



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106459202 A

(43)申请公布日 2017. 02. 22

(21)申请号 201580027888.0

(22)申请日 2015.06.10

(30)优先权数据

62/010,637 2014.06.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.11.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/035111 2015.06.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/191715 EN 2015.12.17

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 A·G·波尔森 毛维光

R·法尔斯坦

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 岑晓东

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书3页 说明书51页

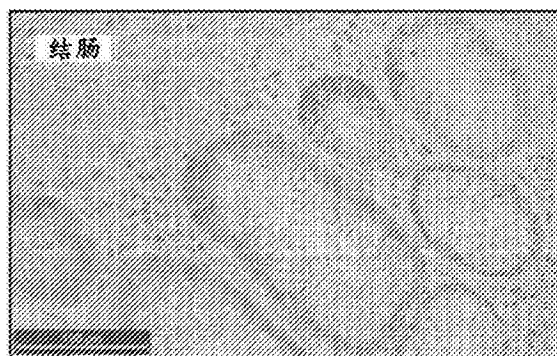
序列表60页 附图8页

(54)发明名称

抗LgR5抗体及其用途

(57)摘要

本发明提供抗LgR5抗体及使用它们的方法。



1. 一种分离的结合LgR5的抗体,其中该抗体包含:
 - a) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的HVR-H1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的HVR-H2,包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的HVR-H3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的HVR-L1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的HVR-L2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的HVR-L3;或
 - b) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的HVR-H1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的HVR-H2,包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的HVR-L1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的HVR-L2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的HVR-L3。
2. 权利要求1的抗体,其包含:
 - a) (i) 与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的VH序列;
(ii) 与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少95%序列同一性的VL序列;或
(iii) (i) 中的VH序列和(ii)中的VL序列;或
 - b) (i) 与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的VH序列;
(ii) 与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少95%序列同一性的VL序列;或
(iii) (i) 中的VH序列和(ii)中的VL序列。
3. 权利要求1或权利要求2的抗体,其包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的VH序列。
4. 前述权利要求任一项的抗体,其包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:9的VL序列。
5. 一种抗体,其包含SEQ ID NO:6的VH序列和SEQ ID NO:5的VL序列。
6. 一种抗体,其包含SEQ ID NO:8的VH序列和SEQ ID NO:7的VL序列。
7. 前述权利要求任一项的抗体,其为单克隆抗体。
8. 权利要求7的抗体,其为小鼠抗体,家兔抗体,人抗体,人源化抗体,或嵌合抗体。
9. 权利要求1至8任一项的抗体,其为选自IgG1,IgG2a,IgG2b,IgG3,和IgG4的IgG。
10. 一种分离的核酸,其编码前述权利要求任一项的抗体。
11. 一种宿主细胞,其包含权利要求10的核酸。
12. 一种生成抗体的方法,其包括培养权利要求11的宿主细胞,使得该抗体生成。
13. 一种免疫缀合物,其包含权利要求1至9任一项的抗体和细胞毒剂。
14. 一种药物配制剂,其包含权利要求13的免疫缀合物和药学可接受载剂。
15. 权利要求1至9任一项的抗体,其是与标记物缀合的。
16. 权利要求15的抗体,其中该标记物为正电子发射体。
17. 权利要求16的抗体,其中该正电子发射体为⁸⁹Zr。
18. 一种检测生物学样品中的人LgR5的方法,其包括在允许权利要求1至9和15至17任一项的抗LgR5抗体结合人LgR5的条件下将该生物学样品与该抗LgR5抗体接触,并检测该抗LgR5抗体和该生物学样品中的人LgR5之间是否形成复合物。
19. 权利要求18的方法,其中该抗LgR5抗体为权利要求4或权利要求5的抗体。
20. 权利要求18或权利要求19的方法,其中该生物学样品为结肠癌样品,结直肠癌样品,小肠癌样品,子宫内膜癌样品,胰腺癌样品,或卵巢癌样品。
21. 一种用于检测LgR5阳性癌症的方法,其包括(i) 将经标记的抗LgR5抗体施用于具有或怀疑具有LgR5阳性癌症的受试者,其中该经标记的抗LgR5抗体包含权利要求1至9任一项的抗LgR5抗体,并(ii) 检测该受试者中的该经标记的抗LgR5抗体,其中检测到该经标记的抗LgR5抗体指示该受试者中的LgR5阳性癌症。

22. 权利要求21的方法,其中该经标记的抗LgR5抗体为经标记的权利要求4或权利要求5的抗体。

23. 权利要求21或权利要求22的方法,其中该经标记的抗LgR5抗体包含与正电子发射体缀合的抗LgR5抗体。

24. 权利要求23的方法,其中该正电子发射体为⁸⁹Zr。

25. 一种将癌症患者鉴定为具有LgR5阳性癌症的方法,其包括在允许权利要求1至9和15至17任一项的抗LgR5抗体结合人LgR5的条件下将来自该患者的癌症样品与该抗LgR5抗体接触,并检测该抗LgR5抗体和该癌症样品中的人LgR5之间是否形成复合物。

26. 权利要求25的方法,其中如果检测到该抗LgR5抗体和该癌症样品中的人LgR5之间的复合物的话,将该癌症患者鉴定为具有LgR5阳性癌症。

27. 一种选择癌症患者用包含抗LgR5抗体的免疫缀合物治疗的方法,其包括使用免疫组织化学(IHC)测定来自该患者的癌症样品中LgR5表达的水平,其中升高的LgR5表达水平指示该癌症患者更有可能受益于用包含抗LgR5抗体的免疫缀合物治疗。

28. 权利要求27的方法,其中升高的LgR5表达水平为2+或3+IHC染色。

29. 权利要求28的方法,其中升高的LgR5表达水平为3+IHC染色。

30. 权利要求27至29任一项的方法,其中IHC是使用权利要求1至9和15至17任一项的抗体实施的。

31. 一种选择癌症患者用包含抗LgR5抗体的免疫缀合物治疗的方法,其包括在允许权利要求1至9和15至17任一项的抗LgR5抗体结合人LgR5的条件下将来自该患者的癌症样品与该抗LgR5抗体接触,并检测该抗LgR5抗体和该癌症样品中的人LgR5之间是否形成复合物。

32. 权利要求31的方法,其中如果检测到该抗LgR5抗体和该癌症样品中的人LgR5之间的复合物的话,选择该癌症患者。

33. 一种治疗癌症患者的方法,其包括对该患者施用治疗有效量的包含抗LgR5抗体的免疫缀合物,其中来自该患者的癌症样品已经使用免疫组织化学(IHC)测定为具有升高的LgR5表达水平。

34. 权利要求33的方法,其中升高的LgR5表达水平为2+或3+IHC染色。

35. 权利要求34的方法,其中升高的LgR5表达水平为3+IHC染色。

36. 权利要求33至35任一项的方法,其中IHC是使用权利要求1至9和15至17任一项的抗体实施的。

37. 权利要求27至36任一项的方法,其中该免疫缀合物包含如下抗LgR5抗体,该抗体包含:

a) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:55的HVR-H1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:56的HVR-H2,包含氨基酸序列SEQ ID NO:57的HVR-H3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:52的HVR-L1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:53的HVR-L2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:54的HVR-L3;或

b) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:73的HVR-H1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的HVR-H2,包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的HVR-H3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的HVR-L1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:71的HVR-L2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:72的HVR-L3;或

c) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的HVR-H1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的HVR-H2,

包含氨基酸序列SEQ ID NO:81的HVR-H3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的HVR-L1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:77的HVR-L2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:78的HVR-L3;或

d) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:85的HVR-H1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:86的HVR-H2,包含氨基酸序列SEQ ID NO:87的HVR-H3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:82的HVR-L1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:83的HVR-L2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:84的HVR-L3。

38. 权利要求37的方法,其中该抗LgR5抗体包含:

a) SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列;或

b) SEQ ID NO:51的VH序列和SEQ ID NO:50的VL序列。

39. 权利要求27至38任一项的方法,其中该免疫缀合物包含与细胞毒剂缀合的抗LgR5抗体。

40. 权利要求25至39任一项的方法,其中该癌症样品为结肠癌样品,结直肠癌样品,小肠癌样品,子宫内膜癌样品,胰腺癌样品,或卵巢癌样品。

抗LgR5抗体及其用途

[0001] 本申请要求2014年6月11日提交的美国临时申请No.62/010,637的权益,通过援引将其完整收入本文用于任何目的。

发明领域

[0002] 本发明涉及抗LgR5抗体及使用它们的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 癌症干细胞假说提出,与正常组织相似,一个独特的专门化细胞子集有能力自我更新和不断繁衍肿瘤。癌症干细胞(CSC)牵涉肿瘤启动,进展,转移和复发,使得它们成为治疗性干预的期望靶物。

[0005] 表征最好的组织干细胞群体之一是胃肠道中含有富含亮氨酸的重复的G蛋白偶联受体5(Lgr5)隐窝细胞,它们产生稳态肠上皮内的所有分化细胞类型。LgR5是在活跃循环的肠干细胞(ISC)的表面上找到的一种七次跨膜蛋白质。人LgR5是一种907个氨基酸的蛋白质,其中约540个氨基酸据预测在切割氨基端信号序列后在胞外空间中。LgR5包含外域中的17个不完美富亮氨酸重复基序,和一个位于富亮氨酸重复和第一跨膜域之间的半胱氨酸富含区。

[0006] 表达LgR5的ISC对Wnt调控敏感且主要负责肠上皮的稳态再生。消除小鼠中表达LgR5的细胞不影响肠上皮的稳态,然而,提示其它细胞类型能补偿这个细胞群体的损失。Tian等,Nature 478:255-259(2011)。R-spondin增强通过WNT3A的WNT信号传导,而且所有四种R-spondin(RSP01,RSP02,RSP03,和RSP04)能够结合LgR5。Lau等,Nature 476:293-297(2011)。

[0007] 还提出LgR5+细胞充当肠癌的起源细胞且起CSC的作用,提示消除LgR5+细胞可能对肿瘤生长和维持有深刻影响。

[0008] 来自LgR5+细胞的APC突变型肿瘤的谱系追踪表明肠瘤中的多种细胞类型衍生自LgR5+祖先。而且,提出LgR5+细胞启动肿瘤块和不断对肿瘤块贡献后代,提示消除LgR5+细胞可能对肿瘤生长和维持有深刻影响。然而,测定Lgr5表达中一个长期存在的问题是缺乏高品质的免疫组织化学(IHC)反应性抗体。

[0009] 本领域需要靶向LgR5的药剂来诊断和治疗LgR5相关疾患,诸如癌症。本发明实现该需要且提供其它好处。

[0010] 发明概述

[0011] 提供抗LgR5抗体和免疫缀合物及使用它们的方法。提供可用于免疫组织化学的抗LgR5抗体。

[0012] 在一些实施方案中,提供一种分离的结合LgR5的抗体。在一些实施方案中,该抗体包含:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的HVR-H3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的HVR-L3,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的HVR-H2;或(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的HVR-L3,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的HVR-H2。在一些实施方案中,该抗体包含:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的HVR-H1,包含氨基酸序

列SEQ ID NO:13的HVR-H2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的HVR-H3;或(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的HVR-H1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的HVR-H2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H3。在一些实施方案中,该抗体包含:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的HVR-L1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的HVR-L2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的HVR-L3;或(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的HVR-L1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的HVR-L2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的HVR-L3。

[0013] 在一些实施方案中,该抗体包含:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的HVR-H1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的HVR-H2,包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的HVR-H3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的HVR-L1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的HVR-L2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的HVR-L3;或(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的HVR-H1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的HVR-H2,包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的HVR-L1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的HVR-L2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的HVR-L3。

[0014] 在一些实施方案中,该抗体包含:(a) (i) 与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的VH序列;(ii) 与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少95%序列同一性的VL序列;或(iii) (i) 中的VH序列和(ii) 中的VL序列;或(b) (i) 与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的VH序列;(ii) 与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少95%序列同一性的VL序列;或(iii) (i) 中的VH序列和(ii) 中的VL序列。

[0015] 在一些实施方案中,该抗体包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的VH序列。在一些实施方案中,该抗体包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:9的VL序列。

[0016] 在一些实施方案中,该抗体为单克隆抗体。在一些实施方案中,该抗体为小鼠抗体,家兔抗体,人抗体,人源化抗体,或嵌合抗体。在一些实施方案中,该抗体为选自IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 和IgG4的IgG。

[0017] 在一些实施方案中,提供编码本文所述抗体的核酸。在一些实施方案中,提供包含编码本文所述抗体的核酸的宿主细胞。在一些实施方案中,提供生成抗体的方法,其包括培养包含编码本文所述抗体的核酸的宿主细胞。

[0018] 在一些实施方案中,提供免疫缀合物,其包含本文所述抗体和细胞毒剂。在一些实施方案中,提供药物组合物,其包含包含本文所述抗体和细胞毒剂的免疫缀合物和药学可接受载剂。

[0019] 在一些实施方案中,提供与标记物缀合的本文所述抗体。在一些实施方案中,该标记物为正电子发射体。在一些实施方案中,该正电子发射体为⁸⁹Zr。

[0020] 在一些实施方案中,提供检测生物学样品中的人LgR5的方法。在一些实施方案中,该方法包括在允许本文所述抗LgR5抗体结合人LgR5的条件下将该生物学样品与该抗LgR5抗体接触。在一些实施方案中,该方法进一步包括检测该抗LgR5抗体和该生物学样品中的人LgR5之间是否形成复合物。在一些实施方案中,该生物学样品为结肠癌样品,结直肠癌样品,小肠癌样品,子宫内膜癌样品,胰腺癌样品,或卵巢癌样品。

[0021] 在一些实施方案中,提供检测LgR5阳性癌症的方法。在一些实施方案中,该方法包括(i) 将经标记的抗LgR5抗体施用于具有或怀疑具有LgR5阳性癌症的受试者,其中该经标记的抗LgR5抗体包含本文所述抗LgR5抗体,并(ii) 检测该受试者中的该经标记的抗LgR5抗

体,其中检测到该经标记的抗LgR5抗体指示该受试者中的LgR5阳性癌症。在一些实施方案中,该经标记的抗LgR5抗体包含与正电子发射体缀合的抗LgR5抗体。在一些实施方案中,该正电子发射体为⁸⁹Zr。

[0022] 在一些实施方案中,提供将癌症患者鉴定为具有LgR5阳性癌症的方法。在一些实施方案中,该方法包括在允许本文所述抗LgR5抗体结合人LgR5的条件下将来自该患者的癌症样品与该抗LgR5抗体接触。在一些实施方案中,该方法进一步包括检测该抗LgR5抗体和该癌症样品中的人LgR5之间是否形成复合物。在一些实施方案中,如果检测到该抗LgR5抗体和该癌症样品中的人LgR5之间的复合物的话,将该癌症患者鉴定为具有LgR5阳性癌症。在一些实施方案中,该癌症样品为结肠癌样品,结直肠癌样品,小肠癌样品,子宫内膜癌样品,胰腺癌样品,或卵巢癌样品。

[0023] 在一些实施方案中,提供选择癌症患者用包含抗LgR5抗体的免疫缀合物治疗的方法。在一些实施方案中,该方法包括使用免疫组织化学(IHC)测定来自该患者的癌症样品中LgR5表达的水平。在一些实施方案中,升高的LgR5表达水平指示该癌症患者更有可能受益于用包含抗LgR5抗体的免疫缀合物治疗。在一些实施方案中,升高的LgR5表达水平为2+或3+IHC染色。在一些实施方案中,升高的LgR5表达水平为3+IHC染色。在一些实施方案中,IHC是使用本文所述抗体实施的。在一些实施方案中,该癌症样品为结肠癌样品,结直肠癌样品,小肠癌样品,子宫内膜癌样品,胰腺癌样品,或卵巢癌样品。

[0024] 在一些实施方案中,提供选择癌症患者用包含抗LgR5抗体的免疫缀合物治疗的方法,其中该方法包括在允许本文所述抗LgR5抗体结合人LgR5的条件下将来自该患者的癌症样品与该抗LgR5抗体接触,并检测该抗LgR5抗体和该癌症样品中的人LgR5之间是否形成复合物。在一些实施方案中,如果检测到该抗LgR5抗体和该癌症样品中的人LgR5之间的复合物的话,选择该癌症患者。在一些实施方案中,该癌症样品为结肠癌样品,结直肠癌样品,小肠癌样品,子宫内膜癌样品,胰腺癌样品,或卵巢癌样品。

[0025] 在一些实施方案中,提供治疗癌症患者的方法,其包括对该患者施用治疗有效量的包含抗LgR5抗体的免疫缀合物,其中来自该患者的癌症样品已经使用免疫组织化学(IHC)测定为具有升高的LgR5表达水平。在一些实施方案中,升高的LgR5表达水平为2+或3+IHC染色。在一些实施方案中,升高的LgR5表达水平为3+IHC染色。在一些实施方案中,IHC是使用本文所述抗体实施的。在一些实施方案中,该癌症样品为结肠癌样品,结直肠癌样品,小肠癌样品,子宫内膜癌样品,胰腺癌样品,或卵巢癌样品。

[0026] 在一些实施方案中,该免疫缀合物包含如下抗LgR5抗体,该抗体包含:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:55的HVR-H1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:56的HVR-H2,包含氨基酸序列SEQ ID NO:57的HVR-H3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:52的HVR-L1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:53的HVR-L2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:54的HVR-L3;或(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:73的HVR-H1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的HVR-H2,包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的HVR-H3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的HVR-L1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:71的HVR-L2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:72的HVR-L3;或(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的HVR-H1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的HVR-H2,包含氨基酸序列SEQ ID NO:81的HVR-H3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的HVR-L1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:77的HVR-L2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:78的HVR-L3;或(d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:85的HVR-H1,包含氨

氨基酸序列SEQ ID NO:86的HVR-H2,包含氨基酸序列SEQ ID NO:87的HVR-H3,包含氨基酸序列SEQ ID NO:82的HVR-L1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:83的HVR-L2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:84的HVR-L3。在一些实施方案中,该免疫缀合物包含如下抗LgR5抗体,该抗体包含(a) SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列;或(b) SEQ ID NO:51的VH序列和SEQ ID NO:50的VL序列。在一些实施方案中,该免疫缀合物包含与细胞毒剂缀合的抗LgR5抗体。

[0027] 附图简述

[0028] 图1显示多种组织中的人LgR5基因表达水平的示意图,如实施例A中描述的。图1中的插图显示正常结肠组织和结肠肿瘤中人LgR5基因表达水平的示意图,如实施例A中描述的。

[0029] 图2通过原位杂交显示结肠肿瘤中的LgR5表达,如实施例B中描述的。

[0030] 图3A和3B显示(A)结肠肿瘤组织微阵列中LgR5表达的各种水平的流行度,和(B)来自每一份结直肠癌样品的3份芯中LgR5表达的异质性,均通过原位杂交测定,如实施例B中描述的。

[0031] 图4A和4B显示抗体LGR5.1-12和抗体LGR5.26-1(A)轻链和(B)重链的比对。标示了接触区,Chothia,和Kabat互补决定区(CDR,也称作高变区,或HVR)。Kabat HVR标有下划线。

[0032] 图5A,5B,和5C显示抗体LGR5.1-12对(A)结肠组织,(B)毛囊,和(C)脊髓的染色,如实施例E中描述的。

[0033] 图6A,6B,6C,和6D显示使用抗体YW353通过FACS对(A)LoVo X 1.1异种移植物肿瘤细胞和(B)D5124异种移植物肿瘤细胞表面上LgR5的检测,和使用抗体LGR5.1-12通过免疫组织化学对(C)LoVo X 1.1异种移植物肿瘤和(D)D5124异种移植物肿瘤的染色,如实施例F中描述的。

[0034] 图7A,7B,7C,和7D显示使用抗体LGR5.1-12对结肠肿瘤的例示性0,1+,2+,和3+染色,如实施例G中描述的。

[0035] 图8A和8B显示使用(A)抗体LGR5.1-12和(B)抗体LGR5.26-1对CXF233异种移植物肿瘤样品的染色,如实施例H中描述的。

[0036] 发明详述

[0037] I. 定义

[0038] 出于本文中的目的,“受体人框架”指包含自人免疫球蛋白框架或如下文定义的人共有框架衍生的轻链可变域(VL)框架或重链可变域(VH)框架的氨基酸序列的框架。自人免疫球蛋白框架或人共有框架“衍生”的受体人框架可以包含其相同的氨基酸序列,或者它可以含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,氨基酸变化的数目是10或更少,9或更少,8或更少,7或更少,6或更少,5或更少,4或更少,3或更少,或2或更少。在一些实施方案中,VL受体人框架与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列在序列上相同。

[0039] “亲和力”指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另有指示,如本文中使用的,“结合亲和力”指反映结合的成员(例如抗体和抗原)之间1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以用解离常数(Kd)来表述。亲和力可以通过本领域知道的常用方法来测量,包括本文中所描述的方法。下文描述了用于测量结合亲和力的具体的说明性和例示性的实施方案。

[0040] “亲和力成熟的”抗体指在一个或多个高变区(HVR)中具有一处或多处改变的抗体,与不拥有此类改变的亲本抗体相比,此类改变导致该抗体对抗原的亲和力改善。

[0041] 术语“抗LgR5抗体”和“结合LgR5的抗体”指能够以足够亲和力结合LgR5,使得该抗体可作为诊断剂和/或治疗剂用于靶向LgR5的抗体。在一个实施方案中,如例如通过放射性免疫测定法(RIA)或Scatchard分析或表面等离子共振(诸如例如Biacore)测量的,抗LgR5抗体结合无关的,非LgR5的蛋白质的程度小于该抗体对LgR5的结合的约10%。在某些实施方案中,结合LgR5的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 5\text{nM}$, $\leq 4\text{nM}$, $\leq 3\text{nM}$, $\leq 2\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, $\leq 0.1\text{nM}$, $\leq 0.01\text{nM}$,或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 到 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 到 10^{-13}M)的解离常数(Kd)。在某些实施方案中,抗LgR5抗体结合在来自不同物种的LgR5中保守的LgR5表位。

[0042] 本文中的术语“抗体”以最广义使用,并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体,多克隆抗体,多特异性抗体(例如双特异性抗体),和抗体片段,只要它们展现出期望的抗原结合活性。

[0043] 如本文中使用的,术语“抗体药物缀合物”(ADC)等同于术语“免疫缀合物”。

[0044] “抗体片段”指与完整抗体不同的分子,其包含完整抗体的一部分且结合完整抗体结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于Fv,Fab,Fab',Fab'-SH,F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0045] 与参照抗体“结合相同表位的抗体”指在竞争测定法中将参照抗体对其抗原的结合阻断50%或更多的抗体,且相反,参照抗体在竞争测定法中将该抗体对其抗原的结合阻断50%或更多。本文中提供了例示性的竞争测定法。

[0046] 术语“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长/增殖不受调控的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌,淋巴瘤(例如何杰金氏(Hodgkin)淋巴瘤和非何杰金氏淋巴瘤),母细胞瘤,肉瘤和白血病。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌,小细胞肺癌,非小细胞肺癌,肺的腺癌,肺的鳞癌,腹膜癌,肝细胞癌,胃肠癌,胰腺癌,胶质瘤,宫颈癌,卵巢癌,肝癌(liver cancer),膀胱癌,肝瘤(hepatoma),乳腺癌,结肠癌,结肠直肠癌,子宫内膜癌或子宫癌,唾液腺癌,肾癌,肝癌(liver cancer),前列腺癌,外阴癌,甲状腺癌,肝癌(hepatic carcinoma),白血病和其它淋巴增殖性病症,及各种类型的头和颈癌。

[0047] 术语“嵌合”抗体指其中的重和/或轻链的一部分自特定的来源或物种衍生,而重和/或轻链的剩余部分自不同来源或物种衍生的抗体。

[0048] 抗体的“类”指其重链拥有的恒定域或恒定区的类型。抗体有5大类:IgA,IgD,IgE,IgG,和IgM,并且这些中的几种可以进一步分成亚类(同种型),例如,IgG₁,IgG₂,IgG₃,IgG₄,IgA₁,和IgA₂。与不同类免疫球蛋白对应的重链恒定域分别称作 α , δ , ϵ , γ ,和 μ 。

[0049] 在用于本文时,术语“细胞毒剂”指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒剂包括但不限于:放射性同位素(例如At²¹¹,I¹³¹,I¹²⁵,Y⁹⁰,Re¹⁸⁶,Re¹⁸⁸,Sm¹⁵³,Bi²¹²,P³²,Pb²¹²和Lu的放射性同位素);化学治疗剂或药物(例如甲氨蝶呤(methotrexate),阿霉素(adriamycin),长春花生物碱类(vinca alkaloids)(长春新碱(vincristine),长春碱(vinblastine),依托泊苷(etoposide)),多柔比星(doxorubicin),美法仑(melphalan),丝裂霉素(mitomycin)C,苯丁酸氮芥(chlorambucil),柔红霉素(daunorubicin)或其它嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段,诸如溶核酶;抗生素;毒素,诸如

小分子毒素或者细菌,真菌,植物或动物起源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体;及下文公开的各种抗肿瘤或抗癌剂。

[0050] “效应器功能”指那些可归于抗体Fc区且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应器功能的例子包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)下调;和B细胞活化。

[0051] 药剂(例如药物配制剂)的“有效量”指在必需的剂量和时段上有效实现期望的治疗或预防结果的量。

[0052] 术语“表位”指抗原分子上抗体所结合的特定位点。

[0053] 本文中的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链中至少含有恒定区一部分的C端区。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区自Cys226,或自Pro230延伸至重链的羧基端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。除非本文中另有规定,Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号方式依照EU编号系统,又称作EU索引,如记载于Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版 Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991。

[0054] “框架”或“FR”指除高变区(HVR)残基外的可变域残基。一般地,可变域的FR由4个FR域组成:FR1,FR2,FR3,和FR4。因而,HVR和FR序列在VH(或VL)中一般以如下的顺序出现:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0055] 术语“全长抗体”,“完整抗体”,和“全抗体”在本文中可互换使用,指与天然抗体结构具有基本上类似的结构或者具有含有如本文中所限定的Fc区的重链的抗体。

[0056] 术语“LgR5的糖基化形式”指通过添加碳水化合物残基经过翻译后修饰的LgR5天然存在形式。

[0057] 术语“宿主细胞”,“宿主细胞系”,和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且指已经导入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”,其包括原代的经转化的细胞及自其衍生的后代而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可以与亲本细胞不完全相同,而是可以含有突变。本文中包括具有与在初始转化细胞中筛选或选择的相同功能或生物学活性的突变体后代。

[0058] “人抗体”指拥有与由人或人细胞生成的或利用人抗体全集或其它人抗体编码序列自非人来源衍生的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列的抗体。人抗体的此定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0059] “家兔抗体”指拥有与由家兔或家兔细胞生成的或利用家兔抗体全集或其它家兔抗体编码序列自非家兔来源衍生的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列的抗体。

[0060] “人共有框架”指代表人免疫球蛋白VL或VH框架序列选集中最常存在的氨基酸残基的框架。通常,人免疫球蛋白VL或VH序列选集来自可变域序列亚组。通常,序列亚组是如Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,NIH Publication 91-3242,Bethesda MD(1991),第1-3卷中的亚组。在一个实施方案中,对于VL,亚组是如Kabat等,见上文中的亚组κI。在一个实施方案中,对于VH,亚组是如Kabat等,见上文中的亚组III。

[0061] “人源化”抗体指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体会包含至少一个,通常两个基本上整个可变域,其中

所有或基本上所有HVR (例如, CDR) 对应于非人抗体的那些, 且所有或基本上所有FR对应于人抗体的那些。任选地, 人源化抗体可以至少包含自人抗体衍生的抗体恒定区的一部分。抗体, 例如非人抗体的“人源化形式”指已经经历人源化的抗体。

[0062] 在用于本文时, 术语“高变区”或“HVR”指抗体可变域中在序列上高变的和/或形成结构上限定的环(“高变环”)的每个区。一般地, 天然的4链抗体包含6个HVR; 三个在VH中(H1, H2, H3), 且三个在VL中(L1, L2, L3)。HVR一般包含来自高变环和/或来自“互补决定区”(CDR)的氨基酸残基, 后一种是最高序列变异性的和/或牵涉抗原识别。例示性高变环存在于氨基酸残基26-32(L1), 50-52(L2), 91-96(L3), 26-32(H1), 53-55(H2), 和96-101(H3)(Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。例示性CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, 和CDR-H3)存在于氨基酸残基L1的24-34, L2的50-56, L3的89-97, H1的31-35B, H2的50-65, 和H3的95-102(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。除了VH中的CDR1外, CDR一般包含形成高变环的氨基酸残基。CDR还包含“特异性决定残基”, 或“SDR”, 其是接触抗原的残基。SDR包含在称作缩短的-CDR, 或a-CDR的CDR区内。例示性的a-CDR(a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, 和a-CDR-H3)存在于L1的氨基酸残基31-34, L2的50-55, L3的89-96, H1的31-35B, H2的50-58, 和H3的95-102(参见Almagro和Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008))。除非另有指示, 可变域中的HVR残基和其它残基(例如, FR残基)在本文中依照Kabat等, 见上文编号。

[0063] “免疫缀合物”指与一种或多种异源分子, 包括但不限于细胞毒剂缀合的抗体。免疫缀合物等同于术语“抗体药物缀合物”(ADC)。

[0064] “个体”或“患者”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养动物(例如, 牛, 绵羊, 猫, 犬, 和马), 灵长类(例如, 人和非人灵长类诸如猴), 家兔, 和啮齿类(例如, 小鼠和大鼠)。在某些实施方案中, 个体或受试者是人。

[0065] “分离的抗体”指已经与其天然环境的组分分开的抗体。在一些实施方案中, 抗体纯化至大于95%或99%的纯度, 如通过例如电泳(例如, SDS-PAGE, 等电聚焦(IEF), 毛细管电泳)或层析(例如, 离子交换或反相HPLC)测定的。关于用于评估抗体纯度的方法的综述, 参见例如Flatman等, J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)。

[0066] “分离的核酸”指已经与其天然环境的组分分开的核酸分子。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中含有的核酸分子, 但是核酸分子在染色体外或在与其天然染色体位置不同的染色体位置处存在。

[0067] “编码抗LgR5抗体的分离的核酸”指编码抗体重和轻链(或其片段)的一种或多种核酸分子, 包括单一载体或不同载体中的此类核酸分子, 和存在于宿主细胞中的一个或多个位置的此类核酸分子。

[0068] 如本文中使用的, 术语“LgR5”指源自细胞中LgR5前体蛋白加工的任何天然, 成熟LgR5。该术语包括来自任何脊椎动物来源的LgR5, 包括哺乳动物诸如灵长类动物(例如人和食蟹猴或恒河猴)和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠), 除非另有说明。该术语还包括LgR5的天然存在变体, 例如剪接变体或等位变体。一种例示性的人LgR5前体蛋白(带信号序列, 氨基酸1-21)的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:21。一种例示性的成熟人LgR5的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:22。一种例示性食蟹猴LgR5的氨基酸33至907的预测序列显示于SEQ ID NO:

23. 例示性大鼠LgR5前体(带信号序列, 氨基酸1-21)的氨基酸序列和成熟序列分别显示于SEQ ID NO: 24和25。例示性小鼠LgR5前体(带信号序列, 氨基酸1-21)的氨基酸序列和成熟序列分别显示于SEQ ID NO: 26和27。

[0069] 术语“LgR5阳性癌症”指包含在其表面上表达LgR5的细胞的癌症。为了确定细胞是否在表面上表达LgR5的目的, 认为LgR5mRNA表达与细胞表面上的LgR5表达有关。在一些实施方案中, 通过选自原位杂交和RT-PCR(包括定量RT-PCR)的方法来测定LgR5mRNA的表达。或者, 例如可以使用针对LgR5的抗体在诸如免疫组织化学, FACS, 等方法中测定细胞表面上的LgR5表达。

[0070] 术语“LgR5阳性癌细胞”指在其表面上表达LgR5的癌细胞。

[0071] 在用于本文时, 术语“单克隆抗体”指从一群基本上同质的抗体获得的抗体, 即构成群体的各个抗体是相同的和/或结合相同表位, 除了例如含有天然存在的突变或在单克隆抗体制备物的生成期间发生的可能的变体抗体外, 此类变体一般以极小量存在。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同, 单克隆抗体制备物的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。如此, 修饰语“单克隆”指示抗体自一群基本上同质的抗体获得的特性, 而不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如, 可以通过多种技术来生成要依照本发明使用的单克隆抗体, 包括但不限于杂交瘤方法, 重组DNA方法, 噬菌体展示方法, 和利用含有所有或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法, 本文中描述了用于生成单克隆抗体的此类方法和其它例示性方法。

[0072] “裸抗体”指未与异源模块(例如细胞毒性模块)或放射性标记物缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物配制剂中。

[0073] “天然抗体”指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如, 天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚糖蛋白, 由二硫化物键合的两条相同轻链和两条相同重链构成。从N至C端, 每条重链具有一个可变区(VH), 又称作可变重域或重链可变域, 接着是三个恒定域(CH1, CH2, 和CH3)。类似地, 从N至C端, 每条轻链具有一个可变区(VL), 又称作可变轻域或轻链可变域, 接着是一个恒定轻(CL)域。根据其恒定域氨基酸序列, 抗体轻链可归入两种类型中的一种, 称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。

[0074] 术语“包装插页”用于指治疗产品的商业包装中通常包含的用法说明书, 其含有关于涉及此类治疗产品应用的适应症, 用法, 剂量, 施用, 联合疗法, 禁忌症和/或警告的信息。

[0075] 关于参照多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为比对序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后, 且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时, 候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以以本领域技术范围内的多种方式进行, 例如使用公众可得到的计算机软件, 诸如BLAST, BLAST-2, ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以决定用于比对序列的合适参数, 包括对所比较序列全长获得最大对比所需的任何算法。然而, 为了本发明的目的, %氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生的。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc. 编写, 并且源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局(US Copyright Office, Washington D.C., 20559), 其中其以美国版权注册号TXU510087注册。公众自Genentech, Inc., South San Francisco, California可获得ALIGN-2程序, 或者可以从源代码编译。ALIGN2程序应当编译成在UNIX操

作系统,包括数码UNIX V4.0D上使用。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设定且不变。

[0076] 在采用ALIGN-2来比较氨基酸序列的情况中,给定氨基酸序列A相对于(to),与(with),或针对(against)给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(或者可表述为具有或包含相对于,与,或针对给定氨基酸序列B的某一%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A)如下计算:

[0077] 分数 $X/Y \times 100$

[0078] 其中X是由序列比对程序ALIGN-2在该程序的A和B比对中评分为相同匹配的氨基酸残基数,且其中Y是B中的氨基酸残基总数。应当领会,若氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不相等,则A相对于B的%氨基酸序列同一性将不等于B相对于A的%氨基酸序列同一性。除非另有明确说明,本文中所使用的所有%氨基酸序列同一性值都是依照上一段所述,使用ALIGN-2计算机程序获得的。

[0079] 术语“药物配制剂”指处于如下的形式,使得容许其中含有的活性成分的生物学活性是有效的,且不含对会接受配制剂施用的受试者具有不可接受的毒性的别的组分的制剂。

[0080] “药学可接受载体”指药物配制剂中与活性成分不同的,且对受试者无毒的成分。药学可接受载体包括但不限于缓冲剂,赋形剂,稳定剂,或防腐剂。

[0081] 如本文中使用的,“铂复合物”指抗癌化疗药物,诸如例如但不限于顺铂(cisplatin),奥沙利铂(oxaliplatin),卡铂(carboplatin),异丙铂(iproplatin),沙铂(satraplatin),CI-973,AZ0473,DWA2114R,奈达铂(nedaplatin),和螺铂(sprioplatin),它们基于它们共价结合DNA的能力发挥针对肿瘤的功效。

[0082] 在用于本文时,“治疗”(及其语法变化形式,诸如“处理”或“处置”)指试图改变所治疗个体的自然进程的临床干预,可以是为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发,缓解症状,削弱疾病的任何直接或间接病理学后果,预防转移,减缓疾病进展的速率,改善或减轻疾病状态,及免除或改善预后。在有些实施方案中,抗LgR5抗体用于延迟疾病的发生/发展,或用于减缓疾病的进展。

[0083] 术语“可变区”或“可变域”指抗体重或轻链中牵涉抗体结合抗原的域。天然抗体的重链和轻链可变域(分别为VH和VL)一般具有类似的结构,其中每个域包含4个保守的框架区(FR)和3个高变区(HVR)。(参见例如Kindt等人,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单个VH或VL域可以足以赋予抗原结合特异性。此外,可以分别使用来自结合抗原的抗体的VH或VL域筛选互补VL或VH域的文库来分离结合特定抗原的抗体。参见例如Portolano等,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等,Nature 352:624-628(1991)。

[0084] 在用于本文时,术语“载体”指能够增殖与其连接的另一种核酸的核酸分子。该术语包括作为自身复制型核酸结构的载体及并入接受其导入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0085] II.组合物和方法

[0086] 一方面,本发明部分基于结合LgR5的抗体和包含此类抗体的免疫缀合物。本发明的抗体和免疫缀合物对于例如LgR5阳性癌症的诊断或治疗是有用的。

[0087] A.例示性抗LgR5抗体

[0088] 在一些实施方案中,本发明提供分离的结合LgR5的抗体。LgR5是在例如活跃循环的肠干细胞的表面上找到的一种七次跨膜蛋白质。LgR5在约77%的所检查的结肠肿瘤切片中表达。参见例如PCT公开文本No. WO 2013/149159。一种例示性天然发生的带信号序列(氨基酸1-21)的人LgR5前体蛋白序列提供于SEQ ID NO:21,而相应的LgR5成熟蛋白序列显示于SEQ ID NO:22(对应于SEQ ID NO:21的氨基酸22-907)。

[0089] 在一些实施方案中,本发明提供分离的结合人LgR5氨基酸22至322内的表位的抗体。在一些实施方案中,本发明提供分离的结合人LgR5胞外域内氨基酸22至322以外的表位的抗体。在一些实施方案中,本发明提供分离的结合人LgR5氨基酸323至558内的表位的抗体。

[0090] 抗体αLgR5.1-12和其它实施方案

[0091] 一方面,本发明提供一种抗LgR5抗体,其包含至少一种,两种,三种,四种,五种,或六种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的HVR-L3。

[0092] 一方面,本发明提供一种抗体,其包含至少一种,至少两种,或所有三种选自下述的VH HVR序列:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的HVR-H2;和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的HVR-H3。在一个实施方案中,该抗体包含HVR-H3,该HVR-H3包含氨基酸序列SEQ ID NO:14。在另一个实施方案中,该抗体包含HVR-H3和HVR-L3,该HVR-H3包含氨基酸序列SEQ ID NO:14,该HVR-L3包含氨基酸序列SEQ ID NO:11。在又一个实施方案中,该抗体包含HVR-H3,HVR-L3和HVR-H2,该HVR-H3包含氨基酸序列SEQ ID NO:14,该HVR-L3包含氨基酸序列SEQ ID NO:11,该HVR-H2包含氨基酸序列SEQ ID NO:13。在又一个实施方案中,该抗体包含:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的HVR-H2;和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的HVR-H3。

[0093] 另一方面,本发明提供一种抗体,其包含至少一种,至少两种,或所有三种选自下述的VL HVR序列:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的HVR-L3。在一个实施方案中,该抗体包含:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的HVR-L3。

[0094] 另一方面,本发明的抗体包含:(a) VH结构域,其包含至少一种,至少两种,或所有三种选自下述的VH HVR序列:(i)包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的HVR-H1,(ii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的HVR-H2,和(iii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的HVR-H3;和(b) VL结构域,其包含至少一种,至少两种,或所有三种选自下述的VL HVR序列:(i)包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的HVR-L1,(ii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的HVR-L2,和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的HVR-L3。

[0095] 另一方面,本发明提供一种抗体,其包含:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的

HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的HVR-L3。

[0096] 在任何上述实施方案中,抗LgR5抗体是人源化的。在一个实施方案中,抗LgR5抗体包含任何上述实施方案中的HVR,而且进一步包含人受体框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。在一些实施方案中,抗LgR5抗体包含上文所述HVR和家兔框架区。

[0097] 另一方面,抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列同一性的重链可变域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%同一性的VH序列相对于参照序列包含替代(例如保守替代),插入,或删除,但是包含该序列的抗LgR5抗体保留结合LgR5的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:6中替代,插入和/或删除了总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,替代,插入,或删除发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,抗LgR5抗体包含SEQ ID NO:6的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定的实施方案中,该VH包含一种,两种或三种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的HVR-H1,(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的HVR-H2,和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的HVR-H3。

[0098] 另一方面,提供一种抗LgR5抗体,其中该抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列同一性的轻链可变域(VL)。在某些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%同一性的VL序列相对于参照序列包含替代(例如保守替代),插入,或删除,但是包含该序列的抗LgR5抗体保留结合LgR5的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:5中替代,插入和/或删除了总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,替代,插入,或删除发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,抗LgR5抗体包含SEQ ID NO:5的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定的实施方案中,该VL包含一种,两种或三种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的HVR-L3。

[0099] 另一方面,提供一种抗LgR5抗体,其中该抗体包含上文提供的任何实施方案中的VH和上文提供的任何实施方案中的VL。在一个实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:5中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0100] 又一方面,本发明提供了一种抗体,其与本文中提供的抗LgR5抗体结合相同表位。例如,在某些实施方案中,提供了一种抗体,其与包含VH序列SEQ ID NO:6和VL序列SEQ ID NO:5的抗LgR5抗体结合相同表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,其与包含VH序列SEQ ID NO:6和VL序列SEQ ID NO:5的抗LgR5抗体竞争结合人LgR5。在一些实施方案中,提供了一种抗体,其与包含VH序列SEQ ID NO:6和VL序列SEQ ID NO:5的抗LgR5抗体竞争结合人LgR5。在一些实施方案中,提供了一种抗体,其结合LgR5胞外域内氨基酸22至322以外的表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,其不与抗体huYW353或8E11任一竞争结合人LgR5。在一些实施方案中,提供了一种抗体,其结合人LgR5氨基酸323-558内的表位。

[0101] 在本发明的又一方面,依照任何上述实施方案的抗LgR5抗体是单克隆抗体,包括嵌合抗体,人源化抗体或人抗体。在一个实施方案中,抗LgR5抗体是抗体片段,例如Fv,Fab,Fab',scFv,双抗体,或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体是实质性全长抗体,例如IgG1抗体或其它抗体类或同种型,如本文中定义的。

[0102] 又一方面,依照任何上述实施方案的抗LgR5抗体可单一地或组合地并入下文1-7节中描述的任何特征。

[0103] 抗体αLgR5.26-1和其它实施方案

[0104] 一方面,本发明提供一种抗LgR5抗体,其包含至少一种,两种,三种,四种,五种,或六种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的HVR-L3。

[0105] 一方面,本发明提供一种抗体,其包含至少一种,至少两种,或所有三种选自下述的VH HVR序列:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的HVR-H2;和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H3。在一个实施方案中,该抗体包含HVR-H3,该HVR-H3包含氨基酸序列SEQ ID NO:20。在另一个实施方案中,该抗体包含HVR-H3和HVR-L3,该HVR-H3包含氨基酸序列SEQ ID NO:20,该HVR-L3包含氨基酸序列SEQ ID NO:17。在又一个实施方案中,该抗体包含HVR-H3,HVR-L3和HVR-H2,该HVR-H3包含氨基酸序列SEQ ID NO:20,该HVR-L3包含氨基酸序列SEQ ID NO:17,该HVR-H2包含氨基酸序列SEQ ID NO:19。在又一个实施方案中,该抗体包含:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的HVR-H2;和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H3。

[0106] 另一方面,本发明提供一种抗体,其包含至少一种,至少两种,或所有三种选自下述的VL HVR序列:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的HVR-L3。在一个实施方案中,该抗体包含:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的HVR-L3。

[0107] 另一方面,本发明的抗体包含:(a) VH结构域,其包含至少一种,至少两种,或所有三种选自下述的VH HVR序列:(i)包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的HVR-H1,(ii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的HVR-H2,和(iii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H3;和(b) VL结构域,其包含至少一种,至少两种,或所有三种选自下述的VL HVR序列:(i)包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的HVR-L1,(ii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的HVR-L2,和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的HVR-L3。

[0108] 另一方面,本发明提供一种抗体,其包含:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的HVR-L3。

[0109] 在任何上述实施方案中,抗LgR5抗体是人源化的。在一个实施方案中,抗LgR5抗体包含任何上述实施方案中的HVR,而且进一步包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。在一些实施方案中,抗LgR5抗体包含上文所述HVR和家兔框架区。

[0110] 另一方面,抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列同一性的重链可变域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%同一

性的VH序列相对于参照序列包含替代(例如保守替代),插入,或删除,但是包含该序列的抗LgR5抗体保留结合LgR5的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:8中替代,插入和/或删除了总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,替代,插入,或删除发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,抗LgR5抗体包含SEQ ID NO:8的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定的实施方案中,该VH包含一种,两种或三种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的HVR-H1,(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的HVR-H2,和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的HVR-H3。

[0111] 另一方面,提供一种抗LgR5抗体,其中该抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列同一性的轻链可变域(VL)。在某些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%同一性的VL序列相对于参照序列包含替代(例如保守替代),插入,或删除,但是包含该序列的抗LgR5抗体保留结合LgR5的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:7中替代,插入和/或删除了总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,替代,插入,或删除发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,抗LgR5抗体包含SEQ ID NO:7的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定的实施方案中,该VL包含一种,两种或三种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的HVR-L3。

[0112] 另一方面,提供一种抗LgR5抗体,其中该抗体包含上文提供的任何实施方案中的VH和上文提供的任何实施方案中的VL。在一个实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:7中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0113] 又一方面,本发明提供了一种抗体,其与本文中提供的抗LgR5抗体结合相同表位。例如,在某些实施方案中,提供了一种抗体,其与包含VH序列SEQ ID NO:8和VL序列SEQ ID NO:7的抗LgR5抗体结合相同表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,其与包含VH序列SEQ ID NO:8和VL序列SEQ ID NO:7的抗LgR5抗体竞争结合人LgR5。在一些实施方案中,提供了一种抗体,其与包含VH序列SEQ ID NO:8和VL序列SEQ ID NO:7的抗LgR5抗体竞争结合人LgR5氨基酸22至322内的表位。

[0114] 在本发明的又一方面,依照任何上述实施方案的抗LgR5抗体是单克隆抗体,包括嵌合抗体,人源化抗体或人抗体。在一个实施方案中,抗LgR5抗体是抗体片段,例如Fv,Fab,Fab',scFv,双抗体,或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体是实质性全长抗体,例如IgG2a抗体或其它抗体类或同种型,如本文中定义的。

[0115] 又一方面,依照任何上述实施方案的抗LgR5抗体可单一地或组合地并入下文1-7节中描述的任何特征。

[0116] 抗体8E11和其它实施方案

[0117] 在一些实施方案中,本发明提供一种抗LgR5抗体,其包含至少一种,两种,三种,四种,五种,或六种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:55的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:56的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:57的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:52的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:53的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:54的HVR-L3。

[0118] 另一方面,本发明提供一种抗体,其包含(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:55的HVR-

H1; (b) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:56的HVR-H2; (c) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:57的HVR-H3; (d) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:52的HVR-L1; (e) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:53的HVR-L2; 和(f) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:54的HVR-L3。

[0119] 在任何上述实施方案中, 抗LgR5抗体是人源化的。在一个实施方案中, 抗LgR5抗体包含任何上述实施方案中的HVR, 且进一步包含人受体框架, 例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。在某些实施方案中, 该人受体框架是人VL卡帕IV共有 (VL_{KIV}) 框架和/或VH框架VH_I。在某些实施方案中, 该人受体框架是人VL卡帕IV共有 (VL_{KIV}) 框架和/或在重链框架区FR3中包含R71S突变和A78V突变的VH框架VH_I。

[0120] 在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含任何上述实施方案中的HVR, 且进一步包含选自SEQ ID NO:65至68的重链框架FR3序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含任何上述实施方案中的HVR, 且进一步包含SEQ ID NO:66的重链框架FR3序列。在一些此类实施方案中, 该重链可变域框架是具有选自SEQ ID NO:65至68的FR3序列的经过修饰的人VH_I框架。在一些此类实施方案中, 该重链可变域框架是具有SEQ ID NO:66的FR3序列的经过修饰的人VH_I框架。

[0121] 在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含任何上述实施方案中的HVR, 且进一步包含SEQ ID NO:61的轻链框架FR3序列。在一些此类实施方案中, 该重链可变域框架是具有SEQ ID NO:61的FR3序列的经过修饰的VL卡帕IV共有 (VL_{KIV}) 框架。

[0122] 另一方面, 抗LgR5抗体包含与选自SEQ ID NO:31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 和45的氨基酸序列具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的重链可变域 (VH) 序列。在某些实施方案中, 与选自SEQ ID NO:31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 和45的氨基酸序列具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 或99%同一性的VH序列相对于参照序列包含替代 (例如保守替代), 插入, 或删除, 但是包含该序列的抗LgR5抗体保留结合LgR5的能力。在某些实施方案中, 在选自SEQ ID NO:31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 和45的序列中替代, 插入和/或删除了总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中, 在选自SEQ ID NO:31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 和45的序列中替代, 插入和/或删除了总共1至5个氨基酸。在某些实施方案中, 替代, 插入, 或删除发生在HVR以外的区域中 (即在FR中)。

[0123] 在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的重链可变域 (VH) 序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:33具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的重链可变域 (VH) 序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:35具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的重链可变域 (VH) 序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:37具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的重链可变域 (VH) 序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:39具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的重链可变域 (VH) 序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:41具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的重链可变域 (VH) 序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:43具有至少90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的重链可变域(VH)序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:45具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的重链可变域(VH)序列。

[0124] 任选地, 该抗LgR5抗体包含选自SEQ ID NO:31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 和45的VH序列, 包括该序列的翻译后修饰。在一个特定的实施方案中, 该VH包含一种, 两种或三种选自下述的HVR: (a) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:55的HVR-H1, (b) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:56的HVR-H2, 和(c) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:57的HVR-H3。

[0125] 另一方面, 提供一种抗LgR5抗体, 其中该抗体包含与选自SEQ ID NO:30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 和44的氨基酸序列具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的轻链可变域(VL)。在某些实施方案中, 与选自SEQ ID NO:30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 和44的氨基酸序列具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 或99%同一性的VL序列相对于参照序列包含替代(例如保守替代), 插入, 或删除, 但是包含该序列的抗LgR5抗体保留结合LgR5的能力。在某些实施方案中, 在选自SEQ ID NO:30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 和44的氨基酸序列中替代, 插入和/或删除了总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中, 在选自SEQ ID NO:30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 和44的氨基酸序列中替代, 插入和/或删除了总共1至5个氨基酸。在某些实施方案中, 替代, 插入, 或删除发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。

[0126] 在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的轻链可变域(VL)序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的轻链可变域(VL)序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:34具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的轻链可变域(VL)序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:36具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的轻链可变域(VL)序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:38具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的轻链可变域(VL)序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:40具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的轻链可变域(VL)序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:42具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的轻链可变域(VL)序列。在一些实施方案中, 抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:44具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的轻链可变域(VL)序列。

[0127] 任选地, 该抗LgR5抗体包含选自SEQ ID NO:30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 和44的VL序列, 包括该序列的翻译后修饰。在一个特定的实施方案中, 该VL包含一种, 两种或三种选自下述的HVR: (a) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:52的HVR-L1; (b) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:53的HVR-L2; 和(c) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:54的HVR-L3。

[0128] 另一方面,提供一种抗LgR5抗体,其中该抗体包含上文提供的任何实施方案中的VH和上文提供的任何实施方案中的VL。在一个实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:30中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:32中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:34中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:36中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:38中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:40中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:42中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:44中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0129] 又一方面,本发明提供一种抗体,其与本文中提供的抗LgR5抗体结合相同表位。例如,在某些实施方案中,提供了一种抗体,其与包含VH序列SEQ ID NO:33和VL序列SEQ ID NO:32的抗LgR5抗体结合相同表位。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合来自氨基酸22-323,在氨基酸22-323内,与氨基酸22-323交叠的SEQ ID NO:21的表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,其结合来自氨基酸1-312,在氨基酸1-312内,与氨基酸1-312交叠的SEQ ID NO:22的表位。

[0130] 在本发明的又一方面,依照任何上述实施方案的抗LgR5抗体是单克隆抗体,包括嵌合抗体,人源化抗体或人抗体。在一个实施方案中,抗LgR5抗体是抗体片段,例如Fv, Fab, Fab', scFv, 双抗体,或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体是实质性全长抗体,例如IgG1抗体或其它抗体类或同种型,如本文中定义的。

[0131] 又一方面,依照任何上述实施方案的抗LgR5抗体可单一地或组合地并入下文1-7节中描述的任何特征。

[0132] 抗体YW353和其它实施方案

[0133] 一方面,本发明提供一种抗LgR5抗体,其包含至少一种,两种,三种,四种,五种,或六种选自下述的HVR: (a) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:85的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:86的HVR-H2; (c) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:87的HVR-H3; (d) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:82的HVR-L1; (e) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:83的HVR-L2; 和(f) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:84的HVR-L3。

[0134] 另一方面,本发明提供一种抗体,其包含 (a) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:85的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:86的HVR-H2; (c) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:87的HVR-H3; (d) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:82的HVR-L1; (e) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:83的HVR-L2; 和(f) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:84的HVR-L3。

[0135] 在任何上述实施方案中,抗LgR5抗体是人抗体。

[0136] 另一方面,抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:51具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或100%序列同一性的重链可变域(VH)序列。在某些实施方案中,与氨基酸序列SEQ ID NO:51具有至少90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 或99%同一性的VH序列相对于参照序列包含替代(例如保守替代),

插入,或删除,但是包含该序列的抗LgR5抗体保留结合LgR5的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:51中替代,插入和/或删除了总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:51中替代,插入和/或删除了总共1至5个氨基酸。在某些实施方案中,替代,插入,或删除发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,抗LgR5抗体包含SEQ ID NO:51的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定的实施方案中,该VH包含一种,两种或三种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:85的HVR-H1,(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:86的HVR-H2,和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:87的HVR-H3。

[0137] 另一方面,提供一种抗LgR5抗体,其中该抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:50具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列同一性的轻链可变域(VL)。在某些实施方案中,与氨基酸序列SEQ ID NO:50具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%同一性的VL序列相对于参照序列包含替代(例如保守替代),插入,或删除,但是包含该序列的抗LgR5抗体保留结合LgR5的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:50中替代,插入和/或删除了总共1至5个氨基酸。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:50中替代,插入和/或删除了总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,替代,插入,或删除发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,抗LgR5抗体包含SEQ ID NO:50的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定的实施方案中,该VL包含一种,两种或三种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:82的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:83的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:84的HVR-L3。

[0138] 另一方面,提供一种抗LgR5抗体,其中该抗体包含上文提供的任何实施方案中的VH和上文提供的任何实施方案中的VL。在一个实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:50中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0139] 又一方面,本发明提供了一种抗体,其与本文中提供的抗LgR5抗体结合相同表位。例如,在某些实施方案中,提供了一种抗体,其与包含VH序列SEQ ID NO:51和VL序列SEQ ID NO:50的抗LgR5抗体结合相同表位。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合来自氨基酸22-123,在氨基酸22-123内,与氨基酸22-123交叠的SEQ ID NO:21的表位。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合来自氨基酸1-102,在氨基酸1-102内,与氨基酸1-102交叠的SEQ ID NO:22的表位。

[0140] 在本发明的又一方面,依照任何上述实施方案的抗LgR5抗体是单克隆抗体,包括人抗体。在一个实施方案中,抗LgR5抗体是抗体片段,例如Fv,Fab,Fab',scFv,双抗体,或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体是实质性全长抗体,例如IgG2a抗体或其它抗体类或同种型,如本文中定义的。

[0141] 又一方面,依照任何上述实施方案的抗LgR5抗体可单一地或组合地并入下文1-7节中描述的任何特征。

[0142] 抗体3G12和其它实施方案

[0143] 在一些实施方案中,本发明提供一种抗LgR5抗体,其包含至少一种,两种,三种,四种,五种,或六种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:73的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:71的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:72的HVR-L3。

[0144] 另一方面,本发明提供一种抗体,其包含(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:73的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:71的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:72的HVR-L3。

[0145] 在任何上述实施方案中,抗LgR5抗体是人源化的。在一个实施方案中,抗LgR5抗体包含任何上述实施方案中的HVR,且进一步包含人受体框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。在某些实施方案中,该人受体框架是人VL卡帕共有(VL_K)框架和/或人VH亚组3共有(VH₃)框架。

[0146] 另一方面,抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:47具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列同一性的重链可变域(VH)序列。在某些实施方案中,与氨基酸序列SEQ ID NO:47具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%同一性的VH序列相对于参照序列包含替代(例如保守替代),插入,或删除,但是包含该序列的抗LgR5抗体保留结合LgR5的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:47的氨基酸序列中替代,插入和/或删除了总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:47的氨基酸序列中替代,插入和/或删除了总共1至5个氨基酸。在某些实施方案中,替代,插入,或删除发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。

[0147] 任选地,抗LgR5抗体包含SEQ ID NO:47的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定的实施方案中,该VH包含一种,两种或三种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:73的HVR-H1,(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:74的HVR-H2,和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的HVR-H3。

[0148] 另一方面,提供一种抗LgR5抗体,其中该抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:46具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列同一性的轻链可变域(VL)。在某些实施方案中,与氨基酸序列SEQ ID NO:46具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%同一性的VL序列相对于参照序列包含替代(例如保守替代),插入,或删除,但是包含该序列的抗LgR5抗体保留结合LgR5的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:46的氨基酸序列中替代,插入和/或删除了总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:46的氨基酸序列中替代,插入和/或删除了总共1至5个氨基酸。在某些实施方案中,替代,插入,或删除发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。

[0149] 任选地,抗LgR5抗体包含SEQ ID NO:46的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定的实施方案中,该VL包含一种,两种或三种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:71的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:72的HVR-L3。

[0150] 另一方面,提供一种抗LgR5抗体,其中该抗体包含上文提供的任何实施方案中的VH和上文提供的任何实施方案中的VL。在一个实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:46中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0151] 又一方面,本发明提供了一种抗体,其与本文中提供的抗LgR5抗体结合相同表位。例如,在某些实施方案中,提供了一种抗体,其与包含VH序列SEQ ID NO:47和VL序列SEQ ID NO:46的抗LgR5抗体结合相同表位。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合来自氨基酸324-423,在氨基酸324-423内,与氨基酸324-423交叠的SEQ ID NO:21的表位。在一些实

施方案中,提供了一种抗体,其结合来自氨基酸303-402,在氨基酸303-402内,与氨基酸303-402交叠的SEQ ID NO:22的表位。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合来自氨基酸324-555,在氨基酸324-555内,与氨基酸324-555交叠的SEQ ID NO:21的表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,其结合来自氨基酸303-534,在氨基酸303-534内,与氨基酸303-534交叠的SEQ ID NO:22的表位。

[0152] 在本发明的又一方面,依照任何上述实施方案的抗LgR5抗体是单克隆抗体,包括嵌合抗体,人源化抗体或人抗体。在一个实施方案中,抗LgR5抗体是抗体片段,例如Fv,Fab,Fab',scFv,双抗体,或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体是实质性全长抗体,例如IgG1抗体或其它抗体类或同种型,如本文中定义的。

[0153] 又一方面,依照任何上述实施方案的抗LgR5抗体可单一地或组合地并入下文1-7节中描述的任何特征。

[0154] 抗体2H6和其它实施方案

[0155] 在一些实施方案中,本发明提供一种抗LgR5抗体,其包含至少一种,两种,三种,四种,五种,或六种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:81的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:77的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:78的HVR-L3。

[0156] 另一方面,本发明提供一种抗体,其包含(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:81的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:77的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:78的HVR-L3。

[0157] 在任何上述实施方案中,抗LgR5抗体是人源化的。在一个实施方案中,抗LgR5抗体包含任何上述实施方案中的HVR,且进一步包含人受体框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。在某些实施方案中,该人受体框架是人VL卡帕共有(VL_K)框架和/或人VH亚组3(VH₃)框架。

[0158] 另一方面,抗LgR5抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:49具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列同一性的重链可变域(VH)序列。在某些实施方案中,与氨基酸序列SEQ ID NO:49具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%同一性的VH序列相对于参照序列包含替代(例如保守替代),插入,或删除,但是包含该序列的抗LgR5抗体保留结合LgR5的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:49的氨基酸序列中替代,插入和/或删除了总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:49的氨基酸序列中替代,插入和/或删除了总共1至5个氨基酸。在某些实施方案中,替代,插入,或删除发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。

[0159] 任选地,抗LgR5抗体包含SEQ ID NO:49的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定的实施方案中,该VH包含一种,两种或三种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的HVR-H1,(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:80的HVR-H2,和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:81的HVR-H3。

[0160] 另一方面,提供一种抗LgR5抗体,其中该抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:48具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列同一性的轻

链可变域(VL)。在某些实施方案中,与氨基酸序列SEQ ID NO:48具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%同一性的VL序列相对于参照序列包含替代(例如保守替代),插入,或删除,但是包含该序列的抗LgR5抗体保留结合LgR5的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:48的氨基酸序列中替代,插入和/或删除了总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:48的氨基酸序列中替代,插入和/或删除了总共1至5个氨基酸。在某些实施方案中,替代,插入,或删除发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。

[0161] 任选地,抗LgR5抗体包含SEQ ID NO:48的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定的实施方案中,该VL包含一种,两种或三种选自下述的HVR:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:76的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:77的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:78的HVR-L3。

[0162] 另一方面,提供一种抗LgR5抗体,其中该抗体包含上文提供的任何实施方案中的VH和上文提供的任何实施方案中的VL。在一个实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:48中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0163] 又一方面,本发明提供了一种抗体,其与本文中提供的抗LgR5抗体结合相同表位。例如,在某些实施方案中,提供了一种抗体,其与包含VH序列SEQ ID NO:49和VL序列SEQ ID NO:48的抗LgR5抗体结合相同表位。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合来自氨基酸324-423,在氨基酸324-423内,与氨基酸324-423交叠的SEQ ID NO:21的表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,其结合来自氨基酸303-402,在氨基酸303-402内,与氨基酸303-402交叠的SEQ ID NO:22的表位。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合来自氨基酸324-555,在氨基酸324-555内,与氨基酸324-555交叠的SEQ ID NO:21的表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,其结合来自氨基酸303-534,在氨基酸303-534内,与氨基酸303-534交叠的SEQ ID NO:22的表位。

[0164] 在本发明的又一方面,依照任何上述实施方案的抗LgR5抗体是单克隆抗体,包括嵌合抗体,人源化抗体或人抗体。在一个实施方案中,抗LgR5抗体是抗体片段,例如Fv,Fab,Fab',scFv,双抗体,或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体是实质性全长抗体,例如IgG1抗体或其它抗体类或同种型,如本文中定义的。

[0165] 又一方面,依照任何上述实施方案的抗LgR5抗体可单一地或组合地并入下文1-7节中描述的任何特征。

[0166] 1. 抗体亲和力

[0167] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, $\leq 0.1\text{nM}$, $\leq 0.01\text{nM}$,或 $\leq 0.001\text{nM}$ 的解离常数(Kd),且任选 $\geq 10^{-13}\text{M}$ (例如 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如, 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。

[0168] 在一个实施方案中,Kd是通过如下述测定法所述用Fab型式的感兴趣抗体及其抗原实施的放射性标记抗原结合测定法(RIA)来测量的。通过在存在未标记抗原的滴定系列的情况中用最小浓度的(¹²⁵I)标记抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体包被板捕捉结合的抗原来测量Fab对抗原的溶液结合亲和力(参见例如Chen等,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了建立测定法的条件,将MICROTITER®多孔板(Thermo Scientific)用50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5μg/ml捕捉用抗Fab抗体(Cappel Labs)包被过夜,随后用PBS中的2%(w/v)牛血清清蛋白于室温(约23℃)封闭2-5小时。在非吸附板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM

[125 I]-抗原与连续稀释的感兴趣Fab (例如与Presta等, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997) 中抗VEGF抗体, Fab-12的评估一致) 混合。然后将感兴趣的Fab温育过夜;然而,温育可持续更长时间 (例如约65小时) 以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕捉板,于室温温育 (例如1小时)。然后除去溶液,并用PBS中的0.1%聚山梨酯20(TWEEN-20®)洗板8次。平板干燥后,加入150 μ l/孔闪烁液 (MICROSCINT-20™; Packard), 然后在TOPCOUNT™伽马计数器 (Packard) 上对平板计数10分钟。选择各Fab给出小于或等于最大结合之20%的浓度用于竞争性结合测定法。

[0169] 在一些实施方案中,Kd是使用表面等离子共振测定法使用BIAcore®-2000或BIAcore®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 于25℃使用固定化抗原CM5芯片在约10个响应单位 (RU) 测量的。简言之,依照供应商的用法说明书用盐酸N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺 (EDC) 和N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片 (CM5, BIAcore, Inc.)。将抗原用10mM乙酸钠pH 4.8稀释至5 μ g/ml (约0.2 μ M), 然后以5 μ l/分钟的流速注射以获得约10个响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。注入抗原后,注入1M乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量,于25℃以约25 μ l/分钟的流速注入在含0.05%聚山梨酯20 (TWEEN-20™) 表面活性剂的PBS (PBST) 中两倍连续稀释的Fab (0.78nM至500nM)。使用简单一对一朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型 (BIAcore® Evaluation Software version 3.2) 通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (Kd) 以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如Chen等, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)。如果根据上文表面等离子共振测定法,结合速率超过 $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$,那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定,即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计 (Aviv Instruments) 或8000系列SLM-AMINCO™分光光度计 (ThermoSpectronic) 中用搅拌比色杯的测量,在存在浓度渐增的抗原的情况下,测量PBS pH 7.2中20nM抗抗原抗体 (Fab形式) 于25℃的荧光发射强度 (激发=295nm; 发射=340nm, 16nm带通) 的升高或降低。

[0170] 2. 抗体片段

[0171] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 和scFv片段,及下文所描述的其它片段。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)。关于scFv片段的综述,参见例如Pluckthun, 于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenberg和Moore编, (Springer-Verlag, New York), 第269-315页 (1994); 还可参见WO 93/16185; 及美国专利No. 5,571,894和5,587,458。关于包含补救受体结合表位残基,并且具有延长的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利No. 5,869,046。

[0172] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价的或双特异性的。参见例如EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson等, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); 及Hollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)。三抗体和四抗体也记载于Hudson等, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)。

[0173] 单域抗体是包含抗体的整个或部分重链可变域或整个或部分轻链可变域的抗体片段。在某些实施方案中,单域抗体是人单域抗体 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见例如美国专利No. 6,248,516B1)。

[0174] 可以通过多种技术,包括但不限于对完整抗体的蛋白水解消化及重组宿主细胞

(例如大肠杆菌或噬菌体)的生成来生成抗体片段,如本文中所描述的。

[0175] 3.嵌合的和人源化的抗体

[0176] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体记载于例如美国专利No.4,816,567;及Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)。在一个例子中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,自小鼠,大鼠,仓鼠,家兔,或非人灵长类,诸如猴衍生的可变区)和人恒定区。在又一个例子中,嵌合抗体是“类转换的”抗体,其中类或亚类已经自亲本抗体的类或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0177] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。一般地,人源化抗体包含一个或多个可变域,其中HVR,例如CDR(或其部分)自非人抗体衍生,而FR(或其部分)自人抗体序列衍生。任选地,人源化抗体还会至少包含人恒定区的一部分。在一些实施方案中,将人源化抗体中的一些FR残基用来自非人抗体(例如衍生HVR残基的抗体)的相应残基替代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0178] 人源化抗体及其生成方法综述于例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008),并且进一步记载于例如Riechmann等,Nature 332:323-329(1988); Queen等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利No.5,821,337,7,527,791,6,982,321和7,087,409;Kashmiri等,Methods 36:25-34(2005)(描述了SDR(a-CDR)嫁接);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述了“重修表面”);Dall'Acqua等,Methods 36:43-60(2005)(描述了“FR改组”);及Osborn等,Methods 36:61-68(2005)和Klimka等,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述了FR改组的“引导选择”方法)。

[0179] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合(best-fit)”方法选择的框架区(参见例如Sims等,J.Immunol.151:2296(1993));自轻或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列衍生的框架区(参见例如Carter等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);及Presta等,J.Immunol.,151:2623(1993));人成熟的(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(参见例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));和通过筛选FR文库衍生的框架区(参见例如Baca等,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)及Rosok等,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0180] 4.人抗体

[0181] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是人抗体。可以使用本领域中已知的多种技术来生成人抗体。一般地,人抗体记载于van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)及Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)。

[0182] 可以通过对转基因动物施用免疫原来制备人抗体,所述转基因动物已经修饰为响应抗原性攻击而生成完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有所有或部分人免疫球蛋白基因座,其替换内源免疫球蛋白基因座,或者其在染色体外存在或随机整合入动物的染色体中。在此类转基因小鼠中,一般已经将内源免疫球蛋白基因座灭活。关于自转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125(2005)。还可参见例如美国专利No.6,075,181和6,150,584,其描述了XENOMOUSE™技术;美国专利No.5,770,429,其描述了HUMAB®技术;美国专利No.7,041,870,其描述了K-M

MOUSE®技术,和美国专利申请公开文本No.US 2007/0061900,其描述了VELOCIMOUSE®技术)。可以例如通过与不同人恒定区组合进一步修饰来自此类动物生成的完整抗体的人可变区。

[0183] 也可以通过基于杂交瘤的方法生成抗体。已经描述了用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异骨髓瘤细胞系(参见例如Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第51-63页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及Boerner等, J. Immunol., 147:86 (1991))。经由人B细胞杂交瘤技术生成的人抗体也记载于Li等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)。其它方法包括那些例如记载于美国专利No. 7,189,826 (其描述了自杂交瘤细胞系生成单克隆人IgM抗体) 和Ni, Xiandai Mianyixue, 26 (4):265-268 (2006) (其描述了人-人杂交瘤) 的。人杂交瘤技术 (Trioma技术) 也记载于Vollmers和Brandlein, Histology and Histopathology, 20 (3):927-937 (2005) 及Vollmers和Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27 (3):185-91 (2005)。

[0184] 也可以通过分离自人衍生的噬菌体展示文库选择的Fv克隆可变域序列生成抗体。然后,可以将此类可变域序列与期望的人恒定域组合。下文描述了自抗体文库选择人抗体的技术。

[0185] 5. 文库衍生的抗体

[0186] 可以通过对组合文库筛选具有期望的一种或多种活性的抗体来分离本发明的抗体。例如,用于生成噬菌体展示文库并对此类文库筛选拥有期望结合特征的抗体的多种方法是本领域中已知的。此类方法综述于例如Hoogenboom等,于Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等编, Human Press, Totowa, NJ, 2001), 并且进一步记载于例如McCafferty等, Nature 348:552-554; Clackson等, Nature 352:624-628 (1991); Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992); Marks和Bradbury, 于Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo编, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu等, J. Mol. Biol. 338 (2):299-310 (2004); Lee等, J. Mol. Biol. 340 (5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34):12467-12472 (2004); 及Lee等, J. Immunol. Methods 284 (1-2):119-132 (2004)。

[0187] 在某些噬菌体展示方法中,将VH和VL基因的全集分别通过聚合酶链式反应 (PCR) 克隆,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以对所述噬菌体文库筛选抗原结合噬菌体,如记载于Winter等, Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994) 的。噬菌体通常以单链Fv (scFv) 片段或以Fab片段展示抗体片段。来自经免疫的来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。或者,可以(例如自人)克隆天然全集以在没有任何免疫的情况中提供针对一大批非自身和还有自身抗原的抗体的单一来源,如由Griffiths等, EMBO J, 12:725-734 (1993) 描述的。最后,也可以通过自干细胞克隆未重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物编码高度可变的CDR3区并在体外实现重排来合成生成未免疫文库,如由Hoogenboom和Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992) 所描述的。描述人抗体噬菌体文库的专利公开文本包括例如:美国专利No. 5,750,373, 和美国专利公开文本No. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936和2009/0002360。

[0188] 认为自人抗体文库分离的抗体或抗体片段是本文中的人抗体或人抗体片段。

[0189] 6. 多特异性抗体

[0190] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,结合特异性之一针对LgR5,而另一种针对任何其它抗原。在某些实施方案中,双特异性抗体可以结合LgR5的两个不同表位。也可以使用双特异性抗体来将细胞毒剂定位于表达LgR5的细胞。双特异性抗体可以以全长抗体或抗体片段制备。

[0191] 用于生成多特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的两对免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(参见Milstein和Cuello,Nature 305:537 (1983)),WO 93/08829,和Traunecker等,EMBO J.10:3655 (1991)),和“突起-入-空穴”工程化(参见例如美国专利No.5,731,168)。也可以通过用于生成抗体Fc-异二聚体分子的工程化静电操纵效应(WO 2009/089004A1);交联两个或更多个抗体或片段(参见例如美国专利No.4,676,980,及Brennan等,Science,229:81 (1985));使用亮氨酸拉链来生成双特异性抗体(参见例如Kostelny等,J.Immunol.,148(5):1547-1553 (1992));使用用于生成双特异性抗体片段的“双抗体”技术(参见例如Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448 (1993));及使用单链Fv(sFv)二聚体(参见例如Gruber等,J.Immunol.,152:5368 (1994));及如例如Tutt等,J.Immunol.147:60 (1991)中所描述的,制备三特异性抗体来生成多特异性抗体。

[0192] 本文中还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化改造抗体,包括“章鱼抗体”(参见例如US 2006/0025576A1)。

[0193] 本文中的抗体或片段还包括包含结合LgR5及另一种不同抗原的抗原结合位点的“双重作用FAB”或“DAF”(参见例如US 2008/0069820)。

[0194] 7. 抗体变体

[0195] 在某些实施方案中,涵盖本文中提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可以期望改善抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。可以通过将合适的修饰引入编码抗体的核苷酸序列中,或者通过肽合起来制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如对抗体的氨基酸序列内的残基的删除,和/或插入和/或替代。可以进行删除,插入,和替代的任何组合以得到最终的构建体,只要最终的构建体拥有期望的特征,例如,抗原结合。

[0196] a) 替代,插入,和删除变体

[0197] 在某些实施方案中,提供了具有一处或多处氨基酸替代的抗体变体。替代诱变感兴趣的位点包括HVR和FR。保守替代在表1中在“优选的替代”的标题下显示。更实质的变化在表1中在“例示性替代”的标题下提供,并且如下文参照氨基酸侧链类别进一步描述的。可以将氨基酸替代引入感兴趣的抗体中,并且对产物筛选期望的活性,例如保留/改善的抗原结合,降低的免疫原性,或改善的ADCC或CDC。

[0198] 表1

[0199]

初始残基	例示性替代	优选的替代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala

[0200]

Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0201] 依照共同的侧链特性,氨基酸可以如下分组:

[0202] (1) 疏水性的:正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0203] (2) 中性,亲水性的: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0204] (3) 酸性的: Asp, Glu;

[0205] (4) 碱性的: His, Lys, Arg;

[0206] (5) 影响链取向的残基: Gly, Pro;

[0207] (6) 芳香族的: Trp, Tyr, Phe。

[0208] 非保守替代会需要用这些类别之一的成员替换另一个类别的。

[0209] 一类替代变体牵涉替代亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。一般地,为进一步研究选择的所得变体相对于亲本抗体会具有某些生物学特性的改变(例如改善)(例如升高的亲和力,降低的免疫原性)和/或会基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。例示性的替代变体是亲和力成熟的抗体,其可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术诸如本文中所描述的那些技术来方便地生成。简言之,将一个或多个HVR残基

突变,并将变体抗体在噬菌体上展示,并对其筛选特定的生物学活性(例如结合亲和力)。

[0210] 可以对HVR做出变化(例如,替代),例如以改善抗体亲和力。可以对HVR“热点”,即由在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子编码的残基(参见例如Chowdhury, *Methods Mol.Biol.* 207:179-196 (2008)),和/或SDR (a-CDR) 做出此类变化,其中对所得的变体VH或VL测试结合亲和力。通过次级文库的构建和再选择进行的亲和力成熟已经记载于例如Hoogenboom等,于*Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等编,Human Press,Totowa,NJ, (2001))。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如,易错PCR,链改组,或寡核苷酸指导的诱变)将多样性引入为成熟选择的可变基因。然后,创建次级文库。然后,筛选文库以鉴定具有期望的亲亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法牵涉HVR指导的方法,其中将几个HVR残基(例如,一次4-6个残基)随机化。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性鉴定牵涉抗原结合的HVR残基。特别地,经常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0211] 在某些实施方案中,可以在一个或多个HVR内发生替代,插入,或删除,只要此类变化不实质性降低抗体结合抗原的能力。例如,可以对HVR做出保守变化(例如,保守替代,如本文中提供的),其不实质性降低结合亲和力。此类变化可以在HVR“热点”或SDR外部。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR是未改变的,或者含有不超过1,2或3处氨基酸替代。

[0212] 一种可用于鉴定抗体中可以作为诱变靶位的残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如由Cunningham和Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所描述的。在此方法中,将残基或靶残基的组(例如,带电荷的残基诸如arg,asp,his,lys,和glu)鉴定,并用中性或带负电荷的氨基酸(例如,丙氨酸或多丙氨酸)替换以测定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在对初始替代表明功能敏感性的氨基酸位置引入进一步的替代。或者/另外,利用抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体与抗原间的接触点。作为替代的候选,可以靶向或消除此类接触残基和邻近残基。可以筛选变体以确定它们是否含有期望的特性。

[0213] 氨基酸序列插入包括长度范围为1个残基至含有100或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基端融合,及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N或C端与酶(例如对于ADEPT)或延长抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

[0214] b) 糖基化变体

[0215] 在某些实施方案中,改变本文中提供的抗体以提高或降低抗体糖基化的程度。可以通过改变氨基酸序列,使得创建或消除一个或多个糖基化位点来方便地实现对抗体的糖基化位点的添加或删除。

[0216] 在抗体包含Fc区的情况中,可以改变其附着的碳水化合物。由哺乳动物细胞生成的天然抗体通常包含分支的,双触角寡糖,其一般通过N连接附着于Fc区的CH2域的Asn297。参见例如Wright等, *TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如,甘露糖, N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc), 半乳糖, 和唾液酸, 以及附着于双触角寡糖结构“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可以对本发明的抗体中的寡糖进行修饰以创建具有某些改善的特性的抗体变体。

[0217] 在一个实施方案中,提供了抗体变体,其具有缺乏附着(直接或间接)于Fc区的岩

藻糖的碳水化合物结构。例如,此类抗体中的岩藻糖量可以是1%至80%,1%至65%,5%至65%或20%至40%。通过相对于附着于Asn297的所有糖结构(例如,复合的,杂合的和高甘露糖的结构)的总和,计算Asn297处糖链内岩藻糖的平均量来测定岩藻糖量,如通过MALDI-TOF质谱术测量的,例如如记载于WO 2008/077546的。Asn297指位于Fc区中的约第297位(Fc区残基的Eu编号方式)的天冬酰胺残基;然而,Asn297也可以由于抗体中的微小序列变异而位于第297位上游或下游约±3个氨基酸,即在第294位和第300位之间。此类岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。参见例如美国专利公开文本No.US 2003/0157108 (Presta, L.);US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。涉及“脱岩藻糖基化的”或“岩藻糖缺乏的”抗体变体的出版物的例子包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等, J.Mol.Biol.336:1239-1249 (2004);Yamane-Ohnuki等,Biotech.Bioeng.87:614 (2004)。能够生成脱岩藻糖基化抗体的细胞系的例子包括蛋白质岩藻糖基化缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka等,Arch.Biochem.Biophys.249:533-545 (1986);美国专利申请No US 2003/0157108 A1,Presta,L;及WO 2004/056312 A1,Adams等,尤其在实施例11),和敲除细胞系,诸如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki等, Biotech.Bioeng.87:614 (2004);Kanda,Y.等,Biotechnol.Bioeng.,94 (4):680-688 (2006);及WO2003/085107)。

[0218] 进一步提供了具有两分型寡糖的抗体变体,例如其中附着于抗体Fc区的双触角寡糖是通过GlcNAc两分的。此类抗体变体可以具有降低的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的例子记载于例如WO 2003/011878 (Jean-Mairet等);美国专利No.6,602,684 (Umana等);及US 2005/0123546 (Umana等)。还提供了在附着于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可以具有改善的CDC功能。此类抗体变体记载于例如WO 1997/30087 (Patel等);WO 1998/58964 (Raju,S.);及WO 1999/22764 (Raju,S.)。

[0219] c) Fc区变体

[0220] 在某些实施方案中,可以将一处或多处氨基酸修饰引入本文中提供的抗体的Fc区中,由此生成Fc区变体。Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置包含氨基酸修饰(例如替代)的人Fc区序列(例如,人IgG1,IgG2,IgG3或IgG4Fc区)。

[0221] 在某些实施方案中,抗体变体拥有一些但不是所有效应器功能,所述效应器功能使其成为如下应用的期望候选物,其中抗体的体内半衰期是重要的,而某些效应器功能(诸如补体和ADCC)是不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定法以确认CDC和/或ADCC活性的降低/消减。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定法以确保抗体缺乏Fc γ R结合(因此有可能缺乏ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI,Fc γ RII和Fc γ RIII。在Ravetch和Kinet, Annu.Rev.Immunol.9:457-492 (1991)的第464页上的表3中汇总了造血细胞上的FcR表达。评估感兴趣分子的ADCC活性的体外测定法的非限制性例子记载于美国专利No.5,500,362 (参见例如Hellstrom,I.等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063 (1986)) and Hellstrom,I等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502 (1985);5,821,337 (参见

Bruggemann, M. 等, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987))。或者, 可以采用非放射性测定方法 (参见例如用于流式细胞术的 ACT1™ 非放射性细胞毒性测定法 (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA; 和 CytoTox 96® 非放射性细胞毒性测定法 (Promega, Madison, WI))。对于此类测定法有用的效应细胞包括外周血单个核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。或者/另外, 可以在体内评估感兴趣分子的 ADCC 活性, 例如在动物模型中, 诸如披露于 Clynes 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998) 的。也可以实施 C1q 结合测定法以确认抗体不能结合 C1q, 并且因此缺乏 CDC 活性。参见例如 WO 2006/029879 和 WO 2005/100402 中的 C1q 和 C3c 结合 ELISA。为了评估补体激活, 可以实施 CDC 测定法 (参见例如 Gazzano-Santoro 等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M. S. 等, Blood 101:1045-1052 (2003); 及 Cragg, M. S. 和 M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004))。也可以使用本领域中已知的方法来实施 FcRn 结合和体内清除/半衰期测定 (参见例如 Petkova, S. B. 等, Int'l. Immunol. 18 (12):1759-1769 (2006))。

[0222] 具有降低的效应器功能的抗体包括那些具有 Fc 区残基 238, 265, 269, 270, 297, 327 和 329 中的一个或多个的替代的 (美国专利 No. 6,737,056)。此类 Fc 突变体包括在氨基酸位置 265, 269, 270, 297 和 327 中的两处或更多处具有替代的 Fc 突变体, 包括残基 265 和 297 替代成丙氨酸的所谓的“DANA”Fc 突变体 (美国专利 No. 7,332,581)。

[0223] 描述了具有改善的或降低的对 FcR 的结合的某些抗体变体 (参见例如美国专利 No. 6,737,056; WO 2004/056312, 及 Shields 等, J. Biol. Chem. 9 (2):6591-6604 (2001))。

[0224] 在某些实施方案中, 抗体变体包含具有改善 ADCC 的一处或多处氨基酸替代, 例如 Fc 区的位置 298, 333, 和/或 334 (残基的 EU 编号方式) 的替代的 Fc 区。

[0225] 在一些实施方案中, 对 Fc 区做出改变, 其导致改变的 (即, 改善的或降低的) C1q 结合和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC), 例如, 如记载于美国专利 No. 6,194,551, WO 99/51642, 及 Idusogie 等, J. Immunol. 164:4178-4184 (2000) 的。

[0226] 具有延长的半衰期和改善的对新生儿 Fc 受体 (FcRn) 的结合的抗体记载于 US2005/0014934A1 (Hinton 等), 新生儿 Fc 受体 (FcRn) 负责将母体 IgG 转移至胎儿 (Guyer 等, J. Immunol. 117:587 (1976) 及 Kim 等, J. Immunol. 24:249 (1994))。那些抗体包含其中具有改善 Fc 区对 FcRn 结合的一处或多处替代的 Fc 区。此类 Fc 变体包括那些在 Fc 区残基 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 或 434 中的一处或多处具有替代, 例如, Fc 区残基 434 的替代的 (美国专利 No. 7,371,826)。

[0227] 还可参见 Duncan 和 Winter, Nature 322:738-40 (1988); 美国专利 No. 5,648,260; 美国专利 No. 5,624,821; 及 WO 94/29351, 其关注 Fc 区变体的其它例子。

[0228] d) 经半胱氨酸工程化改造的抗体变体

[0229] 在某些实施方案中, 可以期望创建经半胱氨酸工程化改造的抗体, 例如, “thioMAb”, 其中抗体的一个或多个残基用半胱氨酸残基替代。在具体的实施方案中, 替代的残基存在于抗体的可接近位点。通过用半胱氨酸替代那些残基, 反应性硫醇基团由此定位于抗体的可接近位点, 并且可以用于将抗体与其它模块, 诸如药物模块或接头-药物模块缀合, 以创建免疫缀合物, 如本文中进一步描述的。在某些实施方案中, 可以用半胱氨酸替代下列残基之任一个或多个: 轻链的 V205 (Kabat 编号方式); 重链的 A118 (EU 编号方式); 和重链 Fc 区的 S400 (EU 编号方式)。可以如例如美国专利 No. 7,521,541 所述生成经半胱氨酸工

程化改造的抗体。

[0230] e) 抗体衍生物

[0231] 在某些实施方案中,可以进一步修饰本文中提供的抗体以含有本领域知道的且易于获得的额外非蛋白质性质模块。适合于抗体衍生化的模块包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG),乙二醇/丙二醇共聚物,羧甲基纤维素,右旋糖苷,聚乙烯醇,聚乙烯吡咯烷酮,聚-1,3-二氧戊环,聚-1,3,6-三口恶烷,乙烯/马来酸酐共聚物,聚氨基酸(均聚物或随机共聚物),和右旋糖苷或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇,丙二醇均聚物,环氧丙烷/环氧乙烷共聚物,聚氧乙烯化多元醇(例如甘油),聚乙烯醇及其混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛在生产中可能具有优势。聚合物可以是任何分子量,而且可以是分支的或不分支的。附着到抗体上的聚合物数目可以变化,而且如果附着了超过一个聚合物,那么它们可以是相同或不同的分子。一般而言,可根据下列考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型,包括但不限于抗体要改进的具体特性或功能,抗体衍生物是否将用于指定条件下的治疗等。

[0232] 在另一个实施方案中,提供了抗体和可以通过暴露于辐射选择性加热的非蛋白质性质模块的缀合物。在一个实施方案中,非蛋白质性质模块是碳纳米管(Kam等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605(2005))。辐射可以是任何波长的,并且包括但不限于对普通细胞没有损害,但是将非蛋白质性质模块加热至抗体-非蛋白质性质模块附近的细胞被杀死的温度的波长。

[0233] B. 重组方法和组合物

[0234] 可以使用重组方法和组合物来生成抗体,例如,如记载于美国专利No.4,816,567的。在一个实施方案中,提供了编码本文中所描述的抗LgR5抗体的分离的核酸。此类核酸可以编码包含抗体VL的氨基酸序列和/或包含VH的氨基酸序列(例如,抗体的轻和/或重链)。在又一个实施方案中,提供了包含此类核酸的一种或多种载体(例如,表达载体)。在又一个实施方案中,提供了包含此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施方案中,宿主细胞包含(例如,已经用下列载体转化):(1)包含核酸的载体,所述核酸编码包含抗体的VL的氨基酸序列和包含抗体的VH的氨基酸序列,或(2)第一载体和第二载体,所述第一载体包含编码包含抗体的VL的氨基酸序列的核酸,所述第二载体包含编码包含抗体的VH的氨基酸序列的核酸。在一个实施方案中,宿主细胞是真核的,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,Y0,NS0,Sp20细胞)。在一个实施方案中,提供了生成抗LgR5抗体的方法,其中该方法包括在适合于表达抗体的条件下培养包含编码抗体的核酸的宿主细胞,如上文提供的,并且任选地,自宿主细胞(或宿主细胞培养液)回收抗体。

[0235] 对于抗LgR5抗体的重组生成,将编码抗体的核酸(例如如上文所描述的)分离,并插入一种或多种载体中,以在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规规程将此类核酸容易地分离并测序(例如,通过使用寡核苷酸探针来进行,所述寡核苷酸探针能够特异性结合编码抗体的重和轻链的基因)。

[0236] 适合于克隆或表达抗体编码载体的宿主细胞包括本文中所描述的原核或真核细胞。例如,可以在细菌中生成抗体,特别是在不需要糖基化和Fc效应器功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见例如美国专利No.5,648,237,5,789,199和5,840,523(还可参见Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编,Humana Press,

Totowa, NJ, 2003), 第245-254页, 其描述了抗体片段在大肠杆菌 (*E. coli.*) 中的表达。表达后, 可以将抗体在可溶性级分中自细菌细胞团糊分离, 并可以进一步纯化。

[0237] 在原核生物外, 真核微生物诸如丝状真菌或酵母是适合于抗体编码载体的克隆或表达宿主, 包括其糖基化途径已经“人源化”, 导致生成具有部分或完全人的糖基化样式的抗体的真菌和酵母菌株。参见Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), 及Li等, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)。

[0238] 适合于表达糖基化抗体的宿主细胞也自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)衍生。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定出许多杆状病毒株, 其可以与昆虫细胞一起使用, 特别是用于转染草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞。

[0239] 也可以利用植物细胞培养物作为宿主。参见例如美国专利No. 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978和6,417,429 (其描述了用于在转基因植物中生成抗体的 PLANTIBODIES™ 技术)。

[0240] 也可以使用脊椎动物细胞作为宿主。例如, 适合于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可以是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其它例子是经SV40转化的猴肾CV1系(COS-7); 人胚肾系(293或293细胞, 如记载于例如Graham等, *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977) 的); 幼年仓鼠肾细胞(BHK); 小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4细胞, 如记载于例如Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980) 的); 猴肾细胞(CV1); 非洲绿猴肾细胞(VERO-76); 人宫颈癌细胞(HELA); 犬肾细胞(MDCK); 牛鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A); 人肺细胞(W138); 人肝细胞(Hep G2); 小鼠乳房肿瘤(MMT 060562); TRI细胞, 如记载于例如Mather等, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982) 的; MRC 5细胞; 和FS4细胞。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞, 包括DHFR⁻CHO细胞(Urlaub等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); 和骨髓瘤细胞系诸如Y0, NS0和Sp2/0。关于适合于抗体生成的某些哺乳动物宿主细胞系的综述, 参见例如Yazaki和Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷(B.K.C.Lo编, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268页(2003)。

[0241] C. 测定法

[0242] 可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的抗LgR5抗体鉴定, 筛选, 或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

[0243] 一方面, 对本发明的抗体测试其抗原结合活性, 例如通过已知的方法诸如ELISA, FACS或Western印迹来进行。

[0244] 另一方面, 可使用竞争测定法来鉴定与本文所述任何抗体竞争对LgR5的结合的抗体。在某些实施方案中, 此类竞争性抗体结合与本文所述抗体所结合表位相同的表位(例如线性或构象表位)。用于定位抗体所结合表位的详细例示性方法参见Morris (1996) “Epitope Mapping Protocols”, *Methods in Molecular Biology* vol.66 (Humana Press, Totowa, NJ)。

[0245] 在一种例示性竞争测定法中, 在包含第一经标记抗体(其结合LgR5, 例如本文所述任何抗体)和第二未标记抗体(其要测试与第一抗体竞争对LgR5的结合的能力)的溶液中温育固定化LgR5。第二抗体可存在于杂交瘤上清液中。作为对照, 在包含第一经标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中温育固定化LgR5。在允许第一抗体结合LgR5的条件下温育后, 除去过量的未结合抗体, 并测量与固定化LgR5联合的标记物的量。如果测试样品中与固

定化LgR5联合的标记物的量与对照样品相比实质性降低,那么这指示第二抗体与第一抗体竞争对LgR5的结合。参见Harlow和Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

[0246] D. 免疫缀合物

[0247] 本发明还提供免疫缀合物,其包含缀合有一种或多种细胞毒剂(诸如化疗剂或化疗药物,生长抑制剂,毒素(例如蛋白质毒素,细菌,真菌,植物,或动物起源的酶活性毒素,或其片段),或放射性同位素(即放射缀合物))的本文中抗LgR5抗体。

[0248] 免疫缀合物容许将药物模块靶向投递至肿瘤,而且在一些实施方案中,在其中胞内积累,在那里系统施用未缀合的药物可对正常细胞导致不可接受水平的毒性 (Polakis, P. (2005) *Current Opinion in Pharmacology* 5:382-387)。

[0249] 抗体-药物缀合物 (ADC) 是靶向化疗分子,其通过将有力的细胞毒性药物靶向表达抗原的肿瘤细胞而组合抗体和细胞毒性药物二者的特性 (Teicher, B.A. (2009) *Current Cancer Drug Targets* 9:982-1004),由此通过最大化功效及最小化脱靶毒性而增强治疗指数 (Carter, P.J. 和 Senter, P.D. (2008) *The Cancer Jour.* 14 (3):154-169; Chari, R.V. (2008) *Acc. Chem. Res.* 41:98-107)。

[0250] 本发明的ADC化合物包括那些具有抗癌活性的。在一些实施方案中,该ADC化合物包括缀合(即共价附着)至药物模块的抗体。在一些实施方案中,经由接头将抗体共价附着至药物模块。本发明的抗体-药物缀合物 (ADC) 将有效剂量的药物选择性投递至肿瘤组织,由此在提高治疗指数(“治疗窗”)的同时可实现更大的选择性(即更低的有效剂量)。

[0251] 抗体-药物缀合物 (ADC) 的药物模块 (D) 可包括任何具有细胞毒性或细胞抑制性效果的化合物,模块或基团。药物模块可通过包括但不限于微管蛋白结合,DNA结合或插层,和抑制RNA聚合酶,蛋白质合成,和/或拓扑异构酶的机制来发挥它们的细胞毒性和细胞抑制性效果。例示性药物模块包括但不限于美登木素生物碱 (maytansinoid),多拉司他汀 (dolastatin),奥瑞司他汀 (auristatin),加利车霉素 (calicheamicin),吡咯并苯并二氮卓 (pyrrolobenzodiazepine, PBD),奈莫柔比星 (nemorubicin) 及其衍生物,PNU-159682,蒽环类抗生素 (anthracycline),度卡霉素 (duocarmycin),长春花生物碱 (vinca alkaloid),紫杉烷 (taxane),单端孢菌素 (trichothecene),CC1065,喜树碱 (camptothecin),依利奈法德 (elinafide),及其具有细胞毒性活性的立体异构体,电子等排体,类似物,和衍生物。

[0252] E. 用于诊断和检测的方法和组合物

[0253] 在某些实施方案中,本文中提供的任何抗LgR5抗体可用于检测生物学样品中LgR5的存在。在用于本文时,术语“检测”涵盖定量或定性检测。“生物学样品”包括例如细胞或组织(例如活检材料,包括癌性或潜在癌性的结肠,结直肠,小肠,子宫内膜,胰腺,或卵巢组织)。

[0254] 在一个实施方案中,提供了在诊断或检测方法中使用的抗LgR5抗体。在又一方面,提供了检测生物学样品中LgR5的存在的方法。在某些实施方案中,该方法包括在容许抗LgR5抗体结合LgR5的条件下使生物学样品与抗LgR5抗体接触,如本文中所描述的,并检测是否在抗LgR5抗体与生物学样品中的LgR5间形成复合物。此类方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中,使用抗LgR5抗体来选择适合用抗LgR5抗体治疗的受试者,例如其中LgR5是一种用于选择患者的生物标志。在又一个实施方案中,生物学样品是细胞或组织(例

如活检材料,包括癌性或潜在癌性的结肠,结直肠,小肠,子宫内膜,胰腺,或卵巢组织)。

[0255] 在又一个实施方案中,体内使用抗LgR5抗体来检测(例如通过体内成像)受试者中的LgR5阳性癌症,例如为了癌症诊断,预后,或分期,确定适宜的治疗过程,或监测癌症对治疗的响应的目的。本领域已知用于体内检测的一种方法是免疫-正电子发射体层摄影术(immuno-PET),如记载于例如vanDongen等,The Oncologist 12:1379-1389 (2007) 及Verel等,J.Nucl.Med.44:1271-1281 (2003)。在此类实施方案中,提供了一种用于检测受试者中的LgR5阳性癌症的方法,该方法包括将经过标记的抗LgR5抗体施用于具有或怀疑具有LgR5阳性癌症的受试者,并检测所述受试者中所述经过标记的抗LgR5抗体,其中检测到所述经过标记的抗LgR5抗体指示所述受试者中的LgR5阳性癌症。在某些此类实施方案中,经过标记的抗LgR5抗体包含与正电子发射体缀合的抗LgR5抗体,诸如⁶⁸Ga,¹⁸F,⁶⁴Cu,⁸⁶Y,⁷⁶Br,⁸⁹Zr,和¹²⁴I。在一个具体的实施方案中,正电子发射体是⁸⁹Zr。生成和使用⁸⁹Zr标记的抗体的非限制性例示性方法记载于例如PCT公开文本No.WO 2011/056983。在一些实施方案中,经标记的抗LgR5抗体为与一种或多种钼复合物缀合的半胱氨酸改造抗体。参见例如WO 2011/056983。

[0256] 在又一些实施方案中,诊断或检测方法包括使固定化至基片的第一抗LgR5抗体与要测试LgR5存在情况的生物学样品接触,使该基片暴露于第二抗LgR5抗体,并检测该第二抗LgR5抗体是否结合至该第一抗LgR5抗体和该生物学样品中的LgR5之间的复合物。基片可以是任何支持性介质,例如玻璃,金属,陶瓷,聚合物珠,载玻片,芯片,和其它基片。在某些实施方案中,生物学样品包括细胞或组织(例如活检材料,包括癌性或潜在癌性的结肠,结直肠,小肠,子宫内膜,胰腺或卵巢组织)。在某些实施方案中,第一或第二抗LgR5抗体是本文所述任何抗体。在此类实施方案中,第二抗LgR5抗体可以是本文所述αLgR5.1-12或自αLgR5.1-12衍生的抗体。在此类实施方案中,第二抗LgR5抗体可以是本文所述αLgR5.26-1或自αLgR5.26-1衍生的抗体。

[0257] 可依照任何上述实施方案来诊断或检测的例示性病症包括LgR5阳性癌症,诸如LgR5阳性结直肠癌(包括腺癌),LgR5阳性小肠癌(包括腺癌,肉瘤(例如平滑肌肉瘤),类癌肿瘤,胃肠基质肿瘤,和淋巴瘤),LgR5阳性卵巢癌(包括卵巢浆液状腺癌),LgR5阳性胰腺癌(包括胰腺导管腺癌),和LgR5阳性子宫内膜癌。

[0258] 在一些实施方案中,LgR5阳性癌症是在实施例(见例如实施例F、H、和I)中本文所述条件下得到大于“0”的LgR5免疫组织化学(IHC)得分的癌症,这对应于染色很弱或无染色。在另一个实施方案中,LgR5阳性癌症以1+,2+或3+水平表达LgR5,如在本文实施例(见例如实施例F、H、和I)中所述条件下定义的。在一些实施方案中,可以使用一种或多种细胞系作为染色水平的对照。例如,在一些实施方案中,可以使用实施例I中表4中所示细胞系作为染色水平的对照。例如,在一些实施方案中,可以使用细胞系SW480,RKO,COLO741,HCT-15,CX-1,HT-29,SW1116,HCA-7,和/或COLO-205作为0染色的对照;可以使用细胞系SW948,CACO-2,和/或C2BBel作为1+染色的对照;和/或,可以使用细胞系T84,SW1463,SK-CO-1,和/或LOVO作为2+染色的对照。在一些实施方案中,LgR5阳性癌症是得到50或更大的H得分的癌症,如在本文实施例H中所述条件下定义的(对应于使用50%+标准的1+,2+或3+的总体得分)。在一些实施方案中,LgR5阳性癌症是得到10或更大的H得分的癌症,如在本文实施例H中所述条件下定义的(对应于使用10%+标准的1+,2+或3+的总体得分)。

[0259] 在一些实施方案中,LgR5阳性癌症是根据检测LgR5mRNA的逆转录酶PCR (RT-PCR)测定法表达LgR5的癌症。在一些实施方案中,所述RT-PCR是定量RT-PCR。

[0260] 在某些实施方案中,提供了经标记的抗LgR5抗体。标记物包括但不限于直接检测的标记物或模块(诸如荧光,发色,电子致密,化学发光,和放射性标记物),及例如经由酶反应或分子相互作用间接检测的模块,诸如酶或配体。例示性的标记物包括但不限于放射性同位素 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H ,和 ^{131}I ,荧光团诸如稀土螯合物或荧光素及其衍生物,罗丹明(rhodamine)及其衍生物,丹酰,伞形酮,萤光素酶,例如,萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利No.4,737,456),萤光素,2,3-二氢酞嗪二酮,辣根过氧化物酶(HRP),碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶,葡糖淀粉酶,溶菌酶,糖类氧化酶,例如,葡萄糖氧化酶,半乳糖氧化酶,和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,杂环氧化酶诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶(其与采用过氧化氢氧化染料前体的酶诸如HRP偶联),乳过氧化物酶,或微过氧化物酶,生物素/亲合素,自旋标记物,噬菌体标记物,稳定的自由基,等等。在另一个实施方案中,标记物是正电子发射体。正电子发射体包括但不限于 ^{68}Ga , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr ,和 ^{124}I 。在一个具体的实施方案中,正电子发射体是 ^{89}Zr 。

[0261] F. 药物配制剂

[0262] 通过混合具有期望纯度的此类抗体或免疫缀合物与一种或多种任选的药学可接受载体(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编(1980))以冻干配制剂或水性溶液形式制备如本文中所描述的抗LgR5抗体或免疫缀合物的药物配制剂。一般地,药学可接受载体在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,而且包括但不限于缓冲剂,诸如磷酸盐,柠檬酸盐,和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵,苯索氯铵;酚,丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,组氨酸,精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖,甘露醇,海藻糖或山梨醇;成盐相反离子,诸如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。本文中的例示性的药学可接受载体进一步包含间质药物分散剂诸如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rHuPH20 (HYLENEX®,Baxter International,Inc.)。某些例示性的sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20记载于美国专利公开文本No.2005/0260186和2006/0104968。在一方面,将sHASEGP与一种或多种别的糖胺聚糖酶诸如软骨素酶组合。

[0263] 例示性的冻干抗体或免疫缀合物配制剂记载于美国专利No.6,267,958。水性抗体或免疫缀合物配制剂包括那些记载于美国专利No.6,171,586和W02006/044908的,后一种配制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0264] 本文中的配制剂还可含有超过一种所治疗具体适应症所必需的活性组分,优选那些活性互补且彼此没有不利影响的。例如,在一些情况中,可能期望进一步提供Avastin®(贝伐珠单抗),例如用于治疗LgR5阳性癌症,诸如LgR5阳性结肠癌或LgR5阳性结直肠癌。

[0265] 活性成分可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别

是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊),在胶状药物投递系统中(例如脂质体,清蛋白微球体,微乳剂,纳米颗粒和纳米胶囊),或在粗滴乳状液中。此类技术披露于例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编(1980)。

[0266] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适的例子包括含有抗体或免疫缀合物的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质为成形商品形式,例如膜,或微胶囊。

[0267] 用于体内施用的配制剂一般是无菌的。无菌性可容易地实现,例如通过穿过无菌滤膜过滤。

[0268] G. 治疗性方法和组合物

[0269] 可以在例如治疗性方法等方法中使用本文中提供的任何抗LgR5抗体或免疫缀合物。

[0270] 一方面,本文中提供的抗LgR5抗体或免疫缀合物用于抑制LgR5阳性细胞增殖的方法,该方法包括在允许抗LgR5抗体或免疫缀合物结合细胞表面上的LgR5的条件下将细胞暴露于抗LgR5抗体或免疫缀合物,由此抑制细胞增殖。在某些实施方案中,该方法是体外或体内方法。在又一些实施方案,该细胞为结肠,结直肠,小肠,卵巢,胰腺,或子宫内膜细胞。

[0271] 在一些实施方案中,本文中提供的抗LgR5抗体或免疫缀合物用于治疗如下癌症的方法,该癌症的至少一部分细胞中包含Kras基因中的突变和/或腺瘤性息肉病(APC)基因中的突变。在各种实施方案,该癌症选自结肠,结直肠,小肠,卵巢,胰腺,和子宫内膜癌。在一些实施方案中,本文中提供的抗LgR5抗体或免疫缀合物用于治疗如下结肠或结直肠癌的方法,该癌症的至少一部分细胞中包含Kras基因中的突变和/或APC基因中的突变。在癌症(包括结肠和结直肠癌)中找到的非限制性例示性Kras突变包括Kras密码子12(例如G12D, G12V, G12R, G12C, G12S, 和G12A),密码子13(例如G13D和G13C),密码子61(例如G61H, G61L, G61E, 和G61K),和密码子146处的突变。参见例如Yokota, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 12:163-171 (2012); Wicki等, *Swiss Med. Wkly*, 140:w13112 (2010)。在癌症中找到的非限制性例示性APC突变包括突变簇区(MCR)中的突变,诸如导致截短的APC基因产物的终止密码子和移码突变。参见例如Chandra等, *PLoS One*, 7:e34479 (2012); 和Kohler等, *Hum. Mol. Genet.*, 17:1978-1987 (2008)。

[0272] 在一些实施方案中,治疗癌症的方法包括对受试者施用抗LgR5抗体或免疫缀合物,其中该受试者具有至少一部分癌细胞中包含Kras突变和/或APC突变的癌症。在一些实施方案中,该癌症选自结肠,结直肠,小肠,卵巢,胰腺,和子宫内膜癌。在一些实施方案中,该癌症为结肠和/或结直肠癌。在一些实施方案中,该受试者先前已经确定具有至少一部分癌细胞中包含Kras突变和/或APC突变的癌症。在一些实施方案中,该癌症是LgR5阳性的。

[0273] 可通过许多方法学来分析样品中各种生物标志物的存在,其中许多是本领域中已知且熟练技术人员理解的,包括但不限于免疫组织化学("IHC"), Western印迹分析,免疫沉淀,分子结合测定法, ELISA, ELIFA, 荧光激活细胞分选("FACS"), MassARRAY, 蛋白组学, 基于血液的定量测定法(如例如血清ELISA), 生化酶活性测定法, 原位杂交, Southern分析, Northern分析, 全基因组测序, 聚合酶链式反应("PCR") (包括定量实时PCR("qRT-PCR") 和其它扩增类型检测方法, 诸如例如分支的DNA, SISBA, TMA等等), RNA-Seq, FISH, 微阵列分析, 基因表达概况分析, 和/或基因表达系列分析("SAGE"), 以及可通过蛋白质, 基因和/或组织阵列分析实施的许多种测定法中的任一种。用于评估基因和基因产物状态的典型方案

见于例如Ausubel等,eds.,1995,Current Protocols In Molecular Biology,Units 2 (Northern Blotting),4 (Southern Blotting),15 (Immunoblotting) 和18 (PCR Analysis)。还可使用多重免疫测定法,诸如那些可从Rules Based Medicine或Meso Scale Discovery (“MSD”) 获得的。

[0274] 体外细胞增殖抑制可使用可购自Promega (Madison,WI) 的CellTiter-Glo™发光细胞存活力测定法来测定。该测定法基于存在的ATP (它是代谢活跃细胞的指标) 的量化来测定培养物中的可存活细胞数目。参见Crouch等(1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88;美国专利No. 6602677。该测定法可以以96孔或384孔形式进行,使之适应自动化高通量筛选 (HTS)。参见Cree等(1995) AntiCancer Drugs 6:398-404。该测定法规程牵涉直接向培养细胞添加单一试剂 (CellTiter-Glo®试剂)。这导致细胞溶解和通过萤光素酶反应产生的发光信号的生成。发光信号与存在的ATP的量成正比,后者直接与培养物中存在的可存活细胞数成正比。可以通过光度计或CCD照相机成像装置来记录数据。发光输出表述成相对光单位 (RLU)。

[0275] 另一方面,本发明提供抗LgR5抗体或免疫缀合物,其用作药物。又一方面,本发明提供抗LgR5抗体或免疫缀合物,其用于治疗方法。在某些实施方案中,提供抗LgR5抗体或免疫缀合物,其用于治疗LgR5阳性癌症。在某些实施方案中,本发明提供抗LgR5抗体或免疫缀合物,其用于治疗具有LgR5阳性癌症的个体的方法,所述方法包括对个体施用有效量的所述抗LgR5抗体或免疫缀合物。在一个此类实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用有效量的至少一种其它的治疗剂,例如如下文所描述的。

[0276] 又一方面,本发明提供抗LgR5抗体或免疫缀合物制造或制备药物的用途。在一个实施方案中,所述药物用于治疗LgR5阳性癌症。在又一个实施方案中,所述药物用于治疗LgR5阳性癌症的方法,所述方法包括对具有LgR5阳性癌症的个体施用有效量的所述药物。在一个此类实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用有效量的至少一种其它的治疗剂,例如如下文所描述的。

[0277] 又一方面,本发明提供治疗LgR5阳性癌症的方法。在一个实施方案中,所述方法包括对具有此类LgR5阳性癌症的个体施用有效量的抗LgR5抗体或免疫缀合物。在一个此类实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用有效量的至少一种其它的治疗剂,如下文所描述的。

[0278] 依照任何上述实施方案的LgR5阳性癌症可以是例如LgR5阳性结肠或结直肠癌 (包括腺癌),LgR5阳性小肠癌 (包括腺癌,肉瘤 (例如平滑肌肉瘤),类癌肿瘤,胃肠基质肿瘤,和淋巴瘤),LgR5阳性卵巢癌 (包括卵巢浆液状腺癌),LgR5阳性胰腺癌 (包括胰腺导管腺癌),和LgR5阳性子宫内膜癌。

[0279] 在一些实施方案中,LgR5阳性癌症是得到大于“0”的LgR5免疫组织化学 (IHC) 得分的癌症,这对应于本文实施例中所述条件下的染色很弱或无染色 (见例如实施例F、H、和I)。在另一个实施方案中,LgR5阳性癌症以1+,2+或3+水平表达LgR5,如在本文实施例 (见例如实施例F、H、和I) 中所述条件下定义的。在一些实施方案中,可以使用一种或多种细胞系作为染色水平的对照。例如,在一些实施方案中,可以使用实施例I中表4中所示细胞系作为染色水平的对照。例如,在一些实施方案中,可以使用细胞系SW480,RK0,COL0741,HCT-15,CX-1,HT-29,SW1116,HCA-7,和/或COL0-205作为0染色的对照;可以使用细胞系SW948,CACO-2,

和/或C2BBel作为1+染色的对照;和/或,可以使用细胞系T84,SW1463,SK-CO-1,和/或LOVO作为2+染色的对照。在一些实施方案中,LgR5阳性癌症是得到50或更大的H得分的癌症,如在本文实施例H中所述条件下定义的(对应于使用50%+标准的1+,2+或3+的总体得分)。在一些实施方案中,LgR5阳性癌症是得到10或更大的H得分的癌症,如在本文实施例H中所述条件下定义的(对应于使用10%+标准的1+,2+或3+的总体得分)。

[0280] 在一些实施方案中,LgR5阳性癌症是根据检测LgR5mRNA的逆转录酶PCR(RT-PCR)测定法表达LgR5的癌症。在一些实施方案中,所述RT-PCR是定量RT-PCR。

[0281] 依照任何上述实施方案的“个体”可以是人。

[0282] 又一方面,本发明提供药物配制剂,其包含本文中提供的任何抗LgR5抗体或免疫缀合物,例如在任何上述治疗性方法中使用。在一个实施方案中,药物配制剂包含本文中提供的任何抗LgR5抗体或免疫缀合物和药学可接受载体。在另一个实施方案中,药物配制剂包含本文中提供的任何抗LgR5抗体或免疫缀合物和至少一种其它的治疗剂,例如如下文所描述的。

[0283] 可以单独或与疗法中的其它药剂组合使用本发明的抗体或免疫缀合物。例如,可以与至少一种别的治疗剂共施用本发明的抗体或免疫缀合物。在某些实施方案中,别的治疗剂是**Avastin®**(贝伐珠单抗),例如用于治疗LgR5阳性癌症,诸如LgR5阳性结肠癌或LgR5阳性结直肠癌。

[0284] 上文记录的此类组合疗法涵盖组合施用(其中两种或更多种治疗剂包含在同一配制剂或分开的配制剂中),和分开施用,在该情况中,可以在别的治疗剂和/或佐剂的施用之前,同时,和/或之后发生本发明抗体或免疫缀合物的施用。也可以与放射疗法组合使用本发明抗体或免疫缀合物。

[0285] 可以通过任何合适的手段,包括胃肠外,肺内,和鼻内,及若期望用于局部治疗的话,损伤内施用来施用抗体或免疫缀合物(和任何别的治疗剂)。胃肠外输注包括肌肉内,静脉内,动脉内,腹膜内,或皮下施用。部分根据施用是短暂的还是长期的,剂量给药可以通过任何合适的路径,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射进行。本文中涵盖各种剂量给药日程表,包括但不限于单次施用或在多个时间点里的多次施用,推注施用,和脉冲输注。

[0286] 抗体或免疫缀合物会以一种符合良好的医学实践的方式配制,确定剂量及施用。关于这一点考虑的因素包括在治疗的特定病症,在治疗的特定哺乳动物,患者个体的临床状态,病症的原因,药剂的递送部位,施用的方法,施用进度表,及其它为医学从业人员所知的因素。抗体或免疫缀合物无需但任选与一种或多种目前用于预防或治疗所讨论病症的药剂一起配制。此类其它药剂的有效量取决于配制剂中存在的抗体或免疫缀合物的量,病症或治疗的类型,及其它上文讨论的因素。这些药剂通常以与本文所述相同的剂量和施用路径使用,或者是本文所述剂量的约1-99%,或者凭经验/在临床上确定适宜的以任何剂量并通过任何途径使用。

[0287] 为了预防或治疗疾病,抗体或免疫缀合物(当单独或与一种或多种其它另外的治疗剂组合使用时)的适宜剂量会取决于要治疗的疾病的类型,抗体或免疫缀合物的类型,疾病的严重性和过程,施用抗体或免疫缀合物是为了预防还是治疗目的,在先的疗法,患者的临床史和对抗体或免疫缀合物的响应,及主治医师的斟酌决定。抗体或免疫缀合物适合于在一次或一系列的治疗中施用于患者。根据疾病的类型和严重性,约1 μ g/kg至15mg/kg(例

如0.1mg/kg-10mg/kg)的抗体或免疫缀合物可作为首次候选剂量施用于患者,无论是例如通过一次或多次分开的施用或者是通过连续输注。根据上文提到的因素,一种典型的日剂量可在约1 μ g/kg至100mg/kg或更多的范围内。对于几天或更长时间的重复施用,根据状况,治疗通常会持续直至发生疾病症状的期望阻抑。抗体或免疫缀合物的一种例示性剂量会在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围中。如此,可以对患者施用一剂或多剂约0.5mg/kg,2.0mg/kg,4.0mg/kg或10mg/kg(或其任意组合)。此类剂量可间歇施用,例如每周或每三周(例如,使得患者接受约2至约20或例如约6剂抗体)。可施用初始较高的加载剂量,接着施用一个或多个较低的剂量。然而,其它剂量方案可以是有用的。通过常规技术和测定法易于监测此疗法的进展。

[0288] 理解的是,可以使用免疫缀合物和抗LgR5抗体二者实施任何上述配制剂或治疗性方法。

[0289] H. 制品

[0290] 在另一方面,提供了一种制品,其含有可用于治疗,预防和/或诊断上文所描述的病症的材料。制品包含容器和容器上或与容器联合的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶,管形瓶,注射器,IV溶液袋,等等。容器可以由多种材料诸如玻璃或塑料形成。容器容纳单独或与另一种组合物组合有效治疗,预防和/或诊断病症的组合物,并且可以具有无菌存取口(例如,容器可以是具有由皮下注射针可穿过的塞子的管形瓶或静脉内溶液袋)。组合物中的至少一种活性剂是抗LgR5抗体或免疫缀合物。标签或包装插页指示使用组合物来治疗选择的状况。此外,制品可以包含(a)具有其中含有的组合物的第一容器,其中组合物包含抗体或免疫缀合物;和(b)具有其中含有的组合物的第二容器,其中组合物包含其它的细胞毒性或其它方面治疗性的药剂。在此实施方案中的制品可以进一步包含包装插页,其指示可以使用组合物来治疗特定的状况。或者/另外,制品可以进一步包含第二(或第三)容器,其包含药学可接受缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI),磷酸盐缓冲盐水,Ringer氏溶液或右旋糖溶液。它可以进一步包含从商业和用户观点看期望的其它材料,包括其它缓冲液,稀释剂,滤器,针,和注射器。

[0291] III. 实施例

[0292] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。应当理解,鉴于上文提供的一般描述,可以实施各种其它实施方案。

[0293] A. 人LgR5基因表达

[0294] 使用含有基因表达信息的专有数据库分析人LgR5基因表达(GeneExpress®, Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD)。使用微阵列概况浏览器进行GeneExpress®数据库的图形分析。图1是多种组织中的人LgR5基因表达的示意图。y轴上的刻度指示基于杂交信号强度的基因表达水平。自每一种所列组织的名称伸出的线的左边和右边都出现了点。线的左边出现的点代表正常组织中的基因表达,而线的右边出现的点代表肿瘤和患病组织中的基因表达。图1显示某些肿瘤或患病组织中相对于它们的正常对应物升高的LgR5基因表达。特别地,LgR5在结直肠,子宫内膜,和卵巢肿瘤中实质性过表达。图1,插图,显示LgR5至少在下述结肠肿瘤中过表达:腺癌,良性肿瘤,和转移性结肠肿瘤,而且还在具有结肠肿瘤含量小于50%的组织中过表达(图1插图中的“低肿瘤”);但是不在正常结肠,克罗恩氏病,或溃疡性结肠炎中过表达。人LgR5表达在正常组织中低得多,在正常脑,肌肉,卵巢,和胎盘组织中

具有低水平的表达。

[0295] B.人LgR5在结肠肿瘤中的流行度

[0296] 为了评估LgR5在结直肠癌中的表达,自多个来源获取57份原发性结直肠腺癌(Asterand,Detroit,MI;Bio-Options,Fullerton,CA;University of Michigan,Ann Arbor,MI;Cytomyx,Rockville,MD;Cooperative Human Tissue Network,Nashville,TN;Indivumed,Hamburg,Germany;ProteoGenex,Culver City,CA)。44%的样品来自男性,而且患者的平均年龄为66岁(范围为31至93岁)。如Bubendorf L.等,J Pathol.2001 Sep;195(1):72-9中记载的那样使用重复芯组装组织微阵列(TMA),而且包括5份来自匹配案例的正常结直肠粘膜样品。

[0297] 使用表2中所示寡核苷酸探针通过原位杂交测定LgR5表达。参见例如Jubb,AM等,Methods Mol Biol 2006;326:255-64。在分析之前使用 β -肌动蛋白的ISH来确认结直肠癌组织中的mRNA完整性。

[0298] 表2.同位素原位杂交探针的引物序列

[0299]

基因	Genbank 登录号	与探针 互补的 核苷酸	反义(AS) 或 有义(S)	正向引物 (5'至3')	反向引物 (5'至3')
Lgr5	NM_003667	508	AS	ACCAACTGCA TCCTAAACTG (SEQ ID NO:92)	ACCGAGTTTC ACCTCAGCTC (SEQ ID NO:93)
Lgr5	NM_003667	496	S	ACATTGCCCT GTTGCTCTTC (SEQ ID NO:94)	ACTGCTCTGA TATACTCAATC (SEQ ID NO:95)

[0300] 由经过训练的病理学家依照下述方案对LgR5杂交强度打分,考虑了染色的强度(银颗粒)以及宽度。

[0301] 0(阴性):>90%的肿瘤细胞中无杂交或杂交很弱

[0302] 1+(轻度):主流的杂交样式是弱的

[0303] 2+(中等):在大多数(>50%)增生性细胞中主流的杂交样式是中等强的

[0304] 3+(强):在大多数(>50%)增生性细胞中主流的杂交样式是强的

[0305] 使用有义探针来控制杂交的特异性。

[0306] 图2显示具有1+,2+,和3+水平的染色的例示性结肠肿瘤切片。顶部小图显示暗场图像,而底部小图显示明场图像。暗场图像中银颗粒的沉积指示探针杂交和LgR5mRNA表达。约77%(41/53)所分析的结肠肿瘤切片呈LgR5阳性,显示1+,2+,或3+水平的染色,34%(18/53)显示2+或3+染色。所分析的57份样品中有4份不能提供LgR5表达信息。

[0307] 为了评估Lgr5表达在结肠肿瘤中的意义,自圣詹姆斯大学医院(Leeds,UK)处自1988年至2003年的病理档案回顾性地汇编了基于群体的患者系列,该患者为结直肠腺癌经

历过手术切除。如Bubendorf L.等,J Pathol.2001 Sep;195(1):72-9中记载的那样用每位患者的正常粘膜的一份芯和腺癌的三份芯构建组织微阵列(TMA)。如上所述实施ISH并打分。还测定来自同一肿瘤的三份芯之间表达的异质性,并且表述为在三份芯之一中显示特定水平的不一致的肿瘤的比例。例如,如果三份芯具有得分+1,+3,和+3,那么来自该肿瘤的三份芯之一相差2。

[0308] 图3A显示结肠肿瘤组织微阵列中0,1+,2+,和3+水平的LgR5染色的流行度,是通过原位杂交测量的。75%的结肠肿瘤组织显示1+,2+,或3+水平的染色,其中37%显示2+或3+染色。图3B显示LgR5表达的异质性。67%的肿瘤显示三份芯之间没有异质性。32%在三份芯之一中显示1的不一致性,而且只有1%显示大于1的不一致性。

[0309] C.不适于免疫组织化学的商品化抗体

[0310] 测定Lgr5表达中一个长期存在的问题是缺乏高品质的免疫组织化学(IHC)反应性抗体。先前有限地检查了Lgr5的RNA表达;然而,关于人体中胃,结肠,和毛囊以外的正常组织表达样式的数据很少。

[0311] 对6种作为IHC抗体销售的不同商品化抗体测试了作为用于免疫组织化学的抗体的适合性。对家兔多克隆抗体MC-1235(MBL International Corp.,Woburn,MA)测试对293细胞表面上表达的LgR5的结合,没有观察到LgR5检测。当它在293细胞上过表达时,家兔多克隆抗体MC-1236(MBL International Corp.,Woburn,MA)能够对LgR5染色,但是与仅用载体转染的293细胞相比,在LoVo结肠癌细胞上没有观察到特异性LgR5染色。而且,用MC-1236染色的脑组织在血管内显示高水平的染色,提示可能是血清的背景染色。

[0312] 发现家兔单克隆抗体2495-1(Epitomics,Burlingame,CA)对293细胞表面上表达的LgR5特异性染色。LoVo和D5124结肠癌细胞显示弱胞质染色,而且一些SW116结肠癌细胞显示很弱的染色。人结肠和小肠组织在上皮隔室中显示弱染色,表征为遍及肠隐窝广泛弥漫的胞质染色。然而,在隐窝的基部没有注意到特异性染色,而且在所测试的任何细胞系或组织中没有观察到膜特异性染色。

[0313] 对另外3种商品化抗体测试了特异性LgR5染色:家兔多克隆抗体HPA012530(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO),家兔单克隆抗体LS-C105455(LifeSpan BioSciences,Inc.,Seattle,WA),和小鼠单克隆抗体TA503316(OriGene,Rockville,MD)。无一抗体显示正常人小肠和/或结肠组织样品的特异性膜染色,在那些组织的隐窝基底中也没有检测到LgR5。

[0314] D.家兔单克隆抗体生成

[0315] 在小鼠中开发IHC反应性抗体的数次尝试失败之后,我们在家兔中生成了IHC反应性抗体。给家兔免疫接种LgR5胞外域(ECD) huFc (SEQ ID NO:96) 融合蛋白,它是在CHO细胞中生成的。使用测试采血使用标准方案评估针对LgR5的血清滴度。发现2只家兔具有较好的免疫应答,并且选择它们作为用于脾切除和单克隆融合的候选。

[0316] 实施脾切除,分离脾细胞,并将 200×10^6 个淋巴细胞与 100×10^6 个融合配偶细胞融合,并分配到96孔板(Epitomics,Burlingame,CA)上。在标准条件下培养板。

[0317] 使用标准ELISA方案筛选板,其中用LgR5胞外域(ECD)-huFc融合物包被板。选择了3个克隆,并在24孔板中扩充。使用表达人或小鼠LgR5的293细胞通过免疫组织化学(IHC)和ELISA测试36个扩充的克隆。

[0318] 进一步测试之后,包括测定克隆是否生成识别人肠隐窝基底柱形细胞上的LgR5的抗体,选择抗体1-12和26-1用于克隆。简言之,使用TuboCapture试剂盒(Qiagen:目录#72232)遵循制造商的说明书分离来自杂交瘤细胞的mRNA,然后使用oligo-dT引物逆转录成cDNA。PCR扩增重链可变区(VH)。PCR整个轻链(LC)。使用限制酶HindIII和KpnI消化PCR扩增的VH区。使用限制酶HindIII和NotI消化PCR扩增的LC。使用Qiagen QIAquick PCR纯化试剂盒(目录#28014)纯化消化产物。纯化后,将VH和LC连接入重或轻链表达载体并转化入DH5 α 细胞(MC Lab,目录#DA-100)。挑取转化菌落,并使用相应的限制酶通过预期大小来确认插入物。使用TT5引物对具有预期大小的插入物的质粒测序。抗体1-12的重链可变区和轻链可变区的序列显示于图4,分别为SEQ ID NO:6和5;而抗体26-1的重链可变区和轻链可变区的序列显示于图4,分别为SEQ ID NO:8和7。

[0319] 将轻链和重链表达载体共转染入CHO细胞,并使用蛋白A自细胞培养物上清液纯化。

[0320] E. 抗体表位测定

[0321] 使用FACS竞争测定法来定位受到抗体1-12和26-1识别的表位。简言之,在293细胞中表达人LgR5,并使用抗体huYW353(重链和轻链序列分别显示于SEQ ID NO:98和88,先前已经显示结合LgR5上包含氨基酸22至122的表位)和抗体8E11(重和轻链可变区分别显示于SEQ ID NO:29和28,先前已经显示结合LgR5上包含氨基酸22至322的表位)实施竞争测定法。

[0322] 发现抗体26-1与huYW353和8E11竞争LgR5结合,而抗体1-12不与huYW353或8E11任一竞争LgR5结合。(数据未显示。)如此,看来抗体26-1结合人LgR5氨基酸22至322的区域中的表位,而抗体1-12结合该区域以外的表位。

[0323] F. 正常组织上LgR5的检测

[0324] 使用抗体LGR5.1-12来检测正常人组织上LgR5的表达。在Dako通用自动染色仪(Dako,Carpinteria,CA)上实施针对Lgr5的免疫组织化学(IHC)。简言之,将福尔马林固定,石蜡包膜的全组织和组织微阵列切片脱石蜡,并在PT模块(Thermo Scientific,Kalamazoo,MI)中用Target Retrieval pH 6(Dako)于99℃实施抗原揭露20分钟。用PBS中的3% H_2O_2 处理4分钟来抑制内源过氧化物酶,并使用亲合素/生物素封闭试剂盒(Vector Labs,Burlingame,CA)封闭内源生物素。使用3%BSA/PBS中的10%驴血清封闭内源IgG,并将针对Lgr5的一抗(LGR5.1-12)以4 μ g/ml于室温温育60分钟。将生物素化驴抗家兔IgG(Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA)于室温温育30分钟,接着用Vectastain ABC Elite-HRP(Vector Labs)于室温处理30分钟。用金属增强型DAB(Pierce Rockford,IL)于室温检测抗体结合5分钟,并用Mayer氏苏木精(Rowley Biochemical,Danvers,MA)对切片复染色。

[0325] 抗体LGR5.1-12以预期样式对正常肠隐窝染色。见图5A。还在毛囊中观察到中等染色(图5B),而且在输卵管,子宫内膜,肾上腺,和脊髓中观察到弱染色(图5C)。

[0326] G. 异种移植物肿瘤上LgR5的检测

[0327] 使用抗体YW353通过流式细胞术分析自LoVo X 1.1和D5124异种移植物模型小鼠分离的肿瘤以测定LgR5的表面表达。简言之,收获Lovo1.1或D5124肿瘤并用磷酸盐缓冲液(PBS)中的1%牛血清清蛋白(BSA)及胶原酶混合物处理。将肿瘤于37℃温育15分钟,并在

含1%BSA的PBS中清洗细胞。使细胞沉降并在氯化铵-钾裂解缓冲液中重悬浮以裂解红血球。在含1%BSA的PBS和含10%胎牛血清(FBS)的RRMI 1640培养基中清洗细胞。在荧光活化细胞分选缓冲液(含1%BSA的PBS)中重悬浮细胞,并与抗LgR5抗体一起温育45分钟,接着与缀合有PE的抗人二抗一起温育30分钟。用FACSCalibur™流式细胞仪(BD Biosciences)实施分析。

[0328] 图6显示该实验的结果。使用抗体YW353通过FACS能检测到(A) LoVo X1.1异种移植肿瘤细胞和(B) D5124异种移植肿瘤细胞表面上的LgR5。使用抗体LGR5.1-12,通过免疫组织化学,LgR5的表达对于(C) LoVo X 1.1异种移植肿瘤和(D) D5124异种移植肿瘤均为2+。(C)中所示小图顶部是视野中显示每种水平的染色的细胞的百分比。

[0329] H. 通过免疫组织化学,结肠肿瘤上LgR5的流行度

[0330] 为了测定结肠肿瘤中LgR5的流行度,如上文实施例(E)中所述那样使用抗体LGR5.1-12在含有来自143份不同结肠肿瘤的芯的组织微阵列上实施免疫组织化学。

[0331] 使用下述标准:

[0332] 0=无染色,

[0333] 1+=弱染色,

[0334] 2+=中等染色,和

[0335] 3+=强染色,

[0336] 40%的结肠肿瘤呈LgR5阳性,其中29%(41/143)得分1+,9%(13/143)得分2+,而2%(3/143)得分3+。

[0337] 使用抗体LGR5.1-12通过IHC,剩余结肠肿瘤(86/143)得分0。图7A至D显示使用抗体LGR5.1-12时结肠肿瘤的例示性0,1+,2+,和3+染色。

[0338] 观察到IHC染色的实质性异质性。因此,使用抗体LGR5.1-12对19份结肠癌肿瘤切片实施IHC。3份切片呈LgR5表达阴性;在2份切片中,超过50%的细胞呈LgR5阳性;剩余切片显示介于0和50%之间的染色。表3显示每份切片中以每一种水平染色的细胞的百分比,和使用50%标准(即50%或更多的细胞呈LgR5阳性)或10%标准(即10%的细胞呈LgR5阳性)的总体得分。为了比较,还包括在上文所述D5124和LoVo异种移植肿瘤中观察到的染色。H得分等于(%以1+染色的细胞)+(%以2+染色的细胞)x2+(%以3+染色的细胞)x3。H得分考虑了处于每一种染色强度的细胞的百分比。

[0339] 表3:使用抗体LGR5.1-12对结肠肿瘤切片的免疫组织化学

[0340]

样品	0	+1	+2	+3	H得分	总体得分 (50%+标准)	总体得分 (10%+标准)
HP-2889	40	45	15	0	75	1+	1+
HP-9328	80	17	3	0	23	0	1+
HP-11394	85	10	5	0	20	0	1+
HP-19862	85	0	15	0	30	0	2+
HP-19882	75	25	0	0	25	0	1+
HP-20531	60	40	0	0	40	0	1+
HP-21638	25	65	10	0	85	1+	1+
HP-23099	85	15	0	0	15	0	1+
HP-23301	15	20	65	0	150	2+	2+
HP-23302	50	45	5	0	55	1+	1+
HP-23433	55	5	35	5	90	0	2+
HP-23451	95	5	0	0	5	0	0
HP-24574	75	10	15	0	40	0	2+
HP-24583	100	0	0	0	0	0	0
HP-24586	85	10	5	0	20	0	1+
HP-24589	100	0	0	0	0	0	0
HP-24592	90	10	0	0	10	0	1+

[0341]

HP-24671	100	0	0	0	0	0	0
HP-24672	95	5	0	0	5	0	0
D5124异种模型	10	20	70	0	160	2+	2+
LOVO异种模型	45	20	25	10	100	2+	2+

[0342] 这些结果证明抗体LGR5.1-12能够检测结肠肿瘤中的Lgr5表达。总之,在多种正常组织隔室内观察到Lgr5 RNA和蛋白质表达,而且虽然是异质的,但是Lgr5在结肠肿瘤中表达。

[0343] I. 用抗体LGR5.26-1进行的免疫组织化学

[0344] 在CXF233(人结肠肿瘤模型;Oncotest)异种移植物肿瘤中及在多种结肠癌细胞系中比较抗体LGR5.26-1的染色与抗体LGR5.1-12的染色。在Dako通用自动染色仪(Dako, Carpinteria, CA)上实施针对Lgr5的免疫组织化学(IHC)。简言之,将福尔马林固定,石蜡包膜的肿瘤组织脱石蜡,并在PT模块(Thermo Scientific, Kalamazoo, MI)中用Target

Retrieval pH 6 (Dako) 于99℃实施抗原揭露20分钟。用PBS中的3% H_2O_2 处理4分钟来抑制内源过氧化物酶,并使用亲合素/生物素封闭试剂盒 (Vector Labs, Burlingame, CA) 封闭内源生物素。使用3%BSA/PBS中的10%驴血清封闭内源IgG,并将针对Lgr5的一抗 (LGR5.1-12或26-1) 以4 μ g/ml于室温温育60分钟。将生物素化驴抗家兔IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 于室温温育30分钟,接着用Vectastain ABC Elite-HRP (Vector Labs) 于室温处理30分钟。用金属增强型DAB (Pierce Rockford, IL) 于室温检测抗体结合5分钟,并用Mayer氏苏木精 (Rowley Biochemical, Danvers, MA) 对切片复染色。

[0345] 如图8中所示,抗体LGR5.1-12 (A) 和抗体LGR5.26-1 (B) 在CXF233异种移植物肿瘤样品中显示相似的染色样式。

[0346] 还使用RNAseq数据通过lgr5基因表达将每一种细胞系表征成下述表达水平:无,很低,低,中等,和高。另外,实质性如上文所述那样通过IHC测定细胞系中的LgR5水平。该实验的结果显示于表4。

[0347] 表4:使用抗体LGR5.1-12和LGR5.26-1对结肠癌细胞系的IHC染色

[0348]

RNAseq表达	细胞系	FACS	Ab1-12	Ab26-1
无	SW480		0	0
无	RKO		0	0

[0349]

无	COLO741		0	0
很低	HCT-15		0	0
很低	CX-1		0	0
很低	HT-29		0	0
很低	SW403		2+ (60%)	1+ (65%)
低	SW1116		0	0
低	HCA-7		0	0
低	COLO-205		0	0
低	LS180	-	0	1+ (10%)
低	SW948		1+ (15%)	1+ (10%)
中等	CACO-2		1+ (15%)	1+ (15%)
中等	T84		2+ (40%)	2+ (40%)
中等	KM-12		2+ (25%)	1+ (60%)
中等	C2BBe1		1+ (10%)	1+ (15%)
高	DLD-1	-	0	1+ (10%)
高	SW620	-	0	1+ (20%)
高	SW1463	+/-	2+ (50%)	2+ (25%)
高	SK-CO-1	+/-	2+ (80%)	2+ (85%)
高	LS174T	-	0	0
高	LOVO	++	2+ (50%)	2+ (50%)

[0350] 抗体LGR5.1-12和抗体LGR5.26-1均能够检测多种不同结肠癌细胞系表面上的LgR5。

[0351] 尽管为了清楚理解的目的已经通过例示和实施例的方式较为详细地描述了上述发明,说明书和实施例不应解释为限制发明范围。通过援引明确收录本文中引用的所有专利和科学文献的完整公开内容。

[0352] 序列的表格

[0353]

SEQ ID NO	说明	序列
1	α LgR5.1-12 轻链	AYDMTQTPAS VEVAVGGT VT IKCQASQSIG SNLAWYQQKP GQPPKLLIYG ASNLAGSVSS RFKGS SSGTE FTLTISDLEC ADAATYYCQT TYGSSSDGFF WTFGGGTEVV VKGDPVAPT V LIFPPAADQV ATGTVTIVCV ANKYFPDVT V TWEVDGTTQT TGIENSKTPQ NSADCTYNLS STLTLTSTQY NSHKEYTCKV TQGTTSVVQS FNRGDC
2	α LgR5.1-12 重链	QSLEESGGGL VQPEGSLT LT CTASGFSFSR TYWICWDRQA PGKGLEWIA C IYAGGSNTY YASWAKGRFT ISKTSSTTVT LQVTSLTAA D TATYFCARY Y AGSSEYFNLW GPGLTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCCGDTPS STVTLGCLVK GYLPEPVT V WNSGTLTNGV RTFPSVRQSS GLYSLSSVVS VTSSSQPVTC NVAHPATNTK VDKTVAPSTC SKPTCPPPEL LGGPSVFIFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQDDPEVQ FTWYINNEQV RTARPLREQ QNSTIRVVS TLPIAHQDWL RGKEFKCKVH NKALPAPIEK TISKARGQPL EPKVYTMGPP REELSSRSVS LTCMINGFYP SDISVEWEKN GKAEDNYKTT PAVLSDGSY FLYSKLSVPT SEWQRGDVFT CSVMHEALHN HYTQKSISRS PGK
3	α LgR5.26-1 轻链	AFELTQTPSS VEAAVGGT VT IKCQASQSIG VGLAWYQQKP GQPPKLLIYK ASTLASGVPS RFKGS SSGTE FTLTISDLEC ADAATYYCQS YDSSSTTANV FGGGTEVVVK GDPVAPT VLI FPPAADQVAT GTVTIVCVAN KYFPDVTVTW EVDGTTQTG IENSKTPQNS ADCTYNLSST LTLTSTQYNS HKEYTCKVTQ GTTSVVQSFN RGDC
4	α LgR5.26-1 重链	QSLEESGGDL VKPGGTLT LT CTASGIDFSY YSYM CWVRQA PGKGLEWIA C IYAGTSGSTY YASWAKGRFT ISKTSSTTVT LQMISLTAA D TATYFCARS Y YTFGVNGYAW DLWGPGLTVT VSSASTKGPS VFPLAPCCG DTPSSTVTLGC LVKGYLPEPV TVTWNSTLT NGVRTFPSVR QSSGLYSLSS VVSVTSSSQP VTCNVAHPAT NTKVDKTVAP STCSKPTCPP PELLGGPSVF IFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSQDDP EVQFTWYINN EQVRTARPL REQQFNSTIR VVSTLPIAHQ DWLRGKEFKC KVHNKALPAP IEKTISKARG QPLEPKVYTM GPPREELSSR SVSLTCMING FYPSDISVEW EKNGKAEDNY KTTPAVLDS D GSYFLYSKLS VPTSEWQRGD VFTCSVMHEA LHNHYTQKSI SRSPGK
5	α LgR5.1-12 轻链可变区	AYDMTQTPAS VEVAVGGT VT IKCQASQSIG SNLAWYQQKP GQPPKLLIYK ASNLAGSVSS RFKGS SSGTE FTLTISDLEC ADAATYYCQT TYGSSSDGFF WTFGGGTEVV VK
6	α LgR5.1-12 重链可变区	QSLEESGGGL VQPEGSLT LT CTASGFSFSR TYWICWDRQA PGKGLEWIA C IYAGGSNTY YASWAKGRFT ISKTSSTTVT LQVTSLTAA D TATYFCARY Y AGSSEYFNLW GPGLTVTVSS
7	α LgR5.26-1 轻链可变区	AFELTQTPSS VEAAVGGT VT IKCQASQSIG VGLAWYQQKP GQPPKLLIYK ASTLASGVPS RFKGS SSGTE FTLTISDLEC ADAATYYCQS YDSSSTTANV FGGGTEVVVK
8	α LgR5.26-1 重链可变区	QSLEESGGDL VKPGGTLT LT CTASGIDFSY YSYM CWVRQA PGKGLEWIA C IYAGTSGSTY YASWAKGRFT ISKTSSTTVT LQMISLTAA D TATYFCARS Y YTFGVNGYAW DLWGPGLTVT VSS
9	α LgR5.1-12 HVR-L1	QASQSIGSNL A
10	α LgR5.1-12 HVR-L2	GASNLAS
11	α LgR5.1-12 HVR-L3	QTTYGSSSDG FFWT
12	α LgR5.1-12 HVR-H1	RTYWIC
13	α LgR5.1-12 HVR-H2	CIYAGGS DNT YYASWAK
14	α LgR5.1-12 HVR-H3	YYAGSSEYFN L
15	α LgR5.26-1 HVR-L1	QASQSISVGL A
16	α LgR5.26-1 HVR-L2	KASTLAS
17	α LgR5.26-1 HVR-L3	QSY YDSSSTA NV
18	α LgR5.26-1	YYSYMC

[0354]

	HVR-H1	
19	α LgR5.26-1 HVR-H2	CIYAGTSGST YYASWAK
20	α LgR5.26-1 HVR-H3	SYTTFGVNGY AWDL
21	人LgR5前体; LGR5_人 NP_003658; 信号序列= 氨基酸1-21; 22至558是 胞外域(ECD)	MDTSRLGVLL SLPVLLQLAT GGSSPRSGVL LRGCPTHCHC EPDGRMLLRV DCSDLGLSEL PSNLSVFSTY LDLSMNNISQ LLPNPLPSLR FLEELRLAGN ALTYIPKGAF TGLYSLKVLML QNNQLRHVP TEALQNLRS QSLRLDANHI SYVPPSCFSG LHSRLHLWLD DNALTEIPVQ AFRSLSALQA MTLALNKIHH IPDYAFGNLS SLVVLHLHNN RHSLGKKCF DGLHSLETLD LNYNNLDEFP TAIRTLNLK ELGFHSNNIR SIPEKAFVGN PSLITIHFDYD NPIQFVGRSA FQHLPELRTL TLNGASQITE FPDLTGTANL ESLELTGAQI SSLPQTVCNQ LPNLQVLDLS YNLEDLPSF SVCQKLQKID LRHNEIYEIK VDTFQQLLSL RSLNLAWNKI AIIHPNAFST LPSLIKLDLS SNLLSSFPT GLHGLTHLKL TGNHALQSLI SSENFPPELV IEMPYAYQCC AFGVCENAYK ISNQWNKGDN SSMDDLHKKD AGMFQAQDER DLEDFLLDFE EDLKALHSVQ CSPSPGPFKP CEHLLDGWLI RIGVWTIAVL ALTNCALVTS TVFRSPYIS PIKLLIGVIA AVNMLTGVSS AVLAGVDAFT FGSFARHGAW WENGVGCHVI GFLSIFASES SVFLLTLAAL ERGFSVKYSA KFETKAPFSS LKVIILLCAL LALTMAAVPL LGGSKYGASP LCLPLPFGEF STMGYMVALI LLNSLCFLMM TIAYTKLYCN LDKGDLENIW DCSMVKHIAL LFTNCILNC PVAFLSFSSL INLTFSPEV IKFILLVVVP LPACLNPLLY ILFNPHEKED LVSLRKQTYV WTRSKHPSLM SINSDDVEKQ SCDSTQALVT FTSSSITYDL PPSSVPSPAY PVTESCHLSS VAFVPCL
22	人LgR5成熟, 无信号序列; 氨基酸22至907	GGSPRSGVL LRGCPTHCHC EPDGRMLLRV DCSDLGLSEL PSNLSVFSTY LDLSMNNISQ LLPNPLPSLR FLEELRLAGN ALTYIPKGAF TGLYSLKVLML LQNNQLRHVP TEALQNLRS QSLRLDANHI SYVPPSCFSG LHSRLHLWLD DNALTEIPVQ AFRSLSALQA MTLALNKIHH IPDYAFGNLS SLVVLHLHNN RHSLGKKCF DGLHSLETLD LNYNNLDEFP TAIRTLNLK ELGFHSNNIR SIPEKAFVGN PSLITIHFDYD NPIQFVGRSA FQHLPELRTL TLNGASQITE FPDLTGTANL ESLELTGAQI SSLPQTVCNQ LPNLQVLDLS YNLEDLPSF SVCQKLQKID LRHNEIYEIK VDTFQQLLSL RSLNLAWNKI AIIHPNAFST LPSLIKLDLS SNLLSSFPT GLHGLTHLKL TGNHALQSLI SSENFPPELV IEMPYAYQCC AFGVCENAYK ISNQWNKGDN SSMDDLHKKD AGMFQAQDER DLEDFLLDFE EDLKALHSVQ CSPSPGPFKP CEHLLDGWLI RIGVWTIAVL ALTNCALVTS TVFRSPYIS PIKLLIGVIA AVNMLTGVSS AVLAGVDAFT FGSFARHGAW WENGVGCHVI GFLSIFASES SVFLLTLAAL ERGFSVKYSA KFETKAPFSS LKVIILLCAL LALTMAAVPL LGGSKYGASP LCLPLPFGEF STMGYMVALI LLNSLCFLMM TIAYTKLYCN LDKGDLENIW DCSMVKHIAL LFTNCILNC PVAFLSFSSL INLTFSPEV IKFILLVVVP LPACLNPLLY ILFNPHEKED LVSLRKQTYV WTRSKHPSLM SINSDDVEKQ SCDSTQALVT FTSSSITYDL PPSSVPSPAY PVTESCHLSS VAFVPCL
23	食蟹猴LgR5部分 序列, 预测的; 预测对应于 全长前体的 氨基酸33至907	GCPTHCHCEP DGRMLLRVDC SDGLSELPS NLSVFSTYLD LSMNNISQLL PNPLPSLRFL EELRLAGNAL TYIPKGAFTG LYSKVLMLQ NNQLRQVPTE ALQNLRSLOS LRLDANHISY VPPSCFSG LH SLRHLWLDN ALTEIPVQAF RSLSALQAMT LALNKIHHIP DYAFGNLSSL VVLHLHNNRI HSLGKKCFDG LHSLETLDLN YNNLDEFP TAIRTLNLKEL GFHSNNIRSI PEKAFVGNPS LITIHFDYD NPIQFVGRSAFQ HLPPELRTL TLNGASQITEFP DLTGTANLES LTLTGAQISS LPQTVCNQLP NLQVLDLSYN LLEDLPFSFSV CQKLQKIDLR HNEIYEIKVD TFQQLLSIRS LNLAWNKIAT IHPNAFSTLP SLIKLDLSSN LLSSFVPTGL HGLTHLKL TG NHALQSLISS ENFPPELV IEMPYAYQCAF GVCENAYKIS NQWNKGDNS MDDLHKKDAG MFQVQDERDL EDFLLDFEED LKALHSVQCS PSPGPFKPCE HLLDGWLIRI GVWTIAVLAL TCNALVTSTV FRSPYISPI KLLIGVIAVV NMLTGVSSAV LAGVDAFTFG SFARHGAWWE NGVGQVIGF LSIFASESSV FLLTLAALER GFSVKCSAKF ETKAPFSSLK VIILLCALLA LTMAAVPLLG GSEYGASPLC LPLPFGEFST TGYMVALILL NSLCFLMMTI AYTKLYCNLD KGDLENIWDC SMVKHIALLL FTNCILYCPV AFLSFSSLLN LTFISPEVIK FILLVIVPLP ACLNPLLYIL FNPHEKEDLV SLGKQTYFWT RSKHPSLMISI NSDDVEKQSC DSTQALVTFT SSSIAYDLPP SSVPSPAYPV TESCHLSSVA FVPCL
24	大鼠LgR5前体; LGR5_大鼠 NP_001100254;	MDTSRVRMLL SLLALLQLVA AGSPRPDPTM PRGCPSYCHC ELDGRMLLRV DCSDLGLSEL PSNLSVFSTY LDLSMNNISQ LPASLLHRLR FLEELRLAGN ALTHIPKGAF AGLHSLKVLML QNNQLRQVP EEALQNLRS QSLRLDANHI SYVPPSCFSG LHSRLHLWLD DNALTDVPEVQ AFRSLSALQA MTLALNKIHH

[0355]

	信号序列= 氨基酸1-21	EADHAFGNLS SLVVLHLHNN RIHSLGKKCF DGLHSLETLD LNYNNLDEFP TAIKTLNLK ELGFHSNNIR SIPERAFVGN PSITITHFYD NPIQFVGISA FOHLPELRTL TLNGASQITE FPDLTGTATL ESLLTGTAKI SSLPQTVCDQ LPNLQVLDLS YNLLEDLPSL SGCQKLQKID LRHNEIYEIK GSTFQQLFNL RSLNLARNKI AIHPNAFST LPSLIKLDLS SNLLSSFPVT GLHGLTHLKL TGNRALQSLI PSANFPELKI IEMPYAYQCC AFGGCENVYK IPNQWNKDD SSVDDLKKD AGLFQVQDER DLEDFLDDE EDLKVLSVQ CSPPGPFKP CEHLFGSWLI RIGVWTTAVL ALSCNALVAF TVERTPLYIS SIKLLIGVIA VVDILMGVSS AILAVVDTFT FGSAHQHAW WEGGIGCQIV GFLSIFASES SVFLLTLAAL ERGFSVKCSS KFEMKAPLSS LKAIILLCVL LALTIATVPL LGSSEYNASP LCLPLPFGE STTGMYVALV LLNSLCFLIM TIAYTRYCS LEKGELENLW DCSMVKHTAL LLFTNCILYC PVAFLSFSSL LNLTFISPEV IKFILLVIVP LPACLNPLLY IVFNPHFKED MGS LGKQTRF WTRAKHPSLL SINSDDVEKR SCDSTQALVS FTHASIAIDL PSDSGSSPAY PMTESCHLSS VAFVPC
25	大鼠LgR5成熟, 无信号序列; 氨基酸22至907	GSPPRPDTM PRGCPSYCHC ELDGRMLLRV DCSJLGLSEL PSNLSVFTSY LDLSMNNISQ LPASLLHRLR FLEELRLAGN ALTHIPKGAF AGLHSLKVL LQNNQLRQVP EEALQNLRLS QSLRLDANHI SYVPPSCFSG LHSRLHLWLD DNALTDVPVQ AFRSLALQA MTLALNKIHH EADHAFGNLS SLVVLHLHNN RIHSLGKKCF DGLHSLETLD LNYNNLDEFP TAIKTLNLK ELGFHSNNIR SIPERAFVGN PSITITHFYD NPIQFVGISA FOHLPELRTL TLNGASQITE FPDLTGTATL ESLLTGTAKI SSLPQTVCDQ LPNLQVLDLS YNLLEDLPSL SGCQKLQKID LRHNEIYEIK GSTFQQLFNL RSLNLARNKI AIHPNAFST LPSLIKLDLS SNLLSSFPVT GLHGLTHLKL TGNRALQSLI PSANFPELKI IEMPYAYQCC AFGGCENVYK IPNQWNKDD SSVDDLKKD AGLFQVQDER DLEDFLDDE EDLKVLSVQ CSPPGPFKP CEHLFGSWLI RIGVWTTAVL ALSCNALVAF TVERTPLYIS SIKLLIGVIA VVDILMGVSS AILAVVDTFT FGSAHQHAW WEGGIGCQIV GFLSIFASES SVFLLTLAAL ERGFSVKCSS KFEMKAPLSS LKAIILLCVL LALTIATVPL LGSSEYNASP LCLPLPFGE STTGMYVALV LLNSLCFLIM TIAYTRYCS LEKGELENLW DCSMVKHTAL LLFTNCILYC PVAFLSFSSL LNLTFISPEV IKFILLVIVP LPACLNPLLY IVFNPHFKED MGS LGKQTRF WTRAKHPSLL SINSDDVEKR SCDSTQALVS FTHASIAIDL PSDSGSSPAY PMTESCHLSS VAFVPC
26	小鼠LgR5前体; LGR5 小鼠 NP_034325; 信号序列= 氨基酸1-21	MDTSCVHMLL SLLALLQLVA AGSSPGPDAI PRGCPSHCHC ELDGRMLLRV DCSJLGLSEL PSNLSVFTSY LDLSMNNISQ LPASLLHRLC FLEELRLAGN ALTHIPKGAF TGLHSLKVL LQNNQLRQVP EEALQNLRLS QSLRLDANHI SYVPPSCFSG LHSRLHLWLD DNALTDVPVQ AFRSLALQA MTLALNKIHH EADYAFGNLS SLVVLHLHNN RIHSLGKKCF DGLHSLETLD LNYNNLDEFP TAIKTLNLK ELGFHSNNIR SIPERAFVGN PSITITHFYD NPIQFVGISA FOHLPELRTL TLNGASHITE FPHLTGTATL ESLLTGTAKI SSLPQAVCDQ LPNLQVLDLS YNLLEDLPSL SGCQKLQKID LRHNEIYEIK GSTFQQLFNL RSLNLAWNKI AIHPNAFST LPSLIKLDLS SNLLSSFPVT GLHGLTHLKL TGNRALQSLI PSANFPELKI IEMPSAYQCC AFGGCENVYK ISNQWNKDDG NSVDDLHKKD AGLFQVQDER DLEDFLDDE EDLKVLSVQ CSPPGPFKP CEHLFGSWLI RIGVWTTAVL ALSCNALVAL TVERTPLYIS SIKLLIGVIA VVDILMGVSS AVLA AVDAFT FGRFAHQHAW WEDGIGCQIV GFLSIFASES SIFLLTLAAL ERGFSVKCSS KFEVKAPLFS LRAIVLLCVL LALTIATVPL LGGSKYNASP LCLPLPFGE STTGMYVALV LLNSLCFLIM TIAYTRYCS LEKGELENLW DCSMVKHIAL LLFANCILYC PVAFLSFSSL LNLTFISPDV IKFILLVIVP LPACLNPLLY IVFNPHFKED MGS LGKHTRF WMRSKHASLL SINSDDVEKR SCDSTQALVS FTHASIAIDL PSTSGASPAY PMTESCHLSS VAFVPC
27	小鼠LgR5成熟, 无信号序列; 氨基酸22至907	GSPPGPDAI PRGCPSHCHC ELDGRMLLRV DCSJLGLSEL PSNLSVFTSY LDLSMNNISQ LPASLLHRLC FLEELRLAGN ALTHIPKGAF TGLHSLKVL LQNNQLRQVP EEALQNLRLS QSLRLDANHI SYVPPSCFSG LHSRLHLWLD DNALTDVPVQ AFRSLALQA MTLALNKIHH EADYAFGNLS SLVVLHLHNN RIHSLGKKCF DGLHSLETLD LNYNNLDEFP TAIKTLNLK ELGFHSNNIR SIPERAFVGN PSITITHFYD NPIQFVGISA FOHLPELRTL TLNGASHITE FPHLTGTATL ESLLTGTAKI SSLPQAVCDQ LPNLQVLDLS YNLLEDLPSL SGCQKLQKID LRHNEIYEIK GSTFQQLFNL RSLNLAWNKI AIHPNAFST LPSLIKLDLS SNLLSSFPVT GLHGLTHLKL TGNRALQSLI PSANFPELKI IEMPSAYQCC AFGGCENVYK ISNQWNKDDG NSVDDLHKKD AGLFQVQDER DLEDFLDDE EDLKVLSVQ CSPPGPFKP CEHLFGSWLI RIGVWTTAVL ALSCNALVAL TVERTPLYIS SIKLLIGVIA VVDILMGVSS AVLA AVDAFT

[0356]

		FGRFAQHGAW WEDGIGCQIV GFLSIFASES SIFLLTLAAL ERGFSVKCSS KFEVKAPLFS LRAIVLLCVL LALTIATIP LGGSKYNASP LCLPLPFGEF STTGYMVALV LLNSLCFLIM TIAYTKLYCS LEKSELENLW DCSMVKHIAL LLFANCILYC PVAFLSFSSL LNLTFISPDV IKFILLVIVP LPSCINPLLY IVFNPHFKED MGS LGKHTRF WMRSKHASLL SINSDDEVEKR SCESTQALVS FTHASIAIDL PSTSGASPAY PMTESCHLSS VAFVPC L
28	mu8E11 轻链可变区	NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT INCRASESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNYEDPF TFGSGTKVEI KR
29	mu8E11 重链可变区	QVQLQQSGTE LMKPGASVKI SCKATGYTFS AYWIEWIKQR PGHGLEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKVKATF SSOTSSNTVY IQLNSLTIED SAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTTLKVSS
30	hu8E11.v1 轻链可变区	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR
31	hu8E11.v1 重链可变区	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFS AYWIEWVRQA PGQGLEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKVRVTI TSOTSTSTVY LELSSLRSED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLTVTVSS
32	hu8E11.v2 轻链可变区	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR
33	hu8E11.v2 重链可变区	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFS AYWIEWVRQA PGQGLEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKVRATF TSOTSTSTVY LELSSLRSED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLTVTVSS
34	hu8E11.v3 轻链可变区	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SRTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR
35	hu8E11.v3 重链可变区	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFS AYWIEWVRQA PGQGLEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKVRVTI TSOTSTSTVY LELSSLRSED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLTVTVSS
36	hu8E11.v4 轻链可变区	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SRTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR
37	hu8E11.v4 重链可变区	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFS AYWIEWVRQA PGQGLEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKVRATF TSOTSTSTVY LELSSLRSED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLTVTVSS
38	hu8E11.v5 轻链可变区	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR
39	hu8E11.v5 重链可变区	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFS AYWIEWVRQA PGQGLEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKVRVTI TRDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLTVTVSS
40	hu8E11.v6 轻链可变区	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR
41	hu8E11.v6 重链可变区	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFS AYWIEWVRQA PGQGLEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKVRVTI TADTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLTVTVSS
42	hu8E11.v7 轻链可变区	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SRTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR
43	hu8E11.v7 重链可变区	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFS AYWIEWVRQA PGQGLEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKVRVTI TRDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLTVTVSS
44	hu8E11.v8 轻链可变区	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SRTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR
45	hu8E11.v8 重链可变区	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFS AYWIEWVRQA PGQGLEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKVRVTI TADTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLTVTVSS
46	mu3G12 轻链可变区	DIVMTQTFLS LPVSLGDQAS INCRSSQSLV HSNNGTYLOW YLQKPGQSPK LLIYKVS NRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLG YFCSQSTHFP YTFGGGCKLE IKR

[0357]

47	mu3G12 重链可变区	QVQLQQPGAE MVKPGASVKL SCKASVDTFN SYWMHWVKQR PGQGLEWIGE INPSNGRTNY IEKFKNRATV TVDKSSSTAF MQLSSLTSED SAVYYCATGW YFDVWGAGTT VTVSS
48	mu2H6 轻链可变区	DIVMTQSPSS LTVTAGEKVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WFQOKPGQPP KLLIYWASTR ESGVPDRFTG SSGTDFTLT ISNVQAEDLA VYYCQNDYSF PFTFGQGTKV EIKR
49	mu2H6 重链可变区	EVQLQDSGPE LVKPGTSMKI SCKASGYSFT GYTMNWVKQS HKNGLEWIGL INCYNNGTNY NQKPKGKATL TVDKSSSTAF MELLSSLTSED SAVYYCARGG STMITPRFAY WGQGTLVTVS S
50	YW353 轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFGSGSGSDT FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SYTTPPTFGQ GTKVEIKR
51	YW353 重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFT SYSISWVRQA PGKGLEWVAE IYPPGQYTDY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKAR LFFDYWGQGT LVTVSS
52	mu8E11 HVR L1	RASESVNYG NSFMH
53	mu8E11 HVR L2	LASNLES
54	mu8E11 HVR L3	QQNYEDPFT
55	mu8E11 HVR H1	GYTFSAYWIE
56	mu8E11 HVR H2	EILPGSDSD YNEKFKV
57	mu8E11 HVR H3	GGHYGSLDY
58	Hu8E11 轻链(LC) 框架1 (FR1)	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INC
59	Hu8E11 LC FR2	WYQQKPGQPP KLLIY
60	Hu8E11.v1 LC FR3 Hu8E11.v2 LC FR3 Hu8E11.v5 LC FR3 Hu8E11.v6 LC FR3	GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YC
61	Hu8E11.v3 LC FR3 Hu8E11.v4 LC FR3 Hu8E11.v7 LC FR3 Hu8E11.v8 LC FR3	GVPDRFSGSG SRTDFTLTIS SLQAEDVAVY YC
62	Hu8E11 LC FR4	FGQGTKVEIK R
63	Hu8E11 重链(HC) 框架1 (FR1)	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKAS
64	Hu8E11 HC FR2	WVRQAPGQGL EWIG
65	Hu8E11.v1 HC FR3 Hu8E11.v3 HC FR3	RVTITSQTST STVYLELSSL RSEDTAVYYC AR
66	Hu8E11.v2 HC FR3 Hu8E11.v4	RATFTSQTST STVYLELSSL RSEDTAVYYC AR

[0358]

	HC FR3	
67	Hu8E11.v5 HC FR3 Hu8E11.v7 HC FR3	RVTITRDTST STAYLELSSL RSEDTAVYYC AR
68	Hu8E11.v6 HC FR3 Hu8E11.v8 HC FR3	RVTITADTST STAYLELSSL RSEDTAVYYC AR
69	Hu8E11 HC FR4	WGQGTILVTVS S
70	mu3G12 HVR L1	RSSQSLVHSN GNTYLQ
71	mu3G12 HVR L2	KVSNRFS
72	mu3G12 HVR L3	SQSTHFPPYT
73	mu3G12 HVR H1	VDTFNSYWMH
74	mu3G12 HVR H2	EINPSNGRTN YIEKFKN
75	mu3G12 HVR H3	GWYFDV
76	mu2H6 HVR L1	KSSQSLLSNG NQKNYLT
77	mu2H6 HVR L2	WASTRES
78	mu2H6 HVR L3	QNDYSFPFT
79	mu2H6 HVR H1	GYSFTGYTMN
80	mu2H6 HVR H2	LINCYNNGTN YNQKFKG
81	mu2H6 HVR H3	GGSTMITPRF AY
82	YW353 HVR L1	RASQDVSTAV A
83	YW353 HVR L2	SASFLYS
84	YW353 HVR L3	QQSYTTPPT
85	YW353 HVR H1	GFTFTSYSIS
86	YW353 HVR H2	EIYPPGGYTD YADSVKG
87	YW353 HVR H3	ARLFFDY
88	hu8E11.v2 轻链	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCQONYEDPF TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLG STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
89	hu8E11.v2 重链	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFS AYWIEWVRQA PGQGLEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKVRATF TSDTSTSTVY LELSSLRSED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLVTVSSAS TRGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGEVHNAK KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPOVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGOPEN NYKTPPVLC SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
90	YW353	DIQMTQSPSS LSASVGRDVT TCRASQDVS TAVAWYQQKPK GRAPKLLIYS

[0359]

	轻链	ASFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTSSSLQP EDFATYYCQQ SYTTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
91	YW353 重链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGETFT SYSTSWVRQA PGKGLEWVAE IYPPGGYTDY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKAR LFFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPEKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPOVYTL PESREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQGPENNY KTFPPVLDS GSFFLYSKLT VDKSRWQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL SLSPGK
92	反义正向引物	ACCAACTGCATCCTAAACTG
93	反义反向引物	ACCGAGTTTCACCTCAGCTC
94	有义正向引物	ACATTGCCCTGTTGCTCTTC
95	有义反向引物	ACTGCTCTGATATACTCAATC
96	LgR5 ECD huFc (1至537是 LgR5 ECD)	GSSPRSGVLLRGCPHCHCEPDGRMLLRVDCSDLGLSELPSNLSVFTSYLDL SMNNISQLLPNPLPSLRFLEELRLAGNALTYPKGAFGLYSLKVLMLQNNQ LRHVPTEALONLRSLOSLRLDANHISYVPPSCFSGLSLRHLWLDDNALTEI PVQAFRSLSALQAMTLALNKIHHIPDYAFGNLSSLVVLHLHNNRIHSLGKKC FDGLHSLETLDLNNLDEFPTAIRTLNLKELGFHSNNIRSIPEKAFVGNP SLITTHFYDNPIQFVGRSAFQHLPELRTLTLNGASQITEFPDLTGANLESL TLTGAQISSLPQTVCNQLPNIQVLDLSYNLLEDLPSFSVCQKLQKIDLRHNE IYEIKVDTEQQLLSLRLNLAWNKIATIHNAFSTLPSLIKLDLSSNLLSSF PITGLHGLTHLKLGTGNHALQSLSSSENFPELKVIEMFYAYQCAFGVCENAY KISNQWNKGDNSMDDLHKKDAGMFQAQDERDLEDLLDFEEDLKALHSVQC SPSPGPFKPCHELLDGWGRAQVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTFPPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMEHALHNHYTQKSLSLSPGK

序列表

<110> 基因泰克公司(GENENTECH, INC.)等

<120> 抗LgR5抗体及其用途

<130> 01146-0035-00PCT

<150> US 62/010,637

<151> 2014-06-11

<160> 96

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 216

<212> PRT

<213> 家兔(Oryctolagus cuniculus)

<400> 1

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

195	200	205
Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys		
210	215	
<210> 2		
<211> 443		
<212> PRT		
<213> 家兔 (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)		
<400> 2		
Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly Ser		
1	5	10
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Arg Thr Tyr		
20	25	30
Trp Ile Cys Trp Asp Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Gly Ser Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp		
50	55	60
Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr		
65	70	75
Leu Gln Val Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys		
85	90	95
Ala Arg Tyr Tyr Ala Gly Ser Ser Glu Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Pro		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr		
145	150	155
Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val		
165	170	175
Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr		
180	185	190
Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn		
195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr		
210	215	220
Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro		
225	230	235
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		

				245					250					255	
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Thr
				260					265					270	
Trp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Glu	Gln	Val	Arg	Thr	Ala	Arg	Pro	Pro	Leu	Arg
				275					280					285	
Glu	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Ile	Arg	Val	Val	Ser	Thr	Leu	Pro	Ile
				290					295					300	
Ala	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Arg	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	His
305						310					315				320
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Arg
						325					330				335
Gly	Gln	Pro	Leu	Glu	Pro	Lys	Val	Tyr	Thr	Met	Gly	Pro	Pro	Arg	Glu
						340					345				350
Glu	Leu	Ser	Ser	Arg	Ser	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Asn	Gly	Phe
						355								365	
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Lys	Asn	Gly	Lys	Ala	Glu
						370								380	
Asp	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr
385						390					395				400
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Pro	Thr	Ser	Glu	Trp	Gln	Arg	Gly
						405								415	
Asp	Val	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
						420								430	
Thr	Gln	Lys	Ser	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro	Gly	Lys					
						435								440	
<210> 3															
<211> 214															
<212> PRT															
<213> 家兔(Oryctolagus cuniculus)															
<400> 3															
Ala	Phe	Glu	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	Ser	Val	Glu	Ala	Ala	Val	Gly
1				5					10					15	
Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Lys	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Val	Gly
				20					25				30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
				35				40				45			
Tyr	Lys	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Lys	Gly
						50		55				60			
Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Asp	Leu	Glu	Cys

65	70	75	80
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ser Ser Thr			
	85	90	95
Thr Ala Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly Asp			
100	105	110	
Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp Gln Val			
115	120	125	
Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr Phe Pro			
130	135	140	
Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr Thr Gly			
145	150	155	160
Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr Tyr Asn			
	165	170	175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser His Lys			
	180	185	190
Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val Val Gln Ser			
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly Asp Cys			
210			
<210> 4			
<211> 446			
<212> PRT			
<213> 家兔 (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)			
<400> 4			
Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly Thr			
1	5	10	15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Tyr Tyr Ser			
	20	25	30
Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp			
50	55	60	
Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Ile Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys			
	85	90	95
Ala Arg Ser Tyr Tyr Thr Phe Gly Val Asn Gly Tyr Ala Trp Asp Leu			
100	105	110	
Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly			

115	120	125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser		
130	135	140
Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val		
145	150	155
Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe		
165	170	175
Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
180	185	190
Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro		
195	200	205
Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser		
210	215	220
Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	235
Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val		
260	265	270
Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro		
275	280	285
Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr		
290	295	300
Leu Pro Ile Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys		
305	310	315
Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
325	330	335
Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro		
340	345	350
Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile		
355	360	365
Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly		
370	375	380
Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp		
405	410	415
Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
420	425	430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 5

<211> 112

<212> PRT

<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 5

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

<210> 6

<211> 120

<212> PRT

<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 6

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

	100		105		110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		
<210> 7					
<211> 110					
<212> PRT					
<213> 家兔 (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)					
<400> 7					
Ala Phe Glu Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Glu Ala Ala Val Gly					
1	5		10		15
Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Val Gly					
	20		25		30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile					
	35		40		45
Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly					
	50		55		60
Ser Arg Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys					
65	70		75		80
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ser Ser Thr					
	85		90		95
Thr Ala Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys					
	100		105		110
<210> 8					
<211> 123					
<212> PRT					
<213> 家兔 (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)					
<400> 8					
Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly Thr					
1	5		10		15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Tyr Tyr Ser					
	20		25		30
Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile					
	35		40		45
Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp					
	50		55		60
Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr					
65	70		75		80
Leu Gln Met Ile Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys					
	85		90		95

Ala Arg Ser Tyr Tyr Thr Phe Gly Val Asn Gly Tyr Ala Trp Asp Leu
100 105 110

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 9

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 10

Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 11

Gln Thr Thr Tyr Gly Ser Ser Ser Asp Gly Phe Phe Trp Thr
1 5 10

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 12

Arg Thr Tyr Trp Ile Cys
1 5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 13

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

Lys

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 14

Tyr Tyr Ala Gly Ser Ser Glu Tyr Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 15

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Val Gly Leu Ala

1 5 10

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 16

Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 17

Gln Ser Tyr Tyr Asp Ser Ser Thr Thr Ala Asn Val

1 5 10

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 18

Tyr Tyr Ser Tyr Met Cys

1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 19

Cys Ile Tyr Ala Gly Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala

1 5 10 15

Lys

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> 家兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 20

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

1 5 10

<210> 21

<211> 907

<212> PRT

<213> 人 (*Homo sapiens*)

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Cys Pro Thr His Cys His Cys Glu Pro Asp Gly Arg Met Leu Leu

35 40 45

Arg Val Asp Cys Ser Asp Leu Gly Leu Ser Glu Leu Pro Ser Asn Leu

50 55 60

Ser Val Phe Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Ser Met Asn Asn Ile Ser Gln

65 70 75 80

Leu Leu Pro Asn Pro Leu Pro Ser Leu Arg Phe Leu Glu Glu Leu Arg

85 90 95

Leu Ala Gly Asn Ala Leu Thr Tyr Ile Pro Lys Gly Ala Phe Thr Gly

100 105 110

Leu Tyr Ser Leu Lys Val Leu Met Leu Gln Asn Asn Gln Leu Arg His

115 120 125

Val Pro Thr Glu Ala Leu Gln Asn Leu Arg Ser Leu Gln Ser Leu Arg

130 135 140

Leu Asp Ala Asn His Ile Ser Tyr Val Pro Pro Ser Cys Phe Ser Gly

145 150 155 160

Leu His Ser Leu Arg His Leu Trp Leu Asp Asp Asn Ala Leu Thr Glu

165 170 175

Ile Pro Val Gln Ala Phe Arg Ser Leu Ser Ala Leu Gln Ala Met Thr		
180	185	190
Leu Ala Leu Asn Lys Ile His His Ile Pro Asp Tyr Ala Phe Gly Asn		
195	200	205
Leu Ser Ser Leu Val Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile His Ser		
210	215	220
Leu Gly Lys Lys Cys Phe Asp Gly Leu His Ser Leu Glu Thr Leu Asp		
225	230	235
240		
Leu Asn Tyr Asn Asn Leu Asp Glu Phe Pro Thr Ala Ile Arg Thr Leu		
245	250	255
Ser Asn Leu Lys Glu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Ile Arg Ser Ile		
260	265	270
Pro Glu Lys Ala Phe Val Gly Asn Pro Ser Leu Ile Thr Ile His Phe		
275	280	285
Tyr Asp Asn Pro Ile Gln Phe Val Gly Arg Ser Ala Phe Gln His Leu		
290	295	300
Pro Glu Leu Arg Thr Leu Thr Leu Asn Gly Ala Ser Gln Ile Thr Glu		
305	310	315
320		
Phe Pro Asp Leu Thr Gly Thr Ala Asn Leu Glu Ser Leu Thr Leu Thr		
325	330	335
Gly Ala Gln Ile Ser Ser Leu Pro Gln Thr Val Cys Asn Gln Leu Pro		
340	345	350
Asn Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Leu Leu Glu Asp Leu Pro		
355	360	365
Ser Phe Ser Val Cys Gln Lys Leu Gln Lys Ile Asp Leu Arg His Asn		
370	375	380
Glu Ile Tyr Glu Ile Lys Val Asp Thr Phe Gln Gln Leu Leu Ser Leu		
385	390	395
400		
Arg Ser Leu Asn Leu Ala Trp Asn Lys Ile Ala Ile Ile His Pro Asn		
405	410	415
Ala Phe Ser Thr Leu Pro Ser Leu Ile Lys Leu Asp Leu Ser Ser Asn		
420	425	430
Leu Leu Ser Ser Phe Pro Ile Thr Gly Leu His Gly Leu Thr His Leu		
435	440	445
Lys Leu Thr Gly Asn His Ala Leu Gln Ser Leu Ile Ser Ser Glu Asn		
450	455	460
Phe Pro Glu Leu Lys Val Ile Glu Met Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys		
465	470	475
480		
Ala Phe Gly Val Cys Glu Asn Ala Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Trp Asn		

	485		490		495
Lys Gly Asp Asn Ser Ser Met Asp Asp Leu His Lys Lys Asp Ala Gly					
	500		505		510
Met Phe Gln Ala Gln Asp Glu Arg Asp Leu Glu Asp Phe Leu Leu Asp					
	515		520		525
Phe Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu His Ser Val Gln Cys Ser Pro Ser					
	530		535		540
Pro Gly Pro Phe Lys Pro Cys Glu His Leu Leu Asp Gly Trp Leu Ile					
545		550		555	560
Arg Ile Gly Val Trp Thr Ile Ala Val Leu Ala Leu Thr Cys Asn Ala					
	565		570		575
Leu Val Thr Ser Thr Val Phe Arg Ser Pro Leu Tyr Ile Ser Pro Ile					
	580		585		590
Lys Leu Leu Ile Gly Val Ile Ala Ala Val Asn Met Leu Thr Gly Val					
	595		600		605
Ser Ser Ala Val Leu Ala Gly Val Asp Ala Phe Thr Phe Gly Ser Phe					
	610		615		620
Ala Arg His Gly Ala Trp Trp Glu Asn Gly Val Gly Cys His Val Ile					
625		630		635	640
Gly Phe Leu Ser Ile Phe Ala Ser Glu Ser Ser Val Phe Leu Leu Thr					
	645		650		655
Leu Ala Ala Leu Glu Arg Gly Phe Ser Val Lys Tyr Ser Ala Lys Phe					
	660		665		670
Glu Thr Lys Ala Pro Phe Ser Ser Leu Lys Val Ile Ile Leu Leu Cys					
	675		680		685
Ala Leu Leu Ala Leu Thr Met Ala Ala Val Pro Leu Leu Gly Gly Ser					
	690		695		700
Lys Tyr Gly Ala Ser Pro Leu Cys Leu Pro Leu Pro Phe Gly Glu Pro					
705		710		715	720
Ser Thr Met Gly Tyr Met Val Ala Leu Ile Leu Leu Asn Ser Leu Cys					
	725		730		735
Phe Leu Met Met Thr Ile Ala Tyr Thr Lys Leu Tyr Cys Asn Leu Asp					
	740		745		750
Lys Gly Asp Leu Glu Asn Ile Trp Asp Cys Ser Met Val Lys His Ile					
	755		760		765
Ala Leu Leu Leu Phe Thr Asn Cys Ile Leu Asn Cys Pro Val Ala Phe					
	770		775		780
Leu Ser Phe Ser Ser Leu Ile Asn Leu Thr Phe Ile Ser Pro Glu Val					
785		790		795	800

Ile Lys Phe Ile Leu Leu Val Val Val Pro Leu Pro Ala Cys Leu Asn
 805 810 815
 Pro Leu Leu Tyr Ile Leu Phe Asn Pro His Phe Lys Glu Asp Leu Val
 820 825 830
 Ser Leu Arg Lys Gln Thr Tyr Val Trp Thr Arg Ser Lys His Pro Ser
 835 840 845
 Leu Met Ser Ile Asn Ser Asp Asp Val Glu Lys Gln Ser Cys Asp Ser
 850 855 860
 Thr Gln Ala Leu Val Thr Phe Thr Ser Ser Ser Ile Thr Tyr Asp Leu
 865 870 875 880
 Pro Pro Ser Ser Val Pro Ser Pro Ala Tyr Pro Val Thr Glu Ser Cys
 885 890 895
 His Leu Ser Ser Val Ala Phe Val Pro Cys Leu
 900 905

<210> 22

<211> 886

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 22

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

Phe Arg Ser Leu Ser Ala Leu Gln Ala Met Thr Leu Ala Leu Asn Lys		
165	170	175
Ile His His Ile Pro Asp Tyr Ala Phe Gly Asn Leu Ser Ser Leu Val		
180	185	190
Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile His Ser Leu Gly Lys Lys Cys		
195	200	205
Phe Asp Gly Leu His Ser Leu Glu Thr Leu Asp Leu Asn Tyr Asn Asn		
210	215	220
Leu Asp Glu Phe Pro Thr Ala Ile Arg Thr Leu Ser Asn Leu Lys Glu		
225	230	235
Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Ile Arg Ser Ile Pro Glu Lys Ala Phe		
245	250	255
Val Gly Asn Pro Ser Leu Ile Thr Ile His Phe Tyr Asp Asn Pro Ile		
260	265	270
Gln Phe Val Gly Arg Ser Ala Phe Gln His Leu Pro Glu Leu Arg Thr		
275	280	285
Leu Thr Leu Asn Gly Ala Ser Gln Ile Thr Glu Phe Pro Asp Leu Thr		
290	295	300
Gly Thr Ala Asn Leu Glu Ser Leu Thr Leu Thr Gly Ala Gln Ile Ser		
305	310	315
Ser Leu Pro Gln Thr Val Cys Asn Gln Leu Pro Asn Leu Gln Val Leu		
325	330	335
Asp Leu Ser Tyr Asn Leu Leu Glu Asp Leu Pro Ser Phe Ser Val Cys		
340	345	350
Gln Lys Leu Gln Lys Ile Asp Leu Arg His Asn Glu Ile Tyr Glu Ile		
355	360	365
Lys Val Asp Thr Phe Gln Gln Leu Leu Ser Leu Arg Ser Leu Asn Leu		
370	375	380
Ala Trp Asn Lys Ile Ala Ile Ile His Pro Asn Ala Phe Ser Thr Leu		
385	390	395
Pro Ser Leu Ile Lys Leu Asp Leu Ser Ser Asn Leu Leu Ser Ser Phe		
405	410	415
Pro Ile Thr Gly Leu His Gly Leu Thr His Leu Lys Leu Thr Gly Asn		
420	425	430
His Ala Leu Gln Ser Leu Ile Ser Ser Glu Asn Phe Pro Glu Leu Lys		
435	440	445
Val Ile Glu Met Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys Ala Phe Gly Val Cys		
450	455	460
Glu Asn Ala Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Trp Asn Lys Gly Asp Asn Ser		

465	470	475	480
Ser Met Asp Asp Leu His Lys Lys Asp Ala Gly Met Phe Gln Ala Gln			
	485	490	495
Asp Glu Arg Asp Leu Glu Asp Phe Leu Leu Asp Phe Glu Glu Asp Leu			
500	505	510	
Lys Ala Leu His Ser Val Gln Cys Ser Pro Ser Pro Gly Pro Phe Lys			
515	520	525	
Pro Cys Glu His Leu Leu Asp Gly Trp Leu Ile Arg Ile Gly Val Trp			
530	535	540	
Thr Ile Ala Val Leu Ala Leu Thr Cys Asn Ala Leu Val Thr Ser Thr			
545	550	555	560
Val Phe Arg Ser Pro Leu Tyr Ile Ser Pro Ile Lys Leu Leu Ile Gly			
565	570	575	
Val Ile Ala Ala Val Asn Met Leu Thr Gly Val Ser Ser Ala Val Leu			
580	585	590	
Ala Gly Val Asp Ala Phe Thr Phe Gly Ser Phe Ala Arg His Gly Ala			
595	600	605	
Trp Trp Glu Asn Gly Val Gly Cys His Val Ile Gly Phe Leu Ser Ile			
610	615	620	
Phe Ala Ser Glu Ser Ser Val Phe Leu Leu Thr Leu Ala Ala Leu Glu			
625	630	635	640
Arg Gly Phe Ser Val Lys Tyr Ser Ala Lys Phe Glu Thr Lys Ala Pro			
645	650	655	
Phe Ser Ser Leu Lys Val Ile Ile Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ala Leu			
660	665	670	
Thr Met Ala Ala Val Pro Leu Leu Gly Gly Ser Lys Tyr Gly Ala Ser			
675	680	685	
Pro Leu Cys Leu Pro Leu Pro Phe Gly Glu Pro Ser Thr Met Gly Tyr			
690	695	700	
Met Val Ala Leu Ile Leu Leu Asn Ser Leu Cys Phe Leu Met Met Thr			
705	710	715	720
Ile Ala Tyr Thr Lys Leu Tyr Cys Asn Leu Asp Lys Gly Asp Leu Glu			
725	730	735	
Asn Ile Trp Asp Cys Ser Met Val Lys His Ile Ala Leu Leu Leu Phe			
740	745	750	
Thr Asn Cys Ile Leu Asn Cys Pro Val Ala Phe Leu Ser Phe Ser Ser			
755	760	765	
Leu Ile Asn Leu Thr Phe Ile Ser Pro Glu Val Ile Lys Phe Ile Leu			
770	775	780	

Leu Val Val Val Pro Leu Pro Ala Cys Leu Asn Pro Leu Leu Tyr Ile
 785 790 795 800
 Leu Phe Asn Pro His Phe Lys Glu Asp Leu Val Ser Leu Arg Lys Gln
 805 810 815
 Thr Tyr Val Trp Thr Arg Ser Lys His Pro Ser Leu Met Ser Ile Asn
 820 825 830
 Ser Asp Asp Val Glu Lys Gln Ser Cys Asp Ser Thr Gln Ala Leu Val
 835 840 845
 Thr Phe Thr Ser Ser Ser Ile Thr Tyr Asp Leu Pro Pro Ser Ser Val
 850 855 860
 Pro Ser Pro Ala Tyr Pro Val Thr Glu Ser Cys His Leu Ser Ser Val
 865 870 875 880
 Ala Phe Val Pro Cys Leu
 885

<210> 23

<211> 875

<212> PRT

<213> 食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)

<400> 23

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

Leu Ala Leu Asn Lys Ile His His Ile Pro Asp Tyr Ala Phe Gly Asn		
165	170	175
Leu Ser Ser Leu Val Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile His Ser		
180	185	190
Leu Gly Lys Lys Cys Phe Asp Gly Leu His Ser Leu Glu Thr Leu Asp		
195	200	205
Leu Asn Tyr Asn Asn Leu Asp Glu Phe Pro Thr Ala Ile Arg Thr Leu		
210	215	220
Ser Asn Leu Lys Glu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Ile Arg Ser Ile		
225	230	235
Pro Glu Lys Ala Phe Val Gly Asn Pro Ser Leu Ile Thr Ile His Phe		
245	250	255
Tyr Asp Asn Pro Ile Gln Phe Val Gly Arg Ser Ala Phe Gln His Leu		
260	265	270
Pro Glu Leu Arg Thr Leu Thr Leu Asn Gly Ala Ser Gln Ile Thr Glu		
275	280	285
Phe Pro Asp Leu Thr Gly Thr Ala Asn Leu Glu Ser Leu Thr Leu Thr		
290	295	300
Gly Ala Gln Ile Ser Ser Leu Pro Gln Thr Val Cys Asn Gln Leu Pro		
305	310	315
Asn Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Leu Leu Glu Asp Leu Pro		
325	330	335
Ser Phe Ser Val Cys Gln Lys Leu Gln Lys Ile Asp Leu Arg His Asn		
340	345	350
Glu Ile Tyr Glu Ile Lys Val Asp Thr Phe Gln Gln Leu Leu Ser Leu		
355	360	365
Arg Ser Leu Asn Leu Ala Trp Asn Lys Ile Ala Ile Ile His Pro Asn		
370	375	380
Ala Phe Ser Thr Leu Pro Ser Leu Ile Lys Leu Asp Leu Ser Ser Asn		
385	390	395
Leu Leu Ser Ser Phe Pro Val Thr Gly Leu His Gly Leu Thr His Leu		
405	410	415
Lys Leu Thr Gly Asn His Ala Leu Gln Ser Leu Ile Ser Ser Glu Asn		
420	425	430
Phe Pro Glu Leu Lys Ile Ile Glu Met Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys		
435	440	445
Ala Phe Gly Val Cys Glu Asn Ala Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Trp Asn		
450	455	460
Lys Gly Asp Asn Ser Ser Met Asp Asp Leu His Lys Lys Asp Ala Gly		

465	470	475	480
Met Phe Gln Val Gln Asp Glu Arg Asp Leu Glu Asp Phe Leu Leu Asp			
	485	490	495
Phe Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu His Ser Val Gln Cys Ser Pro Ser			
500	505	510	
Pro Gly Pro Phe Lys Pro Cys Glu His Leu Leu Asp Gly Trp Leu Ile			
515	520	525	
Arg Ile Gly Val Trp Thr Ile Ala Val Leu Ala Leu Thr Cys Asn Ala			
530	535	540	
Leu Val Thr Ser Thr Val Phe Arg Ser Pro Leu Tyr Ile Ser Pro Ile			
545	550	555	560
Lys Leu Leu Ile Gly Val Ile Ala Val Val Asn Met Leu Thr Gly Val			
565	570	575	
Ser Ser Ala Val Leu Ala Gly Val Asp Ala Phe Thr Phe Gly Ser Phe			
580	585	590	
Ala Arg His Gly Ala Trp Trp Glu Asn Gly Val Gly Cys Gln Val Ile			
595	600	605	
Gly Phe Leu Ser Ile Phe Ala Ser Glu Ser Ser Val Phe Leu Leu Thr			
610	615	620	
Leu Ala Ala Leu Glu Arg Gly Phe Ser Val Lys Cys Ser Ala Lys Phe			
625	630	635	640
Glu Thr Lys Ala Pro Phe Ser Ser Leu Lys Val Ile Ile Leu Leu Cys			
645	650	655	
Ala Leu Leu Ala Leu Thr Met Ala Ala Val Pro Leu Leu Gly Gly Ser			
660	665	670	
Glu Tyr Gly Ala Ser Pro Leu Cys Leu Pro Leu Pro Phe Gly Glu Pro			
675	680	685	
Ser Thr Thr Gly Tyr Met Val Ala Leu Ile Leu Leu Asn Ser Leu Cys			
690	695	700	
Phe Leu Met Met Thr Ile Ala Tyr Thr Lys Leu Tyr Cys Asn Leu Asp			
705	710	715	720
Lys Gly Asp Leu Glu Asn Ile Trp Asp Cys Ser Met Val Lys His Ile			
725	730	735	
Ala Leu Leu Leu Phe Thr Asn Cys Ile Leu Tyr Cys Pro Val Ala Phe			
740	745	750	
Leu Ser Phe Ser Ser Leu Leu Asn Leu Thr Phe Ile Ser Pro Glu Val			
755	760	765	
Ile Lys Phe Ile Leu Leu Val Ile Val Pro Leu Pro Ala Cys Leu Asn			
770	775	780	

Pro	Leu	Leu	Tyr	Ile	Leu	Phe	Asn	Pro	His	Phe	Lys	Glu	Asp	Leu	Val
785					790					795					800
Ser	Leu	Gly	Lys	Gln	Thr	Tyr	Phe	Trp	Thr	Arg	Ser	Lys	His	Pro	Ser
				805					810					815	
Leu	Met	Ser	Ile	Asn	Ser	Asp	Asp	Val	Glu	Lys	Gln	Ser	Cys	Asp	Ser
			820					825					830		
Thr	Gln	Ala	Leu	Val	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Ser	Ile	Ala	Tyr	Asp	Leu
		835					840					845			
Pro	Pro	Ser	Ser	Val	Pro	Ser	Pro	Ala	Tyr	Pro	Val	Thr	Glu	Ser	Cys
	850					855					860				
His	Leu	Ser	Ser	Val	Ala	Phe	Val	Pro	Cys	Leu					
865					870					875					
<210>	24														
<211>	907														
<212>	PRT														
<213>	大鼠 (Rattus rattus)														
<400>	24														
Met	Asp	Thr	Ser	Arg	Val	Arg	Met	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu
1				5				10						15	
Gln	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Pro	Asp	Thr	Met	Pro	Arg
			20					25					30		
Gly	Cys	Pro	Ser	Tyr	Cys	His	Cys	Glu	Leu	Asp	Gly	Arg	Met	Leu	Leu
		35					40					45			
Arg	Val	Asp	Cys	Ser	Asp	Leu	Gly	Leu	Ser	Glu	Leu	Pro	Ser	Asn	Leu
	50					55					60				
Ser	Val	Phe	Thr	Ser	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Met	Asn	Asn	Ile	Ser	Gln
65					70					75					80
Leu	Pro	Ala	Ser	Leu	Leu	His	Arg	Leu	Arg	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg
				85					90					95	
Leu	Ala	Gly	Asn	Ala	Leu	Thr	His	Ile	Pro	Lys	Gly	Ala	Phe	Ala	Gly
			100					105					110		
Leu	His	Ser	Leu	Lys	Val	Leu	Met	Leu	Gln	Asn	Asn	Gln	Leu	Arg	Gln
		115					120					125			
Val	Pro	Glu	Glu	Ala	Leu	Gln	Asn	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Ser	Leu	Arg
	130					135					140				
Leu	Asp	Ala	Asn	His	Ile	Ser	Tyr	Val	Pro	Pro	Ser	Cys	Phe	Ser	Gly
145					150					155					160
Leu	His	Ser	Leu	Arg	His	Leu	Trp	Leu	Asp	Asp	Asn	Ala	Leu	Thr	Asp
				165					170						175

Val	Pro	Val	Gln	Ala	Phe	Arg	Ser	Leu	Ser	Ala	Leu	Gln	Ala	Met	Thr
			180					185					190		
Leu	Ala	Leu	Asn	Lys	Ile	His	His	Ile	Ala	Asp	His	Ala	Phe	Gly	Asn
			195					200					205		
Leu	Ser	Ser	Leu	Val	Val	Leu	His	Leu	His	Asn	Asn	Arg	Ile	His	Ser
			210					215					220		
Leu	Gly	Lys	Lys	Cys	Phe	Asp	Gly	Leu	His	Ser	Leu	Glu	Thr	Leu	Asp
225								230					235		240
Leu	Asn	Tyr	Asn	Asn	Leu	Asp	Glu	Phe	Pro	Thr	Ala	Ile	Lys	Thr	Leu
								245					250		255
Ser	Asn	Leu	Lys	Glu	Leu	Gly	Phe	His	Ser	Asn	Asn	Ile	Arg	Ser	Ile
								260					265		270
Pro	Glu	Arg	Ala	Phe	Val	Gly	Asn	Pro	Ser	Leu	Ile	Thr	Ile	His	Phe
								275					280		285
Tyr	Asp	Asn	Pro	Ile	Gln	Phe	Val	Gly	Ile	Ser	Ala	Phe	Gln	His	Leu
								290					295		300
Pro	Glu	Leu	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Asn	Gly	Ala	Ser	Gln	Ile	Thr	Glu
305								310					315		320
Phe	Pro	Asp	Leu	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Leu	Glu	Ser	Leu	Thr	Leu	Thr
								325					330		335
Gly	Ala	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	Pro	Gln	Thr	Val	Cys	Asp	Gln	Leu	Pro
								340					345		350
Asn	Leu	Gln	Val	Leu	Asp	Leu	Ser	Tyr	Asn	Leu	Leu	Glu	Asp	Leu	Pro
								355					360		365
Ser	Leu	Ser	Gly	Cys	Gln	Lys	Leu	Gln	Lys	Ile	Asp	Leu	Arg	His	Asn
								370					375		380
Glu	Ile	Tyr	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Leu	Phe	Asn	Leu
385								390					395		400
Arg	Ser	Leu	Asn	Leu	Ala	Arg	Asn	Lys	Ile	Ala	Ile	Ile	His	Pro	Asn
								405					410		415
Ala	Phe	Ser	Thr	Leu	Pro	Ser	Leu	Ile	Lys	Leu	Asp	Leu	Ser	Ser	Asn
								420					425		430
Leu	Leu	Ser	Ser	Phe	Pro	Val	Thr	Gly	Leu	His	Gly	Leu	Thr	His	Leu
								435					440		445
Lys	Leu	Thr	Gly	Asn	Arg	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Ile	Pro	Ser	Ala	Asn
								450					455		460
Phe	Pro	Glu	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Met	Pro	Tyr	Ala	Tyr	Gln	Cys	Cys
465								470					475		480
Ala	Phe	Gly	Gly	Cys	Glu	Asn	Val	Tyr	Lys	Ile	Pro	Asn	Gln	Trp	Asn

	485		490		495
Lys Asp Asp Ser Ser Ser Val Asp Asp Leu Arg Lys Lys Asp Ala Gly					
500		505		510	
Leu Phe Gln Val Gln Asp Glu Arg Asp Leu Glu Asp Phe Leu Leu Asp					
515		520		525	
Phe Glu Glu Asp Leu Lys Val Leu His Ser Val Gln Cys Ser Pro Pro					
530		535		540	
Pro Gly Pro Phe Lys Pro Cys Glu His Leu Phe Gly Ser Trp Leu Ile					
545		550		555	
Arg Ile Gly Val Trp Thr Thr Ala Val Leu Ala Leu Ser Cys Asn Ala					
565		570		575	
Leu Val Ala Phe Thr Val Phe Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Ser Ser Ile					
580		585		590	
Lys Leu Leu Ile Gly Val Ile Ala Val Val Asp Ile Leu Met Gly Val					
595		600		605	
Ser Ser Ala Ile Leu Ala Val Val Asp Thr Phe Thr Phe Gly Ser Phe					
610		615		620	
Ala Gln His Gly Ala Trp Trp Glu Gly Gly Ile Gly Cys Gln Ile Val					
625		630		635	
Gly Phe Leu Ser Ile Phe Ala Ser Glu Ser Ser Val Phe Leu Leu Thr					
645		650		655	
Leu Ala Ala Leu Glu Arg Gly Phe Ser Val Lys Cys Ser Ser Lys Phe					
660		665		670	
Glu Met Lys Ala Pro Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Cys					
675		680		685	
Val Leu Leu Ala Leu Thr Ile Ala Thr Val Pro Leu Leu Gly Gly Ser					
690		695		700	
Glu Tyr Asn Ala Ser Pro Leu Cys Leu Pro Leu Pro Phe Gly Glu Pro					
705		710		715	
Ser Thr Thr Gly Tyr Met Val Ala Leu Val Leu Leu Asn Ser Leu Cys					
725		730		735	
Phe Leu Ile Met Thr Ile Ala Tyr Thr Arg Leu Tyr Cys Ser Leu Glu					
740		745		750	
Lys Gly Glu Leu Glu Asn Leu Trp Asp Cys Ser Met Val Lys His Thr					
755		760		765	
Ala Leu Leu Leu Phe Thr Asn Cys Ile Leu Tyr Cys Pro Val Ala Phe					
770		775		780	
Leu Ser Phe Ser Ser Leu Leu Asn Leu Thr Phe Ile Ser Pro Glu Val					
785		790		795	
				800	

Ile	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Val	Ile	Val	Pro	Leu	Pro	Ala	Cys	Leu	Asn
				805					810					815	
Pro	Leu	Leu	Tyr	Ile	Val	Phe	Asn	Pro	His	Phe	Lys	Glu	Asp	Met	Gly
			820					825						830	
Ser	Leu	Gly	Lys	Gln	Thr	Arg	Phe	Trp	Thr	Arg	Ala	Lys	His	Pro	Ser
			835					840						845	
Leu	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Asp	Asp	Val	Glu	Lys	Arg	Ser	Cys	Asp	Ser
			850					855						860	
Thr	Gln	Ala	Leu	Val	Ser	Phe	Thr	His	Ala	Ser	Ile	Ala	Tyr	Asp	Leu
865						870					875				880
Pro	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ala	Tyr	Pro	Met	Thr	Glu	Ser	Cys
				885					890						895
His	Leu	Ser	Ser	Val	Ala	Phe	Val	Pro	Cys	Leu					
				900					905						

<210> 25

<211> 886

<212> PRT

<213> 大鼠(Rattus rattus)

<400> 25

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

Phe Arg Ser Leu Ser Ala Leu Gln Ala Met Thr Leu Ala Leu Asn Lys			
	165	170	175
Ile His His Ile Ala Asp His Ala Phe Gly Asn Leu Ser Ser Leu Val			
	180	185	190
Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile His Ser Leu Gly Lys Lys Cys			
	195	200	205
Phe Asp Gly Leu His Ser Leu Glu Thr Leu Asp Leu Asn Tyr Asn Asn			
	210	215	220
Leu Asp Glu Phe Pro Thr Ala Ile Lys Thr Leu Ser Asn Leu Lys Glu			
225	230	235	240
Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Ile Arg Ser Ile Pro Glu Arg Ala Phe			
	245	250	255
Val Gly Asn Pro Ser Leu Ile Thr Ile His Phe Tyr Asp Asn Pro Ile			
	260	265	270
Gln Phe Val Gly Ile Ser Ala Phe Gln His Leu Pro Glu Leu Arg Thr			
	275	280	285
Leu Thr Leu Asn Gly Ala Ser Gln Ile Thr Glu Phe Pro Asp Leu Thr			
	290	295	300
Gly Thr Ala Thr Leu Glu Ser Leu Thr Leu Thr Gly Ala Lys Ile Ser			
305	310	315	320
Ser Leu Pro Gln Thr Val Cys Asp Gln Leu Pro Asn Leu Gln Val Leu			
	325	330	335
Asp Leu Ser Tyr Asn Leu Leu Glu Asp Leu Pro Ser Leu Ser Gly Cys			
	340	345	350
Gln Lys Leu Gln Lys Ile Asp Leu Arg His Asn Glu Ile Tyr Glu Ile			
	355	360	365
Lys Gly Gly Thr Phe Gln Gln Leu Phe Asn Leu Arg Ser Leu Asn Leu			
	370	375	380
Ala Arg Asn Lys Ile Ala Ile Ile His Pro Asn Ala Phe Ser Thr Leu			
385	390	395	400
Pro Ser Leu Ile Lys Leu Asp Leu Ser Ser Asn Leu Leu Ser Ser Phe			
	405	410	415
Pro Val Thr Gly Leu His Gly Leu Thr His Leu Lys Leu Thr Gly Asn			
	420	425	430
Arg Ala Leu Gln Ser Leu Ile Pro Ser Ala Asn Phe Pro Glu Leu Lys			
	435	440	445
Ile Ile Glu Met Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys Ala Phe Gly Gly Cys			
	450	455	460
Glu Asn Val Tyr Lys Ile Pro Asn Gln Trp Asn Lys Asp Asp Ser Ser			

465	470	475	480
Ser Val Asp Asp Leu Arg Lys Lys Asp Ala Gly Leu Phe Gln Val Gln			
	485	490	495
Asp Glu Arg Asp Leu Glu Asp Phe Leu Leu Asp Phe Glu Glu Asp Leu			
	500	505	510
Lys Val Leu His Ser Val Gln Cys Ser Pro Pro Pro Gly Pro Phe Lys			
	515	520	525
Pro Cys Glu His Leu Phe Gly Ser Trp Leu Ile Arg Ile Gly Val Trp			
	530	535	540
Thr Thr Ala Val Leu Ala Leu Ser Cys Asn Ala Leu Val Ala Phe Thr			
545	550	555	560
Val Phe Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Ser Ser Ile Lys Leu Leu Ile Gly			
	565	570	575
Val Ile Ala Val Val Asp Ile Leu Met Gly Val Ser Ser Ala Ile Leu			
	580	585	590
Ala Val Val Asp Thr Phe Thr Phe Gly Ser Phe Ala Gln His Gly Ala			
	595	600	605
Trp Trp Glu Gly Gly Ile Gly Cys Gln Ile Val Gly Phe Leu Ser Ile			
	610	615	620
Phe Ala Ser Glu Ser Ser Val Phe Leu Leu Thr Leu Ala Ala Leu Glu			
625	630	635	640
Arg Gly Phe Ser Val Lys Cys Ser Ser Lys Phe Glu Met Lys Ala Pro			
	645	650	655
Leu Ser Ser Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Cys Val Leu Leu Ala Leu			
	660	665	670
Thr Ile Ala Thr Val Pro Leu Leu Gly Gly Ser Glu Tyr Asn Ala Ser			
	675	680	685
Pro Leu Cys Leu Pro Leu Pro Phe Gly Glu Pro Ser Thr Thr Gly Tyr			
	690	695	700
Met Val Ala Leu Val Leu Leu Asn Ser Leu Cys Phe Leu Ile Met Thr			
705	710	715	720
Ile Ala Tyr Thr Arg Leu Tyr Cys Ser Leu Glu Lys Gly Glu Leu Glu			
	725	730	735
Asn Leu Trp Asp Cys Ser Met Val Lys His Thr Ala Leu Leu Leu Phe			
	740	745	750
Thr Asn Cys Ile Leu Tyr Cys Pro Val Ala Phe Leu Ser Phe Ser Ser			
	755	760	765
Leu Leu Asn Leu Thr Phe Ile Ser Pro Glu Val Ile Lys Phe Ile Leu			
	770	775	780

Leu Val Ile Val Pro Leu Pro Ala Cys Leu Asn Pro Leu Leu Tyr Ile
 785 790 795 800
 Val Phe Asn Pro His Phe Lys Glu Asp Met Gly Ser Leu Gly Lys Gln
 805 810 815
 Thr Arg Phe Trp Thr Arg Ala Lys His Pro Ser Leu Leu Ser Ile Asn
 820 825 830
 Ser Asp Asp Val Glu Lys Arg Ser Cys Asp Ser Thr Gln Ala Leu Val
 835 840 845
 Ser Phe Thr His Ala Ser Ile Ala Tyr Asp Leu Pro Ser Asp Ser Gly
 850 855 860
 Ser Ser Pro Ala Tyr Pro Met Thr Glu Ser Cys His Leu Ser Ser Val
 865 870 875 880
 Ala Phe Val Pro Cys Leu
 885

<210> 26

<211> 907

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 26

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

Leu His Ser Leu Arg His Leu Trp Leu Asp Asp Asn Ala Leu Thr Asp		
165	170	175
Val Pro Val Gln Ala Phe Arg Ser Leu Ser Ala Leu Gln Ala Met Thr		
180	185	190
Leu Ala Leu Asn Lys Ile His His Ile Ala Asp Tyr Ala Phe Gly Asn		
195	200	205
Leu Ser Ser Leu Val Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile His Ser		
210	215	220
Leu Gly Lys Lys Cys Phe Asp Gly Leu His Ser Leu Glu Thr Leu Asp		
225	230	235
Leu Asn Tyr Asn Asn Leu Asp Glu Phe Pro Thr Ala Ile Lys Thr Leu		
245	250	255
Ser Asn Leu Lys Glu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Ile Arg Ser Ile		
260	265	270
Pro Glu Arg Ala Phe Val Gly Asn Pro Ser Leu Ile Thr Ile His Phe		
275	280	285
Tyr Asp Asn Pro Ile Gln Phe Val Gly Val Ser Ala Phe Gln His Leu		
290	295	300
Pro Glu Leu Arg Thr Leu Thr Leu Asn Gly Ala Ser His Ile Thr Glu		
305	310	315
Phe Pro His Leu Thr Gly Thr Ala Thr Leu Glu Ser Leu Thr Leu Thr		
325	330	335
Gly Ala Lys Ile Ser Ser Leu Pro Gln Ala Val Cys Asp Gln Leu Pro		
340	345	350
Asn Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Leu Leu Glu Asp Leu Pro		
355	360	365
Ser Leu Ser Gly Cys Gln Lys Leu Gln Lys Ile Asp Leu Arg His Asn		
370	375	380
Glu Ile Tyr Glu Ile Lys Gly Ser Thr Phe Gln Gln Leu Phe Asn Leu		
385	390	395
Arg Ser Leu Asn Leu Ala Trp Asn Lys Ile Ala Ile Ile His Pro Asn		
405	410	415
Ala Phe Ser Thr Leu Pro Ser Leu Ile Lys Leu Asp Leu Ser Ser Asn		
420	425	430
Leu Leu Ser Ser Phe Pro Val Thr Gly Leu His Gly Leu Thr His Leu		
435	440	445
Lys Leu Thr Gly Asn Arg Ala Leu Gln Ser Leu Ile Pro Ser Ala Asn		
450	455	460
Phe Pro Glu Leu Lys Ile Ile Glu Met Pro Ser Ala Tyr Gln Cys Cys		

465	470	475	480
Ala Phe Gly Gly Cys Glu Asn Val Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Trp Asn			
	485	490	495
Lys Asp Asp Gly Asn Ser Val Asp Asp Leu His Lys Lys Asp Ala Gly			
	500	505	510
Leu Phe Gln Val Gln Asp Glu Arg Asp Leu Glu Asp Phe Leu Leu Asp			
	515	520	525
Phe Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu His Ser Val Gln Cys Ser Pro Ser			
	530	535	540
Pro Gly Pro Phe Lys Pro Cys Glu His Leu Phe Gly Ser Trp Leu Ile			
545	550	555	560
Arg Ile Gly Val Trp Thr Thr Ala Val Leu Ala Leu Ser Cys Asn Ala			
	565	570	575
Leu Val Ala Leu Thr Val Phe Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Ser Ser Ile			
	580	585	590
Lys Leu Leu Ile Gly Val Ile Ala Val Val Asp Ile Leu Met Gly Val			
	595	600	605
Ser Ser Ala Val Leu Ala Ala Val Asp Ala Phe Thr Phe Gly Arg Phe			
	610	615	620
Ala Gln His Gly Ala Trp Trp Glu Asp Gly Ile Gly Cys Gln Ile Val			
625	630	635	640
Gly Phe Leu Ser Ile Phe Ala Ser Glu Ser Ser Ile Phe Leu Leu Thr			
	645	650	655
Leu Ala Ala Leu Glu Arg Gly Phe Ser Val Lys Cys Ser Ser Lys Phe			
	660	665	670
Glu Val Lys Ala Pro Leu Phe Ser Leu Arg Ala Ile Val Leu Leu Cys			
	675	680	685
Val Leu Leu Ala Leu Thr Ile Ala Thr Ile Pro Leu Leu Gly Gly Ser			
	690	695	700
Lys Tyr Asn Ala Ser Pro Leu Cys Leu Pro Leu Pro Phe Gly Glu Pro			
705	710	715	720
Ser Thr Thr Gly Tyr Met Val Ala Leu Val Leu Leu Asn Ser Leu Cys			
	725	730	735
Phe Leu Ile Met Thr Ile Ala Tyr Thr Lys Leu Tyr Cys Ser Leu Glu			
	740	745	750
Lys Gly Glu Leu Glu Asn Leu Trp Asp Cys Ser Met Val Lys His Ile			
	755	760	765
Ala Leu Leu Leu Phe Ala Asn Cys Ile Leu Tyr Cys Pro Val Ala Phe			
	770	775	780

Leu Ser Phe Ser Ser Leu Leu Asn Leu Thr Phe Ile Ser Pro Asp Val			
785	790	795	800
Ile Lys Phe Ile Leu Leu Val Ile Val Pro Leu Pro Ser Cys Leu Asn			
	805	810	815
Pro Leu Leu Tyr Ile Val Phe Asn Pro His Phe Lys Glu Asp Met Gly			
	820	825	830
Ser Leu Gly Lys His Thr Arg Phe Trp Met Arg Ser Lys His Ala Ser			
	835	840	845
Leu Leu Ser Ile Asn Ser Asp Asp Val Glu Lys Arg Ser Cys Glu Ser			
	850	855	860
Thr Gln Ala Leu Val Ser Phe Thr His Ala Ser Ile Ala Tyr Asp Leu			
865	870	875	880
Pro Ser Thr Ser Gly Ala Ser Pro Ala Tyr Pro Met Thr Glu Ser Cys			
	885	890	895
His Leu Ser Ser Val Ala Phe Val Pro Cys Leu			
	900	905	

<210> 27

<211> 886

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 27

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

His	Leu	Trp	Leu	Asp	Asp	Asn	Ala	Leu	Thr	Asp	Val	Pro	Val	Gln	Ala
145						150				155					160
Phe	Arg	Ser	Leu	Ser	Ala	Leu	Gln	Ala	Met	Thr	Leu	Ala	Leu	Asn	Lys
				165					170					175	
Ile	His	His	Ile	Ala	Asp	Tyr	Ala	Phe	Gly	Asn	Leu	Ser	Ser	Leu	Val
			180					185						190	
Val	Leu	His	Leu	His	Asn	Asn	Arg	Ile	His	Ser	Leu	Gly	Lys	Lys	Cys
		195					200					205			
Phe	Asp	Gly	Leu	His	Ser	Leu	Glu	Thr	Leu	Asp	Leu	Asn	Tyr	Asn	Asn
	210					215					220				
Leu	Asp	Glu	Phe	Pro	Thr	Ala	Ile	Lys	Thr	Leu	Ser	Asn	Leu	Lys	Glu
225					230					235					240
Leu	Gly	Phe	His	Ser	Asn	Asn	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Glu	Arg	Ala	Phe
				245				250						255	
Val	Gly	Asn	Pro	Ser	Leu	Ile	Thr	Ile	His	Phe	Tyr	Asp	Asn	Pro	Ile
			260					265						270	
Gln	Phe	Val	Gly	Val	Ser	Ala	Phe	Gln	His	Leu	Pro	Glu	Leu	Arg	Thr
		275					280							285	
Leu	Thr	Leu	Asn	Gly	Ala	Ser	His	Ile	Thr	Glu	Phe	Pro	His	Leu	Thr
	290					295						300			
Gly	Thr	Ala	Thr	Leu	Glu	Ser	Leu	Thr	Leu	Thr	Gly	Ala	Lys	Ile	Ser
305					310					315					320
Ser	Leu	Pro	Gln	Ala	Val	Cys	Asp	Gln	Leu	Pro	Asn	Leu	Gln	Val	Leu
			325					330						335	
Asp	Leu	Ser	Tyr	Asn	Leu	Leu	Glu	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ser	Gly	Cys
		340						345						350	
Gln	Lys	Leu	Gln	Lys	Ile	Asp	Leu	Arg	His	Asn	Glu	Ile	Tyr	Glu	Ile
		355					360						365		
Lys	Gly	Ser	Thr	Phe	Gln	Gln	Leu	Phe	Asn	Leu	Arg	Ser	Leu	Asn	Leu
	370						375				380				
Ala	Trp	Asn	Lys	Ile	Ala	Ile	Ile	His	Pro	Asn	Ala	Phe	Ser	Thr	Leu
385					390					395					400
Pro	Ser	Leu	Ile	Lys	Leu	Asp	Leu	Ser	Ser	Asn	Leu	Leu	Ser	Ser	Phe
				405						410				415	
Pro	Val	Thr	Gly	Leu	His	Gly	Leu	Thr	His	Leu	Lys	Leu	Thr	Gly	Asn
			420					425						430	
Arg	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Ile	Pro	Ser	Ala	Asn	Phe	Pro	Glu	Leu	Lys
	435						440						445		
Ile	Ile	Glu	Met	Pro	Ser	Ala	Tyr	Gln	Cys	Cys	Ala	Phe	Gly	Gly	Cys

450	455	460
Glu Asn Val Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Trp Asn Lys Asp Asp Gly Asn		
465	470	475
Ser Val Asp Asp Leu His Lys Lys Asp Ala Gly Leu Phe Gln Val Gln		480
	485	490
Asp Glu Arg Asp Leu Glu Asp Phe Leu Leu Asp Phe Glu Glu Asp Leu		495
	500	505
Lys Ala Leu His Ser Val Gln Cys Ser Pro Ser Pro Gly Pro Phe Lys		510
	515	520
Pro Cys Glu His Leu Phe Gly Ser Trp Leu Ile Arg Ile Gly Val Trp		525
	530	535
Thr Thr Ala Val Leu Ala Leu Ser Cys Asn Ala Leu Val Ala Leu Thr		540
545	550	555
Val Phe Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Ser Ser Ile Lys Leu Leu Ile Gly		560
	565	570
Val Ile Ala Val Val Asp Ile Leu Met Gly Val Ser Ser Ala Val Leu		575
	580	585
Ala Ala Val Asp Ala Phe Thr Phe Gly Arg Phe Ala Gln His Gly Ala		590
	595	600
Trp Trp Glu Asp Gly Ile Gly Cys Gln Ile Val Gly Phe Leu Ser Ile		605
	610	615
Phe Ala Ser Glu Ser Ser Ile Phe Leu Leu Thr Leu Ala Ala Leu Glu		620
625	630	635
Arg Gly Phe Ser Val Lys Cys Ser Ser Lys Phe Glu Val Lys Ala Pro		640
	645	650
Leu Phe Ser Leu Arg Ala Ile Val Leu Leu Cys Val Leu Leu Ala Leu		655
	660	665
Thr Ile Ala Thr Ile Pro Leu Leu Gly Gly Ser Lys Tyr Asn Ala Ser		670
	675	680
Pro Leu Cys Leu Pro Leu Pro Phe Gly Glu Pro Ser Thr Thr Gly Tyr		685
	690	695
Met Val Ala Leu Val Leu Leu Asn Ser Leu Cys Phe Leu Ile Met Thr		700
705	710	715
Ile Ala Tyr Thr Lys Leu Tyr Cys Ser Leu Glu Lys Gly Glu Leu Glu		720
	725	730
Asn Leu Trp Asp Cys Ser Met Val Lys His Ile Ala Leu Leu Leu Phe		735
	740	745
Ala Asn Cys Ile Leu Tyr Cys Pro Val Ala Phe Leu Ser Phe Ser Ser		750
	755	760
		765

Leu Leu Asn Leu Thr Phe Ile Ser Pro Asp Val Ile Lys Phe Ile Leu
 770 775 780
 Leu Val Ile Val Pro Leu Pro Ser Cys Leu Asn Pro Leu Leu Tyr Ile
 785 790 795 800
 Val Phe Asn Pro His Phe Lys Glu Asp Met Gly Ser Leu Gly Lys His
 805 810 815
 Thr Arg Phe Trp Met Arg Ser Lys His Ala Ser Leu Leu Ser Ile Asn
 820 825 830
 Ser Asp Asp Val Glu Lys Arg Ser Cys Glu Ser Thr Gln Ala Leu Val
 835 840 845
 Ser Phe Thr His Ala Ser Ile Ala Tyr Asp Leu Pro Ser Thr Ser Gly
 850 855 860
 Ala Ser Pro Ala Tyr Pro Met Thr Glu Ser Cys His Leu Ser Ser Val
 865 870 875 880
 Ala Phe Val Pro Cys Leu
 885

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 28

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

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 29

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

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu8E11.v1轻链可变区

<400> 30

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

<210> 31

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列s

<220>

<223> hu8E11.v1重链可变区

<400> 31

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

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu8E11.v2轻链可变区

<400> 32

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
 85 90 95
 Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 33

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu8E11.v2重链可变区

<400> 33

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

<210> 34

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu8E11.v3轻链可变区

<400> 34

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

<400> 36

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

<210> 37

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu8E11.v4重链可变区

<400> 37

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 38

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu8E11.v5轻链可变区

<400> 38

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

<210> 39

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu8E11.v5重链可变区

<400> 39

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

100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 40		
<211> 112		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> hu8E11.v6轻链可变区		
<400> 40		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
1 5 10 15		
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr		
20 25 30		
Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
35 40 45		
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp		
50 55 60		
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65 70 75 80		
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr		
85 90 95		
Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		
100 105 110		
<210> 41		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> hu8E11.v6重链可变区		
<400> 41		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ala Tyr		
20 25 30		
Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
35 40 45		
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe		
50 55 60		

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

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

<210> 44

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu8E11.v8轻链可变区

<400> 44

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

<210> 45

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu8E11.v8重链可变区

<400> 45

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

<210> 46

<211> 113

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 46

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

Arg

<210> 47

<211> 115

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 47

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

<210> 48

<211> 114

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 48

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

Lys Arg

<210> 49

<211> 121

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Lys Asn Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Cys Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Ser Thr Met Ile Thr Pro Arg Phe Ala Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 50

<211> 108

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 50

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 51

<211> 116

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 51

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Ala Glu Ile Tyr Pro Pro Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Lys Ala Arg Leu Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100

105

110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 52

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Asn Ser Phe Met His

1

5

10

15

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 53

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1

5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 54

Gln Gln Asn Tyr Glu Asp Pro Phe Thr

1 5

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 55

Gly Tyr Thr Phe Ser Ala Tyr Trp Ile Glu

1 5 10

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 56

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Val

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 57

Gly Gly His Tyr Gly Ser Leu Asp Tyr

1 5

<210> 58

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hu8E11轻链 (LC) 框架1 (FR1)

<400> 58

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

20

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hu8E11 LC FR2

<400> 59

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 60

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hu8E11.v1 LC FR3; Hu8E11.v2 LC FR3; Hu8E11.v5 LC FR3; Hu8E11.v6 LC

FR3

<400> 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 61

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hu8E11.v3 LC FR3; Hu8E11.v4 LC FR3; Hu8E11.v7 LC FR3; Hu8E11.v8 LC

FR3

<400> 61

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hu8E11 LC FR4

<400> 62

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 63

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hu8E11重链(HC)框架1 (FR1)

<400> 63

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hu8E11 HC FR2

<400> 64

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 65

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hu8E11.v1 HC FR3; Hu8E11.v3 HC FR3

<400> 65

Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Leu Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 66

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hu8E11.v2 HC FR3; Hu8E11.v4 HC FR3

<400> 66

Arg Ala Thr Phe Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Leu Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 67

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hu8E11.v5 HC FR3; Hu8E11.v7 HC FR3

<400> 67

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 68

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hu8E11.v6 HC FR3; Hu8E11.v8 HC FR3

<400> 68

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hu8E11 HC FR4

<400> 69

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

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 70

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln

1 5 10 15

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 71

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 72

Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 73

Val Asp Thr Phe Asn Ser Tyr Trp Met His

1 5 10

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 74

Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asn

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 75

Gly Trp Tyr Phe Asp Val

1 5
 <210> 76
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 76
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Thr
 <210> 77
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 77
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5
 <210> 78
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 78
 Gln Asn Asp Tyr Ser Phe Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 79
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 79
 Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn
 1 5 10
 <210> 80
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)
 <400> 80
 Leu Ile Asn Cys Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 81

Gly Gly Ser Thr Met Ile Thr Pro Arg Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 82

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 83

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 84

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 85

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr Ser Ile Ser

1 5 10

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 86

Glu Ile Tyr Pro Pro Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 87
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)
 <400> 87
 Ala Arg Leu Phe Phe Asp Tyr
 1 5
 <210> 88
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> hu8E11.v2轻链
 <400> 88
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
 85 90 95
 Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 89
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> hu8E11.v2重链
 <400> 89
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Val Arg Ala Thr Phe Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly His Tyr Gly Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
210	215	220	
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
245	250	255	
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
260	265	270	
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
275	280	285	
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
325	330	335	
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
340	345	350	
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
355	360	365	
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
370	375	380	
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
405	410	415	
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
420	425	430	
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
435	440	445	
<210> 90			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人(Homo sapiens)			
<400> 90			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala			
20	25	30	

Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
35							40						45		
Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
50							55					60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
				100					105					110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
				115					120					125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
				130					135					140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
				180					185					190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
				195					200					205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
210															
<210>	91														
<211>	446														
<212>	PRT														
<213>	人(Homo sapiens)														
<400>	91														
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
				20					25					30	
Ser	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				35					40					45	
Ala	Glu	Ile	Tyr	Pro	Pro	Gly	Gly	Tyr	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
				50					55					60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70									75	80

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

385	390	395	400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp			
	405	410	415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His			
	420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	435	440	445

<210> 92

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义正向引物

<400> 92

accaactgca tcctaaactg 20

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义反向引物

<400> 93

accgagtttc acctcagctc 20

<210> 94

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 有义正向引物

<400> 94

acattgccct gttgctcttc acattgccct gttgctcttc 40

<210> 95

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 有义反向引物

<400> 95

actgctctga tataactcaat c 21

<210> 96

<211> 770

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LgR5 ECD huFc (1至537是LgR5 ECD)

<400> 96

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

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

	565		570		575
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu					
	580		585		590
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His					
	595		600		605
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg					
	610		615		620
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys					
625		630		635	640
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu					
	645		650		655
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr					
	660		665		670
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu					
	675		680		685
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp					
	690		695		700
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val					
705		710		715	720
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp					
	725		730		735
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His					
	740		745		750
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro					
	755		760		765
Gly Lys					
	770				

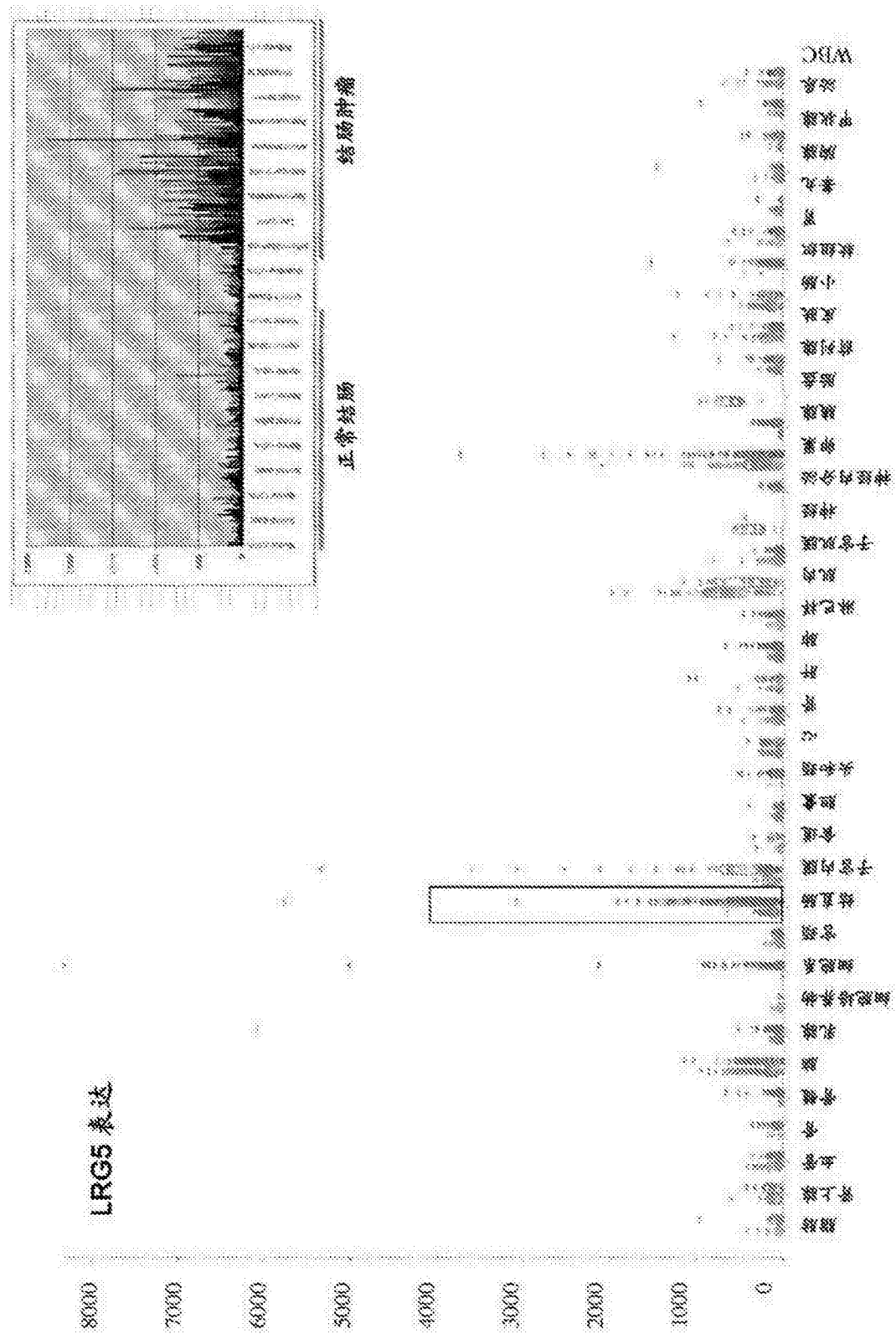


图1

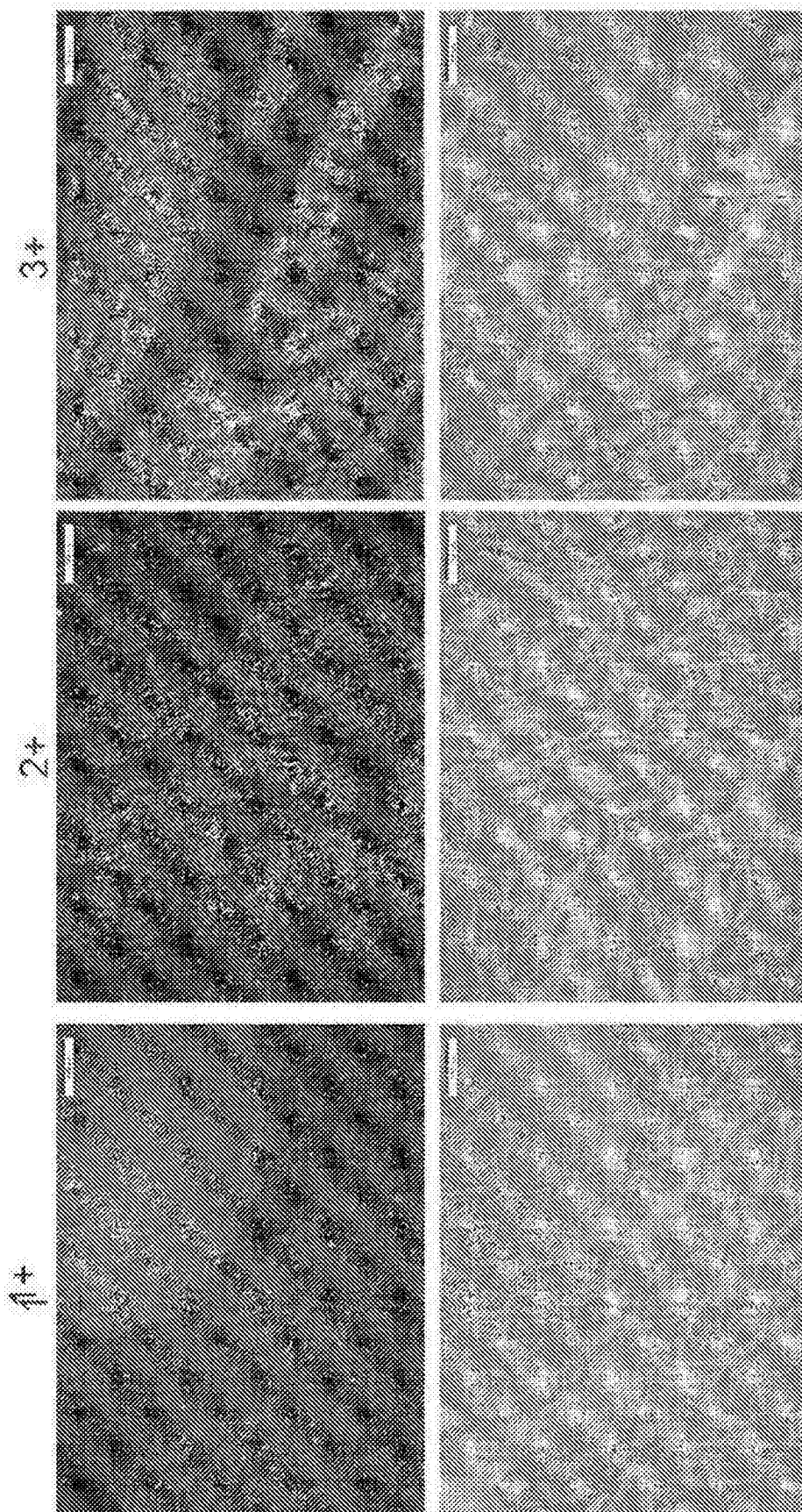


图2

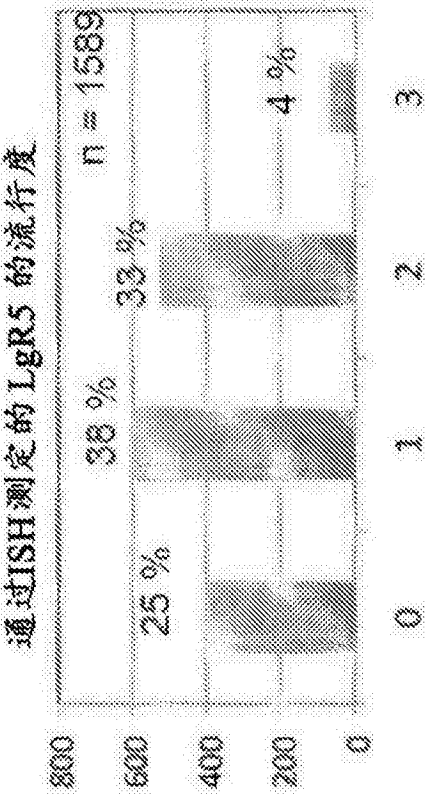


图3A

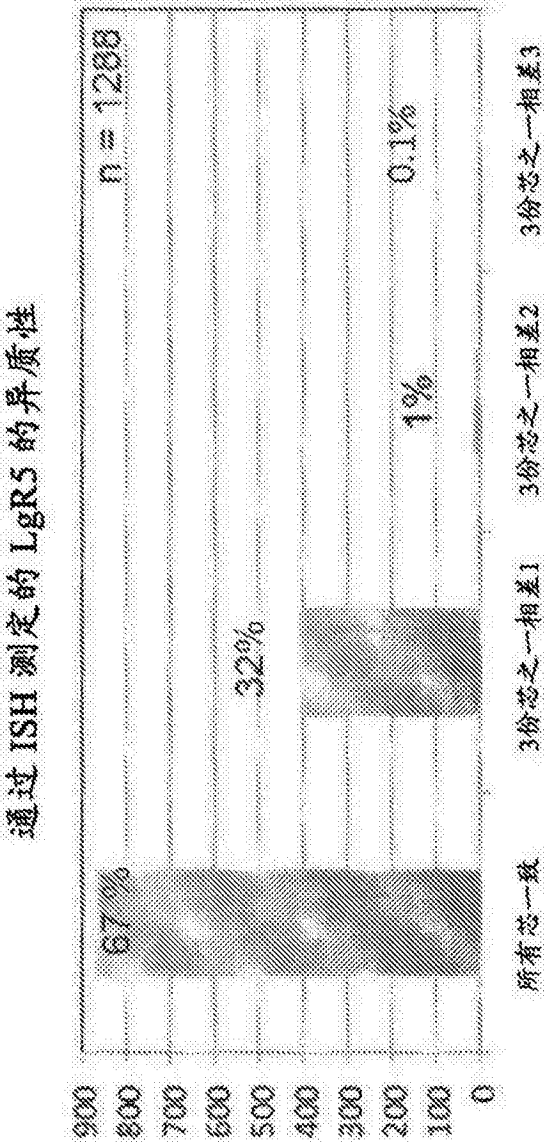


图3B

Kabat 编号	CDRL1-连接																			
	CDRL1-Kabat																			
GEN89.LGR5.1-12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
GEN89.LGR5.26-1	A	Y	D	M	T	Q	T	P	A	S	V	E	A	V	G	G	T	V	T	I
	A	F	E	L	T	Q	T	P	S	S	V	E	A	V	G	G	T	V	T	I
Kabat 编号	CDRL2-连接																			
	CDRL2-Kabat																			
GEN89.LGR5.1-12	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
GEN89.LGR5.26-1	P	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	N	L	A	S	G	V	P	S	R	F
	P	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	A	S	G	V	P	S	R	F
Kabat 编号	CDRL3-连接																			
	CDRL3-Kabat																			
GEN89.LGR5.1-12	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
GEN89.LGR5.26-1	T	Y	Y	C	Q	T	T	Y	G	S	S	S	D	G	F	F	W	T	F	F
	T	Y	Y	C	Q	S	Y	D	S	S	T	A	.	.	N	V	F	G	G	G

图4A

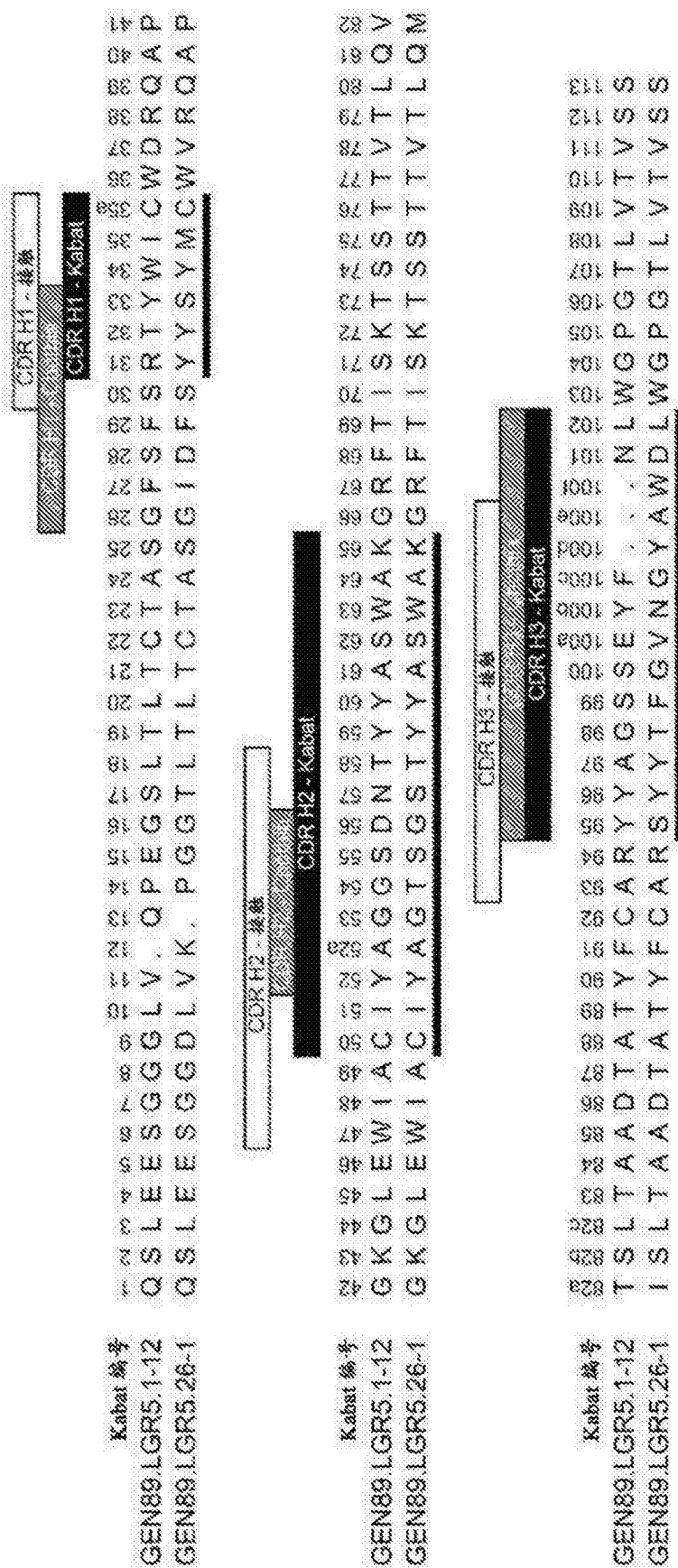


图4B

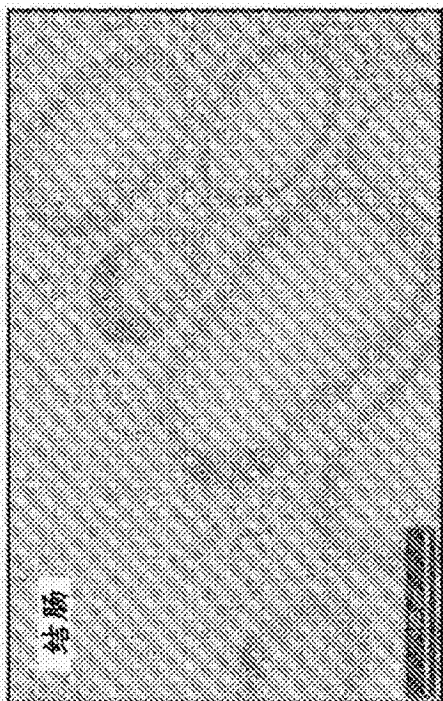


图5A

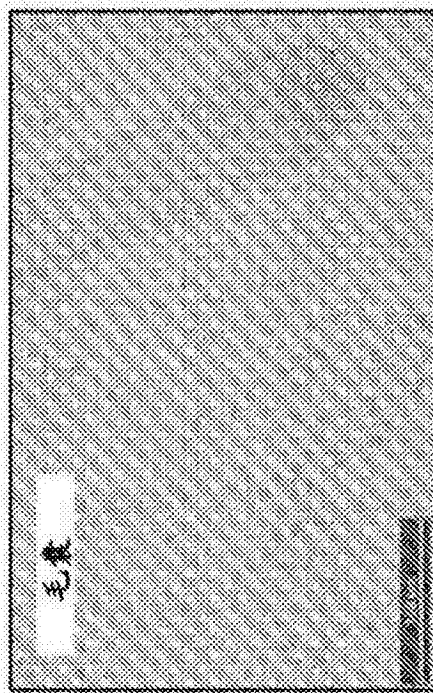


图5B

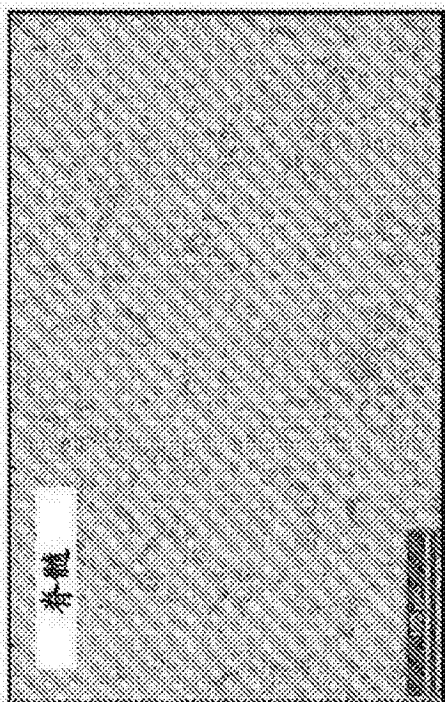


图5C

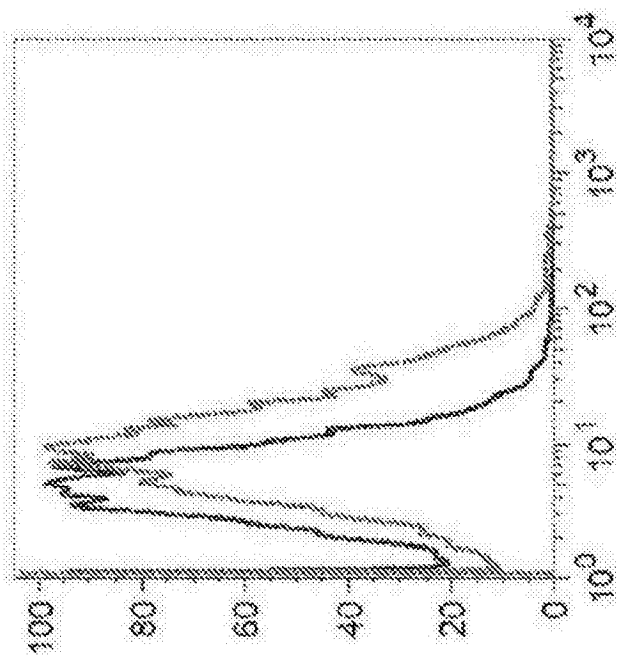


图6A

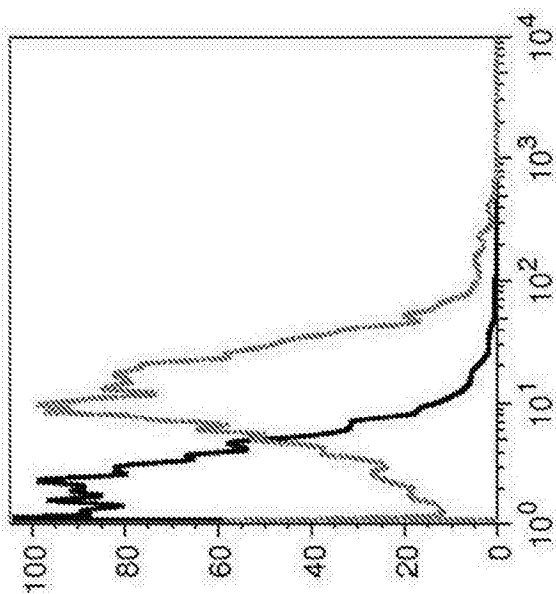


图6B

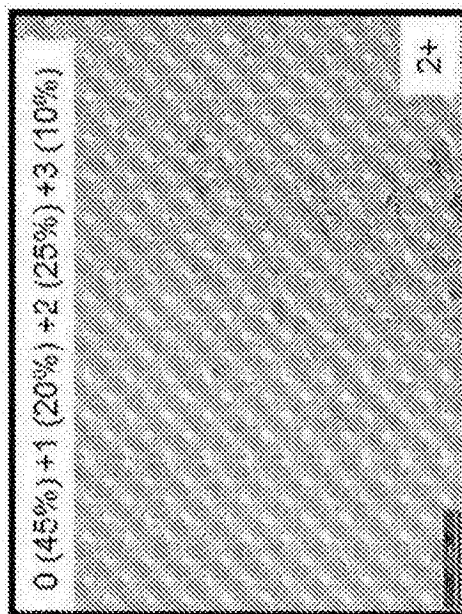


图6C

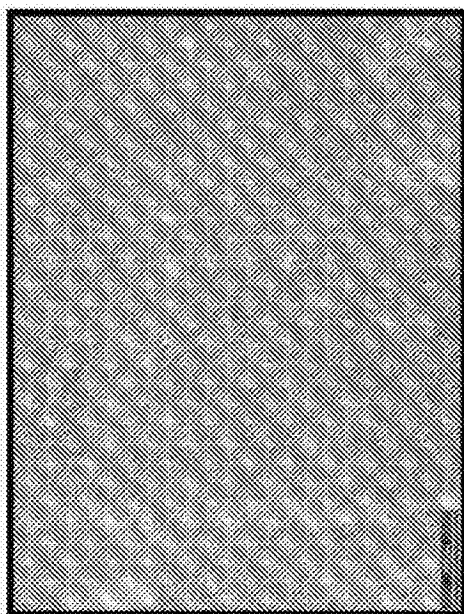


图6D

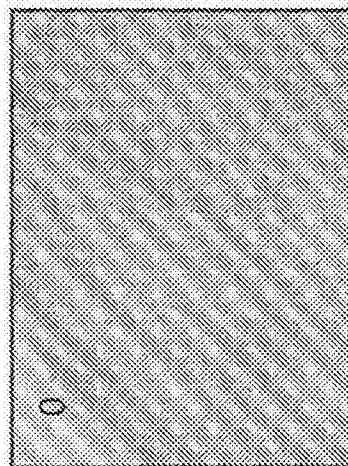


图7A

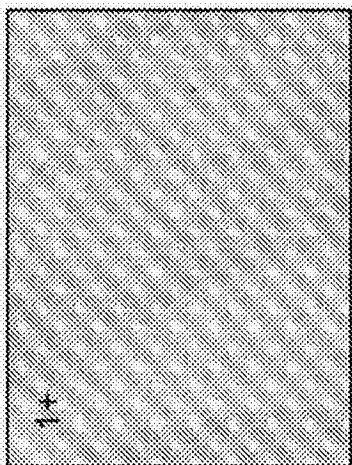


图7B

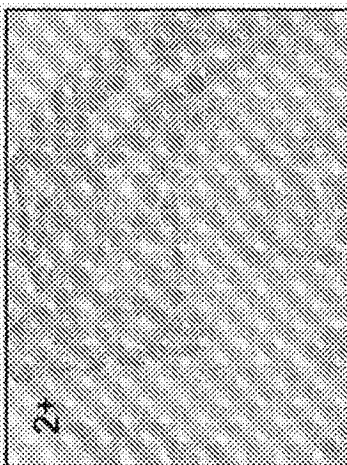


图7C

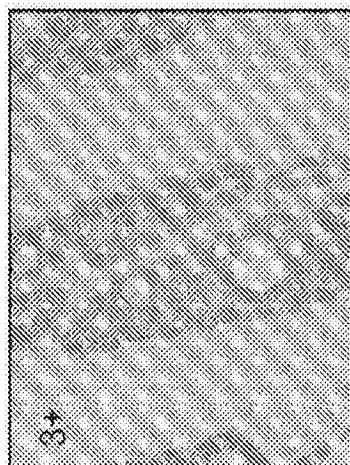


图7D

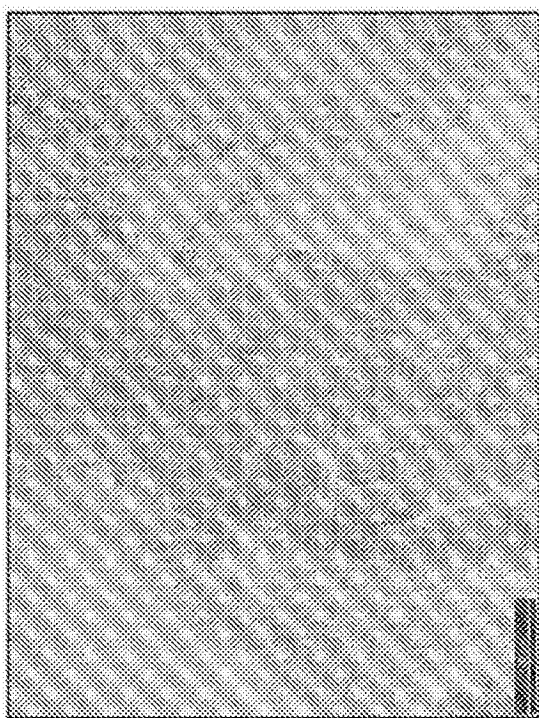


图8A

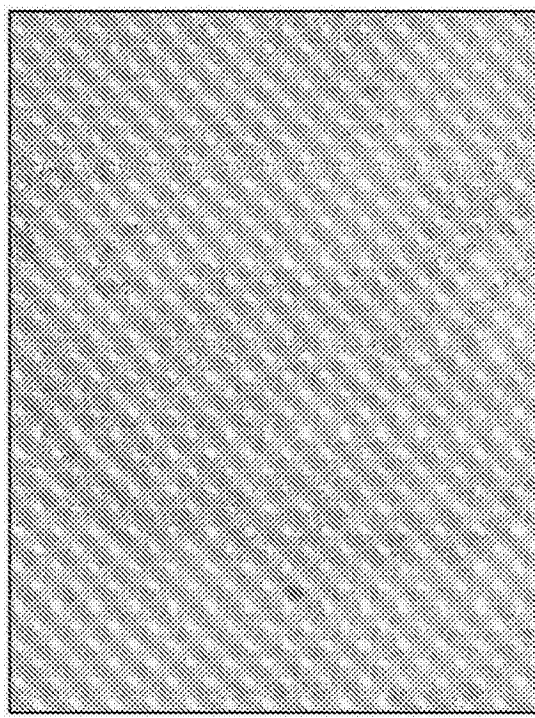


图8B