

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910157592.7

[51] Int. Cl.

*C07K 16/28 (2006.01)*

*C12N 15/13 (2006.01)*

*C12N 15/63 (2006.01)*

*C12N 5/10 (2006.01)*

*C12N 1/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2010年1月20日

[11] 公开号 CN 101628940A

[22] 申请日 2009.7.15

[21] 申请号 200910157592.7

[30] 优先权

[32] 2008.7.15 [33] CN [31] 200810116696.9

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100081 北京市朝阳区大屯路中国科学院生物物理研究所

[72] 发明人 唐捷 刘阳 陈列平 朱卫彬

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅 任凤华

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种单克隆抗体及其应用

[57] 摘要

本发明公开了一种单克隆抗体及其应用。该单克隆抗体由轻链和重链组成，所述重链的可变区的氨基酸残基序列如序列表中序列 1 所示，所述轻链的可变区的氨基酸残基序列如序列表中序列 2 所示。本发明将抗 CTLA-4 抗体与抗 4-1BB 抗体联用构建成抗人 4-1BB 和 CTLA-4 的单克隆抗体，实验结果表明，上述单克隆抗体具有抗体结构，可以分别与人 4-1BB 和 CTLA-4 结合。

1、一种单克隆抗体，由轻链和重链组成，其特征在于：所述重链的可变区的氨基酸残基序列如序列表中序列 1 所示，所述轻链的可变区的氨基酸残基序列如序列表中序列 2 所示。

2、根据权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征在于：所述单克隆抗体重链的氨基酸残基序列如序列表中序列 3 所示，所述单克隆抗体轻链的氨基酸残基序列如序列表中序列 4 所示。

3、权利要求 1 或 2 所述单克隆抗体编码基因。

4、用木瓜蛋白酶酶解权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体得到的 Fab 片段。

5、权利要求 4 所述的 Fab 片段的编码基因。

6、含有权利要求 3 或 5 所述编码基因的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌。

7、由权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体衍生的人源化抗体，由轻链和重链组成，其特征在于：所述重链可变区的氨基酸残基序列如序列表中序列 1 所示，所述轻链可变区的氨基酸残基序列如序列表中序列 2 所示。

## 一种单克隆抗体及其应用

### 技术领域

本发明涉及一种单克隆抗体及其应用。

### 背景技术

理论上讲，人体每天都有大量细胞发生突变，但只有极少数突变的细胞能够继续分裂生长，并且逃脱免疫系统的监视和攻击而形成肿瘤。肿瘤来源于机体自身突变的细胞，大部分突变细胞的成分与机体正常细胞的成分相同，只有极少数异常表达的蛋白质和畸形多糖具有免疫原性。由于肿瘤细胞之间存在免疫原性的差异，那些免疫原性较强的肿瘤可以诱导有效的抗肿瘤免疫应答，易被机体消灭；而那些免疫原性相对较弱的肿瘤，则能逃脱免疫系统的监视而选择性地增殖，这一过程称为免疫选择；经过不断的选择，肿瘤的免疫原性越来越弱。

机体有多种抗肿瘤免疫机制，包括细胞免疫和体液免疫，又可分为特异性免疫和非特异性免疫。抗肿瘤免疫以细胞免疫为主，其中具有免疫记忆功能和特异性的主要是 T 细胞，一直受到人们的重视，而非特异性抗肿瘤免疫细胞-自然杀伤细胞 (NK) 也日益受到人们的重视。T 细胞主要有两类:CD4+T 辅助细胞和 CD8+细胞毒性 T 细胞 (CTL)。CD4+T 细胞在接受专职抗原提呈细胞 (APC) 上的 MHC 抗原复合物和共刺激分子双重信号后，发生克隆性增值，并释放出多种细胞因子，其中主要为：白细胞介素 2 (IL-2)、 $\gamma$  干扰素 (INF- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子 (TNF) 和淋巴毒素 (LT)。这些细胞因子在调节与活化 CTL、巨噬细胞和 B 细胞的抗肿瘤效应中起重要作用。CD8+ CTL 也是在双重信号作用下被活化和克隆增值，CTL 必须与靶细胞直接接触才能产生杀伤作用。目前的研究认为，CTL 杀伤作用方式有三种：①CTL 与靶细胞接触产生脱颗粒作用，排出穿孔素 (perforin) 插入到靶细胞膜上，并使其形成通道，而粒酶 (granzymes)、TNF、分泌性 ATP 等效应分子进入靶细胞，导致其死亡。其中，穿孔素造成靶细胞膜损伤，粒酶使 DNA 断裂，引起细胞凋亡 (PCD)。② CTL 激活后表达 Fas 配体 (FasL)，它可被释放到胞外与靶细胞表面的 Fas 分子结合，传导死亡信号进入胞内，活化靶细胞内的 DNA 降解酶，引起靶细胞凋亡。激活白介素 1b 转换酶 (ICE) 或与 ICE 相关的蛋白酶，引起细胞凋亡。③上述两种方式共存。CD8+CTL 杀伤活性约有 2/3 来自于穿孔素途径，而 Fas/FasL 诱导的 PCD 约占 1/3。

T 细胞的活化除了通过 T 细胞受体 (TCR) 和 CD3 复合物对抗原进行识别外, 还必须要有共刺激分子 (costimulator) 参与。在 T 细胞激活诱导阶段缺乏共刺激信号, 不仅不能活化 T 细胞, 还会引起 T 细胞克隆特异性无反应性, 导致免疫耐受。共刺激分子 B7 是目前公认的第二刺激信号, 属于免疫球蛋白超家族成员, 最初发现于活化的 B 细胞上, 它也表达于树突状细胞和活化的巨噬细胞上, 除 B 细胞来源的肿瘤外, 其他肿瘤很少表达 B7。共刺激分子的缺乏也是肿瘤的弱免疫原性的重要因素。B7 有两种受体存在于 T 细胞表面, CD28 低亲和力受体和 CTLA-4 高亲和力受体。CD28 是免疫球蛋白超家族成员, 是分子量为 44kD 的同源二聚体, 在 95% 的 CD4+T 淋巴细胞、50% CD8+T 淋巴细胞及 CD4+ CD8+ 双阳性的胸腺细胞表面皆有组成性表达。CTLA-4 为 CD28 的同源分子, 他们共表达于活化的 T 细胞表面。CTLA-4 的表达量虽然比 CD28 低, 但它与 B7 的亲和力是 CD28 的 20 倍。B7: CD28 通路为 IL-2 的产生提供了关键信号。B7 与 T 细胞上的 CD28 结合产生阳性信号, 增强免疫应答; B7 与 CTLA-4 结合则产生阴性信号, 封闭了 CD28 依赖的 T 细胞激活, 下调免疫反应。

4-1BB/4-1BBL 共刺激途径是近几年发现的, 4-1BB (CDw137) 是肿瘤坏死因子受体超家族成员, 主要表达于 T 细胞上。其高亲和力配体 4-1BBL 表达于巨噬细胞和活化的 B 细胞上。4-1BBL 或抗 4-1BB 抗体与 T 细胞的 4-1BB 结合后可诱导 T 细胞的活化与增殖。4-1BB 既能协同 CD28 对 T 细胞的共刺激作用, 也能不依赖于 CD28 而发挥共刺激效应。

由于共刺激分子在 T 细胞活化中的关键作用, 利用抗体刺激这些分子, 从而打破免疫细胞对肿瘤细胞的免疫不反应性, 成为开发抗肿瘤药物的一个重要方向。在研的药物中 CTLA-4 抗体 tremelimumab 和 ipilimumab 受到业界的关注。tremelimumab 由辉瑞公司开发, ipilimumab 由百时美施贵宝和 Medarex 公司开发。tremelimumab 和 ipilimumab 目前都已处于临床试验的最后阶段, 数百名黑素瘤病人加入了该试验。

根据 4-1BB/4-1BBL 共刺激通路, 应用抗 4-1BB 抗体在小鼠体内可直接活化 T 细胞, 根除某些已种植的大肿瘤。小鼠实验表明: 应用抗 4-1BB 单克隆抗体可根除免疫原性差的 Ag104A 肉瘤和高成瘤性的 P815 肥大细胞瘤。

通过激活免疫细胞治疗肿瘤的主要副作用是自身的免疫反应, 抗 CTLA-4 抗体的临床实验中, 肿瘤病人出现较强的自身免疫病。但抗 4-1BB 抗体不但具有激活 CD8+ T 细胞的作用, 还有抑制 B 细胞功能, 从而表现出抑制自身免疫性疾病的效果。

## 发明内容

本发明的目的是提供一种单克隆抗体。

本发明所提供的单克隆抗体名称为 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a，含有重链和轻链；所述重链的可变区的氨基酸残基序列如序列表中序列 1 所示，所述轻链的可变区的氨基酸残基序列如序列表中序列 2 所示。

具体的，上述单克隆抗体中，所述重链的恒定区为同种型 (isotype) 鼠 IgG2a 的恒定区，所述轻链的恒定区为鼠的 Kappa 的恒定区。

所述单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 的重链的氨基酸残基序列如序列表中序列 3 所示，所述单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 的轻链的氨基酸残基序列如序列表中序列 4 所示。

上述单克隆抗体的编码基因也属于本发明的保护范围。

用木瓜蛋白酶酶解上述单克隆抗体得到的 Fab 片段也属于本发明的保护范围。

上述 Fab 片段的编码基因也属于本发明的保护范围。

含有上述单克隆抗体或 Fab 片段的编码基因的重组表达载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌也属于本发明的保护范围。

本发明的另一个目的是提供一种由上述单克隆抗体衍生的人源化抗体。

所述人源化抗体由轻链和重链组成，所述重链可变区的氨基酸残基序列如序列表中序列 1 所示，所述轻链可变区的氨基酸残基序列如序列表中序列 2 所示。

本发明将抗 CTLA-4 抗体与抗 4-1BB 抗体联用构建成抗人 4-1BB 和 CTLA-4 的单克隆抗体，实验结果表明，上述单克隆抗体具有抗体结构，能够分别与人 4-1BB 和 CTLA-4 特异性结合。

### **附图说明**

图 1 为 ELISA 检测单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 与人 CTLA-4 的结合曲线

图 2 为流式细胞仪检测单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 与展示在酵母表面的人 4-1BB 胞外段的结合曲线

### **具体实施方式**

下述实验方法，如无特别说明，均为常规方法。

实施例 1、单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 的制备

1、单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 重链及轻链的获得

分别人工合成抗 CTLA-4 抗体和抗 4-1BB 抗体的重链可变区的编码基因。将得

到的抗 CTLA-4 抗体和抗 4-1BB 抗体的重链可变区的编码基因采用重叠延伸 PCR 的方法相连接，得到单克隆抗体重链可变区的 DNA 序列，该单克隆抗体重链可变区的 DNA 序列编码的氨基酸残基序列如序列 1 所示。

再将上述获得的单克隆抗体重链可变区的编码基因和同种型鼠 IgG2a 恒定区编码基因分别用重叠延伸 PCR 的方法相连接，得到单克隆抗体重链的 DNA 序列，该单克隆抗体重链的 DNA 序列编码的氨基酸残基序列如序列 3 所示。

分别人工合成抗 CTLA-4 抗体和抗 4-1BB 抗体的轻链可变区的编码基因。将得到的抗 CTLA-4 抗体和抗 4-1BB 抗体的轻链可变区的编码基因重叠延伸 PCR 的方法相连接，得到单克隆抗体轻链可变区的 DNA 序列，该单克隆抗体轻链可变区的 DNA 序列编码的氨基酸残基序列如序列 2 所示。

再将上述获得的单克隆抗体轻链可变区的编码基因和同种型鼠 Kappa 恒定区编码基因分别用重叠延伸 PCR 的方法相连接，得到单克隆抗体轻链的 DNA 序列，该单克隆抗体轻链的 DNA 序列编码的氨基酸残基序列如序列 4 所示。

## 2、单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 表达载体的构建

将上述步骤 1 获得的单克隆抗体重链的编码基因经 NotI 和 SalI 酶切后插入到表达载体 pCI 的 NotI 和 SalI 酶切位点间，得到单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 重链的重组表达载体 pCI-DHFR-4-1BB-CTLA4-H。

将上述步骤 1 获得的单克隆抗体轻链的编码基因经 SalI 和 XbaI 酶切后插入到表达载体 pCI 的 SalI 和 XbaI 酶切位点间，得到单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 轻链的重组表达载体 pPCI-4-1BB-CTLA4-L。

## 3、单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 的制备

将上述步骤 2 获得的单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 重链和轻链的重组表达载体 pCI-4-1BB-CTLA4-H 和 pPCI-4-1BB-CTLA4-L 共转染进入哺乳动物 COS-7 细胞中，表达、纯化得到单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a。

### 实施例 2、单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 的结合能力鉴定

#### 1、单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 与 CTLA-4 的结合能力鉴定

以 CTLA-4-Fc 单克隆抗体(购自 R&D 公司,货号:325-CT)包板,每孔包被 1 $\mu$ g/ml。将实施例 1 构建的单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 梯度稀释孵育,二抗用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (购自 JacksonImmunoResearch,货号:115-035-062),以 OPD 为底物,用 2mmol/L 硫酸作为终止剂,ELISA 检测单克隆抗

体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 与 CTLA-4 的结合能力。结果如图 1 所示，图 1 中，纵坐标是 ELISA 显色后的光吸收值。结果表明，单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 可以与 CTLA-4 结合。

## 2、单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 与 4-1BB 的结合能力鉴定

在酵母细胞表面表达 4-1BB 分子胞外段，将 4-1BB 分子胞外段（以人外周血细胞的 mRNA 为模板，经过 oligo(dT) 逆转录，以 5'-TTTGAGAGGACAAGATCATTG-3' 为 5' 引物，以 5'-GGAGATGATCTGCGGAGAGTG-3 为 3' 引物，进行 PCR 扩增）用 EcoR1 和 NotI 酶切后与经过相同酶切的 pYD1 质粒（购自 Invitrogen 公司）相连接得到重组质粒，将该重组质粒转化酿酒酵母 EBY100。从 SD 平板上挑单克隆接种到 2ml SD 培养基中（培养基中葡萄糖的终浓度为 2%），30°C 摇床培养到 OD 值至 2.0 时，取 1ml 菌液，5000 转/分钟离心 5 分钟，弃上清。用 1ml SG 培养基（培养基中半乳糖的终浓度为 2%）悬浮菌体，5000 转/分钟离心 5 分钟，弃上清，然后用 2ml SG 培养基悬浮菌体，转入试管，20°C 摇床诱导 36~48 小时，以抗 V5 抗体证实酵母表面 4-1BB 分子胞外段的表达，FACS 检测单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 与 4-1BB 分子的结合能力，结果如图 2 所示，图 2 中，纵坐标是抗体标记阳性的细胞占总细胞的百分比。结果表明，单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 可以与 4-1BB 结合，且结合能力与抗 4-1BB 抗体和 4-1BB 的结合能力相当。

## 实施例 3、单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a 的 Fab 片段的制备

利用 ImmunoPure® Fab 制备试剂盒（Pierce）中的固定化木瓜蛋白酶消化瞬时转染的哺乳动物 COS-7 细胞分泌的单克隆抗体 anti-4-1BB-CTLA4-IgG2a，将全长单克隆抗体降解为 Fab 和 Fc 片段。将酶解后的产物用试剂盒中提供的固定化蛋白 A 柱纯化得到 Fab 片段。按照实施例 2 的方法进行 ELISA 鉴定。结果表明，Fab 片段与全长抗体结合能力相当。

## 序列表

<160> 4

<210> 1

<211> 269

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly  
1                                   5                                   10                                   15

Val Gln Cys Lys Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Gly Leu Val Lys  
                                  20                                   25                                   30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
                                  35                                   40                                   45

Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Trp Ile Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu  
                                  50                                   55                                   60

Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Gly Gly Ile Asn Tyr Asn  
65                                   70                                   75                                   80

Glu Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
                                  85                                   90                                   95

Thr Val Tyr Leu Asp Leu Ser Lys Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val





Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 260 265

<210> 2

<211> 249

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15

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

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser  
 35 40 45

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Tyr Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ile Leu  
 65 70 75 80

Asp Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 85 90 95

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr  
 100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr  
 115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Asp Ile Gln  
 130 135 140

Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val  
 145 150 155 160

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp  
 165 170 175

Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Ala Ala  
 180 185 190

Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
 195 200 205

Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe  
 210 215 220

Gly Thr Tyr Phe Cys Gln His Leu Trp Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly  
 225 230 235 240

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

245

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 599

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Gly
1				5					10					15	

Val	Gln	Cys	Lys	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Gly	Leu	Val	Lys
			20					25						30	

Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
		35					40						45		

Thr	Asp	Tyr	Ile	Ile	Gln	Trp	Ile	Lys	Gln	Arg	Ser	Gly	Gln	Gly	Leu
	50					55					60				

Glu	Trp	Ile	Gly	Trp	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Ile	Asn	Tyr	Asn
65					70					75					80

Glu	Lys	Phe	Lys	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser
				85						90				95	

Thr	Val	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Lys	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val
			100					105						110	

Tyr Phe Cys Val Arg His Glu Gly Ser Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 115 120 125

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

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 145 150 155 160

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr  
 165 170 175

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 180 185 190

Gly Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Thr Asn Phe His Ser Ala Leu Ile  
 195 200 205

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 210 215 220

Glu Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
 225 230 235 240

Lys Thr Glu Gly His Tyr Tyr Gly Ser Asn Tyr Gly Tyr Tyr Ala Leu  
 245 250 255

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 260 265 270

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
 275 280 285

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 290 295 300

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 305 310 315 320

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 325 330 335

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 340 345 350

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
 355 360 365

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 370 375 380

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 385 390 395 400

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

---

	405		410		415
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp					
	420		425		430
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr					
	435		440		445
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp					
	450		455		460
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu					
	465		470		475
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg					
	485		490		495
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys					
	500		505		510
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp					
	515		520		525
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys					
	530		535		540
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser					
	545		550		555
					560





Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ile Leu  
65 70 75 80

Asp Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
85 90 95

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr  
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Asp Ile Gln  
130 135 140

Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val  
145 150 155 160

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp  
165 170 175

Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Ala Ala  
180 185 190

Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
195 200 205

Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe



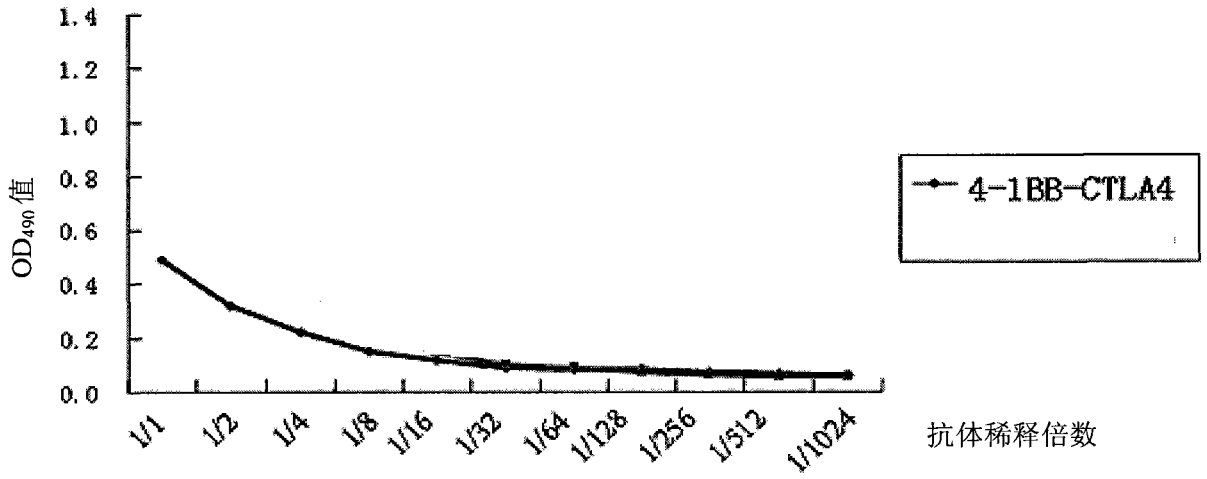


图 1

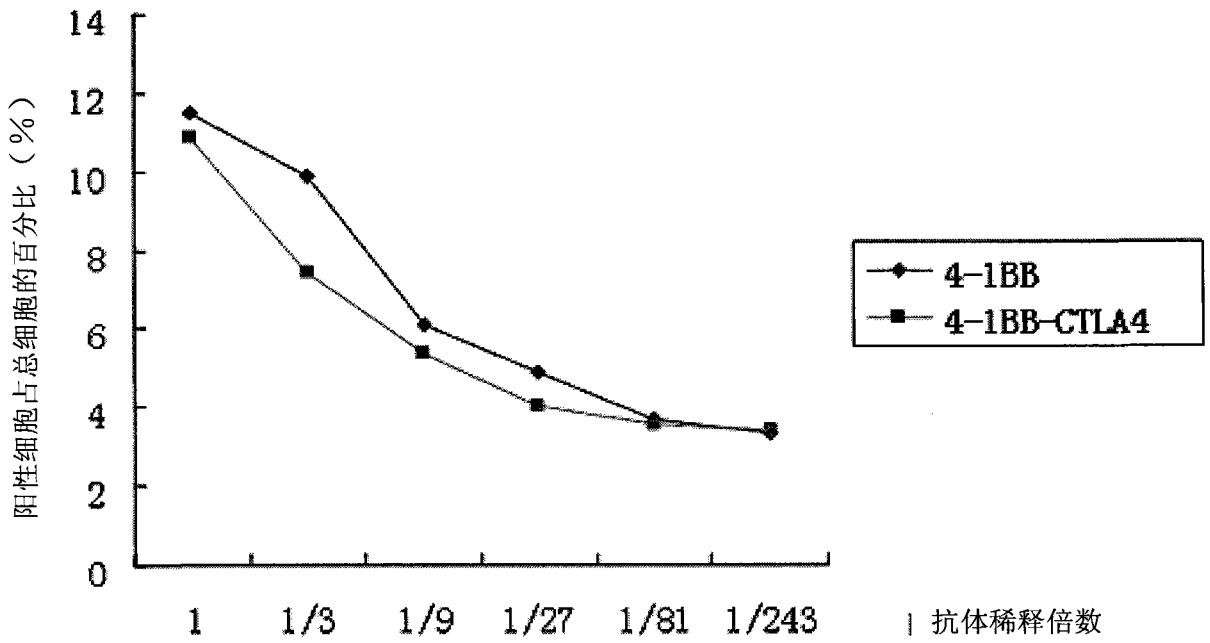


图 2