

抗 BCMA 的单域抗体及其应用

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体地，涉及一组抗 B 细胞成熟抗原 (BCMA) 的单域抗体及其应用。

背景技术

BCMA (B cell maturation antigen, BCMA) 是肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族的成员，可结合 B 细胞激活因子 (B cell-activating factor (BAFF)) 或 B 淋巴细胞刺激因子 (B lymphocyte stimulator (BLyS)) 和增殖诱导配体 (APRIL)。据报道，在正常细胞中，BCMA 主要由浆细胞和一部分成熟 B 细胞表达，而在大部分 B 细胞以及其它器官上都不表达。多发性骨髓瘤 (MM)，是以克隆性浆细胞大量增生为特征的恶性肿瘤。BCMA 的 RNA 在 MM 细胞中普遍检测到，多发性骨髓瘤患者的浆细胞表面可检测到 BCMA 蛋白。因此，MM 的免疫治疗的一种候选靶抗原是 BCMA。目前 MM 治疗可诱导缓解，但几乎所有患者最终仍会复发并死亡。一些单克隆抗体候选药物已经在临床前研究和早期临床试验中显示出治疗 MM 的希望，但并没有得到一致性认可，也没有单抗药物上市。显然，对 MM 的新的免疫治疗是非常需要的，并且为该疾病开发有效的抗原特异性过继性 T 细胞疗法将是重大研究进展。

单域抗体 (single domain antibody (sdAb) 或称纳米抗体 (nanobody) 是由羊驼血液中发现的缺失轻链的重链抗体，经比利时科学家应用分子生物学技术结合纳米粒子科学的概念，而研发出来的最新及分子量最小的能结合抗原的抗体分子片段。其具有结构简单，穿透力强，易于表达和纯化，亲和力及稳定性高，无毒副反应等一系列优点。运用单域抗体平台技术研究各种靶抗原的单域抗体，并应用于生物医药领域。

本发明旨在研究出有应用前景的一组抗 BCMA 的单域抗体，可应用于治疗性抗体候选药物和靶向 BCMA 的嵌合抗原受体 T 细胞。

发明内容

本发明要解决的技术问题是提供一组具有良好效果的新颖的抗 BCMA 单

域抗体。

本发明要解决的另一个技术问题是开发抗 BCMA 单域抗体的各种应用。

为实现上述目的，本发明提供以下技术方案：

本发明提供了一组抗 BCMA 的单域抗体，所述组的单域抗体由框架区和互补决定区组成，所述互补决定区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:1-66(附表 1: 筛选的 BCMA-sdAbs 互补决定区氨基酸序列)。

在一些实施方案中，所述互补决定区的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1-66 所示的氨基酸序列的同一性大于 80%、大于 85%、大于 90%、大于 95%或大于 99%。

优选地，差异的氨基酸为保守替换。

在一些实施方案中，所述组的单域抗体具有选自 SEQ ID NO:67-132 的氨基酸序列，或其氨基酸序列为 SEQ ID NO:67-132(附表 2: 筛选的 BCMA-sdAbs 氨基酸序列)。

在一些实施方案中，其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 67-132 所示氨基酸序列的同一性大于 80%、大于 85%、大于 90%、大于 95%或大于 99%。

优选地，差异的氨基酸为保守替换，更优选地，一个或多个保守替换。

本发明提供了一组抗 BCMA 的单域抗体基因，所述组的单域抗体基因具有选自 SEQ ID NO:133-198 的核苷酸序列(附表 3: 筛选的 BCMA-sdAbs 核苷酸序列)，或其核苷酸序列为 SEQ ID NO:133-198 的核苷酸序列，或编码上述单域抗体的核苷酸序列。

在一些实施方案中，其核苷酸序列与 SEQ ID NO:133-198 所示核苷酸序列的同一性大于 80%、大于 85%、大于 90%、大于 95%或大于 99%。

优选地，差异的碱基为保守替换，更优选地，一个或多个保守替换。

本发明提供了一种多肽，具有选自上面所述的单域抗体组中的一个或多个单域抗体。

优选地，所述的多个单域抗体相同或不同。

本发明提供了一种表达载体，其包含选自上面所述的单域抗体基因组的一个或多个基因。

优选地，所述表达载体为原核细胞表达载体、真核细胞表达载体或其它细胞表达载体。

本发明提供了一种宿主细胞，其包含上面所述的表达载体。

优选地，所述的宿主细胞为原核表达细胞、真核表达细胞，真菌细胞或酵母细胞，所述原核表达细胞优选大肠杆菌。

本发明提供了一种嵌合抗原受体，其具有选自上面所述的单域抗体组中的一个或多个单域抗体。

优选地，所述多个单域抗体相同或不同。

本发明提供了一种嵌合抗原受体修饰的 T 细胞，由上面所述的嵌合抗原受体进行修饰。

本发明提供了一种药用组合物，其包含选自上面所述的单域抗体组中的一个或多个单域抗体作为活性成份。

本发明提供了一种人源化形式的抗 BCMA 的单域抗体，其通过对选自上面所述的单域抗体组中的单域抗体进行人源化而获得。

本发明提供了上面所述的单域抗体组中的单域抗体在检测 BCMA 中的应用。

本发明提供了上面所述的单域抗体组中的单域抗体在阻断 BAFF 与 BCMA 之间相互作用中的应用。

在一些实施方案中，所述单域抗体与细胞毒性剂、酶相、放射性同位素、荧光化合物或化学发光化合物中的一种或多种相连。

本发明提供了上面所述的单域抗体组中的单域抗体在制备用于治疗 BCMA 表达异常相关疾病的药物的应用。

优选地，所述的 BCMA 表达异常相关疾病是多发性骨髓瘤性疾病。

本发明的有益技术效果：

本发明筛选得到的一组抗 BCMA 的单域抗体。与现有的抗体相比，该组的各个抗 BCMA 的单域抗体活性高、具有强的中和或结合能力。该组单域抗体能特异性结合人 BCMA 抗原、结合细胞表面表达 BCMA 的肿瘤细胞株，有

效阻断 BAFF 抗原与 BCMA 结合以及产生相应的信号级联效应，该组单域抗体可用于检测和/或治疗多种与 BCMA 表达异常相关疾病。

以下结合附图和具体实施方式详细说明本发明，并不以此限定本发明的实施范围。

附图说明

图 1 为第一轮 PCR 普通重链抗体及单链抗体基因的扩增。参照 (Marker) (1500BP、1000BP、800BP、500BP、250BP 和 100BP) 1. PCR 扩增物，有大于 800BP 的普通抗体重链基因扩增片段和小于 800BP 的重链抗体基因扩增片段。2 和 3 为 PCR 扩增物，仅为约 500BP 的重链抗体基因扩增片段。

图 2 为第二轮 PCR 扩增得到 VHH 目的基因片段。Marker (1500BP、1200BP、1000BP、800BP、700BP、600BP、500BP、250BP 和 100BP)。1~12 为 PCR 扩增物，约 500BP 的重链抗体 VHH 基因扩增片段。

图 3 为表达的 BCMA-sdAbs 纯化前 SDS-PAGE 图例。

图 4 为表达的 BCMA-sdAbs 经镍柱纯化后 SDS-PAGE 图例。

图 5 为纯化的 BCMA 单域抗体与 BCMA 蛋白结合的浓度梯度 (ELISA)。

图 6 为 BCMA 单域抗体能够竞争抑制 BAFF 蛋白与 BCMA 蛋白的结合。

图 7 为 BCMA CART 对肿瘤细胞的杀伤效率。

具体实施方式

本发明通过一系列的步骤筛选得到了一组抗 BCMA 的单域抗体，它们具有高活性和高中和或结合能力的潜在，这些单域抗体具有相似的结构 (由框架区和互补决定区组成)，以及相似功能效果，因此可以看作是具有共同结构和共同性能效果的一组抗 BCMA 的单域抗体。

本文所用的术语“BCMA”，是肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族的成员，可结合 B 细胞激活因子或 B 淋巴细胞刺激因子和增殖诱导配体 (APRIL)。多发性骨髓瘤 (MM)，是以克隆性浆细胞大量增生为特征的恶性肿瘤。BCMA 的 RNA 在 MM 细胞中普遍检测到，多发性骨髓瘤患者的浆细胞表面可检测到

BCMA 蛋白。

本文所用的术语“多发性骨髓瘤（MM）”是指以克隆性浆细胞大量增生为特征的恶性肿瘤。目前 MM 治疗可诱导缓解，但几乎所有患者最终仍会复发并死亡。尽管一些单克隆抗体已经在临床前研究和早期临床试验中显示出治疗 MM 的希望，但并没有得到一致性认可。显然，对 MM 的新的抗体以及新的免疫治疗显然是非常需要的。

针对 BCMA 的新抗体是本文的开发对象，最终也是本文的保护对象，本文的范围涉及所得到的抗 BCMA 抗体、其各种形式（如，单域抗体）、以该抗体为成分的物质（如，药物组合物、试剂盒、载体、嵌合抗原受体、嵌合抗原受体修饰的 T 细胞等等）、应用（如，诊断应用、治疗应用、制备应用等等），然而，本领域技术人员应该理解，本文的保护对象并不限于举例的这些内容。

本文所用的术语“单域抗体（sdAb）”是指包含了抗体中单个可变域的片段，也称为纳体（Nanobody）。和完整的抗体一样，它可以选择性的和特定抗原结合。与完整抗体的150—160kDa的质量相比，单域抗体则显得小得多，大约只有12—15kDa。第一个单域抗体是从羊驼的重链抗体中人造工程制作出来的，称为“VHH区段”。在优选的实施方式中，本发明使用了羊驼的单域抗体，然而，本领域技术人员应该理解，来自其他物种的单域抗体也在本发明的保护范围之内。非限制性的，本发明的单域抗体是抗BCMA的单域抗体。

术语“框架区（Framework region）”，即骨架区，在免疫球蛋白的 H 和 L 链的近 N 端约有 110 个氨基酸序列的变化很大，其他部分的氨基酸序列相对恒定，据此可将轻链和重链区分为可变区(V)和恒定区(C)。可变区内包含超变区 HVR（hypervariable region）或称互补决定区 CDR（Complementarity-determining region）与 FR 骨架区。FR 的可变性要低于 CDR。FR 分子共四个，分别为 FR1、FR2、FR3 和 FR4。在识别抗体时，四个 FR 分子卷曲使 CDR 分子相互靠近。应该理解，本发明并不限于特定的框架区，本领域技术人员根据实际应用能够选择或取得合适的框架区，而不脱离本发明的保护范围。

术语“互补决定区（Complementarity determining region, CDR）”，整个

抗体分子可分为恒定区和可变区两部分。在可变区内有一小部分氨基酸残基变化特别强烈，这些氨基酸的残基组成和排列顺序更易发生变异区域称高变区。在 L 链、H 链的 V 区中有三个高变区（hypervariable regions, HVR），该部位因在空间结构上可与抗原决定簇形成精密的互补，故高变区又称互补性决定区。

本文所用的术语序列的“同一性(identity)”可以与“相同性”互换使用，指的是序列之间通过序列比对软件例如BLAST确定的相似程度。序列比对的方法和软件对于本领域技术人员是公知的。可以通过对已知序列进行一个或几个（例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或更多个）氨基酸或碱基的取代、缺失和/或添加而获得经改造的核苷酸序列。例如，通过常规手段（例如保守取代等），对本发明的序列SEQ ID NO: 1-198中一个或多个所示的氨基酸或核苷酸序列进行改造，可以获得与这些具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或大于99%的序列同一性，并且具有基本相同的性能，这都在本发明的保护范围之内。优选地，本发明通过保守取代获得序列同一性，但并不限于保守取代。

术语“氨基酸序列”是指氨基酸相互连接形成肽链（或多肽）的顺序，氨基酸序列只能按照一个方向读取。氨基酸有 100 多种不同类型，其中 20 种常用，本发明不排除氨基酸链上有其他物质，例如糖类、脂类等修饰，本发明也不限于 20 中常用的氨基酸。

术语“核苷酸序列”是指 DNA 或 RNA 中碱基的排列顺序，即在 DNA 中为 A、T、G、C 的排列顺序，或者在 mRNA 中 A、U、G、C 的排列顺序，也包括 rRNA、tRNA、mRNA 中碱基的排列顺序。应该理解，本发明请求保护的抗体基因除了 DNA 序列外，也涵盖 RNA（rRNA、tRNA、mRNA）以及它们的互补序列。也应该理解，编码本发明的抗体的基因并不等同于本发明的序列 SEQ ID NO:133-198，这些编码本发明的抗体的基因但不同于 SEQ ID NO:133-198 所述核苷酸的序列也在本发明的保护范围之内。

在一些实施方式中，本发明的多肽、药物组合物、嵌合抗原受体或 CART 包含一个单域抗体，应该理解，本发明并不限于此，本发明的上述物质可以包

含 2 个单域抗体、3 个单域抗体或更多个单域抗体，这些多个单域抗体之间相同或不同，此外，除了包含本发明的单域抗体之外，还可以包含本发明以外的其他抗体或单域抗体，并没有超出本发明的范围。

术语“表达载体(Expression vectors)”是指在克隆载体基本骨架的基础上增加表达元件（如启动子、RBS、终止子等），使目的基因能够表达的载体。表达载体四部分：目的基因、启动子、终止子、标记基因。本发明包括但不限于原核细胞表达载体、真核细胞表达载体或其它细胞表达载体。

“嵌合抗原受体(CAR)”是“嵌合抗原受体 T 细胞 (CART)”的核心部件，赋予 T 细胞非依赖的方式识别肿瘤抗原的能力，这使得经过 CAR 改造的 T 细胞相较于天然 T 细胞表面受体能够识别更广泛的目标。CAR 的基础设计中包括一个肿瘤相关抗原结合区，一个胞外铰链区，一个跨膜区和一个胞内信号区。

在本发明的实施方式中，本发明的嵌合抗原受体或嵌合抗原受体 T 细胞可以包含本发明的 1 个单域抗体、2 个单域抗体或更多个单域抗体，它们可以是相同的，也可以是不同的。

在本发明的实施方式中，本发明的“药物组合物”可以包含本发明的 1 个单域抗体、2 个单域抗体或更多个单域抗体，它们可以是相同的，也可以是不同的。

术语“人源化”抗体是指抗体的恒定区部分（即 CH 和 CL 区）或抗体所有全部由人类抗体基因所编码。人源化抗体可以大大减少异源抗体对人类机体造成的免疫副反应。人源化抗体包括嵌合抗体、改型抗体和全人源化抗体等几类。应该理解，本领域技术人员根据实际需要能够制备出本发明单域抗体的合适的人源化形式，这在本发明涵盖的范围之内。

本文所用的术语“慢病毒”是反转录病毒科下的一个属，包括 8 种能够感染人和脊椎动物的病毒，原发感染的细胞以淋巴细胞和巨噬细胞为主，感染个体最终发病。慢病毒种类例如人类免疫缺陷病毒(HIV)、猴免疫缺陷病毒(SIV)、马传染性贫血(EIA)、猫免疫缺陷病毒(FIV)。慢病毒载体的研究发展得很快，研究的也非常深入。该载体可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上，从而达到持久性表达。在感染能力方面可有效地感染神经元细胞、肝细胞、心肌细

胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞等多种类型的细胞，从而达到良好的基因治疗效果。此外，本领域技术人员也能选择除慢病毒之外其他合适的载体，这都在本发明的保护范围之内。

本发明通过下列实施例进行详细描述，然而本发明不限于这些实施例的特定细节，因为对于本领域的普通研究技术人员来说，其它的变化是已知的，或根据直接公开的内容和附属的权利要求是显而易见的。因此，凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

下述实施例中所述实验方法，如无特殊说明，均为常规方法；所述试剂和生物材料，如无特殊说明，均可从商业途径获得。

实施例 1：抗 BCMA 抗原特异性的单域抗体库构建

1) BCMA 抗原免疫羊驼

按照常规免疫方法进行，简略介绍为，以购买的 BCMA 抗原（Human TNFRSF17/BCMA/CD269 Protein，厂家北京义翘神州，货号 10620-H15H）总量 2mg 左右，选择成年健康的羊驼，在颈背部皮下多点注射抗原，加入抗原和等体积福氏佐剂，分 4-6 次免疫，跟踪观察注射部位包块吸收情况，以确认免疫正确。免疫间隔时间为 7-15 天，第 4 次免疫后，采血清，测定抗原免疫效价，当效价达到 1 万倍以上时（ELISA 方法），采全血 100ml 左右，分离淋巴细胞，-80℃保存备用。

2) 羊驼外周血淋巴细胞的分离和 RNA 的提取

分离羊驼外周血淋巴细胞，应用 QIAGEN 试剂盒（QIAamp RNA Blood Mini Kit（50），货号，52304），按照说明书进行，简述之：1ml 全血，加入红细胞裂解液 5~10ml，混匀，放冰浴中 30 分钟，待红细胞裂解后，2000rpm，离心 10 分钟，去上清，再加入红细胞裂解液 1~2ml，混匀，放冰浴中 10 分钟，以裂解残余红细胞，2000rpm，离心 10 分钟，去净上清，加入 0.3ml 的裂解液，把白细胞混匀，-80℃保存，备用。

RNA 纯化，应用 QIAGEN 试剂盒（QIAamp RNA Blood Mini Kit（50），货号，52304），按照说明书进行，简述之：取分离好的羊驼淋巴细胞 0.3 ml，加入 0.3 ml 缓冲液 RLT，振荡混匀。将上步混匀的液体转移到已装入吸附柱

的收集管 (QIAshredderSpinColumn) 中, 14,000rpm 离心 2 分钟, 将收集管中的滤液转移到新的离心管中。向滤液中加入 0.5ml 的 70%乙醇, 上下颠倒混匀。10000rpm 离心 15 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。将吸附柱转移到新的 2ml 收集管中, 加入 0.7ml 缓冲液 RW1, 10000rpm 离心 15 秒。将吸附柱转移到新的 2ml 收集管中, 加入 0.5ml 缓冲液 RPE, 10000rpm 离心 15 秒。加入 0.5ml 缓冲液 RPE, 14000rpm 离心 3 分钟。将吸附柱转移到新的 1.5ml 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加入 30-50 μ l RNase-free 水, 室温放置 2-5 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 将质粒溶液收集到离心管中。测定得到的 RNA 浓度。

3) 重链抗体可变区-VHH

合成 cDNA 第一链: 用 cDNA 合成试剂盒 (MiniBESTAgarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0, TAKARA 公司), 按照说明书进行。以此模板, 分别用两套引物进行 PCR 扩增重链抗体 VHH 基因片段。采用巢式 PCR 方法, 第一次 PCR 扩增中大于 800bp 的为普通重链基因片段, 在 800~500bp 之间的为缺失轻链的重链抗体基因片段 (参见图 1), 切胶回收缺失轻链重链抗体基因片段, 以此为模板用 VHH 特异性引物经 PCR 扩增得到 VHH 目的基因 (~500bp) (参见图 2)。

引物的合成:

第一轮 PCRFd5'引物:

YF-1: CGC CAT CAA GGT ACC AGT TGA (SEQ ID NO:199)

YF-2: GGG GTA CCT GTC ATC CAC GGA CCA GCT GA (SEQ ID NO:200)

第一轮 PCR Bd3'引物:

YBN: CAG CCG GCC ATG GCC SMK GTR CAG CTG GTG GAK TCT
GGG GGA G (SEQ ID NO:201)

第二轮 PCR 引物:

YV-BACK: CAT GTG CATGGCCTA GAC TCG CGG CCCAGC CGG CCA
TGG CC (SEQ ID NO:202)

YV-FOR: CAT GTG TAG ATT CCT GGC CGG CCT GGC CTG AGG AGA

CGG TGA CCT GG (SEQ ID NO:203)

4) VHH 片段和噬菌体展示载体的连接及电转化 TG1 感受态。

Sfi 单酶切 VHH 片段和 pHEN6 载体质粒后，将 VHH 片段及 pHEN6 载体 (Conrath, KEM other. Antimicrob Agents Chemother (Antimicrobial Chemotherapy) 2001,45:(10)2807-12., 中国专利 ZL20111028003.1) 经连接酶连接，电转化至 TG1 感受态细胞中，涂布平板，经菌落 PCR 验证抗体插入率。重组基因克隆效率检测：取电转化菌液涂布 LB / Amp 平板上，32℃，过夜培养，次日用菌落 PCR 的方法验证抗体的连接效率，噬菌体抗体库的连接效率在 90%以上。将电转化菌液涂布 LB / Amp 平板上，32℃，过夜培养物，用 2YT 培养基洗下，加入 15%甘油，-80℃保存。

5) VHH 噬菌体抗体库的制备

抗体库加入辅助噬菌体 M13K07 (Invitrogen) 进行拯救：按照常规方法进行噬菌体抗体库的制备，并保存于-80℃备用。

实施例 2：BCMA 的单域抗体的获得

针对 BCMA 特异性单域抗体的筛选

第一轮 BCMA 蛋白浓度 150μg/ml，150μl/孔，1 个微孔，4℃过夜孵育。

第二轮 BCMA 蛋白浓度 10~100μg/ml，150μl/孔，5 个微孔，4℃过夜孵育。

第三轮 BCMA 蛋白浓度 10~50μg/ml，150μl/孔，5 个微孔，4℃过夜孵育。

封闭：1%CPBS，300μl/孔，37℃，孵育 2 小时。

筛选次数	加入噬菌体 抗体库总量	洗脱液+Tris-HCl	单菌落个数	洗脱滴度
第一轮	5.6×10^{11}	300μl+200μl	10	50/μl
第二轮	5.25×10^{11}	150μl/孔×5+350μl	1/4=600 约 2400	$2.4 \times 10^4/\mu\text{l}$
第三轮	5.32×10^{11}	150μl/孔×5+350μl	1/4=750	$3 \times 10^4/\mu\text{l}$

			约 3000	
--	--	--	--------	--

2. 噬菌体 ELISA 方法挑选阳性克隆

从第 3 轮筛选生长菌落的琼脂平板上随机挑取单个菌落,接种在含有 Amp 的 2YT 液体培养基的 96 孔培养板中培养,用辅助噬菌体超感染诱导表达噬菌体抗体。收获表达上清,以 BCMA 为抗原进行 ELISA 测定,挑选出 BCMA 阳性孔,经 DNA 测序以鉴定抗 BCMA 单域抗体克隆的基因序列。得到包括序附表 3 基因序列在内的一系列单域抗体基因序列,用于进一步表达和筛选特异性、高活性的单域抗体。

实施例 3: 特异性 BCMA 单域抗体表达质粒的构建

PCR 扩增实施例 3 所获得的特异性的 BCMA 单域抗体基因,而获得带有限制性内切酶 BbsI 和 BamHI 位点 PCR 产物,用限制性内切酶 BbsI 和 BamHI 分别处理 PCR 产物和载体 (pSJF2 载体) (kim Is. Biosic Biochem.2002,66(5):1148-51, 中国专利 ZL 201110280031), 经 T4 连接酶连接重组,而获得能在大肠杆菌中高效表达的质粒 sdAb-pSJF2, 并进行基因序列测定以确定其序列的正确性。

1) 获得 VHH 目的基因的 PCR 扩增条件, 50 μ l PCR 体系的组成:

MIX	25 μ l
阳性菌落克隆	1 μ l
5'引物	1 μ l (1mol/l)
3'引物	1 μ l (1mol/l)
DEPC 处理的 ddH ₂ O	22 μ l
总体积	50 μ l

PCR 反应条件:

94°C	3 分钟	
94°C	30 秒	
	55°C	
		30 秒
		30 循环

72°C 1 分钟

5'引物—GAA GAAGAA GAC AA CAG GCC SVK GTG MAG CTG GWG
GAK TCT (SEQ ID NO:204)

3' 引物——gaagatctccgatccTGAGGAGACGGTGACCTGGGT (SEQ ID
NO:205)

2) 目的基因和载体酶切, 连接目的基因与载体, 转化 TG1, PCR 鉴定含有目的片段的克隆, 基因测序, 获得基因序列正确的 BCMA 单域抗体表达质粒。

实施例 4: 抗 BCMA 单域抗体的表达和纯化

将实施例 3 所述的含有质粒 BCMA_{sdAb}-pSJF2 的菌种接种在含氨基苄青霉素的 LB 培养板上, 37°C 过夜。挑选单个菌落接种于 15ml 的含氨基苄青霉素的 LB 培养液中, 37°C, 摇床培养过夜。转种 10ml 过夜培养物于 1L 含氨基苄青霉素的 2YT 培养液中, 37°C 摇床培养, 240 转/分, 培养到 OD 值达 0.4~0.6 时, 加入 0.5~1.0mM IPTG, 继续培养过夜。离心, 收菌。加溶菌酶裂解细菌, 离心, 收上清中可溶性单域抗体蛋白。经 Ni²⁺ 离子亲和层析获得纯度达 95%以上的蛋白。图 3 为表达的抗 BCMA 单域抗体蛋白, 图 4 为表达的 BCMA-sdAbs 经镍柱纯化后 SDS-PAGE 电泳结果。

实验例 5: BCMA 单域抗体亲和力测定实验

1) 样品制备

抗原: Bio-BCMA 用 1×动态缓冲液 (1×PBS, 含 0.05% Tween 20、0.1% BSA, pH 7.2) 稀释至 10 µg/ml;

单域抗体: 用 1× kinetic 缓冲液依次稀释为 400 nM、200 nM、100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM;

2) 样品测试

待测抗原通过 SA sensor 进行加载, 抗原稀释 5 个稀释度, 所有 BCMA 单域抗体的亲和力在 50nm、20nm、10nm、1nm、0.1nm、0.01nm。

实施例 6：纯化的 BCMA 单域抗体与 BCMA 抗原结合试验（ELISA）

0.05 M NaHCO₃ (pH 9.5) 稀释 BCMA-Fc 抗原至 1 µg/ml, 100µl 抗原包被 96 孔板, 4 °C 过夜。300µl 0.5%BSA -PBS 封闭 96 孔板, 37°C, 2 小时。加入不同稀释浓度的纯化的 BCMA 单域抗体, 按 100µl /孔加入, 37°C, 1 小时。用 0.05%PBST 洗板三次。加入 1:5000 倍稀释的鼠抗 His-HRP, 按 100µl /孔加入, 37°C, 1 小时。用 0.05%PBST 洗板三次。加 TMB100 µl, 避光室温静置 20 分钟。加入 1mol/LHCl 100µl 终止反应。用酶标仪测定 450 nm 波长下的样品 OD 值。图 5 为纯化的 BCMA 单域抗体与 BCMA 蛋白结合的浓度梯度 (ELISA), 除了 B35(13), B92(6-1)两个抗体结合 BCMA 抗原的结合力较低, 其余 11 个抗体结合力都很高。

实施例 7：BCMA 单域抗体对 BAFF 与 BCMA 的结合竞争抑制作用试验

由于 BCMA 能够结合 BAFF, 有功能的 BCMA 单域抗体应该能够竞争抑制 BAFF 与 BCMA 的结合。按照 1µg/ml, 100µl/孔包被 BAFF 蛋白在可拆酶标板, 4°C 孵育过夜。加入 2%BSA 封闭, 300µl/孔, 37°C, 孵育 2 小时。稀释 BCMA 单域抗体至终浓度为 10µg/ml。加入 100µl BCMA (10µg/ml) 单域抗体, 每孔加入 BAFF (5µg/ml) 蛋白 2µl, 混匀。稀释羊抗兔 IgG-HRP (1:5000), 100µl/孔, 37°C 孵育 1 小时。加入 TMB 显色液, 100µl/孔, 避光反应 10 分钟。加入 50µl/孔 2M H₂SO₄ 终止反应。在 450nm 波长测 OD 值。图 6 显示 BCMA 单域抗体能够竞争抑制 BAFF 蛋白与 BCMA 蛋白的结合。不同 BCMA 单域抗体能够竞争抑制 BAFF 蛋白与 BCMA 蛋白的结合, 抑制率从 34~92%。

实施例 8：BCMA 单域抗体作为 CART 细胞上特异性 BCMA 靶抗原的识别抗体研究。

1) 载体构建

合成 BCMA 单域抗体基因和 2 代 CAR 结构基因, 两条基因通过重叠 PCR 进行拼接, 得到 BCMA CAR 基因。得到合成基因后, 进行分子克隆, 首先得到两个基因片段的 PCR 产物, 然后进行重叠 PCR, 得到两个片段连接在一起

的 2 代 CAR 结构的 BCMA CAR 基因,通过酶切 Pre 载体和 BCMA CAR 基因,连接,转化,挑克隆,提质粒,测序,得到序列正确的表达 BCMA CAR 的慢病毒载体 Pre-Lenti-EF1 BCMA CAR。

2) 慢病毒包装

包装病毒前一天,胰酶消化 293T 细胞,铺于 150cm 培养皿内。将细胞置于 5% CO₂ 培养箱内,孵育 8-24 小时,当细胞贴壁后达到培养皿总面积的 80% 开始转染 293T 细胞。用脂质体(lipofectamine)2000 共转染 Pre-Lenti-EF1 BCMA CAR: psPAX2: pMD2G = 4: 3 : 1, 48 小时收集病毒上清。4℃, 1250rpm, 5 分钟, 去除死亡的 293T 细胞及细胞碎片。然后将病毒上清过滤, 浓缩, 分装冻存-80℃冰箱。

3) CART 细胞的制备

采取健康志愿者的新鲜血 10ml, 用淋巴细胞分离液分离外周血单核细胞(PBMC)后再经磁珠分离纯化 T 细胞, 2×10⁶ 个 T 细胞/孔种植在 6 孔板, 用含 IL-2 (1000U/ml) 的 x-vivo15 培养基培养并用抗-CD3 刺激, 刺激 24 小时。刺激 24 小时后, 加入 BCMA 病毒液, 感染过夜。第二天补加 2ml 培养基。感染 6-7 天后, 流式细胞术评价 CAR 分子表达情况。用生物素化的 BCMA 经流式细胞术分析转染 T 细胞表达抗 BCMA-CAR 的阳性率。

4) 杀伤活力测定

细胞杀伤实验采用 LDH 检测试剂盒(Promega)进行检测, CART 细胞/T 细胞: 靶细胞均设置四个梯度, 分别为 0.5:1、1:1、2:1、4:1, Daudi 细胞 3×10⁴/孔, 用含 X-VIVO 培养基/1640 培养基将其余所有孔的体系补足 200 μL。将 96 孔板放置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。17 h 后, 在最大释放的孔内加入 20 μL 的裂解液, 混匀使细胞完全破裂, 将 96 孔板放入 CO₂ 培养箱中孵育 2 h。2 h 后, 观察最大释放的孔, 靶细胞全部裂解后从每个孔吸出 50 μL 上清液到平底 96 孔板中, 再在各个孔中加入 50 μL 底物液, 避光显色 30min。30 min 之后看颜色变化, 最大释放 MM.1S 孔, 和 CART 细胞孔颜色应该比较深。酶标仪进行测量, 测量波长为 490 nm。杀伤结果参见图 7, BCMA 嵌合抗原受体修饰 T 细胞可以特异性杀伤 BCMA 阳性的细胞, 对 BCMA 阴性的细

胞不具杀伤效应，并且杀伤活性很高，在 20%以上。

附表 1

序 列	CDR1	CDR2	CDR3	克隆 组别
1	TYFMA	GGIRWSDGVPHYADSVKG	CASRGIADGSDFGS	G3
2	IKAMA	AYIRSGGTTNYADSVKG	CNADYSPPGSRFPDLGP	G1
3	ANTM	ARISTDGRITNYADSVKG	CNANWLSKFDY	NG7
4	VNAVA	AYIRRSRGSTNYADSVKG	CNADFGSDYVVLGS	G5
5	IKALA	AYITSGGNTNYADSVRG	CNADFGEGTIIISLGP	G9
6	INAMA	AALTSGGNTHYADSVKG	CNADFGTAGLVVLGP	G7
7	INAMA	AYIRSNGRTNYADSVKG	CNADYGPPVSIGP	G6-2
8	IKAMA	AAVTSGGSTHYLDSVKG	CNADFGTDYVDLGP	G10
9	INAMG	AAITKSNINNYADSVKG-	CNGFFALPGYSSEFGP	G2
10	MNRMG	ADIRDGGSTIYDSVKG	CNAGRTGDRFNLVAY	G8
11	GYAMA	AAISSSNSAPYYANSVKG	CAARYGTKRYVAREYDS	G17
12	INGMG	ARIDSRGSAYYADFVEG	CFAWQGAETY	G25
13	TYAMA	AYITNGGSTDYAASVKG	CNGATRGAQLVFD	NG1
14	NYAMA	AAISVSANSAPYYANSVKG	CAARYGTKRYVAREYDS	NG20
15	LNAMG	ARIAADGSTHYADSVEG	CFAWLGTDTY	NG21
16	NNAMG	ARIDSGGITRYADSLKG	CFAHVGGTI	G14
17	INSMG	ASITGGGSSRYADSVKG	CNTIPPARTQSDHGEWYDY	NGS1
18	IN-MS	ATTRHDSTHYDSVKG	CSGFFLDGSTWHPY	G12
19	INAMA	AYIRSNGSTNYADSVKG	CNGFFTLPGYSSEFGP	G6
20	INAMG	AGITKGGRTNYADSVKG	CNGLCSGRECYGDSLFAA	G22#
21	INAMA	AYIRSNGRTNYADSVKG	CSGFFLDGSTWHPY	G6-1
22	DYAIG	SCISSSDGSTHYADSVKG	CATPWVTYCPENLLFSY	G13#
23	DYAIG	SCITSSDGSTYYADSVKG	CATPWVTYCPENLLFSY	G13-2#

24	IKAMG	AAITSGGSTNYADSVKG	CNGFFEYRGLEQLGP	G31
25	IRAMT	AVLTSAGKPMYADSVKG	CNADFGTPGSVVLGP	G4
26	IEAMG	AAITSGDSTNYADFVKG	CNALMVVRAGSNPEIGP	NG2
27	DYAIG	SCISSSDGSTYYADSVKG	CATPWVTYCPENLLFSY	G13-3#
28	LDAVG	ARIDRRGSTYYAVSVEG	CFAWQGAETH	G20
29	FNDMG	AAITSSRNTLYVDSVKG	CNPYPSPNNY	NG3
30	INAMG	AAITRSGKTNYADSVKG	CNGFYGSEFGP	NG4
31	RYAVG	ASITWSGDYTYKDSVKG	CAADKSSFRLRGPGLDY	NG5
32	YYAIG	SCISSRDGTTHYADSVKG	CATPWVTYCPENLLFSY	++
33	YYAIG	SAISNIDDDTYEDSVKG	CAADKDVVVVRTGLSESDY	NG8
34	INAMA	AVITSGGRTMYAESVKG	CNGDWGSEGRVDLGP	NG9
35	IGDME	ASISAGPEMRSAGTPTYAKSV EG	CNADVLTYNGRYSRDVY	NG10
36	INMS	ATITRHDSTHYSDSVKG	CSGFFLDGSTWRPY	G12-1
37	GYAVA	AAISSDNSSPYANVVKG	CAARYGTKRYVAREYDS	
38	INAMA	AYIRSSGTTMYADSVKG	CNGDYSPPGSTYPDLGP	NG11
39	DYAIG/YCPENLLFS Y	SCITSSDGSTYYADSVKG/ AAIRWSDGVPHYTDSVKG	CATPWVN/CASRGIADGSDFG SY	G15 (bi)
40	ATTMA	ALITSDWHTKYADSVKD	CYARQAFSEPR	G11
41	IDAMG	ARLGSNGFTQYDISVEG	CFAWLGQDTV	NG12
42	NYAMG	ASVTRSGDNTYYKDSAKG	CAADKSSFRLRGPVYDY	NG14
43	VMLMG	ASITSADYTTYAESVEG	CKVIAATVWGQETQVRQGLF	NG13
44	ARSMT	AVIMGGGSTMYADSVKG	CNADWGEVGFPNLGP	G21
45	TYAIG	AAISRRGNKTDYAESVKG	CAASARNFIGTQPLDYDY	NG23
46	NYALG	AAIDWRHSSYYADSVKG	CAASSLPSSAPRQYDY	NG15
47	NYAMG	AAIVGSGDSTRYADSVKG	CASSDPRVYIASTLDY	NG16
48	MFIMG	AAISRNSNLTYFQSVKG	CNADYGPPVSIGP	G23
49	IKAMG	AGIVSSGNTNYADFVKG	CNALVVVTSASGPELAS	NG17
50	TYFMA	CNADYSPPGSRFPDLGP	AGIVSSGNTNYADFVKG	G1-3

51	NYAIA	SSTGSDGNLYTPSVRG	CVAGKRPVITTWIALDA	NG18
52	IDSMR	AHITSTGRNTNYADAVKG	CNMVTTTPYMH	NG24
53	ENAMG	AAITSSRSTLYIDSVKG	CNPYPSPNSY	NG25
54	ANKMG	ARISTDGRNTNYADSVKG	CNANWLDKYDY	NG19
55	ARSMT	AVITSGGSTMYADSVKG	CNADWGEVGFVNLGP	NG26 (G21-1)
56	FNGVA	AVIRSGGNTLYADSVKG	CNVDYSPPGSLVPDLGP	G18
57	INAMG	AAITRGGSTNYADSVKG	CNGLCSDDRCYGDSLFP	G16
58	LDAVG	ARIDSRGSAYYADSVKG	CFAYYGAQISFGP	G24
59	LDAMG	AHIDDDRGTYAYADFVKG	CFAWQGAETY	G19
60	VNAVA	AYIRRSRGSTNYADSVKG	CNAGRTGDRFNLVAY	G5-1
61	TYFMA	GGIRWSDGVPHYADSVKG	CNADYSPPGSRFPDLGP	G26
62	IKAMA	AYIRSGGTNYADSVKG	CASRGIADGSDFGS	G27
63	LYAMG	AYIRSGGTTNYADSVKG	CNADYSPPGSRFPDLGP	G1-2
64	TYAMG	AAISRRGNKTDYAESVKG	CAASARNFIGTQPLDYDY	G28
65	GYFMA	GGIRWSDGVPHYADSK	CASRGIADGSDFGS	G29
66	INAMG	AAITKSNININADSBKG	CNGFFTLPGYSSEFGP	G2-1

附表 2

序列	氨基酸序列	克 隆 组别
67	EVQLQASGGGLAQAGGSLRLSCTASGRFTSTYFMAWFRQPPGKEREYVGGIRWSDGVPHYADS VKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKSEDTAVYFCASRGADGSDFGSYGQGTQVTVSS	G3
68	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS IKAMAWYRQAPGKQRELVAYIRSGGTTNYADSV KGRFTISRDIKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNADYSPPGSRFPDLGPWGQGTQVTVSS	G1
69	QVKLEESGGGLAQPGGSLRLSCAASGLVFSANTMAWYRRAPGKQRELVARISTDGRNTNYADSV KGRFTISRDNREKTVFLQMNRLNPDDTAVYYCNANWLSKFDYWGQGTQVTVSS	NG7
70	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCVASGSIFSVNAWYRQAPGKQRELVAYIRRGSTNYADSV KGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNADFGSDYVVLGSGWGQGTQVTVSS	G5
71	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFS IKALAWYRQAPGKQRELVAYITSGGNTNYADSV RGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNADFGEGTIIISLGPWGQGTQVTVSS	G9
72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSEFSINAMAWYRQAPGKQRELVAAITSGGNTHYADSV KGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNADFGTAGLVVLGPWGQGTQVTVSS	G7
73	EVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMAWYRQAPGKQRELVAYIRSNRNTNYADSV KGRFTISRDNKNTVYLMNSLKLEDTAVYYCNADYGPPVSI GPWGQGTQVTVSS	G6-2
74	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVVS GLLSIKAMAWFRQPPGKQRELVAAVTSGGSTHYLDSV KGRFTISRDNANTVHLMNSLKPEDTAVYYCNADFGTDYVDLGPWGQGTQVTVSS	G10
75	DVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAAITKSNINNYADSV KGRFTISTDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNGFFALPGYSSEFGPWGQGTQVTVSS	G2
76	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGNIFDMNRMGWYRQPPGKQRELVADIRDGGSTIYSDSV KGRFTISRDNKNTLYLMNSLKPD TAVYYCNAGRTGDRFNLVAYWGQGTQVTVSS	G8
77	DVQLQASGGGLVQHGGSLRLSCEASGRFTSGYAMAWFRQAPGKEHEFVAAISSSSNSAPYYAN SVKGRFTISRDNKNTVYLMNNLQTEDTAVYYCAARYGTRKYVAREYDSWGQGTQVTVSS	G17
78	DVQLQASGGGVVQAGGSLRLSCTASGSIRSINGMCWSRVAPGKQRDFVARIDSRGSAYYADSV EGRFTISRDNKNTVYLVDTLKPEDTAVYYCFAWQGAETYWGLGTQVTVSS	G25
79	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIGDTYAMAWYRQAPGKQRDLVAYITNGGSTDYAASV KGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNGATRGAQLVFDWGQGTQVTVSS	NG1

80	QVKLEESGGGLVQHGGSLRLSCAASGGTFSNYAMAWFRQAPGKEREVAAISVSANSAPYYAN SVKGRFTISRDNANTVYLMNSLKTEDTAVYYCAARYGTRKYVAREYDSWGQGTQVTVSS	NG20
81	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSVSLNAMGWSRVQPGSTRDFVARIAADGSTHYADSV EGRFTISGDAARNTVYLMNSLKPEDTAVYYCFAWLGTDTYWGGGTQVTVSS	NG21
82	DVQLQASGGGLVQAGGSLTLSCAASGSIGDNNAMGWSRTPPGKQREFVARIDSGGITRYADSL KGRFTVSRDTGKNTVSLQNSLKAEDTGVIYCFHVGGTIWGGGTQVTVSS	G14
83	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLPSGGIFTINSMGWYRQAPGKQRELVASITGGGSSRYADSV KGRFIMSRDNAKNMVYLMNSLKPEDTAVYYCNTIPPARTQSDHGEWYDYWGQGTQVTVSS	NGS1
84	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASSSIFSNMSWYRQAPGNERELVATITRHDSTHYSDSVK GRFTISRDDDKNTIYLMNSLKPEDTAVYYCSGFFLDGSTWHPYWGQGTQVTVSS	G12
85	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIVSINAMAWYRQAPGKQRELVAIIRSNGSTNYADSV KGRFTISRDNANTVYLMNSLKLKEDTAVYYCNGFFTLPGYSSEEFPGPWGGGTQVTVSS	G6
86	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASESIFSNAMGWYRQAPGKQREYVAGITKGGRTNYADSV KGRFTISRDDAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNGLCSGRECYGDSLFAAWGGGTQVTVSS	G22#
87	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIVSINAMAWYRQAPGKQRELVAIIRSNGRNYADSV KGRFTISRDNANTVYLMNSLKLKEDTAVYYCSGFFLDGSTWHPYWGQGTQVTVSS	G6-1
88	EVQLVESGGGLAQAGGSLRLSCAASGFTDDYAIGWFRQAPGKEREVSCISSSDGSTHYADS VKGRFTISRDNARNTVTLQINSLKPEDTAVYYCATPWVTYCPENLLFSYWGQGTQVTVSS	G13#
89	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTDDYAIGWFRQAPGKEREVSCITSSDGSTYYADS VKGRFTISRDNANNTVHLQISNLKPEDTAVYYCATPWVTYCPENLLFSYWGQGTQVTVSS	G13-#
90	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSSFSIKAMGWYRLAPGKQRELVAAITSGGSTNYADSV KGRFTISRDSAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNGFFEYRGLEQLGPWGQGTQVTVSS	G31
91	DVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIVGIRAMTWYRQAPGKQRELVAVLTSAGKPMYADSV KGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCNADFGTPGSVVLGPWGQGTQVTVSS	G4
92	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILSIEAMGWYRQTLGKQRELVAAITSGDSTNYADFV KGRFTISRDKAKNMVYLMNSLKPEDTAVYFCNALMVVRAGSNPEIGPWGGGTQVTVSS	NG2
93	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTDDYAIGWFRQAPGKEREVSCISSSDGSTYYADS VKGRFTISRDNANNTVHLQISNLKPEDTAVYYCATPWVTYCPENLLFSYWGQGTQVTVSS	G13-#
94	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSARGVSLDAVGWSRVAPGKQRDFVARIDRRGSTYYAVSV	G20

	EGRSTISRDNANTVYLQLDTLKPEDTAVYYCFAWQGAETHWGLGTQVTVSS	
95	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSHFSFNDMGWYRQDPWKGRDLVAAITSSRNTLYVDSV KGRFTISRDDAKNTVYLMNNLKPEDTAVYYCNPYPSPNNYWGQGTQVTVSS	NG3
96	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSPFTINAMGWYRQAPGKQRELVAAITRSGKTNVADSV KGRFTISGDNALTTVYLMNNLQPEDTAVYYCNGFYGSEFGPWGQGTQVTVSS	NG4
97	QVKLEESGGGLVQAGGSATLSCSAPGDTLSRYAVGWFRQPGQERDFVASITWSGDYTYKDS VKGRFTISRDSVNNMVYLRMNSLKPEDTALYYCAADKSSFRLRGPGLYDYRGQGTQVTVSS	NG5
98	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSRDGTHYADS VKGRFTISRDNANTVYLQIDSLKPEDTAVYYCATPWVITYCPENLLFSYWGQGTQVTVSS	NG6#
99	QVKLEESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFSLHYAIGWFRQAPGKEREWVSAISNIDDDTYEDS VKGRFTISRDNANTAYLQMNLLKPEDTAVYYCAADKDVVVVRTGLSESDYWGQGTQVTVSS	NG8
100	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFGINAMAWYRQAPGKQRELVAVITSGGRTMYAESV KGRFAISRDAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNGDWGSEGRVDLGPWGQGTQVTVSS	NG9
101	QVKLEESGGGLVQPGGTLRLSCAASGSIRSIGDMEWYRQAPGQRELVASISAGPEMRSAGTP TYAKSVEGRFTISRDNINKMMWLQMNSLRPEDTAVYSCNADVLTYNGRYSRDVYWGQGTQVT VSS	NG10
102	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASSSIFSNMSWYRQAPGNERELVATITRHDSTHYSDSVK GRFAISRDDDNTIYLMNSLKPEDTAVYYCSGFFLDGSTWRPYWGQGTQVTVSS	G12-1
103	DVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTLSGYAVAWFRQAPGKEREFVAAITSSDNSSPYAN VVKGRFTISRDNANTVYLMNSLQTEDTALYYCAARYGTRKYVAREYDSWGQGTQVTVSS	G17-1
104	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIFSINAMAWYRQAPGKQRELVAIRSSGTTMYADSV KGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCNGDYSPPGSTYPLGPWGQGTQVTVSS	NG11
105	EVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCITSSDGSTYYADS VKGRFTISRDNANNTVHLQISNLKPEDTAVYYCATPWVNYCPENLLFSYWGQGTQVTVSSQAQ VQLVESGGGLAQAGGSLRLSCTASGRTFSTYFMA WFRQPPGKEREYVGGIRWSDGVPHYTDSVKGRFTISRDNANTVYLMNSLKSEDTAVYFCAS RGIADGSDFGSYGQGTQVTVSS	G15 (b i)
106	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCGASGIFSATTMAWYRQAPGKQRELVALITSDWHTKYADSV KDRFISRDNANTSTVHLQMNLSRSEDVAVYFCYARQAFSEPRWGQGTQVTVSS	G11

107	QVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSGRIDAMGWSRVAPGKQRDFVARLGSNGFTQYDISV EGRFTISGDVAKNTIYLMQMDTLKPEDTAVYYCFAWLGGDTVWGQGTQVTVSS	NG12
108	QVQLVDSGGGLVKAGASLRLSCAASGDALFNYAMGWFRQPGKERDFVASVTRSGDNTYYKDS AKGRFTISRDDAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYFCAADKSSFRRLRGPVGYDYRGQGTQVTVSS	NG14
109	DVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSDGRVMLMGWYRQAPGQQRDLVASITSADYTTAESV EGRFTISTDNKNTVYLMQNSLKPEDTAVYFCKVIAATVWGQETQVRQGLTFWGQGTQVTVSS	NG13
110	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSISSARSMTWYRQALGKQRELVAVIMGGGSTMYADSV KGRFTISRDNKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCNADWGGVGFNLPWGGQGTQVTVSS	G21
111	DVQLQASGGGLVQIGDSVRLSCIASGGTFRTYAIGWFRQAPGAEREFVAAISRRGNKDYAESV KGRFTVSRDNAENTVYLMQNSLKPDDMGVYYCAASARNFIGTQPLDYDWGQGTQVTVSS	NG23
112	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGWNLGNYALGWFRQAPGKEREFVAAIDWRHSSYYADSV KGRFTISRDNKNTVYLMQNSLKPDDMGVYYCAASARNFIGTQPLDYDWGQGTQVTVSS	NG15
113	DVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSNYAMGWYRRRPLEREFVAAIVGSGDSTRYADS VKGRFTISRDNKNTVYLMQNTLKPEDTAVYYCASSSDPRVYIASTLDYWGQGTQVTVSS	NG16
114	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSMFIMGWFRQAPGKERELVAAISRNSNLTYFQS VKGRFTISRDNKNTVYLMQNSLKPDDMGVYYCAASARNFIGTQPLDYDWGQGTQVTVSS	G23
115	QVKLEESGGGWVQPGGSLRLSCVVSGRILSIKAMGWYRQAPGKQREYVAGIVSSGNTNYADSV KGRFTISGDNAKNTVFLQMSLKPEDTAVYYCNALVVVTSASGPELASWGQGTQVTVSS	NG17
116	DVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTFSTYFMAWFRQPPGKQRELVAYIRSGGTTNYADSV KGRFTISRDIKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCNADYSPPGSRFPDLGPWGQGTQVTVSS	G1-3
117	QVKLEESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFTLDNYAIAWFRQAPGREREWVSSTGSDGNLYTPSVR GRFTISRDNKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCVAGKRPVITTWIALDAWGQGTQVTVSS	NG18
118	DVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGTFSSIDSMRWFRAPGKEREFVAHITSTGRNTYADAV KGRFTISRDNKNTMWLQMDNLKPDDTAVYYCNMVTTPYMHWGQGTQVTVSS	NG24
119	QVKLEESGGGLVQAGGSLKLSVASGSRFSENAMGWYHQAPDKQRTLVAAITSSRSTLYIDSV KGRFTISRDNKNTVYLMQNSLKPEDTGYYCNPYPSPNSYWGQGTQVTVSS	NG25
120	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLVFSANKMGWYRQAPGKQRELVARISTDGRNTYADSV KGRFTISRDNKNTVFLQMSLNPDDTAVYYCNANWLDKYDYWGQGTQVTVSS	NG19
121	QVKLEESGGGLVEPGGSLRLSCVASGSISSARSMTWYRQAHGKQRELVAVITSGGSTMYADSV	NG26 (

	KGRFTISRDSAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNADWGEVGFVNLGPWGQGTQVTVSS	G21-1)
122	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSI FGFNGVAWFRQAPGKQRELVAVIRSGGNTYADSVK GRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCNVDYSPPGSLVPDLGPWGQGTQVTVSS	G18
123	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASINAMGWYRQAPGKQRELVAAITRGGSTNYADSV KGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYSCNGLCSDDRCYGDSLFAPWGPQTQVTVSS	G16#
124	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLVSGRGVSLDAVGWSRVAPGKQRDFVARIDSRGSAYYADSV EGRFTISRDNANTVYLVQDTLKPEDTAVYYCFAYYGAQISFGPWGQGTQVTVSS	G24
125	DVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCVVSGRGVNLDAMGWSRVAPGKQRDFVAHIDDRGTAYYADFV KGRSTISRDNANTVYLVQDTLKPEDTAVYYCFAWQGAETYWGLGTRVTVSS	G19
126	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSIFSNAVAWYRQAPGKQRELVAIIRSGSTNYADSV KGRFTISRDNANTLYLMNSLKPDDTAVYYCNAGRTGDRFNLVAYWGQGTQVTVSS	G5-1
127	EVQLVESGGGLAQAGGSLRLSCTASGRFTSTYFMAWFRQPPGKEREYVGGIRWSDGVPHYADS VKGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCNADYSPPGSRFPDLGPWGQGTQVTVSS	G26
128	EVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIFS IKAMAWYRQAPGKQRELVAIIRSGGTTNYADSV KGRFTISRDIANTVYLMNSLKSED TAVYFCASRG IADGSDFGSYGQGTQVTVSS	G27
129	EVQLVESGGGLVQAGASVRLSCAASGRANSLYAMGWFRQAPGKQRELVAIIRSGGTTNYADSV KGRFTISRDIANTVYLMNSLKPEDTAVYYCNADYSPPGSRFPDLGPWGQGTQVTVSS	G1-2
130	EVQLVESGGGLVQIGDSVRLSCIASGGTFRTYAMGWFRQAPGAEREFVAAITSRGNKTDYAES VKGRFTVSRDNAENTVYLMNSLKPDDMGVYYCAASARNFIGTQPLDYDYWGQGTQVTVSS	G28
131	QVKLEESGGGMVQAGGSLRLSCVASGRSFVGYFMAWFRQPPGKEREYVGGIRWSDGVPHYADS VKGRFTISRDNANTVYLMNSLKSED TAVYFCASRG IADGSDFGSYGQGTQVTVSS	G29
132	QVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAAITKSNNINYADSV KGRFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCNGFFTLPGYSSEEFGPWGQGTQVTVSS	G2-1

附表 3

序列	核苷酸序列	克隆组别
133	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGATTGGCGCAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCC TGTACAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTACCTATTTTCATGGCCTGGTTCCGCCAGCCTCCAGGG AAAGAGCGTGAATACGTAGGCGGTATTAGGTGGAGTGATGGTGTTCCACACTATGCAGACTCC GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATTTGCAAATGAAC AGCCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTTTATTTTGTGCATCACGGGGTATTGCGGATGGATCT GACTTTGGTTCCTACGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G3
134	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGATTGGCGCAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCC TGTACAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTACCTATTTTCATGGCCTGGTTCCGCCAGCCTCCAGGG AAAGAGCGTGAATACGTAGGCGGTATTAGGTGGAGTGATGGTGTTCCACACTATGCAGACTCC GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATTTGCAAATGAAC AGCCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTTTATTTTGTGCATCACGGGGTATTGCGGATGGATCT GACTTTGGTTCCTACGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G1
135	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTAAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGACTCGTCTTCAGTGCCAATACCATGGCCTGGTACCGCCGGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTTGGTCGCACGTATTAGCACTGACGGACGTACAAACTACGCGGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACCGCGAGAAGACGGTGTCTTGCAAATGAACAGG CTGAACCCTGACGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCAAACTGGCTCAGTAAATTTGACTAC TGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG7
136	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGTAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTGTCAATGCCGTGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAACAGCGCGAGTTGGTCGCATATATACGTCGTAGTGGTAGCAGCAAACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACAGCCGTCTATTACTGTAATGCAGATTTCGGTAGCGACTATGTCGTC CTCGGTTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G5

137	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTATCAAAGCCTTGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGGAGTTGGTCGCATATATTACTAGTGGTGGTAACACAACTATGCAGACTCCGTG AGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTATATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACAGCCGTCTATTACTGTAATGCAGATTTCCGAGAAGGGACTATCATA TCCCTTGGACCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA	G9
138	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCAATTCAGTATCAATGCCATGGCGTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGGAGTTGGTCGCAGCACTTACTAGTGGTGGTAACACTCACTATGCGGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGTGGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCAGATTTCCGAACTGCGGGTTGGTA GTGCTGGGTCCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA	G7
139	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCATCGTCAGTATCAATGCCATGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGGAGTTGGTCGCATATATTCGTAGTAATGGCCGCACAACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATTTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACTTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCAGACTACGGGCCTCCAGTATCCATT GGTCCTTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA	G6-2
140	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGTAGTCTCTGGAAGTCTCCTCAGTATCAAAGCCATGGCCTGGTTCGCCAGCCTCCAGGG AAGCAGCGGAGTTGGTCGCAGCTGTACTAGTGGTGGAAAGCACACACTATTTAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAACACGGTGCATCTGCAAATGAACAGCCTG AAACCTGAGGACACAGCTGTCTATTACTGTAATGCAGATTTCCGTACTGACTATGTCGACTTA GGGCCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA	G10
141	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGTCTCTGGAAGCATCTTCAGTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAACAGCGGAGTTGGTCGCAGCTATTACTAAAAGTAATAACATAAACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGGATTCTTCGCTTGCCTGGGTACAGT	G2

	AGTGAAGAATTTGGTCCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	
142	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGTAGCCTCTGGAAACATCTTCGATATGAATCGGATGGGCTGGTACCGCCAGCCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAGATATTCGTGATGGCGGTTCTACAATTTATTCAGATTCGGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGACGACACAGCCGTGTATTATTGTAATGCGGGGCGGACAGGGGATCGTTTAAAT TTGGTGGCGTATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G8
143	GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCACGGGGGCTCTCTGAGACTCTCC TGTGAAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTGGCTATGCCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGA AAGGAACATGAATTTGTAGCAGCTATTAGCTCAAGTAGTAATAGTGCCCCATACTATGCAAAT TCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTTTATCTACAAATG AACAACTACAACTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCCCGGTACGGTACGAAACGG TACGTCGCCCGGGAGTATGACTCGTGGGGCCAAGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G17
144	GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGCGTCGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTACAGCCTCTGGAAGCATCCGCAGTATCAATGGCATGGGCTGGTCGCGCTGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGACTTCGTTCGCACGTATTGATAGTAGGGGTAGCGCATACTATGCAGACTCCGTA GAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAGTGGACACG CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGCTTTGCGTGGCAGGGTGGGAAACATATTGG GGCCTGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G25
145	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGCGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCATCGGCGATACCTATGCCATGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGACTTGGTCGCATATATTACTAATGGTGGTAGCACGGACTACGCAGCCTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTCTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTACTACTGTAATGGAGCTACCCGTGGTGCACAGTTAGTC TTCGACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG1

146	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCACGGGGGCTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAGGCACGTTCACTAATATGCCATGGCCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGA AAGGAGCGTGAATTTGTAGCAGCTATTAGCGTGAGTGCTAATAGTGCCCCATACTATGCAAAT TCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTTTATCTGCAAATG AACAGCCTAAAACTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCCCGGTACGGTACGAAACGA TACGTGCCCCGGGAGTATGACTCGTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA	NG20
147	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGCGACTCTCC TGCGCAGCCTCTGGAAGTAGCGTCAGTCTCAATGCCATGGGCTGGTCGCGGTGCAACCAGGA AGTACGCGCGACTTCGTGCGACGGATTGCTGCCGATGGTAGCACTCACTATGCAGACTCCGTG AGGGCCGGTTCACCATCTCCGGGGACGCCCGCAGGAACACGGTGTATCTACAAATGGATTGCG TGAAACCCGAAGACACGGCCGTCTATTACTGTTTTGCGTGGCTGGGTACGGACACGTAAGTGGG GCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA	NG21
148	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCATCGGCGATAACAATGCCATGGGCTGGTCCCGCAGCCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTTTCGTGCGACGTATAGATAGTGGGGGGATCACACGCTATGCAGACTCCCTG AAGGGCCGATTCACTGTCTCCAGAGACACCGCAAGAACACGGTGTCTCTGCAAATGAACAGC CTGAAAGCTGAGGACACAGGCGTCTATTACTGTTTTGCACATGTGCGTGGTACTATCTGGGGC CAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA	G14
149	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTTTACCCTCTGGAGGCATCTTCACTATCAATAGCATGGGCTGGTATCGGCAGGCTCCAGGG AAACAGCGCGAGTTGGTCGCAAGTATCACTGGTGGTGGTAGTTCAGTTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTTCATCATGTCCAGAGACAACGCCAAGAACATGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAATACAATCCCCCGGCCCGGACCCAAAGC GATCATGGGGAGTGGTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA	NGS1
150	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCC TGCGCAGCCTCTAGCAGCATCTTCACTATCAATATGAGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAC GAGCGCGAGTTGGTCGCAACTATTACAGGCATGATAGCACACTATTCACTAGACTCCGTGAAG GGCCGATTACCATCTCCAGAGACGACGACAAGAACACGATATATCTGCAAATGAACAGCCTG AAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTTCTGGGTTTTTCTGGACGGTAGTACCTGGCAC	G12

	CCATATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	
151	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCATCGTCAGTATCAATGCCATGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTTGGTCGCATATATTCGTAGTAATGGCAGCACAACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATTTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTCTACCTGCAAATGAACAGC CTGAAACTTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGTAATGGATTCTTCACTTTGCCTGGGTACAGT AGTGAAGAATTTGGTCCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G6
152	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGAGAGCATCTTCAGTATCAACGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTATGTCGACGGCATTACTAAGGGTGGGCGTACAACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACGACGCCAAGAATACGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAAGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGGTTTGTGCTCAGGCAGAGAGTGTTAT GGGGACTCCCTTTTTGCCGCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGGATCCGAA CAAAACTGATCAGCGAAGAAGATCTGAACCATCACCATCACCATTAGTGA	G22#
153	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCATCGTCAGTATCAATGCCATGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTTGGTCGCATATATTCGTAGTAATGGCCGCACAACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATTTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACTTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTTCTGGGTTTTTTCTGGACGGTAGTACCTGG CACCCATATTGGGGCCAGGGCACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G6-1
154	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGATTGGCGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCGATGATTATGCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGCCCCAGGG AAGGAGCGTGAGGGGGTCTCATGTATTAGTAGTAGTGATGGTAGCACACACTATGCAGACTCC GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAGGAACACGGTGACTCTGCAAATAAAC AGCCTGAAACCTGAGGATACGGCCGTTTATTACTGTGCGACCCCTGGGTGACCTATTGCCCC GAGAACCTTCTGTTTAGTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G13#

155	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCGATGATTATGCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGCCCCAGGG AAGGAGCGCGAGGGGGTCTCATGTATTACGAGTAGTGATGGTAGCACATACTATGCAGACTCT GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAACAACACGGTGCATCTGCAAATAAGC AACCTAAAACCTGAGGATACGGCCGTTTATTACTGTGCGACCCCTGGGTGACCTACTGCCCC GAGAACCTTCTGTTTAGTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G13-2#
156	GAGGTACAGCTGGTGAATCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGTCTCTGGAAGCAGCTTCAGTATCAAGGCCATGGGCTGGTACCGCTGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAGCAATTACTAGTGGTGGTAGCACGAACATGCGGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAGCGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACAGCCGTCTATTACTGTAATGGTTTTTTCGAGTATAGGGGTCTTGAA CAATTGGGGCCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G31
157	GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCATCGTCGGTATCCGTGCCATGACGTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAGTCTTACTAGTGCTGGTAAACCTATGTATGCCGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTATATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAACGCAGATTTGGGACTCCGGGTTCAGTA GTACTGGGTCCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G4
158	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCATCCTCAGTATCGAGGCCATGGGCTGGTACCGCCAGACTCTTGGG AAGCAGCGCGAATTGGTCGCAGCTATTACTAGTGGTGATAGCAGAACTATGCAGACTTCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAGGCCAAGAACATGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTTCTGTAATGCCCTAATGGTAGTTAGGGCTGGCTCG AATCCCGAAATTGGTCCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG2
159	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCGATGATTATGCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGCCCCAGGG AAGGAGCGTGAGGGGGTCTCATGTATTAGTAGTAGTGATGGTAGCACATACTATGCAGACTCC GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATAAAC AGCCTGAAACCTGAGGATACGGCCGTTTATTACTGTGCGACCCCTGGGTGACCTACTGCCCC	G13-3#

	GAGAACCTTCTGTTTAGTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	
160	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTGTCC TGTGTAGTCTCTGCAAGGGGCGTCAGTCTCGATGCCGTGGGCTGGTCGCGCGTGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGACTTCGTGCGACGTATTGATCGAAGGGGTAGTACATACTATGCAGTGTCCGTA GAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAACTGGACACG CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGTTTTGCATGGCAGGGTGGCGAAACACATTGG GGCCTGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G20
161	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGACCCTCTCC TGTGTAGCCTCTGGAAGCCACTTCAGTTTCAATGACATGGGCTGGTATCGCCAGGATCCGTGG AAGGGGCGCGACTTGGTCGCGGCTATTACTAGTAGTCGTAACACACTTTATGTAGACTCCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACGACGCCAAGAACACGGTGTATCTACAAATGAACAAC CTGAAACCTGAGGACACAGCCGTCTATTACTGTAACCCGTACCCTTCCCCAAATAACTACTGG GGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG3
162	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCCCCTTCACGATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTTGGTCGAGCAATTACTCGTAGTGGTAAGACGAACATATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCGAGACAACGCCCTGACCACGGTGTATCTGCAAATGAACAAC CTGCAACCTGAAGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGGGTTCTACGGGTCTGAATTTGGGCCC TGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG4
163	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTCCAGGCTGGGGGGTCTGCGACGCTCTCC TGTTTCAGCCCCTGGAGACACCTTAAGTAGATACGCCGTGGGCTGGTTCCGCCAGGGGCCAGGG CAGGAGCGTGATTTTGTAGCATCCATTACCTGGAGTGGTGATTACACATACTATAAAGACTCC GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAGTGTCAACAACATGGTGTATCTGCGAATGAAC AGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCAGCCGATAAGAGTTCCTTTAGACTC CGAGGCCCTGGATTATATGACTACAGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG5

164	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCGATTATTATGCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGCCCCAGGG AAGGAGCGCGAGGGGGTCTCATGTATTAGTAGTAGGGATGGTACCACCCACTATGCAGACTCC GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATAGAC AGCCTGAAACCTGAGGATACGGCCGTTTATTACTGTGCGACCCCTGGGTGACCTACTGCCCC GAGAACCTTCTGTTTAGTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG6#
165	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTCGTACAGCCTGGGGGGTCACTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCGGGATTCACTTTGCATTATTATGCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGCCCCAGGG AAGGAGCGCGAGTGGGTCTCTGCCATTAGTAATATTGATGATGACACATACTATGAAGACTCC GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGCGTATCTGCAAATGAAC AACCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGCAGATAAGGATGTAGTGGTAGTG CGTACGGGTCTCAGCGAGTCTGACTATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG8
166	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCGGTATCAATGCCATGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAACTGGTCGCAGTTATTACCAGTGGTGGACGCACAATGTATGCAGAGTCCGTG AAGGGCCGATTGCGCATCTCCAGAGACGTCGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAAGACACAGCCGTCTATTACTGTAATGGAGACTGGGGGTCGGAGGGTAGGGTG GACCTTGGACCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG9
167	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGACGCTGAGACTCTCC TGTGCCGCCTCGGAAGCATTTCGCAGTATCGGCGACATGGAGTGGTACCGCCAGGCTCCAGGA CAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAAGTATTAGTGCTGGCCCTGAGATGCGTAGTGCTGGTACCCCA ACTTATGCAAAGTCCGTGGAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACATCAAGAACATGATG TGGCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAAGACACGGCCGTCTATTCTGTAATGCCGACGTT CTGACGTACTATAATGGTAGATACTCCCGAGATGTCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACC GTCTCCTCA	NG10
168	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGCGCAGCCTCTAGCAGCATCTTCAGTATCAATATGAGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAC GAGCGCGAGTTGGTCGCAACTATTACACGACATGATAGTACACACTATTCAGACTCCGTGAAG GGCCGATTGCGCATCTCCAGAGACGACGACAAGAACACGATATATCTGCAAATGAACAGCCTG	G12-1

	AAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTTCTGGATTTTTTCTGGACGGTAGTACCTGGCGG CCATATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	
169	GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGACGCACCCCTCAGTGGCTATGCCGTGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGA AAGGAGCGTGAGTTTGTAGCAGCCATTAGCTCGAGTGATAATAGTAGCCCATATTATGCAAAT GTCGTGAAGGGTCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTTTATCTGCAAATG AACAGCCTGCAAACCTGAGGACACGGCCCTTTATTACTGTGCAGCCCGGTACGGTACGAAACGG TACGTGCCCCGGGAGTATGACTCGTGGGGTCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G17-1
170	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTAGAAGCATCTTCAGTATCAATGCCATGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTTGGTCGCATATATTCTAGTAGTGGTACCACAATGTATGCGGATTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGTAACGGAGATTACTCCCCGCCGGCAGCACG TACCCTGACTTAGGTCCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG11
171	GAGGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCGATGATTATGCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGCCCCAGGG AAGGAGCGCGAGGGGGTCTCATGTATTACGAGTAGTGATGGTAGCACATACTATGCAGACTCT GTGAAGGGCCGATTACCATCTCTAGAGACAATGCCAACAACACGGTGCATCTGCAAATAAGC AACCTAAAACCTGAGGATACGGCCGTTTATTACTGTGCGACCCCTGGGTGAACTACTGCCCC GAGAACCTTCTGTTTAGTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACAGGCCAG GTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGATTGGCGCAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGT ACAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTACCTATTTTATGTCCTGGTTCCGCCAGCCTCCAGGAAA GAGCGTGAATACGTAGGCGGTATTAGGTGGAGTGATGGTGTCCACACTATACAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATTTGCAAATGAACAGC CTGAAATCTGAGGACACGGCCGTTATTTTTGTGCATCACGGGTATTGCGGATGGATCTGAC TTTGTTCCCTACGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGGATCCGAACAAAACTGATC AGCGAAGAAGATCTGAACCATCACCATCACCATTAGTGA	G15 (bi)

172	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGGAGCATCTGGAATTATTTTAGTGCCACTACCATGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGGAGTTGGTCGCACTGATTACTAGTGATTGGCACACAAAGTATGCAGACTCCGTG AAGGACCGATTCTCCATTTCCAGAGACAACGCCAAGAGCACGGTGCACCTGCAAATGAACAGC CTGAGATCTGAAGACACAGCAGTCTATTTTGTATGCCCCCAAGCCTTCAGTGAGCCTCGT TGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G11
173	CAGGTACAGCTGGTGGATTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTGAGATTGTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCAGCGGCAGAATCGATGCCATGGGCTGGTCGCGGTGGCTCCAGGG AAGCAGCGGACTTCGTGCGACGTCTTGGCAGTAATGGATTACACAGTATGACATCTCCGTG GAGGGCCGATTACCATCTCCGGGACGTGCGCAAGAATACGATATATCTGCAAATGGACACG CTGAAACCTGAGGACACGGCGTCTATTACTGTTTTGCGTGGCTGGGGCAAGATACCGTGTGG GGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG12
174	CAGGTACAGCTGGTGGATTCTGGGGGAGGATTGGTAAAGGCTGGGGCATCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAGACGCCTTATTTAACTACGCCATGGGCTGGTTTCGCCAGGGGCCAGGG AAGGAGCGTGACTTTGTAGCATCTGTTACCAGGAGTGGTGATAATACATACTATAAAGACTCC GCGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACGACGCCAAGAACACGGTATATCTGCAAATGAAC AGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTTCTGTGCAGCAGATAAGAGTTCCTTTAGGCTC CGAGGCCCTGGAGTATATGACTACAGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG14
175	CAGGTACAGCTGGTGGATTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGTCTCTGGAAGCGACGGCCGAGTCATGCTCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG CAGCAGCGGACCTGGTCGCATCTATTACTAGTGAGATTACACAACCTATGCAGAATCCGTC GAGGGCCGATTACCATCTCCACAGACAACAACAAGAACACAGTGTATCTACAAATGAACAGC CTGAAGCCTGAAGACACAGCCGTCTATTTTGTAAAGTAATTGCGGCGACGGTCTGGGGCCAG GAGACCCAGGTCAGGCAGGGTTTGACATTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG13
176	GAGGTACAGCTGGTGGAACTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGTAGCCTCTGGAAGCATCTCCAGTGCCAGATCCATGACCTGGTACCGCCAGGCTCTAGGG AAGCAGCGGAGTTGGTCGCACTGATTATGGGTGGCGGTAGCACGATGTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTACAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGTAATGCAGACTGGGGGGAGTCGGGTTTCCG	G21

	AACTTAGGTCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	
177	GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAAAATTGGGGACTCTGTGAGACTCTCC TGTATAGCCTCTGGAGGCACCTTCAGAACTTATGCTATCGGTTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGG GCTGAGCGTGAATTTGTAGCTGCCATTAGCCGGCGCGTAATAAGACAGATTATGCAGAGTCC GTGAAGGGCCGATTACAGTCTCCAGAGACAACGCCGAGAATACGGTGTATTTGCAATGAAC AGCCTGAAACCTGATGACATGGGCGTTTATTACTGTGCAGCGTCGGCGCGTAATTTTCATCGGC ACCCAGCCACTTGATTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG23
178	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTACAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATGGAACCTTGGTAATTATGCCTTGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGG AAGGAGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATCGACTGGCGTCATAGTTCATACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACATGGTGTATCTGCAATGAGCAGC CTGAAACTTGAGGACACGCGCCTTTATTACTGTGCAGCATCAAGCCTATTCCCTAGTAGTGCT CCCCGTCACTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG15
179	CAGGTACAGCTGGTGGATTCTGGGGGAGGATTGGTGACAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCC TGTGTAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTAATTATGCCATGGGCTGGTACCGCCGACGTCCAGGG CTGGAGCGTGAATTTGTAGCAGCTATTGTTGGGAGTGGTGATAGCACAAGGTATGCAGACTCC GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAATGAAC ACGCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGTCATCCTCCGACCCGCGGGTTTAT ATAGCAAGTACTCTCGATTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG16
180	CAGGTACAGCTGGTGGAACTCTGGGGGAGGATTGGTGACAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTATGTTTATCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGG AAGGAGCGTGAATTAGTAGCAGCTATTAGCCGGAATAGTAATCTCACATACTATTTTCAGTCC GTGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATTTGCAATGAAC AGCCTGAAACTTGAGGACACGGCCGCTATTACTGTAATGCAGACTACGGGCCTCCAGTATCC ATTGGTCCTTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G23

181	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGTAGTCTCTGGAAGGATCCTCAGTATCAAGGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCTGGG AAGCAGCGGAGTACGTCGCAGGTATTGTTAGCAGTGGTAATACAACTATGCAGACTTCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTTTCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAAGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCCCTAGTGGTCGTTACTAGTGCCCTCG GGTCCCAGATTGGCTTCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG17
182	GATGTACAGCTGGTGGATTCTGGGGGAGGATTGGCGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTACAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTACCTATTTCATGGCCTGGTTCGCCAGCCTCCAGGG AAGCAGCGGAGTTGGTCGCATACATTCTGTAGTGGTGGTACGACAACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACATCGCCAAGAACACGGTGATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGCAATGCAGATTACTCCCCGCCCGGAGCCGG TTCCCTGACTTAGGTCCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G1-3
183	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGCGCAGCCTCTGGATTACCTTGATAATTATGCCATAGCGTGGTTCGCCAGGCCCCAGGG AGGGAGCGGAGTGGGTCTCATCACTGGTAGTGATGGTAAGTATATACACCGTCCGTGAGG GGCCGATTACCATTTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGATCTGCAAATGAACAGCCTG AAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTATTGTGTAGCAGGAAGAGACCGGTAATTACTACATGG ATTGCTTTGGACGCATGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG18
184	GATGTACAGCTGGTGGATTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAACATTCTCCAGTATCGATTCCATGCGCTGGTTCGGCGGGCTCCAGGA AAGGAGCGGAATTTGTGCGACATATTACTAGCACGGGTAGGACAACTATGCAGACGCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCTAGAGACAACGCCAAGAACACGATGTGGCTGCAAATGGACAAC CTGAAACCTGACGACACGGCCGTCTATTATTGCAATATGGTGACGACTCCTTATATGCACTGG GGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG24
185	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAAACTCTCC TGTGTAGCCTCTGGAAGCCGCTTCAGTGAAAATGCCATGGGCTGGTATCACCAGGCTCCAGAC AAACAGCGCACCTTGGTCGCAGCTATTACTAGTAGTCGTAGCACTCTTTATATAGACTCCGTG AAGGGCCGCTTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTATATCTGCAAATGAGCAAC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAACCCGTACCCTTCCCCAAATTCCTACTGG	NG25

	GGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	
186	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTAAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGACTCGTCTTCAGTGCCAATAAGATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAGTATTAGCACTGACGGACGTACAACTATGCGGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCGAGAAGACGGTGTTTCTGCAAATGAACAGC CTGAATCCTGACGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCAAACCTGGCTCGATAAATATGACTAC TGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG19
187	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGGAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGTGGCCTCTGGAAGCATCTCCAGTGCCAGATCCATGACCTGGTACCGCCAGGCTCACGGG AAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAGTTATTACTAGTGGCGGTAGCACAATGTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAGCGCCAAGAACACGGTGATCTACAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGTAATGCAGACTGGGGGGAAGTCGGGTTTGTG AACTTAGGTCCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	NG26 (G 21-1)
188	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCGGTTTCAATGGCGTGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAGTATTTCGTAGTGGTGGTAACACGCTCTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGTAGATTACTCCCCGCCCGGTAGTCTG GTTCCTGACTTAGGTCCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G18
189	GAGGTACAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCATCGCCAGTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAGTATTACTAGAGGTGGTAGCACAACCTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTATATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCGGAGGACACGGCCGTCTATTATGTAATGGTTTGTGCTCAGACGATCGGTGTTAT GGGGACTCCCTTTTGGCCCCCTGGGGCCCGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G16#

190	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTGTCC TGTCTAGTCTCTGGAAGGGGCGTCAGTCTCGATGCCGTGGGCTGGTCGCGCGTGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGACTTCGTCGCACGTATTGATAGTAGGGGTAGCGCATACTATGCAGACTCCGTA GAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAGTGGACACG CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGTTTTGCGTACTACGGGGCTCAAATATCTTTT GGTCCGTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCTTCA	G24
191	GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTGTCC TGTGTAGTCTCTGGAAGGGGCGTCAATCTCGATGCCATGGGCTGGTCGCGCGTGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGACTTCGTCGCACATATTGATGATAGGGGTACCGCATACTATGCAGACTTCGTA AAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAGTGGACACG CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGCTTTGCGTGGCAGGGTCCGGAACATATTGG GGCCTGGGGACCCGGGTACCGTCTCCTCAGGATCCGAACCAAACTGATCAACGAAGAACAT CTGAACCATCACCATCACCATTATTGA	G19
192	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGTAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTGTCAATGCCGTGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAACAGCGCGAGTTGGTCGCATATATACGTCGTAGTGGTAGCACAACCTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGACGACACAGCCGTGTATTATTGTAATGCGGGGCGGACAGGGGATCGTTTTAAT TTGGTGGCGTATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G5-1
193	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGATTGGCGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTACAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTACCTATTTTCATGGCCTGGTTCCGCCAGCCTCCAGGG AAAGAGCGTGAATACGTAGGCGGTATTAGGTGGAGTGATGGTGTTCACACTATGCAGACTCC GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATTTGCAAATGAAC AGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGCAATGCAGATTACTCCCCGCCCGGCAGC CGGTTCCCTGACTTAGGTCCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	G26
194	GAGGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCC TGTGTAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTATCAAAGCCATGGCCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTTGGTCGCATACATTCGTAGTGGTGGTACGACAACCTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACATCGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGC	G27

	CTGAAATCTGAGGACACGGCCGTTTATTTTGTGCATCACGGGGTATTGCCGATGGATCTGCT TTGGTTCCTACGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA	
195	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGCCTCCGTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGACGCGCCAACAGTTTGTATGCCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAGTTGGTCGCATACATTCGTAGTGGTGGTACGACAACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACATCGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGCAATGCAGATTACTCCCCGCCCGGCAGCCGG TTCCCTGACTTAGGTCCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA	G1-2
196	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGATTGGTGCAAATGGGGACTCTGTGAGACTCTCC TGTATAGCCTCTGGAGGCACCTTCAGAACTTATGCTATGGGTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGG GCTGAGCGTGAATTTGTAGCTGCCATTAGCCGGCGCGTAATAAGACAGATTATGCAGAGTCC GTGAAGGGCCGATTACAGTCTCCAGAGACAACGCCGAGAATACGGTGTATTTGCAAATGAAC AGCCTGAAACCTGATGACATGGGCGTTTATTACTGTGCAGCGTCGGCGCGTAATTTTCATCGGC ACCCAGCCACTTGATTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA	G28
197	CAGGTAAAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGAATGGTGCAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCC TGTGTAGCCTCTGGACGCTCCTTCGTTGGCTATTTTCATGGCCTGGTTCCGCCAGCCTCCAGGG AAAGAGCGTGAATACGTAGGCGGTATTAGGTGGAGTGATGGTGTTCACACTATGCAGACTCC GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATTTGCAAATGAAC AGCCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTTTATTTTGTGCATCACGGGTATTGCCGATGGATCT GACTTTGGTTCCTACGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA	G29
198	GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCAATTGGTCGCAGCTATTACTAAAAGTAATAACATAAACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGTAATGGATTCTTCACTTTGCCTGGGTACAGT AGTGAAGAATTTGGTCCCTGGGGCCTGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA	G2-1

权 利 要 求 书

1. 一组抗 BCMA 的单域抗体，所述组的单域抗体由框架区和互补决定区组成，所述互补决定区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:1-66。
2. 根据权利要求 1 所述的一组抗 BCMA 的单域抗体，所述互补决定区的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1-66 所示的氨基酸序列的同一性大于 80%、大于 85%、大于 90%、大于 95%或大于 99%，优选地，差异的氨基酸为保守替换。
3. 根据权利要求 1 所述的一组抗 BCMA 的单域抗体，所述组的单域抗体具有选自 SEQ ID NO:67-132 的氨基酸序列，或其氨基酸序列为 SEQ ID NO:67-132。
4. 根据权利要求 3 所述的一组抗 BCMA 的单域抗体，其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 67-132 所示氨基酸序列的同一性大于 80%、大于 85%、大于 90%、大于 95%或大于 99%，优选地，差异的氨基酸为保守替换。
5. 一组抗 BCMA 的单域抗体基因，所述组的单域抗体基因具有选自 SEQ ID NO:133-198 的核苷酸序列，或其核苷酸序列为 SEQ ID NO:133-198 的核苷酸序列，或编码权利要求 3 或 4 所述单域抗体的核苷酸序列。
6. 根据权利要求 5 所述的一组抗 BCMA 的单域抗体基因，其核苷酸序列与 SEQ ID NO:133-198 所示核苷酸序列的同一性大于 80%、大于 85%、大于 90%、大于 95%或大于 99%，优选地，差异的碱基为保守替换。
7. 一种多肽，具有选自权利要求 1-4 任一项所述的单域抗体组中的一个或多个单域抗体，优选地，所述的多个单域抗体相同或不同。
8. 一种表达载体，其包含选自权利要求 5 或 6 所述的单域抗体基因组的一个或多个基因，优选地，所述表达载体为原核细胞表达载体、真核细胞表达载体或其它细胞表达载体，更优选地，慢病毒载体。
9. 一种宿主细胞，其包含权利要求 8 所述表达载体，优选地，所述的宿主细胞为原核表达细胞、真核表达细胞，真菌细胞或酵母细胞，所述原核表达细胞优选大肠杆菌。
10. 一种嵌合抗原受体，其具有选自权利要求 1-4 任一项所述的单域抗体组中的一个或多个单域抗体，优选地，所述多个单域抗体相同或不同。

11. 一种嵌合抗原受体修饰的 T 细胞，由权利要求 10 所述的嵌合抗原受体进行修饰。

12. 一种药用组合物，其包含选自权利要求 1-4 任一项所述的单域抗体组中的一个或多个单域抗体作为活性成份。

13. 一种人源化形式的抗 BCMA 的单域抗体，其通过对选自权利要求 1-4 任一项所述的单域抗体组中的单域抗体进行人源化而获得。

14. 权利要求 1-4 任一项所述的单域抗体组中的单域抗体在检测 BCMA 中的应用。

15. 权利要求 1-4 任一项所述的单域抗体组中的单域抗体在阻断 BAFF 与 BCMA 之间相互作用中的应用。

16. 根据权利要求 16 所述的应用，所述单域抗体与细胞毒性剂、酶相、放射性同位素、荧光化合物或化学发光化合物中的一种或多种相连。

17. 权利要求 1-4 任一项所述的单域抗体组中的单域抗体在制备用于治疗 BCMA 表达异常相关疾病的药物的应用。

18. 根据权利要求 17 所述的应用，所述的 BCMA 表达异常相关疾病是多发性骨髓瘤性疾病。