



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106831996 B

(45)授权公告日 2020.05.19

(21)申请号 201710206872.7

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2017.03.31

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 104558192 A,2015.04.29,

申请公布号 CN 106831996 A

CN 1867583 A,2006.11.22,

(43)申请公布日 2017.06.13

WO 2017/081746 A2,2016.05.26,

(73)专利权人 北京智仁美博生物科技有限公司

黎晓维 等.双特异性抗体的结构设计及其  
装配工艺研究进展.《中国新药杂志》.2014,第23  
卷(第20期),第2430-2436页.

地址 101111 北京市经济技术开发区科创

六街88号A3-501

chia-chen lu et al..tetraivalent anti-  
CD20/cd3 bispecific antibody for the  
treatment of B cell lymphoma.《biochemical  
and biophysical research communications》  
.2016,全文.

(72)发明人 刘志刚 刘玉兰 郝小勃 郭晶晶

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

审查员 周振威

(51)Int.Cl.

C07K 16/46(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

权利要求书3页 说明书18页

序列表56页 附图6页

(54)发明名称

具有CD3E和/或HER2靶向功能的双特异性抗  
体及其用途

(57)摘要

本申请提供了新型双特异性抗体,其包含针  
对人CD3E的抗原结合部和/或针对HER2的抗原结  
合部。此外,本申请还提供了所述新型双特异性  
抗体的医学和生物学用途。

1. 双特异性人IgG1抗体,其包含针对人CD3E的抗原结合部,所述针对人CD3E的抗原结合部包含:

如SEQ ID NO:3所示的HCDR1,  
如SEQ ID NO:4所示的HCDR2,  
如SEQ ID NO:5所示的HCDR3,  
如SEQ ID NO:6所示的LCDR1,  
如SEQ ID NO:7所示的LCDR2,和  
如SEQ ID NO:8所示的LCDR3;  
其中HCDR和LCDR根据Kabat定义。

2. 双特异性人IgG1抗体,其包含针对HER2的抗原结合部,所述针对HER2的抗原结合部包含:

如SEQ ID NO:9所示的HCDR1,  
如SEQ ID NO:10所示的HCDR2,  
如SEQ ID NO:11所示的HCDR3,  
如SEQ ID NO:6所示的LCDR1,  
如SEQ ID NO:7所示的LCDR2,和  
如SEQ ID NO:8所示的LCDR3;  
其中HCDR和LCDR根据Kabat定义。

3. 双特异性人IgG1抗体,其包含针对人CD3E的抗原结合部和针对HER2的抗原结合部,所述针对人CD3E的抗原结合部包含:

如SEQ ID NO:3所示的HCDR1,  
如SEQ ID NO:4所示的HCDR2,  
如SEQ ID NO:5所示的HCDR3,  
如SEQ ID NO:6所示的LCDR1,  
如SEQ ID NO:7所示的LCDR2,和  
如SEQ ID NO:8所示的LCDR3;并且

所述针对HER2的抗原结合部包含:

如SEQ ID NO:9所示的HCDR1,  
如SEQ ID NO:10所示的HCDR2,  
如SEQ ID NO:11所示的HCDR3,  
如SEQ ID NO:6所示的LCDR1,  
如SEQ ID NO:7所示的LCDR2,和  
如SEQ ID NO:8所示的LCDR3;  
其中HCDR和LCDR根据Kabat定义。

4. 如权利要求1或3所述的双特异性人IgG1抗体,其中所述针对人CD3E的抗原结合部包含如SEQ ID NO:12所示的重链可变区和如SEQ ID NO:13所示的轻链可变区。

5. 如权利要求2或3所述的双特异性人IgG1抗体,其中所述针对HER2的抗原结合部包含SEQ ID NO:14所示的重链可变区和如SEQ ID NO:13所示的轻链可变区。

6. 如权利要求1-3中任一项所述的双特异性人IgG1抗体,其中所述针对HER2的抗原结

合部为单链抗体 (scfv) 或Fab片段, 和/或所述针对人CD3E的抗原结合部为单链抗体 (scfv) 或Fab片段。

7. 如权利要求6所述的双特异性人IgG1抗体, 其中所述抗体具有第一臂和第二臂, 所述第一臂和第二臂具有选自以下的结构:

(1) 第一臂包含单链抗体 (scfv) 形式的针对HER2的抗原结合部, 第二臂包含单链抗体 (scfv) 形式的针对人CD3E的抗原结合部, 其中

第一臂包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列, 或者

第一臂包含如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;

(2) 第一臂包含Fab片段形式的针对HER2的抗原结合部, 第二臂包含单链抗体 (scfv) 形式的针对人CD3E的抗原结合部, 其中

第一臂包含如SEQ ID NO:17的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列, 并且第二臂包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列, 或者

第一臂包含如SEQ ID NO:20的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列, 并且第二臂包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列, 或者

第一臂包含如SEQ ID NO:23的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列, 并且第二臂包含如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列, 或者

第一臂包含如SEQ ID NO:25的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列, 并且第二臂包含如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;

(3) 第一臂包含单链抗体 (scfv) 形式的针对HER2的抗原结合部, 第二臂包含Fab片段形式的针对人CD3E的抗原结合部, 其中

第一臂包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:19的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列, 或者

第一臂包含如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:24的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列;

(4) 第一臂包含Fab片段形式的针对HER2的抗原结合部, 第二臂包含Fab片段形式的针对人CD3E的抗原结合部, 其中

第一臂包含如SEQ ID NO:17的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:19的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列, 或

第一臂包含如SEQ ID NO:20的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:19的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列, 或

第一臂包含如SEQ ID NO:23的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:24的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列, 或

第一臂包含如SEQ ID NO:25的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:24的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列, 或

第一臂包含如SEQ ID NO:26的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:27的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。

8. 如权利要求1-3中任一项所述的双特异性人IgG1抗体, 其包含两种具有相同铰链区

的Fc片段,所述铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:28所示,当所述铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:28所示时,其替换天然人IgG1抗体恒定区的第216-230位序列,抗体恒定区氨基酸位置按照EU numbering确定。

9. 药物组合物,其包含权利要求1-8中任一项所述的双特异性人IgG1抗体。

10. 权利要求1-8中任一项所述的双特异性人IgG1抗体或者权利要求9所述的药物组合物在制备用于预防或治疗肿瘤的药物中的用途。

## 具有CD3E和/或HER2靶向功能的双特异性抗体及其用途

### 技术领域

[0001] 本申请大体涉及抗体药物领域,具体而言,本申请提供了新型双特异性抗体及其医学和生物学用途。

### 背景技术

[0002] 双特异性抗体(bispecific antibody, BsAb)是一类人工抗体,其包含两个不同的抗原结合位点。双特异性抗体在生物医药领域,尤其是肿瘤免疫治疗方面应用广泛。

[0003] 双特异性抗体从作用机制上可分为双重信号阻断型和介导细胞功能型。通常,介导细胞功能型双特异性抗体指介导T细胞杀伤的抗CD3双特异性抗体。1985年,利用T细胞杀死肿瘤细胞的概念就已被提出(Stearz et al. Nature 1985, 314:628-631)。通常认为有效激活T细胞需要双重信号,第一信号来自抗原呈递细胞上MHC-抗原复合物与T细胞受体TCR-CD3的结合,第二信号为T细胞与抗原呈递细胞表达的共刺激分子相互作用后产生的非抗原特异性共刺激信号。由于多数癌细胞表面MHC的表达下调甚至缺失,从而使癌细胞逃逸免疫杀伤。靶向CD3的双特异性抗体则能够分别结合T细胞表面CD3分子和癌细胞表面抗原,从而拉近细胞毒性T细胞(cytotoxic T cell, Tc或CTL)与癌细胞的距离,引导T细胞直接杀伤癌细胞,而不再依赖于T细胞的双重激活信号。双特异性抗体可以是三功能抗体,即一条臂靶向肿瘤细胞上的抗原,另一条臂靶向T细胞的CD3分子, Fc段结合Fc受体。这种抗体使得T细胞、肿瘤细胞和结合抗体Fc结构域的效应细胞形成复合体(Muller and Kontermann, BioDrugs 2010; 24:89-98)。

[0004] CD3分子有 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、 $\zeta$ 共4个亚基,分子量分别为18.9kDa、23.1kDa、20.5kDa、18.7kDa,各包括171个、207个、182个和164个氨基酸残基。四种亚基组成的6条多肽链与T细胞受体(T cell receptor, TCR)紧密结合,形成包含8条多肽链的TCR-CD3复合物,该复合物传导T细胞激活信号,稳定TCR结构。CD3的胞内部分含有免疫受体酪氨酸激活基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM), TCR识别和结合MHC分子呈递的抗原肽,使得T细胞内的酪氨酸蛋白激酶p56lck磷酸化CD3分子中ITAM的酪氨酸残基,之后募集含有SH2(Srchomology 2)结构域的酪氨酸蛋白激酶(如ZAP-70)。ITAM磷酸化和结合ZAP-70是T细胞激活早期信号传导过程的重要生化反应之一。因此,CD3分子有传导TCR识别抗原产生的激活信号的功能。

[0005] 抗CD3E抗体能结合T细胞表面TCR受体复合物中的CD3E亚基,能够提供T细胞激活的第一信号(类似于抗原递呈细胞上的MHC-肽复合物结合到TCR),有利于T细胞的激活。而且包含针对CD3E的抗原结合部的双特异性抗体,可以实现T细胞在肿瘤细胞周边的富集,提高T细胞对肿瘤细胞的杀伤效率。

[0006] 由于早期在免疫原性、结构稳定性以及抗体质量控制等方面的不足,限制了双特异性抗体的进一步发展。近年来,上游基因工程抗体和下游生产工艺技术的改进,克服了传统双特异性抗体的缺陷,从而推动了多类新型双特异性抗体进入临床开发阶段。为了解决将两个不同的半抗体进行正确装配的问题,设计开发了多种结构的双特异性抗体。

[0007] 一类双特异性抗体不含Fc区。这类结构抗体的优点是分子量小,可以在原核细胞中表达,不需要考虑正确装配的问题;缺点是由于没有抗体Fc段,不能介导相应的生物学功能,而且半衰期短,因而临床应用受到一定限制。目前已有报道的此类双特异性抗体包括BiTE、DART、TrandAbs、bi-Nanobody等。德国Micromet公司开发的BiTE (bispecific T-cell engager) 系列产品是将抗CD3scfv与不同抗肿瘤细胞表面抗原scfv通过肽段进行连接获得的,可同时结合CD3<sup>+</sup>T细胞和肿瘤细胞。此类抗体克服了稳定性差、表达量低、溶解性低等生产问题,其中Blinatumomab已成功上市。

[0008] 另一类是保留抗体Fc结构域的抗体。此类抗体形成IgG样结构,具有Fc介导的生物学功能。此类双特异性抗体主要有Triomabs、kih IgG、Cross-mab、ortho Fab IgG、DVD IgG、IgG scFv、scFv2-Fc等。这些包含Fc段的双特异性抗体,都具有体内半衰期长,能够介导ADCC和CDC等优点。

[0009] HER2基因位于人17q21染色体,编码分子量185kD的跨膜蛋白,该蛋白有酪氨酸激酶活性,正常状态下以无活性形式存在,参与调节细胞正常分化,通常只在婴儿期表达,成人只在少数组织中低水平表达。HER2基因在正常细胞中是双拷贝基因,通过基因突变激活,其扩增导致转录上调,蛋白表达增加。HER2是人表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)家族的第二个成员,属于I型受体酪氨酸激酶家族,在许多正常和异常表皮细胞的生长、分化和代谢过程中起重要的调节作用,多种肿瘤的发生、发展和疾病状态都与HER2相关。该家族共有4种受体,分别命名为HER1、HER2、HER3和HER4,这些受体相互作用形成同源或异源二聚体,尤以HER2异二聚体为主,在细胞的信号传导过程中发挥重要作用。HER2激活抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤细胞增殖;上调VEGF/VPF,加速肿瘤血管生成,促进肿瘤细胞转移,破坏组织抗侵袭功能(Artufel MV, Valero A C, Llado R R, et al. Clin Transl Oncol, 2005, 7. (11):504-511)。HER2蛋白过表达对诱导细胞分化、增殖和转化以及促进肿瘤转移、侵袭和粘附具有重要作用(Hynes N E, Stem D F. Biochem Biophys Acta, 1994, 1198 (2-3):165-184.)。由于在20%的乳腺癌病例中过表达,而且与不良预后相关,因此HER2在乳腺癌中的作用格外受到关注(Reese et al., Stem Cells 1997;15:1-8; Andrechek et al., Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:3444-3449. Slamon et al., Science 1987;235:177-182)。

[0010] 因而,靶向CD3和/或HER2的双特异性抗体会在肿瘤治疗中有良好的应用前景。

## 发明内容

[0011] 第一方面,本申请提供双特异性人IgG1抗体,其包含针对人CD3E的抗原结合部,所述针对人CD3E的抗原结合部包含:

[0012] 如SEQ ID NO:3所示的HCDR1,

[0013] 如SEQ ID NO:4所示的HCDR2,

[0014] 如SEQ ID NO:5所示的HCDR3,

[0015] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR1,

[0016] 如SEQ ID NO:7所示的LCDR2,和

[0017] 如SEQ ID NO:8所示的LCDR3;

[0018] 其中HCDR和LCDR根据Kabat定义。

[0019] 第二方面,本申请提供双特异性人IgG1抗体,其包含针对HER2的抗原结合部,所述针对HER2的抗原结合部包含:

[0020] 如SEQ ID NO:9所示的HCDR1,

[0021] 如SEQ ID NO:10所示的HCDR2,

[0022] 如SEQ ID NO:11所示的HCDR3,

[0023] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR1,

[0024] 如SEQ ID NO:7所示的LCDR2,和

[0025] 如SEQ ID NO:8所示的LCDR3;

[0026] 其中HCDR和LCDR根据Kabat定义。

[0027] 第三方面,本申请提供双特异性人IgG1抗体,其包含针对人CD3E的抗原结合部和针对HER2的抗原结合部,所述针对人CD3E的抗原结合部包含:

[0028] 如SEQ ID NO:3所示的HCDR1,

[0029] 如SEQ ID NO:4所示的HCDR2,

[0030] 如SEQ ID NO:5所示的HCDR3,

[0031] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR1,

[0032] 如SEQ ID NO:7所示的LCDR2,和

[0033] 如SEQ ID NO:8所示的LCDR3;并且

[0034] 所述针对HER2的抗原结合部包含:

[0035] 如SEQ ID NO:9所示的HCDR1,

[0036] 如SEQ ID NO:10所示的HCDR2,

[0037] 如SEQ ID NO:11所示的HCDR3,

[0038] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR1,

[0039] 如SEQ ID NO:7所示的LCDR2,和

[0040] 如SEQ ID NO:8所示的LCDR3;

[0041] 其中HCDR和LCDR根据Kabat定义。

[0042] 在第一和第三方面的一些实施方案中,针对人CD3E的抗原结合部包含如SEQ ID NO:12所示的重链可变区和如SEQ ID NO:13所示的轻链可变区。

[0043] 在第二和第三方面的一些实施方案中,针对HER2的抗原结合部包含SEQ ID NO:14所示的重链可变区和如SEQ ID NO:13所示的轻链可变区。

[0044] 在上述任一方面的一些实施方案中,针对HER2的抗原结合部为单链抗体(scfv)或Fab片段。

[0045] 在上述任一方面的一些实施方案中,针对人CD3E的抗原结合部为单链抗体(scfv)或Fab片段。

[0046] 在上述任一方面的一些实施方案中,双特异性人IgG1抗体具有第一臂和第二臂,其中第一臂和第二臂具有选自以下的结构:

[0047] (1) 第一臂包含单链抗体(scfv)形式的针对HER2的抗原结合部,第二臂包含单链抗体(scfv)形式的针对人CD3E的抗原结合部,其中

[0048] 第一臂包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列,或者

[0049] 第一臂包含如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;

[0050] (2) 第一臂包含Fab片段形式的针对HER2的抗原结合部,第二臂包含单链抗体(scfv)形式的针对人CD3E的抗原结合部,其中

[0051] 第一臂包含如SEQ ID NO:17的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,并且第二臂包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列,或者

[0052] 第一臂包含如SEQ ID NO:20的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,并且第二臂包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列,或者

[0053] 第一臂包含如SEQ ID NO:23的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,并且第二臂包含如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列,或者

[0054] 第一臂包含如SEQ ID NO:25的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,并且第二臂包含如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;

[0055] (3) 第一臂包含单链抗体(scfv)形式的针对HER2的抗原结合部,第二臂包含Fab片段形式的针对人CD3E的抗原结合部,其中

[0056] 第一臂包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:19的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,或者

[0057] 第一臂包含如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:24的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列;

[0058] (4) 第一臂包含Fab片段形式的针对HER2的抗原结合部,第二臂包含Fab片段形式的针对人CD3E的抗原结合部,其中

[0059] 第一臂包含如SEQ ID NO:17的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:19的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,或

[0060] 第一臂包含如SEQ ID NO:20的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:19的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,或

[0061] 第一臂包含如SEQ ID NO:23的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:24的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,或

[0062] 第一臂包含如SEQ ID NO:25的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:24的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,或

[0063] 第一臂包含如SEQ ID NO:26的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列并且第二臂包含如SEQ ID NO:27的氨基酸序列和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。

[0064] 在上述任一方面的一些实施方案中,双特异性人IgG1抗体包含两种具有相同铰链区的Fc片段,所述铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:28所示,当所述铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:28所示时,其替换天然人IgG1抗体恒定区的第216-230位序列,抗体恒定区氨基酸位置按照EU numbering确定。

[0065] 第四方面,本申请提供药物组合物,其包含第一至第三方面中任一方面所述的双

特异性人IgG1抗体。

[0066] 第五方面,本申请提供第一至第三方面中任一方面所述的双特异性人IgG1抗体或者第四方面所述的药物组合物在制备用于预防或治疗肿瘤的药物中的用途。

[0067] 第六方面,本申请提供了预防或治疗肿瘤的方法,包括向有需要的个体给予第一至第三方面中任一方面所述的双特异性人IgG1抗体或者第四方面所述的药物组合物。

## 附图说明

[0068] 图1a-图1d为本申请设计的四种不同结构双特异性抗体的结构示意图。

[0069] 图2显示了采用ELISA方法检测各种双特异性抗体同时结合CD3E和HER2两种抗原的结果。

[0070] 图3显示了利用流式细胞术分析各种双特异性抗体与MDA-MB-453人乳腺癌细胞表面HER2结合的结果。

[0071] 图4显示了利用流式细胞术分析各种双特异性抗体与PBMC表面CD3结合的结果。

[0072] 图5a-5g显示了不同双特异性抗体对肿瘤细胞的杀伤作用结果,其中图5a显示了双特异性抗体对HER2阳性细胞的杀伤结果;图5b显示了双特异性抗体对HER2阴性细胞的杀伤结果;图5c-图5e显示了双特异性抗体的不同铰链区结构对杀伤活性的影响;图5f和图5g为双特异性抗体的不同抗原结合部设计对杀伤活性的影响。

[0073] 图6a-6c显示了不同双特异性抗体介导HER2阳性靶细胞(MDA-MB-453人乳腺癌细胞)对T细胞的激活,其中图6a和图6b显示了不同双特异性抗体激活T细胞表达早期活化标志分子CD69的结果;图6c显示了不同双特异性抗体诱导T细胞产生细胞因子IL-2的结果。

[0074] 序列说明

[0075] SEQ ID NO:1为本申请的示例性双特异性抗体包含的铰链区的氨基酸序列,其为天然的人IgG2抗体的铰链区。

[0076] SEQ ID NO:2为天然的人IgG1抗体恒定区CH1片段的氨基酸序列。

[0077] SEQ ID NO:3为本申请的示例性抗人CD3E单克隆抗体的HCDR1的氨基酸序列。

[0078] SEQ ID NO:4为本申请的示例性抗人CD3E单克隆抗体的HCDR2的氨基酸序列。

[0079] SEQ ID NO:5为本申请的示例性抗人CD3E单克隆抗体的HCDR3的氨基酸序列。

[0080] SEQ ID NO:6为本申请的示例性抗人CD3E单克隆抗体和抗HER2单克隆抗体的LCDR1的氨基酸序列。

[0081] SEQ ID NO:7为本申请的示例性抗人CD3E单克隆抗体和抗HER2单克隆抗体的LCDR2的氨基酸序列。

[0082] SEQ ID NO:8为本申请的示例性抗人CD3E单克隆抗体和抗HER2单克隆抗体的LCDR3的氨基酸序列。

[0083] SEQ ID NO:9为本申请的示例性抗HER2单克隆抗体的HCDR1的氨基酸序列。

[0084] SEQ ID NO:10为本申请的示例性抗HER2单克隆抗体的HCDR2的氨基酸序列。

[0085] SEQ ID NO:11为本申请的示例性抗HER2单克隆抗体的HCDR3的氨基酸序列。

[0086] SEQ ID NO:12为本申请的示例性抗人CD3E单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列。

[0087] SEQ ID NO:13为本申请的示例性抗人CD3E单克隆抗体和抗HER2单克隆抗体的轻

链可变区的氨基酸序列。

[0088] SEQ ID NO:14为本申请的示例性抗HER2单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列。

[0089] SEQ ID NO:15为本申请的示例性双特异性抗体的含抗HER2scfv的臂(抗HER2scfv-Fc融合蛋白)的氨基酸序列。

[0090] SEQ ID NO:16为本申请的示例性双特异性抗体的含抗人CD3E scfv的臂(抗人CD3E scfv-Fc融合蛋白)的氨基酸序列。

[0091] SEQ ID NO:17为本申请的示例性双特异性抗体的含抗HER2 Fab的臂的重链部分的氨基酸序列。

[0092] SEQ ID NO:18为本申请的示例性双特异性抗体的含抗HER2 Fab或含抗人CD3E Fab的臂的轻链部分的氨基酸序列。

[0093] SEQ ID NO:19为本申请的示例性双特异性抗体的含抗人CD3E Fab的臂的重链部分的氨基酸序列。

[0094] SEQ ID NO:20为本申请的示例性双特异性抗体的含抗HER2 Fab的臂的重链部分的氨基酸序列。

[0095] SEQ ID NO:21为本申请的示例性双特异性抗体的含抗HER2 scfv的臂(抗HER2scfv-Fc融合蛋白)的氨基酸序列。

[0096] SEQ ID NO:22为本申请的示例性双特异性抗体的含抗人CD3E scfv的臂(抗人CD3E scfv-Fc融合蛋白)的氨基酸序列。

[0097] SEQ ID NO:23为本申请的示例性双特异性抗体的含抗HER2 Fab的臂的重链部分的氨基酸序列。

[0098] SEQ ID NO:24为本申请的示例性双特异性抗体的含抗人CD3E Fab的臂的重链部分的氨基酸序列。

[0099] SEQ ID NO:25为本申请的示例性双特异性抗体的含抗HER2 Fab的臂的重链部分的氨基酸序列。

[0100] SEQ ID NO:26为本申请的示例性双特异性抗体的含抗HER2 Fab的臂的重链部分的氨基酸序列。

[0101] SEQ ID NO:27为本申请的示例性双特异性抗体的含抗人CD3E Fab的臂的重链部分的氨基酸序列。

[0102] SEQ ID NO:28为本申请的示例性双特异性抗体包含的铰链区的氨基酸序列,其为天然的人IgG2抗体的铰链区的变体。

[0103] SEQ ID NO:29为本申请的示例性双特异性抗体包含的铰链区的氨基酸序列,其为天然的人IgG1抗体的铰链区。

[0104] SEQ ID NO:30为本申请的示例性双特异性抗体包含的Fab片段中的CH1片段的氨基酸序列。

[0105] SEQ ID NO:31为本申请的示例性双特异性抗体包含的Fc片段中的CH2片段的氨基酸序列。

[0106] SEQ ID NO:32为人CD3E胞外区(CD3E)的氨基酸序列。

[0107] SEQ ID NO:33为人CD3D胞外区(CD3D)的氨基酸序列。

- [0108] SEQ ID NO:34为猴CD3E胞外区(mfCD3E)的氨基酸序列。
- [0109] SEQ ID NO:35为猴CD3D胞外区(mfCD3D)的氨基酸序列。
- [0110] SEQ ID NO:36为小鼠CD3E胞外区(mCD3E)的氨基酸序列。
- [0111] SEQ ID NO:37为小鼠CD3D胞外区(mCD3D)的氨基酸序列。
- [0112] SEQ ID NO:38为HER2胞外区D1D2D3部分(HER2)的氨基酸序列。
- [0113] SEQ ID NO:39为His标签的氨基酸序列。
- [0114] SEQ ID NO:40为鼠抗体IgG2a的Fc片段(mFc)的氨基酸序列。
- [0115] SEQ ID NO:41为人IgG1抗体的Fc片段变体(FcK)的氨基酸序列。
- [0116] SEQ ID NO:42为人IgG1抗体的Fc片段变体(FcH)的氨基酸序列。
- [0117] SEQ ID NO:43为天然的人IgG1抗体重链恒定区的氨基酸序列。
- [0118] SEQ ID NO:44为人IgG1抗体重链恒定区的变体(IgG1Hn)的氨基酸序列。
- [0119] SEQ ID NO:45为人IgG1抗体重链恒定区的变体(IgG1Kn)的氨基酸序列。
- [0120] SEQ ID NO:46为人IgG1抗体重链恒定区的变体(IgG1Hn-m3)的氨基酸序列。
- [0121] SEQ ID NO:47为人IgG1抗体重链恒定区的变体(IgG1kn-m3)的氨基酸序列。
- [0122] SEQ ID NO:48为人IgG1抗体重链恒定区的变体(IgG1H3n-m3)的氨基酸序列。
- [0123] SEQ ID NO:49为人IgG1抗体重链恒定区的变体(IgG1kn1-m3)的氨基酸序列。
- [0124] SEQ ID NO:50为人IgG1抗体重链恒定区的变体(IgG1H3n1-m3)的氨基酸序列。
- [0125] SEQ ID NO:51为人IgG1抗体 $\kappa$ 亚型轻链恒定区的氨基酸序列。

[0126] 发明详述

[0127] 定义

[0128] 除非另外指明,本申请中所用的术语具有本领域技术人员通常所理解的含义。

[0129] 在本文描述抗体结构时,涉及氨基酸位置编号的描述参照人IgG1抗体的EU numbering定义,这是本领域技术人员公知且容易查询到的。此外,在本文结合EU numbering位置描述突变时,是指相对于天然抗体序列产生的突变。

[0130] 本文所用术语“Fc片段”、“Fc结构域”、“Fc部分”或类似的术语是指抗体重链恒定区的一部分,包括铰链区(hinge)、恒定区的CH2片段和CH3片段。参照人IgG1抗体的EU numbering定义,Fc片段是抗体恒定区中第216-447位的氨基酸序列。

[0131] 本文所用术语“Fab(fragment antigen binding)片段”、“Fab部分”或类似的术语是指完整的抗体用木瓜蛋白酶处理后产生的能够与抗原结合的抗体片段,包括完整的轻链(VL-CL)、重链可变区和CH1片段(VH-CH1)。

[0132] 本文所用术语“单链抗体(scfv,single chain fragment variable)”是指一般利用基因工程技术构建的单链结构的抗体,包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的一条多肽链。在重链可变区和轻链可变区之间通常会设计一段柔性的连接肽(linker)以便重链可变区和轻链可变区可以折叠成为能够结合抗原的正确构象。

[0133] 本文所用术语“抗原结合部”指抗体结构中决定抗原结合能力的部分。本领域技术人员能够理解,抗体结构中决定抗原结合能力的主要部分是CDR,因此CDR也是抗原结合部的核心组成部分。在双特异性抗体构建中,“抗原结合部”包括但不限于Fab片段的形式或单链抗体的形式。

[0134] 本文所用术语“双特异性抗体”是具有结合两种不同抗原能力的抗体,其可以由

两个Fc片段以及分别与其融合的两个抗原结合部组成。

[0135] 本文所用术语“双特异性人IgG1抗体”是指基于人IgG1抗体的双特异性抗体,并且除了本文说明的改变结构之外,其具备人IgG1抗体的基本特征和功能。

[0136] 本领域技术人员公知,互补决定区(CDR,通常有CDR1、CDR2及CDR3)是可变区中对抗体的亲和力和特异性影响最大的区域。VH或VL的CDR序列有两种常见的定义方式,即Kabat定义和Chothia定义。(参阅例如Kabat,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991); Al-Lazikani et al.,J.Mol.Biol.273:927-948(1997);以及Martin et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:9268-9272(1989))。对于给定抗体的可变区序列,可以根据Kabat定义或者Chothia定义来确定VH和VL序列中CDR区序列。在本申请的实施方案中,利用Kabat定义CDR序列。

[0137] 对于给定抗体的可变区序列,可以通过多种方式分析可变区序列中CDR区序列,例如可以利用在线软件Abysis确定(<http://www.abysis.org/>)。

[0138] 如本文所用术语“特异性结合”,是指两个分子之间的非随机结合反应,例如抗体至抗原表位的结合。

[0139] 第一方面,本申请提供双特异性人IgG1抗体,其包含针对人CD3E的抗原结合部,所述针对人CD3E的抗原结合部包含:

[0140] 如SEQ ID NO:3所示的HCDR1,

[0141] 如SEQ ID NO:4所示的HCDR2,

[0142] 如SEQ ID NO:5所示的HCDR3,

[0143] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR1,

[0144] 如SEQ ID NO:7所示的LCDR2,和

[0145] 如SEQ ID NO:8所示的LCDR3;

[0146] 其中HCDR和LCDR根据Kabat定义。

[0147] 第二方面,本申请提供双特异性人IgG1抗体,其包含针对HER2的抗原结合部,所述针对HER2的抗原结合部包含:

[0148] 如SEQ ID NO:9所示的HCDR1,

[0149] 如SEQ ID NO:10所示的HCDR2,

[0150] 如SEQ ID NO:11所示的HCDR3,

[0151] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR1,

[0152] 如SEQ ID NO:7所示的LCDR2,和

[0153] 如SEQ ID NO:8所示的LCDR3;

[0154] 其中HCDR和LCDR根据Kabat定义。

[0155] 第三方面,本申请提供双特异性人IgG1抗体,其包含针对人CD3E的抗原结合部和针对HER2的抗原结合部,所述针对人CD3E的抗原结合部包含:

[0156] 如SEQ ID NO:3所示的HCDR1,

[0157] 如SEQ ID NO:4所示的HCDR2,

[0158] 如SEQ ID NO:5所示的HCDR3,

[0159] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR1,

[0160] 如SEQ ID NO:7所示的LCDR2,和

[0161] 如SEQ ID NO:8所示的LCDR3;并且

[0162] 所述针对HER2的抗原结合部包含:

[0163] 如SEQ ID NO:9所示的HCDR1,

[0164] 如SEQ ID NO:10所示的HCDR2,

[0165] 如SEQ ID NO:11所示的HCDR3,

[0166] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR1,

[0167] 如SEQ ID NO:7所示的LCDR2,和

[0168] 如SEQ ID NO:8所示的LCDR3;

[0169] 其中HCDR和LCDR根据Kabat定义。

[0170] 在第一和第三方面的一些实施方案中,针对人CD3E的抗原结合部包含如SEQ ID NO:12(包含如SEQ ID NO:3所示的HCDR1、如SEQ ID NO:4所示的HCDR2和如SEQ ID NO:5所示的HCDR3)所示的重链可变区和如SEQ ID NO:13所示的轻链可变区(包含如SEQ ID NO:6所示的LCDR1、如SEQ ID NO:7所示的LCDR2和如SEQ ID NO:8所示的LCDR3)。

[0171] 在第二和第三方面的一些实施方案中,针对HER2的抗原结合部包含SEQ ID NO:14(包含如SEQ ID NO:9所示的HCDR1、如SEQ ID NO:10所示的HCDR2和如SEQ ID NO:11所示的HCDR3)所示的重链可变区和如SEQ ID NO:13所示的轻链可变区(包含如SEQ ID NO:6所示的LCDR1、如SEQ ID NO:7所示的LCDR2和如SEQ ID NO:8所示的LCDR3)。

[0172] 在上述任一方面的一些实施方案中,针对HER2的抗原结合部为单链抗体(scfv)或Fab片段。

[0173] 在上述任一方面的一些实施方案中,针对人CD3E的抗原结合部为单链抗体(scfv)或Fab片段。

[0174] 由于双特异性抗体具有针对两种不同抗原的两个不同抗原结合部,而抗原结合部可以为单链抗体(scfv)或Fab片段两种形式,那么针对给定的两种抗原时,双特异性抗体的抗原结合部配置具有四种组合方式(例如,可参见图1a-图1d)。

[0175] 在本文中,还将双特异性抗体描述为具有两个“臂”,例如,在图1a-图1d所示的四种结构中,以中间为界,可以将双特异性抗体分为两个臂。双特异性抗体的臂可以由Fc片段和抗原结合部(Fab片段或单链抗体)组成。对于由Fc片段和Fab片段组成的臂,其结构类似于通常的抗体,含有完整的重链和轻链,因此这样的臂的结构可以表示为Fc+Fab,也可以表示为重链(Fc+Fab中的重链可变区和CH1片段)+轻链(Fab中的轻链部分)。当两个臂都含有Fab片段形式的抗原结合部时,由此形成的双特异性抗体的结构接近于天然抗体,是优选的一种实施方案。

[0176] 在上述任一方面的一些实施方案中,双特异性人IgG1抗体包含两种具有相同铰链区的Fc片段,所述铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:28所示,当所述铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:28所示时,其替换天然人IgG1抗体恒定区的第216-230位序列,抗体恒定区氨基酸位置按照EU numbering确定。

[0177] SEQ ID NO:29为天然的人IgG1抗体的铰链区。SEQ ID NO:1为天然的人IgG2抗体的铰链区,SEQ ID NO:28为天然的人IgG2抗体的铰链区的变体。本申请的发明人发现,在双特异性人IgG1抗体中引入人IgG2抗体的铰链区能够改进双特异性抗体的一些功能和性

质。

[0178] 当构建保留抗体Fc结构域的双特异性抗体时,可以从以下两个角度 优化双特异性抗体的结构:一是重链异聚化,二是轻链和重链的正确装 配。在一些实施方案中,两种Fc片段包含能够确保重链异聚化的突变。KIH技术(knob-in-hole,KIH)是解决重链异聚化的一种策略。通常,KIH 技术是指通过改造CH3区的氨基酸序列,形成有利于异种半抗体相互配 对的结构,可以在构成双特异性抗体的同时又尽可能地保持正常抗体的 结构。在一些实施方案中,所利用的KIH技术包括,使一个Fc片段包含点 突变S354C和T366W,另一个Fc片段包含点突变Y349C、T366S、L368A 和Y407V。关于KIH技术的指导,例如可参见“An efficient route to human bispecific IgG”,A.Margaret Merchant et al.,Nature Biotechnology,Volume 16,1998,通过引用的方式将该文献全文并入本文。

[0179] 在一些实施方案中,识别不同抗原表位的Fab片段包含相同的轻链。该实施方案有利于轻链和重链的正确装配,也是优选的一种实施方案。

[0180] 在一些实施方案中,一种Fab片段包含天然的人IgG1抗体恒定区CH1 片段,另一种Fab片段包含突变的人IgG1抗体恒定区CH1片段,突变的人 IgG1抗体恒定区CH1片段包含点突变G137E、N203D和R214T中的任意1 个、2个或3个,其中CH1片段的氨基酸序列为抗体恒定区第118-215位的 氨基酸序列。在一些实施方案中,天然的人IgG1抗体恒定区CH1片段的氨基酸序列为SEQ ID NO:2。在一些实施方案中,突变的人IgG1抗体恒 定区CH1片段的氨基酸序列为SEQ ID NO:30。

[0181] 不被任何理论所束缚,在一种Fab片段中引入上述突变能在不改变抗 体恒定区结构/功能以及免疫原性的前提下,改变含有该突变的重链的电 荷特性(等电点,pI),进而有利于双特异性抗体的后期纯化。137、203 和214这三个位点位于CH1结构域的亲水区(结构域的表面),对其进行 突变不会改变CH1的构象,所涉及的突变是将碱性氨基酸改为中性氨 基酸(如R214T),或者将中性氨基酸改为酸性氨基酸(如G137E、N203D), 这样的突变能导致含有突变的这条重链的等电点(pI)下降,低于未突变 的另一条重链的等电点,这有利于后期纯化过程中利用等电点不同将目 的的双特异性抗体与例如KIH技术可能产生的同聚体进行有效的分离。而 且,上述突变也天然存在于其它亚型的抗体(如IgG2、IgG4),预期不会 导致明显的免疫原性问题。

[0182] 在一些实施方案中,两种Fc片段的CH2片段中均包含点突变L234F、L235E和 P331S,其中CH2片段的氨基酸序列为抗体恒定区第231-340位的 氨基酸序列。在一些实施方案中,两种Fc片段的CH2片段的氨基酸序列 均为SEQ ID NO:31。

[0183] 在CH2片段中引入上述突变能够降低抗体Fc段介导的抗体依赖性细 胞毒作用(ADCC),从而可能减少双特异性抗体在体内导致的副作用。关 于上述突变的指导,例如可参见“The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region”,Stephen M.Canfield et al.,J. Exp.Med.Volume 173,1991,通过引用的 方式将该文献全文并入本文。

[0184] 本申请的双特异性人IgG1抗体可以具有第一臂和第二臂,根据每个 臂所含的抗原结合部是单链抗体(scfv)形式还是Fab片段形式,第一臂和第 二臂可以具有选自以下的结构:

[0185] (1) 第一臂包含单链抗体 (scfv) 形式的针对HER2的抗原结合部和Fc 片段,第二臂包含单链抗体 (scfv) 形式的针对人CD3E的抗原结合部和Fc 片段;

[0186] (2) 第一臂包含Fab片段形式的针对HER2的抗原结合部和Fc片段,第二臂包含单链抗体 (scfv) 形式的针对人CD3E的抗原结合部和Fc片段;

[0187] (3) 第一臂包含单链抗体 (scfv) 形式的针对HER2的抗原结合部和Fc 片段,第二臂包含Fab片段形式的针对人CD3E的抗原结合部和Fc片段;

[0188] (4) 第一臂包含Fab片段形式的针对HER2的抗原结合部和Fc片段,第二臂包含Fab片段形式的针对人CD3E的抗原结合部和Fc片段。

[0189] 在一些具体的实施方案中,第一臂和第二臂的序列结构可以如下表 所示:

	包含单链抗体 (scfv) 形式的针对HER2的抗原结合部和Fc片段的臂	SEQ ID NO:15 SEQ ID NO:21
[0190]	包含Fab片段形式的针对HER2的抗原结合部和Fc片段的臂	SEQ ID NO:17+SEQ ID NO:18 SEQ ID NO:20+SEQ ID NO:18 SEQ ID NO:23+SEQ ID NO:18 SEQ ID NO:25+SEQ ID NO:18 SEQ ID NO:26+SEQ ID NO:18
	包含单链抗体 (scfv) 形式的针对人CD3E的抗原结合部和Fc片段的臂	SEQ ID NO:16 SEQ ID NO:22
[0191]	包含Fab片段形式的针对人CD3E的抗原结合部和Fc片段的臂	SEQ ID NO:19+SEQ ID NO:18 SEQ ID NO:24+SEQ ID NO:18 SEQ ID NO:27+SEQ ID NO:18

[0192] 因此,本申请公开了上表所示的任一类型的HER2相关臂与任一类型 的人CD3E相关臂的全部可能组合方式。

[0193] 第四方面,本申请提供药物组合物,其包含第一至第三方面中任一 方面所述的双特异性人IgG1抗体。

[0194] 在一些实施方案中,药物组合物还包含药学可接受的载体、赋形 剂、稀释剂等。

[0195] 在一些实施方案中,药物组合物用于治疗肿瘤,例如表达双特异 性人IgG1抗体所针对的肿瘤表面抗原的肿瘤。

[0196] 在一些实施方案中,药物组合物还可包含润滑剂,如滑石粉、硬 脂酸镁和矿物油;润湿剂;乳化剂;悬浮剂;防腐剂,如苯甲酸、山 梨酸和丙酸钙;增甜剂和/或调味剂等。

[0197] 在一些实施方案中,可将本申请中的药物组合物配制为片剂、丸 剂、粉剂、锭剂、酞剂、悬液、乳剂、溶液、糖浆、栓剂或胶囊等形 式。

[0198] 在一些实施方案中,可以利用任何生理上可接受的给药方式递送 本申请的药物组合物,这些给药方式包括但不限于:口服给药、肠胃 外给药、经鼻给药、直肠给药、腹膜内 给药、血管内注射、皮下给药、经皮给药、吸入给药等。

[0199] 在一些实施方案中,可以通过混合具有所需纯度的试剂与视情况 的药学上可接

受的载体、赋形剂等,以冻干制剂或水溶液的形式配制 用于治疗用途的药物组合物用于存储。

[0200] 第五方面,本申请提供第一至第三方面中任一方面所述的双特异性 人IgG1抗体或者第四方面所述的药物组合物在制备用于预防或治疗肿瘤 的药物中的用途。

[0201] 第六方面,本申请提供了预防或治疗肿瘤的方法,包括向有需要的 个体给予第一至第三方面中任一方面所述的双特异性人IgG1抗体或者第 四方面所述的药物组合物。

[0202] 在第四、第五或第六方面的一些实施方案中,肿瘤表达HER2。

[0203] 在第四、第五或第六方面的一些实施方案中,肿瘤选自乳腺癌、胃癌、结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、白血病、多发性骨髓瘤以及恶性 淋巴瘤。

[0204] 应当理解,以上详细描述仅为了使本领域技术人员更清楚地了解本 申请的内容,而并非意图在任何方面加以限制。本领域技术人员能够对 所述实施方案进行各种改动和变化。

[0205] 以下实施例仅用于说明而非限制本申请范围的目的。

## 实施例

[0206] 实施例1单克隆抗体的制备和确认

[0207] 作为展示本申请的双特异性人IgG1抗体的一个实例,制备了靶向于 人CD3E和HER2的双特异性人IgG1抗体。

[0208] 作为制备该双特异性人IgG1抗体的基础,本申请的发明人首先制备 了针对人CD3E和HER2的两种单克隆抗体,该过程需要利用多种不同 的重组蛋白,包括重组人CD3E的胞外区(CD3E,SEQ ID NO:32),人 CD3D-胞外区(CD3D,SEQ ID NO:33),猴CD3E胞外区(mfCD3E,SEQ ID NO:34),猴CD3D胞外区(mfCD3D,SEQ ID NO:35),小鼠CD3E胞外区(mCD3E,SEQ ID NO:36),小鼠CD3D胞外区(mCD3D,SEQ ID NO:37), 重组HER2胞外区D1D2D3部分(HER2,SEQ ID NO:38)。在自然环境中,CD3E与CD3D形成异源二聚体,因此为了制备有天然构象的CD3E 抗原,我们将CD3E和CD3D同时表达,并利用FcK+FcH异源二聚体方 法将CD3D和CD3E形成异源二聚体,用作本研究中的抗原。这些重组 蛋白都有大量的翻译后修饰(如:糖基化或二硫键等),因而利用哺乳动 物细胞表达系统将更有利于保持重组蛋白的结构和功能。此外,为了方 便纯化,非抗体类的重组蛋白在C端添加了His-tag(SEQ ID NO: 39), 或者鼠抗体IgG2a的Fc段(mFc,SEQ ID NO:40)。重组抗体制备时,抗 体重链恒定区可以来自人IgG1抗体(SEQ ID NO:43),或者为IgG1恒定 区的各种突变体,如:IgG1Hn(SEQ ID NO:44),IgG1Kn(SEQ ID NO:45), IgG1Hn-m3(SEQ ID NO:46),IgG1kn-m3(SEQ ID NO:47), IgG1H3n-m3(SEQ ID NO:48),IgG1kn1-m3(SEQ ID NO:49), IgG1H3n1-m3(SEQ ID NO:50), 轻链恒定区是kappa亚型(SEQ ID NO:51)。

[0209] 根据Uniprot数据库的各种目的重组蛋白的氨基酸序列,设计并合成 上述各种重组蛋白的基因(包含His-tag、mFc或者Fc编码基因)。利用 常规的分子生物学技术将合成的各种重组蛋白基因克隆至合适的真核表 达载体(如invitrogen公司的pcDNA3.1等),然后 利用脂质体(如invitrogen 公司的293fectin等)或其它转染试剂(如PEI等)将制备的重组 蛋白表 达质粒转染入HEK293细胞(如invitrogen公司的HEK293F),在无血清 悬浮培养条 件下培养3-5天。然后通过离心等方式收获培养上清。

[0210] His-tag融合表达的重组蛋白利用金属螯合亲和层析柱(如GE公司的HisTrap FF等)对培养上清中的重组蛋白进行一步纯化。而mFc融合表达的重组蛋白和重组抗体用ProteinA/G亲和层析柱(如GE公司的Mabselect SURE等)进行一步纯化。然后利用脱盐柱(如GE公司的Hitrap desalting等)将重组蛋白保存缓冲液置换为PBS(pH7.0)或者其它合适的缓冲液。必要时,可以对抗体样品进行过滤除菌,然后分装保存于-20℃。

[0211] 利用重组抗体技术得到靶向于肿瘤抗原HER2的单克隆抗体(指定为C6G9+L1A7)和靶向于人CD3E的单克隆抗体(指定为H10B7+L1A7)。C6G9+L1A7的重链可变区序列为SEQ ID NO:14,轻链可变区序列为SEQ ID NO:13。H10B7+L1A7的重链可变区序列为SEQ ID NO:12,轻链可变区序列为SEQ ID NO:13。C6G9+L1A7和H10B7+L1A7具有相同的轻链。此外,C6G9+L1A7和H10B7+L1A7各自的抗体功能和性质经过实验确认。

[0212] 实施例2不同结构双特异性抗体的设计和制备

[0213] 基于实施例1制备和验证的两种单克隆抗体,设计了一系列针对人CD3E和HER2的双特异性抗体。

[0214] 由于双特异性抗体的每个臂可以包含Fab片段或scfv,因此根据不同的组合方式设计了四种结构的双特异性抗体(参见图1a-图1d)。

[0215] 此外,为了促进形成异源二聚体,使用了基于KIH(Knob-Into-Hole)技术的人IgG1抗体的Fc片段突变体(FcK,SEQ ID NO:41或者FcH,SEQ ID NO:42),即,将针对人CD3E(源自H10B7+L1A7)的抗原结合区融合在含有Knob突变的Fc(FcK)的N端,将针对HER2(源自C6G9+L1A7)的抗原结合区融合在含有Hole突变的Fc(FcH)的N端。

[0216] 按照与实施例1类似的重组抗体技术,制备了表1中所示的双特异性抗体(BsAb)和作为对照的单克隆抗体(Mab)。

[0217] 表1.不同结构的人CD3E+HER2双特异性抗体和对照单克隆抗体的结构

[0218]

抗体	铰链区	抗人 CD3E 臂		抗 HER2 臂	
		Fc 片段	抗原结合部	Fc 片段	抗原结合部
<b>MAb1</b>	SEQ ID NO:29	Fc (来自天然人 IgG1 抗体)	Fab (CH1 片段来自天然人 IgG1 抗体, 即, SEQ ID NO: 2)	/	/
<b>MAb2</b>	SEQ ID NO: 29	/	/	Fc (来自天然人 IgG1 抗体)	Fab (CH1 片段来自天然人 IgG1 抗体, 即, SEQ ID NO: 2)
<b>BsAb1</b>	SEQ ID NO: 29	FcK; (CH2 片段来自天然人 IgG1 抗体)	Fab (CH1 片段来自天然人 IgG1 抗体, 即, SEQ ID NO: 2)	FcH (CH2 片段来自天然人 IgG1 抗体)	Fab (CH1 片段来自天然人 IgG1 抗体, 即, SEQ ID NO: 2)
<b>BsAb2</b>	SEQ ID NO:29	FcK (CH2 片段来自天然人 IgG1 抗体)	scFv	FcH (CH2 片段来自天然人 IgG1 抗体)	scFv
<b>BsAb3</b>	SEQ ID NO:29	FcK (CH2 片段来自天然人 IgG1 抗体)	scFv	FcH (CH2 片段来自天然人 IgG1 抗体)	Fab (CH1 片段来自天然人 IgG1 抗体, 即, SEQ ID NO: 2)

[0219]

<b>BsAb4</b>	SEQ ID NO:1	FcK (CH2 片段为 SEQ ID NO: 31)	Fab (CH1 片段来自天 然人 IgG1 抗体, 即, SEQ ID NO: 2)	FcH (CH2 片段 为 SEQ ID NO: 31)	Fab (CH1 片段为 SEQ ID NO: 30)
<b>BsAb5</b>	SEQ ID NO:1	FcK (CH2 片段来 自天然人 IgG1 抗体)	scFv	FcH (CH2 片段 来自天然人 IgG1 抗体)	scFv
<b>BsAb6</b>	SEQ ID NO:1	FcK (CH2 片段来 自天然人 IgG1 抗体)	Fab (CH1 片段来自天 然人 IgG1 抗体, 即, SEQ ID NO: 2)	FcH (CH2 片段 来自天然人 IgG1 抗体)	scFv
<b>BsAb7</b>	SEQ ID NO:1	FcK (CH2 片段来 自天然人 IgG1 抗体)	scFv	FcH (CH2 片段 来自天然人 IgG1 抗体)	Fab (CH1 片段为 SEQ ID NO: 30)
<b>BsAb8</b>	SEQ ID NO:28	FcK (CH2 片段为 SEQ ID NO: 31)	Fab (CH1 片段来自天 然人 IgG1 抗体, 即, SEQ ID NO: 2)	FcH (CH2 片段 为 SEQ ID NO: 31)	Fab (CH1 片段为 SEQ ID NO: 30)

[0220] 实施例3各种双特异性抗体的亲和力分析

[0221] 用GE的Biacore X100plus进行抗体亲和力测定。胺基偶联试剂 (Amine coupling kit)、人抗体捕获试剂(human antibody capture kit)、His 捕获试剂(his capture kit)以及CM5芯片和pH7.4的10×HBS-EP等相关试剂和耗材均购自GE Healthcare公司。

[0222] 采用捕获法测定不同双特异性抗体的亲和力。在测定实施例2中制备的单克隆抗体或者双特异性抗体对CD3E的亲和力时,将抗His的抗体偶联至CM5芯片表面,将带有His标签的CD3E抗原 (CD3E-FcK-His/CD3D-FcH) 捕获到CM5芯片表面作为固定相,采用单循环的方法将各种抗CD3E抗体蛋白设置一系列的浓度梯度流经固定相表面,测定各抗体蛋白的亲和力。

[0223] 在测定实施例2中制备的单克隆抗体或者双特异性抗体对HER2抗原的亲和力时,将抗Fc的抗体偶联至CM5芯片表面,稀释各种抗HER2 抗体蛋白至合适浓度,分别捕获到CM5芯片表面作为固定相,采用单循环的方法将重组的HER2-His设置一系列的浓度梯度流经固定相表面,测定不同抗体蛋白的亲和力。

[0224] 本实施例中使用的CD3E和HER2抗原的制备见实施例1的描述。

[0225] 如表2和表3的结果所示,各种双特异性抗体均能够分别有效结合 CD3E和HER2两

种抗原。

[0226] 表2. 对照单克隆抗体和双特异性抗体结合CD3E的亲和力常数

[0227] 抗体	Ka	Kd	KD
MAb1	1.615E+7	4.871E-3	3.016E-10
BsAb1	3.161E+6	2.275E-2	7.189E-9
BsAb2	8.260E+5	1.118E-2	1.353E-8
BsAb3	4.346E+5	4.122E-2	9.486E-8
BsAb4	3.221E+6	1.198E-2	3.718E-9
BsAb5	1.276E+6	1.228E-2	9.622E-9
BsAb6	2.2E+6	8.701E-3	3.954E-9
BsAb7	6.573E+5	8.677E-3	1.320E-8
BsAb8	3.111E+6	1.843E-2	5.924E-9

[0228] 表3. 对照单克隆抗体和双特异性抗体结合HER2的亲和力常数

[0229] 抗体	Ka	Kd	KD
MAb2	1.194E+5	6.676E+ <sup>-4</sup>	5.313E-9
BsAb1	9.659E+4	6.846E+ <sup>-4</sup>	7.088E-9
BsAb2	7.427E+4	9.622E+ <sup>-4</sup>	1.296E-8
BsAb3	1.32E+5	9.474E+ <sup>-4</sup>	7.175E-9
BsAb4	8.231E+4	7.118E+ <sup>-4</sup>	8.648E-9
BsAb5	6.666E+ <sup>-4</sup>	7.172E+ <sup>-4</sup>	1.076E-8
BsAb6	8.252E+4	6.984E+ <sup>-4</sup>	8.463E-9
BsAb7	9.533E+4	6.473E+ <sup>-4</sup>	6.79E-9
BsAb8	5.236E+4	5.071E-4	9.686E-9

[0230] 实施例4各种双特异性抗体同时识别CD3E和HER2两种抗原的能力 鉴定

[0231] 利用常规ELISA方法检测实施例2中制备的双特异性抗体对CD3E 和HER2两种抗原的同时结合,ELISA流程如下:首先用 CD3E-FcK/CD3D-FcH抗原包被ELISA板,4℃冰箱过夜;然后用含有 1%BSA的封闭液37℃封闭1小时;洗涤后加入双特异性抗体37℃孵育1 小时;洗涤后加HER2-His抗原,37℃孵育1小时;洗涤后加入HRP-抗 His IgG,37℃孵育1小时;洗涤后加入HRP底物液进行显色分析。结果 如图2所示:构建的各种双特异性抗体均能够同时识别CD3E和HER2 两种抗原。

[0232] 实施例5各种双特异性抗体识别细胞表面的CD3E和HER2的能力鉴 定

[0233] 通过流式细胞术分析实施例2中制备的双特异性抗体与 MDA-MB-453人乳腺癌细胞上表达的人HER2或人PBMC上表达的人 CD3的结合能力。MDA-MB-453细胞购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心,并培养于RPMI1640培养基中。PBMC利用Ficon 密度梯度离心法从志愿者全血中分离,并培养于RPMI1640培养基中。

[0234] 采集正常志愿者的血液(各50mL),其中所采集的血液由发明人及其 同事作为志愿者提供,所有志愿者均已签署知情同意书。志愿者的纳入 标准为:

[0235] 1. 年龄大于18周岁;

[0236] 2. 无HIV、HBV感染;

[0237] 3. 血常规检测正常;

[0238] 4. 非孕妇或哺乳期妇女。

[0239] 收集培养的细胞, 并使用台盼蓝染色评估细胞活力。然后将活细胞在含有0.1% BSA的PBS缓冲液中调整至 $3 \times 10^6$ 个细胞/ml, 向圆底96孔板中每孔加入90 $\mu$ l的细胞悬浮液。向含细胞的孔中加入10 $\mu$ l的双特异性抗体或相应的两种单克隆抗体 (MAb1和MAb2) 以获17.8nM (MDA-MB-453结合研究) 或者53.3nM (PBMC结合研究) 的终浓度。于4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟后, 将细胞离心 (5分钟, 350g), 利用150 $\mu$ l/孔含BSA的PBS染色缓冲液洗涤, 重悬浮并与100 $\mu$ l/孔荧光染料缀合的羊抗人IgG抗体于4 $^{\circ}$ C下孵育额外的30分钟。然后通过加入150 $\mu$ l/孔PBS染色缓冲液并在350g下离心5分钟来洗涤细胞。利用150 $\mu$ l/孔PBS染色缓冲液进行第二个洗涤步骤。将样品重悬浮在100 $\mu$ l/孔PBS染色缓冲液中, 使用流式细胞仪 (BD Biosciences) 获得并分析所述样品。结果如图3和图4中所示: 实施例2中制备的双特异性抗体均能够分别识别MDA-MB-453人乳腺癌细胞上表达的人HER2和PBMC上表达的人CD3。

[0240] 实施例6各种双特异性抗体介导T细胞对HER2阳性肿瘤细胞的杀伤

[0241] 收集MDA-MB-453人乳腺癌细胞 (HER2阳性细胞) 或 MDA-MB-468人乳腺癌细胞 (HER2阴性细胞, 购自中国医学科学院基础医学研究所), 计数, 并使用台盼蓝评估细胞活力。调整细胞密度为 $2 \times 10^5$ /ml, 每孔100 $\mu$ l接种于96孔细胞培养板, 然后加入起始浓度为3.3nM, 10倍梯度稀释的实施例2中制备的CD3+HER2双特异性抗体。为了方便比较, 将不同的CD3+HER2双特异性抗体或者对照单克隆抗体 (MAb1和MAb2) 调整至相同的摩尔浓度。最后向孔中加入人PBMC细胞 (效应物) 以获得5:1的最终E:T比例。同时设置单独靶细胞 (MDA-MB-453人乳腺癌细胞或MDA-MB-468人乳腺癌细胞) 对照、单独PBMC细胞 (效应细胞) 对照、单独培养基做空白对照。孵育20小时后, 取上清, 参照CytoTox 96<sup>®</sup>非放射性细胞毒性检测试剂盒说明书 (CytoTox 96<sup>®</sup>Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, promega, G1780) 检测和分析双特异性抗体介导的T细胞对靶细胞MDA-MB-453人乳腺癌细胞的杀伤率。检测结果如图5a-图5g和表4所示: 本申请构建的各种双特异性抗体 (BsAb) 均能有效介导T细胞对HER2阳性靶细胞的杀伤, 不能介导T细胞对HER2阴性靶细胞的杀伤, 双特异性抗体中抗原结合部的形式或铰链区的序列的不同选择带来的双特异性抗体的活性存在一定差异。当采用SEQ ID NO:1或者SEQ ID NO:28所示的铰链区时, 双特异性抗体能够介导T细胞对肿瘤细胞实现更强的杀伤能力。

[0242] 表4. 不同双特异性抗体介导T细胞对靶细胞MDA-MB-453杀伤的 EC50

实验批次	EC50 (M)						
	BsAb1	BsAb2	BsAb4	BsAb5	BsAb6	BsAb7	BsAb8
20160914	6.567e-012		3.622e-012				
[0243] 20160914		5.15e-011		2.13e-011			
20161010			1.938e-012		5.507e-013	1.430e-011	
20161010			2.474e-012	7.283e-012	5.507e-013		
20161230			1.007e-012				9.237e-013

[0244] 实施例7各种双特异性抗体介导的T细胞激活

[0245] 收集表达HER2的MDA-MB-453人乳腺癌细胞, 计数并使用台盼蓝评估细胞活力。调整MDA-MB-453人乳腺癌细胞的细胞密度为 $2 \times 10^5$ /ml, 每孔100 $\mu$ l接种于96孔细胞培养板,

然后加入系列稀释的实施例2制备的各种CD3+HER2双特异性抗体。为了方便比较,将不同的CD3+HER2双特异性抗体或者对照单克隆抗体(MAb1和MAb2)调整至相同的摩尔浓度。最后向孔中加入人PBMC(效应物)以获得5:1的最终E:T比例。同时设置单独靶细胞(MDA-MB-453人乳腺癌细胞)对照。孵育20小时后,通过离心(5分钟,350g)沉淀细胞并利用150 $\mu$ l/孔PBS缓冲液洗涤两次。加入抗人CD3和人CD69的抗体(eBioscience,11-0037-42,12-0699-42),于4 $^{\circ}$ C下避光孵育30分钟。然后利用150 $\mu$ l/孔PBS缓冲液洗涤细胞两次,重悬浮于100 $\mu$ l/孔PBS缓冲液中,并使用流式细胞仪(BD Biosciences C6)对细胞样品进行分析并比较不同样品处理后CD3阳性细胞群中激活标志物CD69的表达差异。或者在孵育20小时后,取培养上清,利用ELISA分析上清中IL2水平(人IL-2ELISA试剂,DAKEWE,DKW12-1020-096)。结果如图6a-图6c所示:本申请构建的多种双特异性抗体均能够实现HER2阳性靶细胞对T细胞的特异性激活。

[0246] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范

## 序列表

<110> 北京智仁美博生物科技有限公司  
 刘志刚  
 刘玉兰  
 郝小勃  
 郭晶晶

<120> 新型双特异性抗体及其用途

<130> 17C10757CN

<160> 51

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

[0001]

<210> 2

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

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

Arg Val

<210> 3  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

&lt;400&gt; 3

Gly Tyr Gly Met His  
 1 5

<210> 4  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

&lt;400&gt; 4

Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Arg Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

[0002]

<210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

&lt;400&gt; 5

Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Gly Leu  
 1 5

<210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

&lt;400&gt; 6

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Trp Leu Thr  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 7

Ala Ala Ser Ser Arg Gln Thr  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

Gln Gln Tyr Ala Lys Leu Pro Val Thr  
1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

Asp Tyr Thr Met Asp  
1 5

[0003]

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 10

Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Ser Ser Ile Tyr Asn Glu Arg Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 11

Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 12

<211> 118

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <400> 12  
  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Gly Tyr  
 20 25 30  
  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
  
 Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Arg Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60  
  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
  
 [0004]  
 Ala Arg Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Gly Leu Trp Gly Arg Gly Thr  
 100 105 110  
  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115  
  
 <210> 13  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <400> 13  
  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Trp  
 20 25 30  
  
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80		
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Lys Leu Pro Val 85 90 95		
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100 105		
<210> 14 <211> 119 <212> PRT <213> 人工序列		
<400> 14		
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 Phe Thr Phe Asn Asp Tyr 20 25 30		
[0005]		
Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Ser Ser Ile Tyr Asn Glu Arg Phe 50 55 60		
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly 100 105 110		
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115		
<210> 15 <211> 472 <212> PRT		

<213> 人工序列  
 <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 Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Trp  
 20 25 30  
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Lys Leu Pro Val  
 85 90 95  
 [0006] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu  
 115 120 125  
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys  
 130 135 140  
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg  
 145 150 155 160  
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn  
 165 170 175  
 Ser Gly Ser Ser Ile Tyr Asn Glu Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu  
 180 185 190  
 Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu  
 195 200 205  
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro

	210		215				220										
	Ser 225	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr 230	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr 235	Leu	Val	Thr	Val	Ser 240	
	Ser	Ala	Ser	Glu	Arg 245	Lys	Cys	Cys	Val	Glu 250	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala 255	
	Pro	Glu	Leu	Leu 260	Gly	Gly	Pro	Ser	Val 265	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
	Lys	Asp	Thr 275	Leu	Met	Ile	Ser	Arg 280	Thr	Pro	Glu	Val	Thr 285	Cys	Val	Val	
	Val 290	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp 295	Pro	Glu	Val	Lys	Phe 300	Asn	Trp	Tyr	Val	
	Asp 305	Gly	Val	Glu	Val	His 310	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys 315	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 320	
[0007]	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr 325	Arg	Val	Val	Ser	Val 330	Leu	Thr	Val	Leu	His 335	Gln	
	Asp	Trp	Leu	Asn 340	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 345	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala 350	
	Leu	Pro	Ala 355	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr 360	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 365	Gly	Gln	Pro	
	Arg 370	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr 375	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 380	Glu	Glu	Met	Thr	
	Lys 385	Asn	Gln	Val	Ser	Leu 390	Ser	Cys	Ala	Val	Lys 395	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 400	
	Asp	Ile	Ala	Val	Glu 405	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly 410	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr 415	
	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser 425	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val 430	
	Ser	Lys	Leu 435	Thr	Val	Asp	Lys	Ser 440	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe 445	

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 16  
<211> 474  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<400> 16

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Gly Tyr  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

[0008]

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Arg Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Gly Leu Trp Gly Arg Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly Gly  
115 120 125

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro  
130 135 140

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg  
145 150 155 160

Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Trp Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Gln Thr  
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
195 200 205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
210 215 220

Gln Gln Tyr Ala Lys Leu Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
225 230 235 240

Glu Ile Lys Ala Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys  
245 250 255

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
260 265 270

[0009] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
305 310 315 320

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu  
370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

385		390		395		400
Pro Ser Asp Ile	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	405		410		415
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		420		425		430
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		435		440		445
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		450		455		460
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		465		470		
<210>	17					
<211>	446					
<212>	PRT					
<213>	人工序列					
[0010]	<400>	17				
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 Phe Thr Phe Asn Asp Tyr		20		25		30
Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		35		40		45
Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Ser Ser Ile Tyr Asn Glu Arg Phe		50		55		60
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		65		70		75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		85		90		95
Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		100		105		110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu  
210 215 220

[0011]

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro  
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val  
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

[0012] <210> 18  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Trp  
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Lys Leu Pro Val  
85 90 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

[0013]

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 445

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 19

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Gly Tyr  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Arg Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Gly Leu Trp Gly Arg Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 [0014] Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys  
 210 215 220  
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 260 265 270  
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285  
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

	290		295			300													
	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys			
	305					310					315					320			
	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys			
					325					330					335				
	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys			
				340					345					350					
	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys			
			355					360					365						
	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln			
		370					375					380							
	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly			
	385					390					395					400			
[0015]	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln			
					405					410					415				
	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn			
				420					425					430					
	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			435					440					445						
	<210>	20																	
	<211>	446																	
	<212>	PRT																	
	<213>	人工序列																	
	<400>	20																	
	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	Phe	Thr	Phe	Asn	Asp	Tyr			
				20					25					30					
	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val			
			35					40					45						

Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Ser Ser Ile Tyr Asn Glu Arg Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Glu Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160

[0016]

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro  
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val  
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380

[0017] Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 21  
 <211> 472  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Trp  
 20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Lys Leu Pro Val  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu  
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys  
130 135 140

[0018]

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg  
145 150 155 160

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn  
165 170 175

Ser Gly Ser Ser Ile Tyr Asn Glu Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu  
180 185 190

Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu  
195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro  
210 215 220

Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
225 230 235 240

Ser Ala Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
245 250 255

Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 260 265 270

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 275 280 285

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 290 295 300

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 305 310 315 320

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 325 330 335

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 340 345 350

Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 355 360 365

[0019]

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
 370 375 380

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 385 390 395 400

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 405 410 415

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val  
 420 425 430

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 22  
 <211> 474  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Gly Tyr  
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Arg Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

[0020] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Gly Leu Trp Gly Arg Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro  
 130 135 140

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg  
 145 150 155 160

Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Trp Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Gln Thr  
 180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 195 200 205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 210 215 220

Gln Gln Tyr Ala Lys Leu Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
 225 230 235 240

Glu Ile Lys Ala Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys  
 245 250 255

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 305 310 315 320

[0021]

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu  
 370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 420 425 430 435

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 23  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<400> 23

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 Phe Thr Phe Asn Asp Tyr  
20 25 30

[0022] Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Ser Ser Ile Tyr Asn Glu Arg Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp



Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 24

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 24

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

[0024]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Gly Tyr  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Arg Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Gly Leu Trp Gly Arg Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys  
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240

[0025] Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys  
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys

	355		360		365															
	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln				
	370						375					380								
	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly				
	385					390					395					400				
	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln				
				405						410					415					
	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn				
				420					425					430						
	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
			435				440						445							
	<210>	25																		
	<211>	446																		
	<212>	PRT																		
	<213>	人工序列																		
[0026]	<400>	25																		
	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	Phe	Thr	Phe	Asn	Asp	Tyr				
				20					25					30						
	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
			35					40					45							
	Ala	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Asn	Glu	Arg	Phe				
		50					55					60								
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr				
	65					70					75				80					
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85						90					95					
	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly				
				100					105					110						

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Glu Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu  
210 215 220

[0027]

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro  
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val  
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

[0028] <210> 26  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<400> 26

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 Phe Thr Phe Asn Asp Tyr  
20 25 30

Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Ser Ser Ile Tyr Asn Glu Arg Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Glu Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
195 200 205

[0029]

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro  
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val  
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

[0030] Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 27

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Gly Tyr  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Arg Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser 85	Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 90		
Ala Arg Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Gly Leu Trp Gly Arg Gly Thr 100	105	110	
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro 115	120	125	
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly 130	135	140	
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn 145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln 165	170		175
[0031] Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser 180	185	190	
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser 195	200	205	
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys 210	215	220	
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu 225	230	235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu 245	250	255	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys 260	265	270	
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys 275	280	285	
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu 290	295	300	

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys  
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys  
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
405 410 415

[0032]

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 28  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<400> 28

Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 29  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 29

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1	5	10	15
<210> 30			
<211> 98			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<400> 30			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Glu 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
[0033] 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 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Thr Val			
<210> 31			
<211> 110			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<400> 31			
Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
1	5	10	15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
	20	25	30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
	35	40	45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
100 105 110

<210> 32

<211> 104

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 32

Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys Val  
1 5 10 15

[0034] Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro Gly  
20 25 30

Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp Glu  
35 40 45

Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys Glu  
50 55 60

Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly  
65 70 75 80

Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val  
85 90 95

Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp  
100

<210> 33

<211> 84

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 33

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys  
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser  
20 25 30

Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly  
35 40 45

Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr  
50 55 60

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys Val Glu Leu Asp Pro  
65 70 75 80

Ala Thr Val Ala

<210> 34

<211> 96

<212> PRT

[0035] <213> 食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)

<400> 34

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Gln  
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Ser Gln His Leu  
20 25 30

Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser  
35 40 45

Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu Met Glu Gln Ser Gly  
50 55 60

Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro Glu Asp Ala Ser His  
65 70 75 80

His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp  
85 90 95

<210> 35

<211> 84  
 <212> PRT  
 <213> 食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)  
 <400> 35  
 Phe Lys Ile Pro Val Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Lys Cys  
 1 5 10 15  
 Asn Thr Ser Val Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Thr  
 20 25 30  
 Asn Asn Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly  
 35 40 45  
 Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Ala  
 50 55 60  
 Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Val Glu Leu Asp Pro  
 65 70 75 80

Ala Thr Leu Ala

[0036]

<210> 36  
 <211> 87  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠 (*Mus musculus*)  
 <400> 36  
 Asp Asp Ala Glu Asn Ile Glu Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Ser  
 1 5 10 15  
 Val Glu Leu Thr Cys Pro Leu Asp Ser Asp Glu Asn Leu Lys Trp Glu  
 20 25 30  
 Lys Asn Gly Gln Glu Leu Pro Gln Lys His Asp Lys His Leu Val Leu  
 35 40 45  
 Gln Asp Phe Ser Glu Val Glu Asp Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Thr  
 50 55 60  
 Pro Ala Ser Asn Lys Asn Thr Tyr Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys  
 65 70 75 80

Glu Tyr Cys Val Glu Val Asp  
85

<210> 37  
<211> 84  
<212> PRT  
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 37

Phe Lys Ile Gln Val Thr Glu Tyr Glu Asp Lys Val Phe Val Thr Cys  
1 5 10 15

Asn Thr Ser Val Met His Leu Asp Gly Thr Val Glu Gly Trp Phe Ala  
20 25 30

Lys Asn Lys Thr Leu Asn Leu Gly Lys Gly Val Leu Asp Pro Arg Gly  
35 40 45

Ile Tyr Leu Cys Asn Gly Thr Glu Gln Leu Ala Lys Val Val Ser Ser  
50 55 60

[0037] Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Val Glu Leu Asp Ser  
65 70 75 80

Gly Thr Met Ala

<210> 38  
<211> 488  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<400> 38

Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln  
20 25 30

Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser  
35 40 45

Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile  
50 55 60

Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val  
65 70 75 80

Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp  
85 90 95

Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro  
100 105 110

Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys  
115 120 125

Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr  
130 135 140

Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr  
145 150 155 160

Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met  
165 170 175

[0038]

Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser  
180 185 190

Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro  
195 200 205

Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly  
210 215 220

Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly  
225 230 235 240

Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr  
245 250 255

Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser  
260 265 270

Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser  
275 280 285

Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp  
290 300

Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys  
305 310 315 320

Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser  
325 330 335

Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu  
340 345 350

Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala  
355 360 365

Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile  
370 375 380

Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu  
385 390 395 400

[0039] Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn  
405 410 415

Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly  
420 425 430

Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His  
435 440 445

Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe  
450 455 460

Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp  
465 470 475 480

Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala  
485

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 39

His His His His His His  
1 5

<210> 40

<211> 232

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 40

Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala  
1 5 10 15

Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile  
20 25 30

Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val  
35 40 45

Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val  
50 55 60

[0040]

Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp  
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln  
85 90 95

Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp  
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val  
115 120 125

Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr  
130 135 140

Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu  
145 150 155 160

Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr  
165 170 175

Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr  
180 185 190

Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr  
195 200 205

Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys  
210 215 220

Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
225 230

<210> 41

<211> 232

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 41

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
1 5 10 15

[0041] Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr  
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

[0042] <210> 42  
<211> 232  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<400> 42

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val  
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 195 200 205

[0043] Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 225 230

<210> 43  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 43

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  
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 [0044]  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 44  
<211> 327  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<400> 44

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

[0045] 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

Arg Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
130 135 140

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

	145		150		155		160									
	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
					165					170					175	
	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
				180						185				190		
	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
			195					200					205			
	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
		210					215					220				
	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
	225					230					235					240
	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
					245					250					255	
[0046]	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
				260					265					270		
	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser
			275					280					285			
	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
	290						295					300				
	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
	305					310					315					320
	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
					325											
	<210>	45														
	<211>	327														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<400>	45														
	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

Arg Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

[0047]

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 195 200 205

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
275 280 285

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

<210> 46

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

[0048]

<400> 46

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

Arg Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
130 135 140

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
195 200 205

Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
210 215 220

[0049]

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser  
275 280 285

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

<210> 47  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 47

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

[0050] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Arg Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

	195	200	205														
	Pro	Ala	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
	210						215					220					
	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
	225					230					235					240	
	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
					245					250						255	
	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
				260					265					270			
	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
			275					280					285				
	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
	290						295					300					
[0051]	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	
	305					310					315					320	
	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
					325												
	<210>	48															
	<211>	327															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<400>	48															
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
	1				5					10					15		
	Ser	Thr	Ser	Glu	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 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
 Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 165 170 175  
 [0052]  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 195 200 205  
 Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220  
 Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240  
 Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser  
 275 280 285

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

<210> 49

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 49

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

[0053] 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

Arg Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
130 135 140

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
195 200 205

Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270

[0054]

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
275 280 285

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

<210> 50

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 50

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu 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 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

[0055] Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 195 200 205

Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

	245	250	255
	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 260	265	270
	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser 275	280	285
	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser 290	295	300
	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 305	310	315
	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 325		
	<210> 51		
	<211> 107		
	<212> PRT		
	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[0056]	<400> 51		
	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu 1	5	10
	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
	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	



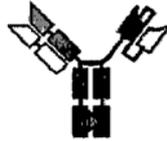
**Fab1-FcK+Fab2-FcH**

图1a



**scFv1-FcK+scFv2-FcH**

图1b



**Fab1-FcK+scFv2-FcH**

图1c



**scFv1-FcK+Fab2-FcH**

图1d

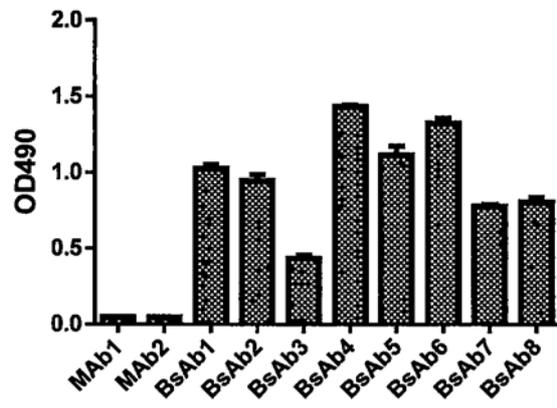


图2

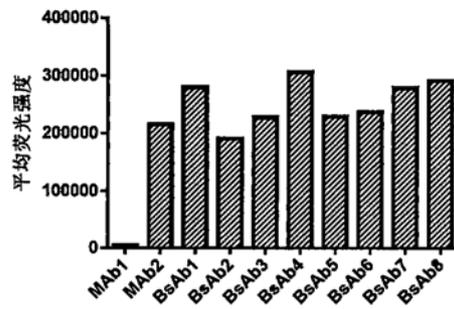


图3

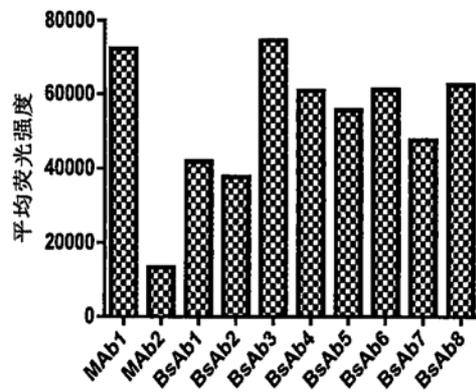


图4

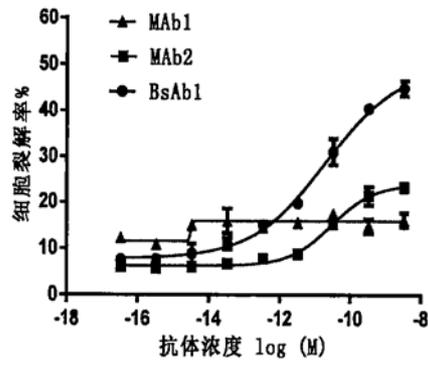


图5a

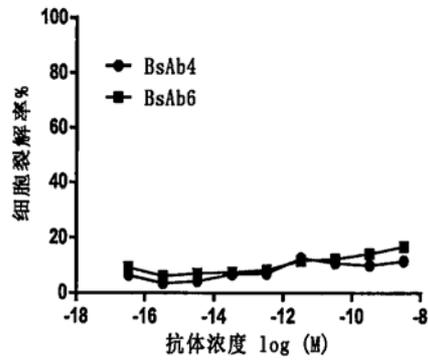


图5b

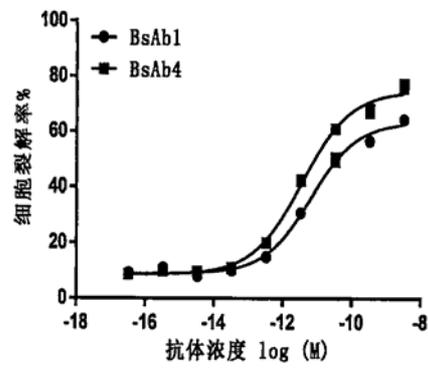


图5c

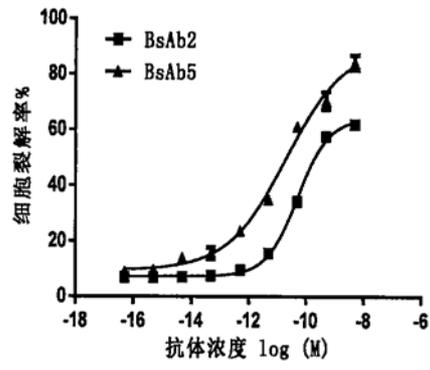


图5d

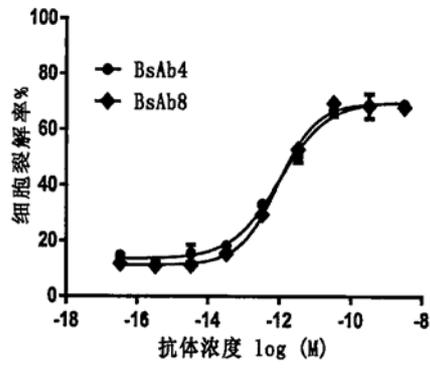


图5e

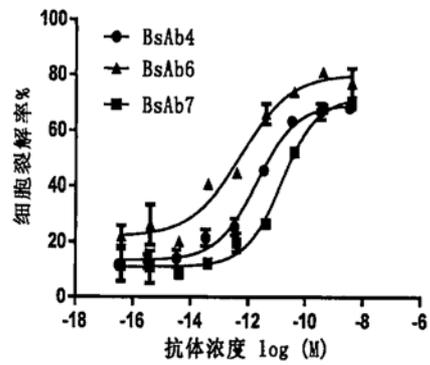


图5f

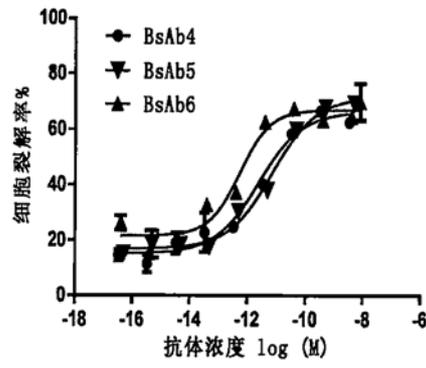


图5g

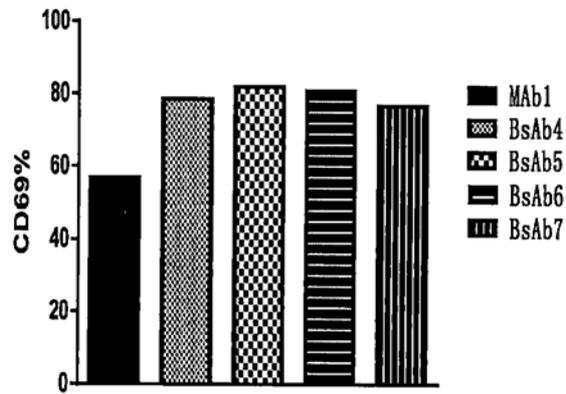


图6a

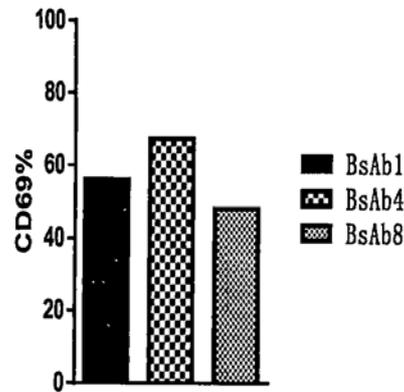


图6b

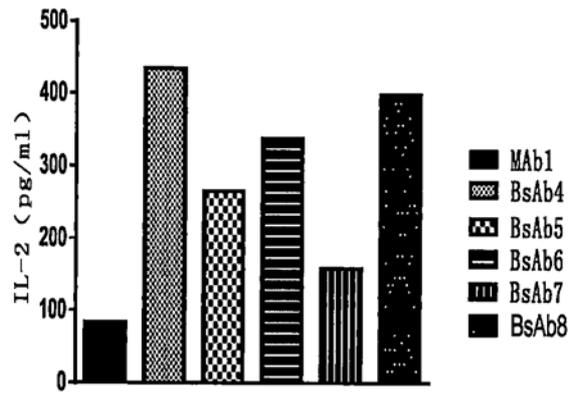


图6c