



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111171150 B

(45) 授权公告日 2020.12.08

(21) 申请号 202010080450.1

A61P 25/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.02.05

A61P 19/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 11/00 (2006.01)

申请公布号 CN 111171150 A

A61P 13/12 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.05.19

A61P 17/00 (2006.01)

(73) 专利权人 北京智仁美博生物科技有限公司

A61P 11/02 (2006.01)

地址 101111 北京市大兴区经济技术开发

A61P 1/00 (2006.01)

区科创六街88号A3-501

A61P 19/08 (2006.01)

(72) 发明人 刘志刚 刘玉兰 郝小勃 张雪萍

郭晶晶

(56) 对比文件

CN 102027012 A, 2011.04.20

CN 104231081 A, 2014.12.24

WO 2020010108 A1, 2020.01.09

新闻.阿斯利康/安进tezepelumab获美国FDA.《中国处方药》.2018,

(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

Zhuang-Gui Chen等.Neutralization of

TSLP Inhibits Airway Remodeling in a Murine Model of Allergic Asthma Induced by Chronic Exposure to House Dust Mite.《PLOS ONE》.2013,

(51) Int.Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

审查员 苏存生

权利要求书2页 说明书19页

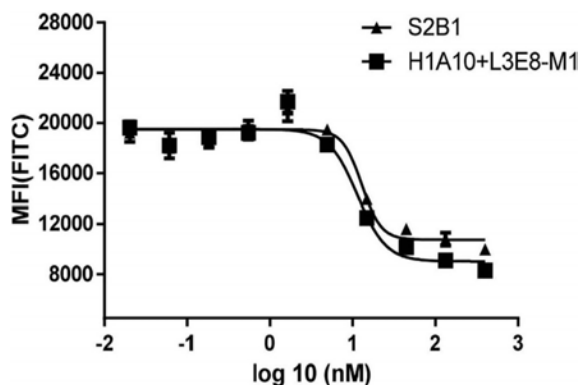
序列表21页 附图4页

(54) 发明名称

抗人TSLP抗体及其用途

(57) 摘要

本申请公开了结合人TSLP的抗体或其抗原结合部分,编码所述抗体或其抗原结合部分的核酸分子、包含所述核酸分子的载体、包含所述核酸分子或载体的宿主细胞、制备和纯化该抗体的方法及所述抗体或其抗原结合部分的应用。



1. 一种结合人TSLP的抗体,其包含含HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列的重链可变区和含LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列的轻链可变区,其中

所述HCDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:30、所述HCDR2氨基酸序列如SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:36所示、所述HCDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:32所示、所述LCDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:33所示、所述LCDR2氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示、所述LCDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示;

其中HCDR和LCDR氨基酸序列根据Kabat定义。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:22或者25所示。

3. 根据权利要求1所述的抗体,所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:23、24、26、27、28或者29所示。

4. 根据权利要求1所述的抗体,其中

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示;或者

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示;或者

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示;或者

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示;或者

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体,其中

所述抗体能够结合如SEQ ID NO:1所示的重组人TSLP和如SEQ ID NO:4所示的重组猴TSLP。

6. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体,其中所述抗体抑制人TSLP与人TSLP受体结合。

7. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体,其中

所述抗体为全抗体、Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段或单链Fv片段scFv。

8. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体,其中所述抗体为全人源抗体。

9. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体,其中所述抗体为单克隆抗体。

10. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体,其中所述抗体还包含选自IgG1亚型、IgG2亚型或IgG4亚型的重链恒定区。

11. 根据权利要求10所述的抗体,其中所述重链恒定区包含人IgG1亚型重链恒定区的Fc段序列并且所述Fc段序列的第234、235和331位的氨基酸序列分别为F、E和S,其中抗体恒定区氨基酸序列顺序按照EU numbering来确定。

12. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体,其中所述抗体还包含选自κ亚型或者λ亚型的轻链恒定区。

13. 核酸分子,其编码权利要求1-12中任一项所述的抗体或其抗原结合部分。

14. 药物组合物,其包含权利要求1-12中任一项所述的抗体和药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

15. 权利要求1-12中任一项所述的抗体或权利要求14所述的药物组合物在制备用于预防或治疗选自以下的疾病的药物中的用途:哮喘、硬皮病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、Churg-Strauss综合征、韦格纳肉芽肿、过敏性肺炎、特应性皮炎、鼻炎、克罗恩病、银屑病关节炎、慢性肾炎、斯耶格伦氏综合征以及多发性硬化。

## 抗人TSLP抗体及其用途

### 技术领域

[0001] 本申请大体涉及基因工程和抗体药物领域；具体而言，涉及抗人 TSLP抗体领域及其用途。本申请开发了新的抗人TSLP抗体，并提供了该抗体在预防或治疗TSLP介导的疾病中的用途。

### 背景技术

[0002] 人胸腺基质淋巴细胞生成素 (Thymic stromal lymphopoietin, TSLP) 也被称为 IL-7样细胞因子<sup>1</sup>，是IL-2细胞因子家族的一员。TSLP主要由胸腺、肺部、肠道和皮肤的上皮细胞分泌<sup>2,3</sup>，其次是一些纤维母细胞、气道平滑肌内皮细胞、肥大细胞、单核细胞、粒细胞、DC细胞<sup>4-14</sup>。TSLP的表达受到一些因子调控，如过敏原、前期促炎症因子 (IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IL-4、IL-13)、Th2因子、创伤、机械损伤、细菌等<sup>15-18</sup>。

[0003] TSLP受体 (Thymic stromal lymphopoietin receptor, TSLPR) 属于造血因子受体家族成员，为I型细胞因子受体蛋白。TSLPR包括IL-7 受体 $\alpha$ 链 (IL-7R $\alpha$ ) 和TSLP受体 $\alpha$ 链 (TSLPR $\alpha$ )，只有受体复合物共同作用时才可具备高亲和力<sup>19</sup>。TSLPR (TSLP和IL-7的共受体) 主要表达于成熟DC细胞、肥大细胞以及一些激活的T细胞表面<sup>20</sup>。

[0004] 哮喘是一种以气道炎症为特征的慢性疾病，临床特征表现为反复发作的喘息、气促、胸闷和咳嗽等症状<sup>21</sup>。在全球范围内，大约有3 亿人患有哮喘<sup>22</sup>。近二十年来全球哮喘患病率大约每年以1%的速度递增。现有的治疗药物包括支气管扩张剂、糖皮质激素、两者的联合制剂 (舒利迭、信必可)、白三烯调节剂、长效胆碱能受体拮抗剂 (噻托溴胺)、IgE抗体等，都不能控制所有哮喘患者病情。

[0005] 大量研究证明约2/3的严重哮喘表现为Th2类细胞因子过表达，TSLP是引起Th2类细胞因子过表达的一个重要因子。TSLP-TSLPR 作用主要是通过JAK-STAT信号通路完成的<sup>2</sup>。研究认为TSLP的上调，会与DC细胞上的TSLPR结合引起JAK活化，招募转录因子 STAT5，引起下游信号转导，最终导致DC细胞的活化。DC细胞活化表现出共刺激分子的表达上调 (如CD80、CD40、CD86) 和趋化因子的分泌 (TARC/CCL17、MDC/CCL22和I-309/CCL1)，从而提供给Th0 向Th2细胞分化的有利微环境，引导Th2细胞为主的炎症反应，且伴随因子 (IL-4、IL-13、IL-5) 释放<sup>11,12,23,24</sup>。TSLP转基因鼠易受特异抗原诱导而发生哮喘，而TSLP受体敲除的小鼠症状则明显减轻<sup>24</sup>。从哮喘和炎症的发生机制分析，抗细胞因子 (IL-4、IL-13、IL-5) 药物仅靶向于驱动哮喘炎症的特定炎性分子，只适合某些类型的重症哮喘患者即亚组患者，如嗜酸性粒细胞性哮喘。TSLP与IL4、IL5等靶点明显不同，TSLP在炎症级联反应的早期上游活动，可能适用于广泛的重症不受控哮喘患者。

[0006] 研究人员对于靶向TSLP的药物进行了大量的探索和研究。在螨尘诱导的小鼠哮喘模型中抗TSLP单克隆抗体可有效阻断 TSLP/TSLPR作用，逆转气道炎症，预防组织结构改变，降低气道高反应性 (AHR) 以及TGF- $\beta$ 1水平<sup>25</sup>。在血清蛋白诱导小鼠哮喘模型中，抗TSLP单克隆抗体有效地降低了Th2类因子 (IL-4、IL-5等) 的表达<sup>26</sup>。抗TSLP单克隆抗体的安全性在猴体内也得到充分证实。而且，全球范围内，唯一临床在研的抗TSLP单克隆抗体在早期临床

中显示出良好的客观反应率,有效缓解受试患者的病症<sup>27</sup>。

[0007] 因此,鉴于抗TSLP抗体具有广泛的适用性,基于临床需求,探索和研发抗TSLP的抗体具有重要的生物学和医学意义。

[0008] 发明概述

[0009] 第一方面,本申请提供了一种结合人TSLP的抗体,其包含含 HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列的重链可变区和含LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列的轻链可变区,其中

[0010] 所述HCDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:30、所述HCDR2氨基酸序列如SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:36所示、所述HCDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:32所示、所述LCDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:33 所示、所述LCDR2氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示、所述LCDR3 氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示;

[0011] 其中HCDR和LCDR氨基酸序列根据Kabat定义。

[0012] 在一些实施方案中,所述抗体的重链可变区的氨基酸如SEQ ID NO:22或者25所示。

[0013] 在一些实施方案中,所述抗体的轻链可变区的氨基酸如SEQ ID NO:23、24、26、27、28或者29所示。

[0014] 在一些实施方案中,所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示;或者

[0015] 所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示;或者

[0016] 所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示;或者

[0017] 所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示;或者

[0018] 所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示。

[0019] 第二方面,本申请提供了一种结合人TSLP的抗体,其中所述抗体的重链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:22和25中任何一项具有至少90%的同源性,并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:23、24、26、27、28和29中任何一项具有至少90%的同源性。

[0020] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中,所述抗体能够结合重组人TSLP (SEQ ID NO:1) 和重组猴TSLP (SEQ ID NO:4)。

[0021] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中,所述抗体抑制人 TSLP与人TSLP受体结合。

[0022] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中,所述抗体为所述抗体为全抗体、Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段或单链Fv片段(scFv)。

[0023] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中,所述抗体为全人源抗体。

[0024] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中,所述抗体为单克隆抗体。

[0025] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中,所述抗体还包含选自 IgG1亚型、IgG2亚型或IgG4亚型的重链恒定区。

[0026] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中,所述抗体还包含选自 $\kappa$ 亚型或者 $\lambda$ 亚型的轻链恒定区。

[0027] 第三方面,本申请提供了核酸分子,其编码第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合部分。

[0028] 第四方面,本申请提供了药物组合物,其包含第一方面或第二方面所述的抗体和药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0029] 在一些实施方案中,所述药物组合物用于预防或治疗TSLP介导的疾病。

[0030] 在一些实施方案中,所述TSLP介导的疾病为自身免疫疾病或炎性疾病,例如哮喘、硬皮病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、Churg-Strauss综合征、韦格纳肉芽肿(Wegener's granulomatosis)、肺出血-肾炎综合征、过敏性肺炎、特应性皮炎、鼻炎、克罗恩病、强直性脊柱炎、风湿热、纤维肌痛、银屑病关节炎、慢性肾炎、斯耶格伦氏综合征以及多发性硬化等。

[0031] 第五方面,本申请提供了第一方面或第二方面所述的抗体在制备用于预防或治疗TSLP介导的疾病的药物中的用途。

[0032] 在第五方面的一些实施方案中,所述TSLP介导的疾病为自身免疫疾病或炎性疾病,例如哮喘、硬皮病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、Churg-Strauss综合征、韦格纳肉芽肿(Wegener's granulomatosis)、肺出血-肾炎综合征、过敏性肺炎、特应性皮炎、鼻炎、克罗恩病、强直性脊柱炎、风湿热、纤维肌痛、银屑病关节炎、慢性肾炎、斯耶格伦氏综合征以及多发性硬化等。

[0033] 第六方面,本申请提供了预防或治疗TSLP介导的疾病的方法,包括向有需要的个体给予第一方面或第二方面所述的抗体或第四方面所述的药物组合物。

[0034] 在第六方面的一些实施方案中,所述TSLP介导的疾病为自身免疫疾病或炎性疾病,例如哮喘、硬皮病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、Churg-Strauss综合征、韦格纳肉芽肿(Wegener's granulomatosis)、肺出血-肾炎综合征、过敏性肺炎、特应性皮炎、鼻炎、克罗恩病、强直性脊柱炎、风湿热、纤维肌痛、银屑病关节炎、慢性肾炎、斯耶格伦氏综合征以及多发性硬化等。

## 附图说明

[0035] 图1显示化学发光法细胞活力测定分析抗人TSLP单克隆抗体抑制TSLP对BAF3-TSLPR/IL-7R $\alpha$ 细胞的增殖促进作用的能力。

[0036] 图2显示ELISA分析不同抗人TSLP单克隆抗体抑制TSLP刺激 PBMC分泌TARC的能力。

[0037] 图3显示化学发光法细胞活力测定分析抗人TSLP的轻链突变体 S2B1VH-h1+L3E8抑制TSLP对BAF3-TSLPR/IL-7R $\alpha$ 细胞的增殖促进作用的能力。

[0038] 图4显示化学发光法细胞活力测定分析抗人TSLP的去DG、NG 突变体H1A10+L3E8抑制TSLP对BAF3-TSLPR/IL-7R $\alpha$ 细胞的增殖促进作用的能力。

[0039] 图5显示流式细胞仪分析人源化抗TSLP单克隆抗体 H1A10+L3E8-M1有效阻断TSLP和细胞表面的TSLPR结合的能力。

[0040] 图6显示化学发光法细胞活力测定分析不同抗人TSLP的L3E8 人源化突变体H1A10

+L3E8-M1、H1A10+L3E8-M2、H1A10+L3E8-M3 和H1A10+L3E8-M4抑制TSLP对BAF3-TSLPR/IL-7R $\alpha$ 细胞的增殖促进作用的能力。

[0041] 图7显示ELISA分析不同抗人TSLP的L3E8人源化突变体 H1A10+L3E8-M1、H1A10+L3E8-M2、H1A10+L3E8-M3和 H1A10+L3E8-M4抑制TSLP刺激PBMC分泌TARC的能力。

[0042] 图8显示ELISA分析重组抗TSLP单克隆抗体与不同种属TSLP 的结合能力。

[0043] 图9显示ELISA分析L3E8人源化突变体与Tezepelumab结合TSLP的不同表位的结果。

[0044] 序列说明

[0045] SEQ ID NO:1显示长版本人 (homo sapiens) TSLP胞外区 (hTSLP1) 的氨基酸序列。

[0046] SEQ ID NO:2显示短版本人 (homo sapiens) TSLP胞外区 (hTSLP2) 的氨基酸序列。

[0047] SEQ ID NO:3显示小鼠 (mus musculus) TSLP胞外区 (mTSLP) 的氨基酸序列。

[0048] SEQ ID NO:4显示食蟹猴 (Macaca fascicularis) TSLP胞外区 (mfTSLP) 的氨基酸序列。

[0049] SEQ ID NO:5显示删除弗林蛋白酶识别位点的hTSLP1突变体的氨基酸序列。

[0050] SEQ ID NO:6显示删除弗林蛋白酶识别位点的hTSLP2突变体的氨基酸序列。

[0051] SEQ ID NO:7显示删除弗林蛋白酶识别位点的mfTSLP突变体的氨基酸序列。

[0052] SEQ ID NO:8显示His标签 (His) 的氨基酸序列。

[0053] SEQ ID NO:9显示人 (homo sapiens) IgG1抗体的Fc段 (hFc) 的氨基酸序列。

[0054] SEQ ID NO:10显示小鼠 (mus musculus) IgG2a抗体的Fc段 (mFc) 的氨基酸序列。

[0055] SEQ ID NO:11显示人 (homo sapiens) IgG1亚型重链恒定区的氨基酸序列。

[0056] SEQ ID NO:12显示人 (homo sapiens) IgG2亚型重链恒定区的氨基酸序列。

[0057] SEQ ID NO:13显示人 (homo sapiens) IgG4亚型重链恒定区的氨基酸序列。

[0058] SEQ ID NO:14显示小鼠 (mus musculus) IgG1亚型重链恒定区的氨基酸序列。

[0059] SEQ ID NO:15显示小鼠 (mus musculus) IgG2a亚型重链恒定区的氨基酸序列。

[0060] SEQ ID NO:16显示人 (homo sapiens)  $\kappa$ 亚型轻链恒定区的氨基酸序列。

[0061] SEQ ID NO:17显示人 (homo sapiens)  $\lambda$ 亚型轻链恒定区的氨基酸序列。

[0062] SEQ ID NO:18显示小鼠 (mus musculus)  $\kappa$ 亚型轻链恒定区的氨基酸序列。

[0063] SEQ ID NO:19显示小鼠 (mus musculus)  $\lambda$ 亚型轻链恒定区的氨基酸序列。

[0064] SEQ ID NO:20显示抗人TSLP对照抗体Tezepelumab的轻链可变区氨基酸序列。

[0065] SEQ ID NO:21显示抗人TSLP对照抗体Tezepelumab的重链可变区氨基酸序列。

[0066] SEQ ID NO:22显示抗人TSLP抗体S2B1的重链可变区 (S2B1VH) 的氨基酸序列,其CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32所示。

[0067] SEQ ID NO:23显示抗人TSLP抗体S2B1的轻链可变区 (S2B1VK) 的氨基酸序列,其CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35所示。

[0068] SEQ ID NO:24显示轻链可变区突变体L3E8的氨基酸序列。

[0069] SEQ ID NO:25显示重链可变区突变体H1A10氨基酸序列,其 CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:36所示。

[0070] SEQ ID NO:26显示轻链L3E8人源化突变体L3E8-M1的氨基酸序列。

[0071] SEQ ID NO:27显示轻链L3E8人源化突变体L3E8-M2的氨基酸序列。

[0072] SEQ ID NO:28显示轻链L3E8人源化突变体L3E8-M3的氨基酸序列。

[0073] SEQ ID NO:29显示轻链L3E8人源化突变体L3E8-M4的氨基酸序列。

[0074] SEQ ID NO:37显示引物PmCGR的核苷酸序列。

[0075] SEQ ID NO:38显示引物PmCKR的核苷酸序列。

[0076] 发明详细描述

[0077] 本申请的发明人通过抗体工程技术得到了新的抗人TSLP抗体。在本申请的多个方面,提供了新的抗人TSLP抗体或其抗原结合片段,编码该抗体或其抗原结合片段的核酸分子、包含所述核酸分子的载体、包含所述核酸分子或载体的宿主细胞、制备和纯化该抗体的方法及所述抗体或其抗原结合片段的医学和生物学应用。根据本申请提供的抗体的可变区的序列,可构建全长的抗体分子作为药物用于治疗临床上由TSLP介导的疾病。

[0078] 除非另外指明,本申请的实施采用本领域常规的分子生物学、微生物学、细胞生物学、生物化学以及免疫学技术。

[0079] 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。

[0080] 定义

[0081] 如本文所用术语“抗体”,是指能够经由至少一个位于免疫球蛋白分子的可变区中的抗原识别位点特异性结合到靶标的免疫球蛋白分子。靶标包括但不限于碳水化合物、多聚核苷酸、脂质、多肽等。本文所使用的“抗体”不仅包括完整的(即全长的)抗体,而且还包括其抗原结合片段(例如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv)、其变异体、包含抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体、双抗体、线性抗体、单链抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)及任何其他包含所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的修改配置,包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体及共价修饰的抗体。

[0082] 通常,完整或全长的抗体包含两个重链和两个轻链。每个重链含有重链变异区(VH)和第一、第二及第三恒定区(CH1、CH2及CH3)。每个轻链含有轻链变异区(VL)和恒定区(CL)。全长的抗体可以是任何种类的抗体,例如IgD、IgE、IgG、IgA或IgM(或上述的子类),但抗体不需要属于任何特定的类别。根据重链的恒定域的抗体氨基酸序列,可以将免疫球蛋白指定为不同的类别。通常,免疫球蛋白有五种主要的类别:IgA、IgD、IgE、IgG及IgM,而且这些类别中有几个可以再被进一步区分成子类(同型),例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。对应于不同免疫球蛋白类别的重链恒定域分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、以及 $\mu$ 。不同类别的免疫球蛋白的子单元结构和三维结构是公知的。

[0083] 如本文所用术语“抗原结合片段或抗原结合部分”,是指负责结合抗原的完整抗体分子的一部分或区域。抗原结合域可以包含重链变异区(VH)、轻链变异区(VL)或上述两者。VH和VL中的每个通常含有三个互补决定区CDR1、CDR2及CDR3。

[0084] 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Chothia定义和kabat定义。(参阅例如Kabat,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,National Institutes of Health,Bethesda,Md. (1991);A1-Lazikani等人,J.Mol.Biol.273:927-948(1997);以及Martin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:9268-9272(1989)。对于给定抗体的可变区序列,可以根据Chothia定义或者Kabat定义来确定VH和VL序列中的CDR序列。在本申请的实施方案中,利用



Chothia定义CDR序列。

[0085] 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的CDR序列,例如可以利用在线软件Abysis确定 (<http://www.abysis.org/>)。

[0086] 抗原结合片段的实例包括但不限于:(1)Fab片段,其可以是具有VL-CL链和VH-CH1链的单价片段;(2) $F(ab')_2$ 片段,其可以是具有两个Fab'片段的二价片段,该两个Fab'片段由铰链区的二硫桥(即Fab'的二聚物)连接;(3)具有抗体的单臂的VL和VH域的Fv片段;(4)单链Fv(scFv),其可以是由VH域和VL域经由胜肽连接符组成的单一多胜肽链;以及(5) $(scFv)_2$ ,其可以包含两个由胜肽连接符连接的VH域和两个VL域,该两个VL域是经由二硫桥与该两个VH域组合。

[0087] 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。

[0088] 如本文所用术语“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。

[0089] 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。

[0090] 如本文所用术语“单克隆抗体”指由基本同质的抗体群体获得的抗体,即,除了可能在少量个体中存在自然发生的突变以外,组成群体的各个抗体是相同的。本文所述单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与来源于具体物种或属于具体抗体类或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,而重链和/或轻链的余下部分与来源于另一物种或属于另一抗体类或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,并且还包含这样的抗体的片段,只要它们能表现出所期望的生物学活性(美国专利号4,816,567;和 Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。

[0091] 如本文所用术语“同源性”被定义为经过序列比对和引入空位后,氨基酸或核苷酸序列变体中相同的残基的百分比,如果需要,达到最大百分比的同源性。用于比对的方法和计算机程序在本领域内是公知的。

[0092] 如本文所用术语“自身免疫病”是指自机体对自身抗原发生免疫反应而导致自身组织损害所引起的疾病,包括但不限于硬皮病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、Churg-Strauss综合征、韦格纳肉芽肿(Wegener's granulomatosis)和肺出血-肾炎综合征等。

[0093] 如本文所用术语“炎性疾病”是指炎症作为其主要破坏因子的疾病的统称。炎症为组织对有害刺激的生物反应,其是一种病变,并且伴随有组织退化、循环紊乱和液体渗出三种事件,以及肥大。炎性疾病的实例包括急性和慢性疾病,包括但不限于哮喘、过敏性肺炎、特应性皮炎、鼻炎、克罗恩病、强直性脊柱炎、风湿热、纤维肌痛、银屑病关节炎、慢性肾炎、斯耶格伦氏综合征以及多发性硬化等。

[0094] 第一方面,本申请提供了一种结合人TSLP的抗体,其包含含HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列的重链可变区和含LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列的轻链可变区,其中

[0095] 所述HCDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:30、所述HCDR2氨基酸序列如SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:36所示、所述HCDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:32所示、所述LCDR1氨基酸序列如

SEQ ID NO:33 所示、所述LCDR2氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示、所述LCDR3 氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示；

[0096] 其中HCDR和LCDR氨基酸序列根据Kabat定义。

[0097] 在一些实施方案中，所述抗体的重链可变区的氨基酸如SEQ ID NO:22或者25所示。

[0098] 在一些实施方案中，所述抗体的轻链可变区的氨基酸如SEQ ID NO:23、24、26、27、28或者29所示。

[0099] 在一些实施方案中，所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示，所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示；或者

[0100] 所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示，所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示；或者

[0101] 所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示，所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示；或者

[0102] 所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示，所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示；或者

[0103] 所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示，所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示。

[0104] 第二方面，本申请提供了一种结合人TSLP的抗体，其中所述抗体的重链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:22和25中任何一项具有至少90%的同源性，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:23、24、26、27、28和29中任何一项具有至少90%的同源性。

[0105] 在第二方面的一些实施方案中，所述抗体的重链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:22和25中任何一项具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同源性。

[0106] 在第二方面的一些实施方案中，所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:23、24、26、27、28和29中任何一项具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同源性。

[0107] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中，所述抗体能够结合重组人TSLP (SEQ ID NO:1) 和重组猴TSLP (SEQ ID NO:4)。

[0108] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中，所述抗体抑制人 TSLP与人TSLP受体结合。

[0109] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中，所述抗体为全抗体、Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段或单链Fv片段(scFv)。

[0110] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中，所述抗体为全人源抗体。

[0111] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中，所述抗体为单克隆抗体。

[0112] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中，所述抗体还包含选自 IgG1亚型、IgG2亚型或IgG4亚型的重链恒定区。

[0113] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中，所述抗体的重链恒定区可以是人IgG1亚型、人IgG2亚型、人IgG4亚型、鼠IgG1亚型或鼠IgG2a亚型。

[0114] 在第一方面和第二方面的一些具体实施方案中,所述重链恒定区为IgG4亚型或IgG1亚型。

[0115] 在第一方面和第二方面的一些具体实施方案中,所述抗体的重链恒定区包含人IgG1亚型重链恒定区的Fc段序列并且所述Fc序列的第234、235和331位的氨基酸序列分别为F、E和S,其中抗体恒定区氨基酸序列顺序按照EU numbering来确定。

[0116] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中,所述抗体还包含选自κ亚型或者λ亚型的轻链恒定区。

[0117] 在第一方面和第二方面的一些实施方案中,所述抗体的轻链恒定区可以是人κ亚型、人λ亚型、鼠κ亚型或者鼠λ亚型。

[0118] 第三方面,本申请提供了核酸分子,其编码第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合部分。

[0119] 在一些实施方案中,所述核酸分子可操作地连接到调控序列,调控序列可以被用所述载体转化过的宿主细胞识别。

[0120] 第四方面,本申请提供了药物组合物,其包含第一方面或第二方面所述的抗体和药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0121] 在一些实施方案中,所述药物组合物用于预防或治疗TSLP介导的疾病。

[0122] 在一些实施方案中,所述TSLP介导的疾病为自身免疫疾病或炎性疾病,例如哮喘、硬皮病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、Churg-Strauss综合征、韦格纳肉芽肿(Wegener's granulomatosis)、肺出血-肾炎综合征、过敏性肺炎、特应性皮炎、鼻炎、克罗恩病、强直性脊柱炎、风湿热、纤维肌痛、银屑病关节炎、慢性肾炎、斯耶格伦氏综合征以及多发性硬化等。

[0123] 在一些实施方案中,所述药物组合物还可包含下述中的一种或多种: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。

[0124] 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。

[0125] 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。

[0126] 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。

[0127] 第五方面,本申请提供了第一方面或第二方面所述的抗体在制备用于预防或治疗TSLP介导的疾病的药物中的用途。

[0128] 在一些实施方案中,所述TSLP介导的疾病为自身免疫疾病或炎性疾病,例如哮喘、硬皮病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、Churg-Strauss综合征、韦格纳肉芽肿(Wegener's granulomatosis)、肺出血-肾炎综合征、过敏性肺炎、特应性皮炎、鼻炎、克罗恩病、强直性脊柱炎、风湿热、纤维肌痛、银屑病关节炎、慢性肾炎、斯耶格伦氏综合征以及多发性硬化等。

[0129] 第六方面,本申请提供了预防或治疗TSLP介导的疾病的方法,包括向有需要的个

体给予第一方面或第二方面所述的抗体或第四方面所述的药物组合物。

[0130] 在一些实施方案中,所述TSLP介导的疾病为自身免疫疾病或炎性疾病,例如哮喘、硬皮病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、Churg-Strauss综合征、韦格纳肉芽肿(Wegener's granulomatosis)、肺出血-肾炎综合征、过敏性肺炎、特应性皮炎、鼻炎、克罗恩病、强直性脊柱炎、风湿热、纤维肌痛、银屑病关节炎、慢性肾炎、斯耶格伦氏综合征以及多发性硬化等。

[0131] 在其他方面,本申请还提供编码本发明抗体或其轻链或重链的分离的核酸分子以及包含所述核酸分子的载体、包含所述载体的宿主细胞以及产生所述抗体的方法。在一些实施方案中,所述核酸分子可操作地连接到调控氨基酸序列,调控氨基酸序列可以被用所述载体转化过的宿主细胞识别。在一些实施方案中,产生抗体的方法包括培养宿主细胞以便于表达核酸。在一些实施方案中,产生抗体的方法还包括从宿主细胞培养基中回收抗体。

[0132] 此外,本文所述的特异性结合人TSLP的抗体也可用于检测生物样品中TSLP的存在。基于抗体的检测方法在本领域是众所周知的,并且包括例如ELISA、免疫印迹、放射免疫试验、免疫荧光、免疫沉淀以及其它相关技术。

[0133] 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。

## 实施例

[0134] 以下实施例仅用于说明而非限制本申请范围的目的。

[0135] 实施例1:重组蛋白的制备

[0136] 制备抗TSLP单克隆抗体的过程中需要用到多种不同的重组蛋白,包括长版本的人TSLP胞外区(hTSLP1,SEQ ID NO:1)、短版本的人TSLP胞外区(hTSLP2,SEQ ID NO:2)、小鼠TSLP胞外区(mTSLP,SEQ ID NO:3)和食蟹猴TSLP胞外区(mfTSLP1,SEQ ID NO:4)。这些蛋白具有大量的翻译后修饰(如糖基化或者二硫键等),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,为避免hTSLP1、hTSLP2和mfTSLP1中的弗林蛋白酶识别位点对TSLP蛋白活性的影响,分别构建删除弗林蛋白酶识别位点的hTSLP1突变体(hTSLP1-m,SEQ ID NO:5)、hTSLP2突变体(hTSLP2-m,SEQ ID NO:6)、mfTSLP1突变体(mfTSLP1-m,SEQ ID NO:7)。同时,在这些重组蛋白的C端添加了His标签(His,SEQ ID NO:8)或者人抗体IgG1的Fc段(hFc,SEQ ID NO:9)或者鼠抗体IgG2a的Fc段(mFc,SEQ ID NO:10),将更有利于重组蛋白的纯化和单克隆抗体功能的鉴定。抗体重链恒定区可以是人IgG1亚型(SEQ ID NO:11)、人IgG2亚型(SEQ ID NO:12)、人IgG4亚型(SEQ ID NO:13)或者鼠IgG1亚型(SEQ ID NO:14)、鼠IgG2a亚型(SEQ ID NO:15),轻链恒定区可以是人 $\kappa$ 亚型(SEQ ID NO:16)、人 $\lambda$ 亚型(SEQ ID NO:17)或者鼠 $\kappa$ 亚型(SEQ ID NO:18)、鼠 $\lambda$ 亚型(SEQ ID NO:19)。

[0137] 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标签或者hFc、mFc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)或者其他阳离子转染试剂(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3-4天。然后通过离心等方式收获培养上清。

[0138] His标签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。hFc和 mFc融合表达的重组蛋白用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)或者其他合适的缓冲液。必要时,可以对抗体样品进行过滤除菌,然后分装保存于-20℃。

[0139] 实施例2:鼠抗人TSLP单克隆抗体的制备

[0140] 2.1小鼠免疫及免疫抗体库的制备

[0141] 取6-8周龄BALB/c小鼠,首次免疫每只小鼠腹腔注射50μg融合蛋白hTSLP1-m-His加弗氏完全佐剂,之后间隔两周加强免疫,每只小鼠腹腔注射50μg融合蛋白加弗氏不完全佐剂,共加强4次。末次免疫,以不加佐剂的hTSLP1-m-His融合蛋白作为免疫原,每只小鼠腹腔注射50μg融合蛋白,冲击免疫后3天处死小鼠,收集脾细胞。

[0142] 使用小鼠淋巴细胞分离液(达科为生物技术股份有限公司, CAT#DKW33-R0100)分离小鼠脾脏淋巴细胞,利用细胞总RNA提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司, CAT#DP430)提取淋巴细胞总 RNA。以提取的总RNA为模板,利用第一链cDNA合成试剂盒(Thermo scientific, CAT#K1621)分别合成重链可变区和轻链可变区,反转录引物采取基因特异性引物,引物配对区分别位于抗体重链恒定区和抗体轻链恒定区,具体序列分别为PmCGR: TGCATTTGAACTCCTTGCC (SEQ ID NO:37)和PmCKR: CCATCAATCTTCCACTTGAC (SEQ ID NO:38)。合成的cDNA立即存放于-70℃保存备用。然后以反转录得到的cDNA为模板,参考文献(Krebber, A., et al. "Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system." *Journal of Immunological Methods* 201.1 (1997): 35-55),通过引用方式将上述文献的全部内容并入本文)合成引物,并利用PCR分别扩增鼠抗体VH和VK基因,然后利用重叠延伸PCR技术,构建单链抗体(scFv)基因。最后将制备的小鼠单链抗体基因克隆至载体pADSCFV-S(实验技术流程可参见第 201510097117.0号中国专利申请的实施例1,通过引用方式将上述专利申请的全部内容并入本文),构建scFv库。抗体库的库容达到  $1 \times 10^8$ ,正确率为50%。

[0143] 2.2抗人TSLP单克隆抗体的筛选

[0144] 以实施例1制备的重组人TSLP1-m-his为抗原,利用固相筛选策略(实验方案参考噬菌体展示:通用实验指南/(美)克拉克森(Clackson, T.), (美)洛曼(Lowman, H. B.)编;马岚等译。化学工业出版社, 2008.5)筛选上述2.1构建的展示小鼠单链抗体的噬菌体库,通过结合、洗脱、中和、感染、扩增的方式共进行三轮筛选,最终获得多株序列不同,但均能结合人和猴TSLP的单链抗体,包括克隆S2B1、S1A3、S1B3、S2A10、S2B9、S2D10、S2E4和S2G2。

[0145] 实施例3:鼠抗人TSLP单克隆抗体的鉴定

[0146] 利用常规分子生物学方法,将编码S2B1、S1A3、S1B3、S2A10、S2B9、S2D10、S2E4和S2G2八种分子的轻链和重链的核酸分子分别克隆至真核表达载体,制备重组人IgG4-κ形式鼠-人嵌合抗体。同时,参照美国专利US9284372B2制备人源抗TSLP单克隆抗体 Tezepelumab (AMG 157, MEDI9929)(轻链氨基酸序列如SEQ ID NO: 20所示;重链氨基酸序

列如SEQ ID NO:21所示;专利中的克隆号为A5)作为阳性对照抗体。

### [0147] 3.1重组鼠抗TSLP单克隆抗体的亲和力分析

[0148] 利用Biacore X100通过表面等离子共振技术测定抗TSLP抗体 (S2B1、S1A3、S1B3、S2A10、S2B9、S2D10、S2E4、S2G2和Tezepelumab) 的亲和力。氨基偶联试剂盒 (BR-1000-50)、人抗体捕获试剂盒 (BR-1008-39),CM5芯片 (BR100012)和pH7.4的10× HBS-EP (BR100669)等相关试剂和耗材均购自GE healthcare。依照试剂盒说明书,用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride,EDC) 和N-羟基琥珀酰亚胺 (N-Hydroxysuccinimide,NHS)对羧基化CM5芯片表面进行活化,将抗人IgG (Fc) 抗体(捕获抗体)用10mM pH5.0乙酸钠稀释至25μg/mL,之后以流速10μL/min注射以实现大约10000个响应单位 (RU) 的偶联量。注射捕获抗体之后,注射1M乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量,稀释抗TSLP抗体至0.5-1μg/mL, 10μL/min注射,保证100RU左右的抗体被抗人Fc的抗体捕获。然后将hTSLP1-m-his设置一系列的浓度梯度(例如0.625nM、1.25nM、2.5nM、5nM、10nM),于25℃下30μL/min从低浓度到高浓度进行注射,结合时间为120s,解离时间为3600s,以10μL/min注射3M的 MgCl<sub>2</sub>溶液30s对芯片表面进行再生。使用Biacore X100评估软件 2.0.1版,通过1:1结合模型拟合结合和解离传感图来计算结合速率 (K<sub>on</sub>)和解离速率 (K<sub>off</sub>)。以比率K<sub>off</sub>/K<sub>on</sub>计算解离平衡常数 (KD)。拟合结果如表1所示。

[0149] 表1.重组鼠抗TSLP单克隆抗体结合hTSLP的亲和力常数

[0150]

	K <sub>on</sub>	K <sub>off</sub>	KD
S2B1-IgG4	2.377E+6	2.188E-5	9.204E-12
S2G2-IgG4	1.353E+6	1.348E-5	9.967E-12
S2A10-IgG4	1.625E+6	2.374E-5	1.461E-11
S1A3-IgG4	4.695E+6	6.565E-5	1.398E-11
S1B3-IgG4	2.338E+6	2.737E-4	1.171E-10
S2E4-IgG4	1.636E+7	4.191E-3	2.563E-10
S2B9-IgG4	1.291E+6	1.437E-5	1.113E-11
Tezepelumab	1.27E+7	2.565E-5	2.019E-12

[0151] 3.2重组鼠抗TSLP单克隆抗体抑制TSLP对BAF3-TSLPR/IL-7R $\alpha$ 细胞的增殖促进作用

[0152] BAF3-TSLPR/IL-7R $\alpha$ 是一株TSLPR高表达的稳转细胞株,且依赖mIL-3增殖。在没有mIL-3的条件下,TSLP可以有效促进 BAF3-TSLPR/IL-7R $\alpha$ 细胞的增殖,通过该方法可有效评价抗TSLP单克隆抗体对TSLP的抑制作用。实验中,使用去掉mIL-3的完全培养基对BAF3-TSLPR/IL-7R $\alpha$ 细胞预培养两天。实验当天,离心重悬细胞至1×10<sup>6</sup>个/mL,加50μL/孔至96孔平底细胞培养板;重组抗TSLP单克隆抗体 (S2B1、S1A3、S1B3、S2A10、S2B9、S2D10、S2E4和S2G2) 以及阳性对照抗体 (Tezepelumab) 都以终浓度60μg/mL起始,第二个浓度是30μg/mL,之后8个点均是5倍梯度稀释,稀释后的抗 TSLP单克隆抗体与终浓度是0.35ng/mL的hTSLP-m-his等体积预混 30min,后与BAF3-TSLPR/IL-7R $\alpha$ 细胞混合孵育,总体积是150μL/孔。48h后,使用CellTiter-Glo<sup>®</sup>化学发光法细胞活力测定试剂盒 (Promega,Cat#G7570),利用多

功能酶标仪 (SpectraMax® I3X) 检测细胞增殖情况。以化学发光读值结果进行拟合分析, 结果(图1) 显示, 所有的重组抗TSLP单克隆抗体以及阳性对照抗体Tezepelumab都可有效抑制TSLP的作用。

[0153] 3.3重组鼠抗TSLP单克隆抗体抑制TSLP刺激PBMC分泌TARC的作用

[0154] 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:

[0155] 1. 年龄大于18周岁;

[0156] 2. 无HIV、HBV感染;

[0157] 3. 血常规检测正常;

[0158] 4. 非孕妇或哺乳期妇女。

[0159] 使用Ficoll密度梯度离心法从健康人外周血中分离人外周血单个核细胞(PBMC)。

[0160] TSLP与树突细胞上的TSLPR结合, 会引起树突细胞的活化, 树突细胞活化表现出趋化因子(如TARC, 又名CCL17)的分泌。通过检测TARC可有效评价重组抗TSLP抗体对TSLP的抑制作用。用含有10%(灭活)血清的R1640培养基重悬PBMC至 $2.5 \times 10^6$ 个/mL, 加入到96孔平底细胞培养板(50 $\mu$ L/孔)。重组抗TSLP单克隆抗体(S2B1、S2A10、S2B9和S2G2)以及阳性对照抗体(Tezepelumab)都以终浓度1nM起始, 5倍梯度稀释(共8个浓度梯度)。稀释后的重组抗TSLP单克隆抗体与终浓度0.08ng/mL的hTSLP-m-his等体积预混30min, 加入到细胞中混合, 总体积是200 $\mu$ L/孔, 于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下孵育24h。然后取上清, 用人CCL17(TARC) ELISAMAX™ Deluxe试剂盒(Biolegend, cat#441104)检测TARC, 使用酶标仪(Biotek, Cat# ELX800)测定OD<sub>450</sub>光密度值。以读值结果进行拟合分析, 结果(图2)显示重组抗TSLP单克隆抗体以及对对照抗体Tezepelumab都可有效抑制TSLP的作用。

[0161] 实施例4: 鼠抗TSLP单克隆抗体的人源化改造

[0162] 4.1鼠单克隆抗体的人源化改造

[0163] 对鼠抗体S2B1(重链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO:22;轻链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO:23)进行人源化研究以降低其免疫原性。将编码S2B1的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的核酸分子分别与IMGT数据库中的人抗体胚系基因序列相比较, 选择合适的胚系基因序列以提供编码抗体的框架区1至3(FR1+FR2+FR3)的基因序列, 选择合适的J区基因序列以提供编码框架区4(FR4)的基因序列。这个模板可以根据多种因素选出, 如: 抗体的相对总长度、CDR区的大小、位于抗体框架区(FR)和超变区(CDR)之间连接处的氨基酸残基、序列整体的同源性等。所选的模板可以是多个序列的嵌合版本或者可以是共有模板, 目的是尽可能维持亲本互补决定区(CDR)的合适构象。对S2B1的重链可变区进行CDR移植得到两个人源化版本S2B1VH-h1和S2B1VH-h2; 对S2B1的轻链可变区进行CDR移植得到两个人源化版本S2B1VK-h1和S2B1VK-h2。根据人源化抗体的氨基酸序列设计并合成抗体可变区基因, 克隆至真核表达载体。S2B1VK-h1、S2B1VK-h2分别配合S2B1VH-h1、S2B1VH-h2组合表达人IgG4版本全抗体。

[0164] 4.2人源化抗TSLP单克隆抗体亲和力测定

[0165] 参考实施例3.1, 用Biacore X100对S2B1人源化单克隆抗体进行亲和力分析, 结果如表2所示。

[0166] 表2. S2B1人源化单克隆抗体结合hTSLP的亲和力常数

[0167]		$K_{on}$	$K_{off}$	KD
	S2B1	2.646E+6	3.179E-5	1.201E-11
	S2B1VH-h1+S2B1VK-h2	1.394E+6	2.199E-4	1.577E-10
	S2B1VH-h2+S2B1VK-h2	9.374E+5	2.011E-4	2.146E-10
	S2B1VH-h1+S2B1VK-h1	3.895E+5	4.611E-3	1.183E-8
	S2B1VH-h2+S2B1VK-h1	2.2E+5	5.672E-3	2.578E-8

[0168] 实施例5:S2B1VK-h2亲和力成熟

[0169] 5.1 S2B1VK-h2亲和力成熟改造

[0170] 为保持亲本抗体S2B1的亲和力,减少由于S2B1VK-h2的FR移植而导致的抗体结合TSLP亲和力下降,以人源化版本S2B1VK-h2 序列为模板,在其框架区关键位置处氨基酸引入亲本氨基酸回复突变。目的是尽量恢复亲和力的同时,减少由于鼠源氨基酸而可能导致的免疫原性。S2B1VK-h2回复突变库设计方案如表3所示,利用常规分子生物学手段,构建基于S2B1VK-h2的亲和力成熟突变库,构建库容大小为 $1.4 \times 10^8$ 。基于双载体呈现系统(实验技术流程参照专利第201510097117.0号中国专利申请中的实施例5),以人源化版本重链S2B1VH-h1为基础,通过固相筛选的方法,利用hTSLP1-m-His 抗原对构建的S2B1VK-h2回复突变库进行共3轮筛选。最终获得亲和力成熟的轻链可变区突变体L3E8(SEQ ID NO:24)、L3F8和L5E11,检测结果显示S2B1VH-h1+L3E8的亲和力为 $KD=7.458E-12$ 。

[0171] 表3.S2B1VK-h2回复突变库设计方案

S1B1VK-h2 氨基酸(kabat 编号)	设计突变	简并密码子
18R	RK	ARA
19A	AV	GYC
21L	IL	MTT
22S	ST	WCT
40P	SP	YCA
41G	EGD	GRM
42Q	TQKP	MMA
45R	KR	ARA
46L	PL	CYA
47L	WL	TKG
58I	VI	RTC
60A	VA	GYC
70E	SED	GAM/AGC
71F	YF	TWT
72T	TS	WCT
78L	MLV	VTG
79Q	EQ	SAG
80S	ASP	BCA
83F	AF	TTC/GCA
85V	TV	GTG/ACA



[0174] 5.2 S2B1VK-h2突变体的鉴定

[0175] 表达S2B1VH-h1+L3E8、S2B1VH-h1+L3F8、S2B1VH-h1+L5E11。参考实施例3.2,使用CellTiter-Glo<sup>®</sup>化学发光细胞活力测定试剂盒 (Promega,Cat#G7570) 检测细胞增殖情况,利用多功能酶标仪 (SpectraMax<sup>®</sup>I3X) 读值。结果(图3)显示,亲和力成熟的轻链突变体S2B1VH-h1+L3E8可有效抑制TSLP对BAF3-TSLPR/IL-7R $\alpha$ 细胞的增殖促进作用。

[0176] 实施例6:S2B1VH-h1的去DG、NG改造

[0177] 6.1 S2B1VH-h1的去DG、NG改造

[0178] 为提高S2B1VH人源化版本S2B1VH-h1的人源化程度,减少由于脱氨基位点可能导致的异质性,在S2B1VH-h1的CDR2区设计突变,筛选理化性质和人源化程度均提高的S2B1VH-h1突变体,突变库设计方案如表4所示。基于双载体呈现系统(实验技术流程参照专利第201510097117.0号中国专利申请中的实施例5),以亲和力成熟的轻链L3E8为基础,通过固相筛选的方法,利用 hTSLP1-m-His抗原对构建的S2B1VH-h2-CDR2突变库进行共3轮筛选。最终获得人源化程度提高的去除NG和DG的突变体 H1A10 (SEQ ID NO:25)、H1C8、H1D8和H1E7,检测结果显示 H1A10+L3E8的亲和力KD=8.999E-12。

[0179] 表4.S2B1VH-h1突变库设计方案

[0180]

原始氨基酸 (Kabat编号)	设计突变	简并密码子
G53	GS	RGT
D54	DGSNATIV	RNC
G55	GSAT	RSC
N60	NASDTG	RVC
G61	GSATQ	RST/CAG
K64	KQ	MAG

[0181] 6.2 S2B1VH-h1的去DG、NG突变体鉴定

[0182] 表达H1A10+L3E8、H1C8+L3E8、H1D8+L3E8、H1E7+L3E8。参考实施例3.2,使用CellTiter-Glo<sup>®</sup>化学发光法细胞活力测定试剂盒 (Promega,Cat#G7570) 检测细胞增殖情况,利用多功能酶标仪 (SpectraMax<sup>®</sup>I3X) 读值。结果(图4)显示,去DG、NG改造的抗TSLP单克隆抗体H1A10+L3E8可有效抑制TSLP对BAF3-TSLPR/IL-7R $\alpha$ 细胞的增殖作用。

[0183] 实施例7:构建L3E8轻链人源化程度提高的突变体

[0184] 7.1提高人源化程度改造

[0185] 为提高L3E8轻链序列的人源化程度,明确导致S2B1VK-h2在FR移植过程中亲和力下降的关键氨基酸,在L3E8轻链框架区设置人源化突变。突变位置根据chothia number确定为第21、22、45、46、47、72、78、79和83位的氨基酸,共设计4种突变体,分别为L3E8-M1 (SEQ ID NO:26)、L3E8-M2 (SEQ ID NO:27)、L3E8-M3 (SEQ ID NO:28)和L3E8-M4 (SEQ ID NO:29)。利用常规分子生物学手段,以L3E8为模板,在引物区引入设计突变,通过重叠延伸PCR方法扩增4种突变体并克隆至真核表达载体,配合H1A10重链表达IgG4版本全抗体,人源化程度如表5所示。

[0186] 表5.人源化程度分析

	序列名称	序列相似度最高的人基因和等位基因	相似度(%)	
	亲本 VK	S2B1VK	IGKV3-15*01	58.3
[0187]	人源化 VK	S2B1VK-h1	IGKV6-21*01	86.5
		S2B1VK-h2	IGKV3-15*01	85.4
		L3E8	IGKV3-15*01	75.0
		L3E8-M1	IGKV3-15*01	83.3
		L3E8-M2	IGKV3-15*01	82.3
		L3E8-M3	IGKV3-15*01	81.2
		L3E8-M4	IGKV3-15*01	80.2
	亲本 VH	S2B1VH	IGHV5-51*01	61.2
人源化 VH	S2B1VH-h1	IGHV1-46*01	85.7	
	S2B1VH-h2	IGHV1-69*08	83.7	
	H1A10	IGHV1-46*01	86.7	

[0188] 7.2 L3E8人源化改造突变体的鉴定

[0189] 7.2.1突变体亲和力鉴定

[0190] Biacore S200测定不同抗TSLP抗体结合hTSLP的亲和力。使用氨基偶联试剂盒(BR-1000-50)将不同抗TSLP抗体(H1A10+L3E8-M1、H1A10+L3E8-M2、H1A10+L3E8-M3、H1A10+L3E8-M4和 Tezepelumab)偶联至CM5芯片表面,偶联量控制在500-550RU。hTSLP1-m-his浓度梯度分别为25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM、1.563nM、0.781nM、0.39nM、0.195nM、0.098nM。结合时间为240s,解离时间为2400s。以10 $\mu$ L/min注射pH2.0 10mM甘氨酸30s对芯片表面进行再生。拟合结果如表6所示。

[0191] 参考实施例3.1,用Biacore X100检测L3E8人源化突变体(H1A10+L3E8-M1、H1A10+L3E8-M2、H1A10+L3E8-M3、H1A10+L3E8-M4和Tezepelumab)结合mfTSLP的亲和力,拟合结果如表7所示。

[0192] 表6.L3E8人源化突变体结合hTSLP亲和力常数

	$K_{on}$	$K_{off}$	KD	
	Tezepelumab	4.901E+6	1.338E-5	2.832E-12
[0193]	H1A10+L3E8-M1	1.001E+7	5.473E-5	5.466E-12
	H1A10+L3E8-M2	5.185E+6	2.461E-5	4.747E-12
	H1A10+L3E8-M3	3.243E+6	2.113E-5	6.515E-12
[0194]	H1A10+L3E8-M4	3.334E+6	1.176E-5	3.528E-12

[0195] 表7.L3E8人源化突变体结合mfTSLP亲和力常数

	$K_{on}$	$K_{off}$	KD	
	Tezepelumab	1.211E+7	9.882E-5	8.163E-12
	H1A10+L3E8-M1	4.074E+6	1.083E-2	2.658E-9
	H1A10+L3E8-M2	3.719E+6	9.626E-3	2.588E-9
	H1A10+L3E8-M3	4.4E+6	1.042E-2	2.369E-9
[0196]	H1A10+L3E8-M4	4.027E+6	1.06E-2	2.632E-9

[0197] 7.2.2 L3E8人源化突变体抑制TSLP与细胞表面的TSLPR结合

[0198] 将BAF3-TSLPR/IL-7R $\alpha$ 细胞以 $2 \times 10^5$ 个/孔加入V形底96孔板,抗TSLP单克隆抗体(H1A10+L3E8-M1和S2B1)以终浓度400nM起始,3倍梯度稀释(共10个浓度梯度,100 $\mu$ L/孔),稀释液是含0.1 $\mu$ g/mL的hTSLP1-m-His的PBS缓冲液,于4 $^{\circ}$ C孵育1个小时,PBS缓冲液洗三遍。将抗6 $\times$ His标签<sup>®</sup>抗体(FITC,abcam,cat#ab1206)以1:400用PBS缓冲液稀释,100 $\mu$ L/孔,避光孵育30min,PBS缓冲液洗两遍后100 $\mu$ L/孔重悬细胞,使用流式仪(Novocyte,2060R)检测FL-1荧光通路。结果(图5)显示,以平均荧光强度读取值拟合分析数据,人源化抗TSLP单克隆抗体可有效阻断TSLP和细胞表面的TSLPR结合。

[0199] 7.2.3 L3E8人源化突变体抑制TSLP对BAF3-TSLPR/IL-7R $\alpha$ 细胞的增殖促进作用

[0200] 参考实施例3.2,使用CellTiter-Glo<sup>®</sup>化学发光法细胞活力测定试剂盒(Promega,Cat#G7570)检测细胞增殖情况,利用多功能酶标仪(SpectraMax<sup>®</sup>I3X)读值。结果(图6)显示,L3E8人源化突变体(H1A10+L3E8-M1、H1A10+L3E8-M2、H1A10+L3E8-M3和H1A10+L3E8-M4)可有效抑制TSLP对BAF3-TSLPR/IL-7R $\alpha$ 细胞的促增殖作用。

[0201] 7.2.4 L3E8人源化突变体抑制TSLP刺激PBMC分泌TARC的作用

[0202] 参考实施例3.3,使用人CCL17(TARC)ELISA MAX<sup>™</sup> Deluxe试剂盒(Biolegend,cat#441104)进行TARC检测,使用酶标仪(Biotek,Cat#ELX800)测定OD<sub>450</sub>光密度值,拟合分析数据。结果(图7)显示,L3E8人源化突变体(H1A10+L3E8-M1、H1A10+L3E8-M2、H1A10+L3E8-M3和H1A10+L3E8-M4)有效抑制TSLP刺激PBMC分泌TARC的作用。

[0203] 7.2.5 L3E8人源化突变体与不同种属TSLP的结合

[0204] 将制备的人TSLP(hTSLP1-m-mFc)、食蟹猴TSLP(mfTSLP1-m-mFc)和小鼠TSLP(mTSLP-mFc)分别包被于96孔ELISA板(1 $\mu$ g/mL,100 $\mu$ L/孔),于4 $^{\circ}$ C包被过夜。利用封闭液PBS-0.1%Tween20-3%牛奶于37 $^{\circ}$ C封闭1小时后,分别加入各重组抗TSLP单克隆抗体(S2B1VH-h1+L3E8、H1A10+L3E8、H1A10+L3E8-M1、H1A10+L3E8-M2、H1A10+L3E8-M3、H1A10+L3E8-M4和Tezepelumab),于37 $^{\circ}$ C结合1小时。用PBST缓冲液洗涤ELISA板,加入HRP鼠抗人IgG(bioss,bsm-0297M-HRP),于37 $^{\circ}$ C结合1小时。PBST缓冲液洗涤ELISA板,加入OPD底物显色液,5-10分钟后用1M的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止显色,使用酶标仪测定492nm/630nm双波长光密度值。ELISA分析结果(图8)显示,所有抗体分子都识别hTSLP1,并且都交叉识别mfTSLP,都不识别mTSLP。

[0205] 7.2.6 L3E8人源化突变体和Tezepelumab表位比较

[0206] 将重组蛋白hTSLP1-m-his包被于96孔板(1 $\mu$ g/mL,100 $\mu$ L/孔),于4 $^{\circ}$ C包被过夜。然后分别用固定浓度(0.05 $\mu$ g/ml)的人版本抗体(包括Tezepelumab-IgG4和四种L3E8人源化突变体抗体蛋白(H1A10+L3E8-M1-IgG1m3、H1A10+L3E8-M2-IgG1m3、H1A10+L3E8-M3-IgG1m3、H1A10+L3E8-M4-IgG1m3)对Tezepelumab-mIgG2a(鼠恒定区版本)进行梯度稀释,抗体Tezepelumab-mIgG2a的起始浓度为200 $\mu$ g/mL,3倍梯度稀释,共10个浓度梯度。然后用HRP鼠抗人IgG(bioss,bsm-0297M-HRP)检测Tezepelumab-IgG4及L3E8人源化突变体(IgG1m3版本)和TSLP的结合信号。ELISA结果(图9)显示,Tezepelumab-mIgG2a(鼠恒定区版本)能够阻断Tezepelumab-IgG4结合TSLP,但不能有效阻断四种L3E8人源化突变体结合TSLP。因而四种L3E8人源化突变体结合TSLP的表位不同于Tezepelumab。

[0207] 上文对本申请的各项发明的示例性实施方案进行了描述,但是,在不脱离本申请

的实质和范围的情况下,本领域技术人员能够对本申请描述的示例性实施方案进行修改或改进,由此得到的变形方案或等同方案也属于本申请的范围。

[0208] 参考文献

[0209] 1.Leonard,W.J.(2002) TSLP is now revealed to be an important regulator of DC-mediated control of TH2-based human allergic responses,identifying a potentially new species-specific function for this cytokine.Nat Immunol 3, 605-607.

[0210] 2.Liu,Y.J.,Soumelis,V.,Watanabe,N.,et al.(2007) TSLP:an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation.Annual Review of Immunology 25,93-219.

[0211] 3.Ziegler,S.F.,Artis,D.(2010) Sensing the outside world:TSLP regulates barrier immunity. Nat Immunol 11,289-293.

[0212] 4.Allakhverdi,Z.,Comeau,M.R.,Jessup,H.K.,et al.(2009) Thymic stromal lymphopoietin as a mediator of crosstalk between bronchial smooth muscle and mast cells.Journal of Allergy and Clinical Immunology 123,958-960.

[0213] 5.Allakhverdi,Z.,Comeau,M.R.,Jessup,H.K.,et al.(2007) Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma,or inflammation and potently activates mast cells.J Exp Med 204,253-258.

[0214] 6.Lee,H.C.,Ziegler,S.F.(2007) Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFκB.Proceedings of the National Academy of Sciences 104,914-919.

[0215] 7.Ying,S.,O'Connor,B.,Ratoff,J.,et al.(2005) Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease.Journal of Allergy and Clinical Immunology 115,S9.

[0216] 8.Gounni,A.S.(2007) Constitutive and inducible thymic stromal lymphopoietin expression in human airway smooth muscle cells:role in chronic obstructive pulmonary disease.American Journal of Physiology Lung Cellular& Molecular Physiology 293,375-382.

[0217] 9.Ying,S.,O'Connor,B.,Ratoff,J.,et al.(2005).Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of th2-attracting chemokines and disease severity.The Journal of Immunology 174,8183-8190.

[0218] 10.Kashyap,M.,Rochman,Y.,Spolski,R.,Samsel,L.,et al.(2011) Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells.The Journal of Immunology 187(3),13-24.

[0219] 11.Soumelis,V.,Reche,P.A.,Kanzler,H.,et al.(2002) Human epithelial

cells trigger dendritic cell mediator allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3,673-680.

[0220] 12. Watanabe, N., Hanabuchi, S., Soumelis, V., et al. (2004) Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol* 5,426-434.

[0221] 13. Moon, P. D., Choi, I. H., Kim, H. M. (2011) Naringenin suppresses the production of thymic stromal lymphopoietin through the blockade of RIP2 and caspase-1 signal cascade in mast cells. *European Journal of Pharmacology* 671, 128-132.

[0222] 14. Barton, G. M., Farr, A. G., et al. (2008) A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nature Immunology* 9(3), 310-318.

[0223] 15. He R, Geha, R. S. (2010) Thymic stromal lymphopoietin. *Ann NY Acad Sci* 1183, 13-24.

[0224] 16. Oyoshi, M. K., Larson, R. P., Ziegler, S. F., et al. (2010) Mechanical injury polarizes skin dendritic cells to elicit a T(H)2 response by inducing cutaneous thymic stromal lymphopoietin expression. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 126, 976-984; e975.

[0225] 17. Hai yan Tu, Xin Chen, Jing Li. (2007) Signal transduction in respiratory syncytial virus infection-induced thymic stromal lymphopoietin expression in human epithelial cells. *Journal of Southern Medical University* 27(10), 1581-1583.

[0226] 18. Medoff, B. D., Landry, A. L., Wittbold, K. A., et al. (2009) CARMA3 mediates lysophosphatidic acid-stimulated cytokine secretion by bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2009(40), 286-294.

[0227] 19. Park, L. S., Martin, U., Garka, K., et al. (2000) Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *The Journal of Experimental Medicine* 192, 659-670.

[0228] 20. He, S. H., Liu, Z. Q., Chen, X., et al. (2011) IL-9+IL-10+T cells link immediate allergic response to late phase reaction. *Clinical and experimental immunology* 165, 29-37.

[0229] 21. GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Available from: <http://www.ginasthma.com>.

[0230] 22. von Bülow, Anna, Kriegbaum, M., Backer, V., et al. (2014) The prevalence of severe asthma and low asthma control among Danish adults. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 2(6), 759-673.

[0231] 23. Reche, P. A., Soumelis, V. M., Gorman, D. M., et al. (2001) Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *The Journal of*

Immunology 167,336-343.

[0232] 24.Zhou,B.,Comeau,M.R.,De,S.T.,et al.(2005)Thymic stromal lymphopietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice.Nat Immunol 6,1047-1053.

[0233] 25.Zhuang gui Chen,Tian tuo Zhang,Hong tao Li,et al.(2013) Neutralization of TSLP inhibits airway remodeling in a murine model of allergic asthma induced by chronic exposure to house dust mite.PLoS One 8, e51268.

[0234] 26.He,R.,Oyoshi,M.K.,Garibyan,L.,et al.(2008).TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation.Proc Natl Acad Sci USA 105(33),11875-11880.

[0235] 27.Corren,J.,Parnes,J.R.,Wang,L.,et al.(2017)Tezepelumab in Adults with Uncontrolled Asthma.New England Journal of Medicine 377(10),936-946.



[0039]	35	40	45
[0040]	Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln		
[0041]	50	55	60
[0042]	<210> 3		
[0043]	<211> 121		
[0044]	<212> PRT		
[0045]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
[0046]	<400> 3		
[0047]	Tyr Asn Phe Ser Asn Cys Asn Phe Thr Ser Ile Thr Lys Ile Tyr Cys		
[0048]	1	5	10 15
[0049]	Asn Ile Ile Phe His Asp Leu Thr Gly Asp Leu Lys Gly Ala Lys Phe		
[0050]	20	25	30
[0051]	Glu Gln Ile Glu Asp Cys Glu Ser Lys Pro Ala Cys Leu Leu Lys Ile		
[0052]	35	40	45
[0053]	Glu Tyr Tyr Thr Leu Asn Pro Ile Pro Gly Cys Pro Ser Leu Pro Asp		
[0054]	50	55	60
[0055]	Lys Thr Phe Ala Arg Arg Thr Arg Glu Ala Leu Asn Asp His Cys Pro		
[0056]	65	70	75 80
[0057]	Gly Tyr Pro Glu Thr Glu Arg Asn Asp Gly Thr Gln Glu Met Ala Gln		
[0058]	85	90	95
[0059]	Glu Val Gln Asn Ile Cys Leu Asn Gln Thr Ser Gln Ile Leu Arg Leu		
[0060]	100	105	110
[0061]	Trp Tyr Ser Phe Met Gln Ser Pro Glu		
[0062]	115	120	
[0063]	<210> 4		
[0064]	<211> 131		
[0065]	<212> PRT		
[0066]	<213> 食蟹猴 (Macaca fascicularis)		
[0067]	<400> 4		
[0068]	Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Gln Lys Ile Glu Ala Asp Tyr Leu		
[0069]	1	5	10 15
[0070]	Arg Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser		
[0071]	20	25	30
[0072]	Thr Asp Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu		
[0073]	35	40	45
[0074]	Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Pro Arg Cys Ala Ser		
[0075]	50	55	60
[0076]	Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Arg Lys Thr Lys Ala Thr Leu Ala Leu		
[0077]	65	70	75 80



[0078]	Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met
[0079]	85 90 95
[0080]	Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln
[0081]	100 105 110
[0082]	Val Ser Gln Leu Leu Gly Leu Trp Arg Arg Phe Ile Arg Thr Leu Leu
[0083]	115 120 125
[0084]	Lys Lys Gln
[0085]	130
[0086]	<210> 5
[0087]	<211> 126
[0088]	<212> PRT
[0089]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0090]	<400> 5
[0091]	Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu
[0092]	1 5 10 15
[0093]	Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser
[0094]	20 25 30
[0095]	Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu
[0096]	35 40 45
[0097]	Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser
[0098]	50 55 60
[0099]	Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile
[0100]	65 70 75 80
[0101]	Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met
[0102]	85 90 95
[0103]	Lys Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu Gln
[0104]	100 105 110
[0105]	Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln
[0106]	115 120 125
[0107]	<210> 6
[0108]	<211> 58
[0109]	<212> PRT
[0110]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0111]	<400> 6
[0112]	Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly
[0113]	1 5 10 15
[0114]	Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Val Thr
[0115]	20 25 30
[0116]	Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg

[0117]	35	40	45
[0118]	Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln		
[0119]	50	55	
[0120]	<210> 7		
[0121]	<211> 126		
[0122]	<212> PRT		
[0123]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0124]	<400> 7		
[0125]	Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Gln Lys Ile Glu Ala Asp Tyr Leu		
[0126]	1	5	10 15
[0127]	Arg Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser		
[0128]		20	25 30
[0129]	Thr Asp Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu		
[0130]		35	40 45
[0131]	Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Pro Arg Cys Ala Ser		
[0132]		50	55 60
[0133]	Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Arg Lys Thr Lys Ala Thr Leu Ala Leu		
[0134]	65	70	75 80
[0135]	Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met		
[0136]		85	90 95
[0137]	Lys Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu Leu		
[0138]		100	105 110
[0139]	Gly Leu Trp Arg Arg Phe Ile Arg Thr Leu Leu Lys Lys Gln		
[0140]		115	120 125
[0141]	<210> 8		
[0142]	<211> 6		
[0143]	<212> PRT		
[0144]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0145]	<400> 8		
[0146]	His His His His His His		
[0147]	1	5	
[0148]	<210> 9		
[0149]	<211> 232		
[0150]	<212> PRT		
[0151]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[0152]	<400> 9		
[0153]	Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
[0154]	1	5	10 15
[0155]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		



[0195]	50	55	60
[0196]	Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp		
[0197]	65	70	75
[0198]	Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln		
[0199]	85	90	95
[0200]	Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp		
[0201]	100	105	110
[0202]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val		
[0203]	115	120	125
[0204]	Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr		
[0205]	130	135	140
[0206]	Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu		
[0207]	145	150	155
[0208]	Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr		
[0209]	165	170	175
[0210]	Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr		
[0211]	180	185	190
[0212]	Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr		
[0213]	195	200	205
[0214]	Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys		
[0215]	210	215	220
[0216]	Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys		
[0217]	225	230	
[0218]	<210> 11		
[0219]	<211> 330		
[0220]	<212> PRT		
[0221]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[0222]	<400> 11		
[0223]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
[0224]	1	5	10
[0225]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
[0226]	20	25	30
[0227]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
[0228]	35	40	45
[0229]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
[0230]	50	55	60
[0231]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
[0232]	65	70	75
[0233]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		







[0351]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[0352]	275 280 285
[0353]	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
[0354]	290 295 300
[0355]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[0356]	305 310 315 320
[0357]	Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0358]	325
[0359]	<210> 14
[0360]	<211> 324
[0361]	<212> PRT
[0362]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)
[0363]	<400> 14
[0364]	Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
[0365]	1 5 10 15
[0366]	Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
[0367]	20 25 30
[0368]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
[0369]	35 40 45
[0370]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
[0371]	50 55 60
[0372]	Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val
[0373]	65 70 75 80
[0374]	Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
[0375]	85 90 95
[0376]	Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro
[0377]	100 105 110
[0378]	Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
[0379]	115 120 125
[0380]	Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
[0381]	130 135 140
[0382]	Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
[0383]	145 150 155 160
[0384]	Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
[0385]	165 170 175
[0386]	Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
[0387]	180 185 190
[0388]	Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
[0389]	195 200 205



[0390]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
[0391]	210 215 220
[0392]	Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
[0393]	225 230 235 240
[0394]	Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val
[0395]	245 250 255
[0396]	Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
[0397]	260 265 270
[0398]	Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
[0399]	275 280 285
[0400]	Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
[0401]	290 295 300
[0402]	Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
[0403]	305 310 315 320
[0404]	Ser Pro Gly Lys
[0405]	<210> 15
[0406]	<211> 330
[0407]	<212> PRT
[0408]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)
[0409]	<400> 15
[0410]	Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
[0411]	1 5 10 15
[0412]	Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
[0413]	20 25 30
[0414]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
[0415]	35 40 45
[0416]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
[0417]	50 55 60
[0418]	Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
[0419]	65 70 75 80
[0420]	Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
[0421]	85 90 95
[0422]	Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
[0423]	100 105 110
[0424]	Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
[0425]	115 120 125
[0426]	Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
[0427]	130 135 140
[0428]	Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp

[0429]	145	150	155	160
[0430]	Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg			
[0431]		165	170	175
[0432]	Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln			
[0433]		180	185	190
[0434]	His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn			
[0435]		195	200	205
[0436]	Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly			
[0437]		210	215	220
[0438]	Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu			
[0439]		225	230	235
[0440]	Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met			
[0441]		245	250	255
[0442]	Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu			
[0443]		260	265	270
[0444]	Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe			
[0445]		275	280	285
[0446]	Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn			
[0447]		290	295	300
[0448]	Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr			
[0449]		305	310	315
[0450]	Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys			
[0451]		325	330	
[0452]	<210> 16			
[0453]	<211> 107			
[0454]	<212> PRT			
[0455]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[0456]	<400> 16			
[0457]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu			
[0458]		1	5	10
[0459]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe			
[0460]		20	25	30
[0461]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln			
[0462]		35	40	45
[0463]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
[0464]		50	55	60
[0465]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu			
[0466]		65	70	75
[0467]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser			

[0468]		85		90		95
[0469]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
[0470]		100		105		
[0471]	<210> 17					
[0472]	<211> 106					
[0473]	<212> PRT					
[0474]	<213> 智人(Homo sapiens)					
[0475]	<400> 17					
[0476]	Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser					
[0477]	1	5		10		15
[0478]	Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp					
[0479]		20		25		30
[0480]	Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro					
[0481]		35		40		45
[0482]	Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn					
[0483]		50		55		60
[0484]	Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys					
[0485]	65	70		75		80
[0486]	Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val					
[0487]		85		90		95
[0488]	Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser					
[0489]		100		105		
[0490]	<210> 18					
[0491]	<211> 107					
[0492]	<212> PRT					
[0493]	<213> 小家鼠(Mus musculus)					
[0494]	<400> 18					
[0495]	Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu					
[0496]	1	5		10		15
[0497]	Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe					
[0498]		20		25		30
[0499]	Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg					
[0500]		35		40		45
[0501]	Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser					
[0502]		50		55		60
[0503]	Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu					
[0504]	65	70		75		80
[0505]	Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser					
[0506]		85		90		95

[0507] Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 [0508] 100 105  
 [0509] <210> 19  
 [0510] <211> 106  
 [0511] <212> PRT  
 [0512] <213> 小家鼠 (Mus musculus)  
 [0513] <400> 19  
 [0514] Gly Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser  
 [0515] 1 5 10 15  
 [0516] Glu Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp  
 [0517] 20 25 30  
 [0518] Phe Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro  
 [0519] 35 40 45  
 [0520] Val Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
 [0521] 50 55 60  
 [0522] Lys Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu  
 [0523] 65 70 75 80  
 [0524] Arg His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val  
 [0525] 85 90 95  
 [0526] Glu Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser  
 [0527] 100 105  
 [0528] <210> 20  
 [0529] <211> 122  
 [0530] <212> PRT  
 [0531] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 [0532] <400> 20  
 [0533] Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 [0534] 1 5 10 15  
 [0535] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Thr Tyr  
 [0536] 20 25 30  
 [0537] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0538] 35 40 45  
 [0539] Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val  
 [0540] 50 55 60  
 [0541] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asn  
 [0542] 65 70 75 80  
 [0543] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0544] 85 90 95  
 [0545] Ala Arg Ala Pro Gln Trp Glu Leu Val His Glu Ala Phe Asp Ile Trp

[0546]		100		105		110
[0547]	Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser					
[0548]		115		120		
[0549]	<210> 21					
[0550]	<211> 108					
[0551]	<212> PRT					
[0552]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0553]	<400> 21					
[0554]	Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln					
[0555]	1	5		10		15
[0556]	Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Leu Gly Ser Lys Ser Val					
[0557]		20		25		30
[0558]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr					
[0559]		35		40		45
[0560]	Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Trp Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser					
[0561]		50		55		60
[0562]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Gly Glu Ala Gly					
[0563]	65	70		75		80
[0564]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His					
[0565]		85		90		95
[0566]	Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu					
[0567]		100		105		
[0568]	<210> 22					
[0569]	<211> 121					
[0570]	<212> PRT					
[0571]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0572]	<400> 22					
[0573]	Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser					
[0574]	1	5		10		15
[0575]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Tyr					
[0576]		20		25		30
[0577]	Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
[0578]		35		40		45
[0579]	Gly Gln Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe					
[0580]		50		55		60
[0581]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr					
[0582]	65	70		75		80
[0583]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys					
[0584]		85		90		95

[0585]	Ala Arg Ala Gly Tyr Tyr Arg Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
[0586]	100                                    105                                    110
[0587]	Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ala
[0588]	115                                    120
[0589]	<210> 23
[0590]	<211> 108
[0591]	<212> PRT
[0592]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0593]	<400> 23
[0594]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ala Ala Ser Pro Gly
[0595]	1                                    5                                    10                                    15
[0596]	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser
[0597]	20                                    25                                    30
[0598]	Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Glu Thr Ser Pro Lys Pro Trp
[0599]	35                                    40                                    45
[0600]	Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser
[0601]	50                                    55                                    60
[0602]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
[0603]	65                                    70                                    75                                    80
[0604]	Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
[0605]	85                                    90                                    95
[0606]	Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0607]	100                                    105
[0608]	<210> 24
[0609]	<211> 108
[0610]	<212> PRT
[0611]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0612]	<400> 24
[0613]	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
[0614]	1                                    5                                    10                                    15
[0615]	Glu Arg Ala Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser
[0616]	20                                    25                                    30
[0617]	Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Pro Trp
[0618]	35                                    40                                    45
[0619]	Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
[0620]	50                                    55                                    60
[0621]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu
[0622]	65                                    70                                    75                                    80
[0623]	Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro

[0624]		85		90		95
[0625]	Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[0626]		100		105		
[0627]	<210> 25					
[0628]	<211> 121					
[0629]	<212> PRT					
[0630]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0631]	<400> 25					
[0632]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala					
[0633]	1	5		10		15
[0634]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Tyr					
[0635]		20		25		30
[0636]	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met					
[0637]		35		40		45
[0638]	Gly Gln Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Thr Asp Tyr Asp Gln Lys Phe					
[0639]		50		55		60
[0640]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr					
[0641]	65	70		75		80
[0642]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
[0643]		85		90		95
[0644]	Ala Arg Ala Gly Tyr Tyr Arg Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly					
[0645]		100		105		110
[0646]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser					
[0647]		115		120		
[0648]	<210> 26					
[0649]	<211> 108					
[0650]	<212> PRT					
[0651]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0652]	<400> 26					
[0653]	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly					
[0654]	1	5		10		15
[0655]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser					
[0656]		20		25		30
[0657]	Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp					
[0658]		35		40		45
[0659]	Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser					
[0660]		50		55		60
[0661]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln					
[0662]	65	70		75		80

[0663]	Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
[0664]	85 90 95
[0665]	Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0666]	100 105
[0667]	<210> 27
[0668]	<211> 108
[0669]	<212> PRT
[0670]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0671]	<400> 27
[0672]	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
[0673]	1 5 10 15
[0674]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser
[0675]	20 25 30
[0676]	Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Pro Trp
[0677]	35 40 45
[0678]	Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
[0679]	50 55 60
[0680]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
[0681]	65 70 75 80
[0682]	Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
[0683]	85 90 95
[0684]	Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0685]	100 105
[0686]	<210> 28
[0687]	<211> 108
[0688]	<212> PRT
[0689]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0690]	<400> 28
[0691]	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
[0692]	1 5 10 15
[0693]	Glu Arg Ala Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser
[0694]	20 25 30
[0695]	Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp
[0696]	35 40 45
[0697]	Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
[0698]	50 55 60
[0699]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
[0700]	65 70 75 80
[0701]	Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro



[0702]		85		90		95
[0703]	Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[0704]		100		105		
[0705]	<210> 29					
[0706]	<211> 108					
[0707]	<212> PRT					
[0708]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0709]	<400> 29					
[0710]	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly					
[0711]	1	5		10		15
[0712]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser					
[0713]		20		25		30
[0714]	Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp					
[0715]		35		40		45
[0716]	Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser					
[0717]		50		55		60
[0718]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu					
[0719]	65	70		75		80
[0720]	Ala Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro					
[0721]		85		90		95
[0722]	Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[0723]		100		105		
[0724]	<210> 30					
[0725]	<211> 5					
[0726]	<212> PRT					
[0727]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0728]	<400> 30					
[0729]	Asn Tyr Trp Met Asn					
[0730]	1	5				
[0731]	<210> 31					
[0732]	<211> 17					
[0733]	<212> PRT					
[0734]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0735]	<400> 31					
[0736]	Gln Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys					
[0737]	1	5		10		15
[0738]	Gly					
[0739]	<210> 32					
[0740]	<211> 12					

- [0741] <212> PRT
- [0742] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0743] <400> 32
- [0744] Ala Gly Tyr Tyr Arg Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
- [0745] 1 5 10
- [0746] <210> 33
- [0747] <211> 12
- [0748] <212> PRT
- [0749] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0750] <400> 33
- [0751] Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn Leu His
- [0752] 1 5 10
- [0753] <210> 34
- [0754] <211> 7
- [0755] <212> PRT
- [0756] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0757] <400> 34
- [0758] Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
- [0759] 1 5
- [0760] <210> 35
- [0761] <211> 9
- [0762] <212> PRT
- [0763] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0764] <400> 35
- [0765] Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
- [0766] 1 5
- [0767] <210> 36
- [0768] <211> 17
- [0769] <212> PRT
- [0770] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0771] <400> 36
- [0772] Gln Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Thr Asp Tyr Asp Gln Lys Phe Gln
- [0773] 1 5 10 15
- [0774] Gly
- [0775] <210> 37
- [0776] <211> 19
- [0777] <212> DNA
- [0778] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0779] <400> 37

- 
- [0780] tgcatttgaa ctccttgcc 19  
[0781] <210> 38  
[0782] <211> 20  
[0783] <212> DNA  
[0784] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0785] <400> 38  
[0786] ccatcaatct tccacttgac 20

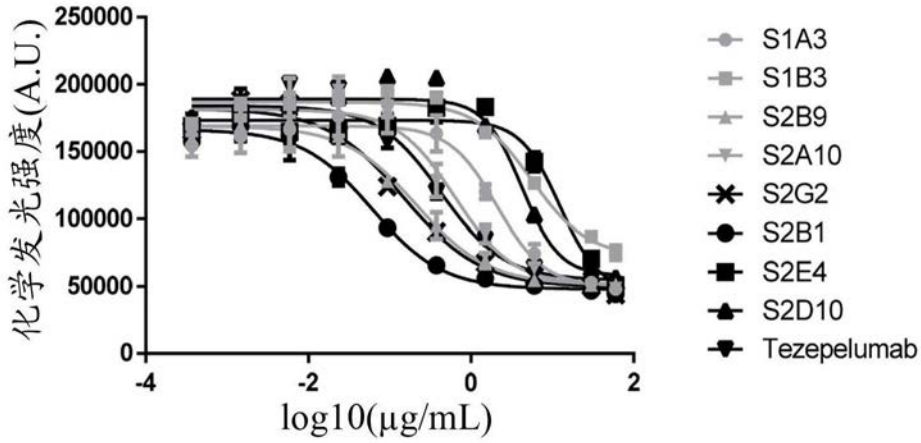


图1

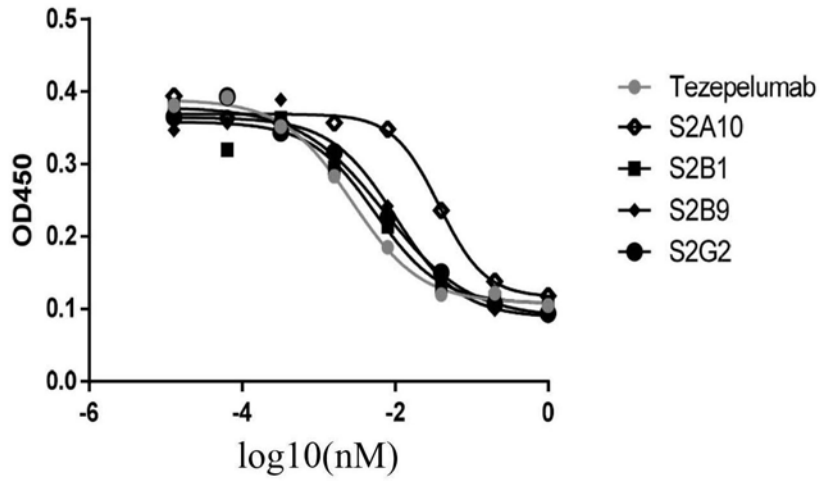


图2

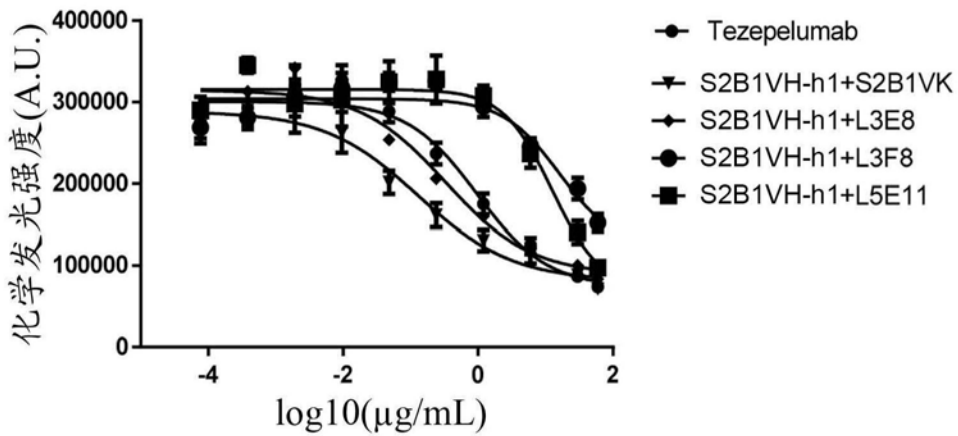


图3

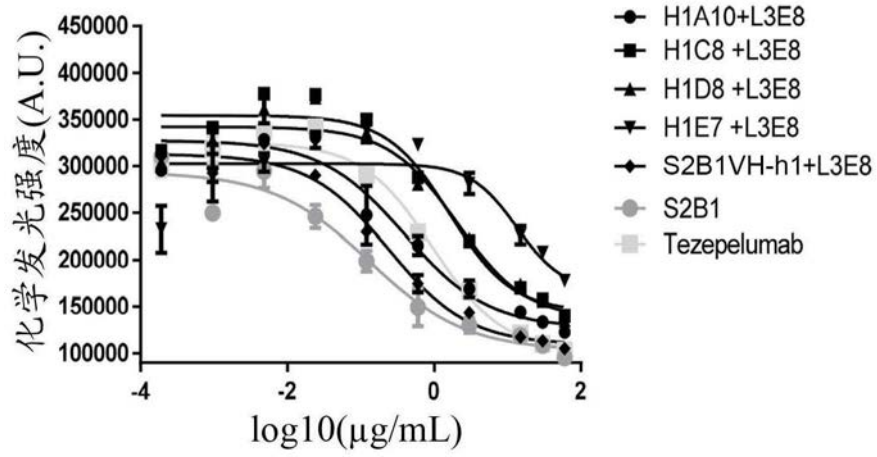


图4

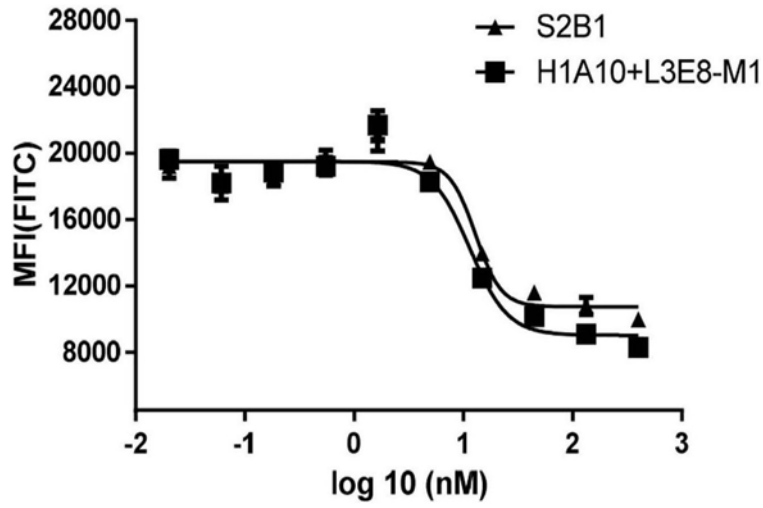


图5

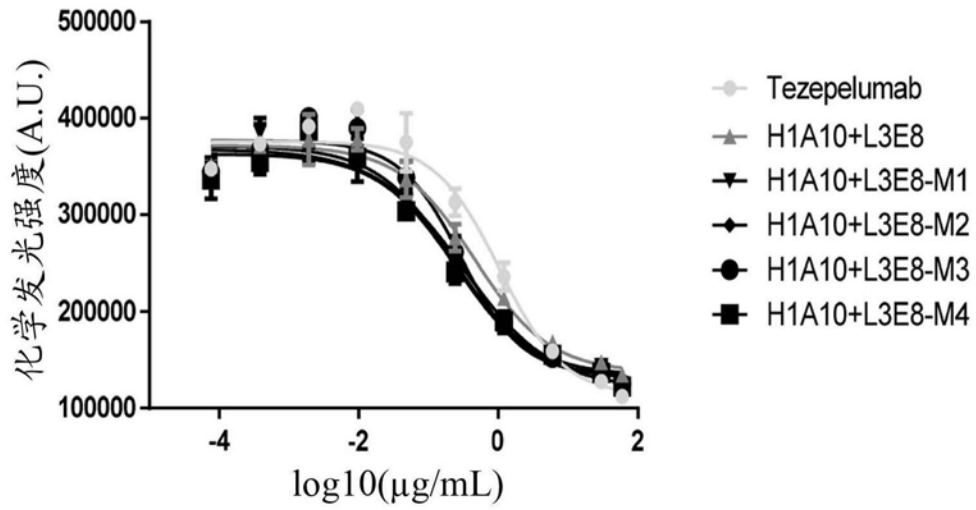


图6

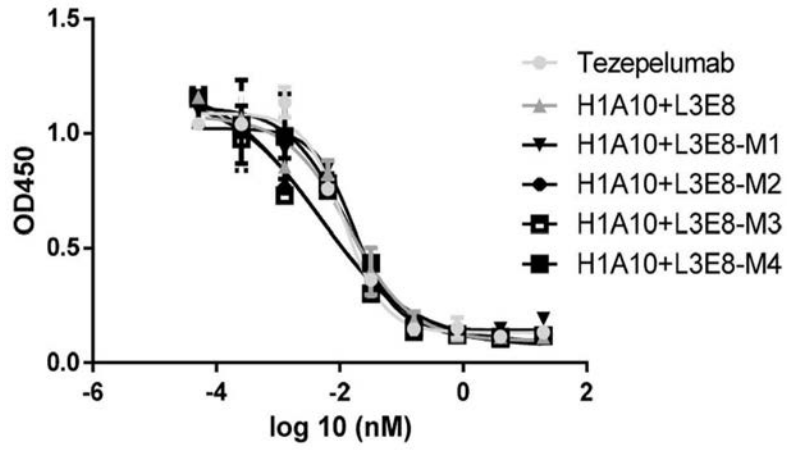


图7

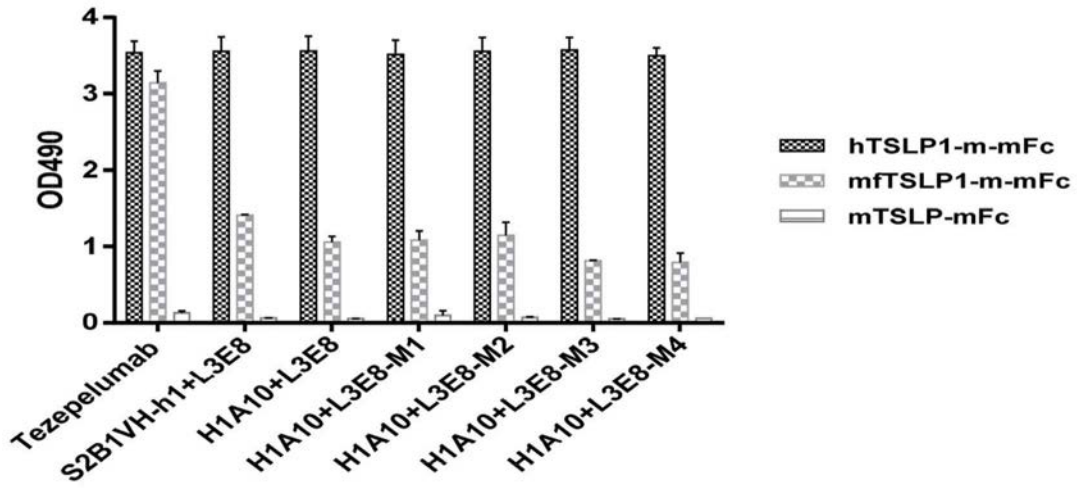


图8

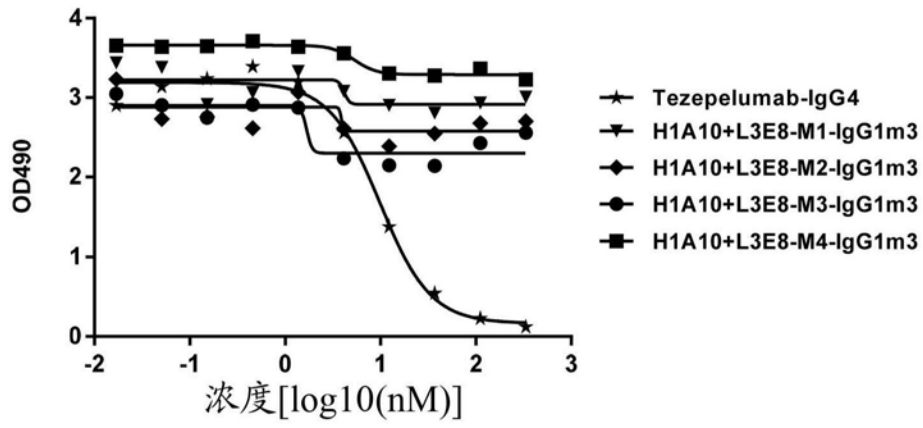


图9