

[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 200810240950.6

[51] Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

[43] 公开日 2009年12月23日

[11] 公开号 CN 101607985A

[51] Int. Cl. (续)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

[22] 申请日 2008.12.24

[21] 申请号 200810240950.6

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路15号

[72] 发明人 阎锡蕴 冯 静 郑超固 杨东玲
卢 迪

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 王 旭

权利要求书2页 说明书64页 附图9页

[54] 发明名称

抗人 CEA 的单克隆抗体, 包含其的组合物, 及其用途

[57] 摘要

本发明是利用生物技术研制出的一株具有抗结直肠肿瘤活性的抗人 CEA 蛋白的鼠单克隆抗体。本发明包括: 抗人 CEA 鼠单克隆抗体 CC4, 利用其抗原结合能力特异性检测 CEA 家族蛋白的方法, 及利用其抗结直肠肿瘤活性的肿瘤治疗方法。这株抗体能够在分子、细胞和组织水平特异性识别人 CEA, 并识别一个广泛分布于 CEA 家族蛋白中的特殊抗原表位。CC4 在组织水平特异性结合结直肠癌组织, 在动物模型及细胞水平上表现出很强的抑制肿瘤生长、迁移及侵袭的能力。这株抗体及其为基础的检测和治疗手段将成为基础研究或临床应用中有效的肿瘤诊断和治疗的工具。

1. 人癌胚抗原家族蛋白的抗原表位，其氨基酸序列选自由 SEQ ID NO:2, 47, 55 和 57 共同含有的保守的 SEQ ID NO:62 的氨基酸序列。
2. 权利要求 1 的抗原表位，其为 SEQ ID NO:2, 47, 55 或 57 表示的序列。
3. 一种抗人癌胚抗原家族蛋白的抗体，其特征在于能够特异性识别权利要求 1 或 2 的抗原表位。
4. 权利要求 3 的抗体，其特征在于所述抗体包括抗体重链和抗体轻链，
其中所述抗体重链包括作为 CDR 的由 SEQ ID NO: 3 氨基酸序列组成的 CDR1，由 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列组成的 CDR2 和由 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列组成的 CDR3，
所述抗体轻链包括作为 CDR 的由 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列组成的 CDR1，由 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列组成的 CDR2 和由 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列组成的 CDR3。
5. 权利要求 4 的抗体，其特征在于所述抗体的重链可变区由 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列组成，轻链可变区由 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列组成。
6. 权利要求 3-5 任一项的抗体在制备用于治疗肿瘤的药物组合物中的应用。
7. 权利要求 6 的应用，其中所述肿瘤是指过度表达癌胚抗原的肿瘤，例如结直肠癌、肝癌、肺癌、胃癌、子宫内膜癌、食管癌、卵巢癌及乳腺癌等。
8. 权利要求 3-5 任一项的抗体在制备用于靶向癌胚抗原的人体肿瘤的成像定位诊断的诊断剂中的应用。
9. 一种用于治疗肿瘤的药物组合物，其包含权利要求 3-5 任一项的抗体和药用载体。
10. 分泌抗人癌胚抗原抗体的杂交瘤细胞株，保藏号为 CGMCC NO:

2504。

11. 一种编码能与下面定义的各个另外抗体链一起装配的多肽的核酸，其中所述多肽是下述多肽的任一种

- a) 抗体重链，其选自权利要求 4 或 5 所定义的抗体重链；
- b) 抗体轻链，其选自权利要求 4 或 5 所定义的抗体轻链。

12. 一种包括按照权利要求 11 的核酸的表达载体，其能够在原核或真核宿主细胞中表达所述核酸。

13. 一种原核或真核宿主细胞，其包括按照权利要求 12 的载体。

14. 一种制备结合人癌胚抗原家族蛋白的抗体的方法，其特征在于在原核或真核宿主细胞中表达按照权利要求 12 的编码抗体重链的核酸和编码抗体轻链的核酸，并且从所述细胞中回收所述多肽。

15. 一种检测人癌胚抗原家族蛋白的方法，其特征在于利用权利要求 3-5 任一项的抗体。

16. 权利要求 3-5 任一项的抗体的衍生物，其中所述衍生物为所述抗体与生物标记物、抗肿瘤药物、毒素、放射活性剂偶联的产物。

抗人 CEA 的单克隆抗体，包含其的组合物，及其用途

技术领域

本发明属于分子生物学和生物技术领域。具体地说，本发明涉及一株抗人 CEA 的鼠单克隆抗体 CC4，这株抗体能够特异地结合结直肠癌组织，并在动物模型和细胞水平有效抑制结直肠肿瘤细胞生长、迁移及侵袭。CC4 能够在生化、细胞和组织水平特异性识别人源 CEA 蛋白，并结合一个保守存在于 CEA 家族蛋白中的抗原表位。利用这些特性，此抗体能够广泛应用于针对于表达 CEA 或 CEA 家族蛋白的肿瘤的临床诊断和治疗。

背景技术

癌胚抗原 (Carcinoembryonic antigen, CEA) 是最早被人们发现的肿瘤相关抗原之一。它是由 Gold P 和 Freedman SO 在 1965 年首次在结肠癌组织提取物中发现并报道(Gold and Freedman 1965; Gold and Freedman 1965)。1966 年，Gold P 和 Freedman SO 又与其同事 Thomson DM 和 Krupey J 一起报道了可以利用敏感的放射性免疫分析的方法在结肠癌病人和其他肿瘤病人的血清中检测到 CEA，而在健康人或其他疾病患者血清中 CEA 的含量极低(Thomson, Krupey et al. 1969)。这一报道之后，CEA 检测开始逐渐应用于肿瘤的诊断、分期、监控和预后等。目前，CEA 已成为应用最广泛的肿瘤标志物之一，其最主要的临床应用是通过检测血清中 CEA 的水平监控结肠癌切除手术后的复发和结肠癌的肝转移(Hammarstrom 1999; Duffy 2001)。

CEA 基因家族包括 29 个成员，分为三个亚群，即：CEA 亚群，PSG (Pregnancy-specific β 1 glycoprotein) 亚群和未命名的第三亚群(Hammarstrom 1999)。

CEA 属于免疫球蛋白超家族(Thomas and Toth 1990; Thompson, Grunert et al. 1991)，含有两类免疫球蛋白的结构域，即 N-端一段长 108 个

氨基酸的与免疫球蛋白可变区同源的序列 (IgV-like) 和六个与免疫球蛋白恒定区 C-2 同源的结构域(Thompson, Grunert et al. 1991; Hammarstrom 1999)。

CEA 家族成员在结构上有两个共同特点: (1)都包含一个类 IgV 的 N-端结构域, 该结构域缺少二硫键, 是重要的功能性结构域。 (2)糖基化程度高。糖基化位点位于天冬氨酸残基, 糖基含量占总分子量的 50%~60%。

CEA 在健康成人组织中表达量稳定, 而在结肠癌组织中高表达。在正常结肠中, CEA 表达于呈极性的柱状上皮细胞的顶端细胞膜上, 即朝向肠腔的一面, 通过糖基化的磷脂酰肌醇锚定在细胞膜上。在特定的生理条件下, CEA 可通过囊泡释放和酶解破坏两种可能的机制释放到肠腔中, 最终成为粪便的组分。因此, 在健康成人的血液中 CEA 含量极低。而在结肠癌组织中, 肿瘤细胞失去极性, CEA 分布于细胞膜四周, 而且肿瘤组织缺少基底层, 被覆着 CEA 的囊泡可通过对淋巴和血管的浸润而进入血液, 并随着肿瘤体积的增长而在血液中累积(Hammarstrom 1999; Duffy 2001; Hammarstrom and Baranov 2001)。血清中 CEA 水平与结肠癌的相关性使 CEA 成为结肠癌的诊断、分期、监控和预后的标志。

CEA 家族属于免疫球蛋白超家族, 与某些黏附分子结构相似, 具有介导细胞黏附的功能。表达于肿瘤细胞表面的 CEA 亚群成员, 特别是 BGP, CEA 和 NCA, 可作为细胞黏附分子在同型黏附 (CEA-CEA) 和异型黏附 (CEA-非 CEA 的黏附分子) 中起作用(Zhou, Stanners et al. 1993; Maxwell 1999)。而肿瘤细胞的黏附功能与肿瘤的转移相关。研究表明, 细胞表面高表达 CEA 的结肠癌细胞更容易产生肝脏转移(Hashino, Fukuda et al. 1994; Kim, Roh et al. 1997; Solimene, Carneiro et al. 2001)。除此之外, CEA 在细胞信号传导(Beauchemin, Kunath et al. 1997; Kharitonov, Chen et al. 1997)和对微生物的天然免疫(Hammarstrom and Baranov 2001)中也发挥着作用。

虽然至今还没有靶向 CEA 的抗体被 FDA 批准上市, 但大量的抗 CEA 抗体药物处于临床及临床前研究之中。

利用抗 CEA 抗体治疗 CEA 阳性肿瘤是基于 CEA 的肿瘤靶向治疗

的另一个策略。随着抗体工程技术的发展,抗 CEA 治疗性抗体的发展也经历了一个从鼠源单克隆抗体到人鼠嵌合抗体,直到全人抗体的过程。人源化抗 CEA 抗体 Labetuzumab 在荷人瘤小鼠体内表现出了对 CEA 阳性的甲状腺肿瘤生长的抑制作用(Stein and Goldenberg 2004);一株利用转基因鼠制备的全人抗 CEA 抗体也被证明具有抑制肿瘤生长的作用(Imakiire, Kuroki et al. 2004)。另外,也有报道表明,抗 CEA 抗体还具有抗肿瘤转移的作用(Blumenthal, Osorio et al. 2005)。抗 CEA 抗体形式也多种多样,包括完整抗体、scFv 及其二聚体、F(ab')₂ 及其二聚体和三聚体以及人鼠嵌合 Fab 等形式(Mayer, Chester et al. 1999)。

发明内容

在基于蛋白质组学筛选肿瘤抗原的基础上,本发明利用专利 ZL 01 1 36092.5 中介绍的抗体差异筛选和鉴定肿瘤靶抗原的策略,将抗原/抗体的筛选进行二位一体整合。通过用结直肠癌细胞 LS 174T 免疫小鼠,利用细胞 ELISA 方法和免疫组化筛选出肿瘤特异抗体,并通过抗体“钓取”肿瘤抗原,获得了本发明中的具有很强抗肿瘤活性的抗人 CEA 小鼠单克隆抗体 CC4。

本发明用结直肠癌细胞 LS 174T 免疫 BALB/c 小鼠,获得杂交瘤细胞。用细胞 ELISA 方法筛选与 LS 174T 细胞有强结合的抗体,获得一株肿瘤特异性抗体,命名为 CC4,同时分泌该抗体的杂交瘤细胞系命名为 cc4。这株抗体属于 IgG2a, κ 亚型。通过免疫荧光证实了 CC4 与 LS 174T 细胞的结合,并发现 CC4 在免疫印迹实验中能够识别细胞裂解液中 130kD 的蛋白。

利用免疫组化鉴定了抗体 CC4 的肿瘤组织结合谱(如表 1),发现 CC4 能够特异性识别肿瘤组织,主要为胃癌、结肠癌、肝癌、子宫内膜癌、肺癌、食管癌、卵巢癌及乳腺癌等,而不结合或弱结合正常消化道组织。利用细胞免疫荧光鉴定了抗体 CC4 对肿瘤细胞的结合谱(如表 2),发现 CC4 对结直肠癌和胰腺癌细胞都有强烈结合。

利用免疫沉淀从 LS 174T 细胞裂解液中捕获 CC4 抗原,用 SDS-PAGE 分离富集的抗原,并利用胰酶进行胶内酶解,通过 LC-MS (液相色谱-质

谱)的方法鉴定出 CC4 抗体识别的特异性抗原为 CEA 蛋白(即 CEACAM5)。通过在 CC4 不结合的细胞(如黑色素瘤细胞 A375,膀胱癌细胞 T2-4 和 293T 细胞等)中转染 CEACAM5 的 cDNA,并检测 CC4 与转染细胞的结合,证实了 CC4 与 CEA 的相互结合。

利用重组表达的 CEA 蛋白不同结构域和不同缺失突变片段以及免疫印迹的实验方法,发现了 CC4 识别的抗原表位为 CEA 蛋白上的氨基酸 42-61 区域(序列为 SEQ ID NO: 1 的人 CEA 序列中的位置 42-61,即 SEQ ID NO:2)。而这段抗原表位保守存在于 CEA 蛋白家族各成员中,如 CEACAM1、CEACAM5、CEACAM6、CEACAM7、CEACAM8 等。其中 CC4 与 CEACAM1 的结合得到证实,而且 CC4 结合的抗原表位也是此段抗原表位氨基酸 42-61 区域。

抗体功能研究发现,CC4 抗体能够在体外显著抑制肿瘤细胞的增殖、迁移、聚集及侵袭等。体内裸鼠荷瘤实验也证实 CC4 抗体显著抑制肿瘤生长。同时 CC4 在活体荧光影像中特异性靶向并积累于荷瘤鼠肿瘤部位,体现出很强的肿瘤特异性。此外 CC4 还具有细胞毒活性,能引起明显的 ADCC(抗体介导的细胞毒)反应。由于 CC4 抗体具有较强的抗肿瘤活性,CC4 极有潜力发展成为针对于表达 CEA 的肿瘤,特别是结直肠癌,的诊断工具及治疗药物。

具体地,本发明涉及一种人 CEA 抗原表位,其氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 所示。

本发明涉及一种抗人 CEA 抗体,命名为 CC4,其特征在于其能够特异性识别上述人 CEA 抗原表位。

优选地,所述抗人 CEA 抗体特征在于包括抗体重链和抗体轻链,

其中所述抗体重链包括作为 CDR 的由 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列组成的 CDR1,由 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列组成的 CDR2 和由 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列组成的 CDR3,

所述抗体轻链包括作为 CDR 的由 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列组成的 CDR1,由 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列组成的 CDR2 和由 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列组成的 CDR3。

更优选地,所述抗体的重链可变区由 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列组

成，轻链可变区由 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列组成。

在本发明的另一个方面，还涉及上述抗人 CEA 的抗体在制备用于靶向 CEA 的人体肿瘤的成像定位诊断的诊断剂中的应用。优选地，这种诊断可以是应用实施例中所述的活体荧光影像技术为基础的肿瘤诊断手段。

在本发明的另一方面，还涉及上述抗人 CEA 的抗体在制备用于治疗肿瘤的药物组合物中的应用。优选地，所述肿瘤是结直肠癌，肝癌，肺癌。

在另一个方面，本发明还涉及一种组合物，例如用于治疗肿瘤的药物组合物，其包含上述任一方面的抗人 CEA 抗体，和药用载体。

用于本文时，“药用载体”包括生理适合的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延缓试剂等。优选地，所述载体适合于静脉内的、肌内的、皮下的、肠胃外的、脊柱的或表皮的施用(例如，通过注射或灌输)。

通过许多本领域已知的方法可以施用本发明的组合物。如本领域技术人员将理解，施用路径和/或模式将取决于所需结果而变化。

为了通过某些施用路径来施用本发明化合物，用一种材料来包被化合物，或与一种材料共同施用化合物以预防其失活可能是必需的。例如，可以以适当载体，例如脂质体或稀释剂来给受试者施用所述化合物。药用稀释剂包括盐水和水性缓冲溶液。

药用载体包括用于即时制备灭菌的可注射溶液或分散体的灭菌水溶液或分散体和灭菌粉末。将这些介质和试剂用于药用活性物质的应用为本领域所知。

在用于本文时，短语“肠胃外的施用”和“经肠胃外施用”表示除肠内的和局部施用以外的通常通过注射的施用模式，包括但不限于，静脉内的、肌内的、动脉内的、鞘内的、囊内的、眶内的、心内的、皮内的、腹膜内的、经气管的、皮下的、表皮下的、关节内的、囊下的、蛛网膜下的、脊柱内的、硬膜外的、胸骨内的注射和灌输。

无论选择何种施用路径，通过为本领域技术人员已知的常规方法，将可以以适合的水合形式和/或本发明的药物组合物形式使用的本发明的化合物配制成可药用剂型。

对于特定患者、组合物和施用方式，本发明药物组合物的活性成分的

实际剂量水平可以变化以获得有效实现理想的治疗反应而不会对患者具有毒性的活性成分的量。选定的剂量水平将取决于许多药物动力学因素，其包括所用的本发明特定组合物的活性，施用的路径，施用的时间，所用的特定化合物的排泄率，治疗的持续时间，与所用的特定化合物结合使用的其它药物、化合物和/或物质，待治疗的患者的年龄、性别、体重、疾病状况、一般健康和以前的疾病史和医学领域众所周知的类似因素。

所述组合物必须是无菌且流体的，以到达组合物可以通过注射器进行传递的程度。除了水之外，载体优选是等渗缓冲盐溶液。

在另一个方面，本发明还涉及分泌抗人 CEA 抗体的杂交瘤细胞株，保藏号为 CGMCC NO: 2504 。

在另一个方面，本发明还涉及编码能与下面定义的几个另外抗体链一起装配的多肽的核酸，其中所述多肽是下述多肽的任一种

- a) 抗体重链，其为上述所定义的抗体重链之一；
- b) 抗体轻链，其为上述所定义的抗体轻链之一。

同时，本发明还涉及包括上述核酸的表达载体，其能够在原核或真核宿主细胞中表达所述核酸。以及包括所述表达载体的原核或真核宿主细胞。

在本发明的另一个方面，还涉及一种制备结合人 CEA 的抗体的方法，其特征在于在原核或真核宿主细胞中表达上述编码抗体重链的核酸和编码抗体轻链的核酸，并且从所述细胞中回收所述多肽。

在本发明的另一个方面，还涉及所述抗人 CEA 的抗体的衍生物，其中所述衍生物为所述抗体与生物标记物（如生物素、HRP、碱性磷酸酶、FITC、PE、Cy3、Cy5 等常规荧光染料、纳米磁珠等纳米材料）、抗肿瘤药物（如现有技术已知的卡铂、顺铂、五氟尿嘧啶等）、毒素（如蓖麻毒素、淋巴毒素等）、放射活性剂（如 ¹³¹碘、⁹⁰钷、放射性铜等）偶联的产物。

本领域的普通技术人员基于说明书关于抗人 CEA 抗体的教导，结合现有技术知识，完全可以毫无困难地获得上述衍生物，进而确定衍生物的效果。

本发明的创新点在于：（1）研制了一株针对人 CEA 蛋白的鼠单克隆

抗体；(2) 揭示了这株抗 CEA 抗体识别的抗原表位，并发现这个抗原表位保守存在于包括 CEACAM1 在内的 CEA 家族其他蛋白成员中，同时证实了 CC4 在分子、细胞及组织水平上对于 CEA 蛋白的结合有显著差别；

(3) 发现了 CC4 能够通过抑制肿瘤细胞增殖、迁移、聚集和侵袭，以及抗体介导的细胞毒作用，来抑制肿瘤生长。

附图说明

图 1: 单克隆抗体 CC4 的亚型鉴定。

图 2: 单克隆抗体 CC4 对于结直肠肿瘤及正常组织的免疫组化染色，箭头指示组化染色部位。

图 3: 单克隆抗体 CC4 对于结直肠肿瘤细胞 LS 174T 的免疫荧光染色，绿色荧光染色部位如箭头所指。

图 4: 单克隆抗体 CC4 对于结直肠肿瘤及正常组织裂解液和结直肠癌细胞 LS 174T 及 SW948 的免疫印迹结合。

图 5: 单克隆抗体 CC4 在免疫沉淀实验中结合存在于 LS 174T 细胞裂解液中的抗原。泳道 1 和 2 是免疫沉淀前的样品，泳道 3 和 4 分别是应用 CC4 和 IgG 免疫沉淀之后的样品，泳道 5 和 6 是用 CC4 和 IgG 沉淀下来的目的抗原蛋白。

图 6: CC4 与 CEACAM5 蛋白的结合。左图是转染 pcDNA3.1 空载体的 T2-4 细胞，右图是转染 pcDNA3.1-CEACAM5 的 T2-4 细胞。阴影是用 IgG 染色细胞，黑线是用 CC4 染色细胞。

图 7: CEACAM5 蛋白的重组片段示意图。

图 8: CEACAM5 重组结构域 1-3 在免疫印迹实验中与抗体 CC4 及 anti-His 抗体的结合。左图为蛋白凝胶电泳，右图为免疫印迹实验。

图 9: CEACAM5 蛋白重组片段在免疫印迹实验中与抗体 CC4 及 anti-His 抗体的结合。左图为蛋白凝胶电泳，右图为免疫印迹实验。

图 10: 单克隆抗体 CC4 结合 CEACAM5 蛋白上位于 aa 42-61 的一段抗原表位。A 图是 CEACAM5 全长及缺失突变的示意图。B 图是 CC4 抗体和 RACEA 多抗分别对表达 CEACAM5 或缺失突变 CEACAM5-Δ42-61 的 293T 细胞。阴影是用 IgG 染色细胞，黑线是用 CC4 染色细胞，而绿线

是用抗 CEA 兔多抗 RACEA 染色细胞。

图 11: 不同 CEA 蛋白家族成员的位于 aa 42-61 的保守表位比较。

图 12: 单克隆抗体 CC4 结合 CEACAM1 蛋白上位于 aa 42-61 的一段抗原表位。A 图是 CEACAM1 全长及缺失突变的示意图。B 图是 CC4 抗体和 RACEA 多抗分别对表达 CEACAM1 或缺失突变 CEACAM1- Δ 42-61 的 293T 细胞。阴影是用 IgG 染色细胞, 黑线是用 CC4 染色细胞, 而绿线是用抗 CEA 兔多抗 RACEA 染色细胞。

图 13: 单克隆抗体 CC4 与 CEACAM6 和 CEACAM8 蛋白分子的结合。左图是转染了 CEACAM8 cDNA 的 293T 细胞, 右图是转染了 CEACAM6 cDNA 的 293T 细胞。阴影是用 IgG 染色细胞, 黑线是用 CC4 染色细胞, 而绿线是用抗 CEA 兔多抗 RACEA 染色细胞, 蓝线是用 9A6 抗体染色细胞。

图 14: 单克隆抗体 CC4 与小鼠 CEACAM1 蛋白分子的结合。

图 15: 单克隆抗体 CC4 在荷瘤鼠活体内靶向肿瘤部位的荧光影像。图 A 是 Cy5-CC4 对于肺癌细胞 A549 的免疫荧光染色。图 B 是 Cy5-CC4 在荷人肺癌细胞 A549 成瘤的裸鼠上的荧光影像。图 C 是 Cy5-IgG 在荷瘤鼠内的分布情况。

图 16: 单克隆抗体 CC4 对于裸鼠荷瘤生长的抑制作用。上图是肿瘤体积随注射抗体时间变化的曲线图。下图是肿瘤大小的照片示意。

图 17: 单克隆抗体 CC4 对于结直肠癌细胞 LS 174T 增殖的抑制作用。CFSE 标记的第一代细胞所占比例标注于图上。

图 18: 单克隆抗体 CC4 对于结直肠癌细胞 LS 174T 细胞周期进程的影响。不同时期的细胞所占比例标注于图上。

图 19: 单克隆抗体 CC4 对于结直肠癌细胞 LS 174T 迁移的影响。每个视野下穿过微孔膜的细胞数以柱状图显示于图上。

图 20: 单克隆抗体 CC4 对于结直肠癌细胞 LS 174T 黏附的影响。单细胞所占比例以柱状图显示于图上。

图 21: 单克隆抗体 CC4 引起的 ADCC 作用。特异性细胞杀伤与抗体浓度的关系以线图的形式显示于图中。

杂交瘤细胞株 cc4（其分泌抗体 CC4）于 2008 年 5 月 19 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC，中国，北京，海淀区中关村北一条 13 号），保藏号为 CGMCC No. 2504。

具体实施方式

下面通过实施例详细描述本发明。本领域的普通技术人员可以理解，下述实施例仅是用于举例说明的目的。本发明的精神和范围由后附的权利要求所限定。

实施例 1：单克隆抗体 CC4 的制备及鉴定。

应用杂交瘤技术(Kohler and Milstein 1975; Yeh, Hellstrom et al. 1979; Yeh, Hellstrom et al. 1982)产生并筛选获得抗体 CC4。简述如下：以人结直肠癌细胞 LS 174T 活细胞（ATCC）为抗原免疫 BALB/c 小鼠（北京实验动物中心），经 4 次加强免疫后将小鼠杀死，取脾脏，并将脾细胞悬浮于 RPMI 培养基中。在聚乙二醇（PEG）存在下，将脾细胞和 SP2/0-Ag14 鼠骨髓瘤细胞（ATCC）进行融合，并用 HAT 选择性培养基对杂交瘤进行筛选。具体方法见参考文献(Kohler and Milstein 1975)。

用培养于 96 孔细胞培养板内并经固定的 LS 174T 细胞作为抗原，ELISA 法筛选各杂交瘤细胞培养上清。细胞 ELISA 方法简介如下：(1) 将 LS 174T 细胞接种于 96 孔细胞培养板，培养至近于汇片（sub-confluence）；

(2) 吸去 96 孔细胞培养板中的培养基，PBS 洗涤细胞，用 -20℃ 预冷的丙酮/甲醇（1:1）固定孔内的细胞，1 min；吸去固定剂，PBS 洗涤；

(3) 用 PBS 配制的 5% 脱脂牛奶加入各孔至满，室温孵育 1 h 封闭，PBS 洗涤；

(4) 将收集的各个杂交瘤细胞克隆的培养上清 50 μ l 分别加入各孔中，室温孵育 1h，PBS 洗涤三次；

(5) 各孔内加入 PBS 稀释（1: 5000 稀释）的 HRP-羊抗鼠 IgG（Santa Cruz）50 μ l，室温孵育 1 h，PBS 洗涤三次；

(6) 各孔内加入底物 (200ng/ml TMB (Amersco), 0.03% H_2O_2 (北京化学试剂公司), pH4.5) 显色, 用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的光吸收值。选择读数高的克隆进行进一步的鉴定实验。

在细胞 ELISA 实验中, 杂交瘤克隆 cc4 分泌的抗体 CC4 表现出与靶细胞强烈而稳定的结合。将单克隆抗体杂交瘤细胞株 cc4 (其分泌抗体 CC4) 于 2008 年 5 月 19 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC, 中国, 北京, 朝阳区大屯路, 中国科学院微生物研究所), 保藏号为 CGMCC No. 2504。

大量培养扩增杂交瘤细胞 cc4, 收集含有 CC4 抗体的培养上清; 同时将杂交瘤细胞 cc4 用无血清 RPMI-1640 培养基制成细胞悬液, 用于制备抗体腹水。腹水制备方法如下: 取 6—8 周龄的 BALB/c 小鼠, 腹腔注射 0.5 ml 降植烷 (Pristane), 10 天后腹腔注射 5×10^6 个杂交瘤细胞, 两周后处死小鼠, 抽取小鼠腹水, 保存于 -70°C 。

用 Protein A Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia) 从杂交瘤培养上清或小鼠腹水中纯化小鼠抗体, 纯化方法参见产品说明书。

应用 BD Pharmingen 公司鼠抗体亚型鉴定试剂盒 (目录号 550487), ELISA 方法鉴定出抗体 CC4 属于 IgG1, κ 亚型, 如图 1 所示。

实施例 2: 单克隆抗体 CC4 对肿瘤组织及肿瘤细胞的特异性研究。

为系统研究本发明所述单克隆抗体 CC4 对人体正常和肿瘤组织的结合特异性, 应用免疫组化的方法筛选了 29 例人正常组织和 24 例人肿瘤组织的冰冻切片标本。

具体实验方法如下: 将人正常组织或肿瘤组织用 OCT (冰冻组织包埋液, Sakura 提供) 包埋, 进行冰冻切片。切片在预冷的丙酮里固定 5 分钟, 然后在含有 0.3% H_2O_2 的甲醇中室温闭光孵育 30 分钟去除内源性过氧化物酶的干扰。PBS 洗涤三次之后, 用 5% 马血清 (北京中杉金桥, PBS 稀释马血清) 封闭切片, 然后分别在含有 CC4 和不含有 CC4 (阴性对照) 的一抗稀释液 (1:2000 封闭液稀释) 中 4°C 孵育过夜。之后用生物素标记的二抗 (生物素偶联的羊抗鼠 IgG, Vector 公司, 1:1000 封闭液稀释) 和辣根过氧化物酶偶联的链霉抗生物素蛋白作为三抗 (Vector,

1:1000 PBS 稀释), 37°C 孵育组织切片, 最后用新鲜配置的 DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥, 产品编号: ZLI-9033) 显色。显色完毕之后用苏木素复染细胞核。

如表 1 所示, CC4 在正常组织中的分布主要包括胃粘膜上皮细胞、小肠和大肠等的腺上皮细胞、肝细胞、宫颈鳞状上皮及前列腺的腺上皮等, 在所有检测过的正常组织标本中的阳性率为 11/29, 胃、肠、肝和子宫的阳性率为 7/16。CC4 与所测试的绝大多数肿瘤组织有结合, 阳性率为 22/24, 主要集中于消化道肿瘤以及生殖系统肿瘤, 其中, 胃癌、结肠癌、肝癌和子宫内膜癌的阳性率为 15/16; 而且, CC4 与肿瘤组织的结合信号强度普遍高于与相应正常组织的结合信号, 证实了 CC4 与肿瘤组织的特异性结合。

表 1 单克隆抗体 CC4 对肿瘤组织特异性的免疫组化分析

正常组织	阳性例数/总例数	肿瘤组织	阳性例数/总例数
胃	1/3	胃癌	2/2
肠	2/8	结肠癌	7/7
肝	1/1	肝癌	3/3
子宫	3/7	子宫内膜癌	3/4
大脑	0/1	肺癌	1/2
心脏	0/2	食管癌	1/1
脾	2/2	卵巢癌	4/4
胰	0/2	乳腺癌	1/1
肾	1/2		
甲状腺	0/1		
睾丸	0/1		
前列腺	1/1		
膀胱	0/1		

CC4 与肝癌和结肠癌肿瘤组织表现出尤为强烈的结合。以结直肠癌为例, 如图 2 所示, CC4 对于结直肠癌组织的典型着色可以看出, CC4 主要结合在腺上皮细胞胞浆内 (如图 2 的箭头所示), 同时在上皮围成的腔

内和基底膜外也有弥漫的信号存在（如图 2 的箭头所示）。除此之外，CC4 还与肝癌组织癌细胞、胃癌组织的胃粘膜，子宫内膜癌组织的内膜等上皮组织有结合（结果未显示）。

用细胞免疫荧光等实验手段，以 CC4 为一抗，以 FITC-羊抗鼠 IgG 为二抗，检测了单克隆抗体 CC4 与人肿瘤细胞系的结合。

简单方法如下：

(1) 培养在盖玻片上的单层细胞用 -20°C 预冷的丙酮/甲醇（1:1）或 4% 甲醛固定 1 min，PBS 洗涤；

(2) 5%（v/v）羊血清（北京中杉金桥）封闭，室温，30 min；

(3) 稀释 1000 倍的单抗 CC4 腹水与样本孵育，室温，1 h，PBS 洗涤三次；

(4) 400 倍稀释的 FITC-羊抗鼠 IgG（Sigma）与样本孵育，室温，30 min，PBS 洗涤三次；

(5) 用普通荧光显微镜或激光共聚焦激光扫描显微镜观察样本，拍照。

如表 2 所示，在检验的 16 株肿瘤细胞中，CC4 与其中的 8 株有特异性结合。这 8 株细胞分别属于结直肠癌、肝癌和胰腺癌。可以看出大部分的结直肠癌细胞都表达 CC4 抗原，能够被 CC4 识别。

表 2 免疫荧光分析单克隆抗体 CC4 对人肿瘤细胞的特异性

细胞系*	CC4 免疫反应性
膀胱癌 5637	-
膀胱癌 T24	-
绒毛膜癌 BeWo	-
结直肠癌 LS 174T	+
结直肠癌 SW1116	+
结直肠癌 SW620	+
结直肠癌 SW480	+
结直肠癌 SW948	+
十二指肠癌 HuTu 80	-
肝细胞癌 Alex	-

肝细胞癌 HepG2	+
乳腺癌 MCF-7	-
乳腺癌 ZR-75-1	-
黑色素瘤 A-375	-
胰腺癌 Capan-2	+
胰腺癌 SW1990	+

*上列所有癌细胞系均来自 ATCC。

图 3 显示了免疫荧光实验中，CC4 与两株结直肠癌细胞 LS 174T 和 SW1116 的结合。可以看出，CC4 抗原分布在细胞膜上，在细胞的接触面上有更显著的表达（如图 3 的箭头所示）。这一结果提示，CC4 抗原可能与细胞间黏附有关。

实施例 3：单克隆抗体 CC4 的抗原鉴定。

应用免疫印迹的实验方法发现 CC4 识别存在于 LS 174T 细胞及结直肠癌组织中的大小为 130kD 的蛋白。具体操作如下：收集与 CC4 强烈结合的人源结直肠癌细胞 LS 174T（ATCC），用预冷的 PBS 洗涤细胞两遍，4℃800rpm 离心 5 分钟，细胞沉淀用裂解液(Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 150mM, EDTA 1mM, NP-40 1%, Glycerol 10%, PMSF 100μg/ml)裂解细胞，4℃12000g 离心 15 分钟，收集上清，分别加入含有 DTT（终浓度 100mM）（二硫苏糖醇）和不含有 DTT 的上样缓冲液（5x 上样缓冲液：0.313M Tris-HCl, pH6.8, 10%SDS, 0.05%溴酚蓝, 50%甘油），100℃煮样。10% SDS-PAGE 分离全细胞蛋白，之后半干电转移至硝酸纤维素膜。5%脱脂牛奶封闭后，用 CC4 腹水作为一抗（1: 10000 用封闭液 5%脱脂牛奶/TBST 稀释）4℃孵育膜过夜，然后用辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG 二抗（Pierce, 1: 2000 封闭液 5%脱脂牛奶/TBST 稀释）室温孵育 1 小时，用 Pierce 公司提供的显色底物（产品编号：34076, 400μl 3%H₂O₂+400μl Luminol 溶液/miniblot）检测。如图 4 所示，CC4 在还原和非还原状态下结合 LS 174T 细胞裂解液中 130kD 左右的蛋白。证明 CC4 结合的抗原表位是一个不依赖于二硫键的线性表位。而且 CC4 识别条带呈现弥散状，

结合 CC4 靶抗原的细胞膜分布形式，提示 CC4 靶抗原可能存在较高程度的糖基化。

接着利用免疫沉淀的办法在 LS 174T 细胞裂解液中富集 CC4 靶抗原，并进行胶内酶解和液相色谱-质谱 (LC-MS) 鉴定该靶抗原。

免疫沉淀的具体方法简述如下： 5×10^7 LS 174T(同上)细胞在 2 mL 冰预冷的上述裂解液中裂解 30 分钟， 4°C 12000g 离心 15 分钟，收集上清。先加入 20 μl 50% slurry(50%与 PBS 或 TE 混合)的 protein A-Agarose (Santa Cruz)，进行预清除。然后分别加入 5 μg CC4 和正常鼠 IgG (Sigma)， 4°C 孵育过夜。之后加入 50 μl 50% slurry 的 protein A-Agarose 捕获抗原-抗体复合物，用 PBS 洗涤沉淀三次，加入 80 μl 1x 上样缓冲液 (将上述 5x 上样缓冲液稀释 5 倍)， 100°C 加热煮样 10 分钟。蛋白沉淀用免疫印迹的方法检测 (实验方法同上所述)，CC4 作为检测一抗。

如图 5 所示，用 CC4 免疫沉淀富集了 CC4 靶抗原，而阴性对照小鼠 IgG 不能捕获 CC4 靶抗原 (泳道 5 和 6)。并且经过 CC4 免疫沉淀之后的细胞裂解液中，CC4 靶抗原含量下降明显 (泳道 3) 也反映了 CC4 抗体富集靶抗原的效率。

用 SDS-PAGE 分离 CC4 靶抗原之后，银染色，切取胶上 130kD 条带，利用胰酶进行胶内酶解，用 LC-MS 方法鉴定抗原蛋白。

具体操作如下：

- (1). 将所选择的胶条带用 1.5mm 切胶笔切下，并切成 1mm^3 大小的碎块，置于 eppendorf (EP) 管或 96 孔 PCR 板中；
- (2). 加 50 μL DD.H₂O 洗两次，10min/次；
- (3). 加 100mmol 硫代硫酸钠和 30mmol 铁氰化钾(1:1)溶液 50 μL ，超声脱色 5min 或 37°C 脱色 20min，吸干；
- (4). 重复步骤 3，直至颜色褪去；
- (5). 加乙腈 50 μL 脱水至胶粒完全变白，真空抽干 5min；
- (6). 加 10 mM DTT (10 μL 1M DTT，990 μL 25mM NH₄HCO₃ 配制) 20 μL ， 56°C 水浴 1hr；
- (7). 冷却到室温后，吸干，快速加 55 mM IAM (55 μL 1M IAM，945 μL 25mM NH₄HCO₃ 配制) 20 μL ，置于暗室 45min；

(8). 依次用 25 mM NH_4HCO_3 、50% 乙腈溶液和乙腈洗，乙腈脱水到胶粒完全变白为止，真空抽干 5min;

(9). 将 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的酶储液以 25 mM NH_4HCO_3 稀释 10 倍，每 EP 管加 2 μL ，稍微离心一下，让酶液充分与胶粒接触，4 $^\circ\text{C}$ 或冰上放置 30min，待溶液被胶块完全吸收，加 25mM NH_4HCO_3 10-15 μL 置 37 $^\circ\text{C}$ ，消化过夜；

(10). 加入 2% FA (甲酸) 终止反应，使 FA 终浓度为 0.1%，振荡混匀，离心。

(11). 将上清吸取 20 μl ，上机检测。(中国科学院生物物理所质谱平台，LC-MS 蛋白鉴定服务)。

(12). 通过在线工具及在线软件可以鉴定蛋白序列。

Masco (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)

蛋白鉴定结果如表 3 所示，符合理论预测的 4 个肽段被鉴定出来，蛋白则被鉴定为 CEACAM5，得分 40.34，分子量 76, 795。

表 3 LC-MS 鉴定的 CC4 抗原肽段列表

Reference				Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)
Scan(s)	Peptide	MH+	z	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions
	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5 preproprotei			40.34	9.26	76795.2	98986445	4 (4 0 0 0 0)
4346	K.SDLVNEEATGQFR.V	1466.53505	2	4.05	0.59	1699.0	1	19/24
6302	R.QIIGYVIGTQQATPGPAYSGR.E	2178.43317	2	5.86	0.70	1238.6	1	26/40
6350	R.VDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGR.E	2719.99361	3	5.14	0.54	974.2	1	33/100
9201	R.RSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYR.S	2850.17596	3	6.71	0.57	2329.1	1	44/100

进一步的实验证实了 CC4 的靶抗原就是 CEA 蛋白 (即 CEACAM5)。从武汉三鹰生物技术有限公司购买 CEACAM5 的 cDNA (克隆在 pCMV-SPORTS6 载体上)，序列为 SEQ ID NO: 11 所示，将 CEACAM5 亚克隆至 pcDNA3.1(-)b (Invitrogen)，利用限制性内切酶 NotI 和 HindIII (NEB 提供) 及引物 5'- AAA TAT GCG GCC GCA TGG AGT CTC CCT CGG CCC-3' (SEQ ID NO:12) 和 5'- CCC AAG CTT GGC TGC TAT ATC AGA GCA AC-3' (SEQ ID NO: 13)。

将构建好的 pcDNA3.1(-)b-CEACAM5 质粒以 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 介导转染至 CC4 不结合的人膀胱癌细胞 T2-4 (ATCC) 中。方法简介如下：

- (1). 以 $1-3 \times 10^5$ 细胞/孔的密度接种 T2-4 细胞至六孔板, 37°C 培养过夜, 细胞生长至 70-80% 汇片。
- (2). 将 5 μl Lipofectamine2000 (Invitrogen) 稀释到 125 μl 的 Opti-MEM (Gibco) 中, 混合均匀。
- (3). 将 2 μg 质粒 DNA 稀释到另一 125 μl 的 DMEM (Gibco) 中混合均匀, 室温孵育 5 分钟。
- (4). 将上述两种稀释液混合均匀, 室温孵育 20 分钟。
- (5). 将混合液逐滴滴加到细胞培养板各孔中, 摇动培养板使其均匀混合。48 小时后收集细胞进行流式细胞术检测。

用 CC4 抗体分别对转染 CEACAM5 cDNA 及空载体的 T2-4 细胞进行流式细胞术检测。方法简述如下:

- (1) 用 0.03% EDTA 消化细胞, 用含有 0.1% BSA 的 PBS (PBSB) 洗涤, 重悬, 细胞浓度约 $10^6/\text{ml}$;
- (2) 加入 1000 倍稀释的 CC4 腹水做一抗, 以加入正常小鼠 IgG (Sigma) 的细胞作为空白对照; 4°C 孵育 45 分钟; PBSB 洗涤;
- (3) 加入 400 倍稀释的 FITC-羊抗鼠 IgG (Sigma), 4°C 避光孵育 30 分钟; PBSB 洗涤;
- (4) 将细胞重悬于 PBS, FACS 检测。

结果如图 6 所示, 转染空载体的 T2-4/Control 不能被 CC4 抗体所识别, 但转染 T2-4/CEACAM5 的细胞却能够被 CC4 强烈结合。这一实验证实了 CC4 对 CEACAM5 蛋白的特异性结合。

实施例 4: 抗体 CC4 的抗原表位鉴定

运用分别重组表达的人 CEA 蛋白 (即 CEACAM5) 胞外区段的不同缺失突变体, 以及免疫印迹的实验方法鉴定了本发明所述的抗体 CC4 识别的抗原表位。

如图 7 所示, 结构域 1-3 分别表示 CEA 最靠近胞外 N 端的三个结构域。重叠的序列被设计来防止可能的表位丢失。结构域 1 (序列为 SEQ ID NO:1 的人 CEA 序列中的位置 35-155 的氨基酸, 如 SEQ ID NO: 14 所示)、结构域 2 (序列为 SEQ ID NO: 1 的人 CEA 序列中的位置 139-273 的氨基

酸，如 SEQ ID NO: 15 所示）以及结构域 3（序列为 SEQ ID NO: 1 的人 CEA 序列中的位置 230-355 的氨基酸，如 SEQ ID NO: 16 所示）分别克隆在 pET32a（Novagen）上，表达出来的分别是 Trx-His6-S tag 融合的 Trx-His6-S-D1, Trx-His6-S-D2 和 Trx-His6-S-D3。

克隆过程简述如下：用相应的一对引物 D1S 和 D1A（用于结构域 1），D2S 和 D2A（用于结构域 2），D3S 和 D3A（用于结构域 3），及模板 pcDNA3.1(-)b-CEA（如前实施例 3 所述）作 PCR 反应，条件为 95°C 5 分钟；95°C 45 秒，56°C 40 秒，72°C 50 秒，30 个循环；72°C 5 分钟。分别扩增出编码结构域 1-3 的核苷酸序列。

引物列表如下，正义链引物带有 Nco I 酶切位点（如下划线所示），反义链引物带有 Hind III 酶切位点（如下划线所示）：

引物名称	引物序列 5'至 3'
D1S	5' catg <u>CCATGG</u> GctAAGCTCACTATTGAATCCAC 3'(SEQ ID NO: 17)
D1A	5' ccc <u>AAGCTT</u> ttaTTTGGAGTTGTTGCTGGAGA 3' (SEQ ID NO:18)
D2S	5' catg <u>CCATGG</u> GctCGGGTATACCCGGAGCTGC 3' (SEQ ID NO:19)
D2A	5' ccc <u>AAGCTT</u> ttaGACAAACCAAGAGTACTGTG 3' (SEQ ID NO: 20)
D3S	5' catg <u>CCATGG</u> GctATCCTGAATGTCCTCTATGG 3' (SEQ ID NO:21)
D3A	5' ccc <u>AAGCTT</u> ttaCAGGTAGGTTGTGTTCTGAA 3' (SEQ ID NO:22)

PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶（Biowest Agarose）分离，用 Tiangen 公司提供的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒（产品编号：DP209-03）回收 PCR 产物，然后用 Takara 公司提供的 pMD18 T-simple kit 将片段连接到 T 载体（试剂盒内提供了载体和酶）上，并转化 Top10 感受态细胞（Tiangen 提供）。加有氨苄青霉素的 LB 培养板上长出来的单克隆 D1-T（插入了结构

域 1 的核苷酸序列), D2-T (插入了结构域 2 的核苷酸序列) 和 D3-T (插入了结构域 3 的核苷酸序列), 用带有氨苄青霉素的 LB 培养基培养 37°C 过夜, 并用 Tiangen 提供的质粒小提试剂盒 (产品编号: DP103-03) 抽提质粒, 用 Nco I 和 Hind III (NEB) 双酶切 pET32a、提取的质粒 (即分别插入了结构域 1-3 的核苷酸序列的 T 载体)。之后用 2%琼脂糖凝胶 (Biowest Agarose) 分离, 用 Tiangen 公司提供的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (产品编号: DP209-03) 回收 T 载体的酶切小片段 (即结构域 1-3 的核苷酸序列) 及 pET32a 酶切开的质粒片段。D1-T, D2-T 及 D3-T 的酶切小片段与 pET32a 酶切开的质粒片段连接, 用 NEB 公司提供的 T4 DNA 连接酶建立连接反应, 16°C 连接过夜。转化 Top10 感受态细胞 (Tiangen), pET32a-D1, pET32a-D2 和 pET32a-D3 用含氨苄霉素 (100ng/ml) 的半固体 LB 培养板筛选。过夜培养获得的单克隆分别用含有抗生素的 LB 培养基培养, 并抽提质粒, 获得的质粒用于转化 B121(DE3)感受态细胞 (Tiangen)。

重组蛋白 Trx-His6-S-D1 (简称 D1), Trx-His6-S-D2 (简称 D2) 和 Trx-His6-S-D3 (简称 D3) 的诱导表达: 转化了 pET32a-D1, pET32a-D2 和 pET32a-D3 的 B121(DE3)单克隆, 在含有相应抗生素的 5ml LB 培养液中 37°C 培养过夜。过夜菌 1: 100 接种至相应新鲜的培养基中 37°C 培养, 待细菌生长至 OD600 为 0.6 时, 加入 1mM IPTG (Ameresco) 37°C 诱导表达 6 小时或者 0.2mM IPTG 16°C 诱导过夜。图 8 的左图显示了重组表达的 D1-3 蛋白。

D1, D2 和 D3 由 IPTG 诱导表达之后, 大部分呈现可溶状态, 用 Ni 柱纯化。具体方法如下: 菌体重悬于 25mM Tris-HCl (pH7.4), 300W 超声 2x99 个循环, 每个循环超声 4 秒, 暂停 8 秒, 共 12 秒。4°C 12000g 离心 30 分钟, 收集上清, 过 0.45mm 滤膜去除杂质。Ni-NTA sepharose 6 Fast Flow (GE Health Care) 填柱, 用超纯水洗涤后, 在 50mM Tris-HCl (pH7.4), 150mM NaCl 的平衡溶液中平衡。然后将含有 His6-tag 的蛋白的离心可溶上清上样挂柱, 用洗涤溶液 (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 50mM 咪唑) 洗柱。最后洗脱溶液 (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 300mM 咪唑) 洗脱柱上的蛋白。

利用免疫印迹实验鉴定 CC4 所识别的结构域。简单过程如下：用 15%SDS-PAGE 分离原核表达纯化的 D1-D3 蛋白，然后用 Bio-rad 半干转印仪将胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上。用溶解在 PBST 中的 5%脱脂牛奶室温封闭 2 小时，然后用上述 5%脱脂牛奶/PBST 稀释（1：5000）的一抗溶液（CC4）4℃孵育过夜。接着 PBST 洗 5 遍，用上述 5%脱脂牛奶/PBST 稀释（1：2000）的二抗（辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG 抗体，Pierce）溶液室温孵育 1 小时。PBST 洗 5 遍之后，用 Pierce 公司的显色底物（产品编号：34076，400 μ l 3% H_2O_2 +400 μ l Luminol 溶液/miniblot）显色。如图 8 右图所示，D1-3 因为都带有 His-tag，都能够被 anti-His-tag 的抗体所识别。然而 CC4 只结合 D1，不结合相邻的 D2，证实了其抗原表位处于结构域 1 中，即 CEA 蛋白氨基酸 35-138 的一段蛋白区段中。

进一步的研究利用四个重组表达的不同蛋白片段更细化的鉴定 CC4 结合的抗原表位。

如图 7 所示，片段 42-273，片段 62-273，片段 80-273 以及片段 101-273 分别表示四个针对于结构域 1 的 CEA 蛋白截短体。用于找出 CC4 抗体所识别的抗原表位序列。片段 42-273（序列为 SEQ ID NO:1 的人 CEA 序列中的位置 42-273 的氨基酸，如 SEQ ID NO:23 所示）、片段 62-273（序列为 SEQ ID NO:1 的人 CEA 序列中的位置 62-273 的氨基酸，如 SEQ ID NO:24 所示）、片段 80-273（序列为 SEQ ID NO:1 的人 CEA 序列中的位置 80-273 的氨基酸，如 SEQ ID NO:25 所示）以及片段 101-273（序列为 SEQ ID NO:1 的人 CEA 序列中的位置 101-273 的氨基酸，如 SEQ ID NO:26 所示）分别克隆在 pET32a（Novagen）上，表达出来的分别是 Trx-His6-S tag 融合的 Trx-His6-S-F42-273，Trx-His6-S-F62-273，Trx-His6-S-F80-273 和 Trx-His6-S-F101-273。

克隆过程同结构域 1-3 克隆过程相同。用相应的一对引物 42S 和 D2A（用于片段 42-273），62S 和 D2A（用于片段 62-273），80S 和 D2A（用于片段 80-273），101S 和 D2A（用于片段 101-273）及模板 pcDNA3.1(-)b-CEA（如前实施例 3 所述）作 PCR 反应，条件为 95℃ 5 分钟；95℃ 45 秒，55℃ 40 秒，72℃ 50 秒，30 个循环；72℃ 5 分钟。分别扩增出编码上述四个片段的核苷酸序列。

引物列表如下，带有 Nco I 酶切位点（如下划线所示）：

引物名称	引物序列 5'至 3'
42S	5' catg <u>CCATG</u> GctCCGTTCAATGTCGCAGAGG 3' (SEQ ID NO:27)
62S	5' catg <u>CCATG</u> GctCTTTTTGGCTACAGCTGGT 3' (SEQ ID NO:28)
80S	5' catg <u>CCATG</u> GctATAGGATATGTAATAGGAAC 3' (SEQ ID NO:29)
101S	5' catg <u>CCATG</u> GctATATACCCCAATGCATCCC 3' (SEQ ID NO:30)

克隆和表达过程与前述结构域 1-3 的克隆表达过程完全相同。图 9 左图显示了重组表达四个蛋白片段。

重组蛋白 Trx-His6-S-F42-273 (简称 F42-273), Trx-His6-S-F62-273 (简称 F62-273), Trx-His6-S-F80-273 (简称 F80-273) 和 Trx-His6-S-F101-273 (简称 F101-273) 诱导表达之后大部分呈不可溶的包涵体状态。包涵体纯化和洗涤方法如下：菌体重悬于 25mM Tris-HCl (pH7.4), 300W 超声 2x99 个循环，每个循环超声 4 秒，暂停 8 秒，共 12 秒。4℃ 12000g 离心 30 分钟。包涵体沉淀重悬于溶液 1 (2.5M NaCl) 中，4℃ 搅拌 30 分钟，4℃ 12000g 离心 30 分钟。包涵体沉淀重悬于溶液 2 (0.5% Triton X-100, 10mM EDTA, pH8.0) 中，4℃ 搅拌 30 分钟，4℃ 12000g 离心 30 分钟。包涵体沉淀重悬于溶液 3 (2M Urea, 50mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0) 中，4℃ 搅拌 30 分钟，4℃ 12000g 离心 30 分钟。随后，包涵体溶解在溶液 4 (8M Urea, 25mM Tris, 150mM NaCl, 25mM DTT, pH 8.0) 中。

利用免疫印迹实验鉴定 CC4 抗体所识别的蛋白片段以及抗原表位。实验方法同验证 CC4 与 D1-3 结合的免疫印迹方法完全相同。如图 9 右图所示，F42-273, F62-273, F80-273 及 F101-273 都带有 His-tag，都能够被 anti-His-tag 的抗体所识别。但只有 F42-273 能够被 CC4 所识别，而其他三个蛋白片段均不结合 CC4，说明 CC4 的识别位点位于 CEA 氨基酸序列 aa 42-61 中。

接着,发明者利用标准的重叠 PCR 法构建了缺失 aa42-61 一段氨基酸序列的全长 CEA 突变体(如图 10A 所示),其氨基酸序列如 SEQ ID NO:31 所示, DNA 序列如 SEQ ID NO:32 所示。方法简单描述如下:先用引物 C5-EcoRI-sense 和 C5-Antisense-splicer, PCR 扩增得到 C5-Δ42-61-F1 片段,用引物 C5-Sense-splicer 和 C5-BglII-antisense, PCR 扩增获得 C5-Δ42-61-F2;接着利用 C5-Δ42-61-F1 和 C5-Δ42-61-F2 互为模板和引物,以 54°C 为退火温度, PCR 扩增 5 个循环,之后加入引物 C5-EcoRI-sense 和 C5-BglII-antisense,以 56°C 为退火温度, PCR 扩增 25 个循环。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳分离鉴定,用 Tiangen 公司提供的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(产品编号: DP209-03)回收 PCR 产物,用 NEB 公司提供的 EcoRI 和 BglII 双酶切 pcDNA3.1(-)b-CEACAM5 (前述构建)和 PCR 产物,再用琼脂糖凝胶电泳分离,并回收 DNA 片段(同上)。将酶切过的载体和 PCR 产物连接,用 NEB 公司提供的 T4 DNA 连接酶建立连接反应,16°C 连接过夜。转化 Top10 感受态细胞(Tiangen),含有质粒 pcDNA3.1(-)b-CEACAM5-Δ42-61 的阳性克隆用含氨苄霉素(100ng/ml)的半固体 LB 培养板筛选。过夜培养获得的单克隆分别用含有抗生素的 LB 培养基培养,并抽提质粒。

C5-EcoRI-sense: 5'-CCGGAATTCATGGAGTCTCCCTCGGCC-3' (SEQ ID NO:33)

C5-Antisense-splicer: 5'-GCCAAAAGCGTGGATTCAATAGTGAGC-3' (SEQ ID NO:34)

C5-Sense-splicer: 5'-TGAATCCACGCTTTTTGGCTACAGCTGGT-3' (SEQ ID NO:35)

C5-Bgl II-antisense: 5'-GGAAGATCTGACTTTATGACGTG-3' (SEQ ID NO:36)

获得的 pcDNA3.1(-)b-CEACAM5-Δ42-61 质粒用于转染 293T 细胞。同时转染 pcDNA3.1(-)b-CEACAM5 质粒作为阳性对照(转染方法同前)。将转染的细胞用 CC4 或者 RACEA(抗人 CEA 家族蛋白兔多抗, DakoCytomation 公司提供)染色,并进行流式细胞术检测(FACS 方法同前, FITC 标记抗兔二抗由 Sigma 公司提供)。结果显示未转染的 293T 细胞不能被 CC4 或者 RACEA 识别,转染了 CEACAM5 野生型 cDNA 的细胞能够同时被 CC4 和 RACEA 识别,但是转染了 CEACAM5-Δ42-61 突变体的 293T 细胞只能被 RACEA 识别,但不能被 CC4 结合(如图 10B 所示)。

上述实验结果说明 CC4 的抗原表位存在于序列为 SEQ ID NO: 1 的人 CEA 序列中的位置 42-61 之间，具体序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

对比鉴定出的抗原表位在 CEA 家族蛋白中的相似程度，发现该抗原表位保守地存在于 CEA 家族蛋白各成员当中。如图 11 所示，斜体表示与 CEA 蛋白同源序列。分析发现 CEA 蛋白（即 CEACAM5）中位于氨基酸序列 42-61 的 CC4 所识别的抗原表位，除少数几的氨基酸存在变异外，保守地存在于 CEA 家族蛋白其他成员中，如 CEACAM1、CEACAM3、CEACAM6、CEACAM7 及 CEACAM8。

因此，发明者以 CEACAM1 为例，验证了 CC4 与 CEA 蛋白家族其他成员的结合，及 CC4 识别的抗原表位是否同时存在于 CEA 蛋白家族其他成员相应的氨基酸序列中。

CEACAM1 的 cDNA 购自武汉三鹰生物技术有限公司，序列为 SEQ ID NO:37，亚克隆至 pcDNA3.1(-)b，利用限制性内切酶 EcoRI 和 HindIII(NEB 提供)及引物 5'-CCG GAA TTC ATG GGG CAC CTC TCA GCC C-3' (SEQ ID NO:38) 和 5'-CCC AAG CTT GGT CTT GTT AGG TGG GTC ATT-3' (SEQ ID NO:39)。同时发明者利用前述重叠 PCR 的方法，在 CEACAM1 野生型的基础上，构建了缺乏 aa42-61 这一段氨基酸片段的 CEACAM1 突变体，CEACAM1-Δ42-61，其氨基酸序列如 SEQ ID NO:40 所示，DNA 序列如 SEQ ID NO:41 所示（如图 12A）。利用的引物如下：

C1-EcoR I-Sense: 5'-CCGGAATTCATGGGGCACCTCTCAGCC-3' (SEQ ID NO:42)

C1-BamH I-antisense: 5'-CGCGGATCCACTATTATTCACA-3' (SEQ ID NO:43)

C1-Sense-splicer: 5'-TGAATCCATGCTTTTTGGCTACAGCTGGT-3' (SEQ ID NO:44)

C1-antisense-splicer: 5'-GCCAAAAAGCATGGATTCAGTAGTGAGC-3' (SEQ ID NO:45)

同样，将获得的质粒 pcDNA3.1(-)b-CEACAM1 及 pcDNA3.1(-)b-CEACAM1-Δ42-61 转染 293T 细胞，用 CC4 和 RACEA 染色细胞，进行流式细胞术检测（方法同前述）。结果显示转染 CEACAM1 的 293T 细胞能够被 CC4 和 RACEA 结合，但是转染突变体 CEACAM1-Δ42-61 的 293T 细胞只能被 RACEA 识别，而无法与 CC4 结合（如图 12B）。因此，CC4

能够识别 CEA 家族成员 CEACAM1，而且识别位点位于，处在同一位置的，序列为 SEQ ID NO: 46 的人 CEACAM1 氨基酸序列中的位置 42-61 之间，具体序列如 SEQ ID NO: 47 所示。

针对，CC4 所识别氨基酸序列保守的存在于 CEA 家族不同成员蛋白之中这一现象，发明者又研究了 CC4 抗体与另外两个具有代表性的 CEA 家族蛋白成员，CEACAM6 和 CEACAM8，的结合情况。

CEACAM6 cDNA 购自武汉三鹰生物技术有限公司，序列为 SEQ ID NO:48，亚克隆至 pcDNA3.1(-)b 质粒，利用 NEB 公司提供的 EcoRI 和 HindIII，及引物 5'-CCG GAA TTC ATG GGA CCC CCC TCA GCC CCT-3' (SEQ ID NO:49) 和 5'-CCC AAG CTT CTA TAT CAG AGC CAC CCT GGC-3' (SEQ ID NO:50)。CEACAM8 cDNA 购自武汉三鹰生物技术有限公司，序列为 SEQ ID NO:51，亚克隆至 pcDNA3.1(-)b 质粒，利用 NEB 公司提供的 EcoRI 和 HindIII，及引物 5'-CCG GAA TTC CGC AGG CAG CAG AGA CCA TG-3' (SEQ ID NO:52) 和 5'-CCC AAG CTT ACA CCA GAG CTA CTA TAT CAG-3' (SEQ ID NO:53)。

将 pcDNA3.1(-)b-CEACAM6 及 pcDNA3.1(-)b-CEACAM8 质粒分别转染 293T 细胞，用 CC4 和 RACEA 分别染色细胞，进行流式细胞术检测。如图 13 所示，CC4 能够与表达 CEACAM6 及表达 CEACAM8 的 293T 细胞结合，说明了 CC4 能够与 CEACAM6 分子结合，结合位点基本可以确定存在于序列为 SEQ ID NO:54 的人 CEACAM6 序列中的位置 42-61 之间，具体序列如 SEQ ID NO: 55 所示；CC4 能够与 CEACAM8 分子结合，结合位点基本可以确定存在于序列为 SEQ ID NO: 56 的人 CEACAM8 序列中的位置 42-61 之间，具体序列如 SEQ ID NO: 57 所示。

此外，发明者还检测了与人 CEA 家族蛋白具有同源性的鼠 CEACAM1 蛋白与单克隆抗体 CC4 的结合情况。

含有小鼠 CEACAM1 cDNA，序列为 SEQ ID NO: 58，的真核细胞表达质粒 pERFP-N1-mCEACAM1，购自武汉三鹰生物技术有限公司。将 pERFP-N1-mCEACAM1 质粒转染 293T 细胞，用 CC4 和 RACEA 分别染色细胞，进行流式细胞术检测。如图 14 所示，RACEA 能够与表达 mCEACAM1 的细胞结合，但是 CC4 却不能结合转染的细胞。说明 CC4

不结合存在于氨基酸序列为 SEQ ID NO: 59 的小鼠 CEACAM1 序列中的位置 42-61 之间的抗原表位(如图 11 所示),其具体氨基酸序列为 SEQ ID NO: 60.

综上所述,经过一系列的实验,发明者证实了 CC4 与 CEA 家族蛋白许多成员之间的结合,并鉴定出了 CC4 结合的是一段广泛存在于不同 CEA 家族蛋白成员之间的保守的抗原表位。这段保守序列存在于人 CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 及 CEACAM8 的氨基酸序列中的位置 42-61 之间。通过分析小鼠 CEACAM1 的氨基酸序列及 CC4 的结合情况,发明者发现 CC4 不与小鼠 CEACAM1 结合的原因在于,存在于小鼠 CEACAM1 氨基酸序列位置 46-53 的一段表位,具体为 SEQ ID NO: 61,与完全保守存在于人 CEA 家族蛋白中的表位不一致,具体可以用存在于序列为 SEQ ID NO: 1 的人 CEACAM5 氨基酸序列位置 46-53 的表位来表示,具体为 SEQ ID NO: 62。

因此,发明者基于 CC4 与共同存在于人 CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 及 CEACAM8 中的以 SEQ ID NO: 62 所示的抗原表位结合,而不与存在于小鼠 CEACAM1 中的以 SEQ ID NO: 61 所示的抗原表位结合这一现象,得出结论:CC4 结合的抗原表位是由 SEQ ID NO:2, 47, 55 和 57 共同含有的保守的序列为 SEQ ID NO:62 的一段氨基酸序列。

实施例 5: CC4 在活体荧光影像中特异性靶向小鼠荷瘤部位。

利用参考文献(Jin, Josserand et al. 2006; Jin, Razkin et al. 2007)中所述的活体荧光影像的方法,检测 CC4 特异性靶向肿瘤能力。

实验方法简单描述如下:

发明者首先用免疫荧光的方法检测了 CC4 与人肺癌细胞系 A549 (ATCC) 的结合(免疫荧光的方法同前),结果证实了 A549 表达 CC4 的抗原,CC4 能够结合 A549 细胞,如图 15A 所示。

将 2×10^7 A549 细胞皮下注射于 6-8 周裸鼠(Janvier, Le Genest Saint Isle, France),4-6 周形成 6-8mm 直径的荷瘤。将 Cy5 标记的 CC4 抗体 20 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ 静脉注射于荷瘤鼠,对照荷瘤鼠注射 Cy5 标记的小鼠 IgG (Sigma),注射了抗体的荷瘤鼠直接应用活体荧光影像观察。利用基于

Hamamatsu 光学成像系统的活体荧光反射成像技术,发明者观察了荧光标记抗体在荷瘤鼠体内的活体分布情况。简单的说,小鼠被麻醉后置于一个黑盒子中,用 633nm 波长的激光($50 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$)激发,激发出来的荧光透过 RG 665 的滤光片,并用一个 -70°C 制冷的数码 CCD 镜头(Hamamatsu digital camera C4742-98-26LWGS, Hamamatsu Photonics K.K., Japan)收集荧光。所有的荧光影像收集的曝光时间均为 100ms,其他参数在实验中保持不变。图像以 16-bit 的 TIFF 文件获得,并用 Wasabi 软件(Hamamatsu)分析。对于肿瘤/背景对比度的计算,现分别计算肿瘤区域的荧光强度(记为 T),然后计算较远距离之外的皮肤背景荧光强度(记为 S),T/S 就被认为是肿瘤组织和背景的荧光水平差异。

结果如图 15B 所示,注射 Cy5 标记的 CC4 50 个小时之后肿瘤/背景比就接近 4,达到最大值。而注射 Cy5 标记 IgG 的对照鼠,肿瘤/背景比一直低于 2(如图 15C)。IgG 只在肝脏代谢,而抗体 CC4 能够靶向积累于荷瘤部位。实验说明了抗体 CC4 在动物模型上有很好的肿瘤靶向作用。

实施例 6: CC4 的体内及体外抑瘤活性研究。

CC4 在荷瘤裸鼠模型中抑制肿瘤生长。将结直肠癌细胞 LS 174T 接种裸鼠,荷瘤部位局部注射单克隆抗体 CC4,观察其对肿瘤生长的影响。具体做法如下:

(1) 收集培养的 LS 174T 细胞,无血清培养基洗涤,以 2×10^7 个/ml 的密度重悬于无血清培养基中;

(2) 皮下注射 1×10^7 个 LS 174T 细胞于裸鼠(购自中国医学科学院动物繁育中心)肩胛部位,并在接种部位局部多点注射纯化的单克隆抗体, $100 \mu\text{g}/\text{只}$; 设置对照组,以相同体积 PBS 代替抗体注射该组裸鼠;之后每周两次按照同样方法注射;

(3) 待肿瘤长至明显可见时,于注射当天用游标卡尺测量肿瘤长径和短径;按照公式:肿瘤体积 = 长径 \times 短径 $^2/2$ 计算肿瘤体积;

(4) 实验至裸鼠开始出现死亡时结束。

结果如图 16 所示,注射单克隆抗体 CC4 的裸鼠荷瘤生长明显抑制,肿瘤大小与注射 PBS 的对照组相比明显较小。利用体内荷瘤模型证明了

单克隆抗体 CC4 能够显著抑制肿瘤的生长。

基于 CC4 在体内实验中显示的抑瘤活性，发明者进一步研究了 CC4 在体外的抗肿瘤活性，即对体外培养的肿瘤细胞的增殖、迁移、粘附及侵袭的影响。

利用 CFSE 染色研究 CC4 对于结直肠肿瘤细胞 LS 174T 增殖的影响。方法简介如下：

(1) 将 LS 174T 细胞重悬于预热的 PBS/0.1% BSA 溶液中，终浓度为 1×10^6 个/ml。CFSE 固体粉末购自 Molecular Probes，用 DMSO 溶解配制成 5mM 储存液。

(2) 每毫升细胞悬液加入 $2 \mu\text{l}$ 5mM 的 CFSE 溶液，CFSE 终浓度为 $10 \mu\text{M}$ 。37°C 孵育 10 分钟。

(3) 加入 5 倍体积冰预冷的细胞培养液，淬灭未进入细胞的 CFSE 染色剂。冰上孵育 5 分钟。离心收集细胞。

(4) 将细胞沉淀重悬在新鲜的培养液中洗涤细胞，然后离心收集细胞。重复重悬和离心过程至少三次以洗涤细胞。

(5) 将 CFSE 标记的细胞接种到 6 孔板，每孔 2×10^6 个细胞。

(6) 24 小时后收集细胞，用流式细胞仪检测。

结果如图 17 所示， $25 \mu\text{g/ml}$ CC4 抗体就足以抑制超过 10% 的 LS 174T 细胞分裂增殖，说明 CC4 抗体能够显著抑制肿瘤细胞增殖。

接下来的研究用 PI 染色细胞测定细胞内 DNA 含量，分析了 CC4 对肿瘤细胞细胞周期产生的影响。方法简介如下：

(1) 接种 2×10^6 LS 174T 细胞(ATCC)到 10cm 细胞培养皿中，培养过夜。更换成无血清培养液。进行血清饥饿 24 小时。

(2) 更换成 10%血清的培养液，培养 12h。用 PBS 洗涤细胞一次。

(3) 加入 1ml 胰酶溶液消化细胞，吹打均匀，转移至离心管中，加入 10ml PBS。离心收集细胞，800rpm 离心 10min。

(4) 弃去上清，加入 1ml PBS，重悬沉淀并吹打混匀细胞。加入 10ml 冰预冷的 70%乙醇，吹打混匀细胞，固定过夜。800rpm 4°C 离心 10 分钟，收集细胞。

(5) 弃去上清，加入 1ml PBS，重悬沉淀并吹打混匀细胞。再加入 9ml PBS，混匀。800rpm 4°C 离心 10 分钟，收集细胞。

(6) 弃去上清，用 1ml PBS 重悬细胞沉淀，混匀，4°C 自然沉降 5 分钟。

(7) 转移上相 800 μ l 至新管，2500rpm 4°C 离心 10 分钟，收集细胞。

(8) 加入新配制的 PI 溶液 [0.1% (v/v) TritonX-100; 200 μ g/ml DNase-free RNase A (BBI); 20 μ g/ml PI (sigma)] 重悬细胞沉淀，37°C 孵育 30 分钟，上机检测。

检测结果如图 18 所示 25 μ g/ml CC4 抗体就可以抑制近 20%的细胞由 S 期向 G2 期转变，这证明了 CC4 抗体对于细胞周期的抑制作用，解释了 CC4 抑制肿瘤细胞增殖的作用。

利用 Transwell 系统 (Corning HTS Transwell-96 Cell Migration Products) 研究 CC4 抗体对于细胞迁移的影响。方法简述如下：

(1) LS 174T 细胞(ATCC)以无血清培养基制成单细胞悬液(10^5 /ml)，按不同浓度向培养细胞中加入抗体与对照。

(2) Transwell 下室加入含 10%胎牛血清的培养液 (200 μ l/孔)，上室加入细胞悬液 (50 μ l/孔，每个浓度设三个平行孔)，在 37°C 二氧化碳培养箱中孵育 12 小时。

(3) 将膜上层的细胞用棉签擦掉，下层细胞以 4%多聚甲醛固定后，用 1%结晶紫染色，镜检计数。

实验结果如图 19 所示，CC4 处理的实验组每孔穿过的细胞数明显减少，说明 CC4 能够显著抑制 LS 174T 细胞的迁移，而且这种抑制呈现浓度依赖。

同时发明者也研究了 CC4 对于细胞的粘附和聚集的影响。方法主要如参考文献(Takeichi 1977)所述，简述如下：

(1) 为了增强粘附效率，LS 174T 细胞培养在低钙 (0.1 mM Ca^{2+}) 的含 5% FCS 的 MEM 培养液中培养过夜。

(2) 用不含 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 的 PBS 洗涤细胞两次，然后用含 1 mM EDTA

的 HBSS 缓冲液 37°C 消化细胞 10 到 20 分钟。

(3) 将消化好的细胞吹起，800rpm 离心 10 分钟收集细胞。将细胞用含有 1% BSA 的 HBSS 洗涤两次，并重悬于 1% BSA/HBSS 中，将细胞通过 18-gauge 针头，制成单细胞悬液 (5×10^5 cells/ml)。

(4) 将细胞悬液接种在 24 孔板中 (0.5ml/孔)，24 孔培养板事先用 2% BSA/HBSS 包被。在 37°C 摇床上孵育 3 小时。加入的 CaCl_2 和 EGTA 终浓度均为 1 mM。

(5) 每孔加入 0.5ml 5%的戊二醛终止反应。镜检。

(6) 至少三个细胞聚集在一起作为聚集的细胞，计算单细胞比率%单细胞= $[1-(N_0-N_t)/N_0] \times 100$ 。其中 N_0 为总细胞数， N_t 为聚集在一起的细胞数。

实验结果如 20 所示，上图显示加入抗体 CC4 后单细胞比率明显降低，且呈现浓度依赖，说明 CC4 抗体能够抑制肿瘤细胞相互聚集和粘附。下图显示，假如 EGTA 或者 Ca^{2+} 均不会影响 CC4 抗体的作用，说明 CC4 抗体靶向的 CEA 蛋白介导的细胞-细胞相互粘附是 Ca^{2+} 非依赖的。

由于 CC4 抗体的亚型是 IgG2a, κ 亚型，这一亚型的抗体理论上具有抗体介导的细胞毒活性，即 ADCC 活性。发明者利用 LDH 释放的方法研究了 CC4 抗体介导的免疫细胞对肿瘤细胞杀伤活性。具体方法如试剂盒 (CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay, Promega, 货号 G7890) 中所介绍。效应细胞选择 BALB/c 小鼠的脾脏细胞，用注射器活塞磨碎后，用红细胞裂解液 [144mM NH_4Cl , 1mM NaHCO_3 , 1mM EDAT(pH8.0)] 破碎红细胞，重悬于 PBS 中即制得脾细胞悬液。在 96 孔板中接种 5000 个 LS 174T 或 A375 细胞(ATCC) (靶细胞) 培养过夜，加入不同浓度抗体 CC4 及 5×10^5 个小鼠脾细胞 (E:T=100)，37°C 杀伤 4 小时。用前述试剂盒测定释放的 LDH，计算杀伤率。

杀伤率由以下公式计算：

$$\% \text{ 细胞毒性} = (\text{Exp} - \text{T.spon.} - \text{Effe.spon.}) / (\text{Tmax.} - \text{T.spon})$$

Exp 表示的实验组读值，T.spon 表示的是只有靶细胞的对照组读值，Effe.spon 表示的是只有效应细胞的对照组读值，Tmax 表示的是将靶细胞

裂解后得到的全细胞 LDH 最大释放组读值。

实验结果如图 21 所示,CC4 能够对表达 CEA 的 LS 174T 细胞引起较强的 ADCC 反应,而不对 CC4 不结合的 A375 细胞引起特异性杀伤。而且 ADCC 的效果是随着 CC4 抗体浓度的增加而变强的。此项实验证明了 CC4 能够引起抗体介导的特异性免疫反应,从而部分解释了在裸鼠模型上的抑瘤活性。

主要参考文献:

Beauchemin, N., T. Kunath, et al. (1997). "Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells." Oncogene **14**(7): 783-90.

Blumenthal, R. D., L. Osorio, et al. (2005). "Carcinoembryonic antigen antibody inhibits lung metastasis and augments chemotherapy in a human colonic carcinoma xenograft." Cancer Immunol Immunother **54**(4): 315-27.

Duffy, M. J. (2001). "Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful?" Clin Chem **47**(4): 624-30.

Gold, P. and S. O. Freedman (1965). "Demonstration of Tumor-Specific Antigens in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absorption Techniques." J Exp Med **121**: 439-62.

Gold, P. and S. O. Freedman (1965). "Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system." J Exp Med **122**(3): 467-81.

Hammarstrom, S. (1999). "The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues." Semin Cancer Biol **9**(2): 67-81.

Hammarstrom, S. and V. Baranov (2001). "Is there a role for CEA in innate immunity in the colon?" Trends Microbiol **9**(3): 119-25.

Hashino, J., Y. Fukuda, et al. (1994). "Metastatic potential of human colorectal carcinoma SW1222 cells transfected with cDNA encoding carcinoembryonic antigen." Clin Exp Metastasis **12**(4): 324-8.

Imakiire, T., M. Kuroki, et al. (2004). "Generation, immunologic

characterization and antitumor effects of human monoclonal antibodies for carcinoembryonic antigen." Int J Cancer **108**(4): 564-70.

Jin, Z. H., V. Josserand, et al. (2006). "Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)4." Mol Imaging **5**(3): 188-97.

Jin, Z. H., J. Razkin, et al. (2007). "In vivo noninvasive optical imaging of receptor-mediated RGD internalization using self-quenched Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)(4)." Mol Imaging **6**(1): 43-55.

Kharitonov, A., Z. Chen, et al. (1997). "A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors." Nature **386**(6621): 181-6.

Kim, J. C., S. A. Roh, et al. (1997). "Adhesive function of carcinoembryonic antigen in the liver metastasis of KM-12c colon carcinoma cell line." Dis Colon Rectum **40**(8): 946-53.

Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-7.

Maxwell, P. (1999). "Carcinoembryonic antigen: cell adhesion molecule and useful diagnostic marker." Br J Biomed Sci **56**(3): 209-14.

Mayer, A., K. A. Chester, et al. (1999). "Taking engineered anti-CEA antibodies to the clinic." J Immunol Methods **231**(1-2): 261-73.

Solimene, A. C., C. R. Carneiro, et al. (2001). "Functional differences between two morphologically distinct cell subpopulations within a human colorectal carcinoma cell line." Braz J Med Biol Res **34**(5): 653-61.

Stein, R. and D. M. Goldenberg (2004). "A humanized monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen, labetuzumab, inhibits tumor growth and sensitizes human medullary thyroid cancer xenografts to dacarbazine chemotherapy." Mol Cancer Ther **3**(12): 1559-64.

Takeichi, M. (1977). "Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins." J Cell Biol **75**(2 Pt 1): 464-74.

Thomas, P. and C. A. Toth (1990). "Carcinoembryonic antigen binding to

Kupffer cells is via a peptide located at the junction of the N-terminal and first loop domains." Biochem Biophys Res Commun **170**(1): 391-6.

Thompson, J. A., F. Grunert, et al. (1991). "Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives." J Clin Lab Anal **5**(5): 344-66.

Thomson, D. M., J. Krupey, et al. (1969). "The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system." Proc Natl Acad Sci U S A **64**(1): 161-7.

Yeh, M. Y., I. Hellstrom, et al. (1982). "A cell-surface antigen which is present in the ganglioside fraction and shared by human melanomas." Int J Cancer **29**(3): 269-75.

Yeh, M. Y., I. Hellstrom, et al. (1979). "Cell surface antigens of human melanoma identified by monoclonal antibody." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(6): 2927-31.

Zhou, H., C. P. Stanners, et al. (1993). "Specificity of anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies and their effects on CEA-mediated adhesion." Cancer Res **53**(16): 3817-22.

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 抗人CEA的单克隆抗体CC4, 包含其的组合物, 及其用途

<130> IB085940

<160> 62

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 702

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

```

Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln
1           5           10           15

Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
                20           25           30

Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
          35           40           45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly
          50           55           60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile
65           70           75           80

Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser
          85           90           95

Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile
          100          105          110

Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp
          115          120          125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu
          130          135          140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys
145          150          155          160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr

```

	165		170		175
Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln	180		185		190
Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn	195		200		205
Asp Ser Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg	210		215		220
Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro	225		230		235
Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn	245		250		255
Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe	260		265		270
Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn	275		280		285
Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser	290		295		300
Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala	305		310		315
Glu Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu	325		330		335
Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr	340		345		350
Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg	355		360		365
Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr	370		375		380
Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser	385		390		395
Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp	405		410		415
Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn	420		425		430
Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser	435		440		445
Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile	450		455		460
Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn	465		470		475
					480

Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val
485 490 495

Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro
500 505 510

Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln
515 520 525

Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser
530 535 540

Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn
545 550 555 560

Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser
565 570 575

Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly
580 585 590

Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly
595 600 605

Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln
610 615 620

Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu
625 630 635 640

Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe
645 650 655

Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile
660 665 670

Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr
675 680 685

Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
690 695 700

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn
1 5 10 15

Leu Pro Gln His
20

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp
1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Ile Asn Pro Gly Ser Ser Thr Ile
1 5

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Ala Thr Ser Tyr Gly Asn Ser Pro Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

Glu Ser Val Asp Thr Tyr Ala Val Ser Phe
1 5 10

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Thr Ala Ser
1

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

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

Ser Leu Asn Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Pro Gly Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Ser Tyr Gly Asn Ser Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 10

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

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

<210> 11

<211> 2109

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 11

```

atggagtcic ccteggeccc tccccacaga tggtgcatcc cctggcagag gctcctgctc    60
acagcctcac ttctaacctt ctggaacctg cccaccactg ccaagctcac tattgaatcc    120
acgcgcttca atgtgcaga ggggaaggag gtgctttctac ttgtccacaa tctgccccag    180
catctttttg gctacacctg gtacaaaggt gaaagagtgg atggcaaccg tcaaattata    240
ggatattgtaa taggaactca acaagctacc ccagggcccg catacagtgg tegagagata    300
atatacccca atgcatcctt getgatccag aacaicatcc agaatgacac aggattctac    360
accctacacg tcataaagtc agatcttgtg aatgaagaag caactggcca gticcgggta    420
taccgggagc tgeccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaaaccctg ggaggacaag    480
gatgtgtggt ccttcacctg tgaacctgag actcaggacg caacctacct gtggtgggta    540
aacaalcaga gcctcccggt cagteccagg ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc    600
actctattca atgtcacaag aatgactca gcaagctaca aatgtgaaac ccagaaccca    660
gigagtgcc a ggcgcagtga ttcagtcac ctgaatgtcc tctatggccc ggatgcccc    720
accatttccc ctctaaacac atcttacaga tcaggggaaa atctgaaact ctctgcccac    780
geagcctcta acccaactgc acagtactct tggtttgta atgggacttt ccagcaatcc    840
accecaagagc tctttatccc caacatcaet gtgaataata gtggatccta tacgtgccaa    900
geccataact cagacaactgg cctcaatagg accacagtca cgacgatcac agtctatgca    960
gagccaccca aacccttcac caccagcaac aactccaacc cctgggagga tgaggatgct    1020
glagccttaa cctgtgaacc tgagattcag aacacaacct acctgtggtg ggtaaataat    1080
cagagcctcc cggctagctc caggctgcag ctgtccaatg acaacaggac cctcaactta    1140
ctcagtgta caaggaatga tgtaggacce tatgagtgtg gaatccagaa cgaattaagt    1200

```


gttgaccaca ggcaccagc catcctgaat gtctctatg gccagacga cccaccatt 1260
 tccccctcat acacctatta ccgtccagg gtagacctca gcctctctg ccagcagcc 1320
 tctaaccac ctgcacagta ttcttggctg attgatggga acatccagca acacacaaa 1380
 gagctcttta tctccaacat cactgagaag aacagcggac tctatactg ccaggccaat 1440
 aactcagcca gtggccacag caggactaca gtcaagaaa tcacagtctc tgcggagctg 1500
 cccaagccct ccattccag caacaactcc aaaccctgg aggacaagga tctgtggcc 1560
 ttacactgig aacctgaggc tcagaacaca acctacctgt ggtgggtaaa tggtcagagc 1620
 ctcccagtc gtcaccagct gcagctgtcc aatggcaaca ggacctcac tctattcaat 1680
 gtcacaagaa atgacgaag agcctatgta tgtggaatcc agaactcagt gactgcaaac 1740
 cgcagtgacc cagtcacct ggatgtctc taaggccgg acacccccat catttcccc 1800
 ccagactegt ctaccttcc gggagcgaac ctcaacctct cctgccactc gccctctaac 1860
 ccacccccgc agtattcttg gcglatcaat gggataccgc agcaacacac acaagtctc 1920
 ttatcgcga aaatcagcc aaalaataac gggacctatg ccgittigt ctctaacctg 1980
 gctactggcc gcaataattc catagtcag agcatcacag tctctgcatc tggaaattct 2040
 cctggctct cagciggggc cactgtcgcc atcatgattg gactgctggt tggggttgc 2100
 ctgatatag 2109

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

aaataigcgg ccgcatggag tctccctcgg ccc 33

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 13

cccaagcttg gctgctatat cagagcaac 29

<210> 14

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 14

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

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile Gly Tyr
35 40 45

Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg
50 55 60

Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys
115 120

<210> 15

<211> 135

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 15

Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser
1 5 10 15

Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu
20 25 30

Thr Gln Asp Ala Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro
35 40 45

Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu
50 55 60

Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ser Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln
65 70 75 80

Asn Pro Val Ser Ala Arg Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu
85 90 95

Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg
100 105 110

Ser Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro
115 120 125

Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val
130 135

<210> 16

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 16

Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile Ser Pro Leu
1 5 10 15

Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ala
20 25 30

Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe
35 40 45

Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr Val Asn Asn
50 55 60

Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser Asp Thr Gly Leu Asn
65 70 75 80

Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Glu Pro Pro Lys Pro
85 90 95

Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Glu Asp Ala Val
100 105 110

Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr Thr Tyr Leu
115 120 125

<210> 17

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 17

catgccatgg ctaagctcac tattgaatcc ac

32

<210> 18

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 18

cccaagcttt tatttggagt tgttgctigga ga

32

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 19
ca1gccatgg ctccgggtata cccggagctg c 31

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 20
cccaagcttt tagacaaacc aagagtactg tg 32

<210> 21

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 21
ca1gccalgg ctatcc1gaa tgcctctat gg 32

<210> 22

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 22
cccaagcttt tacaggtagg ttgtgttctg aa 32

<210> 23

<211> 232

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 23

Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn
1 5 10 15

Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val
20 25 30

Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala
35 40 45

Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala
50 55 60

Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr
65 70 75 80

Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln
85 90 95

Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn
100 105 110

Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro
115 120 125

Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu
130 135 140

Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr
145 150 155 160

Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ser Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr
165 170 175

Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val
180 185 190

Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr
195 200 205

Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro
210 215 220

Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val
225 230

<210> 24

<211> 212

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 24

Leu Phe Gly Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg
1 5 10 15

Gln Ile Ile Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro
20 25 30

Ala Tyr Ser Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile
35 40 45

Gln Asn Ile Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile
50 55 60

Lys Ser Asp Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr
65 70 75 80

Pro Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val
85 90 95

Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp
100 105 110

Ala Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro
115 120 125

Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val
130 135 140

Thr Arg Asn Asp Ser Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val
145 150 155 160

Ser Ala Arg Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro
165 170 175

Asp Ala Pro Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu
180 185 190

Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr
195 200 205

Ser Trp Phe Val
210

<210> 25

<211> 194

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 25

Ile Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr
1 5 10 15

Ser Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn
20 25 30

Ile Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser
35 40 45

Asp Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu
50 55 60

Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp
65 70 75 80

Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr
85 90 95

Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu
100 105 110

Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg
115 120 125

Asn Asp Ser Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala
130 135 140

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

Pro Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu
165 170 175

Asn Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp
180 185 190

Phe Val

<210> 26

<211> 173

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 26

Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln Asn Asp
1 5 10 15

Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val Asn Glu
20 25 30

Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys Pro Ser
35 40 45

Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala
50 55 60

Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr Leu Trp Trp Val
65 70 75 80

Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly
85 90 95

Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ser Ala Ser
100 105 110

Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg Arg Ser Asp Ser
115 120 125

Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile Ser Pro
130 135 140

Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser Cys His
145 150 155 160

Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val

	165	170	
<210>	27		
<211>	32		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	27		
	catgccatgg ctccgttcaa tgcgcagag gr		32
<210>	28		
<211>	31		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	28		
	catgccatgg ctcttttgg ctacagctgg t		31
<210>	29		
<211>	32		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	29		
	catgccatgg ctataggata tgtaatagga ac		32
<210>	30		
<211>	31		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<400>	30		
	catgccatgg ctatatacc caatgcatcc c		31
<210>	31		
<211>	682		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<400>	31		
	Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln		
	1 5 10 15		
	Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr		
	20 25 30		

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

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
 340 345 350

Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Val
 355 360 365

Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser Val Asp His Ser
 370 375 380

Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Asp Pro Thr Ile
 385 390 395 400

Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn Leu Ser Leu Ser
 405 410 415

Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu Ile Asp
 420 425 430

Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile Ser Asn Ile Thr
 435 440 445

Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn Asn Ser Ala Ser
 450 455 460

Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val Ser Ala Glu Leu
 465 470 475 480

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys
 485 490 495

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn Thr Thr Tyr
 500 505 510

Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 515 520 525

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn
 530 535 540

Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser Ala Asn
 545 550 555 560

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp Thr Pro
 565 570 575

Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn
 580 585 590

Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg
 595 600 605

Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys
 610 615 620

Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu
 625 630 635 640

Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala
645 650 655

Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr Val Gly Ile Met
660 665 670

Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
675 680

<210> 32

<211> 2049

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 32

```

atggagtcctc cctcggcccc tccccacaga tggtagcatcc cctggcagag gctcctgctc 60
acagccctcac ttctaacctt ctggaacccg cccaccactg ccaagctcac tattgaatcc 120
acgcttttttg gctacagctg gtacaaaggt gaaagagtgg atggcaaccg tcaaattata 180
ggataigttaa taggaactca acaagctacc ccagggcccg catacagtgg tcgagagata 240
atatacctcca atgcaatcct gctgatccag aacatcatcc agaatgacac aggattctac 300
accttacag tcataaagtc agatcttgtg aatgaagaag caactggcca gttccgggta 360
taccggagc tgeccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaaaccct ggaggacaag 420
gatgctgtgg ccttcacctg tgaacctgag actcaggacg caacctacct gtggtgggta 480
aacaatcaga gccctccggg cagtcaccag ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc 540
actctattca atgtcacaag aatgactca gcaagctaca aatgtgaaac ccagaaccca 600
gtgagtccca ggccgagtga ttcagtcctc ctgaatgtcc tctatggccc ggatgcccc 660
accatttccc ctctaaacac atcttacaga tcaggggaaa atctgaacct ctctgccac 720
gcagccteta acccaactgc acagtactct tggttgtca atgggacttt ccagcaatcc 780
acceaaagagc tctttatccc caacatcact gtgaataata gtggatccta tacgtgccaa 840
gcccataact cagacactgg cctcaatagg accacagta cgacgatcac agtctatgca 900
gagccaccca aaccttcat caccagcaac aactccaacc cgtggagga tgaggatgct 960
glagecttaa cctgtgaacc tgagattcag aacacaacct acctgtggtg ggtaaataat 1020
cagagcctcc cggctagctc caggctgcag ctgiccaatg acaacaggac ctcactcta 1080
ctcagtgta caaggaatga ttaggaccc tatgagtggt gaatccagaa cgaattaagt 1140
gttgaccaca gcgaccctgt catctgaat gtcctctatg gccagacga ccccaccatt 1200
tcccctcat acacctatta ccgtccaggg gtgaacctca gcctctctg ccatgcagcc 1260
tctaaccac ctgcacagta ttcttggtg attgatggga acatccagca acacacacaa 1320
gagctcttta tetccaacat cactgagaag aacagcggac tctatactg ccaggccaat 1380
aacacagcca gtggccacag caggactaca gtcaagacaa tcacagtctc tgcggagctg 1440
cccaagccct ccatctccag caacaactcc aaacctgtgg aggacaagga tgctgtggcc 1500
ttcaactgtg aacctgaggc tcagaacaca acctacctgt ggtgggtaaa tggctagagc 1560
ctcccagtea gtcccaggct gcagctgtcc aatggcaaca ggaccctcac tctattcaat 1620

```

gtcacaagaa atgacgcaag agcctatgta tgtggaatcc agaactcagt gagtgcaaac	1680
cgcagtgacc cagtcacctt ggatgtcttc tatgggccgg acaccccat catttcccc	1740
ccagactcgt cttacctttc gggagcgaac ctcaacctct cctgccctc ggcccttaac	1800
ccatccccgc agtattcttg gcgtatcaat gggataccgc agcaacacac acaagtctc	1860
tttatcgcca aatcaagcc aaataataac gggacctatg cctgttttgt ctctaactg	1920
gctactggcc gcaataatc calagtcag agcatcacag tctctgcatc tggaacttct	1980
ccctggctct cagctggggc cactgtcggc atcatgattg gagtgcctgt tggggttgc	2040
ctgatatag	2049
<210> 33	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 33	
ccggaattca tggagtctcc ctggcccc	28
<210> 34	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 34	
gccaaaaagc gtggattcaa tagtgagc	28
<210> 35	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 35	
tgaatccacg ctttttggt acagctggt	29
<210> 36	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 36	
ggaagatctg actttatgac gtg	23
<210> 37	
<211> 1407	

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 37

```

atggggcacc tctcagcccc acttcacaga gtgcgtgtac cctggcaggg gcttctgctc    60
acagcctcac ttctaacctt ctggaacctg cccaccactg cccagctcac tactgaatcc    120
atgccattca atgttcgaga ggggaaggag gtctctctcc ttgtccaca tctgccccag    180
caactttitg gctacagctg gtacaaaggg gaaagagigg atggcaacct tcaaattgta    240
ggataigcaa laggaactca acaagctacc ccagggcccc caaacagcgg tcgagagaca    300
atatacecca atgcatccct gctgateccg aacgtcacc agaatgacac aggattctac    360
accttacaag tcataaagtc agatcttltg aatgaagaag caactggaca gtcccatgta    420
taccgggagc tgcccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaacctgtg ggaggacaag    480
gatgctlggg ccttcacctg tgaacctgag atcaggaca caacctacct gtggaggata    540
aacaatcaga gcctcccggc cagtcaccag ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc    600
actctactca gtgtcacaag gaatgacaca ggacctatg agtgtgaaat acagaaccca    660
gtgagtgcga accgcagtga cccagtcacc ttgaatgtca cctatggccc ggacaccccc    720
accatttccc cticagacac ctattaccgt ccaggggcaa acctcagcct ctctgctat    780
gcagcctcta acccactgca acagtactcc tggcctatca atggaacatt ccagcaaagc    840
acacaagagc tctttatccc taacatcact gtgaataata gtggatccta tacctgccac    900
gccaaataact cagtcactgg ctgcaacagg accacagtca agacgatcat agtcactgag    960
ctaagtcagc tagtagcaaa gccccaatc aaagccagca agaccacagt cacaggagat    1020
aaggactctg tgaacctgac ctgctccaca aatgacactg gaatctccat ccgttggttc    1080
ttcaaaaacc agagctctcc gtctctggag aggatgaagc tgtcccaggg caacaccacc    1140
ctcagcataa acctgtcaa gagggaggat gctgggacgt attggtgtga ggtcttcaac    1200
ccaatcagta agaaccaaag cgaccccatc atgctgaacg taaactataa tgctctacca    1260
caagaaaatg gcctctcacc tggggccatt gctggcattg tgattggagt agtggccctg    1320
gttctctgta tagcagtagc cctggcatgt tttctgatt tcgggaagac cggcaggacc    1380
actccaatga cccacctaac aagatga                                     1407

```

<210> 38

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 38

```

ccggaattca tggggcacct ctcagccc                                     28

```

<210> 39

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 39
 cccaagcttg gtccttgtag gtgggtcatt 30

<210> 40
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

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

Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu Ile Asn Gly Thr
245 250 255

Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr Val Asn
260 265 270

Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser Val Thr Gly Cys
275 280 285

Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu Leu Ser Pro Val
290 295 300

Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val Thr Gly Asp
305 310 315 320

Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr Gly Ile Ser
325 330 335

Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser Glu Arg Met
340 345 350

Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val Lys Arg
355 360 365

Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro Ile Ser Lys
370 375 380

Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn Ala Leu Pro
385 390 395 400

Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly Ile Val Ile Gly
405 410 415

Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu Ala Cys Phe Leu
420 425 430

His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Thr Thr Pro Met Thr His Leu Thr Arg
435 440 445

<210> 41

<211> 1347

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 41

atggggcacc tctcagcccc acttcacaga gtgcgtgiac cctggcaggg gcttctgctc 60

acagectcac ttctaacctt ctggaacctg cccaccactg cccagctcac tactgaatcc 120

atgctttttg gctacagctg gtacaaaggg gaaagagtgg atggcaaccg tcaaattgta 180

ggatatgcaa taggaactca acaagctacc ccagggcccg caaacagcgg tcgagagaca 240

atatacceca atgcatccct getgatccag aacgtcacc agaatgacac aggattctac 300

accctacaag tcataaagtc agatcttgtg aatgaagaag caactggaca gttccatgta 360

taccceggage tgeccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaaccctgt ggaggacaag 420
gatgcigigg ccttcacctg tgaacctgag actcaggaca caacctacct gtggtggata 480
aacaatcaga gccctccggg cagtcaccagg ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc 540
acictactca gtgtcacaag gaatgacaca ggaccctatg agtgtgaaat acagaacceca 600
gigagtgcga accgcagtga cccagtcacc ttgaatgtca cctatggccc ggacaccccc 660
accatttccc cttcagacac ctattaccgt ccaggggcaa acctcagcct ctctgtclat 720
gcagcctcra acccaccctgc acagctactc ttgcttatca atggaacatt ccagcaaagc 780
acacaagage tctttatccc taacatcact gtgaataata gtggatccta tacctgccac 840
gccaaiaact cagtcactgg ctgcaacagg accacagica agacgatcat agtcactgag 900
ctaaftccag tagtagcaaa gccccaaatc aaagccagca agaccacagt cacaggagat 960
aaggactctg tgaacctgac ctgctccaca aatgacactg gaatctccat ccgttggttc 1020
ttcaaaaacc agagtctccc gtctctggag aggatgaagc tgtcccagg caacaccacc 1080
ctcagcataa accctgtcaa gagggaggat gctgggacgt attggtgtga ggtcttcaac 1140
ccaaicaglia agaaccaaaag cgaccccatc atgctgaacg taaactataa tgctctacca 1200
caagaaaaig gccctcacc tggggccatt gctggcattg tgattggagt agtggccctg 1260
gltgctctga tagcagtagc cctggcatgt tttctgcatt tcgggaagac cggcaggacc 1320
actccaatga cccacctaac aagatga 1347

<210> 42

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 42

ccggaattca tggggcacct ctcagcc

27

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 43

cgcggatcca ctattattca ca

22

<210> 44

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 44

tgaatccatg ctttttggtc acagctggt

29

<210> 45

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 45

gccccaaagc atggattcag tagtgagc

28

<210> 46

<211> 468

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 46

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

Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
20 25 30

Thr Ala Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly
50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val
65 70 75 80

Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser
85 90 95

Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
100 105 110

Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
165 170 175

Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
195 200 205

Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
210 215 220

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro
225 230 235 240

Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
245 250 255

Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
260 265 270

Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
275 280 285

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser
290 295 300

Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu
305 310 315 320

Leu Ser Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr
325 330 335

Val Thr Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp
340 345 350

Thr Gly Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser
355 360 365

Ser Glu Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn
370 375 380

Pro Val Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn
385 390 395 400

Pro Ile Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr
405 410 415

Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly
420 425 430

Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu
435 440 445

Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Thr Thr Pro Met Thr
450 455 460

His Leu Thr Arg
465

<210> 47

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 47

Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn
1 5 10 15

Leu Pro Gln Gln
20

<210> 48

<211> 1035

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 48

```
atgggacccc ctcagcccc tcccgcaga ttgcaigtcc cciggaagga ggtccigtcc 60
acagcctcac tctaacctt ciggaaacca cccaccactg ccaagctcac tattgaaacc 120
acgcattca atgtgcaga ggggaaggag gtctctctac tgcgccacaa cctgccccag 180
aatcgtattg gtacacgtg gtacaaaggc gaaagagtgg atggcaacag tctaattgta 240
ggataatgtaa taggaactca acaagctacc ccagggcccg catacagtgg tcgagagaca 300
atatacccca atgcatccct gctgatccag aacgtcacc agaatgacac aggattctat 360
acctacaag tcataaagtc agatcttgtg aatgaagaag caaccggaca gtcccatgta 420
taccggagc tgcccgaagc ctccatcicc agcaacaact ccaaccccggt ggaggacaag 480
gatgctgtgg ccttcacctg tgaacctgag gticagaaca caacctacct gtgggggta 540
aatggtcaga gcctcccggc cagtcaccag ctgcagctgt ccaatggcaa catgaccctc 600
actctactca gcgtcaaaag gaacgatgca ggatcctatg aatgtgaaat acagaaccca 660
ggagtgcca accgcagtga cccagtcacc ctgaaatgtc tctatggccc agatggcccc 720
accattccc cctcaaaaggc caattaccgt ccaggggaaa atctgaaact ctccctgccac 780
gcagccteta acccaccctg acagtactct tggtttatca atgggacgtt ccagcaatcc 840
acacaagage tctttatccc caacatcact gtgaataata gcggatccta tatgtgccaa 900
gcccataact cagccactgg cctcaatagg accacagtca cgatgatcac agtctctgga 960
agtgtctctg tctctcagc tgtggccacc gtcggcatca cgattggagt gctggccagg 1020
gtcgtcttga tatag 1035
```

<210> 49

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 49

ccggaattca tgggaccccc ctcagcccc 30

<210> 50

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 50

cccaagcttc tatatcagag ccaccctggc

30

<210> 51

<211> 1050

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 51

atggggccca tctcagcccc ttctcgcaga tgggcgatcc cciggcaggg grtctctctc	60
acagcctcac ttctcaactt ctggaaccgg cccaaccatg ctcagctcac tattgaaget	120
gtgccatcca atgtcgcaga ggggaaggag gttctctctc ttgtccacaa tctgccccag	180
gaccctcgtg gctacaactg gtacaaaggg gaaacagtgg atgccaaccg tcgaattata	240
ggatatgtaa tatcaaatca acagattacc ccagggcctg catacagcaa tcgagagaca	300
atatacccca atgcatecct gctgatgcgg aacgtcacca gaaatgacac aggatcctac	360
acctatacag tcaataagct aaatcttatg agtgaagaag taactggcca gttcagegta	420
catccggaga ctcccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaaccctgt ggaggacaag	480
gatgtctggt ccttcacctg tgaacctgag actcagaaca caacctacct gtggtgggta	540
aatggtcaga gtctcccgtt cagtcaccag ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc	600
actctactca gtgtcacaaag gaatgacgta ggaccctatg aatgtgaaat acagaaccca	660
gagagtgcaa acttcagtga cccagtcacc ctgaaatgct tctatggccc agatgcccc	720
accatttccc cttcagacac ctattaccat gcaggggtaa atctcaacct ctctgceat	780
gcggcctcta atccaccctc acagtattct tggctgtca atggcacatt ccagcaatac	840
acacaaaage tctttatccc caacatcact acaaagaaca gcggatccta tgctgcccac	900
accactaact cagccactgg ccgcaacagg accacagtca ggatgatcac agtctctgat	960
gttttagtac aaggaagttc tctggcctc tcagctagag ccaactgtcag catcatgatt	1020
ggagtactgg ccagggtagc tctgatatag	1050

<210> 52

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 52

ccggaattcc gcaggcagca gagaccatg

29

<210> 53

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 53

cccaagctta caccagagct actatatcag

30

<210> 54

<211> 344

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 54

Met Gly Pro Pro Ser Ala Pro Pro Cys Arg Leu His Val Pro Trp Lys
1 5 10 15

Glu Val Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
20 25 30

Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Ala His Asn Leu Pro Gln Asn Arg Ile Gly
50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Ser Leu Ile Val
65 70 75 80

Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser
85 90 95

Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
100 105 110

Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Val Gln Asn Thr Thr Tyr
165 170 175

Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Met Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Lys Arg Asn
195 200 205

Asp Ala Gly Ser Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Ala Ser Ala Asn
210 215 220

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Gly Pro
225 230 235 240

Thr Ile Ser Pro Ser Lys Ala Asn Tyr Arg Pro Gly Glu Asn Leu Asn
245 250 255

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe
260 265 270

Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
275 280 285

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser
290 295 300

Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Met Ile Thr Val Ser Gly
305 310 315 320

Ser Ala Pro Val Leu Ser Ala Val Ala Thr Val Gly Ile Thr Ile Gly
325 330 335

Val Leu Ala Arg Val Ala Leu Ile
340

<210> 55

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 55

Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu Val Leu Leu Leu Ala His Asn
1 5 10 15

Leu Pro Gln Asn
20

<210> 56

<211> 349

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 56

Met Gly Pro Ile Ser Ala Pro Ser Cys Arg Trp Arg Ile Pro Trp Gln
1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Phe Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
20 25 30

Thr Ala Gln Leu Thr Ile Glu Ala Val Pro Ser Asn Ala Ala Glu Gly
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Asp Pro Arg Gly
 50 55 60
 Tyr Asn Trp Tyr Lys Gly Glu Thr Val Asp Ala Asn Arg Arg Ile Ile
 65 70 75 80
 Gly Tyr Val Ile Ser Asn Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser
 85 90 95
 Asn Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Met Arg Asn Val
 100 105 110
 Thr Arg Asn Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Leu Asn
 115 120 125
 Leu Met Ser Glu Glu Val Thr Gly Gln Phe Ser Val His Pro Glu Thr
 130 135 140
 Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
 145 150 155 160
 Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asn Thr Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 180 185 190
 Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
 195 200 205
 Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Ala Ser Ala Asn
 210 215 220
 Phe Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
 225 230 235 240
 Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr His Ala Gly Val Asn Leu Asn
 245 250 255
 Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ser Gln Tyr Ser Trp Ser
 260 265 270
 Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Tyr Thr Gln Lys Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285
 Ile Thr Thr Lys Asn Ser Gly Ser Tyr Ala Cys His Thr Thr Asn Ser
 290 295 300
 Ala Thr Gly Arg Asn Arg Thr Thr Val Arg Met Ile Thr Val Ser Asp
 305 310 315 320
 Ala Leu Val Gln Gly Ser Ser Pro Gly Leu Ser Ala Arg Ala Thr Val
 325 330 335
 Ser Ile Met Ile Gly Val Leu Ala Arg Val Ala Leu Ile
 340 345

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 57

Pro Ser Asn Ala Ala Glu Gly Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn
1 5 10 15

Leu Pro Gln Asp
20

<210> 58

<211> 1566

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 58

atggagc1gg cctcagcaca tctccacaaa gggcagggtc cctggggagg actactgctc 60
acagcctcac ttttagcctc ctggagccct gccaccactg ctgaagtcac cattgaggct 120
gtgcgcgccccc aggttgcctga agacaacaat gttcttctac ttgttcacaa tetgcccctg 180
gagcttggag cctttgcctg gtacaaggga aacctactcg ctatagacaa agaaattgca 240
cgatttgiac caaatagtaa tatgaatttc acggggcaag catacagcgg cagagagata 300
atatacagca atggatccct gctcttccaa atgatcacca tgaaggatat gggagtctac 360
aacactagata tgacagatga aaactatcgt cgtactcagg cgactgtgcg atttcatgta 420
caccccatat tattaagcc caacatcaca agcaacaact ccaatcccgt ggagggtgac 480
gactccgtat cattaacctg tgactcttac actgaccctg ataataataa ctacctgtgg 540
agcagaaatg gtgaaagcct ttcagaaggt gacaggctga agctgtctga gggcaacagg 600
acletcactt tactcaatgt cagaggaat gacacaggac cctatgtgtg tgaaacccgg 660
aatccagtga gigtcaaccg aagtgacca ttcagcctga acattatcta tggctcggac 720
accccgatta tateccctc agatatttat ttgcatccag ggtcaaacct caacctctcc 780
tgccatgcag cctctaaccc acctgcacag tacttttggc ttatcaatga gaagcccat 840
gcatcctccc aagagctctt tatcccacac atcactacta ataatagcgg aacctatacc 900
tgcttctgca ataactctgt cactggcctc agtaggacca cagtcaagaa cttacagtc 960
cttgagccag tgactcagcc ctctctccaa gtcaccaaca ccacagtcaa agaactagac 1020
tetgtgaccc tgacctgctt gtcgaatgac attggagcca acatccagtg gctcttcaat 1080
agccagagtc ttcagctcac agagagaatg acactctccc agaacaacag catcctcaga 1140
atagacccta ttaagaggga agatgccggc gagtatcagt gtgaaatctc gaatccagtc 1200
agcgtcagga ggagcaactc aatcaagctg gacataatat ttgacccaac acaaggagcc 1260
ctctcagaig gcgccattgc tggcatctgt attggagtgg tggttgggtt ggctctaata 1320
gcagggtcgg catatttctt ctattccagg aagtctggcg ggggaagtga ccagcgagat 1380
ctcacagagc acaaacctc agcctccaac cacaatctgg ctcttctga caactctcct 1440

aacaaggtgg atgacgtgc atacactgtc ctgaacttca attcccagca acccaaccgg 1500
 ccaacttcag ccccttcttc tccaagagcc acagaaacag tttattcaga agtaaaaaag 1560
 aagtga 1566

<210> 59

<211> 521

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 59

Met Glu Leu Ala Ser Ala His Leu His Lys Gly Gln Val Pro Trp Gly
 1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Ala Ser Trp Ser Pro Ala Thr
 20 25 30

Thr Ala Glu Val Thr Ile Glu Ala Val Pro Pro Gln Val Ala Glu Asp
 35 40 45

Asn Asn Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Leu Ala Leu Gly Ala
 50 55 60

Phe Ala Trp Tyr Lys Gly Asn Thr Thr Ala Ile Asp Lys Glu Ile Ala
 65 70 75 80

Arg Phe Val Pro Asn Ser Asn Met Asn Phe Thr Gly Gln Ala Tyr Ser
 85 90 95

Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Ser Asn Gly Ser Leu Leu Phe Gln Met Ile
 100 105 110

Thr Met Lys Asp Met Gly Val Tyr Thr Leu Asp Met Thr Asp Glu Asn
 115 120 125

Tyr Arg Arg Thr Gln Ala Thr Val Arg Phe His Val His Pro Ile Leu
 130 135 140

Leu Lys Pro Asn Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Gly Asp
 145 150 155 160

Asp Ser Val Ser Leu Thr Cys Asp Ser Tyr Thr Asp Pro Asp Asn Ile
 165 170 175

Asn Tyr Leu Trp Ser Arg Asn Gly Glu Ser Leu Ser Glu Gly Asp Arg
 180 185 190

Leu Lys Leu Ser Glu Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Asn Val Thr
 195 200 205

Arg Asn Asp Thr Gly Pro Tyr Val Cys Glu Thr Arg Asn Pro Val Ser
 210 215 220

Val Asn Arg Ser Asp Pro Phe Ser Leu Asn Ile Ile Tyr Gly Pro Asp

225 230 235 240
Thr Pro Ile Ile Ser Pro Ser Asp Ile Tyr Leu His Pro Gly Ser Asn
 245 250 255
Leu Asn Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Phe
 260 265 270
Trp Leu Ile Asn Glu Lys Pro His Ala Ser Ser Gln Glu Leu Phe Ile
 275 280 285
Pro Asn Ile Thr Thr Asn Asn Ser Gly Thr Tyr Thr Cys Phe Val Asn
 290 295 300
Asn Ser Val Thr Gly Leu Ser Arg Thr Thr Val Lys Asn Ile Thr Val
305 310 315
Leu Glu Pro Val Thr Gln Pro Phe Leu Gln Val Thr Asn Thr Thr Val
 325 330 335
Lys Glu Leu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Leu Ser Asn Asp Ile Gly
 340 345 350
Ala Asn Ile Gln Trp Leu Phe Asn Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Glu
 355 360 365
Arg Met Thr Leu Ser Gln Asn Asn Ser Ile Leu Arg Ile Asp Pro Ile
 370 375 380
Lys Arg Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Gln Cys Glu Ile Ser Asn Pro Val
385 390 395
Ser Val Arg Arg Ser Asn Ser Ile Lys Leu Asp Ile Ile Phe Asp Pro
 405 410 415
Thr Gln Gly Gly Leu Ser Asp Gly Ala Ile Ala Gly Ile Val Ile Gly
 420 425 430
Val Val Ala Gly Val Ala Leu Ile Ala Gly Leu Ala Tyr Phe Leu Tyr
 435 440 445
Ser Arg Lys Ser Gly Gly Gly Ser Asp Gln Arg Asp Leu Thr Glu His
 450 455 460
Lys Pro Ser Ala Ser Asn His Asn Leu Ala Pro Ser Asp Asn Ser Pro
465 470 475 480
Asn Lys Val Asp Asp Val Ala Tyr Thr Val Leu Asn Phe Asn Ser Gln
 485 490 495
Gln Pro Asn Arg Pro Thr Ser Ala Pro Ser Ser Pro Arg Ala Thr Glu
 500 505 510
Thr Val Tyr Ser Glu Val Lys Lys Lys
 515 520

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 60

Pro Pro Gln Val Ala Glu Asp Asn Asn Val Leu Leu Leu Val His Asn
1 5 10 15

Leu Pro Leu Ala
20

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 61

Ala Glu Asp Asn Asn Val Leu Leu Leu
1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 62

Ala Glu Gly Lys Glu Val Leu Leu Leu
1 5

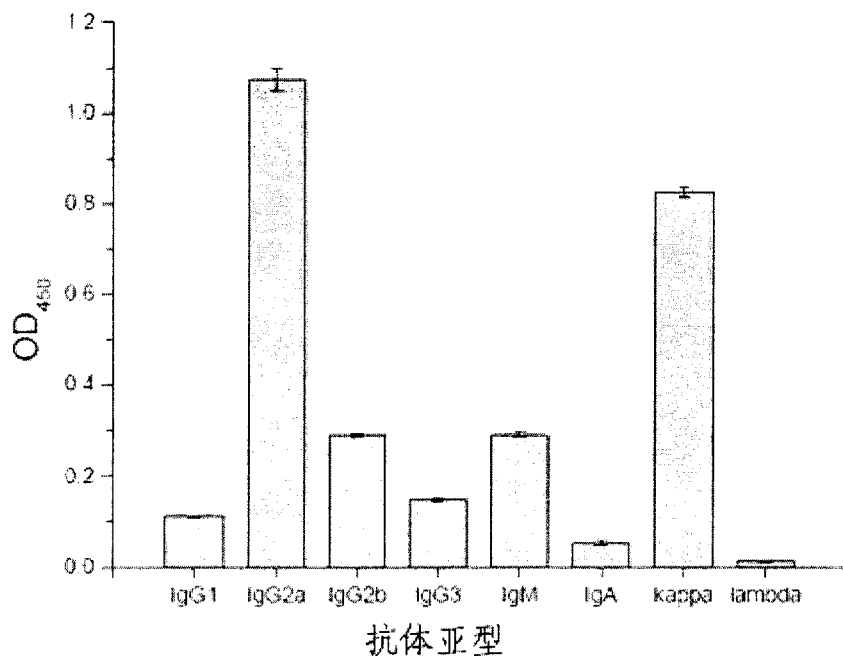


图 1

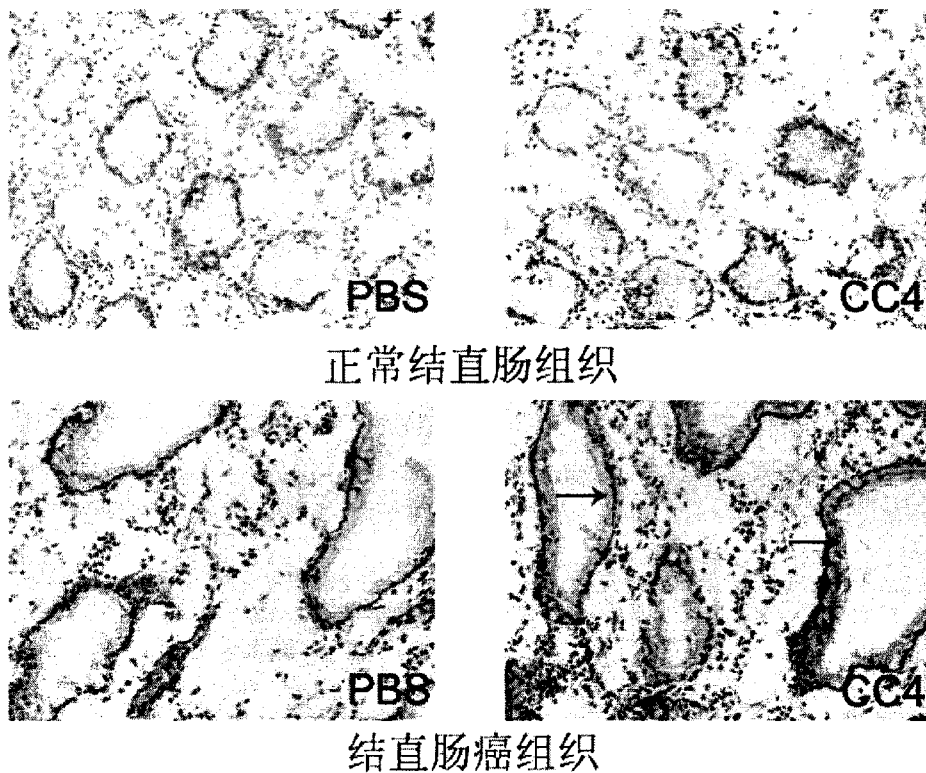


图 2

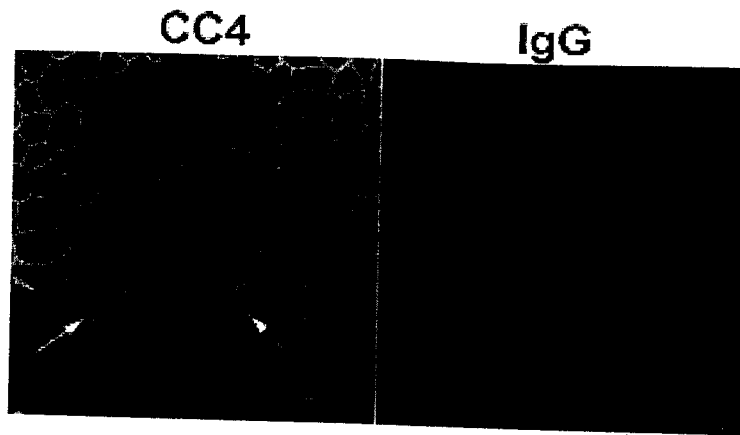


图 3

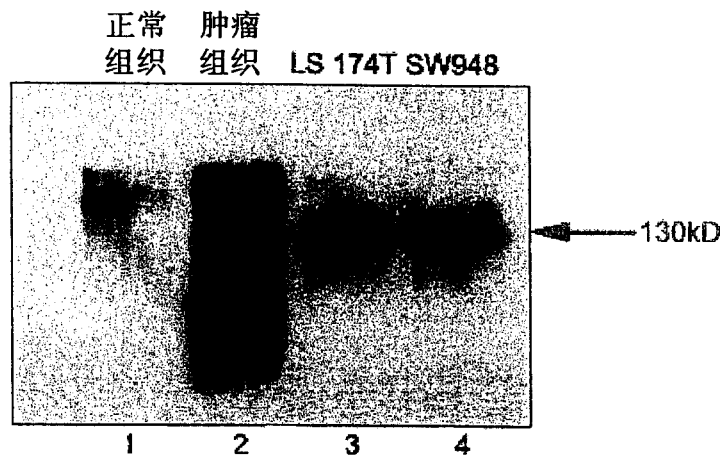


图 4

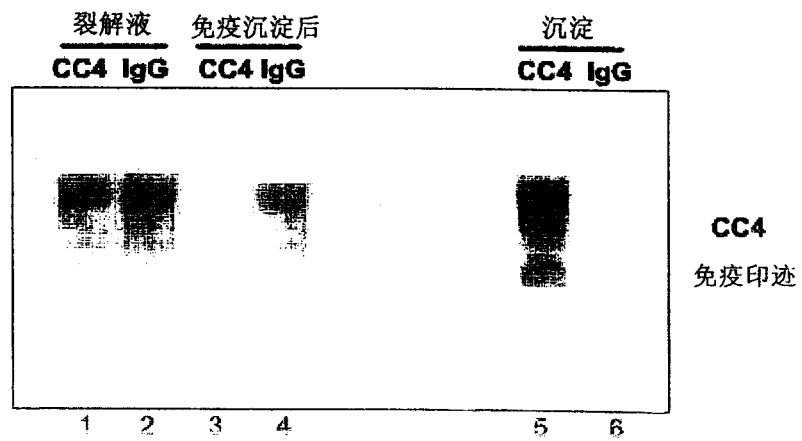


图 5

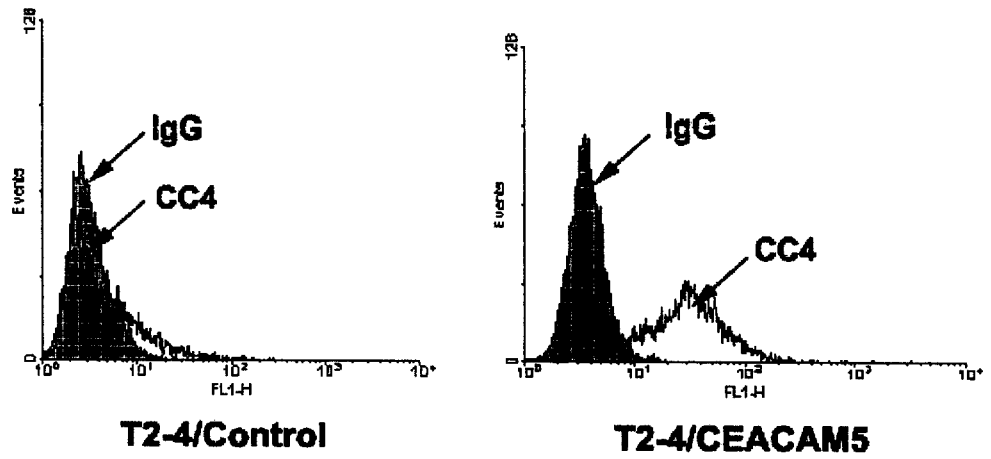


图 6

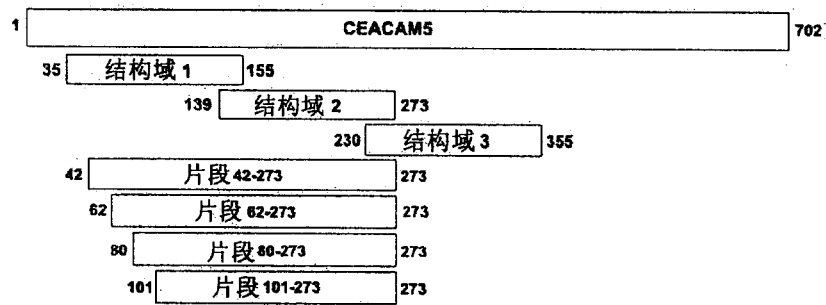


图 7

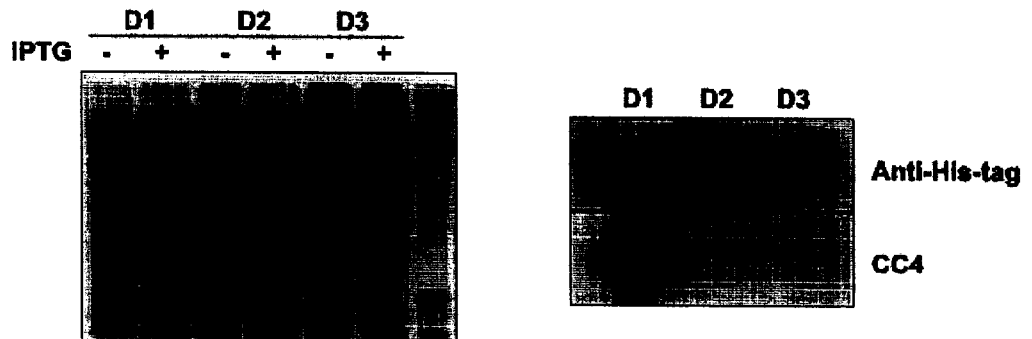


图 8

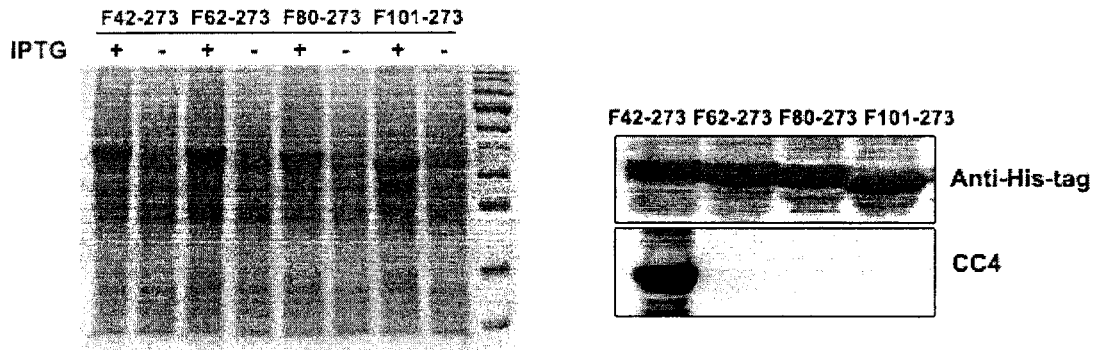


图 9

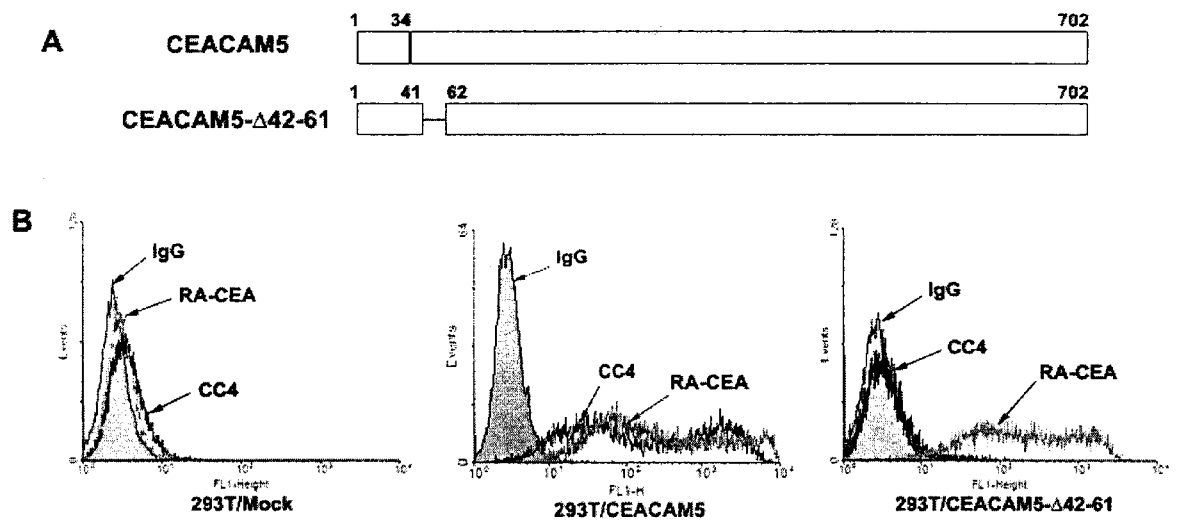


图 10

42 61

人CEACAM1: PFNVAEGKEVLLL VHNLPQQ
 人CEACAM3: PLSVAEGKEVLLL VHNLPQH
 人CEACAM5: PFNVAEGKEVLLL VHNLPQH
 人CEACAM6: PFNVAEGKEVLLL AHNLPQN
 人CEACAM7: PFNVAEGKEVLLV VHNESQN
 人CEACAM8: PSNAAEGKEVLLL VHNLPQD
 鼠CEACAM1: PPQVAEDNNVLLL VHNLPQA

图 11

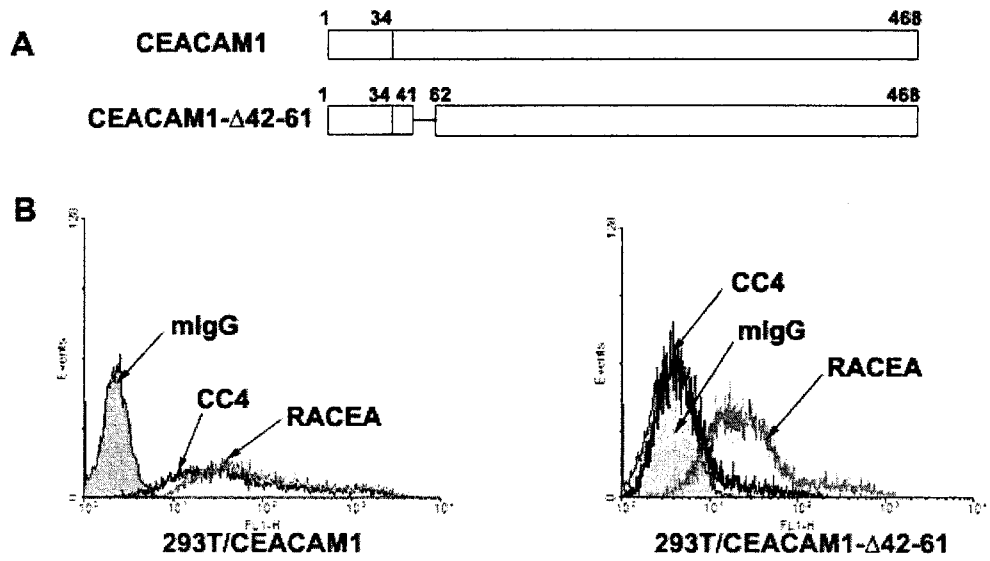


图 12

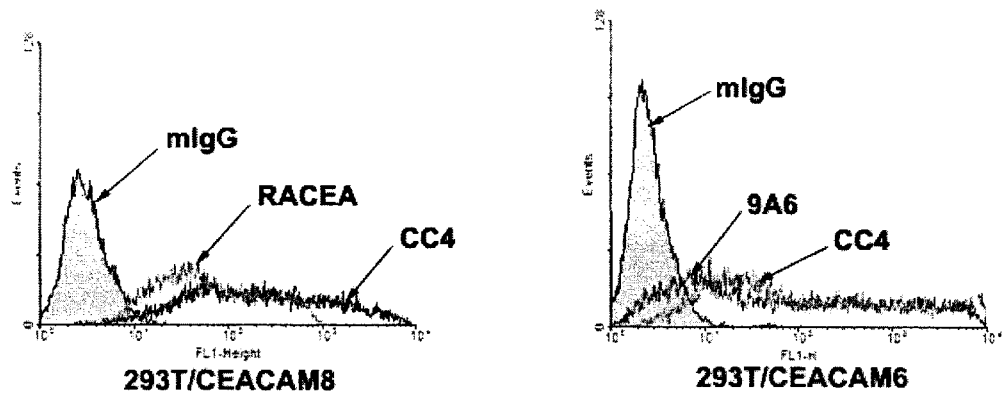


图 13

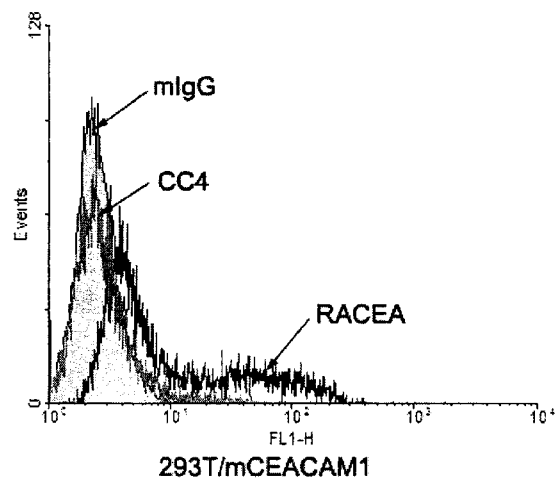


图 14

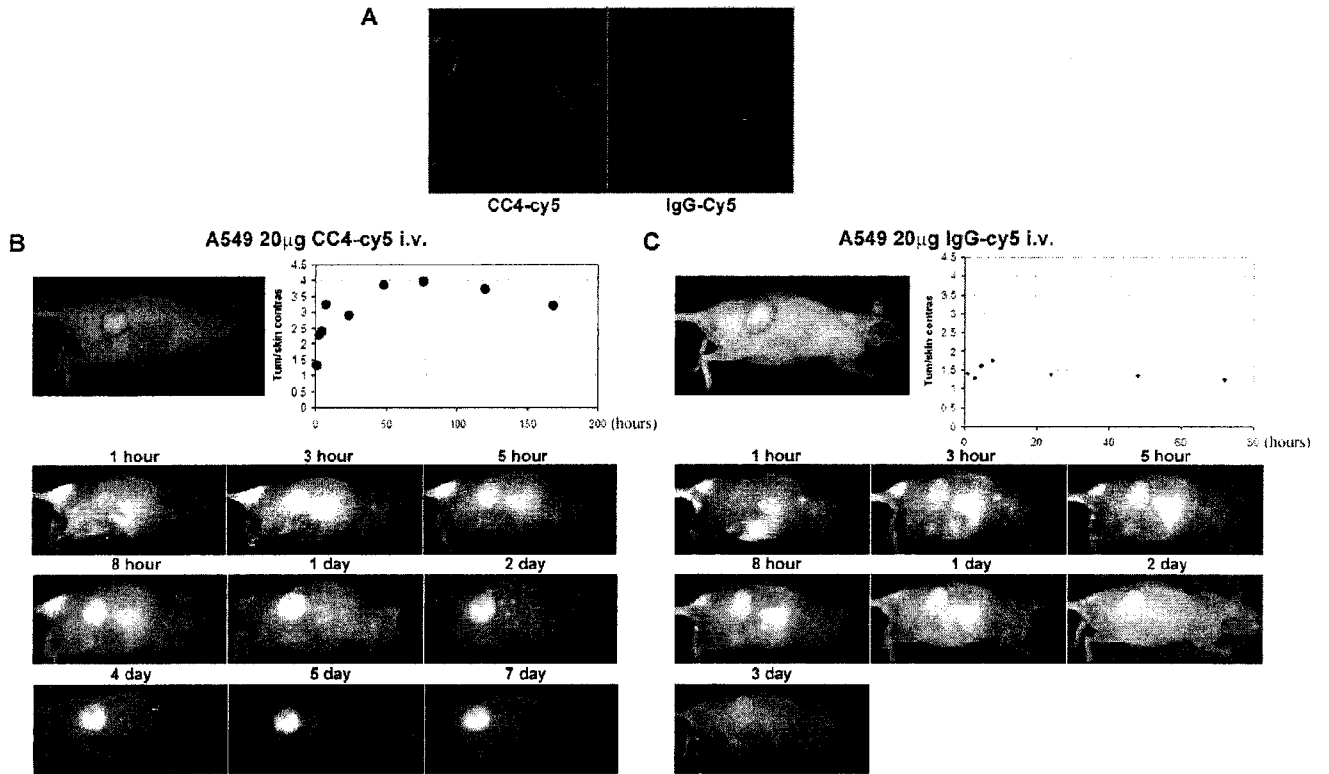


图 15

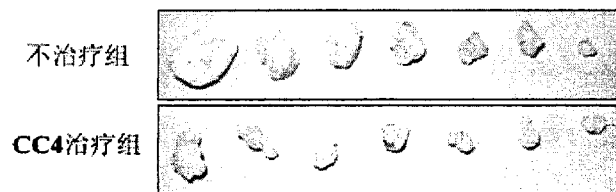
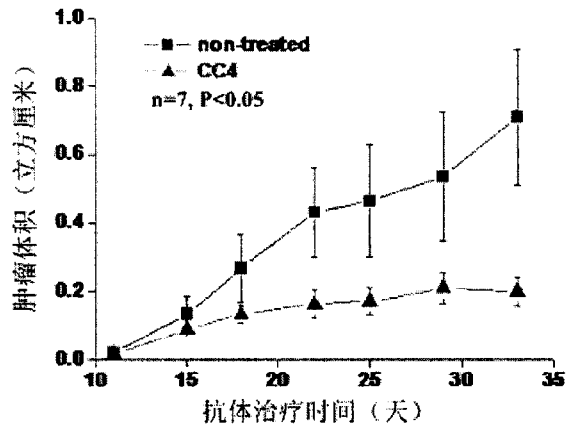


图 16

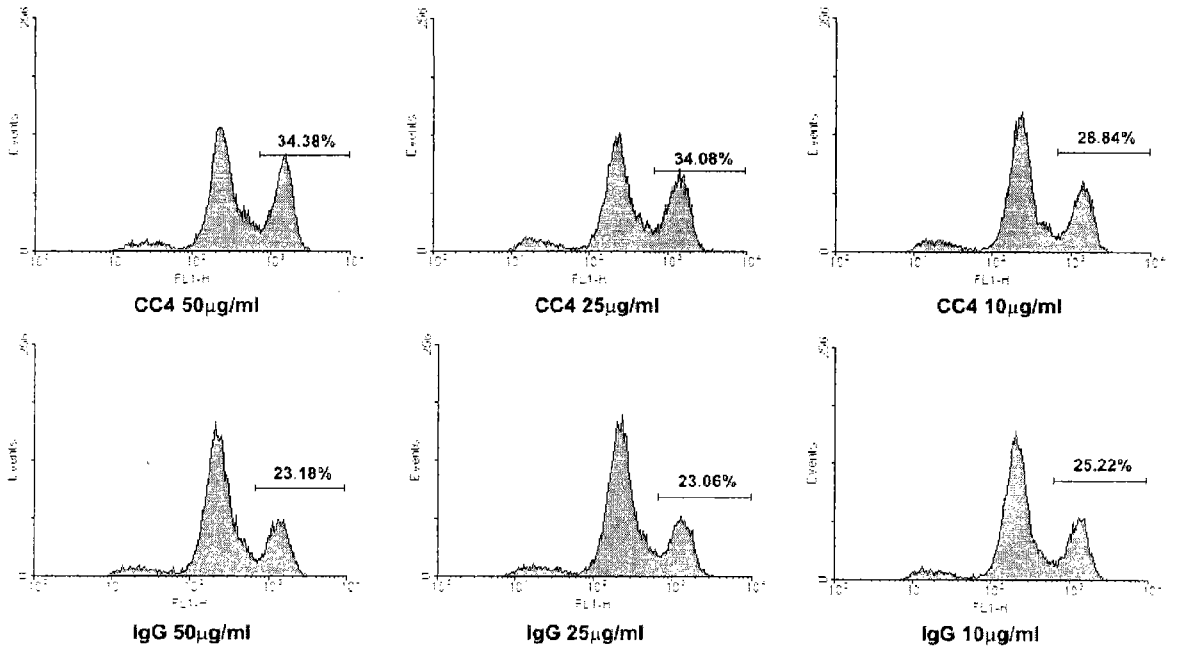


图 17

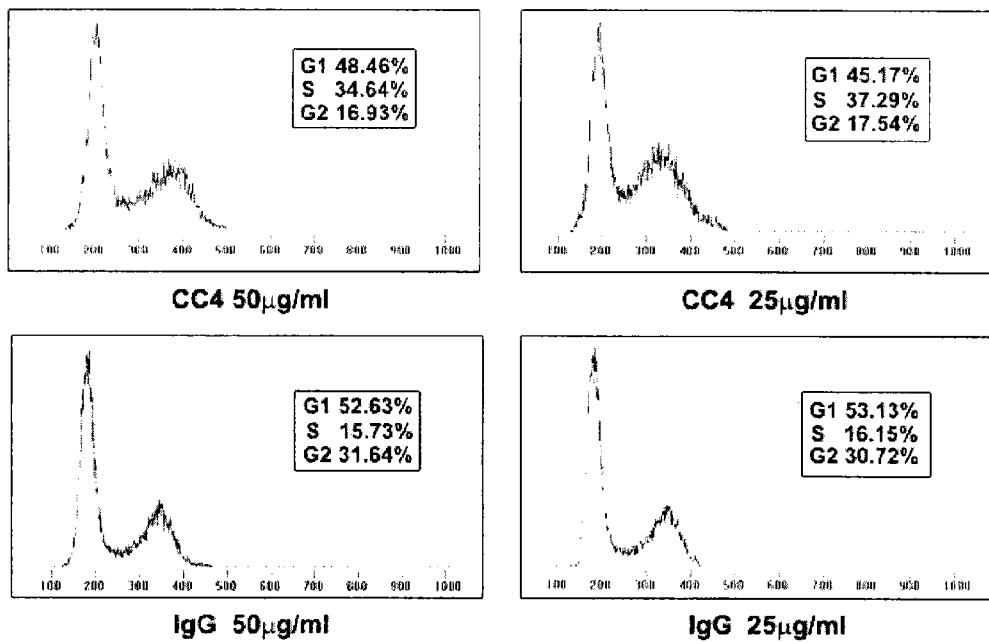


图 18

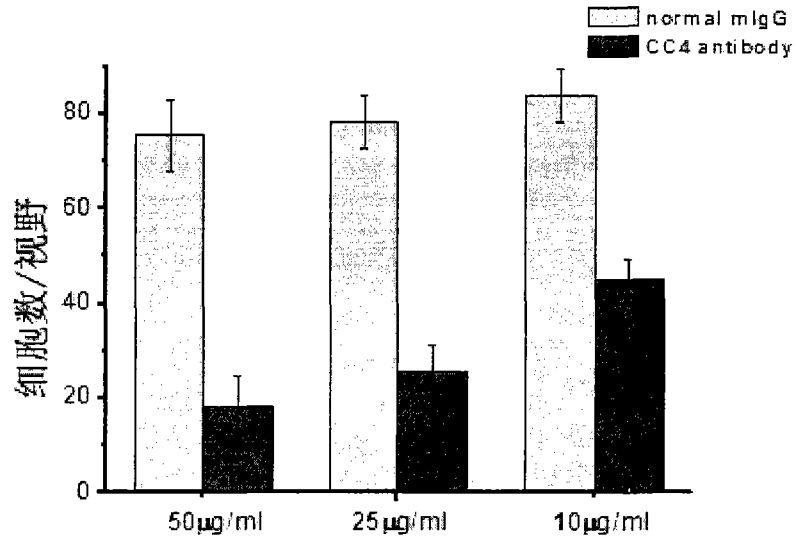


图 19

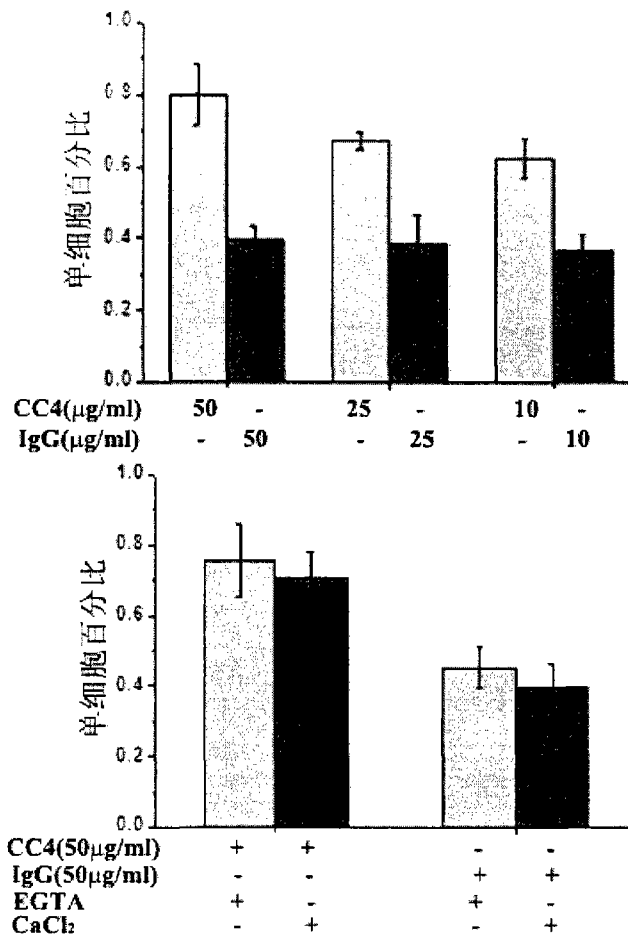


图 20

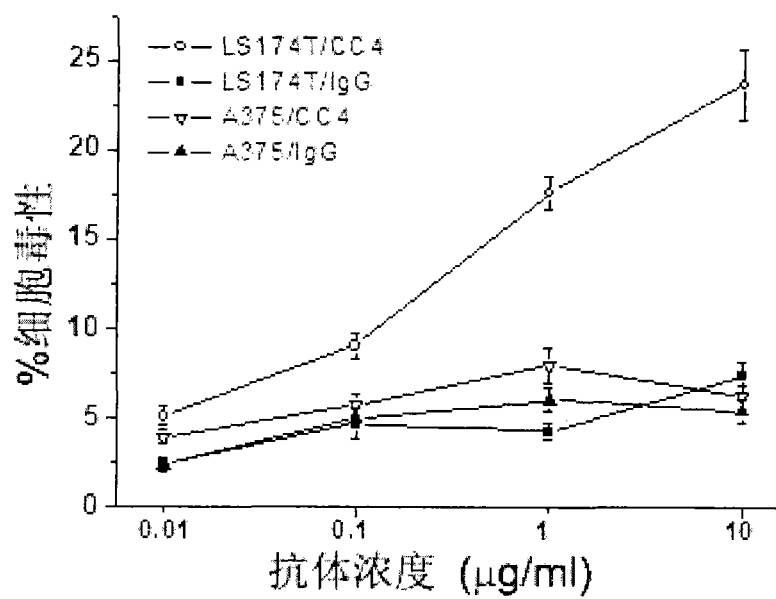


图 21