



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111349163 A

(43)申请公布日 2020.06.30

(21)申请号 202010229581.1

C12N 15/13(2006.01)

(22)申请日 2020.02.05

A61K 39/395(2006.01)

(62)分案原申请数据

A61P 35/00(2006.01)

202010080449.9 2020.02.05

(71)申请人 北京智仁美博生物科技有限公司

地址 101111 北京市大兴区亦庄经济技术
开发区泰河三街6号4层智仁美博

申请人 智翔(上海)医药科技有限公司

(72)发明人 刘志刚 郝小勃 张雪萍 刘玉兰

郭晶晶

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

权利要求书1页 说明书18页

序列表29页 附图5页

(54)发明名称

针对CD123的单克隆抗体

(57)摘要

本申请提供了针对人CD123的单克隆抗体及其医学和生物学用途。

1. 结合人CD123的单克隆抗体,其包含:
如SEQ ID NO:7所示的HCDR1,
如SEQ ID NO:8所示的HCDR2,
如SEQ ID NO:9所示的HCDR3,
如SEQ ID NO:4所示的LCDR1,
如SEQ ID NO:5所示的LCDR2,和
如SEQ ID NO:6所示的LCDR3;
其中,HCDR和LCDR根据Kabat定义。
2. 如权利要求1所述的单克隆抗体,其中所述抗体包含如SEQ ID NO:13所示的重链可变区。
3. 如权利要求1或2所述的单克隆抗体,其中所述抗体包含如SEQ ID NO:12所示的轻链可变区。
4. 结合人CD123的单克隆抗体,其中所述抗体的重链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:13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:12具有至少90%的同源性。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的单克隆抗体,其中所述抗体为全抗体、Fab片段、F(ab')₂片段或单链Fv片段(scFv)。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的单克隆抗体,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,优选为IgG1亚型的重链恒定区。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的单克隆抗体,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。
8. 核酸分子,其编码权利要求1-7中任一项所述的单克隆抗体。
9. 药物组合物,其包含权利要求1-7中任一项所述的单克隆抗体。
10. 权利要求1-7中任一项所述的单克隆抗体、权利要求8所述的核酸分子、或者权利要求9所述的药物组合物在制备用于预防或治疗CD123阳性肿瘤的药物中的用途;优选地,所述CD123阳性肿瘤选自急性髓系白血病(AML)和母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤(BPDCN)。

针对CD123的单克隆抗体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是中国专利申请第202010080449.9号的分案申请。

技术领域

[0003] 本申请大体涉及抗体药物领域,具体而言,本申请提供了包含针对人CD123的单克隆抗体及其医学和生物学用途。

背景技术

[0004] 双特异性抗体(bispecific antibody, BsAb)是一类人工抗体,其包含两个不同的抗原结合位点。双特异性抗体在生物医药领域,尤其是肿瘤免疫治疗方面应用广泛。靶向CD3的双特异性抗体,一条臂能够结合T细胞表面TCR受体复合物中的CD3E亚基,另一条臂靶向肿瘤抗原。通过此种方式,双特异性抗体能够以非组织相容性复合物(MHC)依赖方式,重新导向T细胞特异性杀伤肿瘤细胞。

[0005] 双特异性抗体的平台众多,结构复杂。以抗体结构区分可以分为有Fc段和无Fc段两大类。无Fc段的双特异性抗体由两个抗体的VH区及VL区组成或者由Fab片段组成,此类双特异性抗体的主要代表有BiTE、DART、TandAbs、bi-nanobody等。此类双特异性抗体的优势在于无轻重链错配,缺点在于半衰期短,临床应用不方便。有Fc段的双特异性抗体保留了传统单克隆抗体的结构,并可以介导Fc段的生物学功能。此类双特异性抗体的代表有KIH IgG、crossmab、DVD-Ig、Triomab等,体内半衰期长且可以具有ADCC、CDC活性(Hongyan Liu, Abhishek Saxena, Sachdev S. Sidhu, et al. Fc engineering for Developing Therapeutic Bispecific Antibodies and Novel Scaffolds. Front. Immunol. 2017;8: 38)。

[0006] 因此,鉴于双特异性抗体具有广泛的适用性,本领域需要开发新的双特异性抗体。

发明内容

[0007] 第一方面,本申请提供了双特异性抗体,其包含针对人CD3E的抗原结合部,所述针对人CD3E的抗原结合部包含:

[0008] 如SEQ ID NO:1所示的HCDR1(重链CDR1),

[0009] 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2(重链CDR2),

[0010] 如SEQ ID NO:3所示的HCDR3(重链CDR3),

[0011] 如SEQ ID NO:4所示的LCDR1(轻链CDR1),

[0012] 如SEQ ID NO:5所示的LCDR2(轻链CDR2),和

[0013] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR3(轻链CDR3);

[0014] 其中,HCDR和LCDR根据Kabat定义。

[0015] 第二方面,本申请提供了双特异性抗体,其包含针对人CD123的抗原结合部,所述针对人CD123的抗原结合部包含:

- [0016] 如SEQ ID NO:7所示的HCDR1(重链CDR1),
- [0017] 如SEQ ID NO:8所示的HCDR2(重链CDR2),
- [0018] 如SEQ ID NO:9所示的HCDR3(重链CDR3),
- [0019] 如SEQ ID NO:4所示的LCDR1(轻链CDR1),
- [0020] 如SEQ ID NO:5所示的LCDR2(轻链CDR2),和
- [0021] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR3(轻链CDR3);
- [0022] 其中,HCDR和LCDR根据Kabat定义。
- [0023] 第三方面,本申请提供了双特异性抗体,其包含针对人CD3E的抗原结合部和针对人CD123的抗原结合部。
- [0024] 在第三方面的一些实施方案中,所述针对人CD3E的抗原结合部包含:
- [0025] 如SEQ ID NO:1所示的HCDR1,
- [0026] 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2,
- [0027] 如SEQ ID NO:3所示的HCDR3,
- [0028] 如SEQ ID NO:4所示的LCDR1,
- [0029] 如SEQ ID NO:5所示的LCDR2,和
- [0030] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR3;
- [0031] 其中,HCDR和LCDR根据Kabat定义。
- [0032] 在第三方面的一些实施方案中,所述针对人CD123的抗原结合部包含:
- [0033] 如SEQ ID NO:7所示的HCDR1,
- [0034] 如SEQ ID NO:8所示的HCDR2,
- [0035] 如SEQ ID NO:9所示的HCDR3,
- [0036] 如SEQ ID NO:4所示的LCDR1,
- [0037] 如SEQ ID NO:5所示的LCDR2,和
- [0038] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR3;
- [0039] 其中,HCDR和LCDR根据Kabat定义。
- [0040] 在第三方面的一些实施方案中,所述针对人CD3E的抗原结合部和所述针对人CD123的抗原结合部包含相同的轻链可变区。
- [0041] 在第三方面的一些实施方案中,所述双特异性抗体是IgG1抗体,其包含两种具有相同铰链区的重链恒定区,所述铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。
- [0042] 在第三方面的一些实施方案中,所述双特异性抗体是IgG1抗体,其包含第一重链恒定区和第二重链恒定区,其中所述第一重链恒定区的第354和366位的氨基酸分别为C和W,所述第二重链恒定区的第349、366、368和407位的氨基酸分别为C、S、A和V;抗体恒定区氨基酸位置按照EU numbering确定。
- [0043] 在第三方面的一些实施方案中,所述双特异性抗体是IgG1抗体,其包含第一重链恒定区和第二重链恒定区,其中所述第一重链恒定区和第二重链恒定区的第234、235和331位的氨基酸分别为F、E和S;抗体恒定区氨基酸位置按照EU numbering确定。
- [0044] 在第一方面和第三方面的一些实施方案中,所述针对人CD3E的抗原结合部包含如SEQ ID NO:11所示的重链可变区和如SEQ ID NO:12所示的轻链可变区。
- [0045] 在第二方面和第三方面的一些实施方案中,所述针对人CD123的抗原结合部包含

SEQ ID NO:13所示的重链可变区和如SEQ ID NO:12所示的轻链可变区。

[0046] 在上述任一方面的一些实施方案中,所述针对人CD3E的抗原结合部包含单链抗体(scfv)或Fab片段。

[0047] 在上述任一方面的一些实施方案中,所述针对人CD123的抗原结合部包含单链抗体(scfv)或Fab片段。

[0048] 在第三方面的一些实施方案中,所述抗体具有第一臂和第二臂,其中所述第一臂包含针对人CD3E的抗原结合部,所述第二臂包含针对人CD123的抗原结合部:

[0049] 所述第一臂包含如SEQ ID NO:11所示的重链可变区氨基酸序列、如SEQ ID NO:31所示的重链恒定区氨基酸序列、如SEQ ID NO:12所示的轻链可变区氨基酸序列和如SEQ ID NO:32所示的轻链恒定区氨基酸序列;

[0050] 所述第二臂包含如SEQ ID NO:13所示的重链可变区氨基酸序列、如SEQ ID NO:30所示的重链恒定区氨基酸序列、如SEQ ID NO:12所示的轻链可变区氨基酸序列和如SEQ ID NO:32所示的轻链恒定区氨基酸序列。

[0051] 第四方面,本申请提供药物组合物,其包含第一至第三方面中任一方面所述的双特异性抗体。

[0052] 第五方面,本申请提供第一至第三方面中任一方面所述的双特异性抗体或者第四方面所述的药物组合物在制备用于预防或治疗CD123阳性肿瘤的药物中的用途。

[0053] 第六方面,本申请提供了预防或治疗CD123阳性肿瘤的方法,包括向有需要的个体给予第一至第三方面中任一方面所述的双特异性抗体或者第四方面所述的药物组合物。

附图说明

[0054] 图1显示了采用流式细胞仪分析重组抗CD123单克隆抗体特异性与细胞表面的CD123结合的结果。

[0055] 图2显示了采用流式细胞仪分析H7A3人源化突变体H7A3-h2-m5+L27E5结合MV-4-11细胞表面的CD123的结果。

[0056] 图3显示了利用ELISA分析双特异性抗体CD3E×CD123与CD3E和CD123两种抗原结合的结果。

[0057] 图4显示了采用流式细胞仪分析双特异性抗体CD3E×CD123结合Jurkat-Dual细胞表面的CD3E的能力的结果。

[0058] 图5显示了采用流式细胞仪分析双特异性抗体CD3E×CD123结合MV-4-11细胞表面的CD123的能力的结果。

[0059] 图6显示了双特异性抗体CD3×CD123在CD123阳性肿瘤细胞存在时对Jurkat-Dual激活的结果,其中图A为双特异性抗体CD3×CD123、抗CD3E单克隆抗体H3B8+L27E5、抗CD123单克隆抗体H7A3-h2-m5+L27E5、以及抗CD3E单克隆抗体H3B8+L27E5和抗CD123单克隆抗体H7A3-h2-m5+L27E5的联合组对Jurkat-Dual激活的结果;图B为在CD123阳性靶细胞存在时双特异性抗体CD3×CD123、双特异性抗体对照样品Xmab14045以及HIgG对Jurkat-Dual激活的结果,以及在CD123阴性靶细胞存在时双特异性抗体CD3×CD123和双特异性抗体对照样品Xmab14045对Jurkat-Dual激活的结果。

[0060] 图7显示了双特异性抗体CD3E×CD123介导的纯化T细胞对CD123阳性肿瘤细胞的

杀伤的结果。

[0061] 图8显示了采用流式细胞仪检测双特异性抗体CD3E×CD123在CD123阳性肿瘤细胞存在时特异性活化T细胞,上调CD69的表达的结果。

[0062] 图9显示了采用流式细胞仪检测双特异性抗体CD3E×CD123在CD123阳性肿瘤细胞存在时促进T细胞增殖的结果,其中图A为双特异性抗体CD3×CD123、抗CD3E单克隆抗体H3B8+L27E5、抗CD123单克隆抗体H7A3-h2-m5+L27E5、以及抗CD3E单克隆抗体H3B8+L27E5和抗CD123单克隆抗体H7A3-h2-m5+L27E5的联合组在CD123阳性肿瘤细胞存在时促进T细胞增殖的结果;图B为双特异性抗体CD3×CD123和双特异性抗体对照样品Xmab14045在CD123阳性肿瘤细胞存在时促进T细胞增殖的结果。

[0063] 图10显示了双特异性抗体CD3E×CD123治疗的hCD34⁺人源化MV-4-11细胞肿瘤模型小鼠肿瘤体积的变化。

[0064] 序列说明

[0065] SEQ ID NO:1为抗人CD3E单克隆抗体H3B8+L27E5的重链可变区H3B8的HCDR1的氨基酸序列。

[0066] SEQ ID NO:2为抗人CD3E单克隆抗体H3B8+L27E5的重链可变区H3B8的HCDR2的氨基酸序列。

[0067] SEQ ID NO:3为抗人CD3E单克隆抗体H3B8+L27E5的重链可变区H3B8的HCDR3的氨基酸序列。

[0068] SEQ ID NO:4为轻链可变区L27E5的LCDR1的氨基酸序列。

[0069] SEQ ID NO:5为轻链可变区L27E5的LCDR2的氨基酸序列。

[0070] SEQ ID NO:6为轻链可变区L27E5的LCDR3的氨基酸序列。

[0071] SEQ ID NO:7为抗人CD123单克隆抗体H7A3-h2-m5+L27E5的重链可变区H7A3-h2-m5的HCDR1的氨基酸序列。

[0072] SEQ ID NO:8为抗人CD123单克隆抗体H7A3-h2-m5+L27E5的重链可变区H7A3-h2-m5的HCDR2的氨基酸序列。

[0073] SEQ ID NO:9为抗人CD123单克隆抗体H7A3-h2-m5+L27E5的重链可变区H7A3-h2-m5的HCDR3的氨基酸序列。

[0074] SEQ ID NO:10为铰链区的氨基酸序列。

[0075] SEQ ID NO:11为大鼠单克隆抗体WM03-C6的人源化重链突变体H3B8的氨基酸序列。

[0076] SEQ ID NO:12为大鼠单克隆抗体WM03-C6的人源化的轻链突变体L27E5的氨基酸序列。

[0077] SEQ ID NO:13为人源化版本H7A3-h2-m5的氨基酸序列。

[0078] SEQ ID NO:14为人(Homo sapiens)CD3E胞外区(hCD3E)的氨基酸序列。

[0079] SEQ ID NO:15为人(Homo sapiens)CD3D胞外区(hCD3D)的氨基酸序列。

[0080] SEQ ID NO:16为食蟹猴(Macaca fascicularis)CD3E胞外区(mfCD3E)的氨基酸序列。

[0081] SEQ ID NO:17为食蟹猴(Macaca fascicularis)CD3D胞外区(mfCD3D)的氨基酸序列。

- [0082] SEQ ID NO:18为小鼠 (*Mus musculus*) CD3E胞外区 (mCD3E) 的氨基酸序列。
- [0083] SEQ ID NO:19为小鼠 (*Mus musculus*) CD3D胞外区 (mCD3D) 的氨基酸序列。
- [0084] SEQ ID NO:20为人 (*Homo sapiens*) CD123亚型1胞外区 (hCD123-SP1) 的氨基酸序列。
- [0085] SEQ ID NO:21为食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) CD123亚型1胞外区 (mfCD123-SP1) 的氨基酸序列。
- [0086] SEQ ID NO:22为小鼠 (*Mus musculus*) CD123亚型1胞外区 (mCD123-SP1) 的氨基酸序列。
- [0087] SEQ ID NO:23为His标签的氨基酸序列。
- [0088] SEQ ID NO:24为小鼠 (*Mus musculus*) IgG2a抗体的Fc段 (mFc) 的氨基酸序列。
- [0089] SEQ ID NO:25为异源二聚体的人IgG1亚型的Fc突变体FcK的氨基酸序列。
- [0090] SEQ ID NO:26为异源二聚体的人IgG1亚型的Fc突变体FcH的氨基酸序列。
- [0091] SEQ ID NO:27为人 (*Homo sapiens*) IgG1亚型抗体重链恒定区的氨基酸序列。
- [0092] SEQ ID NO:28为人IgG1亚型抗体重链恒定区突变体IgG1H的氨基酸序列。
- [0093] SEQ ID NO:29为人IgG1亚型抗体重链恒定区突变体IgG1K的氨基酸序列。
- [0094] SEQ ID NO:30为人IgG1亚型抗体重链恒定区突变体IgG1m3-H的氨基酸序列。
- [0095] SEQ ID NO:31为人IgG1亚型抗体重链恒定区突变体IgG1m3-K的氨基酸序列。
- [0096] SEQ ID NO:32为人 (*Homo sapiens*) κ 亚型轻链恒定区的氨基酸序列。
- [0097] SEQ ID NO:33为人 (*Homo sapiens*) λ 亚型轻链恒定区的氨基酸序列。
- [0098] SEQ ID NO:34为单克隆抗体WM03-C6的重链可变区氨基酸序列。
- [0099] SEQ ID NO:35为单克隆抗体WM03-C6的轻链可变区的氨基酸序列。
- [0100] SEQ ID NO:36为抗人CD123的单链抗体S8F3的氨基酸序列。
- [0101] SEQ ID NO:37为抗人CD123的单链抗体S8F3的重链可变区S8F3VH的氨基酸序列。
- [0102] SEQ ID NO:38为抗CD123抗体CSL362的重链氨基酸序列。
- [0103] SEQ ID NO:39为抗CD123抗体CSL362的轻链氨基酸序列。
- [0104] SEQ ID NO:40为包含有Hole突变的IgG1m3亚型的Xmab14045的结合CD123的重链的氨基酸序列。
- [0105] SEQ ID NO:41为包含有Knob突变的IgG1m3亚型的Xmab14045的结合CD3E的scFv结构的氨基酸序列。
- [0106] SEQ ID NO:42为Xmab14045的轻链的氨基酸序列。
- [0107] 发明详述
- [0108] 定义
- [0109] 提供以下定义和方法用以更好地界定本申请以及在本申请实践中指导本领域普通技术人员。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。本文所引用的所有专利文献、学术论文及其他公开出版物,其中的全部内容整体并入本文作为参考。
- [0110] 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。

[0111] 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。

[0112] 本文所用术语“Fab(fragment antigen binding)片段”、“Fab部分”或类似的术语是指完整的抗体用木瓜蛋白酶处理后产生的能够与抗原结合的抗体片段,包括完整的轻链(VL-CL)、重链可变区和CH1片段(VH-CH1)。

[0113] 本文所用术语“单链抗体(scfv,single chain fragment variable)”是指一般利用基因工程技术构建的单链结构的抗体,包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的一条多肽链。在重链可变区和轻链可变区之间通常会设计一段柔性的连接肽(linker)以便重链可变区和轻链可变区可以折叠成为能够结合抗原的正确构象。

[0114] 本文所用术语“抗原结合部”是指抗体结构中决定抗原结合能力的部分。本领域技术人员能够理解,抗体结构中决定抗原结合能力的主要部分是CDR,因此CDR也是抗原结合部的核心组成部分。在双特异性抗体构建中,“抗原结合部”的例子包括但不限于单链抗体(scfv)或Fab片段。

[0115] 本文所用术语“双特异性抗体”是指具有结合两种不同抗原能力的抗体,其可以由两个Fc片段以及分别与其融合的两个抗原结合部组成。

[0116] 在一些实施方案中,本文中的“双特异性抗体”是指基于人IgG1抗体的双特异性抗体,并且除了本文说明的改变结构之外,其具备人IgG1抗体的基本特征和功能。本领域技术人员公知本文中的“双特异性抗体”也可以基于其他免疫球蛋白亚型,例如人IgG2抗体。

[0117] 本领域技术人员公知,互补决定区(CDR,通常有CDR1、CDR2及CDR3)是可变区中对抗体的亲和力和特异性影响最大的区域。VH或VL的CDR序列有两种常见的定义方式,即kabat定义和Chothia定义(参阅例如Kabat,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991);Al-Lazikani et al.,J.Mol.Biol.273:927-948(1997);以及Martin et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:9268-9272(1989))。对于给定抗体的可变区序列,可以根据Kabat定义或者Chothia定义来确定VH和VL序列中CDR区序列。在本申请的实施方案中,利用Kabat定义CDR序列。

[0118] 对于给定抗体的可变区序列,可以通过多种方式分析可变区序列中CDR区序列,例如可以利用在线软件Abysis确定(<http://www.abysis.org/>)。

[0119] 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。

[0120] CD3分子是T细胞膜上的重要分化抗原,也是成熟T细胞的特征性标志。CD3由 γ 、 δ 、 ϵ 和 δ 四种链或 γ 、 δ 、 ϵ 、 δ 和 ϵ (δ 和 ϵ 为同源异构体)五种链组成,以CD3 $\gamma\epsilon$ 、CD3 $\delta\epsilon$ 和CD3 $\delta\delta$ (或CD3 $\delta\epsilon$)3种二聚体组成并表达于T细胞膜上。CD3 γ 、 δ 和 ϵ 三条链中含有高度保守的酸性氨基酸残基(γ 为谷氨酸, δ 和 ϵ 为天冬氨酸),可以与T细胞受体(TCR) α 和 β 链上的碱性氨基酸残基通过盐桥以非共价键相连形成稳定的TCR-CD3复合物结构。该复合物可以传导T细胞激活信号并稳定TCR结构。CD3各链的胞内区中均含有ITAM(免疫受体酪氨酸活化基序)结构,该结构是CD3分子介导细胞内信号转导的基础。当TCR特异性识别并结合抗原(MHC分子提呈的抗原肽)后,T细胞内的酪氨酸蛋白激酶磷酸化ITAM上的酪氨酸残基,募集含有SH2结构域的酪氨酸蛋白激酶(ZAP-70),将信号转导到T细胞胞浆内,启动细胞内活化机制,因此CD3有传

导TCR识别抗原产生的激活信号的功能,是诱导T细胞活化的第一信号。

[0121] CD123又称为人白细胞介素-3(IL-3)受体 α 链,属于细胞因子受体超家族成员,分子量约40KDa,为I型跨膜糖蛋白。白细胞介素-3受体是由 α 链(CD123)和 β 链(CD131)形成的异二聚体。IL-3与CD123结合后,由CD131提供信号转导,进而调节造血细胞和免疫细胞的功能并刺激内皮细胞增殖(Testa et al,Biomark Res.2:4(2014))。

[0122] CD123主要表达在骨髓祖细胞、浆细胞样树突状细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞和少量的B细胞亚群(Munoz L et al,Haematologica.86(12):1261-9)。大约80%的AML患者原幼细胞过表达CD123,研究显示CD123抗原的过表达对应AML的不良预后和较低的缓解率(Testa U et al,Blood.2002;100(8))。虽然大多数AML患者对初始治疗响应良好,但仍有部分患者(60-80%)需要巩固治疗才能达到完全缓解。

[0123] 第一方面,本申请提供了双特异性抗体,其包含针对人CD3E的抗原结合部,所述针对人CD3E的抗原结合部包含:

[0124] 如SEQ ID NO:1所示的HCDR1,

[0125] 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2,

[0126] 如SEQ ID NO:3所示的HCDR3,

[0127] 如SEQ ID NO:4所示的LCDR1,

[0128] 如SEQ ID NO:5所示的LCDR2,和

[0129] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR3;

[0130] 其中,HCDR和LCDR根据Kabat定义。

[0131] 第二方面,本申请提供了双特异性抗体,其包含针对人CD123的抗原结合部,所述针对人CD123的抗原结合部包含:

[0132] 如SEQ ID NO:7所示的HCDR1,

[0133] 如SEQ ID NO:8所示的HCDR2,

[0134] 如SEQ ID NO:9所示的HCDR3,

[0135] 如SEQ ID NO:4所示的LCDR1,

[0136] 如SEQ ID NO:5所示的LCDR2,和

[0137] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR3;

[0138] 其中,HCDR和LCDR根据Kabat定义。

[0139] 第三方面,本申请提供了双特异性抗体,其包含针对人CD3E的抗原结合部和针对人CD123的抗原结合部。

[0140] 在第三方面的一些实施方案中,所述针对人CD3E的抗原结合部包含:

[0141] 如SEQ ID NO:1所示的HCDR1,

[0142] 如SEQ ID NO:2所示的HCDR2,

[0143] 如SEQ ID NO:3所示的HCDR3,

[0144] 如SEQ ID NO:4所示的LCDR1,

[0145] 如SEQ ID NO:5所示的LCDR2,和

[0146] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR3;

[0147] 其中,HCDR和LCDR根据Kabat定义。

[0148] 在第三方面的一些实施方案中,所述针对人CD123的抗原结合部包含:

[0149] 如SEQ ID NO:7所示的HCDR1,

[0150] 如SEQ ID NO:8所示的HCDR2,

[0151] 如SEQ ID NO:9所示的HCDR3,

[0152] 如SEQ ID NO:4所示的LCDR1,

[0153] 如SEQ ID NO:5所示的LCDR2,和

[0154] 如SEQ ID NO:6所示的LCDR3;

[0155] 其中,HCDR和LCDR根据Kabat定义。

[0156] 在第三方面的一些实施方案中,所述针对人CD3E的抗原结合部和所述针对人CD123的抗原结合部包含相同的轻链可变区。

[0157] 在第三方面的一些具体实施方案中,所述针对人CD3E的抗原结合部和所述针对人CD123的抗原结合部包含相同的轻链,该实施方案有利于轻链和重链的正确装配,也是优选的一种实施方案。

[0158] 在第三方面的一些实施方案中,所述双特异性抗体是IgG1抗体,包含两种具有相同铰链区的重链恒定区,所述铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,其替换天然人IgG1抗体恒定区的第216-230位序列,抗体恒定区氨基酸位置按照EU numbering确定。

[0159] 在第三方面的一些实施方案中,所述双特异性抗体是IgG1抗体,其包含第一重链恒定区和第二重链恒定区,其中第一重链恒定区的第354和366位的氨基酸分别为C和W,第二重链恒定区的第349、366、368和407位的氨基酸分别为C、S、A和V;抗体恒定区氨基酸位置按照EU numbering确定。

[0160] 当构建保留抗体Fc结构域的双特异性抗体时,可以从以下两个角度优化双特异性抗体的结构:一是重链异聚化,二是轻链和重链的正确装配。在一些实施方案中,两种Fc片段包含能够确保重链异聚化的突变。KIH技术(knob-in-hole,KIH)是解决重链异聚化的一种策略。通常,KIH技术是指通过改造CH3区的氨基酸序列,形成有利于异种半抗体相互配对的结构,可以在构成双特异性抗体的同时又尽可能地保持正常抗体的结构。在一些实施方案中,所利用的KIH技术包括,使一个Fc片段的第354和366位的氨基酸分别为C和W,另一个Fc片段的第349、366、368和407位的氨基酸分别为C、S、A和V。关于KIH技术的指导,例如可参见“An efficient route to human bispecific IgG”,A.Margaret Merchant et al., Nature Biotechnology,Volume 16,1998,通过引用的方式将该文献全文并入本文。

[0161] 在第三方面的一些实施方案中,所述双特异性抗体是IgG1抗体,其包含第一重链恒定区和第二重链恒定区,其中第一重链恒定区和第二重链恒定区的第234、235和331位的氨基酸分别为F、E和S;抗体恒定区氨基酸位置按照EU numbering确定。

[0162] 在第三方面的一些实施方案中,两种重链恒定区的CH2片段的第234、235和331位的氨基酸分别为F、E和S,其能够降低抗体Fc段介导的抗体依赖性细胞毒作用(ADCC),从而可能减少双特异性抗体在体内导致的副作用。关于上述突变的指导,例如可参见“The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region”,Stephen M.Canfield et al.,J.Exp.Med.Volume 173,1991,通过引用的方式将该文献全文并入本文。

[0163] 在第一和第三方面的一些实施方案中,针对人CD3E的抗原结合部包含如SEQ ID

NO:11 (包含如SEQ ID NO:1所示的HCDR1、如SEQ ID NO:2所示的HCDR2和如SEQ ID NO:3所示的HCDR3)所示的重链可变区和如SEQ ID NO:12所示的轻链可变区(包含如SEQ ID NO:4所示的LCDR1、如SEQ ID NO:5所示的LCDR2和如SEQ ID NO:6所示的LCDR3)。

[0164] 在第二和第三方面的一些实施方案中,针对人CD123的抗原结合部包含SEQ ID NO:13 (包含如SEQ ID NO:7所示的HCDR1、如SEQ ID NO:8所示的HCDR2和如SEQ ID NO:9所示的HCDR3)所示的重链可变区和如SEQ ID NO:12所示的轻链可变区(包含如SEQ ID NO:4所示的LCDR1、如SEQ ID NO:5所示的LCDR2和如SEQ ID NO:6所示的LCDR3)。

[0165] 在上述任一方面的一些实施方案中,所述针对人CD3E的抗原结合部包含单链抗体(scfv)或Fab片段。

[0166] 在上述任一方面的一些实施方案中,所述针对人CD123的抗原结合部包含单链抗体(scfv)或Fab片段。

[0167] 由于双特异性抗体具有针对两种不同抗原的两个不同抗原结合部,而抗原结合部可以包含单链抗体(scfv)或Fab片段两种形式,那么针对给定的两种抗原时,双特异性抗体的抗原结合部配置可以具有四种组合方式:Fab+Fab、Fab+scfv、scfv+Fab和scfv+scfv。

[0168] 在上述任一方面的一些具体实施方案中,所述针对人CD3E的抗原结合部包含Fab片段,所述针对人CD123的抗原结合部包含Fab片段。

[0169] 在上述任一方面的一些具体实施方案中,所述针对人CD3E的抗原结合部包含Fab片段,所述针对人CD123的抗原结合部包含单链抗体(scfv)。

[0170] 在上述任一方面的一些具体实施方案中,所述针对人CD3E的抗原结合部包含单链抗体(scfv),所述针对人CD123的抗原结合部包含Fab片段。

[0171] 在上述任一方面的一些具体实施方案中,所述针对人CD3E的抗原结合部包含单链抗体(scfv),所述针对人CD123的抗原结合部包含单链抗体(scfv)。

[0172] 在本文中,还将双特异性抗体描述为具有两个“臂”,以中间为界,可以将双特异性抗体分为两个臂。双特异性抗体的臂可以由Fc片段和抗原结合部(Fab片段或单链抗体)组成。对于由Fc片段和Fab片段组成的臂,其结构类似于通常的抗体,含有完整的重链和轻链,因此这样的臂的结构可以表示为Fc+Fab,也可以表示为重链(Fc+Fab中的重链可变区和CH1片段)+轻链(Fab中的轻链部分)。当两个臂都含有Fab片段形式的抗原结合部时,由此形成的双特异性抗体的结构接近于天然抗体,是优选的一种实施方案。

[0173] 在第三方面的一些实施方案中,所述抗体具有第一臂和第二臂,其中第一臂包含针对人CD3E的抗原结合部,第二臂包含针对人CD123的抗原结合部:

[0174] 所述第一臂包含如SEQ ID NO:11所示的重链可变区氨基酸序列、如SEQ ID NO:31所示的重链恒定区氨基酸序列、如SEQ ID NO:12所示的轻链可变区氨基酸序列和如SEQ ID NO:32所示的轻链恒定区氨基酸序列;

[0175] 所述第二臂包含如SEQ ID NO:13所示的重链可变区氨基酸序列、如SEQ ID NO:30所示的重链恒定区氨基酸序列、如SEQ ID NO:12所示的轻链可变区氨基酸序列和如SEQ ID NO:32所示的轻链恒定区氨基酸序列。

[0176] 在上述任一方面的一些实施方案中,所述双特异性抗体的重链恒定区是人IgG1亚型或者选定的人IgG1亚型的各种突变体,例如:IgG1H、IgG1K、IgG1m3-H或者IgG1m3-K。

[0177] 在上述任一方面的一些实施方案中,所述双特异性抗体的轻链恒定区是人κ亚型

或人 λ 亚型,优选为人 κ 亚型。

[0178] 第四方面,本申请提供药物组合物,其包含第一至第三方面中任一方面所述的双特异性抗体。

[0179] 在一些实施方案中,药物组合物还包含药学可接受的载体、赋形剂、稀释剂等。

[0180] 在一些实施方案中,药物组合物用于预防或治疗CD123阳性肿瘤,例如急性髓系白血病(AML)和母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤(BPDCN)。

[0181] 在一些实施方案中,药物组合物还可包含润滑剂,如滑石粉、硬脂酸镁和矿物油;润湿剂;乳化剂;悬浮剂;防腐剂,如苯甲酸、山梨酸和丙酸钙;增甜剂和/或调味剂等。

[0182] 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。

[0183] 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。

[0184] 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。

[0185] 第五方面,本申请提供第一至第三方面中任一方面所述的双特异性抗体或者第四方面所述的药物组合物在制备用于预防或治疗CD123阳性肿瘤的药物中的用途。

[0186] 在第五方面的一些实施方案中,所述CD123阳性肿瘤选自急性髓系白血病(AML)和母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤(BPDCN)。

[0187] 第六方面,本申请提供了预防或治疗CD123阳性肿瘤的方法,包括向有需要的个体给予第一至第三方面中任一方面所述的双特异性抗体或者第四方面所述的药物组合物。

[0188] 在第六方面的一些实施方案中,所述CD123阳性肿瘤选自急性髓系白血病(AML)和母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤(BPDCN)。

[0189] 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。

[0190] 以下实施例仅用于说明而非限制本申请范围的目的。

实施例

[0191] 实施例1重组蛋白的制备

[0192] 制备和鉴定CD3E \times CD123双特异性抗体的过程中需要用到多种不同的重组蛋白,包括人CD3E胞外区(hCD3E,SEQ ID NO:14)、人CD3D胞外区(hCD3D,SEQ ID NO:15)、猴CD3E胞外区(mfCD3E,SEQ ID NO:16)、猴CD3D胞外区(mfCD3D,SEQ ID NO:17)、小鼠CD3E胞外区(mCD3E,SEQ ID NO:18)、小鼠CD3D胞外区(mCD3D,SEQ ID NO:19)以及人CD123亚型1胞外区(hCD123-SP1,SEQ ID NO:20)、猴CD123亚型1胞外区(mfCD123-SP1,SEQ ID NO:21)、小鼠CD123亚型1胞外区(mCD123-SP1,SEQ ID NO:22)。这些重组蛋白都有大量的翻译后修饰(如糖基化或二硫键等),因而利用哺乳动物细胞表达系统将更有利于保持重组蛋白的结构和功能。此外,为了方便纯化,非抗体类的重组蛋白在C端添加His标签(SEQ ID NO:23),或者小鼠抗体IgG2a的Fc段(mFc,SEQ ID NO:24),或者基于KIH(Knob-Into-Hole)技术形成异源

二聚体的人IgG1亚型的Fc突变体(FcK, SEQ ID NO:25或者FcH, SEQ ID NO:26)。在制备重组抗体时,抗体重链恒定区可以是人IgG1亚型(SEQ ID NO:27)或者选定的人IgG1亚型的各种突变体,如:IgG1H(SEQ ID NO:28)、IgG1K(SEQ ID NO:29)、IgG1m3-H(SEQ ID NO:30)或者IgG1m3-K(SEQ ID NO:31),轻链恒定区是人κ亚型(SEQ ID NO:32)或人λ亚型(SEQ ID NO:33)。

[0193] 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、mFc或者Fc编码基因)。利用常规的分子生物学技术将合成的各种重组蛋白基因克隆至合适的真核表达载体(如invitrogen公司的pcDNA3.1等),然后利用脂质体(如invitrogen公司的293fectin等)或其它转染试剂(如PEI等)将制备的重组蛋白表达质粒转染入HEK293细胞(如invitrogen公司的HEK293F),在无血清悬浮培养条件下培养3-5天。然后通过离心等方式收获培养上清。

[0194] 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。而mFc融合表达的重组蛋白和重组抗体用ProteinA/G亲和层析柱(如GE公司的Mabselect SURE等)进行一步纯化。然后利用脱盐柱(如GE公司的Hitrap desalting等)将重组蛋白保存缓冲液置换为PBS(pH7.0)或者其它合适的缓冲液。必要时,可以对抗体样品进行过滤除菌,然后分装保存于-20℃。

[0195] 实施例2基于固定轻链的CD123小鼠免疫库构建

[0196] 为构建基于共同轻链的CD3E×CD123双特异性抗体,选取特定的抗CD3E单克隆抗体轻链可变区配合经过CD123抗原体内亲和成熟的小鼠重链可变区,利用常规分子生物学手段构建单链抗体(scFv)库,用于筛选针对CD123的特异性抗体。

[0197] 利用hCD123-SP1-His和mfCD123-SP1-His重组蛋白交叉免疫6-8周龄的BALB/c小鼠后,收集脾细胞。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)对小鼠脾脏淋巴细胞进行分离,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),将分离的淋巴细胞进行总RNA的提取。以提取的总RNA为模板,利用第一链cDNA合成试剂盒(Thermo scientific,CAT#K1621)合成抗体的重链可变区。利用常规分子生物学手段,PCR扩增得到特异性识别人和食蟹猴CD3E的大鼠单克隆抗体WM03-C6(参见专利WO_2016_116626_A1中单克隆抗体20E5-F10的序列,重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示,轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示)轻链可变区和CD123重组抗原免疫得到的小鼠重链可变区,然后利用重叠延伸PCR技术,构建单链抗体(scFv),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中国专利申请第201510097117.0号的实施例1),构建scFv库。此抗体库的库容达到 1.2×10^8 ,正确率为65%。

[0198] 实施例3固定轻链的CD123小鼠免疫库的筛选

[0199] 3.1抗人CD123小鼠单链抗体的筛选

[0200] 以实施例1制备的重组hCD123-SP1-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)筛选实施例2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1株特异性结合人CD123的单链抗体S8F3(SEQ ID NO:36)。

[0201] 利用常规的分子生物学手段,将编码S8F3的重链可变区S8F3VH(SEQ ID NO:37)和轻链可变区WM03-C6VK(SEQ ID NO:35)的核苷酸序列分别克隆至融合有编码人重链恒定区和轻链恒定区的核苷酸序列真核表达载体(如invitrogen公司的pcDNA3.1等),组合表达全抗体S8F3VH+C6VK。同时,参照美国专利US_2014_0178364_A1制备抗CD123抗体CSL362(重链氨基酸序列如SEQ ID NO:38所示,轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:39所示)作为阳性对照抗体用于后续研究。

[0202] 3.2重组抗CD123单克隆抗体的亲和力分析

[0203] 利用Biacore X100通过表面等离子共振技术测定抗CD123抗体的亲和力。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。依照试剂盒中的说明书,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CD123抗体(S8F3VH+C6VK和CSL362)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hCD123-SP1-his设置一系列的浓度梯度(例如2.47nM、7.4nM、22.2nM、66.7nM、200nM),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600-2400s,以10μL/min注射3M的MgCl₂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_{on})和解离速率(K_{off})。以比率K_{off}/K_{on}计算解离平衡常数(KD)。拟合结果如表1所示。

[0204] 表1.重组抗CD123单克隆抗体结合hCD123-SP1-his亲和力常数

	K _{on}	K _{off}	KD
[0205] S8F3VH+C6VK	4.546E+5	3.651E-3	8.030E-9
[0206] CSL362	1.324E+5	7.931E-5	5.991E-10

[0207] 3.3重组抗CD123单克隆抗体结合细胞表面CD123抗原的鉴定

[0208] 取生长对数期的KG-1a(人急性髓系白血病细胞,购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心),离心后用含1%BSA的PBS缓冲液重悬至2×10⁶个/mL,100μL/孔铺于96孔V底板中,离心后去掉上清。用PBS将待测样品S8F3VH+C6VK、对样品CSL362以及HIgG无关抗体(金斯瑞A01006,人IgG对照(全分子),Purifie)分别配制为5μg/mL和0.5μg/mL的终浓度,加入含细胞的孔中,4℃孵育1小时。然后用200μL PBS清洗3遍,加入羊抗人IgG-FITC(中杉金桥,ZF-0308)二抗(100μL/孔),4℃避光孵育30分钟。然后用200μL PBS清洗3遍,100μL PBS重悬后用流式细胞仪(ACEA,Novocyte)检测FITC通道。结果显示S8F3VH+C6VK能特异性结合CD123阳性细胞KG-1a(图1)。

[0209] 实施例4 WM03-C6单克隆抗体的人源化和活性鉴定

[0210] 4.1 WM03-C6人源化设计

[0211] 对大鼠单克隆抗体WM03-C6进行人源化研究以降低其免疫原性。人源化方案采取经典的框架移植策略(Jimmunol.169,1119-1125,2002)。将WM03-C6的重链可变区和轻链可变区分别与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抗体的框架区1至3(FR1+FR2+FR3),选择合适的J区基因序列以提供框架区4(FR4)。这个模板可以根据多种因素选出,如:抗体的相对总长度、CDR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混合物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。同时,为避免抗体超变区(CDR)中脱氨基位点NG可能带来的蛋白异质性,对人源化后的抗体轻重链分别进行了突变设计。最终得到了人源化的轻链突变体L27E5(SEQ ID NO:12)和人源化重链突变体H3B8(SEQ ID NO:11)。

[0212] 4.2 WM03-C6人源化单克隆抗体的亲和力分析

[0213] 参照实施例3.2,将抗人IgG(Fc)抗体偶联至CM5芯片表面,稀释抗CD3E抗体(WM03-C6和H3B8+L27E5)至0.5-1 μ g/mL,10 μ L/min注射,保证350-400RU左右的抗体被抗人Fc的抗体捕获。然后将hCD3E-his设置一系列的浓度梯度(例如6.17nM、18.5nM、55.6nM、167nM、500nM),在25 $^{\circ}$ C下30 μ L/min从低浓度到高浓度进行注射,结合时间为120s,解离时间为600-1800s,以10 μ L/min注射3M的MgCl₂ 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_{on})和解离速率(K_{off})。以比率K_{off}/K_{on}计算解离平衡常数(KD)。拟合结果如表2所示。

[0214] 表2.WM03-C6人源化单克隆抗体结合hCD3E-his亲和力常数

[0215]	K _{on}	K _{off}	KD
WM03-C6	2.716E+4	2.879E-4	1.060E-8
H3B8+L27E5	2.084E+4	9.928E-4	4.763E-8

[0216] 实施例5 S8F3的体外亲和力成熟

[0217] 为提高双特异性抗体针对靶抗原的特异性,增强双特异性抗体在给药过程中的组织分布和杀伤效率,对S8F3重链可变区进行了体外亲和力成熟。利用常规分子生物学手段,通过在S8F3重链可变区的CDR3中引入突变,构建了基于S8F3VH的CDR3突变库。设计的突变方案如表3所示,构建库容为1.7 \times 10⁸,正确率86%。

[0218] 表3.S8F3VH-CDR3突变库设计方案

[0219]	初始氨基酸	设计氨基酸	简并密码子
	L	LFVI	NTC
	R	RTKSN	AVW
	Y	YF	TWC
	G	GSDNIV	RDT
	N	NDTA	RMC
	Y	YF	TWC

[0220]	G	GVAD	GNT
	D	DNYSTA	DMC
	A	ATNDIV	RHT
	M	MVTAKE	RHG
	D	DNYSTA	DMC
	D	DYFV	KWT

[0221] 基于双载体噬菌体展示系统(实验技术流程参见中国专利申请第201510097117.0号中的实施例5),通过固相筛选的方法,利用hCD123-SP1抗原对构建的S8F3VH-CDR3突变文库进行了3轮筛选富集,最终得到亲和力提高的重链可变区突变体H7A3。将得到的编码H7A3可变区的核苷酸序列克隆至融合有编码人重链恒定区的核苷酸序列的真核表达载体,配合L27E5轻链表达载体组合表达全抗体。

[0222] 参照实施例3.2,用Biacore X100对S8F3重链突变体H7A3进行亲和力测定,结果如表4所示。

[0223] 表4.S8F3重链突变体结合hCD123-SP1-his亲和力常数

[0224]		K _{on}	K _{off}	KD
	S8F3VH+L27E5	4.384E+4	1.455E-4	3.319E-9
	H7A3+L27E5	2.698E+5	6.638E-5	2.46E-10

[0225] 实施例6 H7A3的人源化及其活性鉴定

[0226] 抗人CD123鼠单克隆抗体重链H7A3的人源化采用经典的框架移植策略。参照实施例4,对H7A3的重链可变区进行CDR移植得到人源化版本H7A3VH-h2,同时为保证抗体的构象和亲和力,对人源化抗体框架区一些关键氨基酸如I69、R71、T73、A75进行了回复突变,最终得到人源化版本H7A3-h2-m5 (SEQ ID NO:13)。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并配合共同轻链L27E5表达人IgG1版本全抗体。

[0227] 参考实施例3.2,用Biacore X100对H7A3人源化版本H7A3-h2-m5进行亲和力测定,结果如表5所示。

[0228] 表5.H7A3人源化版本结合hCD123-SP1-his亲和力常数

[0229]		K _{on}	K _{off}	KD
	H7A3+L27E5	3.054E+5	6.889E-5	2.256E-10
	H7A3-h2-m5+L27E5	3.144E+5	7.671E-5	2.440E-10

[0230] 取生长对数期的MV-4-11(人急性单核细胞白血病细胞,购自南京科佰生物科技有限公司),离心后用含1%BSA的PBS缓冲液重悬至 2×10^6 个/mL,100 μ L/孔铺于96孔V底板中,离心后去掉上清。用PBS将待测样品H7A3-h2-m5+L27E5、对照样品CSL362以及HIgG无关抗体(金斯瑞A01006,人IgG对照(全分子),Purifie)均配制成终浓度为100nM起始,3倍梯度稀释,共9个浓度,加入含细胞的孔中,4 $^{\circ}$ C孵育1小时。然后用200 μ L PBS清洗3遍,加入羊抗人IgG-FITC(中杉金桥,ZF-0308),100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C避光孵育30分钟。然后用200 μ L PBS清洗3遍,100 μ L PBS重悬后用流式细胞仪(ACEA,Novocyte)检测FITC通道。结果如图2所示,H7A3-h2-m5+L27E5能很好的结合CD123阳性细胞MV-4-11,KD值为3.1nM。

[0231] 实施例7双特异性抗体的制备

[0232] 分别将编码CD3E单克隆抗体的重链可变区H3B8和CD123单克隆抗体的重链可变区H7A3-h2-m5的核苷酸序列克隆至合适的真核表达载体,构建基于共同轻链的异源二聚体。即将编码CD3E抗体的重链可变区的核苷酸序列克隆至融合有编码Knob突变的IgG1恒定区IgG1m3-K的核苷酸序列的真核表达载体,将编码CD123抗体的重链可变区的核苷酸序列克隆至含有编码Hole突变的IgG1恒定区IgG1m3-H核苷酸序列的真核表达载体,将编码共同轻链L27E5的可变区VK的核苷酸序列克隆至融合有编码人轻链恒定区CK的核苷酸序列的真核表达载体。同时为了比较候选分子与临床在研的CD3E×CD123双特异性抗体的生物学活性,参照专利W02017210443,构建了基于相同Fc结构的Xmab14045 (SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42)。

[0233] 将构建的表达H3B8-IgG1m3-K、表达H7A3-h2-m5-IgG1m3-H和表达L27E5-CK的3个真核表达载体利用脂质体共转染入HEK293F细胞,在无血清悬浮培养条件下培养3-5天,然后通过离心等方式收获培养上清。培养上清中双特异性抗体用ProteinA/G亲和层析柱(如GE公司的Mabselect SURE等)进行纯化,然后利用脱盐柱(如GE公司的Hitrap desalting等)将重组蛋白保存缓冲液置换为PBS (pH7.0) 或者其它合适的缓冲液。将脱盐后蛋白溶液通过尺寸排阻层析 (SEC) 使用Superdex200 (GE) 纯化得到目的蛋白。必要时,可以对抗体样品进行过滤除菌,然后分装保存于-20℃备用。

[0234] 实施例8双特异性抗体的亲和力分析

[0235] 参照实施例3.2和4.2,利用Biacore X100通过表面等离子共振技术对抗CD3E单克隆抗体H3B8+L27E5、抗CD123单克隆抗体H7A3-h2-m5+L27E5、CD3×CD123双特异性抗体 (CD3×CD123 BsAb) 及Xmab14045对照抗体进行亲和力测定,亲和力拟合结果见表6和表7。

[0236] 表6.CD3×CD123双特异性抗体结合hCD123-SP1-his亲和力常数

[0237]	K_{on}	K_{off}	KD
H7A3-h2-m5+L27E5	2.337E+5	5.137E-5	2.198E-10
CD3×CD123BsAb	2.254E+5	4.015E-5	1.781E-10
Xmab14045	9.671E+4	8.188E-5	8.467E-10

[0238] 表7.CD3×CD123双特异性抗体结合CD3E亲和力常数

[0239]	hCD3E-his			mfCD3E-his		
	K_{on}	K_{off}	KD	K_{on}	K_{off}	KD
H3B8+L27E5	5.607E+4	7.108E-4	1.268E-8	1.233E+5	6.492E-4	5.263E-9
CD3×CD123BsAb	5.646E+4	7.967E-4	1.411E-8	1.368E+5	1.571E-3	1.149E-8
Xmab14045	5.648E+5	3.674E-4	6.505E-10	8.633E+5	8.074E-4	9.352E-10

[0240] 实施例9双特异性抗体同时识别CD3E和CD123两种抗原的能力鉴定

[0241] 利用常规ELISA方法检测CD3×CD123双特异性抗体 (CD3×CD123 BsAb) 对CD3E和CD123两种抗原的同时结合。将CD123-SP1-mFc抗原包被96孔ELISA板 (3μg/mL, 100μL/孔), 4℃包被过夜。利用封闭液PBS-0.1%Tween20-3%牛奶在37℃下封闭1小时后,分别加入抗CD123单克隆抗体H7A3-h2-m5+L27E5、抗CD3E单克隆抗体H3B8+L27E5和CD3×CD123双特异性抗体 (10μg/mL, 100μL/孔), 各两个复孔, 37℃孵育1小时。PBS-0.1%Tween20洗涤ELISA

板,然后加入CD3E-his抗原(1 μ g/mL,100 μ L/孔),37 $^{\circ}$ C孵育1小时。PBS-0.1%Tween20洗涤ELISA板,然后加入HRP小鼠抗his IgG(北京康为世纪生物科技有限公司,cw0285M),37 $^{\circ}$ C孵育1小时。PBS-0.1%Tween20洗涤ELISA板,加入OPD底物显色液,5-10分钟后用1M的H₂SO₄终止显色,酶标仪492nm/630nm双波长测定光密度值。ELISA分析结果如图3所示,CD3 \times CD123双特异性抗体能够同时识别CD3E和CD123两种抗原。

[0242] 实施例10双特异性抗体识别细胞表面CD3E和CD123的能力鉴定

[0243] 10.1双特异性抗体识别细胞表面CD3E能力鉴定

[0244] 取生长对数期的Jurkat-Dual细胞(购自Invivogen,jktd-isnf),离心后用含1%BSA的PBS缓冲液重悬至 2×10^6 个/mL,100 μ L/孔铺于96孔V底板中,离心后去掉上清。用PBS稀释样品,双特异性抗体对照样品Xmab14045、抗CD3E单克隆抗体H3B8+L27E5、HIgG无关抗体(金斯瑞A01006,人IgG对照(全分子,Purifie)和CD3 \times CD123双特异性抗体(CD3 \times CD123BsAb)均以400nM为起始浓度,前3个点2倍稀释,后5个浓度点3倍稀释,共计8个浓度,加入含细胞的孔中,4 $^{\circ}$ C孵育1小时。然后用200 μ L PBS清洗3遍,加入羊抗人IgG-FITC(中杉金桥,ZF-0308)100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C避光孵育30分钟。然后用200 μ L PBS清洗3遍,100 μ L PBS重悬后用流式细胞仪(ACEA,Novocyte)检测FITC通道。结果显示CD3 \times CD123双特异性抗体可以结合Jurkat-Dual细胞表面的CD3E,结合强度弱于对照样品Xmab14045,与实施例9中亲和力测定结果一致(图4)。

[0245] 10.2双特异性抗体识别细胞表面CD123能力鉴定

[0246] 取生长对数期的MV-4-11细胞,离心后用含1%BSA的PBS缓冲液重悬至 2×10^6 个/mL,100 μ L/孔铺于96孔V底板中,离心后去掉上清。用PBS稀释样品,双特异性抗体对照样品Xmab14045、抗CD123单克隆抗体H7A3-h2-m5+L27E5、CD3 \times CD123双特异性抗体(CD3 \times CD123BsAb)和HIgG无关抗体(金斯瑞A01006,人IgG对照(全分子,Purifie)均以100nM终浓度起始,3倍梯度稀释,共9个浓度点,加入含细胞的96孔板中,4 $^{\circ}$ C孵育1小时。然后用200 μ L PBS清洗3遍,加入羊抗人IgG-FITC(中杉金桥,ZF-0308)100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C避光孵育30分钟。然后用200 μ L PBS清洗3遍,100 μ L PBS重悬后用流式细胞仪(ACEA,Novocyte)检测FITC通道。结果显示,CD3 \times CD123双特异性抗体能很好的结合CD123阳性细胞MV-4-11表面的CD123,KD值为7.08nM,与Xmab14045(KD=6.07nM)相当(图5)。

[0247] 实施例11双特异性抗体介导Jurkat-Dual细胞特异性激活

[0248] 收集处于生长对数期的MV-4-11细胞(CD123⁺细胞),离心后用1640培养基重悬至 2×10^6 个/mL,50 μ L/孔铺于细胞板中,离心后去掉上清。收集生长对数期的Jurkat-Dual细胞(购自Invivogen),离心后用1640培养基重悬至 2×10^6 个/mL,50 μ L/孔加入细胞板中以获得1:1的最终E:T比例。然后加入起始浓度为6nM,4倍梯度稀释,8个浓度点的CD3 \times CD123双特异性抗体(CD3 \times CD123BsAb,50 μ L/孔)。系统对照设置有双特异性抗体对照样品Xmab14045、抗CD3E单克隆抗体H3B8+L27E5、抗CD123单克隆抗体H7A3-h2-m5+L27E5、H3B8+L27E5和H7A3-h2-m5+L27E5的联合组(H3B8+L27E5&H7A3-h2-m5+L27E5)以及CD123阴性靶细胞(BAF3细胞)对照组以及HIgG无关抗体(金斯瑞A01006,人IgG对照(全分子),Purifie),使用浓度均同CD3 \times CD123双特异性抗体的浓度。孵育20小时后,取上清,参照QUANTI-Luc™说明书(QUANTI-Luc,Invivogen,rep-qlc2)检测和分析不同条件下介导的肿瘤细胞对Jurkat-Dual细胞的特异性激活(图6A-B)。

[0249] 实施例12 CD3×CD123双特异性抗体介导纯化的T细胞表面活化分子的表达和对CD123阳性肿瘤细胞的杀伤

[0250] 12.1人外周血单核细胞(PBMC)的分离

[0251] 采集正常志愿者的血液(各50mL),所有志愿者均已签订知情同意书。

[0252] 志愿者入选标准为:

[0253] 1.年龄大于18周岁;

[0254] 2.无HIV、HBV感染;

[0255] 3.血常规检测正常;

[0256] 4.非孕妇或哺乳期妇女;

[0257] 利用Ficoll密度梯度离心法从志愿者全血细胞中分离得到PBMC,并培养于1640培养基中。

[0258] 12.2双特异性抗体介导纯化的T细胞杀伤CD123阳性肿瘤细胞的检测

[0259] 收集生长对数期的MV-4-11细胞(CD123⁺细胞),离心后用1640培养基重悬至 1×10^6 个/mL,50 μ L/孔铺于细胞板中。然后加入起始浓度为1nM,4倍梯度稀释,8个浓度点的CD3×CD123双特异性抗体(CD3×CD123 BsAb,50 μ L/孔)。参照T细胞阴性分选试剂盒说明书(BD Imaq human T lymphocyte enrichment set-DM,BD,557874)从PBMC中分选获得纯化的T细胞(5×10^6 个/mL,50 μ L/孔),最终效靶比为5:1。同时设置单独靶细胞对照(MV-4-11细胞)、单独效应细胞对照(T)、单独培养基空白对照,并用培养基将体积补齐至150 μ L。孵育20小时后,取上清,参照cytoTox96[®]非放射性细胞毒性检测试剂说明书(cytoTox96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, promega, G1780)检测和分析CD3×CD123双特异性抗体介导的T细胞对肿瘤细胞的杀伤率。结果显示CD3×CD123双特异性抗体可以特异的介导T细胞对CD123阳性肿瘤细胞的杀伤,对CD123阴性肿瘤细胞(BAF3细胞)没有表现出杀伤效果(图7)。

[0260] 12.3双特异性抗体特异性激活T细胞后表面活化分子表达的鉴定

[0261] 在12.2实验中,取出上清后的细胞,PBS清洗2遍,加入抗人CD3-APC(ebioscience, 17-0037-42)和抗人CD69-PE(ebioscience, 11-0069-42)流式抗体4℃避光孵育30分钟,然后用PBS清洗2遍,100 μ L PBS重悬后上流式(ACEA, Novocyte)检测,比较CD3×CD123双特异性抗体(CD3×CD123 BsAb)处理后CD3阳性细胞群(MV-4-11细胞)中活化标志物CD69的表达差异。结果显示:CD3×CD123双特异性抗体在阳性肿瘤细胞存在下,可以特异的上调T细胞表面CD69的表达,CD123阴性肿瘤细胞(BAF3细胞)不能上调T细胞表面CD69的表达(图8)。

[0262] 实施例13双特异性抗体介导的T细胞体外增殖实验

[0263] 13.1人外周血单核细胞(PBMC)的分离

[0264] 参照实施例12.1进行分选获得PBMC。

[0265] 13.2双特异性抗体介导的T细胞体外增殖实验

[0266] 参照T细胞阴性分选试剂盒说明书(BD Imaq human T lymphocyte enrichment set-DM,BD,557874)从PBMC中分选获得纯化的T细胞。参考CFSE染色说明书对纯化的T细胞进行染色(CFSE, eBioscience, 65-0850-84),用1640培养基重悬至 2×10^6 个/mL,50 μ L/孔加入细胞培养板。收集生长对数期的MV-4-11(CD123⁺细胞),离心后用1640培养基重悬至 5×10^5 个/mL,50 μ L/孔铺于细胞板中,最终的效靶比是4:1。然后加入起始浓度为0.25nM,4倍梯

度稀释,8个浓度点的CD3×CD123双特异性抗体(CD3×CD123 BsAb,50μL/孔)和Xmab14045;另外设置了0.25nM浓度点的对照,分别为单独的抗CD3E单克隆抗体H3B8+L27E5、单独的抗CD123单克隆抗体H7A3-h2-m5+L27E5以及H3B8+L27E5和H7A3-h2-m5+L27E5的联合(H3B8+L27E5&H7A3-h2-m5+L27E5);此外还设置了0.25nM浓度点的CD3×CD123双特异性抗体在CD123阴性肿瘤细胞(BAF3细胞)存在下作用的对照。孵育5天后,用PBS清洗2遍,用抗人CD3-APC(ebioscience,17-0037-42)流式抗体4℃避光孵育30分钟,然后用PBS清洗2遍,100μL PBS重悬后上流式(ACEA,Novocyte)检测T细胞增殖的情况(图9A-B)。

[0267] 实施例14双特异性抗体在CD34⁺小鼠模型中的活性鉴定

[0268] 选取42只(32只分组,10只备用)20-24周雌性hCD34⁺人源化小鼠(购自澎立生物医药技术(上海)有限公司),将100μL的1×10⁷个MV-4-11细胞和100μL的Matrigel混匀后通过皮下注射接种于小鼠背部右侧,接种前用3-4%异氟烷将小鼠麻醉。当肿瘤生长到平均约50-80mm³左右时,32只荷瘤小鼠根据外周血中hCD45⁺的比例和肿瘤体积被随机分成4组,每组8只。分组给药当天定义为第0天。试验分为CD3×CD123双特异性抗体0.01mg/kg、0.1mg/kg、0.5mg/kg组及阴性对照组(IgG1m3,0.5mg/kg)4组,每组8只,按照第0天、3天、7天、14天和第21天尾静脉注射给药,共给药5次。根据相对肿瘤抑制率(TGI)进行疗效评价,根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

[0269] 实验过程中动物精神状态普遍良好,体内实验结束时(第24天),和阴性对照组(IgG1m3 i.v.0.5mg/kg剂量组,G1组)相比,给药组动物与对照组相比体重无显著性差异(P>0.05)。测试CD3×CD123双特异性抗体在0.5mg/kg剂量下(G2组),具有显著抑制肿瘤生长的作用,相对肿瘤抑制率TGI(%)为97.35%;且有6只动物肿瘤几乎完全消退,与同期阴性对照组(G1组)相比具有极显著差异(p<0.001)。CD3×CD123双特异性抗体0.1mg/kg剂量组(G3组)动物给药后瘤体积增长缓慢,相对肿瘤抑制率TGI(%)为52.08%,与同期阴性对照组(G1组)相比具有显著差异(p<0.05),G4为CD3×CD123双特异性抗体0.01mg/kg剂量组。CD3×CD123双特异性抗体与肿瘤生长有着明显的量效关系,各组动物在各个时间点肿瘤生长情况如图10所示。其中,当与G1组相比,采用单因素方差分析/Dunnett t检验统计时,*表示P<0.05,**表示P<0.01,***表示P<0.001;采用重复测量/Bonferroni校正统计时,###表示P<0.001。

[0270] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

序列表

<110> 北京智仁美博生物科技有限公司

<120> 针对CD123的单克隆抗体

<160> 42

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Asn Ala Trp Met His

1 5

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Gln Ile Lys Asp Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ala

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

Val His Tyr Gly Val Arg Phe Phe Tyr Thr Met Asp Val

1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Asp Asn Thr Tyr Leu Thr

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 6

Gly Gln Gly Thr Gln Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 7

Ser Tyr Asp Val Ser

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 8

Trp Val Tyr Pro Val Asp Gly Ser Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 9

Leu Thr Tyr Gly Asp Phe Gly Asp Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 10

Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 11
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gln Ile Lys Asp Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Val Arg Phe Phe Tyr Thr Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 12
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Asp Asn Thr Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
 85 90 95
 Thr Gln Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

	100	105	110
<210> 13			
<211> 121			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<400> 13			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
	20	25	30
Asp Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Trp Val Tyr Pro Val Asp Gly Ser Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe			
	50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Asp Phe Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly			
	100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 14			
<211> 105			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 14			
Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys			
1	5	10	15
Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro			
	20	25	30
Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp			
	35	40	45
Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys			
	50	55	60
Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg			
65	70	75	80
Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg			
	85	90	95

Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp
 100 105
 <210> 15
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 15
 Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys
 1 5 10 15
 Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser
 20 25 30
 Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly
 35 40 45
 Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr
 50 55 60
 Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys Val Glu Leu Asp Pro
 65 70 75 80
 Ala Thr Val Ala
 <210> 16
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴 (Macaca fascicularis)
 <400> 16
 Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Gln
 1 5 10 15
 Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Ser Gln His Leu
 20 25 30
 Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser
 35 40 45
 Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu Met Glu Gln Ser Gly
 50 55 60
 Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro Glu Asp Ala Ser His
 65 70 75 80
 His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp
 85 90 95
 <210> 17
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴 (Macaca fascicularis)

<400> 17

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

<210> 18

<211> 87

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 18

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

<210> 19

<211> 84

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 19

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

Trp Lys Met Lys Ser His Phe Asn Arg Lys Phe Arg Tyr Glu Leu Arg
 210 215 220
 Ile Gln Lys Arg Met Gln Pro Val Arg Thr Glu Gln Val Arg Asp Thr
 225 230 235 240
 Thr Ser Phe Gln Leu Pro Asn Pro Gly Thr Tyr Thr Val Gln Ile Arg
 245 250 255
 Ala Arg Glu Thr Val Tyr Glu Phe Leu Ser Ala Trp Ser Thr Pro Gln
 260 265 270
 Arg Phe Glu Cys Asp Gln Glu Gly Ala Ser Ser Arg Ala Trp Arg
 275 280 285
 <210> 22
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
 <400> 22
 Ser Asp Leu Ala Ala Val Arg Glu Ala Pro Pro Thr Ala Val Thr Thr
 1 5 10 15
 Pro Ile Gln Asn Leu His Ile Asp Pro Ala His Tyr Thr Leu Ser Trp
 20 25 30
 Asp Pro Ala Pro Gly Ala Asp Ile Thr Thr Gly Ala Phe Cys Arg Lys
 35 40 45
 Gly Arg Asp Ile Phe Val Trp Ala Asp Pro Gly Leu Ala Arg Cys Ser
 50 55 60
 Phe Gln Ser Leu Ser Leu Cys His Val Thr Asn Phe Thr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gly Lys Asp Arg Ala Val Ala Gly Ser Ile Gln Phe Pro Pro Asp Asp
 85 90 95
 Asp Gly Asp His Glu Ala Ala Ala Gln Asp Leu Arg Cys Trp Val His
 100 105 110
 Glu Gly Gln Leu Ser Cys Gln Trp Glu Arg Gly Pro Lys Ala Thr Gly
 115 120 125
 Asp Val His Tyr Arg Met Phe Trp Arg Asp Val Arg Leu Gly Pro Ala
 130 135 140
 His Asn Arg Glu Cys Pro His Tyr His Ser Leu Asp Val Asn Thr Ala
 145 150 155 160
 Gly Pro Ala Pro His Gly Gly His Glu Gly Cys Thr Leu Asp Leu Asp
 165 170 175
 Thr Val Leu Gly Ser Thr Pro Asn Ser Pro Asp Leu Val Pro Gln Val
 180 185 190

Thr Ile Thr Val Asn Gly Ser Gly Arg Ala Gly Pro Val Pro Cys Met
 195 200 205
 Asp Asn Thr Val Asp Leu Gln Arg Ala Glu Val Leu Ala Pro Pro Thr
 210 215 220
 Leu Thr Val Glu Cys Asn Gly Ser Glu Ala His Ala Arg Trp Val Ala
 225 230 235 240
 Arg Asn Arg Phe His His Gly Leu Leu Gly Tyr Thr Leu Gln Val Asn
 245 250 255
 Gln Ser Ser Arg Ser Glu Pro Gln Glu Tyr Asn Val Ser Ile Pro His
 260 265 270
 Phe Trp Val Pro Asn Ala Gly Ala Ile Ser Phe Arg Val Lys Ser Arg
 275 280 285
 Ser Glu Val Tyr Pro Arg Lys Leu Ser Ser Trp Ser Glu Ala Trp Gly
 290 295 300
 Leu Val Cys Pro Pro Glu Val Met Pro Val Lys
 305 310 315
 <210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 23
 His His His His His His
 1 5
 <210> 24
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 小家鼠(Mus musculus)
 <400> 24
 Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile
 20 25 30
 Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
 50 55 60
 Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln

	85		90		95
Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp					
	100		105		110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val					
	115		120		125
Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr					
	130		135		140
Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu					
145		150		155	160
Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr					
	165		170		175
Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr					
	180		185		190
Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr					
	195		200		205
Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys					
	210		215		220
Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys					
225		230			
<210> 25					
<211> 232					
<212> PRT					
<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
<400> 25					
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala					
1	5		10		15
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro					
	20		25		30
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val					
	35		40		45
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val					
	50		55		60
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln					
65		70		75	80
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln					
	85		90		95
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala					
	100		105		110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro					

115	120	125
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr	Leu Pro Pro Cys	Arg Glu Glu Met Thr
130	135	140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145	150	155
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
165	170	175
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
180	185	190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
195	200	205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
210	215	220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
225	230	
<210> 26		
<211> 232		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<400> 26		
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
1	5	10
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
20	25	30
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
35	40	45
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
50	55	60
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
65	70	75
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
85	90	95
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
100	105	110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
115	120	125
Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr		
130	135	140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		

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

<210> 28

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 28

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

115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	

<210> 29

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 29

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

<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 31
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 31
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 32

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

<210> 33

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 33

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

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

<210> 34

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 34

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

<210> 35

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 35

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

Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Pro Ser Gln Ser Leu Val His Asn
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro His Pro Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ile Ser
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Pro Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
 85 90 95
 Thr Gln Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 36
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 36
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Val Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Val Tyr Pro Val Asp Gly Ser Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Arg Tyr Gly Asn Tyr Gly Asp Ala Met Asp Asp Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro
 130 135 140
 Val Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg
 145 150 155 160
 Pro Ser Gln Ser Leu Val His Asn Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp
 165 170 175

Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro His Pro Leu Ile Tyr Lys Val
 180 185 190
 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 195 200 205
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Pro Asp Asp Leu
 210 215 220
 Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Thr Gln Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 245

<210> 37

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 37

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

<210> 38

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 39
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 39
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Glu Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asp Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Lys His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Asp Val Ser Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asp Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Glu Gln Gly Asp Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 <210> 41
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 41
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr			
	20	25	30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp			
	50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr			
65	70	75	80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
	85	90	95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe			
	100	105	110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Lys Pro			
	115	120	125
Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly			
	130	135	140
Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly			
145	150	155	160
Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr			
	165	170	175
Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg			
	180	185	190
Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg			
	195	200	205
Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly			
	210	215	220
Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser			
225	230	235	240
Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Pro			
	245	250	255
Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro			
	260	265	270
Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
	275	280	285
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
	290	295	300
Lys His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
305	310	315	320

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
	100	105	110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
	115	120	125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
	130	135	140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
145	150	155	160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
	165	170	175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
	180	185	190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
	195	200	205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	210	215	220

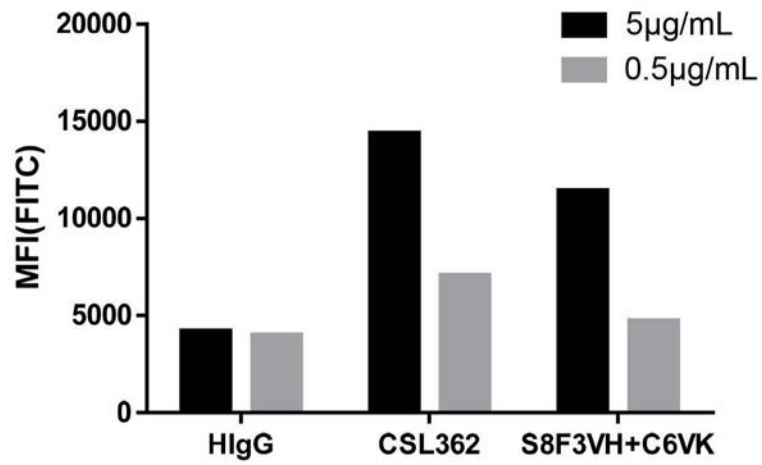


图1

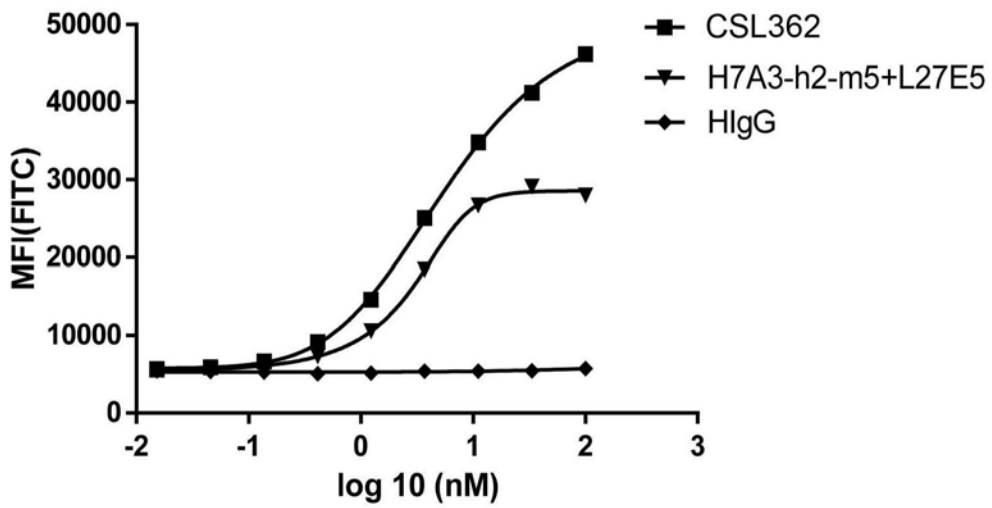


图2

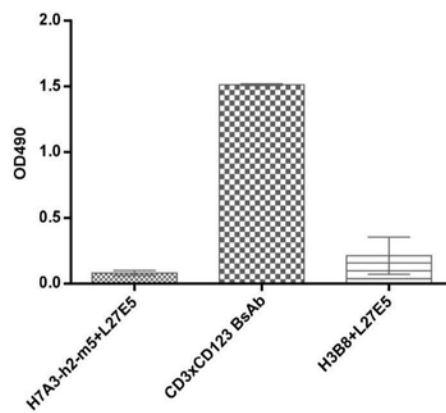


图3

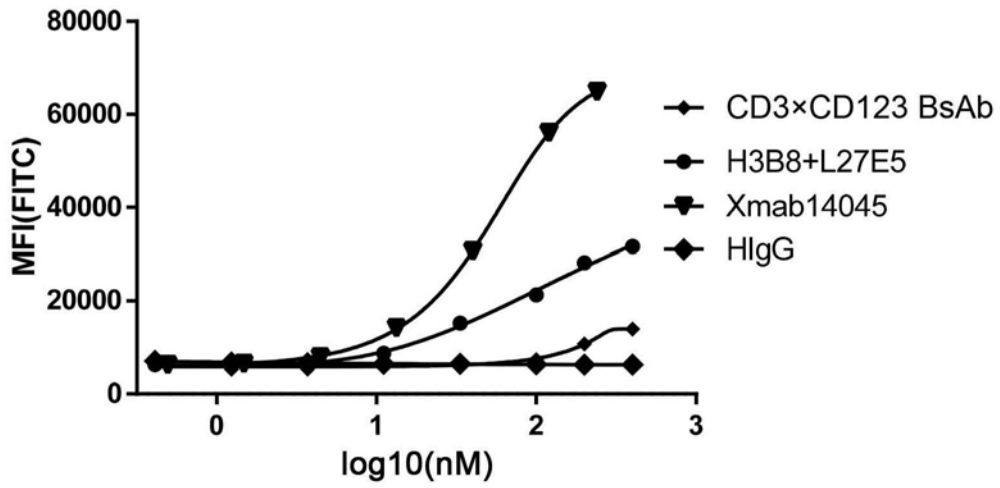


图4

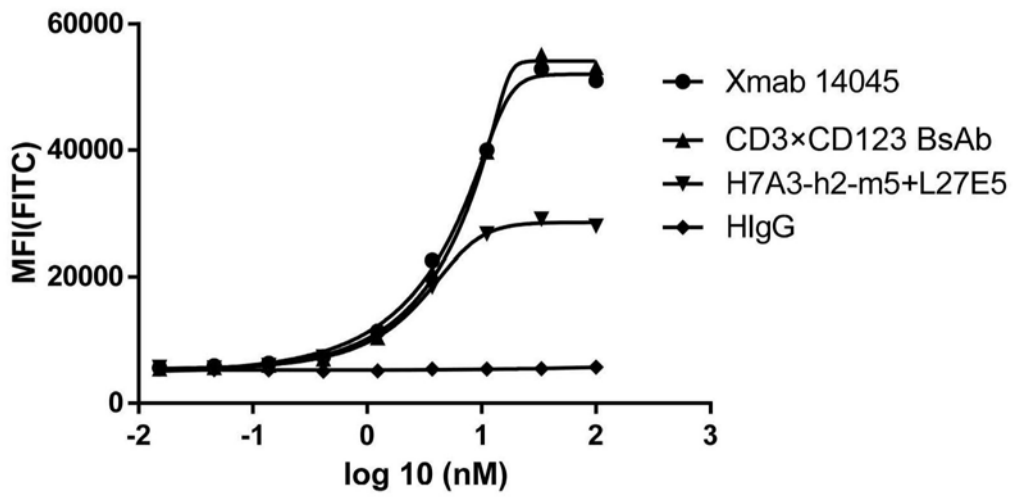


图5

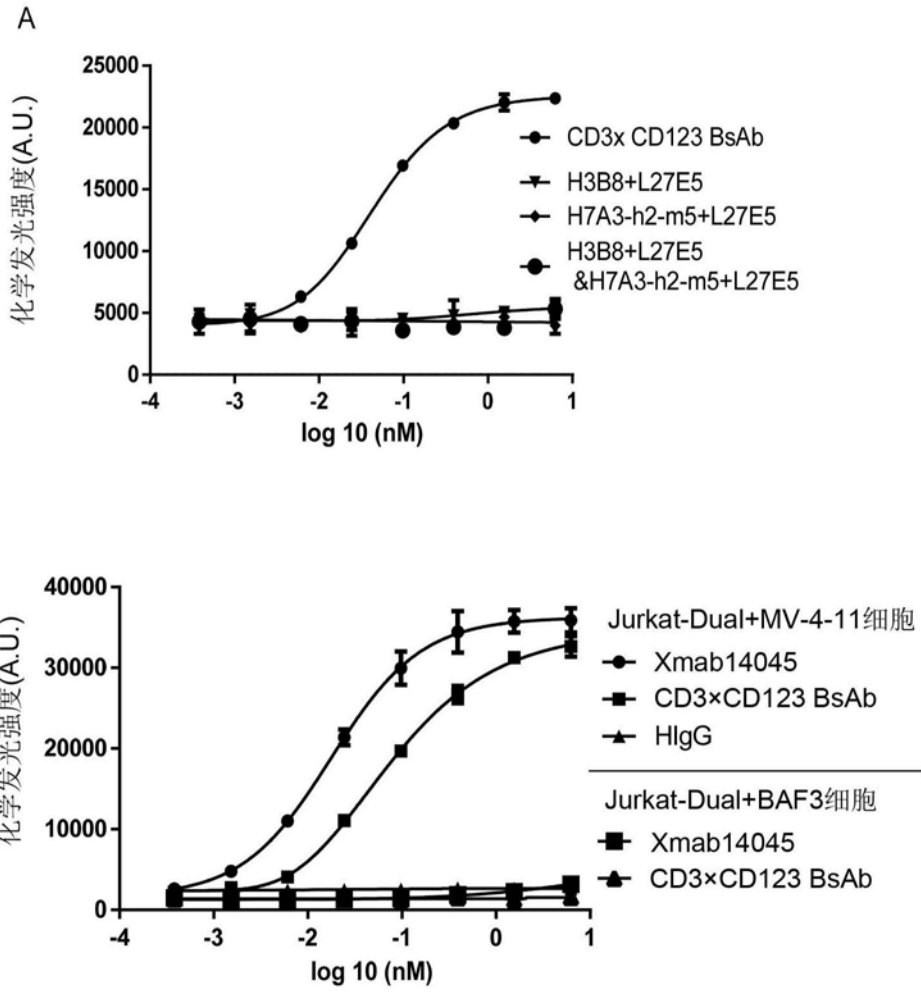


图6

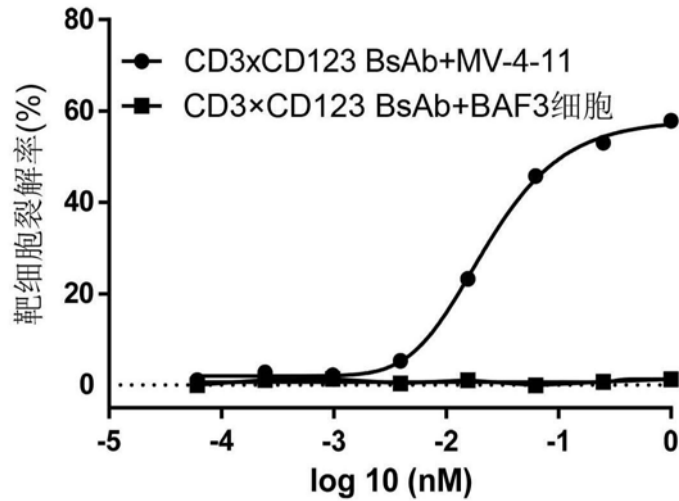


图7

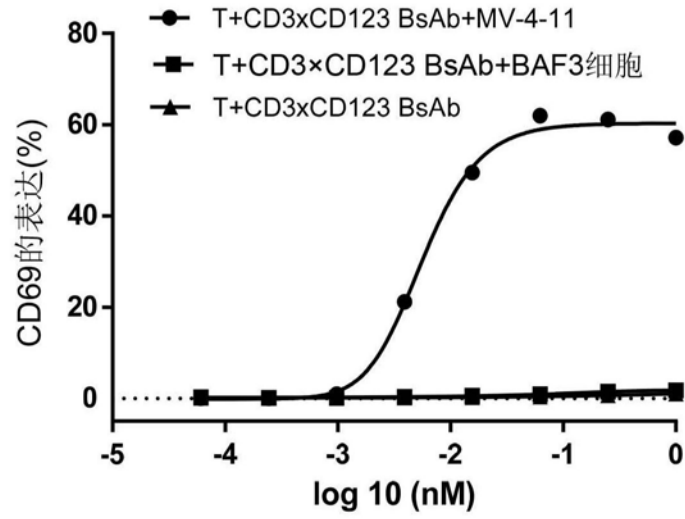


图8

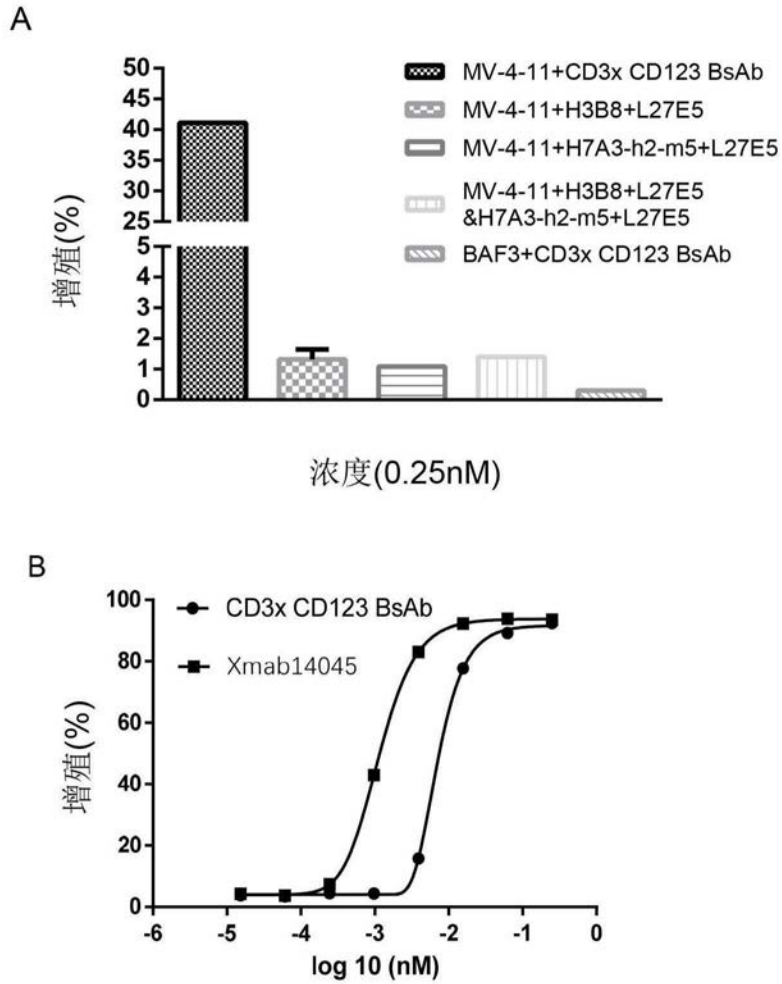


图9

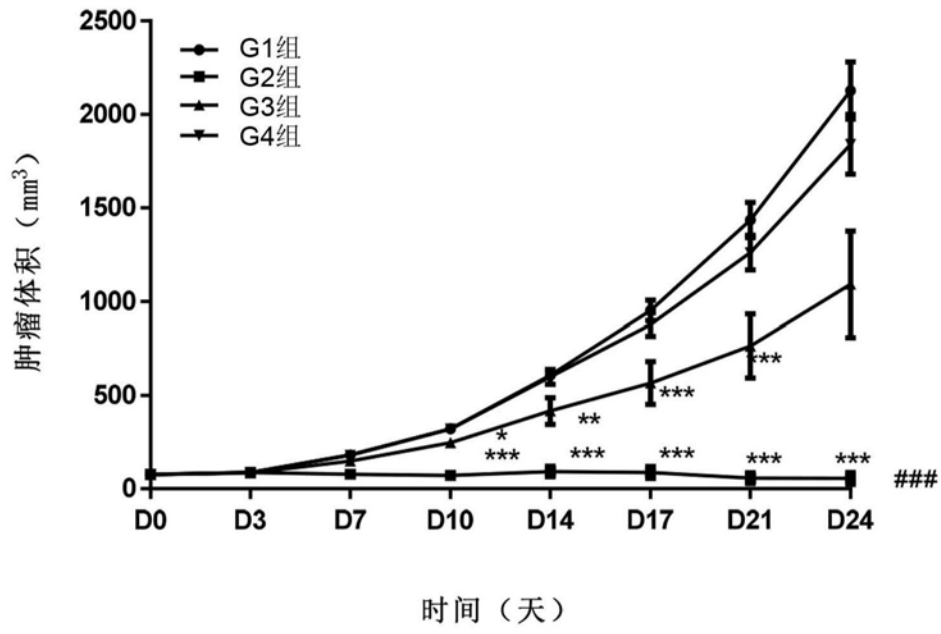


图10