



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115558026 A

(43) 申请公布日 2023.01.03

(21) 申请号 202110750848.6

(22) 申请日 2021.07.02

(71) 申请人 和迈生物科技有限公司

地址 中国香港中环德辅道中249-253号东
宁大厦9楼

(72) 发明人 黄仲廉 丁航海

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限
公司 31266

专利代理师 徐迅 崔佳佳

(51) Int. Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书20页

序列表16页 附图2页

(54) 发明名称

抗TROP2单域抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及抗体药物技术领域,提供了一组针对TROP2的特异性单域抗体编码序列及其应用。本发明提供的抗TROP2单域抗体能有效与TROP2抗原结合,为靶向TROP2的药物包括核素偶联药物,抗体偶联药物及多特异性抗体药物等研发提供了基础。

1. 一种抗TROP2单域抗体VHH链的互补决定区CDR,其特征在于,所述VHH链的互补决定区CDR包含:

SEQ ID NO:17-23所示的CDR1;

SEQ ID NO:24-29所示的CDR2;和

SEQ ID NO:30-35所示的CDR3。

2. 一种抗TROP2单域抗体的VHH链,所述VHH链包括框架区FR和权利要求1所述的互补决定区CDR。

3. 一种抗TROP2单域抗体,其特征在于,所述单域抗体是针对TROP2蛋白的单域抗体,并且具有如SEQ ID NO:1-8任一所示的氨基酸序列的VHH链。

4. 一种多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸编码选自下组的蛋白质:权利要求1所述的CDR区、权利要求2所述的抗TROP2单域抗体的VHH链、或权利要求3所述的抗TROP2单域抗体。

5. 一种表达载体,其特征在于,所述表达载体含有权利要求4所述的多核苷酸。

6. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞含有权利要求5所述的表达载体,或其基因组中整合有权利要求4所述的多核苷酸。

7. 一种产生抗TROP2单域抗体的方法,其特征在于,包括步骤:

(a) 在适合产生单域抗体的条件下,培养权利要求6所述的宿主细胞,从而获得含所述抗TROP2单域抗体的培养物;以及(b) 从所述培养物中分离或回收所述的抗TROP2单域抗体。

8. 一种免疫偶联物,其特征在于,该免疫偶联物含有:

(a) 如权利要求2所述的抗TROP2单域抗体的VHH链、或如权利要求3所述的抗TROP2单域抗体;和(b) 选自下组的偶联部分:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、或酶。

9. 如权利要求2所述的VHH链,如权利要求3所述的抗TROP2单域抗体,或如权利要求8所述的免疫偶联物的用途,其特征在于,用于制备(a) 用于检测TROP2分子的试剂;(b) 用于治疗肿瘤的药物。

10. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含:(i) 如权利要求3所述的单域抗体或如权利要求8所述的免疫偶联物;和(ii) 药学上可接受的载体。

11. 一种体外(诊断和非诊断性)检测样品中TROP2蛋白的方法,其特征在于,包括步骤:

(1) 将样品与权利要求3所述的单域抗体接触;

(2) 检测是否形成抗原-抗体复合物,其中形成复合物就表示样品中存在TROP2蛋白。

抗TROP2单域抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体领域,具体地涉及针对TROP2的特异性单域抗体及其编码序列和其在疾病诊断和治疗中的应用。

背景技术

[0002] 滋养层细胞表面抗原2 (TROP2),又名表皮糖蛋白1 (EGP-1)、胃肠肿瘤相关抗原 (GA733-1)、表面标志物1 (M1S1)、肿瘤相关钙离子信号转导子2 (TACSTD2)。TROP2是一个35kDa的单程跨膜糖蛋白,该结构域包括一个富含半胱氨酸的结构域 (CRD)、一个酪氨酸球蛋白1型结构域 (TY-1) 和一个缺乏半胱氨酸的结构域 (CPD)。TROP2主要通过调节钙离子信号通路、Wnt信号通路、细胞周期蛋白表达及降低纤黏蛋白黏附作用促进肿瘤细胞生长、增殖和转移。

[0003] 研究表明,TROP2在多种上皮癌,包括乳腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、宫颈癌、前列腺癌、结肠癌等肿瘤中都有大量表达,其过度表达与预后不良和转移风险增加有关。TROP2在正常组织中表达有限,能够有效降低潜在治疗毒性,成为靶向治疗的一个天然候选靶点。以TROP2为靶点的抗体、抗体偶联物以及联合用药等多种形式的药物正处于临床研发中 (Zaman, 2019)。其中,新型抗体偶联药物 (ADC),利用人源化抗体hRS7作为靶向载体与伊立替康活性代谢产物SN38偶联而成的Trodelvy (Sacituzumab govitecan),已获得FDA上市批准应用于转移性三阴性乳癌和转移性尿路上皮细胞癌。其中3期ASCENT研究数据证明,Trodelvy有效降低了疾病恶化或死亡的风险 (无进展生存期 (PFS)) 57%,将中位PFS从化疗后的1.7个月延长至4.8个月 (HR:0.43;95%可信区间:0.35-0.54;p<0.0001)。另外,还将死亡风险降低了49%,将中位总生存期 (OS) 从6.9个月延长到11.8个月 (HR:0.51;95%可信区间:0.41-0.62;p<0.0001) (Bardia, 2021)。此外,利用RS7抗体或抗体片段作为靶向TROP2载体标记放射性同位素Lu177的放射免疫疗法,在多种肿瘤细胞系 (Calu-3和BxPC-3) 的异种移植模型中具有显著的特异性抗癌作用 (Van Rij, 2014)。

[0004] 截至目前,市场上尚未有针对TROP2靶点的单域抗体药物,单域抗体即骆驼重链单域抗体VHH(variable domain of heavy-chain antibody),是目前可以得到的具有完整功能的稳定的可结合抗原的最小单位。单域抗体其分子量是传统抗体的1/10,具有稳定性高、水溶性好、人源化简单、靶向性高、穿透性强等特点。单域抗体作为放射性同位素靶向载体,能够快速、特异性地穿透肿瘤组织结合靶标,而无结合抗体能很快从血液清除,降低身体放射性剂量,对比传统抗体用于开发放射免疫成像及放射免疫疗法具有众多明显优势 (D' Huyvetter, 2014)。

[0005] 因此,本领域需要开发一种抗TROP2单域抗体,尤其是能够单一有效地结合TROP2的特异性单域抗体,开发新一代放射免疫成像及放射免疫疗法。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种具备良好的TROP2抗原结合性的抗TROP2单域抗体。

[0007] 本发明的第一方面,提供了一种抗TROP2单域抗体VHH链的互补决定区CDR,所述VHH链的互补决定区CDR包含:

[0008] SEQ ID NO:17-23所示的CDR1;

[0009] SEQ ID NO:24-29所示的CDR2;和

[0010] SEQ ID NO:30-35所示的CDR3。

[0011] 在另一优选例中,所述的CDR1、CDR2和CDR3由VHH链的框架区FR1、FR2、FR3和FR4所隔开。

[0012] 在另一优选例中,所述VHH链的互补决定区CDR包含:

[0013] SEQ ID NO:17所示的CDR1;

[0014] SEQ ID NO:24所示的CDR2;和

[0015] SEQ ID NO:30所示的CDR3。

[0016] 在另一优选例中,所述VHH链的互补决定区CDR包含:

[0017] SEQ ID NO:20所示的CDR1;

[0018] SEQ ID NO:27所示的CDR2;和

[0019] SEQ ID NO:33所示的CDR3。

[0020] 在另一优选例中,所述VHH链的互补决定区CDR包含:

[0021] SEQ ID NO:23所示的CDR1;

[0022] SEQ ID NO:29所示的CDR2;和

[0023] SEQ ID NO:35所示的CDR3。

[0024] 在另一优选例中,所述VHH链的互补决定区CDR包含选自下组的CDR1、CDR2和CDR3:

组	CDR1序列编号	CDR2序列编号	CDR3序列编号
1	17	24	30
2	18	25	31
3	19	26	32
4	20	27	33
5	21	28	34
6	20	27	33
7	22	27	33
8	23	29	35

[0026] 本发明的第二方面,提供了一种抗TROP2单域抗体的VHH链,所述VHH链包括框架区FR和本发明第一方面所述的互补决定区CDR。

[0027] 在另一优选例中,所述的框架区由

[0028] (Z1) SEQ ID NO:36所示的FR1, SEQ ID NO:43所示的FR2, SEQ ID NO:48所示的FR3,和SEQ ID NO:54所示的FR4组成。

[0029] 在另一优选例中,所述的框架区由

[0030] (Z2) SEQ ID NO:39所示的FR1, SEQ ID NO:45所示的FR2, SEQ ID NO:51所示的FR3,和SEQ ID NO:54所示的FR4组成。

[0031] 在另一优选例中,所述的框架区由

[0032] (Z3) SEQ ID NO:40所示的FR1, SEQ ID NO:44所示的FR2, SEQ ID NO:53所示的FR3, 和SEQ ID NO:54所示的FR4组成。

[0033] 在另一优选例中, 所述框架区由选自下组的FR1、FR2、FR3和FR4组成:

组	FR1序列编号	FR2序列编号	FR3序列编号	FR4序列编号
1	36	43	48	54
2	37	44	49	54
[0034] 3	38	44	50	54
4	39	45	51	54
5	40	46	52	55
6	41	45	51	54
[0035] 7	42	47	51	54
8	40	44	53	54

[0036] 在另一优选例中, 所述的抗TROP2单域抗体的VHH链具有如SEQ ID NO:1-8任一所示的氨基酸序列。

[0037] 在另一优选例中, 所述的抗TROP2单域抗体的VHH链具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

[0038] 在另一优选例中, 所述的抗TROP2单域抗体的VHH链具有如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0039] 在另一优选例中, 所述的抗TROP2单域抗体的VHH链具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

[0040] 本发明的第三方面, 提供了一种抗TROP2单域抗体, 所述单域抗体是针对TROP2蛋白的单域抗体, 并且具有如SEQ ID NO:1-8任一所示的氨基酸序列的VHH链。

[0041] 在另一优选例中, 所述单域抗体具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VHH链。

[0042] 在另一优选例中, 所述单域抗体具有如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的VHH链。

[0043] 在另一优选例中, 所述单域抗体具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VHH链。

[0044] 本发明的第四方面, 提供了一种多核苷酸, 所述多核苷酸编码选自下组的蛋白质: 本发明第一方面所述的CDR区、本发明第二方面所述的抗TROP2单域抗体的VHH链、或本发明第三方面所述的抗TROP2单域抗体。

[0045] 在另一优选例中, 所述多核苷酸具有如SEQ ID NO.:9-16任一所示的核苷酸序列。

[0046] 在另一优选例中, 所述的多核苷酸包括DNA、cDNA或RNA。

[0047] 本发明的第五方面, 提供了一种表达载体, 所述表达载体含有本发明第四方面所述的多核苷酸。

[0048] 在另一优选例中, 所述表达载体包括: 细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒、或其他载体。

[0049] 本发明的第六方面, 提供了一种宿主细胞, 所述宿主细胞含有本发明第五方面所述的表达载体, 或其基因组中整合有本发明第四方面所述的多核苷酸。

[0050] 在另一优选例中, 所述的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞。

[0051] 在另一优选例中, 所述的宿主细胞选自下组: 大肠杆菌、酵母细胞。

[0052] 本发明的第七方面, 提供了一种产生抗TROP2单域抗体的方法, 包括步骤:

[0053] (a) 在适合产生单域抗体的条件下,培养本发明第六方面所述的宿主细胞,从而获得含所述抗TROP2单域抗体的培养物;以及(b)从所述培养物中分离或回收所述的抗TROP2单域抗体。

[0054] 在另一优选例中,所述的抗TROP2单域抗体具有如SEQ ID NO:1-8任一所示的氨基酸序列。

[0055] 本发明的第八方面,提供了一种免疫偶联物,该免疫偶联物含有:

[0056] (a) 如本发明第二方面所述的抗TROP2单域抗体的VHH链、或如本发明第三方面所述的抗TROP2单域抗体;和(b)选自下组的偶联部分:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、或酶。

[0057] 在另一优选例中,所述偶联部分为药物或毒素。

[0058] 在另一优选例中,所述偶联部分为可检测标记物。

[0059] 在另一优选例中,所述偶联物选自:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶、放射性核素、生物毒素、细胞因子(如IL-2等)、抗体、抗体Fc片段、抗体scFv片段、金纳米颗粒/纳米棒、病毒颗粒、脂质体、纳米磁粒、前药激活酶(例如,DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL))、化疗剂(例如,顺铂)或任何形式的纳米颗粒等。

[0060] 在另一优选例中,所述免疫偶联物含有:多价(如二价)的如本发明第二方面所述的抗TROP2单域抗体的VHH链、如本发明第三方面所述的抗TROP2单域抗体。

[0061] 在另一优选例中,所述多价是指,在所述免疫偶联物的氨基酸序列中包含多个重复的如本发明第二方面所述的抗TROP2单域抗体的VHH链、本发明第三方面所述的抗TROP2单域抗体。

[0062] 本发明的第九方面,提供了如本发明第二方面所述的VHH链,如本发明第三方面所述的抗TROP2单域抗体,或如本发明第八方面所述的免疫偶联物的用途,其特征在于,用于制备(a)用于检测TROP2分子的试剂;(b)用于治疗肿瘤的药物。

[0063] 在另一优选例中,所述的检测包括流式检测、细胞免疫荧光检测。

[0064] 在另一优选例中,所述肿瘤为TROP2高表达的上皮肿瘤。

[0065] 在另一优选例中,所述肿瘤选自下组:胃癌、胰腺癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、子宫内粘膜浆液性乳头癌,或其组合。

[0066] 本发明的第十方面,提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含:(i)如本发明第三方面所述的单域抗体或如本发明第八方面所述的免疫偶联物;和(ii)药学上可接受的载体。

[0067] 在另一优选例中,所述的药物组合物为注射剂型。

[0068] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于制备治疗肿瘤的药物,所述的肿瘤选自下组:胃癌、胰腺癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、子宫内粘膜浆液性乳头癌,或其组合。

[0069] 本发明的第十一方面,提供了一种体外(诊断和非诊断性)检测样品中TROP2蛋白的方法,包括步骤:

[0070] (1)将样品与本发明第三方面所述的单域抗体或本发明第8方面的免疫偶联物接触;

[0071] (2) 检测是否形成抗原-抗体复合物,其中形成复合物就表示样品中存在TROP2蛋白。

[0072] 本发明的第十二方面,提供了一种治疗肿瘤的方法,包括向需要的对象施用如本发明第三方面所述的单域抗体,如本发明第八方面所述的免疫偶联物,或如本发明第十方面所述的药物组合物。

[0073] 在另一优选例中,所述肿瘤为TROP2高表达的上皮肿瘤。

[0074] 在另一优选例中,所述肿瘤选自下组:胃癌、胰腺癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、子宫内粘膜浆液性乳头癌,或其组合。

[0075] 在另一优选例中,所述对象包括人或非人类哺乳动物。

[0076] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0077] 图1是人TROP2-Fc蛋白抗原的检测结果。结果表明,该蛋白在SDS-PAGE纯度达到90%以上。

[0078] 图2是两个抗TROP2单域抗体噬菌体展示文库的构建和质量检测结果。图A为两个文库第一次和第二次PCR扩增产物的PCR鉴定图,结果表明,最终获得大小约为400bp的VHH基因片段;图B为两个文库的库容检测图,结果表明,两个文库库容分别为 7.1×10^8 和 5.0×10^8 CFU;图C为两个文库的插入率检测图,结果表明,两个文库的VHH插入率分别为96%和88%;图D为两个文库的富集检测图,结果表明,两个文库的特异性噬菌体经三轮筛选后分别达到24和150倍富集。

[0079] 图3是抗TROP2单域抗体与TROP2阳性表达BxPc3细胞结合活性的流式细胞术检测结果。结果表明,8株单域抗体均能够有效结合BxPc3细胞表面的TROP2蛋白。

具体实施方式

[0080] 本发明人经过广泛而深入的研究,经过大量的筛选,首次成功地研发出了一组抗TROP2单域抗体。实验结果表明,本发明获得的8株TROP2单域抗体均能以高亲和力特异性结合人或猴TROP2蛋白。并且,本发明的单域抗体能够与不同TROP2结构域结合,覆盖范围更加广泛。

[0081] 具体地,本发明利用人源的TROP2胞外段抗原蛋白免疫骆驼,获得高质量的免疫单域抗体基因文库。然后将TROP2蛋白分子偶联在酶标板上,展示TROP2蛋白的正确空间结构,以此形式的抗原利用噬菌体展示技术筛选免疫单域抗体基因库(骆驼重链抗体噬菌体展示基因库),从而获得了TROP2特异性的单域抗体基因。再将此基因转至大肠杆菌中,从而获得了能在大肠杆菌中高效表达的、且特异性高的单域抗体株。

[0082] 术语

[0083] 如本文所用,术语“本发明单域抗体”、“本发明的抗TROP2单域抗体”、“本发明TROP2单域抗体”可互换使用,均指特异性识别和结合于TROP2(包括人TROP2)的单域抗体。特别优选的是VHH链的氨基酸序列如SEQ ID NO.:1,4,8所示的单域抗体,最优选的是具有

如SEQ ID NO.:1所示的VHH链的单域抗体。

[0084] 如本文所用,术语“单域抗体”、“VHH”、“纳米抗体”(nanobody)具有相同的含义并可互换使用,指克隆抗体重链的可变区,构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体(VHH),它是具有完整功能的最小的抗原结合片段。通常先获得天然缺失轻链和重链恒定区1(CH1)的抗体后,再克隆抗体重链的可变区,构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体(VHH)。

[0085] 如本文所用,术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白,其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH),其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

[0086] 如本文所用,术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区,它们大致上呈 β -折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等,NIH Publ.No.91-3242,卷I,647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0087] 如本文所用,术语“重链可变区”与“ V_H ”可互换使用。

[0088] 如本文所用,术语“可变区”与“互补决定区(Complementarity Determining Region,CDR)”可互换使用。

[0089] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述抗体的重链可变区包括三个互补决定区CDR1、CDR2、和CDR3。

[0090] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述抗体的重链包括上述重链可变区和重链恒定区。

[0091] 在本发明中,术语“本发明抗体”、“本发明蛋白”、或“本发明多肽”可互换使用,都指特异性结合TROP2蛋白的多肽,例如具有重链可变区的蛋白或多肽。它们可含有或不含起始甲硫氨酸。

[0092] 本发明还提供了具有本发明抗体的其他蛋白质或融合表达产物。具体地,本发明包括具有含可变区的重链的任何蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物(即免疫偶联物及融合表达产物),只要该可变区与本发明抗体的重链可变区相同或至少90%同源性,较佳地至少95%同源性。

[0093] 一般,抗体的抗原结合特性可由位于重链可变区的3个特定区域来描述,称为可变区域(CDR),将该段间隔成4个框架区域(FR),4个FR的氨基酸序列相对比较保守,不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构,通过其间的FR形成的 β 折叠在空间结构上相互靠近,重链上的CDR和相应轻链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的

氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。

[0094] 本发明抗体的重链的可变区特别令人感兴趣,因为它们中至少部分涉及结合抗原。因此,本发明包括那些具有带CDR的抗体重链可变区的分子,只要其CDR与此处鉴定的CDR具有90%以上(较佳地95%以上,最佳地98%以上)的同源性。

[0095] 本发明不仅包括完整的抗体,还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此,本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

[0096] 如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列,或与6His标签形成的融合蛋白)。根据本文的教导,这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0097] 本发明抗体指具有TROP2蛋白结合活性的、包括上述CDR区的多肽。该术语还包括具有与本发明抗体相同功能的、包含上述CDR区的多肽的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于):一个或多个氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括本发明抗体的活性片段和活性衍生物。

[0098] 该多肽的变异形式包括:同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与本发明抗体的编码DNA杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗本发明抗体的抗血清获得的多肽或蛋白。

[0099] 本发明还提供了其他多肽,如包含单域抗体或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外,本发明还包括了本发明单域抗体的片段。通常,该片段具有本发明抗体的至少约50个连续氨基酸,较佳地至少约50个连续氨基酸,更佳地至少约80个连续氨基酸,最佳地至少约100个连续氨基酸。

[0100] 在本发明中,“本发明抗体的保守性变异体”指与本发明抗体的氨基酸序列相比,有至多10个,较佳地至多8个,更佳地至多5个,最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表A进行氨基酸替换而产生。

[0101] 表A

	最初的残基	代表性的取代	优选的取代
[0102]	Ala(A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys

[0103]	Asn(N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
	Asp(D)	Glu	Glu
	Cys(C)	Ser	Ser
	Gln(Q)	Asn	Asn
	Glu(E)	Asp	Asp
	Gly(G)	Pro; Ala	Ala
	His(H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile(I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
	Leu(L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys(K)	Arg; Gln; Asn	Arg
	Met(M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe(F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
	Pro(P)	Ala	Ala
	Ser(S)	Thr	Thr
	Thr(T)	Ser	Ser
	Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val(V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

[0104] 本发明还提供了编码上述抗体或其片段或其融合蛋白的多核苷酸分子。本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。

[0105] 编码本发明的成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列（和任选的附加编码序列）以及非编码序列。

[0106] 术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

[0107] 本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少50%，更佳地至少70%，更佳地至少80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1) 在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如0.2×SSC, 0.1%SDS, 60℃；或(2) 杂交时加有变性剂，如50% (v/v) 甲酰胺, 0.1%小牛血清/0.1%Ficoll, 42℃等；或(3) 仅在两条序列之间的相同性至少在90%以上，更好是95%以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

[0108] 本发明的抗体的核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一种可行的方法是用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。此外，还可将重链的编码序列和表达标签（如6His）融合在一起，形成融合蛋白。

[0109] 一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。本发明所涉及的生物分子（核酸、蛋白等）包括以分离的形式存在的生物分子。

[0110] 目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白（或其片段，或其衍生

物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0111] 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0112] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属;鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞;真菌细胞如酵母;果蝇S2或Sf9的昆虫细胞;CHO、COS7、293细胞的动物细胞等。

[0113] 用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获,用CaCl₂法处理,所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用MgCl₂。如果需要,转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物,可选用如下的DNA转染方法:磷酸钙共沉淀法,常规机械方法如显微注射、电穿孔,脂质体包装等。

[0114] 获得的转化子可以用常规方法培养,表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

[0115] 在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0116] 本发明的抗体可以单独使用,也可与可检测标记物(为诊断目的)、治疗剂、PK(蛋白激酶)修饰部分或任何以上这些物质的组合结合或偶联。

[0117] 用于诊断目的可检测标记物包括但不限于:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶。

[0118] 可与本发明抗体结合或偶联的治疗剂包括但不限于:1.放射性核素;2.生物毒;3.细胞因子如IL-2等;4.金纳米颗粒/纳米棒;5.病毒颗粒;6.脂质体;7.纳米磁粒;8.药激活酶(例如,DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL));9.疗剂(例如,顺铂)或任何形式的纳米颗粒等。

[0119] 药物组合物

[0120] 本发明还提供了一种组合物。优选地,所述的组合物是药物组合物,它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白,以及药学上可接受的载体。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地pH约为6-8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但不限于):瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

[0121] 本发明的药物组合物可直接用于结合TROP2蛋白分子,因而可用于治疗肿瘤。此外,还可同时使用其他治疗剂。

[0122] 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%,较佳地0.01-90wt%,更

佳地0.1-80wt%)的本发明上述的单域抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约10微克/千克体重-约50毫克/千克体重。此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

[0123] 使用药物组合物时,是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物,其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约50毫克/千克体重,较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约10毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0124] 标记的单域抗体

[0125] 在本发明的一个优选例中,所述单域抗体带有可检测标记物。更佳地,所述的标记物选自下组:同位素、胶体金标记物、有色标记物或荧光标记物。

[0126] 胶体金标记可采用本领域技术人员已知的方法进行。在本发明的一个优选的方案中,抗TROP2的单域抗体用胶体金标记,得到胶体金标记的单域抗体。在本发明的另一个优选的方案中,抗TROP2的单域抗体用放射性同位素标记,得到同位素标记的单域抗体。

[0127] 本发明的抗TROP2单域抗体具有很好的特异性,很高的效价。

[0128] 检测方法

[0129] 本发明还涉及检测TROP2蛋白的方法。该方法步骤大致如下:获得细胞和/或组织样本;将样本溶解在介质中;检测在所述溶解的样本中TROP2蛋白的水平。

[0130] 在本发明的检测方法中,所使用的样本没有特别限制,代表性的例子是存在于细胞保存液中的含细胞的样本。

[0131] 试剂盒

[0132] 本发明还提供了一种含有本发明的抗体(或其片段)或检测板的试剂盒,在本发明的一个优选例中,所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。

[0133] 本发明还提供了用于检测TROP2水平的检测试剂盒,该试剂盒包括识别TROP2蛋白的抗体,用于溶解样本的裂解介质,检测所需的通用试剂和缓冲液,如各种缓冲液、检测标记、检测底物等。该检测试剂盒可以是体外诊断装置。

[0134] 应用

[0135] 如上所述,本发明的单域抗体有广泛生物应用价值和临床应用价值,其应用涉及到与TROP2相关的疾病的诊断和治疗、基础医学研究、生物学研究等多个领域。一个优选的应用是用于针对TROP2的临床诊断和靶向治疗。

[0136] 本发明提供了抗TROP2单域抗体在诊断和治疗肿瘤中的应用,所述肿瘤为TROP2异常高表达(包括mRNA和/或蛋白水平)的上皮肿瘤,具体地,所述肿瘤包括但不限于:胃癌、胰腺癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、子宫内粘膜浆液性乳头癌等。

[0137] 本发明的主要优点包括:

[0138] (a) 本发明首次研发了针对TROP2靶点的单域抗体;

[0139] (b) 本发明的单域抗体与TROP2蛋白结合的亲和力高;

[0140] (c) 本发明的单域抗体能够结合不同靶点并与三个不同TROP2结构域结合;

[0141] (d) 本发明的单域抗体特异性好,只与人和恒河猴TROP2结合;

[0142] (e) 本发明的单域抗体能够于TROP2高表达肿瘤模型有效积聚,可应用于TROP2靶向的癌症诊断及疗效评估,同时用于开发新一代TROP2靶向治疗;

[0143] (f) 本发明的单域抗体制备方法简单,易于大量生产。

[0144] 下面结合具体实施例,进一步详陈本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法,通常按照常规条件如美国Sambrook.J等著《分子克隆实验室指南》(黄培堂等译,北京:科学出版社,2002年)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

[0145] 实施例1:人TROP2-Fc蛋白抗原表达

[0146] 利用哺乳动物细胞HEK293F瞬转表达人TROP2胞外段蛋白:将人TROP2胞外段基因克隆至pFUSE-IgG重组质粒,与转染试剂PEI 1:3混合后转染至HEK293F细胞;37°C,6%CO₂摇床培养箱中培养6天;随后收集细胞上清,与Protein A珠子在室温下结合1h;再用磷酸盐缓冲液pH 7.0洗涤珠子后,用0.1M pH3.0甘氨酸溶液洗脱蛋白;再将洗脱的蛋白超滤至PBS溶液中,测定产量后取样进行SDS-PAGE检测。

[0147] 检测结果如图1所示,TROP2-Fc蛋白抗原的纯度大于90%,可用于骆驼免疫及抗体筛选。

[0148] 实施例2:人TROP2胞外段蛋白免疫文库构建及筛选

[0149] 将纯化过的TROP2-Fc蛋白蛋白免疫2只新疆双峰驼,7次免疫结束后从骆驼外周血中分离total RNA,经反转录和PCR扩增出VHH基因(图2A),再将VHH基因克隆至噬菌体载体pMECS上,转化至TG1宿主细胞中构建成噬菌体展示文库。两个构建文库被梯度稀释后涂板并测定库容,同时每个构建文库随机挑取24颗克隆进行菌落PCR检测。

[0150] 结果表明,两个构建文库库容分别为 7.1×10^8 和 5.0×10^8 CFU(图2B),文库插入率为91.6%分别为96%和88%(图2C)。

[0151] 随后利用噬菌体展示技术进行3轮“吸附-洗涤-富集”,最终两个文库的特异性噬菌体分别达到24和150倍富集(图2D)。从以上富集的噬菌体克隆中随机挑选600颗针对人TROP2-Fc进行PE-ELISA鉴定,将获得的阳性克隆(比值>3)全部进行测序鉴定,将所有序列不同的单域抗体(101株)均作为候选对象。

[0152] 实施例3:抗TROP2单域抗体的表达和纯化

[0153] 从实施例2测序分析所获得的抗体克隆挑选出48株,将各质粒电转至大肠杆菌WK6中,并将其涂布在LA+葡萄糖的培养平板上,37°C培养过夜;挑选单个菌落接种在5mL含有氨苄青霉素的LB培养液中,37°C摇床培养过夜;接种1mL的过夜菌种至330mL TB培养液中,37°C摇床培养,培养到OD_{0.6-1}时,加入IPTG,28°C摇床培养过夜;离心收菌,并利用渗透法获得抗体粗提液;经镍柱离子亲和层析制备纯化的单域抗体。

[0154] 经检测表达纯化的单域抗体纯度大于90%,用于候选功能活性研究,最终获得下列8株先导单域抗体。

[0155] 表1 TROP2单域抗体序列编号

[0156]

抗体编号	氨基酸序列编号	核苷酸序列编号
MY1530-1-20	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:9

MY1530-1-26	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:10
MY1530-2-53	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:11
MY1530-4-22	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:12
MY1530-4-28	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:13
MY1530-5-17	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:14
MY1530-5-54	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:15
MY1530-6-1	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:16

[0157] 8株单域抗体的序列如下所示,三个CDR区分别用下划线标出。

[0158] SEQ ID NO:1

[0159] QVQLQESGGGSVLAGGSLRLSCTVSGSFVSSRSMWFRQTPGKEREGVAAISQYGDPKYAGSVKGRFTM
SRDNAKNTLLLQMNLSKPEDTAIYYCAAGEAWELATLSRSDYIYWGGGTQVTVSS

[0160] SEQ ID NO:2

[0161] QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVVS~~GYTTTRY~~SMAWFRQAPGKEREGVAGIDTDVLT~~TYKPSVEGRFTI~~
SRDSAKRTLYLQMNLSKPEDTAMYYCATGTGNFLALDPVWYNTWGQGTQVTVSS

[0162] SEQ ID NO:3

[0163] QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAVSGLTSS~~TCMGWFRQAPGKEREGVAVIRSSGETTAADSVKGRFTI~~
SRDNAKNTLSLQMTSLKPEDTAMYYCAA~~AWPYSGCLLPLSSGDFTYWGQGTQVTVSS~~

[0164] SEQ ID NO:4

[0165] QVQLQESGGGSVQAGGSLKLS~~CVVSGYTVSSVCM~~AWFRQAPGMERELVAGFYHSGGTYYGDSVKGRFTA
SQDNAKNTLYLQMNLSKPEDTATYYCARARYPSSACGTSPSNYNIWGQGTQVTVSS

[0166] SEQ ID NO:5

[0167] QVQLQESGGGSVQAGGSLRLS~~CAASGSVSTTWMH~~WVRQAPGKGLEWVSRI~~AINDH~~TFYAESVKGRFTM
STDNAKNTVYLQMTSLKPEDTAVYYCSPYSDYRIRGQGTQVTVSS

[0168] SEQ ID NO:6

[0169] QVQLQESGGGSVQPGGSLRLS~~CVVSGYTVSSVCM~~AWFRQAPGMERELVAGFYHSGGTYYGDSVKGRFTA
SQDNAKNTLYLQMNLSKPEDTATYYCARARYPSSACGTSPSNYNIWGQGTQVTVSS

[0170] SEQ ID NO:7

[0171] QVQLQESGGGSVQPGGSLRLS~~CVASGYTASSVCM~~AWFRQAPGKERELVAGYYHSGGTYYGDSVKGRFTA
SQDNAKNTLYLQMNLSKPEDTATYYCARARYPSSACGTSPSNYNIWGQGTQVTVSS

[0172] SEQ ID NO:8

[0173] QVQLQESGGGSVQAGGSLRLS~~CAASGFPYSSYSM~~WFRQAPGKEREGVAAIYTGGGSTYYAGSVKGRFT
ISQEHATNTLYLQMNLSKPEDTAMYYCAANMVDNGVISG~~IQALGVRYYNYWGQGTQVTVSS~~

[0174] SEQ ID NO:9

[0175] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTCGGTGCTGGCTGGAGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACA
GTCTCTGGATCGTTTCGTCAGCAGCCGCTCCATGGCCTGGTCCGCCAGACTCCAGGAAGGAGCGCGAGGGGGTCGC
AGCTATTTCTCAGTATGGGGACCCAAAGTACGCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATGTCTCGAGACAACGCCA
AGAACACTCTCTTGCTACAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATCTACTACTGTGCGGCAGGCGAGGCT
TGGGAGTTGGCTACGTTGTCCAGGAGCGACTATATCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0176] SEQ ID NO:10

[0177] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTA
GTCTCTGGATACACCACCACCCGGTACTCCATGGCTTGGTTCCGCCAGGCTCCTGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC
AGGTATTGATACTGATGTTCTTACAACCTACAAACCGTCTGTTGAGGGCCGATTACCATCTCCCGAGACAGCGCCA
AGAGAACTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGACAGGGACTGGA
AATTTCTTGGCACTGGATCCGGTCTGGTATAATACCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0178] SEQ ID NO:11

[0179] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA
GTCTCTGGACTCACCAGCAGTACCACCTGCATGGGCTGGTTCCGACAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC
AGTTATTAGAAGTTCTGGTGAGACAACCGCCGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCGAGACAACGCCA
AGAACACTCTGTCTTTGCAAATGACCAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGCGTGGCCG
TATAGTGGTTGCTACTCCCCCTGTCGTCGGGGACTTTACTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC
A

[0180] SEQ ID NO:12

[0181] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAAACTCTCCTGTGTA
GTCTCTGGATACACCGTTAGTAGCGTCTGCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCGCCAGGGATGGAGCGCGAACTGGTTCGC
AGGTTTTTATCATAGTGGGGGCACTTACTATGGCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCAGCCTCCCAAGACAACGCCA
AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCACATACTACTGTGCGCGCGCACGTTAC
CCGTCTCTGCCTGCGGCACCTTACCATCAAATTATAACATCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0182] SEQ ID NO:13

[0183] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTTCAGCGTCAGTACCACCTGGATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTGTAGTGGGTCTC
GCGTATTGCTATTAATGATCACACATTCTATGCAGAGTCAGTGAAGGGCCGATTACCATGTCCACAGACAACGCCA
AGAATACGGTGTATCTGCAAATGACCAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTAGTCCATATAGTGAC
TATCGAATTCGTGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0184] SEQ ID NO:14

[0185] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGCCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTA
GTCTCTGGATACACCGTTAGTAGCGTCTGCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCGCCAGGGATGGAGCGCGAACTGGTTCGC
AGGTTTTTATCATAGTGGGGGCACTTACTATGGCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCAGCCTCCCAAGACAACGCCA
AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCACATACTACTGTGCGCGCGCACGTTAC
CCGTCTCTGCCTGCGGCACCTTACCATCAAATTATAACATCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0186] SEQ ID NO:15

[0187] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGCCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTA
GCCTCTGGATACACCGCGAGTAGTGTCTGCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCGCCAGGGAAGGAGCGCGAACTGGTTCGC
AGGGTATTATCATAGTGGGGGCACTTACTATGGCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCAGCCTCCCAAGACAACGCCA
AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCACATACTACTGTGCGCGCGCACGTTAT
CCGTCTCTGCCTGCGGCACCTTACCATCAAATTATAACATCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0188] SEQ ID NO:16

[0189] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTTCCCTACAGTAGCTACTCGATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC

AGCTATTTATACTGGTGGTGGTAGCACATACTATGCCGGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCCAAGAGCACG
CCACGAACACACTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAAATATG
GTAGATAACGGCGTTATCTCTGGTATTCAGGCTCTTGGTGTAGGTACTATACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGT
CACCGTCTCCTCA

[0190] 实施例4:抗TROP2单域抗体与不同种属TROP2的酶联免疫法(ELISA)检测

[0191] 利用人,鼠和恒河猴种属的TROP2-Fc抗原蛋白包备酶标板,4℃过夜;第二天用PBS-T洗涤4次,加入1%BSA,室温下封闭2小时;用PBS-T洗涤4次,加入按梯度稀释的抗TROP2单域抗体,37℃放置1小时;用PBS-T洗涤4次,加入鼠抗His-HRP抗体,37℃放置1小时;用PBS-T洗涤4次,加入TMB可溶性底物,室温下放置10分钟;在450nm波长读取吸收值,根据吸收值计算各单域抗体Kd值。

[0192] 检测结果如表2所示,本发明的抗TROP2单域抗体只与人源和恒河猴源TROP结合。

[0193] 表2抗TROP2单域抗体ELISA结果

抗体编号	人TROP2 Kd	鼠TROP2 Kd	恒河猴TROP2 Kd
MY1530-1-20	1.13 nM	ND	2.33 nM
MY1530-1-26	4.86 nM	ND	29.45 nM
MY1530-2-53	4.23 nM	ND	28.11 nM
MY1530-4-22	1.29 nM	ND	1.67 nM

MY1530-4-28	1.20 nM	ND	1.38 nM
MY1530-5-17	1.39 nM	ND	1.78 nM
MY1530-5-54	1.28 nM	ND	1.73 nM
MY1530-6-1	1.51 nM	ND	4.47 nM

[0196] 实施例5:抗TROP2单域抗体与人TROP2的蛋白结合动力学(Biacore 8K)检测

[0197] 利用羧基氨基反应将固定相人TROP2-Fc抗原蛋白固定在CM-5传感芯片表面;将抗TROP2单域抗体用HBS缓冲液稀释成不同浓度,以30u1/分钟流速加入抗TROP2单域抗体,结合90s后解离600s,观察抗TROP2单域抗体与抗原结合过程;用10mM甘氨酸溶液冲洗进行芯片再生后,进行下一个抗TROP2单域抗体测定。

[0198] 检测结果如表3所示,本发明的抗TROP2单域抗体与TROP2-Fc蛋白的结合均能够达到nM。

[0199] 表3抗TROP2单域抗体Biacore 8K结果

抗体编号	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	Kd
MY1530-1-20	5.09E+05	1.79E-04	0.35nM
MY1530-1-26	1.61E+06	3.04E-03	1.89nM
MY1530-2-53	4.51E+05	4.43E-03	9.83nM
MY1530-4-22	2.57E+05	1.87E-04	0.73nM
MY1530-4-28	1.47E+05	7.17E-04	4.89nM

MY1530-5-17	4.05E+05	1.10E-04	0.27nM
MY1530-5-54	4.49E+05	8.99E-05	0.20nM
MY1530-6-1	1.09E+06	2.27E-04	0.21nM

[0201] 实施例6:抗TROP2单域抗体与人TROP2结构域结合的ELISA检测

[0202] 利用不同人TROP2结构域的Fc抗原蛋白包备酶标板,4℃过夜;第二天用PBS-T洗涤4次,加入1%BSA,室温下封闭2小时;用PBS-T洗涤4次,加入按梯度稀释的抗TROP2单域抗体,37℃放置1小时;用PBS-T洗涤4次,加入鼠抗His-HRP抗体,37℃放置1小时;用PBS-T洗涤4次,加入TMB可溶性底物,室温下放置10分钟;在450nm波长读取吸收值,根据吸收值计算各单域抗体Kd值。检测结果如表4所示,本发明的抗TROP2单域抗体与不同TROP2结构域结合。

[0203] 表4抗TROP2单域抗体ELISA结果

[0204]

抗体编号	CRD+TY-1+CPD	TY-1+CPD	CPD	结论
MY1530-1-20	1.13nM	ND	ND	CRD
MY1530-1-26	4.86nM	ND	ND	CRD
MY1530-2-53	4.23nM	ND	ND	CRD
MY1530-4-22	1.29nM	0.53nM	1.02nM	CPD
MY1530-4-28	1.20nM	ND	ND	CRD
MY1530-5-17	1.39nM	0.53nM	0.53nM	CPD
MY1530-5-54	1.28nM	0.53nM	0.53nM	CPD
MY1530-6-1	1.51nM	2.14nM	ND	TY

[0205] 实施例7:抗TROP2单域抗体与人TROP2表位鉴定分组的ELISA检测

[0206] 利用不同抗TROP2单域抗体包备酶标板,4℃过夜;第二天用PBS-T洗涤4次,加入13%BSA,室温下封闭1小时;用PBS-T洗涤5次,加入人TROP2-Fc和抗TROP2单域抗体,37℃放置1小时;加入抗人Fc-HRP抗体,37℃放置1小时;用PBS-T洗涤5次,加入TMB可溶性底物,室温下放置2分钟;在450nm波长读取吸收值,根据吸收值计算各单域抗体竞争结果。

[0207] 检测结果如表5所示,本发明的抗TROP2单域抗体按结合表位能分成4组,其中MY1530-1-20、MY1530-1-26和MY1530-2-53为组1,MY1530-4-22、MY1530-5-17和MY1530-5-54为组2,MY1530-4-28为组3,MY1530-6-1为组4。

[0208] 表5抗TROP2单域抗体表位鉴定ELISA结果

	抗体编号	MY1530 - 1-20	MY1530 - 1-26	MY1530 - 2-53	MY1530 - 4-22	MY1530 - 4-28	MY1530 - 5-17	MY1530 - 5-54	MY1530 - 6-1	结论
	MY1530 - 1-20	竞争	竞争	竞争	非竞争	非竞争	非竞争	非竞争	竞争	组1
	MY1530 - 1-26	竞争	竞争	竞争	非竞争	非竞争	非竞争	非竞争	竞争	组1
[0209]	MY1530 - 2-53	竞争	竞争	竞争	非竞争	非竞争	非竞争	非竞争	竞争	组1
	MY1530 - 4-22	非竞争	非竞争	非竞争	竞争	非竞争	竞争	竞争	非竞争	组2
	MY1530 - 4-28	非竞争	非竞争	非竞争	非竞争	竞争	非竞争	非竞争	非竞争	组3
	MY1530 - 5-17	非竞争	非竞争	非竞争	竞争	非竞争	竞争	竞争	竞争	组2
[0210]	MY1530 - 5-54	竞争	竞争	竞争	非竞争	非竞争	非竞争	非竞争	竞争	组4
	MY1530 - 6-1	竞争	竞争	竞争	非竞争	非竞争	非竞争	非竞争	竞争	组4

[0211] 实施例8:抗TROP2单域抗体与肿瘤细胞的流式细胞分析术 (FACS) 检测

[0212] 利用高表达TROP2的肿瘤细胞BxPc3进行抗体结合功能验证:将培养的BxPc3细胞用胰酶消化并用完全培养基中和后,用PBS洗涤细胞一次,然后收集细胞;平均分装至96孔板中,加入人Fc阻断抗体,4℃孵育15分钟;离心后用PBS洗涤细胞一次,加入抗TROP2单域抗体或非靶向单域抗体(阴性对照),4℃孵育30分钟;离心后用PBS洗涤细胞一次,再加入anti-HA-Alexa Fluor488或鼠和兔抗TROP2-FITC抗体(阳性对照),4℃孵育20分钟;用PBS洗涤一次细胞后,4℃离心5分钟,弃上清,加入200u1 PBS重悬细胞,流式检测每个样本Alexa Fluor488信号。

[0213] 结果如图3所示,本发明的抗TROP2单域抗体能够有效结合肿瘤细胞表面的TROP2蛋白。

[0214] 实施例9:抗TROP2单域抗体在小鼠肿瘤异种移植模型的SPECT/CT显像

[0215] 在三羰基试剂盒,加入高锝酸盐,99℃孵育20分钟;冷却试剂瓶至室温,加入盐酸,中和三羰基锝至pH7-7.5;加入抗TROP2单域抗体,37℃孵育1小时;用薄层色谱法对锝标记抗TROP2单域抗体进行放射纯度鉴定。

[0216] 在裸鼠右侧背部皮下接种 1×10^7 个TROP2高表达(BxPc3)细胞,待肿瘤长至150-200mm³用于正式实验研究;通过异氟烷麻醉荷瘤鼠,尾静脉注射锝标记抗TROP2单域抗体(~10ug,37MBq);给药后90分钟进行扫描,采集方式为静态15分钟SPECT、中分辨率全身CT。

[0217] 本发明的抗TROP2单域抗体能够于TROP2高表达肿瘤模型有效积聚,应用于TROP2靶向的癌症诊断及疗效评估,同时可用于开发新一代TROP2靶向治疗。

[0218] 本发明的氨基酸序列信息

[0219]

名称	序列	SEQ ID NO:
MY1530-1-20 VHH	<u>QVQLQESGGGSVLAGGSLRLSCTVSGSFVSSR</u> <u>SMAWFRQTPGKEREVAAISQYGDPKYAGSV</u> <u>KGRFTMSRDNAKNTLLQLMNSLKPEDTAIYY</u> <u>CAAGEAWELATLSRSDYIYWGGGTQVTVSS</u>	1
MY1530-1-26 VHH	<u>QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVVSgyTTTR</u> <u>YSMAWFRQAPGKEREVAGIDTDVLTtyKPS</u> <u>VEGRFTISRDSAKRTLYLQMNSLKPEDTAMYY</u> <u>CATGTGNFLALDPVWYNTWGQGTQVTVSS</u>	2
MY1530-2-53 VHH	<u>QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAVSGLTSSTT</u> <u>CMGWFRQAPGKEREVAVIRSSGETTAADSV</u> <u>KGRFTISRDNKNTLSLQMTSLKPEDTAMYYC</u> <u>AAAWPYSGCLLPLSSGDFTYWGQGTQVTVSS</u>	3
MY1530-4-22 VHH	<u>QVQLQESGGGSVQAGGSLKLSCVVSgyTVSS</u> <u>VCMAWFRQAPGMERELVAGfyHSGGTyyGD</u> <u>SVKGRFTASQDNKNTLYLQMNSLKPEDTAT</u> <u>YYCARARYPSSACGTSPSNYNIWGQGTQVTVS</u> <u>S</u>	4
MY1530-4-28 VHH	<u>QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGFSVSTT</u> <u>WMHWVRQAPGKGLEWVSRIAINDHTFYAESV</u> <u>KGRFTMSTDNAKNTVYLQMTSLKPEDTAVYY</u> <u>CSPYSDYRIRGQGTQVTVSS</u>	5
MY1530-5-17 VHH	<u>QVQLQESGGGSVQPGGSLRLSCVVSgyTVSSV</u> <u>CMAWFRQAPGMERELVAGfyHSGGTyyGDS</u> <u>VKGRFTASQDNKNTLYLQMNSLKPEDTATY</u> <u>YCARARYPSSACGTSPSNYNIWGQGTQVTVSS</u>	6
MY1530-5-54 VHH	<u>QVQLQESGGGSVQPGGSLRLSCVASgyTASSV</u> <u>CMAWFRQAPGKERELVAGyyHSGGTyyGDS</u> <u>VKGRFTASQDNKNTLYLQMNSLKPEDTATY</u> <u>YCARARYPSSACGTSPSNYNIWGQGTQVTVSS</u>	7
MY1530-6-1 VHH	<u>QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGFPYSSY</u> <u>SMGWFRQAPGKEREVAAIYTGGGSTYYAGS</u> <u>VKGRFTISQEHA TNTLYLQMNSLKPEDTAMY</u> <u>YCAANMVDNGVISGIQALGVRYNYWGQGT</u> <u>QVTVSS</u>	8
MY1530-1-20 CDR1	GSFVSSRSMA	17
MY1530-1-26 CDR1	GYTTTRY SMA	18
MY1530-2-53 CDR1	GLTSSTTCMG	19
MY1530-4-22 CDR1	GYTVSSVCMA	20
MY1530-4-28 CDR1	GFSVSTTWMH	21

[0220]

MY1530-5-17 CDR1	GYTVSSVCMA	20
MY1530-5-54 CDR1	GYTASSVCMA	22
MY1530-6-1 CDR1	GFPYSSYSMG	23
MY1530-1-20 CDR2	AISQYGDP	24
MY1530-1-26 CDR2	GIDTDVLT	25
MY1530-2-53 CDR2	VIRSSGET	26
MY1530-4-22 CDR2	GFYHSGGT	27
MY1530-4-28 CDR2	RIANDHT	28
MY1530-5-17 CDR2	GFYHSGGT	27
MY1530-5-54 CDR2	GYYHSGGT	27
MY1530-6-1 CDR2	AIYTGGGST	29
MY1530-1-20 CDR3	GEAWELATLSRSDYIY	30
MY1530-1-26 CDR3	GTGNFLALDPVWYNT	31
MY1530-2-53 CDR3	AWPYSGCLLPLSSGDFTY	32
MY1530-4-22 CDR3	ARYPSSACGTSPSNYNI	33
MY1530-4-28 CDR3	YSDYRI	34
MY1530-5-17 CDR3	ARYPSSACGTSPSNYNI	33
MY1530-5-54 CDR3	ARYPSSACGTSPSNYNI	33
MY1530-6-1 CDR3	NMVDNGVISGIQALGVRYNY	35
MY1530-1-20 FR1	QVQLQESGGGSVLAGGSLRLSCTVS	36
MY1530-1-26 FR1	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVVS	37
MY1530-2-53 FR1	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAVS	38
MY1530-4-22 FR1	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLSCVVS	39

[0221]

MY1530-4-28 FR1	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS	40
MY1530-5-17 FR1	QVQLQESGGGSVQPGGSLRLSCVVS	41
MY1530-5-54 FR1	QVQLQESGGGSVQPGGSLRLSCVAS	42
MY1530-6-1 FR1	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS	40
MY1530-1-20 FR2	WFRQTPGKEREVA	43
MY1530-1-26 FR2	WFRQAPGKEREVA	44
MY1530-2-53 FR2	WFRQAPGKEREVA	44
MY1530-4-22 FR2	WFRQAPGMERELVA	45
MY1530-4-28 FR2	WVRQAPGKGLEWVS	46
MY1530-5-17 FR2	WFRQAPGMERELVA	45
MY1530-5-54 FR2	WFRQAPGKERELVA	47
MY1530-6-1 FR2	WFRQAPGKEREVA	44
MY1530-1-20 FR3	KYAGSVKGRFTMSRDNAKNTLLLQMNSLKPE DTAIYYCAA	48
MY1530-1-26 FR3	TYKPSVEGRFTISRDSAKRTLQYLMNSLKPEDT AMYYCAT	49
MY1530-2-53 FR3	TAADSVKGRFTISRDNKNTLSLQMTSLKPED TAMYYCAA	50
MY1530-4-22 FR3	YYGDSVKGRFTASQDNKNTLYLQYLMNSLKPE DTATYYCAR	51
MY1530-4-28 FR3	FYAESVKGRFTMSTDNAKNTVYLQYMTSLKPE DTAVYYCSP	52
MY1530-5-17 FR3	YYGDSVKGRFTASQDNKNTLYLQYLMNSLKPE DTATYYCAR	51
MY1530-5-54 FR3	YYGDSVKGRFTASQDNKNTLYLQYLMNSLKPE DTATYYCAR	51
MY1530-6-1 FR3	YYAGSVKGRFTISQEHATNTLYLQYLMNSLKPED TAMYYCAA	53
MY1530-1-20 FR4	WGQGTQVTVSS	54
MY1530-1-26 FR4	WGQGTQVTVSS	54
MY1530-2-53 FR4	WGQGTQVTVSS	54

[0222]	MY1530-4-22 FR4	WGQGTQVTVSS	54
	MY1530-4-28 FR4	RGQGTQVTVSS	55
	MY1530-5-17 FR4	WGQGTQVTVSS	54
	MY1530-5-54 FR4	WGQGTQVTVSS	54
	MY1530-6-1 FR4	WGQGTQVTVSS	54

[0223] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110> 和迈生物科技有限公司

<120> 抗TROP2单域抗体及其应用

<130> P2021-1575

<160> 55

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Ser Phe Val Ser Ser Arg
 20 25 30

Ser Met Ala Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Ser Gln Tyr Gly Asp Pro Lys Tyr Ala Gly Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Leu Leu
65 70 75 80

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

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Tyr Thr Thr Thr Arg Tyr
 20 25 30

Ser Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Asp Thr Asp Val Leu Thr Thr Tyr Lys Pro Ser Val Glu
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Arg Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Thr Gly Thr Gly Asn Phe Leu Ala Leu Asp Pro Val Trp Tyr Asn Thr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 126

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 3

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

<210> 4

<211> 125

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Tyr Thr Val Ser Ser Val

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

<210> 5

<211> 114

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 5

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

Ser Ser

<210> 6

<211> 125

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 6

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly

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

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 7

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

<210> 8

<211> 130

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Tyr Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Tyr Thr Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Gly Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Glu His Ala Thr Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asn Met Val Asp Asn Gly Val Ile Ser Gly Ile Gln Ala Leu
 100 105 110
 Gly Val Arg Tyr Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
 115 120 125
 Ser Ser
 130

<210> 9

<211> 372

<212> DNA

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 9

caggtgcagc tgcaggagtc tggaggagc tcggtgctgg ctggagggtc tctgagactc 60
 tcctgtacag tctctggatc gttcgtcagc agccgctcca tggcctggtt ccgccagact 120
 ccaggaagg agcgcgaggg ggtcgcagct atttctcagt atggggacct aaagtacgca 180
 ggctccgtga agggccgatt caccatgtct cgagacaacg ccaagaacac tctcttgcta 240
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacact gccatctact actgtgcggc aggcgaggct 300
 tgggagttgg ctacgttgte caggagcgac tatatctact ggggccaggg gaccaggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 10

<211> 369

<212> DNA

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 10

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggagc tcggtgcagg ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgtag tctctggata caccaccacc cggtactcca tggcttggtt ccgccaggtc 120

cctgggaagg agcgcgaggg ggtcgcaggt attgatactg atgttcttac aacctacaaa 180
 ccgtctgttg agggccgatt caccatctcc cgagacagcg ccaagagaac tctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacact gccatgtact actgtgagac aggactgga 300
 aatttcttgg cactggatcc ggtctggtat aatactggg gccaggggac ccaggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 11

<211> 378

<212> DNA

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 11

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60
 tcctgtgcag tctctggact caccagcagt accacctgca tgggctggtt ccgacaggct 120
 ccaggggaagg agcgcgaggg ggtcgcagtt attagaagtt ctggtgagac aaccgccgca 180
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc cgagacaacg ccaagaacac tctgtctttg 240
 caaatgacca gcctgaaacc tgaggacact gccatgtact actgtgcggc agcgtggccg 300
 tatagtgggt gcctactccc cctgtcgtcg ggggacttta cttactgggg ccaggggacc 360
 caggtcaccg tctcctca 378

<210> 12

<211> 375

<212> DNA

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 12

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgaaactc 60
 tcctgtgtag tctctggata caccgtagt agcgtctgca tggcctggtt ccgccaggcg 120
 ccagggatgg agcgcgaact ggtcgcaggt tttatcata gtgggggacac ttactatggc 180
 gactccgtga agggccgatt caccgctcc caagacaacg ccaagaacac gctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacact gccacatact actgtgagcg cgcacgttac 300
 ccgtcatctg cctgcggcac ttcacatca aattataaca tctggggcca ggggaccag 360
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 13

<211> 342

<212> DNA

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 13

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cagcgtcagt accacctgga tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggcttgagt ggtctcgcgt attgctatta atgatcacac attctatgca 180
 gagtcagtga agggccgatt caccatgtcc acagacaacg ccaagaatac ggtgtatctg 240
 caaatgacca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtgtatt actgtagtcc atatagtgac 300

tatcgaattc gtggccaggg gaccaggtc accgtctcct ca 342
 <210> 14
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)
 <400> 14
 caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc tcggtgcagc ctggagggtc tctgagactc 60
 tcctgtgtag tctctggata caccgttagt agcgtctgca tggcctggtt ccgccaggcg 120
 ccagggatgg agcgcgaact ggtcgcaggt tttatcata gtgggggcac ttactatggc 180
 gactccgtga agggccgatt caccgcctcc caagacaacg ccaagaacac gctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacact gccacatact actgtgcgcg cgcacgttac 300
 ccgtcatctg cctgcggcac ttaccatca aattataaca tctggggcca ggggaccag 360
 gtcaccgtct cctca 375
 <210> 15
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)
 <400> 15
 caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc tcggtgcagc ctggagggtc tctgagactc 60
 tcctgtgtag cctctggata caccgcgagt agtgtctgca tggcctggtt ccgccaggcg 120
 ccagggaagg agcgcgaact ggtcgcaggg tattatcata gtgggggcac ttactatggc 180
 gactccgtga agggccgatt caccgcctcc caagacaacg ccaagaacac gctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacact gccacatact actgtgcgcg cgcacgttat 300
 ccgtcatctg cctgcggcac ttaccatca aattataaca tctggggcca ggggaccag 360
 gtcaccgtct cctca 375
 <210> 16
 <211> 390
 <212> DNA
 <213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)
 <400> 16
 caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt tcctacagt agctactega tgggctggtt ccgccaggct 120
 ccagggaagg agcgcgaggg ggtcgcagct atttatactg gtggtggtag cacatactat 180
 gccggtccg tgaaggccg attcaccate tccaagagc acgccacgaa cacactgtat 240
 ctgcagatga acagcctgaa acctgaggac actgceatgt actactgtgc ggcaaatatg 300
 gtagataacg gcgttatctc tggattcag gctcttggtg ttaggtacta taactactgg 360
 ggccagggga cccaggtcac cgtctcctca 390
 <210> 17
 <211> 10

<212> PRT
 <213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)
 <400> 17
 Gly Ser Phe Val Ser Ser Arg Ser Met Ala
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)
 <400> 18
 Gly Tyr Thr Thr Thr Arg Tyr Ser Met Ala
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)
 <400> 19
 Gly Leu Thr Ser Ser Thr Thr Cys Met Gly
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)
 <400> 20
 Gly Tyr Thr Val Ser Ser Val Cys Met Ala
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)
 <400> 21
 Gly Phe Ser Val Ser Thr Thr Trp Met His
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)
 <400> 22
 Gly Tyr Thr Ala Ser Ser Val Cys Met Ala

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 28

Arg Ile Ala Ile Asn Asp His Thr

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 29

Ala Ile Tyr Thr Gly Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 30

Gly Glu Ala Trp Glu Leu Ala Thr Leu Ser Arg Ser Asp Tyr Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 31

Gly Thr Gly Asn Phe Leu Ala Leu Asp Pro Val Trp Tyr Asn Thr

1 5 10 15

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 32

Ala Trp Pro Tyr Ser Gly Cys Leu Leu Pro Leu Ser Ser Gly Asp Phe

1 5 10 15

Thr Tyr

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 33

Ala Arg Tyr Pro Ser Ser Ala Cys Gly Thr Ser Pro Ser Asn Tyr Asn

1 5 10 15
 Ile
 <210> 34
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)
 <400> 34
 Tyr Ser Asp Tyr Arg Ile
 1 5
 <210> 35
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)
 <400> 35
 Asn Met Val Asp Asn Gly Val Ile Ser Gly Ile Gln Ala Leu Gly Val
 1 5 10 15
 Arg Tyr Tyr Asn Tyr
 20
 <210> 36
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)
 <400> 36
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Leu Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser
 20 25
 <210> 37
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)
 <400> 37
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser
 20 25
 <210> 38
 <211> 25
 <212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 38

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser
 20 25

<210> 39

<211> 25

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 39

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser
 20 25

<210> 40

<211> 25

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 40

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 41

<211> 25

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 41

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser
 20 25

<210> 42

<211> 25

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 42

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser
 20 25

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 43

Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ala

1 5 10

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 44

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ala

1 5 10

<210> 45

<211> 14

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 45

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Met Glu Arg Glu Leu Val Ala

1 5 10

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 46

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

1 5 10

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 47

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val Ala

1 5 10

<210> 48

<211> 40

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 48

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

<210> 49

<211> 40

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 49

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

<210> 50

<211> 40

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 50

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

<210> 51

<211> 40

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 51

Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ala Ser Gln Asp Asn
 1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
 20 25 30

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 35 40

<210> 52

<211> 40

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 52

Phe Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Thr Asp Asn
 1 5 10 15

Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Pro Glu Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Pro
 35 40

<210> 53

<211> 40

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 53

Tyr Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Glu His
 1 5 10 15

Ala Thr Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
 20 25 30

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala
 35 40

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 54

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> 双峰驼 (Camelus bactrianus)

<400> 55

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1

5

10

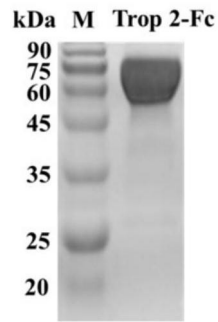


图1

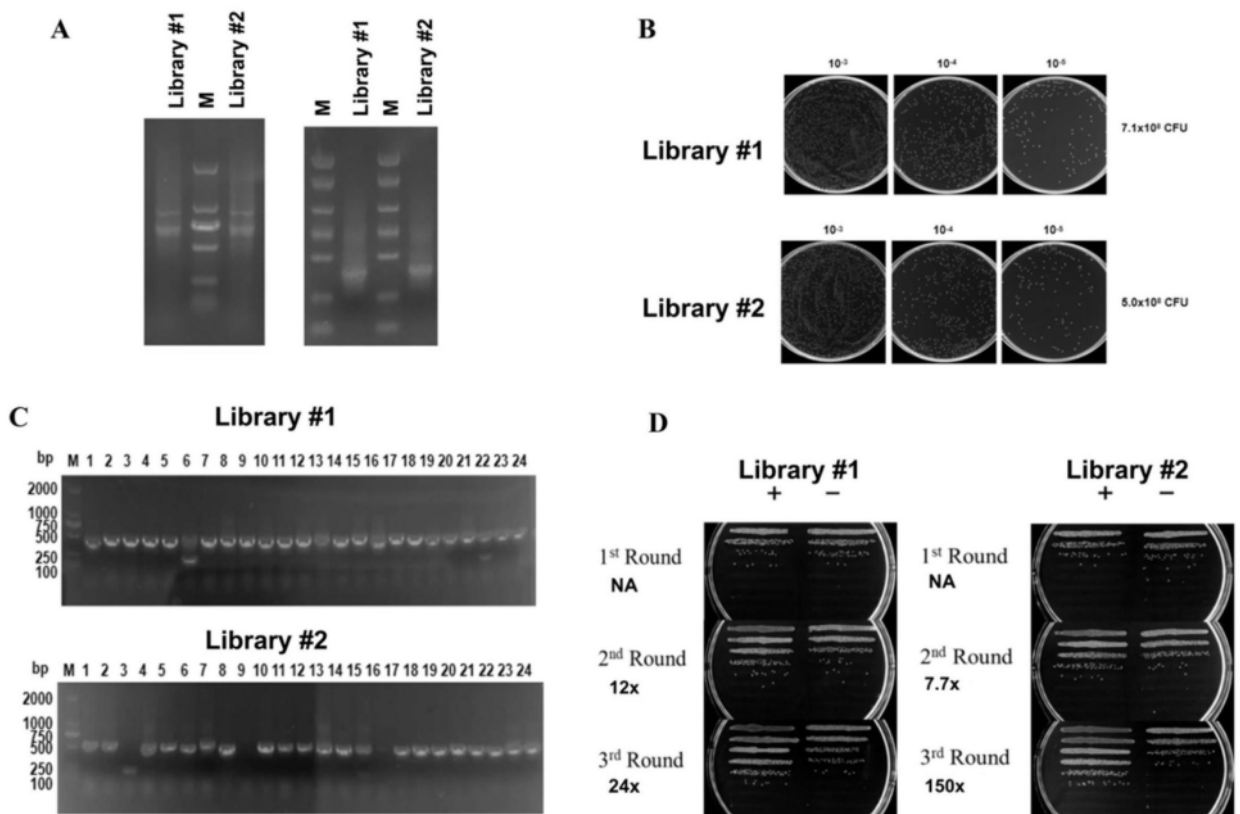


图2

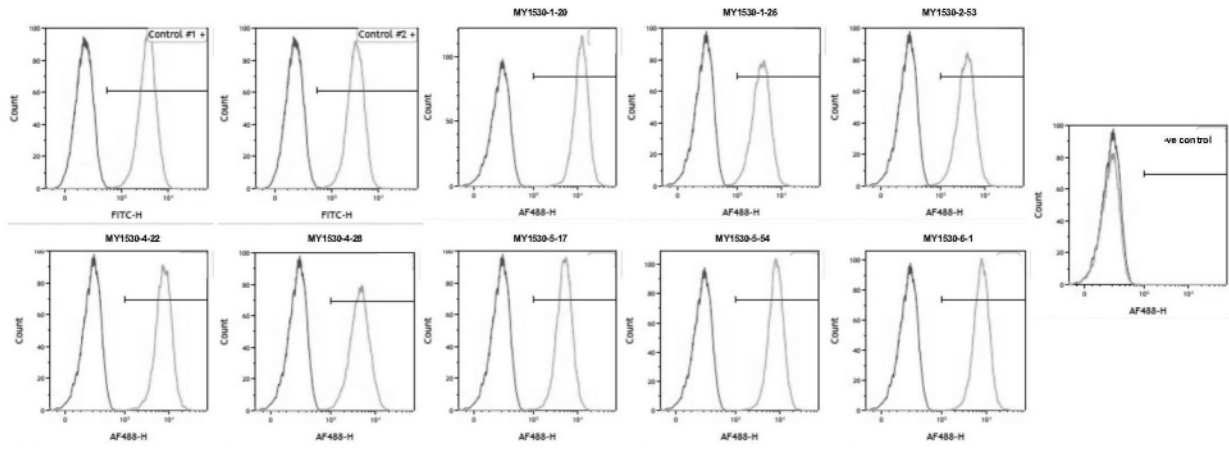


图3