



(21) 申请号 201910962965.1

(22) 申请日 2019.10.11

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112646038 A

(43) 申请公布日 2021.04.13

(73) 专利权人 迈威(上海)生物科技股份有限公司

地址 201210 上海市浦东新区自由贸易试  
验区蔡伦路230号2幢105室

(72) 发明人 王双 王荣娟 焦莎莎 张畅  
张姣 曾大地 张锦超

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11382  
专利代理师 张伟

(51) Int.Cl.

*C07K 16/30* (2006.01)

*C12N 15/13* (2006.01)

*C12N 15/70* (2006.01)

*C07K 19/00* (2006.01)

*A61K 39/395* (2006.01)

*A61K 47/68* (2017.01)

*A61P 35/00* (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104114580 A, 2014.10.22

CN 107406508 A, 2017.11.28

审查员 张英朔

权利要求书2页 说明书27页  
序列表35页 附图17页

(54) 发明名称

抗人Trop-2抗体及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种结合人肿瘤相关钙信号传感器2 (Trop-2) 蛋白的抗体或其片段, 以及所述抗体或其片段用于预防或治疗疾病的用途。本发明的抗体或其片段能够有效结合人Trop-2蛋白, 而且具有内化活性, 并在ADC药物标记后内化活性增强, 且在小鼠模型的体内药效和安全性上不低于对照抗体。

1. 一种结合人Trop-2的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区和轻链可变区选自以下组合:

- (1) 如SEQ ID NO: 12所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 31所示的氨基酸序列;
- (2) 如SEQ ID NO: 13所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 32所示的氨基酸序列;
- (3) 如SEQ ID NO: 16所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 32所示的氨基酸序列;
- (4) 如SEQ ID NO: 14所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 33所示的氨基酸序列;
- (5) 如SEQ ID NO: 16所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 33所示的氨基酸序列;
- (6) 如SEQ ID NO: 14所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 34所示的氨基酸序列;
- (7) 如SEQ ID NO: 14所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 35所示的氨基酸序列;
- (8) 如SEQ ID NO: 15所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 36所示的氨基酸序列;
- (9) 如SEQ ID NO: 14所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 36所示的氨基酸序列;
- (10) 如SEQ ID NO: 16所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 36所示的氨基酸序列;
- (11) 如SEQ ID NO: 2所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 19所示的氨基酸序列;
- (12) 如SEQ ID NO: 3所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 20所示的氨基酸序列;
- (13) 如SEQ ID NO: 5所示的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO: 24所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段为单克隆抗体、单链抗体、双功能抗体、完全或部分人源化的抗体、嵌合抗体、dsFv、(dsFv)<sub>2</sub>、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或Fv。

3. 根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述双功能抗体为BsFv。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段还包含人或鼠的恒定区。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段包含人或鼠的轻链恒定区(CL)或重链恒定区(CH)。

6. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段包含选自IgG、IgA、IgM、IgD或IgE的重链恒定区或者κ或λ型轻链恒定区。

7. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体为单克隆抗体。

8. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体为鼠源、嵌合或人源化的单克隆抗体。

9. 根据权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述单克隆抗体的重链恒定区为IgG1或IgG4亚型,轻链恒定区为κ型。

10. 根据权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述单克隆抗体的重链恒定区包含如SEQ ID NO: 37所示的氨基酸序列。

11. 根据权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述单克隆抗体的轻链恒定区包含如SEQ ID NO: 38所示氨基酸序列。

12. 根据权利要求10所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述单克隆抗体的轻链恒定区包含如SEQ ID NO: 38所示氨基酸序列。

13. 一种核酸分子,其编码权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

14. 一种载体,其包含权利要求13所述的核酸分子。

15. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求13所述的核酸分子或权利要求14所述的载体,或者所述宿主细胞被权利要求13所述的核酸分子或权利要求14所述的载体转化或转染。

16. 一种药物组合物,其包含权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求13所述的核酸分子、权利要求14所述的载体或权利要求15所述的宿主细胞,以及任选地药学上可接受的辅料。

17. 根据权利要求16所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物还包含其他抗体类药物。

18. 根据权利要求17所述的药物组合物,其特征在于,所述抗体类药物为巨噬细胞类免疫检查点抗体。

19. 根据权利要求17所述的药物组合物,其特征在于,所述抗体类药物为抗CD47抗体。

20. 权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求13所述的核酸分子、权利要求14所述的载体、权利要求15所述的宿主细胞或权利要求16至19中任一项所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗胃癌、胰腺癌、肠癌、卵巢癌、鳞状肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、尿路上皮癌、三阴性乳腺癌或宫颈癌。

21. 一种试剂盒,所述试剂盒包括权利要求1至12中任一项所述的抗体分子或其抗原结合片段、权利要求13所述的核酸分子、权利要求14所述的载体、权利要求15所述的宿主细胞或权利要求16至19中任一项所述的药物组合物。

22. 一种缀合物,所述缀合物包含权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段以及与其缀合的药物,其中所述药物为细胞毒剂。

23. 根据权利要求22所述的缀合物,所述缀合物为由下式所示的抗体药物缀合物(ADC):(权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段)-(接头)-(细胞毒剂)。

24. 根据权利要求23所述的缀合物,其特征在于,所述细胞毒剂为微管蛋白抑制剂或DNA复制抑制剂。

25. 根据权利要求24所述的缀合物,其特征在于,所述微管蛋白抑制剂为紫杉醇或多西他赛。

26. 根据权利要求24所述的缀合物,其特征在于,所述DNA复制抑制剂为伊立替康或其代谢活性物SN-38。

27. 权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求13所述的核酸分子、权利要求14所述的载体或权利要求15所述的宿主细胞在制备抗体药物缀合物(ADC)中的用途,所述抗体药物缀合物用于治疗胃癌、胰腺癌、肠癌、卵巢癌、鳞状肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、尿路上皮癌、三阴性乳腺癌或宫颈癌。

28. 权利要求22至26中任一项所述的缀合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗胃癌、胰腺癌、肠癌、卵巢癌、鳞状肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、尿路上皮癌、三阴性乳腺癌或宫颈癌。

## 抗人Trop-2抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及一种新的抗人Trop-2抗体或其功能性片段。本发明还涉及所述抗体或其功能性片段的应用。

### 背景技术

[0002] Trop-2(Tumor-associated calcium signal transducer 2),又名肿瘤相关钙信号传感器(tumor-associated calcium signal transducer,TACSTD2)、上皮糖蛋白-1抗原(epithelial glycoprotein-1,EGP-1)、胃肠肿瘤相关抗原1(gastrointestinal tumor-associated antigen,GA733-1),是一类由TACSTD2基因编码的细胞表面糖蛋白,全长323个氨基酸,胞外区由3个结构域组成,证实可以二聚体形式存在。

[0003] Trop-2是跨膜糖蛋白,与其它原癌基因不同,Trop2没有突变,这意味着它没有导致过表达的遗传组成改变。Trop-2通过ERK/MAPK和cyclin D1通路刺激细胞生长,从而促进肿瘤的侵袭、血管生成、肿瘤进展以及耐药等机制。已发现Trop-2在多种肿瘤中高表达,尤其是三阴性乳腺癌、非小细胞肺癌等,且与预后相关。相对地,Trop-2在正常组织中表达极低,为ADC药物比较理想的靶点。

[0004] 靶向trop-2的抗体药物目前主要以ADC药物进行开发,不完全统计,临床在研品种在3个以上,其中的小分子偶联物主要包括伊利替康的衍生物和微管蛋白抑制剂。目前认为,选用新颖的低毒性的拓扑异构酶抑制剂代谢产物SN-38比较理想。SN-38与现有微管抑制剂、DNA烷化剂的肿瘤抑制存在差异,特别适用于存在较高异质性、多耐药机制的肿瘤,如三阴乳腺癌、胰腺癌、胃癌等肿瘤。临床进展最快的项目为Immunomedics的IMMU-132项目,已经进行了针对复发和转移的三阴乳腺癌(ASCENT-Study)的三期临床试验、单用或与卡铂联用治疗三阴乳腺癌(NCT02161679)的二期临床试验、治疗尿路上皮癌(NCT03547973)的二期临床试验、治疗实体瘤包括胃癌、宫颈癌、小细胞肺癌(NCT01631552)的一期/二期临床试验等。具有类似技术的抗体偶联药物项目还有第一三共、辉瑞公司以及各大具有ADC基础的药物公司等。

[0005] 目前抗Trop-2的抗体临床在研品种较少。因此,本领域仍需要寻找新型的、特别适合开发ADC药物的抗Trop-2抗体。

### 发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是,通过杂交瘤筛选和人源化技术提供一种抗Trop-2抗体,所述抗体对人Trop-2具有高亲和力,具有癌细胞的特异性杀伤作用;同时,所述抗体具有高内化能力,特别适合于开发ADC药物。

[0007] 针对上述技术问题,本发明提供如下技术方案。

[0008] 一方面,本发明提供一种抗体或其片段,所述抗体或其片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)包含选自以下的CDR组合(HCDR1、HCDR2、HCDR3;LCDR1、LCDR2、LCDR3):

[0009]

	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
1	SYWMY	EINPSNGRTNYNEKFKS	EGHNYDGLGAMDH	RSSQSLTNSYGNTFLS	GISNRFS	FQSTHQPYT
2	DYVIG	EIYLGSGTIYYTEKFKG	GSIFPPFDY	SASSSVSYMY	DTSTLAS	QQWSSYPYT
3	DYVIG	EIYLGSGTIYYAEKFKG	GSIFPPFDY	SASSSVSYMY	DTSTLAS	QQWSSYPYT
4	DYVIG	EIYLGSGTIYYTEKFKG	GSIFPPFDY	RASSSVSYMY	DTSTLAS	QQWSSYPYT
5	DYVIG	EIYLGSGTIYYAEKFKG	GSIFPPFDY	RASSSVSYMY	DTSTLAS	QQWSSYPYT
6	DYVIG	EIYLGSGTIYYTEKFKG	GSIFPPFDY	SASSSVSYMY	DASTLAS	QQWSSYPYT
7	DYVIG	EIYLGSGTIYYTEKFKG	GSIFPPFDY	SASSSVSYMY	DTSTLQS	QQWSSYPYT
8	SYWIN	NIYPSNSYTNYNQKFKD	YRSDGFAY	RASQNIGTSIH	FASESIS	QQNSWPFT
9	SYWIN	NIYPSNSYTNYNQKFKD	YRSDGFAY	RASQNIGTSIE	FASESIS	QQNSWPFT
10	SYWIN	NIYPSNSYTNYNQKFKD	YRSEGFAY	RASQNIGTSIE	FASESIS	QQNSWPFT
11	SYWIN	NIYPSNSYTNYNQKFKD	YRSGGFAY	RASQNIGTSIE	FASESIS	QQNSWPFT
12	SYWIN	NIYPSNSYTNYNQKFKD	YRSDAFAY	RASQNIGTSIE	FASESIS	QQNSWPFT
13	SYWIN	NIYPSNSYTNYNQKFKD	YRSDGFAY	RASQNIGTSIS	FASESIS	QQNSWPFT
14	SYWIN	NIYPSNSYTNYNQKFKD	YRSEGFAY	RASQNIGTSIS	FASESIS	QQNSWPFT
15	SYWIN	NIYPSNSYTNYNQKFKD	YRSGGFAY	RASQNIGTSIS	FASESIS	QQNSWPFT
16	SYWIN	NIYPSNSYTNYNQKFKD	YRSDAFAY	RASQNIGTSIS	FASESIS	QQNSWPFT

[0010]

17	SYWIN	NIYPSNSYTNYNQKFKD	YRSDGFAY	RASQNIGTSIA	FASESIS	QQNSWPFT
18	SYWIN	NIYPSNSYTNYNQKFKD	YRSEGFAY	RASQNIGTSIA	FASESIS	QQNSWPFT
19	SYWIN	NIYPSNSYTNYNQKFKD	YRSGGFAY	RASQNIGTSIA	FASESIS	QQNSWPFT
20	SYWIN	NIYPSNSYTNYNQKFKD	YRSDAFAY	RASQNIGTSIA	FASESIS	QQNSWPFT
21	DSAMS	SISRGGDTYYPDSVKG	DRFGFAY	KSGQSLDSDGKTYFN	LVSMLDS	WQGTHFPFT
22	SYWMH	EITPSDNYTSYNQKFKG	GHGNYVSFDY	RASQDISNYLN	YTSRLHS	QQGYTLPPYT
23	SYWMH	EITPSDNYTSYNQKFKG	GEGNYVSFDY	RASQDISNYLN	YTSRLHS	QQGYTLPPYT
24	SYWMH	EITPSDNYGSYNQKFKG	GHGNYVSFDY	RASQDISNYLN	YTSRLES	QQGYTLPPYT
25	SYWMH	EITPSDNYTSYNQKFKG	GEGNYVSFDY	RASQDISNYLN	YTSRLES	QQGYTLPPYT
26	SYWMH	EITPSDNYGSYNQKFKG	GHGNYVSFDY	RASQDISNYLN	YTSRLQS	QQGYTLPPYT
27	SYWMH	EITPSDNYGSYNQKFKG	GHGNYVSFDY	RASQDISNYLN	YTSRLHS	QQYYTLPPYT
28	SYWMH	EITPGDNYTSYNQKFKG	GHGNYVSFDY	RASQDISNYLN	YTSRLHS	QQGYSLPPYT
29	SYWMH	EITPSDNYGSYNQKFKG	GHGNYVSFDY	RASQDISNYLN	YTSRLHS	QQGYSLPPYT
30	SYWMH	EITPSDNYTSYNQKFKG	GEGNYVSFDY	RASQDISNYLN	YTSRLHS	QQGYSLPPYT

[0011] 所述抗体或其片段的结合人Trop-2。

[0012] 优选地,所述重链可变区包含选自以下的序列:

[0013] SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:17中任一个所示的氨基酸序列或与所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和/或

[0014] 所述轻链可变区包含选自以下的序列:

[0015] SEQ ID NO:18至SEQ ID NO:36中任一个所示的氨基酸序列或与所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列。

[0016] 根据本发明的具体实施方式,本发明的抗体或其片段包含的重链可变区和轻链可变区可以选自以下组合:

[0017] (1) 如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0018] (2) 如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0019] (3) 如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0020] (4) 如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0021] (5) 如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0022] (6) 如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0023] (7) 如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0024] (8) 如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0025] (9) 如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0026] (10) 如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0027] (11) 如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列或与如SEQ ID



NO:30所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0041] (25) 如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0042] (26) 如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0043] (27) 如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0044] (28) 如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0045] (29) 如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0046] (30) 如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0047] (31) 如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0048] (32) 如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0049] (33) 如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0050] (34) 如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;和,如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列。

[0051] 一般地,所述抗体或其片段为单克隆抗体、单链抗体、双功能抗体、单域抗体、纳米抗体、完全或部分人源化的抗体或者嵌合抗体等任意形式,或者,所述抗体或其片段为半抗体或半抗体的抗原结合片段,例如scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)<sub>2</sub>、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或Fv;所述抗体或其片段可为小鼠、大鼠、人或任何其它来源的;

[0052] 优选地,所述抗体或其片段还包含人或鼠的恒定区,优选包含人或鼠的轻链恒定区(CL)和/或重链恒定区(CH);

[0053] 更优选地,所述抗体或其片段包含选自IgG、IgA、IgM、IgD或IgE的重链恒定区和/或κ或λ型轻链恒定区。

[0054] 根据本发明的具体实施方式,所述抗体为单克隆抗体,优选为鼠源、嵌合或人源化的单克隆抗体;优选地,所述单克隆抗体的重链恒定区为IgG1或IgG4亚型,轻链恒定区为κ型;

[0055] 根据本发明的具体实施方式,所述单克隆抗体的重链恒定区包含如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列或者与所述氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;

[0056] 优选地,所述单克隆抗体的轻链恒定区包含如SEQ ID NO:38所示氨基酸序列或者与所述氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列。

[0057] 本发明上文所述的至少75%同一性为至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、进一步优选至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或甚至99%同一性等≥75%的任何百分比的同一性。

[0058] 基于本发明的抗体或其片段,另一方面,本发明还提供一种核酸分子,其编码本发明任意抗体或其片段中的重链CDR、轻链CDR、重链可变区、轻链可变区、重链或轻链。

[0059] 还一方面,本发明提供一种载体,其包含本发明的核酸分子。所述载体可以为真核表达载体、原核表达载体、人工染色体及噬菌体载体等。

[0060] 本发明的载体或核酸分子可以用于转化或转染宿主细胞或以任何方式进入宿主细胞内,用于保存或表达抗体等目的。

[0061] 因此,另一方面,本发明提供一种宿主细胞,所述宿主细胞包含本发明的核酸分子和/或载体,或者所述宿主细胞被本发明的核酸分子和/或载体转化或转染。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞,例如细菌或昆虫、真菌、植物或动物细胞。

[0062] 基于本发明的公开内容,本发明提供的抗体或其片段、核酸分子、载体和/或宿主细胞可以通过使用本领域已知的任何常规技术方法获得。所述抗体或其片段、核酸分子、载体和/或宿主细胞可以被包含在药物组合物中,更特别地被包含在药物制剂中,从而根据实际需要用于各种目的。

[0063] 因此,在又一方面,本发明还提供一种药物组合物,所述药物组合物包含本发明所述的抗体或其片段、核酸分子、载体和/或宿主细胞,以及任选地药学上可接受的辅料。

[0064] 本发明的抗体或其片段能够与具有巨噬细胞吞噬作用的其他抗体类药物联合使用。因此优选地,所述抗体类药物通过与细胞表面表达蛋白的结合促进巨噬细胞对所述细胞的吞噬。因此,本发明提供的药物组合物还可包含所述其他抗体类药物,优选巨噬细胞类免疫检查点抗体;根据本发明的具体实施方式,所述抗体为抗CD47抗体。

[0065] 作为结合人Trop-2或其任何部分的抗体,本发明还提供上述主题的相关应用。

[0066] 具体而言,再一方面,本发明提供所述的抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞和/或药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗Trop-2高表达癌症;优选地,所述Trop-2高表达癌症为胃癌、胰腺癌、肠癌、卵巢癌、鳞状肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、尿路上皮癌、三阴性乳腺癌或宫颈癌。

[0067] 在这一方面,所述用途涵盖本发明的抗体或其片段与上文所述的其他抗体类药物联合制备所述药物的用途。

[0068] 本发明提供的抗体或其片段还可以与其他部分融合或缀合。例如,本发明提供一种融合蛋白或缀合物,其包含本发明的抗体或其片段。

[0069] 关于融合蛋白,所述融合蛋白可包含对本发明所述抗体或其片段进行修饰的任何

其它部分,例如氨基酸、多肽或蛋白。

[0070] 关于缀合物,所述缀合物可包含本发明的抗体或其片段以及与其缀合的药物,其中所述药物例如为细胞毒剂。

[0071] 优选地,所述缀合物为由下式所示的抗体药物缀合物(ADC):(本发明的抗体或其片段)-(接头)-(细胞毒剂);

[0072] 优选地,所述细胞毒剂为微管蛋白抑制剂(如紫杉醇、多西他赛等)或DNA复制抑制剂(如伊立替康或其代谢活性物SN-38等)。

[0073] 根据本发明的具体实施方式,所述缀合物为“抗TROP-2抗体-接头-SN-38抗体药物缀合物”。

[0074] 本发明还提供所述抗体或其片段、核酸分子、载体、宿主细胞和/或药物组合物在制备抗体药物缀合物(ADC)中的用途,所述抗体药物缀合物用于治疗Trop-2高表达癌症;优选地,所述Trop-2高表达癌症为胃癌、胰腺癌、肠癌、卵巢癌、鳞状肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、尿路上皮癌、三阴性乳腺癌或宫颈癌。

[0075] 本发明提供了一种新型的抗人Trop-2抗体,所述抗体具有良好的生物学活性:无论是Trop-2重组蛋白还是细胞表面表达的Trop-2抗原,本发明提供的抗体(包括嵌合抗体和人源化抗体)均可以有效结合,与对照抗体Sacituzumab相近。同时,本发明提供的抗体对人Trop-2具有高亲和力:与对照抗体Sacituzumab相比,本发明的人源化抗体甚至具有更高的人Trop-2蛋白的特异性结合能力,亲和力高于Sacituzumab。因此,本发明的抗体具有良好的药效。

[0076] 实验证明,本发明的抗体还具有良好的内化能力:人源化抗体的内化率与对照抗体Sacituzumab相近;在标记成ADC后内化能力明显增强。因此,本发明的抗体具有用于开发ADC药物的潜力。本发明的Trop-2抗体还可与其他抗体具有协同作用,例如,本发明的抗体可以与CD47联用可以进一步促进巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用。

[0077] 此外,本发明抗体还证明具有良好的体内药效。采用本发明的抗体制成ADC,发现该抗Trop2-ADC抗体对肿瘤生长具有剂量依赖地抑制作用,在高剂量下(10mg/kg)各ADC抗体与对照抗体Sacituzumab药效相当,且未观察到ADC小分子SN38的明显的毒性作用,各实验组动物体重平稳增长,与对照无明显差别。

## 附图说明

[0078] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0079] 图1显示了阳性杂交瘤上清与CHO细胞表面Trop-2结合筛选结果。

[0080] 图2显示了阳性杂交瘤上清与CHO细胞表面Trop-2结合筛选结果。

[0081] 图3显示了ELISA检测阳性杂交瘤克隆上清与不同种属重组Trop-2的交叉反应结果。

[0082] 图4显示了ELISA检测抗人Trop-2嵌合抗体与Trop-2重组蛋白的结合活性结果,其中图4A:ch3-11;图4B:ch4-3;图4C:ch23-12;图4D:ch11-4;图4E:ch17-1。

[0083] 图5显示了FACS检测抗人Trop-2嵌合抗体与细胞表面Trop-2重组蛋白的结合活性结果,其中图5A:ch3-11;图5B:ch23-12;图5C:ch11-4;图5D:ch4-3;图5E:ch17-1。

[0084] 图6显示了ELISA检测抗人Trop-2抗体与Trop-2结合的种属特异性结果,其中图

6A:h23-12;图6B:h4-3;图6C:Sacituzumab。

[0085] 图7显示了抗人Trop-2抗体对人Trop-2胞外区重组蛋白的亲合力分析结果,其中图7A:Sacituzumab;图7B:h23-12;图7C:h4-3。

[0086] 图8显示了抗Trop-2人源化抗体结合N87细胞表面Trop-2后的内化观察结果。

[0087] 图9显示了抗Trop-2人源化抗体在裸小鼠体内单次给药的药-时曲线(Trop-2检测的),其中图9A:h23-12;图9B:h4-3。

[0088] 图10显示了抗Trop-2-ADC抗体对细胞生长的抑制率。

[0089] 图11显示了Balb/C nu荷瘤胃癌N87小鼠模型小鼠体重的变化曲线,其中图11A:ch4-3-SN38给药后;图11B:h23-12-SN38给药后;图11C:同型对照抗体给药后;图11D:ch4-3-SN38、h23-12-SN38高剂量给药后。

[0090] 图12显示了Balb/C nu荷瘤胃癌N87小鼠模型的肿瘤体积变化曲线,其中图12A:ch4-3-SN38给药后;图12B:h23-12-SN38给药后;图12C:同型对照抗体给药后;图12D:ch4-3-SN38、h23-12-SN38高剂量给药后。

[0091] 图13显示了抗Trop2抗体与抗CD47抗体联用的SKOV3皮下移植瘤小鼠模型小鼠体重的变化曲线。

[0092] 图14显示了抗Trop2抗体与抗CD47抗体联用的SKOV3皮下移植瘤小鼠模型的肿瘤体积变化曲线。

[0093] 图15显示了Balb/C nu荷瘤胃癌NCI-N87皮下移植瘤小鼠模型的肿瘤体积变化曲线。

[0094] 图16显示了Balb/C nu荷瘤胃癌NCI-N87皮下移植瘤小鼠模型小鼠体重的变化曲线。

### 具体实施方式

[0095] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

[0096] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的药材原料、试剂材料等,如无特殊说明,均为市售购买产品。

[0097] 实施例1抗人Trop-2抗体杂交瘤细胞制备

[0098] 免疫:采用人Trop-2重组蛋白(序列号:NP\_002344.2,1aa-274aa)免疫Balb/c小鼠,用包被人Trop-2-his重组蛋白(序列号:NP\_002344.2,1aa-274aa)的96孔酶标板以ELISA法检测血清滴度;血清滴度达到融合要求的小鼠用于下一步的细胞融合。

[0099] 细胞融合及杂交瘤制备:选取滴度达到要求的小鼠,进行冲击免疫,3天后无菌取小鼠脾脏,制备B淋巴细胞悬液,与SP2/0骨髓瘤细胞以4:1的比例混合,在PEG作用下使两种细胞融合。融合后的细胞用HAT培养基重悬后,分装96孔细胞培养板。置37°C,5% CO<sub>2</sub>培养箱内培养。

[0100] 实施例2抗人Trop-2抗体阳性杂交瘤细胞株的筛选

[0101] 1. 阳性杂交瘤结合筛选

[0102] 融合后10-14天,以人Trop-2-his重组蛋白(序列号:NP\_002344.2,1aa-274aa)(20ng/ml)包被酶标板,4°C,过夜;PBS洗三次后,用4%脱脂奶粉-PBS封闭,室温,1hr;用PBS

洗三遍,加入杂交瘤克隆培养上清,室温,1hr。设以下对照:(1)阳性对照(PC):免疫后小鼠血清(用PBS1:1000稀释);(2)阴性对照(NC):无细胞生长的融合孔。经PBST(0.05%Tween-PBS)洗三遍,PBS洗两遍,加入HRP-羊抗小鼠IgG(Fc $\gamma$ ),37°C,0.5hr;再经PBST(0.05%Tween20-PBS)洗3遍,加入TMB显色液,避光显色15-30min,加入ELISA终止液,终止反应;酶标仪读A450值。

[0103] 按从高到低原则选择读值高的前95个克隆进行二次ELISA确认,选取25个抗体分泌阳性细胞pool1采用有限稀释法进行亚克隆,于铺板10天后,挑选单克隆细胞上清用ELISA方法进一步筛选阳性克隆,ELISA方法同上,按从高到低原则选择读值高的前21个克隆m1-1、m3-11、m4-3、m5-5、m6-6、m7-13、m11-4、m12-2、m12-4、m13-2、m14-2、m15-3、m16-7、m17-1、m18-4、m19-5、m20-4、m21-1、m22-1、m23-12、m24-3进行下一步FACS结合筛选。

[0104] 2. 阳性杂交瘤与CHO细胞表面Trop-2结合筛选

[0105] 通过PCR从含有Trop-2cDNA的载体(Cat.:HG10428-M,北京义翘神州)中克隆出Trop-2基因的阅读框,通过酶切的方法克隆入含有谷氨酰氨合成酶(GS)筛选基因的稳定表达载体中,电转染(Nucleofector IIb,Lonza)悬浮培养的CHO-K1细胞,将转染后的细胞置于含有50 $\mu$ M MSX(Cat.:M5379,Sigma)的CD CHO AGTTM培养基(Cat.:12490-025,Gibco)中,接种于96孔细胞培养板,37°C,5% CO<sub>2</sub>静置培养2-3周,通过MSX加压筛选,预筛获得的22个细胞生长孔,并将其放大至24孔细胞培养板,最终通过流式细胞分析(FACS)挑选出1-T-21号克隆(CHO/Trop-2细胞),进行放大培养和冻存以及用于FACS检测。

[0106] 根据上述ELISA结果,挑选该21个克隆的杂交瘤上清100倍稀释后与构建的CHO细胞(CHO/Trop-2细胞)悬液在37°C孵育30min,设以下对照:(1)阳性对照(PC):Sacituzumab的鼠IgG恒定区形式,1 $\mu$ g/ml;(2)阴性对照(NC):无关鼠抗体,1 $\mu$ g/ml。以PBS洗涤细胞3次后,加入1:200稀释的羊抗鼠IgG-FITC(Cat.:F9006,Sigma)并孵育30min。PBS洗涤细胞3次后通过流式细胞仪(型号B49007AD,SNAW31211,BECKMAN COULTER)检测细胞的平均荧光强度(MFI)以验证杂交瘤分泌的抗体是否可以与CHO细胞表面Trop-2结合,结果见图1。

[0107] 根据图1及细胞状态,挑选克隆m1-1、m3-11、m4-3、m6-6、m7-13、m11-4、m12-2、m12-4、m13-2、m14-2、m16-7、m17-1、m19-5、m21-1、m23-12,取杂交瘤上清利用ProA亲和层析柱进行纯化,将纯化得到的鼠抗体再次进行结合确认。将抗体分别稀释至13nM和0.66nM,然后与重组表达人Trop-2的CHO细胞(CHO/Trop-2细胞)悬液在37°C孵育30min,设以下对照:(1)阳性对照(PC):Sacituzumab的鼠IgG恒定区形式,1 $\mu$ g/ml;(2)阴性对照(NC):无关鼠抗体,1 $\mu$ g/ml。以PBS洗涤细胞3次后,加入1:200稀释的羊抗鼠IgG-FITC(Cat.:F9006,Sigma)并孵育30min。PBS洗涤细胞3次后通过流式细胞仪(型号B49007AD,SNAW31211,BECKMAN COULTER)检测细胞的平均荧光强度(MFI)以验证杂交瘤分泌的抗体是否可以与CHO细胞表面Trop-2结合,如图2所示,来自15个克隆上清的抗体与CHO细胞表面Trop-2都有很好的结合。

[0108] 选择m3-11、m4-3、m11-4、m17-1、m23-12作为候选克隆进行下一步筛选。

[0109] 3. 阳性杂交瘤克隆的种属交叉的ELISA筛选

[0110] 将人Trop-2-His重组蛋白(序列号:NP\_002344.2,1aa-274aa)、食蟹猴Trop-2-His重组蛋白(序列号:UniProtKB-A0A2K5UE71,1aa-272aa)、小鼠Trop-2-His重组蛋白(Cat.:50922-M08H,北京义翘神州)4°C包被过夜,包被浓度分别为0.2、1 $\mu$ g/mL;PBS洗板3次后,加

入5% BSA PBS, 37°C封闭60min, PBST洗板3次; 加入PBS将上述15株纯化后的鼠抗体稀释至1 $\mu$ g/mL, 设以下对照: (1) 阳性对照(PC): Sacituzumab (WHO Drug Information (Vol. 31, No. 1, 2017), SEQ ID NO: 39和SEQ ID NO: 40) 的鼠IgG恒定区形式, 1 $\mu$ g/mL; (2) 阴性对照(NC): 无关杂交瘤抗体, 1 $\mu$ g/mL; (3) 空白对照: PBS。37°C孵育60min, PBST洗板4次; 加入1:5000稀释的HRP-羊抗小鼠IgG (Fc $\gamma$ ) (Cat.: 115-035-071, Jackson Immuno Research), 37°C孵育30min, PBST洗板4次; 加入TMB底物显色, 37°C孵育10min后, 加入2M HCl终止反应; 以630nm为参比波长, 读取并记录波长450nm下孔板的吸光度A<sub>450nm-630nm</sub>。除克隆m12-4、m17-1、m19-5、m21-1的抗体与小鼠Trop-2有交叉外, 其余与鼠无交叉, 但所有杂交瘤抗体均可以特异性地与重组人、食蟹猴Trop-2结合 (图3)。

[0111] 实施例3鼠源抗人Trop-2抗体的序列测定

[0112] 将分泌抗人Trop-2抗体的杂交瘤细胞m3-11、m4-3、m11-4、m17-1、m23-12扩大培养后, 用Mouse Monoclonal Antibody IgG Subclass Test Card (Cat.: A12403, VicNovo) 及 Mouse Monoclonal Antibody Light/Heavy Chain Test Card (Cat.: A12401, VicNovo) 按照试剂操作规程进行亚型检测, 亚型鉴定为: 重链为IgG1, 轻链为Kappa链, 为m3-11、m4-3、m11-4、m17-1、m23-12的抗体基因的克隆提供依据。

[0113] 将m3-11、m4-3、m11-4、m17-1、m23-12杂交瘤细胞按照TRIzol试剂盒 (Cat.: 15596026, Invitrogen) 说明书步骤提取细胞总RNA; 利用M-MuLV反转录酶 (Cat.: M0253S, NEB) 将杂交瘤细胞总RNA反转录成cDNA; 使用简并引物 (可参照图书 [董志伟, 王琰. 抗体工程 (第二版). 北京医科大学出版社, 2001, 313-314]) 和Phusion试剂盒 (Cat.: E0553L, NEB) 扩增抗体轻链可变区IgVL ( $\kappa$ ) 和重链可变区V<sub>H</sub>序列; 利用胶回收试剂盒 (Cat.: AP-GX-250, Axygen) 纯化PCR扩增产物; 按照T载体克隆试剂盒 (Cat.: ZC205, 庄盟生物) 说明书将扩增PCR产物连接至T载体并转化大肠杆菌感受态细胞, 菌株扩增、抽提质粒后进行DNA测序获得单克隆抗体可变区序列。

[0114] 测序结果显示:

[0115] 克隆m3-11的鼠抗体重链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO: 41, 由该DNA序列推测得到克隆m3-11的鼠抗体重链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO: 1; 克隆m3-11的鼠抗体轻链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO: 42, 由该DNA序列推测得到克隆m3-11鼠抗体轻链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO: 18。

[0116] SEQ ID NO: 1:

[0117] QVQLQQPGAELVKPGSSVKLSCKASGYTFTSYWMYVVKQRPGQGLEWI

[0118] GEINPSNGRTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCTRE

[0119] GHNYDGSGLGAMDHWGQGTSTVTVSS

[0120] SEQ ID NO: 18:

[0121] DVVVTQTPLSLPVSGDQVSI~~SCRSSQSLTNSYGNTFLSWYLHKPGQSPQL~~

[0122] LLYGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFLTKINTIKPEDLGMYYCFQSTHQPYT

[0123] FGGGTKLEIK

[0124] 克隆m4-3的鼠抗体重链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO: 43, 由该DNA序列推测得到克隆m4-3的鼠抗体重链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO: 2; 克隆m4-3的鼠抗体轻链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO: 44, 由该DNA序列推测得到克隆m4-3的鼠抗体轻链可

变区氨基酸序列见SEQ ID NO:19。

[0125] SEQ ID NO:2:

[0126] QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGFTFTDYVIGWVKQRTGQGLEWIG

[0127] EIYLGSGTIYYTEKFKGKATLTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGSI

[0128] FPFDYWGQGTTTLTVSS

[0129] SEQ ID NO:19:

[0130] QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTS

[0131] TLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPYTFGGGT

[0132] KLEIK

[0133] 克隆m11-4的鼠抗体重链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO:47,由该DNA序列推测得到克隆m11-4的鼠抗体重链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO:5;克隆m11-4的鼠抗体轻链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO:48,由该DNA序列推测得到克隆m11-4鼠抗体轻链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO:24。

[0134] SEQ ID NO:5:

[0135] QVQLQQPGAELVRPGASVNLSCASGYTFTSYWINWVKQRPQGQGLEWIG

[0136] NIYPSNSYTNYNQKFKDTATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYFCSSYRSDGFAYWGQGTTLTVSA

[0137] SEQ ID NO:24:

[0138] DILLTQSPAILSVPGEKVSFSCRASQNIGTSHHWYQQRTNGSPRLLEFASESISGIPSRFSGSGSGT  
DFTLTINSVESEDIADYYCQQNSWPFTFGGGTKLEIK

[0139] 克隆m17-1的鼠抗体重链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO:51,由该DNA序列推测得到克隆m17-1的鼠抗体重链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO:11;克隆m17-1鼠抗体轻链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO:52,由该DNA序列推测得到克隆m17-1的鼠抗体轻链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO:30。

[0140] SEQ ID NO:11:

[0141] EVKLVESGGVLVKGPSLKLSCAASGFTFSDSAMS~~W~~VRQTPEKRLEWVASISRGDDTYYPDSVKGRITI  
SRDFARNILYLQMTSLRSEDTAMYCTRDRFGFAYWGQGTTLTVSA

[0142] SEQ ID NO:30:

[0143] DIVMTQSPLTSLVTVIGQPASISCKSGQLLSDGKTYFNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSM~~L~~DSGVPDRFTG  
SGSGTDFTLKISRVEDLGVYYCWQGT~~H~~FPFTFGSGTKLEIK

[0144] 克隆m23-12的鼠抗体重链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO:53,由该DNA序列推测得到克隆m23-12的鼠抗体重链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO:12;克隆m23-12的鼠抗体轻链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO:54,由该DNA序列推测得到克隆m23-12的鼠抗体轻链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO:31。

[0145] SEQ ID NO:12:

[0146] QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKADGYIFTSYWMHWVKQRPQGQGLEWIGEITPSDNYTSYNQKFKGKAT  
LTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTR~~H~~GHGNYVSFDYWGQGTTLTVSS

[0147] SEQ ID NO:31:

[0148] DIQMTQITSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGT  
DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGYTLPPYTFGGGTKLEIK

[0149] 实施例4抗人Trop-2嵌合抗体及对照抗体的制备

[0150] 将对照抗体(Sacituzumab)轻重链序列进行全合成,将轻重链序列分别克隆至真核瞬时表达载体中,获得对照抗体轻链和重链表达质粒,转入大肠杆菌扩增,分离获得大量含对照抗体轻链和重链的质粒,利用这些质粒,并根据转染试剂293fectin(Cat.:12347019,Gibco)的操作说明,分别将对照抗体的轻、重链质粒转入HEK293细胞中重组表达。细胞转染后5-6天,取培养上清,利用ProA亲和层析柱对表达上清进行纯化,获得对照抗体。其中,对照抗体Sacituzumab氨基酸序列来源于WHO Drug Information(Vol.31,No.1,2017),重链氨基酸序列见SEQ ID NO:39,轻链氨基酸序列见SEQ ID NO:40。

[0151] 将从各克隆获得的对应的鼠源抗体3-11、4-3、11-4、17-1、23-12的轻链可变区和重链可变区基因通过PCR引入酶切位点,分别克隆至装有人-kappa轻链恒定区和人IgG1重链恒定区编码基因上游的真核瞬时表达载体中,获得人-鼠嵌合轻链(pKN019-ch3-11L、pKN019-ch4-3L、pKN019-ch11-4L、pKN019-ch17-1L、pKN019-ch23-12L)和人-鼠嵌合重链(pKN041-ch3-11H、pKN019-ch4-3H、pKN019-ch11-4H、pKN019-ch17-1H、pKN019-ch23-12H)表达质粒,转入大肠杆菌扩增,分离获得大量含人-鼠嵌合抗体轻链和重链的质粒,利用该质粒,并根据转染试剂293fectin(Cat.:12347019,Gibco)的操作说明,将嵌合抗体ch3-11、ch4-3、ch11-4、ch17-1、ch23-12的轻、重链质粒分别转入HEK293细胞中重组表达。细胞转染后5-6天,取培养上清,利用ProA亲和层析柱对表达上清进行纯化,获得嵌合抗体ch3-11、ch4-3、ch17-1、ch11-4、ch23-12。

[0152] 实施例5ELISA检测抗人Trop-2嵌合抗体与Trop-2重组蛋白的结合活性

[0153] 人Trop-2-his重组蛋白(序列号:NP\_002344.2,1aa-274aa),浓度0.2 $\mu$ g/mL,4 $^{\circ}$ C包被过夜,用5% BSA于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱封闭60min。分别加入ch3-11、ch4-3、ch17-1、ch11-4、ch23-12和对照抗体Sacituzumab(起始浓度为2 $\mu$ g/mL,3倍连续稀释,8个梯度),37 $^{\circ}$ C恒温培养箱反应60min后。PBST洗板4次;然后加入1:5000稀释的HRP-anti-human Fc(Cat.:109-035-098,Jackson Immuno Research),反应45min,加入TMB(Cat.:ME142,北京泰天河生物)底物显色15min,2M HCl终止后读板。以630nm为参比波长,读取并记录波长450nm下孔板的吸光度值A450nm-630nm。

[0154] 通过ELISA测定了ch3-11、ch4-3、ch17-1、ch11-4、ch23-12和对照抗体Sacituzumab对人Trop-2重组蛋白的结合能力,其半数有效结合浓度(EC50)值分别为0.3147nM、0.3195nM、0.3278nM、0.2366nM、0.4581nM和0.271nM(图4),基本相当。结果表明ch3-11、ch4-3、ch17-1、ch11-4、ch23-12嵌合抗体与人Trop-2重组蛋白具有高亲和力,鼠抗体3-11、4-3、11-4、17-1、23-12的序列克隆正确。

[0155] 实施例6FACS检测抗人Trop-2嵌合抗体与CHO细胞表面人Trop-2重组蛋白的结合活性

[0156] 将重组表达人Trop-2的CHO细胞(CHO/Trop-2细胞)悬液分别与嵌合抗体(ch3-11、ch4-3、ch17-1、ch11-4、ch23-12)(浓度为30 $\mu$ g/mL,10 $\mu$ g/mL,5 $\mu$ g/mL起始3倍连续稀释9个梯度,共11个梯度)在37 $^{\circ}$ C孵育30min,设以下对照:(1)阳性对照(PC):对照抗体Sacituzumab;(2)阴性对照(NC):IgG1同型对照抗体NC-IgG1。以PBS洗涤细胞3次后,加入1:100稀释的羊抗人IgG-FITC(Cat.:F9512,Sigma)并孵育30min。PBS洗涤细胞3次后通过流式细胞仪(型号B49007AD,SNAW31211,BECKMAN COULTER)检测细胞的平均荧光强度(MFI)以检测嵌合抗体

与CHO细胞表面的人Trop-2结合能力。

[0157] 通过FACS测定了ch3-11、ch4-3、ch17-1、ch11-4、ch23-12和对照抗体Sacituzumab对CHO细胞表面的人Trop-2重组蛋白的结合能力,其半数有效结合浓度(EC50)值分别为0.993nM、3.326nM、2.918nM、1.154nM、2.748nM和2.316nM(图5)。与对照抗体Sacituzumab相比,ch3-11、ch11-4结合活性更好,ch4-3、ch17-1、ch23-12结合活性相近。结果显示抗人Trop-2嵌合抗体ch3-11、ch4-3、ch17-1、ch11-4、ch23-12可以有效结合CHO细胞表面的人Trop-2重组蛋白。

[0158] 实施例7抗人Trop-2嵌合抗体结合细胞表面Trop-2的内化活性

[0159] 取人胰腺癌细胞BxPC-3,  $5 \times 10^5$ 个细胞/管,分别加入稀释至10 $\mu$ g/ml的嵌合抗体ch3-11、ch4-3、ch11-4、ch23-12、阳性对照抗体Sacituzumab,每个抗体分为四组(孵育1h、3h、5h实验组及对照组),每组2管。实验组放入37 $^{\circ}$ C电热恒温培养箱,分别孵育1h、3h、5h后放置冰上,对照组一直冰育作为阴性对照;所有样品孵育完成后,1,500rpm,4 $^{\circ}$ C离心3min,弃上清,冰冷PBS洗涤1遍,加入二抗即抗人IgG(Fc specific)-FITC抗体(Cat.:F9512, Sigma),冰育30分钟后,1,500rpm离心3min,弃上清,冰冷PBS洗涤,取200 $\mu$ l冰冷PBS重悬细胞,进行FACS检测平均荧光强度MFI,并通过公式计算内化效率:tx时间点的%MFI = 37 $^{\circ}$ C孵育样品的MFI  $\times$  100% / 4 $^{\circ}$ C孵育对照样品的MFI; tx时间点的内化百分比 = 100% - tx时间点的%MFI。

[0160] 结果如表1所示,ch4-3、ch23-12与对照抗体Sacituzumab内化比例相近,而ch3-11、ch11-4无明显内化。

[0161] 表1. 细胞表面Trop-2介导的抗人Trop-2嵌合抗体的内化百分比

	内化百分比 (%)		
	1h	3h	5h
[0162] ch3-11	1.12	-5.13	-8.48
ch11-4	-2	-7.4	-9.38
ch11-23	16.24	21.12	27.15
ch4-3	17.05	23.15	28.1
Sacituzumab	17.16	21.84	20.35

[0163] 实施例8抗人Trop-2嵌合抗体耐受破坏的稳定性

[0164] 将嵌合抗体ch3-11、ch4-3、ch11-4、ch23-12以5mg/mL的浓度分别置于PBS、含10% N,N-二甲基乙酰胺(DMA)(Cat.:ARK2190,上海沸柏化工)的PBS和含20% DMA的PBS中,37 $^{\circ}$ C放置2h后,使用超滤离心管除去样品中的DMA,置换缓冲液为PBS,利用G3000Wx1液相色谱分析柱(Cat.:SEC-0046,东曹),通过高效分子排阻色谱法(SEC-HPLC)分析样品纯度,纯度分析结果见表2。

[0165] 结果显示,4株抗体均可以较好耐受DMA,10%时纯度下降不明显,20%时纯度略有下降,提示抗体对后续ADC工艺可能具有较好的耐受性。

[0166] 表2. DMA处理前后抗体HPLC纯度分析

		ch23-12	ch3-11	ch4-3	ch11-4
[0167]	PBS	97.52%	97.57%	99.47%	99.25%
	10% DMA	97.18%	96.29%	98.44%	99.18%
[0168]	20% DMA	93%	96.27%	94%	98.96%

[0169] 实施例9抗人Trop-2单克隆抗体的人源化及重组表达

[0170] 1. 鼠源单克隆抗体23-12的人源化

[0171] (1) CDR移植

[0172] 首先对鼠源抗体重链序列进行综合分析,确定抗体与抗原结合的抗原互补决定簇(CDR)区域及支撑抗体保守三维构象的框架区(framework)。随后根据同源性比对结果,在人抗体germline库(<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php#VHEX>)寻找最相似人源抗体模板,结合全序列blast结果和重链CDR3序列特点,进行CDR移植,实现了23-12重链可变区(VH)在框架区的全人源化。根据同源性比对结果,在人抗体germline库(<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php#VHEX>)寻找最相似人源抗体模板,结合全序列blast结果和轻链CDR3序列特点,进行CDR移植,实现了轻链框架区的高度人源化。

[0173] 23-12抗体CDR移植的人源化重链可变区h23-12\_VH1核苷酸序列见SEQ ID NO:55,氨基酸序列见SEQ ID NO:13;人源化轻链可变区h23-12\_VL1核苷酸序列见SEQ ID NO:56,氨基酸序列见SEQ ID NO:32。SEQ ID NO:13:

[0174] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGEITPSDNYTSYNQKFKGRVT  
ITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGHGNYVSFDYWGQGLTVTVSS

[0175] SEQ ID NO:32:

[0176] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFRSGSGGT  
DFTLTISLQPEDFATYFCQQGYTLPPYTFGQGTKLEIKRTVAAP

[0177] (2) CDR区突变设计

[0178] 根据鼠源抗体23-12序列特点,对CDR移植的人源化轻重链可变区CDR区序列进行突变设计,突变位点见下表3。

[0179] 表3.23-12人源化序列设计

[0180]	相对于 h23-12_VL1 的突变	相对于 h23-12_VH1 的突变
--------	--------------------	--------------------

	h23-12_VL2	T51A	h23-12_VH2	S54G
	h23-12_VL3	R53S	h23-12_VH3	N56G
[0181]	<b>h23-12_VL4</b>	H55E	<b>h23-12_VH4</b>	T58G
	h23-12_VL5	H55Q	h23-12_VH5	N61A
	h23-12_VL6	G91Y	h23-12_VH6	H100E
	h23-12_VL7	T93S	h23-12_VH7	H100Q

[0182] 注:氨基酸残基位点编号依照Kabat编号系统。

[0183] 2. 人源化单克隆抗体23-12的重组表达

[0184] 将人源化设计的h23-12抗体轻重链可变区(h23-12\_VL1、h23-12\_VH1)序列进行全合成,将人源化的h23-12\_VH1通过酶切克隆入真核瞬时表达载体pKN041的人IgG1的重链恒定区编码基因的上游,重链恒定区核苷酸序列见SEQ ID NO:59,氨基酸序列见SEQ ID NO:37;将人源化的h23-12\_VL1通过酶切克隆入真核瞬时表达载体pKN019的人轻链C $\kappa$ 的编码基因的上游,轻链恒定区核苷酸序列见SEQ ID NO:60,氨基酸序列见SEQ ID NO:38,构建人源化23-12轻、重链表达载体,获得轻链(pKN019-h23-12L1)和重链(pKN041-h23-12H1)表达质粒,转入大肠杆菌扩增,分离获得h23-12抗体轻链和重链的质粒h23-12L1、h23-12H1。

[0185] 根据表3所示的突变设计,利用StarMut基因定点突变试剂盒(GenStar,Cat.:T111-01),分别在轻链(pKN019-h23-12L1)和重链(pKN041-h23-12H1)表达质粒上进行定点突变,转入大肠杆菌扩增,获得h23-12抗体轻、重链CDR区突变表达质粒(h23-12H2~h23-12H7、h23-12L2~h23-12L7),分别对应表3中的23-12人源化序列;根据转染试剂293fectin(Cat.:12347019,Gibco)的操作说明,将23-12人源化抗体的轻、重链质粒进行组合,组合见表4,转入HEK293细胞中重组表达。

[0186] 表4. 人源化23-12轻、重链序列组合

		h23-12H1	h23-12H2	h23-12H3	h23-12H4	h23-12H5	h23-12H6	h23-12H7
	h23-12L1	h23-12-1	h23-12-2	h23-12-3	h23-12-4	h23-12-5	h23-12-6	h23-12-7
[0187]	h23-12L2	h23-12-8	h23-12-9	h23-12-10	h23-12-11	h23-12-12	h23-12-13	h23-12-14
	h23-12L3	h23-12-15	h23-12-16	h23-12-17	h23-12-18	h23-12-19	h23-12-20	h23-12-21
	h23-12L4	h23-12-22	h23-12-23	h23-12-24	h23-12-25	h23-12-26	h23-12-27	h23-12-28
	h23-12L5	h23-12-29	h23-12-30	h23-12-31	h23-12-32	h23-12-33	h23-12-34	h23-12-35
[0188]	h23-12L6	h23-12-36	h23-12-37	h23-12-38	h23-12-39	h23-12-40	h23-12-41	h23-12-42
	h23-12L7	h23-12-43	h23-12-44	h23-12-45	h23-12-46	h23-12-47	h23-12-48	h23-12-49

[0189] 注:该表表示各种23-12轻重链组合所得序列,如h23-12-1表示该抗体由23-12人源化抗体轻链h23-12L1和人源化重链h23-12H1组成,其他类推。

[0190] 细胞转染后5-6天,取培养上清,利用ProA亲和层析柱对表达上清进行纯化,获得的23-12的不同人源化抗体,利用ForteBio公司的Octet QKe system仪器,采用抗人抗体Fc段的捕获抗体(AHC)生物探针捕获抗体Fc段的方法测定抗体亲和力。测定时将23-12抗体及对照抗体Sacituzumab用PBS缓冲液稀释至4 $\mu$ g/mL,流经AHC探针(Cat.:18-0015,PALL)表面,时间为120s。人Trop-2-His重组蛋白(序列号:NP\_002344.2,1aa-274aa)作为流动相,Trop-2-His重组蛋白浓度为60nM。结合时间为100s,解离时间为300s。实验完毕,扣除空白对照响应值,用软件进行1:1Langmuir结合模式拟合,计算抗原抗体结合的动力学常数。

[0191] 通过ForteBio测定h23-12突变体组合抗体、嵌合抗体ch23-12及对照抗体Sacituzumab与人Trop-2-His重组蛋白的亲和力(表5)。

[0192] 表5. 23-12不同抗体与人Trop-2胞外区重组蛋白的亲和力测定结果

抗体	KD 值(M)	抗体	KD 值(M)
Sacituzumab	7.23E-10	h23-12-25	5.02E-10
ch23-12	7.15E-10	h23-12-26	5.43E-09
h23-12-1	2.72E-10	<b>h23-12-27</b>	4.96E-10
h23-12-2	8.93E-10	h23-12-28	4.13E-09
h23-12-3	1.50E-08	h23-12-29	6.72E-09
h23-12-4	8.27E-10	h23-12-30	9.76E-09
h23-12-5	3.20E-09	h23-12-31	6.39E-08
<b>h23-12-6</b>	2.98E-10	<b>h23-12-32</b>	6.01E-10
h23-12-7	6.80E-09	h23-12-33	8.91E-09
h23-12-8	9.00E-10	h23-12-34	5.57E-09
h23-12-9	1.10E-09	h23-12-35	9.77E-09
h23-12-10	9.62E-09	h23-12-36	8.81E-09

[0193]

[0194]	h23-12-11	8.81E-10	h23-12-37	8.93E-10
	h23-12-12	2.62E-08	h23-12-38	7.86E-09
	h23-12-13	9.16E-10	<b>h23-12-39</b>	4.92E-10
	h23-12-14	2.39E-08	h23-12-40	2.16E-09
	h23-12-15	1.43E-09	h23-12-41	7.82E-10
	h23-12-16	2.87E-09	h23-12-42	3.09E-09
	h23-12-17	2.80E-08	h23-12-43	9.80E-10
	h23-12-18	9.91E-10	<b>h23-12-44</b>	7.17E-10
	h23-12-19	1.00E-08	h23-12-45	4.09E-09
	h23-12-20	1.46E-09	<b>h23-12-46</b>	3.12E-10
	h23-12-21	2.28E-08	h23-12-47	2.31E-09
	h23-12-22	1.30E-09	<b>h23-12-48</b>	4.05E-10
	h23-12-23	7.70E-10	h23-12-49	2.99E-09
	h23-12-24	5.21E-09		

[0195] 选择h23-12-25,该组合抗体亲和力(KD)为5.02E-10M,命名为h23-12,进行进一步功能验证,该抗体重链可变区核苷酸序列见SEQ ID NO:57,氨基酸序列见SEQ ID NO:14;轻链可变区核苷酸序列见SEQ ID NO:58,氨基酸序列见SEQ ID NO:33。

[0196] SEQ ID NO:14:

[0197] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEW

[0198] MGEITPSDNYGSYNQKFKGRVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCA

[0199] RGHGNYVSFDYWGQGLTVTVSS

[0200] SEQ ID NO:33:

[0201] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYY

[0202] TSRLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGYTLPPYTFGQG

[0203] TKLEIK

[0204] 3.鼠源单克隆抗体4-3的人源化

[0205] (1)CDR移植

[0206] 首先对鼠源抗体重链序列进行综合分析,确定抗体与抗原结合的抗原互补决定簇(CDR)区域及支撑抗体保守三维构象的框架区(framework)。随后根据同源性比对结果,在人抗体germline库(<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php#VHEX>)寻找最相似人源抗体模板,结合全序列blast结果和重链CDR3序列特点,进行CDR移植,实现了4-3重链可变区(VH)在框架区的全人源化。根据同源性比对结果,在人抗体germline库(<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php#VHEX>)寻找最相似人源抗体模板,结合全序列blast结果和轻链CDR3序列特点,进行CDR移植,实现了轻链框架区的全人源化。

[0207] 4-3抗体CDR移植的人源化重链可变区h4-3\_VH1核苷酸序列见SEQ ID NO:45,氨基酸序列见SEQ ID NO:3;人源化轻链可变区h4-3\_VL1核苷酸序列见SEQ ID NO:46,氨基酸序

列见SEQ ID NO:20。

[0208] SEQ ID NO:3:

[0209] EVQLVQSGPEVKKPGASVKVSKASGFTFTDYVIGWVRQAPGQGLEWIG

[0210] EIYLGSGTIYYTEKFKGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGS

[0211] IFPFDYWGQGLVTVSS

[0212] SEQ ID NO:20:

[0213] DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMYWYQQKPKAPKLLIYDTS

[0214] TLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSYPYTFGQGTK

[0215] LEIK

[0216] (2)CDR区突变设计

[0217] 根据鼠源抗体4-3序列特点,对CDR移植的人源化轻重链可变区CDR区序列进行突变设计,突变位点见下表6。

[0218] 表6.4-3人源化序列设计

相对于 h4-3_VL1 的突变		相对于 h4-3_VH1 的突变	
h4-3_VL2	S24R	h4-3_VH2	T61A
h4-3_VL3	T50A	h4-3_VH3	E62Q
h4-3_VL4	A54Q	h4-3_VH4	P103Y
h4-3_VL5	S91N		

[0220] 注:氨基酸残基位点编号依照Kabat编号系统。

[0221] 4.人源化单克隆抗体4-3的重组表达

[0222] 将人源化设计的h4-3抗体轻重链可变区(h4-3\_VL1、h4-3\_VH1)序列进行全合成,将人源化的h4-3\_VH1通过酶切克隆入真核瞬时表达载体pKN041的人IgG1的重链恒定区编码基因的上游,重链恒定区核苷酸序列见SEQ ID NO:59,氨基酸序列见SEQ ID NO:37;将人源化的h4-3\_VL1通过酶切克隆入真核瞬时表达载体pKN019的人轻链C<sub>κ</sub>的编码基因的上游,轻链恒定区核苷酸序列见SEQ ID NO:60,氨基酸序列见SEQ ID NO:38,构建人源化4-3轻、重链表达载体,获得轻链(pKN019-h4-3L1)和重链(pKN041-h4-3H1)表达质粒,转入大肠杆菌扩增,分离获得h4-3抗体轻链和重链的质粒h4-3L1、h4-3H1。

[0223] 根据表6所示的突变设计,利用StarMut基因定点突变试剂盒(Cat.:T111-01, GenStar),分别在轻链(pKN019-h4-3L1)和重链(pKN041-h4-3H1)表达质粒上进行定点突变,转入大肠杆菌扩增,获得h4-3抗体轻、重链CDR区突变表达质粒(h4-3H2~h4-3H4、h4-3L2~h4-3L5),分别对应表6中的4-3人源化序列;根据转染试剂293fectin(Cat.:12347019, Gibco)的操作说明,将4-3人源化抗体的轻、重链质粒进行组合,组合见表7,转入HEK293细胞中重组表达。

[0224] 表7.人源化4-3轻、重链序列组合

	h4-3 H1	h4-3 H2	h4-3 H3	h4-3 H4
h4-3L1	h4-3-1	h4-3-2	h4-3-3	h4-3-4

h4-3L2	h4-3-5	h4-3-6	h4-3-7	h4-3-8
h4-3L3	h4-3-9	h4-3-10	h4-3-11	h4-3-12
h4-3L4	h4-3-13	h4-3-14	h4-3-15	h4-3-16
h4-3L5	h4-3-17	h4-3-18	h4-3-19	h4-3-20

[0226] 注：该表表示各种4-3轻重链组合所得序列，如h4-3-1表示该抗体由4-3人源化抗体轻链h4-3L1和人源化重链h4-3H1组成，其他类推。

[0227] 细胞转染后5-6天，取培养上清，利用ProA亲和层析柱对表达上清进行纯化，获得的4-3的不同人源化抗体，利用ForteBio公司的Octet QKe system仪器，采用抗人抗体Fc段的捕获抗体(AHC)生物探针捕获抗体Fc段的方法测定抗体亲和力。测定时将4-3抗体及对照抗体Sacituzumab用PBS缓冲液稀释至4 $\mu$ g/mL，流经AHC探针(Cat.:18-0015,PALL)表面，时间为120s。人Trop-2-His重组蛋白(序列号:NP\_002344.2,1aa-274aa)作为流动相，Trop-2-His重组蛋白浓度为60nM。结合时间为100s，解离时间为300s。实验完毕，扣除空白对照响应值，用软件进行1:1Langmuir结合模式拟合，计算抗原抗体结合的动力学常数。

[0228] 通过ForteBio测定h4-3突变体组合抗体、嵌合抗体ch4-3及对照抗体Sacituzumab与人Trop-2-His重组蛋白的亲和力(表8)。

[0229] 表8. 4-3不同人源化抗体与人Trop-2胞外区重组蛋白的亲和力测定结果

抗体组合	KD值(M)	抗体组合	KD值(M)
Sacituzumab	7.23E-10	h4-3-10	7.63E-10
ch4-3	3.00E-10	h4-3-11	8.02E-10
h4-3-1	3.04E-10	h4-3-12	1.03E-09
h4-3-2	4.11E-10	h4-3-13	2.81E-10
h4-3-3	5.01E-10	h4-3-14	5.71E-10
h4-3-4	6.36E-10	h4-3-15	6.87E-10
h4-3-5	2.73E-10	h4-3-16	1.53E-09
h4-3-6	3.97E-10	h4-3-17	5.42E-10
h4-3-7	4.66E-10	h4-3-18	6.71E-10
h4-3-8	8.62E-10	h4-3-19	5.99E-10
h4-3-9	3.17E-10	h4-3-20	8.92E-10

[0231] 选择h4-3-1,该组合抗体亲和力(KD)为3.04E-10M,命名为h4-3,进行进一步功能验证,该抗体重链可变区核苷酸序列见SEQ ID NO:45,氨基酸序列见SEQ ID NO:3;轻链可变区核苷酸序列见SEQ ID NO:46,氨基酸序列见SEQ ID NO:20。

[0232] SEQ ID NO:3:

[0233] EVQLVQSGPEVKKPGASVKVCKASGFTFTDYVIGWVRQAPGQGLEWIG

[0234] EIYLGSGTIYYTEKFKGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGS

[0235] IFPFDYWGQGLTVVSS

[0236] SEQ ID NO:20:

[0237] DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMYWYQQKPKAPKLLIYDTS

[0238] TLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSYPYTFGQGTK

[0239] LEIK

[0240] 5.鼠源单克隆抗体11-4的人源化

[0241] (1)CDR移植

[0242] 首先对鼠源抗体重链序列进行综合分析,确定抗体与抗原结合的抗原互补决定簇(CDR)区域及支撑抗体保守三维构象的框架区(framework)。随后根据同源性比对结果,在人抗体germline库(<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php#VHEX>)寻找最相似人源抗体模板,结合全序列blast结果和重链CDR3序列特点,进行CDR移植,实现了11-4重链可变区(VH)在框架区的全人源化。根据同源性比对结果,在人抗体germline库(<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php#VHEX>)寻找最相似人源抗体模板,结合全序列blast结果和轻链CDR3序列特点,进行CDR移植,,实现了轻链框架区的全人源化。

[0243] 11-4抗体CDR移植的人源化重链可变区h11-4\_VH1核苷酸序列见SEQ ID NO:49,氨基酸序列见SEQ ID NO:6;轻链可变区h11-4\_VL1核苷酸序列见SEQ ID NO:50,氨基酸序列见SEQ ID NO:25。

[0244] SEQ ID NO:6

[0245] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWINVVRQAPGGLEW

[0246] MGNIYPSNSYTNYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC

[0247] ARYRSDGFAYWGQGLVTVSS

[0248] SEQ ID NO:25

[0249] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNIGTSTSIHWYQQKPGQAPRLLIYFAS

[0250] ESISGIPARFSGSGSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQSNSWPFTFGGGTKVE

[0251] IK

[0252] (2)CDR区突变设计

[0253] 根据鼠源抗体11-4序列特点,对CDR移植的人源化轻重链可变区序列进行突变设计,突变位点见下表9。

[0254] 表9.11-4人源化序列设计

相对于 h11-4_VL1 的突变		相对于 h11-4_VH1 的突变	
h11-4_VL2	Y49E	h11-4_VH2	A97S
[0255] h11-4_VL3	H34E, Y49E	h11-4_VH3	R98S
h11-4_VL4	H34S, Y49E	h11-4_VH4	Q1E, A97S, R98S
h11-4_VL5	H34A, Y49E	h11-4_VH5	Q1E, A97S, R98S, D102E
		h11-4_VH6	Q1E, A97S, R98S, D102G
[0256]		h11-4_VH7	Q1E, A97S, R98S, G103A

[0257] 注:氨基酸残基位点编号依照Kabat编号系统。

## [0258] 6. 人源化单克隆抗体11-4的重组表达

[0259] 将人源化设计的h11-4抗体轻重链可变区(h11-4\_VL1、h11-4\_VH1)序列进行全合成,将人源化的h11-4\_VH1通过酶切克隆入真核瞬时表达载体pKN041的人IgG1的重链恒定区编码基因的上游,重链恒定区核苷酸序列见SEQ ID NO:59,氨基酸序列见SEQ ID NO:37;将人源化的h11-4\_VL1通过酶切克隆入真核瞬时表达载体pKN019的人轻链C $\kappa$ 的编码基因的上游,轻链恒定区核苷酸序列见SEQ ID NO:60,氨基酸序列见SEQ ID NO:38,构建人源化11-4轻、重链表达载体,获得轻链(pKN019-h11-4L1)和重链(pKN041-h11-4H1)表达质粒,转入大肠杆菌扩增,分离获得h11-4抗体轻链和重链的质粒h11-4L1、h11-4H1。

[0260] 根据表9所示的突变设计,利用StarMut基因定点突变试剂盒(Cat.:T111-01, GenStar),分别在轻链(pKN019-h11-4L1)和重链(pKN041-h11-4H1)表达质粒上进行定点突变,转入大肠杆菌扩增,获得h11-4抗体轻、重链突变表达质粒(h11-4H2~h11-4H7、h11-4L2~h11-4L5),分别对应表9中的11-4人源化序列;根据转染试剂293fectin(Cat.:12347019, Gibco)的操作说明,将11-4人源化抗体的轻、重链质粒进行组合,组合见表10,转入HEK293细胞中重组表达。

## [0261] 表10. 人源化11-4轻、重链序列组合

	h11-4 H1	h11-4 H2	h11-4 H3	h11-4 H4	h11-4 H5	h11-4 H6	h11-4 H7
h11-4 L1	h11-4-1	h11-4-2	h11-4-3	h11-4-4			
h11-4 L2	h11-4-5	h11-4-6	h11-4-7	h11-4-8			
h11-4 L3				h11-4-9	h11-4-10	h11-4-11	h11-4-12
h11-4 L4				h11-4-13	h11-4-14	h11-4-15	h11-4-16
h11-4 L5				h11-4-17	h11-4-18	h11-4-19	h11-4-20

[0263] 注:该表表示各种11-4轻重链组合所得序列,如h11-4-1表示该抗体由11-4人源化抗体轻链h11-4L1和人源化重链h11-4H1组成,其他类推。

[0264] 细胞转染后5-6天,取培养上清,利用ProA亲和层析柱对表达上清进行纯化,获得的11-4的不同人源化抗体,利用ForteBio公司的Octet QKe system仪器,采用抗人抗体Fc段的捕获抗体(AHC)生物探针捕获抗体Fc段的方法测定抗体亲和力。测定时将11-4抗体及对照抗体Sacituzumab用PBS缓冲液稀释至4 $\mu$ g/mL,流经AHC探针(Cat.:18-0015,PALL)表面,时间为120s。人Trop-2-His重组蛋白(序列号:NP\_002344.2,1aa-274aa)作为流动相,Trop-2-His重组蛋白浓度为60nM。结合时间为100s,解离时间为300s。实验完毕,扣除空白对照响应值,用软件进行1:1Langmuir结合模式拟合,计算抗原抗体结合的动力学常数。

[0265] 通过ForteBio测定h11-4突变体组合抗体、嵌合抗体ch11-4及对照抗体Sacituzumab与人Trop-2-His重组蛋白的亲和力(表11)。

## [0266] 表11. 11-4不同人源化抗体与人Trop-2胞外区重组蛋白的亲和力测定结果

抗体组合	KD值(M)	抗体组合	KD值(M)
Sacituzumab	7.84E-10	h11-4-10	3.51E-10
ch11-4	2.64E-10	h11-4-11	3.75E-10
h11-4-1	2.16E-09	h11-4-12	2.82E-10

h11-4-2	9.91E-10	h11-4-13	2.11E-10
h11-4-3	8.68E-10	h11-4-14	3.52E-10
h11-4-4	8.11E-10	h11-4-15	3.89E-10
h11-4-5	1.08E-09	h11-4-16	2.31E-10
h11-4-6	9.52E-10	h11-4-17	2.38E-10
h11-4-7	8.03E-10	h11-4-18	3.94E-10
h11-4-8	2.22E-10	h11-4-19	2.54E-10
h11-4-9	3.01E-10	h11-4-20	2.10E-10

[0268] 实施例10ELISA检测抗Trop-2人源化抗体与Trop-2结合的种属特异性

[0269] 将人Trop-2-his重组蛋白(序列号:NP\_002344.2,1aa-274aa)、食蟹猴Trop-2-His重组蛋白(序列号:UniProtKB-A0A2K5UE71,1aa-272aa)、小鼠Trop-2-His重组蛋白(Cat.:50922-M08H,北京义翘神州)4°C包被过夜,包被浓度1μg/mL;PBS洗板3次后,加入5% BSA PBS,37°C封闭60min,PBST洗板3次;加入不同稀释倍数的h23-12(起始浓度为10μg/mL,3倍梯度依次稀释14个浓度),h4-3(起始浓度为3μg/mL,3倍梯度依次稀释12个浓度),Sacituzumab(起始浓度为3μg/mL,3倍梯度依次稀释12个浓度),每个浓度一个平行孔,37°C孵育60min,PBST洗板4次;加入1:5000稀释的HRP-anti-human Fc(Cat.:109-035-098, Jackson Immuno Research),37°C孵育30min,PBST洗板4次;加入TMB底物显色,37°C孵育10min后,加入2M HCl终止反应;以630nm为参比波长,读取并记录波长450nm下孔板的吸光度A450nm-630nm。

[0270] 实验结果表明,h23-12,h4-3及对照抗体Sacituzumab均可以特异性地与重组人、食蟹猴Trop-2结合,而与重组小鼠Trop-2则无结合活性(图6,表12),为人源化抗体进行药理毒理实验提供依据。

[0271] 表12.抗Trop-2人源化抗体与不同种属Trop-2结合的EC50

抗体	EC50 (nM)	
	人 Trop-2	食蟹猴 Trop-2
h23-12	0.04729	0.1245
h4-3	0.0469	0.04615
Sacituzumab	0.07032	0.07262

[0273] 实施例11抗Trop-2人源化抗体亲和力分析

[0274] 利用Fortebio公司的Octet QKe system仪器,采用抗人抗体Fc段的捕获抗体(AHC)生物探针捕获抗体Fc段的方法测定抗体亲和力。

[0275] 测定时将抗体(h23-12、h4-3和对照抗体Sacituzumab)用PBS缓冲液稀释至4ug/mL,流经AHC探针(Cat.:18-0015,PALL)表面,时间为120s。人Trop-2-his重组蛋白(序列号:NP\_002344.2,1aa-274aa)作为流动相,每个抗体对应的Trop-2-his浓度分别为h23-12:23、30、45、75nM;h4-3:23、30、45、60nM;Sacituzumab:23、30、45、75nM。结合时间为100s,解离时间为300s。实验完毕,扣除空白对照响应值,用软件进行1:1Langmuir结合模式拟合,计算抗原抗体结合的动力学常数。

[0276] h23-12、h4-3及对照抗体Sacituzumab与人Trop-2重组蛋白的反应曲线如图7所示,拟合曲线并计算亲和力,h23-12亲和力(KD)为 $6.40E-10$ ,h4-3亲和力(KD)为 $5.45E-10$ ,Sacituzumab亲和力(KD)为 $9.41E-10$ 。详细动力学参数如表13所示。结果表明h23-12、h4-3与人Trop-2具有高亲和力,与对照抗体Sacituzumab相当,且h23-12解离值优于Sacituzumab。

[0277] 表13. 抗Trop-2人源化抗体与人Trop-2胞外区重组蛋白的亲和力测定结果

[0278]	KD值 (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
h23-12	$6.40E-10$	$1.78E+05$	$1.14E-04$
h4-3	$5.45E-10$	$2.67E+05$	$1.46E-04$
Sacituzumab	$9.41E-10$	$2.08E+05$	$1.94E-04$

[0279] 实施例12抗人Trop-2人源化抗体结合细胞表面Trop-2的内化活性

[0280] 将天然表达人Trop-2的人胰腺癌细胞BXPc-3,以 $2 \times 10^3$ 个细胞/孔的密度接种于96孔细胞培养板,培养24小时。用PBS洗涤细胞1次,弃上清。将使用Mix-n-Stain™CF™488A (Cat.:MX488AS100, Sigma) 标记的h23-12和对照抗体Sacituzumab,用RPMI 1640 (含10% FBS) 稀释至 $15 \mu\text{g/mL}$ ,加入BXPc-3细胞中,一组放 $37^\circ\text{C}$ 电热恒温培养箱,一组放 $4^\circ\text{C}$ 冰箱作为阴性对照;阴性对照孵育30分钟后PBS洗涤3次,用荧光显微镜观察并拍照, $37^\circ\text{C}$ 实验组孵育5h后用荧光显微镜观察并拍照。

[0281] 实验结果(图8)表明人源化h23-12和对照抗体Sacituzumab在 $37^\circ\text{C}$ 条件下都能够被Trop-2介导内吞,在细胞质内呈点状分布。提示抗体人源化后仍然能够保持内化活性。

[0282] 利用实施例7所示方法通过FACS检测3h时在BxPC-3细胞上的内化率,结果如表14所示,提示人源化后内化率和Sac相当。

[0283] 表14. BXPc-3细胞表面Trop-2介导的抗人Trop-2抗体的内化百分比

[0284]	抗体	荧光强度 MFI		内化百分比 (%)
		$4^\circ\text{C}$	$37^\circ\text{C}$	
	h23-12	57771.6	30444.1	47.3
	Sacituzumab	60612	31793.8	47.55
	NC-IgG1	739.4	715.1	3.29

[0285] 实施例13单次给予Ba1b/C裸小鼠的药代动力学研究

[0286] 将健康雌性5周龄Ba1b/C裸小鼠,2只分为一组,单次单剂量(15mg/kg)腹腔注射h23-12后,分别于第5h、25h、48h、96h、168h、240h收集血清,并于 $-20^\circ\text{C}$ 保存,并设置对照组,与h23-12腹腔注射等同剂量的对照品Sacituzumab进行比较,观察其药代动力学特性。

[0287] 将健康雌性5周龄Ba1b/C裸小鼠,4只分为一组,单次单剂量(20mg/kg)腹腔注射h4-3后,分别于第4h、8h、24h、48h、96h、144h、192h、240h收集血清,并于 $-20^\circ\text{C}$ 保存,观察其药代动力学特性。

[0288] 使用包被人Trop-2-his(序列号:NP\_002344.2,1aa-274aa)ELISA的方法检测血清中药物浓度,同时做标准曲线。以标准抗体的浓度为Y轴,OD值为X轴,拟合线性曲线,将检测血清的OD值带入公式可求得血清中抗体含量,并根据公式 $T_{1/2} = |0.693/k|$ ,计算药物半衰

期 $T_{1/2}$ 。

[0289] 药-时曲线结果显示,h23-12、h4-3与对照抗体Sacituzumab在小鼠体内均具有较长的半衰期,药物代谢半衰期 $T_{1/2}$ 表现相当(图9A,图9B,表15),提示抗体在体内没有明显的失活现象,具有较好的结构稳定性。其代谢符合单抗药物的基本特征, $T_{1/2}$ 约为170h。

[0290] 表15.抗Trop-2抗体在裸小鼠体内单次给药的药代动力学参数

[0291]	$T_{1/2}$ (Trop-2检测)
Sacituzumab (n=2)	168±14
h23-12 (n=2)	174±12
h4-3 (n=4)	180±57

[0292] 实施例14抗Trop-2裸抗及其ADC抗体的亲和力分析

[0293] 利用Fortebio公司的Octet QKe system仪器,采用抗人抗体Fc段的捕获抗体(AHC)生物探针捕获抗体Fc段的方法测定抗体亲和力。

[0294] 首先制备ADC药物SN38标记的抗体。使用20当量的二硫苏糖醇(DTT)将抗体在pH7.0±0.5范围内的磷酸钠缓冲液中还原2h,随后将还原后的抗体利用超滤离心管纯化除去多余的DTT,并将还原后的抗体置换到pH 7.0±0.5的磷酸盐钠冲液中。利用7-15%v/v的DMSO作为共溶剂,将还原后的抗体与CL2A-SN-38在环境温度下孵育30min。最后,将多余的小分子通过超滤离心管去除。利用质谱法对抗体偶联药物的分子量进行分析,计算得到抗体的抗体偶联比例(DAR)值。最终每个抗体平均携带7.5个SN38分子。

[0295] 测定时将如上所述制备的SN38标记的抗体:h23-12-SN38、ch4-3-SN38、ch11-4-SN38、阳性对照抗体Sacituzumab-SN38,以及裸抗h23-12、ch4-3、ch11-4、阳性对照抗体Sacituzumab用PBS缓冲液稀释至4μg/mL,流经AHC探针(Cat.:18-0015,PALL)表面,时间为120s。人Trop-2-his重组蛋白(序列号:NP\_002344.2,1aa-274aa)作为流动相,浓度为60nM。结合时间为300s,解离时间为300s。实验完毕,扣除空白对照响应值,用软件进行1:1Langmuir结合模式拟合,计算抗原抗体结合的动力学常数。

[0296] 如表16显示,标记SN38的ADC抗体与裸抗相比,与人Trop-2重组蛋白的亲和力未发生明显变化。

[0297] 表16.抗Trop-2裸抗及其ADC抗体与人Trop-2重组蛋白的亲和力测定结果

[0298]	KD 值(M)	
	裸抗	SN38 标记的抗体
h23-12	5.07E-10	4.41E-10
ch4-3	3.23E-10	1.77E-10
ch11-4	1.76E-10	7.34E-11
Sacituzumab	5.83E-10	4.31E-10

[0299] 实施例15FACS检测BXP-3介导的抗Trop-2裸抗及其ADC抗体的内化

[0300] 按实施例7所描述的方法,分别检测人胰腺癌细胞BXP-3和人胃癌细胞NCI-N87上的内化率。待测抗体包括如上所述制备的ADC药物SN38标记的抗体:h23-12-SN38、ch4-3-

SN38、ch11-4-SN38、阳性对照抗体Sacituzumab-SN38,以及裸抗h232-12、ch4-3、ch11-4、阳性对照抗体Sacituzumab和阴性同型对照抗体NC-IgG1,10ug/ml。

[0301] 如表17,表18所示,h23-12的裸抗和标记SN38的ADC抗体的内化比率相近,且与对照抗体内化程度相近;而ch4-3,ch11-4标记SN38的ADC抗体较裸抗的内化比率高。

[0302] 表17.NCI-N87细胞表面Trop-2介导的抗人Trop-2抗体的内化百分比

抗体	1 h 内化百分比	
	裸抗	SN38 标记的抗体
h23-12	54.04%	51.09%
ch4-3	50.16%	64.56%

Sacituzumab	49.33%	47.49%
NC-IgG1	-95.03%	

[0305] 表18.BXPC-3细胞表面Trop-2介导的抗人Trop-2抗体的内化百分比

抗体	1 h 内化百分比	
	裸抗	SN38 标记的抗体
h23-12	32.44%	20.12%
ch4-3	30.70%	57.66%
ch11-4	15.50%	51.14%
Sacituzumab	37.39%	32.71%
NC-IgG1	-62.97%	

[0307] 实施例16抗Trop-2-ADC抗体对细胞的杀伤活性检测

[0308] 取人胰腺癌细胞(BxPC-3),按 $2 \times 10^3$ 个/孔接种于96孔细胞培养板中,置于37°C 5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养过夜后,按照表19加入不同浓度的SN38标记的抗Trop-2抗体样本(每个浓度设置两个平行孔并设置空白细胞孔(未经任何处理))置于37°C 5% CO<sub>2</sub>孵箱培养3h后,更换为新鲜的完全培养基。第二天重复前一天的处理方式,连续处理4天后用Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒检测SN38标记的抗Trop-2抗体对细胞的杀伤活性。

[0309] 表19.抗Trop-2-ADC抗体及作用浓度

名称	抗体作用浓度 (µg/ml)											
	100	33.33	11.11	3.704	1.852	0.926	0.463	0.231	0.077	0.026	0.009	0.003
h23-12-SN38	100	33.33	11.11	3.704	1.852	0.926	0.463	0.231	0.077	0.026	0.009	0.003
Sacituzumab-SN38	100	33.33	11.11	3.704	1.852	0.926	0.463	0.231	0.077	0.026	0.009	0.003
[0310] Tocilizumab-SN38 (ADC 阴性对照)	100	33.33	11.11	3.704	1.852	0.926	0.463	0.231	0.077	0.026	0.009	0.003
Ch4-3-SN38	100	33.33	11.11	3.704	1.852	0.926	0.463	0.231	0.077	0.026	0.009	0.003
Ch11-4-SN38	100	33.33	11.11	3.704	1.852	0.926	0.463	0.231	0.077	0.026	0.009	0.003

[0311] 结果显示(图10,表20),各抗Trop-2 ADC抗体均特异性杀伤靶细胞,且杀伤活性上与对照抗体Sacituzumab-SN38无明显差别。

[0312] 表20. 抗Trop-2 ADC抗体对细胞生长的抑制活性

名称	IC <sub>50</sub> (ug/ml)
空白细胞	/
h23-12-SN38	1.409
Sacituzumab-SN38	4.311
ch4-3-SN38	3.299
ch11-4-SN38	2.879

[0314] 实施例17抗Trop2-ADC抗体在N87皮下移植瘤模型中的药效学评价

[0315] 取五周龄、雌性BALB/c裸鼠,皮下接种 $3 \times 10^6$ 个人胃癌细胞(NCI-N87),待肿瘤生长至 $150\text{mm}^3$ 左右时进行随机分组,6只/组,分组及给药剂量、频率如表21,每组每周静脉注射给药两次,给药同时测量瘤体积及小鼠体重,当小鼠体重下降超过15%时,或单只动物瘤体积超过 $3000\text{mm}^3$ 或一组动物平均瘤体积超过 $2000\text{mm}^3$ 时停止实验,给予小鼠安乐死。

[0316] 表21. 裸小鼠分组及给药剂量、频率

组别	药物	给药剂量	给药频率
1	h23-12-SN38	10mg/kg	Biw
2		2mg/kg	Biw
3		0.4mg/kg	Biw
4	Sacituzumab-SN38	10mg/kg	Biw
5		2mg/kg	Biw
6	ch4-3-SN38	10mg/kg	Biw
7		2mg/kg	Biw
8	阴性对照 hIgG1	10mg/kg	Biw
9	ADC 对照 hIgG1-SN38	10mg/kg	Biw

[0318] 如图11,图12所示,抗Trop2-ADC抗体对肿瘤生长具有剂量依赖的抑制作用,在高剂量下(10mg/kg),各ADC抗体之间未观察到药效优劣的差别,且未观察到ADC小分子SN38的明显的毒性作用,各实验组动物体重平稳增长,与对照无明显差别。

[0319] 实施例18抗Trop2抗体与抗CD47抗体联用在SKOV3皮下移植瘤模型中的药效学评价

[0320] 取五周龄、雌性BALB/c裸鼠,每只小鼠右侧肋部皮下接种 $3 \times 10^6$ 个人卵巢癌细胞(SKOV3),待肿瘤生长至 $150\text{mm}^3$ 左右时进行随机分组,6只/组,分组及给药剂量、频率如表22,每组每周腹腔注射给药两次,共给药5次,给药同时测量瘤体积及小鼠体重,并对小鼠状态进行观察,实验末次给药后,给予小鼠安乐死。抗CD47抗体参见专利申请公开文件US20150183874A1,为人源化5F9 version 2。

[0321] 表22. 裸小鼠分组及给药剂量、频率

[0322]

组别	药物	给药剂量	给药频率
1	Anti-CD47	10mg/kg	Biw
2	h23-12	2mg/kg	Biw
3	h23-12+Anti-CD47	2mg/kg+10mg/kg	Biw
4	阴性对照hIgG4	2mg/kg	Biw

[0323] 如图13,图14所示,与阴性对照hIgG4相比,h23-12+Anti-CD47联合组表现出一定的抑瘤活性,同时Anti-CD47与h23-12单药组无明显抑瘤效果。由此说明,本发明的Trop2抗体与抗CD47抗体可协同促进巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬,因此具有协同抑瘤作用。

[0324] 实施例19抗Trop2-ADC抗体在N87皮下移植瘤模型中的药效学评价

[0325] 取五周龄、雌性BALB/c裸鼠,皮下接种 $3 \times 10^6$ 个人胃癌细胞(NCI-N87),待肿瘤生长至 $100\text{mm}^3$ 左右时进行随机分组,6只/组,分组及给药剂量、频率如表23,每组每周静脉注射给药两次,共给药6周,给药同时测量瘤体积及小鼠体重,当小鼠体重下降超过15%时,或单只动物瘤体积超过 $3000\text{mm}^3$ 或一组动物平均瘤体积超过 $2000\text{mm}^3$ 时停止实验,给予小鼠安乐死。

[0326] 表23. 裸小鼠分组及给药剂量、频率

[0327]

组别	药物	给药剂量	给药频率
1	ch3-11-SN38	5mg/kg	Biw $\times$ 6
2	ch11-4-SN38	5mg/kg	Biw $\times$ 6
3	Sacituzumab-SN38	5mg/kg	Biw $\times$ 6
4	阴性对照hIgG1	5mg/kg	Biw $\times$ 6
5	ADC对照hIgG1-SN38	5mg/kg	Biw $\times$ 6

[0328] 如图15,图16所示,抗Trop2-ADC抗体对肿瘤生长具有剂量依赖的抑制作用,在5mg/kg剂量下,ADC抗体ch3-11-SN38,ch11-4-SN38药效略优于Sacituzumab-SN38,且未观察到ADC小分子SN38的明显的毒性作用。

[0329] 以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明,本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形,只要不脱离本发明的精神,均应属于本发明所附权利要求的范围。

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 迈威(上海)生物科技有限公司  
 [0003] 北京科诺信诚科技有限公司  
 [0004] <120> 抗人Trop-2抗体及其应用  
 [0005] <130> LC19110043  
 [0006] <160> 60  
 [0007] <170> SIPOSequenceListing 1.0  
 [0008] <210> 1  
 [0009] <211> 123  
 [0010] <212> PRT  
 [0011] <213> 人工(Artificial)  
 [0012] <220>  
 [0013] <221> PEPTIDE  
 [0014] <222> () .. ()  
 [0015] <223> 重链可变区  
 [0016] <400> 1  
 [0017] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser  
 [0018] 1 5 10 15  
 [0019] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0020] 20 25 30  
 [0021] Trp Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0022] 35 40 45  
 [0023] Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
 [0024] 50 55 60  
 [0025] Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [0026] 65 70 75 80  
 [0027] Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0028] 85 90 95  
 [0029] Thr Arg Glu Gly His Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Gly Ala Met Asp His  
 [0030] 100 105 110  
 [0031] Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 [0032] 115 120  
 [0033] <210> 2  
 [0034] <211> 117  
 [0035] <212> PRT  
 [0036] <213> 人工(Artificial)  
 [0037] <220>  
 [0038] <221> PEPTIDE

[0039] <222> ()..()  
 [0040] <223> 重链可变区  
 [0041] <400> 2  
 [0042] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 [0043] 1 5 10 15  
 [0044] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr  
 [0045] 20 25 30  
 [0046] Val Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0047] 35 40 45  
 [0048] Gly Glu Ile Tyr Leu Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Thr Glu Lys Phe  
 [0049] 50 55 60  
 [0050] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 [0051] 65 70 75 80  
 [0052] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 [0053] 85 90 95  
 [0054] Ala Arg Gly Ser Ile Phe Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 [0055] 100 105 110  
 [0056] Leu Thr Val Ser Ser  
 [0057] 115  
 [0058] <210> 3  
 [0059] <211> 117  
 [0060] <212> PRT  
 [0061] <213> 人工(Artificial)  
 [0062] <220>  
 [0063] <221> PEPTIDE  
 [0064] <222> ()..()  
 [0065] <223> 重链可变区  
 [0066] <400> 3  
 [0067] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0068] 1 5 10 15  
 [0069] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr  
 [0070] 20 25 30  
 [0071] Val Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0072] 35 40 45  
 [0073] Gly Glu Ile Tyr Leu Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Thr Glu Lys Phe  
 [0074] 50 55 60  
 [0075] Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 [0076] 65 70 75 80  
 [0077] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys





[0156] Val Thr Val Ser Ser  
 [0157] 115  
 [0158] <210> 7  
 [0159] <211> 117  
 [0160] <212> PRT  
 [0161] <213> 人工(Artificial)  
 [0162] <220>  
 [0163] <221> PEPTIDE  
 [0164] <222> ()..()  
 [0165] <223> 重链可变区  
 [0166] <400> 7  
 [0167] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0168] 1 5 10 15  
 [0169] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0170] 20 25 30  
 [0171] Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0172] 35 40 45  
 [0173] Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asn Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [0174] 50 55 60  
 [0175] Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 [0176] 65 70 75 80  
 [0177] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0178] 85 90 95  
 [0179] Ser Ser Tyr Arg Ser Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 [0180] 100 105 110  
 [0181] Val Thr Val Ser Ser  
 [0182] 115  
 [0183] <210> 8  
 [0184] <211> 117  
 [0185] <212> PRT  
 [0186] <213> 人工(Artificial)  
 [0187] <220>  
 [0188] <221> PEPTIDE  
 [0189] <222> ()..()  
 [0190] <223> 重链可变区  
 [0191] <400> 8  
 [0192] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0193] 1 5 10 15  
 [0194] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

[0195]		20		25		30										
[0196]	Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
[0197]		35		40		45										
[0198]	Gly	Asn	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asn	Ser	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
[0199]		50		55		60										
[0200]	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
[0201]	65			70		75										80
[0202]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0203]				85		90										95
[0204]	Ser	Ser	Tyr	Arg	Ser	Glu	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
[0205]				100		105										110
[0206]	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
[0207]				115												
[0208]	<210>	9														
[0209]	<211>	117														
[0210]	<212>	PRT														
[0211]	<213>	人工(Artificial)														
[0212]	<220>															
[0213]	<221>	PEPTIDE														
[0214]	<222>	()..()														
[0215]	<223>	重链可变区														
[0216]	<400>	9														
[0217]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
[0218]	1			5		10										15
[0219]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
[0220]				20		25										30
[0221]	Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
[0222]				35		40										45
[0223]	Gly	Asn	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asn	Ser	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
[0224]				50		55										60
[0225]	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
[0226]	65			70		75										80
[0227]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0228]				85		90										95
[0229]	Ser	Ser	Tyr	Arg	Ser	Gly	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
[0230]				100		105										110
[0231]	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
[0232]				115												
[0233]	<210>	10														

[0234] <211> 117  
 [0235] <212> PRT  
 [0236] <213> 人工(Artificial)  
 [0237] <220>  
 [0238] <221> PEPTIDE  
 [0239] <222> ()..()  
 [0240] <223> 重链可变区  
 [0241] <400> 10  
 [0242] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0243] 1 5 10 15  
 [0244] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0245] 20 25 30  
 [0246] Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0247] 35 40 45  
 [0248] Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asn Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [0249] 50 55 60  
 [0250] Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 [0251] 65 70 75 80  
 [0252] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0253] 85 90 95  
 [0254] Ser Ser Tyr Arg Ser Asp Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 [0255] 100 105 110  
 [0256] Val Thr Val Ser Ser  
 [0257] 115  
 [0258] <210> 11  
 [0259] <211> 115  
 [0260] <212> PRT  
 [0261] <213> 人工(Artificial)  
 [0262] <220>  
 [0263] <221> PEPTIDE  
 [0264] <222> ()..()  
 [0265] <223> 重链可变区  
 [0266] <400> 11  
 [0267] Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 [0268] 1 5 10 15  
 [0269] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser  
 [0270] 20 25 30  
 [0271] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 [0272] 35 40 45

[0273] Ala Ser Ile Ser Arg Gly Asp Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
 [0274] 50 55 60  
 [0275] Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Phe Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu  
 [0276] 65 70 75 80  
 [0277] Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Thr  
 [0278] 85 90 95  
 [0279] Arg Asp Arg Phe Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 [0280] 100 105 110  
 [0281] Val Ser Ala  
 [0282] 115  
 [0283] <210> 12  
 [0284] <211> 119  
 [0285] <212> PRT  
 [0286] <213> 人工(Artificial)  
 [0287] <220>  
 [0288] <221> PEPTIDE  
 [0289] <222> ()..()  
 [0290] <223> 重链可变区  
 [0291] <400> 12  
 [0292] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 [0293] 1 5 10 15  
 [0294] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Asp Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr  
 [0295] 20 25 30  
 [0296] Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0297] 35 40 45  
 [0298] Gly Glu Ile Thr Pro Ser Asp Asn Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [0299] 50 55 60  
 [0300] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [0301] 65 70 75 80  
 [0302] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0303] 85 90 95  
 [0304] Thr Arg Gly His Gly Asn Tyr Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [0305] 100 105 110  
 [0306] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 [0307] 115  
 [0308] <210> 13  
 [0309] <211> 119  
 [0310] <212> PRT  
 [0311] <213> 人工(Artificial)

[0312] <220>  
 [0313] <221> PEPTIDE  
 [0314] <222> ()..()  
 [0315] <223> 重链可变区  
 [0316] <400> 13  
 [0317] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0318] 1 5 10 15  
 [0319] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0320] 20 25 30  
 [0321] Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0322] 35 40 45  
 [0323] Gly Glu Ile Thr Pro Ser Asp Asn Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [0324] 50 55 60  
 [0325] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 [0326] 65 70 75 80  
 [0327] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0328] 85 90 95  
 [0329] Ala Arg Gly His Gly Asn Tyr Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [0330] 100 105 110  
 [0331] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0332] 115  
 [0333] <210> 14  
 [0334] <211> 119  
 [0335] <212> PRT  
 [0336] <213> 人工(Artificial)  
 [0337] <220>  
 [0338] <221> PEPTIDE  
 [0339] <222> ()..()  
 [0340] <223> 重链可变区  
 [0341] <400> 14  
 [0342] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0343] 1 5 10 15  
 [0344] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0345] 20 25 30  
 [0346] Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0347] 35 40 45  
 [0348] Gly Glu Ile Thr Pro Ser Asp Asn Tyr Gly Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [0349] 50 55 60  
 [0350] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

[0351]	65	70	75	80
[0352]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0353]		85	90	95
[0354]	Ala Arg Gly His Gly Asn Tyr Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
[0355]		100	105	110
[0356]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0357]		115		
[0358]	<210> 15			
[0359]	<211> 119			
[0360]	<212> PRT			
[0361]	<213> 人工(Artificial)			
[0362]	<220>			
[0363]	<221> PEPTIDE			
[0364]	<222> () .. ()			
[0365]	<223> 重链可变区			
[0366]	<400> 15			
[0367]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[0368]	1	5	10	15
[0369]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
[0370]		20	25	30
[0371]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
[0372]		35	40	45
[0373]	Gly Glu Ile Thr Pro Gly Asp Asn Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe			
[0374]		50	55	60
[0375]	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
[0376]	65	70	75	80
[0377]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0378]		85	90	95
[0379]	Ala Arg Gly His Gly Asn Tyr Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
[0380]		100	105	110
[0381]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0382]		115		
[0383]	<210> 16			
[0384]	<211> 119			
[0385]	<212> PRT			
[0386]	<213> 人工(Artificial)			
[0387]	<220>			
[0388]	<221> PEPTIDE			
[0389]	<222> () .. ()			

[0390] <223> 重链可变区  
 [0391] <400> 16  
 [0392] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0393] 1 5 10 15  
 [0394] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0395] 20 25 30  
 [0396] Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0397] 35 40 45  
 [0398] Gly Glu Ile Thr Pro Ser Asp Asn Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [0399] 50 55 60  
 [0400] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 [0401] 65 70 75 80  
 [0402] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0403] 85 90 95  
 [0404] Ala Arg Gly Glu Gly Asn Tyr Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [0405] 100 105 110  
 [0406] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0407] 115  
 [0408] <210> 17  
 [0409] <211> 119  
 [0410] <212> PRT  
 [0411] <213> 人工(Artificial)  
 [0412] <220>  
 [0413] <221> PEPTIDE  
 [0414] <222> ()..()  
 [0415] <223> 重链可变区  
 [0416] <400> 17  
 [0417] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0418] 1 5 10 15  
 [0419] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0420] 20 25 30  
 [0421] Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0422] 35 40 45  
 [0423] Gly Glu Ile Thr Pro Ser Asp Asn Tyr Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [0424] 50 55 60  
 [0425] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 [0426] 65 70 75 80  
 [0427] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0428] 85 90 95

[0429]	Ala Arg Gly Gln Gly Asn Tyr Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0430]	100                    105                    110
[0431]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0432]	115
[0433]	<210> 18
[0434]	<211> 112
[0435]	<212> PRT
[0436]	<213> 人工(Artificial)
[0437]	<220>
[0438]	<221> PEPTIDE
[0439]	<222> ()..()
[0440]	<223> 轻链可变区
[0441]	<400> 18
[0442]	Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Phe Gly
[0443]	1                    5                    10                    15
[0444]	Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Thr Asn Ser
[0445]	20                    25                    30
[0446]	Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Gln Ser
[0447]	35                    40                    45
[0448]	Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0449]	50                    55                    60
[0450]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0451]	65                    70                    75                    80
[0452]	Asn Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser
[0453]	85                    90                    95
[0454]	Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0455]	100                    105                    110
[0456]	<210> 19
[0457]	<211> 106
[0458]	<212> PRT
[0459]	<213> 人工(Artificial)
[0460]	<220>
[0461]	<221> PEPTIDE
[0462]	<222> ()..()
[0463]	<223> 轻链可变区
[0464]	<400> 19
[0465]	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
[0466]	1                    5                    10                    15
[0467]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

[0468]		20		25		30												
[0469]	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr		
[0470]			35					40					45					
[0471]	Asp	Thr	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser		
[0472]			50					55					60					
[0473]	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Met	Glu	Ala	Glu		
[0474]	65					70						75						80
[0475]	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Thr		
[0476]						85						90						95
[0477]	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys								
[0478]						100												105
[0479]	<210>	20																
[0480]	<211>	106																
[0481]	<212>	PRT																
[0482]	<213>	人工(Artificial)																
[0483]	<220>																	
[0484]	<221>	PEPTIDE																
[0485]	<222>	()..()																
[0486]	<223>	轻链可变区																
[0487]	<400>	20																
[0488]	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly		
[0489]	1				5						10				15			
[0490]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met		
[0491]											20				25			30
[0492]	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr		
[0493]											35				40			45
[0494]	Asp	Thr	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser		
[0495]											50				55			60
[0496]	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu		
[0497]	65							70					75					80
[0498]	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Thr		
[0499]								85					90					95
[0500]	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys								
[0501]								100										105
[0502]	<210>	21																
[0503]	<211>	106																
[0504]	<212>	PRT																
[0505]	<213>	人工(Artificial)																
[0506]	<220>																	

[0507] <221> PEPTIDE  
 [0508] <222> ()..()  
 [0509] <223> 轻链可变区  
 [0510] <400> 21  
 [0511] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0512] 1 5 10 15  
 [0513] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 [0514] 20 25 30  
 [0515] Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 [0516] 35 40 45  
 [0517] Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 [0518] 50 55 60  
 [0519] Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 [0520] 65 70 75 80  
 [0521] Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 [0522] 85 90 95  
 [0523] Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0524] 100 105  
 [0525] <210> 22  
 [0526] <211> 106  
 [0527] <212> PRT  
 [0528] <213> 人工(Artificial)  
 [0529] <220>  
 [0530] <221> PEPTIDE  
 [0531] <222> ()..()  
 [0532] <223> 轻链可变区  
 [0533] <400> 22  
 [0534] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0535] 1 5 10 15  
 [0536] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 [0537] 20 25 30  
 [0538] Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 [0539] 35 40 45  
 [0540] Asp Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 [0541] 50 55 60  
 [0542] Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 [0543] 65 70 75 80  
 [0544] Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 [0545] 85 90 95

[0546]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0547]	100                    105
[0548]	<210> 23
[0549]	<211> 106
[0550]	<212> PRT
[0551]	<213> 人工(Artificial)
[0552]	<220>
[0553]	<221> PEPTIDE
[0554]	<222> ()..()
[0555]	<223> 轻链可变区
[0556]	<400> 23
[0557]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0558]	1                    5                    10                    15
[0559]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[0560]	20                    25                    30
[0561]	Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
[0562]	35                    40                    45
[0563]	Asp Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
[0564]	50                    55                    60
[0565]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
[0566]	65                    70                    75                    80
[0567]	Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
[0568]	85                    90                    95
[0569]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0570]	100                    105
[0571]	<210> 24
[0572]	<211> 107
[0573]	<212> PRT
[0574]	<213> 人工(Artificial)
[0575]	<220>
[0576]	<221> PEPTIDE
[0577]	<222> ()..()
[0578]	<223> 轻链可变区
[0579]	<400> 24
[0580]	Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
[0581]	1                    5                    10                    15
[0582]	Glu Lys Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Ser
[0583]	20                    25                    30
[0584]	Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile

[0585]            35                            40                            45  
 [0586]    Glu Phe Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0587]            50                            55                            60  
 [0588]    Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Val Glu Ser  
 [0589]    65                            70                            75                            80  
 [0590]    Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe  
 [0591]                            85                            90                            95  
 [0592]    Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0593]                            100                            105  
 [0594]    <210> 25  
 [0595]    <211> 107  
 [0596]    <212> PRT  
 [0597]    <213> 人工(Artificial)  
 [0598]    <220>  
 [0599]    <221> PEPTIDE  
 [0600]    <222> ()..()  
 [0601]    <223> 轻链可变区  
 [0602]    <400> 25  
 [0603]    Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 [0604]    1                            5                            10                            15  
 [0605]    Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Ser  
 [0606]                            20                            25                            30  
 [0607]    Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 [0608]                            35                            40                            45  
 [0609]    Tyr Phe Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 [0610]                            50                            55                            60  
 [0611]    Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 [0612]    65                            70                            75                            80  
 [0613]    Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe  
 [0614]                            85                            90                            95  
 [0615]    Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 [0616]                            100                            105  
 [0617]    <210> 26  
 [0618]    <211> 107  
 [0619]    <212> PRT  
 [0620]    <213> 人工(Artificial)  
 [0621]    <220>  
 [0622]    <221> PEPTIDE  
 [0623]    <222> ()..()

[0624]	<223>	轻链可变区
[0625]	<400>	26
[0626]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
[0627]	1	5 10 15
[0628]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Ser	
[0629]		20 25 30
[0630]	Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
[0631]		35 40 45
[0632]	Glu Phe Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly	
[0633]		50 55 60
[0634]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro	
[0635]		65 70 75 80
[0636]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe	
[0637]		85 90 95
[0638]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0639]		100 105
[0640]	<210>	27
[0641]	<211>	107
[0642]	<212>	PRT
[0643]	<213>	人工(Artificial)
[0644]	<220>	
[0645]	<221>	PEPTIDE
[0646]	<222>	()..()
[0647]	<223>	轻链可变区
[0648]	<400>	27
[0649]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
[0650]	1	5 10 15
[0651]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Ser	
[0652]		20 25 30
[0653]	Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
[0654]		35 40 45
[0655]	Glu Phe Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly	
[0656]		50 55 60
[0657]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro	
[0658]		65 70 75 80
[0659]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe	
[0660]		85 90 95
[0661]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0662]		100 105

[0663] <210> 28  
 [0664] <211> 107  
 [0665] <212> PRT  
 [0666] <213> 人工(Artificial)  
 [0667] <220>  
 [0668] <221> PEPTIDE  
 [0669] <222> ()..()  
 [0670] <223> 轻链可变区  
 [0671] <400> 28  
 [0672] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 [0673] 1                    5                    10                    15  
 [0674] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Ser  
 [0675]                    20                    25                    30  
 [0676] Ile Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 [0677]                    35                    40                    45  
 [0678] Glu Phe Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 [0679]                    50                    55                    60  
 [0680] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 [0681] 65                    70                    75                    80  
 [0682] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe  
 [0683]                    85                    90                    95  
 [0684] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 [0685]                    100                    105  
 [0686] <210> 29  
 [0687] <211> 107  
 [0688] <212> PRT  
 [0689] <213> 人工(Artificial)  
 [0690] <220>  
 [0691] <221> PEPTIDE  
 [0692] <222> ()..()  
 [0693] <223> 轻链可变区  
 [0694] <400> 29  
 [0695] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 [0696] 1                    5                    10                    15  
 [0697] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Thr Ser  
 [0698]                    20                    25                    30  
 [0699] Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 [0700]                    35                    40                    45  
 [0701] Glu Phe Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

[0702]	50	55	60
[0703]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
[0704]	65	70	75 80
[0705]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Phe		
[0706]	85	90	95
[0707]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0708]	100	105	
[0709]	<210> 30		
[0710]	<211> 112		
[0711]	<212> PRT		
[0712]	<213> 人工(Artificial)		
[0713]	<220>		
[0714]	<221> PEPTIDE		
[0715]	<222> () .. ()		
[0716]	<223> 轻链可变区		
[0717]	<400> 30		
[0718]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly		
[0719]	1	5	10 15
[0720]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Gly Gln Ser Leu Leu Asp Ser		
[0721]	20	25	30
[0722]	Asp Gly Lys Thr Tyr Phe Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
[0723]	35	40	45
[0724]	Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Met Leu Asp Ser Gly Val Pro		
[0725]	50	55	60
[0726]	Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[0727]	65	70	75 80
[0728]	Ser Arg Val Glu Thr Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly		
[0729]	85	90	95
[0730]	Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0731]	100	105	110
[0732]	<210> 31		
[0733]	<211> 108		
[0734]	<212> PRT		
[0735]	<213> 人工(Artificial)		
[0736]	<220>		
[0737]	<221> PEPTIDE		
[0738]	<222> () .. ()		
[0739]	<223> 轻链可变区		
[0740]	<400> 31		



[0780] <211> 108  
 [0781] <212> PRT  
 [0782] <213> 人工(Artificial)  
 [0783] <220>  
 [0784] <221> PEPTIDE  
 [0785] <222> ()..()  
 [0786] <223> 轻链可变区  
 [0787] <400> 33  
 [0788] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0789] 1 5 10 15  
 [0790] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 [0791] 20 25 30  
 [0792] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 [0793] 35 40 45  
 [0794] Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0795] 50 55 60  
 [0796] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [0797] 65 70 75 80  
 [0798] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Leu Pro Pro  
 [0799] 85 90 95  
 [0800] Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0801] 100 105  
 [0802] <210> 34  
 [0803] <211> 114  
 [0804] <212> PRT  
 [0805] <213> 人工(Artificial)  
 [0806] <220>  
 [0807] <221> PEPTIDE  
 [0808] <222> ()..()  
 [0809] <223> 轻链可变区  
 [0810] <400> 34  
 [0811] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0812] 1 5 10 15  
 [0813] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 [0814] 20 25 30  
 [0815] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 [0816] 35 40 45  
 [0817] Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0818] 50 55 60

[0819] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [0820] 65 70 75 80  
 [0821] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Leu Pro Pro  
 [0822] 85 90 95  
 [0823] Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
 [0824] 100 105 110  
 [0825] Ala Pro  
 [0826] <210> 35  
 [0827] <211> 114  
 [0828] <212> PRT  
 [0829] <213> 人工(Artificial)  
 [0830] <220>  
 [0831] <221> PEPTIDE  
 [0832] <222> () .. ()  
 [0833] <223> 轻链可变区  
 [0834] <400> 35  
 [0835] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0836] 1 5 10 15  
 [0837] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 [0838] 20 25 30  
 [0839] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 [0840] 35 40 45  
 [0841] Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0842] 50 55 60  
 [0843] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [0844] 65 70 75 80  
 [0845] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Thr Leu Pro Pro  
 [0846] 85 90 95  
 [0847] Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
 [0848] 100 105 110  
 [0849] Ala Pro  
 [0850] <210> 36  
 [0851] <211> 114  
 [0852] <212> PRT  
 [0853] <213> 人工(Artificial)  
 [0854] <220>  
 [0855] <221> PEPTIDE  
 [0856] <222> () .. ()  
 [0857] <223> 轻链可变区



[0897]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
[0898]	115 120 125
[0899]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
[0900]	130 135 140
[0901]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
[0902]	145 150 155 160
[0903]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
[0904]	165 170 175
[0905]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
[0906]	180 185 190
[0907]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[0908]	195 200 205
[0909]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
[0910]	210 215 220
[0911]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
[0912]	225 230 235 240
[0913]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0914]	245 250 255
[0915]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0916]	260 265 270
[0917]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0918]	275 280 285
[0919]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0920]	290 295 300
[0921]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0922]	305 310 315 320
[0923]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0924]	325 330
[0925]	<210> 38
[0926]	<211> 107
[0927]	<212> PRT
[0928]	<213> 人工(Artificial)
[0929]	<220>
[0930]	<221> PEPTIDE
[0931]	<222> () .. ()
[0932]	<223> 轻链恒定区
[0933]	<400> 38
[0934]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[0935]	1 5 10 15

[0936]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[0937]	20 25 30
[0938]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[0939]	35 40 45
[0940]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[0941]	50 55 60
[0942]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[0943]	65 70 75 80
[0944]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[0945]	85 90 95
[0946]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0947]	100 105
[0948]	<210> 39
[0949]	<211> 451
[0950]	<212> PRT
[0951]	<213> 人工(Artificial)
[0952]	<220>
[0953]	<221> PEPTIDE
[0954]	<222> ()..()
[0955]	<223> Sacituzumab,重链
[0956]	<400> 39
[0957]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
[0958]	1 5 10 15
[0959]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[0960]	20 25 30
[0961]	Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
[0962]	35 40 45
[0963]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
[0964]	50 55 60
[0965]	Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
[0966]	65 70 75 80
[0967]	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
[0968]	85 90 95
[0969]	Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
[0970]	100 105 110
[0971]	Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0972]	115 120 125
[0973]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
[0974]	130 135 140

[0975]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[0976]	145 150 155 160
[0977]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[0978]	165 170 175
[0979]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[0980]	180 185 190
[0981]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
[0982]	195 200 205
[0983]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
[0984]	210 215 220
[0985]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[0986]	225 230 235 240
[0987]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[0988]	245 250 255
[0989]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[0990]	260 265 270
[0991]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[0992]	275 280 285
[0993]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[0994]	290 295 300
[0995]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[0996]	305 310 315 320
[0997]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[0998]	325 330 335
[0999]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[1000]	340 345 350
[1001]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
[1002]	355 360 365
[1003]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[1004]	370 375 380
[1005]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[1006]	385 390 395 400
[1007]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
[1008]	405 410 415
[1009]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[1010]	420 425 430
[1011]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[1012]	435 440 445
[1013]	Pro Gly Lys



- [1053] <211> 369  
[1054] <212> DNA  
[1055] <213> 人工(Artificial)  
[1056] <220>  
[1057] <221> gene  
[1058] <222> ()..()  
[1059] <223> 重链可变区  
[1060] <400> 41  
[1061] caggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctgggtcttc agtgaagctg 60  
[1062] tcctgcaagg cttctggcta caccttact agttactgga tgtactgggt gaagcagagg 120  
[1063] cctggacagg gccttgagtg gattggagag attaatccta gtaacggtcg tactaattac 180  
[1064] aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca aatcgtccag cacagcctac 240  
[1065] atgcaattca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagagaaggc 300  
[1066] cataattacg atggttcctt cggggctatg gaccactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 360  
[1067] gtctctctca 369  
[1068] <210> 42  
[1069] <211> 336  
[1070] <212> DNA  
[1071] <213> 人工(Artificial)  
[1072] <220>  
[1073] <221> gene  
[1074] <222> ()..()  
[1075] <223> 轻链可变区  
[1076] <400> 42  
[1077] gatgttgtgg tgactcaaac tccactctcc ctgcctgtca gctttggaga tcaggtttct 60  
[1078] atctcttgca ggtctagtca gagtcttaca aacagttatg ggaacacctt tttgtcttgg 120  
[1079] tacctgcaca agcctggcca gtctccacag ctctctctct atgggatttc caacagattt 180  
[1080] tctgggggtgc cagacagggt cagtggcagt ggttcagga cagatttcac actcaagatc 240  
[1081] aacacaataa agcctgagga cctgggaatg tattactgct ttcaaagtac acatcagccg 300  
[1082] tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336  
[1083] <210> 43  
[1084] <211> 351  
[1085] <212> DNA  
[1086] <213> 人工(Artificial)  
[1087] <220>  
[1088] <221> gene  
[1089] <222> ()..()  
[1090] <223> 重链可变区  
[1091] <400> 43

- [1092] caggttcagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
- [1093] tcctgcaagg cttctggatt cacattcact gactatgtta taggctgggt gaagcagaga 120
- [1094] actggacagg gccttgagtg gattggagag atttatcttg gaagtggtagc tatttactac 180
- [1095] actgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca catcctccaa cacagcctac 240
- [1096] atgcagctca gcagcctgac gtctgaagac tctgcggtct atttctgtgc aaggggatct 300
- [1097] attttccctt ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc a 351
- [1098] <210> 44
- [1099] <211> 318
- [1100] <212> DNA
- [1101] <213> 人工(Artificial)
- [1102] <220>
- [1103] <221> gene
- [1104] <222> ()..()
- [1105] <223> 轻链可变区
- [1106] <400> 44
- [1107] caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
- [1108] atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgtact ggtaccagca gaagccagga 120
- [1109] tcctcccca gactcctgat ttatgacaca tccaccctgg cttctggagt cctgttctgc 180
- [1110] ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagccgaat ggaggctgaa 240
- [1111] gatgctgcca cttactactg ccagcagtgg agtagttacc cttacacgtt cggagggggg 300
- [1112] accaagctgg aaataaaa 318
- [1113] <210> 45
- [1114] <211> 351
- [1115] <212> DNA
- [1116] <213> 人工(Artificial)
- [1117] <220>
- [1118] <221> gene
- [1119] <222> ()..()
- [1120] <223> 重链可变区
- [1121] <400> 45
- [1122] gaggtgcagc tgggtgcagtc tggaccgag gtgaagaagc ctggagcctc cgtgaagggtg 60
- [1123] tcctgcaagg cctccggctt caccttcacc gactacgtga tccgctgggt gcgacaggt 120
- [1124] cctggccagg gactggagtg gatcggcgag atctacctgg gctccggcac catctactac 180
- [1125] accgagaagt tcaagggacg ggtgacctg acagccgaca cctccacctc caccgcctac 240
- [1126] atggagctgt cctccctgag gtccgaggac accgccgtgt actactgcgc tcgaggtctc 300
- [1127] atcttccctt tegactactg gggccagggc accctgggtga ccgtgtcctc t 351
- [1128] <210> 46
- [1129] <211> 318
- [1130] <212> DNA

- [1131] <213> 人工(Artificial)  
[1132] <220>  
[1133] <221> gene  
[1134] <222> ()..()  
[1135] <223> 轻链可变区  
[1136] <400> 46  
[1137] gacatccagc tgaccagtc tccctcctcc ctgtctgcct ccgtgggcca cagggtgacc 60  
[1138] atcacctgct ctgcctcctc ctccgtgtcc tacatgtact ggtaccagca gaagcctggc 120  
[1139] aaggctccca agctgctgat ctacgacacc tccaccctgg cctctggcgt gccctccagg 180  
[1140] ttctctggct ccgatctgg caccgacttc accctgacca tctcctccct gcagcccag 240  
[1141] gacttcgcca cctactactg ccagcagtgg tcctcctacc cctacacctt cggacagggc 300  
[1142] accaagctgg agatcaag 318  
[1143] <210> 47  
[1144] <211> 351  
[1145] <212> DNA  
[1146] <213> 人工(Artificial)  
[1147] <220>  
[1148] <221> gene  
[1149] <222> ()..()  
[1150] <223> 重链可变区  
[1151] <400> 47  
[1152] caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaacctg 60  
[1153] tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga taaactgggt gaagcagagg 120  
[1154] cctggacaag gccttgagtg gatcggaat atttatcctt ctaatagtta tactaactac 180  
[1155] aatcaaaagt tcaaggacac ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240  
[1156] atgcagctca gcagcccagc atctgaggac tctgcggctt atttctgttc aagttatagg 300  
[1157] tccgacgggt ttgcttactg gggccaaggg actcttgtea ctgtctctgc a 351  
[1158] <210> 48  
[1159] <211> 321  
[1160] <212> DNA  
[1161] <213> 人工(Artificial)  
[1162] <220>  
[1163] <221> gene  
[1164] <222> ()..()  
[1165] <223> 轻链可变区  
[1166] <400> 48  
[1167] gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aaaagtcagt 60  
[1168] ttctcctgca gggccagtca gaacattggc acaagcatac actggtatca gcaaagaaca 120  
[1169] aatggttctc caaggcttct catagaatth gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 180

[1170] aggttttagtg gcagtgatc agggacagat ttactctta ccatcaacag tgtggagtct 240  
 [1171] gaagatattg cagattatta ctgtcaaca agtaatagct ggccgttcac gttcggaggg 300  
 [1172] gggaccaagc tggaaataaa a 321  
 [1173] <210> 49  
 [1174] <211> 351  
 [1175] <212> DNA  
 [1176] <213> 人工(Artificial)  
 [1177] <220>  
 [1178] <221> gene  
 [1179] <222> ()..()  
 [1180] <223> 重链可变区  
 [1181] <400> 49  
 [1182] caggtgcagc tgggtgcagtc tggagccgag gtgaagaagc ctggagcctc cgtgaagggtg 60  
 [1183] tcttgcaagg cctccggcta caccttcacc tctactgga tcaactgggt gcggcaggct 120  
 [1184] cctggccagg gactggagtg gatgggcaac atctacccat ccaactccta caccaactac 180  
 [1185] aaccagaagt tcaaggacag ggtgaccatg accagagaca cctccacctc caccgtgtac 240  
 [1186] atggagctgt cctccctgcg gtccgaggac acagccgtgt actactgcgc tcggtaccgg 300  
 [1187] tctgacggct tcgcctactg gggacagggc accctgggtga ccgtgtcctc c 351  
 [1188] <210> 50  
 [1189] <211> 321  
 [1190] <212> DNA  
 [1191] <213> 人工(Artificial)  
 [1192] <220>  
 [1193] <221> gene  
 [1194] <222> ()..()  
 [1195] <223> 轻链可变区  
 [1196] <400> 50  
 [1197] gagatcgtgc tgaccagtc tctgccacc ctgtccctgt ctctggcga gagagccacc 60  
 [1198] ctgtcctgca gaggctcca gaacatcggc acctccatcc actggtacca gcagaagcct 120  
 [1199] ggccaggctc ctcggtgct gatctacttc gcctccgagt ccatctctgg catccctgct 180  
 [1200] cggttctctg gctccggatc tggcaccgac ttcaccctga ccatctcctc cctggagcct 240  
 [1201] gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag tccaactcct ggcccttcac cttcggaggt 300  
 [1202] ggcaccaagg tggagatcaa g 321  
 [1203] <210> 51  
 [1204] <211> 345  
 [1205] <212> DNA  
 [1206] <213> 人工(Artificial)  
 [1207] <220>  
 [1208] <221> gene

- [1209] <222> ()..()
- [1210] <223> 重链可变区
- [1211] <400> 51
- [1212] gaggtgaagc tgggtggagtc tgggggagtc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
- [1213] tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactctgccca tgtcttgggt tcgccagact 120
- [1214] ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcattc attagtcgtg gtgatgacac atattatcca 180
- [1215] gacagtgtga agggccgaat caccatttcc agagattttg ccagaaacat cctgtatttg 240
- [1216] caaatgacca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtacaag agatcgggtc 300
- [1217] gggtttgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345
- [1218] <210> 52
- [1219] <211> 336
- [1220] <212> DNA
- [1221] <213> 人工(Artificial)
- [1222] <220>
- [1223] <221> gene
- [1224] <222> ()..()
- [1225] <223> 轻链可变区
- [1226] <400> 52
- [1227] gacattgtga tgaccagtc tccactcact ttgtcgggta ccattggaca acctgcctcc 60
- [1228] atctcttgca agtcaggta gagcctctta gatagtgatg gaaagacata ttttaattgg 120
- [1229] ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactc atctgggtgct tatgctggac 180
- [1230] tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
- [1231] agcagagtgg agactgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtag acattttcca 300
- [1232] ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaag 336
- [1233] <210> 53
- [1234] <211> 357
- [1235] <212> DNA
- [1236] <213> 人工(Artificial)
- [1237] <220>
- [1238] <221> gene
- [1239] <222> ()..()
- [1240] <223> 重链可变区
- [1241] <400> 53
- [1242] caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagctg 60
- [1243] tcctgtaagg ctgatggcta catcttcacc agttactgga tgcactgggt gaaacagagg 120
- [1244] cctggacaag gccttgagtg gatcggagag attactcctt ctgataatta tacttcctac 180
- [1245] aatcaaaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
- [1246] atgcagctca gcagcctgac gtctgaggac tctgcggtct attactgtac aagaggccac 300
- [1247] ggtaactacg tcagctttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca 357

- [1248] <210> 54  
[1249] <211> 324  
[1250] <212> DNA  
[1251] <213> 人工(Artificial)  
[1252] <220>  
[1253] <221> gene  
[1254] <222> ()..()  
[1255] <223> 轻链可变区  
[1256] <400> 54  
[1257] gacatccaga tgacacagat tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60  
[1258] atcacttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120  
[1259] gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccctca 180  
[1260] aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240  
[1261] gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggttatacgc ttctccgta cacgttcgga 300  
[1262] ggggggacca agctggaaat aaaa 324  
[1263] <210> 55  
[1264] <211> 357  
[1265] <212> DNA  
[1266] <213> 人工(Artificial)  
[1267] <220>  
[1268] <221> gene  
[1269] <222> ()..()  
[1270] <223> 重链可变区  
[1271] <400> 55  
[1272] caggtgcagc tgggtcagtc cggagccgag gtgaagaagc ctggagcctc cgtgaaggtg 60  
[1273] tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc tcctactgga tgcactgggt gcggcaggct 120  
[1274] cctggccagg gactggagtg gatgggagc atcacaccct ccgacaacta cacctcctac 180  
[1275] aaccagaagt tcaagggacg ggtgaccatc accagggaca cctccacctc caccgcctac 240  
[1276] atggagctgt cctccctgcg gtccgaggac accgccgtgt actactgcgc tcgaggccac 300  
[1277] ggcaactacg tgtccttcca ctactgggga cagggcaccc tggtgaccgt gtcctcc 357  
[1278] <210> 56  
[1279] <211> 324  
[1280] <212> DNA  
[1281] <213> 人工(Artificial)  
[1282] <220>  
[1283] <221> gene  
[1284] <222> ()..()  
[1285] <223> 轻链可变区  
[1286] <400> 56

- [1287] gacatccaga tgacccagtc tccctcctcc ctgtctgcct ccgtgggaga ccgggtgacc 60
- [1288] atcacctgca gagcctccca ggacatctcc aactacctga actggtacca gcagaagcct 120
- [1289] ggcaaggctc ccaagctgct gatctactac acctccaggc tgcactccgg agtgcctcc 180
- [1290] cggttctccg gctctggctc cggaaccgac ttcacctga ccatctcctc cctgcagccc 240
- [1291] gaggacttcg ccacctactt ctgccagcag ggctacaccc tgcctcccta caccttcggc 300
- [1292] cagggcacca agctggagat caag 324
- [1293] <210> 57
- [1294] <211> 357
- [1295] <212> DNA
- [1296] <213> 人工(Artificial)
- [1297] <220>
- [1298] <221> gene
- [1299] <222> ()..()
- [1300] <223> 重链可变区
- [1301] <400> 57
- [1302] caggtgcagc tgggtgcagtc cggagccgag gtgaagaagc ctggagcctc cgtgaagggtg 60
- [1303] tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc tcctactgga tgcactgggt gcggcaggct 120
- [1304] cctggccagg gactggagtg gatgggcgag atcacacct ccgacaacta cggtcctac 180
- [1305] aaccagaagt tcaagggacg ggtgaccatc accagggaca cctccacctc caccgcctac 240
- [1306] atggagctgt cctccctgcg gtccgaggac accgccgtgt actactgcgc tcgaggccac 300
- [1307] ggcaactacg tgtccttga ctactgggga cagggcaccc tggtgaccgt gtctctcc 357
- [1308] <210> 58
- [1309] <211> 324
- [1310] <212> DNA
- [1311] <213> 人工(Artificial)
- [1312] <220>
- [1313] <221> gene
- [1314] <222> ()..()
- [1315] <223> 轻链可变区
- [1316] <400> 58
- [1317] gacatccaga tgacccagtc tccctcctcc ctgtctgcct ccgtgggaga ccgggtgacc 60
- [1318] atcacctgca gagcctccca ggacatctcc aactacctga actggtacca gcagaagcct 120
- [1319] ggcaaggctc ccaagctgct gatctactac acctccaggc tggagtccgg agtgcctcc 180
- [1320] cggttctccg gctctggctc cggaaccgac ttcacctga ccatctcctc cctgcagccc 240
- [1321] gaggacttcg ccacctactt ctgccagcag ggctacaccc tgcctcccta caccttcggc 300
- [1322] cagggcacca agctggagat caag 324
- [1323] <210> 59
- [1324] <211> 990
- [1325] <212> DNA

[1326]	<213> 人工(Artificial)	
[1327]	<220>	
[1328]	<221> gene	
[1329]	<222> ()..()	
[1330]	<223> 重链恒定区	
[1331]	<400> 59	
[1332]	gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	60
[1333]	ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	120
[1334]	tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca	180
[1335]	ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc	240
[1336]	tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc	300
[1337]	aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	360
[1338]	ccgtcagtct tctcttcccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct	420
[1339]	gaggtccat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
[1340]	tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	540
[1341]	agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	600
[1342]	gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatacgagaa aaccatctcc	660
[1343]	aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag	720
[1344]	atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
[1345]	gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	840
[1346]	ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	900
[1347]	cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	960
[1348]	cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa	990
[1349]	<210> 60	
[1350]	<211> 321	
[1351]	<212> DNA	
[1352]	<213> 人工(Artificial)	
[1353]	<220>	
[1354]	<221> gene	
[1355]	<222> ()..()	
[1356]	<223> 轻链恒定区	
[1357]	<400> 60	
[1358]	agaaccgtgg cggcgccatc tgtcttcac tccccgcat ctgatgagca gttgaaatct	60
[1359]	ggtaccgcta gcgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag	120
[1360]	tggaaggtgg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac	180
[1361]	agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag	240
[1362]	aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag	300
[1363]	agcttcaaca ggggagagtg t	321

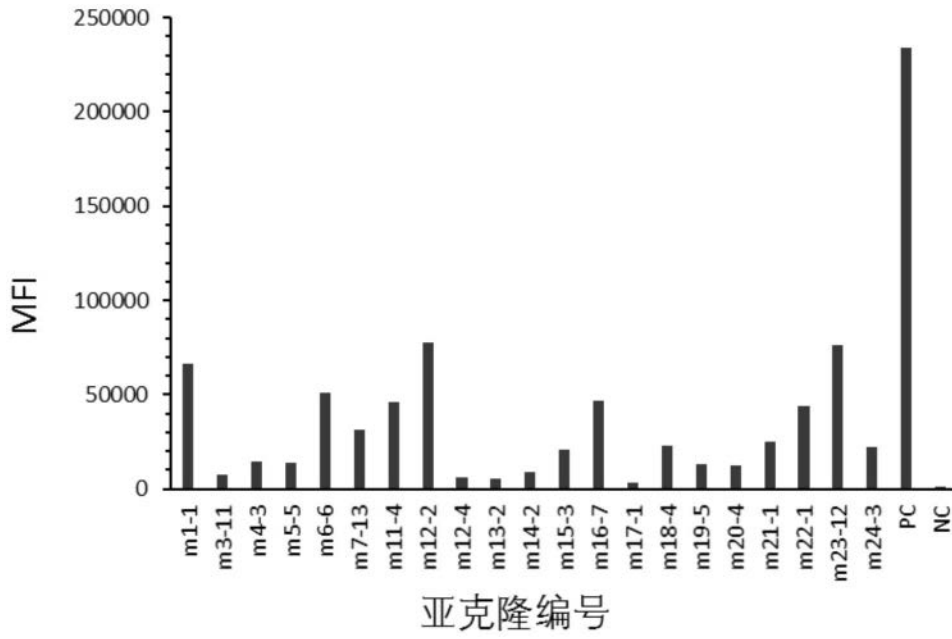


图1

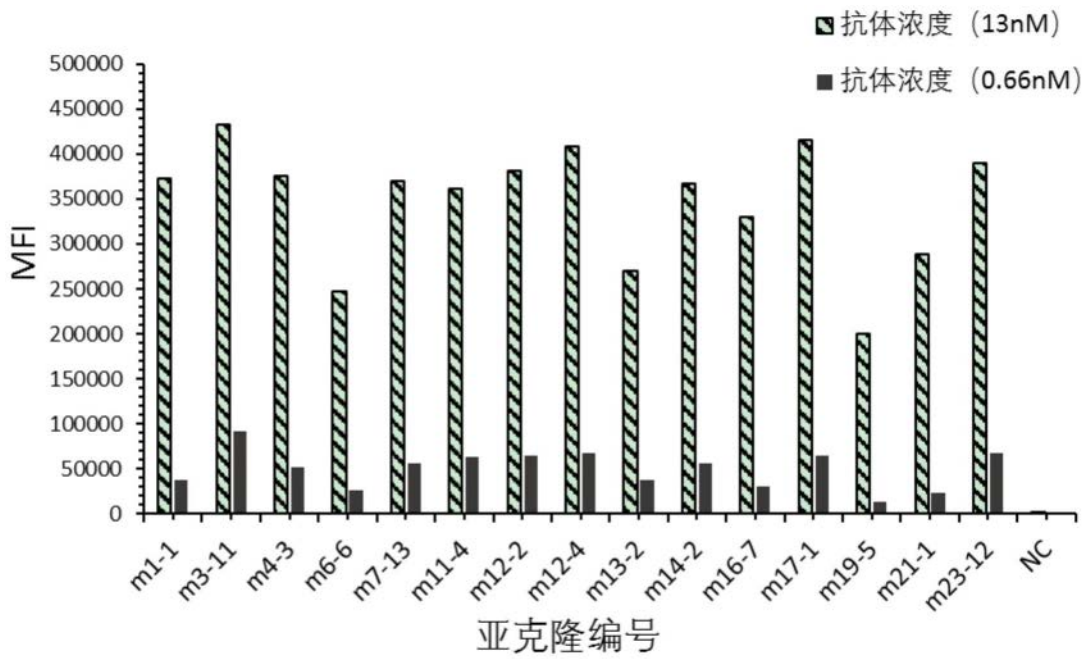


图2

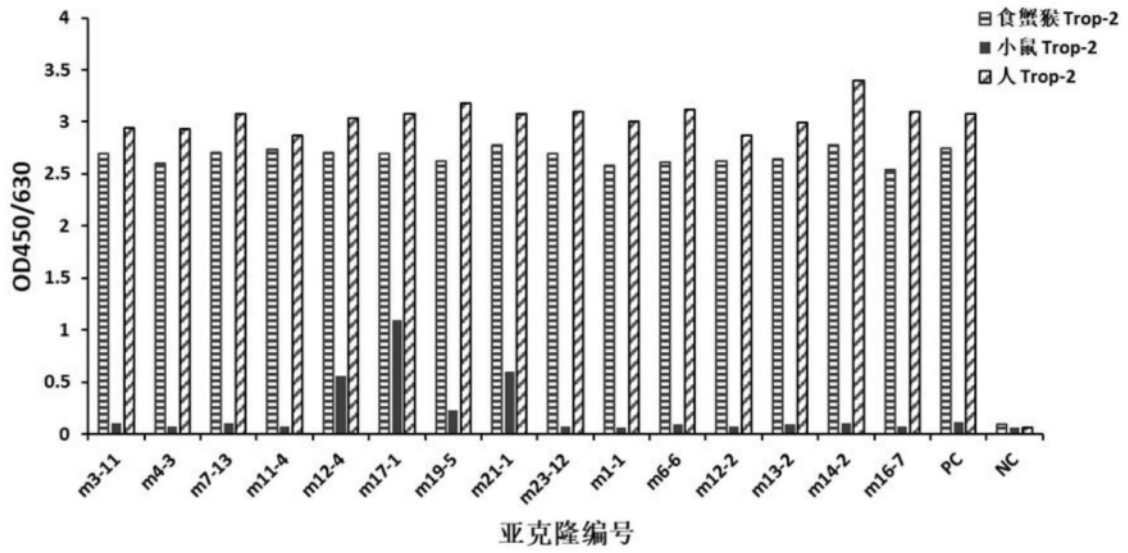
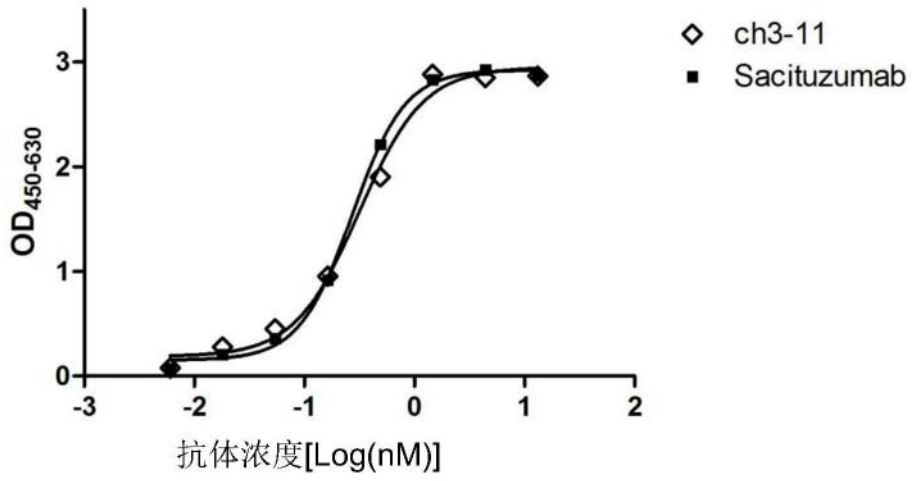
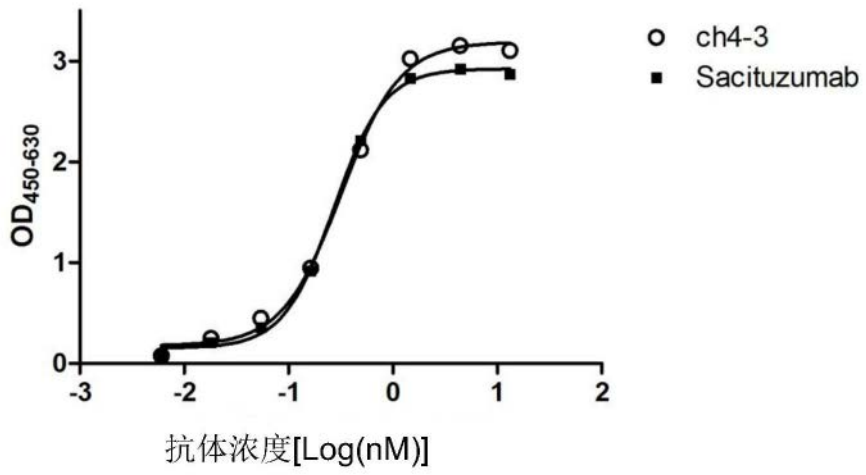


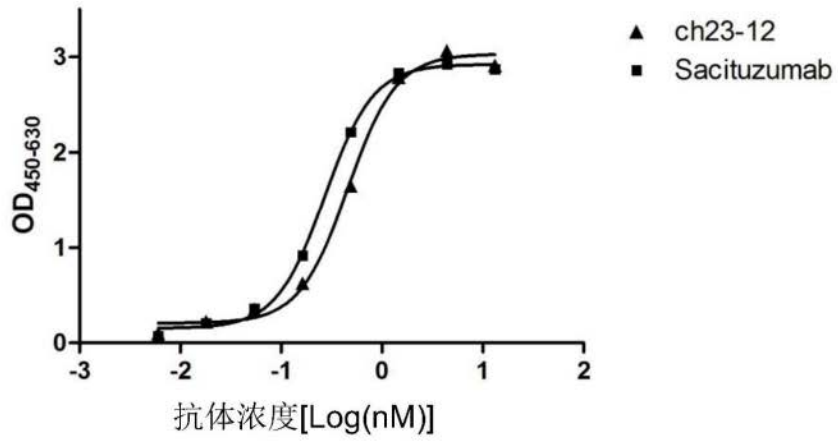
图3



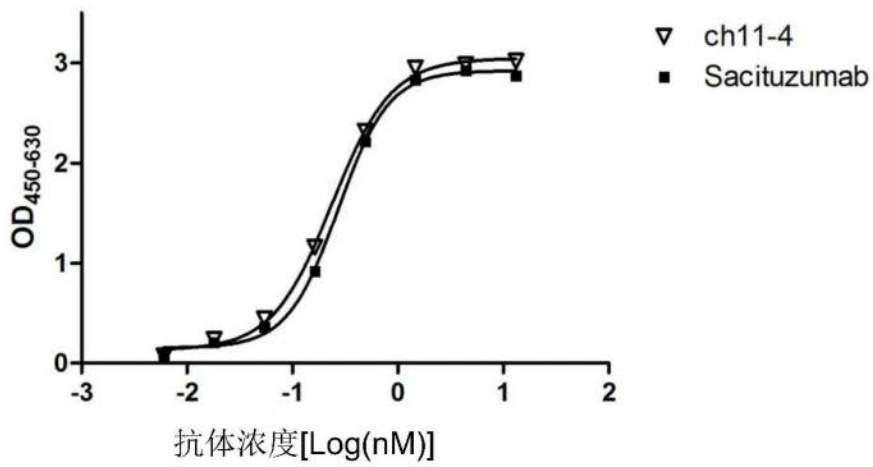
4A



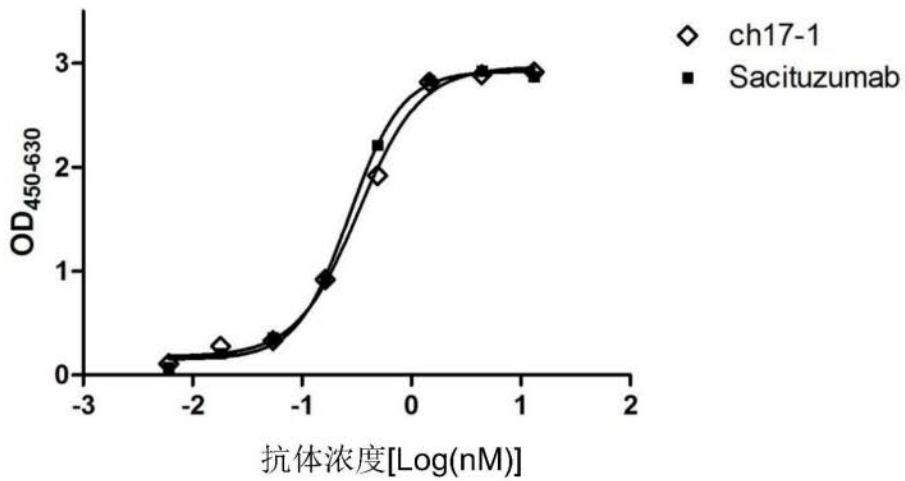
4B



4C

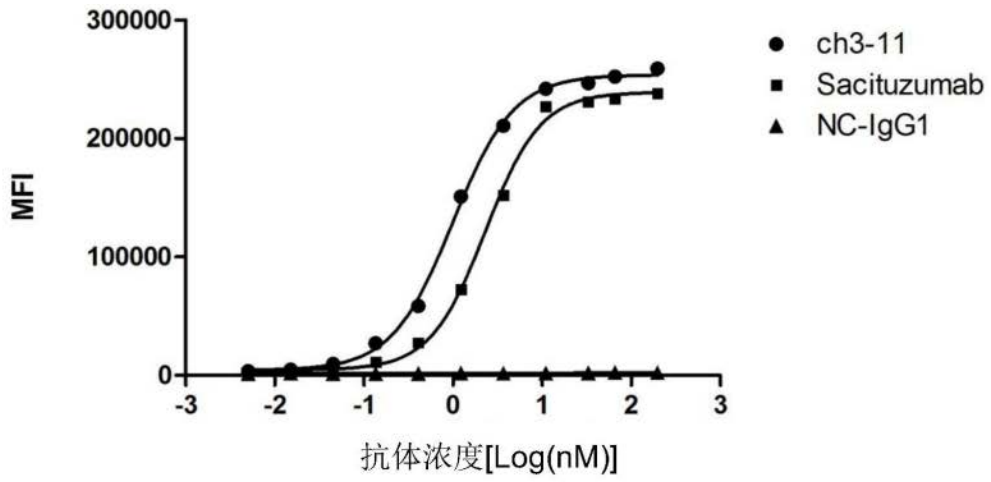


4D

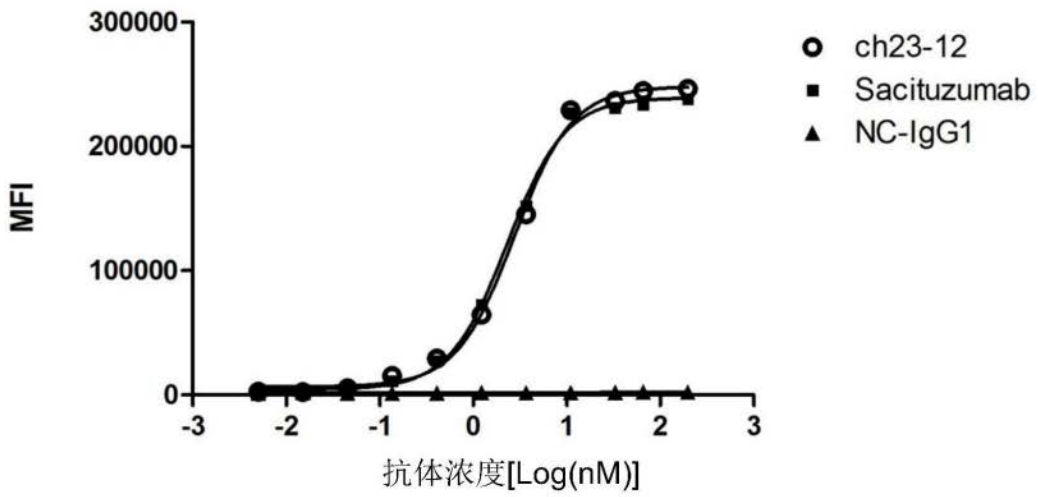


4E

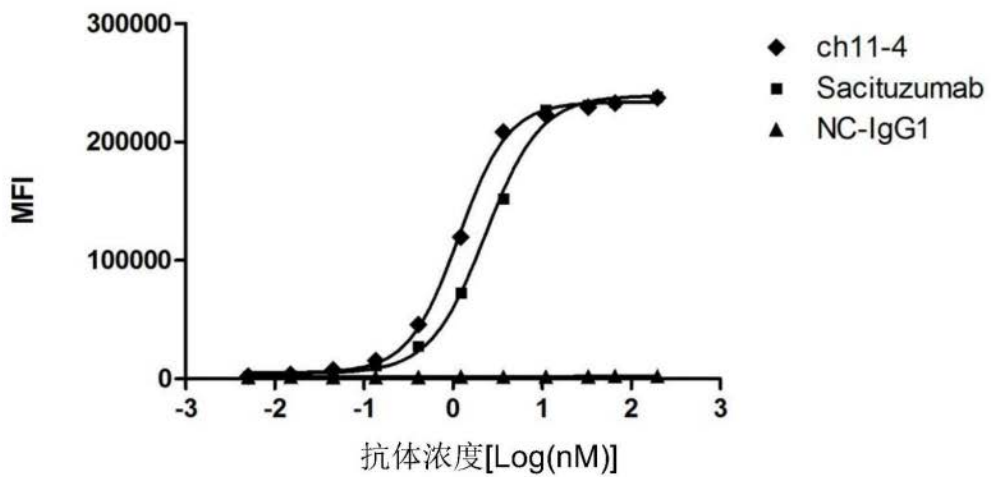
图4



5A



5B



5C

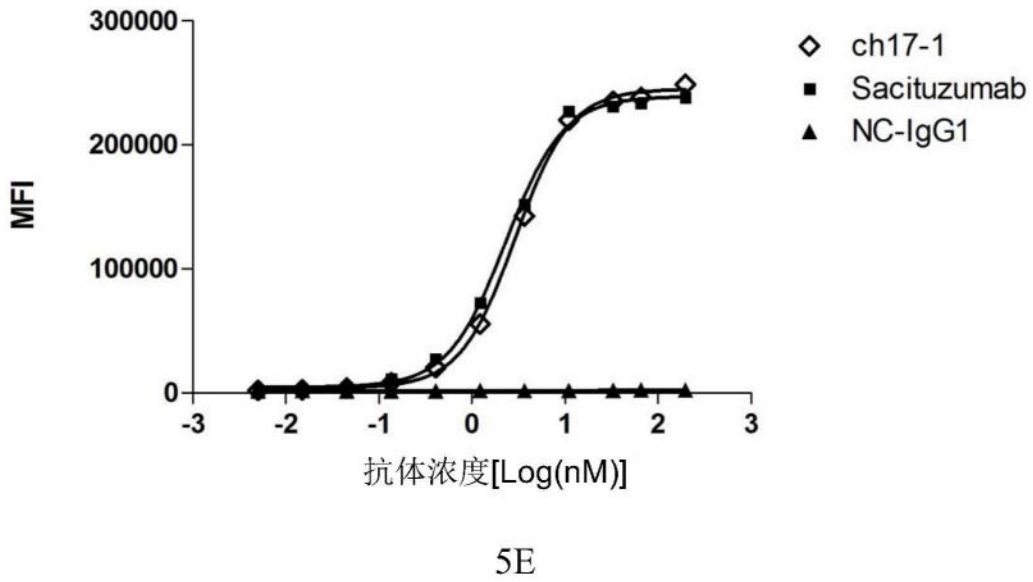
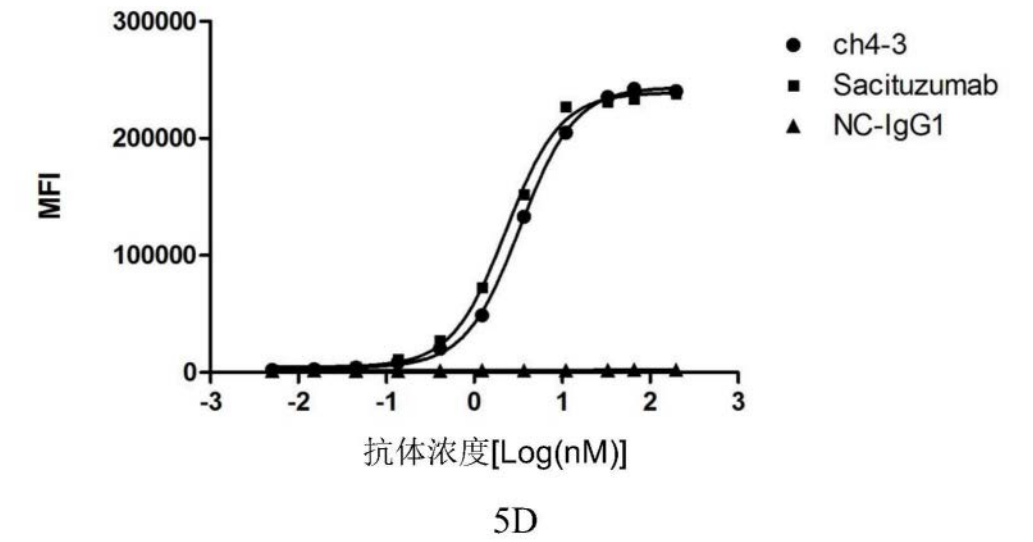
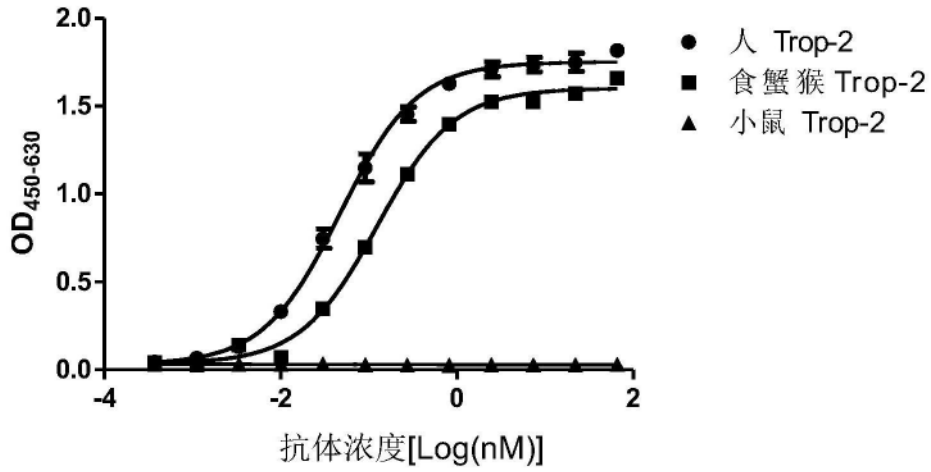
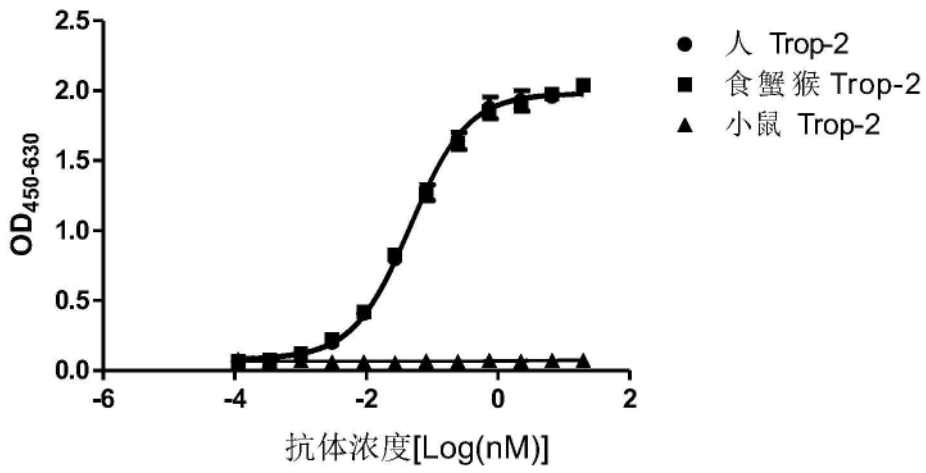


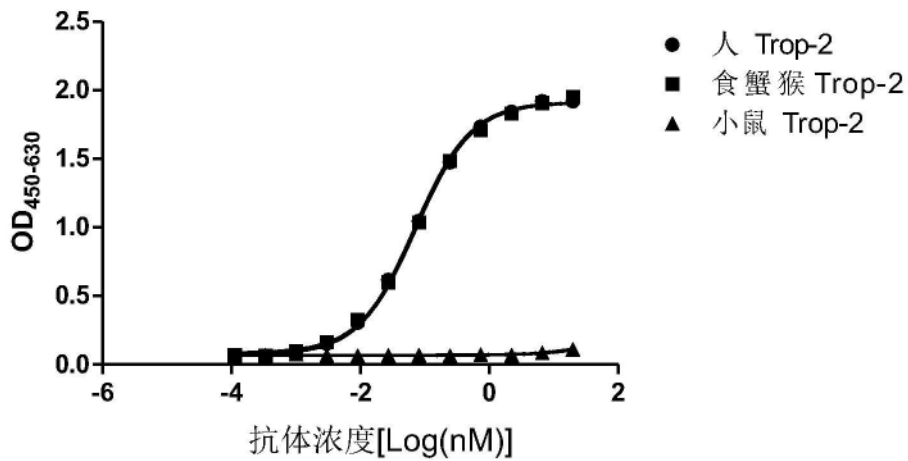
图5



6A

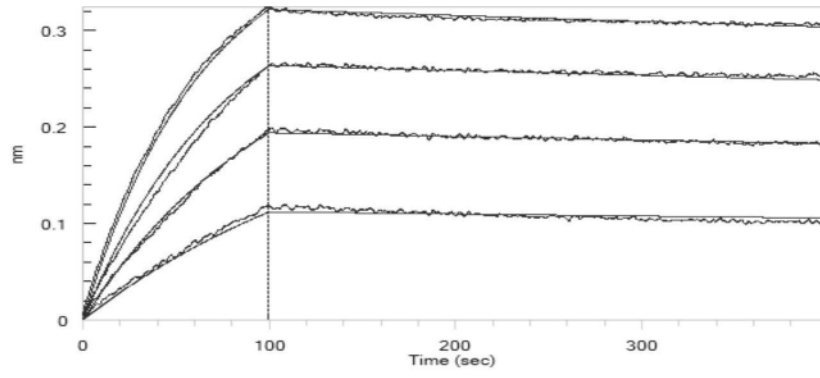


6B

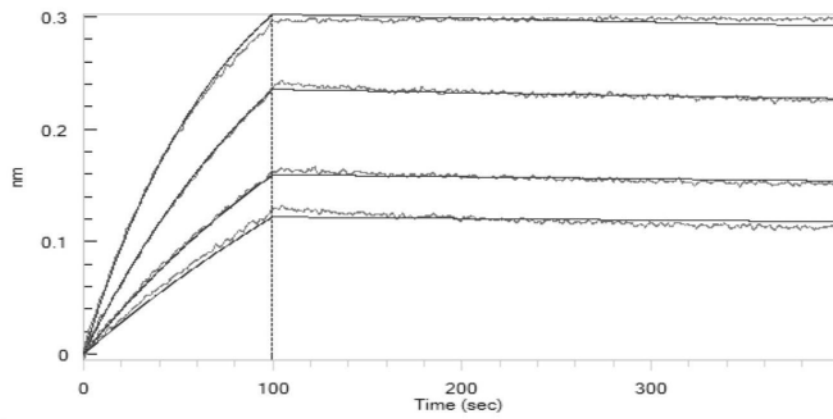


6C

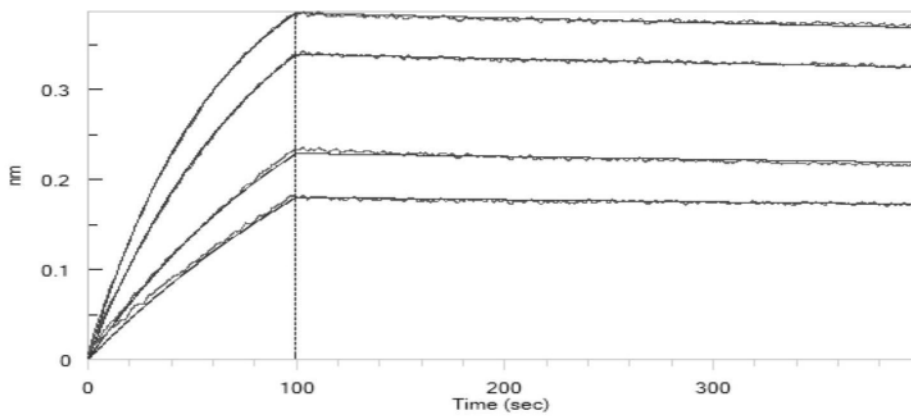
图6



7A



7B



7C

图7

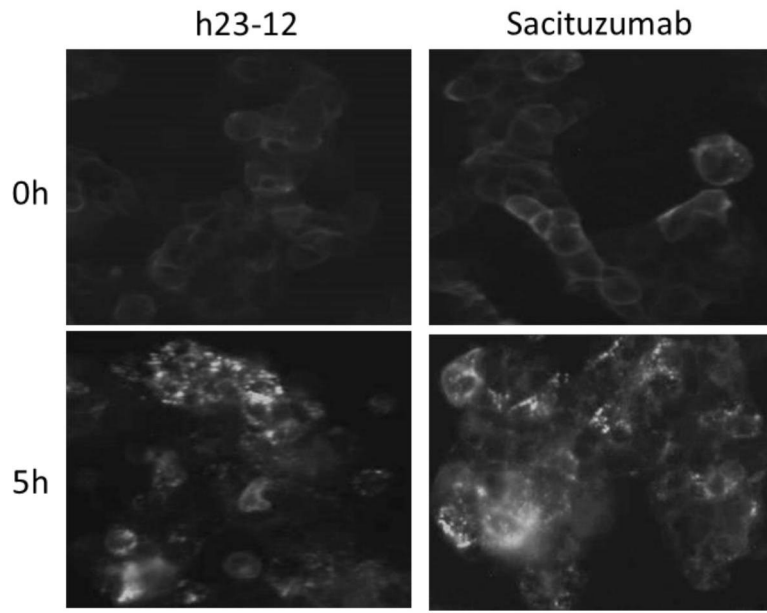
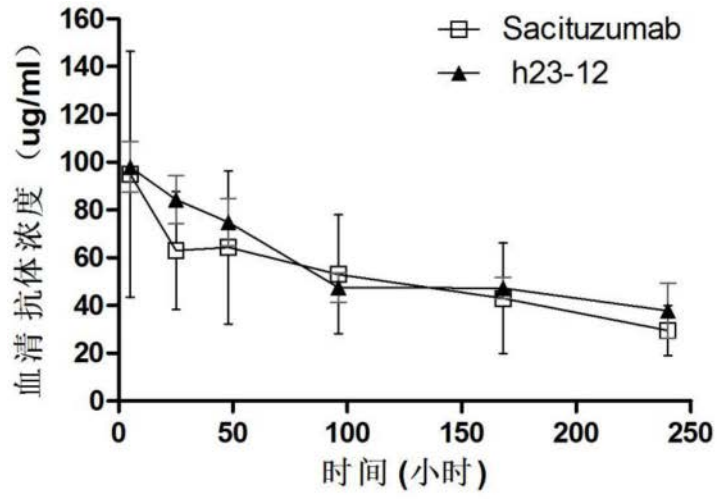
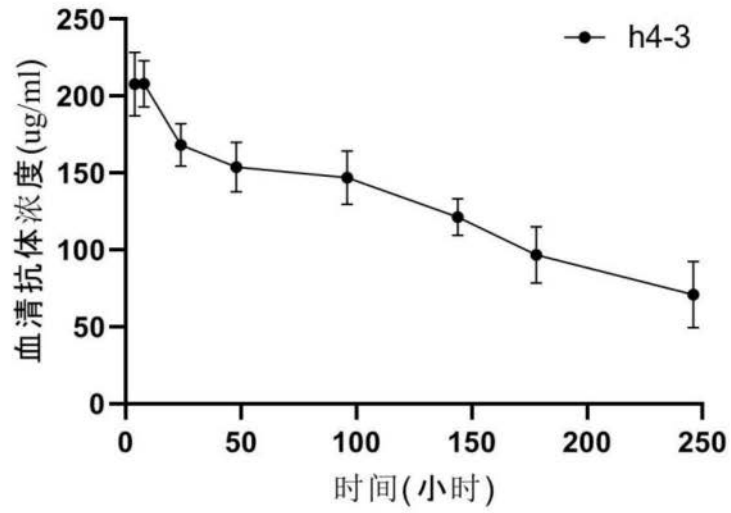


图8



9A



9B

图9

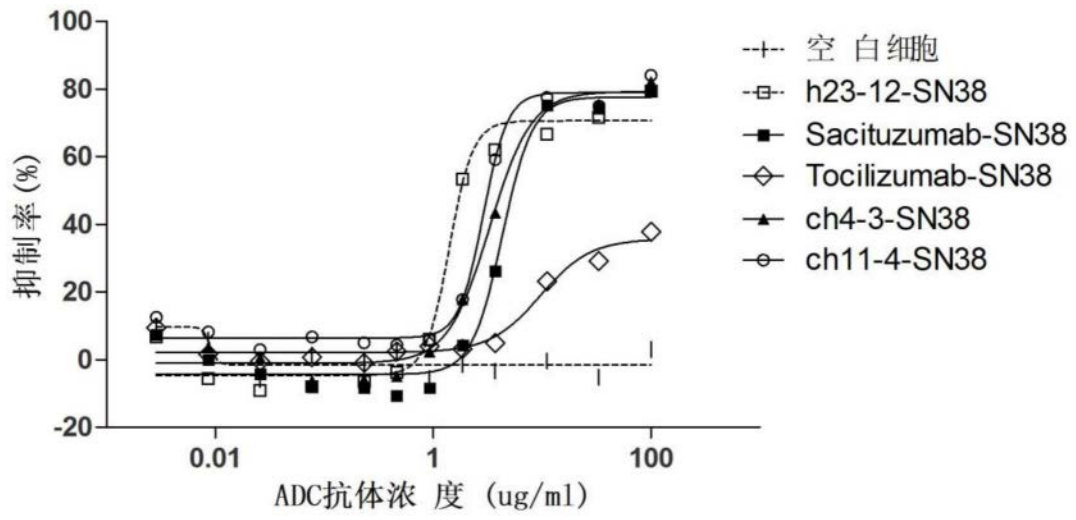
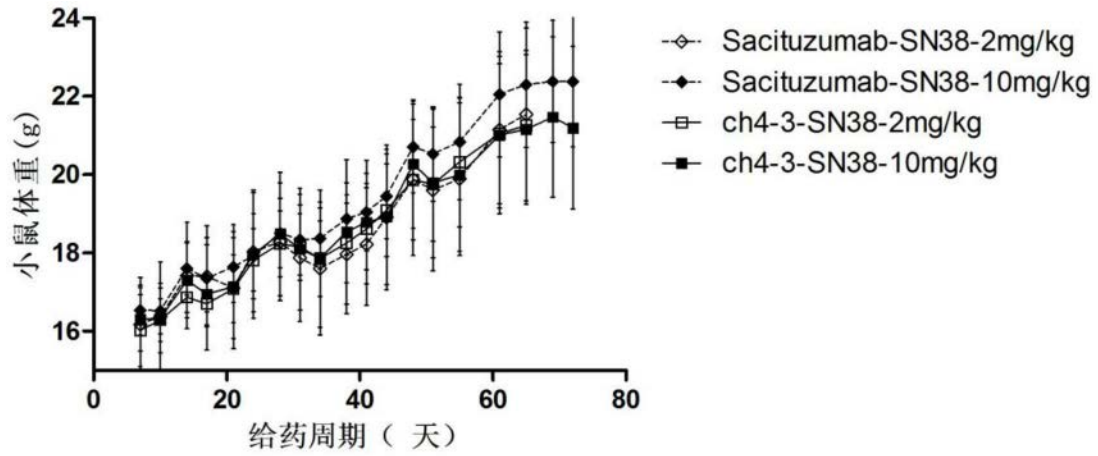
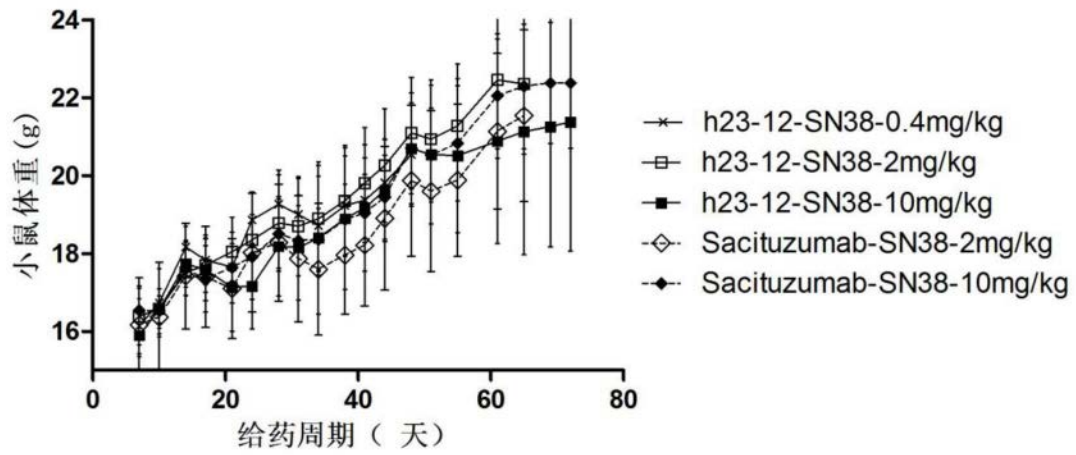


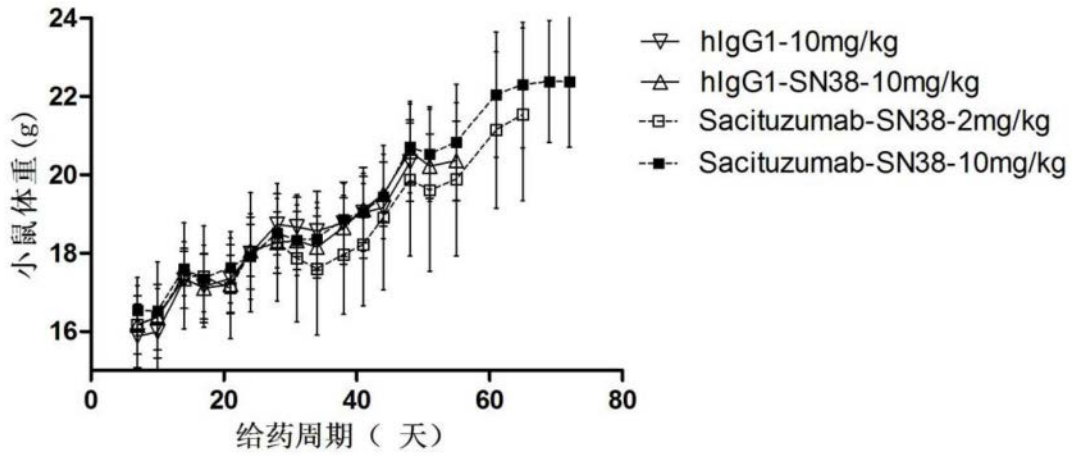
图10



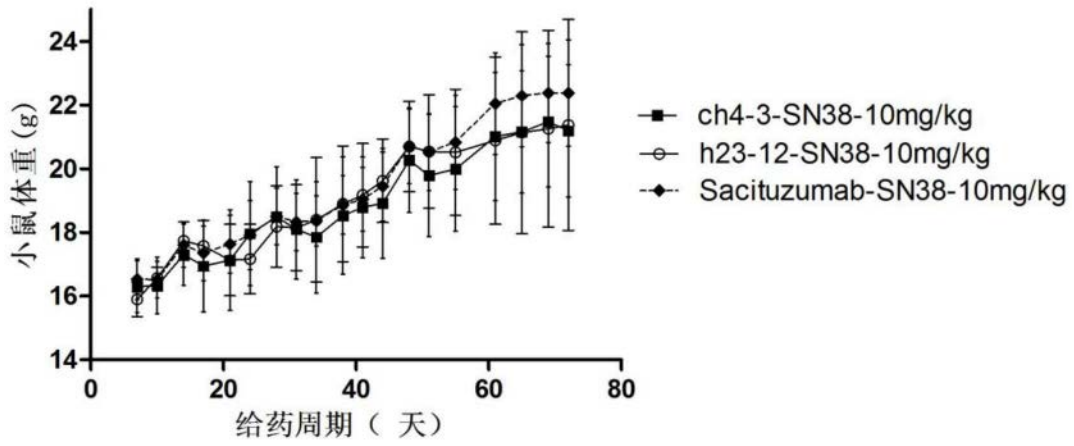
11A



11B

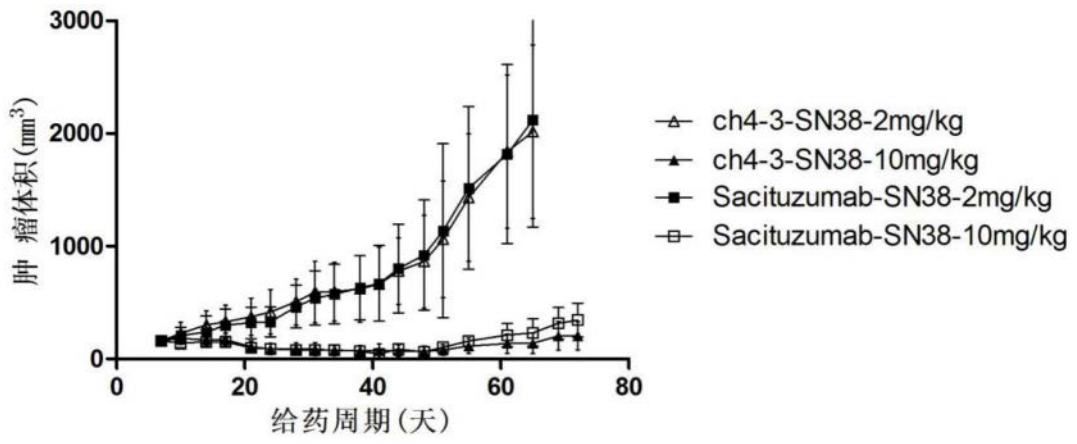


11C

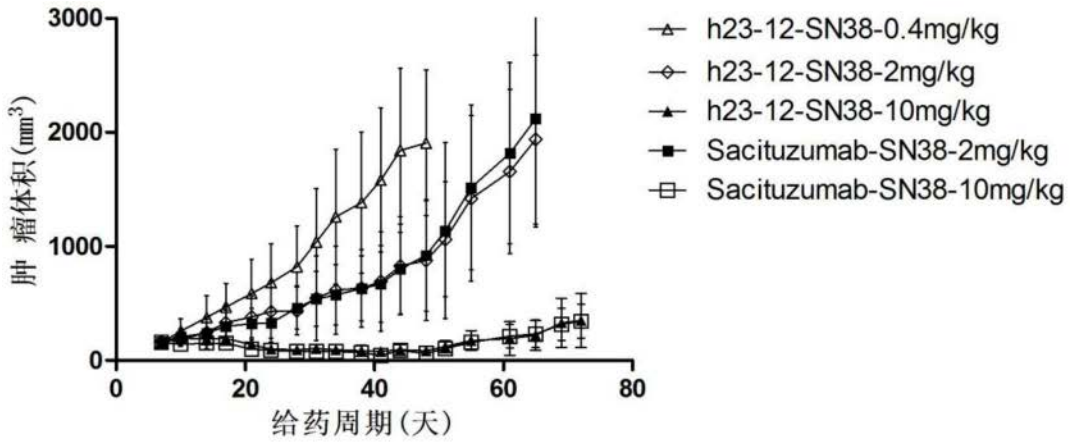


11D

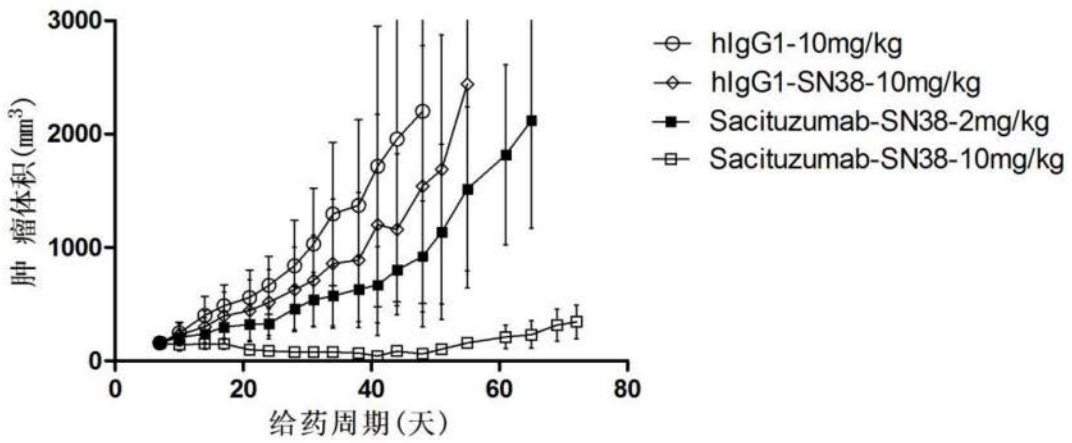
图11



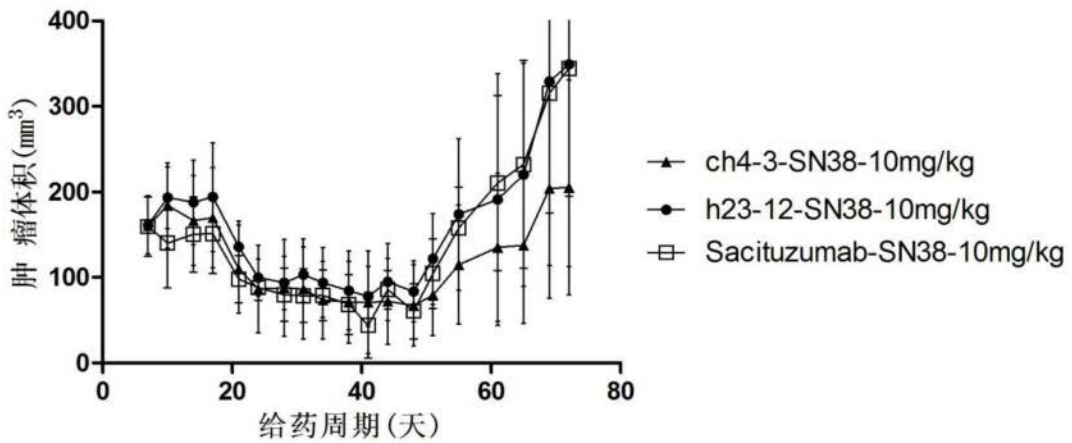
12A



12B



12C



12D

图12

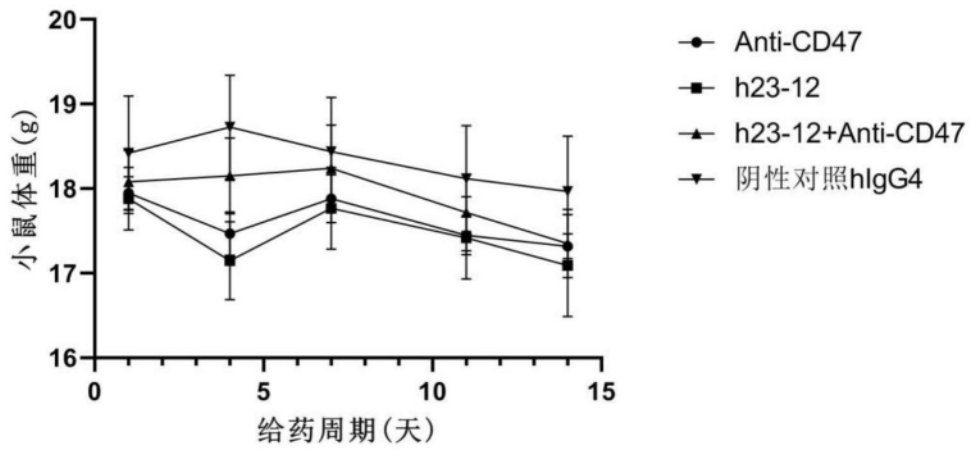


图13

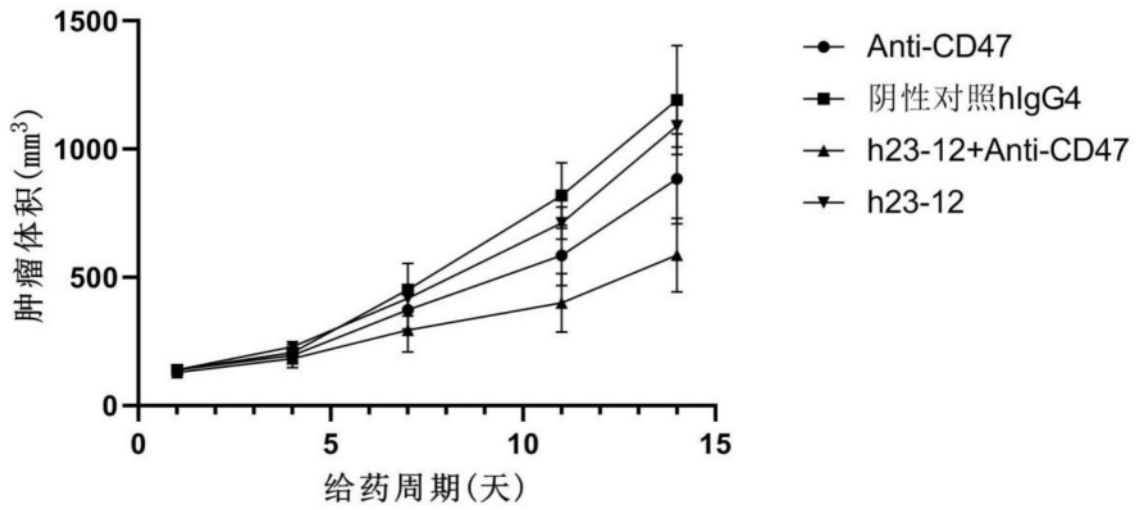


图14

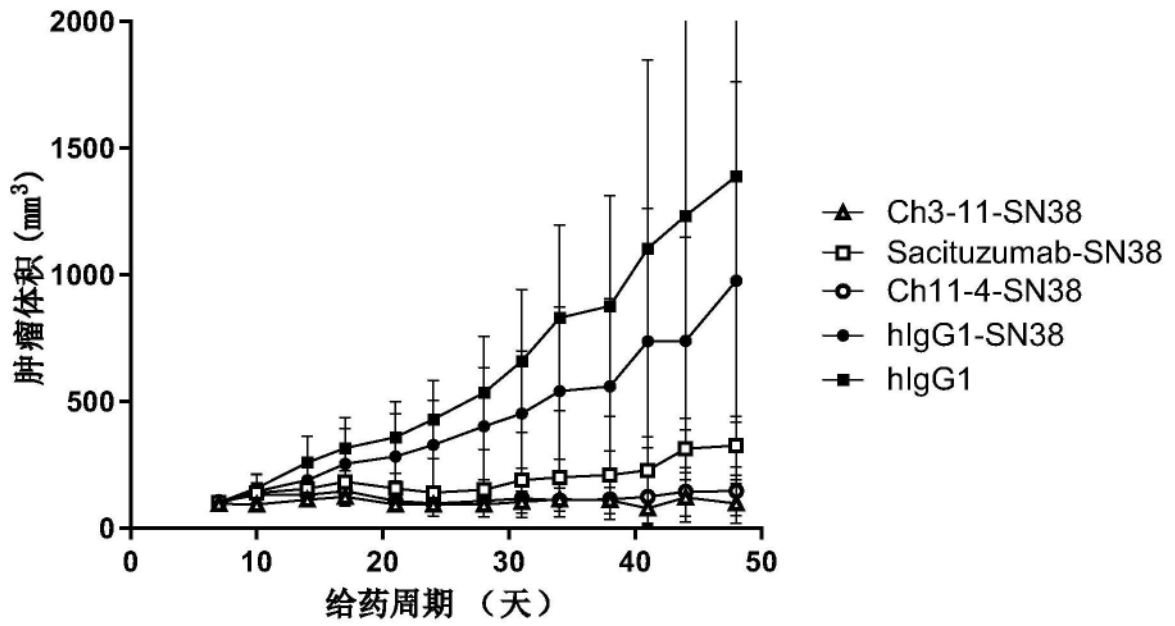


图15

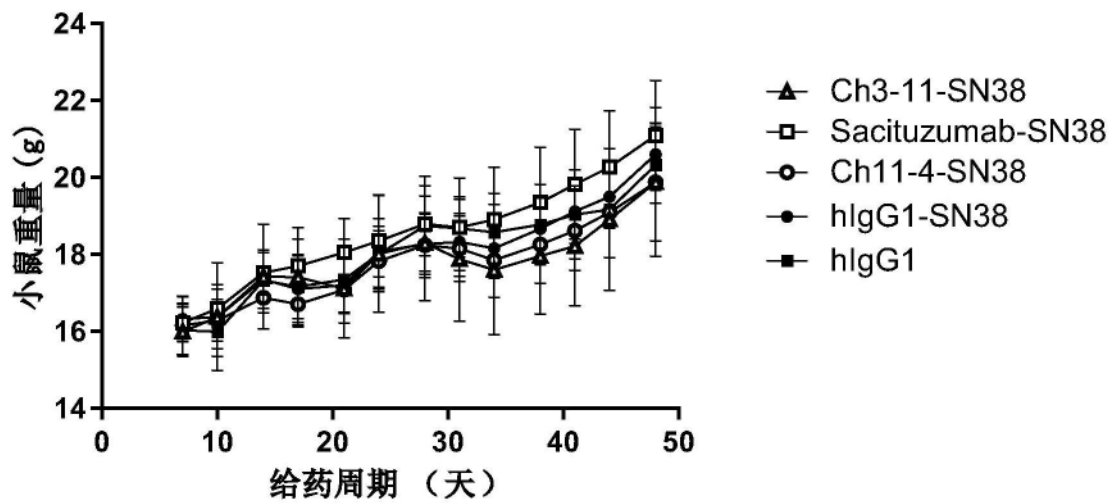


图16