

(19) 国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108350072 B

(45) 授权公告日 2022.05.24

(21) 申请号 201680053203.4

J • 塔拉斯卡 F • 许

(22) 申请日 2016.08.02

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108350072 A

专利代理人 柴云峰 黄革生

(43) 申请公布日 2018.07.31

(51) Int.CI.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/200,445 2015.08.03 US

(56) 对比文件

WO 2012/170438 A2, 2012.12.13

WO 2015/100366 A1, 2015.07.02

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.03.14

Foltz I. N. et al..Treating diabetes
and obesity with an FGF21-mimetic
antibody activating the β -klotho/EGFR1c
receptor complex.《SCIENCE TRANSLATIONAL
MEDICINE》.2012, 第1-10页.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2016/054660 2016.08.02

审查员 李影

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/021893 EN 2017.02.09

(73) 专利权人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

权利要求书3页 说明书99页

序列表44页 附图9页

(72) 发明人 B • 伯特歇尔 D • L • 约韦

S • L • 卡普兰 R • 塞贝 G • 李

(54) 发明名称

治疗FGF21相关病症的方法

(57) 摘要

本发明涉及结合人 β -klotho的单克隆抗体
及其抗原结合片段,以及包含所述单克隆抗体及
其抗原结合片段的药物组合物和治疗方法。

1. 结合 β -klotho的表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基246-265,343-347,536-550,834-857和959-986中的一个或多个氨基酸,且

其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

(i) 根据Kabat定义,SEQ ID NO:23的重链CDR1;SEQ ID NO:24的重链CDR2;SEQ ID NO:25的重链CDR3;SEQ ID NO:33的轻链CDR1;SEQ ID NO:34的轻链CDR2;和SEQ ID NO:35的轻链CDR3;或

(ii) 根据Chothia定义,SEQ ID NO:26的重链CDR1;SEQ ID NO:27的重链CDR2;SEQ ID NO:28的重链CDR3;SEQ ID NO:36的轻链CDR1;SEQ ID NO:37的轻链CDR2;和SEQ ID NO:38的轻链CDR3;

(iii) 根据Kabat定义,SEQ ID NO:63的重链CDR1;SEQ ID NO:64的重链CDR2;SEQ ID NO:65的重链CDR3;SEQ ID NO:73的轻链CDR1;SEQ ID NO:74的轻链CDR2;和SEQ ID NO:75的轻链CDR3;

(iv) 根据Chothia定义,SEQ ID NO:66的重链CDR1;SEQ ID NO:67的重链CDR2;SEQ ID NO:68的重链CDR3;SEQ ID NO:76的轻链CDR1;SEQ ID NO:77的轻链CDR2;和SEQ ID NO:78的轻链CDR3。

2. 根据权利要求1所述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以小于或等于10pM的 K_d 结合人 β -klotho蛋白,其中所述 K_d 通过溶液平衡滴定测定法(SET)测量。

3. 根据权利要求1所述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以小于或等于50nM的 EC_{50} 激活食蟹猴FGFR1c_ β -klotho受体复合体,其中所述 EC_{50} 通过pERK细胞测定法测量。

4. 权利要求1-3中任一项所述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包含:

(i) 重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列或与其具有至少90%同一性的氨基酸序列;其中所述VL包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列或与其具有至少90%同一性的氨基酸序列;或

(ii) 重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列或与其具有至少90%同一性的氨基酸序列;其中所述VL包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列或与其具有至少90%同一性的氨基酸序列。

5. 权利要求4所述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包含:

(i) 重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列;其中所述VL包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列;或

(ii) 重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列;其中所述VL包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列或与其具有至少95%同一性的氨基酸序列。

6. 权利要求4所述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

包含：

(i) 重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) , 其中所述VH包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列或与其具有至少97%同一性的氨基酸序列;其中所述VL包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列或与其具有至少97%同一性的氨基酸序列;或

(ii) 重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) , 其中所述VH包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列或与其具有至少97%同一性的氨基酸序列;其中所述VL包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列或与其具有至少97%同一性的氨基酸序列。

7. 权利要求6所述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选自：

i) 包含SEQ ID NO:29的可变重链序列和SEQ ID NO:39的可变轻链序列的抗体或其抗原结合片段;和

ii) 包含SEQ ID NO:69的可变重链序列和SEQ ID NO:79的可变轻链序列的抗体或其抗原结合片段。

8. 权利要求1-3中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体选自：

i) 包含含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的轻链的抗体,和

ii) 包含含有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链的抗体。

9. 药物组合物,其包含权利要求1—8任一项的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

10. 根据权利要求1-8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求9的药物组合物,用作药物。

11. 权利要求1—8任一项的抗体或其抗原结合片段或权利要求9的药物组合物在制备治疗有需要的受试者中代谢病症的药物中的用途。

12. 权利要求11所述的用途,其中所述代谢病症是肥胖症,1型和2型糖尿病,胰腺炎,血脂异常,非酒精性脂肪性肝炎 (NASH),胰岛素抵抗,高胰岛素血症,葡萄糖耐受不良,高血糖症和代谢综合征的一种或多种。

13. 权利要求12所述的用途,其中所述代谢病症是肥胖症,糖尿病和血脂异常中的一种或多种。

14. 权利要求1—8任一项的抗体或其抗原结合片段或权利要求9的药物组合物在制备治疗心血管病症的药物中的用途。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述心血管病症是动脉粥样硬化,外周动脉疾病,中风,心力衰竭和冠心病中的一种或多种。

16. 编码一种或多种根据权利要求1-8任一项的抗体或其抗原结合片段的核酸。

17. 权利要求16的核酸,其包含与表1中列出的核苷酸序列具有至少90%同一性的序列。

18. 包含权利要求16或17任一项的核酸的载体。

19. 包含权利要求18的载体或权利要求16或17任一项的核酸的宿主细胞。

20. 制备结合 β -klotho的抗体或其抗原结合片段的方法,包括在适于表达所述抗体或

其抗原结合片段的条件下培养权利要求19的宿主细胞的步骤。

21. 权利要求1—8任一项的抗体或其抗原结合片段在制备减轻体重的药物中的用途。
22. 权利要求1—8任一项的抗体或其抗原结合片段在制备降低食欲或食物摄取的药物中的用途。
23. 权利要求1—8任一项的抗体或其抗原结合片段在制备降低血浆甘油三酯 (TG) 浓度或血浆总胆固醇 (TC) 浓度的药物中的用途。

治疗FGF21相关病症的方法

[0001] 本申请要求于2015年8月3日提交的美国临时申请号62/200,445的权益,其在此通过引用整体并入。

[0002] 序列表

[0003] 本申请包含以ASCII格式电子提交的序列表,并且通过引用将其全部内容并入本文。在2016年7月28日创建的所述ASCII副本被命名为PAT056954_SL.txt,并且大小为124,487字节。

技术领域

[0004] 本发明涉及成纤维细胞生长因子21(FGF21)模拟抗体。还公开了用于治疗FGF21相关病症例如肥胖症,1型和2型糖尿病,胰腺炎,血脂异常,非酒精性脂肪性肝炎(NASH),胰岛素抵抗,高胰岛素血症,葡萄糖耐受不良,高血糖症,代谢综合征和其他代谢病症,并降低危重病人的死亡率和发病率的方法。

背景技术

[0005] 成纤维细胞生长因子(FGF)家族的特征在于22个遗传上不同的同源配体,其被分成七个亚家族。根据公开的文献,FGF家族现在由至少二十三个成员FGF-1到FGF-23组成(Reuss et al. (2003) Cell Tissue Res. 313:139-157)。

[0006] 成纤维细胞生长因子21(FGF21)是从小鼠胚胎中分离出来的,最接近FGF19和FGF23。这种FGF亚家族调节经典FGFs罕见的多种生理过程,即能量和胆汁酸稳态,葡萄糖和脂质代谢,以及磷酸盐以及维生素D内稳态。而且,与经典FGF不同,该亚家族以内分泌方式起作用(Moore, D. D. (2007) Science 316, 1436-8)。据报道,FGF21优先在肝中表达(Nishimura et al. (2000) Biochimica et Biophysica Acta, 1492:203-206;专利公开W001/36640;和专利公开W001/18172),并被描述为治疗局部缺血血管疾病,伤口愈合以及与肺,支气管或肺泡细胞功能丧失相关的疾病以及许多其他病症。

[0007] FGF21已被鉴定为一种有效的代谢调节剂。将FGF21全身施用于具有饮食诱导的或遗传性肥胖和糖尿病的啮齿动物和恒河猴发挥了强烈的抗高血糖和甘油三酯降低效果以及体重降低(Coskun, T, et al. (2008) Endocrinology 149:6018-6027; Kharitonov, A. et al. (2005) Journal of Clinical Investigation 115:1627-1635; Kharitonov, A., et al. (2007) Endocrinology 148:774-781; Xu, J, et al. (2009) Diabetes 58:250-259)。FGF21是含有28个氨基酸的前导序列的209个氨基酸的多肽。人FGF21与小鼠FGF21具有约79%的氨基酸同一性,并且与大鼠FGF21具有约80%的氨基酸同一性。

[0008] 在哺乳动物中,FGF通过一组四种FGF受体FGFR1-4介导其作用,所述FGF受体FGFR1-4又以多种剪接变体表达。每个FGF受体含有细胞内酪氨酸激酶结构域,其在配体结合后被激活,导致涉及MAPK(Erk1/2),RAF1,AKT1和STAT的下游信号传导途径。(Kharitonov, A. et al. (2008) BioDrugs 22:37-44)。一些报道表明,FGFR1-3的“c”报告子剪接变体对β-klotho表现出特异性亲和力,并且可以作为FGF21的内源性受体(Kurosu

et al., 2007 J. Biol. Chem. 282: 26687-26695); Ogawa et al., 2007 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 7432-7437; Kharitonov et al., 2008 J. Cell Physiol. 215, 1-7)。在3T3-L1细胞和白色脂肪组织中,FGFR1是迄今为止最丰富的受体,因此在该组织中FGF21的主要功能性受体很可能是 β -klotho-FGFR1c复合体。

[0009] 尽管FGF21激活FGF受体和下游信号分子,包括FRS2a和ERK,但FGFR和FGF21的直接相互作用尚未被检测到。此外,即使它们表达多种FGFR同种型,各种非脂肪细胞也不应答FGF21。所有这些数据表明辅因子必须通过FGFR介导FGF21信号传导。研究已经鉴定了在肝,脂肪细胞和胰腺中高表达的 β -klotho (β -klotho),作为对FGF21的细胞应答的决定因素 (Kurosu, H. et al. (2007) J Biol Chem 282, 26687-95)。 β -klotho-FGFR复合体(而不是单独的FGFR)在体外与FGF21结合 (Kharitonov, A., et al. (2008) J Cell Physiol 215, 1-7)。FGF21结合与FGFR1c, 2c或3c复合的 β -klotho;而不结合与FGFR4复合的 β -klotho (Owen et al., 2015 Trends in Endocrinology 26: 22-29)。在FGF21-klotho-FGFR系统中已经鉴定了类似的机制 (Urakawa, I. et al. (2006) Nature 444, 770-4)。

[0010] 首先在小鼠3T3-L1脂肪细胞葡萄糖摄取测定中鉴定了FGF21的生物活性 (Kharitonov, A. et al. (2005) J Clin Invest 115, 1627-35)。随后,显示FGF21诱导胰岛素非依赖性葡萄糖摄取和GLUT1表达。在一系列糖尿病啮齿动物模型中,FGF21也显示出改善高血糖症。另外,发现过表达FGF21的转基因小鼠对饮食诱导的代谢异常具有抗性,包括体重和脂肪量下降,以及胰岛素敏感性增强 (Badman, M. K. et al. (2007) Cell Metab 5, 426-37)。对糖尿病非人灵长类动物 (NHP) 施用FGF21导致空腹血浆葡萄糖,甘油三酯,胰岛素和胰高血糖素水平下降,并导致脂蛋白谱的显著改善,包括HDL胆固醇增加近80% (Kharitonov, A. et al. (2007) Endocrinology 148, 774-81)。重要的是,在这个NHP研究过程中中任一点没有观察到低血糖。其他研究鉴定FGF21是一种重要的内分泌激素,其有助于控制对禁食状态的适应。这提供了PPAR α 下游的先前缺失的环节,通过该环节,肝脏与身体其他部分在调节能量内稳态的生物学中进行通信。FGF21调节脂肪(脂解),肝脏(脂肪酸氧化和生酮作用)和脑(torpor)的组合观察将其确立为对禁食反应的主要内分泌调节剂 (Kharitonov, A. & Shanafelt, A. B. (2008) BioDrugs 22, 37-44)。

[0011] 直接将FGF21用作生物治疗剂的问题是其半衰期很短。在小鼠中,人FGF21的半衰期为0.5至1小时,在食蟹猴中,半衰期为2至3小时。此外,当将野生型FGF21用于药物配方或制剂时,其稳定性受到防腐剂例如间甲酚的不利影响。

[0012] 概述

[0013] 本发明涉及FGF21模拟抗体,即结合 β -klotho (β -klotho) 并激活人成纤维细胞生长因子21(以下有时称为“FGF21”)受体复合体和FGF21介导的信号传导(例如FGF21-受体依赖性信号传导)的单克隆抗体,其抗原结合片段,以及包含其的药物组合物和治疗方法。

[0014] 本发明的抗原结合片段(FGF21模拟物, β -klotho结合抗体)可以是具有FGF21样活性和选择性的分子,但是具有增加的治疗上所需的特征,如蛋白质稳定性,低免疫原性,易于生产和理想的体内半衰期。

[0015] 本发明的单克隆FGF21模拟抗体,其抗原结合片段和包含其的药物组合物可用于治疗与FGF21相关的病症,例如肥胖症,2型糖尿病,1型糖尿病,胰腺炎,血脂异常,非酒精性脂肪性肝炎(NASH),胰岛素抵抗,高胰岛素血症,葡萄糖耐受不良,高血糖症,代谢综合征,

高血压,心血管疾病,动脉粥样硬化,外周动脉疾病,中风,心力衰竭,冠心病,肾病,糖尿病并发症,神经病,胃轻瘫和其他代谢紊乱,并降低危重病人的死亡率和发病率。

[0016] 本文所述的分离的FGF21模拟抗体或抗原结合片段以小于或等于100pM的平衡解离常数(K_D)结合 β -klotho。例如,本文所述的分离的抗体或抗原结合片段可以以小于或等于100pM,小于或等于50pM,小于或等于45pM,小于或或等于40pM,小于或等于35pM,小于或等于25pM,或小于或等于15pM的 K_D 结合人类 β -Klotho。更具体而言,如通过溶液平衡滴定测定法(SET)所测量,本文所述的分离的抗体或抗原结合片段还可以以小于或等于10pM的 K_D 结合人类 β -klotho;并且如通过pERK细胞测定法测量,还可以以小于或等于50nM的EC 50活化食蟹猴FGFR1c β -klotho受体复合体。

[0017] 本发明涉及结合人和食蟹猴 β -klotho的分离的抗体或其抗原结合片段。本发明还涉及结合 β -klotho并激活FGF21受体复合体和FGF21介导的信号传导(例如FGF21-受体依赖性信号传导)的分离的抗体或其抗原结合片段。在具体的方面,本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段不激活人FGFR2c β -klotho,FGFR3c β -klotho或FGFR4 β -klotho受体复合体。

[0018] 本发明还涉及结合 β -klotho并进一步与表1中所述的抗体竞争结合的分离的抗体或其抗原结合片段。本发明还涉及分离的抗体或其抗原结合片段,其与表1中所述的抗体结合相同的表位。

[0019] 如本文所述,抗体和/或其抗原结合片段之间的“竞争”意味着两种抗体(或其结合片段)结合相同的 β -klotho表位(例如,如通过竞争性结合测定,通过本领域技术人员公知的方法测定)。如果竞争性抗体或其抗原结合片段与本发明的抗体或抗原结合片段结合相同的 β -klotho表位,或重叠的 β -klotho表位,那么所述抗体或其抗原结合片段也与本发明的 β -klotho抗体或抗原结合片段(例如NOV001或NOV002)“竞争”。如本文所用,竞争性抗体或其抗原结合片段也可以包括这样的抗体或其抗原结合片段,其(i)空间阻断本发明的抗体或抗原结合片段与其靶标结合(例如,如果所述竞争性抗体结合至附近的非重叠 β -klotho和/或 β -klotho表位,并物理阻止本发明的抗体或抗原结合片段结合其靶标;和/或(ii)与不同的、不重叠的 β -klotho表位结合并诱导对 β -klotho蛋白质的构象变化,使得所述蛋白质以不存在所述构象变化的情况下发生的方式不再能够被本发明的 β -klotho抗体或其抗原结合片段结合。

[0020] 可以通过溶液平衡滴定(SET)确定本文所述的分离的抗体和抗原结合片段的结合亲和力。SET的方法在本领域中是已知的并且在下面进一步详细描述。或者,可以通过Biacore测定确定本文所述的分离的抗体或片段的结合亲和力。Biacore动力学分析的方法是本领域已知的并且在下面进一步详细描述。

[0021] 分离的FGF21模拟抗体或其抗原结合片段可用于增加FGF21受体复合体的活化,从而增加FGF21信号传导途径。

[0022] 如本文所述的分离的FGF21模拟抗体或其抗原结合片段可以是单克隆抗体,人或人源化抗体,嵌合抗体,单链抗体,Fab片段,Fv片段,F(ab')2片段或scFv片段和/或IgG同种型。

[0023] 如本文所述的分离的FGF21模拟抗体或其抗原结合片段还可以包括构架,其中来自相应的人VH或VL种系序列的氨基酸已经被取代到抗体构架中。

[0024] 本发明的另一个方面包括具有表1中所述Fab的完整重链和轻链序列的分离的抗体或其抗原结合片段。更具体而言，分离的抗体或其抗原结合片段可以具有Fab NOV001, NOV002, NOV003, NOV004的重链和轻链序列。

[0025] 本发明的另一方面包括具有表1中所述的Fab的重链和轻链可变结构域序列的分离的抗体或其抗原结合片段。更具体地，分离的抗体或其抗原结合片段可具有Fab NOV001, NOV002, NOV003, NOV004的重链和轻链可变结构域序列。

[0026] 本发明还涉及分离的抗体或其抗原结合片段，其包含选自SEQ ID NO:3, 23, 43和63的重链CDR1；选自SEQ ID NO:4, 24, 44和64的重链CDR2；和选自SEQ ID NOs:5, 25, 45和65的重链CDR3，其中所述分离的抗体或其抗原结合片段结合人类 β -klotho。另一方面，此类分离的抗体或其抗原结合片段进一步包括选自SEQ ID NO:13, 33, 53和73的轻链CDR1；选自SEQ ID NO:14, 34, 54和74的轻链CDR2；和选自SEQ ID NO:15, 35, 55和75的轻链CDR3。

[0027] 本发明还涉及分离的抗体或其抗原结合片段，其包含选自SEQ ID NO:13, 33, 53和73的轻链CDR1；选自SEQ ID NO:14, 34, 54和74的轻链CDR2；和选自SEQ ID NO:15, 35, 55和75的轻链CDR3，其中所述分离的抗体或其抗原结合片段结合人类 β -klotho。

[0028] 本发明还涉及结合 β -klotho的分离的抗体或其抗原结合片段，其具有如Kabat所定义的HCDR1, HCDR2和HCDR3以及LCDR1, LCDR2和LCDR3，其中HCDR1, HCDR2和HCDR3包含SEQ ID NO:3, 4和5，并且LCDR1, LCDR2, LCDR3包含SEQ ID NO:13, 14和15；或HCDR1, HCDR2和HCDR3包含SEQ ID NO:23, 24和25，且LCDR1, LCDR2, LCDR3包含SEQ ID NO:33, 34和35；或HCDR1, HCDR2和HCDR3包含SEQ ID NO:43, 44和45，且LCDR1, LCDR2, LCDR3包含SEQ ID NO:53, 54和55；或HCDR1, HCDR2和HCDR3包含SEQ ID NO:63, 64和65，且LCDR1, LCDR2, LCDR3包含SEQ ID NO:73, 74和75。

[0029] 本发明还涉及结合 β -klotho的分离的抗体或其抗原结合片段，其具有如通过Chothia所定义的HCDR1, HCDR2和HCDR3以及LCDR1, LCDR2和LCDR3，其中HCDR1, HCDR2和HCDR3包含SEQ ID NO:6, 7和8，并且LCDR1, LCDR2, LCDR3包含SEQ ID NO:16, 17和18；或HCDR1, HCDR2和HCDR3包含SEQ ID NO:26, 27和28，且LCDR1, LCDR2, LCDR3包含SEQ ID NO:36, 37和38；或HCDR1, HCDR2和HCDR3包含SEQ ID NO:46, 47和48，且LCDR1, LCDR2, LCDR3包含SEQ ID NO:56, 57和58；或HCDR1, HCDR2和HCDR3包含SEQ ID NO:66, 67和68，且LCDR1, LCDR2, LCDR3包含SEQ ID NO:76, 77和78。

[0030] 在本发明的一个方面，分离的抗体或其抗原结合片段包括选自SEQ ID NO:9, 29, 49和69的重链可变结构域序列。分离的抗体或抗原结合片段进一步可以包含轻链可变结构域序列，其中重链可变结构域和轻链可变结构域组合以形成 β -klotho的抗原结合位点。特别地，轻链可变结构域序列可以选自SEQ ID NO:19, 39, 59和79，其中所述分离的抗体或其抗原结合片段结合 β -klotho。

[0031] 本发明还涉及包含选自SEQ ID NO:19, 39, 59和79的轻链可变结构域序列的分离的抗体或其抗原结合片段，其中所述分离的抗体或其抗原结合片段结合人类 β -klotho。分离的抗体或抗原结合片段可以进一步包含重链可变结构域序列，其中轻链可变结构域和重链可变结构域组合形成 β -klotho的抗原结合位点。

[0032] 具体而言，结合 β -klotho的分离的抗体或其抗原结合片段可以具有分别包含SEQ ID NO:9和19; 29和39; 49和59; 或69和79的序列的重链和轻链可变结构域。

[0033] 本发明进一步涉及分离的抗体或其抗原结合片段,其包括与选自SEQ ID NO:9, 29, 49和69的序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域,其中所述抗体与 β -klotho结合。在一个方面,分离的抗体或其抗原结合片段也包括与选自SEQ ID NO:19, 39, 59和79的序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。在本发明的另一方面,分离的抗体或抗原结合片段具有如Kabat所定义且如表1中所述的HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2和LCDR3。

[0034] 本发明还涉及分离的抗体或其抗原结合片段,其具有与选自SEQ ID NO:19, 39, 59和79的序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域,其中所述抗体结合 β -klotho。

[0035] 在本发明的另一方面,结合 β -klotho的分离的抗体或其抗原结合片段可以具有包含SEQ ID NO:11, 31, 51或71的序列的重链。分离的抗体可以还包括可以与重链组合以形成人 β -klotho的抗原结合位点的轻链。具体而言,轻链可以具有包含SEQ ID NO:21, 41, 61或81的序列。具体而言,结合 β -klotho的分离的抗体或其抗原结合片段可以具有重链和轻链,其分别包含SEQ ID NO:11和21; 31和41; 51和61; 或71和81的序列。

[0036] 本发明还涉及包含与选自SEQ ID NO:9, 29, 49或69的序列具有至少90%序列同一性的重链的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体结合 β -klotho。一方面,分离的抗体或其抗原结合片段也包括与选自SEQ ID NO:21, 41, 61或81的序列具有至少90%序列同一性的轻链。

[0037] 本发明还涉及分离的抗体或其抗原结合片段,其包含与选自SEQ ID NO:21, 41, 61或81的序列具有至少90%序列同一性的轻链,其中所述抗体结合 β -klotho。

[0038] 本发明还涉及包含本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段的组合物。以及与药学上可接受的载体组合的抗体组合物。具体而言,本发明进一步包括药物组合物,其包含表1的抗体或其抗原结合片段,例如抗体NOV001, NOV002, NOV003, NOV004。本发明还涉及包含两种或更多种表1的分离的抗体或其抗原结合片段的组合的药物组合物。

[0039] 本发明还涉及编码具有选自SEQ ID NO:9, 29, 49和69的序列的可变重链的分离的核酸序列。特别地,核酸具有与选自SEQ ID NO:10, 30, 50和70序列有至少90%序列同一性的序列。在本发明的另一方面,所述序列是SEQ ID NO:10, 30, 50和70。

[0040] 本发明还涉及编码具有选自SEQ ID NO:20, 40, 60和80的序列的可变轻链的分离的核酸序列。特别地,核酸具有与选自SEQ ID NO:20, 40, 60和80序列有至少90%序列同一性的序列。在本发明的另一方面,所述序列是SEQ ID NO:20, 40, 60和80。

[0041] 本发明还涉及包含编码多肽的序列的分离的核酸,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:20, 40, 60和80的序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0042] 本发明还涉及包含本文所述的一种或多种核酸分子的载体。

[0043] 本发明还涉及分离的宿主细胞,其包含编码上述抗体的重链的重组DNA序列和编码上述抗体的轻链的第二重组DNA序列,其中所述DNA序列有效连接至启动子并能够在宿主细胞中表达。预期抗体可以是人单克隆抗体。还考虑到宿主细胞是非人类哺乳动物细胞。

[0044] 本发明还涉及激活成纤维细胞生长因子21(FGF21)受体,从而激活FGF21介导的信号传导(例如FGF21-受体依赖性信号传导),其中该方法包括使细胞与有效量的包含本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触。

[0045] 预期该细胞是人类细胞。进一步设想,细胞处于受试者中。在一个实施方案中,预

期细胞是脂肪细胞。在其他实施方案中,细胞可以是肝细胞,胰腺细胞,内皮细胞,肌细胞或肾细胞中的一种或多种。仍然进一步考虑的是,受试者是人。

[0046] 本发明还涉及治疗,改善或预防受试者中FGF21-相关病症的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用有效量的包含本文所述抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤。一方面,FGF21相关病症是肥胖症。一方面,FGF21相关病症是2型糖尿病。预期受试者是人。

[0047] 任何上述分离的抗体或其抗原结合片段可以是单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0048] 以下方面描述了本公开的非限制性实施方案:

[0049] 1. 分离的抗体或其抗原结合片段,其结合 β -klotho的细胞外结构域内的表位。

[0050] 2. 结合 β -klotho表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含表2所示的一个或多个SEQ ID NO。

[0051] 3. 一种与 β -klotho结合的分离的FGF21模拟抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段增加了 β -klotho和FGFR1c的活性。

[0052] 4. 分离的抗体或其抗原结合片段,如通过溶液平衡滴定测定法(SET)测量的,所述分离的抗体或其抗原结合片段以小于或等于10pM的 K_d 结合人 β -klotho蛋白。

[0053] 5. 结合 β -klotho表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基246-265,536-550,834-857和959-986的一个或多个氨基酸。

[0054] 6. 结合 β -klotho的一个或多个表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基646-670,696-700和646-689中的一个或多个氨基酸。

[0055] 7. 分离的抗体或其抗原结合片段,如通过pERK细胞测定法测量的,所述分离的抗体或其抗原结合片段以小于或等于50nM的EC50活化食蟹猴FGFR1c β -klotho受体复合体。

[0056] 8. 方面1的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含与表1中引用的至少一个CDR具有至少95%同一性的至少一个互补决定区。

[0057] 9. 方面1的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含与表1中引用的至少一个CDR具有至少98%同一性的至少一个互补决定区。

[0058] 10. 方面1的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含与表1中引用的至少一个CDR具有至少99%同一性的至少一个互补决定区。

[0059] 11. 前述方面中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含来自表1的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3,和/或来自表1的轻链CDR1,轻链CDR2和轻链CDR3。

[0060] 12. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含来自表1的CDR1,CDR2和CDR3,并且其中所述变体具有CDR1,CDR2或CDR3之一中至少一个至四个氨基酸改变。

[0061] 13. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含选自SEQ ID NO:5,25,45和65的重链CDR3。

[0062] 14. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9,29,49,69的VH或其具有90%同一性的氨基酸序列;和选自SEQ ID NO:19,39,59和79的VL或其具有90%同一性的氨基酸序列。

[0063] 15. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9,29,49和29的VH或其具有95%同一性的氨基酸序列;和选自SEQ ID NO:19,39,59和79的VL或其具有95%同一性的氨基酸序列。

[0064] 16. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9,29,49和69的VH或其具有97%同一性的氨基酸序列;和选自SEQ ID NO:19,39,59和79的VL或其具有97%同一性的氨基酸序列。

[0065] 17. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9,29,49和69的可变重链序列。

[0066] 18. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含选自SEQ ID NO:19,39,59和79的可变轻链序列。

[0067] 19. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9,29,49和69的可变重链;和选自SEQ ID NO:19,39,59和79的可变轻链序列。

[0068] 20. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段选自包含SEQ ID NO:9的可变重链和SEQ ID NO:19的可变轻链序列的抗体或片段;包含SEQ ID NO:29的可变重链和SEQ ID NO:39的可变轻链序列的抗体或片段;包含SEQ ID NO:49的可变重链和SEQ ID NO:59的可变轻链序列的抗体或片段;和包含SEQ ID NO:69的可变重链和SEQ ID NO:79的可变轻链序列的抗体或片段。

[0069] 21. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含选自SEQ ID NO:3,23,43和63的重链CDR1;选自SEQ ID NO:4,24,44和64的重链CDR2;选自SEQ ID NO:5,25,45和65的重链CDR3;选自SEQ ID NO:13,33,53和73的轻链CDR1;选自SEQ ID NO:14,34,54和74的轻链CDR2;和选自SEQ ID NO:15,35,55和75的轻链CDR3。

[0070] 22. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含选自SEQ ID NO:6,26,46和66的重链CDR1;选自SEQ ID NO:7,27,47和67的重链CDR2;选自SEQ ID NO:8,28,48和68的重链CDR3;选自SEQ ID NO:16,36,56和76的轻链CDR1;选自SEQ ID NO:17,37,57和77的轻链CDR2;和选自SEQ ID NO:18,38,58和78的轻链CDR3。

[0071] 23. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含SEQ ID NO:3的重链CDR1;SEQ ID NO:4的重链CDR2;SEQ ID NO:5的重链CDR3;SEQ ID NO:13的轻链CDR1;SEQ ID NO:14的轻链CDR2;和SEQ ID NO:15的轻链CDR3。

[0072] 24. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含SEQ ID NO:23的重链CDR1;SEQ ID NO:24的重链CDR2;SEQ ID NO:25的重链CDR3;SEQ ID NO:33的轻链CDR1;SEQ ID NO:34的轻链CDR2;和SEQ ID NO:35的轻链CDR3。

[0073] 25. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含SEQ ID NO:43的重链CDR1;SEQ ID NO:44的重链CDR2;SEQ ID NO:45的重链CDR3;SEQ ID NO:53的轻链CDR1;SEQ ID NO:54的轻链CDR2;和SEQ ID NO:55的轻链CDR3。

[0074] 26. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含SEQ ID NO:63的重链CDR1;SEQ ID NO:64的重链CDR2;SEQ ID NO:65的重链CDR3;SEQ ID NO:73的轻链CDR1;SEQ ID NO:74的轻链CDR2;和SEQ ID NO:75的轻链CDR3。

[0075] 27. 方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含SEQ ID NO:6的重链CDR1;SEQ ID NO:7的重链CDR2;SEQ ID NO:8的重链CDR3;SEQ ID NO:

16的轻链CDR1;SEQ ID NO:17的轻链CDR2;和SEQ ID NO:18的轻链CDR3。

[0076] 28.方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含SEQ ID NO:26的重链CDR1;SEQ ID NO:27的重链CDR2;SEQ ID NO:28的重链CDR3;SEQ ID NO:36的轻链CDR1;SEQ ID NO:37的轻链CDR2;和SEQ ID NO:38的轻链CDR3。

[0077] 29.方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含SEQ ID NO:46的重链CDR1;SEQ ID NO:47的重链CDR2;SEQ ID NO:48的重链CDR3;SEQ ID NO:56的轻链CDR1;SEQ ID NO:57的轻链CDR2;和SEQ ID NO:58的轻链CDR3。

[0078] 30.方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含SEQ ID NO:66的重链CDR1;SEQ ID NO:67的重链CDR2;SEQ ID NO:68的重链CDR3;SEQ ID NO:76的轻链CDR1;SEQ ID NO:77的轻链CDR2;和SEQ ID NO:78的轻链CDR3。

[0079] 31.分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段与根据方面12-30中任一项的分离的抗体或片段结合相同的表位。

[0080] 32.一种分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段与根据方面12-30中任一项的分离的抗体或片段竞争与 β -klotho的结合。

[0081] 33.方面1-7中任一项的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或片段选自由NOV001,NOV002,NOV003和NOV004组成的组。

[0082] 34.一种药物组合物,其包含上述方面之一的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

[0083] 35.一种治疗代谢病症的方法,其包括向患有代谢病症的受试者施用有效量的包含根据方面1-30中任一项的抗体或抗原结合片段的药物组合物。

[0084] 36.方面35的方法,其中所述受试者患有肥胖症,1型和2型糖尿病,胰腺炎,血脂异常,非酒精性脂肪性肝炎(NASH),胰岛素抵抗,高胰岛素血症,葡萄糖耐受不良,高血糖症和代谢综合征中的一种或多种。

[0085] 37.方面35的方法,其中所述受试者患有肥胖症,糖尿病和血脂异常中的一种或多种。

[0086] 38.一种治疗心血管病症的方法,所述方法包括向患有心血管病症的受试者施用有效量的包含根据任何前述方面的抗体或片段的药物组合物。

[0087] 39.方面38的方法,其中所述受试者患有动脉粥样硬化,外周动脉疾病,中风,心力衰竭和冠心病中的一种或多种。

[0088] 40.根据方面1-30中任一项的抗体或其抗原结合片段,其用作药物。

[0089] 41.编码根据任何前述方面的一种或多种抗体的核酸。

[0090] 42.一种核酸,其包含与表1中列出的序列具有至少90%同一性的序列。

[0091] 43.一种核酸,其包含与表1中列出的序列具有至少95%同一性的序列。

[0092] 44.载体,其包含根据方面41的核酸。

[0093] 45.包含方面44的载体的宿主细胞。

[0094] 46.一种药物组合物,其包含根据方面1-30中任一项的抗体或抗原结合片段用于治疗代谢病症。

[0095] 定义

[0096] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普

通技术人员通常理解的相同的含义。

[0097] 如本文所用,术语“FGF21”是指成纤维细胞生长因子(FGF)蛋白质家族的成员。FGF21 (GenBank登录号NP_061986.1) 的氨基酸序列如SEQ ID N0:1所示,其相应的多核苷酸序列如SEQ ID N0:2 (NCBI参考序列号NM_019113.2) 所示。

[0098] 如本文所用,术语“FGF21受体”是指FGF21的受体 (Kharitonov, A, et al. (2008) *Journal of Cellular Physiology* 215:1-7; Kurosu, H, et al. (2007) *JBC* 282: 26687-26695; Ogawa, Y, et al. (2007) *PNAS* 104:7432-7437)。

[0099] 术语“FGF21多肽”是指在人体内表达的天然存在的多肽。为了本公开的目的,术语“FGF21多肽”可互换使用以指任何全长FGF21多肽,例如SEQ ID N0:1,其由209个氨基酸残基组成,并由SEQ ID N0:2的核苷酸序列编码;由181个氨基酸残基组成的多肽的任何成熟形式,其中全长FGF21多肽的氨基末端的28个氨基酸残基(其构成信号肽)已经被除去,以及其变体。

[0100] 本文使用的术语“抗体”是指完整抗体和其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。完整抗体是包含通过二硫键连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。每条重链由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1,CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可以进一步细分成称为互补决定区(CDR)的高变区,散布有更保守的区域,称为构架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端到羧基末端以下列顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q))的结合。

[0101] 本文使用的术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”是指完整抗体的一个或多个片段,其保留了与给定抗原(例如,β-klotho)特异性结合的能力。抗体的抗原结合功能可以通过完整抗体的片段进行。术语抗体的抗原结合部分或抗原结合片段所涵盖的结合片段的例子包括Fab片段,由VL,VH,CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)₂片段,包含在铰链区由二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;由VH结构域或VL结构域组成的单结构域抗体(dAb)片段(Ward et al., 1989 *Nature* 341:544-546)和分离的互补决定区(CDR)。

[0102] 此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码,但是可以使用重组方法通过人造肽接头将它们连接起来,所述人造肽接头使得它们可以制成单一蛋白质链,其中VL和VH区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird et al., 1988 *Science* 242:423-426;和Huston et al., 1988 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883)。这样的单链抗体包括抗体的一个或多个抗原结合部分或片段。这些抗体片段使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且以完整抗体相同方式筛选片段的实用性。

[0103] 也可以将抗原结合片段整合到单结构域抗体,大分子抗体(maxibodies),微抗体,胞内抗体(intrabodies),双抗体,三抗体,四抗体,v-NAR和双scFv中(参见例如Hollinger和Hudson, 2005, *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1126-1136)。基于多肽例如III型纤连蛋白(Fn3)(参见美国专利号6,703,199,其描述了纤连蛋白多肽单体),抗体的抗原结合部分可以移植到支架中。

[0104] 可以将抗原结合片段整合到包含一对串联的Fv区段 (VH-CH1-VH-CH1) 的单链分子中, 所述区段与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区域 (Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8 (10) :1057-1062; 和美国专利号5,641,870)。

[0105] 如本文所用, 术语“亲和力”是指抗体与抗原之间在单个抗原位点处相互作用的强度。在每个抗原位点内, 抗体“臂”的可变区在很多位点通过弱的非共价力与抗原相互作用; 相互作用越多, 亲和力就越强。如本文所用, 术语抗体或其抗原结合片段 (例如Fab片段) 的“高亲和力”通常是指具有 10^{-9} M或更小的KD的抗体或抗原结合片段。

[0106] 术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸, 以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸, 以及后来修饰的那些氨基酸, 例如羟脯氨酸, γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物, 即与氢, 羧基, 氨基和R基团结合的 α 碳, 例如高丝氨酸, 正亮氨酸, 甲硫氨酸亚砜, 甲硫氨酸甲基锍。这样的类似物具有修饰的R基团 (例如正亮氨酸) 或修饰的肽主链, 但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构但是以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的化学化合物。

[0107] 如本文所用, 术语“结合特异性”是指单个抗体结合位点仅与一种抗原决定簇反应的能力。

[0108] 短语“特异性(或选择性地)结合”抗体 (例如, β -klotho结合抗体) 是指决定同源抗原 (例如, 人 β -klotho或食蟹猴 β -klotho) 在蛋白质和其他生物制剂的异质群体中存在的结合反应。术语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异的抗体”在本文中与术语“与抗原特异性结合的抗体”可互换使用。

[0109] 术语“FGF21介导的”或类似的是指FGF21受体和/或本发明的抗体在结合 β -klotho时介导细胞应答和FGF21信号传导途径, 由此引发多种生理效应, 包括但不限于以下一种或多种的降低: 血浆甘油三酯, 血浆胰岛素, 血浆葡萄糖, 食物摄入量和体重。

[0110] 本文使用的“FGF21相关病症”, “FGF21相关状况”, “FGF21相关疾病或病症”或类似术语是指寻求通过激活FGF21信号途径 (例如通过激活FGF21受体信号传导) 预防, 诊断和/或治疗的任何数量的病症或疾病。这些可以包括以异常FGF21信号传导为特征的状况, 疾病或病症 (例如, FGF21介导的信号传导和/或FGF21受体信号传导的异常激活)。这些状况包括但不限于代谢, 内分泌和心血管病症, 如肥胖, 1型和2型糖尿病, 胰腺炎, 血脂异常, 非酒精性脂肪肝病 (NAFLD), 非酒精性脂肪性肝炎 (NASH), 胰岛素抵抗, 高胰岛素血症, 葡萄糖不耐受, 高血糖, 代谢综合征, 急性心肌梗塞, 高血压, 心血管疾病, 动脉粥样硬化, 外周动脉疾病, 中风, 心力衰竭, 冠心病, 肾脏疾病, 糖尿病并发症, 神经病, 胃轻瘫, 与胰岛素受体中严重失活突变相关的病症和其他代谢紊乱, 并降低危重病人的死亡率和发病率。

[0111] “2型糖尿病”是一种以葡萄糖产生过多为特征的状况, 尽管胰岛素是可用的, 并且由于葡萄糖清除不足导致循环葡萄糖水平保持过高。

[0112] “1型糖尿病”是以完全缺乏胰岛素引起的高血糖水平为特征的状况。当身体的免疫系统攻击胰腺中产生胰岛素的 β 细胞并将其破坏时, 就会出现这种情况。胰腺然后产生很少或不产生胰岛素。

[0113] “胰腺炎”是胰腺的炎症。

[0114] “血脂异常”是脂蛋白代谢紊乱,包括脂蛋白过度产生或缺乏。血脂异常可以通过总胆固醇,低密度脂蛋白(LDL)胆固醇和甘油三酯浓度的升高以及血液中高密度脂蛋白(HDL)胆固醇浓度的降低来表现。

[0115] “非酒精性脂肪性肝炎(NASH)”是一种肝脏疾病,与酒精消耗无关,以肝细胞脂肪改变为特征,并伴有小叶内炎症和纤维化。

[0116] “葡萄糖耐受不良”或葡萄糖耐量降低(IGT)是血糖异常的糖尿病前期状态,与心血管病理风险增加有关。糖尿病前期病症防止受试者有效地将葡萄糖转移到细胞中,并将其用作有效的燃料来源,导致血液中的葡萄糖水平升高和一定程度的胰岛素抵抗。

[0117] “高血糖症”被定义为血液中过量的糖(葡萄糖)。

[0118] 当您的血糖水平太低而不能为您的身体活动提供足够的能量时,就会发生“低血糖症”,也称为低血糖。

[0119] “高胰岛素血症”被定义为血液中高于正常水平的胰岛素。

[0120] “胰岛素抵抗”被定义为正常量的胰岛素产生低于正常的生物反应的状态。

[0121] 就人受试者而言,“肥胖”可以定义为给定人群超过理想体重20%的体重(R.H.Williams,Textbook of Endocrinology,1974,p.904-916)。它也可以定义为身体质量指数(BMI,定义为一个人的体重(以千克为单位)除以他身高的平方(以米计)(kg/m²))大于或等于30。

[0122] “代谢综合征”可以定义为至少三种以下体征:腹部脂肪-在大多数男性中,腰围40英寸或更大;高血糖-禁食后至少110毫克/分升(mg/dl);高甘油三酯-血流中至少150mg/dL;低HDL-低于40mg/dl;血压130/85mmHg或以上。

[0123] “高血压”或高血压是全身动脉血压短暂或持续升高至可能诱导心血管损伤或其他不良后果的水平。高血压被任意定义为收缩压高于140mmHg或舒张压高于90mmHg。

[0124] “心血管疾病”是与心脏或血管相关的疾病。

[0125] 当携带血液到头部,器官和四肢的动脉中的斑块积聚时,发生“外周动脉疾病”。随着时间的推移,斑块会变硬并使动脉狭窄,限制富氧血液流向器官和身体的其他部分。

[0126] “动脉粥样硬化”是一种血管疾病,其特征在于大中动脉内膜中不规则分布的脂质沉积物,造成动脉管腔狭窄并最终进行纤维化和钙化。病变通常是局灶性的,进展缓慢且间歇性。血流受限造成大多数临床表现,其随着病变的分布和严重程度而变化。

[0127] “中风”是指与脑循环障碍有关的任何急性临床事件,其持续时间超过24小时。中风涉及不可逆的脑损伤,症状的类型和严重程度取决于其循环受损的脑组织的位置和程度。

[0128] “心力衰竭”也称为充血性心力衰竭,是心脏不能再将足够的血液泵送到身体其他部位的一种状况。

[0129] “冠心病”也称为冠状动脉疾病,是将血液和氧气供应到心脏的小血管的狭窄。

[0130] “肾病”或肾病是肾脏的任何疾病。糖尿病肾病是1型或2型糖尿病患者发病和死亡的主要原因。

[0131] “糖尿病并发症”是由高血糖水平引起的与其他身体功能如肾,神经(神经病),脚(足溃疡和循环不良)和眼(如视网膜病)有关的问题。糖尿病也增加了心脏病和骨关节病症的风险。糖尿病的其他长期并发症包括皮肤问题,消化问题,性功能障碍和牙齿和牙龈问

题。

[0132] “神经病变”是涉及颅神经或外周或自主神经系统的任何疾病。

[0133] “胃轻瘫”是胃蠕动的弱化,其导致肠排空延迟。

[0134] 本发明所涵盖的危重病人通常经历不稳定的高代谢状态。这种不稳定的代谢状态是由于底物代谢的变化,这可能导致一些营养素的相对缺乏。一般来说,脂肪和肌肉的氧化都会增加。

[0135] 此外,危重症患者优选为经历全身炎症反应综合征或呼吸窘迫的患者。发病率的降低意味着降低危重病人发展其他疾病,病症或症状或降低其他疾病,病症或症状的严重程度的可能性。例如降低发病率可能对应于菌血症或败血症或与多器官衰竭相关的并发症的发生率的降低。

[0136] 术语“保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列。就特定的核酸序列而言,保守性修饰的变体是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的核酸,或者当核酸不编码氨基酸序列时,指基本相同的序列。由于遗传密码的简并性,大量功能相同的核酸编码任何给定的蛋白质。例如,密码子GCA,GCC,GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在密码子指定丙氨酸的每个位置上,密码子可以改变成所述的任何相应密码子而不改变编码的多肽。这种核酸变异是“沉默变异”,这是一种保守修饰的变异。本文中编码多肽的每个核酸序列也描述了核酸的每种可能的沉默变异。技术人员将认识到,核酸中的每个密码子(除了通常为甲硫氨酸的唯一密码子的AUG和通常为色氨酸的唯一密码子的TGG外)可被修饰以产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异都隐含在每个描述的序列中。

[0137] 对于多肽序列,“保守性修饰的变体”包括导致用化学上相似的氨基酸取代氨基酸的多肽序列的个别取代,缺失或添加。提供功能上相似的氨基酸的保守取代表是本领域众所周知的。此类保守修饰的变体除了并且不排除本发明的多态性变体,种间同源物和等位基因。以下八组含有彼此保守取代的氨基酸:1)丙氨酸(A),甘氨酸(G);2)天冬氨酸(D),谷氨酸(E);3)天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);4)精氨酸(R),赖氨酸(K);5)异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);6)苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);7)丝氨酸(S),苏氨酸(T);和8)半胱氨酸(C),蛋氨酸(M)(参见例如Creighton, Proteins (1984))。在一些实施方案中,术语“保守序列修饰”用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。

[0138] 术语“表位”是指能够特异性结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常由分子的化学活性表面分组(例如氨基酸或糖侧链)组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象表位和非构象表位的区别在于,在变性溶剂存在下,与前者结合而不是后者结合。

[0139] 如本文所用,术语“人抗体”旨在包括具有可变区的抗体,其中构架区和CDR区均源自人源序列。此外,如果抗体含有恒定区,恒定区也来源于这样的人序列,例如人种系序列或人种系序列的突变形式。本发明的人抗体可以包括不由人序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。

[0140] 术语“人单克隆抗体”是指展示单一结合特异性的抗体,其具有可变区,其中构架区和CDR区均源自人序列。在一个实施方案中,人单克隆抗体由杂交瘤产生,所述杂交瘤包含从转基因非人动物例如转基因小鼠获得的B细胞,所述B细胞具有包含人重链转基因和融

合至永生化细胞的轻链转基因的基因组。

[0141] “人源化”抗体是保留非人抗体反应性,同时在人体中具有较低的免疫原性的抗体。这可以通过例如保留非人CDR区并用其人对应物(即恒定区以及可变区的构架部分)替换抗体的剩余部分来实现。参见例如Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855, 1984; Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44: 65-92, 1988; Verhoeven et al., Science, 239: 1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28: 489-498, 1991; 和Padlan, Molec. Immun., 31: 169-217, 1994。人类工程技术的其它实例包括但不限于在US 5,766,886中公开的Xoma技术。

[0142] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“同一的”或百分比“同一性”是指两个或更多个相同的序列或子序列。当在比较窗口或指定区域为了最大对应性进行比较和比对(如使用以下序列比较算法之一测量的或通过手动比对和目视检查)时,如果两个序列具有相同的氨基酸残基或核苷酸的特定百分比(即,在指定区域上,或者当没有指定时,在整个序列上60%同一性,任选65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%或99%的同一性),那么两个序列“基本同一”。任选地,同一性存在于长度为至少约50个核苷酸(或10个氨基酸)的区域,或更优选在100至500个或1000个或更多个核苷酸(或20,50,200或更多个氨基酸)的长度的区域。

[0143] 对于序列比较,通常一个序列作为参考序列,测试序列与其进行比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可以使用默认的程序参数,或者可以指定替代参数。序列比较算法然后基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0144] 如本文所用,“比较窗口”包括提及选自20至600,通常约50至约200,更通常约100至约150的连续位置的任何一个数目的区段,其中序列可以与相同数目的连续位置的参考序列在两个序列最佳比对之后进行比较。用于比较的序列比对方法在本领域中是公知的。用于比较的序列的最佳比对可以通过例如Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2: 482c,通过Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970的同源性比对算法,Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988的相似性搜索方法,这些算法的计算机化实现(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI中的GAP, BESTFIT, FASTA和TFASTA)或通过人工比对和目视检查(参见例如Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou ed., 2003))进行。

[0145] 适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的两个例子是BLAST和BLAST2.0算法,其分别在Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402, 1977; 和Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990中描述。进行BLAST分析的软件可以通过国家生物技术信息中心公开获得。该算法涉及首先通过识别查询序列中的长度为W的短字来识别高评分序列对(HSP),所述短字在数据库序列中与相同长度的字比对时匹配或满足一些正值阈值分数T。T被称为邻近字评分阈值(Altschul等人,同上)。这些最初的邻居字命中作为启动搜索的种子,以找到包含它们的更长的HSP。只要累积比对得分可以增加,字命中就沿每个序列在两个方向上延伸。对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励得分;始终>0)和N(不匹配残基的罚分;总是<0)来计算累积得分。对于氨基酸序列,使用评分

矩阵来计算累积分数。在以下情况下,字命中在各个方向的延伸被停止:累计比对分数从其达到的最大值下降了数量X;由于一个或多个负评分残基比对的积累,累积分数为零或低于零;或者达到任一序列的末端。BLAST算法参数W,T和X确定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)默认使用11的字长(W),期望值(E)或10,M=5,N=-4以及两条链的比较。对于氨基酸序列,BLASTP程序默认使用3的字长和10的期望值(E),以及BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989),50的比对(B),10的期望值(E),M=5,N=-4,以及两条链的比较。

[0146] BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见例如Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993)。由BLAST算法提供的一种相似性度量是最小总和概率(P(N)),其提供了偶然发生两个核苷酸或氨基酸序列之间的匹配的概率的指示。例如,如果测试核酸与参照核酸的比较中的最小总和概率小于约0.2,更优选小于约0.01,并且最优选小于约0.001,那么认为核酸与参考序列是相似的。

[0147] 两个氨基酸序列之间的同一性百分比还可以使用E. Meyers和W. Miller(Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988)的算法来确定,该算法已被整合到ALIGN程序(版本2.0),使用PAM120权重残基表,空位长度罚分为12,空位罚分为4。此外,两个氨基酸序列之间的同一性百分比可以使用Needleman和Wunsch(J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970)算法确定,该算法已经被整合到GCG软件包(可在万维网上在gcb.com上获得)的GAP程序中,使用Blossom62矩阵或PAM250矩阵,并且空位权重为16,14,12,10,8,6或4,长度权重为1,2,3,4,5或6。

[0148] 除了以上指出的序列同一性百分比以外,两个核酸序列或多肽基本上相同的另一个指征是由第一核酸编码的多肽与针对由第二核酸编码的多肽产生的抗体免疫交叉反应,如下面所描述。因此,多肽通常与第二多肽基本上相同,例如,其中两个肽仅通过保守取代而不同。两个核酸序列基本相同的另一个指征是两个分子或其互补物在严格条件下彼此杂交,如下所述。两个核酸序列是基本相同的另外的指示是可以使用相同的引物来扩增该序列。

[0149] 术语“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性结合 β -klotho的分离的抗体基本上不含特异性结合除 β -klotho以外的抗原的抗体)。然而,特异性结合 β -klotho的分离的抗体可能与其他抗原具有交叉反应性。而且,分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0150] 术语“同种型”是指由重链恒定区基因提供的抗体类别(例如,IgM,IgE,IgG,如IgG1或IgG4)。同种型还包括这些类别之一的修饰形式,其中已经进行了修饰以改变Fc功能,例如增强或减少效应子功能或与Fc受体的结合。

[0151] 本文使用的术语“ k_{assoc} ”或“ k_a ”旨在表示特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而如本文所用的术语“ k_{dis} ”或“ k_d ”旨在表示特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文所用,术语“ K_D ”旨在表示由 k_d 与 k_a 的比率(即 k_d/k_a)获得的解离常数,并且表示为摩尔浓度(M)。抗体的 K_D 值可以使用本领域完全建立的方法来确定。确定抗体的 K_D 的方法包括使用生物传感器系统如**Biacore**[®]系统测量表面等离子体共振或通过溶液平衡滴定(SET)测量溶液中的亲和力。

[0152] 如本文所用,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单分子组合物的抗体

分子的制备物。单克隆抗体组合物对特定表位显示出单一的结合特异性和亲和力。

[0153] 术语“核酸”在本文中与术语“多核苷酸”可互换使用，并且是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。该术语包括含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接的核酸，其是合成的，天然存在的和非天然存在的，其具有与参考核酸相似的结合特性，并且以类似于参考核苷酸的方式被代谢。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯，氨基磷酸酯，甲基膦酸酯，手性甲基膦酸酯，2-0-甲基核糖核苷酸，肽-核酸(PNA)。

[0154] 除非另外指出，否则特定的核酸序列也隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如简并密码子取代)和互补序列，以及明确指出的序列。具体而言，如下详述，可通过产生其中一个或多个所选(或全部)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现简并密码子取代(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985; 和 Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994)。

[0155] 术语“有效连接”是指两个或更多个多核苷酸(例如DNA)片段之间的功能关系。通常，该术语是指转录调控序列与转录的序列的功能关系。例如，如果启动子或增强子序列在合适的宿主细胞或其他表达系统中刺激或调节编码序列的转录，则其与编码序列有效连接。通常，与转录序列有效连接的启动子转录调控序列与转录的序列物理上相邻，即它们是顺式作用的。然而，一些转录调节序列，例如增强子，不必与其增强转录的编码序列物理上相邻或者位于编码序列附近。

[0156] 如本文中所使用的，术语“优化的”是指核苷酸序列已被改变以使用在生产细胞或生物体，通常是真核细胞，例如毕赤酵母属细胞，中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或人类细胞中优选的密码子编码氨基酸序列。优化的核苷酸序列经过工程改造以完全或尽可能多地保留最初由起始核苷酸序列编码的氨基酸序列，起始核苷酸序列也被称为“亲本”序列。本文优化的序列已被工程化为具有在哺乳动物细胞中优选的密码子。然而，这里还设想了这些序列在其他真核细胞或原核细胞中的优化表达。由优化的核苷酸序列编码的氨基酸序列也被称为优化的。

[0157] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用，是指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人造化学模拟物的氨基酸聚合物，以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另有说明，否则特定的多肽序列也隐含地涵盖其保守修饰的变体。

[0158] 如本文所用，术语“重组人抗体”包括通过重组手段制备，表达，产生或分离的所有人抗体，诸如从对人免疫球蛋白基因为转基因或转染色体的动物(例如小鼠)或由其制备的杂交瘤分离的抗体，从经转化以表达例如来自转染瘤的人抗体的宿主细胞中分离的抗体，从重组的组合人抗体文库中分离的抗体以及通过任何其它方式制备，表达，产生或分离的抗体，所述其它方式涉及全部或部分人免疫球蛋白基因，序列与其他DNA序列的剪接。这样的重组人抗体具有可变区，其中构架区和CDR区来自人种系免疫球蛋白序列。然而，在某些实施方案中，可以对这样的重组人抗体进行体外诱变(或者当使用对于人Ig序列转基因的动物时，进行体内体细胞诱变)，并且因此所述重组人抗体的VH和VL区的氨基酸序列是这样的序列，其虽然是衍生自人种系VH和VL序列并且与其相关的序列，但可能不天然存在于体内人抗体种系库内。

[0159] 术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)是指其中已导入重组表达载体的细胞。应该理解,这样的术语不仅是指特定的受试者细胞,而且指的是这种细胞的后代。由于突变或环境影响,可能在后代中发生某些修饰,所以这样的子代实际上可能不与亲本细胞相同,但仍包括在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0160] 术语“受试者”包括人类和非人类动物。非人类动物包括所有的脊椎动物(例如哺乳动物和非哺乳动物),例如非人灵长类动物(例如食蟹猴),绵羊,狗,牛,鸡,两栖动物和爬行动物。除了指出之外,术语“患者”或“受试者”在本文中可互换使用。如本文所用,术语“cyno”或“食蟹猴”是指食蟹猴(食蟹猴(*Macaca fascicularis*))。

[0161] 如本文所使用的,任何疾病或病症(例如FGF21相关病症)的术语“治疗”或“治疗”在一个实施方案中是指改善疾病或病症(即,减缓或阻止或减少疾病的发展或至少一种其临床症状)。在另一个实施方案中,“治疗”或“治疗”是指减轻或改善至少一个身体参数,包括那些患者可能无法辨别的身体参数。在又一个实施方案中,“治疗”或“治疗”是指调节在身体上(例如稳定可辨别的症状),生理上(例如稳定身体参数)的疾病或病症或两者。在又一个实施方案中,“治疗”或“治疗”是指预防或延迟疾病或病症的发作或发展或进展。

[0162] 当涉及本文所述的适应症(包括例如FGF21相关病症)时,“预防”意指在具有所述恶化风险的患者中防止或减缓例如FGF21相关疾病参数恶化的任何作用,如下所述。

[0163] 术语“载体”旨在指能够运输与其连接的另一种多核苷酸的多核苷酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指环状双链DNA环,其中另外的DNA区段可以连接到所述双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,如腺伴随病毒载体(AAV或AAV2),其中额外的DNA区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在其所导入的宿主细胞(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)中自主复制。其它载体(例如非附加型哺乳动物载体)可以在导入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。而且,某些载体能够指导它们有效连接的基因的表达。这种载体在本文中被称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。

[0164] 通常,在重组DNA技术中使用的表达载体通常以质粒的形式存在。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明旨在包括其他形式的表达载体,例如具有等同功能的病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒,腺病毒和腺伴随病毒)。

[0165] 如本文使用的,“调节FGF21活性”是指FGF21活性的增加或降低,其可以是例如活性剂与FGF21多核苷酸或多肽的相互作用,FGF21信号途径的激活和/或FGF21介导的信号传导(例如,FGF21-受体依赖性信号传导)的激活等。例如,生物活性的调节是指生物活性的增加或减少。FGF21活性可通过包括但不限于以下的手段来评估:测定受试者的血糖,胰岛素,甘油三酯或胆固醇水平;通过评估 β -klotho和/或FGF受体(例如FGFR-1c)的多肽水平;或通过评估FGF21介导的信号传导(例如FGF21-受体依赖性信号传导)的激活。

[0166] 还可以通过例如测量FGF21下游生物标志物的水平和测量FGF21信号传导的增加来实现FGF21活性的比较。也可以通过测量:细胞信号传导;激酶活性;葡萄糖摄入脂肪细胞;血糖,甘油三酯或胆固醇水平波动;肝脏脂质或肝甘油三酯水平的变化;FGF21和/或 β -klotho与FGF21受体之间的相互作用;或FGF21受体的磷酸化来评估活性。在一些实施方案中,FGF21受体的磷酸化可以是酪氨酸磷酸化。在一些实施方案中,调节FGF21活性可引

起FGF21相关表型的调节。

[0167] 如本文所用,“FGF21下游生物标志物”是基因或基因产物,或基因或基因产物的可测量标记。在一些实施方案中,作为FGF21的下游标志物的基因或活性表现出改变的表达水平,或在血管组织中。在一些实施方案中,下游标志物的活性在FGF21调节剂存在下改变。在一些实施方案中,当用本发明的FGF21调节剂扰乱FGF21时,下游标志物表现出改变的表达水平。FGF21下游标志物包括但不限于葡萄糖或2-脱氧葡萄糖摄取,pERK和其他磷酸化或乙酰化蛋白或NAD水平。

[0168] 如本文所用,术语“上调”是指活性或数量的增加,激活或刺激。例如,在本发明的上下文中,FGF21调节剂可以增加 β -klotho和/或FGF21受体的活性。在一个实施方案中,FGFR-1c可以响应于FGF21调节剂而被上调。上调也可以指FGF21相关的活性,例如降低血糖,胰岛素,甘油三酯或胆固醇水平;降低肝脏脂质或甘油三酯水平;减轻体重;改善葡萄糖耐量,能量消耗或胰岛素敏感性;或引起FGF21受体的磷酸化;或增加FGF21下游标记的能力。FGF21受体可以是 β -klotho和FGFR-1c。上调可以是与对照相比至少25%,至少50%,至少75%,至少100%,至少150%,至少200%,至少250%,至少400%或至少500%。

[0169] 如本文所用,术语“调节剂”是指调节与FGF21相关病症(例如1型或2型糖尿病)或代谢病症(如肥胖症)相关的一种或多种生理或生化事件的组合物。所述事件包括但不限于降低血糖,胰岛素,甘油三酯或胆固醇水平;降低肝脏脂质或肝脏甘油三酯水平;减轻体重;并改善葡萄糖耐量,能量消耗或胰岛素敏感性的能力。

[0170] 附图简述

[0171] 图1:FGF21模拟抗体NOV001,NOV002和NOV004与人 β -Klotho的溶液平衡滴定结合测定。

[0172] 图2:NOV002和NOV004对A)人和B)食蟹猴FGFR1c_ β -klotho_HEK293细胞的pERK活化。

[0173] 图3:NOV002和NOV004对人A)FGFR2c_ β -klotho,B)FGFR3c_ β -klotho和C)FGFR4_ β -klotho HEK293细胞的pERK活化的谱图。FGF21用作FGFR2c_ β -klotho或FGFR3c_ β -klotho活化的阳性对照。FGF19用作FGFR4_ β -klotho活化的阳性对照。

[0174] 图4:用 α -klotho,Egr1-萤光素酶和海肾萤光素酶转染的HEK293细胞,NOV002和NOV004对FGF23活性的谱图。使用FGF23作为阳性对照。

[0175] 图5:使用3T3-L1脂肪细胞对2-DOG的摄取,NOV002和NOV004对小鼠交叉反应性的谱图。使用FGF21作为阳性对照。

[0176] 图6:大鼠IV注射后的NOV002和NOV004浓度-时间图谱。

[0177] 发明详述

[0178] 本发明部分基于特异性结合 β -klotho并导致FGF受体(例如FGFR1c)的活化和FGF21介导的信号传导(例如FGF21-受体依赖性信号传导)的激活的抗体分子的发现。本发明涉及全IgG型抗体及其抗原结合片段,如Fab片段(例如抗体NOV001,NOV002,NOV003和NOV004)。

[0179] 因此,本发明提供了与 β -klotho(例如人和食蟹猴 β -klotho)特异性结合的抗体,药物组合物,生产方法和使用这些抗体和组合物的方法。

[0180] FGF21蛋白质

[0181] 本公开提供了可以诱导如本文所定义的FGF21介导的信号传导(例如,FGF21-受体介导的信号传导)的FGF21模拟mAb(即,与 β -klotho(β -klotho)结合的单克隆抗体)。在体内,FGF21的成熟形式是分子的活性形式。FGF21野生型序列具有NCBI参考序列号NP_061986.1,并且可以在诸如转让给Chiron Corporation的US 6,716,626B1的授权专利中找到(SEQ ID NO:1)。

Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro
 20 25 30
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr
 35 40 45
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg
 50 55 60
 [0182] **Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu**
 65 70 75 80
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val
 85 90 95
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly
 100 105 110
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu
 115 120 125

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu
130 **135** **140**
His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly
145 **150** **155** **160**
Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu
165 **170** **175**
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp
180 **185** **190**
Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala
195 **200** **205**

[0184] 编码全长FGF21多肽 (NCBI参考序列号NM_019113.2) 的相应mRNA序列如下所示
(SEQ_ID NO:2)

1 ctgtcaatcg aggatccage cgaaagagga gccaggeact caggccacat gagttactc
61 acctggacaa ctggaatctg geaccaattc taaaccactc agtttctcg agtcacacc
121 ccggagatca cctgaggacc cgagccattt atggactcgg acgagacccgg gttcgagcac
181 tcaggactgt gggttctgt gctggctgg tttctgtgg gagectgcca ggcacacccc
241 atccctgact ccagtcctt cctgeaattt gggggccaag tccggcageg gtacctctac
301 acagatgtatg cccagcagac agaagccac ctggagatca gggaggatgg gacgggtgggg
361 ggcgttctgtt accagagccc cgaaagtctt ctgcgttctt aagccttggaa gcccggagtt
421 attcaaatctt tgggagtcctt gacatccagg ttctgttgcctt agggccaga tggggccctt
481 tatggatcgc tccacttttttgc ccctgaggcc tgcgttctt gggagtttttctt ttttgggg
541 ggataacaatgtt tttaccatgtt cgaagccac ggcctccgc tgcgttctt gggaaacaatgtt
601 tccccacacc gggaccctgc accccggatgtt ccagtttttgc ttttttttttgc accaggctg
661 cccccccgcac tccccggatgtt accccggatgtt ttttttttttgc agccccccggatgtt ttttttttttgc
721 tcggacccttgc tgatgttgc tggatgttgc tggatgttgc tggatgttgc tggatgttgc
781 agccagagggc tgtttactat gacatctctt ctttttttttgc ttttttttttgc
841 ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
901 aaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa

[0187] 成熟的EGF21序列缺少前导序列，并且还可以包括多肽的其他修饰，例如氨基末端

(有或没有前导序列) 和/或羧基末端的蛋白水解加工, 从较大的前体切割较小的多肽, N-连接的和/或O-连接的糖基化, 以及本领域技术人员所理解的其他翻译后修饰。成熟FGF21序列的代表性实例具有以下序列 (SEQ ID NO:83, 其表示全长FGF21蛋白序列 (NCBI参考序列号NP_061986.1) 的氨基酸位置29-209) :

His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 5 10 15
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 20 25 30
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
 35 40 45
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60
 [0188] **Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly**
 65 70 75 80
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
 85 90 95
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
 100 105 110
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
 115 120 125
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
 130 135 140
Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 [0189] **Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser**
 165 170 175
Pro Ser Tyr Ala Ser
180

[0190] 编码成熟FGF21多肽 (SEQ ID NO:83) 的相应cDNA序列如下所示 (SEQ ID NO:84) :

1 caccccatcc ctgactccag tccctctctg caatccgggg gccaagtcgg gcagcggtac
61 ctctacacag atgatgcaca gcagacagaa gcccacctgg agatcaggga ggatgggacg
121 gtggggggcg ctgtgtacca gagccccgaa agtctctgc agetgaaagc cttgaagccg
181 ggagttattc aaatcttggg agtcaagaca tccaggttcc tgtgccagcg gccagatggg
240 gcccgtatg gatcgttcca ctttgaccct gaggcctgca gcttccggga getgttttt
301 gaggacggat acaatgtta ccagtccgaa gcccacggcc tcccgctgca cctgccaggg
360 aacaagtccc cacaccggga ccctgcaccc cgaggaccag ctcgttccct gccactacca
421 ggcctgeccc cgcactccc ggagccaccc ggaatctgg ccccccagcc ccccgatgtg
481 ggctcctcgg accctctgag catggtggga cttcccaagg gccgaagecc cagctacgct
541 tctgat

[0191] [0192] FGF21模拟抗体和抗原结合片段

[0193] 本发明提供了特异性结合 β -klotho的抗体。在一些实施方案中,本发明提供了与人和食蟹猴 β -klotho特异性结合的抗体。本发明的抗体包括但不限于如实施例中所述分离的人单克隆抗体和Fab。

[0194] β -klotho野生型序列具有NCBI参考序列号NP_783864.1,并且可以在诸如Xu, et al. (2007) J Biol Chem. 282 (40):29069-72和Lin, et al. (2007) J Biol Chem. 282 (37): 27277-84的文献中找到。编码人 β -klotho的全长cDNA具有GenBank登录号NM_175737)。蛋白质序列如下(SEQ ID NO:262)。

1 mkgcaagsp gnewiffstd eittryrntm sngqlqrsvi lsalillrav tgfsgdgrai
61 wsknpnftpv nesqlflydt fpknffwgig tgalqvegsw kkdgkgpsiw dhfihthlkn
121 vsstngssds yiflekdlsa ldfigvsfyq fsiswprlfp dgivtvanak glqyystlld
181 alvlrniepi vtlyhwdlpl alqekyggwk ndtiidifnd yatycfqmfg drvkywith
241 npylvawhgy gtgmhapgek gnlaavytvg hnlikahskv whnynthfrp
hqkgwlsitl
301 gshwiepnrs entmdifkcq qsmvsvlgwf anpihgdgdy pegmrkkdfs vlpifseaek
361 hemrgtadff afsfgpnnfk plntmakmgq nvslnlreal nwikleynnp riliaengwf
421 tdsrvktedt taiymmknfl sqvlqairld eirvfgytaw slldgfewqd ayтирргlfy
[0195] **481 vdfnskqker kpkssahyyk qiirengfsl kestdpvqgq fpcdfswgvt esvlkpesva**
541 sspqfsdphl yvwnatgnrl lhrvegyrlk trpaqctdfv nikkqlemla rmkvthyrfa
601 ldwasvlptg nlsavnraqal ryryrcvvseg lklgisamvt lyypthahlg lpepllhadg
661 wlnpstaeaf qayaglcqfge lgdlvklwit inepnrlsdi ynrsgndtyg aahnllvaha
721 lawrlydrqf rpsqrgavsl slhadwaepa npyadshwra aerflqfeia wfaeplfkgt
781 dypaamreyi askhrrglss salprlteae rrlkkgtvdf calnhfttrf vmheqlagsr
841 ydsdrdiqfl qditrlsspt rlavipwgvr kllrwvrrny gdmdiyitas giddqaledd
901 rlrkyylgky lqevlkayli dkvrikgyya fklaeekskp rfgfftsdfk akssiqfynk
961 vissrgfpfe nsssresqtq entectvclf lvqkkplifl gccffstlvl llsiaifqrq
1021 krrkfwkakn lqhiplkkkgk rvvs

[0196] 本发明提供了特异性结合 β -klotho蛋白(例如人和食蟹猴 β -klotho)的抗体,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO:9,29,49或69的氨基酸序列的VH结构域。本发明还提供了特异性结合 β -klotho蛋白的抗体,其中所述抗体包含具有下文表1所列任何一个VH CDR的氨基酸序列的VH CDR。具体而言,本发明提供了特异性结合于 β -klotho蛋白(例如人和食蟹猴 β -klotho)的抗体,其中所述抗体包含(或者由其组成)一个,两个,三个或更多个具有下文表1中列出的任何VH CDR的氨基酸序列的VH CDR。

[0197] 本发明提供了特异性结合 β -klotho蛋白的抗体,所述抗体包含具有SEQ ID NO:19,39,59或79的氨基酸序列的VL结构域。本发明还提供了特异性结合 β -klotho(例如人和食蟹猴 β -klotho)的抗体,所述抗体包含具有下文表1中所列任何一种VL CDR的氨基酸序列的VL CDR。具体而言,本发明提供了特异性结合 β -klotho蛋白(例如人和食蟹猴 β -klotho)的抗体,所述抗体包含(或者由其组成)一个,两个,三个或更多个具有下文表1中列出的任何VL CDR的氨基酸序列的VL CDR。

[0198] 本发明的其他抗体包括已经突变的氨基酸,但在CDR区中与表1中所述的序列中描述的CDR区具有至少60,70,80,85,90或95%的同一性。在一些实施方案中,它包括突变的氨基酸序列,其中当与表1中所述的序列中描绘的CDR区相比时,CDR区中不超过1,2,3,4或5个氨基酸已被突变。

[0199] 本发明还提供了编码特异性结合 β -klotho蛋白(例如人和食蟹猴 β -klotho)的抗体的VH, VL, 全长重链和全长轻链的核酸序列。这样的核酸序列可以被优化用于在哺乳动物细胞中表达(例如,表1显示了本发明抗体的重链和轻链的优化的核酸序列)。

[0200] 表1.FGF21模拟抗体和fabs的实例

[0201]

序列说明	序列标识符 (SEQ ID NO:)	氨基酸或多核苷酸序列
NOV001 (NOV003 的 IgG1 LALA 版本)		
HCDR1 (Kabat)	3	DYYIN
HCDR2 (Kabat)	4	RIHPGSGNTYYNEKFQG
HCDR3 (Kabat)	5	LLLRSYGMDD
HCDR1	6	GYTFTDY

(Chothia)		
HCDR2 (Chothia)	7	HPGSGN
HCDR3 (Chothia)	8	LLLRSYGMDD
HCDR1 (组合的)	263	GYTFTDYYIN
HCDR2 (组合的)	4	RIHPGSGNTYYNEKFQG
HCDR3 (组合的)	5	LLLRSYGMDD
HCDR1 (IMGT)	264	GYTFTDYY
HCDR2 (IMGT)	265	IHPGSGNT
HCDR3 (IMGT)	266	AILLRSYGMDD
VH	9	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVS CKASGYTFTDYYINWVRQAPG QGLEWMGRIHPGSGNTYYNEK FQGRVTLTADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCAILLRSYGMDS DWGQGTTVTVSS
DNA VH	10	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCT GGCGCCGAAGTGAAGAAACC CGGCAGCAGCGTGAAGGTGT CCTGCAAGGCCAGCGGCTACA CCTTACCGACTACTACATCA ACTGGGTGCCAGGGCCCT GGACAGGGCCTGGAATGGAT GGGCAGAATCCACCCCGGCTC CGGCAACACCTACTACAACGA GAAGTTCCAGGGCAGAGTGA CCCTGACCGCCGACAAGAGCA CCAGCACCGCCTACATGGAAC TGAGCAGCCTGCGGAGCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGT

[0202]

		GCCATCCTGCTGCTGCGGAGC TACGGCATGGATGATTGGGGC CAGGGCACCAACCGTGACCGTC AGCTCA
[0203]	重链 11	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVS CKASGYTFTDYYINWVRQAPG QGLEWMGRIHPGSGNTYYNEK FQGRVTLTADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCAILLRSYGM DWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
	DNA 重链 12	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCT GGCGCCGAAGTGAAGAAACC CGGCAGCAGCGTGAAGGTGT CCTGCAAGGCCAGCGGCTACA CCTTACCGACTACTACATCA ACTGGGTGCCAGGCCCCCT GGACAGGGCCTGGAATGGAT

[0204]

		GGGCAGAATCCACCCCGGCTC CGGCAACACCTACTACAACGA GAAGTTCCAGGGCAGAGTGA CCCTGACCGCCGACAAGAGCA CCAGCACCGCCTACATGGAAC TGAGCAGCCTGCAGGAGCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGT GCCATCCTGCTGCTGCAGGAGC TACGGCATGGATGATTGGGGC CAGGGCACCAACCGTGACCGTC AGCTCAGCTAGCACCAAGGGC CCCAGCGTGTCCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGAGCACCAAG CGGCGGCACAGCCGCCCTGG GCTGCCTGGTGAAGGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACCGTGT CCTGGAACAGCGGAGCCCTG ACCTCCGGCGTGCACACCTTC CCCGCCGTGCTGCAGAGCAG CGGCCTGTACAGCCTGTCCAG CGTGGTGACAGTGCCCCAGCA GCAGCCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAACCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACAC CTGCCCCCCCCTGCCAGCCCC AGAGGCAGCGGGGGGACCCCT CCGTGTTCTGTTCCCCCCCCA AGCCCAAGGACACCCCTGATGA TCAGCAGGACCCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGT
--	--	--

[0205]		<p> GAGCCACGAGGACCCAGAGG TGAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCACAAC GCCAAGACCAAGCCCAGAGA GGAGCAGTACAACAGCACCTA CAGGGTGGTGTCCGTGCTGAC CGTGCTGCACCAGGACTGGCT GAACGGCAAGGAATACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAGGCC TGCCAGCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGC CAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCCTGCCCTCTCCG GGAGGAGATGACCAAGAAC AGGTGTCCCTGACCTGTCTGG TGAAGGGCTTCTACCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAACGGCCAGCCCCGAGAA CAACTACAAGACCACCCCCC AGTGCTGGACAGCGACGGCA GCTTCTCCTGTACAGCAAGC TGACCGTGGACAAGTCCAGGT GGCAGCAGGGCAACGTGTT AGCTGCAGCGTGATGCACGA GGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGAGCCTGAGCCTGTC CCCCGGCAAG </p>
LCDR1 (Kabat)	13	KSSQSIVHSSGNTYLE
LCDR2 (Kabat)	14	KVSNRFS
LCDR3 (Kabat)	15	FQGSHIPYT
LCDR1 (Chothia)	16	SQSIVHSSGNTY

LCDR2 (Chothia)	17	KVS
LCDR3 (Chothia)	18	GSHIPY
LCDR1 (组合的)	13	KSSQSIVHSSGNTYLE
LCDR2 (组合的)	14	KVSNRFS
LCDR3 (组合的)	15	FQGSHIPYT
LCDR1 (IMGT)	267	QSIVHSSGNTY
LCDR2 (IMGT)	17	KVS
LCDR3 (IMGT)	15	FQGSHIPYT
VL	19	DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSIVHSSGNTYLEWYLQKP GQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQGSHIPYTFGQGTKLEIK
DNA VL	20	GACGTGGTGATGACCCAGACC CCCCTGAGCCTGAGCGTGACA CCTGGACAGCCTGCCAGCATC TCCTGCAAGAGCAGCCAGAGC ATCGTGCACAGCAGCGGCAAC ACCTACCTGGAATGGTATCTG CAGAAGCCCCGCCAGAGCCC CCAGCTGCTGATCTACAAGGT GTCCAACCGGTTTCAGCGGCGT GCCCGACAGATTTCTGGCAG CGGCTCCGGCACCGACTTCAC CCTGAAGATCTCCGGGTGGA AGCCGAGGACGTGGCGTGT ACTACTGTTTCAAGGCTCCC ACATCCCCTACACCTTCGGCC AGGGCACCAAGCTGGAAATCA

[0206]

		AG
[0207]	轻链 21	DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSIVHSSGNTYLEWYLQKP GQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQGSHIPYTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTTLSKADYEHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	DNA 轻链 22	GACGTGGTGATGACCCAGACC CCCCTGAGCCTGAGCGTGACA CCTGGACAGCCTGCCAGCATC TCCTGCAAGAGCAGCCAGAGC ATCGTGCACAGCAGCGGCAAC ACCTACCTGGAATGGTATCTG CAGAAGCCCGGCCAGAGCCC CCAGCTGCTGATCTACAAGGT GTCCAACCGGTTCAGCGGCGT GCCCAGACAGATTTCTGGCAG CGGCTCCGGCACCGACTTCAC CCTGAAGATCTCCGGGTGGA AGCCGAGGACGTGGCGTGT ACTACTGTTTCAAGGCTCCC ACATCCCCTACACCTTCGGCC AGGGCACCAAGCTGGAAATCA AGCGTACGGTGGCCGCTCCCA GCGTGTTCATCTCCCCCCCCA GCGACGAGCAGCTGAAGAGC GGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACTTCTACCC

[0208]

		CCGGGAGGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTG CAGAGCGGCAACAGCCAGGA GAGCGTCACCGAGCAGGACA GCAAGGACTCCACCTACAGCC TGAGCAGCACCCCTGACCCTGA GCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAAGGTGTACGCCCTGCGAG GTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGC
NOV002 (NOV004 的 IgG1 LALA 版本)		
HCDR1 (Kabat)	23	SGYTWH
HCDR2 (Kabat)	24	YIHYSVYTNYNPSVKG
HCDR3 (Kabat)	25	RTTSLERYFDV
HCDR1 (Chothia)	26	GYSITSGY
HCDR2 (Chothia)	27	HYSVY
HCDR3 (Chothia)	28	RTTSLERYFDV
HCDR1 (组合的)	268	GYSITSGYTWH
HCDR2 (组合的)	24	YIHYSVYTNYNPSVKG
HCDR3 (组合的)	25	RTTSLERYFDV
HCDR1 (IMGT)	269	GYSITSGYT
HCDR2 (IMGT)	270	IHYSVYT
HCDR3 (IMGT)	271	ARRRTSLERYFDV
VH	29	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSC AVSGYSITSGYTWHWVRQAPG

		KGLEWLSYIHYSVYTNYNPSVK GRFTISRDTAKNSFYLQMNSLR AEDTAVYYCARRRTSLEYFDV WGQGTLTVSS
[0209]	DNA VH	<p>30</p> <p>GAGGTGCAGCTGGTGGAATCT GGCGGCGGACTCGTGAAGCC TGGCGGCTCTCTGAGACTGAG CTGTGCCGTGTCCGGCTACAG CATCACCAAGCGGCTACACCTG GCATTGGGTGCGCCAGGCC CTGGCAAAGGACTGGAATGG CTGTCCTACATCCACTACAGC GTGTACACCAACTACAACCCC AGCGTGAAGGGCCGGTTCAC CATCAGCAGAGACACCGCCAA GAACAGCTTCTACCTGCAAAT GAACAGCCTGCGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGTG CCAGACGGACCACCAGCCTG GAACGGTACTTCGACGTGTGG GGCCAGGGCACACTCGTGAC CGTCAGCTCA</p>
	重链	<p>31</p> <p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSC AVSGYSITSGYTWHWVRQAPG KGLEWLSYIHYSVYTNYNPSVK GRFTISRDTAKNSFYLQMNSLR AEDTAVYYCARRRTSLEYFDV WGQGTLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP</p>

			KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPPKDLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIISKAKGQPREGQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
[0210]	DNA 重链	32	GAGGTGCAGCTGGTCCAATCT GGCGGCGGACTCGTGAAGCC TGGCGGCTCTCTGAGACTGAG CTGTGCCGTGTCCGGCTACAG CATCACCAGCGGCTACACCTG GCATTGGGTGCGCCAGGCC CTGGCAAAGGACTGGAATGG CTGTCCTACATCCACTACAGC GTGTACACCAACTACAACCCC AGCGTGAAGGGCCGGTTCAC CATCAGCAGAGACACCGCCAA GAACAGCTTCTACCTGCAAAT GAACAGCCTGCGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGTG CCAGACGGACCACCAGCCTG GAACGGTACTTCGACGTGTGG GGCCAGGGCACACTCGTGAC CGTCAGCTCAGCTAGCACCAA GGGCCCCAGCGTGTCCCCCT GGGCCCCAGCAGCAAGAGCA CCAGCGGCGGCACAGCCGCC

[0211]

		CTGGGCTGCCTGGTGAAGGA CTACTTCCCCGAGCCC GTGAC CGTGT CCTGGAACACAGCGGAG CCCTGACCTCCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGA GCAGCGGCCTGTACAGCCTGT CCAGCGTGGTGACAGTGC CCA GCAGCAGCCTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAAC CACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAGAGTGGAGCC CAAGAGCTGCGACAAGACCCA CACCTGCCCCCCCCTGCCAGC CCCAGAGGCAGCGGGCGGAC CCTCCGTGTT CCTGTTCCCC CCAAGCCCAAGGACACCCCTGA TGATCAGCAGGACCCCCGAG GTGACCTGCGTGGTGGTGG CGTGAGCCACGAGGACCCAG AGGTGAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCAC AACGCCAAGACCAAGGCCAGA GAGGAGCAGTACAACAGCAC CTACAGGGTGGTGTCCGTGCT GACCGT GCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAATACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAGGC CCTGCCAGCCCCATCGAAAAA GACCATCAGCAAGGCCAAGG GCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCCTGCCCTCC CGGGAGGAGATGACCAAGAA
--	--	--

[0212]

		CCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCAG CGACATGCCGTGGAGTGGG AGAGCAACGCCAGCCCGAG AACAACTACAAGACCACCCCC CCAGTGCTGGACAGCGACGG CAGCTTCTTCCTGTACAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCAG GTGGCAGCAGGGCAACGTGT TCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGT CCCCCGGCAAG
LCDR1 (Kabat)	33	QASQDISNYLN
LCDR2 (Kabat)	34	YTSRLQS
LCDR3 (Kabat)	35	QQGNTLPYT
LCDR1 (Chothia)	36	SQDISNY
LCDR2 (Chothia)	37	YTS
LCDR3 (Chothia)	38	GNTPY
LCDR1 (组合的)	33	QASQDISNYLN
LCDR2 (组合的)	34	YTSRLQS
LCDR3 (组合的)	35	QQGNTLPYT
LCDR1 (IMGT)	272	QDISNY
LCDR2 (IMGT)	273	YTS
LCDR3 (IMGT)	35	QQGNTLPYT
VL	39	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC QASQDISNYLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFTGSGS

		GADYTFTISSLQPEDIATYFCQQ GNTLPYTFQGQGTKLEIK
DNA VL	40	GACATCCAGATGACCCAGAGC CCCAGCAGCCTGTCTGCCAGC GTGGGCGACAGAGTGACCAT CACCTGTCAGGCCAGCCAGGA CATCAGCAACTACCTGAAC TG GTATCAGCAGAAGCCCCGGCAA GGCCCCCAAGCTGCTGATCTA CTACACCAGCAGACTGCAGAG CGGCGTGCCAGCAGATTAC CGGCTCTGGAAGCGGAGCCG ACTACACCTTCACCATCAGCT CCCTGCAGCCCCGAGGATATCG CTACCTACTTCTGTCAGCAAG GCAACACCCCTGCCTTACACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTG GAAATCAAG
轻链	41	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQDISNYLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFTGSGS GADYTFTISSLQPEDIATYFCQQ GNTLPYTFQGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSQ GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSL TLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
DNA 轻链	42	GACATCCAGATGACCCAGAGC CCCAGCAGCCTGTCTGCCAGC GTGGGCGACAGAGTGACCAT CACCTGTCAGGCCAGCCAGGA

[0214]		<p>CATCAGCAACTACCTGAACTG GTATCAGCAGAAGCCCCGGCAA GGCCCCCAAGCTGCTGATCTA CTACACCAGCAGACTGCAGAG CGGCGTGCCAGCAGATTAC CGGCTCTGGAAGCGGAGCCG ACTACACCTTCACCATCAGCT CCCTGCAGCCCGAGGATATCG CTACCTACTTCTGTCAAGCAAG GCAACACCCCTGCCTTACACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTG GAAATCAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTCATCTTC CCCCCCAGCGACGAGCAGCT GAAGAGCGGCACCGCCAGCG TGGTGTGCCTGCTGAACAACT TCTACCCCCGGGAGGCCAAG GTGCAGTGGAAAGGTGGACAA CGCCCTGCAGAGCGGCAACA GCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACC TACAGCCTGAGCAGCACCTG ACCCTGAGCAAGGCCGACTAC GAGAAGCATAAGGTGTACGCC TGCGAGGTGACCCACCAAGGG CCTGTCCAGCCCCGTGACCAA GAGCTTCAACAGGGCGAGT GC </p>
NOV003 (NOV001 的 IgG1 DAPA 版本)		
HCDR1 (Kabat)	43	DYYIN

HCDR2 (Kabat)	44	RIHPGSGNTYYNEKFQG
HCDR3 (Kabat)	45	LLLRSYGMDD
HCDR1 (Chothia)	46	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	47	HPGSGN
HCDR3 (Chothia)	48	LLLRSYGMDD
HCDR1 (组合的)	263	GYTFTDYYIN
HCDR2 (组合的)	44	RIHPGSGNTYYNEKFQG
HCDR3 (组合的)	45	LLLRSYGMDD
HCDR1 (IMGT)	264	GYTFTDYY
HCDR2 (IMGT)	265	IHPGSGNT
HCDR3 (IMGT)	266	AILLLRSYGMDD
[0215] VH	49	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKASGYTFTDYYINWVRQAPG QGLEWMGRIHPGSGNTYYNEK FQGRVTLTADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCAILLRSYGMDD DWGQGTTVTVSS
		CAAGTCCAACTCGTCCAGTCC GGAGCCGAAGTGAAAAAGCC GGGCTCATCAGTGAAGGTGTC CTGCAAGGCCTCGGGCTACAC CTTCACCGACTACTACATCAA CTGGGTGCGCCAGGCCCGG GACAGGGTCTGGAATGGATG GGGAGGATTCACCCCGGATC GGGAAACACCTACTACAACGA GAAGTTCCAGGGCAGAGTGA CCCTGACTGCCGACAAGTCCA
DNA VH	50	

		CGTCCACTGCCTACATGGAAC TGTGTCCTCGGGTCCGAGG ATACCGCCGTGTACTATTGTG CGATCCTGCTGTTGCGGAGCT ACGGGATGGATGACTGGGGA CAGGGTACCACTGTGACTGTG TCCAGC
[0216]	重链 51	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVS CKASGYTFTDYYINWVRQAPG QGLEWMGRIHPGSGNTYYNEK FQGRVTLTADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCAILLRSYGM DWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALAAPIEKTIISKAKGQP VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQP KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
DNA 重链	52	CAAGTCCAACTCGTCCAGTCC GGAGCCGAAGTGAAAAAGCC GGGCTCATCACTGAAGGTGTC CTGCAAGGCGTCGGCTACAC

[0217]

		<p>CTTCACCGACTACTACATCAA CTGGGTGCGCCAGGCCCCGG GACAGGGTCTGGAATGGATG GGGAGGGATTCACCCCGGATC GGGAAACACCTACTACAACGA GAAGTTCCAGGGCAGAGTGA CCCTGACTGCCGACAAGTCCA CGTCCACTGCCCTACATGGAAC TGTGTCGTCCTGCGGTCCGAGG ATACCGCCGTGTACTATTGTG CGATCCTGCTGTTGCGGAGCT ACGGGATGGATGACTGGGA CAGGGTACCACTGTGACTGTG TCCAGCGCTAGCACCAAGGGC CCCTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTCCAGCAAGTCTACCTCC GGCGGCACAGCTGCTCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCTGAGCCTGTGACAGTGTG CTGGAACTCTGGCGCCCTGAC CTCTGGCGTGCACACCTTCCC TGCCGTGCTGCAGTCCTCCGG CCTGTACTCCCTGTCCCTCCGT GGTCACAGTGCCTCAAGCAG CCTGGGCACCCAGACCTATAT CTGCAACGTGAACCACAAGCC TTCCAACACCAAGGTGGACAA GCGGGTGGAGCCTAAGTCCT GCGACAAGACCCACACCTGTC CTCCCTGCCCTGCTCCTGAAC TGCTGGCGGCCCTCTGTGT TCCTGTTCCCTCCAAAGCCCA</p>
--	--	---

[0218]		<code> AGGACACCCCTGATGATCTCCC GGACCCCTGAAGTGACCTGCG TGGTGGTGGCCGTGTCCCACG AGGATCCTGAAGTGAAGTTCA ATTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCACAACGCCAAGAC CAAGCCTCGGGAGGAACAGT ACAACCTCCACCTACCGGGTGG TGTCCGTGCTGACCGTGCTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGC AAAGAGTACAAGTGCAGTC TCCAACAAGGCCCTGGCGCC CCTATCGAAAAGACAATCTCC AAGGCCAAGGGCCAGCCTAG GGAACCCCAGGTGTACACCCT GCCACCCAGCCGGGAGGAAA TGACCAAGAACCAAGGTGTCCC TGACCTGTCTGGTCAAGGGCT TCTACCCCTCCGATATGCCG TGGAGTGGAGTCTAACGGC CAGCCTGAGAACAACTACAAG ACCACCCCTCCTGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTCTTCCTG TACTCCAAACTGACCGTGGAC AAGTCCCAGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTCTCCTGCTCCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCCAGAACAGTC GTCCCTGTCTCCGGCAAG </code>
LCDR1 (Kabat)	53	KSSQSIVHSSGNTYLE
LCDR2 (Kabat)	54	KVSNRFS
LCDR3 (Kabat)	55	FQGSHIPYT

[0219]

LCDR1 (Chothia)	56	SQSIVHSSGNTY
LCDR2 (Chothia)	57	KVS
LCDR3 (Chothia)	58	GSHIPY
LCDR1 (组合的)	53	KSSQSIVHSSGNTYLE
LCDR2 (组合的)	54	KVSNRFS
LCDR3 (组合的)	55	FQGSHIPYT
LCDR1 (IMGT)	267	QSIVHSSGNTY
LCDR2 (IMGT)	57	KVS
LCDR3 (IMGT)	55	FQGSHIPYT
VL	59	DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSIVHSSGNTYLEWYLQKP GQSPQLLIYKVSNRFSGVPDFRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQGSHIPYTFGQGKLEIK
DNA VL	60	GATGTCGTGATGACCCAGACT CCGCTGTCCCTGTCCGTGACC CCTGGACAGCCCGCGTCTATC TCGTGCAAGAGCTCCCAGTCC ATTGTGCATTCAAGCGGAAAC ACCTATCTGGAGTGGTACCTC CAGAAGCCTGGCCAGAGCCC ACAGCTGCTGATCTACAAAGT GTCGAACAGATTCTCCGGTGT CCCGGACCGGTTCTCCGGCTC GGGAAGCGGCAGTGAACCTTAC ACTGAAGATCTCACGGGTGGA AGCCGAGGACGTGGGAGTGT ACTACTGTTCCAAGGGTCCC

		ACATTCCCTACACCTTCGGCC AAGGAACTAAGCTGGAAATCA AG
轻链	61	DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSIVHSSGNTYLEWYLQKP GQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQGSHIPYTFGQGKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTTLSKADYEHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[0220]	DNA 轻链	62 GATGTCGTGATGACCCAGACT CCGCTGTCCCTGTCCGTGACC CCTGGACAGCCCGCGTCTATC TCGTGCAAGAGCTCCCAGTCC ATTGTGCATTCAAGCGGAAAC ACCTATCTGGAGTGGTACCTC CAGAAGCCTGGCCAGAGCCC ACAGCTGCTGATCTACAAAGT GTCGAACAGATTCTCCGGTGT CCCGGACCGGTTCTCCGGCTC GGGAAGCGGCAGTGAACCTTAC ACTGAAGATCTCACGGGTGGA AGCCGAGGACGTGGGAGTGT ACTACTGTTCCAAGGGTCCC ACATTCCCTACACCTTCGGCC AAGGAACTAAGCTGGAAATCA AGCGTACGGTGGCCGCTCCCA GCGTGTTCATCTTCCCCCCC GCGACGAGCAGCTGAAGAGC

[0221]

		GGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACTTCTACCC CCGGGAGGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTG CAGAGCGGCAACAGCCAGGA GAGCGTCACCGAGCAGGACA GCAAGGACTCCACCTACAGCC TGAGCAGCACCTGACCCCTGA GCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAGGTGTACGCCTGCGAG GTGACCCACCAGGGCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGC
NOV004 (NOV002 的 IgG1 DAPA 版本)		
HCDR1 (Kabat)	63	SGYTWH
HCDR2 (Kabat)	64	YIHYSVYTNYNPSVKG
HCDR3 (Kabat)	65	RTTSLERYFDV
HCDR1 (Chothia)	66	GYSITSGY
HCDR2 (Chothia)	67	HYSVY
HCDR3 (Chothia)	68	RTTSLERYFDV
HCDR1 (组合的)	268	GYSITSGYTWH
HCDR2 (组合的)	64	YIHYSVYTNYNPSVKG
HCDR3 (组合的)	25	RTTSLERYFDV
HCDR1 (IMGT)	269	GYSITSGYT
HCDR2 (IMGT)	270	IHYSVYT
HCDR3 (IMGT)	271	ARRRTSLEERYFDV

VH	69	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSC AVSGYSITSGYTWHWVRQAPG KGLEWLSYIHYSVYTNYNPSVK GRFTISRDTAKNSFYLQMNSLR AEDTAVYYCARRRTSLERYFDV WGQGTLVTVSS
DNA VH [0222]	70	GAAGTCCAACTCGTCGAATCC GGCGGGGGACTGGTCAAGCC GGGAGGGATCGCTGAGACTGT CGTGCGCAGTGTCAAGGGTACA GCATCACCTCCGGTTACACCT GGCACTGGGTCAAGACAGGCG CCGGGAAAAGGCCTGGAATG GCTGTCCTACATTCAATTACTC CGTGTACACTAACTACAACCC CTCAGTGAAGGGGGGGTTCAC CATCTCCCAGGACACTGCCAA GAATAGCTTCTATCTGCAAAT GAACTCCCTGCGGGCCGAGG ATACCGCCGTGTACTACTGCG CGAGGGCGACCACTACGTCCCTG GAGCGCTACTTTGACGTGTGG GGCCAGGGTACCCCTCGTGA GTGTCCCTCG
重链	71	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSC AVSGYSITSGYTWHWVRQAPG KGLEWLSYIHYSVYTNYNPSVK GRFTISRDTAKNSFYLQMNSLR AEDTAVYYCARRRTSLERYFDV WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA

			VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPCPAPELLGGPS VFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALAAPIEKTIISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
[0223]	DNA 重链	72	GAAGTCCAACTCGTCGAATCC GGCGGCGGACTGGTCAAGCC GGGAGGGATCGCTGAGACTGT CGTGCGCAGTGTCAAGGTACA GCATCACCTCCGGTTACACCT GGCACTGGGTAGACACAGGGG CCGGGAAAAGGCCTGGAATG GCTGTCCTACATTCAATTACTC CGTGTACACTAACTACAACCC CTCAGTGAAGGGGCGGTTCAC CATCTCCCGGGACACTGCCAA GAATAGCTTCTATCTGCAAAT GAACCTCCCTGCAGGGCCGAGG ATACCGCCGTGTACTACTGCG CGAGGGCGACCAACGTCCCTG GAGCGCTACTTGTACGTGTGG GGCCAGGGTACCCCTCGTACT GTGTCCCTCGGCTAGCACCAAG GGCCCCTCCGTGTTCCCTCTG

[0224]

		GCCCCTTCCAGCAAGTCTACC TCCGGCGGCACAGCTGCTCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCTGAGCCTGTGACAGTG TCCTGGAACTCTGGCGCCCTG ACCTCTGGCGTGCACACCTTC CCTGCCGTGCTGCAGTCCTCC GGCCTGTACTCCCTGTCCTCC GTGGTCACAGTGCCTTCAAGC AGCCTGGGCACCCAGACCTAT ATCTGCAACGTGAACCACAAG CCTTCCAACACCAAGGTGGAC AAGCGGGTGGAGCCTAAGTC CTGCGACAAGACCCACACCTG TCCTCCCTGCCCTGCTCCTGA ACTGCTGGCGGCCCTCTGT GTTCCTGTTCCCTCCAAAGCC CAAGGACACCCCTGATGATCTC CCGGACCCCTGAAGTGACCTG CGTGGTGGTGGCCGTGTCCA CGAGGATCCTGAAGTGAAGTT CAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCACAACGCCAAGA CCAAGCCTCGGGAGGAACAG TACAACCTCACCTACCGGGTG GTGTCCGTGCTGACCGTGCTG CACCAAGGACTGGCTGAACGG CAAAGAGTACAAGTGCAAAGT CTCCAACAAGGCCCTGGCCGC CCCTATCGAAAAGACAATCTC CAAGGCCAAGGGCCAGCCTA GGGAACCCCAGGTGTACACCC
--	--	--

[0225]

		TGCCACCCAGCCGGGAGGAA ATGACCAAGAACCAAGGTGTCC CTGACCTGTCTGGTCAAGGGC TTCTACCCTTCCGATATGCC GTGGAGTGGGAGTCTAACGG CCAGCCTGAGAACAACTACAA GACCACCCCTCCTGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTCTTCT GTACTCCAAACTGACCGTGGA CAAGTCCCAGGTGGCAGCAGG GCAACGTGTTCTCCTGCTCCG TGATGCACGAGGCCCTGCACA ACCACTACACCCAGAAGTCCC TGTCCCTGTCTCCCGCAAG
LCDR1 (Kabat)	73	QASQDISNYLN
LCDR2 (Kabat)	74	YTSRLQS
LCDR3 (Kabat)	75	QQGNTLPYT
LCDR1 (Chothia)	76	SQDISNY
LCDR2 (Chothia)	77	YTS
LCDR3 (Chothia)	78	GNTPY
LCDR1 (组合的)	73	QASQDISNYLN
LCDR2 (组合的)	74	YTSRLQS
LCDR3 (组合的)	75	QQGNTLPYT
LCDR1 (IMGT)	272	QDISNY
LCDR2 (IMGT)	273	YTS
LCDR3 (IMGT)	75	QQGNTLPYT
VL	79	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC QASQDISNYLNWYQQKPGKAP

		KLLIYYTSRLQSGVPSRFTGSGS GADYTFTISSLQPEDIATYFCQQ GNTLPYTFGQGTKLEIK
DNA VL	80	GATATTCAAGATGACTCAGAGC CCCTCCTCGCTCTCCGCCCTCC GTGGGGGATCGCGTGACAAT CACCTGTCAAGCGTCCCAGGA CATCTCAAACACTACCTGAAC TG GTATCAGCAGAAGGCCAGGG A AGGCCCCGAAGCTGCTGATCT ACTACACTTCGCGGCTGCAGT CCGGCGTGCCGTACGGTTCA CTGGCTCGGGCTCCGGAGCA GACTACACCTTCACCATTAGC AGCCTGCAGCCCCGAGGACATC GCTACCTACTTTGCCAACAA GGAAACACCCCTGCCCTACACC TTCGGACAGGGTACTAAGCTG GAAATCAAA
轻链	81	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQDISNYLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFTGSGS GADYTFTISSLQPEDIATYFCQQ GNTLPYTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSL TLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
DNA 轻链	82	GATATTCAAGATGACTCAGAGC CCCTCCTCGCTCTCCGCCCTCC GTGGGGGATCGCGTGACAAT

[0227]		CACCTGTCAAGCGTCCCAGGA CATCTCAAACCTACCTGAAC TG GTATCAGCAGAAGCCAGGGA AGGCCCGAAGCTGCTGATCT ACTACACTTCGCGGCTGCAGT CCGGCGTGCCGTCACGGTTCA CTGGCTCGGGCTCCGGAGCA GAATACACCTTCACCATTAGC AGCCTGCAGCCGAGGACATC GCTACCTACTTTGCCAACAA GGAAACACCCCTGCCTACACC TTCGGACAGGGTACTAAGCTG GAAATCAAACGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTCATCTTC CCCCCCAGCGACGAGCAGCT GAAGAGCGGCACCGCCAGCG TGGTGTGCCTGCTGAACAACT TCTACCCCCGGGAGGCCAAG GTGCAGTGGAAAGGTGGACAA CGCCCTGCAGAGCGGCAACA GCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACC TACAGCCTGAGCAGCACCTG ACCCTGAGCAAGGCCGACTAC GAGAACATAAGGTGTACGCC TGCGAGGTGACCCACCAAGGG CCTGTCCAGCCCCGTGACCAA GAGCTTCAACAGGGCGAGT GC
--------	--	---

[0228] 本发明的其它抗体包括其中氨基酸或编码氨基酸的核酸已被突变但仍与表1中所述序列具有至少60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%或95%同一性的那些。一些实施方案包括突变的氨基酸序列, 其中当与表1中所述的序列中描绘的可变区相比时, 在可变区中不超过1, 2, 3, 4或5个氨基酸已被突变, 而保留基本上相同的抗原结合活性。

[0229] 本发明的其它抗体包括其中氨基酸或编码氨基酸的核酸已被突变但仍与表1中所述序列具有至少60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%或95%同一性的那些。一些实施方案包括突变的氨基酸序列, 其中当与表1中所述的序列中描绘的可变区相比时, 在可变区中

不超过1,2,3,4或5个氨基酸已被突变,而保留基本上相同的抗原结合活性。

[0230] 由于这些抗体中的每一个都可以与 β -klotho结合,可以将VH,VL,全长轻链和全长重链序列(氨基酸序列和编码氨基酸序列的核苷酸序列)“混合并匹配”以产生本发明的其他结合 β -klotho的抗体。可以使用本领域已知的结合测定法(例如,ELISA,以及实施例部分中描述的其他测定法)来测试这种“混合的和匹配的” β -klotho结合抗体。当这些链被混合和匹配时,来自特定VH/VL配对的VH序列应当用结构上相似的VH序列替换。同样,来自特定全长重链/全长轻链配对的全长重链序列应该被结构相似的全长重链序列替换。同样,来自特定VH/VL配对的VL序列应该被结构上相似的VL序列替换。同样,来自特定全长重链/全长轻链配对的全长轻链序列应被结构相似的全长轻链序列替换。

[0231] 因此,一方面,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合区,其具有:包含选自SEQ ID NO:9,29,49和69的氨基酸序列的重链可变结构域和包含选自SEQ ID NO:19,39,59和79的氨基酸序列的轻链可变结构域,其中所述抗体特异性结合 β -klotho(例如人和食蟹猴 β -klotho)。

[0232] 更具体地,在某些方面,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合区,其具有包含分别选自SEQ ID NO:9和19;29和39;49和59;或69和79的氨基酸序列的重链可变结构域和轻链可变结构域。

[0233] 另一方面,本发明提供了(i)分离的抗体,其具有:包含针对哺乳动物细胞中表达优化的选自SEQ ID NO:9,29,49或69的氨基酸序列的全长重链和包含针对哺乳动物细胞中表达优化的选自SEQ ID NOs:21,41,61,或81的氨基酸序列的全长轻链;或(ii)包含其抗原结合部分的功能性蛋白质。更具体地,在某些方面,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合区,其具有包含分别选自SEQ ID NO:9和19;29和39;49和59;或69和79的氨基酸序列的重链和轻链。

[0234] 如本文所用,术语“互补决定区”和“CDR”是指赋予抗原特异性和结合亲和力的抗体可变区内的氨基酸序列。通常,每个重链可变区(HCDR1,HCDR2,HCDR3)中有三个CDR,每个轻链可变区(LCDR1,LCDR2,LCDR3)中有三个CDR。

[0235] 给定CDR的精确氨基酸序列边界可以使用许多众所周知的方案中的任何一种来容易地确定,包括由Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,”5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (“Kabat” numbering scheme), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (“Chothia” numbering scheme), 和ImMunoGenTics (IMGT) 编号 (Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003) (“IMGT” 编号方案) 所述的那些。例如,对于经典形式,在Kabat下,重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基编号为31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) 和95-102 (HCDR3);轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸残基编号为24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) 和89-97 (LCDR3)。在Chothia下,VH中的CDR氨基酸编号为26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) 和95-102 (HCDR3);VL中的氨基酸残基编号为26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) 和91-96 (LCDR3)。通过组合Kabat和Chothia的CDR定义,CDR由人VH中的氨基酸残基26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR 2) 和95-102 (HCDR3) 和人VL中的氨基酸残基24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) 和89-97 (LCDR3) 组成。在IMGT下,VH中的CDR氨基酸残基编号大约26-35 (CDR1), 51-57 (CDR2) 和93-102 (CDR3), 并且VL中

的CDR氨基酸残基编号大约27-32 (CDR1) ,50-52 (CDR2) 和89-97 (CDR3) (根据“Kabat”编号)。在IMGT下,可以使用程序IMGT/DomainGap Align来确定抗体的CDR区。

[0236] 例如,在Kabat下,重链可变结构域(VH)中抗体NOV001的CDR氨基酸残基编号为31-35 (HCDR1) ,50-65 (HCDR2) 和99-108 (HCDR3) ;并且轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸残基编号为24-39 (LCDR1) ,55-61 (LCDR2) 和94-102 (LCDR3) 。在Chothia下,VH中的CDR氨基酸编号为26-32 (HCDR1) ,52-57 (HCDR2) 和99-108 (HCDR3) ;并且VL中的氨基酸残基编号为26-39 (LCDR1) ,55-57 (LCDR2) 和96-101 (LCDR3) 。通过组合Kabat和Chothia的CDR定义,CDR由人VH中的氨基酸残基26-35 (HCDR1) ,50-65 (HCDR2) 和99-108 (HCDR3) 和人VL中氨基酸残基24-39 (LCDR1) ,55-61 (LCDR2) 和94-102 (LCDR3) 组成。

[0237] 另一方面,本发明提供了包含如表1所述的重链和轻链CDR1,CDR2和CDR3或其组合的结合 β -klotho的抗体。抗体的VH CDR1的氨基酸序列示于SEQ ID NO:3,23,43和63中。抗体的VH CDR2的氨基酸序列示于SEQ ID NO:4,24,44和64。抗体的VH CDR3的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:5,25,45和65中。抗体的VL CDR1的氨基酸序列显示在SEQ ID NOs:13,33,53,和73。抗体的VL CDR2的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:14,34,54和74中。抗体的VL CDR3的氨基酸序列显示于SEQ ID NOs:15,35,55,和75中。使用Kabat系统描绘这些CDR区。

[0238] 或者,如使用Chothia系统(A1-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948)所定义的,抗体的VH CDR1的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:6,26,46和66。抗体的VH CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:7,27,47和67所示。抗体的VH CDR3的氨基酸序列显示在SEQ ID NOs:8,28,48,和68中。抗体的VL CDR1的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:16,36,56和76中。抗体的VL CDR2的氨基酸序列显示在SEQ ID NOs:17,37,57,和77中。抗体的VL CDR3的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:18,38,58和78中。

[0239] 或者,如使用组合系统所定义的,抗体的VH CDR1的氨基酸序列示于SEQ ID NO:263和268。抗体的VH CDR2的氨基酸序列示于SEQ ID NO:4,24,44和64。抗体的VH CDR3的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:5,25和45中。抗体的VL CDR1的氨基酸序列显示在SEQ ID NOs:13,33,53,和73中。抗体的VL CDR2的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:14,34,54和74中。抗体的VL CDR3的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:15,35,55和75中。

[0240] 或者,如使用IMGT系统所定义的,抗体的VH CDR1的氨基酸序列示于SEQ ID NO:264和269中。抗体的VH CDR2的氨基酸序列示于SEQ ID NO:265和270。抗体的VH CDR3的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:266和271中。抗体的VL CDR1的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:267和272中。抗体的VL CDR2的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:17,273和57中。抗体的VL CDR3的氨基酸序列显示于SEQ ID NOs:15,35,55,和75。

[0241] 鉴于这些抗体中的每一个都可以与 β -klotho结合并且抗原结合特异性主要由CDR1,2和3区提供,所以可以将VH CDR1,2和3序列以及VL CDR1,2和3序列“混合和匹配”(即,来自不同抗体的CDR可被混合和匹配,尽管每个抗体优选含有VH CDR1,2和3以及VL CDR1,2和3以产生本发明的其他 β -klotho结合分子。此类“混合和匹配的” β -klotho结合抗体可以使用本领域已知的结合测定法和实施例中描述的那些(例如,ELISA,SET, **Biacore®**结合测定法)来测试。当VH CDR序列混合并匹配时,来自特定VH序列的CDR1,CDR2和/或CDR3序列应该用结构上相似的CDR序列替换。同样,当VL CDR序列混合并匹配时,来自特定VL序列的CDR1,CDR2和/或CDR3序列应该用结构上相似的CDR序列替换。普通技术

人员容易明白,通过用来自本文所示的CDR序列的结构相似的序列取代一个或多个VH和/或VL CDR区序列可以为本发明的单克隆抗体产生新的VH和VL序列。除上述外,在一个实施方案中,本文所述抗体的抗原结合片段可包含VH CDR1,2和3或VL CDR1,2和3,其中所述片段结合 β -klotho作为单个可变结构域。

[0242] 在本发明的某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以具有表1中所述的Fab的重链和轻链序列。更具体地,抗体或其抗原结合片段可以具有Fab NOV001,NOV002,NOV003,NOV004的重链和轻链序列。

[0243] 在本发明的某些实施方案中,特异性结合 β -klotho的抗体或抗原结合片段包含Fab NOV001,NOV002,NOV003或NOV004的重链可变区CDR1,CDR2和CDR3,以及Fab NOV001,NOV002,NOV003,或NOV004的轻链可变区CDR1,CDR2,和CDR3,例如,如表1所示。

[0244] 在本发明的其它实施方案中,特异性结合 β -klotho的抗体或抗原结合片段包含如由Kabat定义并在表1中描述的重链可变区CDR1,重链可变区CDR2,重链可变区CDR3,轻链可变区CDR1,轻链可变区CDR2和轻链可变区CDR3。在本发明的其他实施方案中,特异性结合 β -klotho的抗体或抗原结合片段包含如Chothia所定义并且在表1中所述的重链可变区CDR1,重链可变区CDR2,重链可变区CDR3,轻链可变区CDR1,轻链可变区CDR2和轻链可变区CDR3。在其他本发明的实施方案中,特异性结合 β -klotho的抗体或抗原结合片段包含如由组合的Kabat和Chothia所定义并且在表1中所述的重链可变区CDR1,重链可变区CDR2,重链可变区CDR3,轻链可变区CDR1,轻链可变区CDR2和轻链可变区CDR3。在本发明的其他实施方案中,特异性结合 β -klotho的抗体或抗原结合片段包含如IMGT所定义并且在表1中所述的重链可变区CDR1,重链可变区CDR2,重链可变区CDR3,轻链可变区CDR1,轻链可变区CDR2和轻链可变区CDR3。

[0245] 在具体的实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:3的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:4的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:5的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:13的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:14的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:15的轻链可变区CDR3。

[0246] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:23的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:24的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:25的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:33的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:34的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:35的轻链可变区CDR3。

[0247] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:43的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:44的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:45的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:53的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:54的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:55的轻链可变区CDR3。

[0248] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:63的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:64的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:65的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:73的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:74的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:75的轻链可变区CDR3。

[0249] 在具体的实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:6的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:7的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:8的重链可变区CDR3;

SEQ ID NO:16的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:17的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:18的轻链可变区CDR3。

[0250] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:26的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:27的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:28的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:36的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:37的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:38的轻链可变区CDR3。

[0251] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:46的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:47的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:48的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:56的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:57的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:58的轻链可变区CDR3。

[0252] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:66的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:67的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:68的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:76的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:77的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:78的轻链可变区CDR3。

[0253] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:263的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:4的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:5的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:13的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:14的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:15的轻链可变区CDR3。

[0254] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:268的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:24的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:25的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:33的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:34的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:35的轻链可变区CDR3。

[0255] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:263的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:44的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:45的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:53的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:54的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:55的轻链可变区CDR3。

[0256] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:268的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:64的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:25的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:73的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:74的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:75的轻链可变区CDR3。

[0257] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:264的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:265的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:266的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:267的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:17的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:15的轻链可变区CDR3。

[0258] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:269的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:270的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:271的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:272的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:273的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:35的轻链可变区CDR3。

[0259] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:

264的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:265的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:266的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:267的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:57的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:55的轻链可变区CDR3。

[0260] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合 β -klotho的抗体,其包含SEQ ID NO:269的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:270的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:271的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:272的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:273的轻链可变区CDR2;和SEQ ID NO:75的轻链可变区CDR3。

[0261] 在某些实施方案中,本发明包括如表1所述特异性结合 β -klotho的抗体或抗原结合片段。在优选的实施方案中,结合 β -klotho并激活FGF21受体复合体的抗体或抗原结合片段是Fab NOV001,NOV002,NOV003,NOV004。

[0262] 如本文所用的,如果从使用人种系免疫球蛋白基因的系统获得抗体的可变区或全长链,则人抗体包含重链或轻链可变区或全长重链或轻链,其是特定种系序列的“产物”或“源自”特定种系序列。这样的系统包括用目的抗原免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠或用目的抗原筛选在噬菌体上展示的人免疫球蛋白基因文库。作为人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“源自”人种系免疫球蛋白序列的人抗体可通过比较人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列并选择与人抗体序列最接近的序列的人种系免疫球蛋白序列(即最大%同一性)来鉴定。

[0263] 与种系序列相比,作为人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“源自”人种系免疫球蛋白序列的人抗体可能含有氨基酸差异,这是由于例如天然存在的体细胞突变或有意引入位点定向突变。然而,在VH或VL构架区中,选择的人抗体通常在氨基酸序列上与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列有至少90%同一性,并且当与其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(例如,鼠种系序列)比较时,含有将人抗体鉴定为人的氨基酸残基。在某些情况下,人抗体在氨基酸序列中与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列有至少60%,70%,80%,90%,或至少95%,或甚至至少96%,97%,98%或99%同一性。

[0264] 通常,重组人抗体将展示在VH或VL构架区中与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列不超过10个氨基酸差异。在某些情况下,人抗体可能展示与种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列不超过5个,或甚至不超过4,3,2或1个氨基酸差异。人种系免疫球蛋白基因的实例包括但不限于下文所述的可变结构域种系片段,以及DP47和DPK9。

[0265] 同源抗体

[0266] 在又一个实施方案中,本发明提供了包含与表1中所述的序列同源的氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段,并且抗体与 β -klotho蛋白(例如人和食蟹猴 β -klotho)结合,并保留了表1中所述的那些抗体的所需功能特性。

[0267] 例如,本发明提供了包含重链可变结构域和轻链可变结构域的分离的抗体或其功能性抗原结合片段,其中重链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:9,29,49或69的氨基酸序列至少80%,至少90%,95%,96%,97%,98%或至少99%同一性的氨基酸序列;轻链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:19,39,59或79的氨基酸序列至少80%,至少90%,95%,96%,97%,98%或至少99%同一性的氨基酸序列;并且该抗体特异性结合于 β -klotho(例如,人和食蟹猴 β -klotho)。在本发明的某些方面,重链和轻链序列还包含如Kabat所定义的HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3序列,例如分别是SEQ ID NO:3,4,5,13,14和15。

在本发明的某些其它方面,重链和轻链序列还包含如Chothia所定义的HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3序列,例如分别是SEQ ID N0:6,7,8,16,17和18。在本发明的某些其他方面,重链和轻链序列还包含如组合的Kabat和Chothia定义的HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3序列,例如分别是SEQ ID N0s:263,4,5,13,14和15。在本发明的某些其他方面,重链和轻链序列还包含如IMGT所定义的HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3序列,例如分别是SEQ ID N0s:264,265,266,267,17,和15。

[0268] 例如,本发明提供了包含重链可变结构域和轻链可变结构域的分离的抗体或其功能性抗原结合片段,其中重链可变结构域包含与SEQ ID N0:9的氨基酸序列至少80%,至少90%,95%,96%,97%,98%或至少99%同一性的氨基酸序列;轻链可变结构域包含与SEQ ID N0:19的氨基酸序列至少80%,至少90%,95%,96%,97%,98%或至少99%同一性的氨基酸序列;并且该抗体特异性结合于 β -klotho(例如,人和食蟹猴 β -klotho)。在本发明的某些方面,重链和轻链序列还包含如Kabat所定义的HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3序列,例如分别是SEQ ID N0:3,4,5,13,14和15。在本发明的某些其它方面,重链和轻链序列还包含如Chothia所定义的HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3序列,例如分别是SEQ ID N0:6,7,8,16,17和18。在本发明的某些其他方面,重链和轻链序列还包含如组合的Kabat和Chothia定义的HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3序列,例如分别是SEQ ID N0s:263,4,5,13,14和15。在本发明的某些其他方面,重链和轻链序列还包含如IMGT所定义的HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3序列,例如分别是SEQ ID N0s:264,265,266,267,17,和15。

[0269] 例如,本发明提供了包含重链可变结构域和轻链可变结构域的分离的抗体或其功能性抗原结合片段,其中重链可变结构域包含与SEQ ID N0:29的氨基酸序列至少80%,至少90%,95%,96%,97%,98%或至少99%同一性的氨基酸序列;轻链可变结构域包含与SEQ ID N0:39的氨基酸序列至少80%,至少90%,95%,96%,97%,98%或至少99%同一性的氨基酸序列;并且该抗体特异性结合于 β -klotho(例如,人和食蟹猴 β -klotho)。在本发明的某些方面,重链和轻链序列还包含如Kabat所定义的HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3序列,例如分别是SEQ ID N0s:23,24,25,33,34,和35。在本发明的某些其它方面,重链和轻链序列还包含如Chothia所定义的HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3序列,例如分别是SEQ ID N0s:26,27,28,36,37,和38。在本发明的某些其他方面,重链和轻链序列还包含如组合的Kabat和Chothia定义的HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3序列,例如分别是SEQ ID N0s:268,24,25,33,34,和35。在本发明的某些其他方面,重链和轻链序列还包含如IMGT所定义的HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3序列,例如分别是SEQ ID N0s:269,270,271,272,273,和35。

[0270] 例如,本发明提供了包含重链可变结构域和轻链可变结构域的分离的抗体或其功能性抗原结合片段,其中重链可变结构域包含与SEQ ID N0:49的氨基酸序列至少80%,至少90%,95%,96%,97%,98%或至少99%同一性的氨基酸序列;轻链可变结构域包含与SEQ ID N0:59的氨基酸序列至少80%,至少90%,95%,96%,97%,98%或至少99%同一性的氨基酸序列;并且该抗体特异性结合于 β -klotho(例如,人和食蟹猴 β -klotho)。在本发明的某些方面,重链和轻链序列还包含如Kabat所定义的HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3序列,例如分别是SEQ ID N0s:43,44,45,53,54,和55。在本发明的某些其它方面,重

链和轻链序列还包含如Chothia所定义的HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2和LCDR3序列, 例如分别是SEQ ID N0s:46, 47, 48, 56, 57, 和58。在本发明的某些其他方面, 重链和轻链序列还包含如组合的Kabat和Chothia定义的HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2和LCDR3序列, 例如分别是SEQ ID N0s:263, 44, 45, 53, 54, 和55。在本发明的某些其他方面, 重链和轻链序列还包含如IMGT所定义的HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2和LCDR3序列, 例如分别是SEQ ID N0s:264, 265, 266, 267, 57, 和55。

[0271] 例如, 本发明提供了包含重链可变结构域和轻链可变结构域的分离的抗体或其功能性抗原结合片段, 其中重链可变结构域包含与SEQ ID N0:69的氨基酸序列有至少80%, 至少90%, 95%, 96%, 97%, 98%或至少99%同一性的氨基酸序列; 轻链可变结构域包含与SEQ ID N0:79的氨基酸序列有至少80%, 至少90%, 95%, 96%, 97%, 98%或至少99%同一性的氨基酸序列; 并且该抗体特异性结合于 β -klotho(例如, 人和食蟹猴 β -klotho)。在本发明的某些方面, 重链和轻链序列还包含如Kabat所定义的HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2和LCDR3序列, 例如分别是SEQ ID N0s:63, 64, 65, 73, 74, 和75。在本发明的某些其它方面, 重链和轻链序列还包含如Chothia所定义的HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2和LCDR3序列, 例如分别是SEQ ID N0s:66, 67, 68, 76, 77, 和78。在本发明的某些其它方面, 重链和轻链序列还包含如组合的Kabat和Chothia定义的HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2和LCDR3序列, 例如分别是SEQ ID N0s:268, 64, 25, 73, 74, 和75。在本发明的某些其它方面, 重链和轻链序列还包含如IMGT所定义的HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2和LCDR3序列, 例如分别是SEQ ID N0s:269, 270, 271, 272, 273, 和75。

[0272] 在其他实施方案中, VH和/或VL氨基酸序列可以与表1所给出的序列具有50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%或99%同一性。在其他实施方案中, 除了在不超过1, 2, 3, 4或5个氨基酸位置的氨基酸取代之外, VH和/或VL氨基酸序列可以是相同的。具有与表1中所描述的那些的VH和VL区具有高(即, 80%或更大)同一性的VH和VL区的抗体可以通过诱变(例如位点定向或PCR介导的诱变)分别编码SEQ ID N0:10, 30, 50或70和SEQ ID N0:20, 40, 60或80的核酸分子, 然后使用本文所述的功能测定法测试编码的经改变的抗体的保留功能来获得。

[0273] 在其它实施方案中, 全长重链和/或全长轻链氨基酸序列可以与表1所给出的序列具有50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%或99%同一性。与SEQ ID N0s:9, 29, 49, 或69中任一个的全长重链和SEQ ID N0:19, 39, 59或79中任一个的全长轻链具有高(即, 80%或更大)同一性的全长重链和全长轻链的抗体可以通过对编码这些多肽的核酸分子进行诱变(例如位点定向诱变或PCR介导的诱变), 随后使用本文所述的功能测定法检测编码的改变的抗体的保留功能而获得。与SEQ ID N0s:11, 31, 51, 或71中任一个的全长重链和SEQ ID N0s:21, 41, 61, 或81中任一个的全长轻链具有高(即, 80%或更大)同一性的全长重链和全长轻链的抗体可以通过对编码这些多肽的核酸分子进行诱变(例如位点定向诱变或PCR介导的诱变), 随后使用本文所述的功能测定法检测编码的改变的抗体的保留功能而获得。

[0274] 在其它实施方案中, 全长重链和/或全长轻链核苷酸序列可以与表1给出的序列具有60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%或99%同一性。

[0275] 在其他实施方案中, 重链可变区和/或轻链可变区核苷酸序列可以与表1给出的序

列具有60%,70%,80%,90%,95%,96%,97%,98%或99%同一性。

[0276] 在一些实施方案中,重链和/或轻链CDR可以与表1给出的序列具有90%,95%,96%,97%,98%或99%同一性。

[0277] 如本文所用,两个序列之间的百分比同一性是由序列共享的相同位置的数目的函数(即,%同一性等于相同位置的数目/位置的总数×100),考虑到为了两个序列的最佳比对而需要引入的空位的数目,以及每个空位的长度。两个序列之间的序列比较和同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成,如下面的非限制性实施例所述。

[0278] 另外或备选地,本发明的蛋白质序列可以进一步用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索以例如鉴定相关序列。例如,这样的搜索可以使用Altschul, et al., 1990 J. Mol. Biol. 215: 403-10的BLAST程序(2.0版)进行。

[0279] 具有保守修饰的抗体

[0280] 在某些实施方案中,本发明的抗体具有包含CDR1,CDR2和CDR3序列的重链可变区和包含CDR1,CDR2和CDR3序列的轻链可变区,其中基于本文所述抗体,这些CDR序列中的一个或多个具有特定的氨基酸序列或其保守修饰,并且其中所述抗体保留本发明的 β -klotho-结合抗体的所需功能特性。

[0281] 因此,本发明提供了由包含CDR1,CDR2和CDR3序列的重链可变区和包含CDR1,CDR2和CDR3序列的轻链可变区组成的分离的抗体或其抗原结合片段,其中:重链可变区CDR1氨基酸序列选自由SEQ ID NO:3,23,43和63及其保守修饰组成的组;重链可变区CDR2氨基酸序列选自由SEQ ID NO:4,24,44和64及其保守修饰组成的组;重链可变区CDR3氨基酸序列选自由SEQ ID NO:5,25,45和65及其保守修饰组成的组;轻链可变区CDR1氨基酸序列选自由SEQ ID NO:13,33,53和73及其保守修饰组成的组;轻链可变区CDR2氨基酸序列选自由SEQ ID NO:14,34,54和74及其保守修饰组成的组;轻链可变区CDR3氨基酸序列选自由SEQ ID NO:15,35,55和75及其保守修饰组成的组;并且该抗体或其抗原结合片段特异性结合 β -klotho。

[0282] 因此,本发明提供了由包含CDR1,CDR2和CDR3序列的重链可变区和包含CDR1,CDR2和CDR3序列的轻链可变区组成的分离的抗体或其抗原结合片段,其中:重链可变区CDR1氨基酸序列选自由SEQ ID NOs:263和268及其保守修饰组成的组;重链可变区CDR2氨基酸序列选自由SEQ ID NO:4,24,44和64及其保守修饰组成的组;重链可变区CDR3氨基酸序列选自由SEQ ID NOs:5,25,和45及其保守修饰组成的组;轻链可变区CDR1氨基酸序列选自由SEQ ID NO:13,33,53和73及其保守修饰组成的组;轻链可变区CDR2氨基酸序列选自由SEQ ID NO:14,34,54和74及其保守修饰组成的组;轻链可变区CDR3氨基酸序列选自由SEQ ID NO:15,35,55和75及其保守修饰组成的组;并且该抗体或其抗原结合片段特异性结合 β -klotho。

[0283] 在其他实施方案中,本发明的抗体针对哺乳动物细胞中的表达进行了优化,具有全长重链序列和全长轻链序列,其中这些序列中的一个或多个具有基于本文所述抗体的特定氨基酸序列或其保守修饰,并且其中抗体保留本发明的 β -klotho结合抗体的所需功能特性。因此,本发明提供了经优化用于在哺乳动物细胞中表达的分离的抗体,其由全长重链和全长轻链组成,其中全长重链具有选自SEQ ID NO:11,31,51或71,及其保守修饰的氨基酸序列;并且全长轻链具有选自SEQ ID NO:21,41,61或81及其保守修饰的氨基酸序列;并且

该抗体特异性结合于 β -klotho(例如,人和食蟹猴 β -klotho)。

[0284] 结合相同表位的抗体

[0285] 本发明提供与表1中所述的 β -klotho结合抗体(例如,NOV001,NOV002,NOV003或NOV004)结合相同表位的抗体。在一个特定方面,此类抗体和抗原结合片段能够增加 β -klotho和FGFR1c的活性。因此,额外的抗体可基于它们在 β -klotho结合测定(例如实施例中描述的那些)中与本发明的其他抗体竞争(例如以统计学显著方式竞争性抑制结合)的能力来鉴定。测试抗体抑制本发明抗体与 β -klotho蛋白结合的能力表明,测试抗体可以与该抗体竞争结合 β -klotho;根据非限制性理论,这样的抗体可以与其竞争的抗体结合 β -klotho蛋白上的相同或相关(例如,结构上相似或空间上接近)的表位。在某个实施方案中,与本发明的抗体结合 β -klotho上相同表位的抗体是人单克隆抗体。这样的人单克隆抗体可以如本文所述制备和分离。如本文所用,在等摩尔浓度的竞争性抗体存在下,当竞争性抗体抑制本发明的抗体或抗原结合片段的 β -klotho结合超过50%(例如80%,85%,90%,95%,98%或99%)时,抗体“竞争”结合。在某个实施方案中,与本发明的抗体结合 β -klotho上相同表位的抗体是人源化单克隆抗体。这种人源化单克隆抗体可以如本文所述制备和分离。

[0286] 在一个特定的方面,本发明提供了与 β -klotho结合抗体NOV001结合相同表位的抗体。在一个具体的方面,本发明提供了与 β -klotho结合抗体NOV002结合相同表位的抗体。在一个特定的方面,本发明提供了与 β -klotho结合抗体NOV003结合相同表位的抗体。在一个特定的方面,本发明提供了与 β -klotho结合抗体NOV004结合相同表位的抗体。

[0287] 在一个具体的方面,本发明提供了与包含含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区(VH)和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链可变区(VL)的 β -klotho结合抗体结合相同表位的抗体。

[0288] 在一个具体的方面,本发明提供了与包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区(VH)和包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的轻链可变区(VL)的 β -klotho结合抗体结合相同表位的抗体。

[0289] 在一个具体的方面,本发明提供了与包含含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的轻链可变区(VL)的 β -klotho结合抗体结合相同表位的抗体。

[0290] 在一个具体的方面,本发明提供了与包含含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的轻链可变区(VL)的 β -klotho结合抗体结合相同表位的抗体。

[0291] 在具体的方面,本文提供了与 β -klotho的表位结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中该表位包含表2中所示的一个或多个SEQ ID NO。在一个具体的方面,这样的抗体和抗原结合片段能够增加 β -klotho和FGFR1c的活性。

[0292] 在一个特定的方面,本文提供了结合 β -klotho表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基246-265的一个或多个氨基酸。在一个特定的方面,本文提供了结合 β -klotho表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基536-550的一个或多个氨基酸。在一个特定的方面,本文提供了结合 β -klotho表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基834-857的一个或多个氨基酸。在一个特定

的方面,本文提供了结合 β -klotho的表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基959-986的一个或多个氨基酸。

[0293] 在一个特定的方面,本文提供了结合 β -klotho的表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基246-265,536-550,834-857和959-986的一个或多个氨基酸。在具体方面,本文提供了结合 β -klotho的表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基246-265,536-550,834-857和959-986的两个或更多个氨基酸。在具体方面,本文提供了结合 β -klotho表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基246-265,536-550,834-857和959-986的三个或更多个氨基酸。在具体的方面,本文提供了结合 β -klotho表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基246-265,536-550,834-857和959-986的氨基酸。

[0294] 在一个特定的方面,本文提供了结合 β -klotho的一个或多个表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基646-670中的一个或多个氨基酸。在一个特定的方面,本文提供了结合 β -klotho的一个或多个表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基696-700中的一个或多个氨基酸。在一个特定的方面,本文提供了结合 β -klotho的一个或多个表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基646-689中的一个或多个氨基酸。

[0295] 在一个特定的方面,本文提供了结合 β -klotho的一个或多个表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基646-670,696-700和646-689的一个,两个,三个或四个,或五个或更多个氨基酸。在某一方面,本文提供了结合 β -klotho的两个或更多个表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基646-670,696-700,和646-689中的一个或多个氨基酸。在一个具体的方面,本文提供了结合 β -klotho的三个或更多个表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基646-670,696-700,和646-689中的一个或多个氨基酸。在一个具体的方面,本文提供了结合 β -klotho的三个或更多个表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含 β -klotho序列(SEQ ID NO:262)的残基646-670,696-700,和646-689的氨基酸。

[0296] 在具体的方面,本文提供了结合 β -klotho表位的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述表位包含表2中所示的一个或多个SEQ ID NO,其中所述抗体和抗原结合片段能够增加 β -klotho和FGFR1c的活性,并且其中所述抗体和抗原结合片段能够通过氢-氘交换(HDx)来保护 β -klotho的一种或多种肽,如在氘掺入中范围为-0.5至-2.1的改变所表征,例如如表2中所示。

[0297] 在一个具体的方面,本文提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其如通过氢-氘交换(HDx)所确定的,保护了 β -klotho(SEQ ID NO:262)的以下肽的一种,两种,三种,四种,五种或更多种:245-266,246-265,343-349,344-349,421-429,488-498,509-524,536-550,568-576,646-669,646-670,696-700,773-804,834-857,和959-986aa。

[0298] 在一个具体的方面,本文提供了增加 β -klotho和FGFR1c活性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保护(如通过氢-氘交换(HDx)测定)来自表2

中列出的以下的一种,两种,三种,四种,五种或更多种肽:SEQ ID N0s:109,110,111,112,113,125,126,127,128,129,141,142,143,156,157,158,159,160,161,163,164,165,167,168,169,170,171,172,184,185,186,187,188,195,196,197,198,204,212,213,214,215,216,217,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,256,257,258,259,260,和261。

[0299] 在某些方面,本文提供了增加 β -klotho和FGFR1c活性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(如通过氢-氘交换(HDx)确定的)保护来自表2中列出的以下肽的六种,七种,八种,九种,十种或更多种肽:SEQ ID N0s:109,110,111,112,113,125,126,127,128,129,141,142,143,156,157,158,159,160,161,163,164,165,167,168,169,170,171,172,184,185,186,187,188,195,196,197,198,204,212,213,214,215,216,217,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,256,257,258,259,260,和261。

[0300] 在某些方面,本文提供了增加 β -klotho和FGFR1c的活性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不与人 β -klotho (SEQ ID N0:262) 的残基701 (Tyr) 或703 (Arg) 接触。

[0301] 工程化和修饰的抗体

[0302] 还可以使用具有本文所示的一个或多个VH和/或VL序列的抗体作为起始材料来制备本发明的抗体以改造经修饰的抗体,该修饰的抗体可以具有与起始抗体相比改变的性质。可通过修饰一个或两个可变区(即VH和/或VL)内,例如在一个或多个CDR区内和/或在一个或多个构架区内的一个或多个残基来工程化抗体。另外地或备选地,抗体可以通过修饰恒定区内的残基来工程化,例如以改变抗体的效应子功能。

[0303] 可以进行的一种类型的可变区工程化是CDR移植。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。由于这个原因,CDR内的氨基酸序列在各个抗体之间比在CDR之外的序列更加多样化。因为CDR序列负责多数抗体-抗原相互作用,所以可以通过构建表达载体来表达模拟特定天然存在的抗体的特性的重组抗体,所述表达载体包括移植到来自具有不同性质的不同抗体的构架序列上的来自特定天然存在的抗体的CDR序列(参见例如Riechmann, L. et al., 1998 *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 *Nature* 321:522-525; Queen, C. et al., 1989 *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 86: 10029-10033; Winter的美国专利号5,225,539以及Queen等人的美国专利号5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0304] 因此,本发明的另一个实施方案涉及分离的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,重链可变区包含具有选自表1中列出的HCDR1序列的氨基酸序列的CDR1序列;具有选自表1中列出的HCDR2序列的氨基酸序列的CDR2序列;具有选自表1中列出的HCDR3序列的氨基酸序列的CDR3序列;轻链可变区具有选自表1中列出的LCDR1序列的氨基酸序列的CDR1序列;具有选自表1列出的LCDR2序列的氨基酸序列的CDR2序列;和具有选自表1列出的LCDR3序列的氨基酸序列的CDR3序列。因此,这样的抗体含有单克隆抗体的VH和VL CDR序列,但是可以含有来自这些抗体的不同的构架序列。

[0305] 因此,本发明的另一个实施方案涉及分离的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,重链可变区包含具有选自SEQ ID N0s:3,23,43,和63的氨基酸序列的CDR1序列;具有选自SEQ ID N0:4,24,44和64的氨基酸序列的CDR2序列;具有选自SEQ ID N0:5,25,45和65的氨基酸序列的CDR3序列;轻链可变区包含具有选自SEQ ID N0:13,33,53

和73的氨基酸序列的CDR1序列;具有选自SEQ ID NO:14,34,54和74的氨基酸序列的CDR2序列;和由选自SEQ ID NO:15,35,55和75的氨基酸序列组成的CDR3序列。因此,这样的抗体含有单克隆抗体的VH和VL CDR序列,但可以含有来自这些抗体的不同构架序列。

[0306] 这样的构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公开的DNA数据库或出版的参考文献中获得。例如,人类重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在“VBase”人种系序列数据库(也可在万维网上在mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase获得)以及Kabat,E.A.,et al.,1991Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242;Tomlinson,I.M.,et al.,1992J.Mol.Biol.227:776-798;和Cox,J.P.L.et al.,1994Eur.J Immunol.24:827-836中找到;其中每一个的内容通过引用明确地并入本文。

[0307] 用于本发明抗体的构架序列的实例是与本发明所选抗体使用的构架序列结构相似的那些,例如本发明单克隆抗体使用的共有序列和/或构架序列。可以将VH CDR1,2和3序列以及VL CDR1,2和3序列移植到构架区上,所述构架区具有与构架序列所来源的种系免疫球蛋白基因中发现的序列相同的序列,或者CDR序列可以被移植到与种系序列相比含有一个或多个突变的构架区上。例如,已经发现,在某些情况下,突变构架区内的残基以维持或增强抗体的抗原结合能力是有益的(参见例如,Queen等的美国专利号5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。可用作构建本文所述的抗体和抗原结合片段的支架的构架包括但不限于VH1A,VH1B,VH3,Vk1,V12和V2k。另外的构架在本领域中是已知的,并且可以在例如万维网的vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?&MMN_position=1:1的vBase数据库中找到。

[0308] 因此,本发明的一个实施方案涉及分离的 β -klotho结合抗体或其抗原结合片段,其包含含有选自SEQ ID NOs:9,29,49,或69的氨基酸序列或在这样的序列的构架区中具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的重链可变区,并且还包含具有选自SEQ ID NOs:19,39,59,或79的氨基酸序列或在这样的序列的构架区中具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的轻链可变区。

[0309] 因此,本发明的一个实施方案涉及分离的 β -klotho结合抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列或在这样的序列的构架区中具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的重链可变区,并且还包含具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列或在这样的序列的构架区中具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的轻链可变区。

[0310] 在具体方面,本发明的一个实施方案涉及分离的 β -klotho结合抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列或在这样的序列的构架区中具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的重链可变区,并且还包含具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列或在这样的序列的构架区中具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的轻链可变区。

[0311] 在具体方面,本发明的一个实施方案涉及分离的 β -klotho结合抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列或在这样的序列的构架区中具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的重链可变区,并且还包含含有SEQ ID NO:59的氨基酸序列或在这样的序列的构架区中具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基

酸序列的轻链可变区。

[0312] 在具体方面,本发明的一个实施方案涉及分离的 β -klotho结合抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列或在这样的序列的构架区中具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的重链可变区,并且还包含含有SEQ ID NO:79的氨基酸序列或在这样的序列的构架区中具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的轻链可变区。

[0313] 另一类型的可变区修饰是突变VH和/或VL CDR1,CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基,从而改善目的抗体的一种或多种结合特性(例如亲和力),称为“亲和力成熟”。可以进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入突变,并且可以在如本文所述和在实施例中提供的体外或体内测定中评估对抗体结合的影响或感兴趣的其它功能性质。可以引入保守修饰(如上所述)。突变可以是氨基酸取代,添加或缺失。此外,CDR区内通常不超过1,2,3,4或5个残基被改变。

[0314] 已知某些氨基酸序列基序经历翻译后修饰(PTM),例如糖基化(即NxS/T,x为除P以外的任意基团),游离半胱氨酸的氧化,脱酰胺(例如NG)或异构化(例如DG)。如果存在于CDR区中,则通过定点诱变理想地去除那些基序以增加产物的均一性。

[0315] 本领域充分描述了亲和力成熟的方法。在许多展示系统中,噬菌体展示(Smith GP (1985) Science 228:1315-1317)和在真核细胞如酵母上的展示(Boder ET和Wittrup KD (1997) Nature Biotechnology 15:553-557)似乎是最通常应用的系统来选择抗体-抗原相互作用。这些展示系统的优点是它们适用于各种抗原,并且选择的严格性可以很容易地调整。在噬菌体展示中,可以展示scFv或Fab片段,并且在酵母中展示全长IgG。那些通常使用的方法允许从具有多于10E7的多样性的较大的文库中选择期望的抗体变体。多样性较小(例如10E3)的文库可通过微表达和ELISA筛选。

[0316] 可以通过例如易错PCR(Cadwell RC and Joyce GF (1994) Mutagenic PCR. PCR Methods Appl. 3:S136-S140)产生非靶向的或随机的抗体变体文库,并提供非常简单但有时受限的方法。另一种策略是抗体候选者的CDR指导的多样化。可以使用例如简并寡核苷酸(Thompson J et al. (1996) J.Mol.Biol.256:77-88)、三核苷酸诱变(TRIM)(Kayushin AL et al. (1996) Nucleic Acids Res.24:3748-3755)或本领域已知的任何其它方法特异性靶定一个或多个CDR中的一个或多个位置。

[0317] 相应地,在另一个实施方案中,本发明提供了分离的 β -klotho-结合抗体或其抗原结合片段,其由重链可变区和轻链可变区组成,所述重链可变区具有由选自SEQ ID NOs:3, 23, 43和63的氨基酸序列;或者与SEQ ID NO:3, 23, 43和63相比具有1, 2, 3, 4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列组成的VH CDR1区;具有选自SEQ ID NOs:4, 24, 44, 和64的氨基酸序列;或者与SEQ ID NOs:4, 24, 44, 和64相比具有1, 2, 3, 4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的VH CDR2区;具有选自SEQ ID NOs:5, 25, 45, 和65的氨基酸序列;或者与SEQ ID NOs:5, 25, 45, 和65相比具有1, 2, 3, 4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的VH CDR3区;所述轻链可变区具有由选自SEQ ID NOs:13, 33, 53, 和73的氨基酸序列;或者与SEQ ID NOs:13, 33, 53, 和73相比具有1, 2, 3, 4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列组成的VL CDR1区;具有选自SEQ ID NOs:14, 34, 54, 和74的氨基酸序列;或者与SEQ ID NOs:14, 34, 54, 和74相比具有1, 2, 3, 4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的VL

CDR2区；具有选自SEQ ID N0s:15,35,55,和75的氨基酸序列；或者与SEQ ID N0s:15,35,55,和75相比具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR3区。

[0318] 相应地,在另一个实施方案中,本发明提供了分离的 β -klotho-结合抗体或其抗原结合片段,其由重链可变区和轻链可变区组成,所述重链可变区具有由选自SEQ ID N0s:6,26,46,和66的氨基酸序列；或者与SEQ ID N0s:6,26,46,和66相比具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列组成的VH CDR1区；具有选自SEQ ID N0s:7,27,47,和67的氨基酸序列；或者与SEQ ID N0s:7,27,47,和67相比具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的VH CDR2区；具有选自SEQ ID N0s:8,28,48,和68的氨基酸序列；或者与SEQ ID N0s:8,28,48,和68相比具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的VH CDR3区；所述轻链可变区具有选自SEQ ID N0s:13,33,53,和73的氨基酸序列；或者与SEQ ID N0s:13,33,53,和73相比具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR1区；具有选自SEQ ID N0s:14,34,54,和74的氨基酸序列；或者与SEQ ID N0s:14,34,54,和74相比具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR2区；具有选自SEQ ID N0s:15,35,55,和75的氨基酸序列；或者与SEQ ID N0s:15,35,55,和75相比具有1,2,3,4或5个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR3区。

[0319] 将抗原结合结构域移植到备选构架或支架中

[0320] 可以使用多种抗体/免疫球蛋白构架或支架,只要所得的多肽包含至少一个特异性结合 β -klotho的结合区。这样的构架或支架包括5个主要独特型的人免疫球蛋白或其片段,并且包括其他动物物种的免疫球蛋白,优选具有人源化方面。在这方面,单个重链抗体如在骆驼中鉴定的抗体特别有意义。本领域技术人员不断发现和开发了新的构架,支架和片段。

[0321] 一方面,本发明涉及使用非免疫球蛋白支架产生基于非免疫球蛋白的抗体,本发明的CDR可以移植到非免疫球蛋白支架上。可以使用已知的或未来的非免疫球蛋白构架和支架,只要它们包含对靶标 β -klotho蛋白特异性的结合区即可。已知的非免疫球蛋白构架或支架包括但不限于纤连蛋白(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA),锚蛋白(Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland),结构域抗体((Domantis, Ltd., Cambridge, MA, 和 Ablynx nv, Zwijnaarde, Belgium),脂笼蛋白(Pieris Proteolab AG, Freising, Germany),小模块化免疫药物(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA),maxybodies(Avidia, Inc., Mountain View, CA),蛋白质A(Affibody AG, Sweden)和affilin(γ -晶体蛋白或泛素)(Scil Proteins GmbH, Halle, Germany)。

[0322] 纤连蛋白支架基于纤连蛋白III型结构域(例如纤连蛋白III型(10Fn3结构域)的第十个模块)。纤连蛋白III型结构域具有分布在两个 β 片层之间的7或8个 β 链,所述 β 片层本身互相包裹以形成蛋白质的核心,并且还包含使 β 链彼此连接并暴露在溶剂中的环(类似于CDR)。在 β 片层夹层的每个边缘处至少有三个这样的环,其中边缘是垂直于 β 链方向的蛋白质的边界(参见US 6,818,418)。这些基于纤连蛋白的支架不是免疫球蛋白,尽管整体折叠与最小的功能性抗体片段(即包含骆驼和美洲驼IgG中的整个抗原识别单位的重链的可变区)的整体折叠密切相关。由于该结构,非免疫球蛋白抗体模拟与抗体性质和亲和力相似的抗原结合特性。这些支架可以用于体外环随机化和改组策略,与体内抗体亲和力成熟过程相似。这些基于纤连蛋白的分子可以用作支架,其中分子的环区可以使用标准克隆技术用

本发明的CDR取代。

[0323] 锚蛋白技术基于使用具有锚蛋白衍生的重复模块的蛋白质作为携带可变区的支架,所述可变区可用于结合不同的靶。锚蛋白重复模块是由两个反平行 α -螺旋和 β -转角组成的33个氨基酸的多肽。主要通过使用核糖体展示来优化可变区的结合。

[0324] Avimers来源于含有天然A结构域的蛋白质,如LRP-1。这些结构域被天然用于蛋白质-蛋白质相互作用,并且在人中超过250种蛋白质在结构上基于A结构域。Avimers由通过氨基酸接头连接的许多不同的“A结构域”单体(2-10)组成。可以使用在例如美国专利申请公开号20040175756;20050053973;20050048512;和20060008844中描述的方法产生可以结合靶抗原的Avimers。

[0325] 亲和体(Affibody)亲和配体是基于蛋白A的IgG结合结构域之一的支架由三螺旋束组成的小型简单蛋白。蛋白A是来自细菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的表面蛋白。该支架结构域由58个氨基酸组成,其中13个被随机化以产生具有大量配体变体的亲和体文库(参见例如US5,831,012)。亲和体分子模拟抗体,与150kDa的抗体的分子量相比,它们具有6kDa的分子量。尽管其体积小,但亲和体分子的结合位点与抗体的相似。

[0326] Anticalins是由Pieris ProteoLab AG公司开发的产品。它们来源于脂笼蛋白(lipocalin),这是一种广泛的小而稳固的蛋白质,通常参与化学敏感或不溶性化合物的生理转运或储存。几种天然脂笼蛋白存在于人体组织或体液中。蛋白质结构让人联想到免疫球蛋白,在刚性构架顶部具有高变环。然而,与抗体或其重组片段相比,脂笼蛋白由160-180个氨基酸残基的单一多肽链组成,仅略高于单一免疫球蛋白结构域。组成结合口袋的四个环的组显示显著的结构可塑性并且容许多种侧链。结合位点因此可以在专有的过程中重塑,以便以高亲和力和特异性识别不同形状的规定的靶分子。一种脂笼蛋白家族的蛋白质——Pieris Brassicae的后胆色素结合蛋白(BBP)已经被用于通过诱变四个环的组来开发anticalin。描述anticalins的专利申请的一个例子是PCT公开号WO 199916873。

[0327] Affilin分子是小的非免疫球蛋白,其被设计用于对蛋白质和小分子的特异性亲和力。可以从两个文库中快速选择新的affilin分子,每个文库都基于不同的人源支架蛋白。Affilin分子不显示与免疫球蛋白蛋白质的任何结构同源性。目前,使用两种affilin支架,其中一种是 γ 晶体的,一种人结构眼晶状体蛋白,另一种是“泛素”超家族蛋白。两种人支架都非常小,表现出高温稳定性,并且几乎抵抗pH变化和变性剂。这种高稳定性主要是由于蛋白质的扩展的 β 片层结构。WO200104144中描述了 γ 晶体衍生的蛋白质的实例,WO2004106368中描述了“泛素样”蛋白质的实例。

[0328] 蛋白质表位模拟物(PEM)是模拟蛋白质的 β -发夹二级结构(涉及蛋白质-蛋白质相互作用的主要二级结构)的中等大小的环状肽样分子(MW1-2kDa)。

[0329] 本发明提供了与 β -klotho蛋白特异性结合的完全人抗体。与嵌合或人源化抗体相比,本发明的人 β -klotho结合抗体当施用于人受试者时具有进一步降低的抗原性。

[0330] 骆驼抗体

[0331] 从骆驼和单峰骆驼(*Camelus bactrianus*和*Camelus dromaderius*)家族(包括新世界成员,例如美洲驼物种(*Lama paccos*,*Lama glama*和*Lama vicugna*))获得的抗体蛋白已经就尺寸,结构复杂性和对人类受试者的抗原性进行了表征。自然界中发现的来自该哺乳动物家族的某些IgG抗体缺少轻链,因此在结构上与来自其他动物的抗体的典型的具有

两条重链和两条轻链的四链四级结构不同。参见PCT/EP93/02214(1994年3月3日公开的W094/04678)。

[0332] 可以通过基因工程获得被鉴定为VHH的小的单一可变结构域的骆驼抗体的区域,以产生对靶标具有高亲和力的小蛋白,从而导致被称为“骆驼纳米抗体”的低分子量抗体衍生蛋白。参见1998年6月2日公布的美国专利号5,759,808;也参见Stijlemans,B.et al.,2004J Biol Chem 279:1256-1261;Dumoulin,M.et al.,2003Nature 424:783-788;Pleschberger,M.et al.2003Bioconjugate Chem 14:440-448;Cortez-Retamozo,V.et al.2002Int J Cancer 89:456-62;和Lauwereys,M.et al.1998EMBO J 17:3512-3520。骆驼抗体和抗体片段的工程化文库可从例如Ablynx,Ghent,Belgium商购获得。与非人来源的其他抗体一样,骆驼抗体的氨基酸序列可以被重组改变以获得更接近人序列的序列,即纳米抗体可以被“人源化”。因此,骆驼抗体对人类的天然低抗原性可以进一步降低。

[0333] 骆驼纳米抗体的分子量约为人IgG分子的十分之一,蛋白质的物理直径只有几纳米。小尺寸的一个结果是骆驼纳米抗体结合抗原性位点的能力,所述抗原性位点对于较大的抗体蛋白质在功能上是不可见的,即,骆驼纳米抗体可用作试剂检测否则使用经典免疫学技术是隐蔽的抗原,并且作为可能的治疗剂。因此,小尺寸的又一个结果是骆驼纳米抗体由于与靶蛋白的凹槽或狭窄裂缝中的特定位点结合而可以抑制,因此可以比经典抗体更加类似于经典的低分子量药物的功能。

[0334] 低分子量和紧凑的尺寸进一步导致骆驼纳米抗体非常热稳定,对极端pH和蛋白水解消化稳定,和弱抗原性。另一个结果是骆驼纳米抗体很容易从循环系统移动到组织中,甚至穿过血脑屏障,并可以治疗影响神经组织的病症。纳米抗体可以进一步促进穿过血脑屏障的药物转运。参见2004年8月19日公布的美国专利申请20040161738。这些特征与对人类的低抗原性相结合表明了巨大的治疗潜力。而且,这些分子可以在大肠杆菌等原核细胞中完全表达,并作为与噬菌体的融合蛋白表达,并具有功能。

[0335] 因此,本发明的特征是对 β -klotho具有高亲和力的骆驼抗体或纳米抗体。在本文的某些实施方案中,骆驼抗体或纳米抗体是在骆驼科动物中天然产生的,即,使用本文对其他抗体描述的技术,在用 β -klotho或其肽片段免疫后通过骆驼产生。或者,工程改造 β -klotho结合骆驼纳米抗体,即使用淘选程序,如本文实施例中所述使用 β -klotho作为靶标,通过例如从展示适当诱变的骆驼纳米抗体蛋白质的噬菌体文库中选择产生。工程化纳米抗体可进一步通过基因工程来定制,以在受体受试者中具有45分钟至2周的半衰期。在一个具体的实施方案中,骆驼抗体或纳米抗体是通过将本发明的人抗体的重链或轻链的CDR序列移植到纳米抗体或单结构域抗体构架序列中而获得的,如例如PCT/EP93/02214中所述。

[0336] 双特异性分子和多价抗体

[0337] 另一方面,本发明的特征在于包含本发明的结合 β -klotho的抗体或其片段的双特异性或多特异性分子。可将本发明的抗体或其抗原结合区衍生或连接至另一功能分子,例如另一种肽或蛋白质(例如另一抗体或受体的配体)以产生双特异性分子,所述双特异性分子至少结合两个不同的结合位点或靶分子。事实上,本发明的抗体可以被衍生或连接至多于一个的其他功能性分子以产生结合两个以上不同结合位点和/或靶分子的多特异性分子;这样的多特异性分子也意在包括在本文中使用的术语“双特异性分子”中。为了产生本发明的双特异性分子,本发明的抗体可以功能性连接(例如通过化学偶联,遗传融合,非共

价结合或其它方式)到一种或多种其他结合分子,如另一种抗体,抗体片段,肽或结合模拟物,从而产生双特异性分子。

[0338] 因此,本发明包括双特异性分子,所述双特异性分子包含针对 β -klotho的至少一种第一结合特异性和针对第二靶表位的第二结合特异性。例如,第二个靶表位是不同于第一个靶表位的 β -klotho的另一个表位。

[0339] 另外,对于其中双特异性分子是多特异性的本发明,除了第一和第二靶表位以外,该分子还可以包括第三结合特异性。

[0340] 在一个实施方案中,本发明的双特异性分子包含作为结合特异性的至少一种抗体或其抗体片段,包括例如Fab,Fab',F(ab')2,Fv,或单链Fv。该抗体也可以是轻链或重链二聚体,或其任何最小片段,如Ladner等人美国专利号4,946,778所述的Fv或单链构建体。

[0341] 双抗体是二价双特异性分子,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,通过接头连接,所述接头太短而不能在相同链上的两个结构域之间配对。VH和VL结构域与另一条链的互补结构域配对,由此产生两个抗原结合位点(参见例如Holliger et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al., 1994 Structure 2:1121-1123)。可以通过在同一细胞内用结构VHA-VLB和VHB-VLA(VH-VL构型)或VLA-VHB和VLB-VHA(VL-VH构型)表达两条多肽链来产生双抗体。它们中的大多数可以在细菌中以可溶形式表达。通过将两条形成双抗体的多肽链与大约15个氨基酸残基的接头连接来产生单链双抗体(scDb)(参见Holliger and Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45 (3-4):128-30; Wu et al., 1996 Immunotechnology, 2 (1):21-36)。scDb可以以可溶性,活性单体形式在细菌中表达(参见Holliger and Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45 (34):128-30; Wu et al., 1996 Immunotechnology, 2 (1):21-36; Pluckthun and Pack, 1997 Immunotechnology, 3 (2):83-105; Ridgway et al., 1996 Protein Eng., 9 (7):617-21)。双抗体可以与Fc融合以产生“双-双抗体”(参见Lu et al., 2004 J. Biol. Chem., 279 (4):2856-65)。

[0342] 可以在本发明的双特异性分子中使用的其他抗体是鼠类,嵌合和人源化单克隆抗体。

[0343] 双特异性分子可以通过使用本领域已知的方法缀合组分结合特异性来制备。例如,双特异性分子的每种结合特异性可以分开产生,然后彼此缀合。当结合特异性是蛋白质或肽时,可以使用各种偶联剂或交联剂进行共价缀合。交联剂的实例包括蛋白A,碳二亚胺,N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA),5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB),邻苯二马来酰亚胺(oPDM),N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和碘基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环烷烃-1-羧酸酯(碘基-SMCC)(参见例如Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括在Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al., 1985 Science 229:81-83, 和Glennie et al., 1987 J. Immunol. 139:2367-2375)中描述的那些方法。缀合剂是SATA和sulfo-SMCC,都可从Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) 获得。

[0344] 当结合特异性是抗体时,它们可以通过两条重链的C端铰链区的巯基键合而缀合。在一个具体的实施方案中,铰链区被修饰以在缀合之前包含奇数个巯基残基,例如一个巯基残基。

[0345] 备选地,两种结合特异性可以在相同的载体中编码并在相同的宿主细胞中表达和组装。当双特异性分子是mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')2或配体x Fab融合蛋白时,该方法是特别有用的。本发明的双特异性分子可以是包含一个单链抗体和结合决定簇的单链分子,或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可以包含至少两个单链分子。制备双特异性分子的方法描述于例如美国专利号5,260,203;美国专利号5,455,030;美国专利号4,881,175;美国专利号5,132,405;美国专利号5,091,513;美国专利号5,476,786;美国专利号5,013,653;美国专利号5,258,498;和美国专利号5,482,858。

[0346] 双特异性分子与其特异性靶标的结合可通过例如酶联免疫吸附测定(ELISA),放射免疫测定(REA),FACS分析,生物测定(例如,生长抑制)或Western印迹测定法证实。这些测定法中的每一个通常通过使用对感兴趣的复合体特异的标记试剂(例如抗体)来检测特别感兴趣的蛋白质-抗体复合体的存在。

[0347] 另一方面,本发明提供了多价化合物,其包含结合 β -klotho的本发明抗体的至少两个相同或不同的抗原结合部分。抗原结合部分可以通过蛋白质融合或共价或非共价键连接在一起。或者,已经描述了双特异性分子的连接方法。四价化合物可以例如通过将本发明抗体的抗体与结合本发明抗体的恒定区(例如Fc或铰链区)的抗体交联而获得。

[0348] 例如在Borean专利EP 1 012 280B1中描述了三聚结构域。五聚组件描述在例如PCT/EP97/05897中。

[0349] 具有延长半衰期的抗体

[0350] 本发明提供特异性结合具有延长的体内半衰期的 β -klotho蛋白的抗体。

[0351] 许多因素可能影响蛋白质在体内的半衰期。例如,肾脏过滤,肝脏代谢,蛋白水解酶(蛋白酶)降解和免疫原性反应(例如抗体的蛋白质中和和巨噬细胞和树突细胞摄取)。可以使用多种策略来延长本发明抗体的半衰期。例如,通过与聚乙二醇(PEG),reCODE PEG,抗体支架,聚唾液酸(PSA),羟乙基淀粉(HES),白蛋白结合配体和碳水化合物屏障的化学连接;通过与结合血清蛋白如白蛋白,IgG,FcRn,转铁蛋白的蛋白质的遗传融合;通过(基因或化学)偶联结合血清蛋白的其他结合部分(如纳米抗体,Fab,DARPin,avimer,affibodies和anticalin);通过与rPEG,白蛋白,白蛋白结构域,白蛋白结合蛋白和Fc的遗传融合;或通过掺入纳米载体,缓释制剂或医疗装置。

[0352] 为延长体内抗体的血清循环,惰性聚合物分子如高分子量PEG可通过PEG与抗体的N或C末端的位点特异性缀合或通过存在于赖氨酸残基上的 ϵ -氨基而连接到具有或不具有多功能接头的抗体或其片段上。为了使抗体聚乙二醇化,抗体或其片段通常在一个或多个PEG基团变得连接到抗体或抗体片段的条件下与聚乙二醇(PEG)(例如PEG的反应性酯或醛衍生物)反应。聚乙二醇化可以通过酰化反应或与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的烷基化反应来进行。如本文所用,术语“聚乙二醇”旨在包括已经用于衍生其他蛋白质的任何形式的PEG,例如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中,待聚乙二醇化的抗体是非糖基化抗体。将使用导致生物学活性损失最小的线性或分支聚合物衍生化。可通过SDS-PAGE和质谱密切监测缀合的程度以确保PEG分子与抗体的正确缀合。未反应的PEG可通过大小排阻或通过离子交换层析与抗体-PEG缀合物分离。可以使用本领域技术人员熟知的方法(例如通过本文所述的免疫测定法)测试PEG衍生的抗体的结合活性以及体内功效。聚乙二醇化蛋白质的方法是本领域已知的,并且

可以应用于本发明的抗体。参见例如Nishimura等人的EP 0 154316和Ishikawa等人的EP 0 401 384。

[0353] 其他修饰的聚乙二醇化技术包括重构化学正交定向工程技术 (ReCODE PEG) , 其通过包含tRNA合成酶和tRNA的重构系统将化学特定的侧链掺入到生物合成蛋白质中。该技术能够将30多种新氨基酸掺入大肠杆菌, 酵母和哺乳动物细胞中的生物合成蛋白中。tRNA在琥珀密码子定位的任何位置掺入非天然氨基酸, 将琥珀密码子从终止密码子转化为信令掺入化学特定氨基酸的密码子。

[0354] 重组聚乙二醇化技术 (rPEG) 也可用于血清半衰期延长。该技术涉及将300-600个氨基酸的非结构化蛋白质尾部遗传融合至现有的药物蛋白质。由于这种非结构化蛋白质链的表观分子量比其实际分子量大约15倍, 蛋白质的血清半衰期大大增加。与需要化学缀合和再纯化的传统聚乙二醇化相比, 制造过程大大简化, 并且产物均匀。

[0355] 聚唾液酸化是另一项技术, 它使用天然聚合物聚唾液酸 (PSA) 延长活性寿命, 提高治疗性肽和蛋白质的稳定性。PSA是唾液酸 (糖) 的聚合物。当用于蛋白质和治疗性肽药物递送时, 聚唾液酸为缀合提供了保护性微环境。这增加了循环中治疗性蛋白质的活性寿命并防止其被免疫系统识别。PSA聚合物天然存在于人体内。它被某些细菌所采用, 经过数百万年的进化, 它们的细胞壁被PSA聚合物包被。这些天然聚唾液酸化的细菌因此能够凭借分子模仿来避开身体的防御系统。PSA是大自然的终极隐身技术, 可以很容易地从这些细菌中大量生产, 并具有预定的物理特性。即使与蛋白质偶联, 细菌PSA也是完全非免疫原性的, 因为它与人体内的PSA化学性质相同。

[0356] 另一种技术包括使用与抗体连接的羟乙基淀粉 (“HES”) 衍生物。HES是由蜡质玉米淀粉衍生而来的改性天然聚合物, 可以被身体的酶代谢。HES溶液通常被施用以替代血容量不足, 并改善血液的流变性质。抗体的HES化通过增加分子的稳定性以及通过减少肾脏清除来延长循环半衰期, 导致生物活性的增加。通过改变不同的参数, 例如HES的分子量, 可以定制各种各样的HES抗体缀合物。

[0357] 通过在IgG恒定结构域或其FcRn结合片段 (优选Fc或铰链Fc结构域片段) 引入一个或多个氨基酸修饰 (即, 取代, 插入或缺失), 也可以产生具有增加的体内半衰期的抗体。参见例如国际公开号WO 98/23289; 国际公开号WO 97/34631; 和美国专利号6,277,375。

[0358] 此外, 可将抗体与白蛋白 (例如人血清白蛋白; HSA) 缀合以使抗体或抗体片段在体内更稳定或具有更长的体内半衰期。该技术在本领域是公知的, 参见例如国际公开号WO 93/15199, WO 93/15200和WO 01/77137; 和欧洲专利EP 413,622。此外, 在如上所述的双特异性抗体的背景下, 可以设计抗体的特异性, 使得抗体的一个结合结构域结合FGF21, 而抗体的第二结合结构域结合血清白蛋白, 优选HSA。

[0359] 增加半衰期的策略在纳米抗体, 基于纤连蛋白的结合物和其他期望体内半衰期增加的抗体或蛋白质中特别有用。

[0360] 抗体缀合物

[0361] 本发明提供了特异性结合 β -klotho蛋白的抗体或其片段, 所示抗体或其片段与异源蛋白或多肽 (或其片段, 优选多肽的至少10, 至少20, 至少30, 至少40, 至少50, 至少60, 至少70, 至少80, 至少90或至少100个氨基酸) 重组融合或化学缀合 (包括共价和非共价缀合) 以产生融合蛋白。具体而言, 本发明提供了包含本文所述抗体的抗原结合片段 (例如Fab片

段, Fd片段, Fv片段, F(ab)2片段, VH结构域, VH CDR, VL结构域或 VL CDR) 和异源蛋白质, 多肽或肽的融合蛋白。将蛋白质, 多肽或肽融合或缀合至抗体或抗体片段的方法是本领域已知的。参见例如美国专利号5,336,603,5,622,929,5,359,046,5,349,053,5,447,851, 和5,112,946; 欧洲专利号EP 307,434和EP 367,166; 国际公开号WO 96/04388和WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; 和Vil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11337-11341。

[0362] 另外的融合蛋白可以通过基因改组, 基序改组, 外显子改组, 和/或密码子改组的技术(统称为“DNA改组”)产生。可以使用DNA改组来改变本发明抗体或其片段的活性(例如, 具有更高亲和力和更低解离速率的抗体或其片段)。通常参见美国专利号5,605,793,5,811,238,5,830,721,5,834,252, 和5,837,458; Patten et al., 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16 (2) :76-82; Hansson, et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; 和Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24 (2) : 308-313(这些专利和出版物中的每一个都通过引用整体并入本文)。在重组之前通过易错PCR, 随机核苷酸插入或其他方法进行随机诱变, 可以改变抗体或其片段或编码的抗体或其片段。编码特异性结合 β -klotho蛋白的抗体或其片段的多核苷酸可以与一种或多种异源分子的一种或多种组分, 基序, 碎片, 部分, 结构域, 片段等重组。

[0363] 此外, 抗体或其片段可以与标记序列例如肽融合以促进纯化。在优选的实施方案中, 标记氨基酸序列是六组氨基酸肽 (SEQ ID NO:274), 例如在pQE载体 (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) 中提供的标记, 等等, 其中许多是市售的。如 Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824所述, 例如, 六组氨酸 (SEQ ID NO:274) 提供了融合蛋白的方便纯化。用于纯化的其它肽标记包括但不限于对应于流感血凝素蛋白 (Wilson et al., 1984, Cell 37:767) 的表位的血凝素(“HA”)标记, 和“旗”标记。

[0364] 在其他实施方案中, 本发明的抗体或其片段与诊断剂或可检测剂缀合。这样的抗体可用于监测或预测疾病或病症的发作, 发展, 进展和/或严重性, 作为临床测试程序的一部分, 例如确定特定疗法的功效。这种诊断和检测可以通过将抗体偶联至可检测物质来完成, 所述可检测物质包括但不限于各种酶, 例如但不限于辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶; 辅基, 例如但不限于链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素; 萤光材料, 例如但不限于伞形酮, 荧光素, 异硫氰酸荧光素, 罗丹明, 二氯三嗪基胺荧光素, 丹磺酰氯或藻红蛋白; 发光材料, 例如但不限于鲁米诺; 生物发光材料, 例如但不限于萤光素酶, 萤光素和水母发光蛋白; 放射性材料, 例如但不限于碘 (131I, 125I, 123I 和 121I), 碳 (14C), 硫 (35S), 氚 (3H), 钨 (115In, 113In, 112In 和 111In), 钿 (99Tc), 钇 (201Tl), 镥 (68Ga, 67Ga), 钷 (103Pd), 钼 (99Mo), 氙 (133Xe), 氟 (18F), 153Sm, 177Lu, 159Gd, 149Pm, 140La, 175Yb, 166Ho, 90Y, 47Sc, 186Re, 188Re, 142Pr, 105Rh, 97Ru, 68Ge, 57Co, 65Zn, 85Sr, 32P, 153Gd, 169Yb, 51Cr, 54Mn, 75Se, 113Sn, 和 117Tin; 以及使用各种正电子发射断层摄影术的正电子发射金属以及非放射性顺磁性金属离子。

[0365] 本发明还包括与治疗部分缀合的抗体或其片段的用途。抗体或其片段可以与治疗性部分(例如细胞毒素, 例如细胞抑制剂或杀细胞剂, 治疗剂或放射性金属离子, 例如 α -发射体) 缀合。细胞毒素或细胞毒剂包括对细胞有害的任何试剂。

[0366] 此外,可将抗体或其片段缀合至修饰给定生物应答的治疗部分或药物部分。治疗性部分或药物部分不被解释为限于常规的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有所需生物学活性的蛋白质,肽或多肽。这样的蛋白质可以包括例如毒素如相思豆毒蛋白,蓖麻毒蛋白A,假单胞菌外毒素,霍乱毒素或白喉毒素;蛋白质诸如肿瘤坏死因子,α-干扰素,β-干扰素,神经生长因子,血小板衍生生长因子,组织纤溶酶原激活物,凋亡剂,抗血管生成剂;或者生物反应调节剂,例如淋巴因子。

[0367] 此外,可将抗体缀合至治疗部分,例如放射性金属离子,例如α-发射体(如²¹³Bi)或用于缀合放射性金属离子的大环螯合剂,包括但不限于¹³¹In,¹³¹Lu,¹³¹Y,¹³¹Ho,¹³¹Sm,多肽。在某些实施方案中,大环螯合剂是可通过接头分子连接到抗体的1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N",N"’-四乙酸(DOTA)。这样的接头分子在本领域中是公知的,并在Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4 (10): 2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10 (4): 553-7; 和Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26 (8): 943-50中描述,其各自通过引用整体并入。

[0368] 用于将治疗性部分缀合至抗体的技术是众所周知的,参见例如Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 和Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62: 119-58。

[0369] 也可以将抗体附着到固相载体上,这对于目标抗原的免疫测定或纯化是特别有用的。这种固相载体包括但不限于玻璃,纤维素,聚丙烯酰胺,尼龙,聚苯乙烯,聚氯乙烯或聚丙烯。

[0370] 生产本发明抗体的方法

[0371] 编码抗体的核酸

[0372] 本发明提供了基本上纯化的核酸分子,其编码包含上述β-klotho结合抗体链的区段或结构域的多肽。本发明的一些核酸包含编码SEQ ID NO:10,30,50或70所示的重链可变区的核苷酸序列和/或编码SEQ ID NO:20,40,60,或80所示的轻链可变区的核苷酸序列。在具体实施方案中,核酸分子是表1中鉴定的那些。本发明的一些其它核酸分子包含与表1中鉴定的那些核酸分子的核苷酸序列基本上相同(例如至少65%,80%,95%或99%)的核苷酸序列。当从适当的表达载体表达时,由这些多核苷酸编码的多肽能够表现出FGF21抗原结合能力。

[0373] 本发明还提供了编码上述β-klotho结合抗体的重链或轻链的至少一个CDR区和通常全部三个CDR区的多核苷酸。一些其他多核苷酸编码上文所述β-klotho结合抗体的重链

和/或轻链的全部或基本上全部的可变区序列。由于密码的简并性,各种核酸序列将编码每一个免疫球蛋白氨基酸序列。

[0374] 本发明的核酸分子可以编码抗体的可变区和恒定区。本发明的一些核酸序列包含编码重链序列的核苷酸,所述重链序列与SEQ ID NO:11,31,51或71中所示的重链序列基本上相同(例如,至少80%,90%或99%)。一些其他的核酸序列包含编码轻链序列的核苷酸,所述轻链序列与SEQ ID NO:21,41,61或81中列出的轻链序列基本上相同(例如,至少80%,90%或99%)。

[0375] 多核苷酸序列可以通过从头固相DNA合成或通过PCR诱变编码结合 β -klotho的抗体或其结合片段的现有序列(例如,如以下实施例中所述的序列)来产生。核酸的直接化学合成可以通过本领域已知的方法完成,例如Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90的磷酸三酯方法;Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109, 1979的磷酸二酯方法;Baucage et al., Tetra. Lett., 22:1859, 1981的二乙基亚磷酸酰胺法;和美国专利4,458,066的固相支持体方法。通过PCR向多核苷酸序列中引入突变可以按照例如PCR Technology:Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; 和Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991中所述进行。

[0376] 在本发明中还提供了用于产生上述 β -klotho结合抗体的表达载体和宿主细胞。可以使用各种表达载体来表达编码结合 β -klotho的抗体链或结合片段的多核苷酸。基于病毒的和非病毒的表达载体均可用于在哺乳动物宿主细胞中产生抗体。非病毒载体和系统包括质粒,附加型载体,通常具有用于表达蛋白质或RNA的表达盒和人类人造染色体(参见例如Harrington et al., Nat Genet 15:345, 1997)。例如,用于在哺乳动物(例如,人)细胞中表达FGF21-结合多核苷酸和多肽的非病毒载体包括pThioHis A, B&C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B&C, (Invitrogen, San Diego, CA), MPSV载体以及本领域已知用于表达其他蛋白质的许多其他载体。有用的病毒载体包括基于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒的载体,基于SV40、乳头瘤病毒、HBP EB病毒的载体,痘苗病毒载体和塞姆利基森林病毒(SFV)载体。参见Brent et al., supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; 和Rosenfeld et al., Cell 68:143, 1992。

[0377] 表达载体的选择取决于待表达载体的预期宿主细胞。通常,表达载体含有启动子和其他调控序列(例如增强子),所述启动子和其他调控序列与编码结合 β -klotho的抗体链或片段的多核苷酸有效连接。在一些实施方案中,除了在诱导条件下,使用诱导型启动子来防止插入序列的表达。诱导型启动子包括例如阿拉伯糖, lacZ, 金属硫蛋白启动子或热休克启动子。转化的生物体的培养物可以在非诱导条件下扩增,而不会使群体偏爱表达产物被宿主细胞更好地耐受的编码序列。除了启动子之外,对于有效表达 β -klotho结合抗体链或片段也可能需要或期望其他调节元件。这些元件通常包括ATG起始密码子和相邻的核糖体结合位点或其他序列。另外,通过在使用中包含适合于细胞系统的增强子可以增强表达效率(参见例如Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; 和Bittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987)。例如,SV40增强子或CMV增强子可用于增加哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0378] 表达载体还可以提供分泌信号序列位置,以与插入的FGF21-结合抗体序列编码的多肽形成融合蛋白。更经常地,插入的结合 β -klotho的抗体序列在包含在载体中之前与信号序列连接。用于接收编码结合 β -klotho抗体轻链和重链可变结构域的序列的载体有时也编码恒定区或其部分。这种载体允许将可变区与恒定区一起表达为融合蛋白,由此导致产生完整的抗体或其片段。通常,这样的恒定区是人类的。

[0379] 用于携带和表达 β -klotho结合抗体链的宿主细胞可以是原核的或真核的。大肠杆菌是可用于克隆和表达本发明的多核苷酸的一种原核宿主。其它适用的微生物宿主包括芽孢杆菌如枯草芽孢杆菌,以及其他肠杆菌科如沙门氏菌属,沙雷氏菌属和各种假单胞菌属物种。在这些原核宿主中,也可以制备表达载体,其通常含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如复制起点)。另外,将存在许多种众所周知的启动子,例如乳糖启动子系统,色氨酸(trp)启动子系统, β -内酰胺酶启动子系统或来自 λ 噬菌体的启动子系统。启动子任选地与操纵基因序列一起通常控制表达,并具有用于启动和完成转录和翻译的核糖体结合位点序列等。其他微生物,如酵母,也可用于表达本发明的FGF21-结合多肽。也可以使用与杆状病毒载体组合的昆虫细胞。

[0380] 在一些优选的实施方案中,使用哺乳动物宿主细胞来表达和产生本发明的 β -klotho结合多肽。例如,它们可以是表达内源性免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系(例如,如实施例中描述的1D6.C9骨髓瘤杂交瘤克隆)或携带外源表达载体的哺乳动物细胞系(例如,下文示例的SP2/0骨髓瘤细胞)。这些包括任何正常的必死或正常或不正常的永生动物或人类细胞。例如,已经开发了许多能够分泌完整免疫球蛋白的合适的宿主细胞系,包括CHO细胞系,各种Cos细胞系,HeLa细胞,骨髓瘤细胞系,转化的B细胞和杂交瘤。使用哺乳动物组织细胞培养物表达多肽通常在例如Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987中讨论。哺乳动物宿主细胞的表达载体可包括表达控制序列,例如复制起点,启动子和增强子(参见例如Queen, et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986)和必需的加工信息位点,例如核糖体结合位点, RNA剪接位点,聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。这些表达载体通常含有来自哺乳动物基因或哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可以是组成型的,细胞类型特异性的,阶段特异性的和/或可调控的或可调节的。有用的启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子,组成型腺病毒主要晚期启动子,地塞米松诱导的MMTV启动子,SV40启动子,MRP polIII启动子,组成型MPSV启动子,四环素诱导的CMV启动子(例如人立即早期CMV启动子),组成型CMV启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

[0381] 引入含有感兴趣的多核苷酸序列的表达载体的方法根据细胞宿主的类型而变化。例如,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处理或电穿孔可用于其他细胞宿主。(一般参见Sambrook等,同上)。其他方法包括例如电穿孔,磷酸钙处理,脂质体介导的转化,注射和显微注射,弹道法,病毒体,免疫脂质体,聚阳离子:核酸缀合物,裸DNA,人造病毒体,与疱疹病毒结构蛋白VP22的融合(Elliott and O'Hare, Cell 88:223, 1997),DNA的活性剂增强的摄取和离体转导。对于重组蛋白的长期高产量生产来说,往往需要稳定的表达。例如,可以使用含有病毒复制起点或内源表达元件和选择标记基因的本发明的表达载体来制备稳定表达结合 β -klotho-的抗体链或结合片段的细胞系。载体导入后,可以允许细胞在富集培养基中生长1-2天后将它们转换到选择培养基。选择标记的目的是赋予对选择的抗性,并且其存在允许在选择培养基中成功表达引入序列的细胞的生长。使用适合于细胞类型的组织

培养技术,可以使抗性的稳定转染的细胞增殖。

[0382] 产生单克隆抗体

[0383] 单克隆抗体 (mAb) 可以通过多种技术产生,包括常规的单克隆抗体方法,例如 Kohler and Milstein, 1975 *Nature* 256:495 的标准体细胞杂交技术。可以使用许多生产单克隆抗体的技术,例如 B 淋巴细胞的病毒或致癌性转化。

[0384] 用于制备杂交瘤的动物系统包括小鼠,大鼠和兔系统。小鼠中杂交瘤的生产是一个完善的程序。分离用于融合的免疫脾细胞的免疫方案和技术是本领域已知的。融合伴侣(例如,鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的。

[0385] 基于如上所述制备的鼠单克隆抗体的序列可以制备本发明的嵌合或人源化抗体。编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA可以从感兴趣的鼠杂交瘤获得,并使用标准分子生物学技术工程改造以包含非鼠(例如,人)免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠可变区连接至人恒定区(参见例如 Cabilly 等的美国专利号 4,816,567)。为了产生人源化抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠 CDR 区插入人构架中。参见例如 Winter 的美国专利号 5225539 和 Queen 等人的美国专利号 5530101;5585089;5693762 和 6180370。

[0386] 在某个实施方案中,本发明的抗体是人单克隆抗体。这种针对 β -klotho 的人单克隆抗体可以使用携带部分人免疫系统而不是小鼠系统的转基因或转染色体小鼠产生。这些转基因和转染色体小鼠包括分别在本文中称为 HuMAb 小鼠和 KM 小鼠的小鼠,在本文中统称为“人 Ig 小鼠”。

[0387] HuMAb **mouse**[®] (Medarex, Inc.) 含有编码未重排的人重链 (μ 和 γ) 和 γ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微小基因座,以及使内源性 μ 和 β 链基因座失活的靶向突变(参见例如, Lonberg, et al., 1994 *Nature* 368 (6474): 856-859)。因此,小鼠表现出小鼠 IgM 或 K 的表达降低,并且响应于免疫,导入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变以产生高亲和力的人 IgGK 单克隆抗体((Lonberg, N. et al., 1994 *supra*; Lonberg, N., 1994 *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101 中综述; Lonberg, N. and Huszar, D., 1995 *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93, 和 Harding, F. and Lonberg, N., 1995 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546)。在 Taylor, L. et al., 1992 *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al., 1993 *International Immunology* 5:647-656; Tuailion et al., 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3720-3724; Choi et al., 1993 *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al., 1993 *EMBO J.* 12:821-830; Tuailion et al., 1994 *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. et al., 1994 *International Immunology* 5:579-591; 和 Fishwild, D. et al., 1996 *Nature Biotechnology* 14:845-851 中进一步描述了 HuMAb 小鼠的制备和使用以及由这些小鼠携带的基因组修饰,所有这些文献的全部内容特别通过引用整体并入。进一步参见 Lonberg 和 Kay 的美国专利号 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 和 5,770,429; ; Surani 等人的美国专利号 5,545,807; 均属于 Lonberg 和 Kay 的 PCT 公开号 WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 和 WO 99/45962; 和 Korman 等的 PCT 公开号 WO 01/14424。

[0388] 在另一个实施方案中,可以使用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的

小鼠(例如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠)来产生本发明的人抗体。这种在本文中称为“KM小鼠”的小鼠在Ishida等人的PCT公开W0 02/43478中详细描述。

[0389] 另外,表达人免疫球蛋白基因的备选转基因动物系统在本领域中是可用的,并且可以用于产生本发明的结合 β -klotho的抗体。例如,可以使用被称为Xenomouse (Abgenix, Inc.)的备选转基因系统。这样的小鼠描述于例如Kucherlapati等人的美国专利号5,939,598;6,075,181;6,114,598;6,150,584和6,162,963。

[0390] 此外,表达人免疫球蛋白基因的备选转染色体动物系统在本领域中是可用的,并且可以用于产生本发明的结合 β -klotho的抗体。例如,可以使用携带人重链转染色体和人轻链转染色体的小鼠,称为“TC小鼠”;这样的小鼠在Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727中描述。此外,本领域已经描述了携带人重链和轻链转染色体的奶牛(Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20:889-894),并且其可以用于产生本发明的FGF21-结合抗体。

[0391] 本发明的人单克隆抗体也可以使用用于筛选人免疫球蛋白基因文库的噬菌体展示方法来制备。本领域已经建立了或者在下面的实施例中描述了用于分离人抗体的这种噬菌体展示方法。参见例如:Ladner等人的美国专利号5,223,409;5,403,484;和5,571,698;Dower等人的美国专利号5,427,908和5,580,717;McCafferty等人的美国专利5,969,108和6,172,197;和Griffiths等人的美国专利号5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915和6,593,081。

[0392] 本发明的人单克隆抗体还可以使用已经重建了人免疫细胞的SCID小鼠来制备,从而可以在免疫后产生人抗体应答。这样的小鼠在例如Wilson等的美国专利号5,476,996和5,698,767中描述。

[0393] 构架或Fc工程化

[0394] 本发明的工程化的抗体包括其中已经对VH和/或VL内的构架残基进行了修饰以改善抗体的性质的那些抗体。通常进行这种构架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或多个构架残基“回复突变”成相应的种系序列。更具体地,经历体细胞突变的抗体可以含有不同于衍生抗体的种系序列的构架残基。这样的残基可以通过将抗体构架序列与衍生抗体的种系序列进行比较来鉴定。为了将构架区序列返回到其种系构型,可以通过例如定点诱变将体细胞突变“回复突变”为种系序列。这样的“回复突变的”抗体也意图被本发明所涵盖。

[0395] 另一种类型的构架修饰涉及突变构架区内或甚至一个或多个CDR区内的一一个或多个残基以去除T细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。这种方法也被称为“去免疫”,并且在Carr等人的美国专利公开号20030153043中有更详细的描述。

[0396] 除构架区或CDR区内进行的修饰之外或作为其备选,本发明的抗体可以工程化以包括Fc区内的修饰,典型地改变抗体的一种或多种功能性质,例如血清半衰期,补体固定,Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,本发明的抗体可以被化学修饰(例如,一个或多个化学部分可以连接到抗体上)或被修饰以改变其糖基化,再次改变抗体的一种或多种功能特性。下面将更详细地描述这些实施方案中的每一个。Fc区中残基的编号是Kabat的EU索引的编号。

[0397] 在一个实施方案中,CH1的铰链区被修饰,使得铰链区中半胱氨酸残基的数目被改

变,例如增加或减少。这种方法在Bodmer等人的美国专利号5,677,425中进一步描述。CH1的铰链区中半胱氨酸残基的数目被改变,例如,有利于轻链和重链的组装或增加或降低抗体的稳定性。

[0398] 在另一个实施方案中,抗体的Fc铰链区被突变以降低抗体的生物半衰期。更具体而言,将一个或多个氨基酸突变引入Fc-铰链片段的CH2-CH3结构域接口区,使得抗体相对于天然Fc铰链结构域SpA结合具有受损的葡萄球菌蛋白A (SpA) 结合。这种方法在Ward等人的美国专利号6,165,745中有更详细的描述。

[0399] 在另一个实施方案中,修饰抗体以增加其生物学半衰期。各种方法都是可能的。例如,可以引入一个或多个以下突变:T252L,T254S,T256F,如Ward的美国专利号6,277,375中所述。或者,为了增加生物学半衰期,可以在CH1或CL区域内改变抗体以包含取自IgG的Fc区的CH2结构域的两个环的补救受体结合表位,如Presta等人的美国专利号5,869,046和6,121,022中所述。

[0400] 在其他实施方案中,通过用不同的氨基酸残基替换至少一个氨基酸残基来改变Fc区,以改变抗体的效应子功能。例如,可以用不同的氨基酸残基替换一个或多个氨基酸,使得抗体对效应子配体具有改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力改变的效应子配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。这种方法在Winter等人的美国专利号5,624,821和5,648,260中有更详细的描述。

[0401] 在另一个实施方案中,选自氨基酸残基的一个或多个氨基酸可以用不同的氨基酸残基替换,使得抗体具有改变的C1q结合和/或减少或消除补体依赖性细胞毒性 (CDC)。这种方法在Idusogie等人的美国专利号6,194,551中有更详细的描述。

[0402] 在另一个实施方案中,改变一个或多个氨基酸残基,从而改变抗体固定补体的能力。这种方法在Bodmer等人的PCT公开W0 94/29351中进一步描述。

[0403] 在又一个实施方案中,通过修饰一个或多个氨基酸来修饰Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 和/或增加抗体对Fc γ 受体的亲和力的能力。这种方法在Presta的PCT公开W0 00/42072中进一步描述。此外,人IgG1上对Fc γ R1,Fc γ RII,Fc γ RIII和FcRn的结合位点已经被作图并且描述了具有改善的结合的变体(参见Shields,R.L. et al., 2001J.Biol.Chem.276:6591-6604)。

[0404] 在又一个实施方案中,修饰抗体的糖基化。例如,可以制备非糖基化抗体(即,抗体缺乏糖基化)。可以改变糖基化以例如增加抗体对“抗原”的亲和力。这样的碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来完成。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,导致消除一个或多个可变区构架糖基化位点,从而消除该位点的糖基化。这种无糖基化可增加抗体对抗原的亲和力。Co等人的美国专利号5,714,350和6,350,861中进一步详细描述了这种方法。

[0405] 另外地或备选地,可以制备具有改变的糖基化类型的抗体,例如具有减少的岩藻糖基残基量的低岩藻糖基化抗体或具有增加的二分型GlcNAc结构的抗体。已经证明这种改变的糖基化模式增加了抗体的ADCC能力。这样的碳水化合物修饰可以通过例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体来完成。本领域已经描述了具有改变的糖基化机制的细胞,并且其可以用作宿主细胞,在其中表达本发明的重组抗体从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如,Hang等人的EP 1,176,195描述了具有功能性破坏的FUT8基因的细胞系,其

编码岩藻糖基转移酶,使得在这种细胞系中表达的抗体显示出低岩藻糖基化。Presta的PCT公开WO 03/035835描述了具有降低的将岩藻糖连接到Asn (297) -连接的碳水化合物的能力的变体CHO细胞系Lec13细胞,也导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖化(也参见Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277: 26733-26740)。Umana等人的PCT公开WO 99/54342描述了经改造以表达糖蛋白修饰糖基转移酶(例如,β(1,4)-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III(GnTIII))的细胞系,使得在工程化细胞系中表达的抗体展现增加的二分GlcNac结构,其导致抗体增加的ADCC活性(也参见Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17: 176-180)。

[0406] 工程化改变的抗体的方法

[0407] 如上所述,具有本文显示的VH和VL序列或全长重链和轻链序列的β-klotho-结合抗体可用于通过修饰全长重链和/或轻链序列,VH和/或VL序列或与其连接的恒定区来产生新的β-klotho-结合抗体。因此,在本发明的另一方面,使用本发明的β-klotho-结合抗体的结构特征来产生结构相关的β-klotho-结合抗体,该抗体保留本发明抗体的至少一种功能特性,所述功能特性为如与人β-klotho的结合和激活FGF21-受体复合体的一种或多种功能特性(例如激活FGF21-受体信号传导)。

[0408] 例如,本发明的抗体的一个或多个CDR区或其突变可以与已知的构架区和/或其他CDR重组地组合以产生如上所述的本发明的另外的重组工程化的β-klotho结合抗体。其他类型的修饰包括在前一节中描述的修饰。工程化方法的起始材料是本文提供的一个或多个VH和/或VL序列或其一个或多个CDR区。为了产生工程化抗体,没有必要实际制备(即作为蛋白质表达)具有本文提供的一个或多个VH和/或VL序列或其一个或多个CDR区的抗体。相反,包含在序列中的信息被用作起始材料以产生源自原始序列的“第二代”序列,然后制备“第二代”序列,并且表达为蛋白质。

[0409] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供了用于制备由重链可变区抗体序列和轻链可变区抗体序列组成的β-klotho结合抗体的方法,所述重链可变区抗体序列具有选自SEQ ID NO:3, 23, 43和63的CDR1序列,选自SEQ ID NO:4, 24, 44和64的CDR2序列,和/或选自SEQ ID NO:5, 25, 45和65的CDR3序列;轻链可变区抗体序列具有选自SEQ ID NOs:13, 33, 53, 和73的CDR1序列,选自SEQ ID NO:14, 34, 54和63的CDR2序列和/或选自SEQ ID NO:15, 35, 55和75的CDR3序列;改变重链可变区抗体序列和/或轻链可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基以产生至少一个改变的抗体序列;并将改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0410] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供了用于制备由重链可变区抗体序列和轻链可变区抗体序列组成的β-klotho结合抗体的方法,所述重链可变区抗体序列具有选自SEQ ID NOs:6, 26, 46, 和66的CDR1序列,选自SEQ ID NOs:7, 27, 47, 和67的CDR2序列,和/或选自SEQ ID NOs:8, 28, 48, 和68的CDR3序列;所述轻链可变区抗体序列具有选自SEQ ID NOs:16, 36, 56, 和76的CDR1序列,选自SEQ ID NOs:17, 37, 57, 和77的CDR2序列,和/或选自SEQ ID NOs:18, 38, 58, 和78的CDR3序列;改变重链可变区抗体序列和/或轻链可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基以产生至少一个改变的抗体序列;并将改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0411] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供了一种用于制备被优化用于在哺乳动物细胞中表达的β-klotho-结合抗体的方法,所述抗体由以下组成:具有选自SEQ ID NO:11, 31, 51或71的序列的全长重链抗体序列;和具有选自SEQ ID NOs:21, 41, 61或81的序列的全

长轻链抗体序列；改变全长重链抗体序列和/或全长轻链抗体序列内的至少一个氨基酸残基以产生至少一个改变的抗体序列；并将改变的抗体序列表达为蛋白质。在一个实施方案中，重链或轻链的改变在重链或轻链的构架区中。

[0412] 还可以通过筛选具有如US2005/0255552中所述的固定的CDR3序列或最小基本结合决定簇和CDR1和CDR2序列上的多样性的抗体文库来制备改变的抗体序列。筛选可以根据适合用于从抗体文库筛选抗体的任何筛选技术进行，例如噬菌体展示技术。

[0413] 标准分子生物学技术可用于制备和表达改变的抗体序列。由改变的抗体序列编码的抗体是保留本文所述的 β -klotho-结合抗体的一种，一些或全部功能性质的抗体，所述功能性质包括但不限于特异性结合人，食蟹猴，大鼠和/或小鼠 β -klotho；并且所述抗体在FGFR1c_ β -klotho_HEK293pERK细胞测定中激活FGF21介导的信号传导，例如FGF21-受体依赖性信号传导。

[0414] 在工程化本发明抗体的方法的某些实施方案中，可以沿着全部或部分 β -klotho-结合抗体编码序列随机地或选择性地引入突变，并且可以筛选所得到的修饰的 β -klotho-结合抗体的结合活性和/或如本文所述的其他功能特性。本领域已经描述了突变方法。例如，Short的PCT公开WO 02/092780描述了使用饱和诱变，合成连接组装或其组合来产生和筛选抗体突变的方法。或者，Lazar等人的PCT公开WO 03/074679描述了使用计算筛选方法来优化抗体的生理化学性质的方法。

[0415] 在本发明的某些实施方案中，已经工程化抗体以去除脱酰胺位点。已知脱酰胺引起肽或蛋白质的结构和功能改变。脱酰胺可导致生物活性下降，以及蛋白质药物的药代动力学和抗原性的改变。(Anal Chem. 2005 Mar 1;77 (5) :1432-9)。

[0416] 在本发明的某些实施方案中，抗体已被工程化以增加pI并改善其药物样性质。蛋白质的pI是分子整体生物物理性质的关键决定因素。已知具有低pI的抗体不易溶解，较不稳定并易于聚集。此外，具有低pI的抗体的纯化是具有挑战性的并且可能是有问题的，特别是在用于临床使用的放大期间。增加本发明的抗 β -klotho抗体或Fab的pI提高了它们的溶解性，使得抗体以更高的浓度(>100mg/ml)配制。高浓度(例如>100mg/ml)的抗体制剂提供了能够通过玻璃体内注射将更高剂量的抗体施用到患者眼中的优势，这进而可以减少给药频率，对于治疗慢性疾病包括心血管病症是显著的优点。较高的pI也可以增加抗体IgG形式的FcRn介导的再循环，从而使得药物在体内持续更长的时间，需要更少的注射。最后，由于较高的pI显著提高了抗体的整体稳定性，导致较长的保质期和体内生物活性。优选地，pI大于或等于8.2。

[0417] 可以使用本领域中可获得的和/或本文所述的标准测定法来评估改变的抗体的功能性质，例如实施例中列出的那些(例如，ELISA)。

[0418] 预防和治疗用途

[0419] 通过向有此需要的受试者施用有效量的本发明的抗体或抗原结合片段，如本文所述的结合 β -klotho的抗体可以治疗有用浓度用于治疗与异常FGF21信号传导相关的疾病或病症(例如，FGF21介导的信号传导和/或FGF21受体信号传导的异常激活)。本发明提供了通过向有需要的受试者施用有效量的本发明的抗体来治疗与FGF21相关的代谢紊乱的方法。本发明提供了通过向有需要的受试者施用有效量的本发明的抗体来治疗FGF21相关的心血管疾病的方法。

[0420] 本发明的抗体尤其可用于治疗,预防和改善FGF21相关的状况或病症,包括但不限于代谢,内分泌和心血管病症,如肥胖症,1型和2型糖尿病,胰腺炎,血脂异常,非酒精性脂肪性肝病(NAFLD),非酒精性脂肪性肝炎(NASH),胰岛素抵抗,高胰岛素血症,葡萄糖耐受不良,高血糖症,代谢综合征,急性心肌梗塞,高血压,心血管疾病,动脉粥样硬化,外周动脉疾病,中风,心力衰竭,冠心病,肾病,糖尿病并发症,神经病,胃轻瘫,与胰岛素受体中严重失活突变相关的病症以及其他代谢病症,以及降低危重病人的死亡率和发病率。

[0421] 本发明的抗体也可以与其他药剂组合用于预防,治疗或改善FGF21相关病症。例如,他汀化合物疗法可以与本发明的FGF21模拟物抗体和抗原结合片段组合用于治疗患有心血管或代谢病症的患者。

[0422] 在具体的方面,本文提供了一种降低体重的方法(例如减轻至少4%,至少5%,至少6%,至少7%,至少8%,至少9%,至少10%,至少12%,至少15%或至少20%),所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包含本文所述的结合 β -klotho并且能够增加 β -klotho和FGFR1c的活性的抗体或抗原结合片段。

[0423] 在具体的方面,本文提供了一种降低食欲或食物摄入量的方法(例如减少至少4%,至少5%,至少6%,至少7%,至少8%,至少9%,至少10%,至少12%,至少15%或至少20%),包括向需要其的受试者施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包含本文所述的抗体或抗原结合片段,其结合 β -klotho并且能够增加 β -klotho和FGFR1c的活性。

[0424] 在具体的方面,本文提供了一种降低受试者中血浆甘油三酯(TG)浓度或血浆总胆固醇(TC)浓度(例如降低至少4%,至少5%,至少6%,至少7%,至少8%,至少9%,至少10%,至少12%,至少15%或至少20%)的方法,所述方法包括向需要其的受试者施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包含本文所述的抗体或抗原结合片段,其结合 β -klotho并能够增加 β -klotho和FGFR1c的活性。

[0425] 在具体的方面,受试者患有代谢病症,诸如肥胖症,1型和2型糖尿病,胰腺炎,血脂异常,非酒精性脂肪性肝炎(NASH),胰岛素抵抗,高胰岛素血症,葡萄糖耐受不良,高血糖症和代谢综合征。在具体方面,受试者患有心血管病症。

[0426] 药物组合物

[0427] 本发明提供了药物组合物,其包含与药学上可接受的载体一起配制的结合 β -klotho的抗体(完整或结合片段)。所述组合物可另外含有一种或多种适合于治疗或预防例如心血管病症的其它治疗剂。药学上可接受的载体增强或稳定组合物,或可用于促进组合物的制备。药学上可接受的载体包括生理上相容的溶剂,分散介质,包衣,抗细菌剂和抗真菌剂,等渗剂和吸收延迟剂等。

[0428] 本发明的药物组合物可以通过本领域已知的多种方法施用。施用途径和/或施用模式取决于期望的结果。优选的是玻璃体内,静脉内,肌内,腹膜内或皮下施用,或者在靶部位的附近施用。药学上可接受的载体应适合于玻璃体内,静脉内,肌内,皮下,肠胃外,脊柱或表皮施用(例如通过注射或输注)。取决于施用途径,活性化合物(即抗体,双特异性和多特异性分子)可以被包被在材料中以保护化合物免于可能使化合物失活的酸和其它自然条件的作用。

[0429] 该组合物应该是无菌的和流体的。例如,通过使用诸如卵磷脂的包衣,通过在分散的情况下维持所需的粒度和通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。在许多情况下,

优选在组合物中包含等渗剂,例如糖,多元醇如甘露醇或山梨糖醇,以及氯化钠。通过在组合物中包含延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝或明胶,可以实现可注射组合物的长期吸收。

[0430] 本发明的药物组合物可以根据本领域公知和常规实践的方法来制备。参见例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; 和 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。药物组合物优选在GMP条件下生产。通常,在本发明的药物组合物中使用治疗有效剂量或灵验剂量的 β -klotho结合抗体。通过本领域技术人员已知的常规方法将 β -klotho结合抗体配制成药学上可接受的剂型。调整剂量方案以提供最佳的期望响应(例如治疗响应)。例如,可以施用单次推注,可以随着时间的推移施用数个分开的剂量,或者可以按照治疗情况的紧急程度所指示的,成比例地减少或增加剂量。以剂量单位形式配制肠胃外组合物以便于给药和剂量的均一性是特别有利的。本文使用的剂量单位形式是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位含有预定量的活性化合物,其经计算与所需的药物载体结合产生所需的治疗效果。

[0431] 本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以变化,以获得有效实现特定患者、组合物和给药方式的所需治疗反应而对患者无毒的活性成分的量。所选择的剂量水平取决于多种药物代谢动力学因素,包括所用本发明特定组合物或其酯,盐或酰胺的活性,给药途径,给药时间,所用具体化合物的排泄速率,治疗持续时间,与所用特定组合物联合使用的其它药物,化合物和/或材料,所治疗患者的年龄,性别,体重,状况,一般健康状况和既往病史等因素。

[0432] 医师或兽医可以以低于达到所需治疗效果所需的水平开始药物组合物中使用的本发明抗体的剂量,并逐渐增加剂量直至达到所需效果。通常,用于治疗本文所述的心血管病症的本发明组合物的有效剂量取决于许多不同的因素而变,所述因素包括施用方式,靶位点,患者的生理状态,患者是人类还是动物,施用的其他药物,以及治疗是预防还是治疗性的。需要滴定治疗剂量以优化安全性和有效性。在一个具体的实施方案中,对于用抗体进行全身性施用,剂量范围为约0.0001-100mg/kg或0.01-15mg/kg宿主体重。在一个具体的实施方案中,对于抗体的玻璃体内施用,剂量可以在0.1mg/眼-5mg/眼的范围内。例如,0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.3mg/ml, 0.4mg/ml, 0.5mg/ml, 0.6mg/ml, 0.7mg/ml, 0.8mg/ml, 0.9mg/ml, 1.0mg/ml, 1.1mg/ml, 1.2mg/ml, 1.3mg/ml, 1.4mg/ml, 1.5mg/ml, 1.6mg/ml, 1.7mg/ml, 1.8mg/ml, 1.9mg/ml, 2.0mg/ml, 2.1mg/ml, 2.2mg/ml, 2.3mg/ml, 2.4mg/ml, 2.5mg/ml, 2.6mg/ml, 2.7mg/ml, 2.8mg/ml, 2.9mg/ml, 3.0mg/ml, 3.1mg/ml, 3.2mg/ml, 3.3mg/ml, 3.4mg/ml, 3.5mg/ml, 3.6mg/ml, 3.7mg/ml, 3.8mg/ml, 3.9mg/ml, 4.0mg/ml, 4.1mg/ml, 4.2mg/ml, 4.3mg/ml, 4.4mg/ml, 4.5mg/ml, 4.6mg/ml, 4.7mg/ml, 4.8mg/ml, 4.9mg/ml, 或5.0mg/ml。示例性治疗方案需要每两周一次或一个月一次或每3至6个月一次全身施用。示例性治疗方案需要每两周一次或每月一次或每3至6个月一次或根据需要(PRN)进行系统给药。

[0433] 抗体通常多次施用。单次剂量之间的间隔可以是每周,每月或每年。如通过测量患者中的 β -klotho-结合抗体的血液水平所指示的,间隔也可以是不规则的。另外,备选的给药间隔可由医师确定,并且每月施用或根据需要进行有效治疗。在全身施用的一些方法中,调整剂量以实现1-1000 μ g/ml的血浆抗体浓度和在一些方法中25-500 μ g/ml。或者,抗体可

以作为持续释放制剂施用,在这种情况下,需要较少频率的施用。剂量和频率取决于患者中抗体的半衰期而变。通常,人源化抗体显示出比嵌合抗体和非人抗体更长的半衰期。施用的剂量和频率可以根据治疗是预防还是治疗性而变化。在预防性应用中,相对较低的剂量在较长的时间内以相对不频繁的时间间隔施用。有些患者终生接受治疗。在治疗应用中,有时需要以相对短的时间间隔施用相对较高的剂量,直到疾病进展减缓或终止,并且优选直至患者显示疾病症状的部分或完全改善。此后,可以给患者施用预防性方案。

实施例

[0434] 提供以下实施例以进一步说明本发明,但不限制其范围。本发明的其他变型对于本领域的普通技术人员而言将是显而易见的,并且被所附权利要求涵盖。

[0435] 实施例1:制备用作抗原的人FGFR1c_β-klotho_300.19细胞

[0436] 产生了稳定表达人FGFR1c (1-386aa) 和β-klotho的300.19细胞用作全细胞抗原。将编码人β-klotho (GenBank登录号NM_175737) 的全长cDNA克隆到pEF1/Myc-His B (Invitrogen目录号#V92120) 的EcoRI和EcoRV位点。将编码人FGFR1c (GenBank登录号NM_023106) 的氨基酸1-386的cDNA克隆到pEF6/Myc-His B (Invitrogen, 目录号V96220) 的BamHI和NotI位点。在两种构建体中,紧接在起始密码子之前包括Kozak序列(CACC),并且在载体中的Myc-His标签之前加入终止密码子。使用Amaxa Nucleofector装置和Nucleofector试剂盒(Lonza,Cat#VCA-1003)通过电穿孔用β-klotho和FGFR1c质粒共转染鼠前-B 300-19细胞。使用1mg/ml遗传霉素(Invitrogen,Cat#10131)和8ug/ml杀稻瘟菌素(Invitrogen,Cat#46-1120)选择稳定克隆3周。

[0437] 实施例2:用于细胞测定的FGFR_β-klothoHEK293细胞的制备

[0438] 为了测试β-klotho抗体的结合特异性,功能活性或直向同源物交叉反应性,使用标准Lipofectamine 2000转染和细胞克隆选择方法产生稳定表达人FGFR1c_β-klotho,人FGFR2c_β-klotho,人FGFR3c_β-klotho,人FGFR4_β-klotho或食蟹猴FGFR1c_β-klotho的HEK293细胞。

[0439] 使用编码全长人β-klotho (NM_175737),人FGFR1c (NM_023106),人FGFR2c (NP_001138387),人FGFR3c (NP_000133)或人FGFR4 (NP_998812) cDNA的以下哺乳动物表达质粒:对于食蟹猴β-klotho,使用基于人和恒河猴β-klotho序列的引物,从食蟹猴脂肪组织cDNA (BioChain, 目录号C1534003-Cy) 中PCR扩增全长序列,并克隆。使用基于人FGFR1c序列 (# NM_023106)的引物,从食蟹猴脂肪组织cDNA (BioChain, 目录号C1534003-Cy) 中克隆食蟹猴FGFR1c cDNA,并且其显示在氨基酸水平上与人的FGFR1c 100%同一。因此,由于人和食蟹猴FGFR1c氨基酸序列是相同的,使用上述人FGFR1c cDNA构建体来制备稳定表达食蟹猴β-klotho和人FGFR1c (#NM_023106)的HEK293细胞。

[0440] 实施例3:使用pERK细胞测定法测量FGFR_β-klotho受体激活

[0441] 标准技术用于细胞培养和测量磷酸-ERK 1/2 (pERK) 水平。简言之,将稳定表达人FGFR1c_β-klotho,人FGFR2c_β-klotho,人FGFR3c_β-klotho,人FGFR4_β-klotho或食蟹猴FGFR1c_β-klotho的HEK293细胞维持在含有10% FBS (Hyclone, SH30071),杀稻瘟菌素(Invitrogen, A1113902) 和遗传霉素(Invitrogen, 10131035) 的DMEM培养基(Invitrogen, 11995) 中在37°C 5% CO₂ 中。将细胞接种在384孔聚-D-赖氨酸包被的平板(BD Biosciences,

354663) 中,并在37℃,5%CO₂中温育过夜,然后血清饥饿。

[0442] 将杂交瘤上清液或β-klotho抗体在Freestyle 293培养基中稀释,并将多种浓度的抗体加入平板中。温育后,洗涤细胞,然后用裂解缓冲液裂解。将细胞裂解物转移至384孔测定板(PerkinElmer,目录号6008280),使用AlphaScreen SureFireTM pERK 1/2Kit(Perkin Elmer, TGRES10K)测量磷酸-ERK 1/2水平。使用标准的AlphaScreen设置在EnVision 2104多标签阅读器(Perkin Elmer)上读板。剂量-响应数据绘制为相对基底的pERK活性对比蛋白浓度以测定EC₅₀值,使用方程式Y=底部+(顶部-底部)/(1+10^(LogEC₅₀-X) x HillSlope))和GraphPad Prism 5软件。

[0443] 实施例4:单克隆抗体的制备

[0444] 基本如Dreyer et al (2010) (Dreyer AM et.al. (2010) BMC Biotechnology 10: 87) 所述,在Balb/c (Jackson Laboratory品系:BALB/cJ) 或Bc12 22 wehi (Jackson Laboratory品系:C.Cg-Tg (BCL2) 22Wehi/J) 小鼠中通过全细胞免疫产生抗人β-klotho抗体。

[0445] 简言之,以10至30天的间隔将1x10⁷个人FGFR1c_β-klotho_300.19细胞注射到Balb/c小鼠中六次。第一次全细胞注射用弗氏完全佐剂(Sigma-Aldrich F5881)完成。细胞和佐剂没有混合,而是分别注射在两个紧密但不同的皮下部位。这些随后用Sigma佐剂系统(Sigma-Aldrich S6322)或不用佐剂腹膜内注射相同的细胞。

[0446] 使用Bc12 22 wehi小鼠,以7天的间隔向这些动物注射1x10⁷个人FGFR1c_β-klotho_300.19细胞四次。第一次注射用弗氏完全佐剂(Sigma-Aldrich F5881)完成。将细胞和佐剂分别注入两组两个紧密但不同的皮下部位。细胞的随后注射在无佐剂的情况下皮下进行。

[0447] 通过荧光激活细胞分选(FACS) 测定法测定免疫小鼠中的免疫应答。将稀释1,000倍或10,000倍的免疫小鼠的血清用于染色人FGFR1c_β-klotho_HEK和人FGFR1c_β-klotho_300.19细胞,然后使用别藻蓝蛋白(APC) 第二抗鼠IgG检测抗体(Jackson ImmunoResearch 目录号#115-136-071)。在Becton Dickinson LSRII或Foressa流式细胞仪上读取荧光。选择四只效价最高的小鼠进行电融合。

[0448] 实施例5:杂交瘤筛选,亚克隆和选择

[0449] 在Cytofusion培养基(LCM-C,Cyto Pulse Sciences)中洗涤2x10⁸个脾细胞和5x10⁷个融合伴侣F0细胞(ATCC,CRL-1646),并根据制造商的说明书使用Hybrimune波形发生器(Cyto Pulse Sciences,型号CEEF-50B)以600伏特的峰值脉冲进行融合。将细胞以每孔3000个F0细胞的计算密度接种到384孔板中,并在HAT选择培养基(Sigma-Aldrich Cat.H0262)中培养。

[0450] 初次筛选使用高通量FACS平台(Anderson, Paul. Automated Hybridoma Screening, Expansion, Archiving and Antibody Purification. In:3rd Annual 2014SLAS Conference.Jan.18-22,2014, San Diego, CA)进行。简而言之,将杂交瘤上清液与人FGFR1c-β-klotho稳定表达和非表达细胞系一起孵育,并用抗鼠IgG-APC二抗(Jackson ImmunoResearch Cat#115-136-071)测定抗体结合。

[0451] 测试来自每种杂交瘤上清液的抗体同时针对四种条形码化的细胞系:300.19亲本细胞, human_FGFR1c_β-klotho_300.19细胞, 亲本HEK293细胞和人FGFR1c-β-klotho_HEK

293细胞的结合。在主屏幕中选择了348个命中。初次命中在96孔板中扩大并通过FACS再次在人FGFR1c_β-klotho_HEK 293细胞上确认结合,产生122个确认的命中。使用实施例2中描述的磷酸-ERK1/2测定法,对115FACS结合再确认的命中的含HAT(次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷)培养基的上清液分析人FGFR1c_β-klotho受体复合体的细胞活化。

[0452] 将其上清液中具有最高磷酸-ERK1/2细胞活性的杂交瘤扩增,并从其上清液中纯化出IgG。使用实施例2中描述的磷酸-ERK1/2测定法,从74个杂交瘤中纯化的IgGs用于作图分析人FGFR1c_β-klotho受体复合体的细胞激活。使用实施例2中描述的磷酸-ERK1/2测定法,将对人类FGFR1c_β-klotho受体复合体的磷酸-ERK1/2活化具有最好的效力的来自杂交瘤的IgG对食蟹猴FGFR1c_β-klotho受体复合体的直向同源物交叉反应性以及对人FGFR2c_β-klotho和人FGFR3c_β-klotho受体复合体的选择性作图分析。在这些分析结果的基础上,选择了杂交瘤克隆99G09和127F19用于进一步作图分析。

[0453] 为了评估表达 α -klotho的细胞中的99G09和127F19信号传导,用 α -klotho,Egr1-萤光素酶和海肾萤光素酶转染HEK293细胞。简而言之,将HEK293细胞在DMEM,10%FBS中培养并以30000个细胞/孔铺板,并使用Lipofectamine 2000用Klotho,Egr-1-luc和TK-Rennila转染。第二天,将FGF23,FGF21,99G09和127F19稀释到补充有0.1%FBS的DMEM中的指定浓度并加入到转染的细胞中过夜。根据制造商的说明,通过Dual-Glo萤光素酶测定试剂盒(Promega,E2920)检测萤光素酶活性。正如所料,需要 α -klotho表达用于其信号传导的FGF23表现出很强的萤光素酶表达。然而,FGF21,99G09或127F19都没有显示出任何显著的萤光素酶表达,表明 α -klotho不作为FGF21或这些FGF21模拟抗体的共同受体。

[0454] 实施例6:单克隆抗体的人源化和亲和力成熟

[0455] 人源化

[0456] 本领域已经很好地描述了人源化的方法(Jones PT et al. (1986) Nature 321: 522-525; Queen C et al. (1989) PNAS USA 86:10029-10033; Riechmann L et al. (1988) Nature 33:323-327; Verhoeyen M et al. (1988) Science 239:1534-1536)。术语人源化描述了非人抗体(例如,鼠源性抗体)的抗原结合位点转移到人受体构架,例如,人类种系序列(Retter I et al. (2005) Nucleic Acids Res.33:D671-D674.)。

[0457] 人源化抗体的主要原理在于使对人体中抗体产生免疫原性应答的风险最小化(Rebello PR et al. (1999) Transplantation 68:1417-1420)。抗原结合位点包含互补决定区(CDR)(Chothia C and Lesk AM (1987) Journal of Molecular Biology 196:901-917; Kabat E et al. (1991) Anon. 5th Edition ed; NIH Publication No. 91:3242)和CDR外侧的位置,即在直接或间接影响结合的可变结构域(VL和VH)的构架区中。可以直接影响结合的构架残基例如可以在位于CDR2和CDR3之间的所谓的“外”环区域中找到。间接影响结合的残基例如在所谓的游标区中发现(Foote J, Winter G. (1992) Journal of Molecular Biology 224:4 87-499)。它们被认为支持CDR构象。当选择合适的受体构架时,将CDR外部的这些位置考虑在内,以最小化构架区中最终人源化抗体对人种系受体序列的偏差数目。

[0458] 序列优化亲和力成熟

[0459] 已知某些氨基酸序列基序经历翻译后修饰(PTM),例如糖基化(即NxS/T,x除P以外的任何基团),游离半胱氨酸的氧化,脱酰胺(例如NG)或异构化(例如DG)。如果存在于CDR区中,则通过定点诱变理想地去除那些基序以增加产物的均一性。

[0460] 本领域充分描述了亲和力成熟的方法。在许多展示系统中,噬菌体展示 (Smith GP, 1985, *Filamentous fusion phage:novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. *Science* 228:1315-1317) 和在真核细胞如酵母上展示 (Boder ET and Wittrup KD, 1997, *Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries*. *Nature Biotechnology* 15:553-557) 似乎是选择抗体-抗原相互作用的最常用的系统。这些展示系统的优点是它们适用于宽范围的抗原,并且选择的严格性可以很容易地调整。在噬菌体展示中,可以展示scFv或Fab片段,并且在酵母中展示全长IgG。那些通常使用的方法允许从具有多于10E7的多样性的较大的文库中选择期望的抗体变体。多样性较小(例如10E3)的文库可通过微表达和ELISA筛选。可以通过例如易错PCR (Cadwell RC and Joyce GF, 1994, *Mutagenic PCR*. *PCR Methods Appl.* 3: S136-S140) 产生非靶向的或随机的抗体变体文库,并提供非常简单但有时受限的方法。另一种策略是抗体候选者的CDR指导的多样化。一个或多个CDR中的一个或多个位置可以使用例如简并寡核苷酸 (Thompson J et al., 1996, *Affinity maturation of a high-affinity human monoclonal antibody against the third hypervariable loop of human immunodeficiency virus:use of phage display to improve affinity and broaden strain reactivity*. *J.Mol.Biol.* 256:77-88)、三核苷酸诱变 (TRIM) (Kayushin AL et al., 1996, *A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites--synthons for the generation of oligonucleotide/peptide libraries*. *Nucleic Acids Res.* 24:3748-3755) 或本领域已知的任何其它方法特异性靶向。

[0461] 表达质粒的产生

[0462] 编码人源化VL和VH结构域的DNA序列在GeneArt (Life Technologies Inc. Regensburg, Germany) 处进行订购,包括对于智人的密码子优化。编码VL和VH结构域的序列通过从GeneArt衍生的载体中切割和粘贴到适于在哺乳动物细胞中分泌的表达载体中进行亚克隆。将重链和轻链克隆到单独的表达载体中以允许共转染。表达载体的元件包括启动子(巨细胞病毒 (CMV) 增强子启动子),促进分泌的信号序列,聚腺苷酸化信号和转录终止子(牛生长激素 (BGH) 基因),允许附加型复制和在原核生物中复制的元件(例如SV40起点和ColE1或本领域已知的其它元件)和允许选择的元件(氨苄青霉素抗性基因和zeocin标记物)。

[0463] 人源化抗体候选物的表达和纯化

[0464] 组成型表达SV40大T抗原 (HEK293-T ATCC11268) 的人胚肾细胞是人源化和/或优化的IgG蛋白的瞬时表达的优选宿主细胞系之一。使用PEI (聚乙烯亚胺, MW 25.000线性, Polysciences, USA 目录号23966) 作为转染试剂进行转染。通过在室温 (RT) 下将1g PEI 小心溶解在900ml细胞培养级水中来制备PEI储备溶液。

[0465] 分两步进行纯化,其中从小鼠杂交瘤中产生人源化和亲和力成熟的mAbs。NOV001是来源于小鼠杂交瘤99G09的人源化和亲和力成熟的mAb。NOV002是源自小鼠杂交瘤127F19的人源化和亲和力成熟的mAb。选择IgG1L234A/L235A (LALA) 或IgG1κD265A/P329A (DAPA) 同种型作为预防措施以降低抗体促进抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的能力 (Hezareh M et al. (2001) *Journal of Virology* 75:12161-

12168)。NOV001是IgG1 (LALA) 同种型,NOV003是同一mAb的IgG1 (DAPA) 同种型。NOV002是IgG1 (LALA) 同种型,NOV004是同一mAb的IgG1 (DAPA) 同种型。

[0466] 实施例7:单克隆抗体的体外表征

[0467] 如实施例5中所述的SET测定法用于估计mAb对人 β -Klotho的KD。NOV001,NOV002和NOV004的KD分别约为42pM,8pM和9pM(图1)。使用实施例3中所述的pERK测定法来分析mAb的FGFR $_{\beta}$ -klotho受体活性。NOV002分别以约5nM和37nM的EC50激活人和食蟹猴FGFR1c $_{\beta}$ -klotho受体复合体(图2)。NOV004分别以约6nM和40nM的EC50激活人和食蟹猴FGFR1c $_{\beta}$ -klotho受体复合体(图2)。NOV002和NOV004不激活人FGFR2c $_{\beta}$ -klotho,FGFR3c $_{\beta}$ -klotho,或FGFR4 $_{\beta}$ -klotho受体复合体(图3)。如实施例5中所述,将mAbs对FGF23活性作图分析。NOV002和NOV004不显示FGF23活性(图4)。如实施例5中所述,对mAbs分析与小鼠FGFR $_{\beta}$ -klotho受体复合体的交叉反应性。mAbs NOV002和NOV004不导致小鼠3T3L1脂肪细胞的葡萄糖摄取(图5)。

[0468] 实施例8:通过用NOV001和NOV002进行人 β -klotho胞外结构域的氢-氘交换进行表位作图

[0469] 氢-氘交换(HDx)与质谱(MS) (Woods VL et al. (2001) High Resolution, High-Throughput Amide Deuterium Exchange-Mass Spectrometry (DXMS) Determination of Protein Binding Site Structure and Dynamics: Utility in Pharmaceutical Design. *J.Cell.Biochem.Supp.*; 84 (37) :89-98)结合被用于作图在人 β -klotho胞外结构域(ECD) (52-997aa)上NOV001和NOV002的推定的结合位点。在HDx骨架中,蛋白质的酰胺氢被氘取代。该方法对蛋白质结构/动力学和溶剂可及性敏感,因此能够报告配体结合后经历氘摄取减少的位置。这些实验的目的是鉴定潜在的表位,并了解当与NOV001或NOV002结合时人 β -klotho ECD的动力学。氘摄取的变化对直接结合和变构事件都敏感。

[0470] 使用与文献(Chalmers MJ et al. (2006) Probing protein ligand interactions by automated hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal.Chem.*; 78 (4) :1005-1014)中所述相似的方法进行HDx-MS实验。实验在包括LEAP自动进样器,nanoACQUITY UPLC和Synapt G2质谱仪的Waters HDx-MS平台上进行。用于标记人类 β -klotho ECD (52-997aa)的蛋白质骨架的氘缓冲液是pH 7.2的D-PBS;氘在溶液中的总体百分比是95%。从R&D System (5889-KB-050)订购人 β -klotho蛋白 (52-997aa)。在HDx-MS分析之前,将蛋白质针对pH7.2的PBS缓冲液透析过夜。对于不存在抗体的人 β -klotho ECD (52-997aa)氘标记实验,用冷却管中的100 μ l氘缓冲液(95%氘)稀释300pmol的人 β -klotho ECD (52-997aa) (体积为13 μ l),并在旋转器上在4℃温育15分钟。然后标记反应用100 μ l冷却的淬灭缓冲液在2℃淬灭5分钟,然后注射到LC-MS系统上进行自动胃蛋白酶消化和肽分析。

[0471] 对于在NOV001或NOV002存在下的人 β -klotho ECD (52-997aa)氘标记实验,首先将350pmol的NOV001或NOV002固定在Thermo Protein G Plus珠上,并与DSS(二琥珀酰亚胺辛二酸酯)交联。为了进行标记实验,含有350pmol抗体的抗体珠与300pmol人 β -klotho ECD (52-997aa)在4℃温育20分钟。20分钟后,用200 μ lPBS缓冲液洗涤珠子。然后加入200 μ l冷的氘缓冲液(84.1%氘),并将复合物在4℃温育15分钟。15分钟后,将氘缓冲液离心并用200 μ l冷的淬灭缓冲液在冰上猝灭标记反应4.5分钟。在离心机中旋转样品30秒后,将猝灭的溶液

注射到LC-MS系统上进行自动胃蛋白酶消化和肽分析。

[0472] 所有的氘交换实验都使用0.5M TCEP (三(2-羧乙基)膦) 和3M尿素 (pH=2.6) 淬灭。淬灭后,交换的抗原在12°C用Poroszyme Immobilized Pepsin柱 (2.1×30mm) 进行在线胃蛋白酶消化,然后捕获在Waters Vanguard HSS T3捕获柱上。从捕获柱洗脱肽并在Waters BEH C18 1×100mm柱(维持在1°C)下以40μl/min的流速使用2至35% B的二元8.4分钟梯度(流动相A为99.9%水和0.1%甲酸;流动相B为99.9%乙腈和0.1%甲酸)分离。

[0473] 对于人 β -klotho ECD (52-997aa), 82%的序列通过本文所述的氘交换实验进行监测。对于NOV001或NOV002结合和未结合的 β -Klotho ECD之间的差异实验,检查两种状态之间的氘掺入的变化是有益的。在表2中,负值表明NOV001-或NOV002- β -Klotho ECD复合体相对于单独的 β -klotho ECD经历较少的氘摄取。氘摄入量的减少可能是由于抗体保护抗原免于可交换氘或对氢键网络的稳定化。相反,正值表明复合体相对于单独的 β -klotho ECD经历更多的氘摄取。氘摄入的增加可能是由于氢键网络的去稳定化(即蛋白质的局部解折叠)。当检查两种不同状态之间的氘交换的差异变化时,例如apo β -klotho ECD和NOV001-或NOV002- β -klotho ECD复合体,通常使用一种方法来确定这些变化是否显著。通常,只要差异大于0.5Da,那么该差异被认为是显著的 (Houde D, et al. (2010) J. Pharma. Sci.; 100 (6): 2071-2086)。

[0474] 表2列出了NOV001-或NOV002- β -Klotho ECD复合体相对于单独的 β -klotho ECD的氘掺入的变化。使用-0.5Da显著截止值 (Houde D, et al. (2010) The Utility of Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry in Biopharmaceutical Comparability Studies. J. Pharma. Sci.; 100 (6): 2071-2086)。下列肽在NOV001- β -Klotho ECD复合体中被显著保护:245-266, 344-349, 421-429, 488-498, 509-524, 536-550, 568-576, 646-670, 696-700, 773-804, 834-857, 和959-986aa。以下肽在NOV002- β -Klotho ECD复合体中被显著保护:246-265, 343-349, 421-429, 488-498, 509-524, 536-550, 568-576, 646-669, 773-804, 834-857和959-986aa。

[0475] 通过比较重叠肽的保护值,可以进一步提高氘交换数据的分辨率。例如,肽329-342aa在NOV001- β -klotho ECD复合体中仅保护-0.51Da,而较大的肽330-348aa受到-1.48Da的保护。因此,可以推断,较大肽的显著保护区必须是区域343-347aa。在整个数据中进行这种分析揭示,在NOV002或NOV001与 β -klotho ECD结合(例如,对于SEQ ID NO:262内的所述区域的结合)时,区域246-265, 536-550, 834-857和959-986aa受到最强烈地保护。

[0476] 此外,除了前面提到的受最强烈保护的区域之外,受到NOV001保护的总体上许多区域也在NOV002中受到保护。这些保护区域分布在线性序列空间中的许多区域,尽管对ECD的C端侧有更多的保护区域。相反,很少区域区分两种抗体。对于NOV001,两个区域受到独特的保护:646-670aa和697-700aa,对于NOV002,一个区域646-689aa受到独特保护。总体而言,使用单独的HDX-MS在 β -klotho ECD上区分NOV002与NOV001的表位是具有挑战性的。HDX数据表明表位非常相似。

[0477] 表2显示了NOV001和NOV002结合对氘掺入人 β -klotho (53-997aa) 的影响。对于通过质谱检测的每种肽,显示NOV001- β -klotho复合体相对于单独的 β -klotho ECD和NOV002- β -klotho复合体相对于单独的 β -klotho ECD的的氘掺入(以道尔顿计)的变化。

[0478] 表2:人 β -klotho细胞外结构域 (52-997aa) 的HDX-MS肽覆盖率

[0479]

序列	SEQ ID NO:	起始位置	末端位置	气掺入的变化 (NOV001)	气掺入的变化 (NOV002)
FSGDGRAIW	85	53	61	-0.37	-0.36
FLYDTFPKNFF	86	76	86	-0.26	-0.50
FFWGI GT	87	85	91	0.22	0.10
FFWGI GTGAL	88	85	94	-0.10	-0.12
GIGTGALQ	89	88	95	-0.15	-0.12
QVEGSWKDGKGPSIW DHF	90	95	113	-0.77	-0.79
LEKDL SA	91	134	140	-0.16	-0.19
LEKDL SAL	92	134	141	-0.12	-0.20
SALDFIGVSFYQFSISWP	93	139	168	-0.23	-0.03

[0480]

序列	SEQ ID NO:	起始位置	末端位置	气掺入的变化 (NOV001)	气掺入的变化 (NOV002)
RLFPDGIVTVAN					
SISWPRL	94	152	158	-0.07	-0.07
SISWPRLFPDGIVT	95	152	165	-0.28	-0.34
FPDGIVT	96	159	165	-0.19	-0.24
VANAKGLQ	97	166	173	-0.66	-0.70
VANAKGLQY	98	166	174	-0.67	-0.67
LVLRNIEPIVT	99	182	192	-0.02	-0.07
VLRNIEPIVT	100	183	192	-0.09	-0.05
RNIEPIVT	101	185	192	-0.11	-0.12
RNIEPIVTL	102	185	193	-0.07	-0.08
LYHWDLPLAL	103	193	202	-0.05	-0.11
IFNDYAT	104	217	223	-0.02	-0.04
FNDYATYC	105	218	225	-0.16	-0.03
CFQMGDRVKY	106	225	235	-0.07	-0.10
FQMGDRVVK	107	226	234	-0.10	-0.11
FQMGDRVKY	108	226	235	-0.03	-0.05
VAWHGYGTGMHAPGE KGNL	109	245	263	-0.84	-0.82
AWHGYGTGMHAPGEK GNL	110	246	263	-0.84	-0.83
WHGYGTGMHAPGEKG NL	111	247	263	-1.14	-0.97
WHGYGTGMHAPGEKG NLAA	112	247	265	-1.72	-1.56
HGYGTGMHAPGEKGN L	113	248	263	-0.71	-0.72
YTVGHNLIKA	114	267	276	-0.21	-0.24
YTVGHNLIKAHSKVWH	115	267	295	0.13	0.01

[0481]

序列	SEQ ID NO:	起始位置	末端位置	气掺入的变化 (NOV001)	气掺入的变化 (NOV002)
NYNTHFRPHQKGW					
YTVGHNLIKAHSKVWH	116	267	296	-0.23	-0.26
NYNTHFRPHQKGWL					
VGHNLIKAHSKVWHNY	117	269	296	-0.29	-0.35
NTHFRPHQKGWL					
GHNLIKAHSKVWHNYN	118	270	296	-0.16	-0.16
THFRPHQKGWL					
LIKAHSKVWHNYNTHF	119	273	296	-0.24	-0.27
RPHQKGWL					
SITLGS	120	297	303	-0.12	-0.12
SITLGSHWIEPNRSENT	121	297	315	-0.22	-0.28
MD					
IFKCQQSMV	122	316	324	0.13	0.09
FKCQQSM	123	317	323	-0.07	-0.09
KCQQSMV	124	318	324	-0.16	-0.20
FANPIHGDGDYPEG	125	330	343	-0.58	-0.51
FANPIHGDGDYPEGMR	126	330	348	-1.12	-1.18
KKL					
FANPIHGDGDYPEGMR	127	330	349	-0.92	-1.00
KKLF					
LPIFSEAEKHEMRGT	128	352	366	-0.99	-1.03
PIFSEAEKHEMRGTAD	129	353	368	-0.69	-0.67
PIFSEAEKHEMRGTADF	130	353	369	-0.48	-0.47
SEAEKHEMRGTADF	131	356	369	-0.54	-0.54
AEKHEMRGTADF	132	358	369	-0.29	-0.32
EKHEMRGTADF	133	359	369	-0.26	-0.28
FAFSFGPNNF	134	370	379	-0.05	-0.10
FAFSFGPNNFKPLNT	135	370	384	-0.51	-0.62

[0482]

序列	SEQ ID NO:	起始位置	末端位置	气掺入的变化 (NOV001)	气掺入的变化 (NOV002)
FGPNNFKPLNT	136	374	384	-0.50	-0.48
FGPNNFKPLNTM	137	374	385	-0.47	-0.59
NLREALN	138	395	401	-0.16	-0.18
IKLEYNNPRIL	139	403	413	-0.19	-0.21
EYNPRIL	140	406	413	-0.02	-0.05
FTDSRVKTEDTTA	141	420	432	-1.06	-1.02
DSRVKTEDTTA	142	422	432	-0.94	-0.91
DTTAIYMMKNF	143	429	439	-0.58	-0.48
YMMKNFL	144	434	440	-0.05	-0.01
MMKNFLSQVLQA	145	435	446	-0.06	-0.07
MKNFLSQVLQA	146	436	446	-0.02	-0.07
QAIRLDE	147	445	451	-0.05	-0.03
DEIRVFGYTA	148	450	459	-0.30	-0.26
IRVFGYTA	149	452	459	-0.10	-0.09
IRVFGYTAWSL	150	452	462	-0.21	-0.22
YTAWSLL	151	457	463	-0.09	-0.06
DGFEWQDA	152	464	471	0.00	-0.12
FEWQDAYT	153	466	473	-0.09	-0.13
YTIRRGLF	154	472	479	-0.09	-0.11
TIRRGLF	155	473	479	-0.12	-0.13
NSKQKERKPSSAHY	156	484	498	-1.00	-0.91
NSKQKERKPSSAHYY KQIIRE	157	484	505	-0.75	-0.70
NSKQKERKPSSAHYY KQIIRENG	158	484	507	-0.80	-0.76
NSKQKERKPSSAHYY KQIIRENGF	159	484	508	-0.65	-0.66
NSKQKERKPSSAHYY	160	484	509	-1.11	-1.02

[0483]

序列	SEQ ID NO:	起始位置	末端位置	气掺入的变化 (NOV001)	气掺入的变化 (NOV002)
KQIIRENGFS					
SKQKERKPSSAHYYK QIIRE	161	485	505	-0.72	-0.69
YKQIIRENG	162	499	507	-0.42	-0.43
FSLKESTPDVQGQFPCD	163	508	524	-0.79	-0.89
SLKESTPDVQGQFPCD	164	509	524	-1.02	-1.22
LKESTPDVQGQFPCD	165	510	524	-0.98	-1.07
FSWGVTE	166	525	531	-0.20	-0.19
SVLKPEVASSPQFSDP HL	167	532	550	-1.74	-1.87
KPESVASSPQFSDPHL	168	535	550	-1.74	-1.74
VRLKTRPAQC	169	567	576	-1.37	-1.35
FVNIKKQLEM	170	579	588	-0.91	-0.90
VNIKKQLEM	171	580	588	-0.68	-0.68
VNIKKQLEML	172	580	589	-0.72	-0.74
NIKKQLEM	173	581	588	-0.41	-0.51
LARMKVTHYR	174	589	598	-0.12	-0.08
LARMKVTHYRF	175	589	599	-0.16	-0.16
ARMKVTHYRF	176	590	599	-0.14	-0.12
ALDWASVL	177	600	607	-0.08	-0.11
YRCVVSEG	178	623	630	-0.23	-0.22
VVSEGLKLGISA	179	626	637	-0.13	-0.10
GLKLGISAM	180	630	638	-0.10	-0.05
LKLGISA	181	631	637	-0.06	-0.06
LKLGISAM	182	631	638	-0.04	-0.06
ISAMVTLYYPT	183	635	645	-0.22	-0.18
LYYPHTAHLGLPEPLL	184	641	656	-0.55	-0.86
YYPTHTAHLGLPEPLL	185	642	656	-0.63	-0.83

[0484]

序列	SEQ ID NO:	起始位置	末端位置	气掺入的变化 (NOV001)	气掺入的变化 (NOV002)
YYPTHAHLGLPEPLLH ADGWLNPSTAEA	186	642	669	-1.29	-1.04
HADGWLNPSTAEA	187	657	669	-0.83	-0.61
HADGWLNPSTAEAF	188	657	670	-0.62	-0.48
AFQAYAGL	189	669	676	-0.11	-0.09
FQAYAGLC	190	670	677	-0.08	-0.09
QAYAGLC	191	671	677	-0.13	-0.15
QAYAGLCF	192	671	678	-0.12	-0.16
CFQELGD	193	677	683	-0.18	-0.20
CFQELGDL	194	677	684	0.01	-0.07
WITINEPNRL	195	688	697	-0.70	-0.46
WITINEPNRLSD	196	688	699	-0.80	-0.54
WITINEPNRLSDI	197	688	700	-1.24	-0.68
ITINEPNR	198	689	696	-0.68	-0.40
VAHALAWRL	199	717	725	-0.12	-0.11
AHALAWRL	200	718	725	-0.06	-0.06
HALAWRL	201	719	725	-0.14	-0.13
YDRQFRPSQRGAWS	202	726	739	-0.48	-0.48
YDRQFRPSQRGAWSL	203	726	740	-0.48	-0.43
DRQFRPSQRGAWS	204	727	739	-0.60	-0.58
SLHADWAEPANPYADS HWRAAERF	205	741	764	-0.45	-0.68
HADWAEPANPYADSH W	206	743	758	-0.34	-0.43
HADWAEPANPYADSH WRA	207	743	760	-0.69	-0.78
HADWAEPANPYADSH WRAAERF	208	743	764	-0.73	-0.92

[0485]

序列	SEQ ID NO:	起始位置	末端位置	气掺入的变化 (NOV001)	气掺入的变化 (NOV002)
WAEPANPYADSHWRAAERF	209	746	764	-0.74	-0.92
PANPYADSHWRAAERF	210	749	764	-0.33	-0.51
PYADSHWRAAERF	211	752	764	-0.51	-0.68
FAEPLFKTGDPAA	212	772	785	-0.66	-0.68
FAEPLFKTGDPAAAM	213	772	786	-0.87	-0.83
KTGDYPAAAM	214	778	786	-0.84	-0.81
REYIASKHRRGLSSSAL	215	787	803	-1.21	-1.00
REYIASKHRRGLSSSALPRL	216	787	806	-1.45	-1.25
YIASKHRRGLSSSAL	217	789	803	-1.22	-0.98
PRLTEAE	218	804	810	-0.53	-0.58
PRLTEAERRLLKGTVDF	219	804	820	-0.24	-0.33
AERRLLKGTVDF	220	809	820	-0.24	-0.24
ERRLLKGTVDF	221	810	820	-0.34	-0.34
RRLLKGTVDF	222	811	820	-0.21	-0.23
CALNHFTTRF	223	821	830	-0.28	-0.29
VMHEQLAGSRYDSDRD	224	831	846	-1.32	-1.07
VMHEQLAGSRYDSDRD IQF	225	831	849	-1.08	-0.97
HEQLAGSRYDSDRDIQF	226	833	849	-1.93	-1.88
AGSRYDSDRD	227	837	846	-0.99	-0.85
AGSRYDSDRDIQF	228	837	849	-0.64	-0.55
GSRYDSDRDIQF	229	838	849	-0.76	-0.69
LQDITRLSSPTR	230	850	861	-1.28	-1.28
LQDITRLSSPTRL	231	850	862	-1.69	-1.70
ITRLSSPTRL	232	853	862	-1.09	-1.06

[0486]

序列	SEQ ID NO:	起始位置	末端位置	气掺入的变化 (NOV001)	气掺入的变化 (NOV002)
TRLSSPTR	233	854	861	-1.00	-0.91
SPTRLAV	234	858	864	-0.19	-0.20
SPTRLAVIPWGVRKL	235	858	872	-0.13	-0.18
AVIPWGVRKL	236	863	872	-0.43	-0.60
AVIPWGVRKLLRWVRR NYGDM	237	863	883	-0.12	-0.26
AVIPWGVRKLLRWVRR NYGDM	238	863	884	-0.23	-0.42
AVIPWGVRKLLRWVRR NYGDM	239	863	885	-0.01	-0.20
IPWGVRK	240	865	871	-0.51	-0.35
IPWGVRKLLRWVRRNY GDMD	241	865	884	-0.23	-0.37
LRWVRRNYGDM	242	873	885	-0.08	-0.11
IYITASGIDDQALED	243	885	899	-0.62	-0.91
YITASGIDDQAL	244	886	897	-0.30	-0.21
YITASGIDDQALEDDRL RKYYLGKY	245	886	910	-0.90	-1.02
EDDRLRKYYLGKY	246	898	910	-0.55	-0.62
DRLRKYYLGKY	247	900	910	-0.35	-0.35
DRLRKYYLGKYLQE	248	900	913	-0.44	-0.50
IDKVRIKG	249	920	927	-0.41	-0.40
IDKVRIKGY	250	920	928	-0.37	-0.32
IDKVRIKGYYA	251	920	930	-0.44	-0.42
IDKVRIKGYYAF	252	920	931	-0.28	-0.30
DKVRIKGYYA	253	921	930	-0.45	-0.43
KVRIKGYYA	254	922	930	-0.34	-0.35
KVRIKGYYAF	255	922	931	-0.40	-0.40

序列	SEQ ID NO:	起始位置	末端位置	氘掺入的变化 (NOV001)	氘掺入的变化 (NOV002)
FKLAEEEKSKPRFGF	256	931	944	-0.83	-0.75
FKLAEEEKSKPRFGFF	257	931	945	-0.62	-0.59
KLAEEEKSKPRFGFF	258	932	945	-0.75	-0.74
FKAKSSIQF	259	949	957	-0.89	-0.88
YNKVISSRGFPFENSSR CSQTQE	260	958	981	-1.64	-1.62
SSRCSQTQENTECT	261	973	986	-1.95	-2.01

[0487] 实施例9:单克隆抗体在大鼠中的药代动力学特征

[0488] 动物和维护条件

[0489] 根据“实验动物护理和使用指南”(Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council)提供动物保健和饲养。所有程序均由美国卫生与公众服务部制定的标准进行管理,并根据Novartis East Hanover动物护理和使用委员会批准的方案CV9054进行。将雄性Sprague-Dawley大鼠(n=3/组)置于装有自动无限制供水装置的架子上的固底笼中,保持12小时光照/黑暗周期(上午6点至下午6点),并给予自由获取标准啮齿动物食物(Harlan-Teklad; Frederick, MD; cat#8604)。动物饲养所保持在68至76°F,湿度为30至70%。

[0490] NOV002或NOV004制剂和给药

[0491] 将在20mM组氨酸缓冲液(pH6.0)中的NOV002(12.00mg/mL)和NOV004(16.0mg/mL)的储备溶液冷冻运输,储存在-80°C,并在使用前在冷藏下解冻。在给药早晨,将两种抗体在20mM组氨酸缓冲液中稀释至2mg/mL,并将适当的体积吸入给药注射器(5mL/kg)中,并保持在室温直至给药。将动物置于管限制器中,并通过向尾静脉(10mg/kg)静脉内(IV)注射施用NOV002或NOV004。

[0492] 血样收集

[0493] 在第-3天(基线),第0天(给药后1和6小时)和给药后第1,2,4,7,14,21和28天收集血液样品。所有时间点从第0天给予剂量的施用结束开始计时。在每个时间点,将约0.2mL(200μL)血液用EDTA收集到BD Microtainer收集/分离器管中(Becton, Dickinson, and Company; Franklin Lakes, NJ; cat#365973)。用纱布施加压力以止血。将样品以20,817xg离心10分钟,然后将**~100μL**血浆转移至0.2mL Thermo-strip管(Thermo-Scientific; Pittsburgh, PA; 目录号AB-0451)并在80°C冷冻。每次收集后,大鼠被送回笼子。

[0494] 测量血浆总NOV002或NOV004浓度

[0495] 使用定制夹层免疫测定法用小鼠抗人IgG单克隆抗体(R10Z8E9)作为捕获抗体和具有HRP标记的山羊抗人IgG作为检测抗体对大鼠血浆中的人IgG(即NOV002或NOV004)进行定量。将捕获抗体(PBS中的2μg/mL,30μL/孔)包被在384孔白色微量滴定板(Greiner Bio-One; Monroe, NC; cat no. 781074)上。在室温(RT)下将平板温育过夜而不摇动。在不洗涤的

情况下抽吸包被溶液之后,将90 μ L的1x乳稀释剂/封闭溶液(KPL; Gaithersburg, MD; 目录号50-82-01)加入到每个孔中,并将板在室温下温育2小时。温育结束时,吸出溶液,并将板在-80°C下用干燥剂保存在箔袋中。

[0497] 在测定当天,通过在酪蛋白缓冲液(包括缓冲液阴性对照)中连续稀释制备16个NOV002或NOV004标准浓度,范围从0.15-600ng/mL。所有研究样品均在酪蛋白缓冲液中手工1:50稀释,然后使用Freedom EVO(Tecan; Mannedorf, Switzerland)连续稀释5倍,共5次稀释。将平板在RT温育2小时,以300rpm振荡,然后用磷酸盐洗涤缓冲液(90 μ L/孔)洗涤3次。将HRP标记的山羊抗人IgG(在酪蛋白缓冲液中400ng/mL,30 μ L/孔)加入到每个板中,并将板在室温下温育1小时,同时以300rpm振荡。将板用磷酸盐洗涤缓冲液(90 μ L/孔)洗涤3次,然后加入KPL LumiGLO化学发光底物(30 μ L/孔; 目录号54-61-00)。化学发光立即在SpectraMax M5平板读出器(Molecular Devices)上以50毫秒积分时间在所有波长读取。从NOV002或NOV004标准曲线内插血浆样品中的人Fc浓度(ng/mL),乘以稀释因子,并转换成nM浓度。

[0498] 动物分别在静脉内施用NOV002或NOV004后1小时显示平均C_{max}为1207和1115nM。NOV002和NOV004在Sprague-Dawley大鼠中表现出相等的PK特征(图6)。

[0499] 实施例10:在肥胖,食蟹猴中的研究

[0500] 研究了NOV002对肥胖食蟹猴中食物消耗,体重和血浆生物标志物的影响。

[0501] 方案:

[0502] 五只雄性食蟹猴用两次皮下(sc),1mg/kg剂量的间隔一周(研究第0天和第7天)施用的NOV002处理,并且剂量后评估食物消耗,体重和血浆生物标志物超过100天。对于每次剂量,将动物限制在其家笼中,收集血液样品,然后给每只动物皮下剂量1mg/kg的NOV002。食物消耗测量在第一次剂量前一周开始,并持续整个研究。在喂食之前将研究饮食称重,并且每天分成两个相等的部分。第二天早上,收集剩余的饮食并称重。计数落在收集盘中的丸粒(每个1g)的数目并加入剩余食物的重量中。每日食物消耗计算为所提供食物的重量减去收集的食物。没有测量水果和蔬菜的消耗量。每周三次早晨(血液采集或给药之前)使用秤上的动态特征重复测量非喂食体重。

[0503] 测量血浆NOV002浓度

[0504] 使用基于ELISA的夹心免疫测定法对食蟹猴血浆中的人Fc IgG进行定量。抗人IgG小鼠IgG1(抗人IgG的小鼠单克隆抗体)用作捕获抗体。用2 μ g/mL抗人-IgG小鼠IgG1(30 μ L/孔)包被白色的Greiner384-孔板并在室温(RT)温育过夜。吸出包被抗体,并在RT下以90 μ L/孔加入1x乳封闭剂(KPL#50-82-01)2小时。吸出封闭溶液并将平板在-80°C下储存在具有干燥剂的平板袋中直至测定。在测定当天,将平板和试剂带到室温。通过在定制酪蛋白样品稀释液中将纯化的IgG从4000稀释到16pM并包括缓冲液对照来制备标准品。样品用与标准品相同的稀释剂以1:50,1:250,1:1250和1:6250一式两份稀释,然后将标准品,稀释的样品和对照在RT(所有步骤的工作体积为30 μ L/孔)下加入平板。然后用磷酸盐基洗涤缓冲液洗涤平板3次。在RT下将辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗人Fc- γ 抗体加入平板1小时,然后用磷酸盐基洗涤缓冲液洗涤平板3次。将化学发光底物加入平板中,立即在发光板读数器上读板。

[0505] 每个平板一式三份测定NOV002标准品。一式两份测定稀释的血浆样品。从IgG标准曲线内插未知样品。使用SoftMax Pro软件v5.4.1进行曲线拟合,回算,%回收和样品浓度

插值。绘制通过IgG标准产生的信号并使用4参数逻辑曲线拟合选项拟合。血浆样品中的Fc浓度(pM)从NOV002标准曲线插值并乘以稀释因数。测定定量下限(LLQ)为31.250pM,定量上限(ULOQ)为4000pM。将LLQ和ULOQ定义为100%回收±20%和CV<20%的较低和较高标准浓度,然后乘以稀释因数。

[0506] 检测抗药物抗体

[0507] 将血浆样品在LowCross缓冲液(Boca Scientific; Boca Raton, FL; cat no. 100 500)中以1:5稀释。在LowCross缓冲液中制备含有0.6 μ g/mL生物素标记的NOV002和0.6 μ g/mL地高辛标记的NOV002的反应混合物。将稀释的血浆(80 μ L)与160 μ L反应混合物在96孔U底板(BD Falcon; Billerica, MA; 目录号351177)中组合。用Parafilm密封板的边缘,并将板在振荡平台上在37°C下温育2小时(150rpm, 避光)。然后将每种混合物的等分试样(100 μ L)转移到链霉亲和素包被的96孔板(Roche; 目录号11734776001)的一式两份孔中,其首先用由含0.05% (v/v) Tween-20的1XPBS组成的洗涤缓冲液洗涤三次(每孔300 μ L)。将板密封,然后在室温下在振动平台上温育1小时(300rpm, 避光)。将板用洗涤缓冲液(每孔300 μ L)洗涤3次,然后将100 μ L在LowCross缓冲液中1:2500稀释的抗洋地黄毒苷过氧化物酶_POD Fab片段(Roche; 目录号11633716001)加入到每个孔中。将板密封,在室温下在振动平台上温育45分钟(300rpm, 避光),然后用洗涤缓冲液(每孔300 μ L)洗涤3次。将TMB单组分HRP微孔底物(Bethyl Laboratories; Montgomery TX; 目录号E102; 100 μ L/孔)加入到每个孔中,并且将蓝色显色9-10分钟,避光。通过向每个孔中加入100 μ L的0.18N H₂S04终止显色反应,将板短暂振动,并在OD 450处测量黄色。

[0508] 测量血浆葡萄糖浓度

[0509] 使用Autokit Glucose测定(Wako Chemicals; Richmond, VA; 目录号439-90901)测量血浆葡萄糖浓度。通过将校准物稀释至500, 200, 100, 50, 20和0mg/dL标准来制备标准曲线。将预先加热至37°C的测定试剂(300 μ L)加入透明平底96孔板(Thermo Scientific; 目录号269620)中的2 μ L血浆,标准品和对照样品中。将平板在平板混合器上混合30秒,然后在37°C下温育5分钟。在20s混合后,使用Molecular Devices SPECTRAmax PLUS 384(Sunnyvale, CA)在505/600nm读取平板。通过与标准曲线比较来计算样品葡萄糖浓度。

[0510] 测量血浆胰岛素浓度

[0511] 使用Millipore人胰岛素特异性RIA试剂盒(Billerica, MA; 目录号HI-14K)根据生产商的说明测定血浆胰岛素浓度。将适量的测定缓冲液,标准品或稀释的血浆样品与5mL 75×12mm PP SARSTEDT管(目录号55.526)中的¹²⁵I-胰岛素和抗胰岛素抗体混合。将管涡旋,盖上,并在RT下温育20小时。温育后,加入1mL 4°C的沉淀试剂,将试管涡旋并在4°C温育30分钟。将所有管离心30分钟(4°C, 3000rpm),倒出上清液,并在PerkinElmer WIZARD2自动 γ 计数器(型号2470; PerkinElmer; Waltham, MA)上计数沉淀。通过与使用已知量的胰岛素产生的标准曲线进行比较来计算胰岛素浓度。

[0512] 测量血浆甘油三酯浓度

[0513] 使用甘油三酯(GPO)液体试剂组(Pointe Scientific; Canton, MI; 目录号T7532-500)测量血浆甘油三酯(TG)浓度。将预热的测定试剂(300 μ L, 37°C)加入透明,平底的96孔板(Thermo Fisher Scientific; Tewksbury, MA; 目录号269620)中的5 μ L血浆中。将板在平板摇床上混合30秒,然后置于37°C的培养箱中5分钟。在20秒混合后,用SPECTRAmax PLUS读

板器在500nm处测量吸光度。通过与使用已知量的TG标准 (Pointe Scientific; 目录号 T7531-STD) 产生的校准曲线进行比较来计算TG浓度。

[0514] 血浆胆固醇浓度的测量:

[0515] 使用胆固醇(液体)试剂套装 (Pointe Scientific; 目录号 C7510-500) 定量血浆总胆固醇 (TC)。将预热的测定试剂 (200 μ L, 37°C) 加入到透明平底96孔测定板 (Thermo Fisher Scientific; 目录号 269620) 中的10 μ L血浆中。将平板在平板摇床上混合30秒, 然后在37°C下温育5分钟。在20秒混合后, 在SPECTRAmax PLUS板读数器中在500nm处测量吸光度。通过与使用已知量的胆固醇标准品 (Stanbio Laboratory; Boerne, TX; 目录号 1012-030) 产生的校准曲线进行比较来计算胆固醇浓度。

[0516] 测量血浆高密度脂蛋白胆固醇浓度

[0517] 为了测定高密度脂蛋白 (HDL) 胆固醇浓度, 将50 μ L血浆样品与0.5mL微量离心管中的50 μ L胆固醇沉淀试剂 (Wako Chemicals; Richmond, VA; 目录号 431-52501) 合并, 并短暂涡旋。将管置于室温下10分钟, 然后在4°C以2000 \times g离心10分钟。离心后, 去除大约一半上清液 (包含原始血浆样品的HDL胆固醇部分), 并将10 μ L用于上述胆固醇测定。

[0518] 测量血浆 β -羟基丁酸浓度

[0519] 使用 β -羟基丁酸 LiquiColor 测试试剂盒 (Stanbio Laboratory; cat no. 2440-058) 测量血浆 β -羟基丁酸 (β -HB) 浓度。将测定试剂R1 (215 μ L预热至37°C) 加入到在透明平底的96孔平板 (Thermo Fisher Scientific; 目录号 269620) 中20 μ L的质量控制或血浆样品中。将平板在平板摇床上混合30秒, 然后置于37°C的培养箱中5分钟。预读吸光度在SPECTRAmax PLUS读板器中在505nm测量。将测定试剂R2 (35 μ L预温至37°C) 加入到每个孔中, 再次将板在平板摇床上混合30秒, 并在37°C下温育5分钟。在20秒混合后, 在505nm处测量最终吸光度, 从中减去预读取值。通过与使用已知量的 α -HB校准品 (Wako Diagnostics; Richmond, VA; 目录号 412-73791) 产生的校准曲线进行比较来计算 β -HB浓度。

[0520] 统计分析

[0521] 使用GraphPad Prism (版本6.05; GraphPad Software; La Jolla, CA) 进行统计分析。将每只动物的食物摄取数据归一化为基线的百分比 (以-6至0天的平均值计算), 然后计算平均值的组平均值 \pm 标准误 (SEM); 通过非参数弗里德曼检验和邓恩氏多重比较后检验, 将每一天与第0天进行比较。体重表示为组平均值 \pm 平均值的标准误 (SEM), 计算为基线百分比 (以第-7, -5, -3和0天的平均值计算)。原始体重和血浆生物标记物数据也通过非参数 Friedman's 检验与Dunn多重比较后检验进行分析。P<0.05被认为是显著的。

[0522] 结果

[0523] 在给予NOV002前, 对动物进行预先存在的抗药物抗体 (ADA) 的筛选, 发现所有猴子都是ADA阴性的。为了确定NOV002是否可以减少肥胖猴子的食物摄入量和体重 (平均基准体重 = 12.4 \pm 0.9kg, 其以-6天至0天的平均值计算), 每只动物接受两次皮下剂量1mg/kg NOV002, 在研究第0天和第7天相隔一周。与基线相比, NOV002显著降低了食物摄入量, 在给药后第32天平均峰值降低至基线的**-44%**。通过Friedman检验和Dunn后检验, 食物摄入量在给药后第18, 22, 24, 25, 26, 29和32天与0天相比显著较低。所有五只猴子在食物消耗方面表现出明显的减少, 但整个组中减少的食物摄入的量级和持续时间是可变的。

[0524] 整个研究中还测量了体重, 观察到给药后第67天峰值平均体重变化为-8.9%。通

过Friedman检验和Dunn后检验,体重在给药后第37天至第70天与第0天时相比显著较低。与食物摄入效应类似,在用1mg/kg NOV002处理后观察到体重变化的变化程度和持续时间,这与个体动物的食物摄取反应一致:摄食减少最多的猴子在研究期间失去最多体重。

[0525] 除了评估NOV002对食物摄入和体重的影响之外,还测试了对脂质和碳水化合物代谢的血浆生物标志物的影响。NOV002降低了血浆TG和TC浓度,在给药后第32天与基线(第-7天,第3天和第0天的平均值;Friedman检验与Dunn后检验)之间有显著差异。表3总结了在第32天对基线的所有血浆生物标志物变化。与基线相比,NOV002在研究期间的任何时间点都没有显著改变血浆高密度脂蛋白(HDL)胆固醇,β-羟基丁酸(β-HB),葡萄糖或胰岛素浓度,但NOV002在剂量后第35天显著增加血浆脂连蛋白水平。

[0526] 表3 NOV002改善血浆生物标志物水平

生物标志物	基线 ¹	第32天	平均值%Δ ²
TG (mg/dL)	227 ± 89	93 ± 35*	-53 ± 6
TC (mg/dL)	126 ± 11	96 ± 6*	-22 ± 5
HDL (mg/dL)	53 ± 9	53 ± 5	6 ± 12
β-HB (μM)	53 ± 5	115 ± 31	137 ± 77
葡萄糖 (mg/dL)	80 ± 3	76 ± 7	-10 ± 9
胰岛素 (μU/mL)	271 ± 57	124 ± 12	-40 ± 17
脂连蛋白(μg/mL)³	2.9 ± 0.6	6.0 ± 1.8*	94 ± 22

[0527] [0528] 数值代表组平均数±SEM。

[0529] [0530] 1基线值反映了第-7,-3和0天的平均值。

[0531] 2计算每个个体的百分比变化,然后对组平均值±SEM进行平均。

[0532] 3仅在一部分样品中测量了脂连蛋白水平,因此数据来自研究第0天和第35天。

[0533] [0534] *通过非参数Friedman检验与Dunn后检验,与基线相比*P<0.05。

[0535] 在整个研究期间,在不同时间点(例如,第1,2,3,4,7天(在给药之前和给药后6小时),从第11天到第81天每周两次,然后每周一次测试ADA形成。在筛选前没有猴子展示NOV002ADA,但是在研究期间,有三只动物对NOV002发生ADA。NOV002PK谱图在ADA阳性和ADA阴性动物之间似乎不是不同的。

[0536] NOV002有效地降低了肥胖食蟹猴的食物摄入量和体重。在用两次皮下剂量1mg/kg NOV002处理的动物中,观察到以下情况:给药后第67天峰值体重降低8.9%,但食物摄入量和体重的减少在各动物之间变化。体重减轻伴随血浆TG和TC浓度降低,显示NOV002对血浆脂质谱的有益效果。这些数据表明,NOV002有效降低食物摄入量,体重和血浆TG和TC浓度;表明NOV002及其变体如NOV004,包含NOV002或NOV004的CDR的其它抗β-klotho抗体,以及与NOV002结合相同表位(例如与一种或更多种表2中列出的受保护的肽结合的抗体)或与NOV002竞争的其它抗β-klotho抗体,将是代谢病症(例如肥胖症)的有效新疗法。

[0537] 并入作为参考

[0538] 本文引用的所有参考文献,包括专利,专利申请,论文,教科书等,以及其中引用的

参考文献,在它们尚未被引用的范围内,都通过引用整体并入本文。

[0537] 等同方案

[0538] 前述书面的说明书被认为足以使本领域技术人员能够实施本发明。前面的描述和实施例详细描述了本发明的某些优选实施方案,并描述了发明人所设想的最佳方式。然而,应该理解的是,无论文中如何详述上述内容,本发明都可以以多种方式实施,并且本发明应该根据所附权利要求及其任何等同方案来解释。

<211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 4
 Arg Ile His Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 5
 Leu Leu Leu Arg Ser Tyr Gly Met Asp Asp
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 6
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 1 5
 <210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 7
 His Pro Gly Ser Gly Asn
 1 5
 [0002] <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 8
 Leu Leu Leu Arg Ser Tyr Gly Met Asp Asp
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽
 <400> 9
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 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 Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile His Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Leu Leu Leu Arg Ser Tyr Gly Met Asp Asp Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 10
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸

<400> 10
 cagggtcagtc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac cccggcagcag cgtgaaggtg
 tcctgcagg ccagggctca cacctttacc gactactaca tcaactgggt gcccgaggcc
 cctggacagc gcttggaaat gatgggaga atccaccccg gtcggccaa cactactac
 aacggagaatg tccaggccag agtgaccctg accggccgaca agagcaccag caccggctac
 atggaaactga gcagggctcg gaggcaggac accggcgtgt actactgtgc catctgtcg
 ctggggactc acggcatgga tgattgggc cagggccca cctgtaccgt cagctca
 <210> 11
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽
 <400> 11
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 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 Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile His Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Leu Leu Leu Arg Ser Tyr Gly Met Asp Asp Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

〈210〉 12
〈211〉 1347
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸
 <400> 12
 caggtcagc tggtcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac cggcagcac cgtgaagggtg 60
 tcctgcagg ccagggcta caccttacc gactactaca tcaactgggt ggcgcaggcc 120
 cctggacagg gccttgaatg gatggcaga atccaccccg gctccggcaa caccctactac 180
 aacgagaagt tccaggcag agtaccctg accggcaca agagcaccag caccgcctac 240
 atggaactga gcagcctgca gaggcaggac accggcgtg actactgtgc catccgtctg 300
 ctgcggagct acggcatgta tgatggggc cagggcaca cctgcacgt cagtcacgt 360
 agacaccaagg gccccagct gtcccccctg gccccagca gcaagagcac cagcggcgc 420
 acacccgccc tgggtgcct ggtgaaggac tactccccc agccctgtac cgtgtccctgg 480
 aacagcggag ccctgaccc cggcgtcaca acctccccc cctgtctca gaggcagcgc 540
 ctgtacagcc tggcagctg ggtgacagtg cccagcaga gcctgggcac ccagacactac 600
 atctgcaacg tgaaccacaa gcccacaa accaaagggtg acaagaggt ggagcacaag 660
 agctgcaca agacccacac ctgcacccccc tgcccgcc cagggcage gggcggacc 720
 tcctgttcc tggcccccc caagccccaa gacaccctgatcagcc gaccccccag 780
 gtgacctgca ggttggtgca cttgtgaccc gaggacccag aggtgaagtt caactgttac 840
 gtggacggcg tggagggtgca caacgccaag accaagccca gagaggagca gtacaacagc 900
 actacaggg tgggtccctg gctgaccgtg ctgcacccagg actggctgaa cggcaaggaa 960
 tacaagtggca aggttcccaaa caaggccctt ccagccccca tgaaaaagac catcagcaag 1020
 gccaaggcggc agccacggg gccccaggta tacaccctgc cccctcccg ggaggagatg 1080
 accaaagaacc aggtgtccct gacccctgtc gtgaaaggct tctaccctcg cgacatcgcc 1140
 gtggagggtgg agagcaacgg ccagcccgag aacaactaca agaccacccc cccagtgctg 1200
 gacagcgaacg gcaagttctt cctgtacagc aagtgaccg tggacaagtc caggtggcag 1260
 caggcgaacg tggcagctg cagccgtatg cacgaggccc tgcacaacca ctacacccag 1320
 aagacccctgaa ccgtgtcccc cggcaag 1347
 <210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 13
 Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15
 <210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 14
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 15
 Phe Gln Gly Ser His Ile Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 16
 Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 17
 Lys Val Ser
 1
 <210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 18
 Gly Ser His Ile Pro Tyr
 1 5
 <210> 19
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽
 <400> 19
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 20
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸
 <400> 20
 gacgtgttga tgacccagac ccccttgac ctgagcgtga caccctggaca gcctggcage 60
 atctcctgca agagcagccca gagcatcgta cacagcagcg gcaacaccta cctggaaatgg 120
 tatactgcaga agccccggcca gagccccccag ctgtgtatc acaagggttc caaccgggttc 180
 agccggcgttc cggacagatt ttctggcagc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
 tccgggttgg aagccggagg cgtggcggtg tactactttt ttcaaggctc ccacatcccc 300
 tacacccctcg gccaggccac caagctggaa atcaag 336

[0005]
 <210> 21
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽
 <400> 21
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 22
 <211> 657
 <212> DNA

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸
 <400> 22
 gacgtggta tgaccagac cccctgagc ctgagcgta cacctggaca gcctggcagc 60
 atctctgca agagcagcca gagcatcgta cacagcagcg gcaacacta cctggaatgg 120
 tatctgcaga agccggcca gagccccag ctgctgatc acaagggttc caaccgggtc 180
 agcggcgtgc ccgacagatt ttctggcagc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
 tccgggtgg aagccggaga cgtggcggt tactactgtt tcgaaggctc ccacatcccc 300
 tacacccctcg gccaggccac caagctggaa atcaagcgta cggggccgc tcccgatgt 360
 ttcatcttcc ccccccggca cgacgatgt aagagccgcg cggccagcgt ggtgtccctg 420
 ctgaacaact tctaccccccggaggccaag gtgcagtggaa aggtggacaa cggccctgcag 480
 agccggcaaca gccaggagag cgtaccggag caggacaga aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc tgacccttag caaggccgac tacgagaagc ataagggtta cgcctgcgag 600
 gtgaccacc accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657
 <210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 23
 Ser Gly Tyr Thr Trp His
 1 5
 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 24
 Tyr Ile His Tyr Ser Val Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 25
 Arg Thr Thr Ser Leu Glu Arg Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 26
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr
 1 5
 <210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 27
 His Tyr Ser Val Tyr
 1 5
 <210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 28
 Arg Thr Thr Ser Leu Glu Arg Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽
 <400> 29

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	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Gly	
	20						25					30				
Tyr	Thr	Trp	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
	35						40				45					
Leu	Ser	Tyr	Ile	His	Tyr	Ser	Val	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Val	
	50						55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ala	Lys	Asn	Ser	Phe	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	Arg	Thr	Thr	Ser	Leu	Glu	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	
	100						105				110					
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
	115						120									
<210>	30															
<211>	360															
<212>	DNA															
<213>	人工序列															
<220>																
<223>	人工序列的描述: 合成的多核苷酸															
<400>	30															
gaggtgcagc	tgggtgaatc	tggcgccgga	ctcgtaaagc	ctggcgctc	tctgagactg							60				
agtctgtgcgg	tgtccggcta	cagcatcacc	agcggctaca	cctggcattg	ggtgcccgag							120				
gccctggca	aaggactgga	atggctgtcc	tacatccact	acagcggtta	caccaactac							180				
aaccccgagc	tgaaggccg	gttaccatc	agcagagaca	ccgccaagaa	cagcttctac							240				
ctgcaaatga	acagcctgcg	ggccgaggac	accgcgtgt	actactgtgc	cagacggacc							300				
accagcctgg	aacggtaatt	cgacgtgtgg	ggccaggcga	cactcgtgac	cgtcagctca							360				
<210>	31															
<211>	450															
<212>	PRT															
<213>	人工序列															
<220>																
<223>	人工序列的描述: 合成的多肽															
<400>	31															
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	
1			5				10					15				
[0007]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Gly
	20						25				30					
Tyr	Thr	Trp	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
	35						40				45					
Leu	Ser	Tyr	Ile	His	Tyr	Ser	Val	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Val	
	50						55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ala	Lys	Asn	Ser	Phe	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	Arg	Thr	Thr	Ser	Leu	Glu	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	
	100						105			110						
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Pro	Ser	Val		
	115						120			125						
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala		
	130						135			140						
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145						150			155			160			
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
	165						170			175						
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
	180						185			190						
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys		
	195						200			205						
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
	210						215			220						
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	
	225						230			235			240			
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
	245						250			255						
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
	260						265			270						
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
	275						280			285						
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
	290						295			300						
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305						310			315			320			

<211> 7				
<212> PRT				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 人工序列的描述: 合成的肽				
<400> 36				
Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr				
1 5				
<210> 37				
<211> 3				
<212> PRT				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 人工序列的描述: 合成的肽				
<400> 37				
Tyr Thr Ser				
1				
<210> 38				
<211> 6				
<212> PRT				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 人工序列的描述: 合成的肽				
<400> 38				
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr				
1 5				
<210> 39				
<211> 107				
<212> PRT				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽				
<400> 39				
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly				
1 5 10 15				
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser 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 Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly				
50 55 60				
Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro				
65 70 75 80				
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr				
85 90 95				
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys				
100 105				
<210> 40				
<211> 321				
<212> DNA				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸				
<400> 40				
gacatccaga tgacctcagag cccacgcgc ctgtctgcca gcgtggcga cagagtgacc	60			
atcacctgtc aggccagcca ggacatcgc aactacctgta actgttatca gcagaagccc	120			
ggcaaggccc ccaagctgt gatctactac accacgcgc tgccagccgg cgtgcgcgc	180			
agatttaccc gctctggaa cggagccgc tacaccttca ccatcgcctc cctgcgcgc	240			
gaggatatcg ctacactt ctgtcagcaa ggcaacaccc tgccttacac cttcgccag	300			
ggcaccaagc tggaaatcaa g	321			
<210> 41				
<211> 214				
<212> PRT				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽				
<400> 41				
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly				
1 5 10 15				
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser 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 Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly				
50 55 60				
Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro				

65	70	75	80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln	Gly Asn Thr Leu Pro Tyr		
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
100	105	110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
115	120	125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
180	185	190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210			
<210> 42			
<211> 642			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸			
<400> 42			
gacatccaga tgacccagag cccagcagc ctgtctgcca gcgtggcga cagagtgacc		60	
atcacctgtc aggcaggcca ggacatcagc aactaccta actgttatca gcagaagccc		120	
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagac tgcagagcgg cgtgcccagc		180	
agatttaccc gctcttggaa cggagccgac tacaccttc ccatcagctc cctgcagccc		240	
gaggatatacg ctacacttctt ctgtcagcaa ggcaacaccc tgccttacac cttcgccag		300	
ggcacaaga tggaaatcaa cgatcggtt ggcgttccca cgatgttcat cttccccccc		360	
agcgacgagc agctgaagag cggccggccc agcgtgggt gcctgctgaa caacttctac		420	
ccccggggagg ccaaggtgca gtggaaagggtg gacaacgcgc tgccagcgg caacagccag		480	
gagagcgtca ccggaggcaga cagcaaggac tccacactaca gcctgagcag caccctgacc		540	
ctgagcaagg cggactacga gaagcataag gtgtacgct gcgagggtgac ccaccaggc		600	
ctgtccagcc cgatcgacaa gagttcaac agggcggagt gc		642	
[0010]			
<210> 43			
<211> 5			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的肽			
<400> 43			
Asp Tyr Tyr Ile Asn			
1	5		
<210> 44			
<211> 17			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的肽			
<400> 44			
Arg Ile His Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Gln			
1	5	10	15
Gly			
<210> 45			
<211> 10			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的肽			
<400> 45			
Leu Leu Leu Arg Ser Tyr Gly Met Asp Asp			
1	5	10	
<210> 46			
<211> 7			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的肽			
<400> 46			
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
1	5		

<210> 47
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 47
 His Pro Gly Ser Gly Asn
 1 5
 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 48
 Leu Leu Leu Arg Ser Tyr Gly Met Asp Asp
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽
 <400> 49
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 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 Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile His Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Leu Leu Leu Arg Ser Tyr Gly Met Asp Asp Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 50
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸
 <400> 50
 caagtccaa ac tgcgtccagtc cggagccgaa gtgaaaaaagc cgggctcata agtgaagggt
 tcctgcagg cgtcgggcta cacccacc gactactaca tcaactgggt ggcgcaggcc
 ccggggacagg gtctggaaat gatggggagg attcaccccg gatcgggaaa cacttactac
 aacgagaatgt tccaggccagc agtgcacccgt actgcgcaca agtccacgtc cactgcctac
 atggaaactgt cgtccctgcg gtccggaggat accgcgcgt actattgtgc gatccctgcgt
 ttgcggaggat acgggatgga tgactggggc cagggtacca ctgtactgt gtccacgc
 <210> 51
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽
 <400> 51
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 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 Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile His Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Leu Leu Leu Arg Ser Tyr Gly Met Asp Asp Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115	120	125	
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly	Thr Ala Ala Leu		
130	135	140	
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val	Thr Val Ser Trp		
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe	Pro Ala Val Leu		
165	170	175	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val	Thr Val Pro Ser		
180	185	190	
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val	Asn His Lys Pro		
195	200	205	
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys	Ser Cys Asp Lys		
210	215	220	
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu	Leu Gly Gly Pro		
225	230	235	240
Ser Val Phe Leu Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	Met Ile Ser		
245	250	255	
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ala Val Ser	His Glu Asp		
260	265	270	
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	Glu Val His Asn		
275	280	285	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	Thr Tyr Arg Val		
290	295	300	
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	Asn Gly Lys Glu		
305	310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala	Pro Ile Glu Lys		
325	330	335	
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro	Gln Val Tyr Thr		
340	345	350	
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln	Val Ser Leu Thr		
355	360	365	
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	Glu Trp Glu		
370	375	380	
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	Pro Val Leu		
385	390	395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	Val Asp Lys		
405	410	415	
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu		
420	425	430	
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser	Leu Ser Pro Gly		
435	440	445	
Lys			

<210> 52

<211> 1347

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸

<400> 52

caagtccaaac tcgtccagtc cggagccgaa	gtgaaaaaagc cgggctcatc	agtgaagggt	60
tccctgcaagg cgtcgggcta cacccttacc	gactacta tcaactgggt	gcccaggcc	120
ccgggacagg gtcggatgc	attcaccccg	gatcgaaaaa	180
aacgagaaggat tccaggccag	actgaccctg	caccctactac	240
atggaaactgt cgtccctgcg	gtccggaggat	agtccacgt	300
ttggcgagct acgggatgga	accgcgtgt	actattgtc	360
tgactggga	gatccggat	gatctcgctg	420
cagggtacca	ctgtgactgt	gtccagcgct	480
agacccaagg gcccctccgt	gttccctctg	ctccggccgc	540
ttcccttca	gcaagtctac	ctccggccgc	600
acagctgctc	tgggctgcct	acttccctg	660
acacttggcg	ggtaaggac	agccgtgac	720
ccctgacactc	acttccctg	agtgtctgg	780
ctgtactccc	ccgtgtgcac	acccgtgtca	840
tgtctccgt	acccgtgtca	gtccctccgc	900
atctgcaacg	cccttcaac	gtccctccgc	960
tgaaccacaa	accaagggtt	ccagacccat	1020
tcctcgacaca	acaagggtt	atctccaa	1080
agacccacac	cccttccccc	tcgaaaagac	1140
gttgcaccc	tcgtccccc	aatctccaa	1200
gttgcaccc	tcgtccccc	tcgtccccc	1260
gttgcaccc	tcgtccccc	tcgtccccc	1320
gttgcaccc	tcgtccccc	tcgtccccc	1347

<210> 53

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 53
 Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15
 <210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 54
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 55
 Phe Gln Gly Ser His Ile Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 56
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 56
 Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 57
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 57
 Lys Val Ser
 1
 <210> 58
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 58
 Gly Ser His Ile Pro Tyr
 1 5
 <210> 59
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽
 <400> 59
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 60
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸			
<400> 60			
gatgtcgta tgacccagac tccgctgtcc ctgtccgtga cccctggaca gccccgtct	60		
atctcgta agagctcca gtccattgtg cattcaagcg ggaacaccta tctggagtgg	120		
tacccctcaga agccctggcca gagccccacag ctgtcgatct acaaagtgtc gaacagattc	180		
tccgggtgtcc cggacccgtt ctccggctcg ggaagcggca ctgactttac actgaagatc	240		
tcacgggtgg aagccgagga cgtgggagtg tactactgtt tccaagggtc ccacattccc	300		
tacacccctcg gccaaggaaac taactggaa atcaagcgta cgggtggccgc tcccaagcgtg	336		
<210> 61			
<211> 219			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽			
<400> 61			
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly			
1 5 10 15			
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser			
20 25 30			
Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
35 40 45			
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
50 55 60			
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65 70 75 80			
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly			
85 90 95			
Ser His Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100 105 110			
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu			
115 120 125			
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe			
130 135 140			
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln			
145 150 155 160			
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
165 170 175			
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu			
180 185 190			
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser			
195 200 205			
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210 215			
<210> 62			
<211> 657			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸			
<400> 62			
gatgtcgta tgacccagac tccgctgtcc ctgtccgtga cccctggaca gccccgtct	60		
atctcgta agagctcca gtccattgtg cattcaagcg ggaacaccta tctggagtgg	120		
tacccctcaga agccctggcca gagccccacag ctgtcgatct acaaagtgtc gaacagattc	180		
tccgggtgtcc cggacccgtt ctccggctcg ggaagcggca ctgactttac actgaagatc	240		
tcacgggtgg aagccgagga cgtgggagtg tactactgtt tccaagggtc ccacattccc	300		
tacacccctcg gccaaggaaac taactggaa atcaagcgta cgggtggccgc tcccaagcgtg	360		
ttcatcttcc ccccccagcga cgacgcgtg aagagcggca cccgcgcgt ggtgtgcctg	420		
ctgaacaact tctacccccc ggaggccaaag gtgcagtggaa aggtggacaa cgcgcctgcag	480		
agccgcacaa gcccggagag cgtcaccggag caggacagaaggactccac ctacacgcctg	540		
agcagcaccc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc ataagggtta cgcgcgtcg	600		
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc	657		
<210> 63			
<211> 6			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的肽			
<400> 63			
Ser Gly Tyr Thr Trp His			
1 5			
<210> 64			
<211> 16			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			

<223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 64
 Tyr Ile His Tyr Ser Val Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 65
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 65
 Arg Thr Thr Ser Leu Glu Arg Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 <210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 66
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr
 1 5
 <210> 67
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 67
 His Tyr Ser Val Tyr
 1 5
 <210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 68
 Arg Thr Thr Ser Leu Glu Arg Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 <210> 69
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽
 <400> 69
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Thr Trp His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Leu Ser Tyr Ile His Tyr Ser Val Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ala Lys Asn Ser Phe 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 Arg Thr Thr Ser Leu Glu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 70
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸
 <400> 70
 gaagtccaaac tcgtcgaatc cggcgccgga ctggtaagc cgggaggatc gctgagactg 60
 tcgtgcgcag tgtcagggtta cagcatcacc tccggttaca cctggactg ggtcagacag 120
 ggcgcggaa aaggcctgga atggctgtc tacattcatt actccgtta cactaactac 180
 aaccctcag tgaaggggcg gtteaccatc tcccggtaca ctgccaagaa tagcttctat 240
 ctgcaaatga actccctgcg ggccgaggat accggcgtgt actactgcgc gaggcgcacc 300
 acgtccctgg agcgctactt tgacgtgtgg ggccagggtt ccctcgtgac tgcgtccctcg 360

<210>	71			
<211>	450			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	人工序列的描述：合成的多肽			
<400>	71			
	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 Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly				
20	25	30		
Tyr Thr Trp His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp				
35	40	45		
Leu Ser Tyr Ile His Tyr Ser Val Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val				
50	55	60		
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ala Lys Asn Ser Phe 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 Arg Thr Thr Ser Leu Glu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln				
100	105	110		
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val				
115	120	125		
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala				
130	135	140		
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser				
145	150	155	160	
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val				
165	170	175		
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro				
180	185	190		
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys				
195	200	205		
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp				
210	215	220		
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly				
225	230	235	240	
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile				
245	250	255		
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu				
260	265	270		
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His				
275	280	285		
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg				
290	295	300		
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys				
305	310	315	320	
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala Pro Ile Glu				
325	330	335		
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr				
340	345	350		
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu				
355	360	365		
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp				
370	375	380		
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val				
385	390	395	400	
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp				
405	410	415		
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His				
420	425	430		
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro				
435	440	445		
Gly Lys				
450				
<210>	72			
<211>	1350			
<212>	DNA			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	人工序列的描述：合成的多核苷酸			
<400>	72			
gaagtccaaac tcgtcgaatc cggccggcga ctggtaaagc cgggaggatc gctgagactg			60	
tctgtgcgcag tgcgtcggta cagcatcacc tccgggtaca cctggactg ggtcagacag			120	
gcgcgggaa aaggcctgga atggctgtcc tacattcatt actccgtgt aactaactac			180	

aaccctcg tgaaggggcg gttcaccatc tccgggaca ctgccaagaa tagcttctat	240
ctgcaatga actccctcg ggcgaggat accgcgtgt actactgcgc gaggcgacc	300
acgtccctgg agcgctactt tgacgtgtgg ggcagggtt ccctcggtac tgtgtccctcg	360
getagcacca agggccctc cgtgtccct ctggccctt ccagcaagtc tacctccggc	420
ggcacagctg ctctggctg cctgtcaag gactacttc ctgacgtgt gacagtgtcc	480
tggaaactctg gcgcctgac ctctggcggtg cacacttcc ctgcgtgtgc gcagtcctcc	540
ggcctgtact ccctgtccctc cgtgtcaca gtgecttcaa gcagcctggg caccaggacc	600
tataatctgca acgtgaacca caaggcttcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggagcct	660
aagtccctcg acaagaccca caccgttctt ccctgcctt ctccgtact gctggccgac	720
ccttctgtgt tctgtgttccc tccaaagccc aaggacaccc tcatgtatcc cgggacccct	780
gaagtgcacccgt ggcgtgtggt ggcgtgttccc caccgttccctc cgggacccct	840
taagtggacccgt ggcgtggaggt gcacaacgc aagaccaage ctcgggagga acagtaaac	900
tccacctacc ggggtgtgtc cgtgtgtacc gtgtgcacc aggactggt gaaacggcaaa	960
gaggtacaagt gcaaggcttc caacaaggccc ctggccccc ctatcgaaaa gacaatctcc	1020
aaggcccaagg gccaggcttag ggaacccccc gttgtacaccc tgccaccccg ccgggaggaa	1080
atgaccaaga accagggttcc cctgtgttccctt ctggtaagg gtttcttcc ttccgatatc	1140
gcgtggaggt gggagtctaa cggccagctt gagaacaact acaagaccac ccctctgtg	1200
ctggactccg acggcttccctt ctgtgttccctt tccaaacttga ccgtggacaa gtcccggtgg	1260
cacggggca acgtgttccctt ctgtgttccctt atgcacggg ccctgcacaa ccactacacc	1320
cacgggtccctt tccctgttccctt tccggcaag	1350
<210> 73	
<211> 11	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的肽	
<400> 73	
Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn	
1 5 10	
<210> 74	
<211> 7	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的肽	
<400> 74	
Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser	
1 5	
<210> 75	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的肽	
<400> 75	
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr	
1 5	
<210> 76	
<211> 7	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的肽	
<400> 76	
Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr	
1 5	
<210> 77	
<211> 3	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的肽	
<400> 77	
Tyr Thr Ser	
1	
<210> 78	
<211> 6	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的肽	
<400> 78	
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr	
1 5	
<210> 79	
<211> 107	

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽
 <400> 79
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser 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 Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 80
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸
 <400> 80
 gatattcaga tgactcagag cccctcctcg ctctccgcct ccgtggggga tcgcgtgaca 60
 atcacctgtc aagcgccca ggacatctca aactacctga actgttatca gcagaagccca 120
 gggaggcccc cgaagctgtct gatctactac acttcgcgcg tcgactccgg cgtgcggctca 180
 cggttcaactg gctcgggctc cggagcagac tacaccttca ccatttagcag cctgcagcccc 240
 gggacatcg ctacactt ttgccaacaa gggaaacaccc tgccttacac cttcggacag 300
 ggtactaagg tggaaatcaa a 321
 <210> 81
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽
 <400> 81
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser 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 Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 82
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸
 <400> 82
 gatattcaga tgactcagag cccctcctcg ctctccgcct ccgtggggga tcgcgtgaca 60

atcacctgtc aagcgtccca ggacatctca aactacctga actggtatca gcagaagcca	120
ggaaggccc cgaagctgt gatctactac acttcgcggc tgcaactccg cgtccgtca	180
cggttactg gctccggcgt cggagcagac tacacccca ccattagccg cctgcagccc	240
gaggacatcg ctacactt ttgecaacaa gaaacaccc tgccttacac cttcgacag	300
ggtaactaagc tgaaatcaa acgtacgggt ggcgtccca gctgttcat cttcccccc	360
agcgacgacg agctgaagag cggacccgcg akgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
ccccgggagg ccaagggtca gtgaaagggt gacaacgcgc tgcagagccg caacagccg	480
gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagccg caccctgacc	540
ctgagcaagg cgcactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgagggtac ccaccaggc	600
ctgtccagcc ecgtgacca gagttcaac agggcgagt gc	642
<210> 83	
<211> 181	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 83	
His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val	
1 5 10 15	
Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His	
20 25 30	
Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser	
35 40 45	
Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln	
50 55 60	
Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly	
65 70 75 80	
Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg	
85 90 95	
Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His	
100 105 110	
Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro	
115 120 125	
Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro	
130 135 140	
Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val	
145 150 155 160	
Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser	
165 170 175	
Pro Ser Tyr Ala Ser	
180	
<210> 84	
<211> 546	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 84	
cacccatccc ctgactccag tcctctctgt caattcgccc gccaagtccg gcagcggtac	60
ctctacacag atgatgccc gcagacagaa gcccacctgg agatcaggaa ggtatggacg	120
gtggggggcg ctgtgtacca gagccccgaa agtctctgc agtgaagacg cttgaagccg	180
ggagttttcc aatattttgg agtcaagaca tccagggttcc tggccacgc gccagatgg	240
gcccgtatgt gatcgctcca ctttgaccct gaggtccgtca gcttccggaa gctgttctt	300
gaggacggat acaatgttta ccagtccgaa gcccacggcc tcccgctgca cttgtccagg	360
aacaagtccc cacacccggaa ccgtgcaccc cgaggaccag ctcgttcttcc gccactacca	420
ggcttgcggcc cgcactccc ggacccaccc ggaatctgg ccccccagcc ccccgatgtg	480
ggcttctgg accctcttag catgtggaa ctttccagg gccgaaggcc cagctacgct	540
tcctgtca	546
<210> 85	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述：合成的肽	
<400> 85	
Phe Ser Gly Asp Gly Arg Ala Ile Trp	
1 5 10	
<210> 86	
<211> 11	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述：合成的肽	
<400> 86	
Phe Leu Tyr Asp Thr Phe Pro Lys Asn Phe Phe	
1 5 10	
<210> 87	
<211> 7	
<212> PRT	
<213> 人工序列	

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 87
 Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr
 1 5
 <210> 88
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 88
 Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr Gly Ala Leu
 1 5 10
 <210> 89
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 89
 Gly Ile Gly Thr Gly Ala Leu Gln
 1 5
 <210> 90
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 90
 Gln Val Glu Gly Ser Trp Lys Lys Asp Gly Lys Gly Pro Ser Ile Trp
 1 5 10 15
 Asp His Phe
 <210> 91
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 91
 Leu Glu Lys Asp Leu Ser Ala
 1 5
 <210> 92
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 92
 Leu Glu Lys Asp Leu Ser Ala Leu
 1 5
 <210> 93
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的多肽
 <400> 93
 Ser Ala Leu Asp Phe Ile Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser
 1 5 10 15
 Trp Pro Arg Leu Phe Pro Asp Gly Ile Val Thr Val Ala Asn
 20 25 30
 <210> 94
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 94
 Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu
 1 5
 <210> 95
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 95
 Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro Asp Gly Ile Val Thr
 1 5 10
 <210> 96
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 96
 Phe Pro Asp Gly Ile Val Thr
 1 5
 <210> 97
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 97
 Val Ala Asn Ala Lys Gly Leu Gln
 1 5
 <210> 98
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 98
 Val Ala Asn Ala Lys Gly Leu Gln Tyr
 1 5
 <210> 99
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 99
 Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr
 1 5 10
 <210> 100
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 100
 Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr
 1 5 10
 <210> 101
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 101
 Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr
 1 5
 <210> 102
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 102
 Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr Leu
 1 5
 <210> 103
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 103
 Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Ala Leu

1 5 10
 <210> 104
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 104
 Ile Phe Asn Asp Tyr Ala Thr
 1 5
 <210> 105
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 105
 Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Cys
 1 5
 <210> 106
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 106
 Cys Phe Gln Met Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr
 1 5 10
 <210> 107
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 107
 Phe Gln Met Phe Gly Asp Arg Val Lys
 1 5
 <210> 108
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 108
 Phe Gln Met Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr
 1 5 10
 <210> 109
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 109
 Val Ala Trp His Gly Tyr Gly Thr Gly Met His Ala Pro Gly Glu Lys
 1 5 10 15
 Gly Asn Leu
 <210> 110
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 110
 Ala Trp His Gly Tyr Gly Thr Gly Met His Ala Pro Gly Glu Lys Gly
 1 5 10 15
 Asn Leu
 <210> 111
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 111
 Trp His Gly Tyr Gly Thr Gly Met His Ala Pro Gly Glu Lys Gly Asn

1	5	10	15
Leu			
<210> 112			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的肽			
<400> 112			
Trp His Gly Tyr Gly Thr Gly Met His Ala Pro Gly Glu Lys Gly Asn			
1 5 10 15			
Leu Ala Ala			
<210> 113			
<211> 16			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的肽			
<400> 113			
His Gly Tyr Gly Thr Gly Met His Ala Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu			
1 5 10 15			
<210> 114			
<211> 10			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的肽			
<400> 114			
Tyr Thr Val Gly His Asn Leu Ile Lys Ala			
1 5 10			
<210> 115			
<211> 29			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的肽			
<400> 115			
[0023]			
Tyr Thr Val Gly His Asn Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His			
1 5 10 15			
Asn Tyr Asn Thr His Phe Arg Pro His Gln Lys Gly Trp			
20 25			
<210> 116			
<211> 30			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽			
<400> 116			
Tyr Thr Val Gly His Asn Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His			
1 5 10 15			
Asn Tyr Asn Thr His Phe Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu			
20 25 30			
<210> 117			
<211> 28			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的肽			
<400> 117			
Val Gly His Asn Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr			
1 5 10 15			
Asn Thr His Phe Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu			
20 25			
<210> 118			
<211> 27			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的肽			
<400> 118			
Gly His Asn Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asn			
1 5 10 15			
Thr His Phe Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu			
20 25			

<210> 119
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 119
 Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asn Thr His Phe
 1 5 10 15
 Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu
 20
 <210> 120
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 120
 Ser Ile Thr Leu Gly Ser His
 1 5
 <210> 121
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 121
 Ser Ile Thr Leu Gly Ser His Trp Ile Glu Pro Asn Arg Ser Glu Asn
 1 5 10 15
 Thr Met Asp
 <210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 122
 Ile Phe Lys Cys Gln Gln Ser Met Val
 1 5
 <210> 123
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 123
 Phe Lys Cys Gln Gln Ser Met
 1 5
 <210> 124
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 124
 Lys Cys Gln Gln Ser Met Val
 1 5
 <210> 125
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 125
 Phe Ala Asn Pro Ile His Gly Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Gly
 1 5 10
 <210> 126
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 126
 Phe Ala Asn Pro Ile His Gly Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Gly Met Arg
 1 5 10 15

Lys Lys Leu
 <210> 127
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 127
 Phe Ala Asn Pro Ile His Gly Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Gly Met Arg
 1 5 10 15
 Lys Lys Leu Phe
 20
 <210> 128
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 128
 Leu Pro Ile Phe Ser Glu Ala Glu Lys His Glu Met Arg Gly Thr
 1 5 10 15
 <210> 129
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 129
 Pro Ile Phe Ser Glu Ala Glu Lys His Glu Met Arg Gly Thr Ala Asp
 1 5 10 15
 <210> 130
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 130
 [0025] Pro Ile Phe Ser Glu Ala Glu Lys His Glu Met Arg Gly Thr Ala Asp
 1 5 10 15
 Phe
 <210> 131
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 131
 Ser Glu Ala Glu Lys His Glu Met Arg Gly Thr Ala Asp Phe
 1 5 10
 <210> 132
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 132
 Ala Glu Lys His Glu Met Arg Gly Thr Ala Asp Phe
 1 5 10
 <210> 133
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 133
 Glu Lys His Glu Met Arg Gly Thr Ala Asp Phe
 1 5 10
 <210> 134
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 134
 Phe Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe
 1 5 10
 <210> 135
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 135
 Phe Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Lys Pro Leu Asn Thr
 1 5 10 15
 <210> 136
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 136
 Phe Gly Pro Asn Asn Phe Lys Pro Leu Asn Thr
 1 5 10
 <210> 137
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 137
 Phe Gly Pro Asn Asn Phe Lys Pro Leu Asn Thr Met
 1 5 10
 <210> 138
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 138
 Asn Leu Arg Glu Ala Leu Asn
 1 5
 <210> 139
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 139
 Ile Lys Leu Glu Tyr Asn Asn Pro Arg Ile Leu
 1 5 10
 <210> 140
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 140
 Glu Tyr Asn Asn Pro Arg Ile Leu
 1 5
 <210> 141
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 141
 Phe Thr Asp Ser Arg Val Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala
 1 5 10
 <210> 142
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 142
 Asp Ser Arg Val Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala
 1 5 10

<210> 143
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 143
 Asp Thr Thr Ala Ile Tyr Met Met Lys Asn Phe
 1 5 10
 <210> 144
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 144
 Tyr Met Met Lys Asn Phe Leu
 1 5
 <210> 145
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 145
 Met Met Lys Asn Phe Leu Ser Gln Val Leu Gln Ala
 1 5 10
 <210> 146
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 146
 Met Lys Asn Phe Leu Ser Gln Val Leu Gln Ala
 1 5 10
 <210> 147
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 147
 Gln Ala Ile Arg Leu Asp Glu
 1 5
 <210> 148
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 148
 Asp Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala
 1 5 10
 <210> 149
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 149
 Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala
 1 5
 <210> 150
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 150
 Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu
 1 5 10
 <210> 151
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 151
 Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Leu
 1 5
 <210> 152
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 152
 Asp Gly Phe Glu Trp Gln Asp Ala
 1 5
 <210> 153
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 153
 Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr
 1 5
 <210> 154
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 154
 Tyr Thr Ile Arg Arg Gly Leu Phe
 1 5
 <210> 155
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 155
 [0028] Thr Ile Arg Arg Gly Leu Phe
 1 5
 <210> 156
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 156
 Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr
 1 5 10 15
 <210> 157
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 157
 Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Lys Gln Ile Ile Arg Glu
 20
 <210> 158
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 158
 Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn Gly
 20
 <210> 159
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 159
 Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn Gly Phe
 20 25
 <210> 160
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 160
 Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn Gly Phe Ser
 20 25
 <210> 161
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 161
 Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr Tyr Lys
 1 5 10 15
 Gln Ile Ile Arg Glu
 20
 <210> 162
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 162
 Tyr Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn Gly
 1 5
 <210> 163
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 163
 Phe Ser Leu Lys Glu Ser Thr Pro Asp Val Gln Gly Gln Phe Pro Cys
 1 5 10 15
 Asp
 <210> 164
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 164
 Ser Leu Lys Glu Ser Thr Pro Asp Val Gln Gly Gln Phe Pro Cys Asp
 1 5 10 15
 <210> 165
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 165
 Leu Lys Glu Ser Thr Pro Asp Val Gln Gly Gln Phe Pro Cys Asp
 1 5 10 15
 <210> 166
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 166
 Phe Ser Trp Gly Val Thr Glu
 1 5

<210> 167
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 167
 Ser Val Leu Lys Pro Glu Ser Val Ala Ser Ser Pro Gln Phe Ser Asp
 1 5 10 15
 Pro His Leu

<210> 168
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 168
 Lys Pro Glu Ser Val Ala Ser Ser Pro Gln Phe Ser Asp Pro His Leu
 1 5 10 15

<210> 169
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 169
 Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro Ala Gln Cys
 1 5 10

<210> 170
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 170
 Phe Val Asn Ile Lys Lys Gln Leu Glu Met

[0030] 1 5 10

<210> 171
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 171
 Val Asn Ile Lys Lys Gln Leu Glu Met

1 5

<210> 172
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 172
 Val Asn Ile Lys Lys Gln Leu Glu Met

1 5 10

<210> 173
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 173
 Asn Ile Lys Lys Gln Leu Glu Met

1 5

<210> 174
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 174
 Leu Ala Arg Met Lys Val Thr His Tyr Arg

1 5 10

<210> 175
 <211> 11

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 175
 Leu Ala Arg Met Lys Val Thr His Tyr Arg Phe
 1 5 10
 <210> 176
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 176
 Ala Arg Met Lys Val Thr His Tyr Arg Phe
 1 5 10
 <210> 177
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 177
 Ala Leu Asp Trp Ala Ser Val Leu
 1 5
 <210> 178
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 178
 Tyr Arg Cys Val Val Ser Glu Gly
 1 5
 <210> 179
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 179
 Val Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Ile Ser Ala
 1 5 10
 <210> 180
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 180
 Gly Leu Lys Leu Gly Ile Ser Ala Met
 1 5
 <210> 181
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 181
 Leu Lys Leu Gly Ile Ser Ala
 1 5
 <210> 182
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 182
 Leu Lys Leu Gly Ile Ser Ala Met
 1 5
 <210> 183
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 183
 Ile Ser Ala Met Val Thr Leu Tyr Tyr Pro Thr
 1 5 10
 <210> 184
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽
 <400> 184
 Leu Tyr Tyr Pro Thr His Ala His Leu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 <210> 185
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽
 <400> 185
 Tyr Tyr Pro Thr His Ala His Leu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 <210> 186
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽
 <400> 186
 Tyr Tyr Pro Thr His Ala His Leu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Leu His
 1 5 10 15
 Ala Asp Gly Trp Leu Asn Pro Ser Thr Ala Glu Ala
 20 25
 <210> 187
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽
 <400> 187
 His Ala Asp Gly Trp Leu Asn Pro Ser Thr Ala Glu Ala
 1 5 10
 <210> 188
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽
 <400> 188
 His Ala Asp Gly Trp Leu Asn Pro Ser Thr Ala Glu Ala Phe
 1 5 10
 <210> 189
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽
 <400> 189
 Ala Phe Gln Ala Tyr Ala Gly Leu
 1 5
 <210> 190
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽
 <400> 190
 Phe Gln Ala Tyr Ala Gly Leu Cys
 1 5
 <210> 191
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽
 <400> 191
 Gln Ala Tyr Ala Gly Leu Cys

1 5
 <210> 192
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 192
 Gln Ala Tyr Ala Gly Leu Cys Phe
 1 5
 <210> 193
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 193
 Cys Phe Gln Glu Leu Gly Asp
 1 5
 <210> 194
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 194
 Cys Phe Gln Glu Leu Gly Asp Leu
 1 5
 <210> 195
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 195
 Trp Ile Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu
 1 5 10
 [0033] <210> 196
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 196
 Trp Ile Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp
 1 5 10
 <210> 197
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 197
 Trp Ile Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Ile
 1 5 10
 <210> 198
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 198
 Ile Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg
 1 5
 <210> 199
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 199
 Val Ala His Ala Leu Ala Trp Arg Leu
 1 5
 <210> 200
 <211> 8
 <212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 200
 Ala His Ala Leu Ala Trp Arg Leu
 1 5
 <210> 201
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 201
 His Ala Leu Ala Trp Arg Leu
 1 5
 <210> 202
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 202
 Tyr Asp Arg Gln Phe Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ala Val Ser
 1 5 10
 <210> 203
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 203
 Tyr Asp Arg Gln Phe Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ala Val Ser Leu
 1 5 10 15
 <210> 204
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 204
 Asp Arg Gln Phe Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ala Val Ser
 1 5 10
 <210> 205
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 205
 Ser Leu His Ala Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15
 His Trp Arg Ala Ala Glu Arg Phe
 20
 <210> 206
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 206
 His Ala Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr Ala Asp Ser His Trp
 1 5 10 15
 <210> 207
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 207
 His Ala Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr Ala Asp Ser His Trp
 1 5 10 15
 Arg Ala
 <210> 208
 <211> 22
 <212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽
 <400> 208
 His Ala Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr Ala Asp Ser His Trp
 1 5 10 15
 Arg Ala Ala Glu Arg Phe
 20
 <210> 209
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 209
 Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala
 1 5 10 15
 Glu Arg Phe

 <210> 210
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 210
 Pro Ala Asn Pro Tyr Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala Glu Arg Phe
 1 5 10 15
 <210> 211
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 211
 Pro Tyr Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala Glu Arg Phe
 1 5 10
 <210> 212
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 212
 Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ala Ala
 1 5 10
 <210> 213
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 213
 Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ala Ala Met
 1 5 10 15
 <210> 214
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 214
 Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ala Ala Met
 1 5
 <210> 215
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 215
 Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys His Arg Arg Gly Leu Ser Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Leu

<210> 216
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 216
 Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys His Arg Arg Gly Leu Ser Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Arg Leu
 20
 <210> 217
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 217
 Tyr Ile Ala Ser Lys His Arg Arg Gly Leu Ser Ser Ser Ala Leu
 1 5 10 15
 <210> 218
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 218
 Pro Arg Leu Thr Glu Ala Glu
 1 5
 <210> 219
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 219
 Pro Arg Leu Thr Glu Ala Glu Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr Val Asp
 1 5 10 15
 Phe

 [0036]
 <210> 220
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 220
 Ala Glu Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr Val Asp Phe
 1 5 10
 <210> 221
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 221
 Glu Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr Val Asp Phe
 1 5 10
 <210> 222
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 222
 Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr Val Asp Phe
 1 5 10
 <210> 223
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 223
 Cys Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe
 1 5 10

<210> 224
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 224
 Val Met His Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg Asp
 1 5 10 15
 <210> 225
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 225
 Val Met His Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg Asp
 1 5 10 15
 Ile Gln Phe

 <210> 226
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 226
 His Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg Asp Ile Gln
 1 5 10 15
 Phe

 <210> 227
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 227
[0037] Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg Asp
 1 5 10
 <210> 228
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 228
 Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg Asp Ile Gln Phe
 1 5 10
 <210> 229
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 229
 Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg Asp Ile Gln Phe
 1 5 10
 <210> 230
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 230
 Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Thr Arg
 1 5 10
 <210> 231
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 231
 Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Thr Arg Leu
 1 5 10

<210> 232
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 232
 Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Thr Arg Leu
 1 5 10
 <210> 233
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 233
 Thr Arg Leu Ser Ser Pro Thr Arg
 1 5
 <210> 234
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 234
 Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val
 1 5
 <210> 235
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 235
 Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu
 1 5 10 15
 <210> 236
 [0038] <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 236
 Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu
 1 5 10
 <210> 237
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 237
 Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Arg Trp Val Arg Arg
 1 5 10 15
 Asn Tyr Gly Asp Met
 20
 <210> 238
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 238
 Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Arg Trp Val Arg Arg
 1 5 10 15
 Asn Tyr Gly Asp Met Asp
 20
 <210> 239
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 239
 Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Arg Trp Val Arg Arg
 1 5 10 15

Asn Tyr Gly Asp Met Asp Ile
 20
 <210> 240
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 240
 Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys
 1 5
 <210> 241
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 241
 Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr
 1 5 10 15
 Gly Asp Met Asp
 20
 <210> 242
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 242
 Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly Asp Met Asp Ile
 1 5 10
 <210> 243
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 243
[0039]
 Ile Tyr Ile Thr Ala Ser Gly Ile Asp Asp Gln Ala Leu Glu Asp
 1 5 10 15
 <210> 244
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 244
 Tyr Ile Thr Ala Ser Gly Ile Asp Asp Gln Ala Leu
 1 5 10
 <210> 245
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 245
 Tyr Ile Thr Ala Ser Gly Ile Asp Asp Gln Ala Leu Glu Asp Asp Arg
 1 5 10 15
 Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr
 20 25
 <210> 246
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 246
 Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr
 1 5 10
 <210> 247
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 247

Asp Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr
 1 5 10
 <210> 248
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 248
 Asp Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr Leu Gln Glu
 1 5 10
 <210> 249
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 249
 Ile Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly
 1 5
 <210> 250
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 250
 Ile Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr
 1 5
 <210> 251
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 251
 Ile Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala
 1 5 10
 <210> 252
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 252
 Ile Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala Phe
 1 5 10
 <210> 253
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 253
 Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala
 1 5 10
 <210> 254
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 254
 Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala
 1 5
 <210> 255
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 255
 Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala Phe
 1 5 10
 <210> 256
 <211> 14

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 256
 Phe Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe
 1 5 10
 <210> 257
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 257
 Phe Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe
 1 5 10 15
 <210> 258
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 258
 Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe
 1 5 10
 <210> 259
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 259
 Phe Lys Ala Lys Ser Ser Ile Gln Phe
 1 5
 <210> 260
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 260
 [0041] Tyr Asn Lys Val Ile Ser Ser Arg Gly Phe Pro Phe Glu Asn Ser Ser
 1 5 10 15
 Ser Arg Cys Ser Gln Thr Gln Glu
 20
 <210> 261
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 261
 Ser Ser Arg Cys Ser Gln Thr Gln Glu Asn Thr Glu Cys Thr
 1 5 10
 <210> 262
 <211> 1044
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 262
 Met Lys Pro Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe
 1 5 10 15
 Phe Ser Thr Asp Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Arg Asn Thr Met Ser Asn
 20 25 30
 Gly Gly Leu Gln Arg Ser Val Ile Leu Ser Ala Leu Ile Leu Leu Arg
 35 40 45
 Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Arg Ala Ile Trp Ser Lys Asn
 50 55 60
 Pro Asn Phe Thr Pro Val Asn Glu Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr
 65 70 75 80
 Phe Pro Lys Asn Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr Gly Ala Leu Gln Val
 85 90 95
 Glu Gly Ser Trp Lys Lys Asp Gly Lys Gly Pro Ser Ile Trp Asp His
 100 105 110
 Phe Ile His Thr His Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Asn Gly Ser Ser
 115 120 125
 Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Ser Ala Leu Asp Phe Ile

130 135 140
 Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro
 145 150 155 160
 Asp Gly Ile Val Thr Val Ala Asn Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Tyr Ser
 165 170 175
 Thr Leu Leu Asp Ala Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr
 180 185 190
 Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Ala Leu Gln Glu Lys Tyr Gly Gly
 195 200 205
 Trp Lys Asn Asp Thr Ile Ile Asp Ile Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr
 210 215 220
 Cys Phe Gln Met Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His
 225 230 235 240
 Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Tyr Gly Thr Gly Met His Ala
 245 250 255
 Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Ala Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn
 260 265 270
 Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asn Thr His Phe
 275 280 285
 Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His Trp
 290 295 300
 Ile Glu Pro Asn Arg Ser Glu Asn Thr Met Asp Ile Phe Lys Cys Gln
 305 310 315 320
 Gln Ser Met Val Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His Gly
 325 330 335
 Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Gly Met Arg Lys Lys Leu Phe Ser Val Leu
 340 345 350
 Pro Ile Phe Ser Glu Ala Glu Lys His Glu Met Arg Gly Thr Ala Asp
 355 360 365
 Phe Phe Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Lys Pro Leu Asn Thr
 370 375 380
 Met Ala Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Asn Trp Ile Lys Leu Glu Tyr Asn Asn Pro Arg Ile Leu Ile Ala Glu
 405 410 415
 Asn Gly Trp Phe Thr Asp Ser Arg Val Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala
 420 425 430
 Ile Tyr Met Met Lys Asn Phe Leu Ser Gln Val Leu Gln Ala Ile Arg
 435 440 445
 Leu Asp Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Leu Asp
 450 455 460
 Gly Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr
 465 470 475 480
 Val Asp Phe Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala
 485 490 495
 His Tyr Tyr Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn Gly Phe Ser Leu Lys Glu
 500 505 510
 Ser Thr Pro Asp Val Gln Gly Gln Phe Pro Cys Asp Phe Ser Trp Gly
 515 520 525
 Val Thr Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Ser Val Ala Ser Ser Pro Gln
 530 535 540
 Phe Ser Asp Pro His Leu Tyr Val Trp Asn Ala Thr Gly Asn Arg Leu
 545 550 555 560
 Leu His Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro Ala Gln Cys
 565 570 575
 Thr Asp Phe Val Asn Ile Lys Lys Gln Leu Glu Met Leu Ala Arg Met
 580 585 590
 Lys Val Thr His Tyr Arg Phe Ala Leu Asp Trp Ala Ser Val Leu Pro
 595 600 605
 Thr Gly Asn Leu Ser Ala Val Asn Arg Gln Ala Leu Arg Tyr Tyr Arg
 610 615 620
 Cys Val Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Ile Ser Ala Met Val Thr
 625 630 635 640
 Leu Tyr Tyr Pro Thr His Ala His Leu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Leu
 645 650 655
 His Ala Asp Gly Trp Leu Asn Pro Ser Thr Ala Glu Ala Phe Gln Ala
 660 665 670
 Tyr Ala Gly Leu Cys Phe Gln Glu Leu Gly Asp Leu Val Lys Leu Trp
 675 680 685
 Ile Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Ile Tyr Asn Arg Ser
 690 695 700
 Gly Asn Asp Thr Tyr Gly Ala Ala His Asn Leu Leu Val Ala His Ala
 705 710 715 720
 Leu Ala Trp Arg Leu Tyr Asp Arg Gln Phe Arg Pro Ser Gln Arg Gly
 725 730 735
 Ala Val Ser Leu Ser Leu His Ala Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro

740 745 750
 Tyr Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu
 755 760 765
 Ile Ala Trp Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ala
 770 775 780
 Ala Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys His Arg Arg Gly Leu Ser Ser
 785 790 795 800
 Ser Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Ala Glu Arg Arg Leu Leu Lys Gly
 805 810 815
 Thr Val Asp Phe Cys Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Met
 820 825 830
 His Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg Asp Ile Gln
 835 840 845
 Phe Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val
 850 855 860
 Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr
 865 870 875 880
 Gly Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Ser Gly Ile Asp Asp Gln Ala
 885 890 895
 Leu Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr Leu Gln
 900 905 910
 Glu Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr
 915 920 925
 Tyr Ala Phe Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe
 930 935 940
 Phe Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys Ser Ser Ile Gln Phe Tyr Asn Lys
 945 950 955 960
 Val Ile Ser Ser Arg Gly Phe Pro Phe Glu Asn Ser Ser Arg Cys
 965 970 975
 Ser Gln Thr Gln Glu Asn Thr Glu Cys Thr Val Cys Leu Phe Leu Val
 980 985 990
 Gln Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu Gly Cys Cys Phe Phe Ser Thr Leu
 995 1000 1005
 Val Leu Leu Leu Ser Ile Ala Ile Phe Gln Arg Gln Lys Arg Arg
 1010 1015 1020
 Lys Phe Trp Lys Ala Lys Asn Leu Gln His Ile Pro Leu Lys Lys
 1025 1030 1035
 Gly Lys Arg Val Val Ser
 1040
 <210> 263
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽
 <400> 263
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn
 1 5 10
 <210> 264
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽
 <400> 264
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
 1 5
 <210> 265
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽
 <400> 265
 Ile His Pro Gly Ser Gly Asn Thr
 1 5
 <210> 266
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽
 <400> 266
 Ala Ile Leu Leu Leu Arg Ser Tyr Gly Met Asp Asp
 1 5 10
 <210> 267

<211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 267
 Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 268
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 268
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Thr Trp His
 1 5 10
 <210> 269
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 269
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Thr
 1 5
 <210> 270
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 270
 Ile His Tyr Ser Val Tyr Thr
 1 5
 [0044] <210> 271
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 271
 Ala Arg Arg Thr Thr Ser Leu Glu Arg Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 <210> 272
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 272
 Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 1 5
 <210> 273
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 273
 Tyr Thr Ser
 1
 <210> 274
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的6xHis标签
 <400> 274
 His His His His His His
 1 5

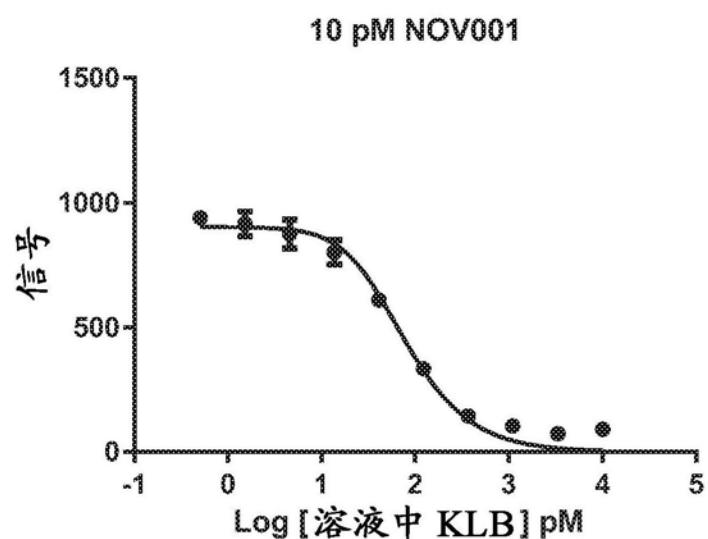


图1A

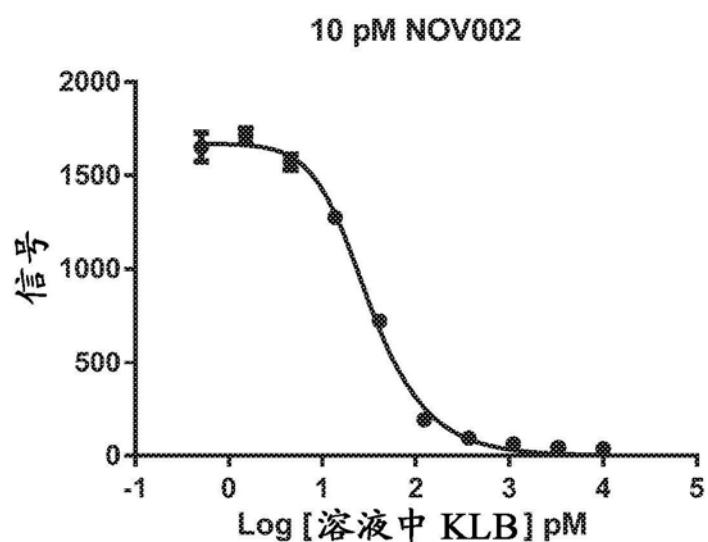


图1B

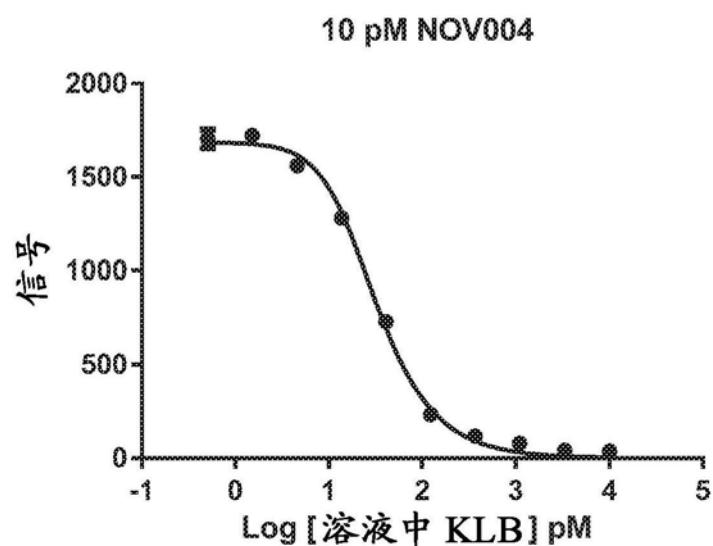


图1C

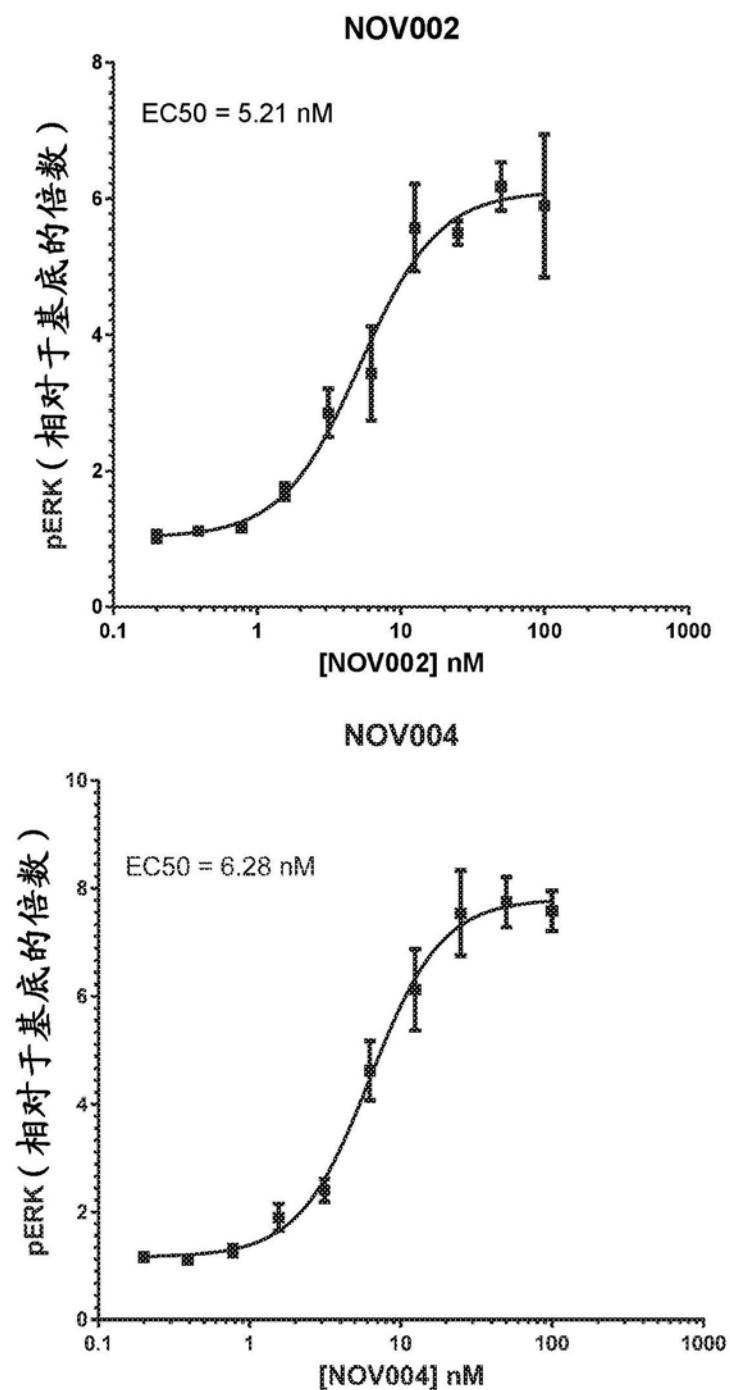


图2A

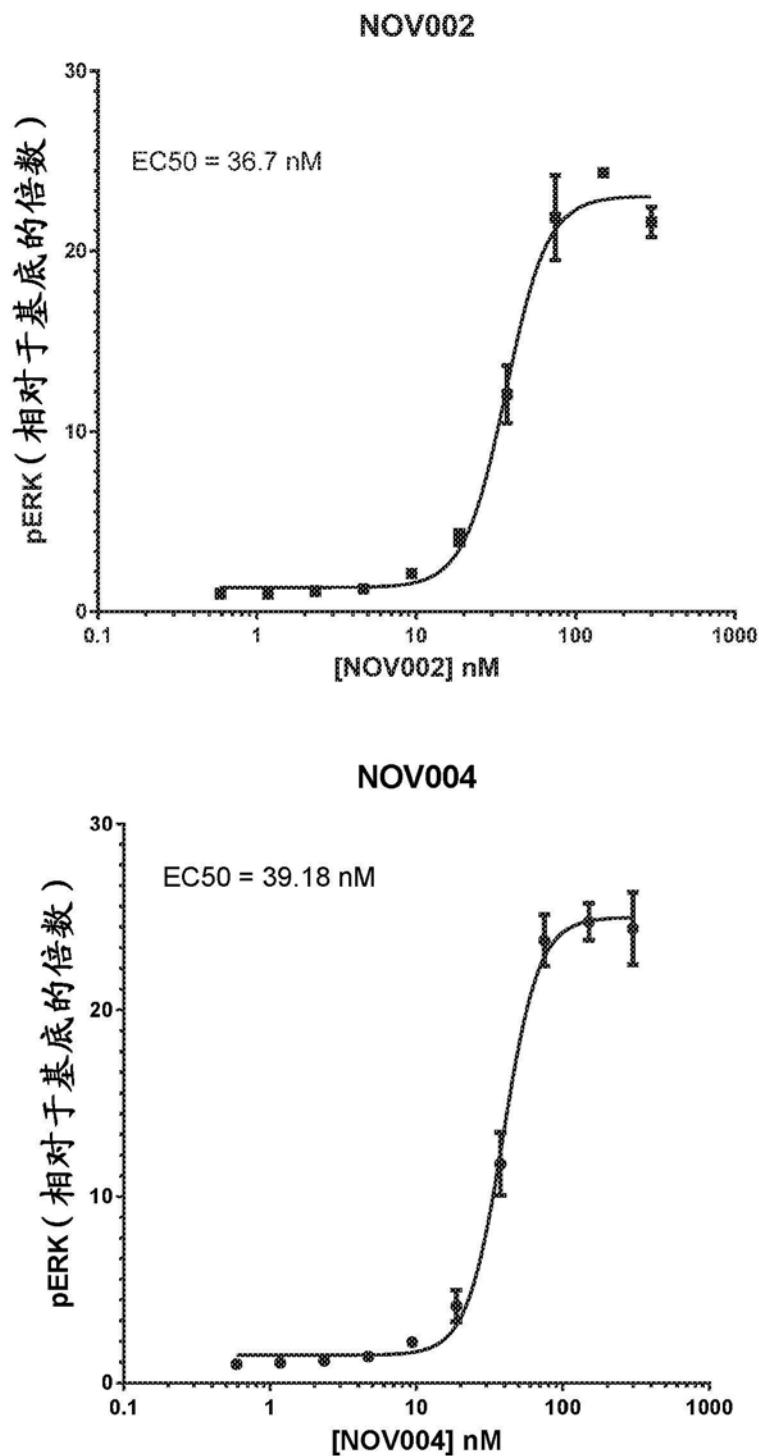


图2B

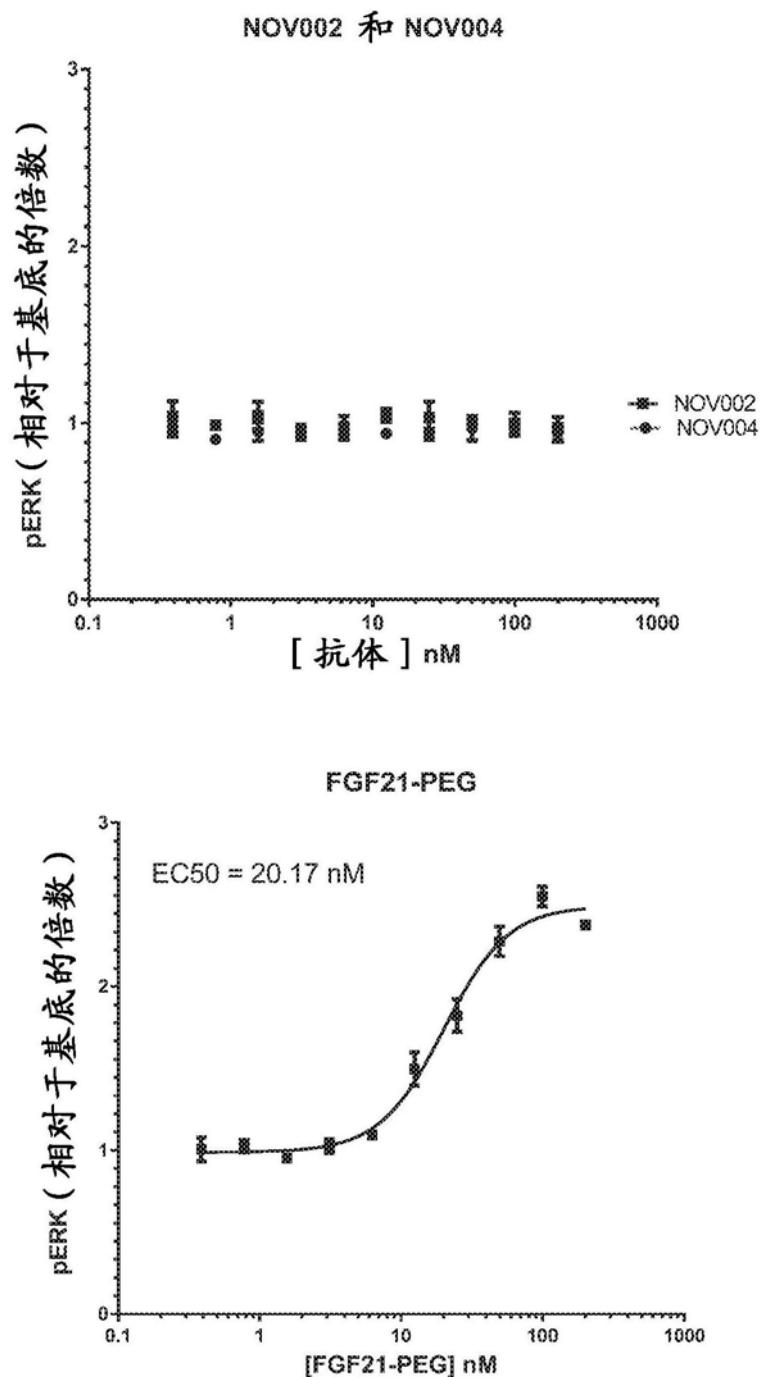
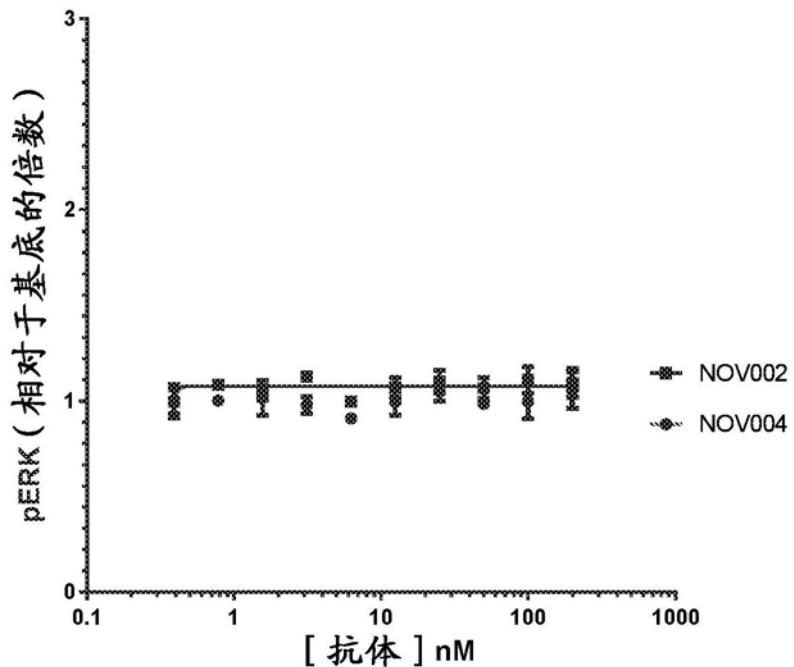


图3A

NOV002 和 NOV004



FGF21-PEG

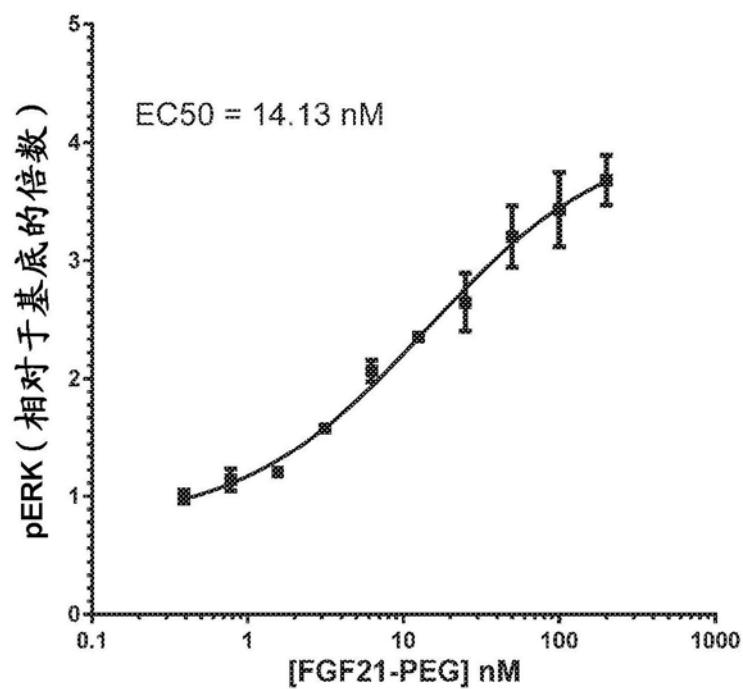


图3B

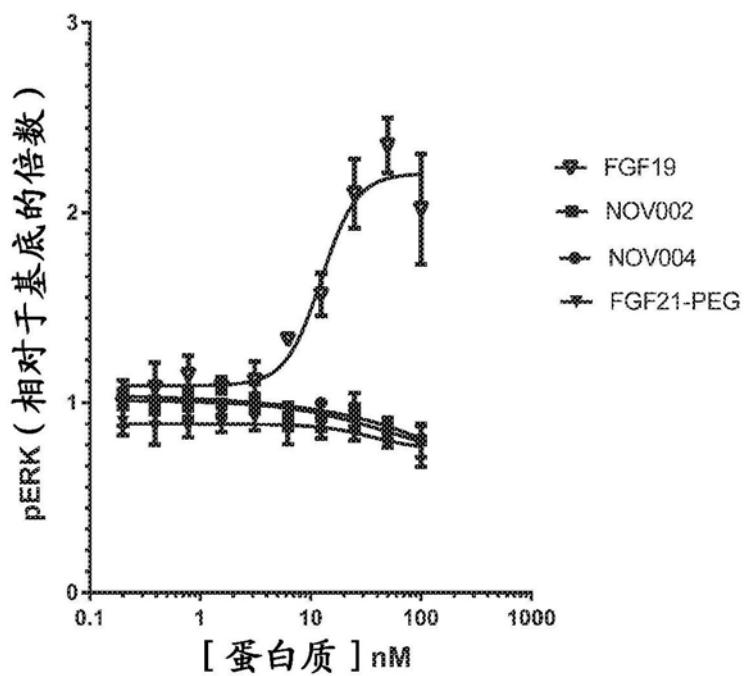


图3C

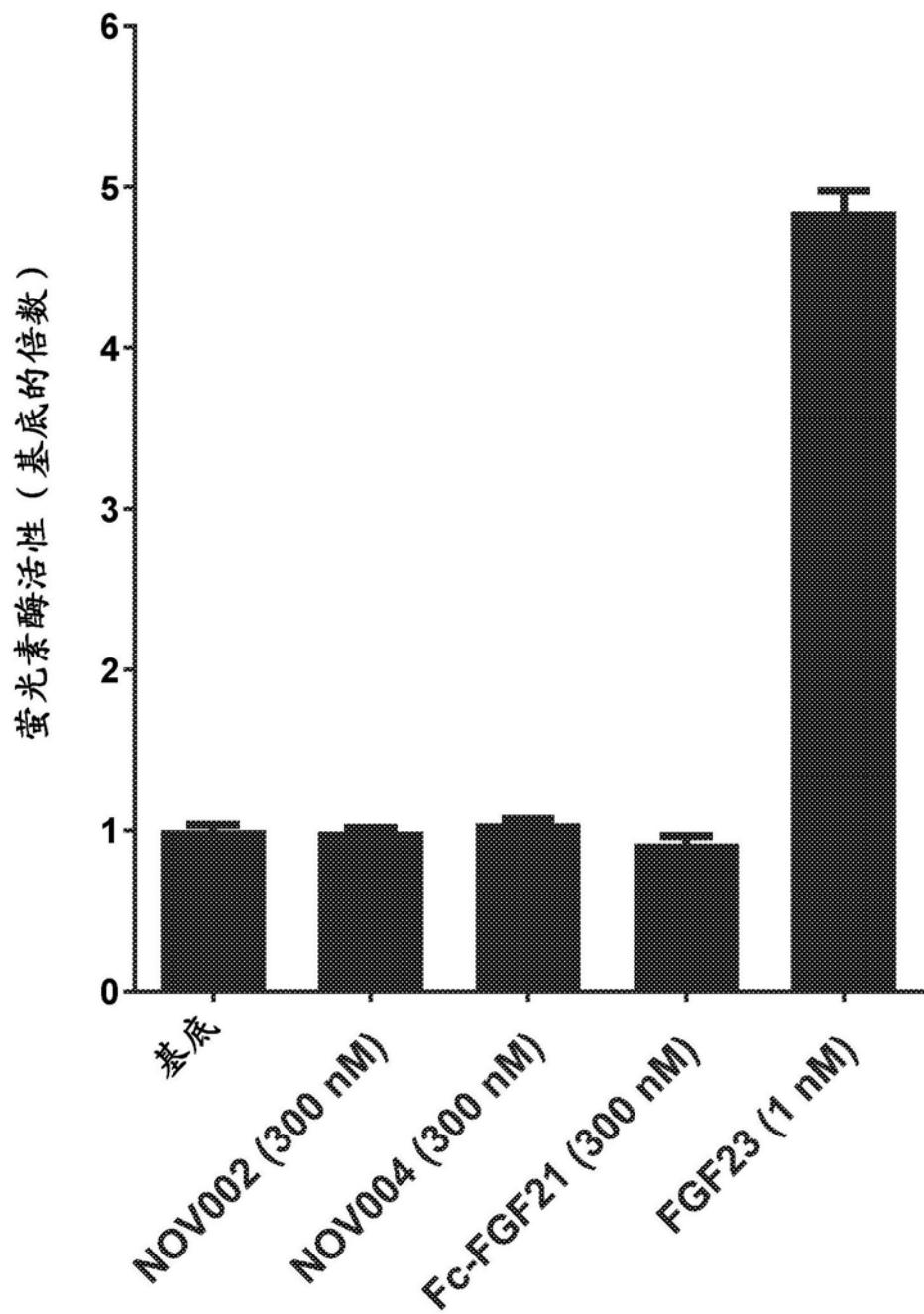


图4

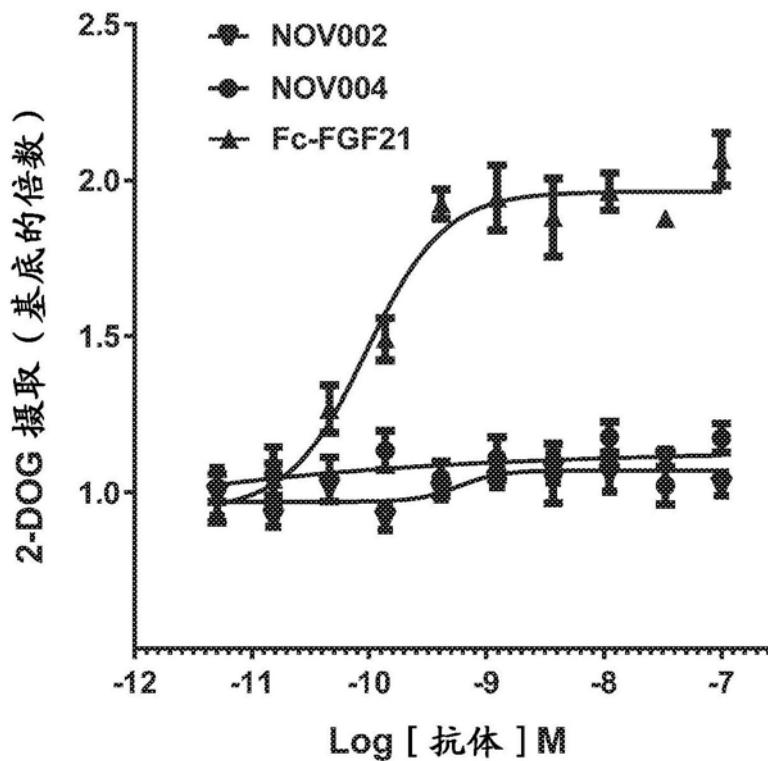


图5

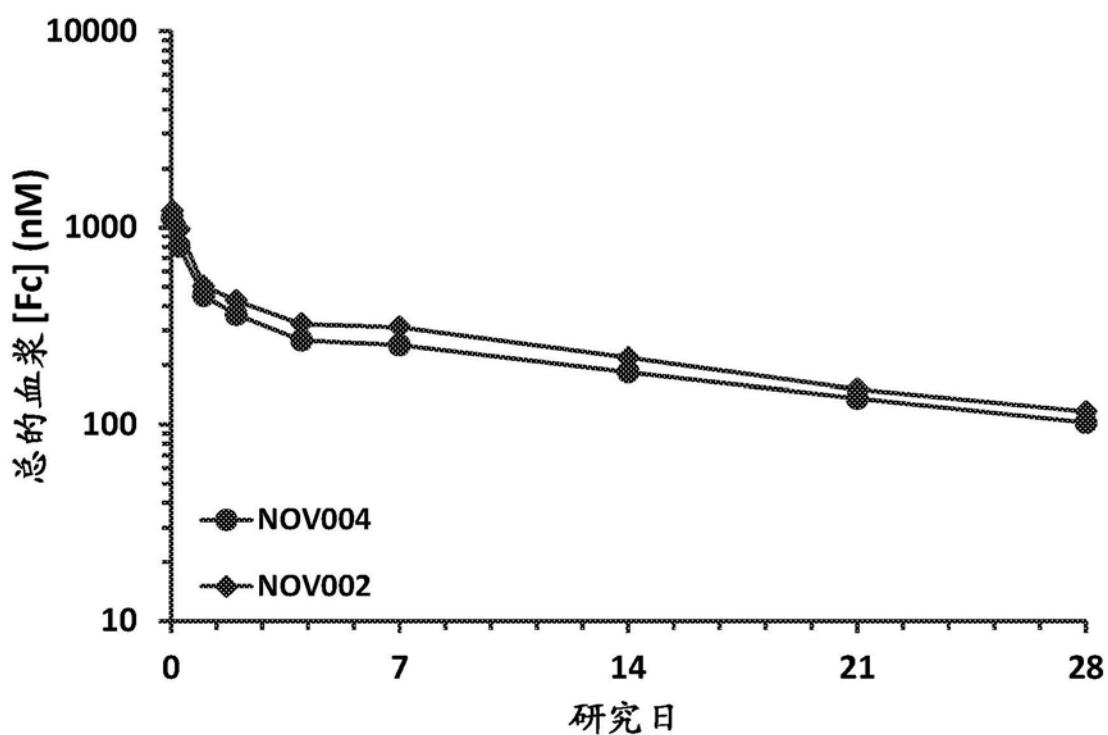


图6