



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114685657 B

(45) 授权公告日 2024.08.16

(21) 申请号 202011627881.1

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.31

A61K 45/06 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 31/12 (2006.01)

申请公布号 CN 114685657 A

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

(43) 申请公布日 2022.07.01

(56) 对比文件

(73) 专利权人 康诺亚生物医药科技(成都)有限公司

CN 101203241 A, 2008.06.18

CN 101370830 A, 2009.02.18

地址 610219 四川省成都市双流区成都天府国际生物城中路18号D2号楼

审查员 韩津

(72) 发明人 徐刚 陈博 王常玉 于俊涛

(74) 专利代理机构 北京植德律师事务所 11780

专利代理师 唐华东

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书2页 说明书51页

C12N 15/13 (2006.01)

序列表52页 附图10页

(54) 发明名称

一种功能增强型抗体阻断剂的开发及其应用

(57) 摘要

本公开涉及一种恶性肿瘤治疗剂的开发及其应用。所述恶性肿瘤治疗剂涉及结合CD70的抗体或其抗原结合部分,其包含选自氨基酸序列SEQ ID NO:5、6、7、15、16、22、29、30、31、37、38、44、45、46、54、55、56、64、65、77、83、84、85、91、97、98、106、107、114、115、116、124、131、132、135、142、160或其任何变体的重链CDR,和/或选自氨基酸序列SEQ ID NO:10、11、12、19、25、26、34、41、49、50、51、59、60、61、68、69、74、80、88、101、102、103、110、111、119、120、121、127、128或任何变体的轻链CDR。所抗体具有极高ADCC和CDC活性,可高效阻断CD70-CD27相互作用及下游信号传导,可显著抑制肿瘤。

1. 一种结合CD70的抗体或其抗原结合部分,其包含:

氨基酸序列为SEQ ID NO: 44的重链CDR1,

氨基酸序列为SEQ ID NO: 135的重链CDR2,

氨基酸序列为SEQ ID NO: 46的重链CDR3;

氨基酸序列为SEQ ID NO: 149的轻链CDR1,

氨基酸序列为SEQ ID NO: 80的轻链CDR2,以及

氨基酸序列为SEQ ID NO: 51的轻链CDR3。

2. 根据权利要求1的抗体或其抗原结合部分,其包含:

氨基酸序列为SEQ ID NO: 133的重链可变区,和氨基酸序列为SEQ ID NO: 147的轻链可变区;或者

氨基酸序列为SEQ ID NO: 133的重链可变区,和氨基酸序列为SEQ ID NO: 150的轻链可变区;或者

氨基酸序列为SEQ ID NO: 133的重链可变区,和氨基酸序列为SEQ ID NO: 152的轻链可变区;或者

氨基酸序列为SEQ ID NO: 136的重链可变区,和氨基酸序列为SEQ ID NO: 147的轻链可变区;或者

氨基酸序列为SEQ ID NO: 136的重链可变区,和氨基酸序列为SEQ ID NO: 150的轻链可变区;或者

氨基酸序列为SEQ ID NO: 136的重链可变区,和氨基酸序列为SEQ ID NO: 152的轻链可变区;或者

氨基酸序列为SEQ ID NO: 138的重链可变区,和氨基酸序列为SEQ ID NO: 147的轻链可变区;或者

氨基酸序列为SEQ ID NO: 138的重链可变区,和氨基酸序列为SEQ ID NO: 150的轻链可变区;或者

氨基酸序列为SEQ ID NO: 138的重链可变区,和氨基酸序列为SEQ ID NO: 152的轻链可变区。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分是来源化的。

4. 编码根据权利要求1-3任一项所述的抗体或其抗原结合部分的核酸分子。

5. 根据权利要求4所述的核酸分子,其中,所述核酸分子包含:

抗体重链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 134的序列,和轻链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 148的序列;或者

抗体重链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 134的序列,和轻链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 151的序列;或者

抗体重链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 134的序列,和轻链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 153的序列;或者

抗体重链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 137的序列,和轻链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 148的序列;或者

抗体重链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 137的序列,和轻链可变区核苷酸序列为

SEQ ID NO: 151的序列;或者

抗体重链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 137的序列,和轻链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 153的序列;或者

抗体重链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 139的序列,和轻链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 148的序列;或者

抗体重链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 139的序列,和轻链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 151的序列;或者

抗体重链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 139的序列,和轻链可变区核苷酸序列为SEQ ID NO: 153的序列。

6. 包含权利要求4或5所述的核酸分子的载体。

7. 包含权利要求4或5所述的核酸分子或权利要求6所述的载体的细胞。

8. 一种组合物,其包含权利要求1-3任一项所述的抗体或其抗原结合部分、权利要求4或5所述的核酸分子、权利要求6所述的载体和/或权利要求7所述的细胞。

9. 一种试剂盒,其包含权利要求1-3任一项所述的抗体或其抗原结合部分、权利要求4或5所述的核酸分子、权利要求6所述的载体、权利要求7所述的细胞和/或权利要求8所述的组合物。

10. 权利要求1-3任一项所述的抗体或其抗原结合部分、权利要求4或5所述的核酸分子、权利要求6所述的载体、权利要求7所述的细胞和/或权利要求8所述的组合物在制备用于诊断、治疗或预防与CD70相关病症的药物或试剂盒中的用途,其中,所述与CD70相关病症为肿瘤,所述肿瘤为淋巴瘤。

11. 根据权利要求10所述的用途,其中,所述淋巴瘤为伯基特淋巴瘤。

12. 根据权利要求10所述的用途,其中,所述与CD70相关病症为急性髓性白血病。

## 一种功能增强型抗体阻断剂的开发及其应用

### 技术领域

[0001] 本公开涉及一种功能增强型抗体阻断剂的开发及其应用,特别是一种结合CD70的抗体及其应用。

### 背景技术

[0002] CD70是一种II型跨膜糖蛋白,属于肿瘤坏死因子超家族。CD70与CD27的相互结合被称为“CD70-CD27信号轴”,在细胞增殖和分化过程中具有重要作用。研究显示,急性髓细胞白血病细胞表面的CD70与T细胞表面的CD27相互作用,可刺激肿瘤微环境中的CD4<sup>+</sup>调节性T<sub>reg</sub>细胞扩增,或显著增加骨髓中发生衰竭的效应CD8<sup>+</sup>T细胞比例,导致肿瘤的免疫逃逸。同时,CD27也表达于部分肿瘤细胞表面,肿瘤细胞间形成的CD70-CD27活化环路,可延长肿瘤细胞生存时间或导致增殖。

[0003] 在白血病患者体内,检测到恶性增殖的肿瘤细胞和白血病干细胞(CD34+CD38-)均广泛表达CD70分子,而可溶性CD27在患者血清中显著升高,和预后呈负相关。而通过抗体阻断CD70-CD27相互作用,可诱导白血病干细胞产生不对称细胞分裂和分化,抑制肿瘤集落的形成,显著延长肿瘤模型小鼠的存活时间。

[0004] CD70在正常组织和造血祖细胞中不表达,但在T细胞淋巴瘤、B细胞淋巴瘤以及相当一部分实体瘤中高表达。而CD33或CD123等其他血液肿瘤靶点,除了在肿瘤细胞高表达,也表达于正常造血祖细胞或正常组织(如:肺、前列腺、皮肤,外周血T细胞)。因此,开发具有杀伤和阻断活性的CD70单克隆抗体,可以特异性清除患者体内的肿瘤细胞或白血病干细胞,而不影响患者的造血祖细胞和恢复后的造血功能。

[0005] 急性髓细胞白血病是一组高度异质性的克隆性疾病,源于骨髓造血干细胞的过度增殖或分化障碍,导致大量未分化细胞在骨髓中蓄积,并排斥具有正常功能的血细胞和免疫细胞,也可能广泛浸润肝、脾、淋巴结等髓外脏器。患者由于贫血和免疫功能低下,最终死于并发感染或其他疾病。急性髓细胞白血病的治疗在过去近40年的时间里进展缓慢,临床采用的标准方案仍是上世纪70年代引入的阿糖胞苷加柔红霉素治疗。

[0006] CN200680021851.8描述了具有抗体Fc效应的CD70抗体,可介导ADCC、ADCP和/或CDC效应,可以在没有偶联于细胞毒性治疗剂或偶联于细胞毒性治疗剂的情况下,行使细胞抑制、细胞毒或免疫调节作用。

[0007] CN200680035376.X描述了结合人CD70蛋白并且抑制肿瘤细胞生长的CD70抗体,以 $1 \times 10^{-7}$ M或更低的K<sub>D</sub>与人CD70结合,所述抗体还与表达CD70的肾细胞癌肿瘤细胞系结合并且被其内化。

[0008] CN201280013552.5描述了来源于大羊驼的CD70抗体,与人CD70高亲和力结合,表现出小于 $7 \times 10^{-4}$ s<sup>-1</sup>或更少的解离速率,一些优选实施方案可表现出对CD70与其配体CD27之相互作用的强效阻断或抑制,优于CN200680021851.8和CN200680035376.X描述的CD70抗体。

[0009] 我们从小鼠免疫获得了

## 发明内容

[0010] 本发明人以CD70重组蛋白免疫小鼠,得到了多株识别人及食蟹猴CD70重组蛋白的高亲和力抗体。本公开抗体具有极高ADCC和CDC活性,明显优于现有技术中的CD70抗体,同时还可高效阻断CD70-CD27相互作用及下游信号传导,对肿瘤的抑制效果显著强于现有抗体。

[0011] 在一方面,本公开提供了一种结合CD70的抗体或其抗原结合部分。

[0012] 在一方面,本公开提供了一种双特异性抗体或其抗原结合部分。

[0013] 在一方面,本公开提供了编码前述的结合CD70的抗体或其抗原结合部分或双特异性抗体或其抗原结合部分的核酸分子。

[0014] 在一方面,本公开提供了包含前述的核酸分子的载体。

[0015] 在一方面,本公开提供了包含前述的载体的细胞。

[0016] 在一方面,本公开提供了包含前述的抗体或其抗原结合部分或其编码核酸分子和药学上可接受的载体的药物组合物或试剂盒。

[0017] 在一方面,本公开提供了包含共价附着至治疗部分的前述任一方面所述的抗体或其抗原结合部分、双特异性或多特异性分子的抗体-药物偶联物。

[0018] 在一方面,本公开提供了治疗与CD70相关病症的方法,其包括下述步骤:向所述受试者施用治疗有效量的前述任一方面的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、细胞和/或药物组合物。

[0019] 在一方面,本公开提供了前述任一方面的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、细胞和/或药物组合物在制备用于治疗受试者中与CD70相关病症的药物或试剂盒中的用途。

[0020] 在一方面,本公开提供了前述任一方面的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、细胞和/或药物组合物在制备用于治疗受试者的病毒感染的药物或试剂盒中的用途。

## 附图说明

[0021] 图1示出了HEK293细胞重组表达的人CD70胞外区蛋白SDS-PAGE检测结果。

[0022] 图2-1示出了流式细胞术检测人CD70/CHO稳转细胞株的CD70表达的检测结果。

[0023] 图2-2示出了流式细胞术检测猴CD70/CHO稳转细胞株的CD70表达的检测结果。

[0024] 图3示出了FACS检测免疫小鼠血清中抗体的滴度。

[0025] 图4-1和4-2示出了CD70单克隆抗体CDC活性筛选结果。

[0026] 图5示出了CD70单克隆抗体ADCC活性。

[0027] 图6-1示出了FACS检测嵌合抗体与CHO-人CD70的结合结果。

[0028] 图6-2示出了FACS检测嵌合抗体与CHO-食蟹猴CD70的结合结果。

[0029] 图7-1示出了嵌合抗体的人CD70/CD27阻断检测结果。

[0030] 图7-2示出了嵌合抗体的食蟹猴CD70/CD27阻断检测结果。

[0031] 图8示出了不同人源化抗体对肿瘤细胞Daudi的CDC杀伤效果。

[0032] 图9-1示出了FACS检测人源化抗体与CHO-人CD70的结合结果。

[0033] 图9-2示出了FACS检测人源化抗体与CHO-食蟹猴CD70的结合结果。

[0034] 图10-1示出了人源化抗体的人CD70/CD27阻断检测结果。

- [0035] 图10-2示出了人源化抗体的食蟹猴CD70/CD27阻断检测结果。
- [0036] 图11-1示出了人源化抗体对肿瘤细胞Daudi的CDC杀伤效果。
- [0037] 图11-2示出了人源化抗体对肿瘤细胞MV-4-11-CD70的CDC杀伤效果。
- [0038] 图11-3示出了人源化抗体对肿瘤细胞Raji的CDC杀伤效果。
- [0039] 图12-1示出了人源化抗体对肿瘤细胞Daudi的ADCC杀伤效果。
- [0040] 图12-2示出了人源化抗体对肿瘤细胞Raji的ADCC杀伤效果。
- [0041] 图13示出了人源化抗体对肿瘤细胞Daudi的ADCP杀伤效果。
- [0042] 图14示出了人源化抗体对CD70介导刺激IL-8分泌的抑制作用。
- [0043] 图15-1示出了人源化CD70抗体对人Burkitt's淋巴瘤Raji皮下移植瘤生长的影响。
- [0044] 图15-2示出了人源化CD70抗体对荷瘤小鼠体重的影响。
- [0045] 图16示出了CDC增强型CD70人源化抗体对肿瘤细胞Daudi的CDC杀伤活性。
- [0046] 图17-1和17-2示出了CDC增强型CD70人源化抗体在不同Fc  $\gamma$  RIII等位基因PBMC中介导的ADCC杀伤活性。
- [0047] 图18示出了CDC活性增强型CD70抗体在Daudi细胞株皮下异种移植NOD/SCID小鼠模型中的抗肿瘤作用。

## 具体实施方式

### [0048] I. 定义

[0049] 在本公开中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时,为了更好地理解本公开,下面提供相关术语的定义和解释。

[0050] 本文提供的是特异性结合CD70的抗体(例如,单克隆抗体)及其抗原结合片段。在具体的方面,本文提供的是特异性结合CD70的单克隆抗CD70抗体,其中所述抗CD70抗体包括亲本抗体的变体。在具体的方面,本文提供的是特异性结合CD70(例如,人CD70)的抗体。在特定的方面,本文提供的是包含一个或更多个氨基酸残基中的修饰的抗CD70抗体(例如,重链可变区的框架区中5-13个氨基酸取代),与没有所述修饰的亲本抗体相比,其保持与抗原的亲合力。

[0051] 术语“CD70”包括变异体、同种型、同系物、直向同源物以及种内同源物。例如对人类CD70蛋白具有特异性的抗体在某些情况下可以与来自除人类之外的物种的CD70蛋白进行交叉反应。在另一个实施方案中,对人类CD70蛋白具有特异性的抗体对于人类CD70蛋白可能是完全特异的,并且可能不表现出物种或其他类型的交叉反应性,或者可能与来自某些其他物种但不是所有其他物种的CD70进行交叉反应(如与灵长类CD70进行交叉反应但不与小鼠CD70进行交叉反应)。术语“人类CD70”指人类序列CD70,如具有Genbank登录号P32970的人类CD70的完整氨基酸序列。术语“小鼠CD70”指小鼠序列CD70,如具有Genbank登录号NP\_035747的小鼠CD70的完整氨基酸序列。通过具有例如保守突变或在非保守区的突变,人类CD70序列可能不同于Genbank登录号P32970的人类CD70,而该CD70具有基本上与Genbank登录号P32970的人类CD70相同的生物功能。例如,人CD70的一个生物功能是结合细

胞因子受体CD27。

[0052] 术语“细胞表面”的使用是根据其在本领域的正常含义,因此包括可通过与蛋白和其它分子结合而接近的细胞外部。

[0053] 术语“信号转导途径”指在多种信号转导分子之间的生物化学关系,这些信号转导分子在信号从细胞的一部分传递至细胞的另一部分的转递中发挥作用。此处使用的短语“细胞表面受体”包括,例如,能够接受信号并将这种信号传递穿过细胞的细胞膜的分子及分子的复合物。本公开的“细胞表面受体”的一个实例是CD70受体。

[0054] 如本文使用的和除非另作说明,术语“约”或“大约”是指在给定值或范围的加或减10%之内。在需要整数的情况下,该术语是指在给定值或范围的加或减10%之内、向上或向下舍入到最接近的整数。

[0055] 就抗体链多肽序列而言,短语“基本相同”可理解为表现出与参照多肽序列至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的抗体链。就核酸序列而言,该术语可理解为表现出与参照核酸序列至少大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的核苷酸序列。

[0056] 序列“相同性”或“同一性”具有本领域公认的含义,并且可以利用公开的技术计算两个核酸或多肽分子或区域之间序列相同性的百分比。可以沿着多核苷酸或多肽的全长或者沿着该分子的区域测量序列相同性(参见,例如:Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)。虽然存在许多测量两个多核苷酸或多肽之间的相同性的方法,但是术语“相同性”是技术人员公知的(Carrillo, H. & Lipman, D., SIAM J Applied Math 48:1073(1988))。

[0057] “取代型”变体是天然序列中至少一个氨基酸残基被除去并被不同的氨基酸插入其相同位置的变体。所述取代可为单个的,其中该分子中仅有一个氨基酸被取代;或可为多个的,其中该相同分子有两个或更多的氨基酸被取代。多个取代可位于连续的位点。同样,一个氨基酸可被多个残基取代,其中这样的变体包括取代和插入二者。“插入型”变体是一个或多个氨基酸被插入到紧邻一段天然序列某个特定位置处的氨基酸的变体。紧邻氨基酸意指与该氨基酸的 $\alpha$ -羧基或 $\alpha$ -氨基官能团连接。“缺失型”变体是天然氨基酸序列中一个或多个氨基酸被除去的变体。通常情况下,缺失型变体在其分子的特定区域内有一个或两个氨基酸被缺失。

[0058] 就抗体的可变结构域而言,术语“可变”系指抗体之间有广泛序列差异的相关分子的某些部分,且被用于针对其特异靶的特定抗体的特异识别和结合。但是,可变性在抗体的整个可变结构域内不是均匀分布的。可变性集中在被称为互补决定区域(CDRs;即CDR1、CDR2和CDR3)或超变区的三个区段,它们均位于轻链和重链的可变结构域内。可变结构域内保守程度更高的部分被称为构架(FR)区或构架序列。天然重链和轻链的每个可变结构域均

包括四个FR区,其主要采用 $\beta$ -折叠构型,它们籍三个CDRs连接起来,CDRs形成环,所述环连接 $\beta$ -折叠结构并在某些情形下形成部分的 $\beta$ -折叠结构。每条链的CDRs通常被FR区在邻近连接起来,并且借助于来自其它链的CDR,有助于抗体靶结合位点(表位或决定簇)的形成(参看Kabat等人Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institute of Health,Bethesda,MD(1987))。正如本文所使用,免疫球蛋白氨基酸残基的编号是依据Kabat等人的免疫球蛋白氨基酸残基编号系统而进行的,除非另有说明。一个CDR可具有特异结合关联表位的能力。

[0059] 如本文所用,抗体的“抗体片段”或“抗原结合片段”指全长抗体的任何部分,其少于全长,但是至少包含结合抗原的所述抗体的部分可变区(例如一个或多个CDR和/或一个或多个抗体结合位点),并且因此保留结合特异性以及所述全长抗体的至少部分特异性结合能力。因此,抗原结合片段指包含与衍生抗体片段的抗体结合相同抗原的抗原结合部分的抗体片段。抗体片段包括通过酶促处理全长抗体所产生的抗体衍生物,以及合成产生的衍生物,例如重组产生的衍生物。抗体包括抗体片段。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链Fv(scFv)、Fv、dsFv、双抗体、Fd和Fd'片段以及其他片段,包括修饰的片段(参见,例如,Methods in Molecular Biology,Vol 207:Recombinant Antibodies for Cancer Therapy Methods and Protocols(2003);Chapter 1;p 3-25,Kipriyanov)。所述片段可以包括连接在一起的多条链,例如通过二硫键和/或通过肽接头。抗体片段一般包含至少或约50个氨基酸,并且典型至少或约200个氨基酸。抗原结合片段包括任何抗体片段,其在被插入抗体框架(例如通过置换相应区域)时获得免疫特异性地结合(即表现出至少或至少约 $10^7$ - $10^8$ M<sup>-1</sup>的K<sub>a</sub>)抗原的抗体。“功能片段”或“抗CD70抗体的类似物”是可防止或实质降低所述受体结合配体或启动信号转导的能力的片段或类似物。正如本文所使用,功能片段一般与“抗体片段”含义相同,且就抗体而论,可指能防止或实质降低所述受体结合配体或启动信号转导的能力的片段,例如Fv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>等等。“Fv”片段由一条重链的可变结构域和一条轻链的可变结构域籍非共价结合方式而形成的二聚体(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>二聚体)组成。在该构型中,每个可变结构域的三个CDRs相互作用,以确定V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>二聚体表面上的靶结合位点,与完整抗体的情况一样。所述六个CDRs共同赋予完整抗体的靶结合特异性。但是,即使是单个可变结构域(或仅包括3个靶特异的CDRs的Fv的一半),仍可具有识别和结合靶的能力。

[0060] 如本文中所示,术语“双特异性”(Bispecific antibody,BsAb)指抗体和/或抗原结合分子能够特异性结合两种不同的抗原性决定簇,通常,双特异性抗体和/或抗原结合分子包含两种抗原结合位点,其中每种特异于不同的抗原性决定簇。在某些实施方案中,所述双特异性抗体和/或抗原结合分子能够同时结合两种抗原决定簇,特别是在两种不同的细胞上表达的两种抗原性决定簇。

[0061] 如本文所用,“单克隆抗体”指相同抗体的群体,表示单克隆抗体群体中的每个单独的抗体分子与其他抗体分子相同。这种特性与抗体的多克隆群体的特性相反,所述抗体的多克隆群体包含具有多种不同序列的抗体。单克隆抗体可以通过许多公知的方法来制备(Smith et al.(2004)J.Clin.Pathol.57,912-917;和Nelson et al.,J Clin Pathol(2000),53,111-117)。例如,单克隆抗体可以通过永生化B细胞来制备,例如通过与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞系或者通过用诸如EBV的病毒感染B细胞。重组技术还可以用来在体外通过用携带编码抗体的核苷酸的人工序列的质粒转化宿主细胞来从宿主细胞的克



隆群体制备抗体。

[0062] 如本文中所示,术语“杂交瘤”或“杂交瘤细胞”指由融合产抗体的淋巴细胞和不产抗体的癌细胞而产生的细胞或细胞系(通常为骨髓瘤或淋巴瘤细胞)。如本领域普通技术人员所知的,杂交瘤可增殖并持续供应产生特定单克隆抗体。用于产生杂交瘤的方法为本领域已知的(见例如,Harlow&Lane,1988)。当提及术语“杂交瘤”或“杂交瘤细胞”时,其还包括杂交瘤的亚克隆和后代细胞。

[0063] 如本文所用,全长抗体是具有两条全长重链(例如VH-CH1-CH2-CH3或VH-CH1-CH2-CH3-CH4)和两条全长轻链(VL-CL)和铰链区的抗体,例如通过抗体分泌B细胞天然产生的抗体以及合成产生的具有相同结构域的抗体。

[0064] 术语“嵌合抗体”是指这样的抗体,其中可变区序列源自一个物种,恒定区序列源自另一物种,如其中可变区序列源自小鼠抗体及恒定区序列源自人抗体的抗体。

[0065] “人源化”抗体是指非人(例如小鼠)抗体形式,其是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或者其片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或者抗体的其它抗原结合亚序列),含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。优选地,人源化抗体是人免疫球蛋白(接受者抗体),其中接受者抗体的互补决定区(CDR)的残基由来自具有希望的特异性、亲和性和能力的非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠或者兔的CDR残基置换。

[0066] 此外,在人源化中,还可能对VH和/或VL的CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基进行突变,由此改善抗体的一或多种结合特性(例如亲和性)。可进行例如PCR介导的突变引入突变,其对抗体结合或其它功能特性的影响可利用本文所述的体外或体内测试评估。通常,引入保守性突变。此类突变可为氨基酸取代、添加或缺失。另外,CDR内的突变通常不超过一个或两个。因此,本公开所述人源化抗体还涵盖CDR内包含1或2两个氨基酸突变的抗体。

[0067] 如本文所用,术语“CDR”指互补决定区(complementarity-determining region),已知抗体分子的每个重链和轻链具有3个CDR。CDR也称作高变区,且存在于抗体的每个重链和轻链的可变区中,在CDR的一级结构中具有非常高的变异性位点。本说明书中,重链的CDR由来自重链的氨基端序列的氨基端的CDR1、CDR2、CDR3表示,轻链的CDR由来自轻链的氨基端序列的氨基端的CDR1、CDR2、CDR3表示。这些位点在三级结构中彼此临近,并决定抗体所结合的抗原的特异性。

[0068] 如本文所用,术语“表位”指抗体的互补位结合的抗原上的任何抗原决定簇。表位决定簇通常包含分子的化学活性表面分型,例如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。

[0069] 如本文所用,关于抗体或其抗原结合片段的“特异性结合”或“免疫特异性地结合”在本文中可交换使用,并且指抗体或抗原结合片段通过抗体和抗原的抗体结合位点之间的非共价相互作用与同种抗原形成一个或多个非共价键的能力。所述抗原可以是分离的抗原或存在于肿瘤细胞。通常,免疫特异性地结合(或特异性结合)抗原的抗体是以约或 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 或 $1 \times 10^8 M^{-1}$ 或更大的亲和常数Ka(或者 $1 \times 10^{-7} M$ 或 $1 \times 10^{-8} M$ 或更低的解离常数(Kd))结合所述抗原。亲和常数可以通过抗体反应的标准动力学方法来测定,例如,免疫测定、表面等离子共振(SPR)(Rich and Myszka(2000)Curr.Opin.Biotechnol 11:54;Englebienne(1998)Analyst.123:1599)、等温滴定量热法(ITC)或本领域已知的其他动力学相互作用测定(参

见,例如,Paul, ed., *Fundamental Immunology*, 2nd ed., Raven Press, New York, pages 332-336 (1989); 还参见描述用于计算抗体的结合亲和力的示例性SPR和ITC方法的美国专利第7,229,619号)。用于实时检测和监测结合速率的仪器和方法是已知的,并且可商购(参见, *BiaCore 2000*, Biacore AB, Uppsala, Sweden and GE Healthcare Life Sciences; Malmqvist (2000) *Biochem. Soc. Trans.* 27:335)。

[0070] 如本文所用,术语“多核苷酸”和“核酸分子”指包含至少两个连接的核苷酸或核苷酸衍生物的寡聚体或聚合物,包括通常通过磷酸二酯键连接在一起的脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。如本文所使用,术语“核酸分子”意欲包括DNA分子及RNA分子。核酸分子可为单链或双链,且可为cDNA。

[0071] 如本文所用,分离的核酸分子是从存在于核酸分子的天然来源中的其他核酸分子分离的核酸分子。诸如cDNA分子的“分离的”核酸分子可以在通过重组技术制备时基本上不含其他细胞物质或培养基,或者在化学合成时基本上不含化学前体或其他化学成分。本文所提供的示例性分离的核酸分子包括编码所提供的抗体或抗原结合片段的分离的核酸分子。

[0072] 如本文所用,关于核酸序列、区域、元件或结构域的“可操作地连接”表示核酸区域互相功能相关。例如,启动子可以可操作地连接至编码多肽的核酸,从而所述启动子调控或介导所述核酸的转录。

[0073] 亦提供本文所述序列列表中所述序列的“保守序列修饰”,即不消除由核苷酸序列编码或含有氨基酸序列的抗体与抗原的结合的核苷酸及氨基酸序列修饰。这些保守序列修饰包括保守核苷酸及氨基酸取代以及核苷酸及氨基酸添加及缺失。例如,可通过本领域已知的标准技术(例如定点诱变及PCR介导的诱变)将修饰引入本文所述的序列列表中。保守序列修饰包括保守氨基酸取代,其中氨基酸残基被替换为具有类似侧链的氨基酸残基。具有类似侧链的氨基酸残基的家族是本领域中已有定义的。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 $\beta$ 分枝侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)及具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,抗CD70抗体中的预测的非必需氨基酸残基优选被来自同一侧链家族的另一氨基酸残基替代。鉴定不消除抗原结合的核苷酸及氨基酸保守取代的方法为本领域所熟知(例如,参见Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187(1993); Kobayashi et al., *Protein Eng.* 12(10):879-884(1999); Burks et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417(1997))。

[0074] 作为另一选择,在另一实施方案中,可通过例如饱和诱变沿抗CD70抗体编码序列的全部或一部分随机引入突变,且可针对改良的结合活性筛选所得经修饰抗CD70抗体。

[0075] 如本文所用,“表达”指通过多核苷酸的转录和翻译产生多肽的过程。多肽的表达水平可以利用本领域已知的任何方法来评价,包括例如测定从宿主细胞产生的多肽的量的方法。这类方法可以包括但不限于通过ELISA定量细胞裂解物中的多肽,凝胶电泳之后考马斯蓝染色,Lowry蛋白测定以及Bradford蛋白测定。

[0076] 如本文所用,“宿主细胞”是用于接受、保持、复制和扩增载体的细胞。宿主细胞还

可以用来表达载体所编码的多肽。当宿主细胞分裂时,载体中所含的核酸复制,从而扩增核酸。宿主细胞可以是真核细胞或原核细胞。合适的宿主细胞包括但不限于CHO细胞、各种COS细胞、HeLa细胞、HEK细胞例如HEK 293细胞。

[0077] 如本文所用,“载体”是可复制的核酸,当载体转化入适当的宿主细胞时,可以从该载体表达一种或多种异源蛋白。关于载体包括那些通常通过限制酶切消化和连接可以将编码多肽或其片段的核酸引入其中的载体。关于载体还包括那些包含编码多肽的核酸的载体。载体用来将编码多肽的核酸引入宿主细胞,用于扩增核酸或者用于表达/展示核酸所编码的多肽。载体通常保持游离,但是可以设计为使基因或其部分整合入基因组的染色体。还考虑人工染色体的载体,例如酵母人工载体和哺乳动物人工染色体。这类媒介物的选择和用途是本领域技术人员公知的。

[0078] 如本文所用,载体还包括“病毒载体”或“病毒的载体”。病毒的载体是工程化的病毒,其可操作地连接至外源基因以将外源基因转移(作为媒介物或穿梭(shuttle))入细胞。

[0079] 如本文所用,“表达载体”包括能够表达DNA的载体,所述DNA与诸如启动子区的能够影响这类DNA片段表达的调控序列可操作地连接。这类额外的片段可以包括启动子和终止子序列,并且任选地可以包括一个或多个复制起点、一个或多个选择标记、增强子、多腺苷酸化信号等。表达载体一般来源于质粒或病毒DNA,或者可以包含这两者的元件。因此,表达载体指重组DNA或RNA构建体,例如质粒、噬菌体、重组病毒或其他载体,当引入适当的宿主细胞时,导致克隆DNA的表达。适当的表达载体是本领域技术人员公知的,并且包括在真核细胞和/或原核细胞中可复制的表达载体以及保持游离的表达载体或者整合入宿主细胞基因组的表达载体。

[0080] 如本文所用,“治疗”患有疾病或疾病状况的个体表示所述个体的症状部分或全部缓解,或者在治疗后保持不变。因此,治疗包括预防、治疗和/或治愈。预防指防止潜在疾病和/或防止症状恶化或疾病发展。治疗还包括所提供的任何抗体或其抗原结合片段以及本文所提供的组合物的任何药学用途。

[0081] 如本文所用,“疗效”表示由个体的治疗所导致的效果,其改变、通常改良或改善疾病或疾病状况的症状,或者治愈疾病或疾病状况。

[0082] 如本文所用,“治疗有效量”或“治疗有效剂量”指施用于对象之后至少足以产生疗效的物质、化合物、材料或包含化合物的组合物的量。因此,其为防止、治愈、改善、阻滞或部分阻滞疾病或病症的症状所必需的量。

[0083] 如本文所用,“预防有效量”或“预防有效剂量”指在施用于对象时会具有预期的预防效果的物质、化合物、材料或包含化合物的组合物的量,例如,防止或延迟疾病或症状的发生或复发,减少疾病或症状发生或复发的可能性。完全预防有效剂量不必通过施用一个剂量发生,并且可以仅在施用一系列剂量之后发生。因此,预防有效量可以在一次或多次施用中施用。

[0084] 如本文中所使用的,术语“患者”是指哺乳动物,例如人。

[0085] II. 具体实施方式

[0086] 在一方面,本公开提供了结合CD70的抗体或其抗原结合部分,其包含选自氨基酸序列SEQ ID NO:5、6、7、15、16、22、29、30、31、37、38、44、45、46、54、55、56、64、65、77、83、84、85、91、97、98、106、107、114、115、116、124、131、132、135、142、160或其任何变体的重链CDR,

和/或选自氨基酸序列SEQ ID NO:10、11、12、19、25、26、34、41、49、50、51、59、60、61、68、69、74、80、88、101、102、103、110、111、119、120、121、127、128或任何变体的轻链CDR。。

[0087] 根据前一方面的抗体或其抗原结合部分,其包含选自氨基酸序列SEQ ID NO:5、15、29、44、54、83、96、114、131或其任何变体的重链CDR1,选自氨基酸序列SEQ ID NO:6、30、37、45、55、64、77、84、91、97、106、115、124、132、135、142或其任何变体的重链CDR2,选自氨基酸序列SEQ ID NO:7、16、22、31、38、46、56、65、85、98、107、116或其任何变体的重链CDR3;和/或选自氨基酸序列SEQ ID NO:10、16、25、34、51、59、59、38、74、88、101、110、119、127、149或其任何变体的轻链CDR1,选自氨基酸序列SEQ ID NO:11、50、60、80、102、111、120、128、160或其任何变体的轻链CDR2,选自氨基酸序列SEQ ID NO:12、26、51、61、69、103、121或其任何变体的轻链CDR3。

[0088] 根据前一方面的抗体或其抗原结合部分,其包含选自下列的重链和轻链的CDR组合:

[0089] (1) 分别包含SEQ ID NO:5、6、7的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:10、11、12的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;

[0090] (2) 分别包含SEQ ID NO:15、6、16的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:19、11、12的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;

[0091] (3) 分别包含SEQ ID NO:5、6、22的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:25、11、26的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;

[0092] (4) 分别包含SEQ ID NO:29、30、31的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:34、11、26的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;

[0093] (5) 分别包含SEQ ID NO:5、37、38的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:41、11、12的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;

[0094] (6) 分别包含SEQ ID NO:44、45、46的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:49、50、51的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;

[0095] (7) 分别包含SEQ ID NO:54、55、56的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:59、60、61的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;

[0096] (8) 分别包含SEQ ID NO:5、64、65的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:68、11、69的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;

[0097] (9) 分别包含SEQ ID NO:29、30、31的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:74、11、26的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;

[0098] (10) 分别包含SEQ ID NO:44、77、46的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:49、80、51的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;

[0099] (11) 分别包含SEQ ID NO:83、84、85的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:88、11、12的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;

[0100] (12) 分别包含SEQ ID NO:5、91、85的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:19、11、12的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;

[0101] (13) 分别包含SEQ ID NO:96、97、98的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:101、102、103的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;

[0102] (14) 分别包含SEQ ID NO:15、106、107的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包

含SEQ ID NO:110、111、103的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列；

[0103] (15) 分别包含SEQ ID NO:114、115、116的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:119、120、121的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列；

[0104] (16) 分别包含SEQ ID NO:15、124、16的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:127、128、103的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列；

[0105] (17) 分别包含SEQ ID NO:131、132、116的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:119、120、121的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列；

[0106] (18) 分别包含SEQ ID NO:44、135、46的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:149、80、51的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列；

[0107] (19) 分别包含SEQ ID NO:29、142、31的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:25、11、26的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列；

[0108] (20) 分别包含SEQ ID NO:29、142、31的重链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:25、160、26的轻链CDR1、CDR2及CDR3序列。

[0109] 根据前一方面的抗体或其抗原结合部分,其包含选自氨基酸序列SEQ ID NO:3、13、20、27、35、42、52、62、70、75、81、89、94、104、112、122、129、133、136、138、140、143、145或其任何变体的重链可变区,和/或选自氨基酸序列SEQ ID NO:8、17、23、32、39、47、57、66、72、78、86、92、99、108、117、125、147、150、152、154、156、158或其任何变体的轻链可变区。

[0110] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:3或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:8或其任何变体的轻链可变区。

[0111] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:13或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:17或其任何变体的轻链可变区。

[0112] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:20或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:23或其任何变体的轻链可变区。

[0113] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:27或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:32或其任何变体的轻链可变区。

[0114] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:35或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:39或其任何变体的轻链可变区。

[0115] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:42或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:47或其任何变体的轻链可变区。

[0116] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:52或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:57或其任何变体的轻链可变区。

[0117] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列

SEQ ID NO:62或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:66或其任何变体的轻链可变区。

[0118] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:70或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:72或其任何变体的轻链可变区。

[0119] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:75或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:78或其任何变体的轻链可变区。

[0120] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:81或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:86或其任何变体的轻链可变区。

[0121] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:89或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:92或其任何变体的轻链可变区。

[0122] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:94或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:99或其任何变体的轻链可变区。

[0123] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:104或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:108或其任何变体的轻链可变区。

[0124] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:112或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:117或其任何变体的轻链可变区。

[0125] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:122或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:125或其任何变体的轻链可变区。

[0126] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:129或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:117或其任何变体的轻链可变区。

[0127] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:133或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:147或其任何变体的轻链可变区。

[0128] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:133或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:150或其任何变体的轻链可变区。

[0129] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:133或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:152或其任何变体的轻链可变区。

[0130] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列

SEQ ID NO:136或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:147或其任何变体的轻链可变区。

[0131] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:136或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:150或其任何变体的轻链可变区。

[0132] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:136或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:152或其任何变体的轻链可变区。

[0133] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:138或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:147或其任何变体的轻链可变区。

[0134] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:138或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:150或其任何变体的轻链可变区。

[0135] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:138或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:152或其任何变体的轻链可变区。

[0136] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:140或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:154或其任何变体的轻链可变区。

[0137] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:140或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:156或其任何变体的轻链可变区。

[0138] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:140或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:158或其任何变体的轻链可变区。

[0139] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:143或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:154或其任何变体的轻链可变区。

[0140] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:143或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:156或其任何变体的轻链可变区。

[0141] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:143或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:158或其任何变体的轻链可变区。

[0142] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:145或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:154或其任何变体的轻链可变区。

[0143] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列

SEQ ID NO:145或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:156或其任何变体的轻链可变区。

[0144] 在本公开的一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分包含氨基酸序列SEQ ID NO:145或其任何变体的重链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:158或其任何变体的轻链可变区。

[0145] 在一方面,本公开提供了一种双特异性或多特异性分子,其包含前述任一方面的抗体或其抗原结合部分。

[0146] 编码根据前述任一方面的抗体或其抗原结合部分或双特异性或多特异性分子的核酸分子。

[0147] 在本公开的一个优选实施方案中,提供了一种编码所述的抗体或其抗原结合部分、双特异性或多特异性分子的核酸分子,所述核酸分子包含选自SEQ ID NO:4、14、21、28、36、43、53、63、71、76、82、90、95、105、113、123、130、134、137、139、141、144、146或其任何变体的抗体重链核酸序列,和/或选自SEQ ID NO:9、18、24、33、40、48、58、67、73、79、87、93、100、109、118、126、148、151、153、155、157、159或其任何变体的抗体轻链核酸序列。

[0148] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:4或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:9或其任何变体的序列。

[0149] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:14或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:18或其任何变体的序列。

[0150] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:21或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:24或其任何变体的序列。

[0151] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:28或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:33或其任何变体的序列。

[0152] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:36或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:40或其任何变体的序列。

[0153] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:43或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:48或其任何变体的序列。

[0154] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:53或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:58或其任何变体的序列。

[0155] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:63或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:67或其任何变体的序列。

[0156] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列



SEQ ID NO:71或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:73或其任何变体的序列。

[0157] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:76或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:79或其任何变体的序列。

[0158] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:82或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:87或其任何变体的序列。

[0159] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:90或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:93或其任何变体的序列。

[0160] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:95或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:100或其任何变体的序列。

[0161] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:105或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:109或其任何变体的序列。

[0162] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:113或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:118或其任何变体的序列。

[0163] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:123或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:126或其任何变体的序列。

[0164] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:130或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:118或其任何变体的序列。

[0165] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:134或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:148或其任何变体的序列。

[0166] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:134或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:151或其任何变体的序列。

[0167] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:134或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:153或其任何变体的序列。

[0168] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:137或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:148或其任何变体的序列。

[0169] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列

SEQ ID NO:137或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:151或其任何变体的序列。

[0170] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:137或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:153或其任何变体的序列。

[0171] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:139或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:148或其任何变体的序列。

[0172] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:139或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:151或其任何变体的序列。

[0173] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:139或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:153或其任何变体的序列。

[0174] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:141或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:155或其任何变体的序列。

[0175] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:141或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:157或其任何变体的序列。

[0176] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:141或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:159或其任何变体的序列。

[0177] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:144或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:155或其任何变体的序列。

[0178] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:144或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:157或其任何变体的序列。

[0179] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:144或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:159或其任何变体的序列。

[0180] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:146或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:155或其任何变体的序列。

[0181] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:146或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:157或其任何变体的序列。

[0182] 在本公开的一个优选实施方案中,所述核酸分子包含抗体重链可变区核苷酸序列

SEQ ID NO:146或其任何变体的序列,和/或轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:159或其任何变体的序列。

[0183] 在一方面,本公开提供了结合CD70的抗体或其抗原结合部分,其与前述任一方面的抗体或其抗原结合部分具有至少大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。

[0184] 在一方面,本公开提供了编码如前述任一方面的抗体或其抗原结合部分的核酸分子,或与其具有至少大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的核酸分子。

[0185] 在一方面,本公开提供了包含如前述任一方面的核酸分子的载体。

[0186] 在一方面,本公开提供了包含如前述任一方面的载体的细胞。

[0187] 在一方面,本公开一种组合物,其包含前述的抗体或其抗原结合部分、双特异性或多特异性分子、核酸分子、权利载体和/或细胞。

[0188] 本公开的抗体在各种CD70被不利地表达或发现的疾病中可用作治疗或诊断工具。

[0189] 在一个与CD70相关的疾病实施方案中,CD70在患病组织或器官的细胞中的表达与在健康组织或器官中的状态相比有所增加。增加是指增加至少10%、特别是至少20%、至少50%、至少100%、至少200%、至少500%、至少1000%、至少10000%或甚至更多。在一个实施方案中,表达仅在患病组织中发现,而在相应健康组织中的表达受阻抑。

[0190] CD70在多种人类癌症中表达,所述癌症包括肾细胞癌、转移性乳腺癌、脑瘤、白血病、淋巴瘤和鼻咽癌。抗CD70抗体可以单独使用,用来抑制癌性肿瘤的生长。或者,如下文所述,抗CD70抗体也可以与其他免疫原性剂、标准癌症治疗或其他抗体一起使用。

[0191] 其生长可以用本公开的抗体抑制的优选癌症包括一般对免疫治疗有应答的癌症。可治疗的优选癌症的非限制性的例子包括肾癌(例如肾细胞癌)、乳腺癌、脑瘤、慢性或急性白血病,包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、淋巴瘤(例如何杰金氏和非何杰金氏淋巴瘤、淋巴细胞淋巴瘤、原发性CNS淋巴瘤、T细胞淋巴瘤)和鼻咽癌。可以用本公开的方法治疗的其他癌症的例子包括黑色素瘤(例如转移性恶性黑色素瘤)、前列腺癌、结肠癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、阴户癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、环境诱发的癌症,包括石棉诱发的癌症,例如间皮瘤,和所述癌症的组合。

[0192] 此外,鉴于CD70在各种肿瘤细胞上表达,本公开的人抗体、抗体组合物和方法能够用来治疗患有致肿瘤疾病的受试者,所述疾病例如是以存在表达CD70的肿瘤细胞为特征性疾病,包括,例如,肾细胞癌(RCC),如透明细胞RCC、胶质母细胞瘤、乳腺癌、脑瘤、鼻咽癌、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、伯基特淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、多发性骨髓瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、结节性小卵裂细胞淋巴瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、伦纳特淋巴瘤、免疫母细胞性淋巴瘤、T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、成人T细胞白血病(T-ALL)、中心母细胞/中心细胞性(cb/cc)滤泡性淋

巴瘤、B系弥漫性大细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性淋巴结病(AILD)-样T细胞淋巴瘤、HIV相关体腔淋巴瘤、胚胎性癌、未分化鼻咽癌(例如施明克瘤)、卡斯尔曼病、卡波西肉瘤、多发性骨髓瘤、沃尔登斯特伦巨球蛋白血症和其他B细胞淋巴瘤。

[0193] 另外,也已经提出CD70与CD27的相互作用在细胞介导的自身免疫病如实验性自身免疫脑脊髓炎(EAE)中起作用。这种作用被认为部分是由TNF- $\alpha$ 产生的抑制介导的。而且,CD70信号的阻断抑制了CD40介导的CD8+T-细胞的克隆扩增,并且减少了CD8+记忆T细胞的产生(Taraban等.(2004)J. Immunol. 173:6542-6)。这样,本公开的人抗体、抗体组合物和方法可以用来治疗患有自身免疫病的患者,所述自身免疫病例如是以存在表达CD70的B细胞为特征的疾病,包括,例如实验性自身免疫脑脊髓炎。可以使用本公开的抗体的其他自身免疫病包括但不限于系统性红斑狼疮(SLE)、胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)、炎性肠病(IBD)(包括克罗恩病、溃疡性结肠炎和乳糜泻)、多发性硬化症(MS)、牛皮癣、自身免疫性甲状腺炎、类风湿性关节炎(RA)和肾小球肾炎。此外,本公开的抗体组合物能够用于抑制或预防移植排斥或用于治疗移植物抗宿主疾病(GVHD)。

[0194] 另外,也已经提出CD70与CD27的相互作用在CD4+T细胞信号传导中起作用。已经证实某些病毒向CD27途径发出信号,导致中和抗体应答的破坏(Matter等.(2006)J Exp Med 203:2145-55)。这样,本公开的人抗体、抗体组合物和方法可以用来治疗患有病毒感染的患者,所述病毒包括,例如,人类免疫缺陷病毒(HIV)、肝炎(甲、乙、丙)、疱疹病毒(例如VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II和CMV、EB病毒)、腺病毒、流感病毒、虫媒病毒、埃可病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、痘苗病毒、HTLV病毒、登革热病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、JC病毒和虫媒病毒脑炎病毒和淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV),或者用于治疗HIV感染/AIDS。另外,本公开的人抗体、抗体组合物和方法可以用来抑制TNF- $\alpha$ 产生。

[0195] 用本公开的CD70抗体治疗的疾病和症状方法包括下述步骤:向所述受试者施用治疗有效量的前述任一方面的抗体或其抗原结合片段或核酸分子或载体或细胞或药物组合物。

[0196] 在一些实施方案中,本公开提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合CD70的抗体,其中施用所述抗体以提供至少40 $\mu$ g/ml的血清水平。在不同实施方案中,施用所述抗体以提供至少50 $\mu$ g/ml、至少150 $\mu$ g/ml、至少300 $\mu$ g/ml、至少400 $\mu$ g/ml或至少500 $\mu$ g/ml的血清水平。在不同实施方案中,施用所述抗体以提供不超过800 $\mu$ g/ml、700 $\mu$ g/ml、600 $\mu$ g/ml、550 $\mu$ g/ml或500 $\mu$ g/ml的血清水平。在一个实施方案中,所提供的血清水平为40 $\mu$ g/ml至700 $\mu$ g/ml,优选为40 $\mu$ g/ml至600 $\mu$ g/ml,优选为50 $\mu$ g/ml至500 $\mu$ g/ml,如150 $\mu$ g/ml至500 $\mu$ g/ml或者300 $\mu$ g/ml至500 $\mu$ g/ml。如本说明书中使用的术语“血清水平”,其意指所讨论的物质在血清中的浓度。在一个实施方案中,提供所述血清水平至少7天或至少14天。在一个实施方案中,所述方法包括施用至少300mg/m<sup>2</sup>的抗体剂量,如至少600mg/m<sup>2</sup>,且优选至多1500mg/m<sup>2</sup>,至多1200mg/m<sup>2</sup>或至多1000mg/m<sup>2</sup>。

[0197] 在一些实施方案中,本公开提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合CD70的抗体,其中以至少300mg/m<sup>2</sup>,如至少600mg/m<sup>2</sup>,且优选至多1500mg/m<sup>2</sup>,至多1200mg/m<sup>2</sup>或至多1000mg/m<sup>2</sup>的剂量施用所述抗体。

[0198] 在一些实施方案中,本公开提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用

能够结合CD70的抗体,其中所述患者的至少50%,优选为60%、70%、80%或90%的癌细胞为CD70阳性和/或所述患者的至少40%,优选为50%或60%的癌细胞为CD70的表面表达阳性。在该方面,本公开还提供治疗或预防癌症疾病的方法,所述方法包括:a. 鉴定显示至少50%,优选为60%、70%、80%或90%的CD70阳性癌细胞和/或至少40%,优选为50%或60%的癌细胞的患者的患者,所述癌细胞为CD70的表面表达阳性;以及b. 向所述患者施用能够结合CD70的抗体。在一个实施方案中,所述患者的至少95%或至少98%的癌细胞为CD70阳性的。在一个实施方案中,所述患者的至少70%、至少80%或至少90%的癌细胞为CD70的表面表达阳性。

[0199] 在本文所述的任何方面的方法的一个实施方案中,癌症疾病的治疗结果是实现病情稳定。在一个实施方案中,病情稳定实现至少2个月、至少3个月或至少6个月。

[0200] 在一些实施方案中,本公开提供实现癌症患者的病情稳定的方法,其包括向所述患者施用能够结合CD70的抗体。在一个实施方案中,病情稳定实现至少2个月、至少3个月或至少6个月。

[0201] 在本文所述的任何方面的方法的一个实施方案中,以单剂量或多剂量施用抗体。

[0202] 在一些实施方案中,本公开提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合CD70的抗体,其中以多剂量施用所述抗体。

[0203] 如果根据本公开以多次剂量施用所述抗体,则优选以至少3次剂量、至少4次剂量、至少5次剂量、至少6次剂量、至少7次剂量、至少8次剂量、至少9次剂量或至少10次剂量且优选至多30次剂量、25次剂量、20次剂量、15次剂量或10次剂量施用所述抗体。优选以至少7天、至少10天、至少14天或至少20天的时间间隔施用所述抗体的剂量。优选以7至30天、10至20天且优选为约14天的时间间隔施用所述抗体的剂量。

[0204] 在一个实施方案中,施用所述抗体以便提供至少40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血清水平。在不同实施方案中,施用所述抗体以便提供至少50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或至少500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血清水平。在不同实施方案中,施用所述抗体以便提供不超过800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、550 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血清水平。在一个实施方案中,所提供的血清水平为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,优选为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,优选为50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,如150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在一个实施方案中,提供所述血清水平至少7天或至少14天。在一个实施方案中,所述方法包括施用至少300 $\text{mg}/\text{m}^2$ ,如至少600 $\text{mg}/\text{m}^2$ 且优选至多1500 $\text{mg}/\text{m}^2$ 、至多1200 $\text{mg}/\text{m}^2$ 或至多1000 $\text{mg}/\text{m}^2$ 的抗体的剂量。

[0205] 前述任一方面的抗体或其抗原结合片段或核酸分子或载体或细胞或药物组合物在制备用于治疗受试者中CD70相关病症的药物中的用途。

[0206] 根据前述任一方面,任选地,所述抗体偶联其他药物,例如带标记或具有细胞毒性的缀合物。

[0207] 在一方面,本公开提供了一种试剂盒,其包含所述的抗体或其抗原结合部分、双特异性或多特异性分子、核酸分子、载体、细胞、组合物和/或抗体-药物偶联物。

[0208] 本公开所述试剂盒包括本公开的抗体、其片段、同源物、其衍生物等,例如带标记或具有细胞毒性的缀合物,以及抗体使用说明书、杀死特定类型细胞的缀合物等等。该说明书可包括在体外、体内或离体使用抗体、缀合物等的指导。抗体可以是液体形式或固体,通常是冻干的。该试剂盒可包含其它适宜的试剂,如缓冲液、重构溶液以及为了预定用途的其

它必要成分。考虑了以预定量包装好的试剂组合与用于其用途的说明书,所述用途例如用于治疗用途或用于进行诊断测定。当抗体是带标记的时,例如用酶标记的,那么该试剂盒可包括底物和酶所需的辅因子(例如提供可检测生色团或荧光团的底物前体)。此外,其它添加剂,如稳定剂、缓冲液(例如封闭缓冲液或裂解缓冲液)等也可包括在内。多种试剂的相对量可以改变而提供试剂溶液的浓缩物,这就提供了用户灵活性、节省空间、节省试剂等。这些试剂也可以干粉形式提供,通常是冻干形式,包括赋形剂,它在溶解时可提供具有适当浓度的试剂溶液。

[0209] 在一方面,本公开提供了所述的抗体或其抗原结合部分、双特异性或多特异性分子、核酸分子、载体、细胞、组合物和/或抗体-药物偶联物在制备用于诊断、治疗或预防与CD70相关病症的药物或试剂盒中的用途。

[0210] 在一些实施方案中,与CD70相关的疾病包括肿瘤和自身免疫疾病。

[0211] 在一些优选的实施方案中,所述肿瘤为癌症疾病;优选地,所述癌症疾病选自肾细胞癌(RCC)、透明细胞RCC、胶质母细胞瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、伯基特淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、多发性骨髓瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、结节性小卵裂细胞淋巴瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、伦纳特淋巴瘤、免疫母细胞性淋巴瘤、T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、成人T细胞白血病(T-ALL)、中心母细胞/中心细胞性(cb/cc)滤泡性淋巴瘤、B系弥漫性大细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性淋巴结病(AILD)-样T细胞淋巴瘤、HIV相关体腔淋巴瘤、胚胎性癌、未分化鼻咽癌、施明克瘤、卡斯尔曼病、卡波西肉瘤、多发性骨髓瘤、沃尔登斯特伦巨球蛋白血症和B细胞淋巴瘤。

[0212] 在一些优选的实施方案中,所述自身免疫疾病是狼疮。

[0213] 在一方面,本公开提供了所述的抗体或其抗原结合部分、双特异性或多特异性分子、核酸分子、载体、细胞、组合物和/或抗体-药物偶联物在制备用于治疗受试者的病毒感染的药物或试剂盒中的用途。

[0214] 在一些优选的实施方案中,所述病毒感染选自以下病毒:人类免疫缺陷病毒(HIV)、肝炎(甲、乙、丙)、疱疹病毒(例如VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II和CMV、EB病毒)、腺病毒、流感病毒、虫媒病毒、埃可病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、痘苗病毒、HTLV病毒、登革热病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、JC病毒和虫媒病毒脑炎病毒、和淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)。

[0215] 此外,本公开的抗体还可用于免疫测定、纯化方法以及其它用到免疫球蛋白或其片段的方法。此类用途在本领域为人所熟知。

[0216] 相应地,本公开还提供包含本公开的抗CD70的抗体或其片段的组合物,所述抗体方便地和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合,这是本领域的常规做法。

[0217] 本公开所使用的术语“药物组合物”系指多种制备物的制剂。含有治疗有效量的多价抗体的制剂为无菌液体溶液、液体悬浮剂或冻干形式,任选地包含稳定剂或赋形剂。

[0218] 本公开的抗体可以作为单独施用的组合物使用,或可与其它活性剂联合使用。

[0219] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体与治疗部分(即药物)偶联。治疗部分可以是例如细胞毒素、化疗剂、细胞因子、免疫抑制剂、免疫刺激剂、裂解肽或放射性同位素。

此类偶联物在本文中称为“抗体-药物偶联物”或“ADC”。

[0220] 在一些实施方案中,抗体与细胞毒性部分偶联。细胞毒性部分可以例如选自以下:紫杉醇;细胞松弛素B;短杆菌肽D;溴化乙锭;吐根碱;丝裂霉素;依托泊苷;替尼泊苷;长春新碱;长春碱;秋水仙碱;多柔比星;柔红霉素;二羟基蒽二酮;微管蛋白抑制剂如美登素或其类似物或衍生物;抗有丝分裂剂如单甲基奥瑞他汀E或F或其类似物或衍生物;海兔毒素10或15或其类似物;伊立替康或其类似物;米托蒽醌;光辉霉素;放线菌素D;1-脱氢睾酮;糖皮质激素;普鲁卡因;丁卡因;利多卡因;普萘洛尔;嘌呤霉素;卡奇霉素或其类似物或衍生物;抗代谢药,如甲氨喋呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、癸二噻、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨或克拉屈滨;烷化剂,如二氯甲基二乙胺、硫代嘌呤、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、达卡巴嗪(DTIC)、丙卡巴嗪、丝裂霉素C;铂类衍生物,如顺铂或卡铂;多卡霉素A、多卡霉素SA、雷切霉素(CC-1065)或其类似物或衍生物;抗生素,如放线菌素、博来霉素、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、光霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普力霉素、安定霉素(AMC);吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓(PDB);白喉毒素及相关分子如白喉A链及其活性片段和杂合分子、蓖麻毒素如蓖麻毒素A或去糖基化蓖麻毒素A链毒素、霍乱毒素、志贺样毒素如SLT I、SLT II、SLT IIV、LT毒素、C3毒素、志贺毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、大豆Bowman-Birk蛋白酶抑制剂、假单胞菌外毒素、阿罗林、皂草素、蒴莲根毒素、胶凝蛋白、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 $\alpha$ -sarcin、油桐(Aleurites fordii)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白如PAPI、PAPII和PAP-S、苦瓜(momordica charantia)抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制剂、白树毒素、丝裂霉素、局限曲菌素、酚霉素和依诺霉素毒素;核糖核酸酶(RNase);DNase I、葡萄球菌内毒素A;商陆抗病毒蛋白;白喉毒素和假单胞菌内毒素。

[0221] 在一些实施方案中,抗体与奥瑞他汀或其肽类似物、衍生物或前药偶联。已经表明,奥瑞他汀干扰微管动力学、GTP水解以及核和细胞分裂并具有抗癌和抗真菌活性。例如,奥瑞他汀E可以与对乙酰基苯甲酸或苯甲酰基戊酸反应,分别产生AEB和AEVB。其他典型的奥瑞他汀衍生物包括AFP、MMAF(单甲基奥瑞他汀F)和MMAE(单甲基奥瑞他汀E)。合适的奥瑞他汀和奥瑞他汀的类似物、衍生物和前药,以及用于将奥瑞他汀与Ab偶联的合适接头描述于例如美国专利号5,635,483、5,780,588和6,214,345以及国际专利申请公开W002088172、W02004010957、W02005081711、W02005084390、W02006132670、W003026577、W0200700860、W0207011968和W0205082023。

[0222] 在一些实施方案中,抗体与吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓(PDB)或其肽类似物、衍生物或前药偶联。合适的PDB以及PDB衍生物和相关技术描述于例如Hartley J.A.等,Cancer Res 2010;70(17):6849-6858;Antonow D.等,Cancer J 2008;14(3):154-169;Howard P.W.等,Bioorg Med Chem Lett 2009;19:6463-6466和Sagnou等,Bioorg Med Chem Lett 2000;10(18):2083-2086。

[0223] 在一些实施方案中,抗体与选自以下的细胞毒性部分偶联:蒽环类抗生素、美登素、卡奇霉素、多卡霉素、雷切霉素(CC-1065)、海兔毒素10、海兔毒素15、伊立替康、单甲基奥瑞他汀E、单甲基奥瑞他汀F、PDB,或它们任何的类似物、衍生物或前药。

[0224] 在一些实施方案中,抗体与蒽环类抗生素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些

实施方案中,抗体与美登素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与卡奇霉素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与多卡霉素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与雷切霉素(CC-1065)或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与海兔霉素10或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与海兔霉素15或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与单甲基奥瑞他汀E或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与单甲基奥瑞他汀F或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与伊立替康或其类似物、衍生物或前药偶联。

[0225] 在一些实施方案中,抗体与细胞因子(例如IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、IFN $\delta$ 、GM-CSF、CD40L、Flt3配体、干细胞因子、安西司亭和TNF $\alpha$ )偶联。

[0226] 在一些实施方案中,抗体与放射性同位素或含放射性同位素的螯合物偶联。例如,抗体可以与允许抗体与放射性同位素络合的螯合剂接头(例如DOTA、DTPA或噻西坦)偶联。抗体还可以或可选地包含一个或多个放射性标记的氨基酸或其他放射性标记的分子或与之偶联。放射性同位素的非限制性实例包括 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 和 $^{227}\text{Th}$ 。为了治疗目的,可以使用发射 $\beta$ 或 $\alpha$ 颗粒辐射的放射性同位素,例如 $^{131}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 和 $^{212}\text{Pb}$ 。

[0227] 将分子与抗体偶联的技术是本领域熟知的。通常,核酸分子分别通过N-羟基琥珀酰亚胺酯或马来酰亚胺官能团与抗体上的赖氨酸或半胱氨酸共价连接。据报道,使用工程化半胱氨酸或整合非天然氨基酸的偶联方法可改进偶联物的同质性。特别地,本领域技术人员还可以预期用含酰基供体谷氨酰胺的标签(例如含有Gln肽的标签或Q-标签)或通过多肽工程(例如通过多肽上的氨基酸缺失、插入、取代或突变)产生反应性的内源性谷氨酰胺工程化的含Fc多肽。然后,转谷氨酰胺酶可与胺供体剂(例如,包含或连接于反应性胺的小分子)共价交联,以形成稳定且均质的工程化含Fc多肽偶联物群,其中胺供体剂通过含酰基供体谷氨酰胺标签或可接近/暴露/反应性的内源性谷氨酰胺位点特异性地与含Fc多肽偶联(WO2012059882)。

[0228] 应当理解,根据所述实施方案的治疗剂将与合适的药学上可接受的载体、赋形剂、以及其它被掺入制剂中以提供改善的转移、递送、耐受性等的试剂一同施用。大量适当的制剂可见于所有药物化学工作者已知的药典中:Remington's Pharmaceutical Sciences(第15版,Mack Publishing Company,Easton,Pa.(1975)),特别是其中Blaug、Seymour的第87章。这些制剂包括例如粉末、糊剂、膏剂、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)载体(例如Lipofectin<sup>TM</sup>)、DNA缀合物、无水吸浆、水包油和油包水乳液、乳液聚乙二醇(各种分子量的聚乙二醇)、半固态凝胶以及含有聚乙二醇的半固态混合物。任何前述混合物均可适用于根据本公开的治疗或疗法,条件是制剂中的活性成分不被制剂灭活并且制剂在生理学上是相容的并耐受给药途径。

[0229] 在一个实施方案中,可将所述抗体用作治疗剂。此类试剂将通常用于治疗、缓解和/或预防受试者的与异常CD70表达、活性和/或信号传导相关的疾病或病理。可使用标准方法通过鉴定受试者,例如患有(或处于风险或发展)与异常CD70表达、活性和/或信号传导



相关的疾病或障碍,例如CD70相关病症的人患者来实施治疗方案。将抗体制剂,优选对其靶抗原具有高特异性和高亲和性的抗体制剂施用给受试者并且将通常因其与靶标结合而产生效应。施用的抗体可消除或抑制或妨碍靶标(例如CD70)的表达、活性和/或信号传导功能。施用的抗体可消除或抑制或妨碍靶标(例如CD70)与其所天然结合的内源性的配体结合。例如,抗体与靶标结合并调节、阻断、抑制、减少、拮抗、中和/或以其它方式妨碍CD70表达、活性和/或信号传导。在一些实施方案中,为治疗与异常CD70表达相关的疾病或障碍,可将具有重链和轻链CDR的抗体施用给受试者。

[0230] 在另一个实施方案中,针对CD70的抗体可用于本领域中已知的与CD70定位和/或定量相关的方法(例如,用于测定适当生理样品中的CD70和/或CD70的水平,用于诊断方法,用于蛋白成像等等)。在一个给定实施方案中,对CD70或其衍生物、片段、类似物或同系物具有特异性的、包含源于抗体的抗原结合结构域的抗体,被用作药理学活性化合物(下文称为“治疗剂”)。

[0231] 在另一个实施方案中,可通过标准技术例如免疫亲和、色谱或免疫沉淀,使用对CD70具有特异性的抗体来分离CD70多肽。针对CD70蛋白质的抗体(或其片段)可用于检测生物样品中的蛋白质。在一些实施方案中,在生物样品中可检测CD70作为临床测试过程的一部分,例如,用于确定给定治疗方案的功效。将抗体偶联(即物理连接)到可检测物质可有利于检测。可检测物质的示例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的示例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的示例包括链霉亲和素/生物素亲和素/生物素;合适的荧光材料的示例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪氨荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的一个示例包括鲁米诺;生物发光材料的示例包括荧光素酶、荧光素和水母蛋白,并且合适放射性材料的示例包括 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 或 $^3\text{H}$ 。

[0232] 在另一个实施方案中,根据本公开的抗体可用作检测样品中CD70或其蛋白质片段存在的试剂。在一些实施方案中,抗体包含可检测标记。抗体为多克隆抗体,或更优选单克隆抗体。使用完整的抗体或其片段(例如Fab、scFv或F(ab')<sub>2</sub>)。关于抗体的术语“标记”旨在包括通过将可检测物质偶联(即物理连接)到该抗体来直接标记该抗体,以及通过与直接标记的另一种试剂反应来间接标记该抗体。间接标记的示例包括使用荧光标记的第二抗体检测第一抗体,以及用生物素进行末端标记抗体,以便能够用荧光标记的链霉亲和素进行检测。术语“生物样品”旨在包括从受试者分离的组织、细胞和生物学流体,以及受试者体内存在的组织、细胞和流体。因此,使用的术语“生物样品”包括血液和血液中的级分或组分,包括血清、血浆、或淋巴液。换言之,所述实施方案的检测方法可用于在体外及体内检测生物样品中的分析物mRNA、蛋白质或基因组DNA。例如,分析物mRNA体外检测技术包括Northern杂交和原位杂交。分析物蛋白质体外检测技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、Western印迹、免疫沉淀、以及免疫荧光。分析物基因组DNA体外检测技术包括Southern杂交。用于进行免疫测定的过程描述于例如“ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology”,第42卷, J.R.Crowther(编辑) Human Press, Totowa, N.J., 1995; “Immunoassay”, E.Diamandis和T.Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1996; 以及“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”, P.Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985。此外,分析物蛋白质的体内检测技术包括向受试者体内导入

标记的抗分析物蛋白抗体。例如,可以用放射性标记标记抗体,然后通过标准成像技术检测受试者体内该放射性标记物的存在和位置。

[0233] 可将本文所述抗体和其衍生物、片段、类似物和同系物掺入适于施用的药物组合物中。制备此类组合物所涉及的原理和考虑事项以及选择组分的指南在本领域中是熟知的,例如参见Remington's Pharmaceutical Sciences:The Science And Practice Of Pharmacy第19版(Alfonso R.Gennaro等人编辑)Mack Pub.Co.,Easton,Pa.:1995;Drug Absorption Enhancement:Concepts,Possibilities,Limitations,And Trends,Harwood Academic Publishers,Langhorne,Pa.,1994;以及Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences,第4卷),1991,M.Dekker,New York。

[0234] 此类组合物通常包含抗体和药学上可接受的载体。当使用抗体片段时,与靶蛋白结合结构域特异性结合的最小抑制片段可为优选的。例如,基于抗体的可变区序列,可以设计保留结合靶蛋白质序列能力的肽分子。此类肽可化学合成和/或通过重组DNA技术产生(参见例如Marasco等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:7889-7893(1993))。

[0235] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”旨在包括与药物给药相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。合适的药学上可接受的载体描述于最新版的Remington's Pharmaceutical Sciences中,这是本领域的标准参考书目,其以引用方式并入本文。此类载体或稀释剂的优选示例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和5%的人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性载体,例如固定化油。将此类介质和试剂用于药物活性物质是本领域熟知的。除去任何常规的介质或试剂与抗体不相容之外,设想其在组合物中的用途。

[0236] 将所述实施方案的药物组合物配制成与其预期施用途径相容。给药途径的示例包括肠胃外,例如静脉内、皮内、皮下、经口(例如吸入)、经皮(即局部的)、经粘膜和直肠给药。用于肠胃外、皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可包括以下组分:注射用无菌稀释剂例如水、盐溶液、固定油、聚乙二醇类、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂,例如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐、以及调节渗透压的试剂,例如氯化钠或右旋糖。pH可用酸或碱进行调节,例如盐酸或氢氧化钠。可将肠胃外制剂包装在安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制多剂量小瓶内。

[0237] 适于注射用途的药物组合物包括无菌水性溶液(在此是水溶性的)或分散体以及用于即时制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的药学上可接受的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物必须是无菌的并且应当为流动性达到易于注射的程度。其在制造和储存条件下必须是稳定的并且必须能防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)的溶剂或分散介质,及其适宜的混合物。例如通过利用涂层例如卵磷脂,在分散体情况下维持所需颗粒尺寸,以及利用表面活性剂,可以保持适宜的流动性。对微生物作用的防止可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现。在许多情况下,将优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(诸如甘露糖醇、山梨醇)、氯化钠。注射用组合物的延长吸收可通过在所述组合物中包含延缓吸收的试剂例如单硬脂酸铝和

明胶来达到。

[0238] 根据需要,可以通过将抗体以所需量掺入具有上文所列成分中的一种或组合(按需要)的合适溶剂中来制备无菌注射溶液,然后过滤消毒。一般来讲,通过将抗体掺入含有碱性分散介质和上文所列那些中的所需其它成分的无菌载体中来制备分散体。就用于制备无菌注射溶液的无菌粉末而言,制备方法是获得粉末的真空干燥和冷冻干燥,该粉末包含活性成分和任何另外的期望成分,它们来自前述的这些成分的无菌过滤溶液。

[0239] 对于吸入给药,从包含合适推进剂如二氧化碳等气体的加压容器或分配器或者喷雾器以气溶胶喷雾形式递送化合物。

[0240] 还可以通过经粘膜或透皮方式全身给药。对于经粘膜或透皮给药,在制剂中使用适于渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂通常在本领域是通常所知的,并且包括如用于经粘膜给药的去污剂、胆盐和夫西地酸衍生物。经粘膜给药可以通过使用喷鼻剂或栓剂来实现。对于透皮给药,可将一种或多种所述抗体配制成如本领域通常所知的膏剂、软膏、凝胶、或霜膏。

[0241] 还可将化合物以栓剂(例如,具有常规栓剂基质,如可可脂或其它甘油酯)或滞留性灌肠剂形式进行制备以用于经直肠递送。

[0242] 在一个实施方案中,所述抗体可用防止其不被身体迅速消除的载体制备,例如缓释/控释制剂,包括植入体和微胶囊化递送体系。可使用可生物降解、可生物相容的聚合物,例如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的方法对于本领域技术人员而言是显而易见的。

[0243] 尤其有利的是以剂量单位形式配制肠胃外组合物以易于施用和剂量的一致性。如本文所用,剂量单位形式是指用于待治疗的受试者,适合作为单位剂量的物理上可分离的单位;每个单位含有经计算与所需药物载体结合产生期望治疗效果的预定量的一种或多种所述抗体。所述实施方案的剂量单位形式的规格由以下指示并直接取决于:抗体的独特特征和待实现的具体治疗效果,和用于治疗个体的此类抗体的调配领域中固有的局限性。

[0244] 所述药物组合物可与给药说明书一起放于容器、包装、或分配器中。

[0245] 本文所述制剂还可根据要治疗的具体情况而包含多于一种所述抗体,优选具有互补活性但对彼此无负面影响的那些。另选地或除此之外,组合物可例如包含增强其功能的试剂,诸如细胞毒素试剂、细胞因子、化学治疗剂、或生长抑制剂。此类分子以对预期目的有效的量适当地联合存在。例如,可以在试剂盒中联合存在,也可以在使用中联合存在。

[0246] 在一个实施方案中,一种或多种所述抗体可在联合治疗中施用,即与其它试剂例如治疗剂(其可用于治疗病理学病症或障碍,例如各种形式的癌症、自身免疫性障碍和炎性疾病)联合。术语“联合”在本文中是指将试剂基本上同步地,同时地或顺次地给予。如果顺次给予,则在开始施用第二种化合物时,两种化合物中的第一种仍优选在治疗位点处以有效浓度被检测到。在一种情况下,“联合”也可以是在试剂盒中同时包含本公开的抗体和其他治疗剂。

[0247] 例如,联合治疗可包含本文所述一种或多种抗体与一种或多种附加治疗剂(例如一种或多种细胞因子和生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂、和/或细胞毒素或细胞生长抑制剂,如下更详述的)共同配制和/或共同施用。此类联合治疗可有利地利用较低剂量的施用的治疗剂,因而避免了与各种单一疗法相关的可能毒性或并发

症。

[0248] 为了达到清楚和简洁描述的目的,本文中作为相同的或分开的一些实施方案的一部分来描述特征,然而,将要理解的是,本公开的范围可包括具有所描述的所有或一些特征的组合的一些实施方案。

[0249] 实施例

[0250] 实施例1、CD70重组蛋白的制备

[0251] 以人CD70的cDNA质粒(Sino Biological,货号:HG10780-M)为模板,PCR扩增人CD70胞外区片段(Glu13-Pro155),通过连接肽GSGSGNGS构建CD70胞外区三聚体结构,C端融合鼠IgG Fc(knob)和Avi tag标签(GSGLNDIFEAQKIEWHE)以便获得纯化的人CD70 mIgG Fc(knob)(其氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示)。将包含所述人CD70 mIgG Fc(knob)编码基因的质粒与鼠IgG Fc(hole)(其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示)质粒共转染HEK293E细胞,培养7天后,收集培养基上清液,经Protein G纯化得到人CD70胞外区三聚体重组蛋白,SDS-PAGE见图1。

[0252] 实施例2、构建CD70-CHO稳转细胞株

[0253] 分别以人CD70 cDNA和猴CD70 cDNA(Sino Biological,货号:CG90089-G),构建含有人和猴CD70全长序列的慢病毒载体质粒,按照慢病毒包装试剂盒说明书(Lenti-Pac HIV Expression Packaging Kit, Gene Copoeia, 货号:HPK-LvTR-20),将构建好的慢病毒质粒和包装质粒共转染HEK293T细胞,进行慢病毒包装。转染48小时后收集培养基,以500\*g离心10分钟去除细胞碎片,获得含慢病毒颗粒的培养上清,0.45 $\mu$ m的PES膜过滤后,分装至1.5mL EP管中,分别取10 $\mu$ L用于感染 $1 \times 10^6$ 的CHO细胞,在培养基中加入10 $\mu$ g/mL嘌呤霉素(puromycin)进行筛选。获得阳性克隆后,通过有限稀释,最终分别得到表达人和猴全长CD70的稳转细胞CHO-人CD70-B07和CHO-猴CD70-D01,结果见图2-1和图2-2。

[0254] 实施例3、抗人CD70单克隆抗体的制备

[0255] 将人CD70重组蛋白作为抗原与等量免疫佐剂(弗氏佐剂)混合,取每组6只6周雌性Balb/c小鼠进行皮下免疫。在初次免疫两周后,进行加强免疫。三次免疫后,眼眶取血,流式细胞仪检测血清效价。检测结果如图3所示。由图3可见,在小鼠血清中均能检测到高滴度CD70抗体。

[0256] 用人CD70重组蛋白对免疫小鼠进行尾静脉注射冲击免疫。三天后,断颈处死小鼠,取小鼠脾和部分外周淋巴结,在DMEM培养基中研磨后离心;倾倒上清后,轻轻将细胞团打散,加入5mL红细胞裂解液,裂解50秒后,加入40mL DMEM培养基离心,得到不含红细胞的B细胞悬浮液。取适量的B细胞悬浮液和SP2/0混合后,用电融仪进行细胞融合,将融合后的杂交瘤细胞在含有HAT的DMEM完全培养基中置于5%CO<sub>2</sub>,37°C条件下培养。剩余B细胞用Trizol裂解法提取总RNA,用逆转录试剂盒(SuperScript First-Strand Synthesis System,货号:18080051),利用重链特异性引物逆转录得到抗体重链cDNA文库;以该cDNA为模板,利用重链可变区引物PCR扩增抗体重链可变区片段,经NcoI和NheI双酶切后,克隆到噬菌体质粒;以此类似,利用轻链特异性引物逆转录得到轻链cDNA库,以该cDNA为模板,利用轻链可变区引物PCR扩增抗体轻链可变区片段,经NcoI和BsiwI双酶切后,克隆到噬菌体质粒;然后构建基于丝状噬菌体M13的小鼠Fab噬菌体展示文库,库容为 $1 \times 10^{10}$ 。

[0257] 实施例4、抗人CD70单克隆抗体的制备

[0258] 1. 抗体噬菌体展示库的筛选

[0259] 噬菌体展示文库采用经典的淘选方式,进行阳性克隆筛选。在Immunotube管包被重组表达的人CD70蛋白,加入 $1 \times 10^{12}$ 噬菌体进行孵育和淘洗,用100mM三乙胺洗脱结合亲和力高的噬菌体颗粒,1M Tris-HCl (pH 7.4)中和后感染入大肠杆菌TG1细菌中,再次包装后得到富集的噬菌体可用于下一轮淘洗。经过2轮淘洗富集得到的克隆,由单克隆接种至96孔U形孔板中进行培养和IPTG诱导表达,取上清进行ELISA检测。

[0260] 1) 酶联免疫吸附实验(ELISA) 筛选结合CD70的Fab抗体

[0261] 在96孔酶标板上包被 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的CD70重组蛋白,4°C孵育过夜。次日PBS洗涤3次,用 $200\mu\text{L}$  2%脱脂奶粉/PBS室温封闭2小时,PBS洗涤1次,加入 $30\mu\text{L}$ 诱导上清,室温孵育1小时后,用PBST (PBS+0.05% Tween-20) 和PBS重复洗涤3次,加入 $100\mu\text{L}$ /孔HRP标记的Anti-Flag二抗溶液,室温孵育60分钟。用PBST和PBS各洗三遍后,加入 $100\mu\text{L}$ 显色液(TMB溶液,Sigma货号T2885),37°C放置5分钟后加入 $50\mu\text{L}$  2M浓硫酸溶液终止反应,立即用酶联检测仪(BioTek, Synergy HT) 测定OD450nm。

[0262] 2) ELISA筛选阻断CD70与CD27相互作用的Fab抗体

[0263] 将与CD70抗原结合的阳性单克隆重新进行IPTG诱导,纯化得到Fab抗体蛋白,进行ELISA检测筛选。分别在96孔酶标板上包被 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的人或者食蟹猴CD27重组蛋白,4°C孵育过夜。次日PBS洗涤3次,加入 $200\mu\text{L}$  2%脱脂奶粉/PBS室温封闭2小时,PBS洗涤1次,加入 $50\mu\text{L}$ 不同稀释梯度的Fab抗体,室温孵育30分钟。然后每孔加入 $50\mu\text{L}$  Biotin标记的CD70重组蛋白,室温孵育60分钟。用PBST和PBS重复洗涤3次,甩干。用0.5%BSA按1:8000比例稀释二抗溶液链霉亲和素偶联辣根过氧化物酶SA-HRP (BD bioscience, 货号:6222697),每孔加入 $100\mu\text{L}$ ,室温孵育30分钟。用PBST和PBS重复洗涤3次,甩干。每孔加入 $100\mu\text{L}$ 显色液(TMB溶液,Sigma,货号:T2885),37°C避光反应,待底物显色适中,每孔加入 $50\mu\text{L}$  2M浓硫酸溶液终止反应,30分钟内用酶联检测仪测定OD450nm,收集数据,结果如表1所示。

[0264] 3) 流式细胞仪筛选特异性结合细胞表面CD70的Fab抗体

[0265] 将ELISA检测到的结合CD70抗体的阳性克隆,进一步验证与CD70阳性细胞的结合。准备空白对照细胞CHO与稳转细胞株CHO-CD70,分别按 $5 \times 10^4$ /孔细胞数,加入96孔板中,每孔再加入 $50\mu\text{L}$ 不同稀释梯度的Fab抗体,4°C孵育60分钟,离心弃去上清,用0.5%BSA/PBS洗涤,再加入 $50\mu\text{L}$ 二抗溶液(Anti-human IgG,F(ab')<sub>2</sub>-AF647, Jackson Immuno Research),4°C孵育45分钟,之后用0.5%BSA洗去多余的二抗,加入PBS溶液重悬细胞,进行流式细胞仪检测,收集数据,结果如表1所示。

[0266] 4) Octet筛选特异性结合CD70的Fab抗体

[0267] 利用生物膜干涉技术(BLI) 将 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 生物素标记的CM352抗原固定在SA探针上,设置时间300s,然后结合不同浓度的CM352 Fab抗体,设置结合时间200s,解离时间300s,得到解离速率 $k_{\text{dis}}$ (1/s),结果如表1所示。

[0268] 表1、抗人CD70抗体噬菌体展示库的筛选

克隆	ELISA 阻断 IC50 (nM)		FACS 结合 EC50 (nM)		Octet k-off (1/s)
	人	食蟹猴	人	食蟹猴	人
[0269] <b>2B12</b>	0.29	0.65	8.6	25.3	$1.25 \times 10^{-4}$
<b>3B2</b>	0.32	0.48	14.15	15.69	$3.25 \times 10^{-4}$
<b>12A1</b>	1.88	15.92	17.67	34.64	$3.17 \times 10^{-4}$
<b>14C12</b>	0.79	5.15	28.01	27.74	$3.21 \times 10^{-4}$
<b>23A11</b>	0.5	0.95	15.63	18.02	$4.03 \times 10^{-4}$
[0270] <b>27A3</b>	0.51	1.45	12.38	18.62	$1.72 \times 10^{-4}$
<b>25H7</b>	0.76	14.44	15.48	23.39	$3.26 \times 10^{-4}$
<b>26G11</b>	4.82	4.36	40.66	49.68	$2.87 \times 10^{-4}$
<b>32D1</b>	2.26	3.37	8.10	9.65	$18.3 \times 10^{-4}$
<b>39H5</b>	0.38	0.37	8.7	10.25	$0.9 \times 10^{-4}$

[0271] 2. 杂交瘤的筛选

[0272] 培养7天后,取杂交瘤细胞培养上清进行ELISA检测,得到多个能特异性识别CD70,并高效阻断CD70-CD27结合的阳性克隆。进一步利用流式细胞术,排除不能结合细胞表面CD70的克隆,结果如表2所示:

[0273] 表2、抗人CD70抗体杂交瘤的筛选

克隆	ELISA 结合		ELISA 阻断		FACS 结合	
	人	猴	人	猴	人	猴
[0274] <b>1H21-D5</b>	+	+	+	+	+	+
<b>10C19-D11</b>	+	+	+	+	+	+
<b>16J15-H3</b>	+	+	+	+	+	+
<b>17A9-G5</b>	+	+	+	+	+	+
<b>36E7-D6</b>	+	+	+	+	+	+
<b>4H6-A6</b>	+	+	+	+	+	+
<b>42H19-G4</b>	+	+	+	+	+	+

[0275] 3. 抗人CD70嵌合抗体的基因克隆及表达

[0276] 根据杂交瘤筛选的结果,采用TRNzo1裂解法提取候选杂交瘤单克隆细胞的RNA,然后逆转录合成单链cDNA,以此为模板扩增杂交瘤单克隆细胞中抗体的可变区序列;根据噬菌体筛选的结果,提取阳性单克隆细菌质粒,经测序后,得到候选阳性克隆重链和轻链可变区序列为:

[0277] 表3、CD70鼠源抗体的可变区序列

[0278]

CD70 鼠源抗体	HCVR		HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR		LCDR1	LCDR2	LCDR3
	氨基酸序列	核苷酸序列	氨基酸序列	氨基酸序列	氨基酸序列	氨基酸序列	核苷酸序列	氨基酸序列	氨基酸序列	氨基酸序列
2B12	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3B2	13	14	15	6	16	17	18	19	11	12
12A1	20	21	5	6	22	23	24	25	11	26
14C12	27	28	29	30	31	32	33	34	11	26
23A11	35	36	5	37	38	39	40	41	11	12
25H7	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
26G11	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
27A3	62	63	5	64	65	66	67	68	11	69
32D1	70	71	29	30	31	72	73	74	11	26
39H5	75	76	44	77	46	78	79	49	80	51
1H21-D5	81	82	83	84	85	86	87	88	11	12
10C19-D11	89	90	5	91	85	92	93	19	11	12
16J15-H3	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103
17A9-G5	104	105	15	106	107	108	109	110	111	103
36E7-D6	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121
4H6-A6	122	123	15	124	16	125	126	127	128	103
42H19-G4	129	130	131	132	116	117	118	119	120	121

[0279] 克隆:2B12

[0280] 2B12重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示,其编码核酸如SEQ ID NO.4所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.5、6、7所示。

[0281] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<---QVQLQQSGPGLVQPSQ  
SLSITCTVSGFSLTTYAVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSTGITDYNAAFISRLSI-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->SKDNSKSVFFKMNSLQSDDIAIYYCARNPYYGNLNAMDYWGQGT  
SVTVSS

[0282] 核酸序列

[0283] CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCACA  
GTCTCTGGTTTCTCATTAACCTATGCTGTGCACTGGGTTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGG  
AGTGATATGGAGTACTGGAATCACAGACTATAATGCAGCTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACCTCCA  
AGAGCCAAGTTTTCTTTAAATGAACAGTCTGCAATCTGATGACATAGCCATATACTACTGTGCCAGAAATCCCTAC  
TATGGTAACCTCAATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0284] 2B12轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示,其编码核酸如SEQ ID NO.9所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.10、11、12所示。

[0285] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<-----DIVLTQSPASLAV  
SLGQRATISCRASKSVDTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGS-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELK

[0286] 核酸序列

[0287] GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
AGGGCCAGCAAAAGTGTGATACTGCTATAGTTTTATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAA  
ACTCCTCATCTATCTTGATCCAACCTAGAACTGGGGTCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT  
TCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCTCTC  
ACGTTCTGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0288] 克隆:3B2

[0289] 3B2重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.13所示,其编码核酸如SEQ ID NO.14所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.15、6、16所示。

[0290] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<---EVQLKQSGPGLVQPSQ  
SLSITCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSTGITDYNAAFISRLSI-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->SKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNSYGNLYVMDYWGQGT  
SVTVSS

[0291] 核酸序列

[0292] GAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCAC  
AGTCTCTGGTTTTTCATTAACCTATGGTGTACACTGGGTTCCGAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTG  
GGAGTGATATGGAGTACTGGAATCACAGACTATAATGCAGCTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGTAAGGACAATT  
CCAAGAGCCAAGTCTTCTTTAAATGAACAGTCTGCAAGCTgATGACACAGCCATATATTACTGTGCCAGAAATTC  
CTACTATGGTAACCTTTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0293] 3B2轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.17所示,其编码核酸如SEQ ID NO.18所示,  
其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.19、11、12所示。

[0294] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<-----DIVLTQSPASLAV  
SLGQRATISCRASKSVSASGYNFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGS-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELK

[0295] 核酸序列

[0296] GACATTGTGCTAACACAGTCTCCTGCTCCTTAGCTGTGTCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
AGGGCCAGCAAAAGTGTCAAGTGCATCTGGCTATAATTTATGCACTGGTATCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAA  
ACTCCTCATCTATCTTGATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT  
TCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCGCTC  
ACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0297] 克隆:12A1

[0298] 12A1重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.20所示,其编码核酸如SEQ ID NO.21所  
示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.5、6、22所示。

[0299] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<---QVQLQQSGPGLVQPSQ  
SLSITCTVSGFSLTTYAVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSTGITDYNAAFISRLSI-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->SKDNSKSQVFFKMDSLQSDDTAIYFCARNPHYGNLNAMDYWGQGT  
SVTVSS

[0300] 核酸序列

[0301] CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCACA  
GTCTCTGGTTTTCTCATTAACCTATGCTGTGCACTGGGTTCCGAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGG  
AGTAATATGGAGTACTGGAATCACAGACTATAATGCAGCTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACCTCCA  
AGAGCCAAGTTTTCTTTAAATGGACAGTCTGCAATCTGATGACACAGCCATATACTTCTGTGCCAGAAATCCCCAC  
TATGGTAATCTCAATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0302] 12A1轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.23所示,其编码核酸如SEQ ID NO.24所  
示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.25、11、26所示。

[0303] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<-----DIVLTQSPASLAV  
SLGQRATISCRASKSVSASGYTWMHWYQQKPGQAPKLLIYLASNLESGVPARFSGS-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPPTFGGGTKLEIK



[0304] 核酸序列

[0305] GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
AGGGCCAGCAAAAGCGTCAGTGCATCTGGCTATACTTGGATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGGCACCCAA  
ACTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAACTGTTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT  
TCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCTCCG  
ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAA

[0306] 克隆:14C12

[0307] 14C12重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.27所示,其编码核酸如SEQ ID NO.28所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.29、30、31所示。

[0308] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<--EVQLQQSGPELVKPGAS  
VKMSCKASGYTFTDYVIHWVKQKPGQGLEWIGYLPYNDITKYNEKFKGKAT-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->LTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVVYVCARRGYDYAWFADWGQG  
TLVTVSA

[0309] 核酸序列

[0310] GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAG  
GCTTCTGGATACACATTCAGTACTATGTTATACACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGG  
ATATCTTCATCCTTACAATGATGATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAAT  
CCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACGGGGG  
TACTATGATTACGCTGGTTTGTGACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0311] 14C12轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.32所示,其编码核酸如SEQ ID NO.33所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.34、11、26所示。

[0312] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<-----DIVLTQSPASLAV  
SLGQRATISCRASKSVSASGYTWHWYQKPRQAPKLLIYLASNLESGVPARFSGS-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPPFTFGGGTKLEIK

[0313] 核酸序列

[0314] GACATTGTGCTAACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
AGGGCCAGCAAAAGTGTGTCAGTGCATCTGGCTATACTTGGATACACTGGTACCAACAGAAACCAAGACAGGCACCCAA  
ACTTCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAACTGTTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT  
TCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAACCTCCTCCG  
ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAA

[0315] 克隆:23A11

[0316] 23A11重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.35所示,其编码核酸如SEQ ID NO.36所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.5、37、38所示。

[0317] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<---QVQLQQSGPGLVQPSQ  
SLSITCTVSGFSLTTYAVHWVRQSPGKGLEWLVGIWVSGSTDYNAAFISRLSI-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->SKDNSKSVFFKMNSLQADDTAIYYCARNIYYGNVYAMDYWGQGT  
SVTVSS

[0318] 核酸序列

[0319] CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCAC

AGTCTCTGGTTTCTCATTAACTACCTATGCTGTACACTGGGTTCCGACAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTG  
GGAGTTATATGGAGTGGTGAAGCACAGACTATAATGCAGCTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAATT  
CCAAGAGCCAAGTTTTCTTTAAAATGAACAGTCTGCAAGCTgATGACACAGCCATATATTACTGTGCCAGAAATAT  
CTACTATGGTAATGTTTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0320] 23A11轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.39所示,其编码核酸如SEQ ID NO.40所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.41、11、12所示。

[0321] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<-----DIVLTQSPASLAV  
SLGQRATISCRASKSV~~D~~ASGYSFMHWYQQKAGQPPKLLIYLASNLESGV~~P~~ARFSGR-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFLNIHPVEEGDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLEIK

[0322] 核酸序列

[0323] GACATTGTGCTAACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
AGGGCCAGCAAAAGTGTGATGCATCTGGCTATAGTTTTATGCACTGGTACCAACAGAAAGCAGGACAGCCACCCAA  
ACTCCTCATCTATCTTGATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGTTCAGTGGCAGGGGTCTGGGACAGACT  
TCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCTCTC  
ACGTTCCGGGCTGGGACCAAGCTGGAAATCAAA

[0324] 克隆:25H7

[0325] 25H7重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.42所示,其编码核酸如SEQ ID NO.43所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.44、45、46所示。

[0326] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<--EIQLVQSGPELKKPGET  
VKISCKASGYTF~~T~~NYGMNWVKQTPGKGLKWMGWINTDTGEPTYADDFKGRFA-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->FSLETSASTAYLQINN~~L~~KNEDMATYFCAREEDYRYVFNYWGQGT  
TLTVSS

[0327] 核酸序列

[0328] GAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACTGTCAAGATCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGATATACCTTCACAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGACTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGG  
CTGGATAAACACCGACACTGGAGAGCCAACATATGCTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCT  
CTGCCAGCACTGCCTATTTGAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACATGGCTACATATTTCTGTGCAAGAGAGGAG  
GACTATAGGTACGTTTTTAATTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[0329] 25H7轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.47所示,其编码核酸如SEQ ID NO.48所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.49、50、51所示。

[0330] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<-----DIQMTQTTSS  
LSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGT-----FR3-----  
>CDR3<---FR4--->DYSLTISNLEQEDIATYFCQ~~Q~~GVTLPLTFGAGTKLELK

[0331] 核酸序列

[0332] GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGC  
AGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTA  
CTACACATCAAGATTACTCAGGAGTCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTACCA  
TTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTACTTTTGCCAACAGGGTGTACGCTTCCTCTCACGTTCCGGTGT  
GGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0333] 克隆:26G11

[0334] 26G11重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.52所示,其编码核酸如SEQ ID NO.53所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.54、55、56所示。

[0335] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<--QVQLQQSGPELVKPGAS  
VKISCKTSGYTFADYTMHWVRQSQGKSLEWIGDIYPNDGGPNNNQKFKDKAT-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->LTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARPFYYGNYAGFAFWGQ  
GTLVTVSA

[0336] 核酸序列

[0337] CAGGTTTCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAG  
ACTTCTGGATACACATTCGCTGATTACACCATGCACTGGGTGAGGCAGAGCCAAGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGG  
AGATATTTATCCTAACGATGGTGGTCCTAACAACAACCAGAAGTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTTGACAAGT  
CCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGACCGTTC  
TATTATGGTAACTACGCGGGATTTGCTTTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0338] 26G11轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.57所示,其编码核酸如SEQ ID NO.58所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.59、60、61所示。

[0339] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<-----EMVLTQSPA  
IMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTS-----FR3-----  
>CDR3<---FR4--->YSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGAGTRLEIK

[0340] 核酸序列

[0341] GAAATGGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC  
AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAGACTCCTGATTTATGA  
CACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCACAATCA  
GCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTTACCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGG  
ACCAGACTGGAAATAAAA

[0342] 克隆:27A3

[0343] 27A3重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.62所示,其编码核酸如SEQ ID NO.63所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.64、65所示。

[0344] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<---EVQLQESGPGGLVQPSQ  
SLSITCTVSGFSLTTYAVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSTGITDYNADFI~~S~~RLSI-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->SKDNSKSVFFKMDSLQSDDTAIYFCARNHYGYNLNAMDYWGQGT  
SVTVSS

[0345] 核酸序列

[0346] GAGGTCCAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTATCCATCACCTGCACA  
GTCTCTGGTTTCTCATTAACCTATGCTGTACTGGTTCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGG  
AGTAATATGGAGTACTGGAATCACAGACTATAATGCAGATTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACCTCCA  
AGAGCCAAGTTTTCTTTAAATGGACAGTCTGCAATCTGATGACACAGCCATATACTTCTGTGCCAGAAATCACTAC  
TATGGCAATCTCAATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0347] 27A3轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.66所示,其编码核酸如SEQ ID NO.67所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.68、69、70所示。

[0348] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<-----DIVLTQSPASLAV  
SLGQRATISCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGS-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPYTFGGGTKLEIK

[0349] 核酸序列

[0350] GACATTGTGCTAACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
AGGGCCAGCAAAAGTGTCACTACATCTGGCTATAGTTTATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAA  
ACTCCTCATCTATCTTGATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT  
TCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCGTAC  
ACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAA

[0351] 克隆:32D1

[0352] 32D1重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.70所示,其编码核酸如SEQ ID NO.71所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.29、30、31所示。

[0353] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<--EVQLQQSGPELVKPGAS  
LKMSCKASGYTFTDYVIHWVKQKPGQGLEWIGYLPYNDTKYNEKFKGKAT-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->LTSKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCCARRGYDYAWFADWGQ  
TLVTVSA

[0354] 核酸序列

[0355] GAGGTCCAGTTCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCACTGAAGATGTCCTGCAAG  
GCTTCTGGATACACATTCAGTACTATGTTATACACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGG  
ATATCTTCATCCTTACAATGATGATACTAAGTACAATGAGAAGTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAAT  
CCTCCAGCACAGCCTACATGGAACCTCAACAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGCGGGGG  
TACTATGATTACGCTGGTTTGTGACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0356] 32D1轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.72所示,其编码核酸如SEQ ID NO.73所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.74、11、26所示。

[0357] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<-----DIVLTQSPASLAV  
SLGQRATISCKASKSVSASGYTWMHWYQQKPGQAPKLLIYLASNLESGVPARFSGS-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPPTTFGGGTKLEIK

[0358] 核酸序列

[0359] GACATTGTGCTAACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
AAGGCCAGCAAAAGTGTCACTGATCTGGCTATACTGGATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGGCACCCAA  
ACTCCTCATCTATCTTGATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT  
TCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCCTCCG  
ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0360] 克隆:39H5

[0361] 39H5重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.75所示,其编码核酸如SEQ ID NO.76所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.44、77、46所示。

[0362] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<--EIQLVQSGPELKKPGET  
VKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGPEPTYADDFTRFA-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->FSLETSASTAYLQINNLKNEDMAAYFCAREEDYRYVFNYWGQGT

TLTVSS

[0363] 核酸序列

[0364] GAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGGTATACCTTCACAAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGACAGGGTTTAAAGTGGATGGG  
CTGGATAAACACCTATACTGGAGAGCCAACATATGCTGATGACTTCACGGGACGGTTTGCCTTCTCCTTGAAACCT  
CTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACATGGCTGCATATTTCTGTGCAAGAGAGGAG  
GACTATAGGTACGTTTTTAACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[0365] 39H5轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.78所示,其编码核酸如SEQ ID NO.79所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.49、80、51所示。

[0366] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<-----DIQMIQSTSS  
LSASLGNRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYDTSRLHAGVPSRFSGSGSGT-----FR3-----  
>CDR3<---FR4--->DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGVTLPLTFGAGTKLEIK

[0367] 核酸序列

[0368] GACATCCAGATGATTCAGTCTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAAACAGAGTCACCATCAGTTGC  
AGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTA  
CGACACATCAAGATTACACGCAGGAGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTACCA  
TTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATCGCCACTACTTTTGCCAACAGGGTGTACGCTTCTCTCACGTTCCGGTGTCT  
GGGACCAAGCTGGAAATAAAA

[0369] 克隆:1H21-D5

[0370] 1H21-D5重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.81所示,其编码核酸如SEQ ID NO.82所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.83、84、85所示。

[0371] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<---QVQLKQSGPGLVQPSQ  
SLSITCTVSGFSLTSYGIHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGSTDFNAAFISRLSI-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->SKDNSKSQVFFKVISLQANDTAIYYCGRNSYYGNLYAMDYWGQGT  
SVTVSS

[0372] 核酸序列

[0373] CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCACA  
GTCTCTGGTTTCTCATTAAGTACTGATGGTATACACTGGGTTCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGG  
AGTGATATGGAGTGGTGAAGCACAGACTTTAATGCAGCTTTCATATCAAGACTGAGCATCAGCAAGGACAATTCCA  
AGAGCCAAGTTTTCTTTAAAGTGATCAGTCTGCAAGCTAATGACACAGCCATATATTACTGTGGCAGAAATTCCTAC  
TATGGTAATCTCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0374] 1H21-D5轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.86所示,其编码核酸如SEQ ID NO.87所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.88、11、12所示。

[0375] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<-----DIVLTSPTSLAV  
SLGQRATISCRASKSVSASGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGS-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELK

[0376] 核酸序列

[0377] GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTACTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
AGGGCCAGCAAAAGTGTCACTGCATCTGGCTATAGTTTTATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAA

ACTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAACTCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT  
TCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTCGGGAGCTTCCTCTC  
ACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0378] 克隆:10C19-D11

[0379] 10C19-D11重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.89所示,其编码核酸如SEQ ID NO.90所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.5、91、85所示。

[0380] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<---QVQLQQSGPGLVQPSQ  
SLSITCTVSGFSLTTYAVHWFRQSPGQGLEWLGVIWSTGITDFNAAFISRLNI-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->NKDSSKSQIFFKMISLQPNDAIYYCGRNSYYGNLYAMDYWGQGT  
SVTVSS

[0381] 核酸序列

[0382] CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCACA  
GTCTCTGGTTTCTCATTAACCTATGCTGTCACTGGTTTCGCCAGTCTCCAGGACAGGGTCTGGAGTGGCTGGG  
AGTGATATGGAGTACTGGAATCACAGACTTTAATGCAGCTTTCATATCAAGACTGAACATCAACAAAGACAGTTCCA  
AGAGCCAGATTTTCTTTAAATGATCAGTCTGCAACCTAATGACACAGCCATATATTACTGTGGCAGAAATTCCTAC  
TATGGTAATCTCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0383] 10C19-D11轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.92所示,其编码核酸如SEQ ID NO.93所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.19、11、12所示。

[0384] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<-----DIVLTQSPTSLAV  
SLGQRATISCRASKSVSASGYNFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGS-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSETDFTLNIHPVEEGDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELK

[0385] 核酸序列

[0386] GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTACTTCCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
AGGGCCAGTAAAAGTGCAGTGCATCTGGCTATAATTTTATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGTCAGCCACCCAA  
ACTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAACTCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGAGACAGACT  
TCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAACACAGTCGGGAGCTTCCTCTC  
ACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0387] 克隆:16J15-H3

[0388] 16J15-H3重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.94所示,其编码核酸如SEQ ID NO.95所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.96、97、98所示。

[0389] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<---QVQLKQSGPGLVQPSQ  
SLSITCTVSNFSLSTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWGGGYTDYNAAFISRLTI-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->SKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNYYGNLYAMDYWGQGT  
SVTVSS

[0390] 核酸序列

[0391] CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCACA  
GTCTCTAATTTCTCATTAAGTACCTATGGTGTACACTGGTTTCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGG  
AGTGATCTGGGGTGGTGGATACACAGACTATAATGCAGCTTTCATATCCAGACTGACCATCAGCAAGGACAACCTCCA  
AGAGCCAAGTTTTCTTTAAATGAACAGTCTGCAAGCTGATGACACAGCCATATATTATTGTGCCAGAAATAACTAC

TATGGTAACCTCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0392] 16J15-H3轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.99所示,其编码核酸如SEQ ID NO.100所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.101、102、103所示。

[0393] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<-----DIVLTQSPASLPV  
SLGQRATISCRANKSVSASGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLD SGV PARFSGS-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQHSREFPLTFGAGTKLELK

[0394] 核酸序列

[0395] GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTACCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
AGGGCCAACAAAAGTGTGCTGCTGCTTACCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
ACTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGATTCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT  
TCACCCTCAACATCCATCTGTGGAGGAGGAGGATACTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGTTTCCGCTC  
ACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0396] 克隆:17A9-G5

[0397] 17A9-G5重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.104所示,其编码核酸如SEQ ID NO.105所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.15、106、107所示。

[0398] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<---QVQLKQSGPGLVQPSQ  
SLSITCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLVGIWSAGITDYNAPFISRLSI-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->TKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNDYYGNLYAMDYWGQGT  
SVTVSS

[0399] 核酸序列

[0400] CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCACA  
GTCTCTGGTTTCTCATTAACTACCTATGGTGTACTGCTGGGTTCCGAGTCTCCAGGAAAGGTCTGGAGTGGCTGGG  
AGTGATATGGAGTGTGGAATCACAGACTATAATGCACCTTTCATATCCAGACTGAGCATCACCAAGGACAATTCCA  
AGAGCCAAGTTTCTTTAAAATGAACAGTCTGCAAGCTGATGACACAGCCATATATTACTGTCCAGAAATGACTAC  
TATGGTAACCTCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0401] 17A9-G5轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.108所示,其编码核酸如SEQ ID NO.109所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.110、111、103所示。

[0402] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<-----DIVLTQSPASLAV  
SLGQRATISCRANKSVSASGYTFMHYQQKPGQPPKLLIYLVSNLASGVPARFSGS-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFTLNIHPVEGEDAATYYCQHSREFPLTFGAGTKLELK

[0403] 核酸序列

[0404] GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTACCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
AGGGCCAACAAGAGTGTGCTGCTGCTTACCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
GCTCCTCATCTATCTAGTATCCAACCTAGCATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT  
TCACCCTCAACATCCATCTGTGGAGGGGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGTTTCCGCTC  
ACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0405] 克隆:36E7-D6

[0406] 36E7-D6重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.112所示,其编码核酸如SEQ ID NO.113所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.114、115、116所示。

[0407] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<---QVQLKQSGPGLVQPSQ  
SLSITCTVSDFLTIFGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWRDGSTDYNAALMSRLNI-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->TKDNSKSQVFFKMNSLQTDDTAIYYCAKNRRYDYAWFPYWGQGT  
LVSVSA

[0408] 核酸序列

[0409] CAGGTGCAACTGAAaCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATAACCTGCAC  
AGTCTCTGATTTCTCATTAACCTATCTTTGGGGTTCCTACTGGGTTCCGACAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGG  
GAGTGATTTGGAGAGATGGAAGCACAGACTATAATGCAGCTCTCATGTCCAGACTGAATATCACCAAGGACAACCTCC  
AAGAGCCAAGTTTTCTTTAAAATGAACAGTCTGCAAAGTATGACACTGCCATATATTACTGTGCCAAAAATCGGAG  
GTATGATTACGCCTGGTTTCCTTATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCTCTGTCTCTGCA

[0410] 3E7-D6轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.117所示,其编码核酸如SEQ ID  
NO.118所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.119、120、121所示。

[0411] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<-----DIVLTQSPASLAV  
SLGQRATISCRASKSVSASGYSFLHWYQQKPGQPPKLLIYLTSNLESGVPARFSGS-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRDFPPTFGAGTKLELK

[0412] 核酸序列

[0413] GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
AGGGCCAGCAAAAGTGTCAAGTGCATCTGGCTATAGTTTTTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAA  
ACTCCTCATTTATCTTACATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT  
TCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGACTTTCCTCCC  
ACGTTCCGGGGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0414] 克隆:4H6-A6

[0415] 4H6-A6重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.122所示,其编码核酸如SEQ ID NO.123  
所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.15、124、16所示。

[0416] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<---QVQLKQSGPGLVQPSQ  
KLSITCTVSGFLTTYGVHWIRQSPVKGLEWLGVIWTTGVVDYNAAFISRLNI-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->TKDNSKSQIFFKMNSLQTNDTAMYYCARNSYGNLYVMDYWGQGT  
SVTVSS

[0417] 核酸序列

[0418] CAGGTGCAACTGAAaCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAAGTTGTCCATTACCTGCAC  
AGTCTCTGGTTTCTCATTAACCTACCTATGGTGTGCACTGGATTCCGACAGTCTCCAGTAAAGGGTCTGGAGTGGCTGG  
GAGTGATATGGACTACTGGAGTTGTAGACTATAATGCAGCTTTCATATCCAGACTGAACATCACCAAGGACAATTCC  
AAGAGCCAAATTTCTTTAAAATGAACAGTCTGCAAAGTATGACACAGCCATGTATTACTGTGCCAGAAATTCCTA  
CTATGGAAACCTCTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0419] 4H6-A6轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.125所示,其编码核酸如SEQ ID NO.126  
所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.127、128、103所示。

[0420] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<-----DIVLTQSPASLPI  
FLGQRATISCRASRSVSASGYTFMHWYQQKPGQPPKLLIYLVSNLESGVPARFSGS-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPLTFGAGTKLELK



[0421] 核酸序列

[0422] GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTACCTATATTTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
AGGGCCAGCAGAAGTGTGAGTGCATCTGGCTATACTTTTATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAA  
ACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAGAACTCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT  
TCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGTTTCCTCTC  
ACGTTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0423] 克隆:42H19-G4

[0424] 42H19-G4重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.129所示,其编码核酸如SEQ ID  
NO.130所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.131、132、116所示。

[0425] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<---QVQLKQSGPGPVQPSQ  
SLSITCTVSDFLTIFGIHWVRQSPGKGLEWLVGIWRDGSTDYNVALMSRLNI-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->TKDNSKSKVFFKMNSLQTD<sup>t</sup>TAIYYCAKNRRYDYAWFPYWGQTL  
VSVSA

[0426] 核酸序列

[0427] CAGGTGCAACTGAAaCAGTCAGGACCTGGCCCAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTATCCATAACCTGCAC  
AGTCTCTGATTTCTCATTAACTATCTTTGGGATTCAGTGGGTTCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTG  
GGAGTGATTTGGAGAGATGGAAGCACAGACTACAATGTAGCTCTCATGTCCAGACTGAACATACCAAGGACA  
CCAAGAGTCAAGTTTTCTTTAAAATGAACAGTCTACAACTGATGACTGCCATATACTACTGTGCCAAAAATCG  
GAGGTATGATTACGCCTGGTTTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCTCTGTCTCTGCA

[0428] 42H19-G4轻链VK的氨基酸序列如SEQ ID NO.117所示,其编码核酸如SEQ ID  
NO.118所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.119、120、121所示。

[0429] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<-----DIVLTQSPASLAV  
SLGQRATISCRASKSVSASGYSFLHWYQKPKGPPKLLIYLTSNLESGVPARFSGS-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHRSRDFPPTFGAGTKLELK

[0430] 核酸序列

[0431] GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGC  
AGGGCCAGCAAAAGTGTGAGTGCATCTGGCTATAGTTTTTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAA  
ACTCCTCATTTATCTTACATCCAACCTAGAACTCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT  
TCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGACTTTCTCCC  
ACGTTTCGGGGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0432] 将重链可变区克隆入含有人重链固定区和调节元件的载体,以在哺乳动物细胞中  
表达完整的IgG重链。类似地,将轻链可变区克隆入含有人轻链固定区和调节元件的载体,  
以在哺乳动物细胞中表达完整的IgG轻链。经测序正确后转染入CHO-S哺乳动物细胞中,IgG  
经表达分泌入培养基中,合并收集上清,过滤后纯化。采用Protein A层析纯化IgG,将培养  
上清液加载于大小合适的Protein A柱子上,用50mM Tris-HCl pH8.0,250mM NaCl洗涤,用  
0.1M Glycine-HCl (pH3.0) 将结合的IgG洗脱下来。利用浓缩管将蛋白超滤浓缩,检测OD280,  
通过分光光度法测定IgG的浓度。

[0433] 4. 嵌合抗体对Daudi细胞的CDC活性

[0434] Daudi细胞重悬后,按照50μL/孔铺入96孔板中,然后每孔加入50μL抗体。将嵌合抗

体稀释至10 $\mu$ g/mL,以此为起始浓度,3倍梯度稀释,共3或者4个梯度。每孔再加入50 $\mu$ L补体混合液,将96孔板放至37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养2小时。然后每孔加入50 $\mu$ L 40% CCK-8溶液,震荡10秒,放于5%CO<sub>2</sub>培养箱培养3小时。将96孔板置于酶标仪(BioTek, Synergy HT)中,读取OD450的值,收集数据使用GraphPad Prism 5软件计算结果。结果如图4-1及4-2、表4所示,嵌合抗体39H5显示了极强的CDC的活性,66.7nM浓度下对肿瘤细胞的最大杀伤率接近80%。

[0435] 表4、CD70单克隆抗体CDC活性筛选

	CD70 抗体	CDC 活性
	2B12	+
	3B2	+
	12A1	+
	14C12	++
	23A11	+
	25H7	+
	26G11	+
	27A3	++
[0436]	32D1	+
	39H5	+++
	1H21-D5	+
	10C19-D11	+
	16J15-H3	+
	17A9-G5	+
	36E7-D6	+
	4H6-A6	+
	42H19-G4	+

[0437] 5. 嵌合抗体对Daudi细胞的ADCC杀伤活性

[0438] 按照每孔50 $\mu$ L将密度为1 $\times$ 10<sup>6</sup>个/mL Daudi细胞铺至U型96孔板中,每孔加入50 $\mu$ L嵌合抗体,放至37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养30分钟。取出NK92-MI-CD16a细胞,加入RPMI 1640培养基,计数,300g离心10分钟。弃上清,RPMI-1640培养基重悬细胞密度至2 $\times$ 10<sup>6</sup>/mL;取出96孔板,每孔加入50 $\mu$ L NK92-MI-CD16a细胞至孔板中,置于5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养4小时。检测前30分钟,向靶细胞最大孔加入2 $\mu$ L细胞裂解液(100 $\times$ ),继续37 $^{\circ}$ C培养。300\*g离心3分钟,取50 $\mu$ L上清至黑色酶标板,加入50 $\mu$ L乳酸脱氢酶(LDH)检测底物(放置室温提前溶解),轻轻震荡混匀;10分钟后,加入25 $\mu$ L终止液进行终止,震荡10秒,选择荧光(激发波长560nm,发射波长590nm)进行读板。结果如图5和表5所示,嵌合抗体对Daudi细胞有明显的ADCC杀伤作用,并且呈剂量依赖关系。

[0439] 表5、CD70单克隆抗体ADCC活性筛选

	CD70 抗体	ADCC 杀伤活性 EC50(nM)
	<b>2B12</b>	0.03
	<b>3B2</b>	ND
[0440]	<b>12A1</b>	0.04
	<b>14C12</b>	0.08
	<b>23A11</b>	0.02
	<b>25H7</b>	0.32
	<b>26G11</b>	0.11
	<b>27A3</b>	0.05
[0441]	<b>32D1</b>	0.07
	<b>39H5</b>	0.05

[0442] ND: 未检测。

[0443] 6. 嵌合抗体FACS细胞亲和力测定

[0444] 取对数生长期的不同细胞, 3% BSA封闭30分钟以 $5 \times 10^4$ 细胞/100 $\mu$ L铺U型96孔板, 1100rpm离心3分钟, 弃上清, 轻轻拍散细胞, 每孔加入50 $\mu$ L梯度稀释的抗体(抗体浓度从30 $\mu$ g/mL起, 3倍稀释5个梯度), 4 $^{\circ}$ C孵育1小时。孵育结束后, 每孔加入180 $\mu$ L 0.5% BSA洗3次, 加30 $\mu$ L/孔二抗AlexaFluro647抗人IgG(Jackson Immuno Research, 货号: 109-606-170), 4 $^{\circ}$ C孵育45分钟。孵育结束后, 每孔加入180 $\mu$ L 0.5% BSA洗3次, 最后每孔重悬于50 $\mu$ L PBS进行iQue(Intellicyt, USA)检测。如图6-1、6-2和表6所示, FACS检测到嵌合抗体分别高亲和力结合稳转细胞株CHO-人CD70和CHO-食蟹猴CD70上表达的CD70分子。

[0445] 表6、FACS细胞亲和力测定

	CD70 抗体	CHO-人 CD70 EC50(nM)	CHO-食蟹猴 CD70 EC50(nM)
	<b>2B12</b>	17.73	22.02
	<b>3B2</b>	ND	ND
	<b>12A1</b>	7.55	14.0
	<b>14C12</b>	14.97	14.35
[0446]	<b>23A11</b>	11.88	9.63
	<b>25H7</b>	16.12	17.38
	<b>26G11</b>	22.48	20.97
	<b>27A3</b>	4.07	7.28
	<b>32D1</b>	12.05	15.84
	<b>39H5</b>	10.18	15.13

[0447] ND: 未检测。

[0448] 7. 嵌合抗体对CD70与CD27结合的阻断作用

[0449] 在96孔酶标板上包被1 $\mu$ g/mL的CD27重组蛋白, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日PBS洗涤3次, 加入200 $\mu$ L 2%脱脂奶粉/PBS室温封闭2小时, PBS洗涤1次; 将纯化的嵌合抗体做12个浓度梯度, 起始浓度为100nM, 按照1:3的梯度进行稀释, 每孔加入30 $\mu$ L, 室温孵育30分钟。然后每孔加入30 $\mu$ L生物素标记的CD70重组蛋白, 室温孵育60分钟。用PBST和PBS重复洗涤3次, 甩干。

用0.5% BSA按1:8000比例稀释二抗链霉亲和素偶联辣根过氧化物酶SA-HRP (BD bioscience, 货号:6222697), 每孔加入100 $\mu$ l, 室温孵育30分钟。用PBST和PBS重复洗涤3次, 甩干。每孔加入100 $\mu$ l显色液(TMB溶液, Sigma, 货号:T2885), 37 $^{\circ}$ C避光反应, 待底物显色适中, 每孔加入50 $\mu$ l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应, 30分钟内用酶联检测仪测定OD450nm, 收集数据, 使用Graph Pad Prism 5软件计算结果, 结果如图7-1、7-2和表7所示, 嵌合抗体能够阻断人CD70和CD27以及食蟹猴CD70和CD27的相互结合。

[0450] 表7、对人CD70与CD27结合的阻断作用测定

	CD70 抗体	人 CD70/CD27 IC50(nM)	食蟹猴 CD70/CD27 IC50(nM)
	<b>2B12</b>	0.11	0.11
	<b>3B2</b>	ND	ND
	<b>12A1</b>	0.12	0.21
[0451]	<b>14C12</b>	0.10	0.09
	<b>23A11</b>	0.07	0.08
	<b>25H7</b>	0.16	0.15
	<b>26G11</b>	0.17	0.21
	<b>27A3</b>	0.08	0.08
	<b>32D1</b>	0.10	0.11
[0452]	<b>39H5</b>	0.06	0.08

[0453] ND: 未检测。

[0454] 实施例5、Anti-CD70抗体的人源化

[0455] 选择CDC活性较强的鼠抗体39H5和32D1进行可变区序列人源化改造。首先将鼠抗体39H5序列与人抗体胚系序列进行比对, 找出同源性好、维持抗体结构核心(Upper hydrophobic core)的关键氨基酸序列完全相同、同时在人体出现频率高的人胚系轻链基因IMGT\_hVK1-33、IGKJ1\*01和人胚系重链基因IMGT\_hVH7-4、IGHJ4\*01, 进行鼠抗体CDR移植; 同时将鼠抗体32D1序列与人抗体胚系序列进行比对, 找出同源性好、维持抗体结构核心的关键氨基酸序列完全相同、同时在人体出现频率高的人胚系轻链基因IMGT\_hVK7-3和IMGT\_hVK3-20、IGKJ1\*01和人胚系重链基因IMGT\_hVH1-69、IGHJ4\*01, 进行鼠抗体CDR移植; 利用计算机进行同源建模, 分析CDR区及其周边框架氨基酸序列, 避免分子表面电荷或疏水区域集中分布。

[0456] 设计共得到6个重链变体h39H5-VHv1-v3、h32D1-VHv1-v3和6个轻链变体h39H5-VKv1-v3、h32D1-VKv1-v3, 将轻、重链分别进行全序列合成后, 克隆到含有抗体kappa链固定区Ckappa或人IgG1固定区CH1-CH3的真核表达载体, 将轻、重链质粒进行组合配对后, 转染CHO-S细胞, 37 $^{\circ}$ C表达5-6天, 收取培养上清, 通过Protein A柱进行纯化。

[0457] 人源化抗体重链/轻链可变区序列如下:

[0458] 表8、CD70人源化抗体的重链可变区序列

CD70 人源化抗体	SEQ ID NOs:				
	HCVR		HCDR1	HCDR2	HCDR3
	氨基酸 序列	核苷酸 序列	氨基酸 序列	氨基酸 序列	氨基酸 序列
[0459] h39H5 VHv1	133	134	44	135	46
h39H5 VHv2	136	137	44	135	46
h39H5 VHv3	138	139	44	135	46
h32D1 VHv1	140	141	29	142	31
h32D1 VHv2	143	144	29	142	31
h32D1 VHv3	145	146	29	142	31

[0460] 表9、CD70人源化抗体的轻链可变区序列

CD70 人源化抗体	SEQ ID NOs:				
	LCVR		LCDR1	LCDR2	LCDR3
	氨基酸 序列	核苷酸 序列	氨基酸 序列	氨基酸 序列	氨基酸 序列
[0461] h39H5 VKv1	147	148	149	80	51
h39H5 VKv2	150	151	149	80	51
h39H5 VKv3	152	153	149	80	51
h32D1 VKv1	154	155	25	11	26
h32D1 VKv2	156	157	25	11	26
h32D1 VKv3	158	159	25	160	26

[0462] h39H5 VHv1

[0463] 重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.133所示,其编码核酸如SEQ ID NO.134所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.44、135、46所示。

[0464] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<--QIQLVQSGSELKKPGAS  
VKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGPEPTYADGFTGRFV-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->FSLDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYFCAREEDYRYVFNYWGQGT  
LVTVSS

[0465] 核酸序列

[0466] CAGATTCAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAG  
GCTAGCGGCTACACATTCACCAACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAATGGATGGG  
CTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCTACCTACGCCGATGGCTTACAGGCAGATTCGTGTTTCAGCCTGGACACCA  
GCGCCAGCACAGCTTACCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGCGCCAGAGAAGAG  
GACTACCGCTACGTGTTCAACTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT

[0467] h39H5 VHv2

[0468] 重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.136所示,其编码核酸如SEQ ID NO.137所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.44、135、46所示。

[0469] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<--QVQLVQSGSELKKPGAS  
VKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGPEPTYADGFTGRFV-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->FSLDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYFCAREEDYRYVFNYWGQGT  
LVTVSS

[0470] 核酸序列

[0471] CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAG

GCTAGCGGCTACACATTCACCAACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAATGGATGGG  
CTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCTACCTACGCCGATGGCTTACAGGCAGATTTCGTGTTTCAGCCTGGACACCA  
GCGCCAGCACAGCTTACCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGCGCCAGAGAAGAG  
GACTACCGCTACGTGTTCAACTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT

[0472] h39H5 VHv3

[0473] 重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.138所示,其编码核酸如SEQ ID NO.139所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.44、135、46所示。

[0474] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<--QVQLVQSGSELKKPGA  
SVKVSCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYTGPEPTYADGFTGRFV-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->FSLDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREEDYRYVFNYWGQGT  
LVTVSS

[0475] 核酸序列

[0476] CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAG  
GCTAGCGGCTACACATTCACCAACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAATGGATGGG  
CTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCTACCTACGCCGATGGCTTACAGGCAGATTTCGTGTTTCAGCCTGGACACCA  
GCGCCAGCACAGCTTACCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGAG  
GACTACCGCTACGTGTTCAACTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT

[0477] h32D1 VHv1

[0478] 重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.140所示,其编码核酸如SEQ ID NO.141所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.29、142、31所示。

[0479] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<--QVQLVQSGAEVKKPGSS  
VKVVSCKASGYTFTDYVIHWVRQAPGQGLEWMGYLHPYNDTKYNEKFQGRVT-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->LTSKSSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRGYDYAWFADWGQG  
TLVTVSS

[0480] 核酸序列

[0481] CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAG  
GCTAGCGGCTACACATTCACCGACTACGTGATCCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGACAGGGACTTGAGTGGATGGG  
CTATCTGCACCCCTACAACGACGACACCAAGTACAACGAGAAGTCCAGGGCAGAGTGACCCTCACCAGCGACAAGT  
CTAGCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGAGGC  
TACTACGACTACGCTTGGTTTGGCGATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACAGTTAGCTCT

[0482] h32D1 VHv2

[0483] 重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.143所示,其编码核酸如SEQ ID NO.144所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.29、142、31所示。

[0484] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<--QVQLVQSGAEVKKPGSS  
VKVVSCKASGYTFTDYVIHWVRQAPGQGLEWMGYLHPYNDTKYNEKFQGRVT-----  
FR3----->CDR3<---FR4--->ITADKSSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRGYDYAWFADWGQG  
TLVTVSS

[0485] 核酸序列

[0486] CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAG

GCTAGCGGCTACACATTCACCGACTACGTGATCCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGACAGGGACTTGAGTGGATGGG  
 CTATCTGCACCCCTACAACGACGACACCAAGTACAACGAGAAGTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAAGT  
 CTAGCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGAGGC  
 TACTACGACTACGCTTGGTTTGGCGATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTTCACAGTTAGCTCT

[0487] h32D1 VHv3

[0488] 重链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.145所示,其编码核酸如SEQ ID NO.146所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.29、142、31所示。

[0489] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<--QVQLVQSGAEVKKPGSS  
 VKVSCKASGYTFTDYVIHWVRQAPGQGLEWMGYLHPYNDTKYNEKFQGRVT-----  
 FR3----->CDR3<---FR4--->ITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGYDYAWFADWGQG  
 TLVTVSS

[0490] 核酸序列

[0491] CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAG  
 GCTAGCGGCTACACATTCACCGACTACGTGATCCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGACAGGGACTTGAGTGGATGGG  
 CTATCTGCACCCCTACAACGACGACACCAAGTACAACGAGAAGTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACGAGT  
 CTACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGAGGC  
 TACTACGACTACGCTTGGTTTGGCGATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTTCACAGTTAGCTCT

[0492] h39H5 VKv1

[0493] 轻链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.147所示,其编码核酸如SEQ ID NO.148所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.149、80、51所示。

[0494] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<-----DIQMTQSPS  
 SLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYDTSRLHAGVPSRFSGSGSGT----  
 FR3----->CDR3<---FR4--->DYTFTISSLQPEDATYFCQQGVTLPLTFGQGTKLEIK

[0495] 核酸序列

[0496] GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGT  
 CAGGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTA  
 CGACACCAGCAGACTGCACGCTGGCGTGCCATCTAGATTCAGCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTACACCTTCACAA  
 TCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGCGTGACCCTGCCTCTGACATTTGGCCAG  
 GGCACCAAGCTGGAAATCAAG

[0497] h39H5 VKv2

[0498] 轻链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.150所示,其编码核酸如SEQ ID NO.151所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.149、80、51所示。

[0499] <-----FR1----->CDR1<----FR2----->CDR2<-----DIQMTQSPS  
 SLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYDTSRLHAGVPSRFSGSGSGT----  
 FR3----->CDR3<---FR4--->DFTFTISSLQPEDATYFCQQGVTLPLTFGQGTKLEIK

[0500] 核酸序列

[0501] GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGT  
 CAGGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTA  
 CGACACCAGCAGACTGCACGCTGGCGTGCCATCTAGATTCAGCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTCACCTTCACAA

TCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGCGTGACCCTGCCTCTGACATTTGGCCAG  
GGCACCAAGCTGGAAATCAAG

[0502] h39H5 VKv3

[0503] 轻链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.152所示,其编码核酸如SEQ ID NO.153所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.149、80、51所示。

[0504] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<-----DIQMTQSPS  
SLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDTSRLHAGVPSRFSGSGSGT----  
FR3----->CDR3<---FR4--->DFTFTISSLPEDIATYYCQQGVTLPLTFGQGTKLEIK

[0505] 核酸序列

[0506] GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTG  
TCAGGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATC  
TACGACACCAGCAGACTGCACGCTGGCGTGCCATCTAGATTCAGCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTCACCTTCA  
CAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATATCGCTACCTACTaCTGCCAGCAAGGCGTGACCCTGCCTCTGACATTTGG  
CCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

[0507] h32D1 VKv1

[0508] 轻链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.154所示,其编码核酸如SEQ ID NO.155所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.25、11、26所示。

[0509] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<-----DIVLTQSPASLAV  
SPGQRATITCRASKSVSASGYTWMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGS----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPPPTFGQGTKLEIK

[0510] 核酸序列

[0511] GACATCGTGCTGACACAGAGCCCTGCTTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCCAGAGAGCCACCATCACCTGT  
AGAGCCAGCAAGAGCGTGTCCGCCTCTGGCTACACATGGATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAA  
GCTGCTGATCTACCTGGCCAGCAACCTGGAAAGCGGAGTGCTGCTAGATTCAGCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACT  
TCACCCTGACAATCAACCCCGTGAAGCCAACGACACCGCCAATACTACTGCCAGCACAGCAGAGAGCTGCCTCCA  
ACATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

[0512] h32D1 VKv2

[0513] 轻链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.156所示,其编码核酸如SEQ ID NO.157所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.25、11、26所示。

[0514] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<-----EIVLTQSPGTL  
SLSPGERATLSCRASKSVSASGYTWMHWYQQKPGQAPRLLIYLASNLESGIPDRFSGS----  
FR3----->CDR3<---FR4--->GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHSRELPPPTFGQGTKLEIK

[0515] 核酸序列

[0516] GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGGCCACACTGAGCTGT  
AGAGCCAGCAAGAGCGTGTCCGCCTCTGGCTACACATGGATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAG  
ACTGCTGATCTACCTGGCCAGCAACCTGGAAAGCGGCATCCCGATAGATTCAGCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACT  
TCACCCTGACAATCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCACAGCAGAGAGCTGCCTCCA  
ACATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

[0517] h32D1 VKv3



[0518] 轻链VH的氨基酸序列如SEQ ID NO.158所示,其编码核酸如SEQ ID NO.159所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.25、160、26所示。

[0519] <-----FR1----->CDR1<-----FR2----->CDR2<-----EIVLTQSPGTLSSPGERATLSCRASKSVSASGYSYWMHWYQQKPGQAPRLLIYLAASSLESGLPDRFSGS-----FR3----->CDR3<-----FR4----->GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHSRELPPTFGGQGTKLEIK

[0520] 核酸序列

[0521] GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGAGCCACACTGAGCTGTAGAGCCAGCAAGAGCGTGTCCGCCTCTGGCTACACATGGATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCTAGACTGCTGATCTACCTGGCCAGCAgCCTGGAAAGCGGCATCCCCGATAGATTCAGCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCACAGCAGAGAGCTGCCTCCAACATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

[0522] 实施例6、不同人源化CD70抗体对肿瘤细胞Daudi的CDC杀伤

[0523] Daudi细胞重悬后,按照50μL/孔铺入96孔板中,然后每孔加入50μL抗体。将人源化抗体稀释至10μg/mL,以此为起始浓度,3倍梯度稀释,共3个梯度。每孔再加入50μL补体混合液,将96孔板放至37°C 5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养2小时。然后每孔加入50μL 40% CCK-8溶液,震荡10秒,放于5%CO<sub>2</sub>培养箱培养3小时。将96孔板置于酶标仪(BioTek, Synergy HT)中,读取OD450的值,收集数据使用GraphPad Prism 5软件计算结果。结果如图8和表10所示,在不同人源化CD70抗体中,人源化变体Ab001、Ab004和Ab007对Dauai细胞的最大杀伤率最高,为60%左右。

[0524] 图8、不同人源化抗体对肿瘤细胞Daudi的CDC杀伤

[0525] 表10、不同人源化CD70抗体对肿瘤细胞Daudi的CDC杀伤

	人源化变体	VH	VK	CDC
[0526]	Ab001	h39H5 VHv1	h39H5 VKv1	++
	Ab002	h39H5 VHv1	h39H5 VKv2	+
	Ab003	h39H5 VHv1	h39H5 VKv3	+
	Ab004	h39H5 VHv2	h39H5 VKv1	++
	Ab005	h39H5 VHv2	h39H5 VKv2	+
	Ab006	h39H5 VHv2	h39H5 VKv3	+
[0527]	Ab007	h39H5 VHv3	h39H5 VKv1	++
	Ab008	h39H5 VHv3	h39H5 VKv2	+
	Ab009	h39H5 VHv3	h39H5 VKv3	+
	Ab010	h32D1 VHv1	h32D1 VKv1	+
	Ab011	h32D1 VHv1	h32D1 VKv2	+
	Ab012	h32D1 VHv1	h32D1 VKv3	+
	Ab013	h32D1 VHv2	h32D1 VKv1	+
	Ab014	h32D1 VHv2	h32D1 VKv2	+
	Ab015	h32D1 VHv2	h32D1 VKv3	+
	Ab016	h32D1 VHv3	h32D1 VKv1	+
	Ab017	h32D1 VHv3	h32D1 VKv2	+
	Ab018	h32D1 VHv3	h32D1 VKv3	+

[0528] 实施例7、人源化CD70抗体的亲和力测定

[0529] 分别取稳转细胞CHO-人CD70和CHO-食蟹猴CD70,3%BSA封闭30分钟,以5×10<sup>4</sup>细胞/100μL铺于U型96孔板,1100rpm离心3分钟,弃上清,轻轻拍散细胞,加入50μL梯度稀释的抗体(抗体浓度从30μg/mL起,3倍稀释8个梯度),4°C孵育1小时。孵育结束后,每孔加入200μ

L 0.5% BSA洗3次,加50 $\mu$ L/孔二抗溶液Alexa Fluro647抗人IgG (Jackson ImmunoResearch,货号:109-606-170),4 $^{\circ}$ C孵育45分钟。孵育结束后,每孔加入180 $\mu$ L 0.5% BSA洗3次,最后每孔重悬于50 $\mu$ L PBS进行iQue (Intellicyt)检测。如图9-1、9-2和表11所示,FACS检测到人源化抗体Ab001、Ab004和Ab007分别高亲和力结合稳转细胞株CHO-人CD70和CHO-猴CD70上表达的CD70分子。

[0530] 表11、FACS细胞亲和力测定

	人源化抗体	CHO-人 CD70 EC50(nM)	CHO-食蟹猴 CD70 EC50(nM)
[0531]	Ab001	2.00	5.78
	Ab004	2.15	3.39
	Ab007	2.57	3.14

[0532] 实施例8、人源化CD70抗体对CD70与CD27结合的阻断作用

[0533] 在96孔酶标板上包被1 $\mu$ g/mL的人CD27重组蛋白,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日PBS洗涤3次,加入200 $\mu$ L 2%脱脂奶粉/PBS室温封闭2小时,PBS洗涤1次;将纯化的嵌合抗体做12个浓度梯度,起始浓度为100nM,按照1:3的梯度进行稀释,每孔加入30 $\mu$ L,室温孵育30分钟。然后每孔加入30 $\mu$ L生物素标记的CD70重组蛋白,室温孵育60分钟。用PBST和PBS重复洗涤3次,甩干。用0.5% BSA按1:8000比例稀释二抗溶液链霉亲和素偶联辣根过氧化物酶SA-HRP (BD bioscience,货号:6222697),每孔加入100 $\mu$ L,室温孵育30分钟。用PBST和PBS重复洗涤3次,甩干。每孔加入100 $\mu$ L显色液(TMB溶液,Sigma,货号:T2885),37 $^{\circ}$ C避光反应,待底物显色适中,每孔加入50 $\mu$ L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,30分钟内用酶联检测仪测定OD450nm,收集数据,使用Graph Pad Prism 5软件计算结果,结果如图10-1、10-2和表12,人源化抗体Ab001、Ab004和Ab007可有效阻断人或食蟹猴CD70受体和配体CD27的相互结合。

[0534] 表12、对人CD70与CD27结合的阻断作用测定

	人源化抗体	人 CD70/CD27 IC50(nM)	食蟹猴 CD70/CD27 IC50(nM)
[0535]	Ab001	0.04	0.05
	Ab004	0.04	0.05
	Ab007	0.04	0.05

[0536] 实施例9、人源化CD70抗体对不同肿瘤细胞的CDC杀伤

[0537] Daudi细胞重悬后,按照50 $\mu$ L/孔铺入96孔板中,然后每孔加入50 $\mu$ L抗体。将人源化抗体稀释至10 $\mu$ g/mL,以此为起始浓度,3倍梯度稀释。再加入50 $\mu$ L补体混合液,将96孔板放至37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养2小时。然后每孔加入50 $\mu$ L 40% CCK-8溶液,震荡10秒,放于5% CO<sub>2</sub>培养箱培养3小时。将96孔板置于酶标仪 (BioTek, Synergy HT) 中,读取OD450的值,收集数据使用GraphPad Prism 5软件计算结果。结果如图11-1、11-2、11-3和表13所示,人源化抗体Ab001、Ab004和Ab007对肿瘤细胞Daudi、MV-4-11-CD70、Raji均具有明显的杀伤作用。

[0538] 表13、不同人源化CD70抗体对不同肿瘤细胞的CDC杀伤

人源化抗体	CDC 杀伤 EC50(nM)		
	Daudi	MV-4-11-CD70	Raji
[0539] Ab001	5.32	ND	ND
Ab004	5.60	5.67	0.71
Ab007	3.49	4.07	0.70

[0540] ND: 未检测

[0541] 实施例10、人源化CD70抗体对不同肿瘤细胞的ADCC杀伤

[0542] 接种Daudi细胞至U型96孔板中,每孔加入不同浓度的人源化抗体,放至CO<sub>2</sub>培养箱培养半小时;取出NK92-MI-CD16a细胞,RPMI-1640培养基重悬细胞密度至2×10<sup>6</sup>/mL;然后在96孔板的每孔中加入50μL NK92-MI-CD16a细胞,置于CO<sub>2</sub>培养箱中培养4小时。检测前30分钟,向靶细胞最大孔加入2μL细胞裂解液(100×),继续37°C培养。300g离心3分钟,取50μL上清至黑色酶标板,每孔加入50μL LDH检测底物(放置室温提前溶解),轻轻震荡混匀;10分钟后,每孔加入25μL终止液进行终止,震荡10秒,选择荧光(激发波长560nm,发射波长590nm)进行读板,并计算杀伤率。杀伤率计算公式如下:

$$[0543] \text{杀伤率}\% = \frac{\text{实验孔} - \text{对照孔}}{\text{最大释放孔} - \text{对照孔}} \times 100\%$$

[0544] 结果如图12-1、12-2和表14所示,人源化抗体Ab001、Ab004和Ab007对肿瘤细胞Daudi、Raji均具有明显的杀伤作用。

[0545] 表14、不同人源化CD70抗体对不同肿瘤细胞的ADCC杀伤

人源化抗体	ADCC 杀伤 EC50(nM)	
	Daudi	Raji
[0546] Ab001	0.08	ND
Ab004	0.08	0.11
Ab007	0.05	0.10

[0547] ND: 未检测

[0548] 实施例11、人源化CD70抗体对肿瘤细胞的ADCP杀伤

[0549] 用10nM荧光染料CFSE标记的Daudi细胞作为CD70+靶细胞,接种至96孔板中,加入梯度稀释的人源化抗体,置于CO<sub>2</sub>培养箱中培养,最后加入GM-CSF1诱导成熟的巨噬细胞,比例为巨噬细胞:Daudi=1:4,于37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下;加入Anti-CD14 APC抗体稀释溶液,于冰上避光20分钟;流式细胞仪检测收集细胞,以单独巨噬细胞孔为对照,圈出CD14单阳性细胞群,实验孔圈出CD14单阳性细胞及CD14和CSFE双阳性细胞群,统计两群细胞数量。结果如图13和表15所示,人源化抗体Ab001、Ab004和Ab007对肿瘤细胞Daudi均有明显的ADCP吞噬作用。

[0550] 表15、不同人源化CD70抗体对肿瘤细胞Daudi的ADCP杀伤

人源化抗体	ADCP 吞噬 EC50(nM)
[0551] Ab001	8.30
Ab004	7.70
Ab007	9.45

[0552] 实施例12、人源化CD70抗体对CD70介导刺激IL-8分泌的抑制作用

[0553] 取 $3 \times 10^6$ 个HT1080-人CD27细胞,300g离心10分钟,弃上清,加入10mL PBS清洗一次,用DMEM完全培养基重悬细胞密度至 $2 \times 10^5$ /mL,每孔加入100 $\mu$ L,置于5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜。第二天,在96孔U型孔板中按照摩尔比1:1,加入实施例1制备的人CD70重组蛋白和Anti-mouse IgG Fc(Jackson Immuno Research),总体积为110 $\mu$ L,充分混匀后,于37°C中预孵育30分钟形成CD70聚体。取新的96孔板,每孔加入110 $\mu$ L不同梯度稀释的人源化CD70抗体和110 $\mu$ L上一步预孵育样品,混匀后,37°C孵育30分钟。取出细胞培养孔板,离心弃去上清,每孔加入200 $\mu$ L抗体和重组蛋白预混合样品,置于5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养6小时,然后300g离心10分钟,收集上清,用人IL-8细胞因子检测试剂盒(BD,货号:555244)检测上清中IL-8的含量。结果如图14和表16所示,人源化抗体Ab001、Ab004和Ab007均能抑制CD70介导刺激IL-8的分泌。

[0554] 表16、不同人源化CD70抗体对CD70介导刺激IL-8分泌的抑制作用

	人源化抗体	IL-8分泌的抑制作用
		IC50(nM)
[0555]	Ab001	10.71
	Ab004	10.99
	Ab007	9.92

[0556] 实施例13、人源化CD70抗体在Raji细胞株皮下异种移植NOD/SCID小鼠模型中的抗肿瘤作用

[0557] 在含10%胎牛血清的RPMI1640培养液中培养Raji细胞。收集对数生长期的Raji细胞,PBS重悬至适合浓度并与基质胶(matrigel)1:1混合后用于NOD/SCID小鼠皮下肿瘤接种。雌性小鼠右侧皮下接种 $1 \times 10^7$ Raji细胞,待肿瘤平均体积为100mm<sup>3</sup>时,根据肿瘤大小随机分组。每组5只小鼠,治疗组的小鼠以1mg/kg、3mg/kg和10mg/kg的剂量每周尾静脉注射二次,共给药两周,监控肿瘤体积。肿瘤体积计算方法为:

[0558] 肿瘤体积(mm<sup>3</sup>) =  $1/2 \times (a \times b^2)$  (其中a表示长径,b表示短径)。

[0559] 结果如图15-1所示,人源化CD70抗体3mg/kg和10mg/kg剂量组均明显抑制人Burkitt's淋巴瘤Raji小鼠皮下移植瘤的生长,引起肿瘤部分消退;其中人源化CD70抗体Ab004在10mg/kg给药剂量下对肿瘤的抑制率为69.4%。

[0560] 同时如图15-2所示,人源化CD70抗体在不同剂量组均不引起小鼠体重的下降,无明显的毒性作用。

[0561] 实施例14、CDC活性增强型CD70人源化抗体

[0562] 基于IgG1和补体C1的结构模型(Ugurlar et al.,2017),在IgG1和补体C1结合区域的第一结合位点引入突变以降低极性(R<sub>292</sub>和/或Y<sub>300</sub>),减弱对C1q的R129和R114的排斥,或同时在CH3引入突变P<sub>396</sub>L,优化CH2和CH3之间的角度。含有Fc突变的CD70抗体在CHO细胞表达,纯化后检测各突变对CD70抗体的生物学活性影响。对照抗体41D12按文献CN201280013552.5合成,并在CHO细胞表达和纯化。

[0563] 结果显示,CD70人源化抗体Ab004和Ab007的CDC活性均显著优于对照抗体41D12,其中含Fc突变的CD70人源化抗体(突变位点如表14所示),Ab004 IgG1 e1、Ab004 IgG1 e3和Ab004 IgG1 e5三种抗体CDC杀伤作用得到显著增强,对Daudi细胞的最大杀伤率大于90%,中效杀伤浓度EC50低于野生型约2-3倍(图16)。

[0564] 人群中广泛存在Fc  $\gamma$  RIII<sub>V158</sub>和Fc  $\gamma$  RIII<sub>F158</sub>两种CD16a受体等位基因,其中等位基因Fc  $\gamma$  RIII<sub>V158</sub>编码受体与抗体IgG1亲和力较高,表达Fc  $\gamma$  RIII<sub>V158</sub>的NK细胞介导更有效的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC),被认为是抗体药物对低亲和力Fc  $\gamma$  RIII<sub>F158</sub>群体疗效不显著的原因。Biacore结果显示,突变体Ab004 IgG1 e5与低亲和力Fc  $\gamma$  RIII<sub>F158</sub>有显著亲和力增强,与野生型IgG1与高亲和力Fc  $\gamma$  RIII<sub>V158</sub>受体亲和力相当(表17)。

[0565] 表17、不同Fc突变体的生物学活性评价

	突变位点	CDC EC50 (nM)	Fc $\gamma$ RIII V158 KD (nM)	Fc $\gamma$ RIII F158 KD (nM)	
[0566]	Ab004 IgG1 wt	无	4.58	565	1305
	Ab004 IgG1 e1	Y <sub>300</sub> L/P <sub>396</sub> L	1.74	118	602
	Ab004 IgG1 e3	R <sub>292</sub> P/Y <sub>300</sub> L/P <sub>396</sub> L	2.00	75	172
	Ab004 IgG1 e5	R <sub>292</sub> P/Y <sub>300</sub> L	3.06	217	342
	Ab007 IgG1	无	4.48	ND	ND
	41D12 IgG1	无	4.39	ND	ND
	KLH IgG1	无	-	ND	ND

[0567] ND:未检测

[0568] 从含不同Fc  $\gamma$  RIIIa等位基因受体的健康志愿者,分离收集外周血PBMC,以RPMI-1640培养基重悬细胞;接种Daudi细胞至U型96孔板中,每孔加入不同浓度的人源化抗体,放至CO<sub>2</sub>培养箱培养半小时;然后每孔加入5×10<sup>5</sup>个PBMC细胞至96孔板中,置于CO<sub>2</sub>培养箱中培养4小时。检测前30分钟,向靶细胞最大孔加入2 $\mu$ L细胞裂解液(100 $\times$ ),继续37 $^{\circ}$ C培养。300g离心3分钟,取50 $\mu$ L上清至黑色酶标板,每孔加入50 $\mu$ L LDH检测底物(放置室温提前溶解),轻轻震荡混匀;10分钟后,每孔加入25 $\mu$ L终止液进行终止,震荡10秒,选择荧光(激发波长560nm,发射波长590nm)进行读板,并计算杀伤率。

[0569] 结果如图17-1、17-2和表18所示,以Fc  $\gamma$  RIII<sub>V158/V158</sub>志愿者PBMC或Fc  $\gamma$  RIII<sub>F158/F158</sub>志愿者PBMC为效应细胞,Ab004 IgG1 e5对肿瘤细胞Daudi杀伤作用相对野生型Ab004 IgG1均有明显增强。其中,Ab004 IgG1 e5在低亲和力受体Fc  $\gamma$  RIII<sub>F158/F158</sub>志愿者PBMC介导的ADCC杀伤作用,与野生型Ab004 IgG1在高亲和力受体Fc  $\gamma$  RIII<sub>V158/V158</sub>志愿者PBMC中介导的ADCC作用相当,提示Fc采用突变体IgG1 e5的抗体对广泛人群均有相当的ADCC药效作用。

[0570] 表18、不同人源化CD70抗体对不同肿瘤细胞的ADCC杀伤

人源化抗体	ADCC 杀伤				
	Fc $\gamma$ RIII <sub>V158</sub>		Fc $\gamma$ RIII <sub>F158</sub>		
	EC <sub>50</sub>	最大杀伤率	EC <sub>50</sub>	最大杀伤率	
[0571]	Ab004 IgG1 e5	0.09nM	66%	0.08nM	34%
	Ab004 IgG1	0.22nM	40%	0.23nM	13%

[0572] 实施例15、CDC活性增强型CD70抗体在Daudi细胞株皮下异种移植NOD/SCID小鼠模型中的抗肿瘤作用

[0573] 取对数生长期的Daudi细胞,调整细胞密度为1.2×10<sup>8</sup>/ml,加入等体积Matrigel Matrix与细胞悬液充分混匀,每只100 $\mu$ l接种于BALB/c-Nude小鼠右肢皮下。待肿瘤平均体积为100-200mm<sup>3</sup>时,随机分组,每组5只小鼠,分组当天开始第一次给药,每三天一次,共给药三次,每只100 $\mu$ l尾静脉注射给药。皮下接瘤当天为D0,绘制肿瘤生长曲线(肿瘤体积不超

过 $2000\text{mm}^3$ ,到达 $2000\text{mm}^3$ 时处死小鼠)。

[0574] 结果如图18所示,CDC活性增强型CD70抗体以及母本抗体均能剂量依赖性地抑制人淋巴瘤Daudi皮下移植瘤的生长。CDC活性增强型CD70抗体按照剂量由高到低的抑瘤率分别为114%、92%、67%;CD70母本抗体的抑瘤率分别为81%、36%、24%。荷瘤小鼠对以上给药剂量均能很好耐受,没有体重减轻等不良反应。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 康诺亚生物医药科技(成都)有限公司

[0003] <120> 一种功能增强型抗体阻断剂的开发及其应用

[0004] <130> MTI20150

[0005] <160> 161

[0006] <170> PatentIn version 3.5

[0007] <210> 1

[0008] <211> 702

[0009] <212> PRT

[0010] <213> Homo sapiens

[0011] <400> 1

[0012] Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His Thr Gly

[0013] 1 5 10 15

[0014] Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala Leu Gly

[0015] 20 25 30

[0016] Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu Arg Ile

[0017] 35 40 45

[0018] His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu Ala Ile

[0019] 50 55 60

[0020] Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu Ala Val

[0021] 65 70 75 80

[0022] Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu Ser

[0023] 85 90 95

[0024] Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu Ala

[0025] 100 105 110

[0026] Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser

[0027] 115 120 125

[0028] Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro Gly

[0029] 130 135 140

[0030] Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu

[0031] 145 150 155 160

[0032] Leu Gln Leu Asn His Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp

[0033] 165 170 175

[0034] Gln Gly Gly Pro Ala Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu

[0035] 180 185 190

[0036] Asp Lys Gly Gln Leu Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His

[0037] 195 200 205

[0038] Ile Gln Val Thr Leu Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His

[0039]	210	215	220
[0040]	His Pro Thr Thr Leu Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser		
[0041]	225	230	235
[0042]	Ile Ser Leu Leu Arg Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser		
[0043]	245	250	255
[0044]	Gln Arg Leu Thr Pro Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu		
[0045]	260	265	270
[0046]	Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly		
[0047]	275	280	285
[0048]	Val Gln Trp Val Arg Pro Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Glu Ser		
[0049]	290	295	300
[0050]	Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His Thr Gly Pro Gln		
[0051]	305	310	315
[0052]	Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala Leu Gly Arg Ser		
[0053]	325	330	335
[0054]	Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu Arg Ile His Arg		
[0055]	340	345	350
[0056]	Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu Ala Ile Cys Ser		
[0057]	355	360	365
[0058]	Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu Ala Val Gly Ile		
[0059]	370	375	380
[0060]	Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu Ser Phe His		
[0061]	385	390	395
[0062]	Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu Ala Arg Gly		
[0063]	405	410	415
[0064]	Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg Asn		
[0065]	420	425	430
[0066]	Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro Ala Ser Gly		
[0067]	435	440	445
[0068]	Gly Gly Gly Ser Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro		
[0069]	450	455	460
[0070]	Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile		
[0071]	465	470	475
[0072]	Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile		
[0073]	485	490	495
[0074]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln		
[0075]	500	505	510
[0076]	Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln		
[0077]	515	520	525



[0078]	Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu
[0079]	530 535 540
[0080]	Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys
[0081]	545 550 555 560
[0082]	Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys
[0083]	565 570 575
[0084]	Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Cys
[0085]	580 585 590
[0086]	Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Trp Cys Met Val Thr
[0087]	595 600 605
[0088]	Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys
[0089]	610 615 620
[0090]	Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
[0091]	625 630 635 640
[0092]	Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val
[0093]	645 650 655
[0094]	Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn
[0095]	660 665 670
[0096]	His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys Gly Ser Gly
[0097]	675 680 685
[0098]	Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
[0099]	690 695 700
[0100]	<210> 2
[0101]	<211> 240
[0102]	<212> PRT
[0103]	<213> Mus musculus
[0104]	<400> 2
[0105]	Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
[0106]	1 5 10 15
[0107]	Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
[0108]	20 25 30
[0109]	Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
[0110]	35 40 45
[0111]	Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
[0112]	50 55 60
[0113]	Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
[0114]	65 70 75 80
[0115]	Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val
[0116]	85 90 95

[0117]	Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
[0118]	100 105 110
[0119]	Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
[0120]	115 120 125
[0121]	Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Cys Val Leu
[0122]	130 135 140
[0123]	Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Ser Cys
[0124]	145 150 155 160
[0125]	Ala Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
[0126]	165 170 175
[0127]	Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp
[0128]	180 185 190
[0129]	Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Val Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
[0130]	195 200 205
[0131]	Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
[0132]	210 215 220
[0133]	Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
[0134]	225 230 235 240
[0135]	<210> 3
[0136]	<211> 120
[0137]	<212> PRT
[0138]	<213> Mus musculus
[0139]	<400> 3
[0140]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
[0141]	1 5 10 15
[0142]	Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
[0143]	20 25 30
[0144]	Ala Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
[0145]	35 40 45
[0146]	Gly Val Ile Trp Ser Thr Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
[0147]	50 55 60
[0148]	Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
[0149]	65 70 75 80
[0150]	Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asp Asp Ile Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
[0151]	85 90 95
[0152]	Arg Asn Pro Tyr Tyr Gly Asn Leu Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[0153]	100 105 110
[0154]	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0155]	115 120

[0156] <210> 4  
 [0157] <211> 360  
 [0158] <212> DNA  
 [0159] <213> Mus musculus  
 [0160] <400> 4  
 [0161] caggtgcagc tgcagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60  
 [0162] acctgcacag tctctggttt ctattaact acctatgctg tgcactgggt tcgccagtct 120  
 [0163] ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggagta ctggaatcac agactataat 180  
 [0164] gcagctttca tatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttcttt 240  
 [0165] aaaatgaaca gtctgcaatc tgatgacata gccatatact actgtgccag aaatccctac 300  
 [0166] tatggtaacc tcaatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360  
 [0167] <210> 5  
 [0168] <211> 9  
 [0169] <212> PRT  
 [0170] <213> Mus musculus  
 [0171] <400> 5  
 [0172] Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Ala Val His  
 [0173] 1 5  
 [0174] <210> 6  
 [0175] <211> 16  
 [0176] <212> PRT  
 [0177] <213> Mus musculus  
 [0178] <400> 6  
 [0179] Val Ile Trp Ser Thr Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser  
 [0180] 1 5 10 15  
 [0181] <210> 7  
 [0182] <211> 12  
 [0183] <212> PRT  
 [0184] <213> Mus musculus  
 [0185] <400> 7  
 [0186] Asn Pro Tyr Tyr Gly Asn Leu Asn Ala Met Asp Tyr  
 [0187] 1 5 10  
 [0188] <210> 8  
 [0189] <211> 111  
 [0190] <212> PRT  
 [0191] <213> Mus musculus  
 [0192] <400> 8  
 [0193] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0194] 1 5 10 15

[0195]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Thr Ser
[0196]	20 25 30
[0197]	Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
[0198]	35 40 45
[0199]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
[0200]	50 55 60
[0201]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
[0202]	65 70 75 80
[0203]	Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
[0204]	85 90 95
[0205]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0206]	100 105 110
[0207]	<210> 9
[0208]	<211> 333
[0209]	<212> DNA
[0210]	<213> Mus musculus
[0211]	<400> 9
[0212]	gacattgtgc tgacacagtc tcttgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60
[0213]	atctcatgca gggccagcaa aagtgtcgat acatctggct atagttttat gcaactgtac 120
[0214]	caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcactatc ttgcatccaa cctagaatct 180
[0215]	ggggtccttg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
[0216]	cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gcttcctctc 300
[0217]	acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 333
[0218]	<210> 10
[0219]	<211> 15
[0220]	<212> PRT
[0221]	<213> Mus musculus
[0222]	<400> 10
[0223]	Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Met His
[0224]	1 5 10 15
[0225]	<210> 11
[0226]	<211> 7
[0227]	<212> PRT
[0228]	<213> Mus musculus
[0229]	<400> 11
[0230]	Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
[0231]	1 5
[0232]	<210> 12
[0233]	<211> 9

[0234] <212> PRT  
 [0235] <213> Mus musculus  
 [0236] <400> 12  
 [0237] Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr  
 [0238] 1 5  
 [0239] <210> 13  
 [0240] <211> 120  
 [0241] <212> PRT  
 [0242] <213> Mus musculus  
 [0243] <400> 13  
 [0244] Glu Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
 [0245] 1 5 10 15  
 [0246] Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr  
 [0247] 20 25 30  
 [0248] Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 [0249] 35 40 45  
 [0250] Gly Val Ile Trp Ser Thr Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile  
 [0251] 50 55 60  
 [0252] Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
 [0253] 65 70 75 80  
 [0254] Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 [0255] 85 90 95  
 [0256] Arg Asn Ser Tyr Tyr Gly Asn Leu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 [0257] 100 105 110  
 [0258] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 [0259] 115 120  
 [0260] <210> 14  
 [0261] <211> 360  
 [0262] <212> DNA  
 [0263] <213> Mus musculus  
 [0264] <400> 14  
 [0265] gaggtgcagc tgaagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60  
 [0266] acctgcacag tctctggttt ttcattaact acctatgggtg tacactgggt tcgccagtct 120  
 [0267] ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggagta ctggaatcac agactataat 180  
 [0268] gcagctttca tatccagact gagcatcagt aaggacaatt ccaagagcca agtcttcttt 240  
 [0269] aaaatgaaca gtctgcaagc tgatgacaca gccatatatt actgtgccag aaattcctac 300  
 [0270] tatggtaacc tttatgttat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360  
 [0271] <210> 15  
 [0272] <211> 9

[0273] <212> PRT  
 [0274] <213> Mus musculus  
 [0275] <400> 15  
 [0276] Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Gly Val His  
 [0277] 1 5  
 [0278] <210> 16  
 [0279] <211> 12  
 [0280] <212> PRT  
 [0281] <213> Mus musculus  
 [0282] <400> 16  
 [0283] Asn Ser Tyr Tyr Gly Asn Leu Tyr Val Met Asp Tyr  
 [0284] 1 5 10  
 [0285] <210> 17  
 [0286] <211> 111  
 [0287] <212> PRT  
 [0288] <213> Mus musculus  
 [0289] <400> 17  
 [0290] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0291] 1 5 10 15  
 [0292] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser  
 [0293] 20 25 30  
 [0294] Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 [0295] 35 40 45  
 [0296] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 [0297] 50 55 60  
 [0298] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 [0299] 65 70 75 80  
 [0300] Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 [0301] 85 90 95  
 [0302] Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 [0303] 100 105 110  
 [0304] <210> 18  
 [0305] <211> 333  
 [0306] <212> DNA  
 [0307] <213> Mus musculus  
 [0308] <400> 18  
 [0309] gacattgtgc taacacagtc tcttgcttcc ttagctgtgt ctctggggca gagggccacc 60  
 [0310] atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt gcactctggct ataattttat gcaactggat 120  
 [0311] caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcactctatc ttgcatccaa cctagaatct 180

[0312] ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240  
 [0313] cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gcttccgctc 300  
 [0314] acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 333  
 [0315] <210> 19  
 [0316] <211> 15  
 [0317] <212> PRT  
 [0318] <213> Mus musculus  
 [0319] <400> 19  
 [0320] Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Met His  
 [0321] 1 5 10 15  
 [0322] <210> 20  
 [0323] <211> 120  
 [0324] <212> PRT  
 [0325] <213> Mus musculus  
 [0326] <400> 20  
 [0327] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
 [0328] 1 5 10 15  
 [0329] Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr  
 [0330] 20 25 30  
 [0331] Ala Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 [0332] 35 40 45  
 [0333] Gly Val Ile Trp Ser Thr Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile  
 [0334] 50 55 60  
 [0335] Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
 [0336] 65 70 75 80  
 [0337] Lys Met Asp Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala  
 [0338] 85 90 95  
 [0339] Arg Asn Pro His Tyr Gly Asn Leu Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 [0340] 100 105 110  
 [0341] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 [0342] 115 120  
 [0343] <210> 21  
 [0344] <211> 360  
 [0345] <212> DNA  
 [0346] <213> Mus musculus  
 [0347] <400> 21  
 [0348] caggtgcagc tgcagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60  
 [0349] acctgcacag tctctggttt ctcattaact acctatgctg tgcactgggt tcgccagtct 120  
 [0350] ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta atatggagta ctggaatcac agactataat 180

[0351] gcagctttca tatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttcttt 240  
 [0352] aaaatggaca gtctgcaatc tgatgacaca gccatatact tctgtgccag aaatccccac 300  
 [0353] tatggtaatc tcaatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360  
 [0354] <210> 22  
 [0355] <211> 12  
 [0356] <212> PRT  
 [0357] <213> Mus musculus  
 [0358] <400> 22  
 [0359] Asn Pro His Tyr Gly Asn Leu Asn Ala Met Asp Tyr  
 [0360] 1 5 10  
 [0361] <210> 23  
 [0362] <211> 111  
 [0363] <212> PRT  
 [0364] <213> Mus musculus  
 [0365] <400> 23  
 [0366] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0367] 1 5 10 15  
 [0368] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser  
 [0369] 20 25 30  
 [0370] Gly Tyr Thr Trp Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
 [0371] 35 40 45  
 [0372] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 [0373] 50 55 60  
 [0374] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 [0375] 65 70 75 80  
 [0376] Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 [0377] 85 90 95  
 [0378] Glu Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0379] 100 105 110  
 [0380] <210> 24  
 [0381] <211> 333  
 [0382] <212> DNA  
 [0383] <213> Mus musculus  
 [0384] <400> 24  
 [0385] gacattgtgc tgacacagtc tcttgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60  
 [0386] atctcatgca gggccagcaa aagcgtcagt gcactctggct atacttggat gcaactggta 120  
 [0387] caacagaaac caggacaggc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagaatct 180  
 [0388] ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240  
 [0389] cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gcttcctccg 300



[0390] acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333  
 [0391] <210> 25  
 [0392] <211> 15  
 [0393] <212> PRT  
 [0394] <213> Mus musculus  
 [0395] <400> 25  
 [0396] Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser Gly Tyr Thr Trp Met His  
 [0397] 1 5 10 15  
 [0398] <210> 26  
 [0399] <211> 9  
 [0400] <212> PRT  
 [0401] <213> Mus musculus  
 [0402] <400> 26  
 [0403] Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Pro Thr  
 [0404] 1 5  
 [0405] <210> 27  
 [0406] <211> 120  
 [0407] <212> PRT  
 [0408] <213> Mus musculus  
 [0409] <400> 27  
 [0410] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 [0411] 1 5 10 15  
 [0412] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 [0413] 20 25 30  
 [0414] Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0415] 35 40 45  
 [0416] Gly Tyr Leu His Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 [0417] 50 55 60  
 [0418] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [0419] 65 70 75 80  
 [0420] Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0421] 85 90 95  
 [0422] Ala Arg Arg Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ala Trp Phe Ala Asp Trp Gly Gln  
 [0423] 100 105 110  
 [0424] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 [0425] 115 120  
 [0426] <210> 28  
 [0427] <211> 360  
 [0428] <212> DNA

[0429] <213> Mus musculus  
 [0430] <400> 28  
 [0431] gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60  
 [0432] tcctgcaagg cttctggata cacattcact gactatgtta tacactgggt gaagcagaag 120  
 [0433] cctgggcagg gccttgagtg gattggatat cttcatcctt acaatgatga tactaagtac 180  
 [0434] aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 [0435] atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacggggg 300  
 [0436] tactatgatt acgcctgggt tgctgactgg ggccaaggga ctctgggtcac tgtctctgca 360  
 [0437] <210> 29  
 [0438] <211> 9  
 [0439] <212> PRT  
 [0440] <213> Mus musculus  
 [0441] <400> 29  
 [0442] Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Ile His  
 [0443] 1 5  
 [0444] <210> 30  
 [0445] <211> 17  
 [0446] <212> PRT  
 [0447] <213> Mus musculus  
 [0448] <400> 30  
 [0449] Tyr Leu His Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 [0450] 1 5 10 15  
 [0451] Gly  
 [0452] <210> 31  
 [0453] <211> 11  
 [0454] <212> PRT  
 [0455] <213> Mus musculus  
 [0456] <400> 31  
 [0457] Arg Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ala Trp Phe Ala Asp  
 [0458] 1 5 10  
 [0459] <210> 32  
 [0460] <211> 111  
 [0461] <212> PRT  
 [0462] <213> Mus musculus  
 [0463] <400> 32  
 [0464] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0465] 1 5 10 15  
 [0466] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser  
 [0467] 20 25 30

[0468]	Gly Tyr Thr Trp Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Gln Ala Pro
[0469]	35 40 45
[0470]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
[0471]	50 55 60
[0472]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
[0473]	65 70 75 80
[0474]	Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
[0475]	85 90 95
[0476]	Glu Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0477]	100 105 110
[0478]	<210> 33
[0479]	<211> 333
[0480]	<212> DNA
[0481]	<213> Mus musculus
[0482]	<400> 33
[0483]	gacattgtgc taacacagtc tcttgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60
[0484]	atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt gcatctggct atacttggat aacttggtac 120
[0485]	caacagaaac caagacaggc acccaaactt ctcactatc ttgcatccaa cctagaatct 180
[0486]	ggggtcctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
[0487]	cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga acttcctccg 300
[0488]	acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333
[0489]	<210> 34
[0490]	<211> 15
[0491]	<212> PRT
[0492]	<213> Mus musculus
[0493]	<400> 34
[0494]	Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser Gly Tyr Thr Trp Ile His
[0495]	1 5 10 15
[0496]	<210> 35
[0497]	<211> 120
[0498]	<212> PRT
[0499]	<213> Mus musculus
[0500]	<400> 35
[0501]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
[0502]	1 5 10 15
[0503]	Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
[0504]	20 25 30
[0505]	Ala Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
[0506]	35 40 45

[0507] Gly Val Ile Trp Ser Val Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile  
 [0508] 50 55 60  
 [0509] Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
 [0510] 65 70 75 80  
 [0511] Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 [0512] 85 90 95  
 [0513] Arg Asn Ile Tyr Tyr Gly Asn Val Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 [0514] 100 105 110  
 [0515] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 [0516] 115 120  
 [0517] <210> 36  
 [0518] <211> 360  
 [0519] <212> DNA  
 [0520] <213> Mus musculus  
 [0521] <400> 36  
 [0522] caggtgcagc tgcagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60  
 [0523] acctgcacag tctctggttt ctcattaact acctatgctg tacactgggt tcgccagtct 120  
 [0524] ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatggagtg ttggaagcac agactataat 180  
 [0525] gcagctttca tatccagact gagcatcagc aaggacaatt ccaagagcca agttttcttt 240  
 [0526] aaaatgaaca gtctgcaagc tgatgacaca gccatatatt actgtgccag aaatatctac 300  
 [0527] tatggtaatg tttatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360  
 [0528] <210> 37  
 [0529] <211> 16  
 [0530] <212> PRT  
 [0531] <213> Mus musculus  
 [0532] <400> 37  
 [0533] Val Ile Trp Ser Val Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser  
 [0534] 1 5 10 15  
 [0535] <210> 38  
 [0536] <211> 12  
 [0537] <212> PRT  
 [0538] <213> Mus musculus  
 [0539] <400> 38  
 [0540] Asn Ile Tyr Tyr Gly Asn Val Tyr Ala Met Asp Tyr  
 [0541] 1 5 10  
 [0542] <210> 39  
 [0543] <211> 111  
 [0544] <212> PRT  
 [0545] <213> Mus musculus

[0546] <400> 39  
 [0547] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0548] 1 5 10 15  
 [0549] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ala Ser  
 [0550] 20 25 30  
 [0551] Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro  
 [0552] 35 40 45  
 [0553] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 [0554] 50 55 60  
 [0555] Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 [0556] 65 70 75 80  
 [0557] Pro Val Glu Glu Gly Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 [0558] 85 90 95  
 [0559] Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0560] 100 105 110  
 [0561] <210> 40  
 [0562] <211> 333  
 [0563] <212> DNA  
 [0564] <213> Mus musculus  
 [0565] <400> 40  
 [0566] gacattgtgc taacacagtc tcttgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60  
 [0567] atctcatgca gggccagcaa aagtgtcgat gcatctggct atagttttat gacttggtac 120  
 [0568] caacagaaag caggacagcc acccaaactc ctcattatc ttgcatccaa cctagaatct 180  
 [0569] ggggtccctg ccaggttcag tggcaggggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240  
 [0570] cctgtggagg aggggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gcttcctctc 300  
 [0571] acgttcgggg ctgggaccaa gctggaaatc aaa 333  
 [0572] <210> 41  
 [0573] <211> 15  
 [0574] <212> PRT  
 [0575] <213> Mus musculus  
 [0576] <400> 41  
 [0577] Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Met His  
 [0578] 1 5 10 15  
 [0579] <210> 42  
 [0580] <211> 119  
 [0581] <212> PRT  
 [0582] <213> Mus musculus  
 [0583] <400> 42  
 [0584] Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

[0585] 1 5 10 15  
 [0586] Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 [0587] 20 25 30  
 [0588] Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
 [0589] 35 40 45  
 [0590] Gly Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 [0591] 50 55 60  
 [0592] Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 [0593] 65 70 75 80  
 [0594] Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys  
 [0595] 85 90 95  
 [0596] Ala Arg Glu Glu Asp Tyr Arg Tyr Val Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [0597] 100 105 110  
 [0598] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 [0599] 115  
 [0600] <210> 43  
 [0601] <211> 357  
 [0602] <212> DNA  
 [0603] <213> Mus musculus  
 [0604] <400> 43  
 [0605] gagatccagc tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac tgtcaagatc 60  
 [0606] tcctgcaagg cttctggata taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcagact 120  
 [0607] ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataacaccg acactggaga gccaacatat 180  
 [0608] gctgatgact tcaagggacg gtttgcttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240  
 [0609] ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac atggctacat atttctgtgc aagagaggag 300  
 [0610] gactataggt acgtttttaa ttactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca 357  
 [0611] <210> 44  
 [0612] <211> 9  
 [0613] <212> PRT  
 [0614] <213> Mus musculus  
 [0615] <400> 44  
 [0616] Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn  
 [0617] 1 5  
 [0618] <210> 45  
 [0619] <211> 17  
 [0620] <212> PRT  
 [0621] <213> Mus musculus  
 [0622] <400> 45  
 [0623] Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

[0624]	1	5	10	15
[0625]	Gly			
[0626]	<210> 46			
[0627]	<211> 10			
[0628]	<212> PRT			
[0629]	<213> Mus musculus			
[0630]	<400> 46			
[0631]	Glu Glu Asp Tyr Arg Tyr Val Phe Asn Tyr			
[0632]	1	5	10	
[0633]	<210> 47			
[0634]	<211> 107			
[0635]	<212> PRT			
[0636]	<213> Mus musculus			
[0637]	<400> 47			
[0638]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
[0639]	1	5	10	15
[0640]	Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr			
[0641]		20	25	30
[0642]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile			
[0643]		35	40	45
[0644]	Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0645]		50	55	60
[0646]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln			
[0647]		65	70	75
[0648]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Val Thr Leu Pro Leu			
[0649]		85	90	95
[0650]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys			
[0651]		100	105	
[0652]	<210> 48			
[0653]	<211> 321			
[0654]	<212> DNA			
[0655]	<213> Mus musculus			
[0656]	<400> 48			
[0657]	gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60			
[0658]	atcagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120			
[0659]	gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180			
[0660]	aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240			
[0661]	gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtgttacgc ttctctcac gttcgggtgct 300			
[0662]	gggaccaagc tggagctgaa a 321			

[0663] <210> 49  
 [0664] <211> 11  
 [0665] <212> PRT  
 [0666] <213> Mus musculus  
 [0667] <400> 49  
 [0668] Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
 [0669] 1 5 10  
 [0670] <210> 50  
 [0671] <211> 7  
 [0672] <212> PRT  
 [0673] <213> Mus musculus  
 [0674] <400> 50  
 [0675] Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser  
 [0676] 1 5  
 [0677] <210> 51  
 [0678] <211> 9  
 [0679] <212> PRT  
 [0680] <213> Mus musculus  
 [0681] <400> 51  
 [0682] Gln Gln Gly Val Thr Leu Pro Leu Thr  
 [0683] 1 5  
 [0684] <210> 52  
 [0685] <211> 121  
 [0686] <212> PRT  
 [0687] <213> Mus musculus  
 [0688] <400> 52  
 [0689] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 [0690] 1 5 10 15  
 [0691] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asp Tyr  
 [0692] 20 25 30  
 [0693] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 [0694] 35 40 45  
 [0695] Gly Asp Ile Tyr Pro Asn Asp Gly Gly Pro Asn Asn Asn Gln Lys Phe  
 [0696] 50 55 60  
 [0697] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [0698] 65 70 75 80  
 [0699] Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0700] 85 90 95  
 [0701] Ala Arg Pro Phe Tyr Tyr Gly Asn Tyr Ala Gly Phe Ala Phe Trp Gly



[0702]	100	105	110
[0703]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala		
[0704]	115	120	
[0705]	<210> 53		
[0706]	<211> 363		
[0707]	<212> DNA		
[0708]	<213> Mus musculus		
[0709]	<400> 53		
[0710]	caggttcagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata	60	
[0711]	tcctgcaaga cttctggata cacattcgct gattacacca tgcactgggt gaggcagagc	120	
[0712]	caaggaaaga gccttgagtg gattggagat atttataccta acgatgggtg tcctaacaac	180	
[0713]	aaccagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac	240	
[0714]	atggagctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct attactgtgc aagaccgttc	300	
[0715]	tattatggta actacgcggg atttgctttc tggggccaag ggactctggt cactgtctct	360	
[0716]	gca	363	
[0717]	<210> 54		
[0718]	<211> 9		
[0719]	<212> PRT		
[0720]	<213> Mus musculus		
[0721]	<400> 54		
[0722]	Tyr Thr Phe Ala Asp Tyr Thr Met His		
[0723]	1	5	
[0724]	<210> 55		
[0725]	<211> 17		
[0726]	<212> PRT		
[0727]	<213> Mus musculus		
[0728]	<400> 55		
[0729]	Asp Ile Tyr Pro Asn Asp Gly Gly Pro Asn Asn Asn Gln Lys Phe Lys		
[0730]	1	5	10 15
[0731]	Asp		
[0732]	<210> 56		
[0733]	<211> 12		
[0734]	<212> PRT		
[0735]	<213> Mus musculus		
[0736]	<400> 56		
[0737]	Pro Phe Tyr Tyr Gly Asn Tyr Ala Gly Phe Ala Phe		
[0738]	1	5	10
[0739]	<210> 57		
[0740]	<211> 106		

[0741] <212> PRT  
 [0742] <213> Mus musculus  
 [0743] <400> 57  
 [0744] Glu Met Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 [0745] 1 5 10 15  
 [0746] Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 [0747] 20 25 30  
 [0748] Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 [0749] 35 40 45  
 [0750] Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser  
 [0751] 50 55 60  
 [0752] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu  
 [0753] 65 70 75 80  
 [0754] Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
 [0755] 85 90 95  
 [0756] Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 [0757] 100 105  
 [0758] <210> 58  
 [0759] <211> 318  
 [0760] <212> DNA  
 [0761] <213> Mus musculus  
 [0762] <400> 58  
 [0763] gaaatggttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60  
 [0764] atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgtact ggtaccagca gaagccagga 120  
 [0765] tcctccccc gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc 180  
 [0766] ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgaa 240  
 [0767] gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagttacc cgctcacgtt cgggtctggg 300  
 [0768] accagactgg aaataaaa 318  
 [0769] <210> 59  
 [0770] <211> 10  
 [0771] <212> PRT  
 [0772] <213> Mus musculus  
 [0773] <400> 59  
 [0774] Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr  
 [0775] 1 5 10  
 [0776] <210> 60  
 [0777] <211> 7  
 [0778] <212> PRT  
 [0779] <213> Mus musculus

[0780] <400> 60  
 [0781] Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
 [0782] 1 5  
 [0783] <210> 61  
 [0784] <211> 9  
 [0785] <212> PRT  
 [0786] <213> Mus musculus  
 [0787] <400> 61  
 [0788] Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
 [0789] 1 5  
 [0790] <210> 62  
 [0791] <211> 120  
 [0792] <212> PRT  
 [0793] <213> Mus musculus  
 [0794] <400> 62  
 [0795] Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
 [0796] 1 5 10 15  
 [0797] Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr  
 [0798] 20 25 30  
 [0799] Ala Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 [0800] 35 40 45  
 [0801] Gly Val Ile Trp Ser Thr Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ala Asp Phe Ile  
 [0802] 50 55 60  
 [0803] Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
 [0804] 65 70 75 80  
 [0805] Lys Met Asp Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala  
 [0806] 85 90 95  
 [0807] Arg Asn His Tyr Tyr Gly Asn Leu Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 [0808] 100 105 110  
 [0809] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 [0810] 115 120  
 [0811] <210> 63  
 [0812] <211> 360  
 [0813] <212> DNA  
 [0814] <213> Mus musculus  
 [0815] <400> 63  
 [0816] gaggtccagc tgcaggagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctatccatc 60  
 [0817] acctgcacag tctctggttt ctcattaact acctatgctg tacactgggt tcgccagtct 120  
 [0818] ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta atatggagta ctggaatcac agactataat 180

[0819] gcagatttca tatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttcttt 240  
 [0820] aaaatggaca gtctgcaatc tgatgacaca gccatatact tctgtgccag aaatcactac 300  
 [0821] tatggcaatc tcaatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360  
 [0822] <210> 64  
 [0823] <211> 16  
 [0824] <212> PRT  
 [0825] <213> Mus musculus  
 [0826] <400> 64  
 [0827] Val Ile Trp Ser Thr Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ala Asp Phe Ile Ser  
 [0828] 1 5 10 15  
 [0829] <210> 65  
 [0830] <211> 12  
 [0831] <212> PRT  
 [0832] <213> Mus musculus  
 [0833] <400> 65  
 [0834] Asn His Tyr Tyr Gly Asn Leu Asn Ala Met Asp Tyr  
 [0835] 1 5 10  
 [0836] <210> 66  
 [0837] <211> 111  
 [0838] <212> PRT  
 [0839] <213> Mus musculus  
 [0840] <400> 66  
 [0841] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0842] 1 5 10 15  
 [0843] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
 [0844] 20 25 30  
 [0845] Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 [0846] 35 40 45  
 [0847] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 [0848] 50 55 60  
 [0849] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 [0850] 65 70 75 80  
 [0851] Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 [0852] 85 90 95  
 [0853] Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0854] 100 105 110  
 [0855] <210> 67  
 [0856] <211> 333  
 [0857] <212> DNA

[0858] <213> Mus musculus  
 [0859] <400> 67  
 [0860] gacattgtgc taacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60  
 [0861] atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttttat gcaactggtag 120  
 [0862] caacagaaac caggacagcc acccaaacctc ctcatctatc ttgcatccaa cctagaatct 180  
 [0863] ggggtccctg ccaggttcag tggcagtgagg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240  
 [0864] cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gcttccgtac 300  
 [0865] acgttcggag gggggaccaa gctggaaatc aaa 333  
 [0866] <210> 68  
 [0867] <211> 15  
 [0868] <212> PRT  
 [0869] <213> Mus musculus  
 [0870] <400> 68  
 [0871] Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Met His  
 [0872] 1 5 10 15  
 [0873] <210> 69  
 [0874] <211> 9  
 [0875] <212> PRT  
 [0876] <213> Mus musculus  
 [0877] <400> 69  
 [0878] Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Tyr Thr  
 [0879] 1 5  
 [0880] <210> 70  
 [0881] <211> 120  
 [0882] <212> PRT  
 [0883] <213> Mus musculus  
 [0884] <400> 70  
 [0885] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 [0886] 1 5 10 15  
 [0887] Ser Leu Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 [0888] 20 25 30  
 [0889] Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0890] 35 40 45  
 [0891] Gly Tyr Leu His Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 [0892] 50 55 60  
 [0893] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [0894] 65 70 75 80  
 [0895] Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0896] 85 90 95

[0897] Ala Arg Arg Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ala Trp Phe Ala Asp Trp Gly Gln  
 [0898] 100 105 110  
 [0899] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 [0900] 115 120  
 [0901] <210> 71  
 [0902] <211> 360  
 [0903] <212> DNA  
 [0904] <213> Mus musculus  
 [0905] <400> 71  
 [0906] gaggtccagt tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc actgaagatg 60  
 [0907] tcttgcaagg cttctggata cacattcact gactatgta tacactgggt gaagcagaag 120  
 [0908] cctgggcagg gccttgagtg gattggatat cttcatcctt acaatgatga tactaagtac 180  
 [0909] aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 [0910] atggaactca acagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaggcggggg 300  
 [0911] tactatgatt acgcctggtt tgctgactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 360  
 [0912] <210> 72  
 [0913] <211> 111  
 [0914] <212> PRT  
 [0915] <213> Mus musculus  
 [0916] <400> 72  
 [0917] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0918] 1 5 10 15  
 [0919] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser  
 [0920] 20 25 30  
 [0921] Gly Tyr Thr Trp Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
 [0922] 35 40 45  
 [0923] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 [0924] 50 55 60  
 [0925] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 [0926] 65 70 75 80  
 [0927] Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 [0928] 85 90 95  
 [0929] Glu Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0930] 100 105 110  
 [0931] <210> 73  
 [0932] <211> 333  
 [0933] <212> DNA  
 [0934] <213> Mus musculus  
 [0935] <400> 73

[0936] gacattgtgc taacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60  
 [0937] atctcatgca aggccagcaa aagtgtcagt gcactctggct atacttggat gcaactggtac 120  
 [0938] caacagaaac caggacaggc acccaaaactc ctcactctatc ttgcatccaa cctagaatct 180  
 [0939] ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240  
 [0940] cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gcttcctccg 300  
 [0941] acgttcgggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333  
 [0942] <210> 74  
 [0943] <211> 15  
 [0944] <212> PRT  
 [0945] <213> Mus musculus  
 [0946] <400> 74  
 [0947] Lys Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser Gly Tyr Thr Trp Met His  
 [0948] 1 5 10 15  
 [0949] <210> 75  
 [0950] <211> 119  
 [0951] <212> PRT  
 [0952] <213> Mus musculus  
 [0953] <400> 75  
 [0954] Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu  
 [0955] 1 5 10 15  
 [0956] Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 [0957] 20 25 30  
 [0958] Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met  
 [0959] 35 40 45  
 [0960] Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 [0961] 50 55 60  
 [0962] Thr Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 [0963] 65 70 75 80  
 [0964] Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Ala Tyr Phe Cys  
 [0965] 85 90 95  
 [0966] Ala Arg Glu Glu Asp Tyr Arg Tyr Val Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [0967] 100 105 110  
 [0968] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 [0969] 115  
 [0970] <210> 76  
 [0971] <211> 357  
 [0972] <212> DNA  
 [0973] <213> Mus musculus  
 [0974] <400> 76

[0975] gagatccagt tggatgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60  
 [0976] tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct 120  
 [0977] ccaggacagg gtttaaagtg gatgggctgg ataacacct atactggaga gccaacatat 180  
 [0978] gctgatgact tcacgggacg gtttgcttc tccttgaaa cctctgccag cactgcctat 240  
 [0979] ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac atggctgcat atttctgtgc aagagaggag 300  
 [0980] gactataggt acgtttttaa ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca 357  
 [0981] <210> 77  
 [0982] <211> 17  
 [0983] <212> PRT  
 [0984] <213> Mus musculus  
 [0985] <400> 77  
 [0986] Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Thr  
 [0987] 1 5 10 15  
 [0988] Gly  
 [0989] <210> 78  
 [0990] <211> 107  
 [0991] <212> PRT  
 [0992] <213> Mus musculus  
 [0993] <400> 78  
 [0994] Asp Ile Gln Met Ile Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 [0995] 1 5 10 15  
 [0996] Asn Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 [0997] 20 25 30  
 [0998] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 [0999] 35 40 45  
 [1000] Tyr Asp Thr Ser Arg Leu His Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [1001] 50 55 60  
 [1002] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 [1003] 65 70 75 80  
 [1004] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Val Thr Leu Pro Leu  
 [1005] 85 90 95  
 [1006] Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [1007] 100 105  
 [1008] <210> 79  
 [1009] <211> 321  
 [1010] <212> DNA  
 [1011] <213> Mus musculus  
 [1012] <400> 79  
 [1013] gacatccaga tgattcagtc tacatctctcc ctgtctgcct ctctgggaaa cagagtcacc 60



[1014] atcagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120  
 [1015] gatggaactg ttaaactcct gatctacgac acatcaagat tacacgcagg agtcccatca 180  
 [1016] aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240  
 [1017] gaagatatcg ccacttactt ttgccaacag ggtgttacgc ttcctctcac gttcgggtgct 300  
 [1018] gggaccaagc tggaaataaa a 321  
 [1019] <210> 80  
 [1020] <211> 7  
 [1021] <212> PRT  
 [1022] <213> Mus musculus  
 [1023] <400> 80  
 [1024] Asp Thr Ser Arg Leu His Ala  
 [1025] 1 5  
 [1026] <210> 81  
 [1027] <211> 120  
 [1028] <212> PRT  
 [1029] <213> Mus musculus  
 [1030] <400> 81  
 [1031] Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
 [1032] 1 5 10 15  
 [1033] Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr  
 [1034] 20 25 30  
 [1035] Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 [1036] 35 40 45  
 [1037] Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Phe Asn Ala Ala Phe Ile  
 [1038] 50 55 60  
 [1039] Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
 [1040] 65 70 75 80  
 [1041] Lys Val Ile Ser Leu Gln Ala Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Gly  
 [1042] 85 90 95  
 [1043] Arg Asn Ser Tyr Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 [1044] 100 105 110  
 [1045] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 [1046] 115 120  
 [1047] <210> 82  
 [1048] <211> 360  
 [1049] <212> DNA  
 [1050] <213> Mus musculus  
 [1051] <400> 82  
 [1052] caggtccagc tgaagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60

[1053] acctgcacag tctctggttt ctcattaact agctatggta tacactgggt tcgccagtct 120  
 [1054] ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggagtg gtggaagcac agactttaat 180  
 [1055] gcagctttca tatcaagact gagcatcagc aaggacaatt ccaagagcca agttttcttt 240  
 [1056] aaagtgatca gtctgcaagc taatgacaca gccatatatt actgtggcag aaattcctac 300  
 [1057] tatggtaatc tctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360  
 [1058] <210> 83  
 [1059] <211> 9  
 [1060] <212> PRT  
 [1061] <213> Mus musculus  
 [1062] <400> 83  
 [1063] Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Ile His  
 [1064] 1 5  
 [1065] <210> 84  
 [1066] <211> 16  
 [1067] <212> PRT  
 [1068] <213> Mus musculus  
 [1069] <400> 84  
 [1070] Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Phe Asn Ala Ala Phe Ile Ser  
 [1071] 1 5 10 15  
 [1072] <210> 85  
 [1073] <211> 12  
 [1074] <212> PRT  
 [1075] <213> Mus musculus  
 [1076] <400> 85  
 [1077] Asn Ser Tyr Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr  
 [1078] 1 5 10  
 [1079] <210> 86  
 [1080] <211> 111  
 [1081] <212> PRT  
 [1082] <213> Mus musculus  
 [1083] <400> 86  
 [1084] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [1085] 1 5 10 15  
 [1086] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser  
 [1087] 20 25 30  
 [1088] Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 [1089] 35 40 45  
 [1090] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 [1091] 50 55 60



[1131]	Lys Met Ile Ser Leu Gln Pro Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Gly
[1132]	85 90 95
[1133]	Arg Asn Ser Tyr Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[1134]	100 105 110
[1135]	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[1136]	115 120
[1137]	<210> 90
[1138]	<211> 360
[1139]	<212> DNA
[1140]	<213> Mus musculus
[1141]	<400> 90
[1142]	caggtgcagc tgcagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60
[1143]	acctgcacag tctctggttt ctcattaact acctatgctg ttcactgggt tcgccagtct 120
[1144]	ccaggacagg gtctggagtg gctgggagtg atatggagta ctggaatcac agactttaat 180
[1145]	gcagctttca tatcaagact gaacatcaac aaagacagtt ccaagagcca gattttcttt 240
[1146]	aaaatgatca gtctgcaacc taatgacaca gccatatatt actgtggcag aaattcctac 300
[1147]	tatggtaatc tctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360
[1148]	<210> 91
[1149]	<211> 16
[1150]	<212> PRT
[1151]	<213> Mus musculus
[1152]	<400> 91
[1153]	Val Ile Trp Ser Thr Gly Ile Thr Asp Phe Asn Ala Ala Phe Ile Ser
[1154]	1 5 10 15
[1155]	<210> 92
[1156]	<211> 111
[1157]	<212> PRT
[1158]	<213> Mus musculus
[1159]	<400> 92
[1160]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[1161]	1 5 10 15
[1162]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser
[1163]	20 25 30
[1164]	Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
[1165]	35 40 45
[1166]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
[1167]	50 55 60
[1168]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
[1169]	65 70 75 80

[1170] Pro Val Glu Glu Gly Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 [1171] 85 90 95  
 [1172] Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 [1173] 100 105 110  
 [1174] <210> 93  
 [1175] <211> 333  
 [1176] <212> DNA  
 [1177] <213> Mus musculus  
 [1178] <400> 93  
 [1179] gacattgtgc tgacacagtc tctacttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60  
 [1180] atctcatgca gggccagtaa aagtgtcagt gcatctggct ataattttat gacttggtac 120  
 [1181] caacagaaac caggtcagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagaatct 180  
 [1182] ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgagacag acttcaccct caacatccat 240  
 [1183] cctgtggagg aggggatgc tgcaacctat tactgtcaac acagtcggga gcttcctctc 300  
 [1184] acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 333  
 [1185] <210> 94  
 [1186] <211> 120  
 [1187] <212> PRT  
 [1188] <213> Mus musculus  
 [1189] <400> 94  
 [1190] Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
 [1191] 1 5 10 15  
 [1192] Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Asn Phe Ser Leu Ser Thr Tyr  
 [1193] 20 25 30  
 [1194] Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 [1195] 35 40 45  
 [1196] Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile  
 [1197] 50 55 60  
 [1198] Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
 [1199] 65 70 75 80  
 [1200] Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 [1201] 85 90 95  
 [1202] Arg Asn Asn Tyr Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 [1203] 100 105 110  
 [1204] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 [1205] 115 120  
 [1206] <210> 95  
 [1207] <211> 360  
 [1208] <212> DNA

[1209] <213> Mus musculus  
 [1210] <400> 95  
 [1211] caggtccagc tgaagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60  
 [1212] acctgcacag tctctaattt ctcattaagt acctatgggtg tacactgggtg tcgccagtct 120  
 [1213] ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atctgggggtg gtggatacac agactataat 180  
 [1214] gcagctttca tatccagact gaccatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttcttt 240  
 [1215] aaaatgaaca gtctgcaagc tgatgacaca gccatatatt attgtgccag aaataactac 300  
 [1216] tatggtaacc tctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360  
 [1217] <210> 96  
 [1218] <211> 9  
 [1219] <212> PRT  
 [1220] <213> Mus musculus  
 [1221] <400> 96  
 [1222] Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly Val His  
 [1223] 1 5  
 [1224] <210> 97  
 [1225] <211> 16  
 [1226] <212> PRT  
 [1227] <213> Mus musculus  
 [1228] <400> 97  
 [1229] Val Ile Trp Gly Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser  
 [1230] 1 5 10 15  
 [1231] <210> 98  
 [1232] <211> 12  
 [1233] <212> PRT  
 [1234] <213> Mus musculus  
 [1235] <400> 98  
 [1236] Asn Asn Tyr Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr  
 [1237] 1 5 10  
 [1238] <210> 99  
 [1239] <211> 111  
 [1240] <212> PRT  
 [1241] <213> Mus musculus  
 [1242] <400> 99  
 [1243] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 [1244] 1 5 10 15  
 [1245] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Asn Lys Ser Val Ser Ala Ser  
 [1246] 20 25 30  
 [1247] Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

[1248]	35	40	45
[1249]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Asp Ser Gly Val Pro Ala		
[1250]	50	55	60
[1251]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His		
[1252]	65	70	75
[1253]	Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		
[1254]	85	90	95
[1255]	Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
[1256]	100	105	110
[1257]	<210> 100		
[1258]	<211> 333		
[1259]	<212> DNA		
[1260]	<213> Mus musculus		
[1261]	<400> 100		
[1262]	gacattgtgc tgacacagtc tcttgcttcc ttacctgtat ctctggggca gagggccacc	60	
[1263]	atctcatgca gggccaacaa aagtgtcagt gcatctggct atagttttat gcaactggat	120	
[1264]	caacagaaac caggacagcc acccaaacctc ctcatctatc ttgcatccaa cctagattct	180	
[1265]	ggggtccttg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	240	
[1266]	cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gtttccgctc	300	
[1267]	acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa	333	
[1268]	<210> 101		
[1269]	<211> 15		
[1270]	<212> PRT		
[1271]	<213> Mus musculus		
[1272]	<400> 101		
[1273]	Arg Ala Asn Lys Ser Val Ser Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Met His		
[1274]	1	5	10
[1275]	<210> 102		
[1276]	<211> 7		
[1277]	<212> PRT		
[1278]	<213> Mus musculus		
[1279]	<400> 102		
[1280]	Leu Ala Ser Asn Leu Asp Ser		
[1281]	1	5	
[1282]	<210> 103		
[1283]	<211> 9		
[1284]	<212> PRT		
[1285]	<213> Mus musculus		
[1286]	<400> 103		

[1287]	Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr
[1288]	1 5
[1289]	<210> 104
[1290]	<211> 120
[1291]	<212> PRT
[1292]	<213> Mus musculus
[1293]	<400> 104
[1294]	Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
[1295]	1 5 10 15
[1296]	Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
[1297]	20 25 30
[1298]	Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
[1299]	35 40 45
[1300]	Gly Val Ile Trp Ser Ala Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ala Pro Phe Ile
[1301]	50 55 60
[1302]	Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
[1303]	65 70 75 80
[1304]	Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
[1305]	85 90 95
[1306]	Arg Asn Asp Tyr Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[1307]	100 105 110
[1308]	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[1309]	115 120
[1310]	<210> 105
[1311]	<211> 360
[1312]	<212> DNA
[1313]	<213> Mus musculus
[1314]	<400> 105
[1315]	caggtccagc tgaagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60
[1316]	acctgcacag tctctggttt ctattaact acctatggtg tacactgggt tcgccagtct 120
[1317]	ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggagtg ctggaatcac agactataat 180
[1318]	gcacctttca tatccagact gagcatcacc aaggacaatt ccaagagcca agttttcttt 240
[1319]	aaaatgaaca gtctgcaagc tgatgacaca gccatatatt actgtgccag aaatgactac 300
[1320]	tatggtaacc tctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360
[1321]	<210> 106
[1322]	<211> 16
[1323]	<212> PRT
[1324]	<213> Mus musculus
[1325]	<400> 106





[1365] <210> 110  
 [1366] <211> 15  
 [1367] <212> PRT  
 [1368] <213> Mus musculus  
 [1369] <400> 110  
 [1370] Arg Ala Asn Lys Ser Val Ser Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Met His  
 [1371] 1 5 10 15  
 [1372] <210> 111  
 [1373] <211> 7  
 [1374] <212> PRT  
 [1375] <213> Mus musculus  
 [1376] <400> 111  
 [1377] Leu Val Ser Asn Leu Ala Ser  
 [1378] 1 5  
 [1379] <210> 112  
 [1380] <211> 119  
 [1381] <212> PRT  
 [1382] <213> Mus musculus  
 [1383] <400> 112  
 [1384] Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
 [1385] 1 5 10 15  
 [1386] Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Asp Phe Ser Leu Thr Ile Phe  
 [1387] 20 25 30  
 [1388] Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 [1389] 35 40 45  
 [1390] Gly Val Ile Trp Arg Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Leu Met  
 [1391] 50 55 60  
 [1392] Ser Arg Leu Asn Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
 [1393] 65 70 75 80  
 [1394] Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 [1395] 85 90 95  
 [1396] Lys Asn Arg Arg Tyr Asp Tyr Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [1397] 100 105 110  
 [1398] Thr Leu Val Ser Val Ser Ala  
 [1399] 115  
 [1400] <210> 113  
 [1401] <211> 357  
 [1402] <212> DNA  
 [1403] <213> Mus musculus

[1404] <400> 113  
 [1405] caggtgcaac tgaaacagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccata 60  
 [1406] acctgcacag tctctgattt ctcattaact atctttgggg ttcactgggt tcgccagtct 120  
 [1407] ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atttgagag atggaagcac agactataat 180  
 [1408] gcagctctca tgtccagact gaatatacacc aaggacaact ccaagagcca agttttcttt 240  
 [1409] aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacact gccatatatt actgtgcca aaatcggagg 300  
 [1410] tatgattacg cctggtttcc ttattggggc caagggactc tggctctgt ctctgca 357  
 [1411] <210> 114  
 [1412] <211> 9  
 [1413] <212> PRT  
 [1414] <213> Mus musculus  
 [1415] <400> 114  
 [1416] Phe Ser Leu Thr Ile Phe Gly Val His  
 [1417] 1 5  
 [1418] <210> 115  
 [1419] <211> 16  
 [1420] <212> PRT  
 [1421] <213> Mus musculus  
 [1422] <400> 115  
 [1423] Val Ile Trp Arg Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Leu Met Ser  
 [1424] 1 5 10 15  
 [1425] <210> 116  
 [1426] <211> 11  
 [1427] <212> PRT  
 [1428] <213> Mus musculus  
 [1429] <400> 116  
 [1430] Asn Arg Arg Tyr Asp Tyr Ala Trp Phe Pro Tyr  
 [1431] 1 5 10  
 [1432] <210> 117  
 [1433] <211> 111  
 [1434] <212> PRT  
 [1435] <213> Mus musculus  
 [1436] <400> 117  
 [1437] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [1438] 1 5 10 15  
 [1439] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser  
 [1440] 20 25 30  
 [1441] Gly Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 [1442] 35 40 45

[1443] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 [1444] 50 55 60  
 [1445] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 [1446] 65 70 75 80  
 [1447] Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 [1448] 85 90 95  
 [1449] Asp Phe Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 [1450] 100 105 110  
 [1451] <210> 118  
 [1452] <211> 333  
 [1453] <212> DNA  
 [1454] <213> Mus musculus  
 [1455] <400> 118  
 [1456] gacattgtgc tgacacagtc tctgtcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60  
 [1457] atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt gcatctggct atagtttttt gactgggtac 120  
 [1458] caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcattttatc ttacatccaa cctagaatct 180  
 [1459] ggggtccctg ccaggttcag tggcagtgagg tctggggacag acttcaccct caacatccat 240  
 [1460] cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga ctttctctcc 300  
 [1461] acgttcgggg ctgggaccaa gctggagctg aaa 333  
 [1462] <210> 119  
 [1463] <211> 15  
 [1464] <212> PRT  
 [1465] <213> Mus musculus  
 [1466] <400> 119  
 [1467] Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Leu His  
 [1468] 1 5 10 15  
 [1469] <210> 120  
 [1470] <211> 7  
 [1471] <212> PRT  
 [1472] <213> Mus musculus  
 [1473] <400> 120  
 [1474] Leu Thr Ser Asn Leu Glu Ser  
 [1475] 1 5  
 [1476] <210> 121  
 [1477] <211> 9  
 [1478] <212> PRT  
 [1479] <213> Mus musculus  
 [1480] <400> 121  
 [1481] Gln His Ser Arg Asp Phe Pro Pro Thr

[1482] 1 5  
 [1483] <210> 122  
 [1484] <211> 120  
 [1485] <212> PRT  
 [1486] <213> Mus musculus  
 [1487] <400> 122  
 [1488] Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
 [1489] 1 5 10 15  
 [1490] Lys Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr  
 [1491] 20 25 30  
 [1492] Gly Val His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Val Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 [1493] 35 40 45  
 [1494] Gly Val Ile Trp Thr Thr Gly Val Val Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile  
 [1495] 50 55 60  
 [1496] Ser Arg Leu Asn Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Ile Phe Phe  
 [1497] 65 70 75 80  
 [1498] Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asn Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
 [1499] 85 90 95  
 [1500] Arg Asn Ser Tyr Tyr Gly Asn Leu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 [1501] 100 105 110  
 [1502] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 [1503] 115 120  
 [1504] <210> 123  
 [1505] <211> 360  
 [1506] <212> DNA  
 [1507] <213> Mus musculus  
 [1508] <400> 123  
 [1509] caggtgcaac tgaacagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagaa gttgtccatt 60  
 [1510] acctgcacag tctctggtttctcattaact acctatggtg tgcactggat tcgccagtct 120  
 [1511] ccagtaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggacta ctggagtgt agactataat 180  
 [1512] gcagctttca tatccagact gaacatcacc aaggacaatt ccaagagcca aattttcttt 240  
 [1513] aaaatgaaca gtctgcaaac taatgacaca gccatgtatt actgtgccag aaattcctac 300  
 [1514] tatggaaacc tctatgttat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360  
 [1515] <210> 124  
 [1516] <211> 16  
 [1517] <212> PRT  
 [1518] <213> Mus musculus  
 [1519] <400> 124  
 [1520] Val Ile Trp Thr Thr Gly Val Val Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser

[1521]	1	5	10	15												
[1522]	<210> 125															
[1523]	<211> 111															
[1524]	<212> PRT															
[1525]	<213> Mus musculus															
[1526]	<400> 125															
[1527]	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Pro	Ile	Phe	Leu	Gly
[1528]	1	5	10	15												
[1529]	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Arg	Ser	Val	Ser	Ala	Ser
[1530]			20					25					30			
[1531]	Gly	Tyr	Thr	Phe	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
[1532]			35					40					45			
[1533]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala
[1534]		50					55						60			
[1535]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His
[1536]	65					70					75				80	
[1537]	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg
[1538]						85					90				95	
[1539]	Glu	Phe	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	
[1540]			100						105						110	
[1541]	<210> 126															
[1542]	<211> 333															
[1543]	<212> DNA															
[1544]	<213> Mus musculus															
[1545]	<400> 126															
[1546]	gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttacctatat ttctggggca gagggccacc 60															
[1547]	atctcatgca gggccagcag aagtgtcagt gcactctggct atacttttat gcaactgttac 120															
[1548]	caacagaaac caggacagcc acccaaacct ctcattctatc ttgtatccaa cctagaatct 180															
[1549]	ggggtccttg ccaggttcag tggcagtgagg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240															
[1550]	cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gtttcctctc 300															
[1551]	acgttcgggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 333															
[1552]	<210> 127															
[1553]	<211> 15															
[1554]	<212> PRT															
[1555]	<213> Mus musculus															
[1556]	<400> 127															
[1557]	Arg	Ala	Ser	Arg	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Met	His	
[1558]	1	5	10	15												
[1559]	<210> 128															

[1560] <211> 7  
 [1561] <212> PRT  
 [1562] <213> Mus musculus  
 [1563] <400> 128  
 [1564] Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser  
 [1565] 1 5  
 [1566] <210> 129  
 [1567] <211> 119  
 [1568] <212> PRT  
 [1569] <213> Mus musculus  
 [1570] <400> 129  
 [1571] Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Pro Val Gln Pro Ser Gln  
 [1572] 1 5 10 15  
 [1573] Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Asp Phe Ser Leu Thr Ile Phe  
 [1574] 20 25 30  
 [1575] Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 [1576] 35 40 45  
 [1577] Gly Val Ile Trp Arg Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Val Ala Leu Met  
 [1578] 50 55 60  
 [1579] Ser Arg Leu Asn Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
 [1580] 65 70 75 80  
 [1581] Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 [1582] 85 90 95  
 [1583] Lys Asn Arg Arg Tyr Asp Tyr Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [1584] 100 105 110  
 [1585] Thr Leu Val Ser Val Ser Ala  
 [1586] 115  
 [1587] <210> 130  
 [1588] <211> 357  
 [1589] <212> DNA  
 [1590] <213> Mus musculus  
 [1591] <400> 130  
 [1592] caggtgcaac tgaacagtc aggacctggc ccagtgcagc cctcacagag cctatccata 60  
 [1593] acctgcacag tctctgattt ctcattaact atctttggga ttcactgggt tcgccagtct 120  
 [1594] ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atttggagag atggaagcac agactacaat 180  
 [1595] gtagctctca tgtccagact gaacatcacc aaggacaact ccaagagtca agttttcttt 240  
 [1596] aaaatgaaca gtctacaaac tgatgacact gccatatact actgtgccaa aaatcggagg 300  
 [1597] tatgattacg cctggtttcc ttactggggc caagggactc tgggtctctgt ctctgca 357  
 [1598] <210> 131

[1599] <211> 9  
 [1600] <212> PRT  
 [1601] <213> Mus musculus  
 [1602] <400> 131  
 [1603] Phe Ser Leu Thr Ile Phe Gly Ile His  
 [1604] 1 5  
 [1605] <210> 132  
 [1606] <211> 16  
 [1607] <212> PRT  
 [1608] <213> Mus musculus  
 [1609] <400> 132  
 [1610] Val Ile Trp Arg Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Val Ala Leu Met Ser  
 [1611] 1 5 10 15  
 [1612] <210> 133  
 [1613] <211> 119  
 [1614] <212> PRT  
 [1615] <213> Homo sapiens  
 [1616] <400> 133  
 [1617] Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
 [1618] 1 5 10 15  
 [1619] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 [1620] 20 25 30  
 [1621] Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [1622] 35 40 45  
 [1623] Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Gly Phe  
 [1624] 50 55 60  
 [1625] Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 [1626] 65 70 75 80  
 [1627] Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 [1628] 85 90 95  
 [1629] Ala Arg Glu Glu Asp Tyr Arg Tyr Val Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [1630] 100 105 110  
 [1631] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [1632] 115  
 [1633] <210> 134  
 [1634] <211> 357  
 [1635] <212> DNA  
 [1636] <213> Homo sapiens  
 [1637] <400> 134



[1638] cagattcagc tgggtcagtc tggcagcgag ctgaagaaac ctggcgcctc tgtgaaggtg 60  
 [1639] tcctgcaagg ctageggcta cacattcacc aactacggca tgaactgggt cgcacaggct 120  
 [1640] cctggacagg gactcgaatg gatgggctgg atcaacacct acaccggcga gcctacctac 180  
 [1641] gccgatggct tcacaggcag attcgtgttc agcctggaca ccagcggcag cacagcttac 240  
 [1642] ctgcagatca gctctctgaa ggccgaggat accgcccgtgt acttctgcgc cagagaagag 300  
 [1643] gactaccgct acgtgttcaa ctactggggc cagggcacac tggtcaccgt ttcttct 357  
 [1644] <210> 135  
 [1645] <211> 17  
 [1646] <212> PRT  
 [1647] <213> Homo sapiens  
 [1648] <400> 135  
 [1649] Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Gly Phe Thr  
 [1650] 1 5 10 15  
 [1651] Gly  
 [1652] <210> 136  
 [1653] <211> 119  
 [1654] <212> PRT  
 [1655] <213> Homo sapiens  
 [1656] <400> 136  
 [1657] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
 [1658] 1 5 10 15  
 [1659] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 [1660] 20 25 30  
 [1661] Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [1662] 35 40 45  
 [1663] Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Gly Phe  
 [1664] 50 55 60  
 [1665] Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 [1666] 65 70 75 80  
 [1667] Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 [1668] 85 90 95  
 [1669] Ala Arg Glu Glu Asp Tyr Arg Tyr Val Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [1670] 100 105 110  
 [1671] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [1672] 115  
 [1673] <210> 137  
 [1674] <211> 357  
 [1675] <212> DNA  
 [1676] <213> Homo sapiens

[1677] <400> 137  
 [1678] caggttcagc tgggtgcagtc tggcagcgag ctgaagaaac ctggcgcctc tgtgaagggtg 60  
 [1679] tcctgcaagg ctagecgcta cacattcacc aactacggca tgaactgggt cgcacaggct 120  
 [1680] cctggacagg gactcgaatg gatgggctgg atcaaacacct acaccggcga gcctacctac 180  
 [1681] gccgatggct tcacaggcag attcgtgttc agcctggaca ccagcggcag cacagcttac 240  
 [1682] ctgcagatca gctctctgaa ggccgaggat accgccgtgt acttctgcgc cagagaagag 300  
 [1683] gactaccgct acgtgttcaa ctactggggc cagggcacac tggtcaccgt ttcttct 357  
 [1684] <210> 138  
 [1685] <211> 119  
 [1686] <212> PRT  
 [1687] <213> Homo sapiens  
 [1688] <400> 138  
 [1689] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
 [1690] 1 5 10 15  
 [1691] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 [1692] 20 25 30  
 [1693] Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [1694] 35 40 45  
 [1695] Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Gly Phe  
 [1696] 50 55 60  
 [1697] Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 [1698] 65 70 75 80  
 [1699] Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [1700] 85 90 95  
 [1701] Ala Arg Glu Glu Asp Tyr Arg Tyr Val Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [1702] 100 105 110  
 [1703] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [1704] 115  
 [1705] <210> 139  
 [1706] <211> 357  
 [1707] <212> DNA  
 [1708] <213> Homo sapiens  
 [1709] <400> 139  
 [1710] caggttcagc tgggtgcagtc tggcagcgag ctgaagaaac ctggcgcctc tgtgaagggtg 60  
 [1711] tcctgcaagg ctagecgcta cacattcacc aactacggca tgaactgggt cgcacaggct 120  
 [1712] cctggacagg gactcgaatg gatgggctgg atcaaacacct acaccggcga gcctacctac 180  
 [1713] gccgatggct tcacaggcag attcgtgttc agcctggaca ccagcggcag cacagcttac 240  
 [1714] ctgcagatca gctctctgaa ggccgaggat accgccgtgt actactgcgc cagagaagag 300  
 [1715] gactaccgct acgtgttcaa ctactggggc cagggcacac tggtcaccgt ttcttct 357

[1716] <210> 140  
 [1717] <211> 120  
 [1718] <212> PRT  
 [1719] <213> Homo sapiens  
 [1720] <400> 140  
 [1721] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 [1722] 1 5 10 15  
 [1723] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 [1724] 20 25 30  
 [1725] Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [1726] 35 40 45  
 [1727] Gly Tyr Leu His Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 [1728] 50 55 60  
 [1729] Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [1730] 65 70 75 80  
 [1731] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [1732] 85 90 95  
 [1733] Ala Arg Arg Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ala Trp Phe Ala Asp Trp Gly Gln  
 [1734] 100 105 110  
 [1735] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [1736] 115 120  
 [1737] <210> 141  
 [1738] <211> 360  
 [1739] <212> DNA  
 [1740] <213> Homo sapiens  
 [1741] <400> 141  
 [1742] caggttcagc tggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcagcag cgtgaaggtg 60  
 [1743] tcctgcaagg ctagcggcta cacattcacc gactacgtga tccactgggt ccgacaggct 120  
 [1744] ccaggacagg gacttgagtg gatgggctat ctgcaccctt acaacgacga caccaagtac 180  
 [1745] aacgagaagt tccagggcag agtgaccctc accagcgcaca agtctagcag caccgcctac 240  
 [1746] atggaactga gcagcctgag aagcgcaggac accgcccgtgt actactgtgc cagaagagc 300  
 [1747] tactacgact acgcttggtt tgccgattgg ggccagggaa cccttggtcac agttagctct 360  
 [1748] <210> 142  
 [1749] <211> 17  
 [1750] <212> PRT  
 [1751] <213> Homo sapiens  
 [1752] <400> 142  
 [1753] Tyr Leu His Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Gln  
 [1754] 1 5 10 15

[1755] Gly  
 [1756] <210> 143  
 [1757] <211> 120  
 [1758] <212> PRT  
 [1759] <213> Homo sapiens  
 [1760] <400> 143  
 [1761] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 [1762] 1 5 10 15  
 [1763] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 [1764] 20 25 30  
 [1765] Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [1766] 35 40 45  
 [1767] Gly Tyr Leu His Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 [1768] 50 55 60  
 [1769] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [1770] 65 70 75 80  
 [1771] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [1772] 85 90 95  
 [1773] Ala Arg Arg Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ala Trp Phe Ala Asp Trp Gly Gln  
 [1774] 100 105 110  
 [1775] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [1776] 115 120  
 [1777] <210> 144  
 [1778] <211> 360  
 [1779] <212> DNA  
 [1780] <213> Homo sapiens  
 [1781] <400> 144  
 [1782] caggttcagc tggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcagcag cgtgaaggtg 60  
 [1783] tcctgcaagg ctagcggcta cacattcacc gactacgtga tccactgggt cgcacaggct 120  
 [1784] ccaggacagg gacttgagtg gatgggctat ctgcaccctt acaacgacga caccaagtac 180  
 [1785] aacgagaagt tccagggcag agtgaccatc accgcccaca agtctagcag caccgcctac 240  
 [1786] atggaactga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagaggc 300  
 [1787] tactacgact acgcttggtt tgccgattgg ggccagggaa ccctgggtcac agttagctct 360  
 [1788] <210> 145  
 [1789] <211> 120  
 [1790] <212> PRT  
 [1791] <213> Homo sapiens  
 [1792] <400> 145  
 [1793] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

[1794]	1	5	10	15
[1795]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
[1796]	20	25	30	
[1797]	Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
[1798]	35	40	45	
[1799]	Gly Tyr Leu His Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe			
[1800]	50	55	60	
[1801]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
[1802]	65	70	75	80
[1803]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1804]	85	90	95	
[1805]	Ala Arg Arg Gly Tyr Tyr Asp Tyr Ala Trp Phe Ala Asp Trp Gly Gln			
[1806]	100	105	110	
[1807]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[1808]	115	120		
[1809]	<210> 146			
[1810]	<211> 360			
[1811]	<212> DNA			
[1812]	<213> Homo sapiens			
[1813]	<400> 146			
[1814]	caggttcagc tggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcagcag cgtgaaggtg 60			
[1815]	tcctgcaagg ctageggcta cacattcacc gactacgtga tccactgggt cgcacaggct 120			
[1816]	ccaggacagg gacttgagtg gatgggctat ctgcaccctt acaacgacga caccaagtac 180			
[1817]	aacgagaagt tccagggcag agtgaccatc accgcccagc agtctaccag caccgcctac 240			
[1818]	atggaactga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagaggc 300			
[1819]	tactacgact acgcttggtt tgccgattgg ggccagggaa ccctggtcac agttagctct 360			
[1820]	<210> 147			
[1821]	<211> 107			
[1822]	<212> PRT			
[1823]	<213> Homo sapiens			
[1824]	<400> 147			
[1825]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[1826]	1	5	10	15
[1827]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr			
[1828]	20	25	30	
[1829]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
[1830]	35	40	45	
[1831]	Tyr Asp Thr Ser Arg Leu His Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[1832]	50	55	60	

[1833] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [1834] 65 70 75 80  
 [1835] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Val Thr Leu Pro Leu  
 [1836] 85 90 95  
 [1837] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [1838] 100 105  
 [1839] <210> 148  
 [1840] <211> 321  
 [1841] <212> DNA  
 [1842] <213> Homo sapiens  
 [1843] <400> 148  
 [1844] gacatccaga tgacacagag ccctagcagc ctgtctgcca gcgtgggaga cagagtgacc 60  
 [1845] atcacctgtc aggccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc 120  
 [1846] ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac accagcagac tgcacgctgg cgtgccatct 180  
 [1847] agattcagcg gctctggctc tggcaccgac tacaccttca caatcagcag cctgcagcct 240  
 [1848] gaggatatcg ctacctactt ctgccagcaa ggcgtgacct tgcctctgac atttggccag 300  
 [1849] ggcaccaagc tggaaatcaa g 321  
 [1850] <210> 149  
 [1851] <211> 11  
 [1852] <212> PRT  
 [1853] <213> Homo sapiens  
 [1854] <400> 149  
 [1855] Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
 [1856] 1 5 10  
 [1857] <210> 150  
 [1858] <211> 107  
 [1859] <212> PRT  
 [1860] <213> Homo sapiens  
 [1861] <400> 150  
 [1862] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [1863] 1 5 10 15  
 [1864] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 [1865] 20 25 30  
 [1866] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 [1867] 35 40 45  
 [1868] Tyr Asp Thr Ser Arg Leu His Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [1869] 50 55 60  
 [1870] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [1871] 65 70 75 80

[1872]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Val Thr Leu Pro Leu
[1873]	85 90 95
[1874]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1875]	100 105
[1876]	<210> 151
[1877]	<211> 321
[1878]	<212> DNA
[1879]	<213> Homo sapiens
[1880]	<400> 151
[1881]	gacatccaga tgacacagag ccctagcagc ctgtctgccg gcgtgggaga cagagtgacc 60
[1882]	atcacctgtc aggccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc 120
[1883]	ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac accagcagac tgcacgctgg cgtgccatct 180
[1884]	agattcagcg gctctggctc tggcaccgac ttcaccttca caatcagcag cctgcagcct 240
[1885]	gaggatatcg ctacctactt ctgccagcaa ggcgtgacct tgccctctgac atttggccag 300
[1886]	ggcaccaagc tggaaatcaa g 321
[1887]	<210> 152
[1888]	<211> 107
[1889]	<212> PRT
[1890]	<213> Homo sapiens
[1891]	<400> 152
[1892]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1893]	1 5 10 15
[1894]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
[1895]	20 25 30
[1896]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[1897]	35 40 45
[1898]	Tyr Asp Thr Ser Arg Leu His Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1899]	50 55 60
[1900]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1901]	65 70 75 80
[1902]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Val Thr Leu Pro Leu
[1903]	85 90 95
[1904]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1905]	100 105
[1906]	<210> 153
[1907]	<211> 321
[1908]	<212> DNA
[1909]	<213> Homo sapiens
[1910]	<400> 153

[1911] gacatccaga tgacacagag ccctagcagc ctgtctgcca gcgtgggaga cagagtgacc 60  
 [1912] atcacctgtc aggccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc 120  
 [1913] ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac accagcagac tgcacgctgg cgtgccatct 180  
 [1914] agattcagcg gctctggctc tggcaccgac ttcaccttca caatcagcag cctgcagcct 240  
 [1915] gaggatatcg ctacctacta ctgccagcaa ggcgtgaccc tgcctctgac atttggccag 300  
 [1916] ggcaccaagc tggaaatcaa g 321  
 [1917] <210> 154  
 [1918] <211> 111  
 [1919] <212> PRT  
 [1920] <213> Homo sapiens  
 [1921] <400> 154  
 [1922] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly  
 [1923] 1 5 10 15  
 [1924] Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser  
 [1925] 20 25 30  
 [1926] Gly Tyr Thr Trp Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 [1927] 35 40 45  
 [1928] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 [1929] 50 55 60  
 [1930] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn  
 [1931] 65 70 75 80  
 [1932] Pro Val Glu Ala Asn Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 [1933] 85 90 95  
 [1934] Glu Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [1935] 100 105 110  
 [1936] <210> 155  
 [1937] <211> 333  
 [1938] <212> DNA  
 [1939] <213> Homo sapiens  
 [1940] <400> 155  
 [1941] gacatcgtgc tgacacagag ccctgcttct ctggctgtgt ctcttgcca gagagccacc 60  
 [1942] atcacctgta gagccagcaa gacgctgtcc gcctctggct acacatggat gcaactggtat 120  
 [1943] cagcagaagc cggccagcc tctaagctg ctgatctacc tggccagcaa cctggaaagc 180  
 [1944] ggagtgcctg ctagattcag cggtctgtgc tctggcaccg acttcacct gacaatcaac 240  
 [1945] cccgtggaag ccaacgacac cgccaactac tactgccagc acagcagaga gctgcctcca 300  
 [1946] acatttggcc agggcaccaa gctggaaatc aag 333  
 [1947] <210> 156  
 [1948] <211> 111  
 [1949] <212> PRT



- [1950] <213> Homo sapiens  
 [1951] <400> 156  
 [1952] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 [1953] 1 5 10 15  
 [1954] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser  
 [1955] 20 25 30  
 [1956] Gly Tyr Thr Trp Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
 [1957] 35 40 45  
 [1958] Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp  
 [1959] 50 55 60  
 [1960] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 [1961] 65 70 75 80  
 [1962] Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 [1963] 85 90 95  
 [1964] Glu Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [1965] 100 105 110  
 [1966] <210> 157  
 [1967] <211> 333  
 [1968] <212> DNA  
 [1969] <213> Homo sapiens  
 [1970] <400> 157  
 [1971] gagatcgtgc tgacacagag ccctggcaca ctgtcactgt ctccaggcga gagagccaca 60  
 [1972] ctgagctgta gagccagcaa gacgctgtcc gcctctggct acacatggat gcaactggtat 120  
 [1973] cagcagaagc ccgccagcgc tcttagactg ctgatctacc tggccagcaa cctggaaagc 180  
 [1974] ggcattcccc atagattcag cggctctggc tctggcaccg acttcaccct gacaatcagc 240  
 [1975] agactggaac cggaggactt cgccgtgtac tactgccagc acagcagaga gctgcctcca 300  
 [1976] acatttgcc agggcaccaa gctggaaatc aag 333  
 [1977] <210> 158  
 [1978] <211> 111  
 [1979] <212> PRT  
 [1980] <213> Homo sapiens  
 [1981] <400> 158  
 [1982] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 [1983] 1 5 10 15  
 [1984] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser  
 [1985] 20 25 30  
 [1986] Gly Tyr Thr Trp Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
 [1987] 35 40 45  
 [1988] Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp

[1989]	50	55	60	
[1990]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
[1991]	65	70	75	80
[1992]	Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg			
[1993]		85	90	95
[1994]	Glu Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[1995]		100	105	110
[1996]	<210> 159			
[1997]	<211> 333			
[1998]	<212> DNA			
[1999]	<213> Homo sapiens			
[2000]	<400> 159			
[2001]	gagatcgtgc tgacacagag ccttggcaca ctgtcactgt ctccaggcga gagagccaca 60			
[2002]	ctgagctgta gagccagcaa gacgctgtcc gcctctggct acacatggat gcaactggat 120			
[2003]	cagcagaagc cgggccaggc tcttagactg ctgatctacc tggccagcag cctggaaagc 180			
[2004]	ggcatccccg atagattcag cggctctggc tctggcaccg acttcaccct gacaatcagc 240			
[2005]	agactggaac ccgaggactt cgccgtgtac tactgccagc acagcagaga gctgcctcca 300			
[2006]	acatttggcc agggcaccaa gctggaaatc aag 333			
[2007]	<210> 160			
[2008]	<211> 7			
[2009]	<212> PRT			
[2010]	<213> Homo sapiens			
[2011]	<400> 160			
[2012]	Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser			
[2013]	1 5			
[2014]	<210> 161			
[2015]	<211> 8			
[2016]	<212> PRT			
[2017]	<213> Artificial Sequence			
[2018]	<400> 161			
[2019]	Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser			
[2020]	1 5			

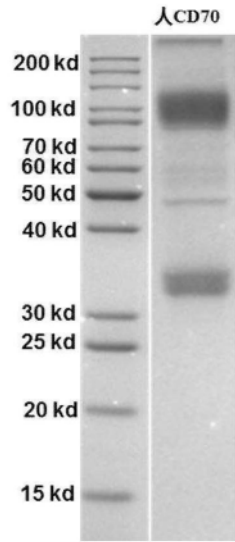


图1

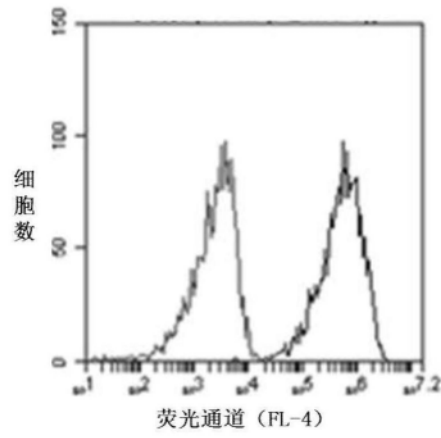


图2-1

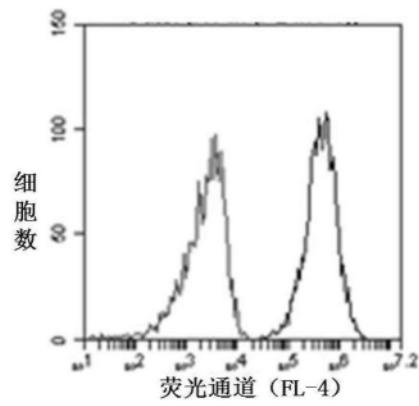


图2-2

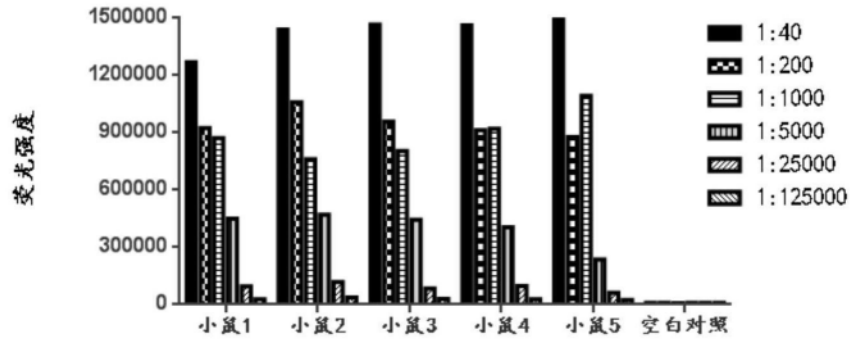


图3

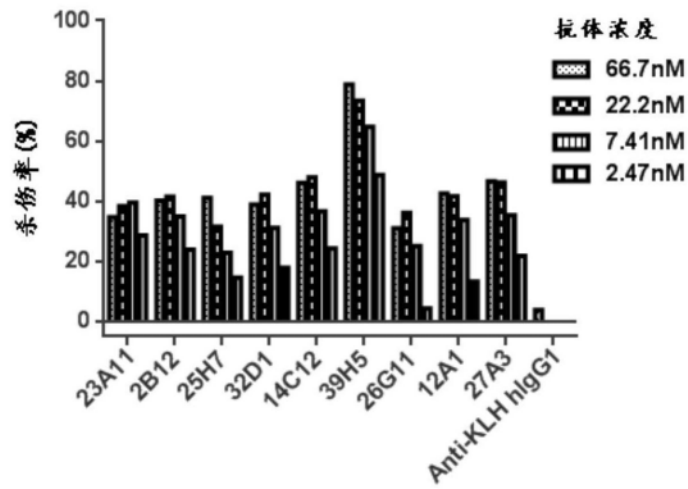


图4-1

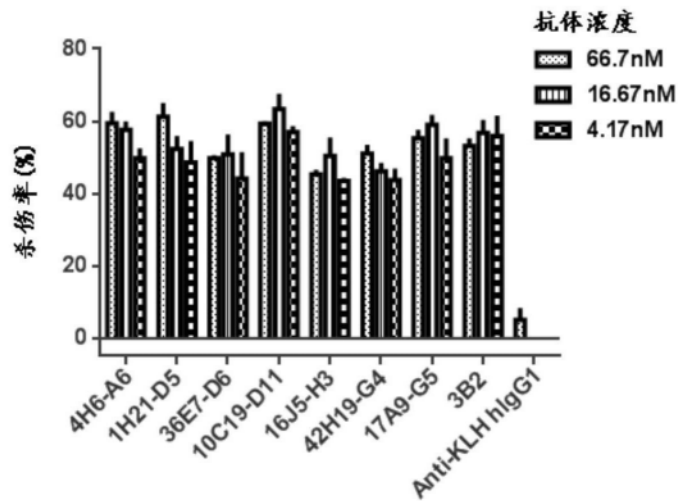


图4-2

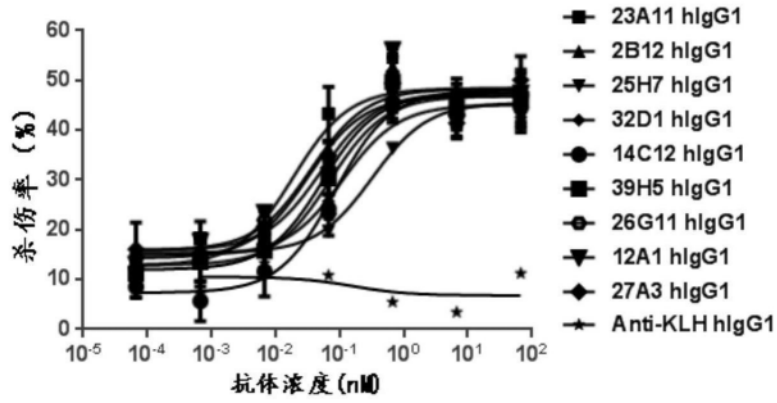


图5

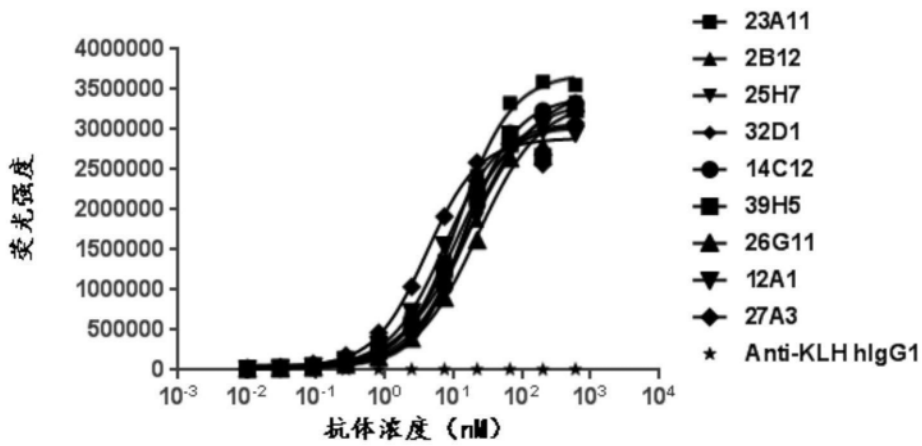


图6-1

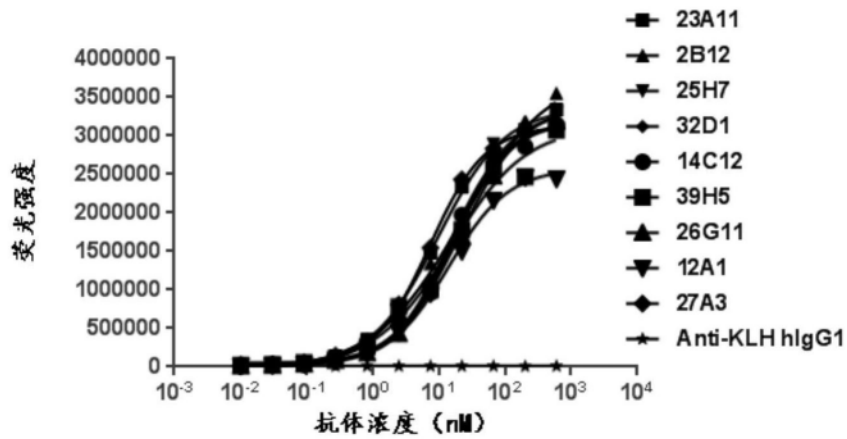


图6-2

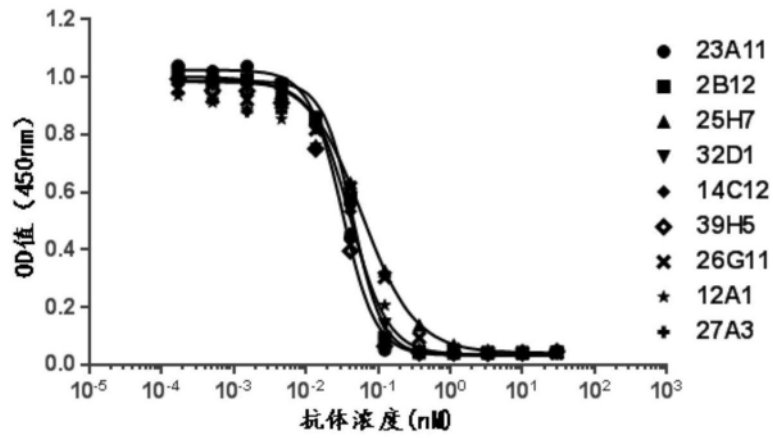


图7-1

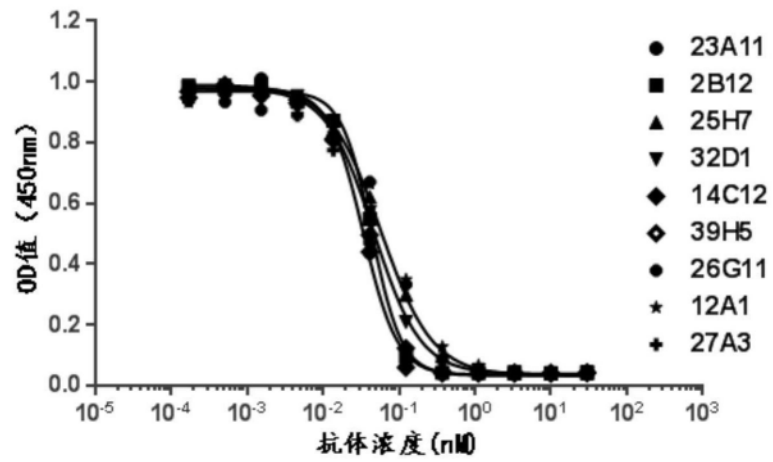


图7-2

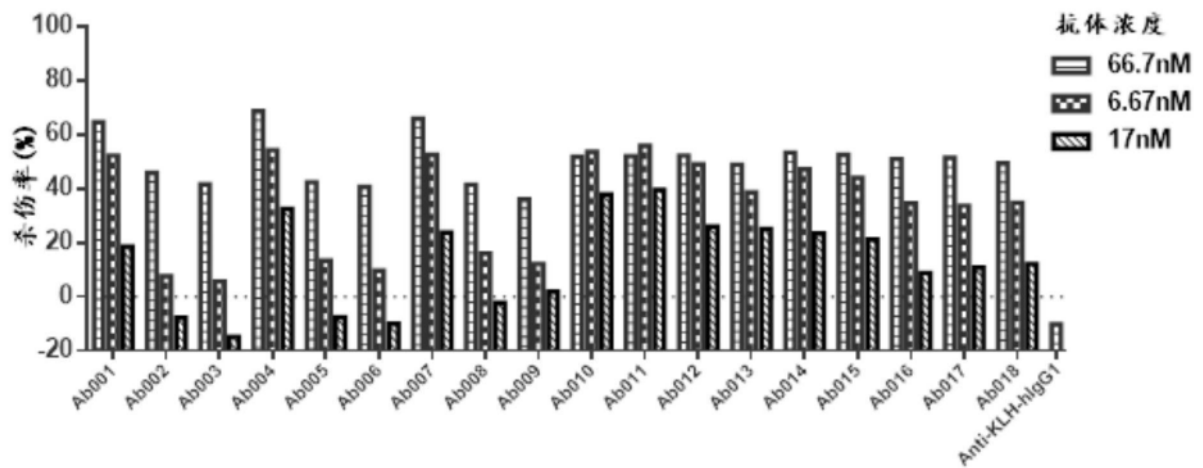


图8

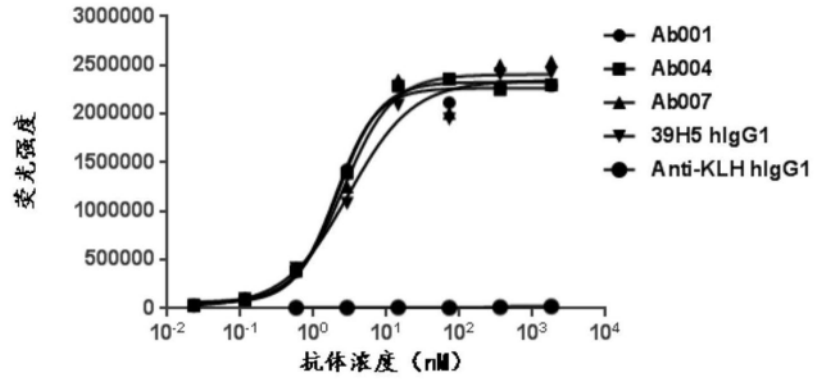


图9-1

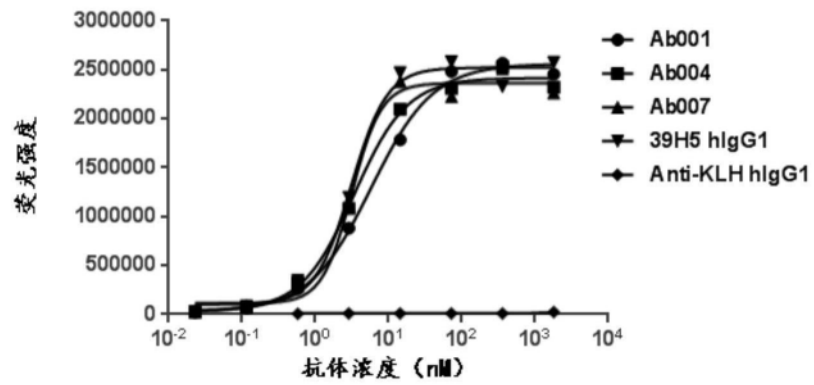


图9-2

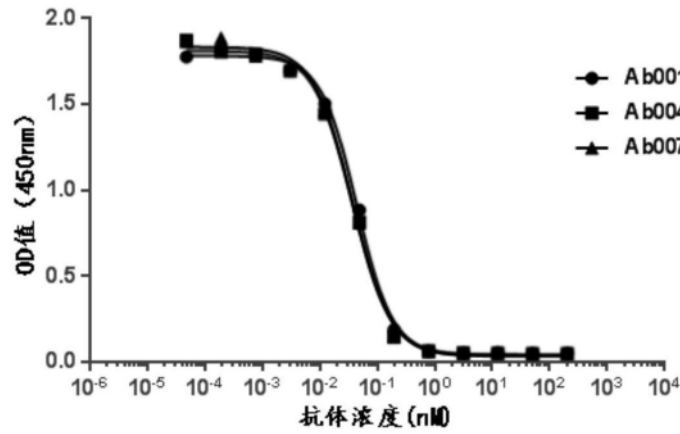


图10-1

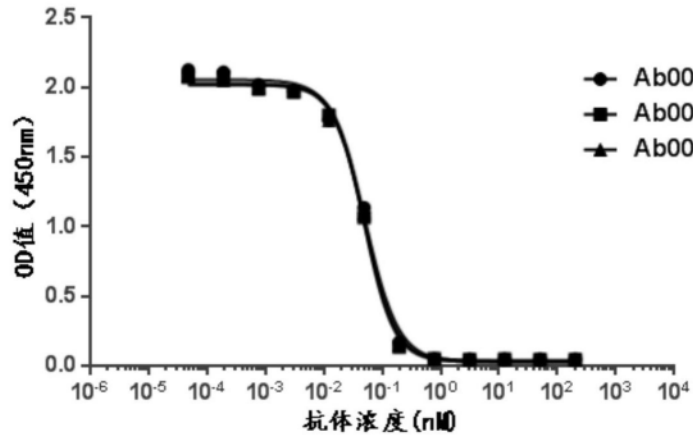


图10-2

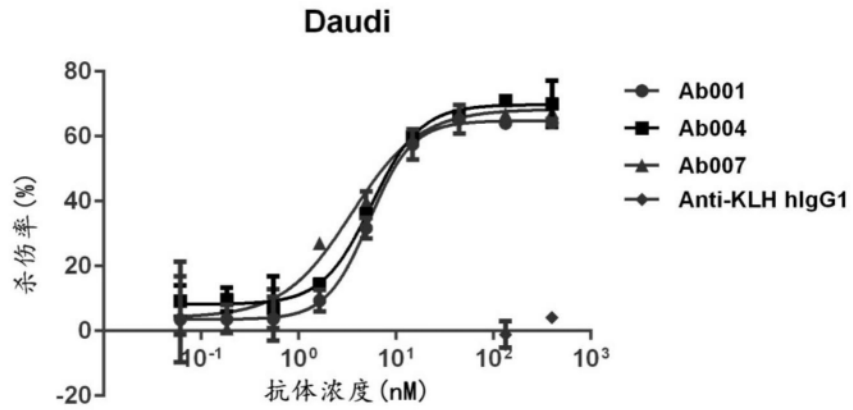


图11-1

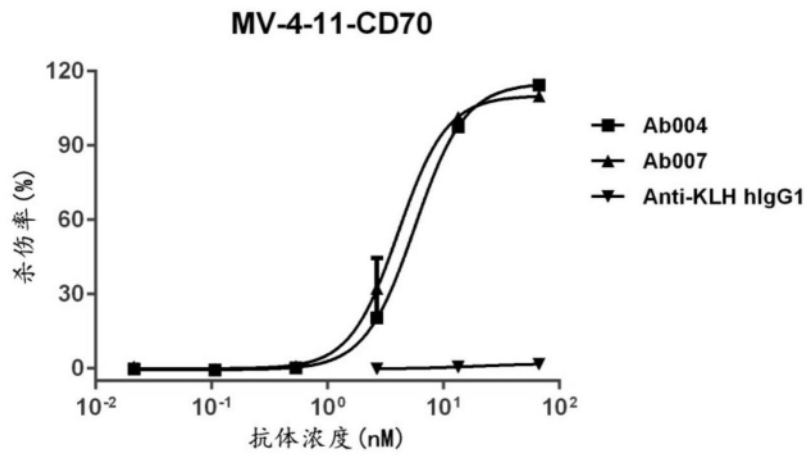


图11-2



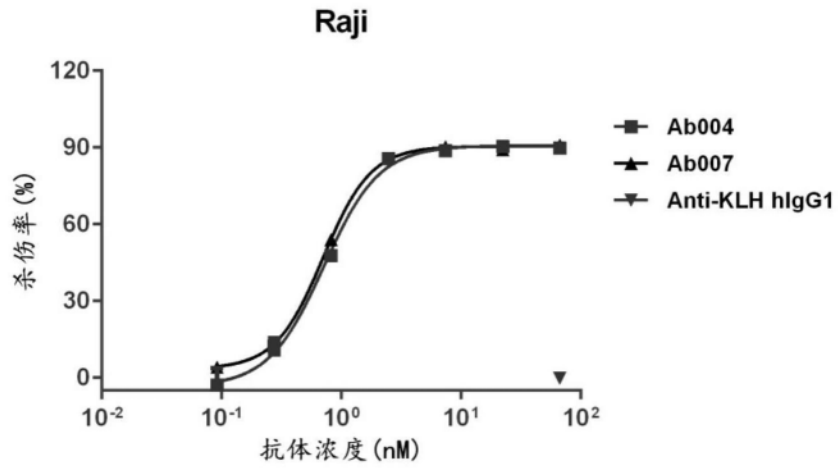


图11-3

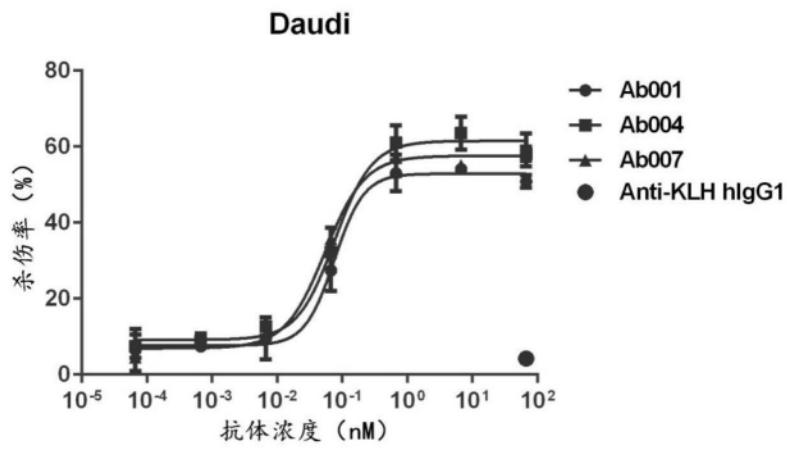


图12-1

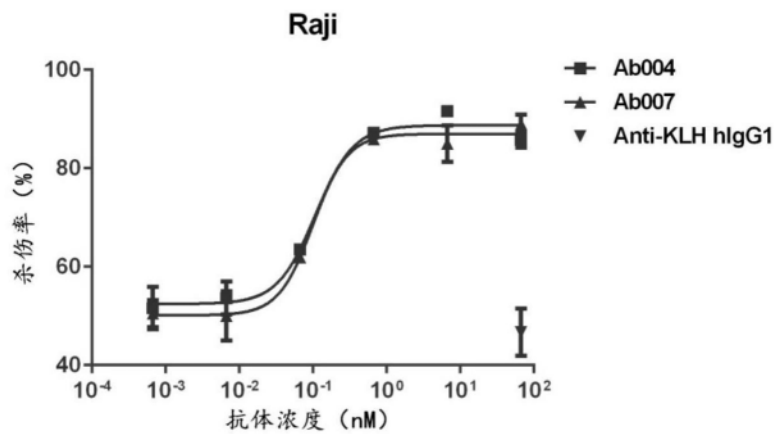


图12-2

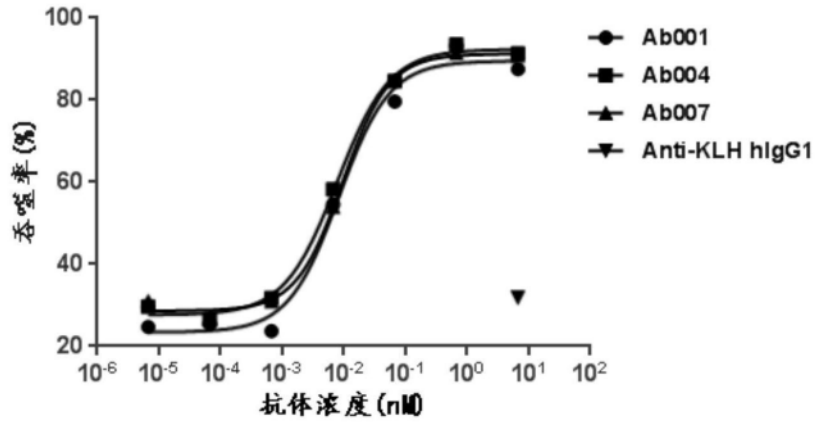


图13

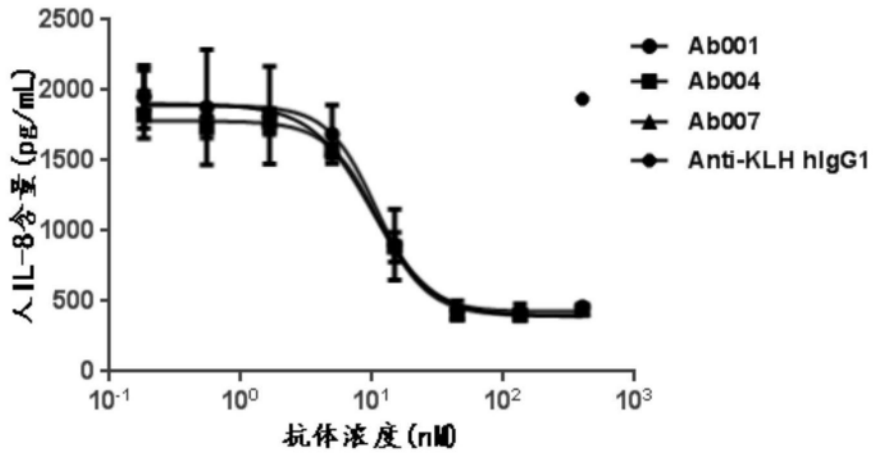


图14

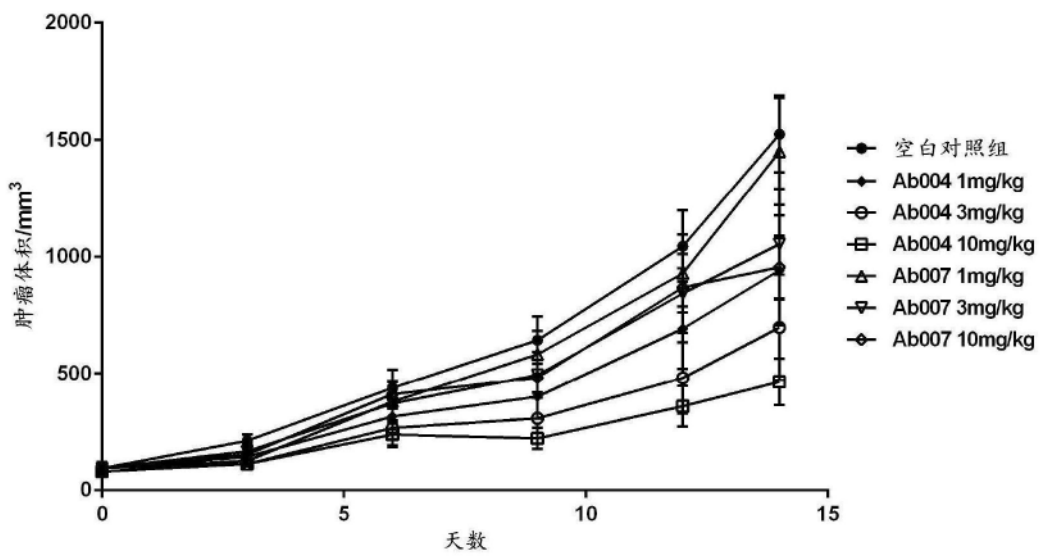


图15-1

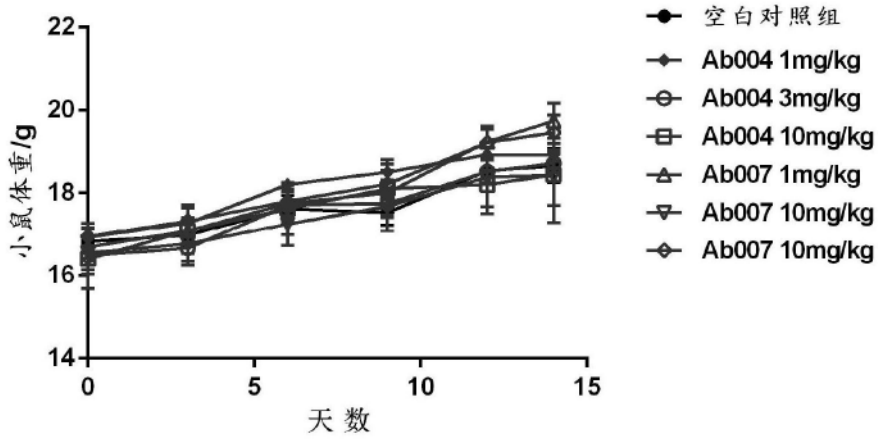


图15-2

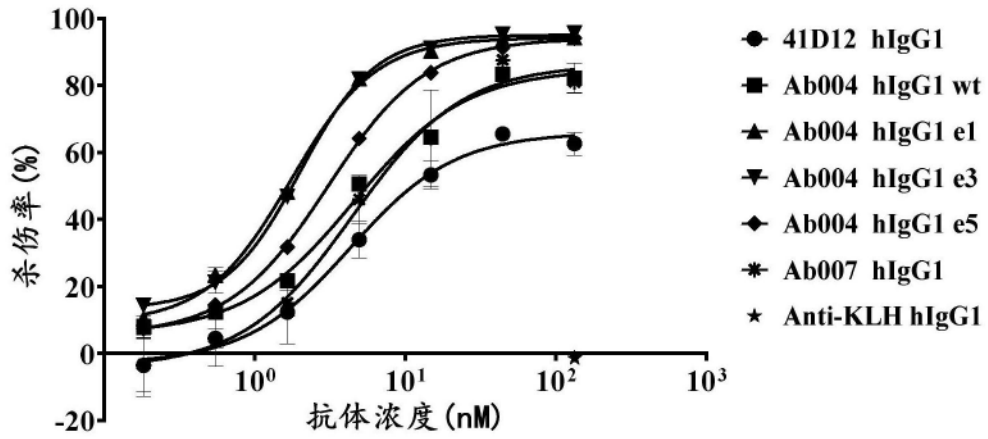


图16

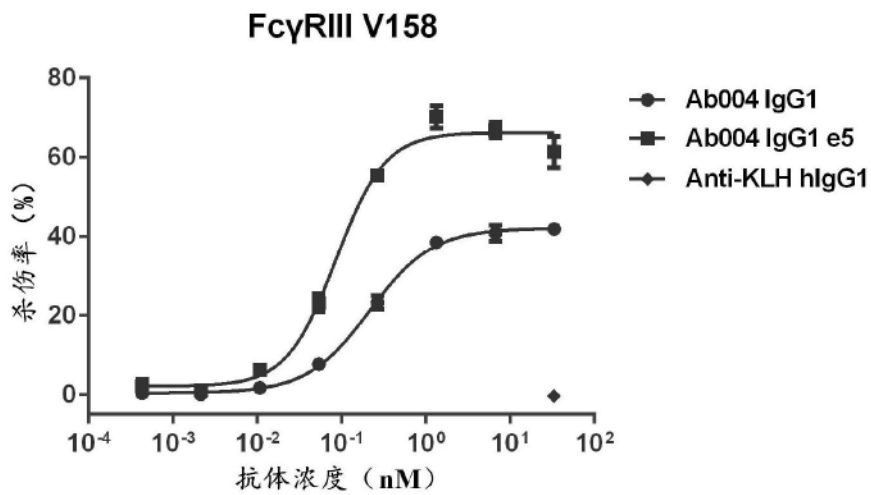


图17-1

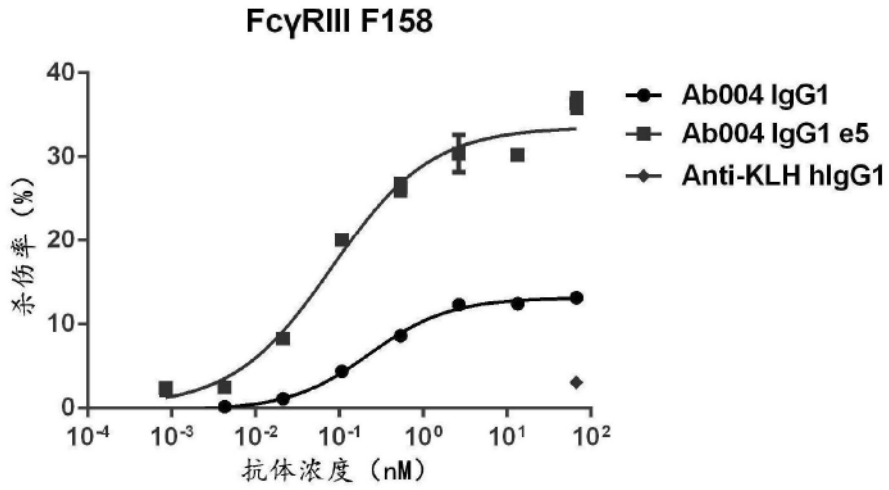


图17-2

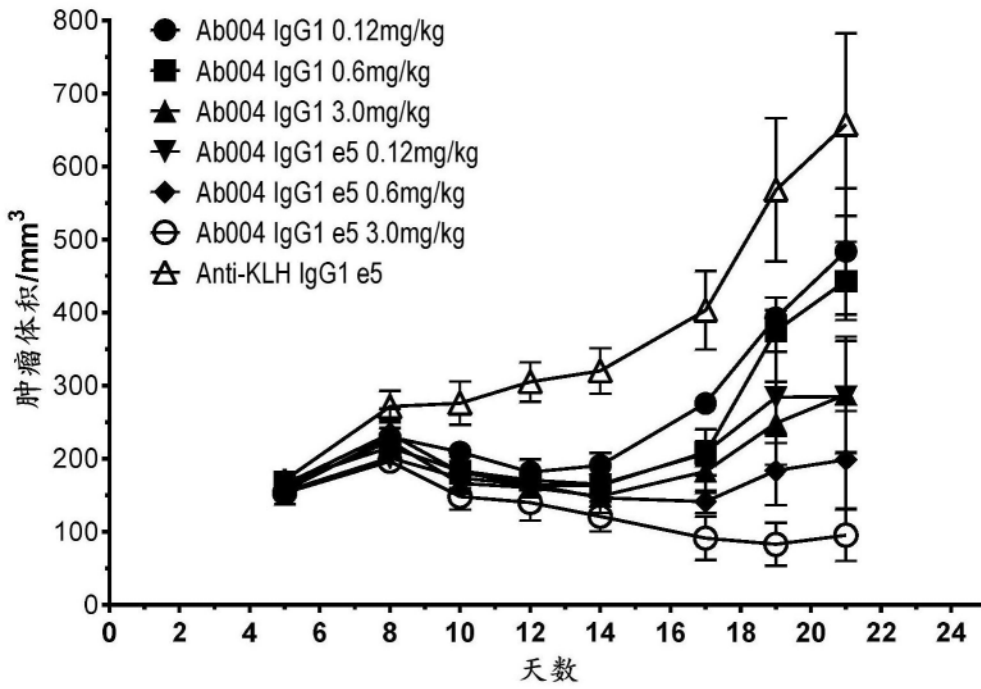


图18