

一种抗 TROP2 抗体

技术领域

本发明涉及能特异性结合人的 TROP2 蛋白的抗体，特别是鼠、嵌合和人源化来源的单克隆抗体，以及编码这些抗体的氨基酸和核苷酸序列。本发明也包含这些抗体作为诊断试剂或者药物在诊断性和/或治疗性处理恶性肿瘤或者所述受体过表达有关的任何病变的用途。

技术背景

Trop2 蛋白，又名 II 类滋养层抗原 (trophoblast antigen 2)、肿瘤钙信号转导因子 2 (tumour associated calcium signal transducer 2)，其由染色体 1p32 位的单拷贝基因 TACSTD2 编码。其对应的 mRNA 合成 36kDa 初生多肽，在经过 N 端糖基化后形成单跨膜域的单体膜蛋白 (Annie R.A. et al., 2015)。

在 Trop2 的 26 氨基酸长度之胞内区序列中，存在第 303 位的丝氨酸位点，此位点在物种间的保守性较高 (Basu et al., 1995; Annie R.A. et al., 2015)，且能被 PKC 激酶磷酸化，既成信号转导分子 PIP₂ 的结合位点，并下游刺激胞质钙离子浓度的上升 (Sewedy et al., 1998; Alberti. et al., 1999)。而在体外细胞系中过表达缺失胞质区的 Trop2，此蛋白即失去生长刺激的功能，表明 Trop2 胞质区域的其它信号通路刺激作用 (Guerra. et al.)。Trop2 的胞外区具有能够结合 EGF 生长因子的结构域，从而可潜在截获 EGF 以下调 IGF-1R/Akt 信号通路的活性，因此，Trop2 表达量的下降可反向激活 IGF-1R/Akt 信号通路 (Lin. et al., 2011; Annie R.A. et al., 2015)。

Trop2 在肿瘤发生过程中具有明显促进作用。过表达 Trop2 可显著增强 NIH3T3 细胞的成瘤性 (Wang. et al., 2008)，Trop2 亦可影响上皮-间质转化 (EMT)，并增强癌细胞的迁徙与侵入能力 (Trerotola. et al., 2013; Li. et al., 2017) 此过程可能通过影响 PI3K/Akt 信号通路而实现：在过表达 Trop2 的胆囊癌细胞中，Akt 的磷酸化激活程度明显提升，反之，敲低 Trop2 的表达则可抑制此信号通路的活性 (Li. et al., 2017)。此外，Trop2 过表达亦能刺激 MAPK/ERK 信号通路的活性，从而导致胰腺癌细胞的增殖上调，及荷瘤小鼠的肿瘤恶化程度增加 (Cubas. et al., 2010)。

Trop2 蛋白的表达见诸于一系列表皮源性组织，如胚胎发育和成体时期的乳腺、肾脏和胰腺等 (Annie R.A. et al., 2015)。但在正常组织对应的肿瘤组织中，Trop2 蛋白的表达量无差别地显著上升，且表达程度的强弱与动物模型中肿瘤生长程度呈现正相关性 (Trerotola. et al., 2013)，由于 Trop2 基因序列本身未发生突变或扩增，因此 Trop2 在癌症中的表达量上调被认为是转录调控层面的刺激所致 (Trerotola. et al., 2013)。在不同种

类的实质瘤病患体内，此蛋白的过表达通常预示肿瘤的预后不良（Zeng, et al., 2016）。在胆囊癌（Chen, et al., 2014）、肠胃癌（Muhlmann, et al., 2009）、肝门部胆管癌（Ning, et al., 2013）和胰腺癌（Fong, et al., 2008）病症的案例中，Trop2 高表达病患者的生存率明显下降。鉴于 Trop2 在多种癌症中的高表达性，以及其对病患生存率的显著影响，此蛋白被认为是一个潜在的肿瘤治疗靶点。

在已知的抗体药物种类中，一项针对 Trop2 靶点的毒素耦联抗体（ADC）：IMMU-132（Goldenberg, et al., 2015）。此 ADC 的装载抗体 RS7 是通过杂交瘤制备手段，经肺癌细胞膜粗提物免疫的小鼠脾脏淋巴细胞与鼠骨髓瘤细胞融合筛选获得（Stein, et al., 1990）。而在粗提物中，RS7 所结合的抗原后被证明为 Trop2（Stein, et al., 1994）。RS7 抗体本身可被多种癌细胞所内吞，因而使其具有制备成 ADC 的潜力（Stein, et al., 1993）。在鼠源 RS7 经过序列人源化以后，人源化版本的 RS7 被用于制备抗体偶联药物，并以链间巯基耦联的方式装载 SN-38 药物、一种拓扑异构酶的抑制剂（Moon, et al., 2008; Sahota, et al., 2017）。在最近的临床 I 期数据中，IMMU-132 在多种癌症，尤其在三阴性乳腺癌的治疗中具有临床有效性（Starodub, et al., 2015; Sahota and Vahdat, 2017）。

此专利披露的信息涉及医药领域，具体而言，本专利所述嵌合抗体或人源化抗体可结合人 II 类滋养层抗原蛋白（Trop2），且具备抗体偶联药物疗法中的靶向抗体功能。

发明内容

本发明不涉及天然形式的抗体，发明中所涉及抗体均通过免疫小鼠以及鉴定和分离手段获得，或者通过基因重组获得。根据本发明所述，要求保护对象为抗体或功能片段或衍生物，所述抗体的特征在于包含至少一个 CDR，其氨基酸序列来源于 SEQ ID No.1 至 SEQ ID No.12。

任何一个抗体片段或者衍生物若含有至少一个 CDR，且该 CDR 的序列在与序列 SEQ ID No.1 至 SEQ ID No.12 进行优化比对后，至少具有 80% 的同一性，或优选的 85%、90%、95% 或者 98% 同一性的，都应该理解为本发明的等同物，因此也是本发明的一部分。

更具体的，本发明所述的抗体或者起功能片段之一或者衍生物的特征在于其包含重链，所述的重链包含至少一个 CDR，所述的 CDR 选自含有氨基酸序列 SEQ ID No.1 至 SEQ ID No.6 的序列。

更具体的，本发明所述的抗体或者其功能片段之一或者衍生物的特征在于其包含轻链，所述的重链包含至少一个 CDR，所述的 CDR 选自含有氨基酸序列 SEQ ID No.7 至 SEQ ID No.12 的序列。

根据所述方面，更具体的第一个具体实施方式，本发明所述的抗体或者其功能片段之一

或者衍生物包含重链,所述重链包含 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3,其中 CDR-H1 包含氨基酸序列 SEQ ID No.1,CDR-H2 包含氨基酸序列 SEQ ID No.2,CDR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID No.3。

更具体的,根据第一个具体实施方式,所述的抗体或者其功能片段之一或者衍生物包含重链,所述重链的序列中,嵌合抗体包含序列 SEQ ID No.13,人源化抗体包含序列 SEQ ID No.17。

根据所述方面,更具体的第一个具体实施方式,本发明所述的抗体或者其功能片段之一或者衍生物包含轻链,所述轻链包含 CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3,其中 CDR-L1 包含氨基酸序列 SEQ ID No.7, CDR-L2 包含氨基酸序列 SEQ ID No.8, CDR-L3 包含氨基酸序列 SEQ ID No.9。

更具体的,根据第一个具体实施方式,所述的抗体或者其功能片段之一或者衍生物包含轻链,所述轻链的序列中,嵌合抗体包含序列 SEQ ID No.14,人源化抗体包含序列 SEQ ID No.18。

根据所述方面,更具体的第二个具体实施方式,本发明所述的抗体或者其功能片段之一或者衍生物包含重链,所述重链包含 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3,其中 CDR-H1 包含氨基酸序列 SEQ ID No.4, CDR-H2 包含氨基酸序列 SEQ ID No.5,CDR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID No.6。

更具体的,根据第二个具体实施方式,所述的抗体或者其功能片段之一或者衍生物包含重链,所述重链的序列中,嵌合抗体包含序列 SEQ ID No.15,人源化抗体包含序列 SEQ ID No.19。

根据所述方面,更具体的第二个具体实施方式,本发明所述的抗体或者其功能片段之一或者衍生物包含轻链,所述轻链包含 CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3,其中 CDR-L1 包含氨基酸序列 SEQ ID No.10,CDR-L2 包含氨基酸序列 SEQ ID No.11,CDR-L3 包含氨基酸序列 SEQ ID No.12

更具体的,根据第二个具体实施方式,所述的抗体或者其功能片段之一或者衍生物包含轻链,所述轻链的序列中嵌合抗体包含序列 SEQ ID No.16,人源化抗体包含序列 SEQ ID No.20

作为发明的另一方面,本发明涉及分离的 DNA,其特征包含选自下述 DNA 序列的核酸:其每一条核酸编码的氨基酸序列为上述氨基酸序列 SEQ ID No.1 至 SEQ ID No.20 中的一条。

更为具体的,包括选自下述的 DNA 序列的核酸:

第一个具体实施方式包含序列 SEQ ID No.21、SEQ ID No.22、SEQ ID No.23 和序列 SEQ ID No.27、SEQ ID No.28、SEQ ID No.29 的核酸序列。

第二个具体实施方式包含序列 SEQ ID No.24、SEQ ID No.25、SEQ ID No.26 和序列 SEQ ID No.30、SEQ ID No.31、SEQ ID No.32 的核酸序列。

再进一步具体说明

第一个具体实施方式嵌合抗体序列包含序列 SEQ ID No.33 和 SEQ ID No.34,人源化抗体序列包含序列 SEQ ID No.37 和 SEQ ID No.38 的核酸序列。

第二个具体实施方式嵌合抗体序列包含序列 SEQ ID No.35 和 SEQ ID No.36,人源化抗体

序列包含序列 SEQ ID No.39 和 SEQ ID No.40 的核酸序列。

附图说明

图 1 是 4D3 轻链、重链可变区序列 CDR 区识别以及二维结构图；

图 2 是 7F11 轻链、重链可变区序列 CDR 区识别以及二维结构图；

图 3 是 ch4D3、ch7F11 的 ELISA 结合曲线；

图 4 是 ch4D3 与 ch7F11 的细胞表面结合活性图；

图 5 是 ch4D3 与 ch7F11 抗体在 BXPc-3 活细胞上的内吞活性图；

图 6 是 4D3 鼠源抗体的轻重链可变区序列，其在人源化前后的类人分值（humanness；Z-score）变化图；

图 7 是 7F11 鼠源抗体的轻重链可变区序列，其在人源化前后的类人分值（humanness；Z-score）变化图；

图 8 是 4D3 人源化抗体与嵌合抗体在同等稀释浓度下的结合曲线图；

图 9 是 4D3 人源化抗体在 Day7(图 A)，Day14（图 B），Day21（图 C）时刻的 SEC 检测结果图；

图 10 是 7F11 人源化抗体与嵌合抗体在同等稀释浓度下的结合曲线图；

图 11 是 7F11 人源化抗体在 Day7(图 A)，Day14（图 B），Day21（图 C）时刻的 SEC 检测结果图；

图 12 是 4D3-humanized-biotin 抗体分别与 0.02~50ug/ml 的 ch4D3 与 hu4D3 抗体结合表位竞争结果；

图 13 是 7F11-humanized-biotin 抗体分别与 0.02~50ug/ml 的 ch7F11 与 hu7F11 抗体结合表位竞争结果。

图 14 是 hu7F11 抗体在 3 种细胞中的结合数据。

图 15 是 Hu4D3 抗体在 3 种细胞中的结合数据。

图 16 是 hu7F11 抗体在 3 种细胞中的内吞数据。

图 17 是 Hu4D3 抗体在 3 种细胞中的内吞数据。

具体实施方式

实施例 1 TROP2 抗原免疫 6~8 周龄的 Balb/c 小鼠

构建 TROP2 胞外区表达载体，用悬浮细胞 293F 瞬时表达毫克级的 TROP2 蛋白。选择 6-8 周龄的小鼠，按如下表格中的免疫剂量和时间点进行 TROP2 抗原的皮下免疫，终免选择三免后血浆效价最高的小鼠，免疫流程如表 1 所示。

程序	免疫进程（天数）	途径、剂量等
初免	0	100ug/0.25ml/每只鼠，完全佐剂，皮下免疫
二免	14	100ug/0.25ml/每只鼠，不完全佐剂，皮下免疫
三免	35	100ug/0.25ml/每只鼠，不完全佐剂，皮下免疫
三免采血	42	TROP2 抗原包板的 ELISA 检测尾静脉血浆效价
终免	56	50ug/0.25ml/每只鼠，磷酸盐缓冲液，腹腔免疫

表 1

实施例 2 免疫小鼠脾脏细胞体外融合

预先培养小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 于 DMEM+FBS 10%完全培养基中，融合前使用巴斯德吸管吹取 5×10^7 个 SP2/0 细胞，以 1000g，5min 转速离心并用 37℃ 预热的无血清 DMEM 润洗残留血清，同时采集 KM 鼠腹腔内的饲养细胞，并以 5×10^3 个/ 100ul/ 孔的细胞量将饲养细胞铺于 96 孔板。在终免后第 3 天眼球采血、并处死终免疫小鼠，75%酒精浸泡消毒后置于无菌操作台剪取脾脏组织。用预热的无血清 DMEM 吹取脾细胞，取 1/2 个脾脏的细胞进行计数，以脾细胞:SP2/0 细胞数量比例 1:1~10:1 混合，离心后吸干残留 DMEM。加入 1ml 体积的预热 PEG-1450 并均匀混合，3min 后加入 35ml 预热的 DMEM 培养基稀释终止。1000rpm，5min 离心细胞，后用 HAT 筛选培养基重悬细胞，铺板于 10 块 96 孔板中。

实施例 3 杂交瘤细胞上清阳性检测

融合后 7~10 天，观察细胞形成克隆的情况。在上清检测前一天用 DMEM+10%FBS 培养基换液一次。同时以 2ug/ml 浓度的 TROP2 抗原包被 ELISA 酶标板。在检测当天，在无菌操作台上用多通道电动移液器吸取 96 孔板中的培养基上清，悬空加入对应的 ELISA 酶标板孔中。将 ELISA 板置于 37° C 孵育 1hr，后 PBST 洗涤孔板 3 次，加入 1:5000 稀释的 HRP 标记羊抗小鼠抗体。37° C 孵育 1hr 后，PBST 洗涤 3 次。配置 TMB 底物显色液，每孔添加 50ul，于室温条件反应 5~10min。随后加入 50ul/孔 2M 硫酸溶液终止显色。根据酶标板上的 OD450 读值筛选阳性克隆。

实施例 4 阳性细胞株亚克隆筛选

标记 OD450 值较高的融合细胞板孔，持续培养不超过 2 天。按照实施例 2 中方法铺板饲养细胞，并用 200ul 枪头吹匀阳性细胞，取不超过 5ul 细胞悬液体积进行亚克隆，将其稀

释至 100ul, 并加入预先含有 100ul/孔饲养细胞悬液的 96 孔板中的第一个空。从 A1 到 H1 的方向以 100ul 体积均匀吹打至最后一排, 再用多通道电动移液器吸取 100ul 从 A1~A12 的方向均匀吹打至最后一列。将孔板培养 7~10 天, 标记单一克隆形成的板孔, 并参照实施例中的方法进行上清阳性检测。

实施例 5 腹水制备单克隆抗体

制备腹水前 7 日, 向 Balb/c 小鼠腹腔注射 1ml/每只用量的石蜡油。随后挑取第一次亚克隆后阳性率稳定的单克隆细胞, 进行扩大培养。在细胞长至至少一个 6 孔板板孔规模时收取细胞, 以 1000g, 3min 离心条件, 用磷酸缓冲液润洗细胞 3 次。按每只小鼠注射 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个/每只的量制备。饲养小鼠 7~10 天并观察小鼠腹腔。用 18 号无菌针头采集腹水, 并以 14000g, 5min 转速收集腹水上清。所得上清经过 proteinA/G 亲和柱纯化后即得到 4D3 和 7F11 细胞株的单克隆抗体。

实施例 6 获取 4D3 抗体轻重链可变区编码序列

培养单克隆细胞株至 6 孔板, 其汇合率达到 90~100%时用 trizol 收集细胞。在无 RNase 环境中提取总 RNA, 使用 oligo dT 作为逆转录引物合成 cDNA 文库。此 cDNA 文库经过末端转移酶 TdT 的 5'端加 dGTP 反应后用作 PCR 模板, 使用上游引物为 oligo dC, 下游引物对应抗体轻重链的 5'端 CH1 恒定区的引物搭配, 借助高保真酶 primerSTAR 进行可变区基因 5' RACE 扩增。将 PCR 产物进行 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析, 回收位于~750bp 长度的 DNA 片段, 进行下游 TA 克隆。将菌落 PCR 鉴定为阳性的菌株实施测序。所得序列由在线 IMGT 数据库进行序列比对鉴定以及可变区序列二维作图。

实施例 7 获取 7F11 抗体轻重链可变区编码序列

参照实施案例 6 中的操作过程, 得到 7F11 克隆的轻重链可变区序列, 如图 2 所示。

实施例 8 抗体的表达与纯化

使用 FreestyleTM 293-F (Invitrogen) 悬浮细胞表达抗体。转染前一天, 以 6×10^5 个/mL 密度将细胞接种于含 300mL F17 完全培养基 (FreestyleTM F17 表达培养基, Gibco 公司) 的 1L 摇瓶中, 37°C, 5%CO₂, 120rpm 细胞培养摇床过夜培养。次日, 用 PEI 进行抗体表达质粒的转染, 其中质粒:PEI 比例为 2:1。转染后一天, 按 2.5% (v/v) 加入 TN1 补料培养基, 继续培养 4 天后离心收集上清。收集得到的表达上清, 经 Protein A 亲和层析柱 (Mabselect Sure LX, GE 公司), 以 0.1M 柠檬酸 (pH3.0) 洗脱, 捕获的抗体用 1M Tris-HCl (pH9.0) 按 1/10 (v/v) 调节至 pH7.0, 再通过凝胶过滤层析柱 SEC (Superdex 200, GE 公司) 去除多聚体和内毒素等杂质, 同时将抗体缓冲液置换成 PBS (pH7.4), 通过此方法获得的抗体, 目标抗体

单体 (POI%) 大于 99%，用于后续试验。

实施例 9 ELISA 方法评估抗体亲和性

将可变区基因克隆至含有人抗体恒定区的表达质粒上，参照实施例 8 方案瞬时转染真核细胞 293F 并纯化分泌的 4D3 与 7F11 嵌合抗体。将嵌合抗体稀释为 50ug/ml 浓度，添加至 TROP2 包被的 ELISA 酶标板上的 A1~H1 孔，再从 A1 至 A12 方向进行 3 倍体积横向稀释；37° C 孵育 1hr 后润洗，加入小鼠抗人 Fc 的 HRP 标记抗体，37° C 孵育后进行显色。

图 3 表明 4D3 与 7F11 均具有较好的相对亲和力。EC50(B4): 0.047ug/ml; EC50(B7): 0.071ug/ml。

实施例 10 细胞免疫荧光方法评估抗体生物学活性

将 BXP-3 细胞铺板并生长 24~48hr，使 96 孔细胞培养板内的细胞汇合率达到 40~50%。实验当天吸弃上清并洗涤 2 次。添加 3% BSA 含量之 PBS 溶液，37° C 封闭 1hr。将嵌合抗体以及 hRS7 抗体稀释至 10ug/ml 于 37°C 孵育 1h，吸弃一抗溶液，洗涤 4 次后，加入 4% 多聚甲醛溶液，100μL/孔并室温静置 20min，重复洗涤 2 次后，按 1:800 比例，用 1%BSA 溶液稀释二抗，100ul/孔。吸弃二抗悬液，重复洗涤 4 次，将 2μg/ml 浓度的 DAPI 染液按 100μL/孔添加，室温避光孵育 5min。吸弃 DAPI 染液，重复洗涤 4 次后，加入 1×DPBS 溶液，100μL/孔，于荧光显微镜下观察，并拍照记录实验结果。

附图 4：同等抗体浓度及处理条件下，ch4D3 与 ch7F11 的细胞表面结合活性。

实施例 11 细胞内吞方法评估抗体生物学活性

参照实施例 10 中的方法铺板 BXP-3 细胞。实验当天，吸弃细胞培养液，加入 PBS 溶液，重复洗涤 2 次。用含 1%FBS 之培养基，将嵌合抗体以及 hRS7 抗体稀释至 10ug/ml 于 4°C 孵育 1h，吸弃一抗溶液，加入待检细胞培养用的完全培养基，37°C 孵育 1hr。吸弃细胞培养基，重复洗涤 4 次后，加入 4% 多聚甲醛溶液，100μL/孔并静置 20min。重复洗涤 2 次后，添加含 0.5%Triton-X100 的 3%BSA 封闭液，100μL/孔，室温静置 1h。吸弃打孔液，重复洗涤 2 次。按 1:800 比例稀释抗人 IgG 荧光二抗；100μL/孔，37°C 孵育 1h。吸弃荧光二抗溶液，重复洗涤 4 次后进行 DAPI 染色，室温避光静置 15min。重复洗涤 4 次，加入 1×DPBS 溶液，100μL/孔，于荧光显微镜下观察荧光染色结果，如图 4、5 所示。

实施例 12 4D3 人源化序列改造

获得 4D3 可变区的核酸序列测序结果，将序列输入网站 IMGT 所提供的 V-QUEST 序列查对窗口 (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest)。以得到轻重链可变区的序列特征，包括三个 CDR 区序列和四个 FR 区序列，以及亲缘关系最相近的胚系基因家族序列。在 IMGT-DomainGapAlign 氨基酸查对窗口中，查找序列相似度最高的人源胚系基因家族序列，

4D3 轻链对应人 IGKV1-27*01+IGKJ2*02 家族序列, 4D3 重链对应人 IGHV1-3*01+IGHJ4*01 家族序列。将此人源胚系基因序列上的 CDR 区替换为 4D3 轻重链的 CDR, 再使用 IMGT-Structural query 查对抗体结构信息。最终获得 4D3-Hum 版本的轻重链人源化序列。将 4D3 鼠源序列及人源化序列输入线上网站评估人类抗体相似性分值。

图 6 蓝色线代表鼠源抗体库的 Z-score 分布范围和频率, 绿色线代表人抗体库的 Z-score 分布范围和频率。红色直线代表 4D3 轻链重链所获得的 Z-score 分值。人源化后, 4D3 的 Z-score 分值明显上升。

实施例 13 7F11 人源化序列改造

参照实施案例 12 中的操作过程, 得到 7F11 鼠抗体的轻重链人源化序列。将 7F11 鼠源序列, 人源化序列输入线上网站评估人类抗体相似性分值。

图 7 中蓝色线代表鼠源抗体库的 Z-score 分布范围和频率, 绿色线代表人抗体库的 Z-score 分布范围和频率。红色直线代表 4D3 轻链重链所获得的 Z-score 分值。在人源化以后, 7F11 的 Z-score 分值明显上升。

实施例 14 4D3 人源化抗体相对亲和力分析

将 4D3 人源化抗体序列克隆至真核表达载体, 参照实施例 8 方案瞬时转染真核细胞 293F。纯化后的抗体统一稀释至 2ug/ml, 与人源化之前的鼠源抗体一同添加至 TROP2 包被的 ELISA 酶标板上的 A1~H1 孔, 再从 A1~A12 方向进行 3 倍稀释; 37° C 孵育 1hr 后润洗, 再加入抗人 Fc 的 HRP 标记抗体, 37° C 孵育后进行显色。最终通过 EC50 和曲线形态来比较 ch4D3 和 hum4D3 抗体之间的相对亲和力。

图 8, EC50(4D3-chimeric): 0.056ug/ml; EC50 (4D3-humanized): 0.0502ug/ml。

实施例 15 4D3 人源化抗体热稳定性分析

将纯化后的 hum4D3 抗体透析, 以 PBS 缓冲液透析并标定终浓度为 2mg/ml, 并按 70ul/管分两批, 每批 3 管。将两批样品各放置于 4° C 和 37° C, 并按照第 0 天, 第 7 天, 第 14 天分别取出样品管。将样品用于 SEC 分析以评估抗体的降解及聚集情况。

图 9: 4D3 人源化抗体在 Day7(图 A), Day14 (图 B), Day21 (图 C) 时刻的 SEC 检测结果。4D3-humanized 抗体在 37° C 条件下各时间点的单体和聚集体, 以及其所占检测分子的比例 (%) 显示于图 D 表格。

实施例 16 7F11 人源化抗体相对亲和力及结合表位一致性分析

参照实施例 14 中的操作过程进行 7F11 人源化抗体的相对亲和力评估

图 10: 7F11 人源化抗体与嵌合抗体在同等稀释浓度下的结合曲线, EC50(7F11-chimeric):

0.061ug/ml; EC50 (7F11-humanized): 0.0601ug/ml。

实施例 17 7F11 人源化抗体热稳定性分析

参照实施例 15 中的操作过程进行 7F11 人源化抗体的热稳定性分析。

附图 11: 7F11 人源化抗体在 Day7(图 A), Day14 (图 B), Day21 (图 C) 时刻的 SEC 检测结果。7F11-humanized 抗体在 37° C 条件下各时间点的单体和聚集体, 以及其所占检测分子的比例 (%) 显示于图 D 表格。

实施例 18 人源化抗体与亲本抗体的抗原亲和力分析

采用 Pall ForteBio Octet 光学分析技术平台, 评估抗体-抗原结合的绝对亲和力。在该方法中, 生物素标记的抗原被固定在链霉亲和素生物传感器芯片表面, 基线平衡 180sec, 后与溶液中的浓度梯度稀释之抗体发生 30sec 的结合, 使得芯片的光学厚度增加, 导致波长发生漂移 ($\Delta\lambda$), 随后进入 30sec 的解离阶段。Trop2 抗原和相应的抗体相互作用被实时测定, 在各浓度下对结合的特异性、结合速率、解离速率或者样品浓度进行精密准确的检测。汇总至少 5 个浓度梯度下的 k-on 和 k-off 值后, 到 KD 结合常数。

Ab Code	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	R ²
ch4D3	6.89E-09	2.35E+05	1.62E-03	0.9935
Hu4D3	3.07E-08	1.39E+05	4.28E-03	0.9916
ch7F11	6.11E-11	2.43E+05	1.45E-05	0.9925
Hu7F11	9.94E-11	1.86E+05	1.85E-05	0.9966

实施例 19 4D3 人源化抗体与嵌合抗体的活性分析及结合表位一致性分析

生物素标记 4D3-humanized 抗体, 并通过 ELISA 测定结合曲线的拐点值为 0.5ng/ml。配置含 0.5ng/ml 4D3 生物素标记抗体的 ELISA 封闭液, 在此溶液基础上配置 50ug/ml 的竞争抗体 4D3-chimeric 与 4D3-humanized。添加含生物素标记抗体与竞争抗体的溶液于 A1~A12, 每孔 150ul, 后吸出 50ul 添加至 B2~B12 中, 与预先添加的体积为 100ul 之生物素抗体溶液充分混合, 再依次稀释 3 倍至 H1~H12, 37° C 孵育 1hr, 后洗涤并孵育 anti-human IgG Fc 二抗, 37° C 孵育 1hr 后洗涤 3 次, 进行 25min 时长的显色并读值。

附图 12: 4D3-humanized-biotin 抗体分别与 0.02~50ug/ml 的 ch4D3 与 hum4D3 抗体相竞争。两种竞争抗体表现同等程度竞争活性, 结合表位一致。EC50(ch4D3): 0.336ug/ml。EC50(hum4D3): 0.326ug/ml

实施例 20 7F11 人源化抗体与人源化抗体与嵌合抗体的活性分析及结合表位一致性分析

参照实施例 18 中的操作流程, 分析 7F11 的表位竞争活性及结合表位一致性。

附图 13: 7F11-humanized-biotin 抗体分别与 0.02~50ug/ml 的 ch7F11 与 hum7F11 抗体相竞

争。两种竞争抗体表现同等程度竞争活性，结合表位一致。EC50(ch7F11): 0.732ug/ml。

EC50(hum7F11): 0.856ug/ml。

实施例 21 人源化抗体 hu7F11&hu4D3 的细胞结合和内吞实验

使用 HEK293 细胞作为阴性细胞，BxPC-3 和 MCF-7 细胞作为阳性细胞，测试梯度浓度下的各个抗体结合与内吞情况。细胞结合测试在 4℃ 下结合 1hr，后添加常规 FITC 标记的荧光二抗，流式收集数据。

内吞测试使用标记有酸敏感型的小分子染料 Phodo-Red 羊抗人二抗，先与各个浓度的一抗共孵育形成复合物后，再与各细胞系共孵育 16hr。后取样，每个 96 孔板的细胞孔铺设至少 10000 个细胞，采用流式细胞仪收集并分析数据。统计各个浓度下的细胞在远红光通道中的平均荧光强度值，以抗体浓度为横坐标描绘内吞程度曲线。

hu7F11 和 Hu4D3 抗体在 3 种细胞中的结合程度比较，BxPC-3 细胞结合程度最大。hu7F11 和 Hu4D3 抗体在 3 种细胞中的内吞程度比较。BxPC-3 细胞内吞程度最大。

序列表

<120> 一种抗 TROP2 抗体

<160> 40

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Asp

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 2

Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asn

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 3

Val Arg Gly Glu Ala Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 4

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Val

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 5

Ile Tyr Pro Gly Ser Asp Asn Ser

1 5

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 6

Ala Arg Glu Gly Tyr Gly Tyr Gly Lys Asn Gly Val Gly Tyr Ala Met

1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 7

Gln Asp Ile Asn Lys Tyr

1 5

<210> 8

<211> 3

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 8

Ser Thr Ser

1

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 9

Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Phe Thr

1 5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 10

Gln Ser Val Ser Asn Asp

1 5

<210> 11

<211> 3

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 11

Tyr Ala Ser

1

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 12

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 13

<211> 137

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 13

Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Ser Phe Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asn Thr Lys Ser Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100 105 110

Tyr Phe Cys Val Arg Gly Glu Ala Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

115 120 125

Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 14

<211> 126

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 14

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

20 25 30

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Pro Ser Gln Asp

35 40 45

Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro

50 55 60

Arg Leu Leu Ile His Ser Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Thr Ile Ser

85 90 95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp

100 105 110

Asp Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 15

<211> 143

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 15

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

1 5 10 15

His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro

20 25 30

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

35 40 45

Asp His Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu

50 55 60
Trp Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Ser Asp Asn Ser Tyr Tyr Ser Glu
65 70 75 80
Lys Leu Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr
85 90 95
Ala Tyr Met Gln Leu Val Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
100 105 110
Phe Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Gly Tyr Gly Lys Asn Gly Val Gly Tyr
115 120 125
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 16

<211> 127

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 16

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

Thr Ala Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr

100

105

110

Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115

120

125

<210> 17

<211> 137

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 17

Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1

5

10

15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20

25

30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35

40

45

Thr Ser Phe Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Gln Arg Leu

50

55

60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Ser

65

70

75

80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser

85

90

95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

100

105

110

Tyr Tyr Cys Val Arg Gly Glu Ala Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

115

120

125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130

135

<210> 18

<211> 126

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 18

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His

1 5 10 15

Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp

35 40 45

Ile Asn Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp

100 105 110

Asp Leu Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 19

<211> 143

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 19

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

20

1 5 10 15

His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro

20 25 30

Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

35 40 45

Asp His Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu

50 55 60

Trp Met Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Ser Asp Asn Ser Tyr Tyr Ala Gln

65 70 75 80

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr

85 90 95

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Gly Tyr Gly Lys Asn Gly Val Gly Tyr

115 120 125

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 20

<211> 127

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 20

Met Lys Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Leu Leu Leu Cys Val Ser

1 5 10 15

Gly Ala His Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala

20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser

35 40 45

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

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 21
ggctacacct tcacaagctt tgat 24

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 22
atttttcctg gagatggtaa t 21

<210> 23
<211> 33
<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 23

gtaagagggg aggccctgta ttactttgac tac

33

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 24

ggatacacat tcactgacca tgtc

24

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 25

atttatcctg gaagtataa tagt

24

<210> 26

<211> 54

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 26

gcaagagagg gctatggta tggaaaaaac ggagttggct atgctatgga ctac

54

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 27

caagacatta ataagtat

18

<210> 28

<211> 9

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 28

tccacatct

9

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 29

ctgcagtatg atgatctatt cacg

24

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 30

cagagtgatga gtaatgat

18

<210> 31

<211> 9

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 31

tatgcatcc

9

<210> 32

<211> 27

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 32

cagcaggatt attcctctcc gtggacg

27

<210> 33

<211> 411

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 33

atgggatgga gctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcccag 60

gttcagctgc agcagtcctgg agctgaactg gtaaagcctg gggcttcagt gaagttgtcc 120

tgcaaggctt ctggctacac cttcacaagc ttgatataa actgggtgag gcagaggcct 180

gaacaggggac ttgagtggat tggatggatt tttcctggag atggtataac taagtccaat 240

gagaaattta agggcaaggc cacactgact acagacaaat cctccagcac agcctacatg 300

cagctcagca ggctgacatc taggactct gctgtctatt tctgtgtaag aggggaggcc 360

ctgtattact ttgactactg gggcccaggc accactctca cagtctctc a 411

<210> 34

<211> 379

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 34

atgagaccgt ctattcagtt cctggggctc ttgttgttct ggcttcattg tgctcagtg	60
gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc	120
atcatttga agccaagcca agacattaat aagtatatag ctgtgtacca acacaagcct	180
ggaaaaggtc ctaggctgct catatctcc acatctacat tacagccagg catcccatca	240
aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca ccatcagcaa cctggaacct	300
gaagatattg caacttatta ttgtctgag tatgatgatc tttcacgtt cggctcgggg	360
acaaagttgg aaataaac	379

<210> 35

<211> 429

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 35

atggaatgga ggatctttct cttatcctg tcaggaaactg caggtgtcca ctccagggt	60
cagctgcagc agtctggacc tgggtgggtg aagcctgggg cttcagtga gatgtcctgc	120
aaggcttctg gatacacatt cactgacat gtcataagct gggtgaagca gagaactgga	180
cagggccttg agtggttg acagatttat cctggaagtg ataatagtta ctacagtga	240
aagttgaagg acaaggccac actgactgca gacaaatcct ccaacacagc ctacatgcag	300
ctcgtcagcc tgacatctga ggactctcg gtctatttct gtgaagaga gggctatggt	360
tatggaaaa acggagttgg ctatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctacgtacc	420
gtctcctca	429

<210> 36

<211> 382

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 36

atgaagtcac agaccaggt ctcgtattt ctactgctct gtgtgtctgg tgctcatggg	60
agtattgtga tgaccagac tccaaattc ctgcttgat cagcaggaga cagggttacc	120
ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtag ttggtacca acagaagcca	180
gggcagtctc ctactgct gatatactat gcatccaatc gctacactgg agtcctgat	240
cgcttcaccg gcagtgata tgggacggat ttcacttca ccatcagcac tgcgcaggct	300
gaagacctgg cagttattt ctgtcagcag gattattcct ctccgtggac gttcggtggg	360
ggcaccaagc tggaaatcaa ac	382

<210> 37

<211> 412

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 37

atgggctggt cctgggtgtt cctgttcctg ctgagcgtga ccgccggcgt gcactcccag	60
gtgcagctgg tgcagtcagg cgccgaggtg aagaagcccg gcgcctccgt gaagctgagc	120
tgtaggcct ccggctacac cttcacctcc ttcgacatta actgggtgag gcaggccccc	180
gagcagcgcc tggagtggat gggctggatc tccccggcg acggcaacac caagtactcc	240
cagaagtcc aggaagagc taccatcacc agagatacat ccgcttctac agcttacatg	300
gagctgtcta gcctgagatc tgaggataca gctgtgtatt actgtgtgag aggagaggct	360
ctgtactatt ttgattattg gggccagggc accctgggtga cagtgtcttc tg	412

<210> 38

<211> 379

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 38

atgagacctt ctatccagtt tctgggcctg ctgctgtttt ggctgcatgg cgcccagtg	60
gatatccaga tgaccagtc tccatctagc ctgtccgctt ctgtgggcga tagagtgacc	120
atcacatgca gagcttctca ggatatcaat aagtatctgg ctggtatca gcagaagcct	180
ggaaagtgct ctaagctgct gatctactct acatctaccc tgcagtctgg agtgccttct	240
agattttctg gatctggctc tggcaccgat ttactactga caatctctt tctgcagcct	300
gaggatgtgg ctacatatta ttgtctgag tatgatgac tgttcacctt tggccagggc	360
accaagctgg agatcaagc	379

<210> 39

<211> 430

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 39

atggagtgga gaatctttct gttatcctg tctggcacag ctggagtga ttctcagtg	60
cagctgggtgc agtctggggc cgagggtgaaa aagccaggcg ctctgtgaa ggtgtcttgc	120
aaggcctccg gctacacctt caccgaccac gtgatctctt gggtgcgcca ggccaccggc	180
cagggcctgg agtggatggg ccagatctac cccggctccg acaactccta ctacgccag	240
aagtccagg gcaggggtgac tctgaccgcc gacaagtcca tcaacaccgc ctacatggag	300
ctgtctccc tgagggtcga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga gggctacggc	360
tacggcaaga acggcgtggg ctacgcatg gattattggg gccagggcac cctggtgaca	420
gtgtcttctg	430

<210> 40

<211> 382

<212> DNA

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 40

atgaagtctc agaccaggt gttgtgttt ctgctgctgt gtgtgtctgg cgctcatggc	60
gatatcgtga tgacacagtc tctgattct ctggcgtgt ctctgggcga aagagctaca	120
atcaactgta aggcttctca gtctgtgtct aatgatgtgg tgtggtacca gcagaagcct	180
gggcagcccc ccaagctgct gatctactac gcctccaaca ggtacaccgg cgtgcccga	240
aggttctccg gctccggcta cggcaccgac ttcacctga ccatctctc cctgcaggcc	300
gaggacgtgg ccgtgtacta ctgccagcag gactactct cccctggac ctcggcggc	360
ggcaccaagg tggagatcaa gc	382