



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112805303 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 20

(21) 申请号 201980065187.4

(22) 申请日 2019.10.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112805303 A

(43) 申请公布日 2021.05.14

(30) 优先权数据
62/749,557 2018.10.23 US
62/755,720 2018.11.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.01

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/057033 2019.10.18

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/086406 EN 2020.04.30

(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司
地址 美国纽约州

(72) 发明人 M·邓恩 J·苏 J·马斯泰蒂斯
J·科洛马达 L·莫顿

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
专利代理师 张莉 黄革生

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2010310561 A1, 2010.12.09
US 2012114659 A1, 2012.05.10
审查员 李雪莹

权利要求书2页 说明书65页
序列表61页 附图28页

(54) 发明名称

抗NPR1抗体及其用途

(57) 摘要

本发明提供与利尿钠肽受体1 (NPR1) 蛋白结合的单克隆抗体及其使用方法。在本发明的各种实施方案中, 抗体是与NPR1结合的完全人抗体。在一些实施方案中, 本发明的抗体可用于激活NPR1活性, 从而提供治疗或预防人类中与NPR1相关的疾病、病症或病状的手段。

1. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与利尿钠肽受体1,即NPR1蛋白特异性结合,其中所述抗体或抗原结合片段包含:SEQ ID NO: 2所示的重链可变区HCVR中的三个重链互补决定区HCDR1,HCDR2和HCDR3;和SEQ ID NO: 10所示的轻链可变区LCVR中的三个轻链互补决定区LCDR1,LCDR2和LCDR3。

2. 权利要求1的抗体或抗原结合片段,其包含SEQ ID NO: 2的HCVR氨基酸序列。

3. 权利要求1的抗体或抗原结合片段,其包含SEQ ID NO: 10的LCVR氨基酸序列。

4. 权利要求1的抗体或抗原结合片段,其包含:

(a) SEQ ID NO: 4的HCDR1序列;

(b) SEQ ID NO: 6的HCDR2序列;

(c) SEQ ID NO: 8的HCDR3序列;

(d) SEQ ID NO: 12的LCDR1序列;

(e) SEQ ID NO: 14的LCDR2序列;以及

(f) SEQ ID NO: 16的LCDR3序列。

5. 权利要求4的抗体或抗原结合片段,其包含SEQ ID NO: 2的HCVR氨基酸序列和SEQ ID NO: 10的LCVR氨基酸序列。

6. 权利要求4的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段,通过氢/氘交换确定,与NPR1的胞外域,即SEQ ID NO:194的氨基酸29 - 347中所含的一个或多个氨基酸相互作用,并且其中所述抗体或其抗原结合片段:(i) 在存在或不存在心房利尿钠肽ANP的情况下结合表达人NPR1的细胞;和/或(ii) 激活NPR1。

7. 权利要求6的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与选自以下的氨基酸序列相互作用:(a) SEQ ID NO:194的氨基酸29至45; 和(b) SEQ ID No:194的氨基酸336至347。

8. 权利要求6的分离的抗体或其抗原结合片段,其中在ANP存在下,所述抗体或其抗原结合片段与选自以下的氨基酸序列相互作用:(a) SEQ ID NO:194的氨基酸29至45 ; 和(b) SEQ ID No:194的氨基酸331至347。

9. 权利要求6的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是完全人单克隆抗体。

10. 权利要求6的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体具有选自以下的一种或多种特性:(a) 是完全人单克隆抗体;(b) 在表面等离子体共振测定法中测量,在25°C和37°C,在不存在ANP和/或脑利尿钠肽BNP的情况下,与人NPR1单体结合,解离常数 K_D 小于690nM;(c) 在表面等离子体共振测定法中测量,在25°C和37°C,在不存在ANP或BNP的情况下,与人NPR1二聚体结合, K_D 小于42nM;(d) 在表面等离子体共振测定法中测量,在25°C和37°C与复合ANP的人NPR1结合, K_D 小于80 nM;(e) 在表面等离子体共振测定法中测量,在25°C和37°C与复合BNP的人NPR1结合, K_D 小于20 nM;(f) 在表面等离子体共振测定法中测量,在25°C和37°C,在不存在ANP和/或BNP的情况下,与猴NPR1单体结合, K_D 小于365nM;(g) 在表面等离子体共振测定法中测量,在25°C和37°C,在不存在ANP或BNP的情况下,与猴NPR1二聚体结合, K_D 小于30nM;(h) 在表面等离子体共振测定法中测量,在25°C和37°C与复合ANP的猴NPR1结合, K_D 小于10 nM;(i) 在表面等离子体共振测定法中测量,在25°C和37°C与复合BNP的猴NPR1结合, K_D 小于10 nM;(j) 不与小鼠NPR1结合;(k) 以小于5nM的 EC_{50} 结合表达无ANP的人NPR1或与ANP复合的NPR1的细胞;(l) 在基于细胞的钙通量生物测定法中测量,以小于

385nM的EC₅₀激活NPR1; (m) 当给血压正常和高血压小鼠施用降低体循环血压,其中在单个剂量施用后体循环和平均动脉血压的降低持续长达28天; 和(n) 当施用于膳食诱发的肥胖小鼠时改善葡萄糖耐量。

11. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至10中任一项的与利尿钠肽受体1 (NPR1) 蛋白结合的分离的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体或稀释剂。

12. 一种分离的多核苷酸分子,其包含编码权利要求1至10中任一项所述的抗体的HCVR和LCVR的多核苷酸序列。

13. 一种载体,其包含权利要求12的多核苷酸序列。

14. 表达权利要求13的载体的宿主细胞。

15. 产生抗NPR1抗体或其抗原结合片段的方法,包括在允许产生所述抗体或片段的条件下生长权利要求14的宿主细胞,并回收由此产生的抗体或片段。

16. 权利要求15的方法,其进一步包括将所述抗体或其抗原结合片段配制成包含可接受载体的药物组合物。

17. 包含权利要求1至10任一项的抗体或其抗原结合片段的药物组合物在制备用于治疗、预防或改善与NPR1相关的疾病或病症的至少一种症状或适应征的药物中的用途,其中所述与NPR1相关的疾病或病症选自高血压,肥胖症和青光眼。

18. 权利要求17的用途,其中将所述药物组合物预防性地或治疗性地施用于有需要的受试者。

19. 权利要求17的用途,其中所述药物组合物与第二治疗剂组合施用。

20. 权利要求19的用途,其中所述第二治疗剂选自醛固酮拮抗剂, α -肾上腺素能受体阻滞剂,血管紧张素转化酶抑制剂,小动脉血管扩张剂,自主神经节性血管扩张剂, β -肾上腺素能受体阻滞剂,儿茶酚胺耗竭性抗交感神经药,中枢性 α -2肾上腺素能受体激动剂,钙通道阻滞剂,利尿剂,肾素抑制剂,抗凝剂,抗血小板药,胆固醇降低剂,血管扩张剂,洋地黄,胰岛素,GLP1激动剂,二甲双胍,骨髓刺激剂和膳食补充剂。

21. 权利要求17至20中任一项的用途,其中所述药物组合物通过皮下,静脉内,皮内,腹膜内或肌内施用。

抗NPR1抗体及其用途

[0001] 本申请作为PCT国际专利申请于2019年10月18日提交,并要求享有2018年10月23日提交的美国临时申请62/749,557号的优先权;和2018年11月5日提交的美国临时申请62/755,720的优先权,这些申请的公开内容均通过引用整体并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及特异性结合利尿钠肽受体1 (NPR1) 的抗体和抗体的抗原结合片段、以及使用这些抗体的治疗和诊断方法。

背景技术

[0003] 利尿钠肽受体1 (Natriuretic peptide receptor 1, NPR1; 也称为NPR-A) 属于细胞表面的鸟苷酸环化酶受体家族,是催化GTP向环状GMP转化的酶。NPR1在肾脏,肺,肾上腺、血管系统,脑,肝脏,内皮和脂肪组织中高表达,在心脏中较低水平表达。通过与心房利尿钠肽 (ANP) 或脑利尿钠肽 (BNP) 结合而被激活。NPR1的激活和信号传导可以刺激涉及许多组织的许多生理反应。已经对ANP-NPR1系统在血管舒张,尿钠排泄 (natriuresis),多尿 (diuresis),内皮通透性以及非心血管功能 (如脂解和免疫细胞功能) 中的作用进行了深入研究 (Potter 2011, Pharmacol. Ther. 130:71-82)。NPR1的激活导致尿钠排泄 (盐由肾脏排出) 并降低血压。

[0004] NPR1的单克隆抗体由Kitano等人于1995年在Immunol. Lett. 47:215-22中首次描述。激活型或激动剂抗NPR1抗体公开于例如美国专利/公开号9090695和20160168251以及W02010065293中。

[0005] 以高亲和力特异性结合NPR1蛋白并激活它的全人抗体在预防和治疗例如高血压,肥胖症和心力衰竭中可能是重要的。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明提供了特异性结合利尿钠肽受体1 (NPR1) 蛋白的抗体及其抗原结合片段。在某些实施方案中,抗NPR1抗体是完全人抗体,其以高亲和力结合NPR1并激活NPR1或稳定该激活的构象。本发明的抗体尤其可用于激活或增加NPR1蛋白的活性。在某些实施方案中,抗体可用于预防、治疗或改善受试者中与NPR1相关的疾病或病症的至少一种症状或适应征。在某些实施方案中,可以将抗体预防性地或治疗性地施用于患有或有风险患有与NPR1相关的疾病或病症的受试者。在特定的实施方案中,抗体用于降低患有高血压的受试者的体循环血压 (systemic blood pressure)。当向有需要的受试者施用时,此类抗体可用作病症如心力衰竭的疗法。

[0008] 在某些特定的实施方案中,所述抗体在存在或不存在心房利尿钠肽 (ANP) 或脑利尿钠肽 (BNP) 的情况下与NPR1结合,即,所述抗体是“肽非依赖性结合剂”。此类抗体是有利的,因为它们可用于结合和激活NPR1,而与内源性配体的不同浓度无关。当将此类抗体施用于有需要的患者时,可以有利地用于避免治疗中患者之间的差异 (就配体浓度而言)。此外,本文公开的抗体以高亲和力结合NPR1并且具有改善的药代动力学性质 (与标准护理药物相

比)。抗体在小鼠中以25mg/kg的剂量显示了长达11天的 $t_{1/2}$ 。当向有需要的受试者给药时,抗体可以有效降低血压并维持该降低的血压长达28天。单剂量的本发明抗体导致了血压的持续降低。这样的抗体可以用于在患有与NPR1相关的疾病或病症(例如高血压)的受试者中提供优异的功效以及较低的给药频率。

[0009] 本发明的抗体可以是全长的(例如,IgG1或IgG4抗体)或可以仅包含抗原结合部分(例如,Fab,F(ab')₂或scFv片段),并且可以被修饰以影响功能性,例如增加在宿主中的持久性或消除存留的效应子功能(Reddy等,2000,J. Immunol. 164:1925-1933)。在某些实施方案中,抗体可以是双特异性的。

[0010] 在第一方面,本发明提供了与NPR1特异性结合的分离的重组单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0011] 在一些实施方案中,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其与利尿钠肽受体1(NPR1)蛋白特异性结合,其中通过氢/氘交换确定,所述抗体或其抗原结合片段与包含在NPR1胞外结构域(SEQ ID NO:194的氨基酸29-347)中的一个或多个氨基酸相互作用,并且其中所述抗体或其抗原结合片段:(i)在心房利尿钠肽(ANP)存在或不存在的条件下与表达人NPR1的细胞结合;和/或(ii)结合NPR1并激活NPR1。

[0012] 在一些实施方案中,抗体是完全人单克隆抗体。

[0013] 本发明的示例性抗NPR1抗体在本文表1和2中列出。表1列出了示例性抗体的重链可变区(HCVR)、轻链可变区(LCVR)、重链互补决定区(HCDR)(HCDR1,HCDR2和HCDR3)和轻链互补决定区(LCDRs)(LCDR1,LCDR2和LCDR3)的氨基酸序列标识号。表2列出了示例性抗体的HCVR,LCVR,HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3的核酸序列标识号。

[0014] 本发明提供了抗体或其抗原结合片段,其包含HCVR,该HCVR包含选自表1所列的任何HCVR氨基酸序列的氨基酸序列、或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本相似序列。

[0015] 本发明也提供了抗体或其抗原结合片段,其包含LCVR,该LCVR包含选自表1所列的任何LCVR氨基酸序列的氨基酸序列、或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本相似序列。

[0016] 本发明还提供了抗体或其抗原结合片段,其包含HCVR和LCVR氨基酸序列对(HCVR/LCVR),所述HCVR/LCVR氨基酸序列对包括与表1中列出的任何LCVR氨基酸序列配对的表1中列出的任何HCVR氨基酸序列。根据某些实施方案,本发明提供抗体或其抗原结合片段,其包含表1中列出的任何示例性抗NPR1抗体中所含的HCVR/LCVR氨基酸序列对。在某些实施方案中,HCVR/LCVR氨基酸序列对选自SEQ ID NOs:2/10(例如,mAb22033)和SEQ ID NOs:66/74(例如,mAb22810)之一。

[0017] 本发明还提供了包含HCVR和LCVR的抗体或其抗原结合片段,所述HCVR包含在其中具有不超过十二个氨基酸取代的表1所列的氨基酸序列,和/或所述LCVR包含在其中具有不超过十个氨基酸取代的表1所列的氨基酸序列。例如,本发明提供了包含HCVR和LCVR的抗体或其抗原结合片段,所述HCVR包含表1所列的氨基酸序列,所述氨基酸序列具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸取代。在另一个实例中,本发明提供了包含HCVR和LCVR的抗体或其抗原结合片段,所述LCVR包含表1所列的氨基酸序列,所述氨基酸序列具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个氨基酸取代。在一个实施方案中,本发明提供了包含HCVR和LCVR的抗NPR1

抗体或其抗原结合片段,其中所述HCVR包含表1所列的氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少一个氨基酸取代;和/或所述LCVR包含表1所列的氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少一个氨基酸取代。

[0018] 本发明还提供了抗体或其抗原结合片段,其包含重链CDR1 (HCDR1),该重链CDR1包含选自表1所列的任何HCDR1氨基酸序列的氨基酸序列、或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本相似序列。

[0019] 本发明还提供了抗体或其抗原结合片段,其包含重链CDR2 (HCDR2),该重链CDR2包含选自表1所列的任何HCDR2氨基酸序列的氨基酸序列、或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本相似序列。

[0020] 本发明还提供了抗体或其抗原结合片段,其包含重链CDR3 (HCDR3),该重链CDR3包含选自表1所列的任何HCDR3氨基酸序列的氨基酸序列、或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本相似序列。

[0021] 本发明还提供了抗体或其抗原结合片段,其包含轻链CDR1 (LCDR1),该轻链CDR1包含选自表1所列的任何LCDR1氨基酸序列的氨基酸序列、或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本相似序列。

[0022] 本发明还提供了抗体或其抗原结合片段,其包含轻链CDR2 (LCDR2),该轻链CDR2包含选自表1中所列的任何LCDR2氨基酸序列的氨基酸序列、或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本相似序列。

[0023] 本发明还提供了抗体或其抗原结合片段,其包含轻链CDR3 (LCDR3),该轻链CDR3包含选自表1所列的任何LCDR3氨基酸序列的氨基酸序列、或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本相似序列。

[0024] 本发明还提供了抗体或其抗原结合片段,其包含HCDR3和LCDR3氨基酸序列对 (HCDR3/LCDR3),所述氨基酸序列对包含与表1中列出的任何LCDR3氨基酸序列配对的表1中列出的任何HCDR3氨基酸序列。根据某些实施方案,本发明提供抗体或其抗原结合片段,其包含表1中列出的任何示例性抗NPR1抗体中所含的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对。在某些实施方案中,HCDR3/LCDR3氨基酸序列对选自SEQ ID NOs:8/16(例如,mAb22033)和72/80(例如,mAb22810)。

[0025] 本发明还提供了包含HCVR和LCVR的抗体或其抗原结合片段,所述HCVR包含HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中所述HCDR1包含与表1中列出的氨基酸序列相差1个氨基酸的氨基酸序列,所述HCDR2包含与表1中列出的氨基酸序列相差1个氨基酸的氨基酸序列,且所述HCDR3包含与表1中列出的氨基酸序列相差1个氨基酸的氨基酸序列。在某些实施方案中,本发明提供了包含HCVR和LCVR的抗体或其抗原结合片段,所述LCVR包含LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中所述LCDR1包含与表1中列出的氨基酸序列相差1个氨基酸的氨基酸序列,所述LCDR2包含与表1中列出的氨基酸序列相差1个氨基酸的氨基酸序列,且所述LCDR3包含与表1中列出的氨基酸序列相差1个氨基酸的氨基酸序列。例如,本发明提供了包含HCVR和LCVR的抗体或其抗原结合片段,所述HCVR包含HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中所述HCDR1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4相差1个氨基酸的氨基酸序列,所述HCDR2包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6相差1个氨基酸的氨基酸序列,且所述HCDR3包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8相差1个氨基酸的氨基酸序列。在另一个示例性实施方案中,

本发明提供了包含HCVR和LCVR的抗体或其抗原结合片段,所述LCVR包含LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中所述LCDR1包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12相差1个氨基酸的氨基酸序列,所述LCDR2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列或与SEQ ID NO:14相差1个氨基酸的氨基酸序列,且所述LCDR3包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或与SEQ ID NO:16相差1个氨基酸的氨基酸序列。

[0026] 本发明还提供抗体或其抗原结合片段,其包含表1所列任何示例性抗体中所含的一组六个CDR(即,HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)。在某些实施方案中,HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组选自SEQ ID NOs:4-6-8-12-14-16(例如,mAb22033)和68-70-72-76-78-80(例如,mAb22810)。

[0027] 在一个相关的实施方案中,本发明提供了抗体或其抗原结合片段,其包含在由表1所列任何示例性抗体定义的HCVR/LCVR氨基酸对中所包含的一组六个CDR(即,HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)。例如,本发明包括抗体或其抗原结合片段,其包含在如下HCVR/LCVR氨基酸对中所含的HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组,所述HCVR/LCVR氨基酸对选自:SEQ ID NOs:2/10(例如,mAb22033)和66/74(例如,mAb22810)。鉴定HCVR和LCVR氨基酸序列内的CDR的方法和技术是本领域众所周知的,并且可用于鉴定本文公开的具体HCVR和/或LCVR氨基酸序列内的CDR。可用于识别CDR边界的示例性常规方法包括例如Kabat定义,Chothia定义和AbM定义。一般而言,Kabat定义基于序列变异性,Chothia定义基于结构环区域的位置,而AbM定义是Kabat和Chothia方法之间的折衷方案。参见,例如,Kabat,"Sequences of Proteins of Immunological Interest,"National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991);Al-Lazikani et al.,J.Mol.Biol.273:927-948(1997);和Martin et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:9268-9272(1989)。公共数据库也可获得用于鉴定抗体的CDR序列。

[0028] 在某些实施方案中,本发明包括特异性结合NPR1的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:包含在重链可变区(HCVR)中的三个重链互补决定区(CDR)(HCDR1,HCDR2和HCDR3);和包含在轻链可变区(LCVR)中的三个轻链CDR(LCDR1,LCDR2和LCDR3),其中HCVR包含:(i)选自SEQ ID NOs:2,18,34,50,66,82,98,114,130,146,162,和178的氨基酸序列;(ii)与选自SEQ ID NOs:2,18,34,50,66,82,98,114,130,146,162,和178的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列;(iii)与选自SEQ ID NOs:2,18,34,50,66,82,98,114,130,146,162,和178的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列;或(iv)其中具有不超过12个氨基酸取代的、选自SEQ ID NOs:2,18,34,50,66,82,98,114,130,146,162,和178的氨基酸序列;且所述LCVR包含:(a)选自SEQ ID NOs:10,26,42,58,74,90,106,122,138,154,170,和186的氨基酸序列;(b)与选自SEQ ID NOs:10,26,42,58,74,90,106,122,138,154,170,和186的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列;(c)与选自SEQ ID NOs:10,26,42,58,74,90,106,122,138,154,170,和186的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列;或(d)其中具有不超过10个氨基酸取代的、选自SEQ ID NOs:10,26,42,58,74,90,106,122,138,154,170,和186的氨基酸序列。

[0029] 在某些优选的实施方案中,本发明包括以激动剂方式特异性结合NPR1的抗体,即增强或诱导NPR1结合和/或活性。

[0030] 本发明包括具有修饰的糖基化模式的抗NPR1抗体。在一些实施方案中,用于去除

不希望的糖基化位点的修饰可能是有用的,或者抗体缺少存在于寡糖链上的岩藻糖部分可能是有用的,例如,以增加抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 功能 (参见Shield等 (2002) JBC277: 26733)。在其他应用中,可以进行半乳糖基化修饰,以修饰补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0031] 在某些实施方案中,本发明提供了表现出pH依赖性的NPR1结合的抗体及其抗原结合片段。例如,本发明包括在中性pH比在酸性pH以更高的亲和力结合NPR1的抗体及其抗原结合片段(即,在酸性pH下结合减少)。

[0032] 本发明还提供了与包含如下HCVR的CDR和LCVR的CDR的抗体或其抗原结合片段竞争与NPR1特异性结合的抗体及其抗原结合片段,其中所述HCVR和LCVR分别具有选自表1中列出的HCVR和LCVR序列的氨基酸序列。

[0033] 本发明还提供与包含如下HCVR的CDR和LCVR的CDR的参照抗体或其抗原结合片段交叉竞争结合NPR1的抗体及其抗原结合片段,其中所述HCVR和LCVR各自具有选自表1中列出的HCVR和LCVR序列的氨基酸序列。

[0034] 本发明还提供了与包含如下HCVR的3个CDR和LCVR的3个CDR的参照抗体或其抗原结合片段结合相同表位的抗体和其抗原结合片段,其中所述HCVR和LCVR各自具有选自表1中列出的HCVR和LCVR序列的氨基酸序列。

[0035] 本发明还提供了增加或稳定NPR1与其配体(例如,ANP或BNP)结合的分离的抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中,激活NPR1与ANP结合的抗体或其抗原结合片段可以与ANP结合NPR1上的相同表位,或可以与ANP结合NPR1上的不同表位。

[0036] 在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段是双特异性的,其包括对NPR1的第一表位的第一结合特异性和对NPR1的第二表位的第二结合特异性,其中第一和第二表位不同并且不重叠。

[0037] 在某些实施方案中,本发明提供了具有以下一个或多个特征的分离的抗体或其抗原结合片段: (a) 是完全人单克隆抗体; (b) 在表面等离子体共振测定法中测定时,在25°C和37°C在不存在ANP和/或BNP的情况下与单体人NPR1结合的解离常数(K_D)小于690nM; (c) 在表面等离子体共振测定法中测定时,在25°C和37°C在不存在ANP或BNP的情况下与二聚体人NPR1结合的 K_D 值小于42nM; (d) 在表面等离子体共振测定法中测定时,在25°C和37°C与复合ANP的人NPR1结合的 K_D 值小于80nM; (e) 在表面等离子体共振测定法中测定时,在25°C和37°C与复合BNP的人NPR1结合的 K_D 值小于20nM; (f) 在表面等离子体共振测定法中测定时,在25°C和37°C在不存在ANP和/或BNP的情况下与单体猴NPR1结合的 K_D 值小于365nM; (g) 在表面等离子体共振测定法中测定时,在25°C和37°C在不存在ANP或BNP的情况下与二聚体猴NPR1结合的 K_D 值小于30nM; (h) 在表面等离子体共振测定法中测定时,在25°C和37°C与复合ANP的猴NPR1结合的 K_D 值小于10nM; (i) 在表面等离子体共振测定法中测定时,在25°C和37°C与复合BNP的猴NPR1结合的 K_D 值小于10nM; (j) 不与小鼠NPR1结合; (k) 以小于50nM的 EC_{50} 结合表达人NPR1(无ANP)或与ANP复合的NPR1的细胞; (l) 在基于细胞的钙通量生物测定法中测定时,以小于385nM的 EC_{50} 激活NPR1; (m) 当给血压正常和高血压的小鼠给药时降低体循环血压,其中在单剂给药后体循环和平均动脉血压的降低持续长达28天; (n) 给予饮食诱发的肥胖小鼠时改善葡萄糖耐量; (o) 包含HCVR和LCVR,其中所述HCVR包含选自表1中所列的HCVR序列的氨基酸序列,所述LCVR包含选自表1中所列的LCVR序列的氨基酸序列。

[0038] 在第二方面,本发明提供了编码抗NPR1抗体或其部分的核酸分子。例如,本发明提

供了编码表1中列出的任何HCVR氨基酸序列的核酸分子。在某些实施方案中,核酸分子包含选自表2中列出的任何HCVR核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本相似序列。

[0039] 本发明还提供了编码表1中列出的任何LCVR氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,核酸分子包含选自表2中列出的任何LCVR核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本相似序列。

[0040] 本发明还提供了编码表1中列出的任何HCDR1氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,核酸分子包含选自表2中列出的任何HCDR1核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本相似序列。

[0041] 本发明还提供了编码表1中列出的任何HCDR2氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,核酸分子包含选自表2中列出的任何HCDR2核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本相似序列。

[0042] 本发明还提供了编码表1中列出的任何HCDR3氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,核酸分子包含选自表2中列出的任何HCDR3核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本相似序列。

[0043] 本发明还提供了编码表1中列出的任何LCDR1氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,核酸分子包含选自表2中列出的任何LCDR1核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本相似序列。

[0044] 本发明还提供了编码表1中列出的任何LCDR2氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,核酸分子包含选自表2中列出的任何LCDR2核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本相似序列。

[0045] 本发明还提供了编码表1中列出的任何LCDR3氨基酸序列的核酸分子;在某些实施方案中,核酸分子包含选自表2中列出的任何LCDR3核酸序列的多核苷酸序列,或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本相似序列。

[0046] 本发明还提供了编码HCVR的核酸分子,其中所述HCVR包含一组三个CDR(即, HCDR1-HCDR2-HCDR3),其中所述HCDR1-HCDR2-HCDR3氨基酸序列组如表1中列出的任何示例性抗体所定义。

[0047] 本发明还提供了编码LCVR的核酸分子,其中所述LCVR包含一组三个CDR(即, LCDR1-LCDR2-LCDR3),其中所述LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组如表1中列出的任何示例性抗体所定义。

[0048] 本发明还提供了编码HCVR和LCVR两者的核酸分子,其中所述HCVR包含表1中列出的HCVR氨基酸序列之任一的氨基酸序列,并且其中所述LCVR包含表1中列出的LCVR氨基酸序列之任一的氨基酸序列。在某些实施方案中,核酸分子包含:选自表2中列出的任何HCVR核酸序列的多核苷酸序列、或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本相似序列;以及选自表1中列出的任何LCVR核酸序列的多核苷酸序列、或与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的基本相似序列。在根据本发明该方面的某些实施方案中,核酸分子编码HCVR和LCVR,其中HCVR和LCVR两者源自表1中列出的相同抗NPR1抗体。

[0049] 在一个相关方面,本发明提供了能够表达包含抗体的重链和/或轻链可变区的多

肽的重组表达载体。例如,本发明包括重组表达载体,其包含上述任何核酸分子,即编码表2中列出的任何HCVR,LCVR和/或CDR序列的核酸分子。在某些实施方案中,本发明提供了表达载体,其包含:(a)包含编码结合NPR1的抗体的HCVR的核酸序列的核酸分子,其中所述HCVR包含选自表1所列序列的氨基酸序列;和/或(b)包含编码结合NPR1的抗体的LCVR的核酸序列的核酸分子,其中所述LCVR包含选自表1所列序列的氨基酸序列。本发明的范围中还包括已经引入了此类载体的宿主细胞、以及通过在允许抗体或抗体片段产生的条件下培养所述宿主细胞来产生该抗体或其部分和回收由此产生的抗体和抗体片段的方法。在某些实施方案中,宿主细胞包括哺乳动物细胞或原核细胞。在某些实施方案中,宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或大肠杆菌(E.coli)细胞。在某些实施方案中,本发明提供了产生本发明的抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括:将表达载体引入宿主细胞,该表达载体包含可操作地连接至启动子的编码本发明抗体或其抗原结合片段的HCVR和/或LCVR的核酸序列;在有利于核酸序列表达的条件下培养宿主细胞;从培养基和/或宿主细胞中分离抗体或其抗原结合片段。分离的抗体或其抗原结合片段可以使用现有技术中已知的任何方法来纯化。

[0050] 第三方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含治疗有效量的至少一种特异性结合NPR1的重组单克隆抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。在相关方面,本发明的特征在于一种组合物,其是抗NPR1抗体和第二治疗剂的组合。在一个实施方案中,第二治疗剂是利地地与抗NPR1抗体组合的任何药剂。可以利地地与抗NPR1抗体组合的示例性药剂包括但不限于,结合和/或激活NPR1活性的其他药剂(包括其他抗体或其抗原结合片段等)、和/或不直接结合NPR1但是仍然治疗或改善NPR1相关疾病或病症的至少一种症状或适应征的药剂(在本文其他地方公开)。涉及本发明的抗NPR1抗体的其他组合疗法和共制剂在本文其他地方公开。

[0051] 第四方面,本发明提供了使用本发明的抗NPR1抗体或抗体的抗原结合部分在受试者中治疗与NPR1相关的疾病或病症的治疗方法,其中所述治疗方法包括对有需要的受试者施用治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含本发明的抗体或抗体的抗原结合片段。所治疗的病症是通过增强NPR1活性可以改善、减轻、抑制或预防的任何疾病或病症(例如高血压)。在某些实施方案中,本发明提供了预防或治疗与NPR1相关的疾病或病症的方法,该方法包括将治疗有效量的本发明抗NPR1抗体或其抗原结合片段施用于有需要的受试者。在一些实施方案中,可以将抗体或其抗原结合片段预防性地或治疗性地施用于患有或有风险患有与NPR1相关的疾病或病症的受试者。在某些实施方案中,将本发明的抗体或其抗原结合片段与第二治疗剂组合施用于有需要的受试者。第二治疗剂可以选自醛固酮拮抗剂, α -肾上腺素能受体阻滞剂,血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂,小动脉血管扩张剂,自主神经节性血管扩张剂(autonomic ganglionic vasodilator), β -肾上腺素能受体阻滞剂,儿茶酚胺耗竭性抗交感神经药(catecholamine-depleting sympatholytic),中枢性 α -2肾上腺素能受体激动剂,钙通道阻滞剂,利尿剂,肾素抑制剂,抗凝剂,抗血小板药,胆固醇降低剂,血管扩张剂,洋地黄,手术,可植入装置,抗肿瘤治疗,胰岛素,GLP1激动剂,二甲双胍,透析,骨髓刺激剂,血液滤过,生活方式改变,膳食补充剂、和任何其他本领域已知的药物或疗法。在某些实施方案中,第二治疗剂可以是有助于抵消或减少与本发明的抗体或其抗原结合片段有关的任何可能的副作用(一种或多种)的药剂(如果这种副作用发生的话)。抗体或其片段可以皮下,静脉内,皮内,腹膜内,口服或肌肉内施用。可以以约0.1mg/kg受试者体重至

约100mg/kg体重的剂量施用抗体或其片段。在某些实施方案中,本发明的抗体可以以一个或多个包含10mg至600mg的剂量施用。

[0052] 本发明还包括本发明的抗NPR1抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗将从激活NPR1的结合和/或活性中受益的疾病或病症的药物中的用途。

[0053] 通过阅读随后的详细描述,其他实施方案将变得显而易见。

附图说明

[0054] 图1显示选择的抗NPR1激动剂抗体对血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠的收缩压的影响。根据体重将遥测的血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠随机分组。如表30中所述,给动物单次皮下注射25mg/kg的NPR1激动剂抗体或PBS对照。所有值是第3-7天自基线的平均变化±SEM,每组n=3-9。统计学——单因素方差分析与Dunnett检验;*p<.05vs.PBS对照。

[0055] 图2显示抗NPR1抗体mAb22033对血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠的收缩压的影响。将遥测的血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为五组,体重相等,并按表32所列剂量单次皮下注射mAb22033。将IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=4-6。统计学——双因素方差分析与Dunnett检验。

[0056] 图3显示抗NPR1抗体mAb22033对血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠的舒张压的影响。将遥测的血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为五组,体重相等,并按表32所列剂量单次皮下注射mAb22033。将IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=4-6。统计学——双因素方差分析与Dunnett检验。

[0057] 图4显示抗NPR1抗体mAb22033对血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠的心率的影响。将遥测的血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为五组,体重相等,并按表32所列剂量单次皮下注射mAb22033。将IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=4-6。统计学——双因素方差分析与Dunnett检验。

[0058] 图5显示抗NPR1抗体mAb22033对血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠的平均动脉血压的影响。将遥测的血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为五组,体重相等,并按表32所列剂量单次皮下注射mAb22033。将IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=4-6。统计学——双因素方差分析与Dunnett检验。

[0059] 图6A和6B显示抗NPR1抗体mAb22033对血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠的左心室功能的影响。遥测血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为五组,体重相等,按表32所列剂量单次皮下注射mAb22033,这些小鼠中的(图6A)收缩末期容积(%);和(图6B)舒张末期容积(%)。使用IgG4抗体作为同种型对照。在给药后第28天,使用高频超声系统和探头,在短轴上对麻醉的小鼠进行超声心动图检查。所有值均为平均值±SEM,每组n=6-7。统计学——单因素方差分析与Dunnett检验;*p<.05vs.IgG4同种型对照。

[0060] 图7A和7B显示抗NPR1抗体mAb22033对血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠的左心室功能的影响。遥测血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为五组,体重相等,按表32所列剂量单次皮下注射mAb22033,这些小鼠中的(图7A)缩短分数(%);和(图7B)射血分数(%)。将IgG4抗体用作同种型对照。在给药后第28天,使用高频超声系统和探头,在短轴上对麻醉的小鼠进行超声心动图检查。所有值均为平均值±SEM,每组n=6-7。统计学——单因素方差分析与Dunnett检验。

[0061] 图8显示单剂量的2种抗NPR1抗体对高血压NPR1^{hu/hu}小鼠的收缩压的影响。将遥测的高血压NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为收缩压相同的六组,并以表36所列剂量单次皮下施用mAb22033或mAb22810。IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=4-6。统计学——双因素方差分析与Dunnett检验;*p<.05,25mg/kg的mAb22033 vs.对照;#p<.05,5mg/kg的mAb22033 vs.对照;!p<.05,19mg/kg的mAb22810 vs.对照。

[0062] 图9显示单剂量的2种抗NPR1抗体对高血压NPR1^{hu/hu}小鼠的舒张压的影响。将遥测的高血压NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为收缩压相同的六组,并以表36所列剂量单次皮下施用mAb22033或mAb22810。IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=3-6。统计学——双因素方差分析与Dunnett检验;*p<.05,25mg/kg的mAb22033 vs.对照;#p<.05,5mg/kg的mAb22033 vs.对照;!p<.05,19mg/kg的mAb22810 vs.对照;%p<.05,5mg/kg的mAb22810 vs.对照。

[0063] 图10显示单剂量的2种抗NPR1抗体对高血压NPR1^{hu/hu}小鼠心率的影响。将遥测的高血压NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为收缩压相同的六组,并以表36所列剂量单次皮下施用mAb22033或mAb22810。IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=3-6。统计学——双因素方差分析与Dunnett检验;*p<.05,25mg/kg的mAb22033 vs.对照;#p<.05,5mg/kg的mAb22033 vs.对照。

[0064] 图11显示单剂量的2种抗NPR1抗体对高血压NPR1^{hu/hu}小鼠的平均动脉血压的影响。将遥测的高血压NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为收缩压相同的六组,并以表36所列剂量单次皮下注射mAb22033或mAb22810。IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=3-6。统计学——双因素方差分析与Dunnett检验;*p<.05,25mg/kg的mAb22033 vs.对照;#p<.05,5mg/kg的mAb22033 vs.对照;!p<.05,19mg/kg的mAb22810 vs.对照。

[0065] 图12显示单剂量和重复剂量的抗NPR1抗体对高血压NPR1^{hu/hu}小鼠的收缩压的影响。将遥测的高血压NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为收缩压相等的五组,并以表40所列剂量单次皮下给药或每周两次持续3周给药mAb22033。IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=3-6。箭头代表对小鼠给药。统计学——双因素方差分析与Dunnett检验;*p<.05,25mg/kg的mAb22033 vs.对照;#p<.05,5mg/kg的mAb22033 vs.对照;!p<.05,50mg/kg的mAb22033 vs.对照。

[0066] 图13显示单剂量和重复剂量的抗NPR1抗体对高血压NPR1^{hu/hu}小鼠的舒张压的影响。将遥测的高血压NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为五组,其收缩压相等,并以表40所列剂量单次皮下给药或每周两次持续3周给药mAb22033。IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=3-6。箭头代表对小鼠给药。统计学——双因素方差分析与Dunnett检验。

[0067] 图14显示单剂量和重复剂量的抗NPR1抗体对高血压NPR1^{hu/hu}小鼠的心率的影响。

[0068] 将遥测的高血压NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为收缩压相等的五组,并以表40所列剂量单次皮下给药或每周两次持续3周给药mAb22033。IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=3-6。箭头代表对小鼠给药。统计学——双因素方差分析与Dunnett检验。

[0069] 图15显示单剂量和重复剂量的抗NPR1抗体对高血压NPR1^{hu/hu}小鼠的平均动脉血压的影响。将遥测的高血压NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为收缩压相等的五组,并以表40所列剂量单次皮下给药或每周两次持续3周给药mAb22033。IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=3-6。箭头代表对小鼠给药。统计学——双因素方差分析与Dunnett检验;*p

$<.05$, 25mg/kg的mAb22033 vs.对照; # $p<.05$, 5mg/kg的mAb22033 vs.对照; ! $p<.05$, 50mg/kg的mAb22033 vs.对照。

[0070] 图16A和16B显示单剂量和重复剂量的抗NPR1抗体对高血压NPR1^{hu/hu}小鼠的心脏功能的影响。遥测的高血压NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为收缩压相等的五组,按表40所列剂量单次皮下给药或每周两次持续3周给药mAb22033,这些小鼠中的(图16A)收缩末期容积%;和(图16B)舒张末期容积%。使用IgG4抗体作为同种型对照。在给药后第21天,使用高频超声系统和探头,在短轴上对麻醉的小鼠进行超声心动图检查。所有值均为平均值 $\pm$ SEM,每组n=5-6。统计学——单因素方差分析与Dunnett检验。

[0071] 图17A和17B显示单剂量和重复剂量的抗NPR1抗体对高血压NPR1^{hu/hu}小鼠的心脏功能的影响。遥测的高血压NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为收缩压相等的五组,按表40所列剂量单次皮下给药或每周两次持续3周给药mAb22033,这些小鼠中的(图17A)缩短分数(%);和(图17B)射血分数(%)。IgG4抗体用作同种型对照。在给药后第21天,使用高频超声系统和探头,在短轴上对麻醉的小鼠进行超声心动图检查。所有值均为平均值 $\pm$ SEM,每组n=5-6。统计学——单因素方差分析与Dunnett检验。

[0072] 图18A显示在施用mAb22810 NPR1激动剂mAb, hFc.FGF21或同种型对照mAb之后的体重变化。图18B和图18C分别显示了通过EchoMRI测量的六周处理后的总脂肪和总瘦体重(lean mass)。将NPR1人源化的小鼠置于60%高脂饮食10周,使其肥胖。在此期间之后,将小鼠随机分为等体重的三组,并以表44所列的剂量和频率进行皮下注射处理。将人IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值 $\pm$ SEM,每组n=10。*= $P<0.05$,相对于同种型对照;**= $P<0.01$,相对于同种型对照。体重采用双因素ANOVA+Tukey进行统计,脂肪和瘦体重采取单因素ANOVA+Bonferonni进行统计。

[0073] 图19A,19B和19C显示,在使用mAb22810 NPR1激动剂mAb, hFc.FGF21或同种型对照mAb处理一周后,VO₂(图19A)、VCO₂(图19B)或能量消耗(图19C)的变化,分解为每个日/夜周期的平均值。处理一周后,将每组小鼠置于Columbia Instruments代谢笼系统(CLAMS)中一周,以记录代谢参数。在测量之前使小鼠适应笼子一周,以最小化压力。人IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值 $\pm$ SEM,每组n=5-6。**= $P<0.01$,与同种型对照相比,***= $P<0.001$,与同种型对照相比。采用单因素方差分析+Bonferonni进行统计。

[0074] 图20A显示在用mAb22810 NPR1激动剂mAb, hFc.FGF21或同种型对照mAb处理两周后通过口服葡萄糖耐量测试(2g/kg葡萄糖)测量的葡萄糖耐量的变化。图20B显示在A中研究开始时记录的过夜禁食后的葡萄糖水平。经过两周的处理,将各组小鼠在干净的笼子中禁食过夜,并于第二天早晨给与2g/kg的口服葡萄糖负荷量。然后在T0, T15, T30, T60, T90和T120,使用手持式血糖仪通过尾静脉记录葡萄糖。人IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值 $\pm$ SEM,每组n=10。hFc.FGF21组:**=与同种型对照相比, $P<0.01$,***=与同种型对照相比, $P<0.001$,****=与同种型对照相比, $P<0.0001$ 。mAb22810组:+=与同种型对照相比, $P<0.01$ 。oGTT采用双因素ANOVA+Bonferonni进行统计,空腹血糖采用单因素ANOVA+Bonferonni进行统计。

[0075] 图21A显示了在施用mAb22033 NPR1激动剂mAb, hFc.FGF21或同种型对照mAb后体重的变化。图21B和图21C分别显示了通过EchoMRI测量的六周处理后的总脂肪和总瘦体重。将NPR1人源化的小鼠置于60%高脂饮食10周,使其肥胖。在此期间之后,将小鼠随机分为等

体重的三组,并以表45所列的剂量和频率进行皮下注射处理。将人IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=10$ 。*= $P<0.05$,相对于同种型对照;****= $P<0.0001$,相对于同种型对照。体重采用双因素ANOVA+Tukey进行统计,脂肪和瘦体重采取单因素ANOVA+Bonferonni进行统计。

[0076] 图22A,22B和22C显示,在使用mAb22033 NPR1激动剂mAb,hFc.FGF21或同种型对照mAb处理一周后, VO_2 (图22A)、 $VC O_2$ (图22B)或能量消耗(图22C)的变化,分解为每个日/夜周期的平均值。处理一周后,将每组小鼠置于Columbia Instruments代谢笼系统(CLAMS)中一周,以记录代谢参数。在测量之前使小鼠适应笼子一周,以最小化压力。人IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5-6$ 。****= $P<0.0001$,与同种型对照相比。采用单因素ANOVA+Bonferonni进行统计。

[0077] 图23A和23B显示抗NPR1抗体mAb22033对葡萄糖耐量的影响,通过血糖(图23A)和空腹葡萄糖(图23B)水平显示。处理四周后,将每组小鼠在干净的笼子中禁食过夜,并于第二天早晨给予2g/kg的口服葡萄糖负荷量。然后在T0,T15,T30,T60,T90和T120,使用手持式血糖仪通过尾静脉记录葡萄糖。人IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=10$ 。hFc.FGF21组:***=与同种型对照相比, $P<0.001$,****=与同种型对照相比, $P<0.0001$ 。mAb2033组:+=与同种型对照相比, $P<0.05$,++=与同种型对照相比, $P<0.01$ 。oGTT采用双因素ANOVA+Bonferonni进行统计,空腹血糖采用单因素ANOVA+Bonferonni进行统计。

[0078] 发明详述

[0079] 在描述本方法之前,应理解,本发明不限于所描述的具体方法和实验条件,因为这些方法和条件可以变化。还应理解,本文中使用的术语仅出于描述具体实施方案的目的,而无意于限制本发明,因为本发明的范围仅由所附权利要求书限制。

[0080] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。尽管类似于或等同于本文描述的那些方法和材料的任何方法和材料都可以用于本发明的实践或测试中,但是现在描述优选的方法和材料。本文提及的所有出版物均通过引用全文并入本文。

[0081] 定义

[0082] 术语“NPR1”,也称为“NPRA”,是指利尿钠肽受体1(也称为利尿钠肽受体A)。NPR1是同型二聚体跨膜鸟苷酸环化酶,一种催化cGMP合成的酶。NPR1是心房利尿钠肽(ANP)和脑利尿钠肽(BNP)的受体,在配体结合后胞外域发生构象变化(Ogawa等2004,J.Biol.Chem.279:28625-31)。该蛋白具有4个独特区域,包括细胞外配体结合结构域,单个跨膜区,细胞内蛋白激酶样同源结构域和鸟苷酸环化酶催化结构域。全长NPR1蛋白的氨基酸序列以UniProtKB/Swiss-Prot中提供的登录号为P16066.1的氨基酸序列为示例(SEQ ID NO:193)。术语“NPR1”包括重组NPR1蛋白或其片段。该术语还涵盖与例如组氨酸标签、小鼠或人Fc或信号序列(如ROR1)偶联的NPR1蛋白或其片段(例如SEQ ID NO:194-199)。

[0083] 如本文所用,术语“抗体”旨在指由四个多肽链——两个重(H)链和两个轻(L)链——通过二硫键相互连接组成的免疫球蛋白分子(即,“完整抗体分子”)、及其多聚体(例如IgM)或其抗原结合片段。每条重链由重链可变区(“HCVR”或“ V_H ”)和重链恒定区(由结构域CH1,CH2和CH3组成)组成。每个轻链由轻链可变区(“LCVR”或“ V_L ”)和轻链恒定区(CL)组

成。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布着更为保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。在本发明的某些实施方案中,抗体(或其抗原结合片段)的FR可以与人种系序列相同,或者可以是天然或人工修饰的。可以基于两个或更多个CDR的并列分析来定义氨基酸共有序列。

[0084] 一个或多个CDR残基的取代或一个或多个CDR的省略也是可能的。在科学文献中已经描述了抗体,其中可以省去一个或两个CDR用于结合。Padlan等人(1995FASEB J.9:133-139)基于公开的晶体结构分析了抗体及其抗原之间的接触区域,并得出结论:只有约五分之一至三分之一的CDR残基实际上与抗原接触。Padlan还发现许多抗体,其中一个或两个CDR没有与抗原接触的氨基酸(也参见Vajdos等,2002J Mol Biol 320:415-428)。

[0085] 不接触抗原的CDR残基可通过分子建模和/或凭经验,基于以前的研究(例如,CDRH2中的H60-H65残基常是不需要的),从位于Chothia CDR之外的Kabat CDR区域中鉴定。如果CDR或其(一个或多个)残基被省略,则通常用在另一个人抗体序列或此类序列的共有序列中占据相应位置的氨基酸取代。CDR中的取代位置和待取代的氨基酸也可以凭经验选择。经验性取代可以是保守性或非保守性取代。

[0086] 与相应的种系序列相比,本文公开的完全人抗NPR1单克隆抗体可在重链和轻链可变域的框架和/或CDR区中包含一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。通过将本文公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本发明包括衍生自本文公开的任何氨基酸序列的抗体及其抗原结合片段,其中一个或多个框架和/或CDR区域内的一个或多个氨基酸突变为抗体所源自的种系序列的相应残基,或突变为另一人种系序列的相应残基、或突变为相应种系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。从本文公开的重链和轻链可变区序列开始,本领域普通技术人员可以容易地产生包含一个或多个种系单突变或其组合的多个抗体和抗原结合片段。在某些实施方案中,将VH和/或VL结构域内的所有框架和/或CDR残基回复突变为在抗体所源自的原始种系序列中发现的残基。在其他实施方案中,仅某些残基回复突变为原始种系序列,例如,仅对FR1的前8个氨基酸内或FR4的后8个氨基酸内发现的突变残基进行回复突变,或仅对CDR1、CDR2或CDR3内发现的突变残基进行回复突变。在其他实施方案中,一个或多个框架和/或CDR残基被突变为不同种系序列(即,不同于抗体所最初源自的种系序列的种系序列)的相应残基。此外,本发明的抗体可以在框架和/或CDR区域内包含两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些单独的残基可以突变为特定种系序列的相应残基,而某些其他不同于原始种系序列的残基被保留或被突变为不同种系序列的相应残基。一旦获得包含一个或多个种系突变的抗体和抗原结合片段,即可容易地测试其一种或多种所需特性,例如,提高的结合特异性,增加的结合亲和力,改善或增强的拮抗生物学特性,降低的免疫原性等。以这种一般方式获得的抗体和抗原结合片段都包括在本发明内。

[0087] 本发明还包括完全人抗NPR1单克隆抗体,其包含具有一个或多个保守取代的、本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中任一个的变体。例如,本发明包括具有如下HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的抗NPR1抗体,所述HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列相对于本文公开的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列具有例如10个或更少,8个或更少,6个或更少,4个或更少保守氨基酸取代。

[0088] 如本文所用,术语“人抗体”或“完全人抗体”旨在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人mAb可以包括,例如在CDR中,特别是在CDR3中,不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外的随机或位点特异性诱变或通过体内的体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所用,术语“人抗体”或“完全人抗体”并不旨在包括这样的mAb,在所述mAb中衍生自另一哺乳动物物种(例如,小鼠)的种系的CDR序列已经移植到人FR序列上。该术语包括在非人哺乳动物或非人哺乳动物的细胞中重组产生的抗体。该术语无意包括从人类受试者分离或产生的抗体。

[0089] 如本文所用,术语“重组”是指通过本领域已知为重组DNA技术的技术或方法产生,表达,分离或获得的本发明的抗体或其抗原结合片段,所述技术或方法包括例如DNA剪接和转基因表达。该术语可以指在非人哺乳动物(包括转基因非人哺乳动物,例如转基因小鼠)或细胞(例如CHO细胞)表达系统中表达的、或从重组的组合人类抗体文库中分离的抗体。

[0090] 术语“特异性结合”或“特异地结合”等是指抗体或其抗原结合片段与抗原形成在生理条件下相对稳定的复合物。特异性结合可以通过平衡解离常数至少为约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小来表征(例如,较小的 K_D 值表示更紧密的结合)。确定两个分子是否特异性结合的方法是本领域众所周知的,并且包括例如平衡透析,表面等离子体共振等。如本文所述,已经通过表面等离子体共振,例如BIACORE™鉴定了与NPR1特异性结合的抗体。此外,如本文所用,结合NPR1的一个结构域和一个或多个其他抗原的多特异性抗体或结合NPR1的两个不同区域的双特异性抗体被认为是“特异性结合”的抗体。

[0091] 术语“高亲和力”抗体是指,以 K_D 值表示结合亲和力,通过表面等离子体共振,例如BIACORE™或溶液-亲和力ELISA测量,对NPR1具有至少 10^{-8}M ;优选 10^{-9}M ;更优选 10^{-10}M ,甚至更优选 10^{-11}M 的 K_D 值的那些mAb。

[0092] 术语“慢解离速率”,“Koff”或“kd”是指,通过表面等离子体共振(例如BIACORE™)测定,抗体从NPR1解离的速率常数为 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 或更小,优选为 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更小。

[0093] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等,包括可以与抗原特异性结合形成复合物的、任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或基因工程的多肽或糖蛋白。如本文所用,术语抗体的“抗原结合片段”或“抗体片段”是指,保留结合NPR1蛋白之能力的抗体的一个或多个片段。

[0094] 在特定的实施方案中,本发明的抗体或抗体片段可以缀合至部分,例如配体或治疗性部分(“免疫缀合物”)、第二抗NPR1抗体、或可用于治疗NPR1-相关疾病或病症的任何其他治疗性部分。

[0095] 如本文所用,“分离的抗体”旨在指,所述抗体基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体(Ab)(例如,特异性结合NPR1的分离的抗体或其片段,基本上不含与NPR1以外的抗原特异性结合的Abs)。

[0096] 如本文所用,“激活型抗体”或“激动剂抗体”(或“增加或增强NPR1活性的抗体”或“稳定活化构象的抗体”)旨在指,该抗体与NPR1结合将导致激活NPR1的至少一种生物学活性。例如,本发明的抗体在施用于有需要的受试者时可以降低体循环血压。

[0097] 如本文所用,术语“表面等离子体共振”是指一种光学现象,其允许通过例如使用BIACORE™系统(Pharmacia Biosensor AB,Uppsala,Sweden和Piscataway,N.J.)检测生物传感器基质内蛋白质浓度的变化来分析实时生物分子相互作用。

[0098] 如本文所用,术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0099] 术语“表位”是指,与抗体分子的可变区中称为互补位的特异性抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单个抗原可以具有一个以上的表位。因此,不同的抗体可以结合在抗原的不同区域上并且可以具有不同的生物学效应。术语“表位”还指抗原上B和/或T细胞对其应答的位点。它还指与抗体结合的抗原区域。表位可以定义为结构或功能的。功能性表位通常是结构性表位的子集,并具有可以直接有助于相互作用之亲和力的残基。表位也可以是构象的,即由非线性氨基酸组成。在某些实施方案中,表位可以包括这样的决定簇,其是分子的化学活性表面基团,例如氨基酸,糖侧链,磷酸基基团或磺酰基基团,并且在某些实施方案中,可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特性。

[0100] 如本文所用,术语“交叉竞争”是指,抗体或其抗原结合片段与抗原结合并抑制或阻断另一抗体或其抗原结合片段的结合。该术语还包括两种抗体相互之间在两个方向上的竞争,即第一抗体结合并阻断第二抗体的结合,且反之亦然。在某些实施方案中,第一抗体和第二抗体可以结合相同的表位。或者,第一和第二抗体可以结合不同但重叠的表位,由此一个抗体的结合,例如通过空间位阻,抑制或阻断第二抗体的结合。抗体之间的交叉竞争可以通过本领域已知的方法来测量,例如通过实时、无标记的生物膜层干涉测定法。两种抗体之间的交叉竞争可以表示为小于背景信号的第二抗体结合,其中所述背景信号由自身结合(其中第一抗体和第二抗体是同一抗体)引起。两种抗体之间的交叉竞争可以表示为例如第二抗体的结合百分比,其小于基线自身背景结合(其中第一抗体和第二抗体是同一抗体)。

[0101] 当涉及核酸或其片段时,术语“基本相同”或“基本同一性”表示,当与另一核酸(或其互补链)通过适当的核苷酸插入或缺失而最佳地比对时,通过任何已知的序列同一性算法,例如FASTA、BLAST或GAP测量(如下所述),在至少约90%、更优选至少约95%,96%,97%,98%或99%的核苷酸碱基中存在核苷酸序列同一性。在某些情况下,与参照核酸分子基本相同的核酸分子可编码与参照核酸分子编码的多肽具有相同或基本相似的氨基酸序列的多肽。

[0102] 应用于多肽时,术语“基本相似性”或“基本相似”是指,两个肽序列在最佳比对时,例如通过程序GAP或BESTFIT使用默认空位权重,具有至少90%的序列同一性,甚至更优选至少95%,98%或99%的序列同一性。优选地,不相同的残基位置通过保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是指,一个氨基酸残基被侧链(R基团)具有相似化学性质(例如电荷或疏水性)的另一氨基酸残基取代。通常,保守氨基酸取代基本上不会改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列通过保守取代而彼此不同的情况下,可以向上调整相似性的百分比或程度以校正取代的保守性质。进行这种调整的手段是本领域技术人员众所周知的。参见例如Pearson(1994)Methods Mol.Biol.24:307-331,其通过引用并入本文。具有类似化学性质的侧链的氨基酸组的例子包括:1)脂族侧链:甘氨酸,丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸;2)脂族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳族侧链:苯丙氨酸,酪氨酸和色氨酸;5)碱性侧链:赖氨酸,精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,以及7)含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸,苯丙氨酸-酪氨酸,赖氨酸-精氨酸,丙氨酸-缬氨酸,谷氨酸-天冬氨酸,和天冬酰胺-谷氨酰胺。备选地,保守取代是在Gonnet et al.(1992)Science 256:1443-45中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何改变,所述文献通过引用并入本

文。“中等保守”取代是PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何改变。

[0103] 多肽的序列相似性通常使用序列分析软件来测量。蛋白质分析软件使用分配给各种取代、缺失和其他修饰(包括保守氨基酸取代)的相似性量度来匹配相似序列。例如,GCG软件包含诸如GAP和BESTFIT之类的程序,这些程序可与默认参数一起使用,以确定紧密相关的多肽(例如来自不同物种生物体的同源多肽、或野生型蛋白质与其突变蛋白之间)的序列同源性或序列同一性。参见例如GCG版本6.1。多肽序列也可以使用FASTA与默认或推荐参数(GCG版本6.1中的程序)进行比较。FASTA(例如FASTA2和FASTA3)提供查询序列和搜索序列之间最佳重叠区域的比对和百分比序列同一性(Pearson(2000),同上引文)。当将本发明的序列与包含来自不同生物的大量序列的数据库进行比较时,另一优选算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见,例如,Altschul et al. (1990) J.Mol.Biol.215:403-410和(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-3402,这些文献均通过引用并入本文。

[0104] 短语“治疗有效量”是指施用时产生期望效果的量。确切的量将取决于治疗的目的,并且可以由本领域技术人员使用已知技术来确定(参见,例如,Lloyd(1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding)。

[0105] 如本文所用,术语“受试者”是指需要改善、预防和/或治疗与NPR1相关的疾病或病症例如高血压的动物,优选为哺乳动物,更优选为人。该术语包括患有或有风险患有这种疾病或病症的人类受试者。

[0106] 如本文所用,术语“治疗”是指,由于向有需要的受试者施用治疗剂例如本发明抗体而导致的NPR1相关疾病或病症的至少一种症状或适应征之严重性的减轻或改善。该术语包括抑制疾病的进展或症状/适应征的恶化。该术语还包括疾病的阳性预后,即,受试者在施用治疗剂例如本发明的抗体后可以没有疾病或可以具有减少的疾病。可以以治疗剂量向受试者施用治疗剂。

[0107] 术语“预防”或“防止”是指在施用本发明的抗体后抑制NPR1相关疾病或病症的表现或这种疾病或病症的任何症状或适应征。

[0108] 抗体的抗原结合片段

[0109] 除非另有明确说明,否则本文所用的术语“抗体”应理解为涵盖包含两个免疫球蛋白重链和两个免疫球蛋白轻链的抗体分子(即“完整抗体分子”)及其抗原结合其片段。如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等,包括与抗原特异性结合形成复合物的任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或基因工程的多肽或糖蛋白。如本文所用,术语抗体的“抗原结合片段”或“抗体片段”是指保留特异性结合NPR1蛋白的能力的抗体的一个或多个片段。抗体片段可以包括Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、dAb片段、含有CDR的片段或分离的CDR。在某些实施方案中,术语“抗原结合片段”指多特异性抗原结合分子的多肽片段。抗体的抗原结合片段可以例如使用任何合适的标准技术从完整抗体分子衍生,所述标准技术诸如蛋白水解消化或重组遗传工程技术,所述重组遗传工程技术涉及操作和表达编码抗体可变区和(可选地)恒定区的DNA。这样的DNA是已知的和/或容易地从例如商业来源,DNA文库(包括例如噬菌体-抗体文库)获得,或者可以被合成。可以对该DNA进行测序并通过化学方式或通过使用分子生物学技术进行操纵,例如将一个或多个可变区和/或恒定区排列成合适的构型,或引入密码子,产生半胱氨酸残基,修饰,添加或删除氨基酸等。

[0110] 抗原结合片段的非限制性实例包括：(i) Fab片段；(ii) F(ab')₂片段；(iii) Fd片段；(iv) Fv片段；(v) 单链Fv(scFv)分子；(vi) dAb片段；以及(vii) 由模拟抗体的高变区(例如,分离的互补决定区(CDR)如CDR3肽)或受约束的FR3-CDR3-FR4肽的氨基酸残基组成的最小识别单元。其他工程改造的分子,如结构域特异性抗体,单域抗体,结构域缺失的抗体,嵌合抗体,CDR嫁接的抗体,双链抗体(diabody),三链抗体(triabody),四链抗体(tetrabody),迷你抗体,纳米抗体(例如单价纳米抗体,二价纳米抗体等),小模块免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域也涵盖在本文所用的表述“抗原结合片段”中。

[0111] 抗体的抗原结合片段通常将包含至少一个可变结构域。可变结构域可以具有任何大小或氨基酸组成,并且通常将包含至少一个CDR,其与一个或多个框架序列相邻或符合读框。在具有与VL结构域结合的VH结构域的抗原结合片段中,VH和VL结构域可以以任何合适的排列方式相对于彼此定位。例如,可变区可以是二聚体并且包含VH-VH,VH-VL或VL-VL二聚体。或者,抗体的抗原结合片段可包含单体VH或VL结构域。

[0112] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可以包含与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。可以在本发明抗体的抗原结合片段中出现的可变和恒定结构域的非限制性示例性构型包括：(i) V_H-C_H1；(ii) V_H-C_H2；(iii) V_H-C_H3；(iv) V_H-C_H1-C_H2；(v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3；(vi) V_H-C_H2-C_H3；(vii) V_H-C_L；(viii) V_L-C_H1；(ix) V_L-C_H2；(x) V_L-C_H3；(xi) V_L-C_H1-C_H2；(xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3；(xiii) V_L-C_H2-C_H3；和(xiv) V_L-C_L。在可变域和恒定域的任何构型中,包括上面列出的任何示例性构型,可变域和恒定域可以彼此直接连接,或者可以通过完整的或部分的铰链或连接区连接。铰链区可以由至少2个(例如5、10、15、20、40、60或更多)氨基酸组成,其导致在单个多肽分子中相邻的可变域和/或恒定域之间的柔性或半柔性连接。此外,本发明抗体的抗原结合片段可以包含以上列出的任何可变和恒定域构型的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体),其中所述可变和恒定域构型彼此之间非共价结合,和/或与一个或多个单体VH或VL结构域(例如,通过二硫键)结合。

[0113] 与完整抗体分子一样,抗原结合片段可以是单特异性或多特异性的(例如,双特异性的)。多特异的抗体的抗原结合片段通常将包含至少两个不同的可变域,其中每个可变域分别能够特异性结合单独的抗原或相同抗原上的不同表位。使用本领域可用的常规技术,可以将任何多特异性抗体形式,包括本文公开的示例性双特异性抗体形式,适用于本发明抗体的抗原结合片段。

[0114] 人抗体的制备

[0115] 在转基因小鼠中产生人抗体的方法是本领域已知的。任何这样的已知方法均可用于本发明中以制备特异性结合NPR1的人抗体。

[0116] 包含以下任一项的免疫原可以用于产生针对NPR1蛋白的抗体。在某些实施方案中,本发明的抗体得自全长天然NPR1蛋白(参见,例如,UniProtKB/Swiss-Prot登录号P16066.1)或编码该蛋白或其片段的DNA免疫的小鼠。或者,可以使用标准的生化技术产生蛋白质或其片段,并对其进行修饰并用作免疫原。

[0117] 在某些实施方案中,免疫原可以是在大肠杆菌或在任何其他真核或哺乳动物细胞(例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)中表达的重组NPR1蛋白或其片段(例如,SEQ ID NOs:194-199)。

[0118] 使用VELOCIMMUNE®技术(例如,参见US 6,596,541,Regeneron Pharmaceuticals,

VELOCIMMUNE®) 或用于产生单克隆抗体的任何其他已知方法, 首先分离出具有人可变区和小鼠恒定区的针对NPR1的高亲和力嵌合抗体。VELOCIMMUNE®技术涉及具有如下基因组的转基因小鼠的产生, 该基因组包含可操作地连接至内源小鼠恒定区基因座的人重链和轻链可变区, 从而使小鼠响应于抗原性刺激而产生包含人可变区和小鼠恒定区的抗体。分离编码抗体重链和轻链可变区的DNA, 并将其与编码人重链和轻链恒定区的DNA可操作地连接。然后在能够表达全人抗体的细胞中表达该DNA。

[0119] 通常, 用目的抗原攻击 VELOCIMMUNE®小鼠, 并且从表达抗体的小鼠中回收淋巴细胞 (例如B细胞)。可将淋巴细胞与骨髓瘤细胞系融合以制备永生的杂交瘤细胞系, 并且筛选并选择此类杂交瘤细胞系以鉴定产生对目标抗原具有特异性的抗体的杂交瘤细胞系。可以分离编码重链和轻链可变区的DNA, 并将其连接至所需同种型的重链和轻链恒定区。这样的抗体蛋白可以在诸如CHO细胞的细胞中产生。或者, 可以直接从抗原特异性淋巴细胞分离编码抗原特异性嵌合抗体或轻链和重链可变域的DNA。

[0120] 首先, 分离具有人可变区和小鼠恒定区的高亲和力嵌合抗体。如在下面的实验部分中, 针对期望的特征 (包括亲和力, 选择性, 表位等) 表征和选择抗体。用期望的人恒定区, 例如野生型或修饰的IgG1或IgG4替换小鼠恒定区, 以产生本发明的完全人抗体。尽管所选择的恒定区可以根据特定用途而变化, 但是高亲和力抗原结合和靶标特异性特征存在于可变区中。

[0121] 生物等效物

[0122] 本发明的抗NPR1抗体和抗体片段包括具有如下氨基酸序列的蛋白质, 所述氨基酸序列不同于本文描述的抗体的氨基酸序列但保留结合NPR1蛋白的能力。当与亲本序列相比时, 这样的变体抗体和抗体片段包含一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代, 但是表现出基本上等同于所描述的抗体的生物学活性。同样, 本发明的编码抗体的DNA序列包括这样的序列, 当与公开的序列相比时, 该序列包含一个或多个核苷酸的添加、缺失或取代, 但是编码与本发明的抗体或抗体片段基本上生物等效的抗体或抗体片段。

[0123] 如果两个抗原结合蛋白或抗体是例如在相似的实验条件下以相同摩尔剂量 (单剂或多剂) 给药时吸收速率和吸收程度没有表现出显著差异的药物等效物或药物替代物, 则它们可以被认为是生物等效的。某些抗体如果在吸收程度上等效但在吸收速率上不等, 则可以被视为是等效物或药物替代物, 并且它们仍可以被认为是生物等效的, 如果: 它们在吸收速率上的这种差异是有意的并反映在标签中, 并且该差异对于在例如长期使用中达到有效体内药物浓度不是必需的, 并被认为对所研究的具体药物产品而言是在医学上无关紧要的。

[0124] 在一个实施方案中, 如果两个抗原结合蛋白在安全性、纯度或功效上没有临床上有意义的差异, 则它们是生物等效的。

[0125] 在一个实施方案中, 两个抗原结合蛋白是生物等效的, 如果: 患者可以在该参照产品和该生物学产品之间转换一次或多次, 而且与不进行此类转换的持续治疗相比, 没有预期增加的不良反应风险 (包括免疫原性的临床显著变化) 或有效性降低。

[0126] 在一个实施方案中, 如果对于应用的病况 (一种或多种) 而言两个抗原结合蛋白通过 (一种或多种) 共同作用机制发挥作用, 在该作用机制已知的情况下, 则认为它们是生物等效的。

[0127] 生物等效性可以通过体内和/或体外方法证明。生物等效性测量包括,例如,(a)在人或其他哺乳动物中进行的体内试验,其中测量血液、血浆、血清或其他生物流体中抗体或其代谢物的浓度随时间的变化;(b)已经与人体内的生物利用度数据相关联并可以对所述的数据形成合理预测的体外试验;(c)在人或其他哺乳动物中进行的体内试验,其中测量抗体(或其靶标)的适当急性药理学效果随时间的变化;(d)在建立抗体的安全性、功效或生物利用度或生物等效性的良好对照的临床试验中。

[0128] 本发明抗体的生物等效变体可以通过例如对残基或序列进行各种取代或缺失生物学活性不需要的末端或内部残基或序列来构建。例如,对于生物学活性不是必需的半胱氨酸残基可以被缺失或被其他氨基酸替代,以防止复性时形成不必要或不正确的分子内二硫键。在其他情况下,生物等效抗体可包括包含氨基酸变化的抗体变体,所述变化改变抗体的糖基化特征,例如消除或去除糖基化的突变。

[0129] 包含Fc变体的抗NPR1抗体

[0130] 根据本发明的某些实施方案,提供了包含Fc结构域的抗NPR1抗体,所述Fc结构域包含一个或多个突变,所述突变(例如与中性pH相比,在酸性pH下)增强或减少抗体与FcRn受体的结合。例如,本发明包括在Fc结构域的CH2或CH3区域中包含突变的抗NPR1抗体,其中所述突变在酸性环境中(例如,在pH约5.5至约6.0的内吞泡(endosome)中)增加Fc结构域对FcRn的亲和力。当施用于动物时,此类突变可导致抗体的血清半衰期增加。此类Fc修饰的非限制性实例包括,例如,在如下位置的修饰:位置250(例如,E或Q);位置250和428(例如L或F);位置252(例如L/Y/F/W或T)、254(例如S或T)和256(例如S/R/Q/E/D或T);或位置428和/或433(例如,H/L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如,A,W,H,F或Y[N434A,N434W,N434H,N434F或N434Y]);或位置250和/或428;或位置307或308(例如308F,V308F)和434。在一个实施方案中,修饰包括428L(例如M428L)和434S(例如N434S)修饰;428L、259I(例如V259I)和308F(例如V308F)修饰;433K(例如H433K)和434(例如434Y)修饰;252、254和256(例如252Y,254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如T250Q和M428L);307和/或308修饰(例如308F或308P)。在又一个实施方案中,修饰包括265A(例如,D265A)和/或297A(例如,N297A)修饰。

[0131] 例如,本发明包括抗-NPR1抗体,其包含Fc结构域,该Fc结构域包含选自以下的一或多对或组突变:250Q和248L(例如,T250Q和M248L);252Y,254T和256E(例如M252Y,S254T和T256E);428L和434S(例如M428L和N434S);257I和311I(例如P257I和Q311I);257I和434H(例如P257I和N434H);376V和434H(例如D376V和N434H);307A,380A和434A(例如T307A,E380A和N434A);和433K和434F(例如H433K和N434F)。前述Fc结构域突变和本文公开的抗体可变结构域中的其他突变的所有可能组合均涵盖在本发明的范围内。

[0132] 本发明还包括包含嵌合重链恒定(CH)区的抗NPR1抗体,其中所述嵌合CH区包含源自一种以上免疫球蛋白同种型的CH区的区段。例如,本发明的抗体可包含嵌合CH区,该嵌合CH区包含源自人IgG1、人IgG2或人IgG4分子的部分或全部CH2结构域,并与源自人IgG1、人IgG2或人IgG4分子的部分或全部CH3结构域组合。根据某些实施方案,本发明的抗体包含具有嵌合铰链区的嵌合CH区。例如,嵌合铰链可包含源自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“上铰链”氨基酸序列(根据EU编号位于216至227位的氨基酸残基),并与源自人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“下铰链”序列(根据EU编号从228至236位的氨基酸残基)组合。根据某些实施方案,嵌合铰链区包含源自人IgG1或人IgG4上铰链的氨基酸残基和源自人IgG2下

铰链的氨基酸残基。在某些实施方案中,包含本文所述的嵌合CH区的抗体可以表现出修饰的Fc效应子功能,而不会不利地影响该抗体的治疗或药代动力学特性。(参见,例如,美国专利申请公开2014/0243504,其公开内容通过引用整体并入本文)。

[0133] 抗体的生物学特性

[0134] 通常,本发明的抗体通过与NPR1蛋白结合并增加其活性而起作用。例如,本发明包括抗体和抗体的抗原结合片段,所述抗体和抗体的抗原结合片段在不存在ANP或BNP的情况下(例如,在25℃或37℃),通过表面等离子体共振测量,例如使用本文实施例3中定义的测定形式,以小于690nM的 K_D 结合单体人NPR1蛋白。在某些实施方案中,通过表面等离子体共振测量,例如使用本文实施例3中定义的测定形式,或使用基本相似的测定方法,抗体或其抗原结合片段以小于约650nM,小于约500nM,小于约400nM,小于约300nM,小于约200nM,小于约100nM,小于约50nM或小于约25nM的 K_D 结合NPR1。

[0135] 本发明还包括抗体和抗体的抗原结合片段,其中,通过表面等离子体共振测定,例如,使用如本文实施例3中定义的测定形式,在不存在ANP或BNP的情况下(例如,在25℃或37℃),所述抗体和抗体的抗原结合片段以小于42nM的 K_D 结合二聚体人NPR1蛋白。在某些实施方案中,通过表面等离子体共振测量,例如使用本文实施例3中定义的测定形式,或使用基本相似的测定方法,抗体或其抗原结合片段以小于约40nM,小于约30nM,小于约20nM,小于约10nM,小于约5nM,小于约1nM或小于约0.5nM的 K_D 结合NPR1。

[0136] 本发明还包括抗体和抗体的抗原结合片段,其中通过表面等离子体共振测量,例如使用本文实施例3中定义的测定形式,所述抗体和抗体的抗原结合片段以小于80nM的 K_D 结合与ANP复合的人NPR1蛋白(例如,在25℃或37℃)。在某些实施方案中,通过表面等离子体共振测量,例如使用本文实施例3中定义的测定形式,或使用基本相似的测定方法,抗体或其抗原结合片段以小于约70nM,小于约50nM,小于约25nM,小于约10nM,小于约5nM,小于约1nM或小于约0.5nM的 K_D 结合NPR1。

[0137] 本发明还包括抗体和抗体的抗原结合片段,其中通过表面等离子体共振测量,例如使用本文实施例3中定义的测定形式,所述抗体和抗体的抗原结合片段以小于20nM的 K_D 结合与BNP复合的人NPR1蛋白(例如,在25℃或37℃)。在某些实施方案中,通过表面等离子体共振测量,例如使用本文实施例3中定义的测定形式,或使用基本相似的测定方法,抗体或其抗原结合片段以小于约15nM,小于约10nM,小于约5nM,小于约1nM或小于约0.5nM的 K_D 结合NPR1。

[0138] 本发明还包括抗体和抗体的抗原结合片段,其中,通过表面等离子体共振测定,例如,使用如本文实施例3中定义的测定形式,在不存在ANP或BNP的情况下(例如,在25℃或37℃),所述抗体和抗体的抗原结合片段以小于365nM的 K_D 结合单体猴NPR1蛋白。在某些实施方案中,通过表面等离子体共振测量,例如使用本文实施例3中定义的测定形式,或使用基本相似的测定方法,抗体或其抗原结合片段以小于约360nM,小于约300nM,小于约150nM,小于约100nM,小于约50nM,小于约25nM,小于约10nM,小于约5nM,小于约1nM或小于约0.5nM的 K_D 结合NPR1。

[0139] 本发明还包括抗体和抗体的抗原结合片段,其中,通过表面等离子体共振测定,例如,使用如本文实施例3中定义的测定形式,在不存在ANP或BNP的情况下(例如,在25℃或37℃),所述抗体和抗体的抗原结合片段以小于30nM的 K_D 结合二聚体猴NPR1蛋白。在某些实施

方案中,通过表面等离子体共振测量,例如使用本文实施例3中定义的测定形式,或使用基本相似的测定方法,抗体或其抗原结合片段以小于约20nM,小于约10nM,小于约5nM,小于约1nM或小于约0.5nM的 K_D 结合NPR1。

[0140] 本发明还包括抗体和抗体的抗原结合片段,其中通过表面等离子体共振测量,例如使用本文实施例3中定义的测定形式,所述抗体和抗体的抗原结合片段以小于10nM的 K_D 结合与ANP复合的猴NPR1蛋白(例如,在25℃或37℃)。在某些实施方案中,通过表面等离子体共振测量,例如使用本文实施例3中定义的测定形式,或使用基本相似的测定方法,抗体或其抗原结合片段以小于约9nM,小于约8nM,小于约5nM,小于约1nM或小于约0.5nM的 K_D 结合NPR1。

[0141] 本发明还包括抗体和抗体的抗原结合片段,其中通过表面等离子体共振测量,例如使用本文实施例3中定义的测定形式,所述抗体和抗体的抗原结合片段以小于10nM的 K_D 结合与BNP复合的猴NPR1蛋白(例如,在25℃或37℃)。在某些实施方案中,通过表面等离子体共振测量,例如使用本文实施例3中定义的测定形式,或使用基本相似的测定方法,抗体或其抗原结合片段以小于约9nM,小于约8nM,小于约5nM,小于约1nM或小于约0.5nM的 K_D 结合NPR1。

[0142] 本发明还包括抗体及其抗原结合片段,其中,例如使用本文实施例5中定义的测定形式测量,或使用基本相似的测定方法进行测量,所述抗体及其抗原结合片段以小于5nM,小于4nM,小于3nM,小于2nM,小于1nM或小于0.5nM的 EC_{50} 在有或无ANP的情况下结合表达人NPR1的细胞。

[0143] 本发明还包括抗体及其抗原结合片段,其中,通过基于细胞的钙通量生物测定法,例如使用本文实施例6中定义的测定形式测量,所述抗体及其抗原结合片段以小于385nM的 EC_{50} 激活NPR1。在某些实施方案中,通过基于细胞的钙通量生物测定法,例如使用本文实施例6中定义的测定形式,或使用基本相似的测定方法,抗体或其抗原结合片段以小于约300nM,小于约200nM,小于约100nM,小于约50nM,小于约10nM或小于约1nM的 EC_{50} 激活NPR1。

[0144] 本发明还包括与NPR1结合的抗体和抗体的抗原结合片段,当以单个剂量(例如,如本文实施例8所示)施用于有需要的受试者时,其持续28天以上降低受试者的体循环血压。

[0145] 本发明还包括与NPR1结合的抗体和抗体的抗原结合片段,当(例如,如本文实施例11所示)施用于有需要的受试者时,其降低空腹血糖水平。

[0146] 在一个实施方案中,本发明提供了一种分离的重组抗体或其抗原结合片段,其在存在或不存在ANP或BNP的情况下特异性结合NPR1蛋白并增加NPR1的活性,其中所述抗体或其片段表现出一个或多个以下特征:(a)是完全人单克隆抗体;(b)在表面等离子体共振测定法中测量,在25℃和37℃时在不存在ANP和/或BNP的情况下与单体人NPR1结合的解离常数(K_D)小于690nM;(c)在表面等离子体共振测定法中测量,在25℃和37℃时在不存在ANP或BNP的情况下与二聚体人NPR1结合的 K_D 值小于42nM;(d)在表面等离子体共振测定法中测量,在25℃和37℃时与复合ANP的人NPR1结合的 K_D 值小于80nM;(e)在表面等离子体共振测定法中测量,在25℃和37℃时与复合BNP的人NPR1结合的 K_D 值小于20nM;(f)在表面等离子体共振测定法中测量,在25℃和37℃时在不存在ANP和/或BNP的情况下与单体猴NPR1结合的 K_D 小于365nM;(g)在表面等离子体共振测定法中测量,在25℃和37℃时在不存在ANP或BNP的情况下与二聚体猴NPR1结合的 K_D 小于30nM;(h)在表面等离子体共振测定法中测量,

在25℃和37℃时与复合ANP的猴NPR1结合的 K_D 值小于10nM; (i) 在表面等离子体共振测定法中测量, 在25℃和37℃时与复合BNP的猴NPR1结合的 K_D 值小于10nM; (j) 不与小鼠NPR1结合; (k) 以小于5nM的 EC_{50} 结合表达人NPR1(不存在ANP) 或与ANP复合的NPR1的细胞; (l) 在基于细胞的钙通量生物测定法中测量, 以小于385nM的 EC_{50} 激活NPR1; (m) 当给血压正常和高血压的小鼠施用, 降低体循环血压, 其中在施用单个剂量后体循环和平均动脉血压的降低持续长达28天; (n) 当施用于膳食诱发的肥胖小鼠时, 改善葡萄糖耐量; (o) 包含具有选自表1中所列的HCVR序列的氨基酸序列的HCVR和具有选自表1中所列的LCVR序列的氨基酸序列的LCVR。

[0147] 本发明的抗体可以具有一种或多种上述生物学特征, 或其任何组合。通过阅读本公开内容, 包括本文的实施例, 本发明抗体的其他生物学特征对于本领域普通技术人员将是显而易见的。

[0148] 表位作图及相关技术

[0149] 本发明包括与NPR1蛋白分子的一个或多个区域内的一个或多个氨基酸相互作用的抗NPR1抗体。抗体结合的表位可以由位于NPR1蛋白分子的任何上述结构域中的、3个或更多个(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个) 氨基酸的单个连续序列组成(例如, 结构域中的线性表位)。备选地, 表位可以由位于蛋白质分子的前述结构域之任一或两者中的多个不连续氨基酸(或氨基酸序列) 组成(例如构象表位)。

[0150] 本领域普通技术人员已知的各种技术可以用于确定抗体是否与多肽或蛋白质中的“一个或多个氨基酸相互作用”。示例性技术包括例如常规的交叉阻断测定, 例如在Antibodies, Harlow和Lane(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) 中描述的。其他方法包括丙氨酸扫描突变分析、肽印迹分析(Reineke (2004) Methods Mol. Biol. 248:443-63)、肽切割分析晶体学研究和NMR分析。另外, 可以采用诸如表位切除、表位提取和抗原化学修饰等方法(Tomer (2000) Prot. Sci. 9:487-496)。可用于鉴定抗体与之相互作用的多肽内氨基酸的另一种方法是通过质谱法检测氢/氘交换。一般而言, 氢/氘交换方法涉及氘标记目标蛋白质, 然后使抗体与氘标记的蛋白质结合。接下来, 将蛋白质/抗体复合物转移到水中, 受抗体复合物保护的氨基酸中的可交换质子比不属于界面的氨基酸中的可交换质子以较慢的速率经历氘-氢反向交换。结果, 与不在界面中的氨基酸相比, 形成蛋白质/抗体界面的一部分的氨基酸可以保留氘, 因此表现出相对较高的质量。抗体解离后, 对靶蛋白进行蛋白酶切割和质谱分析, 从而揭示出氘标记的残基, 这些残基对应于与抗体相互作用的具体氨基酸。参见, 例如, Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267: 252-259; Engen和Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A。

[0151] 术语“表位”是指抗原上B和/或T细胞对其产生应答的位点。B细胞表位可以由连续氨基酸或通过蛋白质的三级折叠而并列的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留, 而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常以独特的空间构象包含至少3个, 更通常至少5或8-10个氨基酸。

[0152] 修饰辅助谱图分析(Modification-Assisted Profiling, MAP), 也称为基于抗原结构的抗体谱图分析(ASAP) 是一种方法, 根据每个抗体与化学或酶学修饰的抗原表面结合谱图的相似性, 将针对同一抗原的大量单克隆抗体(mAb) 进行分类(参见US 2004/0101920, 通过引用整体并入本文)。每个类别可以反映独特的表位, 该独特的表位与另一类别所代表

的表位明显不同或部分重叠。该技术可以快速过滤遗传上相同的抗体,从而使表征可以集中在遗传上不同的抗体上。当用于杂交瘤筛选时,MAP可有助于鉴定产生具有所需特征的mAb的稀有杂交瘤克隆。MAP可用于将本发明的抗体分拣为结合不同表位的抗体组。

[0153] 在某些实施方案中,本发明包括与NPR1的胞外域中存在的一个或多个表位相互作用的抗NPR1抗体及其抗原结合片段。表位可以由位于NPR1胞外域内的3个或更多个(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个)氨基酸的一个或多个连续序列组成。备选地,表位可以由位于NPR1内的多个不连续氨基酸(或氨基酸序列)组成。

[0154] 本发明包括与表1中列出的任何具体示例性抗体结合相同表位或部分表位的抗NPR1抗体。同样,本发明还包括与表1中列出的任何具体示例性抗体竞争结合NPR1蛋白或其片段的抗NPR1抗体。例如,本发明包括与表1中列出的一种或多种抗体交叉竞争与NPR1蛋白结合的抗NPR1抗体。

[0155] 通过使用本领域已知的常规方法,可以容易地确定抗体是否与参照抗-NPR1抗体结合相同的表位,或与之竞争结合。例如,为了确定测试抗体是否与本发明的参照抗NPR1抗体结合相同的表位,允许参照抗体在饱和条件下结合NPR1蛋白或肽。接下来,评估测试抗体结合NPR1蛋白分子的能力。如果在NPR1与参照抗NPR1抗体饱和结合后测试抗体能够与NPR1结合,则可以得出结论:测试抗体与参照抗NPR1抗体结合不同的表位。另一方面,如果在NPR1与参照抗-NPR1抗体饱和结合后测试抗体不能与NPR1蛋白结合,则测试抗体可能与本发明参照抗-NPR1抗体结合相同的表位。

[0156] 为了确定抗体是否与参照抗NPR1抗体竞争结合,以两个方向实施上述结合方法:在第一方向上,使参照抗体在饱和条件下结合至NPR1蛋白。然后评估测试抗体与NPR1分子的结合。在第二方向上,允许测试抗体在饱和条件下结合至NPR1分子,然后评估参照抗体与NPR1分子的结合。如果在两个方向上只有第一(饱和)抗体能够结合NPR1分子,那么可以得出结论:测试抗体和参照抗体竞争结合NPR1。如本领域普通技术人员将理解的,与参照抗体竞争结合的抗体可以不必与参照抗体结合相同的表位,而是可以通过结合重叠或相邻的表位而在空间上阻断参照抗体的结合。

[0157] 如果两种抗体之每一竞争性地抑制(阻断)另一抗体与抗原的结合,则两种抗体结合至相同或重叠的表位。即,在竞争性结合测定试验中测量时,1、5、10、20或100倍过量的一种抗体抑制另一种抗体的结合达至少50%,优选75%、90%或甚至99%(参见,例如,Junghans等人,Cancer Res.1990 50:1495-1502)。或者,如果抗原中减少或消除一种抗体的结合的基本上所有氨基酸突变也减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有相同的表位。如果减少或消除一种抗体结合的一些氨基酸突变也减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有重叠的表位。

[0158] 然后可以进行额外的常规实验(例如,肽突变和结合分析),以确认观察到的测试抗体无结合实际上是由于与参照抗体结合到相同的表位引起,还是空间位阻(或另一种现象)是造成缺乏观察到的结合的原因。可以使用ELISA、RIA、表面等离子共振、流式细胞术或本领域可用的任何其他定量或定性抗体结合测定法,进行此类实验。

[0159] 在某些实施方案中,本发明提供了与利尿钠肽受体1(NPR1)蛋白特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中通过氢/氘交换确定,该抗体或其抗原结合片段与NPR1胞外结构域(SEQ ID NO:194的氨基酸29-347)中包含的一个或多个氨基酸相互作用,并且其

中该抗体或其抗原结合片段: (i) 在心房利钠肽 (ANP) 存在或不存在下与表达人NPR1的细胞结合;和/或(ii) 结合NPR1并激活NPR1。在一个实施方案中, 抗体或其抗原结合片段与选自以下的氨基酸序列相互作用: (a) SEQ ID NO:194的氨基酸29至45; (b) SEQ ID NO:194的氨基酸331至347; (c) SEQ ID NO:194的氨基酸336至347; (d) SEQ ID NO:194的氨基酸331至335;和(e) SEQ ID NO:194的氨基酸70至81。在一个实施方案中, 抗体或其抗原结合片段与选自以下的氨基酸序列相互作用: (a) SEQ ID NO:194的氨基酸29至45;和(b) SEQ ID NO:194的氨基酸336至347。在一个实施方案中, 在ANP存在下, 抗体或其抗原结合片段与选自以下的氨基酸序列相互作用: (a) SEQ ID NO:194的氨基酸29至45;和(b) SEQ ID NO:194的氨基酸331至347。在一个实施方案中, 在ANP存在下, 抗体或其抗原结合片段与选自以下的氨基酸序列相互作用: (a) SEQ ID NO:194的氨基酸29至45; (b) SEQ ID NO:194的氨基酸70至81;和(c) SEQ ID NO:194的氨基酸331至335。在一个实施方案中, 本发明提供了在ANP存在下与NPR1蛋白特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中通过氢/氘交换确定, 所述抗体或其抗原结合片段与选自以下的氨基酸序列相互作用: (a) SEQ ID NO:194的氨基酸29至45;和(b) SEQ ID NO:194的氨基酸331至347, 但不与SEQ ID NO:194的氨基酸70至81相互作用, 其中所述抗体或其抗原结合片段: (i) 在存在或不存在ANP的情况下与表达人NPR1的细胞结合;和/或(ii) 结合NPR1并激活NPR1。

[0160] 免疫缀合物

[0161] 本发明包括缀合至治疗部分的人抗NPR1单克隆抗体(“免疫缀合物”), 以治疗与NPR1相关的疾病或病症(例如高血压)。如本文所用, 术语“免疫缀合物”是指与放射性试剂、细胞因子、干扰素、靶标或报道分子、酶、肽或蛋白质或治疗剂化学或生物学连接的抗体。抗体可以在分子的任何位置连接至放射性试剂、细胞因子、干扰素、靶标或报道分子、酶、肽或治疗剂, 只要它能够结合其靶标即可。免疫缀合物的实例包括抗体药物缀合物和抗体-毒素融合蛋白。在一个实施方案中, 该药剂可以是针对NPR1蛋白的第二种不同的抗体。可以与抗NPR1抗体缀合的治疗部分的类型, 将考虑要治疗的病症和要实现的所需治疗效果。用于形成免疫缀合物的合适药剂的实例在本领域中是已知的。参见例如WO 05/103081。

[0162] 多特异性抗体

[0163] 本发明的抗体可以是单特异性、双特异性或多特异性的。多特异性抗体可以对一种靶多肽的不同表位具有特异性, 或者可以包含对一种以上靶多肽具有特异性的抗原结合结构域。参见, 例如, Tutt等, 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer等, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244。

[0164] 如本领域普通技术人员所知, 可以使用标准分子生物学技术(例如重组DNA和蛋白质表达技术)来构建本发明的任何多特异性抗原结合分子或其变体。

[0165] 在一些实施方案中, 以双特异性形式(“双特异性”)产生NPR1特异性抗体, 其中与NPR1蛋白的不同结构域结合的可变区连接在一起以在单一结合分子中赋予双结构域特异性。适当设计的双特异性可以通过增加特异性和结合亲合力(avidity)来增强总体NPR1蛋白抑制功效。可以将对不同结构域(例如, N末端结构域的片段)具有特异性的可变区或可以与一个结构域内的不同区域结合的可变区配对在结构支架上, 该结构支架允许每个区域同时与单独的表位结合、或与一个结构域中的不同区域结合。在双特异性的一个例子中, 来自对一个结构域具有特异性的结合剂的重链可变区(VH)与来自对第二结构域具有特异性的

一系列结合剂的轻链可变区 (VL) 重组,以鉴定可以与初始VH配对而不破坏该VH的初始特异性的非关联 (non-cognate) VL配偶体。这样,单个VL片段 (例如, V_L1) 可以与两个不同的VH结构域 (例如, V_H1 和 V_H2) 组合,以生成由两个结合“臂” (V_H1-V_L1 和 V_H2-V_L1) 组成的双特异性。单个VL区段的使用降低了系统的复杂性,从而简化了用于产生双特异性的克隆、表达和纯化过程并提高了其效率 (参见,例如,US2011/0195454和US2010/0331527)。

[0166] 备选地,可以使用本文所述的技术或本领域技术人员已知的其他技术,以双特异性形式,制备结合多个结构域和第二靶标的抗体,例如但不限于,第二不同的抗NPR1抗体。结合至不同区域的抗体可变区可以与结合至例如NPR1的胞外结构域上的相关位点的可变区连接在一起,以在单个结合分子内赋予双重抗原特异性。适当设计的具有这种性质的双特异性发挥双重功能。可以将对胞外结构域具有特异性的可变区与对胞外结构域的外部具有特异性的可变区组合,并在结构支架上配对,该结构支架允许每个可变区与单独的抗原结合。

[0167] 可用于本发明的示例性双特异性抗体形式包括使用第一免疫球蛋白 (Ig) CH3结构域和第二Ig CH3结构域,其中第一和第二Ig CH3结构域彼此之间有至少一个氨基酸差异,并且其中与缺乏所述氨基酸差异的双特异性抗体相比,该至少一个氨基酸差异降低双特异性抗体与蛋白A的结合。在一个实施方案中,第一Ig CH3结构域结合蛋白A,而第二Ig CH3结构域包含减少或消除蛋白A结合的突变,例如H95R修饰 (根据IMGT外显子编号;根据EU编号为H435R)。第二CH3可进一步包含Y96F修饰 (根据IMGT;根据EU为Y436F)。在第二CH3中可存在的其他修饰包括:对于IgG1抗体,D16E,L18M,N44S,K52N,V57M,和V82I (根据IMGT;根据EU,D356E,L358M,N384S,K392N,V397M,和V422I);对于IgG2抗体,N44S,K52N和V82I (IMGT;根据EU,N384S,K392N和V422I);对于IgG4抗体,Q15R,N44S,K52N,V57M,R69K,E79Q和V82I (根据IMGT;根据EU,Q355R,N384S,K392N,V397M,R409K,E419Q和V422I)。在本发明的范围内也考虑上述双特异性抗体形式的变化。

[0168] 可在本发明中使用的其他示例性双特异性形式包括但不限于,例如,基于scFv或双链抗体的双特异性形式,IgG-scFv融合物,双可变域 (DVD) - Ig,Quadroma,结入扣 (Knob-into-hole),共同轻链 (例如,带有结入扣的共同轻链等),CrossMab,CrossFab, (SEED) body,亮氨酸拉链,Duobody,IgG1/IgG2,双作用Fab (DAF) - IgG和Mab²双特异性形式 (对前述形式的综述,参见例如Klein等人,2012,mAbs 4:6,1-11以及其中引用的参考文献)。双特异性抗体也可以使用肽/核酸缀合来构建,例如其中具有正交化学反应性的非天然氨基酸用于产生位点特异性抗体-寡核苷酸缀合物,然后将其自组装成具有确定的组成、价性 (valency) 和几何形状的多聚体复合物。(参见,例如,Kazane等人,J. Am. Chem. Soc. [Epub: 2012年12月4日])。

[0169] 治疗性施用和制剂

[0170] 本发明提供了治疗组合物,其包含本发明的抗NPR1抗体或其抗原结合片段。根据本发明的治疗组合物可以与合适的载体、赋形剂以及其他可以掺入制剂中以提供改善的转移、递送、耐受性等的物质一起施用。可以在所有药剂师已知的配方中找到许多合适的配方:雷明顿制药科学,Mack Publishing Company,宾夕法尼亚州伊斯顿。这些制剂包括,例如,粉剂,糊剂,软膏剂,胶冻剂,蜡,油,脂质,含有脂质 (阳离子或阴离子) 的小泡 (如 LIPOFECTINTM),DNA缀合物,无水吸收糊剂,水包油和油包水型乳剂,乳剂碳蜡 (carbowax)

(各种分子量的聚乙二醇),半固体凝胶,和含碳蜡的半固体混合物。也参阅Powell et al.”Compendium of excipients for parenteral formulations”PDA(1998)J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0171] 抗体的剂量可以根据要施用的受试者的年龄和大小,靶疾病,状况,施用途等而变化。当本发明的抗体用于治疗成年患者的疾病或病症或用于预防这种疾病时,通常以约0.1至约100mg/kg体重的单个剂量施用本发明的抗体是有利的。根据病情的严重程度,可以调整治疗的频率和持续时间。在某些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段可以以至少约0.1mg至约800mg,约1至约600mg,约5至约500mg,或约10至约400mg的初始剂量施用。在某些实施方案中,可以在初始剂量之后施用第二或多个后续剂量的抗体或其抗原结合片段,所述后续剂量可以以与初始剂量大致相同或较少的量施用,其中所述后续剂量至少间隔1天至3天;至少一周,至少2周;至少3周;至少4周;至少5周;至少6周;至少7周;至少8周;至少9周;至少10周;至少12周;或至少14周。

[0172] 各种递送系统是已知的,并且可以用于施用本发明的药物组合物,例如,包封在脂质体、微粒、微胶囊中,能够表达突变病毒的重组细胞,受体介导的内吞作用(参见,例如,Wu等人,(1987)J.Biol.Chem.262:4429-4432)。引入的方法包括但不限于,皮内,透皮,肌内,腹膜内,静脉内,皮下,鼻内,硬膜外和口服途径。组合物可以通过任何方便的途径给药,例如通过输注或团注(bolus injection),通过上皮或粘膜皮肤内衬(例如,口腔粘膜,直肠和肠粘膜等)吸收,并且可以与其他生物活性剂一起给药。施用可以是系统的,也可以是局部的。药物组合物也可以在小泡,特别是脂质体中递送(参见,例如,Langer(1990)Science 249:1527-1533)。

[0173] 本文还考虑了纳米颗粒用于递送本发明的抗体的用途。抗体缀合的纳米颗粒可用于治疗和诊断应用。Arruebo,M.等人2009(J.Nanomat.Volume 2009,Article ID 439389,24页,doi:10.1155/2009/439389中,“用于生物医学应用的抗体缀合的纳米颗粒”)详细描述了抗体缀合的纳米颗粒及其制备和使用方法,该文献通过引用并入本文。可以开发纳米颗粒并将其与抗体缀合,包含在药物组合物中以靶向细胞。在例如US 8257740或US 8246995中也描述了用于药物递送的纳米颗粒,每个文献都以其整体并入本文。

[0174] 在某些情况下,可以在控释系统中递送药物组合物。在一个实施方案中,可以使用泵。在另一个实施方案中,可以使用聚合物材料。在另一个实施方案中,可将控释系统放置在组合物的靶标附近,由此仅需要全身剂量的一小部分。

[0175] 可注射制剂可包括用于静脉内、皮下、颅内、腹膜内和肌内注射、滴注等的剂型。这些可注射制剂可通过公知的方法制备。

[0176] 本发明的药物组合物可以用标准的针头和注射器皮下或静脉内递送。另外,关于皮下递送,笔式递送装置可以容易地应用于递送本发明的药物组合物。这样的笔式递送装置可以是可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔式递送装置通常利用包含药物组合物的可更换药筒。一旦已经施用了药筒内的所有药物组合物并且药筒空出后,则可以容易地丢弃空的药筒并用包含药物组合物的新药筒替换。然后可以重新使用该笔式递送装置。在一次性笔式递送装置中,没有可更换的药筒。但是,一次性笔式递送装置预先填充有药物组合物,所述药物组合物被容纳在装置内的储存器中。一旦储液器中的药物组合物被清空,便丢弃整个装置。

[0177] 有利地,将上述用于口服或肠胃外用途的药物组合物制成适合于一定剂量的活性成分的单位剂量的剂型。这种单位剂量的剂型包括例如片剂,丸剂,胶囊剂,注射剂(安瓿),栓剂等。在每个单位剂量的剂型中包含的抗体的量通常为约5至约500mg;特别地在注射形式中,优选地抗体的含量为约5至约300mg,并且对于其他剂型为约10至约300mg。

[0178] 抗体的治疗用途

[0179] 本发明的抗体可用于治疗和/或预防与NPR1相关的疾病或病症或病状和/或用于减轻与这种疾病、病症或病状有关的至少一种症状。在某些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段可以以治疗剂量施用于患有与NPR1相关的疾病或病症或病状的患者。

[0180] 在某些实施方案中,本发明的抗体可用于治疗或预防与NPR1相关的疾病或病症的至少一种症状或适应征,所述疾病或病症选自高血压、心力衰竭、肥胖症、肾衰竭、慢性肾脏疾病、黄斑水肿、青光眼、中风、肺部疾病、肺纤维化、炎症、哮喘、骨骼生长异常、骨折、糖尿病和癌症。

[0181] 在本文中还可能考虑将一种或多种本发明的抗体预防性地用于风险罹患与NPR1相关的疾病或病症的受试者。

[0182] 在本发明的一个实施方案中,本发明抗体应用于制备用于治疗患有本文公开的疾病、病症或病状的患者药物组合物或药物。在本发明的另一个实施方案中,本发明的抗体可以用作辅助疗法,与可用于治疗或改善本文公开的疾病、病症或病状的本领域技术人员已知的任何其他药剂或任何其他疗法一起使用。

[0183] 组合治疗

[0184] 组合治疗可以包括本发明的抗体和可以有利地与本发明的抗体或与本发明的抗体的生物学活性片段组合的任何其他治疗剂。本发明的抗体可以与一种或多种用于治疗NPR1相关疾病或病症的药物或疗法协同组合。在一些实施方案中,本发明的抗体可以与第二治疗剂组合以改善所述疾病或病症的一种或多种症状。

[0185] 取决于疾病、病症或病状,本发明的抗体可以与一种或多种其他治疗剂组合使用,所述治疗剂包括但不限于醛固酮拮抗剂(例如依普利酮eplerenone,螺内酯spironolactone), α -肾上腺素能受体阻滞剂(例如多沙唑嗪doxazosin,酚苄明phenoxybenzamine,酚妥拉明phentolamine,哌唑嗪prazosin,特拉唑嗪terazosin),血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂(例如贝那普利benazepril,卡托普利captopril,依那普利enalapril,福辛普利fosinopril,赖诺普利lisinopril,莫西普利moexipril,培哚普利perindopril,喹那普利quinapril,雷米普利ramipril,群多普利trandolapril),小动脉血管扩张剂(例如,肼苯哒嗪hydralazine,米诺地尔minoxidil),自主神经节血管扩张剂(例如,梅坎米胺mecamylamine), β -肾上腺素能受体阻滞剂(醋丁洛尔acebutolol,阿替洛尔atenolol,倍他洛尔betaxolol,比索洛尔bisoprolol,卡维地洛carvedilol,卡替洛尔carteolol,艾司洛尔esmolol,拉贝洛尔labetolol,美托洛尔metoprolol,纳多洛尔nadolol,penbuterol,吲哚洛尔pindolol,普萘洛尔propranolol,噻吗洛尔timolol),儿茶酚胺耗竭性抗交感神经药(例如,去甲氧利血平deserpidine,利血平reserpine),中枢性 α -2肾上腺素能受体激动剂(例如可乐定clonidine,胍那苄guanabenz,胍法辛guanfacine,甲基多巴methyldopa),钙通道阻滞剂(地尔硫卓diltiazem,维拉帕米verapamil,氨氯地平amlodipine,非洛地平felodipine,伊拉地平isradipine,尼卡地平nicadipine,硝苯地平

nifedipine, 尼索地平 nisoldipine), 利尿剂 (例如布美他尼 bumetanide, 依他尼酸 ethacrynic acid, 呋塞米 furosemide, 托拉塞米 torsemide, 氯噻嗪 chlorothiazide, 氢氯噻嗪 hydrochlorothiazide, 氢氟噻嗪 hydroflumethiazide, 甲氯噻嗪 methyclothiazide, 多噻嗪 polythiazide, 氯噻酮 chlorthalidone, 吲达帕胺 indapamide, 美托拉宗 metolazone), 肾素抑制剂 (例如阿利吉仑 aliskiren), 抗凝剂 (例如香豆素 coumadin, 达比加群 dabigatran, 阿哌沙班 apixaban), 抗血小板药 (例如阿司匹林 aspirin, 氯吡格雷 clopidogrel), 胆固醇降低剂 (例如他汀 statin, PCSK9 抑制剂, 例如 alirocumab), 血管扩张剂 (例如米诺地尔 minoxidil, 肼苯哒嗪 hydralazine, 硝酸盐 nitrates), 洋地黄, 手术 (例如血管成形术 angioplasty, 冠状动脉搭桥术 coronary artery bypass, 心脏移植), 可植入装置 (例如瓣膜置换, 除颤器装置, 左心室辅助装置, 起搏器), 抗肿瘤治疗 (例如化学治疗剂, 外科手术, 放射, PD-1 抑制剂), 胰岛素, GLP1 激动剂 (例如艾塞那肽 exenatide, 利拉鲁肽 liraglutide, 利西拉肽 lixisenatide, 阿比鲁肽 albiglutide, 杜拉鲁肽 dulaglutide, 索玛鲁肽 semaglutide), 二甲双胍, 透析, 骨髓刺激剂, 血液滤过, 生活方式改变和膳食补充剂。

[0186] 如本文所用, 术语“与...组合”是指可以在施用本发明的抗NPR1抗体之前, 同时或之后施用另外的治疗活性组分 (一种或多种)。术语“与……组合”还包括依次或同时给予抗NPR1抗体和第二治疗剂。

[0187] 可以在施用本发明的抗NPR1抗体之前向受试者施用另外的治疗活性成分 (一种或多种)。例如, 如果第一成分在第二成分施用之前1周、72小时、60小时、48小时、36小时、24小时、12小时、6小时、5小时、4小时、3小时、2小时、1小时、30分钟、或少于30分钟施用, 则可以认为第一成分在第二成分“之前”施用。在其他实施方案中, 可以在施用本发明的抗NPR1抗体之后向受试者施用另外的治疗活性成分 (一种或多种)。例如, 如果第一成分在第二成分施用之后30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、12小时、24小时、36小时、48小时、60小时、72小时、或更长时间后施用, 则可以认为第一成分在第二成分“之后”施用。在其他实施方案中, 可以在施用本发明的抗NPR1抗体的同时向受试者施用另外的治疗活性成分 (一种或多种)。为了本发明的目的, “同时”施用包括, 例如, 在单个剂型中或在分开的剂型中向受试者施用抗NPR1抗体和另外的治疗活性成分, 其中所述分开的剂型彼此之间在大约30分钟或更少时间内施用给患者。如果以分开的剂型施用, 则每种剂型可以通过相同的途径施用 (例如, 抗NPR1抗体和另外的治疗活性成分都可以静脉内施用, 等等); 或者, 每种剂型可以通过不同途径施用 (例如, 抗NPR1抗体可以静脉内施用, 并且其他治疗活性成分可以口服施用)。在任何情况下, 出于本公开的目的, 在单一剂型中施用这些成分、在分开剂型中通过相同途径施用这些成分、或在分开剂型中通过不同途径施用这些成分, 均被认为是“同时施用”。为了本公开的目的, 抗NPR1抗体在另外的治疗活性成分“之前”、“同时”或“之后” (这些术语如以上在本文中所定义) 的施用被认为是抗NPR1抗体与另外的治疗活性成分的“组合”施用。

[0188] 本发明包括药物组合物, 其中将本发明的抗NPR1抗体与一种或多种另外的治疗活性成分共同配制, 如本文其他地方所述。

[0189] 抗体的诊断用途

[0190] 本发明的抗体可以用于检测和/或测量样品中的NPR1, 例如用于诊断目的。一些实施方案考虑了本发明的一种或多种抗体在检测NPR1相关疾病或病症的测定法中的用途。

NPR1的示例性诊断测定法可包括,例如,使从患者获得的样品与本发明的抗NPR1抗体接触,其中该抗NPR1抗体被可检测的标记物或报告分子标记或用作捕获配体以从患者样品中选择性分离NPR1。备选地,未标记的抗NPR1抗体可以与本身被可检测地标记的第二抗体组合用于诊断应用。可检测的标记物或报道分子可以是放射性同位素,例如 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S 或 ^{125}I ;荧光或化学发光部分,例如异硫氰酸荧光素或罗丹明;或酶,例如碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶,辣根过氧化物酶或萤光素酶。可用于检测或测量样品中NPR1的特定示例性测定法包括酶联免疫吸附测定(ELISA),放射免疫测定(RIA)和荧光激活细胞分选(FACS)。

[0191] 可用于根据本发明的NPR1诊断测定法的样品包括,在正常或病理条件下,可从患者获得的任何组织或体液样品,其包含可检测量的NPR1蛋白或其片段。通常,对从健康患者(例如,未患有与NPR1相关的疾病的患者)获得的特定样品中的NPR1蛋白水平进行测量,以初步建立NPR1的基线或标准水平。然后可以将此NPR1基线水平与从怀疑患有NPR1相关疾病或与该疾病相关的症状的个体获得的样品中测得的NPR1水平进行比较。

[0192] 对NPR1蛋白具有特异性的抗体可以不包含另外的标记物或部分,或者它们可以包含N-末端或C-末端的标记物或部分。在一实施方案中,标记物或部分生物素。在结合测定中,标记物(如果有的话)的位置可以确定肽相对于结合肽的表面的定向。例如,如果表面用抗生物素蛋白包被,则含有N端生物素的肽将被定向从而使得该肽的C端部分位于该表面的远端。

实施例

[0193] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供关于如何制作和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,并且不旨在限制本发明人所认识的本发明的范围。已经尽力确保所用数字(例如量,温度等)的准确性,但是仍应考虑一些实验误差和偏差。除非另有说明,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,室温是大约25℃,压力是大气压或接近大气压。

[0194] 实施例1:针对利尿钠肽受体1(NPR1)的人抗体的产生

[0195] 在包含编码人免疫球蛋白重链和 κ 轻链可变区的DNA的VELOCIMMUNE[®]小鼠中,产生了针对NPR1蛋白的人抗体。通过流体动力学DNA递送用人NPR1和小鼠ANP DNA免疫小鼠,并通过与小鼠ANP复合的人NPR1蛋白的胞外结构域加强免疫。

[0196] 通过NPR1特异性免疫测定法,监测抗体免疫反应。当达到所需的免疫反应时,收获脾细胞并与小鼠骨髓瘤细胞融合以保持其生存力和形成杂交瘤细胞系。筛选并选择杂交瘤细胞系以鉴定产生NPR1特异性抗体的细胞系。细胞系用于获得几种抗NPR1嵌合抗体(即,具有人可变结构域和小鼠恒定结构域的抗体)。

[0197] 如美国专利7582298中所述,也直接从抗原阳性的小鼠B细胞中分离抗NPR1抗体,而不与骨髓瘤细胞融合,该专利在此全文引入作为参考。使用这种方法,获得了几种完全人抗NPR1抗体(即,具有人可变结构域和人恒定结构域的抗体)。

[0198] 如上所述产生的示例性抗体被命名为mAb22033,mAb22035,mAb22805,mAb22809,mAb22810,mAb25479,mAb25491,mAb25497,mAb25498,mAb25502,mAb25508和ImAb25545。

[0199] 根据本实施例的方法产生的示例性抗体的生物学性质在以下阐述的实施例中详细描述。

[0200] 实施例2:重链和轻链可变区氨基酸和核苷酸序列

[0201] 表1列出了选择的本发明抗NPR1抗体的重链和轻链可变区和CDR的氨基酸序列标识符。

[0202] 表1:氨基酸序列标识符

	SEQ ID NOs:							
抗体名	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb22033	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb22035	18	20	22	24	26	28	30	32
mAb22805	34	36	38	40	42	44	46	48
mAb22809	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb22810	66	68	70	72	74	76	78	80
mAb25479	82	84	86	88	90	92	94	96
mAb25491	98	100	102	104	106	108	110	112

[0203]

mAb25497	114	116	118	120	122	124	126	128
mAb25498	130	132	134	136	138	140	142	144
mAb25502	146	148	150	152	154	156	158	160
mAb25508	162	164	166	168	170	172	174	176
mAb25545	178	180	182	184	186	188	190	192

[0204]

[0205] 相应的核酸序列标识符在表2中列出。

[0206] 表2:核酸序列标识符

	SEQ ID NOs:							
抗体名	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb22033	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb22035	17	19	21	23	25	27	29	31
mAb22805	33	35	37	39	41	43	45	47
mAb22809	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb22810	65	67	69	71	73	75	77	79
mAb25479	81	83	85	87	89	91	93	95
mAb25491	97	99	101	103	105	107	109	111
mAb25497	113	115	117	119	121	123	125	127
mAb25498	129	131	133	135	137	139	141	143
mAb25502	145	147	149	151	153	155	157	159
mAb25508	161	163	165	167	169	171	173	175
mAb25545	177	179	181	183	185	187	189	191

[0207]

[0208] 在此提及的抗体典型地具有完全的人可变区,但是可以具有人或小鼠的恒定区。如本领域普通技术人员将理解的,可以将具有特定Fc同种型的抗体转化为具有不同Fc同种型的抗体(例如,可以将具有小鼠IgG1 Fc的抗体转化为具有人IgG4等的抗体),但无论如何,可变结构域(包括CDR)(由表2中显示的数字标识符表示)将保持不变,并且与抗原的结合特性预期将相同或基本相似而不论Fc结构域的性质如何。在某些实施方案中,将具有小鼠IgG1 Fc的选择的抗体转化为具有人IgG4 Fc的抗体。在一个实施方案中,IgG4 Fc结构域

包含2个或更多个氨基酸变化,如US20100331527中公开的。在一个实施方案中,人IgG4 Fc在铰链区(S108P)包含丝氨酸到脯氨酸突变以促进二聚体稳定。除非另有说明,否则以下实施例中使用的所有抗体均包含人IgG4同种型。

[0209] 在以下实施例中使用的对照构建体

[0210] 为了比较的目的,在本文公开的实验中包括以下对照构建体(抗NPR1抗体):“比较物1”,具有根据美国专利20120114659号(Morphosys)的抗体“mAb5591”的V_H/V_L序列的抗人NPR1单克隆抗体。

[0211] 实施例3:通过表面等离子体共振确定抗体与NPR1的结合

[0212] 实验程序

[0213] 使用基于实时表面等离子体共振的Biacore 4000生物传感器,确定了不同NPR1试剂与纯化的抗NPR1单克隆抗体(mAb)结合的平衡解离常数(K_D)。所有结合研究均在25℃和37℃在10mM HEPES,150mM NaCl,3mM EDTA和0.05% v/v表面活性剂Tween-20,pH 7.4(HBS-ET)运行缓冲液中进行。首先通过与小鼠抗人Fc特异性mAb(GE Healthcare,#BR100839)或山羊抗人Fc γ 特异性多克隆抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories,#BR-1008-39)进行胺偶联,将Biacore CM5传感器芯片表面衍生化,以捕获抗NPR1单克隆抗体。在以下蛋白上进行结合研究:表达带有C末端myc-myc-六组氨酸的人NPR1胞外域(hNPR1-MMH)(SEQ ID NO:194),表达带有C末端myc-myc-六组氨酸的猴NPR1胞外域(mfNPR1-MMH)(SEQ ID NO:195),表达带有C末端myc-myc-六组氨酸的小鼠NPR1胞外域(mNPR1-MMH)(SEQ ID NO:196),表达带有C末端小鼠IgG2a的人NPR1胞外域(hNPR1-mFc)(SEQ ID NO:197),表达带有C末端小鼠IgG2a的猴NPR1胞外结构域(mfNPR1-mFc)(SEQ ID NO:198),表达带有C末端小鼠IgG2a的小鼠NPR1胞外结构域(mNPR1-mFc)(SEQ ID NO:199),hNPR1-mFc+hANP,hNPR1-mFc+hBNP,mfNPR1-mFc+hANP,mfNPR1-mFc+hBNP,mNPR1-mFc+mANP,mNPR1-mFc+mBNP。配制在HBS-ET运行缓冲液中不同浓度的hNPR1-MMH,mfNPR1-MMH(100nM-3.7nM,3倍系列稀释液,或100nM-6.25nM,4倍系列稀释液);hNPR1-mFc,mfNPR1.mFc(100nM-1.56nM,4倍系列稀释液,或100nM-3.7nM,3倍系列稀释液);mNPR1.mmh(100nM),与10倍浓度的hANP或hBNP复合的hNPR1-mFc或mfNPR1-mFc(100nM,25nM,6.25nM,或100nM-3.7nM,3倍系列稀释液);与10倍浓度的mANP或mBNP复合的mNPR1.mFc(100nM,25nM,或100nM-3.7nM,3倍系列稀释);或hNPR1-hFc或与10倍浓度的hANP复合的hNPR1-hFc(100nM-6.25nM,4倍系列稀释液),以30μL/min的流速注射4分钟,在HBS-ET运行缓冲液中监测结合NPR1不同试剂的mAb的解离10分钟。在每个周期结束时,通过使用10秒注射20mM磷酸(针对小鼠抗人Fc特异性mAb表面)或40秒注射10mM甘氨酸HCl,pH1.5(针对山羊抗人Fc γ 特异性多克隆抗体),或通过两次1分钟注射10mM Gly pH1.5,来再生NPR1 mAb捕获表面。通过使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件,将实时结合传感图拟合到具有质量传输限制的1:1结合模型,来确定结合速率(k_a)和解离速率(k_d)。根据动力学速率计算结合解离平衡常数(K_D)和解离半衰期(t_{1/2}):

$$[0214] \quad K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ 和 } t_{1/2} (\text{min}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

[0215] 结果

[0216] 表3至26显示了在25℃和37℃不同NPR1蛋白与本发明选择的抗NPR1抗体结合的结合动力学参数。

[0217] 表3:在25℃下hNPR1-MMH与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0218]

捕获的 mAb	mAb 捕获水平 (RU)	100nM Ag 结合的 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	377 ± 0.9	30	8.55E+03	4.06E-04	4.75E-08	28.4
mAb22035	368 ± 0.6	210	2.03E+05	1.50E-04	7.38E-10	77.3
mAb22805	356 ± 0.7	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22809	359 ± 1.1	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22810	386 ± 3.8	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25479	338 ± 1.2	16	1.40E+04	6.73E-03	4.82E-07	1.7
mAb25491	275 ± 0.9	37	2.62E+04	9.83E-04	3.76E-08	11.7
mAb25497	314 ± 0.6	22	3.17E+04	1.67E-03	5.27E-08	6.9
mAb25498	325 ± 0.8	68	2.25E+04	1.82E-03	8.10E-08	6.3
mAb25502	349 ± 2.3	2	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25508	296 ± 1	192	4.32E+05	1.34E-04	3.09E-10	86.5
mAb25545	360 ± 0.7	2	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
IgG4 同种型对照	315 ± 0.7	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0219] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0220] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0221] 表4: 在37℃下hNPR1-MMH与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0222]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平 (RU)	100nM Ag 结合的 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	473 ± 2.1	52	6.03E+03	8.19E-04	1.36E-07	14.1
mAb22035	492 ± 2.3	284	2.40E+05	3.12E-04	1.30E-09	37.1
mAb22805	451 ± 2	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22809	466 ± 2	-1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22810	428 ± 1.2	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25479	443 ± 4.5	16	2.28E+04	1.57E-02	6.89E-07	0.7
mAb25491	357 ± 1.8	51	3.56E+04	4.53E-03	1.27E-07	2.5
mAb25497	402 ± 3	31	1.86E+04	2.58E-03	1.39E-07	4.5
mAb25498	418 ± 2.8	97	2.25E+04	4.15E-03	1.84E-07	2.8
mAb25502	452 ± 3.3	4	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25508	397 ± 2.1	252	4.53E+05	2.22E-04	4.90E-10	52.1
mAb25545	463 ± 1.7	7	IC*	IC*	IC*	IC*
IgG4 同种型对照	417 ± 3.1	3	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0223] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0224] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0225] 表5: 在25℃下mfNPR1-MMH与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0226]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平 (RU)	100nM Ag 结合的 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	376 ± 0.8	79	1.79E+04	2.91E-04	1.62E-08	39.6
mAb22035	368 ± 0.8	245	4.26E+05	1.43E-04	3.36E-10	80.8
mAb22805	356 ± 1.1	0	NB ^s	NB ^s	NB ^s	NB ^s
mAb22809	359 ± 0.9	0	NB ^s	NB ^s	NB ^s	NB ^s
mAb22810	381 ± 0.8	1	NB ^s	NB ^s	NB ^s	NB ^s
mAb25479	338 ± 0.5	41	2.77E+04	6.82E-03	2.46E-07	1.7
mAb25491	275 ± 0.4	81	4.20E+04	1.28E-03	3.05E-08	9.0
mAb25497	315 ± 0.6	49	3.78E+04	2.26E-03	5.98E-08	5.1
mAb25498	327 ± 0.5	114	5.79E+04	1.58E-03	2.72E-08	7.3
mAb25502	350 ± 0.9	3	NB ^s	NB ^s	NB ^s	NB ^s
mAb25508	298 ± 1.1	213	7.06E+05	1.32E-04	1.87E-10	87.5
mAb25545	360 ± 0.5	4	IC*	IC*	IC*	IC*
IgG4 同种型对照	315 ± 0.6	0	NB ^s	NB ^s	NB ^s	NB ^s

[0227] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0228] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0229] 表6: 在37℃下mfnPR1-MMH与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0230]

mAb 捕获的	mAb 捕获 水平(RU)	100nM Ag 结合的 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	470 ± 1.4	131	2.51E+04	6.97E-04	2.78E-08	16.6
mAb22035	490 ± 1.3	319	5.32E+05	3.74E-04	7.02E-10	30.9
mAb22805	449 ± 1.3	3	NB ^s	NB ^s	NB ^s	NB ^s
mAb22809	465 ± 1	1	NB ^s	NB ^s	NB ^s	NB ^s
mAb22810	426 ± 1.1	0	NB ^s	NB ^s	NB ^s	NB ^s
mAb25479	440 ± 1.8	43	3.96E+04	1.42E-02	3.60E-07	0.8
mAb25491	353 ± 1.2	106	5.83E+04	4.57E-03	7.84E-08	2.5
mAb25497	397 ± 1.4	69	2.77E+04	3.84E-03	1.39E-07	3.0
mAb25498	414 ± 1.7	151	7.07E+04	3.69E-03	5.21E-08	3.1
mAb25502	449 ± 1.7	6	NB ^s	NB ^s	NB ^s	NB ^s
mAb25508	394 ± 1.1	275	7.82E+05	2.73E-04	3.49E-10	42.3
mAb25545	461 ± 1	10	IC*	IC*	IC*	IC*
IgG4 同种型对照	413 ± 1.3	3	NB ^s	NB ^s	NB ^s	NB ^s

[0231] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0232] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0233] 表7: 在25℃下mNPR1-MMH与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0234]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	376 ± 0.7	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22035	368 ± 0.2	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22805	358 ± 1.9	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22809	358 ± 0.3	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22810	378 ± 0.3	-1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25479	338 ± 1.2	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25491	276 ± 0.3	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25497	315 ± 0.1	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25498	326 ± 0.6	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25502	349 ± 0.7	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25508	296 ± 1.2	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25545	359 ± 0.1	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
IgG4 同种型对照	315 ± 0.1	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0235] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0236] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0237] #表示未测试条件

[0238] 表8: 在37℃下mNPR1-MMH与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0239]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	468 ± 0.6	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22035	491 ± 0.9	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22805	450 ± 0.2	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22809	466 ± 0.1	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22810	420 ± 0.1	-2	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25479	438 ± 0.2	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25491	353 ± 1.8	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25497	395 ± 0.7	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25498	413 ± 0.2	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25502	447 ± 0.9	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25508	392 ± 0.3	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25545	460 ± 0.4	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
IgG4 同种型对照	412 ± 0.4	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0240] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0241] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0242] #表示未测试条件

[0243] 表9: 在25℃下hNPR1-mFc或hNPR1-hFc与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0244]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	351 ± 1.3	56	6.18E+04	6.38E-05	1.03E-09	181.0
mAb22035	347 ± 1.2	198	2.25E+05	8.20E-05	3.65E-10	140.9
mAb22805	331 ± 0.8	2	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22809	327 ± 0.7	-2	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22810	380 ± 0.4	4	IC*	IC*	IC*	IC*
mAb25479	327 ± 2.1	26	3.80E+04	8.52E-04	2.24E-08	13.6
mAb25491	249 ± 2.8	36	1.01E+05	1.24E-04	1.24E-09	92.8
mAb25497	302 ± 25.8	49	2.03E+05	4.83E-05	2.38E-10	239.3
mAb25498	312 ± 0.8	94	6.98E+04	2.55E-04	3.65E-09	45.3
mAb25502	321 ± 1.6	17	8.79E+04	8.74E-05	9.94E-10	132.1
mAb25508	276 ± 1.5	211	7.89E+05	6.85E-05	8.68E-11	168.6
mAb25545	340 ± 1.1	7	IC*	IC*	IC*	IC*
IgG4 同种型对照	298 ± 1.6	-14	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0245] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0246] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0247] 表10: 在37℃下hNPR1-mFc或hNPR1-hFc与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0248]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	423 ± 3.1	75	3.68E+04	1.31E-04	3.56E-09	88.2
mAb22035	454 ± 3.6	257	6.36E+05	1.27E-04	2.00E-10	90.8
mAb22805	406 ± 1.8	8	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22809	413 ± 1.6	-1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22810	423 ± 0.8	9	IC*	IC*	IC*	IC*
mAb25479	414 ± 5.6	47	3.37E+04	1.39E-03	4.12E-08	8.3
mAb25491	298 ± 1.6	70	4.19E+04	3.63E-04	8.66E-09	31.8
mAb25497	344 ± 1.7	43	4.23E+04	3.10E-04	7.31E-09	37.3
mAb25498	381 ± 2	129	8.86E+04	5.68E-04	6.41E-09	20.3
mAb25502	396 ± 2.8	9	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25508	353 ± 1.3	242	8.38E+05	1.01E-04	1.21E-10	113.9
mAb25545	415 ± 2.8	15	IC*	IC*	IC*	IC*
IgG4 同种型对照	366 ± 3.9	-19	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0249] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0250] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0251] 表11: 在25℃下hNPR1-mFc:hANP或hNPR1-hFc:hANP复合物与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0252]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	350 ± 0.4	84	6.03E+04	8.60E-05	1.43E-09	134.4
mAb22035	347 ± 0.3	186	1.79E+05	7.78E-05	4.34E-10	148.4
mAb22805	331 ± 1.8	84	4.31E+04	1.41E-04	3.28E-09	81.7
mAb22809	327 ± 1.5	53	3.92E+04	1.93E-04	4.94E-09	59.7
mAb22810	378 ± 0.6	14	8.31E+03	3.44E-04	4.14E-08	34
mAb25479	327 ± 2.4	49	3.10E+04	1.09E-04	3.53E-09	105.8
mAb25491	250 ± 1.7	71	5.22E+04	4.15E-05	7.94E-10	278.5
mAb25497	292 ± 2.1	59	1.63E+05	4.56E-05	2.79E-10	253.1
mAb25498	313 ± 0.6	52	4.58E+04	3.17E-04	6.93E-09	36.4
mAb25502	321 ± 4.3	81	6.06E+04	2.53E-04	4.17E-09	45.7
mAb25508	278 ± 4.2	199	2.64E+05	8.97E-05	3.40E-10	128.8
mAb25545	341 ± 1.8	28	2.34E+04	4.63E-05	1.98E-09	249.7
IgG4 同种型对照	297 ± 1.5	-12	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0253] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0254] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0255] 表12: 在37℃下hNPR1-mFc:hANP或hNPR1-hFc:hANP复合物与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0256]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	412 ± 1.2	108	5.79E+04	9.80E-05	1.69E-09	117.9
mAb22035	444 ± 2	237	2.25E+05	1.14E-04	5.08E-10	101.0
mAb22805	399 ± 1.9	113	6.01E+04	2.95E-04	4.91E-09	39.2
mAb22809	406 ± 0.8	68	5.04E+04	1.66E-04	3.29E-09	69.5
mAb22810	421 ± 0.8	26	1.37E+04	1.04E-03	7.55E-08	11
mAb25479	408 ± 7.6	84	4.97E+04	1.34E-04	2.70E-09	86.1
mAb25491	291 ± 1.3	96	5.69E+04	1.11E-04	1.95E-09	104.1
mAb25497	336 ± 1.6	60	4.85E+04	1.02E-04	2.09E-09	113.7
mAb25498	375 ± 1.9	74	5.30E+04	7.20E-04	1.36E-08	16.0
mAb25502	388 ± 5.1	105	7.20E+04	4.67E-04	6.49E-09	24.7
mAb25508	348 ± 0.8	230	2.93E+05	1.48E-04	5.06E-10	77.9
mAb25545	409 ± 2.7	58	3.67E+04	8.61E-05	2.35E-09	134.2
IgG4 同种型对照	358 ± 4.9	-18	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0257] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0258] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0259] 表13: 在25℃下hNPR1-mFc:hBNP复合物与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0260]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	350 ± 0.4	85	5.43E+04	6.67E-05	1.23E-09	173.2
mAb22035	348 ± 2.9	194	1.71E+05	8.70E-05	5.08E-10	132.7
mAb22805	330 ± 0.4	84	4.14E+04	1.52E-04	3.68E-09	75.8
mAb22809	327 ± 0.4	51	3.28E+04	2.21E-04	6.72E-09	52.4
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	326 ± 0.5	50	2.92E+04	1.23E-04	4.21E-09	94.1
mAb25491	250 ± 0.3	72	5.46E+04	4.96E-05	9.08E-10	232.9
mAb25497	292 ± 0.4	59	1.53E+05	5.49E-05	3.58E-10	210.5
mAb25498	313 ± 0.4	55	4.85E+04	2.56E-04	5.28E-09	45.1
mAb25502	317 ± 1.5	78	6.94E+04	2.36E-04	3.40E-09	49.0
mAb25508	275 ± 0.6	200	2.50E+05	8.57E-05	3.43E-10	134.7
mAb25545	340 ± 0.2	27	2.30E+04	6.26E-05	2.72E-09	184.6
IgG4 同种型对照	296 ± 0.5	-11	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0261] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0262] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0263] #表示未测试条件

[0264] 表14: 在37℃下hNPR1-mFc:hBNP复合物与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0265]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	409 ± 1.4	108	5.37E+04	9.60E-05	1.79E-09	120.3
mAb22035	440 ± 0.8	243	2.32E+05	1.28E-04	5.53E-10	90.0
mAb22805	398 ± 1.4	112	5.20E+04	3.13E-04	6.02E-09	36.9
mAb22809	405 ± 0.5	63	4.65E+04	1.66E-04	3.56E-09	69.8
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	402 ± 0.4	85	4.27E+04	1.63E-04	3.83E-09	70.7
mAb25491	289 ± 1.5	96	5.47E+04	1.34E-04	2.45E-09	86.2
mAb25497	333 ± 1.1	59	4.92E+04	1.16E-04	2.35E-09	99.7
mAb25498	372 ± 0.9	76	5.29E+04	9.48E-04	1.79E-08	12.2
mAb25502	391 ± 0.7	102	6.03E+04	4.72E-04	7.82E-09	24.5
mAb25508	347 ± 0.9	236	3.52E+05	1.64E-04	4.66E-10	70.3
mAb25545	405 ± 1.2	56	3.46E+04	9.84E-05	2.85E-09	117.3
IgG4 同种型对照	354 ± 0.4	-17	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0266] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0267] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0268] #表示未测试条件

[0269] 表15: 在25℃下mfNPR1-mFc与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0270]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	351 ± 0.7	96	5.17E+04	4.85E-05	9.38E-10	238.0
mAb22035	346 ± 0.6	231	2.44E+05	5.57E-05	2.29E-10	207.2
mAb22805	331 ± 1.6	10	IC*	IC*	IC*	IC*
mAb22809	328 ± 0.7	6	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	325 ± 0.7	54	3.12E+04	5.07E-04	1.62E-08	22.8
mAb25491	251 ± 1.4	81	5.40E+04	7.54E-05	1.40E-09	153.1
mAb25497	292 ± 1	76	1.72E+05	5.79E-05	3.37E-10	199.4
mAb25498	313 ± 0.6	128	7.20E+04	1.77E-04	2.45E-09	65.4
mAb25502	321 ± 1.9	22	8.83E+04	1.41E-04	1.60E-09	82.0
mAb25508	276 ± 0.9	230	5.15E+05	5.98E-05	1.16E-10	193.3
mAb25545	340 ± 0.7	13	IC*	IC*	IC*	IC*
IgG4 同种型对照	297 ± 0.6	5	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0271] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0272] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0273] #表示未测试条件

[0274] 表16: 在37℃下mfNPR1-mFc与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0275]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	415 ± 1.3	126	4.82E+04	9.90E-05	2.06E-09	116.7
mAb22035	447 ± 1.5	291	4.59E+05	8.44E-05	1.84E-10	136.9
mAb22805	402 ± 1.7	16	IC*	IC*	IC*	IC*
mAb22809	409 ± 1.6	8	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	408 ± 1.3	89	3.82E+04	1.08E-03	2.81E-08	10.7
mAb25491	294 ± 1.6	114	4.70E+04	1.64E-04	3.49E-09	70.4
mAb25497	340 ± 1.1	79	4.25E+04	2.21E-04	5.20E-09	52.3
mAb25498	377 ± 1.4	170	9.16E+04	3.72E-04	4.06E-09	31.1
mAb25502	393 ± 1.7	17	IC*	IC*	IC*	IC*
mAb25508	350 ± 1.1	268	6.34E+05	8.36E-05	1.32E-10	138.2
mAb25545	410 ± 1	26	5.51E+04	1.44E-04	2.62E-09	80.0
IgG4 同种型对照	360 ± 1.4	8	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0276] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0277] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0278] #表示未测试条件

[0279] 表17:在25℃下mfNPR1-mFc:hANP复合物与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0280]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	349 ± 0.5	133	6.58E+04	5.36E-05	8.15E-10	215.5
mAb22035	346 ± 0.7	227	1.89E+05	4.66E-05	2.46E-10	247.9
mAb22805	330 ± 0.5	116	4.84E+04	9.51E-05	1.96E-09	121.4
mAb22809	327 ± 0.5	86	4.47E+04	1.73E-04	3.88E-09	66.6
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	326 ± 0.3	86	4.20E+04	1.03E-04	2.44E-09	112.7
mAb25491	250 ± 0.8	111	6.01E+04	4.55E-05	7.57E-10	253.8
mAb25497	292 ± 0.6	95	1.56E+05	3.75E-05	2.40E-10	307.7
mAb25498	313 ± 0.4	81	4.19E+04	1.12E-04	2.68E-09	102.9
mAb25502	316 ± 2.7	113	7.40E+04	2.64E-04	3.56E-09	43.8
mAb25508	273 ± 0.5	224	3.14E+05	7.32E-05	2.33E-10	157.7
mAb25545	339 ± 0.4	45	2.28E+04	5.37E-05	2.35E-09	215.1
IgG4 同种型对照	296 ± 0.5	7	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0281] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0282] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0283] #表示未测试条件

[0284] 表18:在37℃下mfNPR1-mFc:hANP复合物与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0285]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	407 ± 1.1	169	6.80E+04	8.90E-05	1.31E-09	129.8
mAb22035	438 ± 0.6	283	2.55E+05	7.70E-05	3.02E-10	150.1
mAb22805	395 ± 0.3	153	6.33E+04	2.09E-04	3.30E-09	55.3
mAb22809	403 ± 0.4	106	5.55E+04	2.05E-04	3.70E-09	56.2
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	401 ± 1.6	138	5.47E+04	2.19E-04	4.00E-09	52.8
mAb25491	288 ± 1	148	7.10E+04	1.06E-04	1.49E-09	109.0
mAb25497	332 ± 0.6	102	5.84E+04	1.52E-04	2.60E-09	75.9
mAb25498	370 ± 1.5	114	5.01E+04	4.45E-04	8.89E-09	25.9
mAb25502	390 ± 0.7	143	9.10E+04	5.24E-04	5.76E-09	22.0
mAb25508	346 ± 0.3	262	4.11E+05	1.46E-04	3.55E-10	79.3
mAb25545	404 ± 1.2	86	4.01E+04	8.18E-05	2.04E-09	141.2
IgG4 同种型对照	353 ± 0.8	9	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0286] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0287] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0288] #表示未测试条件

[0289] 表19:在25℃下mfNPR1-mFc:hBNP复合物与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0290]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	349 ± 0.7	132	6.59E+04	5.15E-05	7.81E-10	224.2
mAb22035	346 ± 0.3	231	2.05E+05	6.13E-05	3.00E-10	188.3
mAb22805	330 ± 1.5	113	4.53E+04	9.60E-05	2.12E-09	120.4
mAb22809	327 ± 0.6	80	4.14E+04	1.60E-04	3.85E-09	72.4
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	325 ± 0.1	86	3.81E+04	1.13E-04	2.95E-09	102.6
mAb25491	249 ± 0.7	110	5.86E+04	3.71E-05	6.32E-10	311.7
mAb25497	291 ± 0.1	93	1.40E+05	4.47E-05	3.20E-10	258.4
mAb25498	312 ± 0.6	81	4.32E+04	1.09E-04	2.53E-09	106.0
mAb25502	314 ± 3.4	110	6.90E+04	2.82E-04	4.08E-09	41.0
mAb25508	273 ± 0.8	229	3.08E+05	8.91E-05	2.90E-10	129.6
mAb25545	339 ± 0.1	42	2.39E+04	4.97E-05	2.08E-09	232.5
IgG4 同种型对照	296 ± 1.1	7	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0291] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0292] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0293] #表示未测试条件

[0294] 表20:在37℃下mfNPR1-mFc:hBNP复合物与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0295]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	406 ± 1.4	167	6.75E+04	8.80E-05	1.30E-09	131.3
mAb22035	436 ± 1.1	286	2.58E+05	9.48E-05	3.68E-10	121.9
mAb22805	394 ± 1	150	5.96E+04	2.02E-04	3.39E-09	57.2
mAb22809	402 ± 0.9	99	5.34E+04	2.29E-04	4.29E-09	50.5
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	399 ± 0.7	135	5.30E+04	2.93E-04	5.53E-09	39.4
mAb25491	286 ± 0.7	146	6.89E+04	1.10E-04	1.60E-09	105.0
mAb25497	330 ± 0.5	100	5.74E+04	1.66E-04	2.90E-09	69.5
mAb25498	369 ± 0	113	5.21E+04	4.64E-04	8.91E-09	24.9
mAb25502	388 ± 1.5	139	8.52E+04	4.81E-04	5.65E-09	24.0
mAb25508	344 ± 0.3	266	4.23E+05	1.50E-04	3.54E-10	77.1
mAb25545	402 ± 0.7	82	3.71E+04	7.77E-05	2.09E-09	148.6
IgG4 同种型对照	351 ± 0.5	9	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0296] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0297] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0298] #表示未测试条件

[0299] 表21:在25℃下mNPR1-mFc与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0300]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	350 ± 0.5	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22035	346 ± 0.8	-1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22805	330 ± 0.5	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22809	328 ± 0.7	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	325 ± 0.3	-1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25491	250 ± 1.1	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25497	292 ± 0.7	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25498	313 ± 1	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25502	321 ± 1.1	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25508	275 ± 0.7	-1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25545	340 ± 0.2	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
IgG4 同种型对照	296 ± 0.6	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0301] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0302] #表示未测试条件

[0303] #表示未测试条件

[0304] 表22:在37℃下mNPR1-mFc与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0305]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	413 ± 0.4	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22035	444 ± 0.5	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22805	400 ± 0.2	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22809	407 ± 1	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	406 ± 0.3	2	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25491	291 ± 0.9	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25497	336 ± 0.7	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25498	375 ± 1	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25502	391 ± 0.6	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25508	347 ± 0.4	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25545	407 ± 0.7	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
IgG4 同种型对照	359 ± 0.6	2	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0306] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0307] #表示未测试条件

[0308] 表23: 在25℃下mNPR1-mFc:hANP复合物与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0309]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	348 ± 0.4	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22035	345 ± 0.4	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22805	330 ± 1.1	18	1.98E+05	8.39E-02	4.24E-07	0.14
mAb22809	326 ± 0.4	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	324 ± 0.8	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25491	249 ± 0.9	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25497	290 ± 0.5	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25498	311 ± 0.9	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25502	317 ± 2.4	25	2.37E+05	7.99E-02	3.37E-07	0.14
mAb25508	274 ± 0.8	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25545	339 ± 0.3	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
IgG4 同种型对照	295 ± 0.8	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0310] ^{\$}表示在当前实验条件下观察到无结合

[0311] #表示未测试条件

[0312] 表24: 在37℃下mNPR1-mFc:hANP复合物与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0313]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	402 ± 1.8	2	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22035	435 ± 0.8	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22805	392 ± 1	15	IC*	IC*	IC*	IC*
mAb22809	400 ± 0.7	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	397 ± 1.2	2	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25491	284 ± 0.7	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25497	328 ± 0.8	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25498	367 ± 0.4	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25502	386 ± 2.1	35	2.64E+05	8.83E-02	3.34E-07	0.13
mAb25508	343 ± 1.1	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25545	401 ± 0.8	3	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
IgG4 同种型对照	349 ± 0.5	2	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0314] ^{\$}表示在当前实验条件下观察到无结合

[0315] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0316] #表示未测试条件

[0317] 表25: 在25℃下mNPR1-mFc:hBNP复合物与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0318]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	347 ± 1.1	5	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22035	345 ± 0.8	0	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22805	329 ± 0.9	21	1.53E+05	6.82E-02	4.45E-07	0.17
mAb22809	326 ± 1.1	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	325 ± 0.2	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25491	249 ± 0.4	5	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25497	291 ± 0.2	2	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25498	312 ± 0.8	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25502	318 ± 0.3	25	2.34E+05	5.03E-02	2.15E-07	0.23
mAb25508	274 ± 0.6	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25545	339 ± 0.4	3	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
IgG4 同种型对照	296 ± 0.6	2	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0319] \$表示在当前实验条件下观察到无结合。

[0320] #表示未测试条件

[0321] 表26:在37℃下mNPR1-mFc:hBNP复合物与NPR1单克隆抗体结合的结合动力学参数

[0322]

mAb 捕获的	mAb 捕获水平(RU)	100nM Ag 结合的(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
mAb22033	401 ± 0.2	4	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22035	433 ± 0.5	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22805	389 ± 0.8	17	IC*	IC*	IC*	IC*
mAb22809	397 ± 1.3	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb22810	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]	NT [#]
mAb25479	397 ± 0.9	2	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25491	282 ± 0.9	4	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25497	327 ± 0.5	2	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25498	366 ± 0.6	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25502	384 ± 1.3	34	2.91E+05	9.98E-02	3.42E-07	0.12
mAb25508	342 ± 0.9	1	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
mAb25545	400 ± 0.4	4	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}
IgG4 同种型对照	348 ± 0.7	3	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}	NB ^{\$}

[0323] \$表示在当前实验条件下观察到无结合

[0324] *表示观察到的结合数据是非结论性的

[0325] #表示未测试条件

[0326] 如表3至6所示,选择的抗NPR1抗体与人和猴NPR1单体结合。

[0327] 如表9至20所示,在存在和不存在ANP或BNP的情况下,抗体均与人和猴NPR1二聚体结合。

[0328] 除了mAb25502在ANP/BNP存在下与mNPR1结合之外,其余抗体不与小鼠NPR1结合(表21至26)。

[0329] 实施例4:选择的抗NPR1激动剂单克隆抗体之间的交叉竞争

[0330] 实验程序

[0331] 在Octet HTX生物传感器平台(Pall ForteBio Corp.)上,使用实时、无标记的生物膜层干涉测定法,确定一组抗NPR1单克隆抗体之间的结合竞争。整个实验在25℃在10mM HEPES,150mM NaCl,3mM EDTA和0.05%v/v表面活性剂Tween-20、1mg/mL BSA,pH7.4(HBS-EBT)缓冲液中进行,其中以1000rpm速度进行平板振荡。为了评估2种抗体是否能够相互竞争结合各自的表位,首先将100nM表达带有C末端小鼠IgG2a的重组人NPR1(hNPR1-mFc;SEQ ID:453)与2μM人ANP孵育至少2小时。首先通过浸蘸抗小鼠Fc抗体包被的Octet生物传感器头(Fortebio Inc,#18-5090)来捕获大约0.3-0.5nM的重组hNPR1-mFc/hANP复合物,方法是将生物传感器头浸入含有hNPR1-mFc/hANP复合物的孔中45秒。然后,将生物传感器头浸入含有50μg/mL mAb-1溶液的孔中5分钟,以第一抗NPR1单克隆抗体(称为mAb-1)饱和捕获了抗原的生物传感器头。然后将生物传感器头浸入含有50μg/mL第二抗NPR1单克隆抗体(称为mAb-2)溶液的孔中3分钟。在实验的每个步骤之间,将生物传感器头在HBS-EBT缓冲液中洗涤。在整个实验过程中监控实时结合反应,并记录每个步骤结束时的结合反应。比较了mAb-2与预先复合了mAb-1的hNPR1-mFc/hANP的结合反应,并确定了不同抗NPR1单克隆抗体的竞争/非竞争行为。

[0332] 结果

[0333] 表27:抗NPR1单克隆抗体之间的交叉竞争

[0334]

mAb-1	与 mAb-1 竞争的 mAb-2
mAb25498	mAb25508
mAb25508	mAb25498
mAb22809	mAb22810
	mAb22033
	mAb25491
	mAb25497
	mAb25502
	mAb25545
	mAb22805
	mAb25479

[0335]

mAb22033	mAb22809
	mAb25491
	mAb25497
	mAb25502
	mAb25545
	mAb22805
	mAb25479
	mAb22810
mAb25491	mAb22809
	mAb22033
	mAb25497
	mAb25502
	mAb25545
	mAb22805
	mAb25479
	mAb22810
mAb25497	mAb22809
	mAb22033
	mAb25491
	mAb25502
	mAb25545
	mAb22805
	mAb25479
	mAb22810
mAb25502	mAb22809
	mAb22033
	mAb25491
	mAb25497
	mAb25545
	mAb22805
	mAb25479
	mAb22810
mAb25545	mAb22809
	mAb22033
	mAb25491
	mAb25497
	mAb25502
	mAb22805
	mAb25479
	mAb22810
mAb22805	mAb22809
	mAb22033
	mAb25491

[0336]		mAb25497
		mAb25502
		mAb25545
		mAb22810
	mAb25479	mAb22809
		mAb22033
		mAb25491
		mAb25497
		mAb25502
		mAb25545
		mAb22810
	mAb22810	mAb22809
		mAb25445

[0337] 表27显示了选择的抗NPR1抗体之间的交叉竞争。

[0338] 实施例5:抗体与表达NPR1的细胞的结合

[0339] 实验程序

[0340] 使用基于电化学发光 (ECL) 的检测,确定了抗人 (h) NPR1单克隆抗体在配体之一人 ANP (hANP) 存在或不存在时结合表达人NPR1 (hNPR1) 的细胞的能力。

[0341] 简而言之,通过用编码人NPR1 (氨基酸M1-G1061,UniProtKB-P16066) 的新霉素抗性 pLVX.hNPR1.myc.DDK表达质粒转染人胚肾 (HEK) 293细胞,产生工程化HEK293/hNPR1.myc.DDK表达细胞。未转染的HEK293细胞通过使用商业a-hNRP1抗体的荧光激活细胞分选 (FACS) 无可检测的NPR1表达,所述未转染的细胞被包括作为非特异性结合对照。

[0342] 根据以下程序进行实验。将上述细胞系的细胞在不含 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的1xPBS缓冲液中冲洗一次,并在37°C下与无酶细胞解离液孵育10分钟,以从烧瓶分离细胞。所有细胞用含 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的1xPBS洗涤一次,并用Cellometer™ Auto T4细胞计数器 (Nexcelom Bioscience) 计数。将约 2.0×10^4 的HEK293/hNPR1.myc.DDK或HEK293细胞分别接种到96孔碳电极板上 (MULTI-ARRAY高结合板,Meso Scale Discovery (MSD, Rockville, MD)) 并在37°C孵育1小时 (h)。非特异性结合位点在室温 (RT) 下用含 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的1xPBS中的2% BSA (w/v) 封闭1h。将HEK293/hNPR1.myc.DDK细胞在有或没有10nM人ANP (Tocris, Minneapolis, MN) 的样品稀释缓冲液中于室温孵育0.5小时,并在相同条件下仅在样品稀释缓冲液中孵育HEK293细胞。不进行洗涤,将抗NPR1、COMP1或同种型对照抗体的系列稀释液 (范围从1.7pM到100nM) 或不含抗体的缓冲液添加到板结合的细胞中,RT持续1h。然后使用带有细胞洗涤头的AquaMax2000洗板机 (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA) 洗涤板,以除去未结合的抗体和/或hANP。用SULFO-TAG™缀合的山羊多克隆抗人IgG抗体 (对重链和轻链具有特异性) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), RT进行1小时,检测了板结合的抗体。

[0343] 洗涤后,根据制造商推荐的程序,用Read缓冲液 (MSD, Rockville, MD) 显影板,并用SECTOR Imager 600 (MSD, Rockville, MD) 记录发光信号。记录以相对光单位 (RLU) 测量的发光强度,以指示每种抗体在浓度范围的结合强度。报道与无hANP添加的情况下相同浓度的抗体与亲本细胞的结合相比,用3.7nM抗体在有或没有10nM hANP的情况下结合NPR1工程化细胞所检测到的信号的比值,以指示NPR1结合的特异性。结合比值大于或等于3的抗体被分

类为特异性结合物,结合比值小于3的抗体被分类为非结合物。

[0344] 另外,分析了直接结合信号(RLU)作为抗体浓度的函数,并且使用R统计软件包(开放源)将数据拟合S形(四参数对数)剂量反应模型。确定 EC_{50} 值,定义为检测到最大结合信号的50%的抗体浓度,以指示在有或无10nM hANP的情况下与NPR1工程化细胞的结合效力。表28中仅报告了特异性结合物的 EC_{50} 值,比值低于3的抗体标记为(-)。

[0345] 结果

[0346] 表28显示了选择的抗NPR1抗体与经工程改造表达人NPR1或NPR1-ANP复合物的细胞的结合。

[0347] 表28:抗NPR1抗体与经工程改造在细胞表面表达人NPR1或NPR1-ANP复合物的细胞的结合

Ab PID	在 3.7nM Ab 浓度与 HEK293/hNPR1.myc.DKK 相对于与亲本HEK293的细胞结合信号(RLU)的比值		与 HEK293/hNPR1.myc.DKK 的细胞结合效力, EC_{50} (M)	
	+ 10nM hANP	0 hANP	+ 10nM hANP	0 hANP
肽依赖性 NPR1 结合物				
mAb22809	166	2	4.8E-10	-
mAb22805	222	1	6.5E-10	-
mAb25545	79	1	1.9E-09	-
mAb22810	24	1	3.7E-09	-
mAb25502	14	1	INC	-
Comparator1	103	2	1.5E-10	-
肽非依赖性 NPR1 结合物				
mAb22033	236	207	8.2E-10	4.9E-10
mAb25497	87	50	8.7E-10	1.5E-09
mAb22035	220	151	8.9E-10	2.3E-09
mAb25491	78	58	1.0E-09	1.6E-09
mAb25479	51	30	1.2E-09	1.7E-09
mAb25508	35	18	1.3E-09	INC
mAb25498	49	41	1.8E-09	4.6E-09
hIgG4 同种型对照	1	1	-	-

[0349] (INC) = 非结合性的,用四参数S形曲线拟合以计算 EC_{50} 值时没有形成顶部平台,但抗体在有或无10nM hANP的情况下特异性结合至NPR1工程化细胞且比值等于或大于3

[0350] 如表28中的结果所示,在10nM hANP存在下所有抗NPR1抗体特异性结合至hNPR1工程化细胞,比值 ≥ 2 。这些抗体在具有10nM hANP的情况下在HEK293/hNPR1.myc.DDK细胞上的结合效力 EC_{50} 值从0.15nM到3.7nM。五种抗体和比较物1仅在10nM hANP存在下特异性结合NPR1工程化细胞,被归类为肽依赖性NPR1结合物。其他七种抗体在有和没有10nM hANP时均与hNPR1工程化细胞结合,这些抗体被归类为肽非依赖性NPR1结合物。这些抗体在不添加hANP的HEK293/hNPR1.myc.DDK细胞上的效力 EC_{50} 值范围为0.49nM至4.6nM。

[0351] 实施例6:激动剂抗NPR1单克隆抗体对NPR1的激活

[0352] 实验程序

[0353] 为了评估人利尿钠肽受体1(hNPR1)的转录激活,通过在HEK293中稳定表达环核苷

酸门控通道 $\alpha 2$ (CNGA2) 和hNPR1,开发了稳定的细胞系。CNGA2是可以被cGMP激活的钙通道,因此,可以用作cGMP生成的传感器(Wunder等,2005,PMID:15776616)。由于NPR1被配体激活并产生cGMP(Zois等人,2014,PMID:24820868),由此CNGA2被激活,并可以使用荧光 Ca^{++} 指示剂测量钙通量。分选高表达hNPR1的细胞系,HEK293/hNPR1.MycDDK/CNGA2.Myc HS或缩写为HEK293/CNGA2/hNPR1,并在含有10%FBS,NEAA,pen/strep/glut,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素和500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418硫酸盐的DMEM中保持。

[0354] 进行生物测定以测量在没有ANP的情况下抗hNPR1抗体对人NPR1信号传导的作用。为了进行生物测定,在黑色透明底部PDL板中,将HEK293/CNGA2/hNPR1细胞以30,000个细胞/孔接种在包含10%FBS,NEAA,pen/strep/glut的DMEM中,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 和5% CO_2 下孵育过夜。第二天早晨,除去培养基,并向细胞中加入80 μl 带有丙磺舒(Thermo Scientific)的FLU04-NW分析缓冲液,在37 $^{\circ}\text{C}$ 持续30分钟。将纯化的hNPR1抗体或同种型对照抗体以1:3从 $\sim 0.4\text{nM}$ 至1 μM (8个点) 系列稀释或ANP以1:3从0.3pM至2nM (10个点) 系列稀释,使用FLIPRTETRA[®] (Molecular Devices) 转移至测定板。捕获了基线和响应图像。根据最大-最小或曲线下面积确定剂量响应曲线(如下所示),并使用Prism[™]6软件(GraphPad)使用非线性回归(4参数logistics)分析结果,以获得 EC_{50} 值。用抗体达到的RFU的最大范围相对于ANP达到的RFU的最大范围,来计算抗体的激活%。

[0355] 结果

[0356] 表29显示了抗NPR1抗体对人NPR1的激活

[0357] 表29:抗NPR1抗体对人NPR1的激活

[0358]

	Expt I		Expt II	
细胞	293/CNGA2/hNPR1		293/CNGA2/hNPR1	
模式	激活		激活	
配体	ANP		ANP	
EC ₅₀ (pM)	60.5-98.8		78.8	
常量(Constant)	无		无	
抗体	EC ₅₀ (nM)	% 激活 (vs ANP max)	EC ₅₀ (nM)	% 激活 (vs. ANP max)
mAb22033	83.7	129.54	41.6	129.20%
mAb22810	未测	未测	50.8	125.50%
mAb25545	187.9	123.14%	74.1	122.70%
mAb25502	161.4	92.90%	>200	109.80%
mAb22805	239	91.61%	112.3	118.90%
mAb22809	270	86.72%	未测	未测
mAb25491	101.8	74.64%	43.4	103.70%
mAb22035	383.9	73.07%	>200	56.80%
mAb25497	72.62	71.09%	56.4	103.40%
mAb25498	335.3	67.74%	未测	未测
mAb25479	174.3	66.73%	101.9	82.80%
mAb25508	325.7	56.08%	未测	未测
比较物 1	>2000	53.45%	无激活	13.80%
同种型对照	无激活	-6.03%	无激活	1.90%

[0359] 在两个实验中,通过在HEK293/CNGA2/hNPR1中测量钙通量活性,测试了本发明的所选抗NPR1抗体对hNPR1的激活(Expt I和II)(表29)。如表29所示(在Expt I中),11种纯化的NPR1抗体在Ca²⁺通量上显示出激活,最大激活范围为55-130%,EC₅₀为83.7-383.9nM。19种抗体显示弱激活,最大激活小于31%(数据未显示)。在Expt II中,有9种抗NPR1抗体在Ca²⁺通量上显示激活,最大激活范围为57-129%,EC₅₀为41.6->200nM(表29)。ANP激活的EC₅₀为60.5-98.8pM。用对照hIgG4同种型抗体未观察到激活。

[0360] 实施例7:单剂量激动剂抗NPR1单克隆抗体对血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠的体循环血压的影响

[0361] 实验程序

[0362] 这项研究的目的是评估遥测血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠中所选NPR1激动剂抗体对基线体循环血压的影响。向约10-20周龄的雄性NPR1^{hu/hu}(n=50)小鼠植入PA-C10遥测仪(DSI, St. Paul, MN),使其恢复7天,然后分组(第1组-第12组)(表30)。

[0363] 表30:剂量和剂量组的总结

[0364]

组号	测试或对照物	剂量水平 (mg/kg/剂)	剂量体积 (mL/kg)	动物数量
				雄性
1	PBS control	25	5	9
3	mAb22035			5
4	mAb22033			4
5	mAb25497			3
6	mAb22805			4
7	mAb25545			3
8	mAb22809			5
9	mAb25479			4
10	mAb25491			4
11	mAb25502			5
12	mAb22810			4

[0365] 在标准条件下(温度为64°F至84°F(18°C至29°C);相对湿度为30%至70%)对动物进行单独笼养,保持12小时光照/12小时黑暗周期。自由获取食物(Research Diets Standard pellet chow)和水。

[0366] 在第0天通过单次皮下注射将测试蛋白或磷酸盐缓冲盐水(PBS)施用于适当的动物。每只动物的剂量体积基于最近的体重测量。

[0367] 在测试期的持续时间中,每分钟收集收缩压、舒张压、平均动脉压和心率10秒。使用研究第3天至研究第7天收集的数据,对功效进行了急性评估。NPR1激动剂抗体的长期作用通过收集的每天24小时数据进行评估,并在28天内取平均值。所有数据均以平均值±SEM表示。

[0368] 结果

[0369] NPR1激动剂抗体的初始体内筛选表明,当给药后从第3天至第7天与PBS给药的对照动物相比时,有9种抗体(mAb22033,mAb25479,mAb25497,mAb22805,mAb25545,mAb22809,mAb25491,mAb25502和mAb22810)显著降低体循环血压,而1种抗体(mAb22035)对体循环血压无影响(图1)。通过平均(给药后第3天至第7天)收缩压自基线的变化,评估了血压降低幅度,为 -3.2 ± 0.2 (mAb25497N) 到 -11.5 ± 0.8 (mAb22810) mmHg。

[0370] 在28天内评估了NPR1激动剂抗体的长期作用(表31)。

[0371] 表31:28天的平均血压和心率

剂量组	收缩压 (mmHg)	舒张压 (mmHg)	平均动脉 (mmHg)	心率 (BPM)
[0372] PBS 对照	0.08±0.09	1.09±0.25	1.19±0.27	11.79±3.17
mAb25545	-4.34±0.18*	0.13±0.38*	-2.0±0.46*	5.35±3.13*
mAb22805	-3.90±0.17*	-1.51±0.30*	-3.40±0.40*	18.83±2.73*

[0373]	mAb25497	-3.04±0.20*	2.37±0.36*	1.04±0.44	12.07±2.64*
	mAb22035	3.80±0.32*	2.05±0.22*	2.95±0.26*	2.86±2.33*
	mAb22033	-11.07±0.59*	-4.55±0.38*	-8.01±0.48*	-2.14±2.83*
	mAb22810	-7.88±0.57*	-2.24±0.31*	-5.21±0.42*	-6.10±2.96*
	mAb25502	-3.63±0.49*	-0.41±0.40*	-2.13±0.44*	-14.27±2.87*
	mAb22809	-2.01±0.58*	2.95±0.70*	0.30±0.62	3.95±2.33*
	mAb25491	-4.90±0.35*	-1.22±0.26*	-3.19±0.30*	-12.9±3.22*
	mAb25479	-3.44±0.50*	0.51±0.42*	-1.60±0.44*	-4.01±3.03*

[0374] 遥测血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠根据体重随机分组。如表1所述,给动物单次皮下注射25mg/kg的NPR1激动剂mAb或PBS对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=3-9。统计学——双因素ANOVA和Dunnett's; *p<.05vs. PBS对照

[0375] 在第0天单次皮下注射后,在血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠中,一种抗体(mAb22035)使压力显著增加~4-7 mmHg,而其余抗体则使体循环血压降低2至11mmHg。心率对体循环血压升高和降低的反应是可变的,其中一些组增加而其他组下降。

[0376] 实施例8:正常血压NPR1^{hu/hu}小鼠中激动剂抗NPR1单克隆抗体对体循环血压的剂量效应实验程序

[0377] 本研究的目的是评估遥测血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠中NPR1激动剂抗体mAb22033对体循环血压的剂量反应。给约20周龄的雄性NPR1^{hu/hu}(n=30)小鼠植入PA-C10遥测仪(DSI, St. Paul, MN),使其恢复7天,然后分组(1-5组)(表32)。

[0378] 表32:剂量和剂量组的总结

组号	测试或对照物	剂量水平 (mg/kg/剂)	剂量体积 (mL/kg)	动物数
				雄性
1	IgG4 同种型对照	25	5	6
2	mAb22033	1	5	7
3	mAb22033	5	5	6
4	mAb22033	25	5	7
5	mAb22033	50	5	7

[0380] 动物在标准条件下(64°F至84°F(18°C至29°C)的温度;相对湿度30%至70%)分别单独笼养,保持12小时光照/12小时黑暗周期。随意获取食物(Research Diets Standard pellet chow)和水。

[0381] 在第0天通过皮下注射将测试蛋白向合适的动物施用一次。每只动物的剂量体积基于最近的体重测量。为了评估尿液和血清生物标志物,在第28天收集尿液,在研究第14天和终止时收集血样。利尿前第28天进行超声心动图检查。

[0382] 在测试期的持续时间内,每分钟收集收缩压、舒张压、平均动脉压和心率10秒。在研究的活体部分(in-life portion)的持续期,从具有存活信号的动物获得图形显示的遥测数据。

[0383] 结果

[0384] 在向血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠给予单剂mAb22033后,血压(图2、3和5)降低了10-15mmHg,持续长达4周。所有剂量的峰值血压降低相似,血压效应的持续时间在1mg/kg时约

为10天,而在50mg/kg时超过28天。

[0385] 表33:28天的平均血压和心率

剂量组:	收缩压 (mmHg)	舒张压 (mmHg)	平均动脉压 (mmHg)	心率 (BPM)
IgG4 同种型对照 (25 mg/kg)	126±0.3	97.0±0.3	112.2±0.3	524.9±3.2
mAb22033 (1 mg/kg)	124.4±0.5	95.1±0.4	110.4±0.4	530.6±4.0
mAb22033 (5 mg/kg)	120.0±0.4****	93.8±0.3**	107.6±0.3****	543.4±4.0****
mAb22033 (25 mg/kg)	119.7±0.5****	93.7±0.4*	107.1±0.4****	524.5±3.4
mAb22033 (50 mg/kg)	118.5±0.5****	94.2±0.3*	106.8±0.3****	553.6±3.5****

[0387] 将遥测的血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为体重相等的五组,并按表1所列剂量单次皮下注射mAb22033。将IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=6-7。统计——双因素ANOVA和Dunnett's; *p<.05vs. IgG4同种型对照, **p<.01vs. IgG4同种型对照; ***p<.001vs. IgG4同种型对照; ****p<.0001vs. IgG4同种型对照

[0388] 在第28天,在50mg/kg组中尿cGMP浓度(表34)显著增加,所有其他剂量与对照具有相似水平。

[0389] 表34:尿液和血清标志物

剂量组:	尿液体积 (mL/天)	尿液 cGMP (mmol/天)	血清 NTproANP (nmol/L) - 第 14 天	血清 NTproANP (nmol/L) - 第 29 天
IgG4 同种型对照 (25 mg/kg)	1.4±0.2	5.0±1.3	0.21±0.06	0.49±0.17
mAb22033 (1 mg/kg)	1.2±0.2	5.2±1.3	0.35±0.11	0.52±0.12
mAb22033 (5 mg/kg)	0.9±0.1	3.7±0.8	0.20±0.08	0.20±0.05
mAb22033 (25 mg/kg)	1.2±0.2	5.9±0.8	0.14±0.06	0.24±0.06
mAb22033 (50 mg/kg)	1.4±0.2	11.9±2.1**	0.26±0.08	0.56±0.20

[0391] 将遥测的血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为体重相等的五组,并按表1所列剂量单次皮下注射mAb22033。将IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=6-7。统计——单因素ANOVA和Dunnett's; **p<.01vs. IgG4同种型对照

[0392] 在50mg/kg组中相对心脏重量(表35)较低,在1、5和25mg/kg组中具有降低趋势。对体重(表35)、绝对心脏重量(表35)、标准血清(ALT, AMYLAS, AST, CHOL, CKNAC, CREA, DHD, IP, TRIG, TP, UA, UN, MG, NEFA)或尿液(ALB, GLUH, CREA, PRO, CA, IP, MG, UN, AMYLAS, UA, NA, K, CL)化学未观察到显著影响

[0393] 表35:终点体重和器官重量

[0394]

剂量组:	终点体重 (g)	心脏重量 (mg)	心脏重量:Tibia 长度	心脏重量:体重
IgG4 同种型对照 (25 mg/kg)	33.1±1.7	0.143±0.003	0.0079±0.0002	0.0043±0.0001
mAb22033 (1 mg/kg)	34.5±2.3	0.140±0.005	0.0078±0.0002	0.0041±0.0001
mAb22033 (5 mg/kg)	34.3±1.4	0.131±0.006	0.0075±0.0004	0.0039±0.0003
mAb22033 (25 mg/kg)	32.4±1.4	0.126±0.006	0.0071±0.0003	0.0039±0.0002
mAb22033 (50 mg/kg)	34.3±2.1	0.124±0.004	0.0069±0.0002	0.0037±0.0002*

[0395] 将遥测的血压正常的NPR1^{hu/hu}小鼠随机分为体重相等的五组,并按表1所列剂量单次皮下注射mAb22033。将IgG4抗体用作同种型对照。所有值均为平均值±SEM,每组n=6-7。统计——单因素ANOVA和Dunnett's;*p<.05vs.IgG4同种型对照

[0396] 施用mAb22033后,心肌功能增强(图6和7A),在25mg/kg剂量组中观察到收缩末期容积的统计学显著降低(图7A),并且缩短分数(图7C)和射血分数(图7B)趋于增加,在25和50mg/kg组中最明显。

[0397] 关键的发现是,NPR1激动剂mAb,mAb22033,产生了持续长达28天的收缩压和平均动脉血压的显著降低。最初在所有组中观察到心率的补偿性增加,其中与同种型对照mAb相比,50mg/kg mAb22033剂量组中持续的轻微增加。

[0398] 实施例9:单剂量激动剂抗NPR1单克隆抗体对高血压NPR1^{hu/hu}小鼠的体循环血压的影响实验程序

[0399] 这项研究的目的是评估单剂量的NPR1激动剂抗体(mAb22033或mAb22810)对遥测血管紧张素II-(Ang II)诱导的高血压NPR1^{hu/hu}小鼠的体循环血压的影响。给约13周龄的雄性NPR1^{hu/hu}(n=36)小鼠植入PA-C10遥测仪(DSI,St.Paul,MN),使其恢复7天,然后分组(第1-6组)(表36)。

[0400] 表36:剂量和剂量组的总结

[0401]

组号	测试或对照物	剂量水平 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	动物数 雄性
1	IgG4 同种型对照	25	5	5
2	mAb22033	1	5	4
3	mAb22033	5	5	5
4	mAb22033	25	5	6
5	mAb22810	5	5	5
6	mAb22810	19	5	6

[0402] 然后给动物植入微型渗透泵(Alzet Micro-Osmotic Pump;型号1004;批号10335-14)。微型泵中装有血管紧张素II乙酸盐(Bachem;批号1066804),并设定为平均泵送速度为0.11μL/小时,以递送1.5mg/kg/天的Ang II。在开始给药前3天,将微型泵皮下植入肩胛骨区域。动物在标准条件下(温度为64°F至84°F(18°C至29°C);相对湿度为30%至70%)单独笼养,并保持12小时光照/12小时黑暗周期。随意获取食物(Research Diets Standard pellet chow)和水。

[0403] 在第3天通过皮下注射将测试蛋白皮下施用于适当的动物一次。每只动物的剂量

体积基于最近的体重测量。

[0404] 在测试期的持续时间中,每分钟收集收缩压、舒张压、平均动脉压和心率10秒。在第14和20天收集尿液。

[0405] 结果

[0406] 当向血管紧张素II诱导的高血压NPR1^{hu/hu}小鼠给药时,单剂量的NPR1激动剂mAb (mAb22033或mAb22810)显著地降低了体循环血压(图8、9和11)。与IgG4同种型对照相比,接受mAb22033或mAb22810的动物的平均23天血压(表37)均显著降低。

[0407] 表37:23天平均血压和心率

剂量组:	收缩压 (mmHg)	舒张压 (mmHg)	平均动脉压 (mmHg)	心率 (BPM)
IgG4 同种型对照 (25 mg/kg)	176±2	147±2	155±2	507±4
[0408] mAb22033 (1 mg/kg)	163±2****	134±2****	147±2	541±4****
mAb22033 (5 mg/kg)	153±2****	120±1****	132±4****	547±7****
mAb22033 (25 mg/kg)	149±2****	121±1****	131±4****	544±7****
mAb22810 (5 mg/kg)	162±2****	128±2****	145±2*	532±5**
mAb22810 (19 mg/kg)	159±2****	127±2****	139±3***	532±4**

[0409] 所有值均为平均值±SEM,每组n=3-6。统计——双因素ANOVA和Dunnett's; *p<.05vs. IgG4同种型对照, **p<.01vs. IgG4同种型对照; ***p<.001vs. IgG4同种型对照; ****p<.0001vs. IgG4同种型对照

[0410] 表38:尿液和血清生物标志物

剂量组:	尿液体积 (mL/天) – 第14天	尿液 cGMP (mmol/天) – 第14天	尿液体积 (mL/天) – 第20天	尿液 cGMP (mmol/天) – 第20天	血 浆 NTproANP (nmol/L) – 第20天
[0411] IgG4 同种型对照 (25 mg/kg)	2.2±0.7	8.7±2.5	5.2±0.9	13.9±3.1	0.7±0.1
mAb22033 (1 mg/kg)	3.0±0.7	13.8±2.3	6.6±0.6	23.4±2.8	0.8±0.2
mAb22033 (5 mg/kg)	1.3±0.5	11.0±3.2	3.9±0.3	20.8±0.8	1.0±0.3
mAb22033 (25 mg/kg)	2.1±0.3	23.5±5.3*	5.6±0.8	44.9±7.8***	1.5±0.2
mAb22810 (5 mg/kg)	1.5±0.4	8.3±2.0	4.1±0.8	19.2±5.3	1.3±0.4
mAb22810 (19 mg/kg)	2.3±0.3	13.6±1.8	4.9±0.7	18.8±1.9	1.0±0.2

[0412] 所有值均为平均值±SEM,每组n=3-6。统计——单因素ANOVA和Dunnett's; *p<.05vs. IgG4同种型对照, ***p<.001vs. IgG4同种型对照

[0413] 表39:终点体重和器官重量

[0414]	剂量组:	终点体重 (g)	心脏重量 (mg)	心脏重量:Tibia 长度	心脏重量:体重
	IgG4 同种型对照 (25 mg/kg)	29±1	0.166±0.011	0.0093±0.0006	0.0057±0.0003
	mAb22033 (1 mg/kg)	32±1	0.168±0.005	0.0094±0.0004	0.0053±0.0003
	mAb22033 (5 mg/kg)	29±2	0.149±0.017	0.0085±0.0009	0.0051±0.0005
	mAb22033 (25 mg/kg)	32±1	0.162±0.008	0.0090±0.0004	0.0051±0.0002
	mAb22810 (5 mg/kg)	30±1	0.150±0.004	0.0084±0.0002	0.0050±0.0001
	mAb22810 (19 mg/kg)	30±1	0.146±0.015	0.0082±0.0008	0.0049±0.0003

[0415] 所有值均为平均值±SEM, 每组n=3-6。统计——双因素ANOVA和Dunnett's

[0416] 心率效应(图10)急性显著增加, 长期更为适度的增加。与同种型对照动物相比, 在所有接受测试物施用的组中, 平均23天心率(表37)显著更高。在大多数施用mAb22033或mAb22810的组中, 尿cGMP水平趋于更高, 其中与IgG同种型对照动物相比, 在25mg/kg mAb22033中的动物在第14天和第20天具有显著增加的尿cGMP水平(表38)。没有观察到对体重或绝对或相对器官重量的影响(表39)。

[0417] 实施例10: 重复剂量的激动剂抗NPR1单克隆抗体对高血压NPR1^{hu/hu}小鼠的体循环血压的影响

[0418] 实验程序

[0419] 这项研究的目的是评估NPR1激动剂抗体mAb22033的重复给药对遥测血管紧张素II-(Ang II)诱导的高血压NPR1^{hu/hu}小鼠的体循环血压的影响。给约26周龄的雄性NPR1^{hu/hu}(n=30)小鼠植入PA-C10遥测仪(DSI, St. Paul, MN), 使其恢复7天, 然后再分组(第1-5组)。(表40)。

[0420] 表40: 剂量和剂量组的总结

组号	测试或对照物	剂量水平 (mg/kg/剂)	剂量体积 (mL/kg)	动物数
				雄性
1	IgG4 同种型对照	25	5	6
2	mAb22033	1	5	6
3	mAb22033	5	5	6
4	mAb22033	25	5	6
5	mAb22033	50*	5	6

[0422] *单剂量

[0423] 然后给动物植入渗透微型泵(Alzet Micro-Osmotic Pump; 型号1004; 批号10335-14)。微型泵中装有血管紧张素II乙酸盐(Bachem; 批号1066804), 并设定为平均泵送速度为0.11μL/小时, 以递送1.5mg/kg/天的Ang II。在开始给药前7天, 将微型泵皮下植入肩胛骨区域。动物在标准条件下(温度为64°F至84°F(18°C至29°C); 相对湿度为30%至70%)单独笼养, 并保持12小时光照/12小时黑暗周期。随意获取食物(Research Diets Standard pellet chow)和水。

[0424] 根据收缩压将动物分层。从第6天开始, 通过皮下注射, 将测试蛋白以第0天一次(第5组)或每周两次连续3周(第1-4组)施用于合适的动物。每只动物的剂量体积基于最近

的体重测量。

[0425] 在测试期的持续时间内,每分钟收集收缩压、舒张压、平均动脉压和心率10秒。结果

[0426] 在血管紧张素II诱导的高血压NPR1^{hu/hu}小鼠中,单个或重复剂量的NPR1激动剂mAb mAb22033使体循环血压(图12、13和15)降回至接近正常血压水平。1、5或25mg/kg mAb22033的重复剂量以剂量依赖方式降低收缩压,在每周两次给药的三周后,相对于各组的基线,峰值分别降低了11、19和39mmHg。到第7天,单剂量50mg/kg使收缩压降低31mmHg,此后逐渐恢复至较高血压的水平。与IgG4同种型对照相比,接受单个或重复剂量mAb22033的动物的平均21天血压(表41)均显著较低。

[0427] 表41:21天的平均血压和心率

剂量组:	收缩压 (mmHg)	舒张压 (mmHg)	平均动脉血压 (mmHg)	心率 (BPM)
IgG4 同种型对照 (25 mg/kg)	173.4±1.3	138.6±0.7	154.9±1.2	538.2±1.8
[0428] mAb22033 (1 mg/kg)	163.0±1.2**	132.9±1.0	146.8±1.0**	532.5±3.2
mAb22033 (5 mg/kg)	151.9±0.9****	124.7±0.7****	137.8±0.8****	524.8±3.5**
mAb22033 (25 mg/kg)	149.1±2.2****	127.0±2.0***	137.1±2.0****	511.3±2.9****
mAb22033 (50 mg/kg)* 单个剂量*	156.2±1.4****	135.0±1.7	144.9±1.5****	552.4±3.1**

[0429] 所有值均为平均值±SEM,每组n=3-6。统计——双因素ANOVA和Dunnett's; **p<.01vs. IgG4同种型对照; ***p<.001vs. IgG4同种型对照; ****p<.0001vs. IgG4同种型对照

[0430] 表42:终点体重和器官的重量

剂量组:	终点体重 (g)	心脏重量 (mg)	心脏重量:Tibia 长度	心脏重量:体重
IgG4 同种型对照 (25 mg/kg)	30.9±1.5	0.165±0.006	0.0091±0.00032	0.0054±0.0002
[0431] mAb22033 (1 mg/kg)	31.1±1.1	0.151±0.007	0.0084±0.00043	0.0049±0.0002
mAb22033 (5 mg/kg)	29.6±1.0	0.149±0.004	0.0082±0.00020	0.0050±0.0001
mAb22033 (25 mg/kg)	32.4±1.9	0.165±0.012	0.009±0.00067	0.0051±0.0003
mAb22033 (50 mg/kg)* 单个剂量*	31.0±1.3	0.153±0.006	0.0085±0.00034	0.0050±0.0003

[0432] 所有值均为平均值±SEM,每组n=3-6。统计——双因素ANOVA和Dunnett's

[0433] 表43:尿液和血清标志物

[0434]	剂量组:	尿液体积 (mL/天)	尿液 cGMP (mmol/天)	血清 NTproANP (nmol/L) – 第 20 天	血清 NTproANP (nmol/L) – 第 29 天
	IgG4 同种型对照 (25 mg/kg)	2.74±0.74	30.5±6.3	0.58±0.05	0.57±0.09
	mAb22033 (1 mg/kg)	3.08±0.51	61.6±20.4	0.75±0.03	0.51±0.05
	mAb22033 (5 mg/kg)	2.48±0.68	36.6±10.4	0.45±.013	0.36±0.08
	mAb22033 (25 mg/kg)	3.2±0.80	*106.3±25.4*	0.59±0.13	0.63±0.14
	mAb22033 (50 mg/kg)*单个 剂量*	3.27±0.89	52.8±21.5	0.56±0.18	1.27±0.43

[0435] 所有值均为平均值±SEM, 每组n=3-6。统计——单因素ANOVA和Dunnett's; *p<0.05vs. IgG4同种型对照

[0436] 分析了mAb22033的急性效应, 在第一剂量的24小时内血压降低了10-20mmHg。心率效应(图14)是可变的, 在21天的给药期间观察到较高和较低的值。在5和25mg/kg重复剂量组中, 平均21天心率(表41)显著较低, 而在单个50mg/kg剂量组中, 平均21天心率趋于较高。在25mg/kg重复剂量组中尿cGMP水平显著增加, 与IgG4同种型对照mAb给药的动物相比, 所有其他组均显示趋势性的、非统计学显著的增加(表43)。未观察到对体重、绝对或相对器官重量、标准血清或尿液化学或心脏功能的影响(表42和图16-17)。

[0437] 实施例11: 抗NPR1激动剂抗体对膳食诱导的肥胖(DIO)小鼠的体重、代谢率和葡萄糖稳态的影响

[0438] 实验1

[0439] 在本实验中, 测试了膳食诱导的肥胖(DIO)小鼠中mAb22810 NPR1激动剂mAb对体重、代谢率和葡萄糖稳态的影响。

[0440] 将三十只雄性NPR1^{hu/hu}小鼠置于60%高脂膳食中10周, 然后随机分为三组(每组n=10): 同种型对照(人IgG4)抗体、NPR1激动剂抗体mAb22810或hFc.FGF21。FGF21是一种分子, 已被证明可改善肥胖小鼠模型的葡萄糖耐量, 增加能量消耗并降低体重(VéniantMM, Endocrinology, 2012, PMID: 22798348)。在此研究中, 将其作为阳性对照用于终点。每周一次(针对对照抗体和mAb22810)或每周两次(针对hFc.FGF21)通过皮下注射(S.C.)在盐水溶液中施用处理。表44列出了研究中的组, 动物数量和剂量。

[0441] 表44: 处理组的总结

组	处理	剂量	给药方案	小鼠
1	对照mAb	25mg/kg	1x/周, S.C.	10
2	mAb22810	25mg/kg	1x/周, S.C.	10
3	hFc.FGF21	3.2mg/kg	2x/周, S.C.	10

[0443] 在给药前以及此后每周两次记录个体体重。在研究的第二周, 将小鼠放入代谢笼中以评估能量消耗。在研究的第三周评估了口服葡萄糖耐量, 并在六周处理后通过EchoMRI测量了身体组成。

[0444] 图18A显示了在施用mAb22810 NPR1激动剂mAb, hFc.FGF21或同种型对照mAb之后的体重变化。图18B和图18C分别显示了通过EchoMRI测量的六周处理后的总脂肪和总瘦体

重。关键发现是,尽管在处理期间hFc.FGF21分子显著降低了体重和肥胖,但mAb22810 NPR1激动剂抗体却没有。

[0445] 图19A-C显示了,用mAb22810 NPR1激动剂mAb,hFc.FGF21或同种型对照mAb处理一周后 VO_2 (A), VCO_2 (B) 或能量消耗 (C) 的变化,分解为每个日/夜周期的平均值。关键发现是,尽管在处理期间hFc.FGF21分子在 VO_2 、 VCO_2 和能量消耗方面产生了显著增加,但mAb22810 NPR1激动剂抗体却没有。

[0446] 图20A显示了在用mAb22810 NPR1激动剂mAb,hFc.FGF21或同种型对照mAb处理两周后通过口服葡萄糖耐量试验 (2g/kg葡萄糖) 测量的葡萄糖耐量的变化。图20B显示了在A中研究开始时记录的过夜禁食后的葡萄糖水平。关键发现是mAb22810和hFc.FGF21分子在两周后均显著改善了葡萄糖耐量。此外,mAb22810对葡萄糖耐量的改善与体重或能量消耗的变化无关(如图18和19所示)。

[0447] 实验2

[0448] 本实验描述了mAb22033 NPR1激动剂mAb对膳食诱导的肥胖 (DIO) 小鼠的体重、代谢率和葡萄糖稳态的影响。

[0449] 将三十只雄性NPR1^{hu/hu}小鼠置于60%高脂膳食中10周,然后随机分为三组(每组n=10):同种型对照(人IgG4)抗体,NPR1激动剂抗体mAb22033或hFc.FGF21作为阳性对照。每周一次(对于对照抗体和mAb22033)或每周两次(对于hFc.FGF21)通过皮下注射(S.C.)在盐水溶媒中进行处理。表45列出了研究中的组,动物数量和剂量。

[0450] 表45:处理组的总结

组	处理	剂量	给药方案	小鼠
1	对照mAb	25mg/kg	1x/周,S.C.	10
2	mAb22033	25mg/kg	1x/周,S.C.	10
3	hFc.FGF21	3.2mg/kg	2x/周,S.C.	10

[0452] 在给药之前和此后每周两次记录个体体重。在研究的第二周,将小鼠放入代谢笼中以评估能量消耗。在研究的第四周内评估了口服葡萄糖耐量,并在六周的处理后通过EchoMRI测量了身体组成。

[0453] 图21A显示了在施用mAb22033 NPR1激动剂mAb,hFc.FGF21或同种型对照mAb后体重的变化。图21B和图21C分别显示了通过EchoMRI测量的六周处理后的总脂肪和总瘦体重。关键发现是,尽管在处理期间hFc.FGF21分子使体重和肥胖症明显减少,但mAb22033 NPR1激动剂抗体却没有。

[0454] 图22A-C显示了用mAb22033 NPR1激动剂mAb,hFc.FGF21或同种型对照mAb处理一周后 VO_2 (A), VCO_2 (B) 或能量消耗 (C) 的变化,分解为每个日/夜周期的平均值。关键发现是,尽管在处理期间hFc.FGF21分子在 VO_2 、 VCO_2 和能量消耗方面产生了显著增加,但mAb22033 NPR1激动剂抗体却没有。

[0455] 图23A显示了在用mAb22033 NPR1激动剂mAb,hFc.FGF21或同种型对照mAb处理4周后通过口服葡萄糖耐量试验 (2g/kg葡萄糖) 测量的葡萄糖耐量的变化。图23B显示了在A中研究开始时记录的过夜禁食后的葡萄糖水平。关键发现是mAb22033和hFc.FGF21分子在两周后均显著改善了葡萄糖耐量。此外,mAb22033对葡萄糖耐量的改善与体重或能量消耗的变化无关(如图21和22所示)。

[0456] 实施例12:HDX表位作图

[0457] 为了确定抗NPR1抗体识别的人NPR1的表位,分别对mAb22033和mAb22810进行了氢-氘交换(HDX)研究。先前的内部实验表明,NPR1与mAb22810的结合需要ANP肽存在。因此,除了使用NPR1/mAb22033复合物的常规HDX实验外,还对NPR1/ANP/mAb22033和NPR1/ANP/mAb22810复合物进行了HDX实验。

[0458] 对于本研究,根据制造商的方案,将抗NPR1抗体(mAb22033和mAb22810)共价连接至N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)琼脂糖珠(GE Lifescience,目录号17-0906-01)。CHO细胞表达的重组人NPR1蛋白包含具有C末端myc-myc-六组氨酸标签的人NPR1蛋白(Uniprot登录号#P16066)的胞外域(SEQ ID NO:194)。ANP肽购自TOCRIS(目录号1906)。

[0459] 在含有137mM NaCl,2.7mM KCl,8mM Na₂HPO₄,和2mM KH₂PO₄(pD=7.4)的D₂O中,制备氘化缓冲液(pD=7.4)。对于“抗原结合”(antigen-on)或“复合物结合”(complex-on)实验,将30μL抗体珠浆(相当于15μL珠)与hNPR1.mmh或hNPR1.mmh/ANP复合物混合。将混合物在室温温和旋转下温育。使用0.075%冰冷的TFA淬灭氘化反应以及将hNPR1.mmh从抗体珠中洗脱。立即将淬灭的样品注入Waters HDX Manager进行在线胃蛋白酶消化(Waters Enzymate BEH胃蛋白酶柱,2.1x30mm)。将消化的肽在0℃捕获到ACQUITY UPLC BEH C18 1.7μm,2.1x5mm VanGuard pre-column上,并通过使用1%-30%B(流动相A:在水中的0.1%甲酸,流动相B:在乙腈中的0.1%甲酸)的8分钟梯度分离,洗脱到ACQUITY UPLC BEH C18 1.7μm,2.1x50mm柱。质谱仪设置在37V的锥电压,0.5s的扫描时间和50-1700Th的质荷比范围。

[0460] 为了作图mAb22033识别的hNPR1.mmh结合表位,进行了两组H/D交换实验。第一实验使用“抗原结合”形式(仅抗原的HDX,然后与抗体珠结合)。对于“抗原结合”实验,将hNPR1.mmh在室温下在D₂O(PBS-D,pD=7.4)中制备的磷酸盐缓冲液中氘化3分钟和8分钟(在两个单独的子实验中)。随后将氘化的hNPR1.mmh添加到PBS-D洗涤过的mAb22033珠子中,在室温下孵育2分钟,从而使总氘化时间分别为5分钟和10分钟。然后使用冰冷的0.075%三氟乙酸水溶液(TFA)从小珠上洗脱结合的hNPR1.mmh。立即将洗脱的hNPR1.mmh注入Waters HDX操作系统中,以进行胃蛋白酶在线消化,然后进行消化肽质量测量。

[0461] 第二实验涉及“复合物结合”形式(复合的抗原/抗体珠的HDX)。对于该实验,首先hNPR1.mmh与常规PBS(pH=7.4)中的mAb22033珠结合2分钟。然后将复合物在PBS-D(pD=7.4)中孵育5或10分钟(在单独的子实验中)进行氘化。如前面的“抗原结合”程序中所述,执行以下步骤(洗脱,注射,胃蛋白酶消化和MS分析)。

[0462] 为了进行肽鉴定和氘摄取测量,首先处理来自未氘化的hNPR1.mmh的LC-MS^E数据,并通过Waters ProteinLynx Global Server(PLGS)软件在包括hNPR1.mmh的数据库中进行搜索。将鉴定出的肽导入DynamX软件并通过两个标准进行过滤:1)每个氨基酸的最低产物量:0.3,和2)复制文件阈值:2。然后DynamX软件能够基于跨两个时间点每个肽的保留时间和质量准确度(<30ppm)确定来自“抗原结合”和“复合物结合”的每个肽的氘吸收率。对所有鉴定出的肽进行检查和手动筛选,以最大程度减少假阳性结果。

[0463] 计算所有检测到的肽的质心值(centroid values)或平均质荷比(m/z),并在两个时间点上在“抗原结合”和“复合物结合”实验之间进行比较。与“复合物结合”的氘化相比,在“抗原结合”的氘化后显示出质量增加的肽包括由于抗体结合而被保护从而不发生氘交

换的氨基酸,并因此揭示了结合表位区。

[0464] 对于NPR1/mAb22033 HDX实验,从hNPR1.mmh鉴定出总共101个肽,代表74%的序列覆盖率。在这些肽中,10个肽覆盖跨29-50和328-347的氨基酸(列在表46中),与“复合物结合”氘化相比在“抗原结合”氘化后具有显著增加的质量。

[0465] 表46:通过胃蛋白酶消化肽的MH⁺值所测量的mAb22033与hNPR1.mmh的结合对H/D交换的影响

[0466]

NPR1- mmH 残 基	5 min 氘化			10 min 氘化		
	抗原结合	复合物结合	Δ	抗原结合	复合物结合	Δ
29-50	2426.346	2424.541	1.80	2426.649	2424.925	1.72
32-50	2128.200	2126.776	1.42	2128.488	2127.088	1.40
46-54	950.481	950.333	0.15	950.549	950.527	0.02
328-335	925.039	925.027	0.01	925.065	925.030	0.03
328-347	2084.447	2081.863	2.58	2084.306	2081.925	2.38
329-347	1921.240	1918.335	2.91	1921.305	1918.614	2.69
331-347	1679.173	1677.107	2.07	1679.106	1677.176	1.93
332-347	1607.797	1605.754	2.04	1607.799	1605.842	1.96
334-347	1407.379	1405.529	1.85	1407.335	1405.612	1.72
335-347	1278.196	1276.411	1.78	1278.225	1276.463	1.76

[0467]

336-347	1176.174	1174.913	1.26	1176.181	1174.926	1.26
337-347	1063.079	1061.760	1.32	1063.014	1061.745	1.27

[0468] 由于两个肽,氨基酸46-54和328-335,在“抗原结合”和“复合物结合”程序之间没有显示出氘摄取差异,因此在29-50和328-347肽中被保护而免于氘交换的区域被减少到残基29-45和336-347。因此,包括氨基酸29-45和336-347的两个片段被鉴定为抗体mAb22033与hNPR1.mmh蛋白结合的表位。

[0469] 对于NPR1/ANP/mAb22033 HDX实验,从hNPR1.mmh鉴定出总共95个肽,代表68%的序列覆盖率。在这些肽中,表47所列的九个肽覆盖跨29-50和331-347的氨基酸,与“复合物结合”氘化相比在“抗原结合”氘化后具有显著增加的质量。

[0470] 表47:通过胃蛋白酶消化肽的MH⁺值所测量的mAb22033与hNPR1.mmh/ANP的结合对H/D交换的影响

[0471]

NPR1- mmH 残基	5 min 氘化			10 min 氘化		
	抗原结合	复合物结合	Δ	抗原结合	复合物结合	Δ
29-50	2425.746	2424.277	1.47	2426.686	2425.079	1.61
32-50	2127.514	2126.429	1.08	2128.333	2127.126	1.21
35-50	1828.391	1827.331	1.06	1829.026	1827.974	1.05
46-54	950.149	950.080	0.07	950.312	950.323	-0.01
331-347	1679.030	1677.150	1.88	1679.016	1677.216	1.80
332-347	1607.700	1605.825	1.88	1607.738	1605.943	1.79
334-347	1407.282	1405.558	1.72	1407.271	1405.715	1.56
335-347	1278.028	1276.463	1.56	1278.087	1276.658	1.43
336-347	1176.211	1175.009	1.20	1176.186	1175.009	1.18
337-347	1063.036	1061.743	1.29	1063.019	1061.807	1.21

[0472] 由于另一肽,氨基酸46-54,在“抗原结合”和“复合物结合”程序之间没有显示出氘摄取差异,因此在29-50肽中被保护而免于氘交换的区域被减少到残基29-45。因此,包括氨基酸29-45和331-347的两个片段被鉴定为抗体mAb22033与hNPR1.mmh/ANP蛋白复合物结合的表位。

[0473] 对于NPR1/ANP/mAb22810 HDX实验,从hNPR.mmh鉴定出总共93个肽,代表70%的序列覆盖率。在这些肽中,表48所列的10个肽覆盖跨29-50、70-81和331-347的氨基酸,与“复合物结合”氘化相比在“抗原结合”氘化后具有显著增加的质量。

[0474] 表48:通过胃蛋白酶消化肽的MH⁺值所测量的mAb22810与hNPR1.mmh/ANP的结合对H/D交换的影响

[0475]

NPR1-mmH 残基	5 min 氘化			10 min 氘化		
	抗原结合	复合物结合	Δ	抗原结合	复合物结合	Δ
29-50	2426.295	2425.324	0.97	2426.927	2426.077	0.85
32-50	2128.086	2127.361	0.72	2128.584	2128.016	0.57
33-50	2056.507	2056.083	0.42	2056.723	2056.405	0.32
35-50	1828.973	1828.597	0.38	1829.278	1828.952	0.33
46-54	950.063	950.090	-0.03	950.267	950.087	0.18
70-81	1456.036	1455.661	0.37	1456.127	1455.699	0.43
72-81	1241.898	1241.496	0.40	1241.969	1241.536	0.43
331-347	1678.712	1678.316	0.40	1678.888	1678.589	0.30
332-347	1607.457	1607.060	0.40	1607.617	1607.323	0.29
334-347	1407.018	1406.698	0.32	1407.217	1406.970	0.25
335-347	1277.816	1277.550	0.27	1278.075	1277.824	0.25
336-347	1175.926	1175.894	0.03	1176.094	1176.051	0.04
337-347	1062.703	1062.646	0.06	1062.844	1062.767	0.08

[0476] 由于三个肽,氨基酸46-54、336-347、337-347,在“抗原结合”和“复合物结合”程序之间没有显示出氘摄取差异,因此在29-50和331-347肽中被保护而免于氘交换的区域被减少到残基29-45和331-335。因此,包括氨基酸29-45、70-81和331-335的三个片段被鉴定为

抗体mAb22810与hNPR1.mmh/ANP蛋白复合物结合的表位。

[0477] 实施例13:在人源化NPR1小鼠中玻璃体内注射NPR1抗体降低眼内压

[0478] 本实施例描述了玻璃体内注射 (IVT) 示例性人NPR1抗体mAb22033对人源化NPR1小鼠的眼内压 (IOP) 的影响。

[0479] 方法:用VelociGene技术 (Regeneron) 产生人源化NPR1小鼠 (NPR1^{hu/hu})。在人源化NPR1或野生型 (WT) 小鼠中单次IVT注射40 μ g mAb22033或对照Ab。注射后四天每天测量IOP。在第二实验中,为检查剂量反应,玻璃体内注射40、12.6或4 μ g mAb22033或40 μ g对照Ab,并每天监测IOP。在另一个实验中,为了测试长期递送抗体的效果,注射了表达NPR1抗体或eGFP的AAV2载体,对IOP进行了7周的跟踪。

[0480] 结果:与对照抗体相比,从第1天到第3天,在NPR1^{hu/hu}小鼠中IVT施用40 μ g mAb22033显著降低了IOP。平均IOP变化为5mmHg。但是,在野生型小鼠中没有IOP降低效果。剂量反应研究表明,mAb22033的40或12.6 μ g IVT具有类似的IOP降低效果,而40 μ g mAb22033的效果持续时间超过12.6 μ g的。4 μ g NPR1抗体的IVT不降低IOP。IVT AAV2-GFP或AAV2-NPR1抗体后在所有实验时间点均未发现IOP效应。这可能是由于NPR1抗体的低表达,即在整個眼部裂解物中仅检测到10ng。

[0481] 结论:在人源化的NPR1小鼠中IVT施用人NPR1抗体 (mAb22033) 显著降低了IOP,从而证明激动剂抗NPR1抗体具有用于在青光眼疾病中降低IOP的潜力。

[0482] 实施例14:通过电子显微镜对抗体-NPR1复合物的结构分析

[0483] 方法

[0484] 尺寸排阻色谱与多角度光散射 (SEC-MALS) 滴定

[0485] 制备了几个滴定系列的具有C末端myc-myc-6xHis标签的人NPR1胞外域 (hNPR1-mmh; SEQ ID NO:194), 其中所述蛋白以不同摩尔比与多种抗体复合。测试的抗体为: mAb22033, REGN5308 (mAb22033的Fab片段), mAb22810和REGN5314 (mAb22810的Fab片段)。所有滴定系列均在有和没有心房利尿钠肽 (ANP, Tocris) 的两种情况下进行,以相对于hNPR1-mmh而言2倍摩尔过量实施。在PBS中于4 $^{\circ}$ C孵育过夜后,将复合物注入SEC-MALS系统,该系统的组成为:Superdex 200Increase 10/300G1柱在ÄKTA微型系统 (GE Healthcare Life Sciences) 上,然后是miniDAWN Treos和Optilab T-rEX (Wyatt Technology Corporation)。由于磷酸盐缓冲液与电子显微镜负染色不兼容,因此SEC柱在50mM Tris pH 7.5、150mM NaCl运行缓冲液中平衡,下面制备的所有较大规模的复合物均在该缓冲液中。尺寸排阻色谱数据使用Unicorn (5.20版General Electric Company) 进行评估,而MALS数据使用ASTRA (7.0.0.69版Wyatt Technology) 进行评估。

[0486] 负染色电子显微镜样品制备

[0487] 以较大的规模制备了hNPR1的复合物,以用于负染色电子显微镜检查。如下制备五个样品:样品1=单独的hNPR1-mmh (SEQ ID NO:194);样品2=单独的hNPR1-Fc (SEQ ID NO:197);样品3=hNPR1-mmh+ANP,摩尔比为1:2;样品4=hNPR1-mmh+REGN5308,摩尔比为1:1.5;样品5=hNPR1-mmh+ANP+REGN5308,摩尔比为1:2:1.5。以与SEC-MALS实验相同的方式,通过尺寸排阻色谱法纯化样品1、3、4和5。收集峰级分,在-80 $^{\circ}$ C冷冻,然后送至NanoImaging Services, Inc.进行EM分析。样品2直接取自2.62mg/ml的PBS中的储备溶液,将缓冲液交换为50mM Tris, pH 7.5+150mM NaCl,稀释至1.5mg/ml,在-80 $^{\circ}$ C冷冻,并与其他

样品一起送样。

[0488] 负染色电子显微镜数据收集与处理

[0489] 使用甲酸铀酰(NanoImaging Services)以标准方式制备五个蛋白质样品的负染EM载网。载网包含放置在C-flat带孔碳网上方的连续碳薄层。在室温下,在以120keV操作的Tecnai T12电子显微镜(FEI/Thermo Fisher)上,用FEI Eagle 4k x 4k CCD相机采集TEM图像。在各种标称放大倍率下(主要是67,000x和110,000x)收集图像。收集的图像在内部进行进一步处理。

[0490] 用眼睛检查NanoImaging显微照片,并且去除了具有差的染色对比度的图像,约占总图像的1/5。剩余的图像根据放大倍率分开;110,000x图像没有用于进一步分析,因为它们每个图像上的颗粒较少。因此,所有后续处理步骤都是使用67,000x图像完成的。使用CTFFIND4对所有图像进行CTF校正。

[0491] EM颗粒拾取和2D类平均(class averaging)

[0492] 所有五个负染色样品的颗粒分布都非常好,具有均一的粒径、非常小的结块和良好的颗粒密度。在样品4和5中,使用Relion拾取颗粒,其中自动拾取模板(autopicking template)来自最初一轮的手动拾取和2D类平均。对于样品4(hNPR1+REGN5308),从总共75张显微照片中选择了19184个良好的颗粒。对于样品5(hNPR1+ANP+REGN5308),最初从总共88张显微照片中选择了20318个良好的颗粒。使用Relion进行的初始2D类平均显示在两个数据集中的显著异质性,并且大量类仅显示REGN5308 Fab或仅显示NPR1。

[0493] 通过消除对应于仅Fab或对应于仅NPR1的颗粒,进一步细化了样品5的2D类平均。剩余的9219个颗粒用于计算新的2D类平均值,这显示了对NPR1+REGN5308复合物的更好的视图分布,并揭示了少数复合物包含仅一个与NPR1二聚体结合的Fab,而大多数复合物包含两个Fab。除去单Fab复合物将颗粒集进一步减少至6728个颗粒。

[0494] 从负染色EM数据重建3D图像

[0495] 使用随机梯度下降“3D初始模型”程序,在Relion中构建了NPR1-ANP-REGN5308复合物的初始3D模型,分辨率限制到40 Å。然后将该模型进一步低通滤波至60Å,并用作上述6728个颗粒的Relion中3D分类的参考,期望步骤分辨率限制为25Å。然后,最佳3D类在Relion中进一步完善直到会聚(convergence),最终分辨率为22Å(通过“金标准”FSC测量)。在3D分类或完善过程中,我们没有施加2次对称。由3D重建得到的密度图清楚地表明,两个Fabs结合在方形颗粒的一侧,与结合了ANP的NPR1的晶体结构(PDB代码1T34)一致。

[0496] 低温电子显微镜样品制备和数据收集

[0497] 以与上述负染色EM样品相同的方式,制备NPR1-ANP-REGN5308复合物的样品用于冷冻电子显微镜(cryoEM)。最终复合物浓度为在50mM Tris,pH 7.5、150mM NaCl中的0.8mg/ml。使用UltrAuFoil载网(Quantifoil Micro Tools GmbH)和Vitrobot(FEI/Thermo Fisher),通过标准技术制备CryoEM样品。使用在计数模式下的K2直接电子探测器和GIF能量过滤器(Gatan,Inc.),在以300kV操作的Titan Krios电子显微镜(FEI/Thermo Fisher)上,进行数据收集。以130,000x(1.04Å/像素)的放大倍率收集了1409个视频,离焦范围为-0.5到-1.5微米,总剂量为45.44 e⁻/Å²。数据收集由Legion软件控制。

[0498] CryoEM数据处理和结构确定

[0499] 使用cistEM软件包对所有cryoEM视频进行了运动校正、剂量加权和CTF校正。然后手动检查图像,以除去具有厚冰、CTF参数差(拟合分辨率低于6Å)、无颗粒、污染等的图像。在此滤过之后保留了1172个图像,然后将其用于cistEM中的非模板化颗粒采集,产生872915个颗粒位置。在进行2D分类以除去不良颗粒后,使用cistEM在3D自动精细化中包括686709个颗粒,其中从头开始生成了初始3D参考体积。该3D精细化会聚到单个方案,通过傅里叶壳层相关曲线估计分辨率为2.8Å。

[0500] 然后,从内置于上述负染EM 3D图的模型开始,将此3D图用于结构优化。两个NPR1分子的N和C末端结构域被Real-Space精化为刚体放入EM图中,然后在模型与EM密度不匹配的少数地方手动重建。将REGN5308同源性模型手动放入EM密度;仔细检查CDR区域允许我们确定重链相对于轻链的方向。该模型的CDR区域需要大量重建以匹配EM密度。最后,使用Phenix进行real-space位置细化,产生了该复合物的当前结构模型。

[0501] 结果/讨论

[0502] 尺寸排阻色谱与多角度光散射(SEC-MALS)滴定

[0503] 在hNPR1-mmh与mAb22033的相互作用中,在存在和不存在ANP的情况下,hNPR1-mmh本身表现为分子量约为110kDa的二聚体,当ANP结合至NPR1时分子量略有增加。就其本身而言,对于hNPR1-mmh,没有观察到游离单体峰。在没有ANP的情况下用mAb22033滴定揭示了该复合物的两个主要种类:一种具有分子量等于一个IgG结合一个NPR1二聚体,另一种具有分子量等于一个IgG结合两个NPR1二聚体。但是,在ANP存在下,NPR1加mAb22033形成了更高分子量的种类,可能是NPR1和IgG的“Papar-doll”聚合物。

[0504] 随后通过考虑REGN5308(mAb22033的Fab片段)简化了系统。与没有ANP的相同复合物相比,hNPR1-mmh和REGN5308的复合物在结合的ANP时显示了非常不同的SEC谱。NPR1-REGN5308复合物的分子量约为155kDa,与每个NPR1二聚体结合一个Fab一致。在存在ANP的情况下,NPR1-ANP-REGN5308复合物的分子量增加约50kDa,与每个NPR1二聚体结合的两个Fab一致。我们提出,先前描述的ANP结合后NPR1的构象变化(Ogawa,H等,2004)允许第二个Fab结合,并且2Fab+2NPR1+ANP复合物对于生长以完整IgG mAb22033观察到的“paper-doll”聚合物是必需的(见下文的进一步讨论)。

[0505] 还用hNPR1-mmh和mAb22810进行了滴定。SEC-MALS分析表明,mAb22810样品的一小部分是二聚体,与标准IgG分子量150kDa相比,其分子量约为315kDa。用NPR1-mAb22810-ANP复合物进行的SEC-MALS滴定表现在430至700kDa范围中的分子种类的异质混合物;此谱图(profile)太复杂而无法可靠地解释,这可能是由于mAb22810蛋白中的IgG二聚体杂质所致。用REGN5314(mAb22810的Fab片段)进行SEC-MALS滴定表明,在没有ANP的情况下,REGN5314与NPR1的结合太弱或太短暂,无法产生可以通过SEC分离的复合物。当存在ANP时,形成分子量约为170kDa的单个NPR1-REGN5314-ANP复合物,与每个NPR1二聚体结合一个Fab一致。

[0506] 负染色2D类平均值

[0507] 通过负染色电子显微镜进一步分析了hNPR1+REGN5308和hNPR1+ANP+REGN5308复合物。复合物颗粒的2D分类和平均显示了样品中的大量异质性。EM网格上的大部分颗粒可分类为仅hNPR1,或分类为仅REGN5308 Fab。由于提交用于成像的蛋白质样品是纯化的均质复合物,因此看起来,这些复合物在负染色载网制备过程中正分解成其组分。但是,相当一

部分复合物仍保持完整,可用于分析。

[0508] hNPR1+REGN5308的负染色2D类平均值显示“单臂”复合物,其中仅单个Fab可见与hNPR1二聚体结合,与SEC-MALS结果一致。相反,hNPR1+ANP+REGN5308的负染色2D类平均值显示出“双臂”复合物,其中两个Fab与二聚体结合。不同的平均值代表实际三维复合物的不同投影视图。在一个类平均值中,在侧视图中看到hNPR1二聚体,具有两个密度叶:一叶对应于彼此叠置的两个单体的N端结构域,另一叶对应于两个叠置的C端结构域。在此方向上,两个结合的Fab看起来就像坐在NPR1密度顶部的“兔子耳朵”。在不同视图中,可以看见hNPR1的所有四个结构域是四个密度团,形成一个正方形,其中两个REGN5308 Fab位于正方形上方,彼此交叉形成一个倒置的V。hNPR1+ANP+REGN5308的类平均值也显示了“单臂”复合物,但这些可能是由于相同复合物解离产生游离Fab和游离NPR1所致。

[0509] 从hNPR1+ANP+REGN5308的cryoEM数据计算得出的2D类平均值与负染色数据相比,显示了复合物的不同视图;特别是,不存在“兔子耳朵”方向。但是,其他cryoEM2D类平均值可以与负染色数据中的相应平均值紧密匹配。我们在cryoEM数据中没有看到太多复合物解离的迹象,这可能是因为起始样品更均一,而且还可能因为冷冻条件更好地保留了溶液中复合物的天然构象。

[0510] 3D图像重建

[0511] 使用2D类平均值作为起点,构建了hNPR1+ANP+REGN5308的cryoEM密度的三维图。除了对复合物直径的粗略估计外,这种重建程序不需要任何有关复合物预期形状或大小的在先信息,因此所得的cryoEM图谱不会因我们对抗体-靶复合物形成方式的预期而出现偏离。然后,将已知的hNPR1+ANP晶体结构,连同通过与已知Fab结构同源而产生的REGN5308 Fabs模型一起,放入并精化到该EM密度图中。手动将NPR1和Fab结构放置在它们的大致位置,然后使用Phenix将其作为刚体精化放置到正确的位置中。cryoEM图的分辨率足以允许人工重建NPR1:抗体接触界面上的残基,特别是REGN5308互补决定区(CDR)的残基,这些残基无法通过同源性准确建模。当前的结构模型已放置了所有抗体CDR残基以及与其接触的NPR1残基。通过组合该当前cryoEM图和针对NPR1(PDB代码1T34)和分离的抗体结构而先前确定的X射线晶体结构信息,已经对模型的更远区域(NPR1 C末端结构域和抗体Fab的恒定结构域)进行了建模。

[0512] NPR1上的mAb22033表位:对hNPR1+ANP+REGN5308结构的检查,揭示了REGN5308 Fab(以及通过延伸,亲本IgG mAb22033)接触NPR1的哪些残基。该表位由NPR1中的四个独立的氨基酸片段组成,这些氨基酸片段组合形成三维的一个连续表面:残基2-4、41-45、47、73-79、332、336-344和347(根据SEQ ID NO:194编号)。较早的氢/氘交换(HDX)质谱实验鉴定了这些残基中的一些是重要的(见实施例12),而cryoEM结构提供了更精细的表位细节。

[0513] mAb22033的结构作用机理

[0514] 在NPR1-抗体复合物的该模型中,在靠近Fab可变结构域和Fab恒定结构域之间“肘部”的点上,两个Fab彼此相距约10Å以内。这两个Fab的C末端相距远得多,大约100Å,因此不可能是单个IgG分子的两个臂。这些Fab并没有特别接近建模的ANP肽(以最接近的方式大约30Å距离),并且似乎Fab和ANP之间没有任何直接的相互作用。

[0515] 如果我们假设Fab相对于其在NPR1的N末端结构域上的结合位点具有固定位置和相对取向,则出现了对REGN5308 Fab的ANP依赖性结合的解释。NPR1已显示在ANP结合后发

生构象变化,其中一个NPR1单体相对于另一个旋转,同时保持二聚化。将此旋转应用于2NPR1+2Fab复合物的一半,将产生一个模型,其中NPR1二聚体类似于不含ANP的NPR1的晶体结构。但是,其中一个REGN5308 Fab现在已经旋转到与另一个Fab在空间上发生冲突的位置,这在物理上是不可能的情况。这种空间干扰是为什么在不存在ANP的情况下只有一个REGN5308 Fab可以与NPR1二聚体结合的原因:两个单体上的两个抗体结合位点具有等同的可及性,但第一个Fab的结合会阻断第二个Fab的结合。

[0516] 如果我们从另一侧考虑该效应,则只要两个Fab都结合,两个Fab与含有ANP的NPR1二聚体的结合将阻止该复合物松弛回到无ANP的构象。在平衡时,这将导致较大比例的NPR1分子处于能够进行下游信号传导的活性状态——如果我们假设此处看到的效应被保留在细胞表面上。抗体结合的另一个可能的效应是如上所述形成抗体与NPR1+ANP的寡聚体簇。仅当每个NPR1二聚体可以结合来自两个单独IgG分子的两个Fab臂时,这种效应才是可能的;在没有ANP的情况下,每个NPR1二聚体可以与仅一个Fab臂结合,复合物的形成停止在小得多的分子种类上,该分子种类包含至多一个IgG,NPR1二聚体分别结合在一个Fab臂上。受体簇聚和受体活性状态延长这两种效应都可以解释mAb22033对NPR1受体的激活作用。

[0517] 本发明的范围不受本文描述的具体实施方案的限制。实际上,除了本文描述的那些之外,根据前述描述和附图,本发明的各种修改对于本领域技术人员将变得显而易见。这样的修改旨在落入所附权利要求的范围内。

序列表

<110> 瑞泽恩制药公司(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)

<120> 抗 NPR1 抗体及其用途

<130> 10471W001

<150> 62/749, 557

<151> 2018-10-23

<150> 62/755, 720

<151> 2018-11-05

<160> 199

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1

caggtgcagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgacggtc 60
tcttgaagg cttctggata caccttcacc gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
ccttgacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaaccta acagtgggtg cacaaactct 180
gcacagaggt ttacagggcag aatcaccatg acctgggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggaactga gcaggtctgag atctgacgac acggccgtgt attactgttc gagagggggc 300
ccagtcatga attactacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

[0001]

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 2

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

	Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	
	<210> 3	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 3	
	ggatacacct tcaccgacta ctat	24
	<210> 4	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 4	
	Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr	
	1 5	
	<210> 5	
	<211> 24	
	<212> DNA	
[0002]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 5	
	atcaaaccta acagtgggtgg caca	24
	<210> 6	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 6	
	Ile Lys Pro Asn Ser Gly Gly Thr	
	1 5	
	<210> 7	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 7	
	tcgagagggg gcccgatcat gaattactac tactactacg gtatggacgt c	51
	<210> 8	

<211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 8
 Ser Arg Gly Gly Pro Val Met Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Val

<210> 9
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 9
 aacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcaattgcc gggcaagtca gagcattgac agttatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 ggtaaagccc ctaaactcct gatctatgtt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggaaagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta tccccacctt cggccaaggg 300
 acacgactgg agattaaa 318

[0003]

<210> 10
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 10
 Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Lys Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

	<210> 11	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 11	
	cagagcattg acagttat	18
	<210> 12	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 12	
	Gln Ser Ile Asp Ser Tyr	
	1 5	
	<210> 13	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0004]	<223> 合成的	
	<400> 13	
	gttgcatcc	9
	<210> 14	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 14	
	Val Ala Ser	
	1	
	<210> 15	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 15	
	caacagagtt acagtatccc cacc	24
	<210> 16	
	<211> 8	
	<212> PRT	

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 16

Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Thr

1 5

<210> 17

<211> 369

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 17

```
gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacccttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccaggaagg gctctggagt ggtctcaggt attagtggga atagtggtag cataggetat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag acctgaagac acggccttgt attattgtgc aaaagatatg 300
ggcgtatcac tggcactatg gggggctttt gatatctggg gccaaaggac aatggtcacc 360
gtctcttca 369
```

<210> 18

<211> 123

[0005]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 18

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

<210> 19

<211> 24

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 19	
	ggattcacct ttgatgatta tgcc	24
	<210> 20	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 20	
	Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala	
	1 5	
	<210> 21	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 21	
[0006]	attagttgga atagtgtac cata	24
	<210> 22	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 22	
	Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile	
	1 5	
	<210> 23	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 23	
	gcaaaagata tgggcgtatc actggcacta tgggggctt ttgatatc	48
	<210> 24	
	<211> 16	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	

<223> 合成的

<400> 24

Ala Lys Asp Met Gly Val Ser Leu Ala Leu Trp Gly Ala Phe Asp Ile

1 5 10 15

<210> 25

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 25

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga caaagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtca gaacattaga acctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggctct gatctctact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg cagttttcta ctgtcaacag agtttcggtg tccctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaatcaa a 321

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0007] <223> 合成的

<400> 26

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

1 5 10 15

Asp Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Gly Ile Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 27

	cagaacatta gaacctat	18
	<210> 28	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 28	
	Gln Asn Ile Arg Thr Tyr	
	1 5	
	<210> 29	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 29	
	actgcatcc	9
	<210> 30	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
[0008]	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 30	
	Thr Ala Ser	
	1	
	<210> 31	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 31	
	caacagagtt tcggtatccc tcggacg	27
	<210> 32	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 32	
	Gln Gln Ser Phe Gly Ile Pro Arg Thr	
	1 5	
	<210> 33	

<211> 366
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 33
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt acctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatggaatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctggat 240
 ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaggctgaat 300
 actcgataaa ctggaactac gaatcttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 34

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 [0009] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Leu Ile Trp Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asp
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Asn Thr Arg Ile Thr Gly Thr Thr Asn Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 35

ggattcacct tcagtaccta tggc 24

<210> 36

	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 36	
	Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly	
	1 5	
	<210> 37	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 37	
	atatggaatg atggaagtaa taaa	24
	<210> 38	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
[0010]	<400> 38	
	Ile Trp Asn Asp Gly Ser Asn Lys	
	1 5	
	<210> 39	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 39	
	gcgaggtga atactcgtat aactggaact acgaatcttg actac	45
	<210> 40	
	<211> 15	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 40	
	Ala Arg Leu Asn Thr Arg Ile Thr Gly Thr Thr Asn Leu Asp Tyr	
	1 5 10 15	
	<210> 41	
	<211> 324	
	<212> DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 41

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
gtctcttgcc gggcaagtca gagcattgcc aactacttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaacctcct gatctatggt gcatacactt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttccgtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg cgacttacta ctgtcaacag acttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324
```

<210> 42

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 42

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

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 43

```
cagagcattg ccaactac 18
```

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0011]

	<400> 44	
	Gln Ser Ile Ala Asn Tyr	
	1 5	
	<210> 45	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 45	
	ggtgcatac	9
	<210> 46	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 46	
	Gly Ala Tyr	
	1	
	<210> 47	
	<211> 30	
[0012]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 47	
	caacagactt acagtacccc tccgatcacc	30
	<210> 48	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 48	
	Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr	
	1 5 10	
	<210> 49	
	<211> 369	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 49	
	cagctgcagc tgcgtgagtc gggcccagga ctggtgaagc cticggagac cctgtccctc	60

accgtgactg tctctgggtg ctccatcaac gacaattctt tttcttgga ctggatccgc 120
 cagaccccag ggaggggact ggagtggatt gggaatatct tttttgatgg gaacacttac 180
 tataccccgt cctcaagag tcgagtcac ataccgttg acatgtccca gaaccaattc 240
 tccttgaggc tgacctctgt gaccgccgca gacacggctc tgtattactg tgcgagacat 300
 aagaggtcca tgacagcttg ggggttcttt gactattggg gccaggggaa cctggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 50

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 50

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Asp Asn

20 25 30

Ser Phe Phe Trp Asp Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Asn Ile Phe Phe Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Thr Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Met Ser Gln Asn Gln Phe

[0013] 65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg His Lys Arg Ser Met Thr Ala Trp Gly Phe Phe Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 51

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 51

ggtggctcca tcaacgacaa ttcttttttc 30

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 52

Gly Gly Ser Ile Asn Asp Asn Ser Phe Phe

	1	5	10	
	<210> 53			
	<211> 21			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成的			
	<400> 53			
	atcttttttg atgggaacac t			21
	<210> 54			
	<211> 7			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成的			
	<400> 54			
	Ile Phe Phe Asp Gly Asn Thr			
	1	5		
	<210> 55			
	<211> 45			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
[0014]	<220>			
	<223> 合成的			
	<400> 55			
	gcgagacata agaggtccat gacagcttgg gggttctttg actat			45
	<210> 56			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成的			
	<400> 56			
	Ala Arg His Lys Arg Ser Met Thr Ala Trp Gly Phe Phe Asp Tyr			
	1	5	10	15
	<210> 57			
	<211> 324			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成的			
	<400> 57			
	gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttggtga cagagtcacc 60			
	atcacttgcc gggcaagtaa gagaattaac acctatttga attggtatca gcagaaacca 120			
	ggtaaagccc ctaaagtict gatctattct gcatccaatt tgcaaagtgg ggtccctca 180			

cggttcagtgcgcagtggatctgggacagatttcaactctccatcaacagtctgcaacct 240
 gaagattttgcaacttactctgtcaacagagtttcagtgcacctccgatcaccttcggc 300
 caaggacacgactggagataaa 324

<210> 58

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 58

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Arg Ile Asn Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

[0015] Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 59

aagagaattaacacctat

18

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 60

Lys Arg Ile Asn Thr Tyr

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 61	
	tctgcatcc	9
	<210> 62	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 62	
	Ser Ala Ser	
	1	
	<210> 63	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 63	
	caacagagtt tcagtgcgcc tccgatacc	30
	<210> 64	
[0016]	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 64	
	Gln Gln Ser Phe Ser Ala Pro Pro Ile Thr	
	1 5 10	
	<210> 65	
	<211> 366	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 65	
	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctggggggtc cctgagactc 60	
	tctgtgttg tctctggatt cactttcaga atctatacca tgaattgggt ccgccaggt 120	
	ccaggaagg gactggagtg ggtcgcatec attagtagta gtagtagttt cattaattat 180	
	gcagactcat tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgcccagaa ctactgtat 240	
	ctacaaatga acagcctgag agccgaggac acggctatit attactgtgc gagagcggcg 300	
	ggtaacgatg ttttgccctgg tcgtatggac gtctggggcc aagggacctc ggtcaccgtc 360	
	tectca	366
	<210> 66	

<211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 66
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ile Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Phe Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Leu
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Ala Gly Asn Asp Val Leu Pro Gly Arg Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0017]

<210> 67
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 67
 ggattcactt tcagaatcta tacc
 <210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 68
 Gly Phe Thr Phe Arg Ile Tyr Thr
 1 5
 <210> 69
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的

24

	<400> 69	
	attagtagta gtagtagttt catt	24
	<210> 70	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 70	
	Ile Ser Ser Ser Ser Ser Phe Ile	
	1 5	
	<210> 71	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 71	
	gcgagagcgg cgggtaacga tgttttgcct ggtcgtatgg acgtc	45
	<210> 72	
	<211> 15	
	<212> PRT	
[0018]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 72	
	Ala Arg Ala Ala Gly Asn Asp Val Leu Pro Gly Arg Met Asp Val	
	1 5 10 15	
	<210> 73	
	<211> 324	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 73	
	gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60	
	ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaactact tagcgtggta ccagcagaaa 120	
	cctggccagg ttccagtcct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180	
	gacaggttca gtggcagcgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcac cagactggag 240	
	cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta tctcaccttg gacgttcggc 300	
	caagggacca aggtggaaat caaa	324
	<210> 74	
	<211> 108	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	

	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 74	
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
	1 5 10 15	
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn	
	20 25 30	
	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Ser Leu Leu	
	35 40 45	
	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser	
	50 55 60	
	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu	
	65 70 75 80	
	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ile Ser Pro	
	85 90 95	
	Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
	100 105	
	<210> 75	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0019]	<223> 合成的	
	<400> 75	
	cagagtgtta gcagcaacta c	21
	<210> 76	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 76	
	Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr	
	1 5	
	<210> 77	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 77	
	ggtgcatcc	9
	<210> 78	
	<211> 3	
	<212> PRT	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 78	
	Gly Ala Ser	
	1	
	<210> 79	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 79	
	cagcagtatg gtatctcacc ttggacg	27
	<210> 80	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 80	
	Gln Gln Tyr Gly Ile Ser Pro Trp Thr	
[0020]	1 5	
	<210> 81	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 81	
	cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60	
	tcttgaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tacactgggt gcgacaggcc 120	
	cctggacaag gacttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtattgg cacaaactat 180	
	gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccttg accagggaca cgtccatcag tacagcctac 240	
	atggagctga gcagtctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagggggt 300	
	agcagctcat attactacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360	
	accgtctcct ca	372
	<210> 82	
	<211> 124	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 82	
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	

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

<210> 83

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 83

[0021] ggatacacct tcaccgcta ctat

24

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 84

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr

1

5

<210> 85

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 85

atcaacccta acagtattgg caca

24

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的
<400> 86
Ile Asn Pro Asn Ser Ile Gly Thr
1 5

<210> 87
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的
<400> 87
gcgagagggg gtagcagctc atattactac tactactacg gtatggacgt c 51

<210> 88
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的
<400> 88
Ala Arg Gly Gly Ser Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15
Val

[0022]

<210> 89
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 89
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattgac aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgtt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tticggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 90
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的
<400> 90
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

<210> 91

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 91

cagagcattg acaactat

18

<210> 92

<211> 6

[0023]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 92

Gln Ser Ile Asp Asn Tyr

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 93

gttgcatcc

9

<210> 94

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 94

Val Ala Ser

1	
<210> 95	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 95	
caacagagtt acagtacccc getcact	27
<210> 96	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 96	
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr	
1 5	
<210> 97	
<211> 372	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
[0024] <220>	
<223> 合成的	
<400> 97	
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgatgaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60	
tcttgcaagg cttctggata caccctcacc ggctactata ttcattgggt acgacaggcc 120	
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaccccta acagtggcgc cacaactat 180	
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccctg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240	
atggaactga ccagctgaa atctgacgac acggccgttt attattgtgc gagaggggt 300	
cagttggagt tcttctatta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360	
accgtctcct ca 372	
<210> 98	
<211> 124	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 98	
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr	
20 25 30	
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	

Gly Trp Ile Thr Pro Asn Ser Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Thr Arg Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Gln Leu Glu Phe Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 99

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 99

ggatacacct tcaccgcta ctat

24

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

[0025]

<220>

<223> 合成的

<400> 100

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr

1 5

<210> 101

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 101

atcaccccta acagtggcgc caca

24

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 102

Ile Thr Pro Asn Ser Gly Ala Thr

1 5

<210> 103

<211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 103
 gcgagagggg gtcagttgga gttcttctat tactactacg gtatggacgt c 51
 <210> 104
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 104
 Ala Arg Gly Gly Gln Leu Glu Phe Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Val

 <210> 105
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 [0026] <220>
 <223> 合成的
 <400> 105
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctctctgcat ctgcaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattgac agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctctgct acatccggtt tccaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagttggatc tgggacagat ttactcttca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg gaacttacta ctgtcaacag agttacacta cccctatcac cttcggccaa 300
 gggacacgac tggagattaa a 321
 <210> 106
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 106
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Ala Thr Ser Gly Phe Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

<220>
 <223> 合成的
 <400> 111
 caacagagtt acactacccc tatcacc 27
 <210> 112
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 112
 Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Ile Thr
 1 5
 <210> 113
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 113
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaaggagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgtaagg cttctggata caccttcacc gactactata tacactgggt gcgacaggcc 120
 [0028] cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaatctta acagtgggtg caaaaaccat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcacctg accagtgaca cgtccatcaa cacagcctat 240
 atcgaactgg gcaggctgag aggtgacgac acggccgtgt attactgttc gagagggggt 300
 ggaagtcact actattatta ttatcacggt atggacgtct ggggccaagg aaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372
 <210> 114
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 114
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Leu Asn Ser Gly Gly Lys Asn His Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Ser Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Ile Glu Leu Gly Arg Leu Arg Gly Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

	85	90	95
	Ser Arg Gly Gly Ser His Tyr Tyr Tyr Tyr His Gly Met Asp		
	100	105	110
	Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
	<210> 115		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 115		
	ggatacacct tcaccgacta ctat		24
	<210> 116		
	<211> 8		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 116		
	Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr		
	1 5		
[0029]	<210> 117		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 117		
	atcaatctta acagtgggtgg caaa		24
	<210> 118		
	<211> 8		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 118		
	Ile Asn Leu Asn Ser Gly Gly Lys		
	1 5		
	<210> 119		
	<211> 51		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的		

<400> 119
 tcgagagggg gtggaagtca ctactattat tattatcacg gtatggacgt c 51
 <210> 120
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 120
 Ser Arg Gly Gly Gly Ser His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr His Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Val

 <210> 121
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 121
 gacatccaga tgaccacgac tccatccctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagaatcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca cagcattgac agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 [0030] gggaaagccc ctaaactcct gatctatcct gcattccactt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctcct ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattctg caatttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac ttctggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321
 <210> 122
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的
 <400> 122
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser His Ser Ile Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Pro Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu

		85		90		95
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys					
		100		105		
	<210> 123					
	<211> 18					
	<212> DNA					
	<213> 人工序列					
	<220>					
	<223> 合成的					
	<400> 123					
	cacagcattg acagctat					18
	<210> 124					
	<211> 6					
	<212> PRT					
	<213> 人工序列					
	<220>					
	<223> 合成的					
	<400> 124					
	His Ser Ile Asp Ser Tyr					
	1 5					
	<210> 125					
	<211> 9					
[0031]	<212> DNA					
	<213> 人工序列					
	<220>					
	<223> 合成的					
	<400> 125					
	cctgcatcc					9
	<210> 126					
	<211> 3					
	<212> PRT					
	<213> 人工序列					
	<220>					
	<223> 合成的					
	<400> 126					
	Pro Ala Ser					
	1					
	<210> 127					
	<211> 27					
	<212> DNA					
	<213> 人工序列					
	<220>					
	<223> 合成的					
	<400> 127					
	caacagagtt acagtacccc getcact					27

<210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 128
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 129
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 129
 cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgtag cgtctggatt caccctcagt agctatggca tggctctgggt ccgccagact 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggcatg atggaactaa taattactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaacca 300
 tggctgtgtac ggggctacta ctactacgct atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372
 <210> 130
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 130
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Val Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp His Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Pro Trp Leu Val Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

	115	120
	<210> 131	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 131	
	ggattcacct tcagtagcta tggc	24
	<210> 132	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 132	
	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly	
	1 5	
	<210> 133	
	<211> 24	
	<212> DNA	
[0033]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 133	
	atatggcatg atggaactaa taat	24
	<210> 134	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 134	
	Ile Trp His Asp Gly Thr Asn Asn	
	1 5	
	<210> 135	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 135	
	gcgagagAAC catggctggt acggggetac tactactacg ctatggacgt c	51
	<210> 136	

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 136

Ala Arg Glu Pro Trp Leu Val Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp

1

5

10

15

Val

<210> 137

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 137

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtc gagtattagt agttggttg cctggatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctcggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

[0034]

<210> 138

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 138

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Arg

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 139

	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 139	
	cagagtatta gtagttgg	18
	<210> 140	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 140	
	Gln Ser Ile Ser Ser Trp	
	1 5	
	<210> 141	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
[0035]	<400> 141	
	aaggcgtct	9
	<210> 142	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 142	
	Lys Ala Ser	
	1	
	<210> 143	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 143	
	caacagtata atagttattc tcggacg	27
	<210> 144	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	

<220>
 <223> 合成的
 <400> 144
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Arg Thr
 1 5
 <210> 145
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 145
 cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtagtt actactgggg ctggatccgc 120
 cagccccag ggaagggact ggagtggatt gggagtatct attatagtgg gagcccctac 180
 tacatcccgt cctcaagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtccaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gaccgccgca gacacggcta tgtattactg tgcgagacag 300
 gggcggggca tagccagggc tggtcccttt gactactggg gccaggaac cctggtcacc 360
 gtctcctca 369
 <210> 146
 <211> 123
 <212> PRT
 [0036] <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 146
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Ile Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Gln Gly Arg Gly Ile Ala Arg Ala Gly Pro Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 147
 <211> 30
 <212> DNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 147	
	ggtggctcca tcagcagtag tagttactac	30
	<210> 148	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 148	
	Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr	
	1 5 10	
	<210> 149	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 149	
[0037]	atctattata gtgggagccc c	21
	<210> 150	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 150	
	Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Pro	
	1 5	
	<210> 151	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 151	
	gcgagacagg ggcggggcat agccagggt ggtccctttg actac	45
	<210> 152	
	<211> 15	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	

<223> 合成的

<400> 152

Ala Arg Gln Gly Arg Gly Ile Ala Arg Ala Gly Pro Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 153

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 153

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtca gggcattagc aattatttag cctggtatca ggagaaacca 120
gggaaagttc ctaaactect gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggteccatct 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaccag cctgcagtct 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tataacagtg cccctccgtg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 154

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0038] <223> 合成的

<400> 154

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 155

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 155

	cagggcatta gcaattat	18
	<210> 156	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 156	
	Gln Gly Ile Ser Asn Tyr	
	1 5	
	<210> 157	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 157	
	gctgcatcc	9
	<210> 158	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
[0039]	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 158	
	Ala Ala Ser	
	1	
	<210> 159	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 159	
	caaaagtata acagtgcgcc tccgtggacg	30
	<210> 160	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 160	
	Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Pro Trp Thr	
	1 5 10	
	<210> 161	

<211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 161
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggc cctcagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caacgttgat gattatggca tgagctgggt cgcgcaaatt 120
 ccagggaagg ggctggagtg gatctctggt attaatgga atggtggtag gatataattat 180
 gctgactcta tgaagggccg aatcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctatat 240
 ctacaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttat atcactgtgt gagagatcag 300
 tggtctgtac gaggacttga ctactggggc cagggaacce tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 162

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 162

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

[0040]

<210> 163

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 163

ggattcaacg ttgatgatta tggc

24

<210> 164

<211> 8

	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 164	
	Gly Phe Asn Val Asp Asp Tyr Gly	
	1 5	
	<210> 165	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 165	
	attaattgga atggtggtag gata	24
	<210> 166	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 166	
[0041]	Ile Asn Trp Asn Gly Gly Arg Ile	
	1 5	
	<210> 167	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 167	
	gtgagagatc agtggctggt acgaggactt gactac	36
	<210> 168	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 168	
	Val Arg Asp Gln Trp Leu Val Arg Gly Leu Asp Tyr	
	1 5 10	
	<210> 169	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

<220>
 <223> 合成的
 <400> 169
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc gggcatttac aattatttag cctggtttca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgccaacaa tataatactt acccgtacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321
 <210> 170
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 170
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 [0042] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 171
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 171
 cagggcattt acaattat 18
 <210> 172
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 172

	Gln Gly Ile Tyr Asn Tyr	
	1 5	
	<210> 173	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 173	
	gctgcatcc	9
	<210> 174	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 174	
	Ala Ala Ser	
	1	
	<210> 175	
	<211> 27	
	<212> DNA	
[0043]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 175	
	caacaatata atacttaccc gtacact	27
	<210> 176	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 176	
	Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Pro Tyr Thr	
	1 5	
	<210> 177	
	<211> 384	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 177	
	caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60	
	tctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactaccacc tgagctggat ccgccagget 120	

ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcttac attagaagta gtggtaggac catagactac 180
gcagcctctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ttactgtat 240
ctgcaaatac acagcctgag agtcgaggat acggccgtgt attactgtgc gagagagaac 300
tggtattgtgc taaaggata tgctggtata gtgggagccc ctcttgacca atggggtcag 360
ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 384

<210> 178

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 178

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
His Leu Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Arg Ser Ser Gly Arg Thr Ile Asp Tyr Ala Ala Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
[0044] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Asn Trp Ile Val Leu Lys Val Tyr Ala Gly Ile Val Gly
100 105 110
Ala Pro Leu Asp Gln Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 179

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 179

ggattcacct tcagtacta ccac 24

<210> 180

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 180

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr His

	1	5	
	<210>	181	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	181	
	attagaagta gtggtaggac cata		24
	<210>	182	
	<211>	8	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	182	
	Ile Arg Ser Ser Gly Arg Thr Ile		
	1	5	
	<210>	183	
	<211>	63	
	<212>	DNA	
[0045]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	183	
	gcgagagaga actggattgt gctaaaggta tatgctggta tagtgggagc ccctcttgac	60	
	caa		63
	<210>	184	
	<211>	21	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	184	
	Ala Arg Glu Asn Trp Ile Val Leu Lys Val Tyr Ala Gly Ile Val Gly		
	1	5	10
	Ala Pro Leu Asp Gln		15
		20	
	<210>	185	
	<211>	324	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的	
	<400>	185	

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 186

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 186

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

[0046] 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 187

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 187

cagagtgtta gcagcagcta c 21

<210> 188

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 188

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1 5

<210> 189

	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 189	
	ggtgcatcc	9
	<210> 190	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 190	
	Gly Ala Ser	
	1	
	<210> 191	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
[0047]	<400> 191	
	cagcagtatg gtagctcacc ttggacg	27
	<210> 192	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 192	
	Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr	
	1 5	
	<210> 193	
	<211> 1061	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> hNPR1	
	<400> 193	
	Met Pro Gly Pro Arg Arg Pro Ala Gly Ser Arg Leu Arg Leu Leu Leu	
	1 5 10 15	
	Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Leu Arg Gly Ser His Ala	
	20 25 30	
	Gly Asn Leu Thr Val Ala Val Val Leu Pro Leu Ala Asn Thr Ser Tyr	

	35		40		45
Pro Trp Ser Trp Ala Arg Val Gly Pro Ala Val Glu Leu Ala Leu Ala					
50			55		60
Gln Val Lys Ala Arg Pro Asp Leu Leu Pro Gly Trp Thr Val Arg Thr					
65			70		80
Val Leu Gly Ser Ser Glu Asn Ala Leu Gly Val Cys Ser Asp Thr Ala					
		85		90	95
Ala Pro Leu Ala Ala Val Asp Leu Lys Trp Glu His Asn Pro Ala Val					
	100			105	110
Phe Leu Gly Pro Gly Cys Val Tyr Ala Ala Ala Pro Val Gly Arg Phe					
	115			120	125
Thr Ala His Trp Arg Val Pro Leu Leu Thr Ala Gly Ala Pro Ala Leu					
	130			135	140
Gly Phe Gly Val Lys Asp Glu Tyr Ala Leu Thr Thr Arg Ala Gly Pro					
145			150		160
Ser Tyr Ala Lys Leu Gly Asp Phe Val Ala Ala Leu His Arg Arg Leu					
		165		170	175
Gly Trp Glu Arg Gln Ala Leu Met Leu Tyr Ala Tyr Arg Pro Gly Asp					
		180		185	190
Glu Glu His Cys Phe Phe Leu Val Glu Gly Leu Phe Met Arg Val Arg					
	195			200	205
Asp Arg Leu Asn Ile Thr Val Asp His Leu Glu Phe Ala Glu Asp Asp					
[0048]	210			215	220
Leu Ser His Tyr Thr Arg Leu Leu Arg Thr Met Pro Arg Lys Gly Arg					
225			230		240
Val Ile Tyr Ile Cys Ser Ser Pro Asp Ala Phe Arg Thr Leu Met Leu					
		245		250	255
Leu Ala Leu Glu Ala Gly Leu Cys Gly Glu Asp Tyr Val Phe Phe His					
		260		265	270
Leu Asp Ile Phe Gly Gln Ser Leu Gln Gly Gly Gln Gly Pro Ala Pro					
	275			280	285
Arg Arg Pro Trp Glu Arg Gly Asp Gly Gln Asp Val Ser Ala Arg Gln					
	290			295	300
Ala Phe Gln Ala Ala Lys Ile Ile Thr Tyr Lys Asp Pro Asp Asn Pro					
305			310		320
Glu Tyr Leu Glu Phe Leu Lys Gln Leu Lys His Leu Ala Tyr Glu Gln					
		325		330	335
Phe Asn Phe Thr Met Glu Asp Gly Leu Val Asn Thr Ile Pro Ala Ser					
		340		345	350
Phe His Asp Gly Leu Leu Leu Tyr Ile Gln Ala Val Thr Glu Thr Leu					
	355			360	365
Ala His Gly Gly Thr Val Thr Asp Gly Glu Asn Ile Thr Gln Arg Met					
	370			375	380
Trp Asn Arg Ser Phe Gln Gly Val Thr Gly Tyr Leu Lys Ile Asp Ser					
385			390		400
				395	

	Ser Gly Asp Arg Glu Thr Asp Phe Ser Leu Trp Asp Met Asp Pro Glu		
	405	410	415
	Asn Gly Ala Phe Arg Val Val Leu Asn Tyr Asn Gly Thr Ser Gln Glu		
	420	425	430
	Leu Val Ala Val Ser Gly Arg Lys Leu Asn Trp Pro Leu Gly Tyr Pro		
	435	440	445
	Pro Pro Asp Ile Pro Lys Cys Gly Phe Asp Asn Glu Asp Pro Ala Cys		
	450	455	460
	Asn Gln Asp His Leu Ser Thr Leu Glu Val Leu Ala Leu Val Gly Ser		
	465	470	475
	Leu Ser Leu Leu Gly Ile Leu Ile Val Ser Phe Phe Ile Tyr Arg Lys		
	485	490	495
	Met Gln Leu Glu Lys Glu Leu Ala Ser Glu Leu Trp Arg Val Arg Trp		
	500	505	510
	Glu Asp Val Glu Pro Ser Ser Leu Glu Arg His Leu Arg Ser Ala Gly		
	515	520	525
	Ser Arg Leu Thr Leu Ser Gly Arg Gly Ser Asn Tyr Gly Ser Leu Leu		
	530	535	540
	Thr Thr Glu Gly Gln Phe Gln Val Phe Ala Lys Thr Ala Tyr Tyr Lys		
	545	550	555
	Gly Asn Leu Val Ala Val Lys Arg Val Asn Arg Lys Arg Ile Glu Leu		
	565	570	575
[0049]	Thr Arg Lys Val Leu Phe Glu Leu Lys His Met Arg Asp Val Gln Asn		
	580	585	590
	Glu His Leu Thr Arg Phe Val Gly Ala Cys Thr Asp Pro Pro Asn Ile		
	595	600	605
	Cys Ile Leu Thr Glu Tyr Cys Pro Arg Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu		
	610	615	620
	Glu Asn Glu Ser Ile Thr Leu Asp Trp Met Phe Arg Tyr Ser Leu Thr		
	625	630	635
	Asn Asp Ile Val Lys Gly Met Leu Phe Leu His Asn Gly Ala Ile Cys		
	645	650	655
	Ser His Gly Asn Leu Lys Ser Ser Asn Cys Val Val Asp Gly Arg Phe		
	660	665	670
	Val Leu Lys Ile Thr Asp Tyr Gly Leu Glu Ser Phe Arg Asp Leu Asp		
	675	680	685
	Pro Glu Gln Gly His Thr Val Tyr Ala Lys Lys Leu Trp Thr Ala Pro		
	690	695	700
	Glu Leu Leu Arg Met Ala Ser Pro Pro Val Arg Gly Ser Gln Ala Gly		
	705	710	715
	Asp Val Tyr Ser Phe Gly Ile Ile Leu Gln Glu Ile Ala Leu Arg Ser		
	725	730	735
	Gly Val Phe His Val Glu Gly Leu Asp Leu Ser Pro Lys Glu Ile Ile		
	740	745	750
	Glu Arg Val Thr Arg Gly Glu Gln Pro Pro Phe Arg Pro Ser Leu Ala		

	755	760	765
	Leu Gln Ser His Leu Glu Glu Leu Gly Leu Leu Met Gln Arg Cys Trp		
	770	775	780
	Ala Glu Asp Pro Gln Glu Arg Pro Pro Phe Gln Gln Ile Arg Leu Thr		
	785	790	795
	Leu Arg Lys Phe Asn Arg Glu Asn Ser Ser Asn Ile Leu Asp Asn Leu		800
	805	810	815
	Leu Ser Arg Met Glu Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Glu Glu Leu Val Glu		
	820	825	830
	Glu Arg Thr Gln Ala Tyr Leu Glu Glu Lys Arg Lys Ala Glu Ala Leu		
	835	840	845
	Leu Tyr Gln Ile Leu Pro His Ser Val Ala Glu Gln Leu Lys Arg Gly		
	850	855	860
	Glu Thr Val Gln Ala Glu Ala Phe Asp Ser Val Thr Ile Tyr Phe Ser		
	865	870	875
	Asp Ile Val Gly Phe Thr Ala Leu Ser Ala Glu Ser Thr Pro Met Gln		
	885	890	895
	Val Val Thr Leu Leu Asn Asp Leu Tyr Thr Cys Phe Asp Ala Val Ile		
	900	905	910
	Asp Asn Phe Asp Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met		
	915	920	925
	Val Val Ser Gly Leu Pro Val Arg Asn Gly Arg Leu His Ala Cys Glu		
[0050]	930	935	940
	Val Ala Arg Met Ala Leu Ala Leu Leu Asp Ala Val Arg Ser Phe Arg		
	945	950	955
	Ile Arg His Arg Pro Gln Glu Gln Leu Arg Leu Arg Ile Gly Ile His		
	965	970	975
	Thr Gly Pro Val Cys Ala Gly Val Val Gly Leu Lys Met Pro Arg Tyr		
	980	985	990
	Cys Leu Phe Gly Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Asn		
	995	1000	1005
	Gly Glu Ala Leu Lys Ile His Leu Ser Ser Glu Thr Lys Ala Val Leu		
	1010	1015	1020
	Glu Glu Phe Gly Gly Phe Glu Leu Glu Leu Arg Gly Asp Val Glu Met		
	1025	1030	1035
	Lys Gly Lys Gly Lys Val Arg Thr Tyr Trp Leu Leu Gly Glu Arg Gly		
	1045	1050	1055
	Ser Ser Thr Arg Gly		
	1060		
	<210> 194		
	<211> 469		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> hNPRI-mmH		

aa 1-441: hNPR1 aa G32-E473 , 来自 NM_000906.3; aa
442-469: Myc-Myc-六组氨酸标签

<400> 194

Gly	Asn	Leu	Thr	Val	Ala	Val	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Asn	Thr	Ser	Tyr
1				5					10					15	
Pro	Trp	Ser	Trp	Ala	Arg	Val	Gly	Pro	Ala	Val	Glu	Leu	Ala	Leu	Ala
				20				25						30	
Gln	Val	Lys	Ala	Arg	Pro	Asp	Leu	Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Val	Arg	Thr
				35				40						45	
Val	Leu	Gly	Ser	Ser	Glu	Asn	Ala	Leu	Gly	Val	Cys	Ser	Asp	Thr	Ala
				50				55						60	
Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Val	Asp	Leu	Lys	Trp	Glu	His	Asn	Pro	Ala	Val
65						70				75				80	
Phe	Leu	Gly	Pro	Gly	Cys	Val	Tyr	Ala	Ala	Ala	Pro	Val	Gly	Arg	Phe
				85					90					95	
Thr	Ala	His	Trp	Arg	Val	Pro	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Ala	Pro	Ala	Leu
				100					105					110	
Gly	Phe	Gly	Val	Lys	Asp	Glu	Tyr	Ala	Leu	Thr	Thr	Arg	Ala	Gly	Pro
				115					120					125	
Ser	Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly	Asp	Phe	Val	Ala	Ala	Leu	His	Arg	Arg	Leu
				130					135					140	
[0051]	Gly	Trp	Glu	Arg	Gln	Ala	Leu	Met	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Arg	Pro	Gly
145						150						155			160
Glu	Glu	His	Cys	Phe	Phe	Leu	Val	Glu	Gly	Leu	Phe	Met	Arg	Val	Arg
						165						170			175
Asp	Arg	Leu	Asn	Ile	Thr	Val	Asp	His	Leu	Glu	Phe	Ala	Glu	Asp	Asp
						180						185			190
Leu	Ser	His	Tyr	Thr	Arg	Leu	Leu	Arg	Thr	Met	Pro	Arg	Lys	Gly	Arg
						195						200			205
Val	Ile	Tyr	Ile	Cys	Ser	Ser	Pro	Asp	Ala	Phe	Arg	Thr	Leu	Met	Leu
						210						215			220
Leu	Ala	Leu	Glu	Ala	Gly	Leu	Cys	Gly	Glu	Asp	Tyr	Val	Phe	Phe	His
						225						230			235
Leu	Asp	Ile	Phe	Gly	Gln	Ser	Leu	Gln	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Ala	Pro
						245						250			255
Arg	Arg	Pro	Trp	Glu	Arg	Gly	Asp	Gly	Gln	Asp	Val	Ser	Ala	Arg	Gln
						260						265			270
Ala	Phe	Gln	Ala	Ala	Lys	Ile	Ile	Thr	Tyr	Lys	Asp	Pro	Asp	Asn	Pro
						275						280			285
Glu	Tyr	Leu	Glu	Phe	Leu	Lys	Gln	Leu	Lys	His	Leu	Ala	Tyr	Glu	Gln
						290						295			300
Phe	Asn	Phe	Thr	Met	Glu	Asp	Gly	Leu	Val	Asn	Thr	Ile	Pro	Ala	Ser
						305						310			315
Phe	His	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu	Tyr	Ile	Gln	Ala	Val	Thr	Glu	Thr	Leu

	325	330	335
Ala His Gly Gly Thr Val Thr Asp Gly Glu Asn Ile Thr Gln Arg Met			
340	345	350	
Trp Asn Arg Ser Phe Gln Gly Val Thr Gly Tyr Leu Lys Ile Asp Ser			
355	360	365	
Ser Gly Asp Arg Glu Thr Asp Phe Ser Leu Trp Asp Met Asp Pro Glu			
370	375	380	
Asn Gly Ala Phe Arg Val Val Leu Asn Tyr Asn Gly Thr Ser Gln Glu			
385	390	395	400
Leu Val Ala Val Ser Gly Arg Lys Leu Asn Trp Pro Leu Gly Tyr Pro			
405	410	415	
Pro Pro Asp Ile Pro Lys Cys Gly Phe Asp Asn Glu Asp Pro Ala Cys			
420	425	430	
Asn Gln Asp His Leu Ser Thr Leu Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu			
435	440	445	
Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His			
450	455	460	
His His His His His			
465			
<210> 195			
<211> 469			
<212> PRT			
[0052] <213> 人工序列			
<220>			
<223> mfNPR1-mmH			
aa 1-441: XP_005541810.1 的同种型 X2 的 mf NPR1 aa G33-E473;			
aa 442-469: Myc-Myc-六组氨酸标签			
<400> 195			
Gly Asn Leu Thr Val Ala Val Val Leu Pro Leu Ala Asn Thr Ser Tyr			
1 5 10 15			
Pro Trp Ser Trp Ala Arg Val Gly Pro Ala Val Glu Leu Ala Leu Ala			
20 25 30			
Arg Val Lys Ala Arg Pro Asp Leu Leu Pro Gly Trp Thr Val Arg Thr			
35 40 45			
Val Leu Gly Ser Ser Glu Asn Ala Leu Gly Val Cys Ser Asp Thr Ala			
50 55 60			
Ala Pro Leu Ala Ala Val Asp Leu Lys Trp Glu His Asn Pro Ala Ala			
65 70 75 80			
Phe Leu Gly Pro Gly Cys Val Tyr Ala Ala Ala Pro Val Gly Arg Phe			
85 90 95			
Thr Ala His Trp Arg Val Pro Leu Leu Thr Ala Gly Ala Pro Ala Leu			
100 105 110			
Gly Phe Gly Val Lys Asp Glu Tyr Ala Leu Thr Thr Arg Ala Gly Pro			
115 120 125			

Ser Tyr Ala Lys Leu Gly Asp Phe Val Ala Ala Leu His Arg Arg Leu			
130	135	140	
Gly Trp Glu Arg Gln Ala Leu Met Leu Tyr Ala Tyr Arg Pro Gly Asp			
145	150	155	160
Glu Glu His Cys Phe Phe Leu Val Glu Gly Leu Phe Met Arg Val Arg			
165	170	175	
Asp Arg Leu Asn Ile Thr Val Asp His Leu Glu Phe Ala Glu Asp Asp			
180	185	190	
Leu Ser His Tyr Thr Arg Leu Leu Arg Thr Met Pro Arg Lys Gly Arg			
195	200	205	
Val Ile Tyr Ile Cys Ser Ser Pro Asp Ala Phe Arg Thr Leu Met Leu			
210	215	220	
Leu Ala Leu Glu Ala Gly Leu Cys Gly Glu Asp Tyr Val Phe Phe His			
225	230	235	240
Leu Asp Ile Phe Gly Gln Ser Leu Gln Gly Gly Gln Gly Pro Ala Pro			
245	250	255	
Arg Arg Pro Trp Glu Arg Gly Asp Gly Gln Asp Val Ser Ala Arg Gln			
260	265	270	
Ala Phe Gln Ala Ala Lys Ile Ile Thr Tyr Lys Glu Pro Asp Asn Pro			
275	280	285	
Glu Tyr Leu Glu Phe Leu Lys Gln Leu Lys His Leu Ala Arg Glu Gln			
290	295	300	
[0053] Phe Asn Phe Thr Met Glu Asp Gly Leu Val Asn Thr Ile Pro Ala Ser			
305	310	315	320
Phe His Asp Gly Leu Leu Tyr Ile Gln Ala Val Thr Glu Thr Leu			
325	330	335	
Ala His Gly Gly Thr Val Thr Asp Gly Glu Asn Ile Thr Gln Arg Met			
340	345	350	
Trp Asn Arg Ser Phe Gln Gly Val Thr Gly Tyr Leu Lys Ile Asp Ser			
355	360	365	
Ser Gly Asp Arg Glu Thr Asp Phe Ser Leu Trp Asp Met Asp Pro Glu			
370	375	380	
Thr Gly Ala Phe Arg Val Val Leu Asn Tyr Asn Gly Thr Ser Gln Glu			
385	390	395	400
Leu Val Ala Val Ser Gly Arg Lys Leu Asn Trp Pro Leu Gly Tyr Pro			
405	410	415	
Pro Pro Asp Ile Pro Lys Cys Gly Phe Asp Asn Glu Asp Pro Ala Cys			
420	425	430	
Asn Gln Asp His Leu Ser Thr Leu Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu			
435	440	445	
Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His			
450	455	460	
His His His His His			
465			
<210>	196		

<211> 469

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mNPR1-mmH

aa 1-441: 小鼠 NPR1 aa S29-E469 , 来自 NM_008727.5;

aa 442-469: Myc-Myc-六组氨酸标签

<400> 196

Ser Asp Leu Thr Val Ala Val Val Leu Pro Leu Thr Asn Thr Ser Tyr

1 5 10 15

Pro Trp Ser Trp Ala Arg Val Gly Pro Ala Val Glu Leu Ala Leu Gly

20 25 30

Arg Val Lys Ala Arg Pro Asp Leu Leu Pro Gly Trp Thr Val Arg Met

35 40 45

Val Leu Gly Ser Ser Glu Asn Ala Ala Gly Val Cys Ser Asp Thr Ala

50 55 60

Ala Pro Leu Ala Ala Val Asp Leu Lys Trp Glu His Ser Pro Ala Val

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ala His Trp Arg Val Pro Leu Leu Thr Ala Gly Ala Pro Ala Leu

[0054] 100 105 110

Gly Ile Gly Val Lys Asp Glu Tyr Ala Leu Thr Thr Arg Thr Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

Gly Trp Glu His Gln Ala Leu Val Leu Tyr Ala Asp Arg Leu Gly Asp

145 150 155 160

Asp Arg Pro Cys Phe Phe Ile Val Glu Gly Leu Tyr Met Arg Val Arg

165 170 175

Glu Arg Leu Asn Ile Thr Val Asn His Gln Glu Phe Val Glu Gly Asp

180 185 190

Pro Asp His Tyr Thr Lys Leu Leu Arg Thr Val Gln Arg Lys Gly Arg

195 200 205

Val Ile Tyr Ile Cys Ser Ser Pro Asp Ala Phe Arg Asn Leu Met Leu

210 215 220

Leu Ala Leu Asp Ala Gly Leu Thr Gly Glu Asp Tyr Val Phe Phe His

225 230 235 240

Leu Asp Val Phe Gly Gln Ser Leu Gln Gly Ala Gln Gly Pro Val Pro

245 250 255

Arg Lys Pro Trp Glu Arg Asp Asp Gly Gln Asp Arg Arg Ala Arg Gln

260 265 270

Ala Phe Gln Ala Ala Lys Ile Ile Thr Tyr Lys Glu Pro Asp Asn Pro

275 280 285

```

Glu Tyr Leu Glu Phe Leu Lys Gln Leu Lys Leu Leu Ala Asp Lys Lys
290                295                300
Phe Asn Phe Thr Met Glu Asp Gly Leu Lys Asn Ile Ile Pro Ala Ser
305                310                315                320
Phe His Asp Gly Leu Leu Leu Tyr Val Gln Ala Val Thr Glu Thr Leu
                325                330                335
Ala Gln Gly Gly Thr Val Thr Asp Gly Glu Asn Ile Thr Gln Arg Met
                340                345                350
Trp Asn Arg Ser Phe Gln Gly Val Thr Gly Tyr Leu Lys Ile Asp Arg
                355                360                365
Asn Gly Asp Arg Asp Thr Asp Phe Ser Leu Trp Asp Met Asp Pro Glu
370                375                380
Thr Gly Ala Phe Arg Val Val Leu Asn Phe Asn Gly Thr Ser Gln Glu
385                390                395                400
Leu Met Ala Val Ser Glu His Arg Leu Tyr Trp Pro Leu Gly Tyr Pro
                405                410                415
Pro Pro Asp Ile Pro Lys Cys Gly Phe Asp Asn Glu Asp Pro Ala Cys
                420                425                430
Asn Gln Asp His Phe Ser Thr Leu Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
                435                440                445
Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His
450                455                460
[0055] His His His His His
465
<210> 197
<211> 674
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hNPR1-mFc
        aa 1-441: 人 NPR1 氨基酸 G32-E473 , 来自
        NM_000906.3; aa 442-674: 小鼠 IgG2a Fc 标签
<400> 197
Gly Asn Leu Thr Val Ala Val Val Leu Pro Leu Ala Asn Thr Ser Tyr
1                5                10                15
Pro Trp Ser Trp Ala Arg Val Gly Pro Ala Val Glu Leu Ala Leu Ala
                20                25                30
Gln Val Lys Ala Arg Pro Asp Leu Leu Pro Gly Trp Thr Val Arg Thr
                35                40                45
Val Leu Gly Ser Ser Glu Asn Ala Leu Gly Val Cys Ser Asp Thr Ala
50                55                60
Ala Pro Leu Ala Ala Val Asp Leu Lys Trp Glu His Asn Pro Ala Val
65                70                75                80
Phe Leu Gly Pro Gly Cys Val Tyr Ala Ala Pro Val Gly Arg Phe
                85                90                95

```

	Thr	Ala	His	Trp	Arg	Val	Pro	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Ala	Pro	Ala	Leu
								100							105	110
	Gly	Phe	Gly	Val	Lys	Asp	Glu	Tyr	Ala	Leu	Thr	Thr	Arg	Ala	Gly	Pro
								115							120	125
	Ser	Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly	Asp	Phe	Val	Ala	Ala	Leu	His	Arg	Arg	Leu
								130							135	140
	Gly	Trp	Glu	Arg	Gln	Ala	Leu	Met	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Arg	Pro	Gly	Asp
								145							150	155
	Glu	Glu	His	Cys	Phe	Phe	Leu	Val	Glu	Gly	Leu	Phe	Met	Arg	Val	Arg
															165	170
	Asp	Arg	Leu	Asn	Ile	Thr	Val	Asp	His	Leu	Glu	Phe	Ala	Glu	Asp	Asp
								180							185	190
	Leu	Ser	His	Tyr	Thr	Arg	Leu	Leu	Arg	Thr	Met	Pro	Arg	Lys	Gly	Arg
								195							200	205
	Val	Ile	Tyr	Ile	Cys	Ser	Ser	Pro	Asp	Ala	Phe	Arg	Thr	Leu	Met	Leu
								210							215	220
	Leu	Ala	Leu	Glu	Ala	Gly	Leu	Cys	Gly	Glu	Asp	Tyr	Val	Phe	Phe	His
								225							230	235
	Leu	Asp	Ile	Phe	Gly	Gln	Ser	Leu	Gln	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Ala	Pro
															245	250
	Arg	Arg	Pro	Trp	Glu	Arg	Gly	Asp	Gly	Gln	Asp	Val	Ser	Ala	Arg	Gln
								260							265	270
[0056]	Ala	Phe	Gln	Ala	Ala	Lys	Ile	Ile	Thr	Tyr	Lys	Asp	Pro	Asp	Asn	Pro
								275							280	285
	Glu	Tyr	Leu	Glu	Phe	Leu	Lys	Gln	Leu	Lys	His	Leu	Ala	Tyr	Glu	Gln
								290							295	300
	Phe	Asn	Phe	Thr	Met	Glu	Asp	Gly	Leu	Val	Asn	Thr	Ile	Pro	Ala	Ser
								305							310	315
	Phe	His	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu	Tyr	Ile	Gln	Ala	Val	Thr	Glu	Thr	Leu
															325	330
	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Asp	Gly	Glu	Asn	Ile	Thr	Gln	Arg	Met
								340							345	350
	Trp	Asn	Arg	Ser	Phe	Gln	Gly	Val	Thr	Gly	Tyr	Leu	Lys	Ile	Asp	Ser
								355							360	365
	Ser	Gly	Asp	Arg	Glu	Thr	Asp	Phe	Ser	Leu	Trp	Asp	Met	Asp	Pro	Glu
								370							375	380
	Asn	Gly	Ala	Phe	Arg	Val	Val	Leu	Asn	Tyr	Asn	Gly	Thr	Ser	Gln	Glu
								385							390	395
	Leu	Val	Ala	Val	Ser	Gly	Arg	Lys	Leu	Asn	Trp	Pro	Leu	Gly	Tyr	Pro
															405	410
	Pro	Pro	Asp	Ile	Pro	Lys	Cys	Gly	Phe	Asp	Asn	Glu	Asp	Pro	Ala	Cys
								420							425	430
	Asn	Gln	Asp	His	Leu	Ser	Thr	Leu	Glu	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile
								435							440	445
	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly

	450	455	460	
	Pro Ser Val Phe Ile Phe	Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile		
	465	470	475	480
	Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp			
		485	490	495
	Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His			
		500	505	510
	Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg			
		515	520	525
	Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys			
		530	535	540
	Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
	545	550	555	560
	Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr			
		565	570	575
	Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu			
		580	585	590
	Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp			
		595	600	605
	Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val			
		610	615	620
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu			
[0057]	625	630	635	640
	Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His			
		645	650	655
	Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro			
		660	665	670
	Gly Lys			
	<210> 198			
	<211> 674			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> mfNPR1-mFc			
	aa 1-441: XP_005541810.1 的同种型 X2 的 mf NPR1 氨基酸 G33-E473;			
	aa 442-674: 小鼠 IgG2a Fc 标签			
	<400> 198			
	Gly Asn Leu Thr Val Ala Val Val Leu Pro Leu Ala Asn Thr Ser Tyr			
	1	5	10	15
	Pro Trp Ser Trp Ala Arg Val Gly Pro Ala Val Glu Leu Ala Leu Ala			
		20	25	30
	Arg Val Lys Ala Arg Pro Asp Leu Leu Pro Gly Trp Thr Val Arg Thr			
		35	40	45
	Val Leu Gly Ser Ser Glu Asn Ala Leu Gly Val Cys Ser Asp Thr Ala			

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

Pro Pro Asp Ile Pro Lys Cys Gly Phe Asp Asn Glu Asp Pro Ala Cys
 420 425 430
 Asn Gln Asp His Leu Ser Thr Leu Glu Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile
 435 440 445
 Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly
 450 455 460
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
 465 470 475 480
 Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
 485 490 495
 Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
 500 505 510
 Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg
 515 520 525
 Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
 530 535 540
 Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 545 550 555 560
 Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
 565 570 575
 Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu
 580 585 590
 [0059] Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp
 595 600 605
 Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val
 610 615 620
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu
 625 630 635 640
 Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His
 645 650 655
 Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro
 660 665 670
 Gly Lys

<210> 199

<211> 674

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mNPR1-mFc

aa 1-441: 小鼠 NPR1 aa S29-E469 来自 NM_008727.5;

aa 442-674: 小鼠 IgG2a Fc 标签

<400> 199

Ser Asp Leu Thr Val Ala Val Val Leu Pro Leu Thr Asn Thr Ser Tyr
 1 5 10 15

	Pro	Trp	Ser	Trp	Ala	Arg	Val	Gly	Pro	Ala	Val	Glu	Leu	Ala	Leu	Gly	
				20				25					30				
	Arg	Val	Lys	Ala	Arg	Pro	Asp	Leu	Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Val	Arg	Met	
			35					40					45				
	Val	Leu	Gly	Ser	Ser	Glu	Asn	Ala	Ala	Gly	Val	Cys	Ser	Asp	Thr	Ala	
			50				55					60					
	Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Val	Asp	Leu	Lys	Trp	Glu	His	Ser	Pro	Ala	Val	
	65					70				75					80		
	Phe	Leu	Gly	Pro	Gly	Cys	Val	Tyr	Ser	Ala	Ala	Pro	Val	Gly	Arg	Phe	
					85					90					95		
	Thr	Ala	His	Trp	Arg	Val	Pro	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Ala	Pro	Ala	Leu	
					100					105					110		
	Gly	Ile	Gly	Val	Lys	Asp	Glu	Tyr	Ala	Leu	Thr	Thr	Arg	Thr	Gly	Pro	
			115				120						125				
	Ser	His	Val	Lys	Leu	Gly	Asp	Phe	Val	Thr	Ala	Leu	His	Arg	Arg	Leu	
					130			135					140				
	Gly	Trp	Glu	His	Gln	Ala	Leu	Val	Leu	Tyr	Ala	Asp	Arg	Leu	Gly	Asp	
					145			150				155			160		
	Asp	Arg	Pro	Cys	Phe	Phe	Ile	Val	Glu	Gly	Leu	Tyr	Met	Arg	Val	Arg	
					165					170					175		
	Glu	Arg	Leu	Asn	Ile	Thr	Val	Asn	His	Gln	Glu	Phe	Val	Glu	Gly	Asp	
				180				185							190		
[0060]	Pro	Asp	His	Tyr	Thr	Lys	Leu	Leu	Arg	Thr	Val	Gln	Arg	Lys	Gly	Arg	
				195				200							205		
	Val	Ile	Tyr	Ile	Cys	Ser	Ser	Pro	Asp	Ala	Phe	Arg	Asn	Leu	Met	Leu	
			210					215							220		
	Leu	Ala	Leu	Asp	Ala	Gly	Leu	Thr	Gly	Glu	Asp	Tyr	Val	Phe	Phe	His	
					225			230				235			240		
	Leu	Asp	Val	Phe	Gly	Gln	Ser	Leu	Gln	Gly	Ala	Gln	Gly	Pro	Val	Pro	
					245					250					255		
	Arg	Lys	Pro	Trp	Glu	Arg	Asp	Asp	Gly	Gln	Asp	Arg	Arg	Ala	Arg	Gln	
					260					265					270		
	Ala	Phe	Gln	Ala	Ala	Lys	Ile	Ile	Thr	Tyr	Lys	Glu	Pro	Asp	Asn	Pro	
					275					280					285		
	Glu	Tyr	Leu	Glu	Phe	Leu	Lys	Gln	Leu	Lys	Leu	Leu	Ala	Asp	Lys	Lys	
			290				295						300				
	Phe	Asn	Phe	Thr	Met	Glu	Asp	Gly	Leu	Lys	Asn	Ile	Ile	Pro	Ala	Ser	
					305			310				315			320		
	Phe	His	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu	Tyr	Val	Gln	Ala	Val	Thr	Glu	Thr	Leu	
					325					330					335		
	Ala	Gln	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Asp	Gly	Glu	Asn	Ile	Thr	Gln	Arg	Met	
					340					345					350		
	Trp	Asn	Arg	Ser	Phe	Gln	Gly	Val	Thr	Gly	Tyr	Leu	Lys	Ile	Asp	Arg	
					355					360					365		
	Asn	Gly	Asp	Arg	Asp	Thr	Asp	Phe	Ser	Leu	Trp	Asp	Met	Asp	Pro	Glu	

	370	375	380
	Thr Gly Ala Phe Arg Val	Val Leu Asn Phe Asn Gly Thr Ser Gln Glu	
	385	390	395 400
	Leu Met Ala Val Ser Glu His Arg Leu Tyr Trp Pro Leu Gly Tyr Pro		
	405	410	415
	Pro Pro Asp Ile Pro Lys Cys Gly Phe Asp Asn Glu Asp Pro Ala Cys		
	420	425	430
	Asn Gln Asp His Phe Ser Thr Leu Glu Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile		
	435	440	445
	Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly		
	450	455	460
	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile		
	465	470	475 480
	Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp		
	485	490	495
	Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His		
	500	505	510
	Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg		
	515	520	525
[0061]	Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys		
	530	535	540
	Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
	545	550	555 560
	Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr		
	565	570	575
	Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu		
	580	585	590
	Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp		
	595	600	605
	Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val		
	610	615	620
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu		
	625	630	635 640
	Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His		
	645	650	655
	Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro		
	660	665	670
	Gly Lys		

第3天到第7天平均收缩压自基线的变化

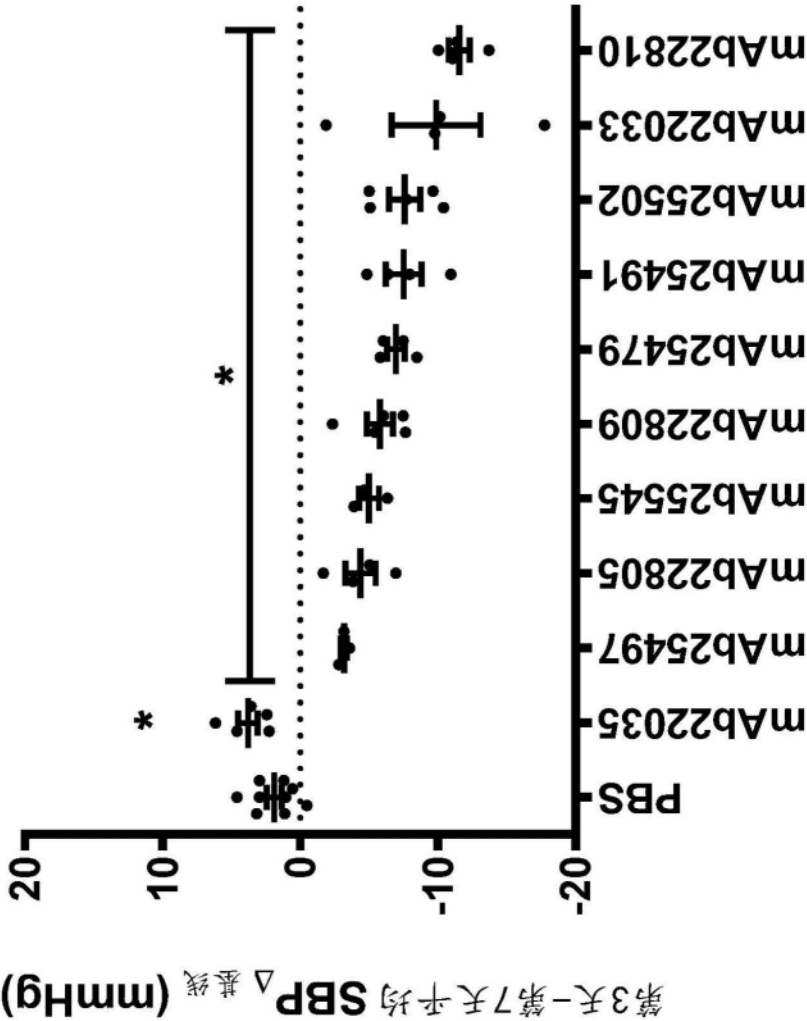


图1

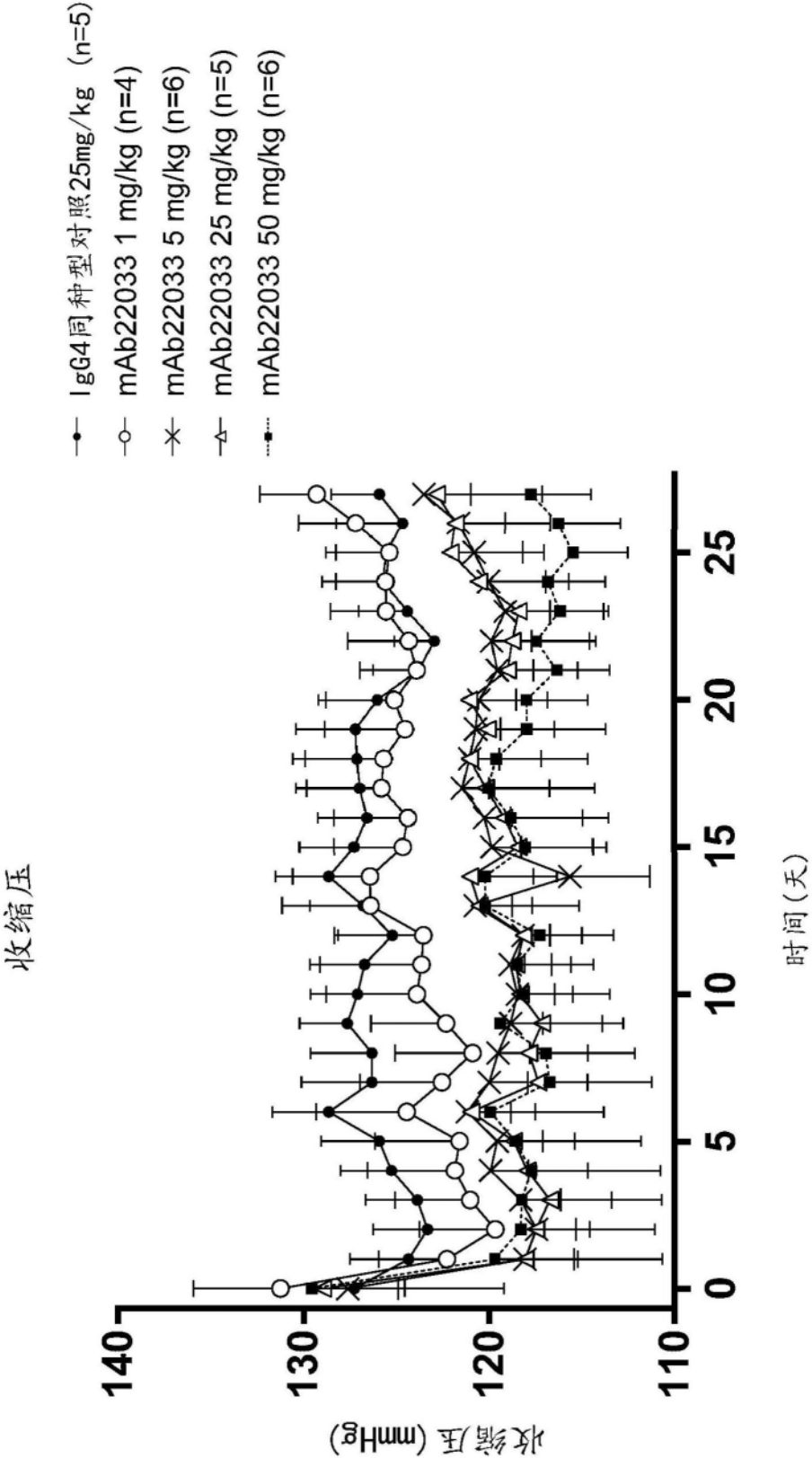


图2

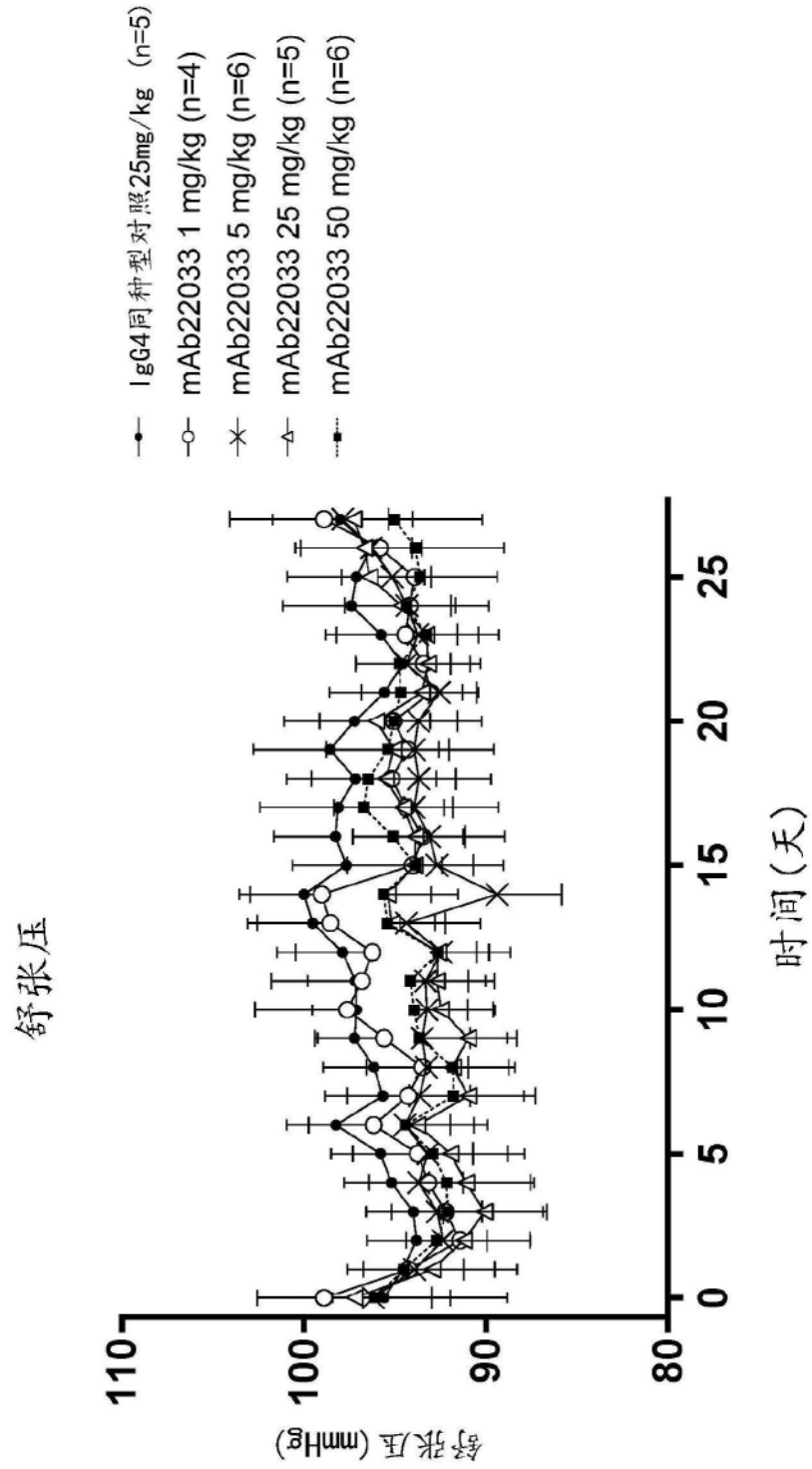


图3

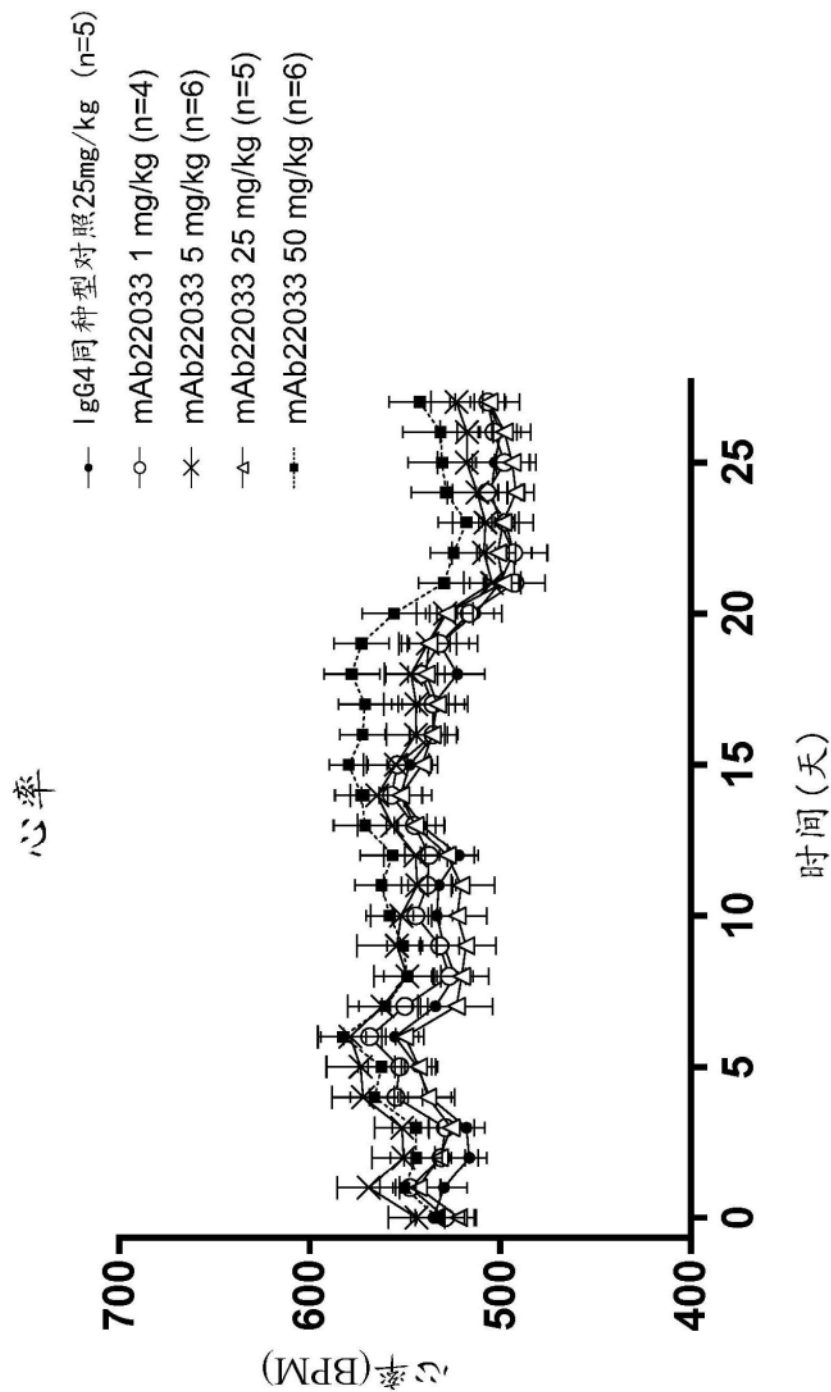


图4

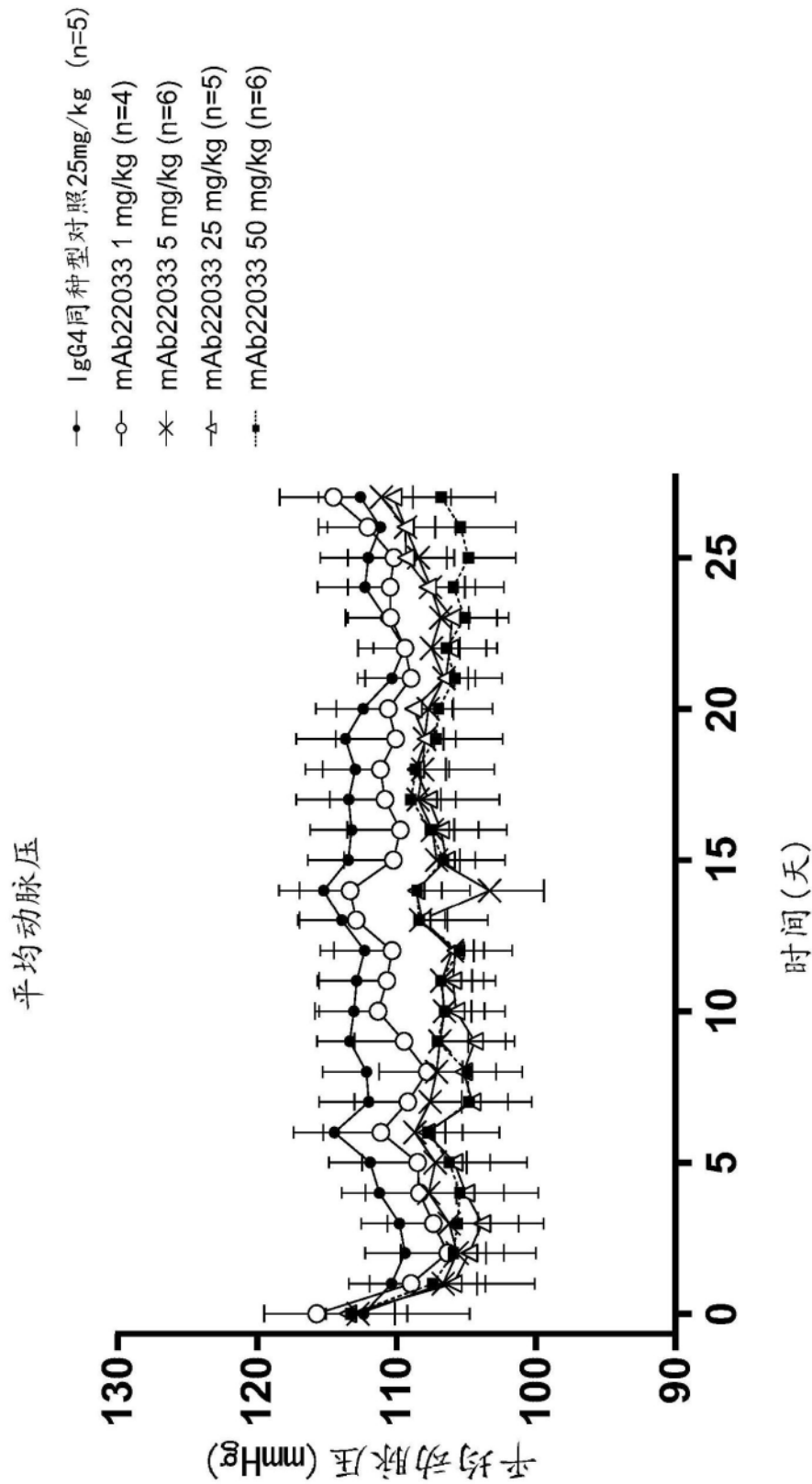


图5

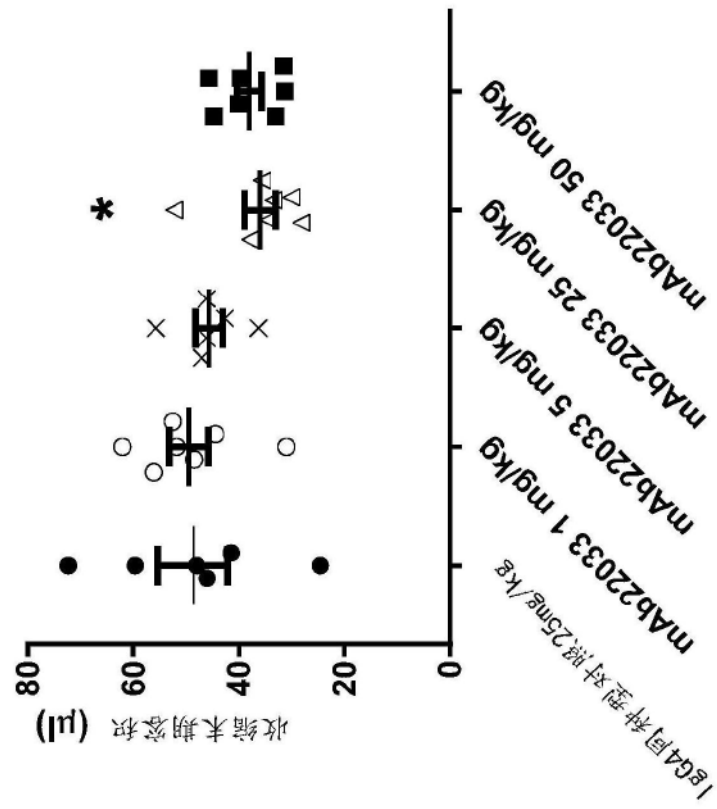


图6A

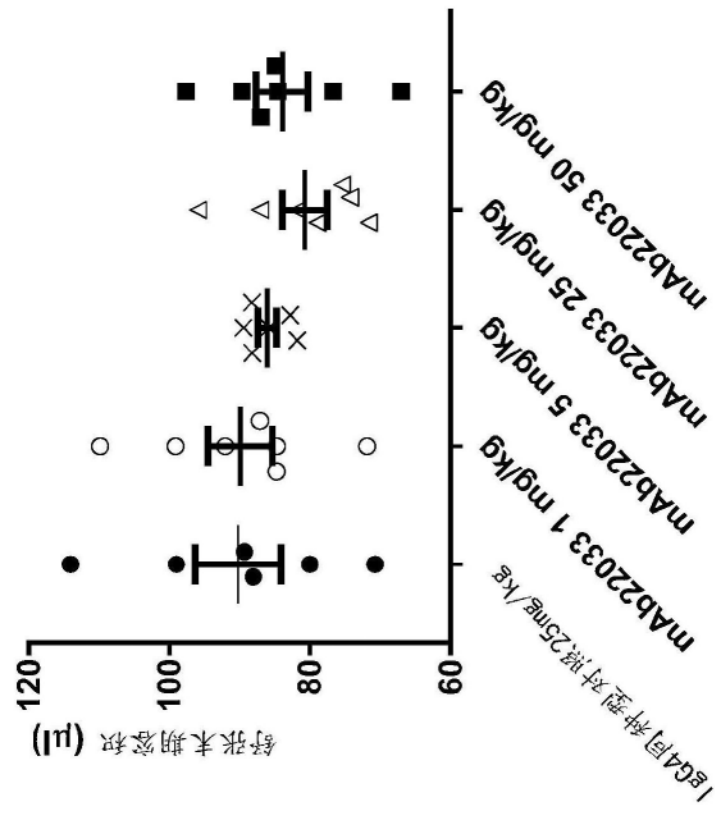


图6B

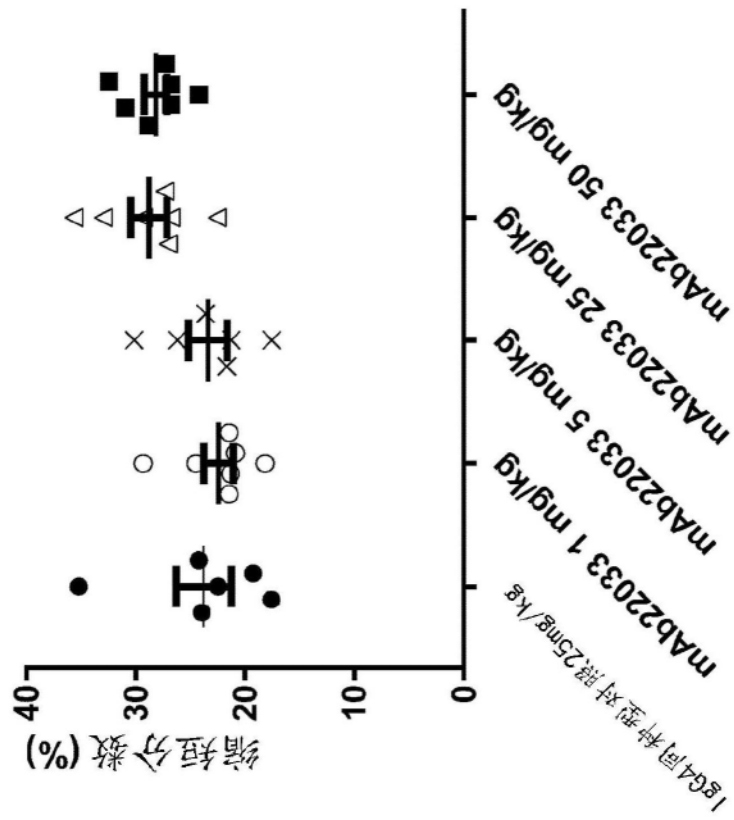


图7A

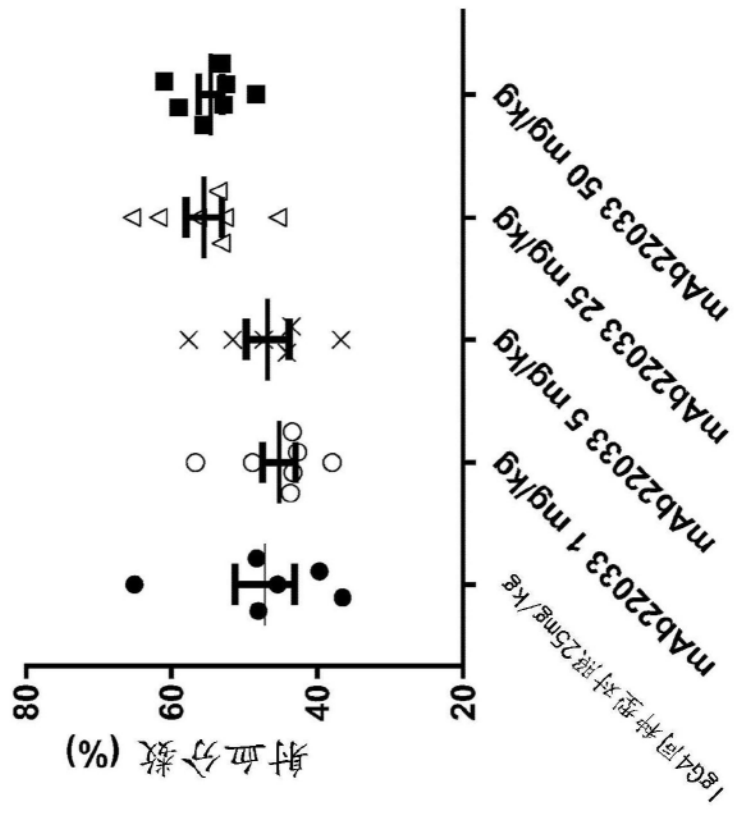


图7B

- IgG4同种型对照25mg/kg
- mAb22033 1 mg/kg
- * mAb22033 5 mg/kg
- △ mAb22033 25 mg/kg
- mAb22810 5 mg/kg
- mAb22810 19 mg/kg

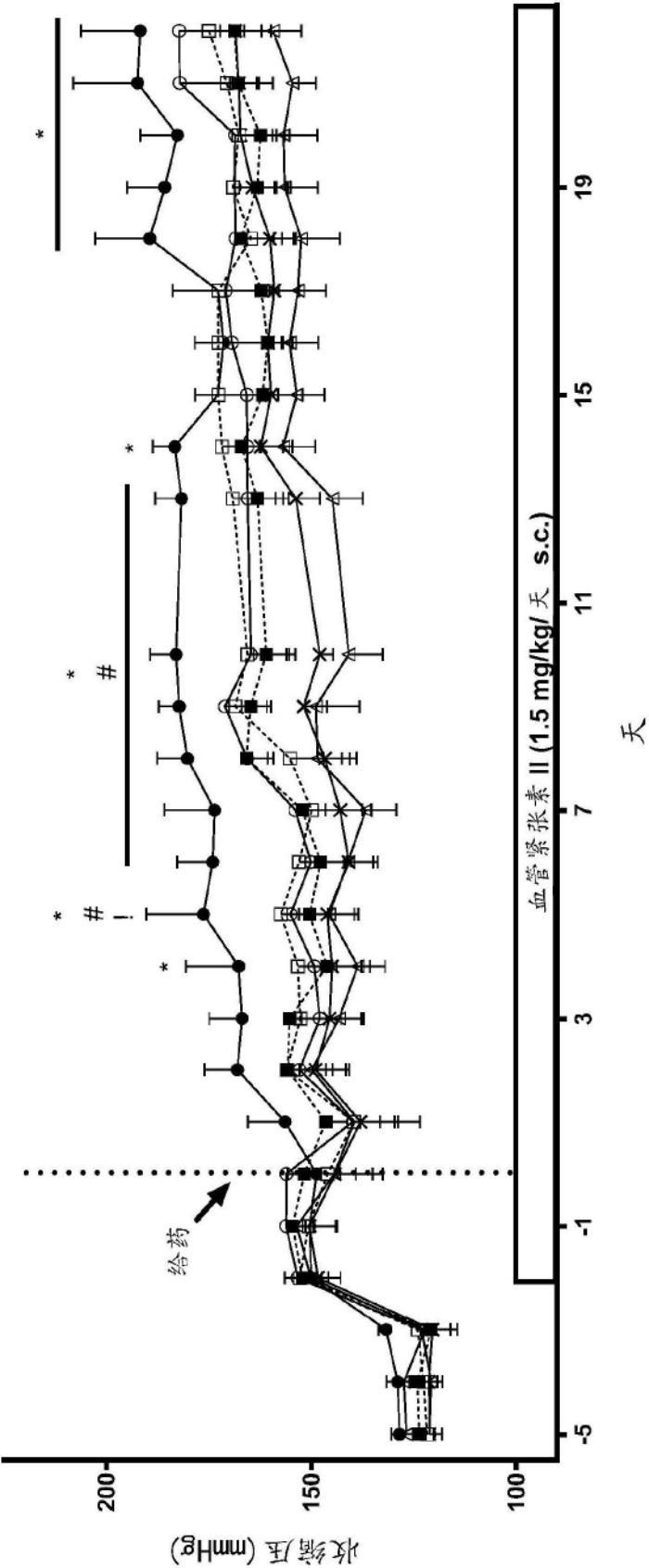


图8

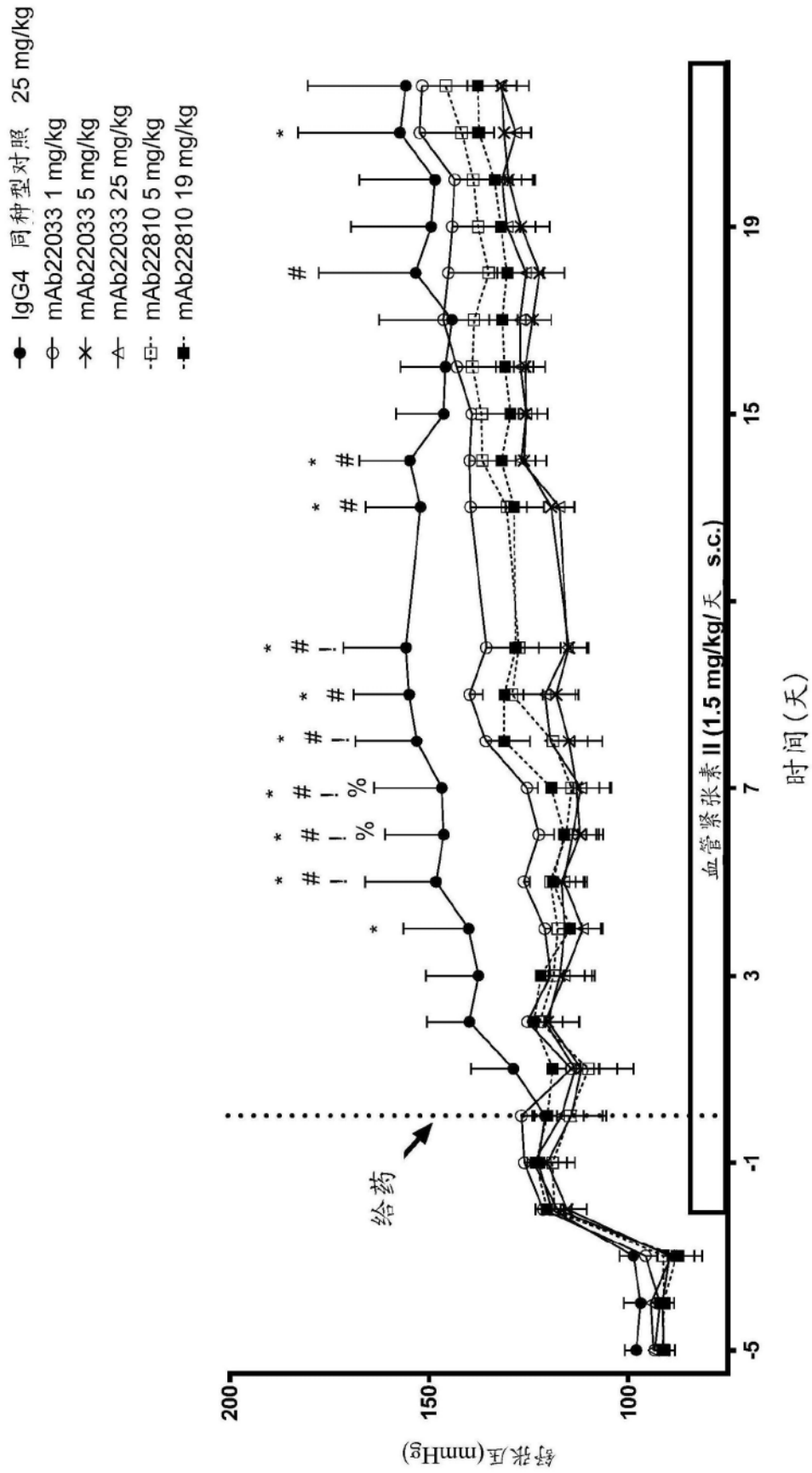


图9

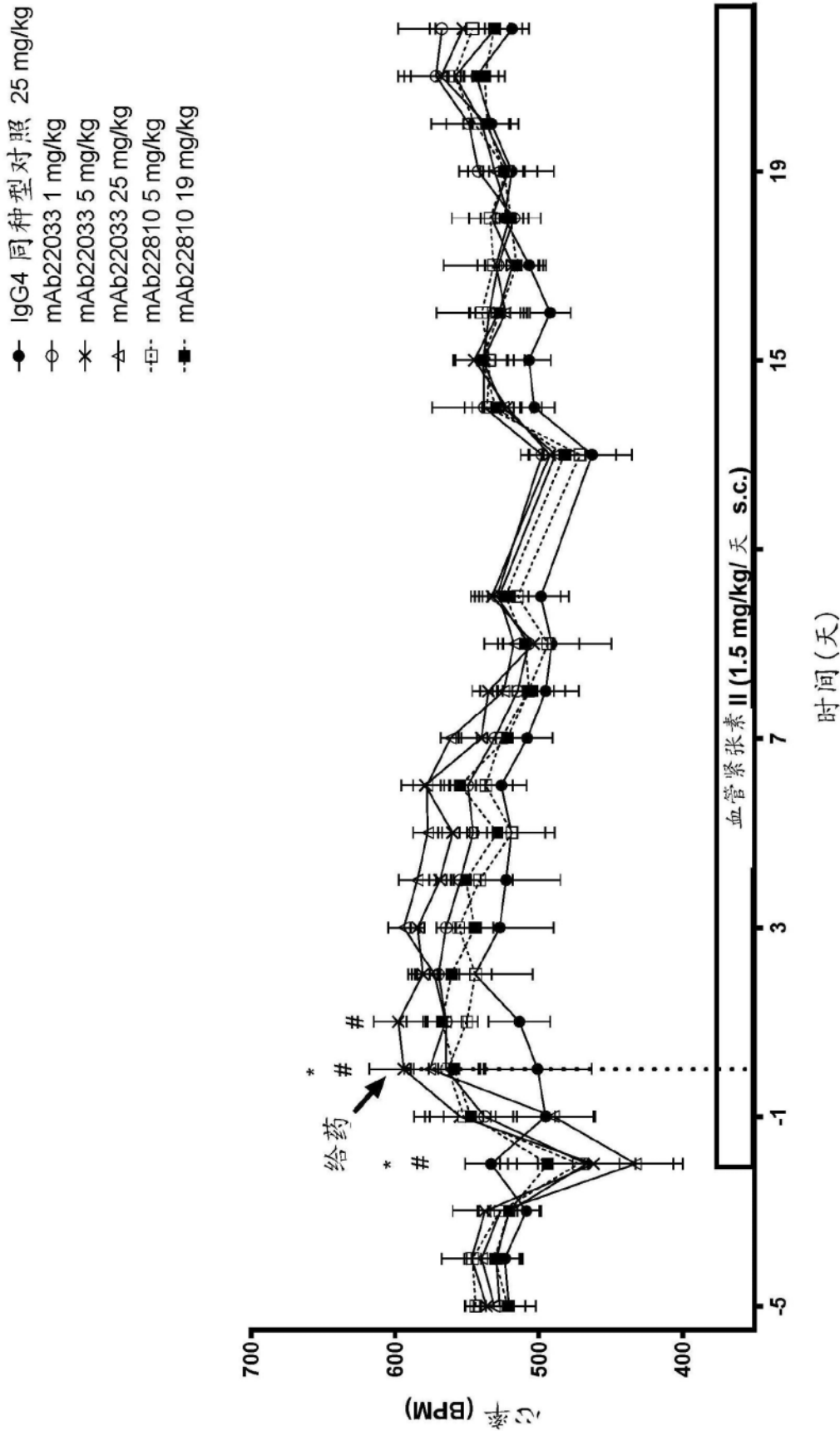


图10

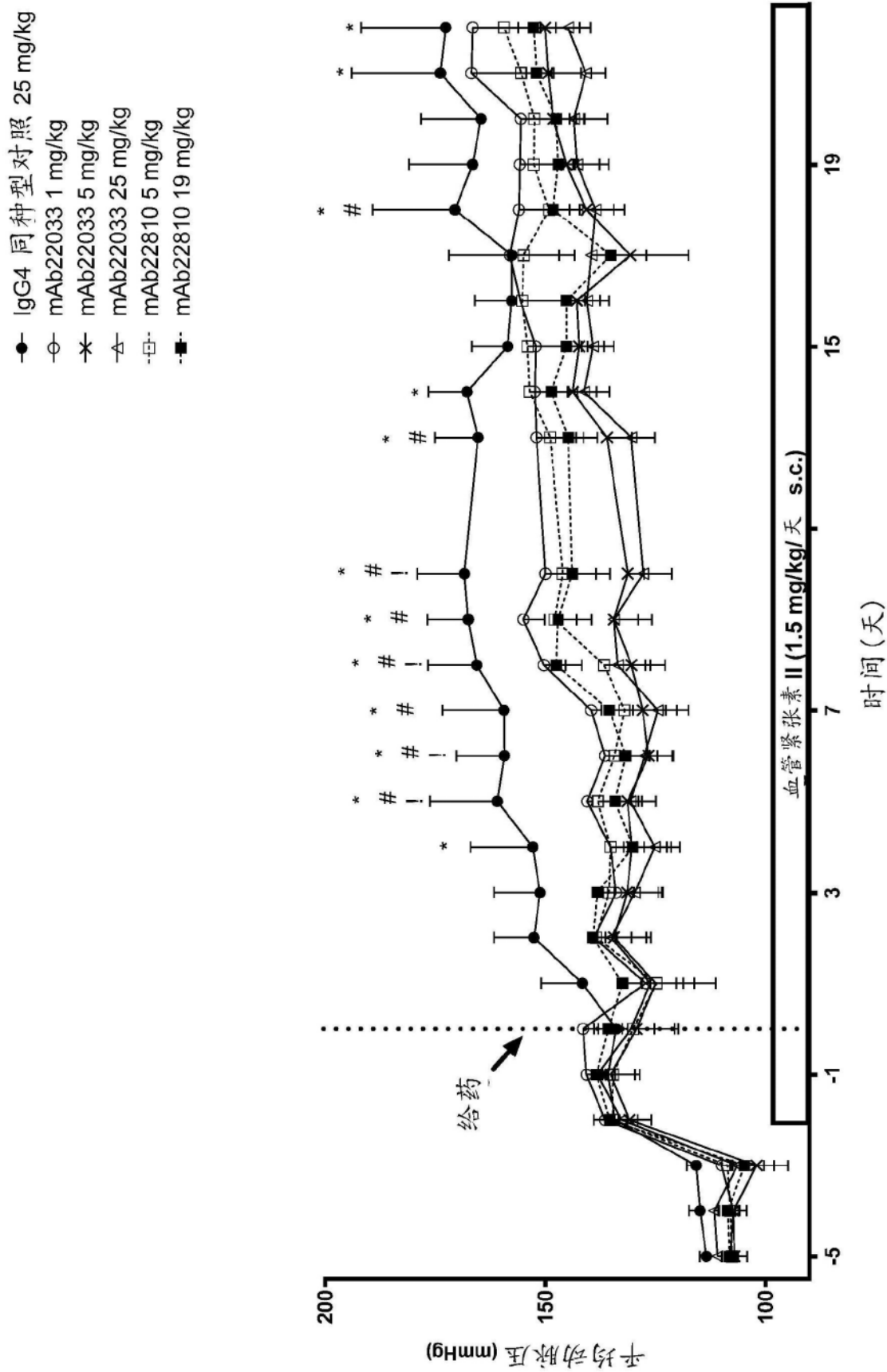


图11

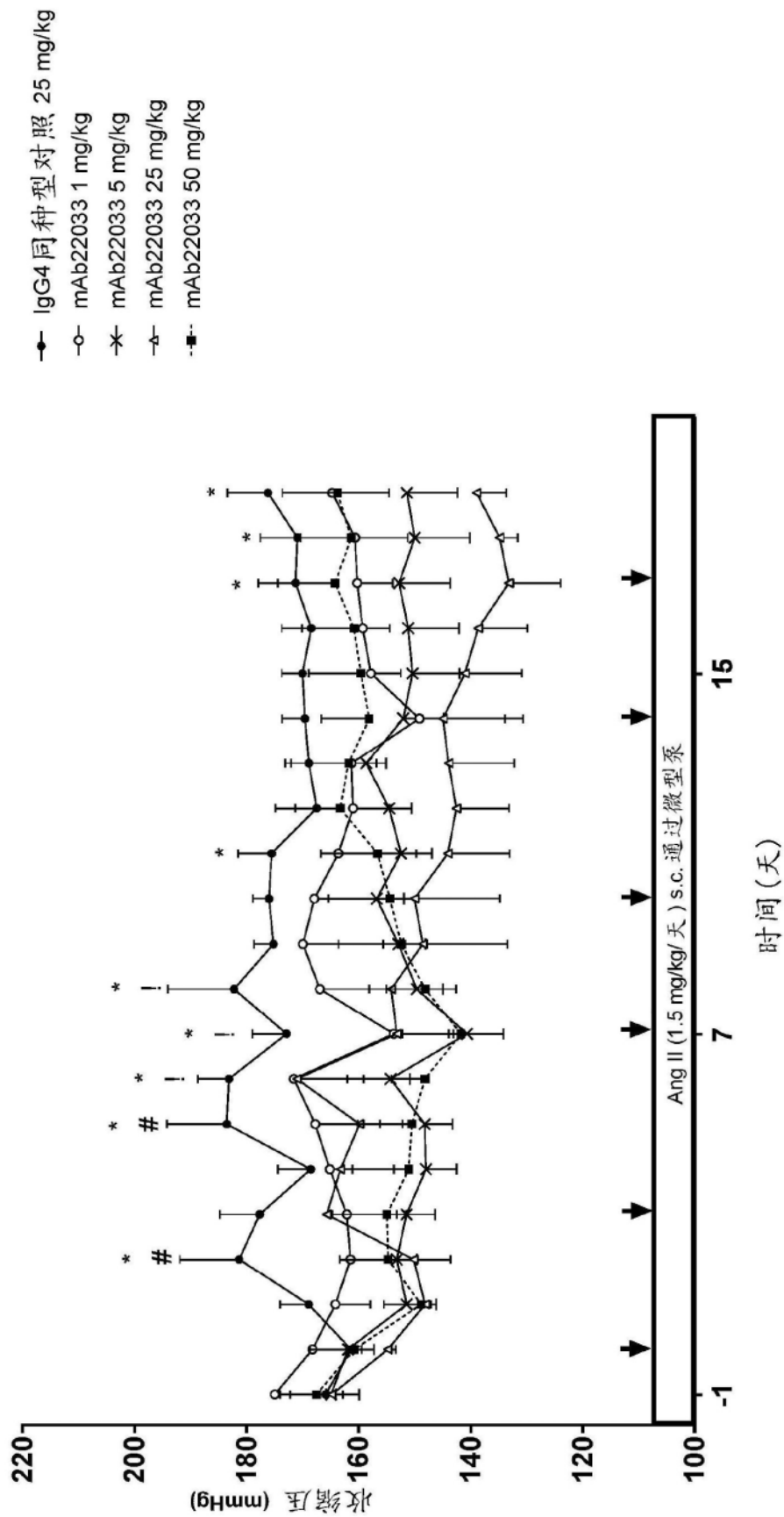


图12

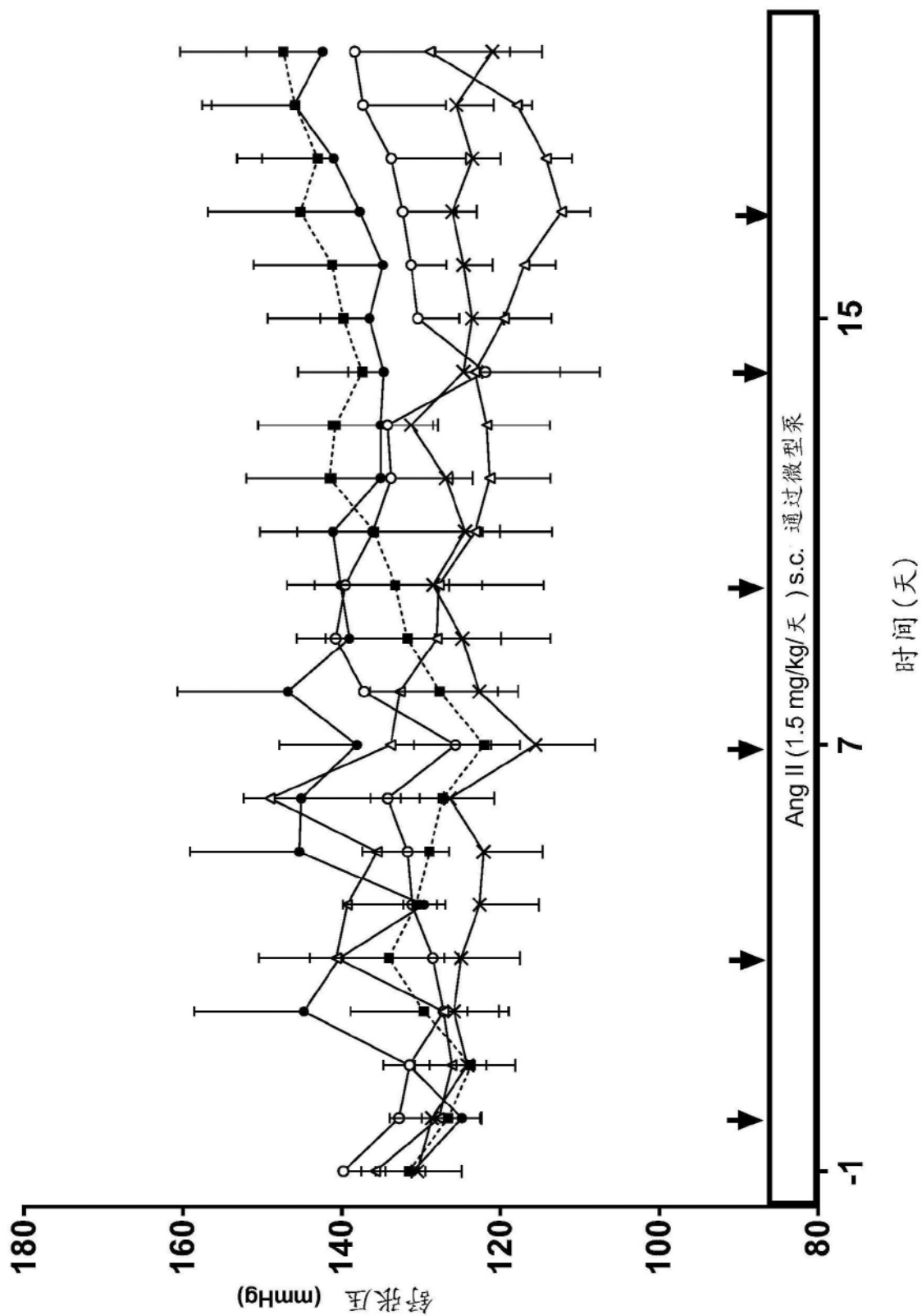


图13

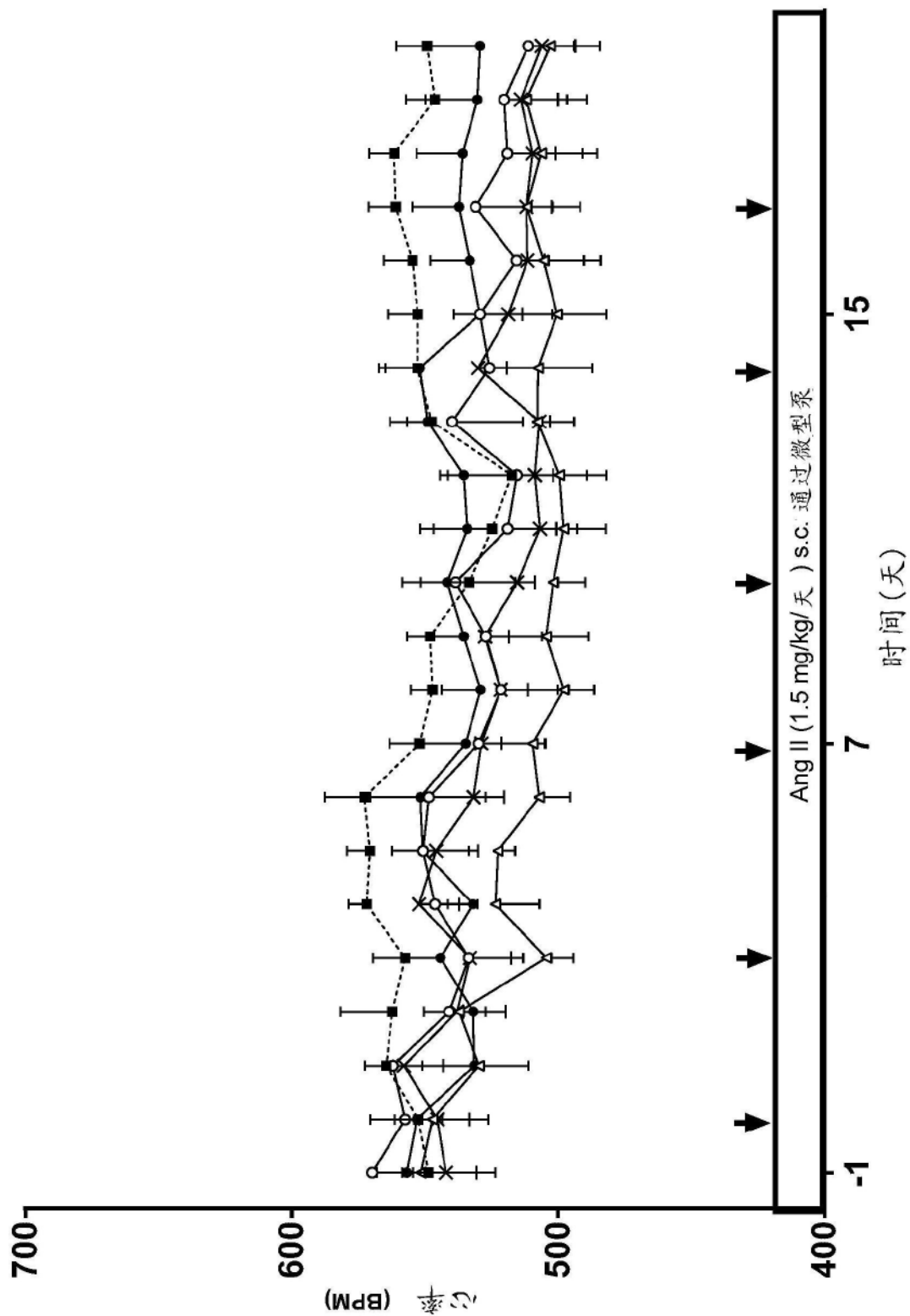


图14

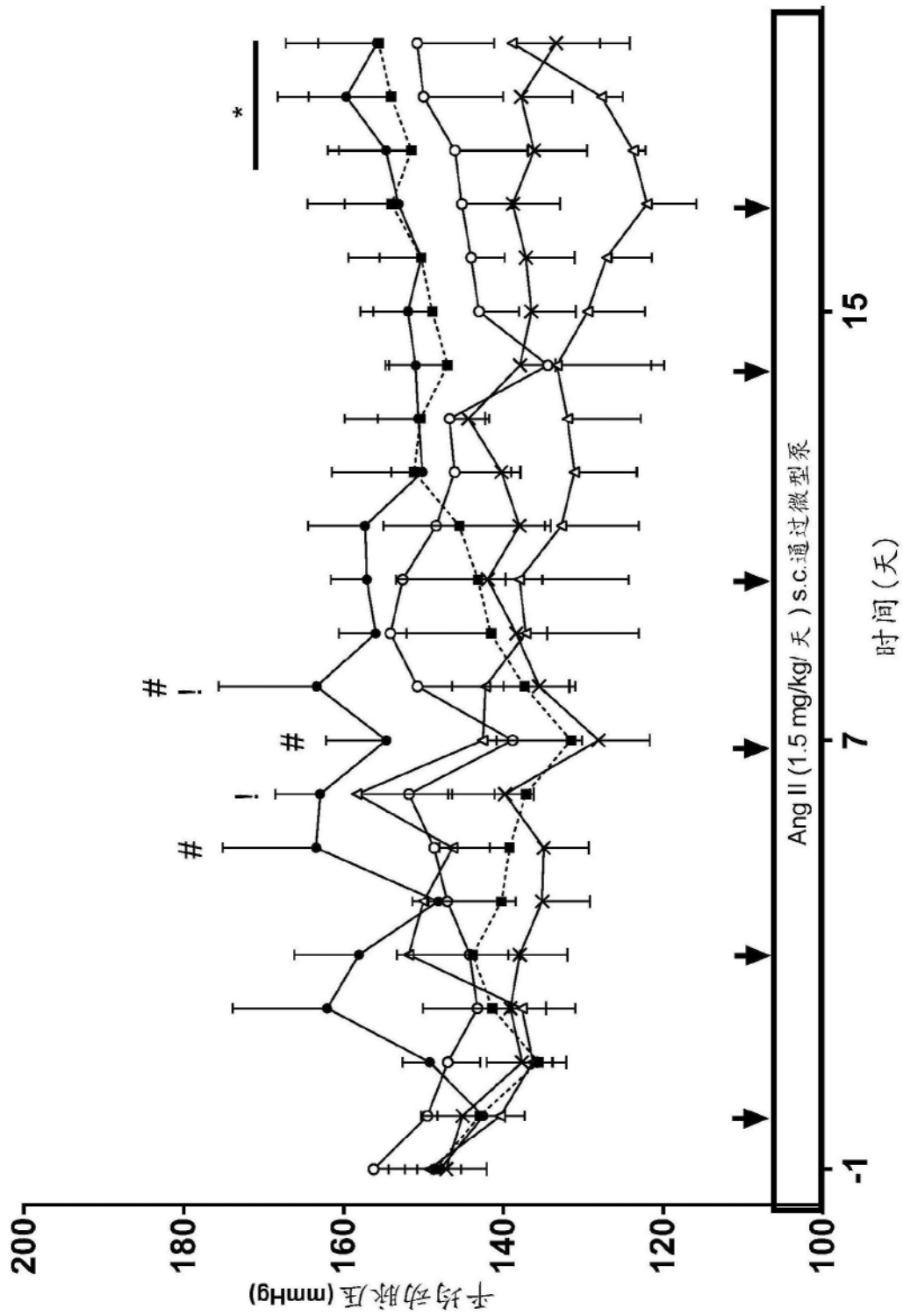


图15

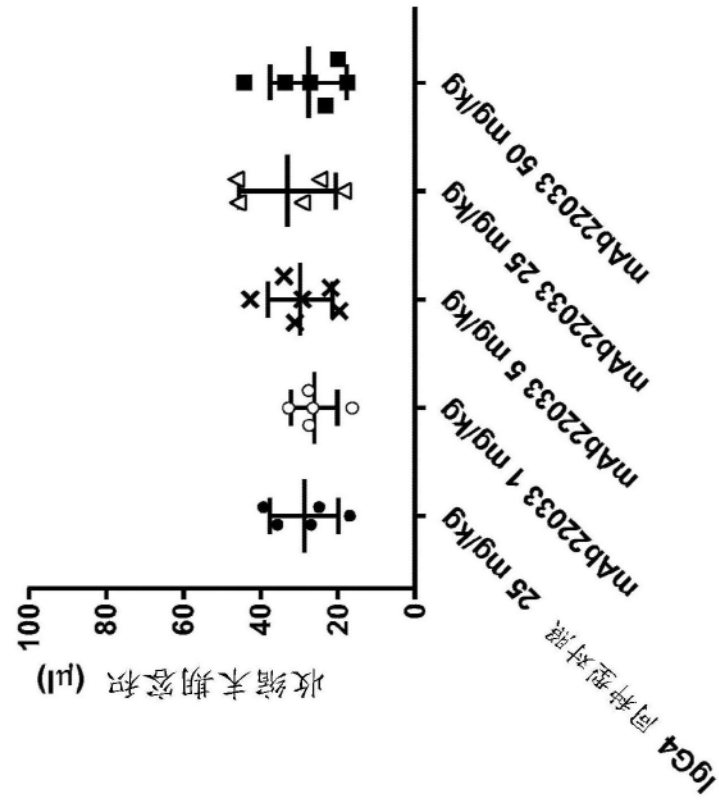


图16A

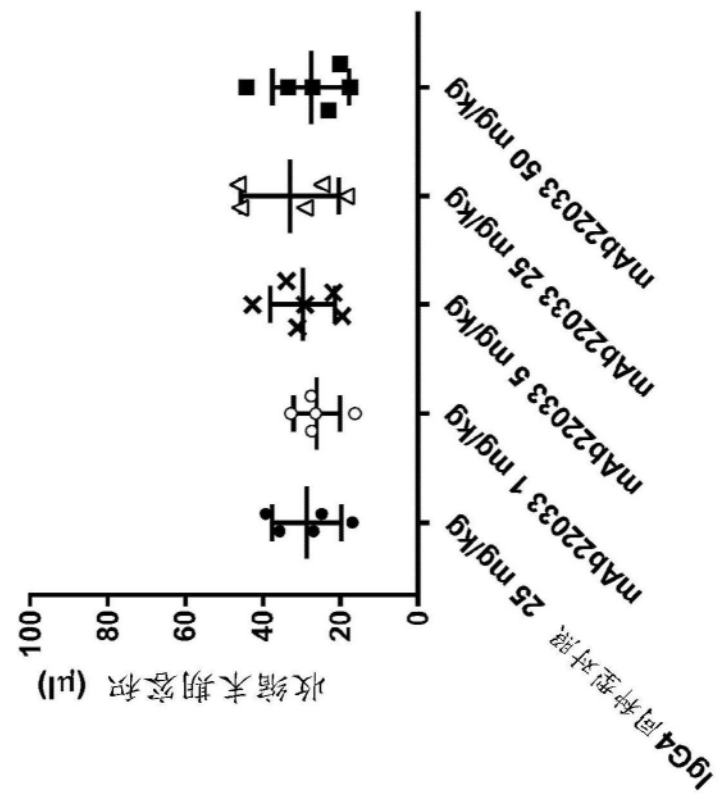


图16B

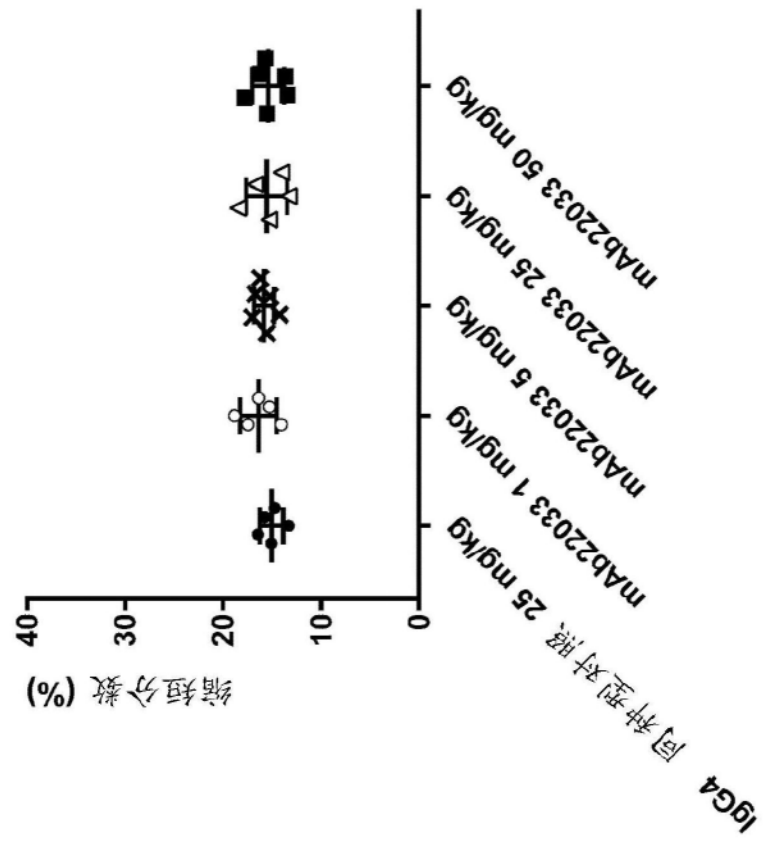


图17A

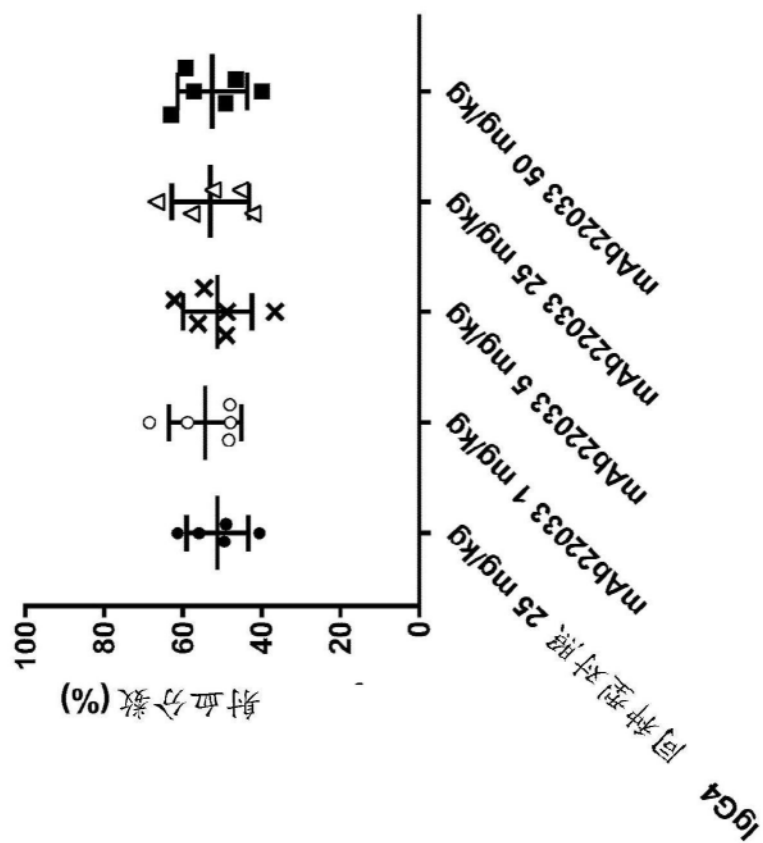


图17B

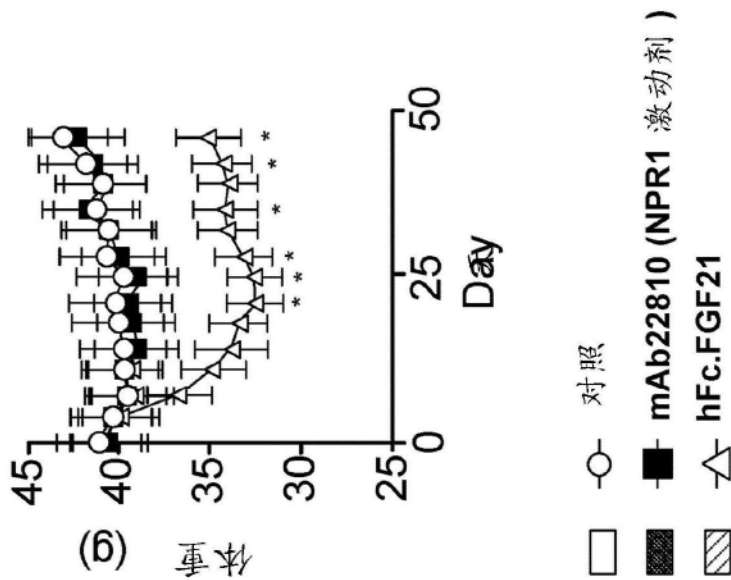


图 18A

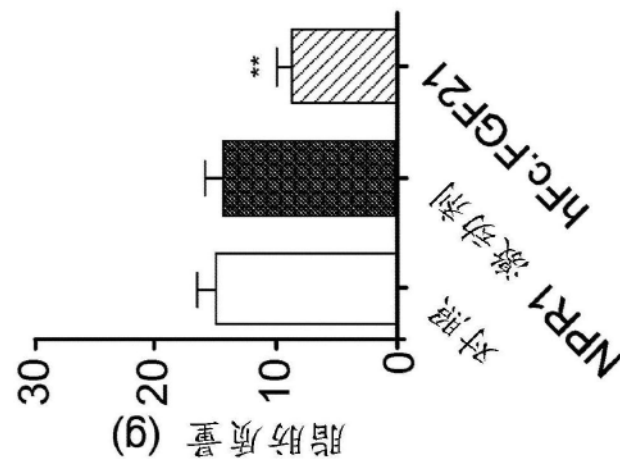


图 18B

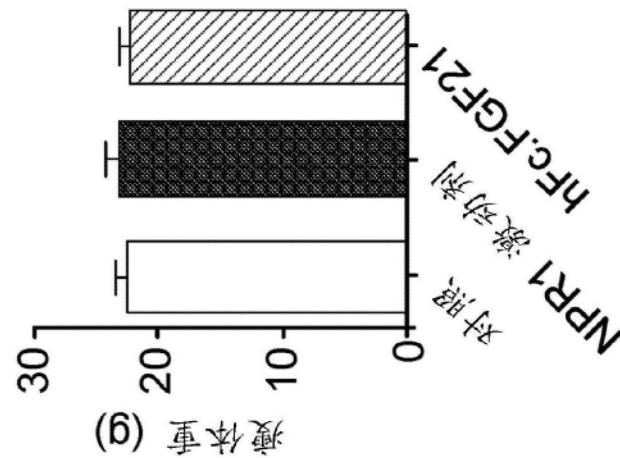


图 18C

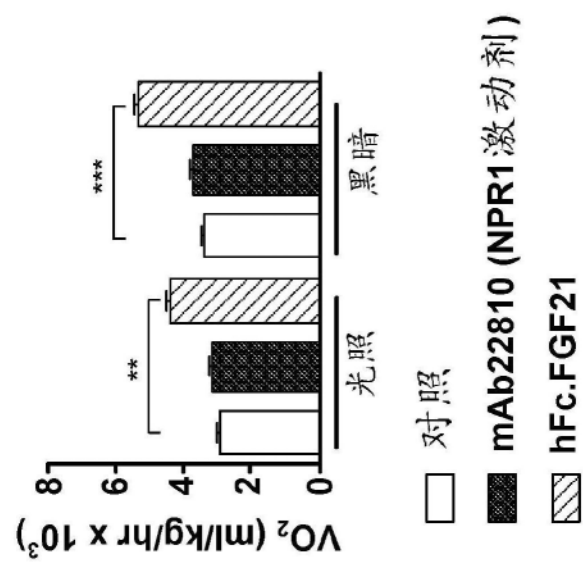


图19A

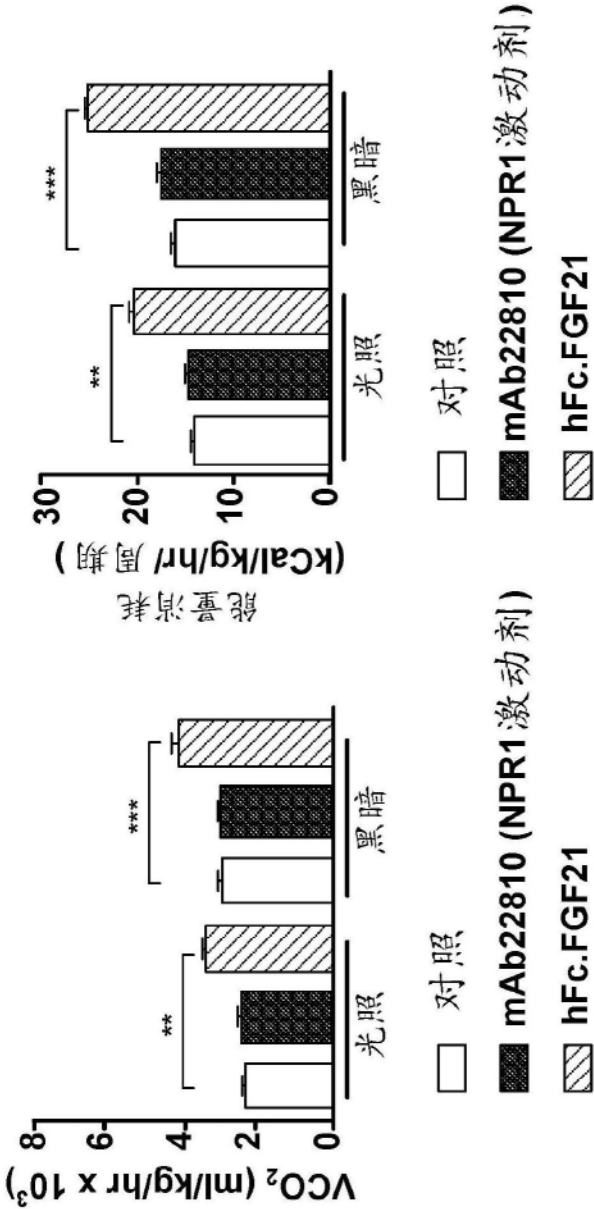


图19B

图19C

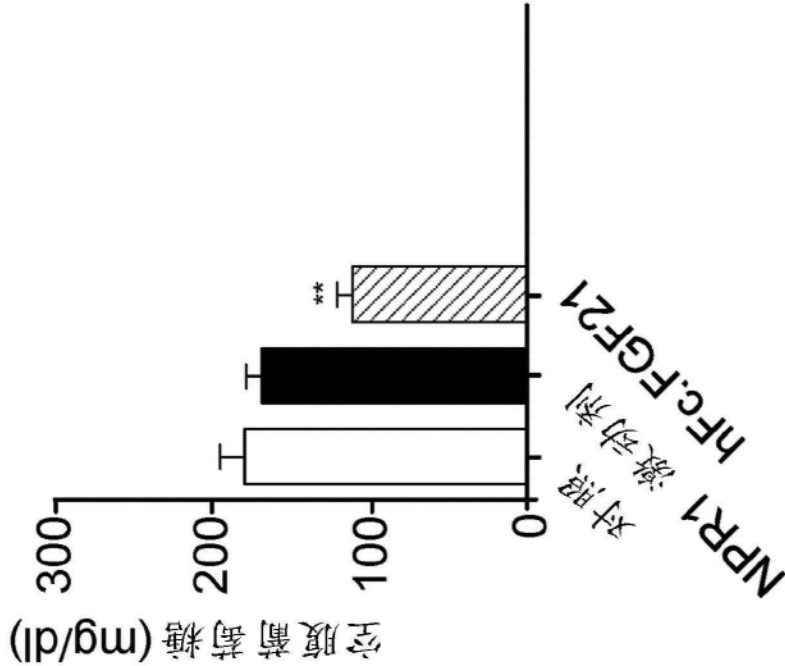


图20B

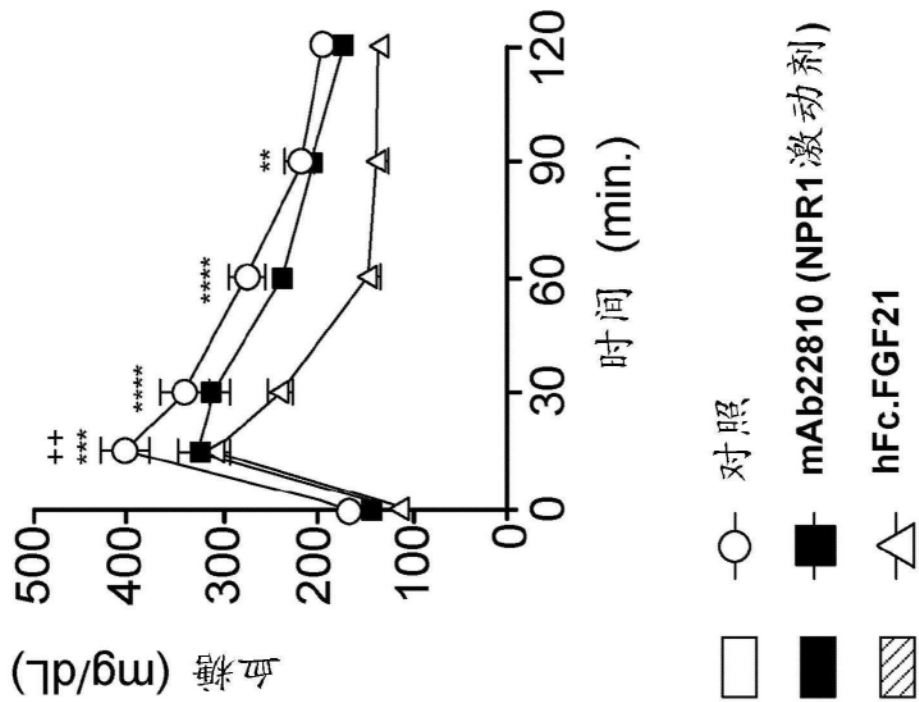


图20A

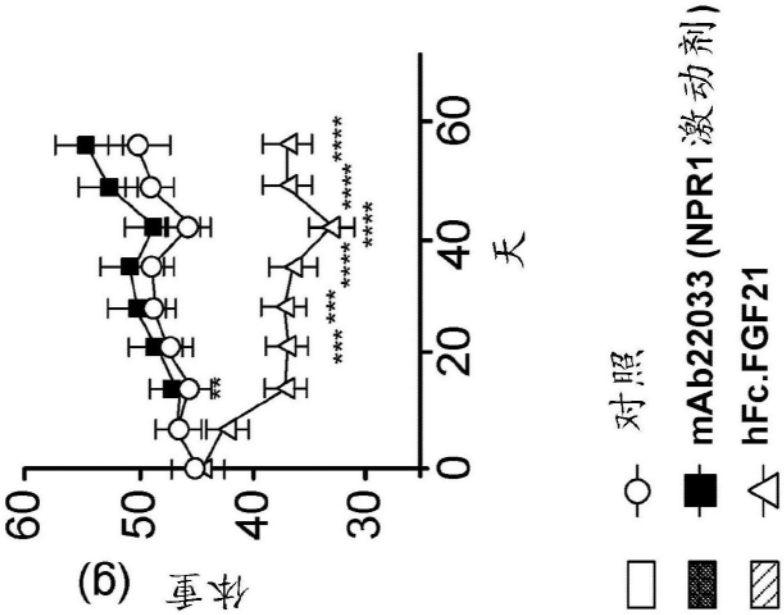


图21A

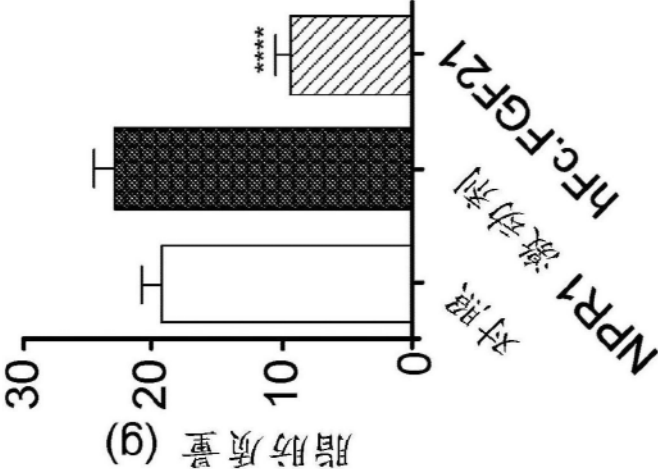


图21B

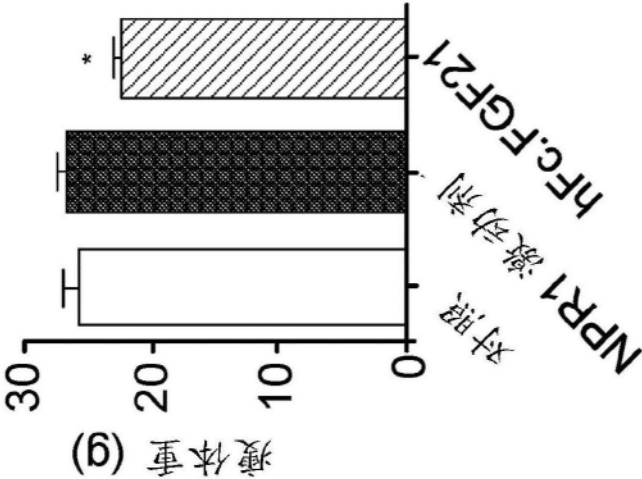


图21C

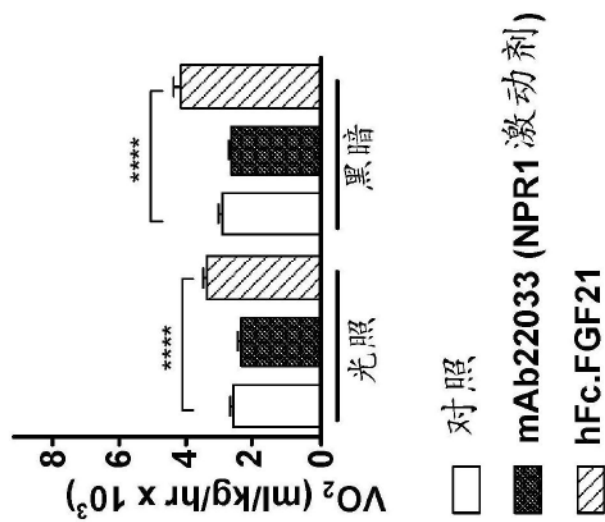


图22A

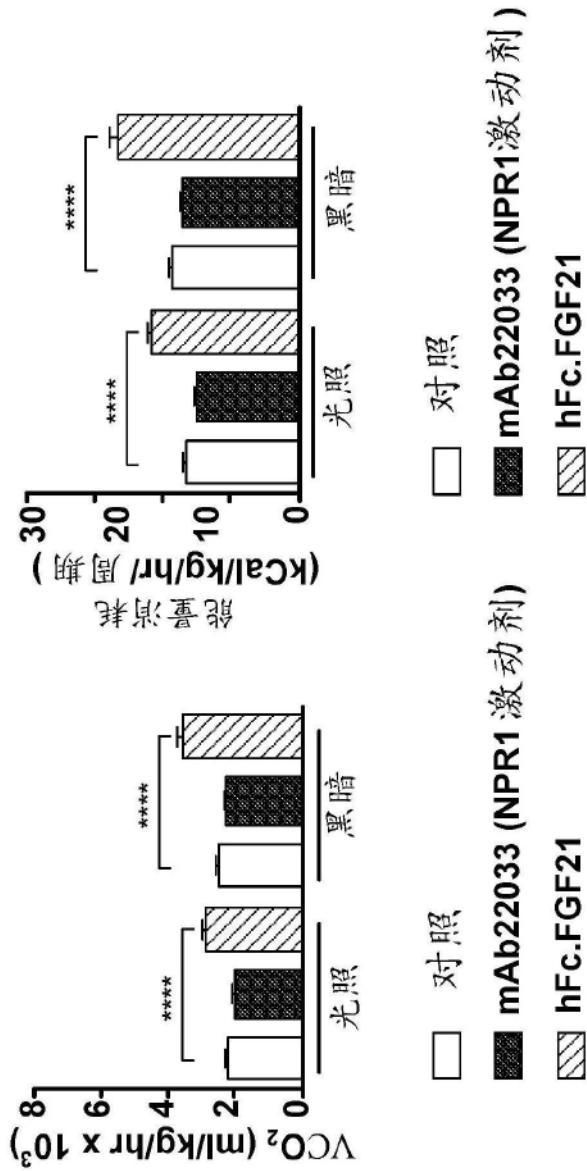


图22B

图22C

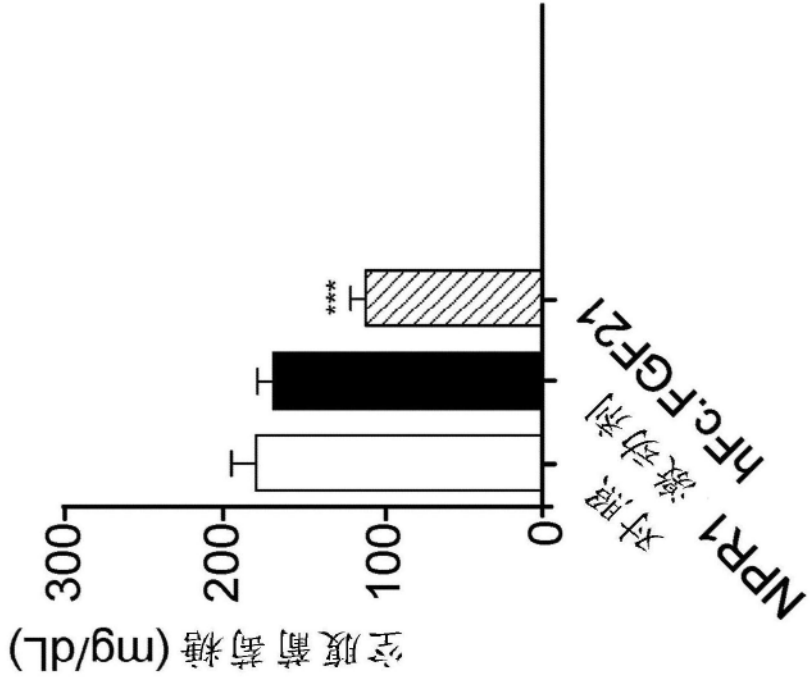


图 23B

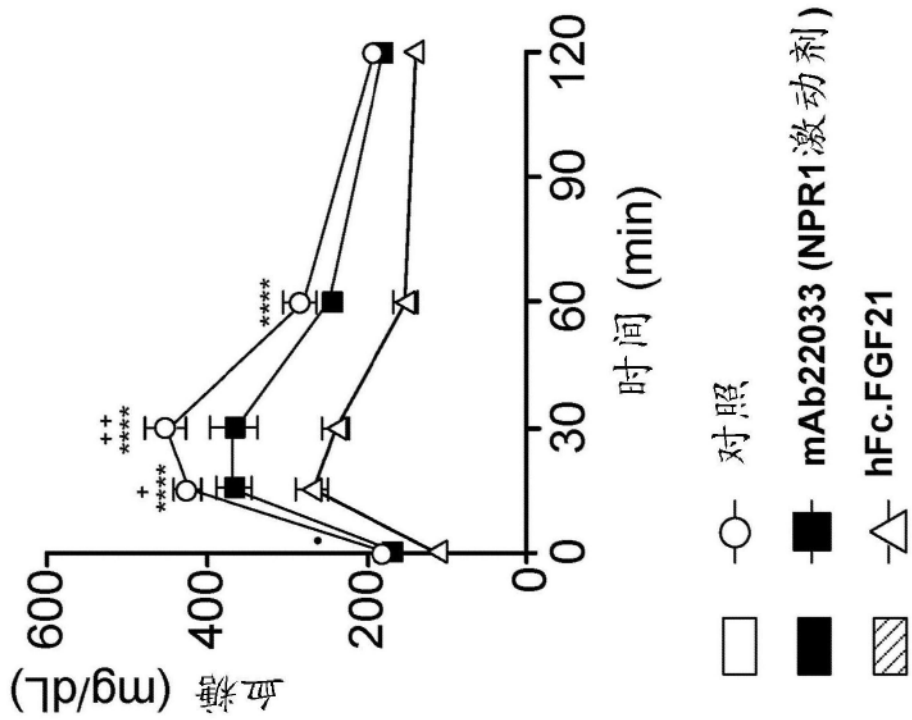


图 23A