



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101970500 B

(45) 授权公告日 2013.08.14

(21) 申请号 200980108515.0

(22) 申请日 2009.03.11

(30) 优先权数据

61/069,199 2008.03.12 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.09.10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/036739 2009.03.11

(87) PCT申请的公布数据

W02009/114585 EN 2009.09.17

(73) 专利权人 伊姆克罗尼责任有限公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 X·康 P·J·鲍德尔斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 凌立

(51) Int. Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1294517 A, 2001.05.09, 全文.

WO 96/40249 A1, 1996.12.19, 全文.

田方等. 抗人黑(素)瘤单克隆抗体免疫组化的研究.《单克隆抗体通讯》.1991,第7卷(第4期),21-23.

Dipa Patel, et, al..Generation and characterization of a therapeutic human antibody to melanoma antigen TYRP1.《Human Antibodies》.IOS Press,2007,第16卷(第3-4期),127-136.

审查员 王涛

权利要求书1页 说明书18页

序列表28页

(54) 发明名称

抗 TYRP1 抗体

(57) 摘要

本发明提供了与 TYRP1 特异性小鼠抗体 TA99 相当或更高的亲和力结合人 TYRP1 抗原的完全人抗体和嵌合抗体。本发明还提供了编码和表达这些抗体的多核酸和宿主细胞。本发明还提供了通过施用单独的或者与抗癌剂或治疗相组合的有效量抗体,在哺乳动物中调节 TYRP1 活性、治疗癌细胞生长以及治疗恶性黑素瘤的方法。

1. 特异性结合 SEQ ID NO. 28 所示的人 TYRP1 的单克隆抗体,其包含下述 VH、CDRL1、CDRL2 以及 CDRL3,所述 VH 包含 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列 QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTSYAMNWRQAPGQGLESMDGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSMDTSVSTAYLQISSLKAEDTAIYYCAPRYSSSWYLDYWGQGLTVTVSS;所述 CDRL1 序列为 SEQ ID NO:4 所示的:RASQSVSSYLA;所述 CDRL2 序列为 SEQ ID NO:5 所示的:DASNRAT;所述 CDRL3 序列为 SEQ ID NO:6 所示的:QQRSNWLMYT。

2. 权利要求 1 的抗体,其包含下述 VL 和 VH,所述 VL 包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAQYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWLYTFGQGTKLEIK,所述 VH 包含 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列 QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTSYAMNWRQAPGQGLESMDGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSMDTSVSTAYLQISSLKAEDTAIYYCAPRYSSSWYLDYWGQGLTVTVSS。

3. 权利要求 1 的抗体,其包含 SEQ ID NO:30 所示的重链以及 SEQ ID NO:32 所示的轻链。

4. 权利要求 1-3 中任一项的抗体,其包含两条 SEQ ID NO:30 所示的重链以及两条 SEQ ID NO:32 所示的轻链。

5. 分离的多核酸,其是编码权利要求 1-4 中任一项的抗体的核苷酸序列。

6. 表达载体,其包含与表达控制元件有效连接的权利要求 5 的多核酸,使得可表达所编码的抗体。

7. 重组细胞,其包含权利要求 6 的表达载体,所述重组细胞能够产生权利要求 1-4 中任一项的抗体。

8. 抗体,其通过培养权利要求 7 的重组细胞产生,使得所述抗体产生,并从培养物中回收所述抗体。

9. 药物组合物,其包含权利要求 1-4 或 8 中任一项的抗体,以及可药用载体、稀释剂或赋形剂。

10. 权利要求 1-4 或 8 中任一项的抗体在制备用于治疗恶性黑素瘤的药物中的用途。

抗 TYRP1 抗体

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 3 月 12 日提交的美国临时申请序列号 No. 61/069199 的权益。

技术领域

[0003] 本发明涉及人抗体和嵌合抗体,包括其片段或部分,其为人酪氨酸酶相关蛋白 -1 (TYRP1) 特异性的。该抗体用于治疗癌细胞的生长,并且可单独使用或与抗肿瘤剂或治疗联合使用。

背景技术

[0004] 人酪氨酸酶相关蛋白 -1 (TYRP1),也称为 gp75, (WO 91/14775) (SEQID NO:28) 是参与黑素生物合成的黑素体膜糖蛋白。其主要在黑素细胞的黑素体内发现,也发现在黑素细胞和人黑素瘤的细胞表面上表达。

[0005] TYRP1 抗原是高度免疫原性的。已在黑素瘤患者中鉴定到针对 TYRP1 的抗体和 T 细胞。细胞和体液应答似乎在体内都有效地去除黑素瘤。黑素瘤反应性 T 细胞的过继转移也导致肿瘤消退。由 TYRP1 疫苗诱导的抗体应答也可在动物中抑制黑素瘤生长和转移。

[0006] 尽管已经研究了针对黑素瘤的多种治疗选择,包括小分子抑制剂、化学治疗剂、免疫治疗,包括疫苗(例如美国专利 6,168,946)、基因治疗/免疫刺激剂以及抗血管发生剂(angiotensins),但是,目前尚没有针对黑素瘤患者的有效治疗。对于此未满足的医学需求,非常有理由开发新的治疗。

[0007] 动物研究已经发现抗体 TA99。TA99(IgG2a),人和鼠 TYRP1 特异性的鼠单克隆抗体(MAb),在体内定位于皮下人黑素瘤。参见 Welt 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:4200-4204(1987) 和美国专利 4,798,790。TA99 治疗在小鼠中抑制肿瘤生长和转移。参见 Takechi 等人,Clin Cancer Res.2:1837-42(1996)。

[0008] 用 TA99 治疗的小鼠经常失去毛色(褪色),表明破坏了皮肤中的黑素细胞。Fc 受体介导的效应器活化似乎在去除 TA99 靶向的细胞中起到关键的作用。TA99 的抗肿瘤作用在 FcR 敲除小鼠中显著降低。参见 Clynes 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)。但是,TA99 的小鼠本性意味着,由于其潜在的免疫原性问题以及其活化下游免疫效应器功能的能力会受限制,妨碍了其用作人体中的治疗。

[0009] 因此,需要提供有效治疗黑素瘤的替代性抗 TYRP1 抗体。本发明提供了有效治疗黑素瘤的替代性抗 TYRP1 抗体。

[0010] 另外,需要提供相比于本领域中已知的抗体而言具有对 TYRP1 提高的结合亲和力的替代性抗 TYRP1 抗体。本发明提供了相比于本领域中已知的抗体而言具有对 TYRP1 提高的结合亲和力的替代性抗 TYRP1 抗体。

[0011] 另外,需要提供在人体中免疫原性降低以及活化下游免疫效应器功能的能力(例如抗体依赖性细胞毒性(ADCC))改善的替代性抗 TYRP1 抗体。本发明提供了相比于本领域中已知的抗体,具有在人体中免疫原性降低以及活化下游免疫效应器功能的能力(例如抗

体依赖性细胞毒性 (ADCC)) 改善的嵌合抗体和人抗 TYRP1 抗体。

[0012] 另外还需要提供通过减少蛋白质错误折叠和错误加工来改善稳定性的替代性抗 TYRP1 抗体。本发明的优选抗体通过减少蛋白质错误折叠和错误加工改善了稳定性。

发明内容

[0013] 本发明涉及结合黑素瘤抗原 TYRP1 (SEQ ID NO :28) 的人和嵌合单克隆抗体, 以及其片段。

[0014] 本发明的一个实施方案是在环境实验室温度 (20℃ -25℃) 下以 $0.1 \times 10^{-9} \text{M}$ 至 $1.6 \times 10^{-9} \text{M}$ 范围的解离常数 K_D 特异性结合人 TYRP1 的单克隆抗体, 其中该 K_D 值由表面等离子共振确定。在本发明的其他实施方案中, 该单克隆抗体是嵌合的或人的。这些抗体能够保留特异性结合人 TYRP1 能力的片段是本发明的一部分, 尽管的这些片段的解离常数不在该范围内。

[0015] 在本发明的其他一些实施方案中, 该单克隆抗体以约 $0.1 \times 10^{-9} \text{M}$ 至约 $1.2 \times 10^{-9} \text{M}$ 、约 $0.1 \times 10^{-9} \text{M}$ 至约 $0.8 \times 10^{-9} \text{M}$ 、约 $0.1 \times 10^{-9} \text{M}$ 至约 $0.4 \times 10^{-9} \text{M}$ 、约 $0.2 \times 10^{-9} \text{M}$ 至约 $1.2 \times 10^{-9} \text{M}$ 、约 $0.2 \times 10^{-9} \text{M}$ 至约 $0.8 \times 10^{-9} \text{M}$ 、约 $0.2 \times 10^{-9} \text{M}$ 至约 $0.4 \times 10^{-9} \text{M}$ 、约 $0.2 \times 10^{-9} \text{M}$ 至约 $0.3 \times 10^{-9} \text{M}$ 或约 $0.28 \times 10^{-9} \text{M}$ 的 K_D 特异性结合人 TYRP1。

[0016] 本发明的一个实施方案是结合 TYRP1 的抗体或其片段, 该 TYRP1 包含具有序列 GYTFTSYAMN (SEQ ID NO :1) 的 CDRH1, 具有序列 WINTNTGNPTYAQGFTG (SEQ ID NO :2) 的 CDRH2, 具有序列 RYSSSWYLDY (SEQ ID NO :3) 的 CDRH3, 具有序列 RASQSVSSYLA (SEQ ID NO :4) 的 CDRL1, 具有序列 DASNRAT (SEQ ID NO :5) 的 CDRL2, 以及具有序列 QQRSNWLMYT (SEQ ID NO :6) 的 CDRL3, 其中该抗体还包含该 CDR 序列之一中的氨基酸取代。在另一个实施方案中, 上述 CDR 在 CDR 序列之一中不具有氨基酸取代。在另一个实施方案中, 具有上述 CDR 的抗体以 $0.1 \times 10^{-9} \text{M}$ 至 $1.6 \times 10^{-9} \text{M}$ 范围的解离常数 K_D 特异性结合人 TYRP1。

[0017] 在本发明的另一个实施方案中, 特异性结合 TYRP1 的抗体或其片段还包含下述 CDR 序列之一中的氨基酸取代, 该 TYRP1 包含具有 GFNIKDYFLH (SEQ ID NO :7) 的 CDRH1、具有序列 WINPDNGNTVYDPKFQG (SEQ ID NO :8) 的 CDRH2、具有序列 DYTYEKAALDY (SEQ ID NO :9) 的 CDRH3、具有序列 RASGNIYNYLA (SEQ ID NO :10) 的 CDRL1、具有序列 DAKTLAD (SEQ ID NO :11) 的 CDRL2, 以及具有序列 QHFWSLPFT (SEQ ID NO :12) 的 CDRL3。在另一个实施方案中, 上述 CDR (SEQ ID NO :7-12) 没有任何氨基酸取代。

[0018] 本发明的另一个实施方案是结合 TYRP1 的抗体或其片段, 其包含

[0019] 具有下述序列的 VL :

[0020] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDA

[0021] SNRATGIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWLMYTFGQG

[0022] TKLEIK (SEQ ID NO :16)

[0023] 以及具有下述序列的 VH

[0024] QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLECMG

[0025] WINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSMDTSVSTAYLQISSLKAEDTAIYYCAPRY

[0026] SSSWYLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO :13)

[0027] 或

[0028] QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTSYAMNWRQAPGQGLESMG

[0029] WINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSMDTSVSTAYLQISSLKAEDTAIYYCAPRY

[0030] SSSWYLDYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO :14) . .

[0031] 本发明的另一个实施方案是包含 SEQ ID NO :29 的重链和 SEQ ID NO :32 的轻链 ; 或者 SEQ ID NO :30 的重链和 SEQ ID NO :32 的轻链的单克隆抗体。在一个实施方案中, 抗体包含 SEQ ID NO :29 的两条重链和 SEQ ID NO :32 的两条轻链, 或者包含 SEQ ID NO :30 的两条重链和 SEQ ID NO :32 的两条轻链。这些抗体的 TYRP1 结合片段是本发明的一部分。

[0032] 本发明还涉及编码这些抗体及其部分的分离的 DNA。本发明的其他一些实施方案包含编码该抗体或其片段的核苷酸序列的分离的多核酸 ; 包含与表达序列连接的该核苷酸序列的表达载体或者包含该表达载体的重组宿主细胞, 或者其中该细胞表达该抗体或其片段的重组宿主细胞或其后代。本发明的另一个实施方案是产生或纯化抗体或其片段的方法, 其包括在允许该抗体或其片段表达的条件下培养该细胞。

[0033] 另外, 本发明涉及通过施用有效量抗体抑制癌细胞生长的方法, 以及治疗黑素瘤的方法, 其全部是在哺乳动物中。本发明的一个实施方案是使用上述抗体或其片段作为药物。在另一个实施方案中, 上述抗体或其片段将用于治疗癌症, 包括但不限于恶性黑素瘤。

[0034] 在另一个实施方案中, 本发明提供了本发明抗体在制备用于治疗癌症的药物中的用途。在一个优选实施方案中, 该癌症是恶性黑素瘤。

[0035] 该抗体可单独使用或与抗肿瘤剂或治疗联合使用。本发明的一个实施方案是将上述抗体与其他抗癌剂或治疗联合使用。在另一个实施方案中, 该抗癌剂是达卡巴嗪 (dacarbazine)。

[0036] 发明详述

[0037] 本发明提供了 TYRP1 抗原特异性的人抗体和嵌合抗体及其片段, 以及编码该抗体的分离或纯化多核苷酸序列。本发明的抗体可用于治疗肿瘤疾病, 包括实体和非实体肿瘤, 以及用于治疗过度增殖性疾病。除非另作说明, 术语抗体包括结合 TYRP-1 的片段。本文的结合参数是针对全长抗体, 不针对片段, 其由于大小不同必然具有不同的结合参数。

[0038] 天然抗体通常具有两条相同的重链和两条相同的轻链, 每个轻链通过链内二硫键与重链共价相连。多个二硫键还将两条重链彼此相连。本文使用的术语“抗体”包括包含 4 条多肽链的免疫球蛋白分子, 通过二硫键彼此相连的两条重链 (H) 和两条轻链 (L)。各个链可折叠成具有类似大小的结构域 (110-125 个氨基酸) 和结构, 但是具有不同功能。

[0039] 轻链可包含一个可变结构域 (本文缩写为 VL) 和 / 或一个恒定结构域 (本文缩写为 CL)。抗体 (免疫球蛋白) 的轻链是 κ 或 λ 轻链。本文使用的表述 VL 旨在包括 κ 型轻链 (V_{κ}) 和 λ 型轻链 (V_{λ}) 的可变区。轻链恒定区由一个结构域 CL 构成。

[0040] 重链也可包含一个可变结构域 (本文缩写为 VH) 和 / 或根据抗体的类别或同种型, 三个或四个恒定结构域 (CH1、CH2、CH3 和 CH4) (本文总体缩写为 CH)。在人中, 该同种型是 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, IgA 和 IgG 进一步又分为亚类或亚型 (IgA_{1-2} 和 IgG_{1-4})。本发明包括任意上述类型或亚类 (同种型) 的抗体。人 IgG_1 是本发明抗体的优选同种型。

[0041] 通常, 该可变结构域在不同抗体之间显示相当多的氨基酸序列可变性, 特别是在抗原结合部位处。在每个 VL 和 VH 中发现称为高可变区或者互补决定区 (CDR) 的三个区域, 其由称为构架可变区 (FR) 的较少可变的区域所支持 (support)。根据 Kabat

规则 (Kabat 等人 Ann. NY Acad. Sci. 190 :382-93(1971) ;Kabat, 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242(1991)) 将氨基酸分配给特定 CDR 区域或结构域。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 组成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0042] 由 VL 和 VH 结构域组成的抗体的部分称为 Fv(Fragment variable) 并构成抗原结合部位。单链 Fv(scFv) 是在一条多肽链上含有 VL 结构域和 VH 结构域的抗体片段,其中一个结构域的 N 端和另一个结构域的 C 端通过柔性接头相连(参见,例如美国专利 No. 4,946,778(Ladner 等人);W088/09344, (Huston 等人);WO 92/01047(McCafferty 等人)描述了 scFv 片段在可溶性重组遗传展示包装(比如噬菌体)表面上的展示。

[0043] 用于产生单链抗体的肽接头可以是柔性肽,其选择以确保 VL 和 VH 结构域发生正确的三维折叠。该接头一般为 10 至 50 个氨基酸残基。优选地,该接头一般为 10 至 30 个氨基酸残基。更优选地,该接头一般为 12 至 30 个氨基酸残基。最优选的接头是 15 至 25 个氨基酸残基。这些接头肽的实例包括 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃。

[0044] “分离抗体”是 (1) 从组分的混合中部分、基本上或完全纯化的抗体;(2) 已从组分的天然环境中鉴定和分离和 / 或回收的抗体;(3) 单克隆抗体;(4) 不含来自相同物种的其他蛋白质的抗体;(5) 由来自不同物种的细胞表达的抗体;或者 (6) 自然界不存在的抗体。其天然环境的杂质组分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,其可包括酶、激素及其他蛋白质或非蛋白质溶质。分离抗体的实例包括已经亲合纯化的抗体,由杂交瘤或其他细胞系体外产生的抗体,以及来自于转基因小鼠的人抗体。

[0045] 本文使用的术语“单克隆抗体”指获得自基本上纯 (homogeneous) 的抗体群体的抗体,例如,包含基本上相同的各个抗体的群体,可能存在的可能天然突变或者次要翻译后变化除外。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原位点(也称为决定簇或表位)。此外,与通常包括针对不同决定簇的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂不同,每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰形式“单克隆的”表示获得自基本上纯的抗体群体的抗体特性,不被视为需要通过任何特定方法生产抗体。

[0046] 本文使用的术语“抗体”也包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和 / 或轻链的部分与来自于特定物种或属于特定抗体类型或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而该链的其余部分与来自于另一个物种(例如小鼠或大鼠)或属于另一个抗体类型或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及这些抗体的片段,只要它们显示希望的生物学活性。参见例如 Morrison 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :6851-6855(1984))。因此,本发明包括,例如,包含嵌合重链和 / 或嵌合轻链的嵌合抗体。嵌合重链可包含与非人抗体的重链恒定区融合的本文所述的任何重链可变区 (VH) 或者其突变体或变体。嵌合轻链可包含与非人抗体的轻链恒定区融合的本文所述的任何轻链可变区 (VL) 或者其突变体或变体。

[0047] 本文使用的术语“人抗体”,包括具有对应于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体(如 Kabat 等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 所述)。本发明的人抗体可包含不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如体外随机或位点特异性诱变引入或者体内体细胞突变引入的突变),例如在 CDR 中。人抗体可具有

至少一个由氨基酸残基替换的位置,例如不由人种系免疫球蛋白序列编码的活性增强的氨基酸残基。但是,本文使用的术语“人抗体”不旨在包括其中来自于另一个哺乳动物物种种系(例如小鼠)的CDR序列移植于人构架序列上的抗体。

[0048] 短语“重组人抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的人抗体,例如使用转染进宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体,分离自重组、组合人抗体文库的抗体,分离自人免疫球蛋白基因转基因的动物的抗体,或者通过包括将人免疫球蛋白基因序列与其他DNA序列剪接的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。这些重组人抗体具有来自于人种系源免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(参见Kabat等人,见上文)。

[0049] Fc(片段结晶(Fragment crystallization))是包含成对重链恒定结构域的抗体部分或片段的名称。在IgG抗体中,例如,Fc包含CH2和CH3结构域。IgA或IgM抗体的Fc还包含CH4结构域。Fc与Fc受体结合、补体介导的细胞毒性和ADCC的活化相关联。对于作为多个IgG样蛋白质复合物的诸如IgA和IgM的抗体,复合物形成需要Fc恒定结构域。

[0050] 因此,本发明的抗体包括但不限于天然抗体、抗体、人抗体、人源化抗体、重组人抗体、单克隆抗体、其消化片段、特定部分和变体,包括抗体模拟物或者包含模拟抗体或其特定片段或部分的结构和/或功能的抗体部分;其各自含有至少一个CDR。功能性片段包括结合TYRP1抗原的抗原结合片段。例如,抗体片段能够结合TYRP1或其部分,本发明所涵盖的包括二价片段例如具有完整链内二硫键的(Fab')₂,单价片段例如Fab(抗原结合片段),其表示由VL、CL、VL、CH1结构域组成并且未保留重链铰链区(例如通过木瓜蛋白酶消化)的抗体片段,保留重链铰链区的fabs,facb(例如通过纤维蛋白酶消化),F(ab')₂,缺少二硫键的Fab',pFc'(例如通过胃蛋白酶或纤维蛋白酶消化),Fd(例如通过胃蛋白酶消化,部分还原和再聚集)以及Fv或scFv(例如通过分子生物学技术)。抗体片段还旨在包括,例如结构域缺失的抗体、线性抗体、单链抗体、scFv、单结构域抗体、多价单链抗体、由抗体片段形成的多特异性抗体,包括特异性结合抗原的双抗体、三抗体等。

[0051] 铰链区将抗体的Fab和Fc部分分开,提供了Fab彼此之间以及相对于Fc的可动性,以及包括多个二硫键用以两个重链的共价连接。

[0052] 本发明的抗体或其片段是TYRP1特异性的。抗体特异性指抗体选择性识别抗原的特定表位。例如,本发明的抗体或其片段,可以是单特异性的、双特异性的或者多特异性的。双特异性抗体(BsAb)是具有两种不同抗原结合特异性或位点的抗体。多特异性抗体具有超过两种不同的抗原结合特异性或位点。在抗体具有超过一种的特异性时,所识别的表位可以与单个抗原或者与多于一个的抗原相关联。因此,本发明提供了结合两种不同抗原的双特异性抗体或其片段,其具有至少一种对TYRP1的特异性。

[0053] 本发明提供了TYRP1特异性的分离抗体或其片段。TYRP1蛋白是哺乳动物的,其优选是人的。在一个特别优选的实施方案中,本发明的抗体能够结合人TYRP1和小鼠TYRP1[Shibahara等人,Nucleic Acids Res. 14(6) 2413-2427(1986)],因此,可用于临床前和临床体内研究。本发明的抗体能够具有一种或多种下列活性:1)显示专门对TYRP1的高结合亲和性;和2)体外和体内抑制肿瘤生长。

[0054] 可以根据亲合力和/或抗体亲抗原性确定本抗体或其片段对TYRP1的特异性。由抗原与抗体解离的平衡常数(K_d)代表的亲合力度量抗原决定簇与抗体结合部位之间的结合强度。

[0055] 本发明的抗体或其片段还包括通过定向突变；亲合力成熟、噬菌体展示或者链改组 (chain shuffling) 的方法修饰或改善结合特征的那些。可通过突变 CDR 和筛选具有所需特征的抗体结合部位来修饰或改善亲合力和特异性 (参见, 例如 Yang 等人, J. Mol. Biol., (1995) 254 :392-403)。CDR 以多种方式突变。一种方式是将各个残基或残基组合随机化, 使得在否则相同的抗体结合部位的群体中, 所有二十种氨基酸存在于特定位置上。作为替代地, 可以通过易错 PCR 方法在 CDR 残基范围内诱导突变 (参见例如 Hawkins 等人, J. Mol. Biol., (1992) 226 :889-896)。例如, 含有重链和轻链可变区基因的噬菌体展示载体可以在大肠杆菌 (E. coli) 突变体菌株中扩增 (参见, 例如 Low 等人, J. Mol. Biol., (1996) 250 :359-368)。这些诱变方法是本领域技术人员已知的许多方法中的示例。

[0056] 产生取代变体的一种便利方法是使用噬菌体展示的亲合力成熟。简言之, 突变几个 CDR 区域的位点, 产生每个位点所有可能的氨基酸取代。由此产生的抗体变体作为在每个颗粒中包装的与 M13 的基因 III 产物的融合物以单价形式展示于丝状噬菌体颗粒。然后, 针对本文公开的生物学活性 (例如结合亲合力、特异性、IC₅₀、EC₅₀、K_D) 筛选噬菌体展示变体。为了鉴定用于修饰的候选 CDR 区域位点, 可进行丙氨酸扫描诱变, 以鉴定对抗原结合有显著贡献的 CDR 区域残基。作为替代地或者另外地, 可在一个或多个残基位置对一个或多个 CDR 序列进行随机诱变, 而 CDR 有效连接可变区或者 CDR 独立于其他可变区序列, 然后使用重组 DNA 技术将改变的 CDR 回复到可变区。一旦产生并表达这些变体抗体, 如本文所述对变体组进行筛选, 可选择在一个或多个相关测定中具有优越性能的抗体用以进一步开发。

[0057] 如本发明所述, 除了本文具体描述的抗体之外, 可利用本领域技术人员公知的多种重组 DNA 技术容易地设计和制备其他“基本上纯的”经修饰抗体。例如, 构架区在一级结构水平上可与天然序列相差数个氨基酸取代、末端和中间添加和缺失等。此外, 多种不同的人构架区可单独或组合用于本发明人源化免疫球蛋白的基础。一般说来, 基因的修饰可通过多种公知方法例如定点诱变容易地实现。

[0058] 本发明包括 TYRP1 结合多肽, 其具有基本上与该全长抗 TYRP1 抗体的可变区或高变区相同的氨基酸序列。基本上相同的氨基酸序列在本文中定义为与另一个氨基酸序列有至少 70%, 优选至少约 80%, 更优选至少约 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同源性, 如根据 Pearson 和 Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85 :2444-8) 的 FASTA 检索方法所确定的。

[0059] 本发明的抗体或其片段包括具有选自表 1 所示 CDR 的氨基酸序列的一个、二个、三个、四个、五个和 / 或六个互补决定区 (CDR) 的人抗体。

[0060] 在另一个实施方案中, 本抗体或其片段可具有下文所示的 20D7 或 20D7S 的重链可变区, 和 / 或 20D7 或 20D7S 的轻链可变区。20D7 和 20D7S 是特别优选的本发明抗体。这些抗体具有人 VH 和 VL 构架区 (FR) 以及人 CDR。

[0061] 本发明包括编码抗 TYRP1 抗体重链的核酸序列, 其包含本文公开的任一 VH 区或其部分, 或者任一 VH CDR, 包括其任何变体。本发明也包括编码抗 TYRP1 抗体轻链的核酸分子, 其包含本文公开的任一 VL 区或其部分, 或者任一 VL CDR, 包括其任何变体。

[0062] 本发明抗体的每个结构域可以是具有重链或轻链可变结构域的完整抗体, 或者可以是功能等同物或者天然结构域的突变体或衍生物, 或者构建的合成结构域, 例如体外使

用例如 WO 93/11236 (Griffiths 等人) 所述的技术。例如,可能将缺少至少一个氨基酸的对应于抗体可变结构域的结构域连接在一起。还包括具有 CDR 序列之一中一个或多个氨基酸取代、突变或缺失的抗体。重要特征性特点是每个结构域与互补结构域相关联形成抗原结合部位的能力。因此,术语可变重链和轻链片段不应解释为排除不具有对特异性有作用的物质的变体,包括 CDR 的变体。

[0063] 本发明的抗体可以通过本领域已知的方法产生。这些方法包括 Kohler 和 Milstein, Nature 256 :495-497 (1975) 以及 Campbell, Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas, Burdon 等人编著, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 第 13 卷, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985) 所述的免疫学方法和 Huse 等人, Science 246 :1275-1281 (1989) 所述的重组 DNA 方法。

[0064] 可通过切割整个抗体或者通过表达编码该片段的 DNA 来产生抗体片段。可通过 Lamoyi 等人, J. Immunol. Methods 56 :235-243 (1983) 和 Parham, J. Immunol. 131 :2895-2902 (1983) 所述的方法制备抗体片段。这些片段可含有一个或两个 Fab 片段或者 F(ab')₂ 片段。这些片段还可含有单链片段可变区抗体,即 scFv、双抗体或者其他抗体片段。产生这些功能等同物的方法公开于 PCT 申请 WO 93/21319、欧洲专利申请 No. 239,400 ; PCT 申请 WO 89/09622 ;欧洲专利申请 338,745 ;以及欧洲专利申请 EP332,424。

[0065] 用于转化载体和表达本发明抗体的优选宿主细胞是哺乳动物细胞,例如 NSO 细胞(非分泌(0)小鼠骨髓瘤细胞)、293 和 CHO 细胞以及其他淋巴来源的细胞系,例如淋巴瘤、骨髓瘤或杂交瘤细胞。可选择性使用其他真核宿主,例如酵母。

[0066] 转化的宿主细胞通过本领域中已知的方法培养于含有可同化碳源(糖类例如葡萄糖或乳糖)、氮源(氨基酸、肽、蛋白质或其降解产物例如蛋白胨、铵盐等)以及无机盐(钠、钾、镁和钙的硫酸盐、磷酸盐和/或碳酸盐)的液体培养基中。该培养基还含有,例如,生长促进物质,例如微量元素,例如铁、锌、锰等。

[0067] 当希望在酵母中表达基因构建物时,用于酵母的合适选择基因是在酵母质粒 YRp7 中存在的 trp1 基因。Stinchcomb 等人 Nature, 282 :39 (1979) ;Kingsman 等人, Gene, 7 :141 (1979)。trp1 基因提供了缺少在色氨酸中生长的能力的突变酵母菌株的选择标记,例如 ATCC No. 44076 或 PEP4-1。Jones, Genetics, 85 :12 (1977)。因此,酵母宿主细胞基因组中 trp1 损伤的存在提供了用于通过在缺乏色氨酸时生长检测转化的有效环境。类似地,Leu2 缺乏酵母菌株(ATCC 20,622 或 38,626)由带有 Leu2 基因的已知质粒来补偿。

[0068] 本发明的抗体可通过本领域中任何已知方法分离或纯化,包括通过硫酸铵或硫酸钠沉淀,然后对盐水进行透析;离子交换层析;亲和或免疫亲和层析以及凝胶过滤或区带电泳。本发明抗体的优选纯化方法是蛋白 A 亲和层析。

[0069] 编码人抗体的 DNA 可通过重组除了 CDR 之外的编码基本上或排他地来源于对应人抗体区域的人恒定区和可变区的 DNA 以及编码来源于人的 CDR 的 DNA 来制备。

[0070] 编码抗体片段的合适 DNA 来源包括表达全长抗体的任何细胞,例如杂交瘤和脾细胞。该片段本身可用作抗体等同物,或者可重组为如上所述的等同物。该部分中所述的 DNA 缺失和重组可通过公知方法进行。如本领域中已知的,另一个 DNA 来源是抗体的噬菌体展示文库。本发明举例的抗体通过杂交瘤技术从免疫的小鼠制备。

[0071] 另外,本发明提供了含有与表达序列、启动子和增强子序列有效连接的上述多核苷酸序列的表达载体。已经开发了用于在原核体系(例如细菌)和真核体系(包括但不限于酵母和哺乳动物细胞培养体系)中有效合成抗体多肽的多种表达载体。本发明的载体可包含染色体区段、非染色体和合成 DNA 序列。

[0072] 可使用任何合适表达载体。例如,原核克隆载体包括来自大肠杆菌的质粒,例如 colE1, pCR1, pBR322, pMB9, pUC, pKSM 和 RP4。原核载体还包括噬菌体 DNA 的衍生物例如 M13 以及其他丝状单链 DNA 噬菌体。可用于酵母的载体实例有 2 μ 质粒。用于在哺乳动物细胞中表达的合适载体包括公知的 SV-40 衍生物、腺病毒、反转录病毒来源的 DNA 序列和来源于功能性哺乳动物载体组合的穿梭载体,例如上文所述的那些,以及功能性质粒和噬菌体 DNA。

[0073] 其他真核表达载体是本领域中已知的(例如 P. J. Southern 和 P. Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1:327-341(1982); Subramani 等人, Mol. Cell. Biol. 1:854-864(1981); Kaufmann 和 Sharp, J. Mol. Biol. 159:601-664(1982); Scallan 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4654-4659(1983); 以及 Urlaub 和 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220(1980)。

[0074] 可用于本发明的表达载体含有至少一个表达控制序列,其有效连接待表达的 DNA 序列或片段。将控制序列插入载体,以控制和调节所克隆的 DNA 序列的表达。可用的表达控制序列实例有 lac 系统、trp 系统、tac 系统、trc 系统、 λ 噬菌体的主要操纵子和启动子区域、fd 衣壳蛋白的控制区、酵母糖酵解启动子例如 3-磷酸甘油酸激酶、酵母酸式磷酸酶启动子例如 Pho5、酵母 α 交配因子启动子、以及来源于多瘤病毒、腺病毒、反转录病毒和猿猴病毒的启动子例如早期和晚期启动子或 SV40,以及已知控制原核或真核细胞以及它们的病毒表达的其他序列或者其组合。

[0075] 本发明还提供了含有上述表达载体的重组宿主细胞。本发明抗体可在杂交瘤之外的细胞系中表达。包含编码本发明多肽的序列的核酸可用于转化合适的哺乳动物宿主细胞。

[0076] 根据高水平表达、组成型表达目的蛋白质以及最少的来自宿主蛋白质的污染来选择具体的细胞系。可用作表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域公知的,包括许多永生细胞系,例如但不限于 NS0 细胞(非分泌(0)小鼠骨髓瘤细胞)、小鼠骨髓瘤细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞等等。其他合适真核细胞包括酵母及其他真菌。可用的原核宿主包括,例如大肠杆菌,例如大肠杆菌 SG-936、大肠杆菌 HB 101、大肠杆菌 W3110、大肠杆菌 X1776、大肠杆菌 X2282、大肠杆菌 DHI 和大肠杆菌 MRC1,假单胞菌属(Pseudomonas),芽孢杆菌属(Bacillus)例如,枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)和链霉菌属(Streptomyces)。

[0077] 这些本发明重组宿主细胞可用于产生抗体或其片段,其通过在允许该抗体或其片段表达的条件下培养该细胞以及从该宿主细胞或宿主细胞周围的培养基中纯化该抗体或其片段来进行。可通过在目的抗体编码基因的 5' 端插入信号或分泌前导肽编码序列来利于所表达的抗体或片段在重组宿主细胞中靶向分泌(参见, Shokri 等人, (2003) Appl Microbiol Biotechnol. 60(6):654-664, Nielsen 等人, Prot. Eng. (1997) 10:1-6 和 von Heinje 等人, (1986) Nucl. Acids Res. 14:4683-4690)。这些分泌前导肽成分可来源于原核

或真核序列。因此,适当地使用分泌前导肽,连接于多肽 N 端的氨基酸,以引导多肽从宿主细胞胞质溶胶中移出并分泌进入培养基。

[0078] 本发明的抗体可以与另外的氨基酸残基融合。这些氨基酸残基可以是肽标签,可能便于分离。还可考虑其他使得该抗体归巢到具体器官或组织的氨基酸残基。

[0079] 制备本发明抗体的另一个实施方案是在转基因动物中表达编码本发明抗体的核酸,该转基因动物具有插入的人抗体产生基因组的实质部分并且缺乏内源抗体的产生。转基因动物包括但不限于小鼠、山羊和兔。本发明的另一个实施方案包括在例如动物乳腺中表达抗体编码基因,从而在哺乳过程中分泌该多肽。

[0080] 本发明还提供了通过向哺乳动物施用有效量抗体治疗哺乳动物中肿瘤生长的方法。本发明待治疗的合适肿瘤优选表达 TYRP1。不受任何具体机制的限制,本方法提供了对包括恶性黑素瘤的癌细胞生长的治疗。本发明上下文中的“治疗”指治疗性处理,包括抑制、减缓、减轻或逆转与疾病或病症相关的下列病症或非预期生理变化的进程,改善病症的临床症状或者预防病症临床症状的出现。有益或希望的临床结果包括但不限于症状的减轻、疾病或障碍程度的降低或者、疾病或障碍稳定(即,疾病或障碍不恶化)、疾病或障碍发展延迟或减缓、疾病或障碍的改善或缓和、以及疾病或障碍的缓解(部分或全部),不论是可检出的或不可检出的。“治疗”还可表示,与未接受治疗时的预期存活相比,存活延长。需要治疗的包括已患疾病的那些。在一个实施方案中,本发明可用作药物。

[0081] 术语“黑素瘤”包括但不限于黑素瘤、转移性黑素瘤、来源于黑素细胞或黑素细胞相关色素痣细胞的黑素瘤、黑素细胞癌、黑素上皮癌、黑肉瘤、原位黑素瘤、浅表扩散性黑素瘤、葡萄膜黑素瘤(modular melanoma)、雀斑恶性黑素瘤、肢端雀斑黑素瘤、侵入性黑素瘤以及家族非典型性葡萄膜黑素瘤(familial atypical mole and melanoma, FAM-M)综合征。在本发明的一个实施方案中,黑素瘤是具体的癌症形式。在另一个实施方案中,黑素瘤可以是恶性的。如下所述,本发明的一个实施方案利用目前描述的抗 TYRP1 抗体治疗一线黑素瘤。在另一个实施方案中,目前描述的抗 TYRP1 抗体是转移性黑素瘤的一线治疗,即它们将用于新诊断的转移性黑素瘤的第一轮治疗。

[0082] 在本发明方法中,向有此需要的哺乳动物施用治疗有效量的本发明抗体。用于治疗本文该疾病的本发明组合物的有效剂量根据许多不同因素而不同,所述因素包括施用方式、目标部位、患者生理状态、患者是人还是动物、施用的其他药物以及治疗是治疗性的还是预防性的。本文使用的术语施用表示通过可实现所追求结果的任何方法将本发明抗体递送至哺乳动物。它们可通过例如静脉内或肌肉内施用。尽管本发明的人抗体特别适合用于施用给人,但是它们也可施用给其他哺乳动物。本文使用的术语哺乳动物旨在包括但不限于人、实验动物、家庭宠物和家畜。治疗有效量表示在施用给哺乳动物时有效产生所需治疗作用例如抑制肿瘤生长的本发明抗体量。可使用本领域技术人员已知的常规方法滴定(titrate)治疗剂量,以优化安全性和有效性。

[0083] 本发明的药物组合物可包括“治疗有效量”的本发明抗 TYRP1 抗体。“治疗有效量”表示在给药时以及所需的时间段内有效实现所需治疗结果的量。抗体的治疗有效量可根据例如下列因素而变化,该因素例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及抗体或抗体部分在个体中引发所需应答的能力。治疗有效量也为:其治疗有益作用超过了抗体或抗体部分任何有毒或有害作用。可调节给药方案以提供最佳的所需应答(例如治疗或预防性应

答)。

[0084] 这些疾病的鉴定也在本领域技术人员的能力和知识范围内。例如,患有恶性黑色素瘤或者处于发生临床显著症状风险的人类个体适于施用本发明的抗 TYRP1 抗体。

[0085] 以足以抑制或减少肿瘤或病理状态发展的量,向患有恶性黑色素瘤的患者治疗性施用本发明的抗 TYRP1 抗体。发展包括,例如肿瘤或病理病症的生长、侵袭、转移和 / 或复发。足以实现这些的量定义为治疗有效剂量。有效实现此用途的量将基于疾病的严重程度和患者自身免疫系统的整体状态。给药方案也会随着疾病状态和患者状态的变化而变化,通常从单次浓注给药或连续输注至每天多次施用(例如每 4-6 小时),或者根据给予治疗的医生和患者状态所示。本发明抗体治疗有效量的示例性非限制性范围是 0.1-50mg/kg,更优选 3-35mg/kg,更优选 5-20mg/kg。给药量和频率将由治疗患者的医生来确定,可包括每天、每周三次、每周、每两周一次或者频率更低地给予小于 1mg/kg 至高于 100mg/kg 的剂量。每次施用的剂量可以在 1-100、2-75 或 5-60mg/kg 的范围内。然而,应当指出本发明不限于任何特定的剂量。

[0086] 在本发明的一个实施方案中,抗 TYRP1 抗体可以与一种或多种其他抗肿瘤剂联合施用。可使用任何合适抗肿瘤剂,例如化疗剂、放射或其组合。抗肿瘤剂可以是烷化剂或抗代谢物。烷化剂的实例包括但不限于顺铂、环磷酰胺、美法仑和达卡巴嗪(DTIC)。体内研究显示对于人 624mel 异种移植物的 20D7 与达卡巴嗪(DTIC)联合施用证明了比单独治疗更强的抗肿瘤活性。在本发明的一个实施方案中,目前所述的抗 TYRP1 抗体与达卡巴嗪联合施用。抗代谢物的实例包括但不限于多柔比星、柔红霉素、紫杉醇、伊立替康(CPT-11)和拓扑替康。当该抗肿瘤剂是放射时,该放射的来源可以是在待治疗患者的外部(外粒子束放射疗法(external beam radiation therapy-EBRT))或者内部(近距离放射治疗(brachytherapy-BT))。所施用的抗肿瘤剂的剂量取决于多个因素,包括例如药物类型、待治疗肿瘤类型和严重程度以及该药物的施用途径。然而应强调本发明不限于任何特定的剂量。

[0087] 在本发明中,可使用任何合适方法或途径施用本发明的抗 TYRP1 抗体,任选地,与抗肿瘤剂和 / 或其他受体拮抗剂共施用。本发明所用的抗肿瘤剂方案包括任何被认为最佳适用于治疗患者肿瘤病症的方案。不同的恶性肿瘤可能需要使用特异性的抗肿瘤抗体和特异性的抗肿瘤剂,其将针对患者个体各个确定。施用途径包括,例如,经口、静脉内、腹膜内的、皮下或肌内施用。优选肠胃外途径。然而应强调本发明不限于任何特定的方法或施用途径。

[0088] 在本发明的另一个方面中,本发明的抗 TYRP1 抗体可以化学地或生物合成地连接一种或多种抗肿瘤剂或抗血管发生剂。

[0089] 本发明还计划在可检测信号产生剂与该抗体缀合的诊断系统中与靶向部分或报告物部分相连的抗 TYRP1 抗体,包括例如仅仅抗肿瘤剂、其他抗体或报告物,例如放射性标记同位素。

[0090] 很清楚,本发明的抗 TYRP1 抗体在以预防或治疗目的用于哺乳动物中时,将以另外包含可药用载体的组合物的形式施用。合适的可药用载体包括,例如水、盐水、磷酸缓冲盐溶液、葡萄糖、甘油、乙醇中的一种或多种以及其组合。可药用载体还可包含次要量的助剂物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其提高了结合蛋白的保存期限或有效性。如本领域中公知的,可配制注射组合物以提供在施用给哺乳动物后快速、持续或延迟释

放活性成分。

[0091] 此外,本发明的范围内还包含本发明抗体在体内和体外用于研究或诊断方法的用途,其是本领域中公知的。诊断方法包括含有本发明抗体的试剂盒。

[0092] 在一个实施方案中,本发明是 TYRP1 特异性的人单克隆抗体或其片段。在另一个实施方案中,本发明是 TYRP1 特异性的嵌合单克隆抗体或其片段。在另一个实施方案中,该抗体的 CDR 区与 CTA99 的 CDR 区相同。在一个不同的实施方案中,该抗体的 CDR 区与 20D7 或 30D7S 的 CDR 区相同。

[0093] 在一个实施方案中,该抗体在环境实验室温度 (20℃ -25℃) 下以 $1.7 \times 10^{-4} 1/s$ (sec^{-1} , 1/秒) 至 $5 \times 10^{-4} 1/s$ 的解离速率常数 (K_d 或 k_{off}) 接合 TYRP1,如本文所述通过表面等离子共振所测。在另一个实施方案中,该抗体以 $1.7 \times 10^{-4} 1/s$ 至 $3.5 \times 10^{-4} 1/s$ 的 K_d 或 k_{off} 结合 TYRP1。在另一个实施方案中,该抗体以在相同条件下所测的 20D7、20D7S 或 CTA99 的解离速率常数的 10% 内的解离速率常数结合 TYRP1,如表面等离子共振所测。

[0094] 本发明的一个实施方案包括 TYRP1 特异性的单克隆抗体或其片段,其包含一个或多个选自表 1 和 2 的 CDR 的互补决定区 (CDR)。在另一个实施方案中,本发明是具有序列为 RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:4) 的轻链 CDR1 区域的 TYRP1 特异性单克隆抗体或其片段。在另一个实施方案中,本发明是具有序列为 :RYSSSWYLDY (SEQ ID NO:3) 的重链 CDR3 的 TYRP1 特异性单克隆抗体或其片段。在一个不同的实施方案中,本发明是下述单克隆抗体或其片段,其包含 (i) 选自 20D7、20D7S 和 CTA99 的轻链可变区,和 (ii) 选自 20D7、20D7S 和 CTA99 的重链可变区。在另一个实施方案中,本发明的下述 TYRP1 特异性单克隆抗体或其片段,其包含 (i) CTA99 的轻链可变区, (ii) CTA99 的重链可变区,和 (iii) 人免疫球蛋白 G1 (hIgG₁) 恒定区。

[0095] 本发明的另一个实施方案是治疗哺乳动物中癌症的方法,其包括向哺乳动物施用有效量的已述任意实施方案的抗体或其片段。本发明还提供了治疗恶性黑素瘤的方法。本发明提供的另一种治疗方法将使用本发明抗体或其片段与施用另外抗癌剂或治疗相组合。在一种治疗方法中,该抗癌剂是达卡巴嗪 (DTIC)。

[0096] 应理解并预期,本领域技术人员可对本文公开的本发明原理做出改变,并且认为这些改变包含在本发明的范围内。

[0097] 本文提及的所有参考文献完整并入本文。

实施例

[0098] 随后的实施例进一步阐述本发明,但不应以任何方式视为对范围的限制。但是,它们不应以任何方式解释为对本发明宽范围的限制。对常规方法的详细说明可得自许多出版物,例如用于构建载体和质粒的方法,将编码多肽的基因插入这些载体和质粒的方法,将质粒引入宿主细胞的方法,以及基因和基因产物表达和对其测定的方法,该出版物包括 Sambrook, J. 等人, (1989) Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press。

[0099] 动物和细胞系

[0100] 在含有 10 % 热灭活胎牛血清 (HyClone Laboratories, Logan, UT) 的 RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies) 中维持 SKmel28、SKmel23、624mel、1102mel 和

A375, 定期检测支原体污染。SKmel23 和 SKmel28 由 Alan Houghton 博士 (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY) 提供。624mel 和 1102mel 获得自 Steve Rosenberg 博士 (National Cancer Institute, Bethesda, MD)。A375 购自美国典型培养物保藏中心 (Manassas, VA)。六至八周龄雌性 Nu/Nu 小鼠购自 Taconic Farms (Germantown, NY)。

[0101] 人和嵌合抗 TYRP1 抗体的表达和纯化

[0102] 对于每种抗体, 通过合适方法, 例如 PCR 克隆, 将合适的重链核苷酸序列, 例如 SEQ ID NO: 21、22 或 23 (分别针对 20D7、20D7S 和 CTA99), 置于合适的表达质粒, 例如 pGSHC, 并将合适的轻链核苷酸序列, 例如 SEQ ID NO: 26 或 27 (分别针对 20D7/20D7S 和 CTA99) 置于合适的表达质粒中, 例如 pGSLC。为了建立稳定细胞系, 通过电穿孔用线性化重链和轻链质粒共转染合适宿主细胞系例如 NSO 细胞, 在合适培养基例如含透析胎牛血清和谷氨酰胺合成酶添加剂的无谷氨酰胺 Dulbecco's Modified Eagle Medium 中培养。通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 针对抗体表达筛选克隆, 选择最高的生产者培养于转瓶中。通过合适方法纯化抗体, 例如蛋白 A 亲和层析法。

[0103] 本发明的一个实施方案是重组人单克隆抗体 20D7, 靶向细胞表面表达的酪氨酸酶相关蛋白-1 (TYRP1 或 TRP1) 的全长 IgG1。该抗体由人 γ -1 重链 (HC) (亚类 I) 和人 κ 轻链 (亚类 III) 构成。20D7 显示以高亲和性选择性结合人 TYRP1, 通过涉及活化免疫效应器功能的机制在异种移植模型中介导有效的抗肿瘤活性。

[0104] 本发明的一个实施方案是重组人单克隆抗体 20D7S, 靶向细胞表面表达的酪氨酸酶相关蛋白 1 (TYRP1 或 TRP1) 的全长 IgG1。该抗体由人 γ -1 重链 (HC) (亚类 I) 和人 κ 轻链 (亚类 III) 构成。20D7S 的产生是为了得到更稳定的分子; 通过定点诱变将重链可变区内的游离半胱氨酸残基 (C47) 转变为丝氨酸残基。此未成对或游离半胱氨酸具有与参与重链和轻链多肽的链内和链间二硫键桥连的其他半胱氨酸错配的潜力。错配有可能导致错误折叠和加工, 增加产物的非均匀性并且可能增加其稳定性。本文所述的 SDS PAGE 凝胶分析证实了 20D7 制剂中游离轻链和游离重链的存在, 但是在 20D7S 制剂中游离轻链和游离重链的存在减少或消除。

[0105] 本发明的另一个实施方案是 CTA99, 具有人恒定区 IgG1 的嵌合抗体。小鼠抗体 TA99 (美国专利 4,798,790) 含有两条轻链; 一条 TA99 轻链是 TYRP1 特异性的, 另一条来自亲代小鼠骨髓瘤细胞。由于杂 (contaminated) 轻链不能结合 TYRP1, 所以活性降低。构建 CTA99 以消除此缺点, 由此改善活性。在本发明的一个实施方案中, 设计具有两条相同重链和两条相同轻链的 CTA99。本文所述的研究阐明了 CTA99 增加的活性和结合亲和力以及更适于人的效应器功能。

[0106] 表 1 和 2 提供了多个本发明 CDR 的氨基酸序列和 SEQ ID NO。表 3 提供了本发明相关的多个序列的 SEQ ID NO。编码下述氨基酸序列的多核苷酸序列也包含在本发明的范围内。

[0107] 表 1: 20D7 和 20D7S 抗体重链和轻链可变区 CDR 的氨基酸序列

[0108]

	重链	SEQ ID NO.	轻链	SEQ ID NO.
CDR1	GYTFTSYAMN	1	RASQSVSSYLA	4
CDR2	WINTNTGNPTYAQGFTG	2	DASNRAT	5
CDR3	RYSSSWYLDY	3	QQRSNWLMYT	6

[0109] 表 2 :CTA99 抗体重链和轻链可变区 CDR 的氨基酸序列

[0110]

	重链	SEQ ID NO.	轻链	SEQ ID NO.
CDR1	GFNIKDYFLH	7	RASGNIYNYLA	10
CDR2	WINPDNGNTVYDPKFQG	8	DAKTLAD	11
CDR3	DYTYEKAALDY	9	QHFWSLPFT	12

[0111] 表 3 :20D7, 20D7S 和 CTA99 抗体的氨基酸序列 SEQ. ID. NO

[0112]

抗体	重链			轻链		
	带信号	可变区	不带信号	带信号	可变区	不带信号
20D7	18	13	29	24	16	32
20D7S	19	14	30	24	16	32
CTA99	20	15	31	25	17	33

[0113] 用于实验的抗体包含不含信号的全长重链和轻链, 如表 3 中所给出的。

[0114] 表 4 :20D7, 20D7S 和 CTA99 抗体的数据总表

[0115]

抗体	竞争 ELISA (EC ₅₀) (M)	FACS (mel)	亲和力 K _D (M)	人 FcR 结合 (M)	人 ADCC (%)	人 CDC (%)
TA99	4.0 x 10⁻¹⁰	+++	1.7 x 10⁻⁹	ND	ND	ND
CTA99	1.1 x 10⁻¹⁰	+++	1.1 x 10⁻⁹	ND	48	94
20D7	1.1 x 10⁻¹⁰	+++	0.28 x 10⁻⁹	1.1 x 10⁻¹⁰	42	100
20D7S	0.98 x 10⁻¹⁰	+++	0.28 x 10⁻⁹	0.97 x 10⁻¹⁰	56	ND

[0116] ND = 未测得

[0117] 竞争性酶联免疫吸附测定 (ELISA)

[0118] 在 4℃ 下用重组人 TYRP (. 5ug/mL × 50 μ L) 涂覆 falcon 柔性 96 孔平底平板过夜。

次日,在室温下用含有 0.1%吐温-20 的 PBS 中的 5% FBS 对该平板封闭 2 小时。在 100 μ l 样品中添加多种量的抗体。用 PBS/吐温将板清洗 3 遍,向该平板添加 100 μ l 以 1 : 5000 在 100 μ l 中稀释的辣根过氧化物酶缀合的山羊抗人抗体 (Biosource, Camarillo, CA),在室温下 (20-25 $^{\circ}$ C) 孵育 1 小时。将该平板清洗 3 遍,向该平板添加 50 μ l/孔的 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB ;KPL,Gaithersburg,MD) 底物。使用微板读数器 (例如 Molecular Devices) 在 450nm 处读取该平板。

[0119] 表 5 :酶联免疫吸附测定 (ELISA)

[0120]

抗体	与 TYRP1 的结合 (EC ₅₀) (M)
TA99	4.0×10^{-10}
CTA99	1.1×10^{-10}
20D7	1.1×10^{-10}
20D7S	0.98×10^{-10}

[0121] 半最小有效浓度 (EC₅₀) 以摩尔 (M) 度量。抗体,包括人 20D7、人 20D7S 和 CTA99,在 ELISA 测定中显示特异性结合人 TYRP1。

[0122] 流式细胞术

[0123] 用 1% BSA/PBS 中的 5 μ g/ml 人 IgG 或抗 TYRP1MAb 在冰上处理 624mel 细胞 1 小时。用 1% BSA/PBS 将细胞清洗 3 遍,与异硫氰酸荧光素 (FITC) - 标记的山羊抗人 IgG 孵育 1 小时。清洗细胞,用合适的流式细胞仪分析,例如 Epics XL Flow Cytometer(Coulter)。流式细胞术分析显示,与对照人 IgG1 相比,本文举例的 20D7S 抗体显示与人细胞系 SKmel28 和 SKmel23 表达的天然 TYRP1 结合。类似地,流式细胞术分析显示,与对照人 IgG1 相比,本文举例的 CTA99 和 20D7 抗体显示结合人细胞系 624mel 表达的天然 TYRP1。

[0124] 表面等离子共振 /Biacore 分析

[0125] 在环境实验室温度 (20 $^{\circ}$ C -25 $^{\circ}$ C) 下用表面等离子共振测量抗体与重组人 TYRP1 的结合动力学,例如用 Biacore 生物传感器 (Pharmacia)。将 TYRP1 蛋白固定于 CM5 研究级传感芯片上,以 0.5nM 至 100nM 的浓度注入抗体。获得每个浓度的传感图,使用 BIA Evaluations 3.2 程序进行评价,以确定速率常数 k_{on} 和 k_{off} 。 K_d ,也称为 k_{off} ,是解离反应的速率常数。 K_a ,也称为 k_{on} ,是结合反应的速率常数。 K_D 是结合亲和力的度量,由以摩尔 (M) 度量的速率常数 k_{off}/k_{on} 的比值计算 K_D 。本文举例抗体 TA99、CTA99、20D7 和 20D7S 的 K_a 、 K_d 和 K_D 总结于下文表 6 中。

[0126] 表 6 :抗体与重组人 TYRP1 的结合动力学

[0127]

抗体	K_a (1/Ms) k_{on}	K_d (1/s) k_{off}	K_D (M)
TA99	9.5×10^4	1.6×10^{-4}	1.7×10^{-9}
CTA99	2.8×10^4	3.0×10^{-4}	1.1×10^{-9}
20D7	6.8×10^5	1.9×10^{-4}	0.28×10^{-9}
20D7S	6.4×10^5	1.8×10^{-4}	0.28×10^{-9}

[0128] 20D7 和 20D7S 与人 TYRP1 结合的 Biacore 分析证明显著的特异性结合亲和性,因

此 20D7 和 20D7S 是治疗性抗体的有效候选者。

[0129] 补体依赖性细胞毒性 (CDC) 测定

[0130] 用合适培养基例如 AIM V 培养基 (Invitrogen Life Technologies) 将人黑素瘤细胞系 624mel 清洗 3 遍, 并将其调节至 10^6 活细胞 / mL 的浓度。将一百微升细胞铺于 96 孔圆底 Falcon 平板, 在 37°C 下与 MA b 20D7 或 hIgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 一起孵育 1 小时, 以 3.7 μ g/mL 起始, 1 : 3 稀释。以 50 μ l / 孔添加在 AIM V 中 1 : 5 稀释的 low-Tox-M 兔补体 (Cedarlane Labs, Westbury, NY), 在 37°C 下孵育 1 小时。用台盼蓝 (Invitrogen Life Technologies) 对存活的细胞计数。

[0131] 表 7 显示 CDC 测定中多种抗体浓度下的细胞毒性百分比。数据证明, 20D7 和 CTA99 抗体体外诱导针对 TYRP1(+) 人 624mel 细胞的 CDC。20D7 引发 624mel 细胞的剂量依赖性补体介导的细胞裂解, 在该测定中使用 3.7 μ g/mL 的抗体浓度实现完全细胞裂解。因此, 在 20D7 和 CTA99 中有对 CDC 的强免疫效应器应答。%特异性裂解 = 测试%细胞毒性 - 阴性对照%细胞毒性。

[0132] 表 7 : CDC 数据证明 20D7 和 CTA99 引起的补体活化

[0133]

抗体浓度 (μ g/mL)	CTA99	20D7
3.7	95%	100%
1.23	54%	84%
0.41	53%	38%
0.14	17%	35%
0.05	9.5%	24%

[0134] 针对人黑素瘤的体外抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)

[0135] 收集 624mel 细胞, 用合适培养基清洗, 例如 AIM V 培养基 (Invitrogen Life Technologies), 以 10,000 细胞 / 孔的密度 100 μ L 的体积将细胞铺于 96-孔 Falcon U 形底平板。添加 50 μ L 体积内的 5 μ g/mL 的抗体, 与靶细胞一起在 37°C 下孵育 0.5 小时。以 50 μ L 的体积, 多种 E : T (效应器 : 靶标) 比添加效应器细胞。再将平板在 37°C 下孵育 4 小时。孵育后, 以 800g 将平板离心, 轻轻地将 100 μ L 上清转移到 96 孔平底平板。如制造商 (Roche) 所指示地, 添加乳酸脱氢酶测定试剂, 在 490nm 处读取平板。测定对照 : 靶标自发值和靶标最大值 (添加 50 μ L 的 4% triton)。

[0136] 裂解依赖于效应器与靶标浓度的比, 50% 靶细胞裂解在 E : T 比为 100 : 1 时出现。在固定浓度下 (5 μ g/mL), 20D7 和 CTA99 活化 624mel 细胞的裂解。表 8 显示 ADCC 测定中在多种效应器细胞与肿瘤细胞比值 (E : T 比) 存在下细胞毒性百分比。20D7S、20D7 和 CTA99 抗体体外诱导针对 TYRP1(+) 人 624mel 细胞的 ADCC。在 20D7S、20D7 和 CTA99 中有 ADCC 的强免疫效应器应答。

[0137] %细胞毒性 = (实验值 - 靶标自发值) /

[0138] (靶标最大值 - 靶标自发值) X 100

[0139] 表 8 : 体外针对人黑素瘤的 ADCC

E:T 比	% 细胞毒性		
	20D7	20D7S	CTA99
100:1	43%	56%	49%
50:1	33%	47%	39%
25:1	31%	43%	17%
12.5:1	17%	23%	12%

[0141] 20D7S 和 20D7 稳定性测定

[0142] 将 20D7 和 20D7S 上样于 SDS-PAGE 凝胶（十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳）。使用 BioRad 装置进行凝胶电泳，直至溴酚蓝染料刚刚消失。使用考马斯染料显现分离的蛋白质。

[0143] 在 SDS PAGE 分析中，更稳定的分子视为单条带，如果有也极少游离轻链和或重链；游离轻链和游离重链的存在证明分子较不稳定。20D7 的 SDS PAGE 显示存在明显的游离轻链和重链。20D7S 的 SDS PAGE 显示存在非常少的游离轻链和重链。因此，20D7S 是比 20D7 更稳定的 IgG1 分子。

[0144] CTA99 和 20D7 有效治疗人黑素瘤异种移植

[0145] 对于下述皮下研究，肿瘤体积由式 $[\pi/6(W1 \times W2 \times W2)]$ 计算，其中 W1 表示最大肿瘤直径，W2 表示最小肿瘤直径。 $\% T/C = 100 \times (\text{治疗体积} / \text{初始体积}) / (\text{对照体积} / \text{初始体积})$ 。统计分析使用传统 p 值方法进行。对于皮下研究，基于接受抗 TYRP 抗体的动物的肿瘤体积相比于对照动物的肿瘤体积来计算 p 值。对于下述转移研究，通过计算肺表面小瘤 (nodule) 来测量肿瘤抑制。 $\% \text{抑制} = 100 \times (\text{对照小瘤} \# - \text{治疗小瘤} \#) / (\text{对照小瘤} \#)$ 。统计分析使用传统 p 值方法进行。对于转移研究，基于接受抗 TYRP 抗体的动物中所观察到的小瘤相比于对照动物中所观察到的小瘤来计算 p 值。

[0146] 抗 TYRP1 抗体在人黑素瘤异种移植模型中的体外单一活性剂 (single agent) 活性

[0147] 在 50/50 的 Matrigel 和 RPMI 1640 培养基 (10% FBS, 热灭活) 的溶液中收获、清洗并重悬 624mel 培养细胞。对于皮下肿瘤模型，将 2×10^6 个细胞皮下注射到裸鼠的左肋。当肿瘤达到 200mm^3 时，用抗 TYRP1 抗体或对照人 IgG 治疗小鼠，每周三次以 1mg/ 小鼠施用抗体。一周两次用游标卡尺测量肿瘤，计算 % T/C。对于抗 TYRP1 抗体在人黑素瘤异种移植模型中的体内单一活性剂活性，与人 IgG 对照相比，用 20D7 治疗抑制 SKmel28 异种移植物的生长 ($T/C = 51\%$; 在第 43 天 $P = 0.01$)。20D7 治疗还显示显著抑制已有 624mel 肿瘤。肿瘤生长得到抑制，并且在抗体治疗开始后第 16 天达到统计学显著性 ($T/C = 44\%$; $P = 0.01$)。对于 20D7 的抗肿瘤活性，评价人黑素瘤异种移植。在抗体治疗后第 11 天，细胞系 A375 和 1102mel 显示受到单一活性剂 20D7 的显著抑制（分别对于 A375 和 1102mel, $T/C = 42\%$; $P = 0.01$ 以及 $T/C = 43\%$; $P = 0.004$ ）。来自不同物种的皮肤裂解物与 TA99 ($5 \mu\text{g/ml}$) 一起在室温下孵育 2 小时。然后，将裂解物与蛋白 A 一起沉淀，在还原和非还原条件下使用四块 12% 梯度凝胶进行 SDS-PAGE。电泳之后，将凝胶转移到 PVDF 膜 (Invitrogen Life Technologies)。用 20D7S ($5 \mu\text{g/ml}$)，然后用 HRP 标记的抗人 IgG (Zymed, South San Francisco, CA) 对膜进行检测。使用化学发光底物 (KPL, Gaithersburg, MD) 对印迹进行显影。数据显示 20D7 容易地与小鼠 TYRP1 交叉反应。但是，在任何用 20D7 治疗中动物中没

有显示明显毒性。20D7 治疗的动物相对于人 IgG 对照治疗的小鼠,体重和总体外观没有显著差异。

[0148] 抗 TYRP1 抗体在人黑素瘤异种移植模型中的体外单一活性剂剂量应答活性

[0149] 在 50/50 的 Matrigel 和 RPMI 1640 培养基 (10% FBS, 热灭活) 的溶液中混合 SKmel28 细胞。将 2×10^6 个细胞皮下注射到裸鼠的左肋。在肿瘤达到 200mm^3 时,一周三次用抗 TYRP1 抗体 (6mg/kg、20mg/kg 或 60mg/kg) 或者对照人 IgG 治疗小鼠。一周两次用游标卡尺测量肿瘤,计算 % T/C。20D7 对 SKmel28 异种移植物的剂量应答研究显示了剂量依赖性抗肿瘤应答。甚至在 6mg/kg 剂量下,20D7 也显著抑制肿瘤 ($T/C = 69\%$; $P < 0.0001$)。每种剂量下的抗肿瘤作用都是统计学显著性的:6mg/kg 和 20mg/kg ($T/C = 50\%$; $P = 0.04$), 6mg/kg 和 60mg/kg ($T/C = 19\%$; $P < 0.003$)。

[0150] 抗 TYRP1 抗体在两个转移黑素瘤模型中的体内单一活性剂活性

[0151] B16BL6 是富有侵略性的自发产生的小鼠黑素瘤。在静脉施用后,其在裸鼠中形成肺转移。用 RPMI 1640 培养基 (10% FBS, 热灭活) 收获、清洗并重悬培养的 SKmel23 和 B16BL6 细胞黑素瘤细胞。

[0152] 模型 1:静脉内注射 1×10^5 B16BL6 细胞。肿瘤注射后第二天,按照三种不同剂量浓度向小鼠施用抗 TYRP1 抗体或对照人 IgG (200 μg /小鼠, 500 μg /小鼠和 1mg/小鼠)。在第 20 天处死小鼠,摘除肺,对肺表面小瘤进行计数并计算百分比抑制。在人 IgG 治疗的小鼠肺表面检测到严重的转移;而在 20D7 治疗的动物中观察到显著较少的转移。所有三种浓度的 20D7 均减少了肺转移的水平 (分别地,抑制 = 65%、74% 和 95%)。

[0153] 模型 2:静脉内注射 1×10^5 SKmel23 细胞。肿瘤注射后第二天,按照两种不同剂量浓度向小鼠施用抗 TYRP1 抗体或对照人 IgG (200 μg /小鼠, 500 μg /小鼠和 1mg/小鼠)。在第 20 天处死小鼠,摘除肺,对肺表面小瘤进行计数并计算百分比抑制。用 200 μg /剂和 500 μg /剂的 20D7 或 CTA99 治疗显著降低了转移小瘤。20D7 分别减少了 58% 和 73% 的转移。CTA99 分别减少了 63% 和 75% 的转移。这些结果证明,在两个不同的模型中,20D7 和 CTA99 抑制黑素瘤转移。

[0154] 20D7 和 20D7S 对于人黑素瘤的皮下异种移植物和转移模型的抑制肿瘤生长的体内比较研究

[0155] 对于皮下肿瘤模型,在 50/50 的 Matrigel 和 RPMI 1640 培养基 (10% FBS, 热灭活) 溶液中收获、清洗并重悬 624mel 培养细胞,然后将 2×10^6 个 624mel 细胞皮下注射到裸鼠的左肋。在肿瘤达到 200mm^3 时,一周两次用 20D7 或 20D7S,以 40mg/kg 治疗小鼠。一周两次用游标卡尺测量肿瘤,计算 % T/C。在 624mel 皮下异种移植模型中,20D7 抑制肿瘤生长, $T/C = 21\%$, 而 20D7S 的 $T/C = 25\%$ 。在该异种移植模型中,20D7 和 20D7S 都抑制肿瘤生长。

[0156] 对于转移模型,用 RPMI 1640 培养基 (10% FBS, 热灭活) 收获、清洗并重悬 888mel 培养细胞,静脉内注射 888mel 细胞。肿瘤注射后第二天,向小鼠施用抗 TYRP1 抗体或对照人 IgG。在第 20 天处死小鼠,摘除肺,对肺表面小瘤进行计数并计算百分比抑制。在裸鼠中的 888mel 转移模型中,20D7 和 20D7S 都显著抑制肺表面转移:20D7 抑制 = 77%, $p = 0.0005$; 20D7S 抑制 = 80%, $p = 0.0005$ 。在该转移模型中,20D7 和 20D7S 都减少了黑素瘤转移。

[0157] 20D7 和达卡巴嗪 (DTIC) 对人异种移植物的组合治疗证明了与单治疗相比更强的

抗肿瘤活性。

[0158] 对于皮下模型,在 50/50 的 Matrigel 和 RPMI 1640 培养基 (10% FBS, 热灭活) 的溶液中收获、清洗并重悬培养的 624mel 细胞。将 2×10^6 个细胞注射到裸鼠的左肋。当肿瘤达到 200mm^3 时,用抗 TYRP1 抗体、DTIC 或抗 TYRP1 抗体与 DTIC 的组合治疗小鼠。每周二次以 40mg/kg 施用抗体。每周一次以 5mg/kg 施用 DTIC。一周两次用游标卡尺测量肿瘤,计算 % T/C。对于转移模型,在 RPMI 1640 培养基 (10% FBS, 热灭活) 中收获、清洗并重悬培养的 SKmel23、888mel 和 B16 黑素瘤细胞。静脉内注射 SKmel23、888mel 和 B16 黑素瘤细胞。在肿瘤注射后第二天,向小鼠施用抗 TYRP1 抗体或对照人 IgG。在第 20 天处死小鼠,摘除肺,对肺表面小瘤进行计数,并计算百分比抑制。

[0159] 如皮下模型中所证明地,20D7 和 DTIC 组合治疗比单独 20D7 ($p < 0.001$) 或 DTIC ($p < 0.001$) 明显更好地抑制肿瘤生长。

[0160] 表 9 :20D7 的体内抗肿瘤活性总结

[0161]

模型	肿瘤	测量	20D7	20D7+DTIC
转移	SKmel23	% 抑制	80%	99%*
转移	888 mel	% 抑制	77%	96%*
转移	B16	% 抑制	95%	ND
皮下	624mel	% T/C	50% P=0.004	19% P<0.0001

[0162] 表 9 汇总了在 4 种模型中与 20D7 或 DTIC 单一疗法相比,20D7S 的体内抗肿瘤活性。20D7 的体内抗肿瘤活性由转移模型中的百分比抑制显示 (* 表示统计学显著的;ND 表示未测得)。在皮下模型中,20D7 的体内抗肿瘤活性以 T/C 百分比显示。20D7 和达卡巴嗪 (DTIC) 的组合治疗证明了与单一疗法相比更强的抗肿瘤活性。

[0001]

序列表

<110> 伊姆克罗尼责任有限公司

<120> 抗-TYRP1 抗体

<130> X18551

<150> 61/069199

<151> 2008-03-12

<160> 33

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asn
1				5					10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Trp	Ile	Asn	Thr	Asn	Thr	Gly	Asn	Pro	Thr	Tyr	Ala	Gln	Gly	Phe	Thr
1				5					10					15	

Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Arg	Tyr	Ser	Ser	Ser	Trp	Tyr	Leu	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

[0002]

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 7

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Phe Leu His
1 5 10

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 8

Trp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Asn Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

[0003]

<213> 小鼠

<400> 9

Asp Tyr Thr Tyr Glu Lys Ala Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 10

Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 11

Asp Ala Lys Thr Leu Ala Asp
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 12

Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 13

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Cys Met
35 40 45

[0004]

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Pro Arg Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Pro Arg Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 122
<212> PRT
<213> 小鼠

[0005]

<400> 15

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

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

Phe Leu His Trp Val Arg Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Asn Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

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

Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Arg Asp Tyr Thr Tyr Glu Lys Ala Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Ala Ser Val Ile Val Phe Ser Ala
115 120

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Met
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

[0006]

<210> 17
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 17

Ala Ile Gln Met Ser Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Thr
 65 70 75 80

Glu Asp Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 18
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 18

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys
 20 25 30

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

Thr Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Cys Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80

Gln Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Val Ser
 85 90 95

[0007]

Thr Ala Tyr	Leu Gln Ile Ser Ser	Leu Lys Ala Glu Asp	Thr Ala Ile
100	105	110	
Tyr Tyr Cys	Ala Pro Arg Tyr Ser Ser	Trp Tyr Leu Asp	Tyr Trp
115	120	125	
Gly Gln Gly	Thr Leu Val Thr Val	Ser Ser Ala Ser	Thr Lys Gly Pro
130	135	140	
Ser Val Phe	Pro Leu Ala Pro Ser Ser	Lys Ser Thr Ser	Gly Gly Thr
145	150	155	160
Ala Ala Leu	Gly Cys Leu Val Lys Asp	Tyr Phe Pro Glu	Pro Val Thr
165	170	175	
Val Ser Trp	Asn Ser Gly Ala Leu Thr	Ser Gly Val His	Thr Phe Pro
180	185	190	
Ala Val Leu	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr	Ser Leu Ser Ser	Val Val Thr
195	200	205	
Val Pro Ser	Ser Ser Leu Gly Thr Gln	Thr Tyr Ile Cys	Asn Val Asn
210	215	220	
His Lys Pro	Ser Asn Thr Lys Val Asp	Lys Arg Val Glu	Pro Lys Ser
225	230	235	240
Cys Asp Lys	Thr His Thr Cys Pro Pro	Cys Pro Ala Pro	Glu Leu Leu
245	250	255	
Gly Gly Pro	Ser Val Phe Leu Phe Pro	Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu
260	265	270	
Met Ile Ser	Arg Thr Pro Glu Val Thr	Cys Val Val Val	Asp Val Ser
275	280	285	
His Glu Asp	Pro Glu Val Lys Phe Asn	Trp Tyr Val Asp	Gly Val Glu
290	295	300	
Val His Asn	Ala Lys Thr Lys Pro Arg	Glu Glu Gln Tyr	Asn Ser Thr
305	310	315	320
Tyr Arg Val	Val Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln Asp	Trp Leu Asn
325	330	335	
Gly Lys Glu	Tyr Lys Cys Lys Val Ser	Asn Lys Ala Leu	Pro Ala Pro
340	345	350	
Ile Glu Lys	Thr Ile Ser Lys Ala Lys	Gly Gln Pro Arg	Glu Pro Gln
355	360	365	

[0008]

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro Gly Lys
465

<210> 19

<211> 468

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 19

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys
20 25 30

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

Thr Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Ser Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Gln Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Val Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Ile
100 105 110

[0009]

Tyr Tyr Cys Ala Pro Arg Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Leu Asp Tyr Trp		
115	120	125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
130	135	140
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
145	150	155 160
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
165	170	175
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
180	185	190
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
195	200	205
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
210	215	220
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser		
225	230	235 240
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
245	250	255
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
260	265	270
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
275	280	285
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
290	295	300
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
305	310	315 320
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
325	330	335
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
340	345	350
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
355	360	365
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
370	375	380

[0010]

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro Gly Lys
465

<210> 20

<211> 471

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 20

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

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

Lys Asp Tyr Phe Leu His Trp Val Arg Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Asn Thr Val Tyr Asp
65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Gly Thr Ala Ser Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Val Tyr Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Thr Arg Arg Asp Tyr Thr Tyr Glu Lys Ala Ala Leu Asp
115 120 125

[0011]

Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Ala	Ser	Val	Ile	Val	Phe	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	130	135	140	
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	145	150	155	160
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	165	170	175	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	180	185	190	
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	195	200	205	
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	210	215	220	
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	225	230	235	240
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	245	250	255	
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	260	265	270	
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	275	280	285	
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	290	295	300	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	305	310	315	320
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	325	330	335	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	340	345	350	
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	355	360	365	
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	370	375	380	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	385	390	395	400

[0012]

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 21

<211> 1407

<212> DNA

<213> 智人

<400> 21

atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt acattcacag	60
gtgcagctgg tccaatctgg gtctgagttg aagaagcctg gggcctcagt gaagatttcc	120
tgcaaggctt ctggatacac cttcactagc tatgctatga attgggtgcg acaggcccct	180
ggacaagggc ttgagtgtat gggatggatc aacaccaaca ctgggaaccc aacgtatgcc	240
cagggttca caggacggtt tgtcttctcc atggacacct ctgtcagcac ggcatatctg	300
cagatcagca gcctaaaggc tgaggacact gccatatatt actgtgcgcc ccgatatagc	360
agcagctggt accttgatta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtgtc ctcagctagc	420
accaagggcc catcggtctt ccccttggea ccctctcca agagcacctc tgggggcaca	480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac	540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc	600
tactcctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc	660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agagagttga gcccaaattc	720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	780
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	840
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtatgtg	900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	960

[0013]

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaagact ggctgaatgg caaggagtag	1020
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc	1140
aagaaccaag tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1260
tccgacggct cttcttctct ctattccaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag	1380
agcctctccc tgtctccggg caaatga	1407

<210> 22

<211> 1407

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 22

atgggatggg catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt acattcacag	60
gtgcagctgg tccaatctgg gtctgagttg aagaagcctg gggcctcagt gaagatttcc	120
tgcaaggctt ctggatacac cttcactagc tatgctatga attgggtgcg acaggcccct	180
ggacaagggc ttgagtctat gggatggatc aacaccaaca ctgggaaccc aacgtatgcc	240
cagggttca caggacggtt tgtcttctcc atggacacct ctgtcagcac ggcatatctg	300
cagatcagca gcctaaaggc tgaggacact gccatatatt actgtgcgcc ccgatatagc	360
agcagctggg accitgatta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtgtc ctcagctagc	420
accaagggcc catcggtctt ccccttgga ccctctcca agagcacctc tgggggcaca	480
gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtagcggt gtcgtggaac	540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc	600
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacac	660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gccc aaatct	720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	780

[0014]

gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc	840
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtatgtg	900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaagact ggctgaatgg caaggagtac	1020
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc	1140
aagaaccaag tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagca catcgccgtg	1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgtggac	1260
tccgacggt ccttcttct ctattccaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1320
gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cagcagaag	1380
agcctctccc tgtctcggg caaatga	1407

<210> 23

<211> 1413

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 23

atgggatggt catgtatcat ctttttcta gtagcaactg caactggagt acattcagag	60
gttcagctgc agcagtctgg ggctgagctt gtgaggccag gggccttggt caagttgtcc	120
tgcaaaactt ctggcttcaa cattaaagac tactttttac actgggtgag acagaggcct	180
gaccagggcc tggagtggat tggatggatt aatcctgata atggtaatat tgtttatgac	240
ccgaagtctc agggcacggc cagttaaca gcagacacat cctccaacac agtctacttg	300
cagctcagcg gcctgacatc tgaggacact gccgtctatt tctgtactcg gagggactat	360
acttatgaaa aggtctgtct ggactactgg ggtcaggag cctcagtcac cgtctcctca	420
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	540
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtctct acagtctca	600
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg caccagacc	660

[0015]

```

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc      720
aaatcttggtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga      780
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct      840
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
tatgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      960
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aagactggct gaatggcaag     1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc     1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag     1140
atgaccaaga accaagtcag cctgacctgc ctggtaaag gcttctatcc cagcgacatc     1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg     1260
ctggactccg acggctcctt ctctcttat tccaagtcac ccgtggacaa gagcaggtgg     1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag     1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggcaaa tga                                     1413

```

<210> 24

<211> 234

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1           5           10           15

```

```

Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
          20           25           30

```

```

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
          35           40           45

```

```

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
          50           55           60

```

```

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg
65           70           75           80

```

```

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
          85           90           95

```

[0016]

Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn
			100					105					110		
Trp	Leu	Met	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg
		115					120					125			
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
	130						135				140				
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
145						150				155					160
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
				165					170					175	
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
			180					185					190		
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
		195					200					205			
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
	210						215				220				
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
225						230									
<210>	25														
<211>	233														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成构建体														
<400>	25														
Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly
1				5					10					15	
Val	His	Ser	Ala	Ile	Gln	Met	Ser	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala
			20					25					30		
Ser	Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gly	Asn	Ile
		35					40					45			
Tyr	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	His
	50						55				60				
Leu	Leu	Val	Tyr	Asp	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg
65					70					75					80

[0017]

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser
 85 90 95
 Leu Gln Thr Glu Asp Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser
 100 105 110
 Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 26
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 26
 atgggatggg catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt acattcagaa 60
 attgtgttga cacagtctcc agccaccctg tctttgtctc caggggaaag agccaccctc 120
 tctgcaggg ccagtcagag tgtagcagc tacttagcct ggtaccaaca gaaacctggc 180
 caggctccca ggctcctcat ctatgatgca tccaacaggg ccaactggcat cccagccagg 240
 ttcagtggca gtgggtcttg gacagacttc actctcacca tcagcagcct agagcctgaa 300
 gattttgcag tttattactg tcagcagcgt agcaactggc tcatgtacac ttttgccag 360
 gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 420
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480

[0018]

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag	540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag	705

<210> 27
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 27 atgggatgggt catgtatcat ctttttcta gtagcaactg caactggagt acattcagcc	60
atccagatgt ctcagtctcc agcctcccta tctgcatctg tgggagaaac tgtcaccatc	120
acatgtcgag caagtggaaa tatttacaat tatttagcat ggtatcagca gaaacaggga	180
aaatctcctc acctcctggt ctatgatgca aaaaccttag cagatgggtg gccatcaagg	240
ttcagtggca gtggctcagg gacacaatat tctctcaaga ttagcagcct gcagactgaa	300
gattctggga attattactg tcaacatttt tggagtcttc cattcacgtt cggtctgggg	360
acaaagttgg aaataaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt ccgccatct	420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc	480
agagaggcca agttacagtg gaagggtgat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag	540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg	600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg	660
agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag	702

<210> 28
 <211> 537
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 28

Met	Ser	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ser	Leu	Gly	Cys	Ile	Phe	Phe	Pro	Leu
1				5					10					15	

[0019]

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

[0020]

Val Cys Asp Ser Leu Glu Asp Tyr Asp Thr Leu Gly Thr Leu Cys Asn		
290	295	300
Ser Thr Glu Asp Gly Pro Ile Arg Arg Asn Pro Ala Gly Asn Val Ala		
305	310	315 320
Arg Pro Met Val Gln Arg Leu Pro Glu Pro Gln Asp Val Ala Gln Cys		
325	330	335
Leu Glu Val Gly Leu Phe Asp Thr Pro Pro Phe Tyr Ser Asn Ser Thr		
340	345	350
Asn Ser Phe Arg Asn Thr Val Glu Gly Tyr Ser Asp Pro Thr Gly Lys		
355	360	365
Tyr Asp Pro Ala Val Arg Ser Leu His Asn Leu Ala His Leu Phe Leu		
370	375	380
Asn Gly Thr Gly Gly Gln Thr His Leu Ser Pro Asn Asp Pro Ile Phe		
385	390	395 400
Val Leu Leu His Thr Phe Thr Asp Ala Val Phe Asp Glu Trp Leu Arg		
405	410	415
Arg Tyr Asn Ala Asp Ile Ser Thr Phe Pro Leu Glu Asn Ala Pro Ile		
420	425	430
Gly His Asn Arg Gln Tyr Asn Met Val Pro Phe Trp Pro Pro Val Thr		
435	440	445
Asn Thr Glu Met Phe Val Thr Ala Pro Asp Asn Leu Gly Tyr Thr Tyr		
450	455	460
Glu Ile Gln Trp Pro Ser Arg Glu Phe Ser Val Pro Glu Ile Ile Ala		
465	470	475 480
Ile Ala Val Val Gly Ala Leu Leu Leu Val Ala Leu Ile Phe Gly Thr		
485	490	495
Ala Ser Tyr Leu Ile Arg Ala Arg Arg Ser Met Asp Glu Ala Asn Gln		
500	505	510
Pro Leu Leu Thr Asp Gln Tyr Gln Cys Tyr Ala Glu Glu Tyr Glu Lys		
515	520	525
Leu Gln Asn Pro Asn Gln Ser Val Val		
530	535	
<210> 29		
<211> 449		
<212> PRT		
<213> 智人		

[0021]

<400> 29

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Cys Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Pro Arg Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

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

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

[0022]

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445

Lys

<210> 30
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 30

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

[0023]

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

[0024]

Ala Lys Thr Lys Pro Arg	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290	295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu	
305	310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys	
	325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr	
	340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr	
	355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu	
370	375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	
385	390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys	
	405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	
	420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
435	440 445

Lys

<210> 31
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 31

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Leu His Trp Val Arg Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

[0025]

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

[0026]

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 32
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 32
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Met
 85 90 95

[0027]

Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
			100					105						110	
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
			115				120					125			
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
			130				135					140			
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
					150					155					160
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
				165					170					175	
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
			180					185						190	
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
			195					200					205		
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
			210			215									
<210>	33														
<211>	214														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成构建体														
<400>	33														
Ala	Ile	Gln	Met	Ser	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1			5					10						15	
Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gly	Asn	Ile	Tyr	Asn	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	His	Leu	Leu	Val
			35				40					45			
Tyr	Asp	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Thr
65					70				75					80	
Glu	Asp	Ser	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Ser	Leu	Pro	Phe
				85					90					95	

[0028]

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