



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 109563163 A

(43)申请公布日 2019. 04. 02

(21)申请号 201780049802.3

(22)申请日 2017.06.16

(30)优先权数据

16175041.9 2016.06.17 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.02.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/064759 2017.06.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/216334 FR 2017.12.21

(71)申请人 生物梅里埃公司

地址 法国迈合西-兰托阿嘞

(72)发明人 Y·阿塔曼-厄纳尔 S·舍克勒

M·孔布 S·达尼埃尔

S·奥托内

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 区斌

(51)Int.Cl.

C07K 16/26(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书4页 说明书31页

序列表86页 附图4页

(54)发明名称

用于制备抗-AMH抗体的方法及其用途

(57)摘要

本发明涉及一种用于制备抗哺乳动物AMH抗体的方法,其包括以下步骤:(i)用AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸免疫动物,所述AMH多肽包含序列SEQ ID No.1或者与所述序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列的至少99个氨基酸,和序列SEQ ID No.2或者与所述序列SEQ ID No.2具有至少75%相同性的序列的至多560个氨基酸,(ii)从已接受所述免疫原的所述动物的淋巴器官的细胞制备杂交瘤,(iii)选择分泌抗体的杂交瘤,所述抗体识别包含序列SEQ ID No.1或与所述序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列的至少99个氨基酸,和序列SEQ ID No.8或与所述序列SEQ ID No.8具有至少75%相同性的序列的至多255个氨基酸的AMH多肽,但是所述抗体既不识别(a)包含序列SEQ ID No.13或者与所述序列SEQ ID No.13具有至少75%相同性的序列的至少131个氨基酸,和序列SEQ ID No.11或者与所述序列SEQ ID No.11具有至少

75%相同性的序列的至多156个氨基酸的AMH多肽,也不识别(b)位于所述序列SEQ ID No.1或与所述序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列中的任何线性表位,以及(iv)产生所述抗体。

1. 一种用于制备抗哺乳动物AMH(哺乳动物抗缪勒氏管激素)抗体的方法,其特征在于,其包括以下步骤:

(i) 用AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸免疫动物,所述AMH多肽包含序列SEQ ID No.1或者与所述序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列的至少99个氨基酸,和序列SEQ ID No.2或者与所述序列SEQ ID No.2具有至少75%相同性的序列的至多560个氨基酸,

(ii) 从已接受免疫原的所述动物的淋巴器官的细胞制备杂交瘤,

(iii) 选择分泌抗体的所述杂交瘤,所述抗体识别包含序列SEQ ID No.1或与所述序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列的至少99个氨基酸,和序列SEQ ID No.8或与所述序列SEQ ID No.8具有至少75%相同性的序列的至多255个氨基酸的AMH多肽,但是所述抗体既不识别(a)包含序列SEQ ID No.13或者与所述序列SEQ ID No.13具有至少75%相同性的序列的至少131个氨基酸,和序列SEQ ID No.11或者与所述序列SEQ ID No.11具有至少75%相同性的序列的至多156个氨基酸的AMH多肽,也不识别(b)位于所述序列SEQ ID No.1或与所述序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列中的任何线性表位,以及

(iv) 产生所述抗体。

2. 如权利要求1所述的用于制备抗-AMH抗体的方法,其中所用的所述免疫原是AMH多肽,或编码所述AMH多肽的多核苷酸,其包含序列SEQ ID No.10或与所述序列SEQ ID No.10具有至少75%相同性的序列的至少230个氨基酸,和序列SEQ ID No.8或与所述序列SEQ ID No.8具有至少75%相同性的序列的至多255个氨基酸,优选所用的所述免疫原选自序列SEQ ID No.8、SEQ ID No.9和SEQ ID No.10或者与这些序列具有75%相同性的序列的AMH多肽。

3. 如权利要求1所述的用于制备抗-AMH抗体的方法,其中所用的所述免疫原是AMH多肽,或编码所述AMH多肽的多核苷酸,其包含序列SEQ ID No.4或与所述序列SEQ ID No.4具有至少75%相同性的序列的至少535个氨基酸,优选所用的所述免疫原选自序列SEQ ID No.2、SEQ ID No.3和SEQ ID No.4或者与这些序列具有75%相同性的序列的AMH多肽。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的用于制备抗-AMH抗体的方法,其中未被所述抗体识别的所述AMH多肽(a)是选自以下序列的多肽:SEQ ID No.11、SEQ ID No.12和SEQ ID No.13和与这些序列具有75%相同性的序列。

5. 如权利要求4所述的用于制备抗-AMH抗体的方法,其中与所述序列SEQ ID No.11、SEQ ID No.12和SEQ ID No.13具有至少75%的相同性的所述序列选自以下序列:SEQ ID No.21、SEQ ID No.22、SEQ ID No.30、SEQ ID No.31、SEQ ID No.42、SEQ ID No.43和SEQ ID No.44。

6. 如权利要求1-4中任一项所述的用于制备抗-AMH抗体的方法,其中未被所述抗体识别的所述线性表位(b)是序列SEQ ID No.45至SEQ ID No.56。

7. 如权利要求1-5中任一项所述的用于制备抗-AMH抗体的方法,其中

-所述哺乳动物是人类,所述免疫原是AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸,其包含序列SEQ ID No.1的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.2的至多560个氨基酸,所述的被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽是包含序列SEQ ID No.1的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.8的至多255个氨基酸的AMH多肽,并且所述的未被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.13的至少131个氨基酸和序列SEQ ID No.11的至多156个氨基酸的

AMH多肽,或者

-所述哺乳动物是马,所述免疫原是AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸,其包含序列SEQ ID No.14的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.15的至多573个氨基酸,所述的被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽是包含序列SEQ ID No.14的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.19的至多265个氨基酸的AMH多肽,并且所述的未被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.22的至少144个氨基酸和序列SEQ ID No.21的至多166个氨基酸的AMH多肽,或者

-所述哺乳动物是狗,所述免疫原是AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸,其包含序列SEQ ID No.23的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.24的至多572个氨基酸,所述的被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽是包含序列SEQ ID No.23的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.28的至多264个氨基酸的AMH多肽,并且所述的未被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.31的至少144个氨基酸和序列SEQ ID No.30的至多165个氨基酸的AMH多肽,或者

-所述哺乳动物是牛,所述免疫原是AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸,其包含序列SEQ ID No.32的至少100个氨基酸和序列SEQ ID No.33的至多575个氨基酸,所述的被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽是包含序列SEQ ID No.32的至少100个氨基酸和序列SEQ ID No.39的至多270个氨基酸的AMH多肽,并且所述的未被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.44的至少146个氨基酸和序列SEQ ID No.42的至多270个氨基酸的AMH多肽。

8.一种抗哺乳动物AMH单克隆抗体或单克隆抗体片段,其识别包含序列SEQ ID No.1或与所述序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列的至少99个氨基酸,和序列SEQ ID No.8或者与所述序列SEQ ID No.8具有至少75%相同性的序列的至多255个氨基酸的AMH多肽,但是既不识别(a)包含序列SEQ ID No.13或者与所述序列SEQ ID No.13具有至少75%相同性的序列的至少131个氨基酸,和序列SEQ ID No.11或者与所述序列SEQ ID No.11具有至少75%相同性的序列的至多156个氨基酸的AMH多肽,也不识别位于所述序列SEQ ID No.1或与所述序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列中的任何线性表位。

9.如权利要求8所述的抗哺乳动物AMH单克隆抗体或单克隆抗体片段,其中未被识别的所述AMH多肽(a)是选自以下序列的多肽:SEQ ID No.11、SEQ ID No.12和SEQ ID No.13或与这些序列具有至少75%相同性的序列。

10.如权利要求9所述的抗哺乳动物AMH单克隆抗体或单克隆抗体片段,其中与所述序列SEQ ID No.11、SEQ ID No.12和SEQ ID No.13具有至少75%的相同性的所述序列选自以下序列:SEQ ID No.21、SEQ ID No.22、SEQ ID No.30、SEQ ID No.31、SEQ ID No.42、SEQ ID No.43和SEQ ID No.44。

11.如权利要求8-10中任一项所述的抗哺乳动物AMH单克隆抗体或单克隆抗体片段,其中未被所述抗体识别的所述线性表位(b)具有序列SEQ ID No.45至SEQ ID No.56。

12.如权利要求9-11中任一项所述的抗哺乳动物AMH单克隆抗体或单克隆抗体片段,其中

-所述哺乳动物是人类,被识别的所述AMH多肽是包含序列SEQ ID No.1的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.8的至多255个氨基酸的AMH多肽,并且未被识别的所述AMH多肽(a)

是包含序列SEQ ID No.13的至少131个氨基酸和序列SEQ ID No.11的至多156个氨基酸的AMH多肽,或者

-所述哺乳动物是马,被识别的所述AMH多肽是包含序列SEQ ID No.14的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.19的至多265个氨基酸的AMH多肽,并且未被识别的所述AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.22的至少144个氨基酸和序列SEQ ID No.21的至多166个氨基酸的AMH多肽,或者

-所述哺乳动物是狗,被识别的所述AMH多肽是包含序列SEQ ID No.23的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.28的至多264个氨基酸的AMH多肽,并且未被识别的所述AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.31的至少144个氨基酸和序列SEQ ID No.30的至多165个氨基酸的AMH多肽,或者

-所述哺乳动物是牛,被识别的所述AMH多肽是包含序列SEQ ID No.32的至少100个氨基酸和序列SEQ ID No.39的至多270个氨基酸的AMH多肽,并且未被识别的所述AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.44的至少146个氨基酸和序列SEQ ID No.42的至多270个氨基酸的AMH多肽。

13.一种缀合物,其包含(i)权利要求8-12中任一项所定义的抗-AMH单克隆抗体或单克隆抗体片段,或者根据权利要求1-7中任一项所定义的方法制备的抗-AMH单克隆抗体或单克隆抗体片段和(ii)能够产生可检测信号的发射用于该缀合物和生物样品中的AMH之间的免疫反应的可视化的标记物。

14.一种用于通过夹心免疫测定在可能包含AMH的生物样品中定量哺乳动物AMH的方法,所述方法包括以下步骤:

-使所述生物样品与两个AMH结合配偶体接触,其中所述配偶体中的至少一个是权利要求8-12中任一项所定义的抗体或抗体片段,或根据权利要求1-7中任一项所定义的方法制备的抗体或抗体片段,或权利要求13所定义的缀合物,

-如果存在,则使用能够产生可检测信号的发射的标记物来检测通过所述结合配偶体和所述AMH之间的结合而发射的信号,和

-将检测到的所述信号转换为AMH浓度。

15.如权利要求14所述的用于定量AMH的方法,其中所述生物样品是血液、血清或血浆样品。

16.如权利要求14和15中任一项所述的用于定量AMH的方法,其中第二AMH结合配偶体是抗体,所述抗体识别包含序列SEQ ID No.57或者与序列SEQ ID No.57具有至少75%相同性的序列的至少196个氨基酸的AMH多肽,但既不识别(a)包含序列SEQ ID No.10或与序列SEQ ID No.10具有至少75%相同性的序列的至少230个氨基酸和序列SEQ ID No.8或与序列SEQ ID No.8具有至少75%相同性的序列的至多255个氨基酸的AMH多肽,也不识别(b)位于序列SEQ ID No.57或者与序列SEQ ID No.57具有至少75%相同性的序列中的线性表位。

17.如权利要求14-16中任一项所定义的用于定量AMH的方法作为辅助诊断与育龄妇女的卵巢功能紊乱相关的病症的用途。

18.如权利要求14-16中任一项所定义的用于定量AMH的方法作为辅助评估12岁以上年轻女孩和妇女的卵泡储量的用途。

19. 如权利要求14-16中任一项所定义的用于定量AMH的方法作为辅助评估与青春期之前的男孩的性分化相关的病症的用途。

20. 一种试剂盒,其包含权利要求8-12中任一项所定义的抗体或抗体片段,或根据权利要求1-7中任一项所定义的方法制备的抗体或抗体片段,和/或权利要求13所定义的缀合物。

用于制备抗-AMH抗体的方法及其用途

[0001] 本发明涉及抗缪勒氏管激素 (anti-Müllerian hormone, 也称为AMH) 的体外检测领域。特别地, 本发明涉及抗-AMH抗体的制备、抗-AMH抗体及其用于确定AMH浓度的用途, 特别是在与妇女或育龄雌性动物的能育性相关的检查的背景下。

[0002] 抗缪勒氏管激素 (也称为AMH) 是转化生长因子 (TGF- β) 家族的144kDa的二聚体糖蛋白, 其家族包括作用于生长和分化的许多因子。AMH是二聚体激素原: 它由通过二硫键连接的两个相同亚基组成。该激素原经历靠近C-末端的蛋白水解裂解, 以获得生物活性并转化为成熟的激素。在裂解之后, 分子复合物保持连接, 并且可以通过免疫测定在血液中进行测定, 该免疫测定允许适于监测从出生到绝经期的卵巢储量的变化的灵敏度性能水平 (Kelsey TW, et al., 2011)。该蛋白也称为MIF (缪勒氏抑制因子)、MIH (缪勒氏抑制激素) 和MIS (缪勒氏抑制物质)。

[0003] AMH存在于所有哺乳动物中。其氨基酸长度和序列取决于物种。因此, 人AMH具有560个氨基酸, 并由以下构成: 短信号肽 (氨基酸1-18)、前体部分 (氨基酸19-25)、N-末端部分 (氨基酸26-451) 和C-末端部分 (氨基酸452-560)。马AMH具有573个氨基酸, 并由以下构成: 短信号肽 (氨基酸1-22)、无前体部分、N-末端部分 (氨基酸23-464) 和C-末端部分 (氨基酸465-573)。犬AMH具有572个氨基酸, 并由以下构成: 短信号肽 (氨基酸1-21)、无前体部分、N-末端部分 (氨基酸22-463) 和C-末端部分 (氨基酸464-572)。牛AMH (对于其一部分而言) 具有575个氨基酸, 并由以下构成: 短信号肽 (氨基酸1-17)、前体部分 (氨基酸18-24)、N-末端部分 (氨基酸25-466) 和C-末端部分 (氨基酸467-575)。不管物种如何, AMH的N-末端部分称为“前区 (pro region)”, 并且C-末端部分称为“成熟区”。

[0004] AMH是以包含信号肽的多肽前体的形式, 随后以前激素原 (在人类和牛中) 或激素原 (在马或狗中) 的形式合成的。允许运输到内质网的信号肽在转运后被裂解。在内质网中, 多肽前体经历翻译后修饰, 即 (i) 同源二聚化和 (ii) 糖基化, 以便实现其天然构象。在人类中, 它是对应于氨基酸26-560的144kDa的二聚体糖蛋白。在人类中, 72kDa的每个单体含有前区 (人类中的58kDa), 随后是成熟区 (人类中的12kDa)。在分泌到胞外介质和血流之前, AMH糖蛋白通过裂解经历最终的翻译后成熟。因此, 在人类和牛中, 通过前体部分的裂解将前激素原转换成激素原。激素原还在N-末端部分和C-末端部分之间裂解, 以获得成熟的激素 (具有生物学活性)。然而, 这两个部分保持非共价结合 (Zec I., et al., 2011)。在人类中, 已经根据研究报道了可变的裂解程度: Zec等人报道为在5%和20%之间, 且Pankhurst等人报道为男孩67%, 或者替代地妇女81% (2016)。因此, 在血流中发现裂解的AMH和非裂解的AMH。

[0005] 在男性中AMH是由支持细胞产生的, 并且在其生命开始时就参与男性管道分化。在妇女中, AMH是由生长的小卵泡的颗粒细胞产生的, 并因此而是从青春期开始介入。因此, 在妇女中, AMH已经显示其自身用于各种领域, 特别是与能育性相关的领域 (Dewailly D, et al. 2014)。例如, 循环中AMH的测定使得能够独立于周期来评估卵巢中存在的窦状卵泡和窦前期卵泡的数目 (Dewailly D, et al., 2014)。此外, 作为卵巢储量自然衰减的指示并因此作为低能育性的固有风险的指示, AMH的测定指示用于帮助妇女管理他们的受孕计划。在辅

助生殖技术的背景下,AMH的测定有助于通过特别地优化卵巢的受控刺激的步骤,同时避免过度刺激的风险来选择用于患者的最佳策略(Arce JC, et al., 2014)。AMH的测定还使得能够在例如癌症的情况下监测已经接受促性腺激素治疗的年轻女孩或妇女中卵巢储量的变化(Chai J and Howie AF., 2014)。对于具有排卵病症的妇女,确定血清AMH水平使得能够更好地表征卵巢功能紊乱的类型,特别是与卵巢功能不全相关的促性腺激素分泌过多的无排卵,例如多囊卵巢综合征(Fong SL, et al., 2015)。在年轻男孩中,AMH是由新生儿胎儿的睾丸以非常显著的量产生的,并因此在早期就参与男性生殖道的分化。因此,在与性别分化相关的病症的背景下,已经发现在青春期前的男孩中测定AMH是有用的。

[0006] AMH的测定是通过夹心免疫测定进行的,并且需要使用同时敏感、特异性和可再现的测试。然而,尽管文献中提出了各种方法(Hudson, 1990; Long, 2000)或替代地,市场上可获得的各种试剂盒,但联合所有这些特征的测试仍不可用。早在1996年就识别了待解决的主要困难之一:生物学样品中缺乏AMH的表观稳定性。因此,储存条件(时间、持续时间、冷冻周期等)可引起所测量的浓度的变化(Lee, 1996)。这些变化当然是假象,并且可能导致生物学结果的错误解释。

[0007] 各种试剂盒已经被投放到市场。这些试剂盒中所用的抗体识别AMH的不同区域。第一代AMH测定对应于EIA/MIS/AMH试剂盒(免疫技术)和活性MIS/AMH ELISA试剂盒(DSL)。这些试剂盒中所用的抗体不相同,但每一种均使用识别AMH的前区的第一抗体、识别成熟区的另一抗体。在2010年,出售它们的公司Beckman Coulter据他们公司所述用具有改进性能水平的第二代试剂盒(AMH Gen II测定)来替换它们。实际上,根据作者,该试剂盒是高度特异性的,且测得的AMH可能不受蛋白水解的影响,因为所用两种单克隆抗体各自识别成熟区(Kumar, 2015; US7897350)。作者认为含有几个半胱氨酸残基的成熟区在蛋白水解的情况下可能比前区更加稳定。一旦在本领域中运用,在常规临床使用中,其快速地证明是AMH Gen II试剂盒没有达到其承诺的情况。广泛的回顾性研究证实了从用于储存样品管的条件的角度来看AMH测定的稳定性的缺乏(Rustamov O, 2012),并且显示出AMH Gen II试剂盒对这些变化非常敏感。提出了几个假说以解释观察到的波动。可能的解释之一可以与这样的事实相联系:在采集血样之后,AMH分子经历构象变化,其从一个个体到另一个个体是可变的。

[0008] 这些结果被独立团队快速重复和确认(Xan et al., 2014)。此外,该团队描述了用于在样品存储期间促进AMH稳定性的解决方案:他们在测定之前进行预稀释,这使得能够通过GenII提高AMH测定的一般再现性。然而,不可否认,易于实施的该解决方案具有一些缺点:

[0009] (i) 在预稀释之后测量的AMH浓度增加。该增加从一个个体到另一个个体而变化(对于可用数据从1.35倍到3.06倍)。因此,有必要实验式地在广泛的群组上重新定义参考值,并且还重新定义临床解释规则。

[0010] (ii) 所进行的稀释并不显著(1/5, 即300 μ L缓冲液中60 μ L样品)。不可否认,其使得能够免除所观察到的干扰,但结果导致测定灵敏度降低,这对于许多临床用途是重要的。

[0011] (iii) 仍然没有识别AMH的不稳定性的原因。因此,不能确认稀释将能够解决所有样品缺乏稳定性的问题。

[0012] 此外,Lukaszuk等人(2014)已经描述了由AMH Gen II测定试剂盒测量的平均AMH浓度的降低以及灵敏度降低。它们的结论是,“基于GenII试剂盒的结果,实施刺激方案是非

常危险的”。

[0013] 因此,重要的是提供一种稳健的试剂盒,其中测量的AMH浓度是准确和可再现的,而不考虑采集样品和进行测定之间的时间,并且不考虑储存条件(独立于预分析条件的剂量)。

[0014] 专利申请WO 2014/074835提出了用于测定各种AMH同种型(仅二聚体AMH、非裂解的AMH、裂解然后再结合的AMH等)的各种方法,以确定特定同种型或一种同种型到另一同种型的变化是否可以有临床意义。因此,本申请描述了针对大量线性表位的多种抗体,所述大量线性表位位于AMH的前区或成熟区中。作者宣称所公开的组合物和方法对应于精确、可再现和标准化的测定的要求。本申请公开了18个表位,即总共324(18×18)种方式来通过结合识别这些表位的抗体构建夹心免疫测定。考虑到各种AMH测定所遇到的许多预分析问题,在没有实验证明的情况下,难以相信这些表位组合(因此抗体组合)中的每一个使得能够获得稳健的测试。而且,该专利申请中没有任何数据段表明,所描述的抗体的用途允许用于常见医疗实践的测定,其是稳健的、准确的、可再现的以及标准化的,并且尤其是其结果独立于预分析条件。该申请中存在的唯一数据涉及基于“单表位夹心或SES”类型的测定的稳定性数据,即,使用相同的单克隆抗体进行捕获和检测的测定。此外,这些测试专门检测AMH的二聚体形式,其临床关注在当前是未知的(因为所测量的浓度与用总AMH测定获得的浓度非常不同,该总AMH测定是用于常见医疗实践中的那些)。

[0015] 申请人意外地发现,可以通过制备新抗体来克服现有技术的缺点,该新抗体仅识别在位于AMH的前区的中间部分的AMH的特定区(在人类的氨基酸157-255之间)中的非线性表位,该抗体使得能够进行稳定且可靠的AMH测试,该稳定且可靠的AMH测试可用于常见的医疗实践中并且其独立于样品的预分析或储存条件是稳健、精确和可再现的。在选择被描述为具有裂解区的AMH的该特定区中(WO 2014/074835),利用这些抗体(识别来自所确定的区域的非线性表位)的AMH测定令人惊讶地且异于期望地检测存在于生物学样品中的生物学目标物的所有AMH。

[0016] 因此,本发明的第一主题涉及一种制备抗哺乳动物AMH(抗缪勒氏管激素)抗体的方法,其特征在于,其包括以下步骤:

[0017] (i) 用AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸免疫动物,所述AMH多肽包含序列SEQ ID No.1或者与序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列的至少99个氨基酸,和序列SEQ ID No.2或者与序列SEQ ID No.2具有至少75%相同性的序列的至多560个氨基酸,

[0018] (ii) 从已接受免疫原的动物的淋巴器官的细胞制备杂交瘤,

[0019] (iii) 选择分泌抗体的杂交瘤,该抗体识别包含序列SEQ ID No.1或与序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.8或者与序列SEQ ID No.8具有至少75%相同性的序列的至多255个氨基酸的AMH多肽,但既不识别(a) 包含序列SEQ ID No.13或与序列SEQ ID No.13具有至少75%相同性的序列的至少131个氨基酸和序列SEQ ID No.11或与序列SEQ ID No.11具有至少75%相同性的序列的至多156个氨基酸的AMH多肽,也不识别(b) 位于序列SEQ ID No.1或者与序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列中的任何线性表位,以及

[0020] (iv) 产生该抗体。

[0021] 本发明的第二主题涉及抗哺乳动物AMH单克隆抗体或单克隆抗体片段,其识别包含序列SEQ ID No.1或与序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列的至少99个氨基酸

和序列SEQ ID No.8或与序列SEQ ID No.8具有至少75%相同性的序列的至多255个氨基酸的AMH多肽,但是既不识别(a)包含序列SEQ ID No.13或者与序列SEQ ID No.13具有至少75%相同性的序列的至少131个氨基酸,和序列SEQ ID No.11或者与序列SEQ ID No.11具有至少75%相同性的序列的至多156个氨基酸的AMH多肽,也不识别位于序列SEQ ID No.1或与序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列中的任何线性表位。

[0022] 本发明的第三主题涉及缀合物,其包含(i)如上定义的或者根据如上定义的方法制备的抗-AMH单克隆抗体或单克隆抗体片段,和(ii)能够产生可检测信号的发射用于该缀合物和生物学样品的AMH之间的免疫反应的可视化的标记物。

[0023] 本发明的第四主题涉及一种用于通过夹心免疫测定来在可包含AMH的生物学样品中定量哺乳动物AMH的方法,该方法包括以下步骤:

[0024] -使所述生物学样品与两个AMH结合配偶体接触,其中所述配偶体中的至少一个是如上定义的或根据如上定义的方法制备的抗体、抗体片段,或者如上定义的缀合物,

[0025] -如果存在,则使用能够发射可检测信号的标记物来检测通过所述结合配偶体和AMH之间的结合发射的信号,和

[0026] -将检测到的信号转换为AMH浓度。

[0027] 本发明的第五主题涉及将如上定义的用于定量AMH的方法用作辅助诊断与育龄妇女中的卵巢功能紊乱相关的病症、或用作辅助评估年龄超过12岁的年轻女孩和妇女中的卵泡储量,或者用作辅助评估与青春期前男孩中的性别分化相关的病症的用途。

[0028] 最后,本发明的最后主题涉及包含如上定义的或者根据如上定义的方法制备的抗体或抗体片段,或者如上定义的缀合物的试剂盒。

[0029] 申请人意外地发现AMH的前区的中间部分用于在他们的制备过程期间选择抗-AMH单克隆抗体,同时丢弃识别该部分上的线性表位的抗体的用途使得当如此选择的这些抗体用于测定AMH时可能具有可靠且可再现的测定。

[0030] 表位(也称为抗原决定簇)是抗原的最小部分,该抗原可以被作为抗体的可变部分的互补位识别。表位的结构与抗体的互补位是互补的。所涉及的结构可以是主要结构,在线性表位的情况下也称为顺序表位或连续表位,因为它包括序列性氨基酸,或在非连续表位的情况下三级结构也称为非线性表位。当抗原具有蛋白质性质时,如在本申请的情况下,线性表位对应于可变长度的肽序列。

[0031] 从特定观点看,线性表位的序列可包含不显著改变表位和抗体之间的结合的“保守性”修饰。

[0032] 因此,根据本发明的方法制备的抗体不识别AMH的前区的中间部分上的线性表位,但确实识别该中间部分。

[0033] 表达“识别AMH的前区的中间部分的单克隆抗体”旨在表示当存在该部分时抗体能够与AMH例如全长AMH结合,但当不存在该部分时不能够与AMH多肽结合。

[0034] 不希望受理论的束缚,一个归纳的假设将包括认为抗体所针对的AMH的前区的中间部分可对应于其中AMH将在生物学样品(AMH在其中被测定)(例如血浆)中经历蛋白水解的区域,使得该区域将保持清楚地呈现在其起源构象中,或者其构象不会受到修饰的影响,该修饰可能影响分子的周围区域。

[0035] 期望产生针对他们的AMH的前区的中间部分的抗体的哺乳动物是其中AMH的测定

构成辅助的任何哺乳动物。作为例子,可以提及人类(妇女和男人,包括男孩)、马(特别是母马)、狗(特别是母狗)、牛、羊属的成员和猫科。

[0036] 哺乳动物分泌的AMH不相同,但接近。在其中AMH的测定构成辅助的人AMH和其它哺乳动物的AMH之间观察到至少75%的序列相同性。在本发明中用作参考的AMH是人AMH。

[0037] 在两个或多个多肽序列的上下文中,术语“相同性”或“百分比相同性”表示所比较的两个序列当它们比对以达到最大对应时,具有指定百分比的在可以比对的最大长度上是相同的氨基酸残基。百分比相同性的这种比对和计算可以使用序列比较算法和/或软件(Emboss Needle、Llign、BLAST、Clustal等)或在简单情况下通过肉眼检查来进行。

[0038] 如前所述,AMH由前区和成熟区组成。在人类中,前区终止于位置451,且成熟区开始于位置452。被根据本发明制备的抗体识别的AMH的前区的中间部分在人类中开始于位置157并且终止于位置255。它由序列SEQ ID No.1的99个氨基酸组成。在马中,被根据本发明制备的抗体识别的AMH的前区的中间部分开始于位置167,终止于位置265并且对应于序列SEQ ID No.14的99个氨基酸。被根据本发明制备的抗体识别的犬AMH的前区的中间部分(对于其一部分而言)开始于位置166,终止于位置264,并且对应于序列SEQ ID No.23的99个氨基酸。对于牛,被根据本发明制备的抗体识别的AMH的前区的中间部分开始于位置171,终止于位置270并且对应于序列SEQ ID No.32的100个氨基酸。

[0039] 为了产生这些特定和有利的抗-AMH抗体,本发明的方法包括用免疫原来免疫动物(作为第一步骤)。该免疫原是AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸,其必须至少包含抗体所必须识别的区域,即至少AMH的前区的中间部分。因此,所用的免疫原包含序列SEQ ID No.1或与序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列的至少99个氨基酸。

[0040] 免疫原也至多包含讨论的物种的全长AMH或编码该讨论的物种的全长AMH的多核苷酸,即,在人AMH的情况下,序列SEQ ID No.2(Uniprot检索号KB F2YMM5)或其他AMH包含与序列SEQ ID No.2的至少75%相同性的560个氨基酸。例如,马完全AMH多肽包含序列SEQ ID No.15的573个氨基酸(Uniprot检索号KB F2YMM5),犬完全AMH多肽包含序列SEQ ID No.24的572个氨基酸(Uniprot检索号KB A0A0E3N0I3),并且牛完全AMH多肽(Uniprot检索号KB P03972)包含序列SEQ ID No.33的575个氨基酸。

[0041] 根据一个特定的实施方案,所用的免疫原是相对于全长AMH序列,缺乏位于AMH的前区的中间部分之后的所有氨基酸的AMH多肽或编码该多肽的多核苷酸,即包含序列SEQ ID No.10或与序列SEQ ID No.10具有75%相同性的序列的至少230个氨基酸,和序列SEQ ID No.8或与序列SEQ ID No.8具有至少75%相同性的序列的至多255个氨基酸的AMH多肽或编码所述AMH多肽的多核苷酸,优选选自序列SEQ ID No.8、SEQ ID No.9和SEQ ID No.10或与这些序列具有至少75%相同性的序列的AMH多肽。序列SEQ ID No.8对应于人AMH的氨基酸1-255(称为AMH-2),序列SEQ ID No.9对应于人AMH的氨基酸19-255,即无信号肽的序列SEQ ID No.8(称为无信号肽的AMH-2),并且序列SEQ ID No.10对应于人AMH的氨基酸26-255,即无信号肽或前体部分的序列SEQ ID No.8(称为无信号肽或前体部分的AMH-2)。

[0042] 根据另一实施方案,所用免疫原是AMH多肽或编码该多肽的多核苷酸,其对应于具有全部或部分的信号肽并且任选地全部或部分的前体部分的完全AMH。因此,AMH多肽包含序列SEQ ID No.4或与序列SEQ ID No.4具有至少75%相同性的序列的至少535个氨基酸,优选选自序列SEQ ID No.2、SEQ ID No.3和SEQ ID No.4或与这些序列具有至少75%相同

性的序列的AMH多肽。序列SEQ ID No.2对应于人AMH的氨基酸1-560,序列SEQ ID No.3对应于人AMH的氨基酸19-560,即无信号肽的序列SEQ ID No.2,并且序列SEQ ID No.3对应于人AMH的氨基酸26-560,即无信号肽或前体部分的序列SEQ ID No.2。

[0043] 根据另一实施方案,所用免疫原是AMH多肽或编码该多肽的多核苷酸,其对应于具有全部或部分的信号肽并且任选地全部或部分的前体部分但没有成熟区的完全AMH。因此,AMH多肽包含序列SEQ ID No.7或与序列SEQ ID No.7具有至少75%相同性的序列的至少426个氨基酸和序列SEQ ID No.5或与序列SEQ ID No.5具有至少75%相同性的序列的至多451个氨基酸,优选选自序列SEQ ID No.5、SEQ ID No.6和SEQ ID No.7或与这些序列具有至少75%相同性的序列的AMH多肽。序列SEQ ID No.5对应于人AMH的氨基酸1-451(称为AMH-3),序列SEQ ID No.6对应于人AMH的氨基酸19-451,即无信号肽的序列SEQ ID No.5(称为无信号肽的AMH-3),且序列SEQ ID No.7对应于人AMH的氨基酸26-451,即无信号肽或前体部分的序列SEQ ID No.5(称为无信号肽或前体部分的AMH-3)。

[0044] 下表(表1)呈现了用于本发明的上下文中的各种AMH多肽(特别对于一些作为免疫原),根据哺乳动物的物种给出了氨基酸的位置和相应的SEQ ID(括号之间)。

	人类	马	犬	牛
AMH前区的中间部分	157-255 (SEQ ID N°1)	167-265 (SEQ ID N°14)	166-264 (SEQ ID N°23)	171-270 (SEQ ID N°32)
完全AMH	1-560 (SEQ ID N°2)	1-573 (SEQ ID N°15)	1-572 (SEQ ID N°24)	1-575 (SEQ ID N°33)
没有信号肽的完全AMH	19-560 (SEQ ID N°3)	23-573 (SEQ ID N°16)	22-572 (SEQ ID N°25)	18-575 (SEQ ID N°34)
没有信号肽或前体部分的完全AMH	26-560 (SEQ ID N°4)	NA	NA	25-575 (SEQ ID N°35)
完全AMH-3	1-451 (SEQ ID N°5)	1-464 (SEQ ID N°17)	1-463 (SEQ ID N°26)	1-466 (SEQ ID N°36)
没有信号肽的完全AMH-3	19-451 (SEQ ID N°6)	23-464 (SEQ ID N°18)	22-463 (SEQ ID N°27)	18-466 (SEQ ID N°37)
没有信号肽或前体部分的完全AMH-3	26-451 (SEQ ID N°7)	NA	NA	25-466 (SEQ ID N°38)
完全AMH-2	1-255 (SEQ ID N°8)	1-265 (SEQ ID N°19)	1-264 (SEQ ID N°28)	1-270 (SEQ ID N°39)
没有信号肽的AMH-2	19-255 (SEQ ID N°9)	23-265 (SEQ ID N°20)	22-264 (SEQ ID N°29)	18-270 (SEQ ID N°40)
没有信号肽或前体部分的完全AMH-2	26-255 (SEQ ID N°10)	NA	NA	25-270 (SEQ ID N°41)

[0045]

[0046] NA=不适用,因为讨论的AMH中没有前体部分

[0047] 当然,除了这些序列中所述的氨基酸外,免疫原在其呈多肽形式时还可包含用于产生多肽及其纯化的其它氨基酸,例如聚组氨酸尾。

[0048] 产生多肽的方法是本领域技术人员公知的。例如,AMH多肽可以使用本领域技术人员常规已知的步骤通过遗传工程来获得,所述步骤由以下组成:

[0049] -提供编码AMH多肽的DNA,所述DNA根据常规方法获得,

[0050] -通过克隆将该DNA插入表达载体诸如质粒、粘粒、 λ 噬菌体或病毒载体(杆状病毒(苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒)、痘苗病毒、西门利克森林病毒、腺病毒、慢病毒等)中,该载体还包括允许其在宿主细胞中扩增的复制原点(对于质粒或粘粒)或复制系统和允许将被翻译成蛋白质的信使RNA转录的一种或多种启动子,

[0051] -将用于表达的具有目的基因的载体导入宿主细胞,诸如通过转化或感染导入原核细胞(例如细菌,如大肠杆菌、枯草杆菌),或通过瞬时或永久转染或其他病毒感染导入真核细胞(例如酵母(酿酒酵母、毕赤氏酵母)、昆虫细胞(Sf9、Sf21、High5细胞)、哺乳动物细胞(CHO、293、Per.C6、BHK-21、Vero等)),

[0052] -任选地利用载体在宿主细胞中扩增来培养和任选地繁殖含有表达载体的宿主细胞,

[0053] -根据需要诱导转录和蛋白质合成以产生重组AMH多肽,以及

[0054] -纯化以便例如通过聚组氨酸尾提取所述多肽。多肽然后称为重组体。

[0055] 当免疫原是多核苷酸时,将使用例如与将用于通过遗传工程制备的AMH多肽的DNA相同的DNA。

[0056] 用于免疫的动物是通常用于获得单克隆抗体的任何动物,例如小鼠、大鼠、兔、山羊或绵羊。

[0057] 免疫的条件和参数(诸如免疫原浓度、免疫模式等)对于本领域技术人员来说是公知的,他们能够参考早在1975年Köhler和Milstein描述的程序,且特别是细胞生物学实验手册中的程序(Yokoyama WM,2001)。

[0058] 本发明方法的第二步是常规步骤,并且由以下组成:从已接收免疫原的动物的淋巴器官的细胞制备杂交瘤,诸如例如脾脏、淋巴结和扁桃体。这个步骤在任何单克隆抗体生产手册均有描述。然而,需要使用适用于每种物种的融合配偶体。因此,例如,对于小鼠,可以使用cGPS CHO-Sa系,对于兔,可以使用240E-W系(US 7 429 487),并且对于绵羊,可以使用SFP1系(WO 92/15699)。

[0059] 该方法的第三步由获得的杂交瘤的特定选择组成。为此,杂交瘤首先在合适的培养基中培养,如本领域技术人员所熟知的,其包含用于它们的繁殖的特定营养物和生长刺激剂。然后根据本领域技术人员已知的技术诸如无标记物的直接检测(抗原-抗体反应后的自发沉淀)、间接检测(例如ELISA或其它类型的免疫测定)、表面等离子体共振(BIAcore®)和干涉测量法(八位组),使用被抗体识别的抗原来选择分泌目的抗体的克隆。该步骤的起始由杂交瘤的特定选择组成,该杂交瘤的特定选择可以以任何顺序用特定多肽和肽以2个连续的筛选进行。

[0060] 第一筛选(称为筛选1)由以下组成:仅保留产生识别前区的中间部分的抗体的杂交瘤,如前所述,然而所述区已知具有应被排除的切割位点。为此,两种方法是可能的:

[0061] 方法1:

[0062] 首选选择分泌识别AMH-2的抗体的杂交瘤,即,对于人AMH-2,氨基酸1-255 (SEQ ID No.8) (在适当的情况下,无全部或部分的信号肽和全部或部分的前体部分) 或与该序列具有至少75%相同性的任何序列。根据一个实施方案,被抗体识别的AMH-2多肽是选自SEQ ID No.8、SEQ ID No.9和SEQ ID No.10的序列和与这些序列具有至少75%相同性的序列的多肽。

[0063] 然后丢弃杂交瘤,该杂交瘤产生识别位于AMH的前区的中间部分之前的AMH的部分的抗体,即,对于人AMH,氨基酸1-156 (SEQ ID No.11) (在适当的情况下,无全部或部分的信号肽和全部或部分的前体部分) 和与该序列具有至少75%相同性的任何序列。该AMH多肽称为未被根据本发明制备的抗体识别的AMH多肽(a)。根据一个实施方案,未被抗体识别的AMH多肽(a)是选自以下序列的多肽:SEQ ID No.11、SEQ ID No.12和SEQ ID No.13以及与此些序列具有至少75%相同性的序列。序列SEQ ID No.11对应于人AMH的氨基酸1-156 (称为AMH-1),序列SEQ ID No.12对应于人AMH的氨基酸19-156,即无信号肽的序列SEQ ID No.11 (称为无信号肽的AMH-1),且序列SEQ ID No.13对应于人AMH的氨基酸26-156,即无信号肽或前体部分的序列SEQ ID No.11 (称为无信号肽或前体部分的AMH-1)。

[0064] 方法2:

[0065] 选择分泌识别AMH的前区的中间部分的抗体的杂交瘤,即,对于人AMH,氨基酸157-255 (SEQ ID No.1) 和与该序列具有至少75%相同性的任何序列。

[0066] 下表(表2)呈现了未被识别并且在本发明的上下文中使用的各种AMH多肽(a),根据哺乳动物的物种给出了氨基酸的位置和相应的SEQ ID (括号之间)。

	人类	马	犬	牛
完全AMH-1	1-156 (SEQ ID N°11)	1-166 (SEQ ID N°21)	1-165 (SEQ ID N°30)	1-170 (SEQ ID N°42)
没有信号肽的完全AMH-1	19-156 (SEQ ID N°12)	23-166 (SEQ ID N°22)	22-165 (SEQ ID N°31)	18-170 (SEQ ID N°43)
没有信号肽或前体部分的完全AMH-1	26-156 (SEQ ID N°13)	NA	NA	25-170 (SEQ ID N°44)

[0068] NA=不适用,因为讨论的AMH中没有前体部分

[0069] 因此,根据一个特定实施方案,与序列SEQ ID No.11、SEQ ID No.12和SEQ ID No.13具有至少75%相同性的序列选自以下序列:SEQ ID No.21、SEQ ID No.22、SEQ ID No.30、SEQ ID No.31、SEQ ID No.42、SEQ ID No.43以及SEQ ID No.44。

[0070] AMH多肽(a)可如先前所述进行制备,并且可包含不属于AMH的其它氨基酸。

[0071] 第二筛选(称为筛选2)由丢弃杂交瘤组成,该杂交瘤产生识别AMH的前区的中间部分中的线性表位的抗体,即序列SEQ ID No.1的序列或与序列SEQ ID No.1具有75%相同性的任何序列中。这些表位称为线性表位(b)。

[0072] 确定氨基酸序列上的线性表位是本领域技术人员熟知的。它由将目的序列切割成

给定长度的重叠肽(例如10、12或15个氨基酸)组成,然后在这些肽中鉴定被单克隆或多克隆抗体识别的那些。当然,由于它们的定义,线性表位具有目的序列的连续氨基酸。

[0073] 下表(表3)呈现了用于本发明的上下文中的在AMH的前区的中间部分中确定的各种线性表位(b),根据哺乳动物的物种给出了SEQ ID。

[0074]	前区的中间部分的线性表位	人类	马	犬	牛
		SEQ ID N°45	SEQ ID N°48	SEQ ID N°51	SEQ ID N°54
		SEQ ID N°46	SEQ ID N°49	SEQ ID N°52	SEQ ID N°55
		SEQ ID N°47	SEQ ID N°50	SEQ ID N°53	SEQ ID N°56

[0075] 因此,根据一个实施方案,未被抗体识别的线性表位(b)具有序列SEQ ID No.45至SEQ ID No.56。

[0076] 如之前一样,根据常规方法产生表位,如前所述。它们也可以通过肽合成产生,其通常是优选的。

[0077] 一个特定实施方案至少包括用于选择步骤(iii)的如下特征:

[0078] -筛选1使用方法1;

[0079] -筛选1在筛选2之前进行。

[0080] 在每个筛选步骤之间,如果需要,根据常规技术(例如蛋白A上的亲和层析)纯化包含在杂交瘤上清液中的抗体。一旦进行了选择和/或如果需要,则在每个筛选步骤之间,克隆杂交瘤以保证稳定和均匀的系。这是本领域技术人员所公知的。

[0081] 本发明方法的最后步骤由目的抗体的产生组成,也为本领域技术人员熟知的并且在所有单克隆抗体生产手册(例如细胞生物学实验手册)中描述的步骤。

[0082] 除了上述步骤(其通用程序已被广泛描述)之外,本发明的方法还可包括其它步骤,例如用于洗涤、储存和将抗体转化为片段的步骤。

[0083] 在用于制备本发明的抗-AMH抗体的方法中,免疫原(包含序列SEQ ID No.1或与序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列的至少99个氨基酸,和序列SEQ ID No.2或与序列SEQ ID No.2具有至少75%相同性的序列的至多560个氨基酸的AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸)、AMH的前区的中间部分(包含序列SEQ ID No.1或与序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列的至少99个氨基酸,和序列SEQ ID No.8或与序列SEQ ID No.8具有至少75%相同性的序列的至多255个氨基酸的AMH多肽)、未被目的抗体识别的多肽(a)(包含序列SEQ ID No.13或与序列SEQ ID No.13具有至少75%相同性的序列的至少131个氨基酸,和序列SEQ ID No.11或与序列SEQ ID No.11具有至少75%相同性的序列的至多156个氨基酸的AMH多肽)以及线性表位(位于序列SEQ ID No.1或者与序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列中)优选属于相同种类。

[0084] 根据一个实施方案:

[0085] -哺乳动物是人类,免疫原是AMH多肽或者编码该AMH多肽的多核苷酸,其包含序列SEQ ID No.1的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.2的至多560个氨基酸,被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽是包含序列SEQ ID No.1的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.8的至多

255个氨基酸的AMH多肽,并且未被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.13的至少131个氨基酸和序列SEQ ID No.11的至多156个氨基酸的AMH多肽,或者

[0086] -哺乳动物是马,免疫原是AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸,其包含序列SEQ ID No.14的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.15的至多573个氨基酸,被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽是包含序列SEQ ID No.14的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.19的至多265个氨基酸的AMH多肽,并且未被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.22的至少144个氨基酸和序列SEQ ID No.21的至多166个氨基酸的AMH多肽,或者

[0087] -哺乳动物是狗,免疫原是AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸,其包含序列SEQ ID No.23的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.24的至多572个氨基酸,被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽是包含序列SEQ ID No.23的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.28的至多264个氨基酸的AMH多肽,并且未被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.31的至少144个氨基酸和序列SEQ ID No.30的至多165个氨基酸的AMH多肽,或者

[0088] -哺乳动物是牛,免疫原是AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸,其包含序列SEQ ID No.32的至少100个氨基酸和序列SEQ ID No.33的至多575个氨基酸,被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽是包含序列SEQ ID No.32的至少100个氨基酸和序列SEQ ID No.39的至多270个氨基酸的AMH多肽,并且未被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.44的至少146个氨基酸和序列SEQ ID No.42的至多270个氨基酸的AMH多肽。

[0089] 特别地:

[0090] -哺乳动物是人类,免疫原是AMH多肽或者编码该AMH多肽的多核苷酸,其选自序列SEQ ID No.2至10的多肽,被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽是选自序列SEQ ID No.1和SEQ ID No.8至10的多肽的AMH多肽,并且未被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽(a)是选自序列SEQ ID No.11至13的多肽的AMH多肽,或者

[0091] -哺乳动物是马,免疫原是AMH多肽或者编码该AMH多肽的多核苷酸,其选自序列SEQ ID No.15至20的多肽,被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽是选自序列SEQ ID No.14以及SEQ ID No.19和20的多肽的AMH多肽,并且未被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽(a)是选自序列SEQ ID No.21和22的多肽的AMH多肽,或者

[0092] -哺乳动物是狗,免疫原是AMH多肽或者编码该AMH多肽的多核苷酸,其选自序列SEQ ID No.24至29的多肽,被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽是选自序列SEQ ID No.23以及SEQ ID No.28和29的多肽的AMH多肽,并且未被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽(a)是选自序列SEQ ID No.30和31的多肽的AMH多肽,或者

[0093] -哺乳动物是牛,免疫原是AMH多肽或者编码该AMH多肽的多核苷酸,其选自序列SEQ ID No.33至41的多肽,被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽是选自序列SEQ ID No.32以及SEQ ID No.39至41的多肽的AMH多肽,并且未被杂交瘤分泌的抗体识别的AMH多肽(a)是选自序列SEQ ID No.42至44的多肽的AMH多肽。

[0094] 通过本发明的方法产生的抗体是新颖的,并且可以通过另一种方法产生,只要它们保持相同的特征即可。因此,本发明的另一主题涉及抗哺乳动物AMH单克隆抗体或单克隆抗体片段,其识别包含序列SEQ ID No.1或与序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.8或与序列SEQ ID No.8具有至少75%相同性的序列的至多255个氨基酸的AMH多肽,但是既不识别(a)包含序列SEQ ID No.13或与序列SEQ ID

No.13具有至少75%相同性的序列的至少131个氨基酸,和序列SEQ ID No.11或与序列SEQ ID No.11具有至少75%相同性的序列的至少156个氨基酸的AMH多肽,也不识别位于序列SEQ ID No.1或与序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列中的任何线性表位。

[0095] 术语“单克隆抗体片段”旨在表示具有与从其衍生的抗体相同的免疫识别特征的抗体的任何部分。在当前情况下,它能够识别AMH的前区的中间部分,并且还能够识别全长AMH。作为片段的示例,可以提及Fab、Fab'和F(ab')₂片段以及提及scFv(单链可变片段)和dsFv(双链可变片段)片段。这些功能性片段可以特别是通过遗传工程或通过特异性蛋白水解消化然后纯化而获得。

[0096] 前述针对本发明方法描述的特征和定义也适用于本发明的抗体。

[0097] 因此,本发明的抗体可满足以下条件中的一个或多个:

[0098] -未被识别的AMH多肽(a)是选自以下序列的多肽:SEQ ID No.11、SEQ ID No.12和SEQ ID No.13的序列或者与这些序列具有至少75%相同性的序列,

[0099] -与序列SEQ ID No.11、SEQ ID No.12和SEQ ID No.13具有至少75%的相同性的序列选自以下序列:SEQ ID No.21、SEQ ID No.22、SEQ ID No.30、SEQ ID No.31、SEQ ID No.42、SEQ ID No.43以及SEQ ID No.44,

[0100] -未被识别的线性表位(b)具有序列SEQ ID No.45至SEQ ID No.56。

[0101] 特别地,

[0102] -哺乳动物是人类,被识别的AMH多肽是包含序列SEQ ID No.1的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.8的至多255个氨基酸的AMH多肽,并且未被识别的AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.13的至少131个氨基酸和序列SEQ ID No.11的至多156个氨基酸的AMH多肽,或者

[0103] -哺乳动物是马,被识别的AMH多肽是包含序列SEQ ID No.14的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.19的至多265个氨基酸的AMH多肽,并且未被识别的AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.22的至少144个氨基酸和序列SEQ ID No.21的至多166个氨基酸的AMH多肽,或者

[0104] -哺乳动物是狗,被识别的AMH多肽是包含序列SEQ ID No.23的至少99个氨基酸和序列SEQ ID No.28的至多264个氨基酸的AMH多肽,并且未被识别的AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.31的至少144个氨基酸和序列SEQ ID No.30的至多165个氨基酸的AMH多肽,或者

[0105] -哺乳动物是牛,被识别的AMH多肽是包含序列SEQ ID No.32的至少100个氨基酸和序列SEQ ID No.39的至多270个氨基酸的AMH多肽,并且未被识别的AMH多肽(a)是包含序列SEQ ID No.44的至少146个氨基酸和序列SEQ ID No.42的至多270个氨基酸的AMH多肽。

[0106] 本发明的抗-AMH抗体特别用于在可含有AMH的生物样品中测定AMH。可以整体或片段形式和/或与标记物缀合的形式使用他们,所述标记物能够在与样品的AMH结合之后产生可检测信号的发射用于免疫反应的可视化,从而构成本发明的另一个主题。

[0107] 能够产生可检测信号的发射用于免疫反应的可视化的表达标记物意指含有以下基团的任何分子,该基团在没有化学修饰的情况下直接与抗体或抗体片段的基团反应或者在用包括这种基团的化学修饰之后与抗体或抗体片段的基团反应,该分子能够直接或间接产生将用于提供所寻求的量的可检测信号。

[0108] 本发明的标记物和抗体或抗体片段之间的结合可以通过本领域技术人员已知的任何方法,且特别是通过偶联进行。

[0109] 标记物的示例特别包括:

[0110] • 产生可以例如通过比色法、荧光或冷光检测的信号酶的,诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,

[0111] • 发色团,诸如荧光、冷光或染料化合物,

[0112] • 放射性分子,诸如P32、S35或I125,

[0113] • 荧光分子,诸如Alexas或藻青蛋白,以及

[0114] • 电化学发光盐,诸如基于吖啶鎓(acridinium-based)或基于钌的有机金属衍生物。

[0115] 间接检测系统的示例包括例如能够与抗配体反应的配体。然后,配体对应于标记物,以与抗体或抗体片段构成缀合物。

[0116] 配体/抗配体对本领域技术人员是熟知的,并且包括例如以下的对:生物素/抗生物素蛋白链霉素、半抗原/抗体、抗原/抗体、肽/抗体、糖/凝集素、多核苷酸/与多核苷酸互补的序列。

[0117] 抗配体然后可通过先前描述的直接检测标记物来直接检测,或其本身可由另一配体/抗配体对等检测。

[0118] 通过夹心免疫测定进行AMH的测定,该测定是本领域技术人员公知的测定。简言之,其由使用两个分析物结合配偶体(在本申请中为本发明的至少一个抗体或抗体片段)确定分析物(在本申请中为哺乳动物AMH)组成。

[0119] 当然,例如前缀“免疫测定”中的前缀“免疫”在本申请中不应当被认为严格地表明结合配偶体(而非本发明的抗体或抗体片段)必须是免疫来源的配偶体,诸如抗体或抗体片段。实际上,如本领域技术人员所熟知的,该术语还更广泛地用于表示测试和方法,其中结合配偶体不是免疫来源/本质的配偶体,而是由例如期望检测和/或定量的分析物的受体组成。基本条件是所讨论的结合配偶体能够与所寻找的分析物结合,在本申请中特别优选AMH。因此,已知的是,使用术语ELISA测定进行指代使用在严格意义上不是免疫学的结合配偶体的测定,更广泛地称为“配体结合测定”,尽管术语“免疫”名义上包括在对应于首字母缩写ELISA的全名中。为了清楚和一致起见,术语“免疫”在本申请中用于表示使用至少一个结合配偶体的任何生物学分析,该至少一个结合配偶体适合于结合所寻找的分析物并且特别优选地定量后者,即使当结合配偶体(而非本发明的抗体或抗体片段)在严格意义来说在本质或来源上不是免疫学的。

[0120] 本发明的另一主题因此涉及一种通过夹心免疫测定来在可包含AMH的生物学样品中定量哺乳动物AMH的方法,该方法包括以下步骤或由以下步骤组成:

[0121] -使所述生物学样品与两个AMH结合配偶体接触,其中所述配偶体中的至少一个是本发明的抗体、抗体片段,或缀合物,

[0122] -如果存在,则使用能够产生可检测信号的发射的标记物来检测通过所述结合配偶体和AMH之间的结合而发射的信号,和

[0123] -将检测到的信号转换为AMH浓度。

[0124] 本定量方法的第一步包括或由以下组成:使生物学样品与两个结合配偶体接触,

其中所述配偶体中的至少一个是本发明的抗体、抗体片段或缀合物。

[0125] 可含有哺乳动物AMH的生物学样品是血液、血清、血浆、卵泡液和精液样品。根据一个实施方案,该生物学样品是血液、血清或血浆样品。

[0126] 任选地呈缀合物的形式的结合配偶体(而非本发明的抗体或抗体片段)包含能够与AMH结合的任何分子。作为这种结合配偶体的例子,可以提及抗-AMH多克隆抗体、抗-AMH单克隆抗体、抗-AMH单克隆抗体片段、抗体类似物(能够模拟抗体的分子)诸如nanofitin、适体或“DARPin”,或已知具有与AMH相互作用的任何其它分子。

[0127] nanofitin抗体类似物是小蛋白质,其如同抗体一样能够与生物学靶结合,从而使得能够检测它、捕获它或相当简单地将其在有机体内靶向。

[0128] 适体抗体类似物是寡核苷酸(通常是RNA或DNA),其在文库中通过称为“经指数富集的配体的系统进化”的SELEX的体外选择的组合方法而被鉴定为含有多达1015个不同序列(Ellington AD and Szostak JW.,1990)。因为RNA具有多样的和复杂结构的能力,大多数适体由RNA组成,这使得可以在其表面产生各种几何形状的腔,使得能够与各种配体结合。它们是可用于生物技术、诊断或治疗应用的目的生物化学工具。它们的选择性和它们的配体结合性质与抗体的那些相当。

[0129] “DARPin”抗体类似物(DARPin是指设计的锚蛋白重复蛋白(Designed Ankyrin Repeat ProteINS)(Boersma YL and Plütckthun A,2011)是使得能够模拟抗体并能够以高亲和力和高选择性结合到靶蛋白的另一类蛋白质。它们衍生自为适体蛋白的锚蛋白家族,该适体蛋白使得能够将整合膜蛋白结合到构成细胞质膜的“脊柱”的血影蛋白/肌动蛋白网络。锚蛋白的结构是基于约33个氨基酸的基序的重复,且这对于DARPin也是一样的。每个基序具有螺旋-转角-螺旋型的二级结构。DARPin含有至少3个,优选4至5个重复单元,并通过筛选组合文库获得。

[0130] 可以以本领域技术人员公知的常规方式制备抗-AMH多克隆抗体、单克隆抗体和抗体片段。一些抗体可在市场上购得,例如购自AnshLabs(US)。

[0131] 申请人还使用与先前针对本发明描述用于制备单克隆抗体的相同方法制备了特别用于AMH的测定的上下文中的其它单克隆抗体,唯一的区别在于抗体识别区是AMH的前区的C-末端部分,即,对于人AMH,氨基酸256至451(SEQ ID No.57的196个氨基酸);对于马AMH,氨基酸266至464(SEQ ID No.58的199个氨基酸),对于犬AMH,氨基酸265至463(SEQ ID No.59的199个氨基酸),对于牛AMH,氨基酸271至466(SEQ ID No.60的199个氨基酸)。所关注前区的C末端部分因此是AMH多肽,其包含序列SEQ ID No.57或与序列SEQ ID No.57具有至少75%相同性的序列的至少196个氨基酸。出乎意料地,与现有技术抗体不同,识别AMH的前区的C-末端部分的抗体不需要大量用于应用它们的测定中。

[0132] 为了制备识别AMH的C-末端部分的这些抗体,所用免疫原是AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸,其必须至少包含抗体必须识别的部分,即至少AMH的前区的C-末端部分,即序列SEQ ID No.57或与序列SEQ ID No.57具有至少75%相同性的序列的至少196个氨基酸。该免疫原也至多包含所讨论物种的全长AMH或编码所讨论物种的全长AMH的多核苷酸,即,在人AMH的情况下,序列SEQ ID No.2的560个氨基酸,其他AMH包含与序列SEQ ID No.2至少75%的相同性。特定免疫原可以选自以下:

[0133] -相对于AMH的整个序列,缺乏位于AMH的前区的C-末端部分之后的所有氨基酸的

AMH多肽或编码该多肽的多核苷酸,即包含序列SEQ ID No.7或与序列SEQ ID No.7具有75%相同性的序列的至少426个氨基酸,和序列SEQ ID No.5或与序列SEQ ID No.5具有至少75%相同性的序列的至多451个氨基酸的AMH多肽或编码所述AMH多肽的多核苷酸,优选选自序列SEQ ID No.5、SEQ ID No.6和SEQ ID No.7或与这些序列具有至少75%相同性的序列(例如序列SEQ ID No.17、18、26、27、36、37或38)的AMH多肽。这对应于AMH-3,在适当的情况下无信号肽并且任选存在地无前体部分;

[0134] -AMH多肽或编码该多肽的多核苷酸,其对应于具有全部或部分的信号肽和任选存在的全部或部分前体部分的完全AMH,即其包含序列SEQ ID No.4或与序列SEQ ID No.4具有至少75%相同性的序列的至少535个氨基酸,优选选自序列SEQ ID No.2、SEQ ID No.3和SEQ ID No.4或者与这些序列具有至少75%相同性的序列(例如序列SEQ ID No.15、16、24、25、33、34或35)的AMH多肽。

[0135] 还以任何顺序使用2个筛选步骤,用特定的多肽和肽进行杂交瘤的选择。

[0136] 第一筛选(称为筛选1)由仅保留杂交瘤组成,如先前所述该杂交瘤产生识别前区的C-末端部分的抗体。为此,可能采用两种方法:

[0137] 方法1:首选选择分泌识别AMH-3的抗体的杂交瘤,即,对于人AMH-3,氨基酸1-451(SEQ ID No.5或与该序列具有至少75%相同性的任何序列)(在适当的情况下,没有全部或部分的信号肽和全部或部分的前体部分)。根据一个实施方案,被抗体识别的AMH-3多肽是选自以下序列的多肽:SEQ ID No.5、SEQ ID No.6和SEQ ID No.7的序列和与这些序列具有75%相同性的序列。然后丢弃杂交瘤,该杂交瘤产生识别位于AMH的前区的C-末端部分之前的AMH的部分的抗体,即,对于人AMH,氨基酸1-255(SEQ ID No.8-AMH-2或与该序列具有至少75%相同性的任何序列)(在适当的情况下,无全部或部分的信号肽和全部或部分的前体部分)。该AMH多肽称为未被根据本发明制备的抗体识别的AMH多肽(a)。根据一个实施方案,未被抗体识别的AMH多肽(a)是选自以下序列的多肽:SEQ ID No.8、SEQ ID No.9和SEQ ID No.10以及与这些序列具有至少75%相同性的序列。

[0138] 方法2:选择杂交瘤,该杂交瘤分泌识别AMH的前区的C-末端部分的抗体,即,对于人AMH,氨基酸256-451(SEQ ID No.57或与该序列具有至少75%相同性的任何序列)。

[0139] 第二筛选(称为筛选2)由丢弃杂交瘤组成,该杂交瘤产生识别AMH的前区的C-末端部分中(即序列SEQ ID No.57或与序列SEQ ID No.57具有75%相同性的任何序列中)的线性表位(b)的抗体。

[0140] 下表(表4)呈现了用于制备这些抗体的在AMH的前区的C-末端部分中确定的各种线性表位(b),根据哺乳动物的物种给出了SEQ ID。

		人类	马	犬	牛
[0141]	前区的C-末端部分的线性表位	SEQ ID N°61 至 68	SEQ ID N°69 至 74 SEQ ID N°62 和 63	SEQ ID N°75 至 81 SEQ ID N°73	SEQ ID N°82 至 85 SEQ ID N°62, 63, 70 和 73

[0142] 如此制备的抗-AMH抗体具有以下特征:它们识别包含序列SEQ ID No.57或与序列

SEQ ID No.57具有至少75%相同性的序列的至少196个氨基酸的AMH多肽,它们既不识别(a)包含序列SEQ ID No.10或与序列SEQ ID No.10具有至少75%相同性的序列的至少230个氨基酸,和序列SEQ ID No.8或与序列SEQ ID No.8具有至少75%相同性的序列的至多255个氨基酸的AMH多肽,也不识别(b)位于序列SEQ ID No.57或与SEQ ID No.57具有至少75%相同性的序列(例如,序列SEQ ID No.61至85)中的线性表位。

[0143] 先前针对用于制备本发明抗体的方法和针对本发明的抗体描述的所有特征和定义也适用于此。

[0144] 两个结合配偶体中的一个可与标记物偶联以形成缀合物或示踪剂。另一个结合配偶体可以直接或间接地捕获在固体支撑物上。然后参考后者的捕获配偶体和前者的检测配偶体。

[0145] 用于定量本发明的AMH的方法中使用的成对AMH结合配偶体可以识别AMH的前区和成熟区,或者仅识别前区,特别是在本发明的抗体的情况下使用识别前区的C-末端部分的抗-AMH抗体时。因此,根据一个特定实施方案,定量方法中使用的第二AMH结合配偶体是抗体,该抗体识别包含序列SEQ ID No.57或与序列SEQ ID No.57具有至少75%相同性的序列的至少196个氨基酸的AMH多肽,但是既不识别(a)包含序列SEQ ID No.10或与序列SEQ ID No.10具有至少75%相同性的序列的至少230个氨基酸,和序列SEQ ID No.8或与序列SEQ ID No.8具有至少75%相同性的序列的至多255个氨基酸的AMH多肽,也不识别(b)位于序列SEQ ID No.57或与序列SEQ ID No.57具有至少75%相同性的序列中的线性表位,后者可能是片段和/或缀合物的形式,该缀合物具有能够产生可检测信号的发射用于该缀合物与生物样品中的AMH之间的免疫反应的可视化的标记物。

[0146] 如本领域技术人员所公知的,使生物样品与两个AMH结合配偶体接触可以是一步或两步。简言之,一步免疫测定包括使测试样品与两个结合配偶体同时接触,其包括先前定义的本发明的抗体、抗体片段或缀合物,然而两步免疫测定包括首先使测试样品与第一结合配偶体接触,并然后使由此形成的分析物-第一结合配偶体复合物与第二结合配偶体接触,这两个结合配偶体中的一个当然是先前定义的本发明的抗体、抗体片段或缀合物。

[0147] 该方法还可以包括本领域技术人员已知的其它步骤,例如洗涤步骤和温育步骤。

[0148] 本发明的定量方法的第二步包含或由以下组成:检测通过所述结合配偶体和AMH之间的结合发射的信号,如果其存在,则使用能够产生如先前定义的可检测信号的发射的标记物。该标记物可以与所述AMH结合配偶体中的一个缀合。

[0149] 取决于所用标记的类型,本领域技术人员将通过任何类型的合适测量装置(例如分光光度计、分光荧光计、密度计、光度计或高分辨率照相机)添加允许标记的可视化或可检测信号的发射的试剂。

[0150] 用于定量AMH的方法的最后步骤包含或由以下组成:将检测到的信号转换成AMH浓度。还参考AMH的水平或量。一般原理是在免疫测定期间发射的测量的信号与生物样品的AMH的量成比例。

[0151] 将检测到的信号转换为AMH浓度的步骤对本领域技术人员是公知的。它由以下组成:基于标准范围使用预先建立的数学模型。该标准范围将以已知的方式预先获得。简言之,获得标准范围由以下组成:测量由目标分析物(AMH)通过增加已知量或浓度而产生的信号,利用信号作为AMH水平的函数绘制曲线,并尽可能如实地找到代表该关系的数学模型。

数学模型将用于确定待测试的生物学样品中所含的AMH的未知量、滴度或浓度。

[0152] AMH浓度的测定可以用于几个方面,且特别是在妇女能育性的背景下,用于估计妇女的卵巢储量,例如在应当接受有破坏卵泡风险的大量治疗的妇女中,而且还可以用于青春期前的男孩中,例如在与性别分化相关的病症的情况下。

[0153] 因此,本发明的另一个主题涉及本发明的抗体、抗体片段或缀合物的用途,无论它们是否使用本发明的方法制备,替代地使用本发明的定量方法作为辅助制备:

[0154] -诊断与育龄妇女的卵巢功能紊乱相关的病症,或

[0155] -评估12岁以上的年轻女孩和妇女的卵泡储量,或

[0156] -评估与青春期前的男孩性别分化相关的病症。

[0157] 为了实施特别是根据上文所述的用途使用的本发明的方法,本发明的抗体、片段或缀合物可以包含在试剂盒中。

[0158] 因此,本发明的另一主题涉及包含先前定义的或制备的抗体或抗体片段和/或如先前定义的缀合物的试剂盒。

[0159] 这里同样,先前在本发明的抗体和方法的上下文中描述的特征和定义适用于本发明的试剂盒。

[0160] 根据一个特定实施方案,该试剂盒还包含或含有至少一种阳性对照。该阳性对照包括能够与在试剂盒的使用期间应用的结合配偶体结合的化合物,该化合物以预定的量存在。

[0161] 作为此类化合物的非限制性示例,可提及序列SEQ ID No.2或与序列SEQ ID No.2具有至少75%相同性的序列的总AMH,在适当情况下其具有全部或部分的信号肽和任选的全部或部分的前体部分。

[0162] 该试剂盒还可以包含证明结合配偶体和AMH之间的反应所需的所有化合物,例如允许标记的可视化或可检测信号的发射的洗涤缓冲液或试剂。

[0163] 本发明通过非限制性说明的方式给出的以下示例以及还通过图1至4将被更清楚地理解,其中:

[0164] 图1是人AMH蛋白和从其衍生的人AMH-1、AMH-2和AMH-3蛋白构建体的结构的图示。

[0165] 图2是在通过4-12%的Bis-Tris凝胶上电泳而分离后,通过转染HEK293T细胞中的AMH-1、AMH-2、AMH-3和全长AMH基因构建体获得的细胞裂解物的Western印迹分析。孔1、2:阴性对照裂解物(用空质粒转染的细胞);孔3、4:AMH-1裂解物;孔5、12:分子量标准;孔6、7:AMH-2裂解物;孔8、9:AMH-3裂解物;孔10、11:全长AMH裂解物。孔1、3、6、8和10对应于条件A:对装载的样品进行加热和还原。孔2、4、7、9和11对应于条件B:对装载的样品加热但不进行还原。图2A是用抗- β -肌动蛋白抗体测试的膜的照片,该抗- β -肌动蛋白抗体用于验证在每个孔中装载等量的总蛋白质。图2B是用抗组氨酸抗体(Qiagen)测试的膜的照片。对应于AMH构建的表达产物的条带已被框住。

[0166] 图3是在通过4-12%的Bis-Tris凝胶上的电泳而分离后,从HEK293T细胞中基因构建体转染的上清液中纯化的AMH-2和AMH-3蛋白的Western印迹分析。孔1:阴性对照(用空质粒转染的细胞);孔2:AMH-2;孔3:AMH-3;孔5:分子量标准。对装载的样品进行加热但不进行还原。制备5个相同的膜(图3A-3E),且每个膜用抗-AMH抗体或用抗组氨酸抗体(Qiagen)进行测试。

[0167] 图4是通过亲和层析而纯化的重组AMH蛋白CHO-AMH5 3F1的SDS-PAGE分析。用硝酸银将SDS-PAGE凝胶染色以使总蛋白质可视化。孔1:分子量标准;孔2:加热但不还原的重组AMH;孔3:加热并还原的重组AMH。

实施例

[0168] 实施例1:对应于人AMH的整个序列或对应于截短序列的DNA片段的克隆,以及HEK293T细胞中的瞬时转染

[0169] 1.1.基因构建体

[0170] 所表达的全长AMH序列是人AMH的序列,其包含560个氨基酸(对应于Uniprot KB数据库的登记号P03971的SEQ ID No.2);该构建体称为AMH-560。其包含信号肽(氨基酸1-18)和前体部分(氨基酸19-25),它们在蛋白质的翻译后成熟期间被裂解。

[0171] 制备分别对应于AMH的氨基酸1-156(SEQ ID No.11)、1-255(SEQ ID No.8)和1-451(SEQ ID No.5)的序列的三个其它蛋白质构建体,称为AMH-1、AMH-2和AMH-3。将聚组氨酸(8-His)标记添加到这4个构建体的C-末端侧,以便于纯化(在序列表中不添加标记)。

[0172] 对应于AMH-1、AMH-2、AMH-3和全长AMH构建体的DNA片段(其序列在下表5中给出)以来自公司GeneArt®(美国生命技术公司)的合成基因的形式获得。每个DNA片段(AMH-1、AMH-2、AMH-3和全长AMH)在CMV启动子的控制下克隆在pCMV6-XL5载体中的Eco RI和Not I位点之间。通过在插入物的水平测序来验证所获得的质粒,以确保它们不包含错误。

[0173] 表5

[0174]	名称	AMH的多核苷酸	相应的DNA片段 SEQ ID N°X-8HIS-终止密码子
	AMH-1	SEQ ID N°86	SEQ ID N°86-CACCACCATCATCACCATCACCAC-TGA
	AMH-2	SEQ ID N°87	SEQ ID N°87-CACCACCATCATCACCATCACCAC-TGA
	AMH-3	SEQ ID N°88	SEQ ID N°88-CACCACCATCATCACCATCACCAC-TGA
	全 AMH	SEQ ID N°89	SEQ ID N°89-CACCACCATCATCACCATCACCAC-TGA

[0175] 1.2.HEK293T细胞中的瞬时转染

[0176] 培养根据供应商的说明书,将HEK-293T/17SF细胞(ATCC ACS-4500™)在富含谷氨酰胺(Gibco#250030.24)的HEK+SF培养基(ATCC#8006386597)中无血清培养。在F75培养瓶中培养细胞,并在转染前在37℃5%CO₂保持在培养箱中。

[0177] 转染通过应用随Amaxa细胞系核酸转染试剂盒V(#VCA-1003)提供的方案并且每次转染针对一百万个细胞使用5μg的DNA来使用Amaxa核酸转染装置(Lonza)通过核酸转染对HEK293T SF细胞(10⁶个细胞)进行转染。简言之,将一百万个细胞在200g下离心10分钟以收获它们。然后将细胞团重悬于100μl的溶液V(在试剂盒中提供)中。将5μg的质粒加入到细胞悬液中。将全部混合物温和地混合并转移到Amaxa比色皿中(也在试剂盒中提供)。将比色皿插入设置为Amaxa Q-001程序的核酸转染装置中,并然后激活核酸转染。然后立即将样品转移到将在37℃、5%CO₂下温育的6孔细胞培养板中的温热培养基中。将HEK293T SF细胞培养48小时。

[0178] 裂解和收获转染后48小时,收集上清液,并然后在加入蛋白酶抑制剂(来自Roche

的cOmplete™,无EDTA的蛋白酶抑制剂混合物片剂)后在-80℃冷冻。用含有130mM NaCl、0.5%Triton X-100、5U/mL benzonase核酸酶(Novagen)、0.48G/L MgCl₂和蛋白酶抑制剂(cComplete™,无EDTA的蛋白酶抑制剂混合物片剂,Roche Cat.No.045-6642,1片/50ml,pH 7.4)的1.8ml的5.5mM磷酸盐裂解缓冲液吸收经转染的细胞团(6×10⁶细胞/团)。然后将细胞裂解物置于冰中30分钟,然后在13000g、4℃离心15分钟。获得的上清液含有AMH-1、AMH-2、AMH-3和全长AMH蛋白,并储存在-80℃下。

[0179] 1.3.蛋白质表达的Western印迹分析

[0180] 在步骤1.2期间获得的表达产物的第一表征通过在NuPAGE®MES SDS缓冲液(美国生命技术公司)中的NuPAGE®Bis-Tris 4-12%凝胶上进行SDS-PAGE分析而进行。在装载到凝胶上(14μL/孔)之前,在NuPAGE®LDS 4X样品缓冲液4X(美国生命技术公司)(3/1,体积/体积)中稀释转染上清液和裂解物,并进行各种处理。通过加入最终浓度55mM的二巯苏糖醇(DTT)进行还原。在75℃加热5分钟。

[0181] 条件A:加热和还原(采用DTT)

[0182] 条件B:加热和不还原(没有采用DTT)。

[0183] 在凝胶迁移之后,在含有20%甲醇的1X Tris-甘氨酸缓冲液中,在350mA恒定电流下,将通过电泳分离的蛋白质转移到0.45μm硝化纤维素膜上50分钟。在含有130mM NaCl的5.5mM磷酸盐缓冲液中,在3%BSA(牛血清白蛋白)存在下,在+2/8℃下过夜进行膜的钝化。钝化后,将小鼠抗组氨酸单克隆抗体(Qiagen,Cat.No.34660)在含有130mM NaCl和0.05%吐温20的5.5mM磷酸盐缓冲液中稀释至1/2000,然后在+18/25℃将10mL该稀释液与膜一起温育1h。同时并在相同条件下将以完全相同的方式制备的第二膜与小鼠抗-β-肌动蛋白单克隆抗体(克隆AC-15,美国生命技术公司,Cat.No.AM4302)(代替抗组氨酸抗体)一起温育。该膜用于验证在每个孔中,相当量的总蛋白质已经经受分析(等效模式控制)。

[0184] 在清洗膜以除去未结合的抗体(在含有130mM NaCl和0.05%吐温20的5.5mM磷酸盐缓冲液中洗涤5次5分钟)之后,将它们与在含有0.2%吐温20的1X PBS中稀释至1/20000的辣根过氧化物酶缀合的抗小鼠二抗(Jackson ImmunoResearch,Cat.No.115-036-003)一起温育1h。在含有0.2%吐温20的1X PBS中洗涤5次5分钟后,在通过化学发光获取之前,通过在搅拌下将膜在澄清的Western印迹底物溶液(Biorad,Cat.No.170-5061)中温育5分钟来进行可视化。

[0185] 结果示于图2中。在用抗-β-肌动蛋白抗体可视化的膜上(图2A),观察到每个孔单个条带,并且这些条带的强度是相等的,除了略微较不强力的AMH-1孔(3和4)之外。因此验证了该控制。在用抗组氨酸抗体可视化的膜上(图2B),条带显示于阴性对照孔中。然而,所述孔含有用无质粒的空白转染的细胞裂解物。这是抗组氨酸抗体与裂解物中的某些蛋白质(在所有孔中)的非特异性反应性的情况。除了这些非特异性条带之外,AMH-1、AMH-2、AMH-3和全长AMH孔含有特异性条带,即阴性对照孔中不存在的条带。这些特异性条带被框在图2B中。对于加热和还原条件,它们的表观分子量对于AMH-1、AMH-2、AMH-3和全长AMH构建体(孔3、6、8、10)分别为约20、30、55和65kDa。对于加热但未还原条件,AMH-1、AMH-2、AMH-3和全长AMH构建体(孔4、7、9、11)的表观分子量分别为约36、50、100和120kDa。这些分子量估值与在非还原条件下的AMH构建体的二聚化相一致。重要的是要注意,二聚化还在不存在成熟区且不管AMH-1和AMH-2构建体中进行的可观的随机C-末端截短的情况下发生。

[0186] 总之,这种Western印迹分析表明,借助于核苷酸序列,AMH-1、AMH-2、AMH-3和全长AMH质粒构建体显然使得可以表达含有组氨酸标记的蛋白质,其表观分子量对应于预期的分子量。

[0187] 实施例2:CHO细胞中AMH蛋白的稳定表达和纯化

[0188] 表达全长AMH的重组CHO(中国仓鼠卵巢)细胞的稳定克隆是使用来自Collectis (Cat.No.CH0Sa-0011-05和CH0Sa-0011-10)的cGPS CHO-Sa CEMAX试剂盒并且根据相关方案获得的。该试剂盒允许外源基因在CHO细胞中的靶向染色体整合。它由cGPS CHO-Sa细胞系(贴壁细胞)、目的基因被克隆入其中的整合载体、组成性表达大范围核酸酶I-Sce I的载体以及TransMessenger™转染试剂盒(Qiagen Cat.No.301525)组成。遗传修饰的cGPS CHO-Sa细胞系具有在其基因组中含有大且独特的特定位点的特质,所述特定位点被具有内切核酸酶活性的大范围核酸酶I-Sce I识别。

[0189] 2.1. 克隆

[0190] 编码连接到C末端8-组氨酸标记的全长人AMH蛋白(aa 1-560)的合成基因购自公司Geneart。优化该基因以在CHO宿主中表达。在CMV启动子的控制下,在Eco RI和Not I位点之间将该AMH基因克隆到Collectis出售的pIM.LP2.Zeo整合载体中。pIM.LP2.Zeo整合载体具有包含2个区域的特性,该2个区域分别与CHO基因组中的大范围核酸酶I-SceI识别的独特位点的上游和下游的区域同源。这2个特定区域构建了插入编码AMH的基因的多克隆位点。此外,该整合质粒为经转染的CHO细胞提供了2个选择优势。第一个是由CMV启动子控制的博来霉素(zeocin)抗性基因。第二个是由SV40启动子控制的新霉素抗性基因。该基因还激活对遗传霉素(G418)(接近新霉素的抗生素)的抗性。

[0191] 2.2. 转染

[0192] 转染前1天(D-1),在补加有2mM L-谷氨酰胺、青霉素(100UI/mL)、链霉素(100μg/mL)、两性霉素B(Fongizone)(0.25μg/mL)和10%胎牛血清的F-12K培养基中每10cm培养皿中接种 2×10^5 个cGPS CHO-Sa CEMAX贴壁细胞。

[0193] 在转染的当天(D),在EC-R缓冲液(可用于TransMessenger™转染试剂盒)中稀释包含AMH基因和1μg大范围核酸酶mRNA的1μg整合载体(pIM.LP2.Zeo)。然后加入4μl的增强子试剂[核酸(mg)/增强子(ml)比率=1/2]。总反应体积必须为100μL。然后在环境温度下温育溶液5分钟。随后加入16μl的TransMessenger™试剂,并然后在沉积在 2×10^5 个细胞上之前将整个混合物在+18/25℃下温育10分钟,其培养基预先用900μL无血清且无抗生素的F-12k培养基替换。

[0194] 2.3 克隆选择和克隆的表征

[0195] 根据它们对博来霉素和遗传霉素(G418)的抗性选择AMH重组克隆。

[0196] 在转染后24h(D+1),用补加有0.6mg/mL G418的10mL完全培养基替换培养基,然后从第6天开始(D+6),用补加有0.6mg/mL G418和0.4mg/mL博来霉素的新鲜培养基定期更换培养基。转染后15天(D+15),通过在96孔板中有限稀释来分离细胞。在该细胞克隆之后,通过培养扩增克隆,然后通过以下进行检测:

[0197] -使用对AMH基因的5' 和3' 端特异性的引物通过对从CHO细胞提取的基因组DNA进行PCR,

[0198] -通过为了验证AMH蛋白的表达的Western印迹。

[0199] 在PCR和Western印迹中均呈阳性的克隆中,选择AMH5 3F1克隆。对于该克隆,通过AMH基因的扩增获得的PCR产物被完整测序以验证基因的完整性并确保在选择期间没有引入突变。

[0200] 2.4.使用稳定的CHO-AMH5 3F1克隆表达重组AMH

[0201] 将AMH5 3F1克隆以在60ml的Excell 302培养基(Sigma Cat.No.4324C)中以 9×10^6 个细胞的比例培养在225cm²培养皿中,该Excell 302培养基补加有1%v/v抗生素和抗真菌剂(Gibco Cat.No.15240)、12mM L-谷氨酰胺(Gibco Cat.No.25030)、6g/L葡萄糖(Sigma Cat.No.G8769)、0.4mM柠檬酸铁(Sigma Cat.No.F6129)、2%次黄嘌呤-胸苷(Gibco Cat.No.41065)、1%甘油和1mg/L胃酶抑素A(Sigma Cat.No.P4265)。在7.5%CO₂的气氛下在37℃在培养箱中温育培养皿。培养4天后(扩增),将获得的细胞悬液(约 66×10^6 个细胞)根据相同的方案再次接种到7F225培养皿中。收获这些培养物的上清液,然后在5000g下离心并在-25℃下冷冻直至纯化。

[0202] 2.5.重组AMH蛋白CHO-AMH5 3F1的纯化

[0203] 解冻并汇集先前收获的培养上清液。然后在0.8μm膜(Nalgene, VWR Cat.No.7345084)上并然后在0.22μm膜(Nalgene aPES Rapid Flow)上过滤5升体积的上清液。然后将样品在具有30kDa截留阈值的中空纤维上(GE Cat.No.564110-18)浓缩20倍。然后用含有100mM NaCl、1mM EDTA、0.9g/L叠氮化物的50mM磷酸钠钾缓冲液(pH 7.8)使约100mL的残留物相对于其5倍体积渗滤。添加两种完全无EDTA蛋白酶抑制剂片剂(Roche Cat.No.11873580001)。根据供应商的方案(GE Cat.No.17-0716-01),通过对以10mg抗体/mL凝胶的比例偶联到抗-AMH(多克隆或单克隆)抗体的Hi-trap NHS-Sepharose柱进行亲和层析来纯化该残留物。使亲和柱在渗滤缓冲液中平衡,然后将50mL的残留物以0.5mL/min的速度注射到柱上。然后在含有100mM NaCl、1mM EDTA的50mM Tris HCl缓冲液(pH 7.9)中进行洗涤。然后以0.5mL/min的速度用0.1M甘氨酸-HCl缓冲液(pH 2.9)进行AMH蛋白的洗脱。将收集的洗脱级分立即中和至pH7-8,将蛋白酶抑制剂加入其中,并且将该级分汇集并在-80℃下储存在含有0.5M NaCl(pH 7.5)和20%乙醇的0.2M NaHCO₃存储缓冲液中。图4给出了根据实施例1.3的方案在重组AMH蛋白CHO-AMH5 3F1的SDS-PAGE分析后的膜的照片。代替Western印迹,用硝酸银对总蛋白质染色。经纯化的蛋白质是非常纯的。

[0204] 实施例3:通过小鼠的免疫制备本发明的抗-AMH抗体

[0205] 3.1.免疫原

[0206] 通过在大肠杆菌中培养来扩增实施例1中获得的全长AMH和AMH-3质粒,然后使用来自Qiagen(Cat.No.12381)的EndoFree Plasmid Mega试剂盒或者等效试剂盒进行纯化。为了制备基因枪药筒(Bio-Rad),根据供应商的说明书,在CaCl₂和精脒(spermidine)存在下,将2μg质粒DNA沉淀在直径1μm的0.22mg的金小珠上。在存在吸湿剂(干燥剂小袋)下,如此制备的小珠可在黑暗中储存在+2/8℃下。

[0207] 将实施例2中获得的重组AMH蛋白CHO-AMH5 3F1与弗氏佐剂(Sigma)等体积混合,该弗氏佐剂以油包水乳液的形式制备并且已知具有良好的佐剂能力。在每次注射之前临时进行该制备。

[0208] 3.2.免疫

[0209] 在第一次免疫时在六至八周大的雌性BALB/c(H-2d)小鼠中进行免疫实验。执行各

种方案:

[0210] • 在0、2、4和6周每次注射全长AMH DNA 4 μ g,共4个剂量,

[0211] • 在0、2、4和6周每次注射AMH-2DNA 4 μ g,共4个剂量,

[0212] • 在0、2、4和6周每次注射AMH-3DNA 4 μ g,共4个剂量,

[0213] • 在0、2、和4周每次注射AMH蛋白10 μ g,共3个剂量。

[0214] 对于DNA免疫,在他们腹部对小鼠进行去毛。在2750kPa的压力下使用Helios基因枪递送系统(Bio-Rad),以将包被DNA的金小珠注射到小鼠的皮肤中。对于蛋白质免疫进行皮下注射。

[0215] 为了监测抗体的外观,从小鼠定期采集血样。通过在96孔微量培养板上进行ELISA来测试在这些浆液中抗-AMH抗体的存在。重组AMH蛋白CHO-AMH5 3F1以捕获模式(1 μ g/孔)使用;饱和后,该抗原与待测试的浆液的各种稀释物反应(37 $^{\circ}$ C下温育1h)。使用与碱性磷酸盐(H+L,Jackson ImmunoResearch,Cat No.115-055-146)缀合的AffiniPure羊抗鼠IgG抗体来揭示存在于血清中的抗-AMH抗体,该AffiniPure羊抗-小鼠IgG抗体缀合到所寻求的抗体(0.1 μ g/孔)。因此在经免疫的小鼠中鉴定了已产生抗-AMH抗体的小鼠。

[0216] 在第一次注射后50和70天之间,通过静脉内注射100 μ g的AMH蛋白来重新刺激已产生抗-AMH体液应答的小鼠。

[0217] 3.3. 杂交瘤的制备

[0218] 在该最终注射后3天,处死应答小鼠:移出血液和脾脏。根据Kohler和Milstein描述的方案(Kohler和Milstein 1975,Kohler等人,1976),用SP2/0-Ag14骨髓瘤细胞培养从脾脏获得的脾细胞,以使它们融合并永生。在12-14天的培养期之后,筛选获得的杂交瘤上清液以使用前述部分中描述的ELISA测定确定抗-AMH抗体的存在。

[0219] 3.4. 选择识别人AMH蛋白的157-255区或256-451区的杂交瘤的上清液

[0220] 将兔抗-6组氨酸抗体(Sigma Aldrich,Cat.No.SAB4301134或等效物)在1X PBS中稀释,并通过在+18/25 $^{\circ}$ C温育过夜,以1 μ g/孔的比例吸附到96孔微量滴定板上。然后将板在PBS-0.05%吐温20缓冲液(PBS-T)中洗涤3次,然后通过含有10g/L BSA的PBS-T缓冲液中温育而钝化,并在PBS-T缓冲液中再次洗涤3次。

[0221] 将在实施例1中获得并储存在-80 $^{\circ}$ C下的裂解物解冻,并在1x PBS缓冲液中在1/2和1/10之间进行稀释。将100 μ l的每种裂解物(阴性对照、AMH-1、AMH-2、AMH-3和全长AMH)分配到板的几个孔中,并在37 $^{\circ}$ C下温育2h。然后将板清空并在含有300mM NaCl的PBS-T缓冲液中洗涤4次。然后将待测试的杂交瘤上清液(100 μ L)添加到5种不同的裂解物的每一种中,并在37 $^{\circ}$ C下温育1h。在含有300mM NaCl的PBS-T中进一步洗涤4次之后,加入与过氧化物酶(H+L,Jackson ImmunoResearch,Cat No.115-035-166)缀合的二抗,其为在山羊中产生的AffiniPure抗-小鼠IgG。在含有300mM NaCl的PBS-T中进一步洗涤3次之后,通过在SureBlueTMTMB微孔过氧化物酶底物(KLP,Cat.No.52-00-01)的存在下将板在+18/25 $^{\circ}$ C下温育10分钟使反应可视化。通过在450和630nm处测量OD来读板。

[0222] 选择识别157-255区的杂交瘤的上清液从ELISA结果中选择的杂交瘤是上清液含有识别AMH-2裂解物且不识别AMH-1裂解物的抗体的那些杂交瘤。当然,AMH-3和全长AMH裂解物还被选择的杂交瘤的上清液识别。因此选择5G51B11杂交瘤。

[0223] 选择识别256-451区的杂交瘤的上清液从ELISA结果中选择的杂交瘤是上清液含

有识别AMH-3裂解物且不识别AMH-2裂解物或AMH-1裂解物的抗体的那些杂交瘤。当然,全长AMH裂解物还被选择的杂交瘤的上清液识别。因此选择3H8、4C7和4G10杂交瘤。

[0224] 在选择之后,根据本领域技术人员熟知的有限稀释技术克隆所选择的杂交瘤,以确保克隆形成能力。因此可以获得分泌以下抗-AMH抗体的单克隆杂交瘤:

[0225] -识别人AMH的157-255区的5G5A10和1B11B1,

[0226] -识别人AMH的256-451区的3H8E2、4C7E12和4G10E12。

[0227] 根据源自Falkenberg (1998) 公开的方案,通过在miniPERM™生物反应器中培养杂交瘤进行单克隆抗体的大规模生产。然后通过对蛋白质A进行亲和层析来从培养上清液中纯化单克隆抗体。

[0228] 实施例4: 识别非线性表位的抗-AMH单克隆抗体的选择

[0229] 在实施例3中获得的单克隆抗体中,确定针对线性表位的那些以便选择识别非线性表位的那些。为此,合成覆盖人AMH的整个氨基酸序列的80个合成肽。通过ELISA测试抗体与这些肽中的每一个的结合。

[0230] 4.1. 肽合成

[0231] 合成了16个氨基酸的80个肽。在16个氨基酸中,12个氨基酸对应于AMH序列并且重叠5个氨基酸,从而覆盖整个人AMH序列(氨基酸1-560)。在N-末端添加生物素并然后是SGSG序列(间隔臂),以便于通过ELISA分析这些肽。这些肽是非纯化的并且在溶液(水/乙腈)中。它们通过LC/MS质谱进行验证。合成的序列示于表6中。

[0232] 表6. 人AMH肽的序列

[0233]

多肽编号	AMH肽 (SEQ ID N°)	位置	总序列
1	MRDLPLTSLALV (SEQ ID N°90)	1-12	Bio-SGSG-MRDLPLTSLALV-amide
2	SLALVLSALGAL (SEQ ID N°91)	8-19	Bio-SGSG-SLALVLSALGAL-amide
3	ALGALLGTEALR (SEQ ID N°92)	15-26	Bio-SGSG-ALGALLGTEALR-amide
4	TEALRAEEPAVG (SEQ ID N°93)	22-33	Bio-SGSG-TEALRAEEPAVG-amide
5	EPAVGTSGLIFR (SEQ ID N°94)	29-40	Bio-SGSG-EPAVGTSGLIFR-amide
6	GLIFREDLDWPP (SEQ ID N°95)	36-47	Bio-SGSG-GLIFREDLDWPP-amide
7	LDWPPGSPQEPL (SEQ ID N°96)	43-54	Bio-SGSG-LDWPPGSPQEPL-amide
8	PQEPLCLVALGG (SEQ ID N°97)	50-61	Bio-SGSG-PQEPLCLVALGG-amide
9	VALGGDSNGSSS (SEQ ID N°98)	57-68	Bio-SGSG-VALGGDSNGSSS-amide
10	NGSSSPLRVVGA (SEQ ID N°99)	64-75	Bio-SGSG-NGSSSPLRVVGA-amide
11	RVVGALSAYEQA (SEQ ID N°100)	71-82	Bio-SGSG-RVVGALSAYEQA-amide
12	AYEQAFLGAVQR (SEQ ID N°101)	78-89	Bio-SGSG-AYEQAFLGAVQR-amide
13	GAVQRRWGPRD (SEQ ID N°102)	85-96	Bio-SGSG-GAVQRRWGPRD-amide
14	WGPRDLATFGVC (SEQ ID N°103)	92-103	Bio-SGSG-WGPRDLATFGVC-amide
15	TFGVCNTGDRQA (SEQ ID N°104)	99-110	Bio-SGSG-TFGVCNTGDRQA-amide
16	GDRQAALPSLRR (SEQ ID N°105)	106-117	Bio-SGSG-GDRQAALPSLRR-amide
17	PSLRRLGAWLRD (SEQ ID N°106)	113-124	Bio-SGSG-PSLRRLGAWLRD-amide
18	AWLRDPGGQRLV (SEQ ID N°107)	120-131	Bio-SGSG-AWLRDPGGQRLV-amide
19	GQRLVVLHLEEV (SEQ ID N°108)	127-138	Bio-SGSG-GQRLVVLHLEEV-amide
20	HLEEVTTWEPTPS (SEQ ID N°109)	134-145	Bio-SGSG-HLEEVTTWEPTPS-amide
21	EPTPSLRFQEPP (SEQ ID N°110)	141-152	Bio-SGSG-EPTPSLRFQEPP-amide
22	FQEPPPGGAGPP (SEQ ID N°111)	148-159	Bio-SGSG-FQEPPPGGAGPP-amide
23	GAGPPELALLVL (SEQ ID N°112)	155-166	Bio-SGSG-GAGPPELALLVL-amide
24	ALLVLYPGPGPE (SEQ ID N°113)	162-173	Bio-SGSG-ALLVLYPGPGPE-amide
25	GPGPEVTVTRAG (SEQ ID N°114)	169-180	Bio-SGSG-GPGPEVTVTRAG-amide

[0234]

26	VTRAGLPGAQSL (SEQ ID N°115)	176-187	Bio-SGSG-VTRAGLPGAQSL-amide
27	GAQSLCPSRDTR (SEQ ID N°116)	183-194	Bio-SGSG-GAQSLCPSRDTR-amide
28	SRDTRYLVLA VD (SEQ ID N°117)	190-201	Bio-SGSG-SRDTRYLVLA VD-amide
29	VLA VDRPAGAWR (SEQ ID N°45)	197-208	Bio-SGSG-VLA VDRPAGAWR-amide
30	AGAWRGSG LALT (SEQ ID N°118)	204-215	Bio-SGSG-AGAWRGSG LALT-amide
31	GLALT LQPRGED (SEQ ID N°119)	211-222	Bio-SGSG-GLALT LQPRGED-amide
32	PRGEDSRLSTAR (SEQ ID N°46)	218-229	Bio-SGSG-PRGEDSRLSTAR-amide
33	LSTAR LQALLFG (SEQ ID N°120)	225-236	Bio-SGSG-LSTAR LQALLFG-amide
34	ALLFGDDHRCFT (SEQ ID N°121)	232-243	Bio-SGSG-ALLFGDDHRCFT-amide
35	HRCFTRMTPALL (SEQ ID N°47)	239-250	Bio-SGSG-HRCFTRMTPALL-amide
36	TPALLLLPRSEP (SEQ ID N°122)	246-257	Bio-SGSG-TPALLLLPRSEP-amide
37	PRSEPAPLPAHG (SEQ ID N°123)	253-264	Bio-SGSG-PRSEPAPLPAHG-amide
38	LPAHGQLDTVPF (SEQ ID N°61)	260-271	Bio-SGSG-LPAHGQLDTVPF-amide
39	DTVPFPPRPSA (SEQ ID N°124)	267-278	Bio-SGSG-DTVPFPPRPSA-amide
40	PRPSAELEESPP (SEQ ID N°125)	274-285	Bio-SGSG-PRPSAELEESPP-amide
41	EESPPSADPFLE (SEQ ID N°126)	281-292	Bio-SGSG-EESPPSADPFLE-amide
42	DPFLET LTRLVR (SEQ ID N°127)	288-299	Bio-SGSG-DPFLET LTRLVR-amide
43	TRLVRALRVPPA (SEQ ID N°128)	295-306	Bio-SGSG-TRLVRALRVPPA-amide
44	RVPPARASAPRL (SEQ ID N°129)	302-313	Bio-SGSG-RVPPARASAPRL-amide
45	SAPRLALDPDAL (SEQ ID N°130)	309-320	Bio-SGSG-SAPRLALDPDAL-amide
46	DPDALAGFPQGL (SEQ ID N°131)	316-327	Bio-SGSG-DPDALAGFPQGL-amide
47	FPQGLVNLS DPA (SEQ ID N°132)	323-334	Bio-SGSG-FPQGLVNLS DPA-amide
48	LSDPAALERLLD (SEQ ID N°62)	330-341	Bio-SGSG-LSDPAALERLLD-amide
49	ERLLDGEEPLLL (SEQ ID N°63)	337-348	Bio-SGSG-ERLLDGEEPLLL-amide
50	EPLLLLLRPTAA (SEQ ID N°64)	344-355	Bio-SGSG-EPLLLLLRPTAA-amide
51	RPTAATTGDPAP (SEQ ID N°133)	351-362	Bio-SGSG-RPTAATTGDPAP-amide
52	GDPAPLHDPTSA (SEQ ID N°65)	358-369	Bio-SGSG-GDPAPLHDPTSA-amide
53	DPTSAPWATALA (SEQ ID N°66)	365-376	Bio-SGSG-DPTSAPWATALA-amide

[0235]

54	ATALARRVAAEL (SEQ ID N°134)	372-383	Bio-SGSG-ATALARRVAAEL-amide
55	VAAELQAAAAEL (SEQ ID N°135)	379-390	Bio-SGSG-VAAELQAAAAEL-amide
56	AAELRSLPGLP (SEQ ID N°136)	386-397	Bio-SGSG-AAELRSLPGLP-amide
57	LPGLPPATAPLL (SEQ ID N°137)	393-404	Bio-SGSG-LPGLPPATAPLL-amide
58	TAPLLARLLALC (SEQ ID N°138)	400-411	Bio-SGSG-TAPLLARLLALC-amide
59	LLALCPGGPGGL (SEQ ID N°139)	407-418	Bio-SGSG-LLALCPGGPGGL-amide
60	GPGGLGDPLRAL (SEQ ID N°140)	414-425	Bio-SGSG-GPGGLGDPLRAL-amide
61	PLRALLLLKALQ (SEQ ID N°141)	421-432	Bio-SGSG-PLRALLLLKALQ-amide
62	LKALQGLRVEWR (SEQ ID N°67)	428-439	Bio-SGSG-LKALQGLRVEWR-amide
63	RVEWRGRDPRGP (SEQ ID N°68)	435-446	Bio-SGSG-RVEWRGRDPRGP-amide
64	DPRGPGRAQRSA (SEQ ID N°142)	442-453	Bio-SGSG-DPRGPGRAQRSA-amide
65	AQRSAGATAADG (SEQ ID N°143)	449-460	Bio-SGSG-AQRSAGATAADG-amide
66	TAADGPCALREL (SEQ ID N°144)	456-467	Bio-SGSG-TAADGPCALREL-amide
67	ALRELSVDLRAE (SEQ ID N°145)	463-474	Bio-SGSG-ALRELSVDLRAE-amide
68	DLRAERSVLIPE (SEQ ID N°146)	470-481	Bio-SGSG-DLRAERSVLIPE-amide
69	VLIPETYQANNC (SEQ ID N°147)	477-488	Bio-SGSG-VLIPETYQANNC-amide
70	QANNCQGVCGWP (SEQ ID N°148)	484-495	Bio-SGSG-QANNCQGVCGWP-amide
71	VCGWPQSDRNPR (SEQ ID N°149)	491-502	Bio-SGSG-VCGWPQSDRNPR-amide
72	DRNPRYGNHVVL (SEQ ID N°150)	498-509	Bio-SGSG-DRNPRYGNHVVL-amide
73	NHVVLKLMQVR (SEQ ID N°151)	505-516	Bio-SGSG-NHVVLKLMQVR-amide
74	KMQVRGAALARP (SEQ ID N°152)	512-523	Bio-SGSG-KMQVRGAALARP-amide
75	ALARPPCCVPTA (SEQ ID N°153)	519-530	Bio-SGSG-ALARPPCCVPTA-amide
76	CVPTAYAGKLLI (SEQ ID N°154)	526-537	Bio-SGSG-CVPTAYAGKLLI-amide
77	GKLLISLSEERI (SEQ ID N°155)	533-544	Bio-SGSG-GKLLISLSEERI-amide
78	SEERISAHHPVN (SEQ ID N°156)	540-551	Bio-SGSG-SEERISAHHPVN-amide
79	HHVPMVATECG (SEQ ID N°157)	547-558	Bio-SGSG-HHVPMVATECG-amide
80	VPNMVATECGCR (SEQ ID N°158)	549-560	Bio-SGSG-VPNMVATECGCR-amide

[0236] Amide-酰胺

[0237] 4.2.ELISA

[0238] 在37℃在1x PBS缓冲液中用链霉亲和素(10μg/mL, 1μg/孔)包被96孔微量培养板1h, 且然后在环境温度下在含有10g/L BSA的PBS-0.05%吐温20缓冲液(PBS-T)中钝化过夜。除去钝化溶液, 然后分配生物素化的肽(在1X PBS缓冲液中10μg/mL, 1μg/孔), 并在37℃温育1h。在PBS-T中洗涤4次后, 以1μg/mL的浓度加入待测试的单克隆抗体。在37℃温育1h30和4次PBS-T洗涤后, 加入过氧化物酶缀合的抗-小鼠IgG抗体。利用TMB底物在450nm处测量光密度(OD)来进行可视化。

[0239] 为了验证ELISA形式, 将商业抗-AMH抗体用作阳性对照。它是来自公司AnshLabs的AA011克隆。该抗体特异性识别肽52 (SEQ ID No. 137), 所获得的OD信号大于1。在实施例3中获得的5个单克隆抗体中, 4C7E12克隆还识别肽52。因此, 4C7E12克隆识别与AA011克隆相同的表位。它不被保留。单克隆抗体5G5A10、1B11B1、3H8E2和4G10E12不识别测试的80个AMH肽。因此它们的表位不是线性的。正是这四种非线性抗体5G5A10、1B11B1、3H8E2和4G10E12被选择用于开发用于定量生物学样品中AMH蛋白的方法。

[0240] 实施例5: 抗-AMH抗体5G5A10、1B11B1、3H8E2和4G10E12的表征

[0241] 5.1. 通过ELISA比较抗-AMH抗体5G5A10、1B11B1、3H8E2和4G10E12的捕获能力

[0242] 将在200mM Tris (pH 6.2) 中稀释至5μg/mL的捕获抗体(5G5A10、1B11B1、3H8E2和4G10E12)以0.5μg/孔的比例分配到96孔微量滴定板中, 并在37℃孵育1h30。然后将板在PBS-0.05%吐温20缓冲液(PBS-T)中洗涤3次, 然后通过含有10g/L BSA的PBS-T缓冲液中温育来钝化2h, 并在PBS-T缓冲液中再次洗涤3次。

[0243] 将在实施例1中获得并储存在-80℃下的裂解物解冻, 并在1X PBS中稀释至1/20。分配100μl的每种裂解物(阴性对照、AMH-1、AMH-2、AMH-3和全长AMH), 并在37℃温育过夜。然后将板清空并在含有300mM NaCl的PBS-T缓冲液中洗涤4次。对在钝化缓冲液中稀释至1/1000的生物素化的抗组氨酸抗体(Qiagen Cat.No. 34440)进行分配, 然后在37℃温育1h30。在与链霉亲和素-过氧化物酶缀合物(Jackson ImmunoResearch Cat.No. 016-030-034) (其在纯化缓冲液中稀释至1/2000)一起例如在37℃温育1h30之前, 再次洗涤该板3次。在PBS-T中进一步洗涤3次之后, 通过在SureBlue™TMB微孔过氧化物酶底物(KLP, Cat.No. 52-00-01)存在下将板在+18/25℃温育10分钟使反应可视化。通过在450和630nm处测量OD来读板。

[0244] 所得结果示于表7中。针对阴性对照(其为PBS)和无质粒转染的裂解物测量的OD值为至多0.28, 其对应于非特异性信号。

[0245] 表7. 抗-AMH抗体的捕获能力(OD_{450nm}值)

[0246]

	Ac 1B11B1		Ac 5G5A10		Ac 3H8E2		Ac 4G10E12	
阴性对照 PBS	0,129	0,141	0,196	0,246	0,137	0,132	0,178	0,122
阴性对照裂解物	0,199	0,189	0,210	0,223	0,165	0,159	0,168	0,281
AMH-1裂解物	0,221	0,236	0,257	0,266	0,244	0,198	0,218	0,203
AMH-2裂解物	4,244	4,246	4,316	4,191	0,176	0,197	0,184	0,168
AMH-3裂解物	3,683	3,774	3,186	3,365	1,859	1,815	1,801	1,622
全长AMH裂解物	3,184	3,351	3,296	3,360	1,667	1,711	2,132	1,812

[0247] Ac-抗体捕获

[0248] 表7中的结果显示,1B11B1和5G5A10抗体捕获AMH-2、AMH-3和全长AMH裂解物(OD>3)。3H8E2和4G10E12抗体捕获AMH-3和全长AMH裂解物(OD>1.6)。AMH-1裂解物(氨基酸1-156)未被测试的任何单克隆抗体捕获。

[0249] 此外,识别人AMH蛋白的157-255区的1B11B1和5G5A10抗体具有大于识别256-451区的3H8E2和4G10E12抗体的捕获能力。实际上,在识别(表2中的阴影值)的情况下,对于给定的裂解物,用1B11B1和5G5A10抗体获得的OD值高于通过3H8E2和4G10E12抗体获得的那些。因此,明智的是在捕获模式中优先使用1B11B1抗体或5G5A10抗体。

[0250] 5.2.Western印迹表征

[0251] 为了更好地表征抗-AMH单克隆抗体的反应性,进行Western印迹分析。

[0252] 蛋白质纯化根据实施例1的方案用编码AMH-2和AMH-3构建体的质粒以及阴性对照(无质粒)进行转染。回收培养上清液,并借助于他们的多聚组氨酸标记,通过分批金属-螯合亲和和层析来纯化其中发现的AMH蛋白。为此,将转染上清液在搅拌下在+2/8℃下与Ni-NTA树脂(Roche,Cat.No.115-26-70)一起温育过夜,该Ni-NTA树脂在含有260mM NaCl(pH 7.4)的11mM磷酸盐缓冲液中平衡。然后通过3000g下离心3分钟回收树脂,并除去含有未吸收材料的上清液。在用平衡缓冲液洗涤3次后,用含有130mM NaCl(pH 7.4)并含有500mM咪唑和蛋白酶抑制剂的5.5mM磷酸盐缓冲液洗脱蛋白质,并将其pH调节至7.6。通过在搅拌下在+2/8℃下温育过夜来进行洗脱。然后在3000g下离心树脂3分钟后收获含有AMH的上清液。该纯化步骤是必要的以便浓缩AMH蛋白,且尤其是除去上清液中存在的大量BSA,其破坏SDS-PAGE凝胶的迁移。

[0253] Western印迹根据实施例1第1.3节中所述的方案,使用抗组氨酸抗体或用抗-AMH抗体(1μg/膜)替换它,进行该分析。

[0254] 结果该分析的结果示于图3中。在加热之后但不还原的情况下对样品进行分析。使两个经纯化的蛋白质AMH-2和AMH-3显示在通过抗组氨酸抗体可视化的膜上(图3A),并且如预期地在阴性对照孔中没有观察到反应性。在测试的抗-AMH抗体中,它们全部识别AMH-3蛋白,但仅还识别AMH-2蛋白的1B11B1克隆具有比AMH-3低得多的反应性。对于4G10E12和3H8E2克隆,该结果与通过ELISA获得的结果一致。实际上,这些抗体的结合区在不存在于AMH-2构建体中的AMH的256-451区中。通过ELISA,1B11B1和5G5A10克隆显示出类似的反应性并识别AMH-2和AMH-3孔。通过Western印迹,1B11B10抗体与AMH-3给出了强信号,用AMH-2获得的信号弱得多,尽管蛋白质以相当的量存在,如用抗His抗体可视化的膜上所看到的。从这可得出结论,作为部分变性技术的Western印迹不适用于研究AMH-2蛋白的抗原性。通过ELISA给出非常好反应性的5G5A10抗体通过Western印迹给出很少或没有信号。鉴于其在实验条件下与AMH-3的弱结合,没有观察到与AMH-2的任何反应性是正常的。总之,该实验显示,Western印迹不适用于研究对热变性敏感的非线性抗体(例如5G5A10或在一定程度上1B11B1)的识别。因此,文献中的通过Western印迹对抗-AMH抗体进行分析应当极其小心地解释,并且如果可能,应该采用通ELISA进行分析而不是通过Western印迹进行分析。

[0255] 实施例6:通过夹心免疫测定检测AMH

[0256] 在商业AMH试剂盒上,在针对样品获得的浓度之间观察到显著差异,该浓度是作为在采集样品之后进行测定时的时间的函数。这种类型的可变性在临床实践中是不可接受

的,因此重要的是具有可用的稳健试剂盒,其中测量的AMH浓度是准确和可再现的,并且其允许样品在测定之前储存在+2/8℃或-19/-31℃。这样的测定是通过选择针对人AMH的氨基酸157-255的抗体来进行的。

[0257] 6.1. 自动化免疫测定程序

[0258] 使用VIDAS®自动免疫分析装置(bioMérieux)通过一步夹心免疫测定进行生物学样品中AMH的检测。一次性枪尖既充当反应的固相又充当其移液系统。自动装置的药筒由覆盖有密封且标记的铝箔的10个孔(X0至X9)组成。第一孔(X0)包括被预剪裁以便于引入样品的部分。最后的孔(X9)是测量底物的荧光的光学比色皿。分析所需的各种试剂包含在中间孔中。因此,测定的所有步骤都由仪器自动进行。它们由反应介质的一系列吸入/排出循环组成。

[0259] 枪尖的敏化和钝化对于C1对,用270μL的5G5A10单克隆抗体溶液,或对于C2对,用270μL的8C5B10H5单克隆抗体溶液对枪尖进行敏化,每一种在pH 6.2的Tris缓冲液均为7μg/mL。用敏化液在+18/25℃温育约20h后,将枪尖清空。然后添加含有5g/L牛白蛋白的300μL该相同溶液以在+18/25℃下对枪尖钝化约20h。然后将枪尖清空、干燥,然后在+4℃下远离潮湿储存直到使用。

[0260] 缀合抗体溶液的制备对于C1对,缀合物溶液含有偶联到碱性磷酸酶的呈Fab'片段形式的4G10E12单克隆抗体。对于C2对,缀合物溶液含有偶联到碱性磷酸酶的呈Fab'片段形式的5G5A10单克隆抗体。在Tris/NaCl BSA缓冲液(pH 6.5)中将缀合的抗体稀释至约0.1μg/mL。

[0261] 免疫测定当VIDAS®枪尖与样品接触时,免疫反应开始,因为捕获抗体被固定在该枪尖上。自动装置将待测试的样品(89.6μL)与226μL的缀合物溶液混合。温育在37℃持续约10分钟,并使AMH在一方面特异性结合到吸附在锥体上的抗体,另一方面特异性结合到缀合抗体(检测抗体)。然后通过用54mM Tris缓冲液(pH 7.3,包含154mM NaCl和0.55%吐温20)洗涤3次来除去未结合的组分。在可视化的最后步骤期间,抽吸4-甲基伞形基磷酸酯底物,并然后在枪尖中排出;缀合抗体的酶催化该底物水解成4-甲基伞形酮的反应,其发射的荧光在450nm处测量。荧光信号的值(RFV=相对荧光值)与样品中存在的抗原的浓度成比例。

[0262] 6.2. 已经受各种储存条件的样品的AMH测定

[0263] 用商业AMH Gen II测定试剂盒(Beckman Coulter)以及用VIDAS®自动装置上的两对抗体(C1和C2)平行测定来自19和52岁之间的妇女的八个天然样品池。每个样品池由来自妇女的3份浆液组成,所述妇女来自罗纳-阿尔卑斯(Rhône-Alps)地区的法国国家血液中心(Etablissement Français du Sang) (EFS) [法国血库]。

[0264] 在采集对应于时间T0的样品之后,然后是+2/8℃下储存24小时后、+2/8℃下储存7天之后以及-19/-31℃下储存7天后(对应于这些样品的各种储存条件),对这些样品测试小于4小时。

[0265] 对于微量培养板形式的试剂盒,将相应剂量作为生产商推荐的范围的函数进行计算。然后计算针对每个存储条件获得的剂量相对于在T0处获得的剂量的比率。对于VIDAS®自动装置,针对每个储存条件,将用2对抗体中的每一对获得的荧光信号(RFV=相对荧光值)用于计算相对于在T0获得的荧光信号的比率。所得结果示于表8中。

[0266] 表8. 在各种条件下和在T0处在储存后获得的AMH剂量或信号的比率(T/T0比率)。

[0267]

	在+2/8℃ 24h	在+2/8℃ 7天	在-19/-31℃ 7天
--	------------	-----------	--------------

[0268]

	C1	C2	REF	C1	C2	REF	C1	C2	REF
池 001	0.99	1.00	1.10	0.95	1.06	1.14	0.98	0.99	1.20
池 002	0.98	1.04	1.27	0.96	1.13	1.20	0.99	1.03	1.30
池 003	0.98	1.00	1.14	0.96	1.04	1.05	1.01	1.02	1.07
池 004	1.01	0.99	1.58	0.97	1.08	1.57	0.99	1.02	1.73
池 005	0.96	1.02	1.46	0.95	1.09	1.33	0.97	1.01	1.24
池 006	1.00	1.01	1.35	0.97	1.10	1.40	0.97	0.99	1.35
池 007	0.97	1.03	1.43	0.96	1.11	1.66	0.95	1.01	1.51
池 008	0.99	1.06	1.34	0.95	1.07	1.34	1.00	1.03	1.35
平均值	0.99	1.02	1.33	0.96	1.09	1.34	0.98	1.01	1.34
最小值	0.96	0.99	1.10	0.95	1.04	1.05	0.95	0.99	1.07
最大值	1.01	1.06	1.58	0.97	1.13	1.66	1.01	1.03	1.73

[0269] C1:用作为捕获抗体的5G5A10和作为检测抗体的4G10E12进行VIDAS[®]测定;C2:用作为捕获抗体的8C5B10H5和作为检测抗体的5G5A10进行VIDAS[®]测定;REF:AMH Gen II微量培养板测定。

[0270] 随着时间或根据储存条件,T/T0比率越接近1,检测到的AMH量的可变性越小。不管样品的在先储存条件如何,使用C1或C2对的AMH测定总是给出相同的结果:当样品在+2/8℃储存24h时,T/T0比率平均为0.99(C1)和1.02(C2)。这些值非常接近1,而参考试剂盒显示1.33的平均比率,其表明测量的剂量平均乘以1.33。对所测试的其它储存条件进行相同类型的观察。

[0271] 总之,5G5A10抗体识别人AMH的157-255区的非线性表位,4G10E12抗体识别人AMH的256-451区的非线性表位,8C5B10H5抗体识别AMH线性表位的成熟区(人AMH的aa 508-519),AMH Gen II测定试剂盒的抗体均针对线性表位的成熟区。

[0272] 抗体对C1和C2使得能够开发稳健的AMH免疫测定,并且其结果不作为样品的在先储存条件的函数而变化。

[0273] 实施例7:VIDAS[®]AMH的分析灵敏度

[0274] 将实施例6中描述的VIDAS[®]AMH免疫测定(C1对)的分析灵敏度与根据现有技术的测定的分析灵敏度进行比较。为了能够在类似条件下比较抗体对,在VIDAS[®]自动装置上进行整个实验。根据实施例6中解释的程序,用5G5A10抗体(识别AMH的前区的C-末端部分的抗体)或用AA012抗体(商业抗体AnshLabs)涂布枪尖。对于检测步骤,比较两个缀合物:4G10E12抗体和AA011抗体(商业抗体-AnshLabs)。两者均根据实施例6的程序与碱性磷酸酶缀合。4G10E12缀合物以180ng/mL使用,AA011缀合物以500ng/mL使用。因此,识别AMH的前区的C-末端部分的4G10E12缀合物与商业抗体相比完全出乎意料地以低得多的量使用。

[0275] 通过在来自绝经期妇女的血清(可忽略的AMH浓度)中稀释已知AMH浓度的浆液来制备0.055至11ng/mL的AMH的标准范围,然后使用以下3种测定形式来测量:

[0276] C1对:捕获5G5A10+检测4G10E12

[0277] AnshLabs对:捕获AA012+检测AA011

[0278] 混合对:捕获5G5A10+检测AA011

[0279] 结果示于表9中。

[0280] 表9. 针对标准范围,通过VIDAS[®]用各种抗体对获得的RFV信号以及S/N比率的比较

捕获	VIRDA RFV 信号				VIDAS RFV/RFV0		
	5G5A10	AA012	5G5A10		5G5A10	AA012	5G5A10
检测(浓度 ng/mL)	4G10E12 (180)	AA011 (500)	AA011 (500)		4G10E12 (180)	AA011 (500)	AA011 (500)
AMH ng/ml	RFV	RFV	RFV		S/N	S/N	S/N
0	1	45	7				
[0281] 0.055	51	81	53		51	2	8
0.11	92	113	91		92	3	13
0.275	224	209	221		224	5	32
0.9	916	735	910		916	16	130
2.1	2113	1602	2097		2113	36	300
4	3817	2938	3816		3817	65	545
6.3	4839	3915	4891		4839	87	699
8.7	5672	4810	5764		5672	107	823
11	6335	5392	6404		6335	120	915

[0282] S/N=“信/噪”比。对于给定的测定形式,RFV信号与点0范围的RFV信号(没有AMH)的比率。

[0283] C1对(5G5A10&4G10E12)表现出优异的信号动力学和极低的背景噪声(在点0处1RFV)。根据现有技术的对AA012&AA011表现出较差的信号动力学(对于C1对,5392RFV为11ng/mL,而不是6335RFV),尤其是45RFV的相当大的背景噪声。混合对(5G5A10&AA011)具有与C1对(相同的捕获抗体)相当的信号动力学。背景噪音(7RFV)显著低于AA012&AA011对,但保持高于C1对。如可以看到的,就信/噪(S/N)比而言,分析上最敏感的测定是使用C1对的那个,然后是用混合对的那个,并且最后是用AnshLabs对的那个。

[0284] 实施例8:VIDAS AMH测定的分析特异性

[0285] 通过分析具有交叉反应性的化合物来建立实施例6中描述的VIDAS AMH测定(C1对)的分析特异性。将这些化合物以过载量加入到含有1ng/mL和4ng/mL的AMH的血清样品中。该研究的结果总结于表10中:

[0286] 表10. VIDAS[®]AMH测定的交叉反应性

[0287]

测试的化合物	测试的浓度	%交叉反应性
激活素A	100ng/ml	≤0.10%
抑制素A	100ng/ml	≤0.12%
LH	500IU/l	≤0.21%
FSH	500IU/l	≤0.23%

[0288] (在测试浓度下没有检测到显著的交叉反应性。VIDAS AMH测定显示出优异的分析特异性。

[0289] 实施例9:VIDAS AMH测定的准确性

[0290] 使用代表测量范围的5个浓度水平的一组人样品进行VIDAS AMH测定(C1对)的准确性的研究。对于每个浓度水平,对重复性(系列内准确性)、批内准确性和实验室内准确性(仪器内批间准确性)进行评估。在该研究期间获得的值记录在表11中:

[0291] 表11.VIDAS AMH测定的准确性

[0292]	N(重复次数)	浓度水平 (ng/mL)	%CV 重复性	%CV 批内	%CV 实验室内
	519	0.22	4.1	6.6	8.3
	520	1.08	4.4	8.0	9.9
	520	2.99	4.4	7.4	9.8
	520	5.45	4.8	7.6	8.9
	520	7.37	4.4	8.2	10.6

[0293] 如该非常广泛的研究显示,VIDAS AMH测定显示出良好的再现性:不同批次之间的变异系数(CV)不超过11%。

序列表

〈110〉 生物梅里埃公司

〈120〉 用于制备抗-AMH抗体的方法及其用途

<130> ANTIAMH-DK1778

<150> EP16175041.9

<151> 2016-06-17

<160> 158

<170> PatentIn version 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1

⟨211⟩ 99

<212> PRT

⟨213⟩ artificial sequence

 $\langle 220 \rangle$

⟨223⟩ polypeptide

 $\langle 400 \rangle$ 1

Gly Pro Pro Glu Leu Ala Leu Leu Val Leu Tyr Pro Gly Pro Gly Pro
1 5 10 15

Glu Val Thr Val Thr Arg Ala Gly Leu Pro Gly Ala Gln Ser Leu Cys
20 25 30

Pro Ser Arg Asp Thr Arg Tyr Leu Val Leu Ala Val Asp Arg Pro Ala
35 40 45

Gly Ala Trp Arg Gly Ser Gly Leu Ala Leu Thr Leu Gln Pro Arg Gly
50 55 60

Glu Asp Ser Arg Leu Ser Thr Ala Arg Leu Gln Ala Leu Leu Phe Gly
65 70 75 80

Asp Asp His Arg Cys Phe Thr Arg Met Thr Pro Ala Leu Leu Leu Leu
85 90 95

Pro Arg Ser

 $\langle 210 \rangle$ 2

560 $\langle 211 \rangle$

<212> PRT

⟨213⟩ human

 $\langle 400 \rangle$ 2

Met Arg Asp Leu Pro Leu Thr Ser Leu Ala Leu Val Leu Ser Ala Leu
1 5 10 15

Gly Ala Leu Leu Gly Thr Glu Ala Leu Arg Ala Glu Glu Pro Ala Val
20 25 30

Gly Thr Ser Gly Leu Ile Phe Arg Glu Asp Leu Asp Trp Pro Pro Gly

35	40	45
Ser Pro Gln Glu Pro Leu Cys	Leu Val Ala Leu Gly Gly	Asp Ser Asn
50	55	60
Gly Ser Ser Ser Pro Leu Arg	Val Val Gly Ala Leu Ser	Ala Tyr Glu
65	70	75
Gln Ala Phe Leu Gly Ala Val	Gln Arg Ala Arg Trp Gly	Pro Arg Asp
85	90	95
Leu Ala Thr Phe Gly Val Cys	Asn Thr Gly Asp Arg Gln	Ala Ala Leu
100	105	110
Pro Ser Leu Arg Arg Leu Gly	Ala Trp Leu Arg Asp Pro	Gly Gly Gln
115	120	125
Arg Leu Val Val Leu His Leu	Glu Glu Val Thr Trp Glu	Pro Thr Pro
130	135	140
Ser Leu Arg Phe Gln Glu Pro	Pro Pro Gly Gly Ala Gly	Pro Pro Glu
145	150	155
Leu Ala Leu Leu Val Leu Tyr	Pro Gly Pro Gly Pro Glu	Val Thr Val
165	170	175
Thr Arg Ala Gly Leu Pro Gly	Ala Gln Ser Leu Cys Pro	Ser Arg Asp
180	185	190
Thr Arg Tyr Leu Val Leu Ala	Val Asp Arg Pro Ala Gly	Ala Trp Arg
195	200	205
Gly Ser Gly Leu Ala Leu Thr	Leu Gln Pro Arg Gly Glu	Asp Ser Arg
210	215	220
Leu Ser Thr Ala Arg Leu Gln	Ala Leu Leu Phe Gly Asp	Asp His Arg
225	230	235
Cys Phe Thr Arg Met Thr Pro	Ala Leu Leu Leu Pro Arg	Ser Glu
245	250	255
Pro Ala Pro Leu Pro Ala His	Gly Gln Leu Asp Thr Val	Pro Phe Pro
260	265	270
Pro Pro Arg Pro Ser Ala Glu	Leu Glu Glu Ser Pro Pro	Ser Ala Asp
275	280	285
Pro Phe Leu Glu Thr Leu Thr	Arg Leu Val Arg Ala Leu	Arg Val Pro
290	295	300
Pro Ala Arg Ala Ser Ala Pro	Arg Leu Ala Leu Asp Pro	Asp Ala Leu
305	310	315
Ala Gly Phe Pro Gln Gly Leu	Val Asn Leu Ser Asp Pro	Ala Ala Leu
325	330	335
Glu Arg Leu Leu Asp Gly Glu	Glu Pro Leu Leu Leu Leu	Leu Arg Pro
340	345	350

Thr	Ala	Ala	Thr	Thr	Gly	Asp	Pro	Ala	Pro	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Ser				
355					360					365									
Ala	Pro	Trp	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	Val	Ala	Ala	Glu	Leu	Gln				
370					375					380									
Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Thr				
385					390					395					400				
Ala	Pro	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Leu	Ala	Leu	Cys	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly				
					405					410					415				
Gly	Leu	Gly	Asp	Pro	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	Ala	Leu	Gln				
					420					425					430				
Gly	Leu	Arg	Val	Glu	Trp	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Arg	Gly	Pro	Gly	Arg				
					435					440					445				
Ala	Gln	Arg	Ser	Ala	Gly	Ala	Thr	Ala	Ala	Asp	Gly	Pro	Cys	Ala	Leu				
450					455					460									
Arg	Glu	Leu	Ser	Val	Asp	Leu	Arg	Ala	Glu	Arg	Ser	Val	Leu	Ile	Pro				
465					470					475					480				
Glu	Thr	Tyr	Gln	Ala	Asn	Asn	Cys	Gln	Gly	Val	Cys	Gly	Trp	Pro	Gln				
					485					490					495				
Ser	Asp	Arg	Asn	Pro	Arg	Tyr	Gly	Asn	His	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Lys				
500					505					510									
Met	Gln	Val	Arg	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Arg	Pro	Pro	Cys	Cys	Val	Pro				
515					520					525									
Thr	Ala	Tyr	Ala	Gly	Lys	Leu	Leu	Ile	Ser	Leu	Ser	Glu	Glu	Arg	Ile				
530					535					540									
Ser	Ala	His	His	Val	Pro	Asn	Met	Val	Ala	Thr	Glu	Cys	Gly	Cys	Arg				
545					550					555					560				

<210> 3
 <211> 542
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> polypeptide
 <400> 3

Leu	Leu	Gly	Thr	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Glu	Glu	Pro	Ala	Val	Gly	Thr
1	5				10				15						
Ser	Gly	Leu	Ile	Phe	Arg	Glu	Asp	Leu	Asp	Trp	Pro	Pro	Gly	Ser	Pro
20					25					30					
Gln	Glu	Pro	Leu	Cys	Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Gly	Asp	Ser	Asn	Gly	Ser
35					40					45					

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

355	360	365
Ala Ala Glu Leu Arg Ser Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Thr Ala Pro		
370	375	380
Leu Leu Ala Arg Leu Leu Ala Leu Cys Pro Gly Gly Pro Gly Gly Leu		
385	390	395
Gly Asp Pro Leu Arg Ala Leu Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln Gly Leu		400
405	410	415
Arg Val Glu Trp Arg Gly Arg Asp Pro Arg Gly Pro Gly Arg Ala Gln		
420	425	430
Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Ala Asp Gly Pro Cys Ala Leu Arg Glu		
435	440	445
Leu Ser Val Asp Leu Arg Ala Glu Arg Ser Val Leu Ile Pro Glu Thr		
450	455	460
Tyr Gln Ala Asn Asn Cys Gln Gly Val Cys Gly Trp Pro Gln Ser Asp		
465	470	475
Arg Asn Pro Arg Tyr Gly Asn His Val Val Leu Leu Leu Lys Met Gln		
485	490	495
Val Arg Gly Ala Ala Leu Ala Arg Pro Pro Cys Cys Val Pro Thr Ala		
500	505	510
Tyr Ala Gly Lys Leu Leu Ile Ser Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ser Ala		
515	520	525
His His Val Pro Asn Met Val Ala Thr Glu Cys Gly Cys Arg		
530	535	540
<210> 4		
<211> 535		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> polypeptide		
<400> 4		
Arg Ala Glu Glu Pro Ala Val Gly Thr Ser Gly Leu Ile Phe Arg Glu		
1	5	10
Asp Leu Asp Trp Pro Pro Gly Ser Pro Gln Glu Pro Leu Cys Leu Val		
20	25	30
Ala Leu Gly Gly Asp Ser Asn Gly Ser Ser Ser Pro Leu Arg Val Val		
35	40	45
Gly Ala Leu Ser Ala Tyr Glu Gln Ala Phe Leu Gly Ala Val Gln Arg		
50	55	60
Ala Arg Trp Gly Pro Arg Asp Leu Ala Thr Phe Gly Val Cys Asn Thr		

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

Leu Cys Pro Gly Gly Pro Gly Gly Leu Gly Asp Pro Leu Arg Ala Leu
 385 390 395 400
 Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln Gly Leu Arg Val Glu Trp Arg Gly Arg
 405 410 415
 Asp Pro Arg Gly Pro Gly Arg Ala Gln Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala
 420 425 430
 Ala Asp Gly Pro Cys Ala Leu Arg Glu Leu Ser Val Asp Leu Arg Ala
 435 440 445
 Glu Arg Ser Val Leu Ile Pro Glu Thr Tyr Gln Ala Asn Asn Cys Gln
 450 455 460
 Gly Val Cys Gly Trp Pro Gln Ser Asp Arg Asn Pro Arg Tyr Gly Asn
 465 470 475 480
 His Val Val Leu Leu Leu Lys Met Gln Val Arg Gly Ala Ala Leu Ala
 485 490 495
 Arg Pro Pro Cys Cys Val Pro Thr Ala Tyr Ala Gly Lys Leu Leu Ile
 500 505 510
 Ser Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ser Ala His His Val Pro Asn Met Val
 515 520 525
 Ala Thr Glu Cys Gly Cys Arg
 530 535
 <210> 5
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> polypeptide
 <400> 5
 Met Arg Asp Leu Pro Leu Thr Ser Leu Ala Leu Val Leu Ser Ala Leu
 1 5 10 15
 Gly Ala Leu Leu Gly Thr Glu Ala Leu Arg Ala Glu Glu Pro Ala Val
 20 25 30
 Gly Thr Ser Gly Leu Ile Phe Arg Glu Asp Leu Asp Trp Pro Pro Gly
 35 40 45
 Ser Pro Gln Glu Pro Leu Cys Leu Val Ala Leu Gly Gly Asp Ser Asn
 50 55 60
 Gly Ser Ser Ser Pro Leu Arg Val Val Gly Ala Leu Ser Ala Tyr Glu
 65 70 75 80
 Gln Ala Phe Leu Gly Ala Val Gln Arg Ala Arg Trp Gly Pro Arg Asp
 85 90 95

Leu	Ala	Thr	Phe	Gly	Val	Cys	Asn	Thr	Gly	Asp	Arg	Gln	Ala	Ala	Leu
100				105				110							
Pro	Ser	Leu	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Trp	Leu	Arg	Asp	Pro	Gly	Gly	Gln
115				120				125							
Arg	Leu	Val	Val	Leu	His	Leu	Glu	Glu	Val	Thr	Trp	Glu	Pro	Thr	Pro
130				135				140							
Ser	Leu	Arg	Phe	Gln	Glu	Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala	Gly	Pro	Pro	Glu
145				150				155				160			
Leu	Ala	Leu	Leu	Val	Leu	Tyr	Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Val
165				170				175							
Thr	Arg	Ala	Gly	Leu	Pro	Gly	Ala	Gln	Ser	Leu	Cys	Pro	Ser	Arg	Asp
180				185				190							
Thr	Arg	Tyr	Leu	Val	Leu	Ala	Val	Asp	Arg	Pro	Ala	Gly	Ala	Trp	Arg
195				200				205							
Gly	Ser	Gly	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Gln	Pro	Arg	Gly	Glu	Asp	Ser	Arg
210				215				220							
Leu	Ser	Thr	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Leu	Phe	Gly	Asp	Asp	His	Arg
225				230				235				240			
Cys	Phe	Thr	Arg	Met	Thr	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Arg	Ser	Glu
245				250				255							
Pro	Ala	Pro	Leu	Pro	Ala	His	Gly	Gln	Leu	Asp	Thr	Val	Pro	Phe	Pro
260				265				270							
Pro	Pro	Arg	Pro	Ser	Ala	Glu	Leu	Glu	Glu	Ser	Pro	Pro	Ser	Ala	Asp
275				280				285							
Pro	Phe	Leu	Glu	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	Val	Arg	Ala	Leu	Arg	Val	Pro
290				295				300							
Pro	Ala	Arg	Ala	Ser	Ala	Pro	Arg	Leu	Ala	Leu	Asp	Pro	Asp	Ala	Leu
305				310				315				320			
Ala	Gly	Phe	Pro	Gln	Gly	Leu	Val	Asn	Leu	Ser	Asp	Pro	Ala	Ala	Leu
325				330				335							
Glu	Arg	Leu	Leu	Asp	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Arg	Pro
340				345				350							
Thr	Ala	Ala	Thr	Thr	Gly	Asp	Pro	Ala	Pro	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Ser
355				360				365							
Ala	Pro	Trp	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	Val	Ala	Ala	Glu	Leu	Gln
370				375				380							
Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Thr
385				390				395				400			
Ala	Pro	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Leu	Ala	Leu	Cys	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly

	405	410	415
Gly Leu Gly Asp Pro Leu Arg Ala Leu Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln			
	420	425	430
Gly Leu Arg Val Glu Trp Arg Gly Arg Asp Pro Arg Gly Pro Gly Arg			
	435	440	445
Ala Gln Arg			
450			
<210> 6			
<211> 433			
<212> PRT			
<213> artificial sequence			
<220>			
<223> polypeptide			
<400> 6			
Leu Leu Gly Thr Glu Ala Leu Arg Ala Glu Glu Pro Ala Val Gly Thr			
1 5 10 15			
Ser Gly Leu Ile Phe Arg Glu Asp Leu Asp Trp Pro Pro Gly Ser Pro			
20 25 30			
Gln Glu Pro Leu Cys Leu Val Ala Leu Gly Gly Asp Ser Asn Gly Ser			
35 40 45			
Ser Ser Pro Leu Arg Val Val Gly Ala Leu Ser Ala Tyr Glu Gln Ala			
50 55 60			
Phe Leu Gly Ala Val Gln Arg Ala Arg Trp Gly Pro Arg Asp Leu Ala			
65 70 75 80			
Thr Phe Gly Val Cys Asn Thr Gly Asp Arg Gln Ala Ala Leu Pro Ser			
85 90 95			
Leu Arg Arg Leu Gly Ala Trp Leu Arg Asp Pro Gly Gly Gln Arg Leu			
100 105 110			
Val Val Leu His Leu Glu Glu Val Thr Trp Glu Pro Thr Pro Ser Leu			
115 120 125			
Arg Phe Gln Glu Pro Pro Pro Gly Gly Ala Gly Pro Pro Glu Leu Ala			
130 135 140			
Leu Leu Val Leu Tyr Pro Gly Pro Gly Pro Glu Val Thr Val Thr Arg			
145 150 155 160			
Ala Gly Leu Pro Gly Ala Gln Ser Leu Cys Pro Ser Arg Asp Thr Arg			
165 170 175			
Tyr Leu Val Leu Ala Val Asp Arg Pro Ala Gly Ala Trp Arg Gly Ser			
180 185 190			
Gly Leu Ala Leu Thr Leu Gln Pro Arg Gly Glu Asp Ser Arg Leu Ser			

195	200	205
Thr Ala Arg Leu Gln Ala Leu Leu Phe Gly Asp Asp His Arg Cys Phe		
210	215	220
Thr Arg Met Thr Pro Ala Leu Leu Leu Leu Pro Arg Ser Glu Pro Ala		
225	230	235
Pro Leu Pro Ala His Gly Gln Leu Asp Thr Val Pro Phe Pro Pro Pro		240
245	250	255
Arg Pro Ser Ala Glu Leu Glu Glu Ser Pro Pro Ser Ala Asp Pro Phe		
260	265	270
Leu Glu Thr Leu Thr Arg Leu Val Arg Ala Leu Arg Val Pro Pro Ala		
275	280	285
Arg Ala Ser Ala Pro Arg Leu Ala Leu Asp Pro Asp Ala Leu Ala Gly		
290	295	300
Phe Pro Gln Gly Leu Val Asn Leu Ser Asp Pro Ala Ala Leu Glu Arg		
305	310	315
Leu Leu Asp Gly Glu Glu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Arg Pro Thr Ala		
325	330	335
Ala Thr Thr Gly Asp Pro Ala Pro Leu His Asp Pro Thr Ser Ala Pro		
340	345	350
Trp Ala Thr Ala Leu Ala Arg Arg Val Ala Ala Glu Leu Gln Ala Ala		
355	360	365
Ala Ala Glu Leu Arg Ser Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Thr Ala Pro		
370	375	380
Leu Leu Ala Arg Leu Leu Ala Leu Cys Pro Gly Gly Pro Gly Gly Leu		
385	390	395
Gly Asp Pro Leu Arg Ala Leu Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln Gly Leu		
405	410	415
Arg Val Glu Trp Arg Gly Arg Asp Pro Arg Gly Pro Gly Arg Ala Gln		
420	425	430
Arg		
<210> 7		
<211> 426		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> polypeptide		
<400> 7		
Arg Ala Glu Glu Pro Ala Val Gly Thr Ser Gly Leu Ile Phe Arg Glu		
1	5	10
		15

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

				325				330				335			
Pro	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Ser	Ala	Pro	Trp	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala	Arg
				340				345				350			
Arg	Val	Ala	Ala	Glu	Leu	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu
				355				360				365			
Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Thr	Ala	Pro	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Leu	Ala
				370				375				380			
Leu	Cys	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Gly	Leu	Gly	Asp	Pro	Leu	Arg	Ala	Leu
385				390				395				400			
Leu	Leu	Leu	Lys	Ala	Leu	Gln	Gly	Leu	Arg	Val	Glu	Trp	Arg	Gly	Arg
				405				410				415			
Asp	Pro	Arg	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Gln	Arg						
				420				425							
<210> 8															
<211> 255															
<212> PRT															
<213> artificial sequence															
<220>															
<223> polypeptide															
<400> 8															
Met	Arg	Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Ser	Leu	Ala	Leu	Val	Leu	Ser	Ala	Leu
1				5				10				15			
Gly	Ala	Leu	Leu	Gly	Thr	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Glu	Glu	Pro	Ala	Val
				20				25				30			
Gly	Thr	Ser	Gly	Leu	Ile	Phe	Arg	Glu	Asp	Leu	Asp	Trp	Pro	Pro	Gly
				35				40				45			
Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Leu	Cys	Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Gly	Asp	Ser	Asn
50				55				60							
Gly	Ser	Ser	Ser	Pro	Leu	Arg	Val	Val	Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Tyr	Glu
65				70				75				80			
Gln	Ala	Phe	Leu	Gly	Ala	Val	Gln	Arg	Ala	Arg	Trp	Gly	Pro	Arg	Asp
				85				90				95			
Leu	Ala	Thr	Phe	Gly	Val	Cys	Asn	Thr	Gly	Asp	Arg	Gln	Ala	Ala	Leu
				100				105				110			
Pro	Ser	Leu	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Trp	Leu	Arg	Asp	Pro	Gly	Gly	Gln
115				120				125							
Arg	Leu	Val	Val	Leu	His	Leu	Glu	Glu	Val	Thr	Trp	Glu	Pro	Thr	Pro
130				135				140							
Ser	Leu	Arg	Phe	Gln	Glu	Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala	Gly	Pro	Pro	Glu

145	150	155	160
Leu Ala Leu Leu Val	Leu Tyr Pro Gly	Pro Gly Pro Glu	Val Thr Val
165	170	175	
Thr Arg Ala Gly Leu	Pro Gly Ala Gln	Ser Leu Cys Pro	Ser Arg Asp
180	185	190	
Thr Arg Tyr Leu Val	Leu Ala Val Asp	Arg Pro Ala Gly	Ala Trp Arg
195	200	205	
Gly Ser Gly Leu Ala	Leu Thr Leu Gln	Pro Arg Gly Glu	Asp Ser Arg
210	215	220	
Leu Ser Thr Ala Arg	Leu Gln Ala Leu	Leu Phe Gly Asp	Asp His Arg
225	230	235	240
Cys Phe Thr Arg Met	Thr Pro Ala Leu	Leu Leu Leu Pro	Arg Ser
245	250	255	
<210> 9			
<211> 237			
<212> PRT			
<213> artificial sequence			
<220>			
<223> polypeptide			
<400> 9			
Leu Leu Gly Thr Glu	Ala Leu Arg Ala	Glu Glu Pro Ala	Val Gly Thr
1	5	10	15
Ser Gly Leu Ile Phe	Arg Glu Asp Leu	Asp Trp Pro Pro	Gly Ser Pro
20	25	30	
Gln Glu Pro Leu Cys	Leu Val Ala Leu	Gly Gly Asp Ser	Asn Gly Ser
35	40	45	
Ser Ser Pro Leu Arg	Val Val Gly Ala	Leu Ser Ala Tyr	Glu Gln Ala
50	55	60	
Phe Leu Gly Ala Val	Gln Arg Ala Arg	Trp Gly Pro Arg	Asp Leu Ala
65	70	75	80
Thr Phe Gly Val Cys	Asn Thr Gly Asp	Arg Gln Ala Ala	Leu Pro Ser
85	90	95	
Leu Arg Arg Leu Gly	Ala Trp Leu Arg	Asp Pro Gly Gly	Gln Arg Leu
100	105	110	
Val Val Leu His Leu	Glu Glu Val Thr	Trp Glu Pro Thr	Pro Ser Leu
115	120	125	
Arg Phe Gln Glu Pro	Pro Pro Gly Gly	Ala Gly Pro Pro	Glu Leu Ala
130	135	140	
Leu Leu Val Leu Tyr	Pro Gly Pro Gly	Pro Glu Val Thr	Val Thr Arg

145	150	155	160
Ala Gly Leu Pro Gly Ala Gln Ser Leu Cys Pro Ser Arg Asp Thr Arg			
	165	170	175
Tyr Leu Val Leu Ala Val Asp Arg Pro Ala Gly Ala Trp Arg Gly Ser			
	180	185	190
Gly Leu Ala Leu Thr Leu Gln Pro Arg Gly Glu Asp Ser Arg Leu Ser			
	195	200	205
Thr Ala Arg Leu Gln Ala Leu Leu Phe Gly Asp Asp His Arg Cys Phe			
	210	215	220
Thr Arg Met Thr Pro Ala Leu Leu Leu Leu Pro Arg Ser			
225	230	235	
<210> 10			
<211> 230			
<212> PRT			
<213> artificial sequence			
<220>			
<223> polypeptide			
<400> 10			
Arg Ala Glu Glu Pro Ala Val Gly Thr Ser Gly Leu Ile Phe Arg Glu			
1	5	10	15
Asp Leu Asp Trp Pro Pro Gly Ser Pro Gln Glu Pro Leu Cys Leu Val			
	20	25	30
Ala Leu Gly Gly Asp Ser Asn Gly Ser Ser Ser Pro Leu Arg Val Val			
	35	40	45
Gly Ala Leu Ser Ala Tyr Glu Gln Ala Phe Leu Gly Ala Val Gln Arg			
	50	55	60
Ala Arg Trp Gly Pro Arg Asp Leu Ala Thr Phe Gly Val Cys Asn Thr			
65	70	75	80
Gly Asp Arg Gln Ala Ala Leu Pro Ser Leu Arg Arg Leu Gly Ala Trp			
	85	90	95
Leu Arg Asp Pro Gly Gly Gln Arg Leu Val Val Leu His Leu Glu Glu			
	100	105	110
Val Thr Trp Glu Pro Thr Pro Ser Leu Arg Phe Gln Glu Pro Pro Pro			
	115	120	125
Gly Gly Ala Gly Pro Pro Glu Leu Ala Leu Leu Val Leu Tyr Pro Gly			
	130	135	140
Pro Gly Pro Glu Val Thr Val Thr Arg Ala Gly Leu Pro Gly Ala Gln			
145	150	155	160
Ser Leu Cys Pro Ser Arg Asp Thr Arg Tyr Leu Val Leu Ala Val Asp			

	165		170		175
Arg	Pro	Ala	Gly	Ala	Trp
Arg	Gly	Ser	Gly	Leu	Ala
Leu	Thr	Leu	Gln		
	180		185		190
Pro	Arg	Gly	Glu	Asp	Ser
Arg	Leu	Ser	Thr	Ala	Arg
Leu	Gln	Ala	Leu		
	195		200		205
Leu	Phe	Gly	Asp	Asp	His
Arg	Cys	Phe	Thr	Arg	Met
Thr	Pro	Ala	Leu		
	210		215		220
Leu	Leu	Leu	Pro	Arg	Ser
	225		230		
<210>	11				
<211>	156				
<212>	PRT				
<213>	artificial sequence				
<220>					
<223>	polypeptide				
<400>	11				
Met	Arg	Asp	Leu	Pro	Leu
Thr	Ser	Leu	Ala	Leu	Val
Leu	Ser	Ala	Leu		
	1		5		10
	15				
Gly	Ala	Leu	Leu	Gly	Thr
Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Glu
Glu	Pro	Ala	Val		
	20		25		30
Gly	Thr	Ser	Gly	Leu	Ile
Phe	Arg	Glu	Asp	Leu	Asp
Trp	Pro	Pro	Gly		
	35		40		45
Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Leu
Cys	Leu	Val	Ala	Leu	Gly
Gly	Gly	Asp	Ser	Asn	
	50		55		60
Gly	Ser	Ser	Ser	Pro	Leu
Arg	Val	Val	Gly	Ala	Leu
Ser	Ala	Tyr	Glu		
	65		70		75
	80				
Gln	Ala	Phe	Leu	Gly	Ala
Val	Gln	Arg	Ala	Arg	Trp
Gly	Pro	Arg	Asp		
	85		90		95
Leu	Ala	Thr	Phe	Gly	Val
Cys	Asn	Thr	Gly	Asp	Arg
Gln	Ala	Ala	Leu		
	100		105		110
Pro	Ser	Leu	Arg	Arg	Leu
Gly	Ala	Trp	Leu	Arg	Asp
Pro	Gly	Gly	Gln		
	115		120		125
Arg	Leu	Val	Val	Leu	His
Leu	Glu	Glu	Val	Thr	Trp
Glu	Pro	Thr	Pro		
	130		135		140
Ser	Leu	Arg	Phe	Gln	Glu
Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala
	145		150		155
<210>	12				
<211>	138				
<212>	PRT				

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 12

Leu	Leu	Gly	Thr	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Glu	Glu	Pro	Ala	Val	Gly	Thr
1				5					10					15	
Ser	Gly	Leu	Ile	Phe	Arg	Glu	Asp	Leu	Asp	Trp	Pro	Pro	Gly	Ser	Pro
			20					25					30		
Gln	Glu	Pro	Leu	Cys	Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Gly	Asp	Ser	Asn	Gly	Ser
		35					40					45			
Ser	Ser	Pro	Leu	Arg	Val	Val	Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Tyr	Glu	Gln	Ala
	50					55					60				
Phe	Leu	Gly	Ala	Val	Gln	Arg	Ala	Arg	Trp	Gly	Pro	Arg	Asp	Leu	Ala
65					70					75				80	
Thr	Phe	Gly	Val	Cys	Asn	Thr	Gly	Asp	Arg	Gln	Ala	Ala	Leu	Pro	Ser
				85					90					95	
Leu	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Trp	Leu	Arg	Asp	Pro	Gly	Gly	Gln	Arg	Leu
			100					105					110		
Val	Val	Leu	His	Leu	Glu	Glu	Val	Thr	Trp	Glu	Pro	Thr	Pro	Ser	Leu
		115					120						125		
Arg	Phe	Gln	Glu	Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala						
	130						135								

<210> 13

<211> 131

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 13

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

Gly Asp Arg Gln Ala Ala Leu Pro Ser Leu Arg Arg Leu Gly Ala Trp
 85 90 95
 Leu Arg Asp Pro Gly Gly Gln Arg Leu Val Val Leu His Leu Glu Glu
 100 105 110
 Val Thr Trp Glu Pro Thr Pro Ser Leu Arg Phe Gln Glu Pro Pro Pro
 115 120 125
 Gly Gly Ala
 130
 <210> 14
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> polypeptide
 <400> 14
 Asn Pro Leu Glu Pro Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ala Gly Pro Gly Pro
 1 5 10 15
 Glu Val Thr Val Thr Gly Ala Gly Leu Pro Gly Ala Gln Ser Leu Cys
 20 25 30
 Pro Ser Pro Asp Thr Arg Tyr Leu Ala Leu Ala Val Asp His Pro Ala
 35 40 45
 Arg Ala Trp Arg His Pro Gly Leu Ile Leu Thr Leu Gln Pro Arg Gly
 50 55 60
 Asp Gly Ala Pro Leu Ser Thr Ala Gln Leu Gln Thr Leu Leu Phe Gly
 65 70 75 80
 Ala Asp Pro Arg Cys Phe Thr Arg Met Thr Pro Ala Leu Phe Leu Leu
 85 90 95
 Gln Arg Pro
 <210> 15
 <211> 573
 <212> PRT
 <213> cheval
 <400> 15
 Met Arg Ala Pro Ser Leu Ser Trp Leu Ala Leu Val Leu Ser Ala Val
 1 5 10 15
 Gly Ala Leu Leu Arg Ala Gly Thr Pro Gly Glu Glu Val Ser Ser Thr
 20 25 30
 Pro Ala Leu Pro Gly Glu Pro Ala Thr Gly Thr Gly Gly Leu Ile Phe
 35 40 45

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

355	360	365
Asp Pro Ala Pro Leu Pro Asp	Pro Ala Ser Ala Pro Trp	Ala Ala Gly
370	375	380
Leu Ala Arg Arg Val Ala Ala	Glu Leu Gln Ala Ala Ala	Ala Glu Leu
385	390	395
Arg Ser Leu Pro Gly Leu Pro	Pro Ala Ala Glu Pro Leu	Leu Ala Arg
405	410	415
Leu Leu Ala Leu Cys Pro Gly	Asp Ala Glu Asp Gln Gly	Gly Pro Gly
420	425	430
Gly Pro Leu Arg Ala Leu Leu	Leu Leu Lys Ala Leu Gln	Gly Leu Arg
435	440	445
Ala Glu Trp Arg Gly Arg Glu	Arg Ser Gly Pro Gly Arg	Ala Gln Arg
450	455	460
Asn Ala Gly Ala Gly Ala Ala	Asp Gly Pro Cys Ala Leu	Arg Glu Leu
465	470	475
Arg Val Asp Leu Arg Ala Glu	Arg Ser Val Leu Ile Pro	Glu Thr Tyr
485	490	495
Gln Ala Asn Asn Cys Gln Gly	Ala Cys Gly Trp Pro Gln	Ser Asp Arg
500	505	510
Asn Pro Arg Tyr Gly Asn His	Val Val Leu Leu Leu Lys	Met Gln Ala
515	520	525
Arg Gly Ala Ala Leu Ala Arg	Ala Pro Cys Cys Val Pro	Thr Ala Tyr
530	535	540
Ala Gly Lys Leu Leu Ile Ser	Leu Ser Glu Glu Arg Ile	Ser Ala His
545	550	555
His Val Pro Asn Met Val Ala	Thr Glu Cys Gly Cys Arg	
565	570	

<210> 16

<211> 551

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 16

Gly Thr Pro Gly Glu Glu Val	Ser Ser Thr Pro Ala Leu	Pro Gly Glu
1	5	10
Pro Ala Thr Gly Thr Gly Gly	Leu Ile Phe His Gln Asp	Trp Asp Trp
20	25	30
Pro Pro Gly Ser Pro Gln Glu	Pro Leu Gly Cys Leu Val	Thr Leu Asp

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

Asp Pro Ala Ser Ala Pro Trp Ala Ala Gly Leu Ala Arg Arg Val Ala		
355	360	365
Ala Glu Leu Gln Ala Ala Ala Glu Leu Arg Ser Leu Pro Gly Leu		
370	375	380
Pro Pro Ala Ala Glu Pro Leu Leu Ala Arg Leu Leu Ala Leu Cys Pro		
385	390	395
Gly Asp Ala Glu Asp Gln Gly Gly Pro Gly Gly Pro Leu Arg Ala Leu		
405	410	415
Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln Gly Leu Arg Ala Glu Trp Arg Gly Arg		
420	425	430
Glu Arg Ser Gly Pro Gly Arg Ala Gln Arg Asn Ala Gly Ala Gly Ala		
435	440	445
Ala Asp Gly Pro Cys Ala Leu Arg Glu Leu Arg Val Asp Leu Arg Ala		
450	455	460
Glu Arg Ser Val Leu Ile Pro Glu Thr Tyr Gln Ala Asn Asn Cys Gln		
465	470	475
Gly Ala Cys Gly Trp Pro Gln Ser Asp Arg Asn Pro Arg Tyr Gly Asn		
485	490	495
His Val Val Leu Leu Leu Lys Met Gln Ala Arg Gly Ala Ala Leu Ala		
500	505	510
Arg Ala Pro Cys Cys Val Pro Thr Ala Tyr Ala Gly Lys Leu Leu Ile		
515	520	525
Ser Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ser Ala His His Val Pro Asn Met Val		
530	535	540
Ala Thr Glu Cys Gly Cys Arg		
545	550	
<210> 17		
<211> 464		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> polypeptide		
<400> 17		
Met Arg Ala Pro Ser Leu Ser Trp Leu Ala Leu Val Leu Ser Ala Val		
1	5	10
Gly Ala Leu Leu Arg Ala Gly Thr Pro Gly Glu Glu Val Ser Ser Thr		
20	25	30
Pro Ala Leu Pro Gly Glu Pro Ala Thr Gly Thr Gly Gly Leu Ile Phe		
35	40	45

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

355	360	365
Asp Pro Ala Pro Leu Pro Asp	Pro Ala Ser Ala Pro Trp	Ala Ala Gly
370	375	380
Leu Ala Arg Arg Val Ala Ala	Glu Leu Gln Ala Ala Ala	Ala Glu Leu
385	390	395
Arg Ser Leu Pro Gly Leu Pro	Pro Ala Ala Glu Pro Leu	Leu Ala Arg
405	410	415
Leu Leu Ala Leu Cys Pro Gly	Asp Ala Glu Asp Gln Gly	Gly Pro Gly
420	425	430
Gly Pro Leu Arg Ala Leu Leu	Leu Leu Lys Ala Leu Gln	Gly Leu Arg
435	440	445
Ala Glu Trp Arg Gly Arg Glu	Arg Ser Gly Pro Gly Arg	Ala Gln Arg
450	455	460
<210> 18		
<211> 442		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> polypeptide		
<400> 18		
Gly Thr Pro Gly Glu Glu Val	Ser Ser Thr Pro Ala Leu	Pro Gly Glu
1	5	10
Pro Ala Thr Gly Thr Gly Gly	Leu Ile Phe His Gln Asp	Trp Asp Trp
20	25	30
Pro Pro Gly Ser Pro Gln Glu	Pro Leu Gly Cys Leu Val	Thr Leu Asp
35	40	45
Glu Gly Gly Asn Gln Ser Ser	Ala Pro Leu Arg Val Ala	Gly Ala Leu
50	55	60
Ser Gly Tyr Glu Gln Ala Phe	Leu Glu Ala Val Gln Arg	Thr His Trp
65	70	75
Ser Pro Arg Asp Leu Pro Thr	Phe Gly Val Cys Ser Pro	Ala Asp Arg
85	90	95
Gln Ala Ala Val Pro Ser Leu	Gln Arg Leu Gln Ala Trp	Leu Gly Ala
100	105	110
Pro Trp Gly Gln Arg Leu Val	Val Leu His Leu Glu Glu	Val Met Trp
115	120	125
Glu Pro Thr Pro Ser Leu Arg	Phe Gln Glu Pro Pro Ser	Gly Gly Ala
130	135	140
Asn Pro Leu Glu Pro Ala Leu	Leu Val Leu Tyr Ala Gly	Pro Gly Pro

145	150	155	160
Glu Val Thr Val Thr Gly Ala Gly Leu Pro Gly Ala Gln Ser Leu Cys			
	165	170	175
Pro Ser Pro Asp Thr Arg Tyr Leu Ala Leu Ala Val Asp His Pro Ala			
	180	185	190
Arg Ala Trp Arg His Pro Gly Leu Ile Leu Thr Leu Gln Pro Arg Gly			
	195	200	205
Asp Gly Ala Pro Leu Ser Thr Ala Gln Leu Gln Thr Leu Leu Phe Gly			
	210	215	220
Ala Asp Pro Arg Cys Phe Thr Arg Met Thr Pro Ala Leu Phe Leu Leu			
225	230	235	240
Gln Arg Pro Gly Pro Ala Pro Met Pro Ala His Gly Arg Leu Asp Thr			
	245	250	255
Val Pro Phe Pro Pro Ala Arg Pro Ser Pro Glu Pro Glu Glu Pro Arg			
	260	265	270
Pro Ser Ala Asp Pro Phe Leu Glu Thr Leu Thr Arg Leu Val Arg Ala			
	275	280	285
Leu Arg Gly Pro Pro Thr Pro Ala Ser Pro Pro Arg Leu Ala Leu Asp			
	290	295	300
Pro Gly Ala Leu Ala Ser Phe Pro Gln Gly Leu Val Asn Leu Ser Asp			
305	310	315	320
Pro Ala Ala Leu Glu Arg Leu Leu Asp Gly Glu Glu Pro Leu Leu Leu			
	325	330	335
Leu Leu Pro Pro Thr Ala Ala Ala Ala Gly Asp Pro Ala Pro Leu Pro			
	340	345	350
Asp Pro Ala Ser Ala Pro Trp Ala Ala Gly Leu Ala Arg Arg Val Ala			
	355	360	365
Ala Glu Leu Gln Ala Ala Ala Ala Glu Leu Arg Ser Leu Pro Gly Leu			
	370	375	380
Pro Pro Ala Ala Glu Pro Leu Leu Ala Arg Leu Leu Ala Leu Cys Pro			
385	390	395	400
Gly Asp Ala Glu Asp Gln Gly Gly Pro Gly Gly Pro Leu Arg Ala Leu			
	405	410	415
Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln Gly Leu Arg Ala Glu Trp Arg Gly Arg			
	420	425	430
Glu Arg Ser Gly Pro Gly Arg Ala Gln Arg			
	435	440	

<210> 19

<211> 265

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 19

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

<210> 21

<211> 166

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 21

```

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

```

<210> 22

<211> 144

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 22

```

Gly Thr Pro Gly Glu Glu Val Ser Ser Thr Pro Ala Leu Pro Gly Glu
1           5           10           15
Pro Ala Thr Gly Thr Gly Gly Leu Ile Phe His Gln Asp Trp Asp Trp
           20           25           30

```

Pro Pro Gly Ser Pro Gln Glu Pro Leu Gly Cys Leu Val Thr Leu Asp
 35 40 45
 Glu Gly Gly Asn Gln Ser Ser Ala Pro Leu Arg Val Ala Gly Ala Leu
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Glu Gln Ala Phe Leu Glu Ala Val Gln Arg Thr His Trp
 65 70 75 80
 Ser Pro Arg Asp Leu Pro Thr Phe Gly Val Cys Ser Pro Ala Asp Arg
 85 90 95
 Gln Ala Ala Val Pro Ser Leu Gln Arg Leu Gln Ala Trp Leu Gly Ala
 100 105 110
 Pro Trp Gly Gln Arg Leu Val Val Leu His Leu Glu Glu Val Met Trp
 115 120 125
 Glu Pro Thr Pro Ser Leu Arg Phe Gln Glu Pro Pro Ser Gly Gly Ala
 130 135 140

<210> 23

<211> 99

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 23

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

Arg Leu Pro

<210> 24

<211> 572

<212> PRT

<213> chien

<400> 24

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

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

<210> 25

<211> 551

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 25

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

Pro Gly Ala Leu Ala Gly Phe Pro Gln Gly Leu Leu Asn Leu Ser Asp			
305	310	315	320
Pro Ala Thr Gln Glu Arg Leu Leu Gly Gly Glu Glu Pro Leu Leu Leu			
	325	330	335
Leu Leu Pro Pro Pro Thr Ala Ala Ala Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro			
	340	345	350
Arg Pro Ala Ser Ala Pro Trp Ala Ala Gly Leu Ala Leu Arg Val Ala			
	355	360	365
Ala Glu Leu Arg Ala Ala Ala Ala Glu Leu Arg Gly Leu Pro Gly Leu			
	370	375	380
Pro Pro Ala Ala Ala Pro Leu Leu Glu Arg Leu Leu Ala Leu Cys Pro			
385	390	395	400
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Asp Pro Leu Arg Ala Leu			
	405	410	415
Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln Gly Leu Arg Ala Glu Trp Arg Gly Arg			
	420	425	430
Glu Arg Gly Gly Pro Pro Arg Ala Gln Arg Ser Ala Gly Ala Gly Ala			
	435	440	445
Ala Asp Gly Pro Cys Ala Leu Arg Glu Leu Ser Val Asp Leu Arg Ala			
	450	455	460
Glu Arg Ser Val Leu Ile Pro Glu Thr Tyr Gln Ala Asn Asn Cys Gln			
465	470	475	480
Gly Ala Cys Gly Trp Pro Gln Ser Asp Arg Asn Pro Arg Tyr Gly Asn			
	485	490	495
His Val Val Leu Leu Leu Lys Met Gln Ala Arg Gly Ala Ala Leu Ala			
	500	505	510
Arg Pro Pro Cys Cys Val Pro Thr Ala Tyr Gly Gly Lys Leu Leu Ile			
	515	520	525
Ser Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ser Ala His His Val Pro Asn Met Val			
	530	535	540
Ala Thr Glu Cys Gly Cys Arg			
545	550		
<210> 26			
<211> 463			
<212> PRT			
<213> artificial sequence			
<220>			
<223> polypeptide			
<400> 26			

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

305	310	315	320
Arg Leu Ala Leu Asp Pro Gly Ala Leu Ala Gly Phe Pro Gln Gly Leu			
	325	330	335
Leu Asn Leu Ser Asp Pro Ala Thr Gln Glu Arg Leu Leu Gly Gly Glu			
	340	345	350
Glu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Thr Ala Ala Ala Gly Pro			
	355	360	365
Pro Ala Pro Pro Pro Arg Pro Ala Ser Ala Pro Trp Ala Ala Gly Leu			
	370	375	380
Ala Leu Arg Val Ala Ala Glu Leu Arg Ala Ala Ala Glu Leu Arg			
385	390	395	400
Gly Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Ala Ala Pro Leu Leu Glu Arg Leu			
	405	410	415
Leu Ala Leu Cys Pro Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Asp			
	420	425	430
Pro Leu Arg Ala Leu Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln Gly Leu Arg Ala			
	435	440	445
Glu Trp Arg Gly Arg Glu Arg Gly Gly Pro Pro Arg Ala Gln Arg			
	450	455	460
<210> 27			
<211> 442			
<212> PRT			
<213> artificial sequence			
<220>			
<223> polypeptide			
<400> 27			
Ala Glu Ala Pro Gly Gly Glu Val Ser Gly Thr Pro Ala Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Pro Ala Thr Gly Thr Gly Gly Leu Leu Phe Gln Pro Asp Trp Asp			
	20	25	30
Trp Pro Pro Ser Ala Pro Gln Asp Pro Leu Cys Leu Val Thr Leu Asp			
	35	40	45
Lys Gly Gly Asn Gly Ser Ser Pro Pro Leu Arg Val Ala Gly Ala Leu			
	50	55	60
Arg Gly Tyr Glu His Thr Phe Leu Glu Ala Val Arg Arg Ala Arg Trp			
65	70	75	80
Gly Pro His Asp Leu Ala Thr Phe Gly Ala Cys Ala Ala Ser Asp Gly			
	85	90	95
Arg Thr Thr Gln Leu Ser Leu Arg Gln Leu Gln Ala Trp Leu Gly Ala			

100	105	110
Pro Gly Gly Arg Arg Leu Val Val Leu His Leu Glu Glu Val Thr Trp		
115	120	125
Glu Pro Ala Leu Ser Leu Lys Phe Gln Glu Pro Pro Pro Gly Gly Ala		
130	135	140
Ser Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Val Leu Tyr Pro Gly Pro Gly Pro		
145	150	155
Glu Val Ala Val Thr Gly Ala Gly Leu Pro Gly Thr Gln Asn Leu Cys		
165	170	175
Arg Ser Arg Asn Thr Arg Tyr Leu Val Leu Ala Leu Asp His Pro Val		
180	185	190
Gly Ala Trp His Ser Pro Arg Val Thr Leu Thr Val His Ala Arg Gly		
195	200	205
Asp Gly Ala Pro Leu Ser Thr Pro Gln Leu Gln Glu Leu Leu Phe Gly		
210	215	220
Pro Asp Ala Arg Cys Phe Thr Arg Met Thr Pro Ala Leu Leu Val Leu		
225	230	235
Arg Leu Pro Gly Pro Thr Ala Val Pro Ala Arg Gly Leu Leu Asp Leu		
245	250	255
Val Pro Phe Pro Pro Pro Arg Pro Ser Arg Glu Pro Ala Glu Pro Pro		
260	265	270
Pro Ser Ala Asp Pro Phe Leu Glu Thr Leu Thr Arg Leu Val Arg Ala		
275	280	285
Leu Arg Gly Pro Pro Thr Pro Ala Ser Pro Pro Arg Leu Ala Leu Asp		
290	295	300
Pro Gly Ala Leu Ala Gly Phe Pro Gln Gly Leu Leu Asn Leu Ser Asp		
305	310	315
Pro Ala Thr Gln Glu Arg Leu Leu Gly Gly Glu Glu Pro Leu Leu Leu		
325	330	335
Leu Leu Pro Pro Pro Thr Ala Ala Ala Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro		
340	345	350
Arg Pro Ala Ser Ala Pro Trp Ala Ala Gly Leu Ala Leu Arg Val Ala		
355	360	365
Ala Glu Leu Arg Ala Ala Ala Ala Glu Leu Arg Gly Leu Pro Gly Leu		
370	375	380
Pro Pro Ala Ala Ala Pro Leu Leu Glu Arg Leu Leu Ala Leu Cys Pro		
385	390	395
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Asp Pro Leu Arg Ala Leu		
405	410	415

Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln Gly Leu Arg Ala Glu Trp Arg Gly Arg
 420 425 430
 Glu Arg Gly Gly Pro Pro Arg Ala Gln Arg
 435 440
 <210> 28
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> polypeptide
 <400> 28
 Met Gly Ala Leu Ala Leu Trp Pro Leu Ala Leu Ala Leu Ser Gly Met
 1 5 10 15
 Gly Pro Leu Leu Gly Ala Glu Ala Pro Gly Gly Glu Val Ser Gly Thr
 20 25 30
 Pro Ala Ser Pro Gly Glu Pro Ala Thr Gly Thr Gly Gly Leu Leu Phe
 35 40 45
 Gln Pro Asp Trp Asp Trp Pro Pro Ser Ala Pro Gln Asp Pro Leu Cys
 50 55 60
 Leu Val Thr Leu Asp Lys Gly Gly Asn Gly Ser Ser Pro Pro Leu Arg
 65 70 75 80
 Val Ala Gly Ala Leu Arg Gly Tyr Glu His Thr Phe Leu Glu Ala Val
 85 90 95
 Arg Arg Ala Arg Trp Gly Pro His Asp Leu Ala Thr Phe Gly Ala Cys
 100 105 110
 Ala Ala Ser Asp Gly Arg Thr Thr Gln Leu Ser Leu Arg Gln Leu Gln
 115 120 125
 Ala Trp Leu Gly Ala Pro Gly Gly Arg Arg Leu Val Val Leu His Leu
 130 135 140
 Glu Glu Val Thr Trp Glu Pro Ala Leu Ser Leu Lys Phe Gln Glu Pro
 145 150 155 160
 Pro Pro Gly Gly Ala Ser Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Val Leu Tyr
 165 170 175
 Pro Gly Pro Gly Pro Glu Val Ala Val Thr Gly Ala Gly Leu Pro Gly
 180 185 190
 Thr Gln Asn Leu Cys Arg Ser Arg Asn Thr Arg Tyr Leu Val Leu Ala
 195 200 205
 Leu Asp His Pro Val Gly Ala Trp His Ser Pro Arg Val Thr Leu Thr
 210 215 220

Val His Ala Arg Gly Asp Gly Ala Pro Leu Ser Thr Pro Gln Leu Gln
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Phe Gly Pro Asp Ala Arg Cys Phe Thr Arg Met Thr Pro
 245 250 255
 Ala Leu Leu Val Leu Arg Leu Pro
 260
 <210> 29
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> polypeptide
 <400> 29
 Ala Glu Ala Pro Gly Gly Glu Val Ser Gly Thr Pro Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Thr Gly Thr Gly Gly Leu Leu Phe Gln Pro Asp Trp Asp
 20 25 30
 Trp Pro Pro Ser Ala Pro Gln Asp Pro Leu Cys Leu Val Thr Leu Asp
 35 40 45
 Lys Gly Gly Asn Gly Ser Ser Pro Pro Leu Arg Val Ala Gly Ala Leu
 50 55 60
 Arg Gly Tyr Glu His Thr Phe Leu Glu Ala Val Arg Arg Ala Arg Trp
 65 70 75 80
 Gly Pro His Asp Leu Ala Thr Phe Gly Ala Cys Ala Ala Ser Asp Gly
 85 90 95
 Arg Thr Thr Gln Leu Ser Leu Arg Gln Leu Gln Ala Trp Leu Gly Ala
 100 105 110
 Pro Gly Gly Arg Arg Leu Val Val Leu His Leu Glu Glu Val Thr Trp
 115 120 125
 Glu Pro Ala Leu Ser Leu Lys Phe Gln Glu Pro Pro Pro Gly Gly Ala
 130 135 140
 Ser Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Val Leu Tyr Pro Gly Pro Gly Pro
 145 150 155 160
 Glu Val Ala Val Thr Gly Ala Gly Leu Pro Gly Thr Gln Asn Leu Cys
 165 170 175
 Arg Ser Arg Asn Thr Arg Tyr Leu Val Leu Ala Leu Asp His Pro Val
 180 185 190
 Gly Ala Trp His Ser Pro Arg Val Thr Leu Thr Val His Ala Arg Gly
 195 200 205

Asp Gly Ala Pro Leu Ser Thr Pro Gln Leu Gln Glu Leu Leu Phe Gly
 210 215 220
 Pro Asp Ala Arg Cys Phe Thr Arg Met Thr Pro Ala Leu Leu Val Leu
 225 230 235 240
 Arg Leu Pro
 <210> 30
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> polypeptide
 <400> 30
 Met Gly Ala Leu Ala Leu Trp Pro Leu Ala Leu Ala Leu Ser Gly Met
 1 5 10 15
 Gly Pro Leu Leu Gly Ala Glu Ala Pro Gly Gly Glu Val Ser Gly Thr
 20 25 30
 Pro Ala Ser Pro Gly Glu Pro Ala Thr Gly Thr Gly Gly Leu Leu Phe
 35 40 45
 Gln Pro Asp Trp Asp Trp Pro Pro Ser Ala Pro Gln Asp Pro Leu Cys
 50 55 60
 Leu Val Thr Leu Asp Lys Gly Gly Asn Gly Ser Ser Pro Pro Leu Arg
 65 70 75 80
 Val Ala Gly Ala Leu Arg Gly Tyr Glu His Thr Phe Leu Glu Ala Val
 85 90 95
 Arg Arg Ala Arg Trp Gly Pro His Asp Leu Ala Thr Phe Gly Ala Cys
 100 105 110
 Ala Ala Ser Asp Gly Arg Thr Thr Gln Leu Ser Leu Arg Gln Leu Gln
 115 120 125
 Ala Trp Leu Gly Ala Pro Gly Gly Arg Arg Leu Val Val Leu His Leu
 130 135 140
 Glu Glu Val Thr Trp Glu Pro Ala Leu Ser Leu Lys Phe Gln Glu Pro
 145 150 155 160
 Pro Pro Gly Gly Ala
 165
 <210> 31
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>

<223> polypeptide

<400> 31

Ala	Glu	Ala	Pro	Gly	Gly	Glu	Val	Ser	Gly	Thr	Pro	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Thr	Gly	Thr	Gly	Gly	Leu	Leu	Phe	Gln	Pro	Asp	Trp	Asp
			20					25					30		
Trp	Pro	Pro	Ser	Ala	Pro	Gln	Asp	Pro	Leu	Cys	Leu	Val	Thr	Leu	Asp
			35				40					45			
Lys	Gly	Gly	Asn	Gly	Ser	Ser	Pro	Pro	Leu	Arg	Val	Ala	Gly	Ala	Leu
	50					55				60					
Arg	Gly	Tyr	Glu	His	Thr	Phe	Leu	Glu	Ala	Val	Arg	Arg	Ala	Arg	Trp
65				70					75					80	
Gly	Pro	His	Asp	Leu	Ala	Thr	Phe	Gly	Ala	Cys	Ala	Ala	Ser	Asp	Gly
			85					90					95		
Arg	Thr	Thr	Gln	Leu	Ser	Leu	Arg	Gln	Leu	Gln	Ala	Trp	Leu	Gly	Ala
			100					105					110		
Pro	Gly	Gly	Arg	Arg	Leu	Val	Val	Leu	His	Leu	Glu	Glu	Val	Thr	Trp
			115					120				125			
Glu	Pro	Ala	Leu	Ser	Leu	Lys	Phe	Gln	Glu	Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala
	130					135						140			

<210> 32

<211> 100

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 32

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

Leu Pro Ala Arg
100

<210> 33

<211> 575

<212> PRT

<213> bovin

<400> 33

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

Thr Arg Lys Thr Pro Ala Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ala Arg Ser Ser			
260	265	270	
Ala Pro Met Pro Ala His Gly Arg Leu Asp Leu Val Pro Phe Pro Gln			
275	280	285	
Pro Arg Ala Ser Pro Glu Pro Glu Glu Ala Pro Pro Ser Ala Asp Pro			
290	295	300	
Phe Leu Glu Thr Leu Thr Arg Leu Val Arg Ala Leu Ala Gly Pro Pro			
305	310	315	320
Ala Arg Ala Ser Pro Pro Arg Leu Ala Leu Asp Pro Gly Ala Leu Ala			
325	330	335	
Gly Phe Pro Gln Gly Gln Val Asn Leu Ser Asp Pro Ala Ala Leu Glu			
340	345	350	
Arg Leu Leu Asp Gly Glu Glu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Thr			
355	360	365	
Ala Ala Thr Thr Gly Val Pro Ala Thr Pro Gln Gly Pro Lys Ser Pro			
370	375	380	
Leu Trp Ala Ala Gly Leu Ala Arg Arg Val Ala Ala Glu Leu Gln Ala			
385	390	395	400
Val Ala Ala Glu Leu Arg Ala Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Ala Pro			
405	410	415	
Pro Leu Leu Ala Arg Leu Leu Ala Leu Cys Pro Gly Asn Pro Asp Ser			
420	425	430	
Pro Gly Gly Pro Leu Arg Ala Leu Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln Gly			
435	440	445	
Leu Arg Ala Glu Trp Arg Gly Arg Glu Arg Ser Gly Ser Ala Arg Ala			
450	455	460	
Gln Arg Ser Ala Gly Ala Ala Ala Ala Asp Gly Pro Cys Ala Leu Arg			
465	470	475	480
Glu Leu Ser Val Asp Leu Arg Ala Glu Arg Ser Val Leu Ile Pro Glu			
485	490	495	
Thr Tyr Gln Ala Asn Asn Cys Gln Gly Ala Cys Gly Trp Pro Gln Ser			
500	505	510	
Asp Arg Asn Pro Arg Tyr Gly Asn His Val Val Leu Leu Leu Lys Met			
515	520	525	
Gln Ala Arg Gly Ala Thr Leu Ala Arg Pro Pro Cys Cys Val Pro Thr			
530	535	540	
Ala Tyr Thr Gly Lys Leu Leu Ile Ser Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ser			
545	550	555	560
Ala His His Val Pro Asn Met Val Ala Thr Glu Cys Gly Cys Arg			

565	570	575
<210> 34		
<211> 558		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> polypeptide		
<400> 34		
Leu Leu Arg Pro Gly Thr Pro Arg Glu Glu Val Phe Ser Thr Ser Ala		
1 5 10 15		
Leu Pro Arg Glu Gln Ala Thr Gly Ser Gly Ala Leu Ile Phe Gln Gln		
20 25 30		
Ala Trp Asp Trp Pro Leu Ser Ser Leu Trp Leu Pro Gly Ser Pro Leu		
35 40 45		
Asp Pro Leu Cys Leu Val Thr Leu His Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg		
50 55 60		
Ala Pro Leu Arg Val Val Gly Val Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Ala Phe		
65 70 75 80		
Leu Glu Ala Val Arg Arg Thr His Trp Gly Leu Ser Asp Leu Thr Thr		
85 90 95		
Phe Ala Val Cys Pro Ala Gly Asn Gly Gln Pro Val Leu Pro His Leu		
100 105 110		
Gln Arg Leu Gln Ala Trp Leu Gly Glu Pro Gly Gly Arg Trp Leu Val		
115 120 125		
Val Leu His Leu Glu Glu Val Thr Trp Glu Pro Thr Pro Leu Leu Arg		
130 135 140		
Phe Gln Glu Pro Pro Pro Gly Gly Ala Ser Pro Pro Glu Leu Ala Leu		
145 150 155 160		
Leu Val Val Tyr Pro Gly Pro Gly Leu Glu Val Thr Val Thr Gly Ala		
165 170 175		
Gly Leu Pro Gly Thr Gln Ser Leu Cys Leu Thr Ala Asp Ser Asp Phe		
180 185 190		
Leu Ala Leu Val Val Asp His Pro Glu Gly Ala Trp Arg Arg Pro Gly		
195 200 205		
Leu Ala Leu Thr Leu Arg Arg Arg Gly Asn Gly Ala Leu Leu Ser Thr		
210 215 220		
Ala Gln Leu Gln Ala Leu Leu Phe Gly Ala Asp Ser Arg Cys Phe Thr		
225 230 235 240		
Arg Lys Thr Pro Ala Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ala Arg Ser Ser Ala		

	245		250		255
Pro Met Pro Ala His Gly Arg Leu Asp Leu Val Pro Phe Pro Gln Pro					
	260		265		270
Arg Ala Ser Pro Glu Pro Glu Glu Ala Pro Pro Ser Ala Asp Pro Phe					
	275		280		285
Leu Glu Thr Leu Thr Arg Leu Val Arg Ala Leu Ala Gly Pro Pro Ala					
	290		295		300
Arg Ala Ser Pro Pro Arg Leu Ala Leu Asp Pro Gly Ala Leu Ala Gly					
305		310		315	320
Phe Pro Gln Gly Gln Val Asn Leu Ser Asp Pro Ala Ala Leu Glu Arg					
	325		330		335
Leu Leu Asp Gly Glu Glu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Thr Ala					
	340		345		350
Ala Thr Thr Gly Val Pro Ala Thr Pro Gln Gly Pro Lys Ser Pro Leu					
	355		360		365
Trp Ala Ala Gly Leu Ala Arg Arg Val Ala Ala Glu Leu Gln Ala Val					
	370		375		380
Ala Ala Glu Leu Arg Ala Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Ala Pro Pro					
385		390		395	400
Leu Leu Ala Arg Leu Leu Ala Leu Cys Pro Gly Asn Pro Asp Ser Pro					
	405		410		415
Gly Gly Pro Leu Arg Ala Leu Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln Gly Leu					
	420		425		430
Arg Ala Glu Trp Arg Gly Arg Glu Arg Ser Gly Ser Ala Arg Ala Gln					
	435		440		445
Arg Ser Ala Gly Ala Ala Ala Asp Gly Pro Cys Ala Leu Arg Glu					
	450		455		460
Leu Ser Val Asp Leu Arg Ala Glu Arg Ser Val Leu Ile Pro Glu Thr					
465		470		475	480
Tyr Gln Ala Asn Asn Cys Gln Gly Ala Cys Gly Trp Pro Gln Ser Asp					
	485		490		495
Arg Asn Pro Arg Tyr Gly Asn His Val Val Leu Leu Leu Lys Met Gln					
	500		505		510
Ala Arg Gly Ala Thr Leu Ala Arg Pro Pro Cys Cys Val Pro Thr Ala					
	515		520		525
Tyr Thr Gly Lys Leu Leu Ile Ser Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ser Ala					
	530		535		540
His His Val Pro Asn Met Val Ala Thr Glu Cys Gly Cys Arg					
545		550		555	

<210> 35
 <211> 551
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> polypeptide
 <400> 35
 Arg Glu Glu Val Phe Ser Thr Ser Ala Leu Pro Arg Glu Gln Ala Thr
 1 5 10 15
 Gly Ser Gly Ala Leu Ile Phe Gln Gln Ala Trp Asp Trp Pro Leu Ser
 20 25 30
 Ser Leu Trp Leu Pro Gly Ser Pro Leu Asp Pro Leu Cys Leu Val Thr
 35 40 45
 Leu His Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Ala Pro Leu Arg Val Val Gly
 50 55 60
 Val Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Ala Phe Leu Glu Ala Val Arg Arg Thr
 65 70 75 80
 His Trp Gly Leu Ser Asp Leu Thr Thr Phe Ala Val Cys Pro Ala Gly
 85 90 95
 Asn Gly Gln Pro Val Leu Pro His Leu Gln Arg Leu Gln Ala Trp Leu
 100 105 110
 Gly Glu Pro Gly Gly Arg Trp Leu Val Val Leu His Leu Glu Glu Val
 115 120 125
 Thr Trp Glu Pro Thr Pro Leu Leu Arg Phe Gln Glu Pro Pro Pro Gly
 130 135 140
 Gly Ala Ser Pro Pro Glu Leu Ala Leu Leu Val Val Tyr Pro Gly Pro
 145 150 155 160
 Gly Leu Glu Val Thr Val Thr Gly Ala Gly Leu Pro Gly Thr Gln Ser
 165 170 175
 Leu Cys Leu Thr Ala Asp Ser Asp Phe Leu Ala Leu Val Val Asp His
 180 185 190
 Pro Glu Gly Ala Trp Arg Arg Pro Gly Leu Ala Leu Thr Leu Arg Arg
 195 200 205
 Arg Gly Asn Gly Ala Leu Leu Ser Thr Ala Gln Leu Gln Ala Leu Leu
 210 215 220
 Phe Gly Ala Asp Ser Arg Cys Phe Thr Arg Lys Thr Pro Ala Leu Leu
 225 230 235 240
 Leu Leu Leu Pro Ala Arg Ser Ser Ala Pro Met Pro Ala His Gly Arg
 245 250 255

Leu Asp Leu Val Pro Phe Pro Gln Pro Arg Ala Ser Pro Glu Pro Glu		
260	265	270
Glu Ala Pro Pro Ser Ala Asp Pro Phe Leu Glu Thr Leu Thr Arg Leu		
275	280	285
Val Arg Ala Leu Ala Gly Pro Pro Ala Arg Ala Ser Pro Pro Arg Leu		
290	295	300
Ala Leu Asp Pro Gly Ala Leu Ala Gly Phe Pro Gln Gly Gln Val Asn		
305	310	315
Leu Ser Asp Pro Ala Ala Leu Glu Arg Leu Leu Asp Gly Glu Glu Pro		
	325	330
		335
Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Thr Ala Ala Thr Thr Gly Val Pro Ala		
	340	345
		350
Thr Pro Gln Gly Pro Lys Ser Pro Leu Trp Ala Ala Gly Leu Ala Arg		
	355	360
		365
Arg Val Ala Ala Glu Leu Gln Ala Val Ala Ala Glu Leu Arg Ala Leu		
	370	375
		380
Pro Gly Leu Pro Pro Ala Ala Pro Pro Leu Leu Ala Arg Leu Leu Ala		
385	390	395
		400
Leu Cys Pro Gly Asn Pro Asp Ser Pro Gly Gly Pro Leu Arg Ala Leu		
	405	410
		415
Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln Gly Leu Arg Ala Glu Trp Arg Gly Arg		
	420	425
		430
Glu Arg Ser Gly Ser Ala Arg Ala Gln Arg Ser Ala Gly Ala Ala Ala		
	435	440
		445
Ala Asp Gly Pro Cys Ala Leu Arg Glu Leu Ser Val Asp Leu Arg Ala		
	450	455
		460
Glu Arg Ser Val Leu Ile Pro Glu Thr Tyr Gln Ala Asn Asn Cys Gln		
465	470	475
		480
Gly Ala Cys Gly Trp Pro Gln Ser Asp Arg Asn Pro Arg Tyr Gly Asn		
	485	490
		495
His Val Val Leu Leu Leu Lys Met Gln Ala Arg Gly Ala Thr Leu Ala		
	500	505
		510
Arg Pro Pro Cys Cys Val Pro Thr Ala Tyr Thr Gly Lys Leu Leu Ile		
	515	520
		525
Ser Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ser Ala His His Val Pro Asn Met Val		
	530	535
		540
Ala Thr Glu Cys Gly Cys Arg		
545	550	

<210> 36

<211> 466

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 36

```

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

```

260	265	270
Ala Pro Met Pro Ala His Gly Arg Leu Asp Leu Val Pro Phe Pro Gln		
275	280	285
Pro Arg Ala Ser Pro Glu Pro Glu Glu Ala Pro Pro Ser Ala Asp Pro		
290	295	300
Phe Leu Glu Thr Leu Thr Arg Leu Val Arg Ala Leu Ala Gly Pro Pro		
305	310	315
Ala Arg Ala Ser Pro Pro Arg Leu Ala Leu Asp Pro Gly Ala Leu Ala		
325	330	335
Gly Phe Pro Gln Gly Gln Val Asn Leu Ser Asp Pro Ala Ala Leu Glu		
340	345	350
Arg Leu Leu Asp Gly Glu Glu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Thr		
355	360	365
Ala Ala Thr Thr Gly Val Pro Ala Thr Pro Gln Gly Pro Lys Ser Pro		
370	375	380
Leu Trp Ala Ala Gly Leu Ala Arg Arg Val Ala Ala Glu Leu Gln Ala		
385	390	395
Val Ala Ala Glu Leu Arg Ala Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Ala Pro		
405	410	415
Pro Leu Leu Ala Arg Leu Leu Ala Leu Cys Pro Gly Asn Pro Asp Ser		
420	425	430
Pro Gly Gly Pro Leu Arg Ala Leu Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln Gly		
435	440	445
Leu Arg Ala Glu Trp Arg Gly Arg Glu Arg Ser Gly Ser Ala Arg Ala		
450	455	460
Gln Arg		
465		
<210> 37		
<211> 449		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> polypeptide		
<400> 37		
Leu Leu Arg Pro Gly Thr Pro Arg Glu Glu Val Phe Ser Thr Ser Ala		
1	5	10
Leu Pro Arg Glu Gln Ala Thr Gly Ser Gly Ala Leu Ile Phe Gln Gln		
20	25	30
Ala Trp Asp Trp Pro Leu Ser Ser Leu Trp Leu Pro Gly Ser Pro Leu		

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

Ala Thr Thr Gly Val Pro Ala Thr Pro Gln Gly Pro Lys Ser Pro Leu
 355 360 365
 Trp Ala Ala Gly Leu Ala Arg Arg Val Ala Ala Glu Leu Gln Ala Val
 370 375 380
 Ala Ala Glu Leu Arg Ala Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Ala Pro Pro
 385 390 395 400
 Leu Leu Ala Arg Leu Leu Ala Leu Cys Pro Gly Asn Pro Asp Ser Pro
 405 410 415
 Gly Gly Pro Leu Arg Ala Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln Gly Leu
 420 425 430
 Arg Ala Glu Trp Arg Gly Arg Glu Arg Ser Gly Ser Ala Arg Ala Gln
 435 440 445
 Arg
 <210> 38
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> polypeptide
 <400> 38
 Arg Glu Glu Val Phe Ser Thr Ser Ala Leu Pro Arg Glu Gln Ala Thr
 1 5 10 15
 Gly Ser Gly Ala Leu Ile Phe Gln Gln Ala Trp Asp Trp Pro Leu Ser
 20 25 30
 Ser Leu Trp Leu Pro Gly Ser Pro Leu Asp Pro Leu Cys Leu Val Thr
 35 40 45
 Leu His Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Ala Pro Leu Arg Val Val Gly
 50 55 60
 Val Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Ala Phe Leu Glu Ala Val Arg Arg Thr
 65 70 75 80
 His Trp Gly Leu Ser Asp Leu Thr Thr Phe Ala Val Cys Pro Ala Gly
 85 90 95
 Asn Gly Gln Pro Val Leu Pro His Leu Gln Arg Leu Gln Ala Trp Leu
 100 105 110
 Gly Glu Pro Gly Gly Arg Trp Leu Val Val Leu His Leu Glu Glu Val
 115 120 125
 Thr Trp Glu Pro Thr Pro Leu Leu Arg Phe Gln Glu Pro Pro Pro Gly
 130 135 140
 Gly Ala Ser Pro Pro Glu Leu Ala Leu Leu Val Val Tyr Pro Gly Pro

145	150	155	160
Gly Leu Glu Val Thr	Val Thr Gly Ala Gly	Leu Pro Gly Thr	Gln Ser
	165	170	175
Leu Cys Leu Thr Ala	Asp Ser Asp Phe	Leu Ala Leu Val	Val Asp His
	180	185	190
Pro Glu Gly Ala Trp	Arg Arg Pro Gly	Leu Ala Leu Thr	Leu Arg Arg
	195	200	205
Arg Gly Asn Gly Ala	Leu Leu Ser Thr	Ala Gln Leu Gln	Ala Leu Leu
	210	215	220
Phe Gly Ala Asp Ser	Arg Cys Phe Thr	Arg Lys Thr Pro	Ala Leu Leu
225	230	235	240
Leu Leu Leu Pro Ala	Arg Ser Ser Ala	Pro Met Pro Ala	His Gly Arg
	245	250	255
Leu Asp Leu Val Pro	Phe Pro Gln Pro	Arg Ala Ser Pro	Glu Pro Glu
	260	265	270
Glu Ala Pro Pro Ser	Ala Asp Pro Phe	Leu Glu Thr Leu	Thr Arg Leu
	275	280	285
Val Arg Ala Leu Ala	Gly Pro Pro Ala	Arg Ala Ser Pro	Pro Arg Leu
	290	295	300
Ala Leu Asp Pro Gly	Ala Leu Ala Gly	Phe Pro Gln Gly	Gln Val Asn
305	310	315	320
Leu Ser Asp Pro Ala	Ala Leu Glu Arg	Leu Leu Asp Gly	Glu Glu Pro
	325	330	335
Leu Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Thr Ala	Ala Thr Thr Gly	Val Pro Ala
	340	345	350
Thr Pro Gln Gly Pro	Lys Ser Pro Leu	Trp Ala Ala Gly	Leu Ala Arg
	355	360	365
Arg Val Ala Ala Glu	Leu Gln Ala Val	Ala Ala Glu Leu	Arg Ala Leu
	370	375	380
Pro Gly Leu Pro Pro	Ala Ala Pro Pro	Leu Leu Ala Arg	Leu Leu Ala
385	390	395	400
Leu Cys Pro Gly Asn	Pro Asp Ser Pro	Gly Gly Pro Leu	Arg Ala Leu
	405	410	415
Leu Leu Leu Lys Ala	Leu Gln Gly Leu	Arg Ala Glu Trp	Arg Gly Arg
	420	425	430
Glu Arg Ser Gly Ser	Ala Arg Ala Gln	Arg	
	435	440	
<210>	39		
<211>	270		

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 39

```

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

```

<210> 40
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> polypeptide
 <400> 40
 Leu Leu Arg Pro Gly Thr Pro Arg Glu Glu Val Phe Ser Thr Ser Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Arg Glu Gln Ala Thr Gly Ser Gly Ala Leu Ile Phe Gln Gln
 20 25 30
 Ala Trp Asp Trp Pro Leu Ser Ser Leu Trp Leu Pro Gly Ser Pro Leu
 35 40 45
 Asp Pro Leu Cys Leu Val Thr Leu His Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg
 50 55 60
 Ala Pro Leu Arg Val Val Gly Val Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Ala Phe
 65 70 75 80
 Leu Glu Ala Val Arg Arg Thr His Trp Gly Leu Ser Asp Leu Thr Thr
 85 90 95
 Phe Ala Val Cys Pro Ala Gly Asn Gly Gln Pro Val Leu Pro His Leu
 100 105 110
 Gln Arg Leu Gln Ala Trp Leu Gly Glu Pro Gly Gly Arg Trp Leu Val
 115 120 125
 Val Leu His Leu Glu Glu Val Thr Trp Glu Pro Thr Pro Leu Leu Arg
 130 135 140
 Phe Gln Glu Pro Pro Pro Gly Gly Ala Ser Pro Pro Glu Leu Ala Leu
 145 150 155 160
 Leu Val Val Tyr Pro Gly Pro Gly Leu Glu Val Thr Val Thr Gly Ala
 165 170 175
 Gly Leu Pro Gly Thr Gln Ser Leu Cys Leu Thr Ala Asp Ser Asp Phe
 180 185 190
 Leu Ala Leu Val Val Asp His Pro Glu Gly Ala Trp Arg Arg Pro Gly
 195 200 205
 Leu Ala Leu Thr Leu Arg Arg Arg Gly Asn Gly Ala Leu Leu Ser Thr
 210 215 220
 Ala Gln Leu Gln Ala Leu Leu Phe Gly Ala Asp Ser Arg Cys Phe Thr
 225 230 235 240
 Arg Lys Thr Pro Ala Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ala Arg
 245 250

<210> 41
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> polypeptide
 <400> 41
 Arg Glu Glu Val Phe Ser Thr Ser Ala Leu Pro Arg Glu Gln Ala Thr
 1 5 10 15
 Gly Ser Gly Ala Leu Ile Phe Gln Gln Ala Trp Asp Trp Pro Leu Ser
 20 25 30
 Ser Leu Trp Leu Pro Gly Ser Pro Leu Asp Pro Leu Cys Leu Val Thr
 35 40 45
 Leu His Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Ala Pro Leu Arg Val Val Gly
 50 55 60
 Val Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Ala Phe Leu Glu Ala Val Arg Arg Thr
 65 70 75 80
 His Trp Gly Leu Ser Asp Leu Thr Thr Phe Ala Val Cys Pro Ala Gly
 85 90 95
 Asn Gly Gln Pro Val Leu Pro His Leu Gln Arg Leu Gln Ala Trp Leu
 100 105 110
 Gly Glu Pro Gly Gly Arg Trp Leu Val Val Leu His Leu Glu Glu Val
 115 120 125
 Thr Trp Glu Pro Thr Pro Leu Leu Arg Phe Gln Glu Pro Pro Pro Gly
 130 135 140
 Gly Ala Ser Pro Pro Glu Leu Ala Leu Leu Val Val Tyr Pro Gly Pro
 145 150 155 160
 Gly Leu Glu Val Thr Val Thr Gly Ala Gly Leu Pro Gly Thr Gln Ser
 165 170 175
 Leu Cys Leu Thr Ala Asp Ser Asp Phe Leu Ala Leu Val Val Asp His
 180 185 190
 Pro Glu Gly Ala Trp Arg Arg Pro Gly Leu Ala Leu Thr Leu Arg Arg
 195 200 205
 Arg Gly Asn Gly Ala Leu Leu Ser Thr Ala Gln Leu Gln Ala Leu Leu
 210 215 220
 Phe Gly Ala Asp Ser Arg Cys Phe Thr Arg Lys Thr Pro Ala Leu Leu
 225 230 235 240
 Leu Leu Leu Pro Ala Arg
 245

<210> 42

<211> 170

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 42

```

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

```

<210> 43

<211> 153

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 43

```

Leu Leu Arg Pro Gly Thr Pro Arg Glu Glu Val Phe Ser Thr Ser Ala
1           5           10           15
Leu Pro Arg Glu Gln Ala Thr Gly Ser Gly Ala Leu Ile Phe Gln Gln

```

20	25	30
Ala Trp Asp Trp Pro Leu Ser Ser Leu Trp Leu Pro Gly Ser Pro Leu		
35	40	45
Asp Pro Leu Cys Leu Val Thr Leu His Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg		
50	55	60
Ala Pro Leu Arg Val Val Gly Val Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Ala Phe		
65	70	75
Leu Glu Ala Val Arg Arg Thr His Trp Gly Leu Ser Asp Leu Thr Thr		
85	90	95
Phe Ala Val Cys Pro Ala Gly Asn Gly Gln Pro Val Leu Pro His Leu		
100	105	110
Gln Arg Leu Gln Ala Trp Leu Gly Glu Pro Gly Gly Arg Trp Leu Val		
115	120	125
Val Leu His Leu Glu Glu Val Thr Trp Glu Pro Thr Pro Leu Leu Arg		
130	135	140
Phe Gln Glu Pro Pro Pro Gly Gly Ala		
145	150	
<210> 44		
<211> 146		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> polypeptide		
<400> 44		
Arg Glu Glu Val Phe Ser Thr Ser Ala Leu Pro Arg Glu Gln Ala Thr		
1	5	10
Gly Ser Gly Ala Leu Ile Phe Gln Gln Ala Trp Asp Trp Pro Leu Ser		
20	25	30
Ser Leu Trp Leu Pro Gly Ser Pro Leu Asp Pro Leu Cys Leu Val Thr		
35	40	45
Leu His Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Ala Pro Leu Arg Val Val Gly		
50	55	60
Val Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Ala Phe Leu Glu Ala Val Arg Arg Thr		
65	70	75
His Trp Gly Leu Ser Asp Leu Thr Thr Phe Ala Val Cys Pro Ala Gly		
85	90	95
Asn Gly Gln Pro Val Leu Pro His Leu Gln Arg Leu Gln Ala Trp Leu		
100	105	110
Gly Glu Pro Gly Gly Arg Trp Leu Val Val Leu His Leu Glu Glu Val		

115	120	125
Thr Trp Glu Pro Thr Pro Leu	Leu Arg Phe Gln Glu Pro Pro Pro Gly	
130	135	140
Gly Ala		
145		
<210> 45		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> epitope		
<400> 45		
Val Leu Ala Val Asp Arg Pro Ala Gly Ala Trp Arg		
1	5	10
<210> 46		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> epitope		
<400> 46		
Pro Arg Gly Glu Asp Ser Arg Leu Ser Thr Ala Arg		
1	5	10
<210> 47		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> epitope		
<400> 47		
His Arg Cys Phe Thr Arg Met Thr Pro Ala Leu Leu		
1	5	10
<210> 48		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> epitope		
<400> 48		

Ala Leu Ala Val Asp His Pro Ala Arg Ala Trp Arg

1 5 10

<210> 49

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> epitope

<400> 49

Pro Arg Gly Asp Gly Ala Pro Leu Ser Thr Ala Gln

1 5 10

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> epitope

<400> 50

Pro Arg Cys Phe Thr Arg Met Thr Pro Ala Leu Phe

1 5 10

<210> 51

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> epitope

<400> 51

Val Leu Ala Leu Asp His Pro Val Gly Ala Trp His

1 5 10

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> epitope

<400> 52

Ala Arg Gly Asp Gly Ala Pro Leu Ser Thr Pro Gln

1 5 10

<210> 53

<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 53
Ala Arg Cys Phe Thr Arg Met Thr Pro Ala Leu Leu
1 5 10
<210> 54
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 54
Ala Leu Val Val Asp His Pro Glu Gly Ala Trp Arg
1 5 10
<210> 55
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 55
Arg Arg Gly Asn Gly Ala Leu Leu Ser Thr Ala Gln
1 5 10
<210> 56
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 56
Ser Arg Cys Phe Thr Arg Lys Thr Pro Ala Leu Leu
1 5 10
<210> 57
<211> 196
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 57

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

<210> 58

<211> 199

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 58

Gly Pro Ala Pro Met Pro Ala His Gly Arg Leu Asp Thr Val Pro Phe
 1 5 10 15
 Pro Pro Ala Arg Pro Ser Pro Glu Pro Glu Glu Pro Arg Pro Ser Ala

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

<210> 59

<211> 199

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 59

Gly Pro Thr Ala Val Pro Ala Arg Gly Leu Leu Asp Leu Val Pro Phe		
1	5	10
Pro Pro Pro Arg Pro Ser Arg Glu Pro Ala Glu Pro Pro Pro Ser Ala		
20	25	30
Asp Pro Phe Leu Glu Thr Leu Thr Arg Leu Val Arg Ala Leu Arg Gly		
35	40	45
Pro Pro Thr Pro Ala Ser Pro Pro Arg Leu Ala Leu Asp Pro Gly Ala		
50	55	60
Leu Ala Gly Phe Pro Gln Gly Leu Leu Asn Leu Ser Asp Pro Ala Thr		

65	70	75	80
Gln Glu Arg Leu Leu Gly Gly Glu Glu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro			
	85	90	95
Pro Pro Thr Ala Ala Ala Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Arg Pro Ala			
	100	105	110
Ser Ala Pro Trp Ala Ala Gly Leu Ala Leu Arg Val Ala Ala Glu Leu			
	115	120	125
Arg Ala Ala Ala Ala Glu Leu Arg Gly Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala			
	130	135	140
Ala Ala Pro Leu Leu Glu Arg Leu Leu Ala Leu Cys Pro Gly Gly Ser			
145	150	155	160
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Asp Pro Leu Arg Ala Leu Leu Leu Leu			
	165	170	175
Lys Ala Leu Gln Gly Leu Arg Ala Glu Trp Arg Gly Arg Glu Arg Gly			
	180	185	190
Gly Pro Pro Arg Ala Gln Arg			
	195		
<210> 60			
<211> 196			
<212> PRT			
<213> artificial sequence			
<220>			
<223> polypeptide			
<400> 60			
Ser Ser Ala Pro Met Pro Ala His Gly Arg Leu Asp Leu Val Pro Phe			
1	5	10	15
Pro Gln Pro Arg Ala Ser Pro Glu Pro Glu Glu Ala Pro Pro Ser Ala			
	20	25	30
Asp Pro Phe Leu Glu Thr Leu Thr Arg Leu Val Arg Ala Leu Ala Gly			
	35	40	45
Pro Pro Ala Arg Ala Ser Pro Pro Arg Leu Ala Leu Asp Pro Gly Ala			
	50	55	60
Leu Ala Gly Phe Pro Gln Gly Gln Val Asn Leu Ser Asp Pro Ala Ala			
65	70	75	80
Leu Glu Arg Leu Leu Asp Gly Glu Glu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro			
	85	90	95
Pro Thr Ala Ala Thr Thr Gly Val Pro Ala Thr Pro Gln Gly Pro Lys			
	100	105	110
Ser Pro Leu Trp Ala Ala Gly Leu Ala Arg Arg Val Ala Ala Glu Leu			

115	120	125
Gln Ala Val Ala Ala Glu Leu Arg Ala Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala		
130	135	140
Ala Pro Pro Leu Leu Ala Arg Leu Leu Ala Leu Cys Pro Gly Asn Pro		
145	150	155
Asp Ser Pro Gly Gly Pro Leu Arg Ala Leu Leu Leu Leu Lys Ala Leu		
165	170	175
Gln Gly Leu Arg Ala Glu Trp Arg Gly Arg Glu Arg Ser Gly Ser Ala		
180	185	190
Arg Ala Gln Arg		
195		

<210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> epitope

<400> 61

Leu Pro Ala His Gly Gln Leu Asp Thr Val Pro Phe

1

5

10

<210> 62

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> epitope

<400> 62

Leu Ser Asp Pro Ala Ala Leu Glu Arg Leu Leu Asp

1

5

10

<210> 63

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> epitope

<400> 63

Glu Arg Leu Leu Asp Gly Glu Glu Pro Leu Leu Leu

1

5

10

<210> 64

<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 64
Glu Pro Leu Leu Leu Leu Arg Pro Thr Ala Ala
1 5 10
<210> 65
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 65
Gly Asp Pro Ala Pro Leu His Asp Pro Thr Ser Ala
1 5 10
<210> 66
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 66
Asp Pro Thr Ser Ala Pro Trp Ala Thr Ala Leu Ala
1 5 10
<210> 67
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 67
Leu Lys Ala Leu Gln Gly Leu Arg Val Glu Trp Arg
1 5 10
<210> 68
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> epitope
<400> 68
Arg Val Glu Trp Arg Gly Arg Asp Pro Arg Gly Pro
1 5 10
<210> 69
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 69
Met Pro Ala His Gly Arg Leu Asp Thr Val Pro Phe
1 5 10
<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 70
Glu Pro Leu Leu Leu Leu Pro Pro Thr Ala Ala
1 5 10
<210> 71
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 71
Gly Asp Pro Ala Pro Leu Pro Asp Pro Ala Ser Ala
1 5 10
<210> 72
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 72

Asp Pro Ala Ser Ala Pro Trp Ala Ala Gly Leu Ala

1 5 10

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> epitope

<400> 73

Leu Lys Ala Leu Gln Gly Leu Arg Ala Glu Trp Arg

1 5 10

<210> 74

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> epitope

<400> 74

Arg Ala Glu Trp Arg Gly Arg Glu Arg Ser Gly Pro

1 5 10

<210> 75

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> epitope

<400> 75

Val Pro Ala Arg Gly Leu Leu Asp Leu Val Pro Phe

1 5 10

<210> 76

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> epitope

<400> 76

Leu Ser Asp Pro Ala Thr Gln Glu Arg Leu Leu Gly

1 5 10

<210> 77

<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 77
Glu Arg Leu Leu Gly Gly Glu Glu Pro Leu Leu Leu
1 5 10
<210> 78
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 78
Glu Pro Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Thr Ala Ala
1 5 10
<210> 79
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 79
Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Arg Pro Ala Ser Ala
1 5 10
<210> 80
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 80
Arg Pro Ala Ser Ala Pro Trp Ala Ala Gly Leu Ala
1 5 10
<210> 81
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> epitope
<400> 81
Arg Ala Glu Trp Arg Gly Arg Glu Arg Gly Gly Pro
1 5 10
<210> 82
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 82
Met Pro Ala His Gly Arg Leu Asp Leu Val Pro Phe
1 5 10
<210> 83
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 83
Gly Val Pro Ala Thr Pro Gln Gly Pro Lys Ser Pro
1 5 10
<210> 84
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 84
Gly Pro Lys Ser Pro Leu Trp Ala Ala Gly Leu Ala
1 5 10
<210> 85
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> epitope
<400> 85

Arg Ala Glu Trp Arg Gly Arg Glu Arg Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 86

<211> 468

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> polynucleotide

<400> 86

```
atgcgggacc tgcccctgac aagcctggct ctggtgctgt ctgctctggg agccctcctg 60
ggaacagaag ccctgagagc cgaagaacct gccgtgggca catccggcct gatcttcaga 120
gaggacctgg actggcctcc cggcagccct caggaacctc tctgtctggt cgctctgggc 180
ggcgacagca atggctctag cagccctctg agagtcgtgg gcgccctgtc tgcctacgag 240
caggcttttc tgggagccgt gcagagggt agatggggcc ctagagatct ggccaccttc 300
ggcgtgtgca acaccggcga tagacaggcc gctctgccc gcctgagaag gctgggagct 360
tggctgagag atcctggcgg ccagagactg gtggtgctgc acctggaaga agtgacctgg 420
gagcctaccc ctagcctgcg gtttcaggaa ccacctcctg gcggagcc 468
```

<210> 87

<211> 765

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> polynucleotide

<400> 87

```
atgcgggacc tgcccctgac aagcctggct ctggtgctgt ctgctctggg agccctcctg 60
ggaacagaag ccctgagagc cgaagaacct gccgtgggca catccggcct gatcttcaga 120
gaggacctgg actggcctcc cggcagccct caggaacctc tctgtctggt cgctctgggc 180
ggcgacagca atggctctag cagccctctg agagtcgtgg gcgccctgtc tgcctacgag 240
caggcttttc tgggagccgt gcagagggt agatggggcc ctagagatct ggccaccttc 300
ggcgtgtgca acaccggcga tagacaggcc gctctgccc gcctgagaag gctgggagct 360
tggctgagag atcctggcgg ccagagactg gtggtgctgc acctggaaga agtgacctgg 420
gagcctaccc ctagcctgcg gtttcaggaa ccacctcctg gcggagccgg acctcctgaa 480
ctggctctgc tggtcctgta tcttggccct ggccccgaag tgaccgtgac aagagctgga 540
ctgcctggcg ccagtcctt gtgccctagc agagacacca gatacctggt gctggccgtg 600
gacagacctg ccggcgcttg gagaggaagt ggcctggcac tgacctgca gcccagaggc 660
gaggatagca gactgagcac cgccagactg caggccctgc tgtttggcga cgaccaccgg 720
tgcttcacca gaatgacccc tgccctgctg ctgctcccca gatct 765
```

<210> 88

<211> 1353

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> polynucleotide

<400> 88

```
atgcgggacc tgccctgac aagcctggct ctggtgctgt ctgctctggg agccctcctg 60
ggaacagaag ccctgagagc cgaagaacct gccgtgggca catccggcct gatcttcaga 120
gaggacctgg actggcctcc cggcagccct caggaacctc tctgtctggt cgctctgggc 180
ggcgacagca atggctctag cagccctctg agagtcgtgg gcgccctgtc tgcctacgag 240
caggcttttc tgggagccgt gcagagggt agatggggcc ctagagatct ggccaccttc 300
ggcgtgtgca acaccggcga tagacaggcc gctctgccc gcctgagaag gctgggagct 360
tggtctgagag atcctggcgg ccagagactg gtggtgctgc acctggaaga agtgacctgg 420
gagcctaccc ctagcctgcg gtttcaggaa ccacctctg gcggagccgg acctcctgaa 480
ctggctctgc tggctcctgta tcctggccct ggccccgaag tgaccgtgac aagagctgga 540
ctgcctggcg ccagtcctt gtgccctagc agagacacca gatacctggt gctggccctg 600
gacagacctg ccggcgcttg gagaggaagt ggcctggcac tgaccctgca gccagaggc 660
gaggatagca gactgagcac cgccagactg caggccctgc tgtttggcga cgaccaccgg 720
tgcttcacca gaatgacccc tgccctgctg ctgctcccca gatctgaacc tgctcctctg 780
cctgcccacg gacagctgga taccgtgcct ttcccaccac ctagaccag cgccgagctg 840
gaagagtctc ctccctagcg cgaccccttc ctggaaacct tgactagact cgtgcgggcc 900
ctgagggtgc caccagctag agcatctgcc ctagactgg cactggatcc cgatgccctg 960
gccggctttc ctcagggact cgtgaacctg tctgaccag ccgctctgga aagactgctg 1020
gacggcgaag aaccactcct cctgctgctc agacctaccg ccgccacaac aggcgatcct 1080
gccccctctg atgatccac atctgctcca tgggccaccg ccctggctag aagagtggct 1140
gctgaactgc aggctgccgc cgctgagctg agatctctgc caggactgcc tcctgccaca 1200
gccccactgc tggctagact gctcgtctg tgtccaggcg gacctggcgg actgggagat 1260
ccactgagag cactgctgct cctcaaggcc ctccagggcc tcagggtcga atggcgggga 1320
agagatccta gaggcccagg cagagcccag aga 1353
```

<210> 89

<211> 1679

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> polynucleotide

<400> 89

```
atgcgggacc tgccctgac aagcctggct ctggtgctgt ctgctctggg agccctcctg 60
ggaacagaag ccctgagagc cgaagaacct gccgtgggca catccggcct gatcttcaga 120
gaggacctgg actggcctcc cggcagccct caggaacctc tctgtctggt cgctctgggc 180
ggcgacagca atggctctag cagccctctg agagtcgtgg gcgccctgtc tgcctacgag 240
```

caggcttttc tgggagccgt gcagagggct agatggggcc ctagagatct ggccaccttc 300
 ggcgtgtgca acaccggcga tagacaggcc gctctgcca gcctgagaag gctgggagct 360
 tggctgagag atcctggcgg ccagagactg gtggtgctgc acctggaaga agtgacctgg 420
 gagcctaccc ctagcctgcg gtttcaggaa ccacctcctg gcggagccgg acctcctgaa 480
 ctggctctgc tggctcctgta tcctggccct ggccccgaag tgaccgtgac aagagctgga 540
 ctgcctggcg ccagtcctt gtgccctagc agagacacca gatacctggg gctggccgtg 600
 gacagacctg ccggcgcttg gagaggaagt ggctggcac tgaccctgca gccagaggc 660
 gaggatagca gactgagcac cgccagactg caggccctgc tgtttggcga cgaccaccgg 720
 tgcttcacca gaatgacccc tgccctgctg ctgctcccca gatctgaacc tgctcctctg 780
 cctgcccacg gacagctgga tacctgacct ttcccaccac ctagaccag cgccgagctg 840
 gaagagtctc ctctagcgc cgaccccttc ctggaaacct tgactagact cgtgcggggc 900
 ctgagggtgc caccagctag agcatctgcc ctagactgg cactggatcc cgatgccctg 960
 gccggctttc ctgagggact cgtgaacctg tctgaccag ccgctctgga aagactgctg 1020
 gacggcgaag aaccactcct cctgctgctc agacctaccg ccgccacaac aggcgatcct 1080
 gcccctctgc atgatccac atctgctcca tgggccaccg ccctggctag aagagtggct 1140
 gctgaactgc aggctgccgc cgctgagctg agatctctgc caggactgcc tcctgccaca 1200
 gcccactgc tggctagact gctcgtctg tgtccaggcg gacctggcgg actgggagat 1260
 ccactgagag cactgctgct cctcaaggcc ctccagggcc tcagggtcga atggcgggga 1320
 agagatccta gaggcccagg cagagcccag agaagcgtg gcgctacagc tgccgatgga 1380
 ccttgcgctc tgcgggaact gagcgtggac ctgagggccg agagaagcgt cctgatcccc 1440
 gagacatacc aggccaacaa ctgccagggc gtgtgcggct ggccctcagag cgacagaaac 1500
 ccagatacgc gcaatcacgt ggtgctgctg ctgaagatgc aagtccgagg cgccgctctg 1560
 gcaagacctc cttgttgtgt gcctaccgcc tacgccgga agctgctgat ctccctgagc 1620
 gaggaacgga tagcggccac cacgtgcca acatggtggc cacagagtgc ggctgccgg 1679

<210> 90

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 90

Met Arg Asp Leu Pro Leu Thr Ser Leu Ala Leu Val

1

5

10

<210> 91

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 91

Ser Leu Ala Leu Val Leu Ser Ala Leu Gly Ala Leu

1 5 10

<210> 92

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 92

Ala Leu Gly Ala Leu Leu Gly Thr Glu Ala Leu Arg

1 5 10

<210> 93

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 93

Thr Glu Ala Leu Arg Ala Glu Glu Pro Ala Val Gly

1 5 10

<210> 94

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 94

Glu Pro Ala Val Gly Thr Ser Gly Leu Ile Phe Arg

1 5 10

<210> 95

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 95

Gly Leu Ile Phe Arg Glu Asp Leu Asp Trp Pro Pro

1 5 10

<210> 96
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 96
Leu Asp Trp Pro Pro Gly Ser Pro Gln Glu Pro Leu
1 5 10
<210> 97
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 97
Pro Gln Glu Pro Leu Cys Leu Val Ala Leu Gly Gly
1 5 10
<210> 98
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 98
Val Ala Leu Gly Gly Asp Ser Asn Gly Ser Ser Ser
1 5 10
<210> 99
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 99
Asn Gly Ser Ser Ser Pro Leu Arg Val Val Gly Ala
1 5 10
<210> 100
<211> 12
<212> PRT

<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 100
Arg Val Val Gly Ala Leu Ser Ala Tyr Glu Gln Ala
1 5 10
<210> 101
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 101
Ala Tyr Glu Gln Ala Phe Leu Gly Ala Val Gln Arg
1 5 10
<210> 102
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 102
Gly Ala Val Gln Arg Ala Arg Trp Gly Pro Arg Asp
1 5 10
<210> 103
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 103
Trp Gly Pro Arg Asp Leu Ala Thr Phe Gly Val Cys
1 5 10
<210> 104
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide

<400> 104

Thr Phe Gly Val Cys Asn Thr Gly Asp Arg Gln Ala

1 5 10

<210> 105

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 105

Gly Asp Arg Gln Ala Ala Leu Pro Ser Leu Arg Arg

1 5 10

<210> 106

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 106

Pro Ser Leu Arg Arg Leu Gly Ala Trp Leu Arg Asp

1 5 10

<210> 107

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 107

Ala Trp Leu Arg Asp Pro Gly Gly Gln Arg Leu Val

1 5 10

<210> 108

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 108

Gly Gln Arg Leu Val Val Leu His Leu Glu Glu Val

1 5 10

<210> 109
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 109
His Leu Glu Glu Val Thr Trp Glu Pro Thr Pro Ser
1 5 10
<210> 110
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 110
Glu Pro Thr Pro Ser Leu Arg Phe Gln Glu Pro Pro
1 5 10
<210> 111
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 111
Phe Gln Glu Pro Pro Pro Gly Gly Ala Gly Pro Pro
1 5 10
<210> 112
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 112
Gly Ala Gly Pro Pro Glu Leu Ala Leu Leu Val Leu
1 5 10
<210> 113
<211> 12
<212> PRT

<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 113
Ala Leu Leu Val Leu Tyr Pro Gly Pro Gly Pro Glu
1 5 10
<210> 114
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 114
Gly Pro Gly Pro Glu Val Thr Val Thr Arg Ala Gly
1 5 10
<210> 115
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 115
Val Thr Arg Ala Gly Leu Pro Gly Ala Gln Ser Leu
1 5 10
<210> 116
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 116
Gly Ala Gln Ser Leu Cys Pro Ser Arg Asp Thr Arg
1 5 10
<210> 117
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide

<400> 117

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

1 5 10

<210> 118

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 118

Ala Gly Ala Trp Arg Gly Ser Gly Leu Ala Leu Thr

1 5 10

<210> 119

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 119

Gly Leu Ala Leu Thr Leu Gln Pro Arg Gly Glu Asp

1 5 10

<210> 120

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 120

Leu Ser Thr Ala Arg Leu Gln Ala Leu Leu Phe Gly

1 5 10

<210> 121

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 121

Ala Leu Leu Phe Gly Asp Asp His Arg Cys Phe Thr

1 5 10

<210> 122

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 122

Thr Pro Ala Leu Leu Leu Leu Pro Arg Ser Glu Pro

1 5 10

<210> 123

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 123

Pro Arg Ser Glu Pro Ala Pro Leu Pro Ala His Gly

1 5 10

<210> 124

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 124

Asp Thr Val Pro Phe Pro Pro Pro Arg Pro Ser Ala

1 5 10

<210> 125

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 125

Pro Arg Pro Ser Ala Glu Leu Glu Glu Ser Pro Pro

1 5 10

<210> 126

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 126
Glu Glu Ser Pro Pro Ser Ala Asp Pro Phe Leu Glu
1 5 10
<210> 127
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 127
Asp Pro Phe Leu Glu Thr Leu Thr Arg Leu Val Arg
1 5 10
<210> 128
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 128
Thr Arg Leu Val Arg Ala Leu Arg Val Pro Pro Ala
1 5 10
<210> 129
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 129
Arg Val Pro Pro Ala Arg Ala Ser Ala Pro Arg Leu
1 5 10
<210> 130
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide

<400> 130

Ser Ala Pro Arg Leu Ala Leu Asp Pro Asp Ala Leu

1 5 10

<210> 131

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 131

Asp Pro Asp Ala Leu Ala Gly Phe Pro Gln Gly Leu

1 5 10

<210> 132

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 132

Phe Pro Gln Gly Leu Val Asn Leu Ser Asp Pro Ala

1 5 10

<210> 133

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 133

Arg Pro Thr Ala Ala Thr Thr Gly Asp Pro Ala Pro

1 5 10

<210> 134

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 134

Ala Thr Ala Leu Ala Arg Arg Val Ala Ala Glu Leu

1 5 10

<210> 135
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 135
Val Ala Ala Glu Leu Gln Ala Ala Ala Glu Leu
1 5 10
<210> 136
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 136
Ala Ala Ala Glu Leu Arg Ser Leu Pro Gly Leu Pro
1 5 10
<210> 137
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 137
Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Thr Ala Pro Leu Leu
1 5 10
<210> 138
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 138
Thr Ala Pro Leu Leu Ala Arg Leu Leu Ala Leu Cys
1 5 10
<210> 139
<211> 12
<212> PRT

<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 139
Leu Leu Ala Leu Cys Pro Gly Gly Pro Gly Gly Leu
1 5 10
<210> 140
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 140
Gly Pro Gly Gly Leu Gly Asp Pro Leu Arg Ala Leu
1 5 10
<210> 141
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 141
Pro Leu Arg Ala Leu Leu Leu Leu Lys Ala Leu Gln
1 5 10
<210> 142
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 142
Asp Pro Arg Gly Pro Gly Arg Ala Gln Arg Ser Ala
1 5 10
<210> 143
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide

<400> 143

Ala Gln Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Ala Asp Gly

1 5 10

<210> 144

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 144

Thr Ala Ala Asp Gly Pro Cys Ala Leu Arg Glu Leu

1 5 10

<210> 145

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 145

Ala Leu Arg Glu Leu Ser Val Asp Leu Arg Ala Glu

1 5 10

<210> 146

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 146

Asp Leu Arg Ala Glu Arg Ser Val Leu Ile Pro Glu

1 5 10

<210> 147

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 147

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

1 5 10

<210> 148

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 148

Gln Ala Asn Asn Cys Gln Gly Val Cys Gly Trp Pro

1 5 10

<210> 149

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 149

Val Cys Gly Trp Pro Gln Ser Asp Arg Asn Pro Arg

1 5 10

<210> 150

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 150

Asp Arg Asn Pro Arg Tyr Gly Asn His Val Val Leu

1 5 10

<210> 151

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 151

Asn His Val Val Leu Leu Lys Met Gln Val Arg

1 5 10

<210> 152

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 152
Lys Met Gln Val Arg Gly Ala Ala Leu Ala Arg Pro
1 5 10
<210> 153
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 153
Ala Leu Ala Arg Pro Pro Cys Cys Val Pro Thr Ala
1 5 10
<210> 154
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 154
Cys Val Pro Thr Ala Tyr Ala Gly Lys Leu Leu Ile
1 5 10
<210> 155
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide
<400> 155
Gly Lys Leu Leu Ile Ser Leu Ser Glu Glu Arg Ile
1 5 10
<210> 156
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> peptide

<400> 156

Ser Glu Glu Arg Ile Ser Ala His His Val Pro Asn

1 5 10

<210> 157

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 157

His His Val Pro Asn Met Val Ala Thr Glu Cys Gly

1 5 10

<210> 158

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 158

Val Pro Asn Met Val Ala Thr Glu Cys Gly Cys Arg

1 5 10

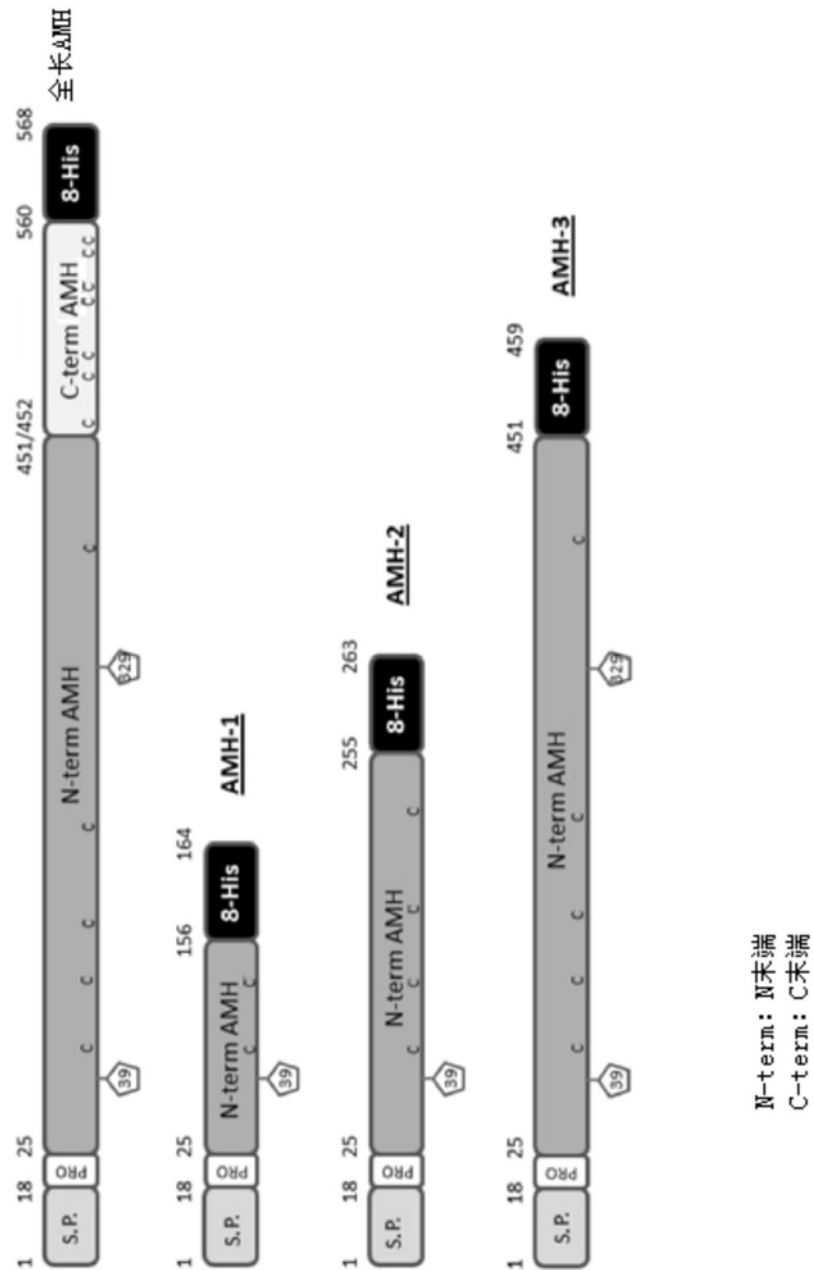


图1

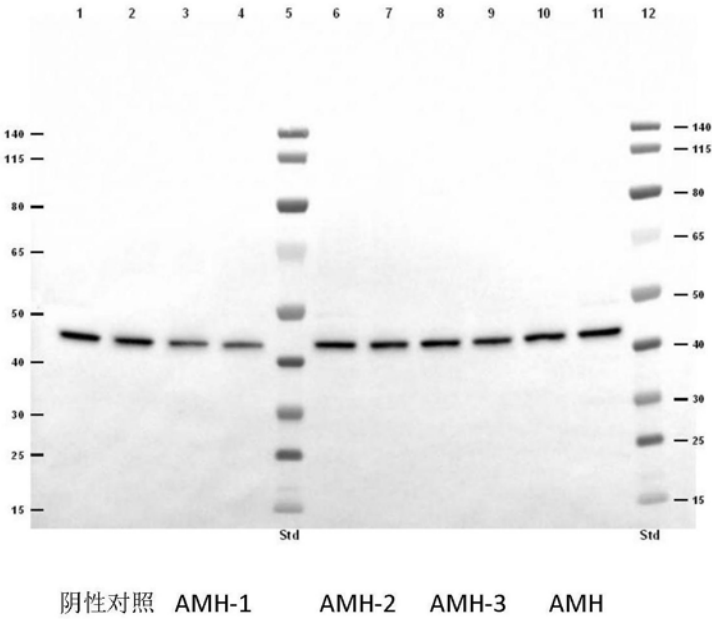


图 2A

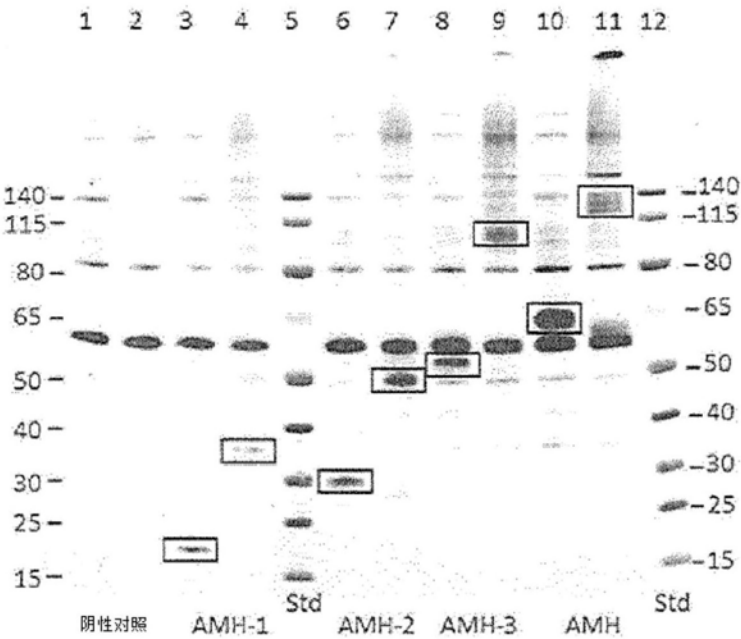


图 2B

图2

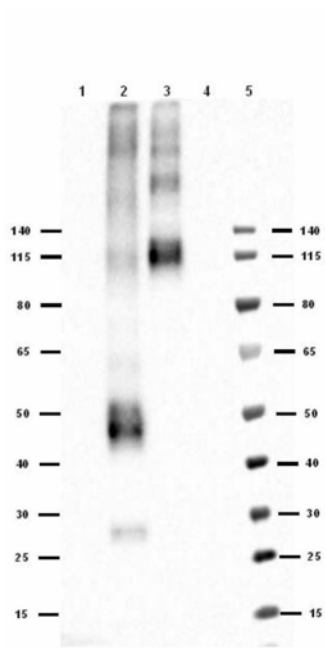


图 3A

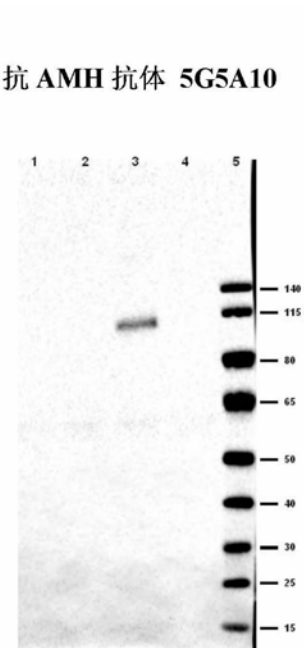


图 3B

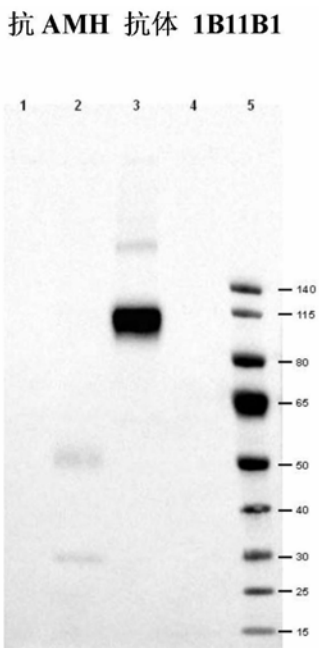


图 3C

1- 阴性对照
2- AMH 2
3- AMH 3
5- 分子量标准

抗 AMH 抗体 4G10E12

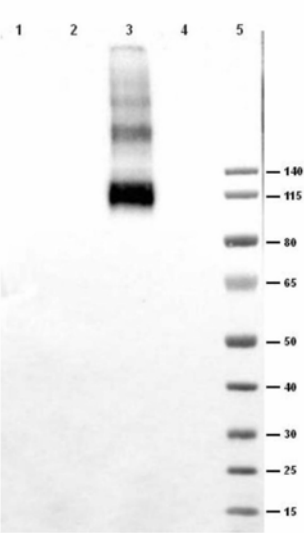


图 3D

抗 AMH 抗体 3H8E2

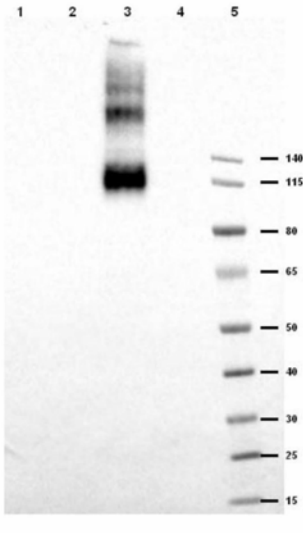


图 3E

图3

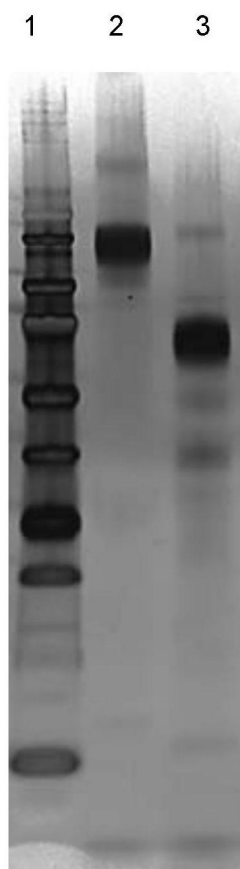


图4

专利名称(译)	用于制备抗-AMH抗体的方法及其用途		
公开(公告)号	CN109563163A	公开(公告)日	2019-04-02
申请号	CN201780049802.3	申请日	2017-06-16
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
[标]发明人	Y阿塔曼 厄纳尔 S舍克勒 S达尼埃尔		
发明人	Y·阿塔曼-厄纳尔 S·舍克勒 M·孔布 S·达尼埃尔 S·奥托内		
IPC分类号	C07K16/26 G01N33/53		
代理人(译)	区斌		
优先权	2016175041 2016-06-17 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于制备抗哺乳动物AMH抗体的方法，其包括以下步骤：(i)用AMH多肽或编码该AMH多肽的多核苷酸免疫动物，所述AMH多肽包含序列SEQ ID No.1或者与所述序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列的至少99个氨基酸，和序列SEQ ID No.2或者与所述序列SEQ ID No.2具有至少75%相同性的序列的至多560个氨基酸，(ii)从已接受所述免疫原的所述动物的淋巴器官的细胞制备杂交瘤，(iii)选择分泌抗体的杂交瘤，所述抗体识别包含序列SEQ ID No.1或与所述序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列的至少99个氨基酸，和序列SEQ ID No.8或与所述序列SEQ ID No.8具有至少75%相同性的序列的至多255个氨基酸的AMH多肽，但是所述抗体既不识别(a)包含序列SEQ ID No.13或者与所述序列SEQ ID No.13具有至少75%相同性的序列的至少131个氨基酸，和序列SEQ ID No.11或者与所述序列SEQ ID No.11具有至少75%相同性的序列的至多156个氨基酸的AMH多肽，也不识别(b)位于所述序列SEQ ID No.1或与所述序列SEQ ID No.1具有至少75%相同性的序列中的任何线性表位，以及(iv)产生所述抗体。

	人/类	马	犬	牛
AMH前区的中间部分	157-255 (SEQ ID N°1)	167-265 (SEQ ID N°14)	166-264 (SEQ ID N°23)	171-270 (SEQ ID N°32)
完全AMH	1-560 (SEQ ID N°2)	1-573 (SEQ ID N°15)	1-572 (SEQ ID N°24)	1-575 (SEQ ID N°33)
没有信号肽的完全AMH	19-560 (SEQ ID N°3)	23-573 (SEQ ID N°16)	22-572 (SEQ ID N°25)	18-575 (SEQ ID N°34)
没有信号肽或前体部分的完全AMH	26-560 (SEQ ID N°4)	NA	NA	25-575 (SEQ ID N°35)
完全AMH-3	1-451 (SEQ ID N°5)	1-464 (SEQ ID N°17)	1-463 (SEQ ID N°26)	1-466 (SEQ ID N°36)
没有信号肽的完全AMH-3	19-451 (SEQ ID N°6)	23-464 (SEQ ID N°18)	22-463 (SEQ ID N°27)	18-466 (SEQ ID N°37)
没有信号肽或前体部分的完全AMH-3	26-451 (SEQ ID N°7)	NA	NA	25-466 (SEQ ID N°38)
完全AMH-2	1-255 (SEQ ID N°8)	1-265 (SEQ ID N°19)	1-264 (SEQ ID N°28)	1-270 (SEQ ID N°39)
没有信号肽的AMH-2	19-255 (SEQ ID N°9)	23-265 (SEQ ID N°20)	22-264 (SEQ ID N°29)	18-270 (SEQ ID N°40)
没有信号肽或前体部分的完全AMH-2	26-255 (SEQ ID N°10)	NA	NA	25-270 (SEQ ID N°41)