



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114736291 B

(45) 授权公告日 2023.08.11

(21) 申请号 202110020857.X

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2021.01.07

A61P 31/14 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

(56) 对比文件

申请公布号 CN 114736291 A

CN 104768571 A, 2015.07.08

CN 101128483 A, 2008.02.20

(43) 申请公布日 2022.07.12

CN 101835489 A, 2010.09.15

CN 109562162 A, 2019.04.02

(73) 专利权人 中国科学院微生物研究所

地址 100101 北京市朝阳区北辰西路1号院
3号

审查员 李岚

(72) 发明人 吴燕 高峰 李世华 高福

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

专利代理师 高丽娜

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表11页 附图3页

(54) 发明名称

特异性结合发热伴血小板减少综合征病毒的
囊膜蛋白Gn的人源单克隆抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种特异性结合发热伴血小板
减少综合征病毒的囊膜蛋白Gn的人源单克隆抗
体及其用途。该抗体能够特异性治疗发热伴血小
板减少综合征病毒的感染。

1. 人源单克隆抗体或其抗原结合片段, 其特异性结合发热伴血小板减少综合征病毒的囊膜蛋白Gn,

其V_H链的互补决定区具有选自下组的氨基酸序列:

如SEQ ID NO:1所示的CDR1,

如SEQ ID NO:2所示的CDR2, 和

如SEQ ID NO:3所示的CDR3;

其V_L链的互补决定区具有选自下组的氨基酸序列:

如SEQ ID NO:4所示的CDR1,

如SEQ ID NO:5所示的CDR2, 和

如SEQ ID NO:6所示的CDR3。

2. 权利要求1所示的人源单克隆抗体或其抗原结合片段, 其含有:

如SEQ ID NO:7所示的重链可变区, 和

如SEQ ID NO:8所示的轻链可变区。

3. 如权利要求1或2所示的人源单克隆抗体或其抗原结合片段, 其含有:

如SEQ ID NO:21所示的重链, 和

如SEQ ID NO:22所示的轻链。

4. 权利要求1-3中任一项所示的人源单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂。

5. 单克隆抗体, 其含有SEQ ID NO:7和8所示的序列, 其中所述SEQ ID NO:7所示的序列是特异性结合发热伴血小板减少综合征病毒的囊膜蛋白Gn的抗体的重链可变区, 所述SEQ ID NO:8所示的序列是特异性结合发热伴血小板减少综合征病毒的囊膜蛋白Gn的抗体的轻链可变区;

或者其含有SEQ ID NO:21和22所示的序列, 其中所述SEQ ID NO:21所示的序列是特异性结合发热伴血小板减少综合征病毒的囊膜蛋白Gn的抗体的重链, 所述SEQ ID NO:22所示的序列是特异性结合发热伴血小板减少综合征病毒的囊膜蛋白Gn的抗体的轻链。

6. 多核苷酸, 其编码权利要求1-4中任一项所述的人源单克隆抗体或其抗原结合片段或权利要求5所述的单克隆抗体。

7. 表达载体, 其包含权利要求6所述的多核苷酸。

8. 宿主细胞, 其包含权利要求7所述的表达载体。

9. 药物组合物, 其含有权利要求1-4中任一项所述的人源单克隆抗体或其抗原结合片段和药用载体。

10. 权利要求1-4中任一项所述的人源单克隆抗体或其抗原结合片段在制备治疗发热伴血小板减少综合征病毒感染的药物中的用途。

特异性结合发热伴血小板减少综合征病毒的囊膜蛋白Gn的人源单克隆抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,具体涉及一种特异性结合发热伴血小板减少综合征病毒的囊膜蛋白Gn的人源单克隆抗体及其用途。

背景技术

[0002] 2009年中国河南等地发生蜱虫咬人致死事件,经科学家鉴定是由一种新型布尼亚病毒(发热伴血小板减少综合征病毒,SFTSV)感染导致的。该病毒通过蜱虫叮咬传播,在我国20多个省市以及韩国、日本、越南都有病例报道。感染者出现急性发热,伴有血小板及白细胞减少,肠胃功能紊乱等症状,严重的患者会发展为多器官功能衰竭甚至死亡,死亡率达12-30%。世界卫生组织已经将SFTSV列为最需要关注的病毒之一。目前没有临床可用的特效药物。

[0003] 治疗性抗体药物不但在肿瘤和自身免疫疾病方面占有重要地位,在传染性疾病的治疗中也同样有效。目前已经上市的治疗和预防病毒感染的药物有预防小儿呼吸道合胞病毒(RSV)感染的帕利珠单抗(Synagis),治疗埃博拉病毒感染的抗体药物Mab114和REGN-EB3,治疗HIV感染的艾巴利珠单抗(Trogarzo),以及用于狂犬病毒暴露后预防的Rabishield。同时还有针对众多病毒的单克隆抗体处于临床研究的不同阶段(参见<https://clinicaltrials.gov/>)。

[0004] SFTSV是布尼亚病毒目白纤病毒科的成员。同科的裂谷热病毒(RVSV)在非洲、沙特阿拉伯和也门等国家造成大范围疫情。中国在2016年有一例输入病例的报道。该类病毒的M基因编码Gn和Gc两种囊膜蛋白。病毒通过其表面的囊膜蛋白结合到宿主的表面启动感染。前期工作已证明SFTSV和RVSV表面蛋白是重要的免疫原,是中和抗体的重要靶点。靶向裂谷热病毒的囊膜蛋白Gn蛋白的抗体可以预防和治疗感染裂谷热病毒的小鼠。

发明内容

[0005] 为了获得具有保护效果的人源中和抗体,本发明首先以昆虫细胞表达SFTSV的Gn蛋白作为抗原,通过流式分选,从SFTSV感染后康复的出院人员的PBMCs中筛选获得可特异性结合Gn的记忆B细胞,然后对筛选的单一B细胞进行RT-PCR,获得抗体的可变区序列与片段,并进一步与恒定区连接至表达载体中。经哺乳动物细胞表达、纯化后,进行一系列的功能检测,包括与抗原结合的能力、中和病毒的能力、预防或治疗感染SFTSV的小鼠等,获得了具有中和与保护活性的人源单克隆抗体SF5。

[0006] 具体地,本发明通过以下方面实现。

[0007] 在一个方面,本发明提供人源化单克隆抗体或其抗原结合片段,其特异性结合发热伴血小板减少综合征病毒的囊膜蛋白Gn,

[0008] 其V_H链的互补决定区具有选自下组的氨基酸序列:

[0009] 如SEQ ID NO:1所示的CDR1,

- [0010] 如SEQ ID NO:2所示的CDR2,和
- [0011] 如SEQ ID NO:3所示的CDR3;
- [0012] 其V_L链的互补决定区具有选自下组的氨基酸序列:
- [0013] 如SEQ ID NO:4所示的CDR1,
- [0014] 如SEQ ID NO:5所示的CDR2,和
- [0015] 如SEQ ID NO:6所示的CDR3。
- [0016] 在一个实施方案中,所述人源单克隆抗体或其抗原结合片段含有:
- [0017] 如SEQ ID NO:7所示的重链可变区,和
- [0018] 如SEQ ID NO:8所示的轻链可变区。
- [0019] 在一个实施方案中,人源单克隆抗体或其抗原结合片段含有:
- [0020] 如SEQ ID NO:21所示的重链,和
- [0021] 如SEQ ID NO:22所示的轻链。
- [0022] 在一个实施方案中,其中所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂。
- [0023] 在另一个方面,本发明提供一种多肽,其含有选自SEQ ID NO:7、8、21或22所示的序列。
- [0024] 在另一个方面,本发明提供一种多核苷酸,其编码前述任一项人源单克隆抗体或其抗原结合片段或多肽。
- [0025] 在另一个方面,本发明提供一种表达载体,其包含上述多核苷酸。
- [0026] 在另一个方面,本发明提供一种宿主细胞,其包含上述表达载体。
- [0027] 在另一个方面,本发明提供一种药物组合物,其含有前述任一项人源单克隆抗体或其抗原结合片段和药用载体。
- [0028] 在另一个方面,本发明提供上述任一项人源单克隆抗体或其抗原结合片段在制备治疗靶向发热伴血小板减少综合征病毒感染的药物中的用途。
- [0029] 本说明书中提及的所有文献均通过引用以其整体并入本文。
- [0030] 定义
- [0031] “抗原结合片段”是指抗体的抗原结合片段及抗体类似物,其通常包括至少部分母体抗体的抗原结合区或可变区,例如一个或多个CDR。抗体的片段保留母体抗体的至少某些结合特异性。抗原结合片段包括选自Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂、包含CDR的肽等。
- [0032] “Fab片段”由一条轻链和一条重链的CH1及可变区组成。
- [0033] “Fc”区含有包含抗体的CH1和CH2结构域的两个重链片段。两个重链片段由两个或多个二硫键并通过CH3结构域的疏水作用保持在一起。
- [0034] “Fab'片段”含有一条轻链和包含VH结构域和CH1结构域或CH1和CH2结构域之间区域的一条重链的部分,两个Fab'片段的二条重链之间形成链间二硫键以形成F(ab')₂分子。
- [0035] “F(ab')₂片段”含有二条轻链和二条包含CH1和CH2结构域之间的恒定区的部分的重链,由此在二条重链间形成链间二硫键。因此,F(ab')₂片段由通过二条重链间的二硫键保持在一起的二个Fab'片段组成。
- [0036] “Fv区”包含来自重链和轻链二者的可变区,但缺少恒定区。

[0037] “单链Fv抗体(scFv抗体)”是指包含抗体的VH和VL结构域的抗原结合片段,这些结构域包含于单个多肽链中。一般而言,scFv多肽在VH和VL结构域之间包含多肽接头,该接头使得scFv能形成用于抗原结合的所需结构。

[0038] 当提及配体/受体、抗体/抗原或其它结合对时,“特异性”结合是指在蛋白和/或其它生物试剂的异质群体中确定是否存在所述蛋白例如本发明的单克隆抗体与发热伴血小板减少综合征病毒的囊膜蛋白Gn的结合反应。因此,在所指定的条件下,特定的配体/抗原与特定的受体/抗体结合,并且并不以显著量与样品中存在的其它蛋白结合。

[0039] 本发明还提供含有本发明特异性结合发热伴血小板减少综合征病毒的囊膜蛋白Gn的人源单克隆抗体或其抗原结合片段的药物组合物。为了制备药物组合物,可以通过使抗体或其抗原结合片段与药用载体或赋形剂混合,制备成各种所需的剂型。作为本发明的医药组合物的剂型的种类,例如可以列举作为口服剂的片剂、粉末剂、丸剂、散剂、颗粒剂、细粒剂、软/硬胶囊剂、薄膜包衣剂、小丸剂、舌下片、膏剂等,作为非口服剂,可以列举注射剂、栓剂、经皮剂、软膏剂、硬膏剂、外用液剂等,本领域的技术人员能够根据给药途径和给药对象等选择适当的剂型。

[0040] 本发明的药物组合物的有效成分的给药量,根据给药对象、对象脏器、症状、给药方法等不同而存在差异,可以考虑剂型的种类、给药方法、患者的年龄和体重、患者的症状等,根据医生的判断来确定。

附图说明

[0041] 图1:SFTSV Gn胞外段蛋白分子筛纯化图和SDS-PAGE鉴定图;

[0042] 图2:SF5抗体分子筛纯化图和SDS-PAGE鉴定图;

[0043] 图3:SF5抗体结合SFTSV Gn胞外段的动力学曲线图;

[0044] 图4:SF5抗体中和SFTSV感染的效果;

[0045] 图5:SF5抗体保护小鼠的效果,A图表示预防实验中小鼠的存活率,B图表示治疗实验中小鼠的存活率,C图表示预防实验中小鼠的体重随时间的变化,D图表示治疗实验中小鼠的体重随时间的变化。

具体实施方式

[0046] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,并参照附图,对本发明作进一步的详细说明。

[0047] 实施例1:SFTSV Gn胞外段的表达与纯化

[0048] 在SFTSV Gn蛋白胞外段编码区(SEQ ID NO:9)的3'端连上6个组氨酸标签(6×his tag)的编码序列及翻译终止密码子,通过EcoRI和XhoI构建入pFastBac1载体(购自Invitrogen)中。再将连接产物转化到DH10Bac感受态细胞(购自Tiangen)中,进行杆状病毒重组。提取重组的杆状病毒,转染至sf9细胞(购自Invitrogen)中进行杆状病毒的包装,再经过病毒的扩增,加入到Hi5细胞(购自Invitrogen)中,进行SFTSV Gn胞外段蛋白的表达。

[0049] 含有目的蛋白的细胞培养液经镍离子亲和层析(HisTrapTMHP(GE))和凝胶过滤层析(SuperoseTM6Increase 10/300GL(GE))纯化后,可以获得较纯的目的蛋白。SDS-PAGE鉴定该目的蛋白的大小为48KD,结果如图1。

[0050] 实施例2:SFTSV Gn蛋白特异性记忆B细胞的分离

[0051] 在SFTSV感染后痊愈出院人员(1名,来自首都医科大学附属北京地坛医院)的知情同意下,采集15mL的血液,分离PBMCs。将分离的PBMCs以 10^7 /mL的密度与终浓度是400nM的实施例1中纯化的SFTSV Gn胞外段蛋白冰上孵育结合半小时,然后用PBS洗2次,再与下列抗体(均购自BD,使用浓度均为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$)分别孵育:anti-human CD3/PE-Cy5,anti-human CD16/PE-Cy5,anti-human CD235a/PE-Cy5,anti-human CD19/APC-Cy7,anti-human CD27/Pacific Blue,anti-human CD38/APC,anti-human IgG/FITC,以及anti-His/PE。抗体冰上孵育半小时后,用PBS洗PBMCs 2次。

[0052] PBS洗后的PBMCs经FACS Aria III分选,收集PE-Cy5⁻APC⁻APC-Cy7⁺Pacific Blue⁺FITC⁺PE⁺的细胞(即B细胞),直接将其收集到96孔板内,1细胞/孔。

[0053] 实施例3:单一B细胞PCR、序列分析及人源抗体设计

[0054] 按照Qihui Wang等人于2016年12月在Science Translational Medicine,第8卷,第369期发表的Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus中描述的方法,将实施例2获得的B细胞通过Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen)逆转录,逆转录引物如表1,55°C反应60分钟。

[0055] 表1. 逆转录反应引物

引物	5'-3' 序列	序列编号
IgM-RT	ATG GAG TCG GGA AGG AAG TC	SED ID NO: 10
IgD-RT	TCA CGG ACG TTG GGT GGT A	SED ID NO: 11
IgE-RT	TCA CGG AGG TGG CAT TGG A	SED ID NO: 12
[0056] IgA1-RT	CAG GCG ATG ACC ACG TTC C	SED ID NO: 13
IgA2-RT	CAT GCG ACG ACC ACG TTC C	SED ID NO: 14
IgG-RT	AGG TGT GCA CGC CGC TGG TC	SED ID NO: 15
C κ -new	GCA GGC ACA CAA CAG AGG CA	SED ID NO: 16
C λ -new-ext	AGG CCA CTG TCA CAG CT	SED ID NO: 17

[0057] 将此逆转录产物作为模板,用HotStar Tap Plus酶(QIAGEN)进行PCR,扩增抗体可变区序列(PCRa)。设计相应的引物,反应条件如下:95°C,5min;95°C30s,55°C(重链/ κ 链)30s,72°C90s,35个循环;72°C,7min。将此产物作为模板再进行1轮PCR(PCRb),条件如下:95°C,5min;95°C30s,58°C(重链)/60°C(κ 链)30s,72°C90s,35个循环;72°C,7min,得到抗体可变区,具体操作步骤参见Hua-Xin Liao等人于2009年发表在Journal of Virological Methods杂志上的文章《High-throughput isolation of immunoglobulin genes from single human B cells and expression as monoclonal antibodies》。

[0058] 用1.2%的琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物。条带大小在400-500bp的切胶回收后送测序公司测序。测序结果用IMGT在线软件进行分析。

[0059] 将IMGT在线软件分析得到的正确的可变区序列与相应的重链/ κ 链的恒定区通过

搭桥PCR连接,克隆至表达载体pCAGGS(购自Addgene)中。其中重链通过EcoRI和XhoI连接, κ 链通过SacI与XhoI连接。B细胞测序及表达质粒构建如下:

[0060] 人源抗体设计策略如下:

[0061] 重链:CMV promoter-EcoR I-Leader sequences-重链可变区-CH-Xho I;

[0062] 轻链(κ):CMV promoter-Sac I-Leader sequences-轻链可变区-CL_(κ)-Xho I。

[0063] 其中,Leader sequence的氨基酸序列如SED ID NO:18所示,CH的氨基酸序列如SED ID NO:19所示,CL的氨基酸序列如SED ID NO:20所示,通过序列测定,获得抗体的序列,将抗体分别命名为SF5抗体。

[0064] 其中SF5的重链可变区序列如SEQ ID NO:7所示,轻链可变区序列如SEQ ID NO:8所示,重链序列如SEQ ID NO:21所示,轻链序列如SEQ ID NO:22所示。

[0065] 其中SF5抗体与胚系基因的序列一致性比较如下:

[0066] 表2.SF5抗体重链与胚系基因比较

	V-H 等位基因	D-H 等位基因	J-H 等位基因	一致性
[0067]			因	(V-H)
	SF5 IGHV3-15*01	IGHD3-10*01,IGHD3-10*02,IGHD3-16*01	IGHJ2*01	99.70%

[0068] 表3.SF5抗体轻链与胚系基因比较

	V-L 等位基因	J-L 等位基因	一致性(V-L)	
[0069]	SF5	IGLV3-19*01	IGLJ2*01,IGLJ3*01	100%

[0070] 实施例4:SF5抗体的表达

[0071] 以含10%FBS的DMEM培养293T细胞。用含有实施例3得到的特定抗体轻、重链编码基因的质粒共转染293T。转染4-6小时后将细胞培养液更换成无血清的DMEM,并且继续培养3天,收集上清后,再补加DMEM,继续培养3天,收集上清。

[0072] 收集的上清经过6000rpm离心30min后,与含有20mM磷酸钠(pH 8.0)的缓冲液等体积混合,经过0.22 μ m滤膜过滤后,与protein A预装柱结合(5mL,GE Healthcare)。以10mM甘氨酸(pH 3.0)洗脱结合的蛋白。收集此蛋白浓缩后进行分子筛层析。目的峰通过SDS-PAGE(还原性和非还原性)确定,结果如图2。得到纯化的SF5抗体。

[0073] 实施例5:表面等离子共振技术检测抗体与SFTSV Gn的结合能力

[0074] 表面等离子共振分析利用Biacore T100(Biacore Inc.)进行。具体步骤如下:

[0075] 选用CM5芯片(购自GE Healthcare),首先在CM5芯片上固定anti-human IgG的抗体(购自GE Healthcare),再将实施例4得到的纯化的抗体固定在芯片上,抗体固定量约为100RU,用10mM HEPES,150mMNaCl,pH 7.4溶液倍比稀释SFTSV Gn胞外段蛋白,从低浓度到高密度逐一上样。抗体结合SFTSV Gn胞外段的动力学曲线如图3所示。抗体结合SFTSV Gn的动力学常数如表4所示。结合动力学常数的计算是利用Biacore T100evaluation software(Biacore,Inc.)软件进行。可见SF5抗体能够和SFTSV Gn以较高的亲和力结合。

[0076] 表4抗体与SFTSV Gn胞外段蛋白结合的动力学常数

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	
[0077]	SF5	1.63E+05	5.77E-05	3.54E-10

[0078] 实施例6:SF5中和SFTSV病毒感染的检测

[0079] 将实施例4中得到的纯化后SF5抗体从50 μ g/mL 3倍稀释,连续稀释7个梯度,与100TCID₅₀ SFTSV(来自山东大学)在37 $^{\circ}$ C混合孵育1小时,然后加入到预先接种Vero细胞的96孔板中。孵育4天后,弃掉上清,用预冷的细胞固定液固定细胞,PBST洗3次,用5%脱脂奶粉封闭室温1小时,用SFTSV特异性抗体室温孵育1小时。PBST洗3次,用HRP标记的羊抗人二抗(Easybiotech)室温孵育1小时,PBST洗3次,加入50 μ l/孔TMB底物进行显色20分钟,加入50 μ l/孔2M盐酸终止反应。读取OD450数值,计算半数抑制浓度IC₅₀(2.805 μ g/mL),结果如图4。

[0080] 实施例7:动物保护实验

[0081] 预防实验中,6-8周龄IFNAR^{-/-}小鼠(购自中国疾病预防控制中心实验动物中心)5只/组腹腔注射200 μ l 10mg/kg剂量的实施例4中得到的纯化后SF5抗体,24小时后皮下注射100LD₅₀的SFTSV,每天观察体重变化以及小鼠状态,SF5抗体组小鼠的存活率为100%,体重没有降低,而PBS对照组全部死亡,结果如图5A和5C所示。治疗实验中,6-8周龄IFNAR^{-/-}小鼠5只/组皮下注射100LD₅₀的SFTSV,24小时后腹腔注射200 μ l10mg/kg剂量的实施例4中得到的纯化后SF5抗体,SF5抗体组小鼠的存活率为100%,体重没有降低,而PBS对照组全部死亡,结果如图5B和5D所示。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院微生物研究所

<120> 特异性结合发热伴血小板减少综合征病毒的囊膜蛋白Gn的人源单克隆抗体及其用途

<130> IB201697

<160> 22

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp
1 5

[0001]

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr
1 5 10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Thr Thr Asp Phe Ile Ser Ala Gly Pro Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Gly Lys Asn
1

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

[0002]

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val
1 5 10

<210> 7

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

Pro 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 Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Asp Phe Ile Ser Ala Gly Pro Trp Tyr Phe Asp Leu
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

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

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

[0003]

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

<210> 9

<211> 433

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

Asp Ser Gly Pro Ile Ile Cys Ala Gly Pro Ile His Ser Asn Lys Ser
1 5 10 15

Ala Asp Ile Pro His Leu Leu Gly Tyr Ser Glu Lys Ile Cys Gln Ile
20 25 30

Asp Arg Leu Ile His Val Ser Ser Trp Leu Arg Asn His Ser Gln Phe
35 40 45

Gln Gly Tyr Val Gly Gln Arg Gly Gly Arg Ser Gln Val Ser Tyr Tyr
50 55 60

Pro Ala Glu Asn Ser Tyr Ser Arg Trp Ser Gly Leu Leu Ser Pro Cys
 65 70 75 80

Asp Ala Asp Trp Leu Gly Met Leu Val Val Lys Lys Ala Lys Gly Ser
 85 90 95

Asp Met Ile Val Pro Gly Pro Ser Tyr Lys Gly Lys Val Phe Phe Glu
 100 105 110

Arg Pro Thr Phe Asp Gly Tyr Val Gly Trp Gly Cys Gly Ser Gly Lys
 115 120 125

Ser Arg Thr Glu Ser Gly Glu Leu Cys Ser Ser Asp Ser Gly Thr Ser
 130 135 140

Ser Gly Leu Leu Pro Ser Asp Arg Val Leu Trp Ile Gly Asp Val Ala
 145 150 155 160

Cys Gln Pro Met Thr Pro Ile Pro Glu Glu Thr Phe Leu Glu Leu Lys
 165 170 175

Ser Phe Ser Gln Ser Glu Phe Pro Asp Ile Cys Lys Ile Asp Gly Ile
 180 185 190

Val Phe Asn Gln Cys Glu Gly Glu Ser Leu Pro Gln Pro Phe Asp Val
 195 200 205

[0004] Ala Trp Met Asp Val Gly His Ser His Lys Ile Ile Met Arg Glu His
 210 215 220

Lys Thr Lys Trp Val Gln Glu Ser Ser Ser Lys Asp Phe Val Cys Tyr
 225 230 235 240

Lys Glu Gly Thr Gly Pro Cys Ser Glu Ser Glu Glu Lys Thr Cys Lys
 245 250 255

Thr Ser Gly Ser Cys Arg Gly Asp Met Gln Phe Cys Lys Val Ala Gly
 260 265 270

Cys Glu His Gly Glu Glu Ala Ser Glu Ala Lys Cys Arg Cys Ser Leu
 275 280 285

Val His Lys Pro Gly Glu Val Val Val Ser Tyr Gly Gly Met Arg Val
 290 295 300

Arg Pro Lys Cys Tyr Gly Phe Ser Arg Met Met Ala Thr Leu Glu Val
 305 310 315 320

Asn Gln Pro Val Gln Arg Ile Gly Gln Cys Thr Gly Cys His Leu Glu
 325 330 335

Cys Ile Asn Gly Gly Val Arg Leu Ile Thr Leu Thr Ser Glu Leu Lys
 340 345 350

Ser Ala Thr Val Cys Ala Ser His Phe Cys Ser Ser Ala Thr Ser Gly
 355 360 365

Lys Lys Ser Thr Glu Ile Gln Phe His Ser Gly Ser Leu Val Gly Lys
 370 375 380
 Thr Ala Ile His Val Lys Gly Ala Leu Val Asp Gly Thr Glu Phe Thr
 385 390 395 400
 Phe Glu Gly Ser Cys Met Phe Pro Asp Gly Cys Asp Ala Val Asp Cys
 405 410 415
 Thr Phe Cys Arg Glu Phe Leu Lys Asn Pro Gln Cys Tyr Pro Ala Lys
 420 425 430

Lys

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

atggagtcgg gaaggaagtc

20

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

[0005]

<400> 11

tcacggacgt tgggtgta

19

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

tcacggaggt ggcattgga

19

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 13

caggcgatga ccacgttcc

19

<210> 14

	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 14	
	catgcgacga ccacgttcc	19
	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 15	
	aggtgtgcac gccgctggtc	20
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0006]	<400> 16	
	gcaggcacac aacagaggca	20
	<210> 17	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 17	
	aggccactgt cacagct	17
	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<400> 18	
	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
	1 5 10 15	
	Gly Ser Thr Gly Asp	
	20	
	<210> 19	

<211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <400> 19
 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
 [0007] Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

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

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

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

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

<210> 20

<211> 102

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 20

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
1 5 10 15

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
20 25 30

[0008]

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
35 40 45

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
65 70 75 80

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
85 90 95

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100

<210> 21

<211> 474

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 21

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

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

[0009]

	340	345	350
	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile 355	Glu Lys Thr Ile Ser 360	Lys Ala Lys Gly 365
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu 370	375	380
	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 385	390	395 400
	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 405	410	415
	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 420	425	430
	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 435	440	445
	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 450	455	460
	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 465	470	
	<210> 22		
	<211> 235		
[0010]	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<400> 22		
	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro 1 5 10 15		
	Gly Ser Thr Gly Asp Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser 20 25 30		
	Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu 35 40 45		
	Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro 50 55 60		
	Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp 65 70 75 80		
	Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr 85 90 95		
	Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp 100 105 110		
	Ser Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val 115 120 125		

Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser
 130 135 140

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser
 145 150 155 160

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser
 165 170 175

[0011] Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn
 180 185 190

Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp
 195 200 205

Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr
 210 215 220

Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

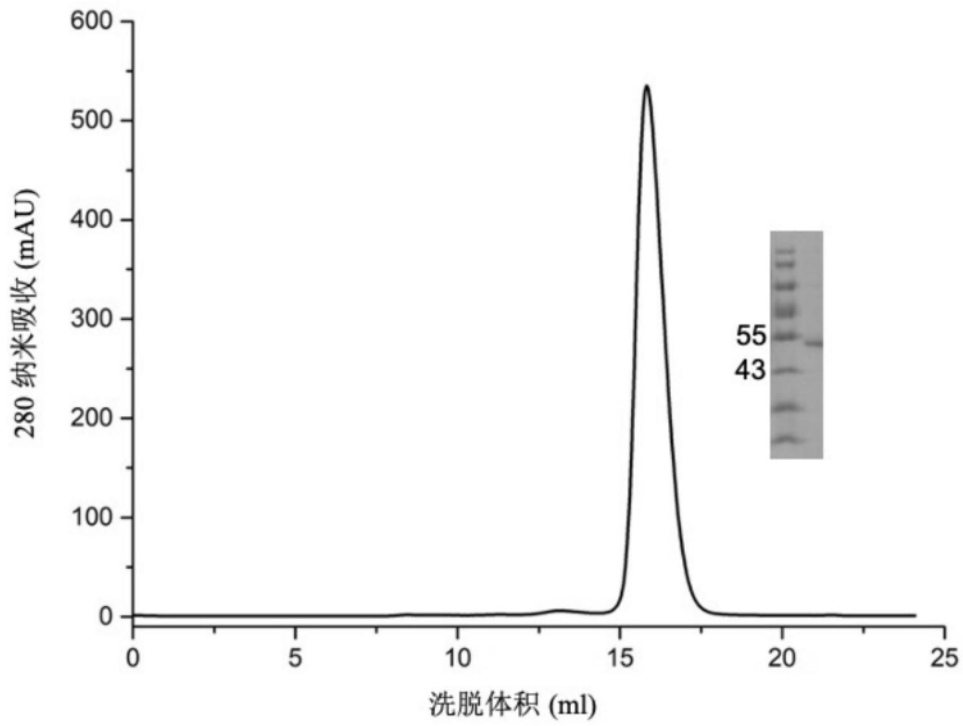


图1

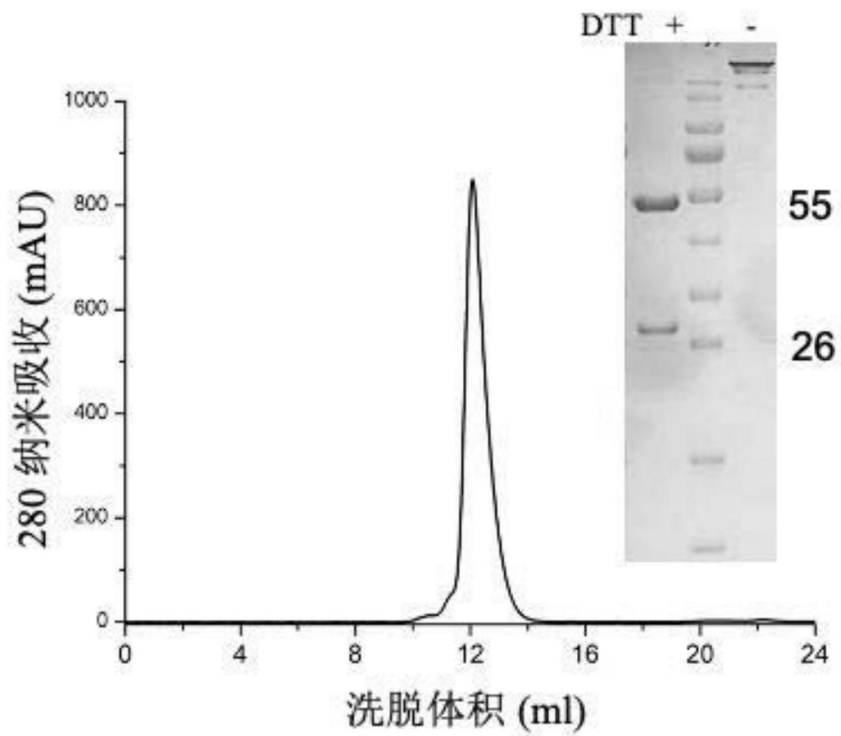


图2

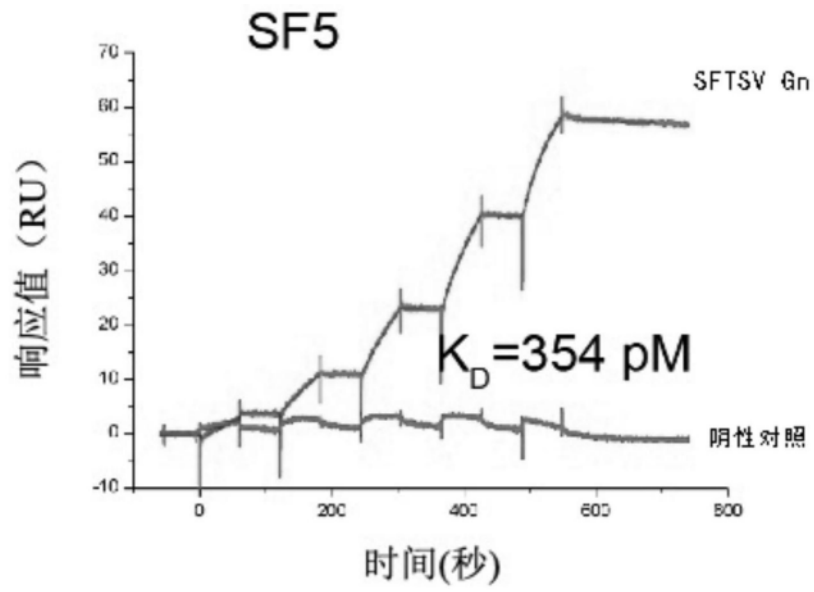


图3

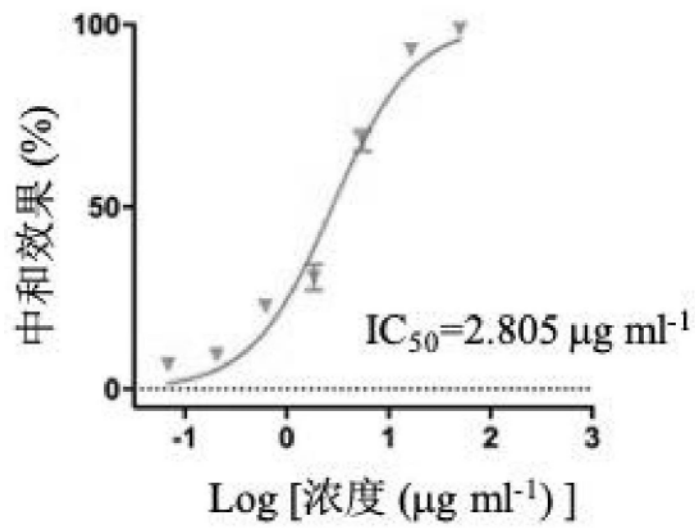


图4

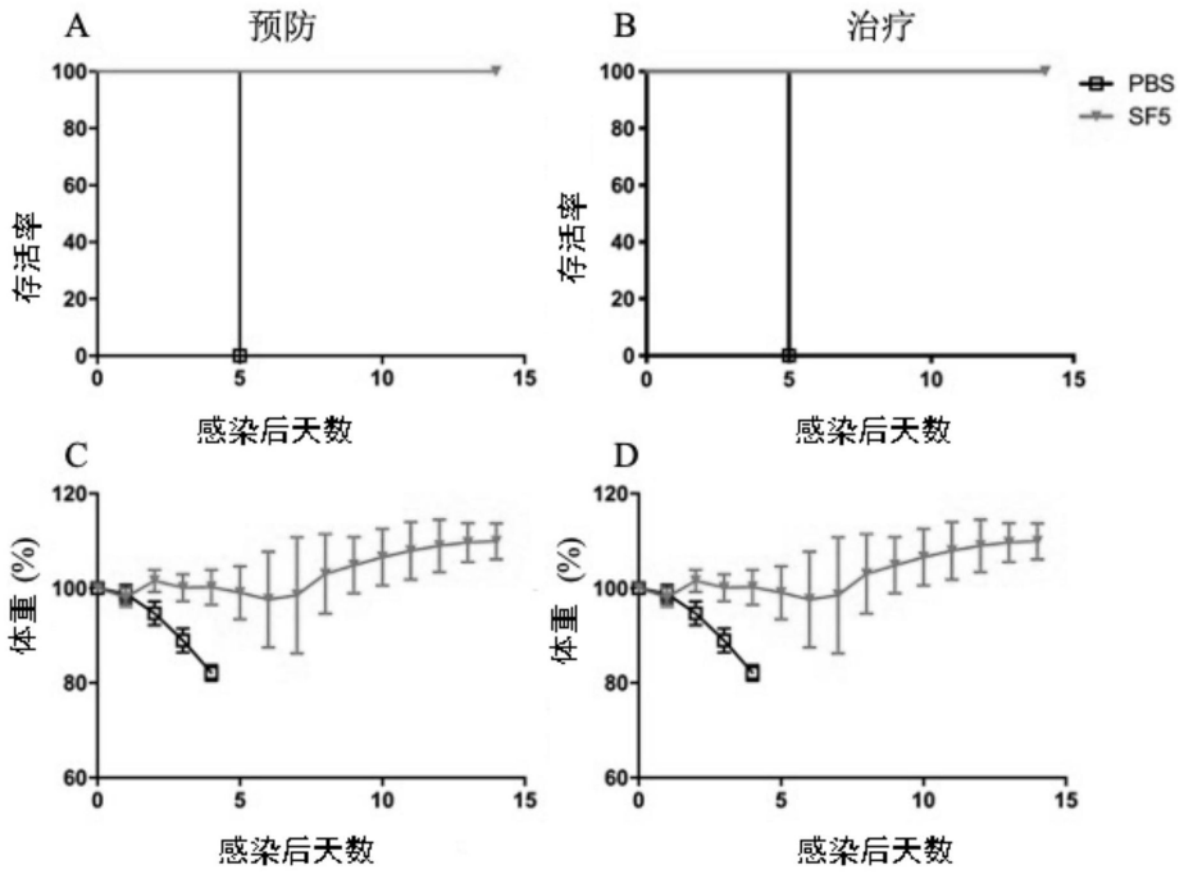


图5