



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102448486 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 09

(21) 申请号 201080020336. 4

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

(22) 申请日 2010. 03. 05

代理人 崔佳佳

(30) 优先权数据

61/158, 143 2009. 03. 06 US

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

C12P 21/08 (2006. 01)

2011. 11. 04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/026429 2010. 03. 05

(87) PCT申请的公布数据

W02010/111018 EN 2010. 09. 30

(83) 生物保藏信息

PTA-8602 2007. 08. 08

(71) 申请人 艾更斯司股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 西雅图基因公司

(72) 发明人 J·古达斯 A·雅各波维茨 Z·安

R·K·莫里森 K·J·M·莫里森

X-C·贾 D·本杰明 R·莫泽

P·森特

权利要求书 1 页 说明书 72 页

序列表 57 页 附图 37 页

(54) 发明名称

结合于 24P4C12 蛋白的抗体药物偶联物

(ADC)

(57) 摘要

本申请描述了结合于 24P4C12 蛋白及其变体的抗体药物偶联物 (ADC)。24P4C12 在正常成人组织中表现出组织特异性表达,且在表 I 所列的癌症中异常表达。因此,本发明的 ADC 提供了用于癌症治疗的治疗性组合物。

1. 一种包含与单甲基耳他汀 E(MMAE) 偶联的抗体或抗原结合片段的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述抗体或片段包含: 由 SEQ ID NO:20 的第 20 位 Q 至第 143 位 S 的氨基酸序列组成的重链可变区, 以及由 SEQ ID NO:22 的第 23 位 D 至第 130 位 R 的氨基酸序列组成的轻链可变区。
2. 一种包含与单甲基耳他汀 E(MMAE) 偶联的抗体或片段的抗体药物偶联物, 所述抗体或片段包含: 由美国典型培养物保藏中心(ATCC) 保藏的、保藏号为 PTA-8602 的杂交瘤产生的抗体的重链和轻链可变区。
3. 如权利要求 3 所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述抗体包含 ATCC 保藏号为 PTA-8602 的杂交瘤产生的抗体的重链和轻链。
4. 如权利要求 1 所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述抗体包含: 由 SEQ ID NO:20 的第 20 位 Q 至第 469 位 K 的氨基酸序列组成的重链, 以及由 SEQ ID NO:22 的第 23 位 D 至第 236 位 C 的氨基酸序列组成的轻链。
5. 如权利要求 1 所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述片段是 Fab、F(ab')₂、Fv 或 Sfv 片段。
6. 如权利要求 1 所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述抗体是全长人抗体。
7. 如权利要求 1 所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述抗体是重组产生的。
8. 一种药物组合物, 其包含人单位剂型的权利要求 1 所述的抗体药物偶联物。
9. 如权利要求 8 所述的药物组合物, 其特征在于, 所述组合物用于癌症治疗。
10. 如权利要求 9 所述的药物组合物, 其特征在于, 所述癌症是结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌或胃癌。
11. 一种抑制对象中癌细胞生长的方法, 包括给予所述对象权利要求 1 所述的抗体药物偶联物。
12. 一种治疗哺乳动物中肿瘤的方法, 包括给予所述哺乳动物有效量的权利要求 1 所述的抗体药物偶联物。
13. 一种减缓哺乳动物中肿瘤生长的方法, 包括联用有效量的抗体药物偶联物与辐射治疗所述哺乳动物。
14. 一种减缓哺乳动物中肿瘤生长的方法, 包括联用有效量的抗体药物偶联物与化疗剂治疗所述哺乳动物。
15. 一种减缓哺乳动物中肿瘤生长的方法, 包括联用有效量的抗体药物偶联物与药物或生物活性治疗剂来治疗所述哺乳动物。

结合于 24P4C12 蛋白的抗体药物偶联物 (ADC)

[0001] 关于政府赞助研究项目发明的权属声明

[0002] 不适用。

技术领域

[0003] 本文所描述的本发明涉及结合于称为 24P4C12 的蛋白质的抗体、结合片段及其抗体药物偶联物 (ADC)。本发明还涉及可用于表达 24P4C12 的癌症治疗的预后、预防和治疗方法及组合物。

背景技术

[0004] 癌症是仅次于冠心病的第二大人类死亡原因。世界范围内每年有数百万人死于癌症。仅在美国,如美国癌症协会的报告,癌症每年造成 50 万以上的人死亡,每年诊断到 120 万人的新病例。虽然死于心脏病的人数明显减少,但死于癌症的人数正在逐渐上升。在下世纪初,预计癌症将成为头号死亡原因。

[0005] 在世界范围内,有几种癌症是主要的杀手。尤其是肺癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌和膀胱癌,它们是癌症死亡的主要原因。这些癌以及事实上所有其它癌都具有相同的致命特征。除了极少的例外,转移性癌疾病是致命的。此外,即便对于那些在原发性癌中存活下来的癌症患者而言,一般经验显示,他们的生活都发生了显著的改变。许多癌症患者由于担心可能复发或治疗失败而产生强烈的焦虑感。许多癌症患者在治疗后身体虚弱。此外,许多癌症患者会经历复发。

[0006] 世界范围内,前列腺癌是男性第四大流行癌症。在北美和北欧,它几乎是男性中最常见的癌症,同时是造成男性癌症死亡的第二大原因。仅在美国,每年有 30,000 以上的男性死于这种疾病—仅次于肺癌。尽管这些数值如此巨大,但仍没有治疗转移性前列腺癌的有效方法。外科前列腺切除术、放疗、激素消融治疗 (hormone ablation therapy)、手术去势和化疗仍然是主要的治疗手段。不幸的是,这些治疗方法对于许多人无效,并且常常会带来不利结果。

[0007] 就诊断而言,缺乏能准确检测早期局部性肿瘤的前列腺肿瘤标记仍旧是这种疾病诊断和治疗中的一个重要限制。尽管血清前列腺特异性抗原 (PSA) 检测已经成为一种有效工具,但广泛认为它在一些重要方面缺乏特异性和通用性。

[0008] 通过产生可再现小鼠中疾病不同阶段的前列腺癌异种移植物促进了其它前列腺癌特异性标记的鉴定。LAPC(洛杉矶前列腺癌)异种移植物是在严重联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠中有存活传代的前列腺癌异种移植物,其显示能模拟从雄激素依赖转变为非雄激素依赖 (Klein 等,1997, Nat. Med. 3 :402)。最近鉴定的前列腺癌标记包括 PCTA-1 (Su 等,1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 :7252)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA) (Pinto 等, Clin Cancer Res 1996-9-2(9) :1445-51)、STEAP (Hubert 等, Proc Natl Acad Sci U S A. 1999-12-7; 96(25) :14523-8) 和前列腺干细胞抗原 (PSCA) (Reiter 等, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 :1735)。

[0009] 尽管以前鉴定的标记物（如 PSA）具有有助于诊断和治疗前列腺癌的作用，但还需要鉴定出前列腺癌和相关癌症的其它标记物和治疗靶以进一步改善诊断和治疗。2000 年估计美国发生了 130,200 例的结肠直肠癌病例，其中包括 93,800 例结肠癌和 36,400 例直肠癌。

[0010] 结肠直肠癌是男性和女性中的第三大常见癌症。在 1992-1996 年间其发病率显著减低（每年降低 2.1%）。研究表明，这些降低是由于筛查和息肉切除增加，从而防止了息肉发展成侵入性癌症。估计 2000 年有 56,300 人死亡（47,700 人死于结肠癌，8,600 人死于直肠癌），占美国癌症死亡总人数的约 11%。

[0011] 目前，外科手术是最常见的治疗结肠直肠癌的方法，对于还未扩散的癌症该方法经常是治愈性的。对于大多数已经深度肠壁穿孔或已经扩散到淋巴结的癌症患者，通常在手术前或手术后进行化疗或化疗加放疗。对结肠癌有时也需要永久性结肠造口术（在腹部形成一开口以排除人体废物），同时直肠癌也偶尔需要这种手术。仍持续需要有效的诊断和治疗结肠直肠癌的方法。

[0012] 在美国所有的新癌症病例中，膀胱癌在男性中约占 5%（第五种最常见的瘤），在女性中占 3%（第八种最常见的瘤）。该发病率缓慢增加，且该增加伴随着老年人口的增加。在 1998 年，估计有 54,500 病例，其中包括 39,500 名男性和 15,000 名女性。在美国，这种年龄调整发病率为每 100,000 名男性 32 人，每 100,000 名女性 8 人。历史上男性/女性 3:1 的比例可能会由于女性中的吸烟模式而降低。估计 1998 年有 11,000 人死于膀胱癌（7,800 名男性和 3,900 名女性）。膀胱癌的发病率和死亡率随着年龄增加而急剧上升，并且随着人口老龄化而成为日益严重的问题。

[0013] 大多数膀胱癌在膀胱中会复发。联用经尿道膀胱切除术（TUR）和膀胱内化疗或免疫疗法来治疗膀胱癌。膀胱癌的多病灶和复发特性指出了 TUR 的局限性。单凭 TUR 不能治愈大多数肌肉侵入性癌症。根治性膀胱切除术和尿流改道术是最有效的根治这种癌症的方法，但会对泌尿和性功能造成不可否认的影响。显然还持续需要对膀胱癌患者有益的治疗方法。

[0014] 估计 2000 年新增 164,100 例肺和支气管癌症，占美国总癌症诊出人数的 14%。肺和支气管癌症的发病率在男性中显著降低，从 1984 年的 86.5 人/100,000 人降低到 1996 年的 70.0 人。在 20 世纪 90 年代，女性中发病率的增加势头开始放慢。在 1996 年，女性中的发病率为 42.3 人/100,000 人。

[0015] 估计 2000 年肺和支气管癌症造成 156,900 人死亡，占总癌症死亡人数的 28%。1992-1996 年间，肺癌的死亡率在男性中显著降低（每年降低 1.7%），而在女性中该比例却显著上升（每年上升 0.9%）。从 1987 年以来，相比乳腺癌，每年有更多的女性死于肺癌，而乳腺癌在过去 40 年中都是女性癌症死亡的主要原因。肺癌发病率和死亡率降低很大可能与过去 30 年吸烟率降低有关；然而，女性吸烟率的降低模式滞后于男性。需要关注的是，尽管成年人的吸烟率已经慢慢降低，但青年人的吸烟率却又在升高。

[0016] 肺和支气管癌症的治疗方案是由癌症的类型和阶段决定的，其中包括手术、放疗和化疗。对许多局部性癌症而言，通常选择手术治疗。由于这种疾病通常随发现时间而扩散，通常需要联用放疗和化疗与手术。可选择单用化疗或与放疗联用来治疗小细胞肺癌；采用这种方案时，大多数患者的症状会缓解，其中有些是长效的。然而，仍旧持续需要有效的

治疗和诊断肺和支气管癌症的方法。

[0017] 2000 年, 估计美国妇女中有 182,800 例侵入性乳腺癌病例。此外, 估计 2000 年在男性中将新诊断出约 1,400 例乳腺癌。在 20 世纪 80 年代, 女性中乳腺癌的发病率每年增加约 4%, 随后在 90 年代该发病率比较平稳, 约为每 100,000 人约 110.6 例。

[0018] 仅在美国, 估计 2000 年有 41,200 人 (40,800 名女性, 400 名男性) 死于乳腺癌。乳腺癌在女性癌症死亡中位居第二。根据最新数据, 无论是白人还是黑人, 该死亡率在 1992-1996 年间显著降低, 且在年轻妇女中降低程度最大。这些降低可能是由于早期检查 and 治疗方法改进的结果。

[0019] 考虑到医疗环境和患者的偏好, 乳腺癌的治疗方法可包括病灶切除术 (局部切除肿瘤) 并除去手臂下的淋巴结; 乳房切除术 (手术切除乳房) 并除去手臂下的淋巴结; 放疗; 化疗; 或激素疗法。通常可联用两种或更多种方法。大量研究显示, 对于早期疾病, 病灶切除术加放疗后的长期存活率与改良根治性乳房切除术后的存活率类似。重建技术的重大进步能够在乳房切除术后为乳房再造术提供一些选择。最近, 这种再造术已经与乳房切除术同时进行。

[0020] 原位导管癌 (DCIS) 及周围适量正常乳房组织的局部切除可防止 DCIS 局部复发。照射乳房和 / 或他莫昔芬治疗可降低剩余乳房组织发生 DCIS 的机会。这是重要的, 因为如果 DCIS 不治疗的话将发展成侵入性乳腺癌。而且, 这些治疗方法有严重的副作用或后遗症。因此, 需要有治疗乳腺癌的有效方法。

[0021] 估计 2000 年在美国新发 23,100 例卵巢癌。这占有女性癌症的 4% 并且是第二大妇科癌症。1992-1996 年间, 卵巢癌发病率显著降低。卵巢癌的结果是, 估计 2000 年有 14,000 人死亡。相比妇女生殖系统的其它癌症, 卵巢癌造成更多人死亡。

[0022] 治疗卵巢癌的可选方法有手术、放疗和化疗。手术通常包括除去一侧或两侧的卵巢、输卵管 (输卵管 - 卵巢切除术) 以及子宫 (子宫切除术)。在一些非常早期的肿瘤中, 只有相关的卵巢会被切除, 尤其是对于那些希望生孩子的年轻女性。在晚期疾病中, 需要除去腹内所有疾病部位以增强化疗效果。有效治疗卵巢癌的方法仍是持续的重要需求。

[0023] 估计 2000 年在美国新发 28,300 例胰腺癌。在过去 20 年中, 男性胰腺癌的发病率有所降低。女性发病率仍保持几乎恒定, 但也可能开始减低。估计 2000 年在美国胰腺癌造成 28,200 人死亡。在过去 20 年中, 男性中死亡率有轻微但明显的降低 (每年约降低 0.9%), 而该比例在女性中轻微升高。

[0024] 手术、放疗和化疗是治疗胰腺癌的可选方法。在大多数患者中, 这些治疗选择可延长存活时间和 / 或缓解症状, 但绝大部分患者不可能全部治愈。迫切需要有其它治疗和诊断癌症的可选方法。这些方法包括将抗体、疫苗和小分子用作治疗形式 (modality)。此外, 还需要将这些形式用作癌症治疗和研究所有领域中的诊断、检测、监测和技术发展水平的研究工具。

[0025] 人们已认识到单克隆抗体 (mAb) 的治疗用途 (G.Kohler 和 C.Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975))。目前, 单克隆抗体已获准用于移植、癌症、传染病、心血管疾病和炎症的治疗。不同的同种型具有不同的效应物功能。这些功能上的不同对应于各种免疫球蛋白同种型的不同三维结构 (P.M.Alzari 等, *Annual Rev. Immunol.*, 6:555-580 (1988))。

[0026] 由于将小鼠便于免疫接种并识别大多数外来的人抗原, 针对具有治疗潜力的人靶

标的 mAb 通常均为鼠源性。然而,鼠 mAb 在人类治疗中本身有缺陷。由于 mAb 在人体中的循环半衰期比人抗体短,需要更频繁地给予 mAb。更关键的是,将鼠抗体反复给予人免疫系统会造成人免疫系统将小鼠蛋白质识别为异物并产生人抗小鼠抗体 (HAMA) 应答。这种 HAMA 应答会造成过敏反应,并从免疫系统中迅速清除鼠源抗体,从而使得采用鼠源抗体的治疗无效。为了避免这种影响,已尝试在小鼠中建立人免疫系统。

[0027] 在初期的尝试中希望建立能对抗原起反应而产生具有人序列的抗体的转基因小鼠 (参见 Bruggemann 等, Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 86 :6709-6713 (1989)), 但却受限于可用克隆载体所稳定保持的 DNA 量。采用酵母人工染色体 (YAC) 克隆载体将人 Ig 基因座的大种系片段导入转基因哺乳动物。采用 YAC 将基本上大部分人 V、D 和 J 区域基因 (它们的排列间隔与人基因组中发现的相同) 和人恒定区导入小鼠。已知一种此类转基因小鼠品系,其称作 XenoMouse® 小鼠,可购自阿目金弗里蒙特公司 (Amgen Fremont, Inc., 加拿大弗里蒙特)。

[0028] 发明概述

[0029] 本发明提供了结合于 24P4C12 蛋白和 24P4C12 蛋白的多肽片段的抗体、及其结合片段和抗体药物偶联物 (ADC)。在一些实施方式中,本发明包括偶联于治疗剂的全长人抗体。在某些实施方式中,前提是不编码图 3 中的整个核酸序列和 / 或不制备图 2 中的整个氨基酸序列。在某些实施方式中,编码图 3 的整个核酸序列和 / 或制备图 2 的整个氨基酸序列,两者均为各自的人单位剂型。

[0030] 本发明还提供了治疗表达 24P4C12 的癌症 (例如表 I 中列出的组织的癌症) 的各种免疫原性或治疗性组合物 (例如抗体药物偶联物) 以及方案。

[0031] 附图简述

[0032] 图 1. 24P4C12 的核酸和氨基酸序列。图 1A. 24P4C12 变体 1 (也称为“24P4C12v. 1”或“24P4C12 变体 1”) 的 cDNA 和氨基酸序列示于图 1A 中。起始的甲硫氨酸以下划线标示。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2138, 包括终止密码子。

[0033] 图 1B. 24P4C12 变体 2 (也称为“24P4C12v. 2”) 的 cDNA 和氨基酸序列示于图 1B 中。起始甲硫氨酸的密码子以下划线标示。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2138, 包括终止密码子。

[0034] 图 1C. 24P4C12 变体 3 (也称为“24P4C12v. 3”) 的 cDNA 和氨基酸序列示于图 1C 中。起始甲硫氨酸的密码子以下划线标示。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2138, 包括终止密码子。

[0035] 图 1D. 24P4C12 变体 4 (也称为“24P4C12v. 4”) 的 cDNA 和氨基酸序列示于图 1D 中。起始甲硫氨酸的密码子以下划线标示。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2138, 包括终止密码子。

[0036] 图 1E. 24P4C12 变体 5 (也称为“24P4C12v. 5”) 的 cDNA 和氨基酸序列示于图 1E 中。起始甲硫氨酸的密码子以下划线标示。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2138, 包括终止密码子。

[0037] 图 1F. 24P4C12 变体 6 (也称为“24P4C12v. 6”) 的 cDNA 和氨基酸序列示于图 1F 中。起始甲硫氨酸的密码子以下划线标示。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2138, 包括终止密码子。

[0038] 图 1G。24P4C12 变体 7(也称为“24P4C12v.7”)的 cDNA 和氨基酸序列示于图 1G 中。起始甲硫氨酸的密码子以下划线标示。开放阅读框从核酸 6 延伸至 1802,包括终止密码子。

[0039] 图 1H。24P4C12 变体 8(也称为“24P4C12v.8”)的 cDNA 和氨基酸序列示于图 1H 中。起始甲硫氨酸的密码子以下划线标示。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2174,包括终止密码子。

[0040] 图 1I。24P4C12 变体 9(也称为“24P4C12v.9”)的 cDNA 和氨基酸序列示于图 1I 中。起始甲硫氨酸的密码子以下划线标示。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2144,包括终止密码子。

[0041] 图 2。24P4C12 抗体的核酸和氨基酸序列。

[0042] 图 2A。Ha5-1(5)2.1 重链的 cDNA 和氨基酸序列。双下划线所示的是前导序列,下划线所示的是重链可变区,以虚线下划标示的是人 IgG2 恒定区。

[0043] 图 2B。Ha5-1(5)2.1 轻链的 cDNA 和氨基酸序列。双下划线所示的是前导序列,下划线所示的是轻链可变区,以虚线下划标示的是人 κ 恒定区。

[0044] 图 3。24P4C12 抗体的氨基酸序列。

[0045] 图 3A。Ha5-1(5)2.1 重链的氨基酸序列。双下划线所示的是前导序列,下划线所示的是重链可变区,以虚线下划标示的是人 IgG2 恒定区。

[0046] 图 3B。Ha5-1(5)2.1 轻链的氨基酸序列。双下划线所示的是前导序列,下划线所示的是轻链可变区,以虚线下划标示的是人 κ 恒定区。

[0047] 图 4。Ha5-1(5)2.1 抗体与人 Ig 种系的比对。

[0048] 图 4A。Ha5-1(5)2.1 重链与人 Ig 种系的比对。

[0049] 图 4B。Ha5-1(5)2.1 轻链与人 Ig 种系的比对。

[0050] 图 5。Ha5-1(5)2.1MAb 结合于 24P4C12 的细胞表面。用从 Ha5-1(5)2.1 重链和轻链载体构建物转染的 CHO 细胞或杂交瘤纯化的 Ha5-1(5)2.1MAb 染色 PC3-对照和 PC3-24P4C12 细胞。采用流式细胞术检测结合。结果显示 CHO 细胞产生的 Ha5-1(5)2.1 与杂交瘤产生的 Ha5-1(5)2.1 类似地结合 24P4C12。

[0051] 图 6。Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 的细胞毒性。在经工程改造表达 24P4C12 的 PC3 细胞中评估 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 的细胞毒性。在第 1 天将 PC3-Neo 或 PC3-24P4C12 细胞(1000 个细胞/孔)接种至 96 孔板上。第 2 天将包含所示浓度的 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 或偶联于 vc-MMAE 的对照 MAb 的等体积培养基加入各孔中。在 37℃ 下孵育细胞 4 天。在孵育期结束时在各孔中加入阿尔玛蓝(Alamar Blue),然后再孵育 4 小时。采用保特(Biotek)读板仪在 620nm 的激发波长和 540nm 的发射波长下检测所得荧光。结果显示 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 介导 PC3-24P4C12 细胞中的细胞毒性,而与 vcMMAE 偶联的对照人 IgG 没有效果。这些结果表明 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 能将细胞毒性药物选择性递送到表达 24P4C12 的细胞,从而杀伤这些细胞。

[0052] 图 7。Ha5-1(5)2.1vcMMAE 抑制 SCID 小鼠中皮下建立的人非雄激素依赖性前列腺癌异种移植物的生长。在该实验中,将非雄激素依赖性人前列腺癌 PC-3-Hu24P4C12 肿瘤细胞(3.0×10^6 个细胞/小鼠)皮下注射到雄性 SCID 小鼠中。当肿瘤达到 100mm^3 时,将小鼠随机分为 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 组和 PBS 对照组(每组中 $n = 5$)。在第 0 天时,用单

剂量 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE (10mg/kg) 或 PBS 静脉给药 (i. v.) 处理小鼠。按指示每 3-4 天用游标卡尺测量以监控肿瘤的生长。肿瘤体积计算为宽度 $2 \times$ 长度 $/2$, 其中宽度是最小尺寸, 长度是最大尺寸。结果显示用 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE 处理显著抑制了 SCID 小鼠中 PC-3-Hu24P4C12 前列腺肿瘤的生长 ($p < 0.01$), 并在绝大多数动物中使得肿瘤完全消退。

[0053] 图 8. Ha5-1 (5) 2. 1vcMMAE 抑制 SCID 小鼠中常位建立的人非雄激素依赖性前列腺癌异种移植物的生长。将 LAPC-9AI 非雄激素依赖性人前列腺癌细胞 (2.0×10^6 个细胞 / 小鼠) 植入雄性 SCID 小鼠的前列腺。移植后 15 天肿瘤良好建立且可触及, 此时将小鼠随机分为两组 (每组中 $n = 8$)。如下对小鼠进行处理: 用 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE 或偶联于 vcMMAE 的同种型对照 MAbs 每 4 天以 3mg/kg 静脉内给药, 共 4 剂。在研究结束时, 切取小鼠前列腺中的肿瘤并用电子称称重。结果显示用 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE 处理显著抑制了 SCID 小鼠中常位移植的人 LAPC9-AI 前列腺肿瘤的生长 ($p < 0.01$)。

[0054] 图 9. Ha5-1 (5) 2. 1vcMMAE 抑制 SCID 小鼠中皮下建立的人非雄激素依赖性结肠癌异种移植物的生长。将 HT-29 人结肠癌细胞 (1.0×10^6 个细胞 / 小鼠) 经皮下注射到 SCID 小鼠中。当肿瘤达到 100mm^3 时, 将小鼠随机分为两组 (每组中 $n = 6$)。从第 0 天开始, 每 4 天静脉内给予 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE (3mg/kg) 或 PBS, 共给予 4 剂。按指示每 3-4 天用游标卡尺检测监控肿瘤的生长。肿瘤体积计算为宽度 $2 \times$ 长度 $/2$, 其中宽度是最小尺寸, 长度是最大尺寸。结果显示用 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE 处理显著抑制了皮下植入 SCID 小鼠的 HT-29 结肠肿瘤异种移植物的生长 ($p < 0.01$)。

[0055] 图 10. Ha5-1 (5) 2. 1vcMMAE 抑制 SCID 小鼠中皮下建立的患者来源结肠癌异种移植物的生长。将 AG-C4 (患者来源的结肠癌异种移植肿瘤切片) 皮下植入 SCID 小鼠。当肿瘤达到 100mm^3 时, 将小鼠随机分为两组 (每组中 $n = 6$)。从第 0 天开始, 每 3-4 天静脉内给予 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE (3mg/kg) 或 PBS, 共给予 4 剂。按指示每 3-4 天用游标卡尺检测监控肿瘤的生长。肿瘤体积计算为宽度 $2 \times$ 长度 $/2$, 其中宽度是最小尺寸, 长度是最大尺寸。结果显示用 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE 处理显著抑制了皮下植入 SCID 小鼠的 AG-C4 人结肠肿瘤异种移植物的生长 ($p < 0.05$)。

[0056] 图 11. Ha5-1 (5) 2. 1vcMMAE 抑制裸鼠中皮下建立的人卵巢癌异种移植物的生长。将 OVCAR-5 人卵巢癌肿瘤细胞 (2.0×10^6 个细胞 / 小鼠) 皮下注射到裸鼠中。当肿瘤达到 100mm^3 时, 将小鼠随机分为两组 (每组中 $n = 6$)。从第 0 天开始, 每 3-4 天静脉内给予 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE (5mg/kg) 或 PBS 1 次, 共给予 4 剂。按指示每 3-4 天用游标卡尺测量以监控肿瘤的生长。肿瘤体积计算为宽度 $2 \times$ 长度 $/2$, 其中宽度是最小尺寸, 长度是最大尺寸。结果显示用 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE 处理显著抑制了皮下植入裸鼠的 OVCAR-5 人卵巢癌肿瘤异种移植物的生长 ($p < 0.01$)。

[0057] 图 12. Ha5-1 (5) 2. 1vcMMAE 抑制 SCID 小鼠中皮下建立的患者来源的胰腺癌异种移植物的生长。将 AG-Panc3 患者来源胰腺肿瘤切片皮下植入 SCID 小鼠。当肿瘤达到 85mm^3 时, 将小鼠随机分为两组 (每组中 $n = 6$)。从第 0 天开始, 每 3-4 天静脉内给予 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE (5mg/kg) 或 PBS 1 次, 共给予 4 剂。按指示每 3-4 天用游标卡尺检测监控肿瘤的生长。肿瘤体积计算为宽度 $2 \times$ 长度 $/2$, 其中宽度是最小尺寸, 长度是最大尺寸。结果显示用 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE 处理显著抑制了皮下植入 SCID 小鼠的 AG-Panc3 肿瘤异种移植物的生长 ($p < 0.01$)。

[0058] 图 13. Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 与其它 24P4C12 抗体药物偶联物 (ADC) 在前列腺癌 LAPC9-AD 异种移植瘤中的效果比较。将 LAPC-9AD 雄激素依赖性人前列腺癌细胞 (1.5×10^6 个细胞 / 小鼠) 皮下注射到雄性 SCID 小鼠中。如图 (图 13) 中所示, 将小鼠随机分组: Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 组、Ha5-1(5)2.1-mcMMAF 组和其它抗体药物偶联物 (ADC) 组, 包括 PBS 对照组 (每组中 $n = 6$)。当肿瘤达到 100mm^3 时, 在第 0 天以 10mg/kg 的剂量静脉内给予 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE、Ha5-1(5)2.1-mcMMAF 和所有其它 ADC 一次。按指示每 3-4 天用游标卡尺测量以监控肿瘤的生长。肿瘤体积计算为宽度 $2 \times$ 长度 $/2$, 其中宽度是最小尺寸, 长度是最大尺寸。结果显示: 与 Ha5-1(5)2.1-mcMMAF 相比, 用 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 处理显著抑制了 LAPC9-AD 前列腺癌异种移植瘤的生长 ($p = 0.0048$)。 (图 13)。其它偶联于 -vcMMAE 和 -mcMMAF 的抗体不具有任何肿瘤抑制活性, 这显示了 Ha5-1(5)2.1 具有抑制肿瘤生长的显著突出效果, 且能用于治疗目的以治疗和控制表 I 中所列的癌症。

[0059] 图 14. 用 IHC 在胃癌患者样本中检测 24P4C12 蛋白。通过免疫组织化学法在胃癌患者的两种不同肿瘤样本中测试 24P4C12 蛋白的表达。简而言之, 将用福尔马林固定、石蜡包埋的组织切成 4 微米的切片, 并固定于载玻片上。对切片进行脱蜡、复水, 并用胰蛋白酶溶液 (0.05% 胰蛋白酶 (ICN, 俄亥俄州欧罗拉公司 (Aurora, Ohio)) 的 0.05% 氯化钙溶液, pH 调节为 7.8) 在 37°C 下处理 10 分钟。然后用 3% 过氧化氢溶液处理切片使得内源的过氧化物酶失活。用无血清蛋白封闭物 (Dako 公司, 加拿大卡奔塔利亚 (Carpenteria, CA)) 抑制非特异性结合, 然后与单克隆小鼠抗 24P4C12 抗体或同种型对照共同孵育。随后, 用超敏感 (Super Sensitive™) 聚合物辣根过氧化物酶 (HRP) 检测系统处理切片, 包括在超级增强剂 (Super Enhancer™ reagent) 中孵育, 然后在聚合物-HRP 二抗偶联物 (拜吉公司, 加拿大圣雷蒙 (BioGenex, San Ramon, CA)) 中孵育。然后, 用 DAB 试剂盒 (拜吉公司, 加拿大圣雷蒙) 对切片进行显影, 用苏木精染色细胞核, 用亮视野显微术进行分析。用 24P4C12 免疫反应性抗体在患者样本中检测到特异性染色, 如棕色染色所示。 (参见, 图 14(A) 和 14(C)。相反, 对照抗体未使任一种患者样本染色。 (参见, 图 14(B) 和 14(D)。该结果显示 24P4C12 在患者胃癌组织的肿瘤细胞中表达。这些结果表明 24P4C12 在人癌症中表达, 针对该抗原的抗体 (例如 Ha5-1(5)2.1) 可用于诊断和治疗目的。 (图 14(A)-14(D))。

[0060] 发明详述

[0061] 章节概述

[0062] I.) 定义

[0063] II.) 24P4C12 抗体

[0064] III.) 抗体药物偶联物概述

[0065] III(A). 类美坦西醇 (Maytansinoids)

[0066] III(B). 耳他汀 (Auristatins) 和多拉司他汀 (dolostatins)

[0067] III(C). 卡奇霉素

[0068] III(D). 其它细胞毒剂

[0069] IV.) 结合 24P4C12 的抗体药物偶联物

[0070] V.) 接头单元

[0071] VI.) 延伸物单元

[0072] VII.) 氨基酸单元

[0073] VIII.) 间隔物单元

[0074] IX.) 药物单元

[0075] X.) 药物加载

[0076] XI.) 测定 ADC 细胞毒效果的方法

[0077] XII.) 表达 24P4C12 的癌症的治疗

[0078] XIII.) 24P4C12 作为抗体治疗的靶标

[0079] XIV.) 24P4C12ADC 鸡尾酒疗法

[0080] XV.) 联合治疗

[0081] XVI.) 试剂盒 / 制品的制造

[0082] I.) 定义：

[0083] 除非另有说明，本文所用的所有技术术语、符号以及其它科学名词或术语具有本发明所属技术领域技术人员常规理解的含义。一些情况下，为澄清和 / 或便于参考在本文定义具有常规理解含义的术语，本文包括这种定义不应解释为它与本领域的通常理解的含义有实质性区别。这里描述或引用的许多技术和方法是熟知的，通常可由本领域技术人员采用常规方法实施，例如 Sambrook 等的《分子克隆实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (第二版, 1989, 冷泉港实验室出版公司 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 冷泉港, 纽约) 中所述的广泛采用的在分子克隆法。除非另有说明，使用市售试剂盒和试剂的方法宜通常按照制造商规定的过程和 / 或参数进行。

[0084] 当本文中采用商品名称时，除非文中另有说明，提及该商品名称还指该商品名称产品的产品成分、普通药物以及活性药物成分。

[0085] 术语“晚期癌症”、“局部晚期癌症”、“晚期疾病”和“局部晚期疾病”是指已经扩展突破相关组织包膜的癌症，意味着包括美国泌尿学会 (AUA) 系统定义的第 C 期疾病、惠特莫 - 朱伊特 (Whitmore-Jewett) 系统定义的第 C1-C2 期疾病和 TNM (肿瘤、结节、转移) 系统定义的第 T3-T4 期及 N+ 期疾病。通常不推荐对局部晚期疾病患者进行手术，相比临床局部性 (器官局限性) 癌症患者，这些患者的手术结果基本上都不佳。

[0086] 缩写“AFP”是指二甲基缬氨酸 - 缬氨酸 - 多拉异亮氨酸 - 多拉脯氨酸 - 苯丙氨酸 - 对 - 苯二胺 (dimethylvaline-valine-dolaisoleuine-dolaproine-phenylalanine-p-phenylenediamine) (参见下文中的式 XVI)。

[0087] 缩写“MMAE”是指单甲基耳他汀 E (参见下文中的式 XI)。

[0088] 缩写“AEB”是指耳他汀 E 与对乙酰基苯甲酸反应产生的酯 (参见下文中的式 XX)。

[0089] 缩写“AEBV”是指耳他汀 E 与苯甲酰基戊酸反应产生的酯 (参见下文中的式 XXI)。

[0090] 缩写“MMAF”是指杜缬氨酸 - 缬氨酸 - 多拉异亮氨酸 - 多拉脯氨酸 - 苯丙氨酸 (d-ovaline-valine-dolaisoleuine-dolaproine-phenylalanine) (参见下文中的式 XIV)。

[0091] 除非另有说明，术语“烷基”是指具有约 1-20 个碳原子 (以及其中碳原子的范围和特定数量的所有组合和亚组合)、优选约 1-8 个碳原子的饱和直链或支链烃基。烷基的例子为：甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、和 3,3-二甲基-2-丁

基。

[0092] 不论是单独或是作为其它基团的一部分,烷基可任选被一个或多个基团、优选 1-3 个基团(和选自卤素的任何其它取代基)所取代,这些取代基包括但不限于:-卤素、-O-(C₁-C₈ 烷基)、-O-(C₂-C₈ 烯基)、-O-(C₂-C₈ 炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂和-CN,其中各 R' 独立选自:-H、-C₁-C₈ 烷基、-C₂-C₈ 烯基、-C₂-C₈ 炔基、或-芳基,且其中所述 -O-(C₁-C₈ 烷基)、-O-(C₂-C₈ 烯基)、-O-(C₂-C₈ 炔基)、-芳基、-C₁-C₈ 烷基、-C₂-C₈ 烯基和 -C₂-C₈ 炔基可任选进一步被一个或多个基团所取代,所述一个或多个基团包括但不限于:-C₁-C₈ 烷基、-C₂-C₈ 烯基、-C₂-C₈ 炔基、-卤素、-O-(C₁-C₈ 烷基)、-O-(C₂-C₈ 烯基)、-O-(C₂-C₈ 炔基)、-芳基、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH₂、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')₂、-NHC(O)R''、-SR''、-SO₃R''、-S(O)₂R''、-S(O)R''、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R'')、-N(R'')₂和-CN,其中各 R'' 独立选自:-H、-C₁-C₈ 烷基、-C₂-C₈ 烯基、-C₂-C₈ 炔基、或-芳基。

[0093] 除非另有说明,术语“烯基”和“炔基”是指包含约 2-20 个碳原子(以及其中碳原子的范围和特定数量的所有组合和亚组合)、优选约 2-8 个碳原子的直链和支链碳链。烯基链在链中至少有一个双键,炔基链在链中至少有一个三键。烯基的例子包括但不限于:乙炔或乙烯基、烯丙基、-1-丁烯基、-2-丁烯基、-异丁烯基、-1-戊烯基、-2-戊烯基、-3-甲基-1-丁烯基、-2-甲基-2-丁烯基、和-2,3-二甲基-2-丁烯基。炔基的例子包括但不限于:炔属(acetylenic)、炔丙基(propargyl)、乙炔基、丙炔基、-1-丁炔基、-2-丁炔基、-1-戊炔基、-2-戊炔基和-3-甲基-1-丁炔基。

[0094] 不论是单独或是作为其它基团的一部分,烯基和炔基可任选被一个或多个基团、优选 1-3 个基团(以及选自卤素的任何其它取代基)所取代,这些取代基包括但不限于:-卤素、-O-(C₁-C₈ 烷基)、-O-(C₂-C₈ 烯基)、-O-(C₂-C₈ 炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂和-CN,其中各 R' 独立选自:-H、-C₁-C₈ 烷基、-C₂-C₈ 烯基、-C₂-C₈ 炔基或-芳基,且其中所述 -O-(C₁-C₈ 烷基)、-O-(C₂-C₈ 烯基)、-O-(C₂-C₈ 炔基)、-芳基、-C₁-C₈ 烷基、-C₂-C₈ 烯基和 -C₂-C₈ 炔基可任选的进一步被一个或多个取代基所取代,所述取代基包括但不限于:-C₁-C₈ 烷基、-C₂-C₈ 烯基、-C₂-C₈ 炔基、-卤素、-O-(C₁-C₈ 烷基)、-O-(C₂-C₈ 烯基)、-O-(C₂-C₈ 炔基)、-芳基、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH₂、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')₂、-NHC(O)R''、-SR''、-SO₃R''、-S(O)₂R''、-S(O)R''、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R'')、-N(R'')₂和-CN,其中各 R'' 独立选自:-H、-C₁-C₈ 烷基、-C₂-C₈ 烯基、-C₂-C₈ 炔基或-芳基。

[0095] 除非另有说明,术语“亚烷基”是指具有约 1-20 个碳原子(以及其中碳原子的范围和特定数量的所有组合和亚组合)、优选约 1-8 个碳原子的饱和支链或直链烃基,其具有通过从母体烷烃的同一或两个不同碳原子上去除两个氢原子而产生的两个单价基团中心(radical center)。典型的亚烷基包括但不限于:亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基、亚己基、亚庚基、亚辛基、亚壬基、亚癸基、1,4-亚环己基等。不论是单独或是作为其它基团的一部分,亚烷基可任选被一个或多个基团、优选 1-3 个基团(以及选自卤素的任何其它取代基)所取代,这些基团包括但不限于:-卤素、-O-(C₁-C₈ 烷基)、-O-(C₂-C₈ 烯基、

基)、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 炔基})$ 、 $- \text{芳基}$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和 $-CN$,其中各 R' 独立选自: $-H$ 、 $-C_1-C_8 \text{ 烷基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 烯基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 炔基}$ 或 $- \text{芳基}$ 、其中所述 $-O-(C_1-C_8 \text{ 烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 炔基})$ 、 $- \text{芳基}$ 、 $-C_1-C_8 \text{ 烷基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 烯基}$ 和 $-C_2-C_8 \text{ 炔基}$ 可进一步任选被一个或多个取代基所取代,这些取代基包括但不限于: $-C_1-C_8 \text{ 烷基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 烯基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 炔基}$ 、 $- \text{卤素}$ 、 $-O-(C_1-C_8 \text{ 烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 炔基})$ 、 $- \text{芳基}$ 、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 和 $-CN$,其中各 R'' 独立选自: $-H$ 、 $-C_1-C_8 \text{ 烷基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 烯基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 炔基}$ 或 $- \text{芳基}$ 。

[0096] 除非另有说明,术语“亚烯基”是指包含至少一个碳-碳双键的任选取代的亚烃基。示例性的亚烯基包括例如:亚乙烯基($-CH=CH-$)和亚丙烯基($-CH=CHCH_2-$)。

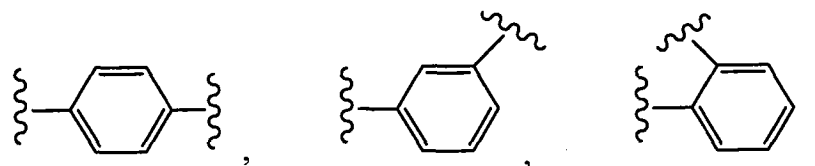
[0097] 除非另有说明,术语“亚炔基”是指包含至少一个碳-碳三键的任选取代的亚烃基。示例性的亚炔基包括例如:亚乙炔基($-C\equiv C-$)、亚丙炔基($-CH_2C\equiv C-$)和4-戊炔基($-CH_2CH_2CH_2C\equiv CH-$)。

[0098] 除非另有说明,术语“芳基”是指6-20个碳原子(以及其中碳原子的范围和特定数量的所有组合和亚组合)的单价芳族烃基,其是从母体芳环系统的单个碳原子上去除一个氢原子而衍生得到的。一些芳基用示例性的结构“Ar”表示。典型的芳基包括但不限于:衍生自苯的基团、取代的苯、苯基、萘、蒽、联苯基等。

[0099] 不论是单独或是作为其它基团的一部分,芳基可任选被一个或多个基团、优选1-5个基团或甚至1-2个基团所取代,这些基团包括但不限于: $- \text{卤素}$ 、 $-C_1-C_8 \text{ 烷基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 烯基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 炔基}$ 、 $-O-(C_1-C_8 \text{ 烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 炔基})$ 、 $- \text{芳基}$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和 $-CN$,其中各 R' 独立选自: $-H$ 、 $-C_1-C_8 \text{ 烷基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 烯基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 炔基}$ 或 $- \text{芳基}$ 、其中所述 $-C_1-C_8 \text{ 烷基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 烯基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 炔基}$ 、 $-O-(C_1-C_8 \text{ 烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 炔基})$ 和 $- \text{芳基}$ 可进一步任选的被一个或多个取代基所取代,这些取代基包括但不限于: $-C_1-C_8 \text{ 烷基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 烯基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 炔基}$ 、 $- \text{卤素}$ 、 $-O-(C_1-C_8 \text{ 烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 炔基})$ 、 $- \text{芳基}$ 、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 和 $-CN$,其中各 R'' 独立选自: $-H$ 、 $-C_1-C_8 \text{ 烷基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 烯基}$ 、 $-C_2-C_8 \text{ 炔基}$ 或 $- \text{芳基}$ 。

[0100] 除非另有说明,术语“亚芳基”是指任选取代的二价芳基(即,从母体芳环系统的同一个或两个不同碳原子上去除两个氢原子而衍生得到),其可为如下结构所示的对位、间位或邻位构型,其中苯基是示范性芳基。

[0101]



[0102] 典型的“ $-(C_1-C_8 \text{ 亚烷基}) \text{ 芳基}$ ”、“ $-(C_2-C_8 \text{ 亚烯基}) \text{ 芳基}$ ”和“ $-(C_2-C_8 \text{ 亚炔基}) \text{ 芳基}$ ”包括但不限于:苄基、2-苯乙-1-基、2-苯乙烯-1-基、萘甲基、2-萘乙-1-基、2-萘乙

烯-1-基、萘苄基 (naphthobenzyl)、2-萘苄基乙-1-基等。

[0103] 除非另有说明,术语“杂环”是指具有 3-14 个环原子(也称为环成员)的单环、双环或多环系统,其中至少一个环中的至少一个环原子是选自 N、O、P 或 S 的杂原子(以及碳原子和其中的杂原子的范围和特定数的所有组合和亚组合)。杂环可具有 1-4 个独立选自 N、O、P 或 S 的环杂原子。杂环中的一个或多个 N、C 或 S 原子可被氧化。单环杂环优选具有 3-7 个环成员(例如,2-6 个碳原子和 1-3 个独立选自 N、O、P 或 S 的杂原子),双环杂环优选具有 5-10 个环成员(例如,4-9 个碳原子和 1-3 个独立选自 N、O、P 或 S 的杂原子)。包含杂原子的环可为芳香性的或非芳香性的。除非另有说明,杂环在任何杂原子或碳原子处与其侧基连接,形成稳定的结构。

[0104] 杂环在如下文献中有所描述:Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" ("现代杂环化学原理", W. A. Benjamin, 纽约, 1968), 尤其是第 1、3、4、6、7 和 9 章; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" ("杂环化合物化学, 专题论文系列", 约翰威利父子出版公司 (John Wiley & Sons, 纽约, 1950 至今), 尤其是第 13、14、16、19 和 28 卷; 以及 J. Am. Chem. Soc. 82 :5566 (1960)。

[0105] “杂环”基团的例子包括, 举例但不限于: 吡啶基、二氢吡啶基、四氢吡啶基(哌啶基)、噻唑基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、苯并呋喃基、硫萘基(thianaphthalenyl)、吲哚基、吲哚美辛基(indolenyl)、喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、哌啶基、4-哌啶酮基、吡咯烷基、2-吡咯烷酮基、吡咯啉基、四氢呋喃基、双-四氢呋喃基、四氢吡喃基、双-四氢吡喃基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、八氢异喹啉基、吡辛因基、三嗪基、6H-1,2,5-噻二嗪基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、噻吩基、噻蒎基、吡喃基、异苯并呋喃基、色烯基、咕吨基、吩噻噁基(phenoxathinyl)、2H-吡咯基、异噻唑基、异噁唑基、吡嗪基、哒嗪基、吲哚嗪基、异吲哚基、3H-吲哚基、1H-吲唑基、嘌呤基、4H-喹嗪基、酚嗪基、萘啶基、喹噁啉基、喹唑啉基、噌啉基、喋啶基、4H-呋唑基、呋唑基、 β -呋啉基、菲啶基、吡啶基、嘧啶基、菲咯啉基、吩嗪基、吩噻嗪基、呋咱基、吩噻嗪基、异色满基、色满基、咪唑烷基、咪唑啉基、吡唑烷基、吡唑啉基、哌嗪基、二氢吲哚基、异二氢吲哚基、奎宁环基、吗啉基、噁唑烷基、苯并三唑基、苯并异噁唑基、羟基吲哚基、苯并噁唑啉基、和靛红酰基(isatinoyl)。优选的“杂环”基团包括但不限于: 苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、苯并吡唑基、香豆素基、异喹啉基、吡咯基、噻吩基、呋喃基、噻唑基、咪唑基、吡唑基、三唑基、喹啉基、嘧啶基、吡啶基、吡啶酮基、吡嗪基、哒嗪基、异噻唑基、异噁唑基和四唑基。

[0106] 不论是单独或是作为其它基团的一部分, 杂环基团可任选被一个或多个、优选 1-2 个基团所取代, 包括但不限于: $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、- 卤素、 $-O-(C_1-C_8 \text{ 烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 炔基})$ 、- 芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和 $-CN$, 其中各 R' 独立选自: $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或 - 芳基, 且其中所述 $-O-(C_1-C_8 \text{ 烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 炔基})$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基和 - 芳基可进一步任选被一个或多个取代基所取代, 所述取代基包括但不限于: $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、- 卤素、 $-O-(C_1-C_8 \text{ 烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8 \text{ 炔基})$ 、- 芳基、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 。

R''、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R'')、-N(R'')₂ 和 -CN, 其中各 R'' 独立选自: -H、-C₁-C₈ 烷基、-C₂-C₈ 烯基、-C₂-C₈ 炔基或芳基。

[0107] 举例但不限于, 碳结合的杂环可结合于以下位置: 吡啶的 2、3、4、5 或 6 位; 哒嗪的 3、4、5 或 6 位; 嘧啶的 2、4、5 或 6 位; 吡嗪的 2、3、5 或 6 位; 呋喃、四氢呋喃、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氢吡咯的 2、3、4 或 5 位; 噁唑、咪唑或噻唑的 2、4 或 5 位; 异噁唑、吡唑或异噻唑的 3、4 或 5 位; 氮丙啶的 2 或 3 位; 氮杂环丁烷的 2、3 或 4 位; 喹啉的 2、3、4、5、6、7 或 8 位; 或异喹啉的 1、3、4、5、6、7 或 8 位。庚典型的碳结合的杂环包括: 2- 吡啶基、3- 吡啶基、4- 吡啶基、5- 吡啶基、6- 吡啶基、3- 哒嗪基、4- 哒嗪基、5- 哒嗪基、6- 哒嗪基、2- 嘧啶基、4- 嘧啶基、5- 嘧啶基、6- 嘧啶基、2- 吡嗪基、3- 吡嗪基、5- 吡嗪基、6- 吡嗪基、2- 噻唑基、4- 噻唑基或 5- 噻唑基。

[0108] 举例但不限于, 氮结合的杂环可结合于以下位置: 氮丙啶、氮杂环丁烷、吡咯、吡咯烷、2- 吡咯啉、3- 吡咯啉、咪唑、四氢咪唑、2- 咪唑啉、3- 咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2- 吡唑啉、3- 吡唑啉、哌啶、哌嗪、吡啶、二氢吡啶或 1H- 吡啶的 1 位; 异吡啶或异二氢吡啶的 2 位; 吗啉的 4 位; 以及呋喃或 β- 呋喃的 9 位。更典型的氮结合杂环包括: 1- 吡啶基 (1-aziridyl)、1- 氮杂环丁烷基 (1-azetedylyl)、1- 吡咯基、1- 咪唑基、1- 吡唑基、和 1- 哌啶基。

[0109] 除非另有说明, 术语“碳环 (carbocycle)”是指具有 3-14 个环原子 (以及其中碳原子的范围和特定数量的所有组合和亚组合) 的饱和或不饱和非芳香单环、双环或多环系统, 其中所有的环原子均为碳原子。单环的碳环优选具有 3-6 个环原子, 更优选 5 或 6 个环原子。双环的碳环优选具有 7-12 个环原子, 例如, 排列为双环 [4, 5]、[5, 5]、[5, 6] 或 [6, 6] 的系统, 或者排列为双环 [5, 6] 或 [6, 6] 的 9 或 10 个环原子的系统。术语“碳环”包括例如与芳环融合的单环碳环 (例如, 与苯环融合的单环碳环)。碳环优选具有 3-8 个碳环原子。

[0110] 不论是单独或是作为其它基团的一部分, 碳环基团可任选被例如一个或多个基团、优选 1 或 2 个基团 (以及选自卤素的任何其它取代基) 所取代, 这些取代基包括但不限于: - 卤素、-C₁-C₈ 烷基、-C₂-C₈ 烯基、-C₂-C₈ 炔基、-O-(C₁-C₈ 烷基)、-O-(C₂-C₈ 烯基)、-O-(C₂-C₈ 炔基)、- 芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂ 和 -CN, 其中各 R' 独立选自: -H、-C₁-C₈ 烷基、-C₂-C₈ 烯基、-C₂-C₈ 炔基或 - 芳基, 且其中所述 -C₁-C₈ 烷基、-C₂-C₈ 烯基、-C₂-C₈ 炔基、-O-(C₁-C₈ 烷基)、-O-(C₂-C₈ 烯基)、-O-(C₂-C₈ 炔基) 和 - 芳基可进一步被一个或多个取代基任选取代, 这些取代基包括但不限于: -C₁-C₈ 烷基、-C₂-C₈ 烯基、-C₂-C₈ 炔基、- 卤素、-O-(C₁-C₈ 烷基)、-O-(C₂-C₈ 烯基)、-O-(C₂-C₈ 炔基)、- 芳基、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH₂、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')₂、-NHC(O)R''、-SR''、-SO₃R''、-S(O)₂R''、-S(O)R''、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R'')、-N(R'')₂ 和 -CN, 其中各 R'' 独立选自: -H、-C₁-C₈ 烷基、-C₂-C₈ 烯基、-C₂-C₈ 炔基或 - 芳基。

[0111] 单环碳环取代基的例子包括: - 环丙基、- 环丁基、- 环戊基、-1- 环戊 -1- 烯基、-1- 环戊 -2- 烯基、-1- 环戊 -3- 烯基、环己基、-1- 环己 -1- 烯基、-1- 环己 -2- 烯基、-1- 环己 -3- 烯基、- 环庚基、- 环辛基、-1, 3- 环己二烯基、-1, 4- 环己二烯基、-1, 3- 环庚二烯基、-1, 3, 5- 环庚三烯基和 - 环辛二烯基。

[0112] 不论是单独使用或是作为其它基团的一部分,“碳环基(carbocyclo)”是指二价的、任选取代的如上所定义的碳环基团(即,通过从母体碳环环系统的同一个或两个不同碳原子上去除两个氢原子衍生得来)。

[0113] 除非上下文中另有说明,短划线(-)表明与侧基分子连接的点。由此,术语“-(C₁-C₈亚烷基)芳基”或“-C₁-C₈亚烷基(芳基)”是指如本文中所定义的C₁-C₈亚烷基,其中亚烷基与侧基分子在该亚烷基的任何碳原子处连接,并且该亚烷基的一个碳原子上所连的氢原子之一被本文中所定义的芳基所替代。

[0114] 当一个具体基团“被取代”时,该基团可具有一个或多个取代基,优选1-5个取代基,更优选1-3个取代基,最优选1-2个取代基,这些取代基独立选自取代基列表。然而,该基团通常可具有任何数量选自卤素的取代基。被取代的基团就是如此表明的。

[0115] 在分子中具体位置上的任何取代基或变量的定义应独立于其在该分子中其它位置的定义。应知道,本发明化合物上的取代基和取代模式可由本领域普通技术人员选择,以提供化学稳定的、通过本领域中已知的技术以及本文中所揭示的方法不难合成的化合物。

[0116] 本文所用的保护基是指选择性封闭(临时性或永久性)多官能化合物中一个反应性位点的基团。用于本发明中合适的羟基保护基是药学上可接受的,在给予对象后为了使化合物具有活性,这些保护基需要或无需从母体化合物上切除。切除通过体内常规的代谢过程进行。在本领域中熟知羟基保护基,参见为所有目的通过引用全文纳入本文的T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts 所著的“protective groups in Organic Synthesis”(“有机合成中的保护基”,约翰威利父子出版公司,第三版),包括,例如:醚(例如,烷基醚和硅醚,包括例如,二烷基硅醚、三烷基硅醚、二烷基烷氧基硅醚)、酯、碳酸酯、氨基甲酸酯、磺酸酯和磷酸酯保护基。羟基保护基的例子包括但不限于:甲醚;甲氧基甲醚、甲硫甲醚、(苯基二甲基甲硅烷基)甲氧基甲醚、苄氧基甲醚、对甲氧基苄氧基甲醚、对硝基苄氧基甲醚、邻硝基苄氧基甲醚、(4-甲氧基苄氧基)甲醚、邻甲氧基苯酚甲醚、叔丁氧基甲醚、4-戊烯基氧基甲醚、硅氧基甲醚、2-甲氧基乙氧基甲醚、2,2,2-三氯乙氧基甲醚、双(2-氯乙氧基)甲醚、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲醚、薄荷氧基甲醚、四氢吡喃基醚、1-甲氧基环己基醚、4-甲氧基四氢噻喃基醚、4-甲氧基四氢噻喃基醚S, S-二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基哌啶-4基醚、1-(2-氟苯基)-4-甲氧基哌啶-4基醚、1,4-二噁烷-2-基醚、四氢呋喃基醚、四氢噻喃基醚;取代的乙醚类、例如1-乙氧基乙醚、1-(2-氯乙氧基)乙醚、1-[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]乙醚、1-甲基-1-甲氧基乙醚、1-甲基-1-苄氧基乙醚、1-甲基-1-苄氧基-2-氟乙醚、1-甲基-1-苄氧基乙醚、2-三甲基硅醚、叔丁基醚、烯丙基醚、炔丙基醚、对氯苯基醚、p-甲氧基苯基醚、二苄醚、对甲氧基苄基醚、3,4-二甲氧基苄基醚、三甲基硅醚、三乙基硅醚、三丙基硅醚、二甲基异丙基硅醚、二乙基异丙基硅醚、二甲基己基硅醚、叔丁基二甲基硅醚、二苯基甲基硅醚、苯甲酰基甲酸酯、乙酸酯、氯乙酸酯、二氯乙酸酯、三氯乙酸酯、三氟乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯基甲氧基乙酸酯、苯基乙酸酯、苯甲酸酯、烷基甲基碳酸酯、烷基9-苄甲氧羰酰氯碳酸酯、烷基乙基碳酸酯、烷基2,2,2-三氯乙基碳酸酯、1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙基碳酸酯、烷基磺酸酯、甲磺酸酯、苄基磺酸酯、甲苯磺酸酯、亚甲基缩醛、亚乙基缩醛和叔丁基亚甲基缩酮。优选的保护基由下式缩表示:-R^a、-Si(R^a)(R^a)(R^a)、-C(O)R^a、-C(O)OR^a、-C(O)NH(R^a)、-S(O)₂R^a、-S(O)₂OH、P(O)(OH)₂、和-P(O)(OH)OR^a,其中R^a是C₁-C₂₀烷基、C₂-C₂₀烯基、C₂-C₂₀炔基、-C₁-C₂₀亚烷基

(碳环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(碳环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(碳环)、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(芳基)、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(杂环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(杂环)或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(杂环),其中所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环和杂环基团不论单独或作为其它基团的一部分均可被任选取代。

[0117] “改变天然糖基化模式”对于本文的目的应指删除在天然序列 24P4C12 上发现的一个或多个糖部分(通过化学和/或酶方法除去潜在的糖基化位点或删除糖基化位点),和/或加入天然序列 24P4C12 中不存在的一个或多个糖基化位点。此外,该短语包括天然蛋白质糖基化的质变,其涉及存在的各种糖部分的性质和比例的改变。

[0118] 术语“类似物”是指与另一分子(例如 24P4C12 相关蛋白)结构类似或共有类似或相应属性的分子。例如,24P4C12 蛋白的类似物可被特异性结合 24P4C12 的抗体或 T 细胞特异性结合。

[0119] 除非另有说明,术语“抗体”以最广泛含义使用。因此,“抗体”可以是天然存在的或人造的,如通过常规杂交瘤技术生产的单克隆抗体。24P4C12 抗体包括单克隆和多克隆抗体,以及含有这些抗体的抗原结合域和/或一个或多个互补决定区的片段。本文所用的术语“抗体”是指特异性结合 24P4C12 和/或表现出所需生物活性的任何形式的抗体或其片段,该定义尤其涵盖了单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们特异性结合 24P4C12 和/或表现出所需生物活性。本文所提供的方法和组合物中可使用任何特异性抗体。因此,在一个实施方式中,术语“抗体”包括如下的分子:该分子包含来自轻链免疫球蛋白的至少一个可变区和重链分子的至少一个可变区,它们相互组合形成靶抗原的特异性结合位点。在一个实施方式中,所述抗体是 IgG 抗体。例如,所述抗体是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 抗体。用于本发明方法和组合物的抗体可在细胞培养物、噬菌体或各种动物中产生,所述的动物包括但不限于:牛、兔、山羊、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、绵羊、狗、猫、猴、黑猩猩、猿。因此,在一个实施方式中,本发明的抗体是哺乳动物抗体。可采用噬菌体技术分离原始的抗体或产生特异性或亲和力特性改变的变体。这些技术是常规技术,是本领域众所周知的。在一个实施方式中,所述抗体采用本领域已知的重组方法产生。例如,可通过用包含编码抗体的 DNA 序列的载体转染宿主细胞来产生重组抗体。可用一种或多种载体将表达至少一个 VL 和一个 VH 区的 DNA 序列转染入宿主细胞。抗体产生和制备的重组方法的示例性描述包括:Delves, ANTIBODIES PRODUCTION:ESSENTIAL TECHNIQUES(“抗体产生的基本技术”,威利出版社(Wiley),1997);Shephard 等, MONOCLONAL ANTIBODIES(“单克隆抗体”,牛津大学出版社,2000);Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES:PRINCIPLES AND PRACTICE(“单克隆抗体:原理与实践”,学术出版社,1993);以及,CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY(“最新免疫学方案”,约翰威利父子出版公司,最新的版本)。可通过重组方法来修饰本发明的抗体,从而提高该抗体介导所需功能的效应。因此,采用重组方法通过取代来修饰本发明的抗体也属于本发明的范围。所述取代通常是保守取代。例如,可用不同的残基取代抗体恒定区中的至少一个氨基酸。参见,例如美国专利 5,624,821、美国专利 6,194,551、专利申请 WO 9958572;以及 Angal 等,Mol. Immunol. 30:105-08(1993)。对氨基酸的修饰包括氨基酸的缺失、添加和取代。在某些情况下,进行这些改变是为了减少不良活性,例如,补体依赖性细胞毒性。经常性将抗体与提供可检测信号的底物共价或非共价连接而对其作标记。已知很多种类的标记和连接技术,科

技和专利文献对它们作了广泛的报道。可筛选这些抗体以用于结合正常或缺陷型 24P4C12。参见例如, ANTIBODY ENGINEERING :A PRACTICAL APPROACH(“抗体工程化:实践方法”, 牛津大学出版社, 1996)。可通过体外试验和体内试验来鉴定具有所需生物活性的适宜抗体, 所示体外试验包括但不限于:增殖、迁移、黏附、软琼脂生长、血管发生、细胞-细胞通讯、凋亡、转运、信号转导;所述体内试验有, 例如肿瘤生长抑制。本文提供的抗体还可用于诊断用途。作为捕获或非中和抗体, 可筛选它们结合特异性抗原而不抑制该抗原的受体结合或生物活性的能力。作为中和抗体, 所述抗体可用于竞争性结合试验。它们还可用于定量测定 24P4C12 或其受体。

[0120] 本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”或“抗体片段”(或简称为“抗体部分”)指保持特异性结合抗原能力的 24P4C12 抗体的一个或多个片段(例如, 24P4C12 及其变体;图 1)。抗体的抗原结合功能已证明是通过全长抗体的片段完成的。术语抗体的“抗原结合部分”所包括的结合片段的例子包括 (i) Fab 片段, 一种由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H 区组成的单价片段; (ii) $F(ab')_2$ 片段, 包含通过二硫桥在铰链区连接的两个 Fab 片段的二价片段; (iii) Fd 片段, 其由 V_H 和 C_H 区组成; (iv) Fv 片段, 其由抗体一条臂的 V_L 和 V_H 区组成; (v) dAb 片段 (Ward 等, (1989) Nature 341 :544-546), 其由 V_H 区组成; 以及 (vi) 分离的互补决定区 (CDR)。此外, 虽然 Fv 片段的两个结构域(即 V_L 和 V_H) 由不同基因所编码, 它们可通过重组方法通过合成的接头连接, 从而使得这两个结构域成为单个蛋白质链, 在该蛋白质链中 V_L 和 V_H 区成对形成单价分子(称为单链 Fv(scFv); 参见例如, Bird 等 (1988) Science 242 :423-426; 和 Huston 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :5879-5883)。此类单链抗体也包含在术语抗体的“抗原结合部分”中。这些抗体片段可采用本领域普通技术人员所知的常规技术获得, 筛选这些片段以便与完整抗体相同的方式使用。

[0121] 如本文所用, 可使用任何形式的“抗原”来产生 24P4C12 的特异性抗体。因此, 引发抗原 (eliciting antibody) 可为单表位、多表位或单用或与本领域已知的一种或多种免疫原性增强剂联用的完整蛋白。该引发抗原可为分离的全长蛋白质、细胞表面蛋白(例如, 用抗原的至少一部分转染的细胞作免疫)或可溶性蛋白(例如, 仅用蛋白质胞外域部分作免疫)。可在遗传修饰的细胞中产生所述抗原。编码该抗原的 DNA 可为基因组的或非基因的(例如, cDNA), 其编码至少部分胞外域。本文所用的术语“部分”指构建感兴趣抗原的免疫原性表位的合适的最少数量氨基酸或核酸。可采用适于转化感兴趣细胞的任何遗传载体, 包括但不限于:腺病毒载体、质粒和非病毒载体, 例如阳离子脂质体。在一个实施方式中, 本文的方法和组合物中的抗体特异性结合感兴趣 24P4C12 胞外域的至少一部分。

[0122] 本文提供的抗体或其抗原结合片段可偶联于“生物活性剂”。本文所用的术语“生物活性剂”是指结合抗原和/或增强或介导所需生物学效应以增强细胞杀伤毒素的任何合成或天然存在的化合物。在一个实施方式中, 用于本发明的结合片段是生物学活性片段。本文所用的术语“生物学活性”指能结合所需抗原性表位和直接或间接施加生物效应的抗体或抗体片段。直接作用包括但不限于:调节、刺激和/或抑制生长信号, 调节、刺激和/或抑制抗凋亡信号, 调节、刺激和/或抑制凋亡或坏死信号, 调节、刺激和/或抑制 ADCC 级联反应, 和调节、刺激和/或抑制 CDC 级联反应。

[0123] 在本发明的方法和组合物中还可使用“双特异性”抗体。本文所用的术语“双特异性抗体”指对至少两种不同的抗原性表位具有结合特异性的抗体, 通常为单克隆抗体。在

一个实施方式中,所述表位来自同一抗原。在另一实施方式中,所述表位来自两个不同的抗原。制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。例如,可采用共表达两种免疫球蛋白重链/轻链对来重组产生双特异性抗体。参见,例如,Milstein 等,Nature 305:537-39(1983)。或者,可采用化学连接制备双特异性抗体。参见,例如,Brennan 等,Science 229:81(1985)。双特异性抗体包括双特异性抗体片段。参见例如,Hollinger 等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 90:6444-48(1993),Gruber 等,J.Immunol. 152:5368(1994)。

[0124] 本文所述的单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体以及该抗体的片段,只要它们特异性结合靶抗原和/或表现出所需生物活性,该嵌合抗体中的部分重链和/或轻链与衍生自特定物种或属于特定抗体家族或亚家族的抗体的相应序列相同或同源,而链的其余部分则与衍生自另一特定物种或属于另一抗体家族或亚家族的抗体的相应序列相同或同源(美国专利 4,816,567;和 Morrison 等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。

[0125] 术语“化疗剂”是指有效抑制肿瘤生长的所有化学化合物。化疗剂的非限制性例子包括:烷化剂,例如氮芥、氮丙啶化合物和烷基磺酸酯;抗代谢物,例如叶酸、嘌呤或嘧啶拮抗剂;有丝分裂抑制剂,例如抗微管蛋白剂,如长春花属生物碱、耳他汀类和鬼臼毒素衍生物;细胞毒性抗生素;破坏或干扰 DNA 表达或复制的化合物,例如 DNA 小沟结合剂;以及生长因子受体拮抗剂。此外,化疗剂包括细胞毒剂(如本文所定义)、抗体、生物分子和小分子。

[0126] 术语“化合物”表示并包含化学化合物本身,以及如下物质(无论明确说明与否,除非文中明确表明不包括以下物质):化合物的无定形和结晶形式,包括多晶形式,其中这些形式可为混合物的一部分或是分离的;化合物的游离酸和游离碱形式,它们通常是本文所示结构中的形式;化合物的异构体,其是指光学异构体和互变异构体,其中光学异构体包括对映体和非对映体、手性异构体和非手性异构体,光学异构体包括分离的光学异构体和光学异构体的混合物(包括外消旋和非外消旋混合物);其中异构体可为分离的形式或与一种或多种其它异构体的混合物;化合物的同位素,包括含氘和氚的化合物,包括含放射性同位素的化合物,包括治疗和诊断有效的放射性同位素;化合物的多聚形式,包括二聚、三聚等形式;化合物的盐,优选药学上可接受的盐,包括酸加成盐和碱加成盐,包括具有有机抗衡离子和无机抗衡离子的盐,包括两性离子形式,其中如果化合物与两个或多个抗衡离子结合,这两个或多个抗衡离子可相同或不同;以及化合物的溶剂化物,包括六溶剂化物、单溶剂化物、二溶剂化物等,包括有机溶剂化物和无机溶剂化物,所述无机溶剂化物包括水合物;其中当化合物与两个或多个溶剂分子结合时,这两个或多个溶剂分子可相同或不同。在某些情况下,本文中所指的本发明化合物将包括明确述及一种或多种以上形式,例如盐和/或溶剂化物;然而,该引述只是为了强调,而不应解释为排除以上所述形式中的其它形式。

[0127] 本文所用的术语“保守取代”是指本领域技术人员已知的氨基酸取代,进行该取代通常不会改变所得分子的生物活性。本领域技术人员认识到通常在多肽非必需区中的单个氨基酸取代不会实质性改变生物活性(参见例如,Watson 等,MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE,“基因分子生物学”,本杰明/科明斯出版公司(The Benjamin/Cummings Pub.Co.),第 224 页(第 4 版,1987))。优选按照表 II 和表 III(a-b)中所述进行这些示例性取代。例如,这些改变可包括用异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)和亮氨酸(L)中任一种取代任何其它这些疏水

性氨基酸；用天冬氨酸 (D) 取代谷氨酸 (E)，反之亦然；用谷氨酰胺 (Q) 取代天冬酰胺 (N)，反之亦然；用丝氨酸 (S) 取代苏氨酸 (T)，反之亦然。其它取代也可被认为是保守性的，这取决于具体氨基酸所处的环境和它在该蛋白质三维结构中的作用。例如，甘氨酸 (G) 和丙氨酸 (A) 常可互换，丙氨酸 (A) 和缬氨酸 (V) 也可互换。相对疏水的甲硫氨酸 (M) 常可与亮氨酸和异亮氨酸互换，有时也可与缬氨酸互换。赖氨酸 (K) 和精氨酸 (R) 在氨基酸残基的显著特征为其电荷且这两种氨基酸残基的差异 pK' 并不显著的位置上常可互换。还有其它变化可在特定的环境下认为是“保守性”的（参见例如本文的表 III(a)；“Biochemistry”（“生物化学”）第 2 版第 13-15 页。Lubert Stryer 编（斯坦福大学）；Henikoff 等，PNAS 1992，卷 89，10915-10919；Lei 等，J Biol Chem 1995 年 5 月 19 日；270(20)：11882-6）。其它取代也是被允许的，并可凭经验或根据已知的保守取代决定。

[0128] 术语“细胞毒剂”是指抑制或阻止细胞表达活性、细胞功能和 / 或造成细胞破坏的物质。该术语包括放射性同位素、化学治疗剂以及毒素，如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素，包括其片段和 / 或变体。细胞毒剂的例子包括但不限于：耳他汀类（例如，耳他汀 E、耳他汀 F、MMAE 和 MMAF）、金霉素、类美坦西醇、蓖麻毒素、蓖麻毒素 A-链、考布他汀、多卡米星、多拉司他汀、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、顺铂、cc1065、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙 (tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素、二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素 (PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素 A 链、莨菪根毒素 A 链、 α -八叠球菌、白树毒素、迈托毒素 (mitogellin)、局限曲菌素 (retstrictocin)、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白 (curicin)、巴豆毒素、卡奇霉素、肥皂草 (*Saponaire officinalis*) 抑制剂以及糖皮质激素和其它化学治疗剂，以及放射性同位素，如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 或 213 、 P^{32} 和包括 Lu^{177} 在内的 Lu 的放射性同位素。抗体也可与能够将前药转化成其活性形式的抗癌前药活化酶偶联。

[0129] 本文所用的术语“双体 (diabody)”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段，该片段在同一多肽链 (V_H - V_L) 中包含连接于轻链可变区 (V_L) 的重链可变区 (V_H)。通过使用过短从而不能使同一链中两个结构域间配对的接头，所述结构域被迫与另一链中的互补结构域配对，并产生了两个抗原结合位点。双体在以下文献中有更全面的描述：例如，欧洲专利 404,097；WO 93/11161；和 Hollinger 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90：6444-48(1993)。

[0130] 就 24P4C12 结合剂对 24P4C12 表达细胞的作用而言，术语“消耗”指减少 24P4C12 表达细胞的数量或清除 24P4C12 表达细胞。

[0131] 术语“基因产物”在本文中是指肽 / 蛋白质或 mRNA。例如，“本发明的基因产物”在本文中有时是指“癌的氨基酸序列”、“癌蛋白”、“表 I 所列癌的蛋白质”、“癌的 mRNA”、“表 I 所列癌的 mRNA”等等。在一个实施方式中，癌蛋白由图 1 的核酸编码。所述癌蛋白可以是片段，或者可以是由图 1 的核酸编码的全长蛋白质。在一个实施方式中，癌氨基酸序列被用来确定序列的相同性或类似性。另一实施方式中，该序列是由图 1 的核酸编码的蛋白质的天然存在等位变体。在另一实施方式中，该序列是本文进一步描述的序列变体。

[0132] 在本发明的方法和组合物中可使用“异源偶联”抗体。本文所用的术语“异源偶联抗体”是指两个共价连接的抗体。可用合成蛋白质化学中已知的方法来制备这些抗体，包括

使用交联剂。参见例如,美国专利 4,676,980。

[0133] 术语“同源物”是指通过例如在相应位置具有相同或类似的化学残基序列而显示与另一分子同源的分子。

[0134] 在一个实施方式中,本文提供的抗体是“人抗体”。本文所用的术语“人抗体”是指轻链和重链序列(包括互补决定区(CDR))的整个序列基本上都来自人基因的抗体。在一个实施方式中,通过三源杂交瘤技术、人 B 细胞技术(参见例如,Kozbor 等,Immunol. Today 4:72(1983))、EBV 转化技术(参见例如,Cole 等,MONOCLONAL ANTIBODY AND CANCER THERAPY(“单克隆抗体和癌症治疗”)77-96(1985))或使用噬菌体展示(参见例如,Marks 等,J. Mol. Biol. 222:581(1991))制备人单克隆抗体。在某一具体的实施方式中,所述人抗体在转基因小鼠中产生。制备此类部分至完全人抗体的技术在本领域中是已知的,任何此类技术均可使用。根据一特别优选的实施方式,在经工程改造以表达人重链和轻链抗体基因的转基因小鼠中制备全长人抗体序列。制备产生人抗体的转基因小鼠的一个示例性描述见专利申请 WO 02/43478 和美国专利 6,657,103(安比基尼克斯公司,Abgenix)及其后续申请。然后可融合转基因小鼠来源的、能产生所需抗体的 B 细胞以制备连续产生该抗体的杂交瘤细胞系。参见例如,美国专利 5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016;和 5,545,806;以及 Jakobovits, Adv. Drug Del. Rev. 31:33-42(1998);Green 等, J. Exp. Med. 188:483-95(1998)。

[0135] 本文所用的术语“人源化抗体”是指含有来自非人(例如,小鼠)抗体以及人抗体的序列的抗体形式。这些抗体是含有源自非人免疫球蛋白最小序列的嵌合抗体。通常,所述人源化抗体会包含至少一个和通常两个可变区的基本上全部,其中全部或基本上全部超变环对应于非人免疫球蛋白的那些,全部或基本上全部 FR 区是人免疫球蛋白序列中的那些。所述人源化抗体还任选包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少部分,通常为人免疫球蛋白的。参见例如,Cabilly 的美国专利 4,816,567;Queen 等(1989)Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033;和 ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH(“抗体工程化:实践方法”,牛津大学出版社,1996)。

[0136] 本文所用的术语“抑制”或“对……的抑制”是指减少可测的量或完全阻止。

[0137] 短语“分离的”或“生物纯的”是指某物质基本上或实质上不含该物质在天然状态时通常相伴的成分。因此,本发明所述的分离的肽优选不含在其原位环境中通常伴随该肽的物质。例如,当一种多核苷酸与对应于 24P4C12 基因之外的基因或是与之互补的基因或编码 24P4C12 基因产物或其片段之外的多肽的基因的污染性多核苷酸基本分开时,则称为是“分离的”。熟练的技术人员可方便地采用核酸分离方法来获得分离的 24P4C12 多核苷酸。例如,当采用物理、机械或化学方法将 24P4C12 蛋白从通常伴随 24P4C12 蛋白的细胞成分中分离时,则称为 24P4C12 蛋白是“分离的”。技术人员不难采用标准纯化方法获得分离的 24P4C12 蛋白。或者可通过化学方法制备分离的蛋白质。

[0138] 适宜的“标记物”包括放射性核素、酶、底物、辅助因子、抑制剂、荧光部分、化学发光部分、磁性颗粒等。教导这些标记物的使用的专利包括:美国专利 3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149;和 4,366,241。此外,本文提供的抗体可用作荧光体的抗原结合成分。参见例如,Zeytun 等, Nat. Biotechnol. 21:1473-79(2003)。

[0139] 术语“哺乳动物”是指任何分类为哺乳动物的生物,包括小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、马和人。在本发明的一个实施方式中,所述哺乳动物是小鼠。在本发明的另一个实施方式中,所述哺乳动物是人。

[0140] 术语“转移性癌症”和“转移性疾病”指已经扩散到局部淋巴结或扩散到不同部位的癌症,包括 AUA 系统的第 D 期疾病和 TNM 系统的第 TxNxM+ 期疾病。

[0141] 术语“调节剂”或“检测化合物”或“药物候选物”或语法上的等价表述在这里描述检测了直接或间接改变癌症表型或癌症序列(例如核酸或蛋白质序列)的表达或癌症序列的效应(例如产生信号、基因表达、蛋白质相互作用等)的能力的任何分子,例如蛋白质、寡肽、小有机分子、多糖、多核苷酸等。一方面,调节剂将中和本发明的癌症蛋白的效应。“中和”指蛋白质的活性以及对细胞的后续效应被抑制或阻遏。在另一方面,调节剂通过使蛋白质水平正常化来中和本发明的基因及其相应蛋白质的功效。在优选的实施方案中,调节剂改变表达谱或本文所提供的核酸或蛋白质的表达谱,或改变下游效应途径。在一个实施方案中,所述调节剂抑制癌症表型,例如使其成为正常组织指纹。另一实施方案中,调节剂诱导癌症表型。通常用不同的试剂浓度平行检测多个试验混合物以获得对不同浓度的差异应答反应。通常,将这些浓度之一,即零浓度或低于检测水平的浓度作为阴性对照。

[0142] 调节剂、候选药物或检测化合物包括多种化学类别,但它们通常是有机分子,优选分子量大于 100 小于约 2,500 道尔顿的小有机化合物。优选的小分子小于 2000,或小于 1500,或小于 1000,或小于 500D。候选试剂包含在结构上与蛋白质相互作用所必需的官能团,尤其是氢键,且通常包含至少一个胺基、羰基、羟基或羧基,优选至少两个化学官能团。所述候选试剂通常包含被一个或多个上述官能团取代的芳香性结构或多环芳香性结构和/或碳环或杂环结构。调节剂还包括以下生物分子:如肽类、糖类、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、或其衍生物、结构类似物或组合。特别优选肽。一类调节剂是肽,例如含有约 5-35 个氨基酸,优选含有约 5-20 个氨基酸,更优选含有约 7-15 个氨基酸的肽。优选癌症调节蛋白是可溶的,包括一个非跨膜区和/或一个 N-末端 Cys 以助溶解。在一个实施方案中,片段的 C-末端被保留作为游离酸同时 N-末端是游离的胺以助偶联,即与半胱氨酸偶联。在一个实施方案中,本发明的癌症蛋白与本文所述的免疫原性剂偶联。在一个实施方案中,所述癌症蛋白与 BSA 偶联。本发明的肽,例如优选长度的肽,可相互连接或与其它氨基酸连接以形成较长的肽/蛋白质。调节肽可以是上述天然产生蛋白质的消化产物、随机肽或“偏置(biased)”随机肽。在一优选的实施方案中,基于肽/蛋白质的调节剂是本文所定义的抗体及其片段。

[0143] 本文所用的术语“单克隆抗体”指获自基本上均质的抗体群的抗体,即除了可能存在少量的天然产生突变,构成该群各抗体的各抗体相同。单克隆抗体是高度特异性的,其直接针对一种抗原性表位。相反,常规(多克隆)抗体制剂通常包含针对(或特异性针对)不同表位的多种抗体。在一个实施方式中,所述多克隆抗体包含多种单克隆抗体,它们具有对含有多个抗原性表位的单个抗原具有不同表位特异性、亲和力或亲合力。修饰语“单克隆”指所述抗体的特征是获自基本上均质的抗体群,并不是解释为需要通过任何特殊的方法来产生该抗体。例如,根据本发明应用的单克隆抗体可采用由 Kohler 等, Nature 256:495(1975)首次描述的杂交瘤技术来制备,或可通过重组 DNA 方法(参见例如,美国专利 4,816,567)来制备。也可采用例如 Clackson 等, Nature 352:624-628(1991)和 Marks 等, J. Mol.

Biol. 222 :581-597 (1991) 所描述的技术从噬菌体抗体文库中分离出“单克隆抗体”。这些单克隆抗体通常以至少约 $1\ \mu\text{M}$ 的 Kd 结合,更通常至少约为 300nM,通常至少约为 30nM,优选至少约为 10nM,更优选至少约为 3nM 或更佳,通常通过 ELISA 测定。

[0144] “药用赋形剂”包括诸如佐剂、载体、pH 调节剂和缓冲剂、张力调节剂、湿润剂、防腐剂等物质。

[0145] “药学上可接受的”是指无毒的、惰性的和 / 或与人或其它哺乳动物生理上相容的组合物。

[0146] 术语“多核苷酸”表示长度至少为 10 个碱基或碱基对的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核苷或其中任一种核苷酸类型的修饰形式)的聚合形式,包括 DNA 和 / 或 RNA 的单链和双链形式。在本领域中,该术语通常与“寡核苷酸”互换使用。多核苷酸可包括本文所揭示的核苷酸序列,例如如图 1 所示,其中的胸腺嘧啶(T)也可以是尿嘧啶(U);这种定义涉及 DNA 和 RNA 化学结构之间的区别,具体地说,涉及 RNA 中四个主要碱基之一是尿嘧啶(U)而不是胸腺嘧啶(T)这一发现。

[0147] 术语“多肽”表示至少约 4、5、6、7 或 8 个氨基酸的聚合物。在本说明书中通篇使用氨基酸的标准三字母或单字母符号。在本领域中,该术语通常与“肽”或“蛋白质”互换使用。

[0148] “重组”DNA 或 RNA 分子是在体外经分子操作(molecular manipulation)的 DNA 或 RNA 分子。

[0149] 本文所用的术语“单链 Fv”或“scFv”或“单链”抗体是指包含抗体 VH 和 VL 区的抗体片段,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,Fv 多肽还包含 VH 和 VL 区之间的多肽接头,该接头使得所述 sFv 形成抗原结合所需的结构。关于 sFv 的综述,可参见 Pluckthun, THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODY, (“单克隆抗体药理学”)卷 113, Rosenberg 和 Moore 编(施普林格出版公司(Springer-Verlag),纽约,第 269-315 页(1994))。

[0150] 本文所用的术语“特异性”、“特异性结合”和“特异性地结合”是指抗体与靶抗原表位的选择性结合。可在给定的条件下,比较抗体和适宜抗原的结合与抗体和无关抗原或抗原混合物的结合来测试抗体的结合特异性。如果所述抗体与适宜抗原的结合比其与无关抗原或抗原混合物结合高出至少 2、5、7 和优选 10 倍,则认为其是特异性的。在一个实施方式中,特异性抗体是仅结合 24P4C12 抗原而不结合无关抗原的抗体。在另一实施方式中,特异性抗体是结合人 24P4C12 抗原但不与该 24P4C12 抗原具有 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多氨基酸同源性的非人 24P4C12 抗原结合的抗体。在另一实施方式中,特异性抗体是结合人 24P4C12 抗原和结合小鼠 24P4C12 抗原、但与人抗原结合程度更高的抗体。在另一实施方式中,特异性抗体是结合人 24P4C12 抗原和结合灵长类 24P4C12 抗原、但与人抗原结合程度更高的抗体。在另一实施方式中,所述特异性抗体结合人 24P4C12 抗原和任何非人 24P4C12 抗原、但与人抗原或其任何组合结合程度更高的抗体。

[0151] 本文所用的“治疗”或“治疗的”以及语法上相关的术语是指对任何疾病后果的任何改善,如延长存活时间、降低发病率和 / 或减轻如此其它治疗模式所致副作用;在本领域中很容易理解,最好能完全根除疾病,但治疗行为并非必须。

[0152] 术语“变体”指显示与所述类型或正常类型不同的分子,如在明确描述的蛋白质(例如图1所示的24P4C12蛋白)的相应位置上含有一个或多个不同氨基酸残基的蛋白质。变体蛋白的一个例子是类似物。剪接同种型和单核苷酸多态性(SNP)是变体的其它例子。

[0153] 本发明的“24P4C12 相关蛋白”包括这里专门描述的那些(参见图1A-1I),以及等位变体、保守取代变体、类似物和同源物,它们可按照这里列出的方法或本领域容易获得的方法无需过度实验便可分离/产生并作表征。也包括将24P4C12蛋白或其片段的不同部分组合产生的融合蛋白以及24P4C12蛋白和异源多肽形成的融合蛋白。这种24P4C12蛋白统称为24P4C12相关蛋白、本发明的蛋白质或24P4C12。术语“24P4C12 相关蛋白”是指有4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或25个以上氨基酸;或至少30、35、40、45、50、55、60、65、70、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、330、335、339或更多氨基酸的多肽片段或24P4C12蛋白序列。

[0154] II.) 24P4C12 抗体

[0155] 本发明的另一方面提供了结合24P4C12相关蛋白的抗体(参见图1)。优选的抗体特异性结合24P4C12相关蛋白,但在生理条件下不结合(或弱结合)并非24P4C12相关蛋白的肽或蛋白质。例如,结合24P4C12的抗体可结合24P4C12相关蛋白,例如24P4C12变体及其同源物或类似物。

[0156] 本发明的24P4C12抗体对于癌症(参见例如表I)预后试验、成像和治疗方法特别有用。类似地,这种抗体可用于治疗、诊断和/或预测结肠和其它癌症,只要24P4C12也在这些其它癌症中表达或过表达。此外,胞内表达的抗体(例如单链抗体)在治疗与24P4C12表达有关的癌症(例如晚期或转移性结肠癌或其它晚期或转移性癌症)中也有治疗作用。

[0157] 各种制造抗体、尤其是单克隆抗体的各种方法是本领域熟知的。例如,可通过用分离形式或免疫偶联形式的24P4C12相关蛋白、肽或片段免疫合适的哺乳动物宿主来制备抗体(Antibodies :A Laboratory Manual,“抗体实验室手册”,CSH出版社,Harlow和Lane编辑(1988);Harlow, Antibodies,“抗体”,冷泉港出版社,纽约(1989))。此外,也可使用24P4C12的融合蛋白,如24P4C12GST-融合蛋白。在一具体实施方案中,制造了包含图1的全部或大部分氨基酸序列的GST融合蛋白,然后将其用作免疫原来产生合适的抗体。另一实施方案中,合成了24P4C12相关蛋白并将其用作免疫原。

[0158] 此外,采用本领域已知的裸DNA免疫技术(有或没有纯化的24P4C12相关蛋白或24P4C12表达细胞)产生针对编码的免疫原的免疫应答(综述可参见Donnelly等,1997, Ann. Rev. Immunol. 15 :617-648)。

[0159] 可分析图1中所示的24P4C12蛋白的氨基酸序列以选择出用于产生抗体的24P4C12蛋白的特定区域。例如,可利用24P4C12氨基酸序列的疏水性和亲水性分析来鉴定24P4C12结构中的亲水区域。具有免疫原性结构的24P4C12蛋白区域以及其它区域和结构域可方便地用本领域已知的各种其它方法来鉴定,这些方法例如Chou-Fasman、Garnier-Robson、Kyte-Doolittle、Eisenberg、Karplus-Schultz或Jameson-Wolf的分析法。可用Hopp, T. P. 和 Woods, K. R. 的方法(1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78 : 3824-3828)生成亲水性图谱(Hydrophilicity profile)。可用Kyte, J. 和 Doolittle, R. F. 的方法(1982, J. Mol. Biol. 157 :105-132)生成亲水性图谱(Hydropathicity

profile)。可用 Janin J. 的方法 (1979, Nature 277:491-492) 生成可接近残基百分比 (%) 图谱。可用 Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K. 的方法 (1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255) 生成平均柔性图谱。可用 Deleage, G., Roux B. 的方法 (1987, Protein Engineering 1:289-294) 生成 β -转角图谱。因此,用这些程序或方法中的任何一种鉴定出的各个区域属于本发明范围。本文还通过举例方式进一步阐述了产生 24P4C12 抗体的优选方法。制备用作免疫原的蛋白质或多肽的方法是本领域熟知的。本领域还熟知制备蛋白质与载体(如 BSA、KLH 或其它载体蛋白)的免疫原性偶联物的方法。一些情况下,采用直接偶联,例如使用碳二亚胺试剂;其它情况下,采用诸如由皮尔斯化学公司(Pierce Chemical Co., 罗克福德,伊利诺斯州)提供的结合试剂是有效的。本领域知晓,通常可通过在适当时间段内注射并利用合适佐剂来给予 24P4C12 免疫原。在免疫接种程序中,可通过抗体的滴度来确定是否形成足够抗体。

[0160] 24P4C12 单克隆抗体可用各种本领域熟知的方法来制造。例如,用众所周知的 Kohler 和 Milstein 的标准杂交瘤技术或改进技术使产生抗体的 B 细胞无限增殖来制备分泌所需单克隆抗体的无限增殖细胞系。分泌所需抗体的无限增殖细胞系通过以 24P4C12 相关蛋白作为抗原的免疫测定来筛选。当鉴定出合适的无限增殖细胞培养物时,可扩增细胞并从体外培养物或从腹水中制造抗体。

[0161] 本发明的抗体或片段也可通过重组方法制造。特异性结合所需 24P4C12 蛋白区域的区域也可在多物种来源的嵌合或互补决定区(CDR)嫁接抗体的情况下生产。也可制造人源化或人 24P4C12 抗体,且它们宜用于治疗情况。通过用一个或多个非人抗体 CDR 来代替相应的人抗体序列来制备人源化鼠抗体或其它非人抗体的方法是熟知的(见例如 Jones 等,1986, Nature 321:522-525; Riechmann 等,1988, Nature 332:323-327; Verhoeyen 等,1988, Science 239:1534-1536)。也可参见 Carter 等,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 和 Sims 等,1993, J. Immunol. 151:2296。

[0162] 在一个优选实施方式中,本发明的抗体包括完全人 24P4C12 抗体(24P4C12 MAbs)。本领域中各种方法提供了生产完全人 24P4C12 MAbs 的途径。例如,一个优选实施方式中提供了采用被称为异种小鼠(Xenomouse,阿目金弗里蒙特公司)的转基因小鼠的技术,该小鼠的抗体产生经灭活并用人重链和轻链基因座进行了基因工程改造。制备产生人抗体的转基因小鼠的示例性描述可见于 U.S. 6,657,103。还可参见美国专利 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; 和 5,545,806; 以及 Mendez 等, Nature Genetics, 15:146-156(1998); Kellerman, S.A. 和 Green, L.L., Curr. Opin. Biotechnol 13, 593-597(2002)。

[0163] 此外,可采用 HuMAb 小鼠(麦达赖克斯公司, Medarex, Inc.)产生本发明的人抗体,该小鼠包含编码未重排人重链(μ 和 γ)和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因的微卫星基因座(miniloci),并灭活内源性 μ 和 κ 链基因座的定点突变(参见例如, Lonberg 等, (1994) Nature 368(6474):856-859)。

[0164] 在另一个实施方式中,可采用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠来产生本发明的完全人抗体,例如可采用携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠。本文将此类小鼠称为“KM 小鼠”,其在如下文献中由描述:Tomizuka 等(2000)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727,以及 Tomizuka 等人的 PCT 公开申请 WO 02/43478。

[0165] 还可采用噬菌体展示方法筛选人免疫球蛋白基因文库以制备本发明的人单克隆抗体。本领域中已建立了用于分离人抗体的该噬菌体展示方法。参见例如：授予 Ladner 等人的美国专利 5,223,409 ;5,403,484 ;和 5,571,698 ;授予 Dower 等人的美国专利 5,427,908 和 5,580,717 ;授予 McCafferty 等人的美国专利 5,969,108 和 6,172,197 ;以及授予 Griffiths 等人的美国专利 5,885,793 ;6,521,404 ;6,544,731 ;6,555,313 ;6,582,915 和 6,593,081。

[0166] 还可采用 SCID 小鼠制备本发明的人单克隆抗体,该小鼠中重建了人免疫细胞从而能在免疫后产生人抗体应答。此类小鼠描述于例如授予 Wilson 等人的美国专利 5,476,996 和 5,698,767 中。

[0167] 在优选的实施方式中,本发明的 24P4C12 MAbs 包含命名为 Ha5-1(5)2.1(由美国典型培养物保藏中心(ATCC)保藏号为 PTA-8602 的杂交瘤产生)的抗体的重链和轻链可变区(参见图 3),或包含与 Ha5-1(5)2.1 的重链和轻链可变区氨基酸序列同源的氨基酸序列的重链和轻链可变区,且其中该抗体保留本发明 24P4C12 MAbs 的所需功能特性。Ha5-1(5)2.1 的重链可变区由 SEQ ID NO:20 的第 20 位 Q 残基至第 143 位 S 残基的氨基酸序列组成,Ha5-1(5)2.1 的轻链可变区由 SEQ ID NO:22 的第 23 位 D 残基至第 130 位 R 残基的氨基酸序列组成。可选择任何亚类的恒定区作为本发明抗体的恒定区。在一个实施方式中,可采用人 IgG2 恒定区作为重链恒定区,并采用人 IgK 恒定区作为轻链恒定区。

[0168] 例如,本发明提供包含重链可变区和轻链可变区的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中:

[0169] (a) 所述重链可变区包含与图 3 所示重链可变区氨基酸序列至少 80%同源的氨基酸序列;以及

[0170] (b) 所述轻链可变区包含与图 3 所示轻链可变区氨基酸序列至少 80%同源的氨基酸序列。

[0171] 在其它的实施方式中, V_H 和/或 V_L 氨基酸序列可与图 3 中所示的 V_H 和 V_L 序列 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同源。

[0172] 在另一个实施方式中,本发明提供包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中:

[0173] (a) 所述重链可变区包含具有图 3 所示重链可变区 CDR 的氨基酸序列的互补决定区(CDR);

[0174] (b) 所述轻链可变区包含具有图 3 所示轻链可变区 CDR 的氨基酸序列的 CDR。

[0175] 本发明的工程改造抗体包括那些在 V_H 和/或 V_L 内的框架残基做出修饰的抗体(例如为了改善抗体的性能)。通常进行此类框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或多个框架残基“回复突变”为相应种系的序列。更具体而言,经体细胞突变的抗体可包含不同于产生该抗体的种系序列的框架残基。可比较抗体框架序列与产生该抗体的种系序列来鉴别这些残基。为了将框架区序列回复成它们的种系构型,可通过例如定点诱变或 PCR 介导的诱变,将体细胞突变“回复突变”为种系序列(例如,由亮氨酸“回复突变”为甲硫氨酸)。此类经“回复突变”的抗体也属于本发明。

[0176] 另一类框架修饰涉及使得框架区或甚至一个或多个 CDR 区中的一个或多个残

基发生突变以消除 T 细胞表位,从而降低抗体潜在的免疫原性。该方法也称为“脱免疫(deimmunization)”,其在 Carr 等人的美国专利公开 No. 2003/0153043 中有详细描述。

[0177] 除了在框架区或 CDR 区内作修饰以外或作为该修饰的替代,可工程改造本发明的抗体以在 Fc 区中包含修饰,该修饰通常改变抗体的一种或多种功能特性,例如血清半衰期、补体结合、Fc 受体结合和 / 或抗原依赖性细胞毒性。此外,可对本发明的 24P4C12 MAb 进行化学修饰(例如,将一个或多个化学部分与抗体连接)或进行修饰以改变其糖基化,这些修饰也是为了改变该 MAb 的一种或多种功能特性。下文将对这些实施方式各自进行详述。

[0178] 在一个实施方式中,对 CH1 的铰链区进行修饰以改变(例如增加或减少)铰链区中半胱氨酸残基的数量。该方法在 Bodmer 等人的美国专利 5,677,425 中有进一步描述。改变 CH1 的铰链区中的半胱氨酸残基数是为了例如,便于轻链和重链的组装、或提高或降低 24P4C12 MAb 的稳定性。

[0179] 在另一个实施方式中,抗体的 Fc 铰链区发生突变以缩短 24P4C12 MAb 的生物学半衰期。更具体而言,将一个或多个氨基酸突变导入 Fc-铰链片段的 CH2-CH3 结构域交界区,从而与天然 Fc-铰链区葡萄球菌蛋白 A(SpA) 结合相比,该抗体的 SpA 结合受损。该方法在 Ward 等人的美国专利 No. 6,165,745 中有进一步描述。

[0180] 在另一个实施方式中,修饰 24P4C12 MAb 以延长其生物学半衰期。可采用各种方法。例如,可按照授予 Ward 的美国专利 6,277,375 所描述引入突变。或者,为了延长生物学半衰期生物学半衰期,可在抗体的 CH1 或 CL 区中进行改变以使其包含补救(salvage)受体结合表位,该表位来自 IgG Fc 区的 CH2 结构域的两个环(如授予 Presta 等人的美国专利 5,869,046 和 6,121,022 中所描述)。

[0181] 在还有其它实施方式中,通过将至少一个氨基酸残基替换为不同的氨基酸残基改变 Fc 区,从而改变 24P4C12 MAb 的一种或多种效应物功能。例如,可将一个或多个选自氨基酸特异性残基的氨基酸替换为不同的氨基酸残基,使得该抗体对效应物配体的亲和力改变,但仍保持原抗体的抗原结合能力。对其的亲和力改变的效应物配体可为例如, Fc 受体或补体的 C1 元件。该方法在授予 Winter 的美国专利 5,624,821 和 5,648,260 中有进一步详细的描述。

[0182] 24P4C12 抗体与 24P4C12 相关蛋白的反应性可通过许多熟知的方法获知,其中包括使用合适 24P4C12 相关蛋白、表达 24P4C12 的细胞或其提取物的 Western 印迹、免疫沉淀、ELISA 和 FACS 分析。24P4C12 抗体或其片段可用可检测标记物标记或与第二分子缀合。合适的可检测标记物包括但不限于:放射性同位素、荧光化合物、生物发光化合物、化学发光化合物、金属螯合剂或酶。此外,用本领域通常了解的方法产生针对两个或多个 24P4C12 表位的双特异性抗体。同源二聚(Homodimeric)抗体也可通过本领域已知的交联技术制得(例如, Wolff 等, Cancer Res. 53:2560-2565)。

[0183] 在还有另一优选的实施方式中,本发明的 24P4C12 MAb 是包含命名为 Ha5-1(5)2.1 的抗体的重链和轻链的抗体。Ha5-1(5)2.1 的重链由 SEQ ID NO:20 的第 20 位 Q 残基至第 469 位 K 残基的氨基酸序列组成,Ha5-1(5)2.1 的轻链由 SEQ ID NO:22 的第 23 位 D 残基至第 236 位 C 残基的氨基酸序列组成。其序列示于图 2 和图 3 中。在优选的实施方式中,Ha5-1(5)2.1 与细胞毒剂偶联。

[0184] 产生名为 Ha5-1(5)2.1 的抗体的杂交瘤在 2007 年 8 月 8 日被送至（通过联邦快递）美国典型培养物保藏中心（ATCC，邮政信箱 1549，马纳萨斯，弗吉尼亚州 20108），并给予保藏号 PTA-8602。

[0185] III.) 抗体药物偶联物概述

[0186] 在另一方面，本发明提供抗体-药物偶联物（ADCs），其包含偶联于细胞毒剂的抗体，所述细胞毒剂可为例如化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素（例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素、或其片段）或放射性同位素（即放射性偶联物）。在另一方面，本发明还提供使用所述 ADC 的方法。在一方面，ADC 包含与细胞毒剂或检测试剂共价结合的上述 24P4C12 MAbs 中的任一种。

[0187] 采用抗体-药物偶联物进行细胞毒剂或细胞抑制剂（即在癌症治疗中杀伤或抑制肿瘤细胞的药物）的局部递送（Syrigos 和 Epenetos(1999) *Anticancer Research* 19 : 605-614 ; Niculescu-Duvaz 和 Springer(1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26 :151-172 ; 美国专利 4,975,278）能将药物部分靶向递送到肿瘤，并在肿瘤中胞内积聚，而全身性给予这些未偶联的药物制剂可能会导致对正常细胞以及需要去除的肿瘤细胞不可接受程度的细胞毒性（Baldwin 等，(1986) *Lancet* pp. (1986 年 3 月 15 日) :603-05 ; Thorpe, (1985), "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review"（“综述：癌症治疗中的细胞毒剂的抗体载体”），刊登于 *Monoclonal Antibodies' 84: Biological And Clinical Application*（“单克隆抗体' 84: 生物学和临床应用”，A. Pinchera 等编，第 475-506 页）。藉此来寻求以最小细胞毒性获得最大效应。已报道多克隆抗体和单克隆抗体均可用于这些策略中（Rowland 等，(1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21 :183-87）。用于这些方法中的药物包括柔红霉素、多柔比星、甲氨蝶呤和长春地辛（Rowland 等，(1986)，同上）。用于抗体-毒素偶联物中的毒素包括：细菌毒素（例如白喉毒素）、植物毒素（例如蓖麻毒素）、小分子毒素（例如格尔德霉素）（Mandler 等 (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19) : 1573-1581 ; Mandler 等 (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10 :1025-1028 ; Mandler 等 (2002) *Bioconjugate Chem.* 13 :786-791）、类美坦西醇（EP 1391213 ; Liu 等，(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 :8618-8623）和卡奇霉素（Lode 等 (1998) *Cancer Res.* 58 : 2928 ; Hinman 等 (1993) *Cancer Res.* 53 :3336-3342）。毒素可通过包括结合微管蛋白、结合 DNA 或拓扑异构酶抑制在内的机制来发挥其细胞毒性和细胞抑制效应。当与大的抗体或蛋白质受体配体偶联时，某些细胞毒性药物会失活或活性降低。

[0188] 抗体药物偶联物的例子是 BI 公司的 ZEVALIN®（替伊莫单抗（ibritumomab tiuxetan），Biogen/Idec），其是抗体-放射性同位素偶联物，由抗正常和恶性 B 淋巴细胞表面上的 CD20 抗原的鼠 IgG1 κ 单克隆抗体与 ¹¹¹In 或 ⁹⁰Y 放射性同位素通过硫脲接头-螯合剂连接形成（Wiseman 等 (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7) :766-77 ; Wiseman 等 (2002) *Blood* 99(12) :4336-42 ; Witzig 等 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10) :2453-63 ; Witzig 等 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15) :3262-69）。

[0189] 此外，惠氏医药公司的 MYLOTARG™（吉妥珠单抗奥佐米星（gemtuzumab ozogamicin），Wyeth Pharmaceuticals）是一种由连接于卡奇霉素的 hu CD33 抗体组成的抗体药物偶联物，其在 2000 年获准用于通过注射治疗急性髓样白血病（*Drugs of the Future* (2000) 25(7) :686 ; 美国专利 4970198 ; 5079233 ; 5585089 ; 5606040 ; 5693762 ;

5739116 ;5767285 ;5773001)。

[0190] 此外,免疫原公司的莫坎妥珠单抗 (Cantuzumab mertansine, Immunogen, Inc.) 是一种由通过二硫键 SPP 连接到类美坦西醇药物部分 DM1 的 huC242 抗体组成的抗体药物偶联物,其已进入治疗表达 CanAg 的癌症 (例如结肠癌、胰腺癌及其它) 的 II 期临床试验。

[0191] 此外,千年制药公司、BZL 生物制品公司、免疫原公司的 MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.) 是由连接于类美坦西醇药物部分 DM1 的抗前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 单克隆抗体组成的抗体药物偶联物,其正在开发用于前列腺肿瘤的潜在治疗。

[0192] 最后,将耳他汀肽、耳他汀 E(AE) 和单甲基耳他汀 (MMAE)、多拉司他汀的合成类似物偶联到嵌合单克隆抗体 cBR96 (癌上 Lewis Y 特异性) 和 cAC10 (恶性血液癌上的 CD30 特异性) (Doronina 等 (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784), 它们正在进行治疗开发。

[0193] 并且,本文中描述了用于产生 ADC 的化疗剂。可用的酶活性毒素及其片段包括:白喉 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链 (来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 α -八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美国商陆蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢霉烯族毒素 (trichothecenes)。参见例如,公开于 1993 年 10 月 28 日的 WO 93/21232。可获得用于产生放射性偶联抗体的多种放射性核素。例子包括: ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 核 ^{186}Re 。可采用各种双功能蛋白偶联剂来制备抗体和细胞毒剂的偶联物,例如 N-琥珀酰-3-(2-联硫基吡啶)-丙酸盐 (SPDP)、亚氨基硫烷 (IT)、酰亚胺酯类的二价衍生物 (例如二甲基己二酸 HCl)、活跃的酯类 (例如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)、醛类 (例如戊二醛)、双叠氮化合物 (例如双 (对-叠氮基苯甲酰基) 己二胺)、双-重氮基衍生物 (例如双-(对-二重氮基苯甲酰基)-亚乙基二胺)、二异氰酸酯 (例如 2,6-二异氰酸甲苯酯) 和双活化的氟化合物 (例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可按照 Vitetta 等 (1987) Science, 238:1098 所描述制备蓖麻蛋白免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于使放射性核素偶联于抗体的示例性螯合剂 (W094/11026)。

[0194] 本文中还包括抗体与一种或多种小分子毒素的偶联物,所述小分子为例如卡奇霉素、类美坦西醇、多拉司他汀类、耳他汀类、单端孢霉烯和 CC1065、以及具有毒素活性的这些毒素的衍生物。

[0195] III(A). 类美坦西醇

[0196] 适于用作类美坦西醇药物部分的美坦生化合物在本领域中是众所周知的,其可根据已知方法从天然来源中分离、采用遗传工程化方法产生 (参见 Yu 等 (2002) PNAS 99:7968-7973) 或根据已知方法制备美登醇和美登醇类似物。

[0197] 示例性的类美坦西醇药物部分包括具有修饰的芳环的那些药物部分,例如: C-19-脱氯 (US 4256746) (通过美登木素 P2 的氢化铝锂还原反应制得); C-20-羟基 (或 C-20-去甲基) +/- C-19-脱氯 (US 专利 4361650 和 4307016) (通过采用链霉菌或放线菌的去甲基化或采用 LAH 的脱氯作用制得); 和 C-20-去甲氧基, C-20-酰氧基 (-OCOR), +/- 脱氯 (美国专利 4,294,757) (通过采用酰氯的酰化作用制得), 以及在其它位置具有修饰的那

些药物部分。

[0198] 示例性类美坦西醇药物部分还包括具有修饰的那些药物部分,例如:C-9-SH(US 4424219)(通过美登醇与 H_2S 或 P_2S_5 的反应制得);C-14-烷氧基甲基(去甲氧基/ CH_2OR)(US 4331598);C-14-羟甲基或酰氧基甲基(CH_2OH 或 CH_2OAc)(US 4450254)(由诺卡菌(*Nocardia*)制得);C-15-羟基/酰氧基(US 4364866)(通过链霉菌对美登醇的转化制得);C-15-甲氧基(美国专利 4313946 和 4315929)(分离自滑桃树(*Trewia nudiflora*));C-18-N-去甲基(美国专利 4362663 和 4322348)(通过链霉菌对美登醇的去甲基化作用制得);以及 4,5-脱氧(US 4371533)(通过美登醇的三氯化钛/LAH 还原制得)。

[0199] 含有类美坦西醇的 ADC、其制备方法、及它们的治疗用途揭示于例如,美国专利 5,208,020;5,416,064;6,441,163 和欧洲专利 EP 0 425 235B1 中,其中内容通过引用纳入本文。Liu 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623(1996) 描述了称为 DM1 的包含类美坦西醇的 ADC,其连接于单克隆抗体 C242,用于抵御人结肠直肠癌。已发现该偶联物对培养的结肠癌细胞具有高细胞毒性,在体内肿瘤生长试验中显示出抗肿瘤活性。Chari 等, *Cancer Research* 52:127-131(1992) 描述了 ADC,其中类美坦西醇通过二硫键接头偶联于鼠抗体 A7(其结合人结肠癌细胞系上的抗原),或偶联于另一种鼠单克隆抗体 TA.1(其结合 HER-2/neu 癌基因)。在人乳腺癌细胞系 SK-BR-3(每个细胞上表达 3×10^5 个 HER-2 表面抗原)上体外测试了 TA.1-类美坦西醇偶联物的细胞毒性。该药物偶联物获得了类似于游离类美坦西醇药物程度的细胞毒性,而通过提高每个抗体分子上类美坦西醇的数量可提高该细胞毒性。A7-类美坦西醇偶联物在小鼠中显示出低全身性细胞毒性。

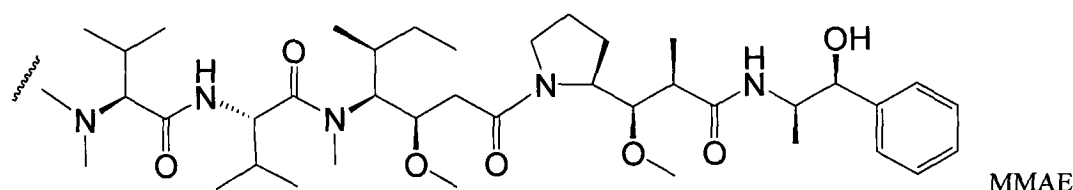
[0200] III(B). 耳他汀类和多拉司他汀类

[0201] 在一些实施方式中,包含本发明抗体的 ADC 偶联于多拉司他汀类、或多拉司他汀肽类似物和衍生物,即耳他汀类(美国专利 5635483;5780588)。已显示多拉司他汀类和耳他汀类干扰微管动力学、GTP 水解以及核与细胞分裂(Woyke 等(2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584),且具有抗肿瘤(US 5663149)和抗真菌活性(Pettit 等(1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965)。多拉司他汀或耳他汀药物部分可通过肽药物部分的 N(氨基)末端或 C(羧基)末端与抗体连接(WO 02/088172)。

[0202] 示例性的耳他汀实施方式包括:N-末端连接的单甲基耳他汀药物部分 DE 和 DF,记载于 Senter 等人美国癌症研究协会学报(“*Proceedings of the American Association for Cancer Research*”,第 45 卷,摘要号 623,公开于 2004 年 3 月 28 日)以及美国专利公开号 2005/0238648 中,这些揭示的内容通过引用全文纳入本文。

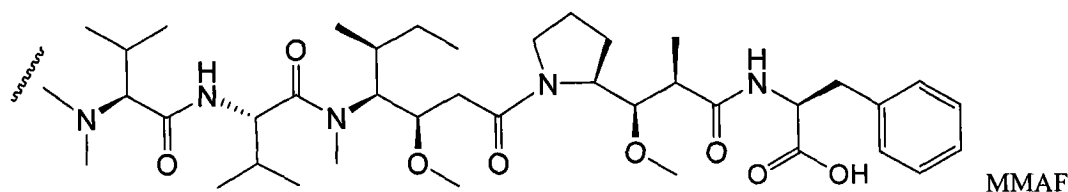
[0203] 示例性的耳他汀实施方式是 MMAE(其中波浪线指示与抗体药物偶联物的接头(L)的共价连接)。

[0204]



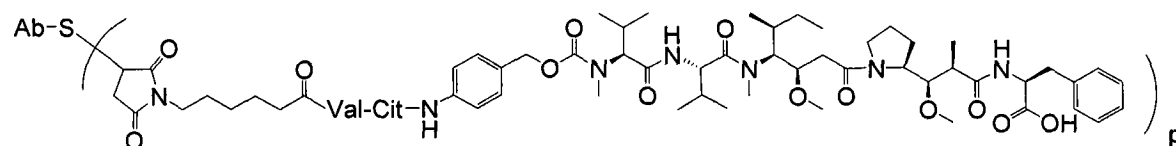
[0205] 另一示例性的耳他汀实施方式是 MMAF,其中波浪线指示与抗体药物偶联物的接头(L)的共价连接(US 2005/0238649):

[0206]

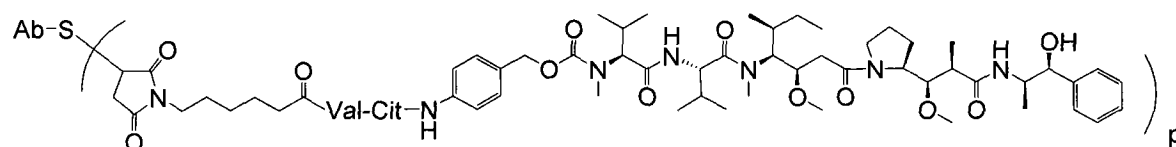


[0207] 包含 MMAE 或 MMAF 和各种接头元件 (本文将进一步描述) 的其它示例性实施方式具有如下结构和缩写 (其中 Ab 是指抗体, p 为 1- 约 8) :

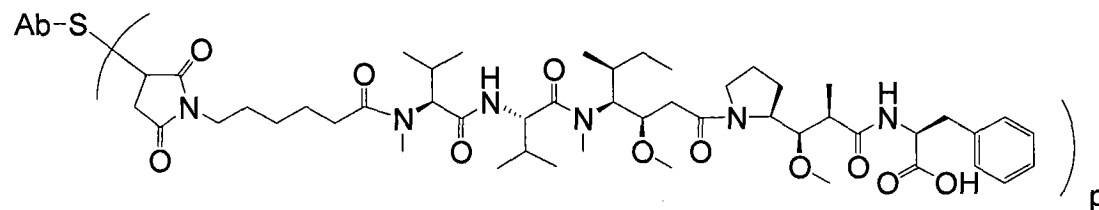
[0208]



Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAF

[0209] 通常可通过在两个或多个氨基酸和 / 或肽片段之间形成肽键来制备基于肽的药物部分。可通过例如肽化学领域中众所周知的液相合成方法 (参见 E. Schröder 和 K. Lübke, "The Peptides ("肽")", 卷 1, 第 76-136 页, 1965, 学术出版社) 来制备此类肽键。可根据如下方法制备耳他汀 / 多拉司他汀药物部分 : US 5635483 ; US 5780588 ; Pettit 等 (1989) J. Am. Chem. Soc. 111 : 5463-5465 ; Pettit 等 (1998) Anti-Cancer Drug Design 13 : 243-277 ; Pettit, G. R. 等. Synthesis, 1996, 719-725 ; Pettit 等 (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15 : 859-863 ; 和 Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7) : 778-784。

[0210] III(C). 卡奇霉素

[0211] 在其它的实施方式中, ADC 包含偶联于一个或多个卡奇霉素分子的本发明的抗体。抗生素的卡奇霉素族能以低于皮摩尔的浓度下产生双链 DNA 断裂。关于卡奇霉素族偶联物的制备, 参见美国专利 5, 712, 374、5, 714, 586、5, 739, 116、5, 767, 285、5, 770, 701、5, 770, 710、5, 773, 001、5, 877, 296 (均授予美国氰氨公司 (American Cyanamid Company))。还可使用卡奇霉素的结构类似物, 其包括但不限于 : γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-乙酰基 - γ_1^I , PSAG 和 θ_1^I (Hinman 等, Cancer Research 53 : 3336-3342 (1993), Lode 等, Cancer Research 58 : 2925-2928 (1998) 以及授予美国氰氨公司的前述美国专利)。另一种可偶联抗体的抗肿瘤药物是 QFA, 其是一种抗叶酸剂。卡奇霉素和 QFA 均具有胞内作用位点, 且不容易穿过细胞膜。因此, 这些试剂通过抗体介导的内化作用进行的细胞摄取极大增强了它们的细胞毒效

应。

[0212] III(D). 其它细胞毒剂

[0213] 可偶联于本发明抗体的其它抗肿瘤剂包括:BCNU、链脲菌素、长春新碱和 5- 氟尿嘧啶,记载于美国专利 5,053,394 和 5,770,710 中的统称为 LL-E33288 复合物的试剂族、以及埃斯波霉素(美国专利 5,877,296)。

[0214] 可使用的酶活性毒素及其片段包括:白喉 A 链,白喉毒素的非结合活性片段,外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 α -八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美国商陆蛋白(PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢霉烯族毒素(tricothecenes)。参见例如,公开于 1993 年 10 月 28 日的 WO 93/21232。

[0215] 本发明还包括由抗体和具有溶核活性的化合物(例如,核糖核酸酶或 DNA 内切酶,如脱氧核糖核酸酶;DNA 酶)形成的 ADC。

[0216] 为了选择性破坏肿瘤,抗体可包含高放射性原子。可获得各种放射性同位素用于生产放射性偶联的抗体。例子包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和 Lu 的放射性同位素。当偶联物用于检测时,其可包含用于闪烁法研究的放射性原子,例如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} ,或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,mri)的自旋标记物,例如再次提到的碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、钆或铁。

[0217] 可采用已知的方式掺入放射性或其它标记物。例如,可采用合适的氨基酸前体来生物合成肽或通过化学氨基酸合成肽,该前体包含例如替代氢的氟-19。可通过肽中的半胱氨酸残基连接标记物,例如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 和 In^{111} 。可通过赖氨酸残基连接钆-90。可采用非水溶性碘化试剂法(10DOGEN method)(Fraker 等(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57)掺入碘-123。" Monoclonal antibodies in Immunoscintigraphy" ("免疫闪烁成像中的单克隆抗体", Chatal, CRC 出版社,1989) 详细描述了其它方法。

[0218] IV.) 结合 24P4C12 的抗体药物偶联物化合物

[0219] 本发明特别提供用于靶向递送药物的抗体药物偶联物。发明人已发现抗体药物偶联物化合物对表达 24P4C12 的细胞具有强烈的细胞毒和/或细胞抑制活性。抗体药物偶联物化合物包含与至少一个药物单元共价连接的抗体单元。药物单元可直接共价连接或通过接头单元(-LU-)共价连接。

[0220] 在一些实施方式中,抗体药物偶联物化合物具有如下式:

[0221] $\text{L}-(\text{LU}-\text{D})_p$ (I)

[0222] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物;其中:

[0223] L 是抗体单元,例如本发明的 24P4C12 MAbs,和

[0224] (LU-D) 是接头单元-药物单元部分,其中:

[0225] LU- 是接头单元,以及

[0226] -D 是对靶细胞具有细胞抑制或细胞毒活性的药物单元;和

[0227] P 是 1-20 的整数。

[0228] 在一些实施方式中,p 的范围是 1~10、1~9、1~8、1~7、1~6、1~5、1~4、1~3 或 1~2。在一些实施方式中,p 的范围是 2~10、2~9、2~8、2~7、2~6、2~

5、2 ~ 4 或 2 ~ 3。在其它的实施方式中，p 为 1、2、3、4、5 或 6。在一些实施方式中，p 为 2 或 4。

[0229] 在一些实施方式中，抗体药物偶联物化合物具有如下式：

[0230] $L-(A_a-W_w-Y_y-D)_p$ (II)

[0231] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中：

[0232] L 是抗体单元，例如 24P4C12 MAbs；和

[0233] $-A_a-W_w-Y_y-$ 是接头单元 (LU)，其中：

[0234] $-A-$ 是延伸物单元，

[0235] a 是 0 或 1，

[0236] 各 $-W-$ 独立为氨基酸单元，

[0237] w 是 0 ~ 12 的整数，

[0238] $-Y-$ 是自分解 (self-immolative) 间隔物单元，

[0239] y 是 0、1 或 2；

[0240] $-D$ 是对靶细胞具有细胞抑制或细胞毒活性的药物单元；以及

[0241] p 是 1 ~ 20 的整数。

[0242] 在一些实施方式中，a 为 0 或 1，w 为 0 或 1，y 为 0、1 或 2。在一些实施方式中，a 为 0 或 1，w 为 0 或 1，y 为 0 或 1。在一些实施方式中，p 的范围是 1 ~ 10、1 ~ 9、1 ~ 8、1 ~ 7、1 ~ 6、1 ~ 5、1 ~ 4、1 ~ 3 或 1 ~ 2。在一些实施方式中，p 的范围是 2 ~ 8、2 ~ 7、2 ~ 6、2 ~ 5、2 ~ 4 或 2 ~ 3。在其它的实施方式中，p 为 1、2、3、4、5 或 6。在一些实施方式中，p 为 2 或 4。在一些实施方式中，当 w 不为 0 时，y 为 1 或 2。在一些实施方式中，当 w 为 1 ~ 12 时，y 为 1 或 2。在一些实施方式中，w 为 2 ~ 12，y 为 1 或 2。在一些实施方式中，a 为 1，且 w 和 y 为 0。

[0243] 对于包含多种抗体的组合物，药物加载表示为 p，即每个抗体的药物分子平均数。药物加载的范围可为 1 ~ 20 个药物 (D) / 抗体。在偶联反应的制备中可通过常规方法表征药物 / 抗体平均数，例如质谱法、ELISA 分析法和 HPLC。也可测定以 p 来表示的抗体 - 药物偶联物的定量分布。在某些情况下，可通过例如反向 HPLC 或电泳等方法分离、纯化和表征均质抗体 - 药物偶联物，其中 p 为带有其它药物加载的抗体 - 药物偶联物的某个特定值。在示例性的实施方式中，p 为 2 ~ 8。

[0244] 可采用本领域技术人员已知的任何技术产生抗体药物偶联物化合物。简而言之，抗体药物偶联物化合物包含：作为抗体单元的 24P4C12 MAbs、药物和任选的连接药物和结合剂的接头。在优选的实施方式中，抗体为包含上文所述的命名为 Ha5-1 (5) 2.1 的抗体的重链和轻链可变区的 24P4C12 MAbs。在更优选的实施方式中，抗体为包含上文所述的命名为 Ha5-1 (5) 2.1 的抗体的重链和轻链的 24P4C12 MAbs。可用多种不同的反应将药物和 / 或接头共价连接到结合剂。其通常通过结合剂，例如抗体分子的氨基酸残基的反应完成，包括赖氨酸的氨基、谷氨酸和天冬氨酸的游离羧基、半胱氨酸的巯基以及芳香族氨基酸的各种部分。共价结合的最常用非特异性方法之一是通过碳二亚胺反应将化合物的羧基（或氨基）连接到抗体的氨基（或羧基）。此外，已利用双官能剂（例如二醛或酰亚胺酯）将化合物的氨基基团连接到抗体分子的氨基。将药物连接到结合剂也可采用希夫碱 (Schiff base) 反应。该方法涉及高碘酸盐氧化包含二醇或羟基的药物，由此形成随后与结合剂反应的醛。通过

与结合剂的氨基形成希夫碱产生连接。异硫氰酸酯类也可用作将药物共价连接到结合剂的偶联剂。其它技术是本领域技术人员已知的,且在本发明的范围内。

[0245] 在某些实施方式中,在合适的条件下使中间体(其为接头的前体)与药物反应。在某些实施方式中,采用药物和/或中间体上的反应性基团。随后,在适宜条件下,使药物和中间体之间的反应产物或衍生药物与 24P4C12 MAbs 反应。

[0246] 抗体药物偶联物化合物的各具体单元在下文中更为详细的描述。示例性接头单元、延伸物单元、氨基酸单元、自分解间隔物单元和药物单元的合成和结构在美国专利申请公开号 2003-0083263、2005-0238649 和 2005-0009751 中也有描述,各专利申请出于全部目的通过引用全文纳入本文。

[0247] V.) 接头单元

[0248] 抗体药物偶联物化合物通常包含位于药物单元和抗体单元之间的接头单元。在一些实施方式中,该接头可在胞内条件下切割,从而接头的切割导致药物单元在胞内环境中从抗体释放。在还有其它实施方式中,接头单元不可切割,药物通过,例如抗体的降解释放。

[0249] 在一些实施方式中,接头可由胞内环境中(例如,溶酶体或内含体或小窝蛋白中)存在的裂解剂切割。接头可为例如可被胞内肽酶或蛋白酶(包括但不限于:溶酶体或内含体蛋白酶)切割的肽基接头。在一些实施方式中,肽基接头的长度至少为两个氨基酸或至少为 3 个氨基酸。裂解剂可包括组织蛋白酶 B 和 D 和纤溶酶,已知这些裂解剂均可水解二肽药物衍生物以在靶细胞内释放活性药物(参见例如,Dubowchik 和 Walker,1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123)。最典型的是可被存在于表达 24P4C12 的细胞中的酶切割的肽基接头。例如,可采用能被癌组织中高表达的巯基依赖性蛋白酶组织蛋白酶 B 切割的肽基接头(例如,Phe-Leu 或 Gly-Phe-Leu-Gly 接头(SEQ ID NO:25))。此类接头的其它例子描述于例如美国专利 6,214,345 中,该专利出于全部目的通过引用全文纳入本文。在一个具体的实施方式中,可被胞内蛋白酶切割的肽基接头是 Val-Cit 接头或 Phe-Lys 接头(参见例如,美国专利 6,214,345,其中描述了具有 val-cit 接头的多柔比星的合成)。采用胞内蛋白水解释放治疗剂的一个优点在于偶联的治疗剂通常是减毒的且偶联物的血清稳定性通常较高。

[0250] 在其它的实施方式中,可切割的接头是 pH 敏感性的,即在特定 pH 值下对水解敏感。pH 敏感性接头通常可在酸性条件下水解。例如,可采用在溶酶体中可水解的酸敏感性接头(例如,脲、缩氨基脲、缩氨基硫脲、顺乌头酰胺、原酸酯、乙缩醛、缩酮等)。(参见例如,美国专利 5,122,368;5,824,805;5,622,929;Dubowchik 和 Walker,1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123;Neville 等,1989, Biol. Chem. 264:14653-14661.) 此类接头在中性 pH 条件下(例如血液中)较稳定,但在 pH5.5 或 5.0 以下(即溶酶体的大致 pH)不稳定。在某些实施方式中,可水解的接头是硫醚接头(例如,通过酰脲键连接于治疗剂的硫醚(参见例如,美国专利 5,622,929))。

[0251] 在还有其它实施方式中,接头(例如二硫化物接头)在还原性条件下可切割。本领域已知各种二硫化物接头,包括例如,采用 SATA(N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和 SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)甲苯)、SPDB 和 SMPT 形成的那些接头。(参见例如,Thorpe 等,1987, Cancer Res. 47:

5924-5931; Wawrzynczak 等, Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (“免疫偶联物: 放射性成像学和癌症治疗中的抗体偶联物”, C. W. Vogel 编, 牛津大学出版社, 1987。也可参见美国专利 4, 880, 935。)

[0252] 在还有另一具体实施方式中, 接头是丙二酸酯接头 (Johnson 等, 1995, Anticancer Res. 15:1387-93)、马来酰亚胺苯甲酰基接头 (Lau 等, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304) 或 3'-N- 酰胺类似物 (Lau 等, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12)。

[0253] 在其它实施方式中, 接头单元不可切割, 药物通过抗体降解释放。(参见美国专利公开号 2005/0238649, 出于所有目的通过引用全文纳入本文)。

[0254] 接头对胞外环境通常基本上不敏感。就接头而言, 本文所用的“对胞外环境基本上不敏感”指在抗体药物偶联物化合物的样品中, 当该抗体药物偶联物处于胞外环境中 (例如在血浆内) 时, 不多于约 20%, 通常不多于约 15%, 更通常不多于约 10%, 更通常不多于约 5%、不多于约 3% 或不多于约 1% 的接头被切割。接头是否对胞外环境基本上不敏感可通过例如如下方式确定: 将抗体药物偶联物化合物与血浆共同孵育预设的时间 (例如, 2、4、8、16 或 24 小时), 然后定量测定血浆中药物的存在量。

[0255] 在其它非相互排斥的实施方式中, 接头促进细胞内化作用。在某些实施方式中, 当接头偶联于治疗剂时 (即, 在如本文所描述的抗体药物偶联物化合物的接头-治疗剂部分的情况下), 接头促进细胞内化作用。在还有其它实施方式中, 当接头同时偶联于耳他汀化合物和 24P4C12 MAb 时, 接头促进细胞内化作用。

[0256] 可用于本发明组合物和的各种示例性接头描述于 WO 2004-010957、美国专利公开号 2006/0074008、美国专利公开号 20050238649 和美国专利公开号 2006/0024317 中 (各专利出于所有目的通过引用全文纳入本文)。

[0257] “接头单元” (LU) 是可用于连接药物单元和抗体单元以形成抗体药物偶联物化合物的双官能化合物。在一些实施方式中, 接头单元具有如下式:

[0258] $-A_a-W_w-Y_y-$

[0259] 其中: -A- 是延伸物单元,

[0260] a 是 0 或 1,

[0261] 各 -W- 独立是氨基酸单元,

[0262] W 是 0 ~ 12 的整数,

[0263] -Y- 是自自分解间隔物单元, 以及

[0264] y 是 0、1 或 2。

[0265] 在一些实施方式中, a 为 0 或 1, w 为 0 或 1, y 为 0、1 或 2。在一些实施方式中, a 为 0 或 1, w 为 0 或 1, y 为 0 或 1。在一些实施方式中, 当 w 为 1 ~ 12 时, y 为 1 或 2。在一些实施方式中, w 为 2 ~ 12, y 为 1 或 2。在一些实施方式中, a 为 1, w 和 y 为 0。

[0266] VI.) 延伸物单元

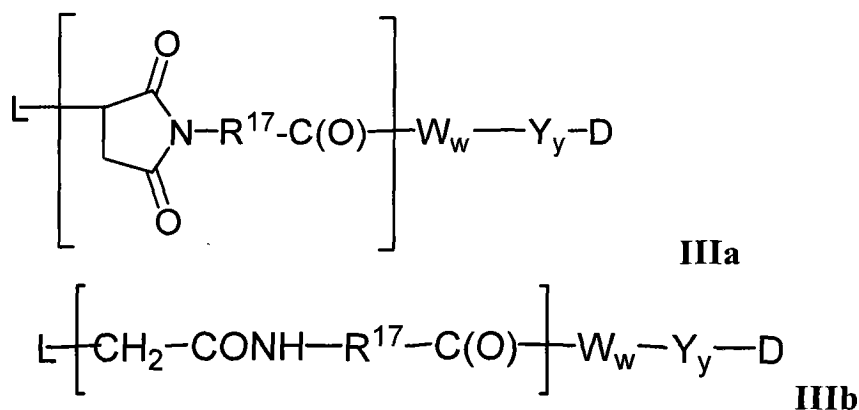
[0267] 当延伸物单元 (A) 存在时, 其能将抗体单元连接到氨基酸单元 (-W-) (如存在的话)、连接到间隔物单元 (-Y-) (如存在的话); 或连接到药物单元 (-D)。可存在于 24P4C12 MAb (例如 Ha5-1 (5) 2.1) 上的有用官能团 (不论天然存在的还是经化学操作的) 包括但不限于: 巯基、氨基、羟基、碳水化合物的异头羟基、和羧基。适当的官能团是巯基和氨基。在一个实例中, 可通过还原 24P4C12 MAb 的分子内二硫键产生巯基。在另一个实施方式中, 通过

24P4C12 MAb的赖氨酸部分的氨基与2-亚氨基硫烷(2-iminothiolane, 曹氏试剂(Traut's reagent))或其它巯基产生试剂反应产生巯基。在某些实施方式中,24P4C12 MAb是重组抗体,经工程改造以携带一个或多个赖氨酸。在某些其它实施方式中,重组24P4C12 MAb经工程改造以携带额外的巯基,例如额外的半胱氨酸。

[0268] 在一个实施方式中,延伸物单元与抗体单元的硫原子形成键。该硫原子可衍生自抗体的巯基。该实施方式中的代表性延伸物单元如式 IIIa 和 IIIb 的方括号中所示,其中 L-、-W-、-Y-、-D、w 和 y 如上所定义, R^{17} 选自: $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-、 $-C_1-C_{10}$ 亚烯基-、 $-C_1-C_{10}$ 亚炔基-、碳环基-、 $-O-(C_1-C_8)$ 亚烷基-、 $-O-(C_1-C_8)$ 亚烯基-、 $-O-(C_1-C_8)$ 亚炔基-、-亚芳基-、 $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-亚芳基-、 $-C_2-C_{10}$ 亚烯基-亚芳基-、 $-C_2-C_{10}$ 亚炔基-亚芳基-、-亚芳基- $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-、-亚芳基- $-C_2-C_{10}$ 亚烯基-、-亚芳基- $-C_2-C_{10}$ 亚炔基-、 $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-(碳环基)-、 $-C_2-C_{10}$ 亚烯基-(碳环基)-、 $-C_2-C_{10}$ 亚炔基-(碳环基)-、-(碳环基)- $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-、-(碳环基)- $-C_2-C_{10}$ 亚烯基-、-(碳环基)- $-C_2-C_{10}$ 亚炔基-、杂环基-、 $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-(杂环基)-、 $-C_2-C_{10}$ 亚烯基-(杂环基)-、 $-C_2-C_{10}$ 亚炔基-(杂环基)-、-(杂环基)- $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-、-(杂环基)- $-C_2-C_{10}$ 亚烯基-、-(杂环基)- $-C_1-C_{10}$ 亚炔基-、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 或 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, r 是 1-10 的整数,其中不论是单独或是作为其它基团的一部分,所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环、碳环基、杂环基和亚芳基可被任选取代。在一些实施方式中,不论是单独或是作为其它基团的一部分,所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环、碳环基、杂环基和亚芳基是未取代的。在一些实施方式中, R^{17} 选自: $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-、-碳环基-、 $-O-(C_1-C_8)$ 亚烷基-、-亚芳基-、 $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-亚芳基-、-亚芳基- $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-、 $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-(碳环基)-、-(碳环基)- $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-、 $-C_3-C_8$ 杂环基-、 $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-(杂环基)-、-(杂环基)- $-C_1-C_{10}$ 亚烷基-、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 和 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$; r 是 1 ~ 10 的整数,其中所述亚烷基未被取代,其余基团可被任选取代。

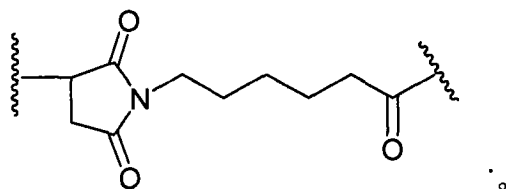
[0269] 通过所有示例性实施方式应理解:即便没有明确指明,抗体可连接 1 ~ 20 个药物部分 ($p = 1-20$)。

[0270]

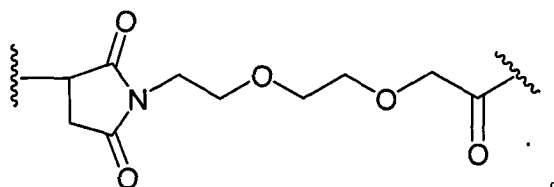


[0271] 示例性的延伸物单元如式 IIIa 所示,其中 R^{17} 为 $-(CH_2)_5-$;

[0272]

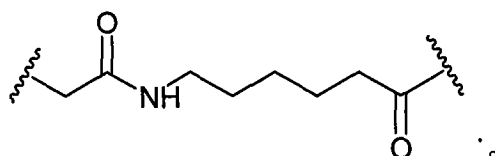


[0273] 另一个示例性的延伸物单元如式 IIIa 所示, 其中 R^{17} 为 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$; r 为 2 :
[0274]



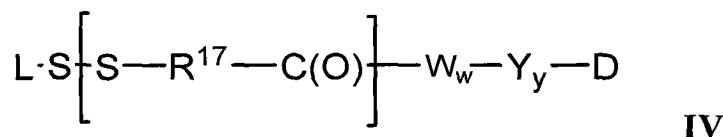
[0275] 示例性的延伸物单元如式 IIIa 所示, 其中 R^{17} 为 - 亚芳基 - 或亚芳基 $-C_1-C_{10}$ 亚烷基 -。在一些实施方式中, 芳基是未取代的苯基。

[0276] 其它示例性的延伸物单元如式 IIIb 所示, 其中 R^{17} 为 $-(CH_2)_5-$:
[0277]



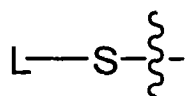
[0278] 在某些实施方式中, 延伸物单元通过抗体单元的硫原子和延伸物单元的硫原子之间的二硫键连接于抗体单元。该实施方式的代表性延伸物单元如式 IV 的方括号中所示, 其中 R^{17} 、 $L-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 w 和 y 如上所定义。

[0279]



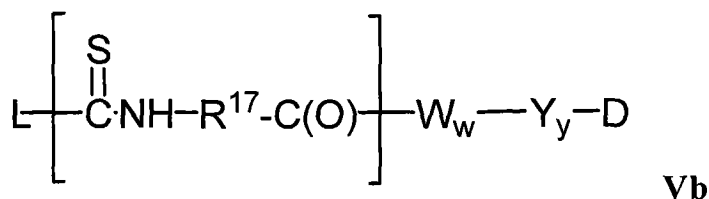
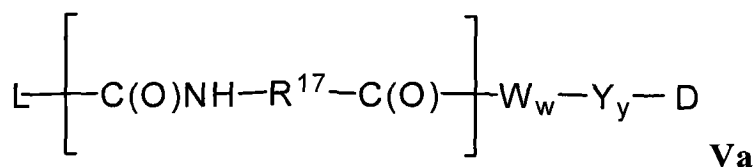
[0280] 应注意到, 除非上下文中另有指明, 在本申请全文中下式的 S 部分是指抗体单元的硫原子。

[0281]



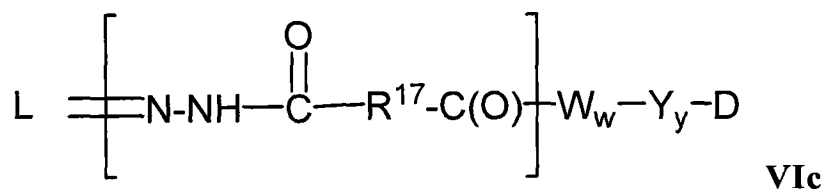
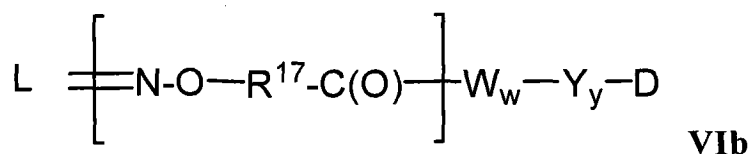
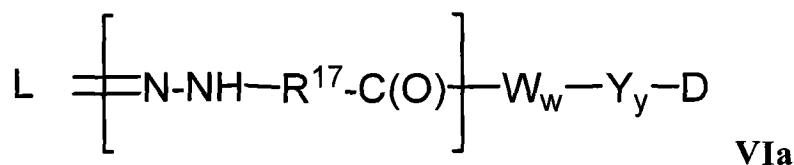
[0282] 在还有其它实施方式中, 延伸物包含可与抗体的伯氨基或仲氨基成键的反应性位点。这些反应性位点的例子包括但不限于: 活化的酯类, 例如琥珀酰亚胺酯、4 硝基苯基酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯、酐、酰氯、磺酰氯、异氰酸酯和异硫氰酯。该实施方式的代表性延伸物单元如式 Va 和 Vb 的方括号中所示, 其中 $-R^{17}-$ 、 $L-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 w 和 y 如上所定义 ;

[0283]



[0284] 在一些实施方式中,延伸物包含与抗体上可存在的修饰的碳水化合物的(-CHO)基团反应的反应性位点。例如,可用诸如高碘酸钠等试剂温和氧化碳水化合物,所得氧化的碳水化合物的(-CHO)单元可与含有官能团的延伸物缩合,所述延伸物可为例如酰肼、肼、伯胺或仲胺、肼、缩氨基硫脲、羧化肼和芳基酰肼,例如 Kaneko 等,1991, Bioconjugate Chem. 2 :133-41 中所描述的那些。该实施方式中的代表性延伸物单元如式 Via、Vib 和 Vic 的方括号中所示,其中 $-\text{R}^{17}$ 、 L 、 $-\text{W}_w$ 、 $-\text{Y}_y$ 、 $-\text{D}$ 、 w 和 y 如上所定义。

[0285]

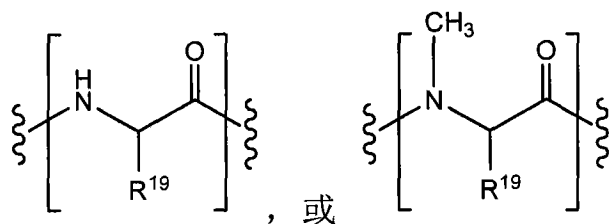


[0286] VII.) 氨基酸单元

[0287] 当氨基酸单元($-\text{W}-$)存在时,其连接延伸物单元和间隔物单元(如果间隔物单元存在的话)、连接延伸物单元和药物部分(如果间隔物单元不存在)、以及连接抗体单元和药物单元(如果延伸物单元和间隔物单元均不存在)。

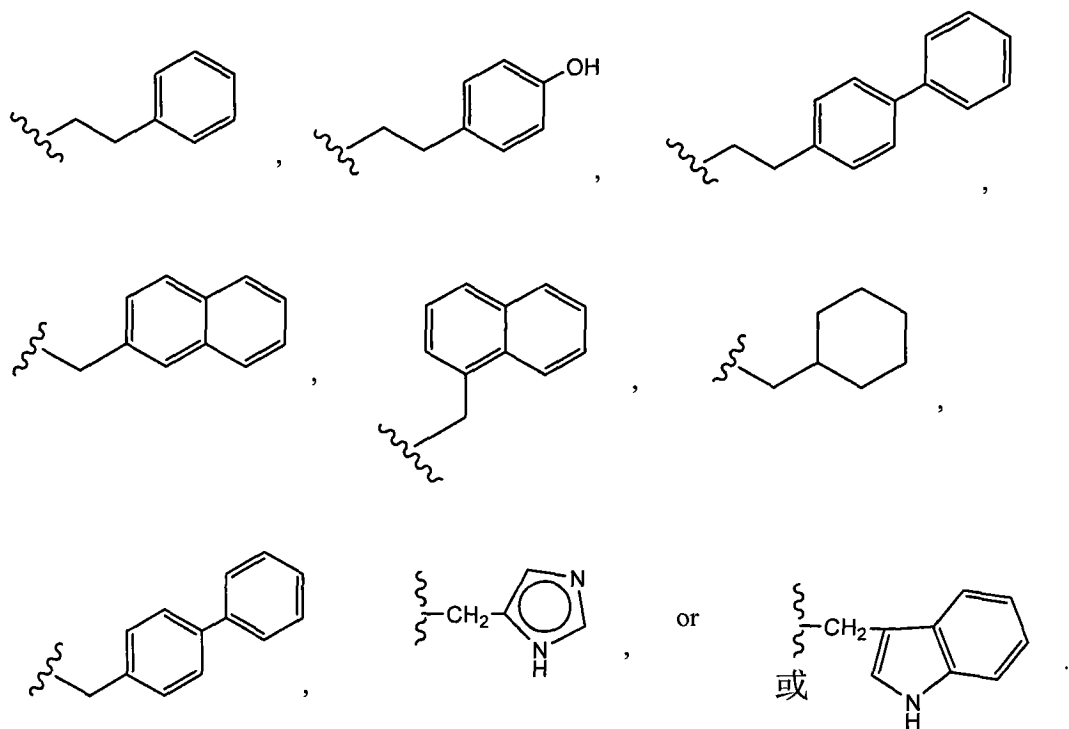
[0288] W_w 可为例如:单肽、二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽单元。各 $-\text{W}-$ 单元独立的如下式的方括号中所示,且 w 为 0 ~ 12 的整数:

[0289]



[0290] 其中, R^{19} 是 H、甲基、异丙基、异丁基、仲丁基、苄基、对羟基苄基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{C}$ H_3 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2$

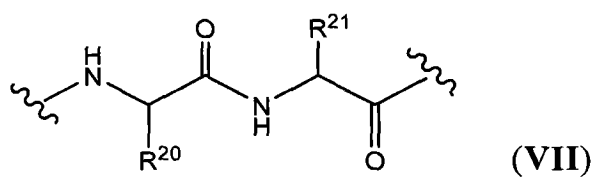
)₃NH₂、-(CH₂)₃NHCOCH₃、-(CH₂)₃NHCHO、-(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₄NH₂、-(CH₂)₄NHCOCH₃、-(CH₂)₄NHCHO、-(CH₂)₃NHCONH₂、-(CH₂)₄NHCONH₂、-CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、环己基、
[0291]



[0292] 在一些实施方式中,氨基酸单元可被一种或多种酶(包括癌症或肿瘤相关的蛋白酶)酶切以释放药物单元(-D),其在一个实施方式中在释放后体内被质子化以提供药物(D)。

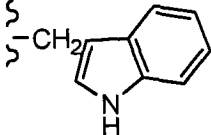
[0293] 在某些实施方式中,氨基酸单元可包含天然氨基酸。在其它的实施方式中,氨基酸单元可包含非天然氨基酸。示例性的 W_w 单元如式(VII)-(IX)所示:

[0294]



[0295] 其中 R²⁰ 和 R²¹ 如下所示:

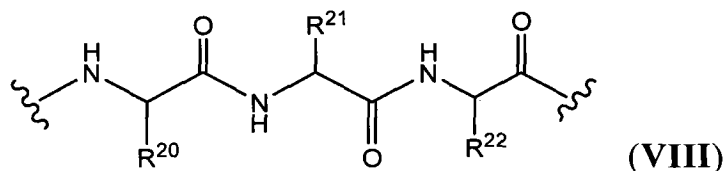
[0296]

$\underline{R}^{20}$	$\underline{R}^{21}$
苄基	$(CH_2)_4NH_2$;
甲基	$(CH_2)_4NH_2$;
异丙基	$(CH_2)_4NH_2$;
异丙基	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
苄基	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
异丁基	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
仲丁基	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
	$(CH_2)_3NHCONH_2$;

[0297]

苄基	甲基;
苄基	$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

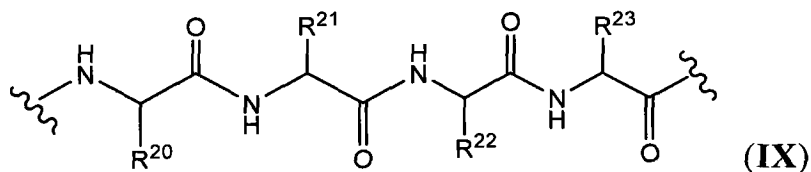
[0298]

[0299] 其中 R^{20} 、 R^{21} 和 R^{22} 如下所示：

[0300]

$\underline{R}^{20}$	$\underline{R}^{21}$	$\underline{R}^{22}$
苄基	苄基	$(CH_2)_4NH_2$;
异丙基	苄基	$(CH_2)_4NH_2$;
H	苄基	$(CH_2)_4NH_2$;

[0301]

[0302] 其中, R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 和 R^{23} 如下所示：

[0303]

$\underline{R}^{20}$	$\underline{R}^{21}$	$\underline{R}^{22}$	$\underline{R}^{23}$
H	苄基	异丁基	H; 和
甲基	异丁基	甲基	异丁基.

[0304] 示例性的氨基酸单元包括但不限于：式 VII 所示的单元，其中： R^{20} 为苄基，且 R^{21} 为 $-(CH_2)_4NH_2$ ； R^{20} 为异丙基，且 R^{21} 为 $-(CH_2)_4NH_2$ ；或 R^{20} 为异丙基，且 R^{21} 为 $-(CH_2)_3NHCONH_2$ 。另一个示例性的氨基酸单元是式 VIII 所示的单元，其中 R^{20} 为苄基， R^{21} 为苄基，且 R^{22} 为 $-(CH_2)_4NH_2$ 。

[0305] 可设计和优化有用的 $-W_w-$ 单元对某一具体酶（例如，肿瘤相关蛋白酶）的酶切选择性。在一个实施方式中， $-W_w-$ 单元由组织蛋白酶 B、C 和 D 或纤溶蛋白酶催化切割。

[0306] 在一个实施方式中, $-W_w-$ 是二肽、三肽、四肽或五肽。当 R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 或 R^{23} 不是氢时, R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 或 R^{23} 所连接的碳原子是手性的。

[0307] R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 或 R^{23} 所连接各碳原子独立为 (S) 或 (R) 构型。

[0308] 在氨基酸单元的一个方面, 氨基酸单元是缬氨酸-瓜氨酸 (vc 或 val-cit)。在另一方面, 氨基酸单元是苯丙氨酸-赖氨酸 (即 fk)。在氨基酸单元的另还有一方面, 氨基酸单元是 N-甲基缬氨酸-瓜氨酸。在还有另一方面, 氨基酸单元是 5-氨基戊酸、高苯丙氨酸赖氨酸、四异喹啉羧酸酯赖氨酸、环己基丙氨酸赖氨酸、异哌啶酸赖氨酸、 β -丙氨酸赖氨酸、甘氨酸丝氨酸缬氨酸谷氨酰胺和异哌啶酸。

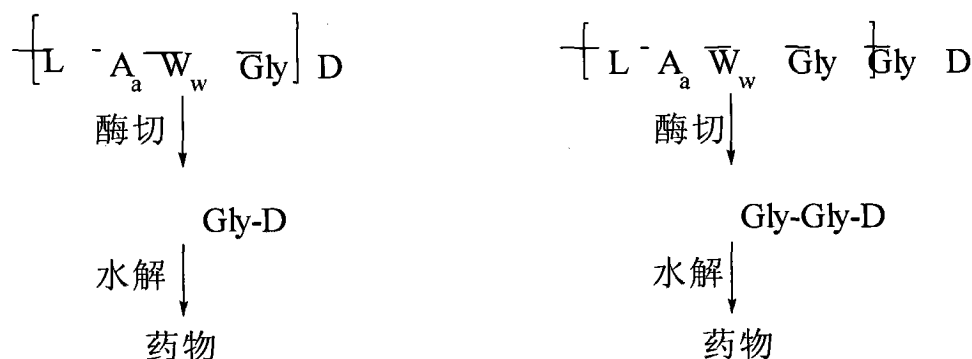
[0309] VIII.) 间隔物单元

[0310] 当间隔物单元 ($-Y-$) 存在时, 其连接氨基酸单元和药物单元 (当氨基酸单元存在时)。或者, 间隔物单元连接延伸物单元和药物单元 (当氨基酸单元不存在时)。间隔物单元还连接药物单元和抗体单元 (当氨基酸单元和延伸物单元均不存在时)。

[0311] 间隔物单元一般分为两类: 非自分解或自分解的间隔物单元。非自分解间隔物单元是从抗体药物偶联物切除 (尤其是酶切) 氨基酸单元后, 部分或全部间隔物单元保持与药物部分连接的间隔物单元。非自分解间隔物单元的例子包括但不限于: (甘氨酸-甘氨酸) 间隔物单元和甘氨酸间隔物单元 (均描述于流程 1 中) (见下文)。当包含甘氨酸-甘氨酸间隔物单元或甘氨酸间隔物单元的偶联物经过酶 (例如, 肿瘤细胞相关蛋白酶、癌细胞相关蛋白酶或淋巴细胞相关蛋白酶) 的酶切, 甘氨酸-甘氨酸-药物部分或甘氨酸-药物部分从 $L-Aa-W_w-$ 切除。在一个实施方式中, 在靶细胞中发生独立的水解反应, 切割甘氨酸-药物部分的键, 释放该药物。

[0312]

流程 1



[0313] 在一些实施方式中, 非自分解间隔物单元 ($-Y-$) 为 $-Gly-$ 。在一些实施方式中, 非自分解间隔物单元 ($-Y-$) 为 $-Gly-Gly-$ 。

[0314] 在一个实施方式中, 提供其中不含间隔物单元的药物-接头偶联物 ($y = 0$), 或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

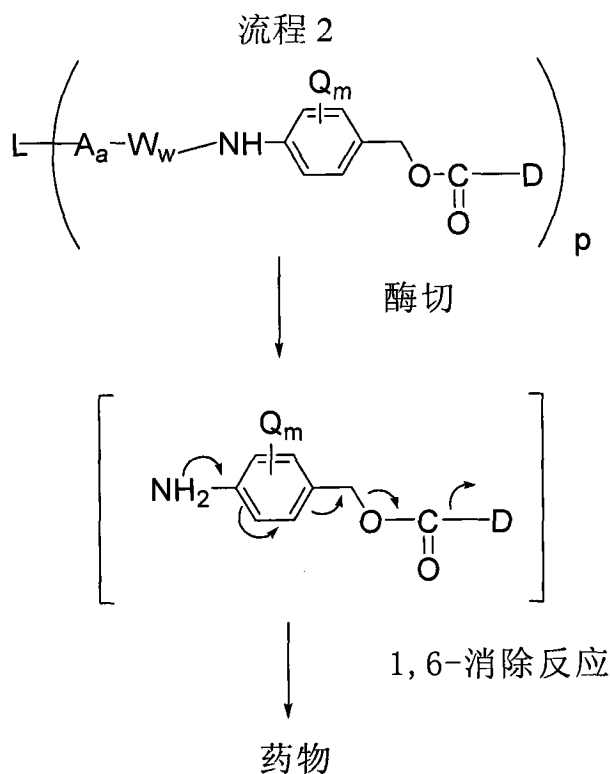
[0315] 或者, 包含自分解间隔物单元的偶联物可释放 $-D$ 。本文所用的术语“自分解间隔物”是指双官能化学部分, 其能将两个间隔的化学部分共价连接在一起以形成稳定的三部分分子。如果其与第一部分之间的键被切割, 其将自发地与第二化学部分分离。

[0316] 在一些实施方式中, $-Y_y-$ 是对氨基苯甲醇 (PAB) 单元 (参考流程 2 和 3), 其亚苯基部分被 Q_m 取代, 其中 Q 为 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_1-C_8$ 烯基、 $-C_1-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_1-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_1-C_8$ 炔基)、-卤素、-硝基或-氰基; m 为 0 ~ 4 的整数。不论是单独或是作

为其它基团的一部分,所述烷基、烯基和炔基可被任选取代。

[0317] 在一些实施方式中, $-Y-$ 是 PAB 基团,通过 PAB 基团的氨基氮原子与 $-W_w-$ 连接,并通过碳酸酯、氨基甲酸酯或醚基与 $-D$ 直接连接。不受任何具体理论或机理的限制,流程 2 描述了 PAB 基团释放药物的可能机理,该 PAB 基团通过氨基甲酸酯或碳酸酯基团与 $-D$ 直接连接(如 Toki 等,2002, J. Org. Chem. 67 :1866-1872 所描述)。

[0318]

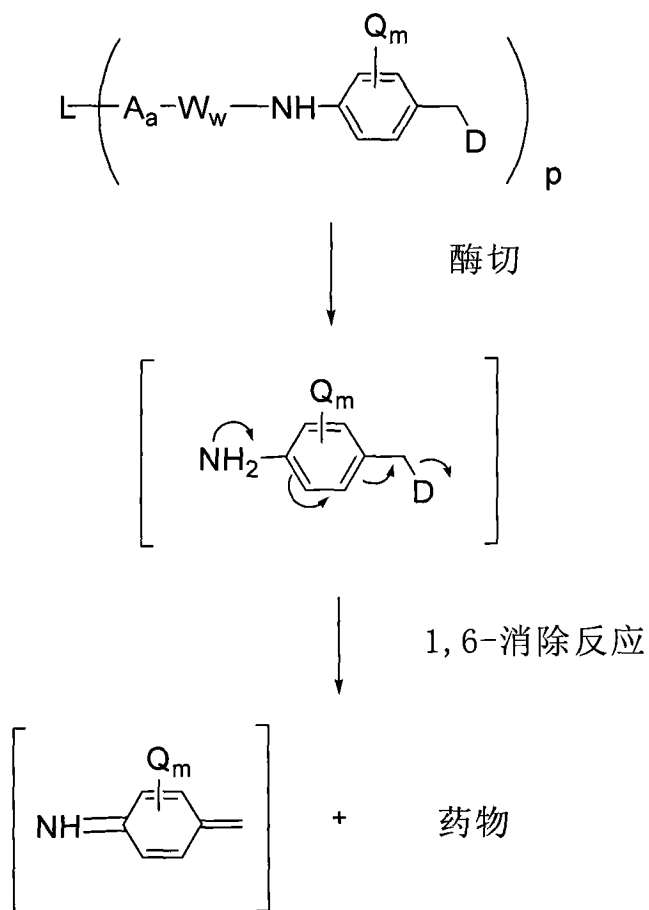


[0319] 在流程 2 中, Q 是 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_1-C_8$ 烯基、 $-C_1-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_1-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_1-C_8$ 炔基)、 $-$ 卤素、 $-$ 硝基或 $-$ 氰基; m 是 $0 \sim 4$ 的整数; p 的范围为 $1 \sim$ 约 20。不论是单独或是作为其它基团的一部分,所述烷基、烯基和炔基可被任选取代。

[0320] 不受任何具体理论或机理的限制,流程 3 描述了 PAB 基团释放药物的可能机理,该 PAB 基团通过醚或胺连接键与 $-D$ 直接连接,其中 D 包含作为药物单元一部分的氧或氮基团。

[0321]

流程 3

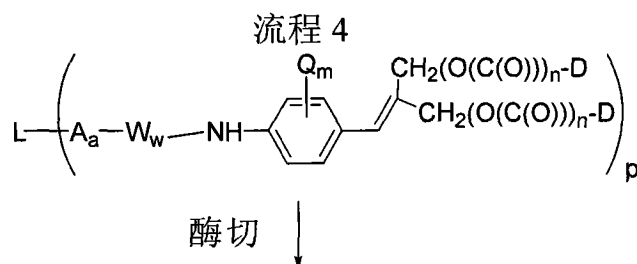


[0322] 在流程 3 中, Q 为 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_1-C_8$ 烯基、 $-C_1-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_1-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_1-C_8$ 炔基)、- 卤素、- 硝基或 - 氰基; m 是 0 ~ 4 的整数; p 的范围为 1 ~ 约 20。不论是单独或是作为其它基团的一部分, 所述烷基、烯基和炔基可被任选取代。

[0323] 自分解间隔物的其它例子包括但不限于: 与 PAB 基团电学特性相似的芳族化合物, 例如 2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物 (Hay 等, 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) 和邻-或对-氨基苄基缩醛。可利用在酰胺键水解后经历环化的间隔物, 例如取代和未取代的 4-氨基丁酸酰胺 (Rodrigues 等, 1995, Chemistry Biology 2:223)、适当取代的二环基 [2.2.1] 和二环基 [2.2.2] 环系统 (Storm 等, 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) 和 2-氨基苯基丙酸酰胺 (Amsberry 等, 1990, J. Org. Chem. 55:5867)。甘氨酸的 α 位被取代的含胺药物的消除反应 (Kingsbury 等, 1984, J. Med. Chem. 27:1447) 也是自分解间隔物的例子。

[0324] 在一个实施方式中, 间隔物单元是支链的双(羟甲基)-苯乙烯 (BHMS) 单元 (如流程 4 所示), 其可用于掺入和释放多个药物。

[0325]



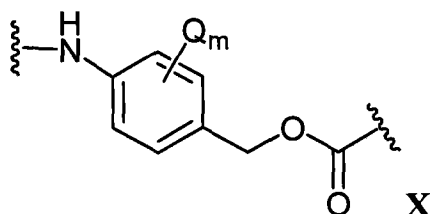
2 个药物

[0326] 在流程 4 中, Q 为 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_1-C_8$ 烯基、 $-C_1-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8 \text{ 烷基})$ 、 $-O-(C_1-C_8 \text{ 烯基})$ 、 $-O-(C_1-C_8 \text{ 炔基})$ 、- 卤素、- 硝基或 - 氰基; m 是 0 ~ 4 的整数; n 为 0 或 1; p 的范围为 1 ~ 约 20。不论是单独或是作为其它基团的一部分, 所述烷基、烯基和炔基可被任选取代。

[0327] 在一些实施方式中, -D 部分是相同的。在还有另一实施方式中, -D 部分是不同的。

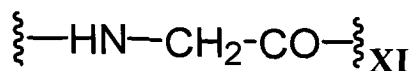
[0328] 在一个方面, 间隔物单元 ($-Y_y-$) 如式 (X)-(XII) 所示:

[0329]



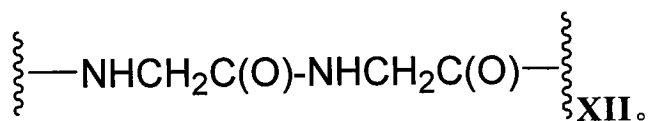
[0330] 其中, Q 为 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_1-C_8$ 烯基、 $-C_1-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8 \text{ 烷基})$ 、 $-O-(C_1-C_8 \text{ 烯基})$ 、 $-O-(C_1-C_8 \text{ 炔基})$ 、- 卤素、- 硝基或 - 氰基; m 是 0 ~ 4 的整数。p 的范围为 1 ~ 约 20。不论是单独或是作为其它基团的一部分, 所述烷基、烯基和炔基可被任选取代。

[0331]



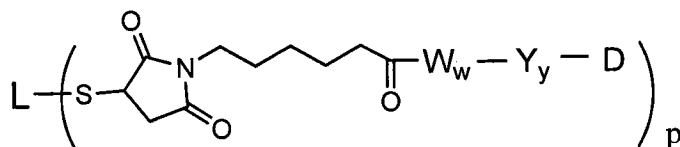
[0332] 和

[0333]



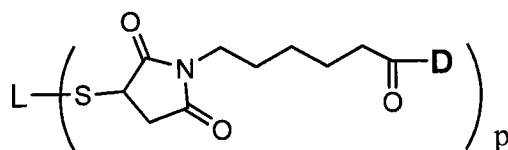
[0334] 包含抗体药物偶联物化合物的式 I 和 II 的实施方式可包括:

[0335]



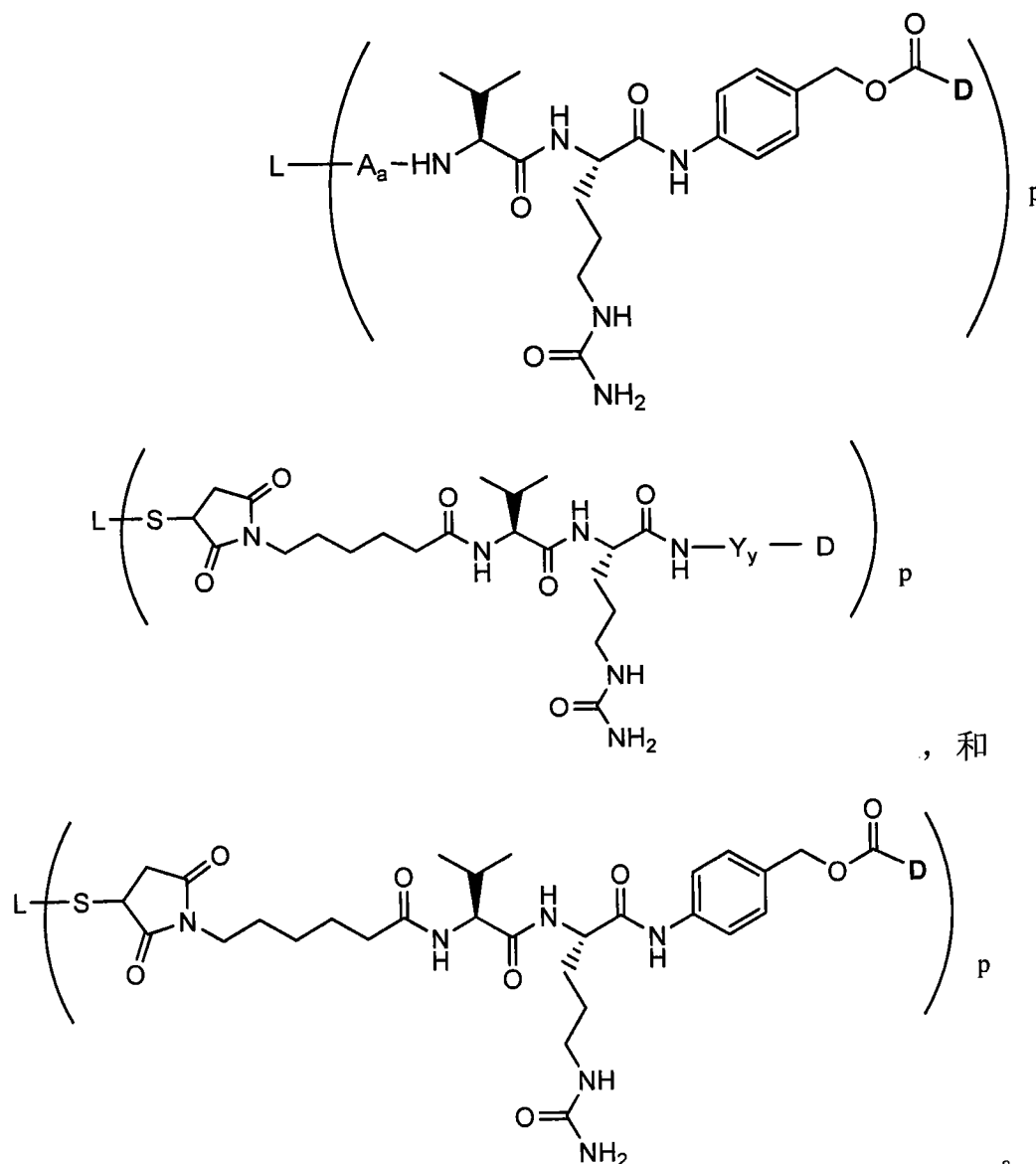
[0336] 其中, w 和 y 各自为 0、1 或 2, 以及

[0337]



[0338] 其中, w 和 y 各自为 0,

[0339]



[0340] IX.) 药物单元

[0341] 药物部分 (D) 可为任何细胞毒、细胞抑制或免疫调节 (例如免疫抑制) 或药物。D 是具有可与间隔物单元、与氨基酸单元、与延伸物单元或与抗体单元形成键的原子的药物单元 (部分)。在一些实施方式中, 药物单元 D 具有可与间隔物单元形成键的氮原子。本文所用的术语“药物单元”和“药物部分”是同义词, 可互换使用。

[0342] 细胞毒剂或免疫调节剂的有用类型包括例如: 抗微管蛋白剂、DNA 小沟结合剂、DNA 复制抑制剂和烷化剂。

[0343] 在一些实施方式中, 药物是耳他汀, 例如耳他汀 E (在本领域中也称为多拉司他汀-10 的衍生物) 或其衍生物。耳他汀可为例如耳他汀 E 和酮酸形成的酯。例如, 耳他汀 E 可与对乙酰基苯甲酸或苯甲酰基戊酸反应分别产生 AEB 和 AEVB。其它典型的耳他汀类包括 AFP、MMAF 和 MMAE。示例性耳他汀类的合成及结构记载于: 美国专利申请公开号 2003-0083263、2005-0238649 和 2005-0009751; 国际专利公开号 WO 04/010957、国际专利公开号 WO 02/088172 和美国专利 6,323,315; 6,239,104; 6,034,065; 5,780,588;

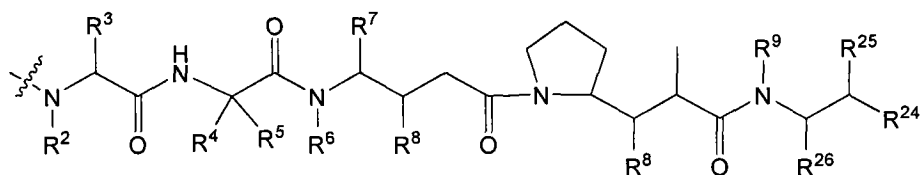
5, 665, 860 ;5, 663, 149 ;5, 635, 483 ;5, 599, 902 ;5, 554, 725 ;5, 530, 097 ;5, 521, 284 ;5, 504, 191 ;5, 410, 024 ;5, 138, 036 ;5, 076, 973 ;4, 986, 988 ;4, 978, 744 ;4, 879, 278 ;4, 816, 444 ;及 4, 486, 414, 各专利文献出于所有目的通过引用全文纳入本文。

[0344] 已显示耳他汀类干扰微管动力学和核与细胞的分裂, 且具有抗肿瘤活性。耳他汀类结合微管蛋白, 且能对表达 24P4C12 的细胞发挥细胞毒或细胞抑制效应。本领域中已知可用于测定耳他汀或所得抗体药物偶联物是否可对所需的细胞系发挥细胞毒或细胞抑制效应的多种不同方法。

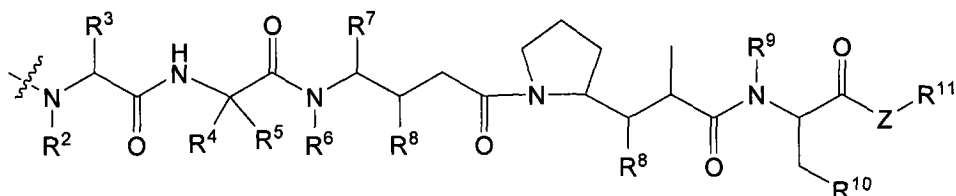
[0345] 测定化合物是否结合微管蛋白的方法在本领域中是已知的。参见例如, Muller 等, Anal. Chem 2006, 78, 4390-4397 ;Hamel 等, Molecular Pharmacology, 1995 47 :965-976 ;以及 Hamel 等, The Journal of Biological Chemistry, 1990 265 :28, 17141-17149。为了本发明的目的, 可测定化合物对微管蛋白的相对亲和力。本发明的一些优选的耳他汀类与微管蛋白结合的亲和力的范围为 : 比 MMAE 对微管蛋白的结合亲和力低 10 倍 (较弱的亲和力) 至比 MMAE 对微管蛋白的结合亲和力高 10 倍、20 倍或甚至 100 倍 (较高的亲和力)。

[0346] 在一些实施方式中, -D 是式 D_E 或 D_F 的耳他汀 :

[0347]



D_E



D_F

[0348] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物 ;

[0349] 其中, 在各位点独立地 :

[0350] 波浪线表示键 ;

[0351] R² 为 -C₁-C₂₀ 烷基、-C₂-C₂₀ 烯基或 -C₂-C₂₀ 炔基 ;

[0352] R³ 为 -H、-C₁-C₂₀ 烷基、-C₂-C₂₀ 烯基、-C₂-C₂₀ 炔基、- 碳环、-C₁-C₂₀ 亚烷基 (碳环)、-C₂-C₂₀ 亚烯基 (碳环)、-C₂-C₂₀ 亚炔基 (碳环)、- 芳基、-C₁-C₂₀ 亚烷基 (芳基)、-C₂-C₂₀ 亚烯基 (芳基)、-C₂-C₂₀ 亚炔基 (芳基)、杂环、-C₁-C₂₀ 亚烷基 (杂环)、-C₂-C₂₀ 亚烯基 (杂环) 或 -C₂-C₂₀ 亚炔基 (杂环) ;

[0353] R⁴ 为 -H、-C₁-C₂₀ 烷基、-C₂-C₂₀ 烯基、-C₂-C₂₀ 炔基、碳环、-C₁-C₂₀ 亚烷基 (碳环)、-C₂-C₂₀ 亚烯基 (碳环)、-C₂-C₂₀ 亚炔基 (碳环)、芳基、-C₁-C₂₀ 亚烷基 (芳基)、-C₂-C₂₀ 亚烯基 (芳基)、-C₂-C₂₀ 亚炔基 (芳基)、- 杂环、-C₁-C₂₀ 亚烷基 (杂环)、-C₂-C₂₀ 亚烯基 (杂环) 或 -C₂-C₂₀ 亚炔基 (杂环) ;

- [0354] R^5 为 $-H$ 或 $-C_1-C_8$ 烷基；
- [0355] 或 R^4 和 R^5 共同形成碳环，且具有式 $-(CR^aR^b)_s-$ ，其中 R^a 和 R^b 独立为： $-H$ ， $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基或 $-$ 碳环， s 为 2、3、4、5 或 6，
- [0356] R^6 为 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；
- [0357] R^7 为 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（碳环）、 $-$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（芳基）、杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（杂环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（杂环）或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（杂环）；
- [0358] 各 R^8 独立的为 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、 $-O-(C_1-C_{20}$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_{20}$ 烯基)、 $-O-(C_1-C_{20}$ 炔基) 或 $-$ 碳环；
- [0359] R^9 为 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；
- [0360] R^{24} 为 $-$ 芳基、 $-$ 杂环或 $-$ 碳环；
- [0361] R^{25} 为 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、 $-$ 碳环、 $-O-(C_1-C_{20}$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_{20}$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_{20}$ 炔基) 或 OR^{18} ，其中 R^{18} 为 $-H$ 、羟基保护基或直接的键，此时 OR^{18} 代表 $=O$ ；
- [0362] R^{26} 为 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基、 $-$ 芳基、 $-$ 杂环或 $-$ 碳环；
- [0363] R^{10} 为 $-$ 芳基或 $-$ 杂环；
- [0364] Z 为 $-O$ 、 $-S$ 、 $-NH$ 或 $-NR^{12}$ ，其中 R^{12} 为 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；
- [0365] R^{11} 为 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、 $-$ 芳基、 $-$ 杂环、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 或 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ ；
- [0366] m 是 1 ~ 1000 的整数；
- [0367] R^{13} 为 $-C_2-C_{20}$ 亚烷基、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基；
- [0368] R^{14} 为 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；
- [0369] 存在的 R^{15} 各自独立为 $-H$ 、 $-COOH$ 、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 炔基；
- [0370] 存在的 R^{16} 各自独立为 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基或 $-(CH_2)_n-COOH$ ；
- 和
- [0371] n 是 0 ~ 6 的整数；
- [0372] 其中，不论是单独或是作为其它基团的一部分，所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环和杂环基可被任选取代。
- [0373] 式 D_E 的耳他汀包括所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环和杂环基未被取代的那些。
- [0374] 式 D_E 的耳他汀包括其中 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^9 未被取代，而 R^{19} 、 R^{20} 和 R^{21} 如本文所述地被任选取代的那些。
- [0375] 式 D_E 的耳他汀包括如下的那些，其中：
- [0376] R^2 为 C_1-C_8 烷基；
- [0377] R^3 、 R^4 和 R^7 独立选自 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、单环的 C_3-C_6 碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（单环的 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（单环的 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（单环的 C_3-C_6 碳环）、 C_6-C_{10} 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（ C_6-C_{10}

芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基 (C_6-C_{10} 芳基)、杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基 (杂环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基 (杂环) 或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基 (杂环); 其中, 所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环、芳基和杂环基是被任选取代的;

[0378] R^5 为 $-H$;

[0379] R^6 为 $-C_1-C_8$ 烷基;

[0380] 各 R^8 独立选自 $-OH$ 、 $-O-(C_1-C_{20}$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_{20}$ 烯基)、或 $-O-(C_2-C_{20}$ 炔基), 其中, 所述烷基、烯基和炔基是被任选取代的;

[0381] R^9 为 $-H$ 或 $-C_1-C_8$ 烷基;

[0382] R^{24} 为任选取代的 - 苯基;

[0383] R^{25} 为 $-OR^{18}$; 其中 R^{18} 为 H 、羟基保护基或直接的键, 此时 OR^{18} 代表 $=O$;

[0384] R^{26} 选自 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基或 - 碳环; 其中, 所述烷基、烯基、炔基和碳环基是被任选取代的; 或其药学上可接受的盐或溶剂化物形式。

[0385] 式 D_E 的耳他汀包括如下那些:

[0386] R^2 为甲基;

[0387] R^3 为 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基或 C_2-C_8 炔基, 其中所述烷基、烯基和炔基是被任选取代的;

[0388] R^4 为 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、单环的 C_3-C_6 碳环、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_8$ 亚烷基 (C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_8$ 亚烯基 (C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_8$ 亚炔基 (C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_1-C_8$ 亚烷基 (单环的 C_3-C_6 碳环)、 $-C_2-C_8$ 亚烯基 (单环的 C_3-C_6 碳环)、 $-C_2-C_8$ 亚炔基 (单环的 C_3-C_6 碳环); 其中, 不论是单独或是其它基团的一部分, 所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基和碳环基是被任选取代的;

[0389] R^5 为 $-H$;

[0390] R^6 为甲基;

[0391] R^7 为 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基或 $-C_2-C_8$ 炔基;

[0392] 各 R^8 为甲氧基;

[0393] R^9 为 $-H$ 或 $-C_1-C_8$ 烷基;

[0394] R^{24} 为 - 苯基;

[0395] R^{25} 为 $-OR^{18}$; 其中 R^{18} 为 H 、羟基保护基或直接的键, 此时 OR^{18} 代表 $=O$;

[0396] R^{26} 为甲基;

[0397] 或其药学上可接受的盐形式。

[0398] D_E 的耳他汀包括如下的那些:

[0399] R^2 为甲基; R^3 为 $-H$ 或 $-C_1-C_3$ 烷基; R^4 为 $-C_1-C_5$ 烷基; R^5 为 $-H$; R^6 为甲基; R^7 为异丙基或仲丁基; R^8 为甲氧基; R^9 为 $-H$ 或 $-C_1-C_8$ 烷基; R^{24} 为苯基; R^{25} 为 $-OR^{18}$; 其中 R^{18} 为 $-H$ 、羟基保护基或直接的键, 此时 OR^{18} 代表 $=O$; 和 R^{26} 为甲基; 或其药学上可接受的盐或溶剂化物形式。

[0400] 式 D_E 的耳他汀包括如下的那些:

[0401] R^2 为甲基或 C_1-C_3 烷基,

[0402] R^3 为 $-H$ 或 $-C_1-C_3$ 烷基;

[0403] R^4 为 $-C_1-C_5$ 烷基;

- [0404] R^5 为 H；
- [0405] R^6 为 C_1-C_3 烷基；
- [0406] R^7 为 $-C_1-C_5$ 烷基；
- [0407] R^8 为 $-C_1-C_3$ 烷氧基；
- [0408] R^9 为 -H 或 $-C_1-C_8$ 烷基；
- [0409] R^{24} 为苯基；
- [0410] R^{25} 为 $-OR^{18}$ ；其中 R^{18} 为 -H、羟基保护基或直接的键，此时 OR^{18} 代表 = O；且
- [0411] R^{26} 为 $-C_1-C_3$ 烷基；
- [0412] 或其药学上可接受的盐的形式。
- [0413] 式 D_F 的耳他汀包括如下的那些：
- [0414] R^2 为甲基；
- [0415] R^3 、 R^4 和 R^7 独立地选自 -H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、单环的 C_3-C_6 碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（单环的 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（单环的 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（单环的 C_3-C_6 碳环）、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（ C_6-C_{10} 芳基）、杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（杂环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（杂环）或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（杂环）；其中，无论单独或作为其它基团的一部分，所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环、芳基和杂环基是被任选取代的；
- [0416] R^5 为 -H；
- [0417] R^6 为甲基；
- [0418] 各 R^8 为甲氧基；
- [0419] R^9 为 -H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；其中，所述烷基、烯基和炔基是被任选取代的；
- [0420] R^{10} 为任选取代的芳基或任选取代的杂环；
- [0421] Z 为 -O-、-S-、-NH- 或 $-NR^{12}$ ，其中 R^{12} 为 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基，各基团是被任选取代的；
- [0422] R^{11} 为 -H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、-芳基、-杂环、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 或 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ ，其中，所述烷基、烯基、炔基、芳基和杂环基是被任选取代的；
- [0423] m 是 1 ~ 1000 的整数或 $m = 0$ ；
- [0424] R^{13} 为 $-C_2-C_{20}$ 亚烷基、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基，各基团被任选取代；
- [0425] R^{14} 为 -H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基，其中，所述烷基、烯基和炔基是被任选取代的；
- [0426] 存在的 R^{15} 各自独立为 -H、 $-COOH$ 、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 炔基，其中，所述烷基、烯基和炔基是被任选取代的；
- [0427] 存在的 R^{16} 各自独立地 -H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基或 $-(CH_2)_n-COOH$ ，其中，所述烷基、烯基和炔基是被任选取代的；
- [0428] n 是 0 ~ 6 的整数；
- [0429] 或其药学上可接受的盐。
- [0430] 在这些实施方式中的某些中， R^{10} 为任选取代的苯基。

[0431] 式 D_F 的耳他汀包括如下的那些 : 其中 R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸ 和 R⁹ 是未被取代的, 且 R¹⁰ 和 R¹¹ 如上所述。

[0432] 式 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环和杂环基团是未被取代的。

[0433] 式 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中 :

[0434] R² 为 -C₁-C₃ 烷基 ; R³ 为 -H 或 -C₁-C₃ 烷基 ; R⁴ 为 -C₁-C₅ 烷基 ; R⁵ 为 -H ; R⁶ 为 -C₁-C₃ 烷基 ; R⁷ 为 -C₁-C₅ 烷基 ; R⁸ 为 -C₁-C₃ 烷氧基 ; R⁹ 为 -H 或 -C₁-C₈ 烷基 ; R¹⁰ 为任选取代的苯基 ; Z 为 -O-、-S- 或 -NH- ; R¹¹ 如本文所述 ; 或其药学上可接受的盐。

[0435] 式 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中 :

[0436] R² 为甲基 ; R³ 为 -H 或 -C₁-C₃ 烷基 ; R⁴ 为 -C₁-C₅ 烷基 ; R⁵ 为 -H ; R⁶ 为甲基 ; R⁷ 为异丙基或仲丁基 ; R⁸ 为甲氧基 ; R⁹ 为 -H 或 -C₁-C₈ 烷基 ; R¹⁰ 为任选取代的苯基 ; Z 为 -O-、-S- 或 -NH- ; 且 R¹¹ 如本文所定义 ; 或其药学上可接受的盐。

[0437] 式 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中 :

[0438] R² 为甲基 ; R³ 为 -H 或 -C₁-C₃ 烷基 ; R⁴ 为 -C₁-C₅ 烷基 ; R⁵ 为 -H ; R⁶ 为甲基 ; R⁷ 为异丙基或仲丁基 ; R⁸ 为甲氧基 ; R⁹ 为 -H 或 C₁-C₈ 烷基 ; R¹⁰ 为苯基 ; 且 Z 为 -O- 或 -NH- 和 R¹¹ 如上所定义, 优选为 H ; 或其药学上可接受的盐的形式。

[0439] 式 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中 :

[0440] R² 为 -C₁-C₃ 烷基 ; R³ 为 -H 或 -C₁-C₃ 烷基 ; R⁴ 为 -C₁-C₅ 烷基 ; R⁵ 为 -H ; R⁶ 为 -C₁-C₃ 烷基 ; R⁷ 为 -C₁-C₅ 烷基 ; R⁸ 为 -C₁-C₃ 烷氧基 ; R⁹ 为 -H 或 -C₁-C₈ 烷基 ; R¹⁰ 为苯基 ; 且 Z 为 -O- 或 -NH-, R¹¹ 如上所定义, 优选为 H ; 或其药学上可接受的盐的形式。

[0441] 式 D_E 或 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中 : R³, R⁴ 和 R⁷ 独立为异丙基或仲丁基, R⁵ 为 -H。在示例性的实施方式中, R³ 和 R⁴ 各自为异丙基, R⁵ 为 H, 且 R⁷ 为仲丁基。其余的取代基如本文所定义。

[0442] 式 D_E 或 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中 : R² 和 R⁶ 各自为甲基, 且 R⁹ 为 H。其余的取代基如本文所定义。

[0443] 式 D_E 或 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中 : 存在的 R⁸ 各自为 -OCH₃。其余的取代基如本文所定义。

[0444] 式 D_E 或 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中 : R³ 和 R⁴ 各自为异丙基, R² 和 R⁶ 各自为甲基, R⁵ 为 H, R⁷ 为仲丁基, 存在的 R⁸ 各自为 -OCH₃, 且 R⁹ 为 H。其余的取代基如本文所定义。

[0445] 式 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中 : Z 为 -O- 或 -NH-。其余的取代基如本文所定义。

[0446] 式 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中 : R¹⁰ 为芳基。其余的取代基如本文所定义。

[0447] 式 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中 : R¹⁰ 为 - 苯基。其余的取代基如本文所定义。

[0448] 式 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中 : Z 为 -O-, 且 R¹¹ 为 H、甲基或叔丁基。其余的取代基如本文所定义。

[0449] 式 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中 : 当 Z 为 -NH- 时, R¹¹ 为 -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂, 其中 R¹⁵ 为 -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, 且 R¹⁶ 为 -C₁-C₈ 烷基或 -(CH₂)_n-COOH。其余的取代基如本文所定义。

[0450] 式 D_F 的耳他汀包括如下的那些, 其中 : 当 Z 为 -NH- 时, R¹¹ 为 -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂, 其

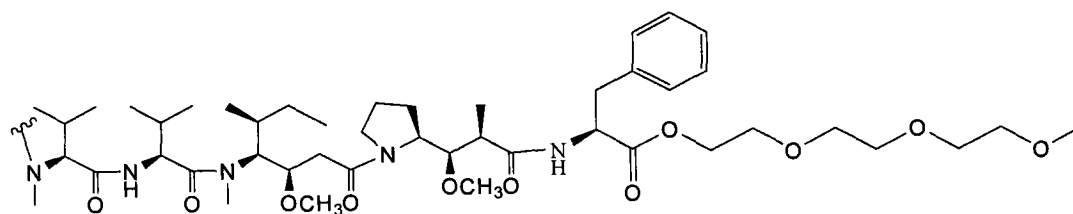
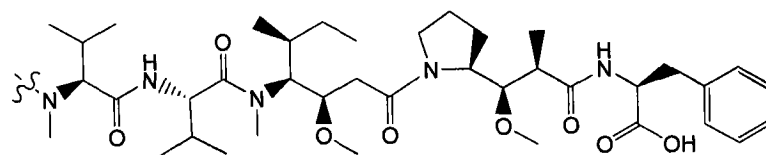
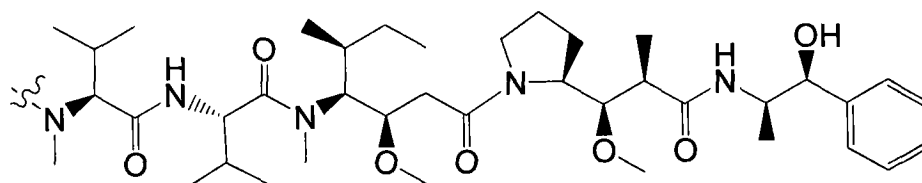
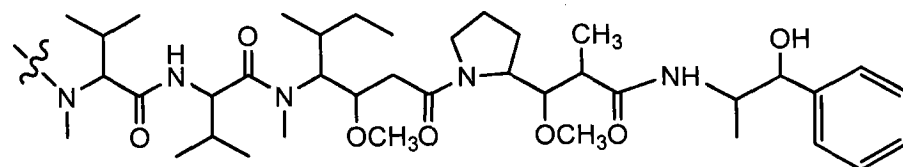
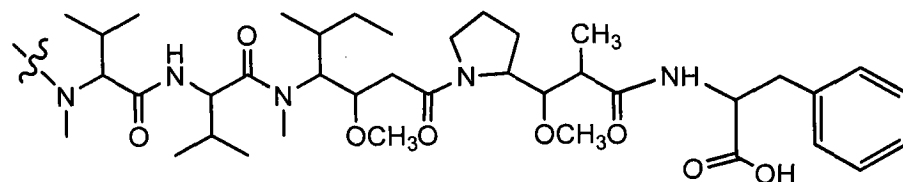
中 R^{15} 为 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 。其余的取代基如本文所定义。

[0451] 在优选的实施方式中,当 D 为式 D_E 的耳他汀时, w 是 1 ~ 12 的整数,优选 2 ~ 12, y 为 1 或 2,且 a 优选为 1。

[0452] 在一些实施方式中,当 D 为式 DF 的耳他汀时, a 为 1, w 和 y 为 0。

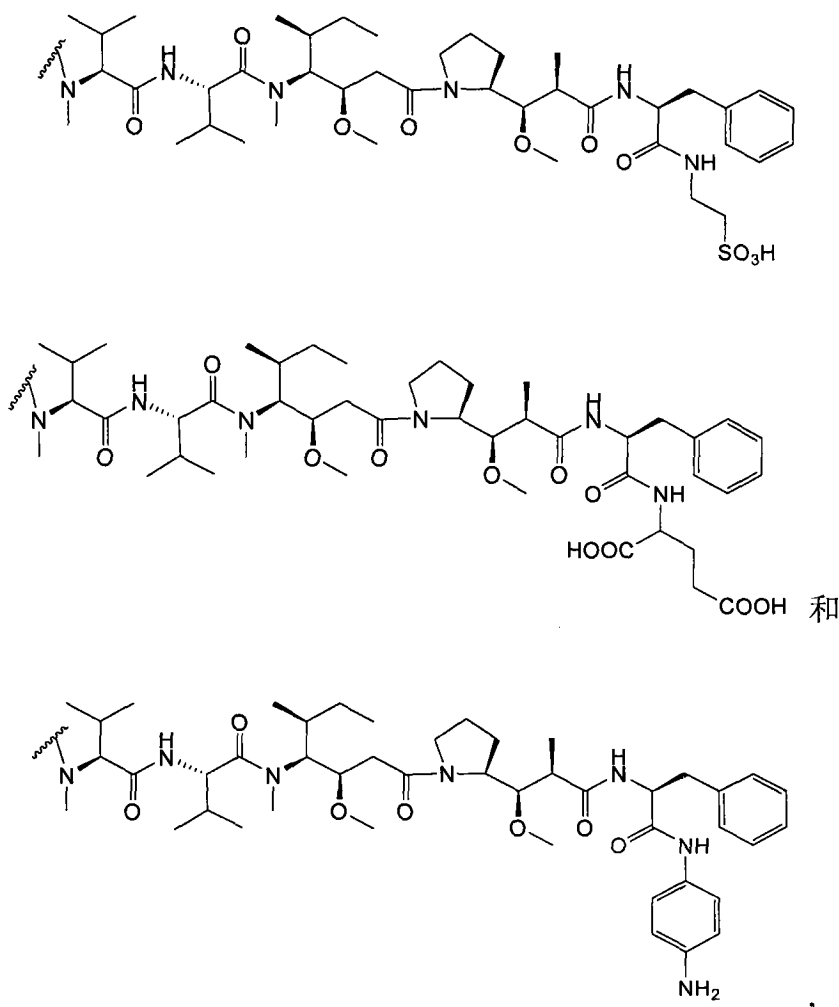
[0453] 示例性的药物单元 (-D) 包括具有以下结构的药物单元:

[0454]



[0455]





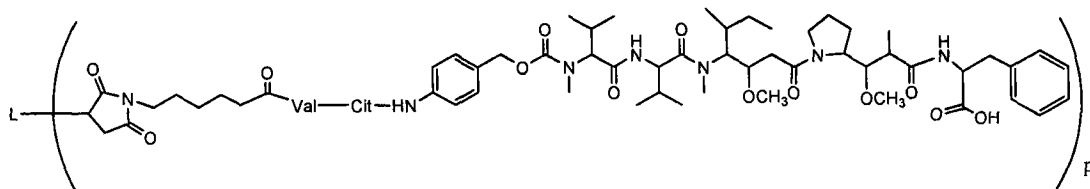
[0457] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0458] 在一个方面,可将亲水基团(例如但不限于四甘醇酯(TEG))连接到药物单元的R11。不为理论所限制,该亲水基团有助于药物单元的内化和不凝聚。

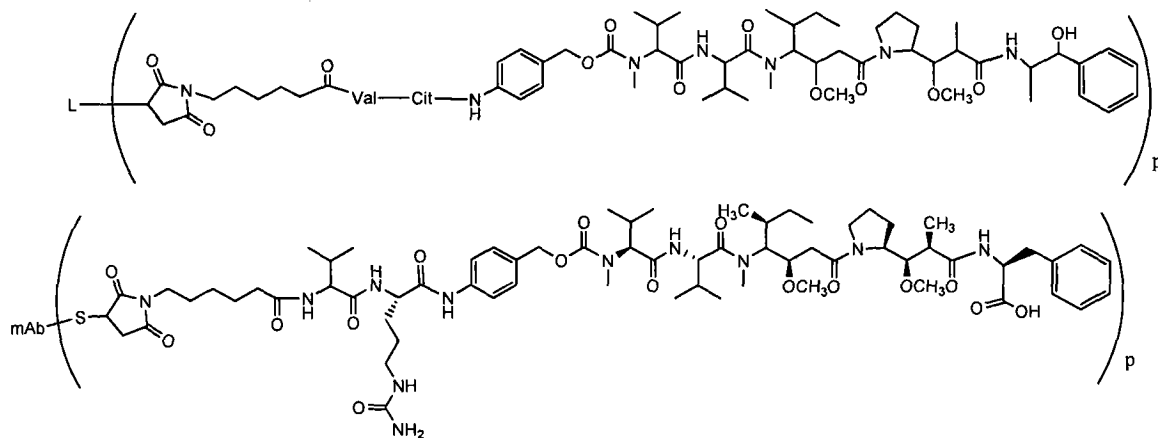
[0459] 在一些实施方式中,药物单元不是TZT-1027。在一些实施方式中,药物单元不是耳他汀E、多拉司他汀10或耳他汀PE。

[0460] 示例性的抗体药物偶联物化合物具有如下结构,其中“L”或“mAb-s-”代表本文中所述的命名为Ha5-1(5)2.1的24P4C12 MAbs:

[0461]



[0462]

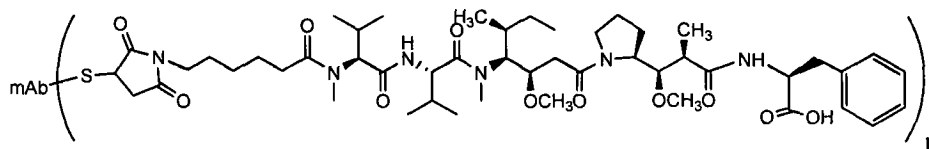


L-MC-vc-PAB-MMAF

或

L-MC-vc-PAB-MMAE.

或



L-MC-MMAF

[0463] 或其药学上可接受的盐。

[0464] 在一些实施方式中, 药物单元是卡奇霉素、喜树碱、类美坦西醇或蒽环类抗生素。在一些实施方式中, 药物是紫杉烷、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。

[0465] 在一些典型的实施方式中,适宜的细胞毒剂包括例如:DNA 小沟结合剂(例如,烯二炔类和来西菌素(lexitropsins),一种CBI化合物;还可参见美国专利6,130,237)、多卡米星、紫杉烷类(例如,紫杉酚和多西他赛)、嘌呤霉素和长春花生物碱类。其它细胞毒剂包括例如:CC-1065、SN-38、托泊替康、吗啉代-多柔比星、根霉素、氰基吗啉代-多柔比星、棘霉素、考布他汀、纺锤菌素、埃博霉素A和B、雌氮芥、隐花素(cryptophysins)、西马多丁、类美坦西醇类、海绵内酯(discodermolide)、软珊瑚蛋白(eleutherobin)和米托蒽醌。

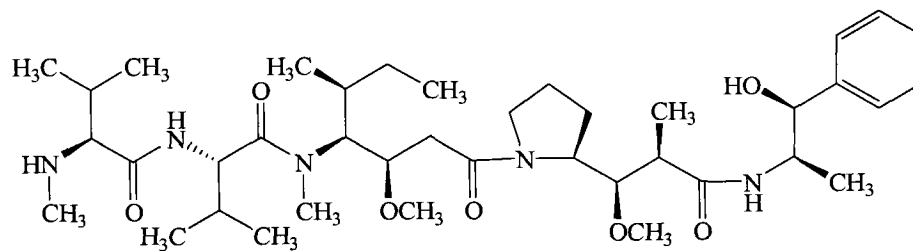
[0466] 在一些实施方式中, 药物是抗微管蛋白剂。抗微管蛋白剂的例子包括: 耳他汀、紫杉烷 (例如, Taxol® (紫杉醇)、Taxotere® (多西他赛))、T67 (图拉里克公司 (Tularik)) 和长春花生物碱类 (例如, 长春新碱、长春碱、长春地辛和长春瑞滨)。其它抗微管蛋白剂包括例如: 浆果赤霉素衍生物、紫杉烷类似物 (例如, 埃博霉素 A 和 B)、诺考达唑、秋水仙碱和秋水仙胺 (colcimid)、雌氮芥、隐花素、西马多丁、类美坦西醇类、考布他汀、海绵内酯和软珊瑚蛋白。

[0467] 在某些实施方式中,细胞毒剂是类美坦西醇,其为另一类抗微管蛋白剂。例如,在特定的实施方式中,类美坦西醇是美坦辛或 DM-1 (免疫原公司;也可参见 Chari 等,1992, Cancer Res. 52:127-131)。

[0468] 在某些实施方式中,细胞毒或细胞抑制剂是多拉司他汀。在某些实施方式中,细胞

毒或细胞抑制剂属于耳他汀类。因此,在一个特定的实施方式中,细胞毒或细胞抑制剂是 MMAE(式 XI)。在另一特定的实施方式中,细胞毒或细胞抑制剂是 AFP(式 XVI)。

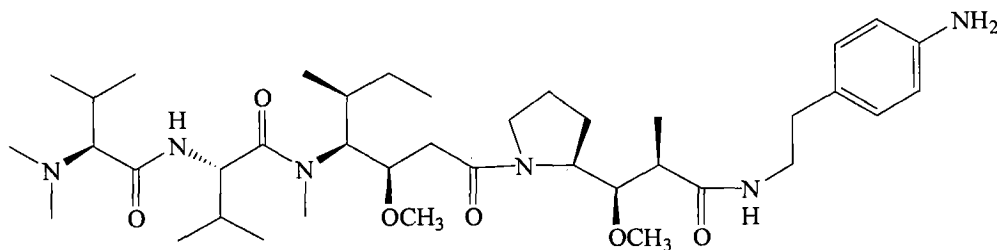
[0469]



(XI)

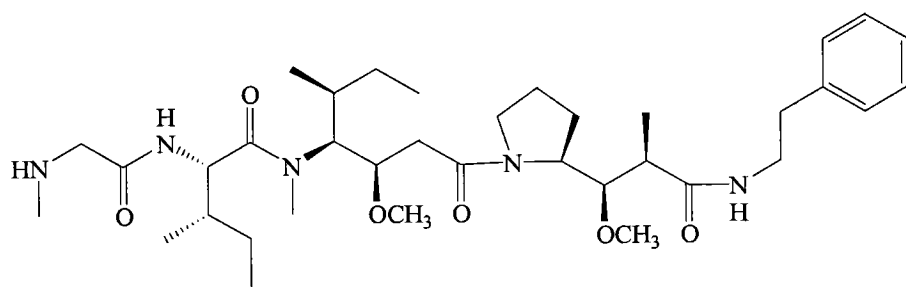
[0470] 在某些实施方式中,细胞毒或细胞抑制剂是式 XII-XXI 的化合物或其药学上可接受的盐:

[0471]

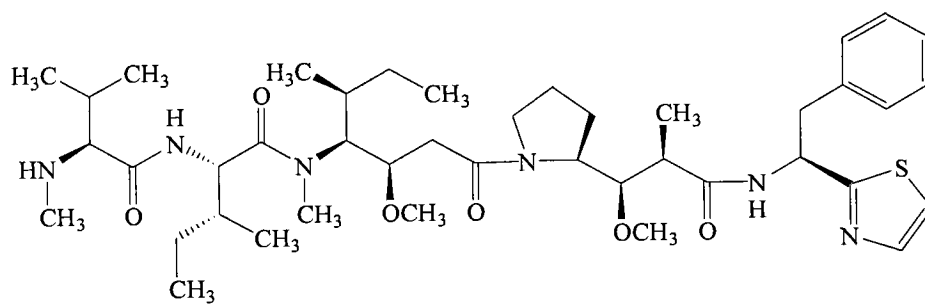


(XII)

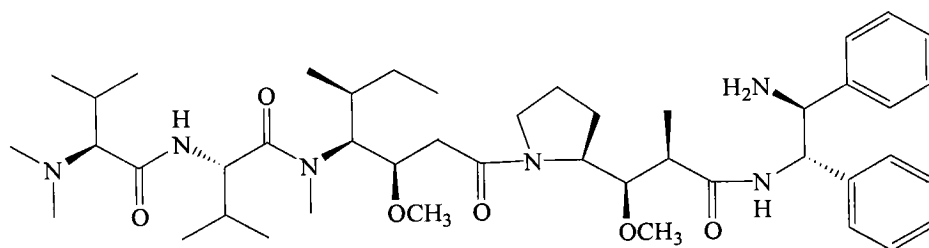
[0472]



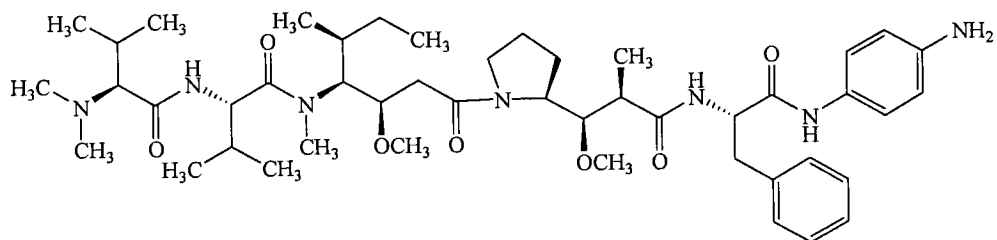
(XIII)



(XIV)

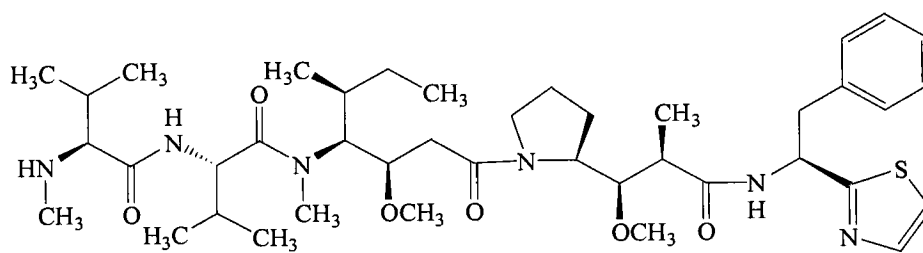


(XV)

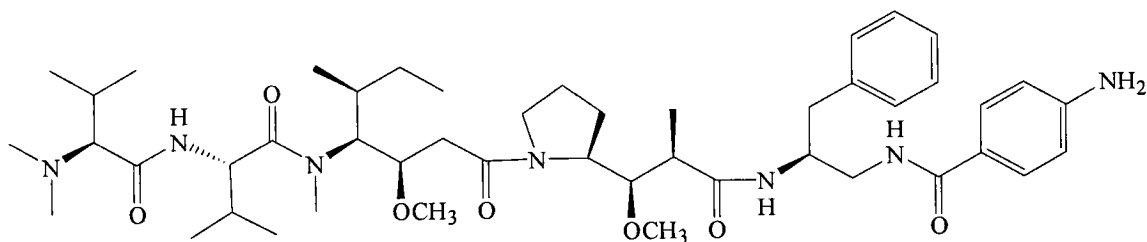


(XVI)

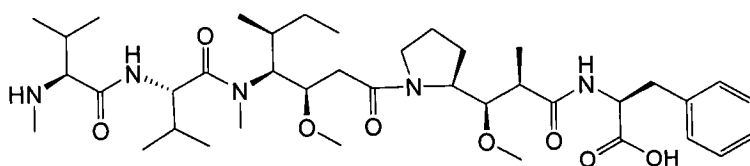
[0473]



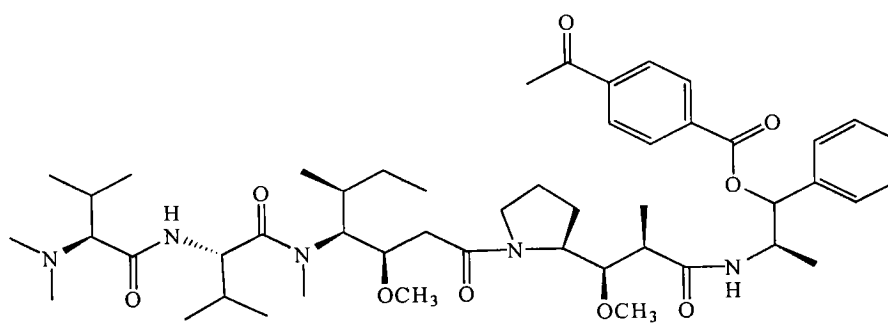
(XVII)



(XVIII)

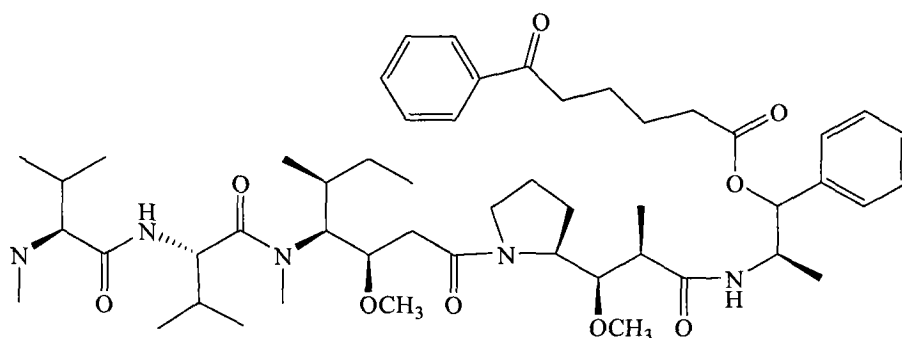


(XIV)



(XX)

[0474]



(XXI)

[0475] X.) 药物加载

[0476] 药物加载以 p 表示, 其为分子中的每个抗体所对应的药物部分的平均数。药物加载的范围可为每个抗体 1 ~ 20 个药物部分 (D)。本发明的 ADC 包括与 1 ~ 20 个药物部分偶联的抗体的集合。通过偶联反应制备 ADC 中的药物部分 / 抗体平均数可通过常规方法表征, 例如质谱和 ELISA 试验。还可测定就 p 而言的 ADC 的定量分布。在一些情况下, 可通过例如电泳等方法分离、纯化和表征均质 ADC, 其中 p 为带有其它药物加载的 ADC 的某个特定值。

[0477] 对于一些抗体药物偶联物, p 可受限于抗体上的结合位点数。例如, 当连接是通过半胱氨酸的巯基 (如上文的示例性实施例中所示), 抗体仅具有一个或数个半胱氨酸巯基, 或仅具有一个或数个活性充分的巯基从而能连接接头。在某些实施方式中, 较高的药物加载 (例如 $p > 5$) 可导致某些抗体药物偶联物凝聚、不溶、毒性或丧失细胞透过性。在某些实施方式中, 本发明 ADC 的药物加载范围可为 1 ~ 约 8; 约 2 ~ 约 6; 约 3 ~ 约 5; 约 3 ~ 约 4; 约 3.1 ~ 约 3.9; 约 3.2 ~ 约 3.8; 约 3.2 ~ 约 3.7; 约 3.2 ~ 约 3.6; 约 3.3 ~ 约 3.8; 或约 3.3 ~ 约 3.7。事实上, 已显示对于某些 ADC, 优化的药物部分 / 抗体比例可小于 8, 可为约 2 ~ 约 5。参见 US 2005-0238649A1 (其通过引用全文纳入本文)。

[0478] 在某些实施方式中, 在偶联反应中, 将少于理论最高值的药物部分偶联到抗体。抗体可包含例如不与药物 - 接头中间体或连接剂反应的赖氨酸残基 (如下所讨论)。抗体通常不包含许多可连接到药物部分的游离和反应性半胱氨酸巯基; 事实上, 抗体中的绝大部分半胱氨酸巯基残基以二硫键形式存在。在某些实施方式中, 可在部分或完全还原条件下, 用还原剂 (例如二硫赤糖醇 (DTT) 或三羰基乙基膦 (TCEP)) 还原抗体, 以产生反应性半胱氨酸巯基基团。在某些实施方式中, 可将抗体置于变性条件下以暴露反应性亲核基团, 例如赖氨酸或半胱氨酸。

[0479] 可通过不同途径控制 ADC 的加载 (药物 / 抗体比), 例如通过: (i) 限制药物接头中间体或连接剂相对于抗体的摩尔过量, (ii) 限制偶联反应时间或温度, (iii) 对半胱氨酸巯基修饰的部分或限制性还原条件, (iv) 通过重组技术工程改造抗体的氨基酸序列, 从而修饰半胱氨酸残基的数量和位置以控制接头 - 药物结合的数量和 / 或位置 (例如本文和 W02006/034488 (通过引用全文纳入本文) 所述制备的硫代 Mab 或硫代 Fab)。

[0480] 应理解当多于一个的亲核基团与药物 - 接头中间体或连接剂反应, 然后与药物部分试剂反应, 则所得产物为具有结合于抗体的一个或多个药物部分的分布的 ADC 化合

物的混合物。药物 / 抗体的平均数可通过对混合物作双重 ELISA 抗体试验（抗体特异性和药物特异性）计算得出。可通过质谱鉴定混合物中各 ADC 分子,通过 HPLC(例如疏水相互作用层析)进行分离(参见例如, Hamblett, K. J. 等, “Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate”(“药物加载对抗 CD-30 抗体药物偶联物的药理学、药动学和毒性影响”), 摘要 No. 624, 美国癌症研究学会, 2004 年年会, 3 月 27-31 日, 2004, AACR 会议录, 卷 45, 2004 年 3 月; Alley, S. C. 等, “Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates”(“抗体药物偶联物中的药物连接位点控制”) 摘要 No. 627, 美国癌症研究学会, 2004 年年会, 3 月 27-31 日, 2004, AACR 会议录, 卷 45, 2004 年 3 月)。在某些实施方式中, 可通过电泳或色谱法从偶联混合物中分离具有单一加载值的均质 ADC。

[0481] XI.) 测定 ADC 细胞毒效应的方法

[0482] 测定药物或抗体药物偶联物是否能对细胞发挥细胞抑制和 / 或细胞毒效应的方法是已知的。抗体药物偶联物的细胞毒或细胞抑制活性总体上可通过如下方法测定: 将表达抗体药物偶联物的靶蛋白的哺乳动物细胞暴露于细胞培养基中; 在约 6 小时~约 5 天的时间段内培养细胞; 并测定细胞活力。可采用基于细胞的体外试验测定抗体药物偶联物所致的活力(增殖)、细胞毒性以及凋亡的诱导(胱冬酶活化)。

[0483] 可采用胸苷掺入法来测定抗体药物偶联物能否发挥细胞抑制效应。例如, 可将表达靶抗原的癌细胞以 5,000 个细胞 / 孔的密度在 96 孔板中培养 72 小时, 并在该 72 小时期间的最后 8 小时内, 将其暴露于 $0.5 \mu\text{Ci}$ 的 ^3H - 胸苷。在有或没有抗体药物偶联物存在下, 测定所培养细胞中 ^3H - 胸苷的掺入情况。

[0484] 为了测定细胞毒性, 可测定坏死或凋亡(程序性细胞死亡)。坏死通常伴随着质膜通透性提高; 细胞溶胀, 以及质膜的破裂。凋亡的典型特征是细胞膜起泡、细胞质收缩、以及内源性内切核酸酶活化。在癌细胞上检测到这些效应中的任何一种均表明抗体药物偶联物可用于癌症治疗。

[0485] 可通过测定细胞内的染料(例如中性红、台盼蓝或 ALAMAR™ 蓝)摄取来测定细胞活力(参见例如, Page 等, 1993, *Intl. J. Oncology* 3:473-476)。在此类测试中, 将细胞在包含染料的培养基中孵育, 洗涤细胞, 通过分光光度法测定剩余染料, 这反映了细胞对该染料的摄取情况。还可使用蛋白结合染料磺酰罗丹明 B(SRB) 来测定细胞毒性(Skehan 等, 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12)。

[0486] 或者, 在哺乳动物细胞活力和增殖的定量比色试验中采用四唑盐(例如 MTT) 来检测活的, 而非死亡的细胞(参见例如, Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63)。

[0487] 可通过测定例如 DNA 的片段化定量测定凋亡。可获得用于体外定量测定 DNA 片段化的商品化光度测定法。包括 TUNEL(其检测片段化 DNA 中标记核苷酸的掺入)以及基于 ELISA 的试验在内的此类试验的例子描述于 Biochemica, 1999, no. 2, 第 34-37 页(罗氏分子生物化学(Roche Molecular Biochemicals))中。

[0488] 还可通过测定细胞内的形态变化测定凋亡。例如, 与坏死一样, 可通过测定对特定染料(例如荧光染料, 如吖啶橙或溴化乙啶)的摄取测定细胞膜完整性是否丧失。Duke 和 Cohen 在 “Current Protocols in Immunology”(“最新免疫学方案”, Coligan 等编, 1992, 第 3.17.1-3.17.16 页)中描述了测定凋亡细胞数的方法。可用 DNA 染料(例如吖

啖橙、溴化乙啖或碘化丙啖) 标记细胞, 并观察细胞的染色质凝聚和沿着内核膜的趋边化(margination)。可作测定以确定凋亡的其它形态变化包括例如, 细胞质凝聚、膜起泡增加以及细胞皱缩。

[0489] 可检测培养物的贴壁部分和“漂浮”部分中凋亡细胞是否存在。例如, 两部分均可通过如下方法收集: 去除上清, 用胰蛋白酶消化贴壁细胞, 合并制得物, 然后进行离心洗涤步骤(例如, 2000rpm, 10 分钟), 并检测凋亡(例如, 通过测定 DNA 片段化)。(参见例如, Piazza 等, 1995, Cancer Research 55:3110-16)。

[0490] 可在合适的动物模型中体内评估 24P4C12 治疗性组合物的效果。例如, 可用异种癌症模型, 其中将癌外植物或传代的异种移植物组织导入缺乏免疫力的动物(例如裸鼠或 SCID 小鼠)中(Klein 等, 1997, Nature Medicine 3:402-408)。例如, PCT 专利申请 W098/16628 和美国专利 6, 107, 540 描述了人前列腺癌的各种异种移植物模型, 这些模型可重现原发性肿瘤的产生、微转移以及晚期疾病特征性的成骨性转移瘤的形成。可采用测定肿瘤形成、肿瘤消退或转移的抑制的试验来预测效力。

[0491] 评估促进凋亡的体内试验可用于评估治疗性组合物。在一个实施方式中, 可检验用治疗性组合物治疗的荷肿瘤小鼠的异种移植物以确定凋亡病灶是否存在, 并将其与未治疗的对照荷异种移植物小鼠进行比较。经治疗小鼠肿瘤中发现凋亡病灶的程度表明了该化合物的治疗效果。

[0492] 可将应用于前述方法的实践中的治疗性组合物配制成药物组合物, 该药物组合物中包含适用于所需递送方法的载体。适宜的载体包括与该治疗性组合物联用时保持该治疗性组合物的抗肿瘤功能并通常与患者的免疫系统无反应活性的任何物质。例子包括但不限于: 各种标准药用载体中的任何一种, 例如无菌磷酸盐缓冲盐溶液、抑菌水等(总体参见, Remington's Pharmaceutical Sciences(“雷明顿药物科学”), 第 16 版, A. Osal. 编, 1980)。

[0493] 可对治疗性制剂进行增溶, 并通过可将治疗性组合物递送到肿瘤部位的任何途径给药。可能的有效给药途径包括但不限于: 静脉内、胃肠外、腹膜内、肌内、肿瘤内、真皮内、器官内、常位给药等。用于静脉内注射的优选制剂包含溶于防腐抑菌水、未加防腐剂的灭菌水溶液中的和/或稀释在包含 0.9% 注射用无菌氯化钠(USP) 的聚氯乙烯或聚乙烯袋内的治疗性组合物。可冻干治疗性蛋白制剂, 并作为无菌粉末(优选在真空下)进行保存, 然后在注射前用抑菌水(包含例如苯甲醇防腐剂)或无菌水重建。

[0494] 采用前述方法进行癌症治疗的剂量和给药方案可根据方法和目标癌症进行改变, 且将通常取决于本领域中已知的多种其它因素。

[0495] XII.) 表达 24P4C12 的癌症的治疗

[0496] 将 24P4C12 鉴别为在有限的组织中正常表达, 但也在癌症(例如表 I 中所列的那些)中表达的蛋白质为治疗此类癌症开启了多种治疗途径。

[0497] 众所周知, 即便当靶蛋白在正常组织(甚至在正常生命器官组织)上表达, 靶向性抗肿瘤治疗已非常有用。生命器官是维持生存所必需的器官, 例如心脏或结肠。非生命器官是可被移除但个体仍能存活的器官。非生命器官的例子是卵巢、乳腺和前列腺。

[0498] 在正常组织(甚至正常生命组织)中表达靶蛋白不会导致该靶蛋白的靶向剂不能用作也过表达该靶蛋白的某些肿瘤的疗剂。例如, 在生命器官中的表达并不造成损害且其

本身无害。此外,可移除被认为非必需的器官(例如前列腺和卵巢)而不影响生存。最后,由于免疫豁免,一些生命器官不会被正常器官表达所影响。免疫豁免器官是指由血-器官屏障与血液隔开,从而不为免疫治疗所接近的器官。免疫豁免器官的例子是脑和睾丸。

[0499] 因此,抑制 24P4C12 蛋白活性的治疗方法对罹患表达 24P4C12 的癌症的患者有用。这些治疗方法通常可分为三类。第一类调节 24P4C12 涉及肿瘤细胞生长的功能,导致肿瘤细胞生长的抑制或延缓或诱导其杀伤。第二类包括抑制 24P4C12 蛋白与其结合伴侣或其它蛋白结合或联合的各种方法。第三类包括抑制 24P4C12 基因转录或 24P4C12 mRNA 翻译的各种方法。

[0500] 因此,可评估癌症患者的 24P4C12 表达是否存在和水平,优选采用肿瘤组织的免疫组织化学评估、定量 24P4C12 成像或可确切指示 24P4C12 表达存在和程度的其它技术。优选将肿瘤活检或手术样本的免疫组织化学分析用于此目的。用于肿瘤组织免疫组织化学分析的方法在本领域中是众所周知的。

[0501] XIII.) 24P4C12 作为基于抗体的治疗的靶标

[0502] 24P4C12 是基于抗体的治疗策略中颇具吸引力的靶标。本领域中已知靶向胞外和胞内分子的多种抗体策略(参见例如,补体和 ADCC 介导的杀伤以及细胞内抗体的应用)。由于相比于相应的正常细胞,24P4C12 由各种癌细胞系表达,准备全身性给予 24P4C12 免疫反应性组合物,其具有优异的敏感性而没有免疫反应性组合物与非靶标组织和器官结合而造成的毒性、非特异性和/或非靶向性效果。对 24P4C12 的结构域具有特异性反应性的抗体可用于全身性治疗表达 24P4C12 的肿瘤,尤其是作为抗体药物偶联物(即 ADC),其中该偶联物含毒素或治疗剂。

[0503] 本领域技术人员理解可用抗体特异性的靶向和结合免疫原性分子,例如如图 1 中所示的 24P4C12 序列的免疫原性区。此外,本领域技术人员理解将抗体与细胞毒剂偶联是常规的(参见例如,Slevers 等 Blood 93:11 3678-3684(6 月 1 日,1999))。当把细胞毒剂和/或治疗剂直接递送到细胞,例如将其偶联于该细胞表达的分子(例如 24P4C12)的特异性抗体,该细胞毒剂会对那些细胞发挥其已知的生物学效应(即细胞毒性)。

[0504] 本领域中已知采用抗体-细胞毒剂偶联物来杀伤细胞的多种组合物和方法。就癌症而言,典型的方法包括给予患有肿瘤的哺乳动物生物学有效量的偶联物,该偶联物包含与靶向剂(例如 24P4C12 MAb,优选 Ha5-1(5)2.1)连接的所选的细胞毒剂或治疗剂,该靶向剂结合在细胞表面表达的、易接近或位于细胞表面上的抗原(例如 24P4C12)。典型的实施方式是将细胞毒剂和/或治疗剂递送到表达 24P4C12 的细胞的方法,该方法包括将该细胞毒剂与免疫特异性结合 24P4C12 表位的抗体偶联,将细胞与该抗体药物偶联物(ADC)接触。另一个示例性实施方式是治疗怀疑患有转移性癌症的个体的方法,该方法包括胃肠外给予所述个体包含治疗有效量的偶联于细胞毒剂和/或治疗剂的抗体的药物组合物。

[0505] 采用 24P4C12 抗体的癌症免疫治疗可按照已成功用于治疗其它癌症类型的各种途径进行,这些癌症包括但不限于:结肠癌(Arlen 等,1998, Crit. Rev. Immunol. 18: 133-138)、多发性骨髓瘤(Ozaki 等,1997, Blood 90:3179-3186, Tsunenari 等,1997, Blood 90:2437-2444)、胃癌(Kasprzyk 等,1992, Cancer Res. 52:2771-2776)、B 细胞淋巴瘤(Funakoshi 等,1996, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19:93-101)、白血病(Zhong 等,1996, Leuk. Res. 20:581-589)、结肠直肠癌(Moun 等,1994, Cancer Res. 54:6160-6166;

Velders 等,1995, Cancer Res. 55 :4398-4403) 和 乳 腺 癌 (Shepard 等,1991, J. Clin. Immunol. 11 :117-127)。一些治疗方法涉及裸抗体与毒素或放射性同位素的分别偶联,例如 Y^{91} 或 I^{131} 与抗-CD20 抗体的偶联 (例如, ZevalinTM, IDEC 药物公司 (IDEC Pharmaceuticals Corp.)); 或 BexxarTM, 犁刀药物公司 (Coulter Pharmaceuticals)), 而其它方法涉及共同给予抗体和其它治疗剂,例如 HerceptinTM (赫赛汀TM, 曲妥珠 MAb) 与紫杉醇 (基因泰克公司, Genentech, Inc.)。在优选的实施方式中, 抗体如上文所述与细胞毒剂偶联, 优选命名为 MMAE 的耳他汀衍生物 (西雅图遗传学公司, Seattle Genetics)。

[0506] 虽然 24P4C12 抗体疗法对各种阶段的癌症均有效, 抗体疗法尤其适用于晚期或转移性癌症。据指示, 采用本发明抗体疗法的治疗可用于接受一轮或多轮化疗的患者。或者, 将本发明的抗体疗法与化疗或放疗方案联用于未接受化疗治疗的患者。此外, 抗体疗法能减少相伴化疗的剂量, 尤其是对不能很好耐受化疗剂的毒性的患者。Fan 等 (Cancer Res. 53 :4637-4642, 1993)、Prewett 等 (International J. of Onco. 9 :217-224, 1996) 和 Hancock 等 (Cancer Res. 51 :4575-4580, 1991) 描述了与化疗剂共同使用各种抗体。

[0507] 治疗结肠癌和其它癌症 (表 I) 的 24P4C12 单克隆抗体包括引发对肿瘤强烈免疫应答或具有直接毒性的那些抗体。就该点而言, 24P4C12 单克隆抗体 (MAb) 能通过补体介导的或抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC) 机制引发肿瘤细胞的溶解, 这两种机制均需要免疫球蛋白分子的完整 Fc 部分与补体蛋白的效应细胞 Fc 受体位点相互作用。此外, 对肿瘤生长发挥直接生物学效果的 24P4C12 Mabs 可用于治疗表达 24P4C12 的癌症。细胞毒性 MAb 直接起作用的机制包括: 抑制细胞生长、调控细胞分化、调控肿瘤血管生成因子分布、以及诱导凋亡。具体 24P4C12 MAb 发挥其抗肿瘤效果所通过的机制可采用评估细胞死亡 (例如 ADCC、补体介导的细胞溶解等) 的任何数量的体外试验进行评估 (如本领域中常规所知)。

[0508] 因此, 优选用于本发明治疗方法中的单克隆抗体完全为人抗体且以高亲和力特异性结合靶 24P4C12 抗原。

[0509] XIV.) 24P4C12 ADC 鸡尾酒疗法

[0510] 本发明的治疗方法包括单独给予 24P4C12 ADC, 以及给予不同 MAb (即 24P4C12 MAb 或结合另一蛋白质的 Mab) 的联合或鸡尾酒方法。该 MAb 鸡尾酒法可具有一定的优势, 例如它们包含靶向不同表位的 MAb, 利用不同的效应子机制或将直接细胞毒性 Mab 与依赖于免疫效应子功能的 Mab 组合。此类组合的 Mab 可具有协同的治疗效果。此外, 可协同给予 24P4C12 Mab 与其它治疗方式, 包括但不限于: 各种化疗剂和生物制剂、雄激素阻断剂、免疫调节剂 (例如 IL-2、GM-CSF)、手术或放疗。在优选的实施方式中, 以偶联形式给予 24P4C12 MAb。

[0511] 通过能将抗体递送到肿瘤细胞的任何途径给予 24P4C12 ADC 制剂。给药途径包括但不限于: 静脉内、腹膜内、肌肉内、肿瘤内、真皮内给药等。治疗通常涉及通过可接受的给药途径 (例如静脉内注射 (IV)) 反复给予 24P4C12 ADC 制剂, 给药剂量典型的为包括但不限于如下的范围: 0.1、.2、.3、.4、.5、.6、.7、.8、.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 或 25mg/kg 体重。总体而言, 每周 10 ~ 1000mg MAb 的剂量范围有效且耐受性佳。

[0512] 基于采用赫赛汀® (曲妥珠单抗) 治疗转移性乳腺癌的临床经验, 可接受的剂量方案是: 约 4mg MAb/kg 患者体重 IV 的首剂负荷量, 然后是约 2mgMAb/kg IV 的周剂量。优选以 90 分钟或更长时间的输液形式给予首剂负荷量。以 30 分钟或更长时间的输液形式给

予周期性维持剂量,前提是首剂剂量可被良好耐受。本领域技术人员知晓在具体情况中,各种因素可影响理想给药方案。这些因素包括例如:所用 MAb 的结合亲和力和半衰期、患者内的 24P4C12 表达程度、循环流出 (circulating shed) 24P4C12 抗原的程度、所需稳态抗体浓度水平、治疗频率、与本发明的治疗方法联用的化疗剂或其它试剂的影响、以及具体患者的健康状况。

[0513] 应在给定样品中任选评估患者的 24P4C12 水平 (例如循环的 24P4C12 抗原和 / 或表达 24P4C12 的细胞的水平),以帮助确定最有效的方案等。该评估还用于监控整个治疗的目的,且可用于与其它参数的评估 (例如,膀胱癌治疗中的尿细胞和 / 或免疫细胞水平,或类似地,前列腺癌治疗中的血清 PSA 水平) 结合来规准治疗的成就。

[0514] 本发明的一个目的是提供 24P4C12ADC,其抑制或延迟表达 24P4C12 的肿瘤细胞的生长。本发明的另一个目的是提供采用此类 24P4C12 ADC,尤其是联用此类 24P4C12 ADC 与其它药物或免疫积极疗法来抑制血管发生和其它生物学功能并由此减少哺乳动物 (优选为人) 中肿瘤生长的方法。

[0515] XV.) 联合治疗

[0516] 在一个实施方式中,当联用 24P4C12 ADC 与化疗剂或辐射或它们的组合治疗肿瘤 (包括人肿瘤) 时,产生协同作用。换言之,当与化疗剂或辐射或它们的组合联用时,采用 24P4C12 ADC 对肿瘤生长的抑制比所预期的更有所增强。协同作用可表现为,例如采用联合治疗所产生的肿瘤生长抑制比仅用 24P4C12 ADC 治疗所预期的肿瘤生长抑制或用 24P4C12 ADC 和化疗剂和放疗的加合效果更佳。优选通过癌症的消退来证明协同作用,其中并未预期到可通过 24P4C12 ADC 或用 24P4C12 ADC 和化疗剂或辐射的加合组合可起到该消退作用。

[0517] 联用 24P4C12 ADC 与化疗剂或辐射或两者抑制肿瘤细胞的方法包括在开始化疗或放疗之前、之中或之后及其任意组合 (即在开始化疗和 / 或放疗之前和之中、之前和之后、之中和之后,或者之前、之中和之后) 时给予 24P4C12 ADC。例如,通常在开始放疗和 / 和化疗之前 1 ~ 60 天,优选 3 ~ 40 天,更优选 5 ~ 12 天给予 24P4C12 ADC。然而,根据治疗方案和特定患者需求,该方法的实施方式应提供最有效的治疗并最终延长患者生命。

[0518] 可采用各种方法给予化疗剂,包括通过胃肠外和肠内途径的全身性给药。在一个实施方式中,将 24P4C12 ADC 和化疗剂作为分离的分子给药。化疗剂和化疗法的具体例子包括:顺铂、达卡巴嗪 (DTIC)、放线菌素 D、氮芥、链佐星、环磷酰胺、卡莫司汀 (BCNU)、洛莫司汀 (CCNU)、多柔比星 (阿霉素)、柔红霉素、丙卡巴肼、丝裂霉素、阿糖胞苷、依托泊甙、氨甲喋呤、5-氟尿嘧啶、长春碱、长春新碱、博来霉素、紫杉醇 (泰素)、多西他赛 (泰素帝)、阿地白介素、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、克拉屈滨、氮烯唑胺、氟尿苷、氟达拉滨、羟基脲、异环磷酰胺、干扰素 α 、亮丙瑞林、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、普卡霉素、米托坦、培门冬酶、喷司他丁、哌泊溴烷、普利霉素、链脲菌素、他莫昔芬、替尼泊苷、睾内酯、硫鸟嘌呤、塞替派、尿嘧啶氮芥、长春瑞滨、苯丁酸氮芥、红豆杉醇及其组合。

[0519] 与 24P4C12ADC 联用的辐射源可位于被治疗患者的体外和体内。当该辐射源位于患者体外,该治疗被称为外线束放疗 (EBRT)。当该辐射源位于患者体内,该治疗被称为短距离放疗 (BT)。

[0520] 以上所描述的治疗方案可进一步与其它肿瘤治疗剂和 / 和方案组合,例如其它化疗、癌症疫苗、信号转导抑制剂、用于治疗非正常细胞生长或癌症的试剂、抗体 (例如

抗-CTLA-4 抗体,如 WO/2005/092380 中所描述(辉瑞制药公司))或通过结合 IGF-1R 抑制肿瘤生长的其它配体以及细胞因子。

[0521] 当对哺乳动物进行其它化疗时,可采用前文所描述的化疗剂。此外,可采用生长因子抑制剂、生物应答调节剂、抗激素治疗、选择性雌激素受体调节剂(SERM)、血管生成抑制剂和抗雄激素类。例如,可使用抗激素,如诸如诺瓦得士(他莫昔芬)的抗雌激素类,或者诸如康士得(4'-氰基-3-(4-氟苯基磺酰基)-2-羟基-2-甲基-3'--(三氟甲基)地恩丙胺)等抗雄激素类。

[0522] 以上治疗途径可与众多的手术、化疗或放疗方案中的任一种组合。本发明的治疗途径能使用降低的化疗(或其它治疗)剂量和/或较少的给药频率,该优点针对所有患者,尤其是不能很好耐受化疗剂的毒性的那些患者。

[0523] XVI.) 试剂盒/制品的制造

[0524] 为用于本文所述的实验室、预后、预防、诊断和治疗用途,本发明的范围内包括试剂盒。这种试剂盒可包含载体、包装物或被划分以容纳一种或多种内容物的容器(如小瓶、试管等),各个容器内中包含用于该方法的独立元件之一,以及包括使用说明(例如本文所述的用途)的标签或插页。例如,容器内可包含已被或可作可检测标记的抗体。试剂盒可包含容纳药物单元的容器。试剂盒可包含图 2 或图 3 中所示的全部或部分氨基酸序列或其衍生物、或编码该氨基酸序列的核酸分子。

[0525] 本发明的试剂盒通常包含上述容器以及一个或多个与其有关的其它容器,这些其它容器中含有出于商业和用户立场而需要的物质,包括缓冲液、稀释剂、填料、针头、针管;载体、包装物、容器、标示成分和/或使用说明的小瓶和/或试管标签、以及包含使用说明的装箱单。

[0526] 标签可出现在容器上或与容器一起出现,以指示该组合物用于特定的治疗或非治疗用途,例如预后、预防、诊断或实验室用途,并且还可以指示其用于体内或体外使用(例如本文所述的那些)。指导和/或其它信息也可出现在插页或标签上,所述插页或标签与试剂盒一起提供或提供在试剂盒上。标签可出现在容器上或与容器一起提供。当构成标签的字母、数字或其它字形是模压到或蚀刻到容器本身上时,标签可出现在容器上;当标签出现在装有该容器的盒子或载体内时,标签可与容器一起提供(例如作为装箱单)。标签可指示将组合物用于诊断、治疗、预防或预测诸如表 I 中所列组织的癌症等状况。

[0527] 术语“试剂盒”和“制品”可互换使用。

[0528] 在本发明的另一实施方式中,提供了包含组合物的制品,如抗体或抗体药物偶联物(ADC),例如用于诊断、预后、预防和/或治疗组织的癌症(例如表 I 中列出的那些)的物质。制品中通常含有至少一个容器和至少一份标签。合适的容器包括,例如,瓶子、小瓶、针筒和试管。所述容器可由多种材料制成,如玻璃、金属或塑料。容器中可容纳有氨基酸序列、小分子、核酸序列、细胞群和/或抗体。在另一实施方式中,容器中包含用于评估细胞和组织中 24P4C12 蛋白表达、或用于相关实验室、预后、诊断、预防和治疗目的的抗体、其结合片段或特异性结合蛋白;对这些应用的指示和/或指导可包含在该容器上或与容器一起提供,也可包含用于这些目的的试剂和其它组合物或工具。

[0529] 容器中也含有能有效治疗、诊断、预测或预防某种症状的组合物并且可含有无菌接口(例如,所述容器可以是静脉内溶液包或小瓶,其上有可用皮下注射针头刺穿的塞

子)。组合物内的活性剂可以是能特异性结合 24P4C12 的抗体,或是特异性结合 24P4C12 的抗体药物偶联物。

[0530] 制品还可含有第二个容器,其中含有药学上可接受的缓冲液,如磷酸缓冲盐水、林格溶液和 / 或葡萄糖溶液。它还可含有其它出于商业和用户立场而需要的物质,包括其它缓冲液、稀释剂、填料、搅拌器、针头、针管和 / 或包含使用指示和 / 或指导的装箱单。

实施例:

[0531] 通过下面的数个实施例对本发明的各个方面做进一步的描述和说明,这些实施例都不意味着对本发明范围的限制。

[0532] 实施例 1

[0533] 24P4C12 抗原

[0534] 采用本领域中已知的抑制消减杂交法 (SSH) 发现了新的 24P4C12 基因序列。采用标准方法从 LAPC 异种移植物 SSH 试验中鉴别出该 160bp 的 24P4C12 SSH 序列。从 LAPC-9AD 阴性 (LAPC-9AD minus) 良性前列腺增生症试验中分离出 24P4C12 的全长 cDNA 克隆。该 cDNA 的长度为 2587bp,编码 710 个氨基酸的 ORF (参见图 1A)。更多参考信息可参见美国专利 6,943,235 (艾更斯司股份有限公司,圣莫尼卡,CA)、美国专利 7,220,823 (艾更斯司股份有限公司,圣莫尼卡,CA)、美国专利 7,227,008 (艾更斯司股份有限公司,圣莫尼卡,CA) 和美国专利 7,244,827 (艾更斯司股份有限公司,圣莫尼卡,CA)。24P4C12 抗原及其变体的示例性实施方式可参见图 1。

[0535] 实施例 2

[0536] 24P4C12 单克隆抗体 (MAb) 的产生

[0537] 在一个实施方式中,针对 24P4C12 和 24P4C12 变体的治疗性单克隆抗体 (“MAb”) 包括与各蛋白的特异性表位或变体之间共有序列的特异性表位反应的那些单克隆抗体,它们结合、内化或调节 24P4C12 或 24P4C12 变体生物学功能,例如干扰与配体、底物和结合伴侣之间相互作用的那些单克隆抗体。用于产生此类 MAb 的免疫原包括通过计算机分析氨基酸序列设计为编码或包含 24P4C12 蛋白序列的胞外结构域或完整序列、预期包含功能性基序的区域以及预期具有免疫原性的 24P4C12 蛋白变体的区域。免疫原包含肽和重组蛋白,例如 tag5-24P4C12,即一种纯化的哺乳动物细胞衍生的 His 标记的蛋白。此外,将经工程改造表达高水平 24P4C12 的细胞 (例如 RAT1-24P4C12 或 300.19-24P4C12) 用于免疫小鼠。

[0538] 采用异种小鼠技术® (XenoMouse technology®,阿目金弗里蒙特公司) 产生针对 24P4C12 的 MAb,其中小鼠重链和 κ 轻链基因座已灭活且已插入了大部分的人重链和 κ 轻链免疫球蛋白基因座。用 RAT(E)-24P4C12 细胞免疫产生人 $\gamma 2$ 的异种小鼠而产生名为 Ha5-1(5)2.1 的 MAb。

[0539] 24P4C12 MAb Ha5-1(5)2.1 特异性结合表达 24P4C12 的重组细胞 (PC3-24P4C12) 和多种表达 24P4C12 的癌细胞系。

[0540] 产生名为 Ha5-1(5)2.1 的抗体的杂交瘤在 2007 年 8 月 8 日被送至 (通过联邦快递) 美国典型培养物保藏中心 (ATCC, 邮政信箱 1549, 马纳萨斯, VA 20108), 并被给予保藏号 PTA-8602。

[0541] 用 Trizol 试剂 (生命技术公司,吉比可 BRL(Life Technologies,Gibco BRL)) 分

离相应杂交瘤的 mRNA 后,确定 24P4C12 MA b Ha5-1(5)2.1 的 DNA 编码序列。

[0542] 采用以下方案测序杂交瘤细胞的抗-24P4C12 Ha5-1(5)2.1 重链和轻链可变核苷酸序列。用 Trizol 试剂(生命技术公司,吉比可 BRL)裂解分泌 Ha5-1(5)2.1 的杂交瘤细胞。纯化并定量测定总 RNA。采用吉比可 BRL Superscript 预扩增系统(Gibco-BRL Superscript Preamplification system),用寡聚(dT)12-18 引物从总 RNA 中产生第一链 cDNA。采用人免疫球蛋白可变重链引物和人免疫球蛋白可变轻链引物扩增第一链 cDNA。测序 PCR 产物并确定重链和轻链可变区。

[0543] 重链和轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列列于图 2 和图 3 中。Ha5-1(5)2.1MAb 与人 Ig 种系的比对示于图 4A-4B 中。

[0544] 实施例 3

[0545] 采用重组 DNA 法表达 Ha5-1(5)2.1

[0546] 为了在转染细胞中重组表达 Ha5-1(5)2.1MAb,分别在人重链 IgG2 和轻链 Ig κ 恒定区的上游克隆 Ha5-1(5)2.1 MA b 重链和轻链可变区序列。在克隆载体中的 CMV 启动子/增强子下游克隆完整 Ha5-1(5)2.1 MA b 人重链和轻链盒。在该 MA b 的编码序列的下游包括多聚腺苷酸化位点。将该重组 Ha5-1(5)2.1 MA b 表达构建物转染入 293T、Cos 和 CHO 细胞。通过流式细胞术评估由重组细胞分泌的 Ha5-1(5)2.1MAb 对细胞表面 24P4C12 的结合(图 5)。用来自杂交瘤或来自用 Ha5-1(5)2.1 重链和轻链载体构建物转染的 CHO 细胞的 Ha5-1(5)2.1 MA b 对 PC3- 对照和 PC3-24P4C12 细胞进行染色。

[0547] 采用流式细胞术检测结合。结果显示 CHO 细胞重组表达的 Ha5-1(5)2.1 对 24P4C12 的结合与从杂交瘤中纯化得到的 Ha5-1(5)2.1 相似(图 5)。

[0548] 实施例 4

[0549] Ha5-1(5)2.1 MA b 的抗体药物偶联

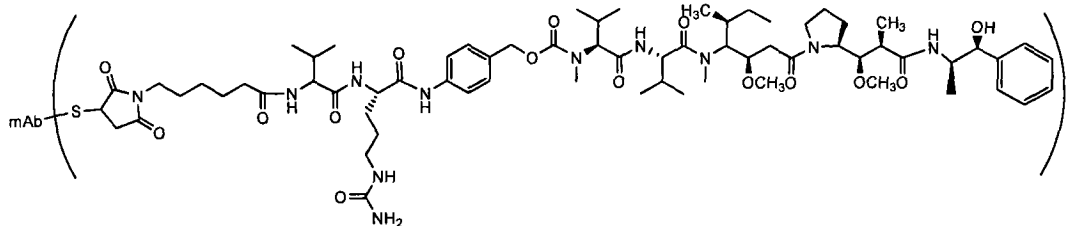
[0550] 采用如下方案,利用本文所述的 vc(Val-Cit) 接头将 Ha5-1(5)2.1 Mab(图 2) 偶联于名为 MMAE(式 XI) 的耳他汀衍生物,从而产生名为 Ha5-1(5)2.1vcMMAE 的本发明抗体药物偶联物(ADC)。采用表 V 中所示的通用方法完成 vc(Val-Cit) 接头与 MMAE(西雅图遗传学公司,西雅图,WA) 的偶联,以产生细胞毒性 vcMMAE(参见 US/2006/0074008)。

[0551] 然后,采用如下方案产生名为 Ha5-1(5)2.1vcMMAE 的本发明抗体药物偶联物(ADC)。

[0552] 简而言之,在 10mg/mL 的 Ha5-1(5)2.1 MA b 的 20mM 组氨酸溶液(pH5.2) 中加入 15 体积%的 0.5M Tris(pH 8.8),将溶液的 pH 调至 8.0-8.2。然后,在反应混合物中分别加入 EDTA 和氯化钠至 5mM 和 250mM 的终浓度。然后通过加入 2.3 摩尔当量的 TCEP(相对于 MA b 的摩尔)部分还原 MA b,随后在 37℃ 下搅拌 3 小时。然后将部分还原的 MA b 溶液冷却到 22℃,以 7mg/mL 的 DMSO 溶液形式加入 5.1 摩尔当量的 vcMMAE(相对于抗体的摩尔)。在 22℃ 下搅拌该混合物 30 分钟,然后加入 2 摩尔当量乙酰半胱氨酸(相对于 vcMMAE),再搅拌 15 分钟。通过用 10 透析体积(diavolume) 的 20mM 组氨酸(pH 5.2) 对抗体药物偶联物(ADC) 进行超滤/透析去除过量的淬灭 vcMMAE 及其它反应组分。

[0553] 所得抗体药物偶联物(ADC) 命名为 Ha5-1(5)2.1vcMMAE,其如下式所示:

[0554]



[0555] 其中,MAb 为 Ha5-1(5)2.1(图 2 和图 3),p 为 1~8。本实施例中所述抗体药物偶联物的 p 值约为 3.6。

[0556] 实施例 5

[0557] HA5-1 (5) 2. 1vcMMAE 的表征

[0558] 采用标题为“Ha5-1(5)2.1MAb 的抗体药物偶联”的实施例中所记载的方法产生结合 24P4C12 的抗体药物偶联物,并采用本领域中已知试验的组合对其进行筛选、鉴定和表征。

[0559] A. 采用 FACS 测定亲和力

[0560] 测试了 Ha5-1(5) 2.1vcMMAE 对 LNCaP 细胞上内源表达的 24P4C12 的结合亲和力。简而言之, 4℃下, 将十一 (11) 种 Ha5-1(5) 2.1vcMMAE 稀释液与 LNCaP 细胞 (50,000 个细胞每孔) 以 160nM 至 0.11nM 的终浓度孵育过夜。孵育结束时, 洗涤细胞并与抗 -hIgG-PE 检测抗体在 4℃下孵育 45 分钟。洗去未结合的检测抗体后, 采用 FACS 分析细胞。获得了如表 IV(A) 中所列的平均荧光强度 (MFI) 值。将 MFI 值输入 Graphpad Prism 软件, 并采用单点结合 (双曲线) 等式 $Y = B_{max} * X / (K_d + X)$ 分析从而产生 Ha5-1(5) 2.1vcMMAE 饱和曲线 (如表 IV(B) 中所示)。B_{max} 为 Ha5-1(5) 2.1vcMMAE 与 24P4C12 最大结合时的 MFI 值; K_d 为 Ha5-1(5) 2.1vcMMAE 结合亲和力, 即达到半数最大结合所需的 Ha5-1(5) 2.1vcMMAE 浓度。

[0561] Ha5-1 (5) 2.1vcMMAE 对内源性表达于 LNCaP 细胞表面上的 24P4C12 的计算亲和力 (Kd) 为 1.05nM。

[0562] 实施例 6

[0563] Ha5-1 (5) 2.1vcMMAE 介导的细胞毒性

[0564] 在经工程改造以表达 24P4C12 的 PC3 细胞中评估 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 介导 24P4C12 依赖性细胞毒性的能力。在第 1 天,将 PC3-Neo 或 PC3-24P4C12 细胞(1000 个细胞/孔)接种入 96 孔板中。第 2 天,将含指示浓度 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 或与 vc-MMAE 偶联的对照 MAb(即对照 -vcMMAE)的等体积培养基加入各孔中。在 37℃ 下孵育细胞 4 天。在孵育期结束时在各孔中加入阿尔玛蓝,然后再孵育 4 小时。采用保特(Biotek)读板仪在 620nm 的激发波长和 540nm 的发射波长下检测所得荧光。

[0565] 图6中的结果显示 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 在 PC3-24P4C12 细胞中介导细胞毒性,而与 vcMMAE 偶联的对照人 IgG 没有效果。不表达 24P4C12 的 PC3-Neo 细胞缺乏毒性进一步证明了 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 的特异性。因此,这些结果表明 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 能将细胞毒性药物选择性递送到表达 24P4C12 的细胞,从而杀伤这些细胞。

[0566] 实施例 7

[0567] Ha5-1 (5) 2.1vcMMAE 在体内抑制肿瘤生长

[0568] 24P4C12 在肿瘤组织细胞表面上显著表达而在正常组织中有限表达,使 24P4C12 成为抗体治疗及类似的通过 ADC 作治疗的良好靶标。因此,在人卵巢、前列腺、结肠和胰腺

癌异种移植小鼠模型中评估了 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 的治疗效果。

[0569] 在小鼠癌症异种移植模型（例如皮下和常位建立）中研究了抗体药物偶联物对肿瘤生长和转移灶形成的效果。

[0570] 通过在雄性 SCID 小鼠的右肋下注射以 1 : 1 混合的 $5 \times 10^4 \sim 10^6$ 个癌细胞与基质胶（共同研究公司 (Collaborative Research)）产生皮下 (s.c.) 肿瘤。为了检测 ADC 对肿瘤形成的效果,即在注射肿瘤细胞的同一天开始 ADC 的注射。作为对照,用纯化的人 IgG 或 PBS 注射小鼠;或用识别在人细胞中不表达的无关抗原的纯化 MAb 注射小鼠。在初步研究中,未发现对照 IgG 或 PBS 对肿瘤生长的影响的差别。用游标卡尺测定肿瘤尺寸,肿瘤体积计算为长 $\times$ 宽 $\times$ 高。处死皮下肿瘤直径大于 1.5cm 的小鼠。

[0571] 卵巢肿瘤常发生转移,并在腹腔内生长。因此,通过将 2 百万个细胞直接注射入雌性小鼠的腹膜内实施卵巢肿瘤的腹膜内生长。监控小鼠的总体健康、身体活动及外观直至它们濒死。在处死时,可检查腹腔以确定肿瘤负荷,并收集肺以评估远端部位的转移灶。或者,以死亡作为终点。然后将小鼠各组以便用静脉内注射 24P4C12 或对照 MAb 作合适处理。

[0572] 晚期异种移植肿瘤模型能研究新生血管形成和血管发生。肿瘤生长部分取决于新生血管的产生。虽然毛细管系统和产生的血管网络是宿主来源的,可通过异种移植肿瘤调控新血管系统的起始和构造 (Davidoff 等, Clin Cancer Res. (2001) 7 :2870 ; Solesvik 等, Eur J Cancer Clin Oncol. (1984) 20 :1295)。根据本领域中已知的方法研究抗体和小分子对新生血管形成的作用,例如通过 IHC 分析肿瘤组织及其周围微环境。

[0573] Ha5-1(5)2.1ADC 抑制结肠、胰腺、卵巢和前列腺癌异种移植物的形成。这些结果表明 Ha5-1(5)2.1ADC 可用于治疗局部和晚期癌症（优选表 I 中所列的那些癌症）。

[0574] 24P4C12 ADC:

[0575] 如标题为“24P4C12 单克隆抗体 (MAb) 的产生”的实施例中所产生抗 24P4C12 的单克隆抗体。根据标题为“Ha5-1(5)2.1 MAb 的抗体药物偶联”的实施例中所进一步将该 MAb 与毒素偶联,形成 AGS-5M2.1vcMMAE。采用 FACS 表征 Ha5-1(5)2.1vcMMAE,并采用本领域中已知的其它方法确定其结合 24P4C12 的能力。

[0576] 细胞系和异种移植:

[0577] 将 PC3-24P4C12、LAPC9、HT-29、AG-C4、OVCAR5-24P4C12 和 AG-Panc3 细胞分别维持在补充有 L-谷氨酰胺和 10% FBS 的 DMEM 和 RPMI 中。通过连续繁殖将 LAPC9、AG-C4 和 AG-Panc3 异种移植维持于 SCID 小鼠中。

[0578] Ha5-1(5)2.1vcMMAE 抑制 SCID 小鼠中皮下建立的人非雄激素依赖性前列腺癌异种移植物的生长

[0579] 在该试验中,将非雄激素依赖性人前列腺癌 PC-3-Hu24P4C12 肿瘤细胞 (3.0×10^6 个细胞 / 小鼠) 经皮下注射到雄性 SCID 小鼠中。当肿瘤达到 100mm^3 时,将小鼠随机分为 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 组和 PBS 对照组（每组中 $n = 5$ ）。在第 0 天时,用单剂量 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE (10mg/kg) 或 PBS 静脉内给药 (i.v.) 处理小鼠。按指示每 3-4 天用游标卡尺测量以监控肿瘤的生长。肿瘤体积计算为宽度² $\times$ 长度/2,其中宽度是最小尺寸,长度是最大尺寸。

[0580] 结果显示用 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 处理显著抑制了 SCID 小鼠中 PC-3-Hu24P4C12 前列腺肿瘤的生长 ($p < 0.01$),并在绝大多数动物中使得肿瘤完全消退。（图 7）

[0581] Ha5-1(5)2.1vcMMAE 抑制 SCID 小鼠中常位建立的人非雄激素依赖性前列腺癌异种移植物的生长

[0582] 在另一试验中,将 LAPC-9AI 非雄激素依赖性人前列腺癌细胞 (2.0×10^6 个细胞 / 小鼠) 植入雄性 SCID 小鼠的前列腺中。移植后 15 天时肿瘤良好建立且可触及,此时将小鼠随机分为两组 (每组中 $n = 8$)。如下对小鼠进行处理:用 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 或偶联于 vcMMAE 的同种型对照 Mab 每 4 天以 3mg/kg 静脉内给药,共给药 4 剂。在研究结束时,切取小鼠前列腺中的肿瘤并用电子天平称重。

[0583] 结果显示用 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 处理显著抑制了 SCID 小鼠中常位移植的人 LAPC9-AI 前列腺肿瘤的生长 ($p < 0.01$)。(图 8)。

[0584] Ha5-1(5)2.1vcMMAE 抑制 SCID 小鼠中皮下建立的人非雄激素依赖性人结肠癌异种移植物的生长

[0585] 在另一个试验中,将 HT-29 人结肠癌细胞 (1.0×10^6 个细胞 / 小鼠) 经皮下注射到 SCID 小鼠中。当肿瘤达到 100mm^3 时,将小鼠随机分为两组 (每组中 $n = 6$)。从第 0 天开始,每 4 天静脉内给予 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE (3mg/kg) 或 PBS,共给予 4 剂。按指示每 3-4 天用游标卡尺检测监控肿瘤的生长。肿瘤体积计算为宽度²× 长度 / 2,其中宽度是最小尺寸,长度是最大尺寸。

[0586] 结果显示用 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 处理显著抑制了皮下植入 SCID 小鼠中的 HT-29 人结肠肿瘤异种移植物的生长 ($p < 0.01$)。(图 9)。

[0587] Ha5-1(5)2.1vcMMAE 抑制 SCID 小鼠中皮下建立的人非雄激素依赖性、患者来源的结肠癌异种移植物的生长

[0588] 在另一个试验中,将 AG-C4 (患者来源的结肠癌异种移植肿瘤切片) 经皮下植入 SCID 小鼠。当肿瘤达到 100mm^3 时,将小鼠随机分为两组 (每组中 $n = 6$)。从第 0 天开始,每 3-4 天静脉内给予 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE (3mg/kg) 或 PBS,共给予 4 剂。按指示每 3-4 天用游标卡尺检测监控肿瘤的生长。肿瘤体积计算为宽度²× 长度 / 2,其中宽度是最小尺寸,长度是最大尺寸。

[0589] 结果显示用 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 处理显著抑制了皮下植入 SCID 小鼠中的 AG-C4 人结肠肿瘤异种移植物的生长 ($p < 0.05$)。(图 10)。

[0590] Ha5-1(5)2.1vcMMAE 抑制裸鼠中皮下建立的人卵巢癌异种移植物的生长

[0591] 在另一个试验中,将 OVCAR-5 人卵巢癌肿瘤细胞 (2.0×10^6 个细胞 / 小鼠) 经皮下注射到裸鼠中。当肿瘤达到 100mm^3 时,将小鼠随机分为两组 (每组中 $n = 6$)。从第 0 天开始,每 3-4 天静脉内给予 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE (5mg/kg) 或 PBS 1 次,共给予 4 剂。按指示每 3-4 天用游标卡尺测量以监控肿瘤的生长。肿瘤体积计算为宽度²× 长度 / 2,其中宽度是最小尺寸,长度是最大尺寸。

[0592] 结果显示用 Ha5-1(5)2.1-vcMMAE 处理显著抑制了皮下植入裸鼠的 OVCAR-5 人卵巢癌肿瘤异种移植物的生长 ($p < 0.01$)。(图 11)。

[0593] Ha5-1(5)2.1vcMMAE 抑制 SCID 小鼠中皮下建立的患者来源的胰腺癌异种移植物的生长

[0594] 在该试验中,将 AG-Panc3 患者来源的胰腺肿瘤切片经皮下植入 SCID 小鼠。当肿瘤达到 85mm^3 时,将小鼠随机分为两组 (每组中 $n = 6$)。从第 0 天开始,每 3-4 天静脉内给

予 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE (5mg/kg) 或 PBS 1 次, 共给予 4 剂。按指示每 3-4 天用游标卡尺检测监控肿瘤的生长。肿瘤体积计算为宽度 $2 \times$ 长度 $/2$, 其中宽度是最小尺寸, 长度是最大尺寸。

[0595] 结果显示用 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE 处理显著抑制了皮下植入 SCID 小鼠的 AG-Panc3 肿瘤异种移植物的生长 ($p < 0.01$)。(图 12)。

[0596] 这些试验的结果显示可将名为 Ha5-1 (5) 2. 1vcMMAE 的 24P4C12 ADC 用于治疗目的以治疗和控制表 I 中所列的癌症。

[0597] Ha5-1 (5) 2. 1vcMMAE 与其它 24P4C12 抗体药物偶联物 (ADC) 在前列腺癌 LAPC9-AD 异种移植植物中的效果比较

[0598] 在另一试验中, 将 LAPC-9AD 雄激素依赖性人前列腺癌细胞 (1.5×10^6 个细胞 / 小鼠) 经皮下注射到雄性 SCID 小鼠中。如图 (图 13) 中所示, 将小鼠随机分成如下组: Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE 组、Ha5-1 (5) 2. 1-mcMMAF 组和其它抗体药物偶联物 (ADC) 组, 包括 PBS 对照组 (每组中 $n = 6$)。当肿瘤达到 100mm^3 时, 在第 0 天以 10mg/kg 的剂量静脉内给予 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE、Ha5-1 (5) 2. 1-mcMMAF 和所有其它 ADC 一次。按指示每 3-4 天用游标卡尺测量以监控肿瘤的生长。肿瘤体积计算为宽度 $2 \times$ 长度 $/2$, 其中宽度是最小尺寸, 长度是最大尺寸。

[0599] 结果显示: 与 Ha5-1 (5) 2. 1-mcMMAF 相比, 用 Ha5-1 (5) 2. 1-vcMMAE 处理显著抑制了 LAPC9-AD 前列腺癌异种移植物的生长 ($p = 0.0048$)。(图 13)。其它偶联于 -vcMMAE 和 -mcMMAF 的抗体不具有任何肿瘤抑制活性, 这显示 Ha5-1 (5) 2. 1 具有抑制肿瘤生长的显著突出效果, 且能用于治疗目的以治疗和控制表 I 中所列的癌症。

[0600] 实施例 8

[0601] 采用 24P4C12 ADC 治疗和诊断人癌症的人临床试验

[0602] 根据本发明中所述使用特异性结合 24P4C12 的 24P4C12 ADC, 并将它们用于特定肿瘤 (优选表 I 中所列的那些) 的治疗中。就这些适应症各自而言, 成功进行了两种临床方法。

[0603] I.) 辅助治疗: 在辅助治疗中, 联用 24P4C12 ADC 与化疗剂或抗肿瘤药物和 / 或放疗或它们的组合来治疗患者。用标准方案, 通过在标准的一线 and 二线治疗中再加 24P4C12 ADC 治疗原发癌症靶标 (例如表 I 所列的那些)。方案设计阐明了通过如下实例评估的有效性, 包括但不限于: 原发或转移灶肿瘤块的缩小, 无进展生存、总存活数的提高, 患者健康的改善, 疾病稳定化以及能减少标准化疗药物和其它生物制剂的常规剂量。这些剂量减少能通过降低化疗剂和生物制剂的剂量相关毒性而进行额外和 / 或延长的治疗。将 24P4C12 ADC 与化疗剂或抗肿瘤剂联合用于数种辅助临床试验。

[0604] II.) 单一治疗: 就在肿瘤的单独治疗中采用 24P4C12 ADC 而言, 将 24P4C12 ADC 给予患者而不用化疗剂或抗肿瘤剂。在一个实施方式中, 针对具有广泛转移疾病的晚期患者临床实施单一治疗。方案设计阐明了通过如下实例评估的有效性, 包括但不限于: 原发或转移灶肿瘤块的缩小, 无进展生存、总存活数的提高, 患者健康的改善, 疾病稳定化以及能降低标准化疗和其它生物制剂的常规剂量。

[0605] 剂量

[0606] 可调节剂量方案以提供最佳所需应答。例如, 可给予单次推注、随时间给予数次分

份剂量、或按照治疗情况的紧急性的指示按比例减少或增加剂量。尤其有利的是将胃肠外组合物配制成单位剂型以易于给药和剂量一致。如本文所用,单位剂型指适于用作待治疗哺乳动物对象的单一剂量的物理分离单位;各单位包含:经计算可产生所需疗效的预定量的活性化合物和所需的药学载体。本发明单位剂型的规格如下所要求且直接取决于:(a) 抗体的独特性质和所要获得的具体治疗或预防效果,和(b)本领域中将该活性化合物配制用于个体敏感性处理的固有局限性。

[0607] 可根据本发明联合给药的 24P4C12 ADC 的治疗有效量的示例性但非限制性范围为:约 0.5 ~ 约 10mg/kg、约 1 ~ 约 5mg/kg、至少 1mg/kg、至少 2mg/kg、至少 3mg/kg 或至少 4mg/kg。其它示例性非限制性范围例如:约 0.5 ~ 约 5mg/kg,或例如约 0.8 ~ 约 5mg/kg,或例如约 1 ~ 约 7.5mg/kg。本发明的高剂量实施方式涉及高于 10mg/kg 的剂量。应注意到剂量值可随待缓解症状的类型和严重程度发生变化,且可包括单或多剂量。还应理解对于任何具体对象,应根据个体需要和给予或监控组合物给药的人员的专业判断而随时调整具体剂量方案,本文所示的剂量范围只是示例性的,并不限制所要求保护的组合物的范围或实施。

[0608] 临床开发计划 (CDP)

[0609] 随后进行 CDP,开发了与辅助治疗、单一治疗相关的 24P4C12 ADC 治疗。试验首先证明了安全性,然后确认了重复给药的有效性。试验是标签公开的,比较了标准化疗与标准治疗加 24P4C12 ADC。应理解的是,与招募患者有关的一个可用非限制性标准是根据活检测定的其肿瘤中 24P4C12 的表达水平。

[0610] 与任何基于蛋白质或抗体输注的治疗一样,安全顾虑主要涉及:(i) 细胞因子释放综合症,如低血压、发热、颤抖、寒战;(ii) 针对该物质产生免疫原性反应(即患者针对抗体治疗产生人抗体,或 HAHA 应答);以及(iii) 对表达 24P4C12 的正常细胞的毒性。采用标准测试和随访监测每一种安全事项。发现 24P4C12 MAbs 给予人体后是安全的。

[0611] 实施例 9

[0612] 用 IHC 在胃癌患者样本中检测 24P4C12 蛋白

[0613] 通过免疫组织化学法在来自胃癌患者的两(2)种不同肿瘤样本中测试 24P4C12 蛋白的表达。简而言之,将用福尔马林固定、石蜡包埋的组织切成 4 微米的切片,并固定在载玻片上。对切片进行脱蜡、复水,并用胰蛋白酶溶液(0.05%胰蛋白酶(ICN, 俄亥俄州欧罗拉公司(Aurora, Ohio))的 0.05%氯化钙溶液,pH 调节为 7.8)在 37°C 下处理 10 分钟。然后用 3%过氧化氢溶液处理切片使得内源的过氧化物酶失活。用无血清蛋白封闭物(Dako 公司,加拿大卡奔塔利亚(Carpenteria, CA))抑制非特异性结合,然后与单克隆小鼠抗 24P4C12 抗体或同种型对照孵育。随后,用超敏感(Super Sensitive™)聚合物辣根过氧化物酶(HRP)检测系统处理切片,包括在超级增强剂(Super Enhancer™ reagent)中孵育,然后与聚合物-HRP 二抗偶联物(拜吉奈克斯,加拿大圣雷蒙(BioGenex, San Ramon, CA))孵育。然后,用 DAB 试剂盒(拜吉奈克斯,加拿大圣雷蒙)显影切片,用苏木精染色细胞核,用亮视野显微术进行分析。用 24P4C12 免疫反应性抗体在患者样本中检测到特异性染色,如棕色染色所示。(参见,图 14(A) 和 14(C)。相反,对照抗体未使任一种患者样本染色。(参见,图 14(B) 和 14(D)。该结果显示 24P4C12 在患者胃癌组织的肿瘤细胞中表达。这些结果表明 24P4C12 在人癌症中表达,针对该抗原的抗体(例如 Ha5-1(5)2.1)可用于诊断和治疗

目的。(图 14(A)-14(D))。

[0614] 在本申请通篇中引用了各种网站资料、出版文献、专利申请和专利。(引用的网站用其统一资源定位符或 URL 表示其在万维网上的地址。)这些参考文献的公开内容都通过引用全文纳入本文。

[0615] 本发明并不局限于本文所描述的实施方式所规定的范围内,这些实施方式只是为了说明本发明的各个方面,与其功能等价的任何方面都包括在本发明的范围之内。除了本文所描述的以外,本领域的技术人员根据上面的描述和说明,应该可以了解对本发明模式和方法所作出的各种修改,这些修改同样也落在本发明的范围之内。只要不偏离本发明的真正范围和精神就可以实施这种修改或其它实施方式。

[0616] 表格

[0617] 表 I :当恶性时表达 24P4C12 的组织。

[0618] 结肠

[0619] 胰腺

[0620] 卵巢

[0621] 乳腺

[0622] 肺

[0623] 前列腺

[0624] 胃

[0625] 表 II :氨基酸缩写

[0626]

单字母	三字母	全称
F	Phe	苯丙氨酸
L	Leu	亮氨酸
S	Ser	丝氨酸
Y	Tyr	酪氨酸
C	Cys	半胱氨酸
W	Trp	色氨酸
P	Pro	脯氨酸
H	His	组氨酸
Q	Gln	谷氨酰胺
R	Arg	精氨酸

I	Ile	异亮氨酸
M	Met	甲硫氨酸
T	Thr	苏氨酸
N	Asn	天冬酰胺
K	Lys	赖氨酸
V	Val	缬氨酸
A	Ala	丙氨酸
D	Asp	天冬氨酸
E	Glu	谷氨酸
G	Gly	甘氨酸

[0627] 表 III :氨基酸取代矩阵

[0628] 改编自 GCG 软件 9.0 BLOSUM62 的氨基酸取代矩阵 (分块取代矩阵 (block substitution matrix))。值越高,在相关的天然蛋白质中越容易发现该取代。

[0629]

A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y.
 4 0 -2 -1 -2 0 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1 -1 -1 1 0 0 -3 -2 A
 9 -3 -4 -2 -3 -3 -1 -3 -1 -1 -3 -3 -3 -3 -1 -1 -1 -2 -2 C
 6 2 -3 -1 -1 -3 -1 -4 -3 1 -1 0 -2 0 -1 -3 -4 -3 D
 5 -3 -2 0 -3 1 -3 -2 0 -1 2 0 0 -1 -2 -3 -2 E
 6 -3 -1 0 -3 0 0 -3 -4 -3 -3 -2 -2 -1 1 3 F
 6 -2 -4 -2 -4 -3 0 -2 -2 -2 0 -2 -3 -2 -3 G
 8 -3 -1 -3 -2 1 -2 0 0 -1 -2 -3 -2 2 H
 4 -3 2 1 -3 -3 -3 -3 -2 -1 3 -3 -1 I
 5 -2 -1 0 -1 1 2 0 -1 -2 -3 -2 K
 4 2 -3 -3 -2 -2 -2 -1 1 -2 -1 L
 5 -2 -2 0 -1 -1 -1 1 -1 -1 M
 6 -2 0 0 1 0 -3 -4 -2 N
 7 -1 -2 -1 -1 -2 -4 -3 P
 5 1 0 -1 -2 -2 -1 Q
 5 -1 -1 -3 -3 -2 R
 4 1 -2 -3 -2 S
 5 0 -2 -2 T
 4 -3 -1 V
 11 2 W
 7 Y

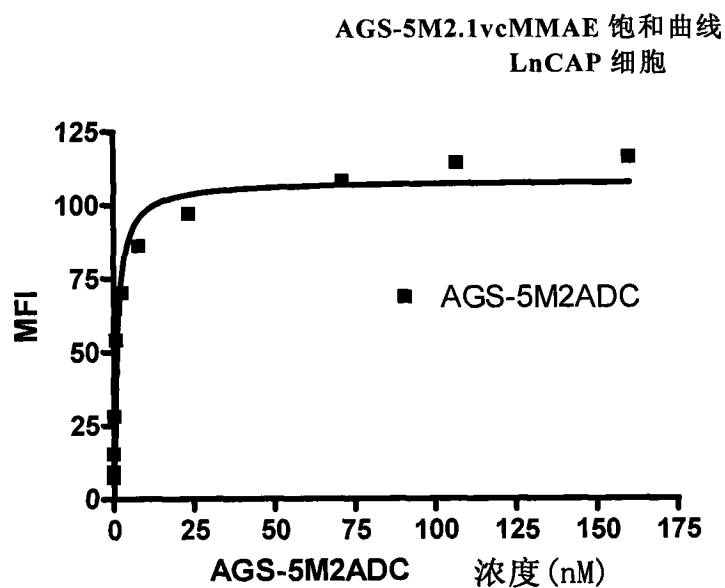
[0630] 表 IV(A) :LnCAP 细胞上 AGS-5M2.1vcMMAE 的 FACS MFI

Ha5-1(5)2.1vcMMAE 的浓度 (nM)	LNCaP 细 胞上的 MFI
160.000	116
106.667	114
71.111	108
23.704	97
7.901	86
2.634	70
0.878	54
0.293	28
0.098	15
0.033	9
0.011	7

[0631]

[0632] 表 IV(B) :通过 GraphPad Prism 软件计算的亲和力数值

[0633]



[0634] 表 V. 合成 vcMMAE 的通用方法

[0635] 其中 :AA1 = 第 1 个氨基酸

[0636] AA2 = 第 2 个氨基酸

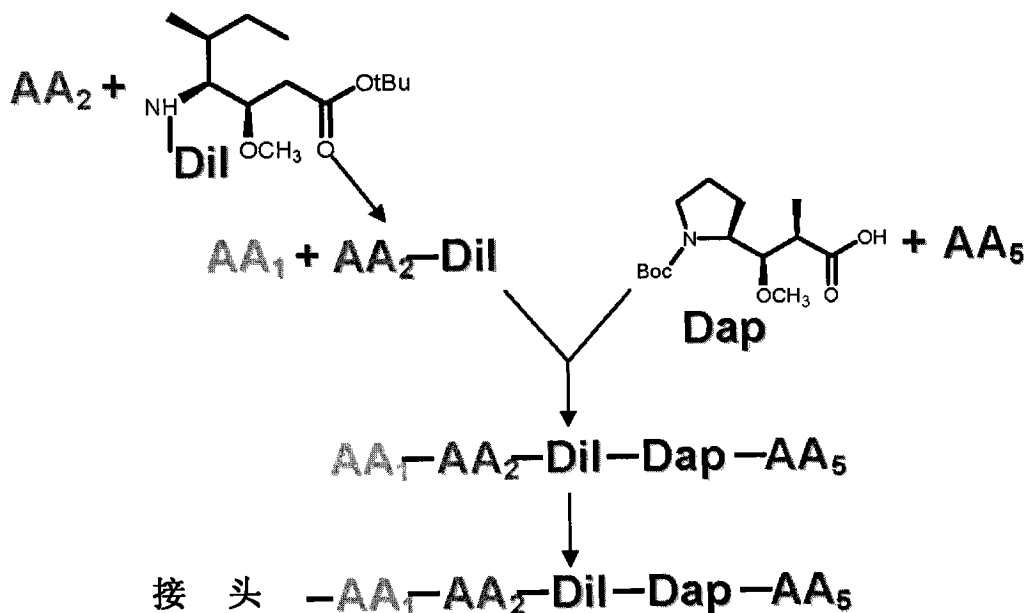
[0637] AA5 = 第 5 个氨基酸

[0638] DIL = 多拉异亮氨酸 (Dolaisoleuine)

[0639] DAP = 多拉脯氨酸 (Dolaproine)

[0640] 接头 = Val-Cit (vc)

[0641]



[0001]

序列表

<110> 艾更斯司股份有限公司 (AGENSYS, INC.)
西雅图基因公司 (SEATTLE GENETICS)
J. 古达斯 (GUDAS, Jean)
A. 雅各波维茨 (JAKOBOVITS, Aya)
Z. 安 (AN, Zili)
R. K. 莫里森 (MORRISON, Robert Kendall)
K. J. M. 莫里森 (MORRISON, Karen Jane Meyrick)
X-C. 贾 (JIA, Xiao-chi)
D. 本杰明 (BENJAMIN, Dennis)
R. 莫泽 (MOSE, Ruth)
P. 森特 (SETER, Peter)

<120> 结合于 24P4C12 蛋白的抗体药物偶联物 (ADC)

<130> 511582001165

<140> PCT/US2010/026429
<141> 2010-03-05

<150> US 61/158, 143
<151> 2009-03-06

<160> 25

<170> FastSEQ for Windows 4.0 版

<210> 1
<211> 2587
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)... (2587)
<223> 24P4C12 变体 1

<220>
<221> CDS
<222> (6)... (2138)

<400> 1
gagcc atg ggg gga aag cag cgg gac gag gat gac gag gcc tac ggg aag 50
Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys
1 5 10 15
cca gtc aaa tac gac ccc tcc ttt cga ggc ccc atc aag aac aga agc 98
Pro Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser
20 25 30
tgc aca gat gtc atc tgc tgc gtc ctc ttc ctg ctc ttc att cta ggt 146
Cys Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Phe Ile Leu Gly
35 40 45
tac atc gtg gtg ggg att gtg gcc tgg ttg tat gga gac ccc cgg caa 194
Tyr Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln
50 55 60

[0002]

gtc ctc tac ccc agg aac tct act ggg gcc tac tgt ggc atg ggg gag Val Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu 65 70 75	424
aac aaa gat aag ccg tat ctc ctg tac ttc aac atc ttc agc tgc atc Asn Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile 80 85 90 95	290
ctg tcc agc aac atc atc tca gtt gct gag aac ggc cta cag tgc ccc Leu Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro 100 105 110	338
aca ccc cag gtg tgt gtg tcc tcc tgc ccg gag gac cca tgg act gtg Thr Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val 115 120 125	386
gga aaa aac gag ttc tca cag act gtt ggg gaa gtc ttc tat aca aaa Gly Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys 130 135 140	434
aac agg aac ttt tgt ctg cca ggg gta ccc tgg aat atg acg gtg atc Asn Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile 145 150 155	482
aca agc ctg caa cag gaa ctc tgc ccc agt ttc ctc ctc ccc tct gct Thr Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala 160 165 170 175	530
cca gct ctg ggg cgc tgc ttt cca tgg acc aac gtt act cca ccg gcg Pro Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala 180 185 190	578
ctc cca ggg atc acc aat gac acc acc ata cag cag ggg atc agc ggt Leu Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly 195 200 205	626
ctt att gac agc ctc aat gcc cga gac atc agt gtt aag atc ttt gaa Leu Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu 210 215 220	674
gat ttt gcc cag tcc tgg tat tgg att ctt gtt gcc ctg ggg gtg gct Asp Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala 225 230 235	722
ctg gtc ttg agc cta ctg ttt atc ttg ctt ctg cgc ctg gtg gct ggg Leu Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly 240 245 250 255	770
ccc ctg gtg ctg gtg ctg atc ctg gga gtg ctg ggc gtg ctg gca tac Pro Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr 260 265 270	818
ggc atc tac tac tgc tgg gag gag tac cga gtg ctg cgg gac aag ggc Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly 275 280 285	866
gcc tcc atc tcc cag ctg ggt ttc acc acc aac ctc agt gcc tac cag	914

[0003]

Ala Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln	
290 295 300	
agc gtg cag gag acc tgg ctg gcc gcc ctg atc gtg ttg gcg gtg ctt	962
Ser Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu	
305 310 315	
gaa gcc atc ctg ctg ctg atg ctc atc ttc ctg cgg cag cgg att cgt	1010
Glu Ala Ile Leu Leu Leu Met Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg	
320 325 330 335	
att gcc atc gcc ctc ctg aag gag gcc agc aag gct gtg gga cag atg	1058
Ile Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met	
340 345 350	
atg tct acc atg ttc tac cca ctg gtc acc ttt gtc ctc ctc ctc atc	1106
Met Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Leu Ile	
355 360 365	
tgc att gcc tac tgg gcc atg act gct ctg tac ctg gct aca tcg ggg	1154
Cys Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly	
370 375 380	
caa ccc cag tat gtg ctc tgg gca tcc aac atc agc tcc ccc gcc tgt	1202
Gln Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys	
385 390 395	
gag aaa gtg cca ata aat aca tca tgc aac ccc acg gcc cac ctt gtg	1250
Glu Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val	
400 405 410 415	
aac tcc tcg tgc cca ggg ctg atg tgc gtc ttc cag gcc tac tca tcc	1298
Asn Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser	
420 425 430	
aaa gcc cta atc caa cgt tct gtc ttc aat ctg caa atc tat ggg gtc	1346
Lys Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val	
435 440 445	
ctg ggg ctc ttc tgg acc ctt aac tgg gta ctg gcc ctg gcc caa tgc	1394
Leu Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys	
450 455 460	
gtc ctc gct gga gcc ttt gcc tcc ttc tac tgg gcc ttc cac aag ccc	1442
Val Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro	
465 470 475	
cag gac atc cct acc ttc ccc tta atc tct gcc ttc atc cgc aca ctc	1490
Gln Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu	
480 485 490 495	
cgt tac cac act ggg tca ttg gca ttt gga gcc ctc atc ctg acc ctt	1538
Arg Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu	
500 505 510	
gtg cag ata gcc cgg gtc atc ttg gag tat att gac cac aag ctc aga	1586
Val Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg	
515 520 525	

[0004]

gga gtg cag aac cct gta gcc cgc tgc atc atg tgc tgt ttc aag tgc Gly Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys 530 535 540	1634
tgc ctc tgg tgt ctg gaa aaa ttt atc aag ttc cta aac cgc aat gca Cys Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala 545 550 555	1682
tac atc atg atc gcc atc tac ggg aag aat ttc tgt gtc tca gcc aaa Tyr Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys 560 565 570 575	1730
aat gcg ttc atg cta ctc atg cga aac att gtc agg gtg gtc gtc ctg Asn Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu 580 585 590	1778
gac aaa gtc aca gac ctg ctg ctg ttc ttt ggg aag ctg ctg gtg gtc Asp Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val 595 600 605	1826
gga ggc gtg ggg gtc ctg tcc ttc ttt ttt ttc tcc ggt cgc atc ccg Gly Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro 610 615 620	1874
ggg ctg ggt aaa gac ttt aag agc ccc cac ctc aac tat tac tgg ctg Gly Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu 625 630 635	1922
ccc atc atg acc tcc atc ctg ggg gcc tat gtc atc gcc agc ggc ttc Pro Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe 640 645 650 655	1970
ttc agc gtt ttc ggc atg tgt gtg gac acg ctc ttc ctc tgc ttc ctg Phe Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu 660 665 670	2018
gaa gac ctg gag cgg aac aac ggc tcc ctg gac cgg ccc tac tac atg Glu Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met 675 680 685	2066
tcc aag agc ctt cta aag att ctg ggc aag aag aac gag gcg ccc ccg Ser Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro 690 695 700	2114
gac aac aag aag agg aag aag tga cagctccggc cctgateccag gactgcaccc Asp Asn Lys Lys Arg Lys Lys * 705 710	2168
cacccccacc gtccagccat ccaacctcac ttgccttac aggtctccat tttgtggtaa aaaaaggttt taggccaggc gccgtggctc acgcctgtaa tccaacatt tgagaggctg aggcgggcgg atcacctgag tcaggagtgc gagaccagcc tggccaacat ggtgaaacct cgtctctat taaaaataca aaaattagcc gagagtgggt gcatgcacct gtcacccag ctactcggga ggctgaggca ggagaatcgc ttgaaccggg gaggcagagg ttgcagtgag ccgagatcgc gccactgcac tccaacctgg gtgacagact ctgtctccaa aacaaaaaaa acaacaaaaa agattttatt aaagatatatt tgttaactca gtaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2228 2288 2348 2408 2468 2528 2587

<210> 2

[0005]

<211> 710
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)... (710)
 <223> 24P4C12 变体 1 的编码序列

<400> 2

```

Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys Pro
 1              5              10              15
Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser Cys
      20              25              30
Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly Tyr
      35              40              45
Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln Val
      50              55              60
Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu Asn
65              70              75              80
Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile Leu
      85              90              95
Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro Thr
      100             105             110
Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val Gly
      115             120             125
Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys Asn
      130             135             140
Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile Thr
145             150             155             160
Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala Pro
      165             170             175
Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala Leu
      180             185             190
Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly Leu
      195             200             205
Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu Asp
210             215             220
Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala Leu
225             230             235             240
Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly Pro
      245             250             255
Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr Gly
      260             265             270
Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly Ala
      275             280             285
Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln Ser
290             295             300
Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu Glu
305             310             315             320
Ala Ile Leu Leu Leu Met Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg Ile
      325             330             335
Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met Met
      340             345             350
Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Leu Ile Cys
      355             360             365
Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly Gln
      370             375             380

```

[0006]

```

Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys Glu
385                      390                      395                      400
Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val Asn
                      405                      410                      415
Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser Lys
                      420                      425                      430
Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val Leu
                      435                      440                      445
Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys Val
                      450                      455                      460
Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro Gln
465                      470                      475                      480
Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu Arg
                      485                      490                      495
Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu Val
                      500                      505                      510
Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg Gly
                      515                      520                      525
Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys Cys
530                      535                      540
Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala Tyr
545                      550                      555                      560
Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys Asn
                      565                      570                      575
Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu Asp
580                      585                      590
Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val Gly
595                      600                      605
Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro Gly
610                      615                      620
Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu Pro
625                      630                      635                      640
Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe Phe
                      645                      650                      655
Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu Glu
660                      665                      670
Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met Ser
675                      680                      685
Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro Asp
690                      695                      700
Asn Lys Lys Arg Lys Lys
705                      710

```

<210> 3
 <211> 2587
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)... (2587)
 <223> 24P4C12 变体 2

<220>
 <221> CDS
 <222> (6)... (2138)

[0007]

```

<400> 3
gagcc atg ggg gga aag cag cgg gac gag gat gac gag gcc tac ggg aag 50
      Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys
        1             5             10             15

cca gtc aaa tac gac ccc tcc ttt cga ggc ccc atc aag aac aga agc 98
      Pro Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser
        20             25             30

tgc aca gat gtc atc tgc tgc gtc ctc ttc ctg ctc ttc att cta ggt 146
      Cys Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly
        35             40             45

tac atc gtg gtg ggg att gtg gcc tgg ttg tat gga gac ccc cgg caa 194
      Tyr Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln
        50             55             60

gtc ctc tac ccc agg aac tct act ggg gcc tac tgt ggc atg ggg gag 242
      Val Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu
        65             70             75

aac aaa gat aag ccg tat ctc ctg tac ttc aac atc ttc agc tgc atc 290
      Asn Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile
        80             85             90             95

ctg tcc agc aac atc atc tca gtt gct gag aac ggc cta cag tgc ccc 338
      Leu Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro
        100            105            110

aca ccc cag gtg tgt gtg tcc tcc tgc ccg gag gac cca tgg act gtg 386
      Thr Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val
        115            120            125

gga aaa aac gag ttc tca cag act gtt ggg gaa gtc ttc tat aca aaa 434
      Gly Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys
        130            135            140

aac agg aac ttt tgt ctg cca ggg gta ccc tgg aat atg acg gtg atc 482
      Asn Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile
        145            150            155

aca agc ctg caa cag gaa ctc tgc ccc agt ttc ctc ctc ccc tct gct 530
      Thr Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala
        160            165            170            175

cca gct ctg gga cgc tgc ttt cca tgg acc aac gtt act cca ccg gcg 578
      Pro Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala
        180            185            190

ctc cca ggg atc acc aat gac acc acc ata cag cag ggg atc agc ggt 626
      Leu Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly
        195            200            205

ctt att gac agc ctc aat gcc cga gac atc agt gtt aag atc ttt gaa 674
      Leu Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu
        210            215            220

gat ttt gcc cag tcc tgg tat tgg att ctt gtt gcc ctg ggg gtg gct 722

```

[0008]

Asp Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala	
225 230 235	
ctg gtc ttg agc cta ctg ttt atc ttg ctt ctg cgc ctg gtg gct ggg	770
Leu Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly	
240 245 250 255	
ccc ctg gtg ctg gtg ctg atc ctg gga gtg ctg ggc gtg ctg gca tac	818
Pro Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr	
260 265 270	
ggc atc tac tac tgc tgg gag gag tac cga gtg ctg cgg gac aag ggc	866
Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly	
275 280 285	
gcc tcc atc tcc cag ctg ggt ttc acc acc aac ctc agt gcc tac cag	914
Ala Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln	
290 295 300	
agc gtg cag gag acc tgg ctg gcc gcc ctg atc glg ttg gcg gtg ctt	962
Ser Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu	
305 310 315	
gaa gcc atc ctg ctg ctg atg ctc atc ttc ctg cgg cag cgg att cgt	1010
Glu Ala Ile Leu Leu Leu Met Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg	
320 325 330 335	
att gcc atc gcc ctc ctg aag gag gcc agc aag gct gtg gga cag atg	1058
Ile Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met	
340 345 350	
atg tct acc atg ttc tac cca ctg gtc acc ttt gtc ctc ctc ctc atc	1106
Met Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Leu Ile	
355 360 365	
tgc att gcc tac tgg gcc atg act gct ctg tac ctg gct aca tcg ggg	1154
Cys Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly	
370 375 380	
caa ccc cag tat gtg ctc tgg gca tcc aac atc agc tcc ccc ggc tgt	1202
Gln Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys	
385 390 395	
gag aaa gtg cca ata aat aca tca tgc aac ccc acg gcc cac ctt gtg	1250
Glu Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val	
400 405 410 415	
aac tcc tcg tgc cca ggg ctg atg tgc gtc ttc cag ggc tac tca tcc	1298
Asn Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser	
420 425 430	
aaa ggc cta atc caa cgt tct gtc ttc aat ctg caa atc tat ggg gtc	1346
Lys Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val	
435 440 445	
ctg ggg ctc ttc tgg acc ctt aac tgg gta ctg gcc ctg ggc caa tgc	1394
Leu Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys	
450 455 460	

[0009]

gtc ctc gct gga gcc ttt gcc tcc ttc tac tgg gcc ttc cac aag ccc Val Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro 465 470 475	1442
cag gac atc cct acc ttc ccc tta atc tct gcc ttc atc cgc aca ctc Gln Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu 480 485 490 495	1490
cgt tac cac act ggg tca ttg gca ttt gga gcc ctc atc ctg acc ctt Arg Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu 500 505 510	1538
gtg cag ata gcc cgg gtc atc ttg gag tat att gac cac aag ctc aga Val Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg 515 520 525	1586
gga gtg cag aac cct gta gcc cgc tgc atc atg tgc tgt ttc aag tgc Gly Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys 530 535 540	1634
tgc ctc tgg tgt ctg gaa aaa ttt atc aag ttc cta aac cgc aat gca Cys Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala 545 550 555	1682
tac atc atg atc gcc atc tac ggg aag aat ttc tgt gtc tca gcc aaa Tyr Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys 560 565 570 575	1730
aat gcg ttc atg cta ctc atg cga aac att gtc agg gtg gtc gtc ctg Asn Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu 580 585 590	1778
gac aaa gtc aca gac ctg ctg ctg ttc ttt ggg aag ctg ctg gtg gtc Asp Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val 595 600 605	1826
gga ggc gtg ggg gtc ctg tcc ttc ttt ttt ttc tcc ggt cgc atc ccg Gly Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro 610 615 620	1874
ggg ctg ggt aaa gac ttt aag agc ccc cac ctc aac tat tac tgg ctg Gly Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu 625 630 635	1922
ccc atc atg acc tcc atc ctg ggg gcc tat gtc atc gcc agc ggc ttc Pro Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe 640 645 650 655	1970
ttc agc gtt ttc ggc atg tgt gtg gac acg ctc ttc ctc tgc ttc ctg Phe Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu 660 665 670	2018
gaa gac ctg gag cgg aac aac ggc tcc ctg gac cgg ccc tac tac atg Glu Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met 675 680 685	2066
tcc aag agc ctt cta aag att ctg ggc aag aag aac gag gcg ccc ccg	2114

[0010]

```

Ser Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro
    690                695                700

gac aac aag aag agg aag aag tga cagctccggc cctgatccag gactgcaccc 2168
Asp Asn Lys Lys Arg Lys Lys *
    705                710

cacccccacc gtccagccat ccaacctcac ttcgccttac aggtctccat tttgtggtaa 2228
aaaaaggttt taggccaggc gccgtggctc acgcctgtaa tccaacactt tgagaggctg 2288
aggcggggcgg atcacctgag tcaggagtgc gagaccagcc tggccaacat ggtgaaacct 2348
ccgtctctat taaaaataca aaaattagcc gagagtggcg gcatgcacct gtcatcccag 2408
ctactcggga ggctgaggca ggagaatcgc ttgaacccgg gaggcagagg ttgcagtgcg 2468
ccgagatcgc gccactgcac tccaacctgg gtgacagact ctgtctccaa aacaaaaaaa 2528
acaacaaaaa agattttatt aaagatatat tgtaactca gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2587

<210> 4
<211> 710
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)... (710)
<223> 24P4C12 变体 2 的编码序列

<400> 4
Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys Pro
  1                5                10                15
Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser Cys
    20                25                30
Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly Tyr
    35                40                45
Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln Val
    50                55                60
Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu Asn
    65                70                75                80
Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile Leu
    85                90                95
Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro Thr
    100               105               110
Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val Gly
    115               120               125
Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys Asn
    130               135               140
Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile Thr
    145               150               155               160
Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala Pro
    165               170               175
Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala Leu
    180               185               190
Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly Leu
    195               200               205
Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu Asp
    210               215               220
Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala Leu
    225               230               235               240
Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly Pro
    245               250               255

```

[0011]


```

Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr Gly
      260                      265                      270
Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly Ala
      275                      280                      285
Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln Ser
      290                      295                      300
Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu Glu
      305                      310                      315                      320
Ala Ile Leu Leu Leu Met Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg Ile
      325                      330                      335
Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met Met
      340                      345                      350
Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Ile Cys
      355                      360                      365
Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly Gln
      370                      375                      380
Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys Glu
      385                      390                      395                      400
Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val Asn
      405                      410                      415
Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser Lys
      420                      425                      430
Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val Leu
      435                      440                      445
Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys Val
      450                      455                      460
Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro Gln
      465                      470                      475                      480
Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu Arg
      485                      490                      495
Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu Val
      500                      505                      510
Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg Gly
      515                      520                      525
Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys Cys
      530                      535                      540
Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala Tyr
      545                      550                      555                      560
Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys Asn
      565                      570                      575
Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu Asp
      580                      585                      590
Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val Gly
      595                      600                      605
Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro Gly
      610                      615                      620
Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu Pro
      625                      630                      635                      640
Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe Phe
      645                      650                      655
Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu Glu
      660                      665                      670
Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met Ser
      675                      680                      685
Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro Asp
      690                      695                      700
Asn Lys Lys Arg Lys Lys
      705                      710

```

[0012]

```

<210> 5
<211> 2587
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)... (2587)
<223> 24P4C12 变体 3

<220>
<221> CDS
<222> (6)... (2138)

<400> 5
gagcc atg ggg gga aag cag cgg gac gag gat gac gag gcc tac ggg aag 50
Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys
1 5 10 15

cca gtc aaa tac gac ccc tcc ttt cga ggc ccc atc aag aac aga agc 98
Pro Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser
20 25 30

tgc aca gat gtc atc tgc tgc gtc ctc ttc ctg ctc ttc att cta ggt 146
Cys Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly
35 40 45

tac atc gtg gtg ggg att gtg gcc tgg ttg tat gga gac ccc cgg caa 194
Tyr Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln
50 55 60

gtc ctc tac ccc agg aac tct act ggg gcc tac tgt ggc atg ggg gag 242
Val Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu
65 70 75

aac aaa gat aag ccg tat ctc ctg tac ttc aac atc ttc agc tgc atc 290
Asn Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile
80 85 90 95

ctg tcc agc aac atc atc tca gtt gct gag aac ggc cta cag tgc ccc 338
Leu Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro
100 105 110

aca ccc cag gtg tgt gtg tcc tcc tgc ccg gag gac cca tgg act gtg 386
Thr Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val
115 120 125

gga aaa aac gag ttc tca cag act gtt ggg gaa gtc ttc tat aca aaa 434
Gly Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys
130 135 140

aac agg aac ttt tgt ctg cca ggg gta ccc tgg aat atg acg gtg atc 482
Asn Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile
145 150 155

aca agc ctg caa cag gaa ctc tgc ccc agt ttc ctc ctc ccc tct gct 530

```

[0013]

Thr Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala	
160	165
cca gct ctg ggg cgc tgc ttt cca tgg acc aac att act cca ccg gcg	578
Pro Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Ile Thr Pro Pro Ala	
180	185
ctc cca ggg atc acc aat gac acc acc ata cag cag ggg atc agc ggt	626
Leu Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly	
195	200
ctt att gac agc ctc aat gcc cga gac atc agt gtt aag atc ttt gaa	674
Leu Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu	
210	215
gat ttt gcc cag tcc tgg tat tgg att ctt gtt gcc ctg ggg gtg gct	722
Asp Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala	
225	230
ctg gtc ttg agc cta ctg ttt atc ttg ctt ctg cgc ctg gtg gct ggg	770
Leu Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly	
240	245
ccc ctg gtg ctg gtg ctg atc ctg gga gtg ctg ggc gtg ctg gca tac	818
Pro Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr	
260	265
ggc atc tac tac tgc tgg gag gag tac cga gtg ctg cgg gac aag ggc	866
Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly	
275	280
gcc tcc atc tcc cag ctg ggt ttc acc acc aac ctc agt gcc tac cag	914
Ala Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln	
290	295
agc gtg cag gag acc tgg ctg gcc gcc ctg atc gtg ttg gcg gtg ctt	962
Ser Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu	
305	310
gaa gcc atc ctg ctg ctg atg ctc atc ttc ctg cgg cag cgg att cgt	1010
Glu Ala Ile Leu Leu Leu Met Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg	
320	325
att gcc atc gcc ctc ctg aag gag gcc agc aag gct gtg gga cag atg	1058
Ile Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met	
340	345
atg tct acc atg ttc tac cca ctg gtc acc ttt gtc ctc ctc ctc atc	1106
Met Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Leu Ile	
355	360
tgc att gcc tac tgg gcc atg act gct ctg tac ctg gct aca tcg ggg	1154
Cys Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly	
370	375
caa ccc cag tat gtg ctc tgg gca tcc aac atc agc tcc ccc ggc tgt	1202
Gln Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys	
385	390

[0014]

gag aaa gtg cca ata aat aca tca tgc aac ccc acg gcc cac ctt gtg Glu Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val 400 405 410 415	1250
aac tcc tcg tgc cca ggg ctg atg tgc gtc ttc cag ggc tac tca tcc Asn Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser 420 425 430	1298
aaa ggc cta atc caa cgt tct gtc ttc aat ctg caa atc tat ggg gtc Lys Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val 435 440 445	1346
ctg ggg ctc ttc tgg acc ctt aac tgg gta ctg gcc ctg ggc caa tgc Leu Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys 450 455 460	1394
gtc ctc gct gga gcc ttt gcc tcc ttc tac tgg gcc ttc cac aag ccc Val Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro 465 470 475	1442
cag gac atc cct acc ttc ccc tta atc tct gcc ttc atc cgc aca ctc Gln Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu 480 485 490 495	1490
cgt tac cac act ggg tca ttg gca ttt gga gcc ctc atc ctg acc ctt Arg Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu 500 505 510	1538
gtg cag ata gcc cgg gtc atc ttg gag tat att gac cac aag ctc aga Val Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg 515 520 525	1586
gga gtg cag aac cct gta gcc cgc tgc atc atg tgc tgt ttc aag tgc Gly Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys 530 535 540	1634
tgc ctc tgg tgt ctg gaa aaa ttt atc aag ttc cta aac cgc aat gca Cys Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala 545 550 555	1682
tac atc atg atc gcc atc tac ggg aag aat ttc tgt gtc tca gcc aaa Tyr Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys 560 565 570 575	1730
aat gcg ttc atg cta ctc atg cga aac att gtc agg gtg gtc gtc ctg Asn Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu 580 585 590	1778
gac aaa gtc aca gac ctg ctg ctg ttc ttt ggg aag ctg ctg gtg gtc Asp Lys Val Thr Asp Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val 595 600 605	1826
gga ggc gtg ggg gtc ctg tcc ttc ttt ttt ttc tcc ggt cgc atc ccg Gly Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro 610 615 620	1874
ggg ctg ggt aaa gac ttt aag agc ccc cac ctc aac tat tac tgg ctg	1922

[0015]

```

Gly Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu
625                      630                      635

ccc atc atg acc tcc atc ctg ggg gcc tat gtc atc gcc agc ggc ttc 1970
Pro Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe
640                      645                      650                      655

ttc agc gtt ttc ggc atg tgt gtg gac acg ctc ttc ctc tgc ttc ctg 2018
Phe Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu
660                      665                      670

gaa gac ctg gag cgg aac aac ggc tcc ctg gac cgg ccc tac tac atg 2066
Glu Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met
675                      680                      685

tcc aag agc ctt cta aag att ctg ggc aag aag aac gag gcg ccc ccg 2114
Ser Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro
690                      695                      700

gac aac aag aag agg aag aag tga cagctccggc cctgatccag gactgcaccc 2168
Asp Asn Lys Lys Arg Lys Lys *
705                      710

cacccccacc gtccagccat ccaacctcac ttgccttac aggtctccat tttgtggtaa 2228
aaaaagggtt taggccaggc gccgtggctc acgcctgtaa tccaacactt tgagaggctg 2288
aggcgggcgg atcacctgag tcaggagtgc gagaccagcc tggccaacat ggtgaaacct 2348
ccgtctctat taaaaataca aaaattagcc gagagtgggtg gcatgcacct gtcatcccag 2408
ctactcggga ggtcagggca ggagaatcgc ttgaaccggg gaggcagagg ttgcagttag 2468
ccgagatgcg gccactgcac tccaacctgg gtgacagact ctgtctccaa aacaaaacaa 2528
acaaacaaaa agattttatt aaagatattt tgttaactca gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2587

<210> 6
<211> 710
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)... (710)
<223> 24P4C12 变体 3 的编码序列

<400> 6
Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys Pro
1                      5                      10                      15
Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser Cys
20                      25                      30
Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly Tyr
35                      40                      45
Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln Val
50                      55                      60
Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu Asn
65                      70                      75                      80
Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile Leu
85                      90                      95
Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro Thr
100                      105                      110
Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val Gly
115                      120                      125

```

[0016]

```

Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys Asn
 130                      135                      140
Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile Thr
 145                      150                      155                      160
Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala Pro
                      165                      170                      175
Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Ile Thr Pro Pro Ala Leu
 180                      185                      190
Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly Leu
 195                      200                      205
Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu Asp
 210                      215                      220
Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala Leu
 225                      230                      235                      240
Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly Pro
                      245                      250                      255
Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr Gly
 260                      265                      270
Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly Ala
 275                      280                      285
Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln Ser
 290                      295                      300
Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu Glu
 305                      310                      315                      320
Ala Ile Leu Leu Leu Met Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg Ile
                      325                      330                      335
Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met Met
 340                      345                      350
Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Ile Cys
 355                      360                      365
Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly Gln
 370                      375                      380
Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys Glu
 385                      390                      395                      400
Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val Asn
                      405                      410                      415
Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser Lys
 420                      425                      430
Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val Leu
 435                      440                      445
Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys Val
 450                      455                      460
Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro Gln
 465                      470                      475                      480
Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu Arg
                      485                      490                      495
Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu Val
 500                      505                      510
Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg Gly
 515                      520                      525
Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys Cys
 530                      535                      540
Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala Tyr
 545                      550                      555                      560
Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys Asn
                      565                      570                      575
Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu Asp
 580                      585                      590

```

[0017]

```

Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val Gly
    595                      600                      605
Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro Gly
    610                      615                      620
Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu Pro
    625                      630                      635                      640
Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe Phe
    645                      650                      655
Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu Glu
    660                      665                      670
Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met Ser
    675                      680                      685
Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro Asp
    690                      695                      700
Asn Lys Lys Arg Lys Lys
    705                      710

```

```

<210> 7
<211> 2587
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)... (2587)
<223> 24P4C12 变体 4

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (6)... (2138)

```

```

<400> 7
gagcc atg ggg gga aag cag cgg gac gag gat gac gag gcc tac ggg aag 50
      Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys
          1              5              10              15

cca gtc aaa tac gac ccc tcc ttt cga ggc ccc atc aag aac aga agc 98
Pro Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser
          20              25              30

tgc aca gat gtc atc tgc tgc gtc ctc ttc ctg ctc ttc att cta ggt 146
Cys Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly
          35              40              45

tac atc gtg gtg ggg att gtg gcc tgg ttg tat gga gac ccc cgg caa 194
Tyr Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln
          50              55              60

gtc ctc tac ccc agg aac tct act ggg gcc tac tgt ggc atg ggg gag 242
Val Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu
          65              70              75

aac aaa gat aag ccg tat ctc ctg tac ttc aac atc ttc agc tgc atc 290
Asn Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile
          80              85              90              95

ctg tcc agc aac atc atc tca gtt gct gag aac ggc cta cag tgc ccc 338

```

[0018]

Leu Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro	
100 105 110	
aca ccc cag gtg tgt gtg tcc tcc tgc ccg gag gac cca tgg act gtg	386
Thr Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val	
115 120 125	
gga aaa aac gag ttc tca cag act gtt ggg gaa gtc ttc tat aca aaa	434
Gly Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys	
130 135 140	
aac agg aac ttt tgt ctg cca ggg gta ccc tgg aat atg acg gtg atc	482
Asn Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile	
145 150 155	
aca agc ctg caa cag gaa ctc tgc ccc agt ttc ctc ctc ccc tct gct	530
Thr Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala	
160 165 170 175	
cca gct ctg ggg cgc tgc ttt cca tgg acc aac gtt act cca ccg gcg	578
Pro Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala	
180 185 190	
ctc cca ggg atc acc aat gac acc acc ata cag cag ggg atc agc ggt	626
Leu Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly	
195 200 205	
ctt att gac agc ctc aat gcc cga gac atc agt gtt aag atc ttt gaa	674
Leu Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu	
210 215 220	
gat ttt gcc cag tcc tgg tat tgg att ctt gtt gcc ctg ggg gtg gct	722
Asp Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala	
225 230 235	
ctg gtc ttg agc cta ctg ttt atc ttg ctt ctg cgc ctg gtg gct ggg	770
Leu Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly	
240 245 250 255	
ccc ctg gtg ctg gtg ctg atc ctg gga gtg ctg ggc gtg ctg gca tat	818
Pro Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr	
260 265 270	
ggc atc tac tac tgc tgg gag gag tac cga gtg ctg cgg gac aag ggc	866
Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly	
275 280 285	
gcc tcc atc tcc cag ctg ggt ttc acc acc aac ctc agt gcc tac cag	914
Ala Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln	
290 295 300	
agc gtg cag gag acc tgg ctg gcc gcc ctg atc gtg ttg gcg gtg ctt	962
Ser Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu	
305 310 315	
gaa gcc atc ctg ctg ctg atg ctc atc ttc ctg cgg cag cgg att cgt	1010
Glu Ala Ile Leu Leu Leu Met Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg	
320 325 330 335	

[0019]

att gcc atc gcc ctc ctg aag gag gcc agc aag gct gtg gga cag atg Ile Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met 340 345 350	1058
atg tct acc atg ttc tac cca ctg gtc acc ttt gtc ctc ctc ctc atc Met Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Leu Ile 355 360 365	1106
tgc att gcc tac tgg gcc atg act gct ctg tac ctg gct aca tcg ggg Cys Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly 370 375 380	1154
caa ccc cag tat gtg ctc tgg gca tcc aac atc agc tcc ccc ggc tgt Gln Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys 385 390 395	1202
gag aaa gtg cca ata aat aca tca tgc aac ccc acg gcc cac ctt gtg Glu Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val 400 405 410 415	1250
aac tcc tcg tgc cca ggg ctg atg tgc gtc ttc cag ggc tac tca tcc Asn Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser 420 425 430	1298
aaa ggc cta atc caa cgt tct gtc ttc aat ctg caa atc tat ggg gtc Lys Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val 435 440 445	1346
ctg ggg ctc ttc tgg acc ctt aac tgg gta ctg gcc ctg ggc caa tgc Leu Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys 450 455 460	1394
gtc ctc gct gga gcc ttt gcc tcc ttc tac tgg gcc ttc cac aag ccc Val Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro 465 470 475	1442
cag gac atc cct acc ttc ccc tta atc tct gcc ttc atc cgc aca ctc Gln Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu 480 485 490 495	1490
cgt tac cac act ggg tca ttg gca ttt gga gcc ctc atc ctg acc ctt Arg Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu 500 505 510	1538
gtg cag ata gcc cgg gtc atc ttg gag tat att gac cac aag ctc aga Val Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg 515 520 525	1586
gga gtg cag aac cct gta gcc cgc tgc atc atg tgc tgt ttc aag tgc Gly Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys 530 535 540	1634
tgc ctc tgg tgt ctg gaa aaa ttt atc aag ttc cta aac cgc aat gca Cys Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala 545 550 555	1682
tac atc atg atc gcc atc tac ggg aag aat ttc tgt gtc tca gcc aaa	1730

[0020]

```

Tyr Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys
560                               565                               570                               575

aat gcg ttc atg cta ctc atg cga aac att gtc agg gtg gtc gtc ctg 1778
Asn Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu
                               580                               585                               590

gac aaa gtc aca gac ctg ctg ctg ttc ttt ggg aag ctg ctg glg gtc 1826
Asp Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val
                               595                               600                               605

gga ggc gtg ggg gtc ctg tcc ttc ttt ttt ttc tcc ggt cgc atc ccg 1874
Gly Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro
                               610                               615                               620

ggg ctg ggt aaa gac ttt aag agc ccc cac ctc aac tat tac tgg ctg 1922
Gly Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu
                               625                               630                               635

ccc atc atg acc tcc atc ctg ggg gcc tat gtc atc gcc agc ggc ttc 1970
Pro Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe
640                               645                               650                               655

ttc agc gtt ttc ggc atg tgt gtg gac acg ctc ttc ctc tgc ttc ctg 2018
Phe Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu
                               660                               665                               670

gaa gac ctg gag cgg aac aac ggc tcc ctg gac cgg ccc tac tac atg 2066
Glu Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met
                               675                               680                               685

tcc aag agc ctt cta aag att ctg ggc aag aag aac gag gcg ccc ccg 2114
Ser Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro
                               690                               695                               700

gac aac aag aag agg aag aag tga cagctccggc cctgatccag gactgcaccc 2168
Asp Asn Lys Lys Arg Lys Lys *
                               705                               710

caccgccacc gtccagccat ccaacctcac ttgccttac aggtctccat ttgtgtgtaa 2228
aaaaaggttt taggccaggc gccgtggctc acgcctgtaa tccaacactt tgagaggctg 2288
aggcggggcg atcacctgag tcaggagtgc gagaccagcc tggccaacat ggtgaaacct 2348
ccgtctctat taaaaataca aaaattagcc gagaglggtg gcatgcacct gtcattccag 2408
ctactcggga ggctgaggca ggagaatcgc ttgaaccggg gaggcagagg ttgcagttag 2468
ccgagatcgc gccactgcac tccaacctgg gtgacagact ctgtctccaa aacaaaacaa 2528
acaaacaaaa agattttatt aaagatattt tgttaactca gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2587

<210> 8
<211> 710
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)... (710)
<223> 24P4C12 变体 4 的编码序列

<400> 8

```

[0021]

```

Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys Pro
 1           5           10           15
Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser Cys
 20           25           30
Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly Tyr
 35           40           45
Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln Val
 50           55           60
Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu Asn
 65           70           75           80
Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile Leu
 85           90           95
Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro Thr
100          105          110
Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val Gly
115          120          125
Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys Asn
130          135          140
Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile Thr
145          150          155          160
Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala Pro
165          170          175
Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala Leu
180          185          190
Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly Leu
195          200          205
Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu Asp
210          215          220
Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala Leu
225          230          235          240
Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly Pro
245          250          255
Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr Gly
260          265          270
Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly Ala
275          280          285
Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln Ser
290          295          300
Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu Glu
305          310          315          320
Ala Ile Leu Leu Leu Met Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg Ile
325          330          335
Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met Met
340          345          350
Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Ile Cys
355          360          365
Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly Gln
370          375          380
Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys Glu
385          390          395          400
Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val Asn
405          410          415
Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser Lys
420          425          430
Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val Leu
435          440          445
Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys Val
450          455          460

```

[0022]

Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro Gln
 465 470 475 480
 Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu Arg
 485 490 495
 Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu Val
 500 505 510
 Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg Gly
 515 520 525
 Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys Cys
 530 535 540
 Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala Tyr
 545 550 555 560
 Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys Asn
 565 570 575
 Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu Asp
 580 585 590
 Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val Gly
 595 600 605
 Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro Gly
 610 615 620
 Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu Pro
 625 630 635 640
 Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe Phe
 645 650 655
 Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu Glu
 660 665 670
 Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met Ser
 675 680 685
 Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro Asp
 690 695 700
 Asn Lys Lys Arg Lys Lys
 705 710

<210> 9
 <211> 2587
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)... (2587)
 <223> 24P4C12 变体 5

<220>
 <221> CDS
 <222> (6)... (2138)

<400> 9
 gagcc atg ggg gga aag cag cgg gac gag gat gac gag gcc tac ggg aag 50
 Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys
 1 5 10 15

cca gtc aaa tac gac ccc tcc ttt cga ggc ccc atc aag aac aga agc 98
 Pro Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser
 20 25 30

tgc aca gat gtc atc tgc tgc gtc ctc ttc ctg ctc ttc att cta ggt 146

[0023]

Cys Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly	
35 40 45	
tac atc gtg gtg ggg att gtg gcc tgg ttg tat gga gac ccc cgg caa	194
Tyr Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln	
50 55 60	
gtc ctc tac ccc agg aac tct act ggg gcc tac tgt ggc atg ggg gag	242
Val Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu	
65 70 75	
aac aaa gat aag ccg tat ctc ctg tac ttc aac atc ttc agc tgc atc	290
Asn Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile	
80 85 90 95	
ctg tcc agc aac atc atc tca gtt gct gag aac ggc cta cag tgc ccc	338
Leu Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro	
100 105 110	
aca ccc cag gtg tgt gtg tcc tcc tgc ccg gag gac cca tgg act gtg	386
Thr Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val	
115 120 125	
gga aaa aac gag ttc tca cag act gtt ggg gaa gtc ttc tat aca aaa	434
Gly Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys	
130 135 140	
aac agg aac ttt tgt ctg cca ggg gta ccc tgg aat atg acg gtg atc	482
Asn Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile	
145 150 155	
aca agc ctg caa cag gaa ctc tgc ccc agt ttc ctc ctc ccc tct gct	530
Thr Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala	
160 165 170 175	
cca gct ctg ggg cgc tgc ttt cca tgg acc aac gtt act cca ccg gcg	578
Pro Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala	
180 185 190	
ctc cca ggg atc acc aat gac acc acc ata cag cag ggg atc agc ggt	626
Leu Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly	
195 200 205	
ctt att gac agc ctc aat gcc cga gac atc agt gtt aag atc ttt gaa	674
Leu Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu	
210 215 220	
gat ttt gcc cag tcc tgg tat tgg att ctt gtt gcc ctg ggg gtg gct	722
Asp Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala	
225 230 235	
ctg gtc ttg agc cta ctg ttt atc ttg ctt ctg cgc ctg gtg gct ggg	770
Leu Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly	
240 245 250 255	
ccc ctg gtg ctg gtg ctg atc ctg gga gtg ctg ggc gtg ctg gca tac	818
Pro Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr	
260 265 270	

[0024]

```

ggc atc tac tac tgc tgg gag gag tac cga gtg ctg cgg gac aag ggc      866
Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly
      275                      280                      285

gcc tcc atc tcc cag ctg ggt ttc acc acc aac ctc agt gcc tac cag      914
Ala Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln
      290                      295                      300

agc gtg cag gag acc tgg ctg gcc gcc ctg atc gtg ttg gcg gtg ctt      962
Ser Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu
      305                      310                      315

gaa gcc atc ctg ctg ctg gtg ctc atc ttc ctg cgg cag cgg att cgt      1010
Glu Ala Ile Leu Leu Leu Val Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg
      320                      325                      330                      335

att gcc atc gcc ctc ctg aag gag gcc agc aag gct gtg gga cag atg      1058
Ile Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met
      340                      345                      350

atg tct acc atg ttc tac cca ctg gtc acc ttt gtc ctc ctc ctc atc      1106
Met Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Leu Ile
      355                      360                      365

tgc att gcc tac tgg gcc atg act gct ctg tac ctg gct aca tcg ggg      1154
Cys Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly
      370                      375                      380

caa ccc cag tat gtg ctc tgg gca tcc aac atc agc tcc ccc ggc tgt      1202
Gln Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys
      385                      390                      395

gag aaa gtg cca ata aat aca tca tgc aac ccc acg gcc cac ctt gtg      1250
Glu Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val
      400                      405                      410                      415

aac tcc tcg tgc cca ggg ctg atg tgc gtc ttc cag ggc tac tca tcc      1298
Asn Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser
      420                      425                      430

aaa ggc cta atc caa cgt tct gtc ttc aat ctg caa atc tat ggg gtc      1346
Lys Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val
      435                      440                      445

ctg ggg ctc ttc tgg acc ctt aac tgg gta ctg gcc ctg ggc caa tgc      1394
Leu Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys
      450                      455                      460

gtc ctc gct gga gcc ttt gcc tcc ttc tac tgg gcc ttc cac aag ccc      1442
Val Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro
      465                      470                      475

cag gac atc cct acc ttc ccc tta atc tct gcc ttc atc cgc aca ctc      1490
Gln Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu
      480                      485                      490                      495

cgt tac cac act ggg tca ttg gca ttt gga gcc ctc atc ctg acc ctt      1538

```

[0025]

Arg Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu	
500 505 510	
gtg cag ata gcc cgg gtc atc ttg gag tat att gac cac aag ctc aga	1586
Val Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg	
515 520 525	
gga gtg cag aac cct gta gcc cgc tgc atc atg tgc tgt ttc aag tgc	1634
Gly Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys	
530 535 540	
tgc ctc tgg tgt ctg gaa aaa ttt atc aag ttc cta aac cgc aat gca	1682
Cys Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala	
545 550 555	
tac atc atg atc gcc atc tac ggg aag aat ttc tgt gtc tca gcc aaa	1730
Tyr Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys	
560 565 570 575	
aat gcg ttc atg cta ctc atg cga aac att gtc agg gtg gtc gtc ctg	1778
Asn Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu	
580 585 590	
gac aaa gtc aca gac ctg ctg ctg ttc ttt ggg aag ctg ctg gtg gtc	1826
Asp Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val	
595 600 605	
gga ggc gtg ggg gtc ctg tcc ttc ttt ttt ttc tcc ggt cgc atc ccg	1874
Gly Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro	
610 615 620	
ggg ctg ggt aaa gac ttt aag agc ccc cac ctc aac tat tac tgg ctg	1922
Gly Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu	
625 630 635	
ccc atc atg acc tcc atc ctg ggg gcc tat gtc atc gcc agc ggc ttc	1970
Pro Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe	
640 645 650 655	
ttc agc gtt ttc ggc atg tgt gtg gac acg ctc ttc ctc tgc ttc ctg	2018
Phe Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu	
660 665 670	
gaa gac ctg gag cgg aac aac ggc tcc ctg gac cgg ccc tac tac atg	2066
Glu Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met	
675 680 685	
tcc aag agc ctt cta aag att ctg ggc aag aag aac gag gcg ccc ccg	2114
Ser Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro	
690 695 700	
gac aac aag aag agg aag aag tga cagctccggc cctgateccag gactgcaccc	2168
Asp Asn Lys Lys Arg Lys Lys *	
705 710	
caacccacc gtccagccat ccaacctcac ttegccttac aggtctccat tttgtggtaa	2228
aaaaaggitt taggccaggc gccgtggctc acgcctgtaa tccaacactt tgagaggctg	2288
aggcggcggg atcacctgag tcaggagttc gagaccagcc tggccaacat ggtgaaacct	2348

[0026]

```

ccgtctctat taaaaatata aaaattagcc gagagtgggtg gcatgcacct gtcacccag 2408
ctactcggga ggctgaggca ggagaatcgc ttgaaccggg gaggcagagg ttgcagttag 2468
cggagatcgc gccactgcac tccaacctgg gtgacagact ctgtctccaa aacaaaacaa 2528
acaaacaaaa agattttatt aaagatattt tgttaactca gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2587

```

<210> 10
 <211> 710
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)... (710)
 <223> 24P4C12 变体 5 的编码序列

<400> 10
 Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys Pro
 1 5 10 15
 Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser Cys
 20 25 30
 Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly Tyr
 35 40 45
 Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln Val
 50 55 60
 Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu Asn
 65 70 75 80
 Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile Leu
 85 90 95
 Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro Thr
 100 105 110
 Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val Gly
 115 120 125
 Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys Asn
 130 135 140
 Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile Thr
 145 150 155 160
 Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala Pro
 165 170 175
 Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala Leu
 180 185 190
 Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly Leu
 195 200 205
 Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu Asp
 210 215 220
 Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala Leu
 225 230 235 240
 Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly Pro
 245 250 255
 Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr Gly
 260 265 270
 Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly Ala
 275 280 285
 Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln Ser
 290 295 300
 Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu Glu
 305 310 315 320
 Ala Ile Leu Leu Leu Val Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg Ile
 325 330 335

[0027]


```

Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met Met
      340                      345                      350
Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Leu Ile Cys
      355                      360                      365
Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly Gln
      370                      375                      380
Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys Glu
      385                      390                      395                      400
Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val Asn
      405                      410                      415
Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser Lys
      420                      425                      430
Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val Leu
      435                      440                      445
Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys Val
      450                      455                      460
Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro Gln
      465                      470                      475                      480
Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu Arg
      485                      490                      495
Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu Val
      500                      505                      510
Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg Gly
      515                      520                      525
Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys Cys
      530                      535                      540
Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala Tyr
      545                      550                      555                      560
Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys Asn
      565                      570                      575
Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu Asp
      580                      585                      590
Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val Gly
      595                      600                      605
Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro Gly
      610                      615                      620
Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu Pro
      625                      630                      635                      640
Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe Phe
      645                      650                      655
Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu Glu
      660                      665                      670
Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met Ser
      675                      680                      685
Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro Asp
      690                      695                      700
Asn Lys Lys Arg Lys Lys
      705                      710

```

```

<210> 11
<211> 2587
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)... (2587)

```

[0028]

<223> 24P4C12 变体 6

<220>

<221> CDS

<222> (6)... (2138)

<400> 11

```

gagcc atg ggg gga aag cag cgg gac gag gat gac gag gcc tac ggg aag 50
      Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys
          1             5             10             15

cca gtc aaa tac gac ccc tcc ttt cga ggc ccc atc aag aac aga agc 98
      Pro Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser
          20             25             30

tgc aca gat gtc atc tgc tgc gtc ctc ttc ctg ctc ttc att cta ggt 146
      Cys Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly
          35             40             45

tac atc gtg gtg ggg att gtg gcc tgg ttg tat gga gac ccc cgg caa 194
      Tyr Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln
          50             55             60

gtc ctc tac ccc agg aac tct act ggg gcc tac tgt ggc atg ggg gag 242
      Val Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu
          65             70             75

aac aaa gat aag ccg tat ctc ctg tac ttc aac atc ttc agc tgc atc 290
      Asn Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile
          80             85             90             95

ctg tcc agc aac atc atc tca gtt gct gag aac ggc cta cag tgc ccc 338
      Leu Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro
          100            105            110

aca ccc cag gtg tgt gtg tcc tcc tgc ccg gag gac cca tgg act gtg 386
      Thr Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val
          115            120            125

gga aaa aac gag ttc tca cag act gtt ggg gaa gtc ttc tat aca aaa 434
      Gly Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys
          130            135            140

aac agg aac ttt tgt ctg cca ggg gta ccc tgg aat atg acg gtg atc 482
      Asn Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile
          145            150            155

aca agc ctg caa cag gaa ctc tgc ccc agt ttc ctc ctc ccc tct gct 530
      Thr Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala
          160            165            170            175

cca gct ctg ggg cgc tgc ttt cca tgg acc aac gtt act cca ccg gcg 578
      Pro Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala
          180            185            190

ctc cca ggg atc acc aat gac acc acc ata cag cag ggg atc agc ggt 626
      Leu Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly
          195            200            205

```

[0029]

ctt att gac agc ctc aat gcc cga gac atc agt gtt aag atc ttt gaa Leu Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu 210 215 220	674
gat ttt gcc cag tcc tgg tat tgg att ctt gtt gcc ctg ggg gtg gct Asp Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala 225 230 235	722
ctg gtc ttg agc cta ctg ttt atc ttg ctt ctg cgc ctg gtg gct ggg Leu Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly 240 245 250 255	770
ccc ctg gtg ctg gtg ctg atc ctg gga gtg ctg ggc gtg ctg gca tac Pro Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr 260 265 270	818
ggc atc tac tac tgc tgg gag gag tac cga gtg ctg cgg gac aag ggc Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly 275 280 285	866
gcc tcc atc tcc cag ctg ggt ttc acc acc aac ctc agt gcc tac cag Ala Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln 290 295 300	914
agc gtg cag gag acc tgg ctg gcc gcc ctg atc gtg ttg gcg gtg ctt Ser Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu 305 310 315	962
gaa gcc atc ctg ctg ctg atg ctc atc ttc ctg cgg cag cgg att cgt Glu Ala Ile Leu Leu Leu Met Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg 320 325 330 335	1010
att gcc atc gcc ctc ctg aag gag gcc agc aag gct gtg gga cag atg Ile Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met 340 345 350	1058
atg tct acc atg ttc tac cca ctg gtc acc ttt gtc ctc ctc ctc atc Met Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Leu Ile 355 360 365	1106
tgc att gcc tac tgg gcc atg act gct ctg tac ctg gct aca tcg ggg Cys Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly 370 375 380	1154
caa ccc cag tat gtg ctc tgg gca tcc aac atc agc tcc ccc ggc tgt Gln Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys 385 390 395	1202
gag aaa gtg cca ata aat aca tca tgc aac ccc acg gcc cac ctt gtg Glu Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val 400 405 410 415	1250
aac tcc tcg tgc cca ggg ctg atg tgc gtc ttc cag ggc tac tca tcc Asn Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser 420 425 430	1298
aaa ggc cta atc cca cgt tct gtc ttc aat ctg caa atc tat ggg gtc	1346

[0030]

Lys Gly Leu Ile Pro Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val	
435 440 445	
ctg ggg ctc ttc tgg acc ctt aac tgg gta ctg gcc ctg ggc caa tgc	1394
Leu Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys	
450 455 460	
gtc ctc gct gga gcc ttt gcc tcc ttc tac tgg gcc ttc cac aag ccc	1442
Val Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro	
465 470 475	
cag gac atc cct acc ttc ccc tta atc tct gcc ttc atc cgc aca ctc	1490
Gln Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu	
480 485 490 495	
cgt tac cac act ggg tca ttg gca ttt gga gcc ctc atc ctg acc ctt	1538
Arg Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu	
500 505 510	
gtg cag ata gcc cgg gtc atc ttg gag tat att gac cac aag ctc aga	1586
Val Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg	
515 520 525	
gga gtg cag aac cct gta gcc cgc tgc atc atg tgc tgt ttc aag tgc	1634
Gly Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys	
530 535 540	
tgc ctc tgg tgt ctg gaa aaa ttt atc aag ttc cta aac cgc aat gca	1682
Cys Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala	
545 550 555	
tac atc atg atc gcc atc tac ggg aag aat ttc tgt gtc tca gcc aaa	1730
Tyr Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys	
560 565 570 575	
aat gcg ttc atg cta ctc atg cga aac att gtc agg gtg gtc gtc ctg	1778
Asn Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu	
580 585 590	
gac aaa gtc aca gac ctg ctg ctg ttc ttt ggg aag ctg ctg gtg gtc	1826
Asp Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val	
595 600 605	
gga ggc gtg ggg gtc ctg tcc ttc ttt ttt ttc tcc ggt cgc atc ccg	1874
Gly Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro	
610 615 620	
ggg ctg ggt aaa gac ttt aag agc ccc cac ctc aac tat tac tgg ctg	1922
Gly Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu	
625 630 635	
ccc atc atg acc tcc atc ctg ggg gcc tat gtc atc gcc agc ggc ttc	1970
Pro Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe	
640 645 650 655	
ttc agc gtt ttc ggc atg tgt gtg gac acg ctc ttc ctc tgc ttc ctg	2018
Phe Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu	
660 665 670	

[0031]

gaa gac ctg gag cgg aac aac ggc tcc ctg gac cgg ccc tac tac atg 2066
 Glu Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met
 675 680 685

tcc aag agc ctt cta aag att ctg ggc aag aag aac gag gcg ccc ccg 2114
 Ser Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro
 690 695 700

gac aac aag aag agg aag aag tga cagctccggc cctgatccag gactgcaccc 2168
 Asp Asn Lys Lys Arg Lys Lys *
 705 710

cacccccacc gtccagccat ccaacctcac ttgccttac aggtctccat tttgtggtaa 2228
 aaaaaggttt taggccaggc gccgtggctc acgcctgtaa tccaacactt tgagaggctg 2288
 aggcgggcgg atcacctgag tcaggagttc gagaccagcc tggccaacat ggtgaaacct 2348
 ccgtctctat taaaaataca aaaattagcc gagagtgggt gcattgcacct gtcattccag 2408
 ctactcggga ggctgaggca ggagaatcgc ttgaaccogg gaggcagagg ttgcagttag 2468
 ccgagatcgc gccactgcac tccaacctgg gtgacagact ctgtctccaa aacaaaacaa 2528
 acaaacaaaa agattttatt aaagatattt tgttaactca gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2587

<210> 12

<211> 710

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (710)

<223> 24P4C12 变体 6 的编码序列

<400> 12

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

[0032]

```

Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu Asp
 210                215                220
Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala Leu
225                230                235                240
Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly Pro
                245                250                255
Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr Gly
                260                265                270
Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly Ala
                275                280                285
Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln Ser
                290                295                300
Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu Glu
305                310                315                320
Ala Ile Leu Leu Leu Met Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg Ile
                325                330                335
Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met Met
                340                345                350
Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Leu Ile Cys
                355                360                365
Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly Gln
                370                375                380
Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys Glu
385                390                395                400
Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val Asn
                405                410                415
Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser Lys
                420                425                430
Gly Leu Ile Pro Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val Leu
                435                440                445
Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys Val
                450                455                460
Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro Gln
465                470                475                480
Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu Arg
                485                490                495
Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu Val
                500                505                510
Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg Gly
                515                520                525
Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys Cys
                530                535                540
Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala Tyr
545                550                555                560
Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys Asn
                565                570                575
Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu Asp
                580                585                590
Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val Gly
                595                600                605
Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro Gly
                610                615                620
Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu Pro
625                630                635                640
Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe Phe
                645                650                655
Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu Glu
                660                665                670

```

[0033]

Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met Ser
675 680 685
Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro Asp
690 695 700
Asn Lys Lys Arg Lys Lys
705 710

<210> 13
<211> 2251
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)... (2251)
<223> 24P4C12 变体 7

<220>
<221> CDS
<222> (6)... (1802)

<400> 13
gagcc atg ggg gga aag cag cgg gac gag gat gac gag gcc tac ggg aag 50
Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys
1 5 10 15
cca gtc aaa tac gac ccc tcc ttt cga ggc ccc atc aag aac aga agc 98
Pro Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser
20 25 30
tgc aca gat gtc atc tgc tgc gtc ctc ttc ctg ctc ttc att cta ggt 146
Cys Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly
35 40 45
tac atc gtg gtg ggg att gtg gcc tgg ttg tat gga gac ccc cgg caa 194
Tyr Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln
50 55 60
gtc ctc tac ccc agg aac tct act ggg gcc tac tgt ggc atg ggg gag 242
Val Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu
65 70 75
aac aaa gat aag ccg tat ctc ctg tac ttc aac atc ttc agc tgc atc 290
Asn Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile
80 85 90 95
ctg tcc agc aac atc atc tca gtt gct gag aac ggc cta cag tgc ccc 338
Leu Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro
100 105 110
aca ccc cag gtg tgt gtg tcc tcc tgc ccg gag gac cca tgg act gtg 386
Thr Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val
115 120 125
gga aaa aac gag ttc tca cag act gtt ggg gaa gtc ttc tat aca aaa 434
Gly Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys
130 135 140

[0034]

```

aac agg aac ttt tgt ctg cca ggg gta ccc tgg aat atg acg gtg atc 482
Asn Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile
145 150 155

aca agc ctg caa cag gaa ctc tgc ccc agt ttc ctc ctc ccc tct gct 530
Thr Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala
160 165 170 175

cca gct ctg ggg cgc tgc ttt cca tgg acc aac gtt act cca ccg gcg 578
Pro Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala
180 185 190

ctc cca ggg atc acc aat gac acc acc ata cag cag ggg atc agc ggt 626
Leu Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly
195 200 205

ctt att gac agc ctc aat gcc cga gac atc agt gtt aag atc ttt gaa 674
Leu Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu
210 215 220

gat ttt gcc cag tcc tgg tat tgg att ctt gtg gct gtg gga cag atg 722
Asp Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Val Gly Gln Met
225 230 235

atg tct acc atg ttc tac cca ctg gtc acc ttt gtc ctc ctc ctc atc 770
Met Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Leu Ile
240 245 250 255

tgc att gcc tac tgg gcc atg act gct ctg tac ctg gct aca tcg ggg 818
Cys Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly
260 265 270

caa ccc cag tat gtg ctc tgg gca tcc aac atc agc tcc ccc ggc tgt 866
Gln Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys
275 280 285

gag aaa gtg cca ata aat aca tca tgc aac ccc acg gcc cac ctt gtg 914
Glu Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val
290 295 300

aac tcc tcg tgc cca ggg ctg atg tgc gtc ttc cag ggc tac tca tcc 962
Asn Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser
305 310 315

aaa ggc cta atc caa cgt tct gtc ttc aat ctg caa atc tat ggg gtc 1010
Lys Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val
320 325 330 335

ctg ggg ctc ttc tgg acc ctt aac tgg gta ctg gcc ctg ggc caa tgc 1058
Leu Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys
340 345 350

gtc ctc gct gga gcc ttt gcc tcc ttc tac tgg gcc ttc cac aag ccc 1106
Val Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro
355 360 365

cag gac atc cct acc ttc ccc tta atc tct gcc ttc atc cgc aca ctc 1154

```

[0035]

Gln Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu 370 375 380	
cgt tac cac act ggg tca ttg gca ttt gga gcc ctc atc ctg acc ctt Arg Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu 385 390 395	1202
gtg cag ata gcc cgg gtc atc ttg gag tat att gac cac aag ctc aga Val Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg 400 405 410 415	1250
gga gtg cag aac cct gta gcc cgc tgc atc atg tgc tgt ttc aag tgc Gly Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys 420 425 430	1298
tgc ctc tgg tgt ctg gaa aaa ttt atc aag ttc cta aac cgc aat gca Cys Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala 435 440 445	1346
tac atc atg atc gcc atc tac ggg aag aat ttc tgt gtc tca gcc aaa Tyr Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys 450 455 460	1394
aat gcg ttc atg cta ctc atg cga aac att gtc agg gtg gtc gtc ctg Asn Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu 465 470 475	1442
gac aaa gtc aca gac ctg ctg ctg ttc ttt ggg aag ctg ctg gtg gtc Asp Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val 480 485 490 495	1490
gga ggc gtg ggg gtc ctg tcc ttc ttt ttt ttc tcc ggt cgc atc ccg Gly Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro 500 505 510	1538
ggg ctg ggt aaa gac ttt aag agc ccc cac ctc aac tat tac tgg ctg Gly Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu 515 520 525	1586
ccc atc atg acc tcc atc ctg ggg gcc tat gtc atc gcc agc ggc ttc Pro Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe 530 535 540	1634
ttc agc gtt ttc ggc atg tgt gtg gac acg ctc ttc ctc tgc ttc ctg Phe Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu 545 550 555	1682
gaa gac ctg gag cgg aac aac ggc tcc ctg gac cgg ccc tac tac atg Glu Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met 560 565 570 575	1730
tcc aag agc ctt cta aag att ctg ggc aag aag aac gag gcg ccc ccg Ser Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro 580 585 590	1778
gac aac aag aag agg aag aag tga cagctccggc cctgatccag gactgcaccc Asp Asn Lys Lys Arg Lys Lys *	1832
595	

[0036]

```

caccgccacc gtccagccat ccaacctcac ttgccttac aggtctccat tttgtgtaa 1892
aaaaagggtt taggccaggc gccgtggctc acgcctglta tccaacactt tgagaggctg 1952
aggcggggcg atcacctgag tcaggagtgc gagaccagcc tggccaacat ggtgaaacct 2012
ccgtctctat taaaaataca aaaattagcc gagagtgggt gcatgcacct gtcateccag 2072
ctactcggga ggctgaggca ggagaatcgc ttgaaccogg gaggcagagg ttgcagttag 2132
ccgagatcgc gccactgcac tccaacctgg gtgacagact ctgtctccaa aacaaaaaaa 2192
acaacaaaaa agatitttatt aaagatatit tgttaactca gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2251

```

<210> 14
 <211> 598
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <221> 变体
 <222> (1)... (598)
 <223> 24P4C12 变体 7 的编码序列

<400> 14
 Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys Pro
 1 5 10 15
 Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser Cys
 20 25 30
 Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly Tyr
 35 40 45
 Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln Val
 50 55 60
 Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu Asn
 65 70 75 80
 Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile Leu
 85 90 95
 Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro Thr
 100 105 110
 Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val Gly
 115 120 125
 Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys Asn
 130 135 140
 Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile Thr
 145 150 155 160
 Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala Pro
 165 170 175
 Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala Leu
 180 185 190
 Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly Leu
 195 200 205
 Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu Asp
 210 215 220
 Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Val Gly Gln Met Met
 225 230 235 240
 Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Leu Ile Cys
 245 250 255
 Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly Gln
 260 265 270
 Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys Glu
 275 280 285
 Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val Asn
 290 295 300

[0037]

```

Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser Lys
305                      310                      315                      320
Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val Leu
                      325                      330                      335
Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys Val
                      340                      345                      350
Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro Gln
                      355                      360                      365
Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu Arg
370                      375                      380
Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu Val
385                      390                      395                      400
Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg Gly
                      405                      410                      415
Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys Cys
420                      425                      430
Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala Tyr
435                      440                      445
Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys Asn
450                      455                      460
Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu Asp
465                      470                      475                      480
Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val Gly
                      485                      490                      495
Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro Gly
500                      505                      510
Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu Pro
515                      520                      525
Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe Phe
530                      535                      540
Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu Glu
545                      550                      555                      560
Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met Ser
565                      570                      575
Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro Asp
580                      585                      590
Asn Lys Lys Arg Lys Lys
595

```

```

<210> 15
<211> 2623
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)... (2623)
<223> 24P4C12 变体 8

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (6)... (2174)

```

```

<400> 15
gagcc atg ggg gga aag cag cgg gac gag gat gac gag gcc tac ggg aag 50
Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys
1 5 10 15

```

[0038]

cca gtc aaa tac gac ccc tcc ttt cga ggc ccc atc aag aac aga agc	98
Pro Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser	
20 25 30	
tgc aca gat gtc atc tgc tgc gtc ctc ttc ctg ctc ttc att cta ggt	146
Cys Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly	
35 40 45	
tac atc gtg gtg ggg att gtg gcc tgg ttg tat gga gac ccc cgg caa	194
Tyr Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln	
50 55 60	
gtc ctc tac ccc agg aac tct act ggg gcc tac tgt ggc atg ggg gag	242
Val Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu	
65 70 75	
aac aaa gat aag ccg tat ctc ctg tac ttc aac atc ttc agc tgc atc	290
Asn Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile	
80 85 90 95	
ctg tcc agc aac atc atc tca gtt gct gag aac ggc cta cag tgc ccc	338
Leu Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro	
100 105 110	
aca ccc cag gtg tgt gtg tcc tcc tgc ccg gag gac cca tgg act gtg	386
Thr Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val	
115 120 125	
gga aaa aac gag ttc tca cag act gtt ggg gaa gtc ttc tat aca aaa	434
Gly Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys	
130 135 140	
aac agg aac ttt tgt ctg cca ggg gta ccc tgg aat atg acg gtg atc	482
Asn Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile	
145 150 155	
aca agc ctg caa cag gaa ctc tgc ccc agt ttc ctc ctc ccc tct get	530
Thr Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala	
160 165 170 175	
cca gct ctg ggg cgc tgc ttt cca tgg acc aac gtt act cca ccg gcg	578
Pro Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala	
180 185 190	
ctc cca ggg atc acc aat gac acc acc ata cag cag ggg atc agc ggt	626
Leu Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly	
195 200 205	
ctt att gac agc ctc aat gcc cga gac atc agt gtt aag atc ttt gaa	674
Leu Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu	
210 215 220	
gat ttt gcc cag tcc tgg tat tgg att ctt gtt gcc ctg ggg gtg gct	722
Asp Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala	
225 230 235	
ctg gtc ttg agc cta ctg ttt atc ttg ctt ctg cgc ctg gtg gct ggg	770

[0039]

[0040]

cag gac atc cct acc ttc ccc tta atc tct gcc ttc atc cgc aca ctc Gln Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu 480 485 490 495	1490
cgt tac cac act ggg tca ttg gca ttt gga gcc ctc atc ctg acc ctt Arg Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu 500 505 510	1538
gtg cag ata gcc cgg gtc atc ttg gag tat att gac cac aag ctc aga Val Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg 515 520 525	1586
gga gtg cag aac cct gta gcc cgc tgc atc atg tgc tgt ttc aag tgc Gly Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys 530 535 540	1634
tgc ctc tgg tgt ctg gaa aaa ttt atc aag ttc cta aac cgc aat gca Cys Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala 545 550 555	1682
tac atc atg atc gcc atc tac ggg aag aat ttc tgt gtc tca gcc aaa Tyr Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys 560 565 570 575	1730
aat gcg ttc atg cta ctc atg cga aac att gtc agg gtg gtc gtc ctg Asn Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu 580 585 590	1778
gac aaa gtc aca gac ctg ctg ctg ttc ttt ggg aag ctg ctg gtg gtc Asp Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val 595 600 605	1826
gga ggc gtg ggg gtc ctg tcc ttc ttt ttt ttc tcc ggt cgc atc ccg Gly Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro 610 615 620	1874
ggg ctg ggt aaa gac ttt aag agc ccc cac ctc aac tat tac tgg ctg Gly Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu 625 630 635	1922
ccc atc atg agg aac cca ata acc cca acg ggt cat gtc ttc cag acc Pro Ile Met Arg Asn Pro Ile Thr Pro Thr Gly His Val Phe Gln Thr 640 645 650 655	1970
tcc atc ctg ggg gcc tat gtc atc gcc agc ggc ttc ttc agc gtt ttc Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe Phe Ser Val Phe 660 665 670	2018
ggc atg tgt gtg gac acg ctc ttc ctc tgc ttc ctg gaa gac ctg gag Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu Glu Asp Leu Glu 675 680 685	2066
cgg aac aac ggc tcc ctg gac cgg ccc tac tac atg tcc aag agc ctt Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met Ser Lys Ser Leu 690 695 700	2114
cta aag att ctg ggc aag aag aac gag gcg ccc ccg gac aac aag aag	2162

[0041]

```

Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro Asp Asn Lys Lys
705                      710                      715

agg aag aag tga cagctccggc cctgatccag gactgcaccc cacccccacc      2214
Arg Lys Lys *
720

gtccagccat ccaacctcac ttgccttac aggtctccat tttgtggtaa aaaaagggtt 2274
taggccaggc gccgtggctc acgcctgtaa tccaacactt tgagaggctg agggggggcg 2334
atcacctgag tcaggagttc gagaccagcc tggccaacat ggtgaaacct ccgtctctat 2394
taaaaataca aaaattagcc gagagtgggtg gcatgcacct gtcatcccag ctactcggga 2454
ggctgaggca ggagaatcgc ttgaaccggg gaggcagagg ttgcagttag ccgagatcgc 2514
gccactgcac tccaacctgg gtgacagact ctgtctccaa aacaaaacaa acaaacaaaa 2574
agattttatt aaagatattt tgtaactca gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      2623

<210> 16
<211> 722
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)... (722)
<223> 24P4C12 变体 8 的编码序列

<400> 16
Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys Pro
1          5          10          15
Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser Cys
20        25        30
Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly Tyr
35        40        45
Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln Val
50        55        60
Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu Asn
65        70        75        80
Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile Leu
85        90        95
Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro Thr
100       105       110
Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val Gly
115       120       125
Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys Asn
130       135       140
Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile Thr
145       150       155       160
Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala Pro
165       170       175
Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala Leu
180       185       190
Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly Leu
195       200       205
Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu Asp
210       215       220
Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala Leu
225       230       235       240
Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly Pro
245       250       255

```

[0042]

```

Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr Gly
      260              265              270
Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly Ala
      275              280              285
Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln Ser
      290              295              300
Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu Glu
      305              310              315              320
Ala Ile Leu Leu Leu Met Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg Ile
      325              330              335
Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met Met
      340              345              350
Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Ile Cys
      355              360              365
Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Leu Ala Thr Ser Gly Gln
      370              375              380
Pro Gln Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly Cys Glu
      385              390              395              400
Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu Val Asn
      405              410              415
Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser Ser Lys
      420              425              430
Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly Val Leu
      435              440              445
Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln Cys Val
      450              455              460
Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys Pro Gln
      465              470              475              480
Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr Leu Arg
      485              490              495
Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr Leu Val
      500              505              510
Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu Arg Gly
      515              520              525
Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys Cys Cys
      530              535              540
Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn Ala Tyr
      545              550              555              560
Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala Lys Asn
      565              570              575
Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val Leu Asp
      580              585              590
Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val Val Gly
      595              600              605
Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile Pro Gly
      610              615              620
Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp Leu Pro
      625              630              635              640
Ile Met Arg Asn Pro Ile Thr Pro Thr Gly His Val Phe Gln Thr Ser
      645              650              655
Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly Phe Phe Ser Val Phe Gly
      660              665              670
Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe Leu Glu Asp Leu Glu Arg
      675              680              685
Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr Met Ser Lys Ser Leu Leu
      690              695              700
Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro Pro Asp Asn Lys Lys Arg
      705              710              715              720

```

[0043]

Lys Lys

<210> 17
 <211> 2593
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)... (2593)
 <223> 24P4C12 变体 9

<220>
 <221> CDS
 <222> (6)... (2144)

<400> 17
 gagcc atg ggg gga aag cag cgg gac gag gat gac gag gcc tac ggg aag 50
 Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys
 1 5 10 15

cca gtc aaa tac gac ccc tcc ttt cga ggc ccc atc aag aac aga agc 98
 Pro Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser
 20 25 30

tgc aca gat gtc atc tgc tgc gtc ctc ttc ctg ctc ttc att cta ggt 146
 Cys Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly
 35 40 45

tac atc gtg gtg ggg att gtg gcc tgg ttg tat gga gac ccc cgg caa 194
 Tyr Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln
 50 55 60

gtc ctc tac ccc agg aac tct act ggg gcc tac tgt ggc atg ggg gag 242
 Val Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu
 65 70 75

aac aaa gat aag ccg tat ctc ctg tac ttc aac atc ttc agc tgc atc 290
 Asn Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile
 80 85 90 95

ctg tcc agc aac atc atc tca gtt gct gag aac ggc cta cag tgc ccc 338
 Leu Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro
 100 105 110

aca ccc cag gtg tgt gtg tcc tcc tgc ccg gag gac cca tgg act gtg 386
 Thr Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val
 115 120 125

gga aaa aac gag ttc tca cag act gtt ggg gaa gtc ttc tat aca aaa 434
 Gly Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys
 130 135 140

aac agg aac ttt tgt ctg cca ggg gta ccc tgg aat atg acg gtg atc 482
 Asn Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile
 145 150 155

[0044]

aca agc ctg caa cag gaa ctc tgc ccc agt ttc ctc ctc ccc tct gct Thr Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala 160 165 170 175	530
cca gct ctg ggg cgc tgc ttt cca tgg acc aac gtt act cca ccg gcg Pro Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala 180 185 190	578
ctc cca ggg atc acc aat gac acc acc ata cag cag ggg atc agc ggt Leu Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly 195 200 205	626
ctt att gac agc ctc aat gcc cga gac atc agt gtt aag atc ttt gaa Leu Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu 210 215 220	674
gat ttt gcc cag tcc tgg tat tgg att ctt gtt gcc ctg ggg gtg gct Asp Phe Ala Gln Ser Trp Tyr Trp Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala 225 230 235	722
ctg gtc ttg agc cta ctg ttt atc ttg ctt ctg cgc ctg gtg gct ggg Leu Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly 240 245 250 255	770
ccc ctg gtg ctg glg ctg atc ctg gga gtg ctg ggc gtg ctg gca tac Pro Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr 260 265 270	818
ggc atc tac tac tgc tgg gag gag tac cga gtg ctg cgg gac aag ggc Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly 275 280 285	866
gcc tcc atc tcc cag ctg ggt ttc acc acc aac ctc agt gcc tac cag Ala Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln 290 295 300	914
agc gtg cag gag acc tgg ctg gcc gcc ctg atc gtg ttg gcg gtg ctt Ser Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu 305 310 315	962
gaa gcc atc ctg ctg ctg atg ctc atc ttc ctg cgg cag cgg att cgt Glu Ala Ile Leu Leu Leu Met Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg 320 325 330 335	1010
att gcc atc gcc ctc ctg aag gag gcc agc aag gct gtg gga cag atg Ile Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met 340 345 350	1058
atg tct acc atg ttc tac cca ctg gtc acc ttt gtc ctc ctc ctc atc Met Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Leu Ile 355 360 365	1106
tgc att gcc tac tgg gcc atg act gct ctg tat cct ctg ccc acg cag Cys Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Pro Leu Pro Thr Gln 370 375 380	1154
cca gcc act ctt gga tat gtg ctc tgg gca tcc aac atc agc tcc ccc	1202

[0045]

Pro Ala Thr Leu Gly Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro	
385 390 395	
ggc tgt gag aaa gtg cca ata aat aca tca tgc aac ccc acg gcc cac	1250
Gly Cys Glu Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His	
400 405 410 415	
ctt gtg aac tcc tcg tgc cca ggg ctg atg tgc gtc ttc cag gcc tac	1298
Leu Val Asn Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr	
420 425 430	
tca tcc aaa ggc cta atc caa cgt tct gtc ttc aat ctg caa atc tat	1346
Ser Ser Lys Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr	
435 440 445	
ggg glc ctg ggg ctc ttc tgg acc ctt aac tgg gta ctg gcc ctg gcc	1394
Gly Val Leu Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly	
450 455 460	
caa tgc gtc ctc gct gga gcc ttt gcc tcc ttc tac tgg gcc ttc cac	1442
Gln Cys Val Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His	
465 470 475	
aag ccc cag gac atc cct acc ttc ccc tta atc tct gcc ttc atc cgc	1490
Lys Pro Gln Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg	
480 485 490 495	
aca ctc cgt tac cac act ggg tca ttg gca ttt gga gcc ctc atc ctg	1538
Thr Leu Arg Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu	
500 505 510	
acc ctt gtg cag ata gcc cgg gtc atc ttg gag tat att gac cac aag	1586
Thr Leu Val Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys	
515 520 525	
ctc aga gga gtg cag aac cct gta gcc cgc tgc atc atg tgc tgt ttc	1634
Leu Arg Gly Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe	
530 535 540	
aag tgc tgc ctc tgg tgt ctg gaa aaa ttt atc aag ttc cta aac cgc	1682
Lys Cys Cys Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg	
545 550 555	
aat gca tac atc atg atc gcc atc tac ggg aag aat ttc tgt gtc tca	1730
Asn Ala Tyr Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser	
560 565 570 575	
gcc aaa aat gcg ttc atg cta ctc atg cga aac att gtc agg gtg gtc	1778
Ala Lys Asn Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val	
580 585 590	
gtc ctg gac aaa gtc aca gac ctg ctg ctg ttc ttt ggg aag ctg ctg	1826
Val Leu Asp Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu	
595 600 605	
gtg gtc gga ggc gtg ggg gtc ctg tcc ttc ttt ttt ttc tcc ggt cgc	1874
Val Val Gly Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg	
610 615 620	

[0046]

```

atc ccg ggg ctg ggt aaa gac ttt aag agc ccc cac ctc aac tat tac 1922
Ile Pro Gly Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr
      625              630              635

tgg ctg ccc atc atg acc tcc atc ctg ggg gcc tat gtc atc gcc age 1970
Trp Leu Pro Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser
640              645              650              655

ggc ttc ttc agc gtt ttc ggc atg tgt gtg gac acg ctc ttc ctc tgc 2018
Gly Phe Phe Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys
      660              665              670

ttc ctg gaa gac ctg gag cgg aac aac ggc tcc ctg gac cgg ccc tac 2066
Phe Leu Glu Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr
      675              680              685

tac atg tcc aag agc ctt cta aag att ctg ggc aag aag aac gag gcg 2114
Tyr Met Ser Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala
      690              695              700

ccc ccg gac aac aag aag agg aag aag tga cagctccggc cctgatccag 2164
Pro Pro Asp Asn Lys Lys Arg Lys Lys *
      705              710

gactgcaccc cacccccacc gtccagccat ccaacctcac ttgccttac aggtctccat 2224
tttgtggtaa aaaaagggtt taggccaggc gccglggctc acgcctgtaa tccaacactt 2284
tgagaggctg aggcgggagg atcacclgag tcaggagttc gagaccagcc tggccaacat 2344
ggtgaaacct ccgtctctat taaaaataca aaaattagcc gagagtgggt gcatgcacct 2404
gtcatccag ctactcggga ggctgaggca ggagaatcgc ttgaaccagg gaggcagagg 2464
ttgcagttag ccgagatcgc gccactgcac tccaacctgg gtgacagact ctgtctccaa 2524
aacaaaacaa acaaacaaaa agatitttatt aaagatatit tgtaactca gtaaaaaaaa 2584
aaaaaaaaa 2593

<210> 18
<211> 712
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)... (712)
<223> 24P4C12 变体 9 的编码序列

<400> 18
Met Gly Gly Lys Gln Arg Asp Glu Asp Asp Glu Ala Tyr Gly Lys Pro
 1              5              10              15
Val Lys Tyr Asp Pro Ser Phe Arg Gly Pro Ile Lys Asn Arg Ser Cys
      20              25              30
Thr Asp Val Ile Cys Cys Val Leu Phe Leu Leu Phe Ile Leu Gly Tyr
      35              40              45
Ile Val Val Gly Ile Val Ala Trp Leu Tyr Gly Asp Pro Arg Gln Val
      50              55              60
Leu Tyr Pro Arg Asn Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Met Gly Glu Asn
65              70              75              80
Lys Asp Lys Pro Tyr Leu Leu Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Cys Ile Leu
      85              90              95
Ser Ser Asn Ile Ile Ser Val Ala Glu Asn Gly Leu Gln Cys Pro Thr

```

[0047]

100	105	110
Pro Gln Val Cys Val Ser Ser Cys	Pro Glu Asp Pro Trp Thr Val Gly	
115	120	125
Lys Asn Glu Phe Ser Gln Thr Val Gly Glu Val Phe Tyr Thr Lys Asn		
130	135	140
Arg Asn Phe Cys Leu Pro Gly Val Pro Trp Asn Met Thr Val Ile Thr		
145	150	155
Ser Leu Gln Gln Glu Leu Cys Pro Ser Phe Leu Leu Pro Ser Ala Pro		
165	170	175
Ala Leu Gly Arg Cys Phe Pro Trp Thr Asn Val Thr Pro Pro Ala Leu		
180	185	190
Pro Gly Ile Thr Asn Asp Thr Thr Ile Gln Gln Gly Ile Ser Gly Leu		
195	200	205
Ile Asp Ser Leu Asn Ala Arg Asp Ile Ser Val Lys Ile Phe Glu Asp		
210	215	220
Phe Ala Gln Ser Trp Trp Tyr Ile Leu Val Ala Leu Gly Val Ala Leu		
225	230	235
Val Leu Ser Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Arg Leu Val Ala Gly Pro		
245	250	255
Leu Val Leu Val Leu Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Leu Ala Tyr Gly		
260	265	270
Ile Tyr Tyr Cys Trp Glu Glu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Lys Gly Ala		
275	280	285
Ser Ile Ser Gln Leu Gly Phe Thr Thr Asn Leu Ser Ala Tyr Gln Ser		
290	295	300
Val Gln Glu Thr Trp Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Ala Val Leu Glu		
305	310	315
Ala Ile Leu Leu Leu Met Leu Ile Phe Leu Arg Gln Arg Ile Arg Ile		
325	330	335
Ala Ile Ala Leu Leu Lys Glu Ala Ser Lys Ala Val Gly Gln Met Met		
340	345	350
Ser Thr Met Phe Tyr Pro Leu Val Thr Phe Val Leu Leu Leu Ile Cys		
355	360	365
Ile Ala Tyr Trp Ala Met Thr Ala Leu Tyr Pro Leu Pro Thr Gln Pro		
370	375	380
Ala Thr Leu Gly Tyr Val Leu Trp Ala Ser Asn Ile Ser Ser Pro Gly		
385	390	395
Cys Glu Lys Val Pro Ile Asn Thr Ser Cys Asn Pro Thr Ala His Leu		
405	410	415
Val Asn Ser Ser Cys Pro Gly Leu Met Cys Val Phe Gln Gly Tyr Ser		
420	425	430
Ser Lys Gly Leu Ile Gln Arg Ser Val Phe Asn Leu Gln Ile Tyr Gly		
435	440	445
Val Leu Gly Leu Phe Trp Thr Leu Asn Trp Val Leu Ala Leu Gly Gln		
450	455	460
Cys Val Leu Ala Gly Ala Phe Ala Ser Phe Tyr Trp Ala Phe His Lys		
465	470	475
Pro Gln Asp Ile Pro Thr Phe Pro Leu Ile Ser Ala Phe Ile Arg Thr		
485	490	495
Leu Arg Tyr His Thr Gly Ser Leu Ala Phe Gly Ala Leu Ile Leu Thr		
500	505	510
Leu Val Gln Ile Ala Arg Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp His Lys Leu		
515	520	525
Arg Gly Val Gln Asn Pro Val Ala Arg Cys Ile Met Cys Cys Phe Lys		
530	535	540
Cys Cys Leu Trp Cys Leu Glu Lys Phe Ile Lys Phe Leu Asn Arg Asn		
545	550	555
Ala Tyr Ile Met Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Asn Phe Cys Val Ser Ala		

[0048]

```

                    565                    570                    575
Lys Asn Ala Phe Met Leu Leu Met Arg Asn Ile Val Arg Val Val Val
                    580                    585                    590
Leu Asp Lys Val Thr Asp Leu Leu Leu Phe Phe Gly Lys Leu Leu Val
                    595                    600                    605
Val Gly Gly Val Gly Val Leu Ser Phe Phe Phe Phe Ser Gly Arg Ile
                    610                    615                    620
Pro Gly Leu Gly Lys Asp Phe Lys Ser Pro His Leu Asn Tyr Tyr Trp
625                    630                    635                    640
Leu Pro Ile Met Thr Ser Ile Leu Gly Ala Tyr Val Ile Ala Ser Gly
                    645                    650                    655
Phe Phe Ser Val Phe Gly Met Cys Val Asp Thr Leu Phe Leu Cys Phe
                    660                    665                    670
Leu Glu Asp Leu Glu Arg Asn Asn Gly Ser Leu Asp Arg Pro Tyr Tyr
                    675                    680                    685
Met Ser Lys Ser Leu Leu Lys Ile Leu Gly Lys Lys Asn Glu Ala Pro
                    690                    695                    700
Pro Asp Asn Lys Lys Arg Lys Lys
705                    710

```

<210> 19
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)... (1410)
 <223> Ha5-1(5)2.1 的重链

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (1410)

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)... (57)
 <223> 前导序列

<220>
 <221> SITE
 <222> (58)... (429)
 <223> 重链可变区

<220>
 <221> SITE
 <222> (430)... (1410)
 <223> 人 IgG2 恒定区

```

<400> 19
atg gag ttt ggg ctg acc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48
Met Glu Phe Gly Leu Thr Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
   1               5               10               15

gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
   20               25               30

```

[0049]

cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc	144
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
35 40 45	
agt agt tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg	192
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg gtg gca gtt atg tca tat gat gga agt aaa aaa ttc tat aca	240
Glu Trp Val Ala Val Met Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Phe Tyr Thr	
65 70 75 80	
gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac	288
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn	
85 90 95	
acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg	336
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gcg aga gat ggg ggt gac tat gtc cgc tac cac tac tac	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Asp Tyr Val Arg Tyr His Tyr Tyr	
115 120 125	
ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gcc	432
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala	
130 135 140	
tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg agc	480
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser	
145 150 155 160	
acc tcc gag agc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc	528
Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe	
165 170 175	
ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gct ctg acc agc ggc	576
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly	
180 185 190	
gtg cac acc ttc cca gct gtc cta cag tcc tca gga etc tac tcc etc	624
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu	
195 200 205	
agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc aac ttc ggc acc cag acc tac	672
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr	
210 215 220	
acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aca	720
Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr	
225 230 235 240	
gtt gag cgc aaa tgt tgt gtc gag tgc cca ccg tgc cca gca cca cct	768
Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro	
245 250 255	
gtg gca gga ccg tca gtc ttc etc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc	816

[0050]

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	
260 265 270	
ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gac gtg	864
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	
275 280 285	
agc cac gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg	912
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	
290 295 300	
gag gtg cat aat gcc aag aca aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc	960
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser	
305 310 315 320	
acg ttc cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg	1008
Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu	
325 330 335	
aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc	1056
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala	
340 345 350	
ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca	1104
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro	
355 360 365	
cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag	1152
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln	
370 375 380	
gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc	1200
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala	
385 390 395 400	
gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc aca	1248
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	
405 410 415	
cct ccc atg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctt tac agc aag ctc	1296
Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu	
420 425 430	
acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc	1344
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	
435 440 445	
gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc	1392
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser	
450 455 460	
ctg tct ccg ggt aaa tga	1410
Leu Ser Pro Gly Lys *	
465	

<210> 20

<211> 469

[0051]

<212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)... (469)
 <223> Ha5-1(5) 2.1 的重链编码序列

 <400> 20
 Met Glu Phe Gly Leu Thr Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Met Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Phe Tyr Thr
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Asp Tyr Val Arg Tyr His Tyr Tyr
 115 120 125
 Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 145 150 155 160
 Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 165 170 175
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 180 185 190
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 195 200 205
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr
 210 215 220
 Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
 225 230 235 240
 Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 245 250 255
 Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 305 310 315 320
 Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
 340 345 350
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

[0052]

```

385          390          395          400
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
          405          410          415
Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
          420          425          430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
          435          440          445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
          450          455          460
Leu Ser Pro Gly Lys
465

```

```

<210> 21
<211> 711
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)... (711)
<223> Ha5-1(5)2.1 的轻链

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)... (711)

```

```

<220>
<221> SITE
<222> (1)... (66)
<223> 前导序列

```

```

<220>
<221> SITE
<222> (67)... (390)
<223> 轻链可变区

```

```

<220>
<221> SITE
<222> (391)... (711)
<223> 人κ 恒定区

```

```

<400> 21
atg gac atg agg gtc cct gct cag ctc ctg gga ctc ctg ctg ctc tgg 48
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
  1          5          10          15

ctc cca gat acc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc acc 96
Leu Pro Asp Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr
          20          25          30

ctg tct gca tct ata gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gcg agt 144
Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
          35          40          45

cag ggc att agc tat tat tta gcc tgg tat cag cag aaa ccg ggg aaa 192
Gln Gly Ile Ser Tyr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
          50          55          60

```

[0053]

att cct aag ctc ctg atc tat gat aca tcc tct ttg caa tca ggg gtc Ile Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val 65 70 75 80	240
cca tct cga ttc agt ggc agt aga tct ggg aca gat ctc tct ctc acc Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Leu Ser Leu Thr 85 90 95	288
atc agc agc ctg cag cct gaa gat gtt gca act tat tac tgt caa agg Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg 100 105 110	336
tat gac agt gcc ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc Tyr Asp Ser Ala Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile 115 120 125	384
aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp 130 135 140	432
gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn 145 150 155 160	480
ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu 165 170 175	528
caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp 180 185 190	576
agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr 195 200 205	624
gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser 210 215 220	672
tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys * 225 230 235	711
<210> 22 <211> 236 <212> PRT <213> 智人(Homo sapiens)	
<220> <221> misc_feature <222> (1)... (236) <223> Ha5-1(5)2.1 的轻链编码序列	
<400> 22 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp	

[0054]

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

<210> 23

<211> 469

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> SITE

<222> (1)... (469)

<223> Ha5-1(5)2.1 的重链

<220>

<221> SITE

<222> (1)... (19)

<223> 前导序列

<220>

<221> SITE

<222> (20)... (143)

<223> 重链可变区

<220>

<221> SITE

<222> (144)... (469)

<223> 人 IgG2 的恒定区

<400> 23

Met Glu Phe Gly Leu Thr Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

[0055]

1	5	10	15
Val Gln Cys	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln		
20	25	30	
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe			
35	40	45	
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
50	55	60	
Glu Trp Val Ala Val Met Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Phe Tyr Thr			
65	70	75	80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn			
85	90	95	
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val			
100	105	110	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Asp Tyr Val Arg Tyr His Tyr Tyr			
115	120	125	
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala			
130	135	140	
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser			
145	150	155	160
Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe			
165	170	175	
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly			
180	185	190	
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu			
195	200	205	
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr			
210	215	220	
Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr			
225	230	235	240
Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro			
245	250	255	
Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
260	265	270	
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
275	280	285	
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
290	295	300	
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser			
305	310	315	320
Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu			
325	330	335	
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala			
340	345	350	
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro			
355	360	365	
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln			
370	375	380	
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala			
385	390	395	400
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr			
405	410	415	
Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu			
420	425	430	
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser			
435	440	445	
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser			
450	455	460	
Leu Ser Pro Gly Lys			

[0056]

465

<210> 24
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)... (236)
 <223> Ha5-1(5)2.1 的轻链

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)... (12)
 <223> 前导序列

<220>
 <221> SITE
 <222> (13)... (130)
 <223> 轻链可变区

<220>
 <221> SITE
 <222> (131)... (236)
 <223> 人κ恒定区

<400> 24
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Pro Asp Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Gln Gly Ile Ser Tyr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ile Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Leu Ser Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg
 100 105 110
 Tyr Asp Ser Ala Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0057]

225

230

235

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建的接头

<400> 25

Gly Phe Leu Gly

1

图 1A. 24P4C12 变体 1 的 cDNA(SEQ ID NO:1)和氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2138, 包括终止密码子。起始的甲硫氨酸以下划线标示。

```
1      M G G K Q R D E D D E A Y G K P V K Y
1 gagccATGGGGGAAAGCAGCGGGACGAGGATGACGAGGCCTACGGGAAGCCAGTCAAAT
20   D P S F R G P I K N R S C T D V I C C V
61  ACGACCCCTCCTTTTCGAGGCCCCATCAAGAACAGAAGCTGCACAGATGTCATCTGCTGCG
40   L F L L F I L G Y I V V G I V A W L Y G
121 TCCTCTTCCTGCTCTTCATTCTAGGTTACATCGTGGTGGGGATTGTGGCCTGGTTGTATG
60   D P R Q V L Y P R N S T G A Y C G M G E
181 GAGACCCCGGCAAGTCCTCTACCCCAGGAACCTCTACTGGGGCCTACTGTGGCATGGGGG
80   N K D K P Y L L Y F N I F S C I L S S N
241 AGAACAAAGATAAGCCGTATCTCCTGTACTTCAACATCTTCAGCTGCATCCTGTCCAGCA
100  I I S V A E N G L Q C P T P Q V C V S S
301 ACATCATCTCAGTTGCTGAGAACGGCCTACAGTGCCCCACACCCAGGTGTGTGTGTCCT
120  C P E D P W T V G K N E F S Q T V G E V
361 CCTGCCCCGAGGACCCATGGACTGTGGGAAAAAACGAGTTCTCACAGACTGTTGGGGAAG
140  F Y T K N R N F C L P G V P W N M T V I
421 TCTTCTATACAAAAACAGGAACTTTTGTCTGCCAGGGGTACCCTGGAATATGACGGTGA
160  T S L Q Q E L C P S F L L P S A P A L G
481 TCACAAGCCTGCAACAGGAACCTTGCCCCAGTTTCCTCCTCCCCTCTGCTCCAGCTCTGG
180  R C F P W T N V T P P A L P G I T N D T
541 GCGCTGCTTTCCATGGACCAACGTTACTCCACCGGCGCTCCCAGGGATCACCAATGACA
200  T I Q Q G I S G L I D S L N A R D I S V
601 CCACCATACAGCAGGGGATCAGCGGTCTTATTGACAGCCTCAATGCCCGAGACATCAGTG
220  K I F E D F A Q S W Y W I L V A L G V A
661 TTAAGATCTTTGAAGATTTTGCCCAGTCCTGGTATTGGATTCTTGTGCCCCTGGGGGTGG
240  L V L S L L F I L L L R L V A G P L V L
721 CTCTGGTCTTGAGCCTACTGTTTATCTTGCTTCTGCGCCTGGTGGCTGGGCCCCCTGGTGC
260  V L I L G V L G V L A Y G I Y Y C W E E
781 TGGTGCTGATCCTGGGAGTGCTGGGCGTGCTGGCATAACGGCATCTACTACTGCTGGGAGG
280  Y R V L R D K G A S I S Q L G F T T N L
841 AGTACCGAGTGCTGCGGGACAAGGGCGCCTCCATCTCCCAGCTGGGTTTCACCACCAACC
300  S A Y Q S V Q E T W L A A L I V L A V L
901 TCAGTGCTTACCAGAGCGTGACAGGAGACCTGGCTGGCCGCCCTGATCGTGTGGCGGTGC
320  E A I L L L M L I F L R Q R I R I A I A
961 TTGAAGCCATCCTGCTGCTGATGCTCATCTTCCTGCGGCAGCGGATTTCGTATTGCCATCG
340  L L K E A S K A V G Q M M S T M F Y P L
1021 CCCTCCTGAAGGAGGCCAGCAAGGCTGTGGGACAGATGATGTCTACCATGTTCTACCCAC
```

图 1

图1A-2

360 V T F V L L L I C I A Y W A M T A L Y L
1081 TGGTCACCTTTGTCTCCTCCTCATCTGCATTGCCTACTGGGCCATGACTGCTCTGTACC
380 A T S G Q P Q Y V L W A S N I S S P G C
1141 TGGCTACATCGGGGCAACCCAGTATGTGCTCTGGGCATCCAACATCAGCTCCCCCGCT
400 E K V P I N T S C N P T A H L V N S S C
1201 GTGAGAAAGTGCCAATAAATACATCATGCAACCCACGGCCACCTTGTGAACTCCTCGT
420 P G L M C V F Q G Y S S K G L I Q R S V
1261 GCCCAGGGCTGATGTGCGTCTTCCAGGGCTACTCATCCAAAGGCCTAATCCAACGTTCTG
440 F N L Q I Y G V L G L F W T L N W V L A
1321 TCTTCAATCTGCAAATCTATGGGGTCTGGGGCTCTTCTGGACCCTTAACTGGGTACTGG
460 L G Q C V L A G A F A S F Y W A F H K P
1381 CCCTGGGCCAATGCGTCTCGCTGGAGCCTTTGCCTCCTTCTACTGGGCCTTCCACAAGC
480 Q D I P T F P L I S A F I R T L R Y H T
1441 CCCAGGACATCCCTACCTTCCCTTAATCTCTGCCTTCATCCGCACACTCCGTTACCACA
500 G S L A F G A L I L T L V Q I A R V I L
1501 CTGGGTCAATTGGCATTGGAGCCCTCATCTGACCCTTGTGCAGATAGCCCGGGTCATCT
520 E Y I D H K L R G V Q N P V A R C I M C
1561 TGGAGTATATTGACCACAAGCTCAGAGGAGTGCAGAACCCTGTAGCCCGCTGCATCATGT
540 C F K C C L W C L E K F I K F L N R N A
1621 GCTGTTTCAAGTGCTGCCTCTGGTGTCTGGAAAATTTATCAAGTTCCTAAACCGCAATG
560 Y I M I A I Y G K N F C V S A K N A F M
1681 CATACTCATGATCGCCATCTACGGGAAGAATTTCTGTGTCTCAGCCAAAATGCGTTCA
580 L L M R N I V R V V V L D K V T D L L L
1741 TGCTACTCATGCGAAACATTGTCAGGGTGGTCTGCTGGACAAAGTCACAGACCTGCTGC
600 F F G K L L V V G G V G V L S F F F F S
1801 TGTTCCTTTGGGAAGCTGCTGGTGGTCTGGAGGCGTGGGGGTCTGTCTTCTTTTTTTTCT
620 G R I P G L G K D F K S P H L N Y Y W L
1861 CCGGTCGCATCCCGGGGCTGGGTAAAGACTTTAAGAGCCCCACCTCAACTATTACTGGC
640 P I M T S I L G A Y V I A S G F F S V F
1921 TGCCCATCATGACCTCCATCCTGGGGGCTATGTCATCGCCAGCGGCTTCTTCAGCGTTT
660 G M C V D T L F L C F L E D L E R N N G
1981 TCGGCATGTGTGTGGACACGCTCTTCTCTGCTTCCTGGAAGACCTGGAGCGGAACAACG
680 S L D R P Y Y M S K S L L K I L G K K N
2041 GCTCCCTGGACCGGCCCTACTACATGTCCAAGAGCCTTCTAAAGATTCTGGGCAAGAAGA
700 E A P P D N K K R K K *
2101 ACGAGGCGCCCCGGACAACAAGAAGAGGAAGAAGTGAcagctccggccctgatccagga
2161 ctgcacccccacccccaccgtccagccatccaacctcacttcgcottacaggtctccattt
2221 tgtggtataaaaaaggttttagggcaggcgccgtggctcacgcctgtaatccaacactttg
2281 agaggctgaggcggcgatcacctgagtcaggagttcgagaccagcctggccaacatgg
2341 tgaaacctccgtctctattataaaaatacaaaaattagccgagagtggtggcatgcacctgt
2401 catcccagctactcgggagggtgaggcaggagaatcgcttgaacccgggaggcagaggtt

图1A-3

2461 gcagtgagccgagatcgcgccactgcactccaacctgggtgacagactctgtctccaaaa
2521 caaaacaaacaaacaaaaagattttatttaaagatatatttgttaactcagtaaaaaaaaaa
2581 aaaaaaa

图 1B: 24P4C12 变体 2 的 cDNA(SEQ ID NO:3)和氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2138, 包括终止密码子。起始的甲硫氨酸以下划线标示。

1 M G G K Q R D E D D E A Y G K P V K Y
1 gagccATGGGGGAAAGCAGCGGGACGAGGATGACGAGGCCTACGGGAAGCCAGTCAAAT
20 D P S F R G P I K N R S C T D V I C C V
61 ACGACCCCTCCTTTTCGAGGCCCATCAAGAACAGAAGCTGCACAGATGTCATCTGCTGCG
40 L F L L F I L G Y I V V G I V A W L Y G
121 TCCTCTTCCTGCTCTTCATTCTAGGTTACATCGTGGTGGGGATTGTGGCCTGGTTGTATG
60 D P R Q V L Y P R N S T G A Y C G M G E
181 GAGACCCCGGCAAGTCCTCTACCCAGGAAGTCTACTGGGGCCTACTGTGGCATGGGGG
80 N K D K P Y L L Y F N I F S C I L S S N
241 AGAACAAAGATAAGCCGTATCTCCTGTACTTCAACATCTTCAGCTGCATCCTGTCCAGCA
100 I I S V A E N G L Q C P T P Q V C V S S
301 ACATCATCTCAGTTGCTGAGAACGGCTACAGTGCCCCACACCCAGGTGTGTGTGTCCT
120 C P E D P W T V G K N E F S Q T V G E V
361 CCTGCCCCGAGGACCCATGGACTGTGGGAAAAACGAGTTCTCACAGACTGTTGGGGAAG
140 F Y T K N R N F C L P G V P W N M T V I
421 TCTTCTATACAAAAACAGGAAGTCTTGTCTGCCAGGGGTACCCTGGAATATGACGGTGA
160 T S L Q Q E L C P S F L L P S A P A L G
481 TCACAAGCCTGCAACAGGAAGTCTGCCCCAGTTTCTCCTCCCCTCTGCTCCAGCTCTGG
180 R C F P W T N V T P P A L P G I T N D T
541 GACGCTGCTTTCCATGGACCAACGTTACTCCACCGGCGCTCCAGGGATCACCAATGACA
200 T I Q Q G I S G L I D S L N A R D I S V
601 CCACCATACAGCAGGGGATCAGCGGTCTTATTGACAGCCTCAATGCCCCGAGACATCAGTG
220 K I F E D F A Q S W Y W I L V A L G V A
661 TTAAGATCTTTGAAGATTTTGGCCAGTCTGGTATTGGATTCTTGTGGCCTGGGGGTGG
240 L V L S L L F I L L L R L V A G P L V L
721 CTCTGGTCTTGAGCCTACTGTTTATCTTGCTTCTGCGCCTGGTGGCTGGGCCCTGGTGC
260 V L I L G V L G V L A Y G I Y Y C W E E
781 TGGTGCTGATCCTGGGAGTGCTGGGCGTGCTGGCATAACGGCATCTACTACTGCTGGGAGG
280 Y R V L R D K G A S I S Q L G F T T N L
841 AGTACCGAGTGCTGCGGGACAAGGGCGCCTCCATCTCCAGCTGGGTTTCACCACCAACC
300 S A Y Q S V Q E T W L A A L I V L A V L
901 TCAGTGCCTACCAGAGCGTGCAAGAGACCTGGCTGGCCGCCCTGATCGTGTGGCGGTGC

图1B-2

320 E A I L L L M L I F L R Q R I R I A I A
961 TTGAAGCCATCCTGCTGCTGATGCTCATCTTCCTGCGGCAGCGGATTTCGTATTGCCATCG
340 L L K E A S K A V G Q M M S T M F Y P L
1021 CCCTCCTGAAGGAGGCCAGCAAGGCTGTGGGACAGATGATGTCTACCATGTTCTACCCAC
360 V T F V L L L I C I A Y W A M T A L Y L
1081 TGGTCACCTTTGTCTCCTCCTCATCTGCATTGCCTACTGGGCCATGACTGCTCTGTACC
380 A T S G Q P Q Y V L W A S N I S S P G C
1141 TGGCTACATCGGGGCAACCCAGTATGTGCTCTGGGCATCCAACATCAGCTCCCCGGCT
400 E K V P I N T S C N P T A H L V N S S C
1201 GTGAGAAAGTGCCAATAAATACATCATGAACCCACGGCCACCTTGTGAACCTCTCGT
420 P G L M C V F Q G Y S S K G L I Q R S V
1261 GCCCAGGGCTGATGTGCGTCTTCCAGGGCTACTCATCAAAGGCCTAATCCAACGTTCTG
440 F N L Q I Y G V L G L F W T L N W V L A
1321 TCTTCAATCTGCAAATCTATGGGGTCTGGGGCTCTTCTGGACCCCTTAACCTGGGTACTGG
460 L G Q C V L A G A F A S F Y W A F H K P
1381 CCCTGGGCCAATGCGTCTCGCTGGAGCCCTTGCCTCCTTCTACTGGGCCTTCCACAAGC
480 Q D I P T F P L I S A F I R T L R Y H T
1441 CCCAGGACATCCCTACCTTCCCTTAATCTCTGCCTTCATCCGCACACTCCGTTACCACA
500 G S L A F G A L I L T L V Q I A R V I L
1501 CTGGGTCATTGGCATTGGAGCCCTCATCCTGACCCTTGTGCAGATAGCCCGGGTCATCT
520 E Y I D H K L R G V Q N P V A R C I M C
1561 TGGAGTATATTGACCACAAGCTCAGAGGAGTGCAGAACCCTGTAGCCCGCTGCATCATGT
540 C F K C C L W C L E K F I K F L N R N A
1621 GCTGTTTCAAGTGTGCTGCTGCTGGTGTCTGGAAAATTTATCAAGTTCCTAAACCGCAATG
560 Y I M I A I Y G K N F C V S A K N A F M
1681 CATAATCATGATCGCCATCTACGGGAAGAATTTCTGTGTCTCAGCCAAAATGCGTTCA
580 L L M R N I V R V V V L D K V T D L L L
1741 TGCTACTCATGCGAAACATTGTCAGGGTGGTCTGCTGACAAAGTCACAGACCTGCTGC
600 F F G K L L V V G G V G V L S F F F F S
1801 TGTCTTTGGGAAGCTGCTGGTGGTGGGAGCGTGGGGTCTGCTCTCTTTTTTTTCT
620 G R I P G L G K D F K S P H L N Y Y W L
1861 CCGGTGCGATCCCGGGGCTGGGTAAAGACTTTAAGAGCCCCACCTCAACTATTACTGGC
640 P I M T S I L G A Y V I A S G F F S V F
1921 TGCCCATCATGACCTCCATCCTGGGGGCTATGTCATCGCCAGCGGCTTCTTACGCGTTT
660 G M C V D T L F L C F L E D L E R N N G
1981 TCGGCATGTGTGTGGACACGCTCTTCTCTGCTTCTGGAAGACCTGGAGCGGAACAACG
680 S L D R P Y Y M S K S L L K I L G K K N
2041 GCTCCCTGGACCGGCCCTACTACATGTCCAAGAGCCTTCTAAAGATTCTGGGCAAGAAGA
700 E A P P D N K K R K K *
2101 ACGAGGCGCCCCCGGACAACAAGAAGAGGAAGAAGTGACagctccggccctgatccagga
2161 ctgcacccacccccaccgtccagccatccaacctcacttcgccttacaggtctccattt

图1B-3

```
2221 tgtggtaaaaaaagggttttaggccaggcgccgtggctcacgcctgtaatccaacactttg
2281 agaggctgaggcgggaggatcacctgagtcaggagttcgagaccagcctggccaacatgg
2341 tgaaacctccgtctctattaaaaatacaaaaattagccgagagtgggtggcatgcacctgt
2401 catcccagctactcgggaggctgaggcaggagaatcgcttgaacccgggaggcagaggtt
2461 gcagtgagccgagatcgcgccactgcactccaacctgggtgacagactctgtctccaaaa
2521 caaaacaaacaaacaaaaagattttattaaagatatatttgttaactcagtaaaaaaaaaa
2581 aaaaaaa
```

图 1C: 24P4C12 变体 3 的 cDNA(SEQ ID NO:5)和氨基酸序列(SEQ ID NO:6)。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2138, 包括终止密码子。起始的甲硫氨酸以下划线标示。

```
1      M G G K Q R D E D D E A Y G K P V K Y
1 gagccATGGGGGAAAGCAGCGGGACGAGGATGACGAGGCCTACGGGAAGCCAGTCAAAT
20   D P S F R G P I K N R S C T D V I C C V
61 ACGACCCCTCCTTTTCGAGGCCCCATCAAGAACAGAAGCTGCACAGATGTCATCTGCTGCG
40   L F L L F I L G Y I V V G I V A W L Y G
121 TCCTCTTCCTGCTCTTCATTCTAGGTTACATCGTGGTGGGGATTGTGGCCTGGTTGTATG
60   D P R Q V L Y P R N S T G A Y C G M G E
181 GAGACCCCCGGCAAGTCCTCTACCCCAGGAAGTCTACTGGGGCCTACTGTGGCATGGGGG
80   N K D K P Y L L Y F N I F S C I L S S N
241 AGAACAAAGATAAGCCGTATCTCCTGTACTTCAACATCTTCAGCTGCATCCTGTCCAGCA
100  I I S V A E N G L Q C P T P Q V C V S S
301 ACATCATCTCAGTTGCTGAGAACGGCCTACAGTGCCCCACACCCAGGTGTGTGTGTCCT
120  C P E D P W T V G K N E F S Q T V G E V
361 CCTGCCCCGAGGACCCATGGACTGTGGGAAAAACGAGTTCTCACAGACTGTTGGGGAAG
140  F Y T K N R N F C L P G V P W N M T V I
421 TCTTCTATACAAAAACAGGAAGTCTTGTCTGCCAGGGGTACCCTGGAATATGACGGTGA
160  T S L Q Q E L C P S F L L P S A P A L G
481 TCACAAGCCTGCAACAGGAAGTCTGCCCCAGTTTCTCCTCCCCTCTGCTCCAGCTCTGG
180  R C F P W T N I T P P A L P G I T N D T
541 GGCCTGCTTTCCATGGACCAACATTACTCCACCGCGCTCCCAGGGATCACCAATGACA
200  T I Q Q G I S G L I D S L N A R D I S V
601 CCACCATACAGCAGGGGATCAGCGGTCTTATTGACAGCCTCAATGCCCGAGACATCAGTG
220  K I F E D F A Q S W Y W I L V A L G V A
661 TTAAGATCTTTGAAGATTTTGGCCAGTCCTGGTATTGGATTCTTGTGTCCTGGGGGTGG
240  L V L S L L F I L L L R L V A G P L V L
721 CTCTGGTCTTGAGCCTACTGTTTATCTTGCTTCTGCGCCTGGTGGCTGGGCCCTGGTGC
260  V L I L G V L G V L A Y G I Y Y C W E E
```

图10-2

781 TGGTGCTGATCCTGGGAGTGCTGGGCGTGCTGGCATAACGGCATCTACTACTGCTGGGAGG
280 Y R V L R D K G A S I S Q L G F T T N L
841 AGTACCGAGTGCTGCGGGACAAGGGCGCCTCCATCTCCCAGCTGGGTTTCACCACCAACC
300 S A Y Q S V Q E T W L A A L I V L A V L
901 TCAGTGCCTACCAGAGCGTGCCAGGAGACCTGGCTGGCCGCCCTGATCGTGTTGGCGGTGC
320 E A I L L L M L I F L R Q R I R I A I A
961 TTGAAGCCATCCTGCTGCTGATGCTCATCTTCCTGCGGCAGCGGATTTCGTATTGCCATCG
340 L L K E A S K A V G Q M M S T M F Y P L
1021 CCCTCCTGAAGGAGGCCAGCAAGGCTGTGGGACAGATGATGTCTACCATGTTCTACCCAC
360 V T F V L L L I C I A Y W A M T A L Y L
1081 TGGTCACCTTTGTCCTCCTCCTCATCTGCATTGCCTACTGGGCCATGACTGCTCTGTACC
380 A T S G Q P Q Y V L W A S N I S S P G C
1141 TGGCTACATCGGGGCAACCCAGTATGTGCTCTGGGCATCCAACATCAGCTCCCCCGGCT
400 E K V P I N T S C N P T A H L V N S S C
1201 GTGAGAAAGTGCCAATAAATACATCATGCAACCCACGGCCACCTTGTGAACTCCTCGT
420 P G L M C V F Q G Y S S K G L I Q R S V
1261 GCCCAGGGCTGATGTGCGTCTTCCAGGGCTACTCATCAAAGGCCAATCCAACGTTCTG
440 F N L Q I Y G V L G L F W T L N W V L A
1321 TCTTCAATCTGCAAATCTATGGGGTCTGGGGCTCTTCTGGACCCCTTAAGTGGGTACTGG
460 L G Q C V L A G A F A S F Y W A F H K P
1381 CCCTGGGCCAATGCGTCCTCGCTGGAGCCTTTGCCTCCTTCTACTGGGCCTTCCACAAGC
480 Q D I P T F P L I S A F I R T L R Y H T
1441 CCCAGGACATCCCTACCTTCCCCTTAATCTCTGCCTTCATCCGCACACTCCGTTACCACA
500 G S L A F G A L I L T L V Q I A R V I L
1501 CTGGGTCATTGGCATTGGAGCCCTCATCCTGACCCTTGTGCAGATAGCCCGGGTCATCT
520 E Y I D H K L R G V Q N P V A R C I M C
1561 TGGAGTATATTGACCACAAGCTCAGAGGAGTGCAAGCCCTGTAGCCCGCTGCATCATGT
540 C F K C C L W C L E K F I K F L N R N A
1621 GCTGTTTTCAAGTGCTGCCTCTGGTGTCTGGAAAAATTTATCAAGTTCCTAAACCGCAATG
560 Y I M I A I Y G K N F C V S A K N A F M
1681 CATAATCATGATCGCCATCTACGGGAAGAATTTCTGTGTCTCAGCCAAAAATGCGTTCA
580 L L M R N I V R V V V L D K V T D L L L
1741 TGCTACTCATGCGAAACATTGTGAGGGTGGTTCCTGGACAAAGTCACAGACCTGCTGC
600 F F G K L L V V G G V G V L S F F F F S
1801 TGTTCTTTGGGAAGCTGCTGGTGGTTCGGAGGCGTGGGGTCTGTCTTCTTTTTTTTTCT
620 G R I P G L G K D F K S P H L N Y Y W L
1861 CCGGTCGCATCCCGGGGCTGGGTAAAGACTTTAAGAGCCCCACCTCAACTATTACTGGC
640 P I M T S I L G A Y V I A S G F F S V F
1921 TGCCCATCATGACCTCCATCCTGGGGGCTATGTGATCGCCAGCGGCTTCTTCAGCGTTT
660 G M C V D T L F L C F L E D L E R N N G
1981 TCGGCATGTGTGTGGACACGCTCTTCCTCTGCTTCCTGGAAGACCTGGAGCGGAACAACG

图10-3

```

680   S L D R P Y Y M S K S L L K I L G K K N
2041 GCTCCCTGGACCGGCCCTACTACATGTCCAAGAGCCTTCTAAAGATTCTGGGCAAGAAGA
700   E A P P D N K K R K K *
2101 ACGAGGCGCCCCCGGACAACAAGAAGAGGAAGAAGTGAcagctccggccctgatccagga
2161 ctgcacccccacccccaccgtccagccatccaacctcacttcgccttacagggtctccattt
2221 tgtggtaaaaaaagggttttaggccaggcgccgtggctcacgcctgtaatccaacactttg
2281 agaggctgaggcgggcggtacacctgagtcaggagttcgagaccagcctggccaacatgg
2341 tgaaacctccgtctctattaaaaatacaaaaattagccgagagtggtggcatgcacctgt
2401 catcccagctactcgggaggtgaggcaggagaatcgcttgaacccgggagggcagaggtt
2461 gcagtgagccgagatcgcgccactgcactccaacctgggtgacagactctgtctccaaaa
2521 caaaacaaacaaacaaaaaagattttattaaagatatatttgttaactcagtaaaaaaaaaa
2581 aaaaaaa

```

图 1D: 24P4C12 变体 4 的 cDNA(SEQ ID NO:7)和氨基酸序列(SEQ ID NO:8)。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2138, 包括终止密码子。起始的甲硫氨酸以下划线标示。

```

1      M G G K Q R D E D D E A Y G K P V K Y
1 gagccATGGGGGAAAGCAGCGGGACGAGGATGACGAGGCCTACGGGAAGCCAGTCAAAT
20   D P S F R G P I K N R S C T D V I C C V
61   ACGACCCCTCCTTTCGAGGCCCCATCAAGAACAGAAGCTGCACAGATGTCATCTGCTGCG
40   L F L L F I L G Y I V V G I V A W L Y G
121  TCCTCTTCCTGCTCTTCATTCTAGGTTACATCGTGGTGGGGATTGTGGCCTGGTTGTATG
60   D P R Q V L Y P R N S T G A Y C G M G E
181  GAGACCCCCGGCAAGTCCTCTACCCAGGAACCTCTACTGGGGCCTACTGTGGCATGGGGG
80   N K D K P Y L L Y F N I F S C I L S S N
241  AGAACAAAGATAAGCCGTATCTCCTGTACTTCAACATCTTCAGCTGCATCCTGTCCAGCA
100  I I S V A E N G L Q C P T P Q V C V S S
301  ACATCATCTCAGTTGCTGAGAACGGCCTACAGTGCCCCACACCCAGGTGTGTGTGTCCT
120  C P E D P W T V G K N E F S Q T V G E V
361  CCTGCCCCGAGGACCCATGGACTGTGGGAAAAACGAGTTCTCACAGACTGTTGGGGAAG
140  F Y T K N R N F C L P G V P W N M T V I
421  TCTTCTATACAAAAACAGGAACCTTTTGTCTGCCAGGGGTACCCTGGAATATGACGGTGA
160  T S L Q Q E L C P S F L L P S A P A L G
481  TCACAAGCCTGCAACAGGAACCTTGCCCCAGTTTCCTCCTCCCCCTCTGCTCCAGCTCTGG
180  R C F P W T N V T P P A L P G I T N D T
541  GCGCTGCTTTCCATGGACCAACGTTACTCCACCGCGCTCCCAGGGATCACCAATGACA
200  T I Q Q G I S G L I D S L N A R D I S V
601  CCACCATACAGCAGGGGATCAGCGGTCTTATTGACAGCCTCAATGCCCGAGACATCAGTG
220  K I F E D F A Q S W Y W I L V A L G V A

```

图1D-2

661 TTAAGATCTTTGAAGATTTTGCCAGTCCTGGTATTGGATTCTTGTGGCCCTGGGGGTGG
240 L V L S L L F I L L L R L V A G P L V L
721 CTCTGGTCTTGAGCCTACTGTTTATCTTGCTTCTGCGCCTGGTGGCTGGGCCCTGGTGC
260 V L I L G V L G V L A Y G I Y Y C W E E
781 TGGTGCTGATCCTGGGAGTGCTGGGCGTGCTGGCATATGGCATCTACTACTGCTGGGAGG
280 Y R V L R D K G A S I S Q L G F T T N L
841 AGTACCGAGTGCTGCGGGACAAGGGCGCCTCCATCTCCCAGCTGGGTTTACCACCAACC
300 S A Y Q S V Q E T W L A A L I V L A V L
901 TCAGTGCCTACCAGAGCGTGCAGGAGACCTGGCTGGCCGCCCTGATCGTGTGGCGGTGC
320 E A I L L L M L I F L R Q R I R I A I A
961 TTGAAGCCATCCTGCTGCTGATGCTCATCTTCCTGCGGCAGCGGATTTCGTATTGCCATCG
340 L L K E A S K A V G Q M M S T M F Y P L
1021 CCCTCCTGAAGGAGGCCAGCAAGGCTGTGGGACAGATGATGTCTACCATGTTCTACCCAC
360 V T F V L L L I C I A Y W A M T A L Y L
1081 TGGTCACCTTTGTCTCTCCTCATCTGCATTGCCTACTGGGCCATGACTGCTCTGTACC
380 A T S G Q P Q Y V L W A S N I S S P G C
1141 TGGCTACATCGGGGCAACCCAGTATGTGCTCTGGGCATCCAACATCAGCTCCCCCGGT
400 E K V P I N T S C N P T A H L V N S S C
1201 GTGAGAAAGTGCCAATAATACATCATGCAACCCACGGCCACCTTGTGAACCTCTCGT
420 P G L M C V F Q G Y S S K G L I Q R S V
1261 GCCCAGGGCTGATGTGCGTCTTCCAGGGCTACTCATCCAAGGCCAATCCAACGTTCTG
440 F N L Q I Y G V L G L F W T L N W V L A
1321 TCTTCAATCTGCAAATCTATGGGGTCCTGGGGCTCTTCTGGACCCCTTAAGTGGGTACTGG
460 L G Q C V L A G A F A S F Y W A F H K P
1381 CCCTGGGCCAATGCGTCCTCGCTGGAGCCTTTGCCTCCTTCTACTGGGCCTTCCACAAGC
480 Q D I P T F P L I S A F I R T L R Y H T
1441 CCCAGGACATCCCTACCTTCCCCTTAATCTCTGCCTTCATCCGCACACTCCGTTACCACA
500 G S L A F G A L I L T L V Q I A R V I L
1501 CTGGGTCATTGGCATTGGAGCCCTCATCCTGACCCTTGTGCAGATAGCCCGGGTCATCT
520 E Y I D H K L R G V Q N P V A R C I M C
1561 TGGAGTATATTGACCACAAGCTCAGAGGAGTGAGAACCCTGTAGCCCGCTGCATCATGT
540 C F K C C L W C L E K F I K F L N R N A
1621 GCTGTTTCAAGTGCTGCCTCTGGTGTCTGGAAAAATTTATCAAGTTCCTAAACGCAATG
560 Y I M I A I Y G K N F C V S A K N A F M
1681 CATAATCATGATCGCCATCTACGGGAAGAATTTCTGTGTCTCAGCCAAAAATGCGTTCA
580 L L M R N I V R V V V L D K V T D L L L
1741 TGCTACTCATGCGAAACATTGTGAGGGTGGTGTCTGCGTGGACAAAGTCACAGACCTGCTGC
600 F F G K L L V V G G V G V L S F F F F S
1801 TGTTCTTTGGGAAGCTGCTGGTGGTGGGAGGCGTGGGGTCTGTCTCTCTTTTTTTTCT
620 G R I P G L G K D F K S P H L N Y Y W L
1861 CCGGTCGCATCCCGGGGCTGGGTAAAGACTTTAAGAGCCCCACCTCAACTATTACTGGC

图1D-3

```
640 P I M T S I L G A Y V I A S G F F S V F
1921 TGCCCATCATGACCTCCATCCTGGGGGCTATGTCATCGCCAGCGGCTTCTTCAGCGTTT
660 G M C V D T L F L C F L E D L E R N N G
1981 TCGGCATGTGTGTGGACACGCTCTTCCTCTGCTTCCTGGAAGACCTGGAGCGGAACAACG
680 S L D R P Y Y M S K S L L K I L G K K N
2041 GCTCCCTGGACCGGCCCTACTACATGTCCAAGAGCCTTCTAAAGATTCTGGGCAAGAAGA
700 E A P P D N K K R K K *
2101 ACGAGGCGCCCCCGGACAACAAGAAGAGGAAGAAGTGAcagctccggccctgatccagga
2161 ctgcacccccacccccaccgtccagccatccaacctcacttcgccttacaggtctccattt
2221 tgtggttaaaaaaagggttttaggccaggcgccgtggctcacgcctgtaatccaacactttg
2281 agaggctgaggcgggcgggatcacctgagtcaggagttcgagaccagcctggccaacatgg
2341 tgaacacctcgtctctattataaaaatacaaaaattagccgagagtgggtggcatgcacctgt
2401 catcccagctactcgggaggctgaggcaggagaatcgcttgaacccgggaggcagaggtt
2461 gcagtgagccgagatcgcgccactgcactccaacctgggtgacagactctgtotccaaaa
2521 caaaacaaacaaacaaaaagattttattaaagatatatttgttaactcagtaaaaaaaaaa
2581 aaaaaaa
```

图 1E: 24P4C12 变体 5 的 cDNA(SEQ ID NO:9)和氨基酸序列(SEQ ID NO:10)。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2138，包括终止密码子。

```
1 M G G K Q R D E D D E A Y G K P V K Y
1 gagccATGGGGGAAAGCAGCGGGACGAGGATGACGAGGCCTACGGGAAGCCAGTCAAAT
20 D P S F R G P I K N R S C T D V I C C V
61 ACGACCCCTCCTTTTCGAGGCCCCATCAAGAACAGAAGCTGCACAGATGTCATCTGCTGCG
40 L F L L F I L G Y I V V G I V A W L Y G
121 TCCTCTTCCTGCTCTTCATTCTAGGTTACATCGTGGTGGGGATTGTGGCCTGGTTGTATG
60 D P R Q V L Y P R N S T G A Y C G M G E
181 GAGACCCCGGCAAGTCCTCTACCCAGGAACCTCTACTGGGGCCTACTGTGGCATGGGGG
80 N K D K P Y L L Y F N I F S C I L S S N
241 AGAACAAAGATAAGCCGTATCTCCTGTACTTCAACATCTTCAGCTGCATCCTGTCCAGCA
100 I I S V A E N G L Q C P T P Q V C V S S
301 ACATCATCTCAGTTGCTGAGAACGGCCTACAGTGCCCCACACCCAGGTGTGTGTGTCCT
120 C P E D P W T V G K N E F S Q T V G E V
361 CCTGCCCGGAGGACCCATGGACTGTGGGAAAAAACGAGTTCTCACAGACTGTGGGGAAG
140 F Y T K N R N F C L P G V P W N M T V I
421 TCTTCTATACAAAAACAGGAACTTTGTCTGCCAGGGGTACCCTGGAATATGACGGTGA
160 T S L Q Q E L C P S F L L P S A P A L G
481 TCACAAGCCTGCAACAGGAACCTTGCCCCAGTTTCCTCCTCCCCTCTGCTCCAGCTCTGG
180 R C F P W T N V T P P A L P G I T N D T
541 GGCGCTGCTTTCATGGACCAACGTTACTCCACCGGCGCTCCAGGGATCACCAATGACA
```


图1E-2

200 T I Q Q G I S G L I D S L N A R D I S V
601 CCACCATACAGCAGGGGATCAGCGGTCTTATTGACAGCCTCAATGCCCCGAGACATCAGTG
220 K I F E D F A Q S W Y W I L V A L G V A
661 TTAAGATCTTTGAAGATTTTGGCCAGTCCTGGTATTGGATTCTTGTGGCCCTGGGGGTGG
240 L V L S L L F I L L L R L V A G P L V L
721 CTCTGGTCTTGAGCCTACTGTTTATCTTGCTTCTGCGCCTGGTGGCTGGGCCCTGGTGC
260 V L I L G V L G V L A Y G I Y Y C W E E
781 TGGTGCTGATCCTGGGAGTGCTGGGCGTGCTGGCATA CGGCATCTACTACTGCTGGGAGG
280 Y R V L R D K G A S I S Q L G F T T N L
841 AGTACCGAGTGCTGCGGGACAAGGGCGCCTCCATCTCCCAGCTGGGTTTCACCACCAACC
300 S A Y Q S V Q E T W L A A L I V L A V L
901 TCAGTGCCTACCAGAGCGTGCAGGAGACCTGGCTGGCCGCCCTGATCGTGTGGCGGTGC
320 E A I L L L V L I F L R Q R I R I A I A
961 TTGAAGCCATCCTGCTGCTGGTGCTCATCTTCTGCGGCAGCGGATTTCGTATTGCCATCG
340 L L K E A S K A V G Q M M S T M F Y P L
1021 CCCTCCTGAAGGAGGCCAGCAAGGCTGTGGGACAGATGATGTCTACCATGTTCTACCCAC
360 V T F V L L L I C I A Y W A M T A L Y L
1081 TGGTCACCTTTGTCTCCTCCTCATCTGCATTGCCTACTGGGCCATGACTGCTCTGTACC
380 A T S G Q P Q Y V L W A S N I S S P G C
1141 TGGCTACATCGGGGCAACCCAGTATGTGCTCTGGGCATCCAACATCAGCTCCCCCGGT
400 E K V P I N T S C N P T A H L V N S S C
1201 GTGAGAAAGTGCCAATAAATACATCATGCAACCCACGGCCACCTTGTGAACTCCTCGT
420 P G L M C V F Q G Y S S K G L I Q R S V
1261 GCCCAGGGCTGATGTGCGTCTTCCAGGGCTACTCATCCAAGGCCAATCCAACGTTCTG
440 F N L Q I Y G V L G L F W T L N W V L A
1321 TCTTCAATCTGCAAATCTATGGGGTCTGGGGCTCTTCTGGACCCCTTAAGTGGGTACTGG
460 L G Q C V L A G A F A S F Y W A F H K P
1381 CCCTGGGCCAATGCGTCTCGCTGGAGCCTTTGCCTCCTTCTACTGGGCCTTCCACAAGC
480 Q D I P T F P L I S A F I R T L R Y H T
1441 CCCAGGACATCCCTACCTTCCCCTTAATCTCTGCCTTCATCCGCACACTCCGTTACCACA
500 G S L A F G A L I L T L V Q I A R V I L
1501 CTGGGTCAATTGGCATTGGAGCCCTCATCCTGACCCTTGTGCAGATAGCCCGGGTCATCT
520 E Y I D H K L R G V Q N P V A R C I M C
1561 TGGAGTATATTGACCACAAGCTCAGAGGAGTGAGAACCCTGTAGCCCGCTGCATCATGT
540 C F K C C L W C L E K F I K F L N R N A
1621 GCTGTTTCAAGTGCTGCCTCTGGTGTCTGGAAAATTTATCAAGTTCCTAAACCGCAATG
560 Y I M I A I Y G K N F C V S A K N A F M
1681 CATACATCATGATCGCCATCTACGGGAAGAATTTCTGTGTCTCAGCCAAAATGCGTTCA
580 L L M R N I V R V V V L D K V T D L L L
1741 TGCTACTCATGCGAAACATTGTCAGGGTGGTCGTCCTGGACAAAGTCACAGACCTGCTGC
600 F F G K L L V V G G V G V L S F F F F S

图1E-3

```
1801 TGTTCTTTGGGAAGCTGCTGGTGGTCGGAGGCGTGGGGTCCTGTCCTTCTTTTTTTTCT
620 G R I P G L G K D F K S P H L N Y Y W L
1861 CCGGTCGCATCCCGGGGCTGGGTAAAGACTTTAAGAGCCCCACCTCAACTATTACTGGC
640 P I M T S I L G A Y V I A S G F F S V F
1921 TGCCCATCATGACCTCCATCCTGGGGGCTATGTCATCGCCAGCGGCTTCTTCAGCGTTT
660 G M C V D T L F L C F L E D L E R N N G
1981 TCGGCATGTGTGTGGACACGCTCTTCCTCTGCTTCCTGGAAGACCTGGAGCGGAACAACG
680 S L D R P Y Y M S K S L L K I L G K K N
2041 GCTCCCTGGACCGCCCTACTACATGTCCAAGAGCCTTCTAAAGATTCTGGGCAAGAAGA
700 E A P P D N K K R K K *
2101 ACGAGGCGCCCCCGGACAACAAGAAGAGGAAGAAGTGACagctccggccctgatccagga
2161 ctgcacccccacccccaccgtccagccatccaacctcacttcgccttacagggtctccattt
2221 tgtggtaaaaaaagggttttagggcaggcgccgtgggtcacgcctgtaatccaacactttg
2281 agaggctgaggcggcggatcacctgagtcaggagttcgagaccagcctggccaacatgg
2341 tgaacctccgtctctattaaaaatacaaaaattagccgagagtggtggcatgcacctgt
2401 catcccagctactcgggaggctgaggcaggagaatcgcttgaacccgggaggcagagggtt
2461 gcagtgagccgagatcgcgccactgcactccaacctgggtgacagactctgtctccaaaa
2521 caaaacaaacaaacaaaaagattttattaaagatattttggttaactcagtaaaaaaaaaa
2581 aaaaaaa
```

图 1F: 24P4C12 变体 6 的 cDNA(SEQ ID NO:11)和氨基酸序列(SEQ ID NO:12)。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2138，包括终止密码子。

```
1 M G G K Q R D E D D E A Y G K P V K Y
1 gagccATGGGGGAAAGCAGCGGGACGAGGATGACGAGGCCTACGGGAAGCCAGTCAAAT
20 D P S F R G P I K N R S C T D V I C C V
61 ACGACCCCTCCTTTCGAGGCCCCATCAAGAACAGAAGCTGCACAGATGTCATCTGCTGCG
40 L F L L F I L G Y I V V G I V A W L Y G
121 TCCTCTTCCTGCTCTTCATTCTAGGTTACATCGTGGTGGGGATTGTGGCCTGGTTGTATG
60 D P R Q V L Y P R N S T G A Y C G M G E
181 GAGACCCCGGCAAGTCCTCTACCCAGGAACCTACTGGGGCCTACTGTGGCATGGGGG
80 N K D K P Y L L Y F N I F S C I L S S N
241 AGAACAAAGATAAGCCGTATCTCCTGTACTTCAACATCTTCAGCTGCATCCTGTCCAGCA
100 I I S V A E N G L Q C P T P Q V C V S S
301 ACATCATCTCAGTTGCTGAGAACGGCCTACAGTGCCCCACACCCAGGTGTGTGTGTCCT
120 C P E D P W T V G K N E F S Q T V G E V
361 CCTGCCCGGAGGACCCATGGACTGTGGGAAAAAACGAGTTCTCACAGACTGTTGGGGAAG
140 F Y T K N R N F C L P G V P W N M T V I
421 TCTTCTATACAAAAACAGGAACCTTTTGTCTGCCAGGGGTACCCTGGAATATGACGGTGA
160 T S L Q Q E L C P S F L L P S A P A L G
```

图1F-2

481 TCACAAGCCTGCAACAGGAAGCTCTGCCCCAGTTTCCTCCTCCCCTCTGCTCCAGCTCTGG
180 R C F P W T N V T P P A L P G I T N D T
541 GGCGCTGCTTTCCATGGACCAACGTTACTCCACCGGCGCTCCCAGGGATCACCAATGACA
200 T I Q Q G I S G L I D S L N A R D I S V
601 CCACCATACAGCAGGGGATCAGCGGTCTTATTGACAGCCTCAATGCCCCGAGACATCAGTG
220 K I F E D F A Q S W Y W I L V A L G V A
661 TTAAGATCTTTGAAGATTTTGCCCAGTCCTGGTATTGGATTCTTGTTGCCCTGGGGGTGG
240 L V L S L L F I L L L R L V A G P L V L
721 CTCTGGTCTTGAGCCTACTGTTTATCTTGCTTCTGCGCCTGGTGGCTGGGCCCTGGTGC
260 V L I L G V L G V L A Y G I Y Y C W E E
781 TGGTGCTGATCCTGGGAGTGCTGGGCGTGCTGGCATAACGGCATCTACTACTGCTGGGAGG
280 Y R V L R D K G A S I S Q L G F T T N L
841 AGTACCGAGTGCTGCGGGACAAGGGCGCCTCCATCTCCCAGCTGGGTTTCACCACCAACC
300 S A Y Q S V Q E T W L A A L I V L A V L
901 TCAGTGCCCTACCAGAGCGTGCAGGAGACCTGGCTGGCCGCCCTGATCGTGTGGCGGTGC
320 E A I L L L M L I F L R Q R I R I A I A
961 TTGAAGCCATCCTGCTGCTGATGCTCATCTTCCTGCGGCAGCGGATTCGTATTGCCATCG
340 L L K E A S K A V G Q M M S T M F Y P L
1021 CCCTCCTGAAGGAGGCCAGCAAGGCTGTGGGACAGATGATGTCTACCATGTTCTACCCAC
360 V T F V L L L I C I A Y W A M T A L Y L
1081 TGGTCACCTTTGTCTCCTCCTCATCTGCATTGCCTACTGGGCCATGACTGCTCTGTACC
380 A T S G Q P Q Y V L W A S N I S S P G C
1141 TGGCTACATCGGGGCAACCCAGTATGTGCTCTGGGCATCCAACATCAGCTCCCCCGGCT
400 E K V P I N T S C N P T A H L V N S S C
1201 GTGAGAAAGTGCCAATAATACATCATGCAACCCACGGCCACCTTGTAAGTCTCTCGT
420 P G L M C V F Q G Y S S K G L I P R S V
1261 GCCCAGGGCTGATGTGCGTCTTCCAGGGCTACTCATCCAAGGCCTAATCCCACGTTCTG
440 F N L Q I Y G V L G L F W T L N W V L A
1321 TCTTCAATCTGAAATCTATGGGGTCTGGGGCTCTTCTGGACCCCTAACTGGGTACTGG
460 L G Q C V L A G A F A S F Y W A F H K P
1381 CCCTGGGCCAATGCGTCCTCGCTGGAGCCTTTGCCTCCTTCTACTGGGCCTTCCACAAGC
480 Q D I P T F P L I S A F I R T L R Y H T
1441 CCCAGGACATCCCTACCTTCCCCTTAATCTCTGCCTTCATCCGCACACTCCGTTACCACA
500 G S L A F G A L I L T L V Q I A R V I L
1501 CTGGGTCAATTGGCATTGGAGCCCTCATCCTGACCCTTGTGCAGATAGCCCGGTGCTATCT
520 E Y I D H K L R G V Q N P V A R C I M C
1561 TGGAGTATATTGACCACAAGCTCAGAGGAGTGCAGAACCCTGTAGCCCGCTGCATCATGT
540 C F K C C L W C L E K F I K F L N R N A
1621 GCTGTTTCAAGTGCTGCCTCTGGTGTCTGGAAAATTTATCAAGTTCCTAAACCGCAATG
560 Y I M I A I Y G K N F C V S A K N A F M
1681 CATAATCATGATCGCCATCTACGGGAAGAATTTCTGTGTCTCAGCCAAAATGCGTTCA

图1F-3

```

580  L L M R N I V R V V V L D K V T D L L L
1741 TGCTACTCATGCGAAACATTGTCAGGGTGGTCGTCCTGGACAAAGTCACAGACCTGCTGC
600  F F G K L L V V G G V G V L S F F F F S
1801 TGTTCCTTTGGGAAGCTGCTGGTGGTCGGAGGCGTGGGGGTCTGTCTTCTTTTCTTCT
620  G R I P G L G K D F K S P H L N Y Y W L
1861 CCGGTCGCATCCCGGGGCTGGGTAAAGACTTTAAGAGCCCCACCTCAACTATTACTGGC
640  P I M T S I L G A Y V I A S G F F S V F
1921 TGCCCATCATGACCTCCATCCTGGGGGCTATGTCATCGCCAGCGGCTTCTTCAGCGTTT
660  G M C V D T L F L C F L E D L E R N N G
1981 TCGGCATGTGTGTGGACACGCTCTTCTCTGCTTCTGGAAGACCTGGAGCGGAACAACG
680  S L D R P Y Y M S K S L L K I L G K K N
2041 GCTCCCTGGACCGGCCCTACTACATGTCCAAGAGCCTTCTAAAGATTCTGGGCAAGAAGA
700  E A P P D N K K R K K *
2101 ACGAGGCGCCCCGGACAACAAGAAGAGGAAGAAGTGAcagctccggccctgatccagga
2161 ctgcacccccacccccaccgtccagccatccaacctcacttcgccttacaggtctccatctt
2221 tgtggtataaaaaagggttttaggccaggcgccgtgggtcacgcctgtaatccaacactttg
2281 agaggctgaggcgggcggtatcacctgagtcaggagttcgagaccagcctggccaacatgg
2341 tgaaacctccgtctctattataaaaaatacaaaaattagccgagagtggtggcatgcacctgt
2401 catcccagctactcgggagggtgaggcaggagaatcgcttgaacccgggaggcagaggtt
2461 gcagtgagccgagatcgcgccactgcactccaacctgggtgacagactctgtctccaaaa
2521 caaaacaaacaaacaaaaagatattttattaaagatattttgttaactcagtaaaaaaaaaa
2581 aaaaaaa

```

图 1G: 24P4C12 变体 7 的 cDNA(SEQ ID NO:13)和氨基酸序列(SEQ ID NO:14)。开放阅读框从核酸 6 延伸至 1802，包括终止密码子。

```

1      M G G K Q R D E D D E A Y G K P V K Y
1 gagccATGGGGGAAAGCAGCGGGACGAGGATGACGAGGCCTACGGGAAGCCAGTCAAAAT
20    D P S F R G P I K N R S C T D V I C C V
61    ACGACCCCTCCTTTTCGAGGCCCCATCAAGAACAGAAGCTGCACAGATGTCATCTGCTGCG
40    L F L L F I L G Y I V V G I V A W L Y G
121   TCCTCTTCTGCTCTTCATTCTAGGTTACATCGTGGTGGGGATTGTGGCCTGGTTGTATG
60    D P R Q V L Y P R N S T G A Y C G M G E
181   GAGACCCCCGGAAGTCCTCTACCCAGGAACCTACTGGGGCCTACTGTGGCATGGGGG
80    N K D K P Y L L Y F N I F S C I L S S N
241   AGAACAAAGATAAGCCGTATCTCCTGTACTTCAACATCTTCAGCTGCATCCTGTCCAGCA
100   I I S V A E N G L Q C P T P Q V C V S S
301   ACATCATCTCAGTTGCTGAGAACGGCCTACAGTGCCCCACACCCAGGTGTGTGTGTCCT
120   C P E D P W T V G K N E F S Q T V G E V
361   CCTGCCCCGAGGACCCATGGACTGTGGGAAAAACGAGTTCTCACAGACTGTTGGGGAAG

```

图1G-2

140 F Y T K N R N F C L P G V P W N M T V I
421 TCTTCTATACAAAAACAGGAACCTTTTGTCTGCCAGGGGTACCCTGGAATATGACGGTGA
160 T S L Q Q E L C P S F L L P S A P A L G
481 TCACAAGCCTGCAACAGGAACCTGCCCCAGTTTCCTCCTCCCCTCTGCTCCAGCTCTGG
180 R C F P W T N V T P P A L P G I T N D T
541 GCGGCTGCTTTCCATGGACCAACGTTACTCCACCGGCGCTCCCAGGGATCACCAATGACA
200 T I Q Q G I S G L I D S L N A R D I S V
601 CCACCATACAGCAGGGGATCAGCGGTCTTATTGACAGCCTCAATGCCCGAGACATCAGTG
220 K I F E D F A Q S W Y W I L V A V G Q M
661 TTAAGATCTTTGAAGATTTTGCCAGTCCTGGTATTGGATTCTTGTGGCTGTGGGACAGA
240 M S T M F Y P L V T F V L L L I C I A Y
721 TGATGTCTACCATGTTCTACCCACTGGTCACCTTTGTCTCCTCCTCATCTGCATTGCCT
260 W A M T A L Y L A T S G Q P Q Y V L W A
781 ACTGGGCCATGACTGCTCTGTACCTGGCTACATCGGGGCAACCCAGTATGTGCTCTGGG
280 S N I S S P G C E K V P I N T S C N P T
841 CATCCAACATCAGCTCCCCGGCTGTGAGAAAGTGCCAATAAATACATCATGCAACCCCA
300 A H L V N S S C P G L M C V F Q G Y S S
901 CGGCCACCTTGTGAACCTCCTCGTGCCAGGGCTGATGTGCGTCTTCCAGGGCTACTCAT
320 K G L I Q R S V F N L Q I Y G V L G L F
961 CCAAAGGCCTAATCCAACGTTCTGTCTTCAATCTGCAAATCTATGGGGTCTTGGGGCTCT
340 W T L N W V L A L G Q C V L A G A F A S
1021 TCTGGACCCCTTAACCTGGGTACTGGCCCTGGGCCAATGCGTCCTCGCTGGAGCCTTTGCCT
360 F Y W A F H K P Q D I P T F P L I S A F
1081 CCTTCTACTGGGCCTTCCACAAGCCCCAGGACATCCCTACCTTCCCCTTAATCTCTGCCT
380 I R T L R Y H T G S L A F G A L I L T L
1141 TCATCCGCACACTCCGTTACCACACTGGGTCATTGGCATTGGAGCCCTCATCCTGACCC
400 V Q I A R V I L E Y I D H K L R G V Q N
1201 TTGTGCAGATAGCCCGGGTCATCTTGGAGTATATTGACCACAAGCTCAGAGGAGTGCAGA
420 P V A R C I M C C F K C C L W C L E K F
1261 ACCCTGTAGCCCGCTGCATCATGTGCTGTTTCAAGTGCTGCCTCTGGTGTCTGGAAAAAT
440 I K F L N R N A Y I M I A I Y G K N F C
1321 TTATCAAGTTCTTAACCGCAATGCATACATCATGATCGCCATCTACGGGAAGAATTTCT
460 V S A K N A F M L L M R N I V R V V V L
1381 GTGTCTCAGCCAAAAATGCGTTCATGCTACTCATGCGAAACATTGTGAGGGTGGTCTGTC
480 D K V T D L L L F F G K L L V V G G V G
1441 TGGACAAAGTCACAGACCTGCTGCTGTTCTTTGGGAAGCTGCTGGTGGTCGGAGGCGTGG
500 V L S F F F F S G R I P G L G K D F K S
1501 GGGTCTGTCTTCTTTTCTTCTTCTCCGGTCGCATCCCGGGGCTGGGTAAAGACTTTAAGA
520 P H L N Y Y W L P I M T S I L G A Y V I
1561 GCCCCACCTCAACTATTACTGGCTGCCCATCATGACCTCCATCCTGGGGGCTATGTCA
540 A S G F F S V F G M C V D T L F L C F L

图10-3

```
1621 TCGCCAGCGGCTTCTTCAGCGTTTTCGGCATGTGTGTGGACACGCTCTTCCTCTGCTTCC
560 E D L E R N N G S L D R P Y Y M S K S L
1681 TGGAGACCTGGAGCGGAACAACGGCTCCCTGGACCGGCCCTACTACATGTCCAAGAGCC
580 L K I L G K K N E A P P D N K K R K K *
1741 TTCTAAAGATTCTGGGCAAGAAGAACGAGGCGCCCCCGGACAACAAGAAGAGGAAGAAGT
1801 GACagctccggccctgatccaggactgcacccccacccccaccgtccagccatccaacctc
1861 acttcgccttacaggtctccattttgtggtaaaaaaagggttttaggccaggcgccgtggc
1921 tcacgcctgtaatccaacactttgagaggctgaggcgggcggtatcacctgagtcaggagt
1981 tcgagaccagcctggccaacatggtgaaacctccgtctctattaaaaatacaaaaattag
2041 ccgagagtggtggcatgcacctgtcatcccagctactcgggaggctgaggcaggagaatc
2101 gcttgaacccgggaggcagagggttgcaagtgcgcgagatcgcgccactgcactccaacct
2161 gggtgacagactctgtctccaaaaacaaacaaacaaaagattttattaaagatat
2221 ttgttaactcagtaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

图 1H. 24P4C12 变体 8 的 cDNA(SEQ ID NO:15)和氨基酸序列(SEQ ID NO:16)。起始的甲硫氨酸以下划线标示。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2174，包括终止密码子。

```
1 M G G K Q R D E D D E A Y G K P V K Y
1 gagccATGGGGGAAAGCAGCGGGACGAGGATGACGAGGCCTACGGGAAGCCAGTCAAAT
20 D P S F R G P I K N R S C T D V I C C V
61 ACGACCCCTCCTTTTCGAGGCCCATCAAGAACAGAAGCTGCACAGATGTCATCTGCTGCG
40 L F L L F I L G Y I V V G I V A W L Y G
121 TCCTCTTCCTGCTCTTCATTCTAGGTTACATCGTGGTGGGGATTGTGGCCTGGTTGTATG
60 D P R Q V L Y P R N S T G A Y C G M G E
181 GAGACCCCGGCAAGTCCTCTACCCAGGAACCTCTACTGGGGCCTACTGTGGCATGGGGG
80 N K D K P Y L L Y F N I F S C I L S S N
241 AGAACAAAGATAAGCCGTATCTCCTGTACTTCAACATCTTCAGCTGCATCCTGTCCAGCA
100 I I S V A E N G L Q C P T P Q V C V S S
301 ACATCATCTCAGTTGCTGAGAACGGCCTACAGTGCCCCACACCCAGGTGTGTGTGTCTCT
120 C P E D P W T V G K N E F S Q T V G E V
361 CCTGCCCGGAGGACCCATGGACTGTGGGAAAAACGAGTTCTCACAGACTGTTGGGGAAG
140 F Y T K N R N F C L P G V P W N M T V I
421 TCTTCTATACAAAAACAGGAACCTTTTGTCTGCCAGGGGTACCCTGGAATATGACGGTGA
160 T S L Q Q E L C P S F L L P S A P A L G
481 TCACAAGCCTGCAACAGGAACCTCTGCCCCAGTTTCCTCCTCCCCTCTGCTCCAGCTCTGG
180 R C F P W T N V T P P A L P G I T N D T
541 GGCCTGCTTTCCATGGACCAACGTTACTCCACCGGCGCTCCCAGGGATCACCAATGACA
200 T I Q Q G I S G L I D S L N A R D I S V
601 CCACCATACAGCAGGGGATCAGCGGTCTTATTGACAGCCTCAATGCCCGAGACATCAGTG
```

图1H-2

220 K I F E D F A Q S W Y W I L V A L G V A
661 TTAAGATCTTTGAAGATTTTGCCAGTCCTGGTATTGGATTCTTGTGCCCTGGGGGTGG
240 L V L S L L F I L L L R L V A G P L V L
721 CTCTGGTCTTGAGCCTACTGTTTATCTTGCTTCTGCGCCTGGTGGCTGGGCCCCTGGTGC
260 V L I L G V L G V L A Y G I Y Y C W E E
781 TGGTGCTGATCCTGGGAGTGCTGGGCGTGCTGGCATAACGGCATCTACTACTGCTGGGAGG
280 Y R V L R D K G A S I S Q L G F T T N L
841 AGTACCGAGTGCTGCGGGACAAGGGCGCCTCCATCTCCCAGCTGGGTTTACCACCAACC
300 S A Y Q S V Q E T W L A A L I V L A V L
901 TCAGTGCCTACCAGAGCGTG CAGGAGACCTGGCTGGCCGCCCTGATCGTGTGGCGGTGC
320 E A I L L L M L I F L R Q R I R I A I A
961 TTGAAGCCATCCTGCTGCTGATGCTCATCTTCTGCGGCAGCGGATTTCGTATTGCCATCG
340 L L K E A S K A V G Q M M S T M F Y P L
1021 CCCTCCTGAAGGAGGCCAGCAAGGCTGTGGGACAGATGATGTCTACCATGTTCTACCCAC
360 V T F V L L L I C I A Y W A M T A L Y L
1081 TGGTCACCTTTGTCTCTCTCATCTGCATTGCCTACTGGGCCATGACTGCTCTGTACC
380 A T S G Q P Q Y V L W A S N I S S P G C
1141 TGGCTACATCGGGGCAACCCAGTATGTGCTCTGGGCATCCAACATCAGCTCCCCCGGCT
400 E K V P I N T S C N P T A H L V N S S C
1201 GTGAGAAAGTGCCAATAAATACATCATGCAACCCACGGCCACCTTGTGAACCTCTCGT
420 P G L M C V F Q G Y S S K G L I Q R S V
1261 GCCCAGGGCTGATGTGCGTCTTCCAGGGCTACTCATCCAAAGGCCTAATCCAACGTTCTG
440 F N L Q I Y G V L G L F W T L N W V L A
1321 TCTTCAATCTGCAAATCTATGGGGTCTCTGGGGCTCTTCTGGACCCCTTAACCTGGGTACTGG
460 L G Q C V L A G A F A S F Y W A F H K P
1381 CCCTGGGCCAATGCGTCTCGCTGGAGCCTTTGCCTCCTTCTACTGGGCCTTCCACAAGC
480 Q D I P T F P L I S A F I R T L R Y H T
1441 CCCAGGACATCCCTACCTTCCCTTAATCTCTGCCTTCATCCGCACACTCCGTTACCACA
500 G S L A F G A L I L T L V Q I A R V I L
1501 CTGGGTCATTGGCATTGGAGCCCTCATCCTGACCCTTGTGCAGATAGCCGGGTCACTCT
520 E Y I D H K L R G V Q N P V A R C I M C
1561 TGGAGTATATTGACCACAAGCTCAGAGGAGTG CAGAACCCTGTAGCCCGCTGCATCATGT
540 C F K C C L W C L E K F I K F L N R N A
1621 GCTGTTTCAAGTGCTGCCTCTGGTGTCTGGAAAAATTTATCAAGTTCCTAAACCGCAATG
560 Y I M I A I Y G K N F C V S A K N A F M
1681 CATACATCATGATCGCCATCTACGGGAAGAATTTCTGTGTCTCAGCCAAAATGCGTTCA
580 L L M R N I V R V V V L D K V T D L L L
1741 TGCTACTCATGCGAAACATTGT CAGGGTGGTCTGCTGGACAAAGTCACAGACCTGCTGC
600 F F G K L L V V G G V G V L S F F F F S
1801 TGTTCTTTGGGAAGCTGCTGGTGGTGGGAGGCGTGGGGTCTGTCTTCTTTTTTTTCT
620 G R I P G L G K D F K S P H L N Y Y W L

图1H-3

```

1861 CCGGTCGCATCCCGGGGCTGGGTAAAGACTTTAAGAGCCCCACCTCAACTATTACTGGC
640 P I M R N P I T P T G H V F Q T S I L G
1921 TGCCCATCATGAGGAACCCAATAACCCCAACGGGTCATGTCTTCCAGACCTCCATCCTGG
660 A Y V I A S G F F S V F G M C V D T L F
1981 GGGCCTATGTCATCGCCAGCGGCTTCTTCAGCGTTTTTCGGCATGTGTGTGGACACGCTCT
680 L C F L E D L E R N N G S L D R P Y Y M
2041 TCCTCTGCTTCTGGAAGACCTGGAGCGGAACAACGGCTCCCTGGACCGGCCCTACTACA
700 S K S L L K I L G K K N E A P P D N K K
2101 TGTCCAAGAGCCTTCTAAAGATTCTGGGCAAGAAGAACGAGGCGCCCCGACAACAAGA
720 R K K *
2161 AGAGGAAGAAGTGAcagctccggccctgatccaggactgcacccacccccaccgtccag
2221 ccatccaacctcacttcgccttacaggtctccattttgtggtaaaaaaagggttttaggcc
2281 aggcgccgtggctcacgcctgtaatccaacactttgagaggctgaggcggcggtatcacc
2341 tgagtccaggagttcgagaccagcctggccaacatggtgaaacctccgtctctattaaaaa
2401 taaaaaattagccgagagtgggtggcatgcacctgtcatcccagctactcgggagggtga
2461 ggcaggagaatcgcttgaacccgggaggcagaggttgagtgagccgagatcgcgccact
2521 gcactccaacctgggtgacagactctgtctccaaaacaaaacaaaacaaaagattt
2581 tattaaagatatattttgttaactcagtaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1I. 24P4C12 变体 9 的 cDNA(SEQ ID NO:17)和氨基酸序列(SEQ ID NO:18)。起始的甲硫氨酸以下划线标示。开放阅读框从核酸 6 延伸至 2144，包括终止密码子。

```

1      M G G K Q R D E D D E A Y G K P V K Y
1 gagccATGGGGGGAAAGCAGCGGGACGAGGATGACGAGGCCTACGGGAAGCCAGTCAAAT
20    D P S F R G P I K N R S C T D V I C C V
61    ACGACCCCTCCTTTCGAGGCCCCATCAAGAACAGAAGCTGCACAGATGTCATCTGCTGCG
40    L F L L F I L G Y I V V G I V A W L Y G
121   TCCTCTTCCTGCTCTTCATTCTAGGTTACATCGTGGTGGGGATTGTGGCCTGGTTGTATG
60    D P R Q V L Y P R N S T G A Y C G M G E
181   GAGACCCCCGGCAAGTCTCTACCCCAGGAAGTCTACTGGGGCCTACTGTGGCATGGGGG
80    N K D K P Y L L Y F N I F S C I L S S N
241   AGAACAAAGATAAGCCGTATCTCCTGTACTTCAACATCTTCAGCTGCATCCTGTCCAGCA
100   I I S V A E N G L Q C P T P Q V C V S S
301   ACATCATCTCAGTTGCTGAGAACGGCCTACAGTGCCCCACACCCCAGGTGTGTGTGTCCT
120   C P E D P W T V G K N E F S Q T V G E V
361   CCTGCCCGGAGGACCCATGGACTGTGGGAAAAAACGAGTTCTCACAGACTGTTGGGGAAG
140   F Y T K N R N F C L P G V P W N M T V I
421   TCTTCTATACAAAAACAGGAAGTTTTGTCTGCCAGGGGTACCCTGGAATATGACGGTGA

```


图1 I-2

160 T S L Q Q E L C P S F L L P S A P A L G
481 TCACAAGCCTGCAACAGGAACCTGCCCCAGTTTCTCCTCCCCCTCTGCTCCAGCTCTGG
180 R C F P W T N V T P P A L P G I T N D T
541 GGCCTGCTTTCCATGGACCAACGTTACTCCACCGGCGCTCCCAGGGATCACCAATGACA
200 T I Q Q G I S G L I D S L N A R D I S V
601 CCACCATACAGCAGGGGATCAGCGGTCTTATTGACAGCCTCAATGCCGAGACATCAGTG
220 K I F E D F A Q S W Y W I L V A L G V A
661 TTAAGATCTTTGAAGATTTTGCCAGTCCTGGTATTGGATTCTTGTGCCCCTGGGGGTGG
240 L V L S L L F I L L L R L V A G P L V L
721 CTCTGGTCTTGAGCCTACTGTTTATCTTGCTTCTGCGCCTGGTGGCTGGGCCCCCTGGTGC
260 V L I L G V L G V L A Y G I Y Y C W E E
781 TGGTGCTGATCCTGGGAGTGCTGGGCGTGCTGGCATA CGGCATCTACTACTGCTGGGAGG
280 Y R V L R D K G A S I S Q L G F T T N L
841 AGTACCGAGTGCTGCGGGACAAGGGCGCCTCCATCTCCCAGCTGGGTTTCACCACCAACC
300 S A Y Q S V Q E T W L A A L I V L A V L
901 TCAGTGCCTACCAGAGCGTGCAGGAGACCTGGCTGGCCGCCCTGATCGTGTTGGCGGTGC
320 E A I L L L M L I F L R Q R I R I A I A
961 TTGAAGCCATCCTGCTGCTGATGCTCATCTTCTGCGGCAGCGGATTCTGATTGCCATCG
340 L L K E A S K A V G Q M M S T M F Y P L
1021 CCCTCCTGAAGGAGGCCAGCAAGGCTGTGGGACAGATGATGTCTACCATGTTCTACCCAC
360 V T F V L L L I C I A Y W A M T A L Y P
1081 TGGTCACCTTTGTCTCCTCCTCATCTGCATTGCCTACTGGGCCATGACTGCTCTGTATC
380 L P T Q P A T L G Y V L W A S N I S S P
1141 CTCTGCCCCAGCAGCCAGCCACTCTTGGATATGTGCTCTGGGCATCCAACATCAGCTCCC
400 G C E K V P I N T S C N P T A H L V N S
1201 CCGGCTGTGAGAAAGTGCCAATAAATACATCATGCAACCCACGGCCACCTTGTGAACT
420 S C P G L M C V F Q G Y S S K G L I Q R
1261 CCTCGTGCCAGGGCTGATGTGCGTCTTCCAGGGCTACTCATCCAAAGGCCTAATCCAAC
440 S V F N L Q I Y G V L G L F W T L N W V
1321 GTTCTGTCTTCAATCTGCAAATCTATGGGGTCTGGGGCTCTTCTGGACCCTTAAC TGGG
460 L A L G Q C V L A G A F A S F Y W A F H
1381 TACTGGCCCTGGGCCAATGCGTCTCGCTGGAGCCTTTGCCTCCTTCTACTGGGCCTTCC
480 K P Q D I P T F P L I S A F I R T L R Y
1441 ACAAGCCCCAGGACATCCCTACCTTCCCCTTAATCTCTGCCTTCATCCGCACACTCCGTT
500 H T G S L A F G A L I L T L V Q I A R V
1501 ACCACACTGGGTCAATTGGCATTGGAGCCCTCATCCTGACCCTTGTGCAGATAGCCCGGG
520 I L E Y I D H K L R G V Q N P V A R C I
1561 TCATCTTGGAGTATATTGACCACAAGCTCAGAGGAGTGCAGAACCTGTAGCCCGCTGCA
540 M C C F K C C L W C L E K F I K F L N R
1621 TCATGTGCTGTTTCAAGTGCTGCCTCTGGTGTCTGGAAAAATTTATCAAGTTCCTAAACC
560 N A Y I M I A I Y G K N F C V S A K N A

图1 I-3

1681 GCAATGCATACATCATGATCGCCATCTACGGGAAGAATTTCTGTGTCTCAGCCAAAAATG
580 F M L L M R N I V R V V V L D K V T D L
1741 CGTTCATGCTACTCATGCGAAACATTGTCAGGGTGGTTCGTCCTGGACAAAGTCACAGACC
600 L L F F G K L L V V G G V G V L S F F F
1801 TGCTGCTGTTCTTTGGGAAGCTGCTGGTGGTTCGGAGGCGTGGGGTCCGTCTCCTTCTTTT
620 F S G R I P G L G K D F K S P H L N Y Y
1861 TTTTCTCCGGTCGCATCCCGGGGCTGGGTAAAGACTTTAAGAGCCCCCACCTCAACTATT
640 W L P I M T S I L G A Y V I A S G F F S
1921 ACTGGCTGCCCATCATGACCTCCATCCTGGGGGCTATGTCATCGCCAGCGGCTTCTTCA
660 V F G M C V D T L F L C F L E D L E R N
1981 GCGTTTTCGGCATGTGTGTGGACACGCTCTTCCTCTGCTTCCTGGAAGACCTGGAGCGGA
680 N G S L D R P Y Y M S K S L L K I L G K
2041 ACAACGGCTCCCTGGACCGGCCCTACTACATGTCCAAGAGCCTTCTAAAGATTCTGGGCA
700 K N E A P P D N K K R K K *
2101 AGAAGAACGAGGCGCCCCCGGACAACAAGAAGAGGAAGAAGTGAcagctccggccctgat
2161 ccaggactgcacccccacccccaccgtccagccatccaacctcacttcgccttacaggtct
2221 ccattttgtggtataaaaaagggttttaggccaggcgccgtgggtcacgcctgtaatccaac
2281 actttgagaggctgaggcgggcggtatcacctgagtcaggagttcgagaccagcctggcca
2341 acatggtgaaacctccgtctctattaaaaatacaaaaattagccgagagtggtggcatgc
2401 acctgtcatcccagctactcgggaggctgaggcaggagaatcgcttgaacccgggaggca
2461 gaggttgagtgagccgagatcgcgccactgcactccaacctgggtgacagactctgtct
2521 ccaaaacaaaacaaaacaaaagattttattaaagatatattttgttaactcagtaaaa
2581 aaaaaaaaaaaaaa

图 2A Ha5-1(5)2.1 重链的 cDNA(SEQ ID NO:19)和氨基酸序列(SEQ ID NO:20)。双下划线所示的是前导序列，下划线所示的是重链可变区，以虚线下划标示的是人 IgG2 恒定区。

```

      M E F G L T W V F L V A L L R G V Q C Q
1  ATGGAGTTTGGGCTGACCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCAGTCTCAG
      V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S
61 GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC
      C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A P
121 TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCA
      G K G L E W V A V M S Y D G S K K F Y T
181 GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATGTCATATGATGGAAGTAAAAAATTCTATACA
      D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L
241 GACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG
      Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D G G
301 CAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGGGT
      D Y V R Y H Y Y G M D V W G Q G T T V T
361 GACTATGTCCGCTACCACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
      V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S
421 GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGC
      T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V
481 ACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
      T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L
541 ACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTTA
      Q S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G
601 CAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGC
      T Q T Y T C N V D H K P S N T K V D K T
661 ACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACA
      V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P
721 GTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCG
      S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E
781 TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG
      V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y
841 GTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC
      V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S
901 GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC
      T F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E
961 ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAG
      Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K
1021 TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
      T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M
1081 ACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG
      T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A
1141 ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCC
      V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L
1201 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTG
      D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q
1261 GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
      Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q

```

图 2

图2A-2

1321 CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
 K S L S L S P G K *

1381 AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

图 2B Ha5-1(5)2.1 轻链的 cDNA(SEQ ID NO:21)和氨基酸序列(SEQ ID NO:22)。双下划线所示的是前导序列, 下划线所示的是轻链可变区, 以虚线下划标示的是人 κ 恒定区。

1 M D M R V P A Q L L G L L L L W L P D T
ATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAGCTCCTGGGACTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGATACC
 R C D I Q M T Q S P S T L S A S I G D R

61 AGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCACCCTGTCTGCATCTATAGGAGACAGA
 V T I T C R A S Q G I S Y Y L A W Y Q Q

121 GTCACCATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGGCATTAGCTATTATTTAGCCTGGTATCAGCAG
 K P G K I P K L L I Y D T S S L Q S G V

181 AAACCGGGGAAAATTCTAAGCTCCTGATCTATGATACATCCTCTTTGCAATCAGGGGTC
 P S R F S G S R S G T D L S L T I S S L

241 CCATCTCGATTCACTGGCAGTAGATCTGGGACAGATCTCTCTCTCACCATCAGCAGCCTG
 Q P E D V A T Y Y C Q R Y D S A P L T F

301 CAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAGGTATGACAGTGCCCCGCTCACTTTC
 G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F

361 GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACGTGGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC
 P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N

421 CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC
 F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N

481 TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC
 S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T

541 TCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
 L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H

601 CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT
 Q G L S S P V T K S F N R G E C *

661 CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

图 3A Ha5-1(5)2.1 重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:23)。双下划线所示的是前导序列，下划线所示的是重链可变区，以虚线下划标示的是人 IgG2 恒定区。

```
1  MEFGLTWVFL VALLRGVOCQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS  
51 YGMHWVRQAP GKGLEWVAVM SYDGSKKFYT DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL  
101 QMNSLRAEDT AVYYCARDGG DYVRYHYGYM DVWGQGTTVT VSSASTKGPS  
151 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL  
201 QSSGLYSLSS VVTVPSSNFG TQTYTCNVDH KPSNTKVDKT VERKCCVECP  
251 PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVQFNWY  
301 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVVSVLTV VHQDWLNGKE YKCKVSNKGL  
351 PAPIEKTISK TKGQPREPOV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA  
401 VEWESNGQPE NNYKTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM  
451 HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
```

图 3B Ha5-1(5)2.1 轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:24)。双下划线所示的是前导序列，下划线所示的是轻链可变区，以虚线下划标示的是人 κ 恒定区。

```
1  MDMRVPAOLL GLLLLWLPDT RCDIQMTQSP STLSASIGDR VTITCRASQG  
51 ISYYLAWYQQ KPGKIPKLLI YDTSSLQSGV PSRFSGSRSG TDLSLTISSL  
101 QPEDVATYYC QRYDSAPLTF GGGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG  
151 TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST  
201 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
```

图 3

图4A-2

			T T V T V S S	
	<u>Ha5-1(5)2.1 重链</u>	408	GACCACGGTCACCGTCTCCTCAG	430
98.3 (291/296)	<u>VH3-30</u>		-----	
90.9 (10/11)	<u>D2-21</u>		-----	
96.6 (57/59)	<u>JH6</u>	41		63

图 4A

图 4B: Ha5-1(5)2.1 轻链与人 Ig 种系的比对

<u>ID#</u>		<-----FWR1----->	<
		D I Q M T Q S P S T L S A S I G D R V T I T C	
	<u>Ha5-1(5)2.1 轻链</u>	67 G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C A C C C T G T C T G C A T C T A T A G G A G A C A G A G T C A C C A T C A C T T G C	136
95.1(270/284)	<u>A20</u>	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	70
100(38/38)	<u>JK4</u>	T.....G.....	
<u>ID#</u>		-----CDR1----->	-----FWR2-----
		R A S Q G I S Y Y L A W Y Q Q K P G K I P K L L	
	<u>Ha5-1(5)2.1 轻链</u>	137 G G G C G A G T C A G G G C A T T A G C T A T T A T T A G C C T G G T A T C A G C A G A A A C C G G G A A A T T C C T A A G C T C C T	206
95.1(270/284)	<u>A20</u>	R A S Q G I S N Y L A W Y Q Q K P G K V P K L L	140
100(38/38)	<u>JK4</u>	A.....A.....G.....	
<u>ID#</u>		-----CDR2----->	
		I Y D T S S L Q S G V P S R F S G S R S G T D	
	<u>Ha5-1(5)2.1 轻链</u>	207 G A T C T A T G A T A C A T C C T C T T T G C A T C A - G G G T C C C A T C T C G A T T C A G T G G C A G T A G A T C T G G A C A G A	275
95.1(270/284)	<u>A20</u>	I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G T D	209
100(38/38)	<u>JK4</u>	C.G.....A.....G.....	
<u>ID#</u>		-----FWR3----->	
		L S L T I S S L Q P E D V A T Y Y C Q R Y D S	
	<u>Ha5-1(5)2.1 轻链</u>	276 T C T C T C T C A C C A T C A G C A G C C T G C A G C C T G A A G A T G T G C A C T T A T T A C T G T C A A G G T A T G A C A G T	345
95.1(270/284)	<u>A20</u>	F T L T I S S L Q P E D V A T Y Y C Q K Y N S	279
100(38/38)	<u>JK4</u>	.T..A.....	
<u>ID#</u>		A P L T F G G T K V E I K	
	<u>Ha5-1(5)2.1 轻链</u>	346 G C C C G C T C A C T T T C G C G G A G G A C C A A G G T G G A G A T C A A A C	388
		A P	
95.1(270/284)	<u>A20</u>		284
100(38/38)	<u>JK4</u>	1	38

图 4B

图5-结合于24P4C12的细胞表面的Ha5-1(5)2.1 MAb
来自杂交瘤的Ha5-1(5)2.1 Mab

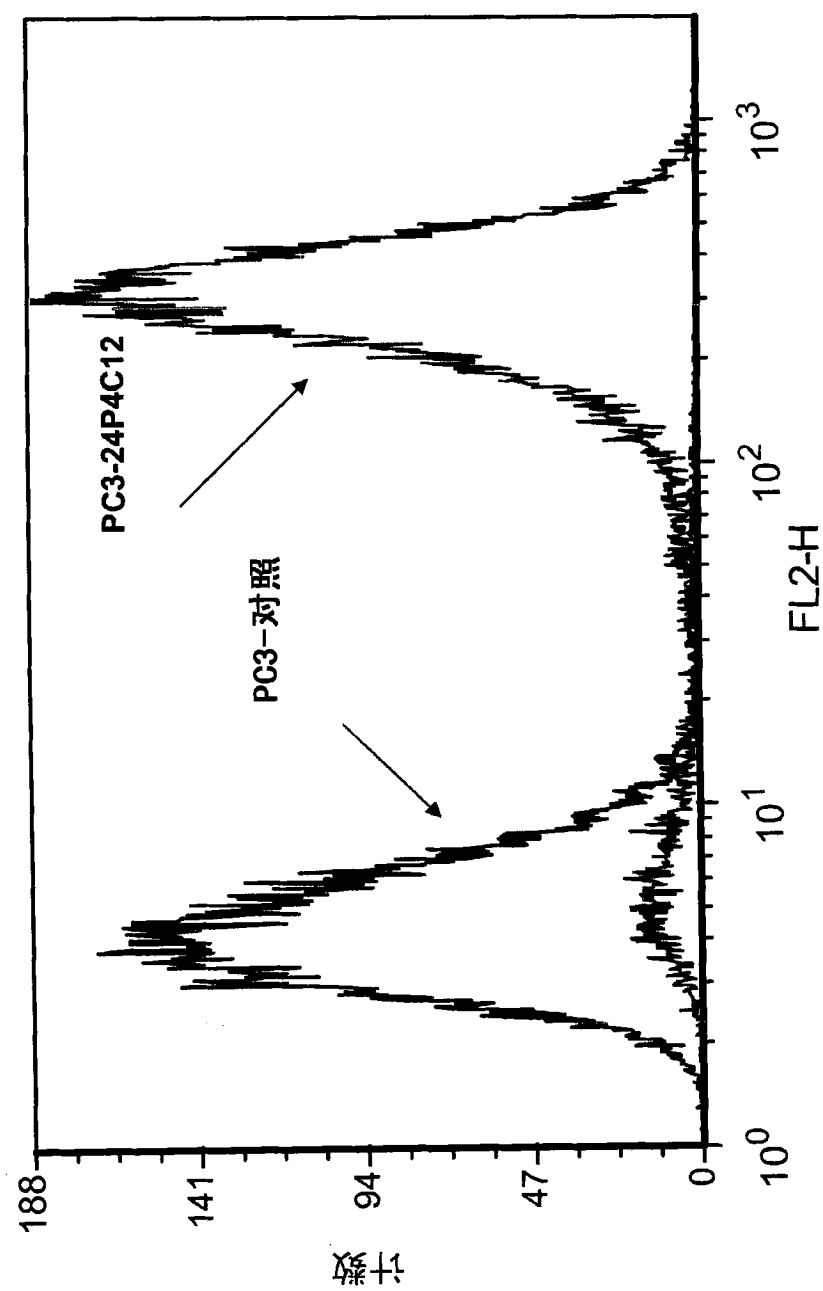


图 5

图5(续) -结合于24P4C12的细胞表面的Ha5-1(5)2.1 MAb
来自CHO转染的Ha5-1(5)2.1 MAb

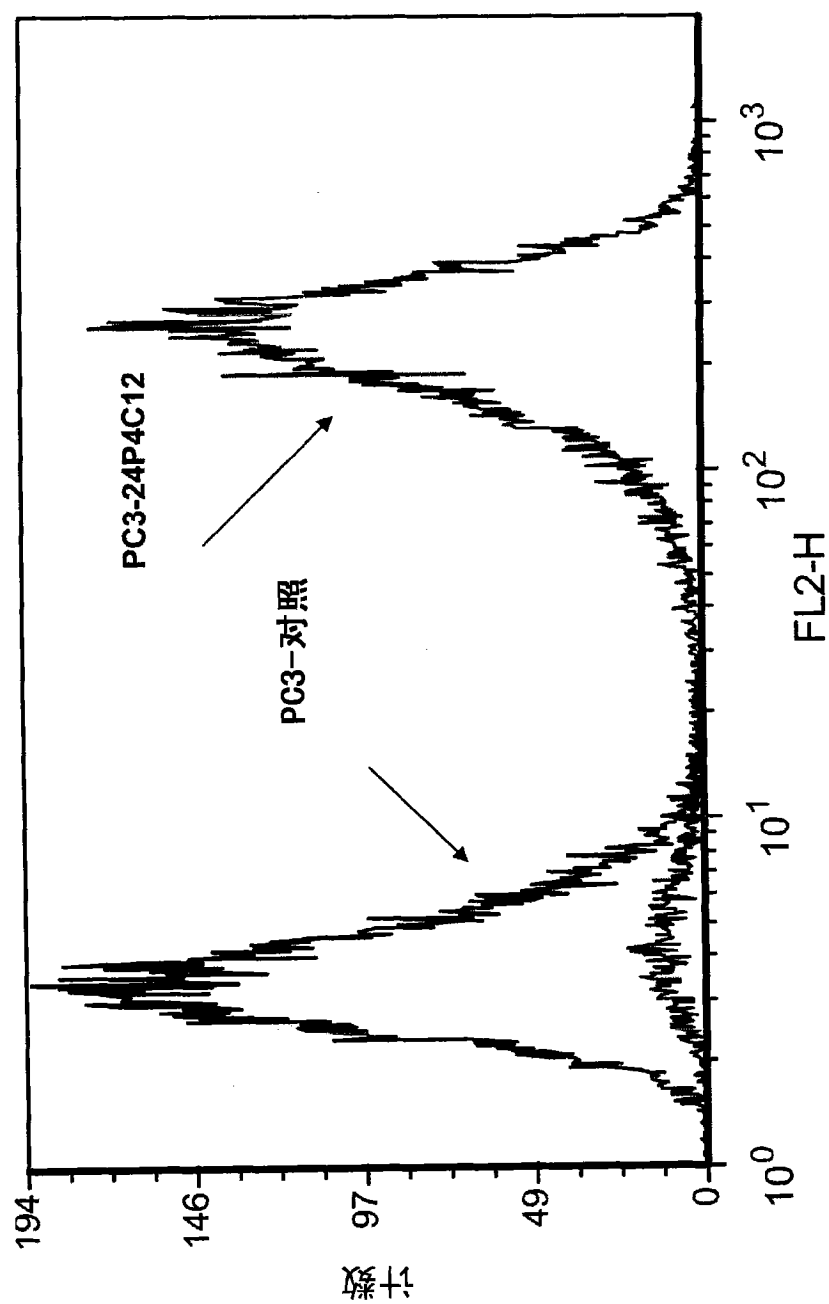


图 5

图6: 由Ha5-1(5)2.1-vcMMAE产生的细胞毒性

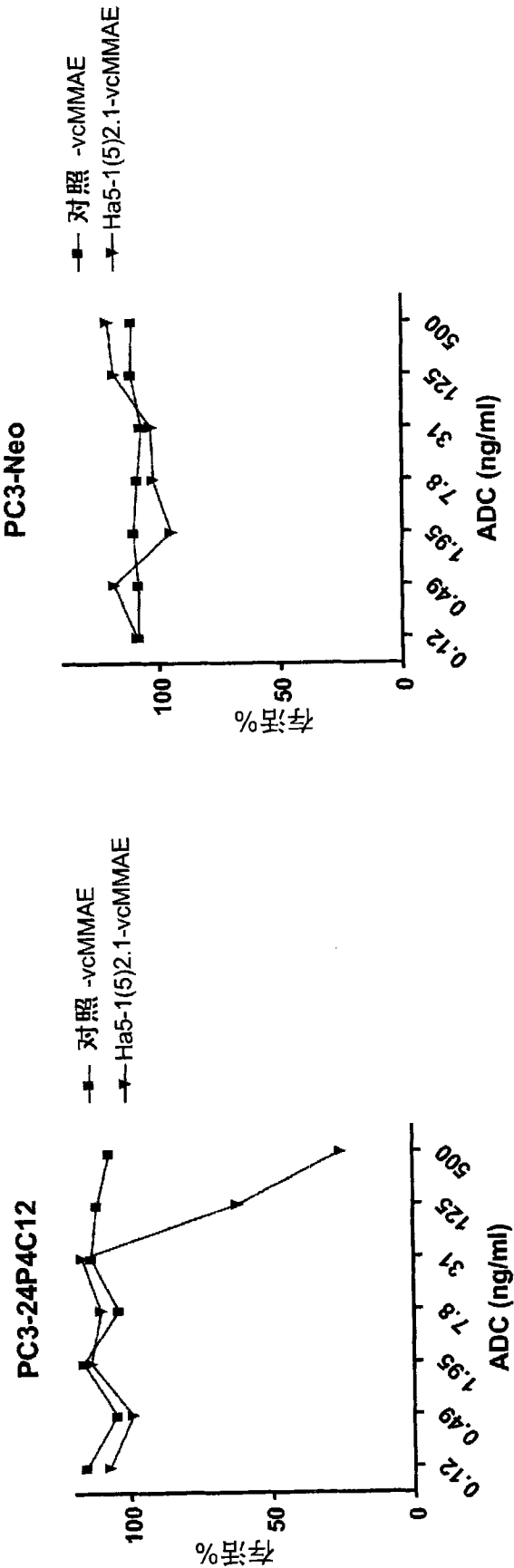


图 6

图7. Ha5-1(5) 2.1vcMMAE抑制SCID小鼠中皮下建立的人非激素依赖性前列腺癌异种移植物的生长

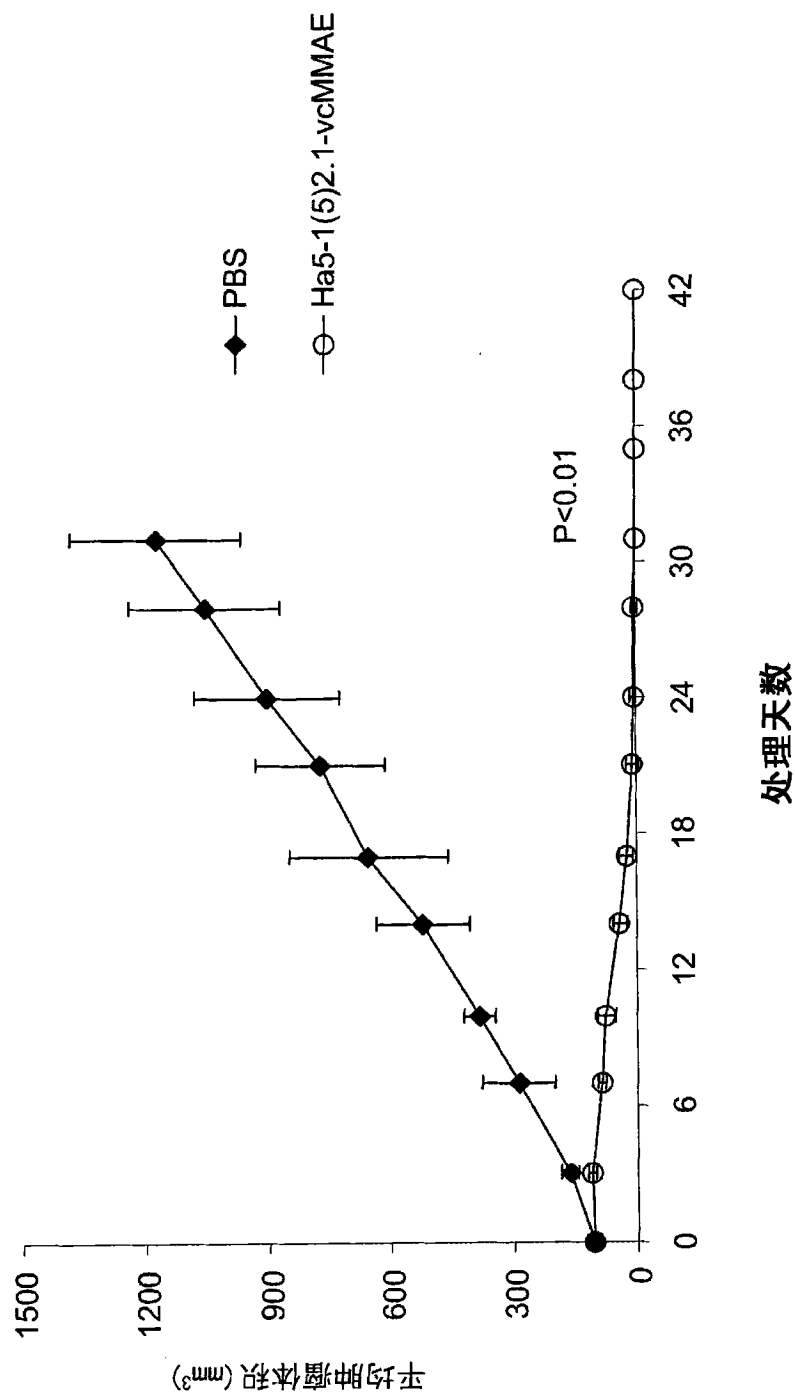


图 7

Ha5-1(5)2.1vcMMAE抑制在SCID小鼠中常位建立的人非雄激素依赖性前列腺癌异种移植物的生长

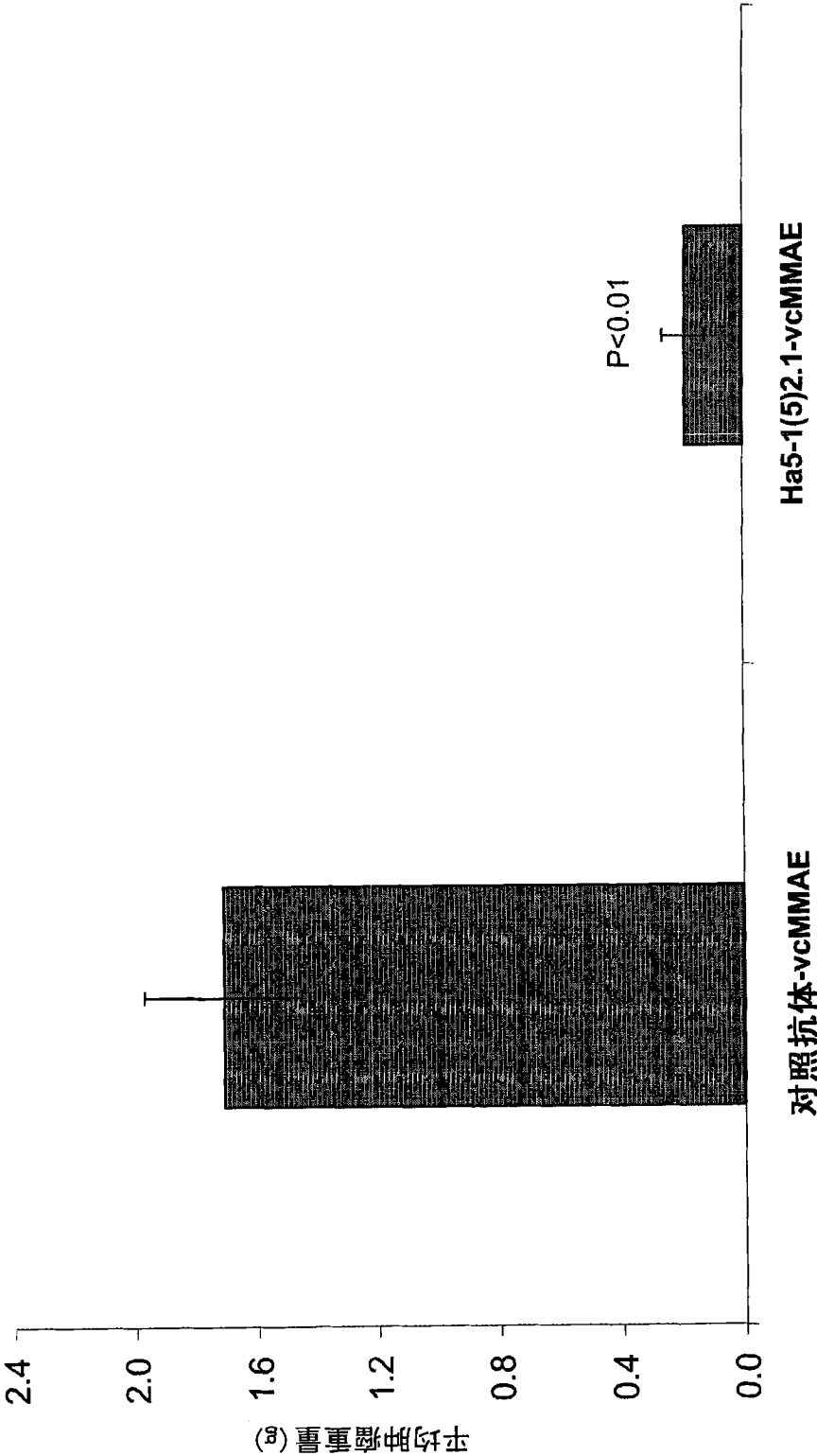


图 8

Ha5-1 (5) 2.1vcMMAE抑制SCID小鼠中皮下建立的人结肠癌异种移植物的生长

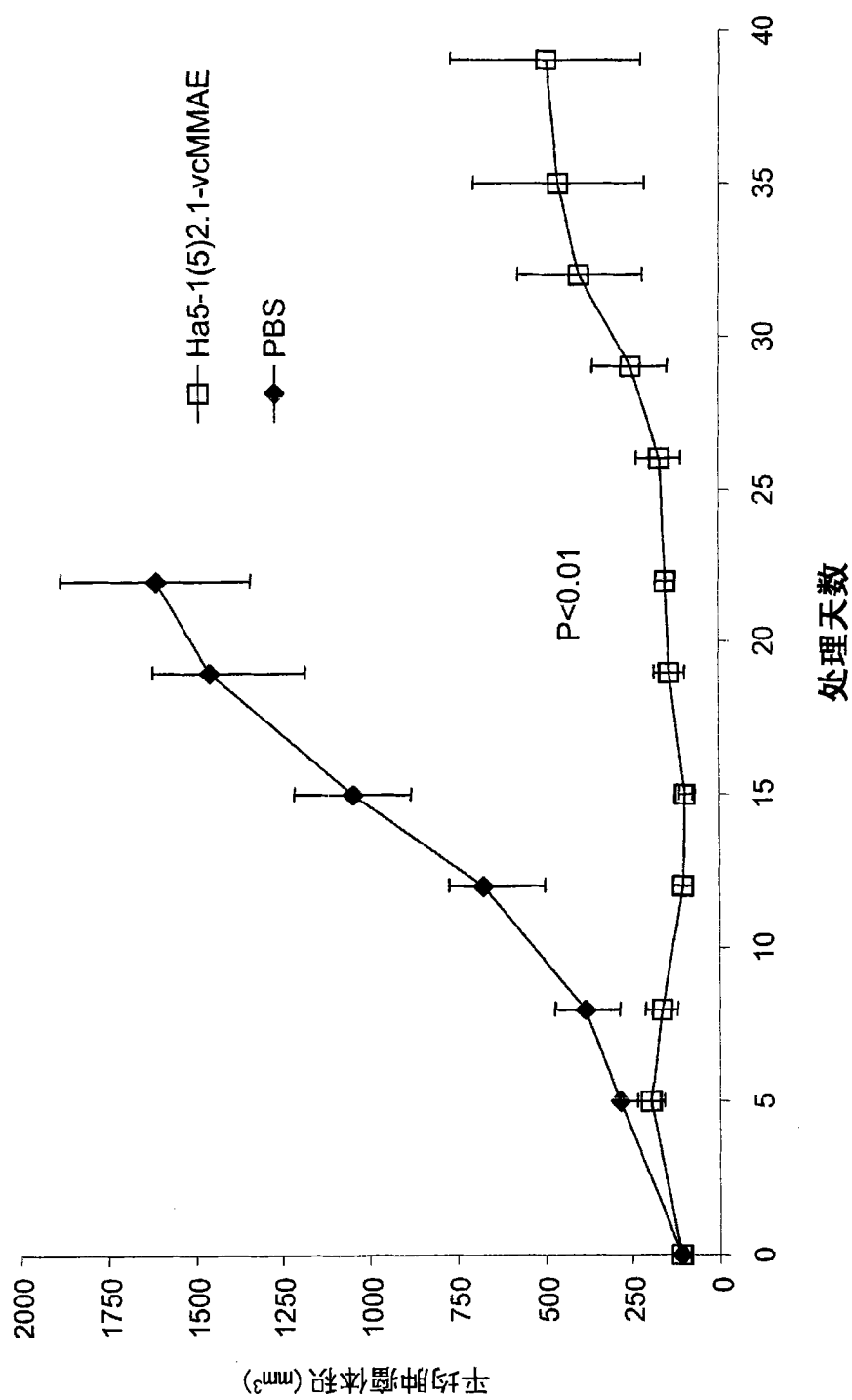


图 9

Ha5-1 (5) 2.1vcMMAE抑制SCID小鼠中皮下建立的结肠癌异种移植物的生长

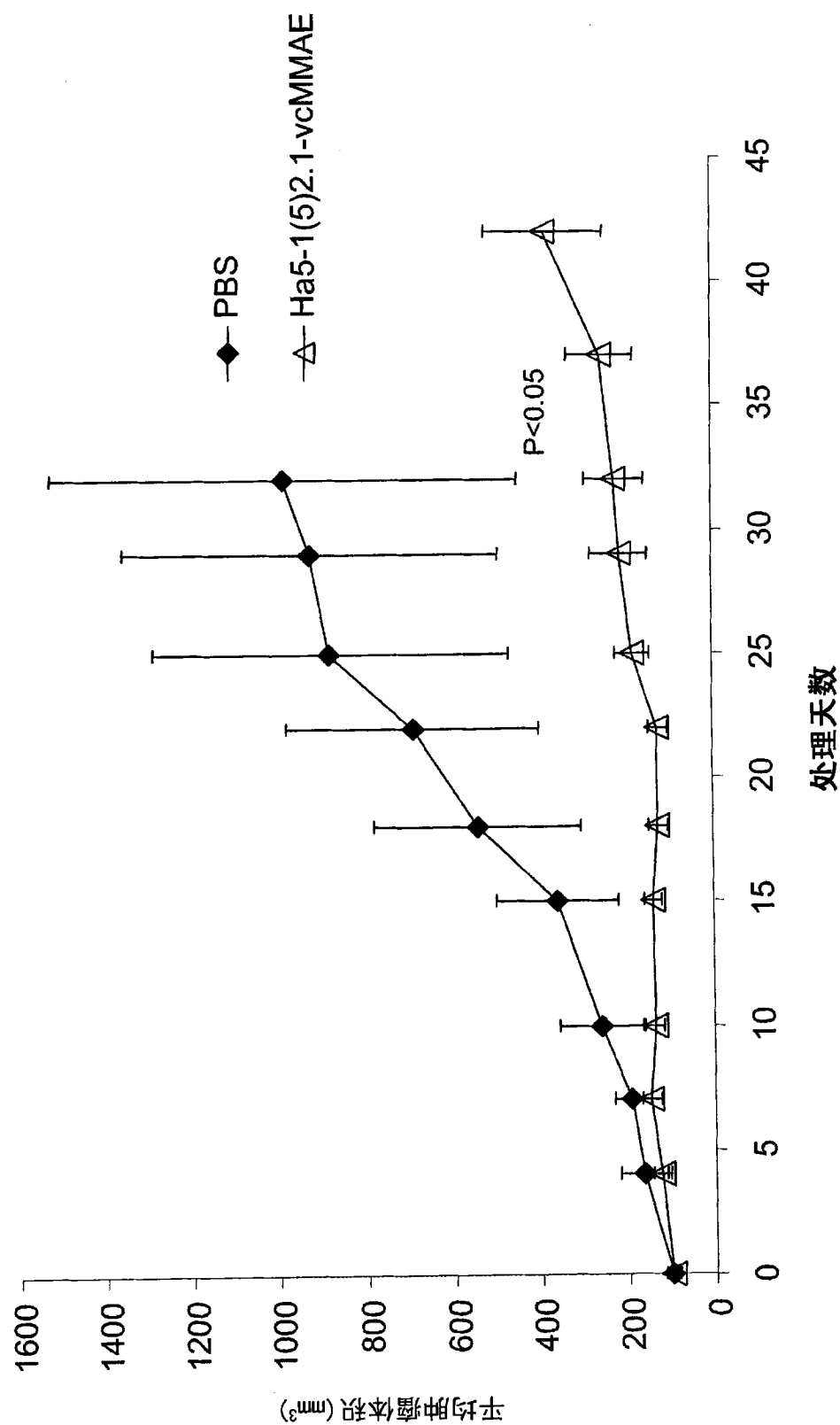


图 10

Ha5-1(5)2.1vcMMAE抑制裸鼠中皮下建立的人卵巢癌异种移植物的生长

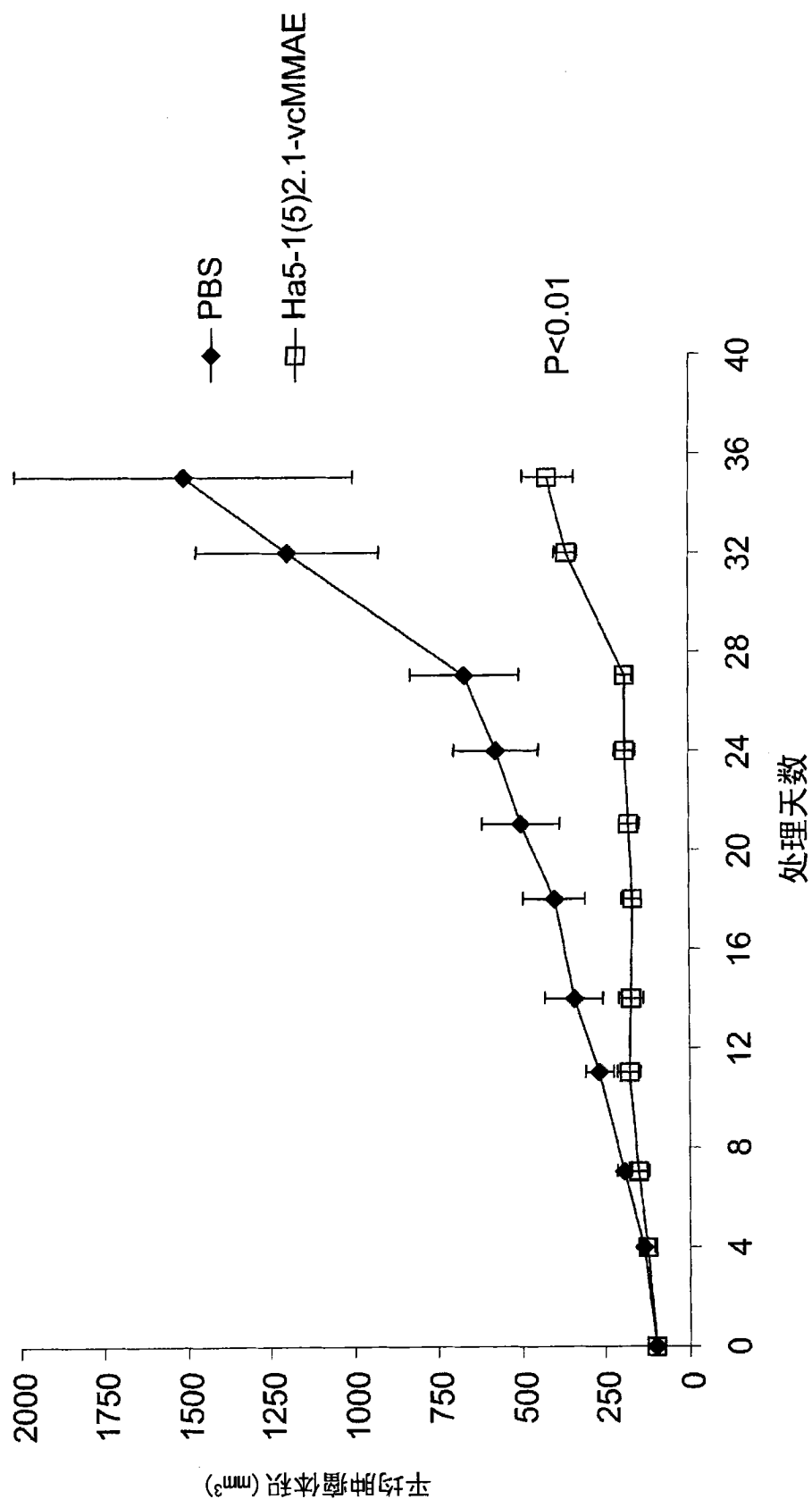


图 11

Ha5-1 (5) 2.1vcMMAE抑制SCID小鼠中皮下建立的胰腺癌异种移植物的生长

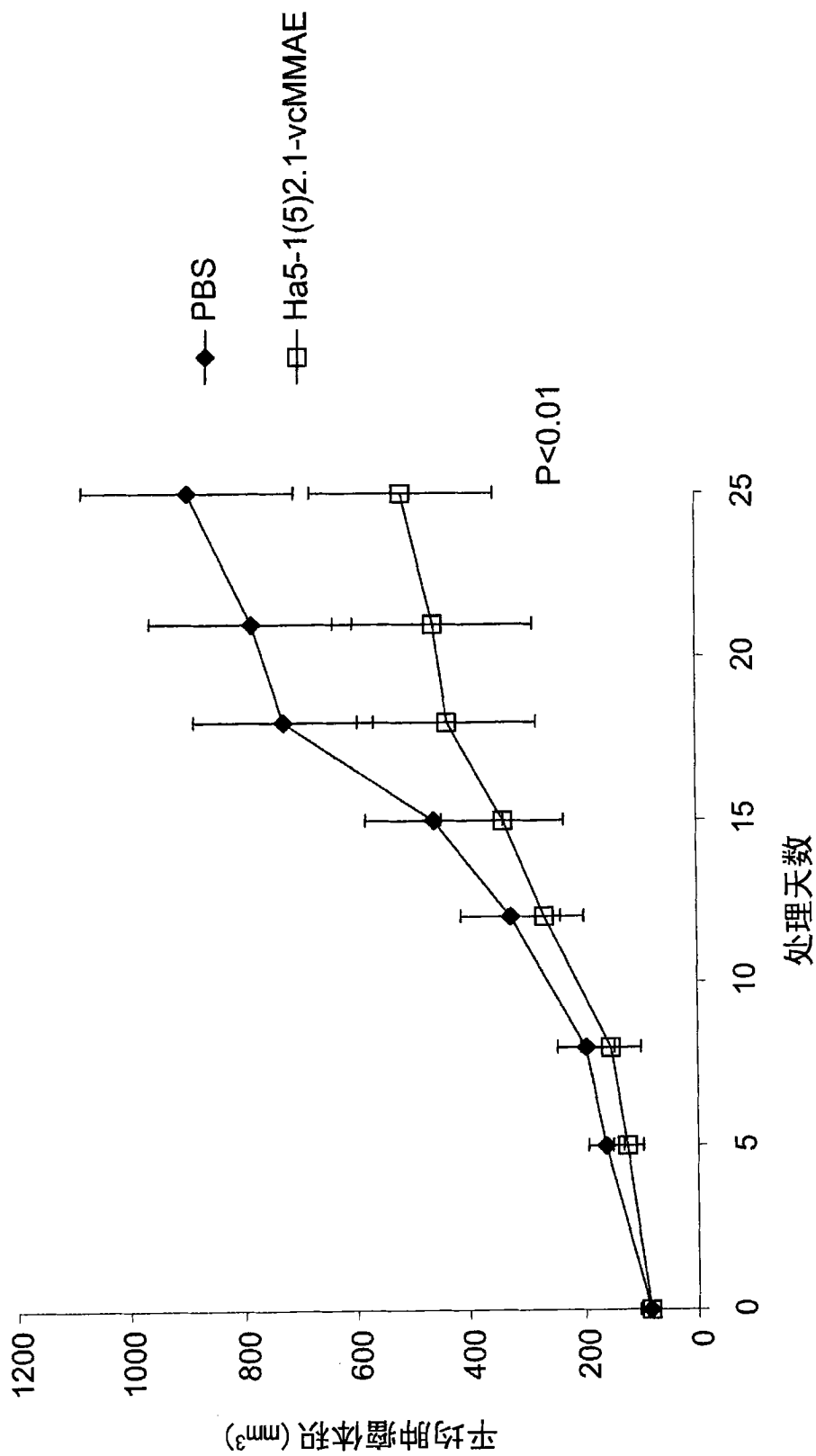


图 12

Ha5-1(5)2.1vcMMAE与其它24P4G12 ADC在前列腺癌LAPC9-AD异种移植瘤中效果的比较

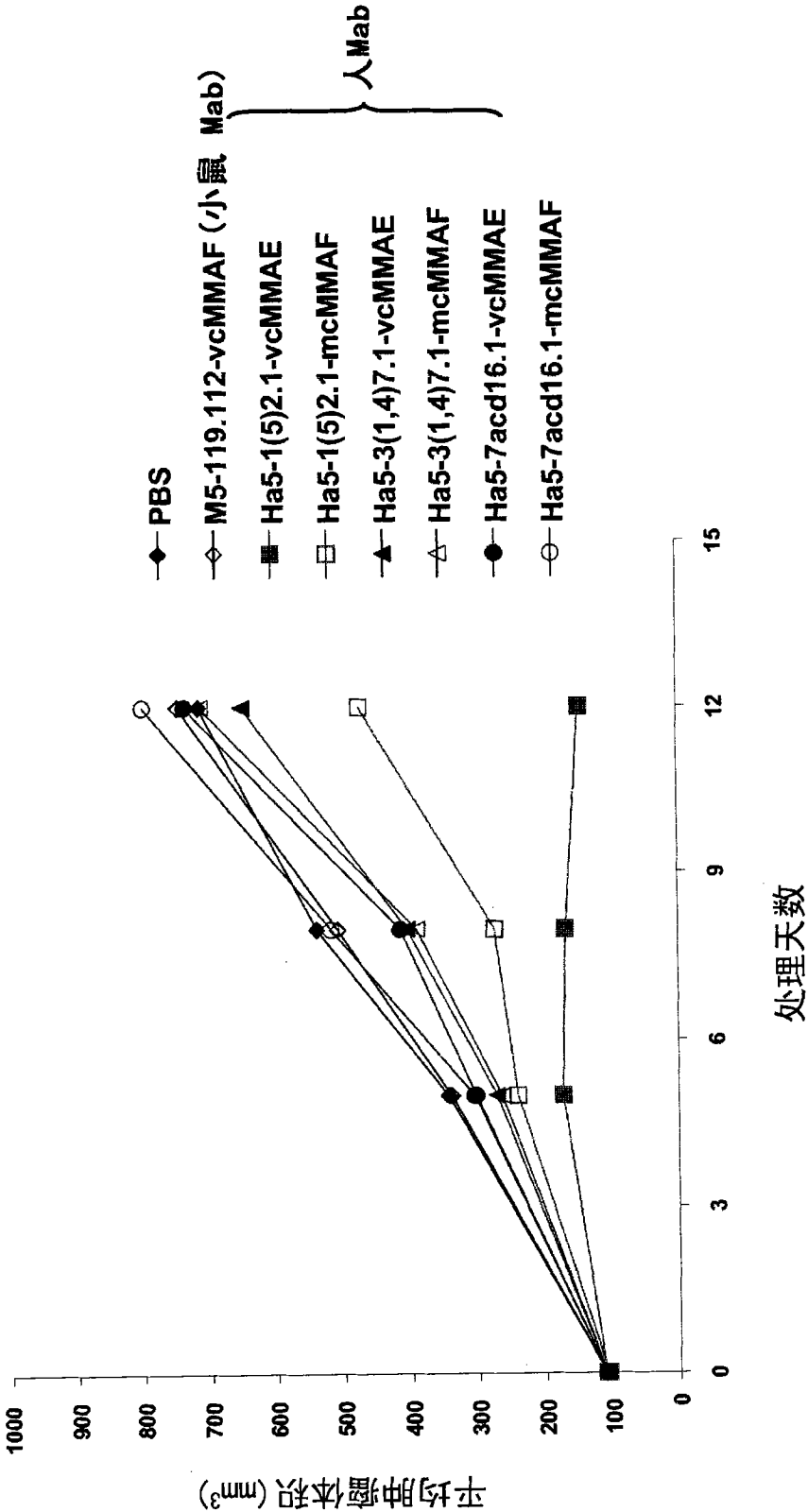
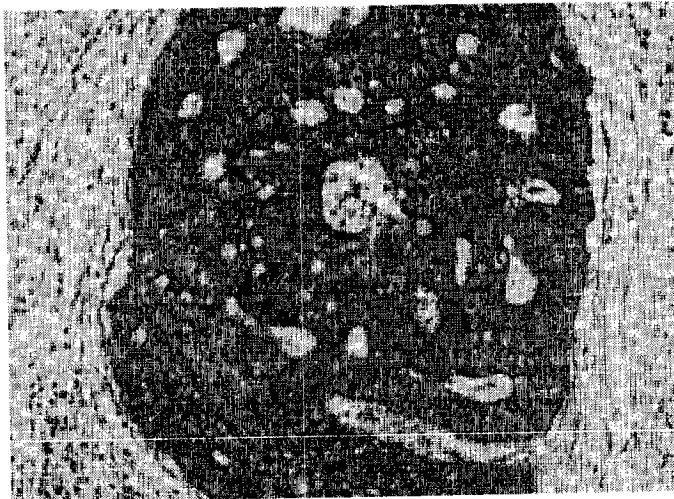


图 13

通过免疫组织化学法在胃癌患者样本中检测24P4C12蛋白

14A



14B

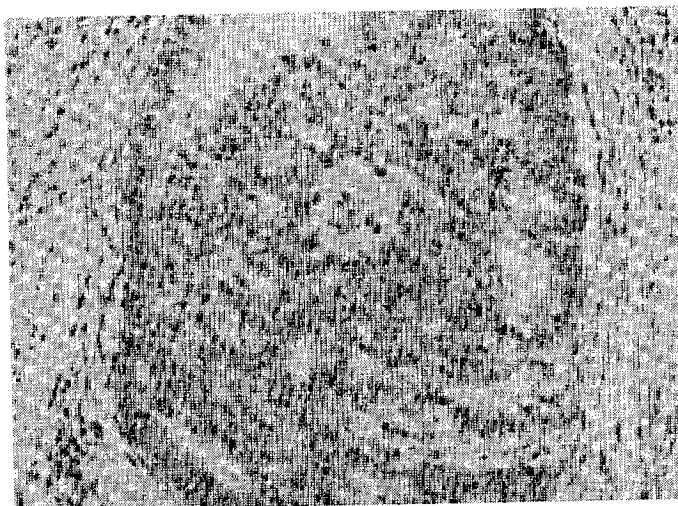
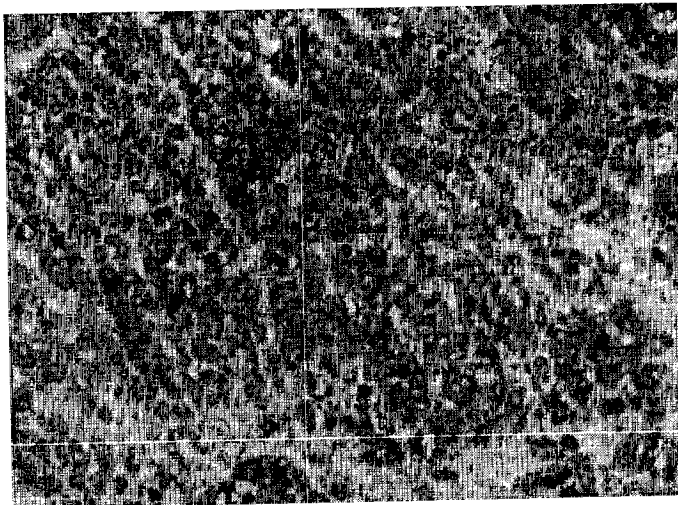


图 14

通过免疫组织化学法在胃癌患者样本中检测24P4C12蛋白

14C



14D

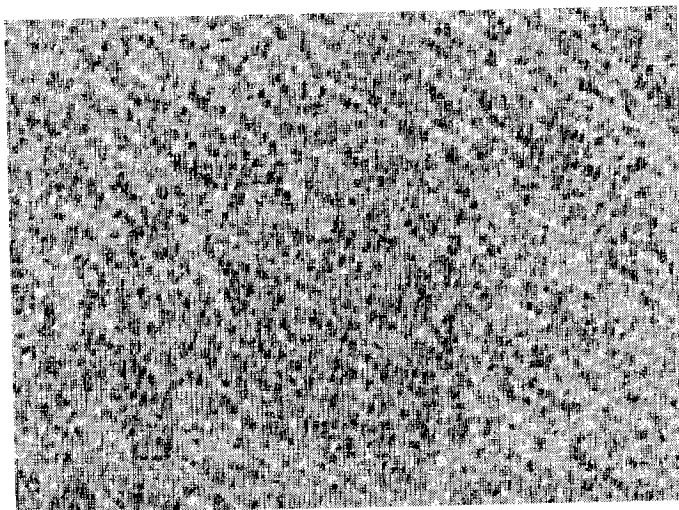


图 14(续)