



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112574309 B

(45) 授权公告日 2023.06.16

(21) 申请号 202011309419.7

(22) 申请日 2020.11.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112574309 A

(43) 申请公布日 2021.03.30

(66) 本国优先权数据
201911235055.X 2019.12.05 CN

(73) 专利权人 启愈生物技术(上海)有限公司
地址 201203 上海市浦东新区中国(上海)
自由贸易试验区张衡路1227号、哈雷
路1118号孵化楼第二层204室、206室、
207室

(72) 发明人 屈向东

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所
11410

专利代理师 王奕勋

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 105524173 A, 2016.04.27
WO 2018233574 A1, 2018.12.27

审查员 程静之

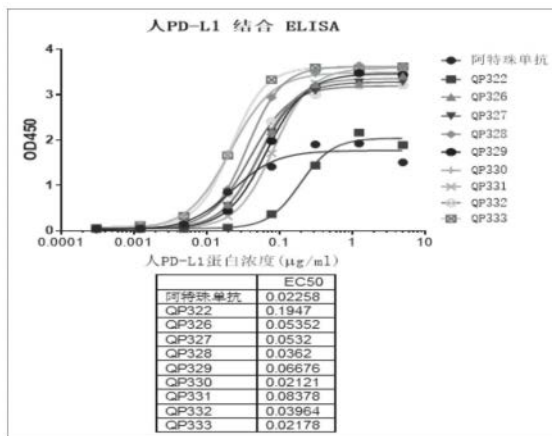
权利要求书2页 说明书15页
序列表30页 附图14页

(54) 发明名称

一种抗PD-L1纳米抗体及其用途

(57) 摘要

本发明提供了一种抗PD-L1纳米抗体及其用途,所述抗PD-L1纳米抗体至少包含一个VHH片段,在所述VHH片段中包含CDR1、CDR2和CDR3三个氨基酸片段。本发明的抗PD-L1纳米抗体及其Fc融合蛋白的特异性强,亲和力高,对人的免疫原性弱,具有显著的抗肿瘤效果。



1. 一种抗PD-L1纳米抗体及其衍生物,其特征在于,
所述抗PD-L1纳米抗体至少包含一个VHH片段,在所述VHH片段中,包含CDR1、CDR2和CDR3三个氨基酸片段,并且CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列如下所示:
 - 1) SEQ ID NO:21所示的CDR1,序列为:GFTLDDYAIG;
 - 2) SEQ ID NO:34所示的CDR2,序列为:CISKSGETTFVSVKD;
 - 3) SEQ ID NO:42所示的CDR3,序列为:ATGSWCTVGSMSRQFYRQFFHS。
2. 根据权利要求1所述的抗PD-L1纳米抗体及其衍生物,其特征在于,
所述抗PD-L1纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。
3. 根据权利要求1所述的抗PD-L1纳米抗体及其衍生物,其特征在于,
在所述抗PD-L1纳米抗体的氨基酸序列中,除CDR1、CDR2和CDR3以外,有至少90%的氨基酸序列与SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列相同。
4. 根据权利要求1所述的抗PD-L1纳米抗体及其衍生物,其特征在于,所述衍生物来源于与多肽的融合;或者与聚合物的化学偶联。
5. 根据权利要求4所述的抗PD-L1纳米抗体及其衍生物,其特征在于,所述多肽包括血清白蛋白及片段、或血清白蛋白结合蛋白,所述聚合物包括聚乙二醇。
6. 一种抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白,其特征在于,
所述抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白包含根据权利要求1至3中任一项所述的抗PD-L1纳米抗体以及Fc段。
7. 根据权利要求6所述的抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白,其特征在于,所述Fc段如SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:62所示。
8. 一种人源化抗PD-L1纳米抗体及其衍生物,其特征在于,
所述人源化抗PD-L1纳米抗体通过对根据权利要求1中所述的抗PD-L1纳米抗体进行修饰而得到,并且具有SEQ ID NO:44至SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列。
9. 根据权利要求8所述的人源化抗PD-L1纳米抗体及其衍生物,其特征在于,所述衍生物来源于与多肽的融合;或者与聚合物的化学偶联。
10. 根据权利要求9所述的抗PD-L1纳米抗体及其衍生物,其特征在于,所述多肽包括血清白蛋白及片段、或血清白蛋白结合蛋白;所述聚合物包括聚乙二醇。
11. 一种人源化抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白,其特征在于,
所述人源化抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白包含根据权利要求8所述的抗PD-L1纳米抗体以及Fc段。
12. 根据权利要求11所述的人源化抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白,其特征在于,所述Fc段如SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:62所示。
13. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗PD-L1纳米抗体及其衍生物、根据权利要求6或7所述的抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白、根据权利要求8至10中任一项所述的人源化抗PD-L1纳米抗体及其衍生物或根据权利要求11或12所述的人源化抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白在制备用于阻断PD-L1和PD-1结合的试剂盒中的用途。
14. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗PD-L1纳米抗体及其衍生物、根据权利要求6或7所述的抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白、根据权利要求8至10中任一项所述的人源化抗PD-L1纳米抗体及其衍生物或根据权利要求11或12所述的人源化抗PD-L1纳米抗体的Fc融

合蛋白在制备用于抑制肿瘤生长的药物中的用途。

15. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗PD-L1纳米抗体及其衍生物、根据权利要求6或7所述的抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白及其衍生物、根据权利要求8至10中任一项所述的人源化抗PD-L1纳米抗体及其衍生物或根据权利要求11或12所述的人源化抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白在制备用于治疗癌症、肿瘤或免疫调节疾病的药物中的用途。

16. 根据权利要求15所述的用途,其特征在于,

所述癌症或肿瘤为结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、食管癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓癌、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫内膜增生、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌肿瘤、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、基底细胞皮肤癌、鳞状细胞皮肤癌、隆突性皮肤纤维肉瘤、梅克尔细胞癌、成胶质细胞瘤、胶质瘤、肉瘤、间皮瘤或骨髓增生异常综合症。

一种抗PD-L1纳米抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年12月5日申请的专利申请号为CN201911235055.X且发明名称为“一种含有TGF- β 抑制剂的三功能融合蛋白及其应用”的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明属于生物医药领域,更具体地,本发明涉及一种抗PD-L1纳米抗体及其Fc融合蛋白,以及该抗PD-L1纳米抗体及其Fc融合蛋白的用途。

背景技术

[0004] 在经典免疫监视理论中,免疫系统可以识别肿瘤抗原并将其消除。如果免疫系统能够完全消除肿瘤细胞,那么免疫清除可以稳定进行。如果肿瘤细胞通过突变逃避免疫系统的清除,免疫系统将会进行重新平衡。在这一过程中,肿瘤细胞的免疫原性逐渐降低。肿瘤细胞的增殖能力在免疫系统的压力下变弱,使得肿瘤细胞的侦测变得更为困难。

[0005] 致癌基因的激活导致肿瘤细胞改变自身及肿瘤微环境,使得免疫系统和肿瘤细胞间的平衡被打破。当免疫系统和肿瘤细胞进入逃逸阶段,肿瘤细胞的恶性程度会提高,而肿瘤细胞丢失MHC分子使其避免被免疫细胞识别和消除。肿瘤微环境也可以通过释放免疫抑制因子抑制免疫系统,例如IL-10、TGF- β 等。肿瘤细胞表面也会高表达免疫抑制蛋白(例如程序化死亡配体-1、PD-L1),当效应T细胞与肿瘤细胞结合时,PD-L1与PD-1相互作用并诱导T细胞发生凋亡,这是肿瘤对免疫系统产生耐受的主要原因之一,肿瘤迅速生长,发生转移。如果人为激活宿主的免疫系统并将其重定向到肿瘤细胞,从理论上讲肿瘤组织就能够被清除,而免疫治疗的理论已经在临床治疗中得到广泛证明。

[0006] 免疫疗法可分为两类:特异性治疗和非特异性治疗。在类别中特定疗法,包括以下治疗策略:肿瘤疫苗通过注射肿瘤激活免疫细胞对患者的抗原。肿瘤疫苗包括:灭活的肿瘤细胞疫苗,肿瘤抗原疫苗,肿瘤DNA疫苗,树突状细胞(DC)疫苗和细菌疫苗。特异性ACT免疫疗法主要包括三种治疗方法:

[0007] a) 肿瘤浸润淋巴细胞(TIL):淋巴细胞从肿瘤组织中分离并在体外培养。TIL可以分泌具有特异性抗肿瘤的IL-2能力。

[0008] b) T细胞受体(TCR)治疗:T细胞识别肿瘤抗原通过其单链抗体片段(scFv),并将单链抗体片段TCR通过病毒载体克隆到正常T细胞中。因此,正常T细胞变为特异性肿瘤杀伤T细胞。

[0009] c) CAR-T:T细胞通过基因修饰获得具有肿瘤特异性受体T细胞。与常规T细胞识别机制不同,CAR-T细胞识别肿瘤抗原不受到MHC分子的限制。因此,CAR-T细胞能够通过增加共刺激信号分子克服肿瘤的免疫逃逸机制,增强T细胞对肿瘤细胞的杀伤能力。

[0010] 在非特异性ACT免疫疗法中,有两种主要应用治疗方法:分别为淋巴因子激活的杀手(lymphokine activated killer,LAK)细胞治疗和细胞因子诱导的杀手(cytokine

induced killer,CIK)细胞治疗。

[0011] a) LAK细胞治疗:LAK细胞一方面利用IL-2刺激外周血淋巴细胞中的免疫细胞,包括NK细胞和T细胞等,另一方面通过过表达FAS配体,增强对靶细胞的识别能力,并通过释放穿孔素和颗粒酶细胞杀死肿瘤细胞。

[0012] b) CIK细胞治疗:CIK细胞来源于病人或健康人的外周血淋巴细胞(PBL),在体外条件下受到抗CD3抗体、IFN- γ 和IL-2刺激下扩增。CIK细胞主要通过FasL和穿孔素发挥抗肿瘤的作用。

[0013] 免疫检查点是人体免疫系统中的保护性分子,在正常机体中防止由于T细胞过度活化引起的炎性损伤。肿瘤细胞能够利用这一特性,过度表达免疫检查点分子,抑制机体的免疫反应,逃避人体免疫系统的监视和杀伤,从而促进肿瘤细胞的生长。免疫检查点抑制剂治疗可以通过抑制肿瘤微环境中的免疫检查点活性,重新激活T细胞对肿瘤的免疫应答反应,实现抗肿瘤的效果。T细胞的完全活化受“双信号”系统调节:第一信号来自其自身TCR(T细胞受体)与抗原的MHC的特异性结合,即T细胞识别抗原;第二信号来自共刺激分子,该信号参与由抗原呈递细胞(APC)表达的共刺激分子与T细胞表面上的相应受体或配体(例如CD28)的相互作用。例如CD28-B7是正向共刺激信号,而负向共刺激分子主要是CTLA4-B7途径和PD-1/PD-L1途径。在肿瘤细胞侵入后,这种抑制途径被肿瘤细胞用于抑制T细胞活化,从而逃避免疫系统的清除作用。

[0014] PD-1(CD279)最早于1992年被报道,人PD-1编码基因PDCD1位于2q37.3,全长2097bp,由6个外显子组成,翻译产物为288个氨基酸组成的PD-1前体蛋白,剪切前20个氨基酸组成的信号肽后得到成熟蛋白质。PD-1包括胞外免疫球蛋白可变区IgV结构域,疏水跨膜结构域和胞内结构域,胞内尾部结构域N端ITIM基序包含2个磷酸化位点,C端则是一个ITSM基序。PD-1是膜蛋白,属于CD28免疫球蛋白超家族,主要表达在激活后的T细胞表面,此外还在胸腺的CD4-CD8-T细胞、活化的NK细胞和单核细胞有低丰度表达。PD-1有2个配体,分别是B7蛋白家族的PD-L1(CD274,B7-H1)和PD-L2(CD273,B7-DC),PD-L1和PD-L2氨基酸序列有40%相同。两者区别主要在于表达模式不同,PD-L1组成性的低表达于APC、非造血细胞(如血管内皮细胞、胰岛细胞)和免疫豁免部位(如胎盘、睾丸和眼睛),炎症细胞因子如I型和II型干扰素、TNF- α 和VEGF等均可以诱导PD-L1的表达。PD-L2则只在被激活的巨噬细胞和树突细胞中有表达。PD-1与PD-L1在激活的T细胞结合后,PD-1的ITSM基序发生酪氨酸磷酸化,进而导致下游蛋白激酶Syk和PI3K的去磷酸化,抑制下游AKT、ERK等通路的活化,最终抑制T细胞活化所需基因及细胞因子的转录和翻译,发挥负向调控T细胞活性的作用。

[0015] 在肿瘤细胞中,肿瘤细胞及肿瘤微环境通过上调PD-L1表达并与肿瘤特异的CD8+T细胞表面的PD-1结合,负调控T细胞活性,抑制免疫反应。肿瘤细胞可以通过以下4种途径上调PD-L1表达:1. 编码PD-L1的基因扩增(9p24.1);2. EGFR、MAPK、PI3K-Akt信号通路激活,HIF-1转录因子等可以从转录水平上调PD-L1表达;3. EB病毒的诱导(EB病毒阳性的胃癌和鼻咽癌表现为PD-L1高表达);以及4. 表观遗传学的调控。在肿瘤微环境中,干扰素- γ 等炎症因子的刺激同样可以诱导PD-L1和PD-L2的表达。炎症因子可以诱导肿瘤微环境中其他细胞,包括巨噬细胞、树突状细胞和基质细胞表达PD-L1和PD-L2,而能够识别肿瘤抗原的肿瘤浸润性T细胞能够分泌干扰素- γ ,进而诱导PD-L1表达上调,这一过程被称为“适应性免疫抵抗”,肿瘤细胞通过这一机制可以实现自我保护。有越来越多的证据表明肿瘤利用PD-1依

赖的免疫抑制免疫逃避。在各种实体瘤和血液系统恶性肿瘤种均已经发现PD-L1和PD-L2的高表达。此外,PD-Ls的表达与肿瘤细胞的不良预后之间具有很强相关性,证明了包括食道癌、胃癌、肾癌、卵巢癌、膀胱癌、胰腺癌和黑色素瘤等。

[0016] 目前FDA已经批准上市的PD-1治疗性单抗包括Nivolumab (Opdivo, 2014年9月)、Pembrolizumab (Keytruda, 2014年12月) 和Cemiplimab (Libtayo, 2018年9月), 并且已上市的PD-L1治疗性单抗包括Atezolizumab (Tecentriq, 2014年9月)、Avelumab (Bavencio, 2016年5月) 和Duravulumab (Imfinzi, 2017年5月), 已批准的适应症见下表所示。

靶点	名称	抗体类型	已批准适应症	公司
PD-1	Nivolumab	人源化抗体 IgG4	黑色素瘤, 鳞状非小细胞肺癌, 非小细胞肺癌霍奇金淋巴瘤, 肝细胞癌	BMS
	Pembrolizumab	人源化抗体 IgG4	晚期黑色素瘤, 晚期非小细胞肺癌, 尿路上皮癌, 头颈鳞癌	Merck
	Cemiplimab	人源化抗体 IgG4	皮肤鳞状细胞癌	Sanofi
PD-L1	Atezolizumab	人源化抗体 IgG1	肾细胞癌, 乳腺癌,	Roche
	Avelumab	全人抗体 IgG1	默克细胞癌, 非小细胞肺癌	Merck, Pfizer
	Duravulumab	人源化抗体 IgG1	头颈鳞癌, 晚期非小细胞肺癌	AstraZeneca

[0017] 此外还有诸如Pidilizumab、AMP-224、AMP-514和PDR001等的PD-1单抗、以及诸如BMS-936559和CK-301等的PD-L1单抗处于研发和临床试验中。

[0018] 然而,在现有的单抗中,亲和力并未达到理想状态,并且由于体积较大,因而免疫原性较强。

发明内容

[0019] 本发明的目的在于根据本领域的现有需求,提供一种新型的抗PD-L1纳米抗体及其Fc融合蛋白,以及该抗PD-L1纳米抗体及其Fc融合蛋白的用途。

[0020] 在一方面,本发明提供了一种抗PD-L1纳米抗体及其衍生物,其特征在于,所述抗PD-L1纳米抗体至少包含一个VHH片段,在所述VHH片段中,包含CDR1、CDR2和CDR3三个氨基酸片段,并且CDR1、CDR2和CDR3分别具有以下氨基酸序列:

[0021] 进一步地,根据本发明的抗PD-L1纳米抗体,其特征在于,所述抗PD-L1纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:20所示。

[0022] 进一步地,根据本发明的抗PD-L1纳米抗体,其特征在于,在所述抗PD-L1纳米抗体的氨基酸序列中,除CDR1、CDR2和CDR3以外,有至少80% (例如90%、95%、98%、99%或99.9%等)的氨基酸序列与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列相同。

[0023] 进一步地,根据本发明的抗PD-L1纳米抗体,其特征在于,所述衍生物来源于与多肽的融合,包括血清白蛋白及片段、或血清白蛋白结合蛋白;与FCRn结合蛋白的融合;以及

与诸如聚乙二醇的聚合物的化学偶联。

[0025] 另一方面,本发明还提供了一种抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白,其特征在于,所述抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白包含如上所述的抗PD-L1纳米抗体以及Fc段,所述Fc段选自由人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4及其突变体组成的组,例如SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:62所示。

[0026] 另一方面,本发明还提供了一种人源化抗PD-L1纳米抗体及其衍生物,其特征在于,所述人源化抗PD-L1纳米抗体通过对如上所述的抗PD-L1纳米抗体进行修饰而得到,并且具有SEQ ID NO:43至SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列。

[0027] 另一方面,本发明还提供了一种人源化抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白,其特征在于,所述人源化抗PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白包含如上所述的抗PD-L1纳米抗体以及Fc段,所述Fc段选自由人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4及其突变体组成的组,例如SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:62所示。

[0028] 进一步地,根据本发明的人源化抗PD-L1纳米抗体,其特征在于,所述衍生物来源于与多肽的融合,包括血清白蛋白及片段、或血清白蛋白结合蛋白;与FCRn结合蛋白的融合;以及与诸如聚乙二醇的聚合物的化学偶联。

[0029] 另一方面,本发明还提供了如上所述的抗PD-L1纳米抗体或其Fc融合蛋白、以及人源化抗PD-L1纳米抗体或其Fc融合蛋白在制备用于阻断PD-L1和PD-1结合的试剂盒中的用途。

[0030] 另一方面,本发明还提供了如上所述的抗PD-L1纳米抗体或其Fc融合蛋白、以及人源化抗PD-L1纳米抗体或其Fc融合蛋白在制备用于抑制肿瘤生长的药物中的用途。

[0031] 另一方面,本发明还提供了如上所述的抗PD-L1纳米抗体或其Fc融合蛋白、以及人源化抗PD-L1纳米抗体或其Fc融合蛋白在制备用于治疗癌症、感染或免疫调节疾病的药物中的用途。

[0032] 进一步地,根据本发明的用途,其特征在于,所述癌症或肿瘤为结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、食管癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓癌、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫内膜增生、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌肿瘤、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、基底细胞皮肤癌、鳞状细胞皮肤癌、隆突性皮肤纤维肉瘤、梅克尔细胞癌、成胶质细胞瘤、胶质瘤、肉瘤、间皮瘤,或者骨髓增生异常综合症。

[0033] 本发明的有益效果

[0034] 本发明的抗PD-L1纳米抗体及其Fc融合蛋白的特异性强,亲和力高,对人的免疫原性弱,具有显著的抗肿瘤效果。

附图说明

[0035] 附图是用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与下面的具体实施方式一起用于解释本发明,但并不构成对本发明的限制。在附图中:

[0036] 图1示出了ELISA检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP326-QP333对人PD-L1蛋白结合的结果;

[0037] 图2示出了ELISA检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP334-QP341对人PD-L1蛋白结合的结果;

[0038] 图3示出了ELISA检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP342-QP345对人PD-L1蛋白结合的结果；

[0039] 图4示出了FACS检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白对天然表达人PD-L1的人非小肺癌细胞HCC827的结合的结果；

[0040] 图5示出了ELISA检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP326-QP335阻断人PD-L1和PD-1蛋白结合的结果；

[0041] 图6示出了ELISA检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP336-QP345阻断人PD-L1和PD-1蛋白结合的结果；

[0042] 图7示出了ELISA检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP326-QP329、以及QP331-QP333阻断人PD-L1和CD80蛋白结合的结果；

[0043] 图8示出了ELISA检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP334、QP341、以及QP343-QP345阻断人PD-L1和CD80蛋白结合的结果；

[0044] 图9示出了ELISA检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP326-QP329、以及QP331-QP333对食蟹猴PD-L1蛋白结合的结果；

[0045] 图10示出了ELISA检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP334、QP341、以及QP343-QP345对食蟹猴PD-L1蛋白结合的结果；

[0046] 图11示出了ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP341、以及QP508-QP512对人PD-L1蛋白结合的结果；

[0047] 图12示出了ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP344、以及QP513-QP517对人PD-L1蛋白结合的结果；

[0048] 图13示出了ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP332、以及QP518-QP522对人PD-L1蛋白结合的结果；

[0049] 图14示出了ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP341、以及QP508-QP512阻断人PD-L1和PD-1蛋白结合的结果；

[0050] 图15示出了ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP344、以及QP513-QP517阻断人PD-L1和PD-1蛋白结合的结果；

[0051] 图16示出了ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP332、以及QP518-QP522阻断人PD-L1和PD-1蛋白结合的结果；

[0052] 图17示出了通过ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白对食蟹猴PD-L1蛋白结合的结果；

[0053] 图18示出了通过ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白QP509及QP3447对人PD-L1蛋白结合的结果；

[0054] 图19示出了通过ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白阻断人PD-L1蛋白与PD-1蛋白结合的结果；

[0055] 图20示出了通过FACS检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP3447结合天然表达人PD-L1的人非小肺癌细胞HCC827的结果；

[0056] 图21至图24示出了人源化纳米抗体Fc融合蛋白QP509和QP3447在混合淋巴细胞反应中促进T细胞增殖的结果；

[0057] 图25和图26示出了在转基因鼠模型中评价抗PD-L1纳米抗体对肿瘤生长的抑制作

用的结果。

具体实施方式

[0058] 以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是,此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明,并不用于限制本发明。

[0059] 在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值,这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说,各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间,以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围,这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

[0060] 本实施方式中未注明具体条件的实验方法,通常是按照常规条件,或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。如分子克隆,实验室手册,冷泉港实验室,当代分子生物学方法,细胞生物学等等。未注明具体来源的试剂,为市场购买的常规试剂。

[0061] 实施例1:羊驼免疫以及构建噬菌体免疫库

[0062] 羊驼免疫:用PD-L1胞外区重组蛋白(义翘神州,10084-H08H)免疫一只健康羊驼(vicugna pacos,alpaca,lama pacos),每次免疫0.11mg蛋白,总共5次,首次使用弗式完全佐剂CFA,第2到第5次均使用弗式不完全佐剂IFA乳化与抗原混合后皮下多点注射。

[0063] 建库:取50ml外周血分离外周血单个核细胞(PBMC),提取PBMC总RNA,RT-PCR反转录成cDNA,设计引物PCR扩增VHH基因,建免疫库。外周血淋巴细胞分离,采集50mL外周血,按照淋巴细胞分离液使用说明分离PBMC,用TRIzol试剂提取PBMC总RNA。反转录,参见SuperScript®III First-Strand Synthesis System for RT-PCR说明书,共转录8 μ g RNA。巢式PCR第一轮,割胶回收750bp左右的VHH片段进行巢式PCR第二轮。构建噬菌体文库载体为pComb3XSS,pComb3XSS噬菌粒载体通过SfiI单酶切,将pComb3XSS酶切为1672bp(SS stuffer)与3301bp(载体目的片段)两个大片段,该载体带有His tag与HA tag方便纯化与检测。载体与目的片段连接将载体与目的片段分别用sfiI进行酶切,50 $^{\circ}$ C过夜酶切,然后割胶回收目的片段。连接摩尔比例为Vector:VHH=1:3。电转化共进行了10次电转化,电转化后立即加入1mL 2YT培养基复苏,共计100ml复苏产物,37 $^{\circ}$ C,180rpm复苏45min,取100 μ L测定库容量,其余离心,加入5mL 2YT重悬,涂布于200mm的平板上共8块。第二天 10^{-5} 共有73个克隆,因此库容量为 7.3×10^8 ($73 \times 100 \times 10^5$)。

[0064] 实施例2:纳米抗体免疫库筛选鉴定

[0065] 用PDL1胞外区重组蛋白筛选2轮。

[0066] 第一轮淘筛:在免疫管中,分别包被PDL1-hFc(蛋白编号QP004)和hFc蛋白,50nM,1ml,4 $^{\circ}$ C过夜。封闭:2%Milk/PBS封闭免疫管,37 $^{\circ}$ C,1小时。消减:倒掉封闭液,在包被hFc免疫管中,加入900 μ l 2%Milk/PBS,再加入100 μ l噬菌体免疫库,室温旋转1小时。结合:将噬菌体免疫库转移至包被PDL1-hFc的免疫管中,室温旋转1小时。洗涤:1 \times PBST洗免疫管5遍,1 \times PBS洗免疫管5遍。洗脱:800 μ l 100mM TEA,室温10min。中和:转移洗脱液至1.5ml EP管中,加入400 μ l 1M pH 7.4Tris。侵染:中和后的洗脱噬菌体,加入到10ml OD600=0.5的TG1中。37 $^{\circ}$ C4min。测滴度,其余菌液涂大平板。37 $^{\circ}$ C,培养过夜。第一轮淘筛输出:3.7E+06。

[0067] 包装噬菌体库:2 \times TY培养基刮菌,菌接种到50ml 2 \times TY培养基+Amp+1%葡萄糖至OD约为0.1,37 $^{\circ}$ C200rpm,生长约1小时20分至OD约为0.4-0.6。加入500 μ l M13K07,37 $^{\circ}$ C感染

40min,离心去上清,沉淀重悬100ml 2×TY培养基+Amp+Kana,30℃200rpm过夜。收集噬菌体库:离心过夜培养的菌液,取上清,加入1/4体积的5×PEG/NaCl。4℃离心20min,弃上清,重新离心,吸弃多余的上清,每50ml上清加入1ml PBS重悬吞噬体沉淀,13000g离心10min,将上清转移至新的EP管。此为第二轮的噬菌体库输入噬菌体,用于接下来的淘筛。

[0068] 第二轮(2nd)淘筛:在免疫管中,分别包被PDL1-hFc(蛋白编号QP004)10nM和hFc蛋白50nM,2ng/ μ l,1ml,4℃过夜。封闭:2%Milk/PBS封闭免疫管,37℃,1小时。消减:倒掉封闭液,在包被hFc免疫管中,加入2ml 2%Milk/PBS,再加入400 μ l输入噬菌体,室温旋转1小时。结合:将上清转移至包被PDL1-hFc的免疫管中,室温旋转1小时。清洗:1×PBST洗免疫管10遍,再用1xPBS洗免疫管10遍。洗脱:800 μ l 100mM TEA,室温10min。中和:转移洗脱液至1.5ml EP管中,加入400 μ l 1M pH 7.4Tris。侵染:中和后的洗脱噬菌体,加入到10ml OD600=0.5的TG1中。37℃4min。测滴度,其余菌液涂大平板。37℃,培养过夜。第二轮的淘筛结果:8.5E+08。

[0069] 免疫库筛选鉴定:经过2轮淘筛,挑取单克隆进行噬菌体ELISA,筛选结合PDL1的阳性克隆。将阳性克隆测序,获得抗体PD-L1抗体的VHH序列。

[0070] VHH抗体分泌表达:在96孔板中,每孔150 μ l 2×YT+氨苄西林+1%葡萄糖培养基中,接种第二轮筛选的单克隆,37℃培养3小时。取50 μ l转移到新的96孔板,加入25 μ l 50%甘油,冻存。在原板中,加入2×YT+氨苄西林+3mM IPTG,50 μ l/孔。30℃,220r培养过夜。

[0071] 结合ELISA:包被PDL1-hFc(蛋白编号QP004)2 μ g/ml,50 μ l/孔,4℃过夜。3%BSA封闭ELISA板,37℃,1小时。离心过夜培养菌液,取上清转移至新96孔板中。在PDL1-hFc板中,孵育上清25 μ l/孔+5%BSA 25 μ l/孔,RT,1h。PBST 3次,PBS 6次。孵育二抗:HRP-抗HA(1:5000),50 μ l/孔,RT,1h。PBST 6次,PBS 3次。TMB显色,H₂SO₄终止。挑选部分克隆进行测序验证。

[0072] 阻断ELISA:包被PD1-hFc蛋白(蛋白编号QP1138)5 μ g/ml,50 μ l/孔,4℃过夜。3%BSA封闭ELISA板,37℃,1小时。离心过夜培养菌液,取上清转移至新96孔板中。将上清和Biotin-PDL1-FC(蛋白编号Biotin-QP004.3)蛋白0.3 μ g/ml按照1:1比例混合,50 μ l/孔,RT,1h。PBST 3次,PBS 6次。孵育二抗:HRP-链霉亲和素(1:5000),50 μ l/孔,RT,1h。PBST 6次,PBS 3次。TMB显色,H₂SO₄终止。

[0073] 阳性克隆ELISA结果如下表1所示:

[0074] 表1

克隆	结合	阻断	克隆	结合	阻断
1806-1	2.8444	0.2167	1806-16	3.0449	0.1705
1806-2	3.0594	0.1403	1806-17	3.0198	0.7665
1806-3	2.8847	0.1424	1806-18	3.0984	0.1764
1806-4	2.8819	0.1912	1806-19	2.9035	0.1641
1806-5	2.8152	0.1631	1806-20	2.9709	0.1538
1806-6	2.9054	0.1377	1806-21	3.0247	0.1579
1806-7	2.8547	0.1540	1806-22	3.0201	0.2637
1806-8	2.8556	0.2004	1806-23	3.0909	0.6582
1806-9	3.0477	0.3595	1806-24	3.0774	0.2384
1806-10	2.9841	0.1912	1806-25	3.0943	0.1524
1806-11	2.8273	0.1680	1806-26	3.0548	0.1541
1806-12	3.0888	0.1457	1806-27	2.9127	0.1956
1806-13	2.8364	0.1945	1806-28	2.9278	0.1741
1806-14	2.9185	0.1690	1806-29	2.9472	0.1775
1806-15	2.7170	0.1626	QP1162(1 μ g/ml)		0.3094

[0076] 选择与PDL1-hFc (蛋白编号QP004) 结合阳性, 阻断PD1/PD-L1结合的克隆, 即为特异结合PD-L1蛋白的阳性克隆, 测序, 获得抗体PD-L1抗体的VHH序列, 将CDR1、2、3均相同的序列视为同一个克隆, 从而获得20个独特的纳米抗体序列, 氨基酸序列如SEQ ID NO:1-20所示。

[0077] 实施例3: 纳米抗体构建FC融合蛋白, 克隆、表达、纯化蛋白

[0078] 克隆设计构建: 将20个克隆转化为C端为人IgG1 FC的PD-L1-FC融合蛋白。重新构建的质粒在HEK293细胞中进行表达, 通过protein A亲和层析纯化, 一共获得20个候选PD-L1 VHH-FC融合蛋白QP326-QP345, 序列为SEQ ID NO:1-20所示的纳米抗体后端连接人IgG1 Fc段如序列SEQ ID NO:61组成。相应的纳米抗体的Fc融合蛋白的编号通过在相应的纳米抗体后加Fc后缀形成。

[0079] 另外, 在实施例中以QP322作为参考, 可参考专利CN201910567277.5, 其抗PD-L1 VHH的序列为:

[0080] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTYGTYAMSWFRQAPGKGGREGVACIDIYGRASYTDPVKGRFTI
SQDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAARDFGYCTASWVHEGFSRYWGQGLTVTVSS

[0081] 另外, 在实施例中以阿特珠单抗 (Atezolizumab) 作为阳性对照, 蛋白编号为QP11801181, 轻重链序列分别由SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59组成。

[0082] 蛋白表达: 293E细胞培养密度维持在 $0.2-3 \times 10^6$ /ml之间, 维护阶段培养基 (GIBCO Freestyle 293表达培养基) 进行培养, 转染前一天将待转染细胞离心换液, 调整细胞密度为 $0.5-0.8 \times 10^6$ /ml。转染当天, 293E细胞密度为 $1-1.5 \times 10^6$ /ml。准备质粒和转染试剂PEI, 需转染质粒量为100 μ g/100ml细胞, 使用PEI和质粒的质量比为2:1。将质粒和PEI进行混匀, 静置15min, 不宜超过20min。将质粒和PEI混合物缓慢加入293E的细胞中, 放入8%CO₂, 120rpm, 37 $^{\circ}$ C的摇床中培养, 转染第五天, 水平离心机4700rpm离心20min收集细胞上清。

[0083] Protein A亲和层析纯化:用平衡液过柱,至少3CV,实际体积20ml,确保最终仪器中流出的溶液pH和电导与平衡液一致,流速1ml/min;将离心后培养液上清过柱,上样40ml,流速0.33ml/min;用平衡液过柱,至少3CV,实际体积20ml,确保最终仪器中流出的溶液pH和电导与平衡液一致,流速0.33ml/min;用洗脱液过柱,当UV280上升至15mAU时开始收集洗脱峰(PAC-EP),UV280下降至15mAU时停止收集,流速1ml/min。样品收集完成后,用pH调节液将PAC-EP调至中性。

[0084] 实施例4:ELISA检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白对人PD-L1蛋白结合

[0085] 实验步骤:

[0086] 包板:包被阳性抗体阿特殊单抗(Atezolizumab) 2 μ g/ml,PD-L1 VHH-FC 1 μ g/ml (13.3nM), 60 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C过夜, PBS*3;

[0087] 封闭:5% milk/PBS, 200 μ l/孔, 25 $^{\circ}$ C, 孵育1h;

[0088] 抗原:孵育PD-L1-his蛋白QP003, 5 μ g/ml起4倍稀释, 8个梯度, 60 μ l/孔, 25 $^{\circ}$ C, 1h, PBST*5;

[0089] 二抗:抗his HRP, 1:8000稀释, 60 μ l/孔, 25 $^{\circ}$ C, 1h, PBST*5;

[0090] 显色:TMB 100 μ l/孔, 5-10min, 2M的H₂SO₄终止反应, 450nm读数。

[0091] 结果如图1-3所示, PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白均结合人PD-L1蛋白。

[0092] 实施例5:SPR检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白对人PD-L1蛋白结合亲和力

[0093] 表面等离子体共振 (SPR) 检测亲和力, 通过Biacore T200 (GE) 测定待检分子与蛋白人PD-L1及人PD-L1的亲和力。

[0094] 抗原及对照抗体信息如下:

[0095] 抗原:人PD-L1重组蛋白(义翘神州, 10084-H08H), 编号为QPJ08;

[0096] 对照抗体:阿特殊单抗(Atezolizumab), 编号为QP11801181。

[0097] SPR亲和力结果如下表2所示:

[0098] 表2:Biacore检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白与人PD-L1蛋白结合亲和力。

[0099]

编号	Abs	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
1	阿特殊单抗	2.30E+05	2.06E-04	8.97E-10
2	QP322	9.98E+05	4.55E-03	4.56E-09
3	QP326	8.14E+05	1.05E-03	1.28E-09
4	QP327	8.98E+05	9.47E-04	1.05E-09
5	QP328	7.16E+05	1.03E-03	1.44E-09
6	QP329	7.37E+05	9.52E-04	1.29E-09
7	QP331	1.26E+06	2.58E-03	2.05E-09
8	QP332	1.21E+06	4.27E-04	3.53E-10
9	QP333	9.48E+05	3.80E-04	4.00E-10
10	QP334	6.53E+05	1.14E-03	1.74E-09
11	QP341	3.14E+06	4.39E-04	1.40E-10
12	QP343	2.53E+06	4.14E-04	1.63E-10
13	QP344	1.81E+06	4.26E-04	2.35E-10
14	QP345	1.88E+06	4.02E-04	2.14E-10

[0100] 结果:筛选得到的PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白都与PD-L1蛋白结合。

[0101] 实施例6:FACS检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白对天然表达人PD-L1的人非小肺癌细胞HCC827的结合

[0102] 人非小细胞肺癌细胞HCC827天然高表达PD-L1。准备对数期生长HCC827细胞(汇合度80%),调整浓度并铺板种于costar 96孔板中,1E5细胞/孔,1×PBS洗板一次,加入3%BSA,250μl/孔,37℃孵育1h;加入4倍梯度稀释(33.33nM至0.008nM,对应质量浓度为5μg/mL至0.001μg/mL)待测抗体,50μl/孔,冰上孵育1h;1×PBS洗板2次,加入PE-抗hFc(1:200),50μl/孔,冰上孵育1h;1×PBS洗板3次,上机读数。

[0103] 结果如图4所示,FACS检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白均结合天然表达人PD-L1的人非小肺癌细胞HCC827。

[0104] 实施例7:ELISA检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白阻断人PD-L1和PD-1蛋白结合

[0105] 包被蛋白QP1138(PD1-FC)2μg/ml 50μl/孔,4℃过夜。PBS洗3次。封闭:3%BSA 250μl/孔,室温孵育1h。分别配制2μg/ml PDL1-小鼠FC和不同浓度抗体,等体积混匀,室温孵育1h。PBST洗3次,PBS洗3次。孵育二抗:HRP-小鼠IgG(1:5000)50μl/孔,PBST洗6次,PBS洗3次。显色:TMB 100μl/孔,显色10min。2M H₂SO₄ 50μl/孔终止。

[0106] 结果如图5和图6所示,PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白能阻断人PD-L1和PD-1蛋白结合。

[0107] 实施例8:ELISA检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白阻断人PD-L1和CD80蛋白结合

[0108] 包被蛋白CD80-hFC 2μg/ml 50μl/孔,4℃过夜。PBS洗3次。封闭:3%BSA 250μl/孔,室温孵育1h。分别配制2μg/ml PDL1-小鼠FC和不同浓度抗体,3倍稀释,等体积混匀,室温孵育1h。PBST洗3次,PBS洗3次。孵育二抗:HRP-小鼠IgG(1:5000)50μl/孔,PBST洗6次,PBS洗3次。显色:TMB 100μl/孔,显色10min。2M H₂SO₄ 50μl/孔终止。

[0109] 结果如图7和图8所示,PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白能阻断人PD-L1和CD80蛋白结合。

[0110] 实施例9:ELISA检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白对食蟹猴PD-L1蛋白结合

[0111] 包被兔His抗体(金斯瑞,A00174)2μg/ml 50μl/孔,4℃过夜。PBS洗3次。封闭:3%BSA 250μl/孔,室温孵育1h。孵育猴PDL1-his(sinobio 90251-C08H)1μg/ml,50μl/孔,25℃1h,PBS洗3遍。孵育抗体QP11801181起始浓度20μg/ml,QP322,QP326……起始浓度10μg/ml,1:4稀释8个梯度。50μl/孔,25℃1h,PBS洗6遍。孵育二抗HRP-抗人FC,1:5000倍稀释,60μl/孔,25℃1h,PBST洗6遍。TMB显色,H₂SO₄终止反应。酶标仪设置450nm读数。

[0112] 结果如图9和图10所示,PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白均结合食蟹猴PD-L1蛋白。

[0113] 实施例10:纳米抗体人源化设计,克隆、表达、纯化蛋白

[0114] 纳米抗体人源化设计:通过比对IMGT人类抗体重轻链可变区种系基因数据库和MOE软件,分别挑选与QP341、QP344、QP332同源性高的重轻链可变区种系基因作为模板,将鼠源抗体的CDR分别移植到相应的人源模板中,形成次序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的可变区序列。再选择一些重要的氨基酸残基做回复突变组合。其中氨基酸残基由Kabat编号系统确定并注释。设计引物PCR搭建各人源化抗体VH基因片段,再与带信号肽及恒定区基因(FC)片段的表达载体pQD同源重组,构建抗体全长表达载体VH-FC-pQD。利用在线软件DNAWorks(v3.2.4)(<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>)设计多条引物合成VH/

VK含重组所需基因片段:5'-30bp信号肽+VH+30bp FC-3'。按照TaKaRa公司Primer STAR GXL DNA聚合酶操作说明书,用上面设计的多条引物,分两步PCR扩增得到VH/VK含重组所需基因片段。带信号肽及恒定区基因(FC)片段的表达载体pQD的构建及酶切,利用限制性内切酶,如BsmBI,识别序列与酶切位点不同的特性设计构建带信号肽及恒定区基因(FC)片段的表达载体pQD。BsmBI酶切载体,切胶回收备用。重组构建表达载体VH-FC-pQD。VH含重组所需基因片段与BsmBI酶切回收表达载体pQD(带信号肽及恒定区基因(FC)片段)按3:1比例分别加入DH5H感受态细胞中,0℃冰浴30min,42℃热击90s,加入5倍体积LB介质,37℃孵育45min,涂布LB-Amp平板,37℃培养过夜,挑取单克隆送测序得到各目的克隆。

[0115] 各克隆人源化设计轻重链可变区序列及蛋白表达编号如下表3所示,其中所有抗体在其C端融合人IgG1-FC恒定区。

[0116] 表3 QP341、QP344、QP332人源化设计

	序列编号	蛋白编号	质粒编号	质粒描述
QP341 人源化 设计	SEQ ID No.43	QP508	QD508	pQDH-huQD341-V1-FC
	SEQ ID No.44	QP509	QD509	pQDH-huQD341-V2-FC
	SEQ ID No.45	QP510	QD510	pQDH-huQD341-V3-FC
	SEQ ID No.46	QP511	QD511	pQDH-huQD341-V4-FC
	SEQ ID No.47	QP512	QD512	pQDH-huQD341-V5-FC
QP344 人源化 设计	SEQ ID No.48	QP513	QD513	pQDH-huQD344-V1-FC
	SEQ ID No.49	QP514	QD514	pQDH-huQD344-V2-FC
	SEQ ID No.50	QP515	QD515	pQDH-huQD344-V3-FC
	SEQ ID No.51	QP516	QD516	pQDH-huQD344-V4-FC
	SEQ ID No.52	QP517	QD517	pQDH-huQD344-V5-FC
QP332 人源化 设计	SEQ ID No.53	QP518	QD518	pQDH-huQD332-V1-FC
	SEQ ID No.54	QP519	QD519	pQDH-huQD332-V2-FC
	SEQ ID No.55	QP520	QD520	pQDH-huQD332-V3-FC
	SEQ ID No.56	QP521	QD521	pQDH-huQD332-V4-FC
	SEQ ID No.57	QP522	QD522	pQDH-huQD332-V5-FC

[0118] 克隆构建:将上面人源化设计克隆转化为C端为人IgG1 FC的PD-L1-FC融合蛋白。重新构建的质粒在HEK293细胞中进行表达,通过protein A亲和层析纯化,一共获得15个人源化PD-L1 VHH-FC融合蛋白QP509-QP522,序列为SEQ ID NO:1-20所示的纳米抗体后端连接人IgG1 FC段,序列如SEQ ID NO:61所示。

[0119] 蛋白表达:293E细胞培养密度维持在 $0.2-3 \times 10^6$ /ml之间,维护阶段培养基(GIBCO Freestyle 293表达培养基)进行培养,转染前一天将待转染细胞离心换液,调整细胞密度为 $0.5-0.8 \times 10^6$ /ml。转染当天,293E细胞密度为 $1-1.5 \times 10^6$ /ml。准备质粒和转染试剂PEI,需转染质粒量为100 μ g/100ml细胞,使用PEI和质粒的质量比为2:1。将质粒和PEI进行混匀,静置15min,不宜超过20min。将质粒和PEI混合物缓慢加入293E的细胞中,放入8%CO₂,120rpm,37℃的摇床中培养,转染第五天,水平离心机4700rpm离心20min收集细胞上清。

[0120] Protein A亲和层析纯化:用平衡液过柱,至少3CV,实际体积20ml,确保最终仪器

中流出的溶液pH和电导与平衡液一致,流速1ml/min;将离心后培养液上清过柱,上样40ml,流速0.33ml/min;用平衡液过柱,至少3CV,实际体积20ml,确保最终仪器中流出的溶液pH和电导与平衡液一致,流速0.33ml/min;用洗脱液过柱,在UV280上升至15mAU时开始收集洗脱峰(PAC-EP),UV280下降至15mAU时停止收集,流速为1ml/min。样品收集完成后,用pH调节液将PAC-EP调至中性。

[0121] 实施例11:ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白对人PD-L1蛋白结合

[0122] 包被人源化纳米抗体QP509等分子1 μ g/ml,阳性对照阿特殊单抗(Atezolizumab)2 μ g/ml。4 $^{\circ}$ C过夜,PBS洗3遍。5% milk封闭,RT 1h。孵育Biotin-QP004(Biotin-PD-L1 hFC)0.5 μ g/ml起始浓度,5倍稀释,RT 1h,PBST洗3遍。HRP-链霉亲和素5000倍稀释,PBST洗5遍。TMB显色10min。450nm读数。

[0123] 结果如图11-13所示,ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白对人PD-L1蛋白结合,选择结合且EC50值低的分子进一步验证。

[0124] 实施例12:ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白阻断人PD-L1和PD-1蛋白结合

[0125] 包被蛋白QP1138(PD1-FC)2 μ g/ml 50 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C过夜。PBS洗3次。封闭:3% BSA 250 μ l/孔,室温孵育1h。分别配制2 μ g/ml PDL1-小鼠FC和不同浓度QP509等人源化纳米抗体15 μ g/ml,阳性对照阿特殊单抗(Atezolizumab)30 μ g/ml,1:3稀释,等体积混匀,室温孵育1h。PBST洗3次,PBS洗3次。孵育二抗:HRP-小鼠IgG(1:5000)50 μ l/孔,PBST洗6次,PBS洗3次。显色:TMB 100 μ l/孔,显色10min。2M H₂SO₄ 50 μ l/孔终止。

[0126] 结果如图14-16所示,ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白阻断人PD-L1蛋白与PD-1蛋白的结合,进一步验证。

[0127] 实施例13:SPR检测人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白对人PD-L1蛋白结合亲和力

[0128] 表面等离子体共振(SPR)检测亲和力,通过Biacore T200(GE)测定待检分子与蛋白人PD-L1及人PD-L1的亲和力。

[0129] 抗原及对照抗体信息如下:

[0130] 抗原:人PD-L1重组蛋白(sinobiologic,10084-H08H);

[0131] 对照抗体:阿特殊单抗(Atezolizumab)。

[0132] SPR亲和力结果如下表4所示:

[0133] 表4

[0134]

Abs	Ka (1/MS)	Kd (1/s)	KD (M)
阿特殊单抗	1.13E+05	3.04E-04	2.70E-09
QP341	2.18E+06	3.16E-04	1.45E-10
QP509	1.69E+06	4.21E-04	2.49E-10
QP512	1.70E+06	2.98E-04	1.76E-10
QP344	1.73E+06	3.25E-04	1.88E-10
QP517	1.11E+06	3.61E-04	3.26E-10
QP332	1.01E+06	3.62E-04	3.59E-10
QP521	7.57E+05	4.08E-04	5.39E-10
QP522	7.07E+05	2.77E-04	3.92E-10

[0135] 人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白结合人PD-L1蛋白。

[0136] 实施例14:ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白对食蟹猴PD-L1蛋白结合

[0137] 包被兔His抗体(金斯瑞,A00174) 2 μ g/ml 50 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C过夜。PBS洗3次。封闭:3% BSA 250 μ l/孔,室温孵育1h。孵育猴PDL1-his(sinobio 90251-C08H) 1 μ g/ml,50 μ l/孔,25 $^{\circ}$ C 1h,PBS洗3遍。孵育阳性对照阿特殊单抗(Atezolizumab) 起始浓度20 μ g/ml,QP322,QP326……起始浓度10 μ g/ml,1:4稀释8个梯度。50 μ l/孔,25 $^{\circ}$ C 1h,PBS洗6遍。孵育二抗HRP-抗人FC,1:5000倍稀释,60 μ l/孔,25 $^{\circ}$ C 1h,PBST洗6遍。TMB显色,H₂SO₄终止反应。酶标仪设置450nm读数。

[0138] 结果如图17所示,人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白结合食蟹猴PD-L1蛋白。

[0139] 为了评估PD-L1体外功能活性,设计了人源化纳米抗体Fc融合蛋白的两种形式,具体地,第一种形式为将QP509 VHH融合在FC蛋白的N端,蛋白编号设计为QP509(QP509 VHH-hFC);第二种形式为将QP509 VHH融合在人IgG1 FC段突变消除FC γ R功能(EU计数L234A/L235A/K338A)的C端,蛋白编号为QP3447(hFC(L234A/L235A/K338A)-QP509 VHH),QP3447的氨基酸序列见SEQ ID NO:60所示。

[0140] 实施例15:SPR检测人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白对人PD-L1蛋白结合亲和力

[0141] 表面等离子体共振(SPR)检测亲和力,通过Biacore T200(GE)测定待检分子与蛋白人PD-L1及人PD-L1的亲和力。

[0142] 抗原及对照抗体信息如下:

[0143] 抗原:人PD-L1重组蛋白(SinoBio,10084-H08H)

[0144] 对照抗体:阿特殊单抗(Atezolizumab)(ROCHE)。

[0145] 实验结果如表5所示。

[0146] 表5:QP3447等分子与人PD-L1结合亲和力。

蛋白	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
QP3447	8.58E+05	4.11E-04	4.79E-10
QP509	1.36E+06	4.07E-04	2.99E-10
阿特殊单抗	2.07E+05	2.87E-04	1.39E-09

[0148] 实施例16:ELISA检测QP3447对人PD-L1蛋白结合

[0149] 包被兔His抗体(金斯瑞,A00174) 2 μ g/ml 50 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C过夜。PBS洗3次。封闭:3% BSA 250 μ l/孔,室温孵育1h。孵育人PDL1-his(sinobio 10084-H08H) 1 μ g/ml,50 μ l/孔,25 $^{\circ}$ C 1h,PBS洗3遍。孵育阳性对照阿特殊单抗(Atezolizumab)、QP509、QP3447起始浓度67nM,5倍稀释7个梯度,最后一孔稀释100倍。50 μ l/孔,25 $^{\circ}$ C 1h,PBS洗6遍。孵育二抗HRP-抗人FC,1:5000倍稀释,60 μ l/孔,25 $^{\circ}$ C 1h,PBST洗6遍。TMB显色,H₂SO₄终止反应。酶标仪设置450nm读数。

[0150] ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白QP509及QP3447对人PD-L1蛋白结合的结果示于图18中。

[0151] 实施例17:ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白阻断人PD-L1和PD-1蛋白结合

[0152] 包被蛋白QP1138(PD1-FC) 2 μ g/ml 50 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C过夜。PBS洗3次。封闭:3% BSA 250 μ l/孔,室温孵育1h。配制2 μ g/ml PDL1-小鼠FC融合蛋白,50 μ l/孔,室温孵育1h,PBST洗3次,PBS洗3次。孵育不同浓度QP509、QP3447和阳性对照阿特殊单抗(Atezolizumab) 333nM起始

浓度,5倍稀释8个浓度梯度,室温孵育1h。PBST洗3次,PBS洗3次。孵育二抗:HRP-小鼠IgG(1:5000)50 μ l/孔,PBST洗6次,PBS洗3次。显色:TMB 100 μ l/孔,显色10min。2M H₂SO₄50 μ l/孔终止。

[0153] ELISA检测人源化PD-L1纳米抗体的Fc融合蛋白阻断人PD-L1蛋白与PD-1蛋白结合的结果示于图19中。

[0154] 实施例18:FACS检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP3447对天然表达人PD-L1的人非小肺癌细胞HCC827的结合

[0155] 人非小细胞肺癌细胞HCC827天然高表达PD-L1。准备对数期生长HCC827细胞(汇合度80%),调整浓度并铺板种于96孔板中,1E5细胞/孔,1 \times PBS洗板一次,加入3%BSA,250 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h;加入不同浓度待测抗体,50 μ l/孔,冰上孵育1h;1 \times PBS洗板2次,加入PE-抗hFc(1:200),50 μ l/孔,冰上孵育1h;1 \times PBS洗板3次,上机读数。

[0156] FACS检测PD-L1纳米抗体Fc融合蛋白QP3447结合天然表达人PD-L1的人非小肺癌细胞HCC827的结果示于图20中。

[0157] 实施例19:人源化纳米抗体Fc融合蛋白在混合淋巴细胞反应中促进T细胞增殖

[0158] PD-L1功能体外活性鉴定(混合淋巴细胞反应MLR):准备DC(供体1)细胞:复苏PBMC,用EasySepTM人单核细胞分离试剂盒(STEMCELL,19359)分离单核细胞,加入rhGM-CSF(1000U/ml)和rhIL4(500U/ml),37 $^{\circ}$ C培养细胞6天诱导为iDC;每2-3天半换液,同时补充rhGM-CSF(1000U/ml)和rhIL4(500U/ml);收集细胞300x g离心5min,用加入rhGM-CSF(1000U/ml)和rhIL4(500U/ml)的培养基重悬,同时加入LPS(1 μ g/ml),37 $^{\circ}$ C继续培养细胞1天诱导为成熟DC;收集细胞,计数备用。准备T(供体2)细胞:复苏PBMC,用EasySepTM人CD4+T细胞分离试剂盒(STEMCELL,17952)分离CD4+T细胞。

[0159] 准备抗体:用培养基1:5梯度稀释抗体(初始浓度10 μ g/ml)6个浓度。将DC细胞:T细胞为1:10的比例混合,加入不同浓度的抗体,混合培养,第2天检测培养上清中IL2的表达,第5天检测培养上清中IFN γ 的表达。

[0160] 结果如图18-21所示,在混合淋巴细胞反应实验中,QP509及QP3447对T细胞激活后产生的细胞因子IFN γ 及IL-2的浓度有明显的抗体浓度依赖。

[0161] 实施例20:在转基因鼠模型中评价抗PD-L1纳米抗体对肿瘤生长的抑制作用

[0162] 实验步骤:由于PDL1抗体不能识别小鼠PDL1,因此采用免疫检查点人源化小鼠模型(C57BL/6-hPDL1)评价抗PD-L1纳米抗体对小鼠结肠癌肿瘤细胞MC38的生长抑制作用。收集对数生长期的MC38-hPDL1(tg)-mPDL1(KO)细胞,PBS重悬至适合浓度接种。然后,对每只实验小鼠于右侧背部皮下接种1 \times 10⁶MC38-hPDL1细胞,定期观察肿瘤生长情况,待肿瘤生长至平均体积约100mm³时根据肿瘤大小和小鼠体重随机分组给药。分组给药当天定义为第0天。给药方案如下表6所示:

[0163] 表6

	组别	动物数	给药组	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药周期
[0164]	1	9	PBS	--	i.p.	BIW×3w
	2	9	QP3447	8	i.p.	BIW×3w
	3	9	阿特殊单抗	8	i.p.	BIW×3w

[0165] 给药体积为10 μ l/g体重。

[0166] 每周观察3次小鼠体重和肿瘤体积,用游标卡尺测量肿瘤长短径,并按公式肿瘤体积(mm^3) = $0.5 \times (a \times b^2)$ 计算、记录肿瘤生长情况,绘制肿瘤生长曲线。结果如图22-23和下表7所示:

[0167] 表7

组	D24 肿瘤体积 mm^3	D24 TGItv%	<i>p</i> 值 (<i>t</i> 检验)	D24 肿瘤体积 /g	D24 TGItw%	<i>p</i> 值 (<i>t</i> 检验)
[0168] 阴性对照	2520.26 \pm 401.70	--	--	3.0526 \pm 0.51		
QP3447	985.56 \pm 333.03	62.97%	0.0096**	1.14 \pm 0.45	62.77%	0.012*
阿特殊单抗	934.84 \pm 249.93	65.08%	0.0041**	1.27 \pm 0.37	58.36%	0.012*

[0169] 根据实验终点时D24天肿瘤体积和肿瘤重量统计分析,与对照组相比,G2组QP3447的肿瘤体积(TGItv% = 62.97%)和肿瘤重量(TGItw% = 62.77%)均有显著性差异($P < 0.05$);G3组对照分子阿特殊单抗(Atezolizumab)的肿瘤体积(TGI% = 65.08%)和肿瘤重量(TGI tw% = 58.36%)均有显著性差异($P < 0.05$)。QP3447和阿特殊单抗(Atezolizumab)均在该模型中表现出较强的抗肿瘤活性。

[0170] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0171] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0172] 此外,本发明的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合,只要其不违背本发明的思想,其同样应当视为本发明所公开的内容。

[0001] 序列表

[0002] <110> 屈向东

[0003] <120> 一种抗PD-L1纳米抗体及其用途

[0004] <130> PD200223N

[0005] <160> 62

[0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0007] <210> 1

[0008] <211> 129

[0009] <212> PRT

[0010] <213> 人工序列()

[0011] <400> 1

[0012] Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0013] 1 5 10 15

[0014] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr

[0015] 20 25 30

[0016] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

[0017] 35 40 45

[0018] Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val

[0019] 50 55 60

[0020] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr

[0021] 65 70 75 80

[0022] Leu Gln Met Asn Asn Leu Ala Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0023] 85 90 95

[0024] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr

[0025] 100 105 110

[0026] Leu Gln Phe Phe Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser

[0027] 115 120 125

[0028] Ser

[0029] <210> 2

[0030] <211> 129

[0031] <212> PRT

[0032] <213> 人工序列()

[0033] <400> 2

[0034] Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0035] 1 5 10 15

[0036] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr

[0037] 20 25 30

[0038] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

[0039]	35	40	45
[0040]	Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val		
[0041]	50	55	60
[0042]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr		
[0043]	65	70	75
[0044]	Leu Gln Met Asn Asn Leu Ala Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0045]	85	90	95
[0046]	Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr		
[0047]	100	105	110
[0048]	Leu Gln Phe Phe Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser		
[0049]	115	120	125
[0050]	Ser		
[0051]	<210> 3		
[0052]	<211> 129		
[0053]	<212> PRT		
[0054]	<213> 人工序列()		
[0055]	<400> 3		
[0056]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0057]	1	5	10
[0058]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr		
[0059]	20	25	30
[0060]	Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val		
[0061]	35	40	45
[0062]	Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val		
[0063]	50	55	60
[0064]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr		
[0065]	65	70	75
[0066]	Leu Gln Met Asn Asn Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0067]	85	90	95
[0068]	Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr		
[0069]	100	105	110
[0070]	Arg Gln Phe Phe Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser		
[0071]	115	120	125
[0072]	Ser		
[0073]	<210> 4		
[0074]	<211> 129		
[0075]	<212> PRT		
[0076]	<213> 人工序列()		
[0077]	<400> 4		

[0117] <210> 6
 [0118] <211> 129
 [0119] <212> PRT
 [0120] <213> 人工序列()
 [0121] <400> 6
 [0122] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0123] 1 5 10 15
 [0124] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
 [0125] 20 25 30
 [0126] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0127] 35 40 45
 [0128] Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Ala Asn Tyr Val Asp Ser Val
 [0129] 50 55 60
 [0130] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0131] 65 70 75 80
 [0132] Leu Gln Met Asn Asn Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0133] 85 90 95
 [0134] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
 [0135] 100 105 110
 [0136] Arg Gln Phe Phe Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 [0137] 115 120 125
 [0138] Ser
 [0139] <210> 7
 [0140] <211> 129
 [0141] <212> PRT
 [0142] <213> 人工序列()
 [0143] <400> 7
 [0144] Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0145] 1 5 10 15
 [0146] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
 [0147] 20 25 30
 [0148] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0149] 35 40 45
 [0150] Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 [0151] 50 55 60
 [0152] Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0153] 65 70 75 80
 [0154] Leu Gln Met Asn Asn Leu Thr Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys
 [0155] 85 90 95

[0156] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
 [0157] 100 105 110
 [0158] Arg Gln Phe Phe Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 [0159] 115 120 125
 [0160] Ser
 [0161] <210> 8
 [0162] <211> 129
 [0163] <212> PRT
 [0164] <213> 人工序列()
 [0165] <400> 8
 [0166] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0167] 1 5 10 15
 [0168] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
 [0169] 20 25 30
 [0170] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0171] 35 40 45
 [0172] Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 [0173] 50 55 60
 [0174] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0175] 65 70 75 80
 [0176] Leu Gln Met Asn Asn Leu Thr Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys
 [0177] 85 90 95
 [0178] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
 [0179] 100 105 110
 [0180] Arg Gln Phe Phe Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 [0181] 115 120 125
 [0182] Ser
 [0183] <210> 9
 [0184] <211> 129
 [0185] <212> PRT
 [0186] <213> 人工序列()
 [0187] <400> 9
 [0188] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0189] 1 5 10 15
 [0190] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Leu Asp Leu His
 [0191] 20 25 30
 [0192] Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0193] 35 40 45
 [0194] Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val

[0195]	50	55	60
[0196]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr		
[0197]	65	70	75 80
[0198]	Leu Gln Met Asn Asn Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0199]	85	90	95
[0200]	Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr		
[0201]	100	105	110
[0202]	Arg Gln Phe Phe Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser		
[0203]	115	120	125
[0204]	Ser		
[0205]	<210> 10		
[0206]	<211> 129		
[0207]	<212> PRT		
[0208]	<213> 人工序列()		
[0209]	<400> 10		
[0210]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0211]	1 5	10	15
[0212]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr		
[0213]	20	25	30
[0214]	Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val		
[0215]	35	40	45
[0216]	Ser Cys Ile Ser Lys Asp Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val		
[0217]	50	55	60
[0218]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ala Lys Asn Thr Val Tyr		
[0219]	65	70	75 80
[0220]	Leu Glu Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0221]	85	90	95
[0222]	Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Thr Met Ser Arg Gln Phe Phe		
[0223]	100	105	110
[0224]	Arg Gln Phe Phe Gln Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser		
[0225]	115	120	125
[0226]	Ser		
[0227]	<210> 11		
[0228]	<211> 129		
[0229]	<212> PRT		
[0230]	<213> 人工序列()		
[0231]	<400> 11		
[0232]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0233]	1 5	10	15

[0234] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr
 [0235] 20 25 30
 [0236] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0237] 35 40 45
 [0238] Ser Cys Ile Ser Lys Asp Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val
 [0239] 50 55 60
 [0240] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn Thr Val Tyr
 [0241] 65 70 75 80
 [0242] Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0243] 85 90 95
 [0244] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Thr Met Ser Arg Gln Phe Phe
 [0245] 100 105 110
 [0246] Arg Gln Phe Phe Gln Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 [0247] 115 120 125
 [0248] Ser
 [0249] <210> 12
 [0250] <211> 129
 [0251] <212> PRT
 [0252] <213> 人工序列()
 [0253] <400> 12
 [0254] Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0255] 1 5 10 15
 [0256] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Arg Thr Leu Asp Ser His
 [0257] 20 25 30
 [0258] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0259] 35 40 45
 [0260] Ser Cys Ile Ser Lys Asp Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val
 [0261] 50 55 60
 [0262] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0263] 65 70 75 80
 [0264] Leu Glu Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0265] 85 90 95
 [0266] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Thr Met Ser Arg Gln Phe Phe
 [0267] 100 105 110
 [0268] Arg Gln Phe Phe Gln Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 [0269] 115 120 125
 [0270] Ser
 [0271] <210> 13
 [0272] <211> 129

[0273] <212> PRT
 [0274] <213> 人工序列()
 [0275] <400> 13
 [0276] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0277] 1 5 10 15
 [0278] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ser Asp Asn Tyr
 [0279] 20 25 30
 [0280] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0281] 35 40 45
 [0282] Ser Cys Ile Ser Lys Asp Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val
 [0283] 50 55 60
 [0284] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0285] 65 70 75 80
 [0286] Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0287] 85 90 95
 [0288] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Thr Met Ser Arg Gln Phe Phe
 [0289] 100 105 110
 [0290] Arg Gln Phe Phe Gln Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 [0291] 115 120 125
 [0292] Ser
 [0293] <210> 14
 [0294] <211> 129
 [0295] <212> PRT
 [0296] <213> 人工序列()
 [0297] <400> 14
 [0298] Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0299] 1 5 10 15
 [0300] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
 [0301] 20 25 30
 [0302] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0303] 35 40 45
 [0304] Ala Cys Ile Asn Lys Ser Gly Glu Thr Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 [0305] 50 55 60
 [0306] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Asp
 [0307] 65 70 75 80
 [0308] Leu Gln Thr Asn Asn Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0309] 85 90 95
 [0310] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Phe
 [0311] 100 105 110

[0312]	Arg Gln Phe Phe Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
[0313]	115 120 125
[0314]	Ser
[0315]	<210> 15
[0316]	<211> 129
[0317]	<212> PRT
[0318]	<213> 人工序列()
[0319]	<400> 15
[0320]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0321]	1 5 10 15
[0322]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
[0323]	20 25 30
[0324]	Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
[0325]	35 40 45
[0326]	Ala Cys Ile Asn Lys Ser Gly Glu Thr Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
[0327]	50 55 60
[0328]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val His
[0329]	65 70 75 80
[0330]	Leu Gln Thr Asn Asn Leu Thr Pro Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
[0331]	85 90 95
[0332]	Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Phe
[0333]	100 105 110
[0334]	Arg Gln Phe Phe Pro Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
[0335]	115 120 125
[0336]	Ser
[0337]	<210> 16
[0338]	<211> 129
[0339]	<212> PRT
[0340]	<213> 人工序列()
[0341]	<400> 16
[0342]	Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0343]	1 5 10 15
[0344]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
[0345]	20 25 30
[0346]	Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
[0347]	35 40 45
[0348]	Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Glu Ser Val
[0349]	50 55 60
[0350]	Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Ser

[0351]	65	70	75	80
[0352]	Leu Gln Met Asn Asn Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0353]		85	90	95
[0354]	Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr			
[0355]		100	105	110
[0356]	Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser			
[0357]		115	120	125
[0358]	Ser			
[0359]	<210> 17			
[0360]	<211> 129			
[0361]	<212> PRT			
[0362]	<213> 人工序列()			
[0363]	<400> 17			
[0364]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0365]	1	5	10	15
[0366]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr			
[0367]		20	25	30
[0368]	Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val			
[0369]		35	40	45
[0370]	Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Glu Ser Val			
[0371]		50	55	60
[0372]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Ser			
[0373]	65	70	75	80
[0374]	Leu Gln Met Asn Asn Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0375]		85	90	95
[0376]	Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr			
[0377]		100	105	110
[0378]	Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser			
[0379]		115	120	125
[0380]	Ser			
[0381]	<210> 18			
[0382]	<211> 129			
[0383]	<212> PRT			
[0384]	<213> 人工序列()			
[0385]	<400> 18			
[0386]	Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0387]	1	5	10	15
[0388]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Thr Tyr			
[0389]		20	25	30

[0390] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0391] 35 40 45
 [0392] Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Asp Ser Val
 [0393] 50 55 60
 [0394] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Ser
 [0395] 65 70 75 80
 [0396] Leu Gln Met Asn Asn Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0397] 85 90 95
 [0398] Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
 [0399] 100 105 110
 [0400] Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Ala Thr Val Ser
 [0401] 115 120 125
 [0402] Ser
 [0403] <210> 19
 [0404] <211> 129
 [0405] <212> PRT
 [0406] <213> 人工序列()
 [0407] <400> 19
 [0408] Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 [0409] 1 5 10 15
 [0410] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Asn Phe
 [0411] 20 25 30
 [0412] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0413] 35 40 45
 [0414] Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Asp Ser Val
 [0415] 50 55 60
 [0416] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Ser
 [0417] 65 70 75 80
 [0418] Leu Gln Met Asn Asn Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0419] 85 90 95
 [0420] Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
 [0421] 100 105 110
 [0422] Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 [0423] 115 120 125
 [0424] Ser
 [0425] <210> 20
 [0426] <211> 129
 [0427] <212> PRT
 [0428] <213> 人工序列()

[0429] <400> 20
 [0430] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0431] 1 5 10 15
 [0432] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Thr Tyr
 [0433] 20 25 30
 [0434] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0435] 35 40 45
 [0436] Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Asp Ser Val
 [0437] 50 55 60
 [0438] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ala Ser
 [0439] 65 70 75 80
 [0440] Leu Gln Met Asn Asn Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0441] 85 90 95
 [0442] Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
 [0443] 100 105 110
 [0444] Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 [0445] 115 120 125
 [0446] Ser
 [0447] <210> 21
 [0448] <211> 10
 [0449] <212> PRT
 [0450] <213> 人工序列()
 [0451] <400> 21
 [0452] Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr Ala Ile Gly
 [0453] 1 5 10
 [0454] <210> 22
 [0455] <211> 10
 [0456] <212> PRT
 [0457] <213> 人工序列()
 [0458] <400> 22
 [0459] Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr Ala Ile Gly
 [0460] 1 5 10
 [0461] <210> 23
 [0462] <211> 10
 [0463] <212> PRT
 [0464] <213> 人工序列()
 [0465] <400> 23
 [0466] Gly Phe Asn Leu Asp Leu His Ala Val Gly
 [0467] 1 5 10

[0468] <210> 24
[0469] <211> 10
[0470] <212> PRT
[0471] <213> 人工序列()
[0472] <400> 24
[0473] Gly Arg Thr Leu Asp Ser His Ala Ile Gly
[0474] 1 5 10
[0475] <210> 25
[0476] <211> 10
[0477] <212> PRT
[0478] <213> 人工序列()
[0479] <400> 25
[0480] Gly Phe Thr Ser Asp Asn Tyr Ala Ile Gly
[0481] 1 5 10
[0482] <210> 26
[0483] <211> 10
[0484] <212> PRT
[0485] <213> 人工序列()
[0486] <400> 26
[0487] Gly Phe Thr Leu Asp Thr Tyr Ala Ile Gly
[0488] 1 5 10
[0489] <210> 27
[0490] <211> 10
[0491] <212> PRT
[0492] <213> 人工序列()
[0493] <400> 27
[0494] Gly Phe Ser Leu Asp Asn Phe Ala Ile Gly
[0495] 1 5 10
[0496] <210> 28
[0497] <211> 17
[0498] <212> PRT
[0499] <213> 人工序列()
[0500] <400> 28
[0501] Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
[0502] 1 5 10 15
[0503] Gly
[0504] <210> 29
[0505] <211> 17
[0506] <212> PRT

[0507] <213> 人工序列()
 [0508] <400> 29
 [0509] Cys Ile Ser Lys Asp Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
 [0510] 1 5 10 15
 [0511] Gly
 [0512] <210> 30
 [0513] <211> 17
 [0514] <212> PRT
 [0515] <213> 人工序列()
 [0516] <400> 30
 [0517] Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Ala Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
 [0518] 1 5 10 15
 [0519] Gly
 [0520] <210> 31
 [0521] <211> 17
 [0522] <212> PRT
 [0523] <213> 人工序列()
 [0524] <400> 31
 [0525] Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 [0526] 1 5 10 15
 [0527] Gly
 [0528] <210> 32
 [0529] <211> 17
 [0530] <212> PRT
 [0531] <213> 人工序列()
 [0532] <400> 32
 [0533] Cys Ile Asn Lys Ser Gly Glu Thr Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 [0534] 1 5 10 15
 [0535] Gly
 [0536] <210> 33
 [0537] <211> 17
 [0538] <212> PRT
 [0539] <213> 人工序列()
 [0540] <400> 33
 [0541] Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Glu Ser Val Lys
 [0542] 1 5 10 15
 [0543] Asp
 [0544] <210> 34
 [0545] <211> 17

[0546] <212> PRT
 [0547] <213> 人工序列()
 [0548] <400> 34
 [0549] Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Glu Ser Val Lys
 [0550] 1 5 10 15
 [0551] Gly
 [0552] <210> 35
 [0553] <211> 17
 [0554] <212> PRT
 [0555] <213> 人工序列()
 [0556] <400> 35
 [0557] Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Asp Ser Val Lys
 [0558] 1 5 10 15
 [0559] Gly
 [0560] <210> 36
 [0561] <211> 22
 [0562] <212> PRT
 [0563] <213> 人工序列()
 [0564] <400> 36
 [0565] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
 [0566] 1 5 10 15
 [0567] Leu Gln Phe Phe Arg Ser
 [0568] 20
 [0569] <210> 37
 [0570] <211> 22
 [0571] <212> PRT
 [0572] <213> 人工序列()
 [0573] <400> 37
 [0574] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
 [0575] 1 5 10 15
 [0576] Arg Gln Phe Phe Arg Ser
 [0577] 20
 [0578] <210> 38
 [0579] <211> 22
 [0580] <212> PRT
 [0581] <213> 人工序列()
 [0582] <400> 38
 [0583] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Thr Met Ser Arg Gln Phe Phe
 [0584] 1 5 10 15

[0585] Arg Gln Phe Phe Gln Ser
 [0586] 20
 [0587] <210> 39
 [0588] <211> 22
 [0589] <212> PRT
 [0590] <213> 人工序列()
 [0591] <400> 39
 [0592] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Phe
 [0593] 1 5 10 15
 [0594] Arg Gln Phe Phe Arg Ser
 [0595] 20
 [0596] <210> 40
 [0597] <211> 22
 [0598] <212> PRT
 [0599] <213> 人工序列()
 [0600] <400> 40
 [0601] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Phe
 [0602] 1 5 10 15
 [0603] Arg Gln Phe Phe Pro Ser
 [0604] 20
 [0605] <210> 41
 [0606] <211> 22
 [0607] <212> PRT
 [0608] <213> 人工序列()
 [0609] <400> 41
 [0610] Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
 [0611] 1 5 10 15
 [0612] Arg Gln Phe Phe His Ser
 [0613] 20
 [0614] <210> 42
 [0615] <211> 129
 [0616] <212> PRT
 [0617] <213> 人工序列()
 [0618] <400> 42
 [0619] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0620] 1 5 10 15
 [0621] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
 [0622] 20 25 30
 [0623] Ala Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0624]	35	40	45
[0625]	Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Glu Ser Val		
[0626]	50	55	60
[0627]	Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0628]	65	70	75
[0629]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0630]	85	90	95
[0631]	Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr		
[0632]	100	105	110
[0633]	Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
[0634]	115	120	125
[0635]	Ser		
[0636]	<210> 43		
[0637]	<211> 129		
[0638]	<212> PRT		
[0639]	<213> 人工序列()		
[0640]	<400> 43		
[0641]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0642]	1	5	10
[0643]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr		
[0644]	20	25	30
[0645]	Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val		
[0646]	35	40	45
[0647]	Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Glu Ser Val		
[0648]	50	55	60
[0649]	Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0650]	65	70	75
[0651]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0652]	85	90	95
[0653]	Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr		
[0654]	100	105	110
[0655]	Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
[0656]	115	120	125
[0657]	Ser		
[0658]	<210> 44		
[0659]	<211> 129		
[0660]	<212> PRT		
[0661]	<213> 人工序列()		
[0662]	<400> 44		

[0663]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0664]	1 5 10 15
[0665]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
[0666]	20 25 30
[0667]	Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val
[0668]	35 40 45
[0669]	Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Glu Ser Val
[0670]	50 55 60
[0671]	Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
[0672]	65 70 75 80
[0673]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0674]	85 90 95
[0675]	Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
[0676]	100 105 110
[0677]	Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
[0678]	115 120 125
[0679]	Ser
[0680]	<210> 45
[0681]	<211> 129
[0682]	<212> PRT
[0683]	<213> 人工序列()
[0684]	<400> 45
[0685]	Gln Leu Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0686]	1 5 10 15
[0687]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
[0688]	20 25 30
[0689]	Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val
[0690]	35 40 45
[0691]	Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Glu Ser Val
[0692]	50 55 60
[0693]	Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
[0694]	65 70 75 80
[0695]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0696]	85 90 95
[0697]	Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
[0698]	100 105 110
[0699]	Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
[0700]	115 120 125
[0701]	Ser

[0702] <210> 46
 [0703] <211> 129
 [0704] <212> PRT
 [0705] <213> 人工序列()
 [0706] <400> 46
 [0707] Gln Leu Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0708] 1 5 10 15
 [0709] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
 [0710] 20 25 30
 [0711] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val
 [0712] 35 40 45
 [0713] Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Glu Ser Val
 [0714] 50 55 60
 [0715] Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 [0716] 65 70 75 80
 [0717] Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0718] 85 90 95
 [0719] Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
 [0720] 100 105 110
 [0721] Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 [0722] 115 120 125
 [0723] Ser
 [0724] <210> 47
 [0725] <211> 129
 [0726] <212> PRT
 [0727] <213> 人工序列()
 [0728] <400> 47
 [0729] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0730] 1 5 10 15
 [0731] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Asn Phe
 [0732] 20 25 30
 [0733] Ala Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0734] 35 40 45
 [0735] Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Asp Ser Val
 [0736] 50 55 60
 [0737] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0738] 65 70 75 80
 [0739] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0740] 85 90 95

[0741]	Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
[0742]	100 105 110
[0743]	Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
[0744]	115 120 125
[0745]	Ser
[0746]	<210> 48
[0747]	<211> 129
[0748]	<212> PRT
[0749]	<213> 人工序列()
[0750]	<400> 48
[0751]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0752]	1 5 10 15
[0753]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Asn Phe
[0754]	20 25 30
[0755]	Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val
[0756]	35 40 45
[0757]	Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Asp Ser Val
[0758]	50 55 60
[0759]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0760]	65 70 75 80
[0761]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0762]	85 90 95
[0763]	Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
[0764]	100 105 110
[0765]	Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
[0766]	115 120 125
[0767]	Ser
[0768]	<210> 49
[0769]	<211> 129
[0770]	<212> PRT
[0771]	<213> 人工序列()
[0772]	<400> 49
[0773]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0774]	1 5 10 15
[0775]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Asn Phe
[0776]	20 25 30
[0777]	Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val
[0778]	35 40 45
[0779]	Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Asp Ser Val

[0780]	50	55	60
[0781]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr		
[0782]	65	70	75 80
[0783]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0784]	85	90	95
[0785]	Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr		
[0786]	100	105	110
[0787]	Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
[0788]	115	120	125
[0789]	Ser		
[0790]	<210> 50		
[0791]	<211> 129		
[0792]	<212> PRT		
[0793]	<213> 人工序列()		
[0794]	<400> 50		
[0795]	Gln Leu Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0796]	1 5 10 15		
[0797]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Asn Phe		
[0798]	20 25 30		
[0799]	Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val		
[0800]	35 40 45		
[0801]	Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Asp Ser Val		
[0802]	50 55 60		
[0803]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr		
[0804]	65 70 75 80		
[0805]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0806]	85 90 95		
[0807]	Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr		
[0808]	100 105 110		
[0809]	Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
[0810]	115 120 125		
[0811]	Ser		
[0812]	<210> 51		
[0813]	<211> 129		
[0814]	<212> PRT		
[0815]	<213> 人工序列()		
[0816]	<400> 51		
[0817]	Gln Leu Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0818]	1 5 10 15		

[0819] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Asn Phe
 [0820] 20 25 30
 [0821] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val
 [0822] 35 40 45
 [0823] Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Asp Ser Val
 [0824] 50 55 60
 [0825] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 [0826] 65 70 75 80
 [0827] Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0828] 85 90 95
 [0829] Ala Thr Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
 [0830] 100 105 110
 [0831] Arg Gln Phe Phe His Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 [0832] 115 120 125
 [0833] Ser
 [0834] <210> 52
 [0835] <211> 129
 [0836] <212> PRT
 [0837] <213> 人工序列()
 [0838] <400> 52
 [0839] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0840] 1 5 10 15
 [0841] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
 [0842] 20 25 30
 [0843] Ala Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0844] 35 40 45
 [0845] Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 [0846] 50 55 60
 [0847] Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0848] 65 70 75 80
 [0849] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0850] 85 90 95
 [0851] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
 [0852] 100 105 110
 [0853] Arg Gln Phe Phe Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 [0854] 115 120 125
 [0855] Ser
 [0856] <210> 53
 [0857] <211> 129

[0858] <212> PRT
 [0859] <213> 人工序列()
 [0860] <400> 53
 [0861] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0862] 1 5 10 15
 [0863] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
 [0864] 20 25 30
 [0865] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val
 [0866] 35 40 45
 [0867] Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 [0868] 50 55 60
 [0869] Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0870] 65 70 75 80
 [0871] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0872] 85 90 95
 [0873] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
 [0874] 100 105 110
 [0875] Arg Gln Phe Phe Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 [0876] 115 120 125
 [0877] Ser
 [0878] <210> 54
 [0879] <211> 129
 [0880] <212> PRT
 [0881] <213> 人工序列()
 [0882] <400> 54
 [0883] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0884] 1 5 10 15
 [0885] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
 [0886] 20 25 30
 [0887] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val
 [0888] 35 40 45
 [0889] Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 [0890] 50 55 60
 [0891] Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 [0892] 65 70 75 80
 [0893] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0894] 85 90 95
 [0895] Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
 [0896] 100 105 110

[0897]	Arg Gln Phe Phe Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
[0898]	115 120 125
[0899]	Ser
[0900]	<210> 55
[0901]	<211> 129
[0902]	<212> PRT
[0903]	<213> 人工序列()
[0904]	<400> 55
[0905]	Gln Leu Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0906]	1 5 10 15
[0907]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
[0908]	20 25 30
[0909]	Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val
[0910]	35 40 45
[0911]	Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val
[0912]	50 55 60
[0913]	Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
[0914]	65 70 75 80
[0915]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0916]	85 90 95
[0917]	Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr
[0918]	100 105 110
[0919]	Arg Gln Phe Phe Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
[0920]	115 120 125
[0921]	Ser
[0922]	<210> 56
[0923]	<211> 129
[0924]	<212> PRT
[0925]	<213> 人工序列()
[0926]	<400> 56
[0927]	Gln Leu Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0928]	1 5 10 15
[0929]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
[0930]	20 25 30
[0931]	Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val
[0932]	35 40 45
[0933]	Ser Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val
[0934]	50 55 60
[0935]	Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr

[0936]	65	70	75	80
[0937]	Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0938]		85	90	95
[0939]	Ala Ala Gly Ser Trp Cys Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr			
[0940]		100	105	110
[0941]	Arg Gln Phe Phe Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser			
[0942]		115	120	125
[0943]	Ser			
[0944]	<210> 57			
[0945]	<211> 214			
[0946]	<212> PRT			
[0947]	<213> 人工序列()			
[0948]	<400> 57			
[0949]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0950]	1	5	10	15
[0951]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala			
[0952]		20	25	30
[0953]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
[0954]		35	40	45
[0955]	Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0956]	50	55	60	
[0957]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[0958]	65	70	75	80
[0959]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala			
[0960]		85	90	95
[0961]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
[0962]		100	105	110
[0963]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
[0964]		115	120	125
[0965]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
[0966]	130	135	140	
[0967]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
[0968]	145	150	155	160
[0969]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
[0970]		165	170	175
[0971]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
[0972]		180	185	190
[0973]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
[0974]		195	200	205

[0975]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0976]	210
[0977]	<210> 58
[0978]	<211> 448
[0979]	<212> PRT
[0980]	<213> 人工序列()
[0981]	<400> 58
[0982]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0983]	1 5 10 15
[0984]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
[0985]	20 25 30
[0986]	Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0987]	35 40 45
[0988]	Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0989]	50 55 60
[0990]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
[0991]	65 70 75 80
[0992]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0993]	85 90 95
[0994]	Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0995]	100 105 110
[0996]	Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
[0997]	115 120 125
[0998]	Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
[0999]	130 135 140
[1000]	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
[1001]	145 150 155 160
[1002]	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
[1003]	165 170 175
[1004]	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
[1005]	180 185 190
[1006]	Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
[1007]	195 200 205
[1008]	Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
[1009]	210 215 220
[1010]	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
[1011]	225 230 235 240
[1012]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[1013]	245 250 255

[1014]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[1015]	260 265 270
[1016]	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[1017]	275 280 285
[1018]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
[1019]	290 295 300
[1020]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[1021]	305 310 315 320
[1022]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[1023]	325 330 335
[1024]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[1025]	340 345 350
[1026]	Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[1027]	355 360 365
[1028]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[1029]	370 375 380
[1030]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[1031]	385 390 395 400
[1032]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[1033]	405 410 415
[1034]	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[1035]	420 425 430
[1036]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1037]	435 440 445
[1038]	<210> 59
[1039]	<211> 379
[1040]	<212> PRT
[1041]	<213> 人工序列()
[1042]	<400> 59
[1043]	Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[1044]	1 5 10 15
[1045]	Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
[1046]	20 25 30
[1047]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
[1048]	35 40 45
[1049]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
[1050]	50 55 60
[1051]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
[1052]	65 70 75 80

[1053]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
[1054]	85 90 95
[1055]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
[1056]	100 105 110
[1057]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Ala Ala Lys Gly Gln Pro
[1058]	115 120 125
[1059]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
[1060]	130 135 140
[1061]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
[1062]	145 150 155 160
[1063]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
[1064]	165 170 175
[1065]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
[1066]	180 185 190
[1067]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
[1068]	195 200 205
[1069]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
[1070]	210 215 220
[1071]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[1072]	225 230 235 240
[1073]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
[1074]	245 250 255
[1075]	Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
[1076]	260 265 270
[1077]	Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg
[1078]	275 280 285
[1079]	Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile Ser Lys Ser
[1080]	290 295 300
[1081]	Gly Glu Thr Thr Phe Phe Val Glu Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile
[1082]	305 310 315 320
[1083]	Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
[1084]	325 330 335
[1085]	Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Gly Ser Trp Cys
[1086]	340 345 350
[1087]	Thr Val Gly Ser Met Ser Arg Gln Phe Tyr Arg Gln Phe Phe His Ser
[1088]	355 360 365
[1089]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1090]	370 375
[1091]	<210> 60

[1092] <211> 232
 [1093] <212> PRT
 [1094] <213> 人工序列()
 [1095] <400> 60
 [1096] Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 [1097] 1 5 10 15
 [1098] Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 [1099] 20 25 30
 [1100] Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 [1101] 35 40 45
 [1102] Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 [1103] 50 55 60
 [1104] Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 [1105] 65 70 75 80
 [1106] Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 [1107] 85 90 95
 [1108] Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 [1109] 100 105 110
 [1110] Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 [1111] 115 120 125
 [1112] Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 [1113] 130 135 140
 [1114] Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 [1115] 145 150 155 160
 [1116] Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 [1117] 165 170 175
 [1118] Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 [1119] 180 185 190
 [1120] Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 [1121] 195 200 205
 [1122] Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 [1123] 210 215 220
 [1124] Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 [1125] 225 230
 [1126] <210> 61
 [1127] <211> 232
 [1128] <212> PRT
 [1129] <213> 人工序列()
 [1130] <400> 61

[1131]	Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[1132]	1 5 10 15
[1133]	Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
[1134]	20 25 30
[1135]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
[1136]	35 40 45
[1137]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
[1138]	50 55 60
[1139]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
[1140]	65 70 75 80
[1141]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
[1142]	85 90 95
[1143]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
[1144]	100 105 110
[1145]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Ala Ala Lys Gly Gln Pro
[1146]	115 120 125
[1147]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
[1148]	130 135 140
[1149]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
[1150]	145 150 155 160
[1151]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
[1152]	165 170 175
[1153]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
[1154]	180 185 190
[1155]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
[1156]	195 200 205
[1157]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
[1158]	210 215 220
[1159]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1160]	225 230
[1161]	<210> 62
[1162]	<211> 17
[1163]	<212> PRT
[1164]	<213> 人工序列()
[1165]	<400> 62
[1166]	Cys Ile Ser Lys Ser Gly Glu Thr Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val Arg
[1167]	1 5 10 15
[1168]	Gly

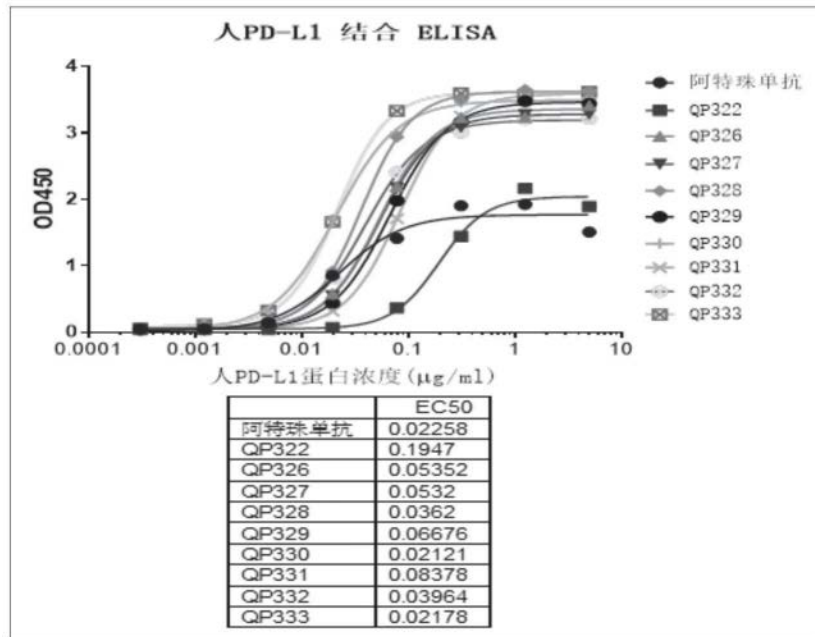


图1

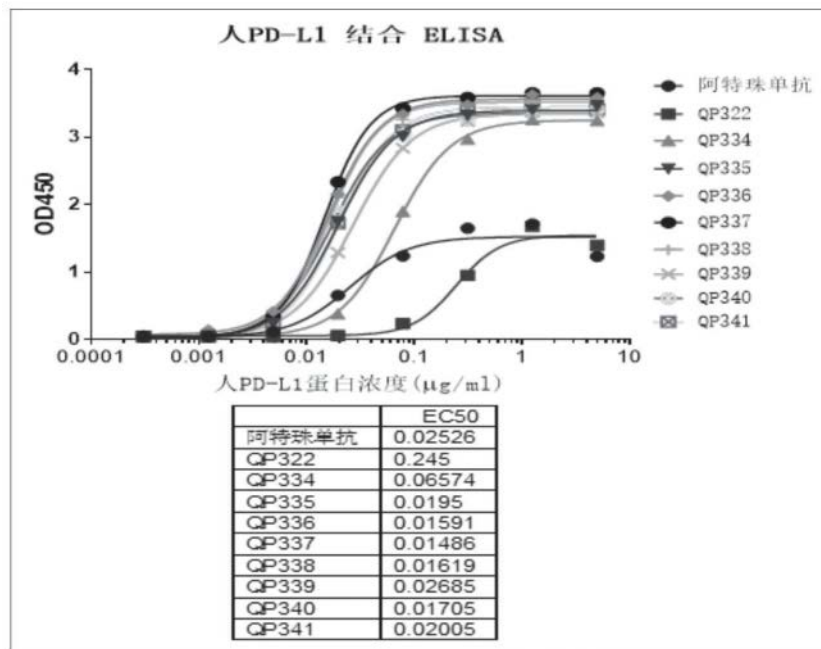


图2

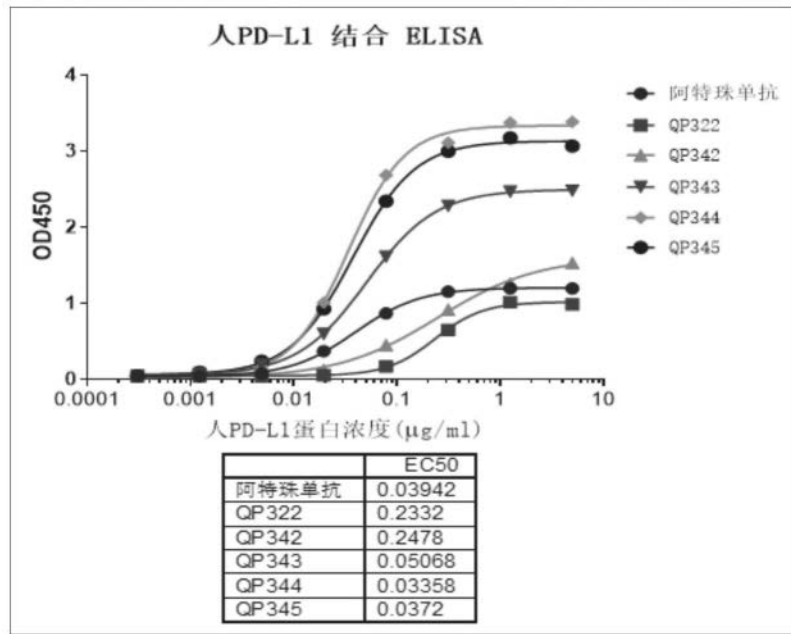


图3

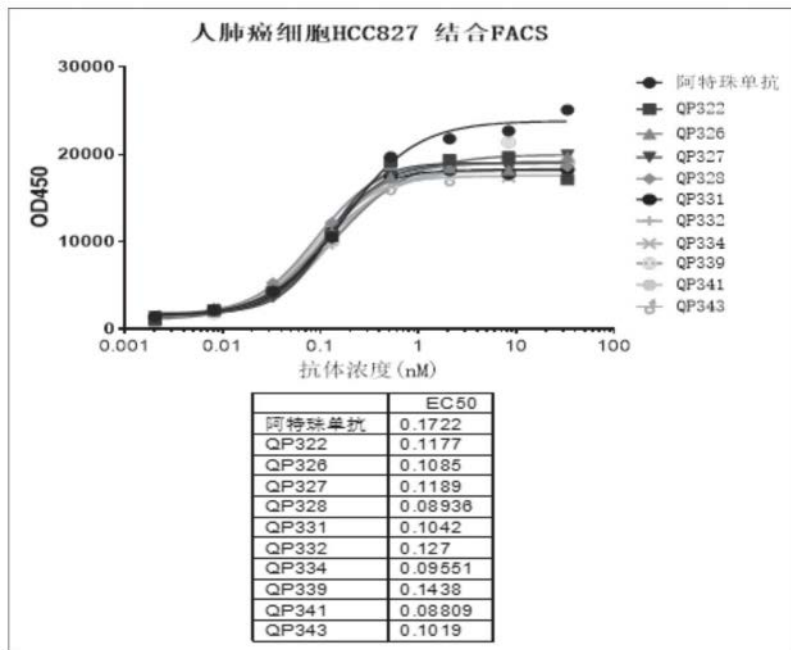


图4

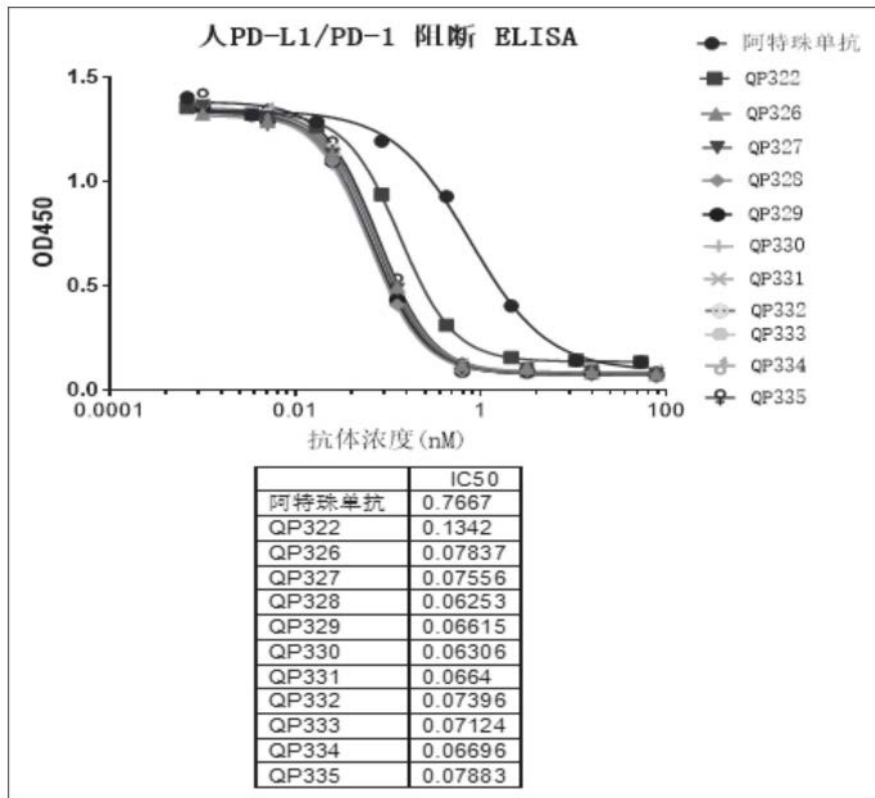


图5

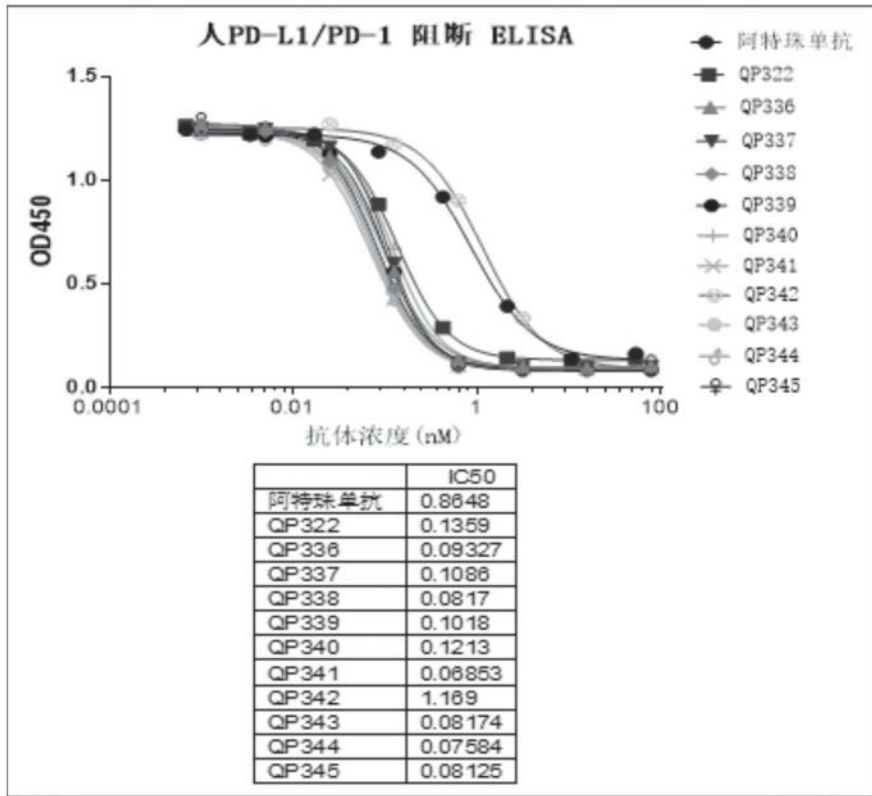


图6

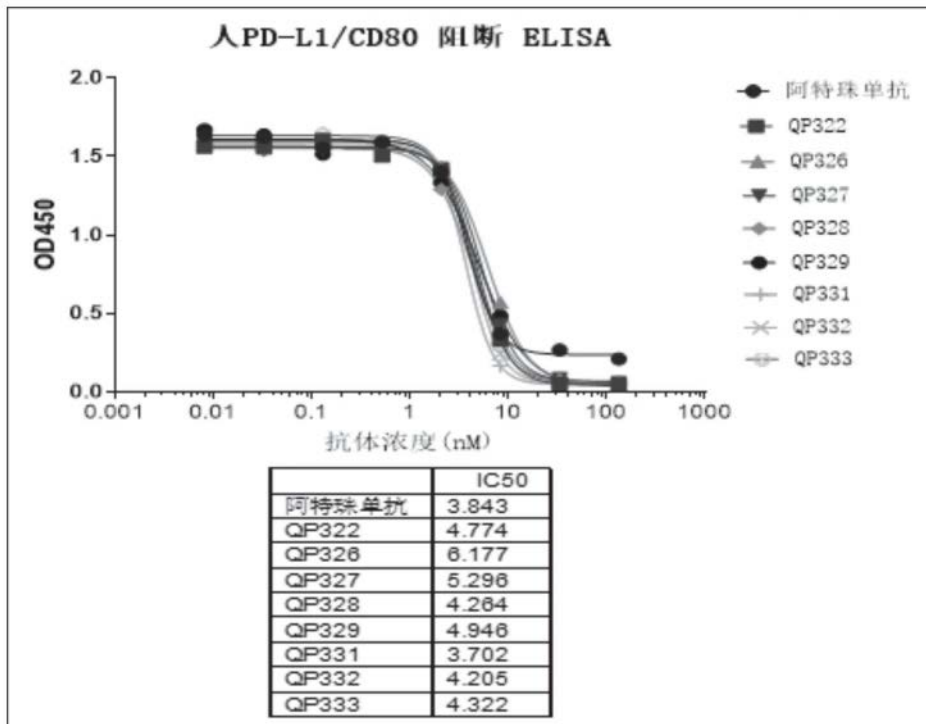


图7

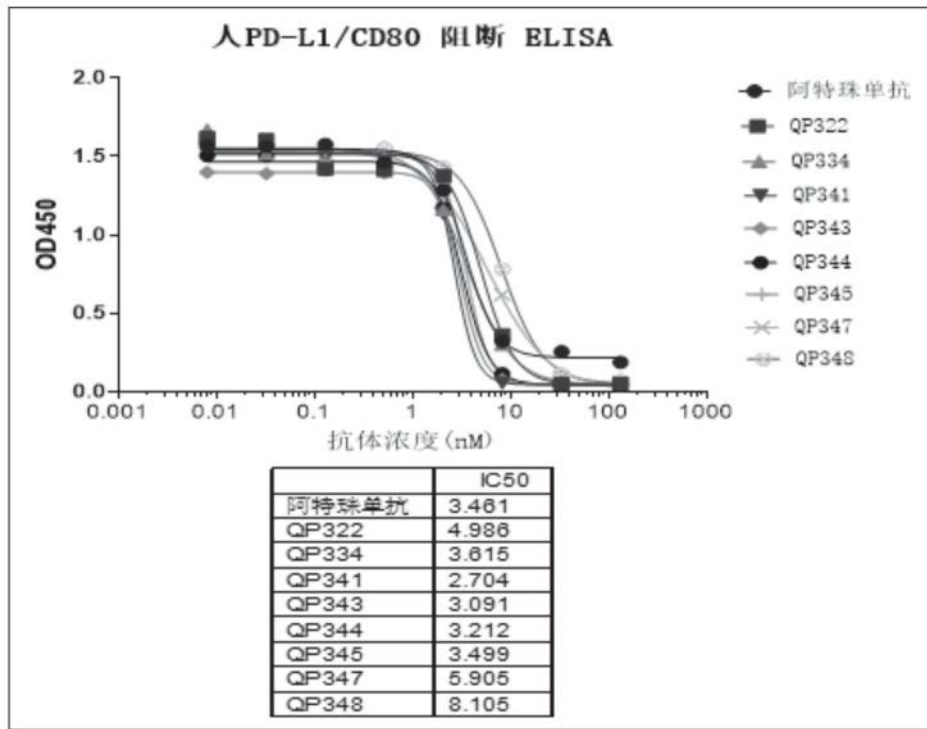


图8

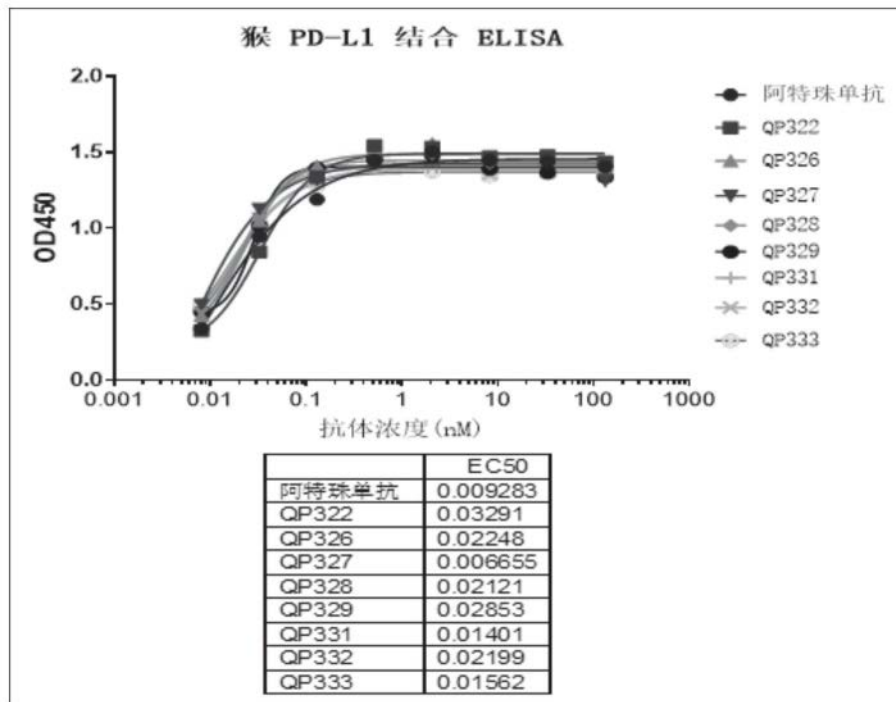


图9

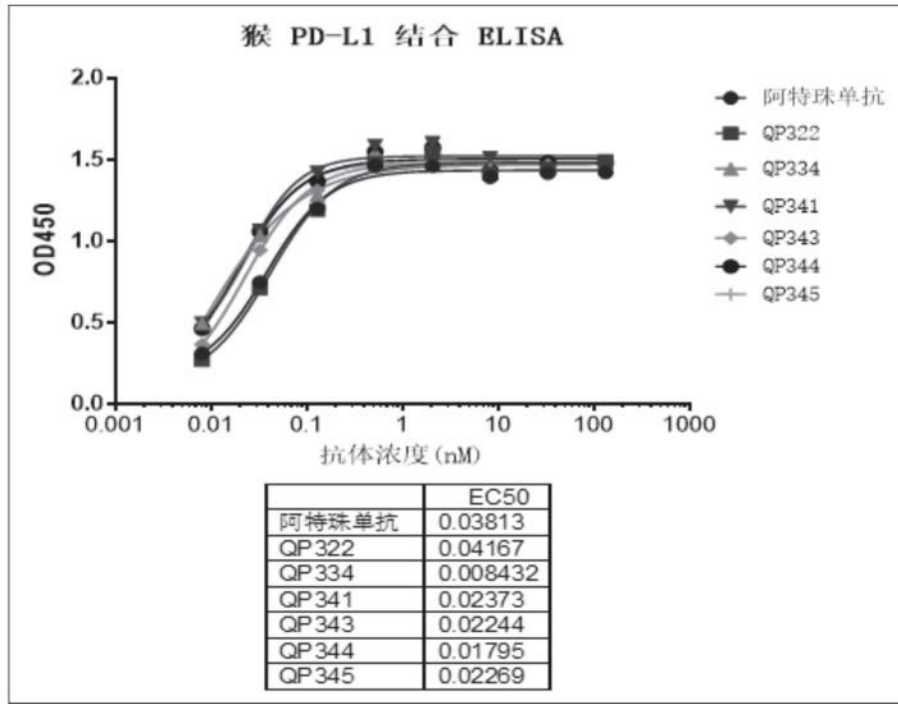


图10

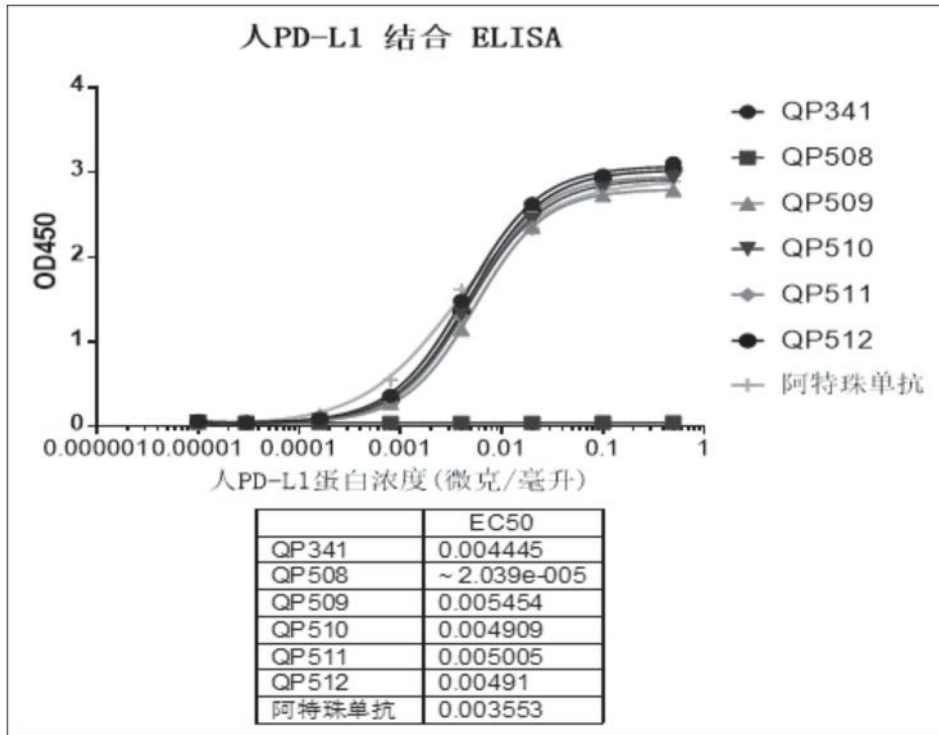


图11

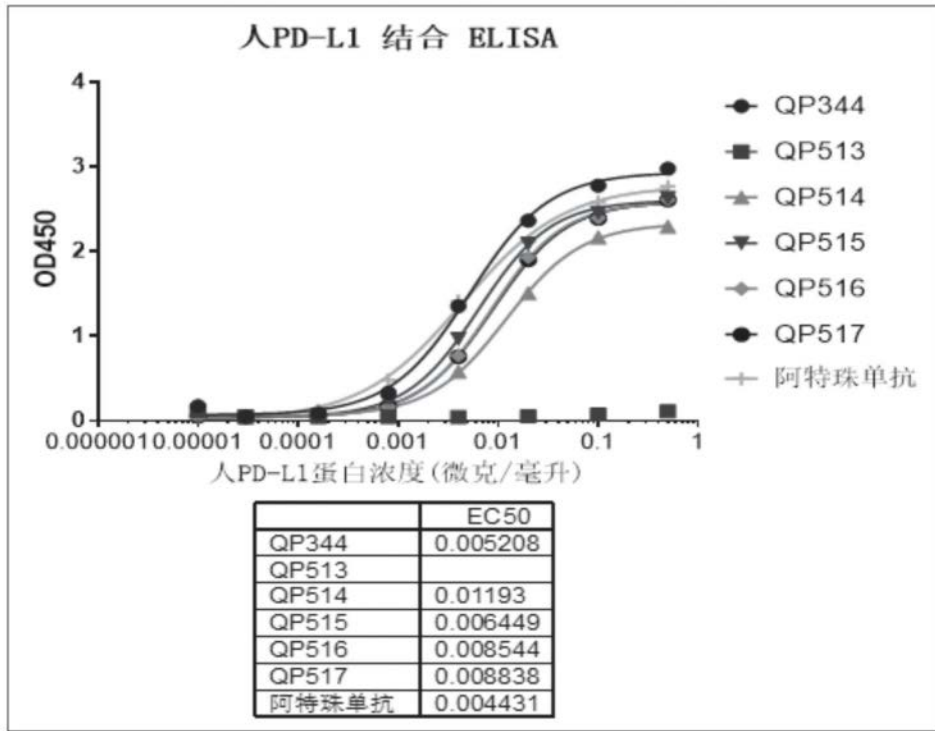


图12

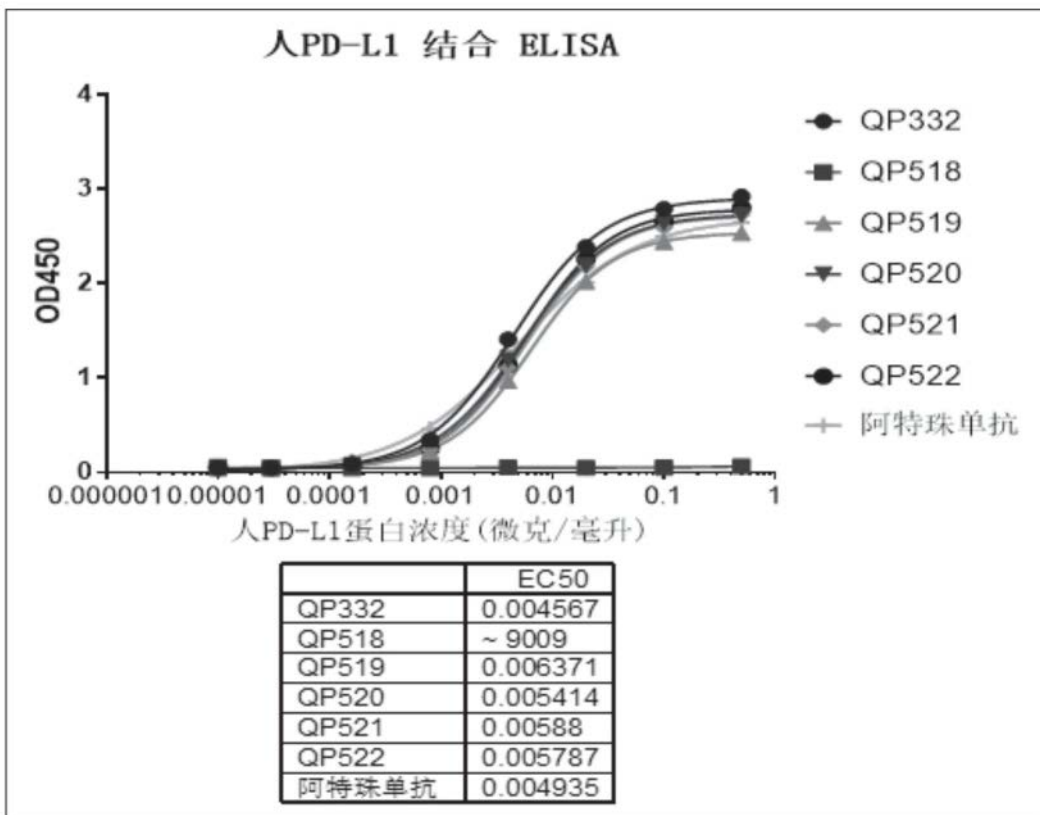


图13

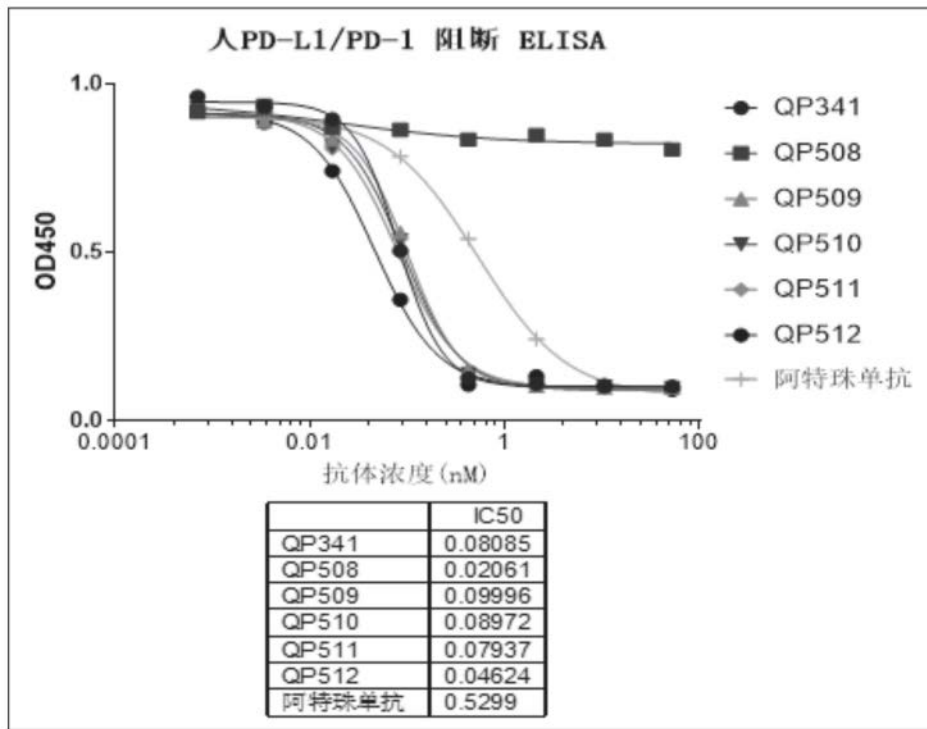


图14

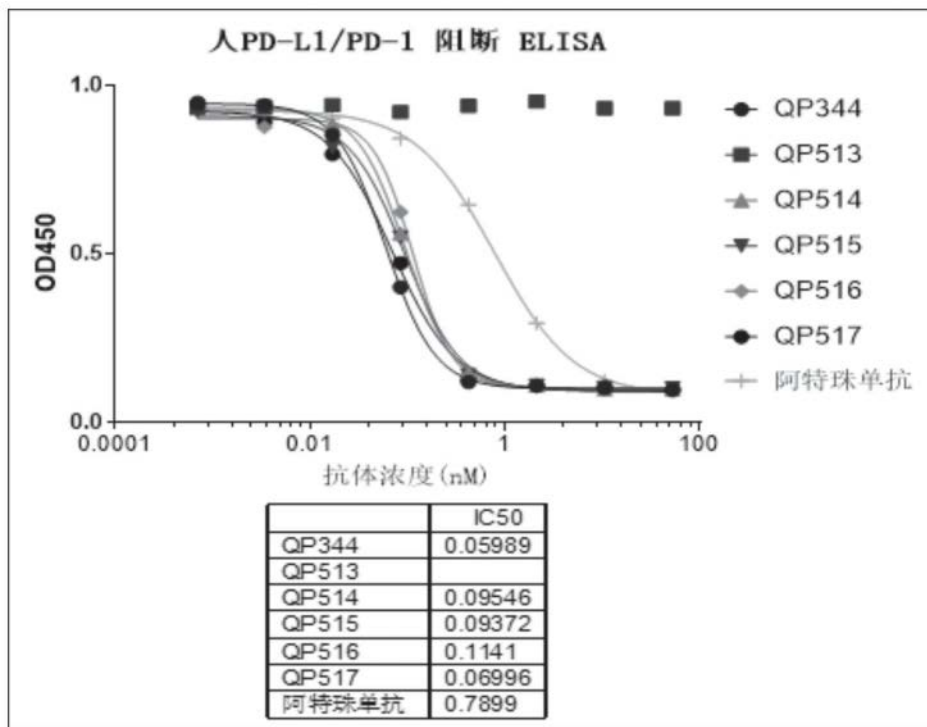


图15

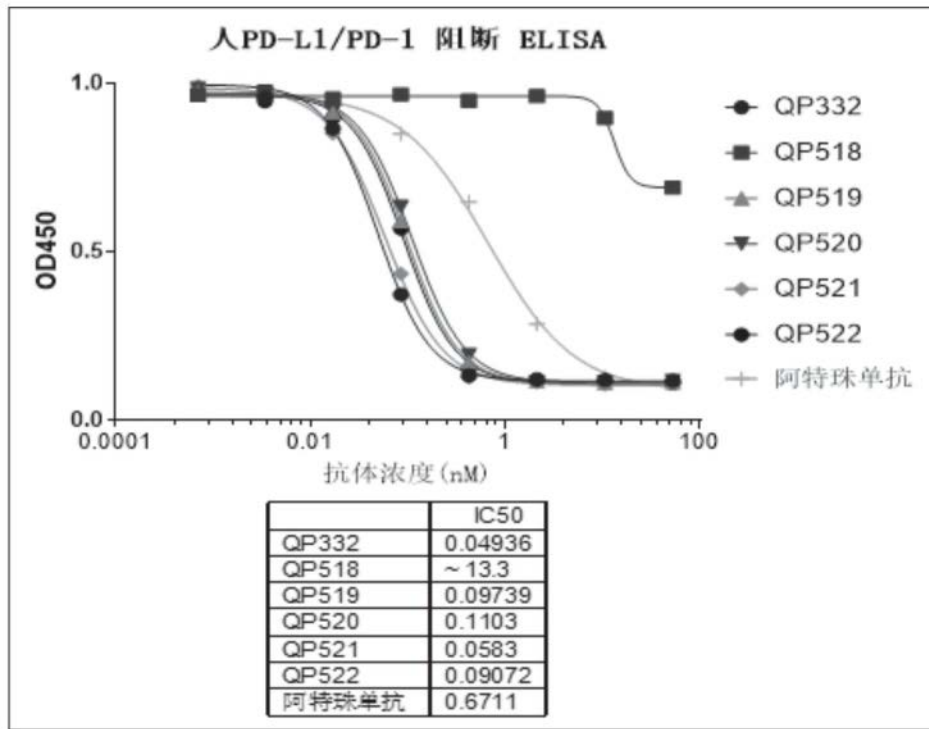


图16

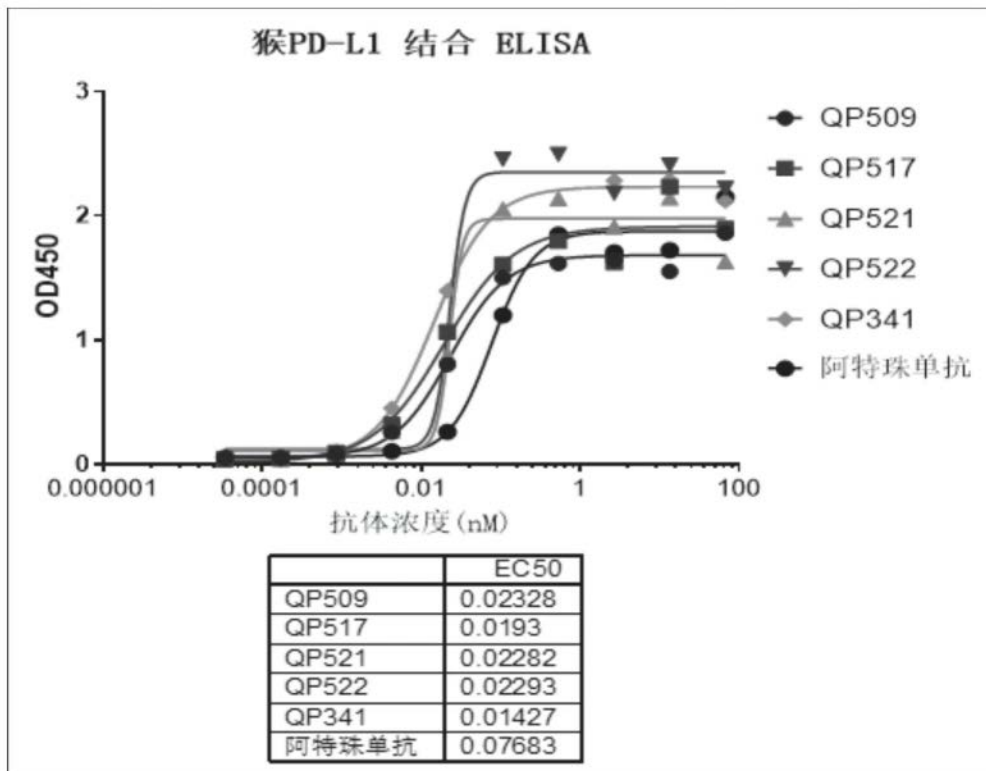


图17

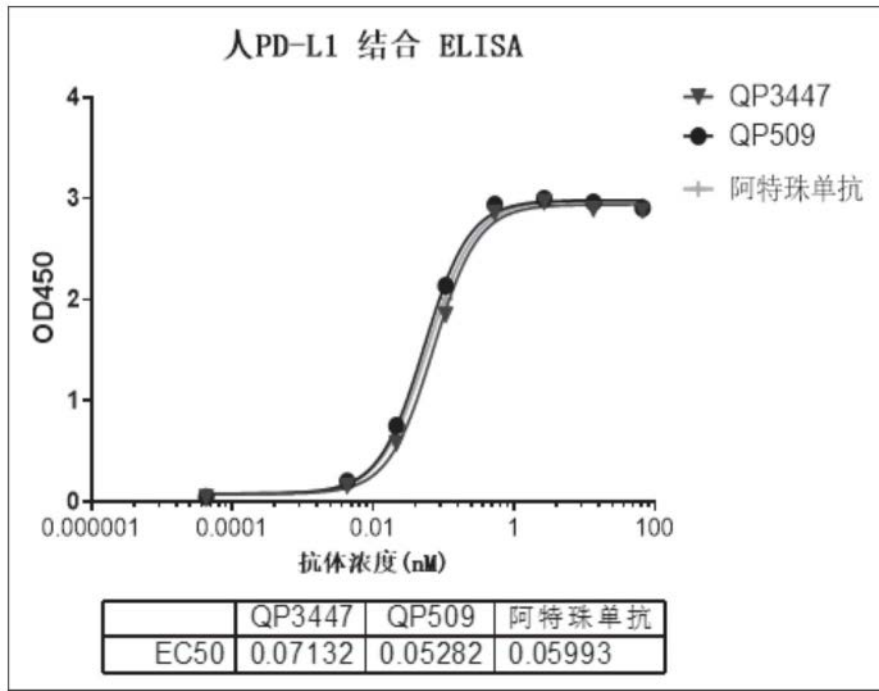


图18

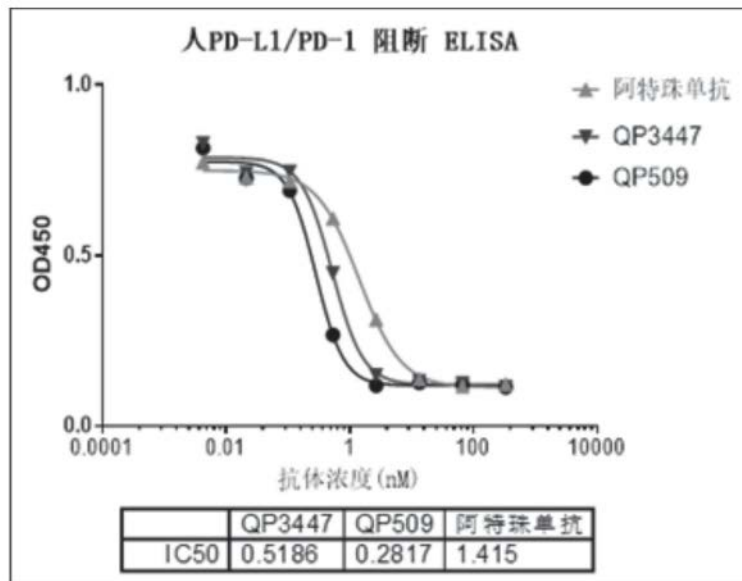


图19

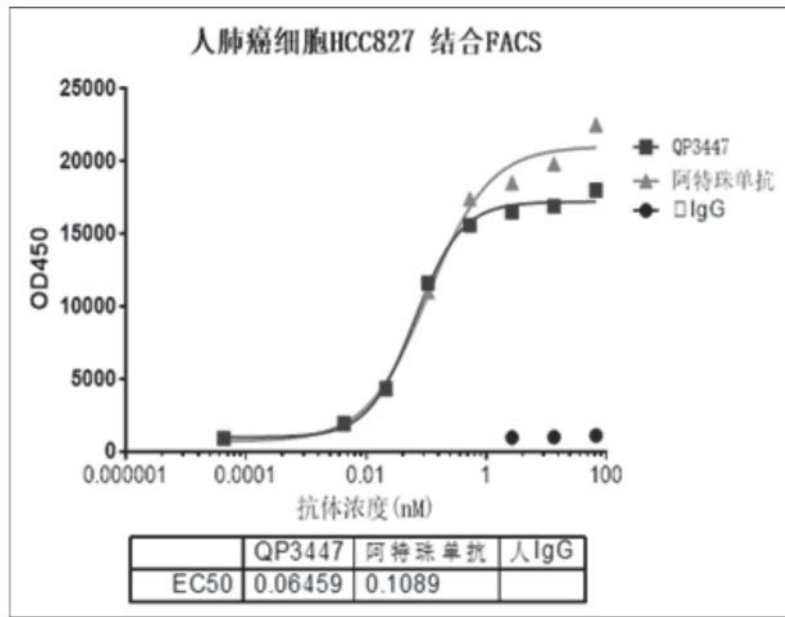


图20

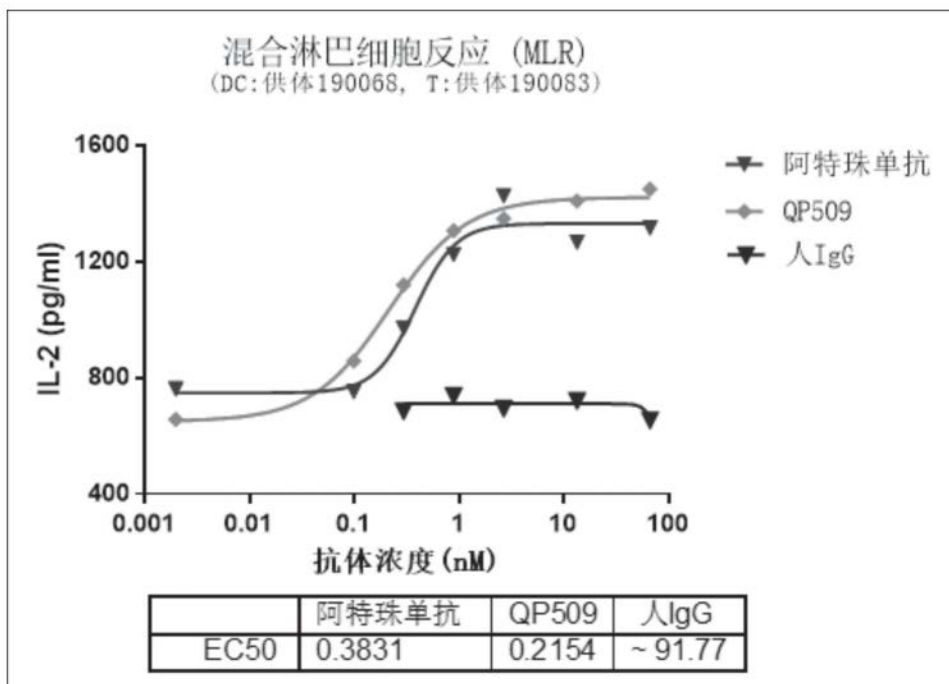


图21

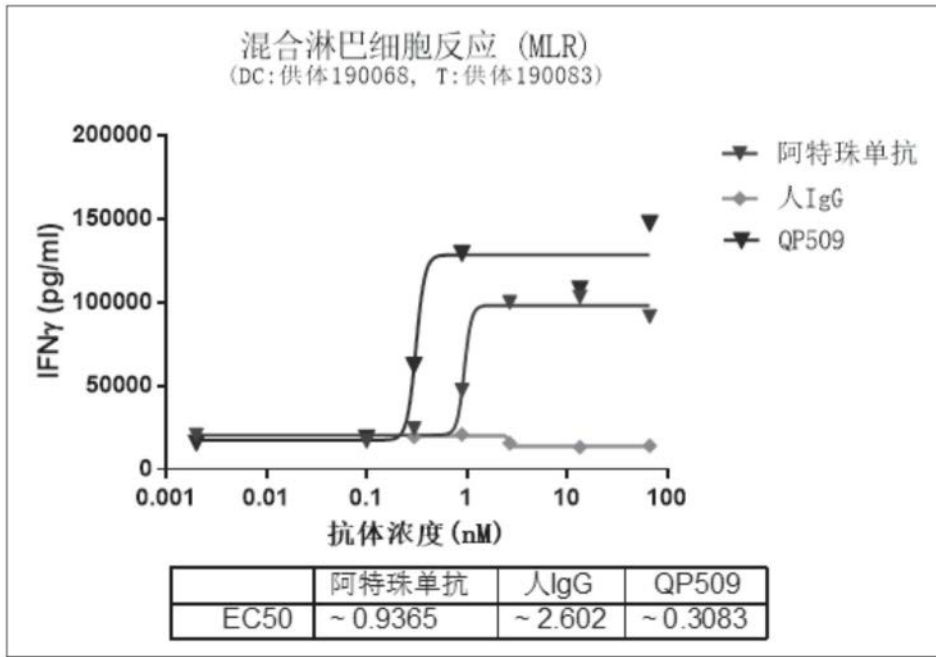


图22

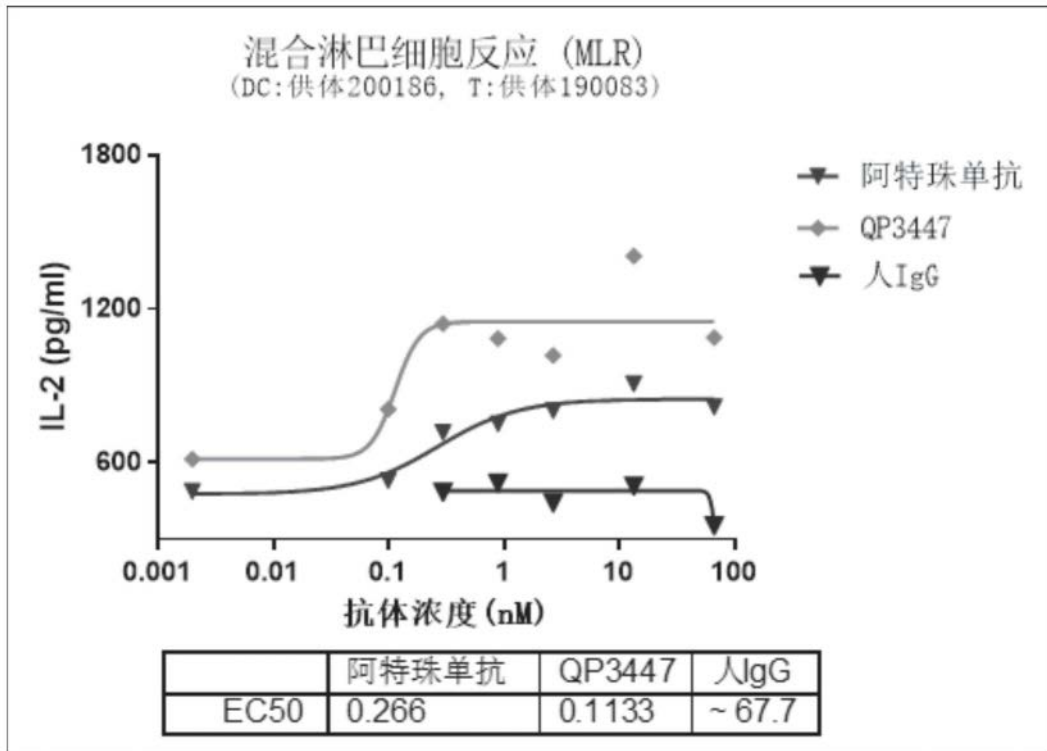


图23

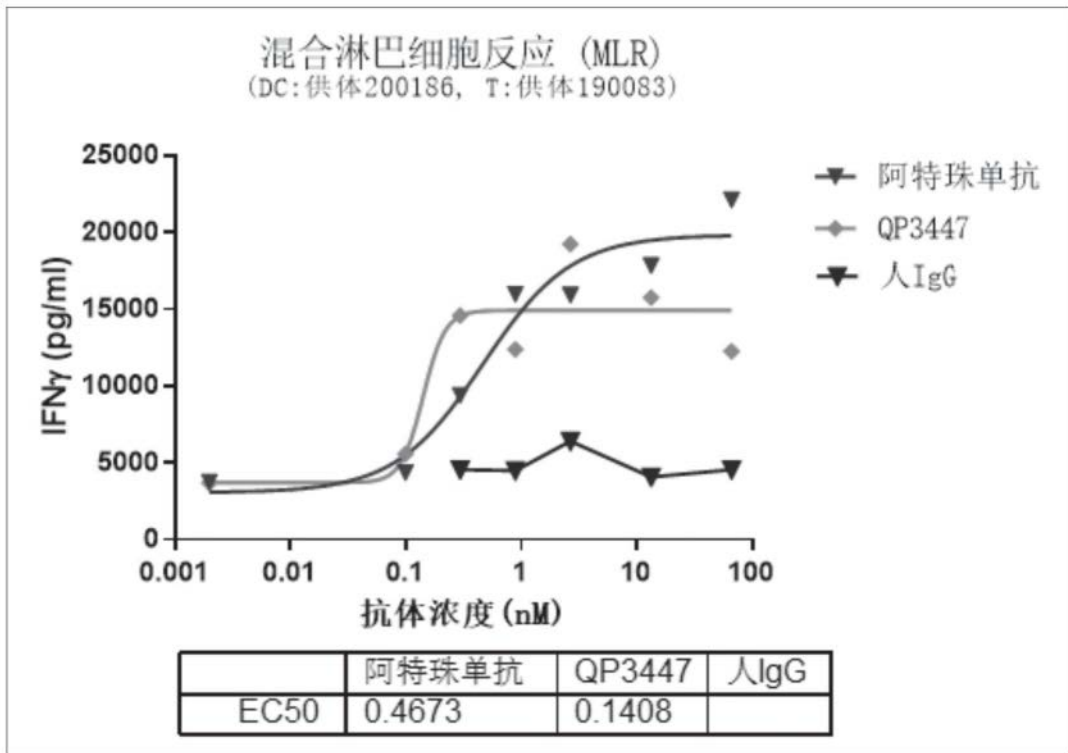


图24

MC38-hPDL1 在 C57BL/6-hPDL1小鼠上药效学试验

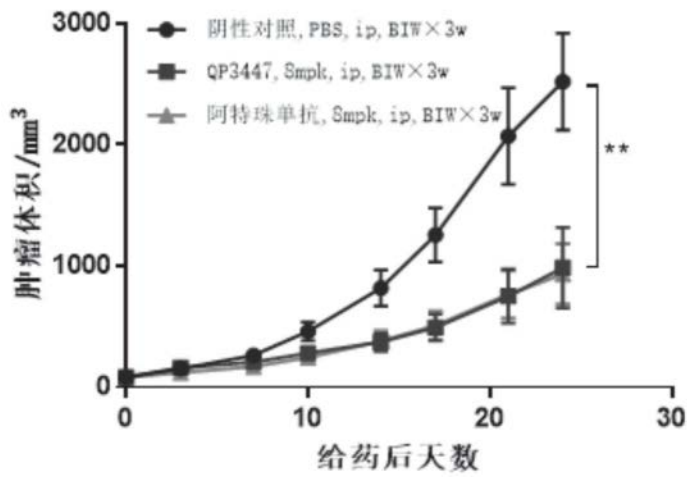


图25

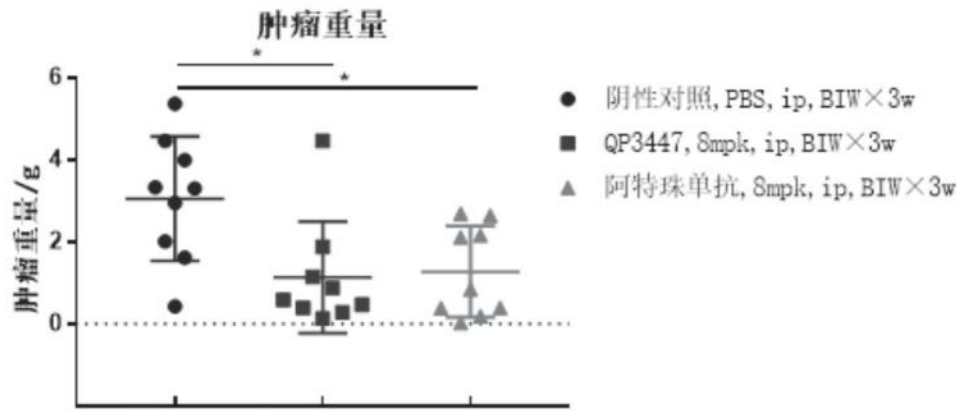


图26