

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：97139094

※ 申請日期：97.10.9

※IPC 分類：A61K39/395

C12N15/09

C12N15/13

C07K16/28

A61P19/10

(2006.01)

(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

骨硬化素(SCLEROSTIN)抗體組合物及使用方法

COMPOSITIONS AND METHODS OF USE FOR ANTIBODIES

AGAINST SCLEROSTIN

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士商諾華公司

NOVARTIS AG

代表人：(中文/英文)

1. 美樂蒂 K 戴斯
DICE, MELODI K.

2. 艾莉莎 A 哈賓
HARBIN, ALISA A.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士巴塞爾市利曲街35號

LICHTSTRASSE 35, 4056 BASEL, SWITZERLAND

國 籍：(中文/英文)

瑞士 SWITZERLAND

三、發明人：(共 5 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 蜜雪拉 克耐塞爾
KNEISSEL, MICHAELA
2. 克利斯汀 哈勞克斯
HALLEUX, CHRISTINE
3. 秀-義 胡
HU, SHOU-IH
4. 畢特 狄芬貝克-史崔柏
DIEFENBACH-STREIBER, BEATE
5. 喬瑟夫 佩斯勒
PRASSLER, JOSEF

國 籍：(中文/英文)

1. 奧地利 AUSTRIA
2. 比利時 BELGIUM
3. 美國 U.S.A.
4. 德國 GERMANY
5. 德國 GERMANY

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2007年10月12日；07118414.7
2. 歐洲專利機構；2008年02月25日；08151911.8
3. 歐洲專利機構；2008年07月29日；08161342.4

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

- 1.
- 2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於骨硬化素抗體及該等抗體之組合物及治療由骨硬化素所介導之病理學病症或與骨異常相關之疾病(諸如骨質疏鬆症)的使用方法。

【先前技術】

SOST基因編碼蛋白質骨硬化素，骨硬化素為含有213個胺基酸之分泌糖蛋白。骨硬化素為含胱胺酸結因子超家族之成員。骨硬化素與DAN/Cerberus蛋白家族有關，其藉由抑制BMP與受體結合而直接干擾BMP信號傳輸且由此干擾BMP信號傳輸級聯(Avsian-Kretchmer, Mol Endocrinol 2004, 18 (1):1-12)。

對於成人，主要在骨及腎臟中偵測到骨硬化素mRNA表現。骨硬化素蛋白主要可在骨中偵測到。在骨中，其表現限於成熟及分化末期之骨形成細胞，即骨細胞。

骨硬化素為人類及小鼠骨形成之有效負調控子。缺乏SOST表現導致骨硬化症(Balemans等人。Hum Mol Genet., 2001, 10(5):537-43；Brunkow等人。Am J Hum Genet, 2001, 68(3):577-89)。患者遭受終生骨增生，導致骨礦物密度及強度增加。其不展示其他內分泌異常，其一生中所經歷之所有併發症均與異常骨積累有關。該隱性病之雜合攜帶者亦展示骨質量增加(Gardner等人。J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90 (12):6392-5)。該表型可在缺乏SOST之小鼠中再現，且其過度表現導致骨質減少。此

外，Van Buchem病[MIM 239100](骨硬化症之表型相似疾病)係由遠距骨增強子之基因組缺失所致之SOST誤調節引起(Balemans等人。J Med Gene, 2002, 39(2):91-7；Loots等人，Genome Res, 2005, 15(7):928-35)。最後，在骨形成期間，SOST由副甲狀腺素下調(臨床上驗證之骨形成原理)表明PTH之合成代謝作用之一部分可能係經由SOST介導(Keller及Kneissel Bone, 2005, 37(2):148-58)。

骨硬化素結合BMP(骨成型蛋白)且可充當活體外BMP拮抗劑(Winkler等人，EMBO J., 2003, 22 (23):6267-76)。骨硬化素亦充當經典Wnt信號傳輸之負調控子，直接藉由與LRP5/LRP6結合(Li等人，J Biol Chem., 2005, 280(20)；Semenov, J Biol Chem. 2006年10月19日；van Bezooijen等人，J Bone Miner Res, 2006年10月10日)或經由間接方式(Winkler等人，J Biol Chem., 2005, 280(4):2498-502)。

缺乏骨硬化素表現使得骨大量形成，但不干擾骨再吸收(骨硬化症、Van Buchem病)(Balemans等人。2001；Brunkow等人。Am J Hum Genet, 2001, 68(3):577-89；Balemans等人。2006；Loots等人，Genome Res, 2005, 15(7):928-35)。

目前可利用之對於骨骼病症之治療中很少會增加成人之骨密度，且目前可利用之治療中大多數主要藉由抑制進一步骨再吸收而非刺激新的骨形成來發揮作用。

用於治療骨質流失之藥劑之一實例為雌激素。然而，尚

未明確雌激素是否具有某些有利的長期作用。此外，雌激素可能帶來增加多種類型之腫瘤(諸如乳房及子宮內膜癌)之發病率的風險。骨質疏鬆症之其他當前療法包括雙膦酸鹽(例如 Fosamax™、Actonel™、Bonviva™, Zometa™、奧帕膦酸鹽(olpadronate)、奈立膦酸鹽(neridronate)、替魯膦酸鈉(skelid)、骨膦(bonefos))、副甲狀腺素、鈣阻滯劑、擬鈣劑(calcimimetic)(例如西那卡塞(cinacalcet))、士他汀(statin)、合成代謝類固醇、鋁鹽及鋇鹽及氟化鈉。然而該等療法通常伴有不適宜之副作用。

【發明內容】

在本文中，本發明之一實施例提供一種針對骨硬化素多肽(SEQ ID NO:155)中之標靶之抗體或包含該抗體之抗原結合部分的功能蛋白，其特徵在於該抗體或功能蛋白與骨硬化素多肽特異性結合且可增加哺乳動物中骨形成、骨礦物密度、骨礦物含量、骨質量、骨品質及骨強度中之至少一者。

在一實施例中，本發明之抗體具有逆轉骨硬化素抑制活體外骨礦化之能力。在一相關實施例中，其具有逆轉骨硬化素抑制 wnt-1 介導之信號傳輸路徑之能力。在另一相關實施例中，其破壞骨硬化素 LRP6 結合且可阻斷高劑量骨硬化素對 BMP 誘導之 Smad1 磷酸化之抑制作用。在另一實施例中，本發明之抗體與 SEQ ID NO:155 之胺基酸 112 與 126 之間(包括胺基酸 112 與 126)的骨硬化素區域(亦即該區域由 SEQ ID NO:155 之胺基酸 112 至 126 組成)及/或 SEQ ID

NO:155之胺基酸160-174(包括160與174)之間的區域(亦即該區域由SEQ ID NO:155之胺基酸160至174組成)結合，且更特定言之，其與包含ARLLPNAIGRGKWWR(SEQ ID NO 156)與RLVASCKCKRLTRFH(SEQ ID NO 157)二者之區域結合。

骨硬化素抑制 HEK293 細胞中 wnt1 介導之 STF (Supertopflash，經典 wnt 信號傳輸之報導體讀出結果) 活化。在一些實施例中，本發明之抗體以高度可再現方式恢復 wnt 信號傳輸報導體讀出結果。

已展示所觀察到的本發明之抗體對非成骨細胞之 Wnt 信號傳輸報導體檢定中骨硬化素作用的抑制作用體現為由於活體內骨硬化素抑制而誘導骨形成反應。實際上，老齡齧齒動物之活體內實驗展示本發明之抗體促進較強骨合成代謝。骨質量增量達至每日以極高合成代謝劑量之副甲狀腺素(其用作陽性對照)間歇治療的作用水準。

因此，根據另一較佳實施例，本發明之抗體對骨硬化素具有在低 pM 範圍內之親和力且以約 10 nM 之 IC_{50} 值抑制骨硬化素對 wnt 信號傳輸之影響。

更佳地，在另一較佳實施例中，本發明之抗體與包含在 SEQ ID NO:155 之胺基酸 112 與 126 (包括胺基酸 112 與 126) 之間的骨硬化素區域(亦即該區域由 SEQ ID NO:155 之胺基酸 112 至 126 組成)及包含在 SEQ ID NO:155 之胺基酸 160 與 174 (包括胺基酸 160 與 174) 之間的骨硬化素區域(亦即該區域由 SEQ ID NO:155 之胺基酸 160 至 174 組成)結合，且更特

定言之與分別覆蓋至少以下肽ARLLPNAIGRGKWWR(SEQ ID NO:156)及RLVASCKCKRLTRFH(SEQ ID NO:157)之區域結合，且對骨硬化素具有在低pM範圍內之親和力且以約10 nM之IC₅₀值抑制骨硬化素對wnt信號傳輸之影響。該等抗體具有以每日以極高合成代謝劑量之副甲狀腺素皮下治療(陽性對照)之作用水準增加小鼠動物模型之主軸骨骼及附肢骨骼中骨質量的能力，且因此適用於治療與骨異常相關之疾病(諸如骨質疏鬆症)。

其他實施例包括包含本發明之抗體與治療骨質疏鬆症之替代性療法(諸如雙膦酸鹽、副甲狀腺素、副甲狀腺素釋放劑(鈣阻滯劑)、LRP4中和抗體及DKK-1中和抗體)之組合的組合物。

【實施方式】

本發明係關於經分離抗體，尤其人類抗體，其與骨硬化素特異性結合且抑制骨硬化素之功能特性。在某些實施例中，本發明之抗體來源於特定重鏈及輕鏈序列且/或包含特定結構特徵，諸如包含特定胺基酸序列之CDR區。本發明提供經分離抗體，製備該等抗體之方法，包含該等抗體之免疫結合物及多價或多特異性分子，及含有本發明之抗體、免疫結合物或雙特異性分子之醫藥組合物。本發明亦係關於使用該等抗體抑制與骨硬化素表現之存在相關之病症或病狀的方法，例如用於治療由骨硬化素所介導或與骨硬化素含量增加相關之病理學病症；例如骨相關疾病，諸如骨質疏鬆症。

為使本發明可更易於理解，首先定義某些術語。其他定義將貫穿整個實施方式進行闡述。

術語"包含"涵蓋"包括"以及"由……組成"，例如"包含"X之組合物可能僅由X組成或可能包括其他某物，例如X+Y。

與數值x有關之術語"約"意謂(例如) $x \pm 10\%$ 。

詞語"大體上"不排除"完全"，例如"大體上不含"Y之組合物可能完全不含Y。若需要，本發明之定義可省略詞語"大體上"。

術語"免疫反應"係指例如淋巴細胞、抗原呈現細胞、吞噬細胞、粒細胞及由以上細胞或肝臟產生之可溶性巨分子(包括抗體、細胞激素及補體)對侵襲性病原體、受病原體感染之細胞或組織、癌細胞或在自體免疫或病理性炎症的狀況下正常人類細胞或組織產生選擇性損害、破壞或使其自人體消除的作用。

術語骨硬化素係指如以SEQ ID NO:155定義之人類骨硬化素。重組人類骨硬化素可由R&D Systems(Minneapolis, MN, USA; 2006目錄號1406-ST-025)獲得。此外，重組小鼠骨硬化素/SOST可購自R&D Systems(Minneapolis, MN, USA; 2006目錄號1589-ST-025)。美國專利第6,395,511號及第6,803,453號及美國專利公開案20040009535及20050106683一般性提及抗骨硬化素抗體。

如本文中所提及之術語"抗體"包括完整抗體及其任何抗原結合片段(亦即"抗原結合部分")或單鏈。天然存在之"抗

體"為包含經二硫鍵相互連接之至少兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈的醣蛋白。各重鏈由重鏈可變區(本文中縮寫為 V_H)及重鏈恆定區組成。重鏈恆定區由3個域($CH1$ 、 $CH2$ 及 $CH3$)組成。各輕鏈由輕鏈可變區(本文中縮寫為 V_L)及輕鏈恆定區組成。該輕鏈恆定區由一個域 CL 組成。 V_H 及 V_L 區可進一步再分為高變區(稱為互補決定區(CDR))，其與更保守之稱為構架區(FR)之區域交替。各 V_H 及 V_L 由自胺基末端至羧基末端按以下順序排列的三個CDR及四個FR組成： $FR1$ 、 $CDR1$ 、 $FR2$ 、 $CDR2$ 、 $FR3$ 、 $CDR3$ 、 $FR4$ 。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用的結合域。該等抗體之恆定區可調節免疫球蛋白與宿主組織或因子(包括免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一組份($C1q$))的結合。

如本文中所使用之術語抗體之"抗原結合部分"(或簡言之"抗原部分")係指保留與抗原(例如骨硬化素)特異性結合之能力的全長抗體或抗體之一或多個片段。已展示抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段執行。術語抗體之"抗原結合部分"所涵蓋之結合片段的實例包括Fab片段，其為由 V_L 、 V_H 、 C_L 及 $CH1$ 域組成之單價片段； $F(ab)_2$ 片段，其為包含在鉸鏈區由雙硫橋連接之兩個Fab片段的二價片段；由 V_H 及 $CH1$ 域組成之Fd片段；由抗體之單臂之 V_L 及 V_H 域組成的Fv片段；由 V_H 域組成之dAb片段(Ward等人，1989 Nature 341:544-546)；及經分離互補決定區(CDR)。

此外，儘管Fv片段之兩個域(V_L 及 V_H)由獨立基因編碼，

但其可使用重組法由合成連接子接合，該連接子使其能夠製成 V_L 及 V_H 區配對以形成單價分子之單蛋白鏈(稱為單鏈Fv(scFv)；參見，例如Bird等人，1988 *Science* 242:423-426；及Huston等人，1988 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883)。該等單鏈抗體亦意欲涵蓋於術語抗體之"抗原結合區"內。該等抗體片段係使用熟習此項技術者已知的習知技術獲得，且以與完整抗體相同之方式針對效用對該等片段進行篩檢。

如本文中所用之"經分離抗體"係指大體上不含具有不同抗原特異性之其他抗體的抗體(例如特異性結合骨硬化素之經分離抗體大體上不含特異性結合除骨硬化素以外之抗原的抗體)。然而，特異性結合骨硬化素之經分離抗體可對其他抗原(諸如來自其他物種之骨硬化素分子)具有交叉反應性。此外，經分離抗體可能大體上不含其他細胞物質及/或化學物質。

如本文中所使用之術語"單株抗體"或"單株抗體組份"係指具有單一分子組份之抗體分子的製劑。單株抗體組份呈現對於特定抗原決定基之單一結合特異性及親和力。

如本文中所使用之術語"人類抗體"意欲包括具有構架區與CDR區均來源於人類來源之序列之可變區的抗體。此外，若該抗體含有恆定區，則該恆定區亦來源於該等人類序列，例如人類生殖系序列或人類生殖系序列之突變型式，或含有來源於人類構架序列分析之一致構架序列之抗體，如Knappik等人(2000. *J Mol Biol* 296, 57-86)中所述。

本發明之人類抗體可包括並非由人類序列編碼之胺基酸殘基(例如藉由活體外隨機或特定位點誘變或藉由活體內體細胞突變所引入之突變)。然而，本文中所使用之術語"人類抗體"並不意欲包括來源於另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系的CDR序列移植於人類構架序列上之抗體。

術語"人類單株抗體"係指展示單一結合特異性之抗體，其具有構架區與CDR區均來源於人類序列之可變區。在一實施例中，人類單株抗體係由包括與永生化細胞融合之B細胞的融合瘤產生，該B細胞係由具有包含人類重鏈轉殖基因及輕鏈轉殖基因之基因組的轉殖基因非人類動物(例如轉殖基因小鼠)獲得。

如本文中所使用之術語"重組人類抗體"包括所有藉由重組方式製備、表現、產生或分離之人類抗體，諸如自針對人類免疫球蛋白基因之轉殖基因或轉染色體動物(例如小鼠)或由其製備之融合瘤分離之抗體，由經轉化以表現人類抗體之宿主細胞(例如由轉染瘤)分離之抗體，由重組組合人類抗體庫分離之抗體，及藉由涉及所有或一部分人類免疫球蛋白基因序列與其他DNA序列拼接之任何其他方式製備、表現、產生或分離之抗體。該等重組人類抗體具有構架區與CDR區均來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區。然而，在某些實施例中，可對該等重組人類抗體進行活體外誘變(或當使用針對人類Ig序列之轉殖基因動物時，進行活體內體細胞誘變)且因此重組抗體之 V_H 及 V_L 區之胺基酸序列為儘管來源於人類生殖系 V_H 及 V_L 序列且與之

相關但可能不天然存在於活體內人類抗體生殖系譜內之序列。

如本文中所使用之"同型"係指重鏈恆定區基因所提供之抗體種類(例如 IgM、IgE、IgG，諸如 IgG1 或 IgG2)。

短語"識別抗原之抗體"及"對抗原具有特異性之抗體"在本文中與術語"特異性結合抗原之抗體"可互換使用。

如本文中所使用，"特異性結合骨硬化素多肽"之抗體意指以 1×10^{-8} M 或 1×10^{-8} M 以下、 1×10^{-9} M 或 1×10^{-9} M 以下或 1×10^{-10} M 或 1×10^{-10} M 以下之 K_D 與骨硬化素多肽結合之抗體。"與除骨硬化素之外之抗原交叉反應"之抗體意指以 0.5×10^{-8} M 或 0.5×10^{-8} M 以下、 5×10^{-9} M 或 5×10^{-9} 以下或 2×10^{-9} M 或 2×10^{-9} M 以下之 K_D 結合抗原之抗體。"不與特定抗原交叉反應"之抗體意指以 1.5×10^{-8} M 或 1.5×10^{-8} M 以上之 K_D 或 5×10^{-8} M 與 10×10^{-8} M 之間的 K_D 或 1×10^{-7} M 或 1×10^{-7} M 以上之 K_D 與該抗原結合之抗體。在某些實施例中，該等不與抗原交叉反應之抗體在標準結合檢定中展示基本上不可偵測之與該等蛋白的結合。

如本文中所使用，"在基於細胞之 wnt 信號傳輸檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用"的抗體意指在基於細胞之 super top flash(STF)檢定中以小於 1 mM、100 nM、20 nM、10 nM 或 10 nM 以下之 IC_{50} 值恢復骨硬化素存在下 wnt 誘導之信號傳輸的抗體。該 STF 檢定在以下實例中進行更詳細描述。

如本文中所使用，"在基於細胞之礦化檢定中阻斷骨硬

化素之抑制作用"的抗體意指在基於細胞之檢定中以小於1 mM、500 nM、100 nM、10 nM、1 nM或1 nM以下之 IC_{50} 值恢復骨硬化素存在下BMP2誘導之礦化作用的抗體。該檢定在以下實例中進行更詳細描述。

如本文中所使用，"在Smad1磷酸化檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用"的抗體意指在基於細胞之檢定中以小於1 mM、500 nM、100 nM、10 nM、1 nM或1 nM以下之 IC_{50} 值恢復骨硬化素存在下BMP2誘導之Smad1磷酸化的抗體。該檢定在以下實例中進行更詳細描述。

如本文中所使用，"抑制骨硬化素與LRP-6之結合"的抗體係指以1 mM、500 nM、100 nM、10 nM、5 nM、3 nM、1 nM或1 nM以下之 IC_{50} 值抑制骨硬化素與LRP-6結合的抗體。該檢定在以下實例中進行更詳細描述。

如本文中所使用，"增加骨形成及質量及密度"之抗體係指能夠達到每日以高合成代謝劑量之PTH間歇治療之水準的骨形成、質量及密度之抗體，如實例10所示。

如本文所使用之術語" K_{assoc} "或" K_a "意指特定抗體-抗原相互作用之締合速率，而如本文所使用之術語" K_{dis} "或" K_D "意指特定抗體-抗原相互作用之解離速率。如本文所使用之術語" K_D "意指解離常數，其係自 K_d 與 K_a 之比率(亦即 K_d/K_a)獲得且以莫耳濃度(M)表示。抗體之 K_D 值可使用此項技術中充分確立之方法測定。一種測定抗體 K_D 之方法係藉由使用表面電漿共振或使用生物感應器系統，諸如Biacore[®]系統。

如本文中所使用之術語"親和力"係指單一抗原位點處抗體與抗原之間相互作用之強度。在各抗原位點內，抗體"臂"之可變區經由微弱的非共價力與抗原在諸多位點處相互作用；相互作用愈多，親和力愈強。

如本文中所使用之術語"親和力強度(avidity)"係指抗體-抗原複合物之總穩定性或強度之資訊性量度。其受三個主要因素控制：抗體抗原決定基親和力；抗原與抗體二者之價數；及相互作用部分之結構排列。最終該等因素定義抗體之特異性，亦即特定抗體與正確抗原之抗原決定基結合之可能性。

為獲得較高結合力探針，可構築二聚結合物，由此使得低親和力相互作用(諸如與生殖系抗體之相互作用)更易於由FACS偵測。此外，增加抗原結合之結合力強度的另一方法涉及產生抗骨硬化素抗體之本文所述構築體中之任一者的二聚物、三聚物或多聚物。該等多聚物可經由個別模組之間的共價鍵結而產生，例如藉由模擬天然C末端與N末端結合或藉由模擬經由恆定區結合在一起之抗體二聚物。經工程化至Fc/Fc界面之鍵可為共價鍵或非共價鍵。此外，除Fc之外的二聚或多聚搭配物可用於在骨硬化素雜交物中產生該等高級結構。舉例而言，可使用多聚域，諸如Borean(WO2004039841)中所述之三聚域或公開專利申請案W098/18943中所述之五聚域。

如本文中所使用之術語"交叉反應性"係指抗體或抗體群與其他抗原上之抗原決定基結合。此可能係由抗體之低結

合力強度或特異性或由具有相同或極類似抗原決定基之多個不同抗原引起。交叉反應性有時在需要與相關抗原群普遍結合時，或在當抗原之抗原決定基序列在進化中並非高度保守時嘗試進行交叉物種標記時為適宜的。

如本文所使用之術語IgG抗體之"高親和力"係指抗體對靶抗原具有 10^{-8} M或 10^{-8} M以下、 10^{-9} M或 10^{-9} M以下，或 10^{-10} M或 10^{-10} M以下之 K_D 。然而，"高親和力"結合可能因其他抗體同型而改變。舉例而言，IgM同型之"高親和力"結合係指抗體具有 10^{-7} M或 10^{-7} M以下，或 10^{-8} M或 10^{-8} M以下之 K_D 。

如本文中所使用之術語"個體"包括任何人類或非人類動物。術語"非人類動物"包括所有脊椎動物，例如哺乳動物及非哺乳動物，諸如非人類靈長類動物、綿羊、犬、貓、馬、牛、雞、兩棲動物、爬行動物等。

如本文中所使用之術語"經最佳化"意謂核苷酸序列經改變以使用較佳在產生細胞或生物體，通常真核細胞，例如畢赤酵母(*Pichia*)或木黴(*Trichoderma*)之細胞、中國倉鼠卵細胞(CHO)或人類細胞中之密碼子編碼胺基酸序列。經最佳化核苷酸序列經工程化以完全或儘可能多地保留最初由起始核苷酸序列編碼之胺基酸序列，其亦稱為"親本"序列。本文中之經最佳化序列已經工程化以具有較佳在哺乳動物細胞中之密碼子，然而，本文中亦預想該等序列在其他真核細胞中之經最佳化表現。由經最佳化核苷酸序列編碼之胺基酸序列亦稱為經最佳化。

本發明之多個態樣在以下子部分中進一步詳細描述。

評估抗體與多個物種之骨硬化素的結合能力之標準檢定為此項技術中已知的，包括(例如)ELISA、西方墨點法及RIA。合適之檢定在實例中進行詳細描述。抗體之結合動力學(例如結合親和力)亦可藉由此項技術中已知之標準檢定，諸如藉由Biacore分析來評定。評估抗體對骨硬化素功能特性(例如受體結合、預防或改善骨質溶解)之作用的檢定在實例中進一步詳細描述。

因此，如根據此項技術已知及本文中所述之方法所測定，"抑制"該等骨硬化素功能特性(例如，生物化學活性、免疫化學活性、細胞活性、生理活性或其他生物活性，或其類似活性)中之一或多者的抗體應理解為與特定活性相對於不存在抗體的情況下(或當存在具有不相關特異性之對照抗體時)所見之活性統計上顯著之減少有關。抑制骨硬化素活性之抗體所實現的該統計上顯著之減少為量測參數之至少10%，至少50%、80%或90%，且在某些實施例中，本發明之抗體可抑制大於95%、98%或99%之骨硬化素功能活性。

術語"交叉阻斷"意謂在標準競爭性結合檢定中抗體或其他結合劑干擾其他抗體或結合劑結合骨硬化素之能力。

可使用標準競爭結合檢定測定抗體或其他結合劑能夠干擾另一抗體或結合分子結合骨硬化素之能力或程度，且因此判定其能否稱為本發明之交叉阻斷。一合適檢定包括使用Biacore技術(例如藉由使用BIAcore 3000儀器(Biacore,

Uppsala, Sweden))，其可使用表面電漿共振技術量測相互作用之程度。量測交叉阻斷之另一檢定使用基於ELISA之方法。

實例中給出兩種方法之進一步詳述。

根據本發明，在所述BIAcore交叉阻斷檢定中，本發明之交叉阻斷抗體或其他結合劑與骨硬化素結合以使所記錄之抗體或結合劑之組合(混合物)的結合介於呈組合形式之兩種抗體或結合劑之最大理論結合(如上所定義)的80%與0.1%之間(例如80%至4%)，特定言之介於最大理論結合的75%與0.1%之間(例如75%至4%)，且更特定言之介於70%與0.1%之間(例如70%至4%)，且更特定言之介於最大理論結合的65%與0.1%之間(例如65%至4%)。

如實例中所述之ELISA檢定中，若與不存在液相抗骨硬化素抗體的情況下(亦即陽性對照孔)獲得之骨硬化素偵測信號相比，液相抗骨硬化素抗體能夠引起骨硬化素偵測信號減少60%至100%、特定言70%至100%，且更特定言之80%至100%，則將該抗體定義為具交叉阻斷性。

單株抗體

本發明之抗體包括如實例中所述分離之人類單株抗體。本發明之經分離抗體的V_H胺基酸序列係如SEQ ID NO:69-77所示。本發明之經分離抗體的V_L胺基酸序列分別係如SEQ ID NO:80-88所示。本發明之抗體的相應較佳全長重鏈胺基酸序列係如SEQ ID NO:113-121所示。本發明之抗體的相應較佳全長輕鏈胺基酸序列分別係如SEQ ID

NO:124-132所示。本發明之其他抗體包括已突變，但在CDR區中與上述序列中所述之CDR區仍具有至少60%、70%、80%、90%或95%或95%以上之一致性的胺基酸。在一些實施例中，本發明包括突變胺基酸序列，其中當與上述序列中所述之CDR區相比時CDR區中不超過1、2、3、4或5個胺基酸已突變。

此外，可變重鏈親本核苷酸序列係如SEQ ID NO 89-90所示。可變重鏈親本核苷酸序列係如SEQ ID NO 100-101所示。經最佳化以於哺乳動物細胞中表現之全長輕鏈核苷酸序列係如SEQ ID NO 146-154所示。經最佳化以於哺乳動物細胞中表現之全長重鏈核苷酸序列係如SEQ ID NO 135-143所示。由經最佳化輕鏈核苷酸序列編碼之全長輕鏈胺基酸序列係如SEQ ID NO 124-132所示。由經最佳化重鏈核苷酸序列編碼之全長重鏈胺基酸序列係如SEQ ID NO 113-121所示。本發明之其他抗體包括已突變，但與上述序列仍具有至少60%、70%、80%、90%或95%或95%以上之一致性的胺基酸或核酸。在一些實施例中，本發明包括突變胺基酸序列，其中當與上述序列中所述之可變區相比時可變區中不超過1、2、3、4或5個胺基酸已突變，同時保留大體上相同之治療活性。

由於該等抗體中之每一者可與骨硬化素結合，故 V_H 、 V_L 、全長輕鏈及全長重鏈序列(核苷酸序列及胺基酸序列)可"經混合且匹配"以產生本發明之其他抗骨硬化素結合分子。該等"經混合且匹配"之抗體之骨硬化素結合可使用上

述及實例中所述之結合檢定(例如 ELISA)來測試。當該等鏈經混合且匹配時，特定 V_H/V_L 對之 V_H 序列應以結構類似之 V_H 序列替代。同樣，特定全長重鏈/全長輕鏈對之全長重鏈序列應以結構類似之全長重鏈序列替代。同樣，特定 V_H/V_L 對之 V_L 序列應以結構類似之 V_L 序列替代。同樣，特定全長重鏈/全長輕鏈對之全長輕鏈序列應以結構類似之全長輕鏈序列替代。因此，在一態樣中，本發明提供一種經分離單株抗體或其抗原結合區，其具有：包含選自由 SEQ ID NO:69-77 組成之群之胺基酸序列的重鏈可變區；及包含選自由 SEQ ID NO:80-88 組成之群之胺基酸序列的輕鏈可變區；其中該抗體特異性結合骨硬化素。

在另一態樣中，本發明提供：

(i) 一種經分離單株抗體，其具有：包含選自由 SEQ ID NO:113-121 組成之群的經最佳化以於哺乳動物細胞中表現之胺基酸序列的全長重鏈；及包含選自由 SEQ ID NO:124-132 組成之群的經最佳化以於哺乳動物細胞中表現之胺基酸序列的全長輕鏈；或

(ii) 一種功能蛋白，其包含該抗體之抗原結合部分。

在另一態樣中，本發明提供：

(i) 一種經分離單株抗體，其具有：包含選自由 SEQ ID NO:135-143 組成之群的經最佳化以於哺乳動物細胞中表現之核苷酸序列的全長重鏈；及包含選自由 SEQ ID NO:146-154 組成之群的經最佳化以於哺乳動物細胞中表現之核苷酸序列的全長輕鏈；或

(ii)一種功能蛋白，其包含該抗體之抗原結合部分。

在另一態樣中，本發明提供包含抗體之重鏈及輕鏈 CDR1、CDR2及CDR3或其組合之抗體。抗體之 V_H CDR1之胺基酸序列係如SEQ ID NO:1-11所示。抗體之 V_H CDR2之胺基酸序列係如SEQ ID NO:12-22所示。抗體之 V_H CDR3之胺基酸序列係如SEQ ID NO:23-33所示。抗體之 V_L CDR1之胺基酸序列係如SEQ ID NO:34-44所示。抗體之 V_L CDR2之胺基酸序列係如SEQ ID NO:45-55所示。抗體之 V_L CDR3之胺基酸序列係如SEQ ID NO:56-66所示。該等CDR區係使用Kabat系統(Kabat, E. A.等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開號91-3242)描繪。

假定該等抗體中之每一者可與骨硬化素結合且主要由 CDR1、2及3區提供抗原結合特異性，則 V_H CDR1、2及3序列及 V_L CDR1、2及3序列可"經混合且匹配"(亦即，不同抗體之CDR可經混合且匹配)(但各抗體必須含有 V_H CDR1、2及3及 V_L CDR1、2及3)以產生本發明之其他抗骨硬化素結合分子。該等"經混合且匹配"之抗體之骨硬化素結合可使用上述及實例中所述之結合檢定(例如ELISA)來測試。當 V_H CDR序列經混合且匹配時，特定 V_H 序列之CDR1、CDR2及/或CDR3序列應以結構類似之CDR序列替代。同樣，當 V_L CDR序列經混合且匹配時，特定 V_L 序列之CDR1、CDR2及/或CDR3序列應以結構類似之CDR序列

替代。一般熟習此項技術者應易於想到，新穎 V_H 及 V_L 序列可藉由以與本文中對本發明之單株抗體所示的CDR序列結構類似之序列取代一或多個 V_H 及/或 V_L CDR區序列而產生。

經分離單株抗體或其抗原結合區具有：包含選自由SEQ ID NO:1-11組成之群之胺基酸序列的重鏈可變區CDR1；包含選自由SEQ ID NO:12-22組成之群之胺基酸序列的重鏈可變區CDR2；包含選自由SEQ ID NO:23-33組成之群之胺基酸序列的重鏈可變區CDR3；包含選自由SEQ ID NO:34-44組成之群之胺基酸序列的輕鏈可變區CDR1；包含選自由SEQ ID NO:45-55組成之群之胺基酸序列的輕鏈可變區CDR2；及包含選自由SEQ ID NO:56-66組成之群之胺基酸序列的輕鏈可變區CDR3；其中該抗體特異性結合骨硬化素。

在某一實施例中，抗體包含：SEQ ID NO:3之重鏈可變區CDR1；SEQ ID NO:14之重鏈可變區CDR2；SEQ ID NO:25之重鏈可變區CDR3；SEQ ID NO:36之輕鏈可變區CDR1；SEQ ID NO:47之輕鏈可變區CDR2；及SEQ ID NO:58之輕鏈可變區CDR3。

在某一實施例中，抗體包含：SEQ ID NO:4之重鏈可變區CDR1；SEQ ID NO:15之重鏈可變區CDR2；SEQ ID NO:26之重鏈可變區CDR3；SEQ ID NO:37之輕鏈可變區CDR1；SEQ ID NO:48之輕鏈可變區CDR2；及SEQ ID NO:59之輕鏈可變區CDR3。

在某一實施例中，抗體包含：SEQ ID NO:5之重鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO:16之重鏈可變區 CDR2；SEQ ID NO:27之重鏈可變區 CDR3；SEQ ID NO:38之輕鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO:49之輕鏈可變區 CDR2；及SEQ ID NO:60之輕鏈可變區 CDR3。

在某一實施例中，抗體包含：SEQ ID NO:6之重鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO:17之重鏈可變區 CDR2；SEQ ID NO:28之重鏈可變區 CDR3；SEQ ID NO:39之輕鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO:50之輕鏈可變區 CDR2；及SEQ ID NO:61之輕鏈可變區 CDR3。

在某一實施例中，抗體包含：SEQ ID NO:7之重鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO:18之重鏈可變區 CDR2；SEQ ID NO:29之重鏈可變區 CDR3；SEQ ID NO:40之輕鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO:51之輕鏈可變區 CDR2；及SEQ ID NO:62之輕鏈可變區 CDR3。

在某一實施例中，抗體包含：SEQ ID NO:8之重鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO:19之重鏈可變區 CDR2；SEQ ID NO:30之重鏈可變區 CDR3；SEQ ID NO:41之輕鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO:52之輕鏈可變區 CDR2；及SEQ ID NO:63之輕鏈可變區 CDR3。

在某一實施例中，抗體包含：SEQ ID NO:9之重鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO:20之重鏈可變區 CDR2；SEQ ID NO:31之重鏈可變區 CDR3；SEQ ID NO:42之輕鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO:53之輕鏈可變區 CDR2；及SEQ ID

NO:64之輕鏈可變區 CDR3。

在某一實施例中，抗體包含：SEQ ID NO:10之重鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO:21之重鏈可變區 CDR2；SEQ ID NO:32之重鏈可變區 CDR3；SEQ ID NO:43之輕鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO:54之輕鏈可變區 CDR2；及SEQ ID NO:65之輕鏈可變區 CDR3。

在某一實施例中，抗體包含：SEQ ID NO:11之重鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO:22之重鏈可變區 CDR2；SEQ ID NO:33之重鏈可變區 CDR3；SEQ ID NO:44之輕鏈可變區 CDR1；SEQ ID NO:55之輕鏈可變區 CDR2；及SEQ ID NO:66之輕鏈可變區 CDR3。

如本文中所使用之人類抗體包含重鏈或輕鏈可變區或全長重鏈或輕鏈，若該抗體之可變區或全長鏈係由使用人類生殖系免疫球蛋白基因之系統獲得，則其為特定生殖系序列"之產物"或"來源於"該特定生殖系序列。該等系統包括以所關注之抗原使帶有人類免疫球蛋白基因之轉殖基因小鼠免疫，或以所關注之抗原來篩檢在噬菌體上呈現之人類免疫球蛋白基因庫。為人類生殖系免疫球蛋白序列"之產物"或"來源於"人類生殖系免疫球蛋白序列之人類抗體可如藉由將該人類抗體之胺基酸序列與人類生殖系免疫球蛋白之胺基酸序列比較，及選擇序列最接近(亦即最大一致性百分比)該人類抗體之序列的人類生殖系免疫球蛋白序列來鑑別。為特定人類生殖系免疫球蛋白序列"之產物"或來源於特定人類生殖系免疫球蛋白序列之人類抗體與該生

殖系序列相比可含有胺基酸差異，此係歸因於(例如)天然存在之體細胞突變或定點突變之意向性引入。然而，所選人類抗體之胺基酸序列通常與由人類生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列至少90%一致，且含有當與其他物種之生殖系免疫球蛋白胺基酸序列(例如，鼠類生殖系序列)相比時將該人類抗體鑑別為人類抗體的胺基酸殘基。在某些情況下，人類抗體之胺基酸序列可與由生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列至少60%、70%、80%、90%或至少95%，或甚至至少96%、97%、98%或99%一致。一般而言，來源於特定人類生殖系序列之人類抗體與由人類生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列相比將呈現不超過10個胺基酸之差異。在某些情況下，人類抗體與由生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列相比可呈現不超過5個，或甚至不超過4個、3個、2個或1個胺基酸之差異。在一些實施例中，生殖系免疫球蛋白胺基酸序列係選自包含分別由SEQ ID NO:67-68組成之可變重鏈序列及分別由SEQ ID NO:78-79組成之可變輕鏈序列之彼等序列。

同源抗體

在另一實施例中，本發明之抗體具有全長重鏈及輕鏈胺基酸序列；全長重鏈及輕鏈核苷酸序列、可變區重鏈及輕鏈核苷酸序列，或與本文所述抗體之胺基酸及核苷酸序列同源之可變區重鏈及輕鏈胺基酸序列，且其中該等抗體保留本發明之抗骨硬化素抗體之所需功能特性。

舉例而言，本發明提供一種經分離單株抗體(或包含其

抗原結合部分之功能蛋白)，其包含重鏈可變區及輕鏈可變區，其中：該重鏈可變區包含與選自由SEQ ID NO:67-77組成之群之胺基酸序列至少80%一致之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含與選自由SEQ ID NOs:77-88組成之群之胺基酸序列至少80%一致之胺基酸序列；該抗體特異性結合骨硬化素，且該抗體展現以下功能特性中之至少一者：該抗體在基於細胞之wnt信號傳輸檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用，該抗體在基於細胞之礦化檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用，或在Smad1磷酸化檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用，或該抗體抑制骨硬化素與LRP-6之結合或該抗體增加骨形成及質量及密度。

在另一實例中，本發明提供一種經分離單株抗體(或包含其抗原結合部分之功能蛋白)，其包含全長重鏈及全長輕鏈，其中：該全長重鏈包含與選自由SEQ ID NO 111-121組成之群之胺基酸序列至少80%一致之胺基酸序列；該全長輕鏈包含與選自由SEQ ID NO 122-132組成之群之胺基酸序列至少80%一致之胺基酸序列；該抗體特異性結合骨硬化素，且該抗體展現以下功能特性中之至少一者：該抗體在基於細胞之wnt信號傳輸檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用，該抗體在基於細胞之礦化檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用，或在Smad1磷酸化檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用，或該抗體抑制骨硬化素與LRP-6之結合或該抗體增加骨形成及質量及密度。

在另一實例中，本發明提供一種經分離單株抗體(或包

含其抗原結合部分之功能蛋白)，其包含全長重鏈及全長輕鏈，其中：該全長重鏈係由與選自由SEQ ID NO 133-143組成之群之核苷酸序列至少80%一致之核苷酸序列編碼；該全長輕鏈包含與選自由SEQ ID NO 144-154組成之群之核苷酸序列至少80%一致之核苷酸序列；該抗體特異性結合骨硬化素，且該抗體展現以下功能特性中之至少一者：在基於細胞之wnt信號傳輸檢定中該抗體阻斷骨硬化素之抑制作用，在基於細胞之礦化檢定中該抗體阻斷骨硬化素之抑制作用，或在Smad1磷酸化檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用，或該抗體抑制骨硬化素與LRP-6之結合或該抗體增加骨形成及質量及密度。

在多個實施例中，該抗體可展示上述功能特性中之一或多者，兩者或兩者以上，或三者。該抗體可為(例如)人類抗體、人源化抗體或嵌合抗體。

在其他實施例中， V_H 及/或 V_L 胺基酸序列可與上述序列50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。在其他實施例中， V_H 及/或 V_L 胺基酸序列除不超過1、2、3、4或5個胺基酸位置上之胺基酸取代之外可為一致的。具有分別與SEQ ID NO 67-77之 V_H 區及SEQ ID NO 78-88 V_L 區具有高(亦即80%或80%以上)一致性之 V_H 區及 V_L 區的抗體可藉由分別誘變(例如定點誘變或PCR介導之誘變)編碼SEQ ID NO:89-99及100-110之核酸分子獲得，繼而使用本文所述之功能檢定測試所編碼之變異抗體所保留之功能(亦即上述功能)。

在其他實施例中，全長重鏈及/或全長輕鏈胺基酸序列可與上述序列50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。具有分別與SEQ ID NO 111-121中之任一者之全長重鏈及SEQ ID NO 122-132中之任一者之全長輕鏈具有高(亦即80%或80%以上)一致性之全長重鏈及全長輕鏈的抗體可藉由分別誘變(例如定點誘變或PCR介導之誘變)編碼SEQ ID NO:133-143及SEQ ID NO 144-154之核酸分子獲得，繼而使用本文所述之功能檢定測試所編碼之變異抗體所保留之功能(亦即上述功能)。

在其他實施例中，全長重鏈及/或全長輕鏈核苷酸序列可與上述序列60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。

在其他實施例中，重鏈及/或輕鏈核苷酸序列之可變區可與上述序列60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。

如本文中所使用之兩個序列之間的一致性百分比為該等序列所共用之相同位置數之函數(亦即一致性%=相同位置數/位置總數 $\times$ 100)，考慮為達成兩個序列之最佳比對所需要引入之空位數及各空位之長度。兩個序列之間的序列比較及一致性百分比測定可使用如在以下非限制性實例中所述之數學算法來達成。

兩個胺基酸序列之間的一致性百分比可使用已併入ALIGN程式(2.0版)中之E. Meyers及W. Miller之算法(Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988)，使用PAM120權重

殘基表(weight residue table)，空位長度處罰12及空位處罰4來測定。此外，兩個胺基酸序列之間的一致性百分比可使用已併入GCG套裝軟體(可在<http://www.gcg.com>獲得)中之GAP程式中的Needleman及Wunsch(J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970)算法，使用Blossom 62矩陣或PAM250矩陣及空位權重16、14、12、10、8、6或4及長度權重1、2、3、4、5或6來測定。

此外或其他，本發明之蛋白質序列可進一步用作"查詢序列"以執行對公開資料庫搜尋以(例如)鑑別相關序列。該等搜尋可使用Altschul等人，1990 J.Mol. Biol. 215:403-10之XBLAST程式(2.0版本)執行。BLAST蛋白質搜尋可以XBLAST程式，分值=50，字長=3執行，以獲得與本發明之抗體分子同源之胺基酸序列。為了獲得空位比對以達成比較目的，可如Altschul等人，1997 Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402中所述使用空位BLAST。當利用BLAST及空位BLAST程式時，可使用各別程式(例如XBLAST及NBLAST)之預設參數。參見<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

具有保守性修飾之抗體

在某些實施例中，本發明之抗體具有包含CDR1、CDR2及CDR3序列之重鏈可變區及包含CDR1、CDR2及CDR3序列之輕鏈可變區，其中該等CDR序列中之一或多者具有基於本文中所述抗體之特定胺基酸序列或其保守性修飾，且其中該等抗體保留本發明之抗骨硬化素抗體之所需功能特性。因此，本發明提供一種經分離單株抗體，或包含其抗

原結合部分之功能蛋白，其由包含CDR1、CDR2及CDR3序列之重鏈可變區及包含CDR1、CDR2及CDR3序列之輕鏈可變區組成，其中：該等重鏈可變區CDR1胺基酸序列係選自由SEQ ID NO:1-11組成之群及其保守性修飾；該等重鏈可變區CDR2胺基酸序列係選自由SEQ ID NO:12-22組成之群及其保守性修飾；該等重鏈可變區CDR3胺基酸序列係選自由SEQ ID NO:23-33組成之群及其保守性修飾；該等輕鏈可變區CDR1胺基酸序列係選自由SEQ ID NO:34-44組成之群及其保守性修飾；該等輕鏈可變區CDR2胺基酸序列係選自由SEQ ID NO:45-55組成之群及其保守性修飾；該等輕鏈可變區之CDR3胺基酸序列係選自由SEQ ID NO:56-66組成之群及其保守性修飾；該抗體特異性結合骨硬化素，且該抗體展現以下功能特性中之至少一者：該抗體在基於細胞之wnt信號傳輸檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用，該抗體在基於細胞之礦化檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用，或在Smad1磷酸化檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用，或該抗體抑制骨硬化素與LRP-6之結合或該抗體增加骨形成及質量及密度。

在多個實施例中，該抗體可展現上述所列之功能特性中之一或多者，兩者或兩者以上，或三者或三者以上。該等抗體可為(例如)人類抗體、人源化抗體或嵌合抗體。

在其他實施例中，本發明之經最佳化以在哺乳動物細胞中表現之抗體具有全長重鏈序列及全長輕鏈序列，其中該等序列中之一或多者具有基於本文所述之抗體之特定胺基

酸序列或其保守性修飾，且其中該等抗體保留本發明之抗骨硬化素抗體之所需功能特性。因此，本發明提供一種經最佳化以在哺乳動物細胞中表現之經分離單株抗體，其由全長重鏈及全長輕鏈組成，其中：該全長重鏈具有選自SEQ ID NO:111-121之群之胺基酸序列及其保守性修飾；且該全長輕鏈具有選自SEQ ID NO:122-132之群之胺基酸序列及其保守性修飾；該抗體特異性結合骨硬化素；且該抗體展現以下功能特性中之至少一者：在基於細胞之wnt信號傳輸檢定中該抗體阻斷骨硬化素之抑制作用；在基於細胞之礦化檢定中該抗體阻斷骨硬化素之抑制作用；或在Smad1磷酸化檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用；或該抗體抑制骨硬化素與LRP-6之結合或該抗體增加骨形成及質量及密度。

在多個實施例中，該抗體可展現上述所列之功能特性中之一或多者，兩者或兩者以上，或三者或三者以上。該等抗體可為(例如)人類抗體、人源化或嵌合抗體。

如本文中所使用之術語"保守性序列修飾"意指並不顯著影響或改變含有該胺基酸序列之抗體之結合特徵的胺基酸修飾。該等保守性修飾包括胺基酸取代、添加及缺失。修飾可藉由此項技術中已知之標準技術，諸如定點誘變及PCR介導之誘變來引入本發明之抗體中。

保守性胺基酸取代為胺基酸殘基經具有類似側鏈之胺基酸殘基替代之取代。具有類似側鏈之胺基酸殘基之家族已在此項技術中進行定義。該等家族包括具有鹼性側鏈之胺

基酸(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、具有酸性側鏈之胺基酸(例如天冬胺酸、麩胺酸)、具有不帶電極性側鏈之胺基酸(例如甘胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、具有非極性側鏈之胺基酸(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、具有 β -分支鏈側鏈之胺基酸(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及具有芳族側鏈之胺基酸(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。因此，本發明之抗體之CDR區內之一或多個胺基酸殘基可以來自同一側鏈家族之其他胺基酸殘基替代，且變異抗體可使用本文中所述之功能檢定來測定其所保留之功能。

與本發明之抗骨硬化素抗體結合相同抗原決定基之抗體

在另一實施例中，本發明提供與本文所述之本發明之各種特定抗骨硬化素抗體結合相同抗原決定基之抗體。實際上已令人驚訝地發現實例中所述之具有以下能力之所有抗體均以高親和力結合骨硬化素中之相同抗原決定基：

(i)在基於細胞之wnt信號傳輸檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用；

(ii)在基於細胞之礦化檢定中阻斷抑制作用；

(iii)抑制骨硬化素與LRP-6之結合；及

(iv)增加骨形成、質量及密度，

該抗原決定基為包括SEQ ID NO:156與SEQ ID NO:157之胺基酸的構形抗原決定基。在不受任何特定形式約束的情況下，本文提出胺基酸序列SEQ ID NO:156及SEQ ID

NO:157描述由本發明之抗體識別之骨硬化素多肽中的一個構形抗原決定基區。

因此其他抗體可基於其在標準骨硬化素結合檢定中與本發明之其他抗體交叉競爭(例如，以統計上顯著之方式競爭性抑制其他抗體之結合)之能力來鑑別。測試抗體抑制本發明之抗體與人類骨硬化素結合之能力展示測試抗體可與該抗體競爭結合人類骨硬化素；根據非限制性理論，該抗體可與跟其競爭之抗體結合人類骨硬化素上之相同或相關(例如結構類似或空間接近)的抗原決定基。在某一實施例中，與本發明之抗體結合人類骨硬化素上之相同抗原決定基之抗體為人類單株抗體。該等人類單株抗體可如實例中所述來製備及分離。

經工程化及修飾之抗體

此外，本發明之抗體可使用具有本文中所示之 V_H 序列及/或 V_L 序列中之一或多者的抗體作為起始物將經修飾之抗體工程化來製備，該經修飾之抗體可具有與起始抗體不同之特性。抗體可藉由修飾一或兩種可變區(意即， V_H 及/或 V_L)內，例如在一或多個CDR區內及/或在一或多個構架區內之一或多個殘基來工程化。此外或其他，抗體可藉由修飾在恆定區內之殘基(例如)以改變該抗體之效應子功能來工程化。

可執行之一類可變區工程化為CDR移植。抗體主要經由位於重鏈及輕鏈之六個互補決定區(CDR)內之胺基酸殘基與靶抗原相互作用。因此，在個別抗體之間，CDR內之胺

基 酸 序 列 比 CDR 外 之 序 列 差 異 更 大 。 由 於 CDR 序 列 負 責 大 部 分 抗 體 - 抗 原 相 互 作 用 ， 故 可 藉 由 建 構 包 括 來 自 特 定 天 然 產 生 抗 體 並 移 植 至 具 有 不 同 特 性 之 不 同 抗 體 之 構 架 序 列 上 的 CDR 序 列 之 表 現 載 體 來 表 現 模 擬 特 定 天 然 產 生 抗 體 之 特 性 的 重 組 抗 體 (參 見 (例 如) Riechmann, L. 等 人 ， 1998 Nature 332:323-327 ； Jones, P. 等 人 ， 1986 Nature 321:522-525 ； Queen, C. 等 人 ， 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033 ； Winter 之 美 國 專 利 第 5,225,539 號 ； 及 Queen 等 人 之 美 國 專 利 第 5,530,101 、 5,585,089 、 5,693,762 及 6,180,370 號) 。

因 此 ， 本 發 明 之 另 一 實 施 例 係 關 於 一 種 經 分 離 單 株 抗 體 或 包 含 其 抗 原 結 合 部 分 之 功 能 蛋 白 ， 其 包 含 重 鏈 可 變 區 ， 該 重 鏈 可 變 區 包 含 分 別 具 有 選 自 由 SEQ ID NO:1-11 組 成 之 群 之 胺 基 酸 序 列 的 CDR1 序 列 、 具 有 選 自 由 SEQ ID NO:12-22 組 成 之 群 之 胺 基 酸 序 列 的 CDR2 序 列 、 具 有 選 自 由 SEQ ID NO:23-33 組 成 之 群 之 胺 基 酸 序 列 的 CDR3 序 列 ； 及 輕 鏈 可 變 區 ， 該 輕 鏈 可 變 區 包 含 分 別 具 有 選 自 由 SEQ ID NO:34-44 組 成 之 群 之 胺 基 酸 序 列 的 CDR1 序 列 、 具 有 選 自 由 SEQ ID NO:45-55 組 成 之 群 之 胺 基 酸 序 列 的 CDR2 序 列 及 由 選 自 由 SEQ ID NO:56-66 組 成 之 群 之 胺 基 酸 序 列 組 成 之 CDR3 序 列 。 因 此 ， 該 等 抗 體 含 有 單 株 抗 體 之 V_H 及 V_L CDR 序 列 ， 亦 可 含 有 與 該 等 抗 體 不 同 之 構 架 序 列 。

該 等 構 架 序 列 可 自 包 括 生 殖 系 抗 體 基 因 序 列 之 公 開 DNA 資 料 庫 或 已 出 版 參 考 文 獻 獲 得 。 舉 例 而 言 ， 人 類 重 鏈 及 輕

鏈可變區基因之生殖系DNA序列可發現於"VBase"人類生殖系序列資料庫(可在網際網路 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase上獲得)以及Kabat, E. A., 等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., 等人, 1992 J. mol. Biol. 227:776-798; 及Cox, J. P. L.等人, 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836中, 該等文獻中每一者之內容係以引用的方式明確併入本文中。

適用於本發明之抗體的構架序列之一實例為結構類似於本發明之所選抗體所用之構架序列(例如一致序列)及/或本發明之單株抗體所用之構架序列的彼等序列。 V_H CDR1、2及3序列及 V_L CDR1、2及3序列可移植至與產生構架序列之生殖系免疫球蛋白基因中所見的序列具有一致序列之構架區上, 或者CDR序列可移植至與生殖系序列相比含有一或多個突變之構架區上。舉例而言, 已發現在某些情況下, 使構架區內之殘基突變以保持或增強該抗體之抗原結合能力為有益的(參見(例如)Queen等人之美國專利第5,530,101; 5,585,089; 5,693,762及6,180,370號)。

另一類可變區修飾為使 V_H 及/或 V_L CDR1、CDR2及/或CDR3區內之胺基酸殘基突變以由此改良所關注抗體之一或多種結合特性(例如親和力), 稱為"親和力成熟"。可執行定點誘變或PCR介導之誘變以引入突變, 且對抗體結合或所關注之其他功能特性之作用可以如本文中所述及實例

中所提供之活體外或活體內檢定來評估。可引入保守性修飾(如上所述)。該等突變可為胺基酸取代、添加或缺失。此外，通常CDR區內不超過1個、2個、3個、4個或5個殘基發生改變。

因此，在另一實施例中，本發明提供經分離抗骨硬化素單株抗體或包含其抗原結合部分之功能蛋白，其由以下部分組成：重鏈可變區，其具有由選自具有SEQ ID NO:1-11之群之胺基酸序列或與SEQ ID NO:1-11相比具有一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸取代、缺失或添加的胺基酸序列組成之 V_H CDR1區，具有選自由SEQ ID NO:12-22組成之群之胺基酸序列或與SEQ ID NO:12-22相比具有一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸取代、缺失或添加之胺基酸序列的 V_H CDR2區，具有選自由SEQ ID NO:23-33組成之群之胺基酸序列或與SEQ ID NO:23-33相比具有一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸取代、缺失或添加之胺基酸序列的 V_H CDR3區；輕鏈可變區，其具有選自由SEQ ID NO:34-44組成之群之胺基酸序列或與SEQ ID NO:34-44相比具有一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸取代、缺失或添加之胺基酸序列的 V_L CDR1區，具有選自由SEQ ID NO:45-55組成之群之胺基酸序列或與SEQ ID NO:45-55相比具有一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸取代、缺失或添加之胺基酸序列的 V_L CDR2區，及具有選自由SEQ ID NO:56-66組成之群之胺基酸序列或與SEQ ID NO:56-66相比具有一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸

取代、缺失或添加之胺基酸序列的V_L CDR3區。

將抗原結合域移植於替代性構架或骨架中

可使用多種抗體/免疫球蛋白構架或骨架，只要所得多肽包括至少一個特異性結合骨硬化素之結合區即可。該等構架或骨架包括5種主要個體基因型之人類免疫球蛋白，或其片段(諸如本文中別處所揭示者)，且包括其他動物物種之免疫球蛋白，較佳具有人源化態樣。單一重鏈抗體(諸如在駱駝科(camelid)中得以鑑別之單一重鏈抗體)在此方面備受關注。熟習此項技術者繼續發現及開發新穎構架、骨架及片段。

在一態樣中，本發明係關於使用可移植有本發明之CDR的非免疫球蛋白骨架來產生非免疫球蛋白基抗體。可使用已知或未來非免疫球蛋白構架及骨架，只要其包含對於SEQ ID NO:155之靶蛋白具有特異性之結合區即可。本文中將該等化合物稱為"包含標靶特異性結合區之多肽"。非免疫球蛋白構架之實例在以下部分中進行進一步描述(駱駝科抗體及非抗體骨架)。

駱駝科抗體

由駱駝及單峰駝(雙峰駝(*Camelus bactrianus*)及單峰駝(*Camelus dromaderius*))家族之成員(包括新世界成員，諸如美洲駝種(羊駝(*Lama paccos*)、大羊駝(*Lama glama*)及小羊駝(*Lama vicugna*)))獲得之抗體蛋白已針對尺寸、結構複雜性及對人類個體之抗原性進行表徵。在自然界中發現之該哺乳動物家族之某些IgG抗體缺乏輕鏈，且因此在結構

上不同於其他動物之抗體的具有兩個重鏈及兩個輕鏈之典型四鏈四級結構。參見PCT/EP93/02214(1994年3月3日公開之WO 94/04678)。

駱駝科抗體中鑑別為 V_{HH} 之小型單一可變域的區域可藉由遺傳工程獲得以產生對標靶具有高親和力之小型蛋白質，產生稱為"駱駝科奈米抗體"之低分子量抗體衍生蛋白。參見1998年6月2日頒布之美國專利第5,759,808號；亦參見Stijlemans, B.等人，2004 J Biol Chem 279: 1256-1261；Dumoulin, M.等人，2003 Nature 424: 783-788；Pleschberger, M.等人。2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448；Cortez-Retamozo, V.等人。2002 Int J Cancer 89: 456-62；及Lauwereys, M.等人。1998 EMBO J 17: 3512-3520。駱駝科抗體及抗體片段之工程化庫可購得，例如購自Ablynx, Ghent, Belgium。如同非人類來源之其他抗體一般，駱駝科抗體之胺基酸序列可經重組改變以獲得更接近人類序列之序列，亦即奈米抗體可"人源化"。因此，可進一步減小駱駝科抗體對人類之天然低抗原性。

駱駝科奈米抗體具有約為人類IgG分子之十分之一的分子量，且該蛋白質具有僅為幾奈米之實體直徑。該小尺寸所引起之一結果為駱駝科奈米抗體結合功能上不可為較大抗體蛋白所見之抗原位點之能力，亦即駱駝科奈米抗體適用作偵測使用經典免疫技術隱藏之抗原之試劑且適用作可能之治療劑。因此，小尺寸所引起之另一結果為駱駝科奈米抗體可由於與靶蛋白之凹槽或較窄間隙中之特定位點結

合而具有抑制作用，且因此可以與經典抗體之功能相比更接近經典低分子量藥物之功能的能力發揮作用。

低分子量及緊湊之尺寸進一步使駱駝科奈米抗體極其熱穩定，對極端pH值及蛋白水解消化穩定，且具有極弱抗原性。另一結果為駱駝科奈米抗體易於自循環系統移至組織中，且甚至跨過血腦屏障且可治療影響神經組織之病症。此外，奈米抗體可有利於藥物跨過血腦屏障輸送。參見2004年8月19日公開之美國專利申請案20040161738。該等特徵與對人類之低抗原性組合指示較大之治療潛力。此外，該等分子可在原核細胞(諸如大腸桿菌(*E. coli*))中完全表現且表現為與噬菌體之融合蛋白且具有功能性。

因此，本發明之特徵為一種對骨硬化素具有高親和力之駱駝科抗體或奈米抗體。在本文之某些實施例中，駱駝科抗體或奈米抗體係在駱駝科動物中天然產生，亦即由駱駝科以骨硬化素或其肽片段使用本文對於其他抗體所述之技術免疫之後產生。或者，將抗骨硬化素駱駝科奈米抗體工程化，亦即藉由(例如)如本文實例中所述使用淘選程序以骨硬化素作為標靶自噬菌體呈現之經適當誘變之駱駝科奈米抗體蛋白的庫選擇產生。工程化奈米抗體可進一步經遺傳工程定製以在接受個體體內具有45分鐘至兩週之半衰期。在一特定實施例中，如(例如)PCT/EP93/02214(WO 94/04678)所述，藉由將本發明之人類抗體之重鏈或輕鏈的CDR序列移植至奈米抗體或單域抗體構架序列中來獲得駱駝科抗體或奈米抗體。

非抗體骨架

已知非免疫球蛋白構架或骨架包括(但不限於)阿第汀(Adnectin)(纖維結合蛋白)(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA)、錨蛋白(ankyrin)(Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland)、域抗體(Domantis, Ltd(Cambridge, MA)及 Ablynx nv(Zwijnaarde, Belgium))、脂質運載蛋白(lipocalin)(Anticalin)(Pieris Proteolab AG, Freising, Germany)、小分子免疫藥物(small modular immunopharmaceutical)(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、maxybody(Avidia, Inc.(Mountain View, CA))、蛋白A(Affibody AG, Sweden)及affilin(γ -晶體蛋白或泛素)(Scil Proteins GmbH, Halle, Germany)、蛋白質抗原決定基模擬劑(Polyphor Ltd, Allschwil, Switzerland)。

(i)阿第汀化合物療法

阿第汀骨架係基於III型纖維結合蛋白域(例如, III型纖維結合蛋白之第十個模組(10 Fn3域))。III型纖維結合蛋白域具有分布於兩個 β 摺疊之間的7或8條 β 鏈, 該等 β 摺疊本身彼此緊挨以形成該蛋白質的核心, 且另外含有將該等 β 鏈彼此連接且暴露於溶劑之環(與CDR類似)。在 β 摺疊夾層之各邊緣處存在至少三個該等環, 其中該邊緣為該蛋白質垂直於 β 鏈之方向的邊界(US 6,818,418)。

該等基於纖維結合蛋白之骨架不為免疫球蛋白, 儘管總摺疊與包含駱駝及美洲駝IgG中之整個抗原識別單元之最小功能抗體片段(重鏈可變區)的總摺疊密切相關。由於此

結構，非免疫球蛋白抗體模擬在本質及親和力上與抗體之抗原結合特性類似之抗原結合特性。該等骨架可用於與活體內抗體之親和力成熟的過程類似之活體外環隨機化及改組策略中。該等基於纖維結合蛋白之分子可用作骨架，其中可使用標準選殖技術將該分子之環區以本發明之CDR替代。

(ii) 錨蛋白-分子搭配物

該技術係基於使用具有錨蛋白衍生之重複模組的蛋白質作為用於承載可變區之骨架，該等可變區可用於與不同標靶結合。該錨蛋白重複模組為由兩個反向平行之 α -螺旋及一個 β -翻轉組成的具有33個胺基酸之多肽。可變區之結合主要藉由使用核糖體呈現來最佳化。

(iii) Maxybody/Avimer-Avidia

Avimer係來源於含天然A域之蛋白質，諸如LRP-1。該等域本性上用於蛋白質-蛋白質相互作用且人類有250餘種蛋白質在結構上基於A域。Avimer係由大量經由胺基酸連接子連接之不同"A-域"單體(2-10個)組成。可使用(例如)20040175756、20050053973、20050048512及20060008844中所述之方法產生可與靶抗原結合之Avimer。

(vi) 蛋白A-Affibody

Affibody[®]親和配體為由基於蛋白A之一個IgG結合域之骨架的3螺旋束組成的小型單純蛋白質。蛋白A為來自細菌金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)之表面蛋白。此骨架域由58個胺基酸組成，隨機選擇其中13個胺基酸以產生

具有大量配體變異體之 Affibody[®] 庫 (參見 (例如) US 5,831,012)。Affibody[®] 分子模擬抗體，其具有 6 kDa 之分子量，與抗體之 150 kDa 之分子量相比較。儘管 Affibody[®] 分子尺寸較小，但其結合位點仍與抗體之結合位點類似。

(v) Anticalins-Pieris

Anticalins[®] 為由 Pieris ProteoLab AG 公司開發之產品。其係來源於脂質運載蛋白，一群分布廣泛之小型且穩固之蛋白質，其通常與化學上敏感或不溶性化合物之生理輸送或儲存有關。若干種天然脂質運載蛋白存在於人類組織或體液中。

該蛋白質結構與免疫球蛋白類似，其中高變環位於剛性構架之頂部。然而，與抗體或其重組片段相對比，脂質運載蛋白由具有 160 至 180 個胺基酸殘基之單一多肽鏈 (其僅略大於單一免疫球蛋白域) 組成。

構成結合袋之四個環之組展示顯著結構可塑性且容許多個側鏈。結合位點因此可在專有過程中再成型以便以高親和力及特異性識別具有不同形狀之指定靶分子。

脂質運載蛋白家族之一種蛋白質 - 大菜粉蝶 (*Pieris Brassicae*) 之後膽色素結合蛋白 (BBP) 已用以藉由誘變四個環之組來開發抗運載蛋白。描述 "抗運載蛋白" 之專利申請案之一實例為 PCT WO 199916873。

(vi) Affilin-Scil Proteins

Affilin[™] 分子為小型非免疫球蛋白蛋白質，其經設計以對蛋白質及小分子具有特異性親和力。新穎 Affilin[™] 分子

可極快速選自兩個庫，每一個庫係基於不同的人類衍生之骨架蛋白。

Affilin™分子並不展示與免疫球蛋白蛋白質的任何結構同源性。Scil Proteins使用兩種Affilin™骨架，其中之一者為 γ 結晶，人類結構眼晶體蛋白，且另一者為"泛素"超家族蛋白質。兩種人類骨架均極小，展示高溫穩定性且幾乎抵抗pH值變化及變性劑。此高穩定性主要係歸因於該等蛋白質經擴大之 β 摺疊結構。 γ 結晶衍生之蛋白質之實例描述於WO200104144中且"泛素樣"蛋白之實例描述於WO2004106368中。

(vii)蛋白質抗原決定基模擬劑(PEM)

PEM為中等尺寸環狀肽樣分子(MW 1-2 kDa)，其模擬蛋白質之 β 髮夾二級結構，即蛋白質-蛋白質相互作用所涉及之主要二級結構。更一般而言，模擬所揭示抗體之抗原決定基的3D結構之任何多肽均為本發明之一部分。較佳實施例為至少包含以下多肽E1-L-E2之具有30-100個胺基酸之多肽，其中E1為SEQ ID NO:156，且E2為SEQ ID NO:157，且L為多肽連接子以使E1及E2能夠複製為本發明之抗體識別之區域的3D結構。根據一較佳實施例，L為由10-20個選自胺基酸甘胺酸或絲胺酸之胺基酸組成之連接子。較佳地，連接子L包含肽GGGSGGGGSGGGG(SEQ ID NO:X/SEQ ID NO:158)或GGGGSGGGGSGGGGSGGGG(SEQ ID NO:Y/SEQ ID NO:159)，更佳地連接子L基本上由SEQ ID NO:X或SEQ ID NO:Y組成。

該等多肽應保留對本發明之抗體的高親和力。該等多肽亦可有利地用作產生骨硬化素抗體之免疫原。

該等多肽亦可用作骨硬化素之拮抗劑或促效劑且因此具有類似於對於本發明之抗體所述之應用。

E1及/或E2序列中具有一或多個胺基酸取代或缺失、較佳不少於1個、2個或3個胺基酸取代或缺失之多肽亦為本發明之一部分。該等多肽可進一步經工程化以延長半衰期或改良溶解性。特別地，可產生該等多肽與血清蛋白(諸如IgG或人類血清白蛋白之Fc片段)之融合構築體以延長半衰期，其類似於以下段落中對於本發明之抗體片段分子所述之Fc工程化。

構架或Fc工程化

本發明之經工程化抗體包括已對 V_H 及/或 V_L 內之構架殘基進行修飾(例如)以改良抗體特性的抗體。通常進行該等構架修飾以降低抗體之免疫原性。舉例而言，一種方法為使一或多個構架殘基"逆突變(backmutate)"成相應生殖系序列。更特定言之，已進行體細胞突變之抗體可含有與產生抗體之生殖系序列不同的構架殘基。該等殘基可藉由將該等抗體構架序列與產生該抗體之生殖系序列比較來鑑別。為使該等構架區序列回復至其生殖系組態，可藉由(例如)定點誘變或PCR介導之誘變來使體細胞突變"逆突變"成生殖系序列。該等經"逆突變"之抗體亦意欲為本發明所涵蓋。

另一類構架修飾涉及使該構架區內或甚至一或多個CDR

區內之一或多個殘基突變以移除T細胞抗原決定基而由此降低該抗體之潛在免疫原性。此方法亦稱為"去免疫"，進一步詳細描述於Carr等人之美國專利公開案第20030153043號中。

除構架區或CDR區內進行之修飾以外，或另外，本發明之抗體可經工程化以包括Fc區內之修飾，通常以改變該抗體之一或多種功能特性，諸如血清半衰期、補體固定、Fc受體結合及/或抗原依賴性細胞毒性。此外，本發明之抗體可經化學修飾(例如，可將一或多個化學部分連接於抗體上)或經修飾以改變其糖基化，以再改變該抗體之一或多種功能特性。以下進一步詳細描述該等實施例。Fc區中之殘基編號為Kabat之EU索引之編號。

在一個實施例中，CH1之鉸鏈區經修飾以使得該鉸鏈區中之半胱胺酸殘基數改變，例如增加或減少。此方法進一步描述於Bodmer等人之美國專利第5,677,425號中。CH1之鉸鏈區中之半胱胺酸殘基數經改變以例如有利於輕鏈及重鏈之組裝或增強或降低該抗體之穩定性。

在另一實施例中，抗體之Fc鉸鏈區經突變以縮短該抗體之生物半衰期。更特定言之，將一或多個胺基酸突變引入Fc鉸鏈片段之CH2-CH3域界面區中以使得該抗體具有葡萄球菌蛋白A(SpA)結合相對於原Fc鉸鏈域SpA結合減弱。此方法進一步詳細描述於Ward等人之美國專利第6,165,745號中。

在另一實施例中，該抗體經修飾以延長其生物半衰期。

多種方法可行。舉例而言，如Ward之美國專利第6,277,375號中所述，可引入一或多種下列突變：T252L、T254S、T256F。或者，為延長生物半衰期，如Presta等人之美國專利第5,869,046及6,121,022號中所述，可使抗體在CH1或CL區內改變以含有一個取自IgG Fc區之CH2域之兩個環的補救受體(salvage receptor)結合抗原決定基。

在其他實施例中，以不同胺基酸殘基替代至少一個胺基酸殘基來改變Fc區以改變該抗體之效應功能。舉例而言，一或多個胺基酸可以不同胺基酸殘基替代以使得該抗體對效應配體之親和力改變但保留該親本抗體之抗原結合能力。對其之親和力改變之效應配體可為(例如)Fc受體或補體之C1組份。該方法進一步詳細描述於Winter等人之美國專利第5,624,821與5,648,260號中。

在另一實施例中，一或多個選自胺基酸殘基之胺基酸可以不同胺基酸殘基替代以使該抗體具有改變之C1q結合及/或減少或消除之補體依賴性細胞毒性(CDC)。該方法進一步詳細描述於Idusogie等人之美國專利第6,194,551號中。

在另一實施例中，一或多個胺基酸殘基經改變以由此改變該抗體結合補體之能力。此方法進一步詳細描述於Bodmer等人之PCT公開案WO 94/29351中。

在另一實施例中，藉由修飾一或多個胺基酸來修飾Fc區以增加該抗體介導抗體依賴性細胞毒性(ADCC)之能力及/或增加該抗體對Fc γ 受體之親和力。此方法進一步詳細描述於Presta之PCT公開案WO 00/42072中。此外，已對人類

IgG1上FcγRI、FcγRII、FcγRIII及FcRn之結合位點進行定位且描述具有改良結合之變異體(參見Shields, R.L.等人, 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604)。

在另一實施例中, 抗體之糖基化經修飾。舉例而言, 可製備去糖基化之抗體(亦即缺乏糖基化之抗體)。糖基化可經改變以(例如)增加該抗體對"抗原"之親和力。該等碳水化合物修飾可藉由(例如)改變抗體序列內之一或多個糖基化位點來完成。舉例而言, 可進行一或多個胺基酸取代, 去除一或多個可變區構架糖基化位點由此去除該位點處之糖基化。該去糖基化可增加抗體對抗原之親和力。該方法進一步詳細描述於Co等人之美國專利第5,714,350及6,350,861號中。

此外或其他, 可製備糖基化類型改變之抗體, 諸如岩藻糖基殘基量減少之低岩藻糖基化抗體或二分GlcNac結構增加之抗體。該等變異糖基化模式已經證實可增加抗體之ADCC能力。該等碳水化合物修飾可藉由(例如)使抗體在糖基化方式改變之宿主細胞中表現來完成。糖基化方式改變之細胞在此項技術中已加以描述且可用作表現本發明之重組抗體由此產生糖基化改變之抗體的宿主細胞。舉例而言, Hang等人之EP 1,176,195描述具有經功能性破壞之FUT8基因(其編碼岩藻糖基轉移酶)的細胞株以使在該細胞株中表現之抗體展現低岩藻糖基化。Presta之PCT公開案WO 03/035835描述一種變異CHO細胞株Lecl3細胞, 其將岩藻糖連接至Asn(297)連接碳水化合物之能力降低, 亦使

在該宿主細胞中表現之抗體低岩藻糖基化(亦參見Shields, R.L.等人, 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740)。Umana等人之PCT公開案WO 99/54342描述經工程化以表現醣蛋白-修飾醣基轉移酶(例如 $\beta(1,4)$ -N乙醯基葡糖胺基轉移酶III(GnTIII))之細胞株, 以使得在工程化細胞株中表現之抗體展現之二分GlcNac結構增加, 其使得該等抗體之ADCC活性增加(亦參見Umana等人, 1999 Nat. Biotech. 17:176-180)。

本發明所涵蓋之本文中之抗體的另一種修飾為聚乙二醇化。抗體可經聚乙二醇化(例如)以延長該抗體之生物(例如血清)半衰期。為使抗體聚乙二醇化, 通常使該抗體或其片段與聚乙二醇(PEG), 諸如PEG之反應性酯或醛衍生物在使一或多個PEG基團連接於該抗體或抗體片段上之條件下反應。聚乙二醇化可藉由與反應性PEG分子(或類似之反應性水溶性聚合物)之醯化反應或烷基化反應來進行。如本文中所使用之術語"聚乙二醇"意欲涵蓋已用以衍生其他蛋白質之任何形式之PEG, 諸如單(C1-C10)烷氧基聚乙二醇或單(C1-C10)芳氧基聚乙二醇或聚乙二醇-順丁烯二醯亞胺。在某些實施例中, 待聚乙二醇化之抗體為去糖基化之抗體。用於使蛋白質聚乙二醇化之方法在此項技術中已知且可應用於本發明之抗體。參見(例如)Nishimura等人之EP 0 154 316或Ishikawa等人之EP 0 401 384。

本發明所涵蓋之抗體之另一種修飾為本發明之抗體的至少抗原結合區與血清蛋白(諸如人類血清白蛋白或其片段)

之結合物或蛋白融合體以延長所得分子之半衰期。該方法(例如)描述於Ballance等人之EP0322094中。

另一可能性為本發明之抗體的至少抗原結合區與能夠結合血清蛋白(諸如人類血清白蛋白)之蛋白質之融合體以延長所得分子之半衰期。該方法(例如)描述於Nygren等人之EP 0 486 525中。

使變異抗體工程化之方法

如以上所論述，具有本文所示之 V_H 及 V_L 序列或全長重鏈及輕鏈序列之抗骨硬化素抗體可用於藉由修飾全長重鏈及/或輕鏈序列、 V_H 及/或 V_L 序列或其所連接之恆定區來產生新的抗骨硬化素抗體。因此，在本發明之另一態樣中，使用本發明之抗骨硬化素抗體之結構特徵來產生結構相關之抗骨硬化素抗體，其保留本發明之抗體之至少一種功能特性(諸如與人類骨硬化素結合)且亦抑制骨硬化素之一或多種功能特性(例如受體結合、預防或改善骨質溶解)。

舉例而言，本發明之抗體之一或多個CDR區或其突變體可與已知構架區及/或其他CDR重組組合以產生如以上所述之本發明之其他經重組工程化之抗骨硬化素抗體。其他類型之修飾包括先前部分中所述之修飾。工程化方法之起始物為本文中所提供之 V_H 及/或 V_L 序列中之一或多者，或其一或多個CDR區。為產生工程化抗體，並非必需實際上製備具有本文中所提供之 V_H 序列及/或 V_L 序列中之一或多者，或其一或多個CDR區的抗體(亦即表現為蛋白質)。實情為該等序列中所含有之資訊用作產生來源於原始序列之

"第二代"序列的起始物，且隨後製備"第二代"序列且表現為蛋白質。

因此，在另一實施例中，本發明提供一種製備抗骨硬化素抗體之方法，該抗骨硬化素抗體由以下部分組成：重鏈可變區抗體序列，其具有選自由SEQ ID NO:1-11組成之群之CDR1序列、選自由SEQ ID NO:12-22組成之群之CDR2序列及/或選自由SEQ ID NO:23-33組成之群之CDR3序列；及輕鏈可變區抗體序列，其具有選自由SEQ ID NO:34-44組成之群的CDR1序列、選自由SEQ ID NO:45-55組成之群的CDR2序列及/或選自由SEQ ID NO:56-66組成之群的CDR3序列；改變該重鏈可變區抗體序列及/或該輕鏈可變區抗體序列內之至少一胺基酸殘基以產生至少一變異抗體序列；及使該變異抗體序列表現為蛋白質。

因此，在另一實施例中，本發明提供一種製備經最佳化以於哺乳動物細胞中表現之抗骨硬化素抗體之方法，該抗骨硬化素抗體由以下部分組成：具有選自SEQ ID NO:111-121之群之序列的全長重鏈抗體序列；及具有選自122-132之群之序列的全長輕鏈抗體序列；改變該全長重鏈抗體序列及/或該全長輕鏈抗體序列內之至少一胺基酸殘基以產生至少一變異抗體序列；及使該變異抗體序列表現為蛋白質。

變異抗體序列亦可藉由篩檢具有選自由SEQ ID NO:23-33組成之群之固定CDR3序列或如US20050255552中所述之最小必需結合決定子及CDR1及CDR2序列之多樣性的抗體

庫來製備。篩檢可根據適合於自抗體庫篩檢抗體之任何篩檢技術(諸如噬菌體呈現技術)執行。

標準分子生物學技術可用以製備及表現變異抗體序列。由變異抗體序列編碼之抗體為保留本文所述之抗骨硬化素抗體之一種、一些或所有功能特性之抗體，該等功能特性包括(但不限於)特異性結合人類骨硬化素；且該抗體展現以下功能特性中之至少一者：該抗體在基於細胞之wnt信號傳輸檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用，該抗體在基於細胞之礦化檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用或在Smad1磷酸化檢定中阻斷骨硬化素之抑制作用，或該抗體抑制骨硬化素與LRP-6結合或該抗體增加骨形成及質量及密度。

變異抗體可展現以上所述之功能特性中之一或多者，兩者或兩者以上，或三者或三者以上。

變異抗體之功能特性可使用此項技術中可用及/或本文中所述之標準檢定，諸如實例中所述之標準檢定(例如ELISA)來評定。

在本發明之使抗體工程化之方法的某些實施例中，可沿整個或一部分抗骨硬化素抗體編碼序列隨機或選擇性引入突變，且可對所得經修飾之抗骨硬化素抗體就如本文中所述之結合活性及/或其他功能特性進行篩檢。突變方法於此項技術中已加以描述。舉例而言，Short之PCT公開案WO 02/092780描述使用飽和誘變、合成接合組裝或其組合產生及篩檢抗體突變之方法。或者，Lazar等人之PCT公開案WO 03/074679描述使用計算篩檢方法來使抗體之生化特

性最佳化之方法。

編碼本發明之抗體的核酸分子

本發明之另一態樣係關於編碼本發明之抗體的核酸分子。全長輕鏈親本核苷酸序列之實例係如SEQ ID NO 144-145所示。全長重鏈親本核苷酸序列之實例係如SEQ ID NO 133-134所示。經最佳化以於哺乳動物細胞中表現之全長輕鏈核苷酸序列之實例係如SEQ ID NO 146-154所示。經最佳化以於哺乳動物細胞中表現之全長重鏈核苷酸序列之實例係如SEQ ID NO 135-143所示。

核酸可存在於完整細胞中，存在於細胞溶解物中，或可為呈部分純或大體上純之形式的核酸。當核酸藉由標準技術(包括鹼/SDS處理、CsCl結合、管柱層析法、瓊脂糖凝膠電泳及此項技術中熟知之其他技術)自其他細胞組份或其他污染物(例如其他細胞核酸或蛋白質)純化時，其為"經分離"或"變成大體上純的"。參見F. Ausubel等人編輯。1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York。本發明之核酸可為(例如)DNA或RNA，且可能含有或可能不含有內含子序列。在一實施例中，該核酸為cDNA分子。核酸可存在於諸如噬菌體呈現載體之載體中，或存在於重組質體載體中。

本發明之核酸可使用標準分子生物學技術獲得。對於由融合瘤(例如，如下進一步描述之由帶有人類免疫球蛋白基因之轉殖基因小鼠製備的融合瘤)表現之抗體而言，編

碼由該融合瘤製備之抗體之輕鏈及重鏈的cDNA可藉由標準PCR擴增或cDNA選殖技術獲得。對於由免疫球蛋白基因庫獲得(例如使用噬菌體呈現技術)之抗體而言，編碼該抗體之核酸可自作為該庫之成員的多個噬菌體純系回收。

一旦獲得編碼 V_H 及 V_L 區段之DNA片段，該等DNA片段即可進一步藉由標準重組DNA技術處理(例如)以使該等可變區基因轉化為全長抗體鏈基因，轉化為Fab片段基因或scFv基因。在該等處理中，將編碼 V_L 或 V_H 之DNA片段操作性連接至另一DNA分子或編碼另一蛋白質之片段(諸如抗體恆定區或可撓性連接子)。如此情況下所用之術語"操作性連接"意謂兩個DNA片段以功能方式接合，例如使得由該兩個DNA片段編碼之胺基酸序列保持同框，或使得該蛋白質在所需啟動子的控制下表現。

可藉由將編碼 V_H 之DNA操作性連接至編碼重鏈恆定區(CH1、CH2及CH3)之另一DNA分子來將編碼 V_H 區之經分離DNA轉化為全長重鏈基因。人類重鏈恆定區基因之序列在此項技術中已知(參見，例如Kabat, E. A.等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，U.S. Department of Health and Human Services，NIH公開號91-3242)且涵蓋該等區域之DNA片段可藉由標準PCR擴增獲得。重鏈恆定區可為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區。較佳地，重鏈恆定區在IgG2同型中選擇。對於Fab片段重鏈基因而言，可將編碼 V_H 之DNA操作性連接至僅編碼重鏈CH1恆定區之另一DNA

分子上。

可藉由將編碼 V_L 之 DNA 操作性連接至編碼輕鏈恆定區 CL 之另一 DNA 分子來將經分離之編碼 V_L 區之 DNA 轉化為全長輕鏈基因(以及 Fab 輕鏈基因)。人類輕鏈恆定區基因之序列在此項技術中已知(參見(例如)Kabat, E. A. 等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 公開號 91-3242), 且涵蓋該等區域之 DNA 片段可藉由標準 PCR 擴增獲得。該輕鏈恆定區可為 κ 或 λ 恆定區。

為產生 scFv 基因, 將編碼 V_H 及 V_L 之 DNA 片段操作性連接至編碼可撓性連接子(例如編碼胺基酸序列 $(Gly4-Ser)_3$) 之另一片段上, 以使得 V_H 及 V_L 序列可表現為鄰近單鏈蛋白, 其中 V_L 及 V_H 區由可撓性連接子接合(參見(例如)Bird 等人, 1988 Science 242:423-426; Huston 等人, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty 等人, 1990 Nature 348:552-554)。

本發明之單株抗體的產生

單株抗體(mAb)可藉由多種技術來製備, 該等技術包括習知單株抗體方法, 例如 Kohler 及 Milstein, 1975 Nature 256: 495 之標準體細胞雜交技術。可使用產生單株抗體之多種技術, 例如 B 淋巴細胞之病毒性或致癌性轉化。

用於製備融合瘤之動物系統為鼠類系統。在小鼠中產生融合瘤為充分確立之程序。分離經免疫脾細胞以供融合之免疫方案及技術在此項技術中已知。亦已知融合搭配物

(例如鼠類骨髓瘤細胞)及融合程序。

本發明之嵌合抗體或人源化抗體可基於如上所述製備之鼠類單株抗體之序列製備。編碼重鏈及輕鏈免疫球蛋白之DNA可使用標準分子生物學技術由所關注之鼠類融合瘤獲得且可經工程化以含有非鼠類(例如人類)免疫球蛋白序列。舉例而言，為產生嵌合抗體，可使用此項技術中已知之方法來使鼠類可變區與人類恆定區連接(參見(例如)Cabilly等人之美國專利第4,816,567號)。為產生人源化抗體，可使用此項技術中已知之方法將鼠類CDR區插入人類構架中。參見(例如)Winter之美國專利第5225539號及Queen等人之美國專利第5530101；5585089；5693762及6180370號。

在某一實施例中，本發明之抗體為人類單株抗體。該等針對骨硬化素之人類單株抗體可使用帶有部分人類免疫系統而非小鼠系統的轉殖基因或轉染色體小鼠來產生。該等轉殖基因及轉染色體小鼠包括在本文中分別稱為HuMAb小鼠及KM小鼠之小鼠，且在本文中統稱為"人類Ig小鼠"。

HuMAb mouse[®](Medarex, Inc.)含有編碼未重排人類重鏈(μ 及 γ)及 κ 輕鏈免疫球蛋白序列之人類免疫球蛋白基因微小位點以及使內源 μ 及 κ 鏈位點失活之靶向突變(參見(例如)Lonberg等人，1994 Nature 368(6474): 856-859)。因此，小鼠展現出小鼠IgM或 κ 表現減少，且對免疫作用作出反應，所引入之人類重鏈及輕鏈轉殖基因進行類別轉換及體細胞突變以產生高親和力人類IgG κ 單株抗體(Lonberg,

N.等人，1994前述；評論於Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101；Lonberg, N.及Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol. 13:65-93；及Harding, F.及Lonberg, N., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546中)。下列文獻中進一步描述HuMAb小鼠之製備及用途及該等小鼠所帶有之基因組修飾：Taylor, L.等人，1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295；Chen, J.等人，1993 International Immunology 5:647-656；Tuailon等人，1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724；Choi等人，1993 Nature Genetics 4:117-123；Chen, J.等人，1993 EMBO J. 12:821-830；Tuailon等人，1994 J. Immunol. 152:2912-2920；Taylor, L.等人，1994 International Immunology 579-591；及Fishwild, D.等人，1996 Nature Biotechnology 14: 845-851，所有該等文獻之全部內容係以引用的方式特別地併入本文中。此外參見皆為Lonberg及Kay之美國專利第5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,789,650、5,877,397、5,661,016、5,814,318、5,874,299及5,770,429號；Surani等人之美國專利第5,545,807號；皆為Lonberg及Kay之PCT公開案第WO 92/103918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/113852、WO 98/24884及WO 99/45962號；及Korman等人之PCT公開案第WO 01/14424號。

在另一實施例中，本發明之人類抗體可使用在轉殖基因及轉染色體上帶有人類免疫球蛋白序列之小鼠，諸如帶有

人類重鏈轉殖基因及人類輕鏈轉染色體之小鼠產生。該等小鼠(在本文中稱為"KM小鼠")詳細描述於Ishida等人之PCT公開案WO 02/43478中。

另外，表現人類免疫球蛋白基因之替代性轉殖基因動物系統在此項技術中可得且可用以產生本發明之抗骨硬化素抗體。舉例而言，可使用稱為Xenomouse(Abgenix, Inc.)之替代性轉殖基因系統。該等小鼠描述於(例如)Kucherlapati等人之美國專利第5,939,598；6,075,181；6,114,598；6,150,584及6,162,963號中。

此外，表現人類免疫球蛋白基因之替代性轉染色體動物系統在此項技術中可得且可用以產生本發明之抗骨硬化素抗體。舉例而言，可使用稱為"TC小鼠"之帶有人類重鏈轉染色體與人類輕鏈轉染色體之小鼠；該等小鼠描述於Tomizuka等人，2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727中。此外，帶有人類重鏈及輕鏈轉染色體之牛於此項技術中已加以描述(Kuroiwa等人，2002 Nature Biotechnology 20:889-894)且可用於產生本發明之抗骨硬化素抗體。

亦可使用噬菌體呈現方法篩檢人類免疫球蛋白基因庫來製備本發明之人類單株抗體。該等用於分離人類抗體之噬菌體呈現方法在此項技術中已確立或描述於以下實例中。參見(例如)：Ladner等人之美國專利第5,223,409、5,403,484及5,571,698號；Dower等人之美國專利第5,427,908及5,580,717號；McCafferty等人之美國專利第

5,969,108 及 6,172,197 號；及 Griffiths 等人之美國專利第 5,885,793、6,521,404、6,544,731、6,555,313、6,582,915 及 6,593,081 號。

本發明之人類單株抗體亦可使用 SCID 小鼠製備，其中已將人類免疫細胞重構於該等小鼠中從而可在免疫之後產生人類抗體反應。該等小鼠係描述於(例如)Wilson 等人之美國專利第 5,476,996 及 5,698,767 號中。

產生人類單株抗體之融合瘤之獲得

為獲得產生本發明之人類單株抗體之融合瘤，可將經免疫小鼠之脾細胞及/或淋巴結細胞分離且與適當永生化細胞株(諸如小鼠骨髓瘤細胞株)融合。可對所得融合瘤就抗原特異性抗體之產生進行篩檢。舉例而言，可以 50% PEG 將來自經免疫小鼠之脾淋巴細胞之單細胞懸浮液與六分之一數目之 P3X63-Ag8.653 非分泌小鼠骨髓瘤細胞(ATCC, CRL 1580)融合。將細胞以約 2×10^5 塗佈於平底微量滴定板內，繼而在含有 20% 胎純系血清、18% "653" 改良性培養基、5% origin(IGEN)、4 mM L-麩醯胺酸、1 mM 丙酮酸鈉、5 mM HEPES、0.055 mM 2-巰基乙醇、50 單位/毫升青黴素、50 mg/ml 鏈黴素、50 mg/ml 慶大黴素及 $1 \times \text{HAT}$ (Sigrna; 融合 24 小時後添加 HAT) 之選擇性培養基中培育兩週。約兩週之後，可將細胞在以 HT 替代 HAT 之培養基中培養。隨後可藉由 ELISA 對個別孔就人類單株 IgM 及 IgG 抗體進行篩檢。出現廣泛融合瘤生長之後，通常可在 10-14 日後觀察培養基。再塗佈分泌抗體之融合瘤，再次篩檢，

若對人類IgG仍為陽性，則可藉由限制稀釋法將單株抗體次選殖至少兩次。隨後可在活體外培養穩定次純系以在組織培養基內產生少量抗體以供表徵。

為純化人類單株抗體，可使所選融合瘤在2公升旋轉瓶中生長以進行單株抗體純化。可將上清液過濾且濃縮，隨後以蛋白A-瓊脂糖(Pharmacia, Piscataway, N.J.)進行親和層析。經溶離之IgG可由凝膠電泳及高效液相層析檢驗以確保純度。可將緩衝溶液替換為PBS，且可使用1.43消光係數藉由OD₂₈₀測定濃度。可將單株抗體等分且儲存於-80°C下。

產生單株抗體之轉染瘤之獲得

本發明之抗體亦可使用(例如)此項技術中熟知之重組DNA技術與基因轉染方法之組合在宿主細胞轉染瘤中產生(例如Morrison, S. (1985) Science 229:1202)。

舉例而言，為表現該等抗體或其抗體片段，編碼部分或全長輕鏈及重鏈之DNA可藉由標準分子生物學技術(例如，PCR擴增或cDNA選殖，使用表現所關注抗體之融合瘤)獲得，且該等DNA可插入表現載體中以使得該等基因與轉錄及轉譯控制序列操作性連接。在此情形中，術語"操作性連接"意謂將抗體基因接合至載體內以使載體內之轉錄及轉譯控制序列發揮其調節抗體基因轉錄及轉譯之預期功能。表現載體及表現控制序列經選擇以與所用表現宿主細胞相容。可將抗體輕鏈基因及抗體重鏈基因插入獨立載體中，或更通常將兩種基因插入同一表現載體中。藉由

標準方法(例如該抗體基因片段與載體上之互補限制位點的接合，或若不存在限制位點則為鈍端接合)將該等抗體基因插入表現載體中。可使用本文所述之抗體之輕鏈及重鏈可變區產生任何抗體同型之全長抗體基因，此係藉由將該等可變區插入已編碼所需同型之重鏈恆定區及輕鏈恆定區之表現載體中，以使得 V_H 區段與載體內之 CH 區段操作性連接且 V_L 區段與載體內之 CL 區段操作性連接。此外或其他，重組表現載體可編碼有利於自宿主細胞分泌抗體鏈之信號肽。該抗體鏈基因可選殖至載體中以使得該信號肽與該抗體鏈基因之胺基末端同框連接。該信號肽可為免疫球蛋白信號肽或異源信號肽(亦即來自非免疫球蛋白蛋白質的信號肽)。

除抗體鏈基因以外，本發明之重組表現載體帶有控制抗體鏈基因在宿主細胞中表現之調節序列。術語"調節序列"意欲包括控制抗體鏈基因之轉錄或轉譯之啟動子、增強子及其他表現控制元(例如聚腺苷酸化信號)。該等調節序列描述於(例如)Goeddel(Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))中。熟習此項技術者應瞭解，表現載體之設計，包括調節序列之選擇，可視諸如待轉化宿主細胞之選擇、所需蛋白質表現量等因素而定。哺乳動物宿主細胞表現之調節序列包括引導哺乳動物細胞內高蛋白質表現量的病毒元，諸如來源於細胞巨大病毒(CMV)、猿猴病毒40(Simian Virus 40, SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期

啟動子(AdMLP))及多形瘤之啟動子及/或增強子。或者，可使用非病毒性調節序列，諸如泛素啟動子或P-血球蛋白啟動子。此外，調節元包含來自不同來源之序列，諸如SRa啟動系統，其含有來自SV40早期啟動子之序列及1型人類T細胞白血病毒之長末端重複序列(Takebe, Y.等人，1988 Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

除抗體鏈基因及調節序列以外，本發明之重組表現載體可帶有其他序列，諸如調節載體在宿主細胞中複製之序列(例如，複製起點)及可選標記基因。該可選標記基因有利於選擇載體已引入其中之宿主細胞(參見(例如)均為Axel等人之美國專利第4,399,216、4,634,665號及5,179,017號)。舉例而言，通常可選標記基因賦予載體已引入其中之宿主細胞對諸如G418、潮黴素(hygromycin)或甲胺喋呤之藥物的抗性。可選標記基因包括二氫葉酸還原酶(DHFR)基因(用於dhfr-宿主細胞中之甲胺喋呤選擇/擴增)及neo基因(用於G418選擇)。

為表現輕鏈及重鏈，藉由標準技術將編碼重鏈及輕鏈之表現載體轉染至宿主細胞中。多種形式之術語"轉染"意欲涵蓋通常用於將外源DNA引入原核或真核宿主細胞中之多種技術，例如電穿孔、磷酸鈣沈澱、DEAE-葡聚糖轉染及其類似技術。理論上可使本發明之抗體在原核或真核宿主細胞中表現。論述了抗體在真核細胞(尤其哺乳動物宿主細胞)中之表現，此係由於該等真核細胞且尤其哺乳動物細胞比原核細胞更有可能組裝及分泌經適當摺疊及免疫活

性之抗體。已報導抗體基因之原核表現對於產生高產率之活性抗體而言無效(Boss, M. A.及 Wood, C. R., 1985 Immunology Today 6:12-13)。

用於表現本發明之重組抗體之哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(CHO細胞)(包括 Urlaub及 Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220中所述之 dhfr-CHO細胞，與例如 R.J. Kaufman及 P.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621中所述之 DH FR可選標記一起使用)、NSO骨髓瘤細胞、COS細胞及 SP2細胞。詳言之，對於與 NSO骨髓瘤細胞一起使用，另一表現系統為 WO 87/04462、WO 89/01036及 EP 338,841中所示之 GS基因表現系統。當將編碼抗體基因之重組表現載體引入哺乳動物宿主細胞時，藉由將該等宿主細胞培養足以使抗體在宿主細胞內表現或將抗體分泌至宿主細胞所生長之培養基內的一段時期來產生抗體。可使用標準蛋白質純化方法自培養基回收抗體。

雙特異性分子

在另一態樣中，本發明之特徵為包含本發明之抗骨硬化素抗體或其片段之雙特異性或多特異性分子。本發明之抗體或其抗原結合部分可衍生為或連接至另一功能分子(例如另一肽或蛋白質)(例如受體之另一抗體或配體)以產生與至少兩個不同結合位點或靶分子結合之雙特異性分子。實際上，本發明之抗體可衍生為或連接至一個以上其他功能分子以產生結合兩個以上不同結合位點及/或靶分子之多特異性分子；該等多特異性分子亦意欲為本文中所使用之

術語"雙特異性分子"所涵蓋。為產生本發明之雙特異性分子，可將本發明之抗體與一或多個諸如另一抗體、抗體片段、肽或結合模擬劑之其他結合分子功能性連接(例如經由化學偶合、基因融合、非共價結合或其他方法)以產生雙特異性分子。

因此，本發明包括包含至少一對骨硬化素之第一結合特異性及對第二靶抗原決定基之第二結合特異性的雙特異性分子。舉例而言，第二標靶抗原決定基為骨硬化素中不同於第一靶抗原決定基之另一抗原決定基。另一實例為包含至少一對骨硬化素之第一結合特異性及對Dkk-1內之抗原決定基之第二結合特異性的雙特異性分子。另一實例為包含至少一對骨硬化素之第一結合特異性及對LRP4內之抗原決定基之第二結合特異性的雙特異性分子。

此外，對於雙特異性分子具有多特異性之發明而言，除第一及第二靶抗原決定基之外，該分子可另外包括第三結合特異性。

在一實施例中，本發明之雙特異性分子包含至少一抗體或其抗體片段(包括(例如)Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或單鏈Fv)作為結合特異性。該抗體亦可為輕鏈或重鏈二聚物，或其任意最小片段，諸如Fv或如Ladner等人之美國專利第4,946,778號中所述之單鏈構築體，該專利之內容以引用的方式明確併入本文中。

可用於本發明之雙特異性分子中之其他抗體為鼠類單株抗體、嵌合單株抗體及人源化單株抗體。

本發明之雙特異性分子可藉由使用此項技術中已知之方法將結合特異性組份結合來製備。舉例而言，雙特異性分子之各結合特異性可獨立地產生且隨後彼此結合。當結合特異性為蛋白質或肽時，多種偶合劑或交聯劑可用於共價結合。交聯劑之實例包括蛋白A、碳化二亞胺、N-琥珀醯亞胺基-S-乙醯基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫雙(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、鄰苯二順丁烯二醯亞胺(oPDM)、N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)及4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸磺酸基琥珀醯亞胺酯(磺酸基-SMCC)(參見(例如)Karpovsky等人，1984 J. Exp. Med. 160:1686；Liu, MA等人，1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括下列文獻中所述之方法：Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78,118-132；Brennan等人，1985 Science 229:81-83；及Glennie等人，1987 J. Immunol. 139: 2367-2375。結合劑為SATA及磺酸基-SMCC，其均可購自Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)。

當結合特異性為抗體時，其可藉由兩個重鏈之C末端鉸鏈區之氫硫基鍵結而結合。在一特定實施例中，該鉸鏈區在結合之前經修飾以含有奇數個氫硫基殘基，例如1個。

或者，兩種結合特異性可在同一載體中編碼且在同一宿主細胞中表現及組裝。若雙特異性分子為mAb×mAb、mAb×Fab、Fab×F(ab')₂或配體×Fab融合蛋白，則此方法尤其適用。本發明之雙特異性分子可為包含一單鏈抗體及一結合決定子的單鏈分子，或包含兩個結合決定子之單鏈雙

特異性分子。雙特異性分子可包含至少兩個單鏈分子。製備雙特異性分子之方法描述於(例如)美國專利第5,260,203號、美國專利第5,455,030號、美國專利第4,881,175號、美國專利第5,132,405號、美國專利第5,091,513號、美國專利第5,476,786號、美國專利第5,013,653號、美國專利第5,258,498號及美國專利第5,482,858號中。

雙特異性分子與其特異性標靶之結合可藉由(例如)酶聯免疫吸附檢定(ELISA)、放射免疫檢定(REA)、FACS分析、生物檢定(例如生長抑制)或西方墨點檢定來證實。該等檢定中之每一者通常藉由使用對所關注之複合物具有特異性的經標記試劑(例如抗體)來偵測備受關注之蛋白質-抗體複合物的存在。

多價抗體

在另一態樣中，本發明提供多價化合物，其包含本發明之抗體與骨硬化素結合之至少兩個相同或不同抗原結合部分。較佳地，假設骨硬化素具有三聚性，則本發明之化合物提供該等抗體之至少三個或四個抗原結合部分。抗原結合部分可經由蛋白質融合或共價或非共價鍵聯連接在一起。或者，鍵聯之方法已對於雙特異性分子進行描述。可(例如)藉由使本發明之抗體與結合本發明之抗體之恆定區(例如Fc或鉸鏈區)的抗體交聯來獲得四價化合物。

三聚域描述於(例如)Borean專利EP 1 012 280B1中。五聚模組描述於(例如)PCT/EP97/05897中。

醫藥組合物

在另一態樣中，本發明提供一種組合物(例如醫藥組合物)，其含有與醫藥學上可接受之載劑一起調配的本發明之一種單株抗體或其抗原結合部分或單株抗體或其抗原結合部分之組合。該等組合物可包括本發明之一種抗體或免疫結合物或雙特異性分子或(例如，兩種或兩種以上不同)抗體或免疫結合物或雙特異性分子之組合。舉例而言，本發明之醫藥組合物可包含與靶抗原上之不同抗原決定基結合或具有互補活性之抗體之組合。

本發明之醫藥組合物亦可以組合療法，亦即與其他藥劑組合投與。舉例而言，組合療法可包括本發明之抗骨硬化素抗體與至少一種其他消炎劑或抗骨質疏鬆劑的組合。可用於組合療法中之治療劑的實例更詳細描述於以下關於本發明之抗體之用途的部分中。該等組合物較佳調配為具有生理pH值。

如本文中所使用之"醫藥學上可接受之載劑"包括生理學上相容之任何及所有溶劑、分散介質、衣料、抗菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑及其類似載劑。載劑應適合於靜脈內、肌肉內、皮下、非經腸、經脊椎或經表皮投藥(例如藉由注射或輸注)。視投藥途徑而定，活性化合物(亦即抗體、免疫結合物或雙特異性分子)可包覆於保護該化合物免受可使該化合物失活之酸及其他自然條件之作用的材料中。

本發明之醫藥化合物可包括一或多種醫藥學上可接受之鹽。"醫藥學上可接受之鹽"係指保留母化合物之所需生物

活性且並不賦予任何不當毒理學作用的鹽(參見(例如)Berge, S.M., 等人, 1977 J. Pharm. Sci. 66:1-19)。該等鹽之實例包括酸加成鹽及鹼加成鹽。酸加成鹽包括來源於以下各酸之鹽: 無毒性無機酸, 諸如鹽酸、硝酸、磷酸、硫酸、氫溴酸、氫碘酸、亞磷酸及其類似物; 以及無毒性有機酸, 諸如脂族單羧酸及二羧酸、經苯基取代之烷酸、羥基烷酸、芳族酸、脂族磺酸及芳族磺酸及其類似物。鹼加成鹽包括來源於以下各鹼之鹽: 鹼土金屬, 諸如鈉、鉀、鎂、鈣及其類似物; 以及無毒性有機胺, 諸如N,N'-二苯甲基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普魯卡因(chloroprocaine)、膽鹼、二乙醇胺、乙二胺、普魯卡因及其類似物。

本發明之醫藥組合物亦可包括醫藥學上可接受之抗氧化劑。醫藥學上可接受之抗氧化劑之實例包括: 水溶性抗氧化劑, 諸如抗壞血酸、半胱胺酸鹽酸鹽、硫酸氫鈉、偏亞硫酸氫鈉、亞硫酸鈉及其類似物; 油溶性抗氧化劑, 諸如抗壞血酸棕櫚酸酯、丁基化羥基茴香醚(BHA)、丁基化羥基甲苯(BHT)、卵磷脂、沒食子酸丙酯、 α -生育酚及其類似物; 及金屬螯合劑, 諸如檸檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸及其類似物。

可用於本發明之醫藥組合物中之合適水性及非水性載劑的實例包括水、乙醇、多元醇(諸如甘油、丙二醇、聚乙二醇及其類似物)及其合適混合物、植物油(諸如橄欖油)及可注射有機酯(諸如油酸乙酯)。可(例如)藉由使用包衣材

料(諸如卵磷脂)、在分散液之情況下藉由保持所需粒度及藉由使用界面活性劑來保持適當流動性。

該等組合物亦可含有佐劑，諸如防腐劑、濕潤劑、乳化劑及分散劑。可藉由前述滅菌程序與藉由包括多種抗菌劑及抗真菌劑(例如，對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸及其類似物)二者來確保防止微生物存在。亦可需要在組合物中包括等張劑，諸如糖、氯化鈉及其類似物。此外，可注射藥物形式之吸收延長可藉由包括延遲吸收劑(諸如單硬脂酸鋁及明膠)來達成。

醫藥學上可接受之載劑包括無菌水性溶液或分散液，及用於實時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。醫藥學活性物質之該等介質及試劑之用途在此項技術中已知。除非任何習知介質或試劑與活性化合物不相容，否則涵蓋其在本發明之醫藥組合物中使用。補充性活性化合物亦可併入該等組合物中。

治療組合物通常在製造及儲存條件下必須為無菌且穩定的。該等組合物可調配為溶液、微乳液、脂質體或其他適合於高藥物濃度之有序結構。載劑可為溶劑或分散介質，其含有(例如)水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液體聚乙二醇，及其類似物)及其合適混合物。可(例如)藉由使用衣料(諸如卵磷脂)、在分散液之情況下藉由保持所需粒度及藉由使用界面活性劑來保持適當流動性。在多種情況下，組合物中可包括等張劑，例如糖、多元醇(諸如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化鈉。可注射組合物之吸收延長可

藉由在該組合物中包括延遲吸收劑(例如單硬脂酸鹽及明膠)來達成。

無菌可注射溶液可藉由將所需量之活性化合物與上文所列舉之一種成份或成份組合一起併入適當溶劑中，視需要繼而進行滅菌微過濾來製備。一般而言，分散液係藉由將活性化合物併入無菌媒劑中來製備，該無菌媒劑含有基本分散介質及來自上文所列舉之其他所需成份。在用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末的情況下，製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥(凍乾)，其產生活性成份外加來自其先前經無菌過濾之溶液的任何其他所需成份的粉末。

可與載劑物質組合以產生單一劑型之活性成份的量應視所治療之個體及特定投藥方式而定。可與載劑物質組合以產生單一劑型之活性成份的量通常為產生治療效應之組合物的量。大體而言，以100%計，此量將在約0.01%至約99%活性成份，約0.1%至約70%，或約1%至約30%與醫藥學上可接受之載劑組合的活性成份之範圍內。

給藥方案經調整以提供最佳所要反應(例如治療反應)。舉例而言，可投與單一大丸劑，可隨時間投與若干分劑量，或如治療情況之緊急性所示，可按比例減少或增加劑量。將非經腸組合物調配成易於投與且劑量均一之單位劑型為尤其有利的。如本文中所使用之單位劑型係指適合作為用於待治療個體之單一劑量的實體上離散之單位；各單位含有經計算以產生所要治療效應之預定量的與所需醫藥載劑結合之活性化合物。本發明之單位劑型之規格由活性

化合物之獨特特徵及欲達成之特定治療效應，及在混配該活性化合物用於治療個體之敏感性的技術中所固有之限制規定且直接視其而定。

為投與抗體，劑量介於每公斤主體體重約0.0001 mg至100 mg，且更通常每公斤主體體重0.01 mg至5 mg之範圍內。舉例而言，劑量可為每公斤體重0.3 mg、每公斤體重1 mg、每公斤體重3 mg、每公斤體重5 mg或每公斤體重10 mg，或在每公斤1-10 mg範圍內。例示性治療方案需要每週投藥一次，每兩週投藥一次，每三週投藥一次，每四週投藥一次，每月投藥一次，每三個月投藥一次或每三至六個月投藥一次。本發明之抗骨硬化素抗體之給藥方案包括每公斤體重靜脈內投與1 mg或3 mg，其中該抗體係使用以下給藥方案中之一者給予：每四週一次，6次劑量，隨後每三個月一次；每三週一次；每公斤體重3 mg一次，繼而每三週每公斤體重1 mg。

在一些方法中，兩種或兩種以上具有不同結合特異性之單株抗體係同時或依次投與，在該情況下，所投與之各抗體之劑量處於指定範圍內。抗體通常多次投與。單次劑量之間的時間間隔可為(例如)一週、一個月、三個月或一年。如藉由量測患者體內靶抗原之抗體的血液含量所指示，時間間隔亦可為不規則的。在一些方法中，調整劑量以使血漿抗體濃度達到約1-1000 $\mu\text{g/ml}$ 且在一些方法中為約25-300 $\mu\text{g/ml}$ 。

或者，抗體可以持續釋放調配物之形式投與，在該情況

下，需要較低頻率之投藥。劑量及頻率視抗體在患者體內之半衰期而變化。一般而言，人類抗體展示最長半衰期，隨後為人源化抗體、嵌合抗體及非人類抗體。投藥之劑量及頻率可視治療為預防性抑或治療性而變化。在預防性應用中，歷經較長時期以相對不頻繁之時間間隔投與相對較低之劑量。一些患者在其餘生中持續接受治療。在治療性應用中，時常需要相對較短之時間間隔之相對較高之劑量直至疾病進程得以減緩或終止或直至患者展示疾病症狀的部分或完全改善。此後，可向患者施以預防性方案。

本發明之醫藥組合物中活性成份之實際劑量水準可變化以獲得有效達成對特定患者、組合物及投藥方式而言之所需治療反應，而對患者不具有毒性的活性成份之量。選定劑量水準應視多種藥物代謝動力學因素而定，該等因素包括所用之本發明之特定組合物或其酯、鹽或醃胺的活性；投藥途徑；投藥時間；所用特定化合物之排泄速率；治療持續時間；與所用特定組合物組合使用的其他藥物、化合物及/或物質；所治療患者之年齡、性別、體重、病狀、一般健康狀況及先前病史；及醫學技術中熟知之類似因素。

"治療有效劑量"之本發明之抗骨硬化素抗體可使得疾病症狀嚴重性降低，無疾病症狀時期之頻率及持續時間增加，或預防由疾病病痛所致之損傷或殘疾。

本發明之組合物可藉由一或多種投藥途徑使用此項技術中已知之多種方法中之一或多者投與。如熟習此項技術者

所瞭解，投藥途徑及/或投藥方式將視所需結果而變化。本發明之抗體之投藥途徑包括靜脈內、肌肉內、皮內、腹膜內、皮下、經脊椎或其他非經腸投藥途徑(例如藉由注射或輸注)。如本文中所使用之短語"非經腸投藥"意謂除腸內及局部投藥以外，通常藉由注射之投藥模式，且包括(但不限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眼眶內、心臟內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊椎內、硬膜外及腦幹內注射及輸注。

或者，本發明之抗體可藉由諸如局部、表皮或黏膜投藥途徑之經腸途徑，例如鼻內、經口、經陰道、經直腸、舌下或局部投與。

活性化化合物可與將保護該化合物免於快速釋放之載劑一起製備，諸如控制釋放調配物，包括植入物、經皮貼片及微囊化傳遞系統。可使用生物可降解、生物相容性聚合物，諸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。製備該等調配物之諸多方法已申請專利或通常為熟習技術者所知。參見(例如)，Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems，J. R. Robinson編，Marcel Dekker，Inc.，New York，1978。

治療組合物可以此項技術中已知之醫療裝置投與。舉例而言，在一實施例中，本發明之治療組合物可以無針皮下注射裝置投與，諸如美國專利第5,399,163；5,383,851；5,312,335；5,064,413；4,941,880；4,790,824或4,596,556

號中所示之裝置。適用於本發明之熟知植入物及模組之實例包括：美國專利第4,487,603號，其展示一種用於以控制速率分配藥物之可植入式微輸注泵；美國專利第4,486,194號，其展示一種用於經由皮膚投與藥物之治療裝置；美國專利第4,447,233號，其展示一種用於以精確輸注速率傳遞藥物之藥物輸注泵；美國專利第4,447,224號，其展示一種用於持續藥物傳遞之可變流速可植入式輸注裝置；美國專利第4,439,196號，其展示一種具有多腔隔室之滲透性藥物傳遞系統；及美國專利第4,475,196號，其展示一種滲透性藥物傳遞系統。該等專利係以引用的方式併入本文中。多種其他此類植入物、傳遞系統及模組為熟習此項技術者所知。

在某些實施例中，可調配本發明之人類單株抗體以確保在活體內適當分布。舉例而言，血腦屏障(BBB)排除許多高親水性化合物。為確保本發明之治療化合物跨過BBB(若需要)，可將其調配(例如)於脂質體中。對於製備脂質體之方法，參見(例如)美國專利4,522,811；5,374,548；及5,399,331。脂質體可包含一或多個部分，該等部分經選擇性輸送至特定細胞或器官中，由此增強靶向藥物傳遞(參見(例如)V.V. Ranade, 1989 J. Cline Pharmacol. 29:685)。例示性靶向部分包括葉酸或生物素(參見(例如)Low等人之美國專利5,416,016)；甘露糖苷(Umezawa等人，1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038)；抗體(P.G. Bloeman等人，1995 FEBS Lett. 357:140；M.

Owais 等人，1995 Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180)；界面活性劑蛋白A受體(Briscoe等人，1995 Am. J. Physiol. 1233:134)；p120(Schreier等人，1994 J. Biol. Chem. 269:9090)；亦參見K. Keinanen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273。

本發明之用途及方法

本發明之抗體具有活體外及活體內診斷及治療效用。舉例而言，該等分子可投與至培養物中(例如活體外或活體內)，或個體體內(例如活體內)之細胞以治療、預防或診斷多種病症。如本文中所使用之術語"個體"意欲包括人類動物及非人類動物。非人類動物包括所有脊椎動物，例如哺乳動物及非哺乳動物，諸如非人類靈長類動物、綿羊、犬、貓、牛、馬、雞、兩棲動物及爬行動物。

該等方法尤其適合於治療、預防或診斷骨硬化素相關病症及/或異常骨礦物密度病症，例如骨質疏鬆症。

本發明亦提供增加骨礦物含量及/或礦物密度之方法。本發明之組合物亦可適用於改良矯形外科程序、牙科程序、植入手術、關節置換、骨移植、骨整形手術及骨修復(諸如骨折癒合、骨不連癒合、延遲連接癒合及面部重建)之結果。可在該程序、置換、移植、手術或修復之前、期間及/或之後投與一或多種組合物。

如本文中所使用之"骨硬化素相關病症"包括骨礦物密度(BMD)相對於健康個體異常及/或病理學上較低之病症。以

低BMD及/或骨易碎性為特徵之病症包括(但不限於)原發性及繼發性骨質疏鬆症、骨質減少、骨軟化、成骨不全(OI)、無血管性壞死(骨壞死)、骨折及植入物癒合(牙植入物及髖植入物)、其他病症所致之骨質流失(例如與HIV感染、癌症或關節炎相關)。其他"骨硬化素相關病症"包括(但不限於)類風濕性關節炎、骨關節炎、關節炎及溶骨病變之形成及/或存在。

如本文中所使用之"骨硬化素相關病症"包括與異常骨硬化素含量相關或以異常骨硬化素含量為特徵之病狀。其包括癌症及骨質疏鬆病狀(例如骨質疏鬆症或骨質減少)，其中有一些與如本文中所定義之"骨硬化素相關病症"相一致。骨硬化素相關癌症可包括骨髓瘤(例如具有溶骨病變之多發性骨髓瘤)、乳癌、結腸癌、黑色素瘤、肝細胞癌、上皮癌、食道癌、腦癌、肺癌、前列腺癌或胰腺癌以及其任何癌轉移。

"骨硬化素相關病症"亦可包括至少歸因於骨硬化素在腎臟及心血管中表現的腎及心血管病狀。該等病症包括(但不限於)腎病，諸如腎小球疾病(例如急性及慢性絲球體腎炎，迅速進行性絲球體腎炎，腎病症候群，局灶性增生性絲球體腎炎，與全身疾病相關之腎小球病變，諸如全身性紅斑性狼瘡症、古德帕斯徹氏症候群(Goodpasture's syndrome)、多發性骨髓瘤、糖尿病、多囊性腎病、瘤形成、鎌狀細胞病及慢性發炎性疾病)、腎小管疾病(例如急性腎小管壞死及急性腎衰竭、多囊性腎病髓質海綿腎、髓

質囊性病、腎原性糖尿病及腎小管性酸中毒)、腎小管間質疾病(例如腎盂腎炎、藥物及毒素誘發之腎小管間質腎炎、高鈣性腎病及低鉀性腎病)、急性及迅速進行性腎衰竭、慢性腎衰竭、腎石病、痛風、血管疾病(例如高血壓及腎硬化、微血管病性溶血性貧血、粥樣栓塞性腎病、擴散性皮層壞死及腎梗塞)或腫瘤(例如腎細胞癌及腎胚細胞瘤)。

該等病症亦包括(但不限於)心血管病症, 諸如缺血性心臟病(例如心絞痛、心肌梗塞及慢性缺血性心臟病)、高血壓性心臟病、肺原性心臟病、瓣膜性心臟病(例如風濕熱及風濕性心臟病、心內膜炎、二尖瓣脫垂及主動脈瓣狹窄)、先天性心臟病(例如瓣膜及血管阻塞性病變、心房或心室中隔缺損及開放性動脈導管)或心肌病(例如心肌炎、充血型心肌病及肥厚型心肌病)。

當骨硬化素之抗體與另一藥劑一起投與時, 兩者可以任意次序(亦即依次)或同時投與。

根據本發明之另一實施例, 本發明之抗體可用作其他療法之輔劑或佐劑, 例如使用骨再吸收抑制劑之療法, 例如在骨質疏鬆症療法中, 尤其使用以下各物之療法: 鈣; 降血鈣素或其類似物或衍生物, 例如鮭魚、鰻魚或人類降血鈣素; 鈣阻滯劑; 擬鈣劑(例如西那卡塞); 類固醇激素, 例如雌激素; 部分雌激素促效劑或雌激素助孕素組合; SERM(選擇性雌激素受體調節劑), 例如雷洛昔芬(raloxifene)、拉索昔芬(lasofoxifene)、巴多昔芬

(bazedoxifene)、阿佐昔芬(arzoxifene)、FC1271、替勃龍(Livial®)；SARM(選擇性雄激素受體調節劑)；RANKL抗體(諸如狄諾塞麥(denosumab))；組織蛋白酶K抑制劑；維生素D或其類似物或PTH，PTH片段或PTH衍生物，例如PTH(1-84)(諸如Preos™)、PTH(1-34)(諸如Forteo™)、PTH(1-36)、PTH(1-38)、PTH(1-31)NH₂或PTS 893。根據另一實施例，本發明之抗體可與其他當前骨質疏鬆症治療方法組合使用，該等其他當前骨質疏鬆症治療方法包括雙膦酸鹽(例如Fosamax™(阿倫膦酸鹽，alendronate)、Actonel™(利塞膦酸鈉，risedronate sodium)、Bonviva™(伊班膦酸，ibandronic acid)、Zometa™(唑來膦酸，zoledronic acid)、Aclasta™/Reclast™(唑來膦酸)、奧帕膦酸鹽、奈立膦酸鹽、替魯膦酸鈉、骨膦)、士他汀、合成代謝類固醇、矽鹽及鋁鹽及氟化鈉。

在一特定實施例中，本發明之抗體可與LRP4調節劑(亦即調節LRP4之表現或活性的藥劑，例如LRP4中和抗體)組合投與。

在另一特定實施例中，本發明之抗體可與DKK1調節劑(亦即干擾或中和Dkk-1介導之Wnt信號傳輸拮抗作用之藥劑，例如DKK1中和抗體)組合投與。

因此，本發明亦提供本發明之抗體或功能蛋白及(i)唑來膦酸、(ii)抗DKK1抗體、(iii)阿倫膦酸鹽、(iv)抗LRP4抗體、(v)hPTH及/或(vi)副甲狀腺素釋放劑(鈣阻滯劑)之用途，其係用於製備治療由骨硬化素所介導或與骨硬化素增

加含量相關之病理學病症之藥劑。

在另一實施例中，本發明提供本發明之抗體或功能蛋白在製備治療由骨硬化素所介導或與骨硬化素含量增加相關之病理學病症之藥劑中的用途，其中該藥劑係與以下各物結合使用(i)唑來膦酸、(ii)抗DKK1抗體、(iii)阿侖膦酸鹽、(iv)抗LRP4抗體、(v)hPTH及/或(vi)副甲狀腺素釋放劑(鈣阻滯劑)。

在另一實施例中，本發明提供(i)唑來膦酸、(ii)抗DKK1抗體、(iii)阿侖膦酸鹽、(iv)抗LRP4抗體、(v)hPTH及/或(vi)副甲狀腺素釋放劑(鈣阻滯劑)在製備治療由骨硬化素所介導或與骨硬化素含量增加相關之病理學病症之藥劑中的用途，其中該藥劑係與本發明之抗體或功能蛋白結合使用。

在另一實施例中，本發明提供本發明之抗體或功能蛋白在製備治療由骨硬化素所介導或與骨硬化素含量增加相關之病理學病症之藥劑中的用途，其中該患者已預先投與(i)唑來膦酸、(ii)抗DKK1抗體、(iii)阿侖膦酸鹽、(iv)抗LRP4抗體、(v)hPTH及/或(vi)副甲狀腺素釋放劑(鈣阻滯劑)。

在另一實施例中，本發明提供(i)唑來膦酸、(ii)抗DKK1抗體、(iii)阿侖膦酸鹽、(iv)抗LRP4抗體、(v)hPTH及/或(vi)副甲狀腺素釋放劑(鈣阻滯劑)在製備治療由骨硬化素所介導或與骨硬化素含量增加相關之病理學病症之藥劑中的用途，其中該患者已預先投與本發明之抗體或功能蛋

白。

在上述組合之一實施例中，hPTH為hPTH(1-34)。

在一實施例中，本發明之抗體可用於偵測骨硬化素之含量或含有骨硬化素之細胞之含量。此可(例如)藉由使樣品(諸如活體外樣品)及對照樣品與抗骨硬化素抗體在使該抗體與骨硬化素之間形成複合物的條件下接觸來達成。偵測樣品及對照物中抗體與骨硬化素之間所形成的任何複合物且將其進行比較。舉例而言，可使用本發明之組合物來執行此項技術中所熟知之標準偵測方法，諸如ELISA及流式細胞計數檢定。

因此，在一態樣中，本發明另外提供用於偵測樣品中骨硬化素(例如人類骨硬化素抗原)之存在，或量測骨硬化素之量的方法，其包含使該樣品及對照樣品與特異性結合骨硬化素之本發明之抗體或其抗原結合區在使該抗體或其部分與骨硬化素之間形成複合物的條件下接觸。隨後偵測複合物之形成，其中樣品與對照樣品之間相比較之複合物形成差異指示樣品中骨硬化素之存在。

由本發明之組合物(例如抗體、人類抗體及雙特異性分子)及使用說明書組成的套組亦屬於本發明之範疇。該套組可另外含有至少一種其他試劑，或本發明之一或多種其他抗體(例如，具有與靶抗原上不同於第一抗體之抗原決定基結合之互補活性的抗體)。舉例而言，該等套組可包含本發明之抗體或功能蛋白及(i)唑來膦酸、(ii)抗DKK1抗體、(iii)阿倫膦酸鹽、(iv)抗LRP4抗體、(v)hPTH及(vi)副

甲狀腺素釋放劑(鈣阻滯劑)中之一或多者。套組通常包括指示該套組之內容物之預期用途的標籤。術語標籤包括提供於該套組上或與套組一起提供，或以其他方式伴隨該套組之任何文字或記錄材料。

本發明已加以充分描述，其由以下實例及申請專利範圍進一步說明，該等實例為說明性且並不意欲進一步限制本發明。熟習此項技術者僅使用常規實驗將想到或能夠確定本文所述之特定程序的諸多等效物。該等等效物屬於本發明及申請專利範圍之範疇。貫穿本申請案引用之所有參考文獻(包括已頒布之專利及公開之專利申請案)之內容係以引用的方式併入本文中。

實例：

功能檢定

鹼性磷酸酶檢定(ALP)

細胞

MC3T3 1b細胞為表現OSE2-luc之MC3T3-JP細胞之純系。該純系係在使用pcDNA3.1+中之8x-OSE2wt-mOG2luc穩定轉染MC3T3-JP(MC3T3-E1小鼠成骨細胞，日本純系，Jp；Dr. T. Kokkubo, Novartis, Japan友情贊助)之後獲得。

培養基

將MC3T3-1b細胞在補充有10%胎牛血清(FCS; Amimed目錄號2-01F100-I)、2 mM L-麩醯胺酸(Gibco目錄號25030-024)、50 IU青黴素/50 µg/ml鏈黴素(Amimed目錄號4-01F00-H)及10 mM Hepes(Gibco目錄號15630-056)及0.75

mg/mL G418(Gibco目錄號10131-027)之最低必需培養基 α (MEM α ; Invitrogen, 目錄號22561-021)(維持培養基)中常規培養。

儲備溶液

於DMEM-LG中之10 mM抗壞血酸(Wako Pure Chemical 目錄號013-12061)、於5 mM乙酸及0.1%牛血清白蛋白(BSA, Sigma目錄號A-8806)中之14 nM BMP-2(R&D目錄號355-BM-010); 於Tyrode溶液中之1 M β -甘油磷酸鹽(Sigma 目錄號G9891); Tyrode溶液: 於1 L H₂O中之9.72 g Tyrode 鹽(Sigma目錄號T2145)及1 g NaHCO₃; ALP受質緩衝液: 25 mM甘氨酸及0.5 mM MgCl₂, pH 10.5; ALP受質溶液: 於3.75 ml ALP受質緩衝液中之5 mg對硝基苯基磷酸鹽(Sigma 104受質, Sigma目錄號50942-200TAB), pH 10.5; 於ALP受質溶液中之1 mM對硝基苯酚(Sigma目錄號104-1)。

檢定

為進行ALP檢定, 使MC3T3 1b細胞於檢定培養基(對應於不存在G418之維持培養基)中生長。若誘導在72 h之後開始, 則將MC3T3 1b以 3×10^4 個細胞/毫升接種於200 μ l中, 若誘導在96 h之後開始, 則將MC3T3 1b以 2×10^4 個細胞/毫升接種於200 μ l中。將培養板在37°C及5% CO₂下培育72 h或96 h, 隨後使用完全培養基(藉由向培養基中補充10 mM b-甘油-磷酸鹽(bGP)及50 μ M抗壞血酸(AA))開始誘導。將待測試抗體以完全培養基稀釋。將抗體以及BMP-

2(0.7 nM)及骨硬化素(50 nM)於最終體積為200 μ l之完全培養基中添加至孔中(一式三份)。在各板上，包括4個內部對照(一式三份)：溶劑對照(BSA)、BMP-2對照、BMP-2+骨硬化素(BMP-2(0.7 nM)及骨硬化素(50 nM))，及骨硬化素對照(50 nM)。將培養板在37°C及5% CO₂下再培育72 h。在誘導期結束時，藉由移除培養基且向各孔中添加150 μ l ALP受質溶液(新鮮製備)來終止檢定。將培養板培育3-30 min。添加100 μ l 1 M NaOH以使反應停止且將培養板在板震盪器上震盪。相對於空白在405 nm下讀取OD值，且以nmol/min計算ALP活性。使用50 nM骨硬化素以獲得對BMP-2誘導之ALP產生[0.7 nM BMP-2]至少70%之抑制。

WNT-檢定

確立該檢定以便基於骨硬化素抑制Wnt1介導之STF報導基因誘導之能力測試抗體。

HEK293細胞之轉染

在第1日，將HEK293細胞以每孔 $1.3-1.4 \times 10^5$ 個細胞(0.5 ml體積)接種於24孔聚D-離胺酸板(BD-Bio目錄號356414)中含有10%胎牛血清(FCS)、1% L-麩醯胺酸(Gibco，目錄號25030.024)、1%非必需胺基酸(Gibco，目錄號11140)且無抗生素之DMEM(Gibco，目錄號61965-026)中。在第2日以Lipofectamine 2000(Invitrogen，目錄號11668-019)執行轉染。對於欲轉染之各孔，將如下量之質體添加至OptiMEM®I(Gibco，目錄號31985-047)中達50 μ l之最終體積：對於對照孔(pcDNA3+，480 ng；SuperTopFlash

(STF)20 ng ; phRL-CMV, 0.5 ng) , 且對於 Wnt1 處理孔 (pcDNA-wnt1, 20 ng ; pcDNA3+, 460 ng ; SuperTopFlash (STF)20 ng ; phRL-CMV, 0.5 ng) 。

在第二管中，將 1.6 μ l Lipofectamine 2000 於 OptiMEM®I 中稀釋至 50 μ l 且在室溫下培育 5 分鐘。隨後藉由將脂質管中之內容物添加至 DNA 管中將兩個管之內容物混合且在室溫下培育 30 分鐘以使 DNA-脂質複合物形成。隨後將 DNA-脂質複合物 (100 μ l) 均勻添加至孔中且在 37°C 5% CO₂ 下培育 5 小時。在 5 小時培育結束時，準備將細胞以測試試劑 (諸如 SOST、抗體等) 處理。

確立 SOST 劑量依賴性抑制

為確立劑量抑制曲線，以 160 nM 開始，製備 rhSOST 於含有 10% FCS、1% L-麩醯胺酸及 1% 非必需胺基酸且無抗生素之 DMEM 中之一系列兩倍稀釋液。儲備液 rhSOST 之濃度為於具有 1% FCS 之 DMEM 中 260 μ g/ml。一般而言，各條件重複測試兩次。因此，對於各條件製備 1 ml 培養基且在自孔移除含有轉染混合物之培養基之後每孔添加 450 μ l。處理時間為 18-20 小時。培育結束時，如下所述執行螢光素酶檢定。

抗 SOST 抗體之測試

將抗體與 SOST 預混合隨後添加至細胞中。出於該目的，製備具有 20 至 30 nM rhSOST 之 DMEM 培養基 (10% FCS、1% L-麩醯胺酸及 1% 非必需胺基酸且無抗生素)。隨後，根據實驗設計將測試抗體之不同稀釋液添加至含有

SOST之培養基中。在處理之前40分鐘製備該等混合物。一般而言，各條件重複測試兩次。為此，對於各條件製備1 ml培養基且在自孔移除含有轉染混合物之培養基之後每孔添加450 μ l。處理時間為18-20小時。培育結束時，如下所述執行螢光素酶檢定。

螢光素酶檢定

在培育結束時，移除培養基，添加300 μ l 1X被動溶解緩衝液(Promega，目錄號E194A)以溶解細胞。隨後使用Dual-Glo螢光素酶系統(Promega，目錄號E2940)以30 μ l溶解物量測螢光素酶活性，重複兩次。根據套組所提供之說明冊執行檢定。一般而言，使用30 μ l Dual-Glo螢光素酶(螢火蟲螢光素酶；用於STF)及30 μ l Dual-Glo Stop及Glo(水母螢光素酶；用於轉染效率對照)受質。以Mithras LB940儀器(Berthold Technologies)量測螢光信號。

數據計算

計算螢火蟲螢光素酶與水母螢光素酶之比率。最終結果藉由將無SOST之Wnt1之值設定為1來表示。

礦化檢定

細胞

MC3T3 1b細胞為表現OSE2-luc之MC3T3-JP細胞之純系。該純系係在使用pcDNA3.1+中之8x-OSE2wt-mOG2luc穩定轉染MC3T3-JP(MC3T3-E1小鼠成骨細胞，日本純系，Jp；Dr. T. Kokkubo, Novartis, Japan友情贊助)之後獲得。

培養基

將MC3T3-1b細胞在補充有10%胎牛血清(FCS; Amimed目錄號2-01F100-I)、2 mM L-麩醯胺酸(Gibco目錄號25030-024)、50 IU青黴素/50 µg/ml鏈黴素(Amimed目錄號4-01F00-H)及10 mM Hepes(Gibco目錄號15630-056)及0.75 mg/mL G418(Gibco目錄號10131-027)之最低必需培養基 α (MEM α ; Invitrogen, 目錄號22561-021)(維持培養基)中常規培養。

礦化檢定

使用鈣套組(Axon Lab, 目錄號AXON0012)測定MC3T3-1b細胞中沈積於孔中之基質結合鈣。將細胞以每孔 6×10^3 個細胞或 2×10^3 個細胞接種於96孔板中100 µl檢定培養基(無G418之維持培養基)中以改良細胞反應性且培育3日以達至長滿。隨後更換檢定培養基且與10 mM b-甘油-磷酸鹽(bGP; Sigma目錄號G9891)及50 µM抗壞血酸(AA; Wako Pure Chemical目錄號013-12061)一起添加待測化合物。在將其添加至細胞中之前, 將待測之骨硬化素及Fab預先在室溫下在獨立培養板中培育2 h; 同時向檢定96孔板提供2.1或2.8 nM BMP-2(R&D Systems, 目錄號355-BM-010), 隨後向其中添加骨硬化素-Fab混合物。將細胞培育14日且每3-4日替換檢定培養基。簡言之, 在培育結束時, 將細胞以每孔200 µl PBS洗滌兩次, 在各孔中添加50 µl 0.5 M HCl, 且將培養板在-20°C下冷凍降溫最少24 h。在適當時間, 將培養板在室溫下解凍2小時且每孔轉移10 µl至新的96孔板中。隨後添加鈣工作溶液(1:5)(200 µl)且5-30分鐘

之後，將培養板在微板讀取器上在595 nm下讀取。

根據標準曲線將吸光度轉化為鈣之 μg 值，各數據孔值減去對照孔(抗壞血酸及 β -甘油磷酸鹽)值且最終結果表示為BMP-2誘導之礦化之百分比。

SMAD1磷酸化西方法

材料

MC3T3-E1小鼠成骨細胞(日本純系，Dr. T. Kokkubo, Novartis Japan友情贊助)

C3H10T1/2細胞(小鼠胚胎間葉細胞；ATCC，目錄號:CCL-226)

SCL，非糖基化，大腸桿菌來源(Novartis, PSU5257)

15N SCL，非糖基化，大腸桿菌來源(Novartis, PSU11274)

hSOST-APP，糖基化，HEK-EBNA來源(Novartis, BTP11100)

rhSCL，糖基化，小鼠骨髓瘤細胞來源(R&D Systems，目錄號:1406-ST/CF)

抗hSOST抗體(R&D Systems，目錄號:AF1406)

PhosphoSafe萃取試劑(Novagen，目錄號:71296-3)

蛋白酶抑制劑混合套裝III(Calbiochem，目錄號:539134)

NuPAGE Novex Tris-乙酸鹽凝膠，7%，1.5 mm，15孔(Invitrogen，目錄號:EA03585)

Tris-乙酸鹽 SDS 電泳緩衝液(Running Buffer) 20 $\times$ (Invitrogen，目錄號:LA0041)

NuPAGE抗氧化劑(Invitrogen, 目錄號:NP0005)

Immobilon-P 轉移膜, 0.45 μm (Millipore, 目錄號:IPVH00010)

Wattman層析紙(Merck, 目錄號:3587600)

XCell SureLock Mini-Cell 及 XCell II 印漬模組
(Invitrogen)

VersaMax微板讀取器(Bucher)

細胞培養及萃取

分別將 MC3T3-E1 及 C3H10T1/2 細胞在最低必需培養基 α (MEM α ; Invitrogen, 目錄號 22561-021) 中或在具有高葡萄糖之 DMEM(Invitrogen, 目錄號 41965-039) 中常規培養。所有培養基中補充有 10% 胎牛血清(FCS; BioConcept 目錄號 2-01F10-I, 批號 Z04459P)、2 mM L-麩醯胺酸(Invitrogen 目錄號 25030-024)、50 IU 青黴素/50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鏈黴素(Invitrogen 目錄號 15140-122)及 10 mM Hepes (Invitrogen 目錄號 15630-056)(維持培養基)。

將細胞接種於 6 孔板之維持培養基中(每孔 3 ml), 且使其生長直至長滿(對於每孔 1.4×10^5 個 MC3T3-1b 細胞, 在第 3 日達至長滿; 對於每孔 1.0×10^5 個 C3H10T1/2 細胞, 在第 3 日達至長滿)。在含有 1% FBS 之培養基中去除血清隔夜之後, 將培養基替換為補充有 1% FBS、BMP-6(R&D Systems, 目錄號 507-BP)及待測物質之新鮮培養基。在將其添加至細胞之前, 如對於 C3H10T1/2 中之磷酸-Smad 1/3/5 所述(Winkler, EMBO J., 2003, 22(23):6267-76), 將

BMP-6及待測物質在室溫下預先培育1 h。當測試抗骨硬化素抗體時，將BMP-6及待測物質與骨硬化素一起在4℃下預培育隔夜，隨後與0.2 nM BMP-6一起在室溫下培育1 h且最後添加至長滿之細胞中。處理適當時間之後，將細胞以2 ml冰冷PBS洗滌。隨後將每孔100 μ l PhosphoSafe萃取試劑及1:200稀釋之蛋白酶抑制劑混合物添加至細胞中，隨後將細胞在冰上培育5 min。將細胞自孔中刮下，且轉移至microfuge管中。將細胞萃取物保持於冰上15 min，每5 min插入渦旋步驟。之後，將細胞萃取物在16'000 g及4℃下離心5 min。最後，將上清液轉移至新鮮microfuge管中進行蛋白質測定。

使用BCA蛋白質檢定套組根據製造商之說明測定細胞溶解物中之蛋白質濃度。將BSA用作標準物。為進行變性，將細胞溶解物以Laemmli緩衝液(Bio-Rad，目錄號161-0737，含有新鮮添加之 β -巰基乙醇(1:20, Merck，目錄號1.12006))1:2稀釋且在95℃下煮沸5 min。冷卻之後，將樣品儲存在-20℃下直至進一步使用。

西方墨點法

Smad(H-465)抗體(Santa Cruz，目錄號:sc-7153)針對代表人類來源之全長Smad1之胺基酸1-465產生之兔多株IgG。其應識別人類、大鼠及小鼠來源之Smad1、Smad2、Smad3、Smad5及Smad8。磷酸-Smad1(Ser463/465)/Smad5(Ser463/465)/Smad8(Ser426/428)抗體(Cell Signalling，目錄號9511)為針對對應於人類mad5之Ser463/465周圍之殘

基之合成磷酸肽產生的兔多株IgG。僅在絲胺酸463及絲胺酸465雙重磷酸化時應偵測Smad1之內源含量，以及僅在人類、小鼠、大鼠、貂及爪蟾(xenopous)來源之等效位點雙磷酸化時偵測Smad5及Smad8之內源含量。該抗體不與其他Smad相關蛋白交叉反應。

根據製造商之說明製備XCell SureLock Mini Cell系統(Invitrogen)。將蛋白質樣品(對於Smad為2 µg，對於磷酸-Smad西方分析為5 µg)以於1 ×電泳緩衝液中之等最終體積裝載於7% NuPAGE Novex Tris-乙酸鹽凝膠上。將SeeBlue Plus2預染色標準物(10 µl, 1:10; Invitrogen，目錄號LC5925)及MagicMark XP Western蛋白質標準物(10 µl, 1:100; Invitrogen，目錄號; LC5602)用作分子量標記。使用恆壓(150 V)跑膠75 min。

將印漬墊及濾紙浸泡在700 ml 1×NuPAGE轉移緩衝液中。首先將PVDF轉移膜在甲醇中浸泡30 sec且隨後在NuPAGE轉移緩衝液(Invitrogen，目錄號NP0006，轉移緩衝液：甲醇10:1新鮮製備)中轉移。使用凝膠刀將凝膠卡板分離，將一預先浸泡之濾紙置於凝膠上且小心移除所夾帶之任何氣泡。將板倒置於Saran wrap上且移除板之後，將預先浸泡之轉移膜置於凝膠上，且移除任何氣泡。將第二張預先浸泡之濾紙置於凝膠上且移除任何氣泡。將兩個經浸泡之繪製墊(platting pad)置於Cell II印漬模組之陰極核中。小心拿起凝膠/膜夾層且置於印漬墊上(使凝膠最接近於陰極核)。最後，將3個經預先浸泡之印漬墊置於膜總成

上，且在上面添加陽極核。根據製造商之說明，將印漬模組滑至下部緩衝液腔室上之導軌中且將楔鎖定於位置中。將印漬模組以1×NuPAGE轉移緩衝液填充直至覆蓋凝膠/膜組件。將外部緩衝液腔室以650 ml去離子水填充，且使用恆壓(30 V)執行蛋白質至PVDF膜之轉移歷時2小時。

印漬之後，首先將膜在PBS中之0.05%吐溫20中洗滌10 min且隨後在室溫下在溫和震盪下於25 ml SuperBlock T20阻斷緩衝液中阻斷1小時。將第一抗體(磷酸-Smad 1/5/8或Smad(H-465))以於SuperBlock T20阻斷緩衝液(Pierce，目錄號37516)中之1:1000稀釋液添加至膜中且將膜在4℃下在震盪下培育隔夜。隨後將膜以PBS中之0.05%吐溫20(Fluka，目錄號93773)洗滌3次歷時10 min，隨後在室溫下在震盪下與RP結合第二抗體(1:1000於SuperBlock T20阻斷緩衝液中)一起培育60 min。執行至少3個各自為10 min之洗滌步驟，隨後將膜與SuperSignal West Femto受質工作溶液(Pierce，目錄號34095)一起培育5 min。最後，將膜置於塑膠袋中且使用Fluor-S Multilmager(Bio-Rad)及相機成像。藉由比較30 sec至5 min採集之圖像確定最佳曝光時間為1至2 min。

數據分析

使用Quantity One(Bio-Rad)量測化學發光活性且使用XLfit4軟體計算EC₅₀值。各磷酸-Smad信號係由其相應總Smad信號標準化。

LRP6/骨硬化素ELISA

將未經處理之96孔板以每孔100 μ l於PBS中稀釋之LRP6/Fc(1 μ g/ml, R&D Systems, 目錄號1505-LR)塗佈。作為非特異性結合(NSB)之對照, 將少數孔以每孔100 μ l PBS填充。將培養板以塑膠薄膜覆蓋且在室溫下培育隔夜。塗佈之後, 將培養板每孔以200 μ l於PBS中之0.05%吐溫20(Fluka, 目錄號93773)洗滌3次, 且藉由每孔添加300 μ l於TBS中之SuperBlock阻斷緩衝液(Pierce, 目錄號37535)將孔在37°C下阻斷1 h。培育之後, 移除阻斷溶液且每孔添加100 μ l於PBS中之1% BSA中稀釋之骨硬化素(大腸桿菌來源, Novartis; 1-1000 ng/ml)。將培養板在室溫下培育2 h, 隨後每孔以200 μ l於PBS中之0.05%吐溫20洗滌3次。之後, 每孔添加100 μ l於PBS中之1% BSA中稀釋之抗骨硬化素抗體(1 μ g/ml), 且將培養板在室溫下培育2 h, 隨後每孔以200 μ l於PBS中之0.05%吐溫20洗滌3次。最後, 在室溫下每孔添加100 μ l於PBS中之1% BSA(Sigma目錄號:A-7888)中稀釋之ALP結合抗山羊IgG Ab(1:5000; Sigma目錄號A-7888)歷時1 h, 且隨後將培養板每孔以200 μ l於PBS中之0.05%吐溫20洗滌3次。為測定ALP, 將每孔100 μ l ALP受質(Sigma, 目錄號S0942)溶液(每5 ml二乙醇胺受質緩衝液(1 $\times$)1錠; Pierce, 目錄號34064)添加至培養板中歷時90 min且在405 nm下量測光學密度。

HEK293細胞中LRP4過度表現

HEK293細胞(ATCC目錄號CRL-1573)在補充胎牛血清10% FCS(BioConcept目錄號2-01F10-I, 批號Z04459P)、2

mM L-麩醯胺酸(Invitrogen目錄號25030-024)、100 IU青黴素/100 $\mu\text{g/ml}$ 鏈黴素(Invitrogen目錄號15140-122)及10 mM HEPES(Invitrogen 目錄 號 15630-056)之 DMEM/F12 (Invitrogen目錄號21331-020)中常規培養。Hek293細胞以每孔 5×10^4 個細胞接種於聚-D-離胺酸48孔板形式中且培育24 h, 隨後以Lipofectamine 2000(Invitrogen目錄號11668-019)執行轉染。對於欲轉染之各孔, 將如下量之質體添加至最終體積25 μl OptiMEM[®]I(Gibco, 目錄號31985-047)中並溫和地混合: 對於對照孔(pmaxGFP, 62.5 ng, pcDNA3+, 125 ng; SuperTopFlash(STF)62.5 ng; SV40 驅動水母(Renilla)螢光素酶質體, 0.75 ng), 對於Wnt1處理孔(pmaxGFP, 62.5 ng, pcDNA-wnt1, 62.5 ng; pcDNA3+, 62.5 ng; SuperTopFlash (STF), 62.5 ng; SV40驅動水母螢光素酶質體, 0.75 ng), 對於LRP4-Wnt1處理孔(pcDNA3+-LRP4, 62.5 ng, pcDNA3+-wnt1, 62.5 ng; pcDNA3+, 62.5 ng; SuperTopFlash (STF), 62.5 ng; SV40驅動水母螢光素酶質體, 0.75 ng)。在第二管中, 將0.8 μl Lipofectamine 2000稀釋至最終體積25 μl 之 OptiMEM[®]I中, 且在室溫下培育5分鐘。隨後藉由將脂質管中之內容物添加至DNA管中混合兩管之內容物, 且在室溫下培育30分鐘以使DNA-脂質複合物形成。隨後將DNA-脂質複合物(50 μl)平均地添加至各孔中且在37°C下於5% CO₂中培育5小時。在5小時培育結束時, 細胞準備好以測試試劑(諸如SOST、DKK1(R&D目錄號1096-DK)、抗體等)處理20 h。螢光素酶

檢定如"Wnt檢定"下所述執行，但添加150 μ l被動溶解緩衝液。

C28A2細胞中LRP4過度表現

C28a2細胞(來自 Mary Goldring, Harvard Institutes of Medicine, Boston, MA, US)在HEK293相同培養基(參見上文)中培養，但其中不存在HEPES且添加非必需胺基酸補充物(Gibco目錄號11140)。C28a2細胞以每孔 1×10^5 個細胞接種於24孔板形式中之無抗生素培養基中且培育隔夜，隨後以Lipofectamine 2000(Invitrogen目錄號11668-019)執行轉染。對於欲轉染之各孔，將如下量之質體(每孔共600 ng)添加至最終體積50 μ l OptiMEM[®]I(Gibco, 目錄號31985-047)中且溫和地混合：對於對照孔(SuperTop Flash (STF) 100 ng；SV40驅動水母螢光素酶質體，2 ng，及pcDNA3+，500 ng補償)，對於Wnt1處理孔(pcDNA-wnt1質體，100 ng；LRP5質體，100 ng；SuperTopFlash(STF)100 ng；SV40驅動水母螢光素酶質體，2 ng，及pcDNA3+，300 ng)，對於LRP4-Wnt1處理孔(pcDNA-wnt1質體，100 ng；LRP5質體，100 ng；LRP4質體，100 ng；SuperTopFlash (STF)100 ng，SV40驅動水母螢光素酶質體2 ng及pcDNA3+ 200 ng)。在第二管中，將1.6 μ l Lipofectamine 2000於48.4 μ l OptiMEM[®]I中稀釋且在室溫下培育5分鐘。隨後藉由將脂質管中之內容物添加至DNA管中將兩個管之內容物混合且在室溫下培育30分鐘以使DNA-脂質複合物形成。隨後將DNA-脂質複合物(100 μ l)均勻添加至孔中且

在37°C下在5% CO₂中培育2小時。在2小時培育結束時，將轉染培養基替換為每孔450 µl無抗生素培養基，且將細胞培育24 h。隨後將細胞以測試試劑(諸如SOST或DKK1(R & D目錄號1096-DK))處理20 h。如"Wnt檢定"下所述執行螢光素酶檢定。

HEK293細胞中之LRP4敲除

將Wnt1/STF/水母Hek293細胞(以Wnt1表現質體、SuperTopFlash報導質體及SV40驅動水母螢光素酶質體穩定轉染Hek293細胞(ATCC目錄號CRL-1573)所產生之穩定純系)在補充有10% FCS(Amimed目錄號2-0F100-I)、2 mM L-麩醯胺酸(Invitrogen目錄號25030-081)、100 IU/ml青黴素/100 µg/ml鏈黴素(Gibco目錄號15140-163)、6 µg/ml嘌呤黴素(Invitrogen目錄號ant-pr-1)、150 µg/ml zeocin(Invitrogen目錄號45-0430)及150 µg/ml潮黴素(Invitrogen目錄號10687-010)之DMEM(4500 g/L葡萄糖)(Invitrogen目錄號41965-035)中常規培養。在敲除實驗期間省去所選抗生素。將細胞以每孔 0.6×10^5 個細胞接種於聚-D-離胺酸24孔板形式中且使其附著隔夜，隨後執行LRP4 siRNA經HiPerFect(Qiagen目錄號301707)之轉染。所用LRP4 siRNA之正義及反義序列如下：

LRP4a: TAAATTATCATAAAGTCCTAA / AGGACTTTATGATAATTTATT; (SEQ ID NOs:160/161)

LRP4b: ATAGTGGTTAAATAACTCCAG / GGAGTTATTTAACCACTATTT; (SEQ ID NOs:162/163)

LRP4c: TAAATTCTCGTGATGTGCCAT / GGCACATCACGAGAATTTATT; (SEQ ID NOs:164/165)

LRP4d: TTTCTTATAGCACAGCTGGTT / CCAGCTGTGCTATAAGAAATT; (SEQ ID NOs:166/167)

LRP4e: TAGACCTTTCCATCCACGCTG / GCGTGGATGGAAAGGTCTATT; (SEQ ID NOs:168/169)

對於待轉染之各孔，製備兩個eppendorf管：第一個含有0.2 μ l一種LRP4 siRNA之20 nM儲備液或0.1 μ l兩種不同LRP4 siRNA之20 nM儲備液(每孔siRNA之最終總濃度為6.6 nM)及50 μ l Optimem，且第二個含有3 μ l HiPerFect及47 μ l Optimem。將第二管之內容物添加至第一管中，簡短渦旋且在室溫下靜置10分鐘。隨後將100 μ l該混合物添加至各別孔中，且將細胞在37°C下在5% CO₂下培育30小時。之後，移除轉染混合物，且替換為新鮮的無抗生素培養基(每孔450 μ l)且使其再培育24小時。在SOST或DKK1處理之前，移除培養基，替換為新鮮的含有SOST或DKK1(R&D目錄號1096-DK)之適當稀釋液之無抗生素培養基，且將細胞在37°C下在5% CO₂下培育20小時。如"Wnt測定"下所述執行螢光素酶測定。

動物模型

向八月齡雌性OF1/IC小鼠(n=16/組，Charles River, France)每週兩次靜脈內投與抗骨硬化素抗體ANTIBODY A(25 mg/kg, h/mIgG2a)(MOR05813)或對照抗體(抗-PC-h/mIgG2a)。對照組每日接受皮下每公斤100 μ g PTH(1-34)或PBS媒劑。對於所有動物治療均持續2.5週。在組織形態學分析時處死一半動物(n=8/組)。對於剩餘動物(n=8/組)繼續治療直至5週。

在開始治療時藉由周邊定量電腦斷層攝影術(pQCT)及微電腦斷層攝影術(microCT)量測動物之脛骨質量及幾何尺寸。將動物根據體重及如由pQCT所量測之脛骨總骨礦物

密度均勻分組。治療2.5週及5週之後評估骨礦物密度、質量及幾何尺寸變化。每週監測體重。在屍體解剖之前第10日及第3日，向治療2.5週之後處死之動物投與兩種螢光染料標記以便標記骨礦化。屍體解剖時採集血液。在屍體解剖時對切除之脛骨、股骨及腰椎進行雙能量X射線吸光測定(DEXA)量測。將骨固定、脫水且包嵌以便進行切片機切片及骨形成動力學之組織形態學分析。

治療方案

對照抗體：抗-PC-h/mIgG2a

濃度：2.5 mg/ml，施用體積：10 ml/kg

媒劑：50 mM Citrat、140 mM NaCl

抗骨硬化素抗體：抗-SOST-MOR05813，h/mIgG2a，
2.45 mg/ml，施用體積：10 ml/kg

媒劑：50 mM Citrat、140 mM NaCl

hPTH(1-34)(Bachem, Bubendorf, Switzerland)100 µg/kg

媒劑：PBS+BSA 0.1%

治療組：

1 靜脈內同型對照=抗-PC-mIgG2a

2 靜脈內抗-SOST-MOR05813

3 皮下媒劑對照=PBS+BSA 0.1%

4 皮下hPTH(1-34)

飼養條件

將動物分成四至五隻動物之組在25°C下在12:12 h之光-暗循環下圈養。向其喂以含有0.8%磷及0.75%鈣之標準實

驗室膳食(NAFAG 3893.0.25, Kliba, Basel, Switzerland)。

隨意提供食品及水。

對動物福利之陳述

根據 Canton, Basel City, Switzerland 實施之規則進行動物實驗。

方法

周邊定量電腦斷層攝影術(pQCT)

將動物在吸入麻醉(異氟烷，2.5%)下側向位置定位。

將左腿拉伸且固定於該位置中。

如使用經調適之裝備有 Oxford 50 AM X射線管及 0.5 mm 直徑之視準儀的 Stratec-Norland XCT-2000 定位掃描所偵測，監測在中腓骨頭部水平面上且距離脛骨近端 1.8 mm 之近端脛骨幹骺端之截面骨質量、密度及幾何尺寸。選擇以下設置進行量測：體素尺寸：0.1×0.1×0.5 mm；掃描速度：定位視圖 10 mm/s；最終掃描：3 mm/s，1塊，輪廓模式 1，外殼模式(peel mode)2；皮層臨限值：610 mg/cm³、內部臨限值：610 mg/cm³

微電腦斷層攝影術(microCT)

將動物在吸入麻醉(異氟烷，2.5%)下側向位置定位。

將左腿拉伸且固定於該位置中。

使用 Scanco vivaCT20(Scanco Medical AG, Switzerland) 評估左近端脛骨幹骺端之松質骨結構。非等距體素具有 10.5×10.5×10.5 μm 之尺寸。由截面圖像，自皮層骨藉由描摹輪廓來描繪松質骨腔室。在所有其他切片中，基於該描

摹插入邊界以界定所關注之體積。評估次級松質區域內143個切片(在生長板側面下部邊緣下方開始)。使用臨限值370以便進行結構參數之三維評估。

雙能量X射線吸光測定法(DEXA)

對左脛骨、左股骨上及第1-第4腰椎執行離體DEXA量測。使用乙醇(70%)進行軟組織模擬。使用適合於量測小動物之普通Hologic QDR-1000儀器執行量測。使用具有0.9 cm直徑及超高解析模式(線距0.0254 cm, 解析度0.0127 cm)之視準儀。

螢光染料標記：

茜素(20 mg/kg, 皮下, 茜素胺羧絡合劑, Merck, Dietikon, Switzerland)為屍體解剖之前第10日投與之標記物

鈣黃綠素(30 mg/kg, 皮下, Fluka, Buchs Switzerland)為屍體解剖之前第3日投與之標記物

組織學及組織形態學

解剖之後, 將右股骨及第5及第6腰椎置於Karnovsky固定劑中24 h, 在4°C下在乙醇中脫水且包嵌於樹脂(甲基丙烯酸甲酯)中。使用切片機2050 Supercut(Reichert Jung, Arnsberg, Germany), 沿正中間體平面切割一組5 µm厚度非連續切片以供評估基於螢光染料標記之骨形成之用。使用裝備有相機(SONY DXC-950P, Tokyo, Japan)及經調適之Quantimet 600軟體(Leica, Cambridge, United Kingdom)之Leica DM顯微鏡(Leica, Heerbrugg, Switzerland)檢查切

片。每個動物取樣一個切片。將試樣之顯微圖像數位化且在螢幕上半自動評估。量測骨周長、經單一標記及雙重標記之骨周長及內標寬度(放大200倍)。計算礦化周長值(%)、礦物接合速率(微米/日)(校正松質骨腔室中之切片傾角)及每日骨形成速率值(每日骨形成速率/骨周長[微米/日])。評估遠端股骨幹骺端之次級松質中及一節腰椎中之所有參數。將另一組切片用抗酒石酸鹽酸性磷酸酶(TRAP)染色。評估次級松質中每骨表面之蝕骨細胞表面(%)。

統計分析

結果表示為平均值 $\pm$ SEM。使用司徒頓t檢驗(Student's t test)(兩尾；不成對)進行統計分析。測試治療(抗骨硬化素抗體或hPTH(1-34))與對照(對照抗體或PBS)之差異，*， $+p<0.05$ ，**， $++p<0.01$ 。

親和力測定

使用表面電漿共振(Biacore)進行所選抗人類骨硬化素Fab之親和力測定

使用BIAcore 3000儀器(BIAcore, Uppsala, Sweden)以與共價固定之抗原骨硬化素結合之各別Fab之連續稀釋液測定動力學常數 k_{on} 及 k_{off} 。為進行共價抗原固定，使用標準EDC-NHS胺偶合化學。在PBS(136 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na_2HPO_4 、1.76 mM KH_2PO_4 ，pH 7.4)中在20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流速下使用介於1.5-500 nM範圍內之Fab濃度進行動力學量測。各濃度之注入時間為1 min，繼而為3 min解離階段。為進行再生，使用2 $\times$ 5 μl 10 mM甘胺酸(pH

1.5)。使用 BIA 評估軟體 3.1(BIAcore)擬合所有感應圖 (sensogram)。

量測溶解物中骨硬化素結合 Fab 之親和力的基於電化學發光 (BioVeris) 之結合分析

為量測大腸桿菌溶解物 (BEL 萃取物) 中骨硬化素結合抗體片段之親和力，藉由 BioVeris M-384 SERIES® 工作站 (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) 分析結合。

在 96 孔聚丙烯微量滴定板中且補充有 0.5% BSA 及 0.02% 吐溫 20 之 PBS 作為檢定緩衝液進行實驗。根據供應商之說明將經生物素標記之人類骨硬化素蛋白固定在 M-280 抗生蛋白鏈菌素順磁珠粒 (Dynal) 上。每孔添加珠粒儲備溶液之 1:25 稀釋液。將 100 μ l 經稀釋之 BEL 萃取物及珠粒在震盪器上在室溫下培育隔夜。為進行偵測，使用根據供應商說明 (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) 以 BV-tag™ 標記之抗-人類 (Fab)'₂ (Dianova)。

將隨機選取之純系以上述方法進行分析。選擇產生最高值之純系以便在溶液平衡滴定中進行進一步分析。

使用溶液平衡滴定 (SET) 測定 Fab 與骨硬化素之親和力

為進行 K_D 測定，使用 Fab 之單體部份 (至少 90% 之單體含量，藉由分析 SEC 分析；Superdex75, Amersham Pharmacia)。

基本上如 Haenel 等人，2005 所述執行溶液中之基於電化學發光 (ECL) 之親和力測定及數據評估。將恆定量之 Fab (25 pM) 以不同濃度 (連續 3ⁿ 稀釋) 之未標記人類、小鼠

或獼猴骨硬化素(起始濃度：500 pM)溶液平衡。添加經生物素標記之與順磁珠粒M-280抗生蛋白鏈菌素(Dynal)偶合之人類骨硬化素(0.5 µg/ml)及BV-tag™(BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK)標記之抗-人類(Fab)'₂抗體(Dianova)且培育30 min。隨後，使用M-SERIES® 384分析器(BioVeris Europe)經由ECL偵測定量未結合Fab之濃度。

藉由基於ECL之高通量親和力篩檢BioVeris檢定鑑別親和力改良之Fab純系。命中選擇之後，藉由相同方法合併4個子純系。

使用BioVeris™之受體結合抑制效能檢定

為進行基於BioVeris™之結合抑制效能檢定，根據供應商說明使重組人類BMP-2與羧酸M-270磁性珠粒(Dynal)直接偶合。在96孔聚丙稀微量滴定板(Nunc)中執行檢定。將每孔50 µl於檢定緩衝液(PBS + 1%吐溫20(嚴格)或0.1%吐溫20(嚴格度較低)+ 1% BSA)中之經純化Fab以1:3稀釋步驟(起始濃度：1000 nM)稀釋。將每孔50 µl經生物素標記之人類骨硬化素(4 nM)添加至各Fab稀釋液中。在400 rpm震盪下在Eppendorf熱混合器上在22°C下培育90 min之後，將25 µl BMP-2塗佈珠粒(每毫升2.7E07個珠粒)及1:500稀釋之根據供應商說明(BioVeris Europe)以BV-tag™標記之抗生蛋白鏈菌素添加至各孔中且培育30 min(800 rpm, 22°C)。藉由BioVeris M-381 SERIES®工作站(BioVeris Europe)執行偵測。為進行EC₅₀值測定，使用4參數邏輯擬合模型(XLfit, IDBS)。

免疫球蛋白之產生

轉化為人類IgG1形式及人類/小鼠IgG2a形式

為表現全長IgG，將重鏈可變域片段(V_H)及輕鏈可變域片段(V_L)自Fab表現載體次選殖於適當pMorph[®]Ig載體(pMorph[®]_h_Ig1及嵌合人類/小鼠pMorph[®]2_h/m_Ig2a)中。分別地，使用限制酶*EcoRI*、*MfeI*、*BlpI*將 V_H 域片段次選殖於pMorph[®]_h_IgG1或pMorph[®]2_h/m_IgG2a中，且使用*EcoRV*、*BsiWI*、*HpaI*將 V_L 域片段次選殖於pMorph[®]_h_Ig κ 、pMorph[®]_h_Ig λ 及pMorph[®]2_h/m_Ig λ 載體中。

使用限制酶*EcoRI*、*MfeI*及*BlpI*將 V_H 域片段次選殖於pMORPH[®]_h_IgG1中：載體主鏈係藉由*EcoRI/BlpI*消化及萃取6400 bp片段而產生，而 V_H 片段(350 bp)係藉由以*MfeI*及*BlpI*消化及隨後純化而產生。載體及插入物係經由分別藉由*EcoRI*及*MfeI*消化產生之相匹配突出端及經由*BlpI*位點接合。由此，*EcoRI*與*MfeI*限制位點均被破壞。

使用限制酶*MfeI*及*BlpI*將 V_H 域片段次選殖於pMORPH[®]2_h/m_IgG2a中。在該新一代IgG載體中，進行其他修飾之後，*EcoRI*位點(其僅允許經由相匹配突出端子選殖)替換為*MfeI*位點由此允許*MfeI/BlpI*消化載體與插入物二者。

V_L 域片段次選殖於pMORPH[®]_h_Ig κ 中係經由*EcoRV*及*BsiWI*位點執行，而次選殖於pMORPH[®]_h_Ig λ 及pMORPH[®]2_h/m_Ig λ 中係使用*EcoRV*及*HpaI*進行。

人類IgG之瞬時表現及純化

將 HEK293 或 HKB11 細胞以等莫耳量之 IgG 重鏈及輕鏈表現載體轉染。轉染後第 4 日或第 5 日，收穫細胞培養物上清液。將上清液之 pH 值調整為 pH 8.0 及無菌過濾之後，對溶液進行標準蛋白 A 管柱層析 (Poros 20A, PE Biosystems)。

實例 1：人類及犬重組骨硬化素蛋白之產生

將編碼以天然信號肽 (aa1-213, NPL 005002) 為特徵之人類骨硬化素前驅物之全長 cDNA (GenBank 登記號 AF326739) 藉由插入限制位點 Asp718 及 Xba1 中而選殖於哺乳動物表現載體 pRS5a 中。將蛋白質偵測及純化標籤 (APP=EFRH) 添加至該基因之 C 末端中。

在瞬時 6 孔板轉染檢定中進行小規模表現驗證之後，藉由以脂質轉染法轉染四個集合 (各自 1.0×10^6 個細胞) 來引發穩定轉染集合之產生。轉染後 48 小時，藉由添加 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度之抗生素 Zeocin™ 開始轉染子之選擇。所有四個集合均恢復正常生長之後，藉由抗-APP HPLC 分析親和層析評定重組蛋白力價，且選擇最高產生集合-集合 2 以適應於無血清培養基及進一步按比例放大。同時，亦使用聚伸乙基亞胺作為轉染期間質體 DNA 之載體及 Wave™ 生物反應器系統 (C20SPS-F, Art-No. 100.001, Wave Biotech) 作為培養系統執行 10 L 規模之大規模瞬時表現試驗。在轉染後 7-10 日收穫 12-22 L 細胞培養物上清液且藉由掃流式過濾及滲濾濃縮隨後純化。

藉由免疫親和層析法純化人類及犬 SOST。簡言之，將 10-20 L 組織培養物上清液批料藉由掃流式過濾 (截留 10

kDa)濃縮為1-2 L且以2 ml/min施加於50 ml藉由根據製造商之說明將專屬單株抗Ab1-40/APP(6E10-A5)與CNBr活化瓊脂糖4B偶合(每毫升樹脂10 mg抗體)來製備之抗APP瓊脂糖管柱上。以PBS進行基線洗滌之後，將所結合之物質以100 mM甘胺酸溶離，中和為pH 2.7且進行無菌過濾。藉由A280使用所計算之吸附因子測定蛋白質濃度。最後將經純化之蛋白質藉由SDS-PAGE、N末端測序及LC-MS表徵。使用1 mM磺酸基-NHS-Ic-生物素(Uptima; UP54398A)將經純化人類SOST之等分試樣在37°C下在PBS中生物素標記1小時。隨後藉由針對PBS廣泛透析移除過量試劑。

大腸桿菌來源之人類SOST

藉由再摺疊產生His₆-PreScission標記之SOST aa24-213(NPL006071，質體pXI504)及SOST aa24-213(NPL006690，質體pXI515)。將大腸桿菌Tuner(DE3)以任一質體轉化。

使用改良TB培養基(實驗室112版)以20公升規模(V9405)醱酵批料PSU5257。將細胞在OD₆₀₀ 3.90下以1 mM IPTG誘導且在37°C下誘導3.5小時。使用連續流動離心收穫細胞，產生重量為190 g之濕細胞離心塊。

在16 L補充有¹⁵N標記之氯化銨之最低M9-1培養基中以20公升規模醱酵批料PSU11274。達到OD₆₀₀ 1.5之後，將細胞以1 mM IPTG誘導且在OD₆₀₀ 3.3下使用連續流動離心收穫，產生重量為50 g之濕細胞離心塊。

使用Avestin C-50乳化器將以上醱酵所得之濕細胞離心

塊溶解於8體積50 mM Tris(pH 8.0, 含有各5 mM之EDTA、DTT及苯甲脒-HCl)中且在12,000 rpm下離心30 min。棄去上清液且將所得離心塊再懸浮於10體積溶解緩衝液中且再次離心。將該過程再重複3次, 之後將溶解緩衝液以含有5 mM DTT之Milli-Q水替換。將離心塊再在該等條件下洗滌兩次。將包涵體在環境溫度下溶解於8 M胍-HCl(含有100 mM DTT、50 mM Tris(pH 8)及5 mM EDTA)中歷時3-4 h, 隨後在20,000 rpm下離心30 min, 經由0.45 μ M過濾器過濾。藉由以88體積(PSU11274)及92體積(PSU5257)冰凍再摺疊緩衝液(含有0.9 M精氨酸-HCl、5 mM GSH及0.5 mM GSSG之0.5 M Tris, pH 8)快速稀釋引發再摺疊。將溶液在4°C下儲存1週。在此階段, 對兩種製備物進行略微不同之處理, 因為在完成再摺疊之前需要自PSU5257移除his₆-標籤。

PSU5257

將經稀釋之摺疊溶液針對1.5體積50 mM Tris(pH 8)、5 mM GSH、0.5 mM GSSG滲濾濃縮2倍, 隨後稀釋回原始體積。將此步驟進行3次, 之後, 添加PreScission蛋白酶且將溶液在4°C下靜置48 h。所有濃縮/滲濾均使用具有10 KDa截留膜之Pellicon II超濾盒進行。最後將溶液濃縮10倍。

PSU11274

將經稀釋之再摺疊溶液濃縮10倍。使用LC-MS來證實濃縮之前所有4個二硫橋之形成。

隨後將兩種製備物針對 2×10 體積 50 mM 乙酸钠 (pH 5) 透析。經由玻璃棉及 3.0 μ m 膜連續過濾以移除沈澱之蛋白質之後，使用 SP-Sepharose™ 高效陽離子交換層析進行純化。將管柱以透析緩衝液平衡且隨後以於相同緩衝液中之 0-1 M NaCl 梯度經 20 管柱體積溶離。將溶離為具有微小肩部之單峰的骨硬化素棄去。在 PSU5257 之情況下，將主峰收集，濃縮，使用以 50 mM Tris, 150 mM NaCl 平衡之 Superdex 75™ 管柱進行尺寸排阻層析。對於 PSU11274 而言，陽離子交換之後直接提供樣品。

藉由 RT-PCR 以基於非洲綠猴 SOST 序列之引子 (GenBank 登記號 AF326742) 擴增獼猴 SOST cDNA (cySOST)。5' 引子 (ATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTTGT) (SEQ ID NO:170) 對應於信號肽序列之 N 末端且並不在最終分泌之蛋白質中；3' 引子 (AATCAGGCCGAGCTGGAGAACGCC TACTAG) (SEQ ID NO:171) 對應於在人類、非洲綠猴及小鼠間保守之區域。將經擴增之片段次選殖於 pcDNA3.1(+) 之 Bam HI/Eco RI 位點中且證實其序列。該質體另外充當犬-SOST PCR 擴增之模板以添加 C 末端 APP 標籤及 attB 重組位點以便根據 Gateway 技術最終選殖於 pDESTRS5a 中 [cySOST-pDESTRS5a]。

藉由大規模瞬時轉染以 10 L 規模在 Wave™ 生物反應器系統中進行表現，在轉染後第 9 日收穫且如上所述進行純化。

實例 2：自 HuCAL GOLD® 庫產生人類骨硬化素特異性抗體

藉由使用市售噬菌體呈現庫(MorphoSys HuCAL GOLD[®]庫)作為抗體變異蛋白之來源選擇具有高結合親和力之純系來產生人類骨硬化素蛋白之治療性抗體。HuCAL GOLD[®]庫為一種Fab庫(Knappik等人, 2000), 其中所有六個CDR藉由適當突變而多樣化且其使用CysDisplay[®]技術使Fab與噬菌體表面連接(WO01/05950, Lohning等人, 2001)。

藉由自庫中淘選骨硬化素特異性抗體來選擇

為選擇識別人類骨硬化素之抗體, 應用多種淘選策略。

總而言之, 將HuCAL GOLD[®]抗體噬菌體分為三個包含不同V_H主基因之集合。

使該等集合個別地進行以下步驟:

- a) 固相淘選, 其中將抗原(人類及小鼠骨硬化素)直接塗佈於Maxisorp 96孔微量滴定板(Nunc, Wiesbaden, Germany)上, 或
- b) 捕獲及不完全溶液淘選, 其中抗原(經生物素標記之骨硬化素), 各別噬菌體-抗原複合物捕獲於N/A透明帶上, 或
- c) 使用經生物素標記之骨硬化素的溶液淘選, 其中對於各淘選集合, 噬菌體-抗原複合物由抗生蛋白鏈菌素磁性珠粒(Dynabeads M-280; Dynal)捕獲。

• 骨硬化素上之固相淘選

對於第一輪骨硬化素上之淘選, 將Maxisorp板之孔以300 μ l(5 μ g/ml)於PBS中稀釋之人類骨硬化素(在HEK細胞中產生)塗佈隔夜。以400 μ l PBS進行兩次洗滌步驟之後,

將該等孔以含有於PBS中稀釋之5%奶粉之阻斷緩衝液培育。

在選擇之前，在室溫下將HuCAL GOLD[®]噬菌體在阻斷緩衝液(5%奶粉/PBS，0.5%吐溫20)中預吸附2 h以避免抗體之非特異性選擇。

將經塗佈及阻斷之Maxisorp板洗滌(2×400 μ l PBS)之後，將300 μ l經預吸附之噬菌體添加至經塗佈孔中且在室溫下溫和震盪培育2h。該培育之後在室溫下以PBS及PBS/0.05%吐溫20進行10次洗滌循環。

藉由在室溫下向每孔添加300 μ l於10 mM Tris/HCl(pH 8.0)中之20 mM DTT使經結合之噬菌體溶離10分鐘。將溶離液移出且添加至15 ml生長至0.6-0.8之OD_{600nm}之大腸桿菌TG1F⁺細胞中。使大腸桿菌之噬菌體感染在37°C下無振盪情況下進行45分鐘。在4120×g下離心5 min之後，將細菌離心塊各自再懸浮於600 μ l 2xYT培養基中，塗佈於LB-CG瓊脂板上且在30°C下培育隔夜。隨後自板上刮下菌落，且援救並擴增噬菌體。

第二及第三輪選擇以與第一輪選擇相同之方法進行，其中唯一區別為在噬菌體結合後洗滌條件更為嚴格。在第二輪選擇中對於一些淘選條件，使用小鼠骨硬化素作為抗原以富集小鼠交叉反應性抗體。對於一些淘選條件，塗佈另一批人類重組骨硬化素(在大腸桿菌中產生)。

•骨硬化素上之不完全溶液淘選

對於該類淘選執行兩種不同方法：捕獲不完全溶液淘選

及標準不完全溶液淘選程序。

詳言之，對於經生物素標記之骨硬化素上之不完全溶液淘選，在室溫下將 100 μ l 抗原塗佈在中性鏈親和素 (NeutrAvidin)(N/A) 透明帶 (來自 Pierce，每孔活化量 100 μ l，結合能力 15 pmol) 上 2 h。將 N/A 帶在 4°C 下以 200 μ l Chemiblock 阻斷隔夜且以 PBS 洗滌兩次。

將經阻斷之噬菌體溶液 (Chemiblock/0.05% 吐溫 20) 添加至經阻斷之 N/A 孔中歷時 30 min，且將該步驟再重複 30 min 以移除中性鏈親和素結合物。隨後將預淨化之噬菌體轉移至固定於 N/A 透明帶上的經生物素標記之骨硬化素中，以箔密封且在室溫下震盪培育隔夜。

次日，將噬菌體溶液自經抗原塗佈之孔中移除且洗滌該等孔。

對於標準不完全溶液淘選，將經阻斷 (Chemiblock/0.05% 吐溫 20)、預淨化之噬菌體添加至新的經預阻斷之 1.5 ml 反應管 (Chemiblock/0.05% 吐溫 20) 中，且隨後添加經生物素標記之人類骨硬化素至 100 nM 之最終濃度且在室溫下震盪培育隔夜。

次日，將 1.5 ml 反應管中之噬菌體-抗原溶液添加至中性鏈親和素帶之新的阻斷孔中且使其在室溫下結合 30 min 且隨後洗滌。

對於兩種淘選程序，在洗滌之後藉由在室溫下向每孔添加 300 μ l 於 10 mM Tris/HCl (pH 8.0) 中之 20 mM DTT 將經結合之噬菌體溶離 10 min。將溶離液移出且添加至 15 ml 生長

至 0.6-0.8 之 OD_{600nm} 之大腸桿菌 TG1 細胞中。使大腸桿菌之噬菌體感染在 $37^{\circ}C$ 下無震盪的情況下進行 45 min。在 $4120\times g$ 下離心 5 min 之後，將細菌離心塊各自再懸浮於 600 μl 2xYT 培養基中，塗佈於 LB-CG 瓊脂板上且在 $30^{\circ}C$ 下培育隔夜。隨後自板上刮下菌落，且援救並擴增噬菌體。

第二及第三輪選擇以與第一輪選擇相同之方法進行，其唯一區別為在噬菌體結合後之洗滌條件更為嚴格。

• 骨硬化素上之溶液淘選

對於此類淘選，將 200 μl 抗生蛋白鏈菌素磁性珠粒 (Dynabeads M-280; Dynal) 以 PBS 洗滌一次，且在室溫下以 Chemiblock 阻斷 2 h。在室溫下將 500 μl 噬菌體以 Chemiblock 旋轉阻斷 1 h。將經阻斷之噬菌體針對 50 μl 經阻斷之抗生蛋白鏈菌素磁性珠粒預吸附兩次歷時 30 min。將噬菌體上清液轉移至新的經阻斷之 2 ml 反應管中，且添加不同濃度之人類生物素標記骨硬化素(參見表 5、6 及 7)且在室溫下旋轉培育 1 h。將 100 μl 經阻斷抗生蛋白鏈菌素磁性珠粒添加至各淘選集合中且在旋轉器上培育 10 min。將珠粒以粒子分離器 (Dynal MPC-E) 收集約 2.5 min 且將溶液小心移除。

洗滌循環(表 2)之後，藉由在室溫下向每孔添加 300 μl 於 10 mM Tris/HCl(pH 8.0) 中之 20 mM DTT 將經結合之噬菌體溶離 10 min。將溶離液移出且添加至 15 ml 生長至 0.6-0.8 之 OD_{600nm} 之大腸桿菌 TG1F⁺ 細胞中。使大腸桿菌之噬菌體感染在 $37^{\circ}C$ 下無振盪情況下進行 45 分鐘。在 $4120\times g$ 下離心 5

min之後，將細菌離心塊各自再懸浮於600 μ l 2xYT培養基中，塗佈於LB-CG瓊脂板上且在30°C下培育隔夜。隨後自板上刮下菌落，且援救並擴增噬菌體。

第二與第三輪選擇以與第一輪選擇相同之方法進行，其唯一區別為在噬菌體結合後之洗滌條件更為嚴格。在第二及第三輪選擇中對於一些淘選條件，降低抗原濃度。

所選Fab片段之次選殖及表現

所選Fab片段之微表現

為有利於可溶性Fab快速表現，將所選HuCAL GOLD[®]噬菌體之Fab編碼插入物經由*Xba*I及*Eco*RI自各別呈現載體次選殖於大腸桿菌表現載體 pMORPH[®]X9_MH 中 (Rauchenberger等人，2003)。將表現質體轉化至大腸桿菌 TG1 F⁻細胞中之後，選取抗氯黴素單純系至以100 μ l 2xYT-CG培養基預填充之無菌96孔微量滴定板之孔中且在37°C下生長隔夜。將5 μ l各大腸桿菌TG-1培養物轉移至以100 μ l每孔補充有34 μ g/ml氯黴素及0.1%葡萄糖之2xYT培養基預填充之新鮮、無菌96孔微量滴定板中。在30°C下將微量滴定板在微板震盪器上以400 rpm震盪培養直至培養物略顯混濁(約2-4小時)，且OD_{600 nm}為約0.5。對於該等表現板，每孔添加20 μ l補充有34 μ g/ml氯黴素及3 mM IPTG(異丙基- β -D-硫代半乳糖苷)之2xYT培養基(最終濃度：0.5 mM IPTG)，將微量滴定板以透氣帶密封，且在30°C下以400 rpm震盪培育隔夜。

全細胞溶解物(BEL萃取物)之產生：向表現板之各孔添

加 40 μ l BEL 緩衝液且在 22°C 下在微量滴定板震盪器 (400 rpm) 上培育 1 h。

大腸桿菌中 HuCAL[®]-Fab 抗體之表現及純化

在震盪燒瓶培養物中使用 750 ml 補充有 34 μ g/ml 氯黴素之 2xYT 培養基進行大腸桿菌 TG1 F⁻ 細胞中由 pMORPH[®]X9_Fab_MH 編碼之 Fab 片段之大規模表現。將培養物在 30°C 下震盪直至 OD_{600nm} 達到 0.5。藉由添加 0.75 mM IPTG (異丙基- β -D-硫代半乳糖苷) 誘導 Fab 表現且將其其在 30°C 下再培養 20 h。收穫細胞且使用溶菌酶將其破壞且藉由 Ni-NTA 層析分離 Fab 片段。藉由尺寸排阻層析 (SEC) 以校準標準測定表觀分子量。由 UV-分光光度計測定濃度 (Krebs 等人, 2001)。

實例 2：骨硬化素特異性 HuCAL[®] 抗體之鑑別

在直接塗佈之骨硬化素上偵測骨硬化素結合 Fab 之酶聯免疫吸附檢定 (ELISA)

在 4°C 下將 Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, USA) 384 孔板以 20 μ l 於 PBS (pH 7.4) 中之 2.5 μ g/ml 抗原 (HEK 細胞中所產生之人類骨硬化素, 大腸桿菌細胞中所產生之人類骨硬化素, 及小鼠骨硬化素) 塗佈隔夜。

在室溫下將培養板以含有 5% 奶粉之 PBS/0.05% 吐溫 20 (PBST) 阻斷 1 h。以 PBST 洗滌孔之後, 將在 PBS 中稀釋之 BEL 萃取物、經純化 HuCAL[®] Fab 或對照 Fab 添加至孔中且在室溫下培育 1 小時。為偵測第一抗體施加以下第二抗體: 鹼性磷酸酶 (AP) 結合 AffiniPure F(ab')₂ 片段、山羊抗

人類、抗小鼠IgG(Jackson ImmunoResearch)。為偵測AP-結合物，根據製造商之說明使用如AttoPhos(Roche)之螢光受質。在所有培養步驟之間，將微量滴定板之孔以PBST洗滌3次且在最後與第二抗體一起培養之後洗滌5次。在TECAN Spectrafluor板讀取器中量測螢光。

使用經生物素標記之骨硬化素之捕獲篩檢

使用此類ELISA以便在進行溶液淘選之後篩檢HuCAL GOLD[®] Fab。

將Maxisorp(Nunc, Rochester, NY, USA)384孔板以20 μ l於PBS(pH 7.4)中稀釋之5 μ g/ml對Fd片段具有特異性之綿羊抗人類IgG(The Binding Site, Birmingham, UK)塗佈。

在室溫下以於TBS中之3% BSA、0.05%吐溫20阻斷2 h之後，添加周質萃取物或經純化HuCAL GOLD[®] Fab且在室溫下培育1 h。以PBST將培養板洗滌五次之後，將20 μ l用於特異性結合之經生物素標記之骨硬化素或用於非特異性結合之經生物素標記之轉鐵蛋白添加至孔中。

隨後，使經生物素標記之抗原骨硬化素結合所捕獲之HuCAL[®]-Fab片段。且洗滌之後，與結合鹼性磷酸酶之抗生蛋白鏈菌素(Zymex)一起培育。為偵測AP-抗生蛋白鏈菌素，根據製造商之說明使用如AttoPhos(Roche)之螢光受質(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)。記錄535 nm下之螢光發射，其中在430 nm下激發。

結果：

淘選之後，將富集之噬菌體集合自pMORPH[®]23庫載體

(允許抗體在噬菌體表面上有效呈現)次選殖於介導可溶性Fab周質表現之pMORPH[®]X9_Fab_MH表現載體中。選取單純系且由該等單純系表現可溶性Fab。在一級篩檢中總共分析約4600個純系，其係藉由以下步驟執行：藉由使細菌溶解物之Fab直接與Maxisorp微量滴定板上所固定之人類及小鼠骨硬化素結合或藉由將Fab經由抗Fd抗體捕獲於maxisorp微量滴定板，繼而結合經生物素標記之人類骨硬化素。在以鹼性磷酸酶標記之抗人類(Fab)'₂抗體或使用抗生蛋白鏈菌素鹼性磷酸酶標記之後以ELISA進行偵測。

對由在重組骨硬化素上之一級篩檢獲得之信號超過背景5倍以上之命中物就與直接塗佈或溶液形式(使用經生物素標記之骨硬化素)之人類HEK及大腸桿菌骨硬化素及小鼠骨硬化素之結合作進一步分析。選擇識別所有骨硬化素衍生物之命中物且對其進行測序。

HuCAL GOLD[®] Fab之表徵

使用Biacore之親和力測定

為進一步表徵抗骨硬化素抗體，測定其與人類、小鼠及獼猴骨硬化素之親和力。將重組骨硬化素蛋白固定於CM5 Biacore晶片上且在移動相中施加不同濃度之Fab。為可靠測定單價親和力，僅將在定性尺寸排阻層析中展示 $\geq 90\%$ 之單體分率之Fab批料用於Biacore量測。

在Biacore中測定對重組人類、獼猴及小鼠骨硬化素之親和力。對人類骨硬化素之親和力介於亞奈莫耳至超過500 nM，對獼猴骨硬化素之親和力介於亞奈莫耳至接近5000

nM且對小鼠骨硬化素之親和力介於亞奈莫耳至4500 nM。

實例3：使用 BioVeris™裝置進行抑制骨硬化素與經固定 BMP-2結合之抗人類骨硬化素 Fab候選者之鑑別

將所有產生且純化之 Fab 在基於 BioVeris 之結合抑制效能檢定中測試其抑制骨硬化素與重組人類 BMP-2 結合之能力。測試兩種不同嚴格度條件(緩衝系統中之 0.1% 吐溫 20 與 1% 吐溫 20)。27 種 Fab 中有 9 種能夠在嚴格緩衝條件下抑制骨硬化素與經固定 BMP-2 之結合。

實例4：MC3T3細胞中骨硬化素抑制 BMP-2誘導之 ALP產生之逆轉

親本結合物之 IgG轉化及 IgG之表徵

將 21 個候選者藉由分別次選殖於 pMORPH[®]_h_IgG1 表現載體及 pMORPH[®]_h_Ig 載體系列之相應輕鏈構築體中而轉化為人類 IgG1 形式。藉由瞬時轉染 HEK293 或 HKB11 細胞執行表現且將全長免疫球蛋白自細胞培養物上清液純化。藉由 ELISA 評定純化之後 IgG1 與經固定之人類、小鼠及獼猴骨硬化素結合之功能。

一級生物檢定中之 IgG

在 ALP 檢定中將所有經純化之 hIgG 進行力價滴定及測試。對於 BMP-2 骨硬化素抑制該檢定為可靠的，但所選候選者不會在所有實驗中均展示骨硬化素抑制(不同檢定之間的活性變化、不同培養板之間的變化、進行重複試驗之孔中之高度變化)。因此，僅可能對 IgG 之活性進行分級。

實例5：藉由 LCDR3及 HCDR2盒之平行交換達成的所選抗

骨硬化素 Fab 之親和力成熟

在 ALP 檢定中測試 IgG 之結果僅可進行分級。由該分級，就親和力成熟之高風險選擇 4 種 Fab。所有候選者經選擇以最佳化為 L-CDR3 及 H-CDR2 中之單一主候選者。

為增加四種所選抗體片段之親和力及生物活性，藉由盒式誘變使用定向誘變 (Virnekas 等人，1994) 來平行最佳化 LCDR3 及 HCDR2 區域，由此構架區保持恆定。選殖成熟庫之前，將所有親本 Fab 片段經由 *XbaI/EcoRI* 限制位點自表現載體 pMORPH[®]x9_MH 轉移至 CysDisplay[™] 成熟載體 pMORPH[®]25 中。該載體提供 N 末端與半胱胺酸殘基融合之噬菌體蛋白以及與 Fd 抗體鏈融合之 C 末端半胱胺酸 pIII 且因此允許各別 Fab 片段在噬菌體表面上經二硫化物連接之呈現。

為產生 HCDR2 庫，將各親本 Fab 之 HCDR2 區域切除且替換為 590 bp 填充片段。該 DNA 填充片段有利於自雙重消化載體帶分離單一消化載體帶且降低成熟淘選期間高親和力親本 Fab 之背景值。在下一步驟中，將填充片段自各親本純系之 Fab 編碼質體切除且替換為高度多樣化之 HCDR2 成熟盒。

平行地，將四個親本純系中之五者之 LCDR3 區域替換為多樣化 LCDR3 成熟盒，中間不進行填充片段的選殖。

成熟庫尺寸介於 1×10^7 個純系與 4×10^8 個純系之間，其中選殖背景低於 1%，且藉由測序達成之品質控制揭示各庫之優良品質。僅親本純系 MOR04520 之 LCDR3 庫具有小尺

寸($<10^6$)及許多錯誤純系且因此不包括在成熟淘選內。

對於各LCDR3及HCDR2成熟庫，製備抗體呈現噬菌體且藉由點滴定測定噬菌體力價。

親和力成熟之淘選策略

對來自以下成熟庫之抗體呈現噬菌體進行獨立淘選及篩檢：

主導(lead)1：MOR04518(L-CDR3成熟)

主導1：MOR04518(H-CDR2成熟)

主導2：MOR04520(H-CDR2成熟)

主導3：MOR04532(L-CDR3成熟)

主導3：MOR04532(H-CDR2成熟)

主導4：MOR04799(L-CDR3成熟)

主導4：MOR04799(H-CDR2成熟)

對各主導庫執行三種不同淘選。對於各淘選策略而言，使用不同嚴格度條件。為增加淘選嚴格度及選擇改良之截留率(off-rate)，執行廣泛洗滌及與經純化親本Fab或與可溶性重組骨硬化素之競爭。成熟淘選之後，將富集之噬菌粒集合次選殖於pMORPH[®]x9_MH表現載體中。選取約2900個單純系且藉由以IPTG誘導表現Fab。

BioVeris™親和力分級及改良親和力之篩檢

為鑑別親和力改良之骨硬化素特異性Fab，將約2900個單純系之細菌溶解物稀釋且檢驗Fab與固定於抗生蛋白鏈菌素塗佈珠粒上之經生物素標記之人類骨硬化素的結合。以BioVeris工作站分析該結合。產生最高信號之彼等純系

表明改良之親和力且因此選擇彼等純系以便藉由溶液平衡滴定進一步分析。

出於該目的，選擇176個單純系且以BioVeris經由4點溶液平衡滴定(SET)測定初始親和力。該等數據中，選擇24個展示最佳親和力之純系。將該等Fab以毫克規模純化。

使用8點SET量測及人類、小鼠及獼猴骨硬化素測定最終親和力。

一級生物檢定中經最佳化之Fab

在細胞ALP檢定中測試經最佳化之Fab。其中大多數無活性；且對於一些Fab觀察到骨硬化素抑制的可變逆轉。因此，將選擇之純系轉化為人類/小鼠IgG2a形式且在同一檢定中測試。但該等人類/小鼠IgG2a形式之純系可能不會完全逆轉骨硬化素抑制亦不能達成所需 EC_{50} ($< 10 \text{ nM}$)標準。最佳成熟候選者MOR05177(自親本MOR04518成熟之 V_L)展示在 50 nM Fab或 $140\text{-}467 \text{ nM}$ 人類/小鼠IgG2a下ALP信號達成75-85%恢復。

實例6：新穎一級生物檢定中自親本及經最佳化之Fab及IgG鑑別抗骨硬化素抗體

基於展示骨硬化素直接或間接影響Wnt信號傳輸之新出版物(Wu等人，JBC 2005；He等人，JBC 2005；Bezooyen等人，ASBMR 2005；Winkler等人，JBC 2005)，開發出一種新穎功能生物檢定。

該檢定係基於骨硬化素抑制HEK293細胞中Wnt1介導之STF活化的能力。

在該檢定中，測試在初始篩檢中鑑別之所有Fab加上在親和力成熟中鑑別之所有Fab。顯而易見，成熟Fab增加之親和力反映wnt-1檢定中增加之效能及功效。

測試所有親本Fab鑑別出另外兩種抗體作為另一親和力成熟之有前景之模板。圖1展示wnt-1檢定中鑑別之最有效抗體之一MOR05813_IgG2 λ 之活性。

實例7：其他生物檢定中親本及親和力成熟Fab之表徵

礦化檢定中親本及親和力成熟Fab之活性

礦化檢定係基於MC3T3細胞形成礦化基質之能力，此指示其進行成骨分化之能力。14日之後在測試之所有BMP-2濃度下均量測到強礦化(每孔沈積之鈣 $>1\ \mu\text{g}$ (96孔形式))。添加遞增濃度之骨硬化素誘導BMP-2(2.1 nM)誘導之礦化的劑量依賴性抑制(IC₅₀值：120 nM)(數據未展示)。

圖2展示在MOR05813_Fab存在下礦化之一實例。該抗體可使BMP-2誘導之礦化最大恢復至初始反應之80%，而用作陰性對照之抗溶菌酶Fab無效。

親本及親和力成熟Fab在LRP6/骨硬化素ELISA中之活性

LRP6/骨硬化素ELISA係基於骨硬化素結合LRP6之能力。為進一步表徵所產生之Fab，在該檢定中測試所選Fab及IgG。在R&D之抗骨硬化素抗體(1000 ng/ml=約7 nM)存在下，與對照相比骨硬化素(0.9 nM)與LRP6之結合被抑制68%(數據未展示)。

在90 nM下，MOR05813_IgG2 λ 抑制骨硬化素與LRP6之結合高達90%，而用作陰性對照之抗溶菌酶IgG對骨硬化

素與LRP6之結合無效(圖3)。

磷酸-Smad1檢定中親本及親和力成熟Fab之活性

磷酸-Smad1檢定(Western)係基於BMP-6在15分鐘內誘導MC3T3-E1細胞中Smad1磷酸化之能力。MOR05318_IgG2 λ 抑制骨硬化素對BMP-6誘導之Smad1磷酸化之作用，其中EC₅₀值為115 nM，且其使Smad1磷酸化最大恢復至BMP-6誘導之磷酸化的66%。陰性對照抗溶菌酶IgG(IgG C)無效(圖4)。

實例8：新穎SOST相互作用搭配物LRP4對抗SOST抗體活性的作用

除LRP4 siRNA e之外，在無SOST的情況下LRP4 mRNA敲除不影響STF活性。然而，其確實將SOST抑制STF活性之能力降低10%與30%之間。此對所有五個單獨(圖5A)或以不同組合(數據未展示)測試之siRNA成立。在HEK及c28a2 supertopflash檢定中，LRP4在過度表現之後，使SOST IC₅₀值分別減少5及16倍(圖5B及圖5C)。該作用在過度表現之LRP4對DKK1 IC₅₀值無效之意義上具特異性。敲除LRP4(siRNA)降低SOST在Wnt-1誘導之STF中之抑制作用，但其不降低DKK1之抑制作用(圖5D)。又，LRP4降低抗SOST抗體之作用，其使MOR05813_IgG2a EC₅₀值自17.2 nM增加至30 nM(圖5E)。該等數據表明LRP4為SOST作用之促進者。

實例9：新穎成熟

為基於由生物檢定獲得之結果增加兩種新近選擇之抗體

片段之親和力及生物活性，藉由盒式誘變使用定向誘變平行最佳化LCDR3及HCDR2區域(Virnekas等人，1994)，由此構架區保持恆定。選殖成熟庫之前，將所有親本Fab片段經由 *XbaI/EcoRI* 限制位點自表現載體 pMORPH[®]X9_MH 轉移至 CysDisplay[™] 成熟載體 pMORPH[®]25 中。該載體提供 N 末端與半胱胺酸殘基融合之噬菌體蛋白 pIII 及與 Fd 抗體鏈融合之 C 末端半胱胺酸且因此允許各別 Fab 片段在噬菌體表面上經二硫化物連接之呈現。

為產生 HCDR2 庫，將各親本 Fab 之 HCDR2 區域切除且替換為 590 bp 填充片段。該 DNA 填充片段有利於自雙重消化載體帶分離單一消化載體帶且降低成熟淘選期間高親和力親本 Fab 之背景值。在下一步驟中，將填充片段自各親本純系之 Fab 編碼質體切除且替換為高度多樣化之 HCDR2 成熟盒。

平行地，將四個親本純系中之五者之 LCDR3 區域替換為多樣化 LCDR3 成熟盒，中間不進行填充片段選殖。

成熟庫尺寸介於 2×10^7 個純系與 2×10^8 個純系之間，其中選殖背景低於 1%，且藉由測序達成之品質控制揭示各庫之優良品質。對於各 LCDR3 及 HCDR2 成熟庫，製備抗體呈現噬菌體且藉由點滴定測定噬菌體力價。

另外親和力成熟之淘選策略

對來自以下成熟庫之抗體呈現噬菌體進行獨立淘選及篩檢：

主導 1：MOR04525(L-CDR3 成熟)

主 導 1：MOR04525(H-CDR2成熟)

主 導 2：MOR04529(L-CDR3成熟)

主 導 2：MOR04529(H-CDR2成熟)

對於各主導或混合庫執行三種不同淘選，對於各淘選策略而言，使用不同嚴格度條件。為增加淘選嚴格度及選擇改良之截留率，在延長之培育及洗滌時間內執行與可溶性重組骨硬化素蛋白之競爭。

淘選之後，將富集之噬菌粒集合次選殖於pMORPH®X9_MH表現載體中。選取約1600個單純系且藉由以IPTG誘導表現Fab。

兩種親本Fab之衍生物均滿足對人類骨硬化素<100 pM之親和力標準。兩種親本Fab之衍生物均滿足與獼猴骨硬化素及與小鼠骨硬化素<500 pM之必須交叉反應性。MOR04525產生更多對所有三個物種均具有較高親和力的純系。

實例10：活體內研究中抗骨硬化素抗體之表徵

向八月齡雌性OF1/IC小鼠(n=16/組，Charles River, France)每週兩次靜脈內投與抗骨硬化素抗體MOR05813(24.5 mg/kg, mIgG2a)或同型對照抗體(抗-PC-mIgG2a)。對照組每日接受皮下每公斤100 µg PTH(1-34)或媒劑(PBS+0.1% BSA)。對於所有動物治療均持續2.5週。在組織形態學分析時處死一半動物(n=8/組)。在屍體解剖之前第10日及第3日使該等動物接受螢光染料標記以作骨形成動力學之組織形態學評估。對於其餘動物n=8/組)繼續治療

直至5週。

監測動物骨質量、密度及幾何尺寸之變化。活體內周邊定量電腦斷層攝影術[pQCT]展示MOR05177在老齡小鼠之近端脛骨中具有強烈骨合成代謝作用，增加骨礦物含量(圖6)及密度(圖7)。骨合成代謝作用存在於皮層(圖8)與松質(圖9)骨腔室中。該等數據表明所觀察到的MOR05813對非成母細胞之Wnt信號傳輸報導體檢定中骨硬化素作用之抑制效應體現為由於活體內骨硬化素抑制而誘導骨形成反應。小鼠骨合成代謝反應之程度與由高劑量hPTH(1-34)誘導之骨合成代謝相當。

MicroCT分析展示骨小樑體積增加(圖9)主要與跟骨合成代謝一致之骨小樑結構變厚(圖10)相關。

此外，治療達5週之動物之骨礦物密度增加(圖11)。藉由DEXA離體評估，附肢骨骼(脛骨、股骨)及主軸(腰椎)骨骼中之骨礦物密度增加(圖12-14)。該作用與每日以100 µg/kg hPTH(1-34)治療之陽性對照組中所量測之作用相當。

基於組織形態學螢光染料標記之骨形成動力學分析展示骨質量增加係歸因於附肢骨骼(圖15)及主軸骨骼(圖18)中骨形成速率之顯著增長。該等作用與高劑量之PTH(1-34)之作用相當。骨形成速率增加與礦物沈積速率(圖16)與礦化表面(圖17)二者相關。骨再吸收並未因該治療增加，如由蝕骨細胞表面量測所展示(圖19)。

**實例11：篩檢交叉阻斷本發明之骨硬化素結合抗體之抗體
Biacore交叉阻斷檢定**

以下一般性描述判定抗體或其他結合劑是否交叉阻斷或能夠交叉阻斷本發明之抗體的合適Biacore檢定。應瞭解該檢定可用於本文所述之任何骨硬化素結合劑。

根據製造商之建議操作Biacore機(例如BIAcore 3000)。

骨硬化素可與(例如)CM5 Biacore晶片經由常規使用之胺偶合化學(例如EDC-NHS胺偶合)偶合以產生骨硬化素塗佈表面。為獲得可量測水準之結合，通常可使200-800共振單位之骨硬化素與晶片偶合(該量產生可量測之結合水準且同時易於為所用測試試劑之濃度飽和)。

使骨硬化素與BIAcore晶片連接之替代性方法為藉由使用"經標記"型式之骨硬化素，例如N末端或C末端His-標記之骨硬化素。在該形式中，使抗His抗體與Biacore晶片偶合，且隨後使His-標記之骨硬化素通過晶片表面且為抗His抗體捕獲。

將欲評定彼此交叉阻斷之能力的兩種抗體以化學計量量(例如莫耳比1:1)之結合位點在合適緩衝液中混合以產生測試混合物。所用緩衝液通常為蛋白質化學中通常使用之緩衝液，諸如PBS(136 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na_2HPO_4 、1.76 mM KH_2PO_4 ，pH 7.4)。當基於結合位點計算濃度時，假定抗體之分子量為抗體之總分子量除以該抗體上標靶(亦即骨硬化素)結合位點數目。

測試混合物中各抗體之濃度應足夠高以確保結合於BIAcore晶片上之骨硬化素分子上對於該抗體之結合位點飽和。混合物中之抗體為相同莫耳濃度(以結合計)且該濃

度通常介於 1.0 mM 與 1.5 mM 之間(以結合位點計)。

亦製備單獨含有獨立抗體之獨立溶液。用於該等獨立溶液之緩衝液應為與測試混合物所用相同之緩衝液且為相同濃度。

使測試混合物通過骨硬化素塗佈之 BIAcore 晶片且記錄結合。此後藉由以(例如)酸(諸如 30 mM HCl)處理晶片約 1 分鐘來移除經結合之抗體。重要的為不損壞與晶片結合之骨硬化素分子。

隨後使單獨第一抗體之溶液通過骨硬化素塗佈表面且記錄結合。此後，處理晶片以在不損壞晶片結合之骨硬化素的情況下移除所有經結合之抗體(例如經由上述酸處理)。

隨後使單獨第二抗體之溶液通過骨硬化素塗佈表面且記錄結合之量。

最大理論結合可定義為各抗體獨立地與骨硬化素結合之總和。隨後將其與所量測抗體混合物之實際結合相比。若實際結合低於理論結合，則兩種抗體彼此交叉阻斷。

基於 ELISA 之交叉阻斷檢定

抗骨硬化素抗體或另一骨硬化素結合劑之交叉阻斷亦可藉由使用 ELISA 檢定偵測。

ELISA 檢定之一般原理涉及將抗骨硬化素抗體塗佈於 ELISA 板之孔上。隨後添加過量的溶液形式(亦即不與 ELISA 板結合)之可能交叉阻斷之第二抗骨硬化素抗體。隨後將有限量之骨硬化素添加至孔中。

塗佈於孔上之抗體與溶液形式之抗體將競爭結合有限數

目之骨硬化素分子。隨後洗滌培養板以移除未與所塗佈抗體結合之骨硬化素且亦移除第二溶液相抗體以及第二溶液相抗體與骨硬化素之間所形成的任何複合物。隨後使用適當骨硬化素偵測試劑量測經結合之骨硬化素之量。能夠交叉阻斷經塗佈抗體之溶液形式之抗體應能夠使經塗佈抗體可結合之骨硬化素分子數目相對於在不存在第二溶液相抗體的情況下經塗佈抗體可結合之骨硬化素分子數目降低。

該檢定在下文中對於稱為Ab-X及Ab-Y之兩種抗體進一步進行更詳細描述。在選擇Ab-X為經固定抗體的情況下，將其塗佈於ELISA板之孔上，之後，將培養板以合適阻斷溶液阻斷以最小化隨後添加之試劑的非特異性結合。隨後將過量Ab-Y添加至ELISA板中以使每孔Ab-Y骨硬化素結合位點之莫耳數高於塗佈ELISA板期間每孔所用Ab-X骨硬化素結合位點之莫耳數至少10倍。隨後添加骨硬化素以使每孔所添加骨硬化素之莫耳數低於用於塗佈各孔之Ab-X骨硬化素結合位點之莫耳數至少25倍。培育合適時段之後，洗滌ELISA板且添加骨硬化素偵測試劑以量測由經塗佈抗骨硬化素抗體(在該情況下為Ab-X)特異性結合之骨硬化素之量。該檢定之背景信號定義為在具有經塗佈抗體(在該情況下為Ab-X)、第二溶液相抗體(在該情況下為Ab-Y)、單獨骨硬化素緩衝液(亦即無骨硬化素)及骨硬化素偵測試劑之孔中所獲得之信號。該檢定之陽性對照信號定義為在具有經塗佈抗體(在該情況下為Ab-X)、單獨第二溶液相抗體緩衝液(亦即無第二溶液相抗體)、骨硬化素及骨硬化素偵

測試劑之孔中所獲得之信號。ELISA檢定需要以一定方式進行以便具有至少6倍於背景信號之陽性對照信號。

為避免來源於選擇何種抗體用作經塗佈抗體且何種抗體用作第二(競爭)抗體之任何人為假像(例如Ab-X與Ab-Y之間對骨硬化素顯著不同之親和力)，交叉阻斷檢定需要以兩種形式進行：1)形式1為Ab-X為塗佈於ELISA板上之抗體且Ab-Y為溶液形式之競爭抗體，及2)形式2為Ab-Y為塗佈於ELISA板上之抗體且Ab-X為溶液形式之競爭抗體。

實例 12：偵測 MOR05813_IgG2 λ 對 LRP6 之 SOST 結合之作用的 ELISA

LRP6/骨硬化素 ELISA

將未經處理之96孔微量滴定板每孔以100 μ l在PBS中稀釋之LRP6/Fc(1 μ g/ml, R&D Systems, 目錄號1505-LR)塗佈。作為非特異性結合(NSB)之對照，少數孔每孔以100 μ l PBS填充。將培養板以塑膠薄膜覆蓋且在室溫下培育隔夜。塗佈之後，將培養板每孔以200 μ l於PBS中之0.05%吐溫20(Fluka, 目錄號93773)洗滌3次且藉由每孔添加300 μ l於TBS中之SuperBlock阻斷緩衝液(Pierce, 目錄號37535)將孔在37°C下阻斷1 h。培育之後，移除阻斷溶液且每孔添加100 μ l於PBS中之1% BSA中稀釋之骨硬化素(大腸桿菌來源, Novartis; 1-1000 ng/ml)。將培養板在室溫下培育2 h，隨後以每孔200 μ l於PBS中之0.05%吐溫20洗滌3次。之後，每孔添加100 μ l於PBS中之1% BSA中稀釋之抗骨硬化素抗體(1 μ g/ml)且將培養板在室溫下培育2 h，隨後以每孔

200 μ l於PBS中之0.05%吐溫20洗滌3次。最後，在室溫下每孔添加100 μ l於PBS中之1% BSA(Sigma 目錄號:A-7888)中稀釋之ALP結合之抗山羊IgG Ab(1:5000; Sigma目錄號A-7888)歷時1 h且隨後將培養板以每孔200 μ l於PBS中之0.05%吐溫20洗滌3次。為測定ALP，將每孔100 μ l ALP受質(Sigma，目錄號S0942)溶液(每5 ml二乙醇胺受質緩衝液(1 $\times$)1錠；Pierce，目錄號34064)添加至培養板中歷時90 min且在405 nm下量測光學密度。

親本及親和力成熟Fab在LRP6/骨硬化素ELISA中之活性

LRP6/骨硬化素ELISA係基於骨硬化素結合LRP6之能力。為進一步表徵所產生之Fab，在該檢定中測試所選Fab及IgG。在R&D之抗骨硬化素抗體(1000 ng/ml=約7 nM)存在下，與對照相比，骨硬化素(0.9 nM)與LRP6之結合被抑制68%(數據未展示)。在90 nM下MOR05813_IgG2 λ 抑制骨硬化素與LRP6之結合達90%，而用作陰性對照之抗溶菌酶IgG對骨硬化素與LRP6之結合無效(圖20)。

實例13：使用MOR05813共同治療

MOR05813+唑來膦酸

將八月齡雌性OF1/IC小鼠(n=10/組，Charles River, France)切除卵巢以藉由剝奪雌激素誘導骨質流失或保持完整。向動物每週兩次靜脈內投與抗骨硬化素抗體MOR05813(24 mg/kg, h/mIgG2a)或對照抗體(抗PC-h/mIgG2a，完整及OVX對照組)。其他組接受單一施用單獨唑來膦酸(100 μ g/kg)或與抗骨硬化素抗體MOR05813組

合施用。抗體治療持續3.5週(施用7次)。

在卵巢切除術之前藉由周邊定量電腦斷層攝影術(pQCT)量測動物之脛骨質量及幾何尺寸。根據體重及脛骨總骨礦物密度將動物均勻地分組。在治療期結束時評估骨礦物密度、質量及幾何尺寸變化。

結果表示為平均值 $\pm$ SEM。使用RS1(系列1999, Windows, Domain Manufacturing Corp., USA)進行統計分析。對數據進行單因子變異數分析(ANOVA)。藉由Levene F-檢驗測試變異數相等性且使用Bonferroni調整之Dunnett檢驗測試各組之間的差異。測試治療組與對照抗體治療OVX組之差異顯著性($p<.05^*$, $p<.01^{**}$)。

老齡小鼠中卵巢切除術誘導之骨質流失可藉由抗體治療阻斷(圖21)。當該抗體與單一靜脈內注射雙膦酸鹽唑來膦酸組合使用時,如由總骨礦物含量(圖21 A)及密度(圖21 B)增加以及皮層厚度(圖21 C)及松質骨礦物密度(圖21 D)增加所指示阻斷骨質流失且誘導骨增加。

MOR05813+阿倫膦酸鹽預治療

向4.5月齡雌性OF1/IC小鼠($n=10$ /組, Charles River, France)每週兩次靜脈內投與抗骨硬化素抗體MOR05813(10 mg/kg, h/mIgG2a)或對照抗體(抗-PC-mIgG2a, 完整及OVX對照組)。其他組接受7週阿倫膦酸鹽預治療(4微克/公斤/日; 5日/週)隨後接受對照抗體或抗骨硬化素抗體MOR05813。抗體治療持續3.5週(施用7次)。

在開始抗體治療之前藉由周邊定量電腦斷層攝影術

(pQCT)量測動物之脛骨質量及幾何尺寸。根據體重及脛骨總骨礦物密度將動物均勻分組。在治療階段期時評估骨礦物密度、質量及幾何尺寸變化。

結果表示為平均值 $\pm$ SEM。使用 RS1(系列 1999, Windows, Domain Manufacturing Corp., USA)進行統計分析。對數據進行單因子變異數分析(ANOVA)。藉由 Levene F-檢驗測試變異數相等性且使用 Bonferroni調整之 Dunnett 檢驗測試各組之間的差異。測試阿侖麟酸鹽預治療組與未接受預治療之組之差異顯著性($p < .05^*$, $p < .01^{**}$)。

以雙麟酸鹽阿侖麟酸鹽長期預治療對抗骨硬化素 MOR05813 之骨合成代謝作用無負面影響，如由總骨礦物含量(圖 22 A)及密度(圖 22 B)增加以及皮層厚度(圖 22 C)及松質骨礦物密度(圖 22 D)增加所反映。由於雙麟酸鹽之抗再吸收特性持續至投藥之後，觀察到總骨礦物含量(圖 22 A)及皮層厚度(圖 22 C)增加。

MOR05813+DKK1 或 hPTH

向六月齡雌性裸鼠($n=8/\text{組}$)每週兩次靜脈內投與媒劑、抗骨硬化素抗體 MOR05813(10、20及 40 mg/kg, IgG2)、抗 Dkk1 抗體(10 mg/kg, IgG1)、hPTH(1-34)(100 $\mu\text{g/kg}$)或其組合。抗體治療持續 4 週(施用 8 次)。

在治療之前藉由周邊定量電腦斷層攝影術(pQCT)量測動物之脛骨質量及幾何尺寸。根據體重及脛骨總骨礦物密度將動物均勻分組。在治療期結束時評估骨礦物密度、質量及幾何尺寸變化。

結果表示為平均值 $\pm$ SEM。使用 RS1(系列 1999, Windows, Domain Manufacturing Corp., USA)進行統計分析。對數據進行單因子變異數分析(ANOVA)。藉由 Levene F-檢驗測試變異數相等性且使用 Bonferroni調整之 Dunnett 檢驗測試各組之間的差異。測試各組與媒劑治療組之差異顯著性($p < .05^*$, $p < .01^{**}$)。

骨合成代謝作用隨抗骨硬化素 MOR05813 劑量增加(圖 23)。與抗 Dkk1 抗體共同治療使得總骨礦物含量(圖 23 A)及密度(圖 23 B)及皮層厚度(圖 23 C)增加改良且松質骨礦物密度協同增加(圖 23 D)。與 hPTH(1-34)共同治療使得所有量測參數協同增加(圖 23 A-D)。

參考文獻

Avsian-Kretchmer O, Hsueh AJ (2004) Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol* 18(1):1-12.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, USA.

Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P, Paes-Alves AF, Hill S, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dijkers FG, Stratakis C, Lindpaintner K, Vickery B, Foemzler D, Van Hul W. (2001) Increased bone density in

sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). Hum Mol Genet. 10(5):537-43.

Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, Lacza C, Dioszegi M, Dijkers FG, Hilderling P, Willems PJ, Verheij JB, Lindpaintner K, Vickery B, Foernzler D, Van Hul W. (2002) Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. J Med Gene 39(2):91-7.

Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, Proll S, Skonier JE, Zhao L, Sabo PJ, Fu Y, Alisch RS, Gillett L, Colbert T, Tacconi P, Galas D, Hamersma H, Beighton P, Mulligan J (2001) Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. Am J Hum Genet 68(3):577-89.

Chen, B.P., Hai, T. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. Gene 139, 73-75. 1994.

Chen, Y., Wiesmann, C, Fuh, G., Li, B., Christinger, H. W., McKay, P., de Vos, A. M., Lowman, H. B. (1999). Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. J. Mol. Biol. 293, 865-881.

Gardner JC, van Bezooijen RL, Mervis B, Hamdy NA,

Lowik CW, Hamersma H, Beighton P, Papapoulos SE. (2005) Bone mineral density in sclerosteosis; affected individuals and gene carriers. *J Clin Endocrinol Metab* 90(12):6392-5.

Haenel C, Satzger M, Delia Ducata D, Ostendorp R and Brocks B (2005) Characterization of High Affinity Antibodies by Electrochemiluminescence-Based Equilibrium Titration. *Anal Biochem* 339(1): 182-4.

Keller H, Kneissel M. (2005) SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone* 37(2): 148-58.

Knappik.A., Ge,L., Honegger.A., Pack.P., Fischer.M., Wellnhofer.G., Hoess.A., Wolle.J., Pluckthun.A., and Virnekas.B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL[®]) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57-86.

Krebs,B., Rauchenberger.R., Reiffert.S., Rothe.C, Tesar.M., Thomassen.E., Cao.M., Dreier.T., Fischer.D., Hoss.A., Inge.L., Knappik.A., Marget.M., Pack.P., Meng.X.Q., Schier.R., Sohlmann,P., Winter.J., Wolle.J., and Kretzschmar,T. (2001). High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254, 67-84.

Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE,

Wu D (2005) Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem.* 20;280(20): 19883-7.

Lohning, C. (2001). Novel methods for displaying (poly)peptides/proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. WO 01/05950.

Loots GG, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, Ovcharenko D, Plajzer-Frick I, Rubin EM. (2005) Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res* 15(7):928-35.

Low, N. M., Holliger, P., Winter, G. (1996). Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* 260, 359-368.

Rauchenberger.R., Borges.E., Thomassen-Wolf.E., Rom.E., Adar.R., Yaniv.Y., Malka.M., Chumakov.l., Kotzer.S., Resnitzky.D., Knappik,A., Reiffert,S., Prassler.J., Jury,K., Waldherr,D., Bauer.S., Kretzschmar.T., Yayon.A.及Rothe.C. (2003). Human combinatorial Fab Library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem.* 278(40):38194-38205.

Semenov MV, He X. LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition

by SOST. J Biol Chem. 2006 Oct 19.

van Bezooijen RL, Svensson JP, Eefting D, Visser A, van der Horst G, Karperien M, Quax PH, Vrieling H, Papapoulos SE, Ten Dijke P, Lowik CW (2006) Wnt but not BMP Signaling is Involved in the Inhibitory Action of Sclerostin on BMP-Stimulated Bone Formation.

Vimekas B, Ge L, Pluckthun A, Schneider KC, Wellnhofer G, Moroney SE (1994) Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. Nucleic Acids Res. 22(25):5600-5607

J Bone Miner Res 2006 Oct 10 Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M.

Brunkow ME, Latham JA. (2003) Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist.

EMBO J 22(23):6267-76 Winkler DG, Sutherland MS, Ojala E, Turcott E, Geoghegan JC, Shpektor D, Skonier JE, Yu C, Latham JA (2005) Sclerostin inhibition of Wnt-3a-induced C3H10T1/2 cell differentiation is indirect and mediated by bone morphogenetic proteins. J Biol Chem. 280(4):2498-502.

【圖式簡單說明】

圖 1：MOR05813_IgG2 λ 在 wnt-1 檢定中之作用；

圖 2：MOR05813_IgG2 λ 在 MC3T3-1b 細胞中 BMP-2 誘導之礦化中之作用；

圖 3：MOR05813_IgG2 λ 在 LRP6-SOST ELISA 中之作用；

圖 4：MOR05813_IgG2 λ 在磷酸-Smad1 檢定中之作用；

圖 5：A-Hek293 細胞之 wnt-1 檢定中 LRP4 敲除 (siRNA) 對 SOST 抑制作用之作用 (黑色數值：相對於不存在 SOST 下的 STF 活性，粗體黑色數值：存在/不存在 SOST 下之 STF 活性之比率)；B-Hek293 細胞之 wnt-1 檢定中 LRP4 過度表現對 SOST IC₅₀ 值及 Dkk1 IC₅₀ 值之作用特異性；C-C28a2 細胞之 wnt-1 檢定中 LRP4 過度表現對 SOST 及 Dkk1 抑制作用之作用特異性；D-Hek293 細胞之 wnt-1 檢定中 LRP4 敲除 (siRNA) 對 SOST 及 Dkk1 抑制作用之作用特異性；E-由 LRP4 調節 MOR05813 之活性；

圖 6：小鼠研究，活體內 pQCT-以 MOR05813 治療 2.5 週增加近端脛骨幹骺端之總骨礦物含量；

圖 7：小鼠研究，活體內 pQCT-以 MOR05813 治療 2.5 週增加近端脛骨幹骺端之總骨礦物密度；

圖 8：小鼠研究，活體內 pQCT-以 MOR05813 治療 2.5 週增加近端脛骨幹骺端之皮層厚度；

圖 9：小鼠研究，活體內 uQCT-以 MOR05813 治療 2.5 週增加近端脛骨幹骺端之松質骨體積；

圖 10：小鼠研究，活體內 uQCT-以 MOR05813 治療 2.5 週增加近端脛骨幹骺端之小樑厚度；

圖 11：小鼠研究，活體內 pQCT-以 MOR05813 治療 5 週進一步增加近端脛骨幹骺端之總骨礦物密度；

圖 12：小鼠研究，離體 DEXA-以 MOR05813 治療 5 週進一步增加脛骨之骨礦物密度；

圖 13：小鼠研究，離體 DEXA-以 MOR05813 治療 5 週進一步增加股骨之骨礦物密度；

圖 14：小鼠研究，離體 DEXA-以 MOR05813 治療 5 週進一步增加脊柱之骨礦物密度；

圖 15：小鼠研究，離體組織形態學-以 MOR05813 治療 2.5 週增加附肢骨骼(遠端股骨幹骺端)中之骨形成速率；

圖 16：小鼠研究，離體組織形態學-以 MOR05813 治療 2.5 週增加附肢骨骼(遠端股骨幹骺端)中之礦物沈積速率；

圖 17：小鼠研究，離體組織形態學-以 MOR05813 治療 2.5 週增加附肢骨骼(遠端股骨幹骺端)中之礦化表面；

圖 18：小鼠研究，離體組織形態學-以 MOR05813 治療 2.5 週增加主軸骨骼(腰椎)中之骨形成速率；

圖 19：小鼠研究，離體組織形態學-以 MOR05813 治療 2.5 週不影響附肢骨骼(遠端股骨幹骺端)中之骨再吸收，如由蝕骨細胞表面所量測；

圖 20：ELISA 展示 MOR05813_IgG2 λ 對 LRP6 之 SOST 結合之作用，在各情況下使用 0.9 nM SOST；

圖 21：小鼠研究，活體內 pQCT：以 MOR05813 與唑來膦酸共同治療之後的 (A) 總骨礦物密度、(B) 總骨礦物含量、(C) 皮層厚度及 (D) 松質骨礦物密度；

圖 22：小鼠研究，活體內 pQCT：阿侖膦酸鹽 (alen) 預治療之後以 MOR05813 治療的 (A) 總骨礦物密度、(B) 總骨礦物含量、(C) 皮層厚度及 (D) 松質骨礦物密度；

圖 23：小鼠研究，活體內 pQCT：以 MOR05813 與 (i) 抗 DKK1 或 (ii) PTH 合成代謝性共同治療之後的 (A) 總骨礦物密度、(B) 總骨礦物含量、(C) 皮層厚度及 (D) 松質骨礦物密度。

序列表

<110> 瑞士商諾華公司
 <120> 骨硬化素(SCLEROSTIN)抗體組合物及使用方法
 <130> 52279
 <140> 097139094
 <141> 2008-10-09
 <150> 07118414.7 ; 08151911.8 ; 08161342.4
 <151> 2007-10-12 ; 2008-02-25 ; 2008-07-29
 <160> 171
 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Asn
 1 5 10

<210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
 1 5 10

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Asn
 1 5 10

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
 1 5 10

<210> 5

<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 10
<211> 10
<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Trp Val Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Trp Val Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp

1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

<210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

<210> 16
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Trp Val Ser Val Thr Gly Val His Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 17
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Trp Val Ser Val Ile Gly Asn Trp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Trp Val Ser Val Thr Thr His Gln Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 19

Trp Val Ser Ala Thr Asn Arg Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

Trp Val Ser Val Ile Thr Pro Tyr Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 22

<211> 19

<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

Trp Val Ser Val Ile Thr Pro Tyr Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

Thr Phe Met His Gly His Leu Gly Gly Gly Leu Ser Met Asp Phe
1 5 10 15

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Thr Phe Met His Gly His Leu Gly Gly Gly Leu Ser Met Asp Phe
1 5 10 15

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

200922621

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 32
<211> 8

<212> PRT
 <213> 智人

<400> 32

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 33
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 33

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 34

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Phe Tyr Val His
 1 5 10

<210> 35
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 35

Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
 1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
 20

<210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 36

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Phe Tyr Val His
 1 5 10

<210> 37
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 38
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 39
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 40
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 41
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 42
<211> 14

200922621

<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 43
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 44
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45

Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47

Leu	Val	Ile	Tyr	Asp	Asp	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 48

Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 49

Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 50

Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 51

Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 52

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 55
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56

Gly Ser Trp Ala Gly Ser Ser Gly Ser Tyr
1 5 10

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 57

Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr

1 5 10

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 58

Ala Ser Trp Thr Gly Val Glu Pro Asp Tyr
1 5 10

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 59

Gln Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Leu Ser Glu
1 5 10

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 60

Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr
1 5 10

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 61

Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr
1 5 10

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 62

Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr
1 5 10

<210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 63

Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr
 1 5 10

<210> 64
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 64

Ser Thr Tyr Asp Gly Pro Gly Leu Ser Glu
 1 5 10

<210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 65

Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr
 1 5 10

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 66

Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr
 1 5 10

<210> 67
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 67

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Thr Phe Met His Gly His Leu Gly Gly Gly Leu Ser Met Asp
 100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 68

<211> 117

<212> PRT

<213> 智人

<400> 68

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
 20 25 30

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

Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 69

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Phe Met His Gly His Leu Gly Gly Gly Leu Ser Met Asp
100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 70

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
20 25 30

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

Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 71
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<400> 71

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
20 25 30

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

Ser Val Thr Gly Val His Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 72
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<400> 72

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
20 25 30

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

Ser Val Ile Gly Asn Trp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
20 25 30

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

Ser Val Thr Thr His Gln Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 74
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<400> 74

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
20 25 30

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

Ser Ala Thr Asn Arg Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

200922621

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210>	75
<211>	117
<212>	PRT
<213>	智人

<400> 75

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
20 25 30

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

Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

$\langle 210 \rangle$	76
$\langle 211 \rangle$	116
$\langle 212 \rangle$	PRT

<213> 智人

<400> 76

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
 20 25 30

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

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 77

<211> 116

<212> PRT

<213> 智人

<400> 77

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
 20 25 30

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

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 78
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 78

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Phe Tyr Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Ala Gly Ser Ser Gly Ser
85 90 95

Tyr Val Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 79
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 79

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
 20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
 85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 80

<211> 110

<212> PRT

<213> 智人

<400> 80

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Phe Tyr Val
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Thr Gly Val Glu Pro Asp
85 90 95

Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 81
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 81

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Gly Ser
85 90 95

Tyr Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 82
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 82

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 83

<211> 113

<212> PRT

<213> 智人

<400> 83

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 84
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 84

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 85
<211> 113

200922621

<212> PRT

<213> 智人

<400> 85

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 86

<211> 113

<212> PRT

<213> 智人

<400> 86

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50

55

60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr Tyr Asp Gly Pro
85 90 95

Gly Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 87
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 87

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 88
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 88

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr Tyr Asp Gly Pro
85 90 95

Gly Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 89
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 89

cagggtgcaat tgggtggaaag cggcgggcggc ctgggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttatgtta tgaattgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcttt atctctggtg attctagcaa tacctattat 180
gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtactttt 300
atgcatggtc atcttggtgg tggcttttct atggattttt ggggccaagg caccctggtg 360

acggttagct ca	372
<210> 90	
<211> 351	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 90	
caggtgcaat tggtggaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgctctg	60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc	120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atcaattatg atggtagctc tacctattat	180
gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgatact	300
tatcttcatt ttgattattg gggccaaggc accctggtga cggttagctc a	351
<210> 91	
<211> 372	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 91	
caggtgcaat tggtggaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgctctg	60
agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttatgtta tgaattgggt gcgccaagcc	120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcttt atctctggtg attctagcaa tacctattat	180
gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtactttt	300
atgcatggtc atcttggtgg tggcttttct atggattttt ggggccaagg caccctggtg	360
acggttagct ca	372
<210> 92	
<211> 351	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 92	
caggtgcaat tggtggaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgctctg	60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc	120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atcaattatg atggtagctc tacctattat	180
gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat	240

ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgatact 300
tatcttcatt ttgattattg gggccaaggc accctggtga cggttagctc a 351

<210> 93
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 93
caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcgtt actggtgttc atggtgatac ttattatgct 180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat 300
cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca 348

<210> 94
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 94
caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcgtt attggttaatt ggggtgatac ttattatgct 180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat 300
cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca 348

<210> 95
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 95
caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcgtt actactcatc agggttatac ttattatgct 180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240

caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat 300
 cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca 348

<210> 96
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 96
 caggtgcaat tgggtggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcgt actaatcgtt atggttatac ttattatgct 180
 gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat 300
 cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca 348

<210> 97
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 97
 caggtgcaat tgggtggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcaat atcaattatg atggtagctc tacctattat 180
 gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgatact 300
 tatcttcatt ttgattattg gggccaaggc accctggtga cggttagctc a 351

<210> 98
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 98
 caggtgcaat tgggtggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcgtt attactcctt atggtgatac ttattatgct 180
 gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240

caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat 300
cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca 348

<210> 99
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 99
caggtgcaat tggaggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt attactcctt atggtgatac ttattatgct 180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat 300
cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca 348

<210> 100
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 100
gatatcgaac tgaccagcc gccttcagt agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60
tcgtgtagcg gcgataatat tggttctttt tatgttcatt ggtaccagca gaaaccggg 120
caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat aataatcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180
tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcgga 240
gacgaagcgg attattattg cggttcttgg gctggttctt ctggttctta tgtgtttggc 300
ggccgcacga agttaaccgt tcttgccag 330

<210> 101
<211> 339
<212> DNA
<213> 智人

<400> 101
gatatcgac tgaccagcc agcttcagt agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag 120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgccc ctgaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240

caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 102
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 102
gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60
tcgtgtagcg gcgataatat tggttctttt tatgttcatt ggtaccagca gaaaccggg 120
caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat aataatcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180
tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcgga 240
gacgaagcgg attattattg cgcttcttgg actggtgttg agcctgatta tgtgtttggc 300
ggcggcacga agttaaccgt tcttggccag 330

<210> 103
<211> 339
<212> DNA
<213> 智人

<400> 103
gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag 120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtec ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc cagtcttatg ctggttctta tctttctgag 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 104
<211> 339
<212> DNA
<213> 智人

<400> 104
gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag 120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtec ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240

caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 105
<211> 339
<212> DNA
<213> 智人

<400> 105
gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag 120
catcccggaaggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgca gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 106
<211> 339
<212> DNA
<213> 智人

<400> 106
gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag 120
catcccggaaggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgca gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 107
<211> 339
<212> DNA
<213> 智人

<400> 107
gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag 120
catcccggaaggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgca gcctgaccat tagcggcctg 240

caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 108
<211> 339
<212> DNA
<213> 智人

<400> 108
gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag 120
catccccgga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tctacttatg atggtcctgg tctttctgag 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 109
<211> 339
<212> DNA
<213> 智人

<400> 109
gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag 120
catccccgga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 110
<211> 339
<212> DNA
<213> 智人

<400> 110
gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag 120
catccccgga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240

caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tctacttatg atggtcctgg tctttctgag 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 111
<211> 469
<212> PRT
<213> 智人

<400> 111

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Phe Met His Gly His Leu Gly Gly Gly Leu
115 120 125

Ser Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
145 150 155 160

Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 180 185 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 195 200 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr
 210 215 220

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
 225 230 235 240

Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 245 250 255

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

405

410

415

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 112

<211> 462

<212> PRT

<213> 智人

<400> 112

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	130	135	140
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	145	150	155
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	165	170	175
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	180	185	190
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	195	200	205
Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	210	215	220
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	225	230	235
Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	245	250	255
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	260	265	270
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	275	280	285
Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	290	295	300
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	305	310	315
Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	325	330	335
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	340	345	350

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
355 360 365

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 113

<211> 469

<212> PRT

<213> 智人

<400> 113

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Phe Met His Gly His Leu Gly Gly Gly Leu
 115 120 125

Ser Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 145 150 155 160

Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 180 185 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 195 200 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr
 210 215 220

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
 225 230 235 240

Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 245 250 255

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 114
<211> 462
<212> PRT
<213> 智人

<400> 114

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35

40

45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
225 230 235 240

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
260 265 270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
275 280 285

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
305 310 315 320

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
340 345 350

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
355 360 365

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 115

<211> 461

<212> PRT

<213> 智人

<400> 115

```

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1           5           10           15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20           25           30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35           40           45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50           55           60

Glu Trp Val Ser Val Thr Gly Val His Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp
65           70           75           80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
85           90           95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100          105          110

Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115          120          125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
130          135          140

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
145          150          155          160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
165          170          175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
180          185          190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
195          200          205

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
210          215          220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu

```

225		230		235		240									
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
			245						250					255	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
			260					265					270		
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
		275					280					285			
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
	290					295					300				
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
305					310					315					320
Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
				325					330					335	
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
			340					345					350		
Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
		355					360					365			
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
	370					375					380				
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
385					390					395					400
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
				405					410					415	
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
			420					425					430		
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
		435					440					445			
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
	450					455					460				

<210> 116
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 116

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Asn Trp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
195 200 205

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
225 230 235 240

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

420

425

430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 117

<211> 461

<212> PRT

<213> 智人

<400> 117

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Thr Thr His Gln Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
195 200 205

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
225 230 235 240

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 118

<211> 465

<212> PRT

<213> 智人

<400> 118

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Ala Thr Asn Arg Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
 130 135 140

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
 145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
 165 170 175

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
 195 200 205

Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
 210 215 220

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys
 225 230 235 240

Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser
 260 265 270

Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp
 275 280 285

Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr
 290 295 300

Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val
 305 310 315 320

Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu
 325 330 335

Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
 340 345 350

Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val
 355 360 365

Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr
 370 375 380

Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr
 385 390 395 400

Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys
 420 425 430

Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu
 435 440 445

Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
 450 455 460

Lys
 465

<210> 119
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 119

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala

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

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
305 310 315 320

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
340 345 350

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
355 360 365

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 120
<211> 461
<212> PRT
<213> 智人

<400> 120

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

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

Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	260	265	270
		275					280					285						
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys			
	290					295					300							
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu			
305					310				315						320			
Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys			
				325					330					335				
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys			
			340					345					350					
Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser			
		355					360					365						
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys			
	370					375					380							
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln			
385					390					395					400			
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly			
				405					410					415				
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln			
			420					425					430					
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn			
		435					440					445						
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
	450					455					460							

<210> 121

<211> 461

<212> PRT

<213> 智人

<400> 121

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
225 230 235 240

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450455460

<210> 122<211> 130<212> PRT<213> 智人<400> 122

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr151551015

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val202530

Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly354045

Ser Phe Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val505560

Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg65707580

Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly859095

Thr Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Ala Gly100105110

Ser Ser Gly Ser Tyr Val Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Thr Val Leu115120125

Gly Gln130

<210> 123<211> 237<212> PRT<213> 智人<400> 123

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr151551015

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
100 105 110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 124

<211> 234
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 124

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

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

Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly
 35 40 45

Ser Phe Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
 50 55 60

Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly
 85 90 95

Thr Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Thr Gly
 100 105 110

Val Glu Pro Asp Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 115 120 125

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 130 135 140

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 165 170 175

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 180 185 190

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 195 200 205

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 210 215 220

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230

<210> 125
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 125

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser
 100 105 110

Tyr Ala Gly Ser Tyr Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp

165

170

175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 126

<211> 237

<212> PRT

<213> 智人

<400> 126

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
100 105 110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 127
<211> 237
<212> PRT
<213> 智人

<400> 127

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr

85

90

95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
100 105 110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 128

<211> 237

<212> PRT

<213> 智人

<400> 128

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
100 105 110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 129

<211> 237

<212> PRT

<213> 智人

<400> 129

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

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

<210> 130
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 130

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr
 100 105 110

Tyr Asp Gly Pro Gly Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
 165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
 180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 131

<211> 237

<212> PRT

<213> 智人

<400> 131

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
100 105 110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 132

<211> 237

<212> PRT

<213> 智人

<400> 132

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr
100 105 110

Tyr Asp Gly Pro Gly Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 133
<211> 1410
<212> DNA
<213> 智人

<400> 133
atggccttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagcgt gcaggcccag 60
gtgcagctgg tcgagtctgg cggcggactg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
tgcgccgccca gcggtttcac cttcagcagc tacgtgatga actgggtgcg gcaggcccct 180
ggcaagggcc tggagtgggt gtccttcac agcggcgaca gcagcaacac ctactacgcc 240
gacagcgtga agggccggtt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300
cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gaccttcattg 360
cacggccacc tgggcggagg actgagcatg gatttctggg gccagggcac cctgggtcacc 420
gtctcctcag cttccaccaa gggcccatcc gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc 480
acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540
acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 600

cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgacag tgccctccag caacttcggc 660
 acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 720
 gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 780
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 840
 gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 900
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 960
 acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccc tgcagaaaac catctccaaa 1080
 accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1200
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1260
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaata 1410

<210> 134
 <211> 1389
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 134
 atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaggtgt ccaggcccag 60
 gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccaacatc aactacgacg gcagcagcac ctactacgcc 240
 gacagcgtga agggccggtt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag ggacacctac 360
 ctgcacttcg actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ttccaccaag 420
 ggcccatccg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc 540
 gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
 ctcagcagcg tggtgacagt gccctccagc aacttcggca ccagaccta cacctgcaac 660

gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc 720
 gagtgtccac cgtgtccagc accacctgtg gcaggacct cagtcttctt cttcccccca 780
 aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 840
 gtgagccacg aagacccoga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900
 aatgccaaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 960
 ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020
 aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaa ccaaaggga gccccgagaa 1080
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1140
 acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200
 cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttcttctc 1260
 ctctacagca agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380
 ggtaaata 1389

<210> 135
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 135
 atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagcgt gcaggccag 60
 gtgcagctgg tcgagtctgg cggcggactg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagcagc tacgtgatga actgggtgcg gcaggcccct 180
 ggcaagggcc tggagtgggt gtccttcac agcggcgaca gcagcaacac ctactacgcc 240
 gacagcgtga agggccggtt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gaccttcacg 360
 cacggccacc tgggcgagg actgagcatg gatttctggg gccagggcac cctggtcacc 420
 gtctcctcag ctccaccaaa gggcccatcc gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc 480
 acctccgaga gcacagcggc cctgggtgctg ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 540
 acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 600
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgacag tgcctccag caacttcggc 660
 acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 720

gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 780
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 840
 gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 900
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 960
 acgttcctgt tggtcagcgt cctcacgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1080
 accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1200
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1260
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1410

<210> 136
 <211> 1389
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 136
 atggcttggg tgtggacett gccattcctg atggcagctg cccaaggtgt ccaggcccag 60
 gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
 tgcgcccga gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggccct 180
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccaacatc aactacgacg gcagcagcac ctactacgcc 240
 gacagcgtga agggccggtt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag ggacacctac 360
 ctgcacttcg actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ttccaccaag 420
 ggcccatccg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480
 ctgggctgcc tggatcaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc 540
 gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
 ctcagcagcg tggtgacagt gccctccagc aacttcggca ccagaccta cacctgcaac 660
 gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc 720
 gagtgccac cgtgccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca 780

```

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac      840
gtgagccacg aagaccccgga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat      900
aatgccaaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc      960
ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac     1020
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa     1080
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg     1140
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg     1200
cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctctttcttc     1260
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc     1320
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg     1380
ggtaaatga                                           1389

```

<210> 137
 <211> 1386
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 137
atggccttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag      60
gtgcagctgg tgcagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc     120
tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct     180
ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgacc ggcgtgcacg gcgacaccta ctacgccgac     240
agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag     300
atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg     360
cacttcgact actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc     420
ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg     480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct     540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc     600
agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcaccc agacctacac ctgcaacgta     660
gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaatg ttgtgtcgag     720
tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttctctct cccccaaaaa     780
cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgagggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg     840

```

```

agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat    900
gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc    960
accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa   1020
ggcctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca   1080
caggtgtaca cctgcccc atcccgagg gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc   1140
tgcttggtca aaggcttcta cccagcgc acgcgcgtgg agtgggagag caatgggcag   1200
ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcctc   1260
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcagtctcc   1320
gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt   1380
aatga                                           1386

```

```

<210> 138
<211> 1386
<212> DNA
<213> 智人

```

```

<400> 138
atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag    60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc   120
tgcgcgcgca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggccctc   180
ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgatc ggcaactggg gcgacaccta ctacgccgac   240
agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag   300
atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg   360
cacttcgact actggggcca gggcacccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc   420
ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg   480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct   540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtccctacagt cctcaggact ctactccctc   600
agcagcgtgg tgacagtgcc ctocagcaac ttcggcacc cagacctacac ctgcaacgta   660
gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaata ttgtgtcgag   720
tgcccaccgt gccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa   780
cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg   840
agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat   900

```

```

gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc 960
accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020
ggcctcccag ccccatcgga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080
caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140
tgctgtgtca aaggcttcta cccagcgcac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200
ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttctc 1260
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcagtctcc 1320
gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380
aatga 1386

```

```

<210> 139
<211> 1386
<212> DNA
<213> 智人

```

```

<400> 139
atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag 60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggtcg gtgcagcctg ggggcagcct gagactgagc 120
tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggccct 180
ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgacc accaccagg gctacaccta ctacgccgac 240
agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag 300
atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg 360
cacttcgact actggggcca gggcacctcg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc 420
ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg 480
ggctgccttg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct 540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtccctacagt cctcaggact ctactccctc 600
agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcacc ccagcctacac ctgcaacgta 660
gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaatg ttgtgtcgag 720
tgcccaccgt gccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa 780
ccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg 840
agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcggtga ggtgcataat 900
gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc 960

```

```

accgtttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020
ggcctcccag ccccatcgaa gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080
caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140
tgcttgggtc aaggcttcta cccagcgcac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200
ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1260
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320
gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380
aatga 1386

```

```

<210> 140
<211> 1386
<212> DNA
<213> 智人

```

```

<400> 140
atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag 60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
tgcgcccga gcggttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgag gcaggcccct 180
ggcaagggcc tggaatgggt gtccgccacc aacagatacg gctacaccta ctacgcccag 240
agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgagc 300
atgaacagcc tgcggggcca ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg 360
cacttcgact actggggcca gggcacctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc 420
ccatccgtct tccccctggc gcctgtctcc aggagcacct ccgagagcac agcggcccctg 480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct 540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtccctacagt cctcaggact ctactccctc 600
agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcacc agacctacac ctgcaacgta 660
gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaatg ttgtgtcgag 720
tgccaccgt gccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 780
ccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg 840
agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900
gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggg cagcgtcctc 960
accgtttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020

```

```

ggcctcccag ccccatcgga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080
caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140
tgcctgggtca aaggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200
ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1260
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320
gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380
aatga 1386

```

<210> 141
 <211> 1389
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 141
atggcttggtg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaggtgt ccaggcccag 60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180
ggcaagggcc tggaatgggt gtccaacatc aactacgacg gcagcagcac ctactacgcc 240
gacagcgtga agggccggtt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300
cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag ggacacctac 360
ctgcacttcg actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ttccaccaag 420
ggcccatccg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgcgtg gaactcaggc 540
gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
ctcagcagcg tggtgacagt gccctccagc aacttcggca ccagaccta cacctgcaac 660
gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc 720
gagtgcccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttcct cttcccccca 780
aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 840
gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900
aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 960
ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa 1080

```

ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1140
 acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200
 cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcccttcttc 1260
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380
 ggtaaata 1389

<210> 142
 <211> 1386
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 142
 atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag 60
 gtgcagctgg tcgagagcgg cgaggggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggccctt 180
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgatc accccctacg gcgacaccta ctacgcogac 240
 agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag 300
 atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg 360
 cacttcgact actggggcca gggcacccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc 420
 ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg 480
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct 540
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600
 agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcaccc agacctacac ctgcaacgta 660
 gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaata ttgtgtogag 720
 tgcccaccgt gccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa 780
 cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg 840
 agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900
 gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcttc 960
 accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020
 ggctcccag ccccatcgaa gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080
 caggtgtaca ccctgcccc atccccggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140

tgctgtgtca aaggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag	1200
ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcctc	1260
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc	1320
gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt	1380
aatga	1386

<210> 143
 <211> 1386
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 143	
atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag	60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc	120
tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct	180
ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgatc accccctacg gcgacaccta ctacgccgac	240
agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag	300
atgaacagcc tgcggggcca ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg	360
cacttcgact actggggcca gggcaccttg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc	420
ccatccgtct tccccctggc gccctgtctc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg	480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct	540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtccctacagt cctcaggact ctactccctc	600
agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcacc agacctacac ctgcaacgta	660
gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaag ttgtgtcgag	720
tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa	780
cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg	840
agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	900
gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggg cagcgtcctc	960
accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaagggt ctccaacaaa	1020
ggcctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca	1080
caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc	1140
tgctgtgtca aaggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag	1200

ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1260
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320
 gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380
 aaatga 1386

<210> 144
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 144
 atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgctac cgtagcgcag 60
 gccgatatcg aactgaccca gccgccttca gtgagcgttg caccagggtca gaccgcgcgt 120
 atctcgtgta gcggcgataa tattggttct ttttatgttc attggtacca gcagaaaccc 180
 gggcaggcgc cagttcttgt gatttatgat gataataatc gtccctcagg catcccggaa 240
 cgctttagcg gatccaacag cggcaacacc gcgacctga ccattagcgg cactcaggcg 300
 gaagacgaag cggattatta ttgcggttct tgggctgggt cttctgggtc ttatgtgttt 360
 ggcggccgca cgaagttaac cgttcttggc cag 393

<210> 145
 <211> 714
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 145
 atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60
 gacatcgccc tgaccagcc cgcagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
 agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180
 cccccggca aggcccccaa gctgatgatc tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
 agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacat cagcggcctc 300
 caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac 360
 gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 420
 actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480
 ataagtgact tctaccggg agcgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540
 aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600

agctatctga gacctgacgcc tgagcagtg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

<210> 146
<211> 705
<212> DNA
<213> 智人

<400> 146
atgagtgtgc tcactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60
gacatcgagc tgaccagacc cccagcgtg agcgtggccc ctggccagac cgcccggatc 120
agctgcagcg gcgacaacat cggcagcttc tacgtgcact ggtatcagca gaagcccggc 180
caggcccccg tgctggtgat ctacgacgac aacaaccggc ccagcggcat ccccgagcgg 240
ttcagcggca gcaacagcgg caacaccgcc accctgacca tcagcggcac ccaggccgag 300
gacgaggccg actactactg cgccagctgg accggcgtgg agcccgacta cgtgtttggc 360
ggcggaaaca agcttaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccctcgggt cactctgttc 420
ccgccctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtct cataagtgc 480
ttctaccggg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcggga 540
gtggagacaa ccacaccctc caaacaagc aacaacaagt acgcggccag cagctatctg 600
agcctgacgc ctgagcagtg gaagtccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 660
gggagcaccg tggaaaagac agtggcccct acagaatgtt catag 705

<210> 147
<211> 714
<212> DNA
<213> 智人

<400> 147
atgagtgtgc tcactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60
gacatcgccc tgaccagacc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180
caccgccgca aggccccaa gctgatgatc tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc cagagctacg ccggcagcta cctgagcgag 360
gtgttcggcg gagggaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 420
actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480

ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

<210> 148
<211> 714
<212> DNA
<213> 智人

<400> 148
atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60
gacatcgccc tgaccagacc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180
caccgccgca agggccccaa gctgatgata tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac 360
gtgtttggcg gcggaaccaa gcttacgctc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc 420
actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480
ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

<210> 149
<211> 714
<212> DNA
<213> 智人

<400> 149
atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60
gacatcgccc tgaccagacc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180
caccgccgca agggccccaa gctgatgata tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300

caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac 360
gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 420
actctgttcc cgccctcttc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660
acgcatgaag ggagcacctg ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

<210> 150
<211> 714
<212> DNA
<213> 智人

<400> 150
atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180
caccocggca agggcccaa gctgatgatc tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac 360
gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 420
actctgttcc cgccctcttc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660
acgcatgaag ggagcacctg ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

<210> 151
<211> 714
<212> DNA
<213> 智人

<400> 151
atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180

cacccccggca aggcccccaa gctgatgac tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcc gacctgacct cagcggcctc 300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac 360
gtgtttggcg gcggaaccaa gcttacgctc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 420
actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660
acgcatgaag ggagcacctg ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

<210> 152
<211> 714
<212> DNA
<213> 智人

<400> 152
atgagtgtgc tcactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60
gacatcgccc tgaccagacc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180
cacccccggca aggcccccaa gctgatgac tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcc gacctgacct cagcggcctc 300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcacctacg acggccctgg cctgagcgag 360
gtgttcggcg gagggaccaa gcttacgctc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 420
actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660
acgcatgaag ggagcacctg ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

<210> 153
<211> 714
<212> DNA
<213> 智人

<400> 153

atgagtgtgc tcactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180
caccgccgca aggccccaa gctgatgatc tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcacctacg acggccctgg cctgagcgag 360
gtgttcggcg gagggaccaa gcttacgcgc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 420
actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgga aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660
acgcatgaag ggagcacctg ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

<210> 154
<211> 714
<212> DNA
<213> 智人

<400> 154
atgagtgtgc tcactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180
caccgccgca aggccccaa gctgatgatc tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcacctacg acggccctgg cctgagcgag 360
gtgttcggcg gagggaccaa gcttacgcgc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 420
actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgga aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660
acgcatgaag ggagcacctg ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

<210> 155

<211> 213
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 155

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr
 1 5 10 15

Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
 20 25 30

Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
 35 40 45

Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
 50 55 60

Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
 65 70 75 80

Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
 85 90 95

Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala
 100 105 110

Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser
 115 120 125

Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val
 130 135 140

Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg
 145 150 155 160

Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln
 165 170 175

Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly
 180 185 190

Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
 195 200 205

Leu Glu Asn Ala Tyr
210

<210> 156
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 156

Ala Arg Leu Leu Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg
1 5 10

<210> 157
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 157

Arg Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His
1 5 10 15

<210> 158
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 蛋白连接子序列

<400> 158

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 159
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 蛋白连接子序列

<400> 159

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly

<210> 160
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> siRNA

<400> 160
taaattatca taaagtccta a

21

<210> 161
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> siRNA

<400> 161
aggactttat gataatttat t

21

<210> 162
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> siRNA

<400> 162
atagtggtta aataactcca g

21

<210> 163
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> siRNA

<400> 163
ggagttatatt aaccactatt t

21

<210> 164
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> siRNA

<400> 164

taaattctcg tgatgtgcca t	21
<210> 165	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> siRNA	
<400> 165	
ggcacatcac gagaatttat t	21
<210> 166	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> siRNA	
<400> 166	
tttcttatag cacagctggt t	21
<210> 167	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> siRNA	
<400> 167	
ccagctgtgc tataagaaat t	21
<210> 168	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> siRNA	
<400> 168	
tagaccttc catccacgct g	21
<210> 169	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	

<223> siRNA

<400> 169

gcgtggatgg aaaggtctat t

21

<210> 170

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> RT-PCT 引子

<400> 170

atgcagctcc cactggccct gtgtcttgt

29

<210> 171

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> RT-PCR 引子

<400> 171

aatcaggccg agctggagaa cgcctactag

30

五、中文發明摘要：

本發明係關於骨硬化素(sclerostin)抗體，及該等抗體之組合物及用於治療骨異常相關疾病(諸如骨質疏鬆症)的方法。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to antibodies against sclerostin and compositions and methods of use for said antibodies to treat disease related to bone abnormalities such as osteoporosis.

十、申請專利範圍：

1. 一種針對骨硬化素(sclerostin)多肽(SEQ ID NO:155)中之標靶之分離抗體或包含該抗體之抗原結合部分的功能蛋白，其特徵在於該抗體或功能蛋白與骨硬化素多肽特異性結合且可增加哺乳動物之骨形成、骨礦物密度及骨礦物含量。
2. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其特徵在於該抗體或功能蛋白與該骨硬化素多肽以小於10 nM、較佳小於1 nM且更佳小於100 pM之 K_D 結合。
3. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其特徵在於該抗體或功能蛋白在基於細胞之Wnt信號傳輸檢定中可阻斷骨硬化素之抑制作用。
4. 如請求項3之抗體或功能蛋白，其特徵在於該抗體或功能蛋白在HEK293細胞株中在骨硬化素存在下如基於細胞之Wnt信號傳輸檢定中所測量具有小於1 μ M、較佳小於100 nM且更佳小於20 nM之 IC_{50} 值。
5. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其特徵在於該抗體或功能蛋白在基於細胞之礦化檢定中可阻斷骨硬化素之抑制作用。
6. 如請求項5之抗體或功能蛋白，其特徵在於該抗體或功能蛋白在MC3T3細胞中在骨硬化素存在下如BMP2誘導之礦化檢定中所測量具有小於1 μ M、較佳小於500 nM且更佳小於200 nM之 IC_{50} 值。
7. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其在溶液抑制檢定中抑

制LRP6/骨硬化素相互作用。

8. 如請求項7之抗體或功能蛋白，其如LRP6/骨硬化素ELISA中所測量具有小於1 μ M、較佳小於100 nM、更佳小於10 nM、更佳小於5 nM、更佳小於3 nM之IC₅₀值。
9. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其在基於細胞之功能檢定中可阻斷骨硬化素對BMP6誘導之Smad1磷酸化之抑制作用。
10. 如請求項9之抗體或功能蛋白，其在MC3T3-E1細胞株中在骨硬化素存在下如BMP6 Smad1磷酸化檢定中所測量具有小於1 μ M、較佳小於500 nM、較佳小於200 nM之IC₅₀值。
11. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其與SEQ ID NO:155之胺基酸112與126之間及/或胺基酸160與174之間的骨硬化素區域結合，且較佳與SEQ ID NO:156與SEQ ID NO:157二者結合。
12. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其包含至少一個互補決定(CDR)序列與SEQ ID NOs:1-66中之至少一個CDR具有至少60、70、80、90或95%一致性。
13. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其包含至少一個重鏈區COR3與一個選自由SEQ ID NO:25-33組成之群之COR3序列具有至少60、70、80、90或95%一致性。
14. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其包含V_H多肽序列與SEQ ID NO:69-77中之至少一者具有至少60、70、80、90、95或100%序列一致性。

15. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其包含V_L多肽序列與SEQ ID NO:80-88中之至少一者具有至少60、70、80、90、95或100%序列一致性。
16. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其包含V_L多肽序列與SEQ ID NO 80-88中之至少一者具有至少60、70、80、90、95或100%序列一致性，及V_H多肽序列與SEQ ID NO:69-77中之至少一者具有至少60、70、80、90、95或100%序列一致性。
17. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其包含：一個重鏈可變區COR1包含一個選自由SEQ ID NOs:1-11組成之群之胺基酸序列；一個重鏈可變區COR2包含一個選自由SEQ ID NOs:12-22組成之群之胺基酸序列；一個重鏈可變區COR3包含一個選自由SEQ ID NOs:23-33組成之群之胺基酸序列；一個輕鏈可變區COR1包含一個選自由SEQ ID NOs:34-44組成之群之胺基酸序列；一個輕鏈可變區COR2包含一個選自由SEQ ID NOs:45-55組成之群之胺基酸序列；及一個輕鏈可變區CDR3包含一個選自由SEQ ID NOs:56-66組成之群之胺基酸序列。
18. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其包含全長重鏈胺基酸序列與SEQ ID NOs:111-121中之至少一者具有至少60、70、80、90、95或100%序列一致性。
19. 如請求項1或18之抗體或功能蛋白，其包含全長輕鏈胺基酸序列與SEQ ID NOs:122-132中之至少一者具有至少60、70、80、90、95或100%序列一致性。

20. 一種抗體，其包含

(a)SEQ ID NO:113之重鏈序列及SEQ ID NO:124之輕鏈序列；

(b)SEQ ID NO:114之重鏈序列及SEQ ID NO:125之輕鏈序列；

(c)SEQ ID NO:115之重鏈序列及SEQ ID NO:126之輕鏈序列；

(d)SEQ ID NO:116之重鏈序列及SEQ ID NO:127之輕鏈序列；

(e)SEQ ID NO:117之重鏈序列及SEQ ID NO:128之輕鏈序列；

(f)SEQ ID NO:118之重鏈序列及SEQ ID NO:129之輕鏈序列；

(g)SEQ ID NO:119之重鏈序列及SEQ ID NO:130之輕鏈序列；

(h)SEQ ID NO:120之重鏈序列及SEQ ID NO:131之輕鏈序列；或

(i)SEQ ID NO:121之重鏈序列及SEQ ID NO:132之輕鏈序列。

21. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其包含 V_H 及 V_L 序列與至少一種如請求項20之抗體之 V_H 及 V_L 相應序列具有至少60、70、80、90、95或100%序列一致性。

22. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其係由至少一種如請求項20之抗體交叉阻斷與骨硬化素結合。

23. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其交叉阻斷至少一種如請求項20之抗體與骨硬化素結合或由至少一種如請求項20之抗體交叉阻斷與骨硬化素結合。
24. 如請求項22或23中任一項之抗體或功能蛋白，其中該交叉阻斷或被交叉阻斷之能力係在BIAcore檢定或ELISA檢定中偵測。
25. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其係用作藥劑。
26. 一種如請求項1-25中任一項之抗體或功能蛋白之用途，其係用於製備治療骨硬化素所介導或骨硬化素之含量增加相關之病理學病症的藥劑，該病理學病症例如骨相關疾病，諸如骨質疏鬆症。
27. 如請求項26之用途，其中該骨相關疾病係選自包含以下之群：原發性及繼發性骨質疏鬆症、骨質減少、骨軟化、成骨不全(OI)、無血管性壞死(骨壞死)、骨折及植入物癒合(牙植入物及髖植入物)、其他病症所致之骨質流失，諸如與HIV感染、癌症或關節炎相關之骨質流失。
28. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1-25中任一項之抗體或功能蛋白。
29. 如請求項28之醫藥組合物，其與一或多種醫藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑或載劑組合。
30. 如請求項28或29之醫藥組合物，其另外包含其他活性成份。
31. 一種分離之聚核苷酸序列，其編碼如請求項1-25中任一

項之抗體或功能蛋白。

32. 一種選殖或表現載體，其包含一或多個如請求項31之聚核苷酸序列。
33. 如請求項32之載體，其中該載體包含至少一個選自由SEQ ID NOs 133-154組成之群之序列或編碼至少一個CDR區之片段。
34. 一種宿主細胞，其包含一或多個如請求項32或33之選殖或表現載體。
35. 一種產生如請求項1-25中任一項之抗體或功能蛋白之方法，其包含培養如請求項34之宿主細胞及分離該抗體或功能蛋白。
36. 如請求項1之抗體或功能蛋白，其係用於治療或預防骨硬化素所介導或骨硬化素含量增加相關之病理學病症。
37. 如請求項28或29之醫藥組合物，其係用於治療或預防骨硬化素所介導或骨硬化素含量增加相關之病理學病症。
38. 一種診斷套組，其包含如請求項1-25中任一項之抗體或功能蛋白。
39. 一種鑑定表現骨硬化素之細胞或組織之方法，該方法包含使該細胞或組織與如請求項1-25中任一項之抗體或功能蛋白接觸，其中該抗體或功能蛋白另外包含可偵測標記。
40. 如請求項39之方法，其中該標記為放射活性、螢光、磁性、順磁性或化學發光標記。
41. 一種如請求項1-25中任一項之抗體或功能蛋白及(i)唑來

膦酸(zoledronic acid)、(ii)抗 DKK1 抗體、(iii)阿倫膦酸鹽(alendronate)、(iv)抗 LRP4 抗體、(v)hPTH及/或(vi)副甲狀腺素釋放劑(鈣阻滯劑(calcilytics))之用途，其係用於製備治療骨硬化素所介導或骨硬化素含量增加相關之病理學病症的藥劑。

42. 一種如請求項 1-25 中任一項之抗體或功能蛋白之用途，其係用於製備治療骨硬化素所介導或骨硬化素含量增加相關之病理學病症的藥劑，其中該藥劑係與(i)唑來膦酸、(ii)抗 DKK1 抗體、(iii)阿倫膦酸鹽、(iv)抗 LRP4 抗體、(v)hPTH及/或(vi)副甲狀腺素釋放劑(鈣阻滯劑)結合使用。
43. 一種(i)唑來膦酸、(ii)抗 DKK1 抗體、(iii)阿倫膦酸鹽、(iv)抗 LRP4 抗體、(v)hPTH及/或(vi)副甲狀腺素釋放劑(鈣阻滯劑)之用途，其係用於製備治療骨硬化素所介導或骨硬化素含量增加相關之病理學病症之藥劑，其中該藥劑係與如請求項 1-25 中任一項之抗體或功能蛋白結合使用。
44. 一種如請求項 1-25 中任一項之抗體或功能蛋白之用途，其係用於製備治療骨硬化素所介導或骨硬化素含量增加相關之病理學病症的藥劑，其中該患者已預先投與(i)唑來膦酸、(ii)抗 DKK1 抗體、(iii)阿倫膦酸鹽、(iv)抗 LRP4 抗體、(v)hPTH及/或(vi)副甲狀腺素釋放劑(鈣阻滯劑)。
45. 一種(i)唑來膦酸、(ii)抗 DKK1 抗體、(iii)阿倫膦酸鹽、(iv)抗 LRP4 抗體、(v)hPTH及/或(vi)副甲狀腺素釋放劑

(鈣阻滯劑)之用途，其係用於製備治療骨硬化素所介導或骨硬化素含量增加相關之病理學病症之藥劑，其中該患者已預先投與如請求項1-25中任一項之抗體或功能蛋白。

46. 如請求項41-45中任一項之用途，其中該hPTH為hPTH(1-34)。

47. 如請求項41-45中任一項之用途，其中該骨相關疾病為以下至少一者：原發性及繼發性骨質疏鬆症、骨質減少、骨軟化、成骨不全(OI)、無血管性壞死(骨壞死)、骨折及植入物癒合(牙植入物及髖植入物)、其他病症所致之骨質流失，諸如與HIV感染、癌症或關節炎相關之骨質流失。

十一、圖式：

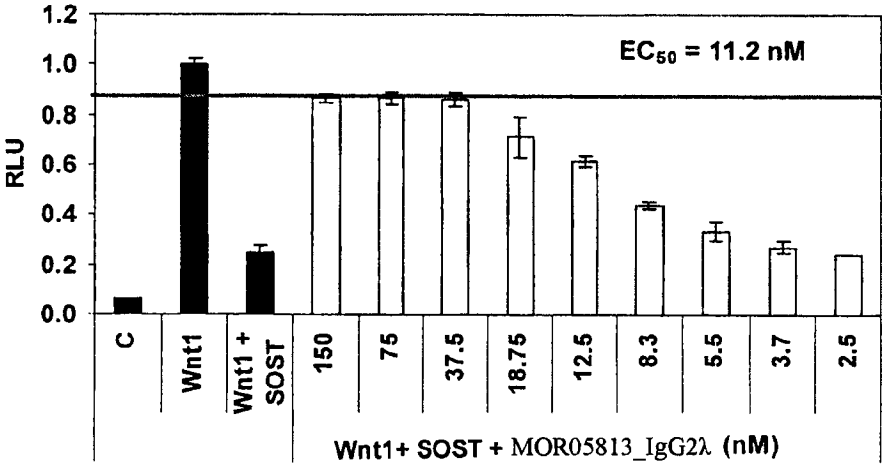


圖 1

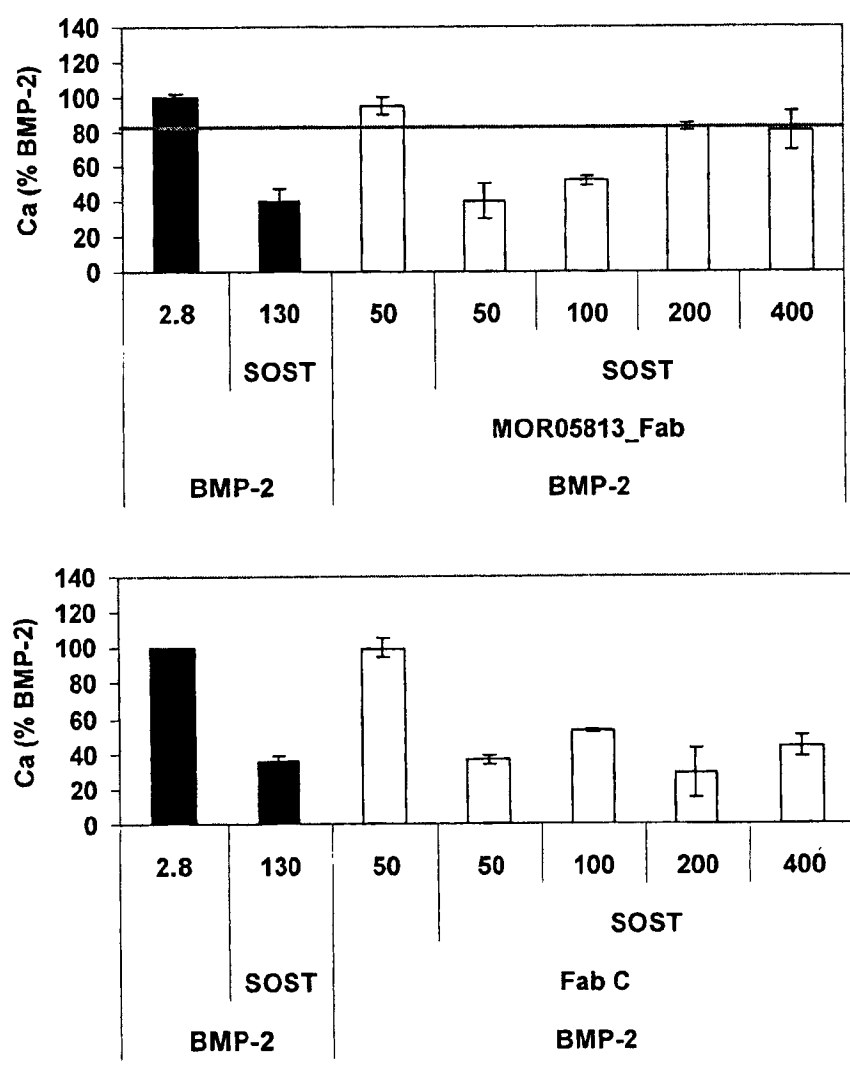


圖2

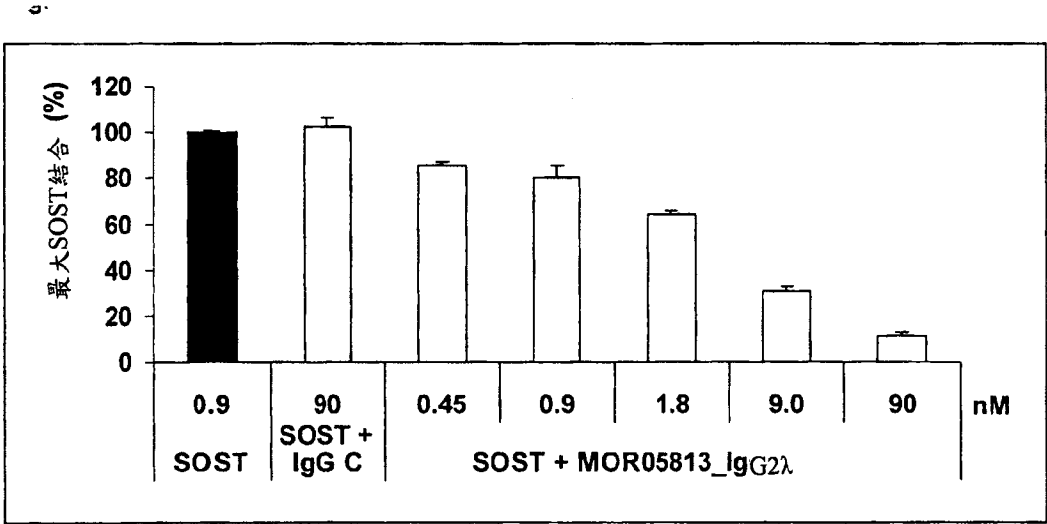


圖3

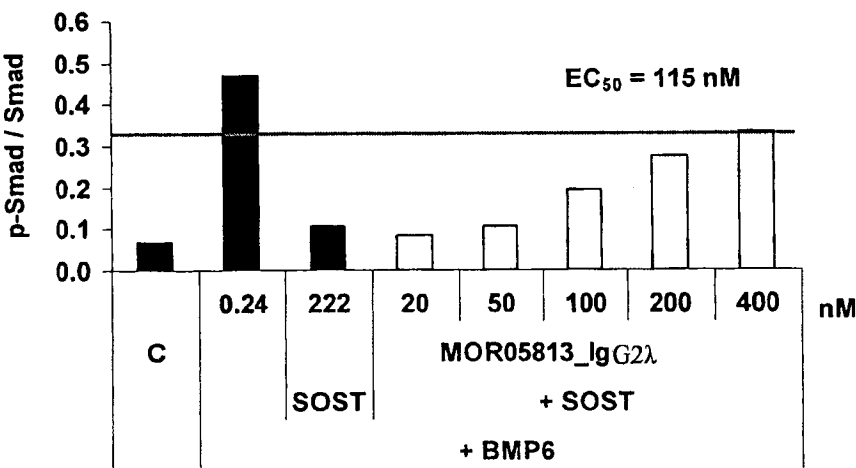
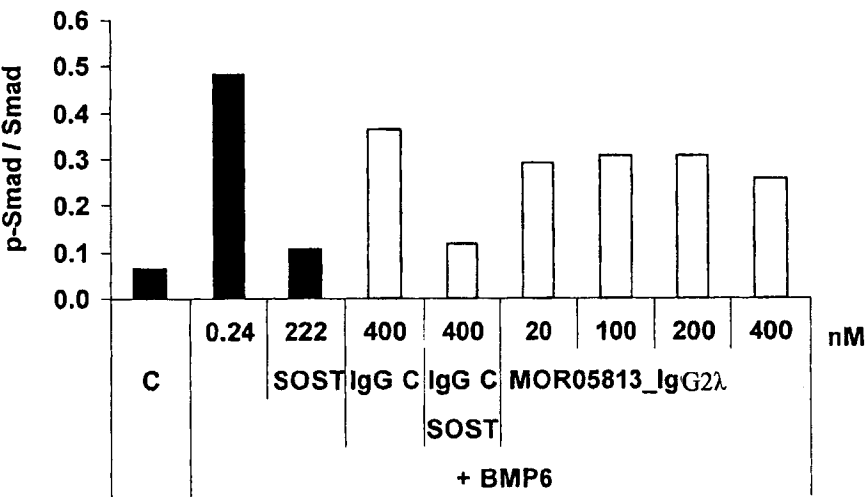


圖 4

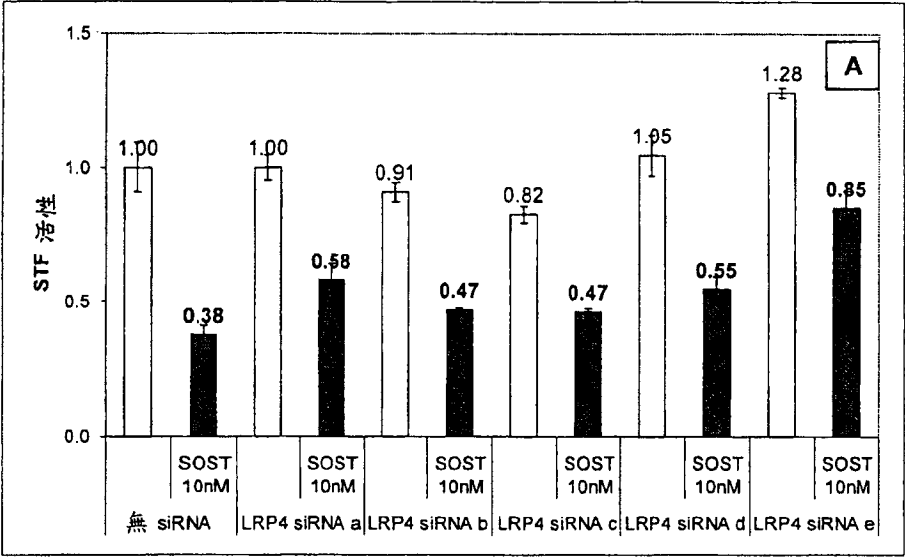


圖5

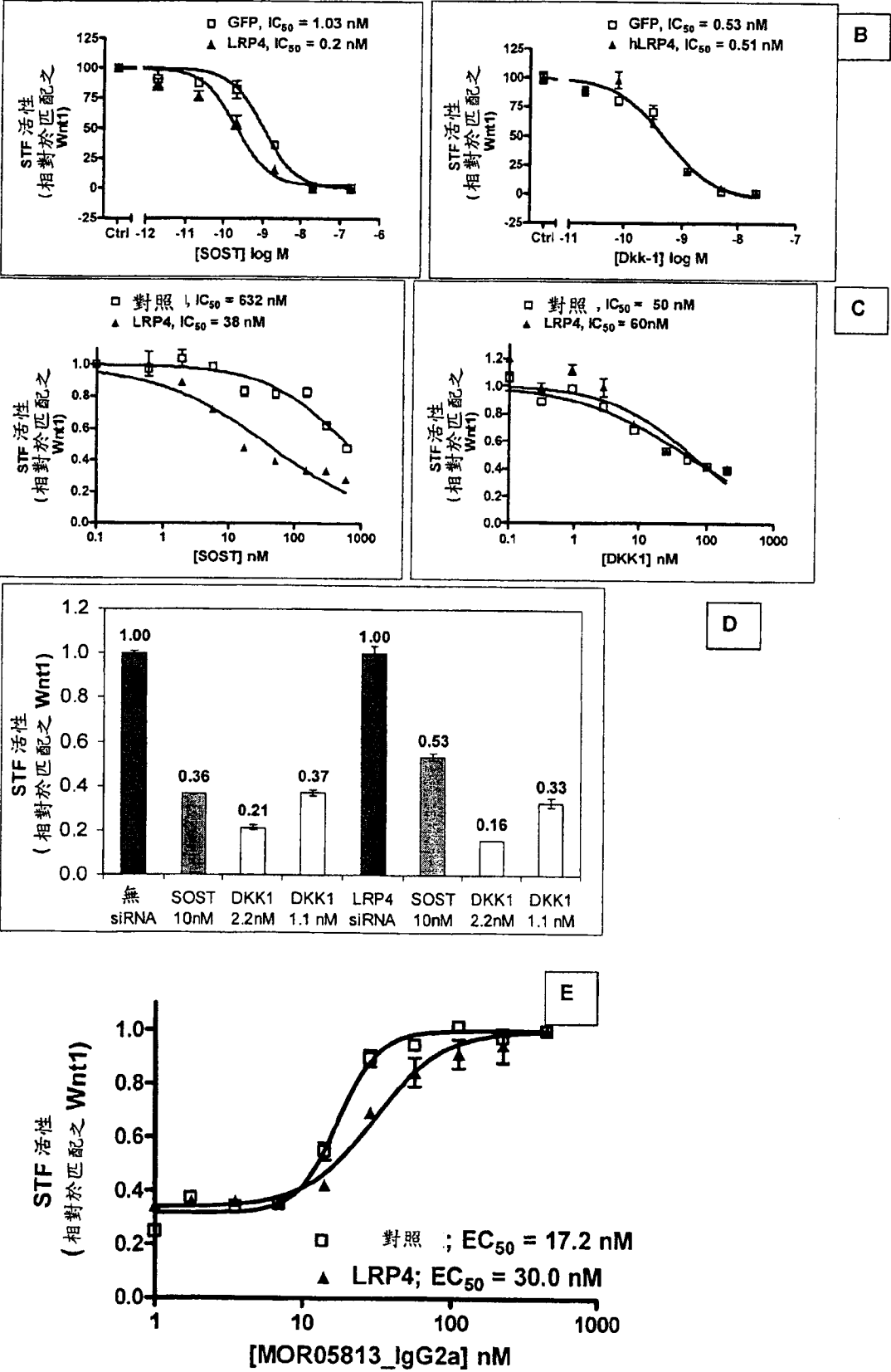


圖5 (續)

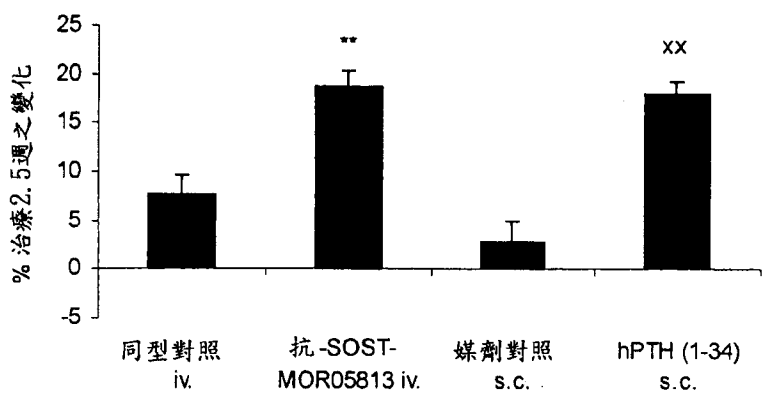


圖6

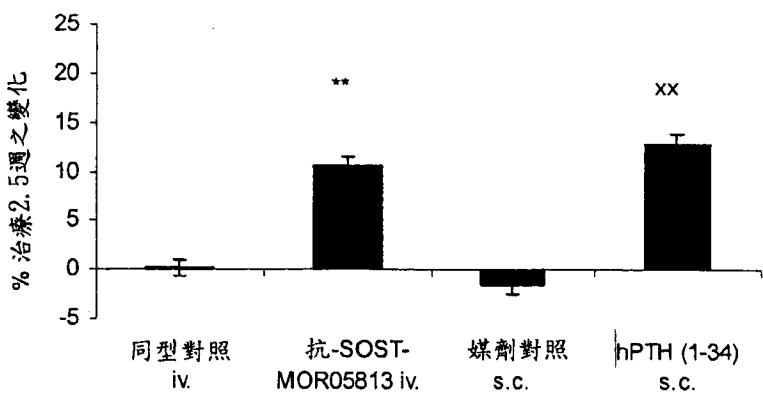


圖7

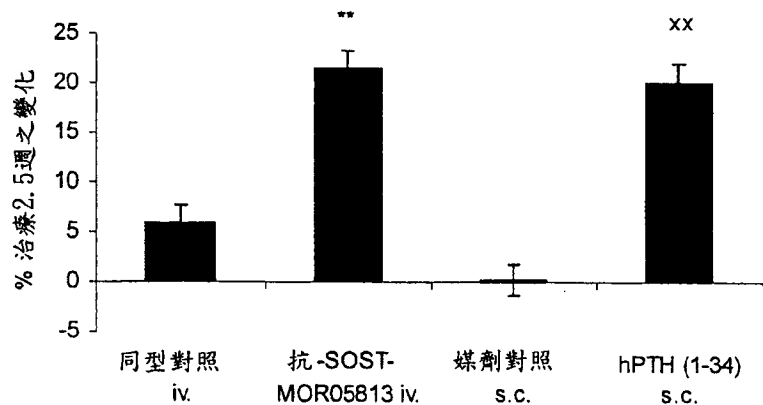


圖8

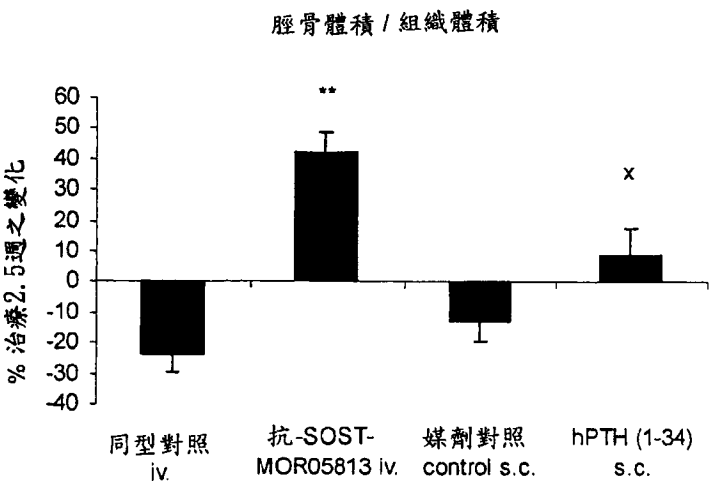


圖9

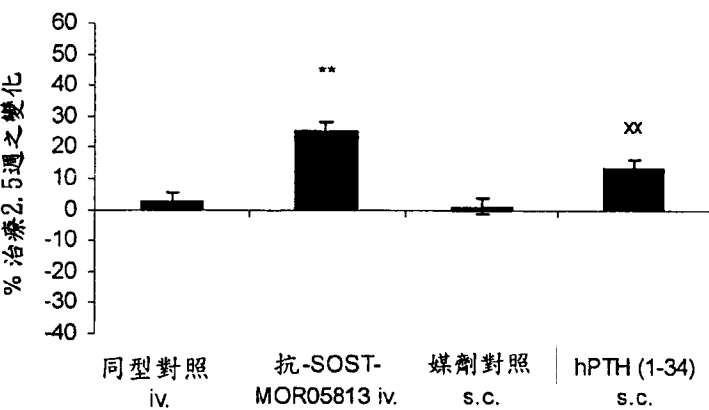


圖10

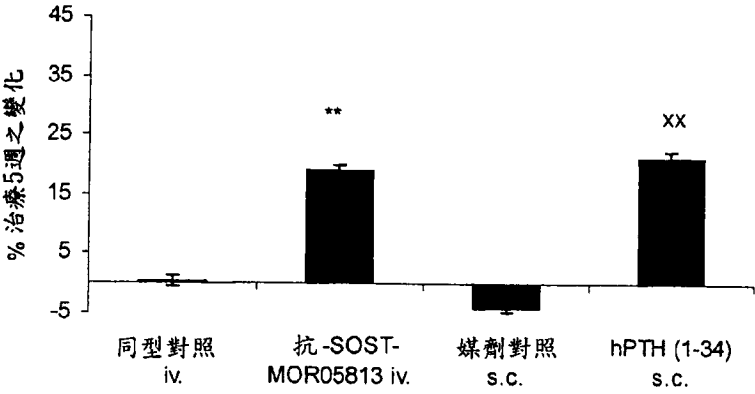


圖11

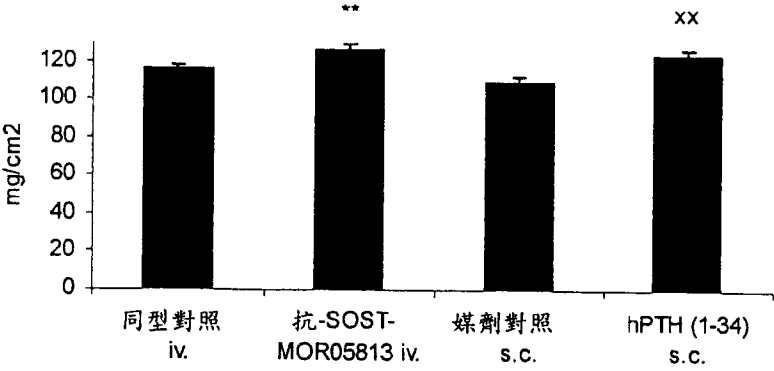


圖12

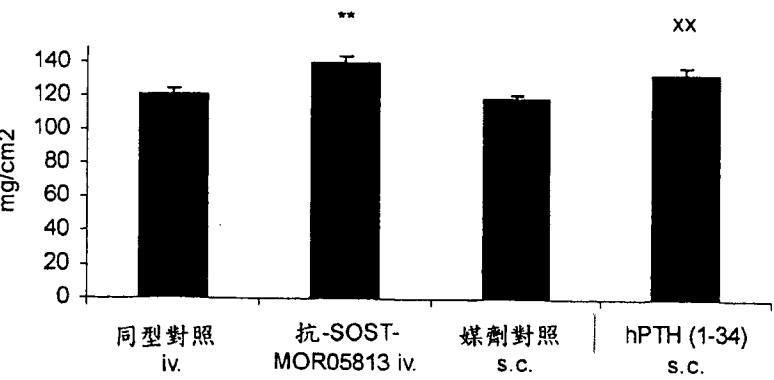


圖13

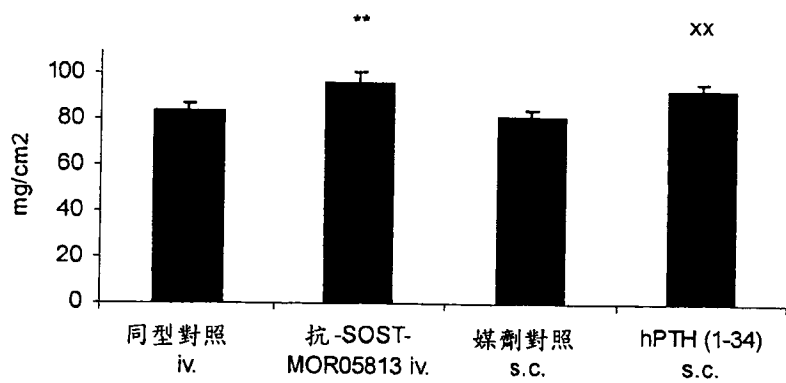


圖14

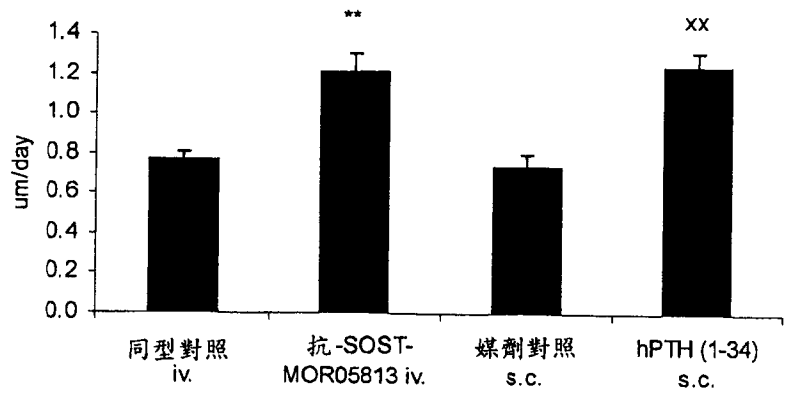


圖15

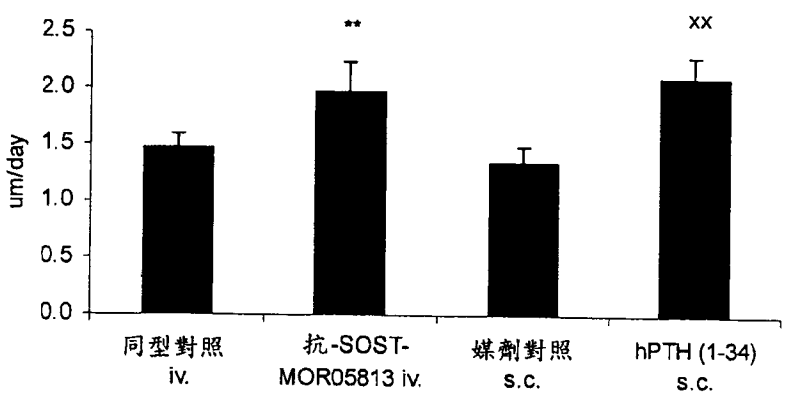


圖16

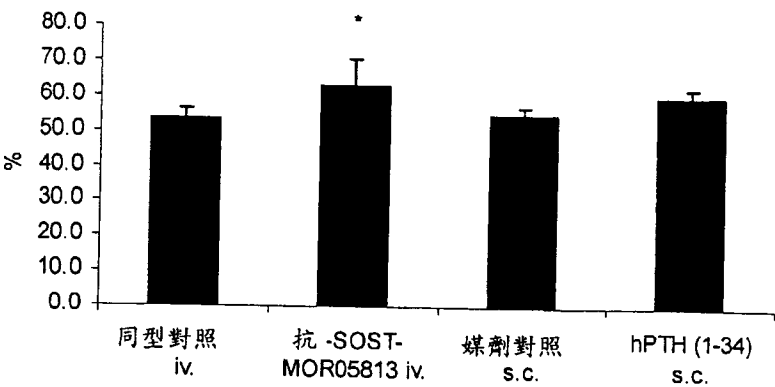


圖17

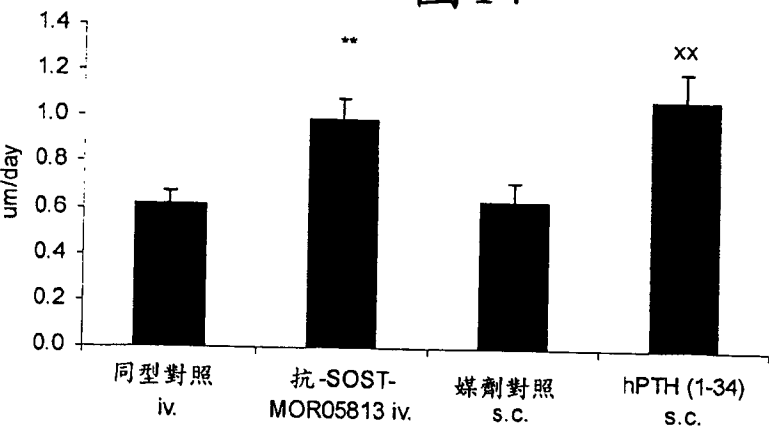


圖18

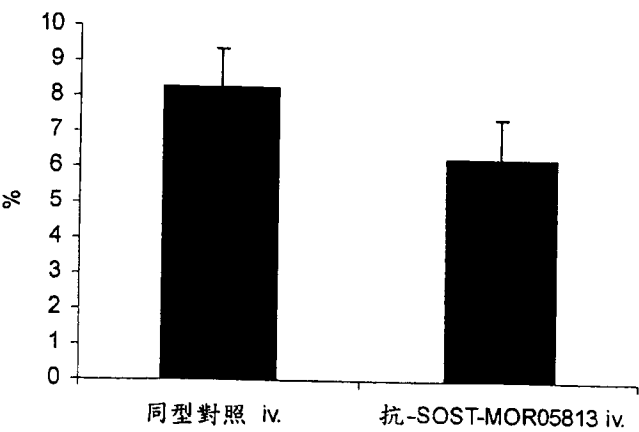


圖19

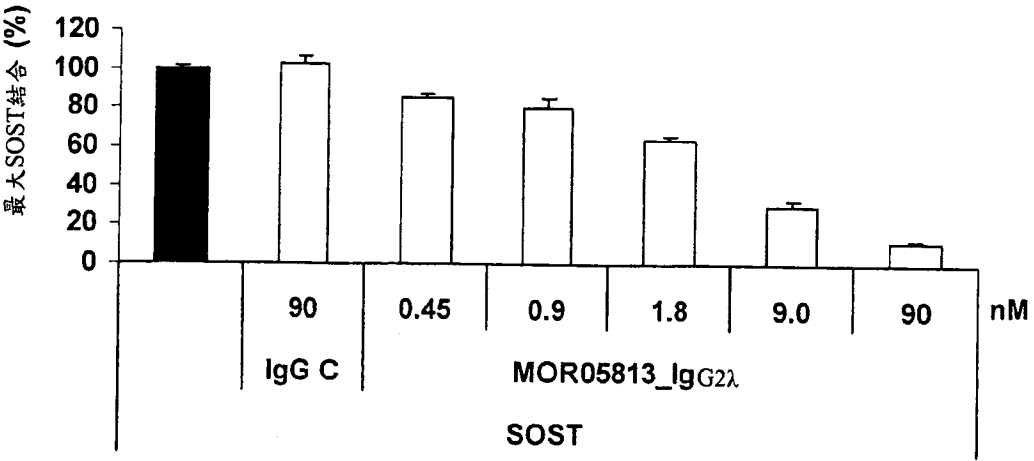


圖20

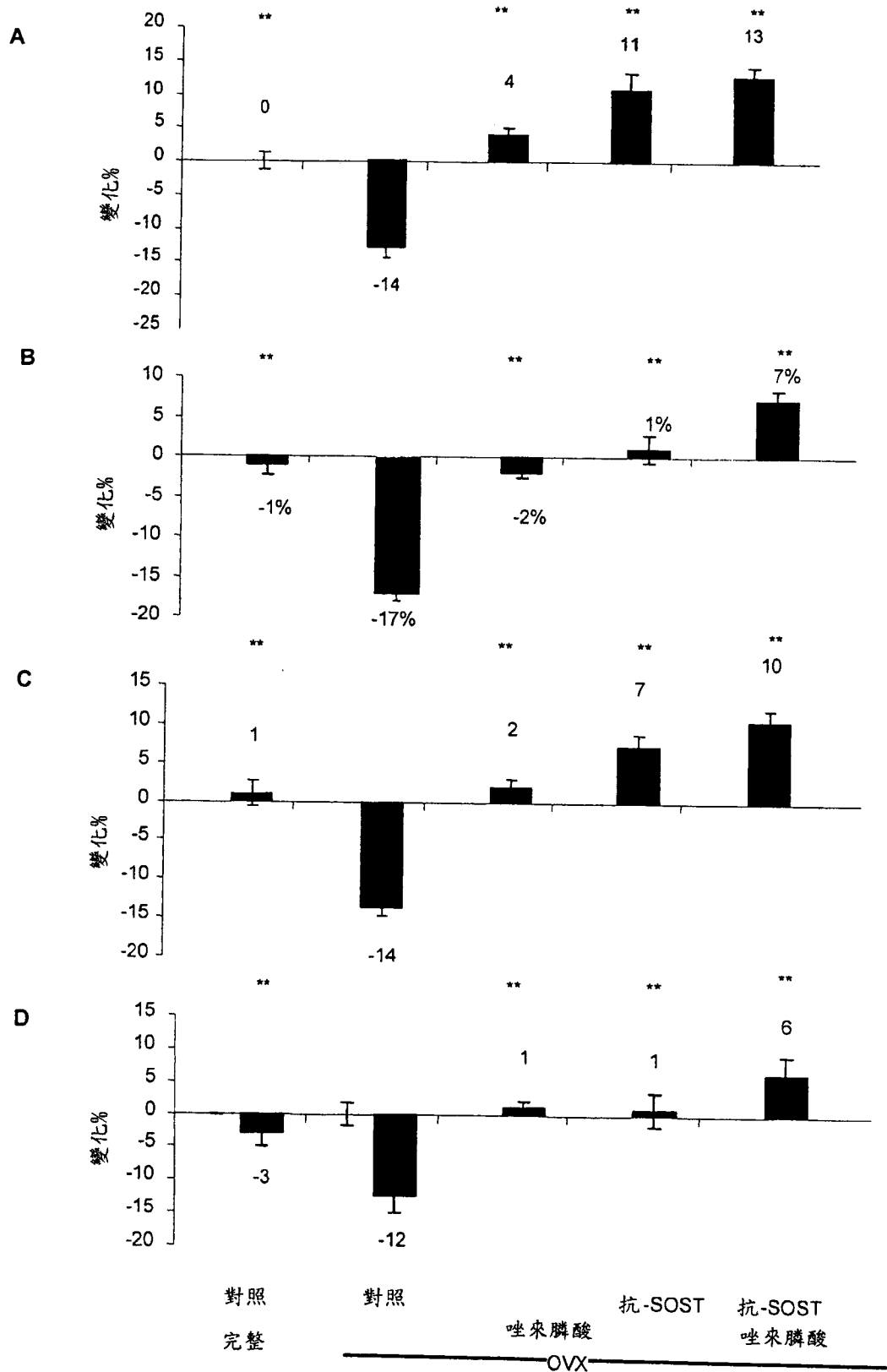


圖21

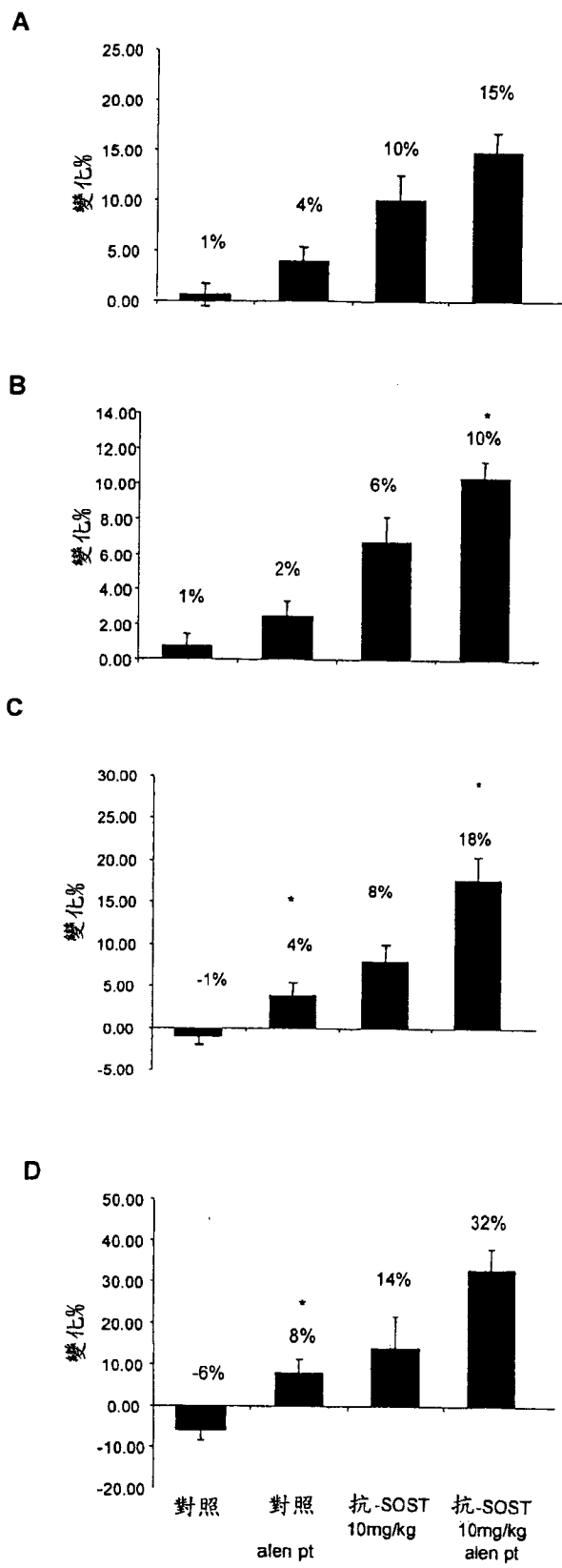


圖22

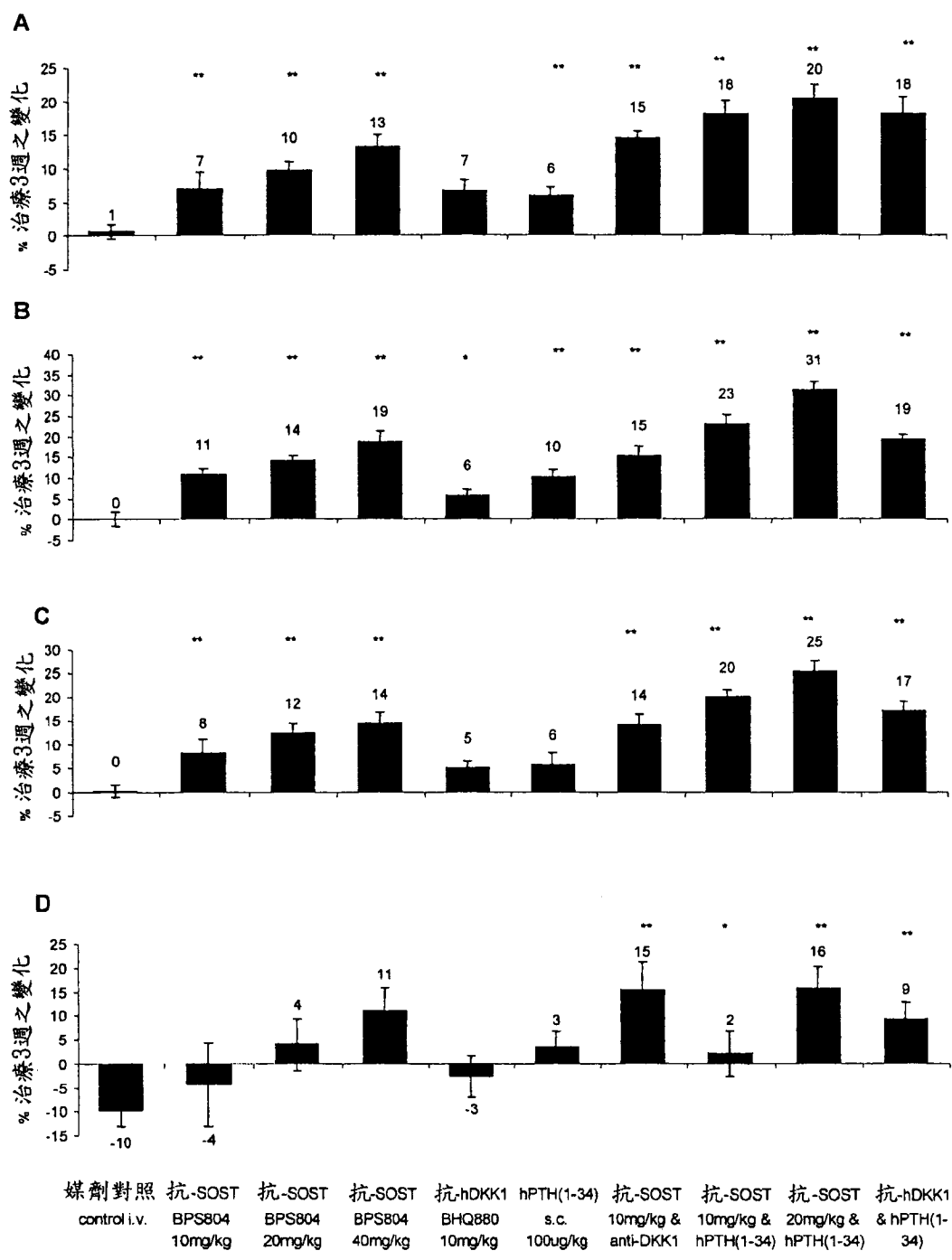


圖23

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)