



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107090034 B

(45) 授权公告日 2021.10.01

---

(21) 申请号 201610970344.4 M·考尔德伦-卡西 A·H·霍维茨  
(22) 申请日 2005.01.06 (74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100  
(65) 同一申请的已公布的文献号 代理人 陶家蓉  
申请公布号 CN 107090034 A  
(43) 申请公布日 2017.08.25 (51) Int.Cl.  
(30) 优先权数据 C07K 16/24 (2006.01)  
60/535,181 2004.01.07 US (56) 对比文件  
60/576,417 2004.06.02 US WO 2004045532 A3,2006.01.26  
WO 9608565 A3,1996.07.11  
(62) 分案原申请数据 Simone Cenci等.M-CSF neutralization  
and Egr-1 deficiency prevent ovariectomy-  
induced bone loss.《The Journal of  
Clinical Investigation》.2000,第1279-1286  
页.  
(73) 专利权人 诺华疫苗和诊断公司 审查员 陈佩  
地址 美国特拉华州  
专利权人 爱克索马技术有限公司  
(72) 发明人 C·刘 D·L·齐默尔曼  
G·M·哈罗 K·科特斯  
W·M·卡瓦诺 L·龙  
权利要求书1页 说明书70页  
序列表89页 附图42页

---

(54) 发明名称  
M-CSF特异性单克隆抗体及其应用

(57) 摘要  
本发明提供了基于RX1或RX-1衍生的M-CSF特异性抗体,以及包含这种抗体的药物组合物,含有药物组合物的药盒,和预防和治疗骨质溶解病患者的骨质损失的方法。

1. 一种人源化抗M-CSF抗体,其中:
  - (i) 重链包含SEQ ID NO:43列出的重链可变区序列和IgG1恒定区;和
  - (ii) 轻链包含SEQ ID NO:53列出的轻链可变区序列。
2. 如权利要求1所述的抗体,其特征在于,包含SEQ ID NO:116列出的重链序列。
3. 如权利要求1或2所述的抗体,其特征在于,所述轻链包含人 $\kappa$ 恒定区。
4. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1-3任一所述的抗体和药学上合适的运载体、赋形剂或稀释剂。

## M-CSF特异性单克隆抗体及其应用

[0001] 本申请要求2004年1月7日提交的美国临时申请号60/535,181和2004年6月2日提交的美国临时申请号60/576,417的优先权,将其各自全文纳入本文作为参考。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及通过给予患者来预防和治疗骨质溶解、癌转移以及癌转移相关骨质损失的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 癌转移是癌症病人手术后或治疗后复发的主要原因。尽管作了广泛努力来发展治疗方法,但癌转移基本上仍然很难治疗。骨骼是多种人类癌症(例如,乳腺癌、肺癌、前列腺癌和甲状腺癌)转移的最常见部位之一。溶骨性转移的发生因难以控制的疼痛、骨折高度敏感、神经压迫和高血钙症而引发严重的病症。尽管这些临床问题十分严重,但是几乎没有治疗癌转移相关骨质损失的治疗方法。

[0005] 破骨细胞介导骨质的重吸收(readsorption)。破骨细胞是由造血细胞分化而来的多核细胞。通常认为,破骨细胞是由骨髓中造血干细胞衍生的单核前体细胞融合形成的,而不是由不完全细胞分裂形成的(Chambers, Bone and Mineral Research, 6:1-25, 1989; Göthling 等, Clin Orthop Relat R. 120:201-228, 1976; Kahn等, Nature 258:325-327, 1975; Suda等, Endocr Rev 13:66-80, 1992; Walker, Science 180:875, 1973; Walker, Science 190:785-787, 1975; Walker, Science 190:784-785, 1975)。它们和单核细胞-巨噬细胞系拥有共同的干细胞(Ash等, Nature 283:669-670, 1980; Kerby等, J. Bone Miner Res 7:353-62, 1992)。破骨前体细胞向成熟的多核破骨细胞分化需要各种不同因素,包括激素的和局部刺激(Athanasou等, Bone Miner 3:317-333, 1988; Feldman等, Endocrinology 107:1137-1143, 1980; Walker, Science 190:784-785, 1975; Zheng等, Histochem J 23:180-188, 1991),而且活的骨骼和骨细胞也被证实在破骨细胞的发育中起着重要作用(Hagenaars等, Bone Miner 6:179-189, 1989)。成骨细胞或骨髓基质细胞也是破骨细胞分化所需要的。这些细胞所产生的支持破骨细胞生成的因子之一是巨噬细胞集落刺激因子, M-CSF(Wiktor-Jedrzejczak等, Proc Natl Acad Sci USA 87:4828-4832, 1990; Yoshida等, Nature 345:442-444, 1990)。NF- $\kappa$ B配体的受体活化因子(RANKL, 也称为TRANCE, ODF或OPGL)是另一种信号(Suda等, Endocr Rev 13:66-80, 1992),通过该信号成骨细胞/基质细胞刺激破骨细胞生成和通过位于破骨细胞和破骨前体细胞上的受体——RANK (TRANCER)——进行再吸收(Lacey等, Cell 93:165-176, 1998; Tsuda等, Biochem Biophys Res Co 234:137-142, 1997; Wong等, J Exp Med 186:2075-2080, 1997; Wong等, J Biol. Chem 272:25190-25194, 1997; Yasuda等, Endocrinology 139:1329-1337, 1998; Yasuda等, Proc Natl Acad Sci US 95:3579-3602, 1998)。成骨细胞还分泌一种强烈抑制破骨细胞生成的蛋白,称为骨保护素(osteoprotegerin, OPG, 也称为OCIF),该蛋白作用是RANKL的假受体,因此抑制破骨细胞和成骨细胞之间通过RANK和RANKL传递的正向信号。

[0006] 破骨细胞负责溶解矿物质和有机骨基质(Blair等, J Cell Biol 102:1164-1172,

1986)。破骨细胞代表终末分化细胞,表现出独特的极化形态,具有特殊化的细胞膜区域和几种细胞膜和胞质标记,例如耐酒石酸的酸性磷酸酶(TRAP)(Anderson等1997),碳酸酐酶II(Vaananen等,Histochemistry 78:481-485,1983),降钙素受体(Warshafsky等,Bone 6:179-185,1985)和玻璃体结合蛋白受体(Davies等,J Cell Biol 109:1817-1826,1989)。多核破骨细胞通常含有不到10个细胞核,但它们可含有直径在10和100 $\mu\text{m}$ 之间的多达100个细胞核(Göthling等,Clin Orthop Relat R 120:201-228,1976)。这使它们在光学显微镜下较易鉴定。处于活跃状态时,这些细胞具有很多液泡,而且还含有许多线粒体,表明有很高的新陈代谢率(Mundy,骨代谢疾病和矿物代谢疾病的初级读本(Primer on the Metabolic Bone Diseases and disorders of mineal metabolism),18-22页,1990)。因为破骨细胞在溶骨性骨质转移中起主要作用,所以该领域需要新的药物和方法来防止破骨细胞的激活和作用。

[0007] 因此,该领域仍需要鉴定用于防止或治疗骨质溶解或癌转移,包括溶骨性骨质转移的新药剂和方法。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明的材料和方法填补了该领域先前提到的和其它相关的需求。在本发明的一个实施方式中,提供了能特异性结合于具有图4、14和15所列氨基酸序列的鼠单克隆抗体RX1、MC1或MC3中任一种相同的M-CSF表位的非鼠单克隆抗体,包括功能片段。在一相关实施方式中,提供上述抗体,所述抗体选自多克隆抗体;包括Human Engineered™抗体的单克隆抗体;人源化抗体;人抗体;嵌合抗体;Fab,F(ab')<sub>2</sub>;Fv;Sc Fv或SCA抗体片段;双抗体;直链抗体;或这些抗体中任何一种的突变蛋白,优选保留至少 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 或 $10^{-9}$ 或更高的结合亲和力。也考虑能与具有图4所列氨基酸序列的单克隆抗体RX1、MC1和/或MC3竞争结合M-CSF大于75%的非鼠单克隆抗体,包括功能片段。

[0010] 在另一实施方式中,提供了非鼠单克隆抗体,包括功能片段,其中所述非鼠单克隆抗体或其功能片段能结合包含图12氨基酸98-105中至少4、5、6、7或8个连续残基的M-CSF表位。

[0011] 在另一实施方式中,本发明提供非鼠单克隆抗体包括功能片段,其中所述非鼠单克隆抗体或其功能片段能结合包含图12氨基酸65-73或138-144中至少4、5、6、7或8个连续残基的M-CSF表位(对应于5H4或MC3识别的M-CSF表位)。

[0012] 在又一实施方式中,提供了能结合包含图12氨基酸98-105的M-CSF表位的上述抗体或片段。在一相关实施方式中,提供的上述抗体包含图4A的CDR3。在另一实施方式中,提供的抗体包含图4A所列鼠抗体RX1的至少1、2、3、4、5或6个CDR。包含鼠抗体RX1的至少1、2、3、4或5个CDR的这种抗体也可包含图16A-B所列抗体5H4的6个CDR的至少1、2、3、4或5个CDR。或者,包含鼠抗体RX1的至少1、2、3、4或5个CDR的抗体也可包含图16A-B所列抗体MC1的6个CDR的至少1、2、3、4或5个CDR。在又一实施方式中,上述抗体也可包含图16A-B所列抗体MC3的6个CDR的至少1、2、3、4或5个CDR。在一相关实施方式中,包含鼠抗体RX1的至少1、2、3、4或5个CDR的抗体可包含图16A-B中所列共有CDR的至少1、2、3、4或5个CDR。在又一实施方式中,在上述抗体中,共有CDR的一个或多个残基被鼠抗体RX1、5H4、MC1或MC3的任一CDR的相应残基取代。可保留所需的结合亲和力,即使通过(例如)CDR中的保守取代和/或在低风险和高风险残基中的保守性或非保守性改变使该抗体中的一个或多个氨基酸发生突变。

[0013] 在本发明另一实施方式中,提供了上述抗体的变体,其包含的重链可变区氨基酸序列与图4A、13、14或15中所列氨基酸序列至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同源。在一相关实施方式中,该抗体包含的轻链可变区氨基酸序列与图4A、13、14或15中所列氨基酸序列至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同源。

[0014] 在又一实施方式中,该抗体包含人抗体序列的恒定区和一个或多个重链和轻链可变区的构架区。在一相关实施方式中,该抗体包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的修饰或未修饰的恒定区。在优选实施方式中,恒定区是人IgG1或IgG4,可任选地修饰它们以增强或降低某些性能。就IgG1而言,对恒定区的修饰,尤其是对绞链区或CH2区的修饰可提高或降低效应器功能,包括ADCC和/或CDC活性。在其它实施方式中,修饰IgG2恒定区可减少抗体-抗原凝聚体形成。就IgG4而言,对恒定区的修饰,尤其是对绞链区的修饰可减少半抗体的形成。

[0015] 在本发明的又一实施方式中,上述抗体衍生自、基于或含有人共有序列、人种系序列、人共有种系序列或以下人抗体序列之一:Kabat,NCBI Ig Blast,

[0016] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi>,Kabat数据库

[0017] <http://www.bioinf.org.uk/abs/seqtest.html>,Kabat 5.0版(1992)的FTP站点

[0018] <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat/rel5.0/>,ImMunoGeneTics数据库(Montpellier France)<http://imgt.cnusc.fr:8104/>,V-Base

[0019] <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/LIST.php?menu=901>,Zurick University

[0020] <http://www.unizh.ch/~antibody/Sequences/index.html>,治疗性抗体的人同源性计划(TAHP)<http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHP.html>,抗体结构域的蛋白质序列和结构分析<http://how.to/AnalyseAntibodies/>,通过设计人源化

[0021] <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>,抗体资源

[0022] <http://www.antibodyresource.com/educational.html>,抗体工程(TT Wu), Humana Press。

[0023] 在本发明的优选方面,上述抗体是Human Engineered™抗体。例如,Human Engineered™抗体序列是图23-24中所列序列的任何一个。考虑了其它Human Engineered™抗体或其变体。

[0024] 例如,在一个实施方式中,提供基于上述RX1的抗体,其重链可变区所含的氨基酸序列是 $X_1VX_2LX_3EX_4GX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}LX_{14}LX_{15}CX_{16}VX_{17}DYSITSDYAWNWX_{18}QX_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}LX_{24}WMGYISYSGSTX_{25}NX_{26}X_{27}LX_{28}X_{29}X_{30}IX_{31}IX_{32}RX_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}FX_{39}LX_{40}LX_{41}X_{42}VX_{43}X_{44}DX_{45}AX_{47}YYCASFDYAHAMDYWX_{48}GTX_{49}VX_{50}VX_{51}X_{52}$ (SEQ ID NO:124),其中X是任何氨基酸。在一相关实施方式中,提供一种抗体,其重链可变区所含的氨基酸序列是 $DVX_1LX_2EX_3GPX_4X_5VX_6PX_7X_8X_9LX_{10}LX_{11}CX_{12}VTDYSITSDYAWNWX_{13}PX_{14}X_{15}KLEWMGYISYSGSTSYNPSLX_{16}RIX_{17}IX_{18}RX_{19}TX_{20}X_{21}NX_{22}FX_{23}LX_{24}LX_{25}X_{26}VX_{27}X_{28}X_{29}DX_{30}ATYYCASFDYAHAMDYWX_{31}GTX_{32}VX_{33}VX_{34}X_{35}$ (SEQ ID NO:125),其中X是任何氨基酸。

[0025] 在本发明又一实施方式中,提供上述抗体,其重链可变区所含的氨基酸序列为 $X_1VQLQESGPGLVKPSQX_2LSLTCTVX_3DYSITSDYAWNWX_{4}X_5LEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIX_6IX_7RDTSKNQFX_8LQLNSVTX_9X_{10}DTAX_{11}YYCASFDYAHAMDYWGQTX_{12}VTVSS$ (SEQ ID NO:126),其中X是任何氨基酸。在一相关实施方式中,提供抗体,其重链可变区所含的氨基酸序列是DVQLQESGPGLVKPSQX<sub>2</sub>LSLTCTVX<sub>3</sub>DYSITSDYAWNWX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>LEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIX<sub>6</sub>IX<sub>7</sub>RDTSKNQFX<sub>8</sub>LQLNSVTX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>DTAX<sub>11</sub>YYCASFDYAHAMDYWGQTX<sub>12</sub>VTVSS

VKPSQX<sub>1</sub>LSLTCTVTDYSITSDYAWNWRQFPGX<sub>2</sub>KLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIX<sub>3</sub>IX<sub>4</sub>RDTSKNQFX<sub>5</sub>LQLN SVTX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>DTATYYCASFDYAHAMDYWGQGTGX<sub>8</sub>VTVSS (SEQ ID NO:127), 其中X是任何氨基酸。在又一实施方式中, 提供抗体, 其重链可变区所含的氨基酸序列是DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTDYSITSDYAWNWRQFPGKKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:41)。在又一实施方式中, 提供抗体, 其重链可变区所含的氨基酸序列是QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDYSITSDYAWNWRQFPGKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:43)。

[0026] 在本发明又一实施方式中, 提供上述抗体, 其轻链可变区所含的氨基酸序列为X<sub>1</sub>IX<sub>2</sub>LX<sub>3</sub>QX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>VX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>VX<sub>15</sub>FX<sub>16</sub>CX<sub>17</sub>AX<sub>18</sub>QSIGTSHWYX<sub>19</sub>QX<sub>20</sub>X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>X<sub>23</sub>X<sub>24</sub>PX<sub>25</sub>LLIKYASEX<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>IX<sub>30</sub>X<sub>31</sub>X<sub>32</sub>FX<sub>33</sub>GX<sub>34</sub>GX<sub>35</sub>GX<sub>36</sub>X<sub>37</sub>FX<sub>38</sub>LX<sub>39</sub>IX<sub>40</sub>X<sub>41</sub>VX<sub>42</sub>X<sub>43</sub>X<sub>44</sub>DX<sub>45</sub>ADYYCQQINSWPTTFGX<sub>46</sub>GTX<sub>47</sub>LX<sub>48</sub>X<sub>49</sub>X<sub>50</sub>X<sub>51</sub>X<sub>52</sub> (SEQ ID NO:128), 其中X是任何氨基酸。在一相关实施方式中, 提供抗体, 其轻链可变区所含的氨基酸序列是X<sub>1</sub>IX<sub>2</sub>LX<sub>3</sub>QX<sub>4</sub>PX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>LX<sub>7</sub>VX<sub>8</sub>PX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>VX<sub>12</sub>FX<sub>13</sub>CX<sub>14</sub>ASQSIGTSHWYQQX<sub>15</sub>TX<sub>16</sub>X<sub>17</sub>SPRLLIKYASEX<sub>18</sub>ISX<sub>19</sub>IPX<sub>20</sub>RFX<sub>21</sub>GX<sub>22</sub>GX<sub>23</sub>GX<sub>24</sub>X<sub>25</sub>FX<sub>26</sub>LX<sub>27</sub>IX<sub>28</sub>X<sub>29</sub>VX<sub>30</sub>X<sub>31</sub>X<sub>32</sub>DX<sub>33</sub>ADYYCQQINSWPTTFGX<sub>34</sub>GTX<sub>35</sub>LX<sub>36</sub>X<sub>37</sub>X<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub> (SEQ ID NO:129), 其中X是任何氨基酸。在又一实施方式中, 提供抗体, 其轻链可变区所含的氨基酸序列为X<sub>1</sub>IX<sub>2</sub>LTQSPX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>LSVSPGERVX<sub>5</sub>FSCRASQSIGTSHWYQQX<sub>6</sub>TX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>PRLLIKYASEX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>GIPX<sub>13</sub>RFSGSGSGTDFTLX<sub>14</sub>IX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>VESEDX<sub>17</sub>ADYYCQQINSWPTTFGX<sub>18</sub>GTKLEIKRX<sub>19</sub> (SEQ ID NO:130), 其中X是任何氨基酸。

[0027] 在本发明又一实施方式中, 提供上述抗体, 其轻链可变区所含的氨基酸序列为X<sub>1</sub>IX<sub>2</sub>LTQSPX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>LSVSPGERVX<sub>5</sub>FSCRASQSIGTSHWYQQX<sub>6</sub>TX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>SPRLLIKYASEX<sub>9</sub>ISGIPX<sub>10</sub>RFSGSGSGTDFTLX<sub>11</sub>IX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>VESEDX<sub>14</sub>ADYYCQQINSWPTTFGX<sub>15</sub>GTKLEIKRX<sub>16</sub> (SEQ ID NO:131), 其中X是任何氨基酸。在一相关实施方式中, 提供抗体, 其轻链可变区所含的氨基酸序列是X<sub>1</sub>IX<sub>2</sub>LTQSPX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>LSVSPGERVX<sub>5</sub>FSCRASQSIGTSHWYQQX<sub>6</sub>TX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>PRLLIKYASESISGIPX<sub>10</sub>RFSGSGSGTDFTLX<sub>11</sub>IX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>VESEDX<sub>14</sub>ADYYCQQINSWPTTFGX<sub>15</sub>GTKLEIKRX<sub>16</sub> (SEQ ID NO:132), 其中X是任何氨基酸。在又一实施方式中, 提供抗体, 其轻链可变区所含的氨基酸序列为EIVLTQSPGTLVSPGERVTFSCRASQSIGTSHWYQQKTGQAPRLLIKYASESISGIPDRFSGSGSGTDFLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGT KLEIKRT (SEQ ID NO:45)。

[0028] 在本发明又一实施方式中, 提供上述抗体, 其轻链可变区所含的氨基酸序列为EIVLTQSPGTLVSPGERVTFSCRASQSIGTSHWYQQKTGQAPRLLIKYASERATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGT KLEIKRT (SEQ ID NO:47)。在另一实施方式中, 提供抗体, 其轻链可变区所含的氨基酸序列为EIVLTQSPGTLVSPGERVTFSCRASQSIGTSHWYQQKTGQSPRLLIKYASERISGIPDRFSGSGSGTDFLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGT KLEIKRT (SEQ ID NO:48)。

[0029] 在本发明另一实施方式中, 提供上述抗体, 其至少一个X是图4A所列氨基酸序列中的对应氨基酸。在一相关实施方式中, 提供抗体, 其至少一个X是图4A所列氨基酸序列中对应氨基酸的保守取代(根据表1)。在又一相关实施方式中, 提供抗体, 其至少一个X是图4A所列氨基酸序列中对应氨基酸的非保守取代(根据表1)。在本发明又一实施方式中, 提供抗体, 其至少一个X是人抗体序列中的对应氨基酸。

[0030] 上述Human Engineered<sup>TM</sup>抗体衍生自、基于或含有人抗体共有序列、人种系序列、人共有种系序列或以下人抗体序列之一: Kabat, NCBI Ig Blast,

[0031] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi>, Kabat数据库

- [0032] <http://www.bioinf.org.uk/abs/seqtest.html>, Kabat 5.0版(1992)的FTP站点
- [0033] <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat/rel5.0/>, ImMunoGeneTics数据库 (Montpellier France) <http://imgt.cnusc.fr:8104/>, V-Base
- [0034] <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/LIST.php?menu=901>, Zurich University
- [0035] <http://www.unizh.ch/~antibody/Sequences/index.html>, 治疗性抗体的人同源性计划 (TAHHP) <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html>, 抗体结构域的蛋白质序列和结构分析 <http://how.to/AnalyseAntibodies/>, 通过设计人源化
- [0036] <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>, 抗体资源
- [0037] <http://www.antibodyresource.com/educational.html>, 抗体工程 (TT Wu), Humana Press.

[0038] 在本发明另一方面, 提供上述抗体, 其中 Human Engineered<sup>TM</sup> 抗体序列是图23-24或29-30中所列序列之一。在另一实施方式中, 该抗体所含的重链可变区氨基酸序列与图19B中所列的重链氨基酸序列之一至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同。在又一实施方式中, 该抗体所含的轻链可变区氨基酸序列与图20B-22B中任一所述的轻链氨基酸序列之一至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同。

[0039] 在又一实施方式中, 具有图24C-24E之一所列序列的上述抗体如5H4、MC1或MC3抗体是根据 Studnicka 等, 美国专利号5,766,886和本文实施例4所列方法 Human Engineered<sup>TM</sup> 的, 其中采用图24C-24E所列 Kabat 编号来鉴定低风险、中风险和高风险残基。在一相关实施方式中, 提供上述抗体, 其重链或轻链的所有低风险残基都经过修饰(需要时)而成为与人参比免疫球蛋白序列相同的残基。类似地, 本发明另一实施方式提供了上述抗体, 其中重链或轻链的所有低风险+中风险残基都经过修饰(需要时)而成为与人参比免疫球蛋白序列相同的残基。所有低风险残基被修饰的重链可与所有低风险和中风险残基被修饰的轻链结合, 反之亦然。类似地, 上述 Human Engineered<sup>TM</sup> 轻链或重链可与人源化或嵌合抗体的轻链或重链结合。

[0040] 在又一实施方式中, 该抗体所含的重链可变区氨基酸序列与按照 Studnicka 法 Human Engineered<sup>TM</sup> 的上述重链氨基酸序列至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同。在又一实施方式中, 该抗体所含的轻链可变区氨基酸序列与根据 Studnicka 法 Human Engineered<sup>TM</sup> 的上述轻链氨基酸序列至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同。

[0041] 在又一实施方式中, 提供包含上面所列重链和上面所列轻链的抗体。

[0042] 在本发明又一实施方式中, 上述抗体的亲和力 K<sub>d</sub> 至少为 10<sup>[-7]</sup>。在一相关实施方式中, 该抗体的亲和力 K<sub>d</sub> 至少为 10<sup>[-9]</sup>。

[0043] 在本发明另一实施方式中, 提供的上述抗体是多克隆抗体; 包括 Human Engineered<sup>TM</sup> 抗体的单克隆抗体; 人源化抗体; 人抗体; 嵌合抗体; Fab, F(ab')<sub>2</sub>; Fv; Sc Fv 或 SCA 抗体片段; 双抗体; 直链抗体; 或这些抗体之一的突变蛋白。在一相关实施方式中, 所述单克隆抗体是分离的抗体。

[0044] 在本发明又一实施方式中, 提供的分离核酸包含编码上述抗体轻链的核酸序列。在一相关实施方式中, 该分离核酸所含重链核酸序列与图4A、13、14或15中所列重链核苷酸

序列至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同。在又一实施方式中,该分离核酸所含轻链核酸序列与图4A、13、14或15中所列轻链核苷酸序列至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同。

[0045] 在另一实施方式中,提供包含上述分离核酸的载体。在一相关实施方式中,提供上述载体,其中该分离核酸操作性连接于调节控制序列。在又一实施方式中,提供包含上述载体的宿主细胞。

[0046] 本发明中考虑了许多方法。例如,提供产生上述抗体的方法,包括培养上述宿主细胞,使所述分离核酸表达产生抗体。在一相关实施方式中,该方法还包括从宿主细胞培养物中回收该抗体的步骤。在一相关实施方式中,提供用上述方法产生的分离抗体。

[0047] 本发明也提供能分泌上述抗体的杂交瘤。此外,提供偶联于毒素的上述抗体。

[0048] 在本发明另一实施方式中,提供一种药物组合物,其包含上述抗体之一和药学上适合的运载体、赋形剂或稀释剂。在一相关实施方式中,该药物组合物还包含第二种治疗剂。在又一相关实施方式中,提供的药物组合物中第二种治疗剂是癌症化疗药。在又一相关实施方式中,提供的药物组合物中第二种治疗剂是二膦酸盐。在另一实施方式中,第二种治疗剂是另一种抗体。

[0049] 考虑本发明抗体具有治疗疾病和失调的许多所需特征。在本发明一个实施方式中,提供了能结合M-CSF而预防对象患上引起或导致骨质溶解疾病的上述抗体之一,其中所述抗体能有效降低与该疾病相关的骨质损失的严重性。

[0050] 考虑了可用本发明抗体治疗许多疾病和失调。在本发明的一个实施方式中,提供上述抗体,其中所述疾病选自:与破骨细胞活性相对升高相关的代谢性骨病,包括:内分泌病(皮质醇增多症、性腺功能减退症、原发性或继发性甲状旁腺功能亢进、甲状腺功能亢进)、高钙血症、营养缺乏状态(佝偻病/骨软化症、坏血病、营养不良)、慢性疾病(吸收不良综合征、慢性肾衰竭(肾性骨营养不良症)、慢性肝病(肝性骨营养不良症))、药物(糖皮质激素类(糖皮质激素诱导的骨质疏松)、肝素、醇)和遗传病(成骨不全、同型胱氨酸尿症)、癌症、骨质疏松、骨硬化症、关节炎和类风湿性关节炎相关骨炎症、牙周病、纤维性结构不良和/或佩吉特病。

[0051] 在一相关实施方式中,提供能结合M-CSF的上述抗体,以预防或治疗骨转移性癌症,其中转移性癌症是:乳腺癌、肺癌、肾癌、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、前列腺癌、腺癌、血细胞恶变包括白血病和淋巴瘤;头颈癌;胃肠癌,包括食道癌、胃癌、结肠癌、肠癌、结直肠癌、直肠癌、胰腺癌、肝癌、胆管或胆囊癌;女性生殖道恶性肿瘤,包括卵巢癌、子宫内膜癌、阴道癌和宫颈癌;膀胱癌;脑癌,包括神经母细胞瘤;肉瘤、骨肉瘤;以及皮肤癌,包括恶性黑色素瘤或鳞状细胞癌。

[0052] 在本发明另一实施方式中,提供了筛选M-CSF特异性抗体的方法,该方法包括以下步骤:使转移性肿瘤细胞培养基、破骨细胞和候选抗体相接触;检测破骨细胞的形成、增殖和/或分化;和如果检测到破骨细胞的形成、增殖和/或分化降低,则将所述候选抗体鉴定为M-CSF特异性抗体。类似地,提供上述方法,所述转移性肿瘤细胞培养基中包括肿瘤细胞。

[0053] 在另一实施方式中,提供的方法中接触步骤(a)在体内发生,所述检测步骤(b)包括检测骨转移灶的大小和/或数目,如果检测到骨转移灶的大小和/或数目减少,则将该候选抗体鉴定为M-CSF特异性抗体。在一相关实施方式中,提供的上述方法还包括测定候选抗

体是否能结合M-CSF的步骤。类似地,本发明另一实施方式提供的上述方法还包括测定所述候选抗体是否能抑制M-CSF与其受体M-CSFR之间相互作用的步骤。

[0054] 在本发明另一实施方式中,提供了鉴定可预防或治疗骨转移性癌症的M-CSF特异性抗体的方法,该方法包括以下步骤:(a)检测候选抗体能否与包含图12氨基酸98-105的至少4个连续残基的M-CSF表位结合;和(b)在体外或体内测定所述候选抗体预防或治疗骨转移性癌症的能力。

[0055] 在本发明另一实施方式中,提供了鉴定可预防或治疗骨转移性癌症的M-CSF特异性抗体的方法,该方法包括以下步骤:(a)检测候选抗体能否与包含图12氨基酸65-73或138-144的至少4个连续残基的M-CSF表位(对应于5H4或MC3识别的M-CSF表位)结合;和(b)在体外或体内测定所述候选抗体预防或治疗骨转移性癌症的能力。

[0056] 在本发明又一实施方式中,提供了改变能结合包含图12氨基酸98-105的M-CSF表位的抗体的CDR的方法,该方法包括改变图4A所列氨基酸序列CDR中的氨基酸和选择结合M-CSF的亲和力 $K_a$ 至少为 $10^{-7}$ 的抗体。在另一实施方式中,提供了系统性改变高达60%图4A所列重链氨基酸序列的方法,该方法包括改变氨基酸序列 $X_1VX_2LX_3EX_4GX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}LX_{14}LX_{15}CX_{16}VX_{17}DYSITSDYAWNWX_{18}QX_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}LX_{24}WMGYISYSGSTX_{25}NX_{26}X_{27}LX_{28}X_{29}X_{30}IX_{31}IX_{32}RX_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}FX_{39}LX_{40}LX_{41}X_{42}VX_{43}X_{44}X_{45}DX_{46}AX_{47}YYCASFDYAHAMDYWX_{48}GTX_{49}VX_{50}VX_{51}X_{52}$ (SEQ ID NO:133)中 $X_1$ - $X_{52}$ 之一,并测试含有此改变的氨基酸序列的抗体能否与包含图12氨基酸98-105的M-CSF表位结合。

[0057] 在一相关实施方式中,提供了系统性改变高达60%图4所列轻链氨基酸序列的方法,该方法包括改变氨基酸序列 $X_1IX_2LX_3QX_4X_5X_6X_7X_8X_9VX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}VX_{15}FX_{16}CX_{17}AX_{18}QSIGT$   
 $SIHWYX_{19}QX_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}PX_{25}LLIKYASEX_{26}X_{27}X_{28}X_{29}IX_{30}X_{31}X_{32}FX_{33}GX_{34}GX_{35}GX_{36}X_{37}FX_{38}LX_{39}IX_{40}X_{41}VX_{42}X_{43}X_{44}DX_{45}ADYYCQQINSWPTTFGX_{46}GTX_{47}LX_{48}X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}$ (SEQ ID NO:134)中 $X_1$ - $X_{52}$ 之一,并测试含有此改变的氨基酸序列的抗体能否与包含图12氨基酸98-105的M-CSF表位结合。

[0058] 在本发明又一实施方式中,提供了改变能结合包含图12氨基酸65-73或138-144的M-CSF表位(对应于5H4或MC3识别的M-CSF表位)的抗体的CDR的方法,该方法包括改变图13、14和15之一所列氨基酸序列CDR中的氨基酸,和选择结合M-CSF的亲和力 $K_a$ 至少为 $10^{-7}$ 的抗体。在另一实施方式中,提供了系统性改变高达60%图13、14和15之一所列重链氨基酸序列的方法,该方法包括根据Studnicka等,美国专利号5,766,886和本文实施例4A所列方法并根据图24C-24E所列Kabat编号改变上述序列,测试含有此改变的氨基酸序列的抗体能否与包含图12氨基酸65-73或138-144的M-CSF表位(对应于5H4或MC3识别的M-CSF表位)结合。在一相关实施方式中,修饰了所有低风险残基。类似地,在本发明另一实施方式中,修饰了所有低风险和中风险残基。在又一实施方式中,修饰了所有低风险和中风险残基除了脯氨酸。

[0059] 在本发明另一实施方式中,提供了表达含有用上述方法设计的CDR的抗体的方法。在另一实施方式中,提供了包含能结合MCSF的抗体的药物组合物,其中所述抗体用上述方法制备。

[0060] 在本发明又一实施方式中,提供了防止或降低骨质损失的方法,该方法包括给予患有引起或导致骨质溶解疾病的对象治疗有效量的上述抗体之一,从而防止或降低与该疾病相关的骨质损失。在一相关实施方式中,提供了治疗患有引起或导致骨质溶解的疾病的

对象的方法,该方法包括给予所述对象治疗有效量的任何一种上述抗体,从而降低与该疾病相关的骨质损失的严重性。

[0061] 在一相关实施方式中,提供上述方法,其中所述疾病选自:与破骨细胞活性相对升高相关的代谢性骨病,包括:内分泌病(皮质醇增多症、性腺功能减退症、原发性或继发性甲状旁腺功能亢进、甲状腺功能亢进)、高钙血症、营养缺乏状态(佝偻病/骨软化症、坏血病、营养不良)、慢性疾病(吸收不良综合征、慢性肾衰竭(肾性骨营养不良症)、慢性肝病(肝性骨营养不良症))、药物(糖皮质激素类(糖皮质激素诱导的骨质疏松)、肝素、醇)和遗传病(成骨不全、同型胱氨酸尿症)、癌症、骨质疏松、骨硬化症、关节炎和类风湿性关节炎相关骨炎症、牙周病、纤维性结构不良和/或佩吉特病。

[0062] 在又一实施方式中,提供了预防或治疗骨转移性癌症的方法,该方法包括给予患有转移性癌症的对象治疗有效量的任何一种上述抗体。在一相关实施方式中,提供该方法,其中转移性癌症是:乳腺癌、肺癌、肾癌、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、前列腺癌、腺癌、血细胞恶变包括白血病和淋巴瘤;头颈癌;胃肠癌,包括食道癌、胃癌、结肠癌、肠癌、结直肠癌、直肠癌、胰腺癌、肝癌、胆管或胆囊癌;女性生殖道恶性肿瘤,包括卵巢癌、子宫内膜癌、阴道癌和宫颈癌;膀胱癌;脑癌,包括神经母细胞瘤;肉瘤、骨肉瘤;以及皮肤癌,包括恶性黑色素瘤或鳞状细胞癌。

[0063] 在本发明又一实施方式中,提供了防止骨质损失和肿瘤生长的方法,该方法包括将治疗有效量的任何一种上述抗体给予需要的对象。在一相关实施方式中,该方法还包括给予第二种治疗剂。在又一相关实施方式中,提供的方法中第二种治疗剂是癌症化疗药或二膦酸盐。在又一相关实施方式中,提供的方法中二膦酸盐是折来膦酸盐(zeledronate)、帕米膦酸盐、氯膦酸盐、依替膦酸盐、替鲁膦酸盐、阿仑膦酸盐或伊班膦酸盐。在又一相关实施方式中,提供的上述方法中治疗药物是细胞毒性化疗药。在另一实施方式中,提供的上述方法中所述对象未曾接受二膦酸盐治疗。

[0064] 在又一相关实施方式中,提供的上述方法中抗体能有效降低获得疗效所需的第二种治疗剂的剂量。在另一实施方式中,第二种治疗剂不是M-CSF集落刺激因子,例如G-CSF,或抗RANKL抗体,或可溶性RANKL受体。

[0065] 在本发明另一实施方式中,提供的上述方法中所述对象是哺乳动物。在一相关实施方式中,所述哺乳动物是人。

[0066] 在另一实施方式中,提供的上述方法中所述抗体能抑制M-CSF及其受体(M-CSFR)之间的相互作用。在另一相关实施方式中,所述抗体能抑制肿瘤细胞诱导的破骨细胞增殖和/或分化。在又一实施方式中,提供的上述方法中所述抗体的给药剂量约为2 $\mu$ g/kg-30mg/kg,0.1mg/kg-30mg/kg或0.1mg/kg-10mg/kg体重。

[0067] 在本发明另一实施方式中,考虑用本发明抗体制备预防或降低骨质溶解症患者的骨质损失的药物,并制备治疗患有引起或导致骨质溶解的疾病的患者的药物。还考虑了上述应用,其中所述疾病选自:破骨细胞活性相对升高相关的代谢性骨病,包括:内分泌病(包括皮质醇增多症、性腺功能减退症、原发性或继发性甲状旁腺功能亢进、甲状腺功能亢进)、高钙血症、营养缺乏状态(包括佝偻病/骨软化症、坏血病、营养不良)、慢性疾病(包括吸收不良综合征、慢性肾衰竭(包括肾性骨营养不良症)、慢性肝病(包括肝性骨营养不良症))、药物(包括糖皮质激素类骨质疏松)、肝素、醇)和遗传病(包括成骨不全、同型胱氨酸尿症)、

癌症、骨质疏松、骨硬化症、关节炎和类风湿性关节炎相关骨炎症、牙周病、纤维性结构不良和/或佩吉特病。

[0068] 在另一实施方式中,考虑用本发明抗体制备预防或治疗转移性癌症患者的骨转移性癌症的药物。在一相关实施方式中,转移性癌症是:乳腺癌、肺癌、肾癌、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、前列腺癌、腺癌、血细胞恶变包括白血病和淋巴瘤;头颈癌;胃肠癌,包括食道癌、胃癌、结肠癌、肠癌、结直肠癌、直肠癌、胰腺癌、肝癌、胆管或胆囊癌;女性生殖道恶性肿瘤,包括卵巢癌、子宫内膜癌、阴道癌和宫颈癌;膀胱癌;脑癌,包括神经母细胞瘤;肉瘤、骨肉瘤;以及皮肤癌,包括恶性黑色素瘤或鳞状细胞癌。

[0069] 在又一实施方式中,考虑用本发明抗体制备用于治疗癌症患者的药物。

[0070] 在上述应用的任何一项中,所述药物与用第二种治疗剂的治疗联用。在一相关实施方式中,第二种治疗剂是癌症化疗药。在一相关实施方式中,第二种治疗剂不是M-CSF集落刺激因子、抗RANKL抗体、可溶性RANKL受体或二膦酸盐。在一相关实施方式中,所述二膦酸盐是折来膦酸盐、帕米膦酸盐、氯膦酸盐、依替膦酸盐、替鲁膦酸盐、阿仑膦酸盐或伊班膦酸盐。

[0071] 在本发明又一实施方式中,考虑了上述应用的任何一项,其中所述患者未曾接受二膦酸盐治疗,和/或用第二种治疗剂预先治疗所述患者。在一相关实施方式中,第二种治疗剂是癌症化疗药、非M-CSF集落刺激因子、抗RANKL抗体、可溶性RANKL受体或二膦酸盐。在又一相关实施方式中,所述二膦酸盐是折来膦酸盐、帕米膦酸盐、氯膦酸盐、依替膦酸盐、替鲁膦酸盐、阿仑膦酸盐或伊班膦酸盐。在又一相关实施方式中,所述患者未曾接受二膦酸盐治疗。

[0072] 在本发明另一实施方式中,考虑了用于制备治疗具有骨质溶解症状的患者的药物的本发明抗体的协同组合应用,其中该药物与用第二种治疗剂治疗联用。在一相关实施方式中,第二种治疗剂是癌症化疗药、非M-CSF集落刺激因子、抗RANKL抗体、可溶性RANKL受体或二膦酸盐。在一相关实施方式中,所述二膦酸盐是折来膦酸盐、帕米膦酸盐、氯膦酸盐、依替膦酸盐、替鲁膦酸盐、阿仑膦酸盐或伊班膦酸盐。在又一实施方式中,所述患者未曾接受二膦酸盐治疗。

[0073] 考虑了任何上述应用的实施方式,其中所述药物中的抗体量是能有效降低获得疗效所需的第二种治疗剂用量的剂量。在涉及癌症相关骨质损失的任何上述实施方式中,所述药物中的抗体量优选能有效抑制肿瘤细胞诱导的破骨细胞增殖和/或分化。

[0074] 在任何上述药物中抗体用量可以是约2 $\mu$ g/kg-30mg/kg体重剂量。在一相关实施方式中,药物中的抗体用量约为0.1mg/kg-30mg/kg体重剂量。在又一实施方式中,药物中的抗体用量约为0.1mg/kg-10mg/kg体重剂量。

[0075] 本发明也考虑了药盒。在一个实施方式中,提供了一种药盒,它装有治疗有效量的本发明抗体,包装在容器如小瓶或瓶子中,还包括贴在容器上或包装在容器中的标签,该标签描述了容器中的内容物并提供可用容器内容物预防或降低骨质损失的指示和/或说明书。

[0076] 在另一实施方式中,提供了一种药盒,它装有治疗有效量的本发明抗体,包装在容器如小瓶或瓶子中,还包括贴在容器上或包装在容器中的标签,该标签描述了容器中的内容物并提供将容器内容物用于患有引起或导致骨质溶解疾病的患者的指示和/或说明书。

[0077] 在一相关实施方式中,提供该药盒,其中所述疾病选自:与破骨细胞活性相对提高相关的代谢性骨病,包括:内分泌病(包括皮质醇增多症、性腺功能减退症、原发性或继发性甲状旁腺功能亢进、甲状腺功能亢进)、高钙血症、营养缺乏状态(包括佝偻病/骨软化症、坏血病、营养不良)、慢性疾病(包括吸收不良综合征、慢性肾衰竭(包括肾性骨营养不良症)、慢性肝病(包括肝性骨营养不良症))、药物(包括糖皮质激素类(糖皮质激素诱导的骨质疏松)、肝素、醇)和遗传病(包括成骨不全、同型胱氨酸尿症)、癌症、骨质疏松、骨硬化症、关节炎和类风湿性关节炎相关骨炎症、牙周病、纤维性结构不良和/或佩吉特病。

[0078] 在另一实施方式中,提供了一种药盒,它装有治疗有效量的本发明抗体,包装在容器如小瓶或瓶子中,还包括贴在容器上或包装在容器中的标签,该标签描述了容器中的内容物并提供可用容器内容物预防或治疗骨转移性癌症的指示和/或说明书。在一相关实施方式中,转移性癌症是:乳腺癌、肺癌、肾癌、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、前列腺癌、腺癌、血细胞恶变包括白血病和淋巴瘤;头颈癌;胃肠癌,包括食道癌、胃癌、结肠癌、肠癌、结直肠癌、直肠癌、胰腺癌、肝癌、胆管或胆囊癌;女性生殖道恶性肿瘤,包括卵巢癌、子宫内膜癌、阴道癌和宫颈癌;膀胱癌;脑癌,包括神经母细胞瘤;肉瘤、骨肉瘤;以及皮肤癌,包括恶性黑色素瘤或鳞状细胞癌。

[0079] 在又一实施方式中,提供了一种药盒,它装有治疗有效量的本发明抗体,包装在容器如小瓶或瓶子中,还包括贴在容器上或包装在容器中的标签,该标签描述了容器中的内容物并提供可用容器内容物治疗癌症的指示和/或说明书。

[0080] 在另一实施方式中,该药盒还装有第二种治疗剂。在一相关实施方式中,第二种治疗剂是癌症化疗药、非M-CSF集落刺激因子、抗RANKL抗体、可溶性RANKL受体或二膦酸盐。在一相关实施方式中,所述二膦酸盐是折来膦酸盐、帕米膦酸盐、氯膦酸盐、依替膦酸盐、替鲁膦酸盐、阿仑膦酸盐或伊班膦酸盐。在又一实施方式中,该药盒包括治疗未曾接受二膦酸盐治疗的患者的说明书。

[0081] 在另一实施方式中,提供上述药盒,它装有能有效降低获得疗效所需的第二种治疗剂用量的抗体剂量。在另一实施方式中,该药盒装有协同剂量的抗体。在又一实施方式中,该药盒装有能有效抑制肿瘤细胞诱导的破骨细胞增殖和/或分化的抗体剂量。

[0082] 在本发明又一实施方式中,上述药盒包括约 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ - $30\text{mg}/\text{kg}$ 体重的抗体剂量。在另一实施方式中,该药盒包括约 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ - $30\text{mg}/\text{kg}$ 体重的抗体剂量。在又一实施方式中,该药盒包括约 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ - $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重的抗体剂量。

[0083] 在本发明又一实施方式中,提供包装、小瓶或容器,其装有含一种或多种上述抗体的药物和该药物应与手术或放疗联用的说明书。在另一实施方式中,提供了预防或治疗骨转移性癌症的方法,该方法包括将任何一种上述抗体给予对象并用手术或放疗治疗对象的步骤。在另一实施方式中,提供了能靶向其表面表达膜结合的M-CSF的肿瘤细胞的方法,该方法包括给予任何一种上述抗体的步骤,其中该抗体偶联于放射性核素或其它毒素。在又一实施方式中,提供了治疗患有癌症的对象的方法,该方法包括给予治疗有效量的任何一种上述抗体。

[0084] 在本发明又一实施方式中,提供了防止骨质损失的方法,该方法包括将能有效中和对象细胞产生的M-CSF用量的任何一种上述抗体给予患有引起或导致骨质溶解的疾病的对象,该用量大于中和癌细胞产生的M-CSF的有效量。在一相关实施方式中,提供了治疗患

有引起或导致骨质溶解的疾病的对象的方法,该方法包括将能有效中和对象细胞产生的M-CSF用量的任何一种上述抗体给予所述对象,该用量大于中和癌细胞产生的M-CSF的有效量。

[0085] 在本发明一个实施方式中,提供了一种包含抗体RX1、5H4、MC1和/或MC3,或非鼠RX1、5H4、MC1和/或MC3衍生的抗体或RX1、5H4、MC1和/或MC3竞争性抗体,和癌症治疗剂的药物组合物。在本发明另一实施方式中,提供包装、小瓶或容器,其装有含抗体RX1、5H4、MC1和/或MC3,或非鼠RX1、5H4、MC1和/或MC3衍生的抗体或RX1、5H4、MC1和/或MC3竞争性抗体的药物,以及该药物应与手术或放疗联用的说明书。

[0086] 在本发明又一实施方式中,提供了治疗患有癌症的对象的方法,其中所述癌细胞不分泌M-CSF,该方法包括给予任何一种上述抗体的步骤。

[0087] 附图简要说明

[0088] 图1是显示截短的二聚M-CSF中二硫键的拓扑图。

[0089] 图2是M-CSF的C- $\alpha$ 骨架的立体图,每10个残基作一标记,虚线表示非晶体图的对称轴。

[0090] 图3是纯化的M-CSF和MDA231细胞与MCF7细胞的条件培养基(CM)诱导破骨细胞活性的比较。

[0091] 图4A显示M-CSF特异性鼠抗体RX1的氨基酸序列(SEQ ID NO:2和4)(由美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA,USA,以ATCC保藏号PTA-6113保藏的质粒的cDNA插入物所编码)和相应的核酸序列(SEQ ID NO:1和3)。CDR区编号用粗体表示。

[0092] 图4B和4C分别显示M-CSF特异性鼠抗体RX1轻链(SEQ ID NO:5)和重链(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列,根据Studnicka等,W093/11794鉴定的高风险(粗体)、中风险(下划线)和低风险残基。

[0093] 图5A显示M-CSF抗体RX1和5A1是物种特异性的。图5B显示抗体MC1和MC3的M-CSF中和活性。

[0094] 图6显示5mg/kg浓度的抗体RX1在人异种移植模型中有效抑制骨质溶解。

[0095] 图7显示当将5mg/kg浓度的抗体RX1给予荷有人乳腺癌MDA-MB-231的裸小鼠时转移灶数目减少。

[0096] 图8A和8B显示结合于乳腺癌细胞系MDA-MB-231或多发性骨髓瘤细胞系ARH77的M-CSF特异性抗体。

[0097] 图9显示M-CSF在许多癌细胞表面普遍存在。

[0098] 图10是M-CSF $\alpha$ 的氨基酸序列(SEQ ID NO:7)。

[0099] 图11是M-CSF $\beta$ 的氨基酸序列(SEQ ID NO:8)。

[0100] 图12是M-CSF $\gamma$ 的氨基酸序列(SEQ ID NO:9)。DNA序列中的许多多态性可导致氨基酸不同。例如,常见的多态性在位置104是Ala,而非Pro。

[0101] 图13、14和15分别显示MCSF特异性鼠抗体5H4(SEQ ID NO:10和11)、MC1(SEQ ID NO:12和13)(由ATCC保藏号PTA-6263所保藏的杂交瘤产生)和MC3(SEQ ID NO:14和15)(由ATCC保藏号PTA-6264所保藏的杂交瘤产生)的氨基酸序列。

[0102] 图16A和B是人MCSF特异性鼠抗体RX1、5H4、MC1和MC3的重链和轻链氨基酸序列的CDR区(SEQ ID NO:16-38)的比对。

[0103] 图17显示RX1与5H4的完全抗体与Fab片段的中和活性。

[0104] 图18显示M-CSF的结构,突出显示了RX1、5H4和MC3表位(SEQ ID NO:120、122和123)。

[0105] 图19A显示(a)鼠RX1重链的风险线(H=高风险,M=中风险,L=低风险),(b)RX1重链氨基酸序列(SEQ ID NO:6),(c)与RX1比对最接近的人共有序列、Kabat Vh2共有序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:39)和(d)为产生两条示范性Human Engineered™序列而作出的改变(SEQ ID NO:41和43)。图19B显示两条示范性重链Human Engineered™序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:41和43),称为“低风险”和“低风险+中风险”,以及相应核酸序列(SEQ ID NO:40和42)。

[0106] 图20A显示(a)鼠RX1轻链的风险线(H=高风险,M=中风险,L=低风险),(b)RX1轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:5),(c)与RX1比对最接近的人共有序列、Kabat Vk3共有序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:49)和(d)为产生两条示范性Human Engineered™序列而作出的改变(SEQ ID NO:45和47)。图20B显示两条示范性轻链Human Engineered™序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:45和47),称为“低风险”和“低风险+中风险”,以及相应核酸序列(SEQ ID NO:44和46)。

[0107] 图21A显示(a)鼠RX1轻链的风险线(H=高风险,M=中风险,L=低风险),(b)RX1轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:5),(c)与RX1比对最接近的人共有序列、Kabat Vk3共有序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:49)和(d)替代的示范性氨基酸序列,其中位置54-56未改变(即保留了鼠序列)(SEQ ID NO:48)。图21B显示两条示范性替代轻链Human Engineered™序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:48、136),以及相应核酸序列(SEQ ID NO:137和135)。

[0108] 图22A显示(a)鼠RX1轻链的的风险线(H=高风险,M=中风险,L=低风险),(b)RX1轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:5),(c)与RX1比对最接近的人共有种系序列、Vk6亚组2-1-(1)A14的氨基酸序列(SEQ ID NO:50)和(d)为产生两条示范性Human Engineered™序列而作出的改变(SEQ ID NO:51和53)。图22B显示两条示范性轻链Human Engineered™序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:51和53),称为“低风险”和“低风险+中风险”,以及相应核酸序列(SEQ ID NO:52)。

[0109] 图23A和23B显示用Kabat编号系统(标明“POS”的行表示氨基酸编号)(SEQ ID NO:55-82)比对鼠RX1轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:54)与各种人共有序列和人种系共有序列。

[0110] 图24A和24B显示用Kabat编号系统(标明“POS”的行表示氨基酸编号)(SEQ ID NO:84-112)比对鼠RX1重链氨基酸序列(SEQ ID NO:83)与各种人共有序列和人种系共有序列。图24C-24E显示抗体5H4、MC1和MC3的氨基酸残基如何对应于Kabat编号系统(分别为SEQ ID NO:10和11;SEQ ID NO:12和13;SEQ ID NO:14和15)。

[0111] 图25显示用标记为rmRX1的重组鼠RX1抗体和各自具有不同恒定区(IgG1、IgG2或IgG4),标记为heRX1-1.G1、heRX1-1.G2和heRX1-1.G4的三种形式Human Engineered™ RX1-1抗体(其中进行了所有低风险改变)中和重组人MCSF的比较。

[0112] 图26显示用标记为rmRX1的重组鼠RX1抗体和各自具有不同恒定区(IgG1、IgG2或IgG4),标记为RX2、RX1-1-IgG2、RX1-1-IgG1、RX1-1-IgG1、RX1-1-IgG4、RX1-a-IgG4的几种不同形式heRX1-1(其中进行了所有低风险改变)中和人血清的比较。

[0113] 图27显示用重组鼠RX1抗体rmRX1和各自具有不同恒定区(IgG1、IgG2或IgG4),标

记为RX2、RX1-1-IgG2、RX1-1-IgG1、RX1-1-IgG1、RX1-1-IgG4、RX1-a-IgG4的几种不同形式heRX1-1(其中进行了所有低风险改变)中和MDA231(乳腺癌细胞系)培养基的比较。

[0114] 图28显示重组鼠RX1抗体rmRX1和各自具有不同恒定区(Ig1或IgG2),标记为heRX1-1.IgG1和heRX1-1.IgG2的两种不同形式heRX1-1对破骨细胞生成(由TRAP活性测定)的影响。

[0115] 图29A显示具有低风险氨基酸改变的heRX1-1.IgG1的氨基酸序列(SEQ ID NO:114)和核苷酸序列(SEQ ID NO:113)。图29B显示具有低风险+中风险氨基酸改变的heRX1-1.IgG1的氨基酸序列(SEQ ID NO:116)和核苷酸序列(SEQ ID NO:115)。

[0116] 图30显示具有低风险氨基酸改变的heRX1-1.IgG4的氨基酸序列(SEQ ID NO:119)和核苷酸序列(cDNA(SEQ ID NO:118)和基因组DNA(SEQ ID NO:117))。

[0117] 发明详述

[0118] 具有转移能力是癌症的定义性特征。转移指癌细胞扩散到身体的其它部分,或者指这种扩散所造成的疾病状况。转移是一个复杂的多步骤过程,包括细胞遗传物质的改变、改变的细胞发生不受控制的增殖从而形成原发性肿瘤、原发性肿瘤新血液供给的产生、原发性肿瘤细胞侵入循环系统、原发性肿瘤细胞小集落扩散至身体的其它部分并在那些部位生长成继发性肿瘤。

[0119] 骨骼是人乳腺癌、肺癌、前列腺癌和甲状腺癌以及其它癌症最常见的转移部位之一,而且尸体解剖发现多达60%的癌症病人有骨转移。溶骨性骨转移表现出独特的破骨细胞骨质重吸收步骤,这在转移至其它器官的癌症中未发现。与癌转移相关的骨质损失是破骨细胞(具有重新吸收矿化组织能力的多核巨大细胞)所介导的,而破骨细胞似乎是被肿瘤产物所激活的。

[0120] 已发现集落刺激因子(CSF 1),也称为巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF),对于破骨细胞的形成至关重要。此外,已证实通过与其它可溶性因子协同作用以及成骨细胞和成纤维细胞之间的细胞间相互作用,M-CSF可调控成熟破骨细胞的破骨功能、这些细胞的迁移以及存活(Fixe和Praloran,Cytokine 10:3-7,1998;Martin等,真核基因表达的重要回顾(Critical Rev.in真核Gene Expression)8:107-23(1998))。

[0121] 全长的人M-CSF mRNA编码具有554个氨基酸的前体蛋白。通过mRNA交替剪接和不同的翻译后蛋白水解加工,M-CSF或者作为一种糖蛋白或含有蛋白聚糖的硫酸软骨素分泌进入循环系统,或者在M-CSF产生细胞的表面表达为跨膜糖蛋白。细菌表达的人M-CSF氨基末端的150个氨基酸(这是该蛋白在体外保持完全生物学活性所必需的最短序列)的三维结构,表明此蛋白是一个通过二硫键相连的二聚体,每个单体由4个 $\alpha$ 螺旋束和一个反平行 $\beta$ 折叠构成(Pandit等人,Science258:1358-62(1992))。通过mRNA交替剪接产生了三种不同的M-CSF。这三种多肽前体是具有256个氨基酸的M-CSF $\alpha$ 、具有554个氨基酸的M-CSF $\beta$ 、具有438个氨基酸的M-CSF $\gamma$ 。M-CSF $\beta$ 是一种分泌蛋白,它没有膜结合形式。M-CSF $\alpha$ 表达为整合膜蛋白,通过蛋白水解切割而缓慢释放。M-CSF $\alpha$ 在图10所列序列的191-197位氨基酸处被切开。膜结合形式的M-CSF能与邻近细胞上的受体相互作用,并由此介导特异性细胞-细胞接触。术语“M-CSF”也可包括图12的氨基酸36-438。

[0122] 多种形式的M-CSF都通过与靶细胞上的受体M-CSFR相结合而发挥其功能。M-CSFR是一种跨膜分子,有5个胞外免疫球蛋白样结构域、一个跨膜域和一个膜内不连续的Src相

关酪氨酸激酶结构域。M-CSFR由c-fms原癌基因所编码。M-CSF与M-CSFR的胞外结构域结合导致受体的二聚体化,而激活胞浆激酶功能域,引起其自磷酸化和其它细胞蛋白的磷酸化(Hamilton J.A., J Leukoc Biol., 62 (2) :145-55 (1997)); Hamilton J.A., Immuno Today., 18 (7) :313-7 (1997)。

[0123] 磷酸化的细胞蛋白引发了一系列生化活动的级联反应,导致细胞反应:有丝分裂、分泌细胞因子、细胞膜褶皱、和调控其自身受体的转录(Fixe和Praloran, Cytokine 10:32-37 (1998))。

[0124] M-CSF在基质细胞、成骨细胞和其它细胞中表达。也在乳房、子宫和卵巢肿瘤细胞中表达。这些肿瘤中的表达程度与(肿瘤)高等级和预后差相关(Kacinski Ann. Med. 27:79-85 (1995)); Smith等人, Clin. Cancer Res. 1:313-25 (1995)。在乳腺癌中, M-CSF主要在侵袭性肿瘤细胞中表达,这和导管内(侵入前)癌相反(Scholl等, J. Natl. Cancer Inst. 86:120-6 (1994))。此外, M-CSF显示能促进哺乳动物肿瘤发展成恶性(Lin等, J. Exp. Med. 93:727-39 (2001))。对于乳腺癌和卵巢癌, M-CSF的产生似乎导致巨噬细胞被募集到肿瘤组织。

[0125] 如本文所示, M-CSF特异性抗体如RX1、5H4、MC1或MC3抗体在癌症动物模型中能中和转移癌细胞诱导的破骨细胞,和/或能减少骨转移。因此,本发明提供治疗或预防癌症、癌症转移和癌症转移相关骨质损失的组合物和方法。

[0126] 根据Studnicka等的Human Engineering™方法修饰优选的抗M-CSF鼠抗体RX1,降低了它在人体内的免疫原性。在一优选实施方式中,在经测定不可能负面影响抗原结合或蛋白质折叠的位置中将重链可变区的8-12个暴露于表面的氨基酸残基和轻链区的16-19个暴露于表面的残基修饰为人残基,而降低它在人体环境中的免疫原性。构建含有修饰的重链和/或轻链可变区的合成基因并连接于人γ重链和/或κ轻链恒定区。任何人重链和轻链恒定区均可与Human Engineered™抗体可变区联用。将人重链和轻链基因引入哺乳动物细胞,获得并表征得到的重组免疫球蛋白产物。其它示范性抗M-CSF抗体如5H4、MC1或MC3被类似地Human Engineered™。

[0127] 术语“RX1衍生的抗体”包括以下任何一种:

[0128] 1) 具有图4所列氨基酸序列的鼠抗体RX1的氨基酸变体,包括含有的重链可变区氨基酸序列与图4所列氨基酸序列至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同源,和/或含有的轻链可变区氨基酸序列与图4所列氨基酸序列至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同源(同源性测定中考虑到相似氨基酸)的变体;

[0129] 2) 包含图4所列氨基酸序列鼠抗体RX1的一个或多个互补决定区(CDR), 优选至少包含RX1重链的CDR3, 优选包含两个或更多、或者三个或更多、或者四个或更多、或者五个或更多、或者所有六个CDR的M-CSF结合性多肽(排除鼠抗体RX1);

[0130] 3) 具有图19B-22B所列重链和轻链氨基酸序列的Human Engineered™抗体或包含至少60%氨基酸序列与图19B-22B原始Human Engineered™重链或轻链相同,更优选至少80%,更优选至少85%,更优选至少90%,最优选至少95%相同,包括例如:65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和100%相同的重链或轻链的变体;

[0131] 4) 包含图19B-22B Human Engineered™抗体的一个或多个CDR的高风险残基, 优选

包含两个或更多、或者三个或更多、或者四个或更多、或者五个或更多、或者所有六个CDR的高风险残基的M-CSF结合性多肽(排除鼠抗体RX1)；

[0132] 5) Human Engineered<sup>TM</sup>抗体或保留了图4B所列高风险氨基酸残基,图4B所列低风险或中风险残基中一个或多个改变的变体；

[0133] 例如,包含低风险残基中一个或多个改变和图4B所列中风险残基的保守取代,或

[0134] 例如,保留了图4B所列中风险和高风险氨基酸残基和包含低风险残基的一个或多个改变,

[0135] 其中,所述改变包括插入、缺失或取代,可以是保守取代或可以使工程改造抗体的序列更接近人轻链或重链序列、人种系轻链或重链序列、共有人轻链或重链序列、或共有人种系轻链或重链序列；

[0136] 保留结合M-CSF的能力。这种抗体结合M-CSF的亲合力优选至少为 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 或 $10^{-9}$ 或更高,优选能中和M-CSF的破骨细胞生成诱导活性。

[0137] 类似地,术语“MC3-衍生的抗体”包括以下任何一种：

[0138] 1) 具有图15所列氨基酸序列的鼠抗体MC3的氨基酸变体,包括含有的重链可变区氨基酸序列与图15所列氨基酸序列至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同源,和/或含有的轻链可变区氨基酸序列与图15所列氨基酸序列至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同源(同源性测定中考虑到相似氨基酸)的变体；

[0139] 2) 包含图15所列氨基酸序列鼠抗体MC3的一个或多个互补决定区(CDR),优选至少包含MC3重链的CDR3,优选包含两个或更多、或者三个或更多、或者四个或更多、或者五个或更多、或者所有六个CDR的M-CSF结合性多肽(任选地包括或排除鼠抗体MC3)；

[0140] 3) 根据Studnicka等,美国专利号5,766,886和本文实施例4A所列方法改变鼠序列而产生的Human Engineered<sup>TM</sup>抗体,用图24C-24E所列Kabat编号鉴定低风险、中风险和高风险残基；这种抗体包含以下重链的至少一条和以下轻链的至少一条：(a) 所有低风险残基都经修饰(需要时)成为与人参比免疫球蛋白序列相同的残基的重链或(b) 所有低风险和中风险残基都经修饰(需要时)成为与人参比免疫球蛋白序列相同的残基的重链, (c) 所有低风险残基都经修饰(需要时)成为与人参比免疫球蛋白序列相同的残基的轻链或(b) 所有低风险和中风险残基都经修饰(需要时)成为与人参比免疫球蛋白序列相同的残基的轻链

[0141] 4) 上面段落(3)中所述抗体的变体,其包含至少60%氨基酸序列与原始Human Engineered<sup>TM</sup>重链或轻链相同,更优选至少80%,更优选至少85%,更优选至少90%,最优选至少95%相同,包括例如:65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和100%相同的重链或轻链；

[0142] 5) 包含图15鼠MC3抗体的一个或多个CDR的高风险残基,优选包含两个或更多、或者三个或更多、或者四个或更多、或者五个或更多、或者所有六个CDR的高风险残基的M-CSF结合性多肽(任选地包括或排除鼠抗体RX1)；

[0143] 6) Human Engineered<sup>TM</sup>抗体或保留了鼠MC3抗体的高风险氨基酸残基,低风险或中风险残基中包含一个或多个改变的变体；

[0144] 例如,包括低风险残基中一个或多个改变和中风险残基的保守取代,或

[0145] 例如,保留中风险和高风险氨基酸残基和包含低风险残基的一个或多个改变,

[0146] 其中,所述改变包括插入、缺失或取代,可以是保守取代或可以使工程改造抗体的序列更接近人轻链或重链序列、人种系轻链或重链序列、共有人轻链或重链序列、或共有人种系轻链或重链序列;

[0147] 保留结合M-CSF的能力。这种抗体结合M-CSF的亲合力优选至少为 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 或 $10^{-9}$ 或更高,优选能中和M-CSF的破骨细胞生成诱导活性。

[0148] 术语“5H4-衍生的抗体”或“MC1-衍生的抗体”的定义与上述说明相似。

[0149] 如本文详述,RX1、5H4、MC1或MC3-衍生的抗体,包括Human Engineered™抗体或变体,可能是不同的同种型,如IgG、IgA、IgM或IgE。IgG类型的抗体可包括不同的恒定区,如可将IgG2抗体修饰成具有IgG1或IgG4恒定区。在优选实施方式中,本发明提供包含修饰或未修饰的IgG1或IgG4恒定区的Human Engineered™抗体或变体。就IgG1而言,对恒定区,尤其是绞链区或CH2区的修饰可提高或降低效应器功能,包括ADCC和/或CDC活性。在其它实施方式中,修饰IgG2恒定区以减少抗体-抗原凝聚体形成。就IgG4而言,对恒定区的修饰,尤其是对绞链区的修饰可减少半抗体的形成。在具体示范性实施方式中,提供了将IgG4绞链序列Cys-Pro-Ser-Cys突变为IgG1绞链序列Cys-Pro-Pro-Cys。

[0150] 本文中证明,与含有IgG2恒定区的Human Engineered™抗体相比,含有IgG1或IgG4恒定区的Human Engineered™抗体具有改进的性能。IgG1或IgG4Fc区的选择提高了结合亲和力和M-CSF中和活性和抗-破骨细胞活性。此外,IgG1或IgG4Fc区的选择所产生的抗原-抗体复合物更接近母体鼠抗体形成的复合物。

[0151] 因此,绞链区的活动性似乎显著地影响到抗体与二聚抗原M-CSF的结合以及抗体的中和活性。本发明通常考虑了制备包含含有修饰或未修饰的IgG1或IgG4恒定区,尤其是绞链区和CH2结构域,或优选至少含有绞链区的重链的抗体,能提高结合亲和力和/或减慢抗体与二聚抗原的解离。

[0152] 术语“RX1-竞争性抗体”包括

[0153] 1) 能与具有图4所列整个轻链和重链序列的鼠RX1相同M-CSF表位结合的非小鼠或非啮齿类单克隆抗体;

[0154] 2) 能结合图12M-CSF氨基酸98-105中至少4个连续氨基酸的非小鼠或非啮齿类单克隆抗体;和

[0155] 3) 能与具有图4所列整个序列的鼠抗体RX1竞争结合M-CSF超过75%,超过80%,或超过81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%或95%的非小鼠或非啮齿类单克隆抗体。这种抗体结合M-CSF的亲合力优选至少为 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 或 $10^{-9}$ 或更高,优选能中和M-CSF的破骨细胞生成诱导活性。

[0156] 术语“MC1-竞争性抗体”或“MC3-竞争性抗体”或“5H4-竞争性抗体”的定义类似地参考具有图13、14或15中分别列出的整个轻链和重链序列的鼠5H4、MC1或MC3抗体,并参考抗体结合的M-CSF表位,如图12氨基酸65-73或138-144(对应于5H4或MC3识别的M-CSF表位)。

[0157] 任选地,在本文申请日之前向公众公开的,或在本文申请日之前提交的申请中公开的任何嵌合、人或人源化M-CSF抗体排除在本发明范围之外。

[0158] “非啮齿类”单克隆抗体是一种抗体,如本文的宽泛定义,它不是啮齿类杂交瘤产

生的整个完整的啮齿类单克隆抗体。因此,非啮齿类抗体具体包括但不限于:啮齿类抗体的变体、啮齿类抗体片段、直链抗体、嵌合抗体、人源化抗体、Human Engineered™抗体和人抗体,包括由转基因动物或通过噬菌体展示技术产生的人抗体。类似地,非鼠抗体包括但不限于:鼠抗体的变体、鼠抗体片段、直链抗体、嵌合抗体、人源化抗体、Human Engineered™抗体和人抗体。

[0159] 本文所用“肿瘤”指各种肿瘤细胞的生长和增殖,不论是恶性的还是良性的,以及所有癌前和癌细胞与组织。

[0160] 术语“癌症”和“癌变的”指或用于描述哺乳动物中以不受控制的细胞生长为典型特征的生理情况。癌症的例子包括但并不限于:癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤、和白血病。这些癌症的更具体例子包括:乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、鳞状上皮细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃肠道癌症、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、结肠直肠癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和各种不同类型的头颈癌。

[0161] “治疗”是一种旨在防止疾病症状的发展或改变疾病病理特征的干预手段。因此,“治疗”不仅指治疗性措施,也指预防性或防止性措施。那些需要接受治疗的对象包括已经出现疾病症状的对象和需要预防疾病的对象。在肿瘤(如癌症)治疗中,治疗药物可以直接降低肿瘤细胞的致病作用,或者使肿瘤细胞对其它治疗方法如放疗和/或化疗更加敏感。治疗患有疾病如骨质溶解的临床、生化、放射性或主观症状的患者,可包括缓解一部分或全部上述症状,或者降低对该疾病的易感性。癌症的“病理症状”包括危及病人健康的所有状况。这包括但不限于:不正常或不受控制的细胞生长、转移、干预邻近细胞的正常功能、释放异常水平的细胞因子或其它分泌产物、抑制或加重炎症反应或免疫应答等。因此,治疗后改善可表现为肿瘤体积减小、肿瘤生长速率降低、摧毁存在的肿瘤细胞或转移细胞和/或减小转移灶的大小或数量。

[0162] 治疗对象“哺乳动物”指分类为哺乳动物的任何动物,包括人、家畜或耕畜,以及用于动物园、运动动物或宠物,如犬、马、猫、奶牛等。哺乳动物优选人。

[0163] 本文所用术语“转移性癌症”的定义是能扩散到身体其它部分(尤其是骨)的癌症。许多癌症能够转移至骨,但最常见的转移性癌症是乳腺癌、肺癌、肾癌、多发性骨髓瘤、甲状腺癌和前列腺癌。举例来说,其它能转移至骨的癌症包括但不限于:腺癌;血细胞恶变,包括白血病和淋巴瘤;头颈癌;胃肠道癌症,包括食道癌、胃癌、结肠直肠癌、肠癌、直肠癌、胰腺癌、肝癌、胆管或胆囊癌;女性生殖道恶性肿瘤,包括卵巢癌、子宫内膜癌、阴道癌和宫颈癌;膀胱癌;脑癌,包括神经母细胞瘤;肉瘤、骨肉瘤;以及皮肤癌,包括恶性黑色素瘤或鳞状细胞癌。本发明特别考虑了预防和治疗肿瘤所引发的溶骨性病变。

[0164] 本文所用术语“治疗有效量”指一定量的治疗或预防用M-CSF抗体,该用量适合本发明实施方式,并且根据所需治疗方案给药后可以获得所需治疗或预防的效果或应答。

[0165] 如本文所用,人“M-CSF”指与成熟的人M-CSF $\alpha$ 、M-CSF $\beta$ 或M-CSF $\gamma$ 多肽具有基本相同的氨基酸序列的人多肽。M-CSF $\alpha$ 、M-CSF $\beta$ 或M-CSF $\gamma$ 多肽的描述见Kawasaki等,Science 230:291(1985),Cerretti等,Molecular Immunology,25:761(1988),或Ladner等,EMBO Journal 6:2693(1987),各自引入本文作为参考。该术语反映了这样的认识,即三种成熟的M-CSF具有不同的氨基酸序列(如上所述),而且M-CSF的活性形式是二硫键相连的二聚体

形式;因此,当术语“M-CSF”指生物活性形式时,所指的是二聚体形式。“M-CSF二聚体”指已形成二聚体的2个M-CSF多肽单体,包括同质二聚体(由2个相同类型的M-CSF单体构成)和异质二聚体(由2种不同的单体构成)。M-CSF单体可以在体外转变成M-CSF二聚体,参见美国专利号4,929,700的描述,该文献引入本文作为参考。

#### [0166] 抗MCSF抗体

[0167] 本发明提供了M-CSF特异性抗体,如RX1、5H4、MC1和/或MC3,包含M-CSF特异性抗体,如RX1、5H4、MC1和/或MC3的药物制剂,该药物制剂的制备方法,和用该药物制剂和化合物治疗患者的方法。以广义应用的术语“抗体”,包括完全组装的抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(如双特异性抗体)、能结合抗原的抗体片段(如Fab'、F'(ab)2、Fv、单链抗体、双抗体),和包含上述物质的重组肽,只要它们能显示所需的生物学活性。

[0168] 本文所用术语“单克隆抗体”指获自基本上均一的抗体群的抗体,即组成该群体的各个抗体都是相同的,除了可能存在的少量天然突变之外。单克隆抗体是高度特异的,只针对一个抗原位点。而且,与常规(多克隆)的抗体制剂一般包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体相反,每个单克隆抗体都针对抗原上的一个决定簇。除了特异性以外,单克隆抗体的优点还在于它们由均一培养物合成,不会污染具有不同特异性和特征的其它免疫球蛋白。

[0169] 修饰语“单克隆”代表该抗体的性质是获自基本上均一的抗体群,而并不能解释成需要采用某种特殊方法生产该抗体。例如,本发明所用的单克隆抗体可以通过Kohler等, Nature, 256:495 (1975) 最早描述的杂交瘤方法进行制备,也可以用重组DNA方法制备(参见,例如美国专利号4,816,567)。“单克隆抗体”还可以用Clackson等, Nature, 352:624628 [1991]中描述的技术从噬菌体抗体库中分离得到。

[0170] 根据重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可分为不同类型。有五种主要类型, IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中几种可进一步分为亚类或同种型,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。不同类免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。不同的同种型具有不同的效应器功能;例如, IgG1和IgG3同种型具有ADCC活性。

[0171] “抗体片段”包含完整全长抗体的一部分,优选包含完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;双抗体;线性化抗体(Zapata等, Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995));单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋白酶消化抗体可产生2个完全相同的抗体结合片段,称为“Fab”片段和一个残留的“Fc”片段,每个“Fab”片段都有一个抗体结合区,而“Fc”片段的命名则反映出它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个F(ab')<sub>2</sub>片段,该片段具有2个含抗体VH和VL结构域的“单链Fv”或“sFv”抗体片段,其中这些结构域存在于一条多肽链中。优选Fv多肽在VH和VL之间还含有一个多肽接头,而使Fv能够形成抗原结合所需的结构。关于sFv的综述,参见Pluckthun的《单克隆抗体药理学》(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies),第113卷, Rosenberg和Moore编, Springer-Verlag, New York, 第269-315页 (1994)。

[0172] 术语“超变”区指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。超变区包含互补决定区或CDR的氨基酸残基[即轻链可变区中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)和重链可变区中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3),如Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of

Health, Bethesda, Md. (1991) 所述] 和/或超变环的残基(即轻链可变区中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)和重链可变区中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3),如[Chothia等, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)]所述。

[0173] “构架”或FR残基是除超变区残基之外的可变区残基。

[0174] 术语“双抗体”指具有2个抗原结合位点的小抗体片段,该片段在同一个多肽链中包含相连的轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)。所用的接头太短以致同一条链上的两个区域无法配对,于是这二个区域只能与另一条肽链上的互补区域相配对,从而产生两个抗原结合位点。双抗体在例如EP404,097;W093/11161和30Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993)中有更详尽的描述。

[0175] 在一些实施方式中,可能需要产生多特异性(如双特异性)单克隆抗体,包括具有至少两个不同表位的结合特异性的单克隆、人、人源化, Human Engineered™抗M-CSF抗体或变体。示范性双特异性抗体可结合M-CSF的两个不同表位。或者,抗M-CSF臂可与能结合白细胞上的触发分子如T-细胞受体分子(如CD2或CD3),或IgG的Fc受体(Fc $\gamma$ R)如Fc $\gamma$ RI(CD64)、Fc $\gamma$ RII(CD32)和Fc $\gamma$ RIII(CD16)的臂组合,以将细胞防御机制集中于表达M-CSF的细胞。双特异性抗体也可用于将细胞毒药物定位于表达M-CSF的细胞。这些抗体具有M-CSF结合臂和结合细胞毒药物(如皂草毒蛋白、抗干扰素-60、长春花生物碱、蓖麻毒蛋白A链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原)的臂。双特异性抗体可制备为全长抗体或抗体片段(如F(ab')<sub>2</sub>双特异性抗体)。

[0176] 根据制备双特异性抗体的另一种方法,可工程改造一对抗体分子之间的界面,使从重组细胞培养物中回收到的异质二聚体的百分比最大。优选的界面包括一种抗体恒定区的至少C<sub>H</sub>3结构域的一部分。在此方法中,来自第一种抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链被较大侧链(如酪氨酸或色氨酸)所取代。可用较小侧链(如丙氨酸或苏氨酸)取代大氨基酸侧链在第二种抗体分子界面上建立与大侧链大小相同或相似的补偿性“腔穴”。这提供了增加异质二聚体产率,使其超过其它不需要的最终产物如同质二聚体的机制。参见1996年9月6日公开的W096/27011。

[0177] 双特异性抗体包括交联的或“异质性偶联”抗体。例如,异质性偶联物中的抗体之一与生物素偶联,另一与抗生物素蛋白偶联。可用任何方便的交联方法制备异质性偶联抗体。合适的交联剂是本领域熟知的,连同许多交联技术一起公开于美国专利号4,676,980。

[0178] 文献中也描述了从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如,可用化学连接法制备双特异性抗体。Brennan等, Science 229:81(1985)描述了通过蛋白水解切割完整抗体以产生F(ab')<sub>2</sub>片段的方法。在二硫醇络合试剂亚砷酸钠的存在下还原这些片段可稳定相邻的二硫醇和防止形成分子间二硫键。然后,将产生的Fab'片段转变为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后再将Fab'-TNB衍生物之一通过用巯基乙胺还原转变为Fab'-硫醇,与等摩尔量的另一Fab'-TNB衍生物混合而形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作选择性固定酶的试剂。在又一实施方式中,直接回收自大肠埃希菌(E. coli)的Fab'-SH片段可在体外化学偶联形成双特异性抗体。(Shalaby等, J. Exp. Med. 175:217-225(1992))。

[0179] Shalaby等, J. Exp. Med. 175:217-225(1992)描述了完全人源化双特异性抗体F(ab')<sub>2</sub>分子的产生。各Fab'片段由大肠杆菌分别分泌,在体外进行定向化学偶联形成双特异性抗体。这样形成的双特异性抗体能够结合表达HER2受体的细胞和正常人T细胞,以及引

发人细胞毒淋巴细胞对人乳腺肿瘤靶细胞的胞溶活性。

[0180] 也报道了直接从重组细胞培养物制备和分离双特异性抗体片段的各种技术。例如,用亮氨酸拉链产生双特异性抗体。(Kostelny等,J.Immunol.148(5):1547-1553(1992))。通过基因融合将来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽连接于两种不同抗体的Fab'部分。在绞链区还原抗体同质二聚物,形成单体,然后再氧化形成抗体异质二聚物。此方法也可用于产生抗体同质二聚物。Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)所述的“双抗体”技术提供了制备双特异性抗体片段的另一种机制。

[0181] 这些片段包含通过接头连接于轻链可变区( $V_L$ )的重链可变区( $V_H$ ),该接头太短以致于不能使同一链上两个结构域之间配对。因此,一个片段的 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域被迫与另一片段互补的 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。也报道了用单链Fv(sFv)二聚体制备双特异性抗体片段的另一方案。参见Gruber等,J.Immunol.152:5368(1994)。

[0182] 或者,双特异性抗体可以是如Zapata等,Protein Eng.8(10):1057-1062(1995)所述产生的“直链抗体”。简要说,这些抗体包含一对串联Fd节段( $V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$ ),它们形成一对抗原结合区。直链抗体可以是双特异性或单特异性抗体。

[0183] 也考虑了二价以上的抗体。例如,可制备三特异性抗体。(Tutt等,J.Immunol.147:60(1991))。

[0184] 在某些实施方式中,单克隆、人、人源化、Human Engineered<sup>TM</sup>抗M-CSF抗体或变体是抗体片段,如RX1、5H4、MC1或MC3抗体的片段。开发了用于产生抗体片段的各种技术。传统上,通过蛋白水解消化完整抗体获得这些片段(参见例如,Morimoto等,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992)和Brennan等,Science 229:81(1985))。然而,现在可直接用重组宿主细胞产生这些片段。Better等,Science 240:1041-1043(1988)公开了用细菌分泌有功能的抗体片段(参见例如Better等,Skerra等,Science 240:1038-1041(1988))。例如,可直接从大肠杆菌回收Fab'-SH片段,并化学偶联形成F(ab')<sub>2</sub>片段(Carter等,Bio/Technology 10:163-167(1992))。在另一实施方式中,用亮氨酸拉链GCN4形成F(ab')<sub>2</sub>以促进F(ab')<sub>2</sub>分子的组装。根据另一方法,可直接从重组宿主细胞培养物中分离得到Fv、Fab或F(ab')<sub>2</sub>片段。本领域技术人员将明白产生抗体片段的其它技术。

[0185] “分离的”抗体指从其自然环境的组分中经鉴定和分离获得的抗体。自然环境中的污染组分指可能干扰该抗体诊断和治疗应用的物质,这些物质可包括酶、激素、和其它蛋白质类或非蛋白质类溶质。在优选的实施例中,抗体的纯度经(1)Lowry法测定超过抗体重量的95wt%,更佳超过99wt%,(2)其纯度采用旋转杯测序仪测定足以获得N-末端或内部氨基酸序列的至少15个残基,或者(3)在还原和非还原条件下,采用考马斯蓝染色或更佳银染在SDS-PAGE中为均一性。分离的抗体包括存在于重组细胞内的原位抗体,因为至少有一种抗体自然环境中的组分不存在。然而,制备分离抗体通常需要至少一个纯化步骤。

[0186] 抗体的结构和产生的详细描述参见Roth,D.B.和Craig,N.L.,Cell,94:411-414(1998),和美国专利号6,255,458,以全文纳入本文作为参考。简要说,产生编码重链和轻链免疫球蛋白基因的DNA的过程主要在B细胞发育中。在各种免疫球蛋白基因节段重排和连接之前,发现V、D、J和恒定(C)基因节段在一条染色体上相对靠近。在B细胞分化期间,将V、D、J(或在轻链基因中仅V和J)基因节段的适当家族成员之一重组形成功能上重排的重链和轻

链免疫球蛋白基因。此基因节段重排过程似乎是依次进行的。首先,制备重链D-至-J连接,然后是重链V-至-DJ连接和轻链V-至-J连接。

[0187] 可变区基因节段重组形成有功能的重链和轻链可变区是通过位于能够重组的V、D和J节段的侧翼的重组信号序列(RSS)介导的。RSS对于指导重组而言是必需的和足够的,它包含一个二价-对称七聚物、一个富含AT的九聚物和12或23个碱基对的插入间隔区。这些信号在进行D-J(或V-J)重组的不同基因座和物种之间是保守的,并且功能上可互换。参见Oettinger等(1990),*Science*,248,1517-1523和本文引用的参考文献。七聚物包含序列CACAGTG或其类似物,后面是非保守序列间隔区,然后是序列为ACAAAAACC的九聚体或其类似物。在J上,或V和D基因节段各自的下流侧发现这些序列。在种系D和J节段之前又是两个重组信号序列,第一个是七聚体,然后是九聚体,它们又由一非保守序列隔开。 $V_L$ 、 $V_H$ 或D节段之后的七聚体和九聚体序列与它们重组的 $J_L$ 、D或 $J_H$ 节段之前的序列互补。七聚体和九聚体序列之间的间隔区长度为12个碱基对或22-24个碱基对。

[0188] 除了V、D和J节段的重排以外,通过在轻链中的V和J节段连接以及重链的D和J节段连接的位置上进行可变重组,在免疫球蛋白重链和轻链的原代储存库(repertoire)中产生其它多样性。这些轻链中的变异一般发生在V基因节段的最后一组密码子和J节段的第一组密码子中。类似的不精确连接发生在D和 $J_H$ 节段之间的重链染色体上,可能延伸超过10个核苷酸。而且,可将几个核苷酸插入不由基因组DNA编码的D和 $J_H$ 之间以及 $V_H$ 和D基因节段之间。这些核苷酸的加入被称为N-区多样化。

[0189] 在可变区基因节段中这种重排和可能在连接期间发生的可变重组的净效应是产生了原代抗体储存库。

[0190] “Fv”是包含一个完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。这一区域由一条重链可变区和一条轻链可变区通过紧密、非共价缔合所组成的二聚体。正是以这种构象,每个可变区的三个CDR才能相互作用并在 $VH$  VI二聚体表面界定一个抗原结合位点。六个CDR共同赋予了抗体的抗原结合特异性。然而,即使是一个可变区(或只含有三个抗原特异性CDR的半个Fv)也能识别和结合抗原,不过其亲和力低于完整的结合位点。

[0191] Fab片段还包含轻链恒定区和重链的第一恒定区(CH1)。Fab片段与Fab'片段的差异在于:Fab'片段的重链CH1区羧基端多几个残基,这些残基包括抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH在本文中指恒定区中半胱氨酸残基具有游离巯基的Fab'片段。最初产生的F(ab')<sub>2</sub>抗体片段是在两个Fab'片段之间连有铰链半胱氨酸的一对Fab'片段。

[0192] “中和抗体”指能够消除或大大减弱与其结合的靶抗原的效应器功能的抗体分子。因此,“中和性”抗靶抗体能够消除或大大减弱效应器功能,例如酶活性、配体结合、或细胞内信号传导。

[0193] 如本文所提供,在用于治疗癌症转移和/或癌转移相关骨质损失的组合物和方法中,可采用一种或多种抗体,它们可以单独使用或与其它疗法联合使用而达到所需效果。本发明的抗体可以从以下动物中分离获得,该动物因为与环境中的抗原直接接触或用该抗原免疫能产生抗体。或者,抗体可以用本领域熟知的抗体表达系统通过重组DNA方法生产(参见,例如:Harlow和Lane,*Antibodies:A Laboratory Manual*,Cold Spring Harbor Laboratory(1998))。这类抗体可包括重组IgG、含有免疫球蛋白衍生序列的嵌合性融合蛋白或“Human Engineered™”抗体,这些抗原都可以根据本发明用于治疗癌症转移和/或癌转

移相关骨质损失。除了完整的、全长的分子之外,术语“抗体”还指其片段(例如,scFv、Fv、Fd、Fab、Fab'和F(ab)'<sub>2</sub>片段)或与M-CSF(或M-CSFR)结合的完整分子和/或片段的多聚体或凝聚体。这些抗体片段结合抗原,并可以经衍生,如通过掺入半乳糖残基而显示有利于清除和摄取的结构特征。

[0194] 在本发明的一个实施方式中,M-CSF单克隆抗体的制备方法基本上如Halenbeck等美国专利:5,491,065(1997)中所述,纳入本文作为参考。示范性M-CSF单克隆抗体包括结合表面构型性抗原表位(该抗原表位和重组或天然的二聚体M-CSF相关)和伴有中和生物活性作用的抗体。这些抗体基本上不能与无生物活性形式的M-CSF(包括M-CSF单体和化学衍生的M-CSF二聚体)起反应。

[0195] 在本发明的其它实施例中,提供了Human Engineered™抗M-CSF单克隆抗体。短语“Human Engineered™抗体”指从非人抗体,一般是鼠单克隆抗体衍生得到的抗体。或者,Human Engineered™抗体可从嵌合抗体衍生得到,该嵌合抗体保留或基本保留了亲代、非人抗体的抗原结合性能,但当给予人类时,它的免疫原性与亲代抗体相比有所减弱。如本文所用,短语“嵌合抗体”指其所含序列衍生自两种不同抗体的抗体(参见,例如美国专利号:4,816,567),这两种不同的抗体通常源自两种不同的动物。最典型地,嵌合抗体包含人和鼠的抗体片段,通常是人抗体的恒定区和鼠抗体的可变区。

[0196] 短语“互补决定区”或术语“CDR”指共同界定了天然免疫球蛋白结合位点的天然Fv区域的结合亲和力和特异性的氨基酸序列(参见例如,Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);Kabat等,美国健康和人类服务部NIH出版物(U.S.Dept of Health and Human Services NIH Publication)No.913242(1991))。短语“恒定区”指抗体分子中具有效应器功能的部分。在本发明中,小鼠抗体的恒定区优先用人抗体恒定区替换。该抗体的恒定区可衍生自人免疫球蛋白。重链恒定区可以选自5种同种型 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 或 $\mu$ 中的任一种。

[0197] 如果本发明的抗体结合抗原的 $K_a$ 值大于或等于约 $10^6 M^{-1}$ ,优选大于或等于约 $10^7 M^{-1}$ ,更优选大于或等于约 $10^8 M^{-1}$ ,最优选大于或等于约 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 或 $10^{12} M^{-1}$ ,那么就称这些抗体是免疫特异性的或是特异性结合的。抗M-CSF抗体可结合于不同的天然形式的M-CSF,包括宿主/对象组织以及肿瘤所表达的M-CSF。本文揭示的单克隆抗体如RX1、5H4、MC1或MC3对M-CSF具有亲和力,其特征是解离平衡常数(Kd)至少为 $10^{-4} M$ ,优选至少约 $10^{-7}$ 至约 $10^{-8} M$ ,更优选至少约 $10^{-8} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $10^{-11} M$ 或 $10^{-12} M$ 。这类亲和力可以不难用常规技术进行测定,例如:用平衡透析;用BIAcore2000仪器,采用制造商给出的通用程序;用<sup>125</sup>I标记的M-CSF进行放射免疫试验;或用本领域技术人员已知的其他方法。亲和数据的分析可采用例如Scatchard等,Ann N.Y.Acad.Sci.,51:660(1949)的方法。因此,显然优选的M-CSF抗体将显示对M-CSF的高度特异性,而结合其它分子的亲和力则低得多。优选抗体结合M-CSF的亲和力与图4鼠RX1结合M-CSF的亲和力相似,但免疫原性低,在转移性疾病动物模型中测试时能抑制癌细胞转移。其它示范性抗体结合M-CSF的亲和力与图13、14或15的鼠5H4、MC1或MC3结合M-CSF的亲和力相似。

[0198] 用于产生抗体的抗原可以是,例如,完整的M-CSF或是保留了所需抗原表位的M-CSF片段,并且可以任选地与另一多肽相融合,使该抗原表位仍表现为其天然构象。或者,可采用细胞表面表达M-CSF的细胞来产生抗体。这种细胞可经转化表达M-CSF,或是可表达M-CSF的其它天然产生的细胞。本领域技术人员将明白用于产生抗体的其它形式的M-CSF。

### [0199] 多克隆抗体

[0200] 优选通过皮下 (sc) 或腹腔内 (ip) 多次注射相关抗原和佐剂在动物中产生多克隆抗体。可将相关抗原偶联于对免疫接种动物具有免疫原性的蛋白, 例如钥孔戚血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、或大豆胰蛋白酶抑制剂来提高抗体应答, 偶联可采用双功能试剂或衍生试剂来完成, 例如, 马来酰亚氨基苯甲酰琥珀酰亚胺酯 (maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester) (通过半胱氨酸残基偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺 (通过赖氨酸残基偶联)、戊二醛、琥珀酸酐或本领域已知的其他制剂。

[0201] 免疫动物采用抗原、免疫原性偶联物或衍生物, 通过将例如: 100 $\mu$ g 或 5 $\mu$ g 的蛋白或偶联物 (分别用于免疫兔或小鼠) 和 3 倍体积的弗氏完全佐剂混合, 然后将该溶液皮内多点注射。一个月后, 这些动物用 1/5 至 1/10 原先用量的多肽或偶联物 (在弗氏佐剂中配制) 多点皮下注射进行加强免疫。加强免疫注射后 7-14 天, 给动物放血, 并检测血清抗体的效价。对动物进行加强免疫, 直到效价达到平台值。优选采用相同抗原的偶联物来加强免疫动物, 但是该偶联物偶联于不同蛋白和/或通过不同的交联剂偶联。还可通过重组细胞培养产生偶联物作为融合蛋白。同样, 诸如明矾之类的凝聚剂适合用来增强免疫应答。

### [0202] 单克隆抗体

[0203] 单克隆抗体可用杂交瘤方法制得, 该方法首次由 Kohler 等人描述于 Nature, 256: 495 (1975), 或可用重组 DNA 方法制备。

[0204] 在杂交瘤方法中, 用本文所述方法免疫小鼠或其它合适的宿主动物, 例如仓鼠或猕猴, 诱生淋巴细胞产生或能够产生特异性结合用于免疫的蛋白质的抗体。或者, 可在体外免疫淋巴细胞。然后, 用适当的融合剂, 例如聚乙二醇, 使淋巴细胞与骨髓瘤细胞相融合, 形成杂交瘤细胞 (Goding, 《单克隆抗体: 原理和实践》(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), 第 59-103 页 (Academic Press, 1986))。

[0205] 将这样制得的杂交瘤细胞接种于合适的培养基中培养, 该培养基优先含一种或多种能抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如, 如果亲代骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT), 那么用于杂交瘤的培养基通常含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶核苷 (HAT 培养基), 这些物质能防止 HGPRT-缺陷型细胞的生长。

[0206] 优选的骨髓瘤细胞是融合效率高、能支持选出的抗体产生细胞稳定高水平产生抗体、并且对上述培养基敏感的骨髓瘤细胞。已报道了人骨髓瘤和鼠-人杂合骨髓瘤 (heteromyeloma) 细胞系用于产生人单克隆抗体 (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur 等, 《单克隆抗体生产技术和应用》(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications), 第 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。示范性鼠骨髓瘤细胞系包括衍生自获自 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA 的 MOP-21 和 M.C.-11 小鼠肿瘤的细胞系和获自美国典型培养物保藏中心, Rockville, Md. USA 的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞的细胞系。

[0207] 检测杂交瘤细胞在其中生长的培养基是否产生针对该抗原的单克隆抗体。优选用免疫沉淀或体外结合试验 (如放射免疫试验 (RIA) 或酶联免疫吸附试验 (ELISA)) 测定杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。单克隆抗体的结合亲和力可用例如 Scatchard 分析法加以测定 (Munson 等, Anal. Biochem., 107:220 (1980))。

[0208] 鉴定到能够产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后, 可将

这些克隆用有限稀释法亚克隆,并用标准方法培养(Goding,《单克隆抗体:原理和实践》(Monoclonal Antibodies:Principles and Practice),第59-103页(Academic Press,1986))。可用于此目的合适培养基包括例如:D-MEM或RPMI-1640培养基。此外,杂交瘤细胞可以作为腹水瘤在动物体内生长。亚克隆分泌的单克隆抗体可从培养基、腹水、或血清中,用常规免疫球蛋白纯化程序,例如蛋白A琼脂糖凝胶、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析合适地分离。

#### [0209] 重组生产抗体

[0210] 可用常规程序(例如,采用能特异性结合编码单克隆抗体重链和轻链基因的寡核苷酸探针),分离杂交瘤细胞的编码单克隆抗体的DNA并测序。序列测定通常需要至少分离感兴趣基因或cDNA的一部分。通常这需要克隆编码该单克隆抗体的DNA,或优选克隆mRNA(即cDNA)。用标准技术进行克隆(参见例如Sambrook等(1989)《分子克隆:实验室指南》(Molecular Cloning:A Laboratory Guide),第1-3卷,Cold Spring Harbor Press,纳入本文作为参考)。例如,可通过逆转录聚A+mRNA,优选结合于膜的mRNA构建cDNA文库,用人免疫球蛋白多肽基因序列的特异性探针筛选该文库。然而,在优选实施方式中,采用聚合酶链反应(PCR)扩增编码感兴趣免疫球蛋白基因节段(如轻链可变节段)的cDNA(或全长cDNA的一部分)。可容易地将扩增序列克隆入任何合适的载体,如表达载体、小基因载体或噬菌体展示载体中。应理解,所用的具体方法并不重要,只要能测定感兴趣免疫球蛋白多肽某些部分的序列。本文所用“分离的”核酸分子或“分离的”核酸序列是(1)经鉴定与天然来源的核酸通常结合在一起的至少一种污染核酸分子相分离的,或(2)经克隆、扩增、标记或区别于背景核酸以致于可测定感兴趣的核酸序列的核酸分子,被认为是分离的。分离的核酸分子不同于天然发现的形式。因此,分离的核酸分子不同于天然细胞中存在的核酸分子。然而,分离的核酸分子包括平常表达抗体的细胞中所含的核酸分子,该细胞中(例如)该核酸分子所在的染色体位置不同于天然细胞。

[0211] 用于克隆和测序的RNA的一个来源是从转基因小鼠获得B细胞并将该B细胞与永生化的细胞融合而产生的杂交瘤。采用杂交瘤的优点是它们容易筛选,和选出能产生感兴趣的人单克隆抗体的杂交瘤。或者,RNA可分离自免疫动物的B细胞(或全脾)。当采用杂交瘤以外的来源时,可能需要筛选编码具有特异性结合特征的免疫球蛋白或免疫球蛋白多肽的序列。进行这种筛选的一种方法是采用噬菌体展示技术。噬菌体展示的描述参见例如Dower等,WO 91/17271,McCafferty等,WO 92/01047,以及Caton和Koprowski,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:6450-6454(1990),将其各自纳入本文作为参考。在采用噬菌体展示技术的一个实施方式中,分离免疫的转基因小鼠的cDNA(如全脾cDNA),用聚合酶链反应扩增编码免疫球蛋白多肽一部分如CDR区的cDNA序列,将扩增序列插入噬菌体载体中。用标准技术如淘选鉴定编码感兴趣肽,如具有所需结合特征的可变区肽的cDNA。

[0212] 然后测定扩增或克隆的核酸序列。一般测定编码免疫球蛋白多肽整个可变区的序列,然而,有时仅测定一部分可变区,例如CDR-编码部分的序列就足够了。测序部分的长度一般至少为30个碱基,更常常测序编码可变区长度的至少约三分之一或至少约一半的碱基。

[0213] 可对分离自cDNA文库的克隆测序,或者,当采用PCR时,在亚克隆扩增序列后或通过直接PCR测序扩增的节段进行测序。用标准技术进行测序(参见例如Sambrook等(1989))

《分子克隆:实验室指南》(Molecular Cloning:A Laboratory Guide),第1-3卷,Cold Spring Harbor Press,Sanger,F.等(1977) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463-5467,纳入本文作为参考)。通过比较克隆的核酸序列与发表的人免疫球蛋白基因和cDNA的序列,本领域技术人员能够根据测序区容易地测定(i)杂交瘤免疫球蛋白多肽(包括重链的同种型)的种系节段用法和(ii)重链和轻链可变区的序列,包括N-区添加和体细胞突变过程产生的序列。免疫球蛋白基因序列信息的一个来源是国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information),国家医学图书馆(National Library of Medicine),国立卫生研究院(National Institutes of Health),Bethesda,Md.。

[0214] 一旦分离后,可将DNA置于表达载体中,然后,再用该载体转染宿主细胞,如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、人胚肾293细胞(如293E细胞)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、或不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞,从而在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。抗体的重组生产是本领域熟知的。

[0215] 表达控制序列指在具体宿主生物体中表达操作性连接的编码序列所必需的DNA序列。适合于原核生物的控制序列,例如包括启动子、任选的操纵子序列和核糖体结合位点。已知真核细胞所采用的启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。

[0216] 当将核酸置于与另一核酸序列功能性相关的位置时是操作性连接的。例如,如果前序列(presequence)或分泌前导DNA表达为参与某多肽分泌的前蛋白(preprotein),那么该DNA操作性连接于此多肽的DNA;如果启动子或增强子能影响某编码序列的转录,那么它操作性连接于该编码序列;或如果核糖体结合位点所在位置能促进某编码序列的翻译,那么它操作性连接于该编码序列。通常,操作性连接指连接的DNA序列是连续的,并且,就分泌性前导序列而言,它是连续的且在阅读框中。然而,增强子不必连续。可通过在方便的限制性位点连接而实现连接。如果不存在这类位点,根据常规实践采用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

[0217] 细胞、细胞系和细胞培养物常常可互换使用,本文中所有这些名称都包括后代。转化子和转化细胞包括原代细胞和其衍生的培养物,而不考虑传代次数。也理解,由于有意或无意突变,所有后代的DNA含量可能不精确相同。包括经筛选与最初转化的细胞具有相同功能或生物学活性的突变后代。从正文中可知道所用不同名称的含义。

[0218] 在另一实施方式中,可用直接蛋白质测序来确定感兴趣免疫球蛋白的氨基酸序列。可根据通用密码子表设计合适的编码核苷酸序列。

[0219] 可以用如下方法制备所需抗体的氨基酸序列变体:在编码的DNA中引入合适的核苷酸改变,或通过肽合成。这些变异包括,例如,抗体氨基酸序列中残基缺失、和/或插入、和/或置换。可以进行缺失、插入、和置换的组合来完成最终的构建,只要最终的构建物具有所需特征。氨基酸的变化还可以改变单克隆、人、人源化、Human Engineered™或变异抗体的翻译后加工,例如改变糖基化位点的数目或位置。

[0220] 编码该抗体氨基酸序列变体的核酸分子,可用本领域已知的各种方法制备。这些方法包括但不限于:从天然来源中分离(在天然存在有氨基酸序列变体的情况下),或对先前制备的变体或非变体形式的抗体采用寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR诱变和盒式诱变来制备。

[0221] 本发明也提供任选地操作性连接于宿主细胞可识别的控制序列的编码本发明抗

体的分离核酸,包含该核酸的载体和宿主细胞,以及产生该抗体的重组技术,该技术包括培养宿主细胞使核酸表达和任选地从宿主细胞培养物或培养基中回收该抗体。

[0222] 对于重组生产抗体而言,分离编码它的核酸,将其插入可复制载体中进一步克隆(扩增DNA)或表达。用常规方法不难分离和测序编码单克隆抗体的DNA(例如,用能特异性结合编码该抗体的重链和轻链基因的寡核苷酸探针)。可购买到许多载体。这些载体组成通常包括但不限于以下的一种或多种:信号序列、复制起点、一个或多个选择性标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0223] (1) 信号序列组件

[0224] 不仅可直接,而且可作为与异源多肽融合的多肽重组产生本发明抗体,异源多肽优选为在成熟蛋白或多肽的N末端上具有特异性切割位点的信号序列或其它多肽。所选信号序列优选为宿主细胞识别和加工(即被信号肽酶酶切)的序列。如果原核宿主细胞不能识别和加工天然抗体的信号序列,可用选自以下物质的信号序列取代该信号序列,例如:果胶酯裂合酶(如pelB)碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp或热稳定性肠毒素II前导序列。对于酵母分泌而言,其天然信号序列可用(例如)酵母转化酶前导序列、 $\alpha$ -因子前导序列(包括酿酒酵母和克鲁维酵母 $\alpha$ -因子前导序列)、或酸性磷酸酶前导序列、白色念珠菌(*C.albicans*)葡糖淀粉酶前导序列或W090/13646所述信号序列。在哺乳动物细胞表达中,可用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列,如单纯疱疹gD信号序列。

[0225] 将这些前体区的DNA在阅读框中连接于编码该抗体的DNA。

[0226] (2) 复制起点组件

[0227] 表达载体和克隆载体都含有使该载体在一种或多种选择的宿主细胞中复制的核酸序列。通常,在克隆载体中,此序列是使载体独立于宿主染色体DNA而复制的序列,包括复制起点或自主复制序列。各种细菌、酵母和病毒的这种序列是熟知的。质粒pBR322的复制起点适合于大多数革兰阴性菌,2 $\mu$ 质粒起点适合于酵母,各种病毒起点可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。通常,哺乳动物表达载体不需要复制起点组件(一般会采用SV40起点仅仅因为它含有早期启动子)。

[0228] (3) 选择性标记组件

[0229] 表达和克隆载体可包含选择性基因,也称为可选择标记。一般的选择基因编码的蛋白质(a)产生对抗生素或其它毒素如氨基青霉素、新霉素、甲氨蝶呤、四环素、G418、遗传霉素、组氨酸或霉酚酸的抗性(b)补充营养缺陷型缺陷,或(c)提供不能从复合培养基中得到的关键营养物,如编码芽孢杆菌的D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0230] 选择方案的一个例子采用药物来阻滞宿主细胞生长。成功转化杂合基因的细胞产生提供药物抗性的蛋白质,从而在选择方案中存活。这种显性选择的例子采用药物甲氨蝶呤、新霉素、组氨酸、嘌呤霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0231] 用于哺乳动物细胞的适当可选择标记的另一个例子是那些使得能够鉴定摄入编码抗体的核酸活性细胞的标记,如DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白-I和-II,优选灵长类金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0232] 例如,首先通过在含有DHFR的竞争性拮抗剂一甲氨蝶呤(Mtx)的培养基中培养所有转化子,鉴定转化了DHFR选择性基因的细胞。在采用野生型DHFR时,合适的宿主细胞是DHFR活性缺陷的中华仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

[0233] 或者,可通过使细胞在含有可选择标记的选择性制剂如氨基糖苷类抗生素如卡那霉素、新霉素或G418的培养基中生长,选出转化或共转化含有编码本发明抗体的DNA序列、野生型DHFR蛋白和另一种可选择标记如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH)的宿主细胞(具体是含有内源性DHFR的野生型宿主细胞)。参见美国专利号4,965,199。

[0234] 用于酵母的合适的选择性基因是存在于酵母质粒YRp7 (Stinchcomb等, Nature, 282:39 (1979)) 中的trp1基因。Trp1基因提供用于选择缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株,例如ATCC编号44076或PEP4-1的选择性标记, Jones, Genetics, 85:12 (1977)。然后,酵母宿主细胞基因组中存在的trp1损伤提供了检测在没有色氨酸时生长转化的有效环境。类似地, Leu2-缺陷型酵母株(ATCC 20,622或38,626)由携带Leu2基因的已知质粒补充。Ura3-缺陷型酵母株由携带ura3基因的质粒补充。

[0235] 此外,衍生自1.6 $\mu$ m环形质粒pKD1的载体可用于转化克鲁维酵母菌属酵母。或者, Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990) 报道了用乳酸克鲁维酵母(K. lactis)大规模生产重组小牛凝乳酶的表达系统。也公开了使克鲁维酵母菌属的工业菌株分泌成熟的重组人血清白蛋白的稳定多拷贝表达载体。Fleer等, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)。

[0236] (4) 启动子组件

[0237] 表达和克隆载体通常包含宿主生物体识别的和操作性连接于编码抗体的核酸的启动子。适合用于原核宿主的启动子包括阿拉伯糖(如araB)启动子, phoA启动子,  $\beta$ -内酰胺酶和乳糖启动子系统, 碱性磷酸酶, 色氨酸(trp)启动子系统和杂交启动子如tac启动子。然而,其它已知的细菌启动子也适用。用于细菌系统的启动子也包含操作性连接于编码本发明抗体DNA的Shine-Dalgarno(S.D.)序列。

[0238] 已知真核生物的启动子序列。基本上所有真核基因都具有AT富集区位于启动转录的位点上游约25-30个碱基处。在许多基因的转录起点上游70-80个碱基处发现的另一序列是CNCAAT区,其中N可以是任何核苷酸。大多数真核基因的3'端是AATAAA序列,这可能是将聚A尾巴加入编码序列3'端的信号。所有这些序列都适合于插入真核表达载体中。

[0239] 用于酵母宿主的合适的启动序列的例子包括:3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶,如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、丙糖磷酸异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖激酶的启动子。

[0240] 具有转录受生长条件控制额外优点的可诱导启动子的其它酵母启动子是:醇脱氢酶2、异细胞色素C、酸性磷酸酶、氮代谢相关降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。EP 73,657进一步描述了用于酵母表达的合适载体和启动子。最好将酵母增强子与酵母启动子一起使用。

[0241] 例如,用获自病毒如Abelson白血病病毒、多瘤病毒、鸡痘病毒、腺病毒(如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒,最优选巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒、猿病毒40(SV40)的基因组的启动子,异源哺乳动物启动子如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子,热激启动子(只要这些启动子与宿主细胞体系相容)在哺乳动物宿主细胞中控制载体的抗体转录。

[0242] 方便地获得SV40病毒的作为含有SV40病毒复制起点的SV40限制性片段的早期和晚期启动子。方便地获得人巨细胞病毒的作为HindIII E限制性片段的立即早期启动子。用

牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达DNA的系统公开于美国专利号4,419,446中。美国专利号4,601,978中描述了对此系统的修饰。也参见Reyes等, *Nature* 297:598-601 (1982), 在单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子控制下在小鼠细胞中表达人 $\beta$ -干扰素cDNA。或者,可采用罗斯肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

[0243] (5) 增强子元件组件

[0244] 将增强子序列插入载体中常能增强高等真核生物对编码本发明抗体DNA的转录。现已知哺乳动物基因的许多增强子序列(珠蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)。然而,一般采用真核细胞病毒的增强子。例子包括复制起点后侧的SV40增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点后侧的多瘤增强子和腺病毒增强子。也参见Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982), 关于激活真核启动子的增强元件。可在抗体编码序列的5'或3'位置上,但优选在启动子的5'位点上将增强子剪接入载体中。

[0245] (6) 转录终止组件

[0246] 用于原核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或其它多细胞生物的有核细胞)的表达载体也含有终止转录和稳定mRNA所必需的序列。这种序列通常来自真核或病毒DNA或cDNA的非翻译区的5'端,偶见3'端。这些区域含有的核苷酸片段转录为编码抗体的mRNA的非翻译部分的聚腺苷酸片段。一个有用的转录终止组件是牛生长激素聚腺苷酸区。参见W094/11026和本文公开的表达载体。另一种是小鼠免疫球蛋白轻链转录终止子。

[0247] (7) 宿主细胞的选择和转化

[0248] 本发明用于克隆或表达载体中DNA的合适宿主细胞是上述原核、酵母或高等真核细胞。用于此目的的合适的原核生物包括真细菌,如革兰阴性菌或革兰阳性菌,例如,肠杆菌科(Enterobacteriaceae)如埃希菌属(*Escherichia*)如大肠埃希菌,肠细菌属(*Enterobacter*),欧文菌属(*Erwinia*),克雷伯菌属(*Klebsiella*),变形杆菌属(*Proteus*),沙门菌属(*Salmonella*)如鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*),沙雷菌属(*Serratia*)如粘质沙雷菌(*Serratia marcescans*)和志贺杆菌属(*Shigella*),以及芽孢杆菌属(*Bacilli*)如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) (如公开于1989年4月12日公布的DD 266,710的地衣芽孢杆菌41P),假单胞菌属(*Pseudomonas*)如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)和链霉菌属(*Streptomyces*)。一种优选的大肠埃希菌克隆宿主是大肠埃希菌294(ATCC 31,446),尽管其它菌株如大肠埃希菌B、大肠埃希菌X1776(ATCC 31,537)和大肠埃希菌W3110(ATCC 27,325)也合适。这些例子是说明性而非限制性的。

[0249] 除原核生物以外,真核微生物如丝状真菌或酵母也是抗体编码载体的合适的克隆或表达宿主。酿酒酵母,或普通面包酵母是最常用的低等真核宿主微生物。然而,许多其它属、种和菌株通常可得到和在本文中使用,如人酵母菌探针(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)宿主如乳酸克鲁维酵母、脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、*K. wickerhamii* (ATCC 24,178)、*K. waltii* (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K. drosophilum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(*K. thermotolerans*)和马克思克鲁维酵母(*K. marxianus*);亚罗酵母属(*yarrowia*) (EP 402,226);甲醇酵母(*Pichia pastors*) (EP 183,070);假丝酵母属(*Candida*);里氏木霉菌(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234);粗糙链孢菌(*Neurospora crassa*);许旺酵母属(*Schwanniomyces*)如西方许旺酵母

(*Schwanniomyces occidentalis*);和丝状真菌如链孢菌属(*Neurospora*)、青霉菌属(*Penicillium*)、颗粒霉菌属(*Tolyocladium*)和曲霉菌属(*Aspergillus*)宿主如构巢曲霉(*A.nidulans*)和黑曲霉(*A.niger*)。

[0250] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞获自多细胞生物。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已鉴定了许多杆状病毒毒株和变体以及对应的感受态昆虫宿主细胞,这些昆虫细胞来自宿主如草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) (果蝇)和家蚕(*Bombyx mori*)。用于转染的各种病毒株可公开地获得,如桃木菌属(*Autographa californica*) NPV的L-1变体和家蚕NPV的Bm-5株,这些病毒可用作本发明所用病毒,具体用于转染草地夜蛾细胞。

[0251] 棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛花、番茄、烟草、浮萍和其它植物细胞的植物细胞培养物也可用作宿主。

[0252] 然而,对脊椎动物细胞最感兴趣,通过培养(组织培养物)增殖脊椎动物细胞已成为常规方法。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子是中华仓鼠卵巢细胞,包括CHOK1细胞(ATCC CCL61)、DXB-11、DG-44和中华仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));用SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7, ATCC CRL 1651);人胚肾细胞系(293或用于悬浮培养的亚克隆293细胞, [Graham等, J.Gen Virol.36:59(1977)];幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);小鼠塞尔托利细胞(TM4, Mather, Biol.Reprod.23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);Buffalo大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(WI38, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等, Annals N.Y Acad.Sci.383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞和人肝癌细胞系(Hep G2)。

[0253] 用上述产生抗体的表达载体或克隆载体转化或转染宿主细胞,培养在经改良适合于诱导性启动子、选择性转化子或扩增编码所需序列的基因的常规营养培养基中。此外,含有由选择性标记隔开的多拷贝转录单元的新载体和转染细胞系特别有用,优选用于表达靶向M-CSF的抗体。

[0254] (8) 宿主细胞的培养

[0255] 可在各种培养基中培养用于产生本发明抗体的宿主细胞。市售培养基如Ham's F10 (Sigma), 极限必需培养基 (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) 和Dulbecco改良的Eagle培养基 (DMEM), (Sigma) 适合于培养宿主细胞。此外, Ham等, Meth.Enz.58:44(1979), Barnes等, Anal.Biochem.102:255(1980), 美国专利号4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655或5,122,469;W090103430;W0 87/00195;或美国专利Re.30,985中描述的任何培养基均可用作宿主细胞的培养基。任何这些培养基可按需要补充激素和/或其它生长因子(如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙盐、镁盐和磷酸盐)、缓冲液(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如庆大霉素<sup>TM</sup>药物)、痕量元素(定义为通常终浓度在微摩尔范围的无机化合物)和葡萄糖或等价能源。本领域技术人员知道,还可包括合适浓度的任何其它必需的补充物。培养条件如温度、pH等是所用的使选择的宿主细胞表达的条件,这是本领域普通技术人员知道的。

### [0256] (9) 抗体纯化

[0257] 当采用重组技术时,抗体产生在细胞内、周质间隙中或直接分泌到培养基中,包括从微生物培养物中产生。如果抗体在细胞内产生,第一步,用(例如)离心或超滤去除颗粒碎片,或宿主细胞或裂解片段。Better等,Science 240:1041-1043(1988);ICSU Short Reports 10:105(1990);和Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:457-461(1993)描述了分离分泌到大肠埃希菌周质间隙的抗体的方法。(也参见[Carter等,Bio/Technology 10:163-167(1992)]。

[0258] 从微生物或哺乳动物细胞制备的抗体组合物可用(例如)羟基磷灰石层析、阳离子或阴离子交换层析和亲和层析纯化,亲和层析是优选的纯化技术。蛋白A作为亲和配体的适用性取决于抗体中存在的免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。可用蛋白A纯化含人 $\gamma$ 1、 $\gamma$ 2或 $\gamma$ 4重链的抗体(Lindmark等,J.Immunol.Meth.62:1-13(1983))。推荐用蛋白质G纯化所有小鼠同种型和人 $\gamma$ 3(Guss等,EMBO J.5:15671575(1986))。连接有亲和配体的基质最常见的是琼脂糖,但也可用其它基质。比起琼脂糖,机械上稳定的基质如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯获得的流速更快,处理时间更短。当抗体含 $C_H3$ 结构域时,Bakerbond ABX<sup>TM</sup>树脂(J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.)可用于纯化。根据待回收抗体,也可用其它蛋白质纯化技术,如在离子交换柱上分级、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅层析、肝素SEPHAROSE<sup>TM</sup>层析、阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)层析、层析聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。

### [0259] 嵌合和人源化抗体

[0260] 因为嵌合或人源化抗体在人体中的免疫原性低于其亲代鼠单克隆抗体,所以它们可用于人类治疗而发生过敏反应的危险性低得多。因此,在治疗应用涉及体内给予人体时,优选使用这些抗体。

[0261] 嵌合性单克隆抗体(其中鼠单克隆抗体的可变Ig区与人的恒定Ig区相融合),可用本领域已知的标准程序生产(参见Morrison,S.L.等(1984)嵌合性人抗体分子;小鼠抗原结合区和人恒定区结构域,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81,6841-6855;和Boulianne,G.L.等,Nature 312,643-646(1984))。尽管已经证明一些嵌合性单克隆抗体在人体中的免疫原性较低,但是鼠Ig可变区仍能引起显著的人抗-鼠应答反应。

[0262] 人源化抗体可以用各种不同方法制备,包括例如:(1)将非人互补决定区(CDRs)移植到人框架和恒定区上(这一过程在本领域中称为通过“CDR移植”而人源化),或者,(2)移植整个非人可变区,但通过表面残基置换用人样(human-like)表面“覆盖”该区域(这一过程在本领域中称为“贴面”(veneering))。在本发明中,人源化抗体包括“人源化”和“贴面”抗体。这些方法见例如,Jones等,Nature 321:522525(1986);Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,81:6851-6855(1984);Morrison和Oi,Adv.Immunol.,44:65-92(1988);Verhoeyer等,Science 239:1534-1536(1988);Padlan,Molec.Immunol.28:489-498(1991);Padlan,Molec.Immunol.31(3):169-217(1994);和Kettleborough,C.A.等,Protein Eng.4(7):733-83(1991),以上各文献引入本文作为参考。

[0263] 具体说,单独或作为偶联物的啮齿类抗体重复体内给予人后会引引起接受者对啮齿类抗体产生免疫应答;即所谓HAMA应答(人抗小鼠抗体)。如果需要重复给药,HAMA应答可能限制药物的有效性。可通过用亲水性聚合物如聚乙二醇化学修饰抗体或用遗传工程方法使

抗体结合结构更像人来降低抗体的免疫原性。例如,结合CEA的啮齿类抗体可变区的基因序列可用人骨髓瘤蛋白的可变区取代,而产生重组嵌合抗体。这些方法的详述见EP 194276、EP 0120694、EP 0125023、EP 0171496、EP 0173494和W0 86/01533。或者,可分离或合成啮齿类抗体CDR的基因序列用同源人抗体基因的相应序列区取代,产生具有原先啮齿类抗体特异性的人抗体。这些方法的描述见EP 023940、W0 90/07861和W091/09967。或者,可将啮齿类抗体可变区的大量表面残基改变为通常在同源人抗体上发现的残基,产生具有表面“贴面”残基的啮齿类抗体,而被识别为人体自身的抗体。Padlan等(1991) *Mol. Immunol.* 28, 489证明了该方法。

[0264] CDR移植包括将鼠重链和轻链Ig可变域内6个CDR中的一个或多个CDR引入人Ig可变域中合适的四个框架区中,这也称为CDR移植。此技术(Reichmann, L.等, *Nature* 332, 323 (1998))采用保守的框架区域(FR1-FR4)作为支架来支持CDR环,这些CDR环是与抗原主要接触的部分。然而,CDR移植的一个缺点是,此方法会导致人源化抗体的结合亲和力大大低于原先鼠抗体,因为框架区的氨基酸可对抗原结合有贡献,以及因为CDR环的氨基酸可能影响两个Ig可变域的结合。要保持人源化单克隆抗体的亲和力,可通过选择与原先鼠抗体框架区最密切相似的人框架区来改进CDR移植技术,或者通过计算机模拟抗原结合位点的帮助,定点诱变框架区或CDR中单个氨基酸来改进(如Co, M. S.等(1994), *J. Immunol.* 152, 2968-2976)。

[0265] 一种人源化抗体的方法包括:比对非人的与人的重链和轻链序列,根据这样的比对,选择人框架并用其置换非人框架,进行分子模拟预测人源化序列的构象并与亲代抗体的构象作比较。这一过程后对CDR区域中干扰CDR结构的残基进行反复突变,直至预测的人源化序列模型的构象十分接近于亲代非人抗体的非人CDR构象。可进一步衍生这样的人源化抗体,而利于摄取和清除,例如,通过Ashwell受体(参见例如,美国专利号:5,530,101和5,585,089,这些专利引入本文作为参考)。

[0266] 已报道了通过合理设计获得的许多人源化鼠单克隆抗体(参见例如,出版于2002年6月11日的20020091240, W092/11018和美国专利号,5,693,762,美国专利号,5,776,886)。

#### [0267] 氨基酸序列变体

[0268] 一种鉴定抗体中优选诱变位置的某些残基或区域的有用方法,称为“丙氨酸扫描诱变法”,如Cunningham和Wells在 *Science*, 244:1081-1085 (1989) 中所述。本文中,鉴定一个或一组靶残基(例如,带电荷残基如Arg、Asp、His、Lys和Glu),并用中性或带负电的氨基酸(最优选丙氨酸或多聚丙氨酸)置换,而影响氨基酸与抗原的相互作用。那些对置换表现出功能敏感性的氨基酸位点,再通过在该置换位点进一步引入变异或引入其它变异而更精细化。因此,尽管引入氨基酸序列变异的位点是预先确定的,但突变本身的性质却不需要预先确定。例如,为了分析某给定位点突变的性能,可对靶密码子或靶区域进行丙氨酸扫描或随机诱变,再筛选具有所需活性的变异抗体。

[0269] 氨基酸序列插入包括氨基端和/或羧基端的融合(其长度从一个残基到含有100个或甚至更多残基的多肽),以及序列间插入一个或多个氨基酸残基。末端插入的例子包括具有N-端甲硫氨酸残基的抗体或与表位标记融合或补救受体表位融合的抗体(包括抗体片段)。抗体分子的其它插入变体包括与能延长该抗体血清半衰期的多肽融合,如在N末端或C

末端融合。

[0270] 术语“表位标记”指抗体融合于表位标记。表位标记多肽具有足够残基，以提供表位来产生抗该表位的抗体，但也可足够短使它不干扰抗体的活性。表位标记优选有足够独特性，以致于针对它的抗体基本不与其它表位发生交叉反应。合适的标记多肽一般具有至少6个氨基酸残基，通常约为8-50个氨基酸残基（优选约9-30个残基）。例子包括flu HA标记多肽及其抗体12CA5[Field等, Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165 (1988)]; c-myc标记及其抗体8F9、3C7、6E10、G4、B7和9E10[Evan等, Mol. Cell. Biol. 5 (12):3610-3616 (1985)]; 和单纯疱疹病毒糖蛋白D(gD)标记及其抗体[Paborsky等, Protein Engineering 3 (6):547-553 (1990)]。其它示范性标记是聚组氨酸序列，通常约六个组氨酸残基，得以分离用镍螯合标记的化合物。本发明包括本领域熟知和常规使用的其它标记和加尾，如FLAG®标记(Eastman Kodak, Rochester, NY)。

[0271] 本文所用术语“补救受体结合表位”指负责提高IgG分子体内血清半衰期的IgG分子(如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>或IgG<sub>4</sub>)的Fc区表位。

[0272] 另一种类型的变体是氨基酸取代变体。这些变体中，抗体分子内至少去除了一个氨基酸残基，并在该位置插入另一个不同的残基。可以在任何超变区或CDR区或框架区内进行取代诱变。表1中列出了保守性取代。在“优选的取代”标题下是最保守的取代。如果取代不引起生物学活性的改变，那么是更基本的变化(这些取代在表1中命名为“示范性取代”)，或者可进一步按下文所述的氨基酸分类引入取代，并对产物进行筛选。

[0273] 表1

原先	示范性	优选残基取代
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; gln	arg
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	
His (H)	asn; gln; lys; arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala;	leu
[0274] Leu (L)	phe; 正亮氨酸; ile; val;	正亮氨酸 ile
	met; ala; phe	
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	
Pro (P)	ala	
Ser (S)	thr	
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe;	leu
	ala; 正亮氨酸	

[0275] 抗体生物学性能的基本修饰,可通过选用以下在作用上没有显著区别的取代基团而实现:(a) 仍然维持取代区域多肽的骨架结构,例如,仍然维持片层或螺旋构形;(b) 仍然维持靶位点处分子的电荷或疏水性;或(c) 仍然维持侧链的体积。天然存在的残基可根据其共同的侧链特性分为以下几组:

[0276] (1) 疏水:正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0277] (2) 中性亲水: Cys, Ser, Thr;

[0278] (3) 酸性: Asp, Glu;

[0279] (4) 碱性: Asn, Gln, His, Lys, Arg;

[0280] (5) 影响链取向的残基: Gly, Pro; 和

[0281] (6) 芳香族: Trp, Tyr, Phe。

[0282] 保守取代涉及用同一类氨基酸一成员取代另一成员。非保守取代涉及用一类氨基酸成员置换另一类的成员。

[0283] 也可取代任何对维持单克隆、人、人源化、Human Engineered™或变异抗体的正确构象不起作用的半胱氨酸残基,通常可用丝氨酸取代,来提高分子的氧化稳定性,并防止异常交联。相反,抗体中可以加入半胱氨酸键,以改善其稳定性(尤其当抗体是抗体片段如Fv片段时)。

[0284] 亲和成熟化包括制备和筛选在亲代抗体的CDR内含有取代的抗体变体,选出生物学性能有所改善的突变体,例如,结合亲和力比亲代抗体提高的突变体。产生这种取代变体的方便方法,是采用噬菌体展示的亲亲和成熟法。简言之,使多个超变区位点(如6-7个)突变,在每个位点产生所有可能的氨基酸取代。这样产生的变异抗体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒的表面,作为与包装在每个噬菌体颗粒内的M13基因III产物相融合的融合蛋白。然后,筛选噬菌体展示变体的生物学活性(如结合的亲和力)。

[0285] 可进行丙氨酸扫描诱变来鉴定对抗原结合起很大作用的超变区残基。或者,或此外,优选对抗原-抗体复合物的结晶结构进行分析,从而鉴定抗原和抗体之间的接触点。这些接触残基以及邻近残基是本文所述技术进行取代的候选残基。这种突变一旦产生,就可用本文所述方法对一批变体进行筛选,在一种或多种有关测试中选出性能优越的抗体,用于进一步的开发。

[0286] 抗体变体还可以通过对亲代抗体糖基化模式进行修饰而产生,例如去除抗体中一个或多个糖分子,和/或在抗体中加入一个或多个原先不存在的糖基化位点。

[0287] 通常,抗体的糖基化为N-连接或O-连接。N-连接指将糖分子连在天冬酰胺残基的侧链上。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸,其中X是除脯氨酸以外的任意氨基酸,是酶催化使天冬酰胺侧链上加入糖分子的识别序列。多肽中存在这二种三肽序列之一即构成潜在的糖基化位点。因此,可通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个这样的三肽序列,从而在抗体中引入N-连接的糖基化位点。O-连接糖基化指N-乙酰半乳糖胺、半乳糖、或木糖之一连于羟基氨基酸上,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可连在5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸上。可通过在最初抗体序列中插入或取代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基,从而在抗体中引入O-连接的糖基化位点。举例来说,可保留图4A中41-43位上的RX1氨基酸(NGS)。或者,仅保留氨基酸41和42(NG)。

[0288] 通常,如图19B-22B中任一幅所列,Human Engineered™抗体的氨基酸序列变体的重链或轻链的氨基酸序列与原先Human Engineered™抗体的氨基酸序列至少60%,更优选至少80%,更优选至少85%,更优选至少90%,最优选至少95%相同,包括例如:80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和100%相同。本文将这种序列的相同性或同源性定义为比对序列和引入缺口(如果需要)达到最大序列相同性百分数后,与Human Engineered™残基相同的候选序列的氨基酸残基百分数,不认为任何保守取代(如上述表1所定义)是序列相同性的一部分。抗体序列的N-末端、C-末端、或内部延伸、缺失或插入不构成对序列相同性或同源性的影响。因此,可通过常用于比较两条多肽氨基酸位置相似性的标准方法测定序列相同性。采用计算机程序如BLAST或FASTA,比对两条多肽各自氨基酸的最佳匹配(沿一条或两条序列的全长,或沿一条或两条序列的预先确定部分)。该程序提供默认开放罚分和默认缺口罚分,评分矩阵如PAM250[标准评分矩阵;参见Dayhoff等,Atlas of Protein Sequence and Structure,第5卷,增刊3(1978)]可与该计算机程序联用。例如,相同性百分数可计算为:相同匹配的总数乘以100再除以匹配范围内较长序列的长度和引入较长序列中的缺口数之和,以比对这两条序列。

[0289] 也考虑了该抗体的其它修饰。例如,可能需要修饰本发明抗体的的效应器功能,以增强该抗体治疗癌症(例如)的有效性。例如,可将半胱氨酸残基引入Fc区,而在此区域中形

成链间二硫键。如此产生的同质二聚抗体可具有改进的内化性能和/或增强的补体介导的细胞杀伤作用和抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。参见Caron等, *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992) 和Shopes, *B. J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同质二聚抗体也可用异质双功能交联剂制备,如Wolff等, *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993) 所述。或者,可工程改造抗体使其具有双Fc区,而增强补体胞溶和ADCC性能。参见Stevenson等, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)。此外,已证明,CDR内的序列可导致抗体与II类MHC分子结合并引发不想要的辅助T-细胞应答。保守取代可使该抗体保留结合活性而丧失引发不想要的T-细胞应答的能力。也参见等, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85 (13):4852-6,全文纳入本文作为参考,此文描述了嵌合抗体,其中鼠可变区与人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 和 $\gamma 4$ 恒定区连接。

[0290] 在本发明的某些实施方式中,可能需要用抗体片段而非完整抗体来增加对肿瘤的渗透(例如)。在这种情况下,可能需要修饰抗体片段以延长其血清半衰期,例如,将分子如PEG或其它水溶性聚合物包括多糖聚合物加入抗体片段以延长半衰期。这也可通过(例如)将补救受体结合表位掺入抗体片段来实现(如抗体片段合适区域的突变或通过将所述表位掺入一肽尾,然后通过DNA或肽合成将此肽尾融合于抗体片段的任一端或中间)(参见例如:W096/32478)。

[0291] 补救受体结合表位优选构成Fc结构域一个或两个环的一个或多个氨基酸残基转移到该抗体片段的类似位置的区域。甚至更优选地,Fc结构域一个或两个环的三个或多个残基被转移。更优选地,所述表位取自Fc区(如IgG的Fc区)的CH2结构域并转移到该抗体的CH1、CH3或VH区,或一个以上的这些区中。或者,所述表位取自Fc区的CH2结构域并转移到该抗体片段的C.sub.L区或V.sub.L区,或二者。也参见国际申请W0 97/34631和W0 96/32478对Fc变体和它们与补救受体的相互作用的描述。

[0292] 因此,本发明抗体可包含人Fc部分、人共有Fc部分或其保留与Fc补救受体相互作用能力的变体,包括参与二硫键的半胱氨酸经修饰或去除的变体,和/或在N-末端加入甲硫氨酸和/或N-末端20个氨基酸中一个或多个被去除的变体,和/或与补体相互作用的区域如C1q结合位点被去除的变体,和/或ADCC位点被去除的变体[参见例如:*Molec. Immunol.* 29 (5):633-9 (1992)]。

[0293] 以前的研究绘制了人和鼠IgG的FcR主要由IgG残基233-239组成的下部铰链区的结合位点图。其它研究提出了宽度增加的节段,如人Fc受体I的Gly316-Lys338,人Fc受体III的Lys274-Arg301和Tyr407-Arg416,或在下部铰链区外发现的几个特异性残基,如鼠IgG2b中与鼠Fc受体II相互作用的Asn297和Glu318。关于人IgG1Fc片段与人Fc受体IIIA的3.2-Å晶体结构的报道描绘出参与结合Fc受体IIIA的IgG1残基Leu234-Ser239、Asp265-Glu269、Asn297-Thr299和Ala327-Ile332。根据晶体结构提出,除下部铰链(Leu234-Gly237)区外,IgG CH2结构域环FG(残基326-330)和BC(残基265-271)中的残基可能在与Fc受体IIA的结合中起作用。参见Shields等, *J. Biol. Chem.*, 276 (9):6591-6604 (2001),全文纳入本文作为参考。Fc受体结合位点内残基的突变可导致效应器功能改变,如ADCC或CDC活性改变,或半衰期改变。如上所述,可能的突变包括一个或多个残基的插入、缺失或取代,取代包括丙氨酸取代、保守取代、非保守取代、或用在相同位置不同IgG亚类的相应氨基酸残基取代(如用相同位置上相应的IgG2残基取代IgG1残基)。

[0294] Shields等报道,参与结合所有人Fc受体的IgG1残基位于邻近铰链的CH2结构域中,属于以下两种类型:1)位于可能直接与所有FcR相互作用的位置包括Leu234-Pro238、Ala327和Pro329(和可能的Asp265);2)位于影响糖类性质的位置或包括Asp265和Asn297位置。影响与Fc受体II结合的其它IgG1残基如下:(最大影响)Arg255、Thr256、Glu258、Ser267、Asp270、Glu272、Asp280、Arg292、Ser298,和(较小影响)His268、Asn276、His285、Asn286、Lys290、Gln295、Arg301、Thr307、Leu309、Asn315、Lys322、Lys326、Pro331、Ser337、Ala339、Ala378和Lys414。A327Q、A327S、P329A、D265A和D270A降低结合。除了上面鉴定的所有FcR残基外,使与Fc受体IIIA结合降低40%或更多的其它IgG1残基如下:Ser239、Ser267(仅Gly)、His268、Glu293、Gln295、Tyr296、Arg301、Val303、Lys338和Asp376。能增强与FcRIIIA结合的变异包括T256A、K290A、S298A、E333A、K334A和A339T。Lys414显示使FcRIIA和FcRIIB结合降低40%,Arg416使FcRIIA和FcRIIIA结合降低30%,Gln419使FcRIIA结合降低30%,使FcRIIB结合降低40%,Lys360使FcRIIIA结合提高23%。也参见Presta等, *Biochem. Soc. Trans.* (2001) 30, 487-490。

[0295] 例如,全文纳入本文作参考的美国专利号6,194,551描述了在人IgG Fc区中氨基酸位置329、331或322(用Kabat编号)处含有突变的变体效应器功能改变,一些变体显示C1q结合能力或CDC活性降低。另一个例子是,全文纳入本文作参考的美国专利号6,737,056描述了在人IgG Fc区中氨基酸位置238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439(用Kabat编号)处含有突变的变体的效应器或Fc- $\gamma$ -受体结合能力改变,一些变体的受体结合特性显示与ADCC或CDC活性降低相关。这些突变中,据称氨基酸位置238、265、269、270、327或329处的突变降低与FcRI的结合,据称氨基酸位置238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438或439处的突变降低与FcRII的结合,据称氨基酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435或437处的突变降低与FcRIII的结合。

[0296] 全文纳入本文作参考的美国专利号5,624,821报道,重链的氨基酸残基318、320或322突变可能改变鼠抗体的C1q结合活性,取代残基297(Asn)导致消除了胞溶活性。

[0297] 全文纳入本文作参考的美国申请公开号20040132101描述了在氨基酸位置240、244、245、247、262、263、266、299、313、325、328或332(用Kabat编号)或位置234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330或332(用Kabat编号)处有突变的变体中,位置234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330或332处的突变可降低ADCC活性或降低与Fc $\gamma$ 受体的结合。

[0298] 全文纳入本文作参考的Chappel等, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88(20): 9036-40报道, IgG1的嗜细胞活性是其重链CH2结构域的内在属性。在IgG1氨基酸残基234-237中任一处的单点突变显著降低或消除其活性。完全恢复结合活性需要用所有IgG1残基234-237(LLGG)取代IgG2和IgG4的残基。观察到含有整个ELLGGP序列(残基233-238)的IgG2

抗体比野生型IgG1活性更高。

[0299] 全文纳入本文作参考的Isaacs等, *J Immunol*.1998;161(8):3862-9报道,在Fc $\gamma$ R结合的关键基序中的突变(谷氨酸233变为脯氨酸,亮氨酸/苯丙氨酸234变为缬氨酸,以及亮氨酸235变为丙氨酸)完全阻止了靶细胞的消除。谷氨酸318突变为丙氨酸消除了小鼠IgG2b的效应器功能,也降低了人IgG4的效能。

[0300] 全文纳入本文作参考的Armour等, *Mol Immunol*.2003;40(9):585-93鉴定到能与活化受体Fc $\gamma$ RIIa反应的IgG1变体,它比野生型IgG1的效率至少低10倍,但与抑制性受体Fc $\gamma$ RIIb的结合仅降低4倍。在氨基酸233-236区域中和/或氨基酸位置327、330和331处产生了突变。也参见W0 99/58572,全文纳入本文作为参考。

[0301] 全文纳入本文作参考的Xu等, *J Biol Chem*.1994;269(5):3469-74报道,IgG1Pro331突变为Ser显著降低C1q结合并基本上消除了胞溶活性。相反,在IgG4中用Pro取代Ser331赋予了IgG4Pro331变体部分胞溶活性(40%)。

[0302] 全文纳入本文作参考的Schuurman等, *Mol Immunol*.2001;38(1):1-8报道,参与重链间键形成的铰链半胱氨酸之一Cys226突变为丝氨酸导致重链间连接更稳定。IgG4铰链序列Cys-Pro-Ser-Cys突变为IgG1铰链序列Cys-Pro-Pro-Cys也显著稳定了重链之间的共价相互作用。

[0303] 全文纳入本文作参考的Angal等, *Mol Immunol*.1993;30(1):105-8报道,IgG4中氨基酸位置241处的丝氨酸突变为脯氨酸(见IgG1和IgG2的该位置)导致产生同类抗体,以及与原先嵌合IgG4相比血清半衰期延长和组织分布改善。

[0304] 人抗体和Human Engineered™抗体

[0305] Human Engineering™

[0306] Studnicka[参见例如:Studnicka等,美国专利号5,766,886;Studnicka等, *Protein Engineering* 7:805-814(1994)]描述采用抗体可变区Human Engineering™作为降低抗体分子的免疫原性同时保持结合活性的方法。根据此方法,给各可变区氨基酸指定一个取代风险。氨基酸取代分为以下三种风险类型:(1)低风险改变是降低免疫原性的可能性最大而破坏抗原结合的可能性最小的改变;(2)中风险改变是进一步降低免疫原性,但更可能影响抗原结合或蛋白质折叠的改变;(3)高风险残基是对于结合或维持抗体结构很重要,并且抗原结合或蛋白质折叠受到影响风险最高的残基。由于脯氨酸的三维结构作用,通常认为对脯氨酸的修饰至少是中风险改变,即使该位置一般是低风险位置。

[0307] Human Engineered™是对啮齿类抗体轻链和重链的可变区,在经测定不可能负面影响抗原结合或蛋白质折叠、但可能降低在人体环境中的免疫原性的位置上用人氨基酸进行取代。通过比对啮齿类可变区与人可变区氨基酸序列,鉴定到处在“低风险”位置的可作为此方法修饰候选对象的氨基酸残基。可采用人的可变区,包括个体VH或VL序列或人共有VH或VL序列或个体或共有种系序列。可改变任何数量低风险位置上或所有低风险位置上的氨基酸残基。例如,在比对的鼠和人氨基酸残基不同的各低风险位置上,引入氨基酸修饰,用人残基取代啮齿类残基。或者,可改变所有低风险位置上和任何数量的中风险位置上的氨基酸残基。理想地,为达到最低免疫原性,可将所有低风险和中风险位置从啮齿类序列改变为人序列。

[0308] 构建含有修饰的重链和/或轻链可变区的合成基因将其连接于人 $\gamma$ 重链和/或 $\kappa$ 轻

链恒定区。任何人重链和轻链恒定区可与Human Engineered™抗体可变区联用,这些恒定区包括IgA(任何亚型,如IgA1或IgA2)、IgD、IgE、IgG(任何亚型,如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)或IgM的恒定区。将人重链和轻链基因引入宿主细胞如哺乳动物细胞,获得并表征得到的重组免疫球蛋白产物。

#### [0309] 转基因动物产生的人抗体

[0310] 人M-SCF抗体也可以用转基因动物来制备,这些转基因动物不产生内源性免疫球蛋白,并经基因工程改造而含有人免疫球蛋白基因座。例如,WO 98/24893揭示了具有人Ig基因座的转基因动物,这些动物由于内源性重链和轻链基因座失活而不能产生具有功能的内源性免疫球蛋白。WO 91/741也揭示了转基因的非灵长类哺乳动物宿主能对免疫原产生免疫应答,产生的抗体具有灵长类的恒定区和/或可变区,其内源性免疫球蛋白编码基因座被取代或失活。WO 96/30498揭示了利用Cre/Lox系统修饰哺乳动物的免疫球蛋白基因座,例如替换恒定区或可变区的全部或部分从而形成修饰的抗体分子。WO 94/02602揭示了具有失活的内源性Ig基因座和功能性的非人哺乳动物宿主。美国专利No.5,939,598揭示了转基因小鼠的制备方法,该转基因鼠缺乏内源性重链,但能表达含有一个或多个异源恒定区的外源免疫球蛋白基因座。

[0311] 利用上述转基因动物,能够对选定的抗原分子产生免疫应答,从该动物中取出产生抗体的细胞用来制备分泌人单克隆抗体的杂交瘤。免疫方案和佐剂等是本领域已知的,可用来免疫例如WO 96/33735所述的转基因小鼠。此出版物揭示了针对各种不同抗原分子(包括IL6、IL8、TNF $\alpha$ 、人CD4、L选择蛋白、gp39、和破伤风毒素)的单克隆抗体。可以检测这些单克隆抗体抑制或中和相应蛋白质活性或生理效应的能力。WO 96/33735揭示了抗IL-8的单克隆抗体,该抗体来源于用IL-8免疫的转基因小鼠的免疫细胞,该抗体可阻断IL-8引发中性粒细胞的功能。在WO 96/34096和美国专利申请2003019440以及美国专利申请20030031667中,还揭示了对用于免疫转基因动物的抗原具有特异性的人单克隆抗体。

[0312] 还可参见,Jakobovits等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551(1993);Jakobovits等,Nature,362:255-258(1993);Bruggemann等人,Year in Immuno.,7:33(1993)和美国专利No5,591,669,美国专利No.5,589,369,美国专利No.5,545,807;和美国专利申请No.20020199213。美国专利申请No.20030092125描述了将动物的免疫应答引向所需抗原表位的方法。人抗体也可以通过体外激活B细胞的方法来产生(参见美国专利5,567,610和5,229,275)。

#### [0313] 噬菌体展示技术制备的人抗体

[0314] 重组人抗体基因库制备技术以及将编码的抗体片段展示在丝状噬菌体表面技术的发展,为直接制备人抗体提供了方法。用噬菌体技术产生的抗体在细菌中作为抗原结合片段而产生,通常是Fv或Fab片段,因此缺乏效应器功能。可以用以下两种策略之一来引入效应器功能:通过基因工程使这些片段在哺乳动物细胞中表达为完整的抗体,或使片段表达成为双特异性抗体片段含有能够引发效应器功能的第二结合位点。

[0315] 通常,抗体的Fd片段( $V_H$ -CH1)和轻链( $V_L$ -C $_L$ )分别用PCR法进行克隆,在组合性噬菌体展示库中随机重组,然后选择能与特定抗原结合的抗体。在噬菌体表面表达的Fab片段,与编码它们的基因物理性相连接。这样,通过抗原结合来选择Fab,同时也选择到了Fab编码序列,随后扩增该序列。通过几轮抗原结合和再扩增(该过程称为淘洗),富集并最终分离达

到抗原特异性Fab。

[0316] 1994年,描述了一种抗体的人源化方法,称为“导向选择(guided selection)”。导向选择利用了噬菌体展示技术对鼠单克隆抗体进行人源化的功能(参见Jespers,L.S.,等,Bio/Technology 12,899-903(1994))。为此,鼠单克隆抗体的Fd片段可以和人轻链库联合展示,再用抗原选择所得的杂交Fab库。因此,鼠Fd片段充当了指导这种选择的模板。随后,将选出的人轻链与人Fd片段库相结合。选择所得库就能得到完整的人Fab。

[0317] 已经描述了从噬菌体展示库产生人抗体的多种方法(参见例如Hoogenboom等,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等,J.Mol.Biol,222:581-597(1991);美国专利5,565,332和5,573,905;Clackson,T.,和Wells,J.A.,TIBTECH 12,173-184(1994))。具体说,体外选择和演变从噬菌体展示库产生的抗体已成为一种强有力的工具(参见,Burton,D.R.,和Barbas III,C.F.,Adv.Immunol.57,191-280(1994);和,Winter,G.,等,Annu.Rev.Immunol.12,433-455(1994);美国专利申请20020004215和W092/01047;出版于2003年10月9日的美国专利申请20030190317以及美国专利6,054,287;美国专利5,877,293)。

[0318] Watkins的“捕获提升法筛选噬菌体表达的抗体库”,分子生物学方法,抗体的噬菌体展示:方法和方案178:187-193,和2003年3月6日出版的美国专利200120030044772,描述了用捕获提升法筛选噬菌体表达的抗体库或其它结合分子的方法,该方法包括将候选的结合分子固定在固相载体上。

[0319] 可采用本文以“筛选方法”为标题的章节中所述的试验或采用本领域已知的合适试验筛选具有活性和适用于本发明治疗方法的抗体产物。

#### [0320] 其它共价修饰

[0321] 抗体的共价修饰也包括在本发明范围中。可通过化学合成或者通过酶学或化学切割抗体(如果可实施)来制备它们。通过使抗体的靶氨基酸残基与能够与所选侧链或N-或C-末端残基反应的有机衍生试剂反应将其它类型的抗体共价修饰引入分子中。

[0322] 最常见的是,半胱氨酰残基与 $\alpha$ -卤代乙酸(和相应胺),如氯代乙酸或氯代乙酰胺反应,产生羧甲基或羧基酰氨基甲基衍生物。半胱氨酰残基也通过与溴代三氟丙酮、 $\alpha$ -溴- $\beta$ -(5-咪唑基)丙酸、氯代乙酰基磷酸、N-烷基马来酰亚胺、3-硝基-2-吡啶基二硫、甲基2-吡啶基二硫、对-氯汞基苯甲酸、2-氯汞基-4-硝基酚或氯-7-硝基苯并-2-噁-1,3-二唑反应进行衍生。

[0323] 组氨酰残基通过与焦碳酸二乙酯在pH 5.5-7.0下反应进行衍生,因为该试剂对组氨酰侧链相对特异。对-溴代苯酰甲基溴也可用;该反应优选在pH 6.0的0.1M二甲胍酸钠中进行。

[0324] 赖氨酰和氨基-末端残基与琥珀酸酐或其它羧酸酐反应。用这些试剂衍生具有反转赖氨酰残基电荷的作用。用于衍生含 $\alpha$ -氨基的残基的其它合适试剂包括亚氨基酯如吡啶亚氨基甲酯(methyl picolinimidate)、吡哆醛磷酸酯、吡哆醛、氯代氯化硼、三硝基苯磺酸、0-甲基异脲、2,4-戊二酮和转氨酶-催化的与乙醛酸的反应。

[0325] 精氨酰残基通过与一种或几种常规试剂的反应而加以修饰,包括苯甲酰甲醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮、和水合茚三酮。由于胍基具有很高的pKa,所以精氨酸残基的衍生反应要在碱性条件下进行。此外,这些试剂可与赖氨酸的基团以及精氨酸的 $\epsilon$ -氨基反应。

[0326] 特别感兴趣地,可通过与芳族重氮化合物或四硝基甲烷反应将光标记物引入酪氨酸残基对酪氨酸残基进行特异性修饰。最常见的是,用N-乙酰咪唑(N-acetylimidazole)和四硝基甲烷分别形成O-乙酰酪氨酸物质和3-硝基衍生物。用<sup>125</sup>I或<sup>131</sup>I碘化酪氨酸残基,以制备用于放射性免疫试验的标记蛋白。

[0327] 羧基侧链基团(天冬氨酸基或谷氨酸基)可以选择性地与碳二亚胺(R-N=C=N-R<sup>1</sup>)反应加以修饰,其中的R和R<sup>1</sup>是不同的烷基,如1-环己基-3-(2-咪唑基-4-乙基)碳二亚胺或1-乙基-3-(4-氮鎓-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺。此外,天冬氨酸基和谷氨酸基可以与铵离子反应转变成天冬酰胺基(asparaginy1)和谷氨酰胺基(glutaminy1)。

[0328] 常常使谷氨酰胺基和天冬酰胺基脱酰氨基,分别成为相应的谷氨酸基和天冬氨酸基残基。这些残基在中性或碱性条件下脱酰氨基。这些残基的脱酰氨基形式属于本发明范围。

[0329] 其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟化,丝氨酸和苏氨酸羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链中 $\alpha$ -氨基的甲基化(T.E.Creighton,《蛋白质:结构和分子特性》(Proteins:Structure and Molecular Properties),W.H.Freeman&Co.,San Francisco,79-86页(1983)),N-末端氨基的乙酰化和任何C-末端羧基的酰胺化。

[0330] 另一类型的共价修饰包括用化学或酶学方法将糖苷偶联于抗体。这些方法的优点是,不需要在具有N-或O-连接糖基化能力的宿主细胞中产生抗体。根据所用偶联方式,可将糖连接于(a)精氨酸和组氨酸,(b)游离羧基,(c)游离巯基如半胱氨酸的巯基,(d)游离羟基如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的羟基,(e)芳族残基如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸残基,或(f)谷氨酰胺的酰胺基。1987年9月11日公开的W087/05330和Aplin和Wriston,CRC Crit.Rev.Biochem.,259-306页(1981)中描述了这些方法。

[0331] 去除抗体上存在的糖基可通过化学或酶学方法实现。化学去糖基化需要使抗体接触化合物三氟甲磺酸或等价化合物。此处理导致切去大多数或全部糖,除了连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)外,而抗体保持完整。Hakimuddin等,Arch.Biochem.Biophys.259:52(1987)和Edge等,Anal.Biochem.,118:131(1981)描述了化学去糖基化。可用各种内切糖苷酶和外切糖苷酶酶切抗体上的糖基,如Thotakura等,Meth.Enzymol.138:350(1987)所述。

[0332] 另一类抗体共价修饰包括将抗体连接于各种非蛋白类聚合物之一,如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇、聚氧乙烯化山梨糖醇、聚氧乙烯化葡萄糖、聚氧乙烯化甘油、聚氧化烯或多糖聚合物如右旋糖苷。这些方法是本领域公知的,参见例如:美国专利号4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192、4,179,337、4,766,106、4,179,337、4,495,285、4,609,546或EP 315 456。

### [0333] 基因治疗

[0334] 可以通过体外、原位或体内基因治疗将治疗性蛋白质递送给合适的细胞,可使用本领域已知的任何合适方法,包括物理的DNA转移方法(例如,脂质体或化学处理),或用病毒载体(例如,腺病毒、腺相关病毒或逆转录病毒)。例如,对于体内治疗,可以直接将编码所需蛋白质的核酸单独地或与载体、脂质体、或沉淀剂一同注射到对象体内,而在一些实施例中,注射的部位是需要表达蛋白化合物的部位。对于离体治疗,可取出对象细胞,将核酸导入这些细胞中,再将经过修饰的细胞返回给对象,可以直接返回也可用,例如,包裹在多孔

膜内植入病人体内。参见例如美国专利4,892,538和5,283,187。已有各种不同技术可用于将核酸导入活细胞内。根据核酸是要转移至体外培养的细胞中,还是要转移至宿主的体内细胞中,所采用的技术有所不同。适用于将核酸转移至体外哺乳动物细胞内的技术包括采用脂质体、电穿孔、显微注射、细胞融合,DEAE-葡聚糖、和磷酸钙沉淀。通用的核酸离体递送载体为逆转录病毒。

[0335] 其它的体内核酸转移技术包括用病毒载体转染(如腺病毒、单纯疱疹病毒I、或腺相关病毒)和脂质系统。可任选使核酸和转染试剂与微粒相结合。典型的转染试剂包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、两性季氨DOTMA(溴化(二油酰氧基丙基)三甲胺,商品名为Lipofectin,由GIBCO-BRL生产))(Felgner等,(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,7413-7417;Malone等(1989) Proc.Natl Acad.Sci.USA 86 6077-6081);带有侧链三甲胺盐头部的亲脂性谷氨酸二酯(Itto等(1990) Biochem.Biophys.Acta 1023,124-132);可代谢的亲代脂类,诸如阳离子脂质二辛基癸酰胺甘氨酸精胺(DOGS,Transfectam,Promega)和二棕榈酰磷脂酰基乙醇戊基精胺(DPPES)(J.P.Belir(1986) Tetrahedron Lett.27,5861-5864;J.P.Behr等(1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA86,6982-6986);可代谢的季铵盐(DOTB,N-(1-[2,3-二油酰氧基]丙基)-N,N,N-三甲胺甲磺酸盐(DOTAP)(Boehringer Mannheim),聚乙烯亚胺(PEI),二油酰酯,ChoTB,ChoSC,DOSC)(Leventis等(1990) Biochim.Inter.22,235-241);3β[N-(N,N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰]胆固醇(DC-Chol),以1:1混合的二油磷脂酰乙醇胺(DOPE)/3β[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰]胆固醇DC-Chol(Gao等,(1991) Biochim.Biophys.Acta 1065,8-14),精胺,精脞,脂多胺(Behr等,Bioconjugate Chem, 1994,5:382-389),亲脂性多聚赖氨酸(LPLL)(Zhou等,(1991) Biochim.Biophys.Acta 939, 8-18),氢氧化[[ (1,1,3,3-四甲基丁基) 甲苯氧基]乙氧基]乙基)二甲基苄基氢氧化铵(氢氧化DEBDA)与过量的磷脂酰胆碱/胆固醇(Ballas等,(1988) Biochim.Biophys.Acta 939, 8-18),溴化十六烷基三甲胺(CTAB)/DOPB混合物(Pinnaduwege等,(1989) Biochim.Biophys.Acta 985,33-37),亲脂性的谷氨酸二酯(TMAG)与DOPE,CTAB,DEBDA,溴化双十二烷基铵(DDAB),和硬脂胺与磷脂酰乙醇胺的混合物(Rose等人,(1991) Biotechnology 10,520-525),DDAB/DOPE(TransfectACE,GIBCO BRL),和含有脂类的寡聚半乳糖。可以提高转移效率的转染增强剂包括,例如,DEAE-葡聚糖,多聚季胺,破溶酶体肽(Ohmori N I等,Biochem Biophys Res Commun 1997年6月27日;235(3):726-9),基于软骨素的蛋白聚糖,硫酸化蛋白聚糖,聚乙烯亚胺,多聚赖氨酸(Pollard H等,J Biol Chem, 1998 273(13):7507-11),整合素结合肽CYGGRGDTF,非糖类线性葡聚糖,甘油,连接于寡核苷酸3'-末端核苷间键的胆固醇基团(Letsinger,R.L.1989 Proc Natl Acad Sci USA 86:(17):6553-6),溶血磷脂,溶血磷脂胆碱,溶血性磷脂酰乙醇胺和1-油基溶血磷脂胆碱。

[0336] 在某些情况下,可能需要一同递送核酸和能使携带核酸的载体导向靶细胞的试剂。这样的靶向分子包括:靶细胞表面膜蛋白的特异性抗体、或靶细胞上受体的配体。使用脂质体时,可利用能与细胞表面胞吞作用相关膜蛋白相结合的蛋白进行靶向和/或促进摄取。这类蛋白质的例子包括:对特定细胞类型具有嗜性的衣壳蛋白及其片段,在循环过程中经历内化的蛋白质的抗体,和靶向胞内定位和延长胞内半衰期的蛋白。在其它实施例中,可以利用受体介导的胞吞作用。这些方法在例如Wu等,1987或Wagner等,1990中有所描述。对

于当前已知的基因标记和基因治疗方案的综述,可参见Anderson 1992。也可参见W0 93/25673及其中引用的参考资料。对于基因治疗技术方面的其他综述,参见Friedmann, *Science*, 244:1275-1281 (1989); Anderson, *Nature*, 392卷(增补), No6679, 25-30页(1998); Verma, *Scientific American*:68-84(1990); 和Miller, *Nature*, 357:455460 (1992)。

#### [0337] 筛选方法

[0338] 有效的治疗依赖于鉴定到有效且无明显毒性的制剂。可用本领域已知方法根据结合亲和力筛选抗体。例如,可采用凝胶移位试验、Western印迹、放射性标记竞争试验、层析共分级、共沉淀、交联、ELISA等,在(例如)《新编分子生物学实验指南》(*Current Protocols in Molecular Biology*) (1999) John Wiley&Sons, NY中有它们的描述,全文纳入本文作为参考。

[0339] 为了初筛能结合M-CSF上所需表位的抗体(如阻断RX1、5H4、MC1和/或MC3与M-CSF结合的抗体),可进行如《抗体,实验室手册》(*Antibodies, A Laboratory Manual*), Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow和David Lane (1988)中所描述的常规交叉阻断试验。也可采用常规竞争性结合试验,该试验中未知抗体的特征是能够抑制M-CSF与本发明M-CSF特异性抗体的结合。可采用完整M-CSF、其片段、或如图12M-CSF氨基酸98-105代表的线性表位,或图12氨基酸65-73或138-144代表的线性表位(对应于5H4或MC3识别的M-CSF表位)。Champe等, *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995)中描述了表位图。

[0340] 还要考虑到下一步测试这些抗体对破骨细胞生成的作用,然后给予动物。可采用多种试验筛选在预防或治疗癌转移相关骨质损失中具有潜在用途的化合物。例如,可先在细胞培养系统中表征候选的拮抗剂以确定其能否中和M-CSF诱导破骨细胞生成的能力。这类系统可包括鼠颅腔破骨细胞与脾细胞的共培养系统(Suda等,破骨细胞分化的调控, *Endocr. Rev.* 13:66-80, 1992; Martin和Udagawa, *Trends Endocrinol. Metab.* 9:6-12, 1998), 鼠基质细胞系(例如, MC3T3-G2/PA6和ST2)与鼠脾细胞的共培养系统(Udagawa等, *Endocrinol* 125:1805-13, 1989), 以及ST2细胞和骨髓细胞、外周血单核细胞或肺泡巨噬细胞的共培养系统(Udagawa等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7260-4, 1990; Sasaki等, *Cancer Res.* 58:462-7, 1998; Mancino等, *J. Surg. Res.* 100:18-24, 2001)。在没有M-CSF拮抗剂存在时,这类共培养系统中形成的多核细胞符合破骨细胞的主要标准,如酒石酸耐受的酸性磷酸酶(TRAP, 破骨细胞的标志酶)活性、降钙素受体、p60C-STS, 玻联蛋白受体和在骨和牙片上形成重吸收坑的能力。有效的M-CSF拮抗剂的存在能抑制这类多核细胞的形成。

[0341] 除了上述的共培养系统外,也可在无基质细胞或无破骨细胞的系统中检测候选的M-CSF抗体抑制破骨细胞生成的能力。破骨细胞生成所需的M-CSF可由共培养的转移性癌细胞(例如MDA 231)提供或由这些癌细胞的条件培养基提供(Mancino等, *J. Surg. Res.* 0:18-24, 2001), 或者可以加入纯化的M-CSF。

[0342] 给定的M-CSF抗体预防或治疗癌转移相关骨质损失的功效,也可以在任何动物骨质损失模型系统中测定,这些系统是本领域技术人员熟知的。这类模型系统包括,直接将肿瘤细胞注射入骨髓腔(Ingall, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 117:819-22, 1964; Falasko, *Clin. Orthop.* 169:20-7, 1982)、注射入大鼠腹主动脉(Powles等, *Br. J. Cancer* 28:316-21, 1973)、注射入小鼠尾部侧静脉或左心室的系统(Auguello等, *Cancer Res.* 48:6876-81, 1988)。在没有有效的M-CSF拮抗剂存在时,注入肿瘤细胞形成的溶骨性转移(溶骨病变区域

的)可用放射显影图来确定或用(骨及软组织的)组织学和免疫组化方法确定。Sasaki等, *Cancer Res.* 55:3551-7, 1995; Yoneda等, *J. Clin. Invest.* 99:2509-17, 1997. Clohisy和 Ramnaraine, *Orthop Res.* 16:660-6, 1998. Yin等, *Clin. Invest.* 103:197-206, 1999. 存在有效的M-CSF抗体时,可以预防或抑制溶骨性转移,使得转移病灶数量减少,和/或体积减小。

[0343] 本发明的M-CSF抗体也可用于预防或治疗癌转移。候选的M-CSF抗体在预防或治疗癌转移方面的功效,可用人羊膜基底膜侵入模型进行筛选,如Filderman等, *Cancer Res.* 52:3661-6, 1992中所述。此外,还可采用各种类型癌症转移的动物模型系统加以检测。这类模型系统包括但不限于:Wenger等, *Clin. Exp. Metastasis* 19:169-73, 2002; Yi等, *Cancer Res.* 62:917-23, 2002; Tsutsumi等, *Cancer Lett* 169:77-85, 2001; Tsingotjidou等, *Anticancer Res.* 21:971-8, 2001; Wakabayashi等, *Oncology* 59:75-80, 2000; Culp和 Kogerman, *Front Biosci.* 3:D672-83, 1998; Runge等, *Invest Radiol.* 32:212-7; Shioda等, *J. Surg. Oncol.* 64:122-6, 1997; Ma等, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37:2293-301, 1996; Kuruppu等, *J Gastroenterol Hepatol.* 11:26-32, 1996中所述的系统。在存在有效的M-CSF抗体的情况下,可以预防或抑制癌转移,使得转移病灶数量更少,和/或体积更小。

[0344] 具体的M-CSF抗体或M-CSF抗体的组合物的抗肿瘤活性,可以用合适的动物模型进行体内评估。例如,可将异源淋巴瘤模型中的人淋巴细胞引入免疫受损的动物,如裸鼠或 SCID小鼠。也可以用测定肿瘤形成、肿瘤复发或转移等抑制的试验来预测其功效。

[0345] 在体外试验的一种变化形式中,本发明提供一种方法,该方法包括以下步骤:(a)使固定的M-CSF与某候选抗体接触;(b)检测该候选抗体与M-CSF的结合。在另一实施例中,固定候选抗体,检测M-CSF与其的结合。固定可以用本领域熟知的任何方法完成,包括与载体、珠、或层析树脂共价键合,以及非共价的高亲和力相互作用(如抗体结合或利用链霉抗生物素蛋白/生物素结合,其中固定的化合物包含生物素组分)。结合的检测可采用(i)非固定化合物上的放射性标记,(ii)非固定化合物上的荧光标记,(iii)非固定化合物的免疫特异性抗体,(iv)非固定化合物上的标记,该标记能够激发与固定化合物结合的载体发射的荧光,也可以采用本领域熟知并常规使用的其它方法。

[0346] 能调节(即增强、减弱或阻断)M-CSF活性或表达的抗体,可以如下鉴定:将某假定的调节剂与表达M-CSF的细胞一同培养,测定该假定调节剂对M-CSF活性或表达的影响。能调节M-CSF多肽或多核苷酸的抗体的选择性可通过比较其对M-CSF多肽或多核苷酸的作用和对其它相关化合物的作用而加以评估。选择性调节剂可包括例如,能特异性结合M-CSF多肽或编码M-CSF多肽的核酸的抗体和其它蛋白质、肽、或有机分子。M-CSF活性调节剂可治疗涉及正常或异常M-CSF多肽活性的疾病和生理状况。

[0347] 本发明还包括,鉴定能与M-CSF多肽相互作用或抑制其生物活性(即抑制其酶活性、结合活性等)的抗体的高通量筛选(HTS)试验。HTS试验能够有效地筛选大量化合物。考虑可将基于细胞的HTS系统用于探查M-CSF多肽与其结合伙伴之间的相互作用。设计的HTS试验,可用于鉴定具有所需性能的“命中化合物”(hit)或“先导化合物”,设计对其进行修饰来改善所需活性。对“命中化合物”或“先导化合物”,常根据“命中化合物”与M-CSF多肽之间的可鉴定结构/活性关系进行化学修饰。

[0348] 本发明另一方面涉及鉴定能调节(即降低)M-CSF活性的抗体的方法,该方法包括使M-CSF与某抗体接触,和确定该抗体是否调节了M-CSF的活性。比较测试抗体存在时的活

性与没有测试抗体时的活性。当含有测试抗体的样品活性低于缺少测试抗体样品的活性时,该抗体具有抑制活性。

[0349] 各种异源系统可用于本领域技术人员熟知的重组多肽的功能性表达。这些系统包括细菌(Strosberg等,Trends in Pharmacological Sciences (1992) 13:95-98)、酵母(Pausch,Trends in Biotechnology (1997) 15:487-494)、几种昆虫细胞(Vanden Broeck, Int.Rev.Cytology (1996) 164:189-268)、两栖类细胞(Jayawickreme等,Current Opinion in Biotechnology (1997) 8:629-634)和几种哺乳动物细胞系(CHO、HEK293、COS等;参见Gerhardt等,Eur.J.Pharmacology (1997) 334:1-23)。这些例子不排除采用其它可能的细胞表达系统,包括获自线虫的细胞系(PCT申请WO 98/37177)。

[0350] 在本发明的一个实施方式中,调节M-CSF活性的抗体的筛选方法包括:使待测抗体与M-CSF多肽接触,并检测抗体与M-CSF之间是否形成复合物。在这类试验中,配体通常是带有标记的。适当培育后,将游离的配体与结合形式配体分离,游离的未形成复合物的标记物量,可作为特定抗体与M-CSF或M-CSFR多肽结合能力的一种衡量。

[0351] 在本发明的另一实施方式中,采用高通量筛选方法筛选对M-CSF多肽具有合适结合亲合力的抗体片段或CDR。简单来说,在固体基质上合成大量不同的小肽测试化合物。使这些肽测试化合物与M-CSF多肽接触并洗涤。然后,用本领域熟知的方法检测结合的M-CSF多肽。也可将本发明纯化的多肽直接包被在板上,用于上述药物筛选技术。此外,可用非中和抗体捕捉蛋白质并将其固定在固体支持物上。

#### [0352] 联合疗法

[0353] 鉴定了一种以上在动物模型中有效的M-CSF抗体以后,优选将两种或多种此类M-CSF抗体混合以进一步提高对癌转移和/或癌转移相关骨质损失的疗效。可将含有一种或多种M-CSF抗体的组合物给予患者、或容易罹患癌转移和/或癌转移相关骨质损失的人或哺乳动物。联合给予两种治疗药物不需要同时或以相同途径给予这两种治疗药物,只要在这些治疗药物发挥疗效的时间有重叠。可考虑同时或依次给药,如在不同日或周给药。

[0354] 尽管M-CSF抗体治疗可用于癌症的所有阶段,但抗体治疗尤其适合晚期或转移性癌症。对没有接受过化疗的病人优选抗体治疗与化疗或放疗联合使用,而接受过一种或更多种化疗的病人更适合应用抗体治疗。此外,抗体治疗还能降低联用的化疗药物剂量,尤其是对化疗药物毒性不能很好耐受的病人。

[0355] 本发明方法包括给予一种抗M-CSF抗体或联合使用不同抗体的“混合物”。这样的抗体混合物具有某些优点,因为它们含有的抗体具有不同的效应器机制,或者可将具有直接细胞毒性的抗体与依赖免疫效应器功能的抗体联合使用。这类组合抗体可能显示协同治疗效果。

[0356] 联用RX1或RX1抗体的Human Engineered™衍生物与其它疗法可能对破骨细胞疾病和/或肿瘤生长或转移患者有效。例如,可用RX1抗体制造治疗骨质溶解病患者的药物,所述药物与采用抗RANKL抗体、可溶性RANKL受体、其它RANKL抑制剂或二膦酸盐(如Aredia; Zometa; 氯屈膦酸盐)的治疗联用。或者,可用抗-RANKL抗体或二膦酸盐制造治疗骨质溶解病患者的药物,所述药物与用RX1抗体或RX1抗体的Human Engineered衍生物治疗联合起作用。这种联合在所治疗的患者中也可能有协同作用。RX1抗体和其它治疗不需要同时给予。给予RX1或其工程改造的人变体和其它治疗可互相间隔1天、1周、2周、4周、2个月、3个月、6

个月、1年或2年。

[0357] 本发明也考虑利用RX1抗体或RX1抗体的Human Engineered™衍生物制造治疗骨质溶解病患者的药物,所述药物用于曾经用抗-RANKL抗体或二膦酸盐预治疗的患者。“曾经治疗”指患者在用RX1或RX1的Human Engineered™变体治疗前2年、1年、6个月、3个月、2个月、1个月、2周、1周、或至少1天曾经治疗过。

[0358] RX1抗体或Human Engineered™变体可与其它抗癌治疗联用。例如,可利用RX1抗体或Human Engineered变体制造治疗癌症患者的药物,所述药物与采用其它治疗剂和/或方法的治疗联用,其它治疗剂和/或方法包括但不限于:各种化疗药、雄激素阻断剂和免疫调节剂(如IL-2、GM-CSF、SLC)、二膦酸盐(如Aredia;Zometa;氯屈膦酸盐)、手术、放疗、细胞毒化疗、激素治疗(如它莫西芬;抗雄激素治疗)、抗体治疗(如中和RANKL/RANK的抗体;PTHrP中和抗体、抗Her2、抗CD20、抗CD40、CD22、VEGF、IGFR-1、EphA2、HAAH、TMEFF2、CAIX抗体)、治疗性蛋白质疗法(如可溶性RANKL受体;OPG以及PDGF和MMP抑制剂)、小分子药物治疗(如Src-激酶抑制剂)、生长因子受体的激酶抑制剂或RANKL抑制剂、寡核苷酸治疗(如RANKL或RANK或PTHrP反义核酸)、基因治疗(如RANKL或RANK抑制剂)、肽治疗(如RANKL的突变蛋白),以及本文所述的蛋白质、肽、化合物和小分子。

[0359] RX1和Human Engineered™变体可用于制造药物来治疗曾用上述疗法治疗过的患者。

[0360] 细胞毒剂指抑制或阻断细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语包括放射性同位素(如I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>和Re<sup>186</sup>)、化疗药和毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的酶学活性毒素或合成毒素,或其片段。非细胞毒剂指不能抑制或阻断细胞功能和/或不引起细胞破坏的物质。非细胞毒剂可包括经活化具有细胞毒性的物质。非细胞毒剂可包括珠、脂质体、基质或颗粒(参见例如:美国专利公开2003/0028071和2003/0032995,纳入本文作为参考)。这些制剂可与本发明抗体偶联、交联、连接或结合。

[0361] 癌症化疗药包括但不限于:烷化剂,如卡铂和顺铂;氮芥烷化剂;亚硝基脲烷化剂如卡莫司汀(BCNU);抗代谢剂,如甲氨蝶呤;叶酸;嘌呤类似物抗代谢剂,巯基嘌呤;嘧啶类似物抗代谢剂,如氟尿嘧啶(5-FU)和吉西他滨(Gemzar®);激素类抗肿瘤制剂,如瑞林、亮丙瑞林和它莫西芬;天然抗肿瘤制剂,如阿地白介素、白介素-2、多西他赛、依托泊甙(VP-16)、干扰素 $\alpha$ 、紫杉醇(泰素®)和维甲酸(ATRA);抗生素类天然抗肿瘤制剂,如博来霉素、放线菌素d、道诺霉素、多柔比星、道诺霉素和丝裂霉素包括丝裂霉素C;以及长春花生物碱类天然抗肿瘤制剂,如长春碱、长春新碱、长春地辛;羟基脲;醋葡醛内酯、阿霉素、异环磷酰胺、依诺他滨、环磷酰胺、阿克拉霉素、安西他滨、尼莫司汀、盐酸甲基胍、卡巴醌、卡铂、卡莫氟、色霉素A3、抗肿瘤多糖、抗肿瘤血小板因子、环磷酰胺(Cytosin®)、裂裯菌素、阿糖胞苷(胞嘧啶阿拉伯糖苷)、达卡巴嗪、硫磺菊素、硫替派、替加氟、多拉司他汀、多拉司他汀类似物如耳他汀(auristatin)、CPT-11(伊立替康)、米托蒽醌、长春瑞滨、替尼泊苷、氨蝶呤、洋红霉素、esperamicins(参见例如:美国专利号4,675,187)、新抑癌蛋白、OK-432、博来霉素、福他隆(furtulon)、溴尿苷、二甲磺酸丁酯、磷酸己烯雌酚四钠、培洛霉素、贝他定(乌苯美司®)、干扰素- $\beta$ 、美雄烷、二溴甘露醇、美法仑、核纤层肽、蘑菇多糖、采绒革盖菌提取物、替加氟/尿嘧啶、雌莫司汀(雌激素/氮芥(mechlorethamine))。

[0362] 此外,其它用作癌症病人治疗剂的制剂包括EPO、G-CSF、更昔洛韦;抗生素、亮丙瑞林;哌替啶;叠氮胸苷(AZT);白介素1至18,包括其突变物和类似物;干扰素或细胞因子,如干扰素 $\alpha$ 、 $\beta$ 、和 $\gamma$ 激素,如促黄体(生成)激素释放激素(LHRH)及其类似物以及促性腺激素释放激素(GnRH);生长因子,如转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、成纤维细胞生长因子(FGF)、神经生长因子(NGF)、生长激素释放因子(GHRF)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子同源因子(FGFHF)、肝细胞生长因子(HGF)、和胰岛素生长因子(IGF);肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和 $\beta$ (TNF- $\alpha$ & $\beta$ );侵入抑制因子-2(IIF-2);骨形态发生蛋白1至7(BMP1-7);生长抑素(somatostatin);胸腺素- $\alpha$ -1; $\gamma$ -球蛋白;超氧化物歧化酶(SOD);补体因子;抗血管生成因子;抗原物质;和前药。

[0363] 前药指药学活性物质的前体或衍生形式,它与母体药物相比对肿瘤细胞的细胞毒性较低或无细胞毒性但能够被酶活化或转化为活性或活性比母体更高的形式。参见例如:Wilman,“癌症化疗中的前药”(Prodrugs in Cancer Chemotherapy)Biochemical Society Transactions,14,375-382页,第615届贝尔法斯特会议(1986)和Stella等,“前药:靶向药物递送的化学方法”(Prodrugs:A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery),Directed Drug Delivery,Borchardt等编,247-267页,Humana Press(1985)。前药包括但不限于:含磷酸的前药,含硫代磷酸的前药,含硫酸的前药,含肽-前药,D-氨基酸修饰的前药,糖基化前药,含 $\beta$ -内酰胺的前药,含任选取代的苯氧基乙酰胺的前药或含任选取代的苯基乙酰胺的前药,5-氟胞嘧啶和其它5-氟尿苷前药,它们可转变为活性更高的细胞毒性游离药物。可衍生为本文所用前药形式的细胞毒药物的例子包括但不限于:上述化疗药。

#### [0364] 给药和制剂

[0365] 可将用于实施本发明方法的抗M-CSF抗体配制到包含适合所需递送方法的运载体的药物组合物中。合适的运载体包括当与抗M-CSF抗体联用时能保留抗体的抗肿瘤功能而不引起对象免疫系统应答的物质。例子包括但不限于:标准药物运载体之一如灭菌的磷酸盐缓冲溶液、抑菌水等。可采用各种水性运载体,如水、缓冲水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸等,其中可包括其它蛋白质以增强稳定性,如清蛋白、脂蛋白、球蛋白等,进行温和的化学修饰等。

[0366] 通过混合具有所需纯度的抗体与任选的生理上可接受的运载体、赋形剂或稳定剂(《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第16版,0sol,A编(1980))制备用于贮存的冻干制剂或水溶液形式的抗体治疗制剂。可接受的运载体、赋形剂或稳定剂应在所用剂量和浓度下对接受者无毒,包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵;杀藻胺,苜索氯铵;苯酚、丁基或苄基醇;烷基对羟基苯甲酸酯类如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇和间甲酚);低分子量(不到约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,组氨酸,精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其它糖,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反荷离子如钠;金属复合物(如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂如吐温<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>或聚乙二醇(PEG)。

[0367] 本文的制剂也可按需要包含一种以上用于治疗特定适应症的活性化合物,优选含

有不会互相负面影响的有补充活性的化合物。例如,还可能需要提供免疫抑制剂。这种分子适合以有效达到所需目的的量共同存在。

[0368] 也可通过(例如)凝聚技术或界面聚合将活性成分分别包裹在微胶囊如羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯(methylmethacrylate))微胶囊中,包裹在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗乳液中。这些技术公开于《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第16版,0sol,A编(1980)。

[0369] 用于体内给药的制剂必须灭菌。这不难通过除菌滤膜完成。

[0370] 通过合适途径给予这些抗体,包括胃肠道外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内,如果需要局部治疗,则包括病损内给药。胃肠道外输液包括静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮内或皮下给予。此外,抗体,尤其是剂量降低的抗体适合于通过脉冲输液给予。优选通过注射,最优选通过静脉内或皮下注射给予这些剂量,这部分取决于给药是短暂或长期性。考虑的其它给药方法,包括局部给药,具体是透皮、透粘膜、直肠、口腔或局部给药如通过安置在所需部位附近的导管给药。

[0371] 本发明组合物可以是(例如)粒剂、粉末剂、片剂、胶囊、糖浆、栓剂、注射剂、乳剂、酏剂、悬浮剂或溶液形式。可将本发明组合物配制成用于各种给药途径例如口服给药、鼻给药、直肠给药、皮下给药、静脉内注射、肌肉内注射或腹膜内注射的制剂。以下剂型以举例的方式给出,不应认为它们限制本发明。

[0372] 对于口服、含服和舌下给药,可接受的固态剂型有:粉末、悬浮剂、颗粒、片剂、丸剂、胶囊、软胶囊、和小胶囊。其制备方法为,例如,混合本发明的一种或多种化合物,或药学上可接受的盐或其互变异构体,至少添加一种添加剂,如淀粉或其它添加剂。合适的添加剂有:蔗糖、乳糖、纤维素糖、甘露醇、麦芽糖醇、葡聚糖、淀粉、琼脂、藻酸盐、几丁质、壳聚糖、果胶、黄蓍胶、阿拉伯树胶、明胶、胶原蛋白、酪蛋白、白蛋白、合成或半合成的聚合物或甘油酯。或者,口服剂型可含有其它组分来辅助给药,如惰性稀释剂、或润滑剂如硬脂酸镁、或防腐剂如对羟基苯甲酸酯(paraben)或山梨酸、或抗氧化剂如抗坏血酸、维生素E或半胱氨酸,崩解剂、粘合剂、增稠剂、缓冲液、甜味剂、调味剂或芳香剂。片剂和丸剂还可以进一步用本领域已知的合适的包衣材料处理。

[0373] 口服的液态剂型是药学上可接受的乳化剂、糖浆、酏剂、悬浮剂和溶液形式,可以含有惰性的稀释剂,如水。药物剂型和药物可以用灭菌液体制备成液态悬浮剂或溶液形式,可用的灭菌液体例如但不限于:油、水、醇,及其组合物。可加入药学上合适的表面活性剂、悬浮剂、乳化剂以口服或肠道外方式给药。

[0374] 如上所述,悬浮剂可包括油类。这些油包括但并不限于:花生油、芝麻油、棉籽油、玉米油和橄榄油。悬浮剂也可含有脂肪酸酯,如油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、脂肪酸甘油酯、乙酰脂肪酸甘油酯。悬浮剂可含有醇类,例如但不限于:乙醇、异丙醇、十六烷基醇、甘油和丙二醇。醚类,例如但不限于:聚(乙烯醇)、石油类碳氢化合物(如矿物油和石蜡油);水也可以用于悬浮剂。

[0375] 对于鼻部给药,药物制剂和药物可以是含有合适溶剂和任选含有其它化合物(例如但不限于:稳定剂、抗微生物剂、抗氧化剂、pH调节剂、表面活性剂、生物利用度调节剂和这些物质的混合物)的喷雾或气溶胶。气溶胶制剂的推进剂可包括压缩的空气、氮气、二氧

化碳、或低沸点碳氢化合物。

[0376] 可注射的剂型通常包括水悬浮液或油悬浮液,可采用合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂进行制备。可注射剂型可以是溶液或为悬液形式,用溶剂或稀释剂制备。可接受的溶剂或运载体包括无菌水、林格氏溶液、或等渗盐水溶液。或者,可以用无菌油类作为溶剂或悬浮剂。优选的油或脂肪酸是非挥发性的,包括天然的或合成的油类、脂肪酸、单、双或三脂肪酸甘油酯。

[0377] 用于注射的药物制剂和/或药物可以适合用上述合适溶液重建的粉末。其例子包括但不限于:冷冻干燥、旋转干燥或喷雾干燥的粉末、无定形粉末、颗粒、沉淀物或粒子。用于注射的制剂可任选地含有稳定剂、pH调节剂、表面活性剂、生物利用度调节剂和这些制剂的混合物。

[0378] 对于直肠给药,药物制剂或药物可以是栓剂、软膏、灌肠剂、片剂或霜剂形式,使化合物在小肠、乙状结肠和/或直肠中释放。通过混合本发明的一种或多种化合物或其药学上可接受的盐或异构体以及可接受的运载体(例如,可可脂或聚乙二醇,通常在储存温度下以固相形式存在,而在体内适合药物释放的温度下(如直肠中)以液相存在)来制备直肠栓剂。也可用油制备软明胶和栓剂。水、盐水、葡萄糖水和相关的糖溶液、以及甘油可用来制备悬浮制剂,悬浮制剂还可含促悬浮剂,如果胶、卡波姆、甲基纤维素、羟丙纤维素或羧甲基纤维素,以及缓冲剂和防腐剂。

[0379] 可制备缓释制剂。缓释制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质是成形制品形式,如膜或微胶囊。缓释基质的例子包括:聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯),或聚(乙烯醇)),聚交酯(美国专利号3,773,919),L-谷氨酸和L-谷氨酸乙酯的共聚物,不可降解的乙烯-乙烯基乙酸酯,可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如Lupron Depot<sup>TM</sup>(由乳酸-乙醇酸共聚物和亮丙瑞林乙酸酯组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然聚合物如乙烯-乙烯基乙酸酯和乳酸-乙醇酸的共聚物释放分子可超过100天,但某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当包入胶囊的抗体在体内长时间保留时,它们可因37℃接触水分而变性或凝聚,导致失去生物学活性而可能改变免疫原性。可根据涉及的机制设计稳定化的合理方案。例如,如果发现凝聚机制是分子内通过硫-二硫互换形成S-S键,那么可通过修饰巯基残基、以酸性溶液冻干、控制水分含量、采用合适添加剂和开发特定的聚合物基质组合物实现稳定化。

[0380] 可设计本发明的制剂成为短时作用、快速释放、长时作用和持续释放制剂。因此,也可将该药物制剂制成控释或缓释制剂。

[0381] 本发明组合物还可以包括例如微胶粒或脂质体,或其它胶囊形式,从而可以长时间释放形式给药达到长时间贮存和/或递送效果。因此,可将所述药物制剂和药物压缩成药丸或药筒作为贮存注射物或作为植入物(如支架)植入肌肉内或皮下。这种植入物可以采用已知的惰性材料,如硅酮和生物可降解聚合物。

[0382] 除了上述典型剂型外,药学上可接受的赋形剂和运载体基本上是本领域技术人员熟知的,因此也包括在本发明中。这些赋形剂和运载体的描述可参见例如,《雷明顿药物科学》(Remingtons Pharmaceutical Sciences),Mack Pub.Co.,New Jersey(1991),作为参考引入本文。

[0383] 可根据患者病情、年龄、体重、总体健康情况、性别和饮食情况、剂量间隔、给药途

径、排泄速率和药物组合等调整具体剂量。任何含有有效剂量的上述剂型都属于常规实验范围内,因此也属于本发明范围内。

[0384] 通常,制备的用于治疗癌症转移或癌症转移相关骨质损失的M-CSF抗体基本上不含有其它天然存在的免疫球蛋白或其它生物分子。优选的M-CSF抗体当应用于罹患或易罹患癌症转移和/或癌症转移相关骨质损失的哺乳动物时表现出最低的毒性。

[0385] 本发明的组合物可以用常规、熟知的除菌技术除菌。得到的溶液在无菌条件下使用或过滤包装并冷冻干燥,应用前将冻干药品与无菌溶液混合。该组合物可含有药理学上可接受的适用于生理条件所需的辅助物质,如pH调节剂和缓冲剂、渗透性调节剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙和稳定剂(例如1.20%的麦芽糖等)。

[0386] 也可通过脂质体给予本发明M-CSF抗体,脂质体是由可用于递送药物(如本文所公开的抗体和任选的化疗药)的各种类型脂质和/或磷脂和/或表面活性剂组成的小囊泡。脂质体包括乳剂、泡沫、胶束、不溶性单层、磷脂分散体、薄片层等,可用作运载体使M-CSF抗体靶向特定组织并延长该组合物的半衰期。可用各种已有方法制备脂质体,如美国专利4,837,028和5,019,369所述,将这些专利纳入本文作参考。

[0387] 可用本领域已知方法来制备含有抗体的脂质体,如Epstein等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:3688(1985);Hwang等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030(1980);和美国专利号4,485,045和4,544,545所述。循环时间延长的脂质体公开于美国专利号5,013,556。可通过反相蒸发法用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物产生特别有用的脂质体。将脂质体通过孔径大小确定的滤器挤出可产生所需直径的脂质体。可将本发明抗体的Fab'片段通过二硫键互换反应偶联于脂质体,如Martin等,J.Biol.Chem.257:286-288(1982)所述。将化疗药(如多柔比星)任选地包含在脂质体中[参见例如:Gabizon等,J.National Cancer Inst.81(19):1484(1989)]。

[0388] 这些组合物中M-CSF抗体的浓度变化范围很宽,即其重量比例从低于约10%,通常至少约为25%,至高达约75%或90%,主要根据所选的具体给药方式,液体的体积、粘度等来选择。制备可口服、局部和肠胃外给药的化合物的实际方法是本领域技术人员熟知或明白的,详述见《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Science),第19版,Mack Publishing Co.,Easton,PA(1995),作为参考引入本文。

[0389] 对本发明化合物治疗患者癌症转移和/或癌症转移相关骨质损失的有效剂量的确定可用标准的经验方法来完成,这是本领域熟知的。例如,可采用能测定血清能否阻断M-CSF引发的鼠单核细胞(CD11b+细胞,CD11细胞的亚群,表达高水平的M-CSF受体)的增殖和存活的试验,来评价用某给定剂量M-CSF抗体治疗对象血清的中和活性。

[0390] 给予已患有或易患癌症转移和/或癌症转移相关骨质损失的哺乳动物本发明组合物,其用量要能足以预防或至少部分抑制癌症转移和/或癌症转移相关骨质损失的发展。足够达到此效果的剂量定义为“治疗有效剂量”。M-CSF抗体的有效剂量可根据疾病的严重性和受治病人的体重和总体状况而不同,但通常为约1.0 $\mu$ g/kg至约100mg/kg体重,或约10 $\mu$ g/kg至约30mg/kg体重,更常用的剂量为每次应用约0.1mg/kg体重至约10mg/kg体重或约1mg/kg体重至约10mg/kg体重。例如,约10 $\mu$ g/kg-5mg/kg或约30 $\mu$ g/kg-1mg/kg抗体是通过例如一次或多次分开给予或连续输注给予患者的起始候选剂量。根据药物对疾病的反应和病人对治疗的耐受情况,可以每日、隔日、每周或以更低的频率给药。可能需要在一段较长的时间,

如4、5、6、7、8、10或12周或更长时间内维持剂量,直到抑制疾病症状,而剂量也可根据需要进行调整。不难用常规技术和试验监测该治疗过程。

[0391] 该组合物可以一次或多次给予,由主治医师选择其剂量水平和给药方式。为了预防或治疗疾病,该抗体的合适剂量将取决于待治疗疾病的类型(如上所述)、疾病的严重性和病程、给予抗体是为了预防还是治疗、先前的治疗、患者的临床病史和对该抗体的反应,以及主治医师的判断。该抗体适合一次或在一系列治疗中给予患者。

[0392] 在任何情况下,这些制剂应能随时间推移提供足够量的M-CSF抗体以有效预防癌症转移和/或癌症转移相关骨质损失或使其严重性降至最低。本发明的组合物可单独给药或作为辅助治疗与本领域已知的其它疗法联合使用来治疗癌症转移和/或癌症转移相关骨质损失。

[0393] 以与良好医疗实践一致的方式进行抗体组合物的配制、计量和给药。这里要考虑的因素包括治疗的具体疾病、治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、病因、递送药物的部位、给药方法、给药方案和医师了解的其它因素。上述考虑决定了待给予抗体的治疗有效量,是能预防、缓解或治疗M-CSF介导的疾病、病症或失调,特别是治疗癌细胞,最特别是治疗肿瘤细胞转移所必需的最小量。所述用量优选低于对宿主有毒性的或明显使宿主更易感染的用量。

[0394] 该抗体不需要,但任选地与目前使用的一种或多种药物配制在一起,以预防或治疗所述疾病。例如,在癌症治疗中,该抗体可与化疗剂联用或在上述ADEPT中给予。所述其它药物的有效量取决于该制剂中存在的抗体量,疾病、病症或失调或治疗的类型,以及上述其它因素。通常采用上述给药途径和相同的剂量,或采用上面所用剂量的约1-99%。

[0395] 在本发明的另一实施方式中,提供了含有用于治疗上述疾病、失调或病症,包括治疗癌症的材料的制品。该制品包括容器和标签。合适容器包括例如:瓶子、小瓶、注射器和试管。容器可由各种材料如玻璃或塑料制成。容器装有有效治疗病症的组合物,可具有无菌进入孔(例如容器可以是静脉内输液袋或带有可用皮下注射针头刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的活性物质是本发明抗体。容器上或与容器相连的标签说明了将该组合物可用于治疗选择的疾病。该制品还可包括第二个容器,其中装有药学上可接受的缓冲液,如磷酸缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。还可装有从商业和用户立场来看需要的其它物质,包括其它缓冲液、稀释液、滤器、针头、注射器和使用的包装说明书。

#### [0396] 免疫疗法

[0397] 用于治疗癌症患者的抗M-CSF抗体包括能诱导抗肿瘤强效免疫反应的抗体以及具有直接细胞毒性的抗体。在这方面,抗M-CSF抗体能够或者通过补体介导的机制或者抗体依赖的细胞毒性(ADCC)机制而引起肿瘤细胞裂解,这两种机制都要求免疫球蛋白分子有完整Fc部分而与效应细胞的Fc受体区域或与补体蛋白相互作用。此外,对肿瘤细胞的生长发挥直接生物学作用的抗M-CSF抗体也可用于实施本发明。这种直接细胞毒性抗体发挥作用的可能机制包括:抑制细胞生长,调节细胞分化,调节肿瘤血管生成因子的类型,以及诱导细胞凋亡。具体的抗M-CSF抗体发挥其抗肿瘤作用的机制可用设计的用于测定ADCC、ADMMC、补体介导的细胞裂解等方法加以评估,这是本领域众所周知的。

[0398] 在一个实施例中,实施免疫疗法采用对膜结合形式的M-CSF(M-CSF $\alpha$ )比分泌性形式M-CSF具有更高亲和力的抗体。例如,可制备能特异性结合M-CSF $\alpha$ 切割位点或其周围区

域,或特异性结合M-CSF $\alpha$ 毗邻膜的部分的抗体。这样的抗体同样有利于抑制可溶性的M-CSF $\alpha$ 活性部分的切割与释放。

[0399] 抗M-CSF抗体可以其“裸露”形式或非偶联形式应用,或者可以将治疗制剂与其偶联。在一个实施例中,抗M-CSF抗体用作辐射致敏剂。这类实施方式中,抗M-CSF抗体偶联于辐射致敏剂。如本文所用,术语“辐射致敏剂”定义为:以治疗有效剂量给予动物,可提高细胞对电磁辐射的敏感性和/或改善电磁辐射治疗疾病的疗效的分子(优选低分子量的分子)。能用电磁辐射治疗的疾病包括肿瘤疾病,良性和恶性的肿瘤,以及癌细胞。

[0400] 如本文所用,术语“电磁辐射”和“辐射”包括但不限于:波长在 $10^{-20}$ 至100米之间的辐射。本发明的优选实施方式采用的电磁辐射有:伽玛射线( $10^{-20}$ 至 $10^{-13}$ 米),X-射线( $10^{-12}$ 至 $10^{-9}$ 米),紫外光(10nm至400nm),可见光(400nm至700nm),红外射线(700nm至1.0mm),和微波辐射(1mm至30cm)。

[0401] 已知辐射致敏剂能够提高癌细胞对电磁辐射毒性作用的敏感性。目前,很多癌症治疗方案都利用能用X-射线电磁辐射激活的辐射致敏剂。例如,X-射线激活的辐射致敏剂包括但不限于以下几种:甲硝哒唑,米索硝唑,脱甲基米索硝唑,哌莫硝唑,依他硝唑,尼莫唑,丝裂霉素C,RSU 1069,SR 4233,E09,RB 6145,烟酰胺,5-溴脱氧尿嘧啶(BUdR),5-碘脱氧尿嘧啶(IUdR),溴脱氧胞嘧啶,氟脱氧尿嘧啶(FUdR),羟基脲,顺铂,以及它们的治疗有效类似物和衍生物。

[0402] 癌症的光动力治疗(PDT)采用可见光作为致敏剂的辐射激活剂。光动力辐射致敏剂的例子包括(但并不限于)下列物质:血卟啉衍生物、光敏素(r) [Photofrin(r)]、苯卟啉衍生物、Npe6、本卟啉锡(SnET2)、脱镁叶绿甲酯酸-a(Pheoborbide-a)、菌叶绿素a(bacteriochlorophyll-a)、萘青色素(naphthalocyanines)、酞菁染料、酞菁锌、以及它们的治疗有效类似物和衍生物。

[0403] 在另一实施方式中,可将该抗体偶联于受体(如链霉抗生物素蛋白),预备用于肿瘤靶向,将该抗体-受体偶联物给予患者,然后用清除剂从循环系统中去除未结合的偶联物,再给予偶联有细胞毒制剂(如放射性核素)的配体(如抗生物素蛋白)。

[0404] 本发明还提供了上述带有可检测标记形式的抗体。可以利用放射性同位素标记、亲和标记(如生物素、亲和素等)、酶标记(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)、荧光或发光或生物发光标记(如FITC或罗丹明等)、顺磁原子等给抗体加上可检测标记。实施这类标记的方式是本领域熟知的;参见例如(Sternberger,L.A.等,J.Histochem.Cytochem.18:315(1970);Bayer,E.A.等,Meth.Enzym.62:308(1979);Engval,E.等,Immunol.109:129(1972);Goding,J.W.J.Immunol.Meth.13:215(1976))。

[0405] “标记”指直接或间接偶联于抗体的可检测化合物或组合物。标记本身可以是可检测的(如放射性同位素标记或荧光标记),或者,就酶标记而言,可催化底物化合物或组合物发生化学变化而可检测。或者,标记自己是不可检测的,但可以是被另一种可检测物质结合的元素(如表位标签或结合对之一如生物素-抗生物素蛋白等)。因此,抗体可包含有助于其分离的标记或标签,用于鉴定抗体的本发明方法包括通过与标记或标签相互作用分离M-CSF/抗体的步骤。

[0406] 示范的治疗性免疫偶联物包括偶联于细胞毒剂如化疗药、毒素(如细菌、真菌、植物或动物来源的有酶活性的毒素,或其片段)、或放射性同位素(即放射性偶联物)的本文所

述抗体。下面进一步详述融合蛋白。

[0407] 美国专利号6,306,393中描述了产生免疫偶联物的方法。可将治疗药物间接偶联于抗体组分来制备免疫偶联物。通用技术见Shih等, *Int. J. Cancer* 41:832-839 (1988); Shih等, *Int. J. Cancer* 46:1101-1106 (1990); 和Shih等, 美国专利号5,057,313。通用技术包括使含有氧化糖部分的抗体组分与含有至少一个游离氨基和加载有多个药物、毒素、螯合剂、硼附加物或其它治疗剂的运载体聚合物反应。此反应先产生Schiff碱(亚胺)连接,通过还原为仲胺形成最终偶联物而稳定化。

[0408] 优选的运载体聚合物是至少含有50个氨基酸残基的氨基葡聚糖或多肽,尽管也可采用其它基本上等价的聚合物载体。优选最终的免疫偶联物可以溶解于水溶液中,如哺乳动物的血清,这样便于给药和在治疗中有效靶向。因此,载体聚合物的溶解功能将会增强最终的免疫偶联物的血清溶解度。尤其优选氨基葡聚糖。

[0409] 用氨基葡聚糖载体制备免疫偶联物的程序通常从葡聚糖聚合物开始,优选平均分子量约10,000-100,000的葡聚糖。葡聚糖与氧化剂的反应影响其糖环中的一部分,进行可调控的氧化而产生醛基,根据常规程序,可方便地用糖醇解化学试剂如 $\text{NaIO}_4$ 来完成氧化。

[0410] 然后,使氧化的葡聚糖与多胺反应(优选二胺,更优地为单羟基或多羟基二胺)。合适的胺包括乙二胺,丙二胺,或其它的诸如聚亚甲基二胺,二亚乙基三胺或多胺,1,3-二胺-2-羟基丙烷,或其它类似的羟基二胺或多胺,等等。相对于葡聚糖的醛基,所用的胺要过量,以保证醛基完全转变成Schiff碱基。

[0411] 采用 $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{NaBH}_3$ ,  $\text{CN}$ 等还原剂使产生的Schiff碱中间物还原而稳定。可将所得的加合物通过常规的分子大小层析柱除去交联的葡聚糖而得到纯化。

[0412] 也可用其它常规方法处理葡聚糖引入氨基,例如,与溴化氰反应后再与二胺反应。

[0413] 然后使氨基葡聚糖与要加载的特定药物的衍生物、毒素、螯合剂、免疫调节剂、硼附加物(addend)或其他治疗药物反应,它们为活化形式,优选用常规方法制备的羧基活化衍生物,例如,用二环己基碳二亚胺(DCC)或其水溶性变体来形成中间加合物。

[0414] 或者,可将例如商陆抗病毒蛋白或蓖麻毒素的A链等多肽毒素偶联于氨基葡聚糖上,方法为戊二醛缩合或使该蛋白质上的活化羧基与氨基葡聚糖上的氨基反应。

[0415] 放射性金属或磁共振增强剂的螯合剂是本领域熟知的。典型的有乙二胺四乙酸(EDTA)和二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)的衍生物。通常可通过这些螯合剂侧链基团使螯合剂连接于载体。这样的基团包括例如:苯甲基异硫氰酸盐,DTPA或EDTA可以通过它偶联于载体的氨基。或者,螯合剂上的羧基或氨基可经活化偶联于载体,或者先制备其衍生物再偶联,这些都是熟知的方法。

[0416] 硼附加物,如碳硼烷,可用常规方法连接于抗体组分。例如,如本领域熟知的,碳硼烷可用悬挂侧链上的羧基制备。可通过碳硼烷的活化羧基与载体上的氨基缩合而将碳硼烷连接于载体,如氨基葡聚糖,产生中间体偶联物。然后,将该中间体偶联物再连接于抗体组分产生有效的治疗免疫偶联物,如下所述。

[0417] 多肽载体可以替代氨基葡聚糖使用,但是多肽载体链至少应含有50个氨基酸残基,优选含有100-5000个氨基酸残基。这些氨基酸中至少一些应为赖氨酸残基或谷氨酸或天冬氨酸残基。赖氨酸残基上悬挂的氨基和谷氨酸以及天冬氨酸残基上悬挂的羧基便于连接药物、毒素、免疫调节剂、螯合剂、硼附加物或其它治疗制剂。合适的多肽载体实例包括多

聚赖氨酸、多聚谷氨酸、多聚天冬氨酸、它们的共聚物,以及这些氨基酸和其它氨基酸(例如,丝氨酸)的混合聚合物,从而使得到的加载载体和免疫偶联物具有所需的溶解性能。

[0418] 中间体偶联物与抗体组分的偶联可通过氧化抗体组分的糖部分并使所得的醛(或酮)羰基与加载了药物、毒素、免疫调节剂、螯合剂、硼附加物或其它的治疗制剂后仍残留在载体上的氨基反应而实现。或者,可在加载了治疗制剂后,通过引入中间体偶联物的氨基,使中间体偶联物与氧化的抗体组分相连。氧化可方便地用化学方法,例如用 $\text{NaIO}_4$ 或其它糖酵解试剂实现,或者用酶的方法,例如用神经氨酸酶和半乳糖氧化酶。在用氨基葡聚糖作为载体时,通常并非氨基葡聚糖的所有氨基都用于加载治疗制剂。氨基葡聚糖中剩余的氨基可与氧化的抗体组分缩合形成Schiff碱加成物,然后通过还原而稳定,通常用硼氢化物还原剂进行还原。

[0419] 类似步骤也用于产生本发明的其它免疫偶联物。加载的多肽载体优选含有剩余的游离赖氨酸残基,可与抗体组分的氧化糖部分缩合。

[0420] 多肽载体上的羧基(如需要)可用例如DCC活化后与过量的二胺反应转化成胺。

[0421] 最终的免疫偶联物用常规方法纯化,如在Sephacryl S-300上进行分子大小层析或用一个或多个CD84Hy抗原表位进行亲和层析。

[0422] 或者,可以直接将抗体组分与治疗制剂偶联来制备免疫偶联物。通用步骤与间接偶联方法类似,除了治疗制剂直接连接于氧化的抗体组分处。

[0423] 应理解可用其它治疗制剂取代本文所述的螯合剂。本领域技术人员有能力不经过过多实验设计出偶联方法。

[0424] 作为进一步说明,治疗制剂可通过形成二硫键而连接于还原抗体组分的铰链区。例如,可在破伤风类毒素多肽上构建一个半胱氨酸残基,用它使该肽连接于抗体组分。或者,可用异双功能交联剂(如N-琥珀酰亚胺3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP))将这类肽连接于抗体组分。Yu等,Int. J. Cancer 56:244 (1994)。偶联所用的通用技术是本领域熟知的。参见,例如,Wong,蛋白偶联和交联化学(CRC出版1991);Upeslakis等,“用化学方法修饰抗体”《单克隆抗体:原理和应用》,Birch等编,187-230页(Wiley-Liss, Inc. 1995);Price,“合成肽衍生抗体的生产及表征”《在单克隆抗体中:生产、工程改造和临床应用》,Ritter等编,60-84页(Cambridge University Press 1995)。

[0425] 抗体和细胞毒剂的偶联物可用各种双功能蛋白偶联剂制备,如N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(iminothiolane, IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如己二酰亚氨酸二甲酯盐酸盐)、活化酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(如戊二醛)、双叠氮化合物(如双(对-叠氮苯甲酰)己烷二胺)、双重氮衍生物(如双(对-重氮苯甲酰)-亚乙基二胺)、二异硫氰酸酯(如甲代亚苯基(tolyene) 2,6-二异硫氰酸酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可如Vitetta等,Science 238:1098 (1987)所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14-标记的1-异硫氰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核素偶联于抗体的示范性螯合剂(参见例如:W094/11026)。

[0426] 如上所述,可利用抗体Fc区中的糖组分偶联治疗制剂。然而,如果用作免疫偶联物抗体组分的抗体片段缺失Fc片段,可将糖组分引入抗体或抗体片段的轻链可变区中。参见例如,Leung等,J. Immunol. 154:5919 (1995);Hansen等,美国专利5,443,953。可用工程改造加入的糖组分连接治疗制剂。

[0427] 此外,本领域技术人员知道很多偶联方法的可能变化形式。例如,糖组分可以用来连接聚乙二醇以延长完整抗体、或其结合片段在血液、淋巴液或其它细胞外液中的半衰期。而且,可以通过将治疗制剂连接于糖组分和游离的巯基构建“二价的免疫偶联物”。这类游离巯基可位于抗体组分的铰链区。

#### [0428] 抗M-CSF抗体融合蛋白

[0429] 本发明考虑采用含一个或多个抗M-CSF抗体部分和免疫调节剂或毒素部分的融合蛋白。制备抗体融合蛋白的方法是本领域熟知的。参见,例如美国专利6,306,393。含有白介素-2的抗体融合蛋白描述于Boleti等,Ann.Oncol.6:945(1995),Nicolet等,Cancer Gene Ther.2:161(1995),Becker等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 93:7826(1996),Hank等,Clin.Cancer Res.2:1951(1996),以及Hu等,Cancer Res.56:4998(1996)。此外,Yang等,人抗体杂交瘤6:129(1995)描述了含有F(ab')<sub>2</sub>片段和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 部分的融合蛋白。

[0430] 制备抗体-毒素融合蛋白(该重组分子含有一个或多个抗体组分和毒素或化疗药)的方法是本领域技术人员熟知的。例如,抗体-假单胞菌外毒素A融合蛋白描述于Chaudhary等,Nature 339:394(1989),Brinkmann等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 88:8616(1991),Batra等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 89:5867(1992),Friedman等,J.Immunol.150:3054(1993),Wels等,Int.J.Can.60:137(1995),Fominaya等,J.Biol.Chem.271:10560(1996),Kuan等,Biochemistry 35:2872(1996),以及Schmidt等,Int.J.Can.65:538(1996)。含有白喉毒素组分的抗体-毒素融合蛋白描述于Kreitman等,Leukemia 7:553(1993),Nicholls等,J.Biol.Chem.268:5302(1993),Thompson等,J.Biol.Chem.270:28037(1995),以及Vallera等,Blood 88:2342(1996)。Deonarain等,Tumor Targeting 1:177(1995)描述了含有RNA酶组分的抗体-毒素融合蛋白,而Linardou等,Cell Biophys.24-25:243(1994)制备了含有DNA酶I组分的抗体-毒素融合蛋白。Wang等,209届ACS全国会议的摘要,Anaheim,Calif,1995年4月2-6日,第1部分,BIOT005将Gelolin用作抗体-毒素融合蛋白中的毒素。作为另一个实例,Dohlsten等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 91:8945(1994),报道了含有葡萄球菌内毒素A的抗体-毒素融合蛋白。

[0431] 适用于制备这类偶联物的代表性毒素有:蓖麻毒素、相思豆毒蛋白,核糖核酸酶,DNase I,葡萄球菌内毒素A,商陆抗病毒蛋白、白树因(gelolin),白喉毒素,假单胞菌外毒素,和假单胞菌内毒素。参见例如,Pastan等,Cell 47:641(1986),和Goldenberg,CA—ACancer Journal for Clinicians 44:43(1994)。其它合适的毒素是本领域的技术人员已知的。

[0432] 通过将抗体偶联于能将前药(如肽酰基化疗药,参见W081/01145)转变为活性抗癌药的前药活化酶,本发明抗体也可用于ADEPT。参见例如,W088/07378和美国专利号4,975,278。

[0433] 用于ADEPT的免疫偶联物中的酶组分包括能够对前药起作用将其转变为更有活性的细胞毒性形式的任何酶。

[0434] 用于本发明方法的酶包括但不限于:将含磷酸的前药转变为游离药物的碱性磷酸酶;将含硫酸的前药转变为游离药物的芳基硫酸酯酶;将无毒5-氟胞嘧啶转变为抗癌药5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶;将含肽前药转变为游离药物的蛋白酶类,如沙雷蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(如组织蛋白酶B和L);将含D-氨基酸取代基

的前药转变为游离药物的D-丙氨酰基羧肽酶；将糖基化前药转变为游离药物的糖-切割酶如 $\beta$ -半乳糖苷酶和神经氨酸酶；将用 $\beta$ -内酰胺衍生的药物转变为游离药物的 $\beta$ -内酰胺酶；和将在氨基氮原子上分别用苯氧基乙酰基或苯基乙酰基衍生的药物转变为游离药物的青霉素酰胺酶如青霉素V酰胺酶或青霉素G酰胺酶。或者，可采用本领域也称为抗体酶的具有酶活的抗体将本发明前药转变为游离活性药物（参见例如：Massey, Nature 328:457-458 (1987)）。抗体-抗体酶偶联物的制备如本文所述，用于将抗体酶递送给肿瘤细胞群。

[0435] 可用本领域熟知技术使本发明酶共价结合于抗体，如采用上述异质双功能交联剂。或者，可用本领域熟知的重组DNA技术构建至少包含连接于本发明酶的至少一个功能活性部分的本发明抗体的抗原结合区的融合蛋白（参见例如：Neuberger等, Nature 312:604-608 (1984)）。

#### [0436] 非治疗性应用

[0437] 本发明抗体可用作M-CSF的亲纯化试剂或用于M-CSF蛋白的诊断试验，如检测其在特定细胞、组织或血清中的表达。这些抗体也可用于体内诊断试验。通常，为这些目的该抗体标记有放射性核素（如 $^{111}\text{In}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 或 $^{35}\text{S}$ ），以使用免疫闪烁照相法定位肿瘤。

[0438] 本发明抗体可用于任何已知试验方法，如竞争性结合试验、直接和间接夹心试验如ELISA，和免疫沉淀试验。Zola,《单克隆抗体：技术手册》(Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques), 147-158页 (CRC Press, Inc. 1987)。这些抗体也可用于免疫组化，用本领域已知方法标记肿瘤样品。

[0439] 为方便起见，可在试剂盒中提供本发明抗体即包装有预定量的试剂组合，和进行诊断试验的说明书。当用酶标记抗体时，该试剂盒包括该酶所需的底物和辅因子（如提供可检测生色团或荧光团的底物前体）。此外，可包括其它添加剂如稳定剂、缓冲液（如封闭缓冲液或裂解缓冲液）等。各种试剂的相对量可有很大不同，以提供能显著优化该试验灵敏度的试剂溶液浓度。具体说，提供的试剂可以是干粉，通常是冻干粉，其中包括溶解后能提供浓度合适的试剂溶液的赋形剂。

[0440] 以下实施例用于说明本发明，但不以任何方式限制本发明。

## 实施例

### [0441] 实施例1

[0442] 本实施例显示，M-CSF抗体RX1和5A1是特异性抗体，抗体RX1、MC1和MC3能中和人M-CSF活性。RX1是市售抗体，在本申请的申请日前一年多就可购得。示范性的市售来源包括但不限于：小鼠抗人M-CSF单克隆抗体克隆116、692和21 (Anogen)；抗人M-CSF抗体克隆21113.131、26730和26786 (R&D Systems, Inc.)；和抗人M-CSF抗体克隆M16 (Antigenix America, Inc.)。

[0443] 为了测试RX1和5A1的中和活性，采用M-NFS-60细胞系的增殖试验（美国典型培养物保藏中心登录号CRL-1838，获自ATCC, Rockville, MD, USA，衍生自Cas-Br-MuLV野生小鼠亲嗜性逆转录病毒诱导的髓性白血病，对白介素3和M-CSF有反应，其含有由整合逆转录病毒所产生的截短的c-myb原癌基因）。M-NFS-60的增殖以剂量依赖性方式需要活性M-CSF。在该试验中，洗涤M-NFS-60细胞，接种在含有10%FBS和3000U/ml M-CSF和1%Pen/Strep的

RPMI 1640培养基中。人或鼠特异性重组人M-CSF(终浓度10ng/ml)与各种浓度的抗体一起在37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中孵育1小时。孵育后,将该混合物加入96孔微量滴定板的M-NFS-60培养物中。每孔中总试验体积是100μl,含有10ng/ml M-CSF,抗体浓度如图5所示。细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>下孵育72小时,然后用CellTiter Glo试验(Promega)定量细胞数。对抗体MC3和MC1重复上述试验。

[0444] 如图5所示,M-CSF抗体RX1和5A1是特异性抗体。细胞增殖用CellTiter Glo试验的荧光读数表示,该荧光读数与细胞数呈线性相关。特异性中和RX1和5A1活性的抗体用其在人或鼠M-CSF的存在时抑制M-NFS-60的能力表示。最后,如图5B所示,抗体MC3和MC1也是M-CSF活性的有效抑制剂。

[0445] 实施例2

[0446] 本实施例说明剂量5mg/kg的抗体RX1能有效抑制人异种移植模型的骨质溶解。本研究中采用4-7周龄、平均体重~20g的雌性裸小鼠。将悬浮在10μl盐水中的肿瘤细胞(MDA-MB-231, 3x10<sup>5</sup>)注射入右胫骨骨髓腔。在接种肿瘤1天后拍摄后腿的射线照片,获得基线图像并检查注射引起的骨折。将小鼠随机分为包括PBS和5mg/kg RX1(腹膜内注射)的治疗组,每组10只,每周注射一次共6周。研究结束时,再拍摄后腿射线照片,与基线比较其骨损伤情况。肿瘤引起的骨损伤程度定义如图6所示。RX1 5mg/kg治疗组显示保护骨免受肿瘤引起的损伤具有统计学显著性。

[0447] 实施例3

[0448] 本实施例说明,当将剂量为5mg/kg的抗体RX1给予人乳腺癌MDA-MB-231荷瘤裸小鼠时,转移灶数目减少。

[0449] 本研究采用4-7周龄、平均体重~20g的雌性裸小鼠。将悬浮在10μl盐水中的肿瘤细胞(MDA-MB-231, 3x10<sup>5</sup>)注射入右胫骨骨髓腔。接种肿瘤1天后拍摄后腿的射线照片,以获得基线图像并检查注射引起的骨折。将小鼠随机分为包括PBS和5mg/kg RX1(腹膜内注射)的治疗组,每周注射一次共6周。研究结束时,收集各治疗组的肺,在Bouin溶液中固定,对转移性肺结节计数。

[0450] 如图7所示,当将剂量为5mg/kg的抗体RX1给予人乳腺癌MDA-MB-231荷瘤裸小鼠时,转移数目减少。

[0451] 实施例4

[0452] 本实施例列出了RX1抗体的人源化方法。用相似方法人源化5H4、MC1和MC3。

[0453] 设计人源化RX1轻链和重链基因

[0454] 鼠RX1的核苷酸和氨基酸序列见图4B。用国家生物医学基金会蛋白质鉴定来源(National Biomedical Foundation Protein Identification Resource)或相似数据库鉴定的人抗体序列来提供人源化抗体的构架。为选择人源化重链序列,比对鼠RX1重链序列与人抗体重链序列。选择人抗体各位置氨基酸用于人源化序列,除非某位置属于下面定义的四种情况之一,在这种情况下选择鼠RX1氨基酸:

[0455] (1) 该位置属于互补决定区(CDR),如Kabat, J. Immunol., 125, 961-969 (1980)所述;

[0456] (2) 人抗体该位置的氨基酸为人重链所罕见,而鼠RX1该位置的氨基酸为人重链所常见;

- [0457] (3) 该位置紧邻鼠RX1重链氨基酸序列中的CDR;或
- [0458] (4) 鼠RX1抗体的3维模式提示该氨基酸在物理上接近抗原结合区。
- [0459] 为选择人源化轻链序列,比对鼠RX1轻链序列与人抗体轻链序列。选择人抗体各位置氨基酸用于人源化序列,除非某位置仍属于上述情况之一,下面重复陈述:
- [0460] (1) CDR;
- [0461] (2) 鼠RX1氨基酸比人抗体氨基酸更常见;
- [0462] (3) 与CDR相邻;或
- [0463] (4) 3维结构可能靠近结合区。
- [0464] 实际选择的重链和轻链基因的核苷酸序列如下:
- [0465] (1) 编码如上所述选择的氨基酸序列的核苷酸序列;
- [0466] (2) 这些编码序列的5',编码前导(信号)序列的核苷酸序列。将这些前导序列选择用于典型抗体;
- [0467] (3) 编码序列的3',核苷酸序列是小鼠轻链J5节段和小鼠重链J2节段之后的序列,它们是鼠RX1序列的一部分。包括这些序列是因为它们包含剪接供体信号;和
- [0468] (4) 序列两端都是Xba I位点,以允许在Xba I位点切割并克隆入载体的Xba I位点。

[0469] 构建人源化轻链和重链基因

- [0470] 为合成重链,用Applied Biosystems 380B DNA合成仪合成4种寡核苷酸。其中两条寡核苷酸是(两条)重链各链的一部分,各寡核苷酸与下一条寡核苷酸重叠约20个核苷酸,以便退火。这些寡核苷酸一起覆盖了整个人源化重链可变区,两端各多出几个核苷酸以便在Xba I位点上切割。用聚丙烯酰胺凝胶纯化这些寡核苷酸。
- [0471] 通过标准方法用ATP和T4多核苷酸激酶磷酸化各寡核苷酸(Maniatis等,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989))。为使磷酸化寡核苷酸退火,将它们一起悬浮于40 $\mu$ l TA(33mM Tris乙酸盐,pH 7.9,66mM乙酸钾,10mM乙酸镁),浓度各为约3.75 $\mu$ M,加热到95 $^{\circ}$ C 4分钟,缓慢冷却至4 $^{\circ}$ C。通过合成各寡核苷酸的相反链从这些寡核苷酸合成完整基因,将以下组分加入100 $\mu$ l最终体积中:

	10 $\mu$ l	退火的寡核苷酸
	0.16 mM	各脱氧核糖核苷酸
	0.5 mM	ATP
	0.5 mM	DTT
[0472]	100 ug/ml	BSA
	3.5 ug/ml	T4 g43 蛋白(DNA 聚合酶)
	25 ug/ml	T4 g44/62 蛋白(聚合酶辅助蛋白)
	25 ug/ml	45 蛋白质(聚合酶辅助蛋白)

- [0473] 在37 $^{\circ}$ C 孵育该混合物30分钟。加入10 $\mu$ l T4DNA连接酶,继续在37 $^{\circ}$ C 孵育30分钟。通过在70 $^{\circ}$ C 孵育该反应物15分钟使聚合酶和连接酶失活。为了用Xba I消化基因,将50 $\mu$ l 含有200ug/ml BSA和1mM DTT的2 $\times$ TA,43 $\mu$ l水和5 $\mu$ l 50u Xba I加入该反应。在37 $^{\circ}$ C 孵育该反应物3小时,然后在凝胶上纯化。将凝胶纯化的Xba I片段用标准方法克隆入质粒pUC19中的

Xba I位点。用标准技术纯化质粒,并用双脱氧法测序。

[0474] 通过从插入有轻链和重链Xba I片段的pUC19质粒中分离轻链和重链Xba I片段,然后将其插入当转染入合适宿主细胞时能表达高水平完整重链的合适表达载体的Xba I位点中,来构建表达人源化轻链和重链的质粒。

[0475] 人源化抗体的合成和亲和力

[0476] 将表达载体转染入小鼠Sp2/0细胞,用标准方法根据表达载体赋予的可选择标记选择整合了该质粒的细胞。为了确认这些细胞分泌结合M-CSF的抗体,将该细胞的上清液与已知能表达M-CSF的细胞一起孵育。洗涤后,将细胞与荧光素偶联的山羊抗人抗体一起孵育,洗涤,并在FACSCAN细胞荧光计上分析荧光。

[0477] 下一个实验,将产生人源化抗体的细胞注射入小鼠,收集得到的腹水。根据标准技术在Affigel-10支架(Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, Calif.)上使腹水通过山羊抗人免疫球蛋白抗体的亲和柱,将人源化抗体纯化至基本均一。为测定人源化抗体相对于原先鼠RX1抗体的亲和力,根据本领域已知技术进行竞争性结合试验。

[0478] 实施例4A

[0479] 本实施例描述了Human Engineered™ RX1抗体的克隆和表达,以及这种抗体的纯化,并测试了结合活性。用相似方法制备Human Engineered™ 5H4、MC1和MC3抗体。

[0480] 设计Human Engineered™序列

[0481] Studnicka[参见例如:Studnicka等,美国专利号5,766,886;Studnicka等,Protein Engineering 7:805-814(1994)]将抗体可变区Human Engineering™描述为一种降低抗体分子的免疫原性同时保持其结合活性的方法。根据该方法,给各可变区氨基酸指定一种取代风险。氨基酸取代分为以下三种风险类型:(1)低风险改变是降低免疫原性的可能性最大而破坏抗原结合机会最小的改变;(2)中风险改变是进一步降低免疫原性,但更可能影响抗原结合或蛋白质折叠的改变;(3)高风险残基是对于结合或维持抗体结构很重要,和影响抗原结合或蛋白质折叠风险最高的残基。由于脯氨酸的三维结构作用,通常认为脯氨酸的修饰至少是中风险改变,即使该位置一般是低风险位置。优选取代改变,但也可能是插入和缺失。图4B和4C分别显示鼠RX1轻链和重链各氨基酸残基的风险指定,分为高风险、中风险和低风险改变。

[0482] 用此方法Human Engineered™为鼠RX1抗体的轻链和重链的可变区。将通过比对鼠可变区的氨基酸序列与人可变区序列鉴定的低风险位置作为用该方法修饰的候选氨基酸残基。可采用人可变区,包括个体的VH或VL序列或人共有VH或VL序列。可改变任何数目的低风险位置上,或所有低风险位置上的氨基酸残基。对于图19A-B中Human Engineered™“低风险”重链序列,用人共有Vh2(根据Kabat)作模板,当低风险位置上鼠和人氨基酸残基不同时各位置上引入氨基酸修饰,用人残基取代鼠残基。对于图20A-B中的Human Engineered™“低风险”轻链序列,用人共有κ3(根据Kabat)序列作模板,当低风险位置上鼠和人氨基酸残基不同时各位置上引入氨基酸修饰,用人残基取代鼠残基。对轻链共进行16个氨基酸低风险修饰,对重链进行8个低风险修饰。

[0483] 类似地,将通过比对鼠可变区的氨基酸序列与人可变区序列鉴定的所有低风险和中风险位置作为用该方法修饰的候选氨基酸残基。可改变任何数目的低风险或中风险位置,或所有低风险和中风险位置上的氨基酸残基。对于图19A-B的Human Engineered™重链

序列,用人共有Vh2(根据Kabat)序列作模板,当低风险或中风险位置上鼠和人氨基酸残基不同时各位置上引入氨基酸修饰,用人残基取代鼠残基。对于图20A-B中的Human Engineered™轻链序列,用人共有κ3(基于Kabat)序列作模板,当低风险或中风险位置上鼠和人氨基酸残基不同时各位置上引入氨基酸修饰,用人残基取代鼠残基。对轻链共进行19个低风险和中风险氨基酸修饰,对重链进行12个低风险和中风险修饰。

[0484] 也制备了“另一种低风险”轻链序列,如图21A-B所示,其中位置54上的修饰逆转回鼠。也制备了“另一种低风险+中风险”轻链序列,如图21A-B所示,其中位置54-56上的修饰逆转回鼠。

[0485] 最后,也用人种系VK6亚组2-1-(1)A14作模板产生Human Engineered™“低风险+中风险”轻链V区序列,如图22A-B所示。

[0486] 本发明也考虑了保留图4A的氨基酸41-43(NGS),此为糖基化位点。或者,可以仅保留氨基酸41-43中的一个或两个(如NG)。

[0487] 制备用于永久细胞系开发的表达载体

[0488] 用合成核苷酸合成构建了编码上述各重链和轻链V区序列与抗体衍生的信号序列的DNA片段。将编码上述各轻链V区氨基酸序列的DNA插入含有人κ轻链恒定区的载体pMXP10中。将编码上述各重链V区氨基酸序列的DNA插入含有人γ-2重链恒定区的载体pMXP6中。构建了含有融合于图29A、29b和30所示人γ-1(cDNA)和γ-4(基因组和cDNA)恒定区的重链V区氨基酸序列的其它载体。所有这些载体都含有hCMV启动子和小鼠κ轻链3'不翻译区,以及可选择标记基因如neo或his,分别用于选择G418或组氨醇抗性转染子。表2和3中分别描述了这类轻链和重链载体。

[0489] 表2.单基因永久κ轻链载体

质粒	V区	选择性标记
pMXC5	低风险+中风险(Kabat)	neo
pMXC6	低风险(Kabat)	neo
pMXC13	低风险(Kabat)-R54~S	neo
pMXC14	低风险+中风险(Kabat)-RAT54,55,56~SIS	neo
pMXC22	低风险+中风险(种系)	neo

[0491] 表3.单基因永久重链载体

质粒	V区	C区	选择性标记
pMXC7	低风险+中风险(Kabat)	γ 2	neo
pMXC8	低风险(Kabat)	γ 2	neo
pMXC40	低风险(Kabat)	γ 1	neo
pMXC41	低风险+中风险(Kabat)	γ 1	neo
pMXC45	低风险+中风险(Kabat)	γ 4(基因组)	neo
pMXC46	低风险+中风险(Kabat)	γ 4(cDNA)	neo

[0493] 然后构建包含所需Human Engineered™轻链加重链基因(γ-1、γ-2和γ-4)的载体。这些“2基因”载体含有编码各抗体链(重链和轻链)的基因,它们在hCMV启动子、CMV剪接受体、SV40 16S剪接受体和包括聚A位点的小鼠κ轻链3'不翻译DNA的控制下。它们也含有可选择标记基因如neo或his和氨苄青霉素抗性基因。表4中描述了含有重链和轻链基因的载

体。也可构建包含轻链和重链基因各两个拷贝的载体(四个基因载体)。

[0494] 表4. 双基因永久表达载体

[0495]	质粒	$\kappa$ 轻链	重链	C 区	选择性标记
			V 区		
	pMXC12	低风险(Kabat)	低风险(Kabat)	$\gamma$ 2	<i>neo</i>
	pMXC37	低风险(Kabat)	低风险(Kabat)	$\gamma$ 2	<i>his</i>
	pMXC9	低风险+中风险(Kabat)	低风险+中风险(Kabat)	$\gamma$ 2	<i>neo</i>
	pMXC16	低风险(Kabat)	低风险+中风险(Kabat)	$\gamma$ 2	<i>neo</i>
	pMXC17	低风险+中风险(Kabat)	低风险(Kabat)	$\gamma$ 2	<i>neo</i>
	pMXC18	低风险(Kabat)R54~S	低风险+中风险(Kabat)	$\gamma$ 2	<i>neo</i>
	pMXC19	低风险+中风险(Kabat)-RAT54,55,56~SIS	低风险+中风险(Kabat)	$\gamma$ 2	<i>neo</i>
	pMXC20	低风险(Kabat)-R54~S	低风险(Kabat)	$\gamma$ 2	<i>neo</i>
[0496]	pMXC21	低风险+中风险(Kabat)-RAT54,55,56~SIS	低风险(Kabat)	$\gamma$ 2	<i>neo</i>
	pMXC25	低风险+中风险(种系)	低风险+中风险(Kabat)	$\gamma$ 2	<i>neo</i>
	pMXC47	低风险+中风险(种系)	低风险+中风险(Kabat)	$\gamma$ 2	<i>his</i>
	pMXC26	低风险+中风险(种系)	低风险(Kabat)	$\gamma$ 2	<i>neo</i>
	pMXC42	低风险+中风险(种系)	低风险(Kabat)	$\gamma$ 1	<i>neo</i>
	pMXC43	低风险+中风险(种系)	低风险+中风险(Kabat)	$\gamma$ 1	<i>neo</i>
	pMXC50	低风险+中风险(种系)	低风险+中风险(Kabat)	$\gamma$ 1	<i>his</i>
	pMXC48	低风险+中风险(种系)	低风险+中风险(Kabat)	$\gamma$ 4(cDNA)	<i>Neo</i>
	pMXC49	低风险+中风险(种系)	低风险+中风险(Kabat)	$\gamma$ 4(基因组)	<i>neo</i>

[0497] 制备用于瞬时表达的表达载体

[0498] 构建用于瞬时转染的含有上述轻链或重链基因的载体。这些载体类似于上述用于永久转染的载体,它们含有EB病毒的oriP,可在表达EB病毒核抗原的HEK293细胞中复制,而不是neo或his基因。表5和6中描述了用于瞬时转染的这些载体。

[0499] 表5. 瞬时 $\kappa$ 轻链载体

[0500]	质粒	V区
	pMXC1	低风险+中风险 (Kabat)
	pMXC2	低风险 (Kabat)
	pMXC10	低风险+中风险 (Kabat) -RAT54, 55, 56~SIS
	pMXC11	低风险 (Kabat) -R54~S
	pMXC15	低风险+中风险 (种系)

[0501] 表6. 瞬时重链载体

[0502]	质粒	V区	C区
	pMXC3	低风险+中风险 (Kabat)	$\gamma$ 2
	pMXC4	低风险 (Kabat)	$\gamma$ 2
	pMXC29	低风险 (Kabat)	$\gamma$ 1
	pMXC38	低风险 (Kabat)	$\gamma$ 4 (基因组)
	pMXC39	低风险+中风险 (Kabat)	$\gamma$ 1

[0503] Human-Engineered RX1在HEK293E细胞中的瞬时表达

[0504] 将各含有EB病毒的oriP和上述轻链或重链基因的不同载体瞬时转染入HEK293E细

胞。培养瞬时转染的细胞10天,然后回收上清液,用蛋白A层析纯化抗体。下表7中描述了瞬时转染293E细胞产生的蛋白质。

[0505] 表7.制备的Human-engineered RX1抗体

抗体	轻链		重链	
	质粒	蛋白质	质粒	蛋白质
heRX1-1.G2	pMXC2	低风险(Kabat)	pMXC4	低风险(Kabat)
heRX1-2.G2	pMXC2	低风险(Kabat)	pMXC3	低风险+中风险(Kabat)
heRX1-3.G2	pMXC1	低风险+中风险(Kabat)	pMXC4	低风险(Kabat)
heRX1-4.G2	pMXC1	低风险+中风险(Kabat)	pMXC3	低风险+中风险(Kabat)
heRX1-5.G2	pMXC11	低风险(Kabat)-R54~S	pMXC4	低风险(Kabat)
heRX1-6.G2	pMXC11	低风险(Kabat)-R54~S	pMXC4	低风险(Kabat)
heRX1-7.G2	pMXC10	低风险+中风险(Kabat)-RAT54,55,56~SIS	pMXC4	低风险(Kabat)
heRX1-8.G2	pMXC10	低风险+中风险(Kabat)-RAT 54,55,56~SIS	pMXC3	低风险+中风险(Kabat)
heRX1-9.G2	pMXC15	低风险+中风险(种系)	pMXC4	低风险(Kabat)
heRX1-10.G2	pMXC15	低风险+中风险(种系)	pMXC3	低风险+中风险(Kabat)
heRX1-1.G1	pMXC2	低风险(种系)	pMXC29	低风险(Kabat)
heRX1-10.G1	pMXC15	低风险+中风险(种系)	pMXC39	低风险+中风险(Kabat)
heRX1-9.G4	pMXC15	低风险+中风险(种系)	pMXC38	低风险(Kabat)

[0507] 开发永久转染的CHO-K1细胞

[0508] 将各含有一个拷贝的轻链和重链基因的上述载体(表4)一起转染入适应Ex-Ce11302的CHO-K1细胞中。一般用电穿孔将40 $\mu$ g线性载体转入适应在Ex-Ce11 302培养基中悬浮生长的CHO-K1细胞中。或者,线性DNA与线性聚乙烯亚胺(PEI)形成复合物用于转染。将细胞接种到含有补充有1%FBS和G418的Ex-Ce11 302培养基的96孔板中。在96孔板中筛选克隆,将每次转染中高达~10%的克隆转移到含有Ex-Ce11 302培养基的24孔板中。

[0509] 在含有Ex-Ce11 302培养基的24孔板中进行生产率测试,培养物生长7和14天时用免疫球蛋白ELISA试验测定培养物上清中分泌抗体IgG的水平。

[0510] 将生产率最高的克隆转移到含有Ex-Ce11 302培养基的摇瓶中。细胞一旦适应悬浮生长,就用这些克隆在Ex-Ce11 302培养基中进行摇瓶(培养)实验。细胞在含有25ml培养

基的125ml锥形烧瓶中培养长达10天。孵育期间至少隔天打开烧瓶一次交换气体,在培养期结束时用IgG ELISA测定培养基中的免疫球蛋白多肽水平。用两种或三种多单位转录载体多次相继转染同一细胞系,产生免疫球蛋白产量水平进一步提高,优选300 $\mu$ g/ml或更高的克隆和细胞系。

#### [0511] 纯化

[0512] 可设计从本发明载体和所有细胞系纯化免疫球蛋白多肽的方法。根据本领域熟知方法,培养结束后过滤去除细胞。将滤出液加载到蛋白A柱上(如果需要,分多次加入)。洗涤该柱,然后从该柱上洗脱表达和分泌的免疫球蛋白多肽。在抗体产物的制备中,将蛋白A库(pool)维持在低pH下(pH 3至少30分钟、至多1小时),作为病毒灭活步骤。接着,用吸附性阴离子交换步骤进一步纯化产物。使吸附性分离柱的洗脱液通过病毒截留滤膜(virus retaining filter)以进一步清除可能的病毒颗粒。使滤出液通过产物不结合的阴离子交换柱进一步纯化。最后,通过渗滤将产物转移到制品缓冲液中,结束纯化过程。将剩余物的蛋白质浓度调整为至少1mg/mL,并加入稳定剂。

#### [0513] 结合活性

[0514] 评价重组Human Engineered™抗体的M-CSF结合活性。将摇瓶培养上清液通过蛋白A柱纯化蛋白质,然后用A<sub>280</sub>测定浓度。如以上实施例1或以下实施例12所述进行结合试验。用PBS包被溶液配的预稀释的sM-CSF抗原预包被Immulon II板,使抗原固定在微量板中。加入范围0.25-20 $\mu$ g/ml的各种测试浓度的M-CSF,50 $\mu$ l/孔,4℃孵育过夜。然后用PBS-0.05%吐温洗涤该板三次。加入含1%BSA的PBS-0.05%吐温,在37℃孵育30分钟进行封闭。用含1%BSA的PBS-0.05%吐温溶液制备免疫球蛋白多肽的稀释液。制备2或3倍系列稀释液,加入(100 $\mu$ l/孔)两复孔或三复孔。37℃孵育90分钟后,用PBS-0.05%吐温洗涤微量板3次。对于信号显色,将偶联于过氧化物酶的山羊抗人IgG( $\gamma$ -或Fc-特异性)第二抗体加入各孔,37℃孵育60分钟,然后加入0.4mg/ml OPD的柠檬酸盐缓冲液和0.012% $H_2O_2$ 。室温5-10分钟后,加入100 $\mu$ l 1M  $H_2SO_4$ 停止该试验,在490nm处读板。采用了山羊抗人IgG( $\gamma$ -特异性)抗体和山羊抗人IgG(Fc-特异性)抗体。

#### [0515] 实施例5

[0516] 以下实施例列出了用M-CSF特异性抗体,如RX1衍生的抗体或RX1-竞争性抗体,包括具有修饰或未修饰的IgG1或IgG4恒定区的RX1Human Engineered™抗体治疗人的方法。该方法也可用MC1-或MC3-衍生的抗体或者MC1-或MC3-竞争性抗体进行。预计的有效剂量范围是2 $\mu$ g/kg-10mg/kg。此估算是根据以下由实验数据证实的基本原理:

[0517] 测定的M-CSF人血浆(健康人和乳腺癌患者)水平约为1ng/ml。经测定M-CSF中和抗体RX1抗1ng/ml人M-CSF的EC<sub>50</sub>为2ng/ml。因此,预计人血浆中有效抗体浓度比EC<sub>50</sub>高10-50,000倍,即人血浆中为20ng/ml-100 $\mu$ g/ml抗体。根据PK研究,为了在人患者中实现此浓度,需要给予2 $\mu$ g/kg-10mg/kg的剂量以达到20ng/ml-100 $\mu$ g/ml的血浆抗体浓度。

#### [0518] 实施例6

[0519] 该实施例显示,在皮下注射模型中评估抗M-CSF单克隆抗体的抗癌活性步骤。以上的实施例2表明,抗M-CSF单克隆抗体治疗显著地抑制骨髓中的肿瘤生长。本研究的目的是评估该抗体是否也能抑制软组织中的肿瘤生长。

[0520] 本研究采用10周龄、平均体重约20g的雌性nu/nu小鼠。小鼠在研究开始前至少经

历7天的适应期。在第0天,在裸鼠的右腹侧皮下注入SW620人结肠癌细胞,每只小鼠注射 $5 \times 10^6$ 细胞/100 $\mu$ l。当肿瘤体积达到100-200mm<sup>3</sup>时(通常在肿瘤接种后的1周),将小鼠随机地分为以下5组,每组10只小鼠:

- [0521] 1) PBS
- [0522] 2) RX1
- [0523] 3) 5A1
- [0524] 4) mIgG1+rIgG1同种型Ab对照
- [0525] 5) 5A1+RX1

[0526] 用指定的抗体以10mpk每周一次共4周小鼠腹膜内注射治疗。当肿瘤体积达到2000mm<sup>3</sup>时,停止研究。或者,当符合下面情况时,对动物实施安乐死:肿瘤表面溃疡面积大于总表面积的30%,体重显著降低(>20%),脱水,和垂死。收集所有小鼠的全血并分析单核细胞群,作为潜在的替代标记。用2-D分析来测定肿瘤的生长/体积。肿瘤宽度及长度的测定用于肿瘤体积的计算。预计因上述实验,结果会导致抑制软组织中的肿瘤的生长。

[0527] 实施例7

[0528] 以下实施例显示评估联合治疗治疗和预防癌转移相关严重溶骨性疾病的方法。

[0529] 实验设计。基本上重复以上实施例5中所述的研究,除了有以下区别。除了以下列出的抗体或抗体联合治疗组外,动物将接受以下额外治疗之一:

- [0530] 1. 二磷酸盐(如Aredia;Zometa;氯膦酸盐)
- [0531] 2. 手术
- [0532] 3. 放射性治疗
- [0533] 4. 化疗
- [0534] 5. 激素治疗(例如,它莫西芬;抗雄激素治疗)
- [0535] 6. 抗体治疗(例如,RNAKL/RANK中和抗体;PTHrP中和抗体)
- [0536] 7. 治疗性蛋白质治疗(例如,可溶性RANKL受体;OPG、PDGF和MMP抑制剂)
- [0537] 8. 小分子药物治疗(例如,Src-激酶抑制剂)
- [0538] 9. 寡核苷酸治疗(例如,RANKL或RANK或PTHrP反义链)
- [0539] 10. 基因治疗(例如,RANKL或RANK抑制剂)
- [0540] 11. 肽治疗(例如,RANKL突变蛋白)

[0541] 治疗组如下。以上的额外治疗在下面表示为“加治疗X”:

- [0542] 1. 只用PBS
- [0543] 2. 只用治疗X
- [0544] 3. 大鼠IgG1同种型对照
- [0545] 4. 小鼠IgG1同种型对照
- [0546] 5. 只用RX1抗人M-CSF
- [0547] 6. 只用5A1大鼠IgG1抗小鼠M-CSF
- [0548] 7. 大鼠IgG1和小鼠IgG1同种型对照联合治疗
- [0549] 8. 5H4和5A1联合治疗
- [0550] 9. 大鼠IgG1同种型对照加治疗X
- [0551] 10. 小鼠IgG1同种型对照加治疗X

[0552] 11. RX1抗人M-CSF加治疗X

[0553] 12. 5A1大鼠IgG1抗小鼠M-CSF加治疗X

[0554] 13. 大鼠IgG1和小鼠IgG1同种型对照联合治疗加治疗X

[0555] 14. RX1和5A1联合治疗加治疗X

[0556] 剂量:每种抗体以0.1-30mg/kg剂量给予每只动物。优选剂量为10mg/kg。施用途径可以是IV、IP、SC。优选途径为腹膜内(IP)。治疗开始于注射肿瘤细胞后的第二天,如实施例5中所述,见上。

[0557] 检测。为了评估各治疗组骨质溶解的严重程度,每只小鼠在注入肿瘤细胞后一天接受基线Faxitron摄像。研究结束(8周后)时,再接受Faxitron摄像。由于肿瘤细胞稳定表达荧光素酶,可用Xenogen系统同时测定肿瘤生长。与单用抗体治疗相比,预计用联合疗法治疗和预防癌转移相关严重溶骨性疾病将会改善疗效。

[0558] 实施例8

[0559] 以下实施例提供了,用荧光激活细胞分选法评估M-CSF特异性抗体与例如乳腺癌细胞(细胞系MDA 231)或多发性骨髓瘤癌细胞(细胞系ARH 77)结合能力的方案。

[0560] 首先,用PBS(无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>)洗涤细胞2次。在每个10cm的培养皿中加入2ml的3mM EDTA,培养皿在37℃培养2-3分钟,直到细胞变圆并开始脱离培养皿。然后,加入10ml缓冲液A(PBS+5%FBS),并混合。此时,沉淀细胞并将细胞重新悬浮于PBS+5%FBS中,约5×10<sup>6</sup>细胞/ml,再将细胞接种于小管中,100微升/样品。

[0561] 此时,加入0.1-1.0μg/ml的第一抗体(采用所示浓度的M-CSF抗体或对照抗体)。如果需要,以5%的FBS/PBS稀释。然后,将混合物4℃培养30分钟。培养后,用400g离心5分钟,洗涤细胞3次,重悬于PBS中。

[0562] 用1%BSA/PBS稀释FITC或PE标记的抗IgG抗体(0.25μg/样品)至最佳稀释度,然后将细胞重悬于此溶液中,4℃培养30分钟。接着,如上所述洗涤细胞3次。洗涤后,用0.5ml/样品PI-PBS重悬细胞(如果需要区分死细胞和活细胞)。也可以固定细胞留作以后分析(如果用0.1%的甲醛固定,细胞可以持续约3天)。然后,采用标准步骤在荧光激活FACS中分析细胞。

[0563] 如图8A和8B所示,M-CSF特异性抗体RX1在所示各种抗体浓度下,能与乳腺癌细胞系MDA 231或多发性骨髓瘤细胞系ARH77结合。

[0564] 实施例9

[0565] 以下实施例表明,M-CSF普遍存在于很多癌细胞表面。用M-CSF特异性抗体RX1对M-CSF进行免疫组化染色,操作如下。

[0566] 首先,将载玻片在55-60℃的烤箱中加热1小时,然后冷却2-3分钟。采用以下脱蜡和复水(re-hydration)参数:

- |        |            |           |
|--------|------------|-----------|
|        | a. 二甲苯     | 3×5 分钟    |
|        | b. 100%醇试剂 | 2×5 分钟    |
|        | c. 95%醇试剂  | 2×4 分钟    |
| [0567] | d. 75%醇试剂  | 2×3 分钟    |
|        | e. 50%醇试剂  | 1×3 分钟    |
|        | g. 去离子水    | 2-3 次快速漂洗 |

[0568] 在过氧化封闭步骤之前,用1×Biogenex Citra Plus制备抗原检索玻片(retrieval)。该溶液先用微波炉最高火力煮沸。一旦溶液沸腾,立即将微波炉火力调至2档,加热13分钟,放凉后再使用。过氧化封闭步骤如下进行。将载玻片浸入3% $H_2O_2$  (将25ml 30%溶液稀释于250ml去离子水中),室温放置10分钟。然后用去离子水漂洗载玻片2次,用1×PBS洗涤2×2分钟。

[0569] 亲和素/生物素封闭步骤如下进行。将载玻片平放在金属支架上。用蓝色的PAP笔(疏水玻片标记)在组织周围划圈。然后,加入2滴Zymed亲和素(试剂A)一足够覆盖组织,室温孵育载玻片10分钟。孵育后,如下洗涤载玻片:

[0570] 1×PBS洗涤2×3分钟

[0571] 加2滴Zymed生物素(试剂B),室温10分钟

[0572] 1×PBS洗涤2×3分钟

[0573] 蛋白质封闭步骤操作如下:首先,加入含第二抗体的10%血清(至2%终浓度)。然后用去离子水将BioGenex Power Block稀释至1×。将载玻片支架浸入Power Block中,室温8分钟,用1×PBS漂洗载玻片2次。

[0574] 为了加入第一抗体(RX1),将载玻片平放于金属支架上。加入抗体覆盖每一切片(~350 $\mu$ l),用移液管尖铺开抗体(如果需要),但不要刮到组织。然后室温孵育载玻片1小时。孵育后,用1×PBS洗涤载玻片3次,每次3-5分钟。此时,将BioGenex Multi-Link加到各切片上,室温孵育10-11分钟。然后,洗涤载玻片,每次3分钟。

[0575] 在切片上施加BioGenex HRP标记物,然后室温孵育10-11分钟,用1×PBS洗涤载玻片3×3分钟进行标记。随后,在切片上加入BioGenex  $H_2O_2$ 底物(每2.5ml  $H_2O_2$ 加入1滴AEC),室温孵育10分钟。然后,用去离子水漂洗切片几次。复染步骤如下:在室温下用苏木精染色切片1分钟。然后,用 $H_2O$ 漂洗切片2次,再用1×PBS孵育1分钟。然后用 $H_2O$ 充分漂洗切片除去PBS。在切片上加1滴BioGenex Super Mount,室温下空气干燥过夜,以封固切片。

[0576] 如图9所示,M-CSF广泛存在于很多肿瘤细胞的表面。所示肿瘤细胞类型切片评分如下:

[0577] 0. 无染色

[0578] 1. 染色与背景类似

[0579] 2. 阳性,但染色弱

[0580] 3. 阳性,显著染色

[0581] 4. 阳性,强染色

[0582] 实施例10

[0583] 以下实施例显示产生抗体MC1和MC3的方法。MC1和MC3是能中和人M-CSF抗体并结合人M-CSF的两种单克隆鼠抗体。这些抗体的氨基酸序列分别显示在图14和15中。它们通过以下一系列步骤鉴定,包括:a)用重组人M-CSF免疫Balb C小鼠;b)用ELISA试验中筛选产生结合人M-CSF的抗体的阳性克隆;c)亚克隆阳性克隆产生稳定的杂交瘤克隆;d)扩大细胞培养规模产生大量抗体;e)在亲和分析、细胞结合和中和活性试验中纯化和表征抗体,如之前实施例所述。

[0584] 图16A和16B分别显示了抗体RX1、5H4、MC1和MC3的重链和轻链CDR的比对。

[0585] 如以上实施例所述产生人源化和Human Engineered™抗体。

[0586] 实施例11

[0587] 本实施例显示M-CSF抗体RX1和5H4及其Fab片段具有不同的中和活性。以下实施例也显示,抗体RX1、5H4和MC3对M-CSF具有不同亲和力。本实施例进一步证明,上述完整抗体的亲和力高于上述抗体的Fab片段。

[0588] 通过测定各种浓度的抗体存在时M-CSF依赖性细胞增殖,检测了完整RX1和5H4与RX1和5H4的Fab片段的中和活性。用化学发光染料测定细胞增殖。如图17所示,完整RX1具有最强活性,而RX1的Fab片段活性降低,与5H4和5H4的Fab片段相似。

[0589] 用Biacore分析上述抗体的结合性能。为了测定RX1、5H4和MC3对M-CSF的相对亲和力,通过氨基偶联将兔抗小鼠Fc固定在CM5生物传感器芯片上。然后,使1.5μg/ml上述抗体以2μl/分钟流过抗小鼠Fc/CM5生物传感器芯片3分钟将其捕获在该芯片上。使不同浓度( $R_{max} \sim 15$ )的MCSF流过修饰的生物传感器表面。用0.01M HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005%表面活性剂P20 (HBS-EP) 稀释测试抗体和抗原。所有实验均在25℃进行。用Biaevaluation软件(Biacore)以1:1相互作用模型/全局拟合(global fit)测定动力学常数和亲合常数。如下表8所示,相对于5H4和MC3,RX1结合M-CSF的亲和力最高。

[0590] 表8

[0591]	Ka (M-1Sec-1)	Kd (sec-1)	KD (nM)
RX1	1.64e6	2.7e-4	0.16
5H4	5.94e5	1.77e-3	3.0
MC3	7.04e5	1.93e-4	0.27

[0592] 为测定RX1、5H4和MC3完整Mab和Fab片段的结合亲和力相对差异,在Biacore分析中采用另一种构型。具体说,通过氨基偶联将M-CSF固定在CM5生物传感器芯片上。以1μl/分钟注射0.05μg/ml M-CSF的10mM乙酸钠溶液(pH 4.0)5分钟,以实现 $RL = 6-12RU$ 。使不同浓度测试抗体(或Fab片段)流过修饰的生物传感器表面。用0.01M HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005%表面活性剂P20 (HBS-EP) 稀释测试抗体,所有实验均在25℃进行。用Biaevaluation软件(Biacore)以1:1相互作用模型/全局拟合测定动力学常数和亲合常数。如下表9所示,相对于其它测试抗体,RX1结合M-CSF的亲和力最高。RX1的Fab片段结合M-CSF的亲和力显著低于RX1全蛋白。

[0593] 表9

[0594]	Ka (M-1Sec-1)	Kd (sec-1)	KD (nM)
rRX1 (小鼠)	2.34e5	2.35e-4	1.0
rRX1Fab (小鼠)	2.81e5	3.03e-3	10.8

5H4	1.27e5	1.26e-3	9.9
5H4Fab	2.04e5	2.85e-3	14.0

[0595] 结合亲和力和中和数据表明RX1的中和活性主要是由于它对M-CSF的亲合力非常高,此种高亲和力至少部分是由于抗体的两臂能同时结合M-CSF二聚体。

[0596] 实施例12

[0597] 以下实施例揭示了抗体RX1、5H4和MC3所识别的M-CSF上的线性表位(即氨基酸序列)。

[0598] 首先,设计表位作图法以确定抗体RX1、5H4和MC3识别的是M-CSF内线性表位还是构象表位。因此,在还原和非还原条件下测定抗M-CSF抗体抗0.1 $\mu$ g M-CSF的情况。各抗体仅识别非还原形式的M-CSF,这说明识别的表位性质上不连续。

[0599] 下一步,测定了各抗体M-CSF的线性表位。具体说,通过将感兴趣的M-CSF片段序列(合成的具有一个氨基酸偏移的重叠性10聚体肽)加载到纤维素支持膜上制备SPOT膜(Sigma Genosys)。然后用上述抗体检测这些膜,鉴定反应活性SPOT。然后通过肽序列在膜上的相应位置鉴定肽序列,将阳性反应肽内的重叠氨基酸鉴定为表位。如图18所示,RX1结合的线性表位不同于5H4和MC3,作图显示该线性表位在M-CSF上的不同位置。RX1结合线性表位RFRDNTPN (SEQ ID NO:120) 或RFRDNTAN (SEQ ID NO:121),即图12的M-CSF氨基酸98-105。5H4结合线性表位ITFEFVDQE (SEQ ID NO:122),即图12的M-CSF氨基酸65-73。MC3结合两个线性表位,分别是(1) ITFEFVDQE (SEQ ID NO:122),即图12的M-CSF氨基酸65-73和(2) FYETPLQ (SEQ ID NO:123),即图12的M-CSF氨基酸138-144。

[0600] 实施例13

[0601] 测定了上述实施例4A制备的Human Engineered™ RX1抗体的结合亲和力。本实施例显示,具有不同IgG亚型恒定区的Human Engineered™ RX1抗体以不同的亲和力体外结合M-CSF。为了用Biacore分析测定完整抗体结合亲和力的相对差异,通过氨基偶联将M-CSF固定在CM5生物传感器芯片上。以1 $\mu$ l/分钟注射0.05 $\mu$ g/ml M-CSF的10mM乙酸钠溶液(pH 4.0)5分钟,实现RL=6-12RU。使范围是100nM-1.5nM、2倍稀释的不同浓度的测试抗体或Fab片段流过修饰的生物传感器表面。用0.01M HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005%表面活性剂P20 (HBS-EP) 稀释测试抗体,所有实验均在25 $^{\circ}$ C进行。各浓度点和缓冲液空白重复运行三次,结合3分钟和分离8分钟时收集数据。用Biaevaluation软件以1:1相互作用模型/全局拟合测定动力学常数和亲和常数。如下表10所示,heRX1-1.G1和heRX1-1.G4结合M-CSF的亲和力最接近鼠RX1-M-CSF的结合亲和力。

[0602] 表10

[0603]

抗体	ka (M <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> )	kd (sec <sup>-1</sup> )	KD (nM)
鼠RX1n=21	$(2.23 \pm 0.35) \times 10^5$	$(1.56 \pm 0.67) \times 10^{-4}$	$0.7 \pm 0.27$
heRX1-1.G2n=5	$(2.36 \pm 0.18) \times 10^5$	$(1.37 \pm 0.24) \times 10^{-3}$	$5.9 \pm 1.4$
heRX1-10.G2n=2	$(1.73 \pm 0.29) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.11) \times 10^{-3}$	$6.3 \pm 1.7$
heRX1-1.G1	$2.50 \times 10^5$	$2.38 \times 10^{-4}$	0.95
heRX1-1.G4	$2.07 \times 10^5$	$2.93 \times 10^{-4}$	1.42

[0604] 相反,如下表11所示,虽然结合亲和力有些不同,但与母体鼠抗体相比,所有 $\gamma$ -2构建物的结合亲和力至少降低7倍。

[0605] 表11

抗体	ka (M <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> )	kd (sec <sup>-1</sup> )	KD (nM)
鼠RX1n=21	$(2.23 \pm 0.35) \times 10^5$	$(1.56 \pm 0.67) \times 10^{-4}$	$0.7 \pm 0.27$
heRX1-1.G2n=5	$(2.36 \pm 0.18) \times 10^5$	$(1.37 \pm 0.24) \times 10^{-3}$	$5.9 \pm 1.4$
heRX1-2.G2	$2.18 \times 10^5$	$1.65 \times 10^{-3}$	7.6
heRX1-3.G2	$2.01 \times 10^5$	$1.18 \times 10^{-3}$	5.9
heRX1-4.G2	$2.38 \times 10^5$	$1.08 \times 10^{-3}$	4.6
heRX1-5.G2	$1.75 \times 10^5$	$1.29 \times 10^{-3}$	7.4
heRX1-6.G2	$1.88 \times 10^5$	$1.49 \times 10^{-3}$	7.9
heRX1-7.G2	$1.57 \times 10^5$	$1.49 \times 10^{-3}$	9.5
heRX1-8.G2	$1.52 \times 10^5$	$1.48 \times 10^{-3}$	9.8
he RX1-9.G2	$2 \times 10^5$	$1.44 \times 10^{-3}$	7.2
heRX1-10.G2n=2	$(1.73 \pm 0.29) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.11) \times 10^{-3}$	$6.3 \pm 1.7$

[0607] 实施例14

[0608] 本实施例显示,具有不同IgG亚型恒定区的Human Engineered™ RX1抗体拥有不同的体外中和活性。为了测试M-CSF抗体的中和活性,采用M-NFS-60细胞系增殖试验(美国典型培养物保藏中心,登录号CRL-1838,获自ATCC,Rockville,MD,USA,衍生自用Cas-Br.MuLV野生小鼠亲嗜性逆转录病毒诱导的髓性白血病。该细胞系对白介素3和M-CSF均起反应,含有因整合了逆转录病毒而产生的截短的c-myc原癌基因)。M-NFS-60增殖以剂量依赖性方式需要活性M-CSF。在该试验中,洗涤M-NFS-60细胞,接种在含有10%FBS和1%Pen/Strep的RPIM1640培养基中。使重组人M-CSF(终浓度10ng/ml,等价于3000U/ml M-CSF活性)与1μg/ml-0.5ng/ml(2倍系列稀释)范围的各种浓度抗体一起在37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中孵育1小时。孵育后,将混合物加入96孔微量滴定板的M-NFS-60培养物中。每孔总测定体积是100μl,含有10ng/ml M-CSF,抗体浓度如图所示。细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>下孵育72小时,然后用CellTiter Glo试验(Promega)定量细胞数。各抗体一式三份测定,第二天重测一次(每种抗体总共测定6次)。用曲线拟合分析各抗体的IC<sub>50</sub>。

[0609] 用人血清MCSF、MDA231条件培养基(含有M-CSF)、食蟹猴血清MCSF和食蟹猴重组MCSF重复该试验。CellTiter Glo试验的荧光读数结果列于图25(重组MCSF)、26(人血清MCSF)和27(MDA231条件培养基),该结果与细胞数呈线性相关。抗体的中和活性表示为对M-NFS-60细胞增殖的抑制程度。

[0610] 结果表明,heRX1-1-IgG1和heRX1-1-IgG4的IC<sub>50</sub>与重组鼠母体RX1抗体大约相同,而heRX1-1-IgG2的IC<sub>50</sub>约高出2倍-4倍。

[0611] 下表12显示上述实施例4A制备的各种IgG2构建物的相对IC<sub>50</sub>(根据IC<sub>50</sub>损失倍数)。这些构建物中,heRX1-1.G2和heRX1-10.G2的IC<sub>50</sub>降低最少。

[0612] 表12

抗体	IC50 损失倍数
heRX1-1.G2	2.8x
heRX1-2.G2	3.1x
heRX1-3.G2	5.3x
heRX1-4.G2	4.6x
heRX1-5.G2	6.5x
heRX1-6.G2	5.9x
[0613] heRX1-7.G2	6.1x
heRX1-8.G2	5.9x
heRX1-9.G2	3.6x
heRX1-10.G2	2.2x
heRX1-1.G1	无损失
heRX1-1.G4	无损失
heRX1-10.G1	无损失
heRX1-10.G4	无损失

[0614] 实施例15

[0615] 本实施例显示具有不同IgG亚类恒定区的Human Engineered™ RX1抗体在体外破骨细胞生成试验中具有不同的TRAP活性。

[0616] 在本文所述实验条件下诱导人骨髓CD34+细胞 (Biowhittaker目录号2M-101A,  $3 \times 10^5$  细胞/小瓶) 分化为破骨细胞。在第1天, 将CD34+细胞从一个冻存管中解冻到10ml培养基 (含有10%FCS、1×Pen Strep和1×两性霉素B的 $\alpha$ MEM) 中。洗涤细胞一次, 重悬于2ml培养基置入96孔板, 每孔100 $\mu$ l。第2天, 不去除原来的培养基, 各孔中加入50 $\mu$ l 4×CSF-1至30ng/ml终浓度和50 $\mu$ l 4×RANKL (sRANKL, Chemicon目录号GF091, 10 $\mu$ g/包装) 至100ng/ml终浓度。第7天, 各孔中加入50 $\mu$ l 5×RANKL至100ng/ml终浓度。第17天, 染色细胞测定TRAP活性 (用于TRAP染色的白细胞酸性磷酸酶试剂盒, Sigma目录号387-A), 在显微镜下镜检。

[0617] 在试验第二天加入M-CSF-中和抗体。该抗体以剂量依赖方式抑制破骨细胞分化, 如图28所示。该抗体在破骨细胞分化试验中的抑制活性表现为在试验第17天没有看见破骨细胞。

[0618] 实施例16

[0619] 进一步表征具有不同IgG亚类恒定区的Human Engineered™ RX1抗体。

[0620] 通过在缓冲液中使等摩尔比的M-CSF与抗体结合, 然后用分子大小排阻色谱或光散射分析抗原-抗体复合物的大小, 研究了各种Human Engineered™ RX1抗体与MCSF形成的抗原-抗体复合物。结果显示, 鼠母体RX1似乎与MCSF形成1:1复合物。heRX1-9.G2或1-10.G2抗体似乎与MCSF形成约400kDa的2:1或2:2复合物。heRX1-1.G2似乎与MCSF形成大于 $2 \times 10^6$ Da的大晶格凝聚体。IgG1和IgG4构建物形成类似于鼠母体RX1的小复合物。

[0621] 正如所料, heRX1-1.G4的变性还原性和非还原性SDS-PAGE显示, IgG4抗体似乎形

成半抗体。

[0622] 在本说明书和/或申请数据表中提及的所有上述美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物,都全文引入本文作为参考。

[0623] 从上述描述中,应理解到,尽管出于阐述目的描述了本发明的具体实施方式,但可以在不背离本发明精神和范围的情况下进行各种改动。

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 刘(LIU) 等  
 [0003] <120> M-CSF特异性单克隆抗体及其应用  
 [0004] <130> 21601.003  
 [0005] <140> 待指定  
 [0006] <141> 2005-01-06  
 [0007] <150> US 60/535,181  
 [0008] <151> 2004-01-07  
 [0009] <150> US 60/576,417  
 [0010] <151> 2004-06-02  
 [0011] <160> 137  
 [0012] <170> PatentIn version 3.3  
 [0013] <210> 1  
 [0014] <211> 1401  
 [0015] <212> DNA  
 [0016] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [0017] <400> 1  
 [0018] atgggttggc cctgtatcat cctattcctg gtggccactg ccacaggtgt gcactccgac 60  
 [0019] gtgcagcttc aggagtcagg acctggcctc gtgaaacctt ctgagagtct gtcctcacc 120  
 [0020] tgtactgtca ctgactactc catcaccagt gattacgcct ggaactggat acggcaattc 180  
 [0021] ccaggaata aacttgagtg gatggggtagc ataagctaca gtggtagcac ttctacaat 240  
 [0022] ccattctctca aaagtcggat ctccatcact cgagacacat ccaagaacca gttcttctctg 300  
 [0023] cagctgaact ctgtgactac tgaggacaca gccacatatt actgtgcatc cttcgactat 360  
 [0024] gcccacgcca tggattactg gggccaaggg acttcgggtca ctgtctcttc cgccaaaaca 420  
 [0025] acagcccat cggctctatcc actggcccct gtgtgtggag atacaactgg ctctctgggtg 480  
 [0026] actctaggat gcctgggtcaa gggttatttc cctgagccag tgaccttgac ctggaactct 540  
 [0027] ggatccctgt ccagtgggtg gcacacctc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacacc 600  
 [0028] ctgagcagct cagtactgtg aacctcgagc acctggccca gccagtccat cacctgcaat 660  
 [0029] gtggcccacc cggcaagcag caccaaggtg gacaagaaaa ttgagcccag aggcccaca 720  
 [0030] atcaagccct gtctccatg caaatgcca gcacctaac tcttgggtgg accatccgtc 780  
 [0031] ttcatcttcc ctccaaagat caaggatgta ctcatgatct ccctgagccc catagtcaca 840  
 [0032] tgtgtgggtg tggatgtgag cgaggatgac ccagatgtcc agatcagctg gtttgtgaac 900  
 [0033] aacgtggaag tacacacagc tcagacacaa acctatagag aggattaca cagtactctc 960  
 [0034] cgggtgggtca gtgccctccc catccagcac caggactgga tgagtggcaa ggagttcaaa 1020  
 [0035] tgcaaggtca acaacaaga cctcccagcg cccatcgaga gaacctctc aaaacccaaa 1080  
 [0036] gggtcagtaa gagtccaca ggtatatgtc ttgctccac cagaagaaga gatgactaag 1140  
 [0037] aaacaggtca ctctgacctg catggtcaca gacttcatgc ctgaagacat ttactgtggag 1200  
 [0038] tggaccaaca acgggaaaac agagctaaac tacaagaaca ctgaaccagt cctggactct 1260  
 [0039] gatggttctt acttcatgta cagcaagctg agagtggaaa agaagaactg ggtggaaaga 1320  
 [0040] aatagctact cctgttcagt ggtccacgag ggtctgcaca atcaccacac gactaagagc 1380  
 [0041] ttctcccga ctccgggtaa a 1401

[0042] <210> 2  
 [0043] <211> 447  
 [0044] <212> PRT  
 [0045] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [0046] <400> 2  
 [0047] Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 [0048] 1 5 10 15  
 [0049] Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 [0050] 20 25 30  
 [0051] Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 [0052] 35 40 45  
 [0053] Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu  
 [0054] 50 55 60  
 [0055] Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 [0056] 65 70 75 80  
 [0057] Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 [0058] 85 90 95  
 [0059] Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [0060] 100 105 110  
 [0061] Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro  
 [0062] 115 120 125  
 [0063] Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly  
 [0064] 130 135 140  
 [0065] Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn  
 [0066] 145 150 155 160  
 [0067] Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 [0068] 165 170 175  
 [0069] Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr  
 [0070] 180 185 190  
 [0071] Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser  
 [0072] 195 200 205  
 [0073] Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro  
 [0074] 210 215 220  
 [0075] Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 [0076] 225 230 235 240  
 [0077] Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu  
 [0078] 245 250 255  
 [0079] Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro  
 [0080] 260 265 270  
 [0081] Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala  
 [0082] 275 280 285  
 [0083] Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val

[0084]	290	295	300
[0085]	Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe		
[0086]	305	310	315 320
[0087]	Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr		
[0088]		325	330 335
[0089]	Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu		
[0090]		340	345 350
[0091]	Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys		
[0092]		355	360 365
[0093]	Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn		
[0094]	370	375	380
[0095]	Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp		
[0096]	385	390	395 400
[0097]	Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys		
[0098]		405	410 415
[0099]	Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly		
[0100]		420	425 430
[0101]	Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly		
[0102]	435	440	445
[0103]	<210> 3		
[0104]	<211> 702		
[0105]	<212> DNA		
[0106]	<213> 小鼠 (Mus musculus)		
[0107]	<400> 3		
[0108]	atggtatcca cacctcagtt ccttgtatTT ttgcttttct ggattccagc ctccagaggt 60		
[0109]	gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 120		
[0110]	ttctcctgca gggccagtca gagcattggc acaagcatac actggtatca gcaaagaaca 180		
[0111]	aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttc 240		
[0112]	aggttagtg gcagtgatc agggacagat tttactetta gcatcaacag tgtggagtet 300		
[0113]	gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa attaatagct ggccaaccac gttcggcggg 360		
[0114]	gggacaagt tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420		
[0115]	tccagtgagc agttaacatc tggagtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480		
[0116]	cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540		
[0117]	aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg 600		
[0118]	ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660		
[0119]	tcaactcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt 702		
[0120]	<210> 4		
[0121]	<211> 214		
[0122]	<212> PRT		
[0123]	<213> 小鼠 (Mus musculus)		
[0124]	<400> 4		
[0125]	Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly		

[0126]	1	5	10	15
[0127]	Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser			
[0128]		20	25	30
[0129]	Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile			
[0130]		35	40	45
[0131]	Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0132]		50	55	60
[0133]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser			
[0134]		65	70	75
[0135]	Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr			
[0136]		85	90	95
[0137]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala			
[0138]		100	105	110
[0139]	Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly			
[0140]		115	120	125
[0141]	Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile			
[0142]		130	135	140
[0143]	Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu			
[0144]		145	150	155
[0145]	Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser			
[0146]		165	170	175
[0147]	Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr			
[0148]		180	185	190
[0149]	Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser			
[0150]		195	200	205
[0151]	Phe Asn Arg Asn Glu Cys			
[0152]	210			
[0153]	<210> 5			
[0154]	<211> 109			
[0155]	<212> PRT			
[0156]	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
[0157]	<400> 5			
[0158]	Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly			
[0159]	1	5	10	15
[0160]	Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser			
[0161]		20	25	30
[0162]	Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile			
[0163]		35	40	45
[0164]	Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0165]		50	55	60
[0166]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser			
[0167]		65	70	75
				80

[0168] Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr  
 [0169] 85 90 95  
 [0170] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala  
 [0171] 100 105  
 [0172] <210> 6  
 [0173] <211> 118  
 [0174] <212> PRT  
 [0175] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [0176] <400> 6  
 [0177] Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 [0178] 1 5 10 15  
 [0179] Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 [0180] 20 25 30  
 [0181] Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 [0182] 35 40 45  
 [0183] Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu  
 [0184] 50 55 60  
 [0185] Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 [0186] 65 70 75 80  
 [0187] Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 [0188] 85 90 95  
 [0189] Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [0190] 100 105 110  
 [0191] Ser Val Thr Val Ser Ser  
 [0192] 115  
 [0193] <210> 7  
 [0194] <211> 256  
 [0195] <212> PRT  
 [0196] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [0197] <400> 7  
 [0198] Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu  
 [0199] 1 5 10 15  
 [0200] Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr  
 [0201] 20 25 30  
 [0202] Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu  
 [0203] 35 40 45  
 [0204] Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln  
 [0205] 50 55 60  
 [0206] Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys  
 [0207] 65 70 75 80  
 [0208] Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr  
 [0209] 85 90 95

[0210]	Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
[0211]	100 105 110
[0212]	Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
[0213]	115 120 125
[0214]	Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
[0215]	130 135 140
[0216]	Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
[0217]	145 150 155 160
[0218]	Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
[0219]	165 170 175
[0220]	Glu Cys Ser Ser Gln Gly His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser
[0221]	180 185 190
[0222]	Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile
[0223]	195 200 205
[0224]	Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg
[0225]	210 215 220
[0226]	Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro
[0227]	225 230 235 240
[0228]	Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
[0229]	245 250 255
[0230]	<210> 8
[0231]	<211> 554
[0232]	<212> PRT
[0233]	<213> 小鼠 (Mus musculus)
[0234]	<400> 8
[0235]	Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
[0236]	1 5 10 15
[0237]	Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
[0238]	20 25 30
[0239]	Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
[0240]	35 40 45
[0241]	Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
[0242]	50 55 60
[0243]	Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
[0244]	65 70 75 80
[0245]	Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
[0246]	85 90 95
[0247]	Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
[0248]	100 105 110
[0249]	Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
[0250]	115 120 125
[0251]	Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln

[0252]	130	135	140
[0253]	Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu		
[0254]	145	150	155
[0255]	Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala		
[0256]		165	170
[0257]	Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu		
[0258]		180	185
[0259]	Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His		
[0260]		195	200
[0261]	Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu		
[0262]		210	215
[0263]	Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro		
[0264]		225	230
[0265]	Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser		
[0266]		245	250
[0267]	Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser		
[0268]		260	265
[0269]	Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn		
[0270]		275	280
[0271]	Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val		
[0272]		290	295
[0273]	Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly		
[0274]		305	310
[0275]	Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu		
[0276]		325	330
[0277]	Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala		
[0278]		340	345
[0279]	Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro		
[0280]		355	360
[0281]	Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro		
[0282]		370	375
[0283]	Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro		
[0284]		385	390
[0285]	Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro		
[0286]		405	410
[0287]	Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly		
[0288]		420	425
[0289]	Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp		
[0290]		435	440
[0291]	Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala		
[0292]		450	455
[0293]	Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly		

[0294]	465	470	475	480
[0295]	His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser			
[0296]		485	490	495
[0297]	Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val			
[0298]		500	505	510
[0299]	Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro			
[0300]		515	520	525
[0301]	Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr			
[0302]		530	535	540
[0303]	Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val			
[0304]	545	550		
[0305]	<210> 9			
[0306]	<211> 438			
[0307]	<212> PRT			
[0308]	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
[0309]	<400> 9			
[0310]	Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu			
[0311]	1	5	10	15
[0312]	Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr			
[0313]		20	25	30
[0314]	Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu			
[0315]		35	40	45
[0316]	Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln			
[0317]		50	55	60
[0318]	Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys			
[0319]	65	70	75	80
[0320]	Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr			
[0321]		85	90	95
[0322]	Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu			
[0323]		100	105	110
[0324]	Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu			
[0325]		115	120	125
[0326]	Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln			
[0327]		130	135	140
[0328]	Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu			
[0329]	145	150	155	160
[0330]	Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala			
[0331]		165	170	175
[0332]	Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu			
[0333]		180	185	190
[0334]	Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His			
[0335]		195	200	205

[0336]	Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
[0337]	210 215 220
[0338]	Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
[0339]	225 230 235 240
[0340]	Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
[0341]	245 250 255
[0342]	Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
[0343]	260 265 270
[0344]	Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
[0345]	275 280 285
[0346]	Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
[0347]	290 295 300
[0348]	Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
[0349]	305 310 315 320
[0350]	Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
[0351]	325 330 335
[0352]	Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
[0353]	340 345 350
[0354]	Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly His Glu Arg Gln
[0355]	355 360 365
[0356]	Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu
[0357]	370 375 380
[0358]	Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu
[0359]	385 390 395 400
[0360]	Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp
[0361]	405 410 415
[0362]	Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg
[0363]	420 425 430
[0364]	Gln Val Glu Leu Pro Val
[0365]	435
[0366]	<210> 10
[0367]	<211> 441
[0368]	<212> PRT
[0369]	<213> 小鼠 (Mus musculus)
[0370]	<400> 10
[0371]	Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Thr
[0372]	1 5 10 15
[0373]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
[0374]	20 25 30
[0375]	Phe Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
[0376]	35 40 45
[0377]	Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe

[0378]	50	55	60
[0379]	Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0380]	65	70	75 80
[0381]	Met Gln Phe Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0382]		85	90 95
[0383]	Ala Arg Glu Gly Gly Asn Tyr Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
[0384]		100	105 110
[0385]	Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu		
[0386]		115	120 125
[0387]	Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys		
[0388]		130	135 140
[0389]	Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser		
[0390]		145	150 155 160
[0391]	Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
[0392]		165	170 175
[0393]	Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp		
[0394]		180	185 190
[0395]	Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr		
[0396]		195	200 205
[0397]	Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys		
[0398]		210	215 220
[0399]	Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys		
[0400]		225	230 235 240
[0401]	Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val		
[0402]		245	250 255
[0403]	Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe		
[0404]		260	265 270
[0405]	Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu		
[0406]		275	280 285
[0407]	Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His		
[0408]		290	295 300
[0409]	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala		
[0410]		305	310 315 320
[0411]	Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg		
[0412]		325	330 335
[0413]	Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met		
[0414]		340	345 350
[0415]	Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro		
[0416]		355	360 365
[0417]	Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn		
[0418]		370	375 380
[0419]	Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val		

[0420]	385	390	395	400
[0421]	Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr			
[0422]		405	410	415
[0423]	Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu			
[0424]		420	425	430
[0425]	Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys			
[0426]		435	440	
[0427]	<210>	11		
[0428]	<211>	214		
[0429]	<212>	PRT		
[0430]	<213>	小鼠 (Mus musculus)		
[0431]	<400>	11		
[0432]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly			
[0433]	1	5	10	15
[0434]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala			
[0435]		20	25	30
[0436]	Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile			
[0437]		35	40	45
[0438]	Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly			
[0439]		50	55	60
[0440]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Ser			
[0441]	65	70	75	80
[0442]	Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu			
[0443]		85	90	95
[0444]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala			
[0445]		100	105	110
[0446]	Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly			
[0447]		115	120	125
[0448]	Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile			
[0449]		130	135	140
[0450]	Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu			
[0451]	145	150	155	160
[0452]	Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser			
[0453]		165	170	175
[0454]	Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr			
[0455]		180	185	190
[0456]	Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser			
[0457]		195	200	205
[0458]	Phe Asn Arg Asn Glu Cys			
[0459]		210		
[0460]	<210>	12		
[0461]	<211>	449		

[0462] <212> PRT  
 [0463] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [0464] <400> 12  
 [0465] Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [0466] 1 5 10 15  
 [0467] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 [0468] 20 25 30  
 [0469] Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 [0470] 35 40 45  
 [0471] Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 [0472] 50 55 60  
 [0473] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 [0474] 65 70 75 80  
 [0475] Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 [0476] 85 90 95  
 [0477] Ala Arg Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [0478] 100 105 110  
 [0479] Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr  
 [0480] 115 120 125  
 [0481] Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu  
 [0482] 130 135 140  
 [0483] Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp  
 [0484] 145 150 155 160  
 [0485] Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 [0486] 165 170 175  
 [0487] Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser  
 [0488] 180 185 190  
 [0489] Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser  
 [0490] 195 200 205  
 [0491] Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys  
 [0492] 210 215 220  
 [0493] Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro  
 [0494] 225 230 235 240  
 [0495] Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser  
 [0496] 245 250 255  
 [0497] Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp  
 [0498] 260 265 270  
 [0499] Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr  
 [0500] 275 280 285  
 [0501] Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val  
 [0502] 290 295 300  
 [0503] Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu

[0504]	305	310	315	320
[0505]	Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg			
[0506]		325	330	335
[0507]	Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val			
[0508]		340	345	350
[0509]	Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr			
[0510]		355	360	365
[0511]	Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr			
[0512]		370	375	380
[0513]	Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu			
[0514]		385	390	395
[0515]	Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys			
[0516]		405	410	415
[0517]	Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu			
[0518]		420	425	430
[0519]	Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly			
[0520]		435	440	445
[0521]	Lys			
[0522]	<210> 13			
[0523]	<211> 214			
[0524]	<212> PRT			
[0525]	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
[0526]	<400> 13			
[0527]	Ala Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
[0528]	1	5	10	15
[0529]	Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr			
[0530]		20	25	30
[0531]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile			
[0532]		35	40	45
[0533]	Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0534]		50	55	60
[0535]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro			
[0536]		65	70	75
[0537]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp			
[0538]		85	90	95
[0539]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala			
[0540]		100	105	110
[0541]	Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly			
[0542]		115	120	125
[0543]	Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile			
[0544]		130	135	140
[0545]	Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu			

[0546]	145	150	155	160
[0547]	Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser			
[0548]		165	170	175
[0549]	Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr			
[0550]		180	185	190
[0551]	Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser			
[0552]		195	200	205
[0553]	Phe Asn Arg Asn Glu Cys			
[0554]	210			
[0555]	<210> 14			
[0556]	<211> 522			
[0557]	<212> PRT			
[0558]	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
[0559]	<400> 14			
[0560]	Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln			
[0561]	1	5	10	15
[0562]	Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp			
[0563]		20	25	30
[0564]	Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp			
[0565]		35	40	45
[0566]	Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu			
[0567]	50	55	60	
[0568]	Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe			
[0569]	65	70	75	80
[0570]	Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys			
[0571]		85	90	95
[0572]	Ala Arg Leu Glu Thr Trp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr			
[0573]		100	105	110
[0574]	Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu			
[0575]		115	120	125
[0576]	Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys			
[0577]	130	135	140	
[0578]	Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser			
[0579]	145	150	155	160
[0580]	Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser			
[0581]		165	170	175
[0582]	Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp			
[0583]		180	185	190
[0584]	Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr			
[0585]		195	200	205
[0586]	Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn			
[0587]	210	215	220	

[0588]	Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu
[0589]	225 230 235 240
[0590]	Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val
[0591]	245 250 255
[0592]	Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
[0593]	260 265 270
[0594]	Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val
[0595]	275 280 285
[0596]	Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser
[0597]	290 295 300
[0598]	Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met
[0599]	305 310 315 320
[0600]	Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser
[0601]	325 330 335
[0602]	Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro
[0603]	340 345 350
[0604]	Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp
[0605]	355 360 365
[0606]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser
[0607]	370 375 380
[0608]	Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr
[0609]	385 390 395 400
[0610]	Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu
[0611]	405 410 415
[0612]	Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn
[0613]	420 425 430
[0614]	Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser
[0615]	435 440 445
[0616]	Arg Ser Pro Gly Leu Asp Leu Asp Asp Ile Cys Ala Glu Ala Lys Asp
[0617]	450 455 460
[0618]	Gly Glu Leu Asp Gly Leu Trp Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Ser Leu
[0619]	465 470 475 480
[0620]	Phe Leu Leu Ser Val Cys Tyr Ser Ala Ser Val Thr Leu Phe Lys Val
[0621]	485 490 495
[0622]	Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val Val Glu Leu Lys Gln Lys Ile Ser Pro
[0623]	500 505 510
[0624]	Asp Tyr Arg Asn Met Ile Gly Gln Gly Ala
[0625]	515 520
[0626]	<210> 15
[0627]	<211> 214
[0628]	<212> PRT
[0629]	<213> 小鼠 (Mus musculus)

[0630] <400> 15  
 [0631] Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 [0632] 1 5 10 15  
 [0633] Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
 [0634] 20 25 30  
 [0635] Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 [0636] 35 40 45  
 [0637] Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0638] 50 55 60  
 [0639] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser  
 [0640] 65 70 75 80  
 [0641] Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Thr  
 [0642] 85 90 95  
 [0643] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Trp Ala Asp Ala Ala  
 [0644] 100 105 110  
 [0645] Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly  
 [0646] 115 120 125  
 [0647] Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile  
 [0648] 130 135 140  
 [0649] Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu  
 [0650] 145 150 155 160  
 [0651] Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser  
 [0652] 165 170 175  
 [0653] Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr  
 [0654] 180 185 190  
 [0655] Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser  
 [0656] 195 200 205  
 [0657] Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 [0658] 210  
 [0659] <210> 16  
 [0660] <211> 5  
 [0661] <212> PRT  
 [0662] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [0663] <400> 16  
 [0664] Gly Tyr Phe Met His  
 [0665] 1 5  
 [0666] <210> 17  
 [0667] <211> 5  
 [0668] <212> PRT  
 [0669] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [0670] <400> 17  
 [0671] Asp Tyr Tyr Met Tyr

[0672]	1	5		
[0673]	<210>	18		
[0674]	<211>	6		
[0675]	<212>	PRT		
[0676]	<213>	智人 (Homo sapiens)		
[0677]	<400>	18		
[0678]		Ser Asp Tyr Ala Trp Asn		
[0679]	1	5		
[0680]	<210>	19		
[0681]	<211>	17		
[0682]	<212>	PRT		
[0683]	<213>	智人 (Homo sapiens)		
[0684]	<400>	19		
[0685]		Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe Lys		
[0686]	1	5	10	15
[0687]		Gly		
[0688]	<210>	20		
[0689]	<211>	17		
[0690]	<212>	PRT		
[0691]	<213>	智人 (Homo sapiens)		
[0692]	<400>	20		
[0693]		Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys		
[0694]	1	5	10	15
[0695]		Gly		
[0696]	<210>	21		
[0697]	<211>	16		
[0698]	<212>	PRT		
[0699]	<213>	智人 (Homo sapiens)		
[0700]	<400>	21		
[0701]		Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser		
[0702]	1	5	10	15
[0703]	<210>	22		
[0704]	<211>	8		
[0705]	<212>	PRT		
[0706]	<213>	智人 (Homo sapiens)		
[0707]	<400>	22		
[0708]		Glu Gly Gly Asn Tyr Pro Ala Tyr		
[0709]	1	5		
[0710]	<210>	23		
[0711]	<211>	10		
[0712]	<212>	PRT		
[0713]	<213>	智人 (Homo sapiens)		

[0714] <400> 23  
[0715] Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Pro Phe Ala Tyr  
[0716] 1 5 10  
[0717] <210> 24  
[0718] <211> 9  
[0719] <212> PRT  
[0720] <213> 智人 (Homo sapiens)  
[0721] <400> 24  
[0722] Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr  
[0723] 1 5  
[0724] <210> 25  
[0725] <211> 8  
[0726] <212> PRT  
[0727] <213> 智人 (Homo sapiens)  
[0728] <400> 25  
[0729] Leu Glu Thr Trp Leu Phe Asp Tyr  
[0730] 1 5  
[0731] <210> 26  
[0732] <211> 7  
[0733] <212> PRT  
[0734] <213> 智人 (Homo sapiens)  
[0735] <400> 26  
[0736] Asp Tyr Gly Trp Phe Asp Tyr  
[0737] 1 5  
[0738] <210> 27  
[0739] <211> 11  
[0740] <212> PRT  
[0741] <213> 智人 (Homo sapiens)  
[0742] <400> 27  
[0743] Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Thr  
[0744] 1 5 10  
[0745] <210> 28  
[0746] <211> 11  
[0747] <212> PRT  
[0748] <213> 智人 (Homo sapiens)  
[0749] <400> 28  
[0750] Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
[0751] 1 5 10  
[0752] <210> 29  
[0753] <211> 11  
[0754] <212> PRT  
[0755] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0756] <400> 29  
[0757] Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His  
[0758] 1 5 10  
[0759] <210> 30  
[0760] <211> 7  
[0761] <212> PRT  
[0762] <213> 智人 (Homo sapiens)  
[0763] <400> 30  
[0764] Trp Thr Ser Thr Arg His Ala  
[0765] 1 5  
[0766] <210> 31  
[0767] <211> 7  
[0768] <212> PRT  
[0769] <213> 智人 (Homo sapiens)  
[0770] <400> 31  
[0771] Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser  
[0772] 1 5  
[0773] <210> 32  
[0774] <211> 7  
[0775] <212> PRT  
[0776] <213> 智人 (Homo sapiens)  
[0777] <400> 32  
[0778] Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser  
[0779] 1 5  
[0780] <210> 33  
[0781] <211> 7  
[0782] <212> PRT  
[0783] <213> 智人 (Homo sapiens)  
[0784] <400> 33  
[0785] Tyr Thr Ser Glu Ser Ile Ser  
[0786] 1 5  
[0787] <210> 34  
[0788] <211> 9  
[0789] <212> PRT  
[0790] <213> 智人 (Homo sapiens)  
[0791] <400> 34  
[0792] Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
[0793] 1 5  
[0794] <210> 35  
[0795] <211> 9  
[0796] <212> PRT  
[0797] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0798] <400> 35  
[0799] Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr  
[0800] 1 5  
[0801] <210> 36  
[0802] <211> 9  
[0803] <212> PRT  
[0804] <213> 智人 (Homo sapiens)  
[0805] <400> 36  
[0806] Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr Thr  
[0807] 1 5  
[0808] <210> 37  
[0809] <211> 9  
[0810] <212> PRT  
[0811] <213> 智人 (Homo sapiens)  
[0812] <400> 37  
[0813] Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Thr Thr  
[0814] 1 5  
[0815] <210> 38  
[0816] <211> 9  
[0817] <212> PRT  
[0818] <213> 智人 (Homo sapiens)  
[0819] <400> 38  
[0820] Gln Gln Tyr Ser Ser Trp Pro Thr Thr  
[0821] 1 5  
[0822] <210> 39  
[0823] <211> 130  
[0824] <212> PRT  
[0825] <213> 智人 (Homo sapiens)  
[0826] <220>  
[0827] <221> misc\_feature  
[0828] <222> (23) .. (23)  
[0829] <223> Xaa=任何氨基酸  
[0830] <220>  
[0831] <221> misc\_feature  
[0832] <222> (27) .. (27)  
[0833] <223> Xaa=任何氨基酸  
[0834] <220>  
[0835] <221> misc\_feature  
[0836] <222> (29) .. (29)  
[0837] <223> Xaa=任何氨基酸  
[0838] <220>  
[0839] <221> misc\_feature

[0840] <222> (31) .. (36)  
 [0841] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [0842] <220>  
 [0843] <221> misc\_feature  
 [0844] <222> (51) .. (51)  
 [0845] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [0846] <220>  
 [0847] <221> misc\_feature  
 [0848] <222> (56) .. (57)  
 [0849] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [0850] <220>  
 [0851] <221> misc\_feature  
 [0852] <222> (59) .. (59)  
 [0853] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [0854] <220>  
 [0855] <221> misc\_feature  
 [0856] <222> (61) .. (61)  
 [0857] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [0858] <220>  
 [0859] <221> misc\_feature  
 [0860] <222> (84) .. (84)  
 [0861] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [0862] <220>  
 [0863] <221> misc\_feature  
 [0864] <222> (86) .. (86)  
 [0865] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [0866] <220>  
 [0867] <221> misc\_feature  
 [0868] <222> (101) .. (116)  
 [0869] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [0870] <220>  
 [0871] <221> misc\_feature  
 [0872] <222> (119) .. (119)  
 [0873] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [0874] <220>  
 [0875] <221> misc\_feature  
 [0876] <222> (125) .. (125)  
 [0877] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [0878] <400> 39  
 [0879] Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 [0880] 1 5 10 15  
 [0881] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Xaa Val Ser Gly Xaa Ser Xaa Ser Xaa Xaa

[0882]	20	25	30
[0883]	Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
[0884]	35	40	45
[0885]	Ile Gly Xaa Tyr Tyr Arg Ala Xaa Xaa Gly Xaa Thr Xaa Tyr Asn Pro		
[0886]	50	55	60
[0887]	Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln		
[0888]	65	70	75
[0889]	Phe Ser Leu Xaa Leu Xaa Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr		
[0890]	85	90	95
[0891]	Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa		
[0892]	100	105	110
[0893]	Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val		
[0894]	115	120	125
[0895]	Ser Ser		
[0896]	130		
[0897]	<210> 40		
[0898]	<211> 354		
[0899]	<212> DNA		
[0900]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[0901]	<400> 40		
[0902]	gacgtacaac ttcaagaatc tggcccaggt ctcgtcaaac cttctcaaac tctctcactc 60		
[0903]	acctgcactg ttactgacta ctctattaca tccgactacg cttggaactg gatccgacaa 120		
[0904]	tttcttggtgta aaaaactoga atggatgggt tatatttctt actctggctc cacctcctac 180		
[0905]	aatccttctc tgaatcacg catcacaatt tcccgcgata cctctaaaaa tcaattttca 240		
[0906]	ctccaactca attctgttac cgccgcgat actgccacct actactgtgc ctcttttgac 300		
[0907]	tagctcag ccatggatta ttggggacag ggtactaccg ttaccgtaag ctca 354		
[0908]	<210> 41		
[0909]	<211> 118		
[0910]	<212> PRT		
[0911]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[0912]	<400> 41		
[0913]	Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln		
[0914]	1	5	10
[0915]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp		
[0916]	20	25	30
[0917]	Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Lys Leu Glu Trp		
[0918]	35	40	45
[0919]	Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu		
[0920]	50	55	60
[0921]	Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser		
[0922]	65	70	75
[0923]	Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys		

[0924]	85	90	95
[0925]	Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
[0926]	100	105	110
[0927]	Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0928]	115		
[0929]	<210> 42		
[0930]	<211> 354		
[0931]	<212> DNA		
[0932]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[0933]	<400> 42		
[0934]	caagttcaac ttcaagaatc aggcccccga ctcgttaaac cctctcaaac tctctctctt 60		
[0935]	acttgcaactg tatccgatta ctctattact tcagactacg cttggaactg gatcagacaa 120		
[0936]	tttcccggaa aaggactcga atggatggga tatatctctt actctggctc aacctcttac 180		
[0937]	aaccctctc tcaaatctcg aataacaatc tcacgcgata cttctaaaaa tcaatttca 240		
[0938]	cttcaactta actccgttac tgccgccgac actgccgttt actactgtgc ttccttcgat 300		
[0939]	tacgccacg ctatggatta ttggggacaa ggaactaccg tcaactgtcag ctca 354		
[0940]	<210> 43		
[0941]	<211> 118		
[0942]	<212> PRT		
[0943]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[0944]	<400> 43		
[0945]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln		
[0946]	1 5 10 15		
[0947]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp		
[0948]	20 25 30		
[0949]	Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
[0950]	35 40 45		
[0951]	Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu		
[0952]	50 55 60		
[0953]	Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser		
[0954]	65 70 75 80		
[0955]	Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0956]	85 90 95		
[0957]	Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
[0958]	100 105 110		
[0959]	Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0960]	115		
[0961]	<210> 44		
[0962]	<211> 327		
[0963]	<212> DNA		
[0964]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[0965]	<400> 44		

[0966] gaaatagttc ttactcaatc ccccggtaca ctctcagttt ccccaggcga acgcgtcact 60  
 [0967] ttttcttgca gagcatcaca atcaatcggc acttcaattc attggtatca acaaaaaaca 120  
 [0968] ggacaggccc cagacttct tattaatat gcatcagaac gagccacagg catcccagac 180  
 [0969] agattttcag gttcaggatc aggcaccgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240  
 [0970] gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataaacagct ggcccactac attcggacaa 300  
 [0971] ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327  
 [0972] <210> 45  
 [0973] <211> 109  
 [0974] <212> PRT  
 [0975] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [0976] <400> 45  
 [0977] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 [0978] 1 5 10 15  
 [0979] Glu Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
 [0980] 20 25 30  
 [0981] Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 [0982] 35 40 45  
 [0983] Lys Tyr Ala Ser Glu Arg Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 [0984] 50 55 60  
 [0985] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ser  
 [0986] 65 70 75 80  
 [0987] Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr  
 [0988] 85 90 95  
 [0989] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr  
 [0990] 100 105  
 [0991] <210> 46  
 [0992] <211> 327  
 [0993] <212> DNA  
 [0994] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [0995] <400> 46  
 [0996] gaaatagttc ttactcaatc ccccggtaca ctctcagttt ccccaggcga acgcgtcact 60  
 [0997] ttttcttgca gagcatcaca atcaatcggc acttcaattc attggtatca acaaaaaaca 120  
 [0998] ggacaggccc cagacttct tattaatat gcatcagaac gagccacagg catcccagac 180  
 [0999] agattttcag gttcaggatc aggcaccgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240  
 [1000] gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataaacagct ggcccactac attcggacaa 300  
 [1001] ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327  
 [1002] <210> 47  
 [1003] <211> 109  
 [1004] <212> PRT  
 [1005] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1006] <400> 47  
 [1007] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

[1008] 1 5 10 15  
 [1009] Glu Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
 [1010] 20 25 30  
 [1011] Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 [1012] 35 40 45  
 [1013] Lys Tyr Ala Ser Glu Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 [1014] 50 55 60  
 [1015] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ser  
 [1016] 65 70 75 80  
 [1017] Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr  
 [1018] 85 90 95  
 [1019] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr  
 [1020] 100 105  
 [1021] <210> 48  
 [1022] <211> 109  
 [1023] <212> PRT  
 [1024] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [1025] <400> 48  
 [1026] Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 [1027] 1 5 10 15  
 [1028] Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
 [1029] 20 25 30  
 [1030] Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 [1031] 35 40 45  
 [1032] Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 [1033] 50 55 60  
 [1034] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ser  
 [1035] 65 70 75 80  
 [1036] Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr  
 [1037] 85 90 95  
 [1038] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr  
 [1039] 100 105  
 [1040] <210> 49  
 [1041] <211> 111  
 [1042] <212> PRT  
 [1043] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [1044] <220>  
 [1045] <221> misc\_feature  
 [1046] <222> (98) .. (98)  
 [1047] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1048] <400> 49  
 [1049] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[1050]	1	5	10	15
[1051]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser			
[1052]		20	25	30
[1053]	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
[1054]		35	40	45
[1055]	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser			
[1056]		50	55	60
[1057]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu			
[1058]		65	70	75
[1059]	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro			
[1060]		85	90	95
[1061]	Pro Xaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr			
[1062]		100	105	110
[1063]	<210> 50			
[1064]	<211> 108			
[1065]	<212> PRT			
[1066]	<213> 智人 (Homo sapiens)			
[1067]	<400> 50			
[1068]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly			
[1069]	1	5	10	15
[1070]	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Gly Ile Gly Asn Tyr			
[1071]		20	25	30
[1072]	Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Lys Leu Leu Ile Lys			
[1073]		35	40	45
[1074]	Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser			
[1075]		50	55	60
[1076]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu			
[1077]		65	70	75
[1078]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Lys His Pro Leu Thr			
[1079]		85	90	95
[1080]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr			
[1081]		100	105	
[1082]	<210> 51			
[1083]	<211> 109			
[1084]	<212> PRT			
[1085]	<213> 人工序列			
[1086]	<220>			
[1087]	<223> 低风险轻链与VK6亚组2-1-(1)A14:			
[1088]	<400> 51			
[1089]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly			
[1090]	1	5	10	15
[1091]	Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser			

[1092]	20	25	30
[1093]	Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Asp Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile		
[1094]	35	40	45
[1095]	Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[1096]	50	55	60
[1097]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala		
[1098]	65	70	75
[1099]	Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr		
[1100]	85	90	95
[1101]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr		
[1102]	100	105	
[1103]	<210> 52		
[1104]	<211> 327		
[1105]	<212> DNA		
[1106]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[1107]	<400> 52		
[1108]	gacatagttc tcacacaatc accagcattc ctctcagtta caccggcgca aaaagtaacc	60	
[1109]	tttacctgtc aggettctca atctatcggc acttctattc actggtatca acaaaaaacc	120	
[1110]	gatcaagctc ctaaacctct cataaaatac gcatccgaat ccatctccgg tatcccctcc	180	
[1111]	agatittcag gctccggctc cggcacagat ttcacctta ccattagctc agttgaagcc	240	
[1112]	gaagacgcag ctgattacta ctgtcaacaa ataaactcat ggcccactac tttcggcggc	300	
[1113]	ggcactaaac tcgaaataaa acgtacg	327	
[1114]	<210> 53		
[1115]	<211> 109		
[1116]	<212> PRT		
[1117]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[1118]	<400> 53		
[1119]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly		
[1120]	1	5	10
[1121]	Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser		
[1122]	20	25	30
[1123]	Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[1124]	35	40	45
[1125]	Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[1126]	50	55	60
[1127]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala		
[1128]	65	70	75
[1129]	Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr		
[1130]	85	90	95
[1131]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr		
[1132]	100	105	
[1133]	<210> 54		

[1134] <211> 99  
 [1135] <212> PRT  
 [1136] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1137] <400> 54  
 [1138] Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 [1139] 1 5 10 15  
 [1140] Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
 [1141] 20 25 30  
 [1142] Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 [1143] 35 40 45  
 [1144] Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [1145] 50 55 60  
 [1146] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser  
 [1147] 65 70 75 80  
 [1148] Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr  
 [1149] 85 90 95  
 [1150] Thr Phe Gly  
 [1151] <210> 55  
 [1152] <211> 95  
 [1153] <212> PRT  
 [1154] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1155] <400> 55  
 [1156] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [1157] 1 5 10 15  
 [1158] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 [1159] 20 25 30  
 [1160] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 [1161] 35 40 45  
 [1162] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [1163] 50 55 60  
 [1164] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [1165] 65 70 75 80  
 [1166] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro  
 [1167] 85 90 95  
 [1168] <210> 56  
 [1169] <211> 101  
 [1170] <212> PRT  
 [1171] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1172] <400> 56  
 [1173] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 [1174] 1 5 10 15  
 [1175] Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

[1176]	20	25	30
[1177]	Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln		
[1178]	35	40	45
[1179]	Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val		
[1180]	50	55	60
[1181]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys		
[1182]	65	70	75
[1183]	Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln		
[1184]	85	90	95
[1185]	Arg Ile Glu Phe Pro		
[1186]	100		
[1187]	<210> 57		
[1188]	<211> 96		
[1189]	<212> PRT		
[1190]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[1191]	<400> 57		
[1192]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[1193]	1	5	10
[1194]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser		
[1195]	20	25	30
[1196]	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
[1197]	35	40	45
[1198]	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		
[1199]	50	55	60
[1200]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
[1201]	65	70	75
[1202]	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro		
[1203]	85	90	95
[1204]	<210> 58		
[1205]	<211> 101		
[1206]	<212> PRT		
[1207]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[1208]	<400> 58		
[1209]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
[1210]	1	5	10
[1211]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser		
[1212]	20	25	30
[1213]	Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
[1214]	35	40	45
[1215]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
[1216]	50	55	60
[1217]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		

[1218]	65	70	75	80
[1219]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
[1220]		85	90	95
[1221]	Tyr Tyr Ser Thr Pro			
[1222]		100		
[1223]	<210> 59			
[1224]	<211> 95			
[1225]	<212> PRT			
[1226]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[1227]	<400> 59			
[1228]	Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly			
[1229]	1	5	10	15
[1230]	Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp			
[1231]		20	25	30
[1232]	Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile			
[1233]		35	40	45
[1234]	Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly			
[1235]		50	55	60
[1236]	Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser			
[1237]	65	70	75	80
[1238]	Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro			
[1239]		85	90	95
[1240]	<210> 60			
[1241]	<211> 95			
[1242]	<212> PRT			
[1243]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[1244]	<400> 60			
[1245]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys			
[1246]	1	5	10	15
[1247]	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser			
[1248]		20	25	30
[1249]	Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile			
[1250]		35	40	45
[1251]	Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[1252]		50	55	60
[1253]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala			
[1254]	65	70	75	80
[1255]	Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro			
[1256]		85	90	95
[1257]	<210> 61			
[1258]	<211> 52			
[1259]	<212> PRT			

[1260] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [1261] <400> 61  
 [1262] Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 [1263] 1 5 10 15  
 [1264] Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
 [1265] 20 25 30  
 [1266] Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 [1267] 35 40 45  
 [1268] Lys Tyr Ala Ser  
 [1269] 50  
 [1270] <210> 62  
 [1271] <211> 57  
 [1272] <212> PRT  
 [1273] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [1274] <220>  
 [1275] <221> misc\_feature  
 [1276] <222> (31) .. (33)  
 [1277] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1278] <220>  
 [1279] <221> misc\_feature  
 [1280] <222> (36) .. (37)  
 [1281] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1282] <220>  
 [1283] <221> misc\_feature  
 [1284] <222> (39) .. (39)  
 [1285] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1286] <220>  
 [1287] <221> misc\_feature  
 [1288] <222> (55) .. (55)  
 [1289] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1290] <400> 62  
 [1291] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [1292] 1 5 10 15  
 [1293] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Val Xaa Xaa  
 [1294] 20 25 30  
 [1295] Xaa Ile Ser Xaa Xaa Leu Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
 [1296] 35 40 45  
 [1297] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Ala Ser  
 [1298] 50 55  
 [1299] <210> 63  
 [1300] <211> 58  
 [1301] <212> PRT

[1302] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1303] <220>  
 [1304] <221> misc\_feature  
 [1305] <222> (33) .. (33)  
 [1306] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1307] <220>  
 [1308] <221> misc\_feature  
 [1309] <222> (36) .. (37)  
 [1310] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1311] <220>  
 [1312] <221> misc\_feature  
 [1313] <222> (56) .. (57)  
 [1314] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1315] <400> 63  
 [1316] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 [1317] 1 5 10 15  
 [1318] Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 [1319] 20 25 30  
 [1320] Xaa Asp Gly Xaa Xaa Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
 [1321] 35 40 45  
 [1322] Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Ser  
 [1323] 50 55  
 [1324] <210> 64  
 [1325] <211> 53  
 [1326] <212> PRT  
 [1327] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1328] <400> 64  
 [1329] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 [1330] 1 5 10 15  
 [1331] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 [1332] 20 25 30  
 [1333] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 [1334] 35 40 45  
 [1335] Ile Tyr Gly Ala Ser  
 [1336] 50  
 [1337] <210> 65  
 [1338] <211> 58  
 [1339] <212> PRT  
 [1340] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1341] <400> 65  
 [1342] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [1343] 1 5 10 15

[1344] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 [1345]                   20                                   25                                   30  
 [1346] Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 [1347]                   35                                   40                                   45  
 [1348] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser  
 [1349]           50                                   55  
 [1350] <210> 66  
 [1351] <211> 52  
 [1352] <212> PRT  
 [1353] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1354] <400> 66  
 [1355] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [1356] 1                                   5                                   10                                   15  
 [1357] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 [1358]                   20                                   25                                   30  
 [1359] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 [1360]                   35                                   40                                   45  
 [1361] Tyr Ala Ala Ser  
 [1362]           50  
 [1363] <210> 67  
 [1364] <211> 58  
 [1365] <212> PRT  
 [1366] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1367] <400> 67  
 [1368] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 [1369] 1                                   5                                   10                                   15  
 [1370] Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 [1371]                   20                                   25                                   30  
 [1372] Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
 [1373]                   35                                   40                                   45  
 [1374] Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser  
 [1375]           50                                   55  
 [1376] <210> 68  
 [1377] <211> 53  
 [1378] <212> PRT  
 [1379] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1380] <400> 68  
 [1381] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 [1382] 1                                   5                                   10                                   15  
 [1383] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 [1384]                   20                                   25                                   30  
 [1385] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

[1386]	35	40	45
[1387]	Ile Tyr Gly Ala Ser		
[1388]	50		
[1389]	<210> 69		
[1390]	<211> 58		
[1391]	<212> PRT		
[1392]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[1393]	<400> 69		
[1394]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
[1395]	1 5 10 15		
[1396]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser		
[1397]	20 25 30		
[1398]	Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
[1399]	35 40 45		
[1400]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser		
[1401]	50 55		
[1402]	<210> 70		
[1403]	<211> 52		
[1404]	<212> PRT		
[1405]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[1406]	<400> 70		
[1407]	Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly		
[1408]	1 5 10 15		
[1409]	Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp		
[1410]	20 25 30		
[1411]	Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile		
[1412]	35 40 45		
[1413]	Gln Glu Ala Thr		
[1414]	50		
[1415]	<210> 71		
[1416]	<211> 52		
[1417]	<212> PRT		
[1418]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[1419]	<400> 71		
[1420]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys		
[1421]	1 5 10 15		
[1422]	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser		
[1423]	20 25 30		
[1424]	Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
[1425]	35 40 45		
[1426]	Lys Tyr Ala Ser		
[1427]	50		

[1428] <210> 72  
 [1429] <211> 57  
 [1430] <212> PRT  
 [1431] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [1432] <400> 72  
 [1433] Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 [1434] 1 5 10 15  
 [1435] Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala  
 [1436] 20 25 30  
 [1437] Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gly  
 [1438] 35 40 45  
 [1439] Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala  
 [1440] 50 55  
 [1441] <210> 73  
 [1442] <211> 58  
 [1443] <212> PRT  
 [1444] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [1445] <220>  
 [1446] <221> misc\_feature  
 [1447] <222> (1) .. (1)  
 [1448] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1449] <220>  
 [1450] <221> misc\_feature  
 [1451] <222> (3) .. (3)  
 [1452] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1453] <220>  
 [1454] <221> misc\_feature  
 [1455] <222> (39) .. (42)  
 [1456] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1457] <220>  
 [1458] <221> misc\_feature  
 [1459] <222> (45) .. (45)  
 [1460] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1461] <400> 73  
 [1462] Xaa Leu Xaa Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 [1463] 1 5 10 15  
 [1464] Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
 [1465] 20 25 30  
 [1466] Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Glu Xaa Thr Phe Gly  
 [1467] 35 40 45  
 [1468] Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 [1469] 50 55

[1470] <210> 74  
 [1471] <211> 58  
 [1472] <212> PRT  
 [1473] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1474] <220>  
 [1475] <221> misc\_feature  
 [1476] <222> (3) .. (3)  
 [1477] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1478] <220>  
 [1479] <221> misc\_feature  
 [1480] <222> (40) .. (40)  
 [1481] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1482] <220>  
 [1483] <221> misc\_feature  
 [1484] <222> (42) .. (42)  
 [1485] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1486] <220>  
 [1487] <221> misc\_feature  
 [1488] <222> (45) .. (45)  
 [1489] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1490] <400> 74  
 [1491] Asn Arg Xaa Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 [1492] 1                    5                    10                    15  
 [1493] Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly  
 [1494]                    20                    25                    30  
 [1495] Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Xaa Gln Xaa Pro Arg Xaa Thr Phe Gly  
 [1496]                    35                    40                    45  
 [1497] Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 [1498]                    50                    55  
 [1499] <210> 75  
 [1500] <211> 58  
 [1501] <212> PRT  
 [1502] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1503] <220>  
 [1504] <221> misc\_feature  
 [1505] <222> (45) .. (45)  
 [1506] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1507] <400> 75  
 [1508] Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 [1509] 1                    5                    10                    15  
 [1510] Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala  
 [1511]                    20                    25                    30

[1512] Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Xaa Thr Phe Gly  
 [1513] 35 40 45  
 [1514] Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 [1515] 50 55  
 [1516] <210> 76  
 [1517] <211> 57  
 [1518] <212> PRT  
 [1519] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1520] <220>  
 [1521] <221> misc\_feature  
 [1522] <222> (44) .. (44)  
 [1523] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1524] <400> 76  
 [1525] Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 [1526] 1 5 10 15  
 [1527] Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala  
 [1528] 20 25 30  
 [1529] Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Xaa Thr Phe Gly Gln  
 [1530] 35 40 45  
 [1531] Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 [1532] 50 55  
 [1533] <210> 77  
 [1534] <211> 57  
 [1535] <212> PRT  
 [1536] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1537] <400> 77  
 [1538] Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 [1539] 1 5 10 15  
 [1540] Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
 [1541] 20 25 30  
 [1542] Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly  
 [1543] 35 40 45  
 [1544] Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 [1545] 50 55  
 [1546] <210> 78  
 [1547] <211> 57  
 [1548] <212> PRT  
 [1549] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1550] <400> 78  
 [1551] Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 [1552] 1 5 10 15  
 [1553] Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

[1554]	20	25	30
[1555]	Val Tyr Tyr Cys Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly		
[1556]	35	40	45
[1557]	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr		
[1558]	50	55	
[1559]	<210> 79		
[1560]	<211> 57		
[1561]	<212> PRT		
[1562]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[1563]	<400> 79		
[1564]	Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
[1565]	1 5 10 15		
[1566]	Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala		
[1567]	20 25 30		
[1568]	Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly		
[1569]	35 40 45		
[1570]	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr		
[1571]	50 55		
[1572]	<210> 80		
[1573]	<211> 57		
[1574]	<212> PRT		
[1575]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[1576]	<400> 80		
[1577]	Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
[1578]	1 5 10 15		
[1579]	Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala		
[1580]	20 25 30		
[1581]	Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly		
[1582]	35 40 45		
[1583]	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr		
[1584]	50 55		
[1585]	<210> 81		
[1586]	<211> 57		
[1587]	<212> PRT		
[1588]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[1589]	<400> 81		
[1590]	Thr Leu Val Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly		
[1591]	1 5 10 15		
[1592]	Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser Glu Asp Ala Ala		
[1593]	20 25 30		
[1594]	Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly		
[1595]	35 40 45		

[1596] Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 [1597] 50 55  
 [1598] <210> 82  
 [1599] <211> 57  
 [1600] <212> PRT  
 [1601] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1602] <400> 82  
 [1603] Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 [1604] 1 5 10 15  
 [1605] Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala  
 [1606] 20 25 30  
 [1607] Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly  
 [1608] 35 40 45  
 [1609] Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 [1610] 50 55  
 [1611] <210> 83  
 [1612] <211> 101  
 [1613] <212> PRT  
 [1614] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1615] <400> 83  
 [1616] Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 [1617] 1 5 10 15  
 [1618] Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 [1619] 20 25 30  
 [1620] Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 [1621] 35 40 45  
 [1622] Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu  
 [1623] 50 55 60  
 [1624] Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 [1625] 65 70 75 80  
 [1626] Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 [1627] 85 90 95  
 [1628] Ala Ser Phe Asp Tyr  
 [1629] 100  
 [1630] <210> 84  
 [1631] <211> 98  
 [1632] <212> PRT  
 [1633] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1634] <400> 84  
 [1635] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [1636] 1 5 10 15  
 [1637] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

[1638]		20		25		30													
[1639]	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met			
[1640]			35					40					45						
[1641]	Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe			
[1642]		50					55						60						
[1643]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr			
[1644]	65					70					75					80			
[1645]	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
[1646]				85						90						95			
[1647]	Ala	Arg																	
[1648]	<210>	85																	
[1649]	<211>	100																	
[1650]	<212>	PRT																	
[1651]	<213>	智人 (Homo sapiens)																	
[1652]	<400>	85																	
[1653]	Gln	Ile	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln			
[1654]	1			5						10					15				
[1655]	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser			
[1656]			20						25					30					
[1657]	Gly	Val	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu			
[1658]		35						40					45						
[1659]	Trp	Leu	Ala	Leu	Ile	Tyr	Trp	Asn	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser			
[1660]		50					55					60							
[1661]	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val			
[1662]	65					70					75					80			
[1663]	Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr			
[1664]				85						90						95			
[1665]	Cys	Ala	His	Arg															
[1666]			100																
[1667]	<210>	86																	
[1668]	<211>	98																	
[1669]	<212>	PRT																	
[1670]	<213>	智人 (Homo sapiens)																	
[1671]	<400>	86																	
[1672]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
[1673]	1			5						10					15				
[1674]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr			
[1675]			20							25					30				
[1676]	Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val			
[1677]		35						40					45						
[1678]	Ala	Asn	Ile	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Val	Asp	Ser	Val			
[1679]		50						55					60						



[1722] <211> 101  
 [1723] <212> PRT  
 [1724] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [1725] <400> 89  
 [1726] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 [1727] 1 5 10 15  
 [1728] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn  
 [1729] 20 25 30  
 [1730] Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu  
 [1731] 35 40 45  
 [1732] Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala  
 [1733] 50 55 60  
 [1734] Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn  
 [1735] 65 70 75 80  
 [1736] Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val  
 [1737] 85 90 95  
 [1738] Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 [1739] 100  
 [1740] <210> 90  
 [1741] <211> 98  
 [1742] <212> PRT  
 [1743] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [1744] <400> 90  
 [1745] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
 [1746] 1 5 10 15  
 [1747] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [1748] 20 25 30  
 [1749] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [1750] 35 40 45  
 [1751] Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe  
 [1752] 50 55 60  
 [1753] Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
 [1754] 65 70 75 80  
 [1755] Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [1756] 85 90 95  
 [1757] Ala Arg  
 [1758] <210> 91  
 [1759] <211> 58  
 [1760] <212> PRT  
 [1761] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [1762] <400> 91  
 [1763] Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

[1764] 1 5 10 15  
 [1765] Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 [1766] 20 25 30  
 [1767] Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 [1768] 35 40 45  
 [1769] Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr  
 [1770] 50 55  
 [1771] <210> 92  
 [1772] <211> 59  
 [1773] <212> PRT  
 [1774] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [1775] <220>  
 [1776] <221> misc\_feature  
 [1777] <222> (1) .. (1)  
 [1778] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1779] <220>  
 [1780] <221> misc\_feature  
 [1781] <222> (16) .. (16)  
 [1782] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1783] <220>  
 [1784] <221> misc\_feature  
 [1785] <222> (30) .. (30)  
 [1786] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1787] <220>  
 [1788] <221> misc\_feature  
 [1789] <222> (33) .. (33)  
 [1790] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1791] <220>  
 [1792] <221> misc\_feature  
 [1793] <222> (35) .. (35)  
 [1794] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1795] <220>  
 [1796] <221> misc\_feature  
 [1797] <222> (50) .. (50)  
 [1798] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1799] <220>  
 [1800] <221> misc\_feature  
 [1801] <222> (52) .. (52)  
 [1802] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1803] <220>  
 [1804] <221> misc\_feature  
 [1805] <222> (55) .. (56)

[1806] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1807] <220>  
 [1808] <221> misc\_feature  
 [1809] <222> (58) .. (58)  
 [1810] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1811] <400> 92  
 [1812] Xaa Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Xaa  
 [1813] 1 5 10 15  
 [1814] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Xaa Ser Tyr  
 [1815] 20 25 30  
 [1816] Xaa Ile Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [1817] 35 40 45  
 [1818] Gly Xaa Ile Xaa Pro Tyr Xaa Xaa Gly Xaa Thr  
 [1819] 50 55  
 [1820] <210> 93  
 [1821] <211> 62  
 [1822] <212> PRT  
 [1823] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [1824] <220>  
 [1825] <221> misc\_feature  
 [1826] <222> (23) .. (23)  
 [1827] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1828] <220>  
 [1829] <221> misc\_feature  
 [1830] <222> (27) .. (27)  
 [1831] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1832] <220>  
 [1833] <221> misc\_feature  
 [1834] <222> (29) .. (29)  
 [1835] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1836] <220>  
 [1837] <221> misc\_feature  
 [1838] <222> (32) .. (37)  
 [1839] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1840] <220>  
 [1841] <221> misc\_feature  
 [1842] <222> (52) .. (52)  
 [1843] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1844] <220>  
 [1845] <221> misc\_feature  
 [1846] <222> (58) .. (59)  
 [1847] <223> Xaa=任何氨基酸

[1848] <220>  
 [1849] <221> misc\_feature  
 [1850] <222> (61) .. (61)  
 [1851] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1852] <400> 93  
 [1853] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 [1854] 1 5 10 15  
 [1855] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Xaa Val Ser Gly Xaa Ser Xaa Ser Ser Xaa  
 [1856] 20 25 30  
 [1857] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 [1858] 35 40 45  
 [1859] Trp Ile Gly Xaa Ile Tyr Tyr Arg Ala Xaa Xaa Gly Xaa Thr  
 [1860] 50 55 60  
 [1861] <210> 94  
 [1862] <211> 60  
 [1863] <212> PRT  
 [1864] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [1865] <220>  
 [1866] <221> misc\_feature  
 [1867] <222> (31) .. (31)  
 [1868] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1869] <220>  
 [1870] <221> misc\_feature  
 [1871] <222> (33) .. (33)  
 [1872] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1873] <220>  
 [1874] <221> misc\_feature  
 [1875] <222> (35) .. (35)  
 [1876] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1877] <220>  
 [1878] <221> misc\_feature  
 [1879] <222> (49) .. (50)  
 [1880] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1881] <220>  
 [1882] <221> misc\_feature  
 [1883] <222> (52) .. (53)  
 [1884] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1885] <220>  
 [1886] <221> misc\_feature  
 [1887] <222> (55) .. (56)  
 [1888] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1889] <220>

[1890] <221> misc\_feature  
 [1891] <222> (58) .. (59)  
 [1892] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [1893] <400> 94  
 [1894] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [1895] 1 5 10 15  
 [1896] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr  
 [1897] 20 25 30  
 [1898] Xaa Met Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [1899] 35 40 45  
 [1900] Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Thr  
 [1901] 50 55 60  
 [1902] <210> 95  
 [1903] <211> 58  
 [1904] <212> PRT  
 [1905] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1906] <400> 95  
 [1907] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [1908] 1 5 10 15  
 [1909] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 [1910] 20 25 30  
 [1911] Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [1912] 35 40 45  
 [1913] Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr  
 [1914] 50 55  
 [1915] <210> 96  
 [1916] <211> 59  
 [1917] <212> PRT  
 [1918] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1919] <400> 96  
 [1920] Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 [1921] 1 5 10 15  
 [1922] Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 [1923] 20 25 30  
 [1924] Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
 [1925] 35 40 45  
 [1926] Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys  
 [1927] 50 55  
 [1928] <210> 97  
 [1929] <211> 58  
 [1930] <212> PRT  
 [1931] <213> 智人(Homo sapiens)

[1932] <400> 97  
 [1933] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [1934] 1 5 10 15  
 [1935] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 [1936] 20 25 30  
 [1937] Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [1938] 35 40 45  
 [1939] Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys  
 [1940] 50 55  
 [1941] <210> 98  
 [1942] <211> 58  
 [1943] <212> PRT  
 [1944] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1945] <400> 98  
 [1946] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly  
 [1947] 1 5 10 15  
 [1948] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 [1949] 20 25 30  
 [1950] Asn Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 [1951] 35 40 45  
 [1952] Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr  
 [1953] 50 55  
 [1954] <210> 99  
 [1955] <211> 58  
 [1956] <212> PRT  
 [1957] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1958] <400> 99  
 [1959] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 [1960] 1 5 10 15  
 [1961] Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 [1962] 20 25 30  
 [1963] Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 [1964] 35 40 45  
 [1965] Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr  
 [1966] 50 55  
 [1967] <210> 100  
 [1968] <211> 61  
 [1969] <212> PRT  
 [1970] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [1971] <400> 100  
 [1972] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 [1973] 1 5 10 15

[1974]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
[1975]	20  25  30
[1976]	Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
[1977]	35  40  45
[1978]	Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn
[1979]	50  55  60
[1980]	<210> 101
[1981]	<211> 58
[1982]	<212> PRT
[1983]	<213> 智人(Homo sapiens)
[1984]	<400> 101
[1985]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
[1986]	1                                  5  10  15
[1987]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[1988]	20  25  30
[1989]	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[1990]	35  40  45
[1991]	Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro
[1992]	50  55
[1993]	<210> 102
[1994]	<211> 60
[1995]	<212> PRT
[1996]	<213> 小鼠(Mus musculus)
[1997]	<400> 102
[1998]	Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr
[1999]	1                                  5  10  15
[2000]	Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp
[2001]	20  25  30
[2002]	Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp
[2003]	35  40  45
[2004]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[2005]	50  55  60
[2006]	<210> 103
[2007]	<211> 70
[2008]	<212> PRT
[2009]	<213> 智人(Homo sapiens)
[2010]	<220>
[2011]	<221> misc_feature
[2012]	<222> (14) .. (14)
[2013]	<223> Xaa=任何氨基酸
[2014]	<220>
[2015]	<221> misc_feature



[2058] <221> misc\_feature  
 [2059] <222> (26) .. (26)  
 [2060] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2061] <220>  
 [2062] <221> misc\_feature  
 [2063] <222> (41) .. (56)  
 [2064] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2065] <220>  
 [2066] <221> misc\_feature  
 [2067] <222> (59) .. (59)  
 [2068] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2069] <220>  
 [2070] <221> misc\_feature  
 [2071] <222> (65) .. (65)  
 [2072] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2073] <400> 104  
 [2074] Xaa Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr  
 [2075] 1 5 10 15  
 [2076] Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Xaa Leu Xaa Ser Val Thr Ala Ala Asp  
 [2077] 20 25 30  
 [2078] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [2079] 35 40 45  
 [2080] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr  
 [2081] 50 55 60  
 [2082] Xaa Val Thr Val Ser Ser  
 [2083] 65 70  
 [2084] <210> 105  
 [2085] <211> 70  
 [2086] <212> PRT  
 [2087] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [2088] <220>  
 [2089] <221> misc\_feature  
 [2090] <222> (40) .. (52)  
 [2091] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2092] <220>  
 [2093] <221> misc\_feature  
 [2094] <222> (55) .. (56)  
 [2095] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2096] <220>  
 [2097] <221> misc\_feature  
 [2098] <222> (59) .. (59)  
 [2099] <223> Xaa=任何氨基酸

[2100] <400> 105  
 [2101] Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 [2102] 1 5 10 15  
 [2103] Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 [2104] 20 25 30  
 [2105] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [2106] 35 40 45  
 [2107] Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Phe Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr  
 [2108] 50 55 60  
 [2109] Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [2110] 65 70  
 [2111] <210> 106  
 [2112] <211> 70  
 [2113] <212> PRT  
 [2114] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [2115] <220>  
 [2116] <221> misc\_feature  
 [2117] <222> (41) .. (55)  
 [2118] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2119] <400> 106  
 [2120] Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr  
 [2121] 1 5 10 15  
 [2122] Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp  
 [2123] 20 25 30  
 [2124] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [2125] 35 40 45  
 [2126] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [2127] 50 55 60  
 [2128] Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [2129] 65 70  
 [2130] <210> 107  
 [2131] <211> 70  
 [2132] <212> PRT  
 [2133] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [2134] <220>  
 [2135] <221> misc\_feature  
 [2136] <222> (42) .. (55)  
 [2137] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2138] <400> 107  
 [2139] Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr  
 [2140] 1 5 10 15  
 [2141] Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp

[2142]                    20                                    25                                    30  
 [2143]   Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [2144]                    35                                    40                                    45  
 [2145]   Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [2146]                    50                                    55                                    60  
 [2147]   Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [2148]   65                                    70  
 [2149]   <210> 108  
 [2150]   <211> 70  
 [2151]   <212> PRT  
 [2152]   <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [2153]   <220>  
 [2154]   <221> misc\_feature  
 [2155]   <222> (41) .. (55)  
 [2156]   <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2157]   <400> 108  
 [2158]   Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 [2159]   1                                    5                                    10                                    15  
 [2160]   Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 [2161]                                    20                                    25                                    30  
 [2162]   Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [2163]                                    35                                    40                                    45  
 [2164]   Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [2165]                                    50                                    55                                    60  
 [2166]   Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [2167]   65                                    70  
 [2168]   <210> 109  
 [2169]   <211> 70  
 [2170]   <212> PRT  
 [2171]   <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [2172]   <220>  
 [2173]   <221> misc\_feature  
 [2174]   <222> (41) .. (55)  
 [2175]   <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2176]   <400> 109  
 [2177]   Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys  
 [2178]   1                                    5                                    10                                    15  
 [2179]   Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp  
 [2180]                                    20                                    25                                    30  
 [2181]   Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [2182]                                    35                                    40                                    45  
 [2183]   Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

[2184] 50 55 60  
 [2185] Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [2186] 65 70  
 [2187] <210> 110  
 [2188] <211> 70  
 [2189] <212> PRT  
 [2190] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [2191] <220>  
 [2192] <221> misc\_feature  
 [2193] <222> (41) .. (55)  
 [2194] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2195] <400> 110  
 [2196] Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys  
 [2197] 1 5 10 15  
 [2198] Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp  
 [2199] 20 25 30  
 [2200] Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [2201] 35 40 45  
 [2202] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [2203] 50 55 60  
 [2204] Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [2205] 65 70  
 [2206] <210> 111  
 [2207] <211> 70  
 [2208] <212> PRT  
 [2209] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [2210] <220>  
 [2211] <221> misc\_feature  
 [2212] <222> (41) .. (55)  
 [2213] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2214] <400> 111  
 [2215] Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr  
 [2216] 1 5 10 15  
 [2217] Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp  
 [2218] 20 25 30  
 [2219] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [2220] 35 40 45  
 [2221] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [2222] 50 55 60  
 [2223] Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [2224] 65 70  
 [2225] <210> 112

[2226] <211> 70  
 [2227] <212> PRT  
 [2228] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [2229] <220>  
 [2230] <221> misc\_feature  
 [2231] <222> (41) .. (55)  
 [2232] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2233] <400> 112  
 [2234] Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr  
 [2235] 1 5 10 15  
 [2236] Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp  
 [2237] 20 25 30  
 [2238] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [2239] 35 40 45  
 [2240] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [2241] 50 55 60  
 [2242] Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [2243] 65 70  
 [2244] <210> 113  
 [2245] <211> 1404  
 [2246] <212> DNA  
 [2247] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [2248] <400> 113  
 [2249] atgggatgga gttgcattat acttttctc gttgccaccg ccaactggagt tcaactctgac 60  
 [2250] gtacaacttc aagaatctgg cccaggtctc gtcaaactt ctcaaactct ctcactcacc 120  
 [2251] tgcactgtta ctgactactc tattacatcc gactacgctt ggaactggat ccgacaattt 180  
 [2252] cctggtaaaa aactcgaatg gatgggttat atttcttact ctggctccac ctcctacaat 240  
 [2253] cttctctga aatcacgcat cacaatttcc cgcgatacct ctaaaaatca attttcaactc 300  
 [2254] caactcaatt ctgttaccgc cgccgatact gccactact actgtgcctc ttttgactac 360  
 [2255] gctcacgcca tggattattg gggacagggt actaccgta ccgtaagctc agccagcaca 420  
 [2256] aagggcccat cggctctccc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480  
 [2257] gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540  
 [2258] ggcgcctga ccagcggcgt gcacacctc ccggtgtcc tacagtctc aggactctac 600  
 [2259] tcctcagca gcgtggtgac cgtgcctcc agcagcttg gcaccagac ctacatctgc 660  
 [2260] aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 720  
 [2261] gacaaaactc acacatgtcc accgtgcca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780  
 [2262] ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggaccc tgaggtcaca 840  
 [2263] tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900  
 [2264] ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960  
 [2265] cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020  
 [2266] tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1080  
 [2267] gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1140

[2268] aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggctttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200  
 [2269] tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260  
 [2270] gacggetcct tcttctctta tagcaagetc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320  
 [2271] aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380  
 [2272] ctctccctgt ccccggttaa atga 1404  
 [2273] <210> 114  
 [2274] <211> 467  
 [2275] <212> PRT  
 [2276] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [2277] <400> 114  
 [2278] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 [2279] 1 5 10 15  
 [2280] Val His Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys  
 [2281] 20 25 30  
 [2282] Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile  
 [2283] 35 40 45  
 [2284] Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Lys  
 [2285] 50 55 60  
 [2286] Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn  
 [2287] 65 70 75 80  
 [2288] Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn  
 [2289] 85 90 95  
 [2290] Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr  
 [2291] 100 105 110  
 [2292] Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 [2293] 115 120 125  
 [2294] Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 [2295] 130 135 140  
 [2296] Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 [2297] 145 150 155 160  
 [2298] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 [2299] 165 170 175  
 [2300] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 [2301] 180 185 190  
 [2302] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 [2303] 195 200 205  
 [2304] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 [2305] 210 215 220  
 [2306] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 [2307] 225 230 235 240  
 [2308] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 [2309] 245 250 255

[2310]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[2311]	260 265 270
[2312]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[2313]	275 280 285
[2314]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[2315]	290 295 300
[2316]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[2317]	305 310 315 320
[2318]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[2319]	325 330 335
[2320]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[2321]	340 345 350
[2322]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[2323]	355 360 365
[2324]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
[2325]	370 375 380
[2326]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[2327]	385 390 395 400
[2328]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[2329]	405 410 415
[2330]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
[2331]	420 425 430
[2332]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[2333]	435 440 445
[2334]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[2335]	450 455 460
[2336]	Pro Gly Lys
[2337]	465
[2338]	<210> 115
[2339]	<211> 1404
[2340]	<212> DNA
[2341]	<213> 智人(Homo sapiens)
[2342]	<400> 115
[2343]	atgggttggt cttgcatcat tctctttctc gtcgctaccg caactggtgt aactcccaa 60
[2344]	gttcaacttc aagaatcagg ccccgactc gttaaaccct ctcaaactct ctctcttact 120
[2345]	tgcactgtat ccgattactc tattacttca gactacgctt ggaactggat cagacaattt 180
[2346]	cccgaaaag gactcgaat gatgggat atctcttact ctggctcaac ctcttacaac 240
[2347]	ccctctctca aatctcgaat aacaatctca cgcgatactt ctaaaaatca attctcactt 300
[2348]	caacttaact ccgttactgc cgccgacact gccgtttact actgtgettc cttegattac 360
[2349]	gcccacgcta tggattattg gggacaagga actaccgtca ctgtcagctc agccagcaca 420
[2350]	aaggcccat cggctctccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
[2351]	gcctgggct gcctggtcaa ggactactc ccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540

[2352] ggcgcctga ccagcggcgt gcacacctc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac 600  
 [2353] tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttg gcacccagac ctacatctgc 660  
 [2354] aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 720  
 [2355] gacaaaactc acacatgtcc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780  
 [2356] ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840  
 [2357] tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggta agttcaactg gtacgtggac 900  
 [2358] ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960  
 [2359] cgtgtgttca gcgtctctac cgtctctgac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020  
 [2360] tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1080  
 [2361] gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1140  
 [2362] aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200  
 [2363] tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctctccgt gctggactcc 1260  
 [2364] gacgctctc tcttctctc tagcaagtc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320  
 [2365] aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380  
 [2366] ctctccctgt ccccggttaa atga 1404  
 [2367] <210> 116  
 [2368] <211> 467  
 [2369] <212> PRT  
 [2370] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [2371] <400> 116  
 [2372] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 [2373] 1 5 10 15  
 [2374] Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys  
 [2375] 20 25 30  
 [2376] Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Tyr Ser Ile  
 [2377] 35 40 45  
 [2378] Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly  
 [2379] 50 55 60  
 [2380] Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn  
 [2381] 65 70 75 80  
 [2382] Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn  
 [2383] 85 90 95  
 [2384] Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
 [2385] 100 105 110  
 [2386] Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 [2387] 115 120 125  
 [2388] Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 [2389] 130 135 140  
 [2390] Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 [2391] 145 150 155 160  
 [2392] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 [2393] 165 170 175

[2394]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[2395]	180 185 190
[2396]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[2397]	195 200 205
[2398]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
[2399]	210 215 220
[2400]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
[2401]	225 230 235 240
[2402]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[2403]	245 250 255
[2404]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[2405]	260 265 270
[2406]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[2407]	275 280 285
[2408]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[2409]	290 295 300
[2410]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[2411]	305 310 315 320
[2412]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[2413]	325 330 335
[2414]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[2415]	340 345 350
[2416]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[2417]	355 360 365
[2418]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
[2419]	370 375 380
[2420]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[2421]	385 390 395 400
[2422]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[2423]	405 410 415
[2424]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
[2425]	420 425 430
[2426]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[2427]	435 440 445
[2428]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[2429]	450 455 460
[2430]	Pro Gly Lys
[2431]	465
[2432]	<210> 117
[2433]	<211> 2002
[2434]	<212> DNA
[2435]	<213> 智人 (Homo sapiens)

[2436]	<400> 117	
[2437]	atgggatgga gttgcattat acttttcctc gttgccaccg cactggagt tcaactctgac	60
[2438]	gtacaacttc aagaatctgg cccaggtctc gtcaaactt ctcaaactet ctcaactcacc	120
[2439]	tgcaactgta ctgactactc tattacatcc gactacgctt ggaactggat ccgacaattt	180
[2440]	cctggtaaaa aactcgaatg gatgggttat atttcttact ctggctccac ctctacaat	240
[2441]	ccttctctga aatcacgcat cacaatttcc cgcgatacct ctaaaaatca attttcaactc	300
[2442]	caactcaatt ctgttaccgc cgccgatact gccacactact actgtgcctc ttttgactac	360
[2443]	gctcacgcca tggattattg gggacagggt actaccgtta ccgtaagtc agccagcaca	420
[2444]	aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc	480
[2445]	gccctgggct gcctgtgcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca	540
[2446]	ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccgctgtcc tacagtctc aggactctac	600
[2447]	tcctcagca gcgtggtgac cgtgcctcc agcagcttg gcacgaagac ctacacctgc	660
[2448]	aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttggtga gaggccagca	720
[2449]	caggaggga ggggtctctgc tggaaaccag gctcagccct cctgcctgga cgcaccccg	780
[2450]	ctgtgcagcc ccagcccagg gcagcaaggc atgccccatc tgtctcctca cccggaggcc	840
[2451]	tctgaccacc ccaactcatgc tcagggagag ggtcttcttg atttttccac caggctccgg	900
[2452]	gcagccacag gctggatgcc cctaccccag gccctgcgca tacaggggca ggtgctgcgc	960
[2453]	tcagacctgc caagagccat atccgggagg accctgccc tgacctaac ccaccccaaa	1020
[2454]	ggccaaactc tccactccct cagctcagac accttctctc ctcccagatc tgagtaactc	1080
[2455]	ccaatcttct ctctgcagag tccaaatag gtccccatg cccatcatgc ccaggtaage	1140
[2456]	caaccaggc ctgcctcc agctcaaggc gggacagtg ccctagagta gctgcatcc	1200
[2457]	agggacaggc cccagccggg tgctgacgca tccacctca tctcttctc agcacctgag	1260
[2458]	ttctggggg gaccatcagt ctctctgtc ccccaaac ccaaggacac tctcatgatc	1320
[2459]	tcccgacc ctgaggtcac gtgcgtggtg gtggactga gccaggaaga cccgaggtc	1380
[2460]	cagttcaact ggtactgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag	1440
[2461]	gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtctca ccgtctgca ccaggactgg	1500
[2462]	ctgaacggca aggagtaca gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcag	1560
[2463]	aaaaccatct ccaaagccaa aggtgggacc cacgggtgc gagggccaca tggacagagg	1620
[2464]	tcagctggc ccacctctg ccctgggagt gaccgtgtg ccaacctctg tcctacagg	1680
[2465]	gcagcccga gagccacagg tgtacacct gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa	1740
[2466]	ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctaccc agcgacatcg ccgtggagt	1800
[2467]	ggagagcaat gggcagccg agaacaacta caagaccag cctcccgtc tggactccga	1860
[2468]	cggtccttc ttctctaca gcaggtaac cgtggacaag agcagggtgc aggagggaa	1920
[2469]	tgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacac agaagagcct	1980
[2470]	ctcctgtct ctgggtaaat ga	2002
[2471]	<210> 118	
[2472]	<211> 1395	
[2473]	<212> DNA	
[2474]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[2475]	<400> 118	
[2476]	atgggatgga gttgcattat acttttcctc gttgccaccg cactggagt tcaactctgac	60
[2477]	gtacaacttc aagaatctgg cccaggtctc gtcaaactt ctcaaactet ctcaactcacc	120

[2478] tgcactgtta ctgactactc tattacatcc gactacgctt ggaactggat ccgacaattt 180  
 [2479] cctggtaaaa aactcgaatg gatgggttat atttcttact ctggctccac ctctacaat 240  
 [2480] ccttctctga aatcacgcat cacaatttcc cgcgatacct ctaaaaatca attttcaactc 300  
 [2481] caactcaatt ctgttaccgc cgccgatact gccacctact actgtgcctc ttttgactac 360  
 [2482] gctcacgcca tggattattg gggacagggt actaccgtta ccgtaagctc agccagcaca 420  
 [2483] aagggcccat ccgtcttccc cctggcgcgc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 480  
 [2484] gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540  
 [2485] ggcgcctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac 600  
 [2486] tccctcagca gcgtgggtgac cgtgcctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 660  
 [2487] aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 720  
 [2488] cccccatgcc catcatgccc agcacctgag ttcttggggg gaccatcagt cttctgttc 780  
 [2489] cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggacc ctgaggtcac gtgcgtgggtg 840  
 [2490] gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 900  
 [2491] gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 960  
 [2492] agcgtcctca ccgtctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020  
 [2493] tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080  
 [2494] cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140  
 [2495] agcctgacct gcctgggtcaa aggttcttac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200  
 [2496] aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctccc tgctggactc cgacggctcc 1260  
 [2497] ttcttctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggagg gaatgtcttc 1320  
 [2498] tcatgtccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctcctg 1380  
 [2499] tctctgggta aatga 1395  
 [2500] <210> 119  
 [2501] <211> 464  
 [2502] <212> PRT  
 [2503] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [2504] <400> 119  
 [2505] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 [2506] 1 5 10 15  
 [2507] Val His Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys  
 [2508] 20 25 30  
 [2509] Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile  
 [2510] 35 40 45  
 [2511] Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Lys  
 [2512] 50 55 60  
 [2513] Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn  
 [2514] 65 70 75 80  
 [2515] Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn  
 [2516] 85 90 95  
 [2517] Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr  
 [2518] 100 105 110  
 [2519] Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly

[2520]	115	120	125
[2521]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
[2522]	130	135	140
[2523]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala		
[2524]	145	150	155
[2525]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
[2526]	165	170	175
[2527]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
[2528]	180	185	190
[2529]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
[2530]	195	200	205
[2531]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His		
[2532]	210	215	220
[2533]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly		
[2534]	225	230	235
[2535]	Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser		
[2536]	245	250	255
[2537]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
[2538]	260	265	270
[2539]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
[2540]	275	280	285
[2541]	Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
[2542]	290	295	300
[2543]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
[2544]	305	310	315
[2545]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
[2546]	325	330	335
[2547]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
[2548]	340	345	350
[2549]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
[2550]	355	360	365
[2551]	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
[2552]	370	375	380
[2553]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
[2554]	385	390	395
[2555]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[2556]	405	410	415
[2557]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[2558]	420	425	430
[2559]	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[2560]	435	440	445
[2561]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		

---

[2562]	450	455	460
[2563]	<210> 120		
[2564]	<211> 8		
[2565]	<212> PRT		
[2566]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[2567]	<400> 120		
[2568]	Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn		
[2569]	1	5	
[2570]	<210> 121		
[2571]	<211> 8		
[2572]	<212> PRT		
[2573]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[2574]	<400> 121		
[2575]	Arg Phe Arg Asp Asn Thr Ala Asn		
[2576]	1	5	
[2577]	<210> 122		
[2578]	<211> 9		
[2579]	<212> PRT		
[2580]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[2581]	<400> 122		
[2582]	Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu		
[2583]	1	5	
[2584]	<210> 123		
[2585]	<211> 7		
[2586]	<212> PRT		
[2587]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[2588]	<400> 123		
[2589]	Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln		
[2590]	1	5	
[2591]	<210> 124		
[2592]	<211> 118		
[2593]	<212> PRT		
[2594]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[2595]	<220>		
[2596]	<221> misc_feature		
[2597]	<222> (1) .. (1)		
[2598]	<223> Xaa=任何氨基酸		
[2599]	<220>		
[2600]	<221> misc_feature		
[2601]	<222> (3) .. (3)		
[2602]	<223> Xaa=任何氨基酸		
[2603]	<220>		

[2604] <221> misc\_feature  
[2605] <222> (5) .. (5)  
[2606] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2607] <220>  
[2608] <221> misc\_feature  
[2609] <222> (7) .. (7)  
[2610] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2611] <220>  
[2612] <221> misc\_feature  
[2613] <222> (9) .. (17)  
[2614] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2615] <220>  
[2616] <221> misc\_feature  
[2617] <222> (19) .. (19)  
[2618] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2619] <220>  
[2620] <221> misc\_feature  
[2621] <222> (21) .. (21)  
[2622] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2623] <220>  
[2624] <221> misc\_feature  
[2625] <222> (23) .. (23)  
[2626] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2627] <220>  
[2628] <221> misc\_feature  
[2629] <222> (25) .. (25)  
[2630] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2631] <220>  
[2632] <221> misc\_feature  
[2633] <222> (39) .. (39)  
[2634] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2635] <220>  
[2636] <221> misc\_feature  
[2637] <222> (41) .. (45)  
[2638] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2639] <220>  
[2640] <221> misc\_feature  
[2641] <222> (47) .. (47)  
[2642] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2643] <220>  
[2644] <221> misc\_feature  
[2645] <222> (60) .. (60)

[2646] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2647] <220>  
[2648] <221> misc\_feature  
[2649] <222> (62) .. (63)  
[2650] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2651] <220>  
[2652] <221> misc\_feature  
[2653] <222> (65) .. (67)  
[2654] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2655] <220>  
[2656] <221> misc\_feature  
[2657] <222> (69) .. (69)  
[2658] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2659] <220>  
[2660] <221> misc\_feature  
[2661] <222> (71) .. (71)  
[2662] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2663] <220>  
[2664] <221> misc\_feature  
[2665] <222> (73) .. (78)  
[2666] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2667] <220>  
[2668] <221> misc\_feature  
[2669] <222> (80) .. (80)  
[2670] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2671] <220>  
[2672] <221> misc\_feature  
[2673] <222> (82) .. (82)  
[2674] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2675] <220>  
[2676] <221> misc\_feature  
[2677] <222> (84) .. (85)  
[2678] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2679] <220>  
[2680] <221> misc\_feature  
[2681] <222> (87) .. (89)  
[2682] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2683] <220>  
[2684] <221> misc\_feature  
[2685] <222> (91) .. (91)  
[2686] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2687] <220>

[2688] <221> misc\_feature  
 [2689] <222> (93) .. (93)  
 [2690] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2691] <220>  
 [2692] <221> misc\_feature  
 [2693] <222> (110) .. (110)  
 [2694] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2695] <220>  
 [2696] <221> misc\_feature  
 [2697] <222> (113) .. (113)  
 [2698] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2699] <220>  
 [2700] <221> misc\_feature  
 [2701] <222> (115) .. (115)  
 [2702] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2703] <220>  
 [2704] <221> misc\_feature  
 [2705] <222> (117) .. (118)  
 [2706] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2707] <400> 124  
 [2708] Xaa Val Xaa Leu Xaa Glu Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [2709] 1 5 10 15  
 [2710] Xaa Leu Xaa Leu Xaa Cys Xaa Val Xaa Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 [2711] 20 25 30  
 [2712] Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Trp  
 [2713] 35 40 45  
 [2714] Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Xaa Asn Xaa Xaa Leu  
 [2715] 50 55 60  
 [2716] Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Ile Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa  
 [2717] 65 70 75 80  
 [2718] Leu Xaa Leu Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ala Xaa Tyr Tyr Cys  
 [2719] 85 90 95  
 [2720] Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr  
 [2721] 100 105 110  
 [2722] Xaa Val Xaa Val Xaa Xaa  
 [2723] 115  
 [2724] <210> 125  
 [2725] <211> 118  
 [2726] <212> PRT  
 [2727] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [2728] <220>  
 [2729] <221> misc\_feature

- [2730] <222> (3) .. (3)  
[2731] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2732] <220>  
[2733] <221> misc\_feature  
[2734] <222> (5) .. (5)  
[2735] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2736] <220>  
[2737] <221> misc\_feature  
[2738] <222> (7) .. (7)  
[2739] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2740] <220>  
[2741] <221> misc\_feature  
[2742] <222> (10) .. (11)  
[2743] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2744] <220>  
[2745] <221> misc\_feature  
[2746] <222> (13) .. (13)  
[2747] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2748] <220>  
[2749] <221> misc\_feature  
[2750] <222> (15) .. (17)  
[2751] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2752] <220>  
[2753] <221> misc\_feature  
[2754] <222> (19) .. (19)  
[2755] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2756] <220>  
[2757] <221> misc\_feature  
[2758] <222> (21) .. (21)  
[2759] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2760] <220>  
[2761] <221> misc\_feature  
[2762] <222> (23) .. (23)  
[2763] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2764] <220>  
[2765] <221> misc\_feature  
[2766] <222> (41) .. (41)  
[2767] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2768] <220>  
[2769] <221> misc\_feature  
[2770] <222> (43) .. (44)  
[2771] <223> Xaa=任何氨基酸

[2772] <220>  
[2773] <221> misc\_feature  
[2774] <222> (66) .. (66)  
[2775] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2776] <220>  
[2777] <221> misc\_feature  
[2778] <222> (69) .. (69)  
[2779] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2780] <220>  
[2781] <221> misc\_feature  
[2782] <222> (71) .. (71)  
[2783] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2784] <220>  
[2785] <221> misc\_feature  
[2786] <222> (73) .. (73)  
[2787] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2788] <220>  
[2789] <221> misc\_feature  
[2790] <222> (75) .. (76)  
[2791] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2792] <220>  
[2793] <221> misc\_feature  
[2794] <222> (78) .. (78)  
[2795] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2796] <220>  
[2797] <221> misc\_feature  
[2798] <222> (80) .. (80)  
[2799] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2800] <220>  
[2801] <221> misc\_feature  
[2802] <222> (82) .. (82)  
[2803] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2804] <220>  
[2805] <221> misc\_feature  
[2806] <222> (84) .. (85)  
[2807] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2808] <220>  
[2809] <221> misc\_feature  
[2810] <222> (87) .. (89)  
[2811] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2812] <220>  
[2813] <221> misc\_feature

[2814] <222> (91) .. (91)  
 [2815] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2816] <220>  
 [2817] <221> misc\_feature  
 [2818] <222> (110) .. (110)  
 [2819] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2820] <220>  
 [2821] <221> misc\_feature  
 [2822] <222> (113) .. (113)  
 [2823] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2824] <220>  
 [2825] <221> misc\_feature  
 [2826] <222> (115) .. (115)  
 [2827] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2828] <220>  
 [2829] <221> misc\_feature  
 [2830] <222> (117) .. (118)  
 [2831] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2832] <400> 125  
 [2833] Asp Val Xaa Leu Xaa Glu Xaa Gly Pro Xaa Xaa Val Xaa Pro Xaa Xaa  
 [2834] 1 5 10 15  
 [2835] Xaa Leu Xaa Leu Xaa Cys Xaa Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 [2836] 20 25 30  
 [2837] Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Xaa Pro Xaa Xaa Lys Leu Glu Trp  
 [2838] 35 40 45  
 [2839] Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu  
 [2840] 50 55 60  
 [2841] Lys Xaa Arg Ile Xaa Ile Xaa Arg Xaa Thr Xaa Xaa Asn Xaa Phe Xaa  
 [2842] 65 70 75 80  
 [2843] Leu Xaa Leu Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 [2844] 85 90 95  
 [2845] Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr  
 [2846] 100 105 110  
 [2847] Xaa Val Xaa Val Xaa Xaa  
 [2848] 115  
 [2849] <210> 126  
 [2850] <211> 118  
 [2851] <212> PRT  
 [2852] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [2853] <220>  
 [2854] <221> misc\_feature  
 [2855] <222> (1) .. (1)

- [2856] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2857] <220>  
 [2858] <221> misc\_feature  
 [2859] <222> (17) .. (17)  
 [2860] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2861] <220>  
 [2862] <221> misc\_feature  
 [2863] <222> (25) .. (25)  
 [2864] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2865] <220>  
 [2866] <221> misc\_feature  
 [2867] <222> (44) .. (45)  
 [2868] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2869] <220>  
 [2870] <221> misc\_feature  
 [2871] <222> (69) .. (69)  
 [2872] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2873] <220>  
 [2874] <221> misc\_feature  
 [2875] <222> (71) .. (71)  
 [2876] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2877] <220>  
 [2878] <221> misc\_feature  
 [2879] <222> (80) .. (80)  
 [2880] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2881] <220>  
 [2882] <221> misc\_feature  
 [2883] <222> (88) .. (89)  
 [2884] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2885] <220>  
 [2886] <221> misc\_feature  
 [2887] <222> (93) .. (93)  
 [2888] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2889] <220>  
 [2890] <221> misc\_feature  
 [2891] <222> (113) .. (113)  
 [2892] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2893] <400> 126  
 [2894] Xaa Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 [2895] 1 5 10 15  
 [2896] Xaa Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Xaa Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 [2897] 20 25 30

[2898] Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Xaa Xaa Leu Glu Trp  
 [2899] 35 40 45  
 [2900] Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu  
 [2901] 50 55 60  
 [2902] Lys Ser Arg Ile Xaa Ile Xaa Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Xaa  
 [2903] 65 70 75 80  
 [2904] Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Xaa Xaa Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr Cys  
 [2905] 85 90 95  
 [2906] Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [2907] 100 105 110  
 [2908] Xaa Val Thr Val Ser Ser  
 [2909] 115  
 [2910] <210> 127  
 [2911] <211> 118  
 [2912] <212> PRT  
 [2913] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [2914] <220>  
 [2915] <221> misc\_feature  
 [2916] <222> (17) .. (17)  
 [2917] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2918] <220>  
 [2919] <221> misc\_feature  
 [2920] <222> (44) .. (44)  
 [2921] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2922] <220>  
 [2923] <221> misc\_feature  
 [2924] <222> (69) .. (69)  
 [2925] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2926] <220>  
 [2927] <221> misc\_feature  
 [2928] <222> (71) .. (71)  
 [2929] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2930] <220>  
 [2931] <221> misc\_feature  
 [2932] <222> (80) .. (80)  
 [2933] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2934] <220>  
 [2935] <221> misc\_feature  
 [2936] <222> (88) .. (89)  
 [2937] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2938] <220>  
 [2939] <221> misc\_feature

[2940] <222> (113) .. (113)  
 [2941] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2942] <400> 127  
 [2943] Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 [2944] 1 5 10 15  
 [2945] Xaa Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 [2946] 20 25 30  
 [2947] Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Xaa Lys Leu Glu Trp  
 [2948] 35 40 45  
 [2949] Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu  
 [2950] 50 55 60  
 [2951] Lys Ser Arg Ile Xaa Ile Xaa Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Xaa  
 [2952] 65 70 75 80  
 [2953] Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Xaa Xaa Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 [2954] 85 90 95  
 [2955] Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [2956] 100 105 110  
 [2957] Xaa Val Thr Val Ser Ser  
 [2958] 115  
 [2959] <210> 128  
 [2960] <211> 109  
 [2961] <212> PRT  
 [2962] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [2963] <220>  
 [2964] <221> misc\_feature  
 [2965] <222> (1) .. (1)  
 [2966] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2967] <220>  
 [2968] <221> misc\_feature  
 [2969] <222> (3) .. (3)  
 [2970] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2971] <220>  
 [2972] <221> misc\_feature  
 [2973] <222> (5) .. (5)  
 [2974] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2975] <220>  
 [2976] <221> misc\_feature  
 [2977] <222> (7) .. (12)  
 [2978] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [2979] <220>  
 [2980] <221> misc\_feature  
 [2981] <222> (14) .. (18)

[2982] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2983] <220>  
[2984] <221> misc\_feature  
[2985] <222> (20) .. (20)  
[2986] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2987] <220>  
[2988] <221> misc\_feature  
[2989] <222> (22) .. (22)  
[2990] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2991] <220>  
[2992] <221> misc\_feature  
[2993] <222> (24) .. (24)  
[2994] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2995] <220>  
[2996] <221> misc\_feature  
[2997] <222> (26) .. (26)  
[2998] <223> Xaa=任何氨基酸  
[2999] <220>  
[3000] <221> misc\_feature  
[3001] <222> (37) .. (37)  
[3002] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3003] <220>  
[3004] <221> misc\_feature  
[3005] <222> (39) .. (43)  
[3006] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3007] <220>  
[3008] <221> misc\_feature  
[3009] <222> (45) .. (45)  
[3010] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3011] <220>  
[3012] <221> misc\_feature  
[3013] <222> (54) .. (57)  
[3014] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3015] <220>  
[3016] <221> misc\_feature  
[3017] <222> (59) .. (61)  
[3018] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3019] <220>  
[3020] <221> misc\_feature  
[3021] <222> (63) .. (63)  
[3022] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3023] <220>

[3024] <221> misc\_feature  
[3025] <222> (65) .. (65)  
[3026] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3027] <220>  
[3028] <221> misc\_feature  
[3029] <222> (67) .. (67)  
[3030] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3031] <220>  
[3032] <221> misc\_feature  
[3033] <222> (69) .. (70)  
[3034] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3035] <220>  
[3036] <221> misc\_feature  
[3037] <222> (72) .. (72)  
[3038] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3039] <220>  
[3040] <221> misc\_feature  
[3041] <222> (74) .. (74)  
[3042] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3043] <220>  
[3044] <221> misc\_feature  
[3045] <222> (76) .. (77)  
[3046] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3047] <220>  
[3048] <221> misc\_feature  
[3049] <222> (79) .. (81)  
[3050] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3051] <220>  
[3052] <221> misc\_feature  
[3053] <222> (83) .. (83)  
[3054] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3055] <220>  
[3056] <221> misc\_feature  
[3057] <222> (100) .. (100)  
[3058] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3059] <220>  
[3060] <221> misc\_feature  
[3061] <222> (103) .. (103)  
[3062] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3063] <220>  
[3064] <221> misc\_feature  
[3065] <222> (105) .. (109)

[3066] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3067] <400> 128  
 [3068] Xaa Ile Xaa Leu Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa  
 [3069] 1 5 10 15  
 [3070] Xaa Xaa Val Xaa Phe Xaa Cys Xaa Ala Xaa Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
 [3071] 20 25 30  
 [3072] Ile His Trp Tyr Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Leu Leu Ile  
 [3073] 35 40 45  
 [3074] Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Gly  
 [3075] 50 55 60  
 [3076] Xaa Gly Xaa Gly Xaa Xaa Phe Xaa Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Xaa Xaa  
 [3077] 65 70 75 80  
 [3078] Xaa Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr  
 [3079] 85 90 95  
 [3080] Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [3081] 100 105  
 [3082] <210> 129  
 [3083] <211> 109  
 [3084] <212> PRT  
 [3085] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [3086] <220>  
 [3087] <221> misc\_feature  
 [3088] <222> (1) .. (1)  
 [3089] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3090] <220>  
 [3091] <221> misc\_feature  
 [3092] <222> (3) .. (3)  
 [3093] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3094] <220>  
 [3095] <221> misc\_feature  
 [3096] <222> (5) .. (5)  
 [3097] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3098] <220>  
 [3099] <221> misc\_feature  
 [3100] <222> (7) .. (7)  
 [3101] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3102] <220>  
 [3103] <221> misc\_feature  
 [3104] <222> (9) .. (10)  
 [3105] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3106] <220>  
 [3107] <221> misc\_feature

- [3108] <222> (12) .. (12)  
[3109] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3110] <220>  
[3111] <221> misc\_feature  
[3112] <222> (14) .. (14)  
[3113] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3114] <220>  
[3115] <221> misc\_feature  
[3116] <222> (16) .. (18)  
[3117] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3118] <220>  
[3119] <221> misc\_feature  
[3120] <222> (20) .. (20)  
[3121] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3122] <220>  
[3123] <221> misc\_feature  
[3124] <222> (22) .. (22)  
[3125] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3126] <220>  
[3127] <221> misc\_feature  
[3128] <222> (24) .. (24)  
[3129] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3130] <220>  
[3131] <221> misc\_feature  
[3132] <222> (39) .. (39)  
[3133] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3134] <220>  
[3135] <221> misc\_feature  
[3136] <222> (41) .. (42)  
[3137] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3138] <220>  
[3139] <221> misc\_feature  
[3140] <222> (54) .. (54)  
[3141] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3142] <220>  
[3143] <221> misc\_feature  
[3144] <222> (57) .. (57)  
[3145] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3146] <220>  
[3147] <221> misc\_feature  
[3148] <222> (60) .. (60)  
[3149] <223> Xaa=任何氨基酸

[3150] <220>  
[3151] <221> misc\_feature  
[3152] <222> (63) .. (63)  
[3153] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3154] <220>  
[3155] <221> misc\_feature  
[3156] <222> (65) .. (65)  
[3157] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3158] <220>  
[3159] <221> misc\_feature  
[3160] <222> (67) .. (67)  
[3161] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3162] <220>  
[3163] <221> misc\_feature  
[3164] <222> (69) .. (70)  
[3165] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3166] <220>  
[3167] <221> misc\_feature  
[3168] <222> (72) .. (72)  
[3169] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3170] <220>  
[3171] <221> misc\_feature  
[3172] <222> (74) .. (74)  
[3173] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3174] <220>  
[3175] <221> misc\_feature  
[3176] <222> (76) .. (77)  
[3177] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3178] <220>  
[3179] <221> misc\_feature  
[3180] <222> (79) .. (81)  
[3181] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3182] <220>  
[3183] <221> misc\_feature  
[3184] <222> (83) .. (83)  
[3185] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3186] <220>  
[3187] <221> misc\_feature  
[3188] <222> (100) .. (100)  
[3189] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3190] <220>  
[3191] <221> misc\_feature

[3192] <222> (103) .. (103)  
 [3193] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3194] <220>  
 [3195] <221> misc\_feature  
 [3196] <222> (105) .. (109)  
 [3197] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3198] <400> 129  
 [3199] Xaa Ile Xaa Leu Xaa Gln Xaa Pro Xaa Xaa Leu Xaa Val Xaa Pro Xaa  
 [3200] 1 5 10 15  
 [3201] Xaa Xaa Val Xaa Phe Xaa Cys Xaa Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
 [3202] 20 25 30  
 [3203] Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 [3204] 35 40 45  
 [3205] Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Ile Ser Xaa Ile Pro Xaa Arg Phe Xaa Gly  
 [3206] 50 55 60  
 [3207] Xaa Gly Xaa Gly Xaa Xaa Phe Xaa Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Xaa Xaa  
 [3208] 65 70 75 80  
 [3209] Xaa Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr  
 [3210] 85 90 95  
 [3211] Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [3212] 100 105  
 [3213] <210> 130  
 [3214] <211> 109  
 [3215] <212> PRT  
 [3216] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [3217] <220>  
 [3218] <221> misc\_feature  
 [3219] <222> (1) .. (1)  
 [3220] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3221] <220>  
 [3222] <221> misc\_feature  
 [3223] <222> (3) .. (3)  
 [3224] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3225] <220>  
 [3226] <221> misc\_feature  
 [3227] <222> (9) .. (10)  
 [3228] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3229] <220>  
 [3230] <221> misc\_feature  
 [3231] <222> (20) .. (20)  
 [3232] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3233] <220>

[3234] <221> misc\_feature  
 [3235] <222> (39) .. (39)  
 [3236] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3237] <220>  
 [3238] <221> misc\_feature  
 [3239] <222> (41) .. (43)  
 [3240] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3241] <220>  
 [3242] <221> misc\_feature  
 [3243] <222> (54) .. (56)  
 [3244] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3245] <220>  
 [3246] <221> misc\_feature  
 [3247] <222> (60) .. (60)  
 [3248] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3249] <220>  
 [3250] <221> misc\_feature  
 [3251] <222> (74) .. (74)  
 [3252] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3253] <220>  
 [3254] <221> misc\_feature  
 [3255] <222> (76) .. (77)  
 [3256] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3257] <220>  
 [3258] <221> misc\_feature  
 [3259] <222> (83) .. (83)  
 [3260] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3261] <220>  
 [3262] <221> misc\_feature  
 [3263] <222> (100) .. (100)  
 [3264] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3265] <220>  
 [3266] <221> misc\_feature  
 [3267] <222> (109) .. (109)  
 [3268] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3269] <400> 130  
 [3270] Xaa Ile Xaa Leu Thr Gln Ser Pro Xaa Xaa Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 [3271] 1 5 10 15  
 [3272] Glu Arg Val Xaa Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
 [3273] 20 25 30  
 [3274] Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Pro Arg Leu Leu Ile  
 [3275] 35 40 45

[3276] Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Xaa Xaa Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly  
 [3277] 50 55 60  
 [3278] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Glu Ser  
 [3279] 65 70 75 80  
 [3280] Glu Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr  
 [3281] 85 90 95  
 [3282] Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Xaa  
 [3283] 100 105  
 [3284] <210> 131  
 [3285] <211> 109  
 [3286] <212> PRT  
 [3287] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [3288] <220>  
 [3289] <221> misc\_feature  
 [3290] <222> (1) .. (1)  
 [3291] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3292] <220>  
 [3293] <221> misc\_feature  
 [3294] <222> (3) .. (3)  
 [3295] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3296] <220>  
 [3297] <221> misc\_feature  
 [3298] <222> (9) .. (10)  
 [3299] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3300] <220>  
 [3301] <221> misc\_feature  
 [3302] <222> (20) .. (20)  
 [3303] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3304] <220>  
 [3305] <221> misc\_feature  
 [3306] <222> (39) .. (39)  
 [3307] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3308] <220>  
 [3309] <221> misc\_feature  
 [3310] <222> (41) .. (42)  
 [3311] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3312] <220>  
 [3313] <221> misc\_feature  
 [3314] <222> (54) .. (54)  
 [3315] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3316] <220>  
 [3317] <221> misc\_feature

[3318] <222> (60) .. (60)  
 [3319] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3320] <220>  
 [3321] <221> misc\_feature  
 [3322] <222> (74) .. (74)  
 [3323] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3324] <220>  
 [3325] <221> misc\_feature  
 [3326] <222> (76) .. (77)  
 [3327] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3328] <220>  
 [3329] <221> misc\_feature  
 [3330] <222> (83) .. (83)  
 [3331] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3332] <220>  
 [3333] <221> misc\_feature  
 [3334] <222> (100) .. (100)  
 [3335] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3336] <220>  
 [3337] <221> misc\_feature  
 [3338] <222> (109) .. (109)  
 [3339] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3340] <400> 131  
 [3341] Xaa Ile Xaa Leu Thr Gln Ser Pro Xaa Xaa Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 [3342] 1 5 10 15  
 [3343] Glu Arg Val Xaa Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
 [3344] 20 25 30  
 [3345] Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 [3346] 35 40 45  
 [3347] Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Ile Ser Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly  
 [3348] 50 55 60  
 [3349] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Glu Ser  
 [3350] 65 70 75 80  
 [3351] Glu Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr  
 [3352] 85 90 95  
 [3353] Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Xaa  
 [3354] 100 105  
 [3355] <210> 132  
 [3356] <211> 109  
 [3357] <212> PRT  
 [3358] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [3359] <220>

- [3360] <221> misc\_feature  
[3361] <222> (1) .. (1)  
[3362] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3363] <220>  
[3364] <221> misc\_feature  
[3365] <222> (3) .. (3)  
[3366] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3367] <220>  
[3368] <221> misc\_feature  
[3369] <222> (9) .. (10)  
[3370] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3371] <220>  
[3372] <221> misc\_feature  
[3373] <222> (20) .. (20)  
[3374] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3375] <220>  
[3376] <221> misc\_feature  
[3377] <222> (39) .. (39)  
[3378] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3379] <220>  
[3380] <221> misc\_feature  
[3381] <222> (41) .. (43)  
[3382] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3383] <220>  
[3384] <221> misc\_feature  
[3385] <222> (60) .. (60)  
[3386] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3387] <220>  
[3388] <221> misc\_feature  
[3389] <222> (74) .. (74)  
[3390] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3391] <220>  
[3392] <221> misc\_feature  
[3393] <222> (76) .. (77)  
[3394] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3395] <220>  
[3396] <221> misc\_feature  
[3397] <222> (83) .. (83)  
[3398] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3399] <220>  
[3400] <221> misc\_feature  
[3401] <222> (100) .. (100)

[3402] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3403] <220>  
 [3404] <221> misc\_feature  
 [3405] <222> (109)..(109)  
 [3406] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3407] <400> 132  
 [3408] Xaa Ile Xaa Leu Thr Gln Ser Pro Xaa Xaa Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 [3409] 1 5 10 15  
 [3410] Glu Arg Val Xaa Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
 [3411] 20 25 30  
 [3412] Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Pro Arg Leu Leu Ile  
 [3413] 35 40 45  
 [3414] Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly  
 [3415] 50 55 60  
 [3416] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Glu Ser  
 [3417] 65 70 75 80  
 [3418] Glu Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr  
 [3419] 85 90 95  
 [3420] Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Xaa  
 [3421] 100 105  
 [3422] <210> 133  
 [3423] <211> 118  
 [3424] <212> PRT  
 [3425] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [3426] <220>  
 [3427] <221> misc\_feature  
 [3428] <222> (1)..(1)  
 [3429] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3430] <220>  
 [3431] <221> misc\_feature  
 [3432] <222> (3)..(3)  
 [3433] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3434] <220>  
 [3435] <221> misc\_feature  
 [3436] <222> (5)..(5)  
 [3437] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3438] <220>  
 [3439] <221> misc\_feature  
 [3440] <222> (7)..(7)  
 [3441] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3442] <220>  
 [3443] <221> misc\_feature

- [3444] <222> (9) .. (17)  
[3445] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3446] <220>  
[3447] <221> misc\_feature  
[3448] <222> (19) .. (19)  
[3449] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3450] <220>  
[3451] <221> misc\_feature  
[3452] <222> (21) .. (21)  
[3453] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3454] <220>  
[3455] <221> misc\_feature  
[3456] <222> (23) .. (23)  
[3457] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3458] <220>  
[3459] <221> misc\_feature  
[3460] <222> (25) .. (25)  
[3461] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3462] <220>  
[3463] <221> misc\_feature  
[3464] <222> (39) .. (39)  
[3465] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3466] <220>  
[3467] <221> misc\_feature  
[3468] <222> (41) .. (45)  
[3469] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3470] <220>  
[3471] <221> misc\_feature  
[3472] <222> (47) .. (47)  
[3473] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3474] <220>  
[3475] <221> misc\_feature  
[3476] <222> (60) .. (60)  
[3477] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3478] <220>  
[3479] <221> misc\_feature  
[3480] <222> (62) .. (63)  
[3481] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3482] <220>  
[3483] <221> misc\_feature  
[3484] <222> (65) .. (67)  
[3485] <223> Xaa=任何氨基酸

[3486] <220>  
[3487] <221> misc\_feature  
[3488] <222> (69) .. (69)  
[3489] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3490] <220>  
[3491] <221> misc\_feature  
[3492] <222> (71) .. (71)  
[3493] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3494] <220>  
[3495] <221> misc\_feature  
[3496] <222> (73) .. (78)  
[3497] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3498] <220>  
[3499] <221> misc\_feature  
[3500] <222> (80) .. (80)  
[3501] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3502] <220>  
[3503] <221> misc\_feature  
[3504] <222> (82) .. (82)  
[3505] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3506] <220>  
[3507] <221> misc\_feature  
[3508] <222> (84) .. (85)  
[3509] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3510] <220>  
[3511] <221> misc\_feature  
[3512] <222> (87) .. (89)  
[3513] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3514] <220>  
[3515] <221> misc\_feature  
[3516] <222> (91) .. (91)  
[3517] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3518] <220>  
[3519] <221> misc\_feature  
[3520] <222> (93) .. (93)  
[3521] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3522] <220>  
[3523] <221> misc\_feature  
[3524] <222> (110) .. (110)  
[3525] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3526] <220>  
[3527] <221> misc\_feature

[3528] <222> (113) .. (113)  
 [3529] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3530] <220>  
 [3531] <221> misc\_feature  
 [3532] <222> (115) .. (115)  
 [3533] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3534] <220>  
 [3535] <221> misc\_feature  
 [3536] <222> (117) .. (118)  
 [3537] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3538] <400> 133  
 [3539] Xaa Val Xaa Leu Xaa Glu Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [3540] 1 5 10 15  
 [3541] Xaa Leu Xaa Leu Xaa Cys Xaa Val Xaa Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 [3542] 20 25 30  
 [3543] Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Trp  
 [3544] 35 40 45  
 [3545] Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Xaa Asn Xaa Xaa Leu  
 [3546] 50 55 60  
 [3547] Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Ile Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa  
 [3548] 65 70 75 80  
 [3549] Leu Xaa Leu Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ala Xaa Tyr Tyr Cys  
 [3550] 85 90 95  
 [3551] Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr  
 [3552] 100 105 110  
 [3553] Xaa Val Xaa Val Xaa Xaa  
 [3554] 115  
 [3555] <210> 134  
 [3556] <211> 109  
 [3557] <212> PRT  
 [3558] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [3559] <220>  
 [3560] <221> misc\_feature  
 [3561] <222> (1) .. (1)  
 [3562] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3563] <220>  
 [3564] <221> misc\_feature  
 [3565] <222> (3) .. (3)  
 [3566] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3567] <220>  
 [3568] <221> misc\_feature  
 [3569] <222> (5) .. (5)

- [3570] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3571] <220>  
[3572] <221> misc\_feature  
[3573] <222> (7) .. (12)  
[3574] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3575] <220>  
[3576] <221> misc\_feature  
[3577] <222> (14) .. (18)  
[3578] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3579] <220>  
[3580] <221> misc\_feature  
[3581] <222> (20) .. (20)  
[3582] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3583] <220>  
[3584] <221> misc\_feature  
[3585] <222> (22) .. (22)  
[3586] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3587] <220>  
[3588] <221> misc\_feature  
[3589] <222> (24) .. (24)  
[3590] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3591] <220>  
[3592] <221> misc\_feature  
[3593] <222> (26) .. (26)  
[3594] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3595] <220>  
[3596] <221> misc\_feature  
[3597] <222> (37) .. (37)  
[3598] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3599] <220>  
[3600] <221> misc\_feature  
[3601] <222> (39) .. (43)  
[3602] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3603] <220>  
[3604] <221> misc\_feature  
[3605] <222> (45) .. (45)  
[3606] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3607] <220>  
[3608] <221> misc\_feature  
[3609] <222> (54) .. (57)  
[3610] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3611] <220>

- [3612] <221> misc\_feature  
[3613] <222> (59) .. (61)  
[3614] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3615] <220>  
[3616] <221> misc\_feature  
[3617] <222> (63) .. (63)  
[3618] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3619] <220>  
[3620] <221> misc\_feature  
[3621] <222> (65) .. (65)  
[3622] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3623] <220>  
[3624] <221> misc\_feature  
[3625] <222> (67) .. (67)  
[3626] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3627] <220>  
[3628] <221> misc\_feature  
[3629] <222> (69) .. (70)  
[3630] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3631] <220>  
[3632] <221> misc\_feature  
[3633] <222> (72) .. (72)  
[3634] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3635] <220>  
[3636] <221> misc\_feature  
[3637] <222> (74) .. (74)  
[3638] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3639] <220>  
[3640] <221> misc\_feature  
[3641] <222> (76) .. (77)  
[3642] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3643] <220>  
[3644] <221> misc\_feature  
[3645] <222> (79) .. (81)  
[3646] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3647] <220>  
[3648] <221> misc\_feature  
[3649] <222> (83) .. (83)  
[3650] <223> Xaa=任何氨基酸  
[3651] <220>  
[3652] <221> misc\_feature  
[3653] <222> (100) .. (100)

[3654] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3655] <220>  
 [3656] <221> misc\_feature  
 [3657] <222> (103)..(103)  
 [3658] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3659] <220>  
 [3660] <221> misc\_feature  
 [3661] <222> (105)..(109)  
 [3662] <223> Xaa=任何氨基酸  
 [3663] <400> 134  
 [3664] Xaa Ile Xaa Leu Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa  
 [3665] 1 5 10 15  
 [3666] Xaa Xaa Val Xaa Phe Xaa Cys Xaa Ala Xaa Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
 [3667] 20 25 30  
 [3668] Ile His Trp Tyr Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Leu Leu Ile  
 [3669] 35 40 45  
 [3670] Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Gly  
 [3671] 50 55 60  
 [3672] Xaa Gly Xaa Gly Xaa Xaa Phe Xaa Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Xaa Xaa  
 [3673] 65 70 75 80  
 [3674] Xaa Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr  
 [3675] 85 90 95  
 [3676] Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [3677] 100 105  
 [3678] <210> 135  
 [3679] <211> 327  
 [3680] <212> DNA  
 [3681] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [3682] <400> 135  
 [3683] gaaatagtcc ttaccaatc tcccgaacc ctctcagtat ctcccggcga acgagtaacc 60  
 [3684] ttttcatgta gagcatccca atccatcggc acttcaatc actggtatca gcagaaaaca 120  
 [3685] ggtcaatccc cacggcttct tataaaatat gcatcagaat caatttctgg catccagac 180  
 [3686] agattttcag gttcaggatc aggcaccgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240  
 [3687] gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataaacagct ggcccactac attcggacaa 300  
 [3688] ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327  
 [3689] <210> 136  
 [3690] <211> 109  
 [3691] <212> PRT  
 [3692] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [3693] <400> 136  
 [3694] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 [3695] 1 5 10 15

[3696] Glu Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
 [3697] 20 25 30  
 [3698] Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 [3699] 35 40 45  
 [3700] Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 [3701] 50 55 60  
 [3702] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ser  
 [3703] 65 70 75 80  
 [3704] Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr  
 [3705] 85 90 95  
 [3706] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr  
 [3707] 100 105  
 [3708] <210> 137  
 [3709] <211> 327  
 [3710] <212> DNA  
 [3711] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [3712] <400> 137  
 [3713] gaaatagttc ttactcaatc ccccggtaca ctctcagttt ccccaggcga acgcgtcact 60  
 [3714] ttttcttgca gagcatcaca atcaatcggc acttcaattc attggtatca acaaaaaaca 120  
 [3715] ggacaggccc cagcaattct tattaaatat gcatcagaat caatttctgg catcccagac 180  
 [3716] agattttcag gttcaggatc aggcaccgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240  
 [3717] gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataacagct ggcccactac attcggacaa 300  
 [3718] ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327

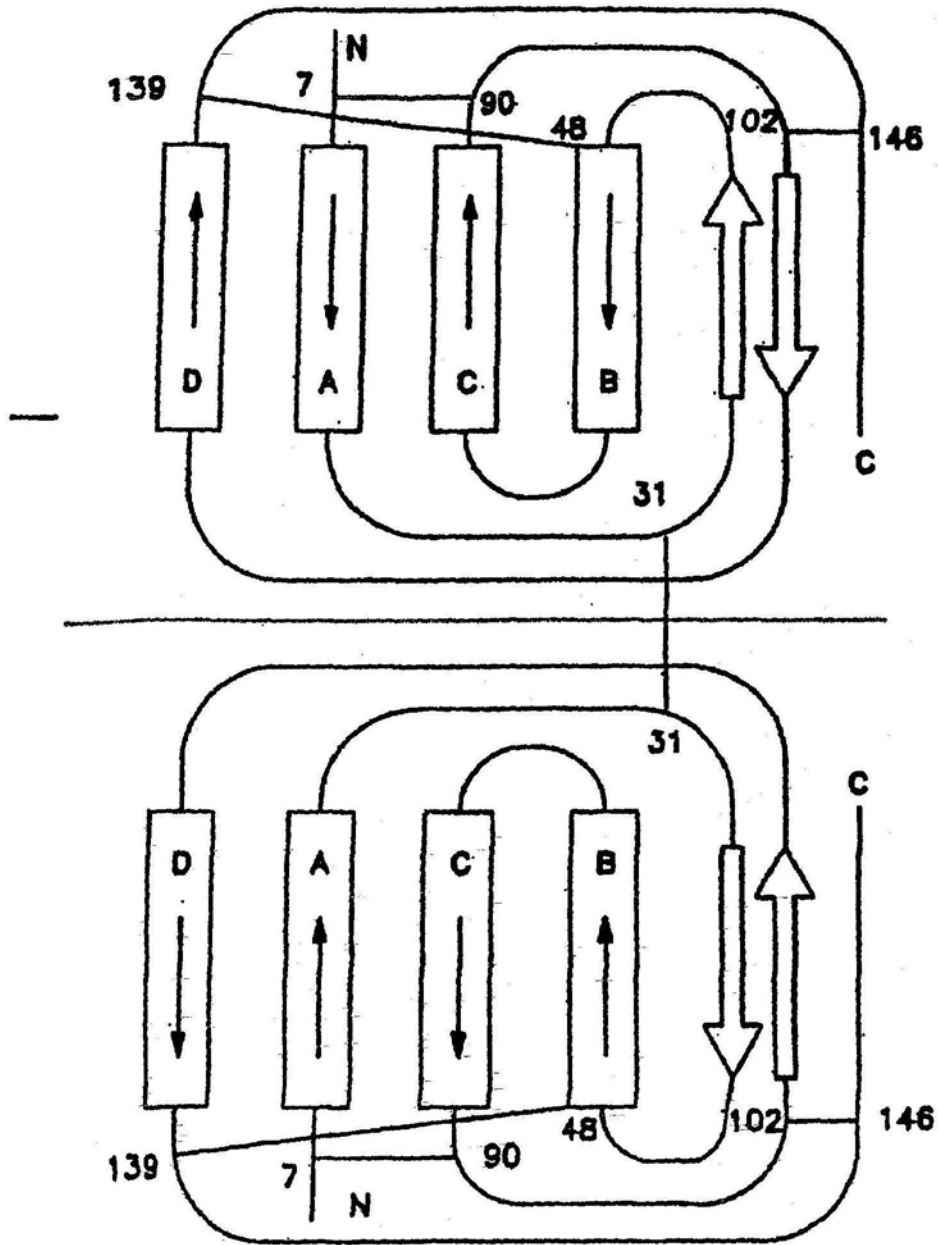


图1

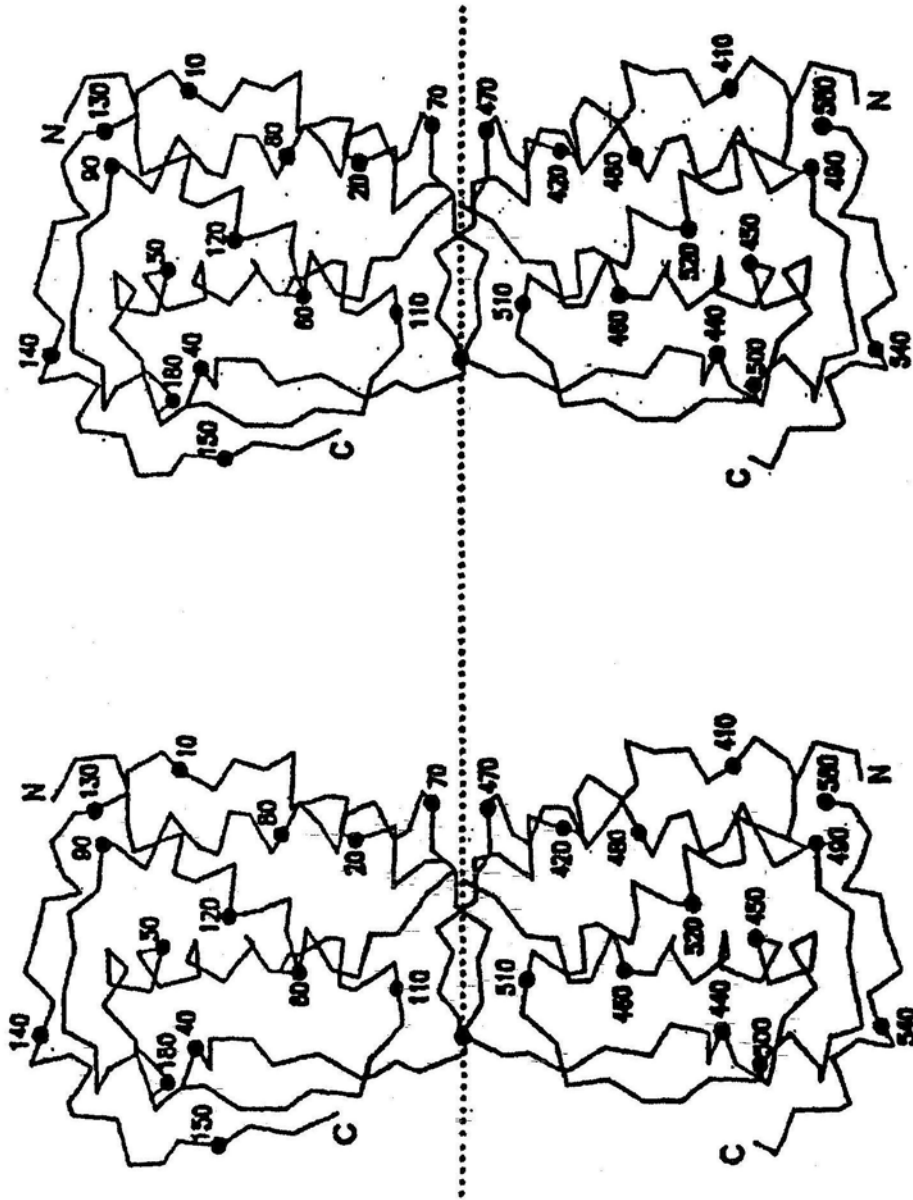


图2

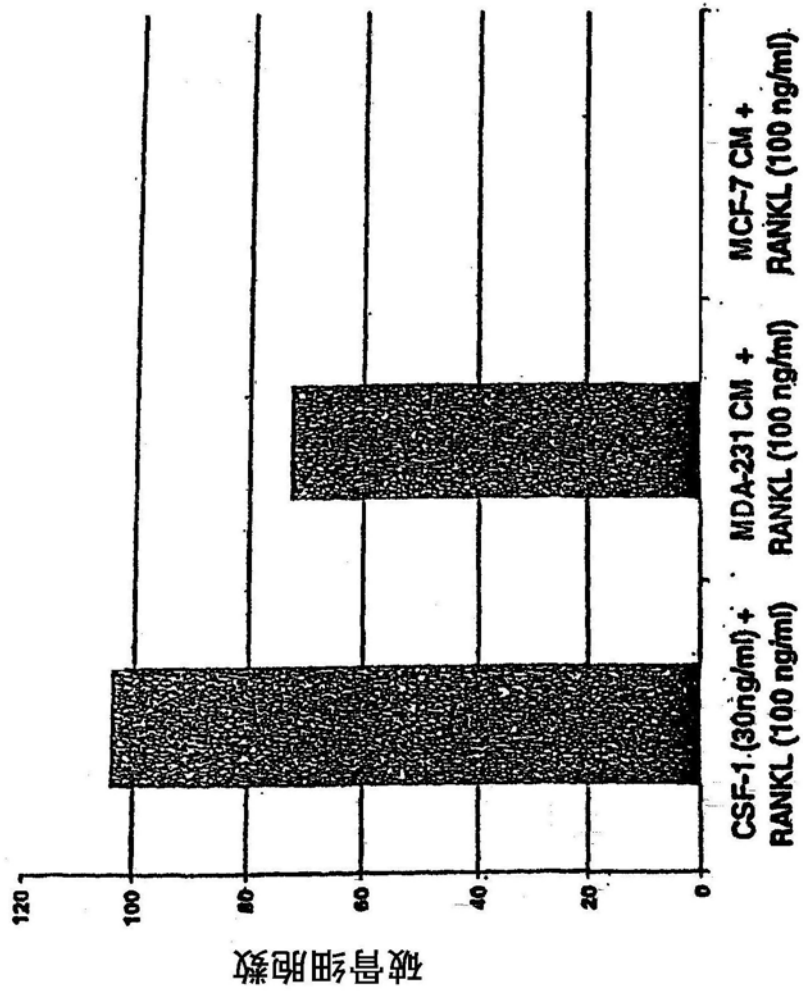


图3

**RX1 轻链氨基酸序列:**

1  
 DILLTQSPAILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTSLHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGGTDFTLLINSVESEDIADYYCQIINWF<sup>3</sup>TFGGGTKLEIKRADAAPTVSI<sup>2</sup>FP<sup>1</sup>PPSS<sup>2</sup>  
 QLTSGGASVVCFLNNFYPKDI<sup>1</sup>NV<sup>2</sup>WKIDGSRQNGVLSNWTQDSDKSDSTYSMSSTLLTKDEYERHNSYTC<sup>1</sup>E<sup>2</sup>A<sup>3</sup>HTKSTSTIVKSNFRNEC

**RX1 重链氨基酸序列:**

4  
 DVQLQESGGLVKPQSLSLCTIVTDYSITSDYANNWIRQFPGNKLEWGMZLSYSGSTSYNPSLKRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASFDYAHAMDYWGQTSVT<sup>6</sup>VSSAKT<sup>5</sup>  
 PSYVPLAPVCGD<sup>4</sup>TGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTSS<sup>5</sup>TWPSQSI<sup>4</sup>TCNV<sup>5</sup>AHPASSTKVDK<sup>6</sup>KI<sup>5</sup>EP<sup>4</sup>RGFTIK<sup>6</sup>PC<sup>5</sup>PK<sup>4</sup>CP<sup>6</sup>AP<sup>5</sup>NLLGG<sup>4</sup>SV<sup>6</sup>FI<sup>5</sup>FP<sup>4</sup>  
 KIKDVLMI<sup>4</sup>SLSPI<sup>5</sup>VTCVVDVSEDDPDVQISW<sup>4</sup>FVNNV<sup>5</sup>EVHTAQ<sup>6</sup>TQ<sup>4</sup>THREDY<sup>5</sup>NS<sup>6</sup>TLRV<sup>4</sup>V<sup>5</sup>SALPI<sup>6</sup>QHODW<sup>4</sup>MSG<sup>5</sup>KE<sup>6</sup>FK<sup>4</sup>V<sup>5</sup>KN<sup>6</sup>KDL<sup>4</sup>PA<sup>5</sup>PI<sup>6</sup>ERTIS<sup>4</sup>K<sup>5</sup>PK<sup>6</sup>GS<sup>4</sup>VR<sup>5</sup>AP<sup>6</sup>QV<sup>4</sup>V<sup>5</sup>VLP<sup>6</sup>PE<sup>4</sup>EM<sup>5</sup>TK<sup>6</sup>Q<sup>4</sup>V<sup>5</sup>TL<sup>6</sup>T<sup>4</sup>Q<sup>5</sup>  
 VTD<sup>4</sup>F<sup>5</sup>M<sup>6</sup>PE<sup>4</sup>I<sup>5</sup>VE<sup>6</sup>WT<sup>4</sup>N<sup>5</sup>NG<sup>6</sup>K<sup>4</sup>TEL<sup>5</sup>NY<sup>6</sup>KN<sup>4</sup>TE<sup>5</sup>PV<sup>6</sup>LDS<sup>4</sup>D<sup>5</sup>GS<sup>6</sup>Y<sup>4</sup>F<sup>5</sup>MY<sup>6</sup>SK<sup>4</sup>LR<sup>5</sup>VE<sup>6</sup>KN<sup>4</sup>W<sup>5</sup>VER<sup>6</sup>NS<sup>4</sup>Y<sup>5</sup>CS<sup>6</sup>V<sup>4</sup>V<sup>5</sup>HE<sup>6</sup>GL<sup>4</sup>HN<sup>5</sup>H<sup>6</sup>ht<sup>4</sup>K<sup>5</sup>S<sup>6</sup>F<sup>4</sup>S<sup>5</sup>R<sup>6</sup>T<sup>4</sup>P<sup>5</sup>

**RX1 重链核苷酸序列:**

atgggttggtcctgtatcctatcctggcctgcccactgccaaggtgtgcaactccgaagtcagctccaggtcaggaacctggcctcgtgaaacctctcagagctgtcctccacctgt  
 actgtcactgactactccatcaccagtgttacgctggaactggatcggcaatcccaggaataaaacttgagtgatgggtacataaagctacagtggtgagcactcctacaatccatct  
 ctcaaaagtggatcctcactcagagacacatccaagaaccagttctctcagctgaactctgtgactgaggaacagccacatattactgtgcatcctcgactatgcccacgcc  
 atggattactgggccaaggactcggactgtctctccgcaaaacaacagcccactcgtctatccactggccccctgtgtggagatacaactggctcctcgtgacttaggatgc  
 ctggccaaggttatctccctgagccagtgacctggaactctggatcctcctcagctgggtgtgcacacctccagctgtcctgcagctgacacctacacctcagcagctcagtg  
 actgtaacctgagcaacctggcccagcctccatcaactgcaatgtggcccacccgcaagcagcaaaagtgagcccaagggggcccaaatcaagccctgtcctcca  
 tgcataatgcccagcaactaacctctgggtggaccatccgtcttaactcctcccaagatcaaggatgactcatgatctcctgagcccaatagtcacatgtgtgggtggtgagc  
 gaggatgacccagatgtccagatcagctggtttgtgaacaacgtggaagtacacacagctcagacacaaacctatagagggattacaacagctactcpcgggtggtcagtgccctccccatc  
 cagcaccaggaactggatgagtggcaaggattcaatgcaaggtcaacaacaagacctcccagcctcagagagaccatcaaaacccaagggtcagtaaggtccacaggtatata  
 gtctgctccaccagaagaagatgactaagaacaaggtcactctgacctgcatggtcacagactcatgctgagagacatttaccgtggagtgaccacaacagggaaacacagagctaaaac  
 tacaagaactgaccagctcctggactctgatggttcttacttactgtacagcaagctgagagtggaagaagaaactcctcctcctcagtggtccaaggggt  
 ctgcacaataccacacagactaagagcttctcccggactccgggtaaa

**RX1 轻链核苷酸序列:**

atgggtatccacacctcagttcctgtgatttttgcttctggattccagctccagaggtgacatttctgactcagctccagccatcctgtgtgagtcaggaagaagagtcagtttc  
 tccctgaggccagtcagagctggcacaagcatcactggtatcagcaagaacaaatggttctccaaggttctcataaagtatgctctgagctctatctctgggatccctccaggttt  
 agtggcagtgatcaggacagatttactcttagcatcaacagtggtgagctgaagatattgcagatttactgtcaacaaataatagctggccaacacagctcggcgggggacaag  
 ttggaaataaaaaggctgactgacccaactgtatccatctcccactccagtgagcagttaaactctggaggtgctcagtcgtgtgtctctgaaacactctaccccaagaacatc  
 aatgtcaagtggaaagattgatggcagtgaaacacaaaatggcgtcctgaaacagtggaactgatcaggacagcaaaagacacacctcagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggaacgag  
 tatgaacacataaacagctatacctgtgagggccactcaacaagacatcaactcaccctatgtcaagagcttcaacaggaatgagttg

图4A





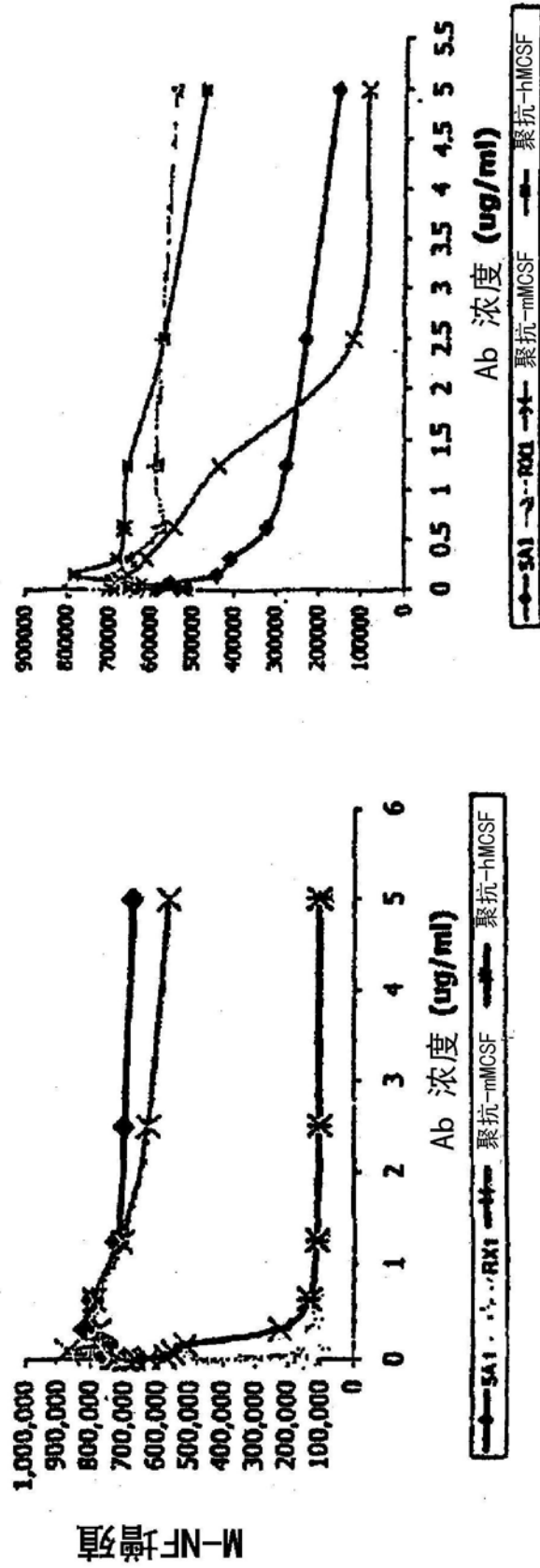
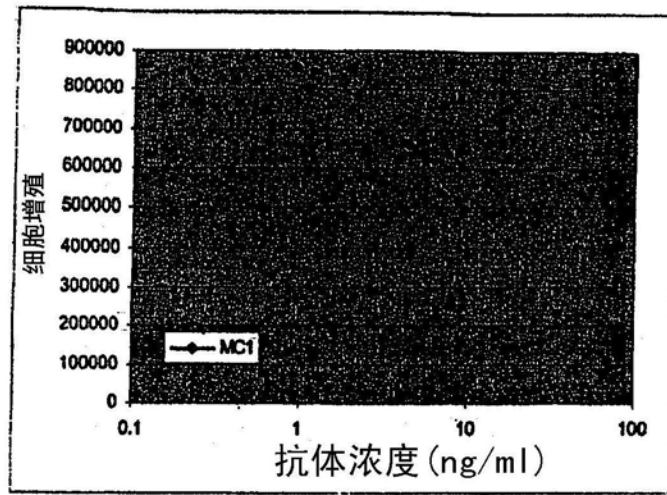


图5A

MC1中和人MCSF活性



MC3中和人MCSF活性

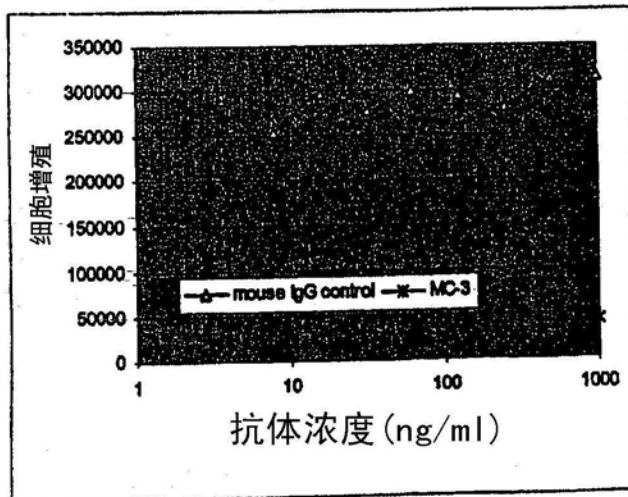


图5B

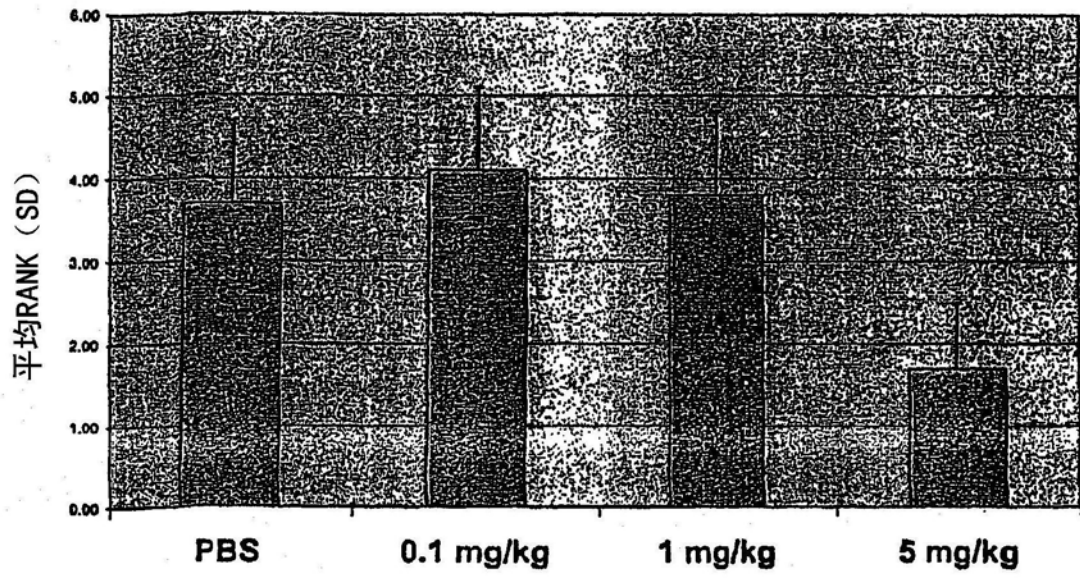


图6

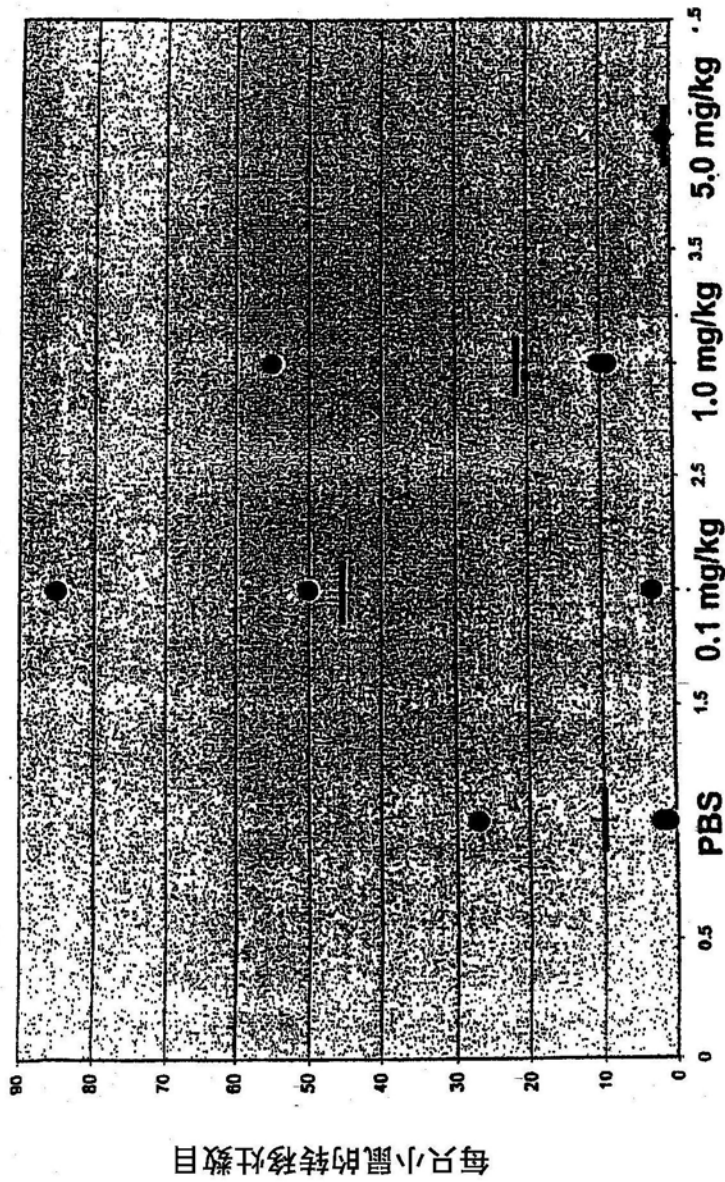


图7

### MCSF特异性抗性与乳腺癌细胞系DMA231结合

红: 无抗体对照  
黑: M-CSF 抗体 1 ug/ml  
绿: M-CSF 抗体 10 ug/ml  
蓝: M-CSF 抗体 50 ug/ml

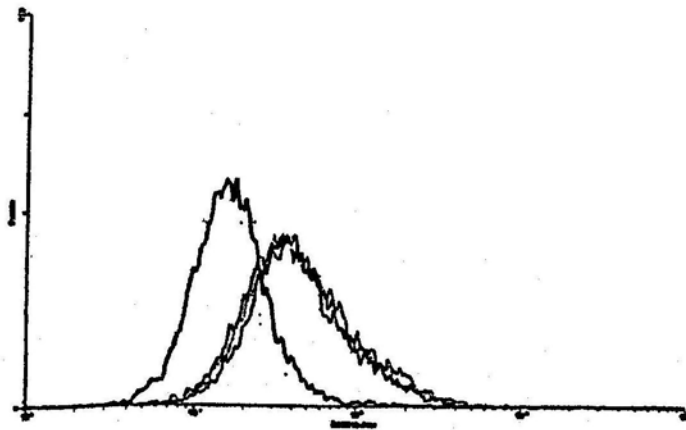


图8A

### MCSF特异性抗体与多发性骨髓瘤细胞系ARH77的结合

红: 无抗体对照  
绿: M-CSF抗体5mg/ml  
蓝: 对照1gG2a5mg/ml

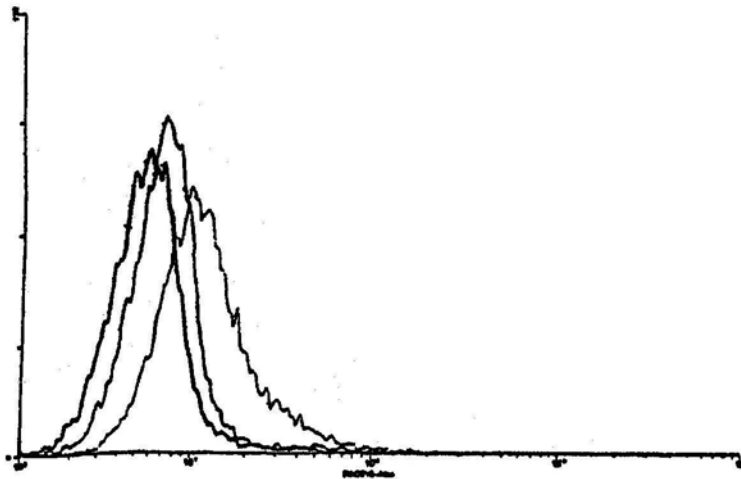


图8B

癌类型	癌状态	评分 0	评分 1	评分 2	评分 3	评分 4	平分为3或更高的百分数
肾上腺	正常	10	5	5	0	0	0
基细胞	癌	5	0	0	0	0	0
膀胱	正常	6	1	2	1	0	10
脑	正常	17	1	2	0	0	0
乳腺	癌	6	5	13	62	0	72
乳腺	正常	7	5	7	6	0	24
良性肿瘤	正常	9	2	2	0	0	0
良性肿瘤(肌肉)	癌	1	0	1	0	0	0
绒毛膜癌	癌	1	0	0	0	0	0
结肠	正常	4	0	2	0	0	0
结肠	癌	9	0	1	4	0	27
纤维肉瘤	癌	3	1	0	0	0	0
胆囊	正常	2	1	0	1	0	25
生殖细胞	癌	1	0	0	0	0	20
心脏	正常	7	3	2	4	0	25
肾	正常	5	10	1	4	0	20
肾	癌	8	1	0	3	0	25
平滑肌肉瘤	癌	5	0	0	0	0	0
肝	正常	11	3	4	1	0	5
肝	癌	5	3	0	3	0	27
肺	正常	19	0	1	0	0	0
肺	癌	3	1	0	3	0	43
淋巴瘤	癌	13	0	3	2	0	12
黑素瘤	癌	7	0	2	5	0	36
黑素瘤(炎症)	癌	0	0	0	1	0	100
间皮瘤	癌	6	0	0	0	0	0
神经细胞瘤	癌	1	0	0	0	0	0
卵巢	正常	6	0	2	0	0	0
卵巢	癌	8	2	0	4	0	29
胰	正常	9	2	5	4	0	20
胰	癌	8	1	0	3	0	25
前列腺	正常	0	3	8	3	0	21
前列腺	癌	9	1	1	4	0	27
全部肉瘤	癌	6	0	2	2	0	20
肉瘤	癌	3	0	2	1	0	17
肉瘤(肾)	癌	3	0	2	1	0	17
肉瘤 mfh	癌	2	0	0	0	0	0
精原细胞瘤	癌	3	0	0	0	0	0
小肠	正常	2	1	0	1	0	25
脾	正常	14	2	3	0	0	0
鳞状细胞	癌	3	0	0	0	0	0
胃	正常	3	2	2	1	0	13
胃	癌	7	1	1	1	0	10
畸胎瘤	癌	1	0	0	0	0	0
睾丸	正常	5	1	3	3	0	25
甲状腺	正常	15	0	0	0	0	0
甲状腺	癌	6	2	1	2	0	18
Undifl all	癌	6	0	2	1	0	11
Undil	癌	5	0	2	0	0	0

图9

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

图10

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr  
 20 25 30  
 Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu  
 35 40 45  
 Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln  
 50 55 60  
 Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys  
 65 70 75 80  
 Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr  
 85 90 95  
 Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu  
 100 105 110  
 Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu  
 115 120 125  
 Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln  
 130 135 140  
 Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu  
 145 150 155 160  
 Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala  
 165 170 175  
 Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu  
 180 185 190  
 Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His  
 195 200 205  
 Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu  
 210 215 220  
 Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro  
 225 230 235 240  
 Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser  
 245 250 255  
 Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser  
 260 265 270  
 Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn  
 275 280 285  
 Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val  
 290 295 300  
 Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly  
 305 310 315 320  
 Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu  
 325 330 335  
 Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala  
 340 345 350  
 Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro  
 355 360 365  
 Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro  
 370 375 380  
 Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro  
 405 410 415  
 Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly  
 420 425 430  
 Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp  
 435 440 445  
 Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala  
 450 455 460  
 Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly  
 465 470 475 480  
 His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser  
 485 490 495  
 Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val  
 500 505 510  
 Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro  
 515 520 525  
 Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr  
 530 535 540  
 Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val

图11

```

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1      5      10
Gly Ser Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
20      25      30
Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
35      40      45
Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
50      55      60
Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65      70      75      80
Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
85      90      95
Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
100     105     110
Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
115     120     125
Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
130     135     140
Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145     150     155     160
Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
165     170     175
Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
180     185     190
Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
195     200     205
Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
210     215     220
Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
225     230     235     240
Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
245     250     255
Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
260     265     270
Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
275     280     285
Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
290     295     300
Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
305     310     315     320
Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
325     330     335
Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
340     345     350
Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly His Glu Arg Gln
355     360     365
Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu
370     375     380
Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu
385     390     395     400
Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp
405     410     415
Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg
420     425     430
Gln Val Glu Leu Pro Val

```

图12

## 5H4 重链蛋白项列:

```

1   EIQLQQSGPE LVKTGTSVKI SCKASGYSFT GYFMHWVKQS HGKSLEWIGY
51  ISCYNGDTNY NQNFKGKATF TVDTSSSTAY MQFNLSLTSED SAVVYCAREG
101 GNYPAYWGQG TLVTVSAAKT TPPSVYPLAP GSAAQTNSMV TLGCLVKGYF
151 PEPVTVTWNS GSLSSGVHTF PAVLQSDLYT LSSSVTVPSS TWPSETVTCN
201 VAHPASSTKV DKKIVPRDCG CKPCICTVPE VSSVFIFPPK PKDVLITILT
251 PKVTCVVVDI SKDDPEVQFS WFVDDVEVHT AQTQPREEQF NSTFRSVSEL
301 PIMHQDWLNG KEFKCRVNSA AFPAPIEKTI SKTKGRPKAP QVYTIPPPKE
351 QMAKDKVSLT CMITDFFPED ITVEWQWNGQ PAENYKNTQP IMDTDGSYFV
401 YSKLVNQKSN WEAGNTFTCS VLHEGLHNNH TEKSLSHSPG K

```

## 5H4 轻链蛋白序列:

```

1   DIVMTQSHKF MSTSVGDRV TITCKASQNVG TAVTWYQQKP GQSPKLLIYW
51  TSTRHAGVPD RFTGSGSGTD FTLTISDVQS EDLADYFCQQ YSSYPLTFGA
101 GTKLELKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLLNNFY PKDINVKWKI
151 DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
201 STSPIVKSFN RNEC

```

图13

## MC-1 重链蛋白序列:

```

1   EVKLVESGGG LVQPGGSLKL SCATSQFTFS DYMYWVRQT PEKRELVVAY
51  ISNGGGSTYY PDTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSRLKSED TAMYYCARQG
101 SYGYPFAYWG QGTLVTVSAA KTTAPSVYPL APVCGDTTGS SVTLGCLVKG
151 YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPVAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT
201 CNVAHPASST KVDKIEPRG PTIKPCPPCK CPAPNLLGGP SVFIFPPKIK
251 DVLMISLSPI VTCVVVDVSE DDPDVQISWF VNNVEVHTAQ TQTHREDYNS
301 TLRVVSALPI QHQDWMSGKE FKCKVNNKDL PAPIERTISK PKGSVRAPQV
351 YVLPPEEEM TKKQVTLTCM VTDMPEDIY VEWTNNGKTE LNYKNTEPVL
401 DSDGSYFMYS KLRVEKKNWV ERNSYSCSVV HEGLHNNHHT KSFRTPGK

```

## MC-1 轻链蛋白序列:

```

1   AIQMTQTTSS LSASLGDRV TISCSASQGIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY
51  TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEP EDIATYYCQQ YSKLPWTFGG
101 GTKLEIKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLLNNFY PKDINVKWKI
151 DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
201 STSPIVKSFN RNEC

```

图14

MC-3 重链蛋白序列:

```

1   DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT SDYAWNWIRO FPGNKLEWVG
51  YISYSGSTSY NPSLKSRI SI TRDTSKNQFF LQLNSVTTED TATYYCARLE
101 TWLFDYWGQG TTLTVSSAKT TPPSVYPLAP GCGDITGSSV TLGCLVKGYF
151 PESVTVTWNS GSISSSVHTF PALLQSGLYT MSSSVTVPSS TWPSQTVTCS
201 VAHPASSTTV DKKLEPSGPI STINPCPPCK ECHKCPAPNL EGGPSVFIFP
251 PNIKDVLMIS LTPKVTCVVV DVSEDDPDVQ ISWFVNNVEV HTAQQTQTHRE
301 DYNSTIRVVS TLPIQHODWM SGKEFKCKVN NKDLPSPIER TISKIKGLVR
351 APQVYILPPP AEQLSRKDVS LTCLVVGFPN GDISVEWTSN GHTTEENYKDT
401 APVLDSGGSY FIYSKLNMTK SKWEKTDSPS CNVRHEGLKN YYLKKTISR S
451 PGLDLDDICA EAKDGELDGL WTTITIFISL FLLSVCYSAS VTLFKVKWIF
501 SSVVELKQKI SPDYRNMIGQ GA
    
```

MC-3 轻链蛋白序列:

```

1   DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TSIHWYQORT NGSPRLLIKY
51  ASESIGIPS RFGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYCQQ SNSWPPTFGG
101 GTKLEIKWAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNIFY PKDINVKWKI
151 DGSERQNGVL NSWTDQDSK STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
201 STSPIVKSEF RNEC
    
```

图15

重链 CDR1:

```

1
H_CDR1_5H4 (1) -GYFMH
H_CDR1_MC-1 (1) -YMY
H_CDR1_CHIR-RX1 (1)
H_CDR1_MC-3 (1)
共有序列 (1) SDYAWN
    
```

重链 CDR2:

```

1 17
H_CDR2_5H4 (1) YISCNGDINYNQNEFKG
H_CDR2_MC-1 (1) YISNGGCTYMPDKG
H_CDR2_CHIR-RX1 (1) YIS-GETSYNPSLK
H_CDR2_MC-3 (1) YIS-GETSYNPSLK
共有序列 (1) YIS YSGSTSYNPSLKS
    
```

重链 CDR3:

```

1
H_CDR3_5H4 (1) --GNYPAY
H_CDR3_MC-1 (1) QGSNPPAY
H_CDR3_CHIR-RX1 (1) -FHAM
H_CDR3_MC-3 (1) --LETLY
共有序列 (1) DYGW FDY
    
```

图16A

重链 CDR1:

		1		11
L_CDR1_5H4	(1)	ASQN	PT	
L_CDR1_MC-1	(1)	SASQG	SNY	N
L_CDR1_CHIR-RX1	(1)	ASQ		
L_CDR1_MC-3	(1)	ASQ		
共有序列	(1)	RASQSIGTSIH		

重链 CDR2:

		1	
L_CDR2_5H4	(1)	STRH	
L_CDR2_MC-1	(1)	SSLH	
L_CDR2_CHIR-RX1	(1)	AS	
L_CDR2_MC-3	(1)	AS	
共有序列	(1)	YTSESI	

重链 CDR3:

		1	
L_CDR3_5H4	(1)	QQ	PLT
L_CDR3_MC-1	(1)	QQ	KLPWT
L_CDR3_CHIR-RX1	(1)	QQIN	PIT
L_CDR3_MC-3	(1)	QQSN	PIT
共有序列	(1)	QQYSSWPTT	

图16B

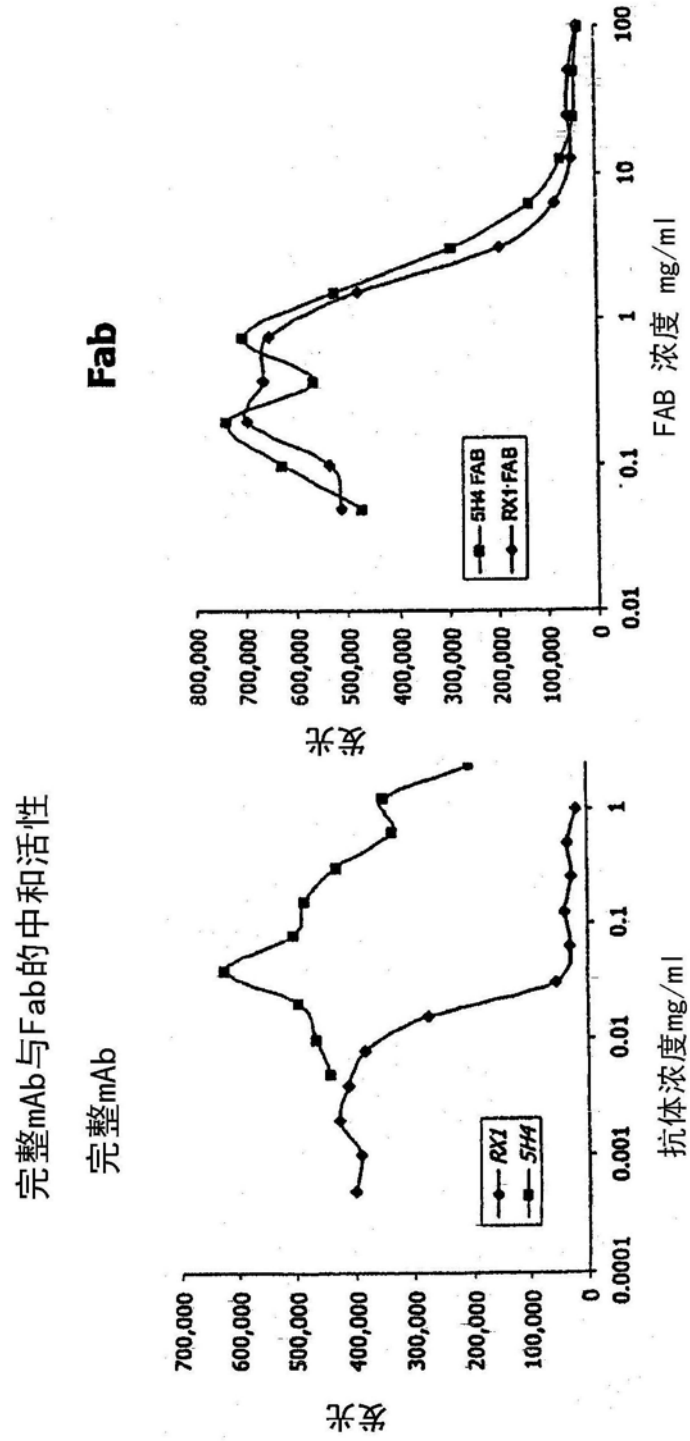
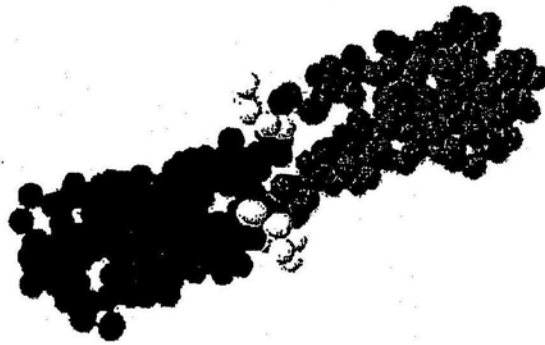


图17

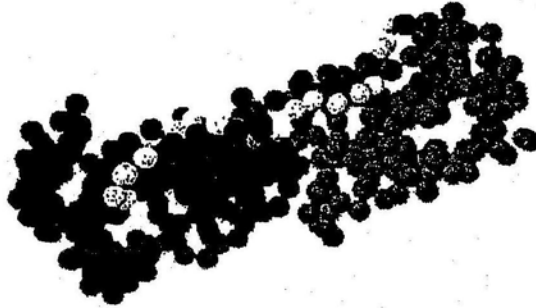
RX1表位突出的MCSF结构

RX1



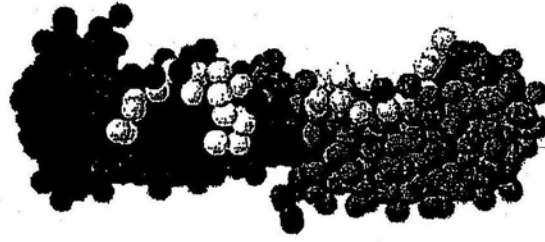
**R<sub>98</sub>FRDNTPN<sub>105</sub>**

5H4



**I<sub>65</sub>TFEFVDQE<sub>73</sub>**

MC3



**I<sub>65</sub>TFEFVDQE<sub>73</sub>**

**F<sub>138</sub>YETPLQ<sub>144</sub>**

图18



低风险重链与Kabat Vh2共有序列:

蛋白序列:

DVQLQESGPGLVKPSQILSLICTIVTDYSITSDYAWNWRQFPGKLEWVMGYISYSGSTSYNPSLKSRLTISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMD  
YWGQGTTIVTVSS

DNA 序列:

GACGTACAACCTTCAAGAATCTGGCCAGGTCCTCGTCAAAACCTTCTCAACTCTCACTGCACTGTTACTGACTCTCTATTACATCCGACTACGCTT  
GGAATGGATCCGACAAATTCCTGGTAAATAAATCGAATGGATGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCTCTCAAAATCCTTCTCTGAAATCACGCATCAC  
AATTTCCCGGATACCTCTAAAATCAATTTTCACTCCAACTCAATTCGTACCCGCCCGGATACTGCCACCTACTACTGTGCTCTTTTACTACGCTCACG  
CCATGGATTATTGGGACAGGGTACTACCGTTACCGTAAGCTCA

低风险+中风险重链与Kabat Vh2共有序列

蛋白序列:

QVQLQESGPGLVKPSQILSLICTIVSDYSITSDYAWNWRQFPGKLEWVMGYISYSGSTSYNPSLKSRLTISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMD  
YWGQGTTIVTVSS

DNA 序列:

CAAGTTCAACTTCAAGAATCAGGCCCGGACTCGTTAAACCCCTCTCAAACTCTCTCTTACTTGCACTGTATCCGATTACTCTATTACTTCAGACTACGCTTG  
GAACTGGATCAGACAAATTCCTGGTAAATAAATCGAATGGATGGATATATCTCTTACTCTGGCTCAACCTCTTACAACCCCTCTCTCAAAATCTCGAATAAC  
AATCTCACGCGATACTCTAAAATAATCAATTTTCACTCCAACTCAACTCCGTTACTGCCGCCGACACTGCCGTTTACTACTGTGCTTCCCTCGATTACGCCCAAG  
CTATGGATTATTGGGACAAAGGAACTACCGTCACTGTCAAGCTCA

图19B



低风险轻链与Kabat Vk3共有序列

蛋白序列:

EIVLTQSPGTLSPGERVTFSCRASQSIGTSHWYQQKTKQSPRLIKYASERISGIPDRFSGSGSDTDFILTSRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRIT

核苷酸序列:

GAAATAGTCCCTTACCCAAATCTCCGGGAAACCCTCAGTATCTCCGGCGAAGAGTAACCTTTTCATGTAGAGCATCCCAAATCCATCGGCACCTTCAATTCACCT  
GGTATCAGCAGAAAAACAAGTCAAATCCCAACGGCTTCTTATAAAATATGCATCAGAAAGAAATATCAGGCATTCAGACAGATTCAGAGTTTCAGGTTTCAGGTTTCAGGC  
ACAGACTTCACACTTACAAATTTCCCGGTCGAATCCGAAAGACTTCGCTGACTATTACTGCCAACAAATCAACTCATGGCCTACTACTTTCGGTCAAGGCACCC  
AAACTCGAAAATTAAACGTACG

低风险+中风险轻链与Kabat Vk3共有序列:

蛋白序列:

EIVLTQSPGTLSPGERVTFSCRASQSIGTSHWYQQKTKQAPRLIKYASERATGIPDRFSGSGSDTDFILTSRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRIT

核苷酸序列:

GAAATAGTTCCTTACTCAAATCCCCGGGTACA CTCTCAGTTTCCCAAGCGGACACTTTTCTTGCAGAGCATCAAAATCAATCGGCACCTTCAATTCATT  
GGTATCAACAAAAACAAGGACAGGCCCAACGACTTCTTATTAATATGCATCAGAACGAGCCACAGGCATCCAGACAGATTTTCAGGTTTCAGGATCAGGC  
ACCGATTCACACTTACAAATATCCAGAGTCGAATCAGAAAGATTTTGCAGATTACTATTGTCAACAAATAAACAGCTGGCCCACTACATTCGGACAAAGGCACA  
AAACTCGAAAATTAAACGTACG

图20B



低风险轻链与Kabat Vk3共有序列; AA54变回鼠

蛋白序列:

EIVLTQSPGTLSPGERVTFSCRASQSIGTSHHWYQQKGTGQSPRLLIKYASESISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPPTTFGGQTKLEIKRT

核苷酸序列:

GAATAGTCTTACCCAATCTCCGGAAACCCTCTCAGTATCTCCGGGAAACGAGTAACCTTTTCATGTAGAGCATCCCAATCCATCGGCACITTCAAITTCAC  
GGTATCAGCAGAAAACAGGTCAATCCCACGGCTTCTTATAAAATATGCATCAAGAAATCAATTTCTGGCATCCAGACAGATTTTCAGGTTTCAGGATCAGGCA  
CCGATTCACACTTACAATATCCAGAGTCGAATCAGAAGATTTTGCAGATTACTATTGTCAACAAATAAACAGCTGGCCCACTACATTCGGACAAAGGCACAA  
AACTCGAAATTAACGTACG

低风险+中风险轻链与Kabat Vk3共有序列; AA54、55、56变回鼠

蛋白序列:

EIVLTQSPGTLSPGERVTFSCRASQSIGTSHHWYQQKGTGQAPRLLIKYASESISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPPTTFGGQTKLEIKRT

核苷酸序列:

GAATAGTCTTACTCAATCCCCGGTACACTCTCAGTTTCCCCAGGCGAACCGGTCACITTTTCTTGCAAGCATCAAAATCGGCACITTCAAITTCAT  
GGTATCAACAAAACAGGACAGGCCACGACTTCTTATAAATATGCATCAGAATCAATTTCTGGCATCCAGACAGATTTTCAGGTTTCAGGATCAGGCA  
CCGATTCACACTTACAATATCCAGAGTCGAATCAGAAGATTTTGCAGATTACTATTGTCAACAAATAAACAGCTGGCCCACTACATTCGGACAAAGGCACAA  
AACTCGAAATTAACGTACG

图21B

轻链-基于HK6 2-1-1 (A14) 的改变

V-区	改变数	氨基酸 1-52
风险		LHLHLMLMLLMLLMLLHLHLHLHLMLMHHHHHHHHHHHHHMLMLMHHHHHHHHH
小鼠		DILLTQSPAILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTSTH----WYQRTNGSPRLLIKYAS
人		DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCQASEGIGNVLY----WYQKPDQAPKLLIKYAS
低风险	10	DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTFTCQASQSIGTSTH----WYQKTDQSPRLLIKYAS
低风险+中风险	12	DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTFTCQASQSIGTSTH----WYQKTDQAPKLLIKYAS

V-区	改变数	氨基酸 53-109
风险		HLMLMLMLHL
小鼠		ESISGIPSRFSGSGGTDFTLSINSVESEDIADYQCQINSWPT-----TFGGTKLEI-KRA
人		QISGVPSPRFSGSGGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQGNKHP-----LTFGGGTVKVEI-KRT
低风险	5	ESISGIPSRFSGSGGTDFTLTISSEAEADAADYQCQINSWPT-----TFGGTKLEI-KRT
低风险+中风险	5	ESISGIPSRFSGSGGTDFTLTISSEAEADAADYQCQINSWPT-----TFGGTKLEI-KRT

图22A

低风险轻链与VK6亚组2-1-1 (1) A14:

蛋白序列:

DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTFTCQASQSIGTSHWYQQKTDQSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGTDFTLTISSVEAEDAADYYCQQINSWPTTFGGGKLEIKRT

核苷酸序列: 未合成

低风险+中风险轻链与VK6亚组2-1- (1) A14:

DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTFTCQASQSIGTSHWYQQKTDQAPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGTDFTLTISSVEAEDAADYYCQQIN  
NSWPTTFGGGKLEIKRT

蛋白序列:

GACATAGTTCTCACACAATCACAGCATTCTCTCAGTTACACCCGGGAAAAGTAAACCTTTACCTGTCAAGGCTTCTCAATCTATCGGCACCTTCTATTCACT  
GGTATCAAACAAAAACCGATCAAGCTCCTAAACTCCTCATAAAAATACGCATCCGAAATCCATCTCCGGTATCCCTCCAGATTTTCAGGCTCCGGCTCCGGCA  
CAGATTTCAACCCTTACCAATTAGCTCAGTTGAAGCCGAAGACGCAGCTGATTACTACTGTCAACAAAATAAACTCATGGCCCACTACTTTCGGCGGGGCACTA  
AACTCGAAATAAAAACGTACG

图22B

鼠 RX-1 轻链:  
 DILLTQSPAILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTTSIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGGTDFTLLINSVESEDIADYYCQQINSWPTTFGGGQTK  
 LEIKRA

共有种系LC  
 rx1 kv (1) DILHQQSPAILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTTSIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGGTDFTLLINSVESEDIADYYCQQINSWPTTFG  
 (1) DIO MFGSSLSASVGDVVTITCRASQSLVXX-XISXXLXWYQQKPKAPKLLIYXAS  
 (1) DIVMTPPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSHSDGXXYLNWYLQKPGQSPQLLIYXXS  
 (1) EIVLTPSPGTLSPGERATLSCRASQSLVSSSY-LAWYQKPGQAPKLLIYXAS  
 (1) DIVMTPSPDLSLAVSLGERATLSCRASQSLVSSSY-LAWYQKPGQAPKLLIYXAS  
 (1) EIVLTPSPDLSLAVSLGERATLSCRASQSLVSSSY-LAWYQKPGQAPKLLIYXAS  
 (1) EIVLTPSPDLSLAVSLGERATLSCRASQSLVSSSY-LAWYQKPGQAPKLLIYXAS  
 (1) EIVLTPSPDLSLAVSLGERATLSCRASQSLVSSSY-LAWYQKPGQAPKLLIYXAS

轻链氨基半

RX-1 DILLTQSPAILSVSPGERVSVFSCRASQSI--GTSIH-----WYQORTNGSPRLLIKYAS

pos.. 10 20 abcdef 30 40 50

Kabat:

HK1...DIQMTQSPSSLSASVGDVVTITCRASQSLVXX-XISXXLXWYQQKPKAPKLLIYXAS  
 HK2...DIVMTPPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSHSDGXXYLNWYLQKPGQSPQLLIYXXS  
 HK3...EIVLTPSPGTLSPGERATLSCRASQSLVSSSY-LAWYQKPGQAPKLLIYXAS  
 HK4...DIVMTPSPDLSLAVSLGERATLSCRASQSLVSSSY-LAWYQKPGQAPKLLIYXAS

种系共有序列 (含有 JK4) :

hVK1 DIQMTQSPSSLSASVGDVVTITCRASQSLVSSSY-LAWYQKPGQAPKLLIYXAS  
 hVK2 DIVMTPPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSHSDGXXYLNWYLQKPGQSPQLLIYXXS  
 hVK3 EIVLTPSPGTLSPGERATLSCRASQSLVSSSY-LAWYQKPGQAPKLLIYXAS  
 hVK4 DIVMTPSPDLSLAVSLGERATLSCRASQSLVSSSY-LAWYQKPGQAPKLLIYXAS  
 hVK5 EIVLTPSPDLSLAVSLGERATLSCRASQSLVSSSY-LAWYQKPGQAPKLLIYXAS  
 hVK6 EIVLTPSPDLSLAVSLGERATLSCRASQSLVSSSY-LAWYQKPGQAPKLLIYXAS

图23A

轻链羧基半

RX-1 ESISGIPSRFSGSGGTDFTLINSVESEDIADYYCQQINSWPT-----TFGGTKLEI-KRA  
 pos... 60 70 80 90 abcdef 100 a

**Kabat:**

HK1... XLXSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQXXXPE-----XTFGQGTKVEI-KRT  
 HK2... NRXSGVPDRFSGSGGTDFTLKI SRVEAEDVGVYCMQAXQXPR-----XTFGQGTKVEI-KRT  
 HK3... SRATGIPDRFSGSGGTDFTLTI SRLEPEDFVAVY CQY GSSPP-----XTFGQGTKVEI-KRT  
 HK4... TRESGV PDRFSGSGGTDFTLTISSLQAE DVAVVY CQY YSTP-----XTFGQGTKVEI-KRT

种系共有序列 (含有JK4) :

hVK1 SLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYSTP-----LTFGGGTKVEI-KRT  
 hVK2 YRAGV PDRFSGSGGTDFTLKI SRVEAEDVGVYCMQRIEFP-----LTFGGGTKVEI-KRT  
 hVK3 SRATGIPDRFSGSGGTDFTLTI SRLEPEDFVAVY CQY GSSP-----LTFGGGTKVEI-KRT  
 hVK4 TRESGV PDRFSGSGGTDFTLTISSLQAE DVAVVY CQY YSTP-----LTFGGGTKVEI-KRT  
 hVK5 TLVPGI PPRFSGSGYGTDFLTINNI ESEDAAYFLQHDNFP-----LTFGGGTKVEI-KRT  
 hVK6 QSFSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQAE DVAVVY CQY YSTP-----LTFGGGTKVEI-KRT

图23B

鼠RX-1重链:

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIROFPGNKLEWMMGYISYSGSTSYNPSLKSRI SITRDTSKNOFFLQLNSVTTEDTATYYC  
ASFDYAHAMDYWGQTSVTIVSS

- (1) DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIROFPGNKLEWMMGYISYSGSTSYNPSLKSRI SITRDTSKNOFFLQLNSVTTEDTATYYCASPDI
- (1) QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSKCKASGYTFSG--YYMHWVRQAPGQGLVWMMGWINP--NSGGTVAQKQFGRVTRDTSISIAAYNEFSRLRSDDTAVYCAR---
- (1) QITLKESGPTLVKPTQTLTCTFSGFSLTSGVGVGIRQPPGKALEWLAALIIY---WSPSEKSRFTTKDTSKNQVLTQNMNDPVDTATYYCAHR--
- (1) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGTFSS--YWMHWVRQAPGKGLVWMMGWINP--NSGGTVAQKQFGRVTRDTSISIAAYNEFSRLRSDDTAVYCAR---
- (1) QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSKCKASGYTFSG--YYMHWVRQAPGQGLVWMMGWINP--NSGGTVAQKQFGRVTRDTSISIAAYNEFSRLRSDDTAVYCAR---
- (1) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGTFSS--YWMHWVRQAPGKGLVWMMGWINP--NSGGTVAQKQFGRVTRDTSISIAAYNEFSRLRSDDTAVYCAR---
- (1) QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSKCKASGYTFSG--YYMHWVRQAPGQGLVWMMGWINP--NSGGTVAQKQFGRVTRDTSISIAAYNEFSRLRSDDTAVYCAR---
- (1) QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSKCKASGYTFSG--YYMHWVRQAPGQGLVWMMGWINP--NSGGTVAQKQFGRVTRDTSISIAAYNEFSRLRSDDTAVYCAR---

重链氨基半

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWN-WIROFPGNKLEWMMGYIS---YSGST

pos ... 10 20 30 40 50 abc

Kabat:

HH1 ...XVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSKCKASGYTFSSYXIX--WVRQAPGQGLWMMGXIXPY-XXGXT  
 HH2 ...QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTFSGFSLTSGVGVGIRQPPGKALEWLAALIIY---WVNDK  
 HH3 ...EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGTFSSYXIMX--WVRQAPGKGLWVWXXIXKXKXGXXT

种系共有序列 (含有JK4) :

hVHI QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSKCKASGYTFSGYTMH--WVRQAPGQGLWMMGWINP--NSGGT  
 hVHII QITLKESGPTLVKPTQTLTCTFSGFSLTSGVGVGIRQPPGKALEWLAALIIY---WVNDK  
 hVHIII EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGTFSSYWMS--WVRQAPGKGLWVWVNIK--QDGSEK  
 hVHIV QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSKCKASGYTFSSYSSNHW--SWVRQPPGKGLWVWVGEIY---HSGST  
 hVHV V EVQLVQSGAEVKKPKGESLKIICKGSGYFTSYWIG--WVRQMPGKGLWMMGIIP--GDSDT  
 hVHVI QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTFSGFSLTCAISGDSVSSNSAANNWIRQSPRGLWLGRTYY--RSKWYN  
 hVHVII QVQLVQSGSELKPKPGASVKVSKCKASGYTFSSYAMN--WVRQAPGQGLWMMGWINT--NTGNP

图24A



5H4的kabat编号:

### 5H4 重链蛋白序列:

1-30: EIQLQQSGPE LVKTGTSVKI SCKASGYSFT  
 31-35: GYFMH  
 36-49: WVKQSHGKSLEWIG  
 50-65: YIS C (52A) YNGDTNY NQNFKG  
 66-94: KATF TVDTSSSTAY MQF N (82A) S(82B) L(82C) TSED SAVYYCAR  
 95-102: EGGNYPAY  
 103-437: WGQG TLVTVSAAKT TPPSVYPLAP GSAAQTNSMV  
 TLGCLVKGYFPEPVTVTWNS GSLSSGVHTF PAVLQSDLYT LSSSVTVVPS TWPSETVTCN  
 VAHPASSTKV DKKIVPRDCG CKPCICTVPE VSSVFIFPPK PKDVLITITLT PKVTCVVVDI  
 SKDDPEVQFS WFDVDDVEVHT AQTQPREEQF NSTFRSVSEL PIMHQDWLNG KEFKCRVNSA  
 AFPAPIEKTI SKTKGRPKAP QVYTIPPPKE QMAKDKVSLT CMITDFFPED ITVEWQWNGQ  
 PAENYKNTQP IMDTDGSYFV YSKLNVQKSN WEAGNTFTCS VLHEGLHNNH TEKSLSHSPG K

### 5H4 轻链蛋白序列:

1-23: DIVMTQSHKF MSTSVGDRVT ITC  
 24-34: KASQNVG TAVT  
 35-49: WYQQKPGQSPKLLIY  
 50-56: WTSTRHA  
 57-88: GVPD RFTGSGSGTD FTLTISDVQS EDLADYFC  
 89-97: QQYSSYPLT  
 98-214: FGAGTKLELKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI  
 DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT  
 STSPIVKSFN RNEC

图24C

## MC1的Kabat编号

## MC-1 重链蛋白序列:

1-30: EVKLVESGGG LVQPGGSLKL SCATSGFTFS  
 31-35: DYMY  
 36-49: WVRQTPEKRLEWVA  
 50-65: YIS N (52A) GGGSTYY PDTVKG  
 66-94: RFTI SRDNAKNTLY LQM S (82A) R (82B) L (82C) KSED TAMYYCAR  
 95-102: QGSYGYPFAY  
 103-449: WG QGTLVTVSAA KTTAPSVYPL APVCGDTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW  
 NSGSLSSGVH TFFAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRG  
 PTIKCPPCK CPAPNLLGGP SVFIFPPKIK DVLMLSLSPI VTCVVVDVSE DDPDVQISWF  
 VNNVEVHTAQ TQTHREDYNS TLRVVSALPI QHGDWMSGKE FKCKVNNKDL PAPIERTISK  
 PKGSVRAPQV YVLPPPEEEM TTKQVTLTCM VTDMPEDIY VEWTNNGKTE LNYKNTEPVL  
 DSDGSYFMYS KLRVEKKNWV ERNSYSCSVV HEGLHNHHTT KSFSRTPGK

## MC-1 轻链蛋白序列:

1-23: AIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISC  
 24-34: SASQGIS NYLN  
 35-49: WYQQKP DGTVKLLIY  
 50-56: YTSSLHS  
 57-88: GVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEP EDIATYYC  
 89-97: QQ YSKLPWT  
 98-214: FGGGTKLEIKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI  
 DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT STSPIVKSFN  
 RNEC

图24D

## MC3 的Kabat编号

## MC-3 重链蛋白序列:

1-30: DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT  
 31-35: SDYAW N (35A)  
 36-49: WIRQ FPGNKLEWMG  
 50-65: YISYSGSTSY NPSLKS  
 66-94: RISIT RDTSKNQFFL QL N (82A) S (82B) V (82C) TTEDT ATYYCAR  
 95-102: LETWLFYD  
  
 103-522: WGQG TTLTVSSAKT TPPSVYPLAP GCGDTTGSSV TLGCLVKGYF PESVTVTWNS  
 GSLSSSVHTF PALLQSGLYT MSSSVTVPSS TWPSQTVTCS VAHPASSTTV  
 DKKLEPSGPI STINPCPPCK ECHKCPAPNL EGGPSVFIFP PNIKDVLMIS  
 LTPKVTCVVV DVSEDDPDVQ ISWVFNVEV HTAQQTTHRE DYNSTIRVVS  
 TLPIQHQDWM SGKEFKCKVN NKDLPSPIER TISKIKGLVR APQVYILPPP  
 AEQLSRKDVS LTCLVVGFPN GDISVEWTSN GHTEENYKDT APVLDSGDSY  
 FIYSKLNMKY SKWEKTSDFS CNVRHEGLKN YYLKKTEERS PGLDLDDICA  
 EAKDGELDGL WTTITIFISL FLLSVCYSAS VTLFKVKWIF SSVVELKQKI  
 SPDYRNMIGQ GA

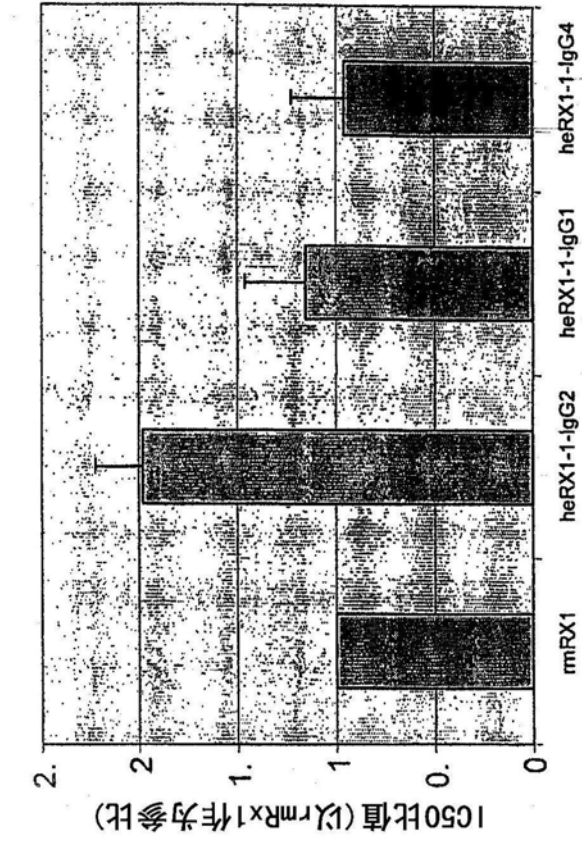
## MC-3 轻链蛋白序列:

1-23: DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSC  
 24-34: RASQSIG TSIH  
 35-49: WYQRT NGSPRLLIK  
 50-56: YASESIS  
 57-88: GIPS RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYC  
 89-97: QQ SNSWPTT  
 98-214: FGG GTKLEIKWAD AAPTVISIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI  
 DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT  
 STSPIVKSFN RNEC

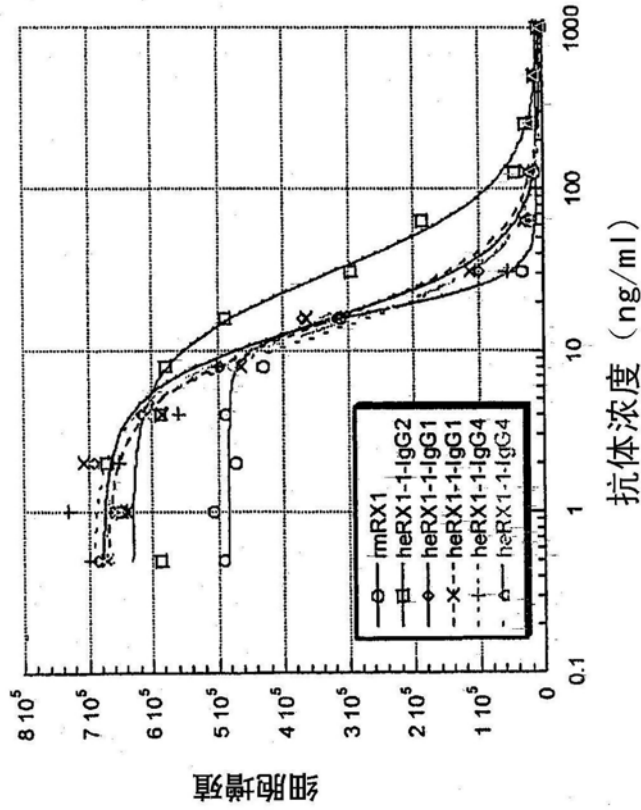
图24E

测量具有不同IgG亚型恒定区的heRx1的中和活性

heRX1-1系列的中和活性



具有4恒定区的heRX1-1的中和活性



抗重组人MCSF

图25

具有不同IgG亚型的heRx1-1对其它形式的MCSF的活性

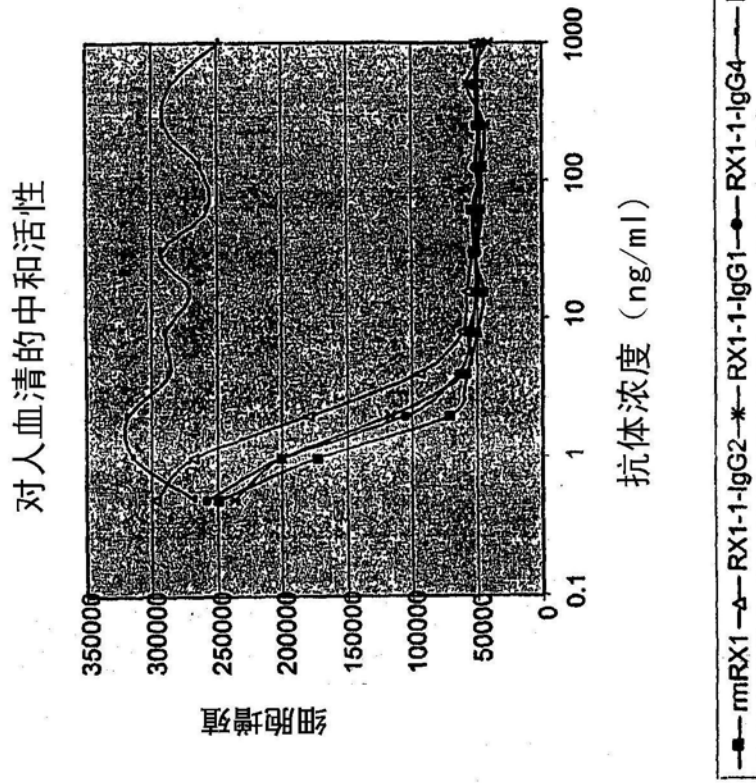


图26

观察到对血清中的Cyno MCSF与重组Cyno MCSF的结果相似

具有不同IgG亚型的heRx1-1对其它形式的MCSF的活性

对MDA231 CM 的中和活性

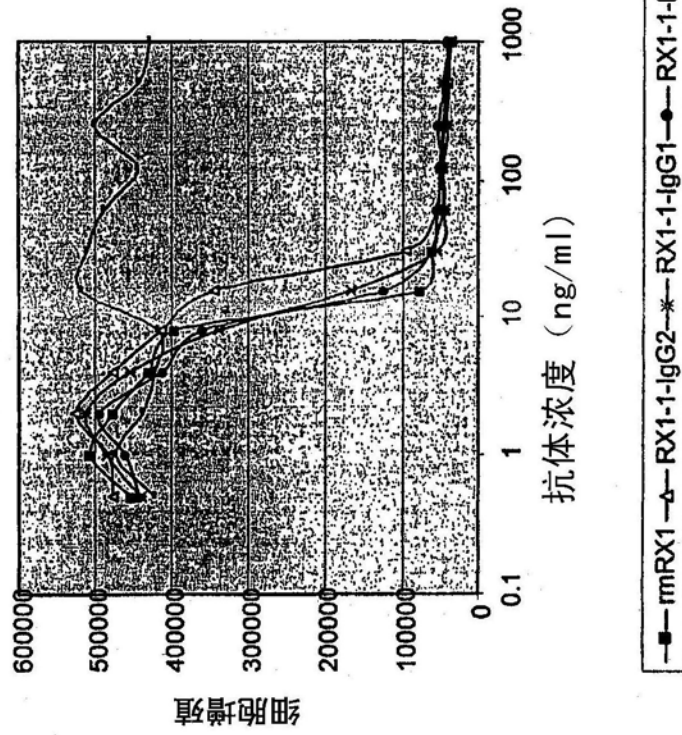


图27

观察到对血清中的Cyno MCSF与重组Cyno MCSF的结果相似

具有不同IgG亚型的heRX1-1的破骨细胞发生测定

在破骨细胞发生测定中条件培养基中的TRAP活性

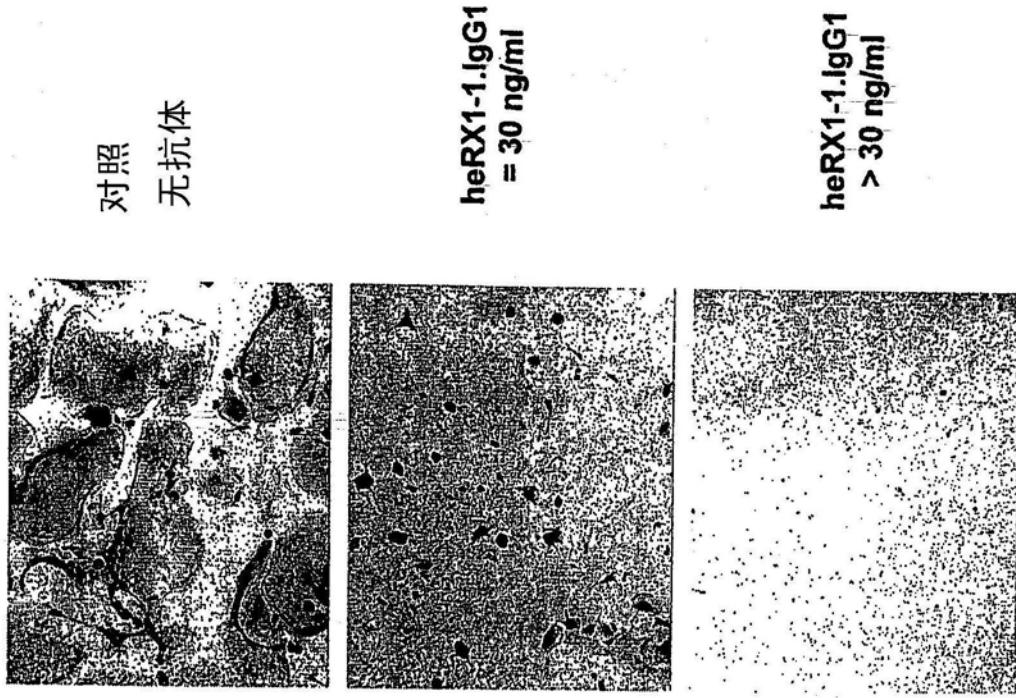
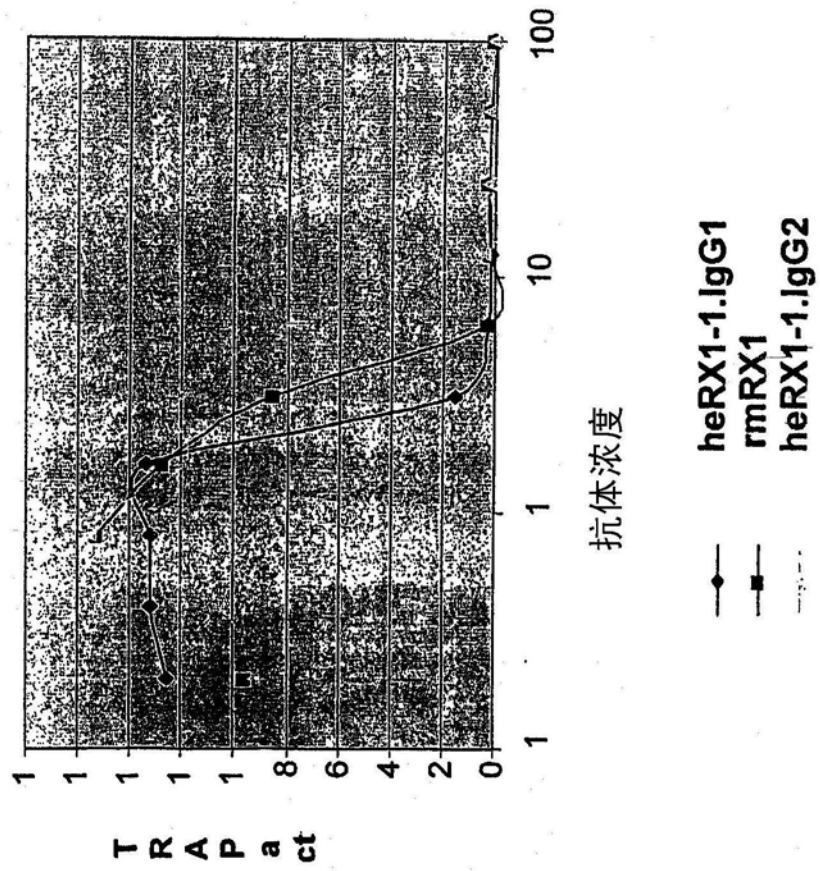


图28

**氨基酸**

MGWSCILFLVATATGVHS

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTDYSITSDYAWNWRQFPGKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSL  
QLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTIWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY  
ICNVNHPKSNKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREE  
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNH  
YTQKSLSLSPGK•**核苷酸**ATGGGATGGAGTTGCATTATACTTTTCTCGTTGCCACCGCCACTGGAGTTCCTGACTGACGTACAACCTCAAGAATC  
TGGCCCAGGTCTCGTCAAACCTTCTCAAACCTCTCTCACTCACCTGCACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA  
CGCTTGGAACCTGGATCCGACAATTTCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCT  
CCTACAATCCTTCTCTGAAATCACGCATCACAATTTCCCGGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCCAACCTCAATT  
CTGTTACCGCCGCGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTGACTACGCTCACGCCATGGATTATTGGGGACAG  
GGTACTACCGTTACCGTAAGCTCAGCCAGCACAAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA  
CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTC  
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG  
TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT  
GGACAAAGAGAGTTGAGCCAAAATCTTGACAAAACCTCACACATGTCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG  
GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT  
GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC  
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGA  
CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC  
AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG  
GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG  
AGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGAC  
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA  
AGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGTAAATGA

图29A

## 氨基酸

MGWSCILFLVATATGVHS

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSDYSITSDYAWNWRQFPKGLWGMGYISYSGSTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSL  
QLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMDYWGQGTITVTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY  
ICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCKDHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVIAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNH  
YTQKSLSLSPGK•

## 核苷酸

ATGGGTTGGTCTTGCACTATTCTCTTTCTCGTCGCTACCGCAACTGGTGTACACTCCCAAGTTCAACTTCAAGAATCA  
GGCCCCGGACTCGTTAAACCCTCTCAAACCTCTCTCTTACTTGCCTGTATCCGATTACTCTATTACTTCAGACTAC  
GCTTGAACTGGATCAGACAATTTCCCGGAAAAGGACTCGAATGGATGGGATATATCTTACTCTGGCTCAACCT  
CTTACAACCCCTCTCTCAAATCTCGAATAACAATCTCACGGATACTTCTAAAAATCAATTCTCACTTCAACTTAAC  
TCCGTACTGCCGCCGACACTGCCGTTACTACTGTGCTTCCCTCGATTACGCCACCGCTATGGATTATTGGGGACA  
AGGAACTACCGTCACTGTCTAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC  
ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACT  
CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG  
GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGG  
TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGTCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGG  
GGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCG  
TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG  
CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGG  
ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTC  
CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCA  
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG  
GAGAACAATAAGACACAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGG  
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA  
GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGTAAATGA

图29B

HeRx-1低风险重链  $\gamma$ -4

氨基酸

MGWSCIIIEFEVATATGVHSDVQLQESGPLVKPSQTLSTCTVTDYSITSDYAWNWIQFPGKKLEWMGYISYSGSTSYN
PSLKRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEV
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGK

核苷酸

cDNA

ATGGGATGGAGTTGCATTATACTTTTCTCGTTGCCACCGCCACTGGAGTTCACCTCTGACGTACAACCTCAAGAATC
TGGCCCAGGTCTCGTCAAACCTTCTCAAACCTCTCTCACTCACCTGCCTGACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA
CGCTTGGAACTGGATCCGACAATTTCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCT
CCTACAATCCTTCTCTGAAATCACGCATCACAATTTCCCGCGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCCAACCTCAATT
CTGTTACCGCCGCCGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTTGACTACGCTCACGCCATGGATTATTGGGGACAG
GGTACTACCGTTACCGTAAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA
CTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTC
AGGCGCCCTGACCAAGCCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCA
GTCTTCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGG
CGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCTCCTCACCGTCTCAGGACTGAGTGGCTGGAAC
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
TACAAGACCACGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGGAGGGGAATGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCTGGGTAATGA

基因组

ATGGGATGGAGTTGCATTATACTTTTCTCGTTGCCACCGCCACTGGAGTTCACCTCTGACGTACAACCTCAAGAATC
TGGCCCAGGTCTCGTCAAACCTTCTCAAACCTCTCTCACTCACCTGCCTGACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA
CGCTTGGAACTGGATCCGACAATTTCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCT
CCTACAATCCTTCTCTGAAATCACGCATCACAATTTCCCGCGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCCAACCTCAATT
CTGTTACCGCCGCCGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTTGACTACGCTCACGCCATGGATTATTGGGGACAG
GGTACTACCGTTACCGTAAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA
CCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTC
AGGCGCCCTGACCAAGCCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGAGTTGTTGAGAGGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCT
GGACGCACCCCGGCTGTGCAGCCCCAGCCAGGGCAGCAAGGCATGCCCATCTGTCTCCTCACCCGGAGGCCTCT
GACCACCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTCCACCAGGCTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGC
CCCTACCCAGGCCCTGCGCATAACAGGGCAGGTGCTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCTT
GCCCCTGACCTAAGCCCAACCCAAAGGCCAAACTCTCACTCCCTCAGCTCAGACACCTTCTCTCCTCCAGATCTG
AGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCATCATGCCAGGTAAGCCAACCCAGG
CCICGECCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTG
ACGCATCCACCTCCATCTCTCTCAGCACTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCC
AAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGG
TCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACA
GCACGTACCGTGTGGTACGCTCCTCACCCTGCAACGACTGGCTGAACGBCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGCAAGGT
CTCCAACAAAGGCCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCAGGGGTGCGAGG
GCCACATGGACAGAGGTGAGCTCGGCCACCCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAGG
GCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAC
CTGCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTA
CAAGACCACGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGGAGGGGAATGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTT
CCCTGTCTCTGGGTAATGA

图30