



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104520330 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 15

(21) 申请号 201380042359. 9

A61P 29/00(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 06. 07

A61K 39/395(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/657, 184 2012. 06. 08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 02. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2013/054688 2013. 06. 07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/183032 EN 2013. 12. 12

(71) 申请人 格兰马克药品股份有限公司

地址 瑞士拉绍德封

(72) 发明人 斯坦尼斯拉斯·布兰 罗曼·奥利耶

达尔科·什凯格罗

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 巩克栋 杨生平

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

权利要求书5页 说明书39页

序列表125页 附图14页

(54) 发明名称

具有氨基酸取代的人源化抗 TrkA 抗体

(57) 摘要

本发明涉及针对 TrkA 受体的抗体及其用途, 包括人源化抗-TrkA 抗体。更具体地, 本发明涉及含重链可变区、轻链可变区、人轻链恒定区和交换性能改变的变体人 IgG4 重链恒定区的具有增强的抑制性能的人源化抗-TrkA 抗体。

1. 一种人源化抗 -TrkA 抗体或其片段, 包含:

a) 重链可变区, 其含有选自 SEQ ID NO:1-5 的序列, 和

b) 轻链可变区, 其含有选自 SEQ ID NO:6-13 的序列,

其中重链可变区的 CDR2 包含至少一种氨基酸取代和 / 或其中重链可变区的非 CDR 区包含选自 37、42 和 89 的氨基酸位点的氨基酸取代, 其中每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

2. 如权利要求 1 所述的人源化抗 -TrkA 抗体或其片段, 其中重链可变区的 CDR2 包含 SEQ ID NO:15 的序列。

3. 如权利要求 1 所述的人源化抗 -TrkA 抗体或其片段, 其中重链可变区包含选自 SEQ ID NO:1、3 和 5 的序列, 并且轻链可变区包含选自 SEQ ID NO:6 和 8 的序列。

4. 如权利要求 1 所述的人源化抗 -TrkA 抗体或其片段, 其中所述抗体所包含的重链可变区和轻链可变区的组合包含选自 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 以及 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:8 的序列。

5. 如权利要求 1 所述的人源化抗 -TrkA 抗体或其片段, 其中所述抗体所包含的重链可变区和轻链可变区的组合含有 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 的序列或者含有 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:8 的序列。

6. 如权利要求 1 所述的人源化抗 -TrkA 抗体或其片段, 其中所述抗体所包含的重链可变区和轻链可变区的组合含有 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 的序列。

7. 如权利要求 1 所述的人源化抗 -TrkA 抗体或其片段, 其中重链可变区的 CDR2 的氨基酸取代包含选自 50、60 和 62 的氨基酸位点的氨基酸取代, 其中每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

8. 如权利要求 1 所述的人源化抗 -TrkA 抗体或其片段, 其中重链可变区的 CDR2 的氨基酸取代不包含选自 Y50A、P60A 和 T62S 的氨基酸取代, 其中每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

9. 如权利要求 1 所述的人源化抗 -TrkA 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段的重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代包含选自 V37A、G42E 和 V89L 的氨基酸取代, 其中每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

10. 如权利要求 1 所述的人源化抗 -TrkA 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段的重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代包含 V37A, 其中所述氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

11. 如权利要求 1 所述的人源化抗 -TrkA 抗体或其片段, 其中所述抗体所包含的重链可变区和轻链可变区的组合包含 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:6 的序列或者包含 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:8 的序列, 其中重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代包含选自 V37A、T40A、G42E、R44G、A49S 和 V89L 的氨基酸取代, 其中每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

12. 如权利要求 6 所述的人源化抗 -TrkA 抗体或其片段, 其中重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代包含选自 K3Q、V37A、G42E、A49S、V89L 和 R94K 的氨基酸取代, 其中每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

13. 如权利要求 6 所述的人源化抗-TrkA 抗体或其片段, 其中重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代包含氨基酸取代 K3Q 和 V37A, 其中所述氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

14. 如权利要求 6 所述的人源化抗-TrkA 抗体或其片段, 其中重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代包含氨基酸取代 V37A, 其中所述氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

15. 一种人源化抗-TrkA 抗体或其片段, 包含:

a) 重链可变区, 其含有选自 SEQ ID NO:31-49 的序列, 和

b) 轻链可变区, 其含有选自 SEQ ID NO:6-13 的序列。

16. 如权利要求 15 所述的人源化抗-TrkA 抗体或其片段, 其中所述抗体包含:

a) 重链可变区, 其含有选自 SEQ ID NO:32 和 36 的序列, 和

b) 轻链可变区, 其含有 SEQ ID NO:6 的序列。

17. 如权利要求 1 到 16 任一项所述的人源化抗-TrkA 抗体或其片段, 还包含重链和 / 或轻链恒定区。

18. 如权利要求 1 到 16 任一项所述的人源化抗-TrkA 抗体或其片段, 还包含重链和 / 或轻链恒定区和铰链区, 其中所述重链恒定区和铰链区是人 IGHG1 同型或人 IGHG4 同型。

19. 如权利要求 1 到 16 任一项所述的人源化抗 TrkA 抗体或其片段, 还包含重链和 / 或轻链恒定区和铰链区, 其中所述重链恒定区和铰链区是人 IGHG4 同型并且其中所述铰链区含有氨基酸取代 S228P, 其中所述氨基酸位点是应用 EU 编号系统标识的。

20. 一种人源化抗 TrkA 抗体或其片段, 包含:

a) 重链, 其含有选自 SEQ ID NO:50-70 的序列, 和

b) 轻链, 其含有选自 SEQ ID NO:29 和 30 的序列。

21. 如权利要求 1 到 20 任一项所述的人源化抗 TrkA 抗体或其片段, 其中所述抗体是全长抗体。

22. 如权利要求 1 到 16 任一项所述的人源化抗 TrkA 抗体或其片段, 其中所述抗体是选自 Fab、Fab'、Fab'-SH、Fd、Fv、dAb、F(ab')₂、scFv、双特异性单链 Fv 二聚体、双体、三体和基因融合到相同或者不同抗体的 scFv 的抗体片段。

23. 如权利要求 1 到 21 任一项所述的人源化抗 TrkA 抗体或其片段, 其中所述抗体包含相对于亲本抗体的 Fc 区含有至少 1 个氨基酸修饰的变体 Fc 区, 而包含所述变体 Fc 区的抗体显示出与亲本抗体相比改变的效应子功能。

24. 如权利要求 1 到 23 任一项所述的人源化抗 TrkA 抗体或其片段, 其中所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段能够抑制 TrkA 的功能活化。

25. 如权利要求 1 到 23 任一项所述的人源化抗 TrkA 抗体或其片段, 其中所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段能够阻断或减低 TrkA 的一种或多种生物学活性。

26. 如权利要求 1 到 23 任一项所述的人源化抗 TrkA 抗体或其片段, 其中所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段与人 TrkA 结合的亲和力 (KD) 为 500nM 或更低。

27. 如权利要求 1 到 23 任一项所述的人源化抗 TrkA 抗体或其片段, 其中所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段在 TF-1 细胞增殖测定中具有与相应的亲本抗体相比至少相当或者更低的 IC50。

28. 如权利要求 1 到 23 任一项所述的人源化抗 TrkA 抗体或其片段, 其中所述人源化抗

TrkA 抗体的 FAB 片段的耐热温度超过 65℃。

29. 如权利要求 28 所述的人源化抗 TrkA 抗体或其片段,其中所述人源化抗 TrkA 抗体的 FAB 片段的耐热温度等于亲本鼠抗体的 FAB 片段的耐热温度。

30. 一种分离的核酸,其编码权利要求 1 到 23 任一项所述的人源化抗 TrkA 抗体或其片段。

31. 如权利要求 30 所述的分离的核酸,包含选自 SEQ ID NO:73-116 的核酸序列。

32. 一种载体,其包含权利要求 30 或 31 的分离的核酸。

33. 一种宿主细胞,其包含权利要求 30 或 31 的分离的核酸或权利要求 32 的载体。

34. 一种产生结合人 TrkA 的人源化抗 TrkA 抗体或其片段的方法,其包括培养权利要求 33 的宿主细胞以使所述核酸表达并产生抗体。

35. 如权利要求 1 到 23 任一项所述的人源化抗 TrkA 抗体或其片段,其为固定的形式。

36. 一种组合物,其包含权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段和药学上可接受的载体。

37. 一种免疫交联物,其包含连接到治疗剂的权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段。

38. 一种组合物,其包含权利要求 37 的免疫交联物和药学上可接受的载体。

39. 如权利要求 36 或 38 所述的组合物,其还包含另外的药物活性剂。

40. 如权利要求 39 所述的组合物,其中所述另外的药物活性剂是下述一种或多种:

a) 镇痛剂

b) 另外的抗 TrkA 抗体

c) NGF

d) 抗癌剂

e) 抗 NGF 抗体。

41. 权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段,权利要求 36、38、39 或 40 的组合物,或权利要求 37 的免疫交联物用于药物。

42. 权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段,权利要求 36、38、39 或 40 的组合物,或权利要求 37 的免疫交联物用于治疗疼痛。

43. 权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段,权利要求 36、38、39 或 40 的组合物,或权利要求 37 的免疫交联物用于治疗慢性疼痛。

44. 权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段,权利要求 36、38、39 或 40 的组合物,或权利要求 37 的免疫交联物用于治疗急性疼痛。

45. 权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段,权利要求 36、38、39 或 40 的组合物,或权利要求 37 的免疫交联物用于治疗下述一种或多种相关的疼痛:炎性疼痛、手术后疼痛、操作后疼痛(包括牙痛)、神经性疼痛、周围神经病变、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、骨折疼痛、痛风关节痛、疱疹后神经痛、癌症疼痛、骨关节炎或类风湿关节炎疼痛、坐骨神经痛、镰状细胞危象相关的疼痛、头痛(例如偏头痛、紧张性头痛、丛集性头痛)、痛经、子宫内膜异位症、子宫肌瘤、肌肉骨骼疼痛、慢性腰背痛、纤维肌痛、扭伤、内脏痛、卵巢囊肿、前列腺炎、慢性骨盆疼痛综合征、膀胱炎、间质性膀胱炎、痛性膀胱综合征和/或膀胱疼痛综合征、慢性非细菌性前列腺炎相关的疼痛、切口疼痛、偏头痛、三叉神经痛、烧伤和

/ 或创口痛、创伤相关的疼痛、肌肉骨骼疾病相关的疼痛、强直性脊柱炎、关节周围病变、骨转移疼痛、HIV 疼痛、红斑性肢痛症或者胰腺炎或肾结石引起的疼痛、恶性黑色素瘤、干燥综合征、哮喘（例如，具有严重的气道高反应性的不受控制哮喘）、顽固性咳嗽、脱髓鞘疾病、慢性酒精中毒、中风、丘脑疼痛综合征、毒素引起的疼痛、化疗疼痛、炎性肠病、肠易激综合征、炎性眼病、炎性或不稳定膀胱病症、银屑病、炎性成分相关的皮肤疾病、晒斑、心肌炎、皮炎、肌炎、神经炎、胶原血管病、慢性炎性病况、炎性疼痛及相关的痛觉过敏和异常性疼痛、神经性疼痛及相关的痛觉过敏或异常性疼痛、糖尿病神经病变疼痛、灼性神经痛、交感神经维持性疼痛、传入神经阻滞综合征、上皮组织损伤或功能障碍、呼吸器官、泌尿生殖器官、胃肠道或血管区域的内脏能动性紊乱、过敏性皮肤反应、瘙痒、白癜风、综合性胃肠道病症、肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、血管舒缩或变应性鼻炎、支气管病症、消化不良、胃食管返流、胰腺炎、内脏痛和骨纤维性结构不良 (FD)。

46. 权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段，权利要求 36、38、39 或 40 的组合物，或权利要求 37 的免疫交联物用于治疗下述一种或多种相关的疼痛：胰腺炎、肾结石、子宫内膜异位症、IBD、克罗恩病、手术后的粘连、胆囊结石、头痛、痛经、肌肉骨骼痛、扭伤、内脏痛、卵巢囊肿、前列腺炎、膀胱炎、间质性膀胱炎、手术后疼痛、偏头痛、三叉神经痛、烧伤和 / 或创口痛、创伤相关的疼痛、神经性疼痛、肌骨骼疾病相关的疼痛、类风湿关节炎、骨关节炎、强直性脊柱炎、关节周围病变、肿瘤痛、骨转移疼痛、HIV 感染。

47. 权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段，权利要求 36、38、39 或 40 的组合物，或权利要求 37 的免疫交联物用于治疗癌症、神经病症、阿尔茨海默氏病、糖尿病、糖尿病性肾病、病毒性病症、HIV 介导的病症、麻风病或炎性病症。

48. 权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段，权利要求 36、38、39 或 40 的组合物，或权利要求 37 的免疫交联物用于治疗急性炎性疼痛，其中痛觉过敏被有效地逆转到与使用 NSAID 相同的程度。

49. 权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段，权利要求 36、38、39 或 40 的组合物，或权利要求 37 的免疫交联物用于治疗慢性炎性疼痛，其中痛觉过敏被有效地逆转到与使用 NSAID 相同的程度。

50. 权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段，权利要求 36、38、39 或 40 的组合物，或权利要求 37 的免疫交联物用于治疗骨关节炎疼痛，其中痛觉过敏被有效地逆转到与使用普瑞巴林和阿片剂相同的程度。

51. 权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段，权利要求 36、38、39 或 40 的组合物，或权利要求 37 的免疫交联物用于治疗神经性疼痛，其中痛觉过敏和异常性疼痛被有效地逆转到与使用普瑞巴林相同的程度。

52. 权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段，权利要求 36、38、39 或 40 的组合物，或权利要求 37 的免疫交联物用于诊断或预后。

53. 权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段，权利要求 36、38、39 或 40 的组合物，或权利要求 37 的免疫交联物用于包含 TrkA 异常表达或 TrkA 活性异常的病况的诊断或预后。

54. 权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段，权利要求 36、38、39 或 40 的组合物，或权利要求 37 的免疫交联物用于权利要求 41 到 47 中所述的任意疾病或病症的

诊断或预后。

55. 一种制品,其包含权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段,权利要求 36、38、39 或 40 的组合物或权利要求 37 的免疫交联物。

56. 一种试剂盒,其包含权利要求 1 到 23 任一项的人源化抗 TrkA 抗体或其片段,权利要求 36、38、39 或 40 的组合物或权利要求 37 的免疫交联物。

具有氨基酸取代的人源化抗 TrkA 抗体

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2012 年 6 月 8 日提交的美国临时专利申请 No. 61/657, 184 的优先权，其以引用方式全文纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明概而言之涉及针对 TrkA 受体的抗体及其用途，包括人源化抗 TrkA 抗体以及使用抗 TrkA 抗体的治疗方法。一方面，本发明涉及具有增强的抑制性能的人源化抗 TrkA 抗体。

[0004] 另一方面，本发明涉及包含重链可变区、轻链可变区、人轻链恒定区和交换性能改变的变体人 IgG4 重链恒定区的具有增强的抑制性能的人源化抗 TrkA 抗体。

背景技术

[0005] 神经营养因子属于与 NGF 家族第一个成员 (Levi-Montalcini R(1987) EMBO J. 6(5):1145-54) 结构上相关的肽生长因子家族 (Barde YA(1994) J. Neurobiol. 25(11):1329-33)。神经营养素调节周围神经元和中枢神经系统的神经元分化和存活，以及突触传递。此外，NGF 可作用于多种非神经组织和细胞例如免疫细胞。NGF 起作用是通过存在于靶细胞中的两种膜受体，低亲和力 p75 受体和 140kDa 高亲和力跨膜糖蛋白，TrkA (Kaplan DR et al., (1991) Science 252(5005):554-8; Klein R et al., (1991) Cell 65(1):189-97) 具有酪氨酸激酶活性。TrkA 在基底前脑和纹状体的神经嵴神经元、交感神经元以及胆碱能神经元中表达，其作为 NGF 活性的重要介质 (Holtzman DM et al., (1992) Neuron 9(3):465-78; Verge VM et al., (1992) J. Neurosci. 12(10):4011-22)。TrkA 也在某些非神经组织和细胞包括 B 淋巴细胞中表达 (Torcia M et al., (1996) Cell 85(3):345-56)。

[0006] 神经生长因子 (NGF) 最初被鉴定为正在发育的神经系统中感觉和交感神经元的存活因子 (Gorin PD&Johnson EM(1979) PNAS USA, 76(10):5382-6)。成体内，NGF 不是存活所必需的，但是其在数种急性和慢性疼痛状态产生疼痛和痛觉过敏时起重要作用。在受伤的和炎性组织中 NGF 高表达，并且 trkA 对伤害性感受神经元的激活通过多种机制引发并产生疼痛信号。在动物模型中通过中和 NGF 生物活性可显著减少炎症相关的疼痛 (Woolf CJ et al., (1994) Neuroscience 62(2):327-31; McMahon SB et al., (1995) Nat. Med. 1(8):774-80; Koltzenburg M et al., (1999) Eur. J. Neurosci. 11(5):1698-704)，显示该神经营养因子水平增加是产生全痛觉过敏反应所必需的。值得注意地，对其他神经营养因子的抑制不会抵消诱导的痛觉过敏，表明所述效应是 NGF 特异的 (McMahon SB et al., (1995) Nat. Med. 1(8):774-80)；此外，NGF 抑制可在不同的神经病变相关的疼痛的治疗方案中起镇痛作用 (Koltzenburg M et al., (1999) Eur. J. Neurosci. 11(5):1698-704; Ro LS et al., (1999) Pain 79(2-3):265-74; Theodosiou M et al., (1999) Pain, 81(3):245-55; Christensen MD&Hulsebosch CE(1997) Exp.

Neurol. 147(2):463-75)。在疼痛治疗中存在很大的、未满足的医疗需求。主要种类的镇痛剂：非固醇类抗炎药 (NSAID) 和阿片制剂受限于他们的有效性和耐受性 (Hefti FF et al., (2006) Trends Pharmacol. Sci. 27(2):85-91)。低于 30% 的慢性疼痛患者通过当前的治疗方法可获得充分地缓解, 并且具有许多副作用, 特别是长期给药时 (Kalso E et al., (2004) Pain 112(3):372-80)。公认 NGF 在成体的疼痛机制中具有重要作用, 这提供了开发全新种类的疼痛治疗的可能。

[0007] 靶向 TrkA 而不靶向 NGF 可代表一种更好的治疗选择, 由于该受体不干扰由 p75 受体介导的 NGF 功能, 后者在神经元发育中具有广泛的功能。

发明内容

[0008] 本公开概而言之涉及人源化抗 TrkA 抗体、其制备方法以及用途。

[0009] 一方面, 本公开提供了人源化抗 TrkA 抗体或其片段, 包含:

[0010] a) 重链可变区, 其含有选自 SEQ ID NO:1-5 的序列, 和

[0011] b) 轻链可变区, 其含有选自 SEQ ID NO:6-13 的序列,

[0012] 其中重链可变区的 CDR2 包含至少一种氨基酸取代和/或其中重链可变区的非 CDR 区包含选自 37、42 和 89 的氨基酸位点的氨基酸取代, 其中每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

[0013] 另一方面, 本公开提供了编码人源化抗 TrkA 抗体或其片段的分离的核酸、包含所述分离的核酸的载体以及包含所述分离的核酸或所述载体的宿主细胞。本公开还提供了产生人源化抗 TrkA 抗体或其片段的方法。

[0014] 另一方面, 本公开提供了含有人源化抗 TrkA 抗体或其片段的组合物以及含有连接到治疗试剂的人源化抗 TrkA 抗体或其片段的免疫交联物。另一方面, 本公开提供了人源化抗 TrkA 抗体或其片段、组合物或免疫交联物用于药剂, 用于治疗疼痛, 用于治疗慢性疼痛, 用于治疗急性疼痛, 用于治疗下述一种或多种相关的疼痛: 胰腺炎、肾结石、子宫内膜异位症、IBD、克罗恩病、手术后的粘连、胆囊结石、头痛、痛经、肌肉骨骼痛、扭伤、内脏痛、卵巢囊肿、前列腺炎、膀胱炎、间质性膀胱炎、手术后疼痛、偏头痛、三叉神经痛、烧伤和/或创口痛、创伤相关的疼痛、神经性疼痛、肌骨骼疾病相关的疼痛、类风湿关节炎、骨关节炎、强直性脊柱炎、关节周围病变、肿瘤痛、骨转移疼痛、HIV 感染; 用于治疗癌症、神经性病症、阿尔茨海默氏病、糖尿病、糖尿病性肾病、病毒性病症、HIV 介导的病症、麻风病或炎性病症以及用于诊断或预后。

[0015] 另一方面, 本公开提供了治疗炎性疼痛、骨关节炎疼痛和神经性疼痛的方法。一方面, 在急性炎性痛觉过敏的体内模型中, 以 0.01mg/kg 施用人源化抗 TrkA 抗体可显著逆转急性炎性痛觉过敏。另一方面, 在慢性炎性痛觉过敏的体内模型中, 以 0.01mg/kg 施用人源化抗 TrkA 抗体可显著且持久地逆转慢性炎性痛觉过敏。另一方面, 在慢性骨关节炎痛觉过敏的体内模型中, 以 0.01mg/kg 施用人源化抗 TrkA 抗体可显著且持久地逆转慢性骨关节炎痛觉过敏。另一方面, 在神经性疼痛的体内慢性缩窄性损伤模型中, 以 1.0mg/kg 施用人源化抗 TrkA 抗体可显著逆转神经性疼痛。

[0016] 另一方面, 本公开提供了含有人源化抗 TrkA 抗体或其片段、组合物或免疫交联物的制品。

[0017] 另一方面,本公开提供了含有人源化抗 TrkA 抗体或其片段、组合物或免疫交联物的试剂盒。

附图说明

[0018] 图 1: 抗 TrkA 抗体的表面等离子体共振测定。数据表示为响应数(缩写为:RU;Y 轴)vs. 时间(X 轴)。(图 1A)MNAC13 抗体。(图 1B)BXhVH5VL1 抗体。(图 1C)GBR VH5(V37A)VL1 抗体。(图 1D)GBR VH5(K3Q, V37A)VL1 抗体。

[0019] 图 2: 使用差示扫描量热仪的抗 TrkA 抗体的热稳定性测定。数据表示为过量的摩尔热容(缩写为 C_p [kcal/mol/°C];Y 轴)vs. 温度(X 轴)。(图 2A)MNAC13 抗体(FAB 片段的 T_m 是 T_{m1} ,为 74°C);(图 2B)BXhVH5VL1 抗体(FAB 片段的 T_m 是 T_{m3} ,为 76.5°C);(图 2C)GBR VH5(V37A)VL1 抗体(FAB 片段的 T_m 是 T_{m1} ,为 73.6°C);(图 2D)GBR VH5(K3Q, V37A)VL1 抗体(FAB 片段的 T_m 是 T_{m1} ,为 73°C);(图 2E)图 2C 和图 2D 的叠加;(图 2F)图 2B 和图 2D 的叠加;(图 2G)图 2A 和图 2D 的叠加。

[0020] 图 3: 抗 TrkA 抗体的功能生物活性。人源化抗 TrkA 抗体对 NGF- 诱导的 TF-1 细胞增殖的影响;数据表示为增殖反应%(Y 轴)vs. 抗体浓度(μ g/ml;X 轴)。(图 3A)GBR VH5(V37A)VL1, GBR VH5(K3Q, V37A)VL1 vs. BXhVH5VL1;(图 3B)GBR VH5(V37A)VL1, GBR VH5(K3Q, V37A)VL1 vs. MNAC13;(图 3C)GBR VH5(K3Q, V37A)VL1 vs. GBR VH5(K3Q, V37A)VL1 IGHG4S228P;(图 3D)BXhVH5VL1, BXhVH5VL3, GBR VH5(V37A)VL1 vs. GBR VH5(V37A)VL3;(图 3E)BXhVH5VL1, BXhVH3VL1, GBR VH5(V37A)VL1 vs. GBR VH3(V37A)VL1。

[0021] 图 4: 人源化抗 TrkA 抗体逆转急性炎性爪疼痛。通过足底注射 CFA 至 AMB1 小鼠一侧后肢的爪诱导所述爪的急性炎性痛觉过敏,并测定同侧(注射的)爪的负重和对侧(非注射侧)爪的负重之间的%比率(% ipsi/contra,平均值 $\pm$ 标准误)。CFA 注射(0hr)后 23hr 测定负重读数,CFA 注射后 24hr 开始处理,单次腹膜注射 0.0001mg/kg(白色柱)、0.001mg/kg(内有水平线的柱)、0.01mg/kg(内有格子花的柱)和 0.1mg/kg(内有对角线的柱)抗 TrkA 抗体或者 0.1mg/kg 同型对照抗体(黑色柱),然后在给药后第 4、8、24、48、72、96 和 120hr 测定负重。作为阳性对照,将小鼠口服 10mg/kg 吲哚美辛处理(内有垂直线的柱)。

[0022] 图 5: 人源化抗 TrkA 抗体逆转慢性炎性关节疼痛。通过关节内注射 CFA 至 AMB1 小鼠的后肢膝关节诱导所述关节的慢性炎性痛觉过敏,并测定同侧(注射的)肢体的负重和对侧(非注射侧)肢体的负重之间的%比率(% ipsi/contra,平均值 $\pm$ 标准误)。CFA 注射之前(空白)和 CFA 处理后第 3、7 和 10 天记录负重读数,给药后第 13 天开始处理,单次腹膜注射 0.01mg/kg(空心方框,虚线)、1mg/kg(实心三角)和 10mg/kg(空心圆)抗 TrkA 抗体或者 10mg/kg 同型对照抗体(实心圆),然后在给药后第 4、8、24、48、72 和 96 天(括号中)测量负重。作为阳性对照,从第 13 天起使用 60mg/kg 塞来考昔每天 2 次(空心菱形)处理小鼠,并在 CFA 处理后第 13 天给药后第 1 和 8hr 以及 CFA 处理后第 14-17 天给药后第 1hr 测量负重。

[0023] 图 6: 人源化抗 TrkA 抗体逆转慢性骨关节炎疼痛。通过关节内注射 MIA 至 AMB1 小鼠一侧后肢的膝关节诱导慢性骨关节炎痛觉过敏,并测定同侧(注射的)肢体的负重和对侧(非注射侧)肢体的负重之间的%比率(% ipsi/contra,平均值 $\pm$ 标准误)。MIA 注

射之前和 MIA 注射后第 3、7 和 10 天记录基线 (BL) 负重读数, MIA 注射后第 14 天开始处理, 单次腹膜注射 $1 \mu\text{g/kg}$ (空心三角)、 $10 \mu\text{g/kg}$ (空心菱形) 和 $100 \mu\text{g/kg}$ (实心圆, 虚线) 抗 TrkA 抗体或者 10mg/kg 同型对照抗体 (实心圆) (图 6A)。作为比较对照, MIA 处理后第 14 天使用口服 10mg/kg 曲马多或 30mg/kg 普瑞巴林处理动物, 然后在 MIA 处理后第 16-22 天每隔 1 天使用 30mg/kg 曲马多或 100mg/kg 普瑞巴林处理动物 (图 6B)。MIA 处理后第 14 天给药后第 4、8 和 24 小时测量所有动物的负重, 然后抗体处理组每 24 小时一次、曲马多和普瑞巴林处理组给药后 1 小时和 24 小时测量所有动物的负重。

[0024] 图 7: 人源化抗 TrkA 抗体逆转神经性疼痛。通过 AMB1 小鼠坐骨神经的慢性缩窄性损伤诱导慢性神经性痛觉过敏和异常性疼痛, 并分别测定缩足所需的极限力 (threshold force, g) 和制冷板引起缩足的潜伏时间 (秒)。手术前和手术后第 7 天处理起始前 (0h) 记录读数。然后单次腹膜注射 $1000 \mu\text{g/kg}$ 同型对照抗体 (实心三角) 或者 $10 \mu\text{g/kg}$ (实心圆)、 $100 \mu\text{g/kg}$ (实心方框) 和 $1000 \mu\text{g/kg}$ (实心菱形) 抗 TrkA 抗体处理动物。在 7 天的给药周期中, 每天 1 次口服施用 $30\text{mg/kg}/10\text{ml}$ 普瑞巴林 (实心倒三角) 或盐水 (空心圆)。给药后第 4h、24h 及其后每隔一天记录给药后读数直至给药后第 7 天。所有天中给药普瑞巴林或盐水后 1h 记录给药后读数。

具体实施方式

[0025] 本公开涉及人源化抗 TrkA 抗体或其片段, 他们的制备方法及其用途。

[0026] 术语“TrkA”、“人 TrkA”、“TrkA 受体”或“人 TrkA 受体”在本文中等价使用, 并且如果没有特别说明其意为“人 TrkA”。本文中 TrkA 包括 TrkA 的变体、异构体及物种同源物。相应地, 本公开的抗体在某些情况下可与来自人以外的物种的 TrkA 交叉反应。在某些实施方案中, 抗体可是一种或多种人 TrkA 蛋白完全特异的, 并且可以不显示物种或其他非人类类型的交叉反应性。

[0027] TrkA 也已知作为高亲和力的神经生长因子受体或 1 型神经营养酪氨酸激酶受体或 TRK1- 转化酪氨酸激酶蛋白或者原肌球蛋白相关的激酶 A 或酪氨酸激酶受体或酪氨酸激酶受体 A 或 Trk-A 或 gp140trk 或 p140-TrkA 或 MTC 或者 TRK。TrkA 是一种受体酪氨酸激酶, 通过调节交感神经和神经元的增殖、分化和存活参与中枢神经系统和周围神经系统的发育和成熟。TrkA 是 NGF 的高亲和力受体, NGF 是 TrkA 的主要配体; TrkA 还可结合到 NTF3/ 神经营养因子 3 并被其激活。

[0028] 4 种已知的人 TrkA 异构体的全长氨基酸序列可见于 UniProt/Swiss-Prot 登陆号为 P04629 (Consortium TU, (2012) Nucleic Acids Res. 40 (D1): D71-D5)。4 种异构体是通过可变剪切生产的: 异构体 TrkA-I 可见于多数非神经组织 (UniProt/Swiss-Prot P04629-2), 而 TrkA-II 主要在神经细胞中表达 (UniProt/Swiss-Prot 登录号 P04629-1), 异构体 TrkA-III 由多能性神经干和神经嵴前体特异地表达 (UniProt/Swiss-Prot 登录号 P04629-4)。第 4 种异构体与异构体 TrkA-II 的 1-71 残基不同, 并缺失残基 393-398, 称为异构体 3 (UniProt/Swiss-Prot 登录号 P04629-3)。异构体 TrkA-II 是已知的 TrkA 的主要异构体。异构体 TrkA-I 具有增强的对 NTF3 神经营养因子的反应性, 而异构体 TrkA-III 可持续地激活但不结合 NGF。在一个优选的实施方案中, 本文所用的 TrkA 异构体是具有 SEQ ID NO: 72 序列的 TrkA-II 异构体, 并且其胞外区包含 SEQ ID NO: 25 序列。

[0029] 本文中术语“抗 TrkA 抗体或其片段”或“人源化抗 TrkA 抗体或其片段”包括结合人 TrkA 例如分离型人 TrkA 的抗体或其片段,具体地是结合 TrkA-II 异构体 (SEQ ID NO:72) 的抗体或其片段,更具体地是结合 TrkA-II 异构体的单价形式的人 TrkA 胞外区 (SEQ ID NO:25) 的抗体或其片段,其亲和力 (KD) 为 500nM 或更低,优选 350nM 或更低,更优选 150nM 或更低,甚至更优选 100nM 或更低,最优选 50nM 或更低,特别是 30nM 或更低。通常地,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段能够抑制 TrkA 的功能活性和 / 或能够阻断或减低一种或多种本来可通过 NGF 结合到 TrkA 诱导的生物活性。

[0030] 本文中,“抗 NGF 抗体”是指能够结合 NGF 优选地结合人 NGF 的抗体。通常地,抗 NGF 抗体能够抑制 TrkA 的功能性活化和 / 或能够阻断或减低 TrkA 的一种或多种生物活性。抗 NGF 抗体与 NGF (例如 hNGF) 的结合亲和力可以是 500nM 或更低,优选 100nM 或更低。通常地,所述抗 NGF 抗体应具有任意一种或多种下述特性:(a) 结合 NGF 并抑制 NGF 生物活性和 / 或由 NGF 信号功能介导的下游途径;(b) 阻断或减低 NGF 受体活化 (包括 TrkA 受体二聚化和 / 或自身磷酸化);(c) 增加 NGF 清除率;(d) 抑制 (减少) NGF 合成、产生或释放。抗 NGF 抗体是本领域公知的,见例如 PCT 公开 No. WO 01/78698、W001/64247、US 专利 No. 5,844,092、5,877,016 和 6,153,189;Hongo et al., (2000) Hybridoma, 19:215-227; GenBank 登录号 No. U39608、U39609、L17078 或 L17077。

[0031] 本文中术语“能够抑制 TrkA 的功能活化的人源化抗 TrkA 抗体或其片段”是指具有任意一种或多种下述特征的人源化抗 TrkA 抗体:(a) 结合 TrkA 并抑制 TrkA 生物活性和 / 或由结合 NGF 介导的下游途径或 NTF3/ 神经营养因子 3 信号功能;(b) 预防、改善或治疗任意方面的疼痛;(c) 阻断或减低 TrkA 活化或者二聚化和 / 或自身磷酸化;(d) 增加 TrkA 清除率;(e) 抑制或减少 TrkA 合成和 / 或细胞表面表达。

[0032] 本文中术语“能够阻断或减低 TrkA 的一种或多种生物活性的人源化抗 TrkA 抗体或其片段”是指能够直接或间接减低、抑制、中和或者清除 TrkA 生物活性的人源化抗 TrkA 抗体。

[0033] 本文中术语“TrkA 生物活性”或“TrkA 的生物活性”是指但不限于下述任意一种或多种:结合 NGF 或其他神经营养因子的能力;同源二聚化或异源二聚化和 / 或自身磷酸化的能力;激活 NGF 诱导的信号途径的能力;促进细胞分化、增殖、存活、生长、迁移以及其他细胞生理学变化 (包括 (对于神经元,包括周围神经元和中枢神经元) 神经元形态变化)、突触发生、突触功能、神经递质和 / 或神经肽释放及损伤后再生的能力;以及缓解疼痛和与骨转移相关的肿瘤疼痛的能力。

[0034] 本文中术语“IC₅₀”是指半数最大抑制浓度 (IC₅₀),可测度化合物抑制生物功能例如人源化抗 TrkA 抗体对 NGF 诱导的 TF-1 细胞增殖抑制的有效性。

[0035] 本文中术语“抗体”包括全长抗体和任意抗原结合片段或其单链。抗体和具体地天然产生的抗体是糖蛋白,其以单个或者多个拷贝的 Y 型单元存在,由 4 条多肽链组成。每个“Y”型包含 2 条相同拷贝的重链 (H) 和 2 条相同拷贝的轻链 (L),以此通过其相对分子量命名。每条轻链与一条重链配对,并且每条重链与另一条重链配对。共价的链间二硫键和非共价相互作用将所述链连接到一起。抗体和具体地天然产生的抗体包含可变区,其为 2 个拷贝的抗原结合位点。木瓜蛋白酶,一种蛋白水解酶将“Y”型分为 3 个独立的分子,2 个称为“Fab”片段 (Fab = 抗原结合片段),1 个称为“Fc”片段或“Fc 区” (Fc = 结晶片段)。Fab

片段由整条轻链和部分重链组成。重链含有 1 个可变区（重链可变区或 VH）和 3 个或 4 个恒定区（CH1、CH2、CH3 和 CH4，取决于抗体类别或者同型）。CH1 和 CH2 结构域之间的区域称为铰链区，使 Y 型抗体分子的 2 个 Fab 臂之间具有弹性，使其可开放和关闭以适应与以固定距离分离的 2 个抗原决定簇的结合。IgA、IgD 和 IgG 的重链各具有 4 个结构域，即 1 个可变区（VH）和 3 个恒定区（CH1-3）。IgE 和 IgM 的重链具有 1 个可变区和 4 个恒定区（CH1-4）。所述抗体的恒定区可介导与宿主组织或因子的结合，包括免疫系统的多种细胞（例如效应细胞）和补体系统经典途径的第一组分（C1q）。每条轻链通常通过一个共价二硫键连接到重链。每条轻链包含 1 个可变区（轻链可变区或 VL）和 1 个轻链恒定区。轻链恒定区是 κ 轻链恒定区本文称为 IGKC 或者是 λ 轻链恒定区本文称为 IGLC。本文中 IGKC 等价于 C κ 或者 CK，并具有相同的含义。本文中 IGLC 等价于 C λ 或者 CL，并具有相同的含义。本文中术语“IGLC 区”是指所有的 λ 轻链恒定区例如选自 IGLC1、IGLC2、IGLC3、IGLC6 和 IGLC7 的所有 λ 轻链恒定区。VH 和 VL 区可被进一步分为超变区，称为互补决定区（CDR），散布有更为保守的区域称为框架区（FR 或 FW 或“非 CDR 区”）。每条 VH 和 VL 由 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成，按以下顺序从氨基末端到羧基末端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。

[0036] 抗体可分为类，也称为同型，通常依据恒定区确定。人恒定轻链可分为 κ 轻链（CK）和 λ 轻链（C λ ）。重链可分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或者 ϵ ，并分别将抗体的同型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。因此，本文中“同型”意指通过其恒定区的化学和抗原特性定义的任意类和 / 或亚类的免疫球蛋白。已知的人免疫球蛋白同型有 IgG1（IGHG1）、IgG2（IGHG2）、IgG3（IGHG3）、IgG4（IGHG4）、IgA1（IGHA1）、IgA2（IGHA2）、IgM（IGHM）、IgD（IGHD）和 IgE（IGHE）。所谓的人免疫球蛋白伪伽玛 IGHGP 基因代表另外的人免疫球蛋白重链恒定区基因，其已经被测序但因开关区域改变而不编码蛋白（Bensmana M et al., Nucleic Acids Res. 16(7):3108）尽管具有改变的开关区域，人免疫球蛋白伪伽玛 IGHGP 基因具有所有重链恒定区（CH1-CH3）和铰链的开放读码框。其重链恒定区的所有开放读码框可编码具有预测的结构特征、与所有的人免疫球蛋白恒定区匹配良好的蛋白结构域。本文中所述另外的伪伽玛同型称为 IgGP 或 IGHGP。其他已报道的伪免疫球蛋白基因例如人免疫球蛋白重链恒定区 ϵ P1 和 P2 伪基因（IGHEP1 和 IGHEP2）。IgG 类最常用于治疗目的。人体内，该类包含 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 亚类。小鼠体内，该类包含 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c 和 IgG3 亚类。

[0037] 本文中术语“嵌合抗体”或“嵌合抗 TrkA 抗体”包括可变区序列来自一个物种并且恒定区序列来自另一个物种的抗体，例如可变区序列来自小鼠抗体并且恒定区序列来自人抗体的抗体。

[0038] 本文中术语“人源化抗体”或“人源化抗 TrkA 抗体”包括将来自另一个哺乳动物种系例如小鼠的 CDR 序列移植到人框架序列中得到的抗体。在人框架序列中以及在来自另一个哺乳动物种系的 CDR 序列中可进行另外的框架区修饰。

[0039] 本文中术语“Fab”或“Fab 区”包括含有 VH、CH1、VL 和 CL 免疫球蛋白结构域的多肽。Fab 可指分离体中的该区域或者全长抗体或抗体片段中的该区域。

[0040] 本文中术语“Fc”或“Fc 区”包括含有除第一个恒定区免疫球蛋白结构域之外的抗体恒定区的多肽。因此，Fc 是指 IgA、IgD 和 IgG 的最后 2 个恒定区免疫球蛋白结构域，

IgE 和 IgM 的最后 3 个恒定区免疫球蛋白结构域,以及这些结构域 N-末端的弹性铰链。对于 IgA 和 IgM, Fc 可包括 J 链。对于 IgG, Fc 包含免疫球蛋白结构域 C γ 2 和 C γ 3 以及 C γ 1 和 C γ 2 之间的铰链。虽然所述 Fc 区的边界可不同,然而人 IgG 重链 Fc 区通常定义为包含 C226 或 P230 残基至其羧基末端,其中编号依据 EU 编号系统 (Edelman GM et al., (1969) PNAS USA 63(1):78-85)。本文中 IgG1 的 Fc 区定义为包含 P232 残基至其羧基末端,其中编号依据 EU 编号系统。Fc 可指分离体中的该区域或 Fc 多肽例如抗体中的该区域。

[0041] 本文中术语“铰链”或“铰链区”或“抗体铰链区”包括含有抗体的第一和第二恒定区之间的氨基酸的弹性多肽。本文中“铰链区”是指仅存在于 IgA、IgD 和 IgG 中长度为 6-62 个氨基酸的序列区域,其包含桥接 2 条重链的半胱氨酸残基。结构上, IgG CH1 结构域末端位于 EU 位点 220, IgG CH2 结构域起始于 EU 位点 237 的残基。因此,对于 IgG,本文中抗体铰链定义为包括 221 (IgG1 中 D221) 到 231 (IgG1 中 A231) 位点,其中编号依据 EU 编号系统。

[0042] 本文中术语“亲本抗体”、“亲本免疫球蛋白”、“亲本的抗体”或“亲本的免疫球蛋白”可等价使用,包括随后被修饰以产生变体的未修饰的抗体。所述亲本抗体可以是天然产生的抗体或者天然产生抗体的变体或工程版本。亲本抗体可指抗体本身、含有亲本抗体或编码其的氨基酸序列的组合物。本文中“亲本鼠抗体”或“相应的亲本鼠抗体”意指可结合人 TrkA 并且可被修饰产生变体的抗体或者免疫球蛋白,具体地如 W000/73344 中公开的鼠抗体 MNAC13。

[0043] 本文中术语“变体抗体”或“抗体变体”包括由与亲本相比至少 1 个氨基酸修饰产生的与亲本抗体序列不同的抗体序列。本文中变体抗体序列优选地具有与亲本抗体序列至少约 80%, 最优选地至少约 90%, 更优选地至少约 95% 氨基酸序列一致性。抗体变体可指抗体本身、含有抗体变体或编码其的氨基酸序列的组合物。

[0044] 本文中术语“氨基酸修饰”包括多肽序列中的氨基酸取代、插入和 / 或缺失。本文中“氨基酸取代”或“取代”意指亲本多肽序列中特定定位点的氨基酸被另一种氨基酸替换。例如, R94K 取代是指重链可变框架区变体的情况下,其中 94 位的精氨酸被赖氨酸取代的变体多肽。上述实例中, 94K 表示 94 位被赖氨酸取代。为此,多位点取代通常用斜杠分开。例如, R94K/L78V 是指含有 R94K 和 L78V 取代的双变体。本文中“氨基酸插入”或“插入”意指亲本多肽序列中在特定定位点加入氨基酸。例如, -94 插入表明在 94 位点的插入。本文中“氨基酸缺失”或“缺失”意指亲本多肽序列中在特定定位点移除氨基酸。例如, R94- 表明缺失 94 位点的精氨酸。

[0045] 本文中,术语“保守的修饰”或“保守的序列修饰”意指不显著影响或改变含所述氨基酸序列的抗体结合特性的氨基酸修饰。所述保守的修饰包括氨基酸取代、插入和缺失。修饰可通过本领域公知的标准技术例如定点突变和 PCR 介导的突变引入本发明的抗体中。保守的氨基酸取代是其中的氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替代。具有相似侧链的氨基酸残基家族是本领域已定义的。所述家族包括具有碱性侧链的氨基酸 (例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链的氨基酸 (例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链的氨基酸 (例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链的氨基酸 (例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 β 分支侧链的氨基酸 (例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸) 和芳香侧链的氨基酸 (例如

苏氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,本发明抗体的 CDR 区或框架区中的一个或多个氨基酸残基可被来自相同侧链家族的其他氨基酸残基取代并且可测试改变后的抗体(变体抗体)保留的功能。

[0046] 对于所有的人免疫球蛋白重链可变区,编号依据“EU 编号系统”(Edelman GM et al., *ibid.*)。对于人 κ 免疫球蛋白轻链恒定区 (IGKC),编号依据“EU 编号系统”(Edelman GM et al., *ibid.*)。对于人 λ 免疫球蛋白轻链恒定区 (IGLC1、IGLC2、IGLC3、IGLC6 和 IGLC7),编号依据“Kabat 编号系统”(Kabat EA et al., (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. 第 5 版 -US Department of Health and Human Services, NIH publication n° 91-3242),如 Dariavach P et al., (1987) *PNAS USA* 84(24):9074-8 和 Frangione B et al., (1985) *PNAS USA* 82(10):3415-9 所述。

[0047] 术语“可变区”是指介导抗原结合并决定特定抗体对特定抗原的特异性的结构域。天然产生的抗体中,抗原结合位点含有 2 个决定特异性的可变区:1 个位于重链中,本文中称为重链可变区 (VH);另 1 个位于轻链中,本文中称为轻链可变区 (VL)。某些情况下,特异性可排他地存在于所述 2 个结构域的其中 1 个中,例如骆驼中发现的重链抗体的单结构域抗体。可变区长度通常约为 110 个氨基酸,包含相对不变的 15-30 个氨基酸的片段称为框架区 (FR 或非 CDR 区),其被较短的 7-17 个氨基酸的变化非常大的区域(称为超变区)分隔。天然重链和轻链的可变区包含 4 个 FR,其大部分采取 β -折叠构象,被 3 个形成环状的超变区连接。每条链的超变区通过 FR 被非常接近地连在一起,并与其他链的超变区一起参与形成抗体的抗原结合位点(见 Kabat EA et al., *ibid.*)。本文中术语“超变区”是抗体中负责与抗原结合的氨基酸残基。超变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基,后者具有最大的序列变异度和/或参与抗原识别。对于所有可变区,编号依据 Kabat (Kabat EA et al., *ibid.*)。

[0048] 目前使用的许多 CDR 的定义都包含在本文中。Kabat 定义基于序列变异度,是最常用的 (Kabat EA et al., *ibid.*)。Chothia 反而涉及结构环的定位 (Chothia&Lesk J. (1987) *Mol. Biol.* 196:901-917)。AbM 定义在 Kabat 和 Chothia 定义之间折衷,并被 Oxford Molecular's AbM 抗体模型化软件所使用 (Martin ACR et al., (1989) *PNAS USA* 86:9268-9272; Martin ACR et al., (1991) *Methods Enzymol.* 203:121-153; Pedersen JT et al., (1992) *Immunomethods* 1:126-136; Rees AR et al., (1996) In Sternberg M. J. E. (ed.), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, 141-172)。接触定义 (contact definition) 近年来已被引入 (MacCallum RM et al., (1996) *J. Mol. Biol.* 262:732-745),其是基于对蛋白质数据库中可获得的复杂结构的分析。由 **IMGT**[®], 国际 ImMunoGeneTics 信息系统[®] (<http://www.imgt.org>) 定义的 CDR 是基于 IMGT 对所有免疫球蛋白的编号和所有物种的 T 细胞受体 V-REGION(**IMGT**[®], the international ImMunoGeneTics information **system**[®]; Lefranc MP et al., (1999) *Nucleic Acids Res.* 27(1):209-12; Ruiz M et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):219-21; Lefranc MP (2001) *Nucleic Acids Res.* 29(1):207-9; Lefranc MP (2003) *Nucleic Acids Res.* 31(1):307-10; Lefranc MP et al., (2005) *Dev. Comp. Immunol.* 29(3):185-203; Kaas Q et al., (2007) *Briefings in Functional Genomics&Pr*

oteomics, 6(4):253-64)。

[0049] 本发明中提及的所有互补决定区 (CDR) 的定义优选如下 (编号依据 Kabat EA et al., *ibid.*):LCDR1:24-34;LCDR2:50-56;LCDR3:89-98;HCDR1:26-35;HCDR2:50-65;HCDR3:95-102。可变区的“非 CDR 区”称为框架区 (FR)。本文中,轻链可变区的“非 CDR 区”包含氨基酸序列:1-23 (FR1)、35-49 (FR2)、57-88 (FR3) 和 99-107 (FR4)。本文中,重链可变区的“非 CDR 区”包含氨基酸序列:1-25 (FR1)、36-49 (FR2)、66-94 (FR3) 和 103-113 (FR4)。

[0050] 本文中术语“全长抗体”包括组成天然生物学形式的抗体的结构,包括可变区和恒定区。例如,在多数哺乳动物包括人和小鼠中,IgG 类全长抗体是四聚体并且包含两个相同对的两条免疫球蛋白链,每对具有 1 条轻链和 1 条重链,每条轻链包含免疫球蛋白结构域 VL 和 CL 并且每条重链包含免疫球蛋白结构域 VH、CH1 (C γ 1)、CH2 (C γ 2) 和 CH3 (C γ 3)。在一些哺乳动物例如骆驼和骆马中,IgG 抗体可只包含 2 条重链,每条重链含有连接到 Fc 区的可变区。

[0051] 本文中抗体片段是指抗原结合片段,其包括但不限于:(i)Fab 片段,由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成,包括 Fab' 和 Fab' -SH;(ii)Fd 片段,由 VH 和 CH1 结构域组成;(iii)Fv 片段,由单一抗体的 VL 和 VH 结构域组成;(iv)dAb 片段 (Ward et al. (1989) *Nature* 341:544-546),其由单一可变区组成;(v)F(ab')₂ 片段,含有两条连接的 Fab 片段的二价片段;(vi)单链 Fv 分子 (scFv),其中 VH 结构域和 VL 结构域通过肽连接子连接使得两个结构域联合形成一个抗原结合位点 (Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426;Huston et al. (1988) *PNAS USA* 85:5879-5883);(vii)双特异性单链 Fv 二聚体 (PCT/US92/09965);(viii)通过基因融合构建的“双体”或“三体”、多价或多特异性片段 (Tomlinson I et al., (2000) *Methods Enzymol.* 326:461-479;W094/13804;Holliger et al., (1993) *PNAS USA* 90:6444-6448) 和 (ix) 基因融合到相同或者不同抗体的 scFv (Coloma&Morrison (1997) *Nature Biotech.* 15:159-163)。

[0052] 本文中术语“效应子功能”包括抗体的 Fc 区与 Fc 受体或配体相互作用产生的生化事件。效应子功能包括 Fc γ R-介导的效应子功能例如 ADCC (抗体依赖的细胞介导的细胞毒性) 和 ADCP (抗体依赖的细胞介导的吞噬作用),以及补体介导的效应子功能例如 CDC (补体依赖的细胞毒性)。抗体的效应子功能可通过改变 (即增强或减弱,优选增强) 抗体与效应分子例如 Fc 受体或补体成分的亲和力而改变。结合亲和力通常可通过修饰效应分子结合位点而变化,并且该情况下适于确定目标位点并以适合的方式修饰至少部分所述位点。还应理解,改变抗体与效应分子的结合位点不必须显著地改变所有的结合亲和力,而是可改变相互作用的几何位置使得效应机制无效如同非生产性结合。也应理解,效应子功能也可通过修饰不直接参与效应分子结合但参与产生效应子功能的位点而改变。通过改变抗体的效应子功能,可控制免疫应答的许多方面例如增强或抑制免疫系统的多种反应,可能在诊断和治疗中产生有利效应。

[0053] 本文中,术语“受试者”包括任意的人或非人的动物。术语“非人的动物”包括所有脊椎动物例如哺乳动物和非哺乳动物,例如灵长类、羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖类、爬行动物等。优选地,所述受试者是人。

[0054] 本发明的抗体

[0055] 一方面,本发明提供了人源化抗 TrkA 抗体或其片段,包括:

[0056] a) 重链可变区, 包含选自 SEQ ID NO:1-5 的序列, 和

[0057] b) 轻链可变区, 包含选自 SEQ ID NO:6-13 的序列,

[0058] 其中重链可变区的 CDR2 包含至少 1 个氨基酸取代和 / 或其中重链可变区的非 CDR 区包含在选自 37、42 和 89 的氨基酸位点的氨基酸取代, 其中所述每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

[0059] 在一些实施方案中, 重链可变区的 CDR2 包含至少 1 个保守氨基酸取代。

[0060] 在一些实施方案中, 重链可变区的非 CDR 区包含在选自 37、42 和 89 的氨基酸位点的保守氨基酸取代。

[0061] 在一些实施方案中, 重链可变区的 CDR2 包含 SEQ ID NO:15 序列。

[0062] 在一些实施方案中, 重链可变区包含选自 SEQ ID NO:1、3 和 5 的序列, 并且轻链可变区包含选自 SEQ ID NO:6 和 8 的序列。

[0063] 在一些实施方案中, 人源化抗 TrkA 抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区的组合, 含有选自以下的序列: SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 以及 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:8; 优选 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 序列或者 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:8 序列; 更优选 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 序列。

[0064] 在一些实施方案中, 本发明的人源化抗 TrkA 抗体或其片段的重链可变区不包含 SEQ ID NO:71 序列。

[0065] 在一些实施方案中, 本发明的人源化抗 TrkA 抗体或其片段的重链可变区缺乏 87 位的丝氨酸, 其中每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

[0066] 在一些实施方案中, 本发明的人源化抗 TrkA 抗体或其片段的重链可变区包含 87 位的苏氨酸, 其中每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

[0067] 在一些实施方案中, 重链可变区的 CDR2 的氨基酸取代包括选自 50、60 和 62 氨基酸位点的氨基酸取代, 优选地选自 60 和 62 氨基酸位点的氨基酸取代, 其中每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

[0068] 在一些实施方案中, 重链可变区的 CDR2 的氨基酸取代不包括选自 Y50A、P60A 和 T62S 的氨基酸取代, 其中每个成员的氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

[0069] 在一些实施方案中, 如果人源化抗 TrkA 抗体或其片段在重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代是 A49S, 则人源化抗 TrkA 抗体或其片段在重链可变区的 CDR2 的氨基酸取代不是 Y50A。

[0070] 在一些实施方案中, 人源化抗 TrkA 抗体或其片段在重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代不是 A49S 和 / 或人源化抗 TrkA 抗体或其片段在重链可变区的 CDR2 的氨基酸取代不是 Y50A。

[0071] 在一些实施方案中, 抗体或其片段在重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代包括选自 V37A、G42E 和 V89L 的氨基酸取代, 优选 V37A, 其中所述氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

[0072] 在一些实施方案中, 抗体包含含有 SEQ ID NO:3 序列的重链可变区, 其中重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代包括选自 V37A、T40A、G42E、R44G、A49S 和 V89L 的氨基酸取代, 优选地选自 V37A、T40A、G42E、R44G 和 V89L 的氨基酸取代, 其中每个氨基酸位点是应用

Kabat 编号系统标识的。

[0073] 在一些实施方案中,抗体包含重链可变区和轻链可变区的组合,含有序列 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:6 或者含有序列 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:8,其中重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代包括选自 V37A、T40A、G42E、R44G、A49S 和 V89L 的氨基酸取代,优选地选自 V37A、T40A、G42E、R44G 和 V89L 的氨基酸取代,其中每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

[0074] 在一些实施方案中,重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代包括选自 K3Q、V37A、G42E、A49S、V89L 和 R94K 的氨基酸取代,优选地选自 K3Q、V37A、G42E、V89L 和 R94K 的氨基酸取代,更优选包括 K3Q 和 V37A 氨基酸取代并且最优选包括 V37A 氨基酸取代,其中每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。同样地最优选的实施方案中,重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代包括选自 V37A 和 K3Q 的氨基酸取代,包括氨基酸取代 V37A 以及每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

[0075] 在一些实施方案中,抗体包含含有序列 SEQ ID NO:5 的重链可变区,其中重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代包括选自 K3Q、V37A、G42E、A49S、V89L 和 R94K 的氨基酸取代,优选地选自 K3Q、V37A、G42E、V89L 和 R94K 的氨基酸取代,更优选地包括 K3Q 和 V37A 氨基酸取代,并且最优选地包括 V37A 氨基酸取代,其中每个成员的氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。同样地最优选的实施方案中,抗体包含含有序列 SEQ ID NO:5 的重链可变区,重链可变区的非 CDR 区的氨基酸取代包括选自 V37A 和 K3Q 的氨基酸取代,包括氨基酸取代 V37A 以及每个氨基酸位点是应用 Kabat 编号系统标识的。

[0076] 另一方面,本发明提供了人源化抗 TrkA 抗体或其片段,包括:

[0077] a) 重链可变区,包含选自 SEQ ID NO:31-49 的序列,和

[0078] b) 轻链可变区,包含选自 SEQ ID NO:6-13 的序列。

[0079] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段包括:

[0080] a) 重链可变区,包含选自 SEQ ID NO:32、36、39、43、48 和 49 的序列,和

[0081] b) 轻链可变区,包含选自 SEQ ID NO:6-13 的序列或者选自 SEQ ID NO:6 和 8 的序列。

[0082] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段包括:

[0083] a) 重链可变区,包含选自 SEQ ID NO:32、36、48 和 49 的序列,和

[0084] b) 轻链可变区,包含选自 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:8 的序列。

[0085] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段包括:

[0086] a) 重链可变区,包含选自 SEQ ID NO:32 和 36 的序列,和

[0087] b) 轻链可变区,包含 SEQ ID NO:6 的序列。

[0088] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段包括:

[0089] a) 重链可变区,包含 SEQ ID NO:36 的序列,和

[0090] b) 轻链可变区,包含 SEQ ID NO:6 的序列。

[0091] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体包含重链可变区和轻链可变区的组合,该组合选自 SEQ ID NO:32 和 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:32 和 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:36 和 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:48 和 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:49 和 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:49 和 SEQ ID NO:8 的序列,优选地选自 SEQ ID NO:32 和 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:32 和

SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:36 和 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:49 和 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:49 和 SEQ ID NO:8 的序列,最优选地选自 SEQ ID NO:36 和 SEQ ID NO:6 的序列组合。

[0092] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段还包含重链和 / 或轻链恒定区,优选重链和 / 或轻链恒定区和铰链区。优选地,所述重链恒定区是人源的并且是例如人 IgG1 (IGHG1)、IgG2 (IGHG2)、IgG3 (IGHG3)、IgG4 (IGHG4)、IgA1 (IGHA1)、IgA2 (IGHA2)、IgM (IGHM)、IgD (IGHD) 或 IgE (IGHE) 同型。更优选地,所述重链恒定区是人 IGHG1 同型或者人 IGHG4 同型。优选地,轻链恒定区是人源的并且是人 κ (CK) 或人 λ (CL) 轻链恒定区,优选人 κ 轻链恒定区。

[0093] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段还包含重链和 / 或轻链恒定区以及铰链区,其中重链恒定区和铰链区是人 IGHG1 同型或人 IGHG4 同型。

[0094] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段还包含重链和 / 或轻链恒定区以及铰链区,其中重链恒定区和铰链区是人 IGHG4 同型并且其中铰链区包含氨基酸取代 S228P,其中氨基酸位点是应用 EU 编号系统标识的。

[0095] 另一方面,本发明提供了人源化抗 TrkA 抗体或其片段,包含:

[0096] a) 重链,包含选自 SEQ ID NO:50-70 的序列,和

[0097] b) 轻链,包含选自 SEQ ID NO:29 和 30 的序列。

[0098] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段包含:

[0099] a) 重链,包含选自 SEQ ID NO:51、52、56、57、60、64、69 和 70 的序列,和

[0100] b) 轻链,包含选自 SEQ ID NO:29 和 30 的序列,优选 SEQ ID NO:29。

[0101] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段包含:

[0102] a) 重链,包含选自 SEQ ID NO:51、52、56、57、69 和 70 的序列,和

[0103] b) 轻链,包含选自 SEQ ID NO:29 和 30 的序列,优选 SEQ ID NO:29。

[0104] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段包含:

[0105] a) 重链,包含选自 SEQ ID NO:51、52、56、57 和 70 的序列,和

[0106] b) 轻链,包含选自 SEQ ID NO:29 和 30 的序列,优选 SEQ ID NO:29。

[0107] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段包含:

[0108] a) 重链,包含选自 SEQ ID NO:51、52、56 和 57 的序列,和

[0109] b) 轻链,包含选自 SEQ ID NO:29 和 30 的序列,优选 SEQ ID NO:29。

[0110] 在一个优选的实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段包含:

[0111] a) 重链,包含 SEQ ID NO:57 的序列,和

[0112] b) 轻链,包含 SEQ ID NO:29 的序列。

[0113] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段是全长抗体。

[0114] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段是选自 Fab、Fab'、Fab'-SH、Fd、Fv、dAb、F(ab')₂、scFv、双特异性单链 Fv 二聚体、双体、三体和基因融合到相同或者不同抗体的 scFv 的抗体片段;优选为 scFv 或 Fab;更优选为 scFv 二聚体或二体或者 F(ab')₂。

[0115] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段包含相对于亲本抗体的 Fc 区含有至少 1 个氨基酸修饰的变体 Fc 区,其中所述包含变体 Fc 区的抗体显示出与亲本抗体相比改变的效应子功能。

[0116] Fc 区内的氨基酸修饰通常改变所述抗体的一种或多种功能属性,例如血清半寿期、补体结合、与 Fc 受体或配体结合相关的效应子功能和 / 或抗原依赖的细胞毒性。下文列出的 Fc 区内修饰是依据 Fc 区内残基的 EU 编号的。在一个实施方案中,对 CH1 的铰链区进行修饰,使铰链区中半胱氨酸残基的数目改变例如增加或减小。Bodmer et al. 在美国专利 No. 5, 677, 425 中对该方法有更详细的描述。CH1 的铰链区中半胱氨酸残基的数目改变用于例如促进轻链和重链的装配或者增加或减低抗体的稳定性。另一个实施方案中,使抗体的 Fc 铰链区突变以缩短抗体的生物学半寿期。更具体地,将一种或多种氨基酸突变引入 Fc 铰链片段的 CH2-CH3 结构域界面区,以使得所述抗体具有与天然 Fc 铰链区的葡萄球菌 A 蛋白 (SpA) 结合相比受损的 SpA 结合。Ward et al. 在美国专利 No. 6, 165, 745 中对该方法有更详细的描述。另一个实施方案中,将抗体修饰以增加其生物学半寿期。多种方法是可行的。例如,可引入一种或多种下述突变:T252L、T254S、T256F,如 Ward 的美国专利 No. 6, 277, 375 中所述。可选择地,为增加生物学半寿期,可在抗体的 CH1 或 CL 区进行改变以含有来自 IgG 的 Fc 区 CH2 结构域的 2 个环的补救受体 (salvage receptor) 结合表位,如 Presta et al. 的美国专利 No. 5, 869, 046 和 No. 6, 121, 022 中所述。另一个实施方案中,通过用不同的氨基酸残基替换至少 1 个氨基酸残基改变 Fc 区以改变抗体的效应子功能。例如,可将选自氨基酸残基 234、235、236、237、297、318、320 和 322 的一个或多个氨基酸用不同的氨基酸残基替换,以使得抗体具有改变的效应子配体亲和力但保留亲本抗体的抗原结合能力。与其亲和力改变的效应子配体可以是例如 Fc 受体或补体的 C1 组分。Winter et al. 等在美国专利 No. 5, 624, 821 和 No. 5, 648, 260 中对该方法进行了更详细地描述。另一个实例中,可将选自氨基酸残基 329、331 和 322 的一个或多个氨基酸用不同的氨基酸残基替换,以使得抗体具有改变的 C1q 结合和 / 或减小或者消除的补体依赖的细胞毒性 (CDC)。Idusogie et al. 在美国专利 No. 6, 194, 551 中对该方法进行了更详细地描述。另一个实例中,改变 CH2 结构域的 N-末端区中 231 到 238 氨基酸位点中的一个或多个氨基酸残基以改变所述抗体固定补体的能力。Bodmer et al. 在 PCT 公开 WO 94/29351 中对该方法进行了更详细地描述。还有另一个实例中,通过修饰下述位点:238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 或 439 中的一个或多个氨基酸将 Fc 区进行修饰,以增加抗体介导抗体依赖的细胞毒性 (ADCC) 和 / 或增加抗体对 Fc γ 受体亲和力的能力。Presta 在 PCT 公开 WO 00/42072 中对该方法进行了更详细地描述。此外,可将本发明的抗体进行化学修饰(例如将一种或多种化学基团连接到抗体)或者进行修饰以改变其糖基化。

[0117] 本发明抗体的性质

[0118] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段能够抑制 TrkA 的功能活化。

[0119] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体能够阻断或者减低 TrkA 的一种或多种生物学活性。

[0120] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段与人 TrkA 结合的亲和力 (K_D) 为 500 nM 或更低,优选 350 nM 或更低,更优选 150 nM 或更低,甚至更优选 100 nM 或更低,最优选 50 nM 或更低,特别是 30 nM 或更低,例如使用 BIAcore 2000 装置 (GE

Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland) 通过表面等离子体共振 (SPR) 测定或者使用本领域公知的等效装置使用重组单价人 TrkA 胞外域 (SEQ ID NO:25) 作为分析物通过捕捉装置传感器芯片上的抗体测定。本文中,关于应用 TrkA 受体的亲和力测量中使用的“单价体”是指人 TrkA 受体结构域比如人 TrkA 胞外域,其不是人工二聚体或多聚体如同例如如果所述结构域的氨基末端融合到免疫球蛋白 Fc 区所呈现的;也不是天然二聚体如同例如如果所述结构域与其天然配体 NGF 联接所呈现的。

[0121] 评价抗体与例如人 TrkA 的结合亲和力的标准测定是本领域公知的,包括例如 ELISA、BIAcore、Western blot、RIA 和流式细胞仪测定。实施例 1 中详细描述了适合的测定。抗体的结合动力学(例如结合亲和力,如 K_D) 也可通过本领域公知的标准测定法来评价,例如通过 Scatchard 或者 BIAcore[®] system 分析。相对结合亲和力 K_i 可通过本领域公知的标准竞争测定来评价。工程化抗 TrkA 抗体可在 TF-1 细胞增殖分析中测定其抑制 TrkA 功能活化的能力。可度量化合物抑制生物学功能的有效性的半数最大抑制浓度 (IC₅₀) 可用于选择优选的抗体。

[0122] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段在 TF-1 细胞增殖分析中具有至少与相应的亲本鼠抗体等价或者更低的 IC₅₀,例如使用因子依赖的人红白血病细胞系 TF-1 通过所述抗体阻断细胞表面 TrkA/ β -NGF 介导的细胞增殖的能力测量的 (Kitamura T et al., (1989) J. Cellular Physiology 140(2):323-34)。优选地,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段在 TF-1 细胞增殖分析中的 IC₅₀ 为 1 μ g/ml 或更低,更优选为 0.75 μ g/ml,甚至更优选为 0.5 μ g/ml 或更低,最优选为 0.3 μ g/ml 或更低,特别是 0.1 μ g/ml 或更低。

[0123] 在一些实施方案中,所述人源化抗 TrkA 抗体或其片段具有耐热温度超过 65°C 优选超过 70°C 的 FAB 片段。使用差示扫描量热法分析 FAB 片段的热稳定性,而鉴定全长 IgG 中 FAB 片段的解链温度的中值。这些种类的量热学测量是本领域技术人员公知的,并且可依据例如 Garber&Demarest (2007) BBRC355:751-7 实施。令人意外地,发现本发明中人源化抗体 FAB 片段的耐热温度等于其亲本鼠抗体的 FAB 片段的耐热温度,并且具有经 SPR 测定的相等的亲和力和通过 TF-1 细胞增殖分析测得的提高的效价。因此,本发明还提供了其 FAB 片段的耐热温度等于其亲本鼠抗体 FAB 片段的耐热温度并且具有相等的与人 TrkA 的亲和力和提高的抑制性能的人源化抗 TrkA 抗体。

[0124] 在本文上下文中使用的“等于亲本鼠抗体 FAB 片段的耐热温度”意指人源化抗 TrkA 抗体或其片段具有的 FAB 片段的耐热温度在亲本鼠抗体 FAB 片段的耐热温度的 $\pm 20\%$ 范围内,优选在 $\pm 15\%$ 范围内,更优选在 $\pm 10\%$ 范围内,甚至更优选在 $\pm 5\%$ 范围内。优选地,本发明的人源化抗体 FAB 片段的耐热温度低于亲本鼠抗体 FAB 片段的耐热温度不超过 15%。

[0125] 在本文上下文中使用的“相等的对人 TrkA 的亲和力”意指人源化抗 TrkA 抗体或其片段具有的亲和力在亲本鼠抗体的亲和力的 $\pm 20\%$ 范围内,优选在 $\pm 15\%$ 范围内,更优选在 $\pm 10\%$ 范围内。优选地,本发明的人源化抗体的 K_D 比亲本鼠抗体的 K_D 低至少 5%,优选地低至少 10%。

[0126] 本发明还提供了可用于治疗疼痛的人源化抗 TrkA 抗体或其片段。

[0127] 在通过后爪足底注射完全弗氏佐剂 (CFA) 诱导急性炎性痛觉过敏的小鼠中测试人源化抗 TrkA 抗体的效应(见实施例 2)。以 0.01mg/kg 或更高的剂量施用人源化抗 TrkA

抗体可显著逆转痛觉过敏,这类似于使用 NSAID 吲哚美辛的观测结果。

[0128] 在通过关节内注射 CFA 至膝关节诱导慢性炎性痛觉过敏的小鼠中测试人源化抗 TrkA 抗体的效应(见实施例 3)。以单次 0.01mg/kg 或更高的剂量施用人源化抗 TrkA 抗体可显著逆转痛觉过敏,这相当于使用多剂量的 COX-2 选择性 NSAID 塞来考昔的观测结果。

[0129] 在通过关节内注射碘乙酸钠(MIA)至膝关节诱导慢性骨关节炎痛觉过敏的小鼠中测试人源化抗 TrkA 抗体的效应(见实施例 4)。以单次 0.01mg/kg 或更高的剂量施用人源化抗 TrkA 抗体可显著逆转痛觉过敏,这相当于使用多剂量的鸦片曲马多和普瑞巴林的观测结果。

[0130] 在遭受坐骨神经慢性缩窄引起的神经性疼痛的小鼠中测试人源化抗 TrkA 抗体的效应(CCI 模型,见实施例 5)。以单次 0.01mg/kg 或更高的剂量施用人源化抗 TrkA 抗体可显著逆转机械性痛觉过敏和冷痛,其测试的最高剂量 1mg/kg 可相当于使用多剂量普瑞巴林的观测结果。

[0131] 因此,本发明一个优选的实施方案提供了人源化抗 TrkA 抗体用于治疗遭受急性炎性疼痛、慢性炎性疼痛、骨关节炎疼痛和 / 或神经性疼痛的患者。

[0132] 核酸、载体和宿主细胞

[0133] 本发明还提供了编码抗 TrkA 抗体或其片段的分离的核酸、载体以及含有所述核酸或载体的宿主细胞。核酸可存在于完整细胞中、细胞裂解物中或者以部分纯化或基本上纯化的形式存在。当通过标准技术包括碱 / SDS 处理、CsCl 带、柱色谱法、琼脂糖凝胶电泳和其他本领域公知的技术(见例如 Ausubel *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York) 从其他细胞组分或其他污染物例如其他细胞核酸或蛋白质中将核酸纯化出来时,该核酸为“分离的”或者“呈现基本纯的”。本发明的核酸可以是例如 DNA 或 RNA 并且可以含有或不含内含子序列。在一个优选的实施方案中,所述核酸是 cDNA 分子。

[0134] 本发明的核酸分子可以使用标准分子生物学技术获得,例如编码抗体的轻链和重链或者编码 VH 和 VL 节段的 cDNA 可通过标准 PCR 扩增或 cDNA 克隆技术获得。对于从免疫球蛋白基因文库(例如使用噬菌体展示技术)获得的抗体,编码抗体的一种或多种核酸可从所述文库中回收。将外源核酸导入宿主细胞的方法是本领域公知的,并且依据所用的宿主细胞而变化。技术包括但不限于葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、氯化钙处理、聚乙烯亚胺介导的转染、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、病毒或噬菌体侵染、在脂质体中的多核苷酸的封装以及直接将 DNA 显微注射到细胞核中。对于哺乳动物细胞,转染可以是瞬时的或者稳定的。

[0135] 在一些实施方案中,编码抗 TrkA 抗体和其片段的分离的核酸包括选自 SEQ ID NO 73-116 的核酸序列,通常为编码选自 SEQ ID NO:113、114、115 和 116 的轻链可变区或轻链的核酸分子和 / 或编码选自 SEQ ID NO:73-112 的重链可变区或重链的核酸分子。

[0136] 本发明优选的核酸分子是编码选自 SEQ ID NO:113 和 114 的轻链可变区的核酸分子和 / 或编码选自 SEQ ID NO:74、78、81、85、90 和 91 的重链可变区的核酸分子。更优选的是编码选自 SEQ ID NO:74 和 78 的重链可变区的核酸分子和 / 或编码选自 SEQ ID NO:113 和 114 的轻链可变区的核酸分子。最优选的是编码含有 SEQ ID NO:74 或 78 的核酸序列的重链可变区和 / 或编码含有 SEQ ID NO:113 的核酸序列的轻链可变区的核酸分子。

[0137] 本发明更优选的核酸分子是编码选自 SEQ ID NO:115 和 116 的轻链的核酸分子和 / 或编码选自 SEQ ID NO:93、94、98、99、102、106、111 和 112 的重链的核酸分子。更优选的是编码含有 SEQ ID NO:93、94、98 和 99 的核酸序列的重链的核酸分子和 / 或编码选自 SEQ ID NO:115 和 116 的轻链的核酸分子。最优选的是编码含有 SEQ ID NO:93、94、98 和 99 的核酸序列的重链的核酸分子和 / 或编码含有 SEQ ID NO:115 的核酸序列的轻链的核酸分子。

[0138] 一旦获得编码 VH 和 VL 节段的 DNA 片段,即可通过标准重组 DNA 技术对这些 DNA 片段进一步操作,例如将可变区基因转变为全长抗体链基因或者对应于上述片段的片段基因例如 Fab 片段基因或者 scFv 基因。这些操作中,将编码 VL 或 VH 的 DNA 片段可操作地连接到编码另一种蛋白(例如抗体恒定区或弹性连接子)的另一个 DNA 片段。本文中术语“可操作地连接”意指将 2 种 DNA 片段连接使得由所述 2 种 DNA 片段编码的氨基酸序列保持在框内。通过将编码 VH 的 DNA 可操作地连接到编码重链可变区(CH1、CH2 和 CH3)的另一个 DNA 分子,可将编码 VH 区的分离的 DNA 转变为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域公知的(见例如 Kabat, EA et al., *ibid.*),并且包含这些区域的 DNA 片段可通过标准 PCR 扩增获得。重链恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区,但最优选的是 IgG4 恒定区,优选铰链区包含氨基酸取代 S228P 的人 IGHG4 恒定区。对于 Fab 片段重链基因,可将编码 VH 的 DNA 可操作地连接到只编码重链 CH1 恒定区的另一个 DNA 分子。可通过将编码 VL 的 DNA 可操作地连接到编码轻链恒定区 CL 的另一个 DNA 分子而将编码 VL 区的分离的 DNA 转变为全长轻链基因(以及 Fab 轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(见例如 Kabat EA et al., *ibid.*),并且包含这些区域的 DNA 片段可通过标准 PCR 扩增获得。在优选的实施方案中,轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区,优选 κ 恒定区。为产生 scFv 基因,将编码 VH 和 VL 的 DNA 片段可操作地连接到编码弹性连接子例如编码氨基酸序列 (Gly4-Ser)3 的另一个片段,使 VH 和 VL 序列可表达为连续的单链蛋白,其 VL 和 VH 区通过弹性连接子联接(见例如 Bird et al., *ibid.*; Huston et al., *ibid.*; McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-554)。多种技术已被开发用于产生抗体的抗体片段。传统地,这些片段是通过蛋白裂解酶消化完整抗体获得的(见例如 Morimoto et al., (1992) *J. Biochem. Biophysical Methods*, 24:107-117 和 Brennan et al., (1985) *Science*, 229:81)。但是,现在可通过重组宿主细胞直接产生这些片段。例如,所述抗体片段可从上述抗体噬菌体文库中分离。可选择地, Fab' -SH 片段可直接从大肠杆菌中回收并化学偶联形成 F(ab')₂ 片段 (Carter et al., (1992) *Bio/Technology*, 10:163-167)。通过另外的方法,可直接从重组宿主细胞培养物中分离 F(ab')₂ 片段。可用于产生抗体片段的其他技术对本领域技术人员是明显的。另外的实施方案中,选择的抗体是单链 Fv 片段(scFv),见例如 W093/16185;美国专利 No. 5, 571, 894 和 No. 5, 587, 458。抗体片段还可以是“线性抗体”,如美国专利 No. 5, 641, 870 所述。

[0139] 还可将本发明的编码抗体的核酸整合到载体中,优选表达载体以表达蛋白。多种表达载体可用于表达蛋白。表达载体可包含自我复制的非染色体载体或者整合进入宿主基因组的载体。表达载体的构建应适合宿主细胞类型。因此,可用于本发明的载体优选表达载体包括但不限于可使蛋白在哺乳动物细胞、细菌、昆虫细胞、酵母和体外系统中表达的载体。本领域已知,多种可用于本发明中以表达抗体的表达载体可通过商购或其他途径获得。

[0140] 表达载体通常包含与控制或调节序列、选择标记、任意融合伴侣和 / 或其他元件可操作地连接的蛋白。本文中“可操作地连接”意指将核酸置于与另外的核酸序列的功能关系中。术语“调节序列”意图包括启动子、增强子和其他控制抗体链基因转录或翻译的表达控制元件（例如 polyA 信号）。所述调节序列可见于例如 Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)) 中所述。通常地, 这些表达载体包括可操作地连接到编码抗体的核苷酸的转录和翻译调节核酸并且典型地适合用于表达所述蛋白的宿主细胞。一般而言, 所述转录和翻译调节序列可包括启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或激活子序列。本领域公知, 表达载体典型地包含选择基因或标记用于选择含有所述表达载体的转化的宿主细胞。选择基因是本领域公知的并且依据所用的宿主细胞而变化。例如, 典型地选择标记基因可为导入所述载体的宿主细胞提供对药物例如 G418、潮霉素或氨甲蝶呤的抗性。优选的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因 (用于 dhfr- 宿主细胞使用氨甲蝶呤选择 / 扩增) 和 neo 基因 (用于 G418 选择)。

[0141] 适于克隆或表达本文所述载体中 DNA 的宿主细胞是原核生物、酵母或高等真核细胞。适于该目的的原核生物包括: 真细菌类包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物, 例如肠杆菌科例如埃希氏菌属例如大肠杆菌、肠杆菌属、克雷伯菌属、变形杆菌属、沙门菌属例如鼠伤寒沙门菌、沙雷菌属例如粘质沙雷菌 (*Serratia marcescans*) 和志贺菌属以及杆菌属如枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌、假单胞菌属如绿脓杆菌和链霉菌。适合的大肠杆菌克隆宿主包括 E. coli 294 (ATCC31, 446)、E. coli B、E. coli X1776 (ATCC 31, 537) 和 E. coli W3110 (ATCC 27, 325)。

[0142] 除原核生物以外, 真核微生物例如丝状真菌或酵母是适合的克隆或表达的宿主。酿酒酵母或普通面包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的。用于表达本发明的重组抗体的宿主细胞优选哺乳动物宿主细胞, 包括中国仓鼠卵巢 (CHO 细胞) (包括 dhfr-CHO 细胞, 描述于 Urlaub&Chasin (1980) PNAS USA77:4216-4220 中, 使用 DHFR 选择标记, 如 Kaufman&Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621 中所述)、NSO 骨髓瘤细胞、COS 细胞、SP2 细胞和 HEK293-EBNA1 细胞 (ATCC® 目录号: CRL-10852)。特别地, 为使用 NSO 骨髓瘤细胞, 另一个优选的表达系统是 W087/04462、W089/01036 和 EP0338841 中公开的 GS 基因表达系统。

[0143] 抗体的构建及产生

[0144] 产生的针对 TrkA 多肽的抗体, 可使用公知且为常规的方法, 通过免疫动物即通过将所述多肽施用给动物优选非人动物获得, 见例如 Handbook of Experimental Immunology, Weir DM (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, (1986)。许多温血动物例如兔、小鼠、大鼠、羊、牛、骆驼或猪可被免疫。但是, 小鼠、兔、猪和大鼠尤其是小鼠通常是最适合的。也可通过本领域技术人员公知的重组 DNA 技术产生抗体。此外, 也可通过酶或化学裂解天然产生的抗体来产生抗体。本发明的人源化抗体可通过将来自非人动物 (例如小鼠) VH 和 / 或 VL 区的一种或多种 CDR 或其部分转移到人 VH 和 / 或 VL 区的一个或多个框架区构建形成。优选地, 本发明的人源化抗体是通过将 W000/73344 中公开的来自鼠 MNAC13 抗体 VH 和 / 或 VL 区的一种或多种 CDR 或其部分转移到人 VH 和 / 或 VL 区的一个或多个框架区构建形成。可选择地, 当需要或者希望减低所述抗体的免疫原

性和/或保留结合亲和力和时,可将存在于 VH 和/或 VL 区的人框架残基用相应的非人(例如小鼠)残基替代。可选择地,存在于 CDR 中的非人氨基酸残基可用人残基替代。本发明的嵌合抗体或人源化抗体可基于上述制备的非人单克隆抗体的序列来制备。编码重链和轻链免疫球蛋白的 DNA 可使用标准分子生物学技术从感兴趣的非人杂交瘤细胞获得并经加工以包含非鼠(例如人)的免疫球蛋白序列。例如,为产生嵌合抗体,可使用本领域已知的方法将鼠可变区连接到人恒定区(见例如 Cabilly et al 的美国专利 No. 4,816,567)。为产生人源化抗体,可使用本领域已知的方法将鼠 CDR 区插入人框架区(见例如 Winter 的美国专利 No. 5,225,539 和 Queen et al 的美国专利 No. 5,530,101、No. 5,585,089、No. 5,693,762 和 No. 6,180,370)。

[0145] 可构建本发明的人源化抗体,其中用于重链可变区的人受体分子的选择是基于可能的受体分子可变区与鼠抗体的重链可变区之间的同源性因素。优选种系候选的人受体分子以减低可能的免疫原性。种系数据库是由读通至重链 FW3 区的末端及部分进入 CDR3 序列的抗体序列组成。为选择 FW4 区,可检索来自选择的种系分子的成熟抗体序列数据库或者使用来自从人供体选择的种系分子的抗体序列。人受体分子优选地选自与鼠供体分子相同的重链类,以及鼠供体分子的相同典型结构类的可变区。用于重链可变区的人受体分子选择的第二因素包括鼠供体分子和人受体分子之间 CDR 长度的同源性。人受体抗体分子优选地通过同源性检索 V-BASE 数据库进行选择,虽然也可使用其他数据库例如 Kabat 和公共 NCBI 数据库。

[0146] 可构建本发明的人源化抗体,其中用于轻链可变区的人受体分子的选择是基于可能的受体分子可变区与鼠抗体的轻链可变区之间的同源性因素。优选种系候选的人受体分子以减低可能的免疫原性。种系数据库是由读通至重链 FW3 区的末端及部分进入 CDR3 序列的抗体序列组成。为选择 FW4 区,可检索来自选择的种系分子的成熟抗体序列数据库或者使用来自从人供体选择的种系分子的抗体序列。人受体分子优选地选自与鼠供体分子相同的轻链类,以及鼠供体分子的相同典型结构类的可变区。用于轻链可变区的人受体分子选择的第二因素包括鼠供体分子和人受体分子之间 CDR 长度的同源性。人受体抗体分子优选地通过同源性检索 V-BASE 数据库进行选择,也可使用其他数据库例如 Kabat 和公共 NCBI 数据库。

[0147] 当抗体是通过例如将基因导入哺乳动物宿主细胞以重组抗体形式产生时,所述抗体是通过将所述宿主细胞培养足以使抗体在宿主细胞中表达的一段时间产生的,或者更优选地培养足以使抗体分泌到所述宿主细胞生长的培养介质中的一段时间。用于产生可与人 TrkA 结合的抗体的宿主细胞可在多种介质中培养。可商购的介质例如 Ham's F10(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)、基本必需培养基(MEM;Sigma-Aldrich Chemie GmbH)、RPMI-1640(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Basel, Switzerland)、EX-CELL 293、HEK293 无血清培养基(Sigma, Buchs, Switzerland)和 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH)是适于培养所述宿主细胞的。可使用标准蛋白纯化方法将抗体从培养介质中回收。

[0148] 可将抗体可操作地连接到融合伴侣以使得能够靶向所表达的蛋白、纯化、筛选、展示等。可通过连接子序列将融合伴侣连接到抗体序列。所述连接子序列通常含有少量的氨

基酸,通常少于 10 个氨基酸,虽然也可使用较长的连接子。通常地,选择具弹性且耐受降解的连接子序列。本领域技术人员应理解,许多序列中的任意序列都可用作连接子。例如,普通的连接子序列包含氨基酸序列 GGGGS。融合伴侣可以是指导抗体和任意相关的融合伴侣到达目标细胞位点或者细胞外介质的靶向序列或信号序列。如本领域已知的,某些信号序列可使蛋白分泌到生长介质或者细胞内膜和外膜之间的周质空间。融合伴侣还可以是编码可用于纯化和 / 或筛选的肽或蛋白质的序列。所述融合伴侣包括但不限于多组氨酸标签 (His-tag) (例如 H6 和 H10 或者可用于固定化金属离子亲和层析 (IMAC) 系统的其他标签 (例如 Ni^{2+} 亲和柱))、GST 融合子、MBP 融合子、Strep-tag、细菌酶 BirA 的 BSP 生物素化靶序列和抗体靶向的表位标签 (例如 c-myc 标签、flag-tag 等)。本领域技术人员应理解,所述标签可用于纯化、筛选或二者都有。

[0149] 抗 TrkA 抗体的鉴定与纯化

[0150] 可通过测量与人 TrkA 结合的测定和 / 或测量阻断 TrkA 结合到其配体 NGF 的能力的测定来筛选抗体。结合测定的一个实例是 ELISA。另外,如实施例中所用的表面等离子体共振 (SPR) 测定可用于测定所述抗体的结合动力学的结合与解离速率常数。阻断测定的一个实例是基于流式细胞术的测定,用于测量对 NGF 与 TrkA 结合的阻断。可使用用于评估抗 TrkA 抗体功能活性的测定例如 TF-1 细胞增殖测定,其中抗体阻断细胞表面 TrkA/ β -NGF 介导的细胞增殖的能力是使用因子依赖的人红白血病细胞系 TF-1 测定的 (Kitamura T et al., (1989) J. Cellular Physiology 140(2):323-34)。

[0151] 本发明的抗体可通过多种本领域技术人员公知的方法分离或纯化。标准的纯化方法包括色谱技术包括离子交换、疏水相互作用、亲和、大小或凝胶过滤和反向色谱,使用系统例如 FPLC 和 HPLC 在大气压或高压下实施。纯化方法还包括电泳、免疫学方法、沉淀、透析和色谱聚焦技术。超滤和渗滤技术结合蛋白浓缩也是可用的。为纯化 TrkA 抗体,可将选择的宿主细胞在例如旋转瓶中培养用于单克隆抗体纯化。使用蛋白 A 琼脂糖 (Pharmacia, Piscataway, NJ) 在亲和层析之前可将上清过滤并浓缩。可通过凝胶电泳和高效液相色谱检测洗脱的抗体以保证纯度。因此,本发明优选的抗体是可结合人 TrkA 的分离的和 / 或纯化的抗体。

[0152] 免疫交联物

[0153] 另一方面,本发明提供了与治疗剂例如细胞毒素、药物 (例如免疫抑制剂) 或放射性毒素连接的、可结合人 TrkA 的 TrkA 抗体或其片段。本文中此类交联物称为“免疫交联物”。包含一种或多种细胞毒素的免疫交联物称作“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒素剂包括对细胞有害 (例如可杀死细胞) 的任意试剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊甙、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素 D、1- 去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同源物。治疗剂还包括例如抗代谢药 (例如,氨甲蝶呤、6- 巯基嘌呤、6- 硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5- 氟尿嘧啶达卡巴嗪)、烷化剂 (例如,氮芥、thioepa chlorambucil、美法仑、卡莫司汀 (BSNU) 和洛莫司汀 (CCNU)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素 C 和顺 - 二氯二胺铂 (II) (DDP) 顺铂)、蒽环类 (例如,柔红霉素 (以前称为道诺霉素) 和多柔比星)、抗生素 (例如,更生霉素 (以前称为放线菌素)、博来霉素、

光神霉素和安曲霉素 (AMC)) 和抗有丝分裂剂 (例如, 长春新碱和长春碱)。可连接到本发明抗体的治疗用细胞毒素的其它实例包括多卡米星、卡奇霉素、美登素和阿里他汀及其衍生物。卡奇霉素抗体交联物的一个实例是可商购的 (麦罗塔 (Mylotarg(R)); 美国家用产品)。使用本领域已知的连接子技术, 可将细胞毒素连接到本发明的抗体。已用于将细胞毒素交联到抗体的连接子类型的实例包括但不限于胍类、硫醚、酯类、二硫化物类和含肽的连接子。可选择这样的连接子, 例如易于通过低 pH 在溶酶体隔室中裂解的连接子或者易于被蛋白酶例如优选地表达在肿瘤组织中的蛋白酶例如组织蛋白酶类 (例如组织蛋白酶 B、C、D) 裂解的连接子。为进一步讨论细胞毒素的类型, 用于将治疗剂交联到抗体的连接子和方法也可见 Saito Get al., (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail PA et al., (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne G (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen TM (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan I & Kreitman RJ (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter PD & Springer CJ (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264。本发明的抗体还可连接到放射性同位素以产生细胞毒性放射性药物, 也称为放射性免疫交联物。可交联到抗体用于诊断或治疗的放射性同位素的实例包括但不限于碘 -131、镱 -111、钇 -90 和镭 -177。制备放射性免疫交联物的方法是本领域已知的。可商购的放射性免疫交联物的实例包括 **Zevalin[®]** (EDEC Pharmaceuticals) 和 **Bexxar[®]** (Corixa Pharmaceuticals), 并且类似的方法可用于使用本发明的抗体制备放射性免疫交联物。本发明的抗体免疫交联物可用于改变某些生物反应, 并且其药物部分不应被解释为仅限于典型的化学治疗剂。例如所述药物部分可以是具有需要的生物活性的蛋白质或多肽。所述蛋白质可包括例如酶促活性毒素或其活性片段, 例如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素或者白喉毒素; 蛋白质例如肿瘤坏死因子或 γ 干扰素; 或者生物反应调节剂例如淋巴因子、白细胞介素 -1 (IL-1)、白细胞介素 -2 (IL-2)、白细胞介素 -6 (IL-6)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 或其他生长因子。可用于将所述治疗剂连接到抗体的技术是公知的, 见例如 Arnon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld et al., (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies' 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) and Thorpe et al., *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982)。

[0154] 另一方面, 本发明提供了与治疗剂例如细胞毒素、药物 (例如免疫抑制剂) 或放射性毒素一起施用的、可结合人 TrkA 的抗 TrkA 抗体或其片段,。

[0155] 药物组合物

[0156] 另一方面,本发明提供了组合物例如药物组合物,包括本发明的抗体或其片段以及药学上可接受的载体。此类组合物可包括上述的抗体和/或本发明的免疫交联物和/或治疗剂例如细胞毒素、药物(例如免疫抑制剂)或放射性毒素中的一种或其组合。例如,本发明的药物组合物可包含与靶抗原上不同表位结合的或者具有补体活性的抗体(或免疫交联物)的组合。本发明的药物组合物还可以联合治疗方式即与下述其他试剂组合施用。

[0157] 本文中“药学上可接受的载体”包括生理上适合的任意和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗及吸收延迟剂等。优选地,所述载体适合用于经静脉、肌肉内、皮下、肠胃外、脊椎或者表皮施用(例如通过注射或灌输)。依据施用途径,可将所述活性化合物即抗体或者免疫交联物包被于材料中以保护所述化合物免受可能使所述化合物失活的酸或者其他自然条件的影响。药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散剂和用于即时制备无菌可注射的溶液或分散剂的无菌粉末。使用所述介质和试剂作为药物活性物质是本领域已知的。任意常规介质或试剂除非与所述活性化合物不相容,否则均可将其用于本发明的药物组合物。补体活性化合物也可纳入所述组合物。

[0158] 另一方面,本发明提供了含有本发明的人源化抗 TrkA 抗体或其片段以及另一种药物活性剂的组合物。优选地,所述药物活性剂是下述一种或多种:

[0159] a) 镇痛剂, b) 另一种抗 TrkA 抗体, c) NGF, d) 抗肿瘤剂, e) 抗 NGF 抗体, 如下文所述。

[0160] 另一方面,本发明提供了包含含有连接到治疗剂的、可结合人 TrkA 的抗体或其片段的免疫交联物和药学上可接受的载体的组合物。可用的免疫交联物和治疗剂如上所述。

[0161] 本发明的药物组合物还可包括药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1) 水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2) 油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、磷脂酰胆碱、没食子酸丙酯、 α 生育酚等;和(3) 金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。可用于本发明的药物组合物的适合的水性载体和非水性载体实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其适合的混合物、植物油例如橄榄油和可注射用有机酯例如油酸乙酯。适当的流体可保留,例如通过使用包衣材料例如卵磷脂、对于分散剂通过保持需要的粒度和通过使用表面活性剂。这些组合物还可包含佐剂例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。防止出现微生物可通过如上所述的灭菌程序和通过包含多种抗细菌剂和抗真菌剂例如尼泊金、氯丁醇、苯酚山梨酸等来保障。所述组合物中还可能包含等渗剂例如糖、氯化钠等。此外,可通过包含延缓吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶形成可延长吸收的注射药物剂型。

[0162] 治疗及其他用途

[0163] 本发明的抗体可用于医学中以治疗多种病症/病况,如以下所列种类。

[0164] 因此,本发明提供了治疗下述病况的方法,其包括向有需要的受试者,适当的哺乳动物受试者特别是人类受试者施用治疗有效量的本文所述的抗体或衍生物以治疗所述病况。

[0165] 本发明还提供了本文所述的抗体或衍生物在制造用于治疗下述病况的药物中的用途。

[0166] 本文中术语“治疗(treatment)”包括现有病症/病况的治疗性处理。其还包括

预防性处理。其还包括改善一种或多种不利的症状,即使患者并未治愈存在的病症/病况。例如,疼痛可缓解或减轻。

[0167] 优选的医疗用途是治疗疼痛。依据国际疼痛研究协会(“IASP”),疼痛通常定义为“与实际的或可能的组织损伤相关的令人不快的感觉和情绪体验,或以损伤方式描述或其二者”。所有形式疼痛的基本元素是专门的高阈值受体和神经纤维活化以警告机体可能的组织损伤。炎性细胞和过程的参与是许多疼痛状态的常见元素。术语“急性疼痛”意指即时的通常是高阈值的由伤害例如割伤、压伤、烧伤或化学刺激引起的疼痛。本文中术语“慢性疼痛”指非急性的疼痛,是炎性和神经性来源的。应理解,慢性疼痛通常是相对长的过程,例如数月或数年并且可为持续性的或者间歇性的。本发明的抗体可用于治疗慢性疼痛或急性疼痛。治疗慢性疼痛是优选的。

[0168] 疼痛可以是下述任意的或与其相关的:炎性疼痛、手术后疼痛、操作后疼痛(包括牙痛)、神经性疼痛、周围神经病变、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、骨折疼痛、痛风关节痛、疱疹后神经痛、癌症疼痛、骨关节炎或类风湿关节炎疼痛、坐骨神经痛、镰状细胞危象相关的疼痛、头痛(例如偏头痛、紧张性头痛、丛集性头痛)、痛经、子宫内膜异位症、子宫肌瘤、肌肉骨骼疼痛、慢性腰背痛、纤维肌痛、扭伤、内脏痛、卵巢囊肿、前列腺炎、慢性骨盆疼痛综合征、膀胱炎、间质性膀胱炎、痛性膀胱综合征和/或膀胱疼痛综合征、慢性非细菌性前列腺炎相关的疼痛、切口疼痛、偏头痛、三叉神经痛、烧伤和/或创口痛、创伤相关的疼痛、肌肉骨骼疾病相关的疼痛、强直性脊柱炎、关节周围病变、骨转移疼痛、HIV 疼痛、红斑性肢痛症或者胰腺炎或肾结石引起的疼痛、恶性黑色素瘤、干燥综合症(Sjogren's syndrome)、哮喘(例如,具有严重的气道高反应性的不受控制的哮喘)、顽固性咳嗽、脱髓鞘疾病、慢性酒精中毒、中风、丘脑疼痛综合征、毒素引起的疼痛、化疗疼痛、炎性肠病、肠易激综合症、炎性眼病、炎性或不稳定膀胱病症、银屑病、炎性成分相关的皮肤疾病、晒斑、心肌炎、皮炎,肌炎,神经炎,胶原血管病、慢性炎性病况、炎性疼痛及相关的痛觉过敏和异常性疼痛、神经性疼痛及相关的痛觉过敏或异常性疼痛、糖尿病神经病变疼痛、灼性神经痛、交感神经维持性疼痛、传入神经阻滞综合征、上皮组织损伤或功能障碍、呼吸器官、泌尿生殖器官、胃肠道或血管区域的内脏能动性紊乱、过敏性皮肤反应、瘙痒、白癜风、综合性胃肠道病症、肠炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、血管舒缩或变应性鼻炎、支气管病症、消化不良、胃食管返流、胰腺炎、内脏痛和骨纤维性结构不良(FD)。

[0169] 疼痛可以是例如下述任意的或与下述任意相关的:胰腺炎、肾结石、子宫内膜异位症、IBD、克罗恩病、手术后的粘连、胆囊结石、头痛、痛经、肌肉骨骼痛、扭伤、内脏痛、卵巢囊肿、前列腺炎、膀胱炎、间质性膀胱炎、手术后疼痛、偏头痛、三叉神经痛、烧伤和/或创口痛、创伤相关的疼痛、神经性疼痛、肌骨骼疾病相关的疼痛、类风湿关节炎、骨关节炎、强直性脊柱炎、关节周围病变、肿瘤痛、骨转移疼痛、HIV 感染。

[0170] 多种模型已知可用于评估疼痛并且可用于筛选抗体/其衍生物。例如,可使用伤害性热板测试,如 WO 00/73344 公开的。所述试验可依据 McMahon et al., 1995(Nature Med. 1:774-780) 使用抗体/衍生物作为免疫粘合素来实施。将抗体/衍生物皮下注入成体鼠的后爪 3 周或者使用渗透性微型真空泵。使用热板测试(Eddy&Leimbach(1953) J. Phar. Exp. Ther. 107:385-393) 间隔地评估伤害敏感度,其可模拟炎症或部分神经损伤后的痛觉过敏状态。所述情况下的伤害刺激可诱导反应(舔爪和/或跳跃),其假定综合协调超过简

单反射。依据该测试,将动物放入具有加热到需要的温度通常为 56℃ 的板作为底座的围栏中。在对照动物(使用非相关抗体处理)和使用抗 TrkA 抗体/衍生物处理的动物中测量两种反应(舔爪和/或跳跃)中任一种的潜伏期。

[0171] 作为热板测试的替代方案,可评估对福尔马林的伤害反应。该测试由 Porro&Cavazzuti, 1993 (Prog. Neurobiol, 41:565-607) 公开,并在 W006/137106 中使用。其包括当测试前施用给给定候选者时,通过分析后续舔爪的任何减少来评估疼痛反应的下降。盐水通常用作阴性对照。

[0172] 评估痛觉过敏可使用负重法确定。小鼠通常将其体重等量地分配于其四肢。对肢体痛觉刺激例如通过局部注射完全弗氏佐剂(CFA)或碘乙酸钠(MIA)至后爪(足底)或膝关节(关节内)后,其体重重新分布以减轻分配于注射肢体的体重并增加分配于未注射肢体的体重。负重是使用双足平衡测痛仪(incapacitance tester)将其后爪置于不同的传感器上并记录两侧后爪施加的平均力测定的。负重可用于评估足底注射 CFA 产生的急性炎性痛觉过敏、关节内注射 CFA 产生的慢性炎性痛觉过敏或者关节内注射 MIA 产生的慢性骨关节炎痛觉过敏,细节分别见实施例 2、3 和 4。

[0173] 评估机械性痛觉过敏可通过多种方法实现,例如 Von Frey 纤维丝测痛仪或 Randall-Selitto 爪压测痛仪(analgesimeter)。缩足阈值是对通过 Von Frey 纤维丝测痛仪增加施加至足底跖面压力刺激的响应测定或者对通过 Randall-Selitto 爪压测痛仪的楔形探针增加施加至背足跖面压力刺激的响应测定的。在对照动物和使用抗 TrkA 抗体/衍生物处理的动物中测量后足缩回的潜伏期。这些方法可用于评估由慢性缩窄性损伤(CCI)动物模型产生的机械性痛觉过敏,如实施例 5 所述。

[0174] CCI 模型也是一种著名的动物模型。其包含坐骨神经慢性缩窄并且被用于诱导啮齿类动物例如小鼠或大鼠中的慢性神经性疼痛。该模型由 Bennett&Xie, 1998 in Pain 33:87-107 描述。其用于例如 W0 06/131592。许多神经性疼痛的主要特征是通常无害的冷刺激开始产生疼痛。对无痛刺激反应的增强称为异常性疼痛(allodynia)。因此,诱导的神经性疼痛的程度可使用用于异常性疼痛的冷板测试来测定,见实施例 5 中详述。将动物放入具有制冷到需要温度的板的围栏中,温度范围可以是 -5℃ 到 15℃。在对照动物和使用抗 TrkA 抗体/衍生物处理的动物中测量后足缩回的潜伏期。通常,缩回的潜伏期在 5℃ 或更低的表面温度变得与基线不同。

[0175] 所述抗体可用于治疗癌症、神经性病症、阿尔茨海默氏病、糖尿病、糖尿病性肾病、病毒性病症、HIV 介导的病症、麻风病或炎性病症。另外,所述抗体还可用于治疗可能与 NGF 水平升高相关的其他疾病,包括例如红斑狼疮、带状疱疹、疱疹后神经痛和痛觉过敏。

[0176] 多种肿瘤可表达 TrkA。TrkA 与 NGF 的相互作用可参与肿瘤发展(例如前列腺癌和胰腺癌)。在某些类型的癌症中,过量的 NGF 可促进神经纤维的生长和浸润。通过阻断 NGF 活性,可能会显著减少神经瘤的形成。此外,作为简单提供阻断效应的替代方案,抗体可偶联到细胞毒性剂并且可用于靶向表达 TrkA 的癌细胞。但是,不必要将所述抗体偶联至毒素。由于免疫应答,ADCC(抗体依赖的细胞介导的细胞毒性)上升,其中通过包被靶细胞抗体可使其易受所述系统攻击(例如通过 T 细胞、通过补体激活等)。优选的可治疗的癌症是前列腺癌、甲状腺癌、肺癌、催乳素瘤、黑色素瘤或者骨癌疼痛包括骨转移相关的癌症疼痛。优选的可治疗的癌症是骨癌疼痛包括骨转移相关的癌症疼痛。

[0177] 所述抗体还可用于治疗多种神经病症包括神经退行性病症,例如所述抗体可用于减少神经瘤的形成。其还可用于治疗阿尔茨海默氏病或神经再生疗法。本发明的抗体可用于这样的治疗,以减轻不需要的 NGF 的激动剂作用(也可见下文中“联合治疗”部分)。此外,所述抗体可用于治疗神经性疼痛,如上所述。这可能与神经系统的损伤或功能障碍有关。NGF 具有治疗糖尿病和麻风病的潜力,但是其具有不希望的激动剂性能包括增加疼痛敏感度,这可通过使用本发明的抗体来避免。

[0178] 还有另一种用途是治疗炎性病症。NGF 是由肥大细胞、成纤维细胞和炎性过程发生位点周围的其他类型细胞释放的。具体地,肥大细胞显示出具有基本功能。其产生 NGF 并同时在其表面表达功能性 TrkA 受体。NGF/TrkA 系统显示出可通过自分泌正反馈机制介导肥大细胞激活,其使得局部放大产生疼痛的炎性信号。可治疗的炎性病症的实例包括泌尿道和骨盆的炎性形式、骨关节炎、多发性硬化、肠炎、炎性肠病、膀胱炎、湿疹、接触性皮炎、关节炎包括慢性关节炎和类风湿关节炎、克罗恩氏病、银屑病和哮喘。

[0179] 本发明的抗体可用于上述治疗以减轻不需要的 NGF 的激动剂作用。

[0180] 本发明的抗体或其衍生物可与一种或多种其他活性剂例如药物活性剂一起用于联合治疗。其可在医学中同时施用、序贯施用或协同施用。例如,所述抗体或衍生物可与镇痛剂例如阿片类镇痛剂或非阿片类镇痛剂组合。W006/137106 中公开了可阻断 TrkA 生物活性的少量分子可增强阿片类药物的镇痛效果。所述镇痛的阿片类药物包括选自下述的一种或多种化合物:吗啡、可待因、双氢可待因二乙酰吗啡、氢可酮、氢吗啡酮、左啡诺、羟吗啡酮、阿芬太尼、丁丙诺啡、布托啡诺、芬太尼、舒芬太尼、哌替啶、美沙酮、蔡丁美酮、丙氧芬、喷他佐辛;和其药学上可接受的衍生物(例如其药学上可接受的盐)。适合的非阿片类镇痛剂包括非甾体抗炎药(NSAID)以及其他镇痛剂例如醋氨酚。通常可获得的用于治疗急性炎性疼痛的 NSAID 包括阿司匹林、布洛芬、吲哚美辛、萘普生和酮洛芬,用于治疗慢性炎性疼痛的 NSAID 包括塞来考昔和美洛昔康。

[0181] 另一种组合是一种或多种本发明的抗体与一种或多种其他抗体的组合。优选的组合是与一种或多种其它抗 TrkA 和/或抗 NGF 抗体的组合。所述组合与单独使用抗体治疗相比可增加治疗一种或多种本文所述病症的效力。例如,在本文所用测定程序中,两种或多种抗体的组合是最有效的。

[0182] 另一种组合是本发明的抗体与 NGF 的组合。如上所述,已述及使用 NGF 治疗多种病症包括阿尔茨海默氏病、糖尿病、麻风病等,但是已发现对于周围靶点的激动剂性能可增加疼痛敏感度。另外,通过使用本发明的抗体或衍生物,可减低疼痛敏感度,以此使基于 NGF 的治疗更有利。

[0183] 另一种组合是本发明的抗体与抗肿瘤剂例如烷化剂、抗代谢物、拓扑异构酶 II 抑制剂、拓扑异构酶 I 抑制剂、有丝分裂抑制剂或铂衍生剂的组合。

[0184] 本发明的抗体可通过认识适合的途径施用。其包括(但不限于)腹膜内、肌内、静脉内、皮下、气管内、口腔、肠内、肠胃外、鼻内或皮肤施用。

[0185] 所述抗体通常是局部施用的,通过注射(腹膜内或颅内—通常在一个脑室—或者腹膜内或囊内)液体剂型或者通过摄取固体剂型(以丸剂、片剂、胶囊形式)或者液体剂型(以乳剂和溶液形式)。用于肠胃外施用的组合物通常包含溶解于相容的溶液优选水溶液中的免疫球蛋白溶液。这些剂型中抗体/衍生物浓度可从低于 0.005% w/v 到 15-20%

w/v 之间变化。其选择主要依据液体的体积、粘度等,以及依据所需的具体施用方式。可选择地,可制备用于固体形式施用的所述抗体。可将所述抗体与不同的惰性物质或赋形剂组合,其可包括配体例如微晶纤维素、明胶或阿拉伯胶;赋形剂例如乳糖或淀粉;试剂例如藻酸、Primogel 或玉米淀粉;润滑剂如硬脂酸镁、胶体二氧化硅;甜味剂如蔗糖或糖精;或者调味剂如薄荷和水杨酸甲酯。其他药学施用体系包括水凝胶、羟甲基纤维素、脂质体、微胶囊、微乳剂、微球体等。

[0186] 如果病症是局部性的,那么在受病症影响的位点/其附近直接地局部注射是优选的施用方式。抗 TrkA 抗体是适于全身性施用的。全身性施用可通过注射例如持续静脉滴注、静脉推注、皮下或肌肉注射进行。

[0187] 可选择地,也可使用其他形式的施用(例如经口腔、粘膜、吸入、舌下等)。但是,如果需要,递送所述抗体/衍生物可在受影响的组织附近通过局部施用(例如关节内注射或皮下、肌肉注射)实施。

[0188] 所述抗 TrkA 抗体/衍生物可适合地配制于适合预期的施用途径的药物组合物中。用于注射的溶液可适于含有在水性介质(例如注射用水)中溶解或分散的抗体/衍生物,同时适当地包含合适的缓冲液和摩尔浓度调节剂(例如磷酸盐、盐和/或葡萄糖)。

[0189] 治疗方案(即剂量,时间和重复)可以通过所选择的施用途径单次或重复施用(例如注射)所述产品来表示。剂量施用的间隔可依据临床反应的程度和持续时间依据具体的个体和个体的临床病史来调整。

[0190] 所述抗 TrkA 抗体/衍生物适合地具有长作用持续时间。具体地,所述抗体施用后通过动物实验所确定的临床效应的持续时间可以长达 21 天。此外,抗 TrkA 抗体施用后可显现出比其在相关的生物学基质例如血清或血浆中可检测的存在更长的临床效应时间。

[0191] 鉴于意图长的作用持续时间(即,效应适合地持续至少 1 周,或者优选地至少 2 周例如至少 3 周或至少 4 周),适合地将所述抗体/衍生物施用至受试者的频率不超过每周一次例如不超过每 2 周一次或者每 3 周一次或每 4 周一次。

[0192] 所述抗 TrkA 抗体/衍生物适合的每日剂量范围通常地从 0.1mg/kg 体重到 10mg/kg 体重。用于治疗急性和慢性炎性疼痛的抗 TrkA 抗体适合的剂量是至少 0.01mg/kg(见实施例 2 和 3)。用于治疗骨关节炎疼痛的抗 TrkA 抗体适合的剂量是至少 0.01mg/kg(见实施例 4)。用于治疗神经性疼痛的抗 TrkA 抗体适合的剂量是至少 0.01mg/kg,优选地 0.1mg/kg 并且最优选地 1mg/kg(见实施例 5)。这些剂量仅相对于小鼠的体内状况而言。本发明涉及人源化抗 TrkA 抗体在治疗急性炎性疼痛中的用途,其中痛觉过敏被有效地逆转至与施用 NSAID 所观察到的相同的程度。本发明还涉及人源化抗 TrkA 抗体在治疗慢性炎性疼痛中的用途,其中痛觉过敏被有效地逆转至与施用 NSAID 所观察到的相同的程度。本发明还涉及人源化抗 TrkA 抗体在治疗骨关节炎疼痛中的用途,其中痛觉过敏被有效地逆转至与施用普瑞巴林和阿片剂所观察到的相同的程度。本发明还涉及人源化抗 TrkA 抗体在治疗神经性疼痛中的用途,其中痛觉过敏被有效地逆转至与施用普瑞巴林所观察到的相同的程度。对于具体地施用至肿瘤,可通过直接和局部注射至肿瘤或肿瘤位点附近的组织来施用。对于全身施用,剂量从 0.05mg/kg 每天到 500mg/kg 每天变化,虽然所述范围内较低的区间是优选的因为其更易于施用。剂量可以是校准的,例如以保证血浆中特定水平的抗体/衍生物(范围约 5-30mg/ml,优选地介于 10-15mg/ml),并保持该水平一段时间直至达到临床

效果。

[0193] 用于确定或评估胰腺肿瘤或前列腺肿瘤阶段的有效的方法是基于血液中前列腺特异性抗原 (PSA) 的测量、胰腺肿瘤存活时间的测量、两种肿瘤类型对转移灶扩散的减缓或抑制的测量。

[0194] 对于在肿瘤位点直接注射, 剂量依赖于不同的因素包括肿瘤的类型、阶段和肿瘤体积, 以及许多其他变量。

[0195] 依据肿瘤体积, 典型的治疗剂量从注射 0.01mg/ml 到 10mg/ml 变化, 其可以需要的频率施用。

[0196] 无论治疗的性质如何, 人源化抗体与非人源化抗体相比可慢得多地被清除并且需要更低的剂量来保持血浆中有效的水平。此外, 具有高亲和力的抗体, 与具有较低亲和力的抗体相比, 可以较低的频率和较低的剂量施用。

[0197] 每种抗体 / 衍生物的治疗有效剂量可由有经验的医师在治疗过程中确定。根据需要, 剂量可减少 (例如为减少副作用) 或者增加 (例如为增加治疗效果)。

[0198] 施用之前, 本发明抗体的制品可冷冻或冻干储存。然后在使用之前可将其在适合的缓冲液中重构。如果是冻干, 那么重构可能会引起活性损失, 抗体的施用水平可进行校准以补偿该影响。(对于一般的免疫球蛋白, IgM 抗体倾向于比 IgG 抗体具有更大的活性损失。)

[0199] 储藏寿命也可标定, 以使得抗体不会在储藏期后被使用。

[0200] 本发明的抗体或其衍生物可用于与医疗用途有关的上述任意疾病 / 病况的诊断或预后。例如, 其可被用于促进 TrkA 阳性肿瘤标志物的检测, 用作阿尔茨海默氏病等发病的早期标志物。

[0201] 其还可被用于诊断 CIPA (“先天性无痛无汗症”)。这是一种遗传性、隐性、常染色体综合征, 特征在于反复发作性发烧、无汗、缺乏对伤害性刺激的反应、精神发育迟缓和自残倾向。其来自于 TrkA 基因的突变。事实上, 本发明的抗体或衍生物可用于范围广泛的包括 TrkA 异常表达 (与健康个体或健康组织样本中的 TrkA 表达相比) 或者 TrkA 活性异常的病况的诊断或预后。因此, 本发明的范围包括包含从患者获得生物学样本并使所述样本与本发明的抗体或衍生物接触的方法。根据需要, 可将所述抗体 / 衍生物固定。因此, 所述方法包括以定量或定性方式测定所述抗体 / 衍生物与所述样本的结合。根据需要, 其可参照阳性对照 (代表健康状态) 或阴性对照 (代表存在 / 疑似病症) 进行。为诊断目的, 所述抗体可用可检测的标志物标记或者不标记。(本文中术语“标志物”包括标签或任何其他可检测到的基团 / 可触发可检测到的变化的基团。)

[0202] 制品和试剂盒

[0203] 本公开的另一个实施方案中, 制品包含本发明的抗体或其片段、组合物或免疫交联物, 用于治疗一种或多种上述疾病 / 病况。所述制品可包含容器和在所述容器上或与其关联的标签或包装说明书。适合的容器包括例如瓶、小瓶或注射器。所述容器可由多种材料例如玻璃或者塑料制成。所述容器容纳可有效治疗所述病况的组合物并可具有无菌入口 (例如, 所述容器可以是静脉注射液袋或带可由皮下注射针刺透的塞子的小瓶)。所述组合物中至少一种活性剂是本发明的抗体。所述标签或包装说明书可表明所述组合物可用于治疗的病况的选择。

[0204] 此外,所述制品可包含 (a) 第一容器,其中含有组合物,其中所述组合物含有本发明的抗体,和 (b) 第二容器,其中含有组合物,其中所述组合物含有所述抗体之外的治疗剂。本发明的该实施方案的制品还可包含包装说明书,表明所述第一和第二组合物可组合使用。此类治疗剂可以是上述辅助治疗剂中的任意一种(例如,血栓溶解剂、抗血小板剂、化疗剂、抗血管生成剂、抗激素化合物、保心药和/或哺乳动物的免疫功能调节剂包括细胞因子)。可选择地或者另外地,所述制品还可包含第二(或第三)容器,该容器含有药学上可接受的缓冲剂例如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲液、林格氏溶液和葡萄糖溶液。其还可包含商业可获得的或用户立场的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0205] 本发明的范围还包含试剂盒,其含有本发明的抗体、组合物或免疫交联物及其使用说明。所述试剂盒还可包含一种或多种其他试剂,例如免疫抑制剂、细胞毒素剂或放射性毒素剂或者一种或多种额外的本发明的抗体(例如,与所述第一抗体不同的结合 TrkA 抗原的表位的具有补体活性的抗体)。

[0206] 即使没有进一步说明,也应理解本领域技术人员可依据以上的描述及下述示例性实施例制造和使用本发明的试剂并实践所要求保护的方法。提供下述工作实施例以方便实践本发明,但不应被理解为以任何方式限定本公开的其余部分。

[0207] 实施例

[0208] 本发明的人源化抗 TrkA 抗体是一种新的抗 TrkA 抗体亚类,其可高效地抑制 TrkA 的功能活化。抗 TrkA 小鼠单克隆抗体公开于 W000/73344 中称为 MNAC13,其人源化变体公开于 W009/098238 中,但它们未达到某些条件下例如治疗疼痛和癌症相关的疼痛时所需要的相同的抑制水平,此时高水平的抑制可产生增加的治疗效率。因此,需要开发可高效抑制 TrkA 的人源化抗 TrkA 抗体。

[0209] 评估抗体介导的 TrkA 功能活化的抑制的方法是本领域公知的,其包括 TF-1 细胞增殖测定,其中抗体阻断细胞表面 TrkA/beta-NGF 介导的细胞增殖的能力是使用因子依赖的人红白血病细胞系 TF-1 测定的(Kitamura T et al., (1989) J. Cellular Physiology 140(2):323-34)。W009/098238 中公开的人源化抗体显示出在 TF-1 增殖测定中的抑制活性, BXhVH5VL1 候选抗体在 MNAC13 小鼠抗体的人源化变体中具有最高程度的抑制。此外, W009/098238 中公开的人源化抗体通过表面等离子体共振 (SPR) 技术检测到可直接结合到 TrkA 的胞外区。因此,为设计具有提高的对人 TrkA 的结合亲和力而且更重要地可提高在 TF-1 细胞增殖测定中超过 BXhVH5VL1 人源化变体的抑制效力的新的小鼠 MNAC13 抗体的人源化变体,选择 W009/098238 中公开的人源化抗体的亚类用作工程化起始点。

[0210] “BXh”之后的字母是 VH 或 VL 或其二者。VH 或 VL 分别代表具有 IGHG1 同型的重链,具体重链可变区由具体数字例如 BXhVH5 表示,或者具有 κ 同型的轻链,具体轻链可变区由具体数字例如 BXhVL1 表示。当具有具体数字的 VH 和具有具体数字的 VL 同时出现于“BXh”之后例如 BXhVH5VL1 时,其代表由重链和轻链的具体组合组成的具体抗体分子,例如 BXhVH5VL1 抗体是指具有 BXhVH5 重链和 BXhVL1 轻链的抗体。基于 W009/098238 中所述选择的 VH 和 VL 可变区的新产生的工程化人源化变体称为“GBR”抗体。反之,相同的命名系统对于 GBR 抗体是有效的。本发明所用的重链可变区中的具体取代还在括号中标识。除非另有说明,否则所有的 GBR 抗体具有 IGHG1 重链同型和 κ 同型轻链。

[0211] 实施例 1: 抗体工程化

[0212] W009/098238 中公开的 40 种抗体中,选择 5 种人源化抗体用于工程化:具有重链可变区 VH1 (SEQ ID NO:1) 和轻链可变区 VL1 (SEQ ID NO:6) 的 BXhVH1VL1、具有重链可变区 VH3 (SEQ ID NO:3) 和轻链可变区 VL1 的 BXhVH3VL1、具有重链可变区 VH3 和轻链可变区 VL3 (SEQ ID NO:8) 的 BXhVH3VL3、具有重链可变区 VH5 (SEQ ID NO:5) 和轻链可变区 VL1 的 BXhVH5VL1、以及具有重链可变区 VH5 和轻链可变区 VL1 的 BXhVH5VL3。本文中使用的 MNAC13 小鼠抗体具有重链可变区 MNAC13 VH 序列 SEQ ID NO:20、重链序列 SEQ ID NO 21 和轻链序列 SEQ ID NO:22。

[0213] 令人意外地,所有工程化抗体都受益于重链可变区位点 37 (Kabat 编号 (Kabat EA et al, ibid.)) 的缬氨酸到丙氨酸的简单替换 (小鼠回复突变)。该取代具有非常独特的性能,所有工程化抗体经 SPR 测定可广泛地提高对人 TrkA 的亲和力。更重要地,相同的取代可导致大多数变体在 TF-1 细胞增殖测定中的效能提高,当导入与 VL1 结构域配对的 VH5 结构域中 (GBRVH5 (V37A) VL1 抗体) 时,令人意外地产生与 BXhVH5VL1 人源化抗体相比 10 倍的效能提高。值得注意地,相同的 GBR VH5 (V37A) VL1 抗体在 TF-1 细胞增殖测定中还显示出与 MNAC13 小鼠抗体相比 3 倍的效能提高。

[0214] 由于人源化抗体中小鼠来源的残基数量增加可增加其免疫原性风险 (Harding FA et al., (2010) MAbs 2(3):256-65),进行了进一步研究以减少工程化抗体中小鼠残基的数量。将 GBR VH5 (V37A) VL1 抗体中位点 3 的小鼠赖氨酸残基变为谷氨酰胺产生 GBRVH5 (K3Q, V37A) VL1 抗体,其具有与 BXhVH5VL1 人源化抗体相比相同数量的小鼠残基但具有与亲本小鼠 MNAC13 抗体相比提高的结合亲和力、相等的 FAB 热稳定性和提高的抑制效能。

[0215] 最后,由于抗体介导的效应子功能对其中只需要 TrkA 阻断能力的治疗不利,需要开发能够抑制 TrkA 但不通过免疫细胞介导杀死 TrkA 表达细胞的抗 TrkA 抗体。人 IGHG4 同型不携带效应子功能例如 ADCC 或 CDC,因此当不需要效应子功能或治疗不利时其是非常适合的抗体类型。但是,天然产生的人 IGHG4 同型的一个缺点是“FAB 交换”现象,天然产生的人 IGHG4 抗体可以此在体内交换重链 (Labrijn AF et al., (2009) Nat. Biotechnol. 27(8):767-71)。阻断重组体和内源的人 IGHG4 之间重链交换的方法是本领域已知的,并且所述交换已知可通过将位于铰链区的位点 228 (EU 编号, Edelman GM et al., ibid.) 的丝氨酸残基取代为脯氨酸残基有效地阻断,以此模拟人 IGHG1 同型中存在的构象铰链结构 (Lewis KB et al., (2009) Mol. Immunol. 46(16):3488-94)。将 GBR VH5 (V37A) VL1 和 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 都格式化为 IGHG4 S228P 免疫球蛋白用于上述治疗目的并且显示出与他们的 IGHG1 同型对应物 (counterpart) 等同的效能,以此使得 GBRVH5 (V37A) VL1 IGHG4 S228P 和 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 抗体适于只需要阻断 TrkA 的人的治疗。

[0216] 方法

[0217] 工程化变体的设计

[0218] VH5-VL1 可变区配对的 3D 模型使用结构同源建模服务器 SWISS-MODEL (ARNOLD K ET AL., (2006) BIOINFORMATICS 22(2):195-201 ;HTTP://SWISSMODEL. EXPASY. ORG) 设定为自动操作模式进行计算。反演模型的模板是实验解析的 MNAC13 FAB 3D 结构 (PDB

code 1SEQ, www.pdb.org, Berman HM et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):235-42, Covaceuszach S et al., (2005) *Proteins* 58(3):717-27)。序列比对 MNAC13 VH、VH1、VH3、VH5 和种系 VH3-023*01 (SEQ ID NO:23) 结构域显示, 在位点 :3、5、19、37、40、42、44、49、50、52A、53、60、62、74、82A、83、84、89 和 94 (Kabat 编号) 的氨基酸不同。模型分析使得可基于其对 CDR 区和 / 或重链 - 轻链可变区包装的推定的影响选择位点子集。所述位点子集由以下组成 :3、37、40、42、44、49、50、60、62、89 和 94 (Kabat 编号)。因此, 工程化抗体具有的重链可变区包含上述可变区序列 (VH1、VH3 和 VH5, 序列分别为 SEQ ID NO:1、3、5) 中选自上述位点子集的单个或多个位点的取代。更具体地, 工程化抗体由上述取代的重链可变区和上述两个轻链可变区 VL1 或 VL3 (SEQ ID NO 6 和 8) 中的一个配对组成。

[0219] 分子生物学

[0220] 编码工程化重链可变区的 DNA 序列 (cDNA) 是使用 WO 09/098238 中所述用于 BXhVH1、BXhVH3 和 BXhVH5 的载体 DNA 作为 PCR 模板通过标准诱变技术产生的。类似地, 轻链可变区 cDNA 是从 WO 09/098238 中所述用于 BXhVL1 和 BXhVL3 的载体 DNA 直接扩增的。可变区 cDNA 是在其相应的恒定区 cDNA 序列上游通过 PCR 组装技术进一步组装的。最后, 将完整的重链和轻链 cDNA 连接到携带 CMV 启动子和牛生长素 polyA 信号的基于改良 pcDNA3.1 载体 (Invitrogen, CA, USA) 的独立载体中。轻链特异性载体可通过 BamHI 和 BsiWI 限制酶位点将目标轻链可变区 cDNA 连接到 κ 轻链恒定区 cDNA 之前表达 κ 同型轻链; 而重链特异性载体是使用 BamHI 和 SalI 限制酶位点将目标重链可变区 cDNA 连接到编码IGHG1 CH1、IGHG1 铰链区、IGHG1 CH2 和 IGHG1 CH3 恒定区的 cDNA 序列之前构建的。在重链和轻链两个表达载体中, 分泌是受含有 BamHI 位点的鼠 VJ2C 前导肽驱动的。BsiWI 限制酶位点位于 κ 恒定区, 而 SalI 限制酶位点见于 IGHG1 CH1 区中。

[0221] 含有 S228P 取代的 IGHG4 免疫球蛋白格式化通过将上述重链特异性载体中编码 IGHG1 CH1、IGHG1 铰链区、IGHG1 CH2 和 IGHG1 CH3 恒定区的 cDNA 序列替换为编码 IGHG4 CH1、具有 S228P 取代的 IGHG4 铰链区、IGHG4 CH2 和 IGHG4 CH3 恒定区的 cDNA 序列实现的。S228P 取代是通过标准 PCR 诱变技术导入人 IGHG4 重链 cDNA 模板的。

[0222] 抗体产生

[0223] 为瞬时表达抗体, 使用聚乙稀亚胺 (jetPEI[®], Polyplus transfection, Illkirch Cedex, France) 将等量的重链和轻链载体共转染到悬浮适应的 HEK293-EBNA1 细胞 (ATCC[®] 目录号 :CRL-10852) 中。典型地, 密度为 0.8-1.2 百万细胞 /ml 的 100 ml 细胞悬液使用含有 50 μ g 编码重链的表达载体和 50 μ g 编码轻链的表达载体的 DNA-jetPEI[®] 混合物转染。将编码抗体基因的重组表达载体转入宿主细胞后, 通过进一步将所述细胞培养 4 至 5 天产生抗体使其分泌到培养介质 (EX-CELL 293, HEK293 无血清培养基; Sigma, Buchs, Switzerland, 补充 0.1% 普朗尼克酸 (pluronic acid)、4 mM 谷氨酰胺和 0.25 μ g/ml 遗传霉素) 中。

[0224] 抗体使用重组蛋白 A 层流介质 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland) 从不含细胞的上清中纯化, 并在测定之前将缓冲液更换为磷酸盐缓冲液。

[0225] 使用差示扫描量热法的稳定性测试

[0226] 量热学测定是使用 VP-DSC 差示扫描微量热仪 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland) 实施的。细胞体积为 0.128ml、加热速率为 200 °C /h、超压维持在 65p. s. i.。所有使用的抗体在 PBS (pH7.4) 中的浓度为 1mg/ml。每种蛋白的摩尔热容是通过比较去除蛋白的、含有相同缓冲液的平行双样评价的。偏摩尔热容和溶解曲线是使用标准程序测定的。使用 Origin 软件 (v7.0, GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland) 中的非二态模型进一步分析前,将温度自记曲线进行基线校正和浓度标准化。

[0227] 通过 SPR 的亲合力测定

[0228] SPR 分析用于测量不同抗体 (小鼠抗体和人源化抗体) 的结合动力学的结合与解离速率常数。小鼠抗体和人源化变体的结合动力学是使用 BIAcore 2000 装置 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland) 在室温测定,并使用软件 (v4.1, GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland) 分析的。

[0229] 由于抗体是二价分子,最好将其固定于传感芯片上。如果将所述抗体用作分析物,那么 SPR 测定可产生亲和力以外的化合价组成。虽然 BIAcore 评估软件可模拟双价和提取亲和常数,然而任何可能的条件下均优选使用单价分析物以避免任何价偏。为达到该目的,通过消化 HEK293-EBNA1 细胞中产生的重组人 TrkA-Fc 融合蛋白 (SEQ ID NO:24) 产生单价形式的人 TrkA 胞外区。所述融合蛋白包含融合到 IGHG1 Fc 区的人 TrkA 胞外区 (SEQ ID NO:25),其中蛋白酶特异的裂解序列包含在所述 2 个区之间 (TEV 裂解蛋白酶氨基酸序列: ENLYFQS)。蛋白酶裂解后,使用标准的色谱技术进一步将单价形式的人 TrkA 胞外区纯化至同质,其包括蛋白 A 步骤以移除 Fc 片段。最后,将所述单价的人 TrkA 胞外区蛋白的缓冲液更换为 PBS,然后稀释于 Biacore 运行缓冲液中用于亲和力测定。样品纯度、均一度和分子量通过 SDS-PAGE 和尺寸排阻分析确定。

[0230] 通过捕获其 Fc 区将抗体固定使其在所述传感芯片表面正确地定向。单克隆小鼠抗人 IgG (Fc) 抗体传感芯片用于捕获所有人源化抗体而不考虑其同型 (Human Antibody Capture Kit, 目录号 BR-1008-39, GE Healthcare Europe GmbH),并且多克隆兔抗小鼠免疫球蛋白传感芯片用于捕获 MNAC13 小鼠抗体 (Mouse Antibody Capture Kit, 目录号 BR-1008-38, GE Healthcare Europe GmbH)。

[0231] 数据 (sensorgram:fc2-fc1) 使用 1:1 Langmuir 传质模型拟合,尽管传质测试中具有小的传质限制。为说明每次测量开始时捕获抗体的实验误差,在所有拟合中将 Rmax 值设定为局部 (local)。解离时间是至少 350 秒。测定重复三次,并且包括零浓度样品作为对照。Chi2 和残差值都用于评估实验数据和个体结合模型之间拟合的质量。

[0232] 使用 TF-1 细胞的增殖测定

[0233] 悬浮适应的 TF-1 细胞 (ATCC® 目录号: CRL-2003) 培养于含 10% FCS 和 5ng/ml rhu β NGF (重组人 β -NGF, R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK) 的完全 RPMI 介质中。为所述测定,将 TF-1 细胞在不含人 β -NGF 的完全 RPMI 中孵育 5h。饥饿步骤后,将细胞离心并接种于含有不同浓度的每种抗体和固定浓度的重组 β -NGF 的平底 96 孔板中。TF-1 的接种密度为 7000 个细胞 / 孔,并且抗体-细胞混合物的总体积是 200 μ l,含有 5ng/ml 人 β -NGF (终浓度)。将所述混合物在 37°C 补充 CO₂ 的条件下孵育 4 天。第 3 天,在不改变孵育条件下将比色染料 Alamar 蓝 (AbD Serotec, Morphosys AbD GmbH, Düsseldorf, Germany)

加入每孔中。第 4 天,在 Bio-Tek Synergy™2 分光光度计 / 酶标仪 (BioTek Instruments GmbH, Luzern, Switzerland) 上使用 530 到 560nm 激发波长和 590nm 发射波长进行荧光读数。实验进行至少 2 次,并且每种抗体浓度测定 3 个重复。

[0234] 结果

[0235] 基于 BXhVH5VL1 的工程化的新的人源化抗 TrkA 抗体

[0236] 基于 VH5-VL1 可变区配对的 3D 模型,选择不同重链可变区 (VH1、VH3 和 VH5) 中一组共有的 3D 位点用于小鼠到人的人和人到小鼠突变,该组位点包括 :3、37、40、42、44、49、50、60、62、89 和 94 (Kabat 编号)。关于本文中所用的取代组合的工程化策略是基于推定的不同取代对 CDR 区和 / 或可变区包装和 / 或免疫原性影响的互补性。

[0237] 第一种方法中,小鼠到人突变和人到小鼠突变是以具有 IGHG1 同型格式背景的 BXhVH5VL1 作为候选工程化的。进行的小鼠到人突变包括以下取代 :K3Q、T40A、R44G、A49S、Y50A、P60A、T62S 和 R94K。基于所述单个取代或组合取代的一些工程化抗 TrkA 抗体的产物产率和亲和力分别见表 1 和 2。组合多数或全部小鼠到人突变导致低产物产率并且完全丧失与 TrkA 的结合。例如,小鼠到人取代 A49S 与 Y50A 组合可完全消除结合,其未能被其他小鼠到人取代补救,并且小鼠到人取代 K3Q、T40A、R44G 和 R94K 单独或与其他小鼠到人取代的组合都未能产生亲和力的任何提高。

[0238] 进行的人到小鼠突变包括以下取代 :V37A、G42E 和 V89L。人到小鼠取代 V37A 具有最积极的影响并导致至少 2 倍的亲和力提高 (K_D 下降至少 2 倍) (表 2 和图 1);GBR VH5 (V37A) VL1 IGHG1 抗体记录产生了 2.5 倍亲和力提高。将人到小鼠取代 V37A 与到人到小鼠取代 P60A 和 T62S 组合后,这种亲和力提高被消除,但将小鼠到人取代 K3Q 和 / 或 R44G 组合时可保留这种亲和力提高。总之这些结果表明了位点 49 和 50 在提供结合时的重要性,以及人到小鼠取代 V37A 在使 BXhVH5VL1 的亲和力增强至少 2 倍中的独特性能。由于抗体介导的效应子功能可能不利于只需要阻断 TrkA 的治疗,将 GBR VH5 (V37A) VL1 和 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 在上述含有 S228P 取代的 IGHG4 同型中重新格式化。两种工程化抗体显示出与其 IGHG1 同型对应物相似的亲和力,表明 V37A 取代产生的亲和力提高不受同型转换的影响。

[0239] 基于 BXhVH1VL1、BXhVH3VL1 BXhVH3VL1 和 BXhVH5VL3 工程化的新的人源化抗 TrkA 抗体

[0240] 第二种方法中,将 V37A 取代导入来自 WO 09/098238 的其他选择的候选中,并且通过 SPR 分析将所述工程化抗 TrkA 抗体的亲和力与 BXhVH5VL1 和 MNAC13 抗体进行比较。表 3 和 4 分别示出了 V37A 取代抗体的产物产率和亲和力。虽然工程化抗体具有不同的产物产率,但是所有的工程化抗体在引入 V37A 取代后都显示出亲和力提高。对于 BXhVH3VL1、BXhVH1VL1、BXhVH3VL3 和 BXhVH5VL3,亲和力分别提高 8%、20%、30% 和 55%。因此,将人到小鼠取代 V37A 不仅导入 BXhVH5VL1 中不仅可导致亲和力提高,而且最令人意外地还可导致所有人源化变体的亲和力提高。值得注意地,GBR VH5 (V37A) VL1 或 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 都作为 IGHG1 或 IGHG4 S228P 同型,具有的亲和力可匹配测定的 MNAC13 小鼠抗体的亲和力 (表 2 和 4);与 BXhVH5VL1 抗体相比都提高至少 2 倍 (K_D 分别下降 2.5 到 2.7 倍)。

[0241] 表 3 和图 2 包括所述工程化抗体中测定的 FAB 片段的解链温度。单克隆抗体的熔解曲线是其同型特有的,但是即使处于全长免疫球蛋白中,FAB 片段的解链温度

(T_m) 的中值也可容易地确定 (Garber E and Demarest SJ(2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355(3):751-7)。这样的 FAB 片段解链温度的中值可用于检测所述工程化候选的稳定性。GBR VH5(V37A)VL1 和 GBR VH5(K3Q, V37A)VL1 FAB 片段分别在 73.6°C 和 73°C 出现单次跃迁, 两者具有等同的热稳定性且 FAB 跃迁的形状和幅度符合协同解链, 这通常发现于精细折叠的 FAB 片段中, 表明所述工程化过程成功地保持了 FAB 的稳定性。当比较 GBR VH5(V37A)VL1 或 GBR VH5(K3Q, V37A)VL1 的 FAB T_m 与 MNAC13 FAB T_m(74°C) 时, 其差异在 1°C 之内或更小, 这是另外的例证。

[0242] 工程化抗 TrkA 抗体的功能测试

[0243] 在 TF-1 细胞增殖测定中测定工程化抗 TrkA 抗体抑制 TrkA 功能活化的能力 (图 3)。半数最大抑制浓度 (IC₅₀) 是化合物抑制生物学功能的有效性的量度, 其是通过每条曲线计算的, 结果见表 5。注意, GBR VH1(V37A)VL1 未进行测定, 因为其 SRP 亲和力较低。

[0244] GBR VH5(V37A)VL1 具有最好的效果, 其次是 GBR VH5(K3Q, V37A)VL1、GBR VH5(K3Q, V37A)VL1 IGHG4 S228P 和 GBR VH3(V37A)VL1, 其具有相同的 IC₅₀。GBR VH3(V37A)VL3 和 GBR VH5(V37A)VL3 抗体的 IC₅₀ 稍高, 但是所有测试的工程化抗体都比 BXhVH5VL1, GBR VH5(V37A)VL1 好超过 10 倍。值得注意地, 在 TF-1 细胞增殖测定中, 与 MNAC13 小鼠抗体相比, GBR VH5(V37A)VL1 抗体还显示出 3 倍的效能提高。所有的 V37A 变体与小鼠亲本抗体相比具有等同或更好的 IC₅₀。

[0245] 表 1: 基于 BXhVH5VL1 选择的工程化抗 TrkA 抗体的产物产率; 除非另有说明否则所有抗体都是 IGHG1 同型。(*) 含有 S228P 取代的 IGHG4 同型。* 包含实施例 1 所述的小鼠到人突变和人到小鼠突变。

[0246]

人源化抗TrkA抗体	SEQ ID NOs	突变数 ⁺	瞬时表达 (mg/l)
BXhVH5VL1	28, 29	8	10
GBR VH5(K3Q)VL1	50, 29	7	16
GBR VH5(V37A)VL1	51, 29	9	19
GBR VH5(V37A)VL1 (*)	52, 29	9	11
GBR VH5(G42E)VL1	53, 29	9	19
GBR VH5(V89L)VL1	54, 29	9	17
GBR VH5(R94K)VL1	55, 29	7	15
GBR VH5(K3Q,V37A)VL1	56, 29	8	52
GBR VH5(K3Q,V37A)VL1 (*)	57, 29	8	11
GBR VH5(K3Q,T40A)VL1	58, 29	6	3
GBR VH5(P60A,T62S)VL1	59, 29	6	7
GBR VH5(K3Q,V37A,R44G)VL1	60, 29	7	24
GBR VH5(K3Q,A49S,Y50A)VL1	61, 29	5	15
GBR VH5(K3Q,P60A,T62S)VL1	62, 29	5	7
GBR VH5(K3Q,T40A,P60A,T62S)VL1	63, 29	4	8
GBR VH5(K3Q,V37A,T40A,P60A,T62S)VL1	64, 29	5	12
GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A)VL1	65, 29	3	22
GBR VH5(K3Q,A49S,Y50A,P60A,T62S)VL1	66, 29	3	16
GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A,P60A,T62S)VL1	67, 29	1	3
GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A,P60A,T62S,R94K)VL1	68, 29	0	3

[0247] 表 2 : 基于 BXhVH5VL1 选择的工程化抗 TrkA 抗体的亲和力 ; 除非另有说明否则所有抗体都是 IGHG1 同型。(*) 含有 S228P 取代的 IGHG4 同型。N. B. 表示无结合。

[0248]

人源化抗TrkA抗体	K_D (nM)
BXhVH5VL1	40.9
GBR VH5(V37A)VL1	16
GBR VH5(V37A)VL1 (*)	15
GBR VH5(R94K)VL1	52
GBR VH5(K3Q,V37A)VL1	15.4
GBR VH5(K3Q,V37A)VL1 (*)	15
GBR VH5(K3Q,V37A,R44G)VL1	20
GBR VH5(K3Q,A49S,Y50A)VL1	N.B.
GBR VH5(K3Q,V37A,T40A,P60A,T62S)VL1	48
GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A)VL1	N.B.
GBR VH5(K3Q,A49S,Y50A,P60A,T62S)VL1	N.B.
GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A,P60A,T62S)VL1	N.B.
GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A,P60A,T62S,R94K)VL1	N.B.

[0249] 表3:所选择工程化抗 TrkA 抗体的产物产率和 FAB 热稳定性数据;所有抗体都是 IGHG1 同型。

[0250]

抗TrkA抗体	SEQ ID NOs	表达 (mg/l)	T _m Fab (°C)
MNAC13	21, 22	5	74
BXhVH1VL1	26, 29	10	64.7
GBR VH1(V37A)VL1	69, 29	16	65.3
BXhVH3VL1	27, 29	9	71.3
GBR VH3(V37A)VL1	70, 29	1	70.2
BXhVH3VL3	27, 30	6	71
GBR VH3(V37A)VL3	70, 30	9	69.3
BXhVH5VL1	28, 29	16	76.5
GBR VH5(V37A)VL1	51, 29	19	73.6
GBR VH5(K3Q,V37A)VL1	56, 29	52	73
BXhVH5VL3	28, 30	16	76.4
GBR VH5(V37A)VL3	51, 30	19	73.3

[0251] 表 4 :V37A 工程化抗 TrkA 抗体的亲和力 ;所有抗体都是 IGHG1 同型。

[0252]

抗 TrkA 抗体	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)	K _D (nM)
MNAC13	6.02x10 ⁴	1.09x10 ⁻³	18
BXhVH1VL1	3.13x10 ⁴	1.33x10 ⁻²	426
GBR VH1 (V37A) VL1	1.96x10 ⁴	6.63x10 ⁻³	338
BXhVH3VL1	4.65x10 ⁴	6.19x10 ⁻³	133
GBR VH3 (V37A) VL1	3.82x10 ⁴	4.71x10 ⁻³	123
BXhVH3VL3	3.14x10 ⁴	4.59x10 ⁻³	134
GBR VH3 (V37A) VL3	3.1x10 ⁴	2.95x10 ⁻³	95
BXhVH5VL1	1.04x10 ⁵	4.26x10 ⁻³	40.9
GBR VH5 (V37A) VL1	1.4x10 ⁵	2.25x10 ⁻³	16
GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1	1.7x10 ⁵	2.62x10 ⁻³	15.4
GBR VH5VL3	6.23x10 ⁴	3.95x10 ⁻³	63
GBR VH5 (V37A) VL3	7.45x10 ⁴	2.05x10 ⁻³	28

[0253] 表 5 :V37A 工程化抗 TrkA 抗体的 TF-1 细胞增殖测定 IC₅₀ ;除非另有说明否则所有抗体都是 IGHG1 同型。(*) 含有 S228P 取代的 IGHG4 同型。N. D. 表示未测定。

[0254]

抗 TrkA 抗体	IC ₅₀ (μ g/ml)
MNAC13	0. 23
BXhVH5VL 1	0. 73
GBR VH1 (V37A) VL1	N. D.
GBR VH3 (V37A) VL1	0. 15
GBR VH3 (V37A) VL3	0. 29
GBR VH5 (V37A) VL1	0. 075
GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1	0. 15
GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 (*)	0. 15
GBR VH5 (V37A) VL3	0. 22

[0255] 实施例 2 :人源化抗 TrkA 抗体逆转足底注射 CFA 诱导的爪急性炎性痛觉过敏

[0256] 足底注射完全弗氏佐剂 (CFA) 至小鼠的一只后爪可引起急性炎性痛觉过敏,其可用负重方法进行评估。空白小鼠通常将其体重等量地分布于其 2 个后爪。但是,当注射 CFA 的后爪发炎并产生疼痛时,其重新分配体重以减轻分配于经注射的后爪 (同侧) 上的体重并增加分配于非注射的后爪 (对侧) 上的体重。

[0257] 方法

[0258] 每只后爪的负重是使用双足平衡测痛仪 (Linton Instruments,UK) 测定的。将小鼠放至双足平衡测痛仪中,将其后爪置于不同的传感器上并记录两侧后爪施加的平均力超过 2 秒。使初次接受试验的 AMB1 小鼠在其鼠笼中适应操作室,食物和水不限量供应。所述 AMB1 小鼠是通过将小鼠 TrkA 的外显子 1 替代为其人源的对应部分,因此其专有地表达人 TrkA 蛋白。对双足平衡测痛仪的适应进行数天。诱导刺激之前记录基线负重。

[0259] 炎性痛觉过敏是通过足底注射 CFA (20μl 1. 5mg/ml 溶液) 至左侧后爪诱导的。记录预处理负重读数以估算 CFA 处理后 23 小时的痛觉过敏。然后依据拉丁方设计中的 CFA 窗口将动物排列并随机分配。CFA 处理后 24 小时,将动物用单次腹膜注射 0. 1mg/kg 同型对照处理或者 0. 0001、0. 001、0. 01 和 0. 1mg/kg 抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 腹膜注射 (10ml/kg 剂量体积) 处理。非选择性 NSAID 吲哚美辛以 10mg/kg 口服 (5ml/kg 剂量体积) 用作阳性对照。抗体 / 药物处理后 4、8、24、48、72、96 和 120 小时记录负重读数。

[0260] 行为评估是盲评进行。记录同侧和对侧后爪的负重 (g) 读数,并表述为 % 负重差异 (% 同侧 / 对侧)。通过比较每个时间点的处理组与同型对照组分析数据。以重复测量 ANOVA 进行统计分析,然后使用 InVivoStat 进行计划比较试验 (p<0. 05 为显著)。

[0261] 结果

[0262] 足底注射 CFA 可诱导显著的痛觉过敏, CFA 处理后 23 小时检测到负重从同侧转移到对侧后爪, 导致%同侧 / 对侧比率下降 (图 4)。CFA 处理后 24 小时开始的同型对照处理显示出对痛觉过敏无效。0.01 和 0.1mg/kg 抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 给药后 4-48 小时观察到与同型对照相比显著的痛觉过敏逆转。0.001 mg/kg 或更低剂量的抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 对逆转痛觉过敏是无效的。吲哚美辛 (10 mg/kg) 在所有测试的时间点都可显著逆转痛觉过敏。总之, 抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 可显著逆转所述爪的急性炎性痛觉过敏, 与吲哚美辛类似。此外, GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 施用的有效剂量 (0.01 和 0.1mg/kg) 比吲哚美辛的有效剂量 (10mg/kg) 低许多倍, 这表明抗 TrkA 抗体可以比该病况的标准治疗低得多的剂量施用。

[0263] 实施例 3 : 人源化抗 TrkA 抗体逆转关节内注射 CFA 诱导的膝关节慢性炎性痛觉过敏

[0264] 关节内注射 CFA 至小鼠后肢的一侧膝关节诱导慢性炎性痛觉过敏, 其可用负重方法进行评估。当注射 CFA 的关节发炎并产生疼痛时, 其重新分配体重以减轻分配于经注射的 (同侧) 关节的后肢上的体重并增加分配于非注射 (对侧) 关节的后肢上的体重。动物模型中这些征兆的发展被认为是临床上相关的, 由于其反映了与潜在病况例如骨关节炎和风湿性关节炎相关的慢性炎性关节痛患者的症状。

[0265] 方法

[0266] 使初次接受试验的 AMB1 小鼠在其鼠笼中适应操作室, 食物和水不限量供应。所述 AMB1 小鼠是通过将小鼠 TrkA 的外显子 1 替代为其人源的对应部分, 因此其专有地表达人 TrkA 蛋白。对双足平衡测痛仪的适应进行数天。诱导刺激之前记录基线负重。使用 3:1 混合的异氟醚和氧在无菌状况下将动物麻醉。将膝盖区剃毛并用稀释的消毒剂溶液洗净。将左膝注射 10 μ l 10mg/ml 的 CFA。在返回鼠笼前, 使动物在温暖环境中恢复。CFA 处理后第 4、7 和 10 天使用负重方法评估动物炎性痛觉过敏的发展。基于 CFA 处理后第 10 天的测定, 依据其 CFA 窗口将动物排列并随机分配到处理组。CFA 处理后第 13 天, 当痛觉过敏已很好地建立时, 单次腹膜注射 10mg/kg 同型对照抗体或者以 0.01、1 和 10mg/kg 单次腹膜注射抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 处理动物。COX-2 选择性 NSAID 塞来考昔以每天 2 次 60mg/kg 口服作为阳性对照。对于抗体处理组, 给药后第 4、8、24 和 96 小时测定负重。对于塞来考昔处理组, CFA 处理后第 13 天给药后第 1 和 8 小时以及 CFA 处理后第 14-17 天给药后第 1 小时测定负重。行为评估是盲评进行。记录同侧和对侧后肢的负重 (g) 读数, 并表述为%负重差异 (%同侧 / 对侧)。通过比较每个时间点的处理组与同型对照组分析数据。以重复测量 ANOVA 进行统计分析, 然后使用 InVivoStat 进行计划比较试验 ($p < 0.05$ 为显著)。

[0267] 结果

[0268] 将 CFA 注入膝关节从第 3 天起可引起显著且长期的痛觉过敏, 检测到负重从同侧转移到对侧后肢, 导致%同侧 / 对侧比率下降 (图 5)。同型对照抗体处理对痛觉过敏无效。处理过程中, 使用塞来考昔 (60mg/kg) 给药后 1 小时, 可检测到显著逆转痛觉过敏。单次注射 0.01、1 和 10mg/kg 抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P, 从给药后 4-72 小时观察到显著逆转痛觉过敏, 在第 96 小时与同型对照相比只有最大的 2 个剂量是显著的。总之,

单剂量 0.01mg/kg 或更高的抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 可显著并长效地逆转膝关节慢性炎性痛觉过敏,与多剂量塞来考昔类似。此外,只需要单剂量 0.01mg/kg 抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 即能达到与多剂量 60mg/kg 塞来考昔相当的效果,这表明抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 可以比目前使用 NSAID 塞来考昔的标准治疗低得多的剂量和更低的频率给予。

[0269] 实施例 4:人源化抗 TrkA 抗体逆转关节内注射 MIA 诱导的膝关节慢性骨关节炎痛觉过敏

[0270] 关节内注射碘乙酸钠 (MIA) 至小鼠的膝关节导致发展为与局部关节炎症相关的慢性炎性痛觉过敏及软骨退化。因此, MIA 模型中测定的痛觉过敏与骨关节炎相关的疼痛非常相似。此外,软骨退化导致具有类神经病理性特征的慢性神经元损伤。由于抗惊厥药 (anticonvulsant) 普瑞巴林被推荐为治疗神经性疼痛的一线药物,其在此用作比较化合物。弱 μ 阿片受体激动剂曲马多越来越多地被用于治疗 OA, 因为与 NSAID 相反, 曲马多既不会引起胃肠出血或肾脏问题,也不会影响关节软骨。因此,曲马多与普瑞巴林一起用作抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 的对照。

[0271] 方法

[0272] 使初次接受试验的 AMB1 小鼠在其鼠笼中适应操作室,食物和水不限量供应。所述 AMB1 小鼠是通过将小鼠 TrkA 的外显子 1 替代为其人源的对应部分,因此其专有地表达人 TrkA 蛋白。对双足平衡测痛仪的适应进行数天。进行基线负重读数测量。使用 3:1 混合的异氟醚和氧在无菌状况下将动物麻醉。将膝盖区剃毛并用稀释的消毒剂溶液洗净。将 5 μ l 100mg/ml (500 μ g) MIA 或者盐水 (sham) 注入左侧后肢的膝关节。在返回鼠笼前,使动物在温暖环境中恢复。MIA 处理后第 3-23 天,使用负重方法每隔一定时间评估动物膝关节痛觉过敏的发展。MIA 处理后第 14 天,进行负重测定,依据其 MIA 响应窗口将动物排列并随机分配到处理组,然后通过单次腹膜注射 1、10、100 μ g/kg 抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 或 100 μ g/kg 同型对照抗体 (5ml/kg 剂量体积) 进行处理。作为比较的对照, MIA 处理后第 14 天口服 10mg/kg 曲马多或者 30mg/kg 普瑞巴林 (5ml/kg 剂量体积) 处理动物,然后在 MIA 处理后第 16-22 天使用 30mg/kg 曲马多或者 100mg/kg 普瑞巴林隔日处理动物 (5ml/kg 剂量体积)。MIA 处理后第 14 天在给药后 4、8 和 24 小时通过负重评估所有动物,然后每 24 小时评估抗体处理组,对于曲马多和普瑞巴林处理组给药后第 1 小时和第 24 小时进行评估。行为评估是盲评进行。记录同侧和对侧后肢的负重 (g) 读数,并表述为 % 负重差异 (% 同侧 / 对侧)。通过比较每个时间点 (MIA 处理后第 3-14 天) 的处理组与 sham 组分析数据,以分析 MIA 对痛觉过敏的影响。通过比较每个时间点的处理组与同型对照组分析给药后的数据。以重复测量 ANOVA 进行统计分析,然后使用 InVivoStat 进行计划比较试验 ($p < 0.05$ 为显著)。

[0273] 结果

[0274] 将 500 μ g MIA 注入膝关节从第 3 天起可引起显著的痛觉过敏,检测到负重从同侧转移到对侧后肢,导致 % 同侧 / 对侧比率下降。单次注射 10 μ g/kg 和 100 μ g/kg 抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 后第 4 小时到第 7 天,可发现每个时间点与同型对照相比显著逆转痛觉过敏 (图 6A)。1 μ g/kg 抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 对痛觉过敏无效。MIA 处理后第 14 天,给药曲马多 (10mg/kg) 和普瑞巴林 (30mg/kg) 后 1 小时无效,

但是给药后 4 小时可显著逆转痛觉过敏（图 6B）。由于 MIA 处理后第 14 天给药后 1 小时无效，将曲马多提高至 30mg/kg 和普瑞巴林提高至 100mg/kg，都在 MIA 处理后第 16、18 和 20 天在给药后 1 小时显示出可显著逆转痛觉过敏。总之，单剂量 10 μ g/kg 或更高的抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 可显著并长效地逆转膝关节慢性骨关节炎痛觉过敏，与多剂量曲马多和普瑞巴林类似。此外，只需要单剂量 10 μ g/kg 抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 即可达到与多剂量的曲马多和普瑞巴林两种药物（剂量高出很多，分别为 30mg/kg 和 100mg/kg）相当的效果。因此，抗 TrkA 抗体可以比普瑞巴林和曲马多低得多的剂量和较低的给药频率施用。

[0275] 实施例 5：人源化抗 TrkA 抗体逆转坐骨神经慢性缩窄性损伤诱导的周围神经性痛觉过敏和异常性疼痛

[0276] 周围神经性疼痛是由周围神经系统的损伤、功能障碍或疾病引起的慢性疼痛。其通常包括痛觉过敏（对痛性刺激的反应提高）以及异常性疼痛（对非痛性刺激的痛性反应）。神经性疼痛可由实验损伤动物体内的周围神经诱导，并且其通常是通过由宽松结扎引起的坐骨神经慢性缩窄性损伤 (CCI) 实现的 (Bennett&Xie(1998)Pain, 33:87-107)。由于普瑞巴林被推荐为治疗神经性疼痛的一线药物，其在此用作比较化合物。

[0277] 方法

[0278] CCI 手术是在氯胺酮和甲苯噻嗪（腹腔注射 100 和 10mg/kg/10ml）麻醉下在雄性和雌性 AMB1 小鼠中实施的。AMB1 小鼠是通过将小鼠 TrkA 的外显子 1 替代为其人源的对应部分，因此其专有地表达人 TrkA 蛋白。剪去毛发后，在无菌条件下将左侧大腿正中间的坐骨神经露出。在神经分支前 1-2mm 将 3 个松散结扎线（使用 4-0 黑丝线）围绕坐骨神经放置。手术位点经皮缝术后使用聚维酮碘溶液处理。此后使动物恢复 7 天。实验前一天，使动物适应测量装置（制冷板）并记录给药前 (0hr) 的缩足阈值。然后将动物重组为 6 组。第二天，将动物单次腹膜注射同型对照抗体 (1000 μ g/kg/10 ml) 或者不同剂量的抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P (10、100 和 1000 μ g/kg/10ml) 进行处理。给药后的 7 天中，每天 1 次给予普瑞巴林 (30mg/kg/10ml, 口服) 或盐水。第 4h、24h 及其后每隔 1 天记录给药后读数直到给药后第 7 天。在所有中给予普瑞巴林或盐水后 1h 记录给药后读数。首先记录机械性痛觉过敏的给药后读数和 5 分钟后记录冷痛的给药后读数。机械性痛觉过敏是以使用动态足底触觉计 (Plantar Von Frey instrument; Ugo Basile Srl, Italy) 引起缩足所需的极限力 (g) 测定的。冷痛是以由制冷板引起的缩足所需的时间 (秒) 测定的 (IITC Life Science Inc., USA)。

[0279] 结果

[0280] CCI 手术后 7 天，小鼠显示出显著的机械性痛觉过敏（图 7A）和冷痛（图 7B），其缩足阈值和缩足潜伏期分别急剧下降。所有剂量的抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 均可逆转机械性痛觉过敏，可见缩足阈值（图 7A）和冷痛（图 7B）的增加，并可见缩足潜伏期增加。这种逆转的程度和持续时间明显地剂量依赖，并且两个读数都与最高剂量 1mg/kg (1000 μ g/kg) 的普瑞巴林相当。单剂量施用时，1mg/kg 剂量的抗体 GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P 是有效的，相当于 30mg/kg 多剂量普瑞巴林，也显示抗 TrkA 抗体可以比普瑞巴林的标准治疗更低的剂量和更低的给药频率施用。

[0001]

序列表

<110> 格兰马克药品股份有限公司
 Glenmark Pharmaceuticals S.A.
 <120> 具有氨基酸取代的人源化抗TrkA抗体
 HUMANIZED ANTI-TRKA ANTIBODIES WITH AMINO ACID SUBSTITUTIONS
 <130> PCT
 <150> US 61/657,184
 <151> 2012-06-08
 <160> 116
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VH1区
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0002]

<210> 2
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VH2区

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 3
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VH3区

<400> 3

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

[0003]

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 4
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH4区

<400> 4

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

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

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

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

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

[0004]

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 5
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH5区

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 6

[0005]

<211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VL1区

<400> 6

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 7
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VL2区

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

[0006]

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL3区

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 9

[0007]

<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL4区

<400> 9

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 10
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL5区

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

[0008]

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 11

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL6区

<400> 11

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

Glu Glu Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 12

[0009]

<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL7区

<400> 12

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 13
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL8区

<400> 13

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

Glu Glu Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

[0010]

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重链可变区CDR1

<400> 14

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

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重链可变区CDR2

<400> 15

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

Gly

<210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重链可变区CDR3

[0011]

<400> 16

Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链可变区CDR1

<400> 17

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链可变区CDR2

<400> 18

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链可变区CDR3

<400> 19

His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr Phe
1 5 10

<210> 20

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MNAC13 VH区

[0012]

<400> 20

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 21

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MNAC13重链

<400> 21

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

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

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

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

[0013]

50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
	85	90
Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr		
	100	105
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Lys Thr Thr Pro Pro		
	115	120
Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met		
	130	135
Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
	145	150
Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
	165	170
Ala Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val		
	180	185
Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His		
	195	200
Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys		
	210	215
Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe		
	225	230
Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro		
	245	250
Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val		
	260	265
Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr		
	275	280
		285

[0014]

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
290 295 300

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
305 310 315 320

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
340 345 350

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
355 360 365

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn
385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
405 410 415

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 22

<211> 212

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MNAC13轻链

<400> 22

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

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

[0015]

	20		25		30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	35	40	45		
Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser	50	55	60		
Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu	65	70	75	80	
Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr	85	90	95		
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Asp Ala Ala Pro Thr	100	105	110		
Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala	115	120	125		
Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val	130	135	140		
Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser	145	150	155	160	
Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr	165	170	175		
Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys	180	185	190		
Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn	195	200	205		
Arg Asn Glu Cys	210				
<210>	23				
<211>	98				
<212>	PRT				
<213>	人				

[0016]

<220>

<221> VH3-23*01区

<222> (1).. (98)

<400> 23

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

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

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

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

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

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

Ala Lys

<210> 24

<211> 628

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人TrkA-Fc融合蛋白

<400> 24

Ala Ala Pro Cys Pro Asp Ala Cys Cys Pro His Gly Ser Ser Gly Leu
1 5 10 15

Arg Cys Thr Arg Asp Gly Ala Leu Asp Ser Leu His His Leu Pro Gly
20 25 30

Ala Glu Asn Leu Thr Glu Leu Tyr Ile Glu Asn Gln Gln His Leu Gln
35 40 45

His Leu Glu Leu Arg Asp Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Arg Asn Leu

[0017]

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

[0018]

Val Leu Asn Glu Thr Ser Phe Ile Phe Thr Glu Phe Leu Glu Pro Ala
290 295 300

Ala Asn Glu Thr Val Arg His Gly Cys Leu Arg Leu Asn Gln Pro Thr
305 310 315 320

His Val Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Leu Leu Ala Ala Asn Pro Phe Gly
325 330 335

Gln Ala Ser Ala Ser Ile Met Ala Ala Phe Met Asp Asn Pro Phe Glu
340 345 350

Phe Asn Pro Glu Asp Pro Ile Pro Val Ser Phe Ser Pro Val Asp Thr
355 360 365

Asn Ser Thr Ser Gly Asp Pro Val Glu Lys Lys Asp Glu Thr Pro Phe
370 375 380

Gly Val Ser Val Ala Val Gly Ala Ala Ala Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
385 390 395 400

Ser Gly Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
405 410 415

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
420 425 430

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
435 440 445

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
450 455 460

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
465 470 475 480

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
485 490 495

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
500 505 510

[0019]

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
515 520 525

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
530 535 540

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
545 550 555 560

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
565 570 575

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
580 585 590

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
595 600 605

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
610 615 620

Ser Pro Gly Lys
625

<210> 25
<211> 391
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 人TrkA胞外区
<222> (1).. (391)

<400> 25

Ala Ala Pro Cys Pro Asp Ala Cys Cys Pro His Gly Ser Ser Gly Leu
1 5 10 15

Arg Cys Thr Arg Asp Gly Ala Leu Asp Ser Leu His His Leu Pro Gly
20 25 30

Ala Glu Asn Leu Thr Glu Leu Tyr Ile Glu Asn Gln Gln His Leu Gln
35 40 45

[0020]

His Leu Glu Leu Arg Asp Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Arg Asn Leu
 50 55 60

Thr Ile Val Lys Ser Gly Leu Arg Phe Val Ala Pro Asp Ala Phe His
 65 70 75 80

Phe Thr Pro Arg Leu Ser Arg Leu Asn Leu Ser Phe Asn Ala Leu Glu
 85 90 95

Ser Leu Ser Trp Lys Thr Val Gln Gly Leu Ser Leu Gln Glu Leu Val
 100 105 110

Leu Ser Gly Asn Pro Leu His Cys Ser Cys Ala Leu Arg Trp Leu Gln
 115 120 125

Arg Trp Glu Glu Glu Gly Leu Gly Gly Val Pro Glu Gln Lys Leu Gln
 130 135 140

Cys His Gly Gln Gly Pro Leu Ala His Met Pro Asn Ala Ser Cys Gly
 145 150 155 160

Val Pro Thr Leu Lys Val Gln Val Pro Asn Ala Ser Val Asp Val Gly
 165 170 175

Asp Asp Val Leu Leu Arg Cys Gln Val Glu Gly Arg Gly Leu Glu Gln
 180 185 190

Ala Gly Trp Ile Leu Thr Glu Leu Glu Gln Ser Ala Thr Val Met Lys
 195 200 205

Ser Gly Gly Leu Pro Ser Leu Gly Leu Thr Leu Ala Asn Val Thr Ser
 210 215 220

Asp Leu Asn Arg Lys Asn Val Thr Cys Trp Ala Glu Asn Asp Val Gly
 225 230 235 240

Arg Ala Glu Val Ser Val Gln Val Asn Val Ser Phe Pro Ala Ser Val
 245 250 255

Gln Leu His Thr Ala Val Glu Met His His Trp Cys Ile Pro Phe Ser
 260 265 270

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

[0021]

275	280	285
Val Leu Asn Glu Thr Ser Phe Ile Phe Thr Glu Phe Leu Glu Pro Ala 290 295 300		
Ala Asn Glu Thr Val Arg His Gly Cys Leu Arg Leu Asn Gln Pro Thr 305 310 315 320		
His Val Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Leu Leu Ala Ala Asn Pro Phe Gly 325 330 335		
Gln Ala Ser Ala Ser Ile Met Ala Ala Phe Met Asp Asn Pro Phe Glu 340 345 350		
Phe Asn Pro Glu Asp Pro Ile Pro Val Ser Phe Ser Pro Val Asp Thr 355 360 365		
Asn Ser Thr Ser Gly Asp Pro Val Glu Lys Lys Asp Glu Thr Pro Phe 370 375 380		
Gly Val Ser Val Ala Val Gly 385 390		
<210> 26 <211> 453 <212> PRT <213> 人工序列		
<220> <223> BXhVH1重链		
<400> 26		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr 20 25 30		
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
Ser Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val 50 55 60		

[0022]

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

[0023]

290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu 305 310 315 320		
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala 325 330 335		
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro 340 345 350		
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln 355 360 365		
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala 370 375 380		
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr 385 390 395 400		
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu 405 410 415		
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser 420 425 430		
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser 435 440 445		
Leu Ser Pro Gly Lys 450		
<210> 27 <211> 453 <212> PRT <213> 人工序列		
<220> <223> BXhVH3重链		
<400> 27		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15		

[0024]

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

[0025]

	245		250		255
Leu Met Ile	Ser Arg Thr Pro Glu	Val Thr Cys Val Val	Val Asp Val		
	260	265	270		
Ser His Glu	Asp Pro Glu Val	Lys Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly Val		
	275	280	285		
Glu Val His	Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu	Glu Gln Tyr Asn Ser		
	290	295	300		
Thr Tyr Arg	Val Val Ser Val	Leu Thr Val Leu	His Gln Asp Trp Leu		
	305	310	315	320	
Asn Gly Lys	Glu Tyr Lys Cys Lys	Val Ser Asn Lys	Ala Leu Pro Ala		
	325	330	335		
Pro Ile Glu	Lys Thr Ile Ser Lys	Ala Lys Gly Gln Pro	Arg Glu Pro		
	340	345	350		
Gln Val Tyr	Thr Leu Pro Pro	Ser Arg Asp Glu	Leu Thr Lys Asn Gln		
	355	360	365		
Val Ser Leu	Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr	Pro Ser Asp Ile Ala		
	370	375	380		
Val Glu Trp	Glu Ser Asn Gly	Gln Pro Glu Asn	Asn Tyr Lys Thr Thr		
	385	390	395	400	
Pro Pro Val	Leu Asp Ser Asp	Gly Ser Phe Phe	Leu Tyr Ser Lys Leu		
	405	410	415		
Thr Val Asp	Lys Ser Arg Trp	Gln Gln Gly Asn	Val Phe Ser Cys Ser		
	420	425	430		
Val Met His	Glu Ala Leu His	Asn His Tyr Thr	Gln Lys Ser Leu Ser		
	435	440	445		
Leu Ser Pro	Gly Lys				
	450				

<210> 28

<211> 453

[0026]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BXhVH5重链

<400> 28

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

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

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

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

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

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

Ala	Arg	Gly	Ala	Met	Tyr	Gly	Asn	Asp	Phe	Phe	Tyr	Pro	Met	Asp	Tyr
			100					105					110		

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
		115					120					125			

Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
		130				135					140				

Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
145					150					155				160	

Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
				165					170					175	

Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
			180					185					190		

Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0027]

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

[0028]

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 29
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BXhVL1轻链

<400> 29

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

[0029]

145	150	155	160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser	165	170	175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala	180	185	190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe	195	200	205
Asn Arg Gly Glu Cys	210		
<210>	30		
<211>	213		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	BXhVL3轻链		
<400>	30		
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met	20	25	30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr	35	40	45
Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser	50	55	60
Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu	65	70	75
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr	85	90	95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro	100	105	110

[0030]

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 31
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GBR VH5(K3Q)重链可变区

<400> 31

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

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

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

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

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

[0031]

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 32
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GBR VH5(V37A)重链可变区

<400> 32

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 33
<211> 123

[0032]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (G42E) 重链可变区

<400> 33

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

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

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 34

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (V89L) 重链可变区

<400> 34

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

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

[0033]

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 35

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5(R94K)重链可变区

<400> 35

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

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

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

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

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

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

[0034]

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 36
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GBR VH5 (K3Q, V37A) 重链可变区

<400> 36

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 37
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

[0035]

<220>

<223> GBR VH5 (K3Q, T40A) 重链可变区

<400> 37

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 38

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (P60A, T62S) 重链可变区

<400> 38

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

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

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

[0036]

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 39

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (K3Q, V37A, R44C) 重链可变区

<400> 39

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr

[0037]

	100		105		110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	115		120		
<210> 40					
<211> 123					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> GBR VH5 (K3Q, A49S, Y50A) 重链可变区					
<400> 40					
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	1	5	10		15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr		20	25		30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val		35	40		45
Ser Ala Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val		50	55		60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		65	70		75
					80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		85	90		95
Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr		100	105		110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	115		120		
<210> 41					
<211> 123					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> GBR VH5 (K3Q, P60A, T62S) 重链可变区					

[0038]

<400> 41

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 42

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5(K3Q, T40A, P60A, T62S)重链可变区

<400> 42

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[0039]

50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr	Ile Ser Arg Asp Asn Ser	Lys Asn Thr Leu Tyr
65	70	75 80
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90 95
Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr		
100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210> 43		
<211> 123		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> GBR VH5 (K3Q, V37A, T40A, P60A, T62S) 重链可变区		
<400> 43		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr		
20	25	30
Thr Met Ser Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr	Ile Ser Arg Asp Asn Ser	Lys Asn Thr Leu Tyr
65	70	75 80
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90 95
Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr		
100	105	110

[0040]

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

<210> 44
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A) 重链可变区

<400> 44

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 45
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GBR VH5 (K3Q, A49S, Y50A, P60A, T62S) 重链可变区

<400> 45

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

[0041]

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

<210> 46
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A, P60A, T62S) 重链可变区

<400> 46

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

[0042]

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 47

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A, P60A, T62S, R94K) 重链可变区

<400> 47

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

[0043]

<210> 48
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH1(V37A)重链可变区

<400> 48

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 49
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH3(V37A)重链 可变区

<400> 49

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

[0044]

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 50

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (K3Q) 重链IGHG1

<400> 50

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

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

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

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

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

[0045]

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

[0046]

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 51

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (V37A) 重链IGHG1

<400> 51

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

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

[0047]

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

[0048]

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 52

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

[0049]

<220>

<223> GBR VH5(V37A)重链IGHG4 S228P

<400> 52

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

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

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

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

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

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

Ala	Arg	Gly	Ala	Met	Tyr	Gly	Asn	Asp	Phe	Phe	Tyr	Pro	Met	Asp	Tyr
			100					105					110		

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
		115					120					125			

Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser
	130					135					140				

Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
145					150					155					160

Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
				165					170					175	

Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
			180					185					190		

Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val
		195					200					205			

[0050]

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

[0051]

435
 Gly Lys
 450

 <210> 53
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> GBR VH5 (G42E) 重链IGHG1

 <400> 53

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

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

 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

 Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110

 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

[0052]

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

[0053]

385		390		395		400
Pro Pro Val	Leu Asp Ser Asp Gly Ser	Phc Phc Leu Tyr Ser Lys Leu				
	405		410		415	
Thr Val Asp	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser					
	420		425		430	
Val Met His	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser					
	435		440		445	
Leu Ser Pro Gly Lys						
450						
<210>	54					
<211>	453					
<212>	PRT					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	GBR VH5 (V89L) 重链IGHG1					
<400>	54					
Glu Val Lys	Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					
1	5		10		15	
Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr					
	20		25		30	
Thr Met Ser	Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val					
	35		40		45	
Ala Tyr Ile	Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val					
	50		55		60	
Lys Gly Arg	Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr					
65	70		75		80	
Leu Gln Met	Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys					
	85		90		95	
Ala Arg Gly	Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr					
	100		105		110	

[0054]

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

[0055]

340	345	350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
355	360	365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
370	375	380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
385	390	395
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
405	410	415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
420	425	430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
435	440	445
Leu Ser Pro Gly Lys		
450		
<210> 55		
<211> 453		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> GBR VH5 (R94K) 重链IGHG1		
<400> 55		
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr		
20	25	30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val		
50	55	60

[0056]

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

[0057]

290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu 305	310	315 320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala 325	330	335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro 340	345	350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln 355	360	365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala 370	375	380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr 385	390	395 400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu 405	410	415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser 420	425	430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser 435	440	445
Leu Ser Pro Gly Lys 450		
<210> 56		
<211> 453		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> GBR VH5 (K3Q, V37A) 重链IGHG1		
<400> 56		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1	5	10 15

[0058]

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

[0059]

	245		250		255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	260		265		270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	275		280		285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	290		295		300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	305		310		315
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala	325		330		335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro	340		345		350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln	355		360		365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala	370		375		380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	385		390		395
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu	405		410		415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	420		425		430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser	435		440		445
Leu Ser Pro Gly Lys	450				
<210> 57					
<211> 450					

[0060]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (K3Q, V37A) 重链IGHG4 S228P

<400> 57

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

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

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

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

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

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

Ala	Arg	Gly	Ala	Met	Tyr	Gly	Asn	Asp	Phe	Phe	Tyr	Pro	Met	Asp	Tyr
		100						105					110		

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
		115					120					125			

Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser
	130					135					140				

Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
145					150					155				160	

Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
				165					170					175	

Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
		180						185					190		

Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0061]

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

[0062]

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 58
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (K3Q, T40A) 重链IGHG1

<400> 58

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

[0063]

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

[0064]

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 59
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GBR VH5 (P60A, T62S) 重链IGHG1

<400> 59

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr

[0065]

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

[0066]

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 60
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GBR VH5 (K3Q, V37A, R44G) 重链IGHG1

<400> 60

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

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

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

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

[0067]

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

[0068]

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 61
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GBR VII5 (K3Q, A49S, Y50A) 重链IGHG1

<400> 61

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

[0069]

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

[0070]

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

[0071]

<210> 62

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VII5(K3Q, P60A, T62S)重链IGHG1

<400> 62

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

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

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

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

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

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

Ala	Arg	Gly	Ala	Met	Tyr	Gly	Asn	Asp	Phe	Phe	Tyr	Pro	Met	Asp	Tyr
		100						105					110		

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
		115					120					125			

Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
		130				135					140				

Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
145					150					155				160	

Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
				165					170					175	

Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
			180					185					190		

[0072]

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

[0073]

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 63

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (K3Q, T40A, P60A, T62S) 重链IGHG1

<400> 63

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

[0074]

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

[0075]

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 64
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GBR VH5 (K3Q, V37A, T40A, P60A, T62S) 重链IGHG1

<400> 64

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

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

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

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

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

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

[0076]

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

[0077]

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 65
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A) 重链IGHG1

<400> 65

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

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

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

[0078]

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

[0079]

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 66

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VII5 (K3Q, A49S, Y50A, P60A, T62S) 重链IGHG1

[0080]

<400> 66

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

[0081]

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

[0082]

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 67

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5(K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A, P60A, T62S) 重链IGHG1

<400> 67

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

[0083]

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

[0084]

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 68

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A, P60A, T62S, R94K) 重链IGHG1

<400> 68

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

[0085]

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

[0086]

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 69
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GBR VH1 (V37A) 重链IGHG1

<400> 69

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

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

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

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

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

[0087]

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

[0088]

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 70

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH3(V37A)重链IGHG1

<400> 70

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

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

[0089]

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

[0090]

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 71

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

[0091]

<220>

<223> 人源化MNAC13的VH区

<400> 71

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 72

<211> 796

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 人TrkA

<222> (1)..(796)

<400> 72

Met Leu Arg Gly Gly Arg Arg Gly Gln Leu Gly Trp His Ser Trp Ala
1 5 10 15

Ala Gly Pro Gly Ser Leu Leu Ala Trp Leu Ile Leu Ala Ser Ala Gly
20 25 30

[0092]

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

[0093]

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

[0094]

Phe Ser Asp Ala Cys Val His His Ile Lys Arg Arg Asp Ile Val Leu
500 505 510

Lys Trp Glu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu
515 520 525

Cys His Asn Leu Leu Pro Glu Gln Asp Lys Met Leu Val Ala Val Lys
530 535 540

Ala Leu Lys Glu Ala Ser Glu Ser Ala Arg Gln Asp Phe Gln Arg Glu
545 550 555 560

Ala Glu Leu Leu Thr Met Leu Gln His Gln His Ile Val Arg Phe Phe
565 570 575

Gly Val Cys Thr Glu Gly Arg Pro Leu Leu Met Val Phe Glu Tyr Met
580 585 590

Arg His Gly Asp Leu Asn Arg Phe Leu Arg Ser His Gly Pro Asp Ala
595 600 605

Lys Leu Leu Ala Gly Gly Glu Asp Val Ala Pro Gly Pro Leu Gly Leu
610 615 620

Gly Gln Leu Leu Ala Val Ala Ser Gln Val Ala Ala Gly Met Val Tyr
625 630 635 640

Leu Ala Gly Leu His Phe Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys
645 650 655

Leu Val Gly Gln Gly Leu Val Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser
660 665 670

Arg Asp Ile Tyr Ser Thr Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly Arg Thr Met
675 680 685

Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro Pro Glu Ser Ile Leu Tyr Arg Lys Phe
690 695 700

Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile
705 710 715 720

[0095]

Phe Thr Tyr Gly Lys Gln Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Thr Glu Ala
725 730 735

Ile Asp Cys Ile Thr Gln Gly Arg Glu Leu Glu Arg Pro Arg Ala Cys
740 745 750

Pro Pro Glu Val Tyr Ala Ile Met Arg Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro
755 760 765

Gln Gln Arg His Ser Ile Lys Asp Val His Ala Arg Leu Gln Ala Leu
770 775 780

Ala Gln Ala Pro Pro Val Tyr Leu Asp Val Leu Gly
785 790 795

<210> 73
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> GBR VH5 (K3Q) 重链可变区cDNA

<400> 73
gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagaactg 60
agctgtgccg ccagcgggett cacccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
cccggcaagc ggetggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag caccctactac 180
cccgaacccg tgaaggcccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
atgtacggca acgaattctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagc 369

<210> 74
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> GBR VII5 (V37A) 重链可变区cDNA

<400> 74
gaagtgaaac tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagaactg 60
agctgtgccg ccagcgggett cacccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacagacc 120

[0096]

cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcget 300
 atgtacggca acgacttctt ctacctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagc 369

<210> 75
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (G42E) 重链可变区cDNA

<400> 75
 gaagtgaac tgctggaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggett caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccgaaaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcget 300
 atgtacggca acgacttctt ctacctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagc 369

<210> 76
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (V89L) 重链可变区cDNA

<400> 76
 gaagtgaac tgctggaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggett caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccctgt actactgtgc cagaggcget 300
 atgtacggca acgacttctt ctacctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360

[0097]

gtgtctagc 369

<210> 77
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (R94K) 重链可变区cDNA

<400> 77
 gaagtgaaac tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccageggcctt caccttcage acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gggaggcag cacctactac 180
 ccgacaccg tgaagggccg gttcaccate agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagectgcg ggccaggac accgccgtgt actactgtgc caaggcget 300
 atgtacggca acgaattctt ctacctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagc 369

<210> 78
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (K3Q, V37A) 重链可变区cDNA

<400> 78
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccageggcctt caccttcage acctacacca tgagctgggc ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gggaggcag cacctactac 180
 ccgacaccg tgaagggccg gttcaccate agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagectgcg ggccaggac accgccgtgt actactgtgc cagagcget 300
 atgtacggca acgaattctt ctacctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagc 369

<210> 79
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

[0098]

<223> GBR VII5 (K3Q, T40A) 重链可变区cDNA

<400> 79

```

gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg    60
agctgtgccg ccageggctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacaggee    120
cccggaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac    180
cccacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac    240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct    300
atgtacggca acgaattctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc    360
gtgtetagc                                     369

```

<210> 80

<211> 369

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (P60A, T62S) 重链可变区cDNA

<400> 80

```

gaagtgaaac tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg    60
agctgtgccg ccageggctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc    120
cccggaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac    180
gccacacgc tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac    240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct    300
atgtacggca acgaattctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc    360
gtgtetagc                                     369

```

<210> 81

<211> 369

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (K3Q, V37A, R44G) 重链可变区cDNA

<400> 81

```

gaagtgcagc tgetggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg    60
agctgtgccg ccageggctt caccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacagacc    120
cccggaagg ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac    180

```

[0099]

```

cccgacaccg tgaagggccg gttcaccate agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcget 300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagc 369

```

<210> 82
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (K3Q, A49S, Y50A) 重链可变区cDNA

```

<400> 82
gaagtgcagc tgctggaaag cgccggagge ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggett caccctcage acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
cccgcaagc ggctggaatg ggtgagcgcc atcagcaagg gccgaggcag cactactac 180
cccgacaccg tgaagggccg gttcaccate agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcget 300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagc 369

```

<210> 83
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (K3Q, P60A, T62S) 重链可变区cDNA

```

<400> 83
gaagtgcagc tgctggaaag cgccggagge ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggett caccctcage acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
cccgcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gccgaggcag cactactac 180
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccate agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcget 300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagc 369

```

[0100]

<210> 84
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (K3Q, T40A, P60A, T62S) 重链可变区cDNA

<400> 84
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggagge ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcgtt caccttcage acctacacca tgagctgggt ccgacaggcc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcget 300
 atgtacggca acgacttett ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctage 369

<210> 85
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (K3Q, V37A, T40A, P60A, T62S) 重链可变区cDNA

<400> 85
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggagge ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcgtt caccttcage acctacacca tgagctgggc ccgacaggcc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcget 300
 atgtacggca acgacttett ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctage 369

<210> 86
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A) 重链可变区cDNA

<400> 86

[0101]

```

gaagtgcagc tgctggaaag cggcggagge ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg      60
agetgtgccg ccageggett cacettcage acctacacca tgagctgggt ccgacaggee      120
cccggaagg gcctggaatg ggtgagcgcc atcagcaagg gcggaggcag cacctactac      180
ccgacacccg tgaaggcccg gtaccaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct      300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc      360
gtgtctagc                                     369

```

<210> 87
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (K3Q, A49S, Y50A, P60A, T62S) 重链可变区cDNA

```

<400> 87
gaagtgcagc tgctggaaag cggcggagge ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg      60
agetgtgccg ccageggett cacettcage acctacacca tgagctgggt ccgacagacc      120
cccggaagg gcctggaatg ggtgagcgcc atcagcaagg gcggaggcag cacctactac      180
ccgacacccg tgaaggcccg gtaccaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct      300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc      360
gtgtctagc                                     369

```

<210> 88
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A, P60A, T62S) 重链可变区cDNA

```

<400> 88
gaagtgcagc tgctggaaag cggcggagge ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg      60
agetgtgccg ccageggett cacettcage acctacacca tgagctgggt ccgacaggee      120
cccggaagg gcctggaatg ggtgagcgcc atcagcaagg gcggaggcag cacctactac      180
ccgacacccg tgaaggcccg gtaccaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct      300

```

[0102]

atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360

gtgtctagc 369

<210> 89

<211> 369

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A, P60A, T62S, R94K) 重链可变区cDNA

<400> 89

gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaaag cctgagaactg 60

agetgtgecg ccageggctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacaggec 120

cccggcaagg gectggaatg ggtgagcgcc atcagcaagg gcgaggcag cacctactac 180

gccgacagcg tgaagggcg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc caagggecgt 300

atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360

gtgtctagc 369

<210> 90

<211> 369

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH1 (V37A) 重链可变区cDNA

<400> 90

gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggg ctggtgcagc caggcggcag cctgaggctg 60

tectgegecg ccageggctt caccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacaggec 120

ccaggcaagg gectggaatg ggtgtcctac atcagcaagg gcggaggaag cacctactac 180

cccgaacccg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggegcc 300

atgtacggca acgacttttt ctaccccatg gactactggg ggcagggcac caccgtgacc 360

gtgtctagc 369

<210> 91

<211> 369

<212> DNA

[0103]

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH3 (V37A) 重链可变区cDNA

<400> 91

```

gaagtgcagc tgcctgaaag cgccggaggc ctggtgcagc caggcggcag cctgaggetg      60
tcctgcgcgc ccagcggett caccctcagc acctacacca tgagctgggc ccgacagacc      120
cccggcaaga ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggaaag caccctactac      180
cccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac      240
ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgcctgtg actactgcgc caaggcgccc      300
atgtacggca acgacttttt ctaccccatg gactactggg ggcagggcac caccgtgacc      360
gtgtctagc                                     369

```

<210> 92

<211> 1359

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (K3Q) 重链IGHG1 cDNA

<400> 92

```

gaagtgcagc tgcctgaaag cgccggaggc ctggtgcagc ctggcggaaag cctgagactg      60
agctgtgcgc ccagcggett caccctcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc      120
cccggcaaga ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag caccctactac      180
cccgacaccg tgaagggcgc gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgtg actactgtgc cagaggcgct      300
atgtacggca acgacttttt ctaccccatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc      360
gtgtctagcg cgtcgaccaa ggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc      420
accagcgggc gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg      480
accgtgtect ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaacttccc egccgtgctc      540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga      600
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca aaccaaggt ggacaagaag      660
gtggagccca agagctgcga caagaccac accctcccc cctgccctgc ccctgagctg      720
ctggggcgac cctcctgttt cctgttccc cccaagecca aggacacct gatgatcagc      780
eggaccccc aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggaccc tgaggtgaag      840

```

[0104]

```

ttcaattggg acgtggacgg cgtggagggtg cacaacgcca agaccaagcc cggggaggaa 900
cagtacaaca gcacctaccg ggtgggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggttg 960
aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgctgccc catcgaaaag 1020
accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacacct gccccctcc 1080
egggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggatgaaggg cttctacccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
ccccctgtgc tggacagcga eggcagcttc ttctgttaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgagge cctgcacaa 1320
cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

```

<210> 93

<211> 1359

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5(V37A)重链IGHG1 cDNA

<400> 93

```

gaagtgaaac tgetggaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggag cctgagactg 60
agctgtgccc ccagcggett caccctcagc acctacacca tgagctgggc ccgacagacc 120
cccggcaagg ggetggaatg ggtggcctac atcagcaagg ggggaggcag caccctactac 180
cccgacaccg tgaaggcgcg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcccgtg actactgtgc cagaggcgt 300
atgtacggca acgaattctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
accagcggcg gcacagccgc cctgggtgtc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg 480
accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acacctccc cgcctgtctc 540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
acceagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc cctgagctg 720
ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacacct gatgatcagc 780
cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggaccc tgaggtgaag 840

```

[0105]

```

ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgetgaccg tgetgcacca ggactggctg 960
aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgcttgcctc cctcgaaaag 1020
accatcagca aggccaaagg ccagcccagg gagcccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
cgggacgagc tgaccaagaa ccagggtgcc ctgacctgtc tggatgaagg cttctacccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac gccagcccc agaacaacta caagaccacc 1200
ccccctgtgc tggacagega cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
agccggtggc agcagggcaa cgtgttcage tgetccgtga tgcacgagc cctgcacaac 1320
cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

```

<210> 94

<211> 1350

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (V37A) 重链IGHG4 S228P cDNA

<400> 94

```

gaagtgaaac tgctgaaag cggcggaggc ctggtgcage ctggcggaag cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggcctt caccttcage acctacacca tgagctgggc ccgacagacc 120
cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gccgagcag cacctaactac 180
cccgacaccg tgaagggccg gttcaccate agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg gcccgaggac accgcctgt actactgtgc cagaggcgt 300
atgtacggca acgacttctt ctacctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctageg cgtcgaccaa gggccccage gtgttcccc tggeccccctg cagcagaagc 420
accagcgagt ccacagccgc cctgggctgt ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg 480
accgtgtcct ggaacagegg agccctgacc agcggcgtgc acaccttccc cgcctgtctg 540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcage gtggtgacag tgcccagcag cagcctgggc 600
accaagacct acacctgcaa cgtggaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagagg 660
gtggagagca agtaaggccc acctgcccc ccatgccag cccccagtt cctgggcgga 720
ccctccgtgt tctgttccc ccccaagccc aaggacaccc tgatgatcag caggaccccc 780
gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgagc caggaggacc cagaggacca gtccaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaage ccagagagga gcagtttaac 900

```

[0106]

```

agcacctaca ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag    960
gaataacaagt gcaaggtctc caacaagggc ctgccagct ccatcgagaa aaccatcage    1020
aaggccaagg gccagccacg ggagcccccag gtgtacaccc tgcacccctc ccaggaggag    1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc ctggtgaagg gcttctaccc cagcgacatc    1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg    1200
ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaggctga cctgggacaa gtccagggtg    1260
caggagggca acgtcttttag ctgcagcgtg atgcacgagg cctgcacaa ccactacacc    1320
cagaagagcc tgagcctgtc cctgggcaag    1350

```

<210> 95

<211> 1359

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VII5 (G42E) 重链IGHI1 cDNA

<400> 95

```

gaagtgaac tgctgaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg    60
agctgtgccg ccagcggett cacctteagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc    120
cccgaaaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac    180
cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa cacctgtac    240
ctgcagatga acagcctgeg ggccgaggac accgcctgt actactgtgc cagagcget    300
atgtacggca acgacttctt ctaccctaig gactactggg gccagggcac caccgtgacc    360
gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagage    420
accagcggcg gcacagccgc cctgggetgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccggtg    480
accgtgtect ggaactctgg agecctgacc tccggcgtgc acacttccc cgccgtgctc    540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcacagcag cagcctggga    600
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag    660
gtggagccca agagctgca caagaccac acctgcccc cctgcctgc cctgagctg    720
ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagcca aggacacct gatgatcage    780
cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacce tgaggtgaag    840
ttcaattggt acgtggacgg cgtggagggt cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa    900

```

[0107]

cagtacaaca gcacctaccg ggtgggtgtcc gtgctgaccg tgetgcacca ggactggetg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctec aacaaggccc tgeetgeccc categaaaag 1020
 accatcagca aggecaaggg ccagcccagg gagecccagg tgtacaccct gccccctec 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccagggtgtc ctgacctgtc tggatgaaggg cttctacccc 1140
 agegacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 cccccgtgtc tggacagcga cggcagcttc ttctgttaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agecgggtgc agcagggeaa cgtgttcage tgcctcgtga tgcacgagge cctgcacaac 1320
 cactacaccc agaagagcct gagecgtgtc cccggcaag 1359

<210> 96
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (V89L) 重链IGHG1 cDNA

<400> 96
 gaagtgaac tgetggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccc ccagcggctt caecttcage acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg ggggagcag caccactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgtgc cagaggcgt 300
 atgtacgca acgacttctt ctacctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acacttccc cgccgtgtc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgeccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagecca agagctgcga caagaccac accctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
 ctgggaggac cctcctgtgt cctgttcccc cccaagccca aggacacct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggagggt cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtgggtgtc gtgctgaccg tgetgcacca ggactggetg 960

[0108]

```

aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgccctgccc catcgaaaag 1020
accatcagca aggccaaagg ccagcccagg gagecccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
egggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggatgaagg cttctacccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcctcgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

```

<210> 97
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (R94K) 重链IGHG1 cDNA

```

<400> 97
gaagtgaaac tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggcct caccctcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
cccggaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag caccctactac 180
cccgacaccc tgaagggccg gtccaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgtg actactgtgc caagggcct 300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttccgc tagccccag cageaagagc 420
accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg 480
accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acacttccc cgcctgtctc 540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgcectgc cctgagctg 720
ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacce tgaggtgaag 840
ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgtgaccg tgtgcacca ggaactggtg 960

```

[0109]

```

aacggcaagg aatacaagtg caaggtetec aacaaggccc tgccctgcccc catcgaaaag 1020
accatcagca aggecaaggg ceagcccagg gageccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
cgggacgagc tgaccaagaa ceaggtgtcc ctgacctgtc tggatgaagg ctcttaccce 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccc agaacaacta caagaccacc 1200
ccccctgtgc tggacagcga eggcagcttc ttctgttaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
agccggtggc agcagggcaa cgtgttcage tgcctcgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
cactacaccc agaagagcct gaggctgtcc cccggcaag 1359

```

<210> 98
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VII5 (K3Q, V37A) 重链IGH1 cDNA

```

<400> 98
gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
agetgtgccg ceagcggett caccttcage acctacacca tgagctgggc ccgacagacc 120
cccgcaagc ggttggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
atgtaeggca acgacttctt ctacctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagcg cgtcgaccaa ggccccage gtgttccgc tagccccag cagcaagagc 420
accagcgccg gcacagccgc cctgggetgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg 480
accgtgtcct ggaactotgg agcctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgcctgtctc 540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
aaccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccaga acaccaaggt ggacaagaag 660
gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc cctgagctg 720
ctggcgaggc cctccgtgtt cctgttcccc cccaagecca aggacaccct gatgatcagc 780
cggacccccg aggtgacctg cgtggtgggt gacgtgagcc acgaggacce tgaggtgaag 840
ttcaattggt acgtggacgg cgtggagggt cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgtgaccc tgetgcacca ggactggetg 960
aacggcaagg aatacaagtg caaggtetec aacaaggccc tgccctgcccc catcgaaaag 1020

```

[0110]

accatcagea aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctec 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccagggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaaggg cttctacccc 1140
 agegacateg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 cccctgtgtc tggacagega cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcctcgtga tgcaagaggc cctgcacaa 1320
 cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 99
 <211> 1350
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VI5(K3Q, V37A) 重链IGHG4 S228P cDNA

<400> 99
 gaagtgcagc tgcctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggctt caccctcagc acctacacca tgagctgggc ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggcctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctaactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gtccaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgt 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa ggccccagc gtgttcccc tggccccctg cagcagaagc 420
 accagcgagt ccacagccgc cctgggctgt ctggtgaagg actacttccc cgagcccggtg 480
 accgtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggcggtgc acaccttccc cgcctgtctg 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctgggc 600
 accaagacct acacctgcaa cgtggaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagagg 660
 gtggagagea agtaeggccc accctgcccc ccatgeccag cccccgagtt cctgggcgga 720
 ccctccgtgt tctgttccc ccccaagccc aaggacacc tgatgateag caggaccccc 780
 gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgagc caggaggacc cagaggtcca gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagttaac 900
 agcacctaca ggggtgtgtc cgtgctgacc gtctgcacc aggactggct gaacggcaag 960
 gaatacaagt gcaaggtctc caacaagggc ctgccagct ccatcgagaa aaccatecag 1020

[0111]

aaggccaagg gccagccacg ggagccccag gtgtacaccc tgccaccctc ccaggaggag 1080
 atgaccaaga accagggtgtc cctgacctgc ctggtgaagg gcttetaccc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cgccagccgc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
 ctggacacgc acggcagctt cttcctgtac agcaggctga ccgtggacaa gtccagggtg 1260
 caggagggca acgtcttttag ctgcagcgtg atgcacgagg cctgcacaa ccactacacc 1320
 cagaagagcc tgagcctgtc cctgggcaag 1350

<210> 100
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VII5(K3Q,T40A)重链 IGHG1 cDNA

<400> 100
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggtt caccctcagc acctacacca tgagctgggt ccgacaggcc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
 cccgacacgg tgaaggggcg gttcaccate agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg gcccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctacctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acacctccc cgccgtgctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc cctgagctg 720
 ctggcgggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagecca aggacacct gatgatecgc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggagggtg cacaacgcc aagaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtctgaccg tgctgcacca ggactggetg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacacct gccccctec 1080

[0112]

egggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggatgaaggg ctctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 cccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcctcgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 cactacacc cagaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 101

<211> 1359

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (P60A, T62S) 重链IGHG1 cDNA

<400> 101

gaagtgaaac tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcgggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggcg gtaccaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctcgc ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgaattctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agcctgacc tccggcgtgc acacttccc cgccgtgtc 540
 cagagcagcg gctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagecca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgcctgc cctgagctg 720
 ctggcgggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
 cggacccccc aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag 840
 ttcaattggc acgtggacgg cgtggagggt cacaacgcca agaccaagcc cggggaggaa 900
 cagtacaaca gcaectaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggtg 960
 aacggcaagg aatacaagt caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaanaag 1020
 accatcagca agccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080

[0113]

egggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggatgaagg cttctacecc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 cccctgtgct tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcctcgtga tgcacgaggc cctgcacaa 1320
 cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 102
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (K3Q, V37A, R44G) 重链IGHG1 cDNA

<400> 102
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggctt caccctcagc acctacacca tgagctgggc ccgacagacc 120
 cccggcaagg ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg ggggaggcag caccctactac 180
 cccgacaccg tgaaggggcg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgt 300
 atgtacggca acgaetfctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccggt 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acacttccc cgccgtgtc 540
 cagagcagcg gccgttacag cctgagcagc gtggtgacag tgcacagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgca caagacccac acctgcccc cctgcccgtc cctgagctg 720
 ctgggcggac cctcctgtgt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatecag 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgtgaccg tctgcacca ggaactggtg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggecc tgcctgcccc cctgaaaaag 1020
 accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggatgaagg cttctacecc 1140

[0114]

agcgacatcg cctggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 cccctgtgctc tggacagcga eggeagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccgggtggc agcagggcaa cgtgttccagc tgctccgtga tgcacgagge cctgcacaa 1320
 cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 103

<211> 1359

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (K3Q, A49S, Y50A) 重链IGHG1 cDNA

<400> 103

gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaaag cctgagactg 60
 agctgtgcgc ccagcggctt caccctcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtgagcgc atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggcgc gtccaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgt 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagccctg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acacttccc cgccgtgtc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac accgtccccc cctgccctgc ccctgagctg 720
 ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacct tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggtg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgccctgccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaaggg cttctacccc 1140

[0115]

agegacateg ccgtaggagtg ggagagcaac ggccageccg agaacaacta caagaccacc 1200
 cccctgtgtc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agecgggtggc agcagggcaa cgtgttcage tgcctcgtga tgcaegagge cctgcacaac 1320
 cactacaccc agaagagcct gaggctgtcc cccggcaag 1359

<210> 104
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5(K3Q,P60A,T62S)重链IGHG1 cDNA

<400> 104
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaaag cctgagactg 60
 agetgtgceg ccageggett caacctcage acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggettggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggecg gttcaccatc agecgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgtg actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctacctatg gactactggg gccagggca caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccage gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggtgcg ctggtgaagg actaettccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agcctgacc tccggcgtgc acaccttccc cggcgtgctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca aaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgca caagaccac acctgcccc cctgcccgc cctgagctg 720
 ctgggaggac cctcgtgtt cctgttcccc cccaagecca aggacacct gatgatecag 780
 eggaccccc aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacce tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggagggt cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgtgaccg tgetgcacca ggactggtg 960
 aacggcaagg aatacaagt caaggtctcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacacct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggtaagggt cttctacccc 1140
 agegacateg ccgtaggagtg ggagagcaac ggccageccg agaacaacta caagaccacc 1200

[0116]

ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttectgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 105
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (K3Q, T40A, P60A, T62S) 重链IGHG1 cDNA

<400> 105
 gaagtgcagc tgcctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagaactg 60
 agctgtgccg ccagcggctt caccctcagc acctacaacca tgagctgggt ccgacaggcc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcgaggcag caccctactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccate agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg gcccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagagcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctacctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccage gtgttccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg 480
 accgtgtcct ggaactcttg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgtct 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagecca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
 ctgggaggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagecca aggacacct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaggacce tgaggtgaag 840
 ttcaatttgt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtgggtgtc gtgtgaccc tgctgcacca ggactggtg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagea aggccaaagg ccagcccagg gagecccagg tgtacacct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccagggtgtc ctgacctgtc tgggtgaagg etttctacccc 1140
 agegacateg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1200

[0117]

ccccctgtgc tggacagega cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agecgggtgga agcagggcaa cgtgttcaga tgetccgtga tgcacaggga cctgcacaac 1320
 cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 106
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (K3Q, V37A, T40A, P60A, T62S) 重链IGHG1 cDNA

<400> 106
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcage ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgcgc ccagcggctt caccttcage acctacacca tgagctgggc ccgacaggcc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggcgc gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcget 300
 atgtacggca acgacttett ctacctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggecccage gtgttccgc tgecccag cagcaagagc 420
 accageggcg gcacagecgc cctgggctgc ctggtgaagg actacitccc cgagcccggtg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acacctccc cgcctgtctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcage gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccaga acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagetgcga caagaccac acctgcccc cctgcccige cctgagctg 720
 ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc ccaagccca aggacacct gatgatcage 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggatgaag 840
 ttaatttgt acgtggacgg cgtggagggt cacaacgcca agaccaagcc cggggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtgggtgtc gtgtgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagt caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca agccaaggc ccagcccagg gagccccagg tgtacacct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccagggtgtc ctgacctgtc tggatgaagg cttctacccc 1140
 agegacateg cgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 cccccctgtgc tggacagega cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260

[0118]

agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgetcegtga tgcaegagge cctgcacaa 1320
cactacaccc agaagagcct gagcctgtec cccggcaag 1359

<210> 107
<211> 1359
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A) 重链IGHG1 cDNA

<400> 107
gaagtgcagc tgctggaaag cggcggagge ctggtgcagc ctggcggaag cctgagaactg 60
agctgtgccg ccageggctt caccctcagc acctacacca tgagetgggt ccgacaggcc 120
cccggcaagg gcctggaatg ggtgagcgcc atcagcaagg gcggaggcag caccctactac 180
cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttccgc tagccccag cagcaagagc 420
accagcgggc gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acacttccc cgccgtgctc 540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcceagcag cagcctggga 600
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
gtggagccca agagctgga caagaccac acctgcccc cctgcccctgc cctgagctg 720
ctggcgggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacacct gatgatcagc 780
cggaccccc aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag 840
ttcaatttgt acgtggacgg cgtggagggt cacaagccca agaccaagcc cggggaggaa 900
cagtacaaca gcacctaccg ggtgggtgtec gtgctgaccg tgetgcacca ggactggctg 960
aacggcaagg aatacaagt caaggtctec aacaagccc tgccctgcccc catcgaaaag 1020
accatcagca aggccaaagg ccagcccagg gageccccag tgtaeacct gccccctcc 1080
cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggatgaagg cttctacccc 1140
agegacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagccc agaacaacta caagaccacc 1200
ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260

[0119]

agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac	1320
cactacaccc agaagagcct gagectgtcc cccggcaag	1359
<210> 108	
<211> 1359	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> GBR VII5 (K3Q, A49S, Y50A, P60A, T62S) 重链IGHG1 cDNA	
<400> 108	
gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctgggtgcagc ctggcggaag cctgagactg	60
agctgtgccg ccagcggcctt cacccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc	120
cccggaagc ggcctggaatg ggtgagcgcc atcagcaagg gcggaggcag caccctaactac	180
gccgacagcg tgaagggcgc gtccaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac	240
ctgcagatga acagcctggc ggccgaggac accgcctgtt actactgtgc cagaggcgct	300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc	360
gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc	420
accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctgggtgaagg actacttccc cgagcccgctg	480
accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acacttccc cgccgtgttc	540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtgggtgacag tgcccagcag cagcctggga	600
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag	660
gtggagccca agagctgcca caagaccac acctgcccc cctgcccctgc cctgagctg	720
ctgggcggac cctccgtgtt cctgttccc cccaagccca aggacacct gatgatcagc	780
eggaccccc aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag	840
ttcaatttgt acgtggaagg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa	900
cagtacaaca gcacctaccg ggtgggtgtc gtgctgacc tgetgcacca ggaactggtg	960
aacggcaagg aatacaagtg caaggctctc aacaaggccc tgcctgcccc cctgaaaaag	1020
accatcagca aggcccaagg ccagcccagg gagccccagg tgtacacct gcccccctcc	1080
cgggacgagc tgaccaagaa ccagggtgtc ctgacctgtc tgggtgaagg cttctacccc	1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagccc agaacaacta caagaccacc	1200
ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag	1260
agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac	1320

[0120]

cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 109

<211> 1359

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A, P60A, T62S) 重链IGHG1 cDNA

<400> 109

gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacaggcc 120
cccggcaagg gcctggaatg ggtgagcgcc atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagectgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggeget 300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttccgc tagccccag cagcaagagc 420
accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg 480
accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaecttccc cgccgtgcte 540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgcccctgc cctgagctg 720
ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacce tgaggtgaag 840
ttcaattggt acgtggacgg cgtggagggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
cagtacaaca geaectaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggetg 960
aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgccctgcccc catcgaaaag 1020
accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggatgaagg cttctacccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320

[0121]

cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 110
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A, P60A, T62S, R94K) 重链IGHG1 cDNA

<400> 110
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgcgg ccagcggett caccctcagc aactacacca tgagctgggt ccgacaggcc 120
 cccggcaagg gcctggaatg ggtgagcgcc atcagcaagg gcggaggcag cactactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gtccaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg gcccgaggac accgcctgtg actactgtgc caaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcgggc gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaactcttg agccctgacc tcggcgctgc acaccttccc cgccgtgttc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcacagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc cctgagctg 720
 ctgggaggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacacct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtgtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag 840
 ttcatttgtt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaagccc tgcctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gacccccagg tgtacacct gcccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggtaagggt cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcctcgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 caetacaccc agaagagcct gacgtgtcc cccggcaag 1359

[0122]

<210> 111
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR VH1 (V37A) 重链IGHG1 cDNA

<400> 111
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggg ctggtgcagc caggcggcag cctgaggetg 60
 tcttgcgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacaggcc 120
 ccaggcaagg gcctggaatg ggtgtcctac atcagcaagg gcggaggaag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggcag gtteaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggcgcc 300
 atgtacggca acgaattttt ctaccccatg gactactggg ggccaggcgc caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttccgc tagccccag cagcaagage 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acacttccc cgccgtgctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcage gtggtgacag tgeccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac accctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
 ctgggoggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacacct gatgatcage 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacce tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaaccca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgtgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaagaag 1020
 accatcagea aggccaaagg ccagcccagg gagccccagg tgtacacctt gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggtaagggt cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagcccc agaacaacta caagaccacc 1200
 cccctgtgct tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcage tgctccgtga tgcacgagge cctgcacaac 1320
 cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

[0123]

<210> 112
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GBR900 VH3 (V37A) 重链IGHG1 cDNA

<400> 112
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggg ctggtgcagc caggcggcag cctgaggctg 60
 tcttgcgccg ccagcggett caccttcagc acctacacca tgagctgggc cegacagacc 120
 cccggcaaga ggttggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggaag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgcctgtg actactgcgc caagggcgcc 300
 atgtacggca acgacttttt ctaccccatg gactactggg ggccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagccctgt 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acacttccc cgccgtgtc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc cctgagctg 720
 ctggggcgac cctcctgtgt cctgttcccc cccaagccca aggacacct gatgatcagc 780
 eggaccccc aggtgacctg cgtggtgtg gacgtgagcc acgaggacce tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgetgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgcttcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaaagg ccagccagc gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggatgaaggg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 cccctgtgc tggacagega cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtgga agcagggcaa cgtgttcagc tgetcctga tgcaegagc cctgcacaac 1320
 cactacccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

[0124]

<210> 113
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VL1可变区cDNA

<400> 113
 gagatcgtgc tgaccacagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60
 ctgagctgta gcgcctccag cagcgtgtcc tacatgcaact ggtatcagca gaagcccggc 120
 caggecccca gactgctgat ctacaccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 180
 ttttctggca gcggcagcgg caccgacttc acctgacca tcagcagcct ggaaccgag 240
 gatttcgccg tgtattattg ccaccagtgg tccagctacc cctggacctt cggccagggg 300
 accaagctgg aaatcaag 318

<210> 114
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VL3可变区cDNA

<400> 114
 catagctgtgc tgaccacagag ccccgccacc ctgagcctga gcccaggcga gagggccacc 60
 ctgtctctgca gcgccagcag cagcgtgagc tacatgcaact ggtaccagca gaagcccggc 120
 cagagcccaa gactgctgat ctacaccacc tccaacctgg ccagcggcat ccccagcagg 180
 ttcagcggca gcggtctcgg caccctctac acctgacca tcagcagcct ggaaccgag 240
 gacttcgccg tgtactactg ccaccagtgg agcagctacc cctggacctt cggcggcggg 300
 accaagctgg aaatcaag 318

<210> 115
 <211> 639
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> BXhVL1轻链cDNA

<400> 115
 gagatcgtgc tgaccacagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60
 ctgagctgta gcgcctccag cagcgtgtcc tacatgcaact ggtatcagca gaagcccggc 120

[0125]

caggccccca gactgetgat ctacaccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga	180
ttttctggca ggggcagcgg caccgacttc acctgacca tcagcagcct ggaacccgag	240
gatttcgcgg tgtattattg ccaccagtgg tccagctacc cctggacctt cggccagggg	300
accaagctgg aaatcaagcg tacgggtggc getcccagcg tgttcatctt cccccccagc	360
gacgagcagc tgaagagcgg caccgcctcc gtggtgtgce tgetgaacaa cttctacccc	420
cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctcc agagcggcaa cagccaggaa	480
agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgacctg	540
agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg	600
tccagccccg tgaccaagag ctteaaccgg ggcgagtgc	639

<210> 116

<211> 639

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> BXhVL3轻链cDNA

<400> 116

cagatcgtgc tgacccagag ccccgccacc ctgagcctga gcccaggcga gagggccacc	60
ctgtcttgea ggcceagcag cagcgtgagc tacatgcact ggtaccagca gaagcccggc	120
cagagcccaa gactgetgat ctacaccacc tccaacctgg ccagcggcat cccagcagg	180
ttcagcggea ggggtccgg cacccttctac acctgacca tcagcagcct ggaacccgag	240
gacttcgcgg tgtactactg ccaccagtgg agcagctacc cctggacctt cggcgcgggg	300
accaagctgg aaateagcg tacgggtggc gctcccagcg tgttcatctt cccccccagc	360
gaegagcagc tgaagagcgg caccgcctcc gtggtgtgce tgetgaacaa cttctacccc	420
cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctcc agagcggcaa cagccaggaa	480
agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgacctg	540
agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg	600
tccagccccg tgaccaagag ctteaaccgg ggcgagtgc	639

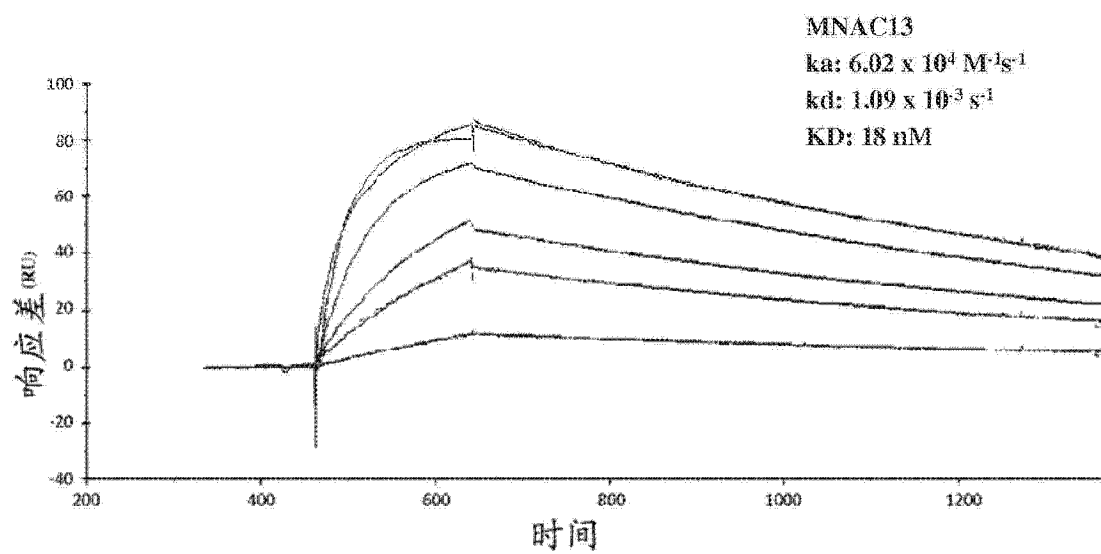


图 1A

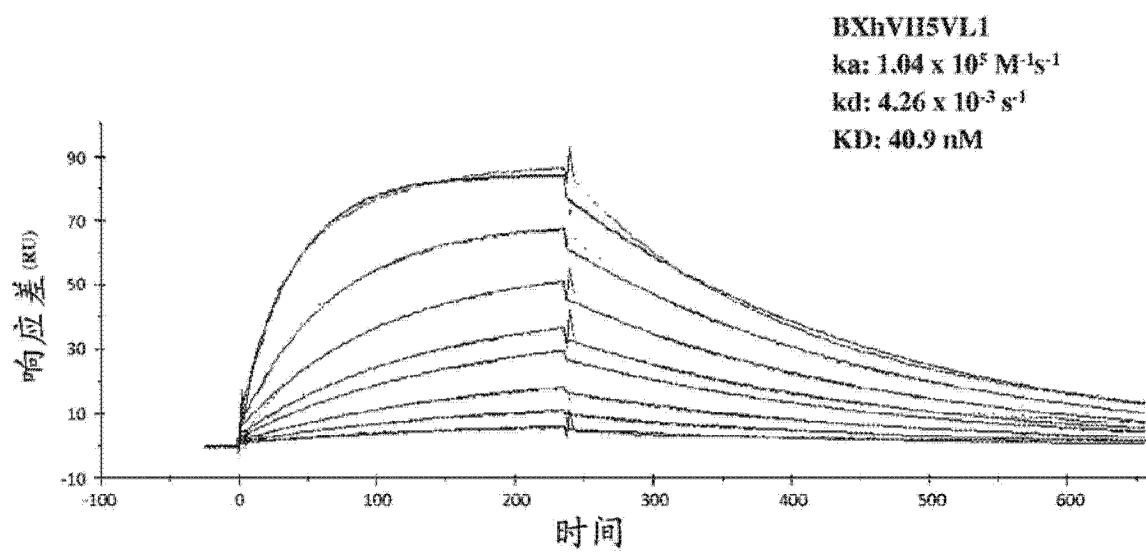


图 1B

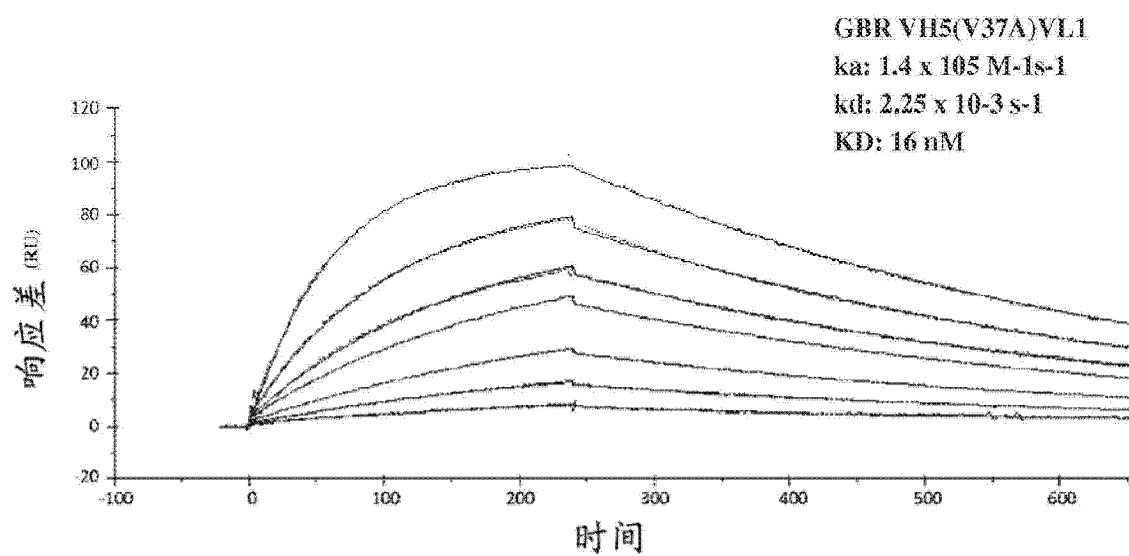


图 1C

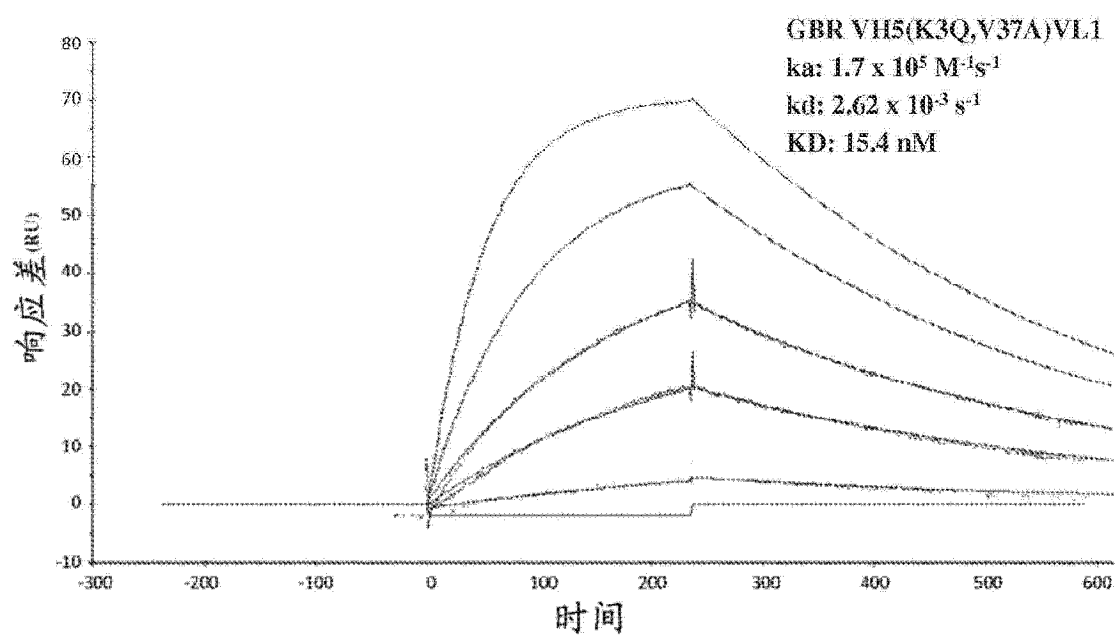


图 1D

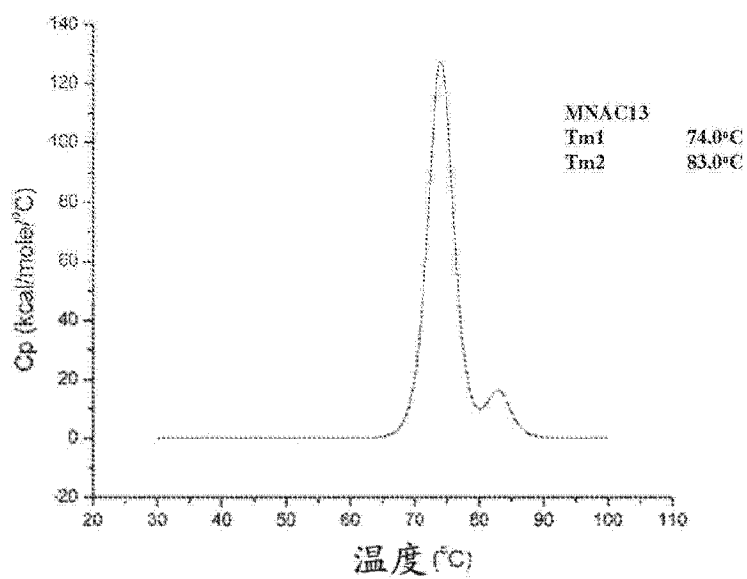


图 2A

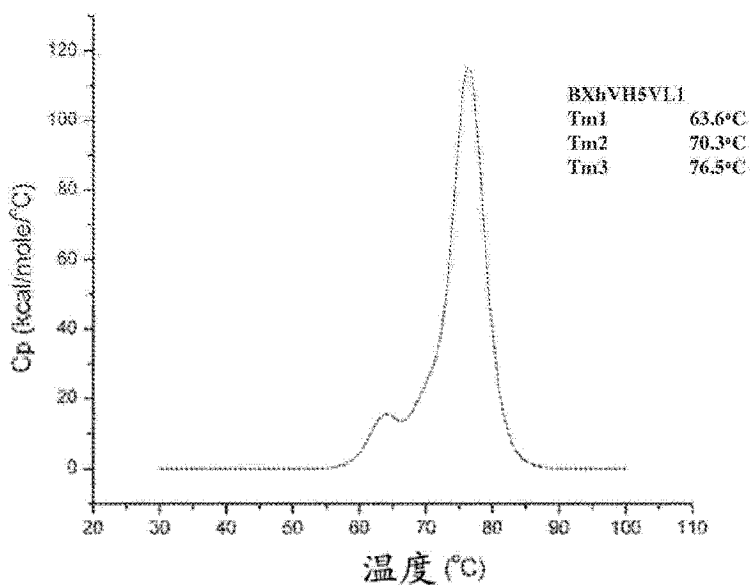


图 2B

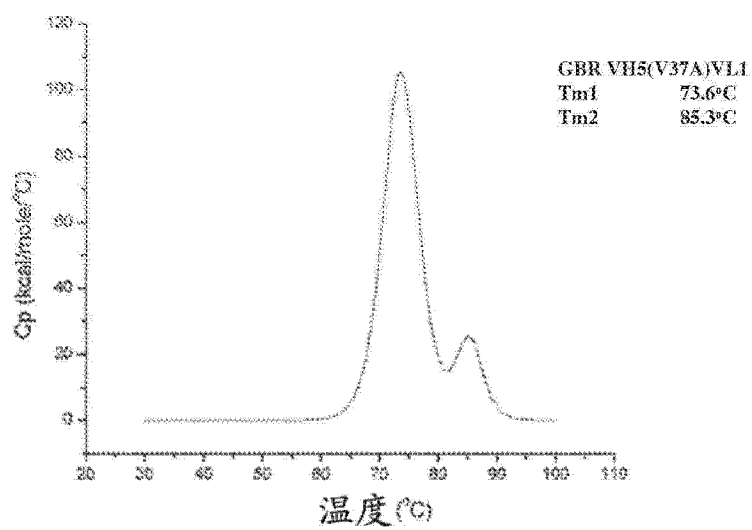


图 2C

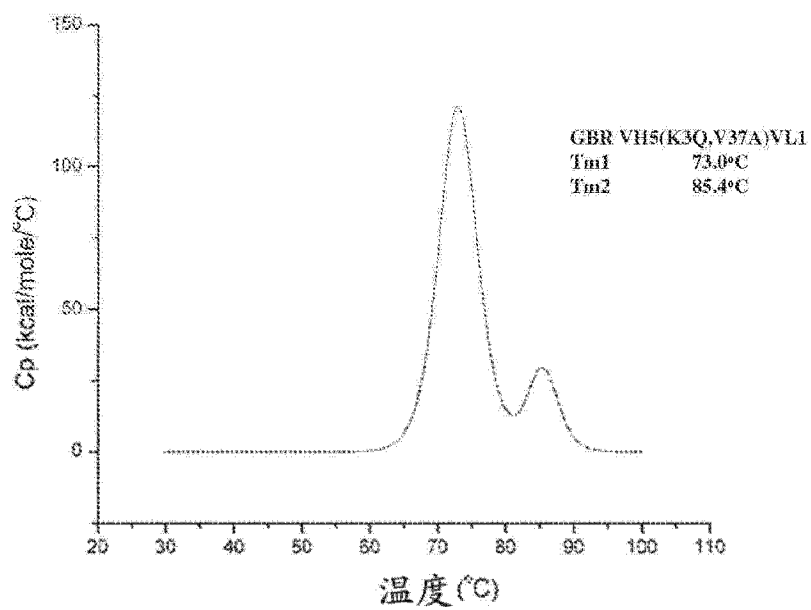


图 2D

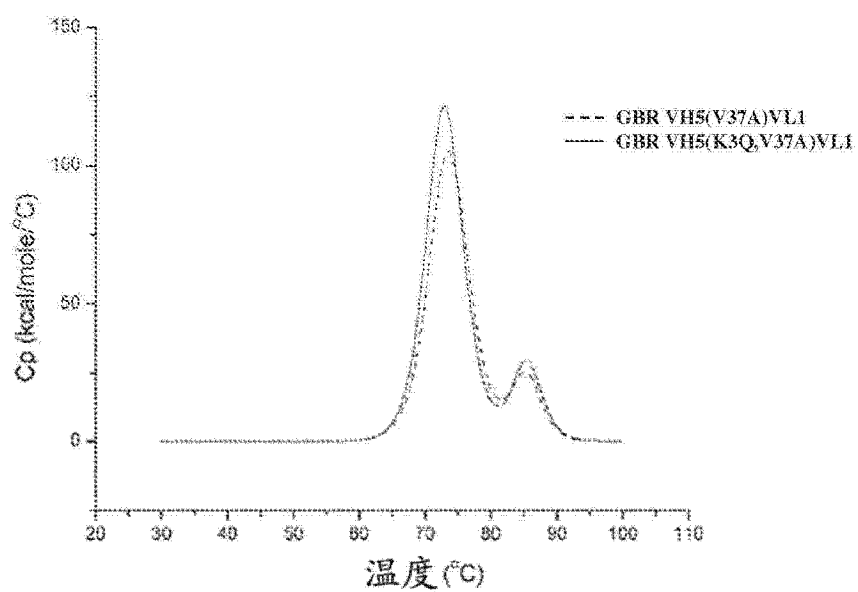


图 2E

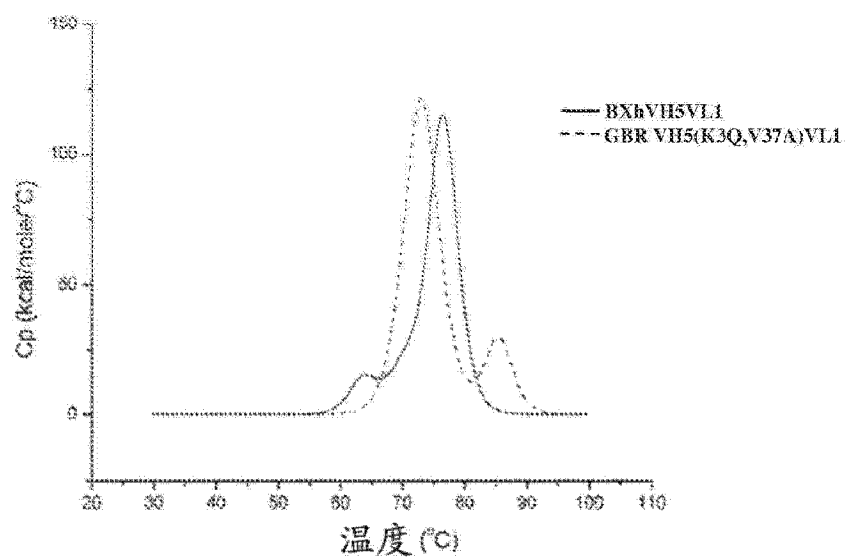


图 2F

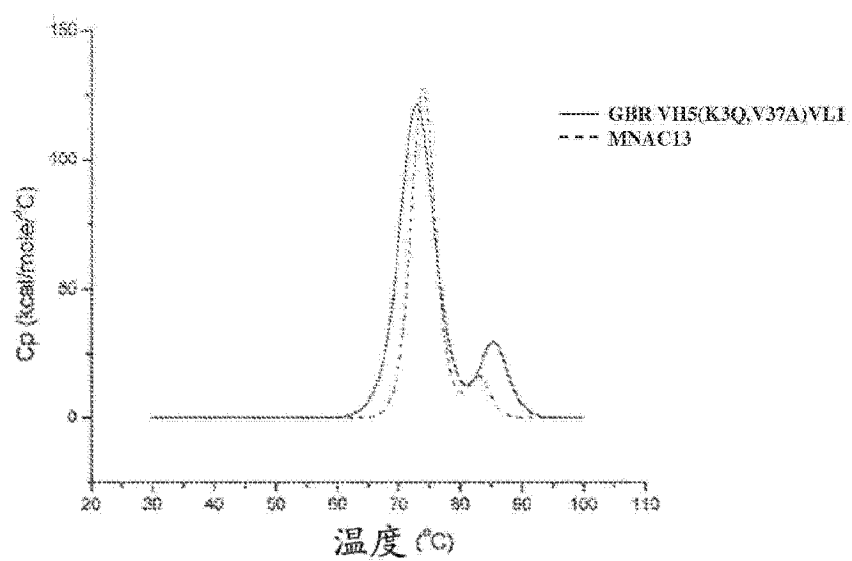


图 2G

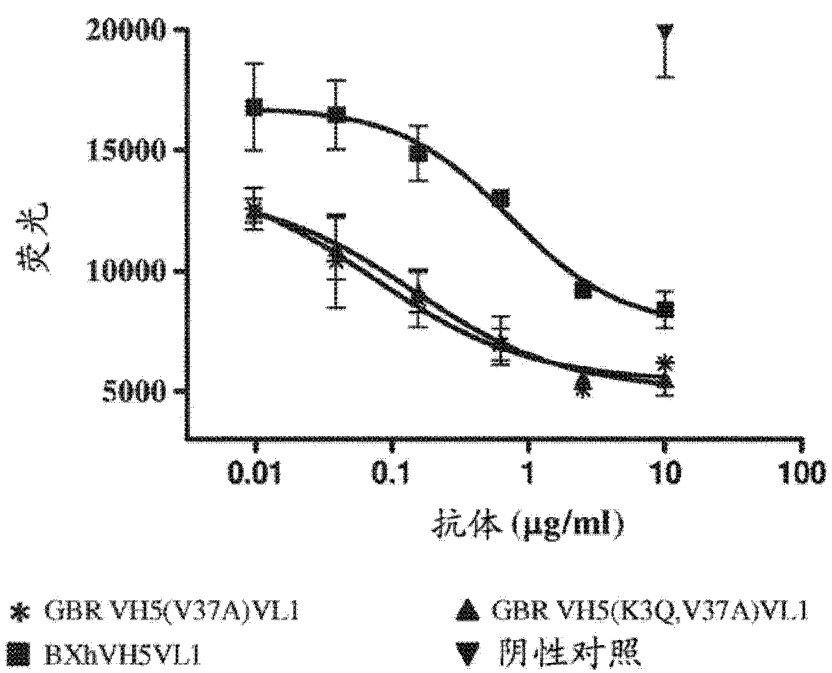


图 3A

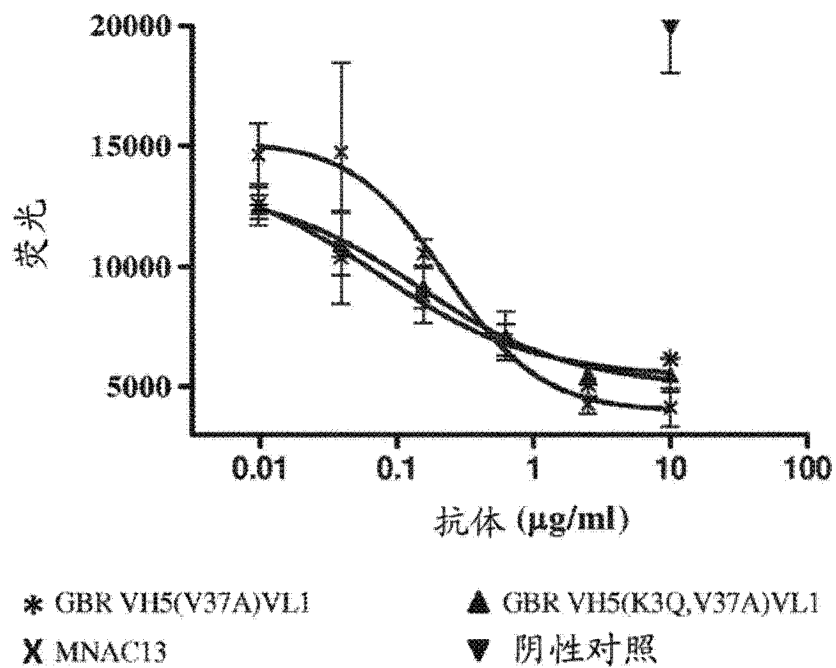


图 3B

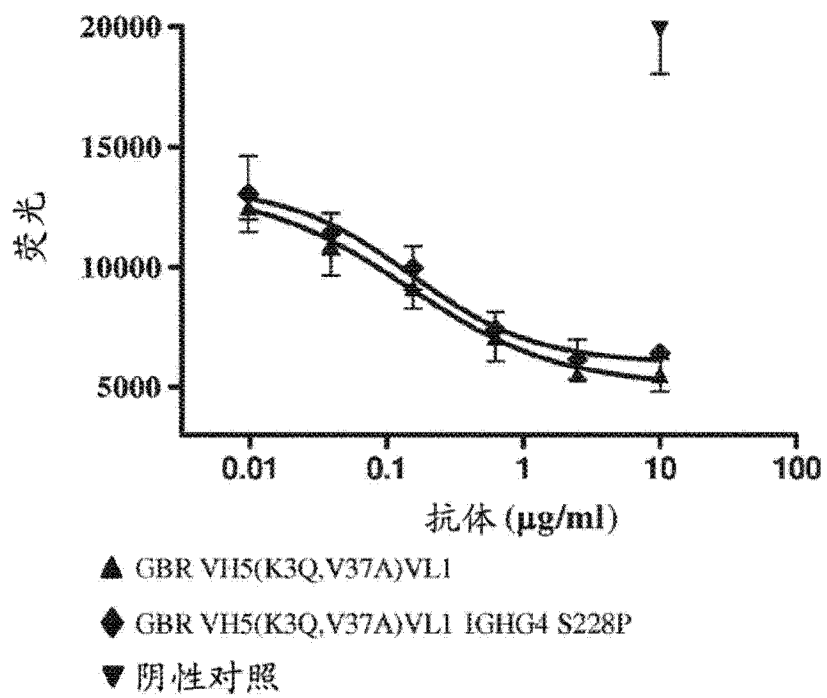


图 3C

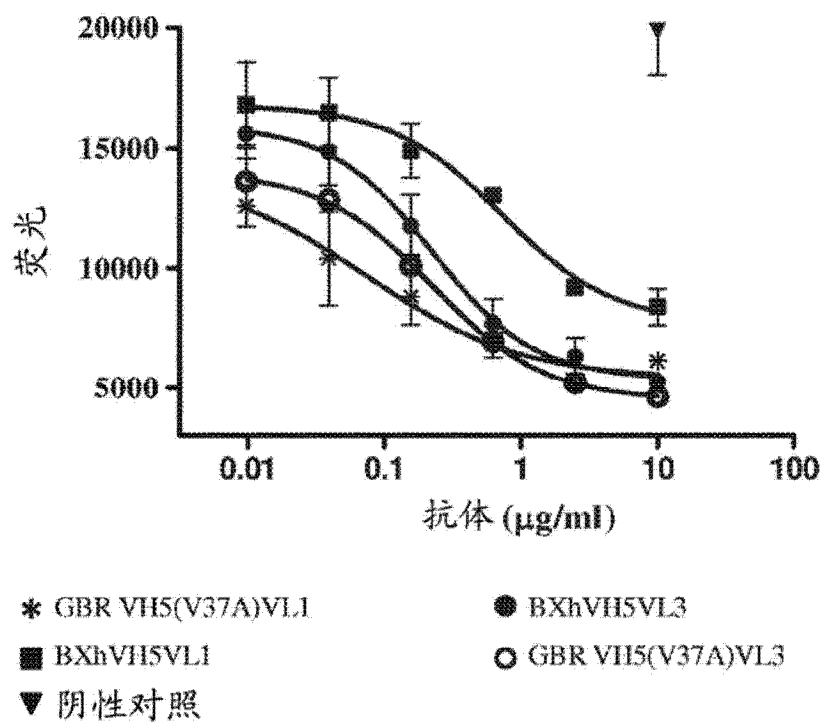


图 3D

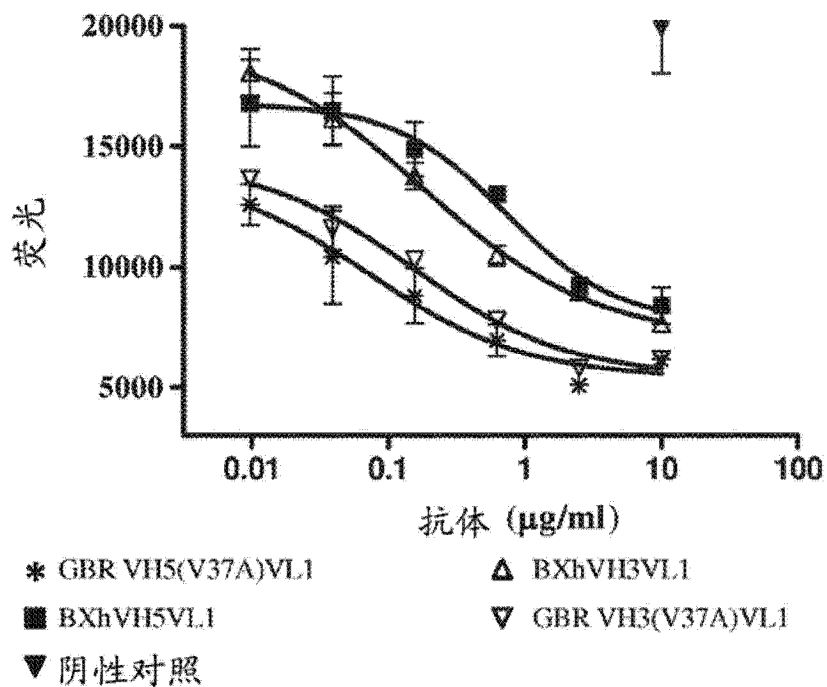


图 3E

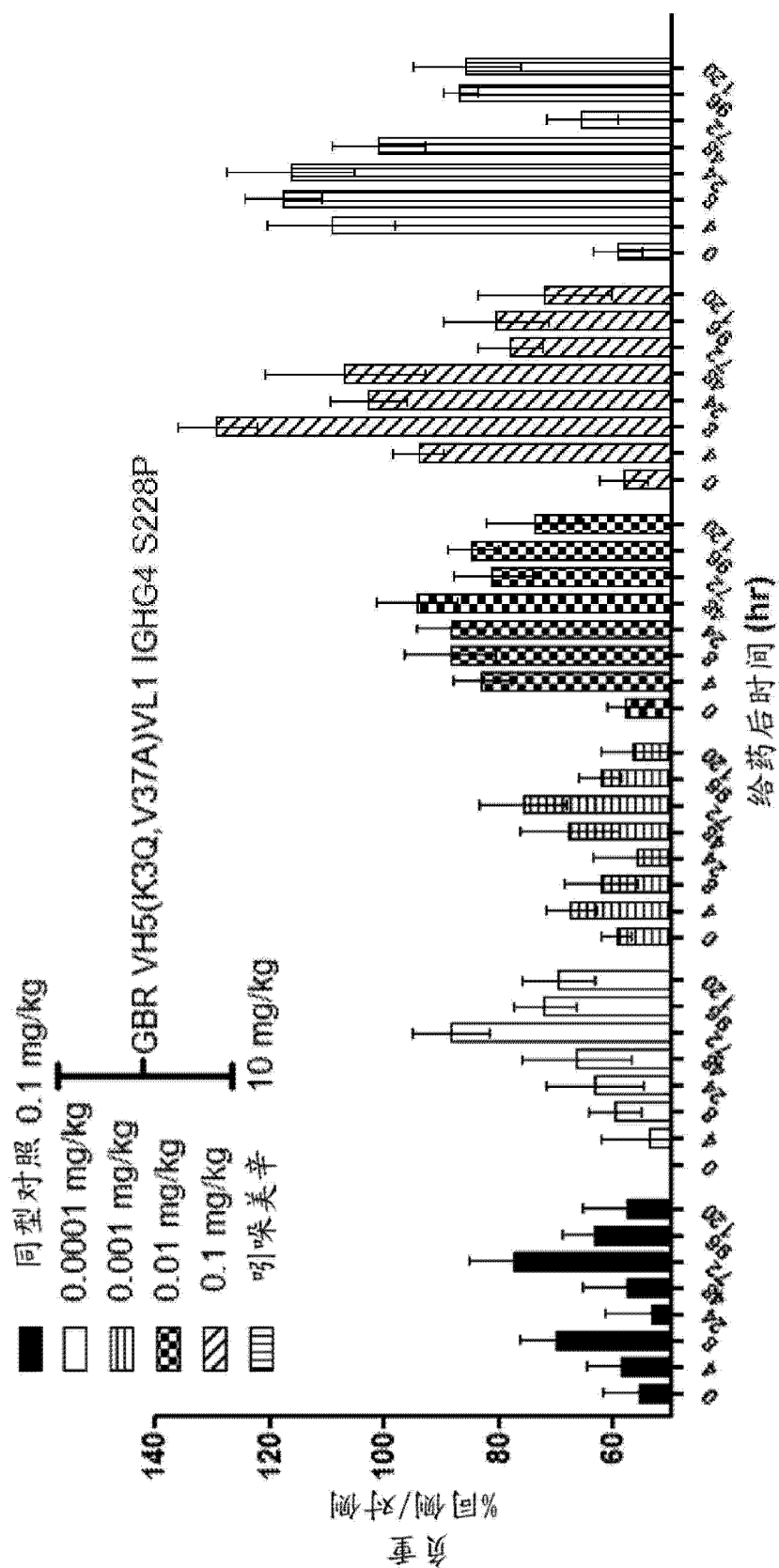


图 4

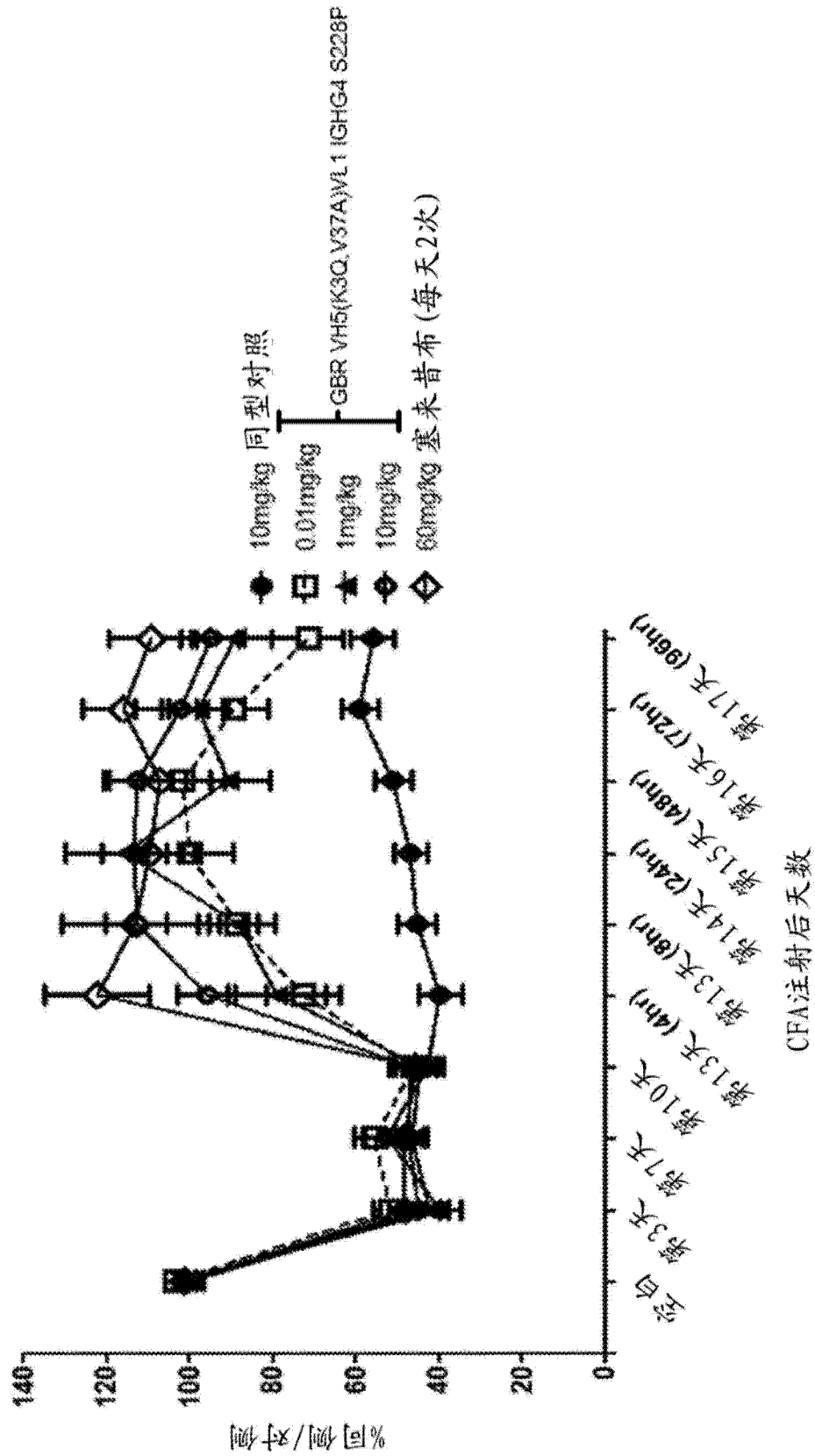


图 5

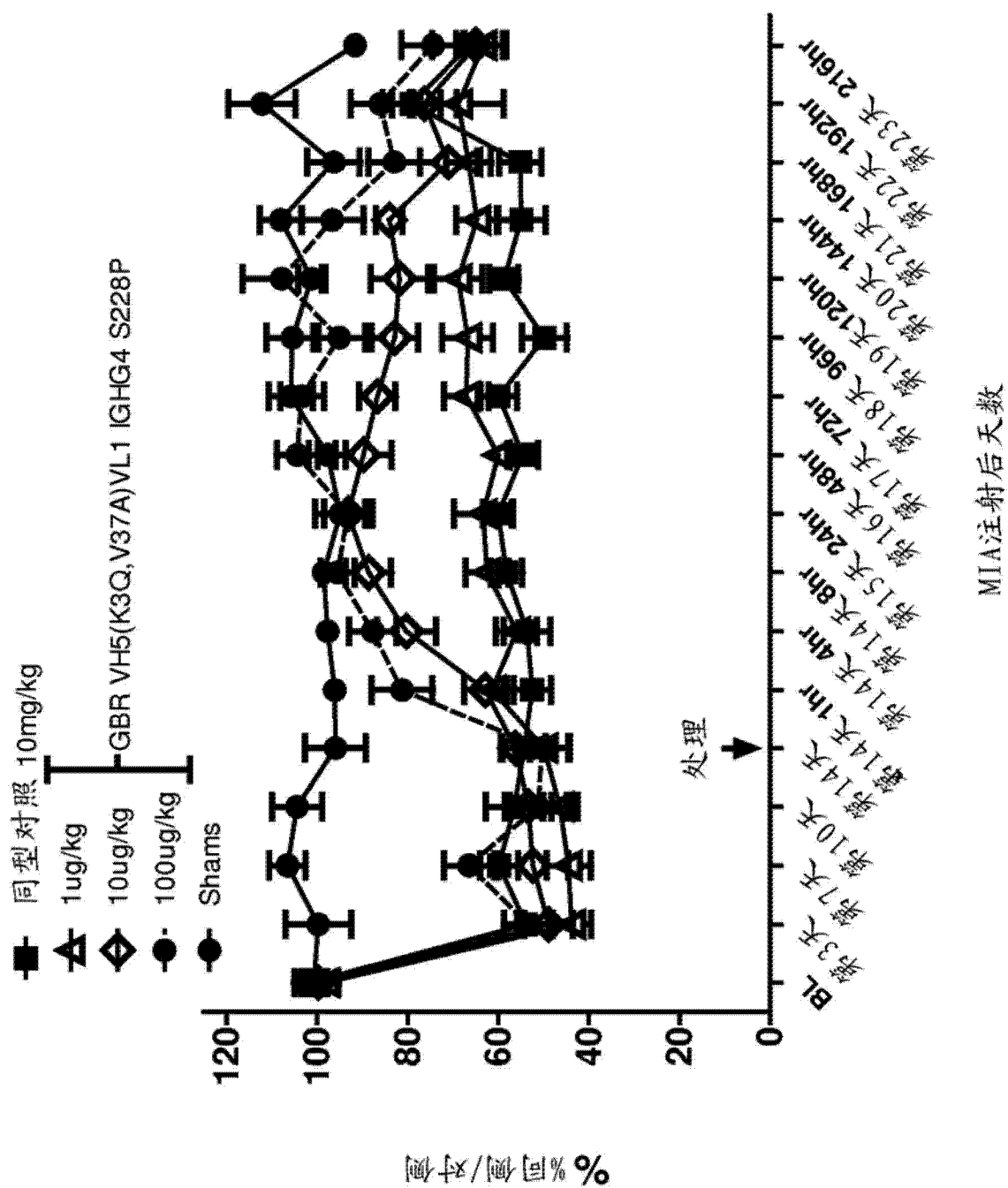


图 6A

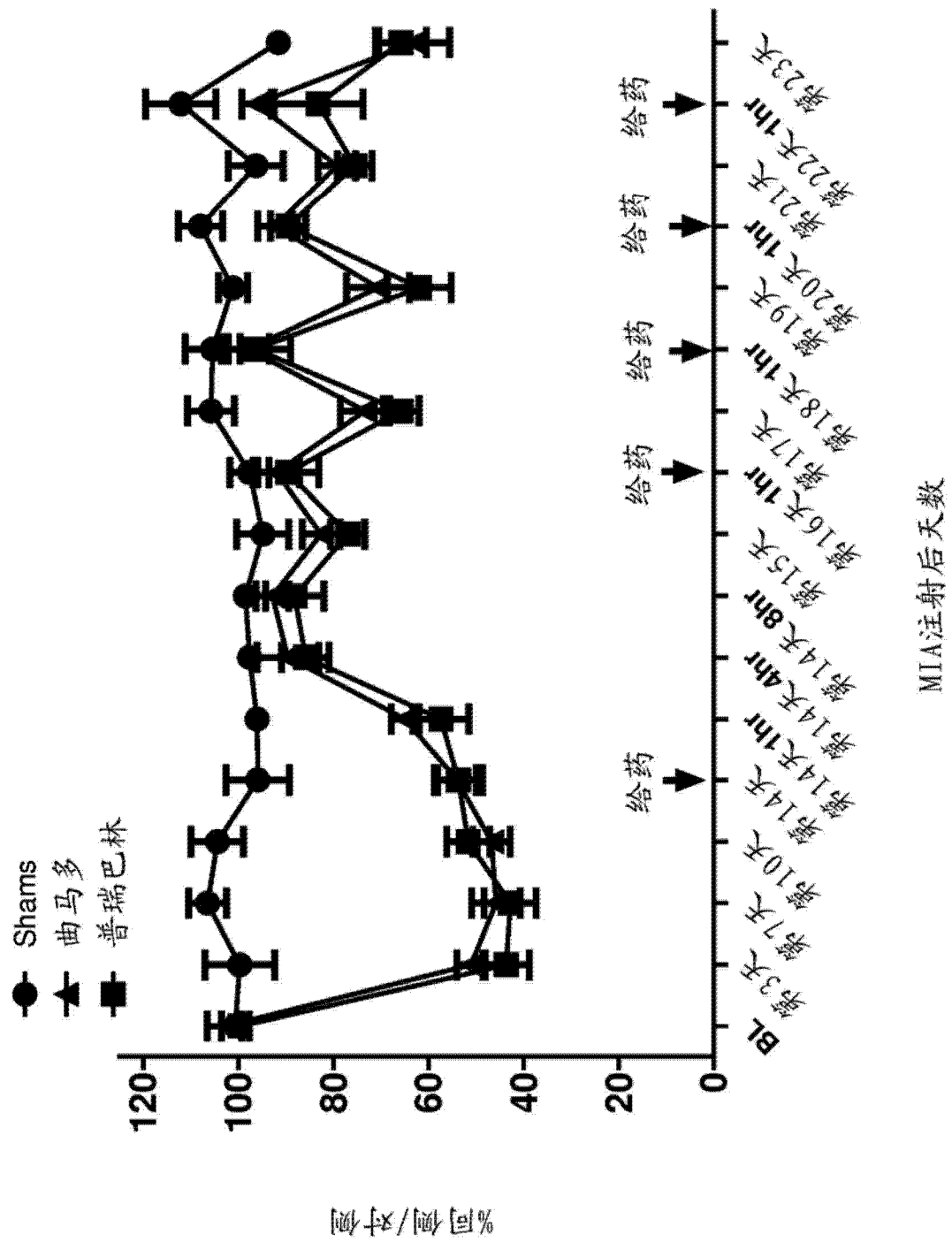


图 6B

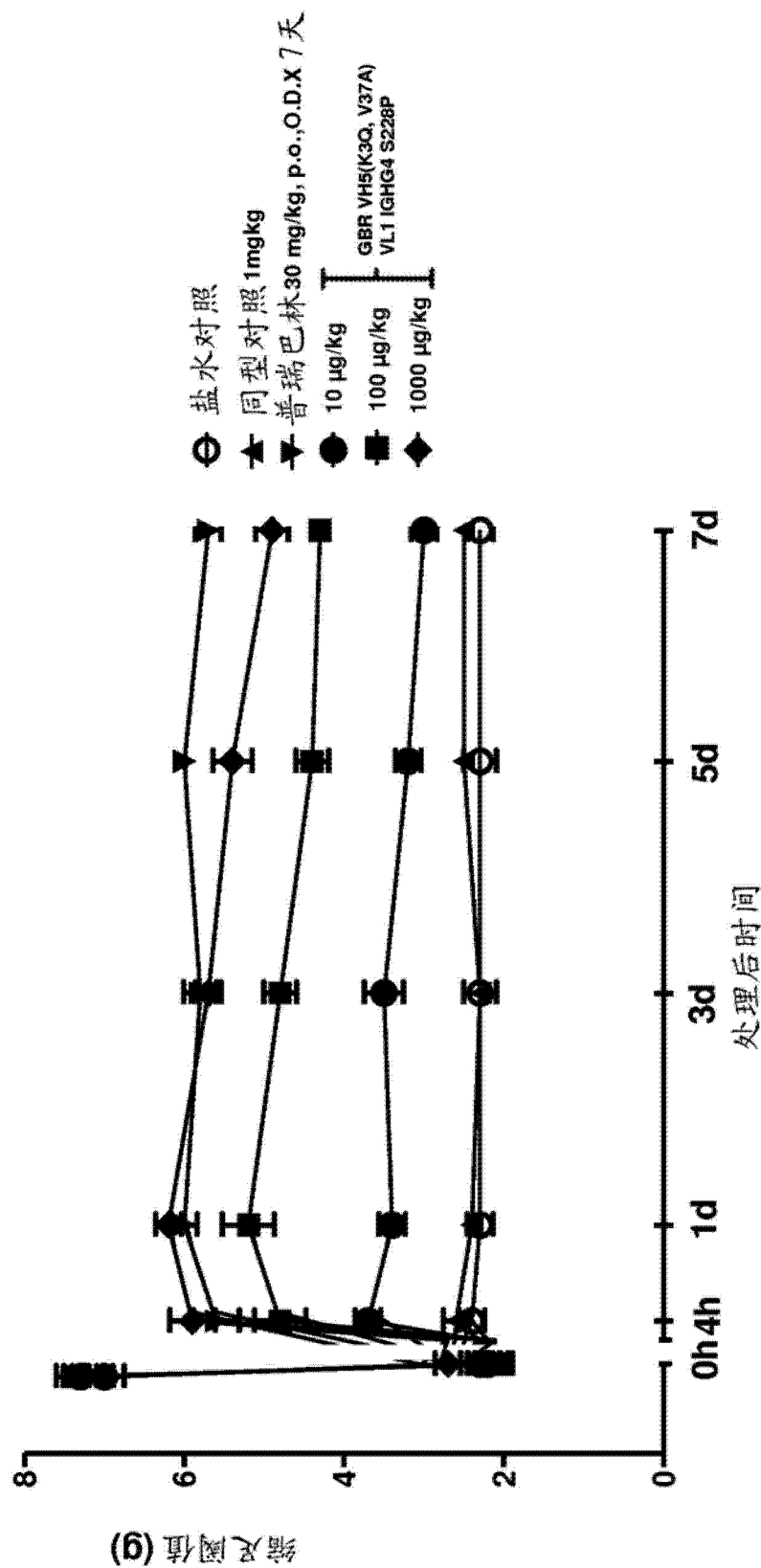


图 7A

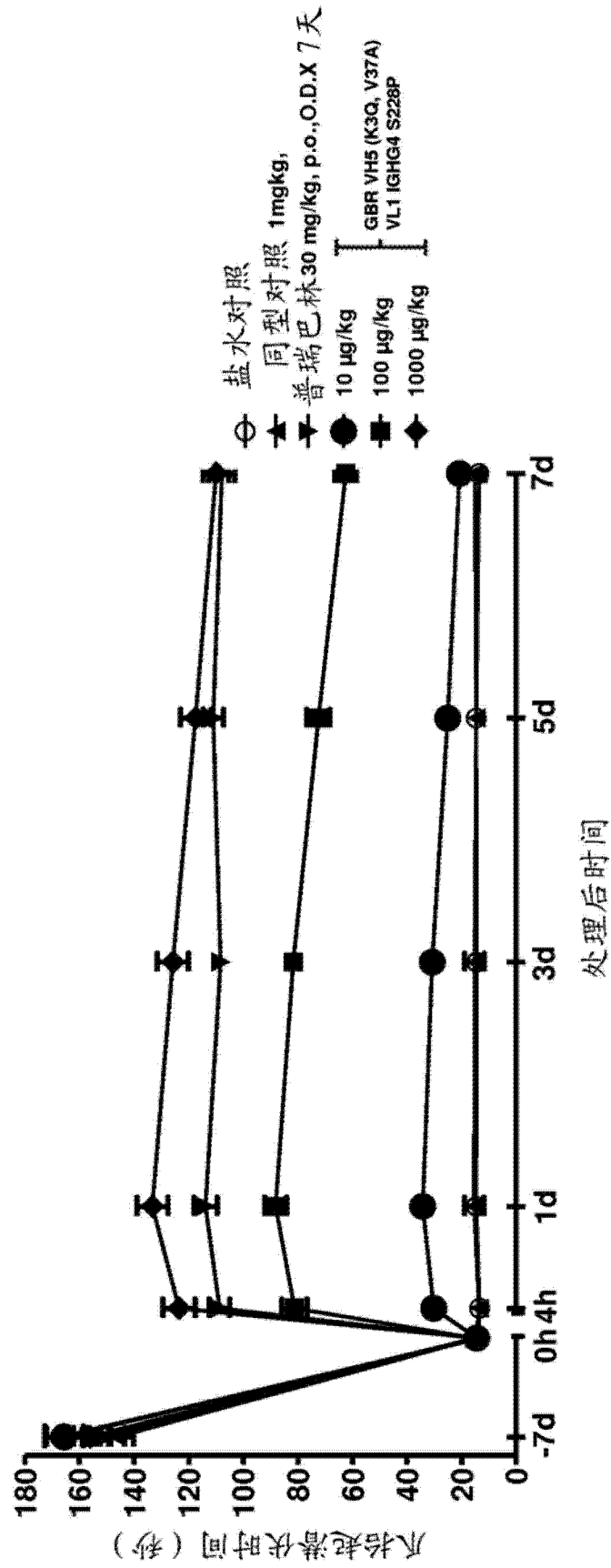


图 7B