



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201132353 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：099144615

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 12 月 17 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)*

C07K16/18 (2006.01)

C12N15/12 (2006.01)

A61P13/12 (2006.01)

(30)優先權：2009/12/18 美國

61/288,171

(71)申請人：安美基公司 (美國) AMGEN INC. (US)

美國

(72)發明人：錢淑敏 QIAN, XUEMING (US)；溫特斯 亞倫 喬治 WINTERS, AARON GEORGE (US)；豪特 米雪兒 HORTTER, MICHELLE (US)；葛漢 凱文 GRAHAM, KEVIN (CA)；蔡美美 TSAI, MEI-MEI (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：29 共 208 頁

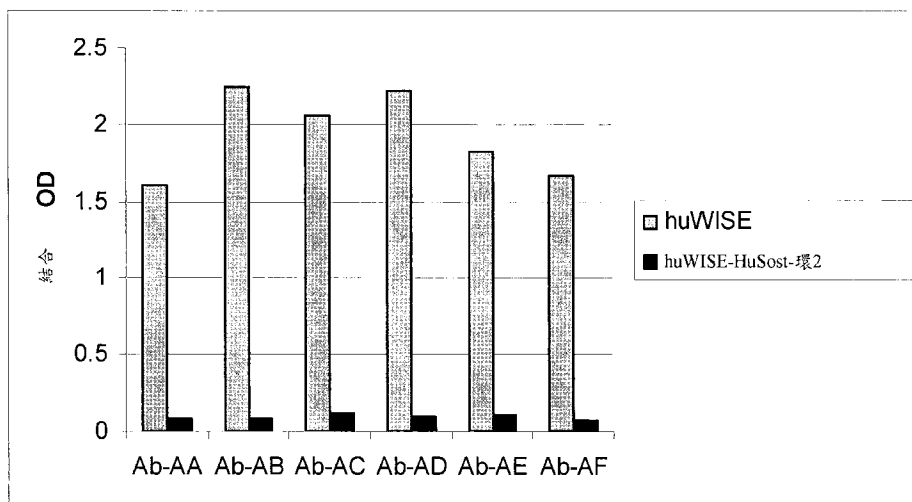
(54)名稱

W I S E 結合劑及抗原決定基

WISE BINDING AGENTS AND EPITOPES

(57)摘要

本發明係關於 WISE 之結合劑，及包括其製造及使用方法。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201132353 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：099144615

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 12 月 17 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)*

C07K16/18 (2006.01)

C12N15/12 (2006.01)

A61P13/12 (2006.01)

(30)優先權：2009/12/18 美國

61/288,171

(71)申請人：安美基公司 (美國) AMGEN INC. (US)

美國

(72)發明人：錢淑敏 QIAN, XUEMING (US)；溫特斯 亞倫 喬治 WINTERS, AARON GEORGE (US)；豪特 米雪兒 HORTTER, MICHELLE (US)；葛漢 凱文 GRAHAM, KEVIN (CA)；蔡美美 TSAI, MEI-MEI (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：29 共 208 頁

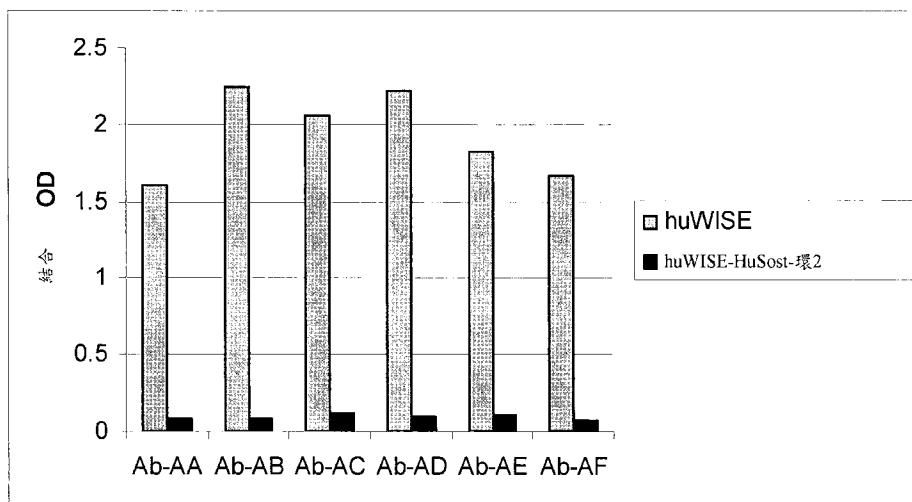
(54)名稱

W I S E 結合劑及抗原決定基

WISE BINDING AGENTS AND EPITOPES

(57)摘要

本發明係關於 WISE 之結合劑，及包括其製造及使用方法。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明一般係關於 WISE 蛋白(包括人類 WISE 蛋白)之抗原決定基，及能夠結合於 WISE 或其中之抗原決定基的結合劑(諸如抗體)。

本申請案主張 2009 年 12 月 18 日申請之美國臨時申請案第 61/288,171 號的權益，該臨時申請案以引用的方式併入本文中。

本申請案與電子格式之序列表一起歸檔。序列表以 2010 年 12 月 1 日創建之題為 A-1532-WO-PCT_SeqList.txt 的文檔提供，大小為 86.5 KB。電子格式之序列表的資訊以全文引用的方式併入本文中。

【先前技術】

纖維化一般定義為作為癒合過程之部分產生額外結締組織且包括各種症狀。過度纖維化為幾乎無治療選擇的嚴重問題。

含有胱胺酸結之蛋白質通常為具有關鍵功能之重要調控劑且影響各種細胞類型。Wise(USAG-1, SOSTDC1)為分泌之含有胱胺酸結之蛋白質且主要表現於腎臟、肺、皮膚及上皮細胞中。WISE KO 小鼠具有生殖能力且其腎臟具有正常功能。然而，當藉由單側輸尿管阻塞(UUO)或注射化學毒性劑順鉑(Cisplatin)攻毒產生腎臟損傷時，WISE KO 小鼠受到保護(Yanagita 等人，J. Clin Invest. 2006 年 1 月 4 日；116(1): 70-79)。在 UUO 模型中，WISE KO 小鼠之受影

響腎臟中的纖維化少得多，且表現少得多的 α SMA(成肌纖維細胞活化之標誌物)，且保持上皮細胞標誌物E-鈣黏素之表現。在腎臟損傷之順鉑模型中，WISE缺失保護動物以免腎小管損傷(tubular injury)且降低死亡率(Tanaka等人，Kidney International advance online publication 2007年10月17日)。此外，當WISE KO小鼠(aka USAG-1 KO小鼠)與Col4a3 KO小鼠繁殖時，雙重基因剔除小鼠相對於具有WT WISE基因之Col4a3 KO小鼠具有顯著較少之蛋白尿且產生較少末期腎病。在4週大時，USAG-1+/+、3(IV)-/-小鼠已顯示嚴重蛋白尿且腎小球基底膜(GBM)大規模分裂，而雙重KO小鼠顯示正常結構之GBM。在10週大時，USAG-1+/+、3(IV)-/-小鼠產生末期腎病，而雙重KO小鼠顯示顯著保持之腎功能且具有較少腎臟組織學改變。(Tanaka等人，*J Clin Invest.* 2010;120(3):768-777 及 Abstract TH-FC059 2008 ASN meeting)。

此等資料表明WISE可能為成年人腎功能之調控劑。然而，此等研究限於在整個發育週期中缺乏WISE之基因剔除小鼠，因此不可預測使用諸如抗體之抑制劑短期抑制WISE活性是否提供在與各種纖維變性疾病相關之病理狀況下保持腎功能的治療益處。

本發明者證明可能使用靶向WISE之結合劑治療與損壞及修復有關之肺病症及腎臟病症，包括纖維化及器官功能障礙。

【發明內容】

本文揭示可用於預防或治療疾病及病症之組合物及方法。本發明另外係關於由本文揭示之結合劑辨識之人類 WISE 的區，使用此等區之方法及製造該等區之方法。本發明亦係關於對識別為胱胺酸結結構域之 WISE 區具特異性之抗原決定基，及特異性結合於彼區之結合劑。

本發明係關於特異性結合於 WISE 之結合劑(諸如抗體)。結合劑特徵為其交叉阻斷至少一種本文揭示之抗體與 WISE 之結合及/或由至少一種該等抗體交叉阻斷與 WISE 之結合的能力。本發明之抗體及其他結合劑的特徵亦為在如本文所揭示之人類 WISE 肽抗原決定基競爭結合檢驗中與人類 WISE 肽之結合模式。

在某些實施例中，本發明係關於抑制 WISE 活性且可降低諸如腎臟、肺、皮膚、眼睛、肝臟及心臟之組織中的組織損傷及相關纖維化之結合劑(諸如抗體)。此外，本發明係關於抑制蛋白尿或蛋白尿誘發之損傷(例如纖維化)之結合劑，該等病症與諸如患有糖尿病性腎病變、腎小球腎炎、膜性腎病變、狼瘡、移植及涉及表現提高之蛋白尿之其他腎病之患者中的各種免疫學及非免疫介導之腎病有關。此外，本發明係關於改善器官功能或延遲上文所述之器官的功能損失之結合劑，該等功能損失由纖維化及/或蛋白尿影響，包括(但不限於)諸如慢性腎臟疾病、慢性同種異體移植腎病變、特發性肺纖維化、心肌症、青光眼(透鏡狀細胞纖維化)及硬皮病(皮膚纖維化)之疾病。此外，因為腫瘤轉移亦使用與組織纖維化中所用機制類似之

機制，所以 WISE 結合劑亦可具有延遲腫瘤轉移及/或癌症進展之效用。

在其他實施例中，本發明係關於可在基於細胞之檢驗中阻斷 WISE 之抑制作用之結合劑(諸如抗體)。本發明亦係關於可在基於細胞之檢驗中改變 WISE 之作用的結合劑(諸如抗體)。本發明亦係關於可在基於細胞之檢驗中活化 WISE 之作用的結合劑(諸如抗體)。

本發明另外係部分關於包含由至少一個二硫鍵連接之兩個、三個或四個多肽片段且表示 WISE 之胱胺酸結的核心區之多肽構築體，及能夠與其特異性結合之抗體。

在一實施例中，本發明係關於獲得適用作在哺乳動物中產生結合劑(諸如能夠特異性結合於 WISE 之抗體)之免疫原的抗原決定基之方法；在某些實施例中，產生之結合劑能夠活體外及/或活體內中和 WISE 活性。

在另一實施例中，本發明係關於投與動物時引發對 WISE 具特異性之抗體的組合物，該組合物包含具有選自(但不限於)下表中之一種序列之序列的多肽：

表 1

Seq Id No.: 1	ATGCTTCCTCCTG CCATTCATTT CTATCTCCTT CCCCTTG CAT GCATCCTAAT GAAAAGCTGT TTGGCTTTTA AAAATGATGC CACAGAAATC CTTTATTCAC ATGTGGTTAA ACCTGTTCCA GCACACCCCA GCAGCAACAG CACGTTGAAT CAAGCCAGAA ATGGAGGCAG GCATTTTCAGT AACACTGGAC TGGATCGGAA CACTCGGGTT CAAGTGGGTT GCCGGGA ACT GCGTTCCACC AAATACATCT CTGATGGCCA GTGCACCAGC ATCAGCCCTC TGAAGGAGCT GGTGTGTGCT GGCGAGTGCT TGCCCCTGCC AGTGCTCCCT AACTGGATTG GAGGAGGCTA TGAACAAAG TACTGGAGCA GGAGGAGCTC CCAGGAGTGG CGGTGTGTCA
---------------	---

	ATGACAAAAC CCGTACCCAG AGAATCCAGC TGCAGTGCCA AGATGGCAGC ACACGCACCT ACAAATCAC AGTAGTCACT GCCTGCAAGT GCAAGAGGTA CACCCGGCAG CACAACGAGT CCAGTCACAA CTTTGAGAGC ATGTCACCTG CCAAGCCAGT CCAGCATCAC AGAGAGCGGA AAAGAGCCAG CAAATCCAGC AAGCACAGCA TGAGTTAGCT CGAGGGGCGG ATCCCCCGGG CTGCAGGAAT TCGATATCAA GCTTGCTAGC
Seq Id No.: 2	<u>MLPPAIHFYL LPLACILMKS CLAFKND</u> ATE ILYSHVVKPV PAHPSSNSTL NQARNGGRHF SNTGLDRNTR VQVGCRELRS TKYISDGQCT SISPLKELVC AGECLPLPVL PNWIGGGYGT <u>KYWSRRSSOE WRCVNDKTRT QRIQLQCQDG</u> STRTYKITVV TACKCKRYTR QHNESSHNFE SMSPAKPVQH HRERKRASKS SKHSMS (人類)
Seq Id No.: 3	ATGC TTCCTCCTGC CATTATCTC TCTCTCATTCCCCTGCTCTG CATCCTGATG AGAAACTGTT TGGCTTTTAA AAATGATGCC ACAGAAATCCTTTATTCACA TGTGGTTAAA CCTGTCCCGG CACACCCAG CAGCAACAGC ACCCTGAATCAAGCCAGGAA TGGAGGCAGG CATTTCAGTA GCACTGGACT GGATCGAAAC AGTCGAGTTCAAGTGGGCTG CAGGGAAGTGG CGGTCCACCA AATACATTTC GGACGGCCAG TGCACCAGCATCAGCCCTCT GAAGGAGCTG GTGTGCGCGG GCGAGTGCTT GCCCCTGCCG GTGCTTCCCAACTGGATCGG AGGAGGCTAT GGAACAAAGT ACTGGAGCCG GAGGAGCTCT CAGGAGTGGCGGTGTGTCAA CGACAAGACG CGCACCCAGA GGATCCAGCT GCAGTGTCAG GACGGCAGCACGCGCACCTA CAAAATCACC GTGGTCACGG CGTGCAAGTG CAAGAGGTAC ACCCGTCAGCACACGAGTC CAGCCACAAC TTTGAAAGCG TGTCGCCCCG CAAGCCCGCC CAGCACCACAGAGAGCGGAA GAGAGCCAGC AAATCCAGCA AGCACAGTCT GAGCTAGCTC GAG
Seq Id No.: 4	<u>MLPPAIHLSL IPLLCILMRN CLAFKND</u> ATE ILYSHVVKPV PAHPSSNSTL NQARNGGRHF SSTGLDRNSR VQVGCRELRS TKYISDGQCT SISPLKELVC AGECLPLPVL PNWIGGGYGT KYWSRRSSQE WRCVNDKTRT QRIQLQCQDG STRTYKITVV TACKCKRYTR QHNESSHNFE SVSPAKPAQH HRERKRASKS SKHSLS (小鼠)
Seq Id No.: 5	ATGCT TCCTCCTGCC ATTCATCTCT CTCTCATTCC CCTGCTCTGCATCCTGATGA AAAACTGTTT GGCTTTTAAA AATGATGCCA CAGAAATCCT TTATTCACATGTGGTTAAAC CTGTTTCAGC ACACCCAGC AGCAACAGCA CCTTGAATCA AGCCAGGAATGGAGGCAGGC ACTTCAGTAG CACGGGACTG GATCGAAATA GTCGAGTTCA AGTGGGCTGCAGGGAACTGC

	GGTCCACCAA ATACATCTCG GATGGCCAGT GCACCAGCAT CAGCCCTCTGAAGGAGCTGG TGTGCGCGGG TGAGTGCTTG CCCTTGCCAG TGCTTCCCAA CTGGATCGGAGGAGGCTACG GAACAAAGTA CTGGAGCCGG AGGAGCTCCC AGGAGTGGCG GTGTGTCAACGACAAGACGC GCACCCAGAG AATCCAGCTG CAGTGTCAAG ACGGCAGCAC ACGCACCTACAAAATCACCG TGGTCACAGC GTGCAAGTGC AAGAGGTACA CCCGGCAGCA CAACGAGTCCAGCCACAAC T TGAAAGCGT GTCTCCCGCC AAGCCCGCCC AGCACCACAG AGAGCGGAAGAGAGCCAGCA AATCCAGCAA GCACAGTCTG AGCTAGGCGG CCGC
Seq Id No.: 6	<u>MLPPAIHFYL LPLACILMKS CLAFKND</u> ATE ILYSHVVKPV PAHPSSNSTM NQARNGGRHF SNTGLDRNTR VQVGCRELRS TKYISDGQCT SISPLKELVC AGECLPLPVL PNWIGGGYGT KYWSRRSSQE WRCVNDKTRT QRIQLQCQDG STRTYKITVV TACKCKRYTR QHNESSHNFE SMSPAKPVQH HRERKRASKS SKHSMS (大鼠)
Seq Id No.: 7	ATGCT TCCTCCTGCC ATTCATCTCT CTCTCATTCC CCTGCTCTGCATCCTGATGA AAAACTGTTT GGCTTTTAAA AATGATGCCA CAGAAATCCT TTATTCACATGTGGTTAAAC CTGTTTCAGC ACACCCAGC AGCAACAGCA CCTTGAATCA AGCCAGGAATGGAGGCAGGC ACTTCAGTAG CACGGGACTG GATCGAAATA GTCGAGTTCA AGTGGGCTGCAGGGAAGTGC GGTCCACCAA ATACATCTCG GATGGCCAGT GCACCAGCAT CAGCCCTCTGAAGGAGCTGG TGTGCGCGGG TGAGTGCTTG CCCTTGCCAG TGCTTCCCAA CTGGATCGGAGGAGGCTACG GAACAAAGTA CTGGAGCCGG AGGAGCTCCC AGGAGTGGCG GTGTGTCAACGACAAGACGC GCACCCAGAG AATCCAGCTG CAGTGTCAAG ACGGCAGCAC ACGCACCTACAAAATCACCG TGGTCACAGC GTGCAAGTGC AAGAGGTACA CCCGGCAGCA CAACGAGTCCAGCCACAAC T TGAAAGCGT GTCTCCCGCC AAGCCCGCCC AGCACCACAG AGAGCGGAAGAGAGCCAGCA AATCCAGCAA GCACAGTCTG AGCTAGGCGG CCGC
Seq Id No.: 8	<u>MLPPAIHLSL IPLLCILMKN CLAFKND</u> ATE ILYSHVVKPV SAHPSSNSTL NQARNGGRHF SSTGLDRNSR VQVGCRELRS TKYISDGQCT SISPLKELVC AGECLPLPVL PNWIGGGYGT KYWSRRSSQE WRCVNDKTRT QRIQLQCQDG STRTYKITVV TACKCKRYTR QHNESSHNFE 181 SVSPAKPAQH HRERKRASKS SKHSLS* (石蟹獼猴)
Seq Id No.: 9	LPLPVL PNWIGGGYGTK

在其他實施例中，本發明亦係關於投與動物時引發對

WISE具特異性之抗體的組合物，該組合物包含至少一種基本上由人類、小鼠、大鼠或石蟹獼猴 WISE之胺基酸序列組成的多肽。

熟習此項技術者應理解，表1中所列之 WISE蛋白為各別物種之全長蛋白質序列且進行進一步處理以供分泌。在特定實施例中，信號肽為前23個胺基酸(Seq Id No.: 2、4、6及8)且移除信號肽會產生成熟多肽。在特定實施例中，本發明亦係關於基本上由上文表1所示之成熟 WISE之胺基酸82至109(亦例如在Seq Id No.: 9中描繪)組成的多肽；此多肽在本文中稱為 WISE環2多肽，可藉由蛋白質片段之重組表現、人類 WISE之胰蛋白酶消化、或化學合成獲得，且蛋白質可藉由尤其 HPLC 部分分離來分離。合成之肽可為線性或環化形式。若肽藉由重組表現產生，則其可融合至其他載體蛋白，諸如 Fc 片段或人類血清白蛋白或將增加之其他蛋白質。

在一實施例中，本發明係關於產生能夠特異性結合於 WISE之抗體的方法，其包含：(a)以包含 WISE多肽之組合物使動物免疫；(b)自動物收集血清；及(c)自血清分離能夠特異性結合於 WISE且抑制 WISE之生物活性的抗體，其中該抗體特異性結合於 WISE之環2。

在另一實施例中，本發明進一步涵蓋使用噬菌體呈現選擇結合於 WISE環2之抗體，及/或使用噬菌體呈現提高已知抗體對 WISE之親和力的方法。

在額外實施例中，本發明亦係關於產生能夠特異性結合

於 WISE 之抗體的方法，該方法包含：(a)以包含含有胱胺酸結之 WISE 片段(例如 Seq Id No. 9)或其衍生物之組合物使動物免疫；(b)自動物收集血清；及(c)自血清分離能夠特異性結合於 WISE 且抑制 WISE 之生物活性的抗體。

在其他實施例中，本發明另外係關於偵測生物樣品中之抗 WISE 抗體之方法，其包含以下步驟：(a)在允許抗體與多肽之間形成複合物之條件下使生物樣品與基本上由具有 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 24 至 206 的多肽、具有 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 24 至 206 的多肽、具有 SEQ ID NO: 6 之胺基酸 24 至 206 的多肽、具有 SEQ ID NO: 8 之胺基酸 24 至 206 的多肽、及諸如 SEQ ID NO: 9 之肽組成之多肽接觸；及(b)偵測複合物是否存在，其中存在複合物指示生物樣品含有抗 WISE 抗體。

在其他實施例中，本發明包含偵測生物樣品中之抗 WISE 抗體之方法，其包含以下步驟：(a)在允許抗體與多肽之間形成複合物的條件下使生物樣品與包含含有胱胺酸結之 WISE 片段的組合物接觸；及(b)偵測是否存在複合物，其中存在複合物指示生物樣品含有抗 WISE 抗體。

在某些實施例中，本發明係關於交叉阻斷至少一種本發明抗體之結合的 WISE 結合劑(諸如抗體)。本發明抗體包括結合於 WISE 多肽之環 2 的抗體。表 2 中包括環 2 結合抗體之實例，其中描繪結合於 WISE 蛋白之環 2 之抗體的可變區。在其他實施例中，本發明係關於交叉阻斷表 2 中至少一種抗體與 WISE 蛋白之結合的 WISE 結合劑(諸如抗體)。

表 2 :

SEQUENCE ID NO.: 10 Ab-AA 輕鏈	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAG CAGGAGAGAAGGTCAGTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTC TGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCA GCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCA TCCACTAGGCAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTG GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGC TGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATAATCTC CTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
SEQUENCE ID NO.: 11 Ab-AA 輕鏈	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIWASTRQSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCKQSYNLLTFGAGTKLELK
SEQUENCE ID NO.: 12 Ab-AA 重鏈	GAGGTTCACTGTCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAGGTCA GGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACA TTAAAGACTACTATATACACTGGATGAAGCAGAGGCCTGAAC AGGGCCTCGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAATGGTG ATACTGAATCTGCCCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATGAC TGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCACCTCAGCAGC CTGACATTTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTAATGCAGAAG GTTACGGTAGTAGGCACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGG GACCACGGTCACCGTCTCCTCA
SEQUENCE ID NO.: 13 Ab-AA 重鏈	EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIHWKQRPEQG LEWIGWIDPENGDTESAPKFQ GKATMTADTSSNTAYLHLSSLTFE DTAVYYCNAEGYGSRHWYFDVWGAGTTVTVSS
SEQUENCE ID NO.: 14 Ab-AB 輕鏈	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTGGCTGCATCTG TGGGAGAAACCATCACCATCACATGTCAAGCAAGTGAGAACA TTTACTTCAGTTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCAAGGGGAAATC TCCTCAGCTCCTGATCTATAATGCAAACA ACTTGGAAGATGGT GTCCCATCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACACAGTATT CTATGAAGATCAACAACATGCAGCCTGAAGATACTGCAACTTA TTTCTGTAAAGAGGCTTATGACTCTCCATTCACGTTCCGGCAGC GGGACAAAATTGGAAATAAAA

SEQUENCE ID NO.: 15 Ab-AB 輕鏈	DIQMTQSPASLAASVGETITITCQASENIYFSLAWYQQKQGKSPQL LIYNANNLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINMQPEDTATYFCKE AYDSPFTFGTGTKLEIK
SEQUENCE ID NO.: 16 Ab-AB 重鏈	GAAATTCAACTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGACAAGGCCTG GGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGACTTCTGGCTACACCTT TACCAGCTACTGGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACA GGGTCTGGAATGGATTGGCGCTCTTTATCCTGGAAATAGTGTT ACTAACTACAACCAGAAAGTTCAAGGGCAAGGCCAAACTGACT GCAGTCACATCCACCAGCACTGCCTACATGGAGCTCAGCAGCC TGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAGGATT TCTTACTGCGCCCTACTTTGACTCCTGGGGCCAAGGCACCACT CTCACAGTCTCCTCA
SEQUENCE ID NO.: 17 Ab-AB 重鏈	EIQLQQSGTVLTRPGASVKMSCKTSGYTFTSYWMHWVKQRPGQ GLEWIGALYPGNSVTNYNQKFKGKAKLTAVTSTSTAYMELSSLT NEDSAVYYCTRGFLTAPYFDSWGQGTTTLTVSS
SEQUENCE ID NO.: 18 Ab-AC 輕鏈	GACATTGTGGTGTACAGGCTCCATCCTCCCTTGCTGTGTGTCAGT TGGAGAGAAGATTATTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTT TTACACAGCAGCAATCGAAGGAAGTACTTGGCCTGGTACCAAC AGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAATTGCTGATTTCCTGGGCATC CATTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGA TCCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCGTGAAGACTG AAGACCTGGCAATTTATTACTGTCACCAATATTATACTTATTCC ACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAG
SEQUENCE ID NO.: 19 Ab-AC 輕鏈	DIVVSQAPSSLAVSVGEKIIMSCSSQSLHSSNRRNYLAWYQQK PGQSPKLLISWASIRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISSVKTEDLAIY YCHQYYTYSTFGAGTKLELK
SEQUENCE ID NO.: 20 Ab-AC 重鏈	CAGGTTACTCTAAAAGAGTCTGGCCCTGAGATACTGCAGCCCT CCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTTCGTTCTCTGGGTTTTCACTG ACCACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCGTCAGCCTTCAG GAGGGAGTCTGGAATGGCTGGCTCACATTTTCTGGGATGATGA CAAGCGGTATAATCCATCCCTGACGAGTCGACTCACAATCTCC AAGGATGCCCCCAGAAACCAGGTTTTCTCAAATCACCAGTG TGGACACTGCAGATGCTGCCACATATTACTGTGCTCGAGGAGG AGATTATTACAGTACTGGATTTGGCTTTGATTACTGGGGCCAA GGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

SEQUENCE ID NO.: 21 Ab-AC 重鏈	QVTLKESGPEILQPSQTLSTCSFSGFSLTTSGMGVSWIRQPSGGSL EWLAHIFWDDDKRYNPSLTSRLTISKDAPRNQVFLKITSVDTADA ATYYCARGGDYYSTGFGFDYWGQGLVTVSA
SEQUENCE ID NO.: 22 Ab-AD 輕鏈	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTGGCTGCATCTG TGGGAGAATCCATCACCATCACATGTCAGGCAAGTGAGAACA TTTACTTCAGTTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCAAGGGAGGTC TCCTCAGCTCCTGATCTATCATGCAAAAAGTTTGAAGATGGT GTCCCATCGAGGTTCAAGTGGCAGTGGCTCTGGGACACAGTATT CTATGAAGATCAACAGCATGCAGCCTGAAGATACTGCAACTTA TTTCTGTAAACAGGCTTATGACCATCCATTACGTTTCGGCACG GGGACAAAATTGGAAATGAAA
SEQUENCE ID NO.: 23 Ab-AD 輕鏈	DIQMTQSPASLAASVGESITITCQASENIYFSLAWYQQKQGRSPQL LIYHAKSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTATYFCKQA YDHPFTFGTGTKLEMK
SEQUENCE ID NO.: 24 Ab-AD 重鏈	GAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTG GGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTT TACCAGCTACTGGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACA GGGTCTGGAATGGATTGTCGCTATTTATCCTGGAAATAGTGAT ACTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAAACTGACT GCAGTCACATCCACCAGCACTGCCTACATGGAAGTCAACAGCC TGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGTAAGAGGATT TATTACTGCGCCCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACT CTCACAGTCTCCTCA
SEQUENCE ID NO.: 25 Ab-AD 重鏈	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQRP QGLEWIVAIYPGNSDTNYNQKFKGKAKLTAVTSTSTAYMELNSL TNEDSAVYYCVRGFITAPYFDYWGQGTTLTVSS
SEQUENCE ID NO.: 26 Ab-AE 輕鏈	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAG CAGGAGAGAAGGTCATATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTC TGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCA GCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCA TCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTG GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGC TGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATAATCTT CCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAGGCTGGAAATCAAA

SEQUENCE ID NO.: 27 Ab-AE 輕鏈	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCKQSYNLPTFGGGTRLEIK
SEQUENCE ID NO.: 28 Ab-AE 重鏈	GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAGGTCA GGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACA TTAAAGACTACTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAAC AGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAAAATGGTG ATACTGAATATGCCCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATGAC TGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGC CTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTTTTACTGTAATTTCTATGA TGTTTACTCCGAGGGGACTATGGCCTACTGGGGTCAAGGAACC TCAGTCACCGTCTCCTCA
SEQUENCE ID NO.: 29 Ab-AE 重鏈	EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYMHVVKQRPEQ GLEWIGWIDPENGDEYAPKFQGKATMTADTSSNTAYLQLSSLT SEDTAVFYCNFYDVYSEGTMAYWGQGTSTVTVSS
SEQUENCE ID NO.: 30 Ab-AF 輕鏈	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCTTCACTGTCTGCATCTG TGGGAGAACTGTCACCATCACATGTGGAGCAAGTGAGAATA TTTACGGTGCTTTAAATTGGTATCAGCGGAAACAGGGAAAATC TCCTCAGGTCCTGATCTATGGTGCAACCAACTTGGCAGATGGC ATGTCATCGAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTAGACAGTATT CTCTCAAGATCAGTAGCCTGCATCCTGACGATGTTGCAATGTA TACTGTCAAATGTGTTTCAGTAGTCCGCTCACGTTCCGGTGCT GGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
SEQUENCE ID NO.: 31 Ab-AF 輕鏈	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGASENIYGALNWFYQRKQKSPQ VLIYGATNLADGMSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDDVAMYQCQ NVFS SPLTFGAGTKLELK
SEQUENCE ID NO.: 32 Ab-AF 重鏈	CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTG GAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATACCTT CACAGACTATTCAATGCACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAA GGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACTGAGACTGGTGA GCCAACATATGCAGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCT TTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTGTTTGGAGATCAACAACC TCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTTCTTTAACTGG GTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQUENCE ID NO.: 33 Ab-AF 重鏈	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSMHWVKQAPGKG LKWMGWINTETGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTACLEINNKLNE DTATYFCSLTGYWQGTSVTVSS
SEQUENCE ID NO.: 70 Ab-AG 輕鏈	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCTTCACTGTCTGCATCTG TGGGAGAACTGTCACCATCACATGTGGAGCCAGTGAGAATA TTTACGGTGCTTTAAATTGGTATCAGCGGAAACAGGGAAAATC TCCTCAGCTCCTGATCTTTGGTGCAACCAACTTGGCAGATGGC ATGTCATCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGTAGACAGTATT CTCTCGAGATCAGTAGCCTGCATCCTGACGATGTTGCAACGTA TACTGTCAAAATTTATTTAATTCTCCGCTCACATTCGGTGCTG GGACCAAGCTGGACCTGAAA
SEQUENCE ID NO.: 71 Ab-AG 輕鏈	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGASENIYGALNWDYQQRKQKSPQ LLIFGATNLADGMSSRFSGSGSGRQYSLEISSLHPDDVATYYCQN LFNSPLTFGAGTKLDLK
SEQUENCE ID NO.: 72 Ab-AG 重鏈	CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTG GAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATACCTT CACAGACTATTCAATGCACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAA GGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACTGAGACTGGTGA GCCAACATATGCAGCTGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCT TTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACC TCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTACTTTAACTGG GTACTGGGGTCAGGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
SEQUENCE ID NO.: 73 Ab-AG 重鏈	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSMHWVKQAPGKG LKWMGWINTETGEPTYAADFKGRFAFSLETSASTAYLQINNKLK EDTATYFCTLGYWQGTSVTVSS
SEQUENCE ID NO.: 74 Ab-AH 輕鏈	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAG CAGGAGAGAAGGTCAGTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTC TGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCA GCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCA TCCACTAGGAAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCATAGGCAGTG GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAGTGTGCAGGC TGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATAATCTC GTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

SEQUENCE ID NO.: 75 Ab-AH 輕鏈	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIYWASTRKSGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCKQSYNLVTFGAGTKLELK
SEQUENCE ID NO.: 76 Ab-AH 重鏈	GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAGGTCA GGGGCCTCAGTCAGGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACA TTAAAGACTTCTATATGCACTGGTTGAAGCAGAGGCCTGAACA GGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAATGGTGAT ACTGAGTCTGCCCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATGACTG CAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCT GACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTGCTGTAATGCAGAAGGC TACGATAATAGCCACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGA CCACGGTCACCGTCTCCTCA
SEQUENCE ID NO.: 77 Ab-AH 重鏈	EVQLQQSGAELVRSGASVRLSCTASGFNIKDFYMHWLKQRPEQG LEWIGWIDPENGDTESAPKFQGKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSE DTAVYCCNAEGYDNSHWYFDVWGAGTTVTVSS
SEQUENCE ID NO.: 78 Ab-AI 輕鏈	GACATTGTGGTGTCACAGGCTCCATCCTCCCTTGCTGTGTGTCAGT TGGAGAGAAGATTATTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTT TTACACAGCAGCAATCAAAGGAACTACTTGGCCTGGTACCAAC AGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACTGCTGATTTCTGGGCATC CATTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCGTGAAGACTG AAGACCTGGCAGTTTATTATTGTCACCAATATTATAGTTATTCC ACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAG
SEQUENCE ID NO.: 79 Ab-AI 輕鏈	DIVVSQAPSSLAVSVGEKIIMSCCKSSQSLLHSSNQRYLAWYQQK PGQSPKLLISWASIRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKTEDLAVY YCHQYYSYSTFGAGTKLELK
SEQUENCE ID NO.: 80 Ab-AI 重鏈	CAGGTTACTCTAAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCT CCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTG ACCACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCGTCAGCCTTCAG GAGGGAGTCTGGAATGGCTGGCACACATTTTCTGGGATGATGA CAAGCGCTATAATCCATCCCTGACGAGCCGACTCACAATCTCC AAGGATGCCTCCAGAAACCAGGTTTTCTCAAGATCAGCAGTG TGGACACTGCAGACGCTGCCACATACTACTGTGCTCGAGGAGG AGATTACTACAGTACTGGATTTGGCTTTGATTACTGGGGCCAA GGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

SEQUENCE ID NO.: 81 Ab-AI 重鏈	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLTTSGMGVSWIRQPSGGG LEWLAHIFWDDDKRYNPSLTSRLTISKDASRNQVFLKISSVDAD AATYYCARGGDYYSTGFGFDYWGGQGLVTVSA
SEQUENCE ID NO.: 82 Ab-AJ 輕鏈	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAG CAGGAGAGAAGGTCACACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTC TGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCA GCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACTGCTGATCTACTGGGCA TCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTG GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGC TGAAGACCTGGCAGTTTATTATTGCAAGCAATCTTATAATCTT CCGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
SEQUENCE ID NO.: 83 Ab-AJ 輕鏈	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQ KPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLA VYYCKQSYNLPFTFGGGTKLEIK
SEQUENCE ID NO.: 84 Ab-AJ 重鏈	GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAGGTCA GGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACA TTAAAGACTACTATATGCATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAAC AGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAATGGTG ATACTGAATATGCCCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATGAC TGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGC CTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTAATTTCTATG ATGTTTACTCCGAGGGGGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAAC CTCAGTCACCGTCTCCTCA
SEQUENCE ID NO.: 85 Ab-AJ 重鏈	EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYMHVVKQRPEQ GLEWIGWIDPENGDTHEYAPKFQGKATMTADTSSNTAYLQLSSLT SEDTAVYYCNFYDVYSEGALDYWGQGTSVTVSS

在本發明之某些實施例中，預期 Seq Id No.: 11及13、Seq Id No.: 15及17、Seq Id No.: 19及21、Seq Id No.: 23及25、Seq Id No. 27及29、Seq Id No. 31及33、Seq Id No. 71及73、Seq Id No. 75及77、Seq Id No. 79及81、以及 Seq Id No. 83及85中所描繪之多肽的可變域對為能夠結合人類 WISE之環2(Seq Id No.: 9)之結合域。如本文所用，如下特

定序列識別號中描繪之可變域包含能夠結合於 WISE(Seq Id No.: 9)之重鏈及輕鏈，亦即 Seq Id No.: 11及13稱為 Ab-AA，Seq Id No.: 15及17稱為 Ab-AB，Seq Id No.: 19及21稱為 Ab-AC，Seq Id No.: 23及25稱為 Ab-AD，Seq Id No.: 27及29稱為 Ab-AE，Seq Id No.: 31及33稱為 Ab-AF，Seq Id No.: 71及73稱為 Ab-AG，Seq Id No.: 75及77稱為 Ab-AH，Seq Id No.: 79及81稱為 Ab-AI以及 Seq Id No.: 83及85稱為 Ab-AJ。另外預期此等可變域之互補決定區可選殖至抗體(例如 IgG2)之人類構架區中，以保留 Seq Id No. 9之結合活性。

下表3中呈現表2中描繪之抗體可變域的 CDR。

表 3：

Seq Id No. 34	KSSQSLLNSRTRKNYLA
Seq Id No. 35	WASTRQS
Seq Id No. 36	KQSYNLLT
Seq Id No. 37	DYYIH
Seq Id No. 38	WIDPENGDTESAPKFQG
Seq Id No. 39	EGYGSRHWYFDV
Seq Id No. 40	QASENIYFSLA
Seq Id No. 41	NANNLED
Seq Id No. 42	KEAYDSPFT
Seq Id No. 43	SYWMH
Seq Id No. 44	ALYPGNSVTNYNQKFKG
Seq Id No. 45	GFLTAPYFDS
Seq Id No. 46	KSSQSLLHSSNRRNYLA
Seq Id No. 47	WASIRES
Seq Id No. 48	HQYYTYST
Seq Id No. 49	TSGMGVS

Seq Id No. 50	HIFWDDDDKRYNPSLTS
Seq Id No. 51	GGDYYSTGFGFDY
Seq Id No. 52	QASENIYFSLA
Seq Id No. 53	HAKSLED
Seq Id No. 54	KQAYDHPFT
Seq Id No. 55	SYWMH
Seq Id No. 56	AIYPGNSDTNYNQKFKG
Seq Id No. 57	GFITAPYFDY
Seq Id No. 58	KSSQSLLNSRTRKNYLA
Seq Id No. 59	WASTRES
Seq Id No. 60	KQSYNLPT
Seq Id No. 61	DYYMH
Seq Id No. 62	WIDPENGDTYAPKFQG
Seq Id No. 63	YDVYSEGTMAY
Seq Id No. 64	GASENIYGALN
Seq Id No. 65	GATNLAD
Seq Id No. 66	QNVFSSPLT
Seq Id No. 67	DYSMH
Seq Id No. 68	WINTETGEPTYADDFKG
Seq Id No. 69	TGY
Seq Id No. 86	GASENIYGALN
Seq Id No. 87	GATNLAD
Seq Id No. 88	QNLFNSPLT
Seq Id No. 89	DYSMH
Seq Id No. 90	WINTETGEPTYAADFKG
Seq Id No. 91	KSSQSLLNSRTRKNYLA
Seq Id No. 92	WASTRKS
Seq Id No. 93	KQSYNLVT
Seq Id No. 94	DFYMH
Seq Id No. 95	WIDPENGDTESAPKFQG
Seq Id No. 96	EGYDNSHWYFDV
Seq Id No. 97	KSSQSLLHSSNQARNYLA
Seq Id No. 98	WASIRES
Seq Id No. 99	HQYYSYST

Seq Id No. 100	TSGMGVS
Seq Id No. 101	HIFWDDDKRYNPSLTS
Seq Id No. 102	GGDYYSTGFGFDY
Seq Id No. 103	KSSQSLLNSRTRKNYLA
Seq Id No. 104	WASTRES
Seq Id No. 105	KQSYNLPT
Seq Id No. 106	DYYMH
Seq Id No. 107	WIDPENGDTHEYAPKFQG
Seq Id No. 108	YDVYSEGALDY

在某些實施例中，本發明抗體包括包含Seq Id No.: 34、35及36以及Seq Id No.: 37、38及39中所示之互補決定區的抗體。在某些實施例中，本發明抗體包括包含Seq Id No.: 40、41及42以及Seq Id No.: 43、44及45中所示之互補決定區的抗體。在某些實施例中，本發明抗體包括包含Seq Id No.: 46、47及48以及Seq Id No.: 49、50及51中所示之互補決定區的抗體。在某些實施例中，本發明抗體包括包含Seq Id No.: 52、53及54以及Seq Id No.: 55、56及57中所示之互補決定區的抗體。在某些實施例中，本發明抗體包括包含Seq Id No.: 58、59及60以及Seq Id No.: 61、62及63中所示之互補決定區的抗體。在某些實施例中，本發明抗體包括包含Seq Id No.: 64、65及66以及Seq Id No.: 67、68及69中所示之互補決定區的抗體。在某些實施例中，本發明抗體包括包含Seq Id No.: 86、87及88以及Seq Id No.: 89、90及69中所示之互補決定區的抗體。在某些實施例中，本發明抗體包括包含Seq Id No.: 91、92及93以及Seq Id No.: 94、95及96中所示之互補決定區的抗體。在某些實施例中，本發明抗體包括包含Seq Id No.: 97、98及99以及Seq

Id No.: 100、101及102中所示之互補決定區的抗體。在某些實施例中，本發明抗體包括包含Seq Id No.: 103、104及105以及Seq Id No.: 106、107及108中所示之互補決定區的抗體。

本發明之WISE結合劑亦可由至少一種包含表2中所描繪之可變域的抗體交叉阻斷與WISE之結合。本發明之WISE結合劑亦可由表2中所描繪之至少一種抗體及/或包含由以下例示之互補決定區的抗體交叉阻斷與WISE之結合：Seq Id No.: 34、35及36以及Seq Id No.: 37、38及39；Seq Id No.: 40、41及42以及Seq Id No.: 43、44及45；Seq Id No.: 46、47及48以及Seq Id No.: 49、50及51；Seq Id No.: 52、53及54以及Seq Id No.: 55、56及57；Seq Id No.: 58、59及60以及Seq Id No.: 61、62及63；Seq Id No.: 64、65及66以及Seq Id No.: 67、68及69；Seq Id No.: 86、87及88以及Seq Id No.: 89、90以及69；Seq Id No.: 91、92及93以及Seq Id No.: 94、95及96；Seq Id No.: 97、98及99以及Seq Id No.: 100、101及102；以及Seq Id No.: 103、104及105以及Seq Id No.: 106、107及108。

包含本文例示之抗體之互補決定區(CDR)的抗體包括編碼Seq Id No.: 34、35及36以及Seq Id No.: 37、38及39；Seq Id No.: 40、41及42以及Seq Id No.: 43、44及45；Seq Id No.: 46、47及48以及Seq Id No.: 49、50及51；Seq Id No.: 52、53及54以及Seq Id No.: 55、56及57；Seq Id No.: 58、59及60以及Seq Id No.: 61、62及63；Seq Id No.: 64、

65及66以及Seq Id No.: 67、68及69；Seq Id No.: 86、87及88以及Seq Id No.: 89、90及69；Seq Id No.: 91、92及93以及Seq Id No.: 94、95及96；Seq Id No.: 97、98及99以及Seq Id No.: 100、101及102；或Seq Id No.: 103、104及105以及Seq Id No.: 106、107及108中所示之CDR的核酸使用習知分子生物學技術選殖至人類構架區中的人類化抗體。此等序列之選殖中可對構架區進行或不進行額外修飾及/或對CDR進行額外改變。此等人類化抗體使用本文部分描述之習知方法表現。本發明人類化抗體之實例包括描繪為重鏈及輕鏈對之相應核酸序列如下表4中Seq Id No.: 110及112、Seq Id No.: 114及116、Seq Id No.: 118及116、Seq Id No.: 114及120、Seq Id No.: 118及120、Seq Id No.: 122及124、Seq Id No.: 126及124、Seq Id No.: 122及128、以及Seq Id No.: 126及128所示的抗體。

表 4：

Seq Id No. 109	GATATCGTAATGACCCAGTCGCCTGACTCACTTGCGGTGTCC CTCGGGGAAAGAGCTACAATCAATTGCAAGTCAAGCCAGTC CTTGCTCAACAGCAGGACGCGAAAGAACTACTTGGCGTGGT ACCAGCAAAAGCCGGGACAACCGCCCAAGTTGCTGATCTAT TGGGCCTCAACGCGCGAGTCGGGGGTCCCAGACCGGTTCTCG GGTTCGGGATCCGGGACTGACTTCACGCTGACTATTTTCGTCG TTGCAGGCAGAGGATGTCGCGGTGTATTACTGTAAACAGAG CTATAACCTTCCCACCTTTGGTGGCGGAACAAAAGTGGAAT CAAA
Seq Id No. 110	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCKQSYNLPTFGGGTKVEIK
Seq Id No. 111	CAGGTACAACTCGTGCAGAGCGGAGCCGAAGTCAAAAAGCC

	CGGTGCGTCAGTGAAGGTATCGTGTAAGGCATCAGGGTTTAA CATCAAAGATTACTACATGCACTGGGTGAGGCAAGCTCCGG GCCAGGGGCTGGAGTGGATGGGGTGGATTGATCCAGAAAAT GGAGACACTGAGTATGCACCTAAGTTCCAGGGGAGAGTGAC GATGACAGCGGACACCTCGACGTCCACAGTGTACATGGAGC TGTCGTCCTTGCGCAGCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGCA ACTTCTATGATGTCTACTCGGAAGGTGCGTTGGACTATTGGG GACAGGGAACCCTTGTGACCGTCTCTAGT
Seq Id No. 112	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAP GQGLEWMGWIDPENGDEYAPKFQGRVTMTADTSTSTVYME SSLRSEDVAVYYCNFYDVYSEGALDYWGQGLTVTVSS
Seq Id No. 113	GACATTCAGATGACTCAATCACCTCGTCCCTCTCAGCTTCC GTCGGTGATAGGGTAACAATCACATGTCAAGCGAGCGAGAA CATCTATTTCTCGCTTGCGTGGTATCAGCAGAAGCCTGGGAA AGCGCCCAAGTTGCTGATCTACAATGCCAACAATTTGGAGGA TGGGGTGCCATCGAGATTTTCGGGATCCGGCAGCGGAAGT ACTTCACGTTACCATTAGCTCGCTTCAGCCGGAGGACATTG CCACCTACTATTGCAAAGAAGCATACGATTCACCGTTTACGT TTGGACAGGGGACAAAGCTCGAAATCAAA
Seq Id No. 114	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASENIYFSLAWYQQKPGKAP KLLIYNANNLEDGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDVATYYCK EAYDSPFTFGQGTKLEIK
Seq Id No. 115	CAAGTACAATTGGTGCAGTCAGGAGCAGAAGTCAAGAAGCC GGGTGCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAGACTTCGGGATATA CTTTCACGAGCTACTGGATGCACTGGGTCCGCCAGGCCCCAG GCCAGGGGCTTGAGTGGATGGGTGCGCTGTACCCCGGAAAT TCGGTCACAACTATAACCAGAAGTTCAAAGGGAGGGTGAC AATGACCGCGGACACGTCAACGTCCACTGTATACATGGAGCT GTCCTCGCTCAGATCAGAGGATACGGCGGTGTACTATTGCAC ACGGGGGTTTTTGACAGCCCCTTACTTTGACTCGTGGGGACA GGGGACCACCGTGACCGTCTCTAGT
Seq Id No. 116	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTSYWMHWVRQAP GQGLEWMGALYPGNSVTNYNQKFKGRVTMTADTSTSTVYME LSSLRSEDVAVYYCTRGFLTAPYFDSWGQGTITVTVSS
Seq Id No. 117	GACATTCAGATGACTCAATCACCTCGTCCCTCTCAGCTTCC GTCGGTGATAGGGTAACAATCACATGTCAAGCGAGCGAGAA CATCTATTTCTCGCTTGCGTGGTATCAGCAGAAGCCTGGGAA

	AGCGCCCAAGTTGCTGATCTACAATGCCAACAATTTGGAGGA TGGGGTGCCATCGAGATTTTCGGGATCCGGCAGCGGAACTG ACTACACGTTACCATTAGCTCGCTTCAGCCGGAGGACATTG CCACCTACTTCTGCAAAGAAGCATACGATTCACCGTTTACGT TTGGACAGGGGACAAAGCTCGAAATCAAA
Seq Id No. 118	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASENIYFSLAWYQQKPGKAP KLLIYNANNLEDGVPSRFSGSGSGTDYFTISLQPEDATYFCK EAYDSPFTFGQGTKLEIK
Seq Id No. 119	CAAATCCAATTGGTGCAGTCAGGAGCAGAAGTCAAGAAGCC GGTGCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAGACTTCGGGATATA CTTTCACGAGCTACTGGATGCACTGGGTCCGCCAGGCCCCAG GCCAGGGGCTTGAGTGGATGGGTGCGCTGTACCCCGGAAAT TCGGTCACAACTATAACCAGAAGTTCAAAGGGAGGGCCAA GCTGACCGCGGACACGTCAACGTCCACTGCCTACATGGAGCT GTCCTCGCTCAGATCAGAGGATACGGCGGTGTACTATTGCAC ACGGGGGTTTTTGACAGCCCCTTACTTTGACTCGTGGGGACA GGGGACCACCGTGACCGTCTCTAGT
Seq Id No. 120	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTSYWMHWVRQAPG QGLEWMGALYPGNSVTNYNQKFKGRAKLTADTSTSTAYMELS SLRSEDVAVYYCTRFLTPYFDSWGQGTITVTVSS
Seq Id No. 121	GATATCGTAATGACGCAATCCCCGGACTCACTTGCCGTGTCG CTTGCGGAAAGAGCTACCATTAAGTCAAGTCATCCAGTCA TTGTTGCATTCGTGCAACCAGAGGAATTACCTGGCGTGGTAC CAACAAAAGCCTGGACAGCCACCCAAATTGTTGATCTATTGG GCGTCAATTGCGGAAAGCGGGGTCCCCGACCGGTTCTCGGG AAGCGGTTCCGGTACTGACTTTACACTCACGATCAGCTCGCT CCAGGCAGAGGATGTGGCGGTATACTATTGTCACCAGTATTA CTCATACTCGACATTCGGGCAGGGAACCAAACTGGAGATCA AA
Seq Id No. 122	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLHSSNQRYNLAWYQ QKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAED VAVYYCHQYYSYSTFGQGTKLEIK
Seq Id No. 123	CAGGTCACACTTAAGGAGTCGGGTCCAGCGCTCGTGAAGCC CACACAGACCTTGACCCTCACGTGTACGTTCTCGGGATTTTC ACTTACGACTAGCGGGATGGGCGTAAGCTGGATTCGGCAAC CTCCGGGGAAAGCGCTGGAATGGTTGGCACACATCTTCTGGG ATGATGACAAAAGGTATAACCCCTCGCTCACGTCGCGCCTGA

	CAATCTCAAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTAGTGCTTACG ATGACGAATATGGATCCCGTGGACACAGCAACTTACTACTGC GCCAGAGGAGGAGATTACTATTCCACAGGGTTTGGTTTTGAC TACTGGGGGCAGGGAACCTCTGGTCACCGTCTCTAGT
Seq Id No. 124	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLTTSGMGVSWIRQPPG KALEWLAHIFWDDDKRYNPSLTSRLTISKDTSKNQVVLMTNM DPVDTATYYCARGGDYYSTGFGFDYWGQGTLVTVSS
Seq Id No. 125	GATATCGTAATGACGCAATCCCCGGACTIONTGGCGTGTCG CTTGGCGAAAGAGCTACCATTAAGTCAAGTCATCCAGTCA TTGTTGCATTTCGTCGAACCAGAGGAATTACCTGGCGTGGTAC CAACAAAAGCCTGGACAGCCACCCAAATTGTTGATCAGCTG GGCGTCAATTCGCGAAAGCGGGGTCCCCGACCGGTTCTCGG GAAGCGGTTCCGGTACTGACTTTACACTCACGATCAGCTCGC TCCAGGCAGAGGATGTGGCGGTATACTATTGTCACCAGTATT ACTCATACTCGACATTCGGGCAGGGAACCAAACCTGGAGATC AAA
Seq Id No. 126	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLHSSNQRYNLAWYQ QKPGQPPKLLISWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCHQYYSYSTFGQGTKLEIK
Seq Id No. 127	CAGGTCACACTTAAGGAGTCGGGTCCAGCGCTCGTGAAGCC CACACAGACCTTGACCCTCACGTGTACGTTCTCGGGATTTTC ACTTAGCACTAGCGGGATGGGCGTAAGCTGGATTTCGGCAAC CTCCGGGGAAAGCGCTGGAATGGTTGGCACACATCTTCTGGG ATGATGACAAAAGGTATAACCCCTCGCTCACGTCGCGCCTGA CAATCTCAAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTAGTGCTTACG ATGACGAATATGGATCCCGTGGACACAGCAACTTACTACTGC GCCAGAGGAGGAGATTACTATTCCACAGGGTTTGGTTTTGAC TACTGGGGGCAGGGAACCTCTGGTCACCGTCTCTAGT
Seq Id No. 128	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLTSGMGVSWIRQPPG KALEWLAHIFWDDDKRYNPSLTSRLTISKDTSKNQVVLMTNM DPVDTATYYCARGGDYYSTGFGFDYWGQGTLVTVSS

在其他實施例中，本發明係關於在「人類 WISE 肽抗原決定基競爭結合檢驗」中對人類 WISE 肽展示與抗體 Ab-AA、Ab-AB、Ab-AC、Ab-AD、Ab-AE、Ab-AF、Ab-

AG、Ab-AH、Ab-AI、Ab-AJ及D14或其衍生物中至少一者所展示類似之結合模式的結合劑(諸如經分離抗體)；經分離抗體或其抗原結合片段可為多株抗體、單株抗體、人類化抗體、人類抗體或嵌合抗體。

對 WISE 具特異性之人類抗體的實例顯示於下表 5 中。

表 5：

Seq Id No. 129	CAGTACGAATTGACTCAGCCACCCTCAGTGGCCGTGTCCCC TGGAAAGACAGCCAGCATCACCTGCGCTGGAGATGAATTGG GTAATAAATATGCTGCGTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAG GCCCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATGATAGCGACCGGCCCTC AGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACA CGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGA GGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGAAGTAGTTATC ATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT CAGCCCAAGGCCAACCCCACTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCC TCTGAGGAGCTCCAAGCCAACAAGGCCACACTAGTGTGTCT GATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGA AGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCAC CAAACCCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGC AGCTACCTGAGCCTGACGCCCAGCAGTGGAAGTCCCACAG AAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTG GAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA
Seq Id No. 130	QYELTQPPSVAVSPGKTASITCAGDELGNKYAAWYQQKPGQA PVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYY CQVWDRS SYHWFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPS SEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Seq Id No. 131	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACGCCT GGTGGTTCTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTT TCTCTCTTTACACTATGCAGTGGGTTTCGCCAAGCTCCTGGTA AAGGTTTGGAGTGGGTTTCTGGTATCGGTTCTTCTGGTGGCG GTACTTCTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCT CTAGAGACAACCTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAAC AGCTTAAGGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAG AGGGGTCAGCAGTTGGTTTTTCGAGTACTGGGGCCAGGGAA CCCTGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAG

	CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGC GGCGTGACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTC GGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTG TCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCG TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGA GGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAATAACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCGGGTAAA
Seq Id No. 132	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLYTMQWVRQAPG KGLEWVSGIGSSGGGTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGVSSWFF EYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSWTVPSNF GTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVWDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV HEALHNHYTQKSLSLSPGK
Seq Id No. 133	AGDELGNKYAA
Seq Id No. 134	DDSDRPS
Seq Id No. 135	QVWDRSSYHVV
Seq Id No. 136	LYTMQ
Seq Id No. 137	GIGSSGGGTSYADSVKG

表 5 中之人類抗體的 CDR 可進一步突變以例如藉由增加對人類 WISE 之親和力提高抗體功能，其中突變如下表 6 中所述。基於抗體之重鏈或輕鏈 (Seq Id No. 132 或 Seq Id No. 130) 中之胺基酸殘基位置進行編號。

表 6

	突變
DNW-D14	親本
D14-DM03	H35(HC CDR2-5D)+L33(LC CDR1-7E)
D14-DM05	H35(HC CDR2-5D)+L36(LC CDR1-7S)
D14-DM09	H35(HC CDR2-5D)+L98(LC CDR3-5W)
D14-DM13	H66(HC CDR2-8P)+L33(LC CDR1-7E)
D14-DM15	H66(HC CDR2-8P)+L36(LC CDR1-7S)
D14-DM16	H66(HC CDR2-8P)+L37(LC CDR1-7T)
D14-DM19	H66(HC CDR2-8P)+L98(LC CDR3-5W)
D14-DM25	H118(HC CDR2-17H)+L36(LC CDR1-7S)
D14-DM44	H95(HC CDR2-14H)+L36(LC CDR1-7S)
D14-DM46	H41(HC CDR2-5Q)+L36(LC CDR1-7S)
D14-TM1	H66(HC CDR2-8P)+H127(HC CDR3-4G)+L34(LC CDR1-7G)
D14-TM2	H66(HC CDR2-8P)+H127(HC CDR3-4G)+L36(LC CDR1-7S)
D14-L36	LC-CDR1-7 N->S

本發明進一步係關於治療哺乳動物個體中之腎臟及/或肺纖維變性疾病或病症之方法，其包含向需要該治療之個體提供足以減輕與該病症相關之症狀之量的抗 WISE 結合劑，其中抗 WISE 結合劑包含抗體或其 WISE 結合片段。

本文提供特異性結合於人類 WISE 之抗體。本發明抗體特徵為其交叉阻斷至少一種本文揭示之抗體與人類 WISE 之結合及/或由至少一種本文揭示之抗體交叉阻斷與人類

WISE之結合的能力。本發明亦提供在基於細胞之檢驗中可阻斷WISE之作用的經分離抗體或其抗原結合片段。本發明亦提供在基於細胞之檢驗中可活化WISE之作用的單株抗體或其片段。

本發明之此等及其他態樣參考以下詳細描述及隨附圖式將顯而易見。本文揭示之所有參考文獻均以全文引用的方式併入本文中，如同其個別併入一般。

【實施方式】

本發明部分係關於含有由抗體辨識之抗原決定基的WISE蛋白之區，其中此等抗體在全長WISE多肽情形中亦能夠結合於抗原決定基，且係關於製備及使用此等抗原決定基之方法。本發明亦提供特異性結合於WISE或WISE之部分的結合劑(諸如抗體)，及該等結合劑之使用方法。結合劑適於阻斷或賦予人類WISE與一或多種配位體之結合及其生物活性。

如本文所用，術語人類WISE欲包括Seq Id No. 2、4、6及8中所描繪之蛋白質及其對偶基因變異體。亦描述WISE之直系同源物且包括小鼠、大鼠及石蟹獼猴Seq Id No. 2、4、6及8。可藉由溶離宿主細胞培養液之經過濾上清液自己由編碼WISE之基因轉染的宿主細胞純化WISE。實例中描述製備及進一步純化。人類WISE核酸描述於美國專利第5,780,263號中。

熟習此項技術者應理解，WISE之直系同源物之間存在高度序列一致性。因此，在結合劑之辨識位點(例如抗體

結合位點，諸如抗原決定基)高度保守且詳言之與人類序列幾乎或完全一致的情形中，預期人類 WISE 之結合劑將結合於小鼠、大鼠或石蟹獼猴 WISE。因此，當使用術語「特異性結合於 WISE」時，應理解包括結合於多個物種之 WISE，其中各物種之間序列為保守的。

本發明結合劑之實例包括以下：Ab-AA、Ab-AB、Ab-AC、Ab-AD、Ab-AE、Ab-AF、Ab-AG、Ab-AH、Ab-AI、Ab-AJ及D14，以及包含Seq Id No.: 34、35及36以及Seq Id No.: 37、38及39；Seq Id No.: 40、41及42以及Seq Id No.: 43、44及45；Seq Id No.: 46、47及48以及Seq Id No.: 49、50及51；Seq Id No.: 52、53及54以及Seq Id No.: 55、56及57；Seq Id No.: 58、59及60以及Seq Id No.: 61、62及63；Seq Id No.: 64、65及66以及Seq Id No.: 67、68及69；Seq Id No.: 86、87及88以及Seq Id No.: 89、90及69；Seq Id No.: 91、92及93以及Seq Id No.: 94、95及96；Seq Id No.: 97、98及99以及Seq Id No.: 100、101及102；Seq Id No.: 103、104及105以及Seq Id No.: 106、107及108；以及Seq Id No.: 133、134及135以及Seq Id No.: 136、137及138之抗體。此外，本發明CDR-L1多肽之實例包括Seq Id No.: 34、40、46、52、58、64、86、91、97、103及133中所示之多肽。CDR-L2之實例包括Seq Id No.: 35、41、47、53、59、65、87、92、98、104及134中所示者。CDR-L3之實例包括Seq Id No.: 36、42、48、54、60、66、88、93、99、105及135中所示者。CDR-H1之實例包括Seq Id

No.: 37、43、49、55、61、67、89、94、100、106及136中所示者。CDR-H2之實例包括Seq Id No.: 38、44、50、56、62、68、90、95、101、107及137中所示者。CDR-H3之實例包括Seq Id No.: 39、45、51、57、63、69、96、102、108及138中所示者。

如本文所用，Ab-AA包含由Seq Id No. 10及12中所示之核苷酸表現之多肽；Ab-AB包含由Seq Id No. 14及16中所示之核苷酸表現之多肽；Ab-AC包含由Seq Id No. 18及20中所示之核苷酸表現之多肽；Ab-AD包含由Seq Id No. 22及24中所示之核苷酸表現之多肽；Ab-AE包含由Seq Id No. 26及28中所示之核苷酸表現之多肽；Ab-AF包含由Seq Id No. 30及32中所示之核苷酸表現之多肽；Ab-AG包含由Seq Id No. 70及72中所示之核苷酸表現之多肽；Ab-AH包含由Seq Id No. 74及76中所示之核苷酸表現之多肽；Ab-AI包含由Seq Id No. 78及80中所示之核苷酸表現之多肽；Ab-AJ包含由Seq Id No. 82及84中所示之核苷酸表現之多肽；且D14包含由Seq Id No.: 129及131中所示之核苷酸表現之多肽。亦應理解，本文中Ab-AA、Ab-AB、Ab-AC、Ab-AD、Ab-AE、Ab-AF、Ab-AG、Ab-AH、Ab-AI、Ab-AJ及D14各顯示缺乏信號肽，且熟習此項技術者可使用習知技術(包括使用此項技術中已知之信號肽)表現此等多肽中之每一者。亦應理解，本文所述之Ab-AA、Ab-AB、Ab-AC、Ab-AD、Ab-AE、Ab-AF、Ab-AG、Ab-AH、Ab-AI及Ab-AJ各僅包括可變輕鏈及重鏈且不包括恆定區。

此外，本文所述之非人類抗體可藉由多種不同策略人類化，包括簡單『剪切及黏貼』CDR，或亦可包括回復突變以保持人類化分子中之關鍵鼠類序列。人類化之特定實例包括下文實例中之Ab-AB、Ab-AI及Ab-AE(Seq Id No.: 114及116、Seq Id No.: 118及120、Seq Id No.: 122及124、Seq Id No.: 126及128、以及Seq Id No. 110及112)。

額外抗體資料參考美國專利申請案第12/275,850號(US 2009/0130114)中先前揭示之分子(例如Ab-C、Ab-T、Ab-S及Ab-P)呈現於本文中，該申請案以全文引用的方式併入本文中。

本發明之結合劑通常為如本文所定義之抗體或其片段。術語「抗體」係指完整抗體或其結合片段。抗體可包含完全抗體分子(包括具有全長重鏈及/或輕鏈之多株、單株、嵌合、人類化或人類型式)或包含其抗原結合片段。抗體片段包括F(ab')₂、Fab、Fab'、Fv、Fc及Fd片段，且可併入至單結構域抗體、單鏈抗體、最大抗體、微型抗體、細胞內抗體、微型雙功能抗體、三功能抗體(triobody)、四功能抗體(tetrabody)、v-NAR及雙-scFv中(參看例如Hollinger及Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136)。抗體多肽亦揭示於美國專利第6,703,199號中，包括纖維結合蛋白多肽單功能抗體(monobody)。其他抗體多肽揭示於美國專利公開案2005/0238646中，其為單鏈多肽。如本文所用，經分離抗體或其抗原結合片段可為多株抗體、單株抗體、人類化抗體、人類抗體、嵌合抗體或其

類似抗體。

根據習知方法，可例如藉由蛋白水解抗體(例如用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化全抗體)獲得源自抗體之抗原結合片段。舉例而言，可藉由使用胃蛋白酶酶促裂解抗體獲得稱為F(ab')₂之5S片段，從而製造抗體片段。此片段可使用硫醇還原劑進一步裂解產生3.5S Fab'單價片段。視情況，可使用二硫鍵裂解產生之硫氫基的阻隔基進行裂解反應。或者，使用木瓜蛋白酶之酶促裂解直接產生兩個單價Fab片段及一個Fc片段。此等方法由例如Goldenberg, 美國專利第4,331,647號；Nisonoff等人, Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960；Porter, Biochem. J. 73:119, 1959；Edelman等人, Methods in Enzymology 1:422 (Academic Press 1967)；及Andrews, S. M.及Titus, J. A., Current Protocols in Immunology (Coligan J. E.等人編), John Wiley & Sons, New York (2003)。第2.8.1頁-第2.8.10頁及第2.10A.1頁-第2.10A.5頁描述。亦可使用裂解抗體之其他方法，諸如分離重鏈形成單價輕鏈-重鏈片段(Fd)、進一步裂解片段、或其他酶促、化學或遺傳技術，只要片段結合於由完整抗體辨識之抗原即可。

抗體片段亦可為任何合成或經遺傳工程改造之蛋白質。舉例而言，抗體片段包括由輕鏈可變區組成之分離片段；由重鏈及輕鏈之可變區組成之「Fv」片段；重組單鏈多肽分子，其中輕鏈及重鏈可變區由肽連接子連接(scFv蛋白)。

抗體片段之另一形式為包含抗體之一或多個互補決定區(CDR)的多肽。CDR(亦稱為「最小辨識單位」或「高變區」)可由建構編碼所關注CDR之聚核苷酸獲得。該等聚核苷酸例如藉由使用聚合酶鏈反應製備，使用產生抗體之細胞的mRNA作為模板合成可變區(參看例如Larrick等人，Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991；Courtenay-Luck，「第 Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies」第 Monoclonal Antibodies. Production, Engineering and Clinical Application, Ritter等人，(編)，第166頁(Cambridge University Press 1995)；及Ward等人，「Genetic Manipulation and Expression of Antibodies」Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch等人，(編)，第137頁(Wiley-Liss, Inc. 1995))。

因此，在一個實施例中，結合劑包含至少一個如本文所述之CDR。結合劑可包含至少兩個、三個、四個、五個或六個如本文所述之CDR。結合劑另外可包含本文所述抗體之至少一個可變區結構域。可變區結構域可具有任何大小或胺基酸組成，一般包含至少一個負責結合於人類 WISE 之CDR序列，例如CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3，及/或本文特定描述之輕鏈CDRs，且與一或多個構架序列相鄰或同框。一般而言，可變(V)區結構域可為免疫球蛋白重鏈(VH)及/或輕鏈(VL)可變域的任何適合排列。因此，舉例而言，V區結構域可為單體的且為VH或VL結構域，其能

夠如下文所述以至少等於或小於 1×10^{-7} M之親和力獨立結合人類 WISE。或者，V區結構域可為二聚的且含有 VH-VH、VH-VL或 VL-VL二聚體。V區二聚體包含可非共價締合之至少一個 VH鏈及至少一個 VL鏈(下文稱為 FV)。需要時，該等鏈可例如經由兩個可變域之間的二硫鍵直接共價偶聯或經例如肽連接子之連接子共價偶聯，形成單鏈 Fv(scFV)。

可變區結構域可為任何天然存在之可變域或其經工程改造之型式。經工程改造之型式意謂可變區結構域使用重組 DNA工程改造技術形成。該等經工程改造之型式包括例如藉由特異性抗體之胺基酸序列的插入、缺失或改變而自特異性抗體可變區形成之型式。特定實例包括經工程改造之可變區結構域，其含有至少一個 CDR及視情況存在之一或多個來自第一抗體之構架胺基酸，且該可變區結構域之其餘部分來自第二抗體。

可變區結構域可在 C端胺基酸處共價連接至至少一個其他抗體結構域或其片段。因此，舉例而言，可變區結構域中存在之 VH結構域可連接至免疫球蛋白 CH1結構域或其片段。同樣，VL結構域可連接至 CK結構域或其片段。以此方式，抗體可例如為如下 Fab片段，其中抗原結合域含有分別在 C端共價連接於 CH1及 CK結構域之締合 VH及 VL結構域。CH1結構域可以其他胺基酸擴展以例如提供如 Fab'片段中所發現之鉸鏈區或鉸鏈區結構域之一部分，或提供其他結構域，諸如抗體 CH2及 CH3結構域。

如本文所述，結合劑包含此等CDR中之至少一者。舉例而言，一或多個CDR可併入至已知抗體構架區(IgG1、IgG2等)中或結合於適合媒劑以提高其半衰期。適合媒劑包括(但不限於)Fc、聚乙二醇(PEG)、白蛋白、運鐵蛋白及其類似物。此項技術中已知此等及其他適合媒劑。該等結合之CDR肽可為單體、二聚、四聚或其他形式。在一實施例中，一或多種水溶性聚合物鍵結於結合劑之一或多個特定位置處(例如胺基端)。

在某些實施例中，結合劑包含一或多個水溶性聚合物連接，包括(但不限於)聚乙二醇、聚氧乙二醇或聚丙二醇。參看例如美國專利第4,640,835號、第4,496,689號、第4,301,144號、第4,670,417號、第4,791,192號及第4,179,337號。在某些實施例中，衍生物結合劑包含以下一或多者：單甲氧基-聚乙二醇、聚葡萄糖、纖維素或其他基於碳水化合物之聚合物、聚-(N-乙烯基吡咯啉酮)-聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)及聚乙烯醇，以及該等聚合物之混合物。在某些實施例中，一或多種水溶性聚合物隨機連接於一或多個側鏈。在某些實施例中，PEG可用於提高結合劑(諸如抗體)的治療能力。某些該等方法論述於例如美國專利第6,133,426號中，該案出於任何目的以引用的方式併入本文中。

熟習此項技術者應瞭解，本發明結合劑可具有至少一個胺基酸取代，只要結合劑保留結合特異性即可。因此，對

結合劑結構之修飾涵蓋於本發明範疇內。此等修飾可包括胺基酸取代，其可為保守或非保守的且不會破壞結合劑之WISE結合能力。保守胺基酸取代可涵蓋非天然存在之胺基酸殘基，其通常藉由化學肽合成而非生物系統中之合成併入。此等殘基包括肽模擬物，及胺基酸部分之其他反相或反向形式。保守胺基酸取代亦可涉及以標準殘基(normative residue)取代原生胺基酸殘基，使得對彼位置處胺基酸殘基的極性或電荷幾乎無影響。

非保守取代可涉及將一類胺基酸或胺基酸模擬物的一員換為具有不同物理特性(例如大小、極性、疏水性、電荷)的另一類別之一員。該等經取代殘基可引入至與非人類抗體同源之人類抗體之區域中或引入至分子之非同源區中。

此外，熟習此項技術者可產生在各所要胺基酸殘基處含有單個胺基酸取代之測試變異體。該測試可對如下文實例中所述之結合劑的標靶或對本發明之治療性結合劑進行。接著可使用熟習此項技術者已知的活性檢驗篩選變異體。該等變異體可用於收集關於適合變異體之資訊。舉例而言，若發現特定胺基酸殘基之改變導致受損、不必要減少或不適當的活性，則可避免具有該改變之變異體。換言之，基於自該等常規實驗收集之資訊，熟習此項技術者可容易地判定胺基酸何處應避免單獨或與其他突變組合的進一步取代。

熟練技術人員將能夠使用熟知技術判定如本文所述多肽之適合變異體。在某些實施例中，熟習此項技術者可藉由

靶向可信對活性不重要之區域來識別可能發生改變但不會破壞活性的適合分子區域。在某些實施例中，可識別在類似多肽中保守之殘基及分子部分。在某些實施例中，甚至對生物活性或對結構重要之區域亦可進行保守胺基酸取代，而不破壞生物活性或不會不利地影響多肽結構。

此外，熟習此項技術者可回顧識別類似多肽中對活性或結構重要之殘基的結構-功能研究。鑒於該比較，可預測在蛋白質中對應於類似蛋白質中對活性或結構重要之胺基酸殘基之胺基酸殘基的重要性。熟習此項技術者可選擇化學上類似之胺基酸取代用於該等預測之重要胺基酸殘基。

許多科學出版物已致力於二級結構之預測。參看 Moult J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4):422-427 (1996); Chou 等人, *Biochemistry*, 13(2):222-245 (1974); Chou 等人, *Biochemistry*, 113(2):211-222 (1974); Chou 等人, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47: 45-148 (1978); Chou 等人, *Ann. Rev. Biochem.*, 47:251-276 及 Chou 等人, *Biophys. J.*, 26:367-384 (1979)。此外，目前可利用電腦程式輔助預測二級結構。一種預測二級結構之方法係基於同源建模。舉例而言，具有大於30%序列一致性或大於40%相似性之兩個多肽或蛋白質通常具有類似的結構佈局。蛋白質結構資料庫(PDB)之近期發展提高了二級結構(包括多肽結構或蛋白質結構內潛在的摺疊數)之可預測性。參看 Holm 等人, *Nucl. Acid. Res.*, 27(1):244-247 (1999)。已提出 (Brenner 等人, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3):369-376

(1997))，在既定多肽或蛋白質中存在有限數目之摺疊且一旦解析關鍵數目之結構，則結構預測將變得顯著更精確。

其他預測二級結構之方法包括「穿線(threading)」(Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(3):377-87 (1997); Sippl等人, *Structure*, 4(1):15-19 (1996))、「概況分析」(Bowie等人, *Science*, 253:164-170 (1991); Gribskov等人, *Meth. Enzym.*, 183:146-159 (1990); Gribskov等人, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84(13):4355-4358 (1987))及「進化聯繫(evolutionary linkage)」(參看 Holm, 上文(1999)及 Brenner, 上文(1997))。

在某些實施例中，結合劑變異體包括糖基化變異體，其中糖基化位點之數目及/或類型相較於親本多肽之胺基酸序列有所改變。在某些實施例中，變異體包含與原生蛋白質相比更多或更少數目之N-連接糖基化位點。N-連接糖基化位點之特徵為以下序列：Asn-X-Ser或Asn-X-Thr，其中表示為X之胺基酸殘基可為除脯胺酸之外的任何胺基酸殘基。形成此序列之胺基酸殘基之取代提供潛在新位點以供添加N-連接碳水化合物鏈。或者，消除此序列之取代將移除現有N-連接碳水化合物鏈。亦提供N-連接碳水化合物鏈之重排，其中消除一或多個N-連接糖基化位點(通常為天然存在之位點)且形成一或多個新N-連接位點。額外較佳抗體變異體包括半胱胺酸變異體，其中與親本胺基酸序列相比，一或多個半胱胺酸殘基缺失或由另一胺基酸(例如絲胺酸)取代。當抗體諸如在分離不可溶包涵體之後須再

摺疊成生物活性構形時，半胱胺酸變異體可能有用。半胱胺酸變異體一般相較於原生蛋白質具有較少半胱胺酸殘基，且通常具有偶數個以使未成對半胱胺酸引起之相互作用降至最低。

所要胺基酸取代(保守或非保守)可在需要該等取代時由熟習此項技術者確定。在某些實施例中，胺基酸取代可用於識別對 WISE 重要的抗體殘基，或增加或降低抗體對本文所述 WISE 之親和力。

根據某些實施例，較佳胺基酸取代為以下取代：(1)降低對蛋白水解之易感性，(2)降低對氧化之易感性，(3)改變形成蛋白質複合物之結合親和力，(4)改變結合親和力，及/或(5)賦予該等多肽其他生理化學或功能特性或修飾該等特性。根據某些實施例，單個或多個胺基酸取代(在某些實施例中，保守胺基酸取代)可於天然存在之序列中進行(在某些實施例中，在形成分子間接觸之結構域之外的多肽部分中)。在某些實施例中，保守胺基酸取代通常無法實質上改變親本序列之結構特徵(例如置換胺基酸不應傾向於中斷親本序列中存在之螺旋，或破壞表徵親本序列之其他類型的二級結構)。此項技術辨識之多肽二級結構及三級結構之實例描述於 *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton 編，W.H. Freeman and Company, New York (1984))；*Introduction to Protein Structure* (C. Branden 及 J. Tooze 編，Garland Publishing, New York, N.Y. (1991))；及 Thornton 等人，*Nature* 354:105

(1991)中，該等文獻各以引用的方式併入本文中。

在某些實施例中，本發明結合劑可與聚合物、脂質或其他部分化學鍵結。

結合劑可包含至少一個併入至生物相容性構架結構中之本文所述之CDR。在一實例中，生物相容性構架結構包含足以形成構形穩定結構支撐之多肽或其部分，或能夠呈現一或多個結合於局部表面區域中之抗原(例如CDR、可變區等)的胺基酸序列之構架或骨架。該等結構可為天然存在之多肽或多肽「摺疊」(結構基元)，或相對於天然存在之多肽或摺疊可具有一或多種修飾，諸如胺基酸之添加、缺失或取代。此等骨架可源自任何物種(或一種以上物種)(諸如人類、其他哺乳動物、其他脊椎動物、無脊椎動物、植物、細菌或病毒)之多肽。

生物相容性構架結構通常基於除免疫球蛋白結構域以外的蛋白質骨架或基幹。舉例而言，可使用基於纖維結合蛋白、錨蛋白、脂質運載蛋白、新抑癌素(neocarzinostatin)、細胞色素b(cytochrome b)、CP1鋅指、PST1、捲曲螺旋、LAC1-D1、Z結構域及澱粉酶抑肽(tendramisat)結構域之構架結構(參看例如Nygren及Uhlen, 1997, Current Opinion in Structural Biology, 7, 463-469)。

在較佳實施例中，應瞭解本發明結合劑包括本文所述之人類化抗體。可使用熟習此項技術者已知之技術產生人類化抗體(諸如本文所述之人類化抗體)(Zhang, W.等人, Molecular Immunology. 42(12): 1445-1451, 2005; Hwang

W.等人，Methods. 36(1):35-42, 2005；Dall'Acqua W F等人，Methods 36(1):43-60, 2005；及Clark, M., Immunology Today. 21(8):397-402, 2000)。

此外，熟習此項技術者將瞭解，適合結合劑包括此等抗體之部分，諸如本文特定揭示之CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3中之一或多者。CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3區中至少一者可具有至少一個胺基酸取代，只要結合劑保留未經取代CDR之結合特異性即可。結合劑之非CDR部分可為非蛋白質分子，其中結合劑交叉阻斷本文揭示之抗體與WISE的結合及/或中和WISE。結合劑之非CDR部分可為非蛋白質分子，其中結合劑在「人類WISE肽抗原決定基競爭結合檢驗」中對人類WISE肽展現與至少一種本文所述抗體所展現類似之結合模式及/或中和WISE。結合劑之非CDR部分可由胺基酸構成，其中結合劑為重組結合蛋白或合成肽，且重組結合蛋白交叉阻斷本文揭示之抗體與WISE之結合及/或中和WISE。結合劑之非CDR部分可由胺基酸構成，其中結合劑為重組結合蛋白，且重組結合蛋白在人類WISE肽抗原決定基競爭結合檢驗(下文所述)中對人類WISE肽展現與至少一種本文所述抗體Ab-AA、Ab-AB、Ab-AC、Ab-AD、Ab-AE、Ab-AF、Ab-AG、Ab-AH、Ab-AI、Ab-AJ D14及以Ab-AA、Ab-AB、Ab-AC、Ab-AD、Ab-AE、Ab-AF、Ab-AG、Ab-AH、Ab-AI、Ab-AJ之CDR人類化之抗體所展現類似的結合模式及/或中和WISE。

若抗體包含如上文所述 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2及 CDR-L3 中之一或多者，則其可藉由自含有編碼此等序列之 DNA 的宿主細胞表現而獲得。編碼各 CDR 序列之 DNA 可基於 CDR 之胺基酸序列測定且根據需要使用寡核苷酸合成技術、定點突變誘發及聚合酶鏈反應 (PCR) 技術與任何所要抗體可變區構架及恆定區 DNA 序列一起合成。熟習此項技術者可自諸如 GenBank® 之基因序列資料庫大量獲得編碼可變區構架及恆定區之 DNA。上述各 CDR 通常將位於根據 Kabat 編號系統在重鏈的位置 31-35 (CDR-H1)、50-65 (CDR-H2) 及 95-102 (CDR-H3) 及輕鏈的位置 24-34 (CDR-L1)、50-56 (CDR-L2) 及 89-97 (CDR-L3) 之可變區構架中 (Kabat 等人，1987 in *Sequences of proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH, USA)。

術語「CDR」可指抗體可變序列內之互補決定區。各重鏈及輕鏈可變區中通常存在三個 CDR，其針對各可變區命名為 CDR1、CDR2 及 CDR3。此等 CDR 之邊界已根據不同系統以不同方式加以定義。Kabat (Kabat 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991))) 所述之系統提供適用於任何抗體可變區之殘基編號系統，且提供界定該三個 CDR 之殘基邊界。Chothia 及同事 (Chothia 及 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) 及 Chothia 等人，*Nature* 342:877-883 (1989)) 發現 Kabat CDR 內之某些子部分即使在

胺基酸序列層面上具有巨大多樣性，亦採用幾乎相同的肽主鏈構形。此等子部分命名為L1、L2及L3或H1、H2及H3，其中「L」與「H」分別表示輕鏈區及重鏈區。此等區可具有與使用Kabat界定之CDR重疊之邊界。Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995))及MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996))已描述界定與Kabat之CDR重疊之CDR的其他邊界。其他CDR邊界定義可能未嚴格遵循上述系統之一，但仍將與Kabat編號重疊，不過根據特定殘基或殘基群或甚至整個CDR不顯著影響抗原結合之預測或實驗研究結果，其可能縮短或延長。本文使用之方法可利用根據此等系統中任一者界定之CDR。

如本文所用，術語「構架」或「構架序列」係指CDR周圍但不包括CDR之其餘可變區序列。因為CDR序列之確切定義可由不同系統確定，所以可相應地對構架序列之含義進行不同解釋。CDR(輕鏈之CDR-L1、-L2及-L3及重鏈之CDR-H1、-H2及-H3)亦將輕鏈及重鏈上之構架區在各鏈上分成四個子區(FR1、FR2、FR3及FR4)，其中CDR1位於FR1與FR2之間，CDR2位於FR2與FR3之間，且CDR3位於FR3與FR4之間。在不將特定子區指定為FR1、FR2、FR3或FR4之情形下，構架區當以其他名稱提及時代表天然存在之單個免疫球蛋白鏈之可變區中之組合FR。如本文所用，FR代表四個子區中之一者，且FRs代表構成構架區之四個子區中之兩者或兩者以上。

合成後，編碼本發明抗體或其片段之DNA可根據用於核

酸切除、接合、轉型及轉染之多種熟知程序中之任一者使用多種已知表現載體增殖及表現。因此，在某些實施例中，抗體片段較佳可在原核生物宿主(諸如大腸桿菌)中表現(參看例如 Pluckthun 等人，1989 *Methods Enzymol.* 178:497-515)。在某些其他實施例中，抗體或其片段較佳可在真核生物宿主細胞，包括酵母(例如釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)及畢赤酵母(*Pichia pastoris*))、動物細胞(包括哺乳動物細胞)或植物細胞中表現。適合動物細胞之實例包括(但不限於)骨髓瘤(諸如小鼠 NSO 細胞系)、COS、CHO 或融合瘤細胞。植物細胞之實例包括菸草、玉米、大豆及稻細胞。

可製備一或多個含有編碼抗體可變區及/或恆定區之 DNA 的可複製表現載體且用於轉型將產生抗體之適當細胞系(例如非生產性骨髓瘤細胞系，諸如小鼠 NSO 細胞系)或細菌(諸如大腸桿菌)。為了獲得有效轉錄及轉譯，各載體中之 DNA 序列應包括適當調節序列，特定言之可操作地連接至可變域序列之啟動子及前導序列。一般熟知且常規使用以此方式製造抗體之特定方法。舉例而言，基本分子生物學程序由 Maniatis 等人(*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*，第 2 版，Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989；亦參看 Maniatis 等人，第 3 版，Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (2001))描述。DNA 定序可如 Sanger 等人(*PNAS* 74:5463, (1977))及 Amersham International

plc sequencing handbook所述進行，且定點突變誘發可根據此項技術中已知之方法進行(Kramer等人，Nucleic Acids Res. 12:9441, (1984)；Kunkel Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-92 (1985)；Kunkel等人，Methods in Enzymol. 154:367-82 (1987)；Anglian Biotechnology Ltd handbook)。此外，大量公開案描述適於藉由操縱DNA、形成表現載體以及轉型及培養適當細胞製備抗體之技術(Mountain A及Adair, J R, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews (Tombs, M P編，10，第1章，1992, Intercept, Andover, UK)；「Current Protocols in Molecular Biology」，1999, F. M. Ausubel (編)，Wiley Interscience, New York)。

當需要改良本發明含有一或多個上述CDR之抗體之親和力時，可藉由多種親和力成熟方案獲得，該等方案包括保留CDR(Yang等人，J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995)、鏈改組(Marks等人，Bio/Technology, 10, 779-783, 1992)、使用大腸桿菌之突變菌株(Low等人，J. Mol. Biol., 250, 350-368, 1996)、DNA改組(Patten等人，Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997)、噬菌體呈現(Thompson等人，J. Mol. Biol., 256, 7-88, 1996)及有性PCR(Cramer等人，Nature, 391, 288-291, 1998)。所有此等親和力成熟法均由Vaughan等人(Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998)論述。

可藉由如本文所述及此項技術中已知的習知免疫及細胞融合程序獲得本發明之其他抗體。可使用多種已知技術產生本發明之單株抗體。一般而言，可藉由熟習此項技術者

已知之方法獲得結合於特異性抗原之單株抗體(參看例如 Kohler 等人, Nature 256:495, 1975; Coligan 等人(編), Current Protocols in Immunology, 1:2.5.12.6.7 (John Wiley & Sons 1991); 美國專利第 RE 32,011 號、第 4,902,614 號、第 4,543,439 號及第 4,411,993 號; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn 及 Bechtol(編)(1980); 及 Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow 及 Lane(編), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Picksley 等人, 「Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli」 DNA Cloning 2: Expression Systems, 第 2 版, Glover 等人(編), 第 93 頁 (Oxford University Press 1995))。可使用諸如蛋白水解消化之任何適合標準技術, 或視情況藉由蛋白水解消化(例如使用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶)、隨後適度還原二硫鍵及烷基化, 自其產生抗體片段。或者, 亦可藉由如本文所述之重組遺傳工程改造技術產生該等片段。

可根據此項技術中已知及本文所述之方法以包含 WISE 之免疫原(例如包括 SEQ ID NO: 2、4、6 或 8 中描繪之全長或成熟多肽或其片段, 例如 Seq Id No. 9)注射動物(例如大鼠、倉鼠、兔或較佳小鼠, 包括例如此項技術中已知之轉殖基因或基因剔除之動物), 藉此獲得單株抗體。可在初始注射後及/或在加強注射後, 藉由獲得血清樣品且使用此項技術中已知及本文所述之若干免疫偵測法中的任一者

偵測結合於人類 WISE 或肽之抗體的存在，監測特異性抗體產生之存在。自產生所要抗體之動物移除淋巴樣細胞(脾臟或淋巴結中最常見之細胞)以獲得 B-淋巴細胞。B 淋巴細胞接著與對藥物敏感之骨髓瘤細胞融合搭配物(較佳為與經免疫動物同系且視情況具有其他所要特性(例如不能表現內源 Ig 基因產物，例如 P3X63-Ag 8.653(ATCC 編號 CRL 1580)；NSO、SP20)的搭配物)融合，產生融合瘤，其為永生真核細胞系。淋巴樣(例如脾臟)細胞及骨髓瘤細胞可與膜融合促進劑(諸如聚乙二醇或非離子清潔劑)組合數分鐘，接著以低密度塗於支持融合瘤細胞生長但不支持未融合之骨髓瘤細胞生長的選擇性培養基上。較佳選擇培養基為 HAT(次黃嘌呤、胺基蝶呤、胸苷)。在足夠時間之後，一般為約 1 至 2 週後，觀測到細胞群落。分離單個群落，且可使用此項技術中已知且本文所述之多種免疫檢驗中的任一者測試細胞產生之抗體對人類 WISE 之結合活性。選殖融合瘤(例如藉由有限稀釋選殖或藉由軟瓊脂空斑分離)，且選擇及培養產生對 WISE 具特異性之抗體的陽性純系。可自融合瘤培養物之上清液分離來自融合瘤培養物之單株抗體。產生鼠類單株抗體之替代方法為將融合瘤細胞注射至同系小鼠(例如已經處理(例如異十八烷預致敏)之小鼠)之腹腔中，以促進形成含有單株抗體之腹水。可藉由多種公認技術分離及純化單株抗體。該等分離技術包括使用蛋白質-A 瓊脂糖凝膠之親和力層析、尺寸排阻層析及離子交換層析(參看例如 Coligan，第 2.7.1 頁-第 2.7.12 頁

及第 2.9.1 頁 - 第 2.9.3 頁；Baines 等人，「Purification of Immunoglobulin G (IgG)」Methods in Molecular Biology，第 10 卷，第 79-104 頁(The Humana Press, Inc. 1992))。單株抗體可藉由親和力層析使用基於特定抗體特性(例如重鏈或輕鏈同型、結合特異性等)選擇之適當配位體純化。固定於固體支撐物上之適合配位體之實例包括蛋白質 A、蛋白質 G、抗恆定區(輕鏈或重鏈)抗體、抗個體基因型抗體、及 TGF- β 結合蛋白、或其片段或變異體。

本發明抗體亦可為人類單株抗體。可藉由一般技術人員熟悉之多種技術產生人類單株抗體。該等方法包括(但不限於)人類周邊血細胞(例如含有 B 淋巴細胞)之 EB 病毒(Epstein Barr Virus, EBV)轉型、活體外免疫人類 B 細胞、融合攜帶有插入的人類免疫球蛋白基因之經免疫轉殖基因小鼠的脾細胞、自人類免疫球蛋白 V 區噬菌體文庫分離、或如此項技術中已知且基於本文揭示內容之其他程序。舉例而言，可自經工程改造以回應於抗原攻毒產生特異性人類抗體之轉殖基因小鼠獲得人類單株抗體。自轉殖基因小鼠獲得人類抗體之方法由例如 Green 等人，Nature Genet. 7:13, 1994；Lonberg 等人，Nature 368:856, 1994；Taylor 等人，Int. Immun. 6:579, 1994；美國專利第 5,877,397 號；Bruggemann 等人，1997 Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58；Jakobovits 等人，1995 Ann. N. Y Acad. Sci. 764:525-35 描述。在此技術中，將人類重鏈及輕鏈基因座之元件引入至源自含有內源重鏈及輕鏈基因座之定向敲除的胚胎幹細胞

系之小鼠品系中(亦參看 Bruggemann 等人, Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58 (1997))。舉例而言,人類免疫球蛋白轉殖基因可為袖珍基因構築體、或酵母人工染色體上之轉殖基因座,其經歷小鼠淋巴組織中之B細胞特異性DNA重排及超突變。可藉由經免疫轉殖基因小鼠獲得人類單株抗體,此接著可產生對WISE具特異性之人類抗體。可使用經免疫轉殖基因小鼠之淋巴樣細胞根據本文所述之方法製造分泌人類抗體之融合瘤。亦可自經免疫動物之血液獲得含有人類抗體之多株血清。

用於產生本發明人類抗體之另一方法包括藉由EBV轉型使人類周邊血細胞永生化。參看例如美國專利第4,464,456號。可藉由如本文所提供之免疫偵測法(例如ELISA)識別該產生特異性結合於WISE之單株抗體的永生化B細胞系(或類淋巴母細胞細胞系),接著藉由標準選殖技術分離。可藉由根據此項技術中已知之方法融合經轉型細胞系與鼠類骨髓瘤產生小鼠-人類雜交細胞系來提高產生抗WISE抗體之類淋巴母細胞細胞系的穩定性(參看例如Glasky等人, Hybridoma 8:377-89 (1989))。產生人類單株抗體之另一方法為活體外免疫,其包括以人類WISE預致敏人類脾臟B細胞,隨後融合預致敏之B細胞與異種雜交融合搭配物。參看例如Boerner等人, 1991 J. Immunol. 147:86-95。

在某些實施例中,選擇產生抗人類WISE抗體之B細胞且根據此項技術中已知(WO 92/02551;美國專利第5,627,052號; Babcook等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48

(1996))且本文所述之分子生物學技術自B細胞選殖輕鏈及重鏈可變區。可藉由選擇產生特異性結合於WISE之抗體的細胞自脾臟、淋巴結或周邊血液樣品分離來自經免疫動物之B細胞。B細胞亦可自人類，例如自周邊血液樣品分離。此項技術中熟知偵測產生具有所要特異性之抗體的單個B細胞之方法，例如斑塊形成、螢光活化細胞分選、活體外刺激繼之以偵測特異性抗體、及其類似方法。用於選擇產生特異性抗體之B細胞的方法包括例如在含有人類WISE之軟瓊脂中製備B細胞之單細胞懸浮液。B細胞產生之特異性抗體結合於抗原會形成複合物，該複合物可以免疫沈澱物之形式可見。在選擇產生所要抗體之B細胞之後，可藉由根據此項技術中已知且本文所述之方法分離及擴增DNA或mRNA選殖特異性抗體基因。

獲得本發明抗體之其他方法為噬菌體呈現。參看例如 Winter等人，1994 *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-55；Burton等人，1994 *Adv. Immunol.* 57:191-280。在噬菌體載體中可形成人類或鼠類免疫球蛋白可變區基因組合文庫，該等載體可經篩選以選擇特異性結合於TGF- β 結合蛋白或其變異體或片段之Ig片段(Fab、Fv、sFv或其多聚體)。參看例如美國專利第5,223,409號；Huse等人，1989 *Science* 246:1275-81；Sastry等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5728-32 (1989)；Alting-Mees等人，*Strategies in Molecular Biology* 3:1-9 (1990)；Kang等人，1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363-66；Hoogenboom等人，1992 *J. Molec.*

Biol. 227:381-388 ; Schlebusch 等人 , 1997 Hybridoma 16:47-52及其中引用之參考文獻。舉例而言, 含有複數個編碼Ig可變區片段之聚核苷酸序列的文庫可與編碼噬菌體鞘蛋白之序列同框插入至絲狀噬菌體(諸如M13或其變異體)之基因組中。融合蛋白可為鞘蛋白與輕鏈可變區結構域及/或重鏈可變區結構域的融合體。根據某些實施例, 免疫球蛋白Fab片段亦可呈現於噬菌體粒子上(參看例如美國專利第5,698,426號)。

重鏈及輕鏈免疫球蛋白cDNA表現文庫亦可例如使用 λ ImmunoZap TM (H)及 λ ImmunoZap TM (L)載體(Stratagene, La Jolla, Calif.)在 λ 噬菌體中製備。簡言之, 自B細胞群體分離 mRNA, 且將其用於在 λ ImmunoZap(H)及 λ ImmunoZap(L)載體中形成重鏈及輕鏈免疫球蛋白cDNA表現文庫。此等載體可個別地經篩選或共表現以形成Fab片段或抗體(參看Huse等人, 上文; 亦參看Sastry等人, 上文)。陽性斑塊可隨後轉化成允許由大腸桿菌高水準表現單株抗體片段的非溶胞質體。

在一實施例中, 在融合瘤中, 使用核苷酸引子擴增表現所關注單株抗體之基因的可變區。此等引子可由一般技術人員合成, 或可購自商業來源。(參看例如Stratagene (La Jolla, Calif.), 其出售小鼠及人類可變區之引子, 尤其包括VHa、VHb、VHc、VHd、CHI、VL及CL區之引子。)此等引子可用於擴增重鏈或輕鏈可變區, 其接著可分別插入至諸如ImmunoZAP TM H或ImmunoZAP TM(Stratagene)之

載體中。此等載體接著可引入至基於大腸桿菌、酵母或哺乳動物之表現系統中。可使用此等方法製造大量含有 VH 與 VL 結構域之融合體的單鏈蛋白質(參看 Bird 等人, Science 242:423-426, 1988)。

使用任何上述免疫及其他技術獲得產生本發明抗體之細胞後,可藉由根據如本文所述之標準程序自其分離及擴增 DNA 或 mRNA 選殖特異性抗體基因。可定序自其產生之抗體,且識別之 CDR 及編碼該等 CDR 之 DNA 可如先前所述經操縱以產生本發明之其他抗體。

結合劑較佳地特異性結合於 WISE。與所有結合劑及結合檢驗一樣,熟習此項技術者認識到,不可能詳盡且不切實際地列出應可偵測地結合於結合劑以在治療上有效及適合之各種部分。因此,對於本文揭示之結合劑,術語「特異性結合」係指結合劑以比結合於不相關對照蛋白質時大的親和力結合於 WISE(較佳為人類 WISE)之能力。對照蛋白質較佳為母雞卵白溶菌酶。結合劑結合於 WISE 之親和力較佳為對對照蛋白質之親和力的至少 50、100、250、500、1000 或 10,000 倍。結合劑對人類 WISE 之結合親和力可小於或等於 1×10^{-7} M, 小於或等於 1×10^{-8} M, 小於或等於 1×10^{-9} M, 小於或等於 1×10^{-10} M, 小於或等於 1×10^{-11} M, 或小於或等於 1×10^{-12} M。

可藉由親和力 ELISA 檢驗測定親和力。在某些實施例中,可藉由 BIAcore 檢驗測定親和力。在某些實施例中,可藉由動力學方法測定親和力。在某些實施例中,可藉由

平衡/溶液法測定親和力。該等方法在本文中進一步詳細描述或為此項技術中已知。

本發明之WISE結合劑較佳在本文所述之基於細胞之檢驗及/或本文所述之活體內檢驗中調節WISE功能，及/或結合於一或多種本文所述之抗原決定基及/或交叉阻斷本申請案中所述抗體中之一者的結合及/或由本申請案中所述抗體中之一者交叉阻斷與WISE之結合。因此，該等結合劑可使用本文所述之檢驗識別。

在某些實施例中，結合劑藉由首先識別結合於一或多種本文提供之抗原決定基的抗體產生，及/或在本文所述之基於細胞之檢驗及/或活體內檢驗中具有中和作用，及/或交叉阻斷本申請案中所述之抗體及/或由本申請案中所述抗體中之一者交叉阻斷與WISE之結合。此等抗體之CDR區接著用於插入至適當生物相容構架中，以產生WISE結合劑。結合劑之非CDR部分可由胺基酸構成，或可為非蛋白質分子。本文所述之檢驗允許表徵結合劑。本發明結合劑較佳為如本文所定義之抗體。

熟習此項技術者應理解，一些蛋白質(諸如抗體)在由宿主細胞表現及分泌期間可經歷多種轉譯後修飾。此等修飾之類型及程度通常視用於表現蛋白質之宿主細胞系以及培養條件而定。該等修飾可包括糖基化之變化、甲硫胺酸或色胺酸氧化、二酮基哌嗪形成、天冬胺酸異構化及天冬醯胺脫醯胺化。常見修飾為由於羧基胺酶之作用失去羧基端鹼性殘基(諸如離胺酸或精胺酸)(如Harris, RJ. Journal of

Chromatography 705:129-134, 1995 中所述)。在蛋白質經表現及處理後，其為『成熟』形式。因此，應理解本發明包括由於表現本發明DNA而產生之成熟抗體。

本文揭示之抗體結合於對蛋白質之活體內活性重要的人類 WISE 區，藉此抑制 WISE 活性。抗體與 WISE 之結合可與腎功能相關之生物標誌物有關，該等生物標誌物為例如白蛋白之尿液含量或24小時總尿液蛋白質排泄、血清肌酸酐或肌酸酐清除率。熟習此項技術者已知建構及表現包含本發明 CDR 之抗體及其片段的方法。

若寡肽或多肽之胺基酸序列與以下各物至少 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 一致：表 1 中所描繪之至少一種 CDR；及/或交叉阻斷至少一種本文所述抗體與 WISE 之環 2 之結合及/或由至少一種本文所述之抗體交叉阻斷與 WISE 之結合的 WISE 結合劑之 CDR；及/或結合劑在基於細胞之檢驗中可阻斷 WISE 之抑制作用或在基於細胞之檢驗(亦即 WISE 中和結合劑)中活化 WISE 之作用的 WISE 結合劑之 CDR；及/或結合於胱胺酸結結構域抗原決定基之 WISE 結合劑的 CDR，則該寡肽或多肽在本發明範疇內。

若 WISE 結合劑多肽及抗體之胺基酸序列與至少一種結合於 WISE 之環 2(例如 Seq Id No. 9)的抗體之可變區至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 一致，且交叉阻斷至

少一種結合於WISE之環2的抗體之結合，及/或由至少一種本文所述抗體交叉阻斷與WISE環2之結合；及/或在基於細胞之檢驗中可阻斷WISE之抑制作用(亦即WISE中和結合劑)；及/或結合於胱胺酸結結構域抗原決定基，則該等WISE結合劑多肽及抗體在本發明範疇內。本發明亦涵蓋經分離抗體或其片段，其中該WISE抗體或其片段可降低至少一種以下參數：組織損傷及其標誌物、天狼星紅染色或膠原蛋白產量、諸如 α SMA或FSP-1之成肌纖維細胞標誌物的表現、骨橋蛋白表現、蛋白尿，及/或在基於細胞之檢驗中可改變WISE之活性。如本文所用，熟習此項技術者將瞭解活性之改變包括活化或抑制。

若編碼WISE結合劑之聚核苷酸的聚核苷酸序列與編碼抗體Ab-AA、Ab-AB及Ab-AC中至少一者的可變區之聚核苷酸至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致，且其中所編碼之WISE結合劑交叉阻斷至少一種本文所述抗體之結合；及/或在基於細胞之檢驗中可阻斷WISE之抑制作用(亦即WISE中和結合劑)；及/或結合於胱胺酸結結構域抗原決定基，則該等編碼WISE結合劑之聚核苷酸在本發明範疇內。

一般技術人員可使用習知技術測定諸如抗體或結合搭配物之結合劑的親和力以及結合劑(諸如抗體)抑制結合之程度，該等習知技術為例如Scatchard等人(Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660-672 (1949))所述之技術或表面電漿子共振

(SPR; BIAcore, Biosensor, Piscataway, N.J.)。對於表面電漿子共振，將標靶分子固定於固相上且暴露於沿流槽流動之移動相中的配位體。若配位體結合於經固定之標靶，則局部折射率改變，導致SPR角改變，此可藉由偵測反射光的強度改變即時監測。可分析SPR信號之變化速率，產生結合反應之締合及解離相的表觀速率常數。此等值之比率給出表觀平衡常數(親和力)(參看例如 Wolff等人，Cancer Res. 53:2560-65 (1993))。

本發明抗體可屬於任何免疫球蛋白類別，例如IgG、IgE、IgM、IgD或IgA。其可獲自或源自動物，例如家禽(例如雞)及哺乳動物，包括(但不限於)小鼠、大鼠、倉鼠、兔或其他齧齒動物、牛、馬、綿羊、山羊、駱駝、人類或其他靈長類動物。抗體可為內化抗體。抗體之製造一般揭示於美國專利公開案第2004/0146888 A1中。

特徵化檢驗

在本文所述之產生本發明抗體且包括將特異性環2 WISE抗體CDR操縱至新構架及/或恆定區中之方法中，使用適當檢驗選擇所要抗體或結合劑(亦即測定對WISE之結合親和力的檢驗；交叉阻斷檢驗；基於Biacore之「人類WISE肽抗原決定基競爭結合檢驗」；基於MC3T3-E1細胞之檢驗；活體內檢驗)。

抗原決定基結合檢驗

未處理之人類WISE為具有信號肽之206個胺基酸，且人類WISE之成熟形式為含有胱胺酸結基元之183個胺基酸的

醣蛋白。由於關鍵胺基酸殘基(特定言之半胱胺酸)保守，因此咸信 WISE 之結構類似於先前所述之胱胺酸結蛋白質。除胱胺酸結基元以外，此結構亦包括三個環，命名為環1、環2及環3。如本文所用，環的位置定義為環1大致處於 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 75 至 104 處；環2大致處於胺基酸 105 至 132 處；且環3大致處於 SEQ ID NO:2 之胺基酸 134 至 170 處。應理解，大致位置意謂相對位置可能在所述位置之羧基端或胺基端加或減3個胺基酸處。

人類 WISE 可經受蛋白水解消化，產生片段。簡言之，使用不同蛋白酶(包括胰蛋白酶、Asp-N 及 Lys-C)產生具有不同裂解位點及大小之片段。測定各種人類 WISE 肽之序列及質量。評估抗體保護以測定對蛋白水解可接近性之作用，包括切斷位點遮罩及肽移位。最後，進行基於 BIAcore 之「人類 WISE 肽抗原決定基競爭檢驗」。

如基於 Biacore 之「人類 WISE 肽抗原決定基競爭結合檢驗」所證明，一組抗體展現結合於特定抗原決定基之特定模式。簡言之，抗體與待測試之抗原決定基在將使抗體上之抗原決定基結合位點飽和的濃度下預培育。抗體接著暴露於結合於晶片表面之 WISE。在適當培育及洗滌程序後，建立競爭結合模式。

交叉阻斷檢驗

術語「交叉阻斷」(「cross-block」、「cross-blocked」及「cross-blocking」)在本文中可互換使用，意謂抗體或其他結合劑干擾其他抗體或結合劑結合 WISE 之能力。

可使用競爭結合檢驗測定抗體或其他結合劑能夠干擾另一抗體或結合劑結合 WISE 之程度，且因此判定其能否稱為本發明之交叉阻斷。一種尤其適合之定量檢驗使用可使用表面電漿子共振技術量測相互作用程度之 Biacore 機。另一種適合之定量交叉阻斷檢驗使用基於 ELISA 之方法來量測抗體或其他結合劑之間就結合於 WISE 而言的競爭。

亦預期一種類型之交叉阻斷檢驗適用於識別抑制 WISE 與其受體 LRP-5 及 LRP-6 之結合的肽。舉例而言，已顯示環 2 肽或使用半胱胺酸二硫鍵環化之環 2 肽抑制 WISE 與其受體之結合。

熟習此項技術者應瞭解，與交叉阻斷有關之術語不欲視作絕對阻斷，而是此項技術中理解為意謂由於測試分子亦結合之區域中的先前結合產生之空間干擾或其他干擾而降低結合，藉此降低測試分子之結合量的術語。因此，應瞭解當測試抗體與標靶之結合存在可偵測降低時，可能存在交叉阻斷。結合中之此可偵測降低可小至 15%、10% 或 10% 以下，視檢驗敏感性而定。

Biacore 交叉阻斷檢驗

下文大體描述判定抗體或其他結合劑是否根據本發明交叉阻斷或是否能夠根據本發明交叉阻斷的適合 Biacore 檢驗。為方便起見提及兩種抗體，但應瞭解，該檢驗可使用本文所述之任何 WISE 結合劑。根據製造商建議操作 Biacore 機(例如 Biacore 3000)。

因此，在一交叉阻斷檢驗中，使用標準胺偶聯化學品將

WISE偶聯至CM5 Biacore晶片，產生經WISE塗覆之表面。通常，200-800共振單位之WISE將偶聯至晶片(容易產生可量測程度之結合但可由所用測試試劑濃度容易地實現飽和之量)。

在適合緩衝液中以1:1莫耳比之結合位點混合待評定彼此交叉阻斷之能力的兩種抗體(稱為A*及B*)，形成測試混合物。當基於結合位點計算濃度時，假定抗體之分子量為抗體之總分子量除以彼抗體上之WISE結合位點數。

各抗體於測試混合物中之濃度應足夠高，以容易地使Biacore晶片上捕捉之WISE分子對彼抗體之結合位點飽和。混合物中之抗體處於相同莫耳濃度下(以結合計)且該濃度通常介於1.00微莫耳濃度與1.5微莫耳濃度之間(以結合位點計)。

亦製備含有單獨抗體A*及含有單獨抗體B*之各別溶液。此等溶液中之抗體A*及抗體B*應與測試混合物在相同緩衝液中且在相同濃度下。

使測試混合物通過經WISE塗覆之Biacore晶片且記錄總結合量。接著以移除結合之抗體而不破壞晶片結合之WISE的方式處理晶片。通常，此藉由以30 mM HCl處理晶片持續60秒來進行。

接著使單獨抗體A*之溶液通過經WISE塗覆之表面且記錄結合量。再次處理晶片以移除所有結合之抗體而不破壞晶片結合之WISE。

接著使單獨抗體B*之溶液通過經WISE塗覆之表面且記

錄結合量。

接著計算抗體A*與抗體B*之混合物的最大理論結合，且其為各抗體單獨通過WISE表面時之結合的和。若實際記錄之混合物結合小於此理論最大值，則兩種抗體彼此交叉阻斷。

因此，一般而言，本發明之交叉阻斷抗體或其他結合劑為在上述Biacore交叉阻斷檢驗中將結合於WISE，使得檢驗期間且在第二抗體或本發明之其他結合劑存在下，所記錄之結合在兩種抗體或結合劑組合時最大理論結合(如上文剛定義)之80%與0.1%之間(例如80%至4%)，特定言之最大理論結合之75%與0.1%之間(例如75%至4%)，且更特定言之最大理論結合之70%與0.1%之間(例如70%至4%)的交叉阻斷抗體或結合劑。

上文所述之Biacore檢驗為用於判定抗體或其他結合劑是否根據本發明彼此交叉阻斷之檢驗。在個別情形下，特定抗體或其他結合劑可能不結合於經由胺化學品偶聯於CM5 Biacore晶片之WISE(此一般發生於WISE上之相關結合位點由於偶聯至晶片而受到遮罩或破壞時)。在該等情形中，可使用經標記型式之WISE(例如N端His標記之WISE)判定交叉阻斷。在此特定格式中，抗His抗體將偶聯於Biacore晶片，接著經His標記之WISE將通過晶片表面且由抗His抗體捕捉。交叉阻斷分析將基本上如上文所述進行，但在各晶片再生循環後，新的經His標記之WISE將加載回經抗His抗體塗覆之表面上。除使用N端His標記之

WISE的既定實例以外，亦可替代使用C端His標記之WISE。此外，此項技術中已知之多種其他標記及標記結合蛋白組合可用於該交叉阻斷分析(例如具有抗HA抗體之HA標記；具有抗FLAG抗體之FLAG標記；具有抗生蛋白鏈菌素之生物素標記)。

基於Elisa之交叉阻斷檢驗

下文大體描述判定抗WISE抗體或其他WISE結合劑是否根據本發明交叉阻斷或是否能夠根據本發明交叉阻斷的ELISA檢驗。為方便起見提及兩種抗體，但應瞭解，該檢驗可使用本文所述之任何WISE結合劑。

檢驗之一般原理為將抗WISE抗體塗覆於ELISA板之孔上。添加過量之含潛在交叉阻斷之第二抗WISE抗體的溶液(亦即未結合於ELISA板)。接著向各孔中添加有限量之WISE。塗覆之抗體及溶液中之抗體競爭結合有限數目之WISE分子。洗滌板以移除未與塗覆之抗體結合的WISE，且亦移除第二溶液相抗體以及第二溶液相抗體與WISE之間形成的任何複合物。接著使用適當WISE偵測試劑量測結合之WISE的量。溶液中之抗體能夠交叉阻斷塗覆之抗體，將能夠使塗覆之抗體可結合之WISE分子數目相對於在無第二溶液相抗體存在下塗覆之抗體可結合之WISE分子數目降低。

下文針對Ab-AA、Ab-AC及Ab-AE更詳細描述此檢驗。在選擇Ab-AA為經固定抗體之情形中，將其塗覆於ELISA板的孔上，此後以適合阻斷溶液阻斷板，使隨後添加之試

劑的非特異性結合降至最低。接著將過量 Ab-AC 添加至 ELISA 板中，使得每孔 Ab-AC WISE 結合位點之莫耳數至少為塗覆 ELISA 板期間每孔所用 Ab-AA WISE 結合位點之莫耳數的 10 倍。

隨後添加 WISE，使得每孔添加之 WISE 的莫耳數至多為用於塗覆各孔之 Ab-AA WISE 結合位點之莫耳數的 1/25。在適合培育時段之後，洗滌 ELISA 板且添加 WISE 偵測試劑以量測由塗覆之抗 WISE 抗體(在此情形下為 Ab-AA)特異性結合之 WISE 的量。該檢驗之背景信號定義為在具有塗覆之抗體(在此情形下為 Ab-AA)、第二溶液相抗體(在此情形下為 Ab-AB)、僅 WISE 緩衝液(亦即無 WISE)及 WISE 偵測試劑之孔中獲得的信號。該檢驗之陽性對照信號定義為在具有塗覆之抗體(在此情形下為 Ab-AA)、僅第二溶液相抗體緩衝液(亦即無第二溶液相抗體)、WISE 及 WISE 偵測試劑之孔中獲得的信號。ELISA 檢驗需要以使陽性對照信號至少為背景信號之 3 倍的方式進行。

為了避免選擇何種抗體用作塗覆之抗體及何種抗體用作第二(競爭劑)抗體所產生的任何偽訊(例如 Ab-AA 與 Ab-AB 對 WISE 的親和力顯著不同)，交叉阻斷檢驗需要以兩種形式進行：1) 形式 1，其中第一抗體為塗覆於 ELISA 板上之抗體且第二抗體為在溶液中之競爭劑抗體，及 2) 形式 2，其中第一抗體及第二抗體為塗覆及溶液形式顛倒。

基於細胞之中和檢驗

使用 MC3T3-E1 SuperTopFlash(STF)報導體細胞測定

WISE蛋白是否可調節Wnt信號傳導。可使用藉由將培養基換為分化培養基或藉由添加外源Wnt(諸如Wnt3a)誘發之任一內源Wnt信號傳導觸發MC3T3-E1 STF細胞中TCF依賴性信號傳導的活化。源自大腸桿菌或哺乳動物細胞之重組WISE蛋白可以劑量依賴方式抑制MC3T3-E1 STF細胞中之Wnt信號傳導。

螢光素酶檢驗：將一小瓶MC3T3-E1/STF細胞塗於培養燒瓶中之擴增培養基中。當細胞匯合時，將其以胰蛋白酶處理，且將擴增培養基中之細胞塗於96孔板之各孔中。第二天，移除所有擴增培養基，且替換為100 μ l新鮮製備之分化培養基。

隨後四天，每天將一半分化培養基(50 μ l)替換為新鮮製備之分化培養基。在分化5天後，所有培養基均替換為體積為100 μ l之新鮮分化培養基中之測試樣品。接著培育板24小時，隨後量測螢光素酶信號。在自測試板移除培養基且添加已平衡至室溫的20 μ l 1倍溶解緩衝液之後量測螢光素酶信號。密封板，且在室溫下搖動30分鐘，且向各孔中添加100 μ l螢光素酶檢驗試劑，且根據製造商之說明書使用光度計(LMAX, Molecular Device)捕捉信號。

活體內中和檢驗

可量測與腎臟保護或肺保護有關或由其產生之多種參數的提高作為WISE結合劑活體內測試之結果，以識別能夠中和WISE且提供治療益之結合劑。該等參數包括各種腎臟/肺標誌物，及腎臟/肺健康之組織形態標誌物。WISE中

和結合劑定義為能夠引起與刺激腎臟/肺保護有關或由其產生之任何參數相較於經媒劑處理之動物的統計學顯著增加之結合劑。該活體內測試可在任何適合哺乳動物(例如小鼠、大鼠、猴)中進行。

治療劑之調配及傳遞

提供醫藥組合物，其包含一種上述結合劑(諸如至少一種本文所述之人類 WISE 之抗體)以及醫藥學或生理學上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑。

此項技術中熟知將本文所述之特定組合物用於多種治療方案(包括例如皮下、經口、非經腸、靜脈內、鼻內及肌肉內投與及調配)之適合給藥及治療方案的開發，其中一些出於一般說明目的在下文中簡單論述。

在某些應用中，本文揭示之醫藥組合物可經口投與傳遞至動物。因此，此等組合物可與惰性稀釋劑或與同化性可食用載劑一起調配，或可封入硬殼或軟殼明膠膠囊中，或可壓成錠劑，或可與膳食直接合併。

在某些情形中，需要經皮下、非經腸、靜脈內、肌肉內或甚至腹膜內傳遞本文揭示之醫藥組合物。該等方法為熟練技術人員所熟知，其中一些進一步描述於例如美國專利第 5,543,158 號；美國專利第 5,641,515 號及美國專利第 5,399,363 號中。在某些實施例中，可在與界面活性劑(諸如羥丙基纖維素)適合混合的水中製備呈游離鹼或藥理學上可接受鹽形式的活性化合物之溶液。亦可於甘油、液體聚乙二醇及其混合物及油中製備分散液。在一般儲存及使

用條件下，此等製劑一般含有防腐劑以防止微生物生長。

適於注射用途之說明性醫藥形式包括滅菌水溶液或分散液，及用於臨用製備滅菌注射溶液或分散液之滅菌粉末(例如參看美國專利第5,466,468號)。在所有情形中，該形式均須滅菌且流動程度均須易於注射。其在製造及儲存條件下須穩定，且須防止微生物(諸如細菌及真菌)之污染作用。載劑可為溶劑或分散介質，含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液體聚乙二醇，及其類似物)、其適合混合物、及/或植物油。可例如藉由使用諸如卵磷脂之包衣，藉由保持所要粒徑(在分散液情形中)及/或藉由使用界面活性劑來保持適當流動性。可藉由各種抗細菌劑及抗真菌劑(例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞及其類似物)幫助預防微生物之作用。在許多情形中，較佳包括等張劑，例如糖或氯化鈉。可藉由在組合物中使用延遲吸收劑(例如單硬脂酸鋁及明膠)來實現注射組合物之長期吸收。

在一實施例中，對於在水溶液中非經腸投與而言，溶液在必要時應經適當緩衝，且首先使用足量生理食鹽水或葡萄糖使液體稀釋劑具等張性。此等特定水溶液尤其適於靜脈內、肌肉內、皮下及腹膜內投與。就此而言，熟習此項技術者根據本發明將獲知可採用之無菌水性介質。舉例而言，可將一劑量溶解於1 ml NaCl等張溶液中，且添加至1000 ml皮下灌注液中或在建議之輸注位置注射(參看例如Remington's Pharmaceutical Sciences，第15版，第1035-

1038頁及第1570-1580頁)。視所治療個體之病狀而定，將必要地出現一些劑量變化。此外，對於人類投與，製劑當然較佳將滿足FDA生物製品標準組辦公室(FDA Office of Biologics standards)所要求的無菌、發熱性及一般安全性及純度標準。

在本發明之另一實施例中，本文揭示之組合物可以中性或鹽形式調配。說明性醫藥學上可接受之鹽包括酸加成鹽(與蛋白質之游離胺基形成)，且其係與諸如鹽酸或磷酸之無機酸形成，或與諸如乙酸、草酸、酒石酸、杏仁酸及其類似物之有機酸形成。與游離羧基形成之鹽亦可衍生自諸如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣或氫氧化鐵之無機鹼及諸如異丙胺、三甲胺、組胺酸、普魯卡因(procaine)及其類似物之有機鹼。在經調配後，溶液將以與劑量調配相容之方式且以諸如治療有效量投與。

載劑可進一步包含任何及所有溶劑、分散介質、媒劑、包衣、稀釋劑、抗細菌劑及抗真菌劑、等張及吸收延遲劑、緩衝劑、載劑溶液、懸浮液、膠體及其類似物。此項技術中熟知該等介質及試劑用於醫藥活性物質之用途。除非任何習知介質或試劑與活性成分不相容，否則預期將其用於治療性組合物中。補充活性成分亦可併入組合物中。

「醫藥學上可接受」一詞係指向人類投與時不產生過敏性或類似非所要反應之分子實體及組合物。

在某些實施例中，使用脂質體、奈米膠囊(nanocapsule)、微粒、脂質粒子、微脂粒及其類似物將本發明組合物引入

至適合宿主細胞/生物體中。詳言之，本發明組合物可經調配以供囊封於脂質粒子、脂質體、微脂粒、奈米球體或奈米粒子或其類似物中來傳遞。或者，本發明組合物可共價或非共價結合於該等載劑媒劑之表面。

熟習此項技術者一般已知作為潛在藥物載劑之脂質體及脂質體樣製劑之形成及用途(參看例如 Lasic, Trends Biotechnol. 16(7):307-21, 1998; Takakura, Nippon Rinsho 56(3):691-95, 1998; Chandran等人, Indian J. Exp. Biol. 35(8):801-09, 1997; Margalit, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 12(2-3):233-61, 1995; 美國專利第5,567,434號; 美國專利第5,552,157號; 美國專利第5,565,213號; 美國專利第5,738,868號及美國專利第5,795,587號, 其各自以全文引用的方式特定併入本文中)。脂質體之使用看似與全身傳遞後的自體免疫反應或不可接受之毒性無關。在某些實施例中, 脂質體由分散於水性介質中之磷脂形成, 且自發形成多層同心雙層微脂粒(亦稱為多層微脂粒(MLV))。

或者, 在其他實施例中, 本發明提供本發明組合物的醫藥學上可接受之奈米膠囊調配物。奈米膠囊一般可以穩定且可再現方式裹入化合物(參看例如 Quintanar-Guerrero等人, Drug Dev. Ind. Pharm. 24(12):1113-28, 1998)。為了避免胞內聚合物超載引起之副作用, 可使用能夠活體內降解之聚合物設計該等超細粒子(大小約為0.1 μm)。該等粒子可例如 Couvreur等人, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.

5(1):1-20, 1988 ; zur Muhlen 等人 , Eur. J. Pharm. Biopharm. 45(2):149-55, 1998 ; Zambaux 等人 , J Controlled Release 50(1-3):31-40, 1998 ; 及美國專利第 5,145,684 號中所述製備。

此外，本發明之醫藥組合物可與提供關於該等醫藥組合物之使用的說明書之封裝材料一起置於容器內。一般而言，該等說明書將包括有形表述，其描述試劑濃度，以及在某些實施例中，復原醫藥組合物必需之賦形劑成分或稀釋劑(例如水、生理食鹽水或PBS)的相對量。

所投與之劑量可在每公斤體重 0.01 mg 至每公斤體重 200 mg 範圍內。典型劑量在 30 mg/kg 與 75 mg/kg 之間。然而，熟習此項技術者將顯而易見，投與之量及頻率當然將視以下因素而定，諸如所治療適應症之性質及嚴重程度、所要反應、患者病狀等。通常，組合物可藉由如上文所述之多種技術投與。

使用 WISE 結合劑之治療方法

「治療」為出於防止病症發展或改變病症病理之目的而進行之介入。因此，「治療」係指治療性處理及防治性或預防性措施。需要治療者包括已患有病症者以及待預防病症者。

出於治療目的之「哺乳動物」係指歸類為哺乳動物之任何動物，包括人類、家畜及農畜、及動物園動物、運動型動物、或寵物型動物，諸如犬、馬、貓、母牛等。哺乳動物較佳為人類。

如治療腎臟病症或疾病之情形中所使用，「治療有效量」一詞欲指使腎臟損壞或惡化減輕、或使與腎病有關之症狀(諸如纖維化及/或蛋白尿)的嚴重程度或進展減輕(亦即提供「治療功效」)或如使用血清肌酸酐或肌酸酐清除率所量測保持或改善腎功能的治療性或防治性WISE抗體之量。如治療纖維化之情形中所使用，「治療有效量」一詞欲指使肌瘤元件或其前驅物減少，及/或使與纖維變性疾病(例如蛋白尿性腎小球疾病)有關之症狀的嚴重程度或進展減輕(亦即提供「治療功效」)的治療性或防治性WISE抗體之量。

在一實施例中，預期本發明組合物適用於治療、減輕及/或預防腎功能障礙，包括選自由以下組成之群者：蛋白尿性腎小球疾病、末期腎病、慢性腎病(諸如糖尿病性腎病變、移植相關之移植物功能障礙、IgA腎病變、巴特氏症候群(Bartter's syndrome)、吉特曼症候群(Gitelman syndrome)、腎結石、腎澱粉樣變性、高血壓、原發性多醛酮症、艾迪森氏病(Addison's disease))；腎衰竭；腎小球腎炎及慢性腎小球腎炎；腎小管間質性腎炎；腎臟之囊性病變及發育不良畸形，諸如多囊性疾病、腎發育不良及皮質或髓質囊性病；遺傳性多囊腎病(PKD)，諸如隱性及自體顯性PKD；髓質囊性疾病；髓質海綿腎及腎小管發育不良；亞伯氏症候群(Alport's syndrome)；影響腎臟生理學之非腎癌，諸如肺支氣管腫瘤或大腦基底區腫瘤；多發性骨髓瘤；腎臟之腺癌；轉移性腎癌；此外，腎毒性病

症，包括由攝取、注射、吸入或吸收的任何醫藥劑、化學藥劑或生物藥劑引起的任何腎功能或形態改變。一些廣泛類別之常見腎毒性劑包括(但不限於)免疫抑制劑，諸如鈣調神經磷酸酶抑制劑、重金屬、所有類別之抗生素、止痛劑、溶劑、草酸鹽沉著症誘發劑、抗癌藥、除草劑及殺蟲劑、植物製劑及生物製劑、及抗癲癇藥。

「降低纖維變性之活性」一詞欲指完全或部分抑制肌瘤形成或移除或減輕現有纖維化之能力。因此，在一實施例中，預期本發明組合物適用於治療纖維變性疾病，包括病理性纖維化或結癥(包括心內膜硬化症)、特發性間質纖維化、間質肺纖維化、肌肉周圍纖維化、幹線型肝纖維化(Symmers' fibrosis)、周心纖維化(pericentral fibrosis)、肝炎、皮膚纖維瘤、膽汁性肝硬化症、酒精性肝硬化症、急性肺纖維化、特發性肺纖維化、急性呼吸窘迫症候群、腎纖維化/腎小球腎炎、腎纖維化/糖尿病性腎病變、硬皮病/全身性、硬皮病/局部、癥痕瘤、肥厚性癥痕、嚴重關節黏連/關節炎、骨髓纖維化、角膜癥痕、囊腫性纖維化、肌肉萎縮症(杜興氏(duchenne's))、心臟纖維化、肌肉纖維化/視網膜脫離、食管狹窄及佩隆樂氏疾病(payronles disease)。其他纖維變性病症可由手術誘發或起始，包括癥痕修復/整形手術、青光眼、白內障纖維化、角膜癥痕、關節黏連、移植物抗宿主疾病(例如移植患者中)、肌腱手術、神經壓迫、杜普宜特朗氏攣縮(dupuytren's contracture)、OB/GYN黏連/纖維化、盆腔黏連、硬膜外纖

維化、再狹窄。亦預期，沈積多種胞外基質蛋白質(包括(但不限於)膠原蛋白及/或纖維結合蛋白)之纖維變性病狀為可根據本發明治療之病因因素。特發性肺纖維化、博萊黴素(bleomycin)肺、囊腫性纖維化及腎小球腎病變(包括特徵在於例如腎臟中之膠原蛋白及/或纖維結合蛋白沈積物最終導致腎衰竭之疾病)為亦可根據本發明治療之病狀的實例。

本發明亦涵蓋對 WISE 之親和力小於 1×10^{-7} M 且抑制 WISE 活性之抗體，其係用於治療與纖維化有關之醫學病狀的方法中，其中纖維化可能與上文所論述之疾病(包括肺病或腎臟疾病)有關。此外，亦涵蓋對 WISE 之親和力小於 1×10^{-7} M 且抑制 WISE 活性的抗體，其適用於治療與蛋白尿有關之醫學病狀的方法中。

本發明亦提供組合療法，其中向有需要之患者投與本發明組合物與治療潛在疾病或減輕與所治療疾病有關之症狀的其他治療劑。此等其他療法可在投與本發明組合物的同時、之前或之後投與。與本發明組合物組合使用之其他療法包括 ACE 抑制劑、血管收縮素受體阻斷劑(ARB)、紅血球生成素(例如 Aranesp®(達貝泊汀(darbepoetin))、Epogen®(紅血球生成素 α))、鈣調神經磷酸酶抑制劑、類固醇、 β 阻斷劑及其類似物。

本發明亦提供診斷套組，其包含至少一種本發明之抗 WISE 結合劑。結合劑可為抗體。此外，該套組可視情況包含以下一或多者：(1)關於將一或多種結合劑用於篩選、

診斷、預後、治療監測或此等應用之任何組合的說明書；
 (2)抗WISE結合劑之經標記結合搭配物；(3)固定有抗WISE結合劑之固相(諸如試劑條)；及(4)指示用於篩選、診斷、預後或治療用途或其任何組合之管理許可的標籤或插頁。
 若未提供結合劑之經標記結合搭配物，則結合劑本身可經一或多個可偵測標誌物，例如化學發光部分、酶部分、螢光部分或放射性部分標記。

以下實例係以說明而非限制的方式給出。

實例

Wise及Wise環2突變體之構築體製備

藉由PCR引子自含有hWise之cDNA的DNA純系(NM_015464)擴增hWise。以XbaI及NotI限制酶消化表現載體以及約641個鹼基對之PCR產物。接合適當片段，產生hWise表現載體。

下文描述以hSost環2置換人類WISE之環2。hWise-hSost環2嵌合蛋白質之選殖：藉由組合引子延伸與重疊PCR產生取代突變。環2嵌合突變體的75 bp hWise環2經63 bp hSost環2取代。特定言之，使用hWise作為模板，hWise之N端以引子擴增且延伸。hWise之C端以引子擴增且延伸。在重疊PCR反應中將N端及C端片段用作模板。PCR產物以XbaI及NotI限制酶消化，且次選殖至哺乳動物表現載體中。

在哺乳動物細胞中表現及純化小鼠及人類WISE

將一小瓶儲備培養物接種至搖瓶(125 ml, Plastic)中之

10 ml培養基中，繼續培養2-3天；接著將培養物自10 mL擴充至100 mL搖瓶中，且再自100 ml擴充成500 ml體積之培養物。對於轉染，將細胞接種至1 L培養基中且生長直至達到適當細胞密度。

製備轉染混合物，使用標準技術轉染細胞，且轉染後24小時，向細胞中添加饋料。接著繼續再培養48小時，且藉由在4000 rpm下旋轉30分鐘，接著經0.2 μ M過濾器過濾來採集條件培養基。接著取小樣品(1 ml)用於西方墨點分析，且其餘冷凍以供純化。離心宿主細胞培養液(CCF)以移除細胞碎片。接著過濾CCF上清液。

使肝素管柱裝載蛋白質，接著以PBS洗滌，直至流經物在280 nm下之吸光度返回基線。接著使用含150 mM至2 M氯化鈉之PBS的線性梯度自管柱溶離WISE蛋白，且收集溶離份。接著藉由庫馬斯藍(Coomassie)染色之SDS-PAGE檢驗溶離份以識別含有多肽之溶離份，其在預定大小之WISE下會遷移。合併管柱之適當溶離份以製備肝素池。

藉由逆向層析法進一步純化自肝素管柱溶離之WISE蛋白。以22%乙醇製備肝素池，且使用乙酸調整至pH 5.0。過濾該池。接著將經過濾之肝素池裝載至平衡管柱上。裝載後，洗滌管柱直至流經物在280 nm下之吸光度返回基線。接著自管柱溶離WISE蛋白。

純化後，藉由透析於PBS中調配WISE。調配後，使WISE經0.2 μ m無菌過濾器過濾，且儲存於4℃下或冷凍。

抗原修飾及免疫

使用完全弗氏佐劑(Complete Freund's Adjuvant, Pierce)或RIBI(Sigma)以1:1比率乳化來自哺乳動物來源之人類WISE蛋白，接著皮下及腹膜內免疫至WISE基因剔除小鼠中。免疫至少每兩週進行一次，且在第3次免疫後取小鼠之抗血清用於抗WISE效價分析。

融合

在融合之前4天，各小鼠以含Hu WISE蛋白之PBS腹膜內加強。在融合當天，在無菌條件下移除脾臟，且將器官處理成單細胞懸浮液。溶解紅血球，且以RPMI(Gibco)洗滌脾細胞。將對數期生長之活骨髓瘤細胞與鼠類脾細胞以骨髓瘤:脾細胞1:2.5之比率混合。接著在細胞融合培養基C(Cytopulse Sciences Inc)中洗滌細胞2次。洗滌後，將細胞以每毫升 1×10^7 個細胞之最終密度懸浮於33%細胞融合培養基C及67%內部產生之低滲透性融合緩衝液中。將此混合物裝載至2 ml BTX融合室(Harvard Apparatus)中，接著經受來自BTX ECM 2001(Harvard Apparatus)之電融合條件。

自該等室移除細胞懸浮液且將其懸浮於細胞生長培養基中。將每孔20 μ l此細胞懸浮液塗於384孔細胞培養板(Greiner)中，且在37°C潮濕10% CO₂培育箱中培育隔夜。第二天，向板之各孔中添加20 μ l含有2X HAT(Sigma)之上述生長培養基。將培養物培育7天，接著自各孔吸出生長培養基且換為新鮮生長培養基。在更換培養基2-3天後，開始篩選融合瘤上清液。

篩選

以每孔 25 μ l 1 μ g/ml 由 PBS 中之山羊抗- μ IgG, Fc 特異性 pAb(Pierce) 組成之溶液塗覆高結合性透明聚苯乙烯 384 孔板(Corning)。板與塗覆溶液一起在 4°C 下培育隔夜，接著在自動板洗滌器上使用 PBS +.05% Tween 20(Sigma)洗滌一次。向各孔中添加 50 μ l 阻斷溶液，且在 4°C 下培育隔夜。

向 ELISA 板之各孔中轉移 5 μ l 融合瘤上清液，且在室溫下培育 60 分鐘。接著使用上述方法洗滌板兩次。接著向板之各孔中添加每孔 20 μ l 10 ng/ml 人類 WISE 蛋白稀釋於阻斷溶液中之溶液。在添加 WISE 抗原之後，在室溫下培育 ELISA 板 60 分鐘，接著洗滌。接著，向各孔中添加每孔 20 μ l 兔抗 WISE-HRP Pab(Amgen)稀釋於阻斷溶液中之溶液，且培育 60 分鐘，且洗滌板 4 次。

最後，向各孔中添加每孔 20 μ l TMB(Pierce)，且在 650 nM 下在 Spectramax 板讀取器(Molecular Devices)上對板讀數。隨後使來自 ELISA 陽性融合瘤孔之細胞在細胞培養物中擴增以供進一步特徵研究。

IgG 之高產量純化

使用自動液體轉移平台(Bravo)將初級篩選期間識別之 ELISA 陽性融合瘤純系轉移至 96 孔板中，且在 37°C 潮濕 5% CO₂ 培育箱中生長 3-5 天。一旦達到足夠細胞質量，則藉由自原始板轉移 20 μ l 上清液將各板複製成 8 個板(96 孔)。各板之最終體積為 200 μ l。在 37°C 潮濕 5% CO₂ 培育箱中培育板 7 天。接著將融合瘤上清液收集至聚丙烯檢驗阻斷液(2 ml, Costar 3961)中，且在 3500G 下離心 30 分鐘。將不含細

胞碎片之澄清上清液轉移至新檢驗阻斷液中，且與每孔 70 μ l 蛋白質 G 加瓊脂糖 (Calbiochem, 目錄號 IP08) 一起在室溫下在震盪器上培育隔夜。接著使用利用慣用軟體及真空歧管系統之自動液體處理機器人分離及澄清含有經結合 IgG 之蛋白質 G 樹脂。接著使用標準低 pH 值溶離及中和條件溶離經結合 IgG。所得經純化 IgG 經由 A280 吸光度定量。

識別環 2 黏合劑 (Binder) 之結合分析

收集抗 WISE 融合瘤上清液且添加至以 1 μ g/ml 山羊抗小鼠 IgG Fc (Pierce) 預塗覆之高結合性 ELISA 板上。板在室溫下培育 1 小時。接著將板以洗滌緩衝液洗滌 4 次。隨後，添加最終濃度為 2 ng/ml 之 huWISE 或人類 WISE-hSost-環 2 嵌合蛋白且在室溫下培育 1 小時。洗滌 4 次後，將兔抗 WISE Pab 生物素 (50 ng/ml) + NeutrAvidin-HRP (Pierce) 添加至板上，且在室溫下培育 1 小時。將板再以洗滌緩衝液洗滌 4 次。根據製造商之說明書使用 1 步 Ultra TMB-ELISA 受質 (Pierce) 分析結合。

在基於 MC3T3-E1/STF-Luc 細胞之檢驗中識別中和抗體

使用 MC3T3-E1 SuperTopFlash (STF) 報導體細胞判定 WISE 蛋白質是否可調節 Wnt 信號傳導。可使用藉由將培養基換為分化培養基或藉由添加外源 Wnt (諸如 Wnt3a 蛋白) 誘發之任一內源 Wnt 信號傳導觸發 MC3T3-E1/STF-luc 細胞中 TCF 依賴性信號傳導之活化。重組 WISE 蛋白可以劑量依賴性方式抑制 MC3T3-E1/STF-luc 細胞中之 Wnt 信號傳導。

將一小瓶 MC3T3-E1/STF-luc 細胞塗於培養燒瓶中之擴增

培養基中。當細胞達到90-95%匯合時，將其以胰蛋白酶處理，且將擴增培養基中之細胞以每孔10K塗於96孔測試板中。第二天，移除所有擴增培養基，且替換為100 μ l新鮮製備之分化培養基。隨後四天，每天將50%分化培養基替換為新鮮製備之分化培養基。在分化5天後，所有培養基均替換為體積為100 μ l之新鮮分化培養基中之測試樣品。將WISE蛋白及WISE mab在37°C下預培育1小時，隨後添加至測試孔中。接著培育板24小時，隨後量測螢光素酶信號。使用Promega螢光素酶檢驗系統量測螢光素酶信號。自測試板小心移除培養基，以PBS沖洗細胞，且添加20 μ l已平衡至室溫之1 $\times$ 溶解緩衝液。密封板，且在室溫下搖動30分鐘，且向各孔中添加100 μ l螢光素酶檢驗受質，且根據製造商之說明書使用光度計(LMAX)捕捉信號。

表現及純化環2融合瘤CM

使用FACS分選分離來自ELISA陽性融合瘤孔之單細胞，且將其置於每孔具有80 μ l BDR培養基[50 ml融合瘤選殖因子(BioVeris)、1X OPI培養基補充液(Sigma)、55 μ M 2-ME(Gibco)、10%低IgG FBS(Gibco)、1X PSG(Gibco)、BD量子產率培養基(BD Bioscience)]之96孔板中。使此等細胞生長直至達到足夠細胞質量。接著將細胞進一步擴增至每孔具有1 ml BDR培養基之24孔板中。在24孔板匯合後，將細胞轉移至每孔具有5 ml BDR培養基之6孔板中。培育5天後，將一半細胞於FBS(超低IgG)+10% DMSO混合物中冷凍以供備份。將另一半轉移至具有40 ml BDR培養基之T-

175燒瓶中且使其擴增。在T-175燒瓶匯合後，收集上清液，過濾(.45 μm CA過濾器)且用於純化。

自融合瘤細胞培養物純化WISE mAb用於活體外研究

自如下融合瘤細胞培養物純化WISE單株抗體(mAb)。所有純化處理均在室溫或4°C下進行。一種純化機制用於純化多種mAb且使用親和力層析法。

蛋白質G層析法

在10°C下，將宿主細胞培養液(CCF)在Beckman Coulter Allegra X-12R離心機中在1500 rpm下離心5分鐘以移除細胞碎片。接著經無菌0.45 μm 過濾器過濾CCF上清液。此時，可冷凍儲存經無菌過濾之CCF直至純化。若冷凍，則CCF在40°C下解凍。在解凍後，CCF經無菌0.45 μm 過濾器過濾，接著裝載至在室溫下在PBS中平衡的呈管柱形式之蛋白質G層析介質(蛋白質G高效(GE Healthcare, 先前為Amersham Biosciences))上。

裝載後，蛋白質G管柱以PBS洗滌，直至流經物在280 nm下之吸光度返回基線。接著使用0.1 M乙酸鹽(pH 3)自管柱溶離WISE mAb，且立即藉由每毫升溶離體積添加65 μL 1 M Tris鹼之儲備溶液中和。監測溶離液在280 nm下之吸光度，且收集含有蛋白質之溶離份以製備蛋白質G池。

調配及濃縮

在4°C下進行調配及濃縮步驟。純化後，藉由使用10,000 MWCO膜(Pierce Slide-A-Lyzer)透析在A5Su(10 mM 乙酸钠，9%蔗糖，pH 5)中調配WISE mAb。若必需濃縮WISE

mAb，則使用具有10,000 MWCO膜之離心裝置(Vivascience Vivaspin)。或者，蛋白質G池可用緩衝液交換至A5Su中，且使用單獨離心裝置濃縮。調配後，經無菌0.2 µm過濾器過濾WISE mAb且將其儲存於40°C下或冷凍。

WISE結合於LRP6且該結合可藉由中和抗Wise環2抗體阻斷使用AlphaScreen技術表徵WISE與推定受體LRP6之結合。下文描述詳細檢驗程序：

每天遵循與AlphaScreen組胺酸(Nickel Chelate)偵測套組(PerkinElmer)一起提供之說明書新鮮製備1x緩衝液。

以1x緩衝液稀釋生物素標記huWise、生物素標記huWise-huSost-環2、rmLRP6-His6(R&D Systems)、抗Wise環2抗體之工作溶液直至達到各蛋白質及抗體反應所需最終濃度之3倍。

將各5 µl Wise或Wise-huSost-環2及LRP6工作溶液分配至白色不透明OptiPlate-384微定量板(PerkinElmer)的適當孔中。在室溫下在溫和震盪下使Wise與LRP6反應1小時後，向彼等適當孔中添加5 µl各連續稀釋之抗體工作溶液，使反應繼續。根據相同說明書製備生物素標記His6(陽性對照，與套組一起提供)連續稀釋液及鎳螯合接受體及抗生蛋白鏈菌素供體珠粒(與套組一起提供)工作溶液。抗體與LRP6競爭結合Wise持續60分鐘後，將15 µl各連續稀釋之生物素標記His6溶液分配於板之空孔中。最終將5 µl各供體及接受體珠粒工作溶液分配至所有樣品及對照孔中，在室溫下在暗處再培育1小時，且在EnVision微

定量板分析器上分析。

建構hWise環2 Ala突變體

丙胺酸篩選突變誘發已成功用於系統地定位功能性結合抗原決定基。全長形式之WISE為206個胺基酸，且成熟形式之hWISE為含有胱胺酸結基元及命名為環1、環2及環3之三個環的183個胺基酸之醣蛋白。環2大致處於全長人類WISE之胺基酸105至132處及成熟形式之人類WISE的胺基酸82至109處。將自hWISE環2中之位置107至129識別的總計23個胺基酸殘基換為丙胺酸。

藉由定點突變誘發使用長度為24-30個核苷酸之寡脫氧核苷酸引子及野生型hWISE質體DNA作為模板產生丙胺酸篩選hWISE環2基因。如QuikChange定點突變誘發套組(Stragagene)中所述進行反應。各突變體直接形成於哺乳動物表現載體中。對丙胺酸突變構築體進行序列確認且將其轉染至哺乳動物宿主細胞中以供短暫產生突變蛋白質。單個胺基酸突變對蛋白質表現無作用。

下文列出具有胺基酸改變之代表性丙胺酸取代：

Seq Id No.: 2之胺基酸107處白胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸108處脯胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸109處纈胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸110處白胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸111處脯胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸112處天冬醯胺換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸113處色胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸114處異白胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸115處甘胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸116處甘胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸117處甘胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸118處酪胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸119處甘胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸120處蘇胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸121處離胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸122處酪胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸123處色胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸124處絲胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸125處精胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸126處精胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸127處絲胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸128處絲胺酸換為丙胺酸。

Seq Id No.: 2之胺基酸128處麩醯胺酸換為丙胺酸。

環2黏合劑之抗原決定基定位及對結合關鍵之殘基

對hWISE環2區進行丙胺酸篩選突變誘發，且總共產生23個突變體，且活體外檢驗抗體結合及功能性特徵。

比較藉由中和抗體或非中和抗體相對捕捉之個別WISE突變蛋白質或野生型蛋白質，評定任何此等單個胺基酸改變是否影響抗體與WISE蛋白之結合。接著使用對抗WISE之HRP結合之親和力純化多株抗體偵測經結合WISE蛋白。

將經純化抗 WISE 抗體 (0.5 $\mu\text{g/ml}$) 添加至以 1 $\mu\text{g/ml}$ 山羊抗小鼠 IgG Fc(Pierce) 預塗覆之高結合性 ELISA 板上。板在室溫下培育 1 小時。接著將板以洗滌緩衝液洗滌 4 次。隨後添加來自短暫轉染培養物 (100 倍稀釋) 之丙胺酸篩選之 WISE 環 2 突變體上清液，且在室溫下培育 1 小時。洗滌 4 次後，將兔抗 WISE Pab 生物素 (50 ng/ml) + NeutrAvidin-HRP(Pierce，目錄號 31001) 添加至板上，且在室溫下培育 1 小時。將板再以洗滌緩衝液洗滌 4 次。根據製造商之說明書使用 1 步 Ultra TMB-ELISA 受質(Pierce，目錄號 34028) 分析結合。

將一組環 2 結合抗體應用於丙胺酸突變體，且識別出對此等抗體之結合重要之特定胺基酸。此等胺基酸包括一或多種選自由以下組成之群的胺基酸：SEQ ID NO: 2 之胺基酸殘基 112 之天冬醯胺酸、SEQ ID NO: 2 之胺基酸殘基 114 之異白胺酸、SEQ ID NO: 2 之胺基酸殘基 115 之甘胺酸、SEQ ID NO: 2 之胺基酸殘基 117 之甘胺酸、SEQ ID NO: 2 之胺基酸殘基 119 之甘胺酸、SEQ ID NO: 2 之胺基酸殘基 121 之離胺酸、SEQ ID NO: 2 之胺基酸殘基 123 之色胺酸、SEQ ID NO: 2 之胺基酸殘基 126 之精胺酸或 SEQ ID NO: 2 之胺基酸殘基 129 之麩醯胺酸。

此等資料提供僅一個上述殘基突變的實例顯著降低 WISE 抗體與 WISE 蛋白之結合。可設想，上述殘基之組合對特定環 2 結合抗體之最佳結合而言可能重要。然而，單個殘基可能足以賦予抗體與 WISE 之環 2 的結合。

選殖鼠類抗 huWISE 抗體重鏈及輕鏈

藉由稱為 5' RACE(快速擴增 cDNA 末端)之聚合酶鏈反應 (PCR) 擴增技術獲得鼠類抗人類 WISE 輕鏈及重鏈可變區之序列。使用 TRIzol 試劑 (Invitrogen) 自六個表現人類 WISE 結合單株抗體 Ab-AA、Ab-AB、Ab-AC、Ab-AD、Ab-AE 及 Ab-AF 之鼠類融合瘤分離總 RNA，隨後使用 RNeasy Mini 套組 (Qiagen) 進一步純化。使用 GeneRacer 套組 (Invitrogen) 製備寡 dT 預致敏之第一股 RACE ready cDNA。使用 Phusion HF DNA 聚合酶 (Finnzymes) 進行 cDNA 之 PCR 擴增。將 RACE PCR 產物選殖至 pCR4-TOPO (Invitrogen) 及其使用 ABI DNA 定序設備 (Perkin Elmer) 測定之序列中。使用 Vector NTI Advance 10 軟體 (Invitrogen) 測定共同序列。

鼠類人類抗 WISE 抗體之人類化

使用直鏈 CDR 移植至 VK1|O18 接受體構架中之輕鏈 v1 人類化 Ab-AB。使用 A24T、R71A 及 A93T 處具有鼠類殘基之 CDR 移植至 VH1|1-46 接受體構架中的重鏈 v1 人類化 Ab Ab-AB。亦使用具有 F71Y 及 Y87F 回復突變之輕鏈 v2 人類化 Ab-AB。使用具有額外 V2I、VTM 67、68、69 至 AKL 及 V78A 的重鏈 v2 及 v1 (分別為 Seq Id No.: 114 及 116 以及 Seq Id No.: 118 及 120) 人類化 Ab-AB。

使用直鏈 CDR 移植至 VK4|B3 接受體構架中之輕鏈 v1 人類化 Ab-AI。使用具有 S30T 回復突變之重鏈 v1 人類化 Ab-AI。亦引入回復突變，因為 Ab-AI 亦使用具有 Y49S 回復突變之輕鏈 v2 (Kabat) 人類化。使用直鏈 CDR 移植至 VH2|2-70

接受體構架中之重鏈v2(Seq Id No.: 122及124以及Seq Id No.: 126及128)人類化Ab-AI。

使用直鏈CDR移植至VK4|B3接受體構架中之輕鏈人類化Ab-AJ。使用重鏈CDR移植至VH1|1-46接受體構架中人類化Ab-AJ，其中鼠類殘基固定於Kabat位置27、28、29、30、71、93、94(Y27F、T28N、F29I、T30K、R71A、A93N、R94F)(Seq Id No.: 110及112)。

上述抗體之人類化輕鏈及重鏈亦可互換，且描繪為重鏈及輕鏈對之相應核酸序列如下表4中Seq Id No.: 110及112(hz Ab-AJ)、Seq Id No.: 114及116(hz Ab-AB v1；分別為LC1及HC1)、Seq Id No.: 118及116(hz Ab-AB v2；分別為LC2及HC1)、Seq Id No.: 114及120(hz Ab-AB v3；分別為LC1及HC2)、Seq Id No.: 118及120(hz Ab-AB v4；分別為LC2及HC2)、Seq Id No.: 122及124(hz Ab-AI v1；分別為LC1及HC1)、Seq Id No.: 126及124(hz Ab-AI v2；分別為LC2及HC1)、Seq Id No.: 122及128(hz Ab-AI v3；分別為LC1及HC2)、以及Seq Id No.: 126及128(hz Ab-AI v4；分別為LC2及HC2)所示。

圖29中顯示使用WISE之人類化抗體的MC3T3報導體檢驗。Ab-R以引用國際專利申請案WO2009/070243的方式併入。人類化WISE環2 mab之MC3T3E1-STF表現：所有資料均表示為相對於對照組校正之總螢光素酶信號%。Mab與300 ng/ml huWISE一起培育。在培育後24小時，根據製造商之說明書使用發光受質(Luciferase Assay System,

Promega E4530)分析報導體基因表現。

自 Fab-310噬菌體文庫分離 D14

在隨後幾輪中針對 5 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 及 0.025 $\mu\text{g/ml}$ 生物素標記之重組人類 WISE 淘選 Fab-310噬菌體文庫 (Dyax Corp)。自第3輪分離 D14，洗滌池隔夜。分離包括結合於 huWISE 之 D14 的 53 個獨特 Fab 噬菌體且將其轉化成 IgG2。在 MC3T3-E1 功能性檢驗中測試此等 IgG2 分子。D14 顯示對 huWISE 的抑制活性最佳。

D14 IgG2 之親和力成熟

對 D14 IgG2 進行親和力成熟以提高抑制活性。藉由隨機突變誘發使重鏈(31個位置)及輕鏈(29個位置)之所有 CDR 中之每個殘基發生突變。藉由 Octet QK(ForteBio)上之親和力量測使用粗條件培養基樣品及以生物素標記之人類 WIES 塗覆之抗生蛋白鏈菌素生物感測器識別出提高與人類 WISE 之結合的 5 個位置中之 7 個重鏈突變及 6 個位置中之 10 個輕鏈突變。L34、L36、H66 及 H127 為 4 個頂部單個殘基突變。藉由在 293 6E 細胞中短暫轉染在基質中配對有益重鏈突變及輕鏈突變，產生進一步改良之雙重突變體 (DM，一個突變在重鏈中且一個突變在輕鏈中)。選擇 10 個 DM 突變體。藉由重疊 PCR 獲得 2 個最佳重鏈突變 (H66 及 H127)。所得具有雙重突變之重鏈與 L34 或 L36 配對產生兩個三重突變體 (TM1 及 TM2)。

與糖尿病性腎病變有關之腎功能障礙之進展的 WISE 抗體治療

藉由組合產生2型糖尿病但無進展性腎病之GK大鼠與產生進展性腎病但無2型糖尿病之FHH大鼠的基因組產生T2DN大鼠模型。在早期發作之糖尿病後，約6個月大之T2DN大鼠中產生明顯蛋白尿，且蛋白尿程度隨著大鼠年齡逐漸變得更嚴重。伴有18個月大時腎小球肥大、腎小球及腎小管基底膜增厚、腎小球膜基質擴增、及產生局部隨後彌漫性整體腎小球硬化、及形成腎小球節結。

在形成嚴重腎小球損傷(包括腎小球肥大及局部區段性腎小球硬化)且由於腎小球膜基質擴增及毛細管填充使得腎小球叢局部黏連於腎球囊(Bowman's capsule)之12個月大的大鼠中測試此模型中WISE抗體對腎功能障礙進展之作用。12個月大時，T2DN大鼠之腎小球亦展現腎小球膜基質擴增及出現過碘酸-希夫(Schiff)陽性物質(參看Diabetes 53: 735-742)。為了加速疾病進展，對大鼠進行單側腎切除(左腎，用作組織學基線)。

手術之後兩週及即將開始處理之前量測各個別大鼠中之蛋白尿程度，且用於將動物隨機分成4組:1)原生組，無處理，n=10；2)賴諾普利(Lisinopril)(每天每公斤飲用水中20 mg，n=12)且用作降低蛋白尿之陽性對照；3)同型匹配對照IgG1(20 mg/kg，腹膜內注射，在抗體稀釋緩衝液中每週3次，n=12)；4)WISE抗體(20 mg/kg，IP注射，在抗體稀釋緩衝液中每週3次，n=12)。在基線時及在代謝籠中每兩週收集尿液樣品，且在測試或冷凍之前等分。在基線時、處理後第8週、處理後第14週、及處理後第16週最終

屍體剖檢時收集血清樣品。在屍體剖檢時，對右腎進行處理以供組織學檢查(一半，H&E，Masson's Trichrome)及蛋白質/RNA檢查(另一半)。評估對蛋白尿、腎小球及間質纖維化以及腎功能之影響。

以WISE抗體處理相對於以IgG對照組處理顯著抑制腎小球及間質損傷之進展；且接受WISE抗體之大鼠相對於基線時觀測到之水準保持及增強腎功能(4%)，而原生組或對照IgG處理組之大鼠的腎功能(估算之肌酸酐清除率)相對於基線水準分別降低27%及23%。因此，預期WISE抗體對降低腎臟損傷及保持或改善以下疾病之腎功能具有治療性應用：如糖尿病性腎病變，其中腎功能障礙由糖尿病、高血壓或兩者之組合引起；及腎臟損傷由嚴重蛋白尿引起之疾病；以及重生纖維化或正在進行之纖維化導致進展性腎臟或移植物功能障礙的疾病，包括(但不限於)高血壓性腎臟疾病、及移植相關之同種異體移植纖維化。

WISE環2抗體之結合形態

圖 20-28描繪結合於環2區之抗WISE抗體的結合形態。圖 20描繪針對WISE突變體之Ab-AB。圖 21描繪針對WISE突變體之Ab-AE。圖 22描繪針對WISE突變體之Ab-AG。圖 23描繪Ab-AI。圖 24描繪針對WISE突變體之Ab-AC。圖 25描繪針對WISE突變體之Ab-AA。圖 26描繪針對WISE突變體之Ab-AH。圖 27描繪針對WISE突變體之Ab-AJ。圖 28描繪針對WISE突變體之Ab-AF。

圖 20-28中之突變體表示為天然存在之胺基酸，隨後為

WISE蛋白中胺基酸位置之編號，及隨後為突變(例如 A = 丙胺酸)。因此，L110A應理解為表示SEQ ID NO: 2之位置110之白胺酸突變成丙胺酸之突變。N112A為SEQ ID NO: 2之位置112之天冬醯胺酸突變為丙胺酸。I114A為SEQ ID NO: 2之位置114之異白胺酸突變為丙胺酸。G115A為SEQ ID NO: 2之位置115之甘胺酸突變為丙胺酸。G116A為SEQ ID NO: 2之位置116之甘胺酸突變為丙胺酸。G117A為SEQ ID NO: 2之位置117之甘胺酸突變為丙胺酸。K121A為SEQ ID NO: 2之位置121之離胺酸突變為丙胺酸。S128A為SEQ ID NO: 2之位置128之絲胺酸突變為丙胺酸。WISE-Sc1 L2描繪環2區已經SOST環2置換的人類WISE蛋白。較高吸光度表示結合，而較低吸光度表示減少之結合。

某些殘基之突變導致與突變WISE蛋白之結合減少，表明抗體需要天然存在之殘基來結合。Ab-AB對G117A之結合減少(圖20)。Ab-AE對I114A之結合減少(圖21)。Ab-AG對I114A及K121A之結合減少(圖22)。Ab-AI對G115A及G117A之結合減少(圖23)。Ab-AC對G115A及G117A之結合減少(圖24)。Ab-AA對N112A、I114A、G115A及K121A之結合減少(圖25)。Ab-AH對N112A及I114A之結合減少(圖26)。Ab-AJ對L11A、N112A及G117A之結合減少(圖27)。Ab-AF對L11A、N112A及G117A之結合減少(圖28)。

因此，本發明之經分離抗體包括經由以下一或多者結合於WISE之抗體：SEQ ID NO: 2之胺基酸110之白胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸112之天冬醯胺酸、SEQ ID NO: 2

之胺基酸114之異白胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸115之甘胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸116之甘胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸117之甘胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸119之甘胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸121之離胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸123之色胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸126之精胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸128之絲胺酸、或SEQ ID NO: 2之胺基酸129之麩醯胺酸。熟習此項技術者應理解，基於本文所述之方法，可藉由在指定位置處產生突變，接著使結合降低來識別藉由或經由殘基結合之抗體。降低之結合由例如 Ab-AJ 代表，其在約 2 之吸光度下結合原生 WISE。殘基 L110A 或 N112A 或 G117A 之突變導致吸光度降至約 1.5 或 1.5 以下(圖 27)。

雖然已根據一些實施例描述本發明之組合物及方法，但熟習此項技術者將顯而易見，變更可在不悖離本發明之概念、精神及範疇的狀況下應用於本文所述之組合物及/或方法及應用於本文所述之方法的步驟或步驟順序中。更特定言之，將顯而易見某些化學上及生理學上相關之藥劑可取代本文所述之藥劑，同時將實現相同或相似結果。熟習此項技術者顯而易見之所有該等類似替代物及修改應視為在如隨附申請專利範圍所定義之本發明之精神、範疇及概念內。

本文全文以向本文所述內容提供例示性程序或其他細節補充的程度引用之參考文獻均以引用的方式特定併入本文中。尤其提及國際申請案 WO2009/070243 中之 WISE 抗體，

該案以全文引用的方式併入本文中。

【圖式簡單說明】

圖 1：需要環 2 結合於 WISE 之抗體的識別；

圖 2：在基於細胞之檢驗中識別中和環 2 抗體。蛋白質濃度為：0.3 $\mu\text{g/ml}$ hWISE 及 3 $\mu\text{g/ml}$ Ab；

圖 3：中和抗 Wise 環 2 抗體抑制 Wise-Lrp6 結合；

圖 4：用於量測 Ab-AA 與 hWISE 之競爭性結合之檢驗。Ab-AA 結合於板。Ab-C、Ab-T、Ab-S 及 Ab-P 為先前識別之對照抗體且包括於此圖及隨後各圖中；

圖 5：用於量測 Ab-AB 與 hWISE 之競爭性結合之檢驗。Ab-AB 結合於板；

圖 6：用於量測 Ab-AC 與 hWISE 之競爭性結合之檢驗。Ab-AC 結合於板；

圖 7：用於量測 Ab-AD 與 hWISE 之競爭性結合之檢驗。Ab-AD 結合於板；

圖 8：用於量測 Ab-AE 與 hWISE 之競爭性結合之檢驗。Ab-AE 結合於板；

圖 9：用於量測 Ab-AF 與 hWISE 之競爭性結合之檢驗。Ab-AF 結合於板；

圖 10：用於量測 Ab-S 與 hWISE 之競爭性結合之檢驗。Ab-S 結合於板；

圖 11：用於量測 Ab-與 hWISE 之競爭性結合之檢驗。Ab-S 結合於板；

圖 12：用於量測 Ab-S 與 hWISE 之競爭性結合之檢驗。

Ab-S結合於板；

圖 13：用於量測 Ab-S 與 hWISE 之競爭性結合之檢驗。

Ab-S結合於板；

圖 14：顯示 hWISE 抗體與突變 hWISE 之相對結合的結合檢驗，其中環 2 中之殘基個別地突變成丙胺酸。編號小於 1 指示減少之結合。HuWISE-HuSost-環 2 為對照多肽，其為 hWISE 之嵌合體且具有 HuSost 環 2 (參看實例)。『WT 殘基』指示胺基酸已轉化成丙胺酸。此等殘基分別對應於 Seq Id No: 9 中之胺基酸 4 至 25；

圖 15：在 T2DN 模型中，WISE 抗體治療保持腎功能；

圖 16：在 T2DN 模型中，WISE 抗體治療保持腎功能；

圖 17：在 T2DN 模型中，WISE 抗體治療抑制腎小管-間質損傷；

圖 18：在 T2DN 模型中，WISE 抗體治療抑制腎小球損傷；

圖 19：在 T2DN 模型中，WISE 抗體治療對已確立之蛋白尿無影響；

圖 20：WISE 環 2 Mab(Ab-AB) 對 WISE 突變體之結合形態；

圖 21：WISE 環 2 Mab(Ab-AE) 對 WISE 突變體之結合形態；

圖 22：WISE 環 2 Mab(Ab-AG) 對 WISE 突變體之結合形態；

圖 23：WISE 環 2 Mab(Ab-AI) 對 WISE 突變體之結合形

態；

圖 24：WISE 環 2 Mab(Ab-AC)對 WISE 突變體之結合形

態；

圖 25：WISE 環 2 Mab(Ab-AA)對 WISE 突變體之結合形

態；

圖 26：WISE 環 2 Mab(Ab-AH)對 WISE 突變體之結合形

態；

圖 27：WISE 環 2 Mab(Ab-AJ)對 WISE 突變體之結合形

態；

圖 28：WISE 環 2 Mab(Ab-AF)對 WISE 突變體之結合形

態；及

圖 29：顯示抗體活性之人類化 WISE 環 2 mab 的 MC3T3E1-STF 表現。

序列表

<110> 美商安美基公司
<120> WISE结合剂及抗原决定基
<130> A-1532-WO-PCT
<140> 099144615
<141> 2010-12-17
<150> 61/288,171
<151> 2009-12-18
<160> 138

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 673
<212> DNA
<213> 智人

<400> 1	
atgcttcctc ctgccattca tttctatctc cttccccttg catgcatcct aatgaaaagc	60
tgtttggtt ttaaaaatga tgccacagaa atcctttatt cacatgtggt taaacctgtt	120
ccagcacacc ccagcagcaa cagcagcttg aatcaagcca gaaatggagg caggcatttc	180
agtaaacactg gactggatcg gaacactcgg gttcaagtgg gttgccggga actgcgttcc	240
accaaataca tctctgatgg ccagtcgacc agcatcagcc ctctgaagga gctggtgtgt	300
gctggcgagt gcttgcccct gccagtgctc cctaactgga ttggaggagg ctatggaaca	360
aagtactgga gcaggaggag ctcccaggag tggcgggtgtg tcaatgacaa aaccctacc	420
cagagaatcc agctgcagtg ccaagatggc agcacacgca cctacaaaat cacagtagtc	480
actgcctgca agtgcaagag gtacacccgg cagcacaacg agtccagtca caactttgag	540
agcatgtcac ctgccaagcc agtccagcat cacagagagc ggaaaagagc cagcaaatcc	600
agcaagcaca gcatgagtta gctcgagggg cggatccccc gggctgcagg aattcgatat	660
caagcttgct agc	673

201132353

<210> 2
<211> 206
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Met Leu Pro Pro Ala Ile His Phe Tyr Leu Leu Pro Leu Ala Cys Ile
1 5 10 15

Leu Met Lys Ser Cys Leu Ala Phe Lys Asn Asp Ala Thr Glu Ile Leu
20 25 30

Tyr Ser His Val Val Lys Pro Val Pro Ala His Pro Ser Ser Asn Ser
35 40 45

Thr Leu Asn Gln Ala Arg Asn Gly Gly Arg His Phe Ser Asn Thr Gly
50 55 60

Leu Asp Arg Asn Thr Arg Val Gln Val Gly Cys Arg Glu Leu Arg Ser
65 70 75 80

Thr Lys Tyr Ile Ser Asp Gly Gln Cys Thr Ser Ile Ser Pro Leu Lys
85 90 95

Glu Leu Val Cys Ala Gly Glu Cys Leu Pro Leu Pro Val Leu Pro Asn
100 105 110

Trp Ile Gly Gly Gly Tyr Gly Thr Lys Tyr Trp Ser Arg Arg Ser Ser
115 120 125

Gln Glu Trp Arg Cys Val Asn Asp Lys Thr Arg Thr Gln Arg Ile Gln
130 135 140

Leu Gln Cys Gln Asp Gly Ser Thr Arg Thr Tyr Lys Ile Thr Val Val
145 150 155 160

Thr Ala Cys Lys Cys Lys Arg Tyr Thr Arg Gln His Asn Glu Ser Ser
165 170 175

His Asn Phe Glu Ser Met Ser Pro Ala Lys Pro Val Gln His His Arg
180 185 190

Glu Arg Lys Arg Ala Ser Lys Ser Ser Lys His Ser Met Ser
195 200 205

<210> 3
<211> 627
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 3
atgcttcttc ctgccattca tctctctctc attccctgc tctgcatcct gatgagaaac 60

tgtttggtt ttaaaaatga tgccacagaa atcctttatt cacatgtggt taaacctgtc 120

ccggcacacc ccagcagcaa cagcaccctg aatcaagcca ggaatggagg caggcatttc 180

agtagcactg gactggatcg aaacagtcca gttcaagtgg gctgcaggga actgcggtcc 240

accaaataca tttcggacgg ccagtgcacc agcatcagcc ctctgaagga gctggtgtgc 300

gcgggcgagt gcttgcccct gccggtgctt cccaactgga tcggaggagg ctatggaaca 360

aagtactgga gccggaggag ctctcaggag tggcgggtgtg tcaacgacaa gacgcgcacc 420

cagaggatcc agctgcagtg tcaggacggc agcacgcga cctacaaaat caccgtggtc 480

acggcgtgca agtgcaagag gtacaccgt cagcacaacg agtcagcca caactttgaa 540

agcgtgtcgc ccgccaagcc cgcccagcac cacagagagc ggaagagagc cagcaaatcc 600

agcaagcaca gtctgagcta gctcgag 627

201132353

<210> 4
<211> 206
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 4

Met Leu Pro Pro Ala Ile His Leu Ser Leu Ile Pro Leu Leu Cys Ile
1 5 10 15

Leu Met Arg Asn Cys Leu Ala Phe Lys Asn Asp Ala Thr Glu Ile Leu
20 25 30

Tyr Ser His Val Val Lys Pro Val Pro Ala His Pro Ser Ser Asn Ser
35 40 45

Thr Leu Asn Gln Ala Arg Asn Gly Gly Arg His Phe Ser Ser Thr Gly
50 55 60

Leu Asp Arg Asn Ser Arg Val Gln Val Gly Cys Arg Glu Leu Arg Ser
65 70 75 80

Thr Lys Tyr Ile Ser Asp Gly Gln Cys Thr Ser Ile Ser Pro Leu Lys
85 90 95

Glu Leu Val Cys Ala Gly Glu Cys Leu Pro Leu Pro Val Leu Pro Asn
100 105 110

Trp Ile Gly Gly Gly Tyr Gly Thr Lys Tyr Trp Ser Arg Arg Ser Ser
115 120 125

Gln Glu Trp Arg Cys Val Asn Asp Lys Thr Arg Thr Gln Arg Ile Gln
130 135 140

Leu Gln Cys Gln Asp Gly Ser Thr Arg Thr Tyr Lys Ile Thr Val Val
145 150 155 160

Thr Ala Cys Lys Cys Lys Arg Tyr Thr Arg Gln His Asn Glu Ser Ser
165 170 175

His Asn Phe Glu Ser Val Ser Pro Ala Lys Pro Ala Gln His His Arg
180 185 190

Glu Arg Lys Arg Ala Ser Lys Ser Ser Lys His Ser Leu Ser
195 200 205

<210> 5
<211> 629
<212> DNA
<213> 褐家鼠

<400> 5
atgcttcctc ctgccattca tctctctctc attcccctgc tctgcatcct gatgaaaaac 60
tgtttggttt ttaaaaatga tgccacagaa atcctttatt cacatgtggt taaacctgtt 120
tcagcacacc ccagcagcaa cagcaccttg aatcaagcca ggaatggagg caggcacttc 180
agtagcacgg gactggatcg aaatagtcga gttcaagtgg gctgcaggga actgcggtcc 240
accaaataca tctcggatgg ccagtgcacc agcatcagcc ctctgaagga gctggtgtgc 300
gcgggtgagt gcttgccctt gccagtgtt cccaactgga tcggaggagg ctacggaaca 360
aagtactgga gccggaggag ctcccaggag tggcggtgtg tcaacgaaa gacgcgcacc 420
cagagaatcc agctgcagtg tcaggacggc agcacacgca cctacaaaat caccgtggtc 480
acagcgtgca agtgcaagag gtacacccgg cagcacaacg agtccagcca caactttgaa 540
agcgtgtctc ccgccaagcc cgcccagcac cacagagagc ggaagagagc cagcaaatcc 600
agcaagcaca gtctgagcta ggcggccgc 629

201132353

<210> 6
<211> 206
<212> PRT
<213> 褐家鼠

<400> 6

Met Leu Pro Pro Ala Ile His Phe Tyr Leu Leu Pro Leu Ala Cys Ile
1 5 10 15

Leu Met Lys Ser Cys Leu Ala Phe Lys Asn Asp Ala Thr Glu Ile Leu
20 25 30

Tyr Ser His Val Val Lys Pro Val Pro Ala His Pro Ser Ser Asn Ser
35 40 45

Thr Met Asn Gln Ala Arg Asn Gly Gly Arg His Phe Ser Asn Thr Gly
50 55 60

Leu Asp Arg Asn Thr Arg Val Gln Val Gly Cys Arg Glu Leu Arg Ser
65 70 75 80

Thr Lys Tyr Ile Ser Asp Gly Gln Cys Thr Ser Ile Ser Pro Leu Lys
85 90 95

Glu Leu Val Cys Ala Gly Glu Cys Leu Pro Leu Pro Val Leu Pro Asn
100 105 110

Trp Ile Gly Gly Gly Tyr Gly Thr Lys Tyr Trp Ser Arg Arg Ser Ser
115 120 125

Gln Glu Trp Arg Cys Val Asn Asp Lys Thr Arg Thr Gln Arg Ile Gln
130 135 140

Leu Gln Cys Gln Asp Gly Ser Thr Arg Thr Tyr Lys Ile Thr Val Val
145 150 155 160

Thr Ala Cys Lys Cys Lys Arg Tyr Thr Arg Gln His Asn Glu Ser Ser
165 170 175

His Asn Phe Glu Ser Met Ser Pro Ala Lys Pro Val Gln His His Arg
180 185 190

Glu Arg Lys Arg Ala Ser Lys Ser Ser Lys His Ser Met Ser
195 200 205

<210> 7
<211> 629
<212> DNA
<213> 食蟹猴

<400> 7
atgtttcctc ctgccattca tctctctctc attcccctgc tctgcatcct gatgaaaaac 60
tgtttggtt ttaaaaatga tgccacagaa atcctttatt cacatgtggt taaacctgtt 120
tcagcacacc ccagcagcaa cagcaccttg aatcaagcca ggaatggagg caggcacttc 180
agtagcacgg gactggatcg aaatagtcga gttcaagtgg gctgcaggga actgcggtcc 240
accaaataca tctcggatgg ccagtgcacc agcatcagcc ctctgaagga gctggtgtgc 300
gcgggtgagt gcttgccctt gccagtgtt cccaactgga tcggaggagg ctacggaaca 360
aagtactgga gccggaggag ctcccaggag tggcgtgtg tcaacgaca gacgcgcacc 420
cagagaatcc agctgcagtg tcaggacggc agcacacgca cctacaaaat caccgtggtc 480
acagcgtgca agtgcaagag gtacacccgg cagcacaacg agtccagcca caactttgaa 540
agcgtgtctc ccgccaagcc cgcccagcac cacagagagc ggaagagagc cagcaaatcc 600
agcaagcaca gtctgagcta ggcggccgc 629

201132353

<210> 8
<211> 206
<212> PRT
<213> 食蟹猴

<400> 8

Met Leu Pro Pro Ala Ile His Leu Ser Leu Ile Pro Leu Leu Cys Ile
1 5 10 15

Leu Met Lys Asn Cys Leu Ala Phe Lys Asn Asp Ala Thr Glu Ile Leu
20 25 30

Tyr Ser His Val Val Lys Pro Val Ser Ala His Pro Ser Ser Asn Ser
35 40 45

Thr Leu Asn Gln Ala Arg Asn Gly Gly Arg His Phe Ser Ser Thr Gly
50 55 60

Leu Asp Arg Asn Ser Arg Val Gln Val Gly Cys Arg Glu Leu Arg Ser
65 70 75 80

Thr Lys Tyr Ile Ser Asp Gly Gln Cys Thr Ser Ile Ser Pro Leu Lys
85 90 95

Glu Leu Val Cys Ala Gly Glu Cys Leu Pro Leu Pro Val Leu Pro Asn
100 105 110

Trp Ile Gly Gly Gly Tyr Gly Thr Lys Tyr Trp Ser Arg Arg Ser Ser
115 120 125

Gln Glu Trp Arg Cys Val Asn Asp Lys Thr Arg Thr Gln Arg Ile Gln
130 135 140

Leu Gln Cys Gln Asp Gly Ser Thr Arg Thr Tyr Lys Ile Thr Val Val
145 150 155 160

Thr Ala Cys Lys Cys Lys Arg Tyr Thr Arg Gln His Asn Glu Ser Ser
165 170 175

His Asn Phe Glu Ser Val Ser Pro Ala Lys Pro Ala Gln His His Arg
180 185 190

Glu Arg Lys Arg Ala Ser Lys Ser Ser Lys His Ser Leu Ser
195 200 205

<210> 9
<211> 28
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Leu Pro Leu Pro Val Leu Pro Asn Trp Ile Gly Gly Gly Tyr Gly Thr
1 5 10 15

Lys Tyr Trp Ser Arg Arg Ser Ser Gln Glu Trp Arg
20 25

<210> 10
<211> 336
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 10

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
atgagctgca aatccagtc gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggt 120
tggtagaccgc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180

caatctgggg tccctgatcg cttcacagge agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctc 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 11

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Gln Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 12
<211> 363

<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 12
gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaggt caggggcctc agtcaagttg 60
tcttgcacag cttctggcctt caacattaaa gactactata tacactggat gaagcagagg 120
cctgaacagg gcctcgagtg gattggatgg attgatcctg agaatgggtga tactgaatct 180
gccccgaagt tccagggcaa ggccactatg actgcagaca catcctccaa cacagcctac 240
ctgcacctca gcagcctgac atttgaggac actgccgtct attactgtaa tgcagaaggt 300
tacggtagta ggcaactgta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 13
<211> 121
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 13
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Ser Ala Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Ala Glu Gly Tyr Gly Ser Arg His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 321
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 14
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctggctgcat ctgtgggaga aaccatcacc 60
atcacatgtc aagcaagtga gaacatttac ttcagtttag catggtatca gcagaagcaa 120
gggaaatctc ctcagctcct gatctataat gcaaacaact tggaagatgg tgtcccatcg 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacacag tattctatga agatcaacaa catgcagcct 240
gaagatactg caacttattt ctgtaaagag gcttatgact ctccattcac gttcggcacg 300
gggacaaaat tggaataaaa a 321

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 15

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

Glu Thr Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Phe Ser
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Asn Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Met Lys Ile Asn Asn Met Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Lys Glu Ala Tyr Asp Ser Pro Phe
85 90 95

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

<210> 16
<211> 357
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 16
gaaattcaac tccagcagtc tgggactgtg ctgacaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcttgcaaga cttctggcta cacctttacc agctactgga tgcactgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattggcgct ctttatcctg gaaatagtgt tactaactac 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccaccag cactgcctac 240
atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcggtct attactgtac aagaggattt 300
cttactgcgc cctactttga ctctggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca 357

<210> 17

<211> 119
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 17

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Leu Tyr Pro Gly Asn Ser Val Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 336
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 18

gacattgtgg tgtcacaggc tccatcctcc cttgctgtgt cagttggaga gaagattatt 60
atgagctgca agtccagtca gagcctttta cacagcagca atcgaaggaa ctacttggcc 120
tggtaccaac agaaaccagg gcagtctcct aaattgctga tttcctgggc atccattagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatccg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcg tgaagactga agacctggca atttattact gtcaccaata ttatacttat 300
tccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaag 336

<210> 19
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 19

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

Glu Lys Ile Ile Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ser Asn Arg Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

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

<210> 20
<211> 369
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 20
caggttactc taaaagagtc tggccctgag atactgcagc cctcccagac cctcagtcctg 60
acttgttcgt tctctgggtt ttactgacc acttcctgta tgggtgtgag ctggattcgt 120
cagccttcag gagggagtc ggaatggctg gtcacattt tctgggatga tgacaagcgg 180
tataatccat ccctgacgag tcgactcaca atctccaagg atgccccag aaaccaggtt 240
ttcctcaaaa tcaccagtgt ggacactgca gatgctgcc catattactg tgctcgagga 300
ggagattatt acagtactgg atttggttt gattactggg gccaggggac tctggtcact 360
gtctctgca 369

<210> 21
<211> 123
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 21

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Thr Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ala Pro Arg Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Ser Thr Gly Phe Gly Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 22
<211> 321
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 22
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctggctgcat ctgtgggaga atccatcacc 60
atcacatgtc aggcaagtga gaacatttac ttcagtttag catggtatca gcagaagcaa 120
gggaggtctc ctcagctcct gatctatcat gcaaaaagtt tggaagatgg tgtcccatcg 180
aggttcagtg gcagtggctc tgggacacag tattctatga agatcaacag catgcagcct 240
gaagatactg caacttatTT ctgtaaacag gcttatgacc atccattcac gttcggcacg 300
gggacaaaat tggaatgaa a 321

<210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 23

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

Glu Ser Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Phe Ser
20 25 30

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

Tyr His Ala Lys Ser Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Met Lys Ile Asn Ser Met Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Lys Gln Ala Tyr Asp His Pro Phe
85 90 95

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

<210> 24

<211> 357

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 24

gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg	60
tctgttaagg cttctggcta cacctttacc agctactgga tgcactgggt aaaacagagg	120
cctggacagg gtctggaatg gattgtcgct atttatcctg gaaatagtga tactaactac	180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccaccag cactgcctac	240

atggaactca acagcctgac aaatgaggac tctgcggtct attactgtgt aagaggattt 300

attactgcgc cctactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca 357

<210> 25

<211> 119

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 25

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Val Arg Gly Phe Ile Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 336
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 26
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60

atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggt 120

tggtaccagc agaagccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctt 300

ccgacgttcg gtggaggcac caggctggaa atcaaa 336

<210> 27
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 27

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 28
<211> 360
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 28
gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaggt caggggcctc agtcaagttg 60
tcttcacag cttctggctt caacattaaa gactactata tgcactgggt gaagcagagg 120
cctgaacagg gcctggagtg gattggatgg attgatcctg aaaatgggtga tactgaatat 180
gccccgaagt tccagggcaa ggccactatg actgcagaca catcctccaa cacagcctac 240
ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct tttactgtaa tttctatgat 300
gtttactccg aggggactat ggcctactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 29
<211> 120
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 29

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15

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

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys
85 90 95

Asn Phe Tyr Asp Val Tyr Ser Glu Gly Thr Met Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 321
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 30
gacatccaga tgactcagtc tccagcttca ctgtctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtg gagcaagtga gaatatttac ggtgctttaa attggtatca gcggaaacag 120
ggaaaatctc ctcaggtcct gatctatggt gcaaccaact tggcagatgg catgtcatcg 180
aggttcagtg gcagtggatc tggtagacag tattctctca agatcagtag cctgcatcct 240
gacgatgttg caatgtatta ctgtcaaaat gtgttcagta gtccgctcac gttcgggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 31

<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 31

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro
65 70 75 80

Asp Asp Val Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Phe Ser Ser Pro Leu
85 90 95

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

<210> 32
<211> 336
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 32

cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60

tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca gactattcaa tgcactgggt gaagcaggct 120

ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacactg agactggtga gccaacatat 180
gcagatgact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctgt 240
ttggagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgttc tttaactggg 300
tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tctca 336

<210> 33
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 33

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Cys
65 70 75 80

Leu Glu Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ser Leu Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 34

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 35

Trp Ala Ser Thr Arg Gln Ser
1 5

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 36

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Leu Thr
1 5

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 37

Asp Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 38

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Ser Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 39

Glu Gly Tyr Gly Ser Arg His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 40

Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Phe Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 41
<211> 7
<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 41

Asn Ala Asn Asn Leu Glu Asp
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 42

Lys Glu Ala Tyr Asp Ser Pro Phe Thr
1 5

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 43

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 44

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

Gly

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 45

Gly Phe Leu Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 46

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Ser Asn Arg Arg Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 47

Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser
1 5

<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 48

His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Ser Thr
1 5

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 49

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser
1 5

<210> 50
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 50

His Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Thr Ser
1 5 10 15

<210> 51
<211> 13
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 51

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

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 52

201132353

Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Phe Ser Leu Ala
1 5 10

<210>	53
<211>	7
<212>	PRT
<213>	小家鼠

<400> 53

His Ala Lys Ser Leu Glu Asp
1 5

<210>	54
<211>	9
<212>	PRT
<213>	小家鼠

<400> 54

Lys Gln Ala Tyr Asp His Pro Phe Thr
1 5

<210>	55
<211>	5
<212>	PRT
<213>	小家鼠

<400> 55

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210>	56
<211>	17
<212>	PRT
<213>	小家鼠

<400> 56

•

•

<210>	57
<211>	10
<212>	PRT
<213>	小家鼠

Gly Phe Ile Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210>	58
<211>	17
<212>	PRT
<213>	小家鼠

<400> 58

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

<210>	59
<211>	7
<212>	PRT
<213>	小家鼠

<400> 59

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 60

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Pro Thr
1 5

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 61

Asp Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 62

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 63

Tyr Asp Val Tyr Ser Glu Gly Thr Met Ala Tyr
1 5 10

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 64

Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn
1 5 10

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 65

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 66

Gln Asn Val Phe Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 67

Asp Tyr Ser Met His
1 5

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 68

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 69
<211> 3
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 69

Thr Gly Tyr
1

<210> 70
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 70
gacatccaga tgactcagtc tccagcttca ctgtctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtg gagccagtga gaatatttac ggtgctttaa attggtatca gcggaaacag 120
ggaaaatctc ctcagctcct gatcttttgt gcaaccaact tggcagatgg catgtcatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tggtagacag tattctctcg agatcagtag cctgcatcct 240
gacgatgttg caacgtatta ctgtcaaaat ttatttaatt ctccgctcac attcggtgct 300
gggaccaagc tggacctgaa a 321

<210> 71
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 71

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala
20 25 30

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

Phe Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Gln Tyr Ser Leu Glu Ile Ser Ser Leu His Pro
65 70 75 80

Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Leu Phe Asn Ser Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Asp Leu Lys
100 105

<210> 72
<211> 336

201132353

<212> DNA
<213> 智人

<400> 72
cagatccagt tggatgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60

tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca gactattcaa tgcactgggt gaagcaggct 120

ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacactg agactgggtga gccaacatat 180

gcagctgact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240

ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtac ttttaactggg 300

tactggggtc agggaaacctc agtcaccgtc tcctca 336

<210> 73
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Leu Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 74
<211> 336
<212> DNA
<213> 智人

<400> 74
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggt 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
aaatctgggg tccctgatcg ctccataggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
attagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctc 300
gtcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 75
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 75

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

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

<210> 76
<211> 363
<212> DNA
<213> 智人

<400> 76
gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaggt caggggcctc agtcaggttg 60

tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gacttctata tgcactggtt gaagcagagg 120

cctgaacagg gcctggagtg gattggatgg attgatcctg agaatggtga tactgagtct 180

gccccgaagt tccagggcaa ggccactatg actgcagaca catcctcaa cacagcctac 240

ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attgctgtaa tgcagaaggc 300

tacgataata gccactggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 77
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人

<400> 77

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Ser Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Asn Ala Glu Gly Tyr Asp Asn Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 78

<211> 336

<212> DNA

<213> 智人

<400> 78

gacattgtgg tgtcacagge tccatcctcc cttgctgtgt cagttggaga gaagattatt 60

atgagctgca agtccagtca gagcctttta cacagcagca atcaaaggaa ctacttggcc 120

tggtaccaac agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttcctgggc atccattagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacagge agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcg tgaagactga agacctggca gtttattatt gtcaccaata ttatagttat 300
tccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaag 336

<210> 79
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 79

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

Glu Lys Ile Ile Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

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

<210> 80
<211> 369
<212> DNA
<213> 智人

<400> 80
caggttactc taaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtcgt 60
acttgttctt tctctgggtt ttcactgacc acttctggta tgggtgtgag ctggattcgt 120
cagccttcag gagggagtct ggaatggctg gcacacattt tctgggatga tgacaagcgc 180
tataatccat ccctgacgag ccgactcaca atctccaagg atgcctccag aaaccaggtt 240
ttcctcaaga tcagcagtgt ggacactgca gacgctgcca catactactg tgctcgagga 300
ggagattact acagtactgg atttggtttt gattactggg gccaaaggac tctggtcact 360
gtctctgca 369

<210> 81
<211> 123
<212> PRT
<213> 智人

<400> 81

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

Leu Thr Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ala Ser Arg Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ser Ser Val Asp Thr Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Ser Thr Gly Phe Gly Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 82
<211> 336
<212> DNA
<213> 智人

<400> 82
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggt 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattatt gcaagcaatc ttataatctt 300
ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 83
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 83

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

- <210> 84
- <211> 360
- <212> DNA
- <213> 智人

<400> 84
gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaggt caggggcctc agtcaagttg 60
tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gactactata tgcattgggt gaagcagagg 120
cctgaacagg gcctggagtg gattggatgg attgatcctg agaatgggtga tactgaatat 180
gccccgaagt tccagggcaa ggccactatg actgcagaca catcctccaa cacagcctac 240
ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtaa tttctatgat 300
gtttactccg agggggcttt ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 85
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 85

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15

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

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Asn Phe Tyr Asp Val Tyr Ser Glu Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 86

Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn
1 5 10

<210> 87

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 87

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 88

Gln Asn Leu Phe Asn Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 89

Asp Tyr Ser Met His
1 5

<210> 90

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 90

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 91
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 91

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 92

Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser
1 5

<210> 93
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 93

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Val Thr
1 5

<210> 94
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 94

Asp Phe Tyr Met His
1 5

<210> 95
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 95

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Ser Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 96
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 96

Glu Gly Tyr Asp Asn Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 97
<211> 17
<212> PRT

<213> 智人

<400> 97

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Ser Asn Gln Arg Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 98

Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser
1 5

<210> 99

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 99

His Gln Tyr Tyr Ser Tyr Ser Thr
1 5

<210> 100

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 100

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser
1 5

<210> 101
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 101

His Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Thr Ser
1 5 10 15

<210> 102
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 102

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

<210> 103
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 103

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 104

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 105
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 105

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Pro Thr
1 5

<210> 106
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 106

Asp Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 107
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 107

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 108
<211> 11

<212> PRT
<213> 智人

<400> 108

Tyr Asp Val Tyr Ser Glu Gly Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 109
<211> 336
<212> DNA
<213> 智人

<400> 109

gatatcgtaa tgaccagtc gcctgactca cttgcggtgt ccctcgggga aagagctaca 60
atcaattgca agtcaagcca gtccttgctc aacagcagga cgcgaaagaa ctacttggcg 120
tggtaccagc aaaagccggg acaaccgccc aagttgctga tctattgggc ctcaacgcgc 180
gagtcggggg tcccagaccg gttctcgggt tcgggatccg ggactgactt cacgtgact 240
atttcgtcgt tgcaggcaga ggatgtcgcg gtgtattact gtaaacagag ctataacctt 300
cccacctttg gtggcggaac aaaagtggaa atcaaa 336

<210> 110
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 110

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

505560

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65707580

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

859095

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

100105110

<210> 111
<211> 360
<212> DNA
<213> 智人

<400> 111

caggtacaac tcgtgcagag cggagccgaa gtcaaaaagc ccggtgcgtc agtgaaggta

60

tcgtgtaagg catcagggtt taacatcaaa gattactaca tgcactgggt gaggcaagct

120

cggggccagg ggctggagtg gatgggggtg attgatccag aaaatggaga cactgagtat

180

gcacctaagt tccaggggag agtgacgatg acagcggaca cctcgacgtc cacagtgtac

240

atggagctgt cgtccttgcg cagcaggagc acggccgtct attactgcaa cttctatgat

300

gtctactcgg aaggtgcggtt ggactattgg ggacagggaa cccttgtgac cgtctctagt

360

<210> 112
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 112

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Asn Phe Tyr Asp Val Tyr Ser Glu Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 113
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 113
gacattcaga tgactcaatc accctcgtec ctctcagctt ccgtcggatga tagggtaaca 60
atcacatgtc aagcgagcga gaacatctat ttctcgcttg cgtggatatca gcagaagcct 120
gggaaagcgc ccaagttgct gatctacaat gccacaatt tggaggatgg ggtgccatcg 180

agattttcgg gatccggcag cggaactgac ttcacgttca ccattagctc gcttcagccg 240
gaggacattg ccacctacta ttgcaaagaa gcatacgatt caccgtttac gtttggacag 300
gggacaaaagc tcgaaatcaa a 321

<210> 114
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 114

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

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

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

Tyr Asn Ala Asn Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Glu Ala Tyr Asp Ser Pro Phe
85 90 95

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

<210> 115

<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 115
caagtacaat tgggtgcagtc aggagcagaa gtcaagaagc cgggtgctag cgtgaaagtc 60

agctgtaaga cttcgggata tacttttcacg agctactgga tgcactgggt ccgccaggcc 120

ccaggccagg ggcttgagtg gatgggtgcg ctgtaccccg gaaattcggc cacaactat 180

aaccagaagt tcaaaggag ggtgacaatg accgcggaca cgtcaacgtc cactgtatac 240

atggagctgt cctcgctcag atcagaggat acggcgggtg actattgcac acggggggtt 300

ttgacagccc cttactttga ctctggggga caggggacca ccgtgaccgt ctctagt 357

<210> 116
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<400> 116

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ala Leu Tyr Pro Gly Asn Ser Val Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 117
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 117
gacattcaga tgactcaatc accctcgtcc ctctcagctt ccgtcggatga tagggtaaca 60
atcacatgtc aagcgagcga gaacatctat ttctcgcttg cgtggtatca gcagaagcct 120
gggaaagcgc ccaagttgct gatctacaat gccacaatt tggaggatgg ggtgccatcg 180
agattttcgg gatccggcag cggaactgac tacacgttca ccattagctc gcttcagccg 240
gaggacattg ccacctactt ctgcaaagaa gcatacgatt caccgtttac gtttggacag 300
gggacaaagc tcgaaatcaa a 321

<210> 118
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 118

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Phe Ser

20 25 30

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

Tyr Asn Ala Asn Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Lys Glu Ala Tyr Asp Ser Pro Phe
85 90 95

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

<210> 119
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 119
caaatccaat tgggtgcagtc aggagcagaa gtcaagaagc cgggtgctag cgtgaaagtc 60
agctgtaaga cttcgggata tactttcacg agctactgga tgcactgggt ccgccaggcc 120
ccaggccagg ggcttgagtg gatgggtgcg ctgtaccccg gaaattcggc cacaactat 180
aaccagaagt tcaaaggag ggccaagctg accgcggaca cgtcaacgct cactgcctac 240
atggagctgt cctcgctcag atcagaggat acggcggtgt actattgcac acgggggttt 300
ttgacagccc cttactttga ctcgtgggga caggggacca ccgtgaccgt ctctagt 357

<210> 120
<211> 119

<212> PRT
<213> 智人

<400> 120

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ala Leu Tyr Pro Gly Asn Ser Val Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 121
<211> 336
<212> DNA
<213> 智人

<400> 121

gatatcgtaa tgacgcaatc cccggactca cttgccgtgt cgcttggcga aagagctacc 60

attaactgca agtcatccca gtcattgttg cattcgtcga accagaggaa ttacctggcg 120
tggtaccaac aaaagcctgg acagccaccc aaattgttga tctattgggc gtcaattcgc 180
gaaagcgggg tccccgaccg gttctcggga agcggttccg gtactgactt tacactcacg 240
atcagctcgc tccaggcaga ggatgtggcg gtatactatt gtcaccagta ttactcatac 300
tcgacattcg ggcagggaac caaactggag atcaaa 336

<210> 122
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 122

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 123
<211> 369
<212> DNA
<213> 智人

<400> 123
caggtcacac ttaaggagtc ggtccagcg ctcgtgaagc ccacacagac ctgaccctc 60
acgtgtacgt tctcgggatt ttcacttacg actagcggga tgggcgtaag ctggattcgg 120
caacctccgg ggaaagcgct ggaatggttg gcacacatct tctgggatga tgacaaaagg 180
tataaccctt cgctcacgtc gcgcctgaca atctcaaagg acacctcaa aaaccaggta 240
gtgcttacga tgacgaatat ggatcccggtg gacacagcaa cttactactg cgccagagga 300
ggagattact attccacagg gtttggtttt gactactggg ggcagggaac tctggtcacc 360
gtctctagt 369

<210> 124
<211> 123
<212> PRT
<213> 智人

<400> 124

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Thr Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Ser Thr Gly Phe Gly Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 125
<211> 336
<212> DNA
<213> 智人

<400> 125
gatatcgtaa tgacgcaatc cccggactca cttgccgtgt cgcttggcga aagagctacc 60

attaactgca agtcatccca gtcattgttg cattcgtcga accagaggaa ttacctggcg 120

tggtaccaac aaaagcctgg acagccaccc aaattgttga tcagctgggc gtcaattcgc 180

gaaagcgggg tccccgaccg gttctcgga agcggttccg gtactgactt tacactcacg 240

atcagctcgc tccaggcaga ggatgtggcg gtatactatt gtcaccagta ttactcatac 300

tcgacattcg ggcagggaac caaactggag atcaaa 336

<210> 126
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 126

201132353

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 127

<211> 369

<212> DNA

〈213〉 智人

<400> 127

caggtcacac ttaaggagtc ggggtccagcg ctcgtgaagc ccacacagac cttgaccctc 60

acgtgtacgt tctcgggatt ttcacttagc actagcggga tgggcgtaag ctggattcgg 120

caacctccgg ggaaagcgct ggaatggttg gcacacatct tctgggatga tgacaaaagg 180

tataaccctt cgctcacgtc ggcctgaca atctcaaagg acacctcaa aaaccaggta 240

gtgcttacga tgacgaatat ggatcccggtg gacacagcaa cttactactg cgccagagga 300

ggagattact attccacagg gtttggtttt gactactggg ggcagggaac tctggtcacc 360
gtctctagt 369

<210> 128
<211> 123
<212> PRT
<213> 智人

<400> 128

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Thr Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Ser Thr Gly Phe Gly Phe Asp Tyr
100 105 110

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

201132353

<210> 129
<211> 642
<212> DNA
<213> 智人

<400> 129
cagtacgaat tgactcagcc accctcagt gccgtgtccc ctggaaagac agccagcatc 60

acctgcgctg gagatgaatt gggtaataaa tatgtctcgt ggtaccagca gaagccaggc 120

caggccccctg tgctggctgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240

gatgaggccg actattactg tcagggtgtg gatagaagta gttatcatgt ggtattcggc 300

ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggcca accccactgt cactctgttc 360

cogccctcct ctgaggagct ccaagccaac aaggccacac tagtgtgtct gatcagtac 420

ttctacccgg gagctgtgac agtggcctgg aaggcagatg gcagccccgt caaggcggga 480

gtggagacca ccaaaccctc caaacagagc aacaacaagt acgcgccag cagctacctg 540

agcctgacgc ccgagcagt gaagtccac agaagctaca gctgccaggt cagcatgaa 600

gggagcaccg tggagaagac agtggcccct acagaatggt ca 642

<210> 130
<211> 214
<212> PRT
<213> 智人

<400> 130

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ala Gly Asp Glu Leu Gly Asn Lys Tyr Ala
20 25 30

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

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

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg Ser Ser Tyr His
85 90 95

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

Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 131
<211> 1332
<212> PRT
<213> 智人

<400> 131

Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala Thr Thr Gly Thr Thr Ala Gly
1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Cys Thr
20 25 30

Thr Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr
35 40 45

Thr Cys Thr Thr Thr Ala Cys Gly Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Thr
50 55 60

Gly Cys Gly Cys Thr Gly Cys Thr Thr Cys Cys Gly Gly Ala Thr Thr
65 70 75 80

Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Thr Thr Thr Ala Cys
85 90 95

Ala Cys Thr Ala Thr Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Thr Cys
100 105 110

Gly Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Cys Cys Thr Gly Gly Thr Ala Ala
115 120 125

Ala Gly Gly Thr Thr Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Thr
130 135 140

Thr Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Cys Gly Gly Thr Thr Cys Thr Thr
145 150 155 160

Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Ala Cys Thr Thr Cys
165 170 175

Thr Thr Ala Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Thr Cys Cys Gly Thr Thr
180 185 190

Ala Ala Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Ala
195 200 205

Thr Cys Thr Cys Thr Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Cys Thr Cys
210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Cys Thr Cys Thr Cys Thr Ala Cys
225 230 235 240

Thr Thr Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Thr
245 250 255

Thr Ala Ala Gly Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys
260 265 270

Thr Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr
275 280 285

Gly Cys Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala
290 295 300

Gly Thr Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Thr Cys Gly Ala Gly Thr Ala
305 310 315 320

Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Cys Cys
325 330 335

Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Thr Ala
340 345 350

Gly Thr Gly Cys Cys Thr Cys Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Gly Gly
355 360 365

Cys Cys Cys Ala Thr Cys Gly Gly Thr Cys Thr Thr Cys Cys Cys Cys
370 375 380

Cys Thr Gly Gly Cys Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Thr Cys Cys Ala
385 390 395 400

Gly Gly Ala Gly Cys Ala Cys Cys Thr Cys Cys Gly Ala Gly Ala Gly
405 410 415

Cys Ala Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly Gly Cys
420 425 430

Thr Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys Thr
435 440 445

Ala Cys Thr Thr Cys Cys Cys Cys Gly Ala Ala Cys Cys Gly Gly Thr
450 455 460

Gly Ala Cys Gly Gly Thr Gly Thr Cys Gly Thr Gly Gly Ala Ala Cys
465 470 475 480

Thr Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Cys Thr Gly Ala Cys Cys Ala
485 490 495

Gly Cys Gly Gly Cys Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Cys Cys Thr Thr
500 505 510

Cys Cys Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Cys Cys Thr Ala Cys Ala Gly
515 520 525

Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Ala Cys Thr Cys Thr Ala Cys Thr
530 535 540

Cys Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Gly Thr Gly Gly Thr
545 550 555 560

Gly Ala Cys Cys Gly Thr Gly Cys Cys Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys
565 570 575

Ala Ala Cys Thr Thr Cys Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Ala Gly Ala
580 585 590

Cys Cys Thr Ala Cys Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Ala Cys Gly Thr
595 600 605

Ala Gly Ala Thr Cys Ala Cys Ala Ala Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys
610 615 620

Ala Ala Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala
625 630 635 640

Ala Gly Ala Cys Ala Gly Thr Thr Gly Ala Gly Cys Gly Cys Ala Ala
645 650 655

Ala Thr Gly Thr Thr Gly Thr Gly Thr Cys Gly Ala Gly Thr Gly Cys
660 665 670

Cys Cys Ala Cys Cys Gly Thr Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys
675 680 685

Cys Ala Cys Cys Thr Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly Gly Ala Cys Cys
690 695 700

Gly Thr Cys Ala Gly Thr Cys Thr Thr Cys Cys Thr Cys Thr Thr Cys
705 710 715 720

Cys Cys Cys Cys Cys Ala Ala Ala Ala Cys Cys Cys Ala Ala Gly Gly
725 730 735

Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Ala Thr Gly Ala Thr Cys Thr Cys
740 745 750

Cys Cys Gly Gly Ala Cys Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys
755 760 765

Ala Cys Gly Thr Gly Cys Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly
770 775 780

Ala Cys Gly Thr Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys Gly Ala Ala Gly Ala
785 790 795 800

Cys Cys Cys Cys Gly Ala Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Thr Thr Cys
805 810 815

Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Gly
820 825 830

Gly Cys Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Thr Ala Ala
835 840 845

Thr Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Cys Ala Ala Ala Gly Cys Cys Ala
850 855 860

Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Thr Thr Cys Ala
865 870 875 880

Ala Cys Ala Gly Cys Ala Cys Gly Thr Thr Cys Cys Gly Thr Gly Thr
885 890 895

Gly Gly Thr Cys Ala Gly Cys Gly Thr Cys Cys Thr Cys Ala Cys Cys
900 905 910

Gly Thr Thr Gly Thr Gly Cys Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Thr
915 920 925

Gly Gly Cys Thr Gly Ala Ala Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala
930 935 940

Gly Thr Ala Cys Ala Ala Gly Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr Cys
945 950 955 960

Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Cys Cys
965 970 975

Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Cys Ala Thr Cys Gly Ala Gly Ala Ala
980 985 990

Ala Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Ala Ala Ala Ala Cys Cys
995 1000 1005

201132353

Ala Ala	Ala Gly Gly Gly Cys	Ala Gly Cys Cys Cys	Cys Gly Ala
1010	1015	1020	
Gly Ala	Ala Cys Cys Ala Cys	Ala Gly Gly Thr Gly	Thr Ala Cys
1025	1030	1035	
Ala Cys	Cys Cys Thr Gly Cys	Cys Cys Cys Cys Ala	Thr Cys Cys
1040	1045	1050	
Cys Gly	Gly Gly Ala Gly Gly	Ala Gly Ala Thr Gly	Ala Cys Cys
1055	1060	1065	
Ala Ala	Gly Ala Ala Cys Cys	Ala Gly Gly Thr Cys	Ala Gly Cys
1070	1075	1080	
Cys Thr	Gly Ala Cys Cys Thr	Gly Cys Cys Thr Gly	Gly Thr Cys
1085	1090	1095	
Ala Ala	Ala Gly Gly Cys Thr	Thr Cys Thr Ala Cys	Cys Cys Cys
1100	1105	1110	
Ala Gly	Cys Gly Ala Cys Ala	Thr Cys Gly Cys Cys	Gly Thr Gly
1115	1120	1125	
Gly Ala	Gly Thr Gly Gly Gly	Ala Gly Ala Gly Cys	Ala Ala Thr
1130	1135	1140	
Gly Gly	Gly Cys Ala Gly Cys	Cys Gly Gly Ala Gly	Ala Ala Cys
1145	1150	1155	
Ala Ala	Cys Thr Ala Cys Ala	Ala Gly Ala Cys Cys	Ala Cys Ala
1160	1165	1170	

Cys Cys Thr Cys Cys Cys Ala Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Cys
1175 1180 1185

Thr Cys Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Thr Cys Cys Thr Thr Cys
1190 1195 1200

Thr Thr Cys Cys Thr Cys Thr Ala Cys Ala Gly Cys Ala Ala Gly
1205 1210 1215

Cys Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly
1220 1225 1230

Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly
1235 1240 1245

Gly Gly Gly Ala Ala Cys Gly Thr Cys Thr Thr Cys Thr Cys Ala
1250 1255 1260

Thr Gly Cys Thr Cys Cys Gly Thr Gly Ala Thr Gly Cys Ala Thr
1265 1270 1275

Gly Ala Gly Gly Cys Thr Cys Thr Gly Cys Ala Cys Ala Ala Cys
1280 1285 1290

Cys Ala Cys Thr Ala Cys Ala Cys Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly
1295 1300 1305

Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly Thr Cys Thr
1310 1315 1320

Cys Cys Gly Gly Gly Thr Ala Ala Ala
1325 1330

<210> 132
<211> 444
<212> PRT
<213> 智人

<400> 132

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 Leu Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gly Thr Ser 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 Val Ser Ser Trp Phe Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
165	170	175	
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
180	185	190	
Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser			
195	200	205	
Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys			
210	215	220	
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
225	230	235	240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
245	250	255	
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe			
260	265	270	
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro			
275	280	285	
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr			
290	295	300	
Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val			
305	310	315	320
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr			

325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 133
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 133

Ala Gly Asp Glu Leu Gly Asn Lys Tyr Ala Ala
1 5 10

<210> 134
<211> 7

<212> PRT
<213> 智人

<400> 134

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 135
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 135

Gln Val Trp Asp Arg Ser Ser Tyr His Val Val
1 5 10

<210> 136
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 136

Leu Tyr Thr Met Gln
1 5

<210> 137
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 137

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

Gly

201132353

<210> 138
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 138

Gly Val Ser Ser Trp Phe Phe Glu Tyr
1 5

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 99 144 615

※ 申請日： 99.12.17

※IPC 分類：()

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

WISE結合劑及抗原決定基

WISE BINDING AGENTS AND EPITOPES

二、中文發明摘要：

本發明係關於 WISE 之結合劑，及包括其製造及使用方法。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to binding agents for WISE, and includes methods for their manufacture and use.

七、申請專利範圍：

1. 一種經分離之抗體或其片段，其交叉阻斷抗體 Ab-AA、Ab-AB、Ab-AC、Ab-AD、Ab-AE、Ab-AF、Ab-AG、Ab-AH、Ab-AI、Ab-AJ及D14中至少一者與人類 WISE之結合，且特異性結合於人類 WISE之環2結構域，及/或由抗體 Ab-AA、Ab-AB、Ab-AC、Ab-AD、Ab-AE、Ab-AF、Ab-AG、Ab-AH、Ab-AI、Ab-AJ及D14中至少一者交叉阻斷與人類 WISE之結合，且特異性結合於人類 WISE之環2結構域。
2. 如請求項1之抗體或其片段，其中該 WISE抗體或其片段可降低至少一種以下參數：組織損傷及其標誌物、天狼星紅(Sirius red)染色或膠原蛋白產量、諸如 aSMA或FSP-1之成肌纖維細胞標誌物的表現、骨橋蛋白(osteopontin)表現、蛋白尿，及/或在基於細胞之檢驗中可抑制 WISE之活性。
3. 如請求項1之抗體，其可提高或保留肌酸酐清除率所測量之腎功能及/或降低血清或血漿肌酸酐的升高於有需要之患者(相較於未經治療之患者)。
4. 一種經分離之抗體或其片段，其結合於 WISE之環2抗原決定基。
5. 如請求項4之經分離之抗體，其中該抗體結合於 WISE在以下一或多處：SEQ ID NO: 2之胺基酸110之白胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸112之天冬醯胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸114之異白胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸115之

甘胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸116之甘胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸117之甘胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸119之甘胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸121之離胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸123之色胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸126之精胺酸、SEQ ID NO: 2之胺基酸128之絲胺酸、或SEQ ID NO: 2之胺基酸129之麩醯胺酸。

6. 如請求項1至3及5中任一項之抗體或其片段，其包含至少一個序列與選自以下之序列具有至少90%一致性：
SEQ ID NO: 34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、133、134、135、136、137及138，且結合於人類WISE。
7. 如請求項4及6中任一項之抗體或其片段，其包含六個該等序列。
8. 如請求項7之抗體或其片段，其中該一致性百分比為95%。
9. 如請求項8之抗體或其片段，其包含：
 - a. SEQ ID NO: 34、35及36之序列；
 - b. SEQ ID NO: 37、38及39之序列；
 - c. SEQ ID NO: 40、41及42之序列；
 - d. SEQ ID NO: 43、44及45之序列；

- e. SEQ ID NO: 46、47及48之序列；
- f. SEQ ID NO: 49、50及51之序列；
- g. SEQ ID NO: 52、53及54之序列；
- h. SEQ ID NO: 55、56及57之序列；
- i. SEQ ID NO: 58、59及60之序列；
- j. SEQ ID NO: 61、62及63之序列；
- k. SEQ ID NO: 64、65及66之序列；
- l. SEQ ID NO: 67、68及69之序列；
- m. SEQ ID NO: 86、87及88之序列；
- n. SEQ ID NO: 89、90及69之序列；
- o. SEQ ID NO: 91、92及93之序列；
- p. SEQ ID NO: 94、95及96之序列；
- q. SEQ ID NO: 97、98及99之序列；
- r. SEQ ID NO: 100、101及102之序列；
- s. SEQ ID NO: 103、104及105之序列；
- t. SEQ ID NO: 106、107及108之序列；
- u. SEQ ID NO: 133、134及135之序列；及
- v. SEQ ID NO: 136、137及138之序列。

10. 如請求項9之抗體或其片段，其包含：

- a. SEQ ID NO: 34、35及36之序列及SEQ ID NO: 37、38及39之序列；
- b. SEQ ID NO: 40、41及42之序列及SEQ ID NO: 43、44及45之序列；
- c. SEQ ID NO: 46、47及48之序列及SEQ ID NO: 49、

50及51之序列；

d. SEQ ID NO: 52、53及54之序列及SEQ ID NO: 55、56及57之序列；

e. SEQ ID NO: 58、59及60之序列及SEQ ID NO: 61、62及63之序列；

f. SEQ ID NO: 64、65及66之序列及SEQ ID NO: 67、68及69之序列；

g. SEQ ID NO: 86、87及88之序列及SEQ ID NO: 89、90及69之序列；

h. SEQ ID NO: 91、92及93之序列及SEQ ID NO: 94、95及96之序列；

i. SEQ ID NO: 97、98及99之序列及SEQ ID NO: 100、101及102之序列；

j. SEQ ID NO: 103、104及105之序列及SEQ ID NO: 106、107及108之序列；及

k. SEQ ID NO: 133、134及135之序列及SEQ ID NO: 136、137及138之序列。

11. 如請求項10之抗體或其片段，其包含至少一個序列與序列a至k中任一者具有至少90%一致性。

12. 如請求項10之抗體，其包含SEQ ID NO: 110之輕鏈及SEQ ID NO: 112之重鏈、SEQ ID NO: 114之輕鏈及SEQ ID NO: 116之重鏈、SEQ ID NO: 118之輕鏈及SEQ ID NO: 116之重鏈、SEQ ID NO: 114之輕鏈及SEQ ID NO: 120之重鏈、SEQ ID NO: 118之輕鏈及SEQ ID NO: 120之

重鏈、SEQ ID NO: 122之輕鏈及SEQ ID NO: 124之重鏈、SEQ ID NO: 1126之輕鏈及SEQ ID NO: 124之重鏈、SEQ ID NO: 122之輕鏈及SEQ ID NO: 128之重鏈，或SEQ ID NO: 126之輕鏈及SEQ ID NO: 128之重鏈。

13. 一種抗體，其對WISE之親和力小於 1×10^{-7} M，特異性結合Seq Id No: 2之成熟多肽之環2，且抑制WISE活性，其用於治療與腎臟疾病或病症有關之醫學病狀的方法。
14. 如請求項13之抗體，其中該腎臟病症為糖尿病性腎病變，或高血壓性腎病，或移植相關之移植物功能障礙。
15. 如請求項13之抗體，其中該腎臟疾病與蛋白尿及/或纖維化有關。
16. 一種醫藥組合物，其包含如請求項13或16之抗體或片段。
17. 如請求項16之抗體或其片段，其係與一或多種醫藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑或載劑組合。
18. 如請求項17之抗體或其片段，其接合於Fc、PEG、白蛋白及運鐵蛋白中至少一者。
19. 一種WISE之免疫原性多肽，其適用於產生抑制性抗體，其中該等抗體以小於 1×10^{-7} M之親和力結合於全長人類WISE且可降低至少一種以下參數：組織損傷、天狼星紅染色或膠原蛋白產量、諸如 α SMA或FSP-1之成肌纖維細胞標誌物之表現、骨橋蛋白表現、及蛋白尿、腎功能下降，及/或在基於細胞之檢驗中可阻斷WISE之抑制作用。

20. 一種使用如請求項1之抗體治療糖尿病性腎病變之方法。

八、圖式：

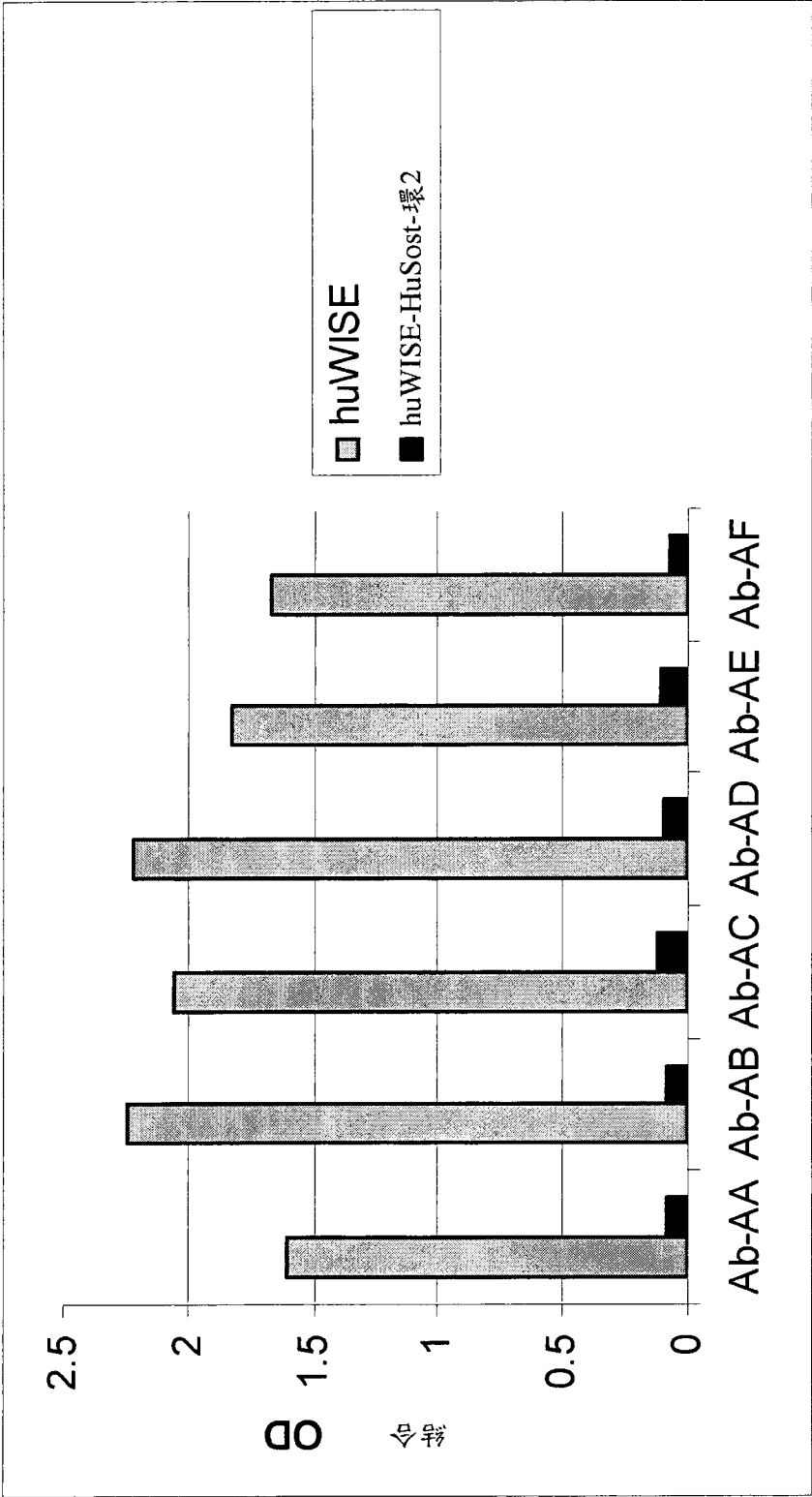


圖1

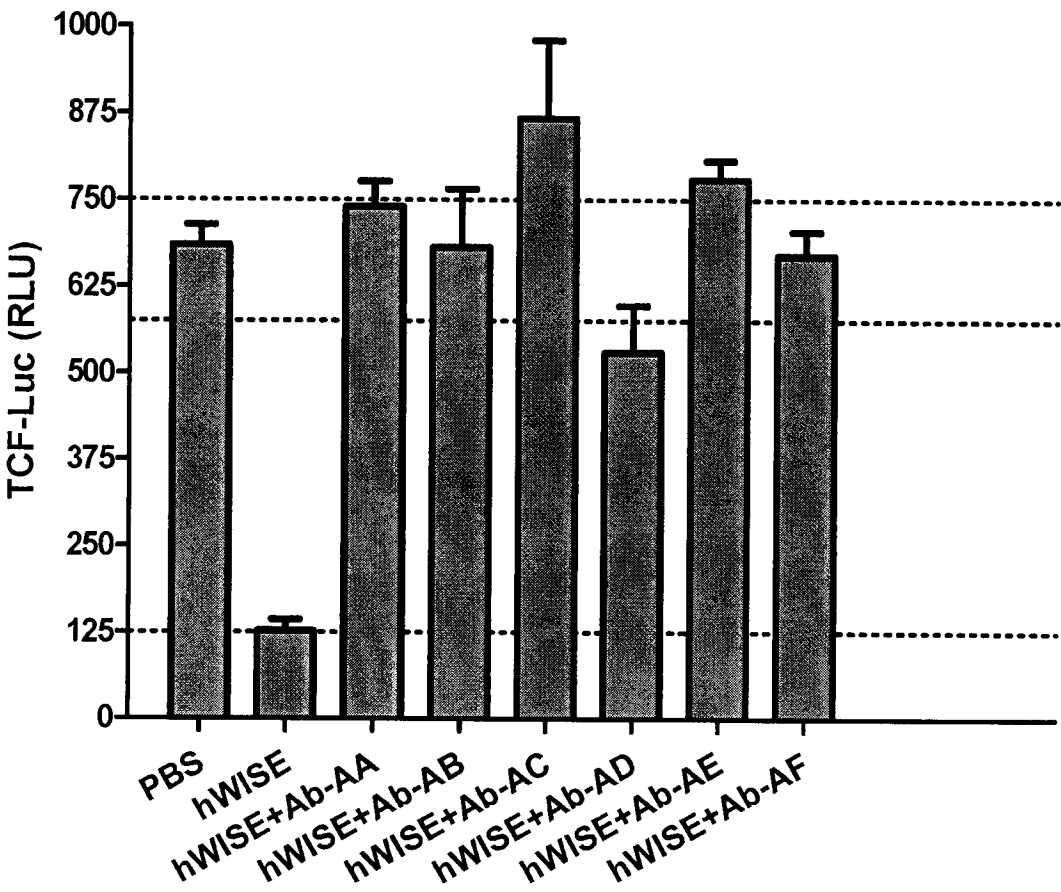


圖 2

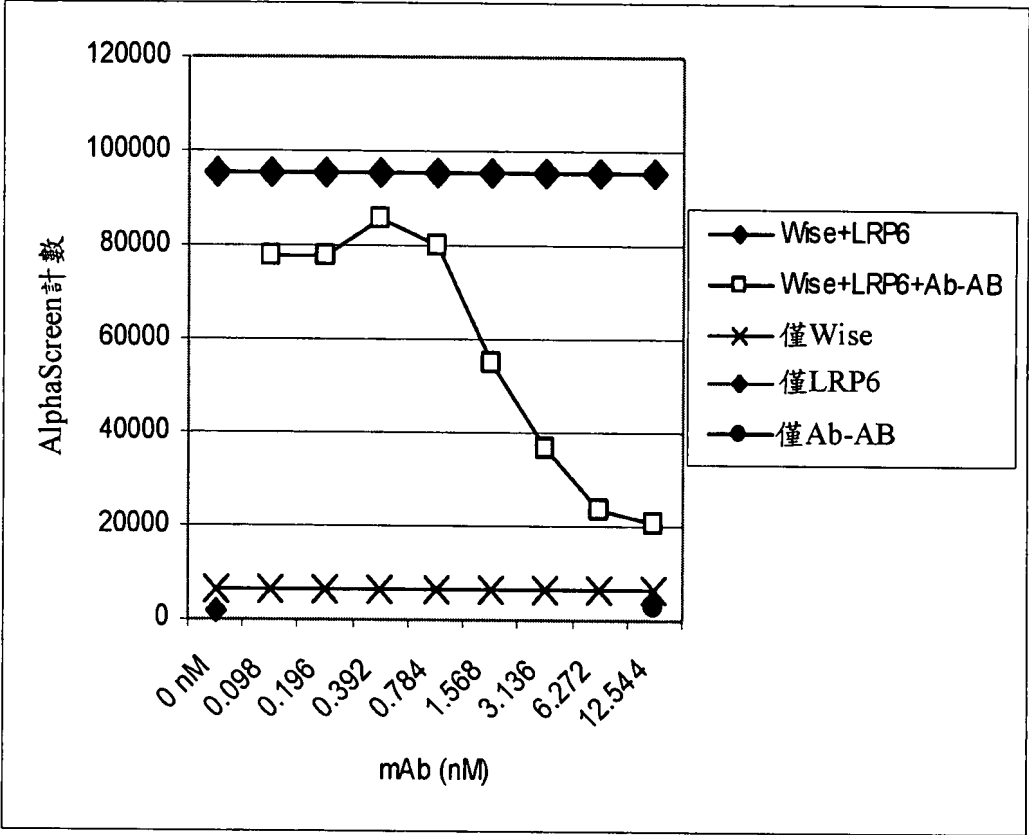


圖3

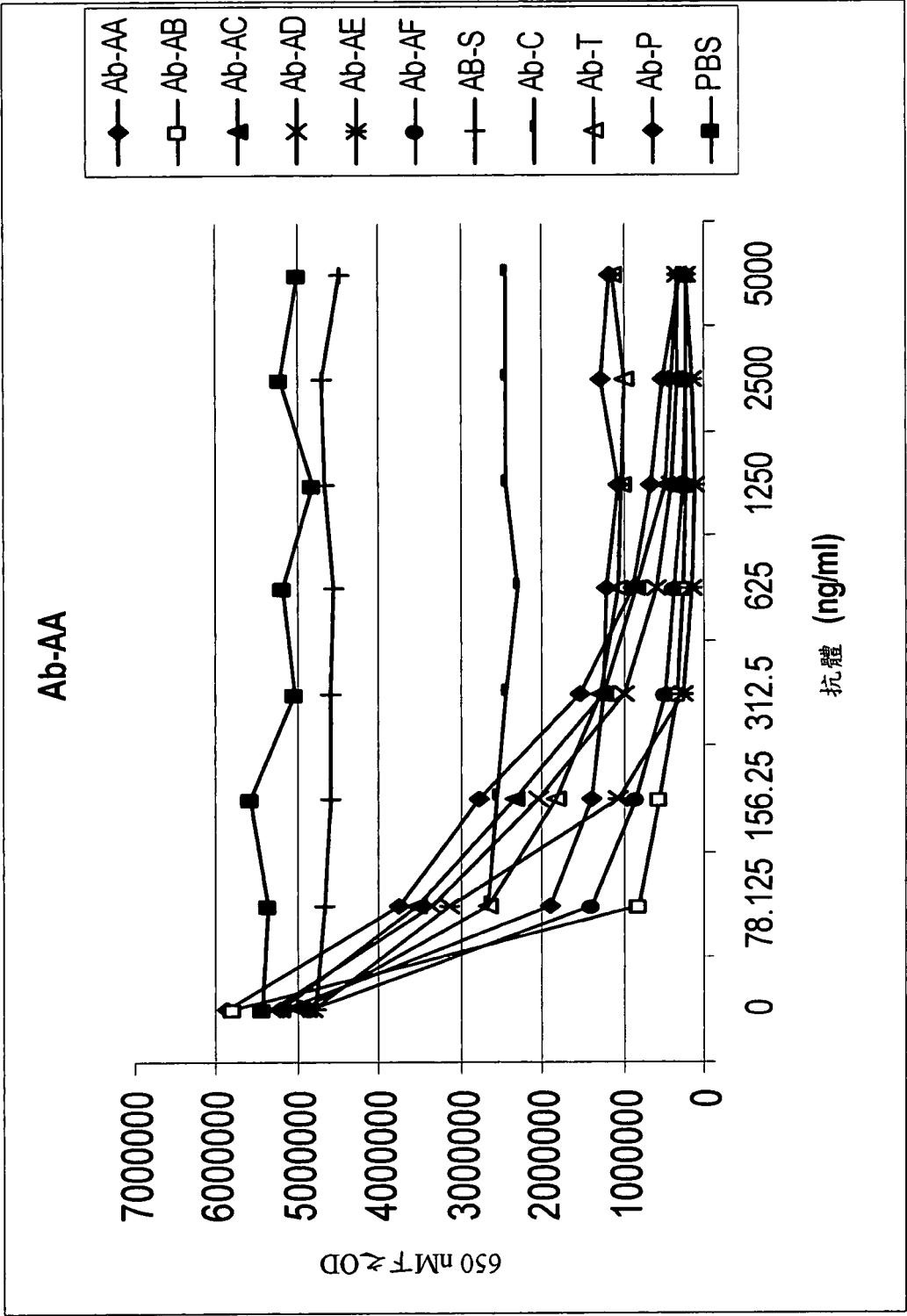


圖 4

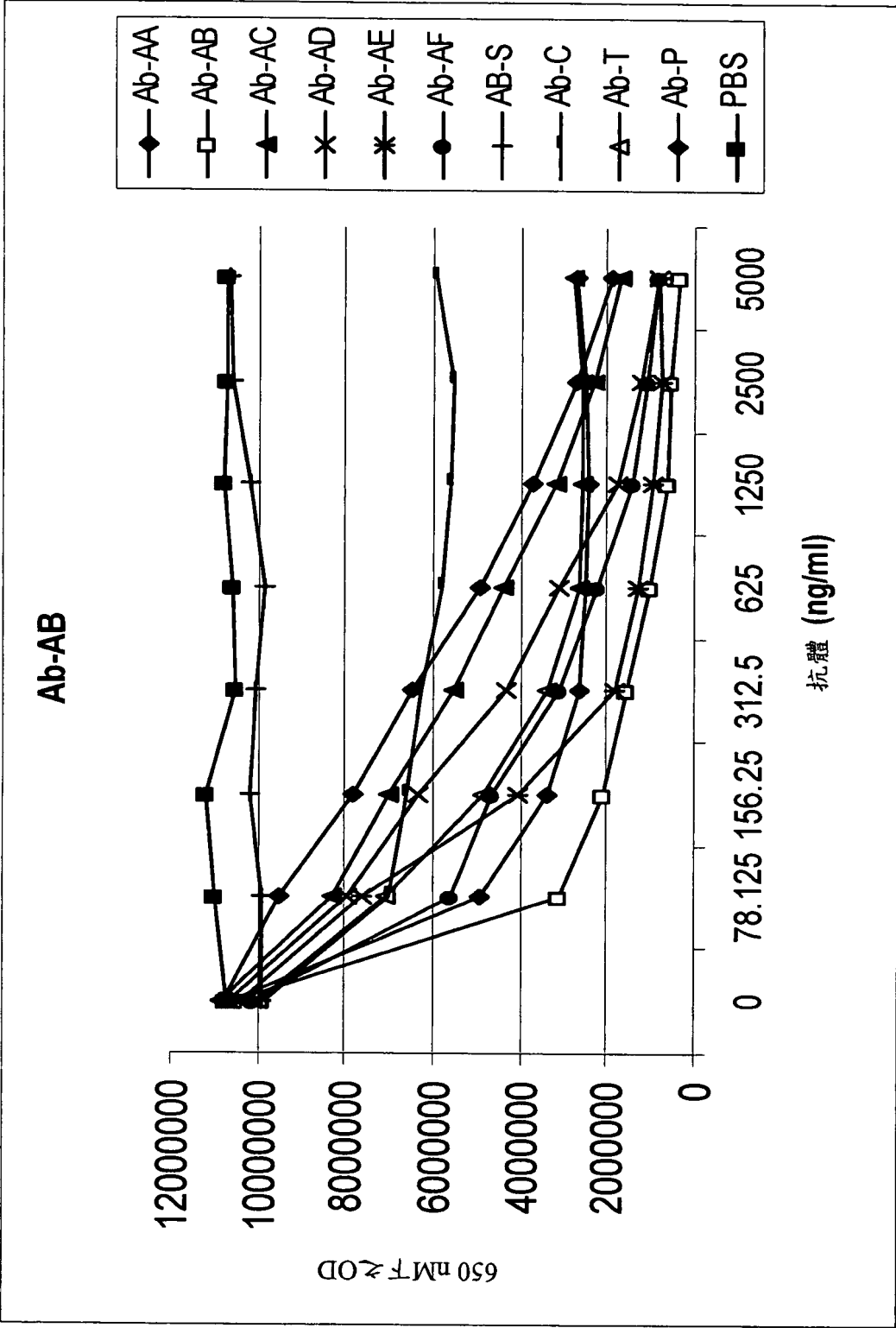


圖5

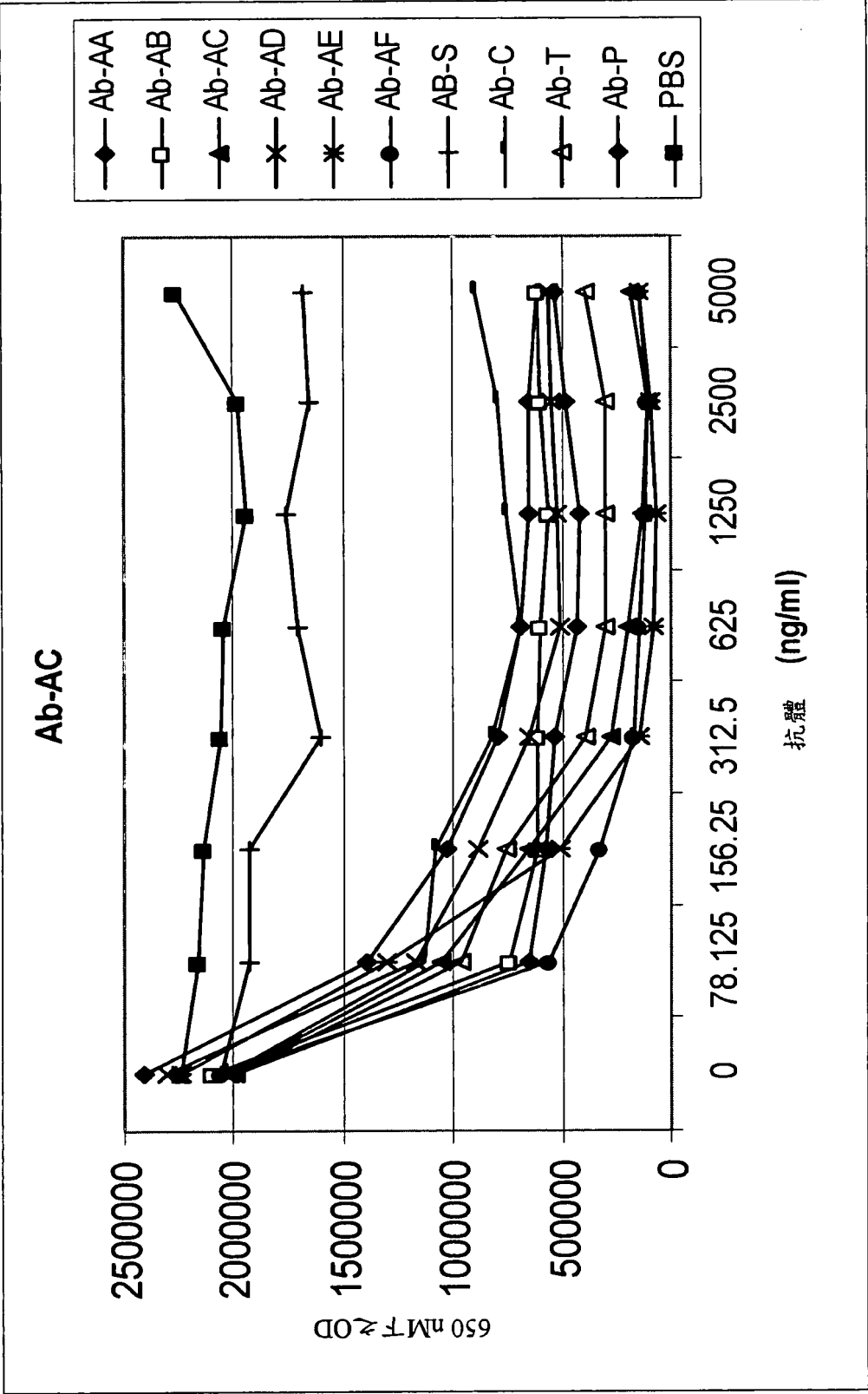


圖6

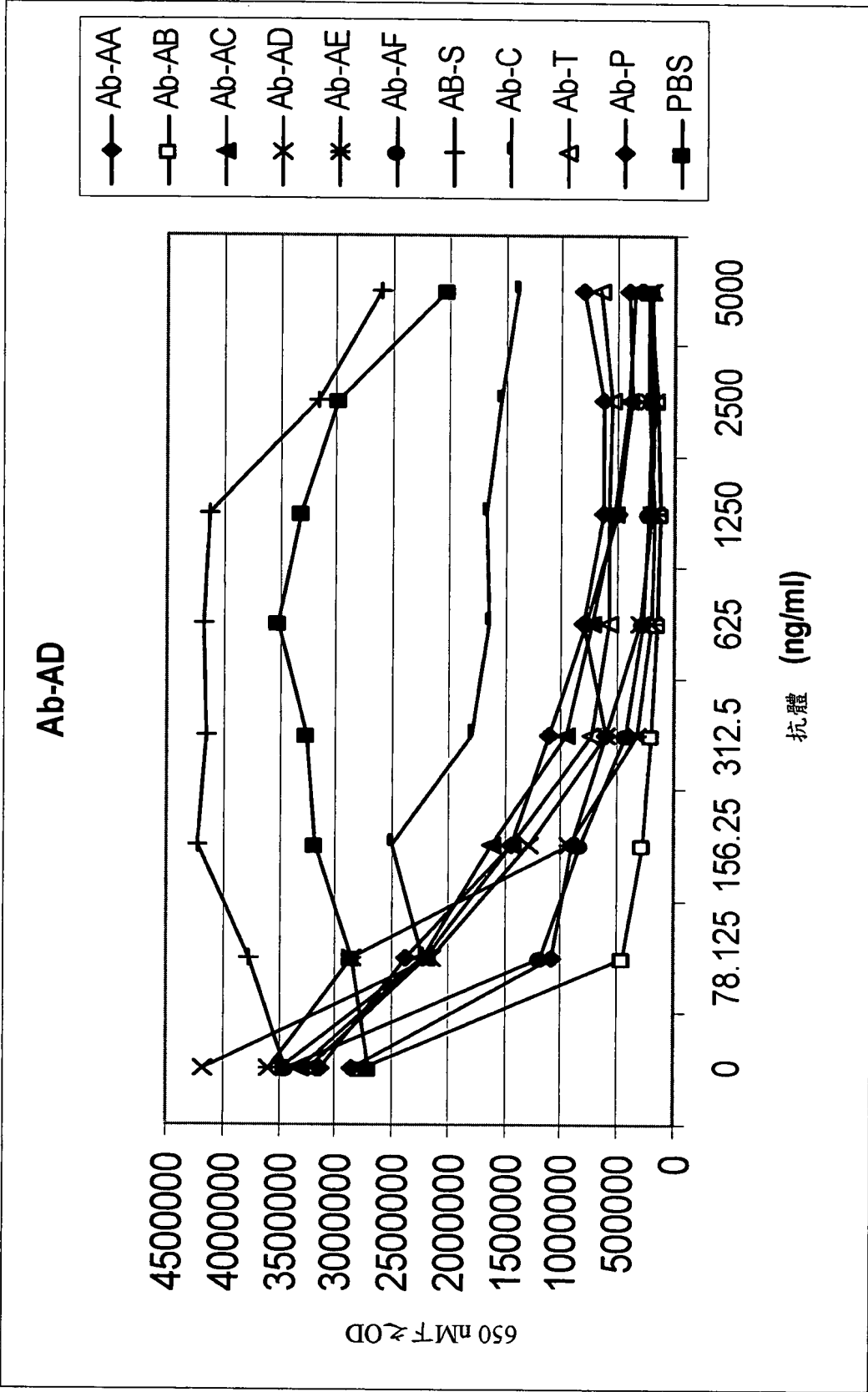


圖7

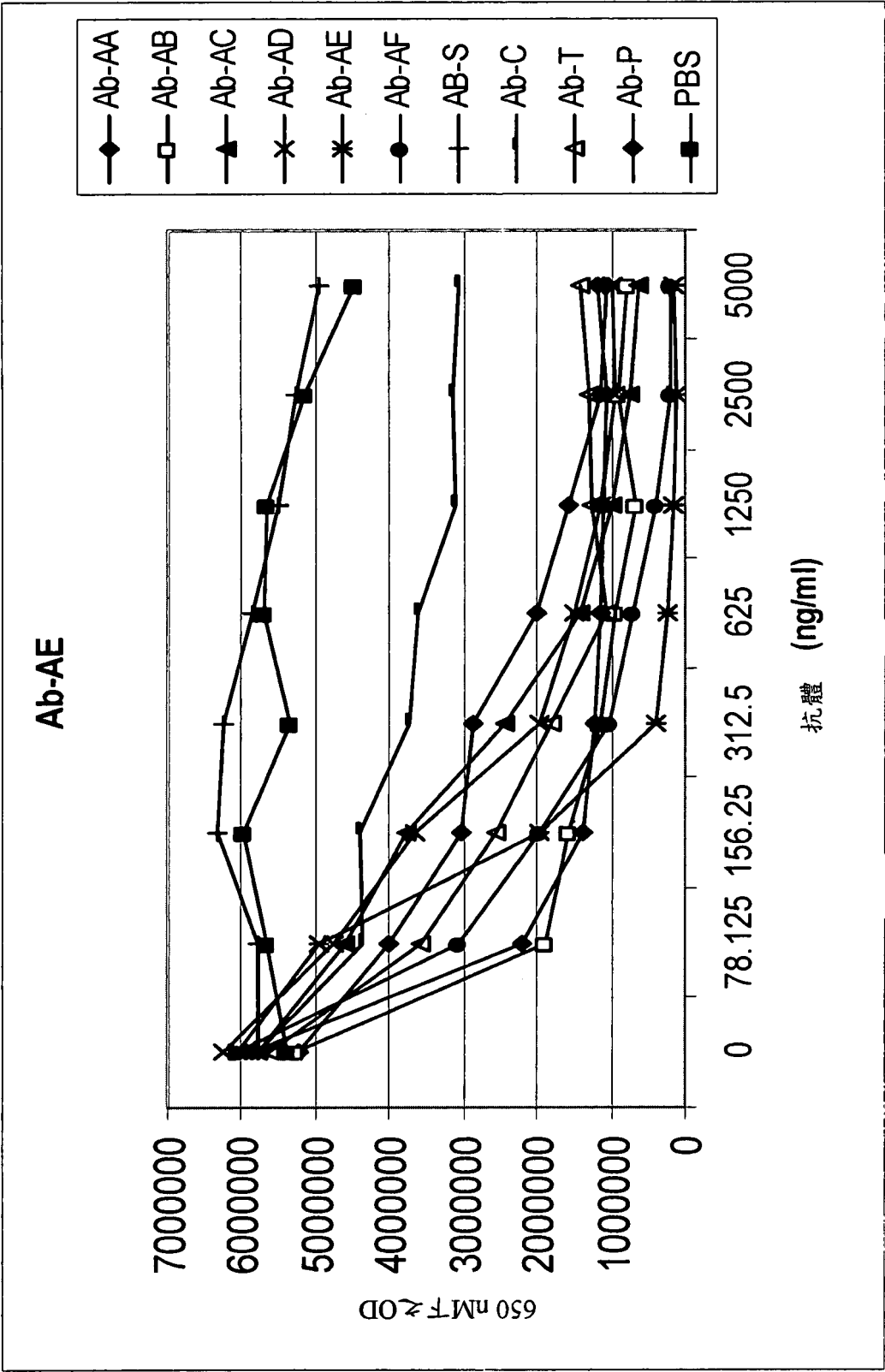


圖8

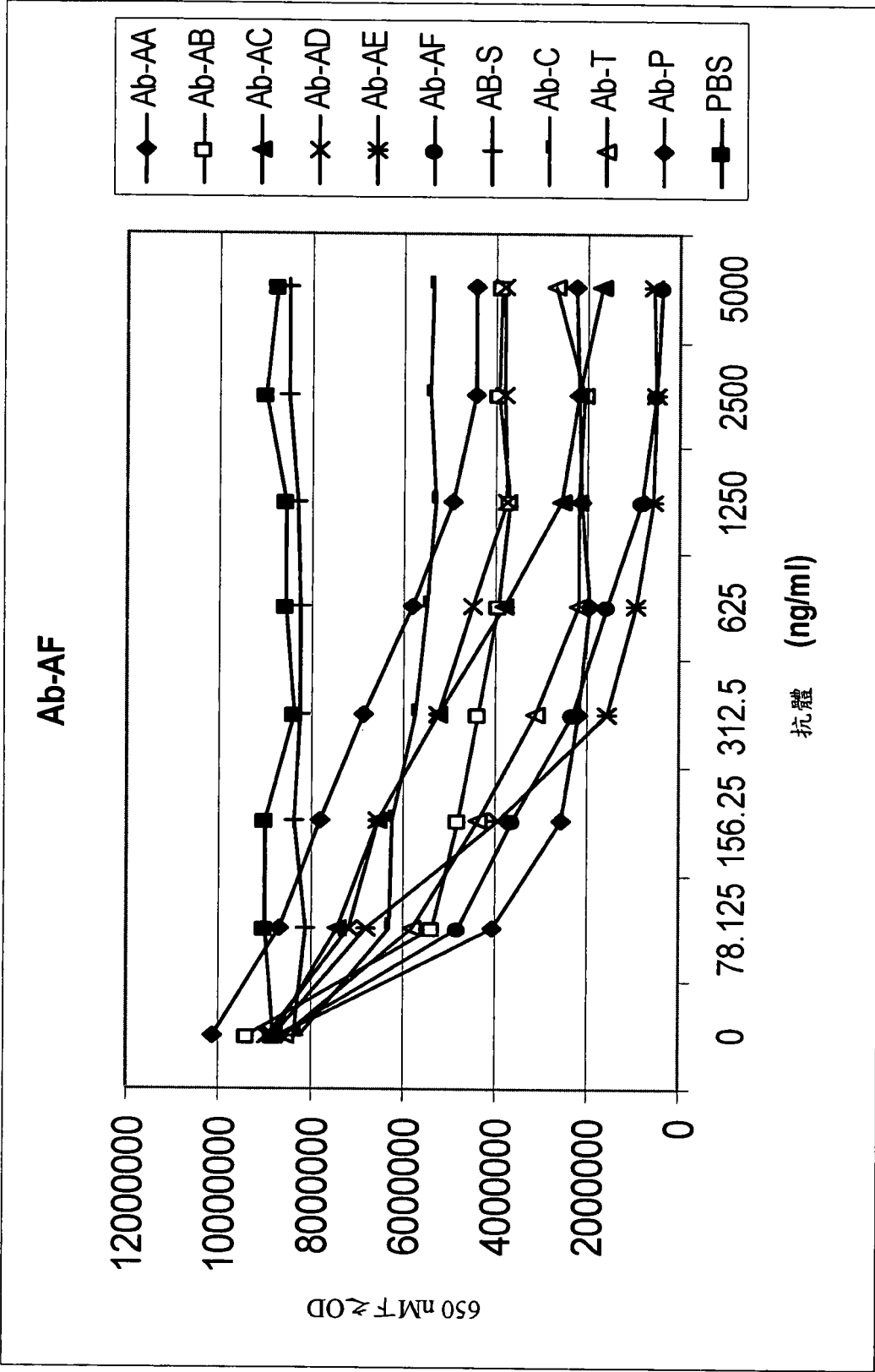


圖9

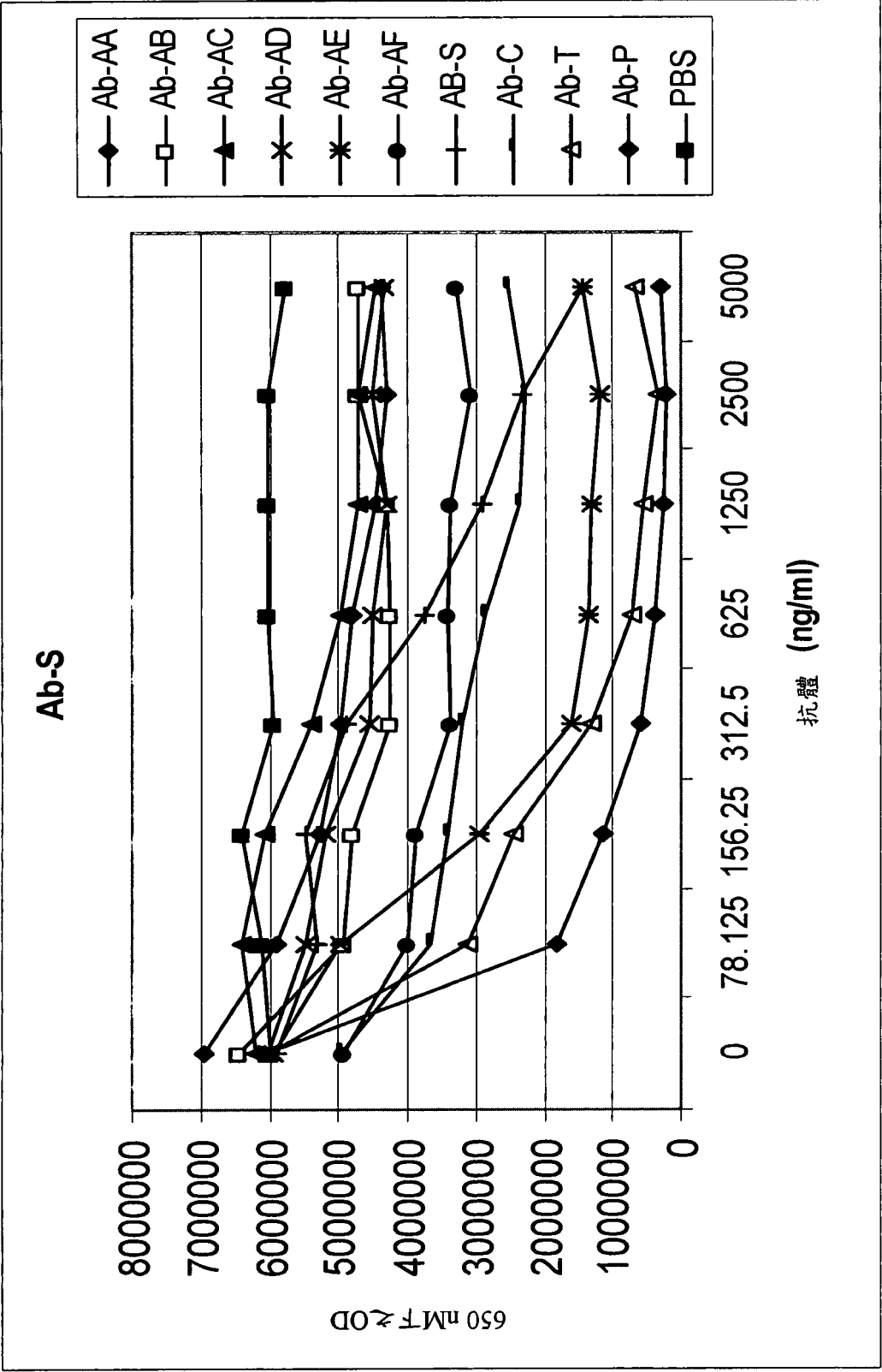


圖10

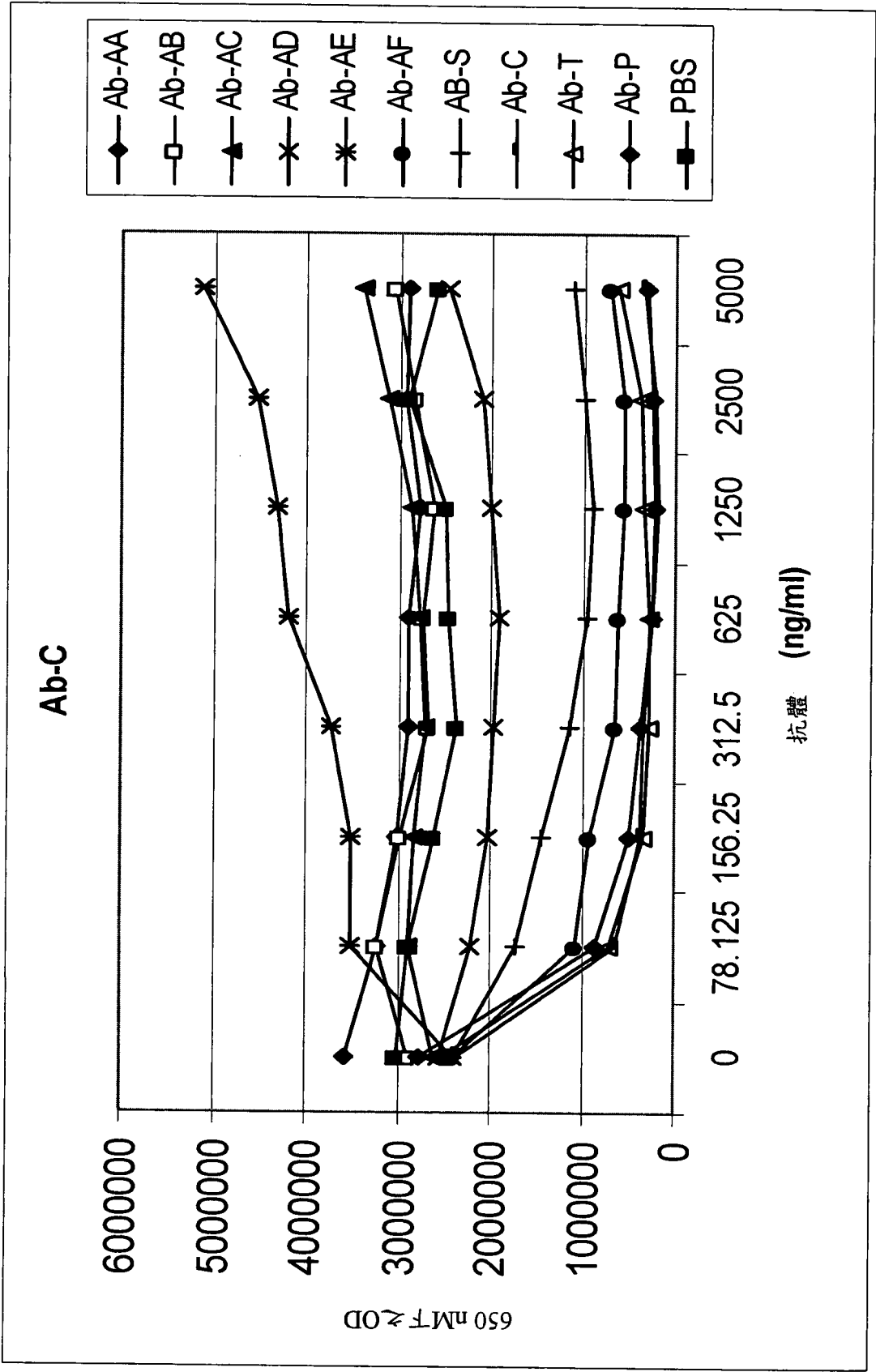


圖 11

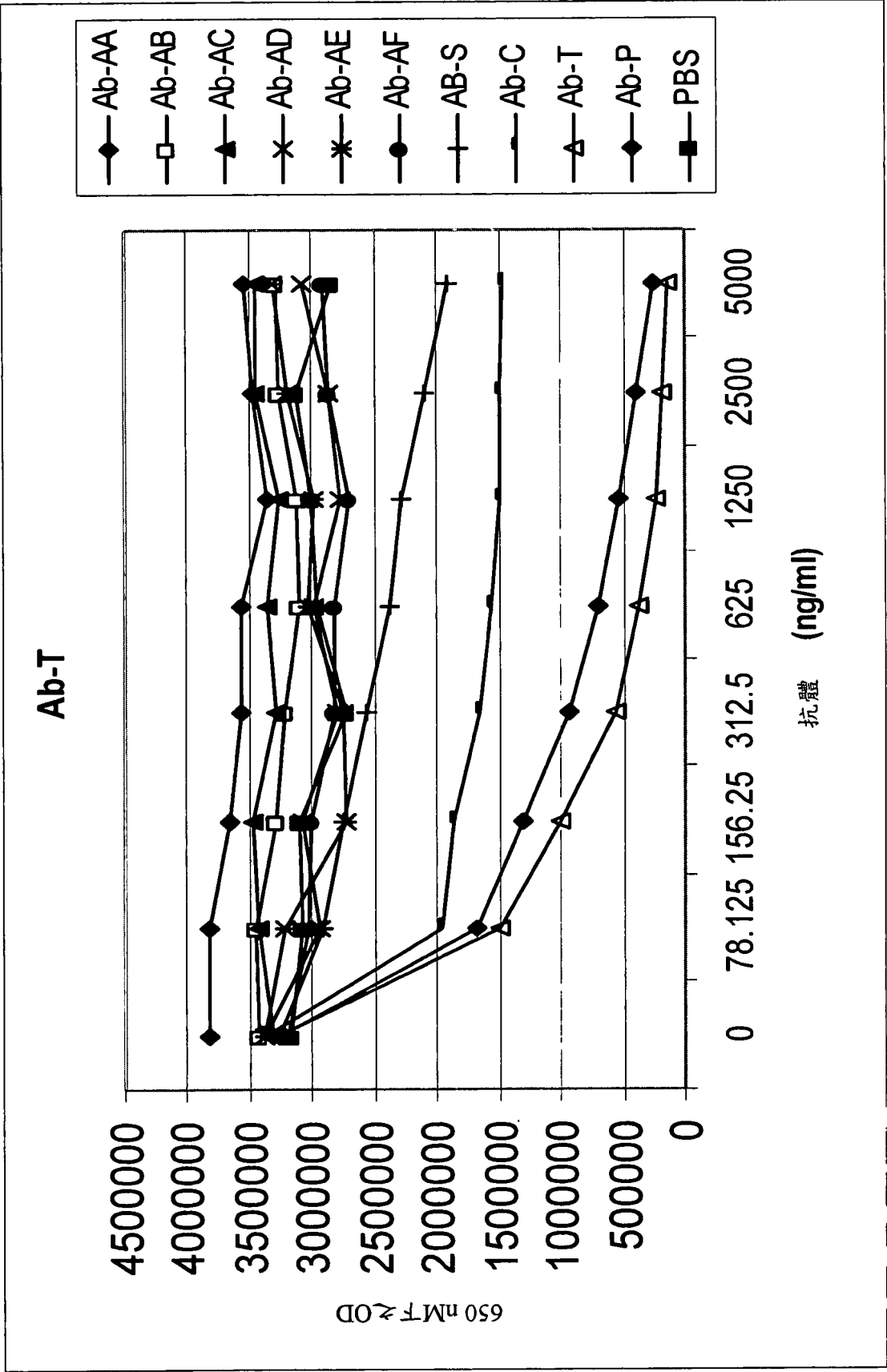


圖12

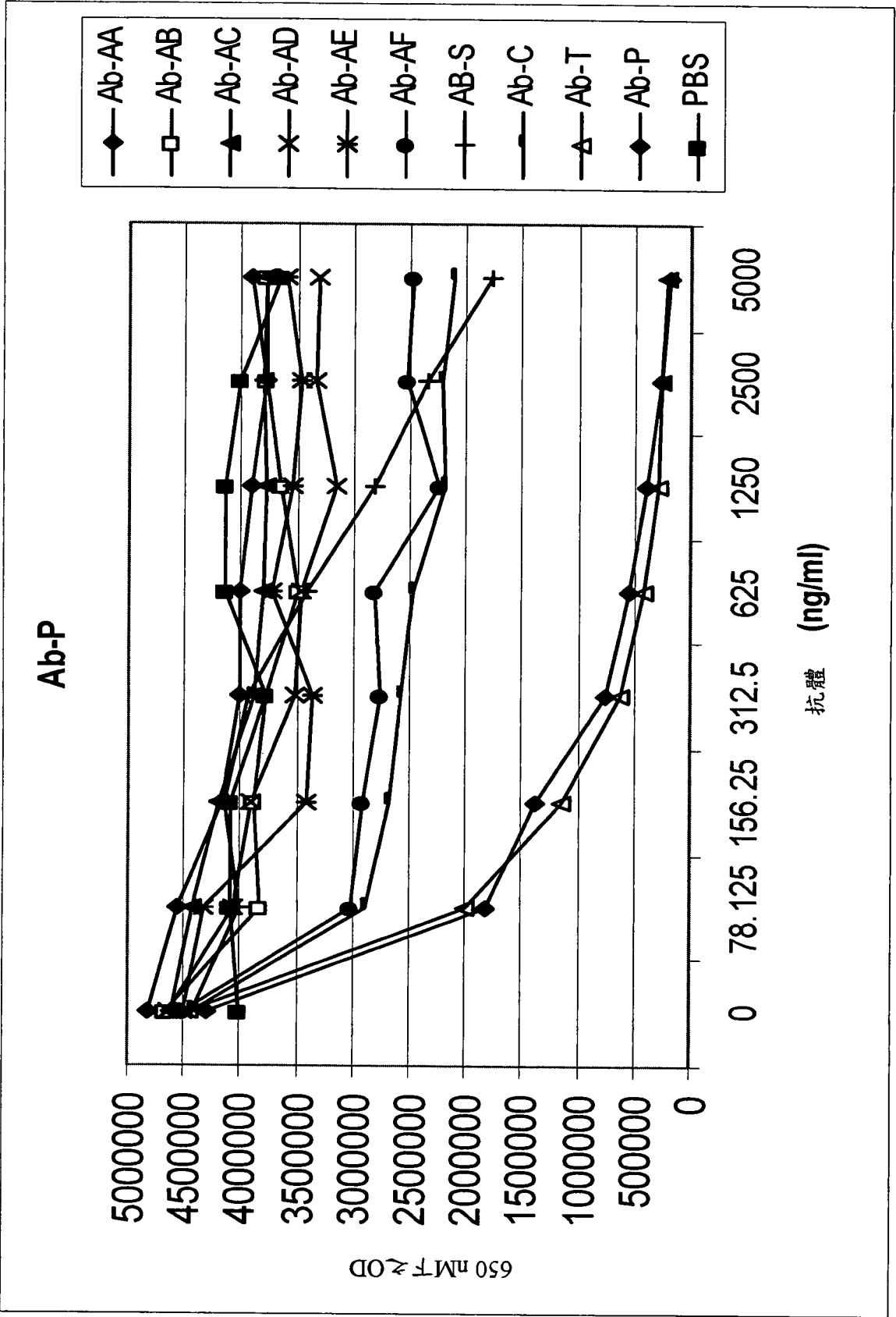


圖 13

WT 殘基	Ab-A	Ab-E	Ab-F	Ab-B	Ab-C	Ab-D
P	1.35	1.32	1.19	1.19	1.40	1.28
V	1.18	1.34	1.17	1.15	1.42	1.26
L	1.23	1.31	1.08	1.16	1.31	1.25
P	1.13	1.36	1.16	1.10	1.34	1.27
N	0.31	0.37	0.33	1.11	0.99	1.04
W	1.13	1.37	1.15	1.10	1.30	1.24
I	0.52	0.70	0.99	0.99	0.76	1.07
G	0.48	0.74	0.58	0.94	0.59	1.09
G	0.90	1.01	0.94	0.89	0.86	0.86
G	0.88	0.97	0.63	0.79	0.54	0.64
Y	0.86	1.15	1.07	0.89	1.06	1.06
G	0.85	1.15	0.97	0.79	1.08	0.91
T	1.03	1.21	1.00	0.94	1.12	1.11
K	0.55	0.77	0.96	0.96	0.65	1.01
Y	1.01	1.16	0.94	0.92	1.07	1.11
W	0.89	0.96	0.89	0.86	0.64	1.08
S	1.01	1.14	0.95	0.91	1.11	1.07
R	0.95	1.23	0.97	0.90	1.03	1.19
R	0.89	1.12	0.84	0.83	0.95	1.03
S	0.88	1.18	0.87	0.83	0.98	1.06
S	0.92	1.12	0.89	0.84	0.96	1.04
Q	0.84	1.09	0.85	0.80	0.96	0.99
HuWISE- HuSost-環2						
	0.48	0.53	0.47	0.42	0.52	0.45
WT huWISE	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

圖14

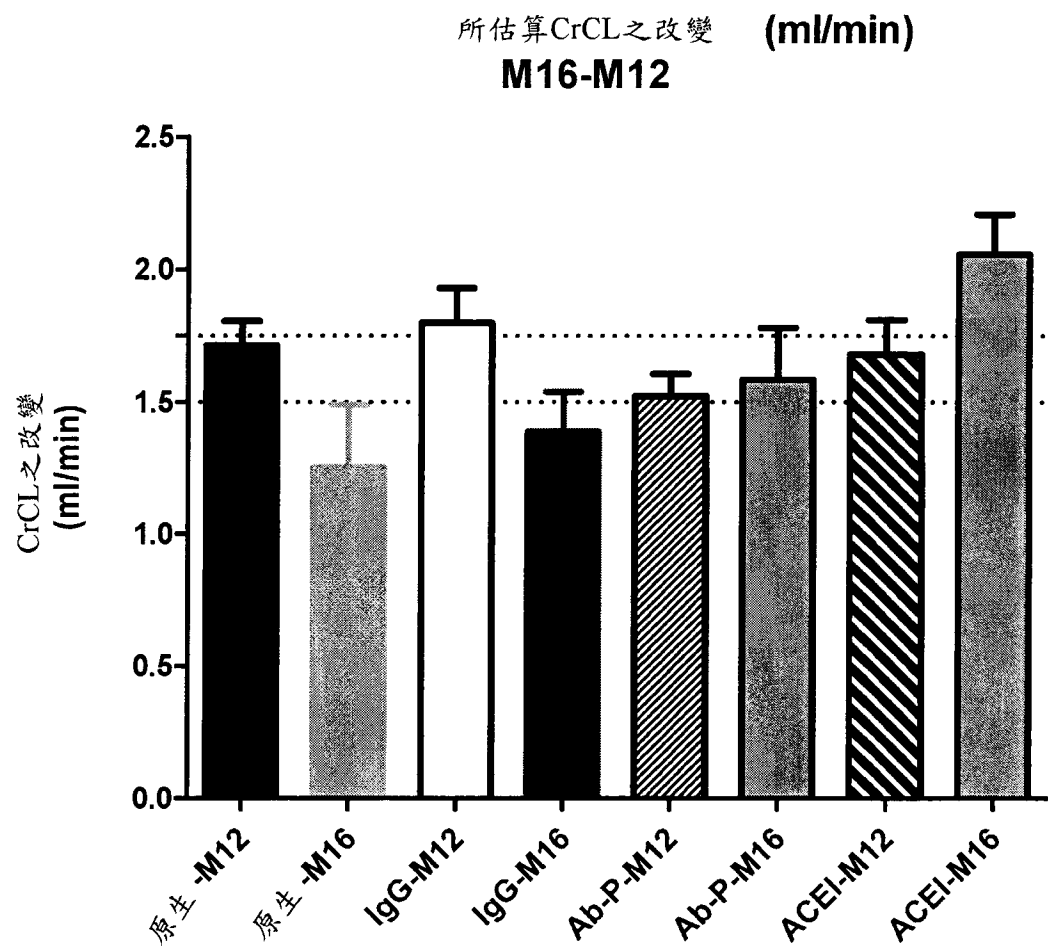


圖15

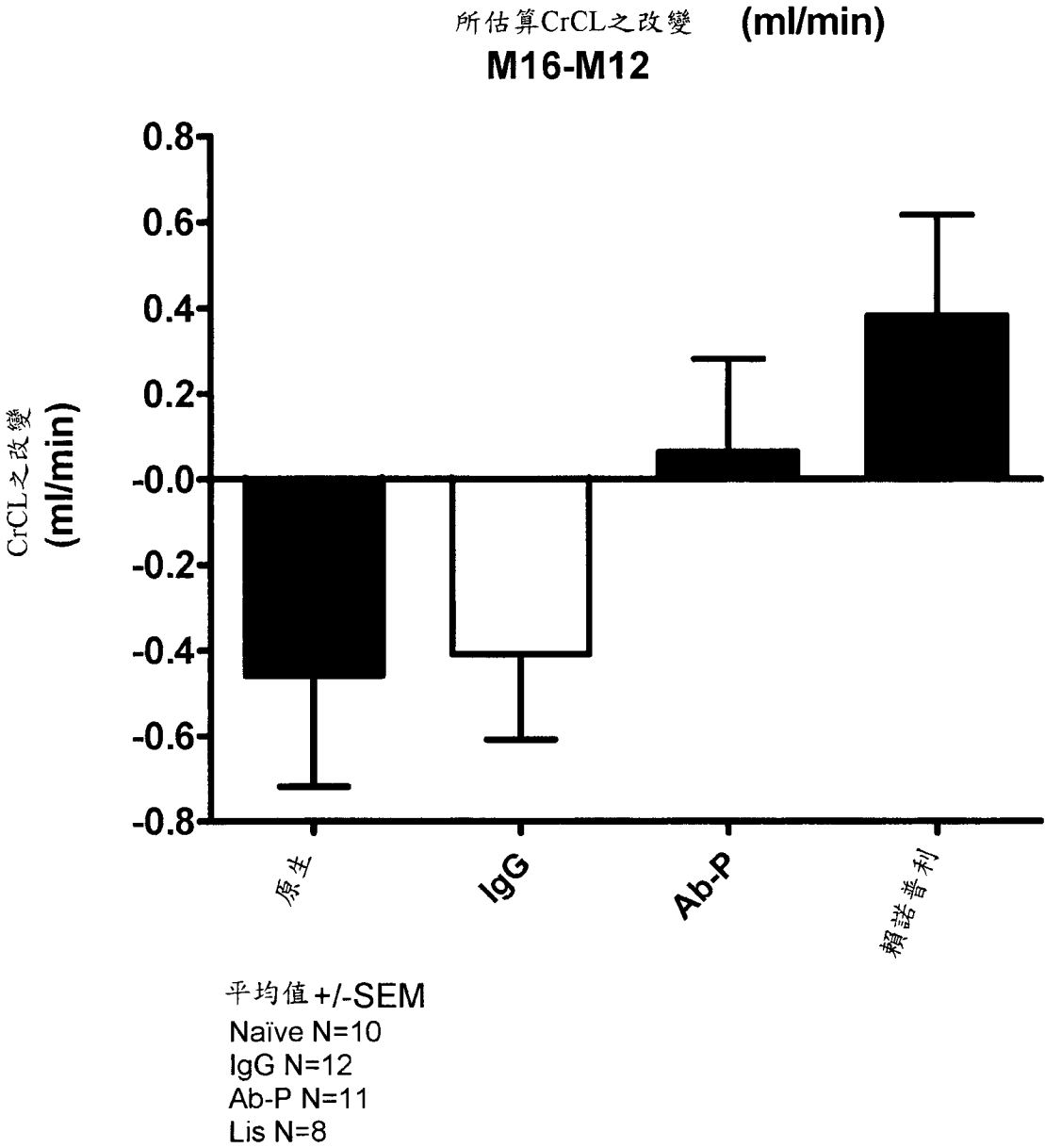


圖16

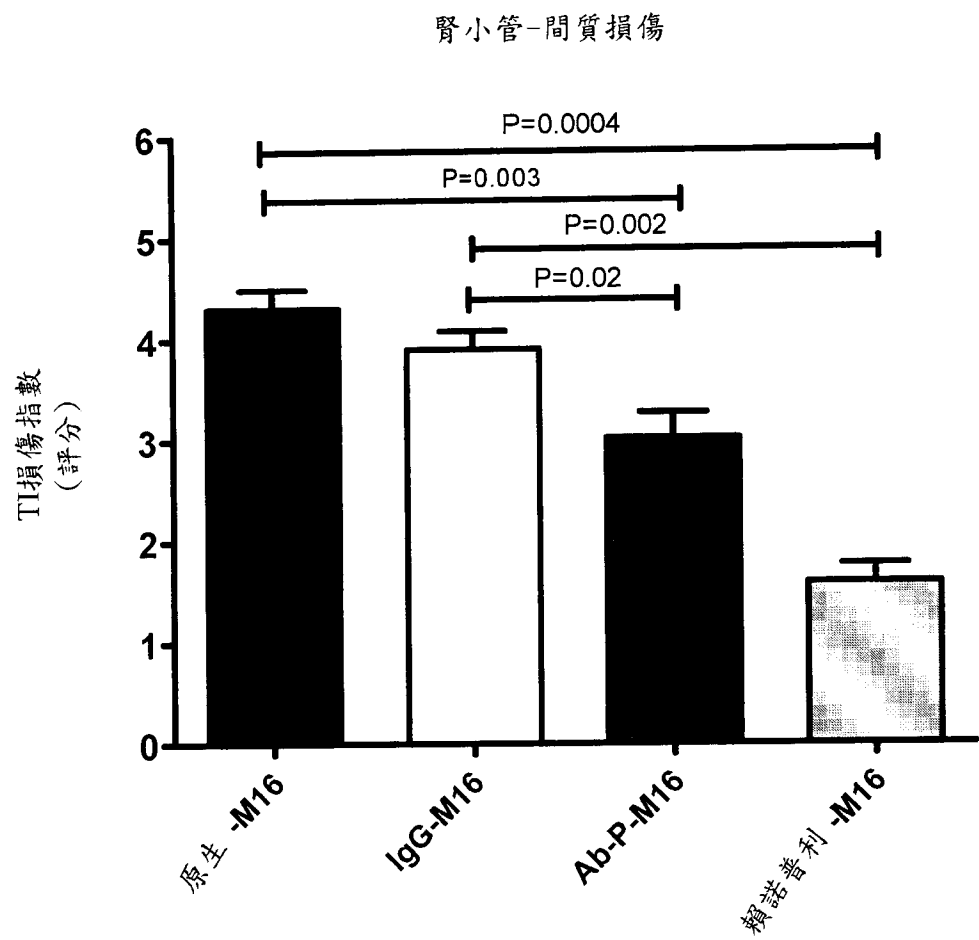


圖17

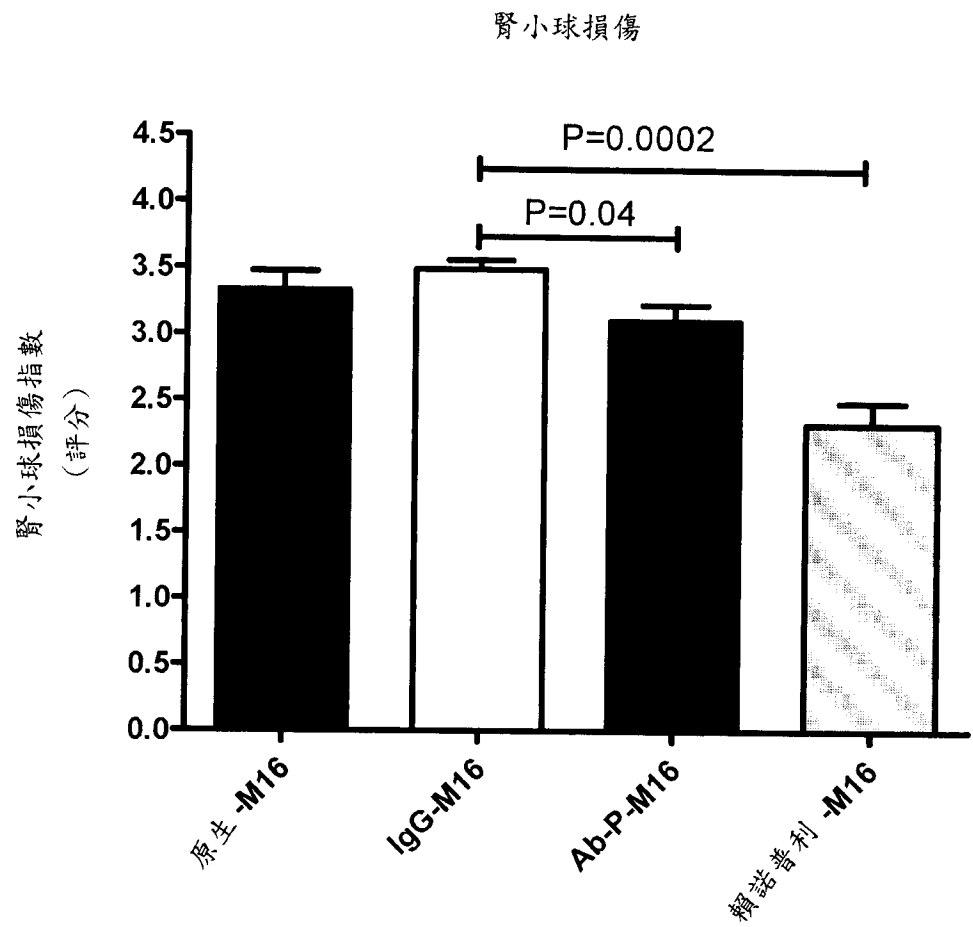


圖18

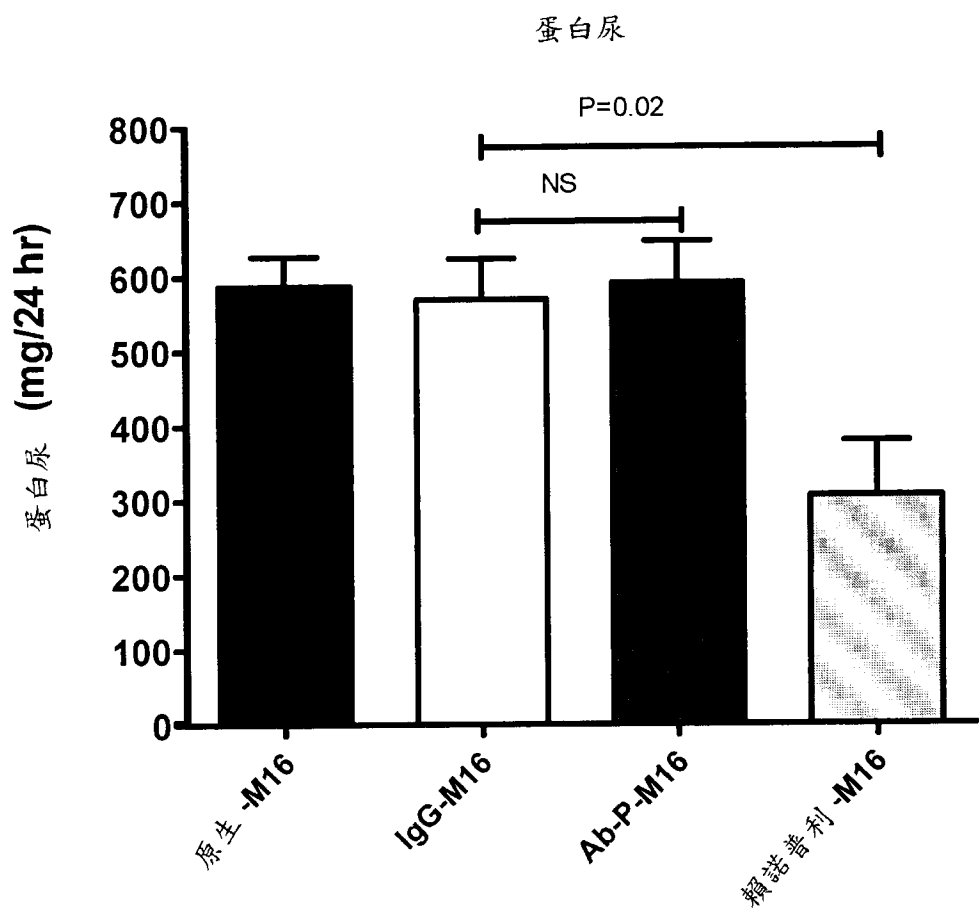


圖19

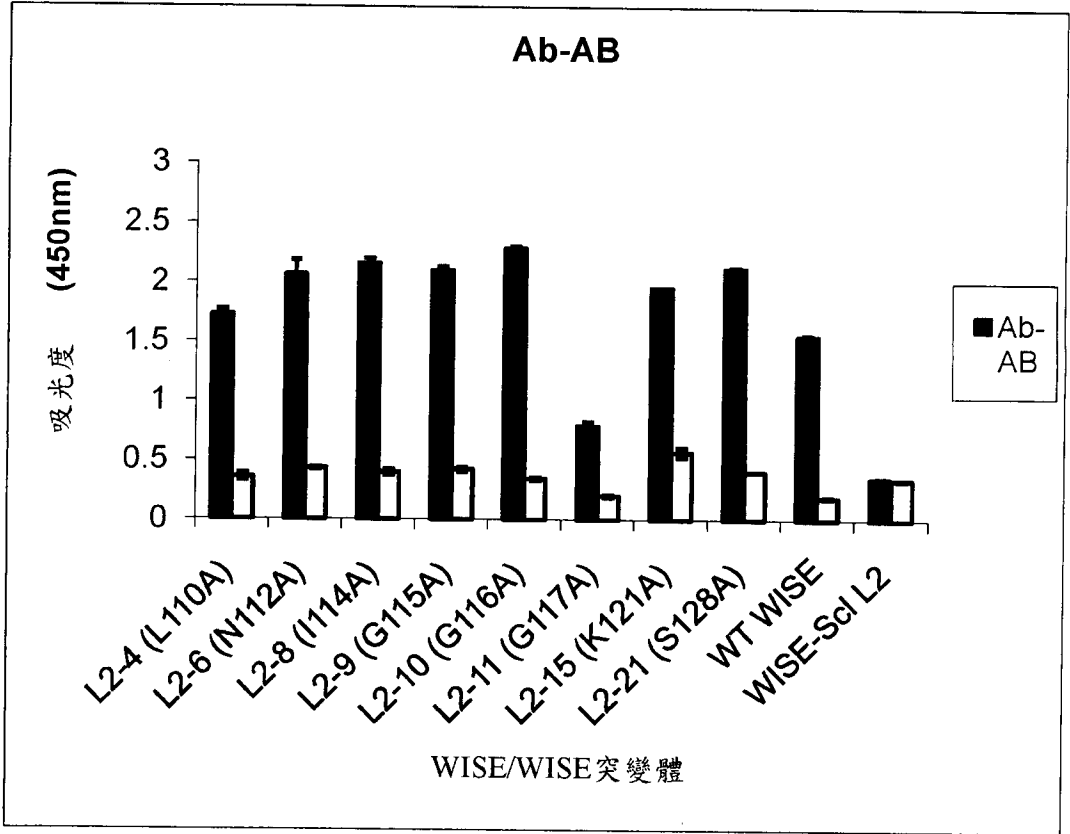


圖20

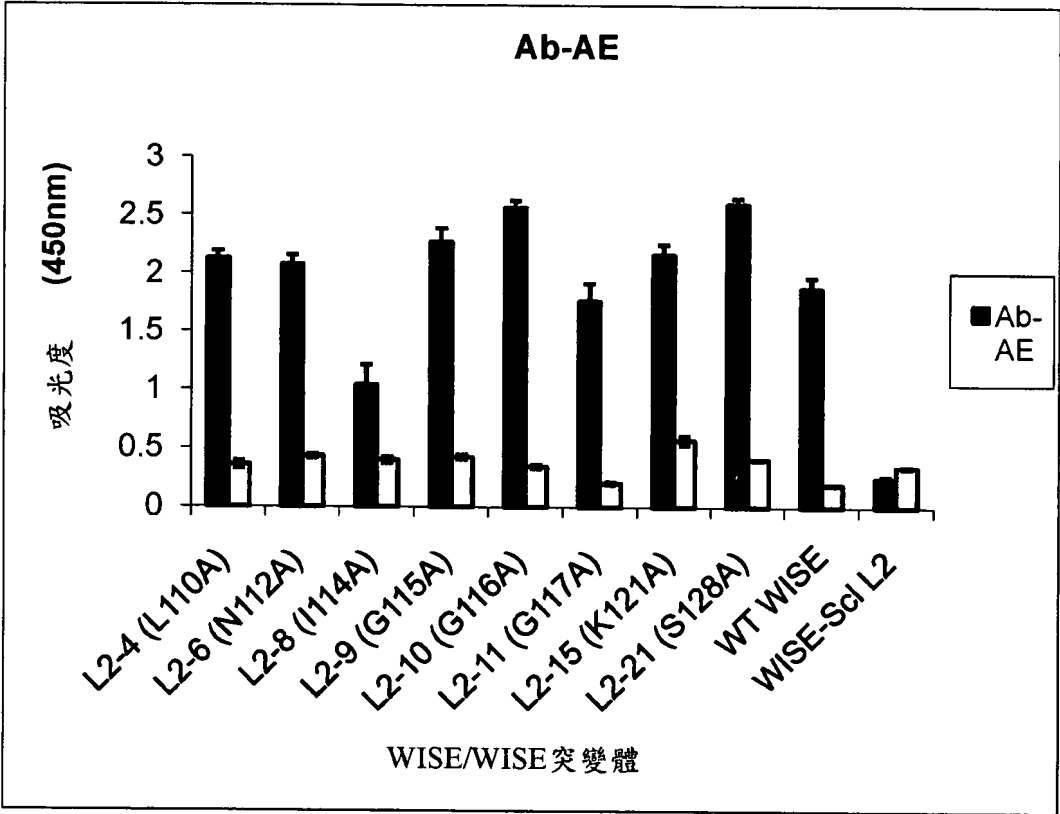


圖21

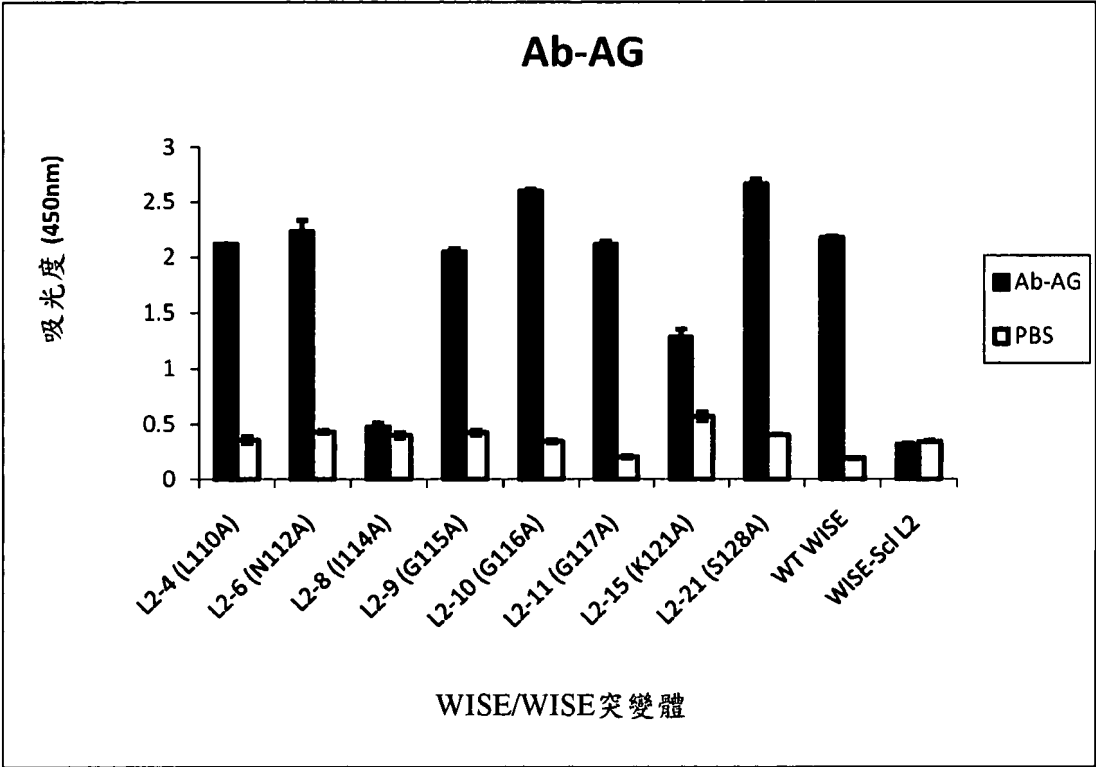


圖22

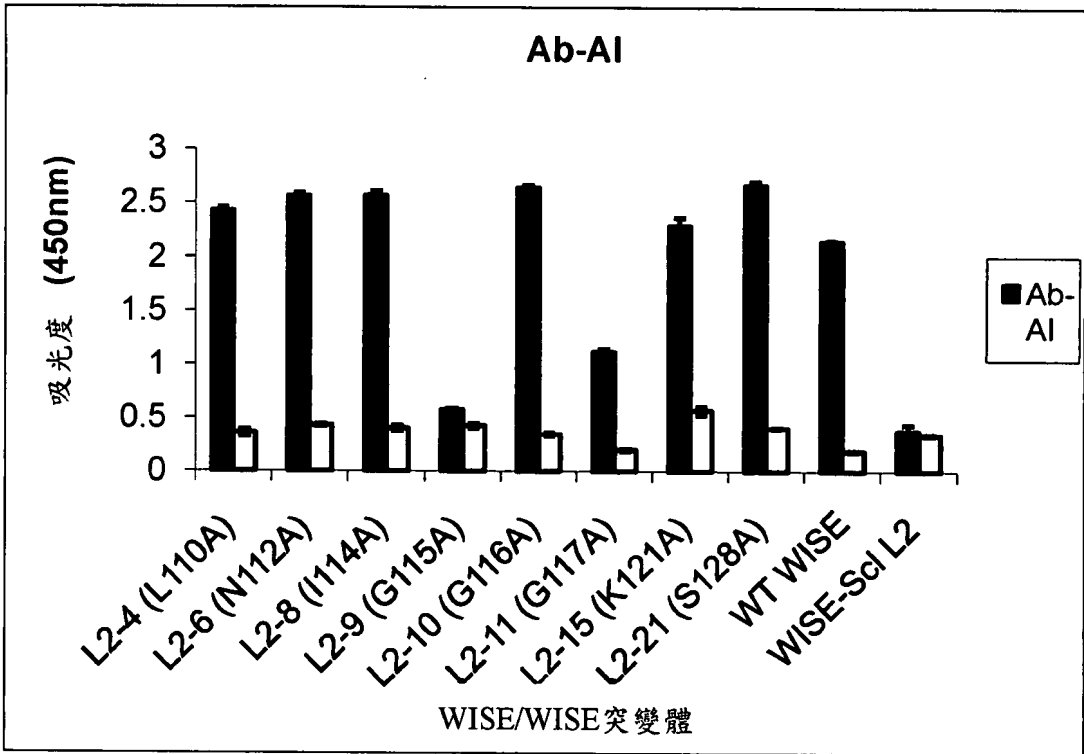


圖23

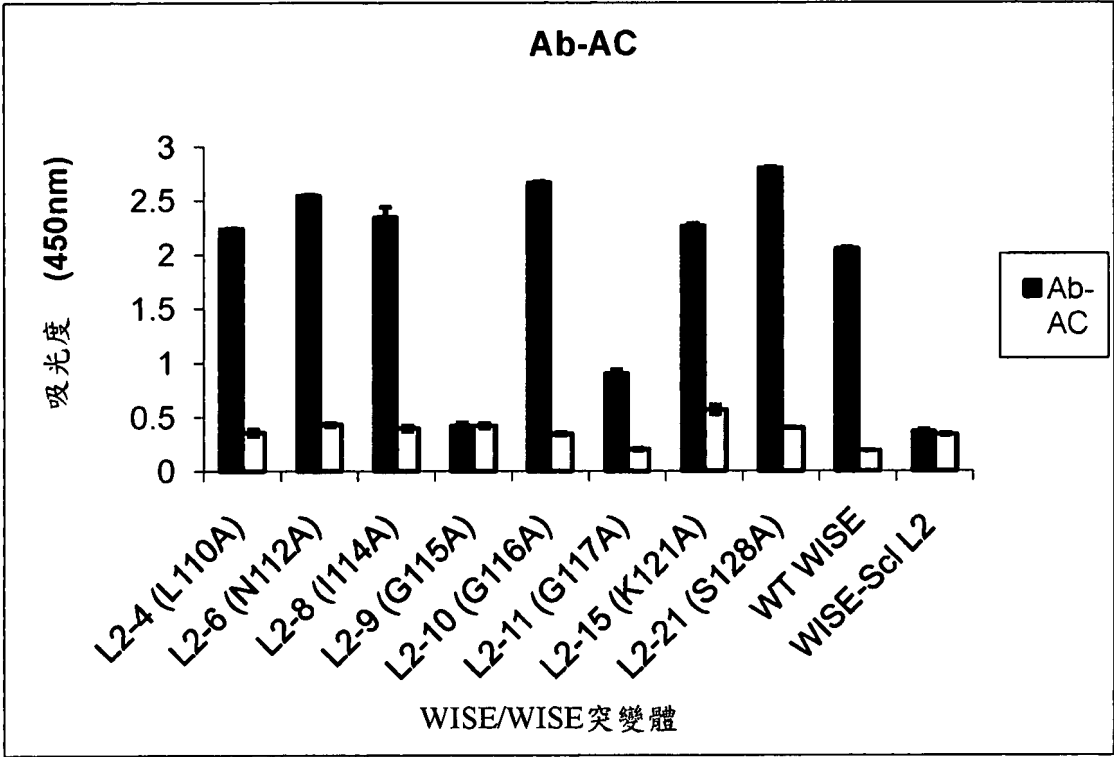


圖24

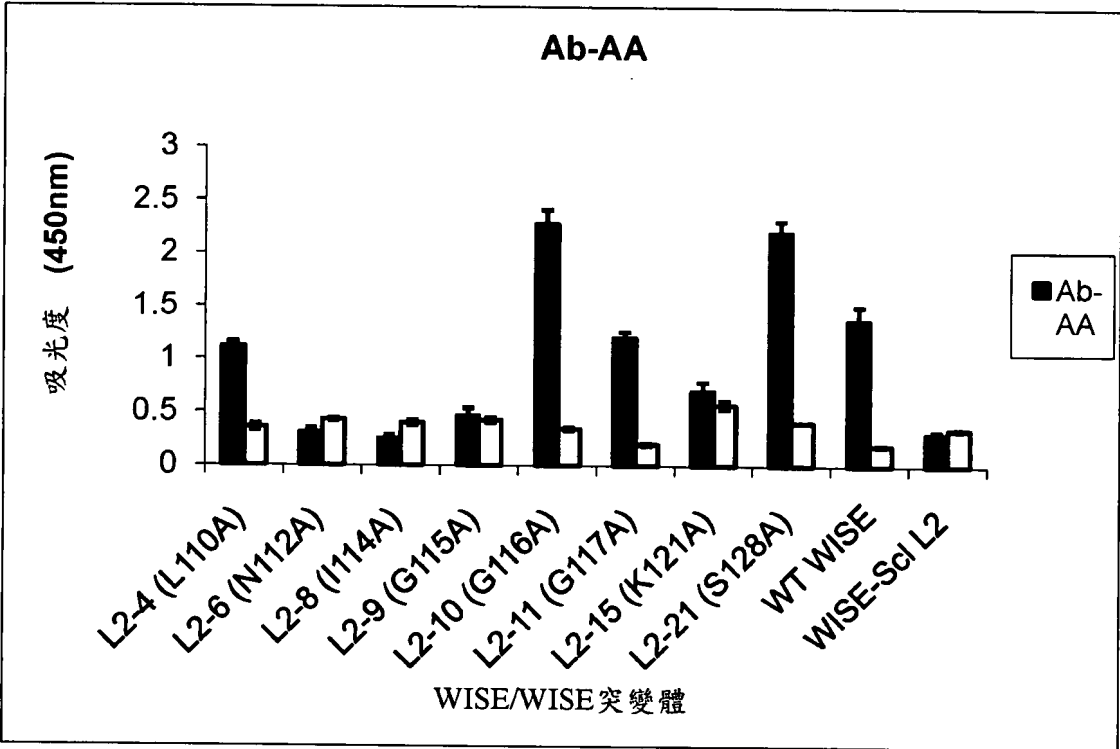


圖25

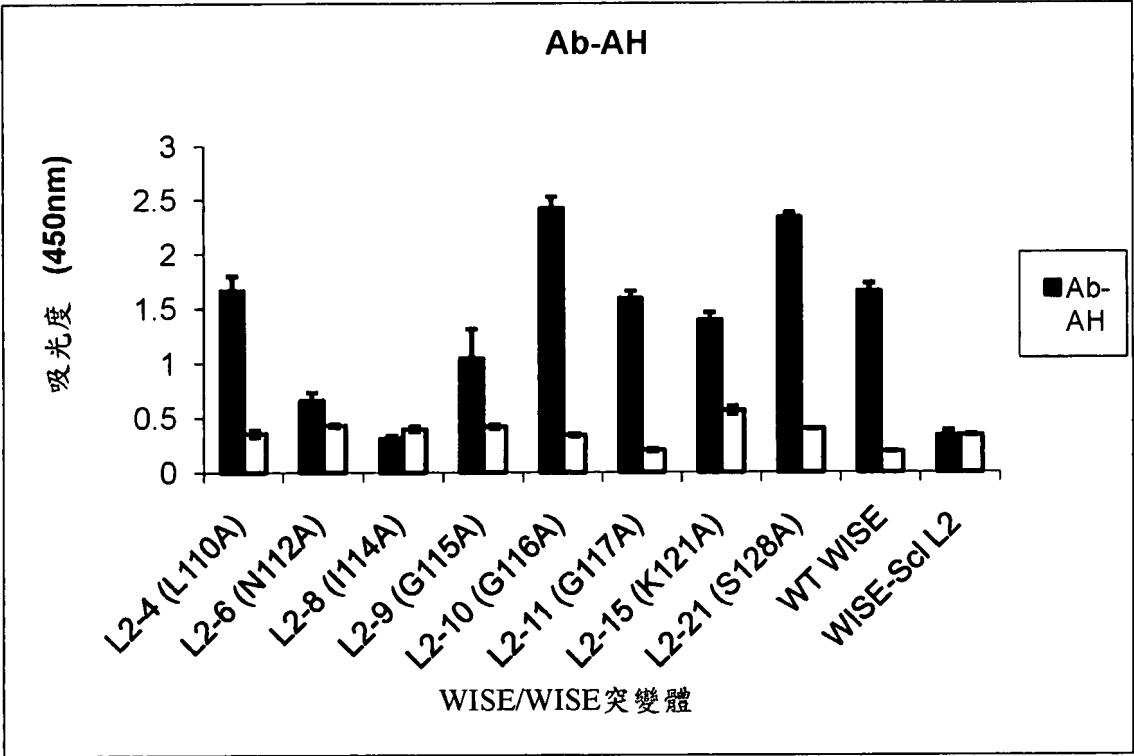


圖26

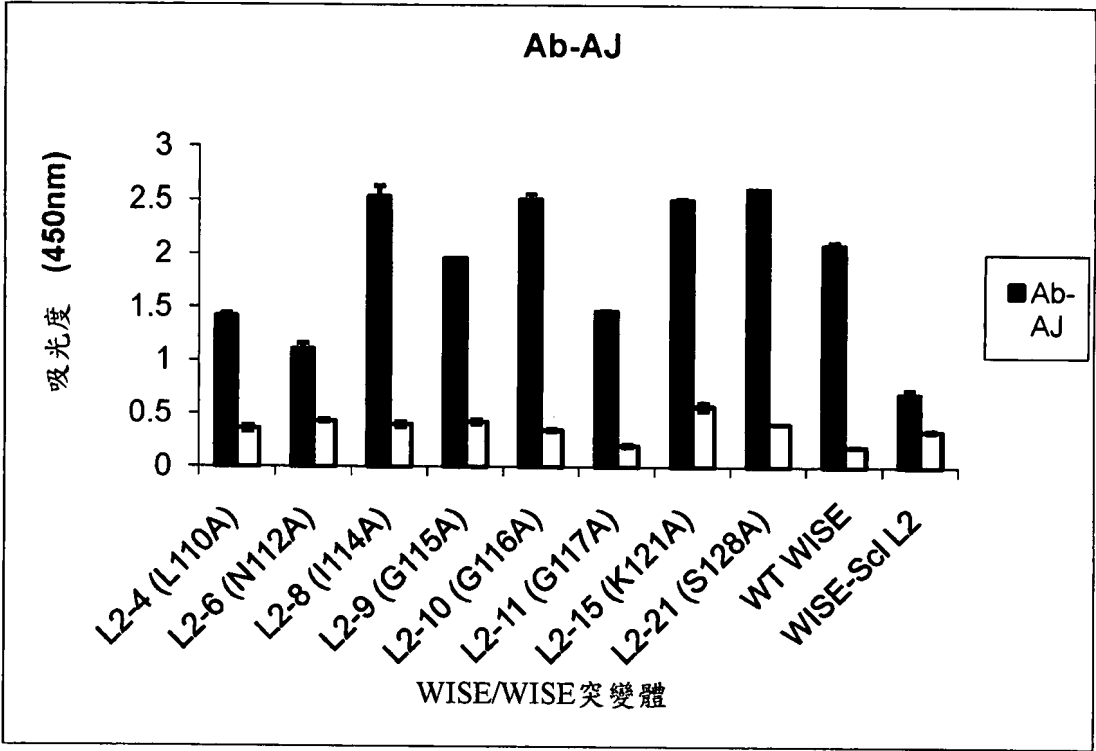


圖27

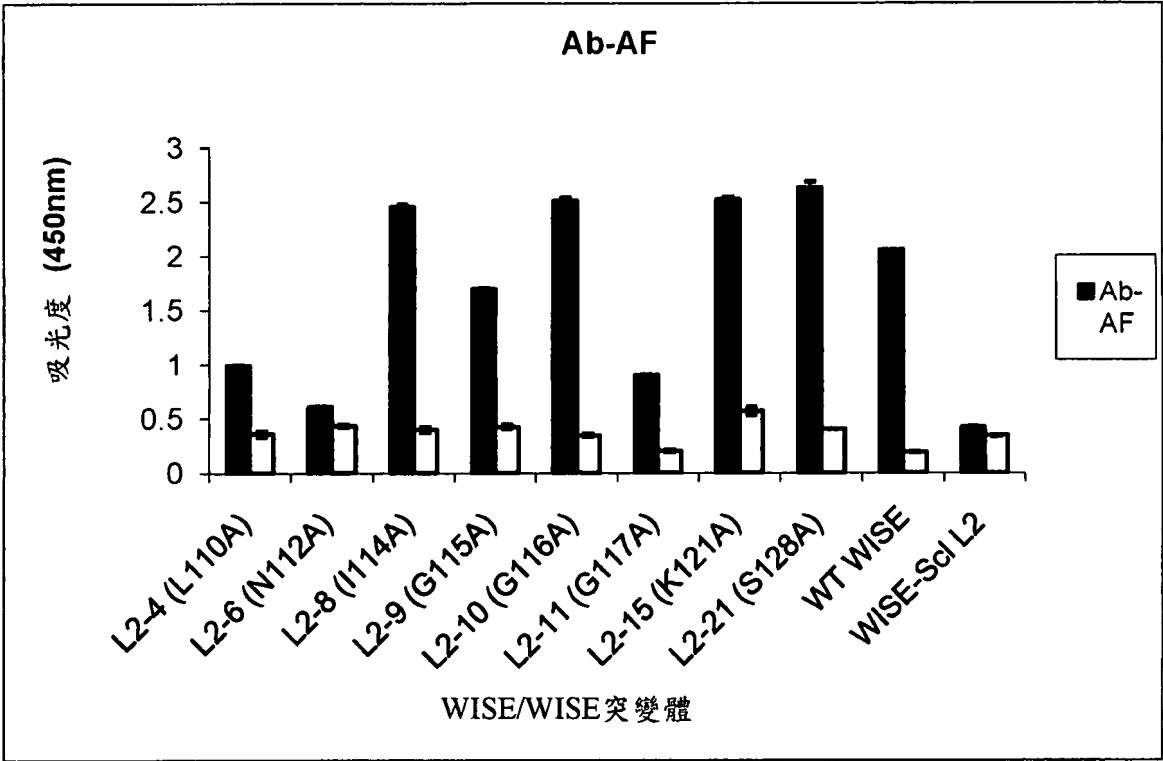


圖28

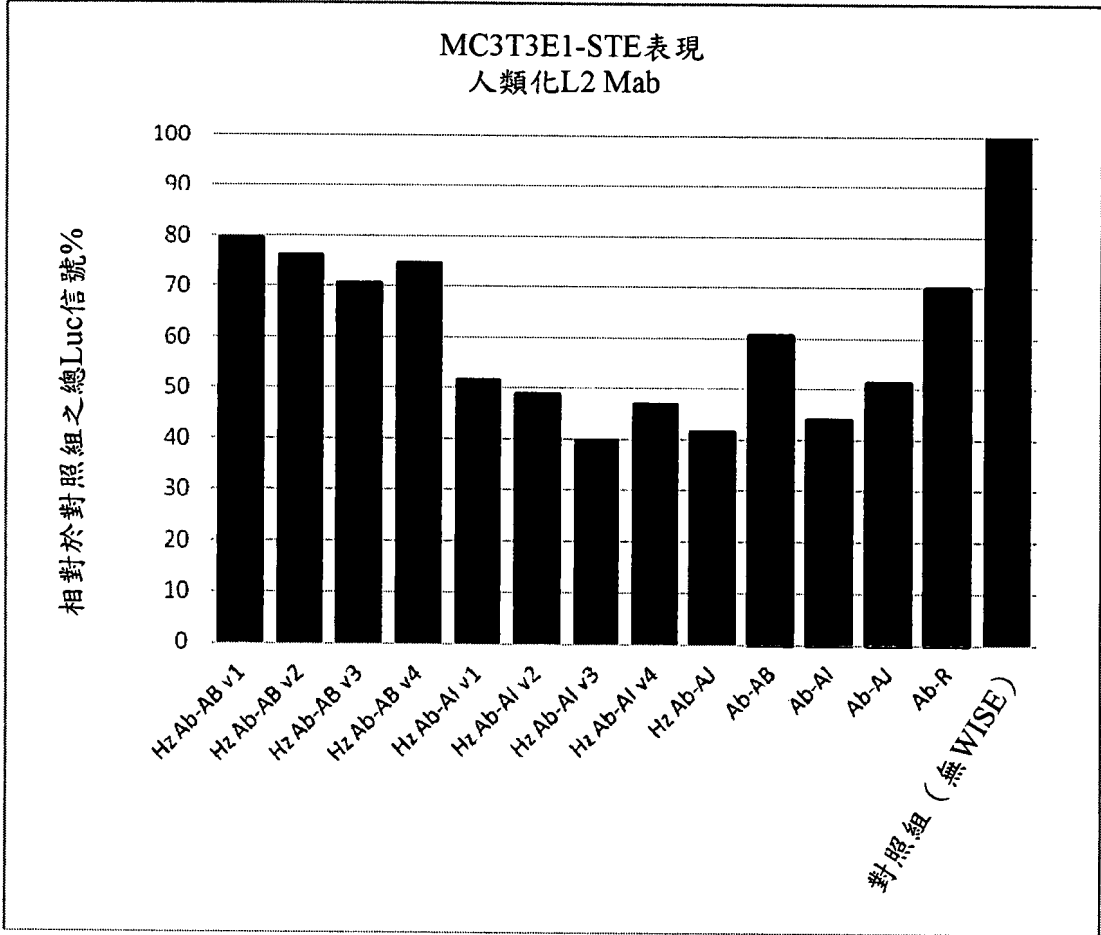


圖29

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)