



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102448984 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 09

(21) 申请号 201080023089. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 03. 26

C07K 14/71 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 15/62 (2006. 01)

61/164, 023 2009. 03. 27 US

C07K 16/22 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 11. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/028877 2010. 03. 26

(87) PCT申请的公布数据

W02010/111625 EN 2010. 09. 30

(71) 申请人 酶遗传学股份有限公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 Q. 潘 C. W. 伯克斯 P. V. 西瓦库马

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 罗天乐

权利要求书 3 页 说明书 82 页

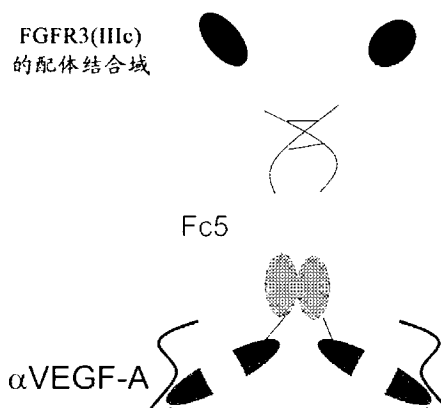
序列表 95 页 附图 9 页

(54) 发明名称

使用包含抗体 - 受体组合的多特异性结合蛋白的组合物和方法

(57) 摘要

本发明公开了包含抗体 / 可溶受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白, 其可减少 VEGF-A 和 FGF 两者的生物活性。FGF 结合部分通常为可溶 FGFR3 或 FGFR2。Fc 多肽融合于 FGF 结合部分的 C- 端, VEGF-A 结合部分为使用肽或多肽接头序列融合的多肽, 且可表达为单一的双特异性结合蛋白。该双特异性抗体 / 可溶受体结合蛋白可用于治疗以实体瘤生长为特征的癌症以及其它疾病。



1. 一种双特异性结合蛋白,其包含抗体部分和可溶受体部分,其中所述蛋白质减少 VEGF-A 和 FGF 两者的生物活性。

2. 一种双特异性结合蛋白,其包含 VEGF-A 抗体部分和 FGF 受体的 FGF 结合部分,其中所述蛋白质减少 VEGF-A 和 FGF 两者的生物活性。

3. 权利要求 2 所述的双特异性结合蛋白,其中该双特异性结合蛋白的可溶 FGF 受体部分包含 FGFR3 或 FGFR2 的 FGF 受体部分。

4. 一种双特异性结合蛋白,其包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白, VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白包含:

FGF 受体部分,其为选自下组的 FGFR3;SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:15;和 SEQ ID NO:22;和

VEGF-A 抗体部分,其选自 SEQ ID NO:44;SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:52;和 SEQ ID NO:70。

5. 权利要求 4 所述的双特异性结合蛋白,其中所述蛋白质减少 FGF 和 VEGF-A 的活性。

6. 一种编码双特异性蛋白的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码选自下组的 FGFR3 多肽;SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:15;和 SEQ ID NO:22;和

选自下组的 VEGF-A 抗体多肽;SEQ ID NO:44;SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:52;和 SEQ ID NO:70。

7. 表达载体,其包含权利要求 6 所述的多核苷酸。

8. 宿主细胞,其包含权利要求 7 所述的表达载体。

9. 制备双特异性结合蛋白的方法,其包括:

在表达双特异性结合蛋白的条件下培养权利要求 8 所述的宿主细胞;和从所述宿主细胞分离所述蛋白。

10. 药物组合物,其包含权利要求 4 的双特异性结合蛋白和可药用的载体。

11. 一种双特异性结合蛋白,其包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白,该 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白包含

FGF 受体部分,其为选自下组的 FGFR3;SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:15;和 SEQ ID NO:22;和

VEGF-A 抗体部分,其选自 SEQ ID NO:48 和 SEQ ID NO:50;SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:56;以及 SEQ ID NO:66 和 SEQ ID NO:68。

12. 权利要求 11 所述的双特异性结合蛋白,其中该蛋白减少 FGF 和 VEGF-A 的活性。

13. 编码双特异性蛋白的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码选自下组的 FGFR3 多肽: SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:15;和 SEQ ID NO:22;和

选自下组的 VEGF-A 抗体多肽;SEQ ID NO:48 和 SEQ ID NO:50;SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:56;以及 SEQ ID NO:66 和 SEQ ID NO:68。

14. 表达载体,其包含权利要求 13 所述的多核苷酸。

15. 宿主细胞,其包含权利要求 14 所述的表达载体。

16. 制备双特异性结合蛋白的方法,其包括:

在表达双特异性结合蛋白的条件下培养权利要求 15 所述的宿主细胞 ;和从所述宿主细胞分离所述蛋白。

17. 药物组合物,其包含权利要求 13 的双特异性结合蛋白和可药用的载体。

18. 一种双特异性结合蛋白,其包含选自 SEQ ID NO :58 ;SEQ ID NO :60 ;SEQ ID NO :62 ;和 SEQ ID NO :64 的 FGFR3 部分和 VEGF-A 抗体部分。

19. 权利要求 18 所述的双特异性结合蛋白,其中所述蛋白质减少 FGF 和 VEGF-A 的活性。

20. 编码双特异性蛋白的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码选自 SEQ ID NO :58 ;SEQ ID NO :60 ;SEQ ID NO :62 ;和 SEQ ID NO :64 的 FGFR3 部分和 VEGF-A 抗体部分。

21. 表达载体,其包含权利要求 20 所述的多核苷酸。

22. 宿主细胞,其包含权利要求 21 所述的表达载体。

23. 制备双特异性结合蛋白的方法,其包括 :

在表达双特异性结合蛋白的条件下培养权利要求 22 所述的宿主细胞 ;和从所述宿主细胞分离所述蛋白。

24. 药物组合物,其包含权利要求 20 的双特异性结合蛋白和可药用的载体。

25. 一种双特异性结合蛋白,其包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白,所述 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白包含

FGF 受体部分,其为选自下组的 FGFR2 ;SEQ ID NO :24 ;SEQ ID NO :29 ;SEQ ID NO :33 ;SEQ ID NO :37 ;SEQ ID NO :40 ;和 SEQ ID NO :42 ;和

VEGF-A 抗体部分,其选自 SEQ ID NO :44 ;SEQ ID NO :46 ;SEQ ID NO :52 ;和 SEQ ID NO :70。

26. 权利要求 22 所述的双特异性结合蛋白,其中所述蛋白质减少 FGF 和 VEGF-A 的活性。

27. 编码双特异性蛋白的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码选自下组的 FGFR2 多肽 :SEQ ID NO :24 ;SEQ ID NO :29 ;SEQ ID NO :33 ;SEQ ID NO :37 ;SEQ ID NO :40 ;和 SEQ ID NO :42 ;和

选自下组的 VEGF-A 抗体多肽 ;SEQ ID NO :44 ;SEQ ID NO :46 ;SEQ ID NO :52 ;和 SEQ ID NO :70。

28. 表达载体,其包含权利要求 27 的多核苷酸。

29. 宿主细胞,其包含权利要求 28 的表达载体。

30. 制备双特异性结合蛋白的方法,其包括 :

在表达双特异性结合蛋白的条件下培养权利要求 29 所述的宿主细胞 ;和从所述宿主细胞分离所述蛋白。

31. 药物组合物,其包含权利要求 25 的双特异性结合蛋白和可药用的载体。

32. 一种双特异性结合蛋白,其包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白,所述 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白包含

FGF 受体部分,其为选自下组的 FGFR2 ;SEQ ID NO :24 ;SEQ ID NO :29 ;SEQ ID NO :33 ;SEQ ID NO :37 ;SEQ ID NO :40 ;和 SEQ ID NO :42 ;和

VEGF-A 抗体部分,其选自下组 :SEQ ID NO :48 和 SEQ ID NO :50 ;SEQ ID NO :54 和 SEQ

ID NO :56 ;以及 SEQ ID NO :66 和 SEQ ID NO :68。

33. 权利要求 29 所述的双特异性结合蛋白,其中该蛋白减少 FGF 和 VEGF-A 的活性。

34. 编码双特异性蛋白的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码选自下组的 FGFR2 多肽 :
SEQ ID NO :24 ;SEQ ID NO :29 ;SEQ ID NO :33 ;SEQ ID NO :37 ;SEQ ID NO :40 ;和 SEQ ID
NO :42 ;和

选自下组的 VEGF-A 抗体多肽 :SEQ ID NO :48 和 SEQ ID NO :50 ;SEQ ID NO :54 和 SEQ
ID NO :56 ;以及 SEQ ID NO :66 和 SEQ ID NO :68。

35. 表达载体,其包含权利要求 34 所述的多核苷酸。

36. 宿主细胞,其包含权利要求 35 所述的表达载体。

37. 制备双特异性结合蛋白的方法,其包括 :

在表达双特异性结合蛋白的条件下培养权利要求 36 所述的宿主细胞 ;和
从所述宿主细胞分离所述蛋白。

38. 药物组合物,其包含权利要求 34 的双特异性结合蛋白和可药用的载体。

39. 治疗受试者中癌症的方法,其包括施用有效量的根据权利要求 1,2,4,11,18,25 或
32 中任一项的双特异性结合蛋白。

40. 权利要求 39 所述的方法,其中所述癌症为实体瘤。

41. 权利要求 39 所述的方法,其中所述癌症为前列腺癌。

42. 权利要求 39 所述的方法,其中所述癌症选自肺癌,胃肠道癌,胃肠道间质瘤
(GIST) ;胰腺癌 ;胰腺腺泡细胞癌 ;小肠的癌症 ;肝的癌症,乳腺癌,子宫颈癌,卵巢癌,肾
癌,皮肤癌,成胶质细胞瘤和骨癌。

使用包含抗体 – 受体组合的多特异性结合蛋白的组合物和方法

背景技术

[0001] 血管发生是从现有血管形成新血管。其在发育中起必要作用。在成人中,血管发生在创伤愈合过程中发生以在损伤或创伤后对组织恢复血流。血管发生也在肿瘤形成和其它疾病,包括类风湿性关节炎,动脉粥样硬化,牛皮癣,糖尿病性视网膜病和黄斑变性中起重要作用。(参见,例如,Fan 等人, Trends Pharmacol. Sci. 16 :57,1995 ;Folkman, Nature Med. 1 :27,1995)。

[0002] 生理或病理条件下新血管的生长需要血管发生的活化剂和抑制剂的协调作用。血管发生的活化剂包括血管内皮生长因子 -A (VEGF-A),成纤维细胞生长因子 (FGFs),胎盘生长因子 (PIGF),和肝细胞生长因子 (HGF) 和一些细胞因子如白介素 -8 (IL-8)。血管发生的内源性抑制剂包括血小板反应蛋白、内皮他丁、血管他丁和白介素 -12。血管发生的活化剂和抑制剂之间的平衡生理和病理血管发生过程中向活化剂倾斜。

[0003] VEGF-A 为生理和病理血管发生的关键调节剂。其通过调节内皮细胞的增殖、迁移和存活在血管的规格、形态形成、分化和体内稳态方面起到重要作用。(参见,例如,Ferrara 等人, Nat Med 9 :669,2003.)。研究表明 VEGF-A 在多种人肿瘤中高度表达。(参见,例如, Ellis 和 Hicklin, Nat. Rev. Cancer 8 :579,2008)。VEGF-A 表达通过低氧诱导因子 1 (HIF-1) 转录因子调节。(参见,例如,Wang 和 Semenza, J. Biol. Chem. 270 :1230,1995)。肿瘤细胞的快速增殖和差的血液流动导致肿瘤中的低氧 – 传导性环境,导致 VEGF-A 的快速上调。(参见,例如,Brahimi-Horn 和 Pouyssegur, Bull. Cancer 93 :E73,2006)。

[0004] 已描述了由不同的 mRNA 剪接变体编码的 121,145,165,189 或 206 个氨基酸长度的 5 种人 VEGF-A 亚型 (VEGF-A₁₂₁₋₂₀₆),它们都能刺激内皮细胞的有丝分裂发生。这些亚型在生物活性、受体特异性、以及对细胞表面及细胞外基质关联的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (该蛋白聚糖作为 VEGF-A 的低亲和力受体起作用) 的亲和力方面不同:VEGF-A₁₂₁ 不结合至肝素或硫酸乙酰肝素;VEGF-A₁₄₅ 和 VEGF-A₁₆₅ (GenBank Acc. No. M32977) 都能结合至肝素;而 VEGF-A₁₈₉ 和 VEGF-A₂₀₆ 对肝素和硫酸乙酰肝素显示最强的亲和力。VEGF-A₁₂₁、VEGF-A₁₄₅ 和 VEGF-A₁₆₅ 以可溶形式分泌,尽管大多数 VEGF-A₁₆₅ 仅限制于细胞表面和细胞外基质蛋白聚糖,而 VEGF-A₁₈₉ 和 VEGF-A₂₀₆ 保持与细胞外基质相关联。VEGF-A₁₈₉ 和 VEGF-A₂₀₆ 都可通过被肝素或肝素酶处理释放,这表明这些亚型是通过蛋白聚糖连接于细胞外基质的。细胞结合的 VEGF-A₁₈₉ 也可被蛋白酶如纤维蛋白溶酶所裂解,导致活性可溶的 VEGF-A₁₁₀ 的释放。人 VEGF-A₁₆₅ 是丰度最高而且是有生物活性的形式,它的 Asn74 被糖基化,并且典型地作为 46kDa 的 23kDa 亚单位同型二聚体表达。

[0005] 已鉴定出了与 VEGF-A 相互作用的 4 种细胞表面受体。这些包括 VEGFR-1/Flt-1 (fms 状酪氨酸激酶 -1 ;GenBank Acc.No. X51602 ;De Vries 等人, Science 255 :989-991,1992) ;VEGFR-2/KDR/Flk-1 (包含受体 / 胎肝激酶 -1 的激酶插入域 ;GenBank Acc. Nos. X59397 (Flk-1) 和 L04947 (KDR) ;Terman 等人, Biochem. Biophys. Res. Comm. 187 :1579-1586,1992 ;Matthews 等 人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :9026-9030,1991) ;

神经纤毛蛋白-1 (Gen Bank Acc.No.NM003873), 和神经纤毛蛋白-2 (Gen Bank Acc.No.NM003872)。VEGF₁₂₁ 和 VEGF₁₆₅ 结合 VEGFR-1; VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅ 和 VEGF₁₆₅ 结合 VEGFR-2; VEGF₁₆₅ 结合神经纤毛蛋白-1; 而 VEGF₁₆₅ 和 VEGF₁₄₅ 结合神经纤毛蛋白-2。(参见, 例如, Neufeld 等人, FASEB J. 13 :9-22, 1999; Stacker 和 Achen, Growth Factors 17 :1-11, 1999; Ortega 等人, Fron. Biosci. 4 :141-152, 1999; Zachary, Intl. J. Biochem. Cell Bio. 30 :1169-1174, 1998; Petrova 等人, Exp. Cell Res. 253 :117-130, 1999)。

[0006] 人们对 VEGF-A 对于几类重要癌症的發生的重要性的认识终于导致了一种人源化 VEGF-A 单克隆抗体 AVASTIN™ 在最近被批准用于与化学治疗联合治疗转移性结肠直肠癌、非小细胞肺癌和转移性乳腺癌。(参见, 例如, Hervitz 等人, N. Engl. J. Med. 350 :2335-2342, 2004; Sandler 等人, N. Engl. J. Med. 355 :2542-2550, 2006; Miller 等人, 2008)。类似的, LUCENTIS™ (一种人源化单克隆抗体片段) 最近被批准用于治疗新生血管(湿型)年龄相关的黄斑变性 (AMD), 这反映了 VEGF-A 在新生血管性眼病的发病机理中的重要性。

[0007] 成纤维细胞生长因子 (FGFs) 为一个肝素结合性生长因子的家族, 在哺乳动物中具有 22 个家族成员 (FGF1-14, 16-23)。FGF 在多种生物功能如细胞增殖、分化、迁移、血管发生和肿瘤发生中起重要作用。它们通过结合、二聚化、并且活化细胞表面 FGF 受体而发挥它们的多效生物作用。(参见, 例如, Eswarakumar 等人 Cytokine Growth Factor Rev. 16 :139-149, 2005)。哺乳动物中有四种 FGF 受体基因, fgfr1-fgfr4。FGFRs 的细胞外域包含三个免疫球蛋白状域。Fgfr1-Fgfr3 的膜近端 Ig 环处的可变剪接产生更多的变体。该环 N-端的一半由不变的外显子 (IIIa) 编码, 且另外一半由选自称为 IIIb 或 IIIc 的外显子编码。

[0008] FGF 配体和受体的过表达和 FGF 受体中的突变体与许多类型的癌症相关, 所说的癌症包括前列腺、乳腺、卵巢、膀胱、结肠直肠、胰腺、肝、肺、成胶质细胞瘤癌症, 多发性骨髓瘤和白血病。(参见例如, Grose 等人, Cytokine Growth Factor Rev. 16 :179-186, 2005)。FGF1, 2, 6, 8b, 9 和 17 在前列腺肿瘤组织中过表达, 且 FGF8b 和 17 的表达水平与肿瘤阶段、级别和预后不良相关 (Dorkin 等人, Oncogene 18 :2755-2761, 1999; Gnanapragasam 等人, Oncogene 21 :5069-5080, 2002; Heer 等人, J Pathol. 204 :578-586, 2004)。FGF9 促使前列腺癌-诱导的新骨形成且可参与雄激素受体-阴性的前列腺癌在骨中成骨细胞的进展 (Li 等人, J Clin Invest. 118 :2697-2710, 2008)。FGFR1 和 FGFR4 在前列腺肿瘤组织中过表达, 且 FGFR2IIIb 至 IIIc 的亚型转换促进前列腺癌起始和进展 (Giri 等人, Clin Cancer Res. 5 :1063-1071, 1999; Wang 等人, Clin. Cancer Res. 10 :6169-6178, 2004; Kwabi-Addo 等人, Prostate 46 :163-172, 2001)。FGF1, 2, 8 在乳腺肿瘤组织中过表达。所有乳腺癌中高达 8.7% 具有 FGFR1 基因扩增, 且该扩增为整体存活率的独立预测因素。FGFR4 过表达与复发性乳腺癌患者的他莫昔芬治疗失败相关 (参见, 例如, Elsheikh 等人, Breast Cancer Res. 9, 2007; Meijer 等人, Endocrine-Related Cancer 15 :101-111, 2008)。FGF1, 8, 9, 18 和 FGFR1_{IIIc}, FGFR2_{IIIc}, FGFR4 在卵巢肿瘤组织中过表达。FGFR3 过表达和激活突变在膀胱癌的膀胱上皮细胞癌中有报道。在非侵入性、低等级和阶段的膀胱肿瘤中的 FGFR3 突变与较高的复发率显著相关。(参见, 例如, Knowles, World J. Urol. 25 :581-593, 2007)。FGF-2, FGFR1 和 FGFR2 经常在肺的腺癌和鳞状细胞癌中过表达。FGF-2 信号途径活化可能是鳞状细胞癌发病的早期现象 (Behrens, 等人, Clin Cancer Res. 14 :6014-6022, 2008)。

[0009] 许多 FGF 家族成员,包括 FGF1, FGF2, FGF4 和 FGF6,也具有强的体外和体内促血管生成活性,且可通过调节肿瘤血管化而促进肿瘤进展 (Presta 等人, Cytokine Growth Factor Rev. 16 :159-178, 2005)。在血管发生过程中在 FGF 家族和 VEGF 家族成员之间存在密切的相互沟通 (cross-talk)。在产生自发性胰腺肿瘤的 Rip1-Tag2 转基因小鼠肿瘤组织中,用抗 VEGFR2 单克隆抗体阻断 VEGF 促进缺氧,并且诱导 FGF1, FGF2 和 FGF7 的表达 (Casanovas 等人, Cancer Cell 8 :299-309, 2005)。FGF 的上调与血管发生的再诱导和逃避 VEGF 阻断同时发生。该模型中联合抑制 VEGF 和 FGF 信号传递导致进一步的肿瘤抑制,表明 FGF 信号途径的上调对于 VEGF 靶向性治疗后的逃避机理至少部分有帮助。而且,在多种小鼠肿瘤模型 (包括 T3M4, Panc1 和 QG56 异种移植模型) 中阻断 VEGF 和 FGF 信号显示加和性的或协同性的抗肿瘤作用 (Ogawa 等人, Cancer Gene Ther. 9 :633-640, 2002)。最近,用泛 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂治疗的成胶质细胞瘤患者的临床研究显示 FGF2 的血清水平在复发患者中比在响应阶段中的相同患者的水平高,表明一种类似的涉及 FGF2 上调的补偿机理 (Batchelor 等人, Cancer Cell 11 :83-95, 2007)。

[0010] 总之,上述临床前数据和临床数据支持以下观点,即阻止 VEGF 和 FGF 信号传递途径二者的联合治疗在许多实体瘤中比单独的 VEGF 阻断可产生更好的抗肿瘤作用。这些数据为肿瘤学中靶向这两种途径提供了强有力的概念证明性论据 (proof-of-concept rationale)。阻断这两种途径也可在其它血管发生疾病,包括 AMD 中提供更好的功效。本发明提供用于所述这些和其它用途的多特异性蛋白,在本文的教导下,其对本领域技术人员将是显而易见的。

发明内容

[0011] 本发明提供双特异性结合蛋白,其包含减少 VEGF-A 和 FGF 两者的生物活性的抗体 / 可溶受体双特异性结合蛋白。根据本发明,该双特异性结合蛋白包含抗 VEGF-A 抗体 (VEGF-A 抗体) 部分的 VEGF-A 结合区和 FGF 受体的 FGF 结合部分,如本文所述。本文所述的 FGF 结合部分通常为可溶 FGF 受体 (FGFR)。本发明在某些实施方案中提供,该双特异性结合蛋白的可溶 FGF 受体部分包含本文所述的 FGFR3 或 FGFR2 的 FGF 受体部分。在其它实施方案中, Fc 多肽融合至 FGFR 的 C-端。在某些实施方案中,该 FGF 结合部分和 VEGF-A 结合部分为使用肽或多肽接头序列融合的多肽,并且在这些情况下,编码所述实施方案的多核苷酸可表达为单一双特异性结合蛋白。

[0012] 本发明还提供,双特异性结合蛋白的某些实施方案包含本文所述的 VEGF-A 抗体部分。该 VEGF-A 抗体部分可进一步由本文所述的 scFV 多肽或 VL 和 VH 多肽构成。

[0013] 在某些实施方案中,该 FGF 结合部分为 FGF 受体部分,且可为 FGFR3,特别是本文所述的 FGFR3_{IIIc}。在某些实施方案中,双特异性抗体 / 可溶受体蛋白质包含 FGF 受体部分,其为选自以下的 FGFR3:SEQ ID NO:13 所示的 FGFR3_{IIIc} (23-375), SEQ ID NO:2 所示的 FGFR3_{IIIc} (23-375) (S249W), SEQ ID NO:19 所示的 FGFR3_{IIIc} (143-375), SEQ ID NO:10 所示的 FGFR3_{IIIc} (143-375) (S249W), SEQ ID NO:15 所示的 FGFR3_{IIIc} (23-375) (P250R), 和 SEQ ID NO:22 所示的 FGFR3_{IIIc} (143-375) (P250R), 以及选自以下的 VEGF-A 抗体部分: SEQ ID NO:44 所示的 c870.1e6 scFV, SEQ ID NO:46 所示的 c1094.1 scFV, SEQ ID NO:52 所示的 c870scFV, 和 SEQ ID NO:70 所示的 c1039scFV。在其它实施方案中,双特异性

抗体 / 可溶受体组合包含 FGF 结合部分, 其为选自以下的 FGFR3 :SEQ ID NO :13 所示的 FGFR3_{IIIc} (23-375), SEQ ID NO :2 所示的 FGFR3_{IIIc} (23-375) (S249W), SEQ ID NO :19 所示的 FGFR3_{IIIc} (143-375), SEQ ID NO :10 所示的 FGFR3_{IIIc} (143-375) (S249W), SEQ ID NO :15 所示的 FGFR3_{IIIc} (23-375) (P250R), 和 SEQ ID NO :22 所示的 FGFR3_{IIIc} (143-375) (P250R), 和选自以下的 VEGF-A 结合部分 :SEQ ID NO :48 所示的 c870VL 和 SEQ ID NO :50 所示的 VH, SEQ ID NO :54 所示的 c1094VL 和 SEQ ID NO :56 所示的 VH, 以及 SEQ ID NO :66 所示的 1039VL 和 SEQ ID NO :68 所示的 VH。

[0014] 在其它实施方案中, 本发明的双特异性结合蛋白包括 FGFR3 部分和 VEGF-A 抗体部分, 其选自 FGFR3 (143-375) (S249W)Fc5c1094. 1pZMP31 (SEQ ID NO :58) ;FGFR3 (23-375) (S249W)Fc5c1094. 1pZMP31 (SEQ ID NO :60) ;FGFR3 (143-375) (S249W)Fc5 c870e6 pZMP31 (SEQ ID NO :62) ;和 FGFR3 (23-375) (S249W)Fc5 c870e6 pZMP31 (SEQ ID NO :64)。

[0015] 在其它实施方案中, 该 FGF 结合部分为 FGFR2。在某些实施方案中, 该 FGFR2 包括 FGFR2_{IIIc}。在某些实施方案中, 双特异性抗体 / 可溶受体组合包含 FGF 结合部分, 其为选自以下的 FGFR2 :SEQ ID NO :24 所示的 FGFR2_{IIIc} (22-377), SEQ ID NO :29 所示的 FGFR2_{IIIc} (22-377) (S252W), SEQ ID NO :33 所示的 FGFR2_{IIIc} (22-377) (P253R), SEQ ID NO :37 所示的 FGFR2_{IIIc} (145-377), SEQ ID NO :40 所示的 FGFR2_{IIIc} (145-377) (S252W), 和 SEQ ID NO :42 所示的 FGFR2_{IIIc} (145-377) (P253R) ;和选自以下的 VEGF-A 结合部分 :SEQ ID NO :44 所示的 c870. 1e6 scFV, SEQ ID NO :46 所示的 c1094. 1scFV, SEQ ID NO :52 所示的 c870scFV, 和 SEQ ID NO :70 所示的 c1039scFV。在其它实施方案中, 双特异性抗体 / 可溶受体组合包含 FGF 结合部分, 其为选自以下的 FGFR2 :SEQ ID NO :24 所示的 FGFR2_{IIIc} (22-377), SEQ ID NO :29 所示的 FGFR2_{IIIc} (22-377) (S252W), SEQ ID NO :33 所示的 FGFR2_{IIIc} (22-377) (P253R), SEQ ID NO :37 所示的 FGFR2_{IIIc} (145-377), SEQ ID NO :40 所示的 FGFR2_{IIIc} (145-377) (S252W), 和 SEQ ID NO :42 所示的 FGFR2_{IIIc} (145-377) (P253R) ;和选自以下的 VEGF-A 结合部分 :SEQ ID NO :48 所示的 c870VL 和 SEQ ID NO :50 所示的 VH, SEQ ID NO :54 所示的 c1094VL 和 SEQ ID NO :56 所示的 VH, 以及 SEQ ID NO :66 所示的 1039VL 和 SEQ ID NO :68 所示的 VH。

[0016] 在其它方面, 本发明提供使用本文所述的双特异性抗体 / 可溶受体结合蛋白的方法。在某些实施方案中, 该双特异性抗体 / 可溶受体结合蛋白可给予受试者以治疗以实体瘤生长为特征的癌症, 如前列腺癌, 乳腺癌, 胰腺癌, 肾细胞癌 (RCC), 结肠直肠癌, 成胶质细胞瘤, 非小细胞肺癌 (NSCLC) 和胃肠道间质瘤 (GIST)。

[0017] 本发明的这些和其它方面在参考以下发明详述和附图后将会是明显的。

[0018] 定义

[0019] 除非另有定义, 本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域技术人员通常理解的所述方法和组合物的意思相同的意思。如本文所述, 以下术语和短语具有属于它们的意思, 除非另有所述。

[0020] “多肽”为通过肽键结合的氨基酸残基的聚合物, 无论天然或合成产生的。少于约 10 个氨基酸残基的多肽通常称为“肽”。

[0021] “蛋白质”为包含一个或多个多肽链的大分子。蛋白质也可包含非肽组分, 如碳水化合物基团。碳水化合物和其它非肽取代基可通过产生蛋白质的细胞添加至蛋白质, 且将

随着细胞的类型而改变。蛋白质在此根据它们的氨基酸主链结构定义；取代基如碳水化合物基团通常没有规定，但仍然可存在。

[0022] 术语“氨基-端”和“羧基-端”在本文使用以表示多肽中的位置。当上下文允许时，这些术语用于以具体的多肽序列或的部分为参考表示近似或相关的位置。例如，位于多肽中相关序列的羧基-端的某一序列是与该相关序列的羧基端相邻，而不一定位于完整多肽的羧基端。

[0023] 如本文所述，“核酸”或“核酸分子”是指多核苷酸，如脱氧核糖核酸（DNA）或核糖核酸（RNA），寡核苷酸，聚合酶链反应（PCR）产生的片段，和连接、分裂、核酸内切酶作用，和核酸外切酶作用中的任一种产生的片段。核酸分子可由单体构成，该单体为天然存在的核苷酸（如 DNA 和 RNA），或天然存在的核苷酸的类似物（例如，天然存在的核苷酸的 α -对映体形式），或两者的组合。修饰的核苷酸可在糖部分和 / 或嘧啶或嘌呤碱基部分具有变化。糖修饰包括，例如，用卤素、烃基、胺和叠氮基代替一个或多个羟基，或糖可官能化为醚或酯。而且，整个糖部分可用立体上和电子上类似的结构，如氮杂-糖和碳环的糖类似物代替。碱基部分的修饰的实例包括烃基化嘌呤和嘧啶、酰基化嘌呤或嘧啶，或其它众所周知的杂环的代替物。核酸单体可通过磷酸二酯键或此类键的类似物连接。磷酸二酯键的类似物包括硫代磷酸酯，二硫代磷酸酯，硒代磷酸酯，硒代磷酸酯，苯胺基硫代磷酸酯（phosphoroanilothioate），苯胺基磷酸酯（phosphoranilidate），氨基磷酸酯，等。术语“核酸分子”也包括所谓的“肽核酸”，其包括连接至聚酰胺主链的天然存在的或修饰的核酸碱基。核酸可为单链或双链。

[0024] 如本文所述，术语“拮抗剂”表示在某个生物环境中减少另一化合物的活性的化合物。例如，VEGF-A 拮抗剂为减少 VEGF-A 的生物活性的化合物，且 FGFR 拮抗剂为减少 FGF 的生物活性的化合物。因为 VEGF-A 和 FGF 两者的活性取决于多种分子（包括配体、受体和信号转导物）的相互作用，拮抗剂可通过直接作用于 VEGF-A 或 FGF，或通过作用于同源生物途径中的另一分子来减少活性。例如，FGF 拮抗剂可通过以下方式减少 FGF 活性，例如，通过结合至受体本身，通过结合至其配体之一，通过干扰受体二聚体化，或通过干扰受体磷酸化。拮抗剂包括但不限于抗体、可溶受体、和结合至配体或其受体，或以其他方式干扰配体-受体相互作用和 / 或其它受体功能的非蛋白质化合物。

[0025] 术语“受体”表示细胞相关的蛋白质，其结合至生物活性分子（即，配体）且介导配体对细胞的作用。膜结合的受体以多域或多肽结构为特征，其包含细胞外配体-结合域和通常在信号转导中涉及的细胞内效应物结构域。配体与受体的结合导致受体中构象变化，导致效应物结构域和细胞中其它分子的相互作用。该相互作用进而导致细胞中代谢变化。与受体-配体相互作用相关的代谢事件包括基因转录、磷酸化、脱磷酸化、环状 AMP 产生的增加、细胞钙动员、膜脂质动员、细胞粘附、肌醇脂质的水解和磷脂的水解。通常，受体可为膜结合的、可溶的或核内的；单体的（例如，甲状腺刺激激素受体， β -肾上腺素能受体）或多聚体的（例如，PDGF 受体、生长激素受体、IL-3 受体、GM-CSF 受体、G-CSF 受体、红细胞生成素受体和 IL-6 受体）。

[0026] “可溶受体”是不结合于细胞膜的受体多肽。最常见的情况下，可溶受体是缺乏跨膜和胞浆域的配体-结合受体多肽。可溶受体可包括另外的氨基酸残基，如提供多肽的纯化或提供用于多肽连接至底物的位点的亲和标签。许多细胞表面受体具有天然存在的可溶

对应物,它们是通过蛋白水解产生或从可变剪接的 mRNAs 翻译的。当受体多肽分别缺少跨膜和细胞内多肽区段的足够部分以提供膜锚定或信号转导时,称该受体多肽基本上没有跨膜和细胞内多肽区段。

[0027] 如本文所述,术语“Fc-融合蛋白”表示兼具异源蛋白质的结合特异性与免疫球蛋白恒定域的效应物作用的抗体状分子。结构上,Fc-融合蛋白包含具有所需结合特异性的氨基酸序列(其不同于抗体的抗原识别和结合位点(即,为“异源的”)),和免疫球蛋白恒定域序列的融合。Fc-融合蛋白分子通常包括连续氨基酸序列,其至少包含受体或配体的结合位点。Fc-融合蛋白中的免疫球蛋白恒定域序列可获自任何免疫球蛋白,如 IgG-1, IgG-2, IgG-3, 或 IgG-4 亚型, IgA(包括 IgA-1 和 IgA-2), IgE, IgD 或 IgM。例如,根据本发明可用的 Fc-融合蛋白为包含 FGFR3 受体的 FGF 结合部分而没有 FGFR3 受体的跨膜或细胞质序列的多肽。在一个实施方案中,FGFR3 的细胞外域融合至免疫球蛋白序列的恒定域。

[0028] 术语“抗体”在本文使用是指机体响应抗原的存在而产生的、结合至抗原的蛋白质,及其抗原-结合片段和工程化变体。因此,术语“抗体”和“抗体”包括多克隆抗体、亲和纯化的多克隆抗体、单克隆抗体、和抗原-结合抗体片段,如 $F(ab')_2$ 和 Fab 片段。遗传工程完整的抗体和片段,如嵌合抗体、人源化抗体、单链 Fv 片段、单链抗体、双抗体、迷你抗体、线性抗体、多价或多特异性杂合抗体等也包括在内。因此,术语“抗体”可广义地用于包括任何包含抗体的抗原结合位点且能结合至其抗原的蛋白质。

[0029] 术语“遗传工程抗体”是指以下抗体,其中氨基酸序列在天然抗体的氨基酸序列的基础上被改变。因为重组 DNA 技术在抗体产生中的重要性,不必限制为在天然抗体发现中的氨基酸序列;可重新设计抗体以得到所需特征。可能的变化非常多,可从仅改变一个或一些氨基酸到例如可变区或恒定区的完全重新设计。通常,对恒定区进行改变以改善或改变如补体结合、与细胞的相互作用和其它效应物作用等特征。通常,将对可变区进行变化以改善抗原结合特征、改善可变区稳定性、或减少免疫原性风险。

[0030] “抗体的抗原结合位点”为抗体的足以结合至其抗原的部分。最小的该区通常为可变域或其遗传工程变体。单域结合位点可产生自骆驼抗体(参见 Muyldermans 和 Lauwereys, J. Mol. Recog. 12 :131-140,1999 ;Nguyen 等人, EMBO J. 19 :921-930,2000) 或其它物种的 V_H 域以产生单域抗体(“dAbs”;参见 Ward 等人, Nature 341 :544-546,1989 ;美国专利 No. 6, 248, 516 to Winter 等人)。在某些变化中,抗原结合位点为仅具有 2 个天然或非天然(例如,诱变处理的)存在的重链可变域或轻链可变域,或其组合的互补决定区(CDR)的多肽区(参见,例如,Pessi 等人, Nature 362 :367-369,1993 ;Qiu 等人, Nature Biotechnol. 25 :921-929,2007)。更一般的,抗体的抗原结合位点包含结合至相同表位的重链可变域和轻链可变域两者。在本发明中,“包含抗体的抗原结合位点”的分子可进一步包含一个或多个抗体的第二抗原结合位点(其可结合至相同或不同表位或相同或不同抗原),肽接头,免疫球蛋白恒定域,免疫球蛋白铰链,两亲性螺旋(参见 Pack 和 Pluckthun, Biochem. 31 :1579-1584,1992),非肽接头,寡核苷酸(参见 Chaudri 等人, FEBS Letters 450 :23-26,1999)等,且可为单体或多聚蛋白质。包含抗体的抗原结合位点的分子的实例是本领域已知的,包括例如 Fv 片段,单链 Fv 片段(scFv), Fab 片段,双抗体,迷你抗体, Fab-scFv 融合物,双特异性 $(scFv)_4$ -IgG,和双特异性 $(scFv)_2$ -Fab。(参见,例如,Hu 等人, Cancer Res. 56 :3055-3061,1996 ;Atwell 等人, Molecular Immunology 33 :1301-1312,

1996 ;Carter 和 Merchant, Curr. Opin. Biotechnol. 8 :449-454, 1997 ;Zuo 等人, Protein Engineering 13 :361-367, 2000 ;and Lu 等人, J. Immunol. Methods 267 :213-226, 2002)。

[0031] 如本文所述,术语“免疫球蛋白”是指由一个或多个基本上由免疫球蛋白基因编码的多肽组成的蛋白质。免疫球蛋白的一种形式构成抗体的基本结构单位。该形式为四聚物,且由两个相同的免疫球蛋白链对组成,每个对具有一个轻链和一个重链。在每个对中,轻链和重链可变区一起负责结合至抗原,且恒定区负责抗体效应物作用。免疫球蛋白通常在脊椎动物生物中作为抗体起作用。已在高等脊椎动物中鉴定出五种免疫球蛋白(IgG, IgA, IgM, IgD 和 IgE)。IgG 是主要的种类;它通常作为血浆中第二丰富的蛋白质存在。在人中, IgG 由四个亚类组成,称为 IgG1, IgG2, IgG3 和 IgG4。IgG 类的重链恒定区用希腊字母 γ 标识。例如, IgG1 亚类的免疫球蛋白包含 $\gamma 1$ 重链恒定区。各个免疫球蛋白重链具有由恒定区蛋白质域(C_H1 , 铰链, C_H2 , 和 C_H3 ; IgG3 也包含 C_H4 域)组成的恒定区,该恒定区蛋白质域基本上为物种的给定亚类的变体。编码人和非人免疫球蛋白链的 DNA 序列是本领域已知的。(参见,例如, Ellision 等人, DNA 1 :11-18, 1981 ;Ellison 等人, Nucleic Acids Res. 10 :4071-4079, 1982 ;Kenten 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 :6661-6665, 1982 ;Seno 等人, Nuc. Acids Res. 11 :719-726, 1983 ;Riechmann 等人, Nature 332 :323-327, 1988 ;Amster 等人, Nuc. Acids Res. 8 :2055-2065, 1980 ;Rusconi and Kohler, Nature 314 :330-334, 1985 ;Boss 等人, Nuc. Acids Res. 12 :3791-3806, 1984 ;Bothwell 等人, Nature 298 :380-382, 1982 ;van der Loo 等人, Immunogenetics 42 :333-341, 1995 ;Karlin 等人, J. Mol. Evol. 22 :195-208, 1985 ;Kindsvogel 等人, DNA 1 :335-343, 1982 ;Breiner 等人, 基因 18 :165-174, 1982 ;Kondo 等人, Eur. J. Immunol. 23 :245-249, 1993 ;and GenBank Accession No. J00228)。关于免疫球蛋白结构和功能的综述可参见 Putnam, The Plasma Proteins, Vol V, Academic Press, Inc., 49-140, 1987 ;和 Padlan, Mol. Immunol. 31 :169-217, 1994。术语“免疫球蛋白”在此使用为其一般意思,表示完整抗体,其组成链,或链的片段,依上下文而定。

[0032] 全长免疫球蛋白“轻链”(约 25Kd 或 214 个氨基酸)由 NH_2 -端的可变区基因(编码约 110 个氨基酸)和 $COOH$ -端的 κ 或 λ 恒定区基因所编码。全长免疫球蛋白“重链”(约 50Kd 或 446 个氨基酸)由可变区基因(编码约 116 个氨基酸)和 γ , μ , α , δ , 或 ϵ 恒定区基因(编码约 330 个氨基酸)编码,后者分别定义抗体的同种型为 IgG, IgM, IgA, IgD, 或 IgE。在轻链和重链中,可变区和恒定区通过约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接,且重链还包括约 10 个或更多氨基酸的“D”区。(通常参见 Fundamental Immunology (Paul, ed., Raven Press, N. Y., 2nd ed. 1989), Ch. 7)。

[0033] 免疫球蛋白“Fv”片段包含重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L),二者通过非共价相互作用保持在一起。因此免疫球蛋白 Fv 片段包含单一抗原结合位点。Fv 片段的二聚结构可进一步通过突变发生引入二硫键而稳定化。(参见 Almog 等人, Proteins 31 :128-138, 1998.)

[0034] 如本文所述,术语“单链 Fv”和“单链抗体”是指这样的抗体片段,其在单一多肽链中包含重链和轻链两者的可变区,但缺乏恒定区。通常,单链抗体进一步包含 V_H 和 V_L 域之间的多肽接头,其使得单链抗体能够形成允许抗原结合的所需结构。单链抗体详细讨论于,例如, Pluckthun 的 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113 (Rosenburg 和

Moore eds., Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315。(也参见 WIPO Publication WO 88/01649 ;U. S. Patent Nos. 4, 946, 778 和 5, 260, 203 ;Bird 等 人, Science 242 : 423-426, 1988)。单链抗体也可为双特异性的和 / 或人源化的。

[0035] “Fab 片段”包含一个轻链以及一个重链的 C_H1 和可变区。Fab 片段的轻链不能与另一重链分子形成二硫键。

[0036] “Fab' 片段”包含一个轻链和一个重链, 所述重链还包含 C_H1 和 C_H2 域之间的恒定区部分, 以使两个重链之间能够形成链间的二硫键而形成 $F(ab')_2$ 分子。

[0037] “ $F(ab')_2$ 片段”包含两个轻链和含一部分 C_H1 和 C_H2 域之间的恒定区的两个重链, 以使两个重链之间形成链间二硫键。

[0038] 免疫球蛋白“Fc 片段”(或 Fc 域) 为抗体中负责结合至细胞上的抗体受体和补体的 C1q 组分的部分。Fc 代表“片段结晶”, 即容易形成蛋白质晶体的抗体的片段。独特的蛋白质片段(最初基于蛋白水解消化描述)可定义免疫球蛋白的总体一般结构。如文献中最初定义的, Fc 片段由二硫键连接的重链铰链区、 C_H2 和 C_H3 域组成。然而, 后来该术语被用于指由下述部分组成的单链: C_H3 、 C_H2 、和至少一部分铰链, 其中所述铰链的至少一部分足以与另一条这样的链形成二硫键连接的二聚物。免疫球蛋白结构和功能的综述可参见 Putnam, The Plasma Proteins, Vol. V (Academic Press, Inc., 1987), pp. 49-140 ;and Padlan, Mol. Immunol. 31 :169-217, 1994。如本文所述, 术语 Fc 包括天然存在的序列的变体。

[0039] 免疫球蛋白轻链或重链可变区由被三个高变区间断的“框架”区组成。因此, 术语“高变区”是指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。该高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如, 在人中, 轻链可变域中的残基 24-34 (L1), 50-56 (L2), 和 89-97 (L3), 和重链可变域中的残基 31-35 (H1), 50-65 (H2) 和 95-102 (H3) (氨基酸序列号基于 EU 索引;参见 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 和/或那些来自“高变环(loop)”的残基(在人中, 轻链可变域中的残基 26-32 (L1), 50-52 (L2) 和 91-96 (L3), 和重链可变域中的 26-32 (H1), 53-55 (H2) 和 96-101 (H3) ;Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196 :901-917, 1987) (兹将上述文献引入并入本文)。“框架区”或“FR”残基为除在此定义的高变区残基之外的那些的可变域残基。不同轻链或重链的框架区的序列在一个物种中相对保守。因此, “人框架区”为基本上等同于(约 85% 或更多, 通常 90-95% 或更多)天然存在的人免疫球蛋白的框架区的框架区。抗体的框架区(其为组分轻链和重链的框架区的总体)起到定位和对准 CDR 的作用。该 CDR 主要负责对抗原表位的结合。 V_L 域的 CDR L1、L2 和 L3 在这里也分别称为 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 ; V_H 域的 CDR H1、H2 和 H3 在这里也分别称为 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

[0040] “嵌合抗体”是这样的抗体, 其轻链和重链基因是从属于不同物种的免疫球蛋白可变区和恒定区基因构建的(典型地通过基因工程)。例如, 可以把小鼠单克隆抗体的基因的可变区段连接于编码人恒定区的区段(例如, 人 $\gamma 1$ 或 $\gamma 3$ 重链基因, 和人 κ 轻链基因)。因此, 治疗嵌合抗体是一种杂合蛋白, 通常由小鼠抗体的可变域或抗原-结合域以及人抗体的恒定域构成, 但也可使用其它哺乳动物物种。具体地, 嵌合抗体通过重组 DNA 技术制备, 其中用免疫球蛋白轻链、重链或两者的铰链和恒定区的全部或部分代替另一动物的免疫球蛋白轻链或重链的相应区域。这样, 亲本单克隆抗体的抗原-结合部分被嫁接到另一物种

的抗体的骨架上。任选地可以通过替换暴露的残基来用类人表面 (human-like surface) 来“遮掩” (cloak) 嵌合抗体, 其结果获得“表面装饰的抗体” (veneered antibody)。

[0041] 如本文所述, 术语“人抗体”包括具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体, 且包括从人免疫球蛋白库或从这样的动物分离的抗体: 该动物转入了一种或多种人免疫球蛋白基因且不表达内源性免疫球蛋白, 这样的动物描述于例如 Kucherlapati 等人的美国专利号 5, 939, 598。

[0042] 术语“人源化免疫球蛋白”是指包含人框架区和源自非人 (例如, 小鼠或大鼠) 免疫球蛋白的一个或多个 CDR 的免疫球蛋白。提供 CDR 的非人免疫球蛋白称为“供者”, 而提供框架的人免疫球蛋白称为“受者”。恒定区不需要存在, 但如果存在的话, 它们必须基本上相同于人免疫球蛋白恒定区, 即, 至少约 85-90%, 优选约 95% 或更多的相同。因此, 人源化免疫球蛋白的所有部分, 除了可能的 CDR, 都基本上相同于天然人免疫球蛋白序列的对应部分。在一些情况下, 人源化抗体可在人可变区框架域内保持非人残基以增强适当的结合特征 (例如, 当抗体被人源化时可能需要框架中的突变以保留结合亲和力)。“人源化抗体”为包含人源化轻链和人源化重链免疫球蛋白的抗体。例如, 人源化抗体不会涵盖如上定义的典型嵌合抗体, 因为, 例如, 嵌合抗体的整个可变区都是非人的。

[0043] “双特异性抗体”或“双功能抗体”为具有两个不同的重/轻链对和两个不同的结合位点的杂合抗体。双特异性抗体可通过多种方法制备, 包括但不限于杂交瘤的融合或 Fab' 片段的连接。参见, 例如, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79 :315-321, 1990 ; Kostelny 等人, J. Immunol. 148 :1547-1553, 1992。

[0044] “二价抗体”不同于“多特异性”或“多功能”抗体, 在某些实施方案中, 为包含两个具有相同抗原特异性的结合位点的抗体。

[0045] 术语“双抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段, 这样的片段在同一多肽链 (V_H-V_L) 中包含连接至轻链可变域 (V_L) 的重链可变域 (V_H)。通过使用太短而不允许在相同链上的两个域之间配对的接头, 各个域被强迫与另一链的互补域配对, 产生两个抗原结合位点。双抗体更详细描述于, 例如, EP 404, 097 ; WO 93/11161 ; 和 Hollinger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448, 1993。

[0046] 术语“迷你抗体”在此是指仅编码天然或非天然 (例如, 经诱变处理的) 存在的重链可变域或轻链可变域的 2 个互补决定区 (CDR), 或其组合的多肽。迷你抗体的实例描述于, 例如, Pessi 等人, Nature 362 :367-369, 1993 ; 和 Qiu 等人, Nature Biotechnol. 25 : 921-929, 2007。

[0047] 术语“线性抗体”是指 Zapata 等人, Protein Eng. 8 :1057-1062, 1995 描述的抗体。简言之, 这些抗体包含一对串联 Fd 区段 ($V_H-C_H1-V_H-C_H1$), 形成一对抗原结合区。线性抗体可为双特异性的或单特异性的。

[0048] 本文使用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指衍生自单一克隆的抗体, 包括任何真核、原核、或噬菌体克隆, 而非其制备的方法。

[0049] 本文使用的术语“亲本抗体”是指通过用于制备变体的氨基酸序列编码的抗体。优选地, 该亲本抗体具有人框架区, 且如果存在的话, 具有人抗体恒定区。例如, 该亲本抗体可为人源化的或人抗体。

[0050] “变体”抗 VEGF-A 抗体,在此是指由于在在亲本抗体序列中添加、缺失和 / 或取代一个或多个氨基酸残基而与“亲本”抗 VEGF-A 抗体氨基酸序列的氨基酸序列不同的分子。在优选的实施方案中,该变体在亲本抗体的一个或多个高变区中包含一个或多个氨基酸取代。例如,该变体在亲本抗体的一个或多个高变区中可包含约 1 至约 10 个,优选约 2 至约 5 个取代。通常,该变体具有这样的氨基酸序列,其与亲本抗体重链或轻链可变域序列具有至少 75% 的氨基酸序列同一性,更优选至少 80%,更优选至少 85%,更优选至少 90%,且最优选至少 95% 的氨基酸序列同一性。相对于该序列的同一性或同源性在此定义为,在比对序列并引入缺口(如果必要的话)以达到最大百分比序列同一性后,候补序列中与亲本抗体残基相同的氨基酸残基的百分比。N-端、C-端、或内部延伸、缺失、或插入抗体序列中都不应解释为影响序列同一性或同源性。该变体保持结合人 VEGF-A 的能力,且优选具有优于亲本受者或抗体的性质。例如,该变体可具有更强的结合亲和力、增强的抑制 VEGF-A-诱导的生物活性(例如血管发生或增殖)的能力。为分析这样的性质,人们应将变体的 Fab 形式与亲本抗体的 Fab 形式,或变体的全长形式与亲本抗体的全长形式进行比较,例如,因为已发现在本文公开的生物活性测试中抗 VEGF-A 抗体的形式影响其活性。本文特别感兴趣的变体抗体为当与亲本抗体相比,显示约至少 3 倍,5 倍,10 倍,20 倍,或 50 倍的生物活性增强的抗体。

[0051] 术语“表位”包括任何能特异结合至免疫球蛋白或 T-细胞受体的蛋白质决定簇。表位决定簇通常由化学活性表面分子群如氨基酸或糖侧链组成,且通常具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。更具体地,本文使用的术语“VEGF-A 表位”是指 VEGF-A 多肽的在动物、优选哺乳动物、最优选小鼠或人中具有抗原性或免疫原性活性的部分。具有免疫原性活性的表位是 VEGF-A 多肽的可引发动物抗体应答的部分。具有抗原活性的表位是 VEGF-A 多肽中被抗体免疫特异性结合(通过任何本领域众所周知的方法测定的,例如通过免疫测试测定的)的部分。抗原性表位不一定是免疫原性的。

[0052] “载体(vector)”是这样的核酸分子,如质粒、粘粒、或噬菌体,其具有在宿主细胞中自主复制的能力。克隆载体通常包含一个或少数个限制核酸内切酶识别位点(其允许以可确定的方式插入核酸分子而不丧失载体的必需生物功能),以及编码适用于鉴别和选择克隆载体转化的细胞的标记基因的核苷酸序列。标记基因通常包括提供四环素抗性或氨苄青霉素抗性的基因。

[0053] “表达载体”是编码在宿主细胞中表达的基因的核酸分子。通常,表达载体包括转录启动子、基因和转录终止子。通常将基因表达置于启动子的控制下,这样的基因被称为“可操作连接”于启动子。同样,如果调节元件调节核心启动子的活性,则调节元件和核心启动子是可操作连接的。

[0054] 术语“表达”是指基因产物的生物合成。例如,在结构基因的情况下,表达包括将结构基因转录为 mRNA 和将 mRNA 翻译为一个或多个多肽。

[0055] 关于本文所述的蛋白质,称“与 SEQ ID NO 规定的氨基酸残基对应的氨基酸残基”包括这些残基的翻译后修饰物。

[0056] 术语“新血管形成”和“血管发生”在此可互换使用。新血管形成和血管发生是指新血管在细胞、组织或器官中的生成。血管发生的控制通常在某些疾病状态中改变,而且在许多情况下,与疾病相关的病理损害与血管发生改变的不受调节的相关。持续性的、不受调

节的血管发生在多种疾病状态（包括那些以内皮细胞的异常生长为特征的疾病）中发生，且支持在这些症状（包括血管的泄漏和渗透）中观察到的病理损害。

[0057] 本文使用的术语“新生血管疾患”是指任何具有如下所述的病理的疾病或疾患，所述的病理至少部分地由增加的或不受调节的血管发生活性所介导。这样的疾病或疾患的实例包括各种癌症，包括实体瘤（例如，胰腺癌，肾细胞癌（RCC），结肠直肠癌，非小细胞肺癌（NSCLC）和胃肠道间质瘤（GIST））以及某些涉及新血管形成的眼病（“新生血管性眼病”）。该疾病或障碍特别适于某些抑制血管发生的治疗方法，如本文进一步描述的。

[0058] 术语“有效量”，在通过向本文所述的受试者给药 FGFR 和 / 或 VEGF-A 拮抗剂治疗新生血管疾病的背景下，是指该药物的量，其足以抑制受试者的血管发生以抑制一种或多种新生血管疾病的发生或改善所述疾病的症状。有效量的药剂根据本发明方法以“有效方案”给药。术语“有效方案”是指足以实现治疗或预防疾病或疾患的给药的量和剂量频率的组合。

[0059] 术语“患者”或“受试者”，在治疗本文所述疾病或障碍的背景下，包括哺乳动物，例如，人和其它灵长类。该术语还包括家养动物，例如，牛，猪，羊，马，狗和猫。

[0060] 如果当将两个氨基酸序列以最大对应性比对时，两个氨基酸序列的氨基酸残基相同，则两个氨基酸序列具有“100%氨基酸序列同一性”。类似的，如果当以最大对应性比对时两个核苷酸序列的核苷酸残基相同，则两个核苷酸序列具有“100%核苷酸序列同一性”。序列比较可使用标准软件程序（如包括在 LASERGENE 生物信息学计算程序组中的程序，由 DNASTAR(Madison, Wisconsin) 出品）来进行。其它用于通过确定最佳比对来比较两种核苷酸或氨基酸序列的方法是本领域技术人员众所周知的。（参见，例如，Peruski 和 Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997) ; Wu 等人 (eds.), “Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins,” Methods in Gene Biotechnology 123-151 (CRC Press, Inc. 1997) ; Bishop (ed.), Guide to Human Genome Computing (2nd ed., Academic Press, Inc. 1998)）。如果两个核苷酸或氨基酸序列相对彼此具有至少 80%，至少 90%，或至少 95% 序列同一性，则两个核苷酸或氨基酸序列认为是具有“基本上类似的序列同一性”或“基本上序列同一性”。

[0061] 百分比序列同一性通过常规方法测定。参见，例如，Altschul 等人, Bull. Math. Bio. 48 :603, 1986, 和 Henikoff 和 Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :10915, 1992。例如，可比对两个氨基酸序列以优化排列得分，其使用的缺口形成罚分 (gap opening penalty) 为 10，缺口延伸罚分 (gap extension penalty) 为 1，和上文的 Henikoff 和 Henikoff 的“BLOSUM62”评分矩阵，如表 1 所示（氨基酸通过标准单字母代码表示）。然后百分比同一性如下计算：([相同匹配的总数]/[较长序列的长度加上引入较长序列以比对该两个序列的缺口数]) (100)。

[0062] 表 1 :BLOSUM62 评分矩阵

[0063]

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															

[0064]

Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

[0065] 本领域技术人员理解存在许多已建立的算法以比对两个氨基酸序列。该 Pearson 和 Lipman 的“FASTA”相似性搜索算法是用于检测本文公开的氨基酸序列和第二氨基酸序列所享有的同一性水平的合适的蛋白质比对方法。该 FASTA 算法描述于 Pearson 和 Lipman, Proc. Nat’l Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, 和 Pearson, Meth. Enzymol. 183:63, 1990。简言之, FASTA 首先表征序列相似性, 其方法是鉴别查询序列 (例如, SEQ ID NO:2 的残基 25-266) 与测试序列共享的如下所述的区域, 它们或者具有最高的同一性密度 (如果 ktup 变量为 1) 或最高的同一性成对数 (如果 ktup = 2), 不考虑保守氨基酸置换、插入、或缺失。然后对具有最高同一性密度的 10 个区重新评分, 方法是使用氨基酸置换矩阵比较所有成对的氨基酸的相似性, 再“修剪”区的末端以仅包括那些对最高评分有贡献的残基。如果存在多个分数大于“截断”值 (基于序列长度和 ktup 值通过预定的公式计算) 的区, 则检查被修剪的起始区以确定这些区域能够被连接起来形成近似的带有缺口的比对。最后, 将两个氨基酸序列的最高的得分区使用修饰的 Needleman-Wunsch-Sellers 算法对准 (Needleman 和 Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444, 1970; Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26:787, 1974), 这种算法允许氨基酸插入和缺失。FASTA 分析的例示的参数为: ktup = 1, 缺口形成罚分 = 10, 缺口延伸罚分 = 1, 且置换矩阵 = BLOSUM62。可通过修改评分矩阵文件 (“SMATRIX”) 将这些参数引入 FASTA 程序, 如 Pearson, Meth. Enzymol. 183:63, 1990 的附件 2 所述。

[0066] FASTA 也可用于测定核酸分子的序列同一性, 使用以上公开的比例。对于核苷酸序列比较, ktup 值范围可为 1 至 6, 优选 3 至 6, 最优选 3, 其它参数如上设定。

[0067] 附图简述

[0068] 图 1A-1C 描述某些免疫球蛋白 Fc 多肽的氨基酸序列。氨基酸序列数基于 EU 索引 (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, Bethesda, 1991)。阐述的序列包括野生型人序列 (“wt”; SEQ ID NO:75) 和 5 个变体序列, 称为 Fc-488 (SEQ ID NO:76), Fc4 (SEQ ID NO:77), Fc5 (SEQ ID NO:74), Fc6 (SEQ ID NO:78), 和 Fc7 (SEQ ID NO:79)。通常在与轻链恒定区 (LC) 和重链恒定区 (HC) 的二硫键键合中涉及的 Cys 残基被标示出来。“.” 表示与在该位置的野生型的同一性。*** 表示终止密码子; C-端 Lys 残基已从 Fc6 去除。示出了铰链、C_H2 和 C_H3 域的边界。

[0069] 图 2 描述了四价、双特异性抗体 / 可溶受体组合, 其对两个不同的靶 (在此称为 α VEGF-A 和 FGFR 的配体结合域) 具有特异性。

[0070] 图 3 描述显示对 FGF-9- 刺激的成骨细胞增殖的可变抑制的 FGFR-Fc (R&D Systems)。

[0071] 图 4A 描述 FGFR-Fc 构建体 (ZymoGenetics) 抑制 FGF-9- 刺激的增殖。全长 FGFR3-Fc 野生型和突变体构建体 (ZymoGenetics) 具有类似的 IC₅₀; 图 4B 描述截短的 FGFR3-Fc 突变体构建体 (ZymoGenetics) 具有类似的 IC₅₀。

[0072] 图 5A 描述 FGFR-Fc (R&D Systems) 对 FGF-8b 的直接结合, 图 5B 描述 FGFR-Fc 构建体 (ZymoGenetics) 对 FGF-8b 的直接结合。

[0073] 图 6A 描述 FGFR-Fc (R&D Systems) 对 FGF-17 的直接结合, 图 6B 描述 FGFR2-Fc 构建体 (ZymoGenetics) 对 FGF-17 的直接结合。

[0074] 图 7 描述 FGFR3-Fc 构建体 (ZymoGenetics) 对 FGF-17 的直接结合。

[0075] 图 8A 描述 FGFR-Fc 抑制 Caki-1 细胞的生长, 图 8B 描述 FGFR-Fc 抑制 DU145 细胞的生长。

[0076] 图 9 描述 FGF 受体家族的第二和第三 Ig 样域。

[0077] 发明描述

[0078] I. 概述

[0079] 本发明通过提供新蛋白质, 即多特异性结合蛋白, 特别是双特异性结合蛋白, 解决了本领域对于提供更多治疗剂以治疗癌症, 特别是实体瘤的需求。所述蛋白质包含与抗体部分融合的可溶受体部分。如本文所述, 术语“双特异性结合蛋白”是指能通过至少两种具有不同结合特异性的结合部分特异结合至少两种不同的靶分子的蛋白质。该结合部分可以是例如蛋白质 (例如, 抗体或可溶受体) 或小分子。双特异性结合蛋白的结合部分可以是物理连接的。如本文所述的本发明提供包含可溶受体部分和抗体部分的双特异性结合蛋白。

[0080] 在本发明中, 可溶的受体部分包含可溶的 FGF 受体或其部分, 而抗体部分包含 VEGF-A 抗体或其部分, 如本文所述。在某些实施方案中, 双特异性结合蛋白的两个或多个不同的部分通过接头连接以形成多聚物 (例如, 二聚物)。例如, 在包含至少两个多肽部分 (例如, 可溶 FGF 受体和 VEGF-A 抗体) 的融合的双特异性结合蛋白的情况下, 可利用肽接头序列来分隔, 例如, 多肽组分, 将它们分隔成足以保证各多肽折叠为其二级和三级结构的距离。

[0081] 在某些实施方案中, 本发明的双特异性结合蛋白减少 FGF 和 VEGF-A 两者的生物活性。具体地, 本发明提供 VEGF-A 和 FGF 拮抗剂, 特别是中和性抗 VEGF-A 抗体与 FGF 可溶受

体的组合,其减少通过 VEGF-A 受体和 FGF 受体的信号传递。使用这样的拮抗剂减少经由 VEGF-A 和 / 或 FGF 的血管生成信号可用于治疗多种具有至少部分以新血管形成为特征的病理的疾病。例如,在肿瘤中和肿瘤周围抑制藉由 VEGF-A 和 / 或 FGF 的血管生成信号可减少肿瘤形成血管、生长和转移的能力。

[0082] FGF 受体的活化可活化多种信号转导途径,包括磷脂酶 C、磷脂酰肌醇 3- 激酶、促分裂原活化的蛋白质激酶、以及转录的信号转导物和活化剂 (STAT) 途径,这些途径都在前列腺癌进展中起作用。FGF 信号传导增加的净结果包括增强的增殖、对细胞死亡的抗性、增加的活动力和侵袭力、增加的血管发生、增强的转移、对化疗和放射的抗性和雄激素非依赖性等,这些都可增强肿瘤进展和临床侵占性。FGF 受体和 / 或 FGF 信号传导可直接影响肿瘤细胞,也可影响肿瘤血管发生 (Kwabi-Addo 等人, Endocrine-Related Cancer 11 (4) 709-724, 2004)。

[0083] 本发明提供减少 VEGF-A 和 FGF 两者的生物活性的 VEGF-A 和 FGF 拮抗剂。该 FGF- 结合部分为可溶 FGF 受体 (FGFR) 且 VEGF-A- 结合部分为 VEGF-A 抗体。根据本发明,该 VEGF-A 和 FGF 拮抗剂为特异结合且减少 VEGF-A 和 FGF 活性的双特异性抗体 / 可溶受体结合蛋白。本发明的双特异性结合蛋白在此详细描述。

[0084] II. FGF 受体,抗 VEGF-A 抗体,和相关双特异性结合组合物

[0085] A. FGF 受体

[0086] 该分子的 FGFR 部分为可溶受体。该 FGFR 包含三个 Ig 样域,称为 D1, D2 和 D3。该受体可包含 FGF 受体的 D1, D2, D3, 或可包含 D2, D3 而没有 D1。而且,该受体可为天然受体或在 D2-D3 区具有突变。该 FGFR 家族和域 D2 和 D3 示于图 1。

[0087] 已证实 D1 的截短可增加受体的亲和力和增强受体 / 配体相互作用 (Olsen 等人 PNAS 101 :935-940, 2004)。已知 FGFR1-3 由于在 D3 的羧基端的可变剪接而具有多个同种型。从该知识出发,本发明者制成了多种具有三个或两个 Ig 样域的变体可溶 FGF 受体,且表征了它们对 FGF 配体的结合亲和力。该 FGFR3 和 FGFR2 同种型 IIIc 是特别令人感兴趣的,因为它们比相应的 IIb 同种型对 FGF 2, 6, 8b, 9 和 17 具有更高的亲和力。

[0088] FGF 受体可以基于它们对 FGF 配体的结合亲和力来定性。对给定的相互作用,测量结合速率常数 (k_a ($M^{-1}s^{-1}$)) 和解离速率常数 (k_d (s^{-1}))。结合速率常数是反映配体 - 受体复合物形成速率的值。解离速率常数是反映该复合物稳定性的值。平衡结合亲和力通常表示为平衡解离常数 (K_D (M)) 或平衡结合常数 (K_A (M^{-1}))。 K_D 是将解离速率常数除以结合速率常数 (k_d/k_a) 而获得,而 K_A 是将结合速率常数除解离速率常数 (k_a/k_d) 而获得。具有类似 K_D (或类似 K_A) 的分子可具有在广范围内可变的结合和解离速率常数。当在标准体外测试如 BIACORE 结合分析中测量时,对本发明双特异性结合蛋白的结合亲和力将在 100nM 或更少,优选 10nM 或更少,且更优选 1nM 或更少的范围。

[0089] 在某些实施方案中, FGFR 为 FGFR3III_c, 其它具体实施方案包括 FGFR3III_c, 其中 SEQ ID NO :2 的第 262 号氨基酸或 SEQ ID NO :9 的第 142 号氨基酸从 S 突变为 W。其它具体实施方案包括 FGFR3III_c, 其中 SEQ ID NO :15 的第 263 号氨基酸或 SEQ ID NO :22 的第 143 号氨基酸从 P 突变为 R。在其它实施方案中, FGFR3III_c 可在 N- 端截短, 如 SEQ ID NOS : 10, 19 和 22 所示。

[0090] 在其它某些实施方案中, FGFR 为 FGFR2III_c, 其它具体实施方案包括 FGFR2III_c, 其

中 SEQ ID NO :29 的氨基酸数 X 或 SEQ ID NO :40 的氨基酸数 Xa 从 S 突变为 W。其它具体实施方案包括 FGFR2III_c, 其中 SEQ ID NO :33 的第 Y 号氨基酸或 SEQ ID NO :42 的第 Ya 号氨基酸从 P 突变为 R。在其它实施方案中, FGFR2III_c 可在 N- 端截短, 如 SEQ ID NOS :37 和 42 所示。

[0091] B. VEGF-A 抗体

[0092] 用于本发明的 VEGF-A 拮抗剂包括这样的分子, 它们结合至 VEGF-A 或 VEGF-A 受体, 从而诱导 VEGF-A 对表达该受体, 例如, VEGFR-1, VEGFR-2, 神经纤毛蛋白 -1, 和 / 或神经纤毛蛋白 -2 的细胞的活性。特别是, VEGF-A 拮抗剂包括抗 VEGF-A 抗体。其它合适的 VEGF-A 拮抗剂包括包含 VEGFR 细胞外域的可溶 VEGF-A 受体, 以及能抑制 VEGF-A 与其受体的相互作用或能以其他方式抑制 VEGF-A 诱导的通过 VEGF-A 受体的细胞内信号传导的小分子拮抗剂。此外, 可使用基于非抗体支架的结合蛋白质。(参见, 例如, Koide 等人, J. Mol. Biol. 284 :1141-1151, 1998 ; Hosse 等人蛋白质 Sci. 15 :14-27, 2006, 以及其中的文献)。本发明使用的优选的 VEGF-A 拮抗剂包括特异结合至 VEGF-A 的抗体, 包括也包含对 FGF 的结合位点的双特异性抗体。对 VEGF-A 特异的抗体至少结合 VEGF-A 的可溶分泌形式, 且优选还结合关联于细胞表面的形式。

[0093] 抗体在以下情况下被认为是特异结合的, 如果 (1) 它们显示结合活性的阈水平, 和 (2) 它们不显著与对照多肽分子交叉反应。例如, 如果抗 VEGF-A 抗体结合至 VEGF-A 多肽、肽或表位的亲和力为与对照 (非 VEGF-A) 多肽的结合亲和力的至少 10 倍, 则确定结合阈水平。优选的是, 本发明中使用的抗体具有的结合亲和力 (K_d) 为 $10^6 M^{-1}$ 或更大, 优选 $10^7 M^{-1}$ 或更大, 更优选 $10^8 M^{-1}$ 或更大, 最优选 $10^9 M^{-1}$ 或更大。抗体的结合亲和力可由本领域技术人员容易地确定, 通常使用自动设备通过表面等离子共振测定。其它方法是本领域已知的, 例如 Scatchard 分析 (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51 :660-672, 1949)。

[0094] 本发明的抗体包含保持抗原 - 结合特异性的完整抗体的部分或由其组成。合适的抗体包括, 例如, 完全的人抗体; 人源化抗体; 嵌合抗体; 抗体片段例如 Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ 和 Fv 抗体片段; 单链抗体; 和抗体重链或轻链的单体或二聚物或其混合物。本发明的优选抗体为单克隆抗体。包含轻链的抗体可包含 κ 或 λ 轻链。

[0095] 在某些实施方案中, 本发明的抗体包括任何同种型的完整免疫球蛋白, 包括 IgA, IgG, IgE, IgD, 或 IgM (包括其亚型)。根据本发明的完整免疫球蛋白优选包括完整 IgG (例如, 完整 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 或 IgA2)。

[0096] 制备和分离多克隆抗体、单克隆抗体和其抗原 - 结合抗体片段的方法是本领域已知的。参见, 例如, Current Protocols in Immunology, (Cooligan 等人 eds., John Wiley and Sons, Inc. 2006); Sambrook 等人, Molecular Cloning : A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, NY, 2nd ed. 1989); 和 Monoclonal Hybridoma Antibodies : Techniques and Applications (Hurrell ed., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982)。抗原结合片段, 包括 scFv, 可根据本领域已知方法使用噬菌体展示文库制备。噬菌体展示也可用于基于非抗体支架制备结合蛋白质 (Koide 等人, 上文.)。制备重组人多克隆抗体的方法公开于 Wiberg 等人, Biotechnol Bioeng. 94 :396-405, 2006; Meijer 等人, J. Mol. Biol. 358 :764-772, 2006; Haurum 等人, 美国专利申请公开 No. 2002/0009453; 和 Haurum 等人, 美国专利申请公开 No. 2005/0180967。

[0097] 对本领域技术人员显而易见的是,用于本发明的多克隆抗体可通过用免疫源性多肽或多肽片段接种多种温血动物如马,牛,山羊,绵羊,狗,鸡,兔,小鼠,和大鼠的任一种而产生。免疫原性多肽的免疫原性可通过使用佐剂,如明矾(氢氧化铝)或弗氏完全或不完全佐剂来增加。用于免疫的多肽还包括融合多肽,如 VEGF-A 或其部分与免疫球蛋白多肽或与麦芽糖结合蛋白的融合物。多肽免疫原可为全长分子或其部分。如果多肽部分为半抗原状,其可有利地结合或连接至大分子载体(如钥孔虫戚血兰素(KLH),牛血清白蛋白(BSA)或破伤风类毒素)以用于免疫。

[0098] 此外,抗体可相对于与抗体靶(例如,直向同源物,横向同源物(paralogs)),或其序列变体相关的已知多肽进行筛选,例如,以分离对于结合靶蛋白或多肽而言高度特异的抗体群体。这样的高特异性群体包括,例如,结合至人 VEGF-A 但不结合至小鼠 VEGF-A 的抗体。这种与相关多肽分子的交叉反应性的缺失通过,例如,使用标准蛋白质印迹分析通过检测 VEGF-A 多肽而不检测已知的相关多肽的抗体显示(Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel 等人 eds., Green and Wiley and Sons, NY 1993))或 ELISA(酶免疫测定)(Immunoassay, A Practical Guide(Chan ed., Academic Press, Inc.1987))。在另一实例中,针对 VEGF-A 多肽产生的抗体吸附到粘附在不可溶基质上的相关多肽上,对 VEGF-A 多肽高度特异的抗体将在适当的缓冲条件下流过基质。筛选使得分离与已知的密切相关的多肽无交叉反应性的多克隆和单克隆抗体成为可能(Antibody :A Laboratory Manual(Harlow and Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988) ;Current Protocols in Immunology(Cooligan 等人 eds., National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc.1995)。特异抗体的筛选和分离是本领域已知的。参见 Fundamental Immunology(Paul ed., Raven Press 1993) ;Getzoff 等人, Adv.in Immunol.43 :1-98, 1988 ;Monoclonal Antibodies :Principles and Practice(Goding ed., Academic Press Ltd.1996) ;Benjamin 等人, Ann. Rev. Immunol.2 :67-101,1984。

[0099] 天然单克隆抗体(“mAbs”)可通过,例如,用纯化的免疫原性蛋白或其片段免疫受试者动物(例如,大鼠或小鼠)而制备。在典型的程序中,首先分别对动物给予腹腔内(IP)注射纯化的蛋白质或其片段,通常与佐剂(例如,完全弗氏佐剂或 RIBI 佐剂(获自 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))组合,然后以例如两周的间隔加强 IP 注射纯化蛋白质。给予第三加强注射后 7-10 天,对动物放血并收集血清。视需要可以给予更多次的加强接种。使用常规方法从高效价动物收集脾细胞和淋巴节细胞,并使其融合至骨髓瘤细胞(例如,小鼠 SP2/0 或 Ag8 细胞)。然后将该融合混合物在胸腺细胞的滋养层上培养或用合适的培养基补充物培养(包括可商购的补充物如杂交瘤融合和克隆补剂 ;Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)。融合后约 10 天,使用标准测试(例如 ELISA)鉴别特异的产生抗体的杂交瘤群。对于阳性池可进一步分析其阻断或减少靶蛋白的活性的能力。通过限制稀释克隆阳性池。

[0100] 在某些方面,本发明还包括多种单克隆抗体的用途,所述多种单克隆抗体对单一靶分子上对不同表位特异。组合使用这样的多种抗体可减少单一抗体所见的载体效应(carrier effect),且还可通过 Fc 受体增加清除率和改善 ADCC。可组合使用两种、三种或多种单克隆抗体。

[0101] 天然抗体的氨基酸序列可通过使用重组 DNA 技术改变。因此,抗体可进行重新设

计以得到所需特征。相对其非修饰的形式,修饰的抗体可提供例如改善的稳定性和/或治疗功效。可能的变化有很多,范围可以从改变仅一个或一些氨基酸到对例如可变区或恒定区的完全重新设计。制造恒定区的变化的目的通常是改善或改变特征,如补体结合、与膜的相互作用和其它效应物作用。通常,制造可变区的变化以改善抗原结合特征,改善可变区稳定性,或减少免疫原性的风险。噬菌体展示技术也可使用。参见,例如,Huse 等人,Science 246:1275-1281,1989;Ladner 等人,美国专利号 5,571,698。

[0102] 对于用于人体的治疗用抗体,通常需要根据已知方法将抗体的非人区人源化。制备人源化抗体的方法公开于,例如,美国专利 5,530,101;5,821,337;5,585,089;5,693,762;和 6,180,370。通常,人源化抗 VEGF-A 抗体包含小鼠供免者免疫球蛋白的互补决定区(CDR)和人受者免疫球蛋白的重链和轻链框架。通常,人框架区中的框架残基将被 CDR 供者抗体的相应残基取代,以改变(优选改善)抗原结合。通过本领域众所周知的方法辨别这些框架取代,例如,通过模仿 CDR 和框架残基的相互作用以鉴别对抗原结合重要的框架残基和序列比较以鉴别在特定位置的一般的框架残基。(参见,例如,Queen 等人,美国专利号 5,585,089;Riechmann 等人,Nature 332:323,1988)。

[0103] 非人源化嵌合抗体也可治疗性地使用(例如,在免疫抑制患者中)。因此,在一些变化中,根据本发明的抗体是从例如非人抗 VEGF-A 抗体衍生的嵌合抗体。优选地,嵌合抗体包含衍生自小鼠或大鼠抗体的可变区和衍生自人的恒定区,以使该嵌合抗体当给予人受试者时具有较长的半衰期和较低的免疫原性。制备嵌合抗体的方法是本领域已知的。(参见例如,Morrison, Science 229:1202,1985;Oi 等人,BioTechniques 4:214,1986;Gillies 等人,J. Immunol. Methods 125:191-202,1989;美国专利 5,807,715;4,816,567;和 4,816,397)。

[0104] 本发明还包括完全的人抗体,如衍生自卵巢,乳腺,肾,结肠直肠,肺,子宫内膜,或脑癌患者的外周血单核细胞的。该细胞可与骨髓瘤细胞融合,例如,以形成产生抗 VEGF-A 的完全的人抗体的杂交瘤细胞。人抗体也可以在转基因非人动物(通常为小鼠)中制备。参见,例如,Tomizuka 等人,美国专利 No. 7,041,870。通常,非人哺乳动物就人重链基因座和人轻链基因座而言是转基因的,且相应的内源性免疫球蛋白基因座被失活。

[0105] 本发明的抗体可用它们所识别或特异结合的 VEGF-A 多肽的表位或部分来特指。表位或多肽部分可例如,用 SEQ ID NO:72 所示的 VEGF-A 多肽的表位或其它部分的 N-端和 C-端位置来特指。

[0106] 本发明的抗体具有这样的结合亲和力,其包括的小于 $5 \times 10^{-2} \text{M}$,小于 10^{-2}M ,小于 $5 \times 10^{-3} \text{M}$,小于 10^{-3}M ,小于 $5 \times 10^{-4} \text{M}$,小于 10^{-4}M ,小于 $5 \times 10^{-5} \text{M}$,小于 10^{-5}M ,小于 $5 \times 10^{-6} \text{M}$,小于 10^{-6}M ,小于 $5 \times 10^{-7} \text{M}$,小于 10^{-7}M ,小于 $5 \times 10^{-8} \text{M}$,小于 10^{-8}M ,小于 $5 \times 10^{-9} \text{M}$,小于 10^{-9}M ,小于 $5 \times 10^{-10} \text{M}$,小于 10^{-10}M ,小于 $5 \times 10^{-11} \text{M}$,小于 10^{-11}M ,小于 $5 \times 10^{-12} \text{M}$,小于 10^{-12}M ,小于 $5 \times 10^{-13} \text{M}$,小于 10^{-13}M ,小于 $5 \times 10^{-14} \text{M}$,小于 10^{-14}M ,小于 $5 \times 10^{-15} \text{M}$,或小于 10^{-15}M 解离常数(K_d)。

[0107] 本发明的抗体进一步包括修饰的衍生物,修饰的方式例如,通过对抗体的任何类型的分子共价连接,以使共价连接不阻止抗体结合至其表位。合适的修饰包括,例如,岩藻糖基化,糖基化,乙酰化,聚乙二醇化,磷酸化和酰胺化。该抗体及其衍生物本身可通过已知的保护基/封闭基、蛋白酶剪切、与细胞配体或其它蛋白质的连接等而衍生化。在本发明一些实施方案中,抗体的至少一个重链被岩藻糖基化。在具体的变化形式中,该岩藻糖基化是

N-连接的。在某些优选的实施方案中,抗体的至少一个重链包含岩藻糖基化、N-连接的寡糖。

[0108] 本发明的抗体可单独使用或作为与细胞毒素剂的免疫缀合物使用。在一些实施方案中,该试剂为化学治疗剂。在其它实施方案中,该试剂为放射性同位素,例如,铅-212,铋-212,碲-211,碘-131,钷-47,铈-186,铈-188,钷-90,碘-123,碘-125,溴-77,铟-111,或可裂变核素如硼-10或铜系元素。在其它实施方案中,该试剂为毒素或细胞毒素药物,例如蓖麻毒蛋白、修饰的假单胞菌肠毒素A、加利车霉素(calicheamicin)、阿霉素、5-氟尿嘧啶、auristatin(例如,auristatin E)、美登木素(maytansin)、等。抗体和抗体片段与该试剂的缀合方法是本领域已知的。

[0109] 本发明的抗体包括相对参照抗体(例如,具有表2或表3所示VL和/或VH序列的参照抗体)具有单个或多个氨基酸取代,缺失,添加,或置换的变体,以使该变体保持参照抗体的一种或多种生物特性(例如,阻断VEGF-A与其各自的对应结构(VEGF-A受体)的结合,阻断VEGF-A的生物活性,结合亲和力)。本领域技术人员可制备具有单一或多重氨基酸取代、缺失、加成或置换的变体。这些变体可包括,例如:(a)其中一个或多个氨基酸残基被保守或非保守氨基酸置换的变体,(b)其中一个或多个氨基酸被添加至多肽或从多肽被删除的变体,(c)其中一个或多个氨基酸包括取代基的变体,和(d)其中多肽与可赋予多肽有用的特性的另一肽或多肽融合的变体,所说的另一肽或多肽如融合配偶体、蛋白标记物或其它化学部分,例如抗体的表位、多组氨酸序列、生物素部分等。本发明的抗体可包括以下变体,其中一个物种的氨基酸残基代替另一物种中的对应残基,代替可发生在保守的或非保守的位置。在另一实施方案中,非保守的位置的氨基酸残基被保守的或非保守的残基代替。获得这些变体的技术,包括遗传的(抑制、缺失、突变等)、化学的和酶学的技术,是本领域技术人员已知的。

[0110] 结合至VEGF-A的示例性抗体已通过筛选噬菌体展示文库得以鉴定。通过噬菌体展示的筛选方法详细描述于标准参考文章,如Babas, Phage Display: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Lab Press, 2001)和Lo, Benny K. C., A., Antibody Engineering(2004)。该噬菌体展示文库可用于将表达的蛋白质展示在细胞或其它物质的表面,以使互补的结合实体可以被功能性分离(functionally isolated)。在一种这样的噬菌体展示文库中,将抗体轻链可变区和部分重链可变区与编码人抗体序列的合成DNA组合,然后它们在噬菌体和噬菌粒文库上作为Fab抗体片段被展示(Dyax® Human Antibody Libraries, Dyax Corp., Cambridge, MA.)。因此,抗体的可变轻链和重链片段可以以Fab形式被分离。然后可处理这些可变区以产生抗体,包括抗原-结合片段,如scFv,双特异性scFv,以及针对VEGF-A的多特异性、多功能拮抗剂。

[0111] 使用该技术,示例性Fabs的可变区已在本文所述得测试中因其结合和/或中和VEGF-A的特征而被鉴定出来。(参见下文实施例)。处理这些可变区以产生多种结合实体,包括结合和/或中和VEGF-A的scFv。下表2显示因其结合和中和VEGF-A的能力而被鉴定出的抗VEGF-A抗体簇的核苷酸和氨基酸SEQ ID NO. 标号,而表3列出了对应于表2所列的抗VEGF-A抗体的框架和CDR区的氨基酸残基位置。

[0112]

表 4: 抗 VEGF-A 抗体簇的 SEQ ID NO.

簇#	<u>V_L核苷酸</u> SEQ ID NO:	<u>V_L多肽 SEQ</u> ID NO:	<u>V_H核苷酸</u> SEQ ID NO:	<u>V_H多肽 SEQ</u> ID NO:
870	47	48	49	50
1039	65	66	67	68
1094	53	54	55	56

表 5: 氨基酸残基位置** 对应于抗 VEGF-A 抗体的框架和 CDR 区

簇 #	轻链 FR1 范围	轻链 CDR1 范围	轻链 FR2 范围	轻链 CDR2 范围	轻链 FR3 范围	轻链 CDR3 范围	轻链 FR4 范围	重链 FR1 范围	重链 CDR1 范围	重链 FR2 范围	重链 CDR2 范围	重链 FR3 范围	重链 CDR3 范围	重链 FR4 范围
870	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-100	101-110	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113
1039	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
1094	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-100	101-110	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113

** 所示残基位置数 (表示为可变轻(VL)或可变重(VH)链多肽的残基位置的“范围”) 是根据对应抗体群集数的 VL 或 VH 多肽序列, 表 4 所指示的氨基酸 SEQ ID NOS:。

[0113] 在一些实施方案中, 本发明的抗 VEGF-A 抗体包含表 2 所列的抗 VEGF-A 抗体的一个或多个 CDR (相应 CDR 区的边界分别示于表 3)。例如, 在某些变化中, 该抗体包含表 2 所列

的抗体的重链 CDR (HCDR1, HCDR2 和 HCDR3 区中的至少一个) 和 / 或相应的轻链 CDR (LCDR1, LCDR2, 和 LCDR3 区中的至少一个)。在典型实施方案中, 该抗 VEGF-A 抗体具有表 2 所列的抗体的两个或三个重链 CDR 和 / 或两个或三个轻链 CDR。在一些变化中, 其中抗 VEGF-A 抗体具有表 2 所列的抗体的至少一个重链 CDR, 该抗体进一步包含至少一个相应的轻链 CDR。

[0114] 在具体的变化形式中, 抗 VEGF-A 抗体包括重和 / 或轻链可变域, 该重链或轻链可变域具有 (a) 对应于表 2 所列的抗体所示的重链或轻链 CDR 的一组三个 CDR, 和 (b) 一组四个框架区。例如, 抗 VEGF-A 抗体可包含重和 / 或轻链可变域, 其中该重链或轻链可变域具有 (a) 一组三个 CDR, 其中该组 CDR 源自表 2 所列的抗体, 和 (b) 一组四个框架区, 其中该组框架区与表 2 所列的相同抗体的那组框架区相同或不同。

[0115] 在具体实施方案中, 抗 VEGF-A 抗体包含与表 2 所列的抗体的重和 / 或轻链可变区基本上相同的重链可变区和 / 或轻链可变区。

[0116] 在根据本发明的抗 VEGF-A 抗体的一些实施方案中, LCDR1 具有 SEQ ID NO:66 的残基 24-34 所示的氨基酸序列; LCDR2 具有 SEQ ID NO:66 的残基 50-56 所示的氨基酸序列; LCDR3 具有 SEQ ID NO:66 的残基 89-97 所示的氨基酸序列; HCDR1 具有抗体 c1039 的 HCDR1 氨基酸序列 (SEQ ID NO:68 的残基 31-35); HCDR2 具有抗体 c1039 的 HCDR2 氨基酸序列 (SEQ ID NO:68 的残基 50-66); 且 HCDR3 具有选自 SEQ ID NOs:68 的氨基酸序列。

[0117] 在根据本发明的抗 VEGF-A 抗体的其它实施方案中, LCDR1 具有选自 c870 和 c1094 的抗体的 LCDR1 氨基酸序列 (分别为 SEQ ID NOS:48 和 54 的残基 23-35); LCDR2 具有选自 c870 和 c1094 的抗体的 LCDR2 氨基酸序列 (分别为 SEQ ID NOS:48 和 54 的残基 51-57); LCDR3 具有选自 c870 和 c1094 的抗体的 LCDR3 氨基酸序列 (分别为 SEQ ID NOS:48 和 54 的残基 90-100); HCDR1 具有选自 c870 和 c1094 的抗体的 HCDR1 氨基酸序列 (分别为 SEQ ID NOS:48 和 54 的残基 31-35); HCDR2 具有选自 c870 和 c1094 的抗体的 HCDR2 氨基酸序列 (分别为 SEQ ID NOS:48 和 54 的残基 50-66); 且 HCDR3 具有选自分别为 SEQ ID NOS:48 和 54 的残基 99-102 的氨基酸序列。在具体的变化形式中, 该抗 VEGF-A 抗体具有选自 c870, c1039 和 c1094 的抗体的 CDR LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 和 HCDR3。例如, 在具体实施方案中, 该抗 VEGF-A 抗体具有选自 c870、c1039 和 c1094 的抗体的轻链和重链可变域 (V_L 和 V_H)。

[0118] 在其它实施方案中, 根据本发明的抗 VEGF-A 抗体包括含 CDR LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的 V_L 域和含 CDR HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的 V_H 域, 其中该组 V_L 和 V_H CDR 相对第二组 CDR 具有 3 个或更少个氨基酸取代, 其中所述第二组 CDR 具有选自 c870、c1039 和 c1094 的抗体的 LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 氨基酸序列。在具体的变化形式中, 该抗体在所述组的 CDR 中包含 0、1 或 2 个氨基酸取代。

[0119] 本发明的抗 VEGF-A 抗体识别的表位通常包含人 VEGF-A₁₆₅ 的 5 个或更多个氨基酸 (SEQ ID NO:72 的残基 27-191)。优选的表位包含至少一个包含在一个或多个以下 VEGF-A 的多肽区内的氨基酸: HEVVKFMDVYQRSYCHPIETL (SEQ ID NO:72 的氨基酸残基 38-58), EYIFKPSCVPLMRG (SEQ ID NO:72 的氨基酸残基 70-84), EESNITMQIMRIKPHQG (SEQ ID NO:72 的氨基酸残基 98-114), 和 PCGPCSERRKHLF (氨基酸残基 142-154)。在某些实施方案中, 该表位包含至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个、或至少 7 个源自 SEQ ID NO:72 的残基 38-58、70-84、98-114、和 142-154 所示的一个或多个 VEGF-A 多肽区的氨基酸。在

一些变化形式中,该 VEGF-A 表位是通过使用重叠 VEGF-A 肽)(例如 13-聚肽,其中在每对依次的肽之间有例如 2 个氨基酸移位)的肽微阵列表位作图而确定的表位。

[0120] 在上述抗 VEGF-A 抗体的具体变化形式中,该抗 VEGF-A 表位包含包括在一个或多个以下的 VEGF-A 多肽区内的至少一个氨基酸:KFMDVYQRSYC(SEQ ID NO:72 的氨基酸残基 42-52),IFKPSCVPLMR(SEQ ID NO:72 的氨基酸残基 72-82),IMRIKPHQG(SEQ ID NO:72 的氨基酸残基 106-114),和 PCGPCSERRKHLF(氨基酸残基 142-154)。在某些实施方案中,该表位包含 SEQ ID NO:72 的残基 42-52,72-82,106-114,和 142-154 所示的一个或多个 VEGF-A 多肽区的至少两个,至少 3 个,至少 4 个,至少 5 个,至少 6 个,或至少 7 个氨基酸。

[0121] 在一些相关的变化形式中,根据本发明的抗 VEGF-A 抗体结合至如下所述的表位,该表位包含 (a) 如 SEQ ID NO:72 的氨基酸残基 38-58 或 42-52 所示的第一 VEGF-A 多肽区内包含的一个或多个氨基酸,和 (b) 如 SEQ ID NO:72 的氨基酸残基 70-84 或 72-82 所示的第二 VEGF-A 多肽区内包含的一个或多个氨基酸。

[0122] 在结合至包含上述 (a) 和 (b) 的表位的抗 VEGF-A 抗体的某些实施方案中,该表位不包含 SEQ ID NO:72 的残基 90 至 132 所示的 VEGF-A 的多肽区内包含的氨基酸 (EGLECVPTTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHKNCECRP)。

[0123] 在结合至包含上述 (a) 和 (b) 的表位的抗 VEGF-A 抗体的其它实施方案中,该表位进一步包含 (c) 如 SEQ ID NO:72 的残基 96-114 或 106-114 所示的第三 VEGF-A 多肽区内包含的一个或多个氨基酸。

[0124] 在结合至包含上述 (a)、(b) 和 (c) 的表位的抗 VEGF-A 抗体的一些实施方案中,该抗体不以彼此的 10 倍以内的 K_d 值结合人和小鼠 VEGF-A。

[0125] 在结合至包含上述 (a) 和 (b) 的表位的抗 VEGF-A 抗体的其它变化形式中,该表位进一步包含 (d) 如 SEQ ID NO:72 的残基 142-154 所示的第四 VEGF-A 多肽区内包含的一个或多个氨基酸。

[0126] 在某些实施方案中,抗 VEGF-A 抗体为抗体片段,例如 Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、scFv、或双特异性抗体。在一些优选的实施方案中,抗 VEGF-A 抗体为 scFv。结合 VEGF-A 的 scFv 实体可具有这样的取向,其中轻链可变 (V_L) 区位于重链可变 (V_H) 区的氨基端或者羧基端。在一些变化形式中,抗 VEGF-A scFv 具有表 X 所列的抗 VEGF-A 抗体的 CDR。在具体的变化形式中,抗 VEGF-A scFv 具有表 2 所列的抗 VEGF-A 抗体的 V_L 和 V_H 域。在某些实施方案中,抗 VEGF-A scFv 的 CDR 或 V_L 和 V_H 域为选自 c870 c1039 和 c1094 的抗 VEGF-A 抗体的 CDR 或 V_L 和 V_H 域。在抗 VEGF-A scFv 的具体变化形式中,该 scFv 包含如 SEQ ID NO:70(c1039scFv;核苷酸序列如 SEQ ID NO:69 所示);SEQ ID NO:44(c870.1e6scFv;核苷酸序列如 SEQ ID NO:43 所示);或 SEQ ID NO:46(c1094.1scFv;核苷酸序列如 SEQ ID NO:43 所示)所述的氨基酸序列。此外,scFvs 可以多种双特异性抗体形式的任一种提供,例如,串联 scFv(tascFv)、双-单链 Fv(biscFv)、和具有融合至羧基端的单链 Fv(scFv) 的完整单克隆抗体(biAb)(参见上文)。

[0127] C. 使用 Fc 蛋白质缀合的双特异性抗体 / 可溶受体组合

[0128] 双特异性结合蛋白通过免疫球蛋白重链的 Fc 区结合本发明的结合蛋白,如图 2 所例示的。该 Fc-融合蛋白包含 IgG 分子的 Fc 区。在另一实施方案中,该 Fc 区来自人 IgG1 分子。在一些实施方案中,该免疫球蛋白融合物包括 IgG1 分子的铰链、CH2 和 CH3 区,或铰

链、CH1、CH2 和 CH3 区。

[0129] 免疫球蛋白融合物的制备也参见美国专利 No. 5, 428, 130, 美国专利 No. 5, 843, 725, 美国专利号 6, 018, 026, 和 Chamow 等人, TIBTECH, 14 :52-60 (1996)。

[0130] 最简单和最直接的 Fc- 融合蛋白设计通常藉由免疫球蛋白重链的 Fc 区联合本发明的拮抗剂多肽的结合域。在本发明的 Fc- 融合蛋白中, 编码结合组分的核酸融合至编码免疫球蛋白恒定域序列的 N- 端的核酸的 C 端, 但是 N- 端融合物也是可能的。

[0131] 典型地, 这样的融合物中, 编码的嵌合多肽将至少保持免疫球蛋白重链的恒定区的功能活性铰链、CH2 和 CH3 域。还在恒定域的 Fc 部分的 C- 端, 或直接在重链的 CH1 或轻链的对应区域的 N 端进行融合。进行融合的精确位点不是关键的; 具体位点是公知的, 且可加以选择以优化 Fc- 融合蛋白的生物活性、分泌或结合特征。

[0132] 在一个优选的实施方案中, 该结合域序列融合至免疫球蛋白 G1 (IgG1) 的 Fc 区的 N- 端。可以融合整个重链恒定区与结合域序列。然而, 更优选地, 融合中使用这样的序列, 其起始于化学限定 IgG Fc 的木瓜蛋白酶切割位点 (即残基 216, 将重链恒定区的第一残基作为 114) 或其它免疫球蛋白中的类似位点紧邻上游的铰链区。在特别优选的实施方案中, 该结合域氨基酸序列融合至 (a) 铰链区和 CH2 和 CH3 或 (b) IgG 重链的 CH1、铰链、CH2 和 CH3 域。

[0133] 对于双特异性 Fc- 融合蛋白, Fc- 融合蛋白被组装为多聚体, 特别是异源二聚体或异源四聚体。通常, 这些组装的免疫球蛋白将具有已知的单元结构。一种基本的四链结构单位是存在于 IgG、IgD 和 IgE 中的形式。四链单位在分子量免疫球蛋白中重复; IgM 通常以通过二硫键保持在一起的四个基本单位的五聚体存在。IgA 球蛋白, 偶尔还有 IgG 球蛋白, 也可在血清中以多聚体形式存在。在多聚体的情况下, 四个单位的每一个可相同或不同。

[0134] 或者, 可将 Fc 序列插入免疫球蛋白的重链和轻链序列之间, 而得到包含嵌合重链的免疫球蛋白。在该实施方案中, 在免疫球蛋白的每条臂中 Fc 序列融合至免疫球蛋白重链的 3' 端, 或是在铰链和 CH2 域之间, 或是在 CH2 和 CH3 域之间。类似构建体已报道于 Hoogenboom 等人, Mol. Immunol., 28 :1027-1037 (1991)。

[0135] 尽管在本发明的 Fc- 融合蛋白中不需要免疫球蛋白轻链的存在, 但免疫球蛋白轻链可共价连接于结合域-免疫球蛋白重链融合多肽, 或直接融合于结合域。在前者的情况下, 通常将编码免疫球蛋白轻链的 DNA 与编码结合域免疫球蛋白重链融合蛋白的 DNA 共表达。当分泌时, 杂合的重链和轻链将被共价连接, 而提供一种包含两个由二硫键连接的免疫球蛋白重链-轻链对的免疫球蛋白状结构。适合制备该结构的方法例如公开于美国专利 No. 4, 816, 567。

[0136] Fc- 融合蛋白最方便地通过将编码结合域部分的 cDNA 序列合框地融合于免疫球蛋白 cDNA 序列而构建。然而, 也可使用与基因组免疫球蛋白片段的融合 (参见, 例如 Aruffo 等人, Cell, 61 :1303-1313 (1990); 和 Stamenkovic 等人, Cell, 66 :1133-1144 (1991))。后一类型的融合需要存在 Ig 调节序列以用于表达。基于自脾或外周血淋巴细胞衍生的 cDNA 库中公开的序列, 可以通过杂交或聚合酶链反应 (PCR) 技术来分离编码 IgG 重链恒定区的 cDNA。将编码 Fc- 融合蛋白的结合域和免疫球蛋白部分的 cDNA 串联地插入指导在所选的宿主细胞中的高效表达的质粒载体中。

[0137] 已进行了特殊的修饰以制备用于产生本发明使用的Fc融合分子的Fc序列。具体地,产生6个版本的修饰的人IgG1 Fc用于生成Fc融合蛋白且命名为Fc-488(SEQ ID NO:76),以及Fc4(SEQ ID NO:77)、Fc5(SEQ ID NO:74)、Fc6(SEQ ID NO:78)、和Fc7(SEQ ID NO:79)。Fc4、Fc5和Fc6包含突变以通过减少Fc γ RI结合和补体C1q结合而减少Fc介导的效应物作用。Fc4包含引入Fc-488的相同氨基酸置换。还引入了另外的氨基酸置换以减少潜在的Fc介导的效应物作用。具体地说,引入三个氨基酸置换以减少Fc γ RI结合。它们是在EU索引位置234、235和237的置换。已显示这些位置上的置换可减少与Fc γ RI的结合(Duncan等人,Nature 332:563(1988))。这些氨基酸置换还可减少Fc γ RIIa结合,以及Fc γ RIII结合(Sondermann等人,Nature 406:267(2000);Wines等人,J. Immunol. 164:5313(2000))。

[0138] 数个研究组描述了EU索引位置330和331在补体C1q结合和后续补体固定(complement fixation)中的重要性(Canfield和Morrison,J. Exp. Med. 173:1483(1991);Tao等人,J. Exp. Med. 178:661(1993))。在Fc4的这些位置上引入氨基酸置换,以减少补体固定。Fc4的C_{H3}域与对应野生型多肽中的C_{H3}域相同,只是终止密码子从TGA变为TAA,以便消除克隆的DNA在dam⁺大肠杆菌菌株中生长时潜在的dam甲基化位点。

[0139] 在Fc5中,在EU索引位置218的精氨酸残基突变回至赖氨酸,因为在包含该特定Fc的融合蛋白中没有使用Bg1II克隆方案。Fc5序列的其余部分与上文对Fc4的描述相符。

[0140] Fc6与Fc5相同,只是羧基末端赖氨酸密码子已被消除。成熟免疫球蛋白的C-端赖氨酸经常在翻译后从B-细胞分泌之前从成熟免疫球蛋白被去除,或在血清循环过程中被去除。因此,在循环抗体上通常找不到C-端赖氨酸残基。像上述Fc4和Fc5一样,Fc6序列中的终止密码子变为TAA。

[0141] Fc7与野生型 γ 1 Fc相同,除了位于C_{H2}域中的EU索引位置297处的氨基酸置换之外。EU索引位置Asn-297是一个N-连接型碳水化合物搭接的位点。由于碳水化合物结构中可能的批次间差异,N-连接的碳水化合物向重组表达的蛋白质中导入了潜在的变异性来源。在一个消除这种潜在的变异性的尝试中,将Asn-297突变为谷氨酰胺残基以防止在该残基位置上的N-连接型碳水化合物的搭接。Fc对于FcRIII的结合也涉及残基297处的碳水化合物(Sondermann等人,Nature 406:267(2000))。因此,去除碳水化合物应该会一般性地减少包含重组Fc7的融合蛋白与Fc γ R的结合。与上面一样,Fc7序列中的终止密码子突变为TAA。

[0142] 本发明也考虑这些分子的亮氨酸拉链形式。“亮氨酸拉链”是本领域的术语,用来表示一种富含亮氨酸的序列,其增强、促进、或驱动其融合配偶体(例如,亮氨酸拉链与之融合或连接的序列或分子)的二聚化或三聚化。现有技术已描述了多种亮氨酸拉链多肽。参见,例如,Landschulz等人,Science,240:1759(1988);美国专利5,716,805;WO 94/10308;Hoppe等人,FEBS Letters,344:1991(1994);Maniatis等人,Nature,341:24(1989)。本领域技术人员将理解亮氨酸拉链序列可融合于本发明多肽的5'或3'端。

[0143] 融合蛋白的制备通常可使用标准技术,包括化学缀合。融合蛋白也可在表达体系中通过标准技术表达为重组蛋白质。合适的接头进一步在下文描述。

[0144] 接头可为天然存在的,合成的,或两者的组合。例如,合成的接头可为随机化的接头,例如,序列和尺寸都随机化。在一方面,随机化的接头可包含完全随机化的序列,或任选

地,随机化的接头可基于天然接头序列。接头可包含,例如,非多肽部分(例如多核苷酸)、多肽、等。

[0145] 接头可为刚性的,或者柔性的,或两者的组合。接头的柔性可以是接头和与接头相互作用的亚单位两者的组成的函数。接头将两个选定的结合实体(例如,两个单独的多肽或蛋白质,如两个不同的抗体)联接到一起,并保持各实体为各别且离散的。该接头可允许单独的、离散的域的协作,且保持各别的特性,如对于多聚物中同一靶标的多个各别的结合位点,或者,例如,对于多聚物中不同靶标的多个各别的结合位点。在一些情况下,在两个连接的结合实体之间,或在接头和结合实体之间存在二硫桥。

[0146] 对于具体的要连接两个或多个结合实体的情况,合适的接头的选择可取决于多个参数,包括例如结合实体的性质、双特异性组合物结合的靶标的结构和性质、和/或接头(例如,肽接头)对蛋白水解和氧化的稳定性。

[0147] 特别合适的接头多肽主要包括选自甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、丙氨酸(Ala)和苏氨酸(Thr)的氨基酸残基。例如,肽接头可包含至少75%(基于肽接头中存在的残基总数计算)、如至少80%、至少85%、或至少90%的选自Gly、Ser、Ala和Thr的氨基酸残基。该肽接头也可仅由Gly、Ser、Ala和/或Thr残基组成。该接头多肽具有的长度应足以连接两个结合实体,使得它们采取相对彼此的正确构象以使它们保持所需的活性,如结合靶分子以及可其它能与这样的靶结合相关的活性(例如,对于给定生物分子的激动或拮抗活性)。

[0148] 适于该目的合适长度是例如至少1个且通常少于约50个氨基酸残基的长度,如2-25个氨基酸残基,5-20个氨基酸残基,5-15个氨基酸残基,8-12个氨基酸残基或11个残基。其它合适的多肽接头尺寸可包括,例如,约2至约15个氨基酸,约3至约15个、约4至约12个、约10个、约8个、或约6个氨基酸。选择纳入接头多肽的氨基酸残基应显示以下特性,其不显著干扰多肽多聚物的活性或功能。因此,该肽接头从整体上说应不具有与多聚物的活性或功能不一致的电荷,不干扰内部折叠,也不与一个或多个域中的氨基酸残基形成会严重阻碍多聚物与所关注靶点的结合的键或其它相互作用。

[0149] 天然存在的以及人造的肽接头用于连接多肽成为新的连接的融合多肽的用途是本领域众所周知的(参见,例如, Hallewell 等人, J. Biol. Chem. 264, 5260-5268, 1989; Alfthan 等人, Protein Eng. 8, 725-731, 1995; Robinson and Sauer, Biochemistry 35, 109-116, 1996; Khandekar 等人, J. Biol. Chem. 272, 32190-32197, 1997; Fares 等人, Endocrinology 139, 2459-2464, 1998; Smallshaw 等人, Protein Eng. 12, 623-630, 1999; 美国专利号 5, 856, 456)。

[0150] 广泛使用肽接头的一个实例是用于制备单链抗体,其中轻链(V_L)和重链(V_H)的可变区通过人造接头连接。在这个领域有大量的公开文献。一种广泛使用的肽接头是由三个重复的 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 氨基酸序列((Gly₄Ser)₃)(SEQ ID NO:73)组成的15聚物。也已使用了其它接头,还使用了噬菌体展示技术,以及选择性传染噬菌体技术来多样化和选择合适的接头序列(Tang 等人, J. Biol. Chem. 271, 15682-15686, 1996; Hennecke 等人, Protein Eng. 11, 405-410, 1998)。肽接头已用于连接异源和同源二聚蛋白质(如 T-细胞受体、 λ Cro 阻抑物、P22 噬菌体 Arc 阻抑物、IL-12、TSH、FSH、IL-5 和干扰素- γ)中的各个链。肽接头也已用于产生融合多肽。已使用多种接头,在 Arc 阻抑物的情况下,噬菌体展

示已用于优化接头长度和组成以增加单链蛋白质的稳定性（参见 Robinson 和 Sauer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5929-5934, 1998）。

[0151] 另一种获得合适的接头的途径是通过随机诱变来优化简单的接头（例如， $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ ）。

[0152] 如上文讨论的，通常优选肽接头具有至少一些柔性。因此，在一些变化形式中，肽接头包含 1-25 个甘氨酸残基，5-20 个甘氨酸残基，5-15 个甘氨酸残基，或 8-12 个甘氨酸残基。特别合适的肽接头通常包含至少 50% 的甘氨酸残基，如至少 75% 的甘氨酸残基。在一些实施方案中，肽接头仅包含甘氨酸残基。在某些变化中，该肽接头还包含甘氨酸之外的其它残基。甘氨酸之外的优选残基包括 Ser, Ala 和 Thr，特别是 Ser。

[0153] 在一些情况下，向肽接头提供一些刚性是理想的或者是必须的。这可通过在肽接头的氨基酸序列中包含脯氨酸残基而实现。因此，在另一实施方案中，肽接头在肽接头的氨基酸序列中包含至少一个脯氨酸残基。例如，肽接头可具有这样的氨基酸序列，其中至少 25%（例如，至少 50% 或至少 75%）的氨基酸残基为脯氨酸残基。在本发明一个具体的实施方案中，肽接头仅包含脯氨酸残基。

[0154] 在一些实施方案中，修饰肽接头而引入包含供非多肽部分搭接的基团的氨基酸残基。此类氨基酸残基的实例可为半胱氨酸或赖氨酸残基（随后非多肽部分搭接于其上）。另一种备选方案是包括具有体内 N-糖基化位点的氨基酸序列（从而将糖部分（体内）连接于肽接头）。另一种选择是利用进化的 tRNAs 和 tRNA 合成酶（参见，例如，美国专利申请公开 2003/0082575）遗传性地将非天然氨基酸掺入多肽结合实体或肽接头。例如，酮-酪氨酸的插入允许针对表达的多肽的位点特异性偶联。

[0155] 在某些变化形式中，肽接头包含至少一个半胱氨酸残基，如一个半胱氨酸残基。例如，在一些实施方案中，肽接头包含至少一个半胱氨酸残基和选自 Gly, Ser, Ala 和 Thr 的氨基酸残基。在某些此类实施方案中，肽接头包含甘氨酸残基和半胱氨酸残基，如仅有甘氨酸残基和半胱氨酸残基。通常，每个肽接头将仅包含一个半胱氨酸残基。包含半胱氨酸残基的具体肽接头的一个实例包括具有氨基酸序列 $\text{Gly}_n\text{-Cys-Gly}_m$ 的肽接头，其中 n 和 m 各为 1-12 的整数，例如，3-9、4-8、或 4-7。

[0156] 如上所述，本发明包括双特异性结合蛋白，其包含 FGFR 和抗 VEGF-A 抗体的双特异性抗体 / 可溶受体组合。在某些此类实施方案中，FGFR 和抗 VEGF-A 抗体共价连接（例如，通过肽接头）以形成双特异性结合蛋白。在一些变化形式中，该双特异性结合蛋白包含免疫球蛋白重链恒定区，例如，Fc 片段。特别合适的 Fc 片段包括，例如，包含修饰的 Fc 区以减少或消除一种或多种效应物作用的 Fc 片段（例如，Fc5，具有 SEQ ID NO:74 所示的氨基酸序列）。

[0157] 例如，在一些实施方案中，根据本发明的减少 VEGF-A 和 FGF 两者的活性的 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白包含如本文所述的抗 VEGF-A 抗体部分的结合区和如本文所述的 FGFR3 的 FGF 结合部分。在某些实施方案中，该 FGF 结合部分为本文所述的 FGFR3_{IIIc}。在某些实施方案中，该 FGF 结合部分为 FGF 受体部分，且可为 FGFR3，尤其是本文所述的 FGFR3_{IIIc}。在某些实施方案中，双特异性抗体 / 可溶受体蛋白质包含 FGF 受体部分和 VEGF-A 抗体部分的组合，其中 FGF 受体部分为选自下组的 FGFR3：如 SEQ ID NO:13 所示的 FGFR3_{IIIc} (23-375)，如 SEQ ID NO:2 所示的 FGFR3_{IIIc} (23-375) (S249W)，如 SEQ ID NO:

19 所示的 FGFR3_{IIIc} (143-375), 如 SEQ ID NO :10 所示的 FGFR3_{IIIc} (143-375) (S249W), 如 SEQ ID NO :15 所示的 FGFR3_{IIIc} (23-375) (P250R), 和如 SEQ ID NO :22 所示的 FGFR3_{IIIc} (143-375) (P250R); 所述 VEGF-A 抗体部分选自下组: 如 SEQ ID NO :44 所示的 c870.1e6scFV, 如 SEQ ID NO :46 所示的 c1094.1scFV, 如 SEQ ID NO :52 所示的 c870scFV, 和如 SEQ ID NO :70 所示的 c1039scFV。在其它实施方案中, 双特异性抗体 / 可溶受体组合包含 FGF 结合部分和 VEGF-A 结合部分, 所述 FGF 结合部分为选自下组的 FGFR3: SEQ ID NO :13 所示的 FGFR3_{IIIc} (23-375), SEQ ID NO :2 所示的 FGFR3_{IIIc} (23-375) (S249W), SEQ ID NO :19 所示的 FGFR3_{IIIc} (143-375), SEQ ID NO :10 所示的 FGFR3_{IIIc} (143-375) (S249W), SEQ ID NO :15 所示的 FGFR3_{IIIc} (23-375) (P250R), SEQ ID NO :22 所示的 FGFR3_{IIIc} (143-375) (P250R), 所述 VEGF-A 结合部分选自下组: SEQ ID NO :48 所示的 c870VL 和 SEQ ID NO :50 所示的 VH, SEQ ID NO :54 所示的 c1094VL 和 SEQ ID NO :56 所示的 VH, 以及 SEQ ID NO :66 所示的 1039VL 和 SEQ ID NO :68 所示的 VH。

[0158] 在其它实施方案中, 本发明的双特异性结合蛋白包括选自下组的 FGFR3 部分和 VEGF-A 抗体部分: FGFR3 (143-375) (S249W)Fc5c1094.1pZMP31 (SEQ ID NO :58); FGFR3 (23-375) (S249W)Fc5c1094.1pZMP31 (SEQ ID NO :60); FGFR3 (143-375) (S249W)Fc5c870e6pZMP31 (SEQ ID NO :62); 和 FGFR3 (23-375) (S249W)Fc5 c870e6 pZMP31 (SEQ ID NO :64)。

[0159] 在其它实施方案中, 该 FGF 结合部分为 FGFR2。在某些实施方案中, 该 FGFR2 包含 FGFR2_{IIIc}。在某些实施方案中, 双特异性抗体 / 可溶受体组合包含 FGF 结合部分和 VEGF-A 结合部分, 所述 FGF 结合部分为选自下组的 FGFR2: SEQ ID NO :24 所示的 FGFR2_{IIIc} (22-377), SEQ ID NO :29 所示的 FGFR2_{IIIc} (22-377) (S252W), SEQ ID NO :33 所示的 FGFR2_{IIIc} (22-377) (P253R), SEQ ID NO :37 所示的 FGFR2_{IIIc} (145-377), SEQ ID NO :40 所示的 FGFR2_{IIIc} (145-377) (S252W), 和 SEQ ID NO :42 所示的 FGFR2_{IIIc} (145-377) (P253R); 所述 VEGF-A 结合部分选自下组: SEQ ID NO :44 所示的 c870.1e6scFV, SEQ ID NO :46 所示的 c1094.1scFV, SEQ ID NO :52 所示的 c870scFV, 和 SEQ ID NO :70 所示的 c1039scFV。在其它实施方案中, 双特异性抗体 / 可溶受体组合包含 FGF 结合部分和 VEGF-A 结合部分, 所述 FGF 结合部分为选自下组的 FGFR2: SEQ ID NO :24 所示的 FGFR2_{IIIc} (22-377), SEQ ID NO :29 所示的 FGFR2_{IIIc} (22-377) (S252W), SEQ ID NO :33 所示的 FGFR2_{IIIc} (22-377) (P253R), SEQ ID NO :37 所示的 FGFR2_{IIIc} (145-377), SEQ ID NO :40 所示的 FGFR2_{IIIc} (145-377) (S252W), 和 SEQ ID NO :42 所示的 FGFR2_{IIIc} (145-377) (P253R); 所述 VEGF-A 结合部分选自下组: SEQ ID NO :48 所示的 c870VL 和 SEQ ID NO :50 所示的 VH, SEQ ID NO :54 所示的 c1094VL 和 SEQ ID NO :56 所示的 VH, 以及 SEQ ID NO :66 所示的 1039VL 和 SEQ ID NO :68 所示的 VH。

[0160] III. 核酸, 宿主细胞, 和制备 VEGF-A 和 FGF 双特异性抗体 / 可溶受体组合蛋白的方法

[0161] 本发明的可溶 FGFR 多肽可通过表达编码细胞外域或其部分的 DNA 制备。例如, 编码包含 SEQ ID NO :13 的残基 36-388 的多肽的多核苷酸序列可用于制备 FGFR3_{IIIc}。N-端截短的 FGFR3_{IIIc} 可使用编码 SEQ ID NO :19 的残基 36-268 的多核苷酸。为制备 FGFR2_{IIIc}, 可使用编码 SEQ ID NO :24 的残基 36-391 的多核苷酸。在另一实例中, 编码包含 SEQ ID NO :37 的残基 36-268 的多肽的多核苷酸序列可用于制备 N-端截短的 FGFR2_{IIIc}。优选该细胞外

域多肽制备为基本上无跨膜和细胞内多肽区段的形式。为引导受体域从宿主细胞输出,该受体 DNA 连接至编码分泌肽的第二 DNA 片段,如受体的天然信号序列。其它可使用的信号序列包括 tPA 信号序列(在以下实施例描述),CD33 信号序列或人生长激素信号序列。为促进分泌的受体域的纯化,可将 C-端延伸物,如多组氨酸标签、物质 P、Flag™ 肽(Hopp 等人,Biotechnology 6:1204-1210,1988;获自 Eastman Kodak Co., New Haven, CT) 或另一有可用的抗体或特异性结合剂的多肽或蛋白质,融合至受体多肽。

[0162] 本发明还包括编码本发明的抗体的重链和/或轻链的核酸。本发明的核酸包括这样的核酸,其具有与如上表 2 所列的编码 V_L 和/或 V_H 的多核苷酸基本相同的区域。本发明的核酸还包括互补核酸。在一些情况下,当形成比对时,各序列将是完全互补的(无错配)。在其它情况下,序列中可存在至多约 20% 错配。在本发明一些实施方案中,提供了编码本发明抗体的重链和轻链两者的核酸。本文提供的核酸序列可使用密码子优化、简并序列、沉默突变和其它 DNA 技术优化在特定宿主中表达后加以利用,本发明涵盖这样的序列修饰。

[0163] 因此,在一些方面,本发明提供编码本文所述 FGFR 和/或 VEGF-A 抗体的一种或多种多核苷酸(例如, DNA 或 RNA)。在一些变化形式中,本发明的多核苷酸编码结合并减少 FGF 和 VEGF-A 两者的活性的 VEGF-A 抗体/可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白。本领域技术人员将容易理解,考虑到遗传密码的简并,在这些多核苷酸分子中可能有大量的序列变化。

[0164] 本发明的核酸可克隆至载体中,载体例如质粒,粘粒,杆粒(bacmid),噬菌体,人造染色体(BAC, YAC)或病毒,可向其中插入另一遗传序列或元件(DNA 或 RNA)以实现连接的序列或原件的复制。在一些实施方案中,该表达载体包含组成型活性启动子区段(例如但不限于 CMV, SV40, 延伸因子或 LTR 序列)或诱导型启动子序列,如类固醇可诱导的 pIND 载体(Invitrogen),在那里核酸的表达可被调节。本发明的表达载体可进一步包括调节序列,例如,内部核糖体进入位点。该表达载体可通过例如转染被引入细胞。

[0165] 因此,用于本发明中的蛋白质可根据常规技术在遗传工程化的宿主细胞中产生。合适的宿主细胞为可用外源性 DNA 转化或转染且生长在培养物中的细胞类型,包括细菌,真菌细胞,和培养的高等真核细胞(包括培养的多细胞有机体的细胞),特别是培养的哺乳动物细胞。处理克隆 DNA 分子和向多种宿主细胞引入外源 DNA 的技术公开于 Sambrook 等人,Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989),和 Ausubel 等人,上文。

[0166] 通常,在表达载体内,编码感兴趣蛋白质的 DNA 序列可操作连接于其表达所需的其它遗传元件,通常包括转录启动子和终止子。该载体通常还包含一个或多个选择标记和一个或多个复制起点,不过,本领域技术人员知道在某些体系内选择标记可提供在另外的载体上,且外源 DNA 的复制可通过整合至宿主细胞基因组中而提供。启动子、终止子、选择标记、载体和其它元件的选择是本领域常规技术的水平内的常规设计。许多这样的元件描述于文献中且可获自商业供应者。

[0167] 为将重组蛋白质导向至宿主细胞的分泌途径,在表达载体中提供分泌信号序列(也称为前导序列,前原序列或前序列)。该分泌信号序列可为重组蛋白质的天然形式的,或可衍生自另一分泌的蛋白质(例如, t-PA; 参见美国专利号 5,641,655)或从头合成。该分泌信号序列可操作连接至编码蛋白质的 DNA 序列,即,该两个序列在正确的读框中连接并定位以将新合成的多肽引导至宿主细胞的分泌途径。分泌信号序列通常位于编码感兴趣

的多肽的 DNA 序列的 5', 但某些信号序列可位于感兴趣的 DNA 序列中的其它位置 (参见, 例如, Welch 等人, 美国专利号 5, 037, 743; Holland 等人, 美国专利号 5, 143, 830)。在具体的变化形式中, 根据本发明使用的分泌信号序列具有选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NOS: 2, 10, 13, 15, 19, 22, 24, 29, 33, 37, 40, 42, 58, 60, 62 和 64 的残基 1-35。

[0168] 培养的哺乳动物细胞为制备用于本发明的重组蛋白质的合适的宿主。向哺乳动物宿主细胞引入外源 DNA 的方法包括磷酸钙 - 介导的转染 (Wigler 等人, Cell 14:725, 1978; Corsaro 和 Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; Graham 和 Van der Eb, Virology 52:456, 1973), 电穿孔 (Neumann 等人, EMBO J. 1:841-845, 1982), DEAE- 葡聚糖介导的转染 (Ausubel 等人, 上文), 和脂质体介导的转染 (Hawley-Nelson 等人, Focus 15:73, 1993; Ciccarone 等人, Focus 15:80, 1993)。重组多肽在培养的哺乳动物细胞中的制备公开于, 例如, Levinson 等人, 美国专利号 4, 713, 339; Hagen 等人, 美国专利号 4, 784, 950; Palmiter 等人, 美国专利号 4, 579, 821; 和 Ringold, 美国专利号 4, 656, 134。合适的哺乳动物宿主细胞的实例包括非洲绿猴肾细胞 (Vero; ATCC CRL 1587), 人胚胎肾细胞 (293-HEK; ATCC CRL 1573), 幼仓鼠肾细胞 (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), 犬肾细胞 (MDCK; ATCC CCL 34), 中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44; CHO DXB11 (Hyclone, Logan, UT); 另参见, 例如, Chasin 等人, Som. Cell. Molec. Genet. 12:555, 1986), 大鼠垂体细胞 (GH1; ATCC CCL82), HeLa S3 细胞 (ATCC CCL2.2), 大鼠肝癌细胞 (H-4-II-E; ATCC CRL 1548) SV40- 转化的猴肾细胞 (COS-1; ATCC CRL 1650) 和鼠胚胎细胞 (NIH-3T3; ATCC CRL 1658)。其他合适的细胞系是本领域已知的, 并且可以从公共保藏机构如 American Type Culture Collection, Manassas, Virginia 获得。可使用强的转录启动子, 如 SV-40 或巨细胞病毒的启动子。参见, 例如, 美国专利号 4, 956, 288。其它合适的启动子包括来自金属硫蛋白基因的启动子 (美国专利 4, 579, 821 和 4, 601, 978) 和腺病毒主要晚期启动子。

[0169] 药物选择通常用于选出已插入外源 DNA 的培养的哺乳动物细胞。这样的细胞通常称为“转染子”。在选择性试剂的存在下培养且能将感兴趣的基因传至其后代的细胞称为“稳定的转染子”。示例性的选择标记包括编码对抗生素新霉素的抗性的基因, 其允许在新霉素型药物如 G-418 等的存在下进行选择; 黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶的 gpt 基因, 其允许宿主细胞在霉酚酸 / 黄嘌呤的存在下生长; 和提供对 zeocin, 博来霉素, 杀稻瘟素 (blastocidin), 和潮霉素的抗性的标记 (参见, 例如, Gatignol 等人, Mol. Gen. Genet. 207:342, 1987; Drocourt 等人, Nucl. Acids Res. 18:4009, 1990)。选择系统也可用于增加感兴趣基因的表达水平, 该过程称为“扩增”。扩增通过以下方式进行, 在低水平的选择剂的存在下培养转染子, 然后增加选择剂的量以选择出产生高水平的引入的基因的产物的细胞。可扩增的选择标记的实例为二氢叶酸还原酶, 其赋予对甲氨蝶呤的抗性。其它药物抗性基因 (例如, 潮霉素抗性, 多药抗性, 嘌呤霉素乙酰基转移酶) 也可使用。

[0170] 其它高等真核细胞也可用作宿主, 包括昆虫细胞、植物细胞和禽类细胞。毛根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 在植物细胞中作为用于表达基因的载体的用途已描述于 Sinkar 等人, J. Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987。昆虫细胞的转化和其中外源多肽的产生公开于 Guarino 等人, 美国专利号 5, 162, 222 和 WIPO 公开 WO 94/06463。

[0171] 昆虫细胞可被通常衍生自苜蓿丫纹夜蛾 (*Autographa californica*) 核型

多角体病毒 (AcNPV) 的重组杆状病毒感染。参见 King 和 Possee, *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide* (Chapman & Hall, London); O'Reilly 等人, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual* (Oxford University Press., New York 1994); 和 *Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology* (Richardson ed., Humana Press, Totowa, NJ, 1995)。重组杆状病毒也可通过使用描述于 Luckow 等人 (*J. Virol.* 67:4566-4579, 1993) 的基于转座子的体系制备。这种系统使用转移载体, 可以试剂盒的形式商购 (BAC-T0-BAC 试剂盒; Life Technologies, Gaithersburg, MD)。转移载体 (例如, PFASTBAC1; Life Technologies) 包含 Tn7 转座子, 以将编码感兴趣蛋白质的 DNA 移至作为大质粒 (称为“杆粒”) 保持在大肠杆菌中的杆状病毒基因组中。参见 Hill-Perkins 和 Possee, *J. Gen. Virol.* 71:971-976, 1990; Bonning 等人, *J. Gen. Virol.* 75:1551-1556, 1994; 和 Chazenbalk 和 Rapoport, *J. Biol. Chem.* 270:1543-1549, 1995。此外, 转移载体可包括与上述编码多肽延伸物或亲和标签的 DNA 的合框融合。使用本领域已知的技术, 将包含编码蛋白质的 DNA 序列的转移载体转化到大肠杆菌宿主细胞中, 并从细胞中筛选包含断裂的 lacZ 基因 (其是重组杆状病毒的指示) 的杆粒。使用一般技术分离包含重组杆状病毒基因组的杆粒 DNA, 并用其转染草地贪夜蛾细胞, 如 Sf9 细胞。随后制备表达感兴趣蛋白质的重组病毒。重组病毒株通过本领域通常使用的方法制备。

[0172] 对于蛋白质制备, 重组病毒用于感染宿主细胞, 通常为衍生自草地贪夜蛾 (*Spodoptera fugiperda*) 的细胞系 (例如, Sf9 或 Sf21 细胞) 或衍生自粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 的细胞系 (例如, HIGH FIVE 细胞; Invitrogen, Carlsbad, CA)。一般参见 Glick 和 Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA* (ASM Press, Washington, D.C., 1994)。也参见美国专利号 5,300,435。无血清培养基用于培养和保持细胞。合适的培养基制剂是本领域已知的且可获自供应商。细胞从约 $2-5 \times 10^5$ 细胞的接种密度生长至 $1-2 \times 10^6$ 细胞的密度, 此时添加重组病毒株, 其感染复数 (MOI) 为 0.1 至 10, 更典型接近 3。使用的步骤通常描述于可用的实验室手册 (参见, 例如, King 和 Possee, 上文; O'Reilly 等人, 上文; Richardson, 上文)。

[0173] 真菌细胞, 包括酵母细胞, 也可用于本发明。在这方面感兴趣的酵母物种包括酿酒酵母, 毕赤酵母 (*Pichia pastoris*), 和甲醇毕赤酵母。用外源 DNA 转化酿酒酵母细胞和由此制备重组多肽的方法公开于, 例如, Kawasaki, 美国专利号 4,599,311; Kawasaki 等人, 美国专利号 4,931,373; Brake, 美国专利号 4,870,008; Welch 等人, 美国专利号 5,037,743; 和 Murray 等人, 美国专利号 4,845,075。依据由选择标记所确定的表型, 通常是药物抗性、或在特定营养素 (例如, 亮氨酸) 不存在的情况下生长的能力, 来选择转化的细胞。用于酿酒酵母的载体系统的实例为 Kawasaki 等人 (美国专利号 4,931,373) 公开的 POT1 载体系统, 其允许通过含葡萄糖的培养基中培养来选择转化的细胞。用于酵母的合适的启动子和终止子包括源自糖酵解酶基因 (参见, 例如, Kawasaki, 美国专利号 4,599,311; Kingsman 等人, 美国专利号 4,615,974; 和 Bitter, 美国专利号 4,977,092) 和醇脱氢酶基因的那些。另参见美国专利号 4,990,446; 5,063,154; 5,139,936; 和 4,661,454。其它酵母的转化体系, 包括多形汉逊酵母, 粟酒裂殖酵母, 乳酸克鲁维酵母, 脆壁克鲁维酵母, 玉米黑粉菌 (*Ustilago maydis*), 巴斯德毕赤酵母, 甲醇毕赤酵母, 季也蒙毕赤酵母, 和麦芽糖

假丝酵母是本领域已知的。参见,例如, Gleeson 等人, J. Gen. Microbiol. 132 :3459-3465, 1986 ;Cregg, 美国专利号 4, 882, 279 ;和 Raymond 等人, Yeast 14 :11-23, 1998。曲霉细胞可根据 McKnight 等人, 美国专利号 4, 935, 349 的方法使用。转化产黄顶孢霉 (*Acremonium chrysogenum*) 的方法公开于 Sumino 等人, 美国专利号 5, 162, 228。转化链孢霉的方法公开于 Lambowitz, 美国专利号 4, 486, 533。在甲醇毕赤酵母中制备重组蛋白质公开于美国专利 5, 716, 808 ;5, 736, 383 ;5, 854, 039 ;和 5, 888, 768。

[0174] 原核宿主细胞, 包括细菌大肠杆菌、芽孢杆菌属、和其它属也是本发明中可用的宿主细胞。转化这些宿主和表达其中克隆的外源 DNA 序列的技术是本领域已知的 (参见, 例如, Sambrook 等人, 上文)。当在细菌如大肠杆菌中表达重组蛋白质时, 该蛋白质可保持在细胞质中, 通常作为不可溶颗粒, 或可通过细菌分泌序列导至周质空间。在前一情形, 将细胞溶解, 回收颗粒并使用例如胍异硫氰酸酯或脲使其变性。然后变性的蛋白质可通过稀释变性剂 (例如, 通过对脲与还原型和氧化型的谷胱甘肽的組合的溶液透析, 然后对缓冲盐水溶液透析) 而重折叠和二聚化。或者, 该蛋白质可以可溶形式从细胞质回收, 并在不使用变性剂的情况下分离。蛋白质作为水提取物 (例如磷酸盐缓冲盐水中的水提取物) 从细胞回收。为了捕捉感兴趣的蛋白质, 将提取物直接施加至色谱介质, 如固定的抗体或肝素-Sepharose 柱。分泌的蛋白质可以以可溶的、有功能的形式从周质空间回收, 方法是破裂细胞 (通过, 例如, 超声处理或渗透压冲击) 以释放周质空间的内含物和回收蛋白质, 从而无需变性和重折叠。抗体, 包括单链抗体, 可在细菌宿主细胞中根据已知方法制备。参见, 例如, Bird 等人, Science 242 :423-426, 1988 ;Huston 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :5879-5883, 1988 ;和 Pantoliano 等人, Biochem. 30 :10117-10125, 1991。

[0175] 转化或转染的宿主细胞根据常规步骤在含营养素和所选宿主细胞的生长所需的其它组分培养基中培养。多种合适的培养基, 包括确定成分培养基和复合培养基, 是本领域已知的, 且通常包括碳源、氮源, 必需氨基酸, 维生素和矿物质。培养基可按需要包含生长因子或血清之类的成分。生长培养基通常会选择包含外源添加的 DNA 的细胞, 例如通过药物选择或必须营养素的缺乏, 该必须营养素通过表达载体携带的或者共转染到宿主细胞中的选择标记补充。

[0176] 包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白通过常规蛋白质纯化方法纯化, 通常通过色谱技术的组合纯化。一般参见 Affinity Chromatography: Principles & Methods (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988) ;Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (Springer-Verlag, New York 1994)。包含免疫球蛋白重链多肽的蛋白质可通过亲和色谱法在固定的蛋白质 A 上纯化。可采用进一步的纯化步骤, 如凝胶过滤, 来获得所需水平的纯度或提供脱盐, 缓冲液交换等。

[0177] 抗体可从细胞培养基通过已知方法, 如亲和色谱法使用常规柱和其它设备纯化。在典型的程序中, 收集条件化培养基, 且可将其在 4℃ 储存至多 5 天。为避免污染, 通常添加抑菌剂 (例如, 叠氮化钠)。降低培养基的 pH (通常至 Ph ~ 5.5), 如通过滴加冰醋酸。较低的 pH 提供通过蛋白 G 树脂的最佳的 IgG 俘获。该蛋白质 G 柱的尺寸基于条件化培养基的体积确定。用合适的缓冲液, 如 35mM NaPO₄, 120mM NaCl pH 7.2 中和填充好的柱子。然后使培养基通过中和的蛋白质 g 树脂, 流速由培养基体积和柱尺寸确定。保留穿透液以备

可能的再次过柱。然后将具有俘获的抗体的树脂冲洗成中和缓冲液。使用酸性洗脱缓冲液,如 0.1M 甘氨酸, pH 2.7 或等价物将柱子洗脱为级分。中和各级分,例如使用 2M tris, pH 8.0,以 tris : 甘氨酸的 1 : 20 比例。汇集包含蛋白质的级分(例如,基于 A_{280})。汇集的级分使用脱盐柱缓冲液交换至合适的缓冲液,如 35mM NaPO_4 , 120mM NaCl pH 7.2。通过 A_{280} 使用消光系数 1.44 测定浓度。内毒素水平可通过 LAL 测定法确定。纯化蛋白质可冷冻储存,通常在 -80°C 。

[0178] 表达功能性 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的细胞在筛选测定中使用。多种合适的测定是本领域已知的。这些测定基于对靶细胞中生物响应的检测。一种这样的测试为细胞增殖测试。在存在或不存在测试化合物的情况下培养细胞,且通过,例如,测量氘化的胸苷的掺入或通过基于 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溴化物 (MTT) 的代谢分解的比色测定细胞增殖 (Mosman, J. Immunol. Meth. 65 :55-63, 1983) 检测。一种备选的测定法形式使用进一步工程化以表达报道基因的细胞。该报道基因连接于对受体连接的途径响应的启动子元件,该测定法检测该报道基因的转录的活化。在此方面,优选的启动子元件为血清响应元件,或称 SRE。(参见,例如,Shaw 等人,Cell 56 :563-572,1989)。优选的该报道基因是荧光素酶基因。(参见 de Wet 等人,Mol. Cell. Biol. 7 :725,1987.)。使用本领域已知方法通过发光检测荧光素酶基因的表达。(参见,例如,Baumgartner 等人,J. Biol. Chem. 269 :29094-29101,1994;Schenborn 和 Goiffin, Promega Notes 41 :11,1993.)。荧光素酶活性测定试剂盒可购自,例如, Promega Corp., Madison, WI。该类型的靶细胞系可用于筛选化学物质库,细胞条件化的培养基,真菌培养液,土壤样,水样,等。例如,可在靶细胞上测定细胞条件化的培养基样品的库以鉴别产生配体的细胞。然后用阳性细胞在哺乳动物表达载体中产生 cDNA 文库,将文库分池 (pools),转染到宿主细胞中,表达。然后测定转染的细胞的培养基样品,随后进一步分池,再转染,传代培养,且重新测定阳性细胞以分离编码配体的克隆 cDNA。

[0179] IV. 治疗方法

[0180] A. 概述

[0181] 在另一方面,本发明提供抑制血管发生的方法,特别是治疗与血管发生相关的疾病或疾患的方法。一般而言,该方法包括向受试者施用可有效抑制血管发生的量的包含双特异性抗体 / 可溶受体组合的双特异性结合蛋白。更具体地,对于治疗用途,将该双特异性结合蛋白施用于患有,或有升高的风险患上以血管发生增加为特征的疾病或疾患(“新生血管疾病”)的患者。适合根据本发明治疗的新生血管疾病包括,例如,以实体瘤生长为特征的癌症(例如,胰腺癌,肾细胞癌 (RCC),结肠直肠癌,非小细胞肺癌 (NSCLC),成胶质细胞瘤,和胃肠道间质瘤 (GIST)) 以及多种新生血管眼病(例如,年龄相关的黄斑变性,糖尿病性视网膜病,虹膜新生血管形成,和新生血管性青光眼)。其它适合根据本发明治疗的新生血管疾病包括,例如,类风湿性关节炎,银屑病,动脉粥样硬化,慢性炎症,肺炎,先兆子痫,心包渗漏(如与心包炎相关的),和胸腔积液。

[0182] 在本文所述治疗方法的每一实施方案中,包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白的递送方式符合与寻求治疗的疾病或疾患的管理相关的常规方法学。根据本文的公开,在足以预防或治疗疾病或疾患的条件下、以足以预防或治疗疾病或疾患的时间向需要该治疗的受试者施用有效量的拮抗剂。

[0183] 施用本文描述的双特异性结合蛋白的受试者包括有较高的风险发生特定的与血管发生相关的疾病或疾患的患者,也包括表现出现有的新生血管疾病的患者。在某些实施方案中,该受试者已诊断为患有寻求治疗的疾病或疾患。而且,可在治疗过程中监测受试者任何疾病或疾患的变化(例如,监测疾病或疾患的临床症状的增加或减少)。

[0184] 在预防性的应用中,将药物组合物或药物施用于对特定疾病易感或具有其他风险的患者,施用的量足以消除或减少疾病的风险或延迟疾病的发生。在治疗性的应用中,将组合物或药物施用于疑似患有,或已患有该疾病的患者,施用的量足以治愈,或至少部分阻止该疾病症状及其并发症。足以实现该目的的量称为治疗有效量或药物有效量。在预防和治疗方案两者中,药物通常施用多个剂量直到达到充分的响应(例如,抑制不合适的血管发生活性)。通常,监测该响应,如果期望响应开始消退则给予重复的剂量。

[0185] 为鉴别用于根据本发明的方法治疗的受试患者,可使用公认的筛选方法来确定与特定的新生血管疾病相关的风险因素或确定受试者中确认的已有疾病的状态。这样的方法可包括,例如,确定个体是否有亲属被诊断有特定疾病。筛选方法还可包括,例如,对已知具有可遗传的成分的具体疾病进行常规病情检查以确定家族状态。例如,多种癌症还已知具有某些可遗传的成分。癌症的可遗传的成分包括,例如,多种转化中的基因(例如,Ras, Raf, EGFR, cMet,及其他)内的突变,某些 HLA 和杀伤抑制性受体(KIR)分子的有无,或癌细胞能直接或间接调节细胞如 NK 细胞和 T 细胞的免疫抑制的机理(参见,例如,Ljunggren 和 Malmberg, *Nature Rev. Immunol.* 7 :329-339, 2007 ;Boyton 和 Altmann, *Clin. Exp. Immunol.* 149 :1-8, 2007)。为此目的,可常规性地使用核苷酸探针鉴定携带与感兴趣的具体疾病相关的遗传标记的个体。此外,很多种免疫方法是本领域已知的,可用于鉴别特定疾病的标记。例如,有多种 ELISA 免疫测定方法可以使用,且为本领域公知,这些方法使用单克隆抗体探针检测与特定肿瘤相关的抗原。可按照已知的患者症状,年龄因素,相关风险因素等的指示来实施筛选。这些方法允许临床医师常规地选择需要本文所述治疗方法的患者。根据这些方法,血管发生的抑制可作为独立治疗过程进行,或作为其它治疗的后续的、辅助的、或协同的治疗方案。

[0186] 对于施用,该包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白配制为药物组合物。包含双特异性 VEGF-A 抗体 / FGFR 可溶受体组合的药物组合物可根据已知方法配制以制备可药用组合物,其中将治疗分子与可药用的载体组合为混合物。如果组合物的施用可被接受的患者耐受,则其称为“可药用的载体”。无菌磷酸盐缓冲盐水为可药用的载体的一个实例。其它合适的载体是本领域技术人员众所周知的。(参见,例如,Gennaro(ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995))。制剂可进一步包括一种或多种赋形剂,防腐剂,增溶剂,缓冲剂,用于防止小瓶表面上蛋白质损失的白蛋白等。单特异性拮抗剂可单独配制或以组合制剂提供。

[0187] 包含含有 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白的药物组合物以有效量施用于受试者。根据本发明的方法,拮抗剂可通过多种施用方式施用于受试者,包括例如,肌内,皮下,静脉内,心房内,关节内,肠胃外,鼻内,肺内,经皮,胸膜内,鞘内,和口腔施用途径。对于治疗新生血管眼病的药物用途,该双特异性结合蛋白通常根据常规方法配制为用于玻璃体内注射。对于治疗和预防目的,拮抗剂可以以下方式施用于受试者:单次推注递送、长时间连续递送(例如,连续经皮递送),或以重复的施用方案

(例如,基于每小时,每日,或每周)。

[0188] 组合物的“治疗有效量”是产生统计学显著效果的量,如疾病进展的统计学显著减少或器官功能的统计学显著改善。精确剂量将通过临床医师根据公认的标准确定,其中考虑治疗症状的性质和严重性、患者特征等。剂量的确定在本领域技术人员水平范围内。

[0189] 此语境中有效剂量的确定通常基于动物模型研究,然后是人体临床试验,并通过确定可显著减少模型受试者中受试者疾病或疾患的发生或严重性的有效剂量和施用方案来指导。本发明的组合物的有效剂量根据多种不同的因素改变,包括施用手段,靶位点,患者生理状态,患者为人还是动物,施用的其它药物,该治疗为预防性还是治疗性,以及组合物本身具体活性及其在个体中引起所需响应的能力。通常,该患者是人,但在一些疾病中,该患者可为非人哺乳动物。通常,对剂量方案进行调节以提供最佳治疗响应,即,优化安全性和功效。因此,治疗性或预防性有效量也是这样的量,其中抑制血管发生的有利作用大于任何不想要的副作用。对于施用包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白,剂量通常为约 0.1 μ g 至 100mg/kg 或 1 μ g/kg 至约 50mg/kg,更通常为 10 μ g 至 5mg/kg 受试者体重。在更具体的实施方案中,药物的有效量为约 1 μ g/kg 至约 20mg/kg,约 10 μ g/kg 至约 10mg/kg,或约 0.1mg/kg 至约 5mg/kg。该范围的剂量可通过单一或多次施用实现,包括,例如,每日施用多次或每日、每周、每两周或每月施用一次。例如,在某些变化形式中,施用方案由初始施用和之后的间隔一周或两周的多次施用组成。另一方案由初始施用和之后的间隔一月或两月的多次施用组成。或者,施用可以是不规则的,通过监测 NK 细胞活性和 / 或疾病或疾患的临床症状来指示。

[0190] 药物组合物的剂量可由主治医师加以改变以保持靶位处所需的浓度。例如,如果选择静脉内递送模式,靶组织处血流中药物的局部浓度可为约 1-50 纳摩尔组合物 / 升,有时为约 1.0 纳摩尔 / 升至 10,15,或 25 纳摩尔 / 升,取决于受试者的状态和预计的测量响应。可基于递送方式(例如是经表皮递送还是递送至粘膜的表面)选择较高或较低浓度。剂量也应基于施用的制剂(例如,鼻喷雾剂对粉末,缓释口服或注射颗粒,经皮制剂等)的释放速率而调节。为达到相同的血清浓度水平,例如,释放速率为 5 纳摩尔(标准条件下)的缓慢释放颗粒的施用剂量为释放速率为 10 纳摩尔的颗粒的剂量的约两倍。

[0191] 包括含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白的药物组合物可以以液体形式、喷雾剂或固体形式提供。液体形式的实例为可注射溶液、气雾剂、滴液、表面用溶液和口服悬液。示例性的固体形式包括胶囊、片剂和控释形式。后一形式的示例有微渗透压泵和植入物。(参见,例如,Bremer 等人,Pharm. Biotechnol. 10 :239,1997 ; Ranade, Drug Delivery Systems 95-123 中的“Implants in Drug Delivery,”(Ranade 和 Hollinger, eds., CRC Press 1995) ;Bremer 等人,Protein Delivery :Physical Systems 239-254 中的“Protein Delivery with Infusion Pumps,”(Sanders 和 Hendren, eds., Plenum Press 1997) ;Yewey 等人,Protein Delivery :Physical Systems 93-117 中的“Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant,”(Sanders 和 Hendren, eds., Plenum Press 1997))。其它固体形式包括乳膏,糊剂,其它表面敷剂等。

[0192] 脂质体提供了一种手段来向受试者递送治疗多肽,例如,静脉内递送,向腹膜内递送,鞘内递送,肌肉内递送,皮下递送,或通过口服施用、吸入、或鼻内施用递送。脂质体为微囊泡,其由围绕着水性隔室的一个或多个脂质双层组成。(参见,一般性的,

Bakker-Woudenberg 等人, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12(Suppl. 1):S61, 1993; Kim, *Drugs* 46:618, 1993; Ranade, *Drug Delivery Systems* 3-24 中的“Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers,” (Ranade 和 Hollinger, eds., CRC Press 1995)。脂质体的组成与细胞膜相似, 因此, 脂质体可安全施用且生物可降解。取决于制备方法, 脂质体可为单层的或多层的, 且脂质体的尺寸可变化, 直径从 $0.02\ \mu\text{m}$ 至大于 $10\ \mu\text{m}$ 不等。多种试剂可包囊在脂质体中: 疏水试剂分配在双层中, 而亲水性试剂分配在内部水性空间中。(参见, 例如, Machy 等人, *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987); Ostro 等人, *American J. Hosp. Pharm.* 46:1576, 1989)。而且, 可通过改变脂质体尺寸、双层的数量、脂质组成、以及脂质体的电荷和表面特征来控制包囊的试剂的治疗可利用度 (therapeutic availability)。

[0193] 脂质体可吸附至几乎任何类型的细胞, 然后缓慢释放包囊的试剂。或者, 吸附的脂质体可被吞噬性的细胞内吞。内吞作用之后发生脂质体脂质的溶酶体内降解和包囊的试剂的释放 (参见 Scherphof 等人, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 446:368, 1985)。静脉内施用后, 小的脂质体 (0.1 至 $1.0\ \mu\text{m}$) 通常被主要位于肝和脾中网状内皮系统的细胞所摄取, 而大于 $3.0\ \mu\text{m}$ 的脂质体沉积在肺中。网状内皮系统的细胞对较小脂质体的这种优先吸收作用已经被利用来将化学治疗剂递送至巨噬细胞和肝的肿瘤。

[0194] 可通过多种方法避开网状内皮系统, 包括用大剂量的脂质体颗粒饱和, 或通过药理手段选择性地对巨噬细胞灭活 (参见 Claassen 等人, *Biochim. Biophys. Acta* 802:428, 1984)。此外, 已显示将用糖脂或聚乙二醇衍生化的磷脂掺入脂质体膜可导致网状内皮系统的吸收显著减少 (参见 Allen 等人, *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133, 1991; Allen 等人, *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9, 1993)。

[0195] 也可在制备脂质体时通过改变磷脂组成或向脂质体插入受体或反受体 (counter-receptors) 以靶向特定细胞或器官。例如, 制备为带有高含量非离子表面活性剂的脂质体已被用于靶向肝。(参见, 例如, Hayakawa 等人的日本专利 04-244, 018; Kato 等人, *Biol. Pharm. Bull.* 16:960, 1993)。这些制剂通过以下方式制备: 在甲醇中混合大豆磷脂酰胆碱、 α -生育酚和乙氧基化氢化蓖麻油 (HCO-60), 真空浓缩该混合物, 然后用水复原该混合物。二棕榈酰基磷脂酰胆碱 (DPPC) 和大豆衍生的甾酰基葡萄糖苷混合物 (SG) 和胆固醇 (Ch) 的脂质体制剂已显示靶向肝。(参见 Shimizu 等人, *Biol. Pharm. Bull.* 20:881, 1997)。

[0196] 或者, 可将多种靶向性反受体连接于脂质体的表面, 如抗体, 抗体片段, 碳水化合物, 维生素, 和转运蛋白。例如, 为了靶向肝脏, 可用支链型的半乳糖基脂质衍生物修饰脂质体以靶向脱唾液酸糖蛋白 (半乳糖) 受体, 此类受体仅在肝细胞表面表达。(参见 Kato 和 Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:287, 1997; Murahashi 等人, *Biol. Pharm. Bull.* 20:259, 1997)。根据一种更通用的组织靶向方法, 用对靶细胞表达的反受体特异的生物素化抗体预先标记靶细胞。(参见 Harasym 等人, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99, 1998)。血浆清除游离抗体后, 施用链亲和素缀合的脂质体。在另一方法中, 将靶向性抗体直接连接至脂质体。(参见 Harasym 等人, 上文)。

[0197] 多肽和抗体可使用蛋白质微囊化的标准技术包封在脂质体中。(参见, 例如, Anderson 等人, *Infect. Immun.* 31:1099, 1981; Anderson 等人, *Cancer Res.* 50:

1853,1990 ;Cohen 等人, *Biochim. Biophys. Acta* 1063 :95,1991 ;Alving 等人 *Liposome Technology* (Vol. III)317 中的“Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies,”(Gregoriadis,ed.,CRC Press,2nd ed.1993) ;Wassef 等人,*Meth. Enzymol.* 149 :124,1987.)。如上所述,治疗上有用的脂质体可包含多种组分。例如,脂质体可包含聚(乙二醇)的脂质衍生物。(参见 Allen 等人,*Biochim. Biophys. Acta* 1150 :9,1993)。

[0198] 已设计了可降解聚合物微球以保持治疗蛋白质的高全身水平。微球从可降解聚合物制备,如丙交酯乙交酯共聚物 (PLG),聚酸酐,聚(原酸酯),非生物可降解的乙基乙酸乙酯聚合物,其中蛋白质圈闭在聚合物中。(参见,例如,Gombotz 和 Pettit,*Bioconjugate Chem.* 6 :332,1995 ;Ranade,“Role of Polymers in Drug Delivery,”in *Drug Delivery Systems* 51-93(Ranade 和 Hollinger, eds., CRC Press 1995) ;Roskos and Maskiewicz,“Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery,”in *Protein Delivery :Physical Systems* 45-92(Sanders 和 Hendren, eds., Plenum Press 1997) ;Bartus 等人, *Science* 281:1161,1998 ;Putney and Burke, *Nature Biotechnology* 16 :153,1998 ;Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2 :548,1998)。聚乙二醇 (PEG) 包被的纳米球也可提供静脉内施用治疗蛋白质的载体。(参见,例如,Gref 等人,*Pharm. Biotechnol.* 10 :167,1997)。

[0199] 本领域技术人员可设计其它剂型,例如可见,Ansel 和 Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*(Lea & Febiger,5th ed.1990) ;Gennaro(ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*(Mack Publishing Company,19th ed.1995),和 Ranade 和 Hollinger, *Drug Delivery Systems*(CRC Press 1996)。

[0200] 本文所述的药物组合物也可在联合治疗的背景下使用。术语“联合治疗”在本文使用时,是指对受试者施用至少一个治疗有效剂量的包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白和另一治疗剂。例如,在癌症免疫治疗的背景下,包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白的组合物可用作血管发生抑制剂与化疗或放射联合。包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白可与常规类型的化疗或放射协同作用。该双特异性结合蛋白可进一步减少肿瘤负担并可使得化疗剂的杀灭作用更有效。

[0201] 显示血管发生抑制活性的本发明的组合物也可与免疫调节化合物(包括多种细胞因子和共刺激 / 抑制分子)联合使用。它们可包括,但不限于,使用刺激抗癌免疫应答的细胞因子。例如,组合使用 IL-2 和 IL-12 在 T- 细胞淋巴瘤,鳞状上皮细胞癌,和肺癌中显示有益作用。(参见 Zaki 等人, *J. Invest. Dermatol.* 118 :366-71,2002 ;Li 等人, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 127 :1319-24,2001 ;Hiraki 等人, *Lung Cancer* 35 :329-33,2002)。此外,VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白可与共刺激基于免疫的效应细胞上发现的多种细胞表面分子的试剂组合,如 CD137 的活化。(参见 Wilcox 等人, *J. Clin. Invest.* 109 :651-9,2002) 或 CTLA4 的抑制 (Chambers 等人, *Ann. Rev. Immunol.* 19 :565-94,2001)。或者,包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白可与通过与 TRAIL- 相关的受体的相互作用诱导肿瘤细胞凋亡的试剂一起使用。(参见,例如,Takeda 等人, *J. Exp. Med.* 195 :161-9,2002 ;Srivastava, *Neoplasia* 3 :535-46,2001)。这样的试剂包括 TRAIL 配体,TRAIL 配体-Ig 融合物,抗 TRAIL 抗体,等。

[0202] 在其它变化形式中,包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白与不特异靶向血管发生的单克隆抗体治疗联合使用。该联合治疗特别用于治疗癌症,其中使用单克隆抗体,特别是针对肿瘤表达的抗原的抗体,正在成为对许多肿瘤(包括乳腺细胞癌(曲妥单抗或 HERCEPTIN®)和结肠癌(西妥昔单抗或 ERBITUX®))的标准做法。

[0203] 药物组合物可作为试剂盒提供,该试剂盒包含含本文所述的治疗组合物的容器。治疗组合物可提供为,例如,单剂或多剂施用的可注射溶液形式,或作为在注射前复原的无菌粉末。或者,该试剂盒可包括用于施用治疗组合物的干粉分散器,液体气雾剂发生器,或喷雾器。该试剂盒可进一步包含关于适应症和药物组合物的用途的书面信息。

[0204] B. 癌症治疗

[0205] 1. 癌症类型

[0206] 根据本发明可治疗的癌症包括以实体瘤的存在为特征的癌症。如前人讨论的,肿瘤组织中血管的量是涉及实体瘤形成的癌症的强的负面预后指标(参见,例如,Weidner 等人, (1992), 上文 ;Weidner 等人, (1993), 上文 ;Li 等人, 上文 ;Foss 等人, 上文),且 VEGF 和 FGF 信号分子家族都显示出在实体瘤相关的新血管形成中起关键作用。下表 4 列出一些特征为实体瘤形成的癌症,主要通过靶组织分类。

[0207] 表 4 :涉及实体瘤形成的示例性癌症

[0208]

1. 头颈部癌症
 - a. 脑
 - b. 口腔
 - c. 口咽
 - d. 鼻咽
 - e. 下咽
 - f. 鼻腔和鼻窦
 - g. 喉
 - h. 唇
2. 肺癌症
 - a. 非小细胞癌
 - b. 小细胞癌
3. 胃肠道癌症
 - a. 结肠直肠癌
 - b. 胃癌
 - c. 食管癌
 - d. 肛门癌
 - e. 肝外胆管癌
 - f. 胰腺癌
 - g. 胃肠道间质瘤 (GIST)

[0209]

- 4. 肝癌症
 - a. 肝细胞腺瘤
 - b. 肝细胞癌
- 5. 乳腺癌症
- 6. 妇科癌症
 - a. 子宫颈癌
 - b. 卵巢癌
 - c. 阴道癌
 - d. 外阴癌症
 - e. 妊娠性滋养层细胞瘤形成
 - f. 子宫癌
- 7. 泌尿道癌症
 - a. 肾癌
 - b. 前列腺癌
 - c. 膀胱癌
 - d. 阴茎癌
 - e. 尿道癌
- 8. 膀胱癌症
- 9. 神经肿瘤
 - a. 星形细胞瘤和成胶质细胞瘤
 - b. 原发性 CNS 淋巴瘤
 - c. 成神经管细胞瘤
 - d. 生殖细胞瘤
 - e. 视网膜母细胞瘤
- 10. 内分泌瘤
 - a. 甲状腺癌
 - b. 胰腺癌
 - 1) 胰岛细胞肿瘤
 - a) 胰岛素瘤
 - b) 胰高血糖素瘤
 - c. 嗜铬细胞瘤
 - d. 肾上腺癌
 - e. 类癌瘤
 - f. 甲状旁腺癌

[0210]

- g. 松果腺瘤
- 11. 皮肤癌症
 - a. 恶性黑素瘤
 - b. 鳞状上皮细胞癌
 - c. 基底细胞癌
 - d. 卡波西肉瘤
- 12. 骨癌症
 - a. 成骨细胞瘤
 - b. 骨软骨瘤
 - c. 骨肉瘤
- 13. 结缔组织瘤
 - a. 软骨母细胞瘤
 - b. 软骨瘤
- 14. 儿童期癌症
 - a. 脑癌
 - b. 神经母细胞瘤
 - c. 维尔姆斯瘤(肾胚细胞瘤)
 - d. 横纹肌肉瘤
 - e. 视网膜母细胞瘤
- 15. 免疫治疗敏感性癌症
 - a. 黑素瘤
 - b. 肾癌
 - c. 乳腺癌
 - d. 前列腺癌
 - e. 结肠直肠癌
 - f. 子宫颈癌
 - g. 卵巢癌
 - h. 肺癌

[0211] 因此,在某些实施方案中,本文所述的包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白用于治疗特征为存在实体瘤的癌症,例如,表 4 所列的任一癌症。例如,在一些实施方案中,要根据本发明治疗的癌症选自下列:头颈部癌症(例如,口腔,口咽,鼻咽,下咽,鼻腔或鼻旁窦,喉,唇,或唾液腺的癌症);肺癌(例如,非小细胞肺

癌,小细胞癌,或间皮瘤);胃肠道癌(例如,结肠直肠癌,胃癌,食管癌,或肛门癌);胃肠道间质瘤(GIST);胰腺癌;胰腺腺泡细胞癌;小肠的癌症;肝癌或胆系癌(例如,肝细胞腺瘤,肝细胞癌,血管肉瘤,肝外或肝内胆管肉瘤,法特壶腹癌,或胆囊癌);乳腺癌(例如,转移性乳腺癌或炎性乳腺癌);妇科癌症(例如,子宫颈癌,卵巢癌,输卵管癌,腹膜癌,阴道癌,外阴癌,妊娠性滋养层细胞瘤形成,或子宫癌,包括子宫内膜癌或子宫肉瘤);泌尿道癌症(例如,前列腺癌;膀胱癌;阴茎癌;尿道癌,或肾癌,例如,肾细胞癌或移行细胞癌,包括肾盂和输尿管);睾丸癌;中枢神经系统(CNS)癌症如颅内肿瘤(例如,星形细胞瘤,间变性星形细胞瘤,成胶质细胞瘤,少突胶质细胞瘤,间变性少突胶质细胞瘤,室管膜瘤,原发性CNS淋巴瘤,成神经管细胞瘤,生殖细胞瘤,松果腺瘤,脑膜瘤,垂体肿瘤,神经鞘肿瘤(例如,神经鞘瘤),脊索瘤,颅咽管瘤,脉络丛肿瘤(例如,脉络丛癌);或其它神经元或神经胶质起源的颅内肿瘤)或脊髓肿瘤(例如,神经鞘瘤,脑膜瘤);内分泌瘤(例如,甲状腺癌,例如,甲状腺癌,髓样癌症,或甲状腺淋巴瘤;胰腺内分泌肿瘤,例如,胰岛素瘤或胰高血糖素瘤;肾上腺癌,例如,嗜铬细胞瘤;类癌瘤;或甲状旁腺癌);皮肤癌(例如,鳞状上皮细胞癌;基底细胞癌;卡波西肉瘤;或恶性黑色素瘤,例如,眼内黑色素瘤);骨癌(例如,骨肉瘤,例如,骨肉瘤,骨软骨瘤,或尤因氏肉瘤);多发性骨髓瘤;绿色瘤;软组织肉瘤(例如,纤维性肿瘤或纤维组织细胞瘤);平滑肌或骨骼肌肿瘤;血液或淋巴管血管周围肿瘤(例如,卡波西肉瘤);滑膜肿瘤;间皮瘤;神经肿瘤;副神经节肿瘤;骨骼外软骨或骨肿瘤;和多能间质瘤。

[0212] 在一些变化形式中,待治疗的癌症是儿童期癌症,例如,脑癌,神经母细胞瘤,维尔姆斯瘤(肾胚细胞瘤),横纹肌肉瘤,视网膜母细胞瘤,或肝母细胞瘤。

[0213] 在其它变化形式中,癌症为免疫治疗敏感性癌症,例如,黑色素瘤,肾癌,乳腺癌,前列腺癌,结肠直肠癌,子宫颈癌,卵巢癌,或肺癌。

[0214] 在以下进一步详细描述上述癌症中的一些,包括一些评价 VEGF-A 抗体/可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白对肿瘤响应的作用的相关动物模型。

[0215] a. 前列腺癌

[0216] 前列腺癌是男性生殖系统中发现于膀胱下侧、直肠之前的一个腺体中的异常生长。几乎所有前列腺癌都产生自前列腺中的分泌性腺细胞,因此都是前列腺腺癌。在美国,前列腺癌症是男性中的普通恶性癌症,仅次于肺癌。前列腺癌主要为老年男性的肿瘤,当扩散时其经常响应于治疗,且当局部化时可被治愈。估计 17% 的男性将在一生中被诊断出前列腺癌。该肿瘤通常作为小的、界限清楚的病变发生,且可经常作为多发性原发肿瘤存在(Villers 等人, 1992)。进展在局部和远端都发生,通常达到精囊、射精管和骨盆淋巴结,在更晚期达到骨、肝和肺。一旦转移发生,癌细胞增殖的速率加快。

[0217] 包含可溶 FGF 受体和抗 VEGF-A 抗体的双特异性结合组合物对肿瘤响应的作用可在小鼠模型中评估,有可用的前列腺癌小鼠模型(Ahmad 等人综述, Expert Rev Mol Med, 10:e16(2008)),在实施例 12 中有提供。

[0218] b. 黑色素瘤

[0219] 浅表性播散性黑色素瘤是最普通类型的黑色素瘤。约十分之七(70%)为该类型。它们最经常发生于中年人。最通常的位置为女性的腿上,而男性中其更通常在躯干上,特别是背部。它们开始时往往穿过皮肤表面扩散,这被称为放射生长期。如果在该阶段去除色素

瘤,治愈的几率非常高。如果不去除黑素瘤,其将开始向下更深地生长进入皮肤层。然后它就有在血流或淋巴系统中扩散至身体其它部分的风险。结节性黑素瘤最通常在胸或背上发生。其最通常发现于中年人。如果不去除,其容易很快地生长进入皮肤深处。该类型的黑素瘤经常从皮肤表面凸起,触觉像肿块。可为极深褐-黑色或黑色。恶性雀斑样黑素瘤最经常存在于脸上,特别是老年人。其生长缓慢,发展可历时数年。肢端黑素瘤通常存在于手掌,足底或趾甲周围。其它的极少见类型的皮肤黑素瘤包括无黑色素性黑素瘤(其中黑素瘤失去其色素且呈现白色区域)和结缔组织增生性黑素瘤(其包括纤维疤组织)。恶性黑素瘤可从皮肤之外的身体部分发生,但这非常少见。可能受影响的身体部分为眼、口、指(趾)甲下(称为甲下黑素瘤)、外阴或阴道组织,或身体内部。

[0220] 大多数黑素瘤首先是正常皮肤外观的变化。这可看起来像异常的新痣。少于三分之一在现有的痣中发生。可能难以认出痣和黑素瘤的差异,但可使用以下清单辅助。其已知为 ABCD 清单。不对称性-普通的痣通常形状对称。黑素瘤很可能为不规则的或不对称的。边界-痣通常具有界限清晰的规则边界。黑素瘤更可能具有锯齿状边缘的不规则边界。颜色-痣通常为均匀棕色的。黑素瘤倾向于具有多于一种颜色。它们可以有不同的色调,棕色混合有黑、红、粉、白色或淡蓝色。直径-痣通常不大于铅笔的平端(径向约 6mm)。黑素瘤通常直径大于 7mm。通常痣可从皮肤凸起和/或可有毛。搔痒、结痂或出血也可发生于黑素瘤-这些是较少出现的迹象但不应忽视(cancerbacup 互联网网站)。包含 VEGF-A 抗体/可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白对肿瘤响应的作用可在类似于下列文献中所述的鼠黑素瘤模型中评估 Hermans 等人, *Cancer Res.* 63 :8408-13, 2003 ; Ramont 等人, *Exp. Cell. Res.* 29 :1-10, 2003 ; Safwat 等人, *J. Exp. Ther. Oncol.* 3 :161-8, 2003 ; 和 Fidler, *Nat New Biol.* 242 :148-9, 1973。

[0221] c. 肾细胞癌

[0222] 肾细胞癌为涉及肾小管细胞中的癌性变化的肾癌形式,其为成人肾癌的最普遍形式。细胞为什么会变为癌性还未知。吸烟史极大增加发生肾细胞癌的风险。一些人也可能自遗传获得了发生肾细胞癌的增加的风险,且家族肾癌病史增加该风险。患有希普尔病(一种影响脑毛细血管的遗传疾病)的人,通常也发生肾细胞癌。需要透析治疗的肾疾病也增加发生肾细胞癌的风险。最初症状通常为尿血。有时两个肾都受累。该癌症容易转移或扩散,最经常转移或扩散至肺和其它器官,且约三分之一的患者在诊断时已转移(Medline Plus Medical Encyclopedia 网站)。包含 VEGF-A 抗体/可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白对肿瘤响应的作用可在类似于下列文献中所述的鼠肾细胞癌模型中评估:Sayers 等人, *Cancer Res.* 50 :5414-20, 1990 ; Salup 等人, *Immunol.* 138 :641-7, 1987 ; 和 Luan 等人, *Transplantation* 73 :1565-72, 2002。

[0223] d. 子宫颈癌

[0224] 子宫颈为通向阴道的子宫的颈部。子宫颈癌,也称为宫颈癌,发生自子宫颈表面的异常细胞。子宫颈癌是影响女性的最常见癌症之一。在子宫颈癌发生之前通常有发育异常,子宫颈表面细胞的癌前变化。这些异常细胞可发展为浸润性癌症。一旦该癌症出现,其可经由四个阶段进展。这些阶段是根据癌症扩散的程度定义的。癌症扩散得越多,治疗可能约深切。子宫颈癌有两种主要类型:(1)鳞状类型(表皮样癌):这是最常见的类型,占子宫颈癌的约 80%至 85%。该癌症可由性传播疾病引起。一种这样的性病为人乳头状瘤病毒,其

引起尖锐湿疣。该癌症肿瘤在子宫颈上生长并进入子宫颈。该癌症通常起始于子宫颈表面且可在早期通过巴氏涂片诊断。(2) 腺癌：该类型的子宫颈癌发生于子宫颈管中的宫颈腺的组织。早期子宫颈癌通常不引起症状。该癌症通常通过巴氏涂片和骨盆检查检测。这就是为什么你一旦有性活动就应开始进行巴氏涂片和骨盆检查的原因。从未有性活动的健康年轻女性应在 18 岁之前进行首次每年的骨盆检查。晚期子宫颈癌引起异常阴道出血或在预期外的时间（如月经期之间，性交后，或绝经后）排出血污。异常阴道排放可为混浊的或带血的或可包含具有恶味的粘液。癌症晚期可引起疼痛（University of Michigan Health System 网站）。包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白对肿瘤响应的作用可在类似于下列文献中所述的鼠子宫颈癌模型中评估：Ahn 等人, Hum. Gene. Ther. 14 :1389-99, 2003 ;Hussain 等人, Oncology 49 :237-40, 1992 ;和 Sengupta 等人, Oncology 48 :258-61, 1991。

[0225] e. 头颈部肿瘤

[0226] 大多数头颈部癌症是称为“癌”(carcinoma) 的类型（特别是鳞状上皮细胞癌）。头颈部的癌起源于构成口、鼻、喉或耳的内层，或覆盖舌的表面层的细胞。然而，头颈部癌症可发生于其它类型的细胞。淋巴瘤发生于淋巴系统细胞。肉瘤发生于构成肌肉、软骨或血管的支持性细胞。黑素瘤起始于称为黑素细胞的细胞，这类细胞给予眼和皮肤颜色。头颈部的癌症的症状将取决于其位置 - 例如，舌癌可引起一些语言迟钝。最通常的症状为发生的头或颈的、几周内不痊愈的溃疡或损伤区域；吞咽困难，或咀嚼或吞咽时疼痛；呼吸或讲话困难，如持续性呼吸杂音，语言迟钝或嘶哑；口中麻木感觉；持续鼻塞，或鼻出血；持续耳痛，耳鸣，或听力困难；口或颈肿胀或肿块；面部或上颌疼痛；在吸烟或咀嚼烟草的人群中，癌前变化可发生于口的衬里，或在舌上。这些可显现为持续白斑（粘膜白斑病）或红斑（粘膜红斑病）。它们通常不疼但有时会溃疡且可出血（Cancerbacup 网站）。包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白对肿瘤响应的作用可在类似于下列文献中所述的鼠头颈肿瘤模型中评估：Kuriakose 等人, Head Neck 22 :57-63, 2000 ;Cao 等人, Clin. Cancer Res. 5 :1925-34, 1999 ;Hier 等人, Laryngoscope 105 :1077-80, 1995 ;Braakhuis 等人, Cancer Res. 51 :211-4, 1991 ;Baker, Laryngoscope 95 :43-56, 1985 ;和 Dong 等人, Cancer Gene. Ther. 10 :96-104, 2003。

[0227] f. 脑癌

[0228] 已知脑组织中产生的肿瘤称为脑的原发性肿瘤。原发性脑肿瘤根据其发源的细胞类型或其产生的脑的部位命名。最常见的原发性脑肿瘤为神经胶质瘤。它们产生于胶质细胞。神经胶质瘤有许多类型。(1) 星形细胞瘤 - 该肿瘤产生自呈星形的胶质细胞，称为星形细胞。在成人中，星形细胞瘤最经常产生自大脑。在儿童中，它们发生于脑干、大脑和小脑。III 级星形细胞瘤有时称为间变性星形细胞瘤。IV 级星形细胞瘤通常称为多形性星形细胞瘤。(2) 脑干神经胶质瘤 - 该肿瘤发生于脑最下方的部分。脑干神经胶质瘤最经常在幼儿和中年成人中诊断出。(3) 室管膜瘤 - 该肿瘤产生自脑室或脊髓中心管的衬底细胞。它们最常见于儿童和年轻成人。(4) 少突胶质细胞瘤 - 这种罕见的肿瘤是由生成覆盖和保护神经的脂肪物质的细胞发生的。这些肿瘤通常发生于大脑中。它们生长缓慢且通常不扩散进入周围脑组织。它们在中年成人中最普遍。脑肿瘤的症状取决于肿瘤尺寸、类型和位置。当肿瘤压迫神经或损伤某一区域的脑时可引起症状。当脑肿胀或液体在颅骨中累积时也可产生症

状。这些是最常见的脑肿瘤症状：头痛（通常在早晨更严重）；恶心或呕吐；语言、视觉、或听觉的改变；平衡或行走问题；情绪、个性、或集中能力的改变；记忆问题；肌肉跳动或颤搐（癫痫发作或惊厥）；和手臂或腿的麻木或麻刺感（National Cancer Institute's 网站）。包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白对肿瘤响应的作用可在类似于下列文献中所述的神经胶质瘤动物模型中评估：Schueneman 等人, Cancer Res. 63 :4009-16, 2003 ;Martinet 等人, Eur. J. Surg. Oncol. 29 :351-7, 2003 ;Bello 等人, Clin. Cancer Res. 8 :3539-48, 2002 ;Ishikawa 等人, Cancer Sci. 95 :98-103, 2004 ;Degen 等人, J. Neurosurg. 99 :893-8, 2003 ;Engelhard 等人, Neurosurgery 48 :616-24, 2001 ;Watanabe 等人, Neurol. Res. 24 :485-90, 2002 ;和 Lumniczky 等人, Cancer Gene Ther. 9 :44-52, 2002。

[0229] g. 甲状腺癌

[0230] 乳头状和滤泡状甲状腺癌占有所有甲状腺癌的 80 至 90%。这两种类型都起始于甲状腺的滤泡细胞。大多数乳头状和滤泡状甲状腺癌倾向于生长缓慢。如果早期检出,大多数可成功治疗。髓样甲状腺癌占甲状腺癌病例的 5 至 10%。它在 C 细胞而非滤泡细胞中产生。如果在甲状腺髓样癌扩散至身体其它部分之前被发现和治疗,其易于控制。甲状腺未分化癌为最少见的一类甲状腺癌（仅占病例的 1 至 2%）。其在滤泡细胞中发生。该癌细胞高度异常且难以识别。该类型的癌症通常非常难以控制,因为癌细胞倾向于非常快速生长和扩散。早期甲状腺癌经常不产生症状。但随着癌症生长,症状可包括：出现在颈前部接近喉结的团块或结节；声嘶或正常声音讲话困难；淋巴结肿胀,尤其在颈部；吞咽或呼吸困难；或咽喉或颈疼痛（National Cancer Institute 的网站）。包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白对肿瘤响应的作用可在类似于下述文献的小鼠或大鼠甲状腺肿瘤模型中评估：Quidville 等人, Endocrinology 145 :2561-71, 2004（小鼠模型）；Cranston 等人, Cancer Res. 63 :4777-80, 2003（小鼠模型）；Zhang 等人, Clin Endocrinol (Oxf). 52 :687-94, 2000（大鼠模型）；和 Zhang 等人, Endocrinology 140 :2152-8, 1999（大鼠模型）。

[0231] h. 肝癌

[0232] 有两种不同类型的原发性肝癌。最通常的种类称为肝癌或肝细胞癌 (HCC), 源自肝的主要细胞（肝细胞）。该类型通常限于肝,尽管偶尔其延伸至其它器官。其经常发生于患有的一种称为肝硬化的肝病的人中。还有一种稀有的肝癌亚型,称为纤维板层 (Fibrolamellar) 肝癌,其可发生于年轻人中且与之前的肝疾病不相关。另一类型的原发性肝癌称为胆管癌或胆管癌,因为其起始于胆管衬底的细胞。大多数患有肝癌的人还通常具有称为肝硬化的肝病。肝硬化是由于多种原因,包括感染和长期大量饮酒,而在整个肝中发生的细小的瘢痕形成。然而,仅有小比例的肝硬化的人产生原发性肝癌。感染乙型肝炎或丙型肝炎病毒可导致肝癌,且也可作为肝硬化的原因,这增加产生肝癌的风险。患有稀有症状称为血色病（其引起体内铁的过量沉积）的人,具有更高的发生肝癌的几率。因此,本发明的包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白可用于治疗肝细胞癌、预防肝细胞癌、抑制肝细胞癌进展,延迟肝细胞癌发生,和 / 或减少与肝细胞癌相关的至少一种症候或症状严重性或抑制与肝细胞癌相关的至少一种症候或症状。肝细胞癌可与肝炎（例如,甲型肝炎,乙型肝炎,丙型肝炎和丁型肝炎）感染相关或不相关。

[0233] 包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白对肿瘤响应的作用可在肝细胞癌转基因小鼠模型中评估,其包括单独的转化生长因子- α (TFG- α) 的过表达 (Jhappan 等人, Cell, 61:1137-1146, 1990; Sandgren 等人, Mol. Cell. Biol., 13:320-330, 1993; Sandgren 等人, Oncogene 4:715-724, 1989; 和 Lee 等人, Cancer Res. 52:5162-5170, 1992) 或其与 c-myc (Murakami 等人, Cancer Res., 53:1719-1723, 1993), 突变的 H-ras (Saitoh 等人, Oncogene 5:1195-2000, 1990), 编码 HbsAg 和 HBx 的乙型肝炎病毒基因 (Toshkov 等人, Hepatology 20:1162-1172, 1994; Koike 等人, Hepatology 19:810-819, 1994), SV40 大 T 抗原 (Sepulveda 等人, Cancer Res. 49:6108-6117, 1989; Schirmacher 等人, Am. J. Pathol., 139:231-241, 1991) 和 FGF19 (Nicholes 等人, American Journal of Pathology, 160:2295-2307, 2002) 的组的过表达。

[0234] i. 肺癌

[0235] 包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白对肿瘤响应的作用可在人小细胞肺癌 / 非小细胞肺癌异种移植模型中评估。简言之,将人肿瘤移植至免疫缺陷小鼠,然后用包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白单独治疗或与其它可用于通过评估肿瘤生长证实治疗的药效的药物组合治疗这些小鼠 (Nemati 等人, Clin. Cancer Res. 6:2075-86, 2000; 和 Hu 等人, Clin. Cancer Res. 10:7662-70, 2004)。

[0236] 2. 实体瘤的终点和抗肿瘤活性

[0237] 尽管各种规程对肿瘤响应评估可能有不同的定义,但 RECIST (实体瘤的响应评价标准) 标准目前被认为是国立癌症研究所用于评估肿瘤响应的推荐的指导方针 (参见 Therasse 等人, J. Natl. Cancer Inst. 92:205-216, 2000)。根据 RECIST 标准,肿瘤响应是指减少或消除所有可测的病变或转移。在以下条件下,疾病通常认为是可测量的:疾病包含可在至少一个维度上可以被准确测量为 $\geq 20\text{mm}$ (用常规技术) 或 $\geq 10\text{mm}$ (用螺旋 CT 扫描) 的损伤,且通过医学照相或 X-射线、计算机轴断层摄影术 (CT)、磁共振成像 (MRI) 或临床检测 (如果损伤是表面的) 可见具有清楚限定的边界。不可测量的疾病是指以下疾病,其由 $< 20\text{mm}$ (用常规技术) 或 $< 10\text{mm}$ (用螺旋 CT 扫描) 的病变,和确实不可测的病变 (太小而不能准确测量) 构成。不可测量的疾病包括胸腔积液,腹水,和间接证据证明的疾病。

[0238] 规程需要目标状态的标准以评估实体瘤响应。代表性的标准包括以下:(1) 完全响应 (CR), 定义为所有可测量的疾病的完全消失;无新的病变;无疾病相关的症状;无不可测量的疾病的证据;(2) 部分响应 (PR), 定义为靶病变的最长直径的总和降低 30%;(3) 进行性疾病 (PD), 定义为靶病变的最长直径的总和增加 20% 或出现任何新病变;(4) 稳定或无响应, 定义为未达到 CR、PR、或进行性疾病的标准者。(参见 Therasse 等人, 上文)。

[0239] 其他在肿瘤学领域中公认的终点包括总存活 (OS), 无疾病存活 (D6FS), 目标应答率 (ORR), 进展前时间 (TTP), 和无进展存活 (PFS) (参见 Guidance for Industry: Clinical Trial Endpoints for the Approval of Cancer Drugs and Biologics, 2005 年 4 月, Center for Drug Evaluation and Research, FDA, Rockville, MD)。

[0240] 3. 组合癌症疗法

[0241] 如上讨论的,在某些实施方案中,将双特异性 VEGF-A 抗体 / FGFR 可溶受体组合与治疗新生血管疾病的第二药剂组合使用。当用于治疗癌症时,本发明的拮抗剂可用于与常

规癌症治疗组合使用,常规癌症治疗例如,外科手术,放疗,化疗,或其组合。在某些方面,其它可用于与包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白进行组合癌症治疗的治疗剂包括其它抗血管发生剂。在一些其它方面,其它用于与包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白进行组合治疗的治疗剂包括针对肿瘤生长中涉及的其它因素的拮抗剂,所述的其它因素例如,EGFR, ErbB2 (Her2), ErbB3, ErbB4, 或 TNF。在一些方面,将包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白与细胞因子 (例如,刺激对肿瘤的免疫应答的细胞因子) 共同施用。特别适合用于治疗癌症的示例性组合治疗在以下更详细描述。

[0242] a. 靶向肿瘤相关的抗原的抗体与包含双特异性抗体 / 可溶受体结合蛋白的双特异性结合蛋白的组合

[0243] 抗体疗法在癌症治疗中已获得了特别的成功,因为某些肿瘤显示唯一的抗原、种系特异性抗原、或相对于正常细胞而言过量存在的抗原。与单克隆抗体治疗的抗肿瘤活性相关的一种机理是抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。在 ADCC 中,单克隆抗体结合至靶细胞 (例如,癌细胞),而表达所述单克隆抗体的受体的特异性效应细胞 (例如, NK 细胞,单核细胞,粒细胞) 结合至该单克隆抗体 / 靶细胞复合物,导致靶细胞死亡。在本发明的某些变化形式中,包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白与针对肿瘤相关的抗原的单克隆抗体共同施用。单抗的剂量和时程基于所共同施用的特定抗体的药代动力学和毒物代谢动力学特性,且应优化这些效果,同时最小化可与施用包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白相关的任何毒性。

[0244] 当第一线治疗 (first line treatment) 失败时,可指示需要与包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白和对肿瘤 - 相关的抗原的单克隆抗体的组合治疗,并可考虑将该组合治疗作为第二线治疗。本发明还提供,对于新确诊的、先前未用抗癌剂治疗的患者群体 (“新患者”),和先前未接受任何单克隆抗体治疗的患者 (“首次治疗患者”),使用该组合作为第一线治疗。

[0245] 双特异性结合蛋白也可用于在不存在任何直接的抗体介导的肿瘤细胞的 ADCC 情况下与针对肿瘤相关抗原的单克隆抗体组合治疗。例如,在免疫系统中阻断抑制信号的抗体可导致增强的免疫应答。实例包括 (1) 抗具有抑制功能的 B7R 家族的分子,如,细胞毒性 T 淋巴细胞 - 相关的抗原 4 (CTLA-4),程序死亡 -1 (PD-1),B 和 T 淋巴细胞弱化子 (BTLA) 的抗体; (2) 抗抑制性细胞因子如 IL-10、TGF β 的抗体;和 (3) 消减或抑制遏制性细胞的功能的抗体如抗 CD25 或 CTLA-4。例如,认为抗 CTLA4 单抗在小鼠和人中都抑制免疫抑制调节性 T 细胞 (Tregs) 的功能或抑制通过 T 细胞上 CTLA-4 与 APC 或肿瘤细胞上的 B7-1 或 B7-2 分子的结合传递的抑制信号。

[0246] 表 8 是一些已经得到批准或正在接受测试的单克隆抗体的非排他性列表,这些单克隆抗体与包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白的组合治疗是可能的。

[0247] 表 8 :用于与 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白组合使用的单克隆抗体疗法

[0248]

靶	药物名称	临床适应证	公司
TRAIL-R1	HGS-ETR1	癌症	HGS
TRAIL-R2	HGS-ETR2	实体瘤	HGS
CD40	SGN40	MM	Seattle Genetics
HER2	赫赛汀	乳腺癌	Genentech

[0249]

靶	药物名称	临床适应证	公司
EGF-R	ABX-EGF	CRC, NSCLC, RCC	Abgenix
EGF-R	EMD72000	实体瘤	Merck
EGF-R	MDX-214	EGF-R- 阳性肿瘤	Medarex
EGF-R	爱必妥 (Erbix)	CRC	Imclone
$\alpha 5 \beta 3$ 整联蛋白	Vitaxin	银屑病, 前列腺癌	AME/Lilly
CD152	CTLA-4	癌症	Medarex
CD49e	整联蛋白 $\alpha 5$	癌症	Protein Design Labs
MUC18(TIM- 状)	ABX-MA1	黑素瘤	
TAG-72 粘蛋白	Anatumomab	癌症	
CD3	Ecromeximab	黑素瘤	Kyowa Hakko
CD64 (FcGR1)	AntiCD64	癌症	Medarex
CEA	CEA-Cide	癌症	Immunomedics
EpCAM	Panorex	结肠直肠癌	Centocor
Lewis-Y-Ag	SGN15	癌症	Seattle Genetics

[0250] b. 包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白

[0251] 在一些实施方案中, 包含如本文所述的 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白与酪氨酸激酶抑制剂组合使用。酪氨酸激酶是催化 γ 磷酸基团从三磷酸腺苷转移至靶蛋白的酶。酪氨酸激酶可分类为受体蛋白酪氨酸激酶和非受体蛋白酪氨酸激酶。它们在多种正常细胞过程中起关键作用, 包括通过生长受体的活化, 且影响多

种细胞类型的增殖、存活和生长。此外,认为它们促进肿瘤细胞增殖,诱导抗凋亡作用且促进血管发生和转移。除了通过生长因子的活化,通过体细胞突变的蛋白质激酶活化是肿瘤发生的一种普遍机理。一些已鉴定的突变在 B-Raf 激酶, FLt3 激酶, BCR-ABL 激酶, c-KIT 激酶, 表皮生长因子 (EGFR) 和 PDGFR 途径中发生。Her2、VEGFR 和 c-Met 是其他在癌症进展和肿瘤发生涉及的重要的受体酪氨酸激酶 (RTK) 途径。因为大量细胞进程是由酪氨酸激酶引发的,它们已被确认为抑制剂的关键靶标。

[0252] 酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 是在细胞中起作用的小分子,与三磷酸腺苷 (ATP) 竞争对受体和非受体酪氨酸激酶两者的催化性酪氨酸激酶域的结合。该竞争性结合阻断下游信号传递的引发,所述下游信号传递导致与这些信号事件相关的效应作用如生长、存活和血管发生。使用结构和计算手段,从众多医药化学组合库鉴定出了大量抑制酪氨酸激酶的化合物。

[0253] 认为大多数 TKI 通过直接抑制肿瘤细胞或通过抑制血管发生而抑制肿瘤生长。而且,某些 TKI,包括索拉非尼和舒尼替尼,通过 VEGF 家族受体影响信号传导。在一些情况下,已显示 TKI 可活化树突状细胞和其它天然免疫细胞,如 NK 细胞的功能。这最近在动物模型中对于伊马替尼进行了报道。伊马替尼是一种已被证明通过树突状细胞和 NK 细胞而增强杀伤活性的 TKI (综述参见 Smyth 等人, NEJM 354 :2282, 2006)。

[0254] BAY 43-9006 (索拉非尼, Nexavar®) 和 SU11248 (舒尼替尼, Sutent®) 是两种这样的 TKI,它们最近获准用于转移性肾细胞癌 (RCC)。许多其它 TKI 处于晚期和早期开发之中,用于治疗不同类型的癌症。其它 TKIs 包括,但不限于:甲磺酸伊马替尼 (Gleevec®, Novartis); 吉非替尼 (Iressa®, AstraZeneca); 埃罗替尼盐酸盐 (Tarceva®, Genentech); 凡德他尼 (Zactima®, AstraZeneca), 替吡法尼 (Zarnestra®, Janssen-Cilag); 达沙替尼 (Sprycel®, Bristol Myers Squibb); 洛那法尼 (Sarasar®, Schering Plough); 瓦他拉尼琥珀酸盐 (Novartis, Schering AG); 拉帕替尼 (Tykerb®, GlaxoSmithKline); 尼洛替尼 (Novartis); 来他替尼 (Cephalon); 帕唑帕尼盐酸盐 (GlaxoSmithKline); 阿西替尼 (Pfizer); 卡奈替尼二盐酸盐 (Pfizer); 培利替尼 (National Cancer Institute, Wyeth); 坦度替尼 (Millennium); 博舒替尼 (Wyeth); 司马沙尼 (Sugen, Taiho); AZD-2171 (AstraZeneca); VX-680 (Merck, Vertex); EXEL-0999 (Exelixis); ARRY-142886 (Array BioPharma, AstraZeneca); PD-0325901 (Pfizer); AMG-706 (Amgen); BIBF-1120 (Boehringer Ingelheim); SU-6668 (Taiho); CP-547632 (OSI); (AEE-788 (Novartis); BMS-582664 (Bristol-Myers Squibb); JNK-401 (Celgene); R-788 (Rigel); AZD-1152HQP (AstraZeneca); NM-3 (Genzyme Oncology); CP-868596 (Pfizer); BMS-599626 (Bristol-Myers Squibb); PTC-299 (PTC Therapeutics); ABT-869 (Abbott); EXEL-2880 (Exelixis); AG-024322 (Pfizer); XL-820 (Exelixis); OSI-930 (OSI); XL-184 (Exelixis); KRN-951 (Kirin Brewery); CP-724714 (OSI); E-7080 (Eisai); HKI-272 (Wyeth); CHIR-258 (Chiron); ZK-304709 (Schering AG); EXEL-7647 (Exelixis); BAY-57-9352 (Bayer); BIBW-2992 (Boehringer Ingelheim); AV-412 (AVEO); YN-968D1 (Advenchen Laboratories); 米哚妥林 (Novartis); 哌立福辛 (AEterna Zentaris, Keryx, National Cancer Institute); AG-024322 (Pfizer); AZD-1152 (AstraZeneca);

ON-01910Na (Onconova) ;和 AZD-0530 (AstraZeneca)。

[0255] c. 化学治疗组合

[0256] 在某些实施方案中,包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体的双特异性结合蛋白与一种或多种化学治疗剂组合施用。化疗剂具有不同的作用方式,例如,通过影响 DNA 或 RNA 和干扰细胞周期复制。以 DNA 水平或 RNA 水平作用化学治疗剂的实例为抗代谢物 (如硫唑嘌呤,阿糖胞苷,磷酸氟达拉滨,氟达拉滨,吉西他滨,阿糖胞苷,克拉屈滨,卡培他滨 6- 巯基嘌呤,6- 巯鸟嘌呤,甲氨蝶呤,5- 氟尿嘧啶和羟基脲);烷化剂 (如美法仑,白消安,顺铂,卡铂,环磷酰胺,异环磷酰胺,达卡巴嗪,丙卡巴肼,苯丁酸氮芥,塞替派,洛莫司汀,替莫唑胺);抗有丝分裂剂 (如长春瑞滨,长春新碱,长春碱,多西紫杉醇,紫杉醇);拓扑异构酶抑制剂 (如多柔比星,安吖啶,伊立替康,柔红霉素,表柔比星,丝裂霉素,米托蒽醌,伊达比星,替尼泊苷,依托泊苷,拓扑替康);抗生素 (如放线菌素和博来霉素);门冬酰胺酶;蒽环类抗生素或紫杉烷。

[0257] d. 放射治疗组合

[0258] 在一些变化形式中,包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白与放射治疗组合施用。某些肿瘤可用放射或放射性药物治疗。放射治疗通常用于治疗不能切除的或不能手术的肿瘤和 / 或肿瘤转移物。放射治疗通常以三种方式递送。外束放射在人体一定的距离之外给予,包括 γ 射线 (^{60}Co) 和 X- 射线。近程放疗使用与靶组织一起或与靶组织接触的放射源,例如 ^{60}Co , ^{137}Cs , ^{192}Ir , 或 ^{125}I 。

[0259] e. 激素药组合

[0260] 在一些实施方案中,包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白与激素或抗激素组合施用。某些癌症与激素依赖相关,包括,例如,卵巢癌,乳腺癌和前列腺癌。激素依赖性癌症的治疗可包括使用抗雄激素或抗雌激素化合物。用于癌症治疗的激素和抗激素包括磷酸雌莫司汀,磷酸聚雌二醇,雌二醇,阿那曲唑,依西美坦,来曲唑,他莫昔芬,乙酸甲地孕酮,醋酸甲羟孕酮,奥曲肽,乙酸环丙孕酮,比卡鲁胺,氟他胺,曲普瑞林,亮丙瑞林,布舍瑞林和戈舍瑞林。

[0261] 本发明进一步通过以下非限制性实例阐述。

[0262] 实施例 1:筛选结合 VEGF-A 的抗体

[0263] 通过筛选 Dyax Fab 310 噬菌体文库 (Dyax Corp., Cambridge, MA) 来鉴别结合 VEGF-A 的抗体。选定的噬菌体 - 抗体文库选择和筛选方法使用抗原 (VEGF-A₁₆₅, R&D Systems) 包被的聚苯乙烯免疫管 (NUNC, Denmark)。通过在少数轮的选择后增加严格性而分离抗体。第一代抗体为 Fab 形式。通过 MluI (#R0198S, New England Biolabs, Beverly, MA) 酶消化产生可溶 Fab 抗体以去除 M13 噬菌体中的 geneIII 残株 (stump)。对 scFv 形式的抗体使用了相同的选择、筛选和裂解策略。

[0264] 实施例 2:鉴别 VEGF-A 结合性 Fab 克隆

[0265] 通过基于平板的结合测定 (plate based binding assay) 来鉴别结合 VEGF-A 的 Fab 克隆。Costar (#9018) 96- 孔板用 50 μl VEGF-A (R&D Systems) 或 PDGF-D (SEQ ID NO: 80) 同二聚体 (0.6 $\mu\text{g/ml}$ 在 0.1M NaHCO_3 , pH 9.6 中) 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。第二天,用 0.1% Tween-20/PBS (PBST) 洗涤板三次。各孔加入 100 μl 2% 牛乳 (#170-6404, Bio-Rad) /PBST, 室温封闭 1 小时。然后用 PBST 洗涤测试板三次。各孔加入 25 μl 2% 牛乳 /PBST, 然后添加

25ul Fab 上清液。然后混合各孔,在室温孵育 1 小时。用 PBST 洗涤板三次。对于 Fab 检测,将 2%牛乳 /PBST 中的 50ul (1 : 4000) 抗人 Fab 特异的 pAb-HRP (#31482, Pierce) 添加至各孔,室温保持 1 小时。然后用 PBST 洗涤板三次。将 50ul TMB (TMBW-1000-01, BioFX Laboratories) 添加至各孔,显色 15 分钟,然后添加 50ul 终止缓冲液 (STPR-1000-01, BioFX Laboratories) 以终止该反应。然后将平板在板读数器上以 450nm 读数。

[0266] 实施例 3 :将 VEGF-A 结合性 sFab 转化为 scFv

[0267] 对于一个第 2 轮, A 臂和 B 臂 VEGF-A 筛选的 Fab Dyax 噬菌体 DNA 池,通过一套 3 步骤程序使用对各亚型的框架序列的引物扩增 λ 、 κ 和重链可变区。第一轮 PCR 扩增各可变框架区且添加合适的突出端以促进第 2 轮 PCR 反应。第 2 轮 PCR 反应向正确的第 1 轮 PCR 产物的末端添加合适的 gly/ser 接头序列,第 3 轮 PCR 反应将可变轻链 λ 、可变轻链 κ 、和可变重链产物重叠以产生 LH 和 HL 两种取向的 scFv 产物,然后其克隆至经 ApaLI/NotI- 消化的 PIMD21 噬菌体展示载体。

[0268] 实施例 4 :抑制 VEGF 与 sVEGFR2 的结合的 sFab 和 scFv 的鉴别

[0269] 通过基于平板的中和测定筛选 VEGF-A Fab 和 scFv 克隆。将 Costar (#9018) 96-孔板用 100 μ l 抗人 IgG Fc γ - 特异抗体 (#109-005-098, Jackson Immunology) (1 μ g/ml, 在 0.1M NaHCO₃ 中, pH 9.6) 在 4°C 包被过夜。第二天,用 400ul 0.1% Tween-20/PBS (PBST) 洗涤板三次。各孔加入 100 μ l 1% BSA (#A3059-100G, Σ) /PBST, 在室温 (RT) 阻断 1 小时。用 PBST 洗涤板三次。将 100 μ l VEGFR2-Fc (SEQ ID NO :81) (以 0.2 μ g/ml, 在 1% BSA/PBST 中) 添加至各孔,在室温保持 1 小时。同时,在一块单独的 96 孔板 (Costar 3357) 中,将 65 μ l Fab 或 scFv 上清液添加至 65 μ l 生物素化 VEGF-A (在 1% BSA/PBST 中, 20ng/ml) 中,在室温保持 1 小时。将经封闭的测定平板用 PBST 洗涤三次。各孔加入 100 μ l 上清液 / 生物素化 VEGF-A 复合物,在室温保持 1 小时。用 PBST 洗涤板三次。将 100 μ l 1% BSA/PBST 中的 (1 : 4000) 链亲和素 -HRP (#21124, Pierce) 添加至各孔,在室温保持 1 小时。然后用 PBST 洗涤板三次。将 100 μ l TMB (TMBW-1000-01, BioFX Laboratories) 添加至各孔以显色 20 分钟,然后添加 100 μ l 终止缓冲液 (STPR-1000-01, BioFX Laboratories) 以停止反应。然后将板以 450nm 在板读数器上读数。

[0270] 实施例 5 :通过表面等离子共振 (Biacore) 测量人 VEGF-A 拮抗剂与人 VEGF-A 的相互作用的解离速率常数

[0271] 对人 VEGF-A 拮抗剂评估其与人 VEGF-A 的结合亲和力。

[0272] VEGF-A 根据其解离速率常数使用表面等离子共振。通过表面等离子共振测量 VEGF-A 拮抗剂与 VEGF-A 的相互作用的解离速率常数。解离速率常数 (kd(s⁻¹)) 是反映该复合物稳定性的值。其与浓度不相关,因此适合用于筛选和评定未知浓度的样品。

[0273] 材料和方法 :进行一系列实验以测量 VEGF-A 拮抗剂与 VEGF-A 的结合亲和力。在 Biacore T-100™ 系统 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 上进行结合动力学和亲和力研究。使用 Biacore T100™ Control 软件, v 1.1.1 编程方法。使用胺偶联化学 (EDC:NHS) 将人 VEGF-A 共价固定在 CM5 传感器芯片上,达到约 200RU 的密度。将 VEGF-A 仅固定至活性流动室 (active flow cell)。固定化过程后,用乙醇胺封闭流动室上的剩余活性位点。用 50mM NaOH 洗涤去除非特异结合的蛋白质。活化参照室,然后用乙醇胺封闭。

[0274] 将 VEGF-A 拮抗剂上清液 (选自 Dyax 噬菌体文库筛选) 在流动缓冲液中 1 : 3 稀

释,注射在表面上,容许其特异结合至传感器芯片上的 VEGF-A,结合时间为 5 分钟,离解时间为 5 分钟。双重注射 100nM VEGFR-2-Fc5 和 100nM 抗 VEGF-A 单克隆抗体 (Avastin™, Genentech) 用作阳性对照。使用 30ul/min 的流速进行动力结合研究。所有结合实验在 25℃ 于 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA 0.05% 表面活性剂 P20, 1mg/ml 牛血清白蛋白, pH 7.4 的流动缓冲液中进行。还进行缓冲液注射以允许减少仪器干扰和误差。在循环之间,流动室用 10mM 甘氨酸, pH 1.5 洗涤以从表面去除结合的 VEGF-A 拮抗剂。

[0275] 使用 Biacore T100™ 评价软件 (版本 1.1.1) 编辑数据。数据通过减去参照流动室和空白注射进行处理。评估基线稳定性以保证该再生步骤在整个系列的注射中提供了一致的结合表面。因为 VEGF-A 拮抗剂的起始浓度未知,所得结合曲线与计算解离速率常数 ($k_d(s^{-1})$) 的 1 : 1 解离结合模型完全拟合。

[0276] 结果:测定 VEGF-A 拮抗剂对人 VEGF-A 的解离速率分析。所得结合曲线与 1 : 1 解离模型良好吻合。VEGF-A 拮抗剂的起始浓度未知,因此仅报道解离速率常数 ($k_d(s^{-1})$), 因为 k_d 与浓度不相关。计算的解离速率常数从最慢至最快排列。在这些测试条件下,VEGF-A 拮抗剂与 VEGF-A 的相互作用显示大范围的解离速率常数 ($1.E-5-2.E-2(s^{-1})$) (参见表 5)。为了比较,VEGFR-2-Fc5-VEGF-A 相互作用的 k_d 为约 $2.E-4s^{-1}$, 抗 VEGF-A 单克隆抗体 Avastin™ Fab-VEGF-A 相互作用为约 $8.E-5s^{-1}$ 。

[0277] 表 5: VEGF-A 拮抗剂与 VEGF-A scFvs 和对照物的相互作用的解离速率常数

[0278]

	脱离速率 [k_d
--	--------------

[0279]

	(s^{-1})	
Avastin™	1.E 04	
Lucentis™	2.E 05	
Avastin™ Fab	8.E 05	
c1094.1_1	4.E 04	
c1039.1_1	2.E 04	
c870.1_1 2.E	04	

[0280] 实施例 6: 衍生自大肠杆菌周质级分的蛋白质的纯化

[0281] 在大肠杆菌细胞的周质空间中表达了 scFv、串联 scFv 和 sFab 蛋白质。发酵规模从 25mL 摇瓶培养到 2L 分批补料的系统不等。大肠杆菌细胞使用离心机旋转沉降为离心沉淀。以每克湿细胞重量 2mL 的比例将湿细胞离心沉淀完全重悬浮于周质缓冲液 [0.2M Tris, 20% (w/v) 蔗糖, 完全无 EDTA 蛋白酶抑制剂混合物 (Roche) pH 7.5]。过程中可包括或不包括溶菌酶 (促进细胞壁降解的酶)。为确定是否使用溶菌酶,将 500uL 重悬浮的离心沉淀转移至 Eppendorf 管,每 uL 使用的周质缓冲液添加 30U Ready-Lyse 溶菌酶 (Epicentre),将悬浮液在室温孵育 5 分钟。孵育后,通过翻转来检测溶液的粘度增加。如果溶液粘在管壁上,那么可能发生了过早的细胞裂解,则在准备的溶液中不包含溶菌酶。如果溶液不粘在管

壁上,则将溶菌酶包含在准备的溶液中。如果使用溶菌酶,每 uL 使用的周质缓冲液添加 30U Ready-Lyse 溶菌酶 (Epicentre),将悬浮液在室温孵育 4-6 分钟。以每克初始湿细胞离心沉淀重量 3mL 的比例添加冰冷的水,并将溶液孵育至少 10 分钟但不长于 30 分钟。将剩余原生质球在室温通过离心分离以 15,000xg (或 10,000-20,000RPM,以更快者为准)离心沉淀至少 15 分钟,但不长于 45 分钟。将包含周质级分的上清液倒入新容器且使用称出的固体调节至 25mM 咪唑,500mM NaCl。该溶液通过 0.22um 滤器过滤,然后使用瓶顶滤器 (Nalgene) 纯化。

[0282] 固定的金属亲和色谱 (IMAC) 捕获

[0283] 常规上,将 5mL HisTrap HP 柱 (GE Healthcare) 用于 IMAC 步骤,然而,柱的尺寸可以按比例放大或缩小,取决于通过分析 IMAC-SEC 测定法测得的周质部分中的 scFv 靶物的量。已显示该 IMAC 树脂的结合能力至少为 20mg/mL 填充床。如果使用尺寸大于 10mL 的柱,优选内径为 2 和 5cm 的 Waters 玻璃柱 (Millipore)。使用合适的色谱工作站 (Akta Explorer,使用 UNICORN 软件 4.1 和更高版本 [GE Healthcare],或 BioCAD Sprint, 700E,或 Vision,使用 Perfusion Chromatography 软件,版本 3.00 或更高版本 [Applied Biosystems]),将 IMAC 柱在 50mM NaPO₄,500mM NaCl,25mM 咪唑 pH 7.5 中平衡,且周质级分以不快于 190cm/hr 上柱直到耗尽。用平衡缓冲液洗涤柱子直到在不超过 190cm/hr 的流速下在 UV A254nm 和 UV A280nm 的监测基线稳定至少 2 个 CV。使用 50mM NaPO₄,500mM NaCl,400mM 咪唑,pH 7.5 以不快于 190cm/hr 竞争性洗脱结合的蛋白。洗脱级分通过 UV@A280nm、分析型大小排阻色谱、和 SDS-PAGE 评估蛋白质含量。

[0284] 其它色谱技术

[0285] 通过 SDS-PAGE 凝胶和分析型大小排阻色谱 (SEC) 评估 IMAC 池 (pool) 的纯度。如果该池不适合通过 SEC 最终提纯,则使用其它色谱技术以进一步纯化靶 scFv 蛋白质以去除残余宿主细胞污染物和聚集体。这些常规技术包括阴离子交换、阳离子交换和疏水相互作用。也使用其它基于亲和力的方法,包括,但不限于使用 c-端 myc 标签,借助抗 myc 树脂或使用共价偶合至刚性珠子的合适的配体的配体亲和力方法。这些其它技术的用处依具体的蛋白质而定。

[0286] 大小排阻色谱法 (SEC)

[0287] 通过 UV@A280nm 和分析型 SEC 方法评估的蛋白质的量确定了所用的凝胶过滤柱的尺寸: < 1mg = 10/300Superdex 200GL 柱, 1-10mg = 16/60Superdex 200, > 10mg = 26/60Superdex 200 (均获自 GE Healthcare)。IMAC 洗脱池使用 10kD MWC0 Ultracel 离心浓缩机 (Millipore) 浓缩,且最终浓缩物体积不大于使用的凝胶过滤柱的体积的 3%。将浓缩物注射入柱,等度洗脱蛋白质,流速不超过 76cm/hr 且不慢于 34cm/hr。通过 SDS-PAGE 分析洗脱级分,制成合适的池。

[0288] 内毒素去除

[0289] 关于内毒素水平的最终产物规格依据一个特定群集的状态来确定。使用 10kD MWC0 Ultracel 离心浓缩机 (Millipore) 将 SEC 池浓缩至 > 0.25mg/mL (通过 UV@A280nm 测定)。Mustang E 0.22um 滤器 (PALL) 用 SEC 流动相缓冲液预润湿,通过手动注射递送系统将 SEC 浓缩物通过该滤器过滤,流速为 ~ 1mL/min。使用 PTS EndoSafe 系统 (Charles River) 测试最终过滤产物的内毒素,UV@A280nm 浓度,等分储存。

[0290] 实施例 7 :利用 293/KDR/KZ136/c22VEGF-A- 诱导的基于细胞的荧光素酶测定法鉴别中和性抗人 VEGF scFv

[0291] 为筛选候选分子 (scFv) 中和人 VEGF-A 的活性的能力,进行基于细胞的荧光素酶测定法。293/KDR/KZ136/c22 细胞于 100 μ l 完全培养基 (DMEM, 10% 胎牛血清 (FBS), 1X 丙酮酸钠, 1X GlutaMax (Invitrogen)) 中以 10,000 细胞 / 孔的接种密度铺板于 96 孔不透明白色组织培养处理板 (Costar#3917), 在 37°C 湿润的 5% CO₂ 培养箱中孵育 48 小时。48 小时后,通过真空抽吸去除完全培养基,用 100 μ l 无血清培养基 (DMEM, 1X 丙酮酸钠, 1X GlutaMax (Invitrogen)) 替换,孵育过夜。

[0292] 第二天,将候选 VEGF-A 中和性分子 (scFv, Fab), 阳性对照 (贝伐单抗 (抗 VEGF-A 单克隆抗体, Genentech), ranibizumab (抗 VEGF-A 亲和力成熟 Fab, Genentech) 和内部制备的贝伐单抗 Fab) 与非中和剂 (仅培养基) 一起在无血清培养基中以 1 : 5 稀释从 200nM 连续稀释至 12pM。向这些之中,添加等体积的 0.54nM VEGF-A₁₆₅, 终浓度为 0.26nM VEGF-A 和 100nM 至 6pM 地中和分子或阳性对照。将这些在 37°C 培养 60 分钟。培养后,将培养基从血清饥饿细胞吸出,添加 100 μ l 上述复合物,并在 37°C 培养 4 小时。

[0293] 4 小时孵育后,使用荧光素酶测定系统 (Promega, E1501) 根据制造商的说明进行荧光素酶测定。简言之,吸出培养基且将 25 μ l 1X is 缓冲液 (Promega, E153A) 添加至各孔。将平板在室温孵育 20-30 分钟以平衡。使用微板发光计 (Berthold Technologies)、以 40 μ l 的底物注射量、1 秒的积分时间测量荧光素酶活性。使用分析软件 (Spotfire) 分析数据,并计算各候选物和对照物的 IC₅₀ 值。

[0294] VEGF-A₁₆₅ 与其受体 VEGF-R2 (KDR/Flk-1) 的结合作用诱发一个信号级联,使驱使荧光素酶报道基因转录的 STAT (转录的信号转导物和活化剂) 和 / 或 SRE (血清 - 响应元素) 活化。荧光素酶活性的降低表明该 VEGF-A 介导的信号传递被中和。

[0295] 结果 :针对下表 6 所列的 scFv 在荧光素酶测试中筛选中和 VEGF- 诱导的活性。若干被筛选的 scFvs 显示了显著抑制 (在表 6 中报道为 IC₅₀ 值)。IC₅₀ 值表示为中和 VEGF- 活性达 50% 所需的 scFv 的 nM 浓度。贝伐单抗 (Avastin™), Lucentis™, 和 Avastin™ Fab (内部制备) 用作活性的对照。

[0296] 表 6 :scFvs 和对照在基于细胞的荧光素酶测定中的活性

[0297] IC₅₀ (nM)

[0298]

Avastin™	0.1-0.4
Lucentis™	0.1-0.5
Avastin™ Fab	2.9-6.45
c1094.1_1	0.95
c870.1_1	0.16-0.3
c1039.1_1	0.07

[0299] 实施例 8 :用于测定 VEGFA scFv 对人 VEGF-A- 刺激的 HUVEC 细胞的中和活性的增殖测定

[0300] 为筛选对 VEGF-A 具有适中亲和力的中和 VEGF-A scFv, 进行 3H- 胸苷测定。重组人 VEGF-A165 以 2.6nM 用作阳性对照。含有 1x 胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒的 DMEM-F12 (1 : 1) 培养基 (无血清培养基, SFM ; Invitrogen, Carlsbad, CA) 用作阴性对照。将人 VEGF-A scFv 在 SFM 中连续稀释为 500nM, 50nM, 5nM, 0.5nM, 0.05nM, 0.005nM, 和 0.0005nM。将人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 铺板于 96- 孔平底板, 体积为 100 μ L, 密度为 900-1000 细胞 / 孔。该 HUVEC 细胞在 37°C, 5% CO₂ 下在完全 EGM-2MV 培养基 (Lonza, Walkersville, MD) 中铺板 2 天。细胞用 SFM 血清饥饿培养 24h, 用 2.6nM 在有或没有连续稀释的 VEGF-A scFv 的情况下刺激 24h, 且每孔用 1 μ Ci 3H- 胸苷 (其掺入增殖中的细胞) 冲激 24h (均在 37°C, 5% CO₂)。收集细胞且使用 Topcount 仪 (Hewlett Packard) 计数。

[0301] 结果 : 如表 7 所示的低 nM IC₅₀ 值可见, 大量在该测定中筛选的 scFvs 显示人 VEGF- 诱导的 HUVEC 增殖的有效中和。

[0302] 表 7 : HUVEC 增殖测试中的抗 VEGF-A scFv 中和活性

[0303]

scFvs 和对照	IC ₅₀ (nM)
Avastin™	0.3-0.6

[0304]

Lucentis™	0.3-0.8
Avastin™ Fab	14-17
c1094.1_1	1.00
c870.1_1	0.8-2
c1039.1_1	0.7
c870e6	1.6-4

[0305] 实施例 9 : VEGF-A 拮抗剂的表位分拣 (Epitope Binning)

[0306] 进行表位分拣实验以测定哪种 VEGF-A 拮抗剂能同时结合至人 VEGF-A。竞争抗原上的相同或重叠的结合位点 (表位) 的 VEGF-A 拮抗剂不能同时结合, 在功能上分组到同一家族或“表位仓” (Epitope Bin) 中。不竞争抗原上的相同结合位点的 VEGF-A 拮抗剂能同时结合, 被分组到不同的家族或表位仓中。实验使用 Biacore T100™ 仪器进行。Biacore 仅仅是通常用于将抗体片段和单克隆抗体组 (panels) 分配至表位仓的多种测试形式中的一种。许多文献 (例如, The Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology, Volume 6, 6 Glenn E. Morris ed.) 描述了备选方法, 其可用于“储藏”抗体片段且预期能提供关于 VEGF-A 拮抗剂与人 VEGF-A 的结合特征的参照数据。表位分拣实验使用可溶的天然人 VEGF-A 作为抗原进行。

[0307] 材料和方法：在 BIACORE T100™ 系统 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 上进行两个单独的表位分拣实验。在两个实验中, 第一 VEGF-A 拮抗剂使用胺偶联化学 (EDC:NHS) 共价固定在 CM5 传感器芯片上, 达到密度约 800-1000RU。固定化过程后, 用乙醇胺封闭流动室上的剩余活性位点。通过用 50mM NaOH 洗涤去除非特异结合的蛋白质。参照室也被活化, 然后用乙醇胺在没有 VEGF-A 拮抗剂的条件下封闭。

[0308] 在第一组实验中, 将第二 VEGF-A 拮抗剂和 VEGF-A 抗原稀释至 100nM。注射 VEGF-A 抗原且使其特异结合于固定在传感器芯片上的 VEGF-A 拮抗剂。VEGF-A 是二聚物, 因此对每个 VEGF-A 拮抗剂而言存在两个潜在的结合位点。为保证所有结合位点被占据, 将先前固定的第一 VEGF-A 拮抗剂注射在 VEGF-A 上。该步骤后, 注射第二 VEGF-A 拮抗剂以观察与 VEGF-A 的同时结合。

[0309] 在第二组分拣实验中, 第一 VEGF-A 拮抗剂再次共价固定至 BIACORECM5 传感器芯片的单独的流动细胞。然而, 在该实验中, 将 10nM VEGF-A 抗原与 1mM 第二 VEGF-A 拮抗剂预混合, 然后以竞争形式注射在固定的第一 VEGF-A 拮抗剂上。所有结合实验在 25℃ 在 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA 0.05% 表面活性剂 P20, 1mg/ml 牛血清白蛋白, pH 7.4 的缓冲液中进行。还进行了缓冲液注射以减少仪器干扰和误差。在循环之间, 在每次注射循环后通过注射 60 秒 10mM 甘氨酸 (pH 1.5, 50ul/min) 来再生俘获表面。这样做从该表面上去除了结合的 VEGF-A。数据使用 Biacore T100™ 评价软件 (版本 1.1.1) 编辑。

[0310] 两组实验结果都由如下解释。如果第二 VEGF-A 拮抗剂不能与第一拮抗剂同时结合至 VEGF-A 抗原, 则将其功能性归类到单一的家族或表位仓中。然而, 如果第二 VEGF-A 拮抗剂能与第一拮抗剂同时结合至抗原 (通过显示芯片表面的质量增加), 则其归类到不同的家族或表位仓中。将各 VEGF-A 拮抗剂本身作为阴性对照进行测试以建立背景 (无结合) 信号水平。

[0311] 结果：使用上述两组实验的结合数据, 将纯化的 VEGF-A 拮抗剂分配至表位仓中。BIACORE™ 报道的信号 (RU, 应答单元) 与传感器芯片表面上的质量直接相关。一旦建立了阴性对照相关的本底信号 (RU) 的水平 (相同 VEGF-A 拮抗剂用作第一和第二拮抗剂), 则分拣结果报道为阳性或阴性结合。阳性结合表明两个不同 VEGF-A 拮抗剂能同时结合抗原。阴性结合表明两个不同 VEGF-A 拮抗剂不能同时结合抗原。

[0312] 利用这些实验中阳性响应值和阴性响应值之间的差异将 VEGF-A 拮抗剂指配到三个家族或表位仓中 (参见表 8)。第一表位仓以克隆 c636 产生的 VEGF-A 拮抗剂代表。第二表位仓以 VEGF-A 拮抗剂 c868、c1039 和 c1081 代表。值得注意的是, 当 c636 先与 VEGF-A 相互作用时, c868 和 c1039 都显示同时结合。当 c868 或 c1039 先与 VEGF-A 相互作用时, c636 不显示任何结合, 因此 c868 和 c1039 重叠了 c636 的表位。此外, VEGF-A 拮抗剂 c870 重叠了仓 #1 和仓 #2。第三表位仓由 VEGF-A 拮抗剂 c820 和阳性对照 VEGF-A 抗体 (小鼠抗 VEGF-A 单克隆抗体, R&D Systems) 代表。这些 VEGF-A 拮抗剂在所有其它 VEGF-A 拮抗剂的存在下都显示同时结合。所有分拣实验中测试的拮抗剂都显示一定程度地中和 VEGF-A 促分裂原活性。

[0313] 表 8：中和性 VEGF-A 拮抗剂的表位仓指配

[0314]

表位仓 #	VEGF-A 拮抗剂
仓 #1 :	c636
仓 #2 :	c868, c1039, c1081
仓 #1/2 :	c870
仓 #3 :	c820

[0315] 实施例 10 :通过表面等离子共振 (Biacore) 测量人 VEGF-A 拮抗剂与 VEGF-A 的结合亲和力

[0316] 使用表面等离子共振评估克隆 c870 和 c1039 产生的一价人 VEGF-A 拮抗剂与人 VEGF-A 的结合亲和力。通过表面等离子共振测量 VEGF-A 拮抗剂与 VEGF-A 的相互作用的亲和力决定动力学速率常数和平衡解离常数用。结合速率常数 ($k_a(M_{-1s-1})$) 是反映抗原-拮抗剂复合物形成的速率的值。解离速率常数 ($k_d(s_{-1})$) 为反映复合物稳定性的值。将结合速率常数除以解离速率常数 (k_a/k_d) 得到平衡结合常数 ($KA(M-1)$)。用解离速率常数除以结合速率常数 (k_d/k_a) 得到平衡解离常数 ($KD(M)$)。该值描述了相互作用的结合亲和力。KD 相同的相互作用可具有广泛变化的结合和解离速率常数。因此,同时测量 k_a 和 k_d 有助于更独特地描述相互作用的亲和力。

[0317] 材料和方法 :进行一系列实验以测量克隆 c870 和 c1039 产生的纯化的 VEGF-A 拮抗剂的结合亲和力。在 Biacore T100™ 系统 (GE Healthcare,Piscataway,NJ) 上进行结合动力学和亲和力研究。方法使用 Biacore T100™ Control 软件,v 1.1.1 编程。制备带有 His6/Myc 表位标签的 VEGF-A 拮抗剂。亲和力分析通过使用固定在 CM5 芯片上的抗 His6/Myc 抗体俘获 VEGF-A 拮抗剂而进行。以 1 : 1 摩尔比混合抗 His6 和抗 Myc 抗体,并利用胺偶联化学将它们共价固定至 CM5 传感器芯片,达到为约 7500RU 的密度。以 10ul/min 将 10nM VEGF-A 拮抗剂注射到单独的流动室上,保持 1 分钟,然后是 1 分钟稳定化时间。将 VEGF-A 连续的 1 : 3 稀释物 (33.3nM-0.14nM) 注射在该表面上,使之特异结合于被俘获在传感器芯片上的 VEGF-A 拮抗剂。进行每个浓度的 VEGF-A 的双重注射,结合时间为 5 分钟,离解时间为 10 分钟。以 30 μ L/min 的流速进行动力学结合研究。所有结合实验在 25℃在 10mM HEPES,500mM NaCl,3mM EDTA 0.05%表面活性剂 P20,0.1mg/ml 牛血清白蛋白, pH 7.4 的缓冲液中进行。在循环之间,用 50mM H3PO4 洗涤流动室以再生表面。该洗涤步骤将被俘获的 VEGF-A 拮抗剂从固定化的抗体表面上去除,且容许之后下一样品的结合。

[0318] 使用 Biacore T100™ 评价软件 (版本 1.1.1) 编辑数据。数据通过减去参照流动室和空白注射处理。评估基线稳定性以保证该再生步骤在整个注射的顺序中提供一致的结合表面。检查重复注射曲线的再现性。由于 VEGF-A 抗原形成二聚物,将所得结合曲线整体拟合于二价分析物相互作用模型。

[0319] 结果 :表征了两种 VEGFA 拮抗剂对 VEGF-A 的结合亲和力 (结果示于表 9)。测量这些人 VEGF-A 拮抗剂的结合速率常数 ($k_a(M_{-1s-1})$) 和解离速率常数 ($k_d(s_{-1})$)。由 k_a 和 k_d 值计算 K_D 和 K_A 。该数据与二价分析物模型良好拟合。该模型测量 $k_a(k_{a1}$ 和 $k_{a2})$ 和 $k_d(k_{d1}$ 和 $k_{d2})$ 的两个值。第一组值 (k_{a1} 和 k_{d1}) 描述相互作用的单价动力学,其报道于表 9。这些样品报

道的亲和力是从这些值导出的,命名为 K_{D1} 。由 k_a 和 k_d 值计算出 K_D 和 K_A 。所有三种 VEGF-A 拮抗剂显示对 VEGF-A 抗原类似的亲和力 ($KD = 0.7-1.0E-9M$),且这些结果在两次独立运行中一致。

[0320] 表 9 :VEGF-A 拮抗剂对 VEGF-A 的结合亲和力的表征

[0321]

ID #	$k_a (M_1s_1)$	$k_d (s_1)$	$K_D (M)$	$K_A (M_1)$
c868	5.E+5	6.E-4	1.E-9	8.E+8
c870	2.E+5	2.E-4	1.E-9	1.E+9
c1039	3.E+5	2.E-4	6.E-10	2.E+9

[0322] 实施例 11 :抗 VEGF-A 抗体的表位作图

[0323] 使用 JPT VEGF-A RepliTope™ 载玻片对克隆 c870 和 c1039 产生的单克隆人 VEGF-A 抗体评价其与人 VEGF-A 的肽结合。

[0324] 材料和方法 :各 JPT 载玻片由一式三份如下所述的阵列组成。每个阵列的组成如下 :连续的、重叠的 VEGF-A 的 13aa 片段 (点 1-78),接着是连续、重叠的 VEGF-A 的 20aa 片段 (点 85-115)。此外,各种测试抗体和小鼠和人 IgG 的对照点分布于各阵列的顶侧、底侧和侧面。进行了一系列实验以测定 scFv c870 和 c1039 相对于人 VEGF-A 蛋白质的合成的直链肽的结合能力。用 His/Myc 表位标签标记抗人 VEGF-A scFv。将 10-100 $\mu g/ml$ 的抗体溶液施加至肽载玻片。然后将抗 His 和 / 或抗 Myc 抗体施加至载玻片。根据试剂盒描述的方法用生物素化酪胺 (Tyramide) 扩增信号 (Renaissance® TSA™ Biotin System, PerkinElmer, #NEL700A)。结合的抗体使用链亲和素碱性磷酸酶和 DAKO Permanent Red 染料显色。

[0325] 数据使用自制显微镜载玻片扫描仪编辑,其由 Nikon Eclipse TE2000U 倒置显微镜,ASI MS-2000 电动台,Photometrics Cascade II 512 相机和 X-cite 120 荧光照明系统组成。信号强度使用 MetaMorph v7.1 成像软件分析。

[0326] 结果 :结合肽的位置和序列示于下表 10。数字代表相对总体信号强度的肽的百分比信号强度。

[0327] 表 10

[0328]

肽 ID	肽序列	功能单位	A2131/c1039	A2128/c870
7	HEVVKFMDVYQRS	$\alpha 1$	3%	4%
8	VVKFMDVYQRSYS	$\alpha 1$	6%	14%
9	KFMDVYQRSYSHP	$\alpha 1$	7%	17%
10	MDVYQRSYSHP	$\alpha 1$	5%	
11	VYQRSYSHP	$\alpha 1$	7%	6%
18	DIFQEYPDEIEYI	$\alpha 2$	3%	
19	FQEYPDEIEYIFK	$\alpha 2$	5%	
20	EYPDEIEYIFKPS	$\beta 2$	3%	
23	EYIFKPSSVPLMR	$\alpha 2$ - $\beta 2$	9%	32%
24	IFKPSSVPLMRSG	$\alpha 2$ - $\beta 2$	7%	25%
34	LESVPTEESNITM	$\beta 4$ - $\beta 5$		
36	PTEESNITMQIMR	$\beta 4$ - $\beta 5$		
37	EESNITMQIMRIK	$\beta 5$	4%	
38	SNITMQIMRIKPH	$\beta 5$		
39	ITMQIMRIKPHQG	$\beta 5$	3%	1%
41	IMRIKPHQGGHIG	$\beta 5$ - $\beta 6$		
59	PSGPSSERRKHLF	$\beta 7$ 后 *	13%	
60	GPSSERRKHLFVQ	$\beta 7$ 后 *	5%	

[0329]

75	ARQLELNERTSRS	$\beta 7$ 后 *	7%
76	QLELNERTSRSDK	$\beta 7$ 后 *	4%
77	ELNERTSRSDKPR	$\beta 7$ 后 *	4%
78	LNERTSRSDKPRR	$\beta 7$ 后 *	4%

[0330] * “ $\beta 7$ 后”区域是 VEGF 分子的肝素结合域。

[0331] 所有抗体均显示在 $\alpha 2$ - $\beta 2$ 区周围有特异性结合位点。该数据表明被测抗体可分为两类：抗体 c870 优选 VEGF 的 c- 端侧，而抗体 c1039 对蛋白质的 n- 端侧具有更强的结合。抗体 c870 具有最少的结合肽而抗体 c1039 具有最分散的结合模式。各抗体的前两个结合位点列于下表。

[0332] 表 11

[0333]

结合等级	A2131/c1039	A2128/c870
------	-------------	------------

1	$\beta 7$ 后	$\alpha 2-\beta 2$
2	$\alpha 2-\beta 2$	$\alpha 1$

[0334] 实施例 12:使用 VEGFR2 磷酸化测定法测试 VEGF-A 结合性 scFv 与抗鼠 VEGF-A 的双特异性抗体的交叉反应性

[0335] 为筛选候选分子 (scFv, Fab 和双特异物) 中和鼠 VEGF-A 的活性的能力,进行了一项基于细胞的发光测定,其测量 VEGFR2 (KDR/F1k-1) 磷酸化。因为 mVEGF-A₁₆₄ 将与 VEGFR2 交叉反应,可使用基于人 VEGFR2 的报道物体系。将 293/KDR/KZ136/c22 细胞以 20,000 细胞/孔的密度在 100 μ l 完全培养基 (DMEM, 10% 胎牛血清 (FBS), 1X 丙酮酸钠、1X GlutaMax (Invitrogen)) 中铺板于透明 96-孔组织培养板,且使之贴壁过夜。第二天,通过真空抽吸去除完全培养基,并用 100 μ l 无血清培养基 (DMEM, 1X 丙酮酸钠, 1X GlutaMax) 替换。将细胞温育过夜。

[0336] 第二天,将候选的 VEGF-A 中和分子 (scFv, Fab) 与非中和剂 (仅培养基) 一道在无血清培养基中以 1 : 5 的稀释度从 200nM 连续稀释至 12pM。VEGFR2-Fc 用作中和的阳性对照。向这些中添加等体积的 0.54nM 的 mVEGF-A₁₆₄ (493-MV-005, R&D Systems), 以达到终浓度为 0.26nM VEGF-A 和 100nM 至 6pM 的中和分子或阳性对照。将这些在 37°C 孵育 60 分钟。

[0337] 孵育后,通过真空抽吸从血清饥饿细胞去除培养基,并用 100 μ l 上述复合物替换。将细胞在 37°C 孵育 10 分钟。孵育后,通过真空抽吸去除培养基,并轻柔地用 100 μ l 冰冷的磷酸盐缓冲盐水 (PBS, Invitrogen) 洗涤细胞。通过真空抽吸去除 PBS,将细胞在 25 μ l NP-40 溶解缓冲液 (Invitrogen Cat. #FNN0021) 中溶解,该溶解缓冲液每 10mL 包含 1mM PMSF (Sigma, P-2714, 溶于 DMSO) 和 1 片 Complete Mini 片剂 (Roche, 11836153001)。将溶解产物在 4°C 在平台振荡器上孵育 20 分钟,然后 4°C 3000rpm 离心 10 分钟以使溶解产物澄清。将溶解产物转移至新的 96-孔微量滴定板上, -20°C 放置直到测定。

[0338] 对于 VEGFR2 磷酸化发光测定,根据制造商的说明使用细胞内蛋白质缓冲液试剂盒 (Invitrogen LHB0002) 和 VEGFR2[pY1059] 抗体珠子试剂盒 (Invitrogen LH00601)。将溶解产物解冻,以 1 : 5 与 80 μ l 测定稀释剂混合。将发光真空过滤板的孔用 200 μ l 工作洗涤溶液预先润湿。以每孔 25 μ l 添加经稀释的珠子,并用 200 μ l 工作洗涤溶液洗涤 2 次。洗涤后,将 50 μ l 稀释的溶解产物和 50 μ l 稀释的检测抗体添加至各孔,将板用箔覆盖,在平台振荡器上以 500rpm 室温 (RT) 孵育 3 小时。孵育后,用 200 μ l 工作洗涤溶液洗涤珠子 2X,然后将 100 μ l 稀释的抗兔 IgG-RPE 添加至各孔,将板用箔覆盖,在平台振荡器上以 500rpm 在室温孵育 30 分钟。孵育后,将珠子用 200 μ l 工作洗涤溶液洗涤 3X,且重悬浮于 125 μ l 工作洗涤溶液。将珠子在平台振荡器上以 500rpm 重悬浮 30 秒,用发光 -100 仪器 (BioRad) 读数。使用分析软件 (Spotfire) 分析数据,并计算各候选物和对照物的 IC₅₀ 值。

[0339] 结果:mVEGF-A₁₆₄ 对人受体 VEGF-R2 (KDR/F1k-1) 的结合作用诱导该受体的磷酸化。该基于发光的测定将总 VEGF-R2 结合于与抗 VEGFR2 抗体缀合的、荧光标记的珠子。利用检测 [pY1059] 的磷酸化的第二抗体来检测有多少 VEGFR2 已被磷酸化。如下表 12 所示,许多中和了人 VEGF-A 活性的 scFv 也在该测定抑制了小鼠 VEGF 活性。包含相同这些 scFv 的双特异性抗体也中和了小鼠 VEGF-A 活性。

[0340] 表 12 :VEGF-A 特异 scFv 和双特异性抗体中和小鼠 VEGF-A 活性

[0341]

scFv	IC50 (nM)
c870	0.16
c1039	无活性
c1094	0.55

[0342] 实施例 13 :用于测定 scFvs 对小鼠 VEGFA (VEGF-A164) 刺激的 HUVEC 细胞的中和活性的增殖测定

[0343] 为筛选中和小鼠 VEGF-A 的 scFv, 进行 3H- 胸苷测定。重组小鼠 VEGF-A164 以 2.6nM 用作阳性对照。含 1x 胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒的 DMEM-F12(1 : 1) 培养基 (无血清培养基, SFM; Invitrogen, Carlsbad, CA) 用作阴性对照。scFv 分子在 SFM 中连续稀释至 500nM, 50nM, 5nM, 0.5nM, 0.05nM, 0.005nM, 和 0.0005nM。将人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 铺板于 96- 孔平底板, 体积为 100 μ L, 密度为 900-1000 细胞 / 孔。将 HUVEC 细胞在完全 EGM-2MV 培养基 (Lonza, Walkersville, MD) 中在 37°C, 5% CO₂ 下铺板 2 天。将细胞用血清饥饿培养 24h, 在或有或没有连续稀释的 VEGF-AscFv 的条件下用 2.6nM 刺激 24h, 且每孔用 1 μ Ci 3H 胸苷脉冲 24h, 该胸苷掺入增殖中的细胞 (均在 37°C, 5% CO₂)。收集细胞并使用 Topcount 仪 (Hewlett Packard) 计数。

[0344] 结果 :从如下表 13 所示低 nM IC50 值可见, 该测定中被筛选的多种 scFv 显示有效地中和小鼠 VEGF- 诱导的 HUVEC 增殖。

[0345] 表 13 :通过 VEGF-A- 特异性 scFv 中和小鼠 VEGF-A 诱导的 HUVEC 增殖

[0346]

scFv	IC50 (nM)
c870	0.36
c1094	2.84
c1039	无活性

[0347] 实施例 14 :构建可溶 FGFR3IIIc C-term Fc5 表达质粒以表达第一、第二和第三细胞外 Ig 样域或包括第二和第三细胞外 Ig 样域的截短的形式

[0348] 生成了包含人 FGFR3IIIc 的第一、第二和第三细胞外 Ig 样域或具有人 FGFR3IIIc 的第二和第三细胞外 Ig 样域的截短的形式的一系列表达构建体。这些人 FGFR3IIIc 序列段与下游 C- 端 Fc5 序列融合。该系列中的构建体包括上述的序列区和一个点突变, 该点突变分别在 SEQ ID NO :2 的氨基酸残基 262 处和 SEQ ID NO :10 的残基 142 处产生色氨酸残基 (突变的 249 位以天然 FGFR3IIIc 氨基酸序列为参照) 代替该位置上的丝氨酸。该突变记录为 S249W。这些构建体通过 PCR 和同源重组使用编码上述 FGFR3IIIc 域的 DNA 片段、Fc5 片段和表达载体 pZMP31 产生。

[0349] 为产生全长可溶人 FGFR3IIIc (S249W)Fc5 构建体指定的 MPET 构建体 #1917 (SEQ ID NOS :1 和 2), 产生了三个 PCR 片段且将它们一起通过酵母重组引入 pZMP31 载体。第一片段呈现 :与 pZMP31 载体序列中优化的 TPA 前导序列的 5' 重叠, 后面是编码 S249W 点突变的人 FGFR3IIIc 的序列和与下游人 FGFR3IIIc 序列的 3' 重叠。对于该片段, PCR 扩增反应使用 5' 寡核苷酸 zc62552 (SEQ ID NO :3) (正向引物, 用于使用 FGFR3IIIc 作为模板产生 PCR 片段。FGFR3IIIc 起始于 SEQ ID NO :2 的 E36))。片段将克隆为 pZMP31, 使用 opTPA 前导序列 (SEQ ID NO :2 的残基 1-35)。该 PCR 使用 3' 寡核苷酸 zc62557 (SEQ ID NO :4) (反向引物, 用于使用 FGFR3IIIc 作为模板产生 PCR 片段。片段将产生 S249W 突变。与在 5' 端嵌套 Rec 序列的正向引物一起使用), 且使用 clonetrack ID#102551 人 FGFR3IIIc 作为模板。

[0350] 第二片段呈现 :与上游人 FGFR3IIIc 序列的 5' 重叠, 然后是编码 S249W 点突变的人 FGFR3IIIc 的序列和与 Fc5 序列 (SEQ ID NO :2 的残基 389-620) 的 3' 重叠。对该片段, PCR 扩增反应使用 5' 寡核苷酸 zc62556 (SEQ ID NO :82) (正向引物, 用于以使用 FGFR3IIIc 作为模板产生 PCR 片段。片段将产生 S249W 突变。与嵌套在 sol. Rec 序列的 3' 端的反向引物一起使用)。PCR 使用 3' 寡核苷酸 zc62553 (SEQ ID NO :6) : (反向引物, 以使用 FGFR3IIIc 作为模板产生 PCR 片段。sol. FGFR3IIIc 的序列至 G 375。片段将具有重叠的 Fc5 序列) 进行, 且使用 clonetrack ID#102551 人 FGFR3IIIc 作为模板。

[0351] 第三片段包含 Fc5 序列且呈现与人 FGFR3IIIc 的 5' 重叠和与 pZMP31 载体序列的 3' 重叠。对该片段, PCR 扩增反应使用 5' 寡核苷酸 zc62554 (SEQ ID NO :7)。(正向引物, 用于使用 Fc5 作为模板产生 PCR 片段。片段将具有重叠的 sol. FGFR3IIIc 的序列至 G 375)。PCR 使用 3' 寡核苷酸 zc62555 (SEQ ID NO :8) (反向引物, 用于使用 Fc5 作为模板产生 PCR 片段。片段将具有重叠的 pZMP31 的序列) 进行, 且使用 MPET 构建体 #1699, IL17REFc5 作为模板。

[0352] 产生上述三个片段的 PCR 扩增反应条件如下 :1 个循环, 95°C, 5 分钟 ;25 个循环, 95°C, 30 秒, 然后 55°C, 30 秒, 然后 68°C, 1 分 30 秒 ;1 个循环, 72°C, 7 分钟。PCR 反应混合物 1% 琼脂糖凝胶上运行, 并使用 QIAquick™ 凝胶提取试剂盒 (Qiagen, Cat. No. 28704) 从凝胶提取对应于预期大小的 DNA 片段。

[0353] 质粒 pZMP31 为哺乳动物表达载体, 其包含具有嵌合 CMV 增强子 /MPSV 启动子的表达框, 用于在酵母重组之前线性化的 FseI、NarI 和 BglIII 位点, 大肠杆菌复制起点 ;哺乳动物选择标记表达单位, 其包含 SV40 启动子, 增强子和复制起点, DHFR 基因, 和 SV40 终止子 ;以及在酿酒酵母中的选择和复制所需的 URA3 和 CEN-ARS 序列。

[0354] 之前, 用 BglIII 消化该质粒 pZMP31, 然后与下列上文提到过的凝胶提取的 PCR 片段在酵母中重组。将 50 μ l 感受态酵母 (酿酒酵母) 细胞与 3 μ l 各个 PCR 片段插入 DNA 和约 50ng BglIII 消化的 pZMP31 载体混合。将该混合物转移至 0.2cm 电穿孔小杯。使用的电源 (BioRad Laboratories, Hercules, CA) 设置为 0.75kV (5kV/cm), ∞ 欧姆, 和 25 μ F, 对酵母 /DNA 混合物进行电脉冲。将 300 μ l 1.2M 山梨醇添加至小杯, 将酵母以 75 μ l 和 200 μ l 的等分铺板于两块 URA-DS 板上, 在 30°C 孵育。约 72 小时后, 将来自一块板的 Ura⁺ 酵母转化体重悬于 100ul 酵母溶解缓冲液 (自制 :. 1M NaCl, .0062M Tris HCL, .0038M Tris 碱, .001M EDTA, 2% (v/v) 聚山梨酯 20, 1% (w/v) SDS) 和含 10U Zymo 裂合酶 /100ul 的 100ul Qiagen

小提试剂盒缓冲液 P1。然后将该混合物在 37℃ 孵育约 15 分钟,小提试剂盒的余下操作根据制造商的说明进行。

[0355] 电感受态大肠杆菌宿主细胞 (DH12S) 的转化使用 4 μ l 酵母 DNA 制备物和 50 μ l 大肠杆菌细胞进行。细胞以 1.75kV, 25 μ F、400 欧姆电脉冲。电穿孔后,添加 .5ml LB,然后将细胞以 10 μ l 和 30 μ l 等分铺板于两块 LB AMP 板 (LB 肉汤 (Lennox), 1.8% Bacto™ 琼脂 (Difco), 100mg/L 氨苄青霉素)。

[0356] 对插入 DNA 克隆进行序列分析。选择包含正确序列的一个克隆。使用可商购的试剂盒 (QIAGEN 质粒大提试剂盒, Qiagen, Valencia, CA) 根据制造商的说明分离大规模质粒 DNA。

[0357] 使用相同的方法制备截短的可溶人 FGFR3IIIc (S249W)Fc5 构建体,其称为 MPET 构建体 #1920 (SEQ ID NOS :9 和 10)。第一片段呈现 :与 pZMP31 载体序列中优化的 TPA 前导序列重叠的 5' 重叠,然后是编码 S249W 点突变的人 FGFR3IIIc 的序列和与下游人 FGFR3IIIc 序列重叠的 3' 重叠。对该片段,PCR 扩增反应使用 5' 寡核苷酸 zc62560 ((SEQ ID NO :11) (正向引物,用于使用 FGFR3IIIc 作为模板产生 PCR 片段。片段将产生 Ig D2D3 形式。截短的 FGFR3IIIc 的序列起始于 SEQ ID NO :2 的 D156, Ig D2 的上游。将利用 opTPA 前导序列克隆至 pZMP31 中的片段))。PCR 使用 3' 寡核苷酸 zc62557 (SEQ ID NO :4) (反向引物,用于使用 FGFR3IIIc 作为模板产生 PCR 片段。片段将产生 S249W 突变。与嵌套在 Rec 序列的 5' 端正向引物一起使用)) 进行,且使用 clonetrackID #102551 人 FGFR3IIIc 作为模板。片段使用如前文所述的相同 PCR 热循环制备,并将该片段与上述第二和第三片段一起引入 BglIII 消化的 pZMP31 载体以产生截短的可溶人 FGFR3IIIc (S249W)Fc5 构建体。

[0358] 使用 Qiagen 大提试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 制备各质粒的大提 DNA。对于全长可溶人 FGFR3IIIc (S249W)Fc5, 和截短的可溶人 FGFR3IIIc (S249W)Fc5 构建体,分别称为 MPET 构建体 #1917 (SEQ ID NOS :1 和 2) 和 #1920 (SEQ ID NOS :9 和 10),将 200 μ g 的每种表达构建体大提质粒用约 240 单位的 BstB1 限制酶在 37℃ 消化 2 小时,用苯酚 / 氯仿 / 异戊醇洗涤,然后用氯仿 / 异戊醇洗涤,然后用乙醇沉淀过夜,且在 1.5mL 微量离心机管离心。倾出上清液,用 1mL 70% 乙醇洗涤离心沉淀,在室温孵育 5 分钟。将管在微量离心机中以 14,000RPM 旋转 10 分钟,且倾去离心沉淀的上清液。在组织培养罩的无菌环境中,将离心沉淀在空气中干燥约 5 分钟,然后重悬浮于 0.4ml 37℃ 预热的 CHO 细胞组织培养基中,且使之在 37℃ 孵育 10 分钟。对 DNA 离心沉淀被溶解时,对各个待电穿孔的载体,将约 9×10^6 CHO 细胞离心沉淀后重悬于 4ml CHO 细胞组织培养基中,并与重悬的质粒 DNA 混合,达到最终体积为 800 μ l。将 DNA / 细胞混合物置于 0.4cm 缝隙小杯中,使用以下参数电穿孔 ;950 μ F, 高电容, 300V。然后,对于每个质粒电穿孔组,移出试管的内含物,汇总,用 CHO 细胞组织培养基稀释至 25mL,置于 125mL 摇瓶中。将瓶置于培养箱中振荡器上, 37℃, 5% CO₂ 120RPM 摇动。

[0359] CHO 细胞用 500nM 甲氨蝶呤 (MTX) 进行营养物选择和扩增。选出的 CHO 细胞系称为 MECL 1334 (solFGFR3IIIc (23375) (S249W)Fc5) 和 MECL 1337 (solFGFR3IIIc (143_375) (S249W)Fc5)。

[0360] 为测试表达,使用电穿孔后汇集物第 3 代建立培养。将细胞离心后 .5e6c/ml 重悬浮于 50ml 体积新鲜培养基 (无选择),且使之如上所述进行 96 小时。通过蛋白质印迹证实蛋白质表达。

[0361] 启动大型转瓶以产生用于纯化的蛋白质。利用第 6 代的转染后 CHO 细胞池 MECL 1334 和 MECL 1337, 使用 ZM2 培养基 (SAFC Biosciences Ex-CELL 目录号 68041), 且添加 5mM L- 谷氨酰胺 (来自 200mM L- 谷氨酰胺, Gibco 目录号 25030-081), 1mM 丙酮酸钠 (来自 100mM 丙酮酸钠, Gibco 目录号 11360-070) 和 500nM 甲氨蝶呤, 开始生成 200ml 接种培养物。将瓶在 37°C 120rpm 和 6% CO₂ 下培养。6 天后, 将每个 CHO 池瓶接种至一个 3L 转瓶中, 使用 ZM2 培养基 (SAFC Biosciences Ex-CELL 目录号 68041), 加有 5mM L- 谷氨酰胺 (来自 200mM L- 谷氨酰胺, Gibco 目录号 25030-081), 1mM 丙酮酸钠 (来自 100mM 丙酮酸钠, Gibco 目录号 11360-070), 无选择, 达到 1L 工作体积, .5e6c/ml。将旋转瓶在 37°C, 95rpm 和 6% CO₂ 培养。接种后约 24 小时后, 将另外 .5L 培养基添加至各个转瓶中以达到最终体积为 1.5L, 继续培养。接种后约 8 天, 收集条件化培养基, 0.2 μM 过滤后, 用于蛋白质纯化。

[0362] 用类似方法产生 FGFR3 Fc5 区的另外的构建体, 包括可溶全长和截短的形式, 没有点突变, 或在序列中具有使得 SEQ ID NO:15 的 263 位和 SEQ ID NO:22 的 143 位的脯氨酸残基改变为精氨酸 (标注为 P250R) 的突变 (突变的 250 位是参照天然 FGFR3IIIc 氨基酸序列)。该寡核苷酸和所得的构建体用相应的序列标识符标示于下。

[0363] 表 14

[0364] pZMP31solFGFR3IIIc (23_375) (S249W)Fc5, 构建体 #1917 (SEQ ID NOS:1 和 2)

[0365]

zc62552	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTCC GTAGAGAGTCCTTGGGGACGGAGCAGCGC	SEQ ID NO:3
zc62557	CGCCTGCAGGATGGGCCGGTGCGGCCAGCGC TCCAGCACGTCCAGCGTGT	SEQ ID NO:4

[0366]

zc62556	TACACGCTGGACGTGCTGGAGCGCTGGCCGCA CCGGCCCATCCTGCAGGCG	SEQ ID NO:5
zc62553	TGGGCATGTGTGAGTTTTGTCTGAAGATTTGGG CTCGCCTGCATACACACTGCCCCGCTC	SEQ ID NO:6
zc62554	GTGGAGGCTGACGAGGCGGGCAGTGTGTATGCA GGCGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	SEQ ID NO:7
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTTAAggcgcgccTCTAGATTA TTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	SEQ ID NO:8

[0367] 表 15

[0368] pZMP31solFGFR3IIIc (143_375) (S249W)Fc5, 构建体 #1920 (SEQ ID NOS:9 和 10)

[0369]

zc62560	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCT TCCGTAGAGACACAGGTGTGGACACAGGGGCC	SEQ ID NO:11
zc62557	CGCCTGCAGGATGGGCGCGGTGCGGCCAG CGCTCCAGCACGTCCAGCGTGT	SEQ ID NO:4
zc62556	TACACGCTGGACGTGCTGGAGCGCTGGCC GCACCGGCCCATCCTGCAGGCG	SEQ ID NO:5
zc62553	TGGGCATGTGTGAGTTTTGTCTGAAGATT GGGCTCGCCTGCATACACACTGCCCCGCCTC	SEQ ID NO:6
zc62554	GTGGAGGCTGACGAGGCGGGCAGTGTGTAT GCAGGCGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	SEQ ID NO:7
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTTAAggcgcgccTCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	SEQ ID NO:8

[0370] 表 16

[0371] pZMP31solFGFR3IIIc (23_375)Fc5, 构建体 #1916 (SEQ ID NOS :12 和 13)

[0372]

zc62552	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCT TCCGTAGAGAGTCCTTGGGGACGGAGCAGCGC	SEQ ID NO:3
zc62553	TGGGCATGTGTGAGTTTTGTCTGAAGATT GGGCTCGCCTGCATACACACTGCCCCGCCTC	SEQ ID NO:6

[0373]

zc62554	GTGGAGGCTGACGAGGCGGGCAGTGTGTAT GCAGGCGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	SEQ ID NO:7
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTTAAggcgcgccTCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	SEQ ID NO:8

[0374] 表 17

[0375] pZMP31solFGFR3IIIc (23_375) (P250R)Fc5, 构建体 #1918 (SEQ ID NOS :14 和 15)

[0376]

zc62552	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCT TCCGTAGAGAGTCCTTGGGGACGGAGCAGCGC	SEQ ID NO:3
zc62554	GTGGAGGCTGACGAGGCGGGCAGTGTGTAT GCAGGCGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	SEQ ID NO:7
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTTAAggcgcgccTCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	SEQ ID NO:8
zc62558	CCCCGCCTGCAGGATGGGCCGGTGCCGGGAG CGCTCCAGCACGTCCAGCGT	SEQ ID NO:16
zc62559	ACGCTGGACGTGCTGGAGCGCTCCCGGCACCG GCCCATCCTGCAGGCGGGG	SEQ ID NO:17

[0377] 表 18

[0378] pZMP31solFGFR3IIIc(143_375)Fc5, 构建体 #1919 (SEQ ID NOS :18 和 19)

[0379]

zc62553	TGGGCATGTGTGAGTTTTGTCTGAAGATTT GGGCTCGCCTGCATACACACTGCCCGCCTC	SEQ ID NO:6
zc62554	GTGGAGGCTGACGAGGCGGGCAGTGTGTAT GCAGGCGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	SEQ ID NO:7
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTTAAggcgcgccTCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	SEQ ID NO:8

[0380]

zc62560	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTCCG TAGAGACACAGGTGTGGACACAGGGGCC	SEQ ID NO:20
---------	--	-----------------

[0381] 表 19

[0382] pZMP31solFGFR3IIIc(143_375) (P250R)Fc5, 构建体 #1921 (SEQ ID NOS :21 和 22)

[0383]

zc62553	TGGGCATGTGTGAGTTTTGTCTGAAGATT GGGCTCGCCTGCATACACACTGCCCCGCCTC	SEQ ID NO:6
zc62554	GTGGAGGCTGACGAGGCGGGCAGTGTGTAT GCAGGCGAGCCCCAAATCTTCAGACAAAAC	SEQ ID NO:7
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTTAAggcgcgccTCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	SEQ ID NO:8
zc62558	CCCCGCCTGCAGGATGGGCCGGTGCCGGGAG CGCTCCAGCACGTCCAGCGT	SEQ ID NO:16
zc62559	ACGCTGGACGTGCTGGAGCGCTCCCGGCACCGG CCCATCCTGCAGGCGGGG	SEQ ID NO:17
zc62560	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTCCGTA GAGACACAGGTGTGGACACAGGGGCC	SEQ ID NO:20

[0384] 使用了类似方法产生 FGFR2 α IIIc Fc5 的可溶形式的构建体区域,包括可溶全长和截短的形式,没有点突变或在序列中具有使 SEQ ID NO:29 的 266 位和 SEQ ID NO:40 的 143 位的丝氨酸残基改变为标注为 S252W 的色氨酸,或 SEQ ID NO:33 的 267 位和 SEQ ID NO:42 的 144 位的脯氨酸残基改变为精氨酸(标注为 P253R)的突变(突变的位置是参照天然 FGFR2 α IIIc 氨基酸序列)。

[0385] 表 20

[0386] pZMP31solFGFR2 α IIIc(22_377)Fc5,构建体 #1945(SEQ ID NOS:23 和 24)

[0387]

zc62932	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTC	SEQ ID
---------	--------------------------------	--------

[0388]

	CGTAGACGGCCCTCCTTCAGTTTAGTTGAG	NO:25
zc62933	TGGGCATGTGTGAGTTTTGTCTGAAGATTGG GCTCCTCCAGGTAGTCTGGGGAAGCTGT	SEQ ID NO:26
zc62934	GAAAAGGAGATTACAGCTTCCCCAGACTACCTG GAGGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	SEQ ID NO:27
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTTAAggcgcgccTCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	SEQ ID NO:8

[0389] 表 21

[0390] pZMP31solFGFR2 α IIIc (22_377) (S252W)Fc5, 构建体 #1946 (SEQ ID NOS :28 和 29)

[0391]

zc62932	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTC CGTAGACGGCCCTCCTTCAGTTTAGTTGAG	SEQ ID NO:25
zc62933	TGGGCATGTGTGAGTTTTGTCTGAAGATTGG GCTCCTCCAGGTAGTCTGGGGAAGCTGT	SEQ ID NO:26
zc62934	GAAAAGGAGATTACAGCTTCCCCAGACTACCTG GAGGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	SEQ ID NO:27
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTTAAggcgcgccTCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	SEQ ID NO:8
zc62937	GGCTTGGAGGATGGGCCGGTGAGGCCATCGC TCCACAACATCCAGGTGGTA	SEQ ID NO:30
zc62936	TACCACCTGGATGTTGTGGAGCGATGGCCTCA CCGGCCCATCCTCCAAGCC	SEQ ID NO:31

[0392] 表 22

[0393] pZMP31solFGFR2 α IIIc (22_377) (P253R)Fc5, 构建体 #1947 (SEQ ID NOS :32 和 33)

[0394]

zc62932	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTC CGTAGACGGCCCTCCTTCAGTTTAGTTGAG	SEQ ID NO:25
zc62933	TGGGCATGTGTGAGTTTTGTCTGAAGATTG GCTCCTCCAGGTAGTCTGGGGAAGCTGT	SEQ ID NO:26
zc62934	GAAAAGGAGATTACAGCTTCCCCAGACTACCTG GAGGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	SEQ ID NO:27
zc62939	TCCGGCTTGGAGGATGGGCGGTGACGCGATCGC TCCACAACATCCAGGTG	SEQ ID NO:34
zc62938	CACCTGGATGTTGTGGAGCGATCGCGTCACCGGCCC ATCCTCCAAGCCGGA	SEQ ID NO:35
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTTAAggcgcgccTCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	SEQ ID NO:8

[0395] 表 23

[0396] pZMP31solFGFR2 α IIIc (145_377)Fc5, 构建体 #1948 (SEQ ID NOS :36 和 37)

[0397]

zc62935	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTCC GTAGAAGTGAGAACAGTAACAACAAGAGA	SEQ ID NO:38
zc62933	TGGGCATGTGTGAGTTTTGTCTGAAGATTG GCTCCTCCAGGTAGTCTGGGGAAGCTGT	SEQ ID NO:26
zc62934	GAAAAGGAGATTACAGCTTCCCCAGACTACCTG GAGGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	SEQ ID NO:27
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTTAAggcgcgccTCTAG	SEQ ID

[0398]

	ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	NO:8
--	------------------------------	------

[0399] 表 24

[0400] pZMP31sol1FGFR2 α IIIc (145_377) (S252W)Fc5, 构建体 #1949 (SEQ ID NOS :39 和 40)

[0401]

zc62935	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTCCGTA GAAGTGAGAACAGTAACAACAAGAGA	SEQ ID NO:38
zc62937	GGCTTGGAGGATGGGCCGGTGAGGCCATCGC TCCACAACATCCAGGTGGTA	SEQ ID NO:30
zc62936	TACCACCTGGATGTTGTGGAGCGATGGCCTCA CCGGCCCATCCTCCAAGCC	SEQ ID NO:31
zc62934	GAAAAGGAGATTACAGCTTCCCCAGACTACCTG GAGGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	SEQ ID NO:27
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTTAAggcgcgcTCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	SEQ ID NO:8

[0402] 表 25

[0403] pZMP31sol1FGFR2 α IIIc (145_377) (P253R)Fc5, 构建体 #1950 (SEQ ID NOS :41 和 42)

[0404]

zc62935	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTCCG TAGAAGTGAGAACAGTAACAACAAGAGA	SEQ ID NO:38
zc62933	TGGGCATGTGTGAGTTTTGTCTGAAGATTGG GCTCCTCCAGGTAGTCTGGGGAAGCTGT	SEQ ID NO:26
zc62934	GAAAAGGAGATTACAGCTTCCCCAGACTACCTG GAGGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	SEQ ID NO:27
zc62939	TCCGGCTTGGAGGATGGGCCGGTGACGCGATCGC TCCACAACATCCAGGTG	SEQ ID NO:34

[0405]

zc62938	CACCTGGATGTTGTGGAGCGATCGCGTCACCGGCCC ATCCTCCAAGCCGGA	SEQ ID NO:35
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTTAAggcgcgccTCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	SEQ ID NO:8

[0406] 实施例 15:多特异性、可溶 FGFR3_{IIIc} Fc5 VEGFA scFv 表达质粒的构建

[0407] 生成一系列表达构建体,其包含人 FGFR3_{IIIc} 的第一、第二和第三细胞外 Ig 样域或具有人 FGFR3_{IIIc} 的第二和第三细胞外 Ig 样域的截短的形式。这些人 FGFR3_{IIIc} 序列区段与下游 C-端 Fc5、接头、下游 c-端用于特异结合至 VEGF-A 的 scFv 序列融合。该系列中的构建体包括上述的人 FGFR3_{IIIc} 序列段和一个点突变(其在 SEQ ID NO:64 的氨基酸 162 位和 SEQ ID NO:62 的 142 位产生色氨酸残基以代替丝氨酸)。该突变记录为 S249W。(突变的位置参考天然 FGFR3_{IIIc} 氨基酸序列)。这些构建体通过使用 PCR 和同源重组(利用编码 FGFR3_{IIIc} 域的 DNA 片段与 Fc5 序列和包含 VEGF-A scFv 序列 870e6 和 1094.1 的表达载体 pZMP31 进行)而产生。

[0408] 为产生全长可溶人 FGFR3_{IIIc} (S249W)Fc5c870e6 和全长可溶人 FGFR3_{IIIc} (S249W)Fc5c1094.1 构建体,产生 PCR 片段且通过酵母重组将其引入基于 pZMP31 的载体,其中基于 pZMP31 的载体包含接头和下游 VEGFAscFv 序列 870e6 或 1094.1(称为 MVC 709-SEQ ID NO:43 和 44;以及 MVC 710-SEQ ID NO:45 和 46)。该 PCR 片段包含:与基于 pZMP31 的载体序列中优化的 TPA 前导序列重叠的 5' 重叠,然后是编码 S249W 点突变的人 FGFR3_{IIIc} 的序列, Fc5 序列、以及与接头序列重叠的 3' 重叠。对该片段,PCR 扩增反应使用 5' 寡核苷酸 zc62552(SEQ ID NO:3)(正向引物,用于使用 FGFR3_{IIIc} 作为模板产生 PCR 片段。FGFR3_{IIIc} 序列起始于 Ig D1 上游的 E23。片段将使用 opTPA 前导序列克隆到 pZMP31 中)。PCR 使用 3' 寡核苷酸 zc60566(SEQ ID NO:82) 进行,使用 MPET 构建体 #1917(SEQ ID NO:1) 作为模板。

[0409] 产生上述三个片段的 PCR 扩增反应如下:1 个循环,95°C,5 分钟;25 个循环,95°C,30 秒,然后 55°C,30 秒,然后 68°C,2 分钟;1 循环,72°C,7 分钟。在 1%琼脂糖凝胶上运行 PCR 反应混合物,且使用 QIAquick™ 凝胶提取试剂盒(Qiagen, Cat.No. 28704)从凝胶提取对应于预期大小的 DNA 片段。

[0410] 质粒 MVC 709 和 MVC 710 是基于 pZMP31 的哺乳动物表达载体,其包含鼠 Fc2、接头、和 870e6(SEQ ID NO:43)或 1094.1scFv(SEQ ID NO:45)的下游序列、VEGF-A 结合序列。这些载体包含具有嵌合 CMV 增强子 /MPSV 启动子的表达框,用于在酵母重组之前线性化的 FseI、NarI 和 BglII 位点,大肠杆菌复制起点;哺乳动物选择标记表达单位,其包含 SV40 启动子,增强子和复制起始区,DHFR 基因,和 SV40 终止子;以及酿酒酵母中的选择和复制所需的 URA3 和 CEN-ARS 序列。

[0411] 将质粒 MVC 709 和 MVC 710 用 BglII 限制酶消化,然后与下列上文提到的凝胶提

取的 PCR 片段在酵母中重组。将 60 μ l 感受态酵母（酿酒酵母）细胞与 5 μ l 的各个 PCR 片段插入的 DNA 和约 50ng BglIII 消化的 MVC 709 和 MVC 710 载体混合。将该混合物转移至 0.2cm 电穿孔小杯。对酵母/DNA 混合物电冲激，使用的电源（BioRad Laboratories, Hercules, CA）设置为 0.75kV (5kV/cm), ∞ 欧姆, 和 25 μ F。将 400 μ l 1.2M 山梨醇添加至小杯, 然后将酵母以 75 μ l 和 200 μ l 等分铺板于两块 URA-DS 板上, 在 30 $^{\circ}$ C 孵育。约 72 小时后, 将来自一块板的 Ura⁺ 酵母转化体重悬浮于 100ul 酵母溶解缓冲液（自制： $\therefore$ 1M NaCl, .0062M Tris HCL, .0038M Tris 碱, .001M EDTA, 2% (v/v) 聚山梨酯 20, 1% (w/v) SDS）和含 10U Zymolyase/100ul 的 100ul Qiagen MiniPrep 试剂盒缓冲液 P1。然后将该混合物在 37 $^{\circ}$ C 孵育约 15 分钟, Qiagen 小提试剂盒方案的其余步骤根据制造商的说明进行。

[0412] 电感受态大肠杆菌宿主细胞 (DH12S) 的转化使用 4 μ l 提取的酵母质粒 DNA 制备物和 50 μ l 大肠杆菌细胞进行。以 1.75kV、25 μ F、400 欧姆对细胞电冲激。电穿孔后, 添加 .5ml LB, 然后将细胞以 10 μ l 和 30 μ l 等分铺板于两块 LB AMP 板上 (LB 肉汤 (Lennox), 1.8% BactoTM 琼脂 (Difco), 100mg/L 氨苄青霉素)。

[0413] 对插入 DNA 克隆进行序列分析。选择一个包含正确序列的克隆。大规模质粒 DNA 使用可商购的试剂盒 (QIAGEN 质粒大提试剂盒, Qiagen, Valencia, CA) 根据制造商的说明分离。

[0414] 利用相同方法制备截短的可溶人 FGFR3_{IIIc} (S249W)Fc5 构建体。一个片段包含：与 pZMP31 载体序列中优化的 TPA 前导序列重叠的 5' 重叠, 然后是编码 S249W 点突变的人 FGFR3_{IIIc} 的序列, Fc5 序列和与接头序列重叠的 3' 重叠。对该片段, PCR 扩增反应使用 5' 寡核苷酸 zc62560 (SEQ ID NO :20)。(正向引物, 用于使用 FGFR3_{IIIc} 作为模板产生 PCR 片段。片段将产生 Ig D2D3 形式。FGFR3_{IIIc} 的序列起始于 SEQ ID NO :60 的 D156, Ig D2 的上游。片段将使用 opTPA 前导序列克隆到 pZMP31 中)。该 PCR 使用 3' 寡核苷酸 zc60566 (SEQ ID NO :82) 进行, 且使用 MPET 构建体 #1920 作为模板 (SEQ ID NO :9)。

[0415] 使用与上述相同的 PCR 热循环产生该片段, 并引入 BglIII 消化的 MVC709 和 MVC 710 载体以产生截短的可溶人 FGFR3_{IIIc} (S249W)Fc5、接头和下游 c- 端对 VEGFA 构建体结合特异的 scFv 序列, 如上所述。

[0416] 编码全长的或截短的可溶人 FGFR3_{IIIc} (S249W)Fc5、接头和下游 c- 端对结合 VEGF-A 特异的 scFv 序列的质粒命名为 :FGFR3(143-375) (S249W)Fc5c1094. 1pZMP31 (MVC 781), 如 SEQ ID NOS :57 和 58 所示, FGFR3(23-375) (S249W)Fc5c1094. 1pZMP31 (MVC 782), 如 SEQ ID NOS :59 和 60 所示, FGFR3(143-375) (S249W)Fc5c870e6pZMP31 (MVC 783), 如 SEQ ID NOS :61 和 62 所示, 和 FGFR3(23-375) (S249W)Fc5c870e6pZMP31 (MVC 784), 如 SEQ ID NOS :63 和 64 所示。将这些质粒在 293F 细胞中瞬时表达 (Invitrogen, Carlsbad, CA Cat#R790-07)。使用 QIAGEN 质粒大提试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 制备各质粒的大提 DNA。将 293F 悬浮细胞在 293Freestyle 培养基 (Invitrogen, Carlsbad, CA Cat#12338-018) 中在 37 $^{\circ}$ C, 6% CO₂ 下在 3L 转瓶中 95RPM 培养。在即将转染之前添加新鲜培养基以得到 1.5 升工作体积, 最终密度为 1x10E6 细胞 /mL。对于每个转瓶, 将 2mL LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA Cat#11668-019) 添加至 20mL Opti-MEM 培养基 (Invitrogen, Carlsbad, CA Cat#31985-070) 中, 且在另一试管中将 1.5mg 总质粒 DNA 在 20mL Opti-MEM 中稀释。各试管单独在室温孵育 5 分钟, 然后混合 (combined) 且一起在

室温下再孵育 30 分钟,不时轻微混合。将脂质-DNA 混合物添加至 293F 细胞的各转瓶,然后恢复至 37℃,6% CO₂、75RPM。约 96 小时后,收集该条件化培养基,0.2 μM 过滤,用于蛋白质纯化。

[0417] 实施例 16:纯化方法

[0418] 将条件化培养基作为包含 0.02%叠氮化钠的 0.2 μ 无菌过滤可输送物输送至纯化。在将该培养基装载至亲和力和俘获柱之前不进行其他调节。

[0419] 对于大规模纯化,~ 10 升可输送物,采用 POROS A50(蛋白 A 亲和树脂)的 87mL 柱床 2 厘米直径的柱子用于俘获过程的目的。对于小规模纯化(~ 1-1.5 升可输送物),使用 4mL 柱床的 POROS Mab MabCapture 灌注色谱树脂。

[0420] 加载样品之前,该柱用 20 柱体积的缓冲液 A(10mM 磷酸二氢钠,10mM 一水合柠檬酸,250mM[NH₄]₂SO₄,pH 7.3,包含 0.02%叠氮化钠(W/v))平衡。一旦平衡后,以 20mL/分钟(对于大规模方法),或 10mL/分钟(对于小规模方法)加载条件化培养基。当方法的装载阶段完成时,用 10-20 柱体积的平衡缓冲液从柱洗出未结合的蛋白质级分。结合的蛋白质的洗脱通过下降的 pH 梯度完成,该梯度是在平衡缓冲液 A 和具有以下组成的洗脱缓冲液 B 之间形成的:10mM 磷酸二氢钠,10mM 一水合柠檬酸,250mM[NH₄]₂SO₄,pH 3.0,包含 0.02%叠氮化钠(w/v)。大规模方法的洗脱流速为 30mL/分钟,同时在缓冲液 A 和缓冲液 B 之间形成 3 个柱体积的梯度。用 0.5mL 2M Tris pH 8.0 缓冲液收集级分(10mL),立即混合内含物。小规模方法的洗脱使用相同缓冲液和 4 柱体积的梯度(从缓冲液 A 至缓冲液 B),且流速为 5mL/分钟。用 0.25mL 2M Tris pH 8.0 缓冲液收集级分(4mL)。立即混合所有洗脱液级分以保证快速 pH 中和。

[0421] 将所有在 280 纳米波长具有正吸收的级分汇集,进一步进行大小排阻色谱法步骤。将汇集的蛋白质浓缩至 7mL(大规模方法)或 1.5mL(小规模方法)用于大小排阻色谱法(SEC)。采用 SEC 色谱法的目的是缓冲液交换,以及将少量多聚体或聚集物质与最终产物区分开来。用于 SEC 和最终蛋白制剂的流动相为 35mM 磷酸钠,120mM 氯化钠,pH 7.3。大规模 SEC 在 Pharmacia Superdex 200 制备级 SEC 柱(26/60 规格,具有 321mL 柱床体积)上进行。小规模 SEC 在 Pharmacia Superdex 200 制备级 SEC 柱(16/60 规格,具有 120mL 柱床体积)上进行。根据方法规模,SEC 步骤的流速对大规模或小规模分别为 2.5mL/分钟或 1.5mL/分钟。汇集在主要对称的峰下的级分,重点是从最终产物中排除任何少量的高分子量材料。最终汇集物以 0.2 μ 无菌过滤,制备等分试样且储存于 -80℃。该相同方法用于处理所有 FGFR 受体和可溶 FGF 受体(FGFR)和 VEGF-A 抗体的双特异性结合组合物。

[0422] 实施例 17:³H-胸苷增殖测定以测定可溶 FGF 受体对 FGF-刺激的 HUVEC 细胞的中和活性

[0423] 为筛选抑制多种 FGF 的活性的中和性可溶 FGF 受体(FGFR),使用人脐带内皮细胞(HUVEC)进行 ³H-胸苷增殖测定。重组人 FGF1,2,4 和 6(R&D Systems, Inc.)以 10ng/mL 在测定介质(RPMI-1640,1% FBS,1 单位/mL 肝素和丙酮酸盐)中使用。然后从 0.5-4ug/mL(取决于受体)滴定的可溶人 FGFR(R&D Systems 和 ZymoGenetics),并在测定介质中连续稀释至 32-4ng/mL。即 HUVEC 铺板于 96-孔平底板(Costar),体积为 100 μL,密度为 2000 细胞/孔。HUVEC 增殖测定体系在 37℃,5% CO₂ 培养 2 天。然后每孔用 1 μCi ³H-胸苷(Amersham, TRK120)冲激 HUVEC18 小时,该 ³H-胸苷掺入增殖中的细胞(均在 37℃,5%

C02)。收集细胞,在 Packard TopCount NXT 板读数器上计数。

[0424] 结果:所有测定的 FGFR 均如预期的那样以类似的活性中和 FGF1。FGFR1 和 FGFR2(R&D Systems)强力地中和所有 FGF。而 FGFR3 和 FGFR4(R&D Systems)对 FGF2, 4 和 6 活性的抑制弱一些。FGFR3A2258F(143_375, S249W)(SEQ ID NO:10)和 FGFR3 A2256F(22_375, S249W)(SEQ ID NO:2)强力地中和 FGF1,2,4 和 6,且 IC50 值与 FGFR1 相似。

[0425] 表 26

[0426]	IC50 (nM)	FGF1	FGF2	FGF4	FGF6
	FGFR1 (R&D systems)	0.63	0.92	0.53	0.42
	FGFR2 (R&D systems)	0.42	0.85	0.48	0.3
	FGFR3 (R&D systems)	0.53	5.5	1.06	9.96
	FGFR4 (R&D systems)	0.85	18	4.15	19
[0427]	FGFR3 A2258F (ZymoGenetics)	0.55	0.67	0.68	0.78
	FGFR3 A2256F (ZymoGenetics)	0.82	1	0.74	0.95

[0428] 实施例 18:用于测定可溶 FGF 受体对 FGF8b 刺激的 LNCap 细胞的中和活性的 ³H-胸苷增殖测定

[0429] 为筛选抑制 FGF8b 的活性的中和性可溶 FGF 受体 (FGFR),使用人 LNCap 细胞进行了 ³H-胸苷增殖测定。重组人 FGF8b(R&D Systems, Inc.)以 200 至 1000ng/ml 在测定介质 (RPMI-1640,1% BSA, ITS[胰岛素-转铁蛋白和硒], L-谷氨酸盐和丙酮酸盐 [均获自 Invitrogen]) 中使用。然后从 1-2ug/ml 滴定 R&D Systems 的可溶人 FGFR(R1-R4)、以及 ZymoGenetics 的 FGFR 3 和 2,并在测定介质中连续稀释至 31-15ng/ml。将 LNCap 细胞铺板于 96-孔平底板 (Costar),体积为 100 μL,密度为 2500 细胞/孔。将该 LNCap 增殖测定在 37℃,5% CO₂ 培养 3 天。然后每孔用 1 μCi ³H-胸苷 (Amersham, TRK120) 将 LNCap 冲激 8 小时,该 ³H-胸苷掺入增殖中的细胞 (均在 37℃,5% CO₂)。收集细胞并在 Packard TopCount NXT 板读数器上计数。

[0430] 结果:R&D System 的 FGFRs R2-R4 中和 FGF8b,但 R1 则否。全长 FGFR2A2556F(22_377)SEQ ID NO:24, A2557F(22_377)(S252W)SEQ ID NO:29, 和 A2558F(22_377)(P253R)SEQ ID NO:33 不中和 FGF8b。而截短的 FGFR2A2559F(145_377)

SEQ ID NO :37, A2560F(145_377) (S252W) SEQ ID NO :40, 和 A2561F(145_377) (P253F) SEQ ID NO :42 确实中和 FGF8b, 类似于 R&D Systems FGFR2。FGFR3A2519F(143_375) (P250R) SEQ ID NO :22, A2256F(23_375) (S249W) SEQ ID NO :2 和 A2258F(143_375) (S249W) SEQ ID NO :10 中和 FGF8b, 但 A2518F(143_375) SEQ ID NO :19, A2257F(23_375) SEQ ID NO :13, 和 A2259F(23_375) (P250R) SEQ ID NO :15 则否。

[0431] 表 27

[0432]

FGFRs	增殖 IC50 (nM)
R&D FGFR1	ND

[0433]

R&D FGFR2	0.29
R&D FGFR3	0.79
R&D FGFR4	0.13
FGFR2 A2556F	ND
FGFR2 A2557F	ND
FGFR2 A2558F	ND
FGFR2 A2559F	0.3
FGFR2 A2560F	0.01
FGFR2 A2561F	0.01
FGFR3 A2518F	ND
FGFR3 A2519F	0.01
FGFR3 A2256F	0.01
FGFR3 A2257F	ND
FGFR3 A2258F	0.02
FGFR3 A2259F	ND

[0434] ND, 未测定。

[0435] 实施例 19 : 用于测定可溶 FGF 受体对 FGF8b 刺激的 MCF-7 细胞的中和活性的 ³H- 胸苷增殖测定

[0436] 为筛选抑制 FGF8b 的活性的中和性可溶 FGF 受体 (FGFR), 使用人 MCF-7 细胞进行 ³H- 胸苷增殖测定。重组人 FGF8b (R&D Systems, Inc.) 在测定介质 (RPMI-1640, 5% FBS, L- 谷氨酸盐和丙酮酸盐) 中为 100ng/ml。从 10ug/ml 滴定来自 R&D Systems 的可溶人 FGFR-Fc (R1-R4) 和 ZymoGenetics 的 FGFR 3 和 2, 并在测定介质中连续稀释至 78ng/ml。将 MCF-7 细胞铺板于 96- 孔平底板 (Costar), 体积为 100 μ L, 密度为 1250 细胞 / 孔。将该

MCF-7 增殖测定系统在 37℃,5% CO₂ 下培养 4 天。然后每孔用 1 μ Ci³H- 胸苷 (Amersham, TRK120) 将细胞冲激 8 小时,该 ³H- 胸苷掺入中的增殖细胞 (均在 37℃,5% CO₂)。收集细胞且在 Packard TopCount NXT 板读数器上计数。

[0437] 实施例 20 :用于测定 sFGFR-Fc 对 FGF-9 刺激的 HCO 成骨细胞的中和活性的 ³H- 胸苷增殖测定

[0438] 为测定 sFGFR-Fc 构建体对 FGF-9- 刺激的成骨细胞增殖的中和作用,进行 ³H- 胸苷测定。用人 FGF-9 刺激人成骨细胞生长。以 0.02nM 至 6nM 的浓度将 FGFR-Fc 蛋白质添加至测定介质。观察到成骨细胞增殖的显著抑制,并对各蛋白质计算 IC50。

[0439] 研究设计 :以 1.2nM 人 FGF-9(R&D Systems, Minneapolis, MN) 刺激人颅盖成骨细胞 (HCO ;ScienCell, Carlsbad, CA)。ObM 测定介质 [成骨细胞基础培养基 (ObM, ScienCell), 含有 0.5% 胎牛血清 (FBS),2mM GlutaMax (Invitrogen, Carlsbad, CA),1mM 丙酮酸钠,和 1x 胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒 (Invitrogen)] 用作阴性对照。将人 FGFR1-Fc, FGFR2-Fc, FGFR3-Fc,和 FGFR4-Fc (R&D Systems) 在 ObM 测定介质中连续稀释到 6nM,2nM,0.67nM,0.22nM,0.07nM,和 0.02nM。对 FGFR3-Fc 突变体 (ZymoGenetics, Seattle, WA) 也类似进行稀释。将 HCO 细胞在补充有 5% FBS 和成骨细胞生长补充剂 (ObGS, ScienCell) 的 ObM 中铺板于在 96- 孔平底板,体积为 100 μ L,密度为 1000 细胞 / 孔。将各板在 37℃,5% CO₂ 孵育过夜。细胞用 ObM 测定介质血清饥饿 24h,在有或无连续稀释的 FGFR-Fc 的条件下用 1.2nM FGF-9 刺激 24h,用 1 μ Ci 每孔的 ³H- 胸苷冲激 24h (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ),该 ³H- 胸苷掺入增殖中的细胞 (均在 37℃,5% CO₂)。收集细胞并在 Packard TopCount NXT 上计数。

[0440] 结果证实该突变体 FGFR3-Fc 构建体显著抑制人成骨细胞增殖,且其 IC50 在 R&D Systems 的 FGFR3-Fc 的 3 倍范围内,如图 3 所示,图 2 显示全长 FGFR3-Fc 野生型和突变体构建体 (ZymoGenetics) 具有类似的 IC50。

[0441] 表 28 :成骨细胞增殖测定中的 FGFR-Fc IC50.

[0442]

FGFR-Fc	增殖 IC50 (nM)
FGFR1-Fc	1.10
FGFR2-Fc	0.49
FGFR3-Fc	0.44
FGFR4-Fc	6.63
全长 FGFR3-Fc (A2257F)	1.19
全长 FGFR3-Fc S249W	0.84

[0443]	(A2256F)	
	全长 FGFR3-Fc P250R	
	(A2259F)	1.14
	截短的 FGFR3-Fc (A2518F)	0.77
	截短的 FGFR3-Fc S249W	
	(A2258F)	0.75
	截短的 FGFR3-Fc P250R	
	(A2519F)	0.99

[0444] 实施例 21 :FGFR-Fc 野生型和突变体构建体与 FGF-8b 和 FGF-17 的结合

[0445] 为测定 FGFR-Fc 与其各自配体的结合能力,进行 ELISA。在室温在摇动下将重组人 FGF-8b 或 FGF-17 (R&D Systems) 以 100nM 铺板于 Nunc Maxisorp 96- 孔板上保持 1h。各板在室温用 BLOTTO(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) 封闭 1h,然后用 ELISA C 缓冲液 (137mM NaCl,2.7mM KCl,7.2mM Na₂HPO₄,1.5mM KH₂PO₄,0.05% (v/w) 聚山梨酯 20, pH 7.2) 洗涤 5 次。FGFR-Fcs 用 PBS/0.1x BLOTTO/10ug/ml 猪肝素 (Sigma,St.Louis,MO) 稀释至 100nM,然后制备 1 : 2 连续稀释物,到 0.10nM 为止。将 100 μ L FGFR-Fc 铺板且在 4℃培养过夜。次日,将各板用 ELISA C 洗涤 5 次,然后在室温在摇动下用 2.5 μ g/mL 辣根过氧化物酶缀合的抗人 Fc 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 孵育 1h。用 ELISAC 洗涤 5 次后,添加柠檬酸盐缓冲液中的 100 μ L OPD (5mg 邻苯二胺,于 63mM 柠檬酸钠,37mM 柠檬酸,pH 5.0,0.03% H₂O₂ 中) 以进行检测。2-5 分钟后,用 1N H₂SO₄ 停止反应。各板使用 SoftMaxPro 软件在 490nm 读数。

[0446] 结果 :尽管野生型和突变体 FGFR2-Fcs 不显著结合至 FGF-8b 或 -17,但有一些突变体 FGFR3-Fc 构建体以大于野生型 FGFR3-Fc 的程度结合至 FGF-8b 和 FGF-17 两者,如图 5A,5B,6A,6B 和 7 所示。

[0447] 表 29 :野生型和突变体 FGFR3-Fc 构建体结合 FGF-8b 和 FGF-17.

[0448]	FGFR-Fc	FGF-8b 结合	FGF-17 结合
		IC50 (nM)	IC50 (nM)

[0449]

FGFR1-Fc	n/a	n/a
FGFR2-Fc	n/a	n/a
FGFR3-Fc	23.4	30.1
FGFR4-Fc	142	317
全长 FGFR2-Fc (A2556F)		n/a
全长 FGFR2-Fc S252W (A2557F)		n/a
全长 FGFR2-Fc P253R (A2558F)		n/a
截短的 FGFR2-Fc (A2559F)		n/a
截短的 FGFR2-Fc S252W (A2560F)		223
截短的 FGFR2-Fc P253R (A2561F)		n/a
全长 FGFR3-Fc (A2257F)	41.9	20.1
全长 FGFR3-Fc S249W (A2256F)	37.7	8.66
全长 FGFR3-Fc P250R (A2259F)	52.6	45.3
截短的 FGFR3-Fc (A2518F)	16.4	3.79
截短的 FGFR3-Fc S249W (A2258F)	10.0	1.31
截短的 FGFR3-Fc P250R (A2519F)	9.7	37.6

[0450] 实施例 22 :通过表面等离子体共振测量 FGF 受体对 FGF 配体的结合亲和力

[0451] 通过表面等离子体共振测量可溶 FGF 受体 (FGFR) 与 FGF 配体的相互作用的动力学速率常数、平衡结合常数和平衡解离常数。在该研究中检查多种形式的 FGFR3。制备了有两个或三个 Ig 样域,且具有两个可能的点突变 (S249W 或 P250R) 的 FGFR3。FGFR3 都制备为二聚体 Fc- 融合蛋白。对于这些研究,利用 Fc 标签将 FGFR 分子俘获在先前用蛋白 A 固定的 Biacore 芯片上。使 FGF 配体在含肝素的缓冲液中在该表面上流过。尽管 FGF 配体为单体,但认为它们在肝素的存在下结合为二聚物。因此确定,二价分析物模型是适合用于这

些相互作用的。

[0452] 亲和力测定：表征了 FGF 受体的对 FGF 配体的结合亲和力。对各相互作用测量结合速率常数 ($k_a(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$) 和解离速率常数 ($k_d(\text{s}^{-1})$)。结合速率常数为反映配体-受体复合物形成速率的值。解离速率常数为反映该复合物稳定性的值。平衡结合亲和力通常表示为平衡解离常数 ($K_D(\text{M})$) 或平衡结合常数 ($K_A(\text{M}^{-1})$)。 K_D 是通过将解离速率常数除以结合速率常数 (k_d/k_a) 获得的, 而 K_A 是通过将结合速率常数除解离速率常数 (k_a/k_d) 获得的。具有类似的 K_D (或类似的 K_A) 的分子可能具有可广泛变化的结合和解离速率常数。因此, 测量 k_a 和 k_d 以及 K_A 或 K_D 有助于更加独特地描述配体-受体相互作用的亲和力。

[0453] 材料和方法：结合动力学和亲和力研究在 Biacore T100™ 系统 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 上进行。Biacore T100™ 的方法使用 Biacore T100™ Control 软件, v 2.0 编程。因为各 FGF 受体分子包含人 Fc 域, 将生物素化蛋白 A (Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL) 用作俘获试剂用于这些研究。将生物素化蛋白 A 在 HBS-EP 缓冲液 (10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% 表面活性剂 P20; GE Healthcare, Piscataway, NJ) 中稀释至 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度, 然后俘获至 SA (链亲和素) 传感器芯片的所有四个流动室上。每个流动室获得约 1100RU 的密度。随后通过蛋白质-A 以 150-250RU 的近似密度将各 FGF 受体分子俘获至 SA 芯片的单独的流动室上。Biacore 仪器测量结合于传感器芯片表面的蛋白质的质量, 因此, 验证了各循环中受体的俘获。

[0454] 对于动力结合研究, 制备了 FGF 配体的从 200nM-0.06nM 的连续 1 : 5 稀释物。将这些样品注射在表面上, 并允许它们特异结合至传感器芯片俘获的 FGF 受体。以结合时间为 7 分钟, 离解时间为 15 分钟进行各配体浓度的注射。以 50 $\mu\text{L/min}$ 的流速进行动力结合研究。所有结合实验在 25°C 在含 50 $\mu\text{g/mL}$ 肝素 (Calbiochem, La Jolla, Ca) 的 HBS-P 缓冲液 (10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.05% 表面活性剂 P20, pH 7.4; GE Healthcare, Piscataway, NJ) 中进行。

[0455] 在循环之间, 用 20mM 盐酸洗涤流动室以再生表面。该洗涤步骤从蛋白 A 表面去除俘获的 FGF 受体和任何结合的 FGF 配体, 便于接下来后一个测定样品的结合。数据使用 Biacore T100™ 评价软件 (版本 2.0) 编辑。数据通过减去参照流动室和空白注射处理。评价基线稳定性以保证在整个注射顺序过程中再生步骤提供了一致的结合表面。检查重复注射曲线的再现性。将结合曲线整体拟合于二价分析物模型。

[0456] 结果：确定了该二价分析物模型对这些相互作用而言是最适合的。该模型对 k_a (k_{a1} 和 k_{a2}) 以及 k_d (k_{d1} 和 k_{d2}) 两者都测量两个值。第一组值 (k_{a1} 和 k_{d1}) 描述相互作用的一价动力学。这些样品报告的亲和力是从这些值导出的, 命名为 K_{D1} 和 K_{A1} 。第二组值 (k_{a2} 和 k_{d2}) 是指相互作用的亲合力, 没有报告。尽管在残差中有一些趋向性 (trending), 但与模型的拟合对评估结合亲和力而言是令人满意的。表 30 详细列出了多种 FGFR3 分子与 FGF6 的结合相互作用的动力学。全长 FGFR 分子 (23_375) 的亲和力类似于二域 FGFR 分子 (143_375) 的亲和力。该点突变增加对 FGF6 的亲和力, 且 S249W 的亲和力 > P250R 的亲和力 > 野生型的亲和力。通常, 该亲和力的增加主要是由于较慢的解离速率常数导致的。

[0457] 表 30 : FGF6 的结合亲和力

[0458]

说明	k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	K_{D1} (M)	K_{A1} (M^{-1})
FGFR3IIIc(23_375) C(Fc5)	4.E+05	6.E-02	2.E-07	7.E+06
FGFR3IIIc(23_375) (S249W) C(Fc5)	6.E+05	5.E-04	8.E-10	1.E+09
FGFR3IIIc(23_375) (P250R) C(Fc5)	3.E+05	5.E-03	2.E-08	6.E+07
FGFR3IIIc(143_375) C(Fc5)	2.E+05	6.E-02	3.E-07	3.E+06
FGFR3IIIc(143_375) (S249W) C(Fc5)	3.E+05	6.E-04	2.E-09	5.E+08
FGFR3IIIc(143_375) (P250R) C(Fc5)	2.E+05	4.E-03	2.E-08	5.E+07

[0459] 实施例 23 :用于测定 FGFR-Fc 对肿瘤细胞的增殖的抑制的 ^3H - 胸苷增殖测定

[0460] 为测定 FGFR-Fc 抑制肿瘤细胞增殖的能力,进行 ^3H - 胸苷测定。将 Caki-1 和 DU145 肿瘤细胞以 2000 细胞 / 孔的密度铺板于 96- 孔平底板,并在 $37^{\circ}C$, 5% CO_2 培养过夜。次日,将 FGFR-Fc 构建体在 RPMI 1640 (具有 0.5% FBS, 1mM 丙酮酸钠,和 2mM GlutaMAX) 中以 20, 10, 和 $5 \mu g/mL$ 连续稀释,并在 $37^{\circ}C$, 5% CO_2 下铺板于孔保持 3 天。将细胞用每孔 $1 \mu Ci$ ^3H - 胸苷 (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ) 冲激 24h, 该 ^3H - 胸苷掺入增殖中的细胞。收集细胞并在 Packard TopCount NXT 上计数。

[0461] 结果 :在 $20 \mu g/mL$, 截短的 FGFR3-FC S249W 突变体抑制 Caki-1 和 DU145 细胞二者,其抑制程度稍微大于野生型 FGFR2-Fc 或 FGFR3-Fc。图 8A 演示 FGFR-Fc 抑制 Caki-1 细胞生长,图 8B 演示 FGFR-Fc 抑制 DU145 细胞生长。

[0462] 表 31 :增殖的百分比抑制

[0463]

细胞	全长 FGFR2-Fc A2256F	全长 FGFR3-Fc A2257F	截短的 FGFR3-Fc S249W A2258F
Caki-1	41%	48%	56%
DU145	47%	53%	59%

[0464] 实施例 24 :sFGFR-VEGF scFv 蛋白质抑制内皮细胞萌芽

[0465] 为测定包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白的功效,如 (Darland et al, Dev Biol 264(2003), 275) 所述建立内皮细胞和周皮细胞的体外共培养系统。在该共培养中,将包被在 Cytodex 珠上的 HUVEC 与人间充质干细胞 (Lonzo) 在 EGM-2 完全培养基和 D551 成纤维细胞条件化培养基的存在下在纤维蛋白凝胶中共培养。在实验开始时或在实验第 7 天,将 0.04-50nM 对照拮抗剂、VEGF-A 拮抗剂或包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白添加至培养物。在添加拮抗剂后的第 8 天使用 PFA 固定细胞。然后使用抗平滑肌细胞肌动蛋白 (α SMA) 或抗 PECAM 抗体通过 IHC 染色细胞以分别识别周皮细胞和内皮细胞。在使用对照拮抗剂处理的孔中,这些细

胞形成被周皮细胞覆盖保护的內皮细胞芽。在用抗 VEGF-A、包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白处理的细胞中,芽的数量和芽的长度减少,表明拮抗剂在该体外共培养模型中显示功效。

[0466] 研究设计 :在第 1 天,Cytodex-3 珠用 HUVECs 包被,在 37℃,5% CO₂ 培养过夜。在第 2 天,在 24 孔板的孔中将 HUVEC 珠 (200 珠 / 孔) 与人间充质干细胞 (hMSC) (40,000 细胞 / 孔) 一起包埋到纤维蛋白凝胶中。将 EGM-2 完全培养基和 D551 成纤维细胞培养基的 1 : 1 混合物与 2ng/mL HGF 一起添加至这些细胞。每两天替换培养基直到实验结束。在第 2 天 (从共培养开始起) 或第 7 天 (共培养形成后) 将拮抗剂添加至培养物。添加拮抗剂后将细胞在 4% PFA 中固定过夜。用抗 PECAM 或抗 SMA 抗体染色细胞,然后用第二抗体 (缀合有荧光剂) 染色。然后通过显微镜观察细胞,对 10 珠 / 孔的代表组手动计数芽的数量和长度。然后计算孔的平均值。

[0467] 结果 :在用对照拮抗剂处理的孔中,细胞形成被周皮细胞覆盖保护的內皮细胞芽。在用抗 VEGF-A 或包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白处理的细胞中,芽的数量和芽的长度减少,表明拮抗剂在该体外共培养模型中显示功效。

[0468] 实施例 25 :用 sFGFR-Fc 蛋白质预防性处理在 Nu/Nu 小鼠中抑制 A549 肺癌细胞生长

[0469] 为测定 sFGFR 蛋白质是否对小鼠肿瘤生长具有活性,在第 0 天对多组小鼠皮下注射 A549 肺癌肿瘤。然后多组小鼠 (n = 10/gp) 注射 0.01mg/Kg 至 10mg/Kg 对照试剂、sFGFR-Fc 蛋白质 2-3X/ 周历时 4 周,起始于肿瘤接种 1 天后。3X/ 周监测肿瘤体积 4 周。与注射对照试剂的小鼠相比,注射 sFGFR 蛋白质的小鼠肿瘤显著较小,表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0470] 研究设计 :8-10 周龄雌性 Nu/Nu 小鼠 (Charles River Laboratories) 在第 0 天用 2×10^6 个 A549 细胞在右肋腹皮下注射。从第 1 天开始,几组小鼠 (n = 10/ 组) 腹膜内注射浓度为 0.01mg/Kg 至 10mg/Kg 的对照试剂或 sFGFR-Fc 蛋白质 2-3X/ 周,注射 4 周。使用测径器测量监测肿瘤生长,3X/ 周,历时 4 周。肿瘤体积使用下式计算 : $1/2 * (B)^2 * L (mm^3)$ 。在研究结束时 (最后一次施用后 24 小时),处死小鼠,称重肿瘤并用于组织学。将肿瘤固定于 NBF 中,然后使用对小鼠內皮细胞特异的 MECA-32 抗体通过免疫组织化学测定血管密度。

[0471] 结果 :相比注射对照试剂的小鼠,注射 sFGFR 蛋白的小鼠肿瘤显著较小,表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0472] 实施例 26 :用 sFGFR-Fc 蛋白治疗处理抑制 Nu/Nu 小鼠中 A549 肺癌细胞生长

[0473] 为测定是否 sFGFR 蛋白对小鼠肿瘤生长具有活性,几组小鼠在第 0 天皮下注射 A549 肺癌肿瘤。当肿瘤达到尺寸 200mm³,几组小鼠 (n = 10/ 组) 注射 0.01mg/Kg-10mg/Kg 对照试剂,或 sFGFR-Fc 蛋白,2-3X/ 周,保持 4 周。监测肿瘤体积,3X/ 周。相比注射对照试剂的小鼠,注射 sFGFR-Fc 蛋白的小鼠肿瘤显著较小,表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0474] 研究设计 :8-10 周龄雌性 Nu/Nu 小鼠 (Charles River Laboratories) 在第 0 天在右肋腹皮下注射 2×10^6 A549 细胞。当肿瘤达到尺寸 200mm³,几组小鼠 (n = 10/ 组) 腹膜内注射 0.01mg/Kg-10mg/Kg 对照试剂,或 sFGFR-Fc 蛋白,2-3X/ 周,保持 4 周。使用测径器测量监测肿瘤生长,3X/ 周,保持 4 周。肿瘤体积使用下式计算 : $1/2 * (B)^2 * L (mm^3)$ 。在研

究结束时（最后一次施用后 24 小时），处死小鼠且肿瘤称重。肿瘤也交付进行组织学分析用于微血管密度。

[0475] 结果：相比注射对照试剂的小鼠，注射 sFGFR 蛋白的小鼠肿瘤显著较小，表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0476] 实施例 27：使用 sFGFR-Fc 蛋白的预防性处理抑制 Nu/Nu 小鼠中 DU145 前列腺癌细胞的生长

[0477] 为测试 sFGFR 蛋白是否对小鼠肿瘤生长具有活性，对多组小鼠在第 0 天皮下注射 DU145 前列腺癌肿瘤。然后对多组小鼠（ $n = 10/\text{组}$ ）注射 0.01mg/Kg 至 10mg/Kg 对照试剂，sFGFR-Fc 蛋白，2-3X/周，历时 4 周，自肿瘤接种 1 天后开始。监测肿瘤体积，3X/周，历时 4 周。相比注射对照试剂的小鼠，注射 sFGFR 蛋白的小鼠肿瘤显著较小，表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0478] 研究设计：8-10 周龄雌性 Nu/Nu 小鼠（Charles River Laboratories）在第 0 天在右肋腹皮下注射 2×10^6 DU145 细胞。从第 1 天开始，对多组小鼠（ $n = 10/\text{组}$ ）腹膜内注射浓度为 0.01mg/Kg 至 10mg/Kg 的对照试剂或 sFGFR-Fc 蛋白，2-3X/周，历时 4 周。使用测径器测量监测肿瘤生长，3X/周历时 4 周。肿瘤体积使用下式计算： $1/2 \times (B)^2 \times L (\text{mm}^3)$ 。在研究结束时（最后一次施用后 24 小时），处死小鼠，称重肿瘤，并进行组织学分析。将肿瘤固定于 NBF 中，然后使用对小鼠内皮细胞特异的 MECA-32 抗体通过免疫组织化学测定血管密度。

[0479] 结果：相比注射对照试剂的小鼠，注射 sFGFR 蛋白的小鼠肿瘤显著较小，表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0480] 实施例 28：用 sFGFR-Fc 蛋白的治疗性处理抑制 Nu/Nu 小鼠中 DU145 前列腺癌细胞的生长

[0481] 为测定 sFGFR 蛋白是否对小鼠肿瘤生长具有活性，对多组小鼠在第 0 天皮下注射 DU145 前列腺癌肿瘤。当肿瘤达到尺寸 200mm^3 时，对多组小鼠（ $n = 10/\text{组}$ ）注射 0.01mg/Kg-10mg/Kg 对照试剂，或 sFGFR-Fc 蛋白，2-3X/周，历时 4 周。监测肿瘤体积，3X/周。相比注射对照试剂的小鼠，注射 sFGFR-Fc 蛋白的小鼠肿瘤显著较小，表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0482] 研究设计：8-10 周龄雌性 Nu/Nu 小鼠（Charles River Laboratories）在第 0 天在右肋腹皮下注射 2×10^6 DU145 细胞。当肿瘤达到尺寸 200mm^3 时，对多组小鼠（ $n = 10/\text{组}$ ）腹膜内注射 0.01mg/Kg-10mg/Kg 对照试剂，或 sFGFR-Fc 蛋白，2-3X/周，历时 4 周。使用测径器测量监测肿瘤生长，3X/周，历时 4 周。肿瘤体积使用下式计算： $1/2 \times (B)^2 \times L (\text{mm}^3)$ 。在研究结束时（最后一次施用后 24 小时），处死小鼠并称重肿瘤。还对肿瘤进行组织学分析以测定微血管密度。

[0483] 结果：相比注射对照试剂的小鼠，注射 sFGFR 蛋白的小鼠肿瘤显著较小，表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0484] 实施例 29：用双特异性结合蛋白的预防性处理抑制 Nu/Nu 小鼠中 A549 肺癌细胞的生长

[0485] 为测定是否包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白对小鼠肿瘤生长具有活性，对多组小鼠在第 0 天皮下注射 A549 肺癌肿瘤。对多组小鼠

(n = 10/ 组) 然后注射 0.01mg/Kg 至 10mg/Kg 对照试剂, sFGFR-VEGF scFv 融合蛋白, 2-3X/ 周, 历时 4 周, 从肿瘤接种 1 天后起。监测肿瘤体积, 3X/ 周, 历时 4 周。相比注射对照试剂的小鼠, 注射包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白的小鼠肿瘤显著较小, 表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0486] 研究设计 :8-10 周龄雌性 Nu/Nu 小鼠 (Charles River Laboratories) 在第 0 天在右肋腹皮下注射 2×10^6 A549 细胞。从第 1 天开始, 对多组小鼠 (n = 10/ 组) 腹膜内注射浓度为 0.01mg/Kg 至 10mg/Kg 的对照试剂或 sFGFR-VEGFscFv 融合蛋白, 2-3X/ 周, 历时 4 周。使用测径器测量监测肿瘤生长, 3X/ 周历时 4 周。肿瘤体积使用下式计算 : $1/2 * (B)^2 * L (mm^3)$ 。在研究结束时 (最后一次施用后 24 小时), 处死小鼠, 称重肿瘤, 并进行组织学分析。将肿瘤固定于 NBF 中, 然后使用对小鼠内皮细胞特异的 MECA-32 抗体通过免疫组织化学测定血管密度。

[0487] 结果 :相比注射对照试剂的小鼠, 注射 sFGFR-VEGF scFv 融合蛋白的小鼠肿瘤显著较小, 表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0488] 实施例 30 :以双特异性结合蛋白的治疗性处理抑制 Nu/Nu 小鼠中 A549 肺癌细胞的生长

[0489] 为测定是否包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白对小鼠肿瘤生长具有活性, 对多组小鼠在第 0 天皮下注射 A549 肺癌肿瘤。当肿瘤达到尺寸 $200mm^3$, 对多组小鼠 (n = 10/ 组) 注射 0.01mg/Kg-10mg/Kg 对照试剂, 或包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白, 2-3X/ 周, 历时 4 周。监测肿瘤体积, 3X/ 周。相比注射对照试剂的小鼠, 注射包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白的小鼠肿瘤显著较小, 表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0490] 研究设计 :8-10 周龄雌性 Nu/Nu 小鼠 (Charles River Laboratories) 在第 0 天在右肋腹皮下注射 2×10^6 个 A549 细胞。当肿瘤达到尺寸 $200mm^3$ 时, 对多组小鼠 (n = 10/ 组) 腹膜内注射 0.01mg/Kg-10mg/Kg 对照试剂, 或包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白, 2-3X/ 周, 历时 4 周。使用测径器测量监测肿瘤生长, 3X/ 周, 历时 4 周。肿瘤体积使用下式计算 : $1/2 * (B)^2 * L (mm^3)$ 。在研究结束时 (最后一次施用后 24 小时), 处死小鼠并称重肿瘤。还对肿瘤进行组织学分析以测定微血管密度。

[0491] 结果 :相比注射对照试剂的小鼠, 注射包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白的小鼠肿瘤显著较小, 表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0492] 实施例 31 :用双特异性结合蛋白的预防性处理抑制 Nu/Nu 小鼠中 DU145 前列腺癌细胞的生长

[0493] 为测定是否包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白对小鼠肿瘤生长具有活性, 对多组小鼠在第 0 天皮下注射 DU145 前列腺癌肿瘤。对多组小鼠 (n = 10/ 组) 然后注射 0.01mg/Kg 至 10mg/Kg 对照试剂、包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白, 2-3X/ 周, 历时 4 周, 从肿瘤接种 1 天后开始。监测肿瘤体积, 3X/ 周, 历时 4 周。相比注射对照试剂的小鼠, 注射包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白的小鼠肿瘤显著较小, 表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0494] 研究设计 :8-10 周龄雌性 Nu/Nu 小鼠 (Charles River Laboratories) 在第 0 天

在右肋腹皮下注射 2×10^6 DU145 细胞。从第 1 天开始,对多组小鼠 ($n = 10$ /组) 腹膜内注射浓度为 0.01mg/Kg 至 10mg/Kg 对照试剂或包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白, 2-3X/ 周, 历时 4 周。使用测径器测量监测肿瘤生长, 3X/ 周历时 4 周。肿瘤体积使用下式计算: $1/2 \times (B)^2 \times L (\text{mm}^3)$ 。在研究结束时 (最后一次施用后 24 小时), 处死小鼠, 称重肿瘤, 并进行组织学分析。将肿瘤固定于 NBF 中, 然后使用对小鼠内皮细胞特异的 MECA-32 抗体通过免疫组织化学测定血管密度。

[0495] 结果: 相比注射对照试剂的小鼠, 注射包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白的小鼠肿瘤显著较小, 表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0496] 实施例 32: 使用双特异性结合蛋白的治疗性处理抑制 DU145 前列腺癌细胞在 Nu/Nu 小鼠中的生长

[0497] 为测定是否包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白对小鼠肿瘤生长具有活性, 对多组小鼠在第 0 天皮下注射 DU145 前列腺癌肿瘤。当肿瘤达到尺寸 200mm^3 时, 对多组小鼠 ($n = 10$ /组) 注射 0.01mg/Kg-10mg/Kg 对照试剂, 或包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白, 2-3X/ 周, 历时 4 周。监测肿瘤体积, 3X/ 周。相比注射对照试剂的小鼠, 注射包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白的小鼠肿瘤显著较小, 表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0498] 研究设计: 8-10 周龄雌性 Nu/Nu 小鼠 (Charles River Laboratories) 在第 0 天在右肋腹皮下注射 2×10^6 DU145 细胞。当肿瘤达到尺寸 200mm^3 时, 对多组小鼠 ($n = 10$ /组) 腹膜内注射 0.01mg/Kg-10mg/Kg 对照试剂, 或包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白, 2-3X/ 周, 历时 4 周。使用测径器测量监测肿瘤生长, 3X/ 周, 历时 4 周。肿瘤体积使用下式计算: $1/2 \times (B)^2 \times L (\text{mm}^3)$ 。在研究结束时 (最后一次施用后 24 小时), 处死小鼠且称重肿瘤。还对肿瘤进行组织学分析以测定微血管密度。

[0499] 结果: 相比注射对照试剂的小鼠, 注射包含 VEGF-A 抗体 / 可溶 FGF 受体双特异性结合蛋白的双特异性结合蛋白的小鼠肿瘤显著较小, 表明拮抗剂对肿瘤生长抑制的功效。

[0500] 根据上述, 应理解, 尽管为了说明的目的在此描述了本发明的具体实施方案, 但在不偏离本发明的精神和范围的前提下可作出各种变化。因此, 本发明除了由所附权利要求限定外不受限制。所有在此引用的公开物、专利和专利申请以其整体通过提述并入本文用于一切目的。

[0001]

序列表

<110> 酶遗传学股份有限公司

<120> 使用包含抗体-受体组合的多特异性结合蛋白的组合物和方法

<130> 08-18PC

<160> 89

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1863

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> pZMP31solFGFR3IIIC(23-375) (S249W) Fc5

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1863)

<400> 1

atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc	48
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly	
1 5 10 15	

gcc gtc ttc gtt tgc ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc	96
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg	
20 25 30	

ttc cgt aga gag tcc ttg ggg acg gag cag cgc glc gtg ggg cga gcg	144
Phe Arg Arg Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala	
35 40 45	

gca gaa gtc ccg ggc cca gag ccc ggc cag cag gag cag ttg gtc ttc	192
Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe	
50 55 60	

ggc agc ggg gat gct gtg gag ctg agc tgt ccc ccg ccc ggg ggt ggt	240
Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly Gly	
65 70 75 80	

ccc atg ggg ccc act gtc tgg gtc aag gat ggc aca ggg ctg gtg ccc	288
Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val Pro	
85 90 95	

tcg gag cgt gtc ctg gtg ggg ccc cag cgg ctg cag gtg ctg aat gcc	336
Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala	
100 105 110	

tcc cac gag gac tcc ggg gcc tac agc tgc cgg cag cgg ctc acg cag	384
Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln	
115 120 125	

cgc gta ctg tgc cac ttc agt gtg cgg gtg aca gac gct cca tcc tcg	432
Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser	
130 135 140	

gga gat gac gaa gac ggg gag gac gag gct gag gac aca ggt gtg gac	480
Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp	
145 150 155 160	

aca ggg gcc cct tac tgg aca cgg ccc gag cgg atg gac aag aag ctg	528
Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu	
165 170 175	

ctg gcc gtg ccg gcc gcc aac acc gtc cgc ttc cgc tgc cca gcc gct	576
Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala	
180 185 190	

ggc aac ccc act ccc tcc atc tcc tgg ctg aag aac ggc agg gag ttc	624
Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe	
195 200 205	

cgc ggc gag cac cgc att gga ggc atc aag ctg cgg cat cag cag tgg	672
Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp	

[0002]

210	215	220	
agc ctg gtc atg gaa agc gtg gtg ccc tgc gac cgc ggc aac tac acc Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr 225 230 235 240			720
tgc gtc gtg gag aac aag ttt ggc agc atc cgg cag acg tac acg ctg Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu 245 250 255			768
gac gtg ctg gag cgc tgg ccg cac cgg ccc atc ctg cag gcg ggg ctg Asp Val Leu Glu Arg Trp Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu 260 265 270			816
ccg gcc aac cag acg gcg gtg ctg ggc agc gac gtg gag ttc cac tgc Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys 275 280 285			864
aag gtg tac agt gac gca cag ccc cac atc cag tgg ctc aag cac gtg Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val 290 295 300			912
gag gtg aat ggc agc aag gtg ggc ccg gac ggc aca ccc tac gtt acc Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr 305 310 315 320			960
gtg ctc aag acg gcg ggc gct aac acc acc gac aag gag cta gag gtt Val Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val 325 330 335			1008
ctc tcc ttg cac aac gtc acc ttt gag gac gcc ggg gag tac acc tgc Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys 340 345 350			1056
ctg gcg ggc aat tct att ggg ttt tct cat cac tct gcg tgg ctg gtg Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala Trp Leu Val 355 360 365			1104
gtg ctg cca gcc gag gag gag ctg gtg gag gct gac gag gcg ggc agt Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser 370 375 380			1152
gtg tat gca ggc gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca Val Tyr Ala Gly Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro 385 390 395 400			1200
ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe 405 410 415			1248
ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val 420 425 430			1296
aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe 435 440 445			1344
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro 450 455 460			1392
cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Arg Val Val Ser Val Leu Thr 465 470 475 480			1440
gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val 485 490 495			1488
tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 500 505 510			1536
aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Ser Arg 515 520 525			1584
gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 530 535 540			1632

[0003]

530	535	540	
ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro 545 550 555 560			1680
gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser 565 570 575			1728
ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln 580 585 590			1776
ggg aac gtc ttc tca tgc tcc glg atg cat gag gct ctg cac aac cac Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His 595 600 605			1824
tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 610 615 620			1863
<210> 2			
<211> 620			
<212> PRT			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 合成结构			
<400> 2			
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly 1 5 10 15			
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg 20 25 30			
Phe Arg Arg Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala 35 40 45			
Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe 50 55 60			
Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly Gly 65 70 75 80			
Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val Pro 85 90 95			
Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala 100 105 110			
Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln 115 120 125			
Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser 130 135 140			
Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp 145 150 155 160			
Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu 165 170 175			
Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala 180 185 190			

[0004]

Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Ser	Ile	Ser	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Arg	Glu	Phe	195	200	205
Arg	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Arg	His	Gln	Gln	Trp	210	215	220
Ser	Leu	Val	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Asn	Tyr	Thr	225	230	235
Cys	Val	Val	Glu	Asn	Lys	Phe	Gly	Ser	Ile	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Leu	245	250	255
Asp	Val	Leu	Glu	Arg	Trp	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	260	265	270
Pro	Ala	Asn	Gln	Thr	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Phe	His	Cys	275	280	285
Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys	His	Val	290	295	300
Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Lys	Val	Gly	Pro	Asp	Gly	Thr	Pro	Tyr	Val	Thr	305	310	315
Val	Leu	Lys	Thr	Ala	Gly	Ala	Asn	Thr	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Glu	Val	325	330	335
Leu	Ser	Leu	His	Asn	Val	Thr	Phe	Glu	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	340	345	350
Leu	Ala	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly	Phe	Ser	His	His	Ser	Ala	Trp	Leu	Val	355	360	365
Val	Leu	Pro	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Val	Glu	Ala	Asp	Glu	Ala	Gly	Ser	370	375	380
Val	Tyr	Ala	Gly	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	385	390	395
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	405	410	415
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	420	425	430
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	435	440	445
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	450	455	460
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	465	470	475
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	485	490	495
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	500	505	510

[0005]

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 515 520 525

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 530 535 540

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 545 550 555 560

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 565 570 575

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 580 585 590

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 595 600 605

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 610 615 620

<210> 3
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> zc62552

<400> 3
 caggaaatcc atgccgagtt gagacgttc cgtagagagt ccttggggac ggagcagcgc 60

<210> 4
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> zc62557

<400> 4
 cgccctgcagg atgggccggt gcggccagcg ctccagcacg tccagcgtgt 50

<210> 5
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> zc62556

<400> 5
 tacacgctgg acgtgctgga gcgtggccg caccggccca tcctgcaggc g 51

<210> 6
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> zc62553

<400> 6
 tgggcattg tgagttttgt ctgaagattt gggtctgcct gcatacacac tgcccgctc 60

<210> 7
 <211> 60
 <212> DNA

[0006]

<213>	人工的	
<220>		
<223>	z62554	
<400>	7	
gtggaggctg acgagggcggg cagtgtgtat gcaggcgagc ccaaattcttc agacaaaact		60
<210>	8	
<211>	61	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	z62555	
<400>	8	
caaccccaga gctgttttaa ggccgcgcctc tagattattt acccggagac agggagaggc		60
t		61
<210>	9	
<211>	1503	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	pZMP31solFGFR3IIIC (143-375) (S249W)Fc5	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(1).. (1503)	
<400>	9	
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc		48
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly		
1 5 10 15		
gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc		96
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg		
20 25 30		
ttc cgt aga gac aca ggt gtg gac aca ggg gcc cct tac tgg aca cgg		144
Phe Arg Arg Asp Thr Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg		
35 40 45		
ccc gag cgg atg gac aag aag ctg ctg gcc gtg ccg gcc gcc aac acc		192
Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr		
50 55 60		
gtc cgc ttc cgc tgc cca gcc gct ggc aac ccc act ccc tcc atc tcc		240
Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser		
65 70 75 80		
tgg ctg aag aac ggc agg gag ttc cgc ggc gag cac cgc att gga ggc		288
Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly		
85 90 95		
atc aag ctg cgg cat cag cag tgg agc ctg gtc atg gaa agc gtg gtg		336
Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val		
100 105 110		
ccc tcg gac cgc ggc aac tac acc tgc gtc gtg gag aac aag ttt ggc		384
Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly		
115 120 125		
agc atc cgg cag acg tac acg ctg gac gtg ctg gag cgc tgg ccg cac		432
Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Trp Pro His		
130 135 140		
cgg ccc atc ctg cag gcg ggg ctg ccg gcc aac cag acg gcg gtg ctg		480
Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu		
145 150 155 160		
ggc agc gac gtg gag ttc cac tgc aag gtg tac agt gac gca cag ccc		528
Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro		
165 170 175		

[0007]

cac atc cag tgg ctc aag cac gtg gag gtg aat ggc agc aag gtg ggc His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly 180 185 190	576
ccg gac ggc aca ccc tac gtt acc gtg ctc aag acg gcg ggc gct aac Pro Asp Lys Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn 195 200 205	624
acc acc gac aag gag cta gag gtt ctc tcc ttg cac aac gtc acc ttt Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe 210 215 220	672
gag gac gcc ggg gag tac acc tgc ctg gcg ggc aat tct att ggg ttt Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe 225 230 235 240	720
tct cat cac tct gcg tgg ctg gtg gtg ctg cca gcc gag gag gag ctg Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu 245 250 255	768
gtg gag gct gac gag gcg ggc agt gtg tat gca ggc gag ccc aaa tct Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Glu Pro Lys Ser 260 265 270	816
tca gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu 275 280 285	864
ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 290 295 300	912
atg atc tcc cgg acc cct gag glc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 305 310 315 320	960
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 325 330 335	1008
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 340 345 350	1056
tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 355 360 365	1104
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser 370 375 380	1152
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 385 390 395 400	1200
gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 405 410 415	1248
agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 420 425 430	1296
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 435 440 445	1344
ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 450 455 460	1392
gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 465 470 475 480	1440
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 485 490 495	1488

[0008]

tct ccg ggt aaa taa
Ser Pro Gly Lys
500

<210> 10
<211> 500
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成结构

<400> 10

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
20 25 30

Phe Arg Arg Asp Thr Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg
35 40 45

Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr
50 55 60

Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser
65 70 75 80

Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly
85 90 95

Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val
100 105 110

Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly
115 120 125

Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Trp Pro His
130 135 140

Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu
145 150 155 160

Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro
165 170 175

His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly
180 185 190

Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn
195 200 205

Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe
210 215 220

Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe
225 230 235 240

Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu
245 250 255

[0009]

Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Glu Pro Lys Ser
 260 265 270
 Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu
 275 280 285
 Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 290 295 300
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 305 310 315 320
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 325 330 335
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 340 345 350
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 355 360 365
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser
 370 375 380
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 385 390 395 400
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495
 Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 11
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> zc62560

<400> 11
 caggaaatcc atgccgagtt gagacgcttc cgtagagaca cagggtgigga cacaggggcc

60

<210> 12
 <211> 1863
 <212> DNA
 <213> 人工的

[0010]

```

<220>
<223> pZMP31sol1FGFR3IT1c (23..375)Fc5

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1863)

<400> 12
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc      48
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1          5          10          15

gcc gtc ttc gtt tgc ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc      96
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
20          25          30

ttc cgt aga gag tcc ttg ggg acg gag cag cgc gtc gtg ggg cga gcg      144
Phe Arg Arg Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala
35          40          45

gca gaa gtc cgg ggc cca gag ccc ggc cag cag gag cag ttg gtc ttc      192
Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe
50          55          60

ggc agc ggg gat gct gtg gag ctg agc tgt ccc ccg ccc ggg ggt ggt      240
Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly Gly
65          70          75          80

ccc atg ggg ccc act gtc tgg gtc aag gat ggc aca ggg ctg gtg ccc      288
Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val Pro
85          90          95

tcg gag cgt gtc ctg gtg ggg ccc cag cgg ctg cag gtg ctg aat gcc      336
Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala
100         105         110

tcc cac gag gac tcc ggg gcc tac agc tgc cgg cag cgg ctc acg cag      384
Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln
115         120         125

cgc gta ctg tgc cac ttc agt gtg cgg gtg aca gac gct cca tcc tcg      432
Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser
130         135         140

gga gat gac gaa gac ggg gag gac gag gct gag gac aca ggt gtg gac      480
Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp
145         150         155         160

aca ggg gcc cct tac tgg aca cgg ccc gag cgg atg gac aag aag ctg      528
Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu
165         170         175

ctg gcc gtg cgg gcc gcc aac acc gtc cgc ttc cgc tgc cca gcc gct      576
Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala
180         185         190

ggc aac ccc act ccc tcc atc tcc tgg ctg aag aac ggc agg gag ttc      624
Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe
195         200         205

cgc ggc gag cac cgc att gga ggc atc aag ctg cgg cat cag cag tgg      672
Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp
210         215         220

agc ctg gtc atg gaa agc gtg gtg ccc tcg gac cgc ggc aac tac acc      720
Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr
225         230         235         240

tgc gtc gtg gag aac aag ttt ggc agc atc cgg cag acg tac acg ctg      768
Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu
245         250         255

gac gtg ctg gag cgc tcc ccg cac cgg ccc atc ctg cag gcg ggg ctg      816
Asp Val Leu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu
260         265         270

ccg gcc aac cag acg gcg gtg ctg ggc agc gac gtg gag ttc cac tgc      864
Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys

```

[0011]

275	280	285	
aag gtg tac agt gac gca cag ccc cac atc cag tgg ctc aag cac gtg Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val 290 295 300			912
gag gtg aat ggc agc aag gtg ggc ccg gac ggc aca ccc tac gtt acc Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr 305 310 315 320			960
gtg ctc aag acg gcg ggc gct aac acc acc gac aag gag cta gag gtt Val Leu Lys Thr 325 Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val 330 335			1008
ctc tcc ttg cac aac gtc acc ttt gag gac gcc ggg gag tac acc tgc Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys 340 345 350			1056
ctg gcg ggc aat tct att ggg ttt tct cat cac tct gcg tgg ctg gtg Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala Trp Leu Val 355 360 365			1104
gtg ctg cca gcc gag gag gag ctg gtg gag gct gac gag gcg ggc agt Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser 370 375 380			1152
gtg tat gca ggc gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca Val Tyr Ala Gly Glu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro 385 390 395 400			1200
ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe 405 410 415			1248
ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val 420 425 430			1296
aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe 435 440 445			1344
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro 450 455 460			1392
cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr 465 470 475 480			1440
gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val 485 490 495			1488
tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 500 505 510			1536
aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg lac acc ctg ccc cca tcc cgg Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg 515 520 525			1584
gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 530 535 540			1632
ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro 545 550 555 560			1680
gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser 565 570 575			1728
ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln 580 585 590			1776
ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His 600 605 610			1824

[0012]

[0013]

Asp Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu
 260 265 270
 Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys
 275 280 285
 Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val
 290 295 300
 Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr
 305 310 315 320
 Val Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val
 325 330 335
 Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys
 340 345 350
 Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala Trp Leu Val
 355 360 365
 Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser
 370 375 380
 Val Tyr Ala Gly Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 385 390 395 400
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
 405 410 415
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 420 425 430
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 435 440 445
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 450 455 460
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 465 470 475 480
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 485 490 495
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 500 505 510
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 515 520 525
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 530 535 540
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 545 550 555 560
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 565 570 575

[0014]

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 580 585 590
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 595 600 605
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 610 615 620
 <210> 14
 <211> 1863
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> pZMP31sol1FGFR3IIIc (23-375) (P250R) Fc5
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1863)
 <400> 14
 atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc 48
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc 96
 Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
 20 25 30
 ttc cgt aga gag tcc ttg ggg acg gag cag cgc gtc gtg ggg cga gcg 144
 Phe Arg Arg Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala
 35 40 45
 gca gaa gtc ccg ggc cca gag ccc ggc cag cag gag cag ttg gtc ttc 192
 Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe
 50 55 60
 ggc agc ggg gat gct gtg gag ctg agc tgt ccc ccg ccc ggg ggt ggt 240
 Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 ccc atg ggg ccc act gtc tgg gtc aag gat ggc aca ggg ctg gtg ccc 288
 Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val Pro
 85 90 95
 tcg gag cgt gtc ctg glg ggg ccc cag cgg ctg cag gtg ctg aat gcc 336
 Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala
 100 105 110
 tcc cac gag gac tcc ggg gcc tac agc tgc cgg cag cgg ctc acg cag 384
 Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln
 115 120 125
 cgc gta ctg tgc cac ttc agt gtg cgg gtg aca gac gct cca tcc tcg 432
 Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 gga gat gac gaa gac ggg gag gac gag gct gag gac aca ggt gtg gac 480
 Gly Asp Asp Glu Asp Glu Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp
 145 150 155 160
 aca ggg gcc cct tac tgg aca cgg ccc gag cgg atg gac aag aag ctg 528
 Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu
 165 170 175
 ctg gcc gtg ccg gcc gcc aac acc gtc cgc ttc cgc tgc cca gcc gct 576
 Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala
 180 185 190
 ggc aac ccc act ccc tcc atc tcc tgg ctg aag aac ggc agg gag ttc 624
 Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe
 195 200 205
 cgc ggc gag cac cgc att gga ggc atc aag ctg cgg cat cag cag tgg 672

[0015]

Arg 210	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Gly 215	Gly	Ile	Lys	Leu	Arg 220	His	Gln	Gln	Trp	
agc Ser 225	ctg Leu	gtc Val	atg Met	gaa Glu	agc Ser 230	gtg Val	gtg Val	ccc Pro	tgg Ser	gac Asp 235	cgc Arg	ggc Gly	aac Asn	tac Tyr	acc Thr 240	720
tgc Cys	gtc Val	gtg Val	gag Glu	aac Asn 245	aag Lys	tgt Phe	ggc Gly	agc Ser	atc Ile 250	cgg Arg	cag Gln	acg Thr	tac Tyr	acg Thr 255	ctg Leu	768
gac Asp	gtg Val	ctg Leu	gag Glu	cgc Arg 260	tcc Ser	cgg Arg	cac His	cgg Pro	ccc Ile	atc Leu	ctg Gln	cag Ala	ggc Ala	ggg Gly	ctg Leu	816
ccg Pro	gcc Ala	aac Asn 275	cag Gln	acg Thr	gcg Ala	gtg Val 280	ctg Leu	ggc Gly	agc Ser	gac Asp	gtg Val	gag Glu	ttc Phe	cac His	tgc Cys	864
aag Lys 290	gtg Val	tac Tyr	agt Ser	gac Asp	gca Ala	cag Gln 295	ccc Pro	cac His	atc Ile	cag Gln 300	tgg Trp	ctc Leu	aag Lys	cac His	gtg Val	912
gag Glu 305	gtg Val	aat Asn	ggc Gly	agc Ser	aag Lys 310	gtg Val	ggc Gly	ccg Pro	gac Asp	ggc Gly 315	aca Thr	ccc Pro	tac Tyr	gtt Val	acc Thr 320	960
gtg Val	ctc Leu	aag Lys	acg Thr	gcg Ala 325	ggc Gly	gct Ala	aac Asn	acc Thr	acc Thr 330	gac Asp	aag Lys	gag Glu	cta Leu	gag Glu 335	gtt Val	1008
ctc Leu	tcc Ser	tgt Leu	cac His 340	aac Asn	gtc Val	acc Thr	ttt Phe	gag Glu 345	gac Asp	gcc Ala	ggg Gly	gag Glu	tac Tyr 350	acc Thr	tgc Cys	1056
ctg Leu	gcg Ala	ggc Gly 355	aat Asn	tct Ser	att Ile	ggg Gly	ttt Phe 360	tct Ser	cat His	cac His	tct Ser	gcg Ala	tgg Trp	ctg Leu	gtg Val	1104
gtg Val 370	ctg Leu	cca Pro	gcc Ala	gag Glu	gag Glu	gag Glu 375	ctg Leu	gtg Val	gag Glu	gct Ala	gac Asp 380	gag Glu	gcg Ala	ggc Gly	agt Ser	1152
gtg Val 385	tat Tyr	gca Ala	ggc Gly	gag Glu	ccc Pro 390	aaa Lys	tct Ser	tca Ser	gac Asp	aaa Lys 395	act Thr	cac His	aca Thr	tgc Cys	cca Pro 400	1200
ccg Pro	tgc Cys	cca Pro	gca Ala 405	cct Pro	gaa Glu	gcc Ala	gag Glu	ggg Gly	gca Ala 410	ccg Pro	tca Ser	gtc Val	ttc Phe	ctc Leu	ttc Phe 415	1248
ccc Pro	cca Pro	aaa Lys 420	ccc Pro	aag Lys	gac Asp	acc Thr	ctc Leu	atg Met 425	atc Ile	tcc Ser	cgg Arg	acc Thr	cct Pro	gag Glu	gtc Val 430	1296
aca Thr	tgc Cys	gtg Val 435	gtg Val	gtg Val	gac Asp	gtg Val	agc His	cac His	gaa Glu	gac Asp	cct Pro	gag Glu	gtc Val	aag Lys	ttc Phe	1344
aac Asn 450	tgg Trp	tac Tyr	gtg Val	gac Asp	ggc Gly	gtg Val 455	gag Glu	gtg Val	cat His	aat Asn	gcc Ala	aag Lys	aca Thr	aag Lys	ccg Pro	1392
cgg Arg 465	gag Glu	gag Glu	cag Gln	tac Tyr	aac Asn 470	agc Ser	acg Thr	tac Tyr	cgt Arg	gtg Val 475	gtc Val	agc Ser	gtc Val	ctc Leu	acc Thr 480	1440
gtc Val	ctg Leu	cac His	cag Gln	gac Asp 485	tgg Trp	ctg Leu	aat Asn	ggc Gly	aag Lys 490	gag Glu	tac Tyr	aag Lys	tgc Cys	aag Lys 495	gtc Val	1488
tcc Ser	aac Asn	aaa Lys 500	gcc Ala	ctc Leu	cca Pro	tcc Ser	tcc Ser	atc Ile	gag Glu 505	aaa Lys	acc Thr	atc Ile	tcc Ser	aaa Lys	gcc Ala	1536
aaa Lys 515	ggg Gly	cag Gln	ccc Pro	cga Arg	gaa Glu	cca Pro	cag Gln	gtg Val	tac Tyr	acc Thr	ctg Leu	ccc Pro	cca Pro	tcc Ser	cgg Arg	1584
gat Gly	gag Glu	ctg Val	acc Asp	aag Lys	aac Glu	cag Glu	gtc Val	agc Ser	ctg Val	acc Thr	tgc Leu	ctg Val	gtc Val	aaa Lys	ggc Pro	1632

[0016]

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 530 535 540	
ttc tal ccc agc gac atc gcc glg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro 545 550 555 560	1680
gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser 565 570 575	1728
ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln 580 585 590	1776
ggg aac gtc ttc tca tgc tcc glg atg cat gag gct ctg cac aac cac Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His 595 600 605	1824
tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 610 615 620	1863
<210> 15 <211> 620 <212> PRT <213> 人工的	
<220> <223> 合成结构	
<400> 15	
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly 1 5 10 15	
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg 20 25 30	
Phe Arg Arg Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala 35 40 45	
Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe 50 55 60	
Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly Gly 65 70 75 80	
Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val Pro 85 90 95	
Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala 100 105 110	
Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln 115 120 125	
Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser 130 135 140	
Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp 145 150 155 160	
Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu 165 170 175	
Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala 180 185 190	

[0017]

Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Ser	Ile	Ser	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Arg	Glu	Phe	195	200	205
Arg	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Arg	His	Gln	Gln	Trp	210	215	220
Ser	Leu	Val	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Asn	Tyr	Thr	225	230	235
Cys	Val	Val	Glu	Asn	Lys	Phe	Gly	Ser	Ile	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Leu	245	250	255
Asp	Val	Leu	Glu	Arg	Ser	Arg	His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	260	265	270
Pro	Ala	Asn	Gln	Thr	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Phe	His	Cys	275	280	285
Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys	His	Val	290	295	300
Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Lys	Val	Gly	Pro	Asp	Gly	Thr	Pro	Tyr	Val	Thr	305	310	315
Val	Leu	Lys	Thr	Ala	Gly	Ala	Asn	Thr	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Glu	Val	325	330	335
Leu	Ser	Leu	His	Asn	Val	Thr	Phe	Glu	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	340	345	350
Leu	Ala	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly	Phe	Ser	His	His	Ser	Ala	Trp	Leu	Val	355	360	365
Val	Leu	Pro	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Val	Glu	Ala	Asp	Glu	Ala	Gly	Ser	370	375	380
Val	Tyr	Ala	Gly	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	385	390	395
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	405	410	415
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	420	425	430
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	435	440	445
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	450	455	460
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	465	470	475
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	485	490	495
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	500	505	510

[0018]

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 515 520 525
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 530 535 540
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 545 550 555 560
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 565 570 575
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 580 585 590
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 595 600 605
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 610 615 620

<210> 16
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> zc62558

<400> 16
 ccccgccctgc aggatggggc ggtgccggga gcgctccagc acgtccagcg t 51

<210> 17
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> zc62559

<400> 17
 acgctggagc tgcaggagcg ctcccgccac cggcccatcc tgcaggcggg g 51

<210> 18
 <211> 1503
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pZMP31solFGFR3IIIc(143-375)Fc5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1503)

<400> 18
 atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc 48
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

gcc gtc ttc gtt tgc ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc 96
 Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
 20 25 30

ttc cgt aga gac aca ggt gtg gac aca ggg gcc cct tac tgg aca cgg 144
 Phe Arg Arg Asp Thr Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg
 35 40 45

[0019]

ccc gag cgg atg gac aag aag ctg ctg gcc gtg ccg gcc gcc aac acc Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr 50 55 60	192
gtc cgc ttc cgc tgc cca gcc gct ggc aac ccc act ccc tcc atc tcc Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser 65 70 75 80	240
tgg ctg aag aac ggc agg gag ttc cgc ggc gag cac cgc att gga ggc Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly 85 90 95	288
atc aag ctg cgg cat cag cag tgg agc ctg gtc atg gaa agc gtg gtg Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val 100 105 110	336
ccc tgc gac cgc ggc aac tac acc tgc gtc gtg gag aac aag ttt ggc Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly 115 120 125	384
agc atc cgg cag acg tac acg ctg gac gtg ctg gag cgc tcc ccg cac Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Pro His 130 135 140	432
cgg ccc atc ctg cag gcg ggg ctg ccg gcc aac cag acg gcg gtg ctg Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu 145 150 155 160	480
ggc agc gac gtg gag ttc cac tgc aag gtg tac agt gac gca cag ccc Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro 165 170 175	528
cac atc cag tgg ctg aag cac glg gag glg aal ggc agc aag gtg ggc His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly 180 185 190	576
ccg gac ggc aca ccc tac gtt acc gtg ctg aag acg gcg ggc gct aac Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn 195 200 205	624
acc acc gac aag gag cta gag gtt ctg tcc ttg cac aac gtc acc ttt Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe 210 215 220	672
gag gac gcc ggg gag tac acc tgc ctg gcg ggc aat tct att ggg ttt Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe 225 230 235 240	720
tct cat cac tct gcg tgg ctg gtg gtg ctg cca gcc gag gag gag ctg Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu 245 250 255	768
gtg gag gct gac gag gcg ggc agt gtg tat gca ggc gag ccc aaa tct Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Glu Pro Lys Ser 260 265 270	816
tca gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu 275 280 285	864
ggg gca ccg tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctg Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 290 295 300	912
atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 305 310 315 320	960
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 325 330 335	1008
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 340 345 350	1056
tac cgt gtg gtc agc gtc ctg acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 355 360 365	1104

[0020]

```

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc      1152
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser
370                               375                               380

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag      1200
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
385                               390                               395                               400

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc      1248
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
405                               410                               415

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa gcc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      1296
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
420                               425                               430

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      1344
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
435                               440                               445

ccc gtg ctg gac tcc gac gcc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      1392
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
450                               455                               460

gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      1440
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
465                               470                               475                               480

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      1488
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
485                               490                               495

tct ccg ggt aaa taa
Ser Pro Gly Lys
500

```

<210> 19
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成结构

<400> 19

```

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1          5          10          15

```

```

Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
20          25          30

```

```

Phe Arg Arg Asp Thr Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg
35          40          45

```

```

Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr
50          55          60

```

```

Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser
65          70          75          80

```

```

Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly
85          90          95

```

```

Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val
100         105         110

```

```

Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly
115        120        125

```

```

Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Pro His

```

[0021]

130	135	140
Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu 145	150	155 160
Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro 165	170	175
His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly 180	185	190
Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn 195	200	205
Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe 210	215	220
Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe 225	230	235 240
Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu 245	250	255
Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Glu Pro Lys Ser 260	265	270
Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu 275	280	285
Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 290	295	300
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 305	310	315 320
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 325	330	335
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 340	345	350
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 355	360	365
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser 370	375	380
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 385	390	395 400
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 405	410	415
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 420	425	430
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 435	440	445
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		

[0022]

450	455	460	
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
465	470	475	480
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
	485	490	495
Ser Pro Gly Lys			
	500		
<210>	20		
<211>	60		
<212>	DNA		
<213>	人工的		
<220>			
<223>	zc62560		
<400>	20		
caggaaatcc atgccgagtt gagacgcctc cgtagagaca cagggtgga cacaggggcc			60
<210>	21		
<211>	1503		
<212>	DNA		
<213>	人工的		
<220>			
<223>	pZMP31solFGFR3IIc (143-375) (P250R)Fc5		
<220>			
<221>	CDS		
<222>	(1).. (1503)		
<400>	21		
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc			48
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly			
1	5	10	15
gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc			96
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg			
	20	25	30
ttc cgt aga gac aca ggt gtg gac aca ggg gcc cct tac tgg aca cgg			144
Phe Arg Arg Asp Thr Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg			
	35	40	45
ccc gag cgg atg gac aag aag ctg ctg gcc gtg cgg gcc gcc aac acc			192
Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr			
	50	55	60
gtc cgc ttc cgc tgc cca gcc gct ggc aac ccc act ccc tcc atc tcc			240
Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser			
	65	70	75
tgg ctg aag aac ggc agg gag ttc cgc ggc gag cac cgc att gga ggc			288
Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly			
	85	90	95
atc aag ctg cgg cat cag cag tgg agc ctg gtc atg gaa agc gtg gtg			336
Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val			
	100	105	110
ccc tcg gac cgc ggc aac tac acc tgc gtc gtg gag aac aag ttt ggc			384
Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly			
	115	120	125
agc atc cgg cag acg tac acg ctg gac gtg ctg gag cgc tcc cgg cac			432
Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Arg His			
	130	135	140
cgg ccc atc ctg cag gcg ggg ctg cgg gcc aac cag acg gcg gtg ctg			480
Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu			
	145	150	155

[0023]

ggc agc gac gtg gag ttc cac tgc aag gtg tac agt gac gca cag ccc Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro 165 170 175	528
cac atc cag tgg ctc aag cac gtg gag gtg aat ggc agc aag gtg ggc His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Thr Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly 180 185 190	576
ccg gac ggc aca ccc tac gtt acc gtg ctc aag acg gcg ggc gct aac Pro Asp Thr 195 Val Thr 200 Lys Thr 205 Ala Gly Ala Asn	624
acc acc gac aag gag cta gag gtt ctc tcc ttg cac aac gtc acc ttt Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe 210 215 220	672
gag gac gcc ggg gag tac acc tgc ctg gcg ggc aat tct att ggg ttt Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe 225 230 235 240	720
tct cat cac tct gcg tgg ctg gtg gtg ctg cca gcc gag gag gag ctg Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu 245 250 255	768
gtg gag gct gac gag gcg ggc agt gtg tat gca gcc gag ccc aaa tct Val Glu Ala Asp 260 Glu Ala Gly Ser 265 Val Tyr Ala Gly Glu Pro Lys Ser 270	816
tca gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu 275 280 285	864
ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 290 295 300	912
atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc Met Ile Ser Arg Thr 310 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 305 315 320	960
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 325 330 335	1008
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 340 345 350	1056
tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 355 360 365	1104
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser 370 375 380	1152
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 385 390 395 400	1200
gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 405 410 415	1248
agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 420 425 430	1296
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 435 440 445	1344
ccc gtc ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 450 455 460	1392
gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg Val Asp Lys Ser Arg Trp 470 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 465 475 480	1440

[0024]

```

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      1488
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
                               485                               490                               495

tct ccg ggt aaa taa      1503
Ser Pro Gly Lys
                               500

<210> 22
<211> 500
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成结构

<400> 22

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1                               5                               10                               15

Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
                               20                               25                               30

Phe Arg Arg Asp Thr Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg
                               35                               40                               45

Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr
                               50                               55                               60

Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser
65                               70                               75                               80

Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly
                               85                               90                               95

Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val
                               100                              105                              110

Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly
                               115                              120                              125

Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Arg His
                               130                              135                              140

Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu
145                              150                              155                              160

Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro
                               165                              170                              175

His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly
                               180                              185                              190

Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn
                               195                              200                              205

Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe
210                              215                              220

Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe
225                              230                              235                              240

```

[0025]

Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu
 245 250 255
 Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Glu Pro Lys Ser
 260 265 270
 Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu
 275 280 285
 Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 290 295 300
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 305 310 315 320
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 325 330 335
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 340 345 350
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 355 360 365
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser
 370 375 380
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 385 390 395 400
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495
 Ser Pro Gly Lys
 500
 <210> 23
 <211> 1872
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> pZMP31sol1FGFR2a1phaIIIC (22-377) Fc5
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1872)

[0026]

<400> 23	
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Cys Gly 1 5 10 15	48
gcc gtc ttc gtt tgc ctc agc cag gaa atc cal gcc gag ttg aga cgc Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg 20 25 30	96
ttc cgt aga cgg ccc tcc ttc agt tta gtt gag gat acc aca tta gag Phe Arg Arg Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu 35 40 45	144
cca gaa gag cca cca acc aaa tac caa atc tct caa cca gaa gtg tac Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr 50 55 60	192
gtg gct gca cca ggg gag tgc cta gag gtg cgc tgc ctg ttg aaa gat Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp 65 70 75 80	240
gcc gcc gtg atc agt tgg act aag gat ggg gtg cac ttg ggg ccc aac Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn 85 90 95	288
aat agg aca gtg ctt att ggg gag tac ttg cag ata aag ggc gcc acg Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr 100 105 110	336
cct aga gac tcc ggc ctc tat gct tgt act gcc agt agg act gta gac Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp 115 120 125	384
agt gaa act tgg tac ttc atg gtg aat gtc aca gat gcc atc tca tcc Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser 130 135 140	432
gga gat gat gag gat gac acc gat ggt gcg gaa gat ttt gtc agt gag Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu 145 150 155 160	480
aac agt aac aac aag aga gca cca tac tgg acc aac aca gaa aag atg Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met 165 170 175	528
gaa aag cgg ctc cal gct gtg cct gcg gcc aac act gtc aag ttt cgc Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg 180 185 190	576
tgc cca gcc ggg ggg aac cca atg cca acc atg cgg tgg ctg aaa aac Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn 195 200 205	624
ggg aag gag ttt aag cag gag cat cgc att gga ggc tac aag gta cga Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg 210 215 220	672
aac cag cac tgg agc ctc att atg gaa agt gtg gtc cca tct gac aag Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys 225 230 235 240	720
gga aat tat acc tgt gtg gtg gag aat gaa tac ggg tcc atc aat cac Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His 245 250 255	768
acg tac cac ctg gat gtt gtg gag cga tgc cct cac cgg ccc atc ctc Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu 260 265 270	816
caa gcc gga ctg ccg gca aat gcc tcc aca gtg gtc gga gga gac gta Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val 275 280 285	864
gag ttt gtc tgc aag gtt tac agt gat gcc cag ccc cac atc cag tgg Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp 290 295 300	912
atc aag cac gtg gaa aag aac ggc agt aaa tac ggg ccc gac ggg ctg Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu 305 310 315 320	960

[0027]

305	310	315	320	
ccc tac ctc aag gtt ctc aag gcc gcc ggt gtt aac acc acg gac aaa Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys	325	330	335	1008
gag att gag gtt ctc tat att cgg aat gta act ttt gag gac gct ggg Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly	340	345	350	1056
gaa tat acg tgc ttg gcg ggt aat tct att ggg ata tcc ttt cac tct Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser	355	360	365	1104
gca tgg ttg aca gtt ctg cca gcg cct gga aga gaa aag gag att aca Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr	370	375	380	1152
gct tcc cca gac tac ctg gag gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His	385	390	395	1200
aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val	405	410	415	1248
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	420	425	430	1296
cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu	435	440	445	1344
gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	450	455	460	1392
aca aag ccg ccg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	465	470	475	1440
gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	485	490	495	1488
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile	500	505	510	1536
tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	515	520	525	1584
cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	530	535	540	1632
gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	545	550	555	1680
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	565	570	575	1728
gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	580	585	590	1776
tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	595	600	605	1824
cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	610	615	620	1872

<210> 24

[0028]

```

<211> 623
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成结构

<400> 24

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1          5          10          15

Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
20          25          30

Phe Arg Arg Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu
35          40          45

Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr
50          55          60

Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp
65          70          75          80

Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn
85          90          95

Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr
100         105         110

Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp
115         120         125

Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser
130         135         140

Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu
145         150         155         160

Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met
165         170         175

Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg
180         185         190

Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn
195         200         205

Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg
210         215         220

Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys
225         230         235         240

Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His
245         250         255

Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu
260         265         270

Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val
275         280         285

```

[0029]

Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp
 290 295 300
 Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu
 305 310 315 320
 Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys
 325 330 335
 Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly
 340 345 350
 Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser
 355 360 365
 Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr
 370 375 380
 Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 385 390 395 400
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val
 405 410 415
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 420 425 430
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 435 440 445
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 450 455 460
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 465 470 475 480
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 485 490 495
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 500 505 510
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 515 520 525
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 530 535 540
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 545 550 555 560
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 565 570 575
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 580 585 590
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 595 600 605

[0030]

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
610 615 620	
<210> 25	
<211> 60	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> zc62932	
<400> 25	
caggaaatcc atgccgagtt gagacgcctc cgtagacggc cctccctcag tttagttgag	60
<210> 26	
<211> 60	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> zc62933	
<400> 26	
tgggcatgtg tgagttttgt ctgaagattt gggtcctcc aggtagtcig gggaagcigt	60
<210> 27	
<211> 60	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> zc62934	
<400> 27	
gaaaaggaga ttacagcttc ccagactac ctggaggagc ccaaacttc agacaaaact	60
<210> 28	
<211> 1872	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> pZMP31solFGFR2alphaIIIc (22_377) (S252W)Fc5	
<220>	
<221> CDS	
<222> (1)..(1872)	
<400> 28	
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc	48
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly	
1 5 10 15	
gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc	96
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg	
20 25 30	
ttc cgt aga cgg ccc tcc ttc agt tta gtt gag gat acc aca tta gag	144
Phe Arg Arg Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu	
35 40 45	
cca gaa gag cca cca acc aaa tac caa atc tct caa cca gaa gtg tac	192
Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr	
50 55 60	
gtg gct gca cca ggg gag tcg cta gag gtg cgc tgc ctg ttg aaa gat	240
Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp	
65 70 75 80	
gcc gcc gtg atc agt tgg act aag gat ggg gtg cac ttg ggg ccc aac	288
Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn	
85 90 95	
aat agg aca gtg ctt att ggg gag tac ttg cag ata aag ggc gcc acg	336

[0031]

Asn	Arg	Thr	Val	Leu	Ile	Gly	Glu	Tyr	Leu	Gln	Ile	Lys	Gly	Ala	Thr		
			100					105					110				
cct	aga	gac	tcc	ggc	ctc	tat	gct	tgt	act	gcc	agc	agg	act	gla	gac	384	
Pro	Arg	Asp	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ala	Cys	Thr	Ala	Ser	Arg	Thr	Val	Asp		
		115					120			125							
agt	gaa	act	tgg	tac	ttc	atg	gtg	aat	gtc	aca	gat	gcc	atc	tca	tcc	432	
Ser	Glu	Thr	Trp	Tyr	Phe	Met	Val	Asn	Val	Thr	Asp	Ala	Ile	Ser	Ser		
	130					135				140							
gga	gat	gat	gag	gat	gac	acc	gat	ggc	gcg	gaa	gat	ttt	gtc	agt	gag	480	
Gly	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Thr	Asp	Gly	Ala	Glu	Asp	Phe	Val	Ser	Glu		
	145				150					155					160		
aac	agc	aac	aac	aag	aga	gca	cca	tac	tgg	acc	aac	aca	gaa	aag	atg	528	
Asn	Ser	Asn	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Asn	Thr	Glu	Lys	Met		
			165					170						175			
gaa	aag	cgg	ctc	cat	gct	gtg	cct	gcg	gcc	aac	act	gtc	aag	ttt	cgc	576	
Glu	Lys	Arg	Leu	His	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Lys	Phe	Arg		
		180					185					190					
tgc	cca	gcc	ggg	ggg	aac	cca	atg	cca	acc	atg	cgg	tgg	ctg	aaa	aac	624	
Cys	Pro	Ala	Gly	Gly	Asn	Pro	Met	Pro	Thr	Met	Arg	Trp	Leu	Lys	Asn		
	195					200						205					
ggg	aag	gag	ttt	aag	cag	gag	cat	cgc	att	gga	ggc	tac	aag	gta	cga	672	
Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Gln	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Tyr	Lys	Val	Arg		
	210					215				220							
aac	cag	cac	tgg	agc	ctc	att	atg	gaa	agt	gtg	gtc	cca	tct	gac	aag	720	
Asn	Gln	His	Trp	Ser	Leu	Ile	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Lys		
	225				230					235				240			
gga	aat	tat	acc	tgt	gtg	gtg	gag	aat	gaa	tac	ggg	tcc	atc	aat	cac	768	
Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Glu	Asn	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ile	Asn	His		
			245					250					255				
acg	tac	cac	ctg	gat	gtt	gtg	gag	cga	tgg	cct	cac	cgg	ccc	atc	ctc	816	
Thr	Tyr	His	Leu	Asp	Val	Val	Glu	Arg	Trp	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Leu		
			260				265						270				
caa	gcc	gga	ctg	cgc	gca	aat	gcc	tcc	aca	glg	gtc	gga	gga	gac	gla	864	
Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Ala	Ser	Thr	Val	Val	Gly	Gly	Asp	Val		
	275					280						285					
gag	ttt	gtc	tgc	aag	gtt	tac	agt	gat	gcc	cag	ccc	cac	atc	cag	tgg	912	
Glu	Phe	Val	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp		
	290					295				300							
atc	aag	cac	gtg	gaa	aag	aac	ggc	agt	aaa	tac	ggg	ccc	gac	ggg	ctg	960	
Ile	Lys	His	Val	Glu	Lys	Asn	Gly	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Asp	Gly	Leu		
	305				310					315				320			
ccc	tac	ctc	aag	gtt	ctc	aag	gcc	gcc	ggc	gtt	aac	acc	acg	gac	aaa	1008	
Pro	Tyr	Leu	Lys	Val	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Val	Asn	Thr	Thr	Asp	Lys		
			325						330					335			
gag	att	gag	gtt	ctc	tat	att	cgg	aat	gta	act	ttt	gag	gac	gct	ggg	1056	
Glu	Ile	Glu	Val	Leu	Tyr	Ile	Arg	Asn	Val	Thr	Phe	Glu	Asp	Ala	Gly		
			340					345					350				
gaa	tat	acg	tgc	tig	gcg	ggc	aat	tct	att	ggg	ata	tcc	ttt	cac	tct	1104	
Glu	Tyr	Thr	Cys	Leu	Ala	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly	Ile	Ser	Phe	His	Ser		
		355					360					365					
gca	tgg	tig	aca	gtt	ctg	cca	gcg	cct	gga	aga	gaa	aag	gag	att	aca	1152	
Ala	Trp	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Arg	Glu	Lys	Glu	Ile	Thr		
	370					375					380						
gct	tcc	cca	gac	tac	ctg	gag	gag	ccc	aaa	tct	tca	gac	aaa	act	cac	1200	
Ala	Ser	Pro	Asp	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His		
	385				390					395				400			
aca	tgc	cca	cgc	tgc	cca	gca	cct	gaa	gcc	gag	ggg	gca	cgc	tca	gtc	1248	
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val		
			405					410					415				
ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	1296	

[0032]

Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
			420					425					430			
cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	1344
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	
		435						440				445				
gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	1392
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
	450					455				460						
aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	1440
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
	465				470					475				480		
gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	1488
Val	Leu	Thr	Val	Lcu	His	Gln	Asp	Trp	Lcu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
			485					490						495		
tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	tcc	tcc	atc	gag	aaa	acc	atc	1536
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
		500						505				510				
tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	glg	tac	acc	ctg	ccc	1584
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
	515						520					525				
cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	1632
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
	530					535					540					
gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	1680
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
	545				550					555				560		
ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	1728
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Lcu	Asp	Ser	
			565						570					575		
gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	glg	gac	aag	agc	agg	1776
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
		580						585					590			
tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	glg	atg	cat	gag	gct	ctg	1824
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
	595						600					605				
cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggg	aaa	taa	1872
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
	610					615					620					
<210> 29																
<211> 623																
<212> PRT																
<213> 人工的																
<220>																
<223> 合成结构																
<400> 29																
Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	
1				5					10					15		
Ala	Val	Phe	Val	Ser	Lcu	Ser	Gln	Glu	Ile	His	Ala	Glu	Lcu	Arg	Arg	
		20						25					30			
Phe	Arg	Arg	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Leu	Val	Glu	Asp	Thr	Thr	Leu	Glu	
	35					40					45					
Pro	Glu	Glu	Pro	Pro	Thr	Lys	Tyr	Gln	Ile	Ser	Gln	Pro	Glu	Val	Tyr	
	50				55						60					
Val	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Glu	Val	Arg	Cys	Leu	Leu	Lys	Asp	
65				70					75					80		

[0033]

Ala	Ala	Val	Ile	Ser	Trp	Thr	Lys	Asp	Gly	Val	His	Leu	Gly	Pro	Asn	
				85					90					95		
Asn	Arg	Thr	Val	Leu	Ile	Gly	Glu	Tyr	Leu	Gln	Ile	Lys	Gly	Ala	Thr	
			100					105					110			
Pro	Arg	Asp	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ala	Cys	Thr	Ala	Ser	Arg	Thr	Val	Asp	
			115				120					125				
Ser	Glu	Thr	Trp	Tyr	Phe	Met	Val	Asn	Val	Thr	Asp	Ala	Ile	Ser	Ser	
			130			135					140					
Gly	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Thr	Asp	Gly	Ala	Glu	Asp	Phe	Val	Ser	Glu	
			145			150				155					160	
Asn	Ser	Asn	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Asn	Thr	Glu	Lys	Met	
				165					170					175		
Glu	Lys	Arg	Leu	His	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Lys	Phe	Arg	
			180					185					190			
Cys	Pro	Ala	Gly	Gly	Asn	Pro	Met	Pro	Thr	Met	Arg	Trp	Leu	Lys	Asn	
			195				200					205				
Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Gln	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Tyr	Lys	Val	Arg	
			210			215					220					
Asn	Gln	His	Trp	Ser	Leu	Ile	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Lys	
					230					235					240	
Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Glu	Asn	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ile	Asn	His	
				245					250					255		
Thr	Tyr	His	Leu	Asp	Val	Val	Glu	Arg	Trp	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Leu	
			260					265					270			
Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Ala	Ser	Thr	Val	Val	Gly	Gly	Asp	Val	
			275				280					285				
Glu	Phe	Val	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp	
			290			295					300					
Ile	Lys	His	Val	Glu	Lys	Asn	Gly	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Asp	Gly	Leu	
					310					315					320	
Pro	Tyr	Leu	Lys	Val	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Val	Asn	Thr	Thr	Asp	Lys	
				325					330					335		
Glu	Ile	Glu	Val	Leu	Tyr	Ile	Arg	Asn	Val	Thr	Phe	Glu	Asp	Ala	Gly	
			340					345					350			
Glu	Tyr	Thr	Cys	Leu	Ala	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly	Ile	Ser	Phe	His	Ser	
			355				360					365				
Ala	Trp	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Arg	Glu	Lys	Glu	Ile	Thr	
			370			375					380					
Ala	Ser	Pro	Asp	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	
					390					395					400	

[0034]

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val
 405 410 415
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 420 425 430
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 435 440 445
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 450 455 460
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 465 470 475 480
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 485 490 495
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 500 505 510
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 515 520 525
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 530 535 540
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 545 550 555 560
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 565 570 575
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 580 585 590
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 595 600 605
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 610 615 620

<210> 30
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> zc62937

<400> 30
 ggcttggagg atgggcccgt gaggccatcg ctccacaaca tccaggtggt a

51

<210> 31
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> zc62936

<400> 31
 taccacctgg atgttgigga gcgatggcct caccggccca tctccaagc c

51

[0035]

```

<210> 32
<211> 1872
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> pZMP31solFGFR2alphaIIc (22-377) (P253R)Fc5

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1872)

<400> 32
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc      48
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1          5          10          15

gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc      96
Ala Val Phe Val Ser Lcu Scr Gln Glu Ile His Ala Glu Lcu Arg Arg
20          25          30

ttc cgt aga cgg ccc tcc ttc agt tta gtt gag gat acc aca tta gag     144
Phe Arg Arg Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu
35          40          45

cca gaa gag cca cca acc aaa tac caa atc tct caa cca gaa gtg tac     192
Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr
50          55          60

gtg gct gca cca ggg gag tcg cta gag gtg cgc tgc ctg ttg aaa gat     240
Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp
65          70          75          80

gcc gcc gtg atc agt tgg act aag gat ggg gtg cac ttg ggg ccc aac     288
Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn
85          90          95

aat agg aca gtg ctt att ggg gag tac ttg cag ata aag ggc gcc acg     336
Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr
100         105         110

cct aga gac tcc ggc ctc tat gct tgt act gcc agt agg act gta gac     384
Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp
115         120         125

agt gaa act tgg tac ttc atg gtg aat gtc aca gat gcc atc tca tcc     432
Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser
130         135         140

gga gat gat gag gat gac acc gat ggt gcg gaa gat ttt gtc agt gag     480
Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu
145         150         155         160

aac agt aac aac aag aga gca cca tac tgg acc aac aca gaa aag atg     528
Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met
165         170         175

gaa aag cgg ctc cat gct gtg cct gcg gcc aac act gtc aag ttt cgc     576
Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg
180         185         190

tgc cca gcc ggg ggg aac cca atg cca acc atg cgg tgg ctg aaa aac     624
Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn
195         200         205

ggg aag gag ttt aag cag gag cat cgc att gga ggc tac aag gta cga     672
Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg
210         215         220

aac cag cac tgg agc ctc att atg gaa agt gtg gtc cca tct gac aag     720
Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys
225         230         235         240

gga aat tat acc tgt gtg gtg gag aat gaa tac ggg tcc atc aat cac     768
Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His
245         250         255

```

[0036]

acg tac cac ctg gat gtt gtg gag cga tcg cgt cac cgg ccc atc ctc Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Arg His Arg Pro Ile Leu 260 265 270	816
caa gcc gga ctg ccg gca aat gcc tcc aca gtg gtc gga gga gac gta Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val 275 280 285	864
gag ttt gtc tgc aag gtt tac agt gat gcc cag ccc cac atc cag tgg Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp 290 295 300	912
atc aag cac gtg gaa aag aac gcc agt aaa tac ggg ccc gac ggg ctg Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu 305 310 315 320	960
ccc tac ctc aag gtt ctc aag gcc gcc ggt gtt aac acc acg gac aaa Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys 325 330 335	1008
gag att gag gtt ctc tat att cgg aat gta act ttt gag gac gct ggg Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly 340 345 350	1056
gaa tat acg tgc ttg gcg ggt aat tct att ggg ata tcc ttt cac tct Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser 355 360 365	1104
gca tgg ttg aca gtt ctg cca gcg cct gga aga gaa aag gag att aca Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr 370 375 380	1152
gcl tcc cca gac tac ctg gag gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His 385 390 395 400	1200
aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val 405 410 415	1248
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr 420 425 430	1296
cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu 435 440 445	1344
gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac gcc gtg gag gtg cat aat gcc aag Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys 450 455 460	1392
aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser 465 470 475 480	1440
gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat gcc aag gag tac aag Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys 485 490 495	1488
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile 500 505 510	1536
tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro 515 520 525	1584
cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu 530 535 540	1632
gtc aaa gcc ttc tat ccc agc gac atc gcc glg gag tgg gag agc aat Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn 545 550 555 560	1680
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser 565 570 575	1728

[0037]

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg 580 585 590	1776
tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu 595 600 605	1824
cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 610 615 620	1872
<210> 33 <211> 623 <212> PRT <213> 人工的	
<220> <223> 合成结构	
<400> 33	
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly 1 5 10 15	
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg 20 25 30	
Phe Arg Arg Arg Pro Ser Phe Ser Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu 35 40 45	
Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr 50 55 60	
Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp 65 70 75 80	
Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn 85 90 95	
Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr 100 105 110	
Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp 115 120 125	
Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser 130 135 140	
Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu 145 150 155 160	
Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met 165 170 175	
Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg 180 185 190	
Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn 195 200 205	
Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg 210 215 220	
Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys	

[0038]

225	230	235	240
Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His	245	250	255
Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Arg His Arg Pro Ile Leu	260	265	270
Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val	275	280	285
Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp	290	295	300
Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu	305	310	315
Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys	325	330	335
Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly	340	345	350
Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser	355	360	365
Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr	370	375	380
Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His	385	390	395
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val	405	410	415
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	420	425	430
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu	435	440	445
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	450	455	460
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	465	470	475
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	485	490	495
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile	500	505	510
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	515	520	525
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	530	535	540
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			

[0039]

545	550	555	560
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	565	570	575
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	580	585	590
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	595	600	605
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	610	615	620
<210> 34			
<211> 51			
<212> DNA			
<213> 人工的			
<220>			
<223> zc62939			
<400> 34			
tccggcttgg aggatgggcc ggtgacgcga tcgctccaca acatccaggt g			51
<210> 35			
<211> 51			
<212> DNA			
<213> 人工的			
<220>			
<223> zc62938			
<400> 35			
cacctggatg ttgtggagcg atcgcgtcac cggcccatcc tccaagccgg a			51
<210> 36			
<211> 1503			
<212> DNA			
<213> 人工的			
<220>			
<223> pZMP31solFGFR2alphaIIc(145-377)Fc5			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1).. (1503)			
<400> 36			
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc			48
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Cys Gly			
1 5 10 15			
gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc			96
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg			
20 25 30			
ttc cgt aga agt gag aac agt aac aac aag aga gca cca tac tgg acc			144
Phe Arg Arg Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr			
35 40 45			
aac aca gaa aag atg gaa aag cgg ctc cat gct glg cct gcg gcc aac			192
Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn			
50 55 60			
act gtc aag ttt cgc tgc cca gcc ggg ggg aac cca atg cca acc atg			240
Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met			
65 70 75 80			
cgg tgg ctg aaa aac ggg aag gag ttt aag cag gag cat cgc att gga			288
Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly			
85 90 95			

[0040]

ggc tac aag gta cga aac cag cac tgg agc ctc att atg gaa agt gtg Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val 100 105 110	336
gtc cca tct gac aag gga aat tat acc tgt gtg gtg gag aat gaa tac Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr 115 120 125	384
ggg tcc atc aat cac acg tac cac ctg gat gtt gtg gag cga tgg cct Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro 130 135 140	432
cac cgg ccc atc ctc caa gcc gga ctg ccg gca aat gcc tcc aca gtg His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val 145 150 155 160	480
gtc gga gga gac gta gag ttt gtc tgc aag gtt tac agt gat gcc cag Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln 165 170 175	528
ccc cac atc cag tgg atc aag cac gtg gaa aag aac ggc agt aaa tac Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr 180 185 190	576
ggg ccc gac ggg ctg ccc tac ctc aag gtt ctc aag gcc gcc ggt gtt Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val 195 200 205	624
aac acc acg gac aaa gag att gag gtt ctc tat att cgg aat gta act Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr 210 215 220	672
ttt gag gac gct ggg gaa tat acg tgc ttg gcg ggt aat tct att ggg Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly 225 230 235 240	720
ata tcc ttt cac tct gca tgg ttg aca gtt ctg cca gcg cct gga aga Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg 245 250 255	768
gaa aag gag att aca gct tcc cca gac tac ctg gag gag ccc aaa tct Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Lys Ser 260 265 270	816
tca gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu 275 280 285	864
ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 290 295 300	912
atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 305 310 315 320	960
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 325 330 335	1008
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 340 345 350	1056
tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 355 360 365	1104
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser 370 375 380	1152
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 385 390 395 400	1200
gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 405 410 415	1248

[0041]

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 420 425 430	1296
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 435 440 445	1344
ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 450 455 460	1392
gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 465 470 475 480	1440
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 485 490 495	1488
tct ccg ggt aaa taa Ser Pro Gly Lys 500	1503
<210> 37 <211> 500 <212> PRT <213> 人工的	
<220> <223> 合成结构	
<400> 37	
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly 1 5 10 15	
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg 20 25 30	
Phe Arg Arg Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr 35 40 45	
Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn 50 55 60	
Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met 65 70 75 80	
Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly 85 90 95	
Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val 100 105 110	
Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr 115 120 125	
Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro 130 135 140	
His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val 145 150 155 160	
Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln 165 170 175	

[0042]

```

Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr
      180                      185                      190

Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val
      195                      200                      205

Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr
      210                      215                      220

Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly
      225                      230                      235                      240

Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg
      245                      250                      255

Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Lys Ser
      260                      265                      270

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu
      275                      280                      285

Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
      290                      295                      300

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
      305                      310                      315                      320

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
      325                      330                      335

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
      340                      345                      350

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
      355                      360                      365

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser
      370                      375                      380

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
      385                      390                      395                      400

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
      405                      410                      415

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
      420                      425                      430

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
      435                      440                      445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
      450                      455                      460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
      465                      470                      475                      480

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
      485                      490                      495

```

[0043]

Ser Pro Gly Lys	
500	
<210> 38	
<211> 60	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> zc62935	
<400> 38	
caggaaatcc atgccgagtt gagacgcttc cgtagaagtg agaacagtaa caacaagaga	60
<210> 39	
<211> 1503	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> pZMP31solFGFR2alphal11c (145_377) (S252W) Fe5	
<220>	
<221> CDS	
<222> (1).. (1503)	
<400> 39	
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc	48
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Cys Gly	
1 5 10 15	
gcc gtc ttc gtt tgc ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc	96
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg	
20 25 30	
ttc cgt aga agt gag aac agt aac aac aag aga gca cca tac tgg acc	144
Phe Arg Arg Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr	
35 40 45	
aac aca gaa aag atg gaa aag cgg ctc cat gct gtc cct gcg gcc aac	192
Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn	
50 55 60	
act gtc aag ttt cgc tgc cca gcc ggg ggg aac cca atg cca acc atg	240
Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met	
65 70 75 80	
cgg tgg ctg aaa aac ggg aag gag ttt aag cag gag cat cgc att gga	288
Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly	
85 90 95	
ggc tac aag gta cga aac cag cac tgg agc ctc att atg gaa agt gtg	336
Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val	
100 105 110	
gtc cca tct gac aag gga aat tat acc tgt gtg gtc gag aat gaa tac	384
Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr	
115 120 125	
ggg tcc atc aat cac acg tac cac ctg gat gtt gtg gag cga tgg cct	432
Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Trp Pro	
130 135 140	
cac cgg ccc atc ctc caa gcc gga ctg ccg gca aat gcc tcc aca gtg	480
His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val	
145 150 155 160	
gtc gga gga gac gta gag ttt gtc tgc aag gtt tac agt gat gcc cag	528
Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln	
165 170 175	
ccc cac atc cag tgg atc aag cac gtg gaa aag aac ggc agt aaa tac	576
Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr	
180 185 190	
ggg ccc gac ggg ctg ccc tac ctc aag gtt ctc aag gcc gcc ggt gtt	624
Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val	

[0044]

195	200	205	
aac acc acg gac aaa gag att gag gtt ctc tat att cgg aat gta act Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr 210 215 220			672
ttt gag gac gct ggg gaa tat acg tgc ttg gcg ggt aat tct att ggg Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly 225 230 235 240			720
ata tcc ttt cac tct gca tgg ttg aca gtt ctg cca gcg cct gga aga Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg 245 250 255			768
gaa aag gag att aca gct tcc cca gac tac ctg gag gag ccc aaa tct Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Lys Ser 260 265 270			816
tca gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu 275 280 285			864
ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 290 295 300			912
atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg ggg gtg gac gtg agc Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 305 310 315 320			960
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 325 330 335			1008
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 340 345 350			1056
tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 355 360 365			1104
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser 370 375 380			1152
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 385 390 395 400			1200
gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 405 410 415			1248
agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 420 425 430			1296
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 435 440 445			1344
ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 450 455 460			1392
gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 465 470 475 480			1440
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 485 490 495			1488
tct ccg ggt aaa taa Ser Pro Gly Lys 500			1503

<210> 40

[0045]

```

<211> 500
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成结构

<400> 40

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1          5          10          15

Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
20          25          30

Phe Arg Arg Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro Tyr Trp Thr
35          40          45

Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn
50          55          60

Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met Pro Thr Met
65          70          75          80

Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly
85          90          95

Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met Glu Ser Val
100         105         110

Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Glu Tyr
115         120         125

Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Trp Pro
130         135         140

His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val
145         150         155         160

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

Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr
180         185         190

Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val
195         200         205

Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr
210         215         220

Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly
225         230         235         240

Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg
245         250         255

Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Lys Ser
260         265         270

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu
275         280         285

```

[0046]

Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 290 295 300
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 305 310 315 320
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 325 330 335
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 340 345 350
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 355 360 365
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser
 370 375 380
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 385 390 395 400
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495
 Ser Pro Gly Lys
 500
 <210> 41
 <211> 1503
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> pZMP31sol1FGFR2alphaIIc(145-377) (P253R)Fc5
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1503)
 <400> 41
 atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc 48
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc 96
 Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
 20 25 30
 ttc cgt aga agt gag aac agt aac aac aag aga gca cca tac tgg acc 144

[0047]

Phe	Arg	Arg	Ser	Glu	Asn	Ser	Asn	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	
		35					40					45				
aac	aca	gaa	aag	atg	gaa	aag	cgg	ctc	cat	gcl	gig	ccg	gcg	gcc	aac	192
Asn	Thr	Glu	Lys	Met	Glu	Lys	Arg	Leu	His	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	
	50					55				60						
act	gtc	aag	ttt	cgc	tgc	cca	gcc	ggg	ggg	aac	cca	atg	cca	acc	atg	240
Thr	Val	Lys	Phe	Arg	Cys	Pro	Ala	Gly	Gly	Asn	Pro	Met	Pro	Thr	Met	
	65				70					75					80	
cgg	tgg	ctg	aaa	aac	ggg	aag	gag	ttt	aag	cag	gag	cat	cgc	att	gga	288
Arg	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Gln	Glu	His	Arg	Ile	Gly	
			85						90					95		
ggc	tac	aag	gta	cga	aac	cag	cac	tgg	agc	ctc	att	atg	gaa	agc	gtg	336
Gly	Tyr	Lys	Val	Arg	Asn	Gln	His	Trp	Ser	Leu	Ile	Met	Glu	Ser	Val	
			100					105					110			
gtc	cca	tct	gac	aag	gga	aat	tat	acc	tgt	gtg	gig	gag	aat	gaa	tac	384
Val	Pro	Ser	Asp	Lys	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Glu	Asn	Glu	Tyr	
		115					120					125				
ggg	tcc	atc	aal	cac	acg	tac	cac	ctg	gal	glt	gig	gag	cga	tgc	cgt	432
Gly	Ser	Ile	Asn	His	Thr	Tyr	His	Leu	Asp	Val	Val	Glu	Arg	Ser	Arg	
	130					135				140						
cac	cgg	ccc	atc	ctc	caa	gcc	gga	ctg	ccg	gca	aat	gcc	tcc	aca	gtg	480
His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Ala	Ser	Thr	Val	
					150					155					160	
gtc	gga	gga	gac	gta	gag	ttt	gtc	tgc	aag	gtt	tac	agt	gat	gcc	cag	528
Val	Gly	Gly	Asp	Val	Glu	Phe	Val	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	
			165					170						175		
ccc	cac	atc	cag	tgg	atc	aag	cac	gtg	gaa	aag	aac	ggc	agt	aaa	tac	576
Pro	His	Ile	Gln	Trp	Ile	Lys	His	Val	Glu	Lys	Asn	Gly	Ser	Lys	Tyr	
			180					185					190			
ggg	ccc	gac	ggg	ctg	ccc	tac	ctc	aag	gtt	ctc	aag	gcc	gcc	ggt	gtt	624
Gly	Pro	Asp	Gly	Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Val	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Val	
		195				200						205				
aac	acc	acg	gac	aaa	gag	att	gag	gtt	ctc	tat	att	cgg	aat	gta	act	672
Asn	Thr	Thr	Asp	Lys	Glu	Ile	Glu	Val	Leu	Tyr	Ile	Arg	Asn	Val	Thr	
		210				215					220					
ttt	gag	gac	gct	ggg	gaa	tat	acg	tgc	ttg	gcg	ggt	aat	tct	att	ggg	720
Phe	Glu	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	Leu	Ala	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly	
				230						235					240	
ata	tcc	ttt	cac	tct	gca	tgg	ttg	aca	gtt	ctg	cca	gcg	cct	gga	aga	768
Ile	Ser	Phe	His	Ser	Ala	Trp	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Arg	
				245					250					255		
gaa	aag	gag	att	aca	gct	tcc	cca	gac	tac	ctg	gag	gag	ccc	aaa	tct	816
Glu	Lys	Glu	Ile	Thr	Ala	Ser	Pro	Asp	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro	Lys	Ser	
			260					265					270			
tca	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	gcc	gag	864
Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	
		275					280					285				
ggg	gca	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	912
Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
		290				295					300					
atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gig	gtg	gac	gtg	agc	960
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
					310					315					320	
cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gig	gac	ggc	gtg	gag	1008
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
				325					330				335			
gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	1056
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
			340					345				350				
tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	1104

[0048]

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn	
355 360 365	
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc	1152
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser	
370 375 380	
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag	1200
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln	
385 390 395 400	
gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc	1248
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val	
405 410 415	
agc ctg acc tgc ctg gtc aaa gcc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg	1296
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	
420 425 430	
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct	1344
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro	
435 440 445	
ccc gtg ctg gac tcc gac gcc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc	1392
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	
450 455 460	
gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg	1440
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val	
465 470 475 480	
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg	1488
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu	
485 490 495	
tct ccg ggt aaa taa	1503
Ser Pro Gly Lys	
500	

<210> 42
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成结构

<400> 42

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

[0049]

Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Arg	130	135	140
His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala Ser Thr Val	145	150	155
Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln	165	170	175
Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr	180	185	190
Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val	195	200	205
Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn Val Thr	210	215	220
Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly	225	230	235
Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala Pro Gly Arg	245	250	255
Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Lys Ser	260	265	270
Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu	275	280	285
Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	290	295	300
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	305	310	315
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu	325	330	335
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr	340	345	350
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn	355	360	365
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser	370	375	380
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln	385	390	395
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val	405	410	415
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	420	425	430
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro	435	440	445

[0050]

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	
450 455 460	
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val	
465 470 475 480	
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu	
485 490 495	
Ser Pro Gly Lys	
500	
<210> 43	
<211> 744	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> c870.1 e6 scFv	
<220>	
<221> CDS	
<222> (1).. (744)	
<400> 43	
gaa gtt caa ttg tta gag tct ggt ggc ggt ctt gtt cag cct ggt ggt	48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tct tta cgt ctt tct tgc gct gct tcc gga ttc act ttc tct ggt tac	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr	
20 25 30	
att atg tgg tgg gtt cgc caa gct cct ggt aaa ggt ttg gag tgg gtt	144
Ile Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
tct gtt atc tct cct tct ggt ggc gat act tgg tat gct gac tcc gtt	192
Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aaa ggt cgc ttc act atc tct aga gac aac tct aag aat act ctc tac	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
tta cag atg aac agc tta agg gct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcc aca gcg gga gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tca	336
Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
100 105 110	
agc ggt ggt ggt ggt tct ggc ggc ggc ggc tcc ggc ggc ggt gga agt	384
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
115 120 125	
ggt ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt ggt tct cag agc gtg ttg act cag	432
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln	
130 135 140	
cca ccc tca gcg tct ggg acc ccc ggc cag agg gtc acc atc tct tgt	480
Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys	
145 150 155 160	
tct gga agc agc tcc aac atc gga agg aat cct gta aac tgg tac cag	528
Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro Val Asn Trp Tyr Gln	
165 170 175	
cag ctc cca gga acg gcc ccc aaa ctc ctc atc tat ggt gat aat cag	576
Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asp Asn Gln	
180 185 190	

[0051]

```

egg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc tct ggc tcc aaa tct ggc acc      624
Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr
      195                200                205

tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc cag tct gag gat gag gct gat      672
Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp
      210                215                220

tat tac tgt gca gca tgg gat gac agc ctg aat ggt gtg gta ttc ggc      720
Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly
      225                230                235                240

gga ggg acc aag ctg acc gtc cta      744
Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
      245

<210> 44
<211> 248
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成结构

<400> 44
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1                5                10                15

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

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

Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp 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 Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
      100                105                110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
      115                120                125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln
      130                135                140

Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys
      145                150                155                160

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro Val Asn Trp Tyr Gln
      165                170                175

Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asp Asn Gln
      180                185                190

Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr
      195                200                205

Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp

```

[0052]

210	215	220	
Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly 225 230 235 240			
Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu 245			
<210> 45 <211> 744 <212> DNA <213> 人工的			
<220> <223> 1094.1 scFv			
<220> <221> CDS <222> (1).. (744)			
<400> 45 gaa gtt caa ttg tta gag tct ggt ggc ggt ctt gtt cag cct ggt ggt Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15			48
tct tta cgt ctt tct tgc gct gct tcc gga ttc act ttc tct ggt tac Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr 20 25 30			96
att atg tgg tgg gtt cgc caa gct cct ggt aaa ggt ttg gag tgg gtt Ile Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45			144
tct gtt atc tct cct tct ggt ggc gat act tgg tat gct gac tcc gtt Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60			192
aaa ggt cgc ttc act atc tct aga gac aac tct aag aat act ctc tac Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80			240
ttg cag atg aac agc tta agg gct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95			288
gcc aca gcg gga gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc act gtc tca Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser 100 105 110			336
agc ggt ggt ggt ggt tct ggc ggc ggc ggc tcc ggc ggc ggt gga agt Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 115 120 125			384
ggt ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt ggt tct cag agc gaa ttg act cag Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Glu Leu Thr Gln 130 135 140			432
cca ccc tca gcg tct ggg acc ccc ggg cag ggc gtc acc atc tct tgt Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Gly Val Thr Ile Ser Cys 145 150 155 160			480
tct gga agt agt tcc aac atc gga agt aat act gtt cag tgg tac cag Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Gln Trp Tyr Gln 165 170 175			528
cag ttc cca gga agg gcc ccc aaa ctc ctc atc tat agt aat aat cgg Gln Phe Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Arg 180 185 190			576
cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc tct ggt tcc aag tct ggc acc Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr 195 200 205			624
tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc cgg tcc gag gat gaa gct gat Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp 210 215 220			672

[0053]

tat tac tgt gca gca tgg gat gac agc ctg agt gtc gtg gta ttc ggc	720
Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Val Val Val Phe Gly	
225 230 235 240	
gga ggg acc aag ctg acc gtc cta	744
Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
245	
<210> 46	
<211> 248	
<212> PRT	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成结构	
<400> 46	
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr	
20 25 30	
Ile Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp 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 Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
100 105 110	
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
115 120 125	
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Glu Leu Thr Gln	
130 135 140	
Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Gly Val Thr Ile Ser Cys	
145 150 155 160	
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Gln Trp Tyr Gln	
165 170 175	
Gln Phe Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Arg	
180 185 190	
Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr	
195 200 205	
Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp	
210 215 220	
Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Val Val Val Phe Gly	
225 230 235 240	

[0054]

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
245

<210> 47
<211> 331
<212> DNA
<213> 人

<400> 47
cagagcgaat tgactcagcc accctcagcg tcitgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcitgttctg gaagcagctc caacatcgga aggaatcctg taaactggta ccagcacctc 120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat ggtgataatc agcggccctc aggggtccct 180
gaccgattct ctggctccag gctcggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggtccag 240
tcitgaggatg aggcitgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggigtggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta g 331

<210> 48
<211> 110
<212> PRT
<213> 人

<400> 48

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

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

Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 49
<211> 340
<212> DNA
<213> 人

<400> 49
gaagttcaat tgtagagtc tggcggcgt ctgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt 60
tcitgcctg ctccggatt cacitctctt ggttacatta tgggtgggt tcgccaagct 120
cctggtaaag gttggagt ggttctgtt atctctctt ctggtggcga tacttggtat 180
gctgactccg ttaaaggctg ctctactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
ttacagatga acagcttaag ggcitaggac acggccgtgt attactgtgc cacagcggga 300
gactactggg gccagggcac cctgggtacc gtcctaagcg 340

<210> 50
<211> 113
<212> PRT

[0055]

<213> 人

<400> 50

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

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

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

Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp 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 Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 51

<211> 744

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> c870.1scFv cDNA

<400> 51

```

gaagttcaat tgttagagtc tggtagcggt ctgttcagc ctggtaggtc tttacgtctt      60
tcttgccgtg cttccggatt cactttctct ggttacatta tgttgtaggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctctt ctggtagcga tacttggtat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttacagatga acagcttaag ggcagaggac acggccgtgt attactgtgc cacagcgga      300
gactactggg gccagggcac cctgggcacc gtctcaagcg gtggtaggtg tctggcggc      360
ggcggtcccg gcgggggtg aagtgggtgt ggtggtctg gtggtaggtg tctcagagc      420
gaattgacac agccaccctc agcgtctggg acccccgggc agagggtcac catctcttgt      480
tctggaagca gctccaacat cggaaggaa cctgtaaaact ggtaccagca cctcccagga      540
acggccccc aactcctcat ctaagggtat aatcagcggc cctcaggggt cctgaccga      600
ttctctggct ccaggtcttg cactcagcc tccctggcca tcagtgggt cagtcctgag      660
gatgaggctg attattactg tgcagcatgg gatgacagcc tgaatggtgt ggtattcggc      720
ggagggacca agctgaccgt ccta                                         744

```

<210> 52

<211> 248

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> c870.1 scFv

[0056]

<400> 52
 Glu Val Gly 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 Gly Tyr
 20 25 30
 Ile Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp 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 Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Glu Leu Thr Gln
 130 135 140
 Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys
 145 150 155 160
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro Val Asn Trp Tyr Gln
 165 170 175
 His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asp Asn Gln
 180 185 190
 Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr
 195 200 205
 Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 245

<210> 53
 <211> 331
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 53
 cagagcgaat tgactcagcc accctcagcg tcitgggaccc ccgggcaggg ggtcaccatc 60
 tcttgttctg gaagtagtgc caacatcgga agtaatactg ttcagtggta ccagcagttc 120
 ccaggaaggg cccccaact cctcatctat agtaataatc ggcggccctc aggggtccct 180
 gaccgattct ctggttccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg 240

[0057]

tccgaggatt aggcctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagccctgag tgcgtggta	300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta g	331
<210> 54	
<211> 110	
<212> PRT	
<213> 人	
<400> 54	
Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln	
1 5 10 15	
Gly Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn	
20 25 30	
Thr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu	
35 40 45	
Ile Tyr Ser Asn Asn Arg Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
50 55 60	
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg	
65 70 75 80	
Ser Glu Asp Gln Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu	
85 90 95	
Ser Val Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
100 105 110	
<210> 55	
<211> 340	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 55	
gaagtccaat tgitagagtc tgggtggcgt ctgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt	60
tcttgccgtg ctccggatt cactttctct ggtagatta tgtggtgggt tcgccaagct	120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat	180
gctgacctcg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgigt attactgtgc cacagcggga	300
gactactggg gccagggcac cctggtcact gtctcaagcg	340
<210> 56	
<211> 114	
<212> PRT	
<213> 人	
<400> 56	
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 Gly Tyr	
20 25 30	
Ile Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	

[0058]

```

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

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

Cys Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100                            105                            110

Ser Ser

<210> 57
<211> 2274
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> FGFR3(143-375) (S249W)Fc5 c1094.1 pZMP31

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (2274)

<400> 57
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc      48
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1                               5                               10                               15

gcc gtc ttc gtt tgc ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc      96
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
20                            25                            30

ttc cgt aga gac aca ggt gtg gac aca ggg gcc cct tac tgg aca cgg      144
Phe Arg Arg Asp Thr Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg
35                            40                            45

ccc gag cgg atg gac aag aag ctg ctg gcc gtg ccg gcc gcc aac acc      192
Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr
50                            55                            60

gtc cgc ttc cgc tgc cca gcc gct ggc aac ccc act ccc tcc atc tcc      240
Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser
65                               70                               75                               80

tgg ctg aag aac ggc agg gag ttc cgc ggc gag cac cgc att gga ggc      288
Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly
85                               90                               95

atc aag ctg cgg cat cag cag tgg agc ctg gtc atg gaa agc gtg gtg      336
Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val
100                            105                            110

ccc tgc gac cgc ggc aac tac acc tgc gtc glg gag aac aag ttt ggc      384
Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly
115                           120                           125

agc atc cgg cag acg tac acg ctg gac gtg ctg gag cgc tgg ccg cac      432
Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Trp Pro His
130                           135                           140

cgg ccc atc ctg cag gcg ggg ctg ccg gcc aac cag acg gcg gtg ctg      480
Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu
145                           150                           155                           160

ggc agc gac gtg gag ttc cac tgc aag gtg tac agt gac gca cag ccc      528
Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro
165                           170                           175

cac atc cag tgg ctc aag cac gtg gag gtg aat ggc agc aag gtg ggc      576
His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly
180                           185                           190

```

[0059]

cgc gac ggc aca ccc tac gtt acc gtg ctc aag acg gcg ggc gct aac Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn 195 200 205	624
acc acc gac aag gag cta gag gtt ctc tcc ttg cac aac gtc acc ttt Thr Thr Asp Lys Glu Leu Thr Val Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe 210 215 220	672
gag gac gcc ggg gag tac acc tgc ctg gcg ggc aat tct att ggg ttt Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe 225 230 235 240	720
tct cat cac tct gcg tgg ctg gtg gtg ctg cca gcc gag gag gag ctg Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu 245 250 255	768
gtg gag gct gac gag gcg ggc agt gtg tat gca ggc gag ccc aaa tct Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Glu Pro Lys Ser 260 265 270	816
tca gac aaa act cac aca tgc cca cgg tgc cca gca cct gaa gcc gag Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu 275 280 285	864
ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 290 295 300	912
atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 305 310 315 320	960
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 325 330 335	1008
gtg cat aat gcc aag aca aag cgg cgg gag gag cag tac aac agc acg Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 340 345 350	1056
tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 355 360 365	1104
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser 370 375 380	1152
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 385 390 395 400	1200
gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 405 410 415	1248
agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 420 425 430	1296
gag tgg gag agc aat ggg cag cgg gag aac aac tac aag acc acg cct Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 435 440 445	1344
ccc gtg ctg gac tcc gac gcc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 450 455 460	1392
gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 465 470 475 480	1440
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 485 490 495	1488
tct cgg ggt ggt gcc ggg ggt tgc ggt gga gga ggt tct gaa gtt caa Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln 500 505 510	1536

[0060]

ttg tta gag tct ggt ggc ggt ctt gtt cag cct ggt ggt tct tta cgt Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg 515 520 525	1584
ctt tct tgc gct gct tcc gga ttc act ttc tct ggt tac att atg tgg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ile Met Trp 530 535 540	1632
tgg gtt cgc caa gct cct ggt aaa ggt ttg gag tgg gtt tct gtt atc Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile 545 550 555 560	1680
tct cct tct ggt ggc gal act tgg tat gct gac tcc gtt aaa ggt cgc Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg 565 570 575	1728
ttc act atc tct aga gac aac tct aag aat act ctc tac ttg cag atg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met 580 585 590	1776
aac agc tta agg gct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt gcc aca gcg Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala 595 600 605	1824
gga gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc act gtc tca agc ggt ggt Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly 610 615 620	1872
ggt ggt tct ggc ggc ggc ggc tcc ggc ggg ggt gga agt ggt ggt ggt Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly 625 630 635 640	1920
ggt tct ggt ggt ggt ggt tct cag agc gaa ttg act cag cca ccc tca Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser 645 650 655	1968
ggg tct ggg acc ccc ggg cag ggg gtc acc atc tct tgt tct gga agt Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Gly Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser 660 665 670	2016
agt tcc aac atc gga agt aat act gtt cag tgg tac cag cag ttc cca Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Phe Pro 675 680 685	2064
gga agg gcc ccc aaa ctc ctc atc tat agt aat aat cgg cgg ccc tca Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Arg Arg Pro Ser 690 695 700	2112
ggg gtc cct gac cga ttc tct ggt tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser 705 710 715 720	2160
ctg gcc atc agt ggg ctc cgg tcc gag gat gaa gct gat tat tac tgt Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys 725 730 735	2208
gca gca tgg gat gac agc ctg agt gtc gtg gla ttc ggc gga ggg acc Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Val Val Val Phe Gly Gly Gly Thr 740 745 750	2256
aag ctg acc gtc cta taa Lys Leu Thr Val Leu 755	2274

<210> 58
<211> 757
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成结构

<400> 58

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg

[0061]

	20	25	30
Phe Arg Arg Asp Thr Gly Val	Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg		
35	40	45	
Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys	Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr		
50	55	60	
Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn	Pro Thr Pro Ser Ile Ser		
65	70	75	80
Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly			
85	90	95	
Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val			
100	105	110	
Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly			
115	120	125	
Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Trp Pro His			
130	135	140	
Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu			
145	150	155	160
Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro			
165	170	175	
His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly			
180	185	190	
Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn			
195	200	205	
Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe			
210	215	220	
Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe			
225	230	235	240
Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu			
245	250	255	
Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Glu Pro Lys Ser			
260	265	270	
Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu			
275	280	285	
Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
290	295	300	
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
305	310	315	320
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
325	330	335	
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr			

[0062]

340	345	350
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn	
355	360	365
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser	
370	375	380
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
385	390	395 400
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
405	410	415
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
420	425	430
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
435	440	445
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
450	455	460
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
465	470	475 480
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
485	490	495
Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln		
500	505	510
Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg		
515	520	525
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ile Met Trp		
530	535	540
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile		
545	550	555 560
Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg		
565	570	575
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met		
580	585	590
Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala		
595	600	605
Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly		
610	615	620
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
625	630	635 640
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser		
645	650	655
Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Gly Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser		

[0063]

660	665	670	
Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Phe Pro 675 680 685			
Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Arg Arg Pro Ser 690 695 700			
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser 705 710 715 720			
Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys 725 730 735			
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Val Val Val Phe Gly Gly Gly Thr 740 745 750			
Lys Leu Thr Val Leu 755			
<210> 59			
<211> 2634			
<212> DNA			
<213> 人工的			
<220>			
<223> FGFR3 (23-375) (S249W) Fe5 c1094.1 pZMP31			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1).. (2634)			
<400> 59			
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly 1 5 10 15			48
gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg 20 25 30			96
ttc cgt aga gag tcc ttg ggg acg gag cag cgc gtc gtg ggg cga gcg Phe Arg Arg Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala 35 40 45			144
gca gaa gtc ccg ggc cca gag ccc ggc cag cag gag cag ttg gtc ttc Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe 50 55 60			192
ggc agc ggg gat gct gtg gag ctg agc tgt ccc ccg ccc ggg ggt ggt Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly Gly 65 70 75 80			240
ccc atg ggg ccc act gtc tgg gtc aag gat ggc aca ggg ctg gtg ccc Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val Pro 85 90 95			288
tgc gag cgt gtc ctg gtg ggg ccc cag cgg ctg cag gtg ctg aat gcc Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala 100 105 110			336
tcc cac gag gac tcc ggg gcc tac agc tgc cgg cag cgg ctg acg cag Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln 115 120 125			384
cgc gta ctg tgc cac ttc agt gtg cgg gtg aca gac gct cca tcc tcg Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser 130 135 140			432
gga gat gac gaa gac ggg gag gac gag gct gag gac aca ggt gtg gac Gly Asp Asp Glu Asp 150 Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp 145 155 160			480

[0064]

aca ggg gcc cct tac tgg aca cgg ccc gag cgg atg gac aag aag ctg Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu 165 170 175	528
ctg gcc gtg ccg gcc gcc aac acc gtc cgc ttc cgc tgc cca gcc gct Leu Ala Val Pro Thr Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala 180 185 190	576
ggc aac ccc act ccc tcc atc tcc tgg ctg aag aac ggc agg gag ttc Gly Asn Thr Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe 195 200 205	624
cgc gcc gag cac cgc att gga gcc atc aag ctg cgg cat cag cag tgg Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp 210 215 220	672
agc ctg gtc atg gaa agc gtg gtg ccc tgc gac cgc gcc aac tac acc Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr 225 230 235 240	720
tgc gtc gtg gag aac aag ttt gcc agc atc cgg cag acg tac acg ctg Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu 245 250 255	768
gac gtg ctg gag cgc tgg cgg cac cgg ccc atc ctg cag gcc ggg ctg Asp Val Leu Glu Arg Trp Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu 260 265 270	816
ccg gcc aac cag acg gcc gtg ctg gcc agc gac gtg gag ttc cac tgc Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys 275 280 285	864
aag gtg tac agt gac gca cag ccc cac atc cag tgg ctc aag cac gtg Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val 290 295 300	912
gag gtg aat gcc agc aag gtg gcc cgg gac gcc aca ccc tac gtt acc Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr 305 310 315 320	960
gtg ctc aag acg gcc gcc gct aac acc acc gac aag gag cta gag gtt Val Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val 325 330 335	1008
ctc tcc ttg cac aac gtc acc ttt gag gac gcc ggg gag tac acc tgc Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys 340 345 350	1056
ctg gcc gcc aat tct att ggg ttt tct cat cac tct gcc tgg ctg gtg Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala Trp Leu Val 355 360 365	1104
gtg ctg cca gcc gag gag gag ctg gtg gag gct gac gag gcc gcc agt Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser 370 375 380	1152
gtg tat gca gcc gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca Val Tyr Ala Gly Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro 385 390 395 400	1200
ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca cgg tca gtc ttc ctc ttc Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe 405 410 415	1248
ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val 420 425 430	1296
aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe 435 440 445	1344
aac tgg tac gtg gac gcc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro 450 455 460	1392
cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr 465 470 475 480	1440

[0065]

gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val 485 490 495	1488
tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc Ser Asn Lys Gln Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 500 505 510	1536
aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg 515 520 525	1584
gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 530 535 540	1632
ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro 545 550 555 560	1680
gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser 565 570 575	1728
ttc ttc ctg tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln 580 585 590	1776
ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His 595 600 605	1824
tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt ggt ggc ggg ggt tgc Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser 610 615 620	1872
ggt gga gga ggt tct gaa gtt caa ttg tta gag tct ggt ggc ggt ctt Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu 625 630 635 640	1920
ggt cag cct ggt ggt tct tta cgt ctt tct tgc gct gct tcc gga ttc Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe 645 650 655	1968
act ttc tct ggt tac att atg tgg tgg gtt cgc caa gct cct ggt aaa Thr Phe Ser Gly Tyr Ile Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys 660 665 670	2016
ggt ttg gag tgg gtt tct gtt atc tct cct tct ggt ggc gat act tgg Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp 675 680 685	2064
tat gct gac tcc gtt aaa ggt cgc ttc act atc tct aga gac aac tct Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser 690 695 700	2112
aag aat act ctc tac ttg cag atg aac agc tta agg gct gag gac acg Lys Asn Thr Leu Tyr Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr 705 710 715 720	2160
gcc gtg tat tac tgt gcc aca gcg gga gac tac tgg ggc cag ggc acc Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 725 730 735	2208
ctg gtc act gtc tca agc ggt ggt ggt ggt tct ggc ggc ggc ggc tcc Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 740 745 750	2256
ggc ggg ggt gga agt ggt ggt ggt ggt tct ggt ggt ggt ggt tct cag Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln 755 760 765	2304
agc gaa ttg act cag cca ccc tca gcg tct ggg acc ccc ggg cag ggg Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Gly 770 775 780	2352
gtc acc atc tct tgt tct gga agt agt tcc aac atc gga agt aat act Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr 785 790 795 800	2400

[0066]

```

gtt cag tgg tac cag cag ttc cca gga agg gcc ccc aaa ctc ctc atc      2448
Val Gln Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      805                      810                      815

tat agt aat aat cgg cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc tct ggt      2496
Tyr Ser Asn Asn Arg Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
      820                      825                      830

tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc cgg tcc      2544
Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser
      835                      840                      845

gag gat gaa gct gat tat tac tgt gca gca tgg gat gac agc ctg agt      2592
Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser
      850                      855                      860

gtc gtg gta ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta taa      2634
Val Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
      865                      870                      875

```

<210> 60
 <211> 877
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成结构

<400> 60

```

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1              5              10              15

```

```

Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
      20              25              30

```

```

Phe Arg Arg Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala
      35              40              45

```

```

Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe
      50              55              60

```

```

Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly Gly
65              70              75              80

```

```

Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Lcu Val Pro
      85              90              95

```

```

Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala
      100             105             110

```

```

Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln
      115             120             125

```

```

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

```

```

Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp
145             150             155             160

```

```

Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu
      165             170             175

```

```

Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala
      180             185             190

```

[0067]

Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Ser	Ile	Ser	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Arg	Glu	Phe	195	200	205
Arg	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Arg	His	Gln	Gln	Trp	210	215	220
Ser	Leu	Val	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Asn	Tyr	Thr	225	230	235
Cys	Val	Val	Glu	Asn	Lys	Phe	Gly	Ser	Ile	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Leu	245	250	255
Asp	Val	Leu	Glu	Arg	Trp	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	260	265	270
Pro	Ala	Asn	Gln	Thr	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Phe	His	Cys	275	280	285
Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys	His	Val	290	295	300
Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Lys	Val	Gly	Pro	Asp	Gly	Thr	Pro	Tyr	Val	Thr	305	310	315
Val	Leu	Lys	Thr	Ala	Gly	Ala	Asn	Thr	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Glu	Val	325	330	335
Leu	Ser	Leu	His	Asn	Val	Thr	Phe	Glu	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	340	345	350
Leu	Ala	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly	Phe	Ser	His	His	Ser	Ala	Trp	Leu	Val	355	360	365
Val	Leu	Pro	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Val	Glu	Ala	Asp	Glu	Ala	Gly	Ser	370	375	380
Val	Tyr	Ala	Gly	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	385	390	395
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	405	410	415
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	420	425	430
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	435	440	445
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	450	455	460
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	465	470	475
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	485	490	495
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	500	505	510

[0068]

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 515 520 525

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 530 535 540

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 545 550 555 560

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 565 570 575

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 580 585 590

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 595 600 605

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 610 615 620

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 625 630 635 640

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 645 650 655

Thr Phe Ser Gly Tyr Ile Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 660 665 670

Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp
 675 680 685

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 690 695 700

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 705 710 715 720

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 725 730 735

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 740 745 750

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 755 760 765

Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Gly
 770 775 780

Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr
 785 790 795 800

Val Gln Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 805 810 815

Tyr Ser Asn Asn Arg Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 820 825 830

[0069]

Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser		
		835					840					845					
Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	Ser		
	850					855					860						
Val	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu					
865					870					875							
<210> 61																	
<211> 2274																	
<212> DNA																	
<213> 人工的																	
<220>																	
<223> FGFR3(143-375)(S249W)Fc5 c870e6 pZMP31																	
<220>																	
<221> CDS																	
<222> (1)..(2274)																	
<400> 61																	
atg	gat	gca	atg	aag	aga	ggg	ctc	tgc	tgt	gtg	ctg	ctg	ctg	tgt	ggc		48
Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly		
1				5				10						15			
gcc	gtc	ttc	gtt	tgc	ctc	agc	cag	gaa	atc	cat	gcc	gag	ttg	aga	cgc		96
Ala	Val	Phe	Val	Ser	Leu	Ser	Gln	Glu	Ile	His	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg		
			20				25					30					
ttc	cgt	aga	gac	aca	ggt	gtg	gac	aca	ggg	gcc	cct	tac	tgg	aca	cgg		144
Phe	Arg	Arg	Asp	Thr	Gly	Val	Asp	Thr	Gly	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Arg		
			35			40					45						
ccc	gag	cgg	atg	gac	aag	aag	ctg	ctg	gcc	gtg	ccg	gcc	gcc	aac	acc		192
Pro	Glu	Arg	Met	Asp	Lys	Lys	Leu	Leu	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr		
	50				55					60							
gtc	cgc	ttc	cgc	tgc	cca	gcc	gct	ggc	aac	ccc	act	ccc	tcc	atc	tcc		240
Val	Arg	Phe	Arg	Cys	Pro	Ala	Ala	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Ser	Ile	Ser		
65				70				75						80			
tgg	ctg	aag	aac	ggc	agg	gag	ttc	cgc	ggc	gag	cac	cgc	att	gga	ggc		288
Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Arg	Glu	Phe	Arg	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly		
			85				90						95				
atc	aag	ctg	cgg	cat	cag	cag	tgg	agc	ctg	gtc	atg	gaa	agc	gtg	gtg		336
Ile	Lys	Leu	Arg	His	Gln	Gln	Trp	Ser	Leu	Val	Met	Glu	Ser	Val	Val		
			100				105					110					
ccc	tgc	gac	cgc	ggc	aac	tac	acc	tgc	gtc	gtg	gag	aac	aag	ttt	ggc		384
Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Glu	Asn	Lys	Phe	Gly		
		115				120					125						
agc	atc	cgg	cag	acg	tac	acg	ctg	gac	gtg	ctg	gag	cgc	tgg	ccg	cac		432
Ser	Ile	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Leu	Asp	Val	Leu	Glu	Arg	Trp	Pro	His		
	130				135					140							
cgg	ccc	atc	ctg	cag	gcg	ggg	ctg	ccg	gcc	aac	cag	acg	gcg	gtg	ctg		480
Arg	Pro	Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Gln	Thr	Ala	Val	Leu		
	145			150					155					160			
ggc	agc	gac	gtg	gag	ttc	cac	tgc	aag	gtg	tac	agt	gac	gca	cag	ccc		528
Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Phe	His	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro		
			165				170						175				
cac	atc	cag	tgg	ctc	aag	cac	gtg	gag	gtg	aat	ggc	agc	aag	gtg	ggc		576
His	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys	His	Val	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Lys	Val	Gly		
			180				185					190					
ccg	gac	ggc	aca	ccc	tac	gtt	acc	gtg	ctc	aag	acg	gcg	ggc	gct	aac		624
Pro	Asp	Gly	Thr	Pro	Tyr	Val	Thr	Val	Leu	Lys	Thr	Ala	Gly	Ala	Asn		
		195				200					205						
acc	acc	gac	aag	gag	cta	gag	gtt	ctc	tcc	tig	cac	aac	gtc	acc	ttt		672
Thr	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	Ser	Leu	His	Asn	Val	Thr	Phe		

[0070]

210	215	220	
gag gac gcc ggg gag tac acc tgc ctg gcg ggc aat tct att ggg ttt Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe 225 230 235 240			720
tct cat cac tct gcg tgg ctg gtg gtg ctg cca gcc gag gag gag ctg Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu 245 250 255			768
gtg gag gct gac gag gcg ggc agt gtg tat gca ggc gag ccc aaa tct Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Glu Pro Lys Ser 260 265 270			816
tca gac aaa acf cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu 275 280 285			864
ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 290 295 300			912
atg atc tcc ccg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 305 310 315 320			960
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac ggg gac ggc gtg gag His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 325 330 335			1008
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg ccg gag gag cag tac aac agc acg Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 340 345 350			1056
tac cgl gtg glc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 355 360 365			1104
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser 370 375 380			1152
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 385 390 395 400			1200
gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg gat gag ctg acc aag aac cag gtc Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 405 410 415			1248
agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 420 425 430			1296
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 435 440 445			1344
ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 450 455 460			1392
gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 465 470 475 480			1440
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 485 490 495			1488
tct ccg ggt ggt ggc ggg ggt tgc ggt gga gga ggt tct gaa gtt caa Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln 500 505 510			1536
tig tta gag tct ggt ggc ggt ctt gtt cag cct ggt ggt tct tta cgt Leu Leu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg 515 520 525			1584
ctt tct tgc gct gct tcc gga ttc act ttc tct ggt tac att atg tgg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ile Met Trp 530 535 540			1632

[0071]

530	535	540	
tgg gtt cgc caa gct cct ggt aaa ggt ttg gag tgg gtt tct gtt atc Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile 545 550 555 560			1680
tct cct tct ggt ggc gat act tgg tat gct gac tcc gtt aaa ggt cgc Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg 565 570 575			1728
ttc act atc tct aga gac aac tct aag aat act ctc tac tta cag atg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met 580 585 590			1776
aac agc lta agg gct gag gac acg gcc glg tal tac tgt gcc aca gcg Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala 595 600 605			1824
gga gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc ggt ggt Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly 610 615 620			1872
ggt ggt tct ggc ggc ggc ggc tcc ggc ggg ggt gga agt ggt ggt ggt Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly 625 630 635 640			1920
ggt tct ggt ggt ggt ggt tct cag agc gtg ttg act cag cca ccc tca Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser 645 650 655			1968
gcg tct ggg acc ccc ggg cag agg gtc acc atc tct tgt tct gga agc Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser 660 665 670			2016
agc tcc aac atc gga agg aat cct gta aac tgg tac cag cag ctc cca Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro 675 680 685			2064
gga acg gcc ccc aaa ctc ctc atc tat ggt gat aat cag cgg ccc tca Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asp Asn Gln Arg Pro Ser 690 695 700			2112
ggg gtc cct gac cga ttc tct ggc tcc aaa tct ggc acc tca gcc tcc Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser 705 710 715 720			2160
ctg gcc atc agt ggg ctc cag tct gag gat gag gct gat tat tac tgt Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys 725 730 735			2208
gca gca tgg gat gac agc ctg aat ggt glg gla ttc ggc gga ggg acc Ala Ala Trp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr 740 745 750			2256
aag ctg acc gtc cta taa Lys Leu Thr Val Leu 755			2274
<210> 62			
<211> 757			
<212> PRT			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 合成结构			
<400> 62			
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly 1 5 10 15			
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg 20 25 30			
Phe Arg Arg Asp Thr Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg 35 40 45			

[0072]

Pro	Glu	Arg	Met	Asp	Lys	Lys	Leu	Leu	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr
50						55					60				
Val	Arg	Phe	Arg	Cys	Pro	Ala	Ala	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Ser	Ile	Ser
65					70				75					80	
Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Arg	Glu	Phe	Arg	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly
			85						90					95	
Ile	Lys	Leu	Arg	His	Gln	Gln	Trp	Ser	Leu	Val	Met	Glu	Ser	Val	Val
			100					105					110		
Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Glu	Asn	Lys	Phe	Gly
		115					120					125			
Ser	Ile	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Leu	Asp	Val	Leu	Glu	Arg	Trp	Pro	His
	130					135					140				
Arg	Pro	Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Gln	Thr	Ala	Val	Leu
145					150					155					160
Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Phe	His	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro
			165						170					175	
His	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys	His	Val	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Lys	Val	Gly
		180						185					190		
Pro	Asp	Gly	Thr	Pro	Tyr	Val	Thr	Val	Leu	Lys	Thr	Ala	Gly	Ala	Asn
		195					200					205			
Thr	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	Ser	Leu	His	Asn	Val	Thr	Phe
	210					215					220				
Glu	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	Leu	Ala	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly	Phe
225					230					235					240
Ser	His	His	Ser	Ala	Trp	Leu	Val	Val	Leu	Pro	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu
			245						250					255	
Val	Glu	Ala	Asp	Glu	Ala	Gly	Ser	Val	Tyr	Ala	Gly	Glu	Pro	Lys	Ser
		260						265					270		
Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu
		275					280					285			
Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
	290					295					300				
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
305					310					315					320
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
			325						330					335	
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
			340					345					350		
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
		355					360					365			

[0073]

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser
 370 375 380
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 385 390 395 400
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495
 Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
 500 505 510
 Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 515 520 525
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ile Met Trp
 530 535 540
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile
 545 550 555 560
 Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 565 570 575
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 580 585 590
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala
 595 600 605
 Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 610 615 620
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 625 630 635 640
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser
 645 650 655
 Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser
 660 665 670
 Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro
 675 680 685

[0074]

Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asp Asn Gln Arg Pro Ser
690 695 700

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser
705 710 715 720

Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
725 730 735

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr
740 745 750

Lys Leu Thr Val Leu
755

<210> 63
<211> 2634
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> FGFR3 (23-375) (S249W) Fc5 c870e6 pZMP31

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (2634)

<400> 63
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc 48
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

gcc gtc ttc gtt tgc ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc 96
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
20 25 30

ttc cgt aga gag tcc ttg ggg acg gag cag cgc gtc gtg ggg cga gcg 144
Phe Arg Arg Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala
35 40 45

gca gaa gtc cgg ggc cca gag ccc ggc cag cag gag cag ttg gtc ttc 192
Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe
50 55 60

ggc agc ggg gat gct gtg gag ctg agc tgt ccc cgg ccc ggg ggt ggt 240
Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly Gly
65 70 75 80

ccc atg ggg ccc act gtc tgg gtc aag gat ggc aca ggg ctg gtg ccc 288
Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val Pro
85 90 95

tgc gag cgt gtc ctg gtg ggg ccc cag cgg ctg cag gtg ctg aat gcc 336
Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala
100 105 110

tcc cac gag gac tcc ggg gcc tac agc tgc cgg cag cgg ctc acg cag 384
Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln
115 120 125

cgc gta ctg tgc cac ttc agt gtg cgg gtg aca gac gct cca tcc tcg 432
Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser
130 135 140

gga gat gac gaa gac ggg gag gac gag gct gag gac aca ggt gtg gac 480
Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp
145 150 155 160

aca ggg gcc cct tac tgg aca cgg ccc gag cgg atg gac aag aag ctg 528
Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu
165 170 175

ctg gcc gtg cgg gcc gcc aac acc gtc cgc ttc cgc tgc cca gcc gct 576

[0075]

Leu	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Arg	Phe	Arg	Cys	Pro	Ala	Ala		
			180					185					190				
ggc	aac	ccc	act	ccc	tec	atc	tec	tgg	ctg	aag	aac	ggc	agg	gag	ttc	624	
Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Ser	Ile	Ser	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Arg	Glu	Phe		
		195					200					205					
cgc	ggc	gag	cac	cgc	att	gga	ggc	atc	aag	ctg	cgg	cat	cag	cag	tgg	672	
Arg	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Arg	His	Gln	Gln	Trp		
	210					215					220						
agc	ctg	gtc	atg	gaa	agc	gtg	gtg	ccc	tcg	gac	cgc	ggc	aac	tac	acc	720	
Ser	Leu	Val	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Asn	Tyr	Thr		
	225				230					235				240			
tgc	gtc	gtg	gag	aac	aag	ttt	ggc	agc	atc	cgg	cag	acg	tac	acg	ctg	768	
Cys	Val	Val	Glu	Asn	Lys	Phe	Gly	Ser	Ile	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Leu		
			245						250					255			
gac	gtg	ctg	gag	cgc	tgg	ccg	cac	cgg	ccc	atc	ctg	cag	ggc	ggg	ctg	816	
Asp	Val	Leu	Glu	Arg	Trp	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu		
			260					265					270				
ccg	gcc	aac	cag	acg	gcg	gtg	ctg	ggc	agc	gac	gtg	gag	ttc	cac	tgc	864	
Pro	Ala	Asn	Gln	Thr	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Phe	His	Cys		
		275					280					285					
aag	gtg	tac	agt	gac	gca	cag	ccc	cac	atc	cag	tgg	ctc	aag	cac	gtg	912	
Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys	His	Val		
	290					295					300						
gag	gtg	aat	ggc	agc	aag	gtg	ggc	ccg	gac	ggc	aca	ccc	tac	gtt	acc	960	
Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Lys	Val	Gly	Pro	Asp	Gly	Thr	Pro	Tyr	Val	Thr		
	305				310					315				320			
gtg	ctc	aag	acg	ggc	ggc	gct	aac	acc	acc	gac	aag	gag	cta	gag	gtt	1008	
Val	Leu	Lys	Thr	Ala	Gly	Ala	Asn	Thr	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Glu	Val		
			325					330						335			
ctc	tec	tig	cac	aac	gtc	acc	ttt	gag	gac	gcc	ggg	gag	tac	acc	tgc	1056	
Leu	Ser	Leu	His	Asn	Val	Thr	Phe	Glu	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys		
			340					345					350				
ctg	gcg	ggc	aat	tct	att	ggg	ttt	tct	cat	cac	tct	gcg	tgg	ctg	gtg	1104	
Leu	Ala	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly	Phe	Ser	His	His	Ser	Ala	Trp	Leu	Val		
		355				360						365					
gtg	ctg	cca	gcc	gag	gag	gag	ctg	gtg	gag	gct	gac	gag	ggc	ggc	agt	1152	
Val	Leu	Pro	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Val	Glu	Ala	Asp	Glu	Ala	Gly	Ser		
	370					375					380						
gtg	tat	gca	ggc	gag	ccc	aaa	tct	tca	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	1200	
Val	Tyr	Ala	Gly	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro		
	385				390					395				400			
ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	gcc	gag	ggg	gca	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	1248	
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe		
			405					410					415				
ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tec	cgg	acc	cct	gag	gtc	1296	
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val		
			420					425					430				
aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	1344	
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe		
	435					440						445					
aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	1392	
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro		
	450					455					460						
cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	1440	
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr		
	465				470				475					480			
gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	1488	
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val		
			485					490					495				
tec	aac	aaa	gcc	ctc	cca	tec	tec	atc	gag	aaa	acc	atc	tec	aaa	gcc	1536	

[0076]

Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala		
			500					505					510				
aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	glg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	1584	
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg		
		515					520					525					
gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	1632	
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly		
		530				535					540						
ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	1680	
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro		
		545			550					555					560		
gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	1728	
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser		
			565						570					575			
ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	1776	
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln		
		580						585					590				
ggg	aac	glc	ttc	tca	tgc	tcc	glg	atg	cat	gag	gcl	ctg	cac	aac	cac	1824	
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His		
		595					600					605					
tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	ggt	ggc	ggg	ggt	tcg	1872	
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
		610				615					620						
ggt	gga	gga	ggt	tct	gaa	ggt	caa	tgg	tta	gag	tct	ggt	ggc	ggt	ctt	1920	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu		
		625			630					635					640		
ggt	cag	cct	ggt	ggt	tct	tta	cgt	ctt	tct	tgc	gct	gct	tcc	gga	ttc	1968	
Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe		
			645						650					655			
act	ttc	tct	ggt	tac	att	atg	tgg	tgg	gtt	cgc	caa	gct	cct	ggt	aaa	2016	
Thr	Phe	Ser	Gly	Tyr	Ile	Met	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys			
			660				665						670				
ggt	tig	gag	lgg	gtt	tct	glt	atc	tct	cct	tct	ggt	ggc	gat	act	tgg	2064	
Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Val	Ile	Ser	Pro	Ser	Gly	Gly	Asp	Thr	Trp		
		675					680					685					
tat	gct	gac	tcc	gtt	aaa	ggt	cgc	ttc	act	atc	tct	aga	gac	aac	tct	2112	
Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser		
		690				695					700						
aag	aat	act	ctc	tac	tta	cag	atg	aac	agc	tta	agg	gct	gag	gac	acg	2160	
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr		
		705			710					715					720		
gcc	gtg	tat	tac	tgt	gcc	aca	gcg	gga	gac	tac	tgg	ggc	cag	ggc	acc	2208	
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Ala	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr		
			725						730					735			
ctg	gtc	acc	gtc	tca	agc	ggt	ggt	ggt	ggt	tct	ggc	ggc	ggc	ggc	tcc	2256	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
			740					745						750			
ggc	ggg	ggt	gga	agt	ggt	ggt	ggt	ggt	tct	ggt	ggt	ggt	ggt	tct	cag	2304	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln		
		755				760						765					
agc	gtg	tig	act	cag	cca	ccc	tca	gcg	tct	ggg	acc	ccc	ggg	cag	agg	2352	
Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg		
		770				775						780					
gtc	acc	atc	tct	tgt	tct	gga	agc	agc	tcc	aac	atc	gga	agg	aat	cct	2400	
Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Arg	Asn	Pro		
					790					795					800		
gta	aac	tgg	tac	cag	cag	ctc	cca	gga	acg	gcc	ccc	aaa	ctc	ctc	atc	2448	
Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile		
				805					810					815			
tat	ggt	gat	aat	cag	cgg	ccc	tca	ggg	gtc	cct	gac	cga	ttc	tct	ggc	2496	

[0077]

Tyr Gly Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
820 825 830	
tcc aaa tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc cag tct	2544
Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser	
835 840 845	
gag gat gag gct gat tat tac tgt gca gca tgg gat gac agc ctg aat	2592
Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn	
850 855 860	
ggg gtg gta ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta taa	2634
Gly Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
865 870 875	
<210> 64	
<211> 877	
<212> PRT	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成结构	
<400> 64	
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly	
1 5 10 15	
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg	
20 25 30	
Phe Arg Arg Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala	
35 40 45	
Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe	
50 55 60	
Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly Gly	
65 70 75 80	
Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val Pro	
85 90 95	
Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala	
100 105 110	
Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln	
115 120 125	
Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser	
130 135 140	
Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp	
145 150 155 160	
Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu	
165 170 175	
Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala	
180 185 190	
Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe	
195 200 205	
Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp	
210 215 220	

[0078]

Ser	Leu	Val	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Asn	Tyr	Thr	225	230	235	240
Cys	Val	Val	Glu	Asn	Lys	Phe	Gly	Ser	Ile	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Leu	245	250	255	
Asp	Val	Leu	Glu	Arg	Trp	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	260	265	270	
Pro	Ala	Asn	Gln	Thr	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Phe	His	Cys	275	280	285	
Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys	His	Val	290	295	300	
Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Lys	Val	Gly	Pro	Asp	Gly	Thr	Pro	Tyr	Val	Thr	305	310	315	320
Val	Leu	Lys	Thr	Ala	Gly	Ala	Asn	Thr	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Glu	Val	325	330	335	
Leu	Ser	Leu	His	Asn	Val	Thr	Phe	Glu	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	340	345	350	
Leu	Ala	Gly	Asn	Ser	Ile	Gly	Phe	Ser	His	His	Ser	Ala	Trp	Leu	Val	355	360	365	
Val	Leu	Pro	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Val	Glu	Ala	Asp	Glu	Ala	Gly	Ser	370	375	380	
Val	Tyr	Ala	Gly	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	385	390	395	400
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	405	410	415	
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	420	425	430	
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	435	440	445	
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	450	455	460	
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	465	470	475	480
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	485	490	495	
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	500	505	510	
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	515	520	525	
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	530	535	540	

[0079]

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 545 550 555 560
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 565 570 575
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 580 585 590
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 595 600 605
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 610 615 620
 Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 625 630 635 640
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 645 650 655
 Thr Phe Ser Gly Tyr Ile Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 660 665 670
 Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp
 675 680 685
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 690 695 700
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 705 710 715 720
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 725 730 735
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 740 745 750
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 755 760 765
 Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg
 770 775 780
 Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro
 785 790 795 800
 Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 805 810 815
 Tyr Gly Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 820 825 830
 Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser
 835 840 845
 Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn
 850 855 860

[0080]

Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
865	870 875
<210> 65	
<211> 322	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 65	
aacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcaagtca gacattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgtagac ttttggccag	300
gggaccaagc tggagatcaa ac	322
<210> 66	
<211> 107	
<212> PRT	
<213> 人	
<400> 66	
Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr	
20 25 30	
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr	
85 90 95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105	
<210> 67	
<211> 364	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 67	
gaagttcaat ttttagagtc tggtagcggt ctgttcagc ctggtgggtc tttaactctt	60
tcttgcgctg ctccggatt cactttctct tggtagata tggtttgggt tcgccaagct	120
cctggtaaag gtttggagtg gttttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat	180
gctgactccg ttaaaggctg ctacactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	240
ttgcagaiga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcat	300
agtggctacg attctgaata ctttgactac tggggccagg gcacctgggt caccgtctca	360
agcg	364

[0081]

<210> 68
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 68

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

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

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

Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp 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 Asp His Ser Gly Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 69
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> c1039.1 scFv cDNA

<400> 69
 gaagttcaat tggtagagtc tggiggcgggt ctgttcagc ctgggtgggtc ttacgtctt 60
 tcttgcgcgt cttccggatt cactttctct tggtagata tgggttgggt tgcgaagct 120
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcct ctgggtgctg gacttcitat 180
 gctgactccg llaaaggteg cttaactaia tctagagaca actctaagaa taactctaac 240
 ttgcagatga acagcttaag ggcagaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcat 300
 agtggctacg attctgaata ctttgactac tggggccagg gcacctgggt caccgtctca 360
 agcggtggtg gttgttctgg cggcgccggc tccggcgggg gtggaagtgg tgggtgtgt 420
 tctggtgtgt gttgttctaa catccagatg acccagtcct cactctcct gtctgcatct 480
 gtaggagaca gattcaccat cacttgccgg gcaagtcaga gcattagcag ctatttaaat 540
 tggtagcagc agaaaccagg gaaagccct aagctcctga tctatgctgc atccagtttg 600
 caaagtgggg tccatcaag gttcagtgcc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 660
 atcagcagtc tgcaacctga agattttgca acttactact gtcaacagag ttacagtacc 720
 ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 759

<210> 70
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> 人工的

[0082]

<220>
<223> c1039.1 scFv

<400> 70
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
20 25 30
Asp Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp 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 Asp His Ser Gly Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
145 150 155 160
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
165 170 175
Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
180 185 190
Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
195 200 205
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
210 215 220
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr
225 230 235 240
Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245 250

<210> 71
<211> 990
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (990)

[0083]

<400> 71	
cag tgt gct ggc ggc ccg gcg cga gcc ggc ccg gcc ccg gtc ggg cct	48
Gln Cys Ala Gly Gly Pro Ala Arg Ala Gly Pro Ala Pro Val Gly Pro	
1 5 10 15	
ccg aaa cca tga act ttc tgc tgt ctt ggg tgc att gga gcc tcg cct	96
Pro Lys Pro Thr Phe Cys Cys Leu Gly Cys Ile Gly Ala Ser Pro	
20 25 30	
tgc tgc tct acc tcc acc atg cca agt ggt ccc agg ctg cac cca tgg	144
Cys Cys Ser Thr Ser Thr Met Pro Ser Gly Pro Arg Leu His Pro Trp	
35 40 45	
cag aag gag gag ggc aga atc atc acg aag tgg tga agt tca tgg atg	192
Gln Lys Ser Glu Gly Arg Ile Ile Thr Lys Trp Ser Ser Trp Met	
50 55 60	
tct atc agc gca gct act gcc atc caa tcg aga ccc tgg tgg aca tct	240
Ser Ile Ser Ala Ala Thr Ala Ile Gln Ser Arg Pro Trp Trp Thr Ser	
65 70 75	
tcc agg agt acc ctg atg aga tcg agt aca tct tca agc cat cct gig	288
Ser Arg Ser Thr Leu Met Arg Ser Ser Thr Ser Ser His Pro Val	
80 85 90	
tgc ccc tga tgc gat gcg ggg gct gct gca atg acg agg gcc tgg agt	336
Cys Pro Cys Asp Ala Gly Ala Ala Ala Met Thr Arg Ala Trp Ser	
95 100 105	
gtg tgc cca ctg agg agt cca aca tca cca tgc aga tta tgc gga tca	384
Val Cys Pro Leu Arg Ser Pro Thr Ser Pro Cys Arg Leu Cys Gly Ser	
110 115 120 125	
aac ctc acc aag gcc agc aca tag gag aga tga gct tcc tac agc aca	432
Asn Leu Thr Lys Ala Ser Thr Glu Arg Ala Ser Tyr Ser Thr	
130 135	
aca aat gtc aat gca gac caa aga aag ata gag caa gac aag aaa atc	480
Thr Asn Val Asn Ala Asp Gln Arg Lys Ile Glu Gln Asp Lys Lys Ile	
140 145 150 155	
cct gtg ggc ctt gct cag agc gga gaa agc att tgt ttg tac aag atc	528
Pro Val Gly Leu Ala Gln Ser Gly Glu Ser Ile Cys Leu Tyr Lys Ile	
160 165 170	
cgc aga cgt gta aat gtt cct gca aaa aca cag act cgc gtt gca agg	576
Arg Arg Arg Val Asn Val Pro Ala Lys Thr Gln Thr Arg Val Ala Arg	
175 180 185	
cga ggc agc ttg agt taa acg aac gta ctt gca gat gtg aca agc cga	624
Arg Gly Ser Leu Ser Thr Asn Val Leu Ala Asp Val Thr Ser Arg	
190 195 200	
ggc ggt gag ccg ggc agg agg aag gag cct ccc tca ggg ttt cgg gaa	672
Gly Gly Glu Pro Gly Arg Arg Lys Glu Pro Pro Ser Gly Phe Arg Glu	
205 210 215	
cca gat ctc tca cca gga aag act gat aca gaa cga tcg ata cag aaa	720
Pro Asp Leu Ser Pro Gly Lys Thr Asp Thr Glu Arg Ser Ile Gln Lys	
220 225 230	
cca cgc tgc cgc cac cac acc atc acc atc gac aga aca gtc ctt aat	768
Pro Arg Cys Arg His His Thr Ile Thr Ile Asp Arg Thr Val Leu Asn	
235 240 245 250	
cca gaa acc tga aat gaa gga aga gga gac tct gcg cag agc act ttg	816
Pro Glu Thr Asn Glu Gly Arg Gly Asp Ser Ala Gln Ser Thr Leu	
255 260 265	
ggt ccg gag ggc gag act ccg gcg gaa gca ttc ccg ggc ggg tga ccc	864
Gly Pro Glu Gly Glu Thr Pro Ala Glu Ala Phe Pro Gly Gly Pro	
270 275 280	
agc acg gtc cct ctt gga att gga ttc gcc att tta ttt ttc ttg ctg	912
Ser Thr Val Pro Leu Gly Ile Gly Phe Ala Ile Leu Phe Phe Leu Leu	
285 290 295	
cta aat cac cga gcc ccg aag att aga gag ttt tat ttc tgg gat tcc	960
Leu Asn His Arg Ala Arg Lys Ile Arg Glu Phe Tyr Phe Trp Asp Ser	
300 305 310	

[0084]

tgt aga cac acc gcg gcc gcc agc aca ctg 990
Cys Arg His Thr Ala Ala Ala Ser Thr Leu
315 320

<210> 72
<211> 19
<212> PRT
<213> 人

<400> 72

Gln Cys Ala Gly Gly Pro Ala Arg Ala Gly Pro Ala Pro Val Gly Pro
1 5 10 15

Pro Lys Pro

<210> 73
<211> 39
<212> PRT
<213> 人

<400> 73

Thr Phe Cys Cys Leu Gly Cys Ile Gly Ala Ser Pro Cys Cys Ser Thr
1 5 10 15

Ser Thr Met Pro Ser Gly Pro Arg Leu His Pro Trp Gln Lys Glu Glu
20 25 30

Gly Arg Ile Ile Thr Lys Trp
35

<210> 74
<211> 38
<212> PRT
<213> 人

<400> 74

Ser Ser Trp Met Ser Ile Ser Ala Ala Thr Ala Ile Gln Ser Arg Pro
1 5 10 15

Trp Trp Thr Ser Ser Arg Ser Thr Leu Met Arg Ser Ser Thr Ser Ser
20 25 30

Ser His Pro Val Cys Pro
35

<210> 75
<211> 36
<212> PRT
<213> 人

<400> 75

Cys Asp Ala Gly Ala Ala Ala Met Thr Arg Ala Trp Ser Val Cys Pro
1 5 10 15

Leu Arg Ser Pro Thr Ser Pro Cys Arg Leu Cys Gly Ser Asn Leu Thr
20 25 30

Lys Ala Ser Thr
35

<210> 76
<211> 58

[0085]

<212> PRT
<213> 人
<400> 76
Ala Ser Tyr Ser Thr Thr Asn Val Asn Ala Asp Gln Arg Lys Ile Glu
1 5 10 15
Gln Asp Lys Lys Ile Pro Val Gly Leu Ala Gln Ser Gly Glu Ser Ile
20 25 30
Cys Leu Tyr Lys Ile Arg Arg Arg Val Asn Val Pro Ala Lys Thr Gln
35 40 45
Thr Arg Val Ala Arg Arg Gly Ser Leu Ser
50 55
<210> 77
<211> 61
<212> PRT
<213> 人
<400> 77
Thr Asn Val Leu Ala Asp Val Thr Ser Arg Gly Gly Glu Pro Gly Arg
1 5 10 15
Arg Lys Glu Pro Pro Ser Gly Phe Arg Glu Pro Asp Leu Ser Pro Gly
20 25 30
Lys Thr Asp Thr Glu Arg Ser Ile Gln Lys Pro Arg Cys Arg His His
35 40 45
Thr Ile Thr Ile Asp Arg Thr Val Leu Asn Pro Glu Thr
50 55 60
<210> 78
<211> 26
<212> PRT
<213> 人
<400> 78
Asn Glu Gly Arg Gly Asp Ser Ala Gln Ser Thr Leu Gly Pro Glu Gly
1 5 10 15
Glu Thr Pro Ala Glu Ala Phe Pro Gly Gly
20 25
<210> 79
<211> 43
<212> PRT
<213> 人
<400> 79
Pro Ser Thr Val Pro Leu Gly Ile Gly Phe Ala Ile Leu Phe Phe Leu
1 5 10 15
Leu Leu Asn His Arg Ala Arg Lys Ile Arg Glu Phe Tyr Phe Trp Asp
20 25 30
Ser Cys Arg His Thr Ala Ala Ala Ser Thr Leu
35 40
<210> 80
<211> 15

[0086]

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽接头(peptide linker)

<400> 80
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 81
<211> 232
<212> PRT
<213> 人

<400> 81
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 82

[0087]

<211> 232
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 82

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 83
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> Fc-488

<400> 83

Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

[0088]

```

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
      20                      25                      30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
      35                      40                      45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
      50                      55                      60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
      65                      70                      75                      80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
      85                      90                      95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
      100                     105                     110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
      115                     120                     125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
      130                     135                     140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
      145                     150                     155                     160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
      165                     170                     175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
      180                     185                     190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
      195                     200                     205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
      210                     215                     220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      225                     230

<210> 84
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> Fc-4

<400> 84

Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1      5                      10                      15

Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
      20                      25                      30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
      35                      40                      45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
      50                      55                      60

```

[0089]

```

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65              70              75              80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85              90              95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100            105            110

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115            120            125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130            135            140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145            150            155            160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165            170            175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180            185            190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195            200            205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210            215            220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225            230

<210> 85
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> Fc6

<400> 85

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1              5              10              15

Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20            25            30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35            40            45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50            55            60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65              70              75              80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85              90              95

```

[0090]

```

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
      100                      105                      110

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
      115                      120                      125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
      130                      135                      140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
      145                      150                      155                      160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
      165                      170                      175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
      180                      185                      190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
      195                      200                      205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
      210                      215                      220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      225                      230

<210> 86
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> FC7

<400> 86

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1                      5                      10                      15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
      20                      25                      30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
      35                      40                      45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
      50                      55                      60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
      65                      70                      75                      80

Tyr Glu Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
      85                      90                      95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
      100                      105                      110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
      115                      120                      125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
      130                      135                      140

```

[0091]

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 87
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 87
 Arg Asp Glu Ser Asn His Leu Thr Asp Leu Tyr Arg Arg Asp Glu Thr
 1 5 10 15
 Ile Gln Val Lys Gly Asn Gly Tyr Val Gln Ser Pro Arg Phe Pro Asn
 20 25 30
 Ser Tyr Pro Arg Asn Leu Leu Leu Thr Trp Arg Leu His Ser Gln Glu
 35 40 45
 Asn Thr Arg Ile Gln Leu Val Phe Asp Asn Gln Phe Gly Leu Glu Glu
 50 55 60
 Ala Glu Asn Asp Ile Cys Arg Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu Asp Ile
 65 70 75 80
 Ser Glu Thr Ser Thr Ile Ile Arg Gly Arg Trp Cys Gly His Lys Glu
 85 90 95
 Val Pro Pro Arg Ile Lys Ser Arg Thr Asn Gln Ile Lys Ile Thr Phe
 100 105 110
 Lys Ser Asp Asp Tyr Phe Val Ala Lys Pro Gly Phe Lys Ile Tyr Tyr
 115 120 125
 Ser Leu Leu Glu Asp Phe Gln Pro Ala Ala Ala Ser Glu Thr Asn Trp
 130 135 140
 Glu Ser Val Thr Ser Ser Ile Ser Gly Val Ser Tyr Asn Ser Pro Ser
 145 150 155 160
 Val Thr Asp Pro Thr Leu Ile Ala Asp Ala Leu Asp Lys Lys Ile Ala
 165 170 175
 Glu Phe Asp Thr Val Glu Asp Leu Leu Lys Tyr Phe Asn Pro Glu Ser
 180 185 190

[0092]

Trp Gln Glu Asp Leu Glu Asn Met Tyr Leu Asp Thr Pro Arg Tyr Arg
 195 200 205
 Gly Arg Ser Tyr His Asp Arg Lys Ser Lys Val Asp Leu Asp Arg Leu
 210 215 220
 Asn Asp Asp Ala Lys Arg Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn Tyr Ser Val
 225 230 235 240
 Asn Ile Arg Glu Glu Leu Lys Leu Ala Asn Val Val Phe Phe Pro Arg
 245 250 255
 Cys Leu Leu Val Gln Arg Cys Gly Gly Asn Cys Gly Cys Gly Thr Val
 260 265 270
 Asn Trp Arg Ser Cys Thr Cys Asn Ser Gly Lys Thr Val Lys Lys Tyr
 275 280 285
 His Glu Val Leu Gln Phe Glu Pro Gly His Ile Lys Arg Arg Gly Arg
 290 295 300
 Ala Lys Thr Met Ala Leu Val Asp Ile Gln Leu Asp His His Glu Arg
 305 310 315 320
 Cys Asp Cys Ile Cys Ser Ser Arg Pro Pro Arg Tyr Leu Glu Tyr Met
 325 330 335
 Pro Met Asp
 <210> 88
 <211> 1002
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> VEGFR2-Fc
 <400> 88
 Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu
 1 5 10 15
 Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro
 20 25 30
 Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr
 35 40 45
 Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro
 50 55 60
 Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser
 65 70 75 80
 Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn
 85 90 95
 Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser
 100 105 110
 Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser

[0093]

115	120	125
Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys 130 135 140		
Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser 145 150 155 160		
Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg 165 170 175		
Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile 180 185 190		
Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser 195 200 205		
Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr 210 215 220		
Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu 225 230 235 240		
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile 245 250 255		
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu 260 265 270		
Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe 275 280 285		
Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu 290 295 300		
Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr 305 310 315 320		
Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met 325 330 335		
Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala 340 345 350		
Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly 355 360 365		
Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr 370 375 380		
Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu 385 390 395 400		
Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val 405 410 415		
Val Tyr Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val 420 425 430		
Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr		

[0094]

435	440	445
Ala Ile Pro Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu 450 455 460		
Glu Cys Ala Asn Glu Pro Ser His Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr 465 470 475 480		
Pro Cys Glu Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys 485 490 495		
Ile Glu Val Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys 500 505 510		
Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr 515 520 525		
Lys Cys Glu Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser 530 535 540		
Phe His Val Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln 545 550 555 560		
Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser 565 570 575		
Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro 580 585 590		
Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr 595 600 605		
Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile 610 615 620		
Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr 625 630 635 640		
Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val 645 650 655		
Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn 660 665 670		
Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys 675 680 685		
Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn 690 695 700		
Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg 705 710 715 720		
Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr 725 730 735		
Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe 740 745 750		
Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Gly Ser Gly Gly		

[0095]

755	760	765
Ser Gly Glu Pro Lys Ser 770	Ser Asp Lys Thr His 775	Thr Cys Pro Pro Cys 780
Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser 785	Val Phe Leu Phe Pro Pro 790	
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 805		815
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 820		830
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 835		845
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 850		860
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 865		875
Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 885		895
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu 900		910
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 915		925
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 930		940
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 945		955
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 965		975
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 980		990
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 995		1000

<210> 89

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> zc60566

<400> 89

agaacctct ccacccgaac cccgccacc acccgagac agggagag

48

	LC										HC		HC		
	218					222							230		
wt	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
Fc-488	.	.	Arg	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	Arg	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	Ser	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<- 较链 ->														
	234					235					237		245		
wt	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	Ala	Glu	.	Ala	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	CH2 -->														
													260		
wt	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
													275		
wt	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
													290		
wt	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
													297		
wt	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	Gln	.	.	.	.	.	.	.	.	.

图 1A

图 1B

		410													
wt	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu														
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
		425													
wt	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys														
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
		431													
		440													
wt	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser														
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
		446													
wt	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***														
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.							
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.							
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.							
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	***							
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.							

图 1C

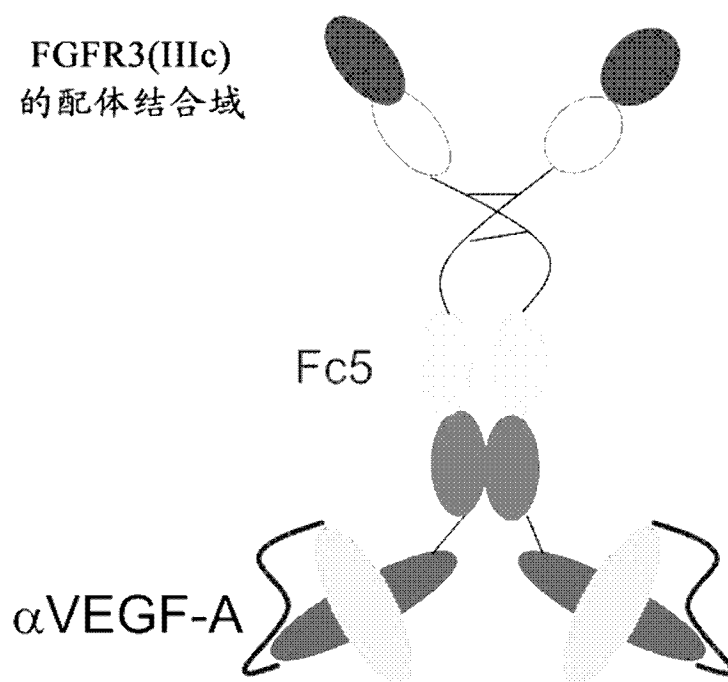


图 2

FGFR-Fc (R&D Systems) 对 FGF-9 刺激的成骨细胞的
增殖显示可变的抑制

成骨细胞中的 FGF-9-/+ FGFR-Fc

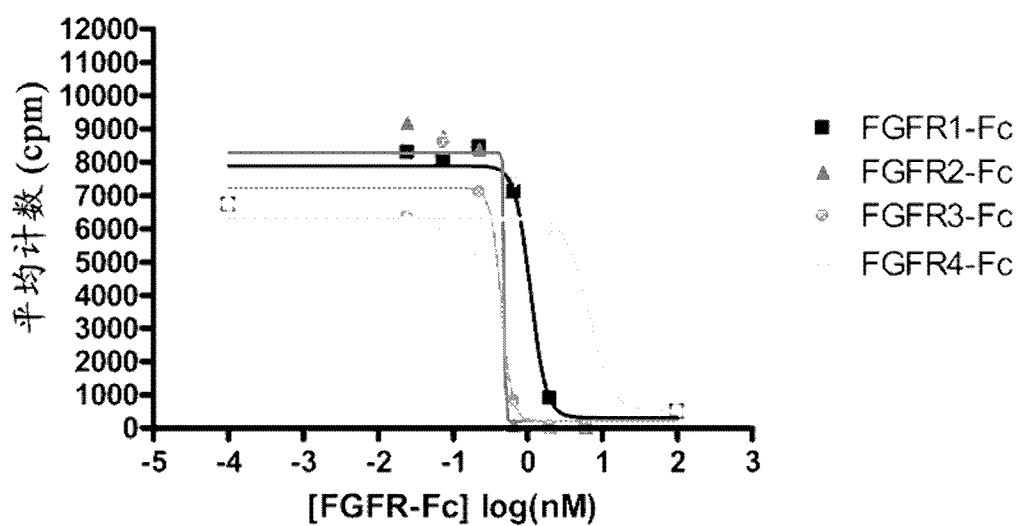


图 3

图 4A: 全长 FGFR3-Fc 野生型和突变构建体 (ZymoGenetics) 具有类似的 IC₅₀。

成骨细胞中的 FGF-9-/+ FGFR3-Fc 全长突变体

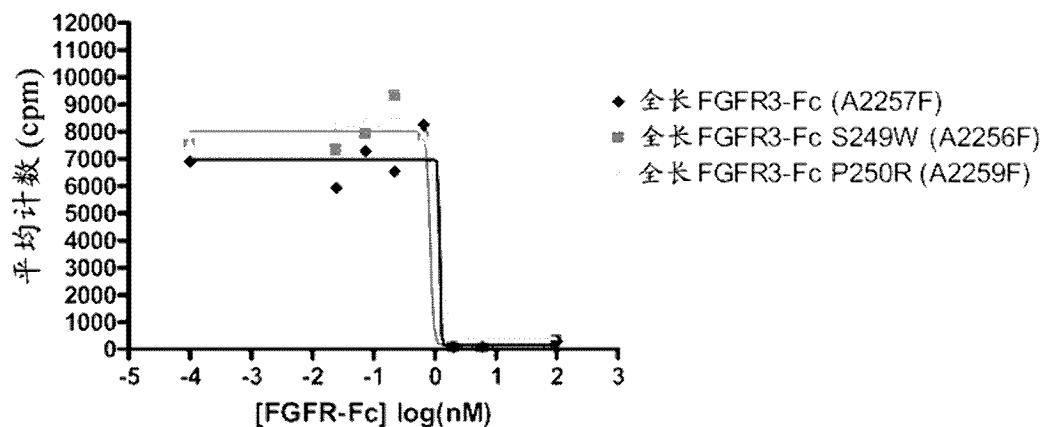


图 4B: 截短的 FGFR3-Fc 突变构建体 (ZymoGenetics) 具有类似的 IC₅₀。

成骨细胞中的 FGF-9-/+ FGFR3-Fc 截短突变体

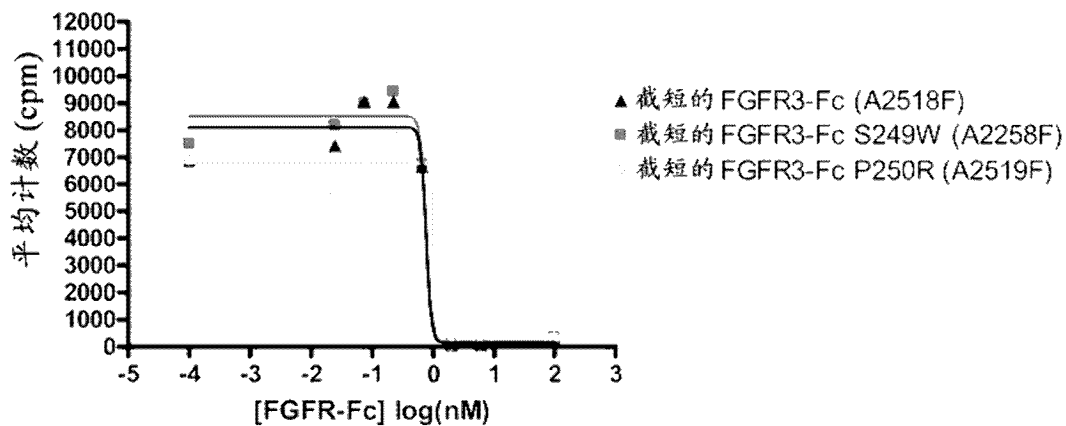


图 4A-B

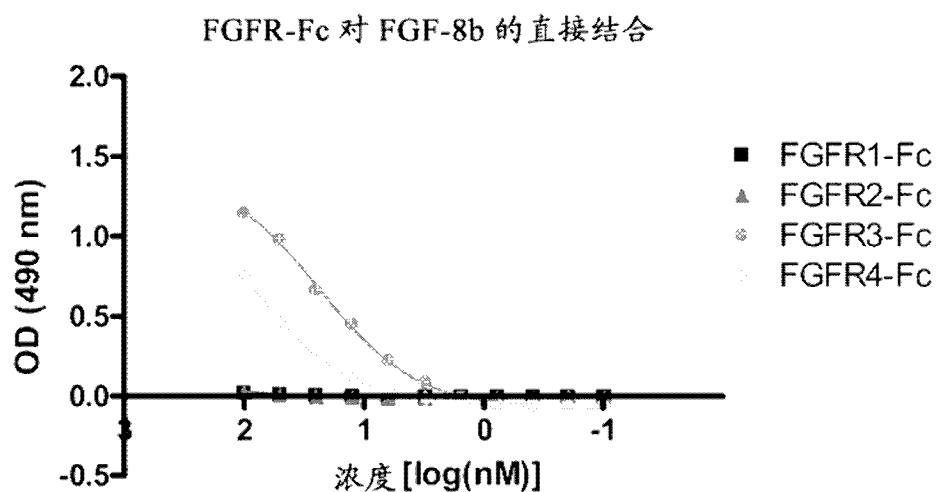


图 5A :FGFR-Fc (R&D Systems) 对 FGF-8b 的直接结合

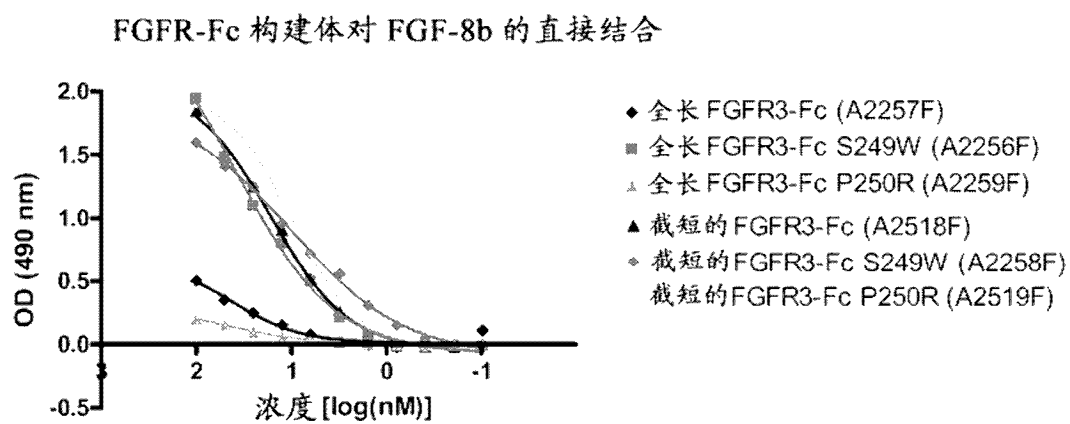


图 5B :FGFR-Fc 构建体 (ZymoGenetics) 对 FGF-8b 的直接结合

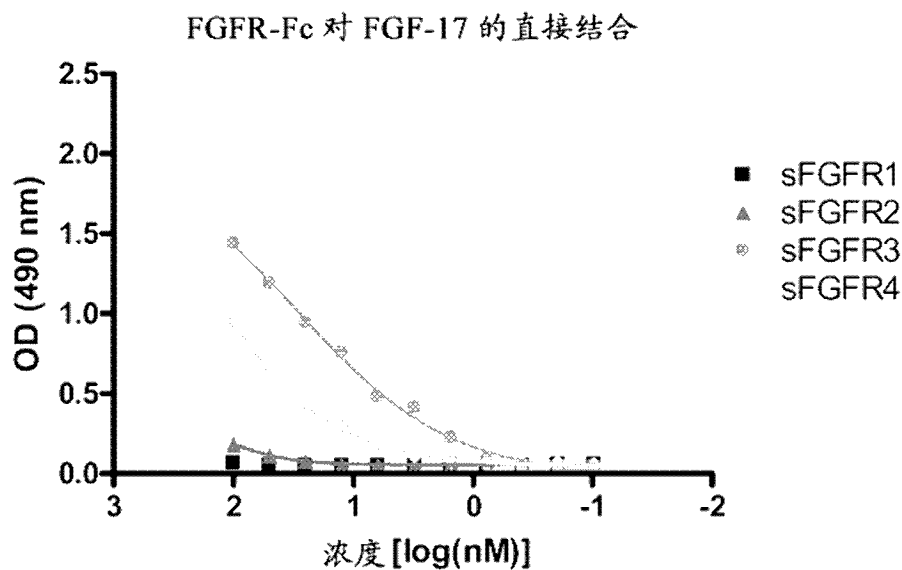


图 6A :FGFR-Fc (R&D Systems) 对 FGF-17 的直接结合

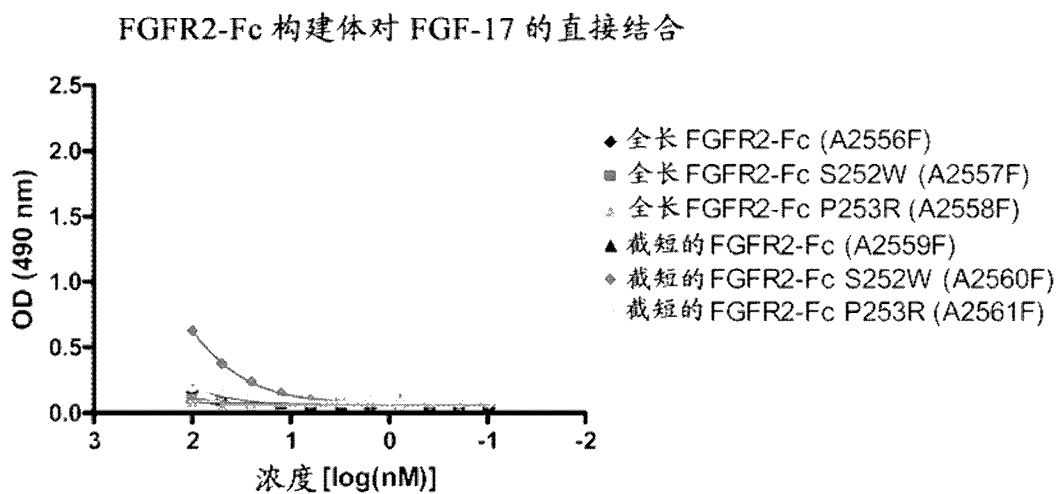


图 6B :FGFR2-Fc 构建体 (ZymoGenetics) 对 FGF-17 的直接结合

FGFR3-Fc 构建体对 FGF-17 的直接结合

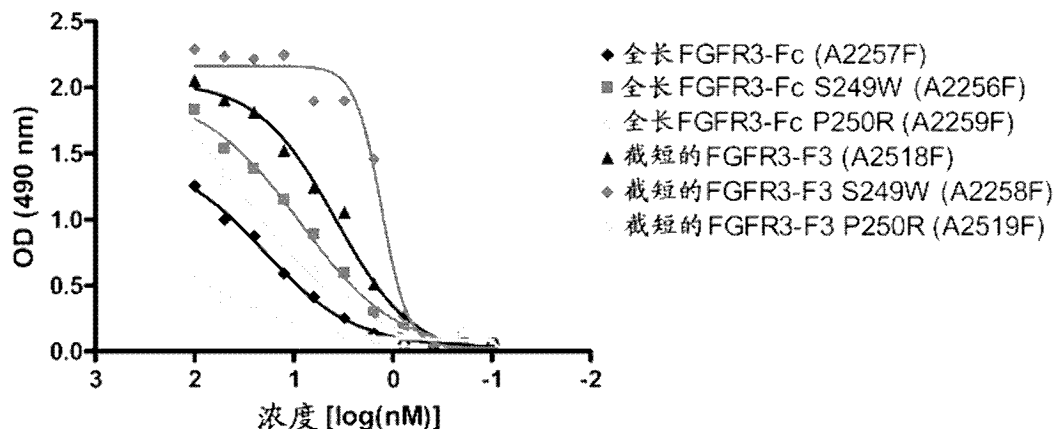


图 7:FGFR3-Fc 构建体 (ZymoGenetics) 对 FGF-17 的直接结合。

使用 FGFR-Fc 的情况下 Caki-1 细胞的增殖

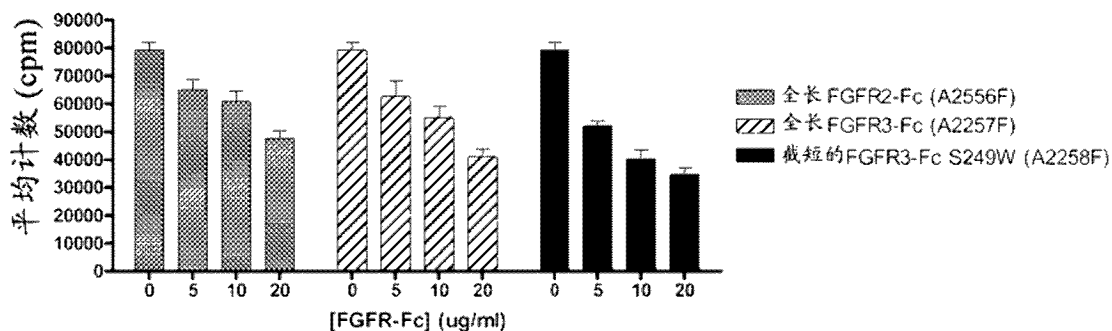


图 8A:FGFR-Fc 抑制 Caki-1 细胞的生长

使用 FGFR-Fc 的情况下 DU145 细胞的增殖

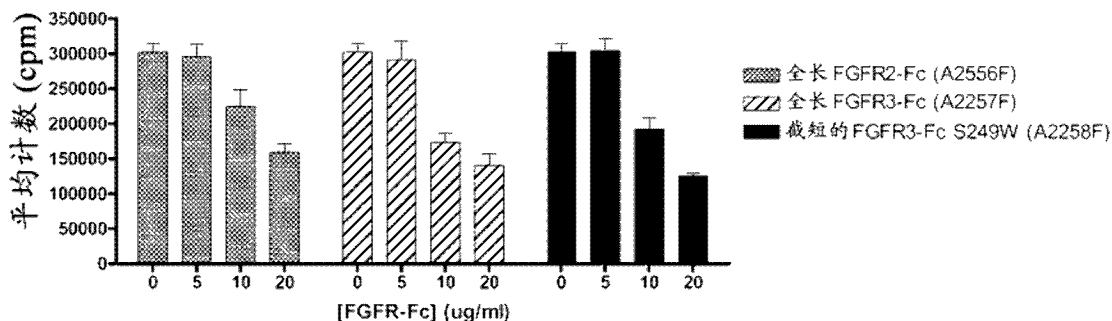


图 8B:FGFR-Fc 抑制 DU145 细胞的生长

A

	bbbbA	gggA	bbbbA'	bbbB	bbbB'	bbbbbbC	bC'
	150	160	170	180	190	200	
FGFR1	MPV.....	SP.....	K.....	K....	SS.T.N..	L.....	P
FGFR2	NKR	PYWTNTEKMEKRLH	AVPAANTVKFRC	PAGGNPMP	TMRWL	KNGKEFKQ	
FGFR3	DTG.....	RP.R.D.K.L.....	R.....	A...T.SIS.....	R..RG		
FGFR4	PQQ.....	HPQR...K.....	G.....	A...T..I....	D.QA.HG		

	bbD	bbbE	bbbbbbbbF	bbbbbbbbbbG
	210	220	230	240 250
FGFR1	D.....	YAT..I..D.....	I.....	Q.....
FGFR2	EHRIGGYKVRNQHWSL	IMESVVP	SDKGN	YTCVVENEYGSINHTYHLDVVERS
FGFR3	I.L.H.Q...	V.....	R.....	KF...RQ..T...L...
FGFR4	.N....IRL.H.....	V.....	R.T...L...AV...RYN.L...L...	

B

	bA	bbA'	bbbB	bb'	bbbbbbC
	260	270	280	290	300
FGFR1 (IIIc)		KTVAL.SN...M.....	P.....	L..I.V....	I...N.
FGFR2 (IIIc)	PHRPILQAGLPANASTV	VGGDVEFVCKVYSDAQ	PHIQWIKHVEKNGSKY	GP	DGL
FGFR3 (IIIc)		QTA.L.S....H.....	L....V....	V....T	
FGFR4		TTA...S...LL.....	L..IVI...SF.AV.F		
FGFR1 (IIIb)		KTVAL.SN...M.....	P.....	L..I.V....	I...N.
FGFR2 (IIIb)					
FGFR3 (IIIb)		QTA.L.S....H.....	L....V....	V....T	

	bbbbbbC'	bbbE	bbbbbbbbF	bbbbbbbbbbG
	310	320	330	340 350 360
FGFR1 (IIIc)	..VQI..T	..M...HL...S.....	L.H.....	
FGFR2 (IIIc)	PYLKVLKAGMAT	KEIEVLYIRNVTFE	DAGEYTCLAGNSIGISF	HSAWLTVL
FGFR3 (IIIc)	..VT...T	A...L...SLH.....	F.H.....	V..
FGFR4	..VQ...T	DISSSE--V...L...SA.....	L.YQ.....	
FGFR1 (IIIb)	..VQI..HS	ISS--A...TLF...EAQS...V.KVS.Y..EANQ.....	T	
FGFR2 (IIIb)	HS	ISSN--A...ALF...EA.....I.KVS.Y..QANQ.....		
FGFR3 (IIIb)	..VT...T	SWISESVEADVRLA..SER.G...L.R.T.F..VAEKAF..S.H		

Plotnikov et al. *Cell* 101 (4), 2000

图 9