



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107787329 B

(45) 授权公告日 2021.08.24

(21) 申请号 201680025633.5

(22) 申请日 2016.03.03

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107787329 A

(43) 申请公布日 2018.03.09

(30) 优先权数据
62/128,149 2015.03.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.11.02

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/020780 2016.03.03

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/141245 EN 2016.09.09

(73) 专利权人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 邱华伟 J·博德

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

(51) Int.Cl.
C07K 16/22 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

审查员 李颖

权利要求书2页 说明书27页
序列表28页 附图17页

(54) 发明名称

以高亲和力、亲和性及特异性结合转化生长因子- β 1的经修饰的IgG抗体

(57) 摘要

经修饰的IgG抗体选择性地且以高亲和力及亲和性结合并中和TGF β 1。经修饰的IgG抗体包含4个多肽链并且可以包含对于多肽链拐角区的修饰。经修饰的IgG抗体在治疗性应用,包括疾病的治疗中是有用的。

1. 一种结合TGFβ1的分离的结合蛋白,其中所述分离的结合蛋白是IgG或所述IgG的Fab片段,其包含(i)含有SEQ ID NO:3所示的可变结构域(VL)氨基酸序列的免疫球蛋白轻链(LC)以及(ii)含有SEQ ID NO:1所示的可变结构域(VH)氨基酸序列的免疫球蛋白重链(HC),其中

(a) 所述LC的拐角区包含第一接头,或

(b) 所述HC的拐角区包含第二接头,或

(c) (a) 和 (b) 二者,

其中所述第一接头和所述第二接头独立地选自G、GG、GGS、GGGS和GGGGS,并且所述HC是IgG4或IgG1同种型的。

2. 权利要求1的分离的结合蛋白,其中所述HC是人IgG4同种型的。

3. 权利要求2的分离的结合蛋白,其中所述HC包含铰链区,所述铰链区包含S228P突变(EU编号)。

4. 权利要求1的分离的结合蛋白,其中所述HC是人IgG1同种型的。

5. 权利要求1-4中任一项的分离的结合蛋白,其中所述LC包含SEQ ID NO:16、38、39、40、41、42或43的氨基酸序列。

6. 权利要求1-5中任一项的分离的结合蛋白,其中所述HC包含SEQ ID NO:17、18、56、57、58或61的氨基酸序列。

7. 权利要求1的分离的结合蛋白,其中所述HC和所述LC:

分别包含SEQ ID NO:18和39;

分别包含SEQ ID NO:18和40;

分别包含SEQ ID NO:18和41;

分别包含SEQ ID NO:18和42;

分别包含SEQ ID NO:18和43;

分别包含SEQ ID NO:56和38;

分别包含SEQ ID NO:56和39;

分别包含SEQ ID NO:56和40;

分别包含SEQ ID NO:56和41;

分别包含SEQ ID NO:56和42;

分别包含SEQ ID NO:56和43;

分别包含SEQ ID NO:57和38;

分别包含SEQ ID NO:57和39;

分别包含SEQ ID NO:57和40;

分别包含SEQ ID NO:57和41;

分别包含SEQ ID NO:57和42;

分别包含SEQ ID NO:57和43;

分别包含SEQ ID NO:58和38;

分别包含SEQ ID NO:58和39;

分别包含SEQ ID NO:58和40;

分别包含SEQ ID NO:58和41;

分别包含SEQ ID NO:58和42;
分别包含SEQ ID NO:58和43;
分别包含SEQ ID NO:61和38;
分别包含SEQ ID NO:61和39;
分别包含SEQ ID NO:61和40;
分别包含SEQ ID NO:61和41;
分别包含SEQ ID NO:61和42;或
分别包含SEQ ID NO:61和43。

8. 一种用于抑制TGF β 1活性的组合物,其包含有效量的权利要求1-7中任一项所述的分离的结合蛋白和药学上可接受的赋形剂。

9. 一种分离的多核苷酸,其包含编码权利要求1-7中任一项所述的分离的结合蛋白的核苷酸序列。

10. 一种哺乳动物表达载体,其包含权利要求9所述的多核苷酸。

11. 一种宿主细胞,其包含权利要求9所述的多核苷酸。

12. 一种制备分离的结合蛋白的方法,包括

在产生所述结合蛋白的合适条件下培养权利要求11所述的重组宿主细胞。

13. 权利要求1-7中任一项的分离的结合蛋白用于制备药物的用途,所述药物用于治疗人类中的疾病,其中所述疾病为纤维化疾病。

14. 权利要求1-7中任一项的分离的结合蛋白用于制备药物的用途,所述药物用于治疗人类中的疾病,其中所述疾病为癌症。

15. 权利要求1-7中任一项的分离的结合蛋白用于制备药物的用途,所述药物用于治疗人类中的疾病,其中所述疾病是骨重塑疾病。

16. 权利要求1-7中任一项的分离的结合蛋白用于制备药物的用途,所述药物用于治疗人类中的疾病,其中所述疾病是肾病。

17. 权利要求1-7中任一项的分离的结合蛋白用于制备药物的用途,所述药物用于治疗人类中的疾病,其中所述疾病是弥散性皮肤系统性硬化病。

以高亲和力、亲和性及特异性结合转化生长因子- β 1的经修饰的IgG抗体

[0001] 相关申请

[0002] 本专利申请要求2015年3月4日提交的美国临时专利申请62/128,149的权益,将其内容通过提述整体并入本文。

[0003] 发明背景

发明领域

[0004] 经修饰的IgG抗体各自包含第一、第二、第三和第四多肽链,所述经修饰的IgG抗体表现出对转化生长因子- β 1 (TGF β 1)的高亲和力(affinity)和亲和性(avidity),但对于TGF β 2或TGF β 3则无。还提供了包含所述经修饰的IgG抗体的组合物和使用该组合物来治疗涉及TGF β 1活性的疾病的方法。

[0005] 许多严重疾病与TGF β 诱导的信号传输途径机能障碍有关。例如,TGF β 的增加的组织水平被认为是特发性肺纤维化和心肌纤维化进展中的因素。此外,高局部组织TGF β 水平可以允许一些类型的癌细胞的维持和进展。因此,TGF β 信号传输的下调可以降低此类肿瘤细胞的存活力。

[0006] TGF β 同种型是~25kDa同型二聚体分子,其具有相似的结构框架,其中两个单体经二硫桥共价地连接。哺乳动物同种型具有70-82%的序列同一性,但在血管发育和免疫细胞功能调控中具有不重叠的活性。在人中已报道了三个TGF β 同种型:TGF β 1、TGF β 2、和TGF β 3 (Swiss Prot登录号分别为P01137、P08112、和P10600)。TGF β 1和TGF β 3在结合至两个跨膜受体(称为TGF β 受体I型和II型)的胞外结构域时触发细胞信号传输级联反应。TGF β 2可以结合至TGF β 受体I型和II型以及TGF β 受体III型。

[0007] 已针对临床使用测试了能结合人TGF β 1、TGF β 2、和TGF β 3的抗体。例如,Grütter等公开了GC1008(一种人IgG4单克隆抗体(Mab;即GC1008)),其在临床开发中用于治疗恶性肿瘤和纤维化疾病。Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 105(51):20251-56(2008)。GC1008是“泛特异性的”TGF β 中和抗体,因为其能够中和所有的三种人TGF β 同种型。选择性中和TGF β 1的抗体是公开的,例如在美国专利No.6,492,497和美国专利No.7,151,169中,其在此通过提述并入本文。美替木单抗(metelimumab),又称CAT192(IgG4),是一种选择性中和TGF- β 1的人IgG4单克隆抗体。参见例如美国专利No.6,492,497。测试美替木单抗用于治疗弥漫性皮肤系统性硬化病(diffuse cutaneous systemic sclerosis),又称硬皮病(scleroderma),但证明其功效不足。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供结合TGF β 1的经修饰的IgG抗体,其能选择性地结合并中和人TGF β 1。本发明的经修饰的IgG抗体来源于美替木单抗。所述经修饰的IgG抗体的VH和VL域表现出与美替木单抗相似的TGF β 1结合亲和力及亲和性以及TGF β 1中和能力。在许多情况中,本发明的抗体提供相对于美替木单抗改进的亲和力、亲和力和中和能力。在一个实施方案中,经修饰的IgG抗体含有各自包含与CL域连接的VL域的两条多肽链,和各自包含与CH1域连接的VH域

的两条多肽链,铰链和Fc区。

[0010] 本发明的经修饰的IgG抗体包含能够结合TGFβ1的可变域。在另一个实施方案中,本发明的经修饰的IgG抗体包含结合蛋白,如通过表面等离子体共振测量的,所述结合蛋白展现出的针对人TGFβ1的Kd比同一结合蛋白针对人TGFβ2的Kd至少低约50% (所述结合蛋白展现出的针对人TGFβ1的Kd是同一结合蛋白针对人TGFβ2的Kd的至多1/2)。

[0011] 在另一个实施方案中,本发明涉及分离的结合蛋白,其包含能结合TGFβ1的可变域,其中如通过表面等离子体共振测量的,所述结合蛋白展现出的针对人TGFβ1的Kd比同一结合蛋白针对人TGFβ3的Kd的至少低约50% (所述结合蛋白展现出的针对人TGFβ1的Kd是同一结合蛋白针对人TGFβ3的Kd的至多1/2)。

[0012] 在进一步的实施方案中,本发明涉及分离的结合蛋白,其包含能结合TGFβ1的可变域,其中如通过表面等离子体共振测量的,所述结合蛋白展现出的针对人TGFβ1的Kd比同一结合蛋白针对人TGFβ2的Kd至少低约50%,且比同一结合蛋白针对人TGFβ3的Kd至少低约50% (所述结合蛋白展现出的针对人TGFβ1的Kd是同一结合蛋白针对人TGFβ2的Kd的至多1/2,且是同一结合蛋白针对人TGFβ3的Kd的至多1/2)。

[0013] 在进一步的实施方案中,本发明涉及结合TGFβ1的分离的结合蛋白,其中所述结合蛋白包含第一多肽链、第二多肽链、第三多肽链和第四多肽链。在一个方面,所述第一和第二多肽链从N末端至C末端具有下式:

[0014] (VL域) - (接头1)_m - (CL域),

[0015] 其中所述VL域包含可变轻链互补决定区1 (LCDR1)、可变轻链互补决定区2 (LCDR2)、及可变轻链互补决定区3 (LCDR3),并且其中m是1,且其中所述接头1包含具有如下序列的肽:亮氨酸-谷氨酸-异亮氨酸-赖氨酸-X_p-Y_q-Z_r-精氨酸-苏氨酸-缬氨酸-丙氨酸,X、Y和Z独立地是选自下组的氨基酸:丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、和苏氨酸,且p、q和r的每一个独立地是0至5的整数。在另一个方面,第三和第四多肽链从N末端至C末端具有下式:

[0016] (VH域) - (接头2)_n - (CH1域) - (铰链)_s - (Fc区),

[0017] 其中所述VH域包含可变重链互补决定区1 (HCDR1)、可变重链互补决定区2 (HCDR2)、及可变重链互补决定区3 (HCDR3);且其中n是0或1而s是0或1。在另一个方面,接头2包含具有如下序列的肽:苏氨酸-缬氨酸-丝氨酸-A_d-B_e-C_f-丝氨酸-丙氨酸-丝氨酸-苏氨酸,A、B和C各自独立地是选自下组的氨基酸:丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、和苏氨酸;且其中d、e和f的每一个独立地是0至5的整数。

[0018] 在一个方面,接头2可以含有选自下组的序列:SEQ ID No.45、SEQ ID No.46、SEQ ID No.47、和SEQ ID No.48。

[0019] 在一个方面,所述HCDR1可以具有具有SEQ ID No.7的氨基酸序列,所述HCDR2可以具有SEQ ID No.8的氨基酸序列,而所述HCDR3可以具有SEQ ID No.9、SEQ ID No.10、SEQ ID No.11或SEQ ID No.15的氨基酸序列。

[0020] VH域的框架区可以选自可变重链种系序列。例如,VH域可以选自SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中所示的人VH域序列,或其具有多至5个氨基酸的修饰的变体。

[0021] 本发明的结合蛋白的VL域可以包含可变轻链互补决定区1 (LCDR1)、可变轻链互补决定区2 (LCDR2)、及可变轻链互补决定区3 (LCDR3)。在一个方面,所述SEQ ID No.12的氨基

酸序列,LCDR2可以具有SEQ ID No.13的氨基酸序列,且LCDR3可以具有SEQ ID No.14的氨基酸序列。

[0022] VL域的框架区可以选自可变的 λ 或 κ 种系序列。例如,VL域可以选自SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的人V κ 域序列,或其具有多至4个氨基酸的修饰的变体。在一个实施方案中,二聚体的各个多肽可以包含SEQ ID NO:1中所示的VH域和SEQ ID NO:3中所示的V κ 域,其分别是美替木单抗中存在的VH和VL域。

[0023] 在另一个实施方案中,Fc区通过铰链与CH1域连接。所述铰链可以包含来源于人IgG1或IgG4铰链区的氨基酸序列。例如,铰链可以包含氨基酸序列PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP (SEQ ID NO:5),或其具有多至5个氨基酸修饰的变体。在另一个实施方案中,铰链长度可以在1至15个氨基酸变化。

[0024] 在另一个实施方案中,在CAT192 Fab拐角区上进行定点诱变以改进TGF β 1结合亲和力。将1至5个氨基酸(G、GG、GGS、GGGS和GGGGS)插入至轻链拐角区以增加铰链的柔性,可能需要所述铰链以呈现来自两条链的功能性结合互补位。来自Expi293转染的条件培养基显示出良好的表达和通过八位字节(byte)对TGF β 1结合的显著改进。通过Ni-NTA纯化突变体,并用Biacore来证实高TGF β 结合亲和力。具有1至5个插入至LC拐角区的氨基酸的CAT192突变体重获scFv对TGF β 1的高亲和力结合。这些工程改造的拐角插入突变体还保留了同种型-选择性并可以充当TGF β 1特异性拮抗剂。

[0025] 在另一个方面,VH域可以含有具有SEQ ID No.7的氨基酸序列的可变重链互补决定区1(HCDR1)、具有SEQ ID No.8的氨基酸序列的可变重链互补决定区2(HCDR2)、和具有选自下组的氨基酸序列的可变重链互补决定区3(HCDR3):SEQ ID No.9、SEQ ID No.10、SEQ ID No.11、和SEQ ID No.15。

[0026] 在另一个方面,VL域可以含有具有SEQ ID No.12的氨基酸序列的可变轻链互补决定区1(LCDR1)、具有SEQ ID No.13的氨基酸序列的可变轻链互补决定区2(LCDR2)、和具有SEQ ID No.14的氨基酸序列的可变轻链互补决定区3(LCDR3)。

[0027] 在另一个方面,接头1可以含有具有亮氨酸-谷氨酸-异亮氨酸-赖氨酸-X_p-Y_q-Z_r-精氨酸-苏氨酸-缬氨酸-丙氨酸的序列的肽,其中X、Y或Z独立地是选自下组的氨基酸:丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、和苏氨酸,且p、q和r的每一个独立地是0至5的整数。在另一个方面,X、Y或Z的每一个优选为丝氨酸和甘氨酸。在另一个方面,p、q和r的每一个是1。在另一个方面,p是0,而q和r的每一个是1。在另一个方面,p是1,而q和r的每一个是0。在另一个方面,p是2,而q和r的每一个是1。在另一个方面,p是1,而q和r的每一个是2。

[0028] 在一个实施方案中,接头1可以含有选自下组的序列:SEQ ID No.22、SEQ ID No.23、SEQ ID No.24、SEQ ID No.25、和SEQ ID No.26,其每一个都是来源于SEQ ID No.21的突变形式。在另一个实施方案中,第一多肽链含有选自下组的序列:SEQ ID No.39、SEQ ID No.40、和SEQ ID No.41,其每一个都是来源于CAT192 IgG1 (SEQ ID No.38)的轻链的突变形式。

[0029] 在另一个方面,接头1和接头2可以各自独立地如上文对接头1的描述所述。在这个方面,接头2可以含有具有亮氨酸-谷氨酸-异亮氨酸-赖氨酸-A_d-B_e-C_f-精氨酸-苏氨酸-缬氨酸-丙氨酸的序列的肽,其中A、B和C独立地是选自下组的氨基酸:丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸

酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、和苏氨酸,且d、e和f的每一个独立地是0至5的整数。在另一个方面,A、B和C的每一个优选为丝氨酸和甘氨酸。在另一个方面,d、e和f的每一个是1。在另一个方面,d是0,而e和f的每一个是1。在另一个方面,d是1,而e和f的每一个是0。在另一个方面,d是2,而e和f的每一个是1。在另一个方面,d是1,而e和f的每一个是2。

[0030] 在另一个实施方案中,接头2可以含有选自下组的序列:SEQ ID No.22、SEQ ID No.23、SEQ ID No.24、SEQ ID No.25,和SEQ ID No.26,其每一个都是来源于SEQ ID No.21的突变形式。在另一个实施方案中,第一多肽链含有选自下组的序列:SEQ ID No.39、SEQ ID No.40、和SEQ ID No.41,其每一个都是来源于CAT192 IgG1 (SEQ ID No.38) 的轻链的突变形式。

[0031] 在另一个实施方案中,本发明的结合TGFβ1的Fab或IgG分子选择性地结合TGFβ1,但不以显著的程度结合TGFβ2或TGFβ3。

[0032] 在另一个实施方案中,公开了分离的多核苷酸,其可以包含编码本发明的经修饰的IgG抗体的核苷酸序列。所述分离的多核苷酸可以是cDNA、重组DNA或合成DNA。宿主细胞可以包含分离的核酸。宿主细胞可以是人细胞,例如人胚肾293 (HEK293) 细胞和来源于其的细胞系,或其可以是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。制备经修饰的IgG抗体的方法可以包括适于产生所述经修饰的IgG抗体的条件下培养宿主细胞。可以对经修饰的IgG抗体进行纯化。纯度可以是90%、95%、99%、99.5%或更高。

[0033] 在某些实施方案中,本发明的经修饰的IgG抗体可以是组合物的组件。该组合物可以是药物组合物。所述药物组合物可以包含治疗有效量的所述经修饰的IgG抗体。组合物还可以进一步包含一个或多个生物活性组分、赋形剂、或稀释剂。

[0034] 还提供一种在人中治疗由TGFβ1活性直接或间接导致的疾病或病况的方法,其包括施用药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的经修饰的IgG抗体。所述疾病或病况可以选自下组:纤维化疾病、癌症、免疫介导的疾病,例如弥散性皮肤系统性硬化病、骨重塑疾病、肾病和/或其组合。经修饰的IgG抗体可以用于制造治疗选自下组的疾病或病况的药物:纤维化疾病、癌症、免疫介导的疾病,例如弥散性皮肤系统性硬化病、骨重塑疾病、肾病和/或其组合。对疾病或病症的治疗可以包括中和TGFβ1或抑制TGFβ1信号传输。对疾病或病症的治疗可以包括抑制TGFβ1介导的纤连蛋白产生、血管内皮生长因子 (VEGF) 产生、上皮细胞增殖、内皮细胞增殖、平滑肌细胞增殖和/或免疫抑制。对疾病或病症的治疗可以包括增加自然杀伤细胞活性。

[0035] 附图简述及一些观点

[0036] 本附图在此用于描述的目的,而不适用于限制本发明的范围。

[0037] 图1描绘了Biacore TGFβ1结合测定的结果,其显示了当scFv (CAT191) 转变为全长IgG4 (CAT192) 分子时亲和力的损失。

[0038] 图2描绘了scFv、Fab、IgG分子、和拐角区的结构元件,其被设计来恢复亲和力。

[0039] 图3显示了纯化的IgG变体的SDS-PAGE凝胶的结果,所述IgG变体在重链和轻链拐角区中具有额外的氨基酸。SDS-PAGE显示了在还原的和非还原的条件下纯化的IgG变体的纯度。

[0040] 图4显示了纯化的IgG变体的Biacore结合测定,所述IgG变体在重链和轻链拐角区中具有额外的氨基酸。Biacore测定结果证明了变体的同种型选择性的及高亲和力结合。

[0041] 图5显示了纯化的IgG变体的A549细胞生物测定,所述IgG变体在重链和轻链拐角区中具有额外的氨基酸。A549测定比较多种抗体构建体对TGFβ1刺激的IL-11生产的抑制效果,显示出拐角工程改造的变体在这项基于细胞的效力测定中是高度有效的。

[0042] 图6描绘了Biacore TGFβ1结合测定,其显示当额外的氨基酸插入至CAT192 Fab的重链和轻链二者的拐角区中时,高亲和力结合得到了恢复。

[0043] 图7显示了差示扫描荧光测定法(DSF)对CAT192 Fab突变体热稳定性的分析。

[0044] 图8显示了差示扫描荧光测定法(DSF)对CAT192 IgG4突变体热稳定性的分析。

[0045] 图9显示了对CAT192 Fab变体解析的晶体结构。

[0046] 发明详述

[0047] 本发明的经修饰的IgG抗体选择性地以高亲和力和亲和性结合并中和TGFβ1。经修饰的IgG抗体可以由与美替木单抗相同的VH和VL域组成。经修饰的IgG抗体有利地显示出比当可变域以其他形式使用时更大的中和TGFβ1效力。

[0048] 本文所用的第一组件“和/或”第二组件意指具体公开了分别的第一或第二组件,或是第一和第二组件的组合。除上下文另有明确说明外,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指称。

[0049] “分离的”多核苷酸(或核酸)或蛋白是使用遗传工程技术自其天然形式移出和改变的。“纯化的”核酸或蛋白可以是基本上纯的,例如至少90%纯,或是同质形式的。

[0050] “选择性结合”或“选择性地结合”至人TGFβ1,意指如通过表面等离子体共振测量的,结合蛋白(例如scFv-Fc二聚体)能够以比结合至人TGFβ2或人TGFβ3更高的亲和力结合人TGFβ1,例如其与人TGFβ1的离解常数比其与人TGFβ2或人TGFβ3的离解常数低至少50%(其与人TGFβ1的离解常数是其与人TGFβ2或人TGFβ3的离解常数的至多1/2)。

[0051] 在一个实施方案中,本发明的经修饰的IgG抗体的可变域包含来自美国专利中No.6,492,497公开的CDR(例如美国专利中No.6,492,497的SEQ ID Nos.11-19)的互补决定区(CDR),其在此通过提述并入。所述CDR区列于下表:

[0052]	HCDR1	SYMGH	SEQ ID No. 7
	HCDR2	VISYDGSIKYYADSVKG	SEQ ID No. 8
	HCDR3	TGEYSGYDTSGVEL	SEQ ID No. 9
		TGEYSGYDTPQYS	SEQ ID No. 10
		TGFYSGYDTPASPD	SEQ ID No. 11
	LCDR1	RASQGIGDDL	SEQ ID No. 12
	LCDR2	GTSTLQS	SEQ ID No. 13
	LCDR3	LQDSNYPLT	SEQ ID No. 14

[0053] 令人惊奇地,揭示了共有的(consensus)HCDR3结合基序,其具有如下序列:

[0054]	HCDR3	TGX ₁ YSGYDTX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆	SEQ ID No.15
--------	-------	---	--------------

[0055] 其中:X₁可以是任意氨基酸(优选为E或F),或缺失,

[0056] X₂可以是任意氨基酸(优选为S、D或P),或缺失,

[0057] X₃可以是任意氨基酸(优选为G、P或A),或缺失,

[0058] X₄可以是任意氨基酸(优选为V、Q或S),或缺失,

- [0059] X_5 可以是任意氨基酸(优选为E、Y或P),或缺失,
- [0060] X_6 可以是任意氨基酸(优选为L、S或D),或缺失。
- [0061] 在一个实施方案中,本公开的经修饰的抗体的VH域包含HCDR1,其具有如下序列:
- [0062] SEQ ID No.1:人IgG1 VH域克隆SL15 (SQN4 US6492497)
- [0063] EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTPQYSWGQGTTVTVSS
- [0064] SEQ ID No.2:人IgG1 VH域克隆JT182 (SQN10 US6492497)
- [0065] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTPASPDWGQGTTVTVSS
- [0066] SEQ ID No.3:人IgG1 V κ 域克隆SL15A: (SQN6 US6492497)
- [0067] EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDL GWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK
- [0068] SEQ ID No.4:人IgG1 V κ 域克隆SL15S: (SQN8 US6492497)
- [0069] EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIGDDL GWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK
- [0070] SEQ ID No.5:人IgG1铰链区
- [0071] PKSCDKTHTCPPCPAPELLGPP
- [0072] SEQ ID No.6:人IgG1 Fc区
- [0073] SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT V LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0074] SEQ ID No.7,具有SEQ ID No.8的序列的HCDR2,和具有选自下组的序列的HCDR3: SEQ ID No.9、SEQ ID No.10、SEQ ID No.11、和SEQ ID No.15。CDR序列可以在任意处被1至4个框架区分隔开,其顺序为自N末端:FW1-CDR1-FW2-CDR2-FW3-CDR3-FW4。VH域的框架区可以选自可变重链种系序列。在一个实施方案中,FW区序列可以选自相同的人可变重链种系序列。VL域的框架区可以选自可变 λ 或 κ 种系序列,例如选自相同的人可变 λ 或 κ 种系序列。目前,本领域已知约40个可变重链种系序列,如存在40个 κ 可变种系序列和约30个可变 λ 种系序列,例如V $_H$ 3、V κ 1、V $_H$ 1-69、和V $_H$ 1-e。
- [0075] 在另一个实施方案中,可以通过使用本文公开的CDR序列来生成复合的VH或VL域。例如,VH或VL的晶体结构可以用作引导来生产复合域,所述产生用来自一个抗体的CDR序列和用来自另一抗体的种系FW区来进行。更多细节可见于美国专利申请公开号20020099179;及Homes和Foote, JImmunol.1997Mar 1;158 (5):2192-201,其二者均在此通过提述并入本文。
- [0076] 本经修饰的IgG抗体可以由与美替木单抗中相同的VH和VL域组成,其分别具有SEQ ID No.1和SEQ ID NO.3中所示序列。所述VH域可以用具有SEQ ID NO.2中所示序列的VH域来替代;所述VL域可以用具有SEQ ID NO.4中所示序列的VL域来替代。这些VH和VL域公开于美国专利No.6,492,497(例如美国专利No.6,492,497的SEQ ID NOS:4、6、8、和10)中,其在此通过提述并入。
- [0077] “可变域”(VD)意指免疫球蛋白的高变结合域,或受体的配体结合域,其涉及抗原/

配体结合,正如本领域技术人员所知的那样。可变域通常根据其在免疫球蛋白内的位置或来源来称呼,例如免疫球蛋白的轻链可变域(VL)、例如免疫球蛋白的重链可变域(VH)、骆驼型免疫球蛋白的重链可变域(VHH)。

[0078] “变体”可变域包含与参考序列相比氨基酸添加、取代和/或缺失。VH或VL域的“变体”可以具有多至4个此类氨基酸修饰。例如,两个域的一个可以包含氨基酸取代,而另一个域是未修饰的,或两个域都可以包含氨基酸取代。添加或缺失氨基酸残基的修饰可以在VH或VL域的N末端或C末端进行。例如,可以缺失VH域的N末端残基。就本公开而言,术语“之间”、“从”、“至”和“至少”是包含(本数)的。例如,“从0至5”的整数意指大于或等于0但小于或等于5的任意整数。

[0079] 在一个实施方案中,可以进行多至5个氨基酸替换以将经修饰的IgG抗体去免疫化。例如,去免疫化可以根据Harding等(2010)mAbs2:256-265的方法来进行。

[0080] 例如,可以取代VH和/或VL域的框架残基来增加经修饰的IgG抗体的稳定性和/或降低其聚集的趋势。低稳定性会影响表达的经修饰的IgG抗体在重组表达时正确折叠的能力,导致表达的抗体级分是非功能性的。低稳定性抗体也可能易于形成潜在免疫原性聚集体或可能具有受损的亲和性或储藏寿命。预期增加VH和/或VL域稳定性和/或降低VH和/或VL域的聚集趋势的框架氨基酸取代(例如在经修饰的IgG抗体中)公开于例如WO 2007/109254中。预期本VH和VL域中的相应残基中的取代类似地增加稳定性和/或降低经修饰的IgG抗体聚集的趋势。

[0081] 预期能容许的取代包括会以其他人VH或VL域种系序列中出现的对应氨基酸来替换SEQ ID No.1、SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、或SEQ ID No.4的氨基酸的那些。用这些种系序列的任一个中出现的氨基酸对框架氨基酸的取代是可以容许的。例如,SEQ ID No.1的VH域的残基可以用任何VH种系序列中对应位置中出现的氨基酸来取代,所述VH种系序列例如来自DP-10(V_H 1-69)或DP-88(V_H 1-e)的种系序列。这种情况中的对应位置是通过不同种系序列之间的序列比对来确定的,所述比对用本领域所熟知的比对技术(例如ClustalW)来进行。

[0082] 预期容许的额外取代是对大多数侧链暴露于溶剂的氨基酸进行的那些额外取代,如通过分析三个共晶结构所确定的。可以用本领域所熟知的技术来评估残基的溶剂可及的表面积。进一步地,预期对埋藏在可变域内的氨基酸的取代会是更为容许的,如果该氨基酸的侧链不与邻近的残基产生位阻的话。因此,埋藏的氨基酸通常用具有相似或更小尺寸的侧链的氨基酸来取代。例如,用Leu、Val、Ala、或Gly对埋藏的Ile残基的取代预期是容许的。可以通过分析所述三个共晶结构来预测可能由取代产生的位阻。预期容许的进一步取代是在可变域内维持现存的静电相互作用(例如偶极-偶极相互作用、诱导的偶极相互作用、氢键、或离子键)的那些。

[0083] 可变域的额外的氨基酸取代包括预期为抗体或其抗原结合片段带来新的有用特性的那些。例如,可以去除VH和/或VL域中推定的N-糖基化位点以防止或降低N-糖型的形成。可以用Gln来取代氨基末端残基以引起焦谷酰胺化(pyroglutamylation),其能降低电荷变体的数目。例如,氨基酸取代可以用于降低等电点,这能降低IgG多肽抗体的清除率。

[0084] 例如,可变域的表面残基可以用Cys或Lys残基来取代,然后能将其共价地修饰并偶联至分子,所述分子能为抗体或其抗原结合片段带来有用特性,例如可检测的标记物、毒

素、靶向模块、或蛋白。例如,能将Cys残基偶联至细胞毒性药物以形成缀合物。还能将Cys残基偶联至增加血清半衰期的分子,例如聚乙二醇(PEG)或血清白蛋白。此类氨基酸修饰综述于例如Beck等(2010)Nature 10:345-52中。

[0085] 可检测标记物包括放射性标记物如¹³¹I或⁹⁹Tc,可以用本领域已知方法将其附接至抗体或其抗原结合片段。标记物也包括酶标记物如辣根过氧化物酶。标记物还包括化学模块如生物素,其可以通过对特异性的同族可检测模块(例如带标记的亲合素)的结合来检测。可以附接其他促进纯化的模块。例如,可以用熟知的重组修饰和表达方法对抗体或其抗原结合片段加His标签。

[0086] 通过接头(此处称为接头1)将经修饰的IgG抗体的VL域连接至CL域。任选地通过第二接头(此处称为接头2)将经修饰的IgG抗体的VH域连接至CH1域。适于制备经修饰的IgG抗体的接头是本领域所熟知的。参见例如Bird等(1988)Science,242:423-426;Huston等(1988)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 85:5879-5883。例如,这可以通过框内融合编码核酸和在合适的宿主细胞中表达融合蛋白来完成。

[0087] 接头1可以含有连接IgG分子内的VL和CL的肽,或具有增加的柔性的修饰形式。例如,其可以具有亮氨酸-谷氨酸-异亮氨酸-赖氨酸-X_p-Y_q-Z_r-精氨酸-苏氨酸-缬氨酸-丙氨酸的序列,其中X、Y或Z独立地是选自下组的氨基酸:丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、和苏氨酸,且p、q和r的每一个独立地是0至5的整数。X、Y或Z的每一个优选地是丝氨酸和甘氨酸,且p、q和r的每一个是1。在另一个方面,p是0,而q和r的每一个是1。在另一个方面,p是1,而q和r的每一个是0。

[0088] 接头2可以含有具有苏氨酸-缬氨酸-丝氨酸-A_d-B_e-C_f-丝氨酸-丙氨酸-丝氨酸-苏氨酸的序列的肽,A、B和C独立地是选自下组的氨基酸:丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、和苏氨酸,且d、e和f独立地是0至5的整数。

[0089] 在另一个实施方案中,任选地将铰链插入经修饰的IgG抗体的CH1域和Fc区之间。在一个方面,铰链区是柔性域,其任选地将CH1部分与Fc区连接。IgG分子中铰链区的柔性可以允许Fab臂采取广范围的角度,允许结合至以可变距离隔开的表位。合适的铰链区包括,例如具有的氨基酸序列PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP (SEQ ID No.5)的人IgG1铰链区。例如,该序列对应于人IgG1上铰链、中铰链的部分、和CH₂域的N末端部分,如美国专利No.8,048,421的图4B中公开的。

[0090] 在另一个实施方案中,经修饰的IgG抗体的合适的Fc区含有两个或三个恒定区。Fc区可以包括来自人IgG1的那些(如SEQ ID No.6中所示)或来自IgG4的那些(如SEQ ID No.17的域CH₂和CH₃中所示)。抗体的Fc区介导其血清半衰期和效应子功能,如补体依赖性的细胞毒性(CDC)、抗体依赖性的细胞毒性(ADCC)、和抗体依赖性的细胞吞噬作用(ADCP)。

[0091] 可以对铰链和Fc区进行修饰以改进经修饰的IgG抗体的多种特性。在一个实施方案中,除了对铰链区的修饰外,还可以对天然存在的人Fc区的1、2、3、4、5或多至10个氨基酸进行修饰。例如,可以修饰Fc区以增加经修饰的IgG抗体的血清半衰期。IgG的半衰期取决于其对受体FcRn的pH依赖性结合。FcRn在内皮细胞表面上表达,其以pH依赖性的方式结合IgG并保护其不被降解。例如,已显示定位于CH₂和CH₃域之间的界面的突变增加对FcRn的结合亲和力及IgG1的体内半衰期。例如,此类修饰综述于Strohl WR.,2009.Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies.Curr Opin Biotechnol.20

(6):685-91;及Vaccaro C.等,2005.Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels.Nat Biotechnol.23(10):1283-8中。

[0092] 对铰链和/或Fc区的其他修饰可以增加或降低效应子功能。四个人IgG同种型以不同的亲和力结合激活性的Fc γ 受体(Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa)、抑制性的Fc γ RIIb受体、及第一补体组份(C1q),导致不同的效应子功能。例如,IgG对Fc γ Rs或C1q的结合取决于定位于IgG铰链区和CH₂域中的残基。这些残基的单个或多个氨基酸取代能通过调制IgG与Fc γ Rs或C1q的相互作用影响效应子功能。已知其他取代影响效应子功能。例如,这些修饰综述于Strohl(2009)“Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies,”Curr.Opin.Biotechnol.20:685-91中。

[0093] 代表性的铰链和/或Fc区修饰总结于表1中。

[0094] 表1.代表性的铰链和Fc区修饰

同种型	物种	取代	FcR/C1q结合	效应子功能	Refs
IgG1	人	T250Q/M428L	对FcRn增加的结合	增加的半衰期	1
IgG1	人	1M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F	对FcRn增加的结合	增加的半衰期	2
IgG1	人	E233P/L234V/L235A/G236 + A327G/A330S/P331S	对Fc γ RI降低的结合	降低的ADCC和CDC	3, 4
IgG1	人	E333A	对Fc γ RIIIa增加的结合	增加的ADCC和CDC	5, 6
IgG1	人	S239D/A330L/I332E	对Fc γ RIIIa增加的结合	增加的ADCC	7, 8
[0095] IgG1	人	P257I/Q311	对FcRn增加的结合	未改变的半衰期	9
IgG1	人	K326W/E333S	对C1q增加的结合	增加的CDC	10
IgG1	人	S239D/I332E/G236A	增加的Fc γ RIIIa/Fc γ RIIb比	增加的巨噬细胞吞噬作用	11
IgG1	人	K322A	对C1q降低的结合	降低的CDC	5
IgG4	人	S228P	--	降低的Fab-臂交换	12
IgG2a	小鼠	L235E + E318A/K320A/K322A	对Fc γ RI和C1q降低的结合	降低的ADCC和CDC	10

[0096] 1.Hinton等(2004)J.Biol.Chem.279(8):6213-16.

[0097] 2.Vaccaro等(2005)Nature Biotechnol.23(10):1283-88.

[0098] 3.Armour等(1999)Eur.J.Immunol.29(8):2613-24.

[0099] 4.Shields等(2001)J.Biol.Chem.276(9):6591-604.

[0100] 5.Idusogie等(2000)J.Immunol.164(8):4178-84.

[0101] 6.Idusogie等(2001)J.Immunol.166(4):2571-75.

[0102] 7.Lazar等(2006)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 103(11):4005-10.

[0103] 8.Ryan等(2007)Mol.Cancer Ther.6:3009-18.

[0104] 9.Datta-Mannan等(2007)Drug Metab.Dispos.35:86-94.

[0105] 10.Steurer等(1995)J.Immunol.155(3):1165-74.

[0106] 11.Richards等(2008)Mol.Cancer Ther.7(8):2517-27.

[0107] 12.Labrijn等(2009)Nature Biotechnol.27(8):767-71.

[0108] 进一步地,重组氨基酸修饰能用于降低表达的多肽的结构同质性。代表性的例子是Peters等(2012)J.Biol.Chem.287(29):24525-33,其公开了IgG4铰链区中的Cys至Ser取代,其降低二硫键异质性并增加Fab域热稳定性。类似地,Zhang等(2010)Anal.Chem.82:1090-99公开了工程化IgG2铰链区以限制治疗应用中二硫键杂乱化(scrambling)和结构异构体的形成。对CH3域的氨基酸修饰也能用于缺失羧基末端Lys残基以减少电荷变体的数目。氨基酸修饰还能用于改进重组抗体或其抗原结合片段的药理学功能。例如,氨基酸修饰能用于提高补体活化、通过增加Fc γ R11A结合或减少Fc γ R11B结合来增强抗体依赖性的细胞毒性(ADCC)、和/或通过增加FcRn结合来增加血清半衰期。例如,此类氨基酸修饰综述于Beck等(2010)Nature 10:345-52中。

[0109] 核酸和制备经修饰的IgG抗体的方法

[0110] 本发明进一步的方面提供编码经修饰的IgG抗体的核酸。例如,分离的核酸可以是合成的DNA、非天然存在的mRNA、或cDNA。例子包括编码美国专利No.6,492,497的SEQ ID NOS:3、5、7、和9中所示的VH和VL域的核酸。重组宿主细胞可以包含一个或多个上述构建体。制备经修饰的IgG抗体的方法包括在产生经修饰的IgG抗体的条件下在宿主细胞中表达所述编码氨基酸,以及回收抗体。回收抗体的方法可以包括分离和/或纯化该抗体。生产的方法可以包括将抗体配制于组合物中,所述组合物包含至少一个额外的组分,如药学上可接受的赋形剂。

[0111] 本文所用的术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)意指其中引入了外源DNA的细胞。应当理解此类术语不仅意指具体的细胞本体,还指这种细胞的后代。因为由于突变或环境影响,具体的修饰可以发生在随后的数代中,所以实际上这种后代可能与亲本细胞不是完全一样的,但仍然涵盖在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。优选的是,宿主细胞包括选自生物界任一种的原核和真核细胞。优选的真核细胞包括原生生物、真菌、植物和动物细胞。最优选的是,宿主细胞包括但不限于原核细胞系大肠杆菌(E.Coli);哺乳动物细胞系CHO、HEK 293和COS;昆虫细胞系Sf9;以及真菌细胞酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)。

[0112] 可以选择或构建合适的包含编码经修饰的IgG抗体的核酸的载体,其含有适当的调控序列,包括启动子序列、终止子序列、多聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因序列和适当的其他序列。例如,载体可以是质粒、噬菌体、噬菌粒、腺病毒、AAV、慢病毒。用于操作核酸(例如在制备核酸构建体、诱变、测序、将DNA引入细胞、和基因表达中)的技术和实验方案,是本领域所熟知的。

[0113] 本文所用的术语“载体”意指能运输与其连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其意指环状双链DNA环,额外的DNA片段可以连接到其中。另一种类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA片段可以连接到该病毒基因组中。一些载体能在它们所被引入的宿主细胞(例如具有细菌复制起点的细菌载体和游离体(episomal)哺乳动物载体)中自主复制。其他载体(例如非游离体(non-episomal)哺乳动物载体)在引入宿主细胞中时能整合至宿主细胞的基因组中,并由此与宿主基因组一起复制。此外,一些载体能指导与其可操作地连接的基因的表达。此类载体在此称为“重组表达载体”(或简称“表达载体”)。通常,在

重组DNA技术中实用的表达载体常常是质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换地使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明意在包括这些其他形式的表达载体,如病毒载体(例如复制缺陷逆转录病毒、腺病毒、和腺相关病毒),其发挥等价的功能。

[0114] 将此类核酸引入宿主细胞可以用本领域所熟知的技术来完成。对于真核细胞而言,合适的技术可以包括例如磷酸钙转染、DEAE-右旋糖酐(DEAE-Dextran)、电穿孔、脂质体介导的转染、和用逆转录病毒或其他病毒转导。对于细菌细胞,合适的技术可以包括氯化钙转化、电穿孔、和用噬菌体转染。引入后可为引起或允许由核酸的表达,例如通过在用于表达基因的条件下培养宿主细胞来进行。在一个实施方案中,本发明的核酸整合至宿主细胞的基因组(例如染色体)中。可以通过按照标准技术含入序列来促进整合,所述序列促进与基因组的重组。

[0115] 用于在多种不同的宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是熟知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、植物细胞、昆虫细胞、真菌、酵母和转基因植物和动物。本领域中用于表达异源多肽的可用哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、小鼠黑色素瘤细胞、大鼠骨髓瘤细胞、人胚肾细胞(例如HEK293细胞)、人胚视网膜细胞,和许多其他细胞系。抗体及抗体片段在原核细胞(例如大肠杆菌)中的表达是本领域中已发展完善的。综述参见例如PlückthunBio/Technology9:545-551(1991)。在培养的真核中表达对于本领域技术人员而言也是可行的,如例如Andersen等(2002)Curr.Opin.Biotechnol.13:117-23中所综述的。

[0116] 在另一个实施方案中,本发明的经修饰的IgG抗体可以天然地或是由表达宿主(例如CHO、HEK293、或NSO(ECACC 85110503)细胞)选择地糖基化的,或例如如果通过在原核细胞中表达来产生的话,它们可以是非糖基化的。还可以特意对糖基化进行改变,例如通过抑制岩藻糖基化,从而增加所得的经修饰的IgG抗体的ADCC活性。

[0117] 使用抗体或其抗原结合片段的方法

[0118] 经修饰的IgG抗体可用于治疗或诊断人或动物身体的方法中,如人患者中的疾病或病症的治疗方法(其可以包括预防性治疗),其包括使用有效量来治疗该患者。可治疗的病况包括TGFβ1起作用的任何病况,例如纤维化疾病、癌症、免疫介导的疾病、和伤口愈合,例如弥散性皮肤系统性硬化病、骨重塑疾病、肾病和/或其组合。

[0119] 已显示特异性针对人TGFβ1的抗体在动物模型中对于治疗TGFβ1肾小球性肾炎(Border等(1990)Nature 346:371-374)、神经瘢痕形成(Logan等(1994)Eur.J.Neurosci.6:355-363)、真皮瘢痕形成(Shah等(1992)Lancet 339:213-214;Shah等(1994)J.Cell Science 107:1137-1157;Shah等(1995)J.Cell Science 108:985-1002)、及肺纤维化(Giri等(1993)Thorax 48:959-966)是有效的。进一步地,已显示针对TGFβ1、2、和3的抗体在肺纤维化、辐射诱导的纤维化(美国专利No.5,616,561)、骨髓纤维化、烧伤、Dupuytren氏挛缩(Dupuytren's contracture)、胃溃疡、和类风湿性关节炎模型中是有效的(Wahl等(1993)Exp.Medicine 177:225-230)。

[0120] 经修饰的IgG抗体对于治疗由TGFβ1活性直接或间接引起的疾病和病况是有用的。经修饰的IgG抗体可以在体外或体内选择性地抑制人TGFβ1同种型的活性。TGFβ1同种型的活性包括但不限于:TGFβ介导的信号传输、细胞外基质(ECM)沉积、抑制上皮和内皮细胞增殖、促进平滑肌增殖、诱导III型胶原表达、诱导TGF-β、纤连蛋白、VEGF和IL-11表达、结合潜

在相关肽 (Latency Associated Peptide)、肿瘤诱导的免疫抑制、促进血管生成、活化肌成纤维细胞、促进转移、和抑制NK细胞活性。例如经修饰的IgG抗体对于治疗局灶性节段性肾小球硬化 (FSGS)、肝纤维化 (HF)、急性心肌梗死 (AMI)、特发性肺纤维化 (IPF)、硬皮病 (SSc)、和马方综合征 (Marfan Syndrome)。

[0121] 经修饰的IgG抗体对于治疗疾病和病况是有用的,所述疾病和病况包括但不限于纤维化疾病(如肾小球性肾炎、神经瘢痕形成、真皮瘢痕形成、肺纤维化 (pulmonary fibrosis)、肺部纤维化 (lung fibrosis)、辐射诱导的纤维化、肝纤维化、骨髓纤维化)、烧伤、免疫介导的疾病、炎症性疾病(包括类风湿性关节炎)、移植排斥、癌症、Dupuytren氏挛缩、和胃溃疡。它们对于治疗、预防肾功能不全或其降低发病风险也是有用的,所述肾功能不全包括但不限于:糖尿病(I型和II型)肾病、辐射诱导的肾病、梗阻性肾病、弥散性系统性硬化病、肺纤维化、同种异体移植排斥、遗传性肾病(例如多囊性肾病、髓质海绵肾、马蹄肾)、肾小球性肾炎、肾硬化、肾钙质沉着症、系统性红斑狼疮、斯耶格伦氏综合征 (Sjogren's syndrome)、贝格尔氏病 (Berger's disease)、系统性或肾小球性高血压、小球间质性肾病、肾小管性酸中毒、肾结核、及肾梗死。具体而言,当与肾素-血管紧张素-醛固酮系统的拮抗剂组合时,经修饰的IgG抗体是有用的,所述拮抗剂包括但不限于:肾素抑制剂、血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂、Ang II受体拮抗剂(也称为“Ang II受体阻断剂”)、和醛固酮拮抗剂。例如,用于组合使用经修饰的IgG抗体与此类拮抗剂的方法示于WO 2004/098637中。

[0122] 经修饰的IgG抗体对于治疗与ECM沉积相关的疾病和病况也是有用的,所述疾病和病况包括系统性硬化病、手术后黏附 (postoperative adhesions)、瘢痕疙瘩和肥厚性瘢痕形成、增殖性玻璃体视网膜病变、青光眼引流手术 (glaucoma drainage surgery)、角膜损伤、白内障、佩伦涅氏病 (Peyronie's disease)、成人呼吸窘迫综合征、肝硬化、心肌梗死后瘢痕形成、血管成形术后再狭窄 (post angioplasty restenosis)、蛛网膜下腔出血后瘢痕形成、多发性硬化、椎板切除术后纤维化、肌腱和其他修复后纤维化、由去除纹身引起的瘢痕形成、胆汁性肝硬化(包括硬化性胆管炎)、心包炎、胸膜炎、气管造口术、渗透性中枢神经系统损伤、嗜曙红细胞肌痛综合征、血管再狭窄、静脉闭塞性病、胰腺炎和牛皮癣性关节炎。

[0123] 经修饰的IgG抗体对于在疾病和病况中促进上皮细胞再形成也是有用的,所述疾病和病况如静脉性溃疡、缺血性溃疡(褥疮)、糖尿病性溃疡、移植部位、移植供体部位、擦伤和烧伤、支气管上皮的疾病,如哮喘、ARDS、肠上皮的疾病,如与细胞毒性治疗相关的黏膜炎、食管溃疡(反流疾病)、胃溃疡、小肠和大肠的病损(炎症肠病)。

[0124] 经修饰的IgG抗体也可以用于促进内皮细胞增殖(例如在稳定动脉粥样硬化斑块中)、促进血管血管吻合的伤愈、或抑制平滑肌细胞增殖(例如在动脉疾病、再狭窄、和哮喘中)。

[0125] 经修饰的IgG抗体对于增强针对巨噬细胞介导的感染的免疫响应而言是有用的。它们对于降低免疫抑制(例如肿瘤、AIDS、或肉芽肿性疾病引起的免疫抑制)也是有用的。经修饰的IgG抗体对于治疗过度增生性疾病是有用的,所述过度增生性疾病如癌症,包括但不限于乳腺、前列腺、卵巢、胃、肾、胰腺、结肠直肠、皮肤、肺、宫颈及膀胱癌、胶质瘤、间皮瘤、以及多种白血病及肉瘤,如卡波西肉瘤 (Kaposi's sarcoma),并且对于治疗或预防此类肿瘤的复发或转移是有用的。经修饰的IgG抗体对于抑制环孢菌素介导的转移也是有用的。

[0126] 在癌症治疗的上下文中,“治疗”包括任何导致肿瘤生长减缓或肿瘤转移减少、以

及癌症部分缓解从而延长患者预期寿命的医学干预。

[0127] 治疗方法包括施用经修饰的IgG抗体或包含经修饰的IgG抗体的药物组合物。经修饰的IgG抗体可用于制造用于施用的药物中。例如,制备药物或药物组合物的方法包括用药学可接受的赋形剂配制经修饰的IgG抗体。组合物可以单独施用或与其他治疗组合施用,所述组合施用或是同时的或是序贯的,取决于其要治疗的病况。

[0128] 施用优选为以足以对患者显示出益处的“治疗有效量”进行。此类益处至少可以是具体疾病或病况的至少一个症状的改善。实际的施用量及施用的速率和时间进程会取决于治疗的疾病或病况的性质和严重程度。治疗的处方,例如对剂量等的决定,可以基于临床前和临床研究来确定,对所述研究的设计完全是在本领域技术水平内的。

[0129] 精确剂量会取决于一些因素,包括经修饰的IgG抗体是用于诊断还是用于治疗、要治疗的部位的大小和位置、以及附接于所述经修饰的IgG抗体的任何可检测标记物或其他分子的性质。例如,经修饰的IgG抗体的典型剂量用于全身应用可以在100 μ g至1克的范围,而用于局部应用可以为1 μ g至1mg。用于成人患者单一治疗的剂量可以针对少儿和婴儿进行比例性调整。治疗可以每天一次、每周两次、每周一次、每月一次或根据其他间隔进行重复,由医师斟酌决定。治疗可以是周期性的,并且施用之间的周期为约2周或更多周、优选为约3周或更多周、更优选为4周或更多周,或约每周一次。

[0130] 在一个实施方案中,约0.1、0.3、1、3、10、15毫克、或20毫克的本发明抗体每千克患者体重的剂量水平可能在人中是有用且安全的。例如,大鼠和小鼠中0.5-5mg/kg在急性病情中是有效的剂量。因此,对于长期给药而言,基于预期的21天半衰期,可以对人施用0.3-10mg/kg。剂量对于功效而言可以是足够的,即使足够低以助于最佳施用。例如,低于50mg的剂量有助于皮下施用。可以使用静脉内施用作为针对一些疾病的递送途径,其中可能需要高剂量和长给药间隔。皮下注射能增加对于产品的潜在免疫响应。对局部疾病的局部施用能降低产品的施用量和增加作用部位处的浓度,其能提高安全性。

[0131] 本发明的经修饰的IgG抗体可以通过注射施用,例如皮下、静脉内、腔内(例如在肿瘤切除后)、病损内(intralesionally)、腹膜内、或肌内注射。经修饰的IgG抗体还可以通过吸入或局部地(例如眼内、鼻内、直肠、伤口中、皮肤上)、或口服递送。

[0132] 经修饰的IgG抗体通常会以药物组合物的形式施用,所述药物组合物可以包含除经修饰的IgG抗体外的至少一个组分。因此药物组合物可以包含药学可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或其他本领域技术人员所熟知的材料。此类材料应当是无毒的且应当不干扰活性成分的功效。此类材料可以包括例如任何及所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂、和吸收延迟剂。药学可接受的载体的一些例子是水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等等,及其组合。在许多情况下,其优选的是包括组合物中的等渗剂,例如糖、多元醇、如甘露醇、山梨醇,或氯化钠。药学可接受的物质的其他例子是润湿剂或辅助物质,如乳化剂、防腐剂、或缓冲剂,其增加储藏期或有效性。

[0133] 载体或其他材料的准确性质取决于施用途径。对于静脉内注射或在患处的注射而言,活性成分会是非经肠的可接受水溶液形式,其是无热原的且具有合适的pK、等渗性、和稳定性。本领域那些相关技术能很好地制备合适的溶液,例如用等渗介质(如氯化钠注射液、林格氏注射液(Ringer's injection)、和乳酸林格氏注射液)来制备。可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。

[0134] 可以将经修饰的IgG抗体配制于液体、半固体、或固体形式中,如液体溶液(例如可注射和可输注(infusible)溶液)、分散液或悬浮液、粉剂、脂质体、和栓剂。优选的形式取决于意欲施用的模式、治疗应用、分子的理化特性、以及递送途径。配制物可以包括赋形剂、或赋形剂的组合,例如:糖、氨基酸和表面活性剂。液体配制物可以包括广范围的经修饰的IgG抗体浓度和pH。固体配制物可以通过例如冻干法、喷雾干燥、或通过超临界流体技术的干燥来生产。

[0135] 可以将治疗组合物配制为溶液、微乳液、分散液、脂质体、或其他适于高药物浓度的有序结构。可以通过将经修饰的IgG抗体与上述成分的一个或其组合合并于合适的溶剂中,然后过滤除菌,来制备无菌注射液。通常,通过将活性化合物并入含有基本分散介质和其他来自上述的成分的无菌介质中,来制备分散液。对于用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况,优选的制备方法是真空干燥法和冻干法,其从其先前经无菌过滤的溶液产出活性成分加任何额外想要的成分的粉末。例如,可以通过使用涂层(如卵磷脂)、通过维持分散液的粒度、或通过使用表面活性剂来维持溶液的适当流动性。对注射组合物的延长的吸收可以通过将延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸盐和明胶)包含于组合物中来触发。

[0136] 在一些实施方案中,可以将活性化合物与载体制备在一起,所述载体会保护经修饰的IgG抗体不被快速释放,如控释制剂,包括移植物、透皮贴片、和微囊化的递送系统。可以使用生物可降解的、生物可相容的聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酞类、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯类、和聚乳酸。许多用于制备此类制剂的方法是获得了专利的或是本领域技术人员普遍知晓的。

[0137] 使用经修饰的IgG抗体的方法可以包括引起或允许对TGFβ的结合。这种结合可以在体内发生,例如在对患者施用经修饰的IgG抗体后发生,或其可以在体外发生,例如在ELISA、Western印迹、免疫细胞化学法、免疫沉淀法、亲和色谱法、或基于细胞的测定中发生,或在基于离体的治疗方法中发生,例如这样的方法,其中将细胞或体液离体地与经修饰的IgG抗体接触然后施用于患者。

[0138] 提供了包含经修饰的IgG抗体的套盒。可以对经修饰的IgG抗体进行标记以允许其在要确定的样品中的反应性。例如,可以在诊断分析中采用所述套盒。套盒可以含有用于使用组分的说明。用于帮助此种方法或使其能够实施的辅助材料可以包含在套盒内。

[0139] 经修饰的IgG抗体在样品中的反应性可以通过任何合适的方法来确定,例如放射免疫测定法(RIA)。可以将带放射性标记的抗原与未标记的抗原(测试样品)混合并允许其结合至经修饰的IgG抗体。将结合的抗原与未结合的抗原物理性地分离,并确定结合至经修饰的IgG抗体的放射性抗原的量。也可以用非放射性抗原来使用竞争性结合测定,其使用连接至报告分子的抗原或类似物。所述报告分子可以是荧光染料、磷光体(phosphor)、或染料。合适的荧光染料包括荧光素、罗丹明、藻红蛋白、和德州红(Texas Red)。合适的发色染料包括二氨基联苯胺。

[0140] 其他报告子包括大分子胶原颗粒或微粒材料如乳胶微球(其是有色的、磁性的或顺磁性的),以及生物或化学活性剂,其能直接或间接引起可检测信号被视觉观察到、电子地检测到,或以其他方式记录到。例如,这些分子可以是催化反应的酶,所述反应显出颜色或改变颜色或是引起电特性的变化。它们可以是分子可激动性的(molecularly excitable),从而能态之间的电子跃迁导致特有的光谱吸收或发射。它们可以包括连同生

物传感器一起使用的化学实体。可以采用生物素/亲和素或生物素/链霉亲和素和碱性磷酸酶检测系统。抗体-报告子缀合物产生的信号可用于产生样品中相关抗体结合的可量化的绝对或相对数据。

[0141] 本发明还提供经修饰的IgG抗体用于测量竞争测定中的抗原水平的用途。可以将经修饰的IgG抗体连接至报告子分子,从而在结合时发生例如物理学或光学变化。报告子分子可以直接或间接地产生可检测的信号,优选为可测量的信号。报告子分子可以直接地或间接地、共价地(例如经肽键连接)或是非共价地连接。经修饰的IgG抗体和蛋白报告子可以通过肽键连接并重组表达为融合蛋白。

[0142] 本发明进一步的方面和实施方案根据本公开对于本领域技术人员而言会是明显的,所述公开包括如下实验例示。

实验例

[0143] 实施例1:在轻链拐角区中具有额外氨基酸的经修饰的IgG抗体

[0144] CAT192是TGFβ1特异性抗体,但当其从scFv转变为全长IgG4时,其大部分结合亲和力都损失了(图1)。抗体亚型和Fc形式单独不能解释这种现象,因为IgG1和IgG4 Fab二者都表现出对TGFβ1非常低的亲和力。scFv对TGFβ1的紧密结合可能是由于高柔性,所述高柔性是由连接重链和轻链Fv域的长(GGGGS)₃接头产生的。所述高柔性可能在scFv至Fab或IgG形式的转换过程中损失了。CAT192的低亲和力特征是非常慢的结合速率(on-rate)但同样非常慢的解离速率(off-rate)。缓慢的结合速率和解离速率提示CAT192和TGFβ1之间的结合可能需要潜在的构象改变(potential conformational change),其受到CAT192(IgG4)中不利氨基酸的限制。本文描述了这样的实验,所述实验经过设计以增加scFv的Fab或IgG版本的柔性/亲和力,其是通过向轻链拐角区中添加额外的氨基酸来进行的,所述轻链拐角区将抗体Fv域连接至CH1域。更具体而言,设计突变以将1个甘氨酸(G)、2个甘氨酸(GG)、2个甘氨酸和1个丝氨酸(GGS)、3个甘氨酸和1个丝氨酸(GGGS)、和4个甘氨酸及1个丝氨酸(GGGGS)序列添加至野生型轻链拐角区中,如下表2中所示,添加的氨基酸用下划线标示。

[0145] 表2:经修饰的-IgG4轻链拐角区插入突变体

[0146]	名称	位置	氨基酸序列
	WT	轻链拐角区	LEIKRTVA (SEQ ID No. 21)
	LC+G	轻链拐角区	LEIK <u>G</u> RTVA (SEQ ID No. 22)
	LC+GG	轻链拐角区	LEIK <u>GG</u> RTVA (SEQ ID No. 23)
	LC+GGS	轻链拐角区	LEIK <u>GGS</u> RTVA (SEQ ID No. 24)
	LC+GGGS	轻链拐角区	LEIK <u>GGGS</u> RTVA (SEQ ID No. 25)
	LC+GGGGS	轻链拐角区	LEIK <u>GGGGS</u> RTVA (SEQ ID No. 26)
	A25S	轻链Fv	Ala25→Ser25

[0147] 轻链氨基酸#25在scFv中是Ala,但在转变为IgG4时变为了Ser。因此,纳入了额外的A25S突变体作为对照,以测试将Ala变为Ser是否影响scFv对TGFβ1的亲和力。野生型CAT192和突变的DNA和氨基酸序列列举如下。

[0148] SEQ ID No.38:CAT192 IgG1野生型LC的氨基酸序列,拐角区用下划线标示:

[0149] EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0150] SEQ ID No.27:CAT192 (IgG1) 轻链的编码序列

[0151] atgggctggctcctgcatcatcctgtttctgggtggccacagccaccggcgtgcacagcGAGATCGTGCT
GACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCG
GCGACGACCTGGGATGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCCATCCTGCTGATCTACGGCACCAGCACACTGCAG
AGCGGCGTGCCCTCCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAACAGCCTGCAGCCCGA
GGACTTCGCCACCTACTACTGTCTGCAAGACAGCAACTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCACCCGGCTGGAAATCA
AGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTG
GTGTGTCTGCTGAACAATTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAA
CTCCCAGGAGTCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTC
AACCGGGGCGAGTGCTGA

[0152] CAT192LC+G (LEIKGRTVA)

[0153] 正向5'-ggctggaaatcaagggccgtacggtggccgc-3' (SEQ ID No.28)

[0154] 互补5'-gcggccaccgtacggcccttgatttccagcc-3' (SEQ ID No.29)

[0155] CAT192LC+GG. (LEIKGGRTVA)

[0156] 正向5'-ggctggaaatcaagggcggccgtacggtggccgc-3' (SEQ ID No.30)

[0157] 互补5'-gcggccaccgtacggccgccccttgatttccagcc-3' (SEQ ID No.31)

[0158] CAT192LC+GGS. (LEIKGGSRTVA)

[0159] 正向5'-ggctggaaatcaagggcggcagccgtacggtggccgc-3' (SEQ ID No.32)

[0160] 互补5'-gcggccaccgtacggctgccgccccttgatttccagcc-3' (SEQ ID No.33)

[0161] CAT192LC+GGGS. (LEIKGGGSRTVA)

[0162] 正向5'-ggctggaaatcaagggcggcgccagccgtacggtggccgc-3' (SEQ ID No.34)

[0163] 互补5'-gcggccaccgtacggctgccgccccttgatttccagcc-3' (SEQ ID No.35)

[0164] CAT192LC+GGGGS. (LEIKGGGGSRTVA)

[0165] 正向5'-ggctggaaatcaagggcggcgccagccgtacggtggccgc-3' (SEQ ID No.36)

[0166] 互补5'-gcggccaccgtacggctgccgcccgcgcccttgatttccagcc-3' (SEQ ID No.37)

[0167] 用Expi293F转染系统 (Life Technologies), 在24孔板规格 (4x 1mL) 中将所述5个CAT192 LC突变体以及A25S突变体和WT LC与His标签化的CAT192 HC Fab共表达。在转染后4天收获条件培养基 (CM) 并用Octet QK384仪器来计算单个测定中的表达量和TGFβ1结合。将纯化的CAT192 Fab-His用作标准曲线 (稀释2倍从100至3.125μg/mL)。将CAT192 Fab CM按1:10稀释于稀释液中, 并纳入GC1008 Fab CM作为阳性对照。在1000rpm和30℃平板处测量对抗-Fab-CH1生物传感器的结合2分钟, 用于定量和捕获。然后将所述感应器移至含有200nM的TGFβ1的孔中用于结合评估。

[0168] TGFβ1结合结果显示, 与WT的对应物相比, 每个额外的氨基酸插入增加CAT192 Fab的结合亲和力。至少2个甘氨酸的添加将结合亲和力增加至与GC1008 Fab抗体的水平相当的水平。A25S突变体显示出弱TGFβ1结合亲和力, 这与WT和纯化的重组CAT192 Fab的亲和力

相似。该结果是定性的,因为捕获至感应器的Fab的量没有针对浓度进行标准化或缓冲消减(buffer subtracted)。

[0169] 然后用PureSpeed IMAC吸头(tips)从Rainin纯化CAT192 LC Fab变体,从而精确评估对于TGFβ1的亲合力并用表面等离子体共振来确证同种型特异性。将每个样品的条件培养基分入4个孔(每个孔~800μL)并向每个孔添加~200μL平衡缓冲液,从而每个样品使用两个1mL纯化吸头(20μL树脂)。在洗脱步骤后用Amicon超滤器对这些样品进行缓冲液交换至Gibco PBS pH 7.2中,以去除咪唑。通过A280测量浓度,并将3.5μg装载于非还原的4-20%Tris-甘氨酸SDS-PAGE凝胶上并用考马斯亮蓝染色以检查纯度。CM中测试的起始材料的总体产量(yield)范围为12-42%。

[0170] 用Biacore T200仪器来评估纯化的CAT192 WT和LC突变体Fab的TGFβ结合亲合力。用胺化学将TGFβ1、TGFβ2、和TGFβ3 (124、125、和112RU) 固定化至CM5系列S芯片。对低亲合力及高亲合力结合剂二者都使用宽的浓度范围。在HBS-EP+缓冲液中将Fab从270至0.37nM稀释3倍。一式两份注射每个样品。用典型的浓度范围来确定 K_D ,以30nM作为最高浓度。Biacore结合结果与上述的Octet结果相符,即,在CAT192 LC的拐角区中添加氨基酸改进了对TGFβ1的结合亲合力。证明了随着每个额外残基的插入的一种分步式(step-wise)改进(图6)。没有CAT192 Fab LC突变体在相同条件下结合至TGFβ2或TGFβ3,这说明突变体保留了同种型选择性,而显著提高TGFβ1结合。因此,经拐角工程改造的突变体是一组新的变体,其具有同种型选择性和对TGFβ1的高亲合力结合。

[0171] 表3:经修饰的Fab的KD

[0172]	样品	K_D (nM)
	WT Fab	n/a
[0173]	LC+G Fab	n/a
	LC+GG Fab	3.32
	LC+GGS Fab	3.76
	A25S Fab	n/a

[0174] 实施例2:在重链拐角区中具有额外氨基酸的经修饰的IgG抗体

[0175] 继续描述了显示高亲合力和TGFβ1选择性结合的轻链拐角区突变体后,还设计了通过在重链拐角区中插入额外氨基酸来增加柔性/亲和力的突变体,所述重链拐角区将抗体Fv域连接至CH1域。更具体而言,设计了将1个甘氨酸(G)、2个甘氨酸(GG)、和4个甘氨酸及1个丝氨酸(GGGGS)序列添加至野生型重链拐角区中的突变体,如下表4所示,添加的氨基酸用下划线标示。

[0176] 表4:经修饰的IgG4重链拐角插入突变体

[0177]	名称	位置	氨基酸序列
	WT	重链拐角区	TVTVSSAS (SEQ ID No. 44)
	HC+G	重链拐角区	TVTVSG <u>S</u> AS (SEQ ID No. 45)
	HC+GG	重链拐角区	TVTVSGG <u>S</u> AS (SEQ ID No. 46)
	HC+GG-ST	重链拐角区	TVTVSGG <u>S</u> SA (SEQ ID No. 47)

HC+GGGS	重链拐角区	TVTVSGGGSSAS (SEQ ID No.48)
---------	-------	-----------------------------

[0178] HC+GG-ST是未预料到的来自PCR诱变过程的副产品,其按照所设计地将2个甘氨酸添加至拐角,但还在拐角区末端缺失了2个氨基酸,如通过DNA测序所验证的。这种突变体在重链拐角区中具有相同数量的氨基酸,但在拐角接头中具有不同的氨基酸组成。将其纳入作为对照,用于表征和亲和力比较。

[0179] CAT192 HC+G引物

[0180] 正向5'-ccaccgtgacagtgtcttggcagcgccagc-3'

[0181] (SEQ ID No.50)

[0182] 互补5'-gctggcgctgccagacactgtcacggtgg-3'

[0183] (SEQ ID No.51)

[0184] CAT192 HC+GG-ST引物

[0185] 正向5'-ccaccgtgacagtgtcttggcggcagcgccagc-3'

[0186] (SEQ ID No.52)

[0187] 互补5'-gctggcgctgccggcagacactgtcacggtgg-3'

[0188] (SEQ ID No.53)

[0189] CAT192 HC+GGGS引物

[0190] 正向5'-caccaccgtgacagtgtcttggcggcggcggcagcgccagca-3'

[0191] (SEQ ID No.54)

[0192] 互补5'-tgctggcgctgctgccgccggcggcagacactgtcacggtggtg-3'

[0193] (SEQ ID No.55)

[0194] CAT192 HC+GG引物

[0195] 正向5'-caccaccgtgacagtgtcttggcggcagcgccagca-3'

[0196] (SEQ ID No.59)

[0197] 互补5'-tgctggcgctgccggcagacactgtcacggtggtg-3'

[0198] (SEQ ID No.60)

[0199] 用Expi293F转染系统 (Life Technologies),在24孔板规格 (4x1mL) 中将CAT192 HC突变体与CAT192 LC Fab共表达。在转染后4天收获条件培养基,然后用PureSpeed IMAC吸头从Rainin将其纯化,从而精确评估对TGFβ1的亲和力。

[0200] 用Biacore T200仪器来评估纯化的CAT192突变体Fab的TGFβ结合亲和力,如实施例1中所述。图6中的结果显示,与轻链拐角区中的突变体相似,在CAT192重链拐角区中添加氨基酸也改进了对TGFβ1的结合亲和力。例如,CAT192 HC+GGGS突变体显示出对TGFβ1的非常高的亲和力。

[0201] 实施例3:重链和轻链组合突变体

[0202] 用Expi293F转染系统 (Life Technologies),在24孔板规格 (4x 1mL) 中,通过在重链和轻链二者的拐角区处携带突变体的DNA共转染生成了CAT192突变体。不同的组合列于表5中。

[0203] 表5:多种重链和轻链组合突变体

[0204]

WT HC WT LC	WT HC LC+G	WT HC LC+GG	WT HC LC+GGS	WT HC LC+GGGS	WT HC LC+GGGGS
HC+G WT LC	HC+G LC+G	HC+G LC+GG	HC+G LC+GGS	HC+G LC+GGGS	HC+G LC+GGGGS
HC+GG WT LC	HC+GG LC+G	HC+GG LC+GG	HC+GG LC+GGS	HC+GG LC+GGGS	HC+GG LC+GGGGS
HC+GG-ST WT LC	HC+GG-ST LC+G	HC+GG-ST LC+GG	HC+GG-ST LC+GGS	HC+GG-ST LC+GGGS	HC+GG-ST LC+GGGGS

[0205]

HC+GGGGS WT LC	HC+GGGGS LC+G	HC+GGGGS LC+GG	HC+GGGGS LC+GGS	HC+GGGGS LC+GGGS	HC+GGGGS LC+GGGGS
-------------------	------------------	-------------------	--------------------	---------------------	----------------------

[0206] 在转染后4天收获条件培养基,然后用PureSpeed IMAC吸头从Rainin将其纯化,从而精确评估对TGFβ1的亲合力。

[0207] 用Biacore T200仪器来评估纯化的CAT192突变体Fab的TGFβ结合亲合力,如实施例1中所述那样。图3中显示的结果表明,组合突变体恢复了CAT192对TGFβ1结合的高亲合力。这些突变体Fab的结合亲合力(KD)列于表6中。

[0208] 表6:重链和轻链组合突变体的TGFβ1结合亲合力(KD),由Biacore确定

[0209]

Fabs	抗原	k_a ($\times 10^5/\text{Ms}$)	k_d ($\times 10^{-4}/\text{s}$)	K_D (nM)
WT HC/WT LC	TGF β 1	n/d	n/d	>100
WT HC/LC+G	TGF β 1	0.16	10.6	66.5
WT HC/LC+GG	TGF β 1	0.70	5.69	8.1
WT HC/LC+GGS	TGF β 1	0.68	5.95	8.8
WT HC/LC+GGGS	TGF β 1	0.89	5.87	6.6
WT HC/LC+GGGGS	TGF β 1	1.18	5.83	5.0
HC+G/WT LC	TGF β 1	n/d	n/d	n/d
HC+G/LC+G	TGF β 1	1.51	6.32	4.2
HC+G/LC+GG	TGF β 1	2.36	6.64	2.8
HC+G/LC+GGS	TGF β 1	2.27	6.96	3.1
HC+G/LC+GGGS	TGF β 1	2.54	6.93	2.7
HC+G/LC+GGGGS	TGF β 1	2.62	6.90	2.6
HC+GG/WT LC	TGF β 1	0.2	5.3	31.7
HC+GG/LC+G	TGF β 1	1.1	4.9	4.4
HC+GG/LC+GG	TGF β 1	2.2	3.8	1.8
HC+GG/LC+GGS	TGF β 1	1.8	4.3	2.3
HC+GG/LC+GGGS	TGF β 1	2.4	3.7	1.5
HC+GG/LC+GGGGS	TGF β 1	2.2	3.9	1.8
HC+GG-ST/WT LC	TGF β 1	0.85	8.11	9.6
HC+GG-ST/LC+G	TGF β 1	1.31	5.87	4.5
HC+GG-ST/LC+GG	TGF β 1	2.04	6.64	3.3
HC+GG-ST/LC+GGS	TGF β 1	2.11	6.67	3.2
HC+GG-ST/LC+GGGS	TGF β 1	1.47	6.31	4.3
HC+GG-ST/LC+GGGGS	TGF β 1	2.50	7.17	2.9
HC+GGGGS/WT LC	TGF β 1	0.68	5.79	8.5
HC+GGGGS/LC+G	TGF β 1	2.21	6.77	3.1
HC+GGGGS/LC+GG	TGF β 1	2.65	7.27	2.7
HC+GGGGS/LC+GGS	TGF β 1	2.63	7.09	2.7

[0210]

HC+GGGGS/LC+GGGS	TGF β 1	2.78	7.16	2.6
HC+GGGGS/LC+GGGGS	TGF β 1	2.64	7.44	2.8
GC1008 Fab	TGF β 1	7.11	20.80	2.9

[0211] n/d=未检测到

[0212] 当对重链和轻链拐角区二者都进行工程改造时,需要较少的氨基酸插入。例如,“HC+G”和“LC+G”突变体的组合显示出对TGF β 1的非常高的亲和力结合。

[0213] 实施例4:对全长IgG4变体的亲和力和效力表征

[0214] 生成了IgG4形式的突变体以确定是否在基于A549细胞的效力测定中能证实重获的亲和力(由Biacore确定的)。将CAT192 HC Fab克隆至重链S228P IgG4主链中,以使半抗体(half-antibody)的形成最小化,然后用CAT192 IgG4 S228P HC和LC插入突变体共转染

Expi293F细胞。

[0215] 对全长CAT192 HC和LC插入突变体进行30mL转染,从而得到足够的用于生物测定的材料。用30 μ g DNA (15 μ g LC+15 μ g HC) 转染Expi293F细胞。在转染后4天收集条件培养基并通过Octet用Protein A生物传感器分析为具有约200 μ g/mL表达。然后用Hi-Trap Protein A HP柱用蠕动泵(peristaltic pump)纯化CM。以0.5mL/min将CM装载至每个柱上,用25柱体积(CV)的50mM NaPi、25mM NaCl pH 7.1 (2mL/min) 洗涤,用25CV的10mM琥珀酸钠pH 6.0 (2mL/min) 洗涤,并在3x 2mL级分中用10mM琥珀酸钠pH 3.75以1mL/min洗脱(标记为#1、#2、#3)。用0.2M NaOH中和蛋白A洗出液,并添加0.2M NaCl以得到40mM NaCl的终浓度。然后将样品浓缩并缓冲液交换至50mM NaPi, 25mM NaCl pH 7.1中。然后将这些CAT192 IgG4 S228P HC和LC插入突变体蛋白A洗出液运行于4-20%Tris甘氨酸凝胶上(图3)并通过Biacore比较其TGF β 1/TGF β 2/TGF β 3结合(图4)。Biacore结果显示纯化的CAT192 IgG4突变体确实重获了TGF β 1结合。突变体均不结合至TGF β 2或TGF β 3(图4)。

[0216] 表7:通过Biacore确定的全长IgG4变体的TGF β 1结合亲和力(KD)

	样品	[0217]		
		k_a ($\times 10^5$ /Ms)	k_d ($\times 10^{-4}$ /s)	K_D (nM)
	CAT192 IgG4 S228P	n/d	n/d	>100
	CAT192 IgG4 S228P LC+G	0.15	5.26	36.1
	CAT192 IgG4 S228P LC+GG	1.0	0.2	0.2
	CAT192 IgG4 S228P LC+GGS	0.8	2.2	2.7
	CAT192 IgG4 S228P LC+GGGS	0.6	0.6	1.0
[0218]	CAT192 IgG4 S228P LC+GGGGS	0.6	1.5	2.6
	CAT192 IgG4 S228P HC+G	0.5	2.1	4.1
	CAT192 IgG4 S228P HC+GG	1.0	2.0	2.2
	CAT192 IgG4 S228P HC+GGGGS	1.1	1.5	1.3
	CAT192 IgG4 S228P HC+GG/LC+GG	2.4	0.5	0.2

[0219] n/d=未检测到

[0220] 然后在A549细胞效力测定(Rapoza等,2006,J Immunol Methods,Vol1316,pp18)中对CAT192 IgG S228P LC插入突变体进行表征。结果(图5)显示了CAT192插入突变体中和了TGF β 1活性,如由突变体对TGF β 1刺激的IL-11生产的抑制性效果所显示的。看起来,向轻链拐角添加的2个甘氨酸足以使CAT192重获功效,如Biacore结合实验中观察到。

[0221] 实施例5:热稳定性研究

[0222] 对拐角-插入突变进行了差示扫描荧光测定(DSF),以确定重链和轻链铰链区处额外的氨基酸是如何影响了CAT192 Fab插入突变体的热稳定性的。DSF的基本原理是,随着温度增加,荧光染料结合至蛋白的疏水区,其解折迭(unfold)提供信号的增加。该方法可用限制性的样品进行,并可用于以高通量方式获得样品的相对稳定性。用Sypro橙(Sypro orange)作为荧光染料。所使用的条件是0.1mg/mL蛋白、1:4000染料比和10 μ L的总体积。结果显示,随着在拐角中添加甘氨酸,CAT192 Fab插入突变体的相对稳定性轻微降低,具有最长添加物的突变体是稳定性最低的(图7)。将T_m值总结于图7中。较长链突变体的一些的T_m值未予计算,这是由于它们的解折迭模式所致。当轻链突变体的一些从Fab转变为IgG4形式时,也观察到了所述轻微降低(图8)。

[0223] 实施例6:对CAT192 Fab变体的晶体结构确认

[0224] 对CAT192 Fab WT和3个变体的蛋白结构进行解析,以提供关于如何以可变域增加的柔性来恢复高亲和力的结构解释。

[0225] 对CAT192 HC和LC Fab插入突变体进行150mL转染以获得用于结构研究的足够材料。用150 μ g DNA (75 μ g LC+75 μ g HC) 转染Expi293F细胞。在转染后5天收集条件培养基。然后用His-Trap Excel柱纯化CM,所述柱是已用20mM NaPi pH 7.4,500mM NaCl,5mM咪唑平衡的。用20mM NaPi pH 7.4,500mM NaCl,500mM咪唑洗脱Fab蛋白并立即缓冲液交换至20mM HEPES pH 7.0,50mM NaCl中,其用大小排阻色谱柱(Superdex 200 10/300)来进行。然后将Fab浓缩至20mg/mL并在室温和4 $^{\circ}$ C二者均设立稀疏矩阵筛选。用于结构确定的所有晶体均于4 $^{\circ}$ C、以1:1的蛋白对结晶条件比获得。野生型蛋白和较低结合亲和力突变体在相似的PEG条件中(WT:12%PEG 8K/0.1M二甲胂酸钠(sodium cacodylate) pH 6/0.2M MgCl₂,CAT192 WT HC/LC+G:12%PEG 20K/0.1M MES pH 6.5,CAT192 HC+GGGS/WT LC:12%PEG 20K,0.1M MES pH 5.75)结晶于P21空间群中。高亲和力突变体(HC+GG/LC+GG)结晶于2M硫酸铵,0.1M乙酸钠pH 4.6(空间群:C2)中。

[0226] 低/中等结合亲和力变体和野生型Fab结构(HC+WT/LC+G和HC+GGGS/LC+WT)几乎是相同的(图9,A部分)。WT HC/LC+G和HC+GGGS/WT LC分别以0.516 $\text{\AA}$ 和0.538 $\text{\AA}$ 的R.M.S.D与WT CAT192重叠。在这些结构的每一个中,不对称单元中所有分子的CDRH3区的电子密度是缺失的。这揭示了该CDR对于低/中等结合亲和力突变体而言是高度柔性的。相比之下,高结合亲和力突变体(HC+GG/LC+GG)与其他CAT192 Fab结构相比表现出可变域中大的构象变化(图9,A部分)。虽然所有4个Fab之间的恒定域良好地重叠,但CAT192 HC+GG/LC+GG中的可变域与其他结构相比显著偏移(图9,B部分)。此外,HC CDR3区在高结合亲和力结构中是完全结构化的(completely structured),并且通过与LC CDR3(<3 $\text{\AA}$)相互作用而被稳定化。这四个结构根据Biacore结果表明,需要大的构象重排来恢复CAT192的高结合亲和力。

[0227] 序列表

[0228] SEQ ID No.1:人IgG1 VH域克隆SL15(SQN4 US6492497)

[0229] EVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSYDTPQYSWGQGTTVTVSS

[0230] SEQ ID No.2:人IgG1 VH域克隆JT182(SQN10 US6492497)

[0231] QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSYDTPASPDWGQGTTVTVSS

[0232] SEQ ID No.3:人IgG1 V κ 域克隆SL15A:(SQN6 US6492497)

[0233] EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

[0234] SEQ ID No.4:人IgG1 V κ 域克隆SL15S:(SQN8 US6492497)

[0235] EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

[0236] SEQ ID No.5:人IgG1铰链区

[0237] PKSCDKTHTCPPCPAPELLGPP

[0238] SEQ ID No.6:人IgG1 Fc区

[0239] SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0240] SEQ ID No.7

[0241] SYGMH

[0242] SEQ ID No.8

[0243] VISYDGSIKYYADSVKG

[0244] SEQ ID No.9

[0245] TGEYSGYDTSGVEL

[0246] SEQ ID No.10

[0247] TGEYSGYDTPQYS

[0248] SEQ ID No.11

[0249] TGFYSGYDTPASPD

[0250] SEQ ID No.12

[0251] RASQGIGDDL

[0252] SEQ ID No.13

[0253] GTSTLQS

[0254] SEQ ID No.14

[0255] LQDSNYPLT

[0256] SEQ ID No.15

[0257] TGX₁YSGYDTX₂X₃X₄X₅X₆

[0258] SEQ ID No.16:CAT192 (IgG4) 轻链

[0259] EWLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0260] SEQ ID No.17:CAT192 (IgG4) 重链

[0261] EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTPQYSWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES
KYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMSHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0262] SEQ ID No.18:CAT192 (IgG4) S228P重链

[0263] EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTPQYSWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES
KYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP

SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0264] SEQ ID No.19:CAT191 (scFv)

[0265] EVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTPQYSWGQGTTTVTVSSSGGSGGGSGGGGSEIVLTQSP
SSLSASVGDRTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFAT
YYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

[0266] SEQ ID No.20:人TGFβ1

[0267] ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHN
PGASAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

[0268] SEQ ID No.21:CAT192 IgG4野生型LC拐角区

[0269] LEIKRTVA

[0270] SEQ ID No.22:具有1个插入的额外氨基酸的突变的LC拐角区

[0271] LEIKGRTVA

[0272] SEQ ID No.23:具有2个插入的额外氨基酸的突变的LC拐角区

[0273] LEIKGGRTVA

[0274] SEQ ID No.24:具有3个插入的额外氨基酸的突变的LC拐角区

[0275] LEIKGGSRTVA

[0276] SEQ ID No.25:具有4个插入的额外氨基酸的突变的LC拐角区

[0277] LEIKGGGSRTVA

[0278] SEQ ID No.26:具有5个插入的额外氨基酸的突变的LC拐角区

[0279] LEIKGGGGSRTVA

[0280] SEQ ID No.27:CAT192 (IgG1) 轻链的编码序列

[0281] atgggctggtcctgcatcatcctgtttctggtggccacagccaccggcgtgcacagcGAGATCGTGCT
GACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCG
GCGACGACCTGGGATGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCCATCCTGCTGATCTACGGCACCAGCACACTGCAG
AGCGGCGTGCCCTCCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAACAGCCTGCAGCCCGA
GGACTTCGCCACCTACTACTGTCTGCAAGACAGCAACTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCACCCGGCTGGAAATCA
AGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTG
GTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAA
CTCCCAGGAGTCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTC
AACCGGGCGAGTGCTGA

[0282] SEQ ID No.28:CAT192LC+G (LEIKGRTVA), 正向

[0283] 5'-ggctggaaatcaagggcgcgtacggtggccgc-3'

[0284] SEQ ID No.29:CAT192LC+G (LEIKGRTVA), 互补

[0285] 5'-gcggccaccgtacggcccttgatttccagcc-3'

[0286] SEQ ID No.30:CAT192LC+GG (LEIKGGRTVA), 正向

[0287] 5'-ggctggaaatcaagggcggccgtacggtggccgc-3'

[0288] SEQ ID No.31:CAT192LC+GG (LEIKGGRTVA), 互补

- [0289] 5'-gcggccaccgtacggcgcccttgatttccagcc-3'
- [0290] SEQ ID No.32:CAT192LC+GGG (LEIKGGSRTVA), 正向
- [0291] 5'-ggctggaaatcaagggcggcagccgtacggtggccgc-3'
- [0292] SEQ ID No.33:CAT192LC+GGG (LEIKGGSRTVA), 互补
- [0293] 5'-gcggccaccgtacggctgccgcccttgatttccagcc-3'
- [0294] SEQ ID No.34:CAT192LC+GGG (LEIKGGSRTVA), 正向
- [0295] 5'-ggctggaaatcaagggcggcggcagccgtacggtggccgc-3'
- [0296] SEQ ID No.35:CAT192LC+GGG (LEIKGGSRTVA), 互补
- [0297] 5'-gcggccaccgtacggctgccgcccttgatttccagcc-3'
- [0298] SEQ ID No.36:CAT192LC+GGG (LEIKGGSRTVA), 正向
- [0299] 5'-ggctggaaatcaagggcggcggcagccgtacggtggccgc-3'
- [0300] SEQ ID No.37:CAT192LC+GGG (LEIKGGSRTVA), 互补
- [0301] 5'-gcggccaccgtacggctgccgcccttgatttccagcc-3'
- [0302] SEQ ID No.38:CAT192 IgG1野生型LC
- [0303] EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0304] SEQ ID No.39:具有1个插入的额外氨基酸的突变的轻链
- [0305] EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0306] SEQ ID No.40:具有2个插入的额外氨基酸的突变的轻链
- [0307] EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0308] SEQ ID No.41:具有3个插入的额外氨基酸的突变的轻链
- [0309] EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0310] SEQ ID No.42:具有4个插入的额外氨基酸的突变的轻链
- [0311] EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0312] SEQ ID No.43:具有5个插入的额外氨基酸的突变的轻链
- [0313] EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0314] SEQ ID No.44:CAT192 IgG4野生型HC拐角区
- [0315] TVTVSSAS

- [0316] SEQ ID No.45:具有1个插入的额外氨基酸的突变的HC拐角区
- [0317] TVTVSGSAS
- [0318] SEQ ID No.46:具有2个插入的额外氨基酸的突变的HC拐角区
- [0319] TVTVSGGSAS
- [0320] SEQ ID No.47:具有2个插入的额外氨基酸且缺失了1个氨基酸的突变的HC拐角区
- [0321] TVTVSGGSA
- [0322] SEQ ID No.48:具有5个插入的额外氨基酸的突变的HC拐角区
- [0323] TVTVSGGGSSAS
- [0324] SEQ ID No.49:CAT192 IgG4野生型HC的编码序列
- [0325] ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCCTCTGAAGTGCAGCTG
GTGGAATCTGGCGGCGGAGTGGTGCAGCCTGGCAGAAAGCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAG
CAGCTACGGAATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCAAAGAACTGGAATGGGTGGCCGTGATCAGCTACGACGGCA
GCATCAAGTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTG
CAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTAGAACCGGCGAGTACAGCGGCTACGACAC
CGACCCTCAGTACTCTTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTAGCGCCAGCACCAAGGGCCCAAGCGTGTTC
CTCTGGCCCCTTGCAGCAGAAGCACCAGCGAATCTACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCGAG
CCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCATACCTTTCCAGCCGTGTGCAGAGCAGCGG
CCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACTGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGACC
ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGCATCACCAACCACCATCAC
- [0326] SEQ ID No.50:CAT192HC+G (TVTVSGSAS), 正向
- [0327] 5'-ccaccgtgacagtgtctggcagcgccagc-3'
- [0328] SEQ ID No.51:CAT192HC+G (TVTVSGSAS), 互补
- [0329] 5'-gctggcgctgccagacactgtcacggtgg-3'
- [0330] SEQ ID No.52:CAT192HC+GG-ST (TVTVSGGSA), 正向
- [0331] 5'-ccaccgtgacagtgtctggcgccagcgccagc-3'
- [0332] SEQ ID No.53:CAT192HC+GG-ST (TVTVSGGSA), 互补
- [0333] 5'-gctggcgctgccgcccagacactgtcacggtgg-3'
- [0334] SEQ ID No.54:CAT192HC+GGGS (TVTVSGGGSSAS), 正向
- [0335] 5'-caccaccgtgacagtgtctggcgccgcccagcagcgccagca-3'
- [0336] SEQ ID No.55:CAT192HC+GGGS (TVTVSGGGSSAS), 互补
- [0337] 5'-tgctggcgctgctgccgcccagacactgtcacggtggtg-3'
- [0338] SEQ ID No.56:具有1个插入的额外氨基酸的突变的重链
- [0339] EVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARTGEYSYDTPDQYSWGQGTTTVTVSGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0340] SEQ ID No.57:具有2个插入的额外氨基酸且缺失了2个氨基酸的突变的重链

[0341] EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTPQYSWGQGTTTVTVSGGS⁵AKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNV¹⁰FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0342] SEQ ID No.58:具有5个插入的额外氨基酸的突变的重链

[0343] EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTPQYSWGQGTTTVTVSGGG⁵SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNV¹⁰FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0344] SEQ ID No.59:CAT192HC+GG (TVTVSGGSAS), 正向

[0345] 5'-caccaccgtgacagtgtctggcggcagcgccagca-3'

[0346] SEQ ID No.60:CAT192HC+GG (TVTVSGGSAS), 互补

[0347] 5'-tgctggcgctgcccagacactgtcacgggtggtg-3'

[0348] SEQ ID No.61:具有2个插入的额外氨基酸的突变的重链

[0349] EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTPQYSWGQGTTTVTVSGGS⁵ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNV¹⁰FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0001]	序列表
[0002]	<110> 邱华伟
[0003]	J·博德
[0004]	<120> 以高亲和力、亲和性及特异性结合转化生长因子- β 1的经修饰的IgG抗体
[0005]	<130> 578941
[0006]	<150> 62/128,149
[0007]	<151> 2015-03-04
[0008]	<160> 61
[0009]	<170> PatentIn版本3.5
[0010]	<210> 1
[0011]	<211> 123
[0012]	<212> PRT
[0013]	<213> 人(Homo sapiens)
[0014]	<400> 1
[0015]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
[0016]	1 5 10 15
[0017]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0018]	20 25 30
[0019]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val
[0020]	35 40 45
[0021]	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0022]	50 55 60
[0023]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0024]	65 70 75 80
[0025]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0026]	85 90 95
[0027]	Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser
[0028]	100 105 110
[0029]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0030]	115 120
[0031]	<210> 2
[0032]	<211> 123
[0033]	<212> PRT
[0034]	<213> 人(Homo sapiens)
[0035]	<400> 2
[0036]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
[0037]	1 5 10 15
[0038]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

[0039]	20	25	30
[0040]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val		
[0041]	35	40	45
[0042]	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0043]	50	55	60
[0044]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0045]	65	70	75
[0046]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0047]	85	90	95
[0048]	Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Pro Ala Ser Pro Asp		
[0049]	100	105	110
[0050]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0051]	115	120	
[0052]	<210> 3		
[0053]	<211> 107		
[0054]	<212> PRT		
[0055]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0056]	<400> 3		
[0057]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0058]	1	5	10
[0059]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp		
[0060]	20	25	30
[0061]	Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Ile Leu Leu Ile		
[0062]	35	40	45
[0063]	Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0064]	50	55	60
[0065]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro		
[0066]	65	70	75
[0067]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu		
[0068]	85	90	95
[0069]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys		
[0070]	100	105	
[0071]	<210> 4		
[0072]	<211> 107		
[0073]	<212> PRT		
[0074]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0075]	<400> 4		
[0076]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0077]	1	5	10

[0078]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp
[0079]	20 25 30
[0080]	Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Ile Leu Leu Ile
[0081]	35 40 45
[0082]	Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0083]	50 55 60
[0084]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
[0085]	65 70 75 80
[0086]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu
[0087]	85 90 95
[0088]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
[0089]	100 105
[0090]	<210> 5
[0091]	<211> 22
[0092]	<212> PRT
[0093]	<213> 人(Homo sapiens)
[0094]	<400> 5
[0095]	Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[0096]	1 5 10 15
[0097]	Glu Leu Leu Gly Gly Pro
[0098]	20
[0099]	<210> 6
[0100]	<211> 209
[0101]	<212> PRT
[0102]	<213> 人(Homo sapiens)
[0103]	<400> 6
[0104]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[0105]	1 5 10 15
[0106]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
[0107]	20 25 30
[0108]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[0109]	35 40 45
[0110]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[0111]	50 55 60
[0112]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[0113]	65 70 75 80
[0114]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
[0115]	85 90 95
[0116]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

[0117]	100	105	110
[0118]	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
[0119]	115	120	125
[0120]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
[0121]	130	135	140
[0122]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
[0123]	145	150	155
[0124]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
[0125]	165	170	175
[0126]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
[0127]	180	185	190
[0128]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0129]	195	200	205
[0130]	Lys		
[0131]	<210> 7		
[0132]	<211> 5		
[0133]	<212> PRT		
[0134]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0135]	<400> 7		
[0136]	Ser Tyr Gly Met His		
[0137]	1	5	
[0138]	<210> 8		
[0139]	<211> 17		
[0140]	<212> PRT		
[0141]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0142]	<400> 8		
[0143]	Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
[0144]	1	5	10
[0145]	Gly		
[0146]	<210> 9		
[0147]	<211> 14		
[0148]	<212> PRT		
[0149]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0150]	<400> 9		
[0151]	Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Ser Gly Val Glu Leu		
[0152]	1	5	10
[0153]	<210> 10		
[0154]	<211> 14		
[0155]	<212> PRT		

[0156] <213> 人 (Homo sapiens)
[0157] <400> 10
[0158] Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser
[0159] 1 5 10
[0160] <210> 11
[0161] <211> 14
[0162] <212> PRT
[0163] <213> 人 (Homo sapiens)
[0164] <400> 11
[0165] Thr Gly Phe Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Pro Ala Ser Pro Asp
[0166] 1 5 10
[0167] <210> 12
[0168] <211> 11
[0169] <212> PRT
[0170] <213> 人 (Homo sapiens)
[0171] <400> 12
[0172] Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp Leu Gly
[0173] 1 5 10
[0174] <210> 13
[0175] <211> 7
[0176] <212> PRT
[0177] <213> 人 (Homo sapiens)
[0178] <400> 13
[0179] Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser
[0180] 1 5
[0181] <210> 14
[0182] <211> 9
[0183] <212> PRT
[0184] <213> 人 (Homo sapiens)
[0185] <400> 14
[0186] Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr
[0187] 1 5
[0188] <210> 15
[0189] <211> 14
[0190] <212> PRT
[0191] <213> 人 (Homo sapiens)
[0192] <220>
[0193] <221> misc_feature
[0194] <222> (3) .. (3)

[0195]	<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
[0196]	<220>
[0197]	<221> misc_feature
[0198]	<222> (10) .. (14)
[0199]	<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
[0200]	<400> 15
[0201]	Thr Gly Xaa Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
[0202]	1 5 10
[0203]	<210> 16
[0204]	<211> 213
[0205]	<212> PRT
[0206]	<213> 人(Homo sapiens)
[0207]	<400> 16
[0208]	Glu Trp Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
[0209]	1 5 10 15
[0210]	Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp Leu
[0211]	20 25 30
[0212]	Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Ile Leu Leu Ile Tyr
[0213]	35 40 45
[0214]	Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
[0215]	50 55 60
[0216]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu
[0217]	65 70 75 80
[0218]	Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr
[0219]	85 90 95
[0220]	Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
[0221]	100 105 110
[0222]	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
[0223]	115 120 125
[0224]	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
[0225]	130 135 140
[0226]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
[0227]	145 150 155 160
[0228]	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
[0229]	165 170 175
[0230]	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
[0231]	180 185 190
[0232]	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
[0233]	195 200 205

[0234]	Asn Arg Gly Glu Cys
[0235]	210
[0236]	<210> 17
[0237]	<211> 450
[0238]	<212> PRT
[0239]	<213> 人(Homo sapiens)
[0240]	<400> 17
[0241]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
[0242]	1 5 10 15
[0243]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0244]	20 25 30
[0245]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val
[0246]	35 40 45
[0247]	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0248]	50 55 60
[0249]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0250]	65 70 75 80
[0251]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0252]	85 90 95
[0253]	Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser
[0254]	100 105 110
[0255]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
[0256]	115 120 125
[0257]	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
[0258]	130 135 140
[0259]	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
[0260]	145 150 155 160
[0261]	Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
[0262]	165 170 175
[0263]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
[0264]	180 185 190
[0265]	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
[0266]	195 200 205
[0267]	Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
[0268]	210 215 220
[0269]	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
[0270]	225 230 235 240
[0271]	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
[0272]	245 250 255

[0273]	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu		
[0274]	260	265	270
[0275]	Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
[0276]	275	280	285
[0277]	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg		
[0278]	290	295	300
[0279]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
[0280]	305	310	315
[0281]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu		
[0282]	325	330	335
[0283]	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
[0284]	340	345	350
[0285]	Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
[0286]	355	360	365
[0287]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
[0288]	370	375	380
[0289]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
[0290]	385	390	395
[0291]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp		
[0292]	405	410	415
[0293]	Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
[0294]	420	425	430
[0295]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu		
[0296]	435	440	445
[0297]	Gly Lys		
[0298]	450		
[0299]	<210> 18		
[0300]	<211> 450		
[0301]	<212> PRT		
[0302]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0303]	<400> 18		
[0304]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
[0305]	1	5	10
[0306]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0307]	20	25	30
[0308]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val		
[0309]	35	40	45
[0310]	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0311]	50	55	60

[0312]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0313]	65 70 75 80
[0314]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0315]	85 90 95
[0316]	Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser
[0317]	100 105 110
[0318]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
[0319]	115 120 125
[0320]	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
[0321]	130 135 140
[0322]	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
[0323]	145 150 155 160
[0324]	Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
[0325]	165 170 175
[0326]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
[0327]	180 185 190
[0328]	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
[0329]	195 200 205
[0330]	Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
[0331]	210 215 220
[0332]	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
[0333]	225 230 235 240
[0334]	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
[0335]	245 250 255
[0336]	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
[0337]	260 265 270
[0338]	Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
[0339]	275 280 285
[0340]	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
[0341]	290 295 300
[0342]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
[0343]	305 310 315 320
[0344]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
[0345]	325 330 335
[0346]	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
[0347]	340 345 350
[0348]	Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
[0349]	355 360 365
[0350]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

[0351]	370	375	380
[0352]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
[0353]	385	390	395
[0354]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp		
[0355]	405	410	415
[0356]	Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
[0357]	420	425	430
[0358]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu		
[0359]	435	440	445
[0360]	Gly Lys		
[0361]	450		
[0362]	<210> 19		
[0363]	<211> 245		
[0364]	<212> PRT		
[0365]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0366]	<400> 19		
[0367]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
[0368]	1	5	10
[0369]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0370]	20	25	30
[0371]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val		
[0372]	35	40	45
[0373]	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0374]	50	55	60
[0375]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0376]	65	70	75
[0377]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0378]	85	90	95
[0379]	Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser		
[0380]	100	105	110
[0381]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser		
[0382]	115	120	125
[0383]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln		
[0384]	130	135	140
[0385]	Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr		
[0386]	145	150	155
[0387]	Cys Arg Ser Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp Leu Gly Trp Tyr Gln Gln		
[0388]	165	170	175
[0389]	Lys Pro Gly Lys Ala Pro Ile Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Ser Thr Leu		

[0390]	180	185	190
[0391]	Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp		
[0392]	195	200	205
[0393]	Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr		
[0394]	210	215	220
[0395]	Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr		
[0396]	225	230	235
[0397]	Arg Leu Glu Ile Lys		
[0398]	245		
[0399]	<210> 20		
[0400]	<211> 112		
[0401]	<212> PRT		
[0402]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0403]	<400> 20		
[0404]	Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys		
[0405]	1	5	10
[0406]	Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp		
[0407]	20	25	30
[0408]	Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys		
[0409]	35	40	45
[0410]	Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu		
[0411]	50	55	60
[0412]	Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro		
[0413]	65	70	75
[0414]	Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro		
[0415]	85	90	95
[0416]	Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser		
[0417]	100	105	110
[0418]	<210> 21		
[0419]	<211> 8		
[0420]	<212> PRT		
[0421]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0422]	<400> 21		
[0423]	Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala		
[0424]	1	5	
[0425]	<210> 22		
[0426]	<211> 9		
[0427]	<212> PRT		
[0428]	<213> 人(Homo sapiens)		

[0429]	<400> 22		
[0430]	Leu Glu Ile Lys Gly Arg Thr Val Ala		
[0431]	1	5	
[0432]	<210> 23		
[0433]	<211> 10		
[0434]	<212> PRT		
[0435]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0436]	<400> 23		
[0437]	Leu Glu Ile Lys Gly Gly Arg Thr Val Ala		
[0438]	1	5	10
[0439]	<210> 24		
[0440]	<211> 11		
[0441]	<212> PRT		
[0442]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0443]	<400> 24		
[0444]	Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala		
[0445]	1	5	10
[0446]	<210> 25		
[0447]	<211> 12		
[0448]	<212> PRT		
[0449]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0450]	<400> 25		
[0451]	Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala		
[0452]	1	5	10
[0453]	<210> 26		
[0454]	<211> 13		
[0455]	<212> PRT		
[0456]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0457]	<400> 26		
[0458]	Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala		
[0459]	1	5	10
[0460]	<210> 27		
[0461]	<211> 702		
[0462]	<212> DNA		
[0463]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0464]	<400> 27		
[0465]	atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccacag ccaccggcgt gcacagcgag	60	
[0466]	atcgtgctga cacagagccc cagcagcctg tctgccagcg tgggcgacag agtgaccatc	120	
[0467]	acctgtagag ccagccaggg catcggcgac gacctgggat ggtatcagca gaagcctggc	180	

[0468] aaggccccca tcctgctgat ctacggcacc agcacactgc agagcggcgt gccctccaga 240
 [0469] ttttctggca gcggtccgg caccgacttc accctgacca tcaacagcct gcagcccgag 300
 [0470] gacttcgcca cctactactg tctgcaagac agcaactacc ccctgacctt cggcggaggc 360
 [0471] acccggtgg aaatcaagcg tacggtggcc gctccttcg tggtcatctt ccctccctcc 420
 [0472] gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgtc tgctgaacaa cttctaccct 480
 [0473] cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtcggcaa ctcccaggag 540
 [0474] tccgtcaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgctcctccac cctgaccctg 600
 [0475] tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgtg aggtgaccca ccagggcctg 660
 [0476] tccagccctg tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtgtc ga 702
 [0477] <210> 28
 [0478] <211> 31
 [0479] <212> DNA
 [0480] <213> 人(Homo sapiens)
 [0481] <400> 28
 [0482] ggctggaaat caagggccgt acggtggccg c 31
 [0483] <210> 29
 [0484] <211> 31
 [0485] <212> DNA
 [0486] <213> 人(Homo sapiens)
 [0487] <400> 29
 [0488] gcggccaccg tacggccctt gatttccagc c 31
 [0489] <210> 30
 [0490] <211> 34
 [0491] <212> DNA
 [0492] <213> 人(Homo sapiens)
 [0493] <400> 30
 [0494] ggctggaaat caagggcggc cgtacgttg ccgc 34
 [0495] <210> 31
 [0496] <211> 34
 [0497] <212> DNA
 [0498] <213> 人(Homo sapiens)
 [0499] <400> 31
 [0500] gcggccaccg tacggccgcc cttgatttcc agcc 34
 [0501] <210> 32
 [0502] <211> 37
 [0503] <212> DNA
 [0504] <213> 人(Homo sapiens)
 [0505] <400> 32
 [0506] ggctggaaat caagggcggc agccgtacgg tggccgc 37

[0507]	<210>	33	
[0508]	<211>	37	
[0509]	<212>	DNA	
[0510]	<213>	人 (Homo sapiens)	
[0511]	<400>	33	
[0512]		gcggccaccg tacggctgcc gcccttgatt tccagcc	37
[0513]	<210>	34	
[0514]	<211>	40	
[0515]	<212>	DNA	
[0516]	<213>	人 (Homo sapiens)	
[0517]	<400>	34	
[0518]		ggctggaaat caagggcggc ggcagccgta cgggtggccgc	40
[0519]	<210>	35	
[0520]	<211>	40	
[0521]	<212>	DNA	
[0522]	<213>	人 (Homo sapiens)	
[0523]	<400>	35	
[0524]		gcggccaccg tacggctgcc gccgcccttg atttccagcc	40
[0525]	<210>	36	
[0526]	<211>	43	
[0527]	<212>	DNA	
[0528]	<213>	人 (Homo sapiens)	
[0529]	<400>	36	
[0530]		ggctggaaat caagggcggc ggcggcagcc gtacggtggc cgc	43
[0531]	<210>	37	
[0532]	<211>	43	
[0533]	<212>	DNA	
[0534]	<213>	人 (Homo sapiens)	
[0535]	<400>	37	
[0536]		gcggccaccg tacggctgcc gccgccgccc ttgatttcca gcc	43
[0537]	<210>	38	
[0538]	<211>	214	
[0539]	<212>	PRT	
[0540]	<213>	人 (Homo sapiens)	
[0541]	<400>	38	
[0542]		Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0543]		1 5 10 15	
[0544]		Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp	
[0545]		20 25 30	

[0546]	Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Ile Leu Leu Ile		
[0547]	35	40	45
[0548]	Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0549]	50	55	60
[0550]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro		
[0551]	65	70	75
[0552]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu		
[0553]	85	90	95
[0554]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
[0555]	100	105	110
[0556]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
[0557]	115	120	125
[0558]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
[0559]	130	135	140
[0560]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
[0561]	145	150	155
[0562]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
[0563]	165	170	175
[0564]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
[0565]	180	185	190
[0566]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
[0567]	195	200	205
[0568]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0569]	210		
[0570]	<210> 39		
[0571]	<211> 215		
[0572]	<212> PRT		
[0573]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0574]	<400> 39		
[0575]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0576]	1	5	10
[0577]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp		
[0578]	20	25	30
[0579]	Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Ile Leu Leu Ile		
[0580]	35	40	45
[0581]	Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0582]	50	55	60
[0583]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro		
[0584]	65	70	75

[0585]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu		
[0586]		85	90
[0587]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Arg Thr Val Ala		
[0588]		100	105
[0589]	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser		
[0590]		115	120
[0591]	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu		
[0592]		130	135
[0593]	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser		
[0594]	145	150	155
[0595]	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
[0596]		165	170
[0597]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
[0598]		180	185
[0599]	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys		
[0600]		195	200
[0601]	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0602]		210	215
[0603]	<210> 40		
[0604]	<211> 216		
[0605]	<212> PRT		
[0606]	<213> 人(Homo sapiens)		
[0607]	<400> 40		
[0608]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0609]	1	5	10
[0610]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp		
[0611]		20	25
[0612]	Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Ile Leu Leu Ile		
[0613]		35	40
[0614]	Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0615]		50	55
[0616]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro		
[0617]	65	70	75
[0618]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu		
[0619]		85	90
[0620]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Arg Thr Val		
[0621]		100	105
[0622]	Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys		
[0623]		115	120

[0624]	Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
[0625]	130 135 140
[0626]	Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
[0627]	145 150 155 160
[0628]	Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
[0629]	165 170 175
[0630]	Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
[0631]	180 185 190
[0632]	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
[0633]	195 200 205
[0634]	Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0635]	210 215
[0636]	<210> 41
[0637]	<211> 217
[0638]	<212> PRT
[0639]	<213> 人(Homo sapiens)
[0640]	<400> 41
[0641]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0642]	1 5 10 15
[0643]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp
[0644]	20 25 30
[0645]	Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Ile Leu Leu Ile
[0646]	35 40 45
[0647]	Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0648]	50 55 60
[0649]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
[0650]	65 70 75 80
[0651]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu
[0652]	85 90 95
[0653]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Arg Thr
[0654]	100 105 110
[0655]	Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
[0656]	115 120 125
[0657]	Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
[0658]	130 135 140
[0659]	Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
[0660]	145 150 155 160
[0661]	Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
[0662]	165 170 175

[0663]	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His
[0664]					180					185					190	
[0665]	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
[0666]					195					200					205	
[0667]	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
[0668]					210					215						
[0669]	<210>	42														
[0670]	<211>	218														
[0671]	<212>	PRT														
[0672]	<213>	人 (Homo sapiens)														
[0673]	<400>	42														
[0674]	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[0675]	1				5					10					15	
[0676]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Gly	Asp	Asp
[0677]					20					25					30	
[0678]	Leu	Gly	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Ile	Leu	Leu	Ile
[0679]					35					40					45	
[0680]	Tyr	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[0681]					50					55					60	
[0682]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Pro
[0683]	65					70					75				80	
[0684]	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Asp	Ser	Asn	Tyr	Pro	Leu
[0685]					85					90					95	
[0686]	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg
[0687]					100					105					110	
[0688]	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
[0689]					115					120					125	
[0690]	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
[0691]					130					135					140	
[0692]	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
[0693]	145					150					155				160	
[0694]	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
[0695]					165					170					175	
[0696]	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
[0697]					180					185					190	
[0698]	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
[0699]					195					200					205	
[0700]	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
[0701]					210					215						

[0702] <210> 43
 [0703] <211> 219
 [0704] <212> PRT
 [0705] <213> 人(Homo sapiens)
 [0706] <400> 43
 [0707] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0708] 1 5 10 15
 [0709] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp
 [0710] 20 25 30
 [0711] Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Ile Leu Leu Ile
 [0712] 35 40 45
 [0713] Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0714] 50 55 60
 [0715] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 [0716] 65 70 75 80
 [0717] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu
 [0718] 85 90 95
 [0719] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 [0720] 100 105 110
 [0721] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 [0722] 115 120 125
 [0723] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 [0724] 130 135 140
 [0725] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 [0726] 145 150 155 160
 [0727] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 [0728] 165 170 175
 [0729] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 [0730] 180 185 190
 [0731] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 [0732] 195 200 205
 [0733] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [0734] 210 215
 [0735] <210> 44
 [0736] <211> 8
 [0737] <212> PRT
 [0738] <213> 人(Homo sapiens)
 [0739] <400> 44
 [0740] Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

[0741]	1	5	
[0742]	<210>	45	
[0743]	<211>	9	
[0744]	<212>	PRT	
[0745]	<213>	人 (Homo sapiens)	
[0746]	<400>	45	
[0747]	Thr Val Thr Val Ser Gly Ser Ala Ser		
[0748]	1	5	
[0749]	<210>	46	
[0750]	<211>	10	
[0751]	<212>	PRT	
[0752]	<213>	人 (Homo sapiens)	
[0753]	<400>	46	
[0754]	Thr Val Thr Val Ser Gly Gly Ser Ala Ser		
[0755]	1	5	10
[0756]	<210>	47	
[0757]	<211>	9	
[0758]	<212>	PRT	
[0759]	<213>	人 (Homo sapiens)	
[0760]	<400>	47	
[0761]	Thr Val Thr Val Ser Gly Gly Ser Ala		
[0762]	1	5	
[0763]	<210>	48	
[0764]	<211>	13	
[0765]	<212>	PRT	
[0766]	<213>	人 (Homo sapiens)	
[0767]	<400>	48	
[0768]	Thr Val Thr Val Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ala Ser		
[0769]	1	5	10
[0770]	<210>	49	
[0771]	<211>	738	
[0772]	<212>	DNA	
[0773]	<213>	人 (Homo sapiens)	
[0774]	<400>	49	
[0775]	atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcactctgaa	60	
[0776]	gtgcagctgg tggaatctgg cggcggagtg gtgcagcctg gcagaagcct gagactgagc	120	
[0777]	tgtgccgcca gcggcttcac cttcagcagc tacggaatgc actgggtgcg ccaggcccct	180	
[0778]	ggcaaagaac tggaatgggt ggccgtgata agctacgacg gcagcatcaa gtactacgcc	240	
[0779]	gacagcgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg	300	

[0780] cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgctag aaccggcgag 360
[0781] tacagcggt acgacaccga ccctcagtac tcttggggcc agggcaccac cgtgacagtg 420
[0782] tctagcgcca gcaccaaggg cccaagcgtg ttccctctgg ccccttgacag cagaagcacc 480
[0783] agcgaatcta cagccgccct gggctgcctc gtgaaggact actttcccga gcccgtgaca 540
[0784] gtgtcctgga actctggcgc cctgaccagc ggagtgcata cctttccagc cgtgctgcag 600
[0785] agcagcgcc tgtactctct gagcagcgtc gtgactgtgc ccagcagctc tctgggcacc 660
[0786] aagacctaca cctgtaacgt ggaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg 720
[0787] catcaccacc accatcac 738
[0788] <210> 50
[0789] <211> 29
[0790] <212> DNA
[0791] <213> 人(Homo sapiens)
[0792] <400> 50
[0793] ccaccgtgac agtgtctggc agcgccagc 29
[0794] <210> 51
[0795] <211> 29
[0796] <212> DNA
[0797] <213> 人(Homo sapiens)
[0798] <400> 51
[0799] gctggcgctg ccagacactg tcacggtgg 29
[0800] <210> 52
[0801] <211> 32
[0802] <212> DNA
[0803] <213> 人(Homo sapiens)
[0804] <400> 52
[0805] ccaccgtgac agtgtctggc ggcagcgcca gc 32
[0806] <210> 53
[0807] <211> 32
[0808] <212> DNA
[0809] <213> 人(Homo sapiens)
[0810] <400> 53
[0811] gctggcgctg ccgccagaca ctgtcacggt gg 32
[0812] <210> 54
[0813] <211> 44
[0814] <212> DNA
[0815] <213> 人(Homo sapiens)
[0816] <400> 54
[0817] caccaccgtg acagtgtctg gcggcggcgg cagcagcgcc agca 44
[0818] <210> 55

[0819] <211> 44
 [0820] <212> DNA
 [0821] <213> 人(Homo sapiens)
 [0822] <400> 55
 [0823] tgctggcgct gctgccgccg ccgccagaca ctgtcacggt ggtg 44
 [0824] <210> 56
 [0825] <211> 454
 [0826] <212> PRT
 [0827] <213> 人(Homo sapiens)
 [0828] <400> 56
 [0829] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [0830] 1 5 10 15
 [0831] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0832] 20 25 30
 [0833] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val
 [0834] 35 40 45
 [0835] Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0836] 50 55 60
 [0837] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0838] 65 70 75 80
 [0839] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0840] 85 90 95
 [0841] Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser
 [0842] 100 105 110
 [0843] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Gly Ser Ala Ser Thr Lys
 [0844] 115 120 125
 [0845] Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 [0846] 130 135 140
 [0847] Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 [0848] 145 150 155 160
 [0849] Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 [0850] 165 170 175
 [0851] Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 [0852] 180 185 190
 [0853] Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 [0854] 195 200 205
 [0855] Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 [0856] 210 215 220
 [0857] Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

[0858]	225	230	235	240
[0859]	Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
[0860]		245	250	255
[0861]	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
[0862]		260	265	270
[0863]	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
[0864]		275	280	285
[0865]	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
[0866]		290	295	300
[0867]	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
[0868]	305	310	315	320
[0869]	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
[0870]		325	330	335
[0871]	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
[0872]		340	345	350
[0873]	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn			
[0874]		355	360	365
[0875]	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile			
[0876]		370	375	380
[0877]	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr			
[0878]	385	390	395	400
[0879]	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys			
[0880]		405	410	415
[0881]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys			
[0882]		420	425	430
[0883]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu			
[0884]		435	440	445
[0885]	Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[0886]	450			
[0887]	<210> 57			
[0888]	<211> 453			
[0889]	<212> PRT			
[0890]	<213> 人 (Homo sapiens)			
[0891]	<400> 57			
[0892]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
[0893]	1	5	10	15
[0894]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
[0895]		20	25	30
[0896]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val			

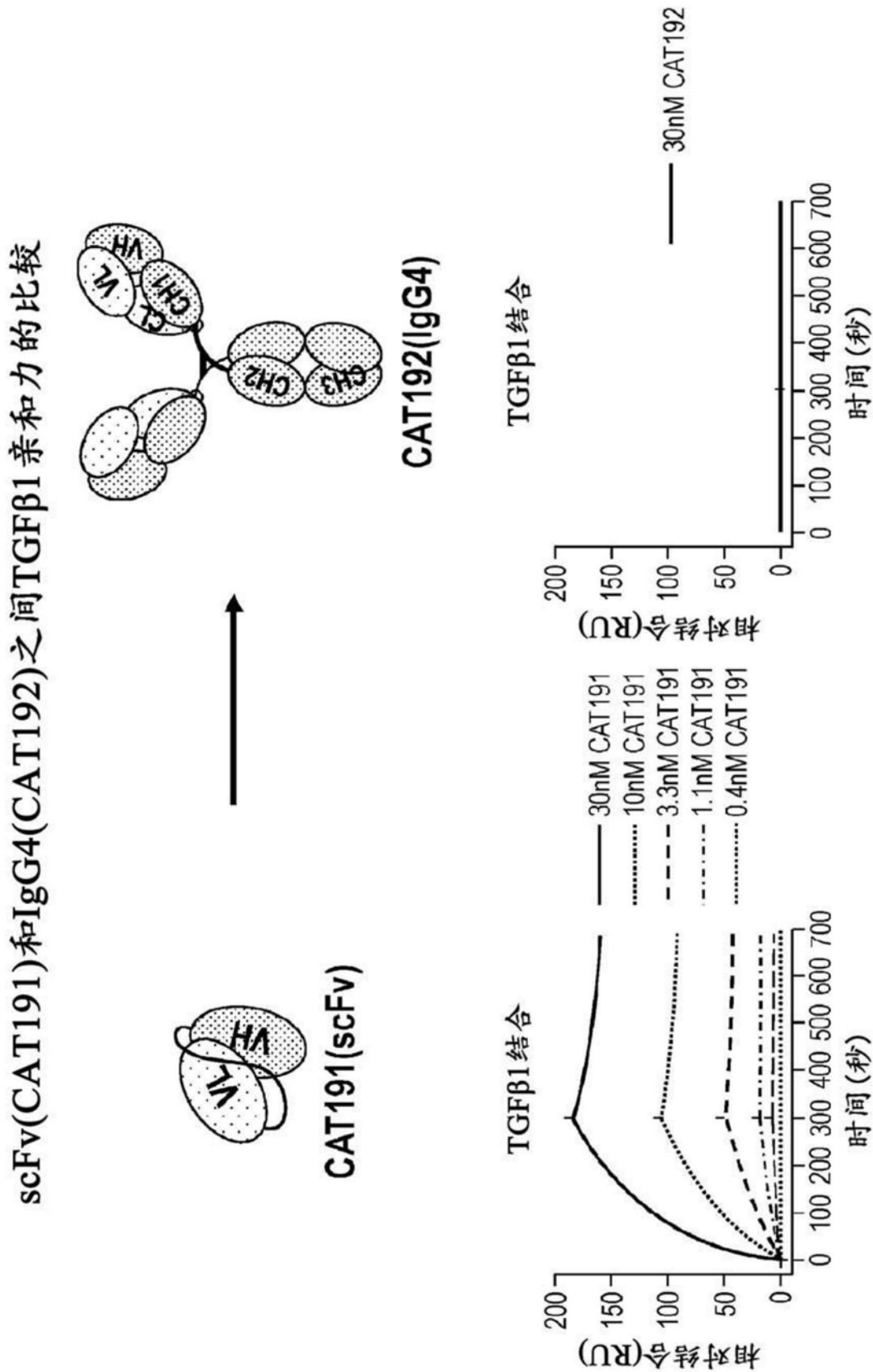
[0897]	35	40	45
[0898]	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0899]	50	55	60
[0900]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0901]	65	70	75
[0902]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0903]	85	90	95
[0904]	Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser		
[0905]	100	105	110
[0906]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Gly Gly Ser Ala Lys Gly		
[0907]	115	120	125
[0908]	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
[0909]	130	135	140
[0910]	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
[0911]	145	150	155
[0912]	Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
[0913]	165	170	175
[0914]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
[0915]	180	185	190
[0916]	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
[0917]	195	200	205
[0918]	Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys		
[0919]	210	215	220
[0920]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
[0921]	225	230	235
[0922]	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
[0923]	245	250	255
[0924]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
[0925]	260	265	270
[0926]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
[0927]	275	280	285
[0928]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
[0929]	290	295	300
[0930]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
[0931]	305	310	315
[0932]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
[0933]	325	330	335
[0934]	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
[0935]	340	345	350

[0936]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
[0937]	355 360 365
[0938]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
[0939]	370 375 380
[0940]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
[0941]	385 390 395 400
[0942]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
[0943]	405 410 415
[0944]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
[0945]	420 425 430
[0946]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
[0947]	435 440 445
[0948]	Leu Ser Pro Gly Lys
[0949]	450
[0950]	<210> 58
[0951]	<211> 458
[0952]	<212> PRT
[0953]	<213> 人(Homo sapiens)
[0954]	<400> 58
[0955]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
[0956]	1 5 10 15
[0957]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0958]	20 25 30
[0959]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val
[0960]	35 40 45
[0961]	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0962]	50 55 60
[0963]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0964]	65 70 75 80
[0965]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0966]	85 90 95
[0967]	Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser
[0968]	100 105 110
[0969]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
[0970]	115 120 125
[0971]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
[0972]	130 135 140
[0973]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[0974]	145 150 155 160

[0975]	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
[0976]					165					170					175	
[0977]	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
[0978]				180					185					190		
[0979]	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
[0980]			195					200					205			
[0981]	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
[0982]		210						215				220				
[0983]	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
[0984]	225					230				235						240
[0985]	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
[0986]				245					250						255	
[0987]	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
[0988]			260						265				270			
[0989]	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
[0990]			275					280					285			
[0991]	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
[0992]		290						295				300				
[0993]	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
[0994]	305					310					315					320
[0995]	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
[0996]				325					330						335	
[0997]	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
[0998]			340						345					350		
[0999]	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
[1000]		355						360					365			
[1001]	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
[1002]		370						375					380			
[1003]	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
[1004]	385					390					395					400
[1005]	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
[1006]				405					410						415	
[1007]	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
[1008]				420					425					430		
[1009]	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
[1010]			435						440				445			
[1011]	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
[1012]		450						455								
[1013]	<210> 59															

[1014]	<211>	35
[1015]	<212>	DNA
[1016]	<213>	人 (Homo sapiens)
[1017]	<400>	59
[1018]	caccaccgtg acagtgtctg gcggcagcgc cagca	35
[1019]	<210>	60
[1020]	<211>	35
[1021]	<212>	DNA
[1022]	<213>	人 (Homo sapiens)
[1023]	<400>	60
[1024]	tgctggcgct gccgccagac actgtcacgg tgggtg	35
[1025]	<210>	61
[1026]	<211>	455
[1027]	<212>	PRT
[1028]	<213>	人 (Homo sapiens)
[1029]	<400>	61
[1030]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
[1031]	1 5 10 15	
[1032]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[1033]	20 25 30	
[1034]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val	
[1035]	35 40 45	
[1036]	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[1037]	50 55 60	
[1038]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[1039]	65 70 75 80	
[1040]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[1041]	85 90 95	
[1042]	Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser	
[1043]	100 105 110	
[1044]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Gly Gly Ser Ala Ser Thr	
[1045]	115 120 125	
[1046]	Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	
[1047]	130 135 140	
[1048]	Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
[1049]	145 150 155 160	
[1050]	Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	
[1051]	165 170 175	
[1052]	Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	

[1053]	180							185					190						
[1054]	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys			
[1055]	195							200					205						
[1056]	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu			
[1057]	210							215					220						
[1058]	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro			
[1059]	225							230					235					240	
[1060]	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys			
[1061]	245							250					255						
[1062]	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val			
[1063]	260							265					270						
[1064]	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp			
[1065]	275							280					285						
[1066]	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr			
[1067]	290							295					300						
[1068]	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp			
[1069]	305							310					315					320	
[1070]	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu			
[1071]	325							330					335						
[1072]	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg			
[1073]	340							345					350						
[1074]	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys			
[1075]	355							360					365						
[1076]	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp			
[1077]	370							375					380						
[1078]	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys			
[1079]	385							390					395					400	
[1080]	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser			
[1081]	405							410					415						
[1082]	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser			
[1083]	420							425					430						
[1084]	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser			
[1085]	435							440					445						
[1086]	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys												
[1087]	450							455											



scFv、Fab和IgG的结构元件比较

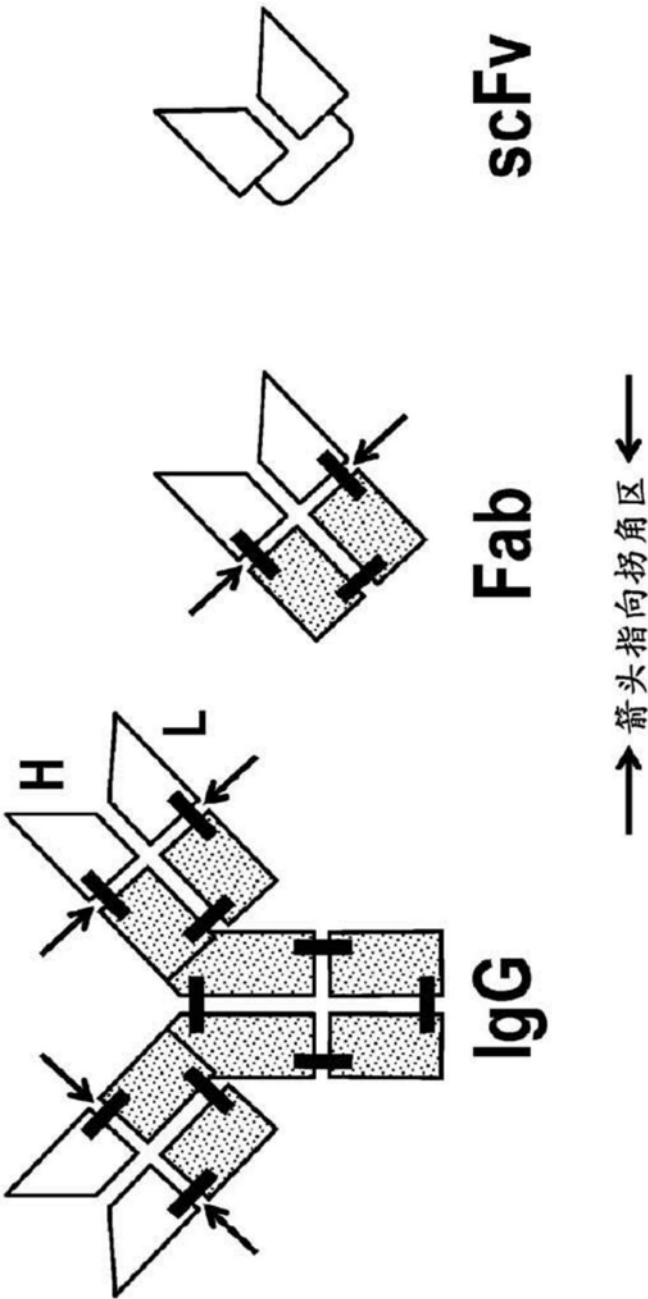


图2

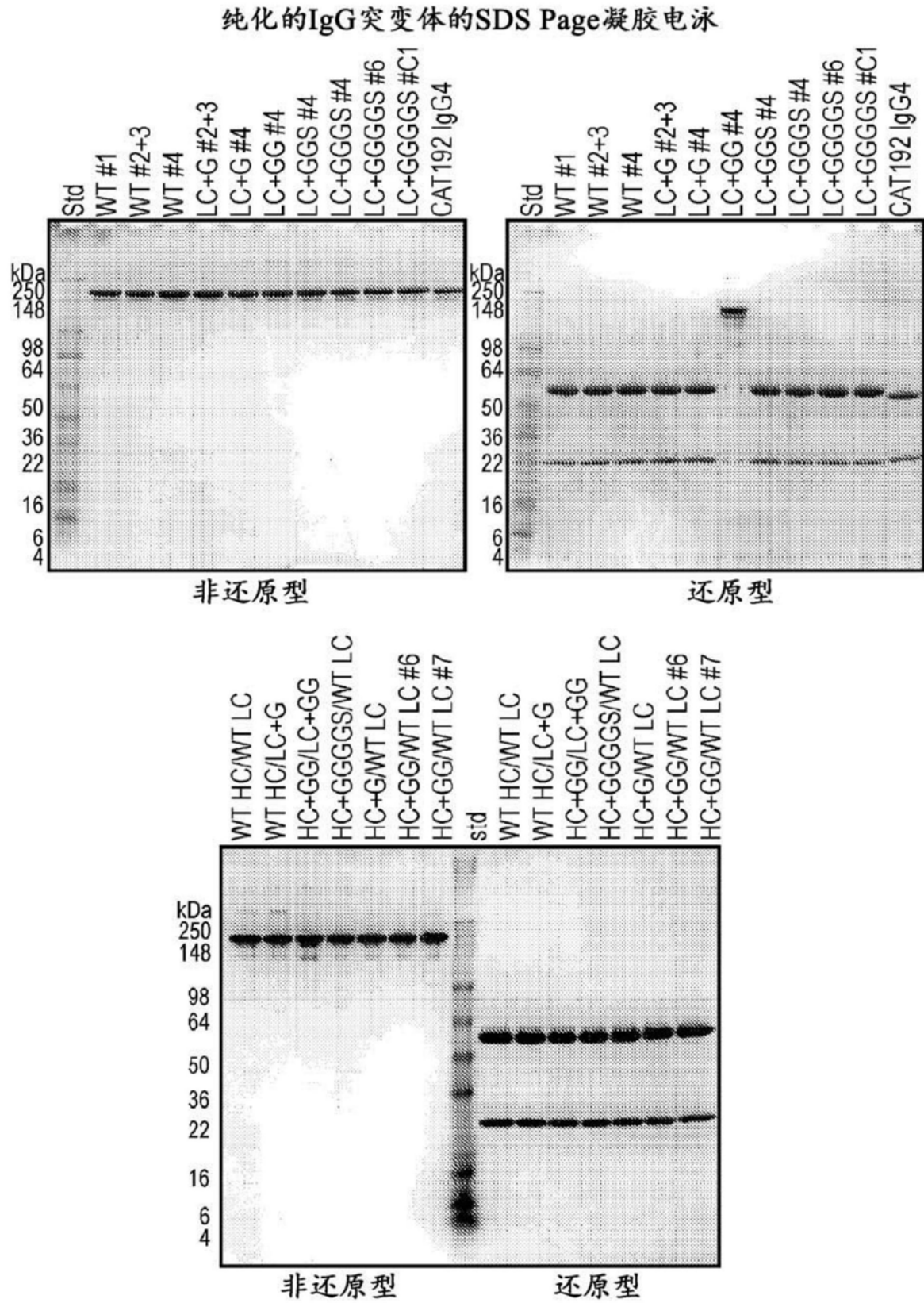


图3

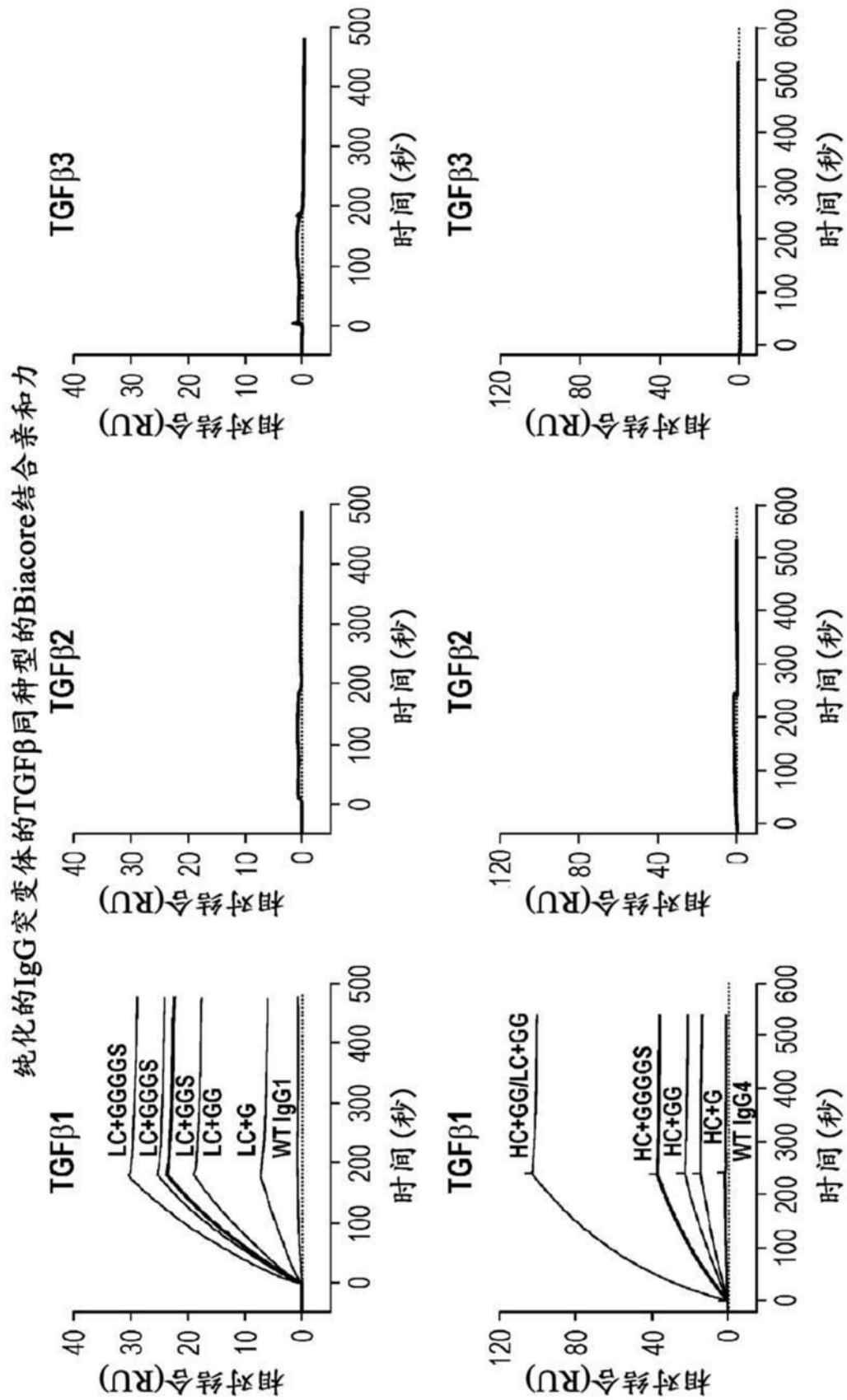


图4

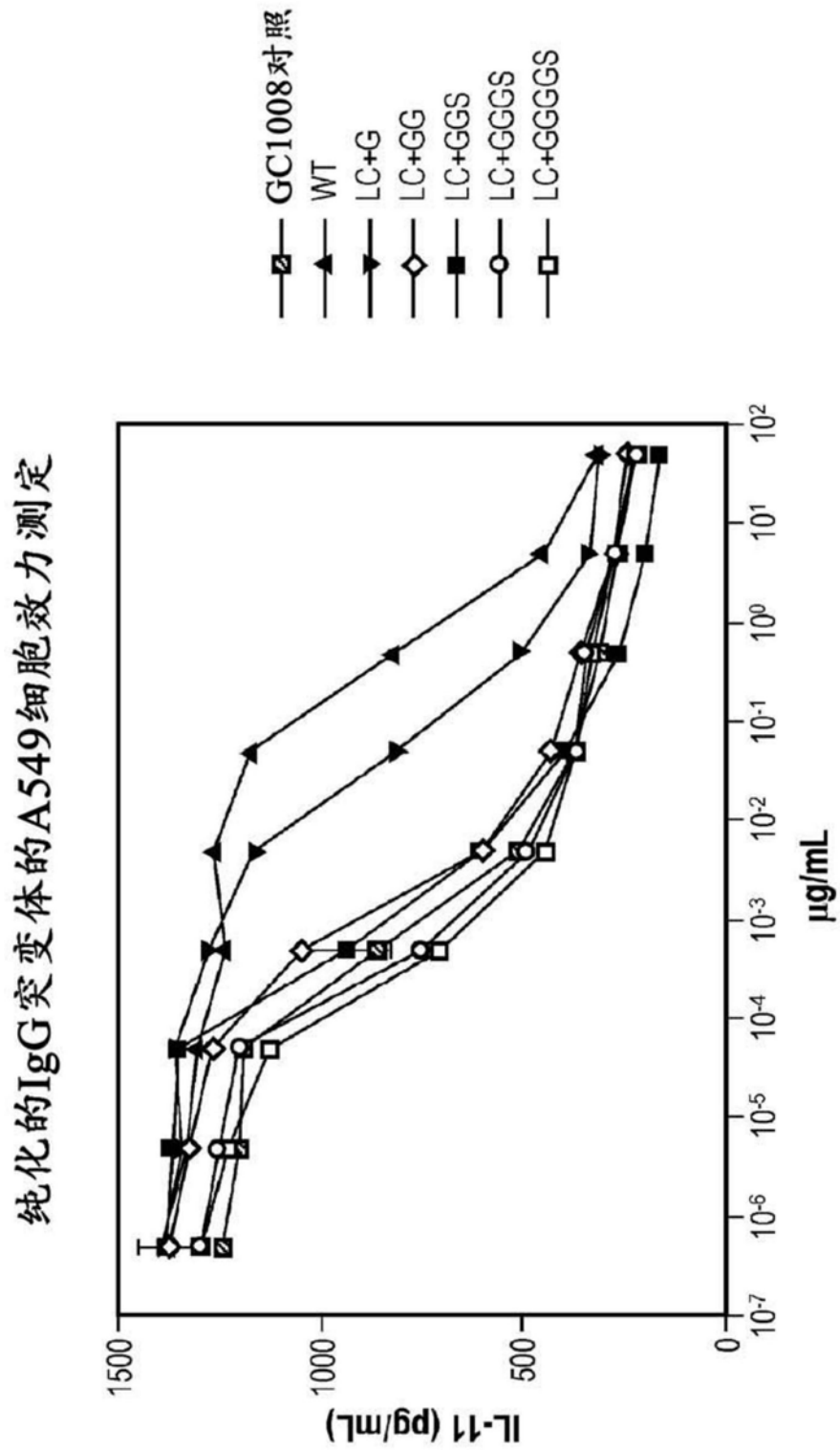


图5

纯化的Fab变体的Biacore TGFβ1结合测定结果

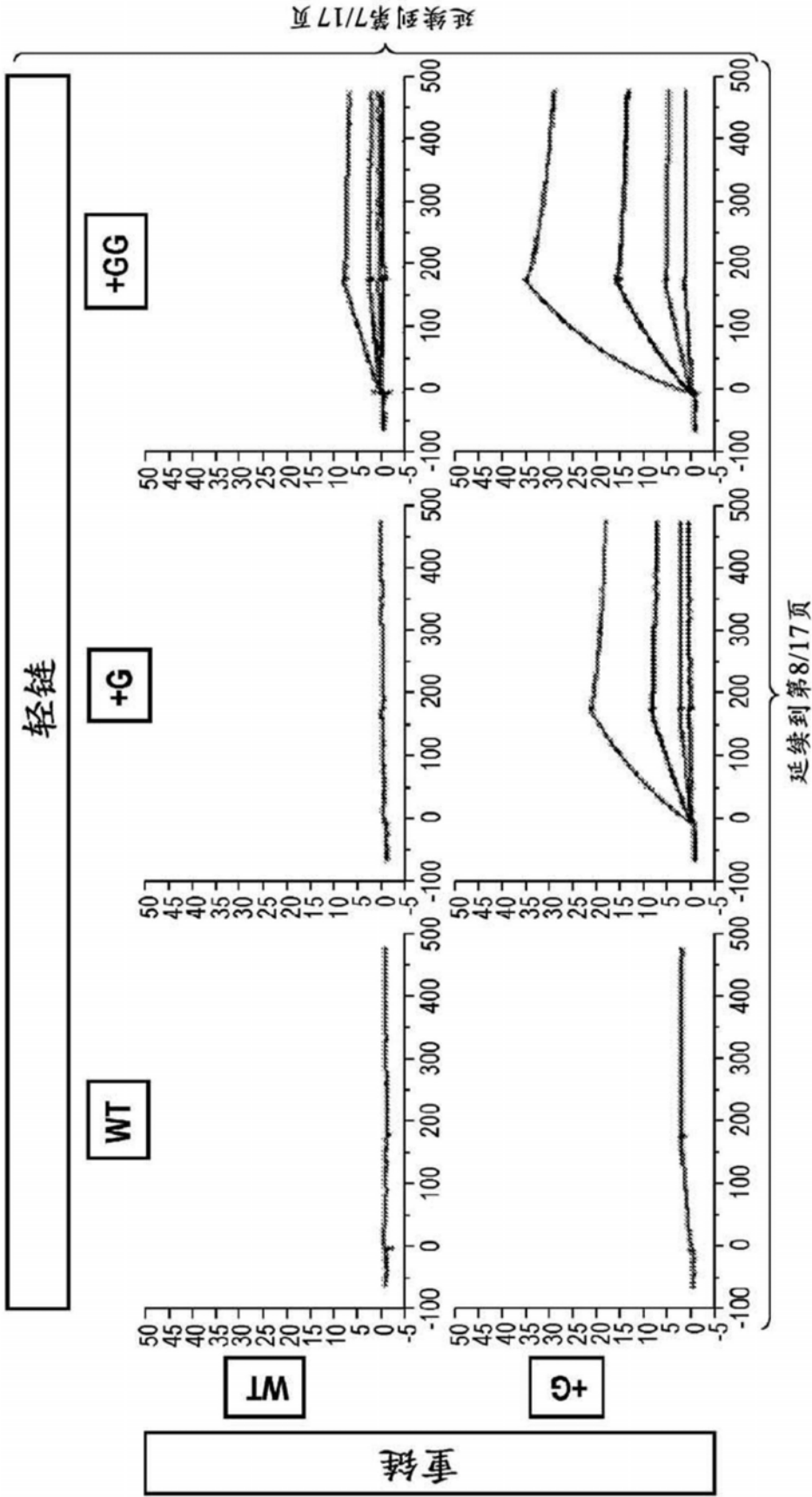


图6

纯化的Fab变体的Biacore TGFβ1结合测定结果

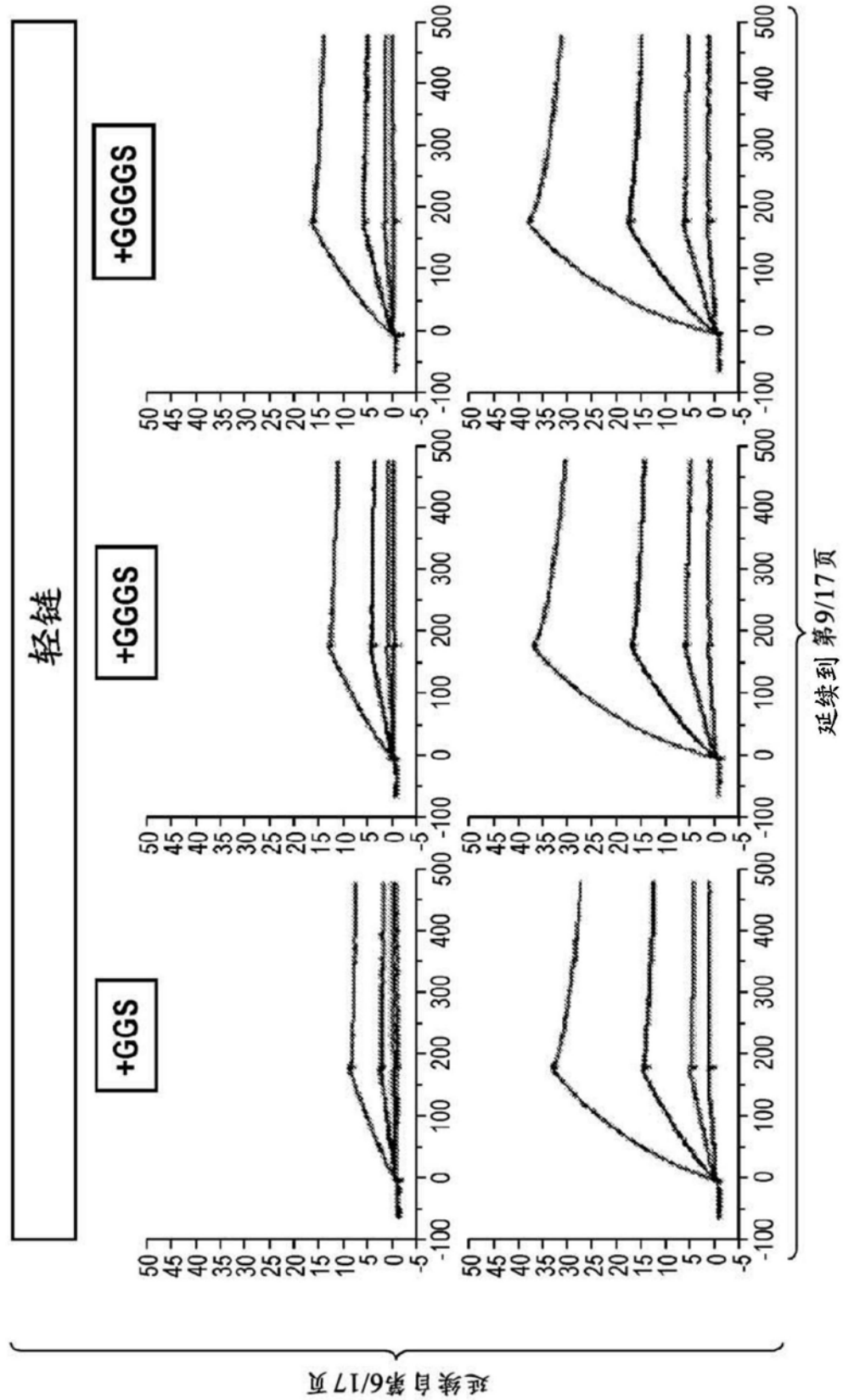


图6(续)

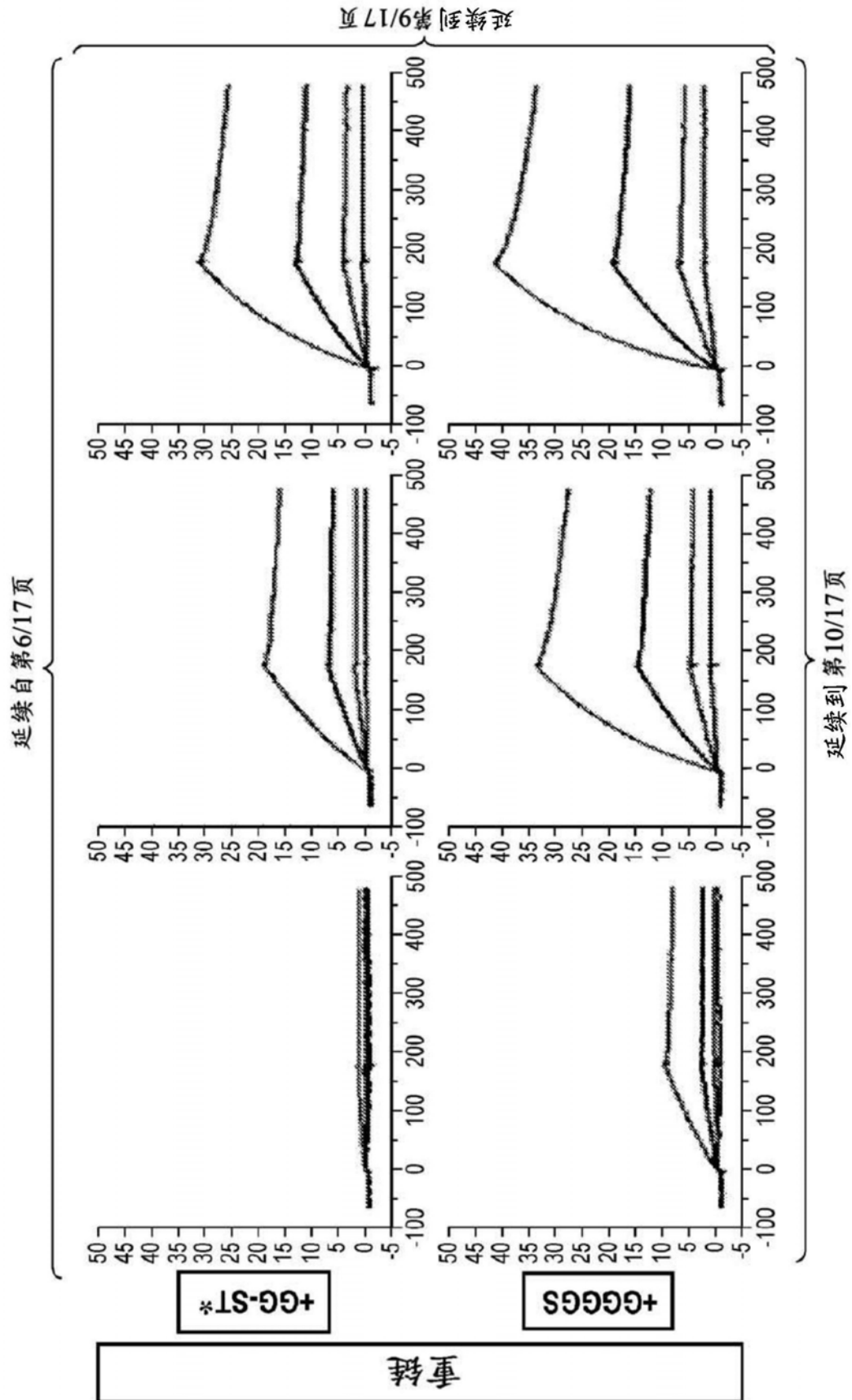


图6(续)

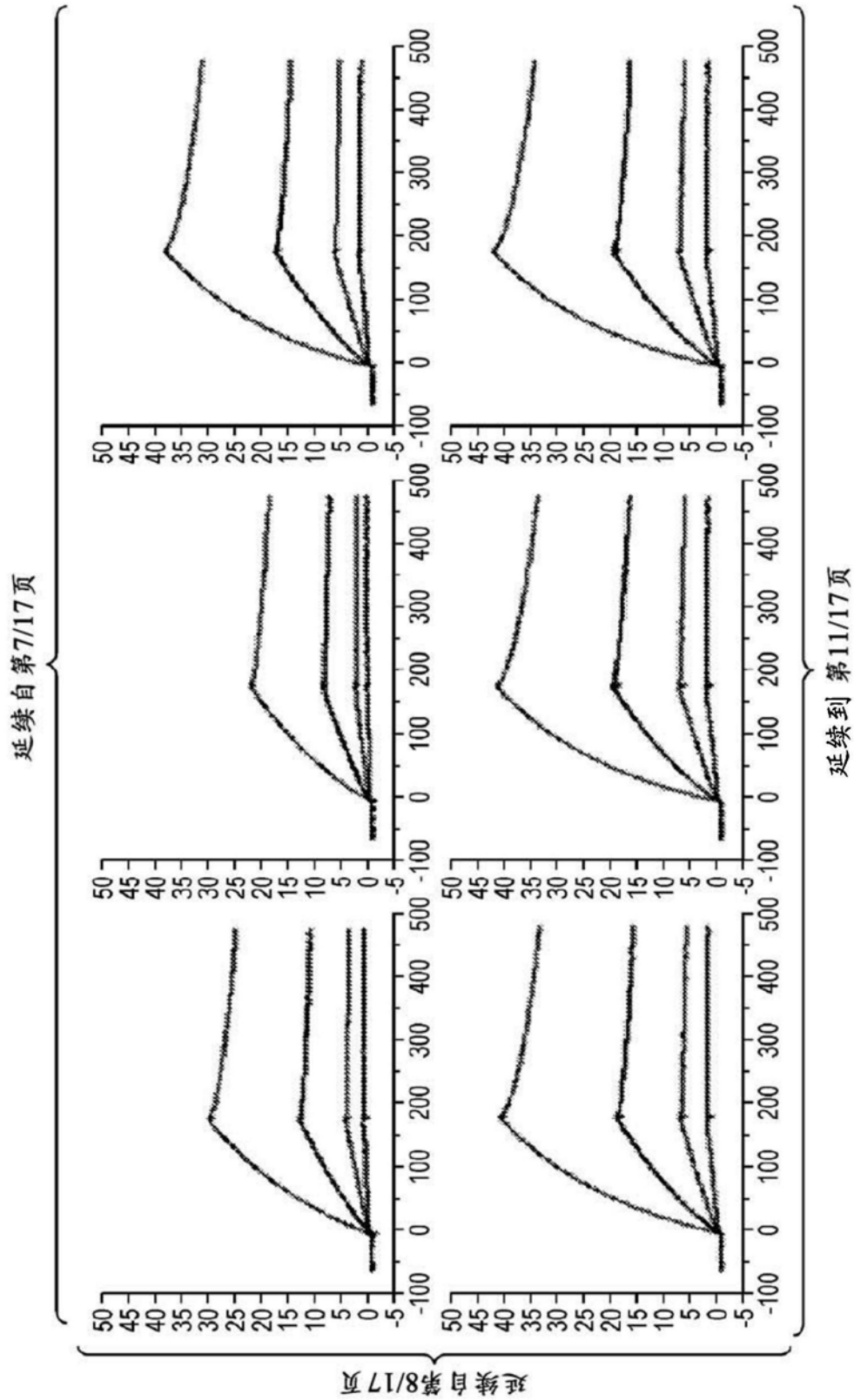


图6(续)

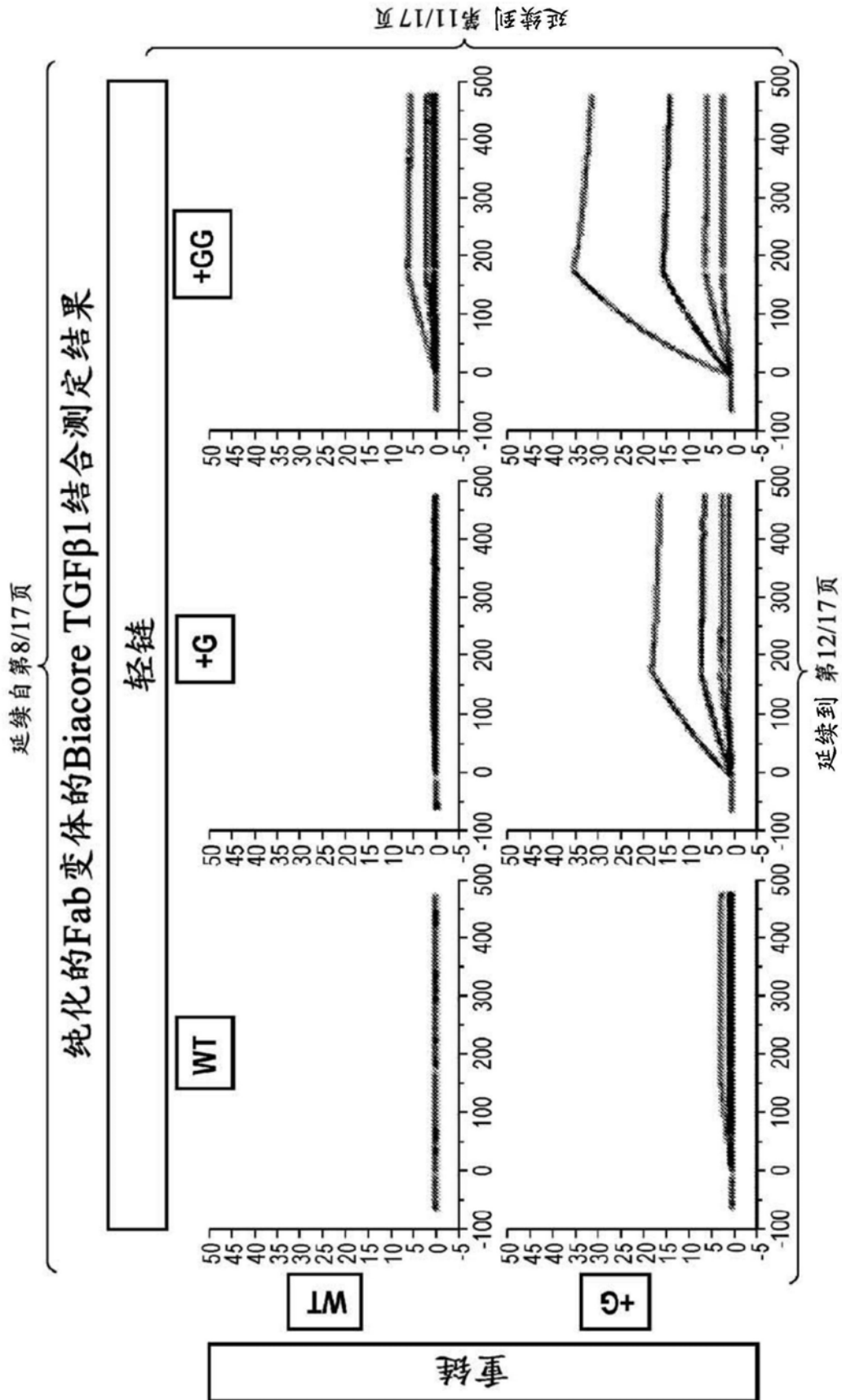
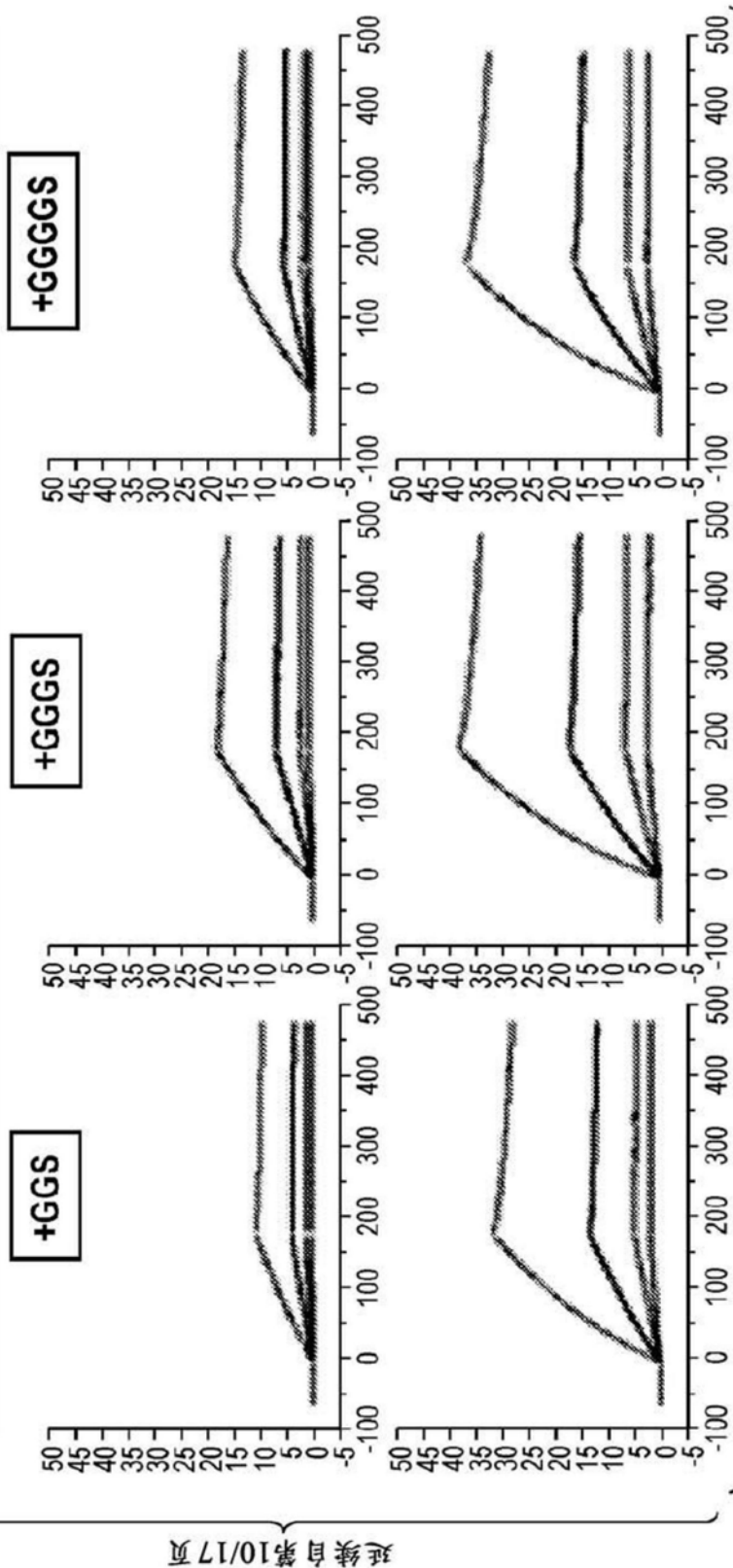


图6(续)

延续自第9/17页

纯化的Fab变体的Biacore TGFβ1结合测定结果

轻链



延续到第13/17页

延续自第10/17页

图6 (续)

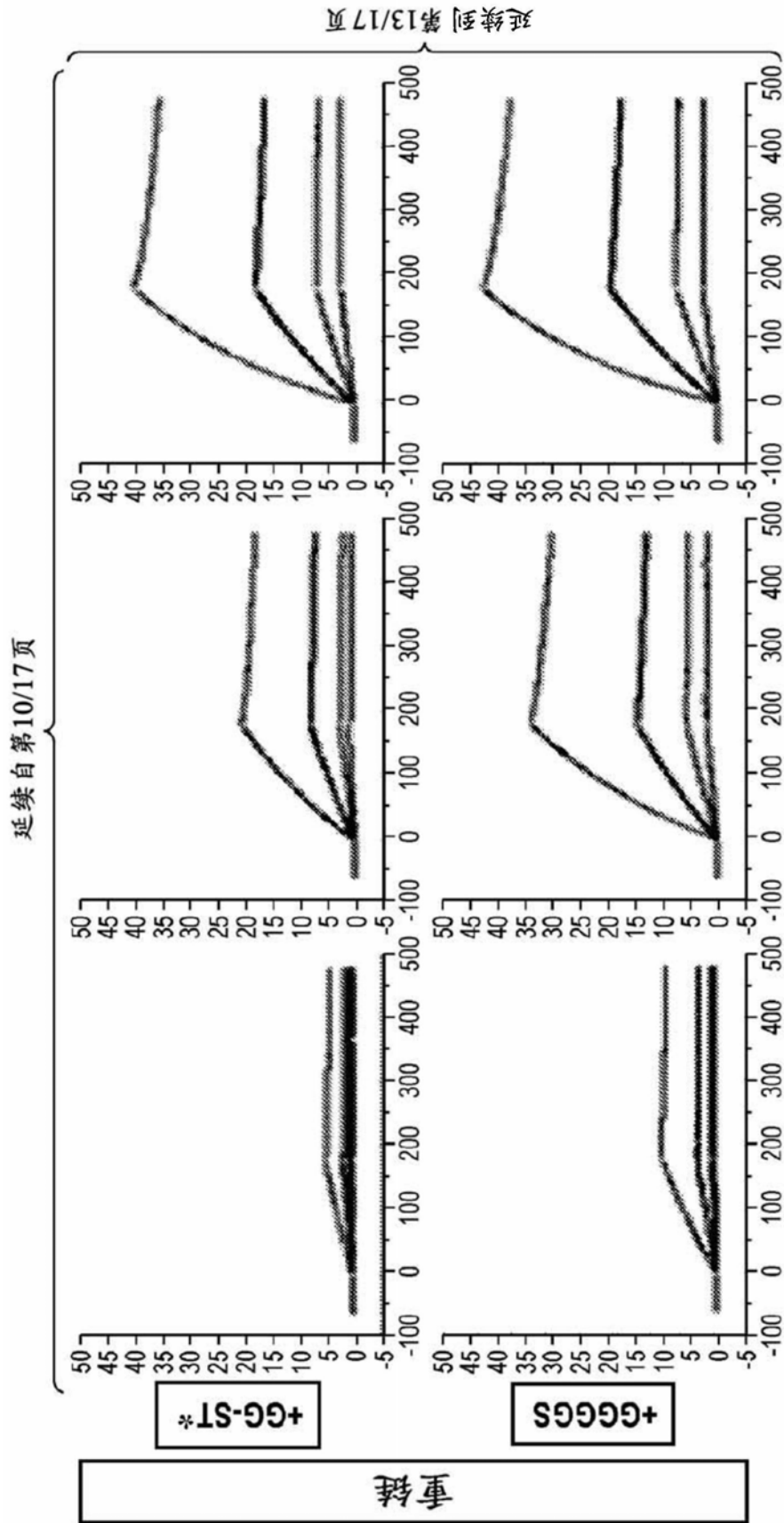


图6(续)

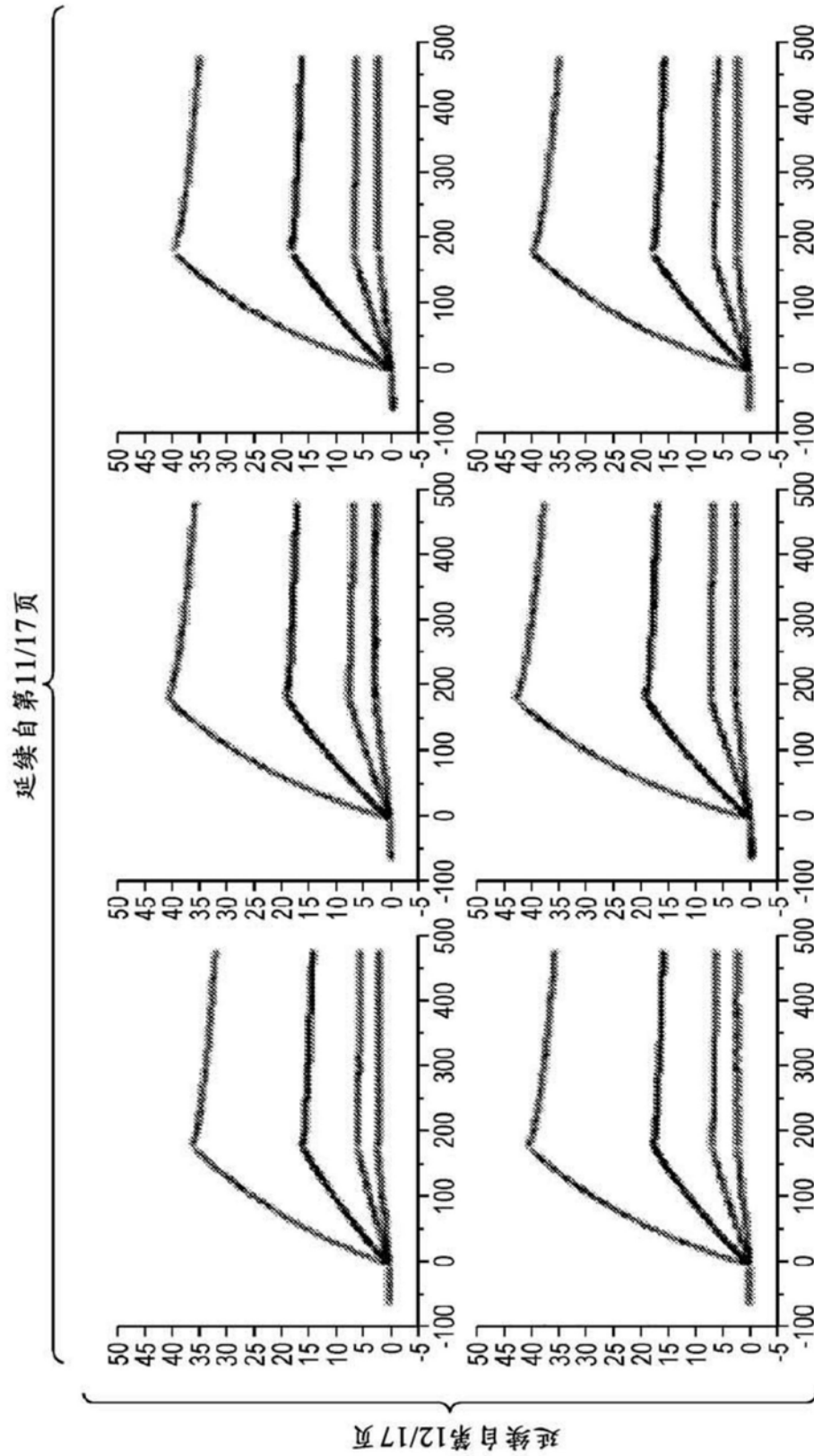


图6(续)

对于CAT192 Fab突变体的DSF测试结果的总结

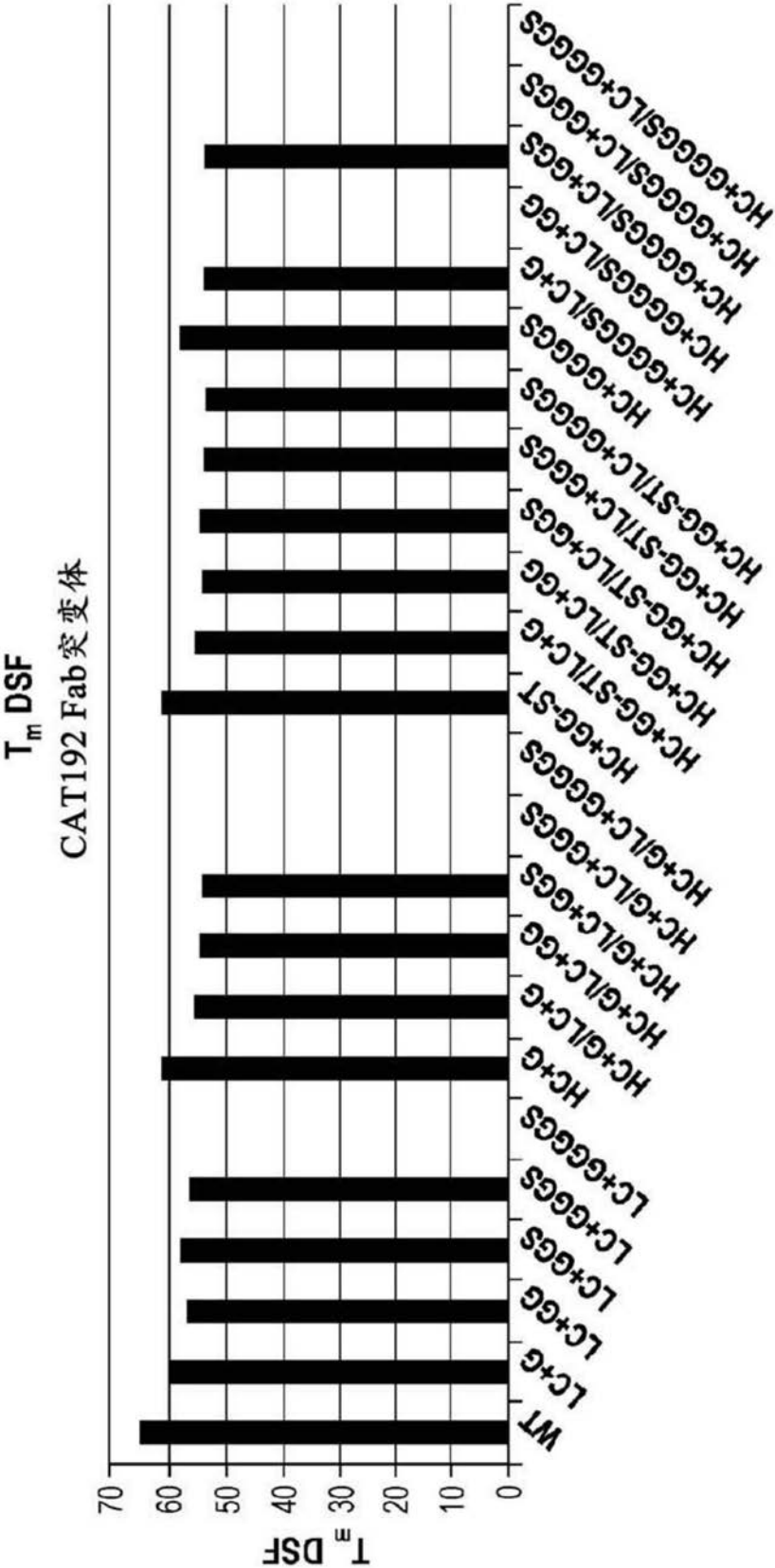


图7

CAT192 IgG4突变体的DSF测试结果

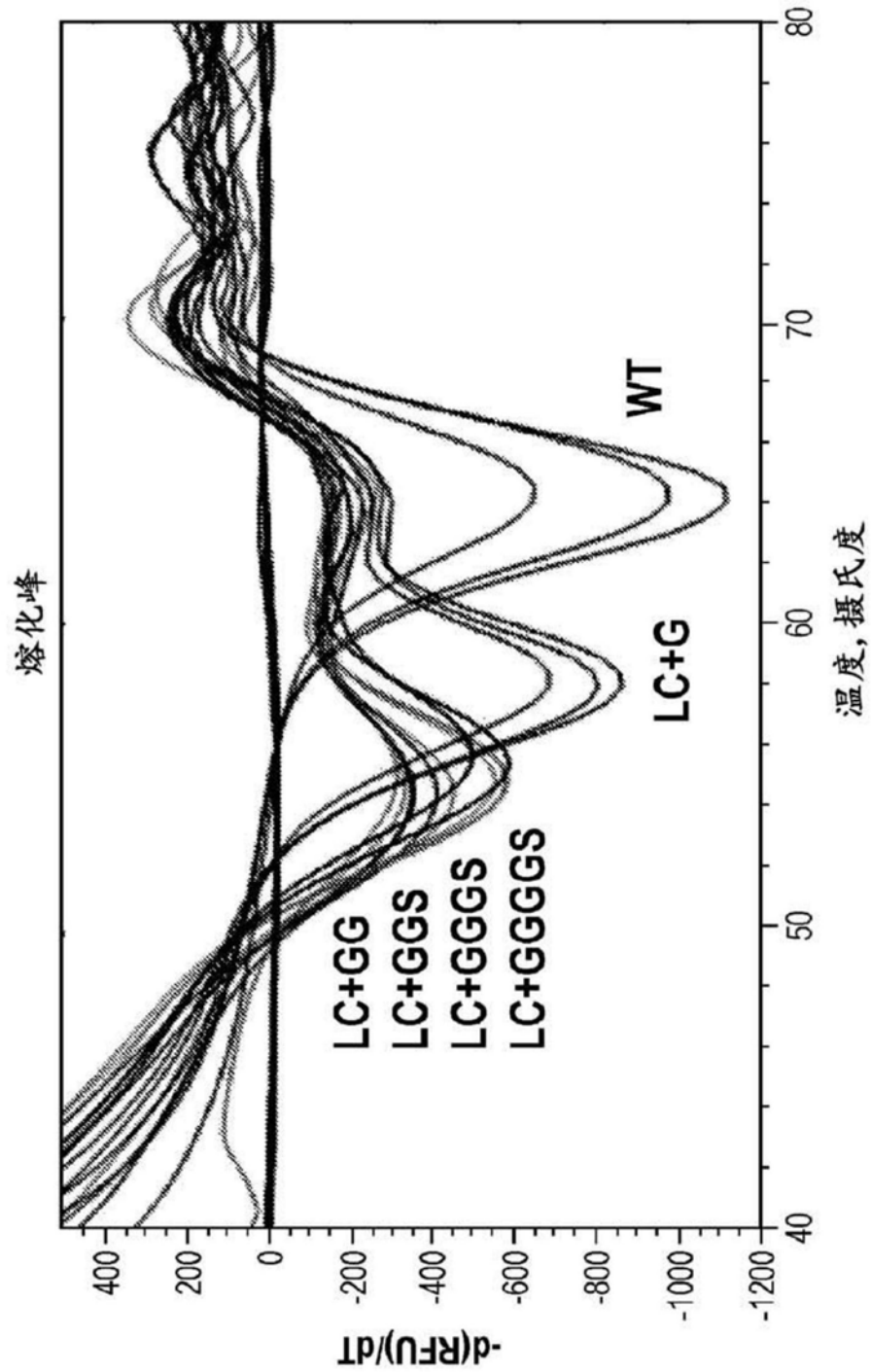


图8

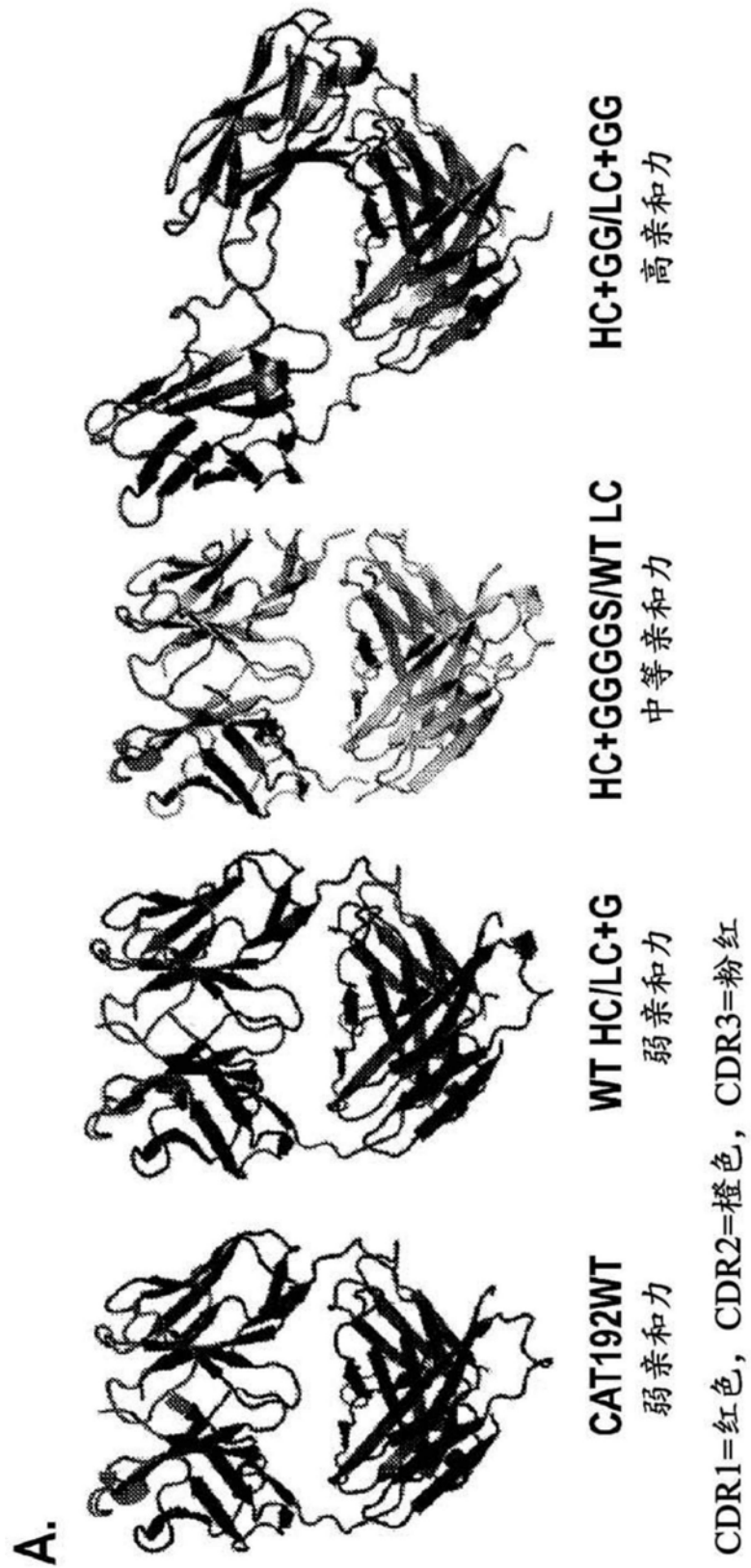


图9

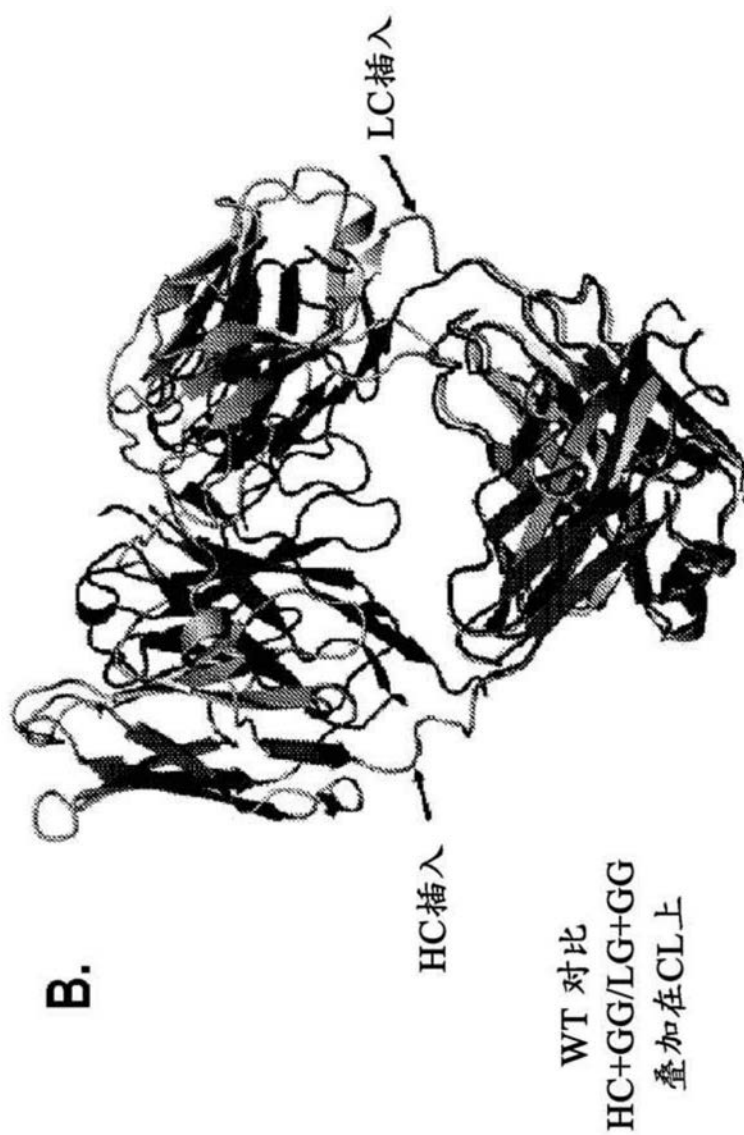


图9(续)