



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I477511 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：103102822

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 16 日

(51)Int. Cl. : C07K16/18 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P1/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/03/20 美國

61/162,154

2010/02/22 美國

61/306,829

(71)申請人：安美基公司(美國) AMGEN INC. (US)

美國

(72)發明人：許海林 HSU, HAILING (US)；福特茲 岸恩 FOLTZ, IAN (CA)；亞羅拉 塔魯那 ARORA, TARUNA (IN)；傑考伯森 費德瑞克 W JACOBSEN, FREDERICK W. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 0178779A2

RUTGEERTS et al., "Biological Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. "GASTROENTEROLOGY Vol. 136, No. 4, Page:1182-1197. Published online 27 Feb. 2009.

RUDIHOFF et al., " Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity. " Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982).

審查人員：莊智惠

申請專利範圍項數：21 項 圖式數：0 共 122 頁

(54)名稱

 $\alpha 4 \beta 7$ 雜二聚體專一性拮抗抗體

ALPHA4BETA7 HETERODIMER SPECIFIC ANTAGONIST ANTIBODY

(57)摘要

本發明揭示 $\alpha 4 \beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白、編碼其之核酸，及其製備及使用方法。

There are disclosed alpha4beta7 heterodimer-specific antigen binding proteins, nucleic acids encoding them, and methods of making and using them.

公告本

發明摘要¹⁰³8. 22 修正
年 月 日 補充

P.1-2

※ 申請案號：103102822

※ 申請日：99年3月16日

※IPC 分類：C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

【發明名稱】

 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性拮抗抗體ALPHA4BETA7 HETERODIMER SPECIFIC ANTAGONIST
ANTIBODY

● 【中文】

本發明揭示 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白、編碼其之核酸，及其製備及使用方法。

【英文】

There are disclosed alpha4beta7 heterodimer-specific antigen binding proteins, nucleic acids encoding them, and methods of making and using them.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：（無）

【本代表圖之符號簡單說明】：

（無）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

α -4- β -7雜二聚體專一性拮抗抗體

ALPHA-4-BETA-7 HETERODIMER SPECIFIC ANTAGONIST
ANTIBODY

【技術領域】

本申請案提供一種關於 α 4 β 7雜二聚體專一性抗原結合蛋白之組合物及方法。

本申請案根據35 U.S.C. 119(e)之規定主張2009年3月20日申請之美國專利申請案第61/162,154號及2010年2月22日申請之美國專利申請案第61/306,829號的權益，該兩個申請案皆以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

整合素為由兩個次單元(一個 α 次單元及一個 β 次單元)形成之雜二聚體I型跨膜蛋白，且介導許多不同的細胞-細胞及細胞-細胞外基質相互作用。在功能方面，整合素已顯示參與眾多生物過程，包括白血球遷移與再循環及免疫反應。在哺乳動物中，存在18種已知 α 次單元及8種已知 β 次單元，該等次單元組合形成24種不同整合素。配位體專一性在很大程度上係由所表現之 α 次單元與 β 次單元之特定組合來決定，而對配位體之親和力由整合素構形變化調節且具二價陽離子依賴性。

整合素之配位體形成結構上不同之群，其包括細胞外基質蛋白，諸如膠原蛋白、纖維結合蛋白(fibronectin)、玻璃連結蛋白(vitronectin)及層黏連蛋白(laminin)；相對受體，諸如細胞黏附分子(例如血管細胞黏附分子或VCAM)；及血漿蛋白。眾多病原性微生物

亦利用整合素來引發感染或作為毒素結合位點。結構上不同之配位體共有暴露之麩胺酸或天冬胺酸殘基，該殘基通常存在於延伸之可撓性環中且對由整合素識別而言較為重要。

$\alpha 4$ 整合素($\alpha 4$ 與 $\beta 1$ 或 $\beta 7$ 次單元搭配)在免疫系統中起重要作用。 $\alpha 4\beta 1$ 於淋巴細胞及骨髓細胞上表現；其似乎為血管細胞黏附分子(VCAM)之主要結合搭配物。VCAM普遍表現於血管內皮細胞上，在發炎期間上調，且結合 $\alpha 4\beta 7$ 以及 $\alpha 4\beta 1$ (不過與 $\alpha 4\beta 7$ 結合較弱)。雖然在周邊T細胞、B細胞、NK細胞及嗜伊紅血球上亦偵測到 $\alpha 4\beta 7$ ，但 $\alpha 4\beta 7$ 最主要表現於CD4+CD45RA-記憶T細胞之亞群上，該亞群已顯示優先駐留於腸中。 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體之主要配位體為於腸內皮細胞中表現之黏膜地址素細胞黏附分子1(mucosal addressin cell adhesion molecule 1, MAdCAM-1或MAdCAM)。

除與 $\alpha 4$ 鏈配對以外， $\beta 7$ 次單元亦與 αE 搭配形成 $\alpha E\beta 7$ ，該 $\alpha E\beta 7$ 主要表現於腸、肺及泌尿生殖道中之上皮內淋巴細胞(IEL)上。 $\alpha E\beta 7$ 亦表現於腸中之樹突狀細胞上。 $\alpha E\beta 7$ 雜二聚體與表現上皮細胞上之E-鈣黏素(E-cadherin)結合。據信，IEL細胞提供上皮區內免疫監視之機制。

結合 $\alpha 4$ 且抑制 $\alpha 4\beta 1$ 與VCAM-1及纖維結合蛋白之結合的抗體定位於 $\alpha 4$ 中具52個胺基酸之區域，該區域介於殘基152與203之間(Schiffer等人，J. Biol. Chem. 270:14270; 1995)。Tidswell等人(J. Immuno 159:1497; 1997)在小鼠/人類嵌合 $\beta 7$ 次單元方法中利用一組結合 $\beta 7$ 之抗體鑑別出對與MAdCAM-1結合重要之 $\beta 7$ 域。其發現七種抑制與MAdCAM-1及E-鈣黏素結合之抗體中有六種定位於包含胺基酸176至250之區域，該區域似乎與其他整合素次單元之金屬離子依賴性黏附位點(MIDAS)具有同源性。Tidswell等人所用之抗體之一為 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗體，稱作ACT-1。

ACT-1抗體最初由Lazarovitz等人(J. Immunol. 133:1857; 1984)描述為藉由以來自PBMC之人類破傷風類毒素(tetanus toxoid)專一性T淋巴細胞株免疫小鼠而產生之抗體。稍後顯示，ACT-1與 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性結合(Schweighoffer等人，J. Immunol. 151:717, 1993)。儘管ACT-1並不結合鼠類 $\alpha 4\beta 7$ ，但其結合來自至少一些非人類靈長類動物物種之 $\alpha 4\beta 7$ ，且已顯示減輕豕養棉冠獼猴(cotton-top tamarin)之自發性結腸炎(Hesterberg等人，Gastroenterology 111:1373; 1996)。

已對ACT-1進行人類化且經評估作為潰瘍性結腸炎之人類治療劑(Feagan等人，N Engl J Med. 352:2499; 2005)，且近來作為克羅恩氏病(Crohn's disease)之人類治療劑(Feagan等人，Clinical Gastroenterology and Hepatology, 6:1370, 2008)。人類化ACT-1亦稱為維多珠單抗(vedolizumab)，且描述於WO 98/06248及美國專利7,147,85以及WO 07/061679及US 2007-0122404中。另一人類化抗體那他珠單抗(natalizumab，Tysabri®)已用於治療克羅恩氏病。那他珠單抗為 $\alpha 4$ 專一性鼠類抗體之人類化型式。維多珠單抗已顯示在一部分患者中產生中和抗人類化抗體反應，且那他珠單抗已與進行性多病竈腦白質病(PML)相關，PML為與免疫功能不全個體中先前感染之JC病毒再活化相關聯的神經病症。因此，需要一種改善此等不足，同時破壞 $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1路徑之治療劑。

【發明內容】

在一態樣中，本發明提供一種與人類 $\alpha 4\beta 7$ 專一性結合之經分離抗原結合蛋白(亦即， $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白)。在本發明之另一態樣中，抗原結合蛋白與非人類靈長類動物、獼猴、黑猩猩、非靈長類哺乳動物、齧齒動物、小鼠、大鼠、倉鼠、天竺鼠、貓或狗之 $\alpha 4\beta 7$ 專一性結合。在另一實施例中，經分離抗原結合蛋白包含人類抗體、嵌合抗體、單株抗體、重組抗體、抗原結合抗體片段、單鏈抗

體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、Fab片段、F(ab')₂片段、域抗體、IgD抗體、IgE抗體、IgM抗體、IgG1抗體、IgG2抗體、IgG3抗體、IgG4抗體，或在鉸鏈區中具有至少一個降低H鏈內二硫鍵形成趨勢之突變的IgG4抗體。在另一態樣中，經分離抗原結合蛋白包含上述抗體之一的重鏈恆定區；在另一態樣中，該恆定區為包含SEQ ID NO:72之多肽，與SEQ ID NO:72至少90%相同之多肽，具有已移除一個、兩個、三個、四個或五個N端及/或C端胺基酸之SEQ ID NO:72所述胺基酸序列的多肽，或含有一或多個轉譯後修飾之上述多肽之一。在一實施例中，經分離抗原結合蛋白包含κ輕鏈恆定區；在另一實施例中，其包含λ輕鏈區。在一實施例中，輕鏈恆定區為包含SEQ ID NO:70之多肽，與SEQ ID NO:70至少90%相同之多肽，具有已移除一個、兩個、三個、四個或五個N端及/或C端胺基酸之SEQ ID NO:70所述胺基酸序列的多肽，或含有一或多個轉譯後修飾之上述多肽之一。

本發明之一實施例提供一種具有各包含一或多個互補決定區或CDR之重鏈及輕鏈之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白。在本發明之另一態樣中，重鏈可變區包含CDR1、CDR2及CDR3，且輕鏈可變區包含CDR1、CDR2及CDR3，其中各個各別CDR係選自由以下組成之群：SEQ ID NO:55之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:58之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:56之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:59之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；以及SEQ ID NO:57之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:60之重鏈CDR1、CDR2及CDR3。

在本發明之另一態樣中，重鏈可變區進一步包含四個構架區(FR)，稱為FR1、FR2、FR3及FR4；且輕鏈可變區進一步包含四個構架區(FR)，稱為FR1、FR2、FR3及FR4。在一態樣中，FR係選自與

CDR相同之SEQ ID NO；在另一態樣中，FR係選自不同SEQ ID NO。在另一實施例中，本發明提供一種 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白，其中輕鏈可變區包含SEQ ID NO:55，且重鏈可變區包含SEQ ID NO:58；輕鏈可變區包含SEQ ID NO:56，且重鏈可變區包含SEQ ID NO:59；或輕鏈可變區包含SEQ ID NO:57，且重鏈可變區包含SEQ ID NO:60。

在本發明之另一態樣中，本發明提供一種具有各包含一或多個互補決定區或CDR之重鏈及輕鏈之經分離 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白。在本發明之另一態樣中，重鏈可變區包含CDR1、CDR2及CDR3，且輕鏈可變區包含CDR1、CDR2及CDR3。在一實施例中，輕鏈CDR係選自由以下組成之群：分別與SEQ ID NO:3之CDR1、CDR2及CDR3至少90%相同之CDR1、CDR2及CDR3；分別與SEQ ID NO:5之CDR1、CDR2及CDR3至少90%相同之CDR1、CDR2及CDR3；分別與SEQ ID NO:7之CDR1、CDR2及CDR3至少90%相同之CDR1、CDR2及CDR3；分別與SEQ ID NO:22之CDR1、CDR2及CDR3至少90%相同之CDR1、CDR2及CDR3；及分別與SEQ ID NO:24之CDR1、CDR2及CDR3至少90%相同之CDR1、CDR2及CDR3；且重鏈可變CDR1、CDR2及CDR3係來自SEQ ID NO:58。

在本發明之另一態樣中，重鏈可變區進一步包含四個構架區(FR)，稱為FR1、FR2、FR3及FR4；且輕鏈可變區進一步包含四個構架區(FR)，稱為FR1、FR2、FR3及FR4。在一態樣中，FR係選自與CDR相同之SEQ ID NO；在另一態樣中，FR係選自不同SEQ ID NO。在另一實施例中，本發明提供一種 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白，其中輕鏈可變區係選自由以下組成之群：與SEQ ID NO:3至少90%相同之輕鏈可變區；與SEQ ID NO:5至少90%相同之輕鏈可變區；與SEQ ID NO:7至少90%相同之輕鏈可變區；與SEQ ID NO:22至

少90%相同之輕鏈可變區；及與SEQ ID NO:24至少90%相同之輕鏈可變區；且重鏈可變區包含SEQ ID NO:58。

本發明之另一態樣提供一種經分離 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白，其具有包含CDR1、CDR2及CDR3之重鏈可變區與包含CDR1、CDR2及CDR3之輕鏈可變區，其中輕鏈CDR1、CDR2及CDR3係選自由以下組成之群：分別與SEQ ID NO:12之CDR1、CDR2及CDR3至少90%相同之CDR1、CDR2及CDR3；分別與SEQ ID NO:25之CDR1、CDR2及CDR3至少90%相同之CDR1、CDR2及CDR3；及分別與SEQ ID NO:26之CDR1、CDR2及CDR3至少90%相同之CDR1、CDR2及CDR3；且重鏈CDR1、CDR2及CDR3係選自由以下組成之群：分別與SEQ ID NO:41之CDR1、CDR2及CDR3至少90%相同之CDR1、CDR2及CDR3；及分別與SEQ ID NO:54之CDR1、CDR2及CDR3至少90%相同之CDR1、CDR2及CDR3。在一實施例中，輕鏈可變區係選自由與SEQ ID NO:12、25及26中任一者至少90%相同之可變區組成之群，且重鏈區係選自由與SEQ ID NO:41及54中任一者至少90%相同之可變區組成之群。在本發明之另一態樣中，重鏈可變區進一步包含四個構架區(FR)，稱為FR1、FR2、FR3及FR4；且輕鏈可變區進一步包含四個構架區(FR)，稱為FR1、FR2、FR3及FR4。在一態樣中，FR係選自與CDR相同之SEQ ID NO；在另一態樣中，FR係選自不同SEQ ID NO。

在一實施例中，本發明提供一種經分離 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白，其具有包含CDR1、CDR2及CDR3之重鏈可變區與包含CDR1、CDR2及CDR3之輕鏈可變區，其中各個各別CDR與選自由以下組成之群的CDR至少90%相同：SEQ ID NO:10之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:38之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:2之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:30之重鏈CDR1、

CDR2及CDR3；SEQ ID NO:20之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:51之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:11之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:39之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:13之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:42之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:17之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:46之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:8之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:36之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:19之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:49之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:18之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:47之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:21之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:52之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:3之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:31之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:7之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:35之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:6之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:34之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:1之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:29之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:22之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:50之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:24之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:40之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:9之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:37之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:4之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:32之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:28之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:53之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:16之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:45之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:15之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID

NO:44之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:14之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:43之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:27之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:43之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:5之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:33之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:12之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:41之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:23之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:48之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；SEQ ID NO:25之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:54之重鏈CDR1、CDR2及CDR3；及SEQ ID NO:26之輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，及SEQ ID NO:54之重鏈CDR1、CDR2及CDR3。在另一態樣中，重鏈CDR及輕鏈CDR與所列SEQ ID NO之各別CDR相同。在本發明之一實施例中，重鏈可變區進一步包含四個構架區(FR)，稱為FR1、FR2、FR3及FR4；且輕鏈可變區進一步包含四個構架區(FR)，稱為FR1、FR2、FR3及FR4。在一態樣中，FR係選自與CDR相同之SEQ ID NO；在另一態樣中，FR係選自不同SEQ ID NO。

在另一實施例中， $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白包含輕鏈可變區及重鏈可變區，其中輕鏈可變區與SEQ ID NO:10至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:38至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:2至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:30至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:20至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:51至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:11至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:39至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:13至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:42至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:17至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:46至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:8至少90%相同，且重

鏈可變區與SEQ ID NO:36至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:19至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:49至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:18至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:47至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:21至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:52至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:3至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:31至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:7至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:35至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:6至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:34至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:1至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:29至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:22至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:50至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:24至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:40至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:9至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:37至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:4至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:32至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:28至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:53至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:16至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:45至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:15至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:44至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:14至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:43至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:27至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:43至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:5至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:33至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:12至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:41至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID NO:23至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:48至少90%相同；輕鏈可變區與SEQ ID

NO:25至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:54至少90%相同；或輕鏈可變區與SEQ ID NO:26至少90%相同，且重鏈可變區與SEQ ID NO:54至少90%相同。在另一態樣中，重鏈可變區及輕鏈可變區與所列SEQ ID NO之各別可變區相同。

本發明之一態樣提供一種在CD4+記憶T細胞結合檢定中具有小於35 ng/ml之EC₅₀的經分離 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白；本發明之另一態樣提供一種在CD4+記憶T細胞結合檢定中具有小於10 ng/ml之EC₅₀的經分離 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白。在另一實施例中，本發明提供一種在MAdCAM競爭檢定中具有小於30 ng/ml之IC₅₀的經分離 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白；在另一實施例中，本發明提供一種在MAdCAM競爭檢定中具有小於10 ng/ml之IC₅₀的經分離 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白。本發明之一態樣提供一種結合 $\alpha 4\beta 7$ 之S250N突變體的經分離 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白。

在本發明之一態樣中，本發明提供編碼上述多肽之核酸。在本發明之另一態樣中，該核酸為載體。在本發明之另一實施例中，本發明提供經本發明核酸轉型或轉染之宿主細胞。在本發明之另一態樣中，提供一種製備多肽之方法，其包含在促進多肽表現之條件下培育宿主細胞及收集該等多肽。

在另一態樣中，本發明提供一種分泌與 $\alpha 4\beta 7$ 結合之抗原結合蛋白的經分離細胞。在另一實施例中，該細胞為融合瘤。在另一實施例中，本發明提供一種製備專一性結合 $\alpha 4\beta 7$ (亦即人類 $\alpha 4\beta 7$)之抗原結合蛋白的方法，其包含在允許該經分離細胞表現該抗原結合蛋白之條件下培育該經分離細胞。

在一態樣中，本發明提供一種與 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性結合之經分離抗原結合蛋白。在另一實施例中，經分離抗原結合蛋白在與人類 $\alpha 4\beta 7$ 結合時，抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與MAdCAM-1之結合。因此，本發明之一實

施例提供一種抑制 $\alpha 4\beta 7$ 之至少一種活性的方法，其包含使表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞與 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白接觸，以使活性部分或完全受抑制。在一態樣中，該方法係於活體內進行。在本發明之一態樣中，經分離抗原結合蛋白抑制表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞黏附於表現MAdCAM-1之細胞。在本發明之另一態樣中，經分離抗原結合蛋白抑制表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞運輸至表現MAdCAM-1之細胞所聚集之區域或組織；在此類實施例之一實例中，經分離抗原結合蛋白抑制淋巴細胞運輸至腸。

在另一態樣中，本發明提供一種包含抗原結合蛋白之醫藥組合物。在一實施例中，本發明提供一種治療個體之病狀的方法，其包含將醫藥組合物投與該個體，其中該病狀可藉由(部分或完全)降低個體中 $\alpha 4\beta 7$ 之活性來治療。在另一實施例中，個體為人類。在另一實施例中，病狀為胃腸系統之發炎性病狀。因此，提供一種治療罹患特徵在於表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞不當運輸至包含表現MAdCAM之細胞的組織之病狀之個體的方法，該方法包含向該個體投與足以(部分或完全)抑制表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞運輸至包含表現MAdCAM之細胞之組織的量的 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白。在一實施例中，該病狀為發炎性腸病，例如潰瘍性結腸炎、克羅恩氏病、乳糜瀉(非熱帶性口瘡)、與血清陰性關節病相關之腸病、顯微結腸炎(microscopic colitis)或膠原性結腸炎(collagenous colitis)、嗜伊紅血球性胃腸炎，或直腸結腸切除術(proctocolectomy)及迴腸肛門吻合術(ileoanal anastomosis)後所致之貯袋炎(pouchitis)。在另一實施例中，病狀為胰臟炎、胰島素依賴性糖尿病、乳房炎、膽囊炎、膽管炎、膽管周圍炎、慢性支氣管炎、慢性竇炎、哮喘或移植物抗宿主疾病。

在另一實施例中，該方法進一步包含向個體投與第二治療。在另一實施例中，該第二治療係在將醫藥組合物投與個體之前及/或同時及/或之後投與該個體。在另一實施例中，第二治療包含消炎劑。

在另一實施例中，第二醫藥組合物包含選自由非類固醇消炎藥、類固醇及免疫調節劑組成之群的藥劑。在另一實施例中，該方法包含向個體投與第三治療。

在另一態樣中，本發明提供一種延長個體壽命之方法，其包含向該個體投與醫藥組合物。在另一態樣中，本發明提供一種降低有需要之個體中 $\alpha 4\beta 7$ 之活性的方法，其包含向該個體投與醫藥組合物。在另一態樣中，本發明提供一種減少有需要之個體中 $\alpha 4\beta 7$ 介導之運輸(例如 $\alpha 4\beta 7$ 介導之腸駐留)的方法，其包含向該個體投與醫藥組合物。

【實施方式】

本發明提供關於與整合素 $\alpha 4\beta 7$ (「 $\alpha 4\beta 7$ 」)結合之分子的組合物、套組及方法，該等分子包括促進或拮抗 $\alpha 4\beta 7$ 之分子，諸如抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體、抗體片段及抗體衍生物，例如拮抗性抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體、抗體片段或抗體衍生物。亦提供包含編碼與 $\alpha 4\beta 7$ 結合之多肽之全部或一部分之核苷酸序列的核酸及其衍生物及片段，例如編碼抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體、抗體片段或抗體衍生物之全部或一部分的核酸；包含該等核酸之質體及載體；及包含該等核酸及/或載體及質體之細胞或細胞株。所提供之方法包括例如製備、鑑別或分離與 $\alpha 4\beta 7$ 結合之分子(諸如抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體)之方法、判定分子是否與 $\alpha 4\beta 7$ 結合之方法、判定分子促進抑或拮抗 $\alpha 4\beta 7$ 之方法、製備包含與 $\alpha 4\beta 7$ 結合之分子之組合物(諸如醫藥組合物)之方法，及將結合 $\alpha 4\beta 7$ 之分子投與個體之方法，例如治療 $\alpha 4\beta 7$ 介導之病狀的方法及在活體內或活體外促進或拮抗 $\alpha 4\beta 7$ 之生物活性的方法。

使用標準單字母或三字母縮寫來表示聚核苷酸及多肽序列。除非另有指示，否則各多肽序列在左側具有胺基端且在右側具有羧基端；各單股核酸序列以及各雙股核酸序列之上股在左側具有5'端且在右側具有3'端。特定多肽或聚核苷酸序列亦可藉由說明其與參考序列之不同程度來描述。

除非本文另有定義，否則與本發明相結合使用之科學及技術術語應具有一般技術者通常所理解之含義。此外，除非上下文另有需要，否則單數術語應包括複數且複數術語應包括單數。一般而言，本文所述之與細胞及組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學及蛋白質與核酸化學以及雜交相結合使用之命名法及其技術為此項技術中所熟知且通常所用者。除非另有指示，否則本發明之方法及技術一般係根據此項技術中所熟知及如本說明書通篇引用及論述之各種一般及更具體之參考文獻中所述之習知方法來進行。參見，例如 Sambrook 等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)；及 Ausubel 等人，*Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992)；及 Harlow 與 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)，該等文獻係以引用的方式併入本文中。酶促反應及純化技術係根據製造商之說明書，如此項技術中通常所實現或如本文所述來進行。本文所述之與分析化學、合成有機化學及醫學與醫藥化學相結合使用之術語及其實驗室程序與技術為此項技術中所熟知及通常所用者。對於化學合成、化學分析、醫藥製備、調配及傳遞以及患者治療可使用標準技術。

除非另有指示，否則以下術語應理解為具有以下含義：

術語「經分離分子」(其中該分子為例如多肽、聚核苷酸或抗體)為根據其起源或衍生來源而具有以下性質之分子：(1)與伴隨其原生狀態一起出現之天然相關組份無關聯，(2)實質上不含來自相同物種之其他分子，(3)由來自不同物種之細胞表現，或(4)在無人為干預之情況下在自然界中不會出現。因此，以化學方式合成或在不同於其天然起源之細胞的細胞系統中合成之分子將與其天然相關組份「分

離」。亦可藉由使用此項技術中所熟知之純化技術進行分離而使分子實質上不含天然相關組份。可由此項技術中所熟知之許多方式來檢定分子純度或均質性。舉例而言，可使用聚丙烯醯胺凝膠電泳及凝膠染色以使用此項技術中所熟知之技術觀測多肽來檢定多肽樣本之純度。出於某些目的，可藉由使用HPLC或此項技術中所熟知之其他純化方式來提供較高解析度。

術語「 $\alpha 4\beta 7$ 抑制劑」與「 $\alpha 4\beta 7$ 拮抗劑」可互換使用。各為可偵測地抑制 $\alpha 4\beta 7$ 之至少一種功能的分子。相反地，「 $\alpha 4\beta 7$ 促效劑」為可偵測地增強 $\alpha 4\beta 7$ 之至少一種功能的分子。 $\alpha 4\beta 7$ 抑制劑所產生之抑制無需為完全抑制，只要該抑制可偵測，例如使用檢定。可使用任何關於 $\alpha 4\beta 7$ 功能之檢定，其實例提供於本文中。可由 $\alpha 4\beta 7$ 抑制劑抑制(或由 $\alpha 4\beta 7$ 促效劑增強)之 $\alpha 4\beta 7$ 功能之實例包括配位體結合(亦即與MAdCAM-1結合)，黏附於配位體表現細胞，運輸至特定隔區(諸如腸)，釋放細胞激素、趨化激素及其他介體，增強或加重發炎反應及組織損傷等。 $\alpha 4\beta 7$ 抑制劑及 $\alpha 4\beta 7$ 促效劑類型之實例包括(但不限於) $\alpha 4\beta 7$ 結合多肽，諸如抗原結合蛋白(例如 $\alpha 4\beta 7$ 抗原結合蛋白)、抗體、抗體片段及抗體衍生物。

術語「肽」、「多肽」及「蛋白質」各指包含兩個或兩個以上胺基酸殘基由肽鍵彼此聯接之分子。此等術語涵蓋例如蛋白質序列之天然及人工蛋白質、蛋白質片段及多肽類似物(諸如突變蛋白質(mutein)、變異體及融合蛋白)，以及轉譯後修飾或其他共價或非共價修飾之蛋白質。肽、多肽或蛋白質可為單體或聚合體。

本文所用之術語「多肽片段」係指與相應全長蛋白質相比具有胺基端及/或羧基端缺失之多肽。片段長度可為例如至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、50、70、80、90、100、150或200個胺基酸。片段長度亦可為例如最多1,000、750、500、250、

200、175、150、125、100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、14、13、12、11或10個胺基酸。片段亦可由蛋白水解(或其他)加工而產生，例如使得胺基端及/或羧基端與預期者相比有一至五個胺基酸之變化。片段可在其任一端或兩端進一步包含一或多個其他胺基酸，例如天然產生之不同蛋白質之胺基酸序列(例如Fc或白胺酸拉鏈域)或人工胺基酸序列(例如人工連接子序列或標籤蛋白)。

本發明之多肽包括已經任何方式及由任何原因修飾之多肽，例如為：(1)降低對蛋白水解之敏感性，(2)降低對氧化之敏感性，(3)改變形成蛋白質複合物之結合親和力，(4)改變結合親和力，及(4)賦予或改變其他物理化學或功能特性。類似物包括多肽之突變蛋白質。舉例而言，可於天然產生之序列中(例如於形成分子間接觸之結構域外的多肽部分中)進行單或多個胺基酸取代(例如保守性胺基酸取代)。共同序列可用於選擇供取代之胺基酸殘基；熟習此項技術者應瞭解，亦可取代其他胺基酸殘基。

「保守性胺基酸取代」為不實質上改變親本序列之結構特徵的胺基酸取代(例如，置換胺基酸不應傾向於斷開親本序列中所存在之螺旋，或破壞其他類型表徵親本序列或為其功能性所需的二級結構)。業內公認之多肽二級及三級結構之實例描述於 *Proteins, Structures and Molecular Principles*(Creighton編，W. H. Freeman and Company, New York (1984))；*Introduction to Protein Structure*(C. Branden及J. Tooze編，Garland Publishing, New York, N.Y. (1991))；及 Thornton等人，*Nature* 354:105 (1991)，該等文獻各以引用的方式併入本文中。

本發明亦提供 $\alpha 4\beta 7$ 結合多肽之非肽類似物。非肽類似物在醫藥工業中通常用作特性與模板肽類似之藥物。此等類型之非肽化合物稱為「肽模擬物(peptide mimetics)」或「擬肽(peptidomimetics)」。參

見，例如Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986)；Veber及Freidinger, TINS 第 392 頁 (1985)；及 Evans 等人，J. Med. Chem. 30:1229 (1987)，該等文獻以引用的方式併入本文中。結構上類似於治療上適用之肽的肽模擬物可用於產生等效治療或預防作用。一般而言，擬肽在結構上類似於樣板肽(亦即，具有所要生物化學特性或藥理學活性之多肽)，諸如人類抗體；但其一或多個肽鍵視情況藉由此項技術中所熟知之方法經選自由以下組成之群的鍵聯置換： $--CH_2NH--$ 、 $--CH_2S--$ 、 $--CH_2--CH_2--$ 、 $--CH=CH--$ (順式與反式)、 $--COCH_2--$ 、 $--CH(OH)CH_2--$ 及 $--CH_2SO--$ 。共同序列之一或多個胺基酸經相同類型之D-胺基酸的系統性取代(例如D-離胺酸替代L-離胺酸)亦可用於產生更穩定之肽。另外，包含共同序列或實質上相同之共同序列變化的限制性肽可由此項技術中已知之方法產生(Rizo及Gierasch, Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)，其以引用的方式併入本文中)，例如藉由添加能夠形成使肽環化之分子內二硫橋鍵的內部半胱胺酸殘基而產生。

多肽(例如抗體)之「變異體」包含如下胺基酸序列：其中相對於另一多肽序列，有一或多個胺基酸殘基插入該胺基酸序列中、自該胺基酸序列缺失及/或取代入該胺基酸序列中。本發明之變異體包括融合蛋白。

多肽之「衍生物」為已經化學修飾之多肽(例如抗體)，例如經由與另一化學部分(諸如聚乙二醇或白蛋白，例如人類血清白蛋白)結合、磷酸化及/或糖基化而修飾。除非另有指示，否則術語「抗體」除包含兩條全長重鏈及兩條全長輕鏈之抗體以外亦包括其衍生物、變異體、片段及突變蛋白質，該等「抗體」之實例描述於下文中。

「抗原結合蛋白」為如下蛋白質：其包含與抗原結合之部分且視情況包含允許抗原結合部分採用促進抗原結合蛋白與抗原結合之構形的骨架或構架部分。抗原結合蛋白之實例包括抗體、抗體片段(例

- 如抗體之抗原結合部分)、抗體衍生物及抗體類似物。抗原結合蛋白可包含例如具有移植CDR或CDR衍生物之替代性蛋白質骨架或人工骨架。該等骨架包括(但不限於): 抗體來源之骨架, 其包含經引入以例如使抗原結合蛋白之三維結構穩定之突變; 以及完全合成骨架, 其包含例如生物相容性聚合物。參見, 例如 Korndorfer 等人, 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 第 53 卷, Issue 1:121-129; Roque 等人, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654。另外, 可使用肽抗體模擬物(「PAM」), 以及基於利用纖維結合蛋白組份作為骨架之抗體模擬物的骨架。

抗原結合蛋白可具有例如天然產生之免疫球蛋白之結構。「免疫球蛋白」為四聚體分子。在天然產生之免疫球蛋白中, 各四聚體由兩個相同多肽鏈對組成, 各對具有一條「輕」鏈(約 25 kDa)及一條「重」鏈(約 50-70 kDa)。各鏈之胺基端部分包括主要負責抗原識別且具有約 100 至 110 個或 110 個以上胺基酸的可變區。各鏈之羧基端部分界定主要負責效應功能之恆定區。人類輕鏈分類為 κ 或 λ 輕鏈。重鏈分類為 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ , 且將抗體之同型分別定義為 IgM、IgD、IgG、IgA 及 IgE。在輕鏈及重鏈內, 可變區及恆定區係由具有約 12 個或 12 個以上胺基酸之「J」區聯接, 其中重鏈亦包括具有約 10 個以上胺基酸之「D」區。一般參見 *Fundamental Immunology* 第 7 章 (Paul, W. 編, 第 2 版 Raven Press, N.Y. (1989)) (其出於所有目的以全文引用的方式併入本文中)。各輕鏈/重鏈對之可變區形成抗體結合位點, 使得完整免疫球蛋白具有兩個結合位點。

天然產生之免疫球蛋白鏈之可變區展現由三個高變區聯接之相對保守構架區(FR)的相同通用結構, 該等高變區亦稱為互補決定區或 CDR。自 N 端至 C 端, 輕鏈與重鏈均包含如下結構域: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 及 FR4。根據 Kabat 等人, *Sequences of*

Proteins of Immunological Interest, 第5版, US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH出版物第91-3242號, 1991中之定義將胺基酸指定至各結構域。免疫球蛋白鏈中之胺基酸的其他編號系統包括IMGT®(國際免疫遺傳學資訊系統(international ImMunoGeneTics information system); Lefranc等人, *Dev. Comp. Immunol.* 29:185-203; 2005) 及 AHo(Honegger 及 Pluckthun, *J. Mol. Biol.* 309(3):657-670; 2001)。

抗體可自含有抗原專一性不同之免疫球蛋白的來源(諸如血清或血漿)獲得。若對該等抗體進行親和純化, 則其特定抗原專一性可得到增濃。該等增濃之抗體製劑通常由少於約10%之對特定抗原具有專一性結合活性的抗體構成。對此等製劑進行數輪親和純化可增加對抗原具有專一性結合活性之抗體的比例。以此方式製備之抗體常稱作「單專一性」抗體。單專一性抗體製劑可由約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或99.9%之對特定抗原具有專一性結合活性的抗體構成。

除非另有規定, 否則「抗體」係指完整免疫球蛋白或其關於專一性結合而與完整抗體競爭之抗原結合部分。抗原結合部分可由重組DNA技術或藉由酶促或化學裂解完整抗體而產生。抗原結合部分尤其包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、域抗體(dAb)及互補決定區(CDR)片段、可變區片段、單鏈抗體(scFv)、嵌合抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體及含有足以賦予多肽專一性抗原結合性之免疫球蛋白之至少一部分的多肽。

Fab片段為具有V_L、V_H、C_L及C_H1域之單價片段; F(ab')₂片段為具有兩個由鉸鏈區之二硫橋鍵連接之Fab片段的二價片段; Fd片段具有V_H及C_H1域; Fv片段具有抗體單臂之V_L及V_H域; 且dAb片段具有V_H域、V_L域, 或V_H或V_L域之抗原結合片段(美國專利第6,846,634號、第

6,696,245號；美國申請公開案第05/0202512號、第04/0202995號、第04/0038291號、第04/0009507號、第03/0039958號；Ward等人，Nature 341:544-546, 1989)。

單鏈抗體(scFv)為 V_L 及 V_H 區經由連接子(例如胺基酸殘基之合成序列)聯接形成連續蛋白質鏈的抗體，其中該連接子足夠長而允許蛋白質鏈自身對折且形成單價抗原結合位點(參見，例如Bird等人，1988, Science 242:423-26；及Huston等人，1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83)。雙功能抗體為包含兩條多肽鏈之二價抗體，其中各多肽鏈包含由連接子聯接之 V_H 及 V_L 域，該連接子過短而使同一鏈上之兩個域無法配對，由此使得各域與另一多肽鏈上之互補域配對(參見，例如Holliger等人，1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48；及Poljak等人，1994, Structure 2:1121-23)。若雙功能抗體之兩條多肽鏈相同，則其配對產生之雙功能抗體將具有兩個相同抗原結合位點。具有不同序列之多肽鏈可用於製備具有兩個不同抗原結合位點之雙功能抗體。類似地，三功能抗體及四功能抗體為分別包含三條及四條多肽鏈且分別形成三個及四個抗原結合位點之抗體，該等多肽鏈及該等抗原結合位點可相同或不同。

可使用Kabat等人(同上)、Lefranc等人(同上)及/或Honegger及Pluckthun(同上)所述之系統來鑑別既定抗體之互補決定區(CDR)及構架區(FR)。可將一或多個CDR以共價方式或非共價方式併入分子中以使該分子成為抗原結合蛋白。抗原結合蛋白可將CDR併入在內作為較大多肽鏈之一部分，可使CDR共價連接於另一多肽鏈，或可以非共價方式將CDR併入在內。CDR使抗原結合蛋白能與相關特定抗原專一性結合。

抗原結合蛋白可具有一或多個結合位點。若存在一個以上結合位點，則該等結合位點可彼此相同，或可不同。舉例而言，天然產生

之人類免疫球蛋白通常具有兩個相同結合位點，而「雙專一性」或「雙功能」抗體具有兩個不同結合位點。

術語「人類抗體」包括所有具有一或多個來源於人類免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體。在一實施例中，所有可變域及恆定域均來源於人類免疫球蛋白序列(完全人類抗體)。此等抗體可以多種方式製備，其實例描述於下文中，包括經由以相關抗原免疫小鼠，該小鼠經遺傳修飾以表現來源於人類重鏈編碼基因及/或輕鏈編碼基因之抗體。

人類化抗體具有如下序列：該序列與來源於非人類物種之抗體序列因一或多個胺基酸取代、缺失及/或添加而不同，使得該人類化抗體與非人類物種抗體相比，在投與人類個體時不太可能誘發免疫反應及/或誘發較不嚴重之免疫反應。在一實施例中，使非人類物種抗體之重鏈及/或輕鏈之構架域及恆定域中之某些胺基酸突變來產生人類化抗體。在另一實施例中，使來自人類抗體之恆定域與非人類物種之可變域融合。在另一實施例中，改變非人類抗體之一或多個CDR序列中之一或多個胺基酸殘基以降低在將該非人類抗體投與人類個體時其可能產生之免疫原性，其中該等改變之胺基酸殘基對抗體與其抗原之免疫專一性結合並非至關重要，或對胺基酸序列所進行之改變為保守性改變，使得人類化抗體與抗原之結合與非人類抗體與抗原之結合相比並不顯著變差。製備人類化抗體之方式的實例可見於美國專利第6,054,297號、第5,886,152號及第5,877,293號中。

術語「嵌合抗體」係指含有一或多個來自一種抗體之區域及一或多個來自一或多種其他抗體之區域的抗體。在一實施例中，一或多個CDR係來源於人類抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體。在另一實施例中，所有CDR皆來源於人類抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體。在另一實施例中，將來自一種以上人類抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體之CDR混合且匹配成嵌合抗體。舉例而言，嵌合抗體可包含來自第

一人類抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體之輕鏈的CDR1、來自第二人類抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體之輕鏈的CDR2及CDR3，及來自第三抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體之重鏈的CDR。可能存在其他組合且包括於本發明之實施例中。

此外，構架區可來源於相同抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體之一，來源於一或多種不同抗體(諸如人類抗體)，或來源於人類化抗體。在嵌合抗體之一實施例中，重鏈及/或輕鏈之一部分與來自特定物種或屬於特定抗體類別或子類之抗體相同、同源或來源於來自特定物種或屬於特定抗體類別或子類之抗體，而該(該等)鏈之其餘部分與來自另一物種或屬於另一抗體類別或子類之抗體相同、同源或來源於來自另一物種或屬於另一抗體類別或子類之抗體。亦包括該等抗體之展現所要生物活性(亦即，專一性結合 $\alpha 4\beta 7$ 之能力)的片段。參見，例如美國專利第4,816,567號及Morrison, 1985, Science 229:1202-07。

「中和抗體」或「抑制抗體」為抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與MAdCAM-1相互作用之抗體，屆時使用諸如本文實例中所述之檢定分析，過量抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體使相互作用量減少至少約20%。在各種實施例中，抗原結合蛋白使 $\alpha 4\beta 7$ 與MAdCAM-1 $\alpha 4\beta 7$ 之相互作用減少至少30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%及99.9%。

抗體之片段或類似物可易於由一般技術者遵循本說明書之教示及使用此項技術中所熟知之技術來製備。片段或類似物之胺基端及羧基端存在於功能域之邊界附近。結構域及功能域可藉由比較核苷酸及/或胺基酸序列資料與公共或專屬序列資料庫來鑑別。可使用電腦化比較方法來鑑別序列基元或預測具有已知結構及/或功能之其他蛋白質中所存在的蛋白質構形域。鑑別摺疊成已知三維結構之蛋白質序列的方法為已知的。參見，例如Bowie等人，1991, Science 253:164。

「CDR移植抗體」為包含一或多個來源於特定物種或同型之抗體的CDR以及相同或不同物種或同型之另一抗體的構架的抗體。

「多專一性抗體」為識別一或多個抗原上之一個以上抗原決定基的抗體。此類型抗體之子類為「雙專一性抗體」，其識別相同或不同抗原上之兩個相異抗原決定基。

若抗原結合蛋白與抗原(例如人類 $\alpha 4\beta 7$)結合之解離常數為1奈莫耳濃度或1奈莫耳濃度以下，則該抗原結合蛋白與該抗原「專一性結合」。如本文所用，若抗原結合蛋白結合第一雜二聚體整合素，而不結合與該第一整合素共有一條鏈之其他整合素，則該抗原結合蛋白具有「雜二聚體專一性」。舉例而言，具有 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性之抗體將結合 $\alpha 4\beta 7$ ，而不結合 $\alpha 4\beta 1$ 或 $\alpha E\beta 7$ 。

已知整合素表現其之細胞的活化狀態及某些金屬離子存在與否採用不同構形。呈「活性」構形之整合素與其同源配位體結合之親和力高於呈「非活性」構形之相同整合素。抗原結合蛋白可僅與呈活性構形之整合素結合，僅與呈非活性構形之整合素結合，或與呈兩種構形或任一構形之整合素均結合。舉例而言， $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白可在存在或不存在二價錳 $^{2+}(\text{Mn}^{2+})$ 陽離子之情況下結合 $\alpha 4\beta 7$ ，表明該抗原結合蛋白結合活性 $\alpha 4\beta 7$ 與非活性 $\alpha 4\beta 7$ 。

「抗原結合域」、「抗原結合區」或「抗原結合位點」為含有與抗原相互作用且對抗原結合蛋白對抗原之專一性及親和力有利之胺基酸殘基(或其他部分)的抗原結合蛋白之一部分。對於與抗原專一性結合之抗體，此將包括該抗體之至少一個CDR域的至少一部分。

「抗原決定基」為抗原結合蛋白(例如抗體)所結合之分子部分。抗原決定基可包含分子之非連續部分(例如，於多肽中，在多肽一級序列中不連續，但在多肽三級結構及四級結構之情形下彼此之接近程度足以由抗原結合蛋白結合的胺基酸殘基)。

兩個聚核苷酸序列或兩個多肽序列之「相同性百分比」係藉由使用GAP電腦程式(10.3版GCG Wisconsin套件(Accelrys, San Diego,

CA)之一部分)、使用其預設參數對序列進行比較來確定。

術語「聚核苷酸」、「寡核苷酸」及「核酸」通篇可互換使用，且包括DNA分子(例如cDNA或基因組DNA)、RNA分子(例如mRNA)、使用核苷酸類似物(例如肽核酸及非天然產生之核苷酸類似物)產生之DNA或RNA類似物，及其雜交體。核酸分子可為單股或雙股。在一實施例中，本發明之核酸分子包含編碼本發明之抗體或其片段、衍生物、突變蛋白質或變異體之連續開放閱讀框架。

若兩個單股聚核苷酸之序列可在反向平行方向上進行比對，使得在未引入間隙之情況下且在任一序列之5'末端或3'末端無未配對核苷酸之情況下，一個聚核苷酸中之每個核苷酸與另一聚核苷酸中之其互補核苷酸相對，則該兩個單股聚核苷酸為彼此之「互補序列」。若兩個聚核苷酸可在中等嚴格條件下彼此雜交，則一聚核苷酸與另一聚核苷酸「互補」。因此，聚核苷酸可與並非其互補序列之另一聚核苷酸互補。

「載體」為可用於將與其所連接之另一核酸引入細胞中之核酸。一種類型之載體為「質體」，其係指可連接其他核酸區段之線性或環狀雙股DNA分子。另一類型之載體為病毒載體(例如複製缺陷型反轉錄病毒、腺病毒及腺相關病毒)，其中其他DNA區段可引入病毒基因組中。某些載體能夠在該等載體所引入之宿主細胞中自主複製(例如包含細菌複製起點之細菌載體及游離型哺乳動物載體)。其他載體(例如非游離型哺乳動物載體)可在引入宿主細胞中後整合至宿主細胞之基因組中，且進而與宿主基因組一起複製。「表現載體」為可指導所選聚核苷酸表現之載體類型。

若調控序列影響核苷酸序列之表現(例如表現量、表現時序或表現位置)，則該核苷酸序列「可操作地連接」於該調控序列。「調控序列」為影響可操作地連接於其之核酸之表現(例如表現量、表現時序

或表現位置)的核酸。調控序列可例如對所調控之核酸直接發揮影響，或經由一或多個其他分子(例如與調控序列及/或核酸結合之多肽)之作用而發揮影響。調控序列之實例包括啟動子、強化子及其他表現控制元件(例如聚腺苷酸化信號)。調控序列之其他實例描述於例如 Goeddel, 1990, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA；及 Baron 等人，1995, *Nucleic Acids Res.* 23:3605-06中。

「宿主細胞」為可用於表現核酸(例如本發明核酸)之細胞。宿主細胞可為原核細胞，例如大腸桿菌(*E. coli*)；或可為真核細胞，例如單細胞真核細胞(例如酵母或其他真菌)、植物細胞(例如菸草或番茄植物細胞)、動物細胞(例如人類細胞、猴細胞、倉鼠細胞、大鼠細胞、小鼠細胞或昆蟲細胞)或融合瘤細胞。宿主細胞之實例包括猴腎細胞之 COS-7 細胞株(ATCC CRL 1651)(參見 Gluzman 等人，1981, *Cell* 23:175)、L 細胞、C127 細胞、3T3 細胞(ATCC CCL 163)、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或其衍生物(諸如 VEGGIE CHO 及於無血清培養基中生長之相關細胞株(參見 Rasmussen 等人，1998, *Cytotechnology* 28:31)或缺乏 DHFR 之 CHO 品系 DX-B11(參見 Urlaub 等人，1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-20))、海拉細胞(HeLa cell)、BHK (ATCC CRL 10)細胞株、來源於非洲綠猴腎細胞株 CV1 (ATCC CCL 70)之 CV1/EBNA 細胞株(參見 McMahan 等人，1991, *EMBO J.* 10:2821)、人類胚腎細胞(諸如 293、293 EBNA 或 MSR 293)、人類表皮 A431 細胞、人類 Colo205 細胞、其他經轉型之靈長類動物細胞株、正常二倍體細胞、來源於初級組織之活體外培養物的細胞品系、原代外植體、HL-60、U937、HaK 或 Jurkat 細胞。通常，宿主細胞為可用編碼多肽之核酸轉型或轉染之培養細胞，該核酸接著可於該宿主細胞中表現。片語「重組宿主細胞」可用於表示已用有待表現之核酸轉型或轉染之宿主細胞。宿主細胞

胞亦可為如下細胞：其包含核酸，但除非將調控序列引入宿主細胞中，以使其變得與核酸可操作地連接，否則該細胞不以所要量表現該核酸。應瞭解，術語宿主細胞不僅指特定個體細胞，而且亦指此類細胞之子代或潛在子代。由於某些修飾可能因例如突變或環境影響而出現於後代中，因此該子代實際上可能與親本細胞不同，但仍包括於如本文所用之該術語的範疇內。

抗原結合蛋白

在一態樣中，本發明提供與 $\alpha 4\beta 7$ (例如人類 $\alpha 4\beta 7$)結合之抗原結合蛋白(例如抗體、抗體片段、抗體衍生物、抗體突變蛋白質及抗體變異體)。

本發明之抗原結合蛋白包括抑制 $\alpha 4\beta 7$ 之生物活性之抗原結合蛋白。該等生物活性之實例包括 $\alpha 4\beta 7$ 與MAdCAM-1之結合，及表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞與表現MAdCAM-1之細胞之間的黏附。其他生物活性包括於活體內由 $\alpha 4\beta 7$ 介導之生物活性，諸如運輸或駐留；特定言之， $\alpha 4\beta 7$ 與淋巴細胞運輸至腸有關。在發炎之腸中MAdCAM-1之表現增加增強了表現 $\alpha 4\beta 7$ 之淋巴細胞募集至腸，在此處異常淋巴細胞活化使發炎反應及組織損傷增加。

不同抗原結合蛋白可與 $\alpha 4\beta 7$ 之不同結構域或抗原決定基結合，或可由不同作用機制起作用。實例包括(但不限於)干擾 $\alpha 4\beta 7$ 與MAdCAM-1結合之能力或抑制細胞相互作用(諸如表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞與表現MAdCAM-1之細胞之間的黏附)之抗原結合蛋白。作用部位可為例如細胞內(例如藉由干擾細胞內信號級聯)或細胞外。抗原結合蛋白無需完全抑制 $\alpha 4\beta 7$ 誘導之活性以便可用於本發明；實際上，降低 $\alpha 4\beta 7$ 之特定活性的抗原結合蛋白同樣涵蓋在內以供使用。(本文中關於結合 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原結合蛋白治療特定疾病之特定作用機制的論述僅為說明性的，且本文所呈現之方法並不受其約束。)

處於本發明範疇內之抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體之其他衍生物包括抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體或其片段與其他蛋白質或多肽之共價共軛物或聚集共軛物 (aggregative conjugate)，諸如藉由表現重組融合蛋白，包含與抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體多肽之N端或C端融合之異源多肽。舉例而言，共軛之肽可為異源信號(或前導)多肽，例如酵母 α 因子前導肽或諸如抗原決定基標籤之肽。含有抗原結合蛋白之融合蛋白可包含經添加以有助於純化或鑑別抗原結合蛋白之肽(例如聚His)。抗原結合蛋白亦可連接於FLAG®肽 Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys(DYKDDDDK) (SEQ ID NO:62)，如 Hopp 等人，*Bio/Technology* 6:1204, 1988 及美國專利 5,011,912 中所述。FLAG®肽具高度抗原性且提供由專一性單株抗體 (mAb) 以可逆方式結合之抗原決定基，從而使得能夠對所表現之重組蛋白進行快速檢定及簡易純化。適用於製備FLAG®肽與指定多肽融合之融合蛋白的試劑可購得(Sigma-Aldrich, St. Louis MO)。

含有一或多個抗原結合蛋白之寡聚物可用作 $\alpha 4\beta 7$ 拮抗劑。寡聚物可呈共價連接或非共價連接之二聚體、三聚體或更高級寡聚物之形式。包含兩個或兩個以上抗原結合蛋白之寡聚物涵蓋在內以供使用，其中一個實例為均二聚體。其他寡聚物包括雜二聚體、均三聚體、雜三聚體、均四聚體、雜四聚體等。

一實施例係關於寡聚物，其包含多個抗原結合蛋白經由與該等抗原結合蛋白融合之肽部分之間的共價或非共價相互作用聯接。該等肽可為肽連接子(間隔子)，或具有促進寡聚之特性的肽。白胺酸拉鏈及某些來源於抗體之多肽為可促進與其連接之抗原結合蛋白寡聚之肽，如下文更詳細描述。

在特定實施例中，寡聚物包含兩個至四個抗原結合蛋白。寡聚物之抗原結合蛋白可呈任何形式，諸如上文所述之任一形式，例如變異體或片段。寡聚物較佳包含具有 $\alpha 4\beta 7$ 結合活性之抗原結合蛋白。

在一實施例中，寡聚物係使用來源於免疫球蛋白之多肽製備。包含某些與抗體來源之多肽之各種部分(包括Fc域)融合之異源多肽之融合蛋白的製備已由例如 Ashkenazi 等人，1991, PNAS USA 88:10535；Byrn 等人，1990, Nature 344:677；及 Hollenbaugh 等人，1992，「Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins」，*Current Protocols in Immunology*，增刊4，第10.19.1-10.19.11頁描述。

本發明之一實施例係關於包含兩個藉由使抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體之 $\alpha 4\beta 7$ 結合片段與抗體之Fc區融合而產生之融合蛋白的二聚體。二聚體可由以下方式製得：例如，將編碼融合蛋白之基因融合體插入適當表現載體中，在經重組表現載體轉型之宿主細胞中表現該基因融合體，及使所表現之融合蛋白組裝為更擬似抗體分子，其後在Fc部分之間形成鏈間二硫鍵以得到該二聚體。

如本文所用之術語「Fc多肽」包括來源於抗體Fc區之原生形式及突變蛋白質形式之多肽。亦包括含有促進二聚之鉸鏈區的截短形式之該等多肽。包含Fc部分之融合蛋白(及自其形成之寡聚物)提供藉由在蛋白質A或蛋白質G管柱上親和層析來進行簡易純化之優勢。

PCT申請案WO 93/10151(以引用的方式併入本文中)中所述之一種適合Fc多肽為自人類IgG1抗體之N端鉸鏈區延伸至Fc區之原生C端的單鏈多肽。另一適用Fc多肽為美國專利5,457,035及Baum等人，1994, EMBO J. 13:3992-4001中所述之Fc突變蛋白質。除了胺基酸19已自Leu變為Ala，胺基酸20已自Leu變為Glu，且胺基酸22已自Gly變為Ala以外，此突變蛋白質之胺基酸序列與WO 93/10151中所呈現之原生Fc序列之胺基酸序列相同。該突變蛋白質對Fc受體之親和力降低。

在其他實施例中，可用抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體之重鏈及/或輕鏈之可變部分取代抗體重鏈及/或輕鏈之可變部分。

或者，寡聚物為包含多個抗原結合蛋白同時有或無肽連接子(間隔肽)之融合蛋白。適合肽連接子為美國專利4,751,180及4,935,233中所述之肽連接子。

另一製備寡聚抗原結合蛋白之方法涉及使用白胺酸拉鏈。白胺酸拉鏈域為促進內部存在該等白胺酸拉鏈域之蛋白質寡聚之肽。白胺酸拉鏈最初在數種DNA結合蛋白中鑑別出(Landschulz等人，1988, *Science* 240:1759)，且此後已在多種不同蛋白質中發現。已知之白胺酸拉鏈為二聚或三聚之天然產生肽及其衍生物。適於產生可溶性寡聚蛋白之白胺酸拉鏈域之實例描述於PCT申請案WO 94/10308中，且來源於肺界面活性蛋白D(SPD)之白胺酸拉鏈描述於Hoppe等人，1994, *FEBS Letters* 344:191中，該等文獻以引用的方式併入本文中。使用允許與白胺酸拉鏈融合之異源蛋白穩定三聚之經修飾白胺酸拉鏈描述於Fanslow等人，1994, *Semin. Immunol.* 6:267-78中。在一種方法中，於適合宿主細胞中表現包含與白胺酸拉鏈肽融合之抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體片段或衍生物的重組融合蛋白，且自培養物上清液中回收所形成之可溶性寡聚抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體片段或衍生物。

在一態樣中，本發明提供干擾 $\alpha 4\beta 7$ 與MAdCAM-1結合之抗原結合蛋白。該等抗原結合蛋白可針對 $\alpha 4\beta 7$ 或其片段、變異體或衍生物製備，且在習知檢定中針對干擾 $\alpha 4\beta 7$ 與MAdCAM-1結合之能力進行篩選。適合檢定之實例為測試抗原結合蛋白抑制MAdCAM-1(亦即，可溶性MAdCAM-1)與表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞結合的能力或測試抗原結合蛋白減少由MAdCAM-1與 $\alpha 4\beta 7$ 相互作用(亦即，表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞與MAdCAM-1或表現MAdCAM-1之細胞黏附)所引起之生物反應或細胞反應的能力的檢定。測試抗原結合蛋白之其他檢定包括定性或定量比較抗原結合蛋白與 $\alpha 4\beta 7$ 多肽之結合同已知抗原結合蛋白與 $\alpha 4\beta 7$ 多肽之結合的檢定，其若干實例揭示於本文中。

在另一態樣中，本發明提供一種顯示物種選擇性之抗原結合蛋白。在一實施例中，抗原結合蛋白與一或多種哺乳動物 $\alpha 4\beta 7$ 結合，例如人類 $\alpha 4\beta 7$ ，及小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠、沙鼠、貓、兔、狗、山羊、綿羊、牛、馬、駱駝及非人類靈長類動物 $\alpha 4\beta 7$ 中之一或多者。在另一實施例中，抗原結合蛋白與一或多種靈長類動物 $\alpha 4\beta 7$ 結合，例如人類 $\alpha 4\beta 7$ ，及獼猴、狨猿、恆河猴、獠猿及黑猩猩 $\alpha 4\beta 7$ 中之一或多者。在另一實施例中，抗原結合蛋白與人類、獼猴、狨猿、恆河猴、獠猿或黑猩猩 $\alpha 4\beta 7$ 專一性結合。在另一實施例中，抗原結合蛋白不與小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠、沙鼠、貓、兔、狗、山羊、綿羊、牛、馬、駱駝及非人類靈長類動物 $\alpha 4\beta 7$ 中之一或多者結合。在另一實施例中，抗原結合蛋白不與新世界猴物種(諸如狨猿)結合。

在另一實施例中，抗原結合蛋白與除 $\alpha 4\beta 7$ 以外之任何天然產生蛋白質均不展現專一性結合。在另一實施例中，抗原結合蛋白與除哺乳動物 $\alpha 4\beta 7$ 以外之任何天然產生蛋白質均不展現專一性結合。在另一實施例中，抗原結合蛋白與除靈長類動物 $\alpha 4\beta 7$ 以外之任何天然產生蛋白質均不展現專一性結合。在另一實施例中，抗原結合蛋白與除人類 $\alpha 4\beta 7$ 以外之任何天然產生蛋白質均不展現專一性結合。在另一實施例中，抗原結合蛋白與來自至少一種非人類靈長類動物(例如獼猴)之 $\alpha 4\beta 7$ 及人類 $\alpha 4\beta 7$ 專一性結合。在另一實施例中，抗原結合蛋白以類似結合親和力與非人類靈長類動物、獼猴及人類 $\alpha 4\beta 7$ 專一性結合。在另一實施例中，抗原結合蛋白阻斷非人類靈長類動物、獼猴及人類 $\alpha 4\beta 7$ 之活性。在另一實施例中，抗原結合蛋白在如本文所述之檢定中對非人類靈長類動物、獼猴及人類 $\alpha 4\beta 7$ 具有類似 IC_{50} 或 EC_{50} 。

可使用此項技術中所熟知之方法且遵循本說明書之教示來確定抗原結合蛋白對 $\alpha 4\beta 7$ 之選擇性。舉例而言，可使用西方墨點法(Western blot)、FACS、ELISA或RIA來確定選擇性。

在另一態樣中，本發明提供一種結合 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原結合蛋白(例如抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體)，其具有一或多種以下特徵：與人類 $\alpha 4\beta 7$ 及非人類靈長類動物 $\alpha 4\beta 7$ 均結合，抑制MAdCAM-1與 $\alpha 4\beta 7$ 之結合，抑制表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞黏附於MAdCAM-1，抑制表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞黏附於表現MAdCAM-1之細胞，抑制表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞運輸至包含表現MAdCAM-1之細胞的組織，結合活性與非活性形式之 $\alpha 4\beta 7$ ，引起相對極小程度的細胞表面表現之 $\alpha 4\beta 7$ 的下調。

本發明之抗原結合蛋白之抗原結合片段可由習知技術產生。該等片段之實例包括(但不限於)Fab及F(ab')₂片段。亦涵蓋藉由遺傳工程改造技術所產生之抗體片段及衍生物。

其他實施例包括嵌合抗體，例如非人類(例如鼠類)單株抗體之人類化型式。該等人類化抗體可由已知技術製備，且提供將抗體投與人類時免疫原性降低之優勢。在一實施例中，人類化單株抗體包含鼠類抗體之可變域(或其抗原結合位點之全部或一部分)及來源於人類抗體之恆定域。或者，人類化抗體片段可包含鼠類單株抗體之抗原結合位點及來源於人類抗體之可變域片段(缺乏抗原結合位點)。產生嵌合單株抗體及經進一步工程改造之單株抗體的程序包括Riechmann等人，1988, Nature 332:323；Liu等人，1987, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:3439；Larrick等人，1989, Bio/Technology 7:934；及Winter等人，1993, TIPS 14:139中所述之程序。在一實施例中，嵌合抗體為CDR移植抗體。使抗體人類化之技術論述於例如美國專利申請案第10/194,975號(2003年2月27日公開)；美國專利第5,869,619號、第5,225,539號、第5,821,337號、第5,859,205號；Padlan等人，1995, FASEB J. 9:133-39；及Tamura等人，2000, J. Immunol. 164:1432-41中。

已開發出在非人類動物體內產生人類抗體或部分人類抗體之程

序。舉例而言，已製備一或多個內源免疫球蛋白基因已利用各種方式失活之小鼠。已將人類免疫球蛋白基因引入小鼠中置換失活之小鼠基因。在動物體內產生之基因併有由引入該動物中之人類遺傳物質所編碼之人類免疫球蛋白多肽鏈。在一實施例中，用 $\alpha 4\beta 7$ 多肽免疫諸如轉殖基因小鼠之非人類動物，使得在該動物體內產生針對 $\alpha 4\beta 7$ 多肽之抗體。適合免疫原之一個實例為可溶性人類 $\alpha 4\beta 7$ ，諸如包含 $\alpha 4\beta 7$ 之一部分或 $\alpha 4\beta 7$ 之其他免疫原性片段的多肽。適合免疫原之另一實例為表現高含量 $\alpha 4\beta 7$ 的細胞或自其製備之細胞膜製劑。

產生及使用供製備人類抗體或部分人類抗體用之轉殖基因動物之技術的實例描述於以下文獻中：美國專利5,814,318、5,569,825及5,545,806；Davis等人，2003, *Production of human antibodies from transgenic mice*, Lo編，Antibody Engineering: Methods and Protocols, Humana Press, NJ:191-200；Kellermann等人，2002, *Curr Opin Biotechnol.* 13:593-97；Russel等人，2000, *Infect Immun.* 68:1820-26；Gallo等人，2000, *Eur J Immun.* 30:534-40；Davis等人，1999, *Cancer Metastasis Rev.* 18:421-25；Green, 1999, *J Immunol Methods.* 231:11-23；Jakobovits, 1998, *Adv Drug Deliv Rev* 31:33-42；Green等人，1998, *J Exp Med.* 188:483-95；Jakobovits A, 1998, *Exp. Opin. Invest. Drugs.* 7:607-14；Tsuda等人，1997, *Genomics* 42:413-21；Mendez等人，1997, *Nat Genet.* 15:146-56；Jakobovits, 1994, *Curr Biol.* 4:761-63；Arbones等人，1994, *Immunity.* 1:247-60；Green等人，1994, *Nat Genet.* 7:13-21；Jakobovits等人，1993, *Nature* 362:255-58；Jakobovits等人，1993, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2551-55；Chen, J.等人，1993, *Int Immunol* 5: 647-656；Choi等人，1993, *Nature Genetics* 4: 117-23；Fishwild等人，1996, *Nat Biotechnol* 14: 845-51；Harding等人，1995, *Ann NY Acad Sci*；Lonberg等人，1994, *Nature*

368: 856-59 ; Lonberg, 1994, *Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies*, Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101 ; Lonberg等人, 1995, *Int Rev Immunol* 13: 65-93 ; Neuberger, 1996, *Nat Biotechnol* 14: 826 ; Taylor等人, 1992, *Nucleic Acids Research* 20: 6287-95 ; Taylor等人, 1994, *Int Immunol* 6: 579-91 ; Tomizuka等人, 1997, *Nat Gen* 16: 133-43 ; Tomizuka等人, 2000, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 722-27 ; Tuailon等人, 1993, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 3720-24 ; 及Tuailon等人, 1994, *J Immunol* 152: 2912-20。此等及其他實例亦論述於2007年5月3日公開之美國專利申請公開案2007-0098715中。

在另一態樣中，本發明提供與 $\alpha 4\beta 7$ 結合之單株抗體。可使用此項技術中已知之任何技術來產生單株抗體，例如藉由在完成免疫時程後使自轉殖基因動物收集之脾細胞永生化。可使用此項技術中已知之任何技術使脾細胞永生化，例如藉由使該等脾細胞與骨髓瘤細胞融合產生融合瘤。用於產生融合瘤之融合程序的骨髓瘤細胞較佳不產生抗體，具有較高融合效率，且具有致使該等骨髓瘤細胞不能在某些僅支持所要融合細胞(融合瘤)生長之選擇性培養基中生長的酶缺陷。適合用於小鼠融合之細胞株之實例包括Sp-20、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1.Ag 4 1、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7及S194/5XX0 Bul；用於大鼠融合之細胞株之實例包括R210.RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983F及4B210。其他適用於細胞融合之細胞株為U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2及UC729-6。

在一實施例中，融合瘤細胞株係由以下方式產生：用 $\alpha 4\beta 7$ 免疫原免疫動物(例如具有人類免疫球蛋白序列之轉殖基因動物)；自經免疫動物收集脾細胞；使所收集之脾細胞與骨髓瘤細胞株融合，藉此產

生融合瘤細胞；自融合瘤細胞建立融合瘤細胞株；且鑑別產生結合 $\alpha 4\beta 7$ 多肽之抗體的融合瘤細胞株。該等融合瘤細胞株及由其產生之抗 $\alpha 4\beta 7$ 單株抗體為本發明所涵蓋。

可使用此項技術中已知之任何技術來純化融合瘤細胞株所分泌之單株抗體。可進一步篩選融合瘤或mAb以鑑別具有特定特性之mAb，諸如阻斷 $\alpha 4\beta 7$ 誘導之活性的能力。該等篩選之實例提供於以下實例中。

亦可使用稱作遺傳免疫之方法來產生單株抗體。舉例而言，可將編碼相關抗原之核酸併入病毒載體(諸如腺病毒載體)中。接著使用所得載體在適合宿主動物(例如非肥胖性糖尿病或NOD小鼠)體內產生針對相關抗原之免疫反應。此技術實質上由Ritter等人，Biodrugs 16(1): 3-10 (2002)描述，該文獻之揭示內容以引用的方式併入本文中。

亦已使用抗體結合位點中心之互補決定區(CDR)的分子演化來分離具有較大親和力之抗體，例如對c-erbB-2具有較大親和力之抗體，如Schier等人，1996, J. Mol. Biol. 263:551所述。因此，該等技術適用於製備針對 $\alpha 4\beta 7$ 之抗體。

針對 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原結合蛋白可用於例如檢定中以於活體外或活體內偵測 $\alpha 4\beta 7$ 多肽或表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞的存在。抗原結合蛋白亦可用於藉由免疫親和層析來純化 $\alpha 4\beta 7$ 蛋白。彼等另外可阻斷MAdCAM-1與 $\alpha 4\beta 7$ 相互作用之抗原結合蛋白可用於抑制由該相互作用產生之生物活性。阻斷性抗原結合蛋白可用於本發明之方法中。該等起到 $\alpha 4\beta 7$ 拮抗劑作用之抗原結合蛋白可用於治療任何 $\alpha 4\beta 7$ 誘發之病狀，包括(但不限於)發炎性病狀。在一實施例中，在該等病狀之治療中使用由涉及轉殖基因小鼠免疫之程序產生之人類抗 $\alpha 4\beta 7$ 單株抗體。

抗原結合蛋白可用於活體外程序中或活體內投與以抑制 $\alpha 4\beta 7$ 誘

導之生物活性。由此可治療因 $\alpha 4\beta 7$ 及其與MAdCAM-1之相互作用(直接或間接)所致或惡化之病症，其實例提供於本文中。在一實施例中，本發明提供一種治療方法，其包含活體內投與有需要之哺乳動物有效降低 $\alpha 4\beta 7$ 誘導之生物活性之量的 $\alpha 4\beta 7$ 阻斷性抗原結合蛋白。

本發明之抗原結合蛋白包括抑制 $\alpha 4\beta 7$ 之生物活性的部分人類單株抗體及完全人類單株抗體。一實施例係關於至少部分阻斷人類 $\alpha 4\beta 7$ 與MAdCAM-1相互作用之人類單株抗體。在一實施例中，藉由用 $\alpha 4\beta 7$ 免疫原免疫轉殖基因小鼠來產生抗體。在另一實施例中，免疫原為人類 $\alpha 4\beta 7$ 多肽(例如經轉型或轉染以表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞，或天然表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞)。本文中亦提供來源於該等經免疫小鼠之融合瘤細胞株，其中該融合瘤分泌結合 $\alpha 4\beta 7$ 之單株抗體。

儘管人類抗體、部分人類抗體或人類化抗體將適合於許多應用，尤其涉及將抗體投與人類個體之應用，但其他類型之抗原結合蛋白亦將適合於某些應用。本發明之非人類抗體可例如來源於任何產生抗體之動物，諸如小鼠、大鼠、兔、山羊、驢或非人類靈長類動物(諸如猴(例如獼猴或恆河猴)或猿(例如黑猩猩))。本發明之非人類抗體可用於例如基於活體外及細胞培養之應用，或針對本發明抗體之免疫反應不出現、不顯著、可避免、無關緊要或合乎需要之任何其他應用。在一實施例中，將本發明之非人類抗體投與非人類個體。在另一實施例中，非人類抗體在非人類個體中不引發免疫反應。在另一實施例中，非人類抗體係來自與非人類個體相同之物種，例如將本發明之小鼠抗體投與小鼠。來自特定物種之抗體可由以下方式製得：例如，用所要免疫原(例如表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞，或可溶性 $\alpha 4\beta 7$ 多肽)免疫彼物種之動物，或使用產生彼物種之抗體的人工系統(例如產生特定物種之抗體的基於細菌或噬菌體呈現之系統)；或藉由用來自其他物種之恆定區置換來自一個物種之抗體的恆定區或藉由置換該抗體之一或多個

胺基酸殘基以使其與來自其他物種之抗體序列的相似程度更加接近而使來自一個物種之抗體轉化成來自另一物種之抗體。在一實施例中，抗體為包含來源於兩個或兩個以上不同物種之抗體之胺基酸序列的嵌合抗體。

抗原結合蛋白可由許多習知技術中之任一者製備。舉例而言，抗原結合蛋白可自天然表現其之細胞純化(例如抗體可自產生其之融合瘤純化)，或在重組表現系統中使用此項技術中已知之任何技術產生。參見，例如*Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet等人(編)，Plenum Press, New York (1980)；及*Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow及Land (編)，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988)。

此項技術中已知之任何表現系統可用於製備本發明之重組多肽。一般而言，用包含編碼所要多肽之DNA的重組表現載體轉型宿主細胞。可採用之宿主細胞為原核細胞、酵母或高級真核細胞。原核細胞包括革蘭氏陰性(gram negative)或革蘭氏陽性(gram positive)生物體，例如大腸桿菌或桿菌。高級真核細胞包括昆蟲細胞或哺乳動物來源之既定細胞株。適合哺乳動物宿主細胞株之實例包括猴腎細胞之COS-7細胞株(ATCC CRL 1651)(Gluzman等人，1981, Cell 23:175)、L細胞、293細胞、C127細胞、3T3細胞(ATCC CCL 163)、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、海拉細胞、BHK(ATCC CRL 10)細胞株，及來源於非洲綠猴腎細胞株CVI(ATCC CCL 70)之CVI/EBNA細胞株，如McMahan等人，1991, EMBO J. 10: 2821所述。供細菌、真菌、酵母及哺乳動物細胞宿主使用之適當選殖及表現載體由Pouwels等人(*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985)描述。

可在促進多肽表現之條件下培養經轉型細胞，且由習知蛋白質純化程序回收多肽。一種此類純化程序包括例如在 $\alpha 4\beta 7$ 之全部或一部

分(例如胞外域)與之結合之基質上使用親和層析。預期用於本文中之多肽包括實質上均質之重組哺乳動物抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體多肽，其實質上不含污染內源物質。

多肽之胺基酸序列可由此項技術中已知之任何方式來驗證，且其可與本文序列表中所揭示之序列相同，或可能因加工而與彼等序列有一或多個胺基酸殘基不同。舉例而言，對實質上均質多肽之全部或一部分，可藉由蛋白水解加工或在培養期間進行之其他加工，例如對C端Lys殘基之加工來移除輕鏈或重鏈(或相關單鏈分子)之C端胺基酸。或者，移除一個以上C端胺基酸殘基，例如兩個C端胺基酸，或三個、四個或五個C端胺基酸。舉例而言，可將C端截短以使所揭示抗體之重鏈的脯胺酸醯胺化。類似地，可缺少N端胺基酸，例如可缺少一個、兩個、三個、四個或五個N端胺基酸。

或者或另外，可對胺基酸殘基進行轉譯後修飾，例如(但不限於)可使麩胺醯胺(特定言之，N端之麩胺醯胺)環化或轉化成焦麩胺酸；或者或另外，可對胺基酸進行脫醯胺、異構化、糖化及/或氧化。可對本發明之多肽進行其他轉譯後修飾，包括在此項技術中熟知之位點處進行糖基化，例如N連接型糖基化或O連接型糖基化。如先前所述，可對多肽之胺基酸序列作出改變以排除該等變化或使該等變化減至最少，或在該加工有益之情況下促進該等變化。

實質上均質多肽之製劑可包含約1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%已進行特定形式之加工的多肽。實質上均質多肽之製劑可包含一些(小於或等於50%)、多數(大於50%，但小於90%)或實質上所有(大於90%)特定形式之經加工多肽。此外，該等製劑可包含具有不同程度之一種類型以上之加工相關修飾的多肽，例如多肽中可有一些、多數或實質上所有C端離胺酸(例如SEQ ID NO:72中之C端胺基酸)經

移除及一些、多數或實質上所有N端胺基酸已轉化成焦麩胺酸(例如表1及/或表2中或共同序列中所示之任何多肽)。

抗原結合蛋白可由許多已知技術中之任一者製備，且針對所要特性進行篩選。某些技術包括分離編碼相關抗原結合蛋白(例如抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體)之多肽鏈(或其部分)的核酸，及經由重組DNA技術操縱核酸。舉例而言，可使核酸與另一相關核酸融合，或改變該核酸(例如藉由突變誘發或其他習知技術)以添加一或多個胺基酸殘基、使一或多個胺基酸殘基缺失或取代一或多個胺基酸殘基。

在一態樣中，本發明提供本發明之抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體之抗原結合片段。該等片段可完全由抗體來源之序列組成或可包含其他序列。抗原結合片段之實例包括Fab、F(ab')₂、單鏈抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體及域抗體。其他實例提供於Lunde等人，2002, Biochem. Soc. Trans. 30:500-06中。

單鏈抗體可由重鏈及輕鏈可變域(Fv區)片段經由胺基酸橋(短肽連接子)連接產生單一多肽鏈而形成。該等單鏈Fvs(scFvs)已藉由編碼肽連接子之DNA融合於編碼該兩個可變域多肽(V_L及V_H)之DNAs之間而製備。所得多肽可自身對折形成抗原結合單體，或可形成多聚體(例如二聚體、三聚體或四聚體)，視兩個可變域之間可撓性連接子之長度而定(Kortt等人，1997, Prot. Eng. 10: 423；Kortt等人，2001, Biomol. Eng. 18:95-108)。藉由組合不同的含V_L及V_H之多肽，可形成結合不同抗原決定基之多聚scFvs(Kriangkum等人，2001, Biomol. Eng. 18: 31-40)。開發用於產生單鏈抗體之技術包括美國專利第4,946,778號；Bird, 1988, Science 242:423；Huston等人，1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879；Ward等人，1989, Nature 334:544；de Graaf等人，2002, Methods Mol Biol. 178: 379-87中所述之技術。

本發明之抗原結合蛋白(例如抗體、抗體片段及抗體衍生物)可包

含此項技術中已知之任何恆定區。輕鏈恆定區可為例如 κ 型或 λ 型輕鏈恆定區，例如人類 κ 型或 λ 型輕鏈恆定區。重鏈恆定區可為例如 α 型、 δ 型、 ϵ 型、 γ 型或 μ 型重鏈恆定區，例如人類 α 型、 δ 型、 ϵ 型、 γ 型或 μ 型重鏈恆定區。在一個實施例中，輕鏈恆定區或重鏈恆定區為天然產生恆定區之片段、衍生物、變異體或突變蛋白質。

自相關抗體得到不同子類或同型抗體的技術為已知，亦即子類轉換。因此，舉例而言，可自IgM抗體得到IgG抗體，反之亦然。該等技術允許製備新抗體，其具有指定抗體(親本抗體)之抗原結合特性，而且亦展現不同於親本抗體之抗體同型或子類相關之生物特性。可採用重組DNA技術。在該等程序中可採用編碼特定抗體多肽之選殖DNA，例如編碼所要同型抗體之恆定域的DNA。亦參見Lantto等人，2002, *Methods Mol. Biol.* 178:303-16。此外，若IgG4為所需，則亦可能需要將點突變(CPSCP- $\rightarrow$ CPPCP)引入鉸鏈區中，如Bloom等人，1997, *Protein Science* 6:407所述(以引用的方式併入本文中)，以降低形成可能導致IgG4抗體異質性之H鏈內二硫鍵之趨勢。

此外，得到具有不同特性(亦即，對所結合之抗原具有不同親和力)之抗原結合蛋白的技術亦為已知。一種此類技術稱作鏈改組(chain shuffling)，涉及在絲狀噬菌體表面上呈現免疫球蛋白可變域基因譜系，通常稱作噬菌體呈現。鏈改組已用於製備針對半抗原2-苯基噁唑-5-酮之高親和力抗體，如Marks等人，1992, *BioTechnology*, 10:779所述。

在另一實施例中，本發明提供一種自 $\alpha 4\beta 7$ 解離之低解離常數之抗原結合蛋白。在一個實施例中，抗原結合蛋白具有100 pM或100 pM以下之 K_d 。在另一實施例中， K_d 為10 pM或10 pM以下；在另一實施例中，其為5 pM或5 pM 以下，或其為1 pM或1 pM以下。在另一實施例中， K_d 實質上與本文實例中所述之抗體相同。在另一實施例中，

抗原結合蛋白與 $\alpha 4\beta 7$ 結合之 K_d 實質上與本文實例中所述之抗體相同。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制 $\alpha 4\beta 7$ 活性之抗原結合蛋白，該活性為例如與MAdCAM-1結合(或黏附於MAdCAM-1)、與表現MAdCAM-1之細胞結合，或表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞與表現MAdCAM-1之細胞之間的黏附。在一實施例中，抗原結合蛋白具有1000 pM或1000 pM以下之 IC_{50} 。在另一實施例中， IC_{50} 為500 pM或500 pM以下；在另一實施例中， IC_{50} 為100 pM或100 pM以下。在另一實施例中， IC_{50} 實質上與本文實例中所述之抗體相同。在另一實施例中，抗原結合蛋白抑制 $\alpha 4\beta 7$ 活性之 IC_{50} 實質上與本文實例中所述之抗體相同。

在一實施例中，本發明之抗原結合蛋白對 $\alpha 4\beta 7$ (或表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞)之表觀親和力為1000 pM或1000 pM以下。在其他實施例中，抗原結合蛋白所展現之表觀親和力為500 pM或500 pM以下、200 pM或200 pM以下、100 pM或100 pM以下、80 pM或80 pM以下、40 pM或40 pM以下，或15 pM或15 pM以下。在另一實施例中，抗原結合蛋白所展現之表觀親和力實質上與本文實例中所述之抗體相同。在另一實施例中，抗原結合蛋白具有實質上與本文實例中所述之抗體相同之表觀親和力。

在另一態樣中，本發明提供一種結合活性形式與非活性形式兩者之 $\alpha 4\beta 7$ 的抗原結合蛋白。在另一實施例中，抗原結合蛋白僅結合一種形式之 $\alpha 4\beta 7$ ，或優先結合一種形式之 $\alpha 4\beta 7$ 。舉例而言，抗原結合蛋白可在存在或不存在 Mn^{2+} 之情況下均結合 $\alpha 4\beta 7$ (亦即，其結合活性形式與非活性形式)。或者，抗原結合蛋白可僅在存在 Mn^{2+} 之情況下或僅在不存在 Mn^{2+} 之情況下結合 $\alpha 4\beta 7$ ，或其可能在一種此類條件下結合之親和力高於另一條件下結合之親和力，表明與特定形式之 $\alpha 4\beta 7$ 優先結合。

在另一實施例中，本發明提供一種與本文所揭示之抗體競爭結

合 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原結合蛋白。該競爭能力可由此項技術中熟知之方法來確定，例如藉由如使用螢光活化細胞分選(FACS)技術或其他類似檢定所觀測，在與表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞結合方面進行競爭，藉由在諸如黏附檢定(亦即，表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞與表現MAdCAM-1之細胞之間)之檢定中進行競爭，或藉由在本文所述之另一檢定中進行競爭。在一態樣中，與本文所揭示之抗體競爭結合 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原結合蛋白結合與該抗體相同之抗原決定基或重疊(或相鄰)之抗原決定基。在另一態樣中，與本文所揭示之抗體競爭結合 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原結合蛋白抑制 $\alpha 4\beta 7$ 之活性。

在另一態樣中，本發明提供一種與細胞表面上所表現之人類 $\alpha 4\beta 7$ 結合且在如此結合時抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與MAdCAM-1相互作用，而不會顯著降低細胞表面上 $\alpha 4\beta 7$ 之量的抗原結合蛋白。可使用測定或估算細胞表面上及/或細胞內部 $\alpha 4\beta 7$ 之量的任何方法。在一實施例中，本發明提供一種與細胞表面上所表現之 $\alpha 4\beta 7$ 結合且在如此結合時抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與MAdCAM-1相互作用，而不會顯著增加 $\alpha 4\beta 7$ 自細胞表面內化之速率的抗原結合蛋白。在其他實施例中，抗原結合蛋白與表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞結合使小於約75%、50%、40%、30%、20%、15%、10%、5%、1%或0.1%之細胞表面 $\alpha 4\beta 7$ 被內化。

在另一態樣中，本發明提供一種於活體外或活體內(例如當投與人類個體時)具有至少一天之半衰期的抗原結合蛋白。在一實施例中，抗原結合蛋白具有至少三天之半衰期。在另一實施例中，抗原結合蛋白具有四天或四天以上之半衰期。在另一實施例中，抗原結合蛋白具有八天或八天以上之半衰期。在另一實施例中，抗原結合蛋白經衍生處理或經修飾，以使其與未經衍生處理或未經修飾之抗原結合蛋白相比具有較長半衰期。在另一實施例中，抗原結合蛋白含有一或多個用以增加血清半衰期之點突變，諸如2000年2月24日公開之WO 00/09560(以引用的方式併入)中所述。

本發明進一步提供多專一性抗原結合蛋白，例如雙專一性抗原結合蛋白，例如經由兩個不同抗原結合位點或抗原結合區與 $\alpha 4\beta 7$ 之兩個不同抗原決定基結合或與 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原決定基及另一分子之抗原決定基結合的抗原結合蛋白。此外，如本文所揭示之雙專一性抗原結合蛋白可包含來自一種本文所述之抗體的 $\alpha 4\beta 7$ 結合位點及來自另一種本文所述之抗體的第二 $\alpha 4\beta 7$ 結合區，包括本文中參考其他公開案所述者。或者，雙專一性抗原結合蛋白可包含來自一種本文所述之抗體的抗原結合位點，及來自此項技術中已知之另一 $\alpha 4\beta 7$ 抗體或來自藉由已知方法或本文所述方法製備之抗體的第二抗原結合位點。

製備雙專一性抗體之眾多方法在此項技術中已知，且論述於2001年4月20日申請之美國專利申請案09/839,632(以引用的方式併入本文中)中。該等方法包括使用雜交融合瘤(如Milstein等人，1983, *Nature* 305:537所述)及其他(美國專利4,474,893、美國專利6,106,833)，及使抗體片段進行化學偶合(Brennan等人，1985, *Science* 229:81；Glennie等人，1987, *J. Immunol.* 139:2367；美國專利6,010,902)。此外，雙專一性抗體可經由重組方式產生，例如藉由使用白胺酸拉鏈部分(亦即，來自Fos及Jun蛋白之白胺酸拉鏈部分，其優先形成雜二聚體；Kostelny等人，1992, *J. Immunol.* 148:1547)，或如美國專利5,582,996中所述之其他鎖-鑰相互作用域結構。其他適用技術包括Kortt等人，1997，同上；美國專利5,959,083及美國專利5,807,706中所述之技術。

在另一態樣中，本發明之抗原結合蛋白包含抗體衍生物。經衍生處理之抗體可包含在特定用途中賦予該抗體所要特性(諸如較長半衰期)之任何分子或物質。經衍生處理之抗體可包含例如可偵測(或標記)部分(例如放射性分子、有色分子、抗原分子或酶分子、可偵測珠粒(諸如磁性珠粒或電緻密(例如金)珠粒)，或與另一分子(例如生物素

或抗生蛋白鏈菌素)結合之分子，治療性或診斷性部分(例如放射性部分、細胞毒性部分或醫藥活性部分)，或增強抗體對特定用途(例如投與個體，諸如人類個體，或其他活體內或活體外用途)之適合性的分子。可用於對抗體進行衍生處理之分子的實例包括白蛋白(例如人類血清白蛋白)及聚乙二醇(PEG)。與白蛋白連接及經聚乙二醇化之抗體衍生物可使用此項技術中熟知之技術來製備。在一實施例中，使抗體與轉甲狀腺素蛋白(transthyretin, TTR)或TTR變異體共軛或以其他方式連接。可用例如選自由葡聚糖、聚(n-乙基吡咯啉酮)、聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚環氧丙烷/聚環氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇及聚乙烯醇組成之群的化學物質對TTR或TTR變異體進行化學修飾。美國專利申請案第20030195154號。

在另一態樣中，本發明提供使用本發明之抗原結合蛋白篩選與 $\alpha 4\beta 7$ 結合之分子的方法。可使用任何適合篩選技術。在一實施例中，使與本發明之抗原結合蛋白結合之 $\alpha 4\beta 7$ 分子或其片段與本發明之抗原結合蛋白及與另一分子接觸，其中若該另一分子減少抗原結合蛋白與 $\alpha 4\beta 7$ 之結合，則該分子與 $\alpha 4\beta 7$ 結合。可使用任何適合方法(例如ELISA)偵測抗原結合蛋白之結合。可藉由如上所論述，對抗原結合蛋白進行可偵測標記來簡化對抗原結合蛋白與 $\alpha 4\beta 7$ 結合之偵測。在另一實施例中，進一步分析結合 $\alpha 4\beta 7$ 之分子以判定其是否抑制 $\alpha 4\beta 7$ 活化及/或信號傳導。

核酸

在一態樣中，本發明提供經分離之核酸分子。核酸包含例如編碼抗原結合蛋白之全部或一部分，例如本發明抗體或其片段、衍生物、突變蛋白質或變異體之一或兩條鏈的聚核苷酸；足以用作用以鑑別、分析、突變或擴增編碼多肽之聚核苷酸之雜交探針、PCR引子或定序引子的聚核苷酸；抑制聚核苷酸表現之反義核酸；及上述各核酸

之互補序列。核酸可具有任何長度。其長度可為例如5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、750、1,000、1,500、3,000、5,000個或5,000個以上核苷酸，及/或可包含一或多個額外序列(例如調控序列)，及/或為較大核酸(例如載體)之一部分。核酸可為單股或雙股，且可包含RNA及/或DNA核苷酸及其人工變異體(例如肽核酸)。

可自已經 $\alpha 4\beta 7$ 免疫之小鼠之B細胞中分離編碼抗體多肽(例如僅編碼重鏈或輕鏈、可變域，或編碼全長抗體多肽)之核酸。可由諸如聚合酶鏈反應(PCR)之習知程序來分離核酸。

本發明進一步提供在特定雜交條件下與其他核酸雜交之核酸。使核酸雜交之方法在此項技術中已熟知。參見，例如 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6。如本文所定義，中等嚴格雜交條件使用含有5×氯化鈉/檸檬酸鈉(SSC)、0.5% SDS、1.0 mM EDTA(pH 8.0)之預洗溶液，約50%甲醯胺、6× SSC之雜交緩衝液，及55°C之雜交溫度(或其他類似雜交溶液，諸如含有約50%甲醯胺之溶液，使用42°C之雜交溫度)，及在60°C下於0.5×SSC、0.1% SDS中之洗滌條件。嚴格雜交條件為在45°C下於6×SSC中雜交，接著在68°C下於0.1×SSC、0.2% SDS中洗滌一或多次。此外，熟習此項技術者可操縱雜交及/或洗滌條件以增強或降低雜交嚴格度，以使得包含彼此至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%相同之核苷酸序列的核酸通常保持彼此雜交。影響雜交條件選擇之基本參數及擬出適合條件之指南係由例如 Sambrook, Fritsch及Maniatis(1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 第9章及第11章；及 *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel等人編，John Wiley & Sons, Inc., 第2.10節及第6.3-6.4

節)闡述，且可易於由一般技術者基於例如DNA之長度及/或鹼基組成來確定。

可由以下方式引入變化：使核酸中發生突變，藉此在該核酸所編碼之多肽(例如抗原結合蛋白)之胺基酸序列中產生變化。可使用此項技術中已知之任何技術引入突變。在一實施例中，使用例如定點突變誘發方案來改變一或多個特定胺基酸殘基。在另一實施例中，使用例如隨機突變誘發方案來改變一或多個隨機選擇之殘基。然而，可表現突變型多肽，且針對所要特性(例如與 $\alpha 4\beta 7$ 結合，或阻斷 $\alpha 4\beta 7$ 與諸如MAdCAM之地址素(addressin)結合)對該多肽進行篩選。

可將突變引入核酸中，而不會顯著改變該核酸所編碼之多肽的生物活性。舉例而言，可進行核苷酸取代，使得在非必需胺基酸殘基處發生胺基酸取代。在一實施例中，使核苷酸序列或其所要片段、變異體或衍生物突變，以使得其編碼包含一或多個胺基酸殘基缺失或取代之胺基酸序列。在另一實施例中，突變誘發在一或多個胺基酸殘基鄰近插入胺基酸。或者，可將一或多個突變引入核酸中，其選擇性地改變該核酸所編碼之多肽的生物活性(例如 $\alpha 4\beta 7$ 結合、抑制 $\alpha 4\beta 7$ 與諸如MAdCAM之地址素結合，等)。舉例而言，突變可定量或定性改變生物活性。定量變化之實例包括增強、降低或消除活性。定性變化之實例包括改變抗原結合蛋白之抗原專一性。

在另一態樣中，本發明提供適合用作用以偵測本發明核酸序列之引子或雜交探針的核酸分子。本發明之核酸分子可僅包含編碼本發明之全長多肽之核酸序列的一部分，例如可用作探針或引子之片段或編碼本發明多肽之活性部分(例如 $\alpha 4\beta 7$ 結合部分)之片段。

基於本發明核酸之序列的探針可用於偵測核酸或類似核酸，例如編碼本發明多肽之轉錄物。探針可包含標記群，例如放射性同位素、螢光化合物、酶或酶輔因子。該等探針可用於鑑別表現多肽之細

胞。

在另一態樣中，本發明提供包含編碼本發明多肽或其一部分之核酸的載體。載體之實例包括(但不限於)：質體、病毒載體、非游離型哺乳動物載體及表現載體，例如重組表現載體。

本發明之重組表現載體可包含本發明之核酸，其呈適合在宿主細胞中表現該核酸之形式。重組表現載體包括一或多個基於欲用於表現之宿主細胞而選擇之調控序列，其可操作地連接於待表現之核酸序列。調控序列包括指導核苷酸序列在許多類型之宿主細胞中組成性表現之調控序列(例如SV40早期基因強化子、Rous肉瘤病毒啟動子及細胞巨大病毒啟動子)、指導核苷酸序列僅在某些宿主細胞中表現之調控序列(例如組織專一性調控序列，參見Voss等人，1986, Trends Biochem. Sci. 11:287；Maniatis等人，1987, Science 236:1237，該等文獻以全文引用的方式併入本文中)，及指導核苷酸序列回應於特定處理或條件而誘導性表現之調控序列(例如哺乳動物細胞中之金屬硫蛋白啟動子(metallothionin promoter)及原核系統與真核系統中之四環素反應性啟動子(tet-responsive promoter)及/或鏈黴素反應性啟動子(streptomycin responsive promoter)(見上))。熟習此項技術者應瞭解，表現載體之設計可視諸如待轉型之宿主細胞之選擇、所要蛋白質之表現量等因素而定。可將本發明之表現載體引入宿主細胞中，藉此產生由本文所述之核酸編碼之蛋白質或肽，包括融合蛋白或融合肽。

在另一態樣中，本發明提供本發明之重組表現載體已引入內部之宿主細胞。宿主細胞可為任何原核細胞(例如大腸桿菌)或真核細胞(例如酵母、昆蟲或哺乳動物細胞(例如CHO細胞))。可經由習知轉型或轉染技術將載體DNA引入原核細胞或真核細胞中。對於哺乳動物細胞之穩定轉染，已知，視所用表現載體及轉染技術而定，僅一小部分細胞可將外來DNA整合至其基因組中。為鑑別及選擇此等整合體，一

般將編碼可選擇標記(例如抗生素抗性)之基因連同相關基因一起引入宿主細胞中。較佳可選擇標記包括使對諸如 G418、潮黴素(hygromycin)及甲胺喋呤(methotrexate)之藥物具有抗性之可選擇標記。經所引入之核酸穩定轉染之細胞可藉由藥物選擇(例如已併有可選擇標記基因之細胞將存活，而其他細胞將死亡)以及其他方法來鑑別。

適應症

在一態樣中，本發明提供治療個體之方法。該方法可例如對個體具有一般有益健康之作用，例如其可延長個體之預期壽命。或者，該方法可例如治療、預防、治癒、減輕或改善(「治療」)疾病、病症、病狀或疾患(「病狀」)。欲根據本發明治療之病狀為特徵在於 $\alpha 4\beta 7$ 之不當表現或活性之病狀。該等病狀包括與細胞不當運輸相關之病狀，例如白血球(諸如淋巴細胞或單核細胞)運輸至包含表現 MAdCAM-1 之細胞的胃腸道或其他組織(由於白血球與表現 MAdCAM-1 之細胞結合所導致)。可據此治療之疾病包括發炎性腸病，諸如潰瘍性結腸炎、克羅恩氏病、乳糜瀉(非熱帶性口瘡)、與血清陰性關節病相關之腸病、顯微結腸炎或膠原性結腸炎、嗜伊紅血球性胃腸炎，或直腸結腸切除術及迴腸肛門吻合術後所致之貯袋炎。可根據本發明治療之其他病狀包括胰臟炎、胰島素依賴性糖尿病、乳房炎、膽囊炎、膽管炎、膽管周圍炎、慢性支氣管炎、慢性竇炎、哮喘及移植物抗宿主疾病。

抗原結合蛋白之治療方法及投藥

本文所提供之某些方法包含將 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白投與個體，藉此減少在特定病狀中起作用的 $\alpha 4\beta 7$ 誘導之生物反應。在特定實施例中，本發明之方法涉及例如經由投與個體或在離體程序中，使內源 $\alpha 4\beta 7$ 與 $\alpha 4\beta 7$ 抗原結合蛋白接觸。

術語「治療」涵蓋緩解或預防病症之至少一種症狀或其他態樣，或減輕疾病嚴重度，及其類似情況。抗原結合蛋白無需達成完全治癒或根除疾病之每種症狀或表現，即可構成有效治療劑。如相關領域中所公認，用作治療劑之藥物可減輕指定疾病病況之嚴重度，而無需消除疾病之每種表現，即可視為適用之治療劑。類似地，出於預防而投與之治療無需完全有效地預防病狀發作，即可構成有效預防劑。僅僅減輕疾病影響(例如藉由減少其症狀之數目或減輕症狀嚴重度，或藉由增加另一治療之有效性，或藉由產生另一有益效果)或降低疾病在個體中出現或惡化之可能性即足以。本發明之一實施例係關於如下方法：該方法包含以足以誘導優於反映特定病症之嚴重度之指標基線的持續改善之量且歷時足以誘導該持續改善之時間向患者投與 $\alpha 4\beta 7$ 拮抗劑。

如相關領域中所瞭解，以適於適應症之方式將包含本發明分子之醫藥組合物投與個體。醫藥組合物可藉由任何適合技術投與，包括(但不限於)非經腸、局部或藉由吸入投與。若進行注射，則醫藥組合物可由以下方式投與：例如經由關節內、靜脈內、肌肉內、病灶內、腹膜內或皮下途徑，藉由快速注射，或連續輸注。涵蓋例如在疾病或損傷部位處局部投藥，亦涵蓋經皮傳遞及自植入物持續釋放。藉由吸入進行傳遞包括例如經鼻或經口吸入、使用噴霧器、吸入氣霧劑形式之拮抗劑，及其類似情況。其他替代物包括滴眼液；口服製劑，包括丸劑、糖漿、口含錠或口嚼錠；及局部製劑，諸如洗劑、凝膠、噴霧及軟膏。

亦涵蓋在離體程序中使用抗原結合蛋白。舉例而言，可離體使患者之血液或其他體液與結合 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原結合蛋白接觸。可使抗原結合蛋白與適合不溶性基質或固體支撐材料結合。

抗原結合蛋白宜以包含一或多種其他組份之組合物形式投與，

該等組份為諸如生理學上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑。視情況，組合物另外包含一或多種生理學活性劑，例如第二發炎抑制物質或免疫抑制物質、抗血管生成物質、止痛物質等，其非排他性實例提供於本文中。在各種特定實施例中，除結合 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原結合蛋白以外，組合物亦包含1、2、3、4、5或6種生理學活性劑。

在一實施例中，醫藥組合物包含本發明之抗原結合蛋白以及一或多種選自由以下組成之群的物質：緩衝劑；抗氧化劑，諸如抗壞血酸；低分子量多肽(諸如具有少於10個胺基酸之多肽)；蛋白質；胺基酸；碳水化合物，諸如葡萄糖、蔗糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；麩胱甘肽；穩定劑；及賦形劑。中性緩衝鹽水或與同種血清白蛋白混合之鹽水為適當稀釋劑之實例。根據適當工業標準，亦可添加防腐劑，諸如苯甲醇。可使用適當賦形劑溶液(例如蔗糖)作為稀釋劑將組合物調配成凍乾物。適合組份在所採用之劑量及濃度下對接受者無毒。醫藥調配物中可採用之組份的其他實例呈現於Remington's Pharmaceutical Sciences，第16版(1980)及第20版(2000)，Mack Publishing Company, Easton, PA中。

供從業醫師所用之套組包括本發明之 $\alpha 4\beta 7$ 抑制物質及關於在治療本文所論述之任一病狀中使用之標記或其他指示。在一實施例中，該套組包括一或多種結合 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原結合蛋白之無菌製劑，其可呈如上所揭示之組合物形式且可處於一或多個小瓶中。

投藥劑量及頻率可根據以下因素而變化：諸如投藥途徑、所採用之特定抗原結合蛋白、待治療疾病之性質及嚴重度、病狀為急性抑或慢性，及個體之體型及一般狀況。適當劑量可藉由相關技術中已知之程序，例如在可包括劑量遞增研究之臨床試驗中確定。

本發明之 $\alpha 4\beta 7$ 抑制物質可投與例如一次或一次以上，例如經一定時段以規律之時間間隔投與。在特定實施例中，經至少1個月或1個

月以上之時段，例如歷經1、2或3個月或甚至無限期地投與抗原結合蛋白。對於治療慢性病狀，長期治療一般最為有效。然而，對於治療急性病狀，歷經較短時段(例如1至6週)投藥即足以。一般而言，投與抗原結合蛋白直至患者表現出優於所選指標之基線的醫學相關程度的改善。

本發明之特定實施例包括以每天每公斤個體體重約1奈克抗原結合蛋白(「1奈克/公斤/天」)至約10毫克/公斤/天、更佳約500奈克/公斤/天至約5毫克/公斤/天且最佳約5微克/公斤/天至約2毫克/公斤/天之劑量將抗原結合蛋白投與個體。在其他實施例中，每週一次、每週兩次或每週三次或三次以上將抗原結合蛋白投與成人，以治療 $\alpha 4\beta 7$ 介導之疾病、病狀或病症，例如本文所揭示之醫學病症。若進行注射，則每一成人劑量中抗原結合蛋白之有效量可在1-20 mg/m²範圍內，且較佳為約5-12 mg/m²。或者，可投與均一劑量(flat dose)，該量可在5-100毫克/劑之範圍內。一種均一劑量範圍為約20-30毫克/劑。在本發明之一實施例中，藉由注射重複投與25毫克/劑之均一劑量。若使用除注射以外之投藥途徑，則根據標準醫學規範適當調整劑量。治療方案之一個實例包括經至少三週之時段、每週一至三次注射約20-30毫克劑量之抗原結合蛋白，不過可能必需治療更長時段以誘導所要程度之改善。對於小兒個體(4-17歲)，一種例示性適合方案包括皮下注射0.4 mg/kg、直至25 mg最大劑量之抗原結合蛋白，每週投與兩次或三次。

本文所提供方法之特定實施例包括每週一或兩次皮下注射0.5 mg至10 mg、較佳3 mg至5 mg之抗原結合蛋白。另一實施例係關於每週一次肺部投與(例如利用噴霧器)3 mg或3 mg以上之抗原結合蛋白。

本文所提供治療方案之實例包含每週一次皮下注射1.5至3 mg劑量之抗原結合蛋白，以治療 $\alpha 4\beta 7$ 起作用之病狀。該等病狀之實例提供

於本文中，且包括例如先前所述之風濕性病狀，及表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞的過量或不當運輸起作用之其他病狀(如本文所述；例如發炎性腸病、胰臟炎等)。持續每週投與抗原結合蛋白直至達成所要結果，例如個體之症狀消退。需要時可恢復治療，或者可投與維持劑量。

本文所提供治療方案之其他實例包含皮下或靜脈內投與每公斤個體身體質量1、3、5、6、7、8、9、10、11、12、15或20毫克(mg/kg)劑量之本發明 $\alpha 4\beta 7$ 抑制劑。可將劑量一次投與個體，或以一定時間間隔投與一次以上，例如每天一次、每週三次、每週兩次、每週一次、每月三次、每月兩次、每月一次、每兩個月一次、每三個月一次、每六個月一次或每年一次。在治療過程中可改變或變更治療之持續時間及治療劑量及/或頻率之任何變化，以滿足特定個體需要。

在另一實施例中，以足以誘導至少一個反映所治療病症之嚴重度之指標的改善、較佳持續改善之量且持續足以誘導該改善之時間將抗原結合蛋白投與個體。可評估反映個體之疾患、疾病或病狀程度之各種指標以判定治療之量及時間是否充分。該等指標包括例如所述病症之疾病嚴重度、症狀或表現的臨床上公認之指標。在一實施例中，若個體在至少兩個隔開2至4週之時刻展現出改善，則該改善視為持續的。改善程度一般係由醫師確定，該醫師可基於徵象、症狀、活組織檢查或其他測試結果作出此確定，且亦可採用投與個體之問卷，諸如開發用於指定疾病之生活品質問卷。

$\alpha 4\beta 7$ 表現之改變及/或 $\alpha 4\beta 7$ 及/或其結合搭配物MAdCAM-1活化之改變與許多病症相關，包括例如胃腸系統之發炎性病狀。可篩選患有指定病症之個體以鑑別 $\alpha 4\beta 7$ 或MAdCAM-1表現及/或活化改變之個體，進而鑑別可在很大程度上受益於用結合 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原結合蛋白治療之個體。因此，本文所提供之治療方法視情況包含量測個體之 $\alpha 4\beta 7$ 或MAdCAM-1活化程度或表現量之第一步驟。可將抗原結合蛋白投與

$\alpha 4\beta 7$ 及/或MAdCAM-1表現及/或活化升高超過正常之個體。

可在用抗原結合蛋白治療之前、期間及/或之後監測個體之 $\alpha 4\beta 7$ 或MAdCAM-1活性程度，以偵測 $\alpha 4\beta 7$ 或MAdCAM-1活性之變化(若有變化)。對於一些病症， $\alpha 4\beta 7$ 及/或MAdCAM-1活性升高之發生率可根據諸如疾病階段或特定疾病形式之因素而變化。可採用已知技術來量測例如個體血液或組織樣本中之該活性。可使用任何適合之技術來量測 $\alpha 4\beta 7$ 或MAdCAM1活性。

本發明之方法及組合物之特定實施例包括使用抗原結合蛋白及一或多種其他 $\alpha 4\beta 7$ 拮抗劑，例如兩種或兩種以上本發明抗原結合蛋白，或本發明抗原結合蛋白及一或多種其他 $\alpha 4\beta 7$ 拮抗劑。在其他實施例中，單獨或與適用於治療患者所罹患之病狀的其他藥劑組合投與抗原結合蛋白。該等藥劑之實例包括蛋白質類藥物與非蛋白質類藥物。當共同投與多種治療劑時，如相關技術中所公認，可據此調整劑量。「共同投藥」及組合療法並不限於同時投藥，而且亦包括如下治療方案：其中在涉及將至少一種其他治療劑投與患者之治療過程中，至少一次投與抗原結合蛋白。

可與抗原結合蛋白一起共同投與之其他藥劑之實例為根據待治療之特定病狀而選擇之其他抗原結合蛋白或治療多肽。或者，可與 $\alpha 4\beta 7$ 拮抗劑一起共同投與適用於治療上文所論述之特定病狀之一的非蛋白質類藥物。

組合療法

在另一態樣中，本發明提供一種用抑制 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原結合蛋白及一或多種其他治療來治療個體之方法。在一實施例中，此類組合療法藉由例如攻擊腫瘤中之多個部位或分子目標而達成協同效應或加和效應。可與本發明相結合使用之組合療法之類型包括抑制或活化(適當時)單一疾病相關路徑中之多個結點、目標細胞中之多個路徑、及目

標組織內之多個細胞類型。

在另一實施例中，組合療法包含向個體投與2、3、4、5、6或6種以上本文所述之 $\alpha 4\beta 7$ 促效劑或拮抗劑。在另一實施例中，該方法包含向個體投與兩種或兩種以上共同抑制或活化(直接或間接) $\alpha 4\beta 7$ 介導之信號轉導的治療。該等方法之實例包括使用兩種或兩種以上抑制 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原結合蛋白之組合，抑制 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原結合蛋白與一或多種具有消炎特性之其他治療部分(例如非類固醇消炎劑、類固醇及/或免疫調節劑)之組合，或抑制 $\alpha 4\beta 7$ 之抗原結合蛋白與一或多種其他治療(例如手術、超音波或有效減輕炎症之治療)之組合。可與 $\alpha 4\beta 7$ 抑制劑組合之適用藥劑包括用於治療例如克羅恩氏病或潰瘍性結腸炎之藥劑，諸如胺基水楊酸鹽(例如美沙拉嗪(mesalamine))；皮質類固醇(包括潑尼松(predisone))；抗生素，諸如甲硝噻唑(metronidazole)或環丙沙星(ciprofloxacin)(或適用於治療例如罹患瘰癧病之患者的其他抗生素)；及免疫抑制劑，諸如硫唑嘌呤(azathioprine)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、甲胺喋呤、他克莫司(tacrolimus)及環孢黴素(cyclosporine)。亦預期該等藥劑之組合與本發明 $\alpha 4\beta 7$ 抑制劑一起使用。該(該等)藥劑可經口或由另一途徑投與，例如經由栓劑或灌腸劑。

此外，一或多種抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體或抗體衍生物可與一或多種分子或其他治療組合使用，其中該(該等)其他分子及/或治療不直接結合或影響 $\alpha 4\beta 7$ ，但該組合有效治療或預防所治療之病狀。舉例而言， $\alpha 4\beta 7$ 抑制劑可與益生菌療法或與用於恢復或維持正常腸道菌叢之其他療法組合使用。在一實施例中，一或多種分子及/或治療可治療或預防在療法過程中由一或多種其他分子或治療所致之病狀，例如噁心、疲勞、禿髮、惡病質、失眠等。在使用分子及/或其他治療之組合的每種情況下，可以任何有效次序或經任何有效時間長度投與個別分子及/或

治療，例如同時、依序或交替投與。在一實施例中，治療方法包含以一種分子或其他治療完成第一療程，繼而開始第二療程。第一療程結束與第二療程開始之間的時間長度可為使總體療法過程有效之任何時間長度，例如數秒、數分鐘、數小時、數天、數週、數月或甚至數年。

在另一實施例中，該方法包含投與一或多種本文所述之 $\alpha 4\beta 7$ 拮抗劑及一或多種其他治療(例如治療性或緩解性治療)。當方法包含將一種以上治療投與個體時，應瞭解，投藥之次序、時序、次數、濃度及體積僅受限於治療之醫療需求及限制，亦即，可例如同時、依序、交替或根據任何其他方案將兩種治療投與個體。

出於說明本發明之特定實施例或特徵之目的提供以下實際實例與預示實例，且該等實例並不限制本發明之範疇。

實例1：抗體製備

藉由用表現人類 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞，亦即經短暫轉染之人類胚腎(HEK)293細胞(293-a4b7)或經穩定轉染之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞(CHO-a4b7)免疫XenoMouseTM XG2 $\kappa\lambda$ (kl)小鼠及XG4kl小鼠(分別表現人類IgG2或IgG4及人類 κ 及 λ 輕鏈之轉殖基因小鼠；Abgenix Inc., Fremont CA)來產生針對人類 $\alpha 4\beta 7$ 之單株抗體。藉由螢光活化細胞分選器(FACS)分析比較經 $\alpha 4\beta 7$ 轉染之細胞與各別親本對照細胞來監測血清效價。將來自任一免疫活動之高免疫動物處死，且對脾及淋巴結組織進行融合瘤融合。

使用一系列檢定來鑑別 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗體。首先藉由螢光微容量檢定技術(Fluorometric Microvolume Assay Technology, FMATTM Applera Corporation, Foster City CA；高產量篩選細胞偵測系統)針對與經 $\alpha 4\beta 7$ 轉染之細胞相較於經虛擬轉染之細胞的結合來篩選融合瘤上清液。以與所述(Erle, J. Immunol, (1994) 153:517)類似之方

式評估經鑑別對與 $\alpha 4\beta 7$ 結合呈陽性之上清液(1001份來自CHO-a4b7細胞免疫活動之陽性結合上清液及1143份來自293-a4b7細胞免疫活動之陽性結合上清液)抑制HUT78細胞黏附於MAdCAM-1-Fc之能力。在此檢定中，60份來自CHO-a4b7活動之上清液及174份來自293-a4b7活動之上清液顯示抑制超過90%(n=2)且對該等上清液進行進一步專一性及效能分析。

製備經 $\alpha 4\beta 7$ 轉染、經 $\alpha 4\beta 1$ 轉染及經 $\alpha E\beta 7$ 轉染之293細胞，且與抑制檢定中鑑別之融合瘤上清液一起用於FACS分析中。將顯示僅與經 $\alpha 4\beta 7$ 轉染之細胞結合之上清液歸類為具雜二聚體專一性，因為針對此整合素之 $\alpha 4$ 次單元的抗體亦將結合經 $\alpha 4\beta 1$ 轉染之細胞，且結合 $\beta 7$ 鏈之抗體將結合經 $\alpha E\beta 7$ 轉染之細胞。亦藉由FACS分析來分析融合瘤上清液與經獼猴 $\alpha 4\beta 7$ 轉染之293細胞的結合活性。選擇7個來自CHO-a4b7活動之細胞株及25個來自293-a4b7活動之細胞株以供次選殖及進一步分析。

實例2：抗體分析

選殖所獲得之抗體分泌細胞，且分離編碼抗體之核酸並定序。使用定點突變誘發來製備與經分離序列有一或多個胺基酸殘基不同之變異體。抗體及變異體之輕鏈及重鏈之胺基酸序列展示於下表1及表2中。應瞭解，CDR及FR區之邊界可與以下所示不同，如本文先前所論述。

表1：輕鏈之序列分析

輕鏈	FR1	CDR1	FR2
1A10K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC	RASQGVSSWLA	WYQQKPGMAPKLLIY
11E7K1	EIVMTQSPATLSVSPGETATLSC	RASQTVSSNLA	WYQQKPGQAPRLLIY
11E7K2	DIQMTQSPSSLSASIGDRVITIC	RASQGIRNYLA	WYQRKPGKVPKLLIY
2F12K	DIQMTQSPSSVFASVGDRVITIC	RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPNLLIY
14E4L	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY

3A5K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC	RASQGVISWLA	WYQQKPGMAPKLLIY
10D7K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC	RASQGVNNWLA	WYQQKPGKAPKLLIF
27D8K	EIVMMQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSTNLA	WYQQKPGQAPRLLIY
18A11K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC	RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY
20D7K	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY
23H6K	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVNSNLA	WYQQKPGQAPRLLIY
27G8L	QSVLTQPPSVSEAPRQRVTISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
26C7K	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSDNLA	WYQQKPGQPPRLLIY
26H3K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC	QASQDISNYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
19G6K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITISC	QASQDINTYLN	WYQQKPGKVPKLLIY
22B2K	DVQMTQSPSSLSASVGDRVITIC	QASQDITDYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
24A2K	EVMMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSSNLA	WYQQKPGQAPRLLIF
26E9K	ELVMTQSPATLSVSPGERATVSC	RASQSVSSDLA	WYQQKPGQAPRLLIY
22F5K	EIVMTQSPATLSVFPGEATLSC	RASQSVSSDLA	WYQQKPGQAPRLLIY
26C10K	EIVLTQSPGTLSLSPGEGATLSC	RASQTVTSSYLA	WYQQSPSQSPRLLIY
17C8K	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSSNLV	WYQQKPGQAPRLLIY
25C9k	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC	RASQDISSWLA	WYQRKPGKAPKVLII
19E6L	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQSPVLVIY
26G2k	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC	RASQDISSWLA	WYQQKPGTAPKVLII
27G8L (a)	QSVLTQPPSVSGAPRQRVTISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
27G8L (b)	QSVLTQPRSVSGAPRQRVTISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
26H3K (c)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC	QASQDISNYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
1A10K (d)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC	RASQGVSSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY

表1(續)

輕鏈	CDR2	FR3
1A10K	AASILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
11E7K1	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
11E7K2	AASTLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYCC
2F12K	GASSLQN	GVPLRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
14E4L	DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSAILDITGLQTGDEADYYC
3A5K	AASILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
10D7K	ATSSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYC
27D8K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYFC
18A11K	GASNLES	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFANYYC

20D7K	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
23H6K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
27G8L	HDDLPS	GVSDRFSGSRSGTSASLAISGLQSEDETYYC
26C7K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
26H3K	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFTFTINSLQPEDIATYFC
19G6K	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISGLQPEDIATYYC
22B2K	DTSNLEA	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYC
24A2K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYCC
26E9K	GASSRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
22F5K	GASARAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
26C10K	GASTRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
17C8K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYYC
25C9k	SASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
19E6L	QDSKRPS	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC
26G2k	SASSLQN	GVPSRFSGRSGSGTDFALTISLQPEDFATYYC
27G8L (a)	HDDLPS	GVSDRFSGSRSGTSASLAISGLQSADETYYC
27G8L (b)	HDDLPS	GVSDRFSGSRSGTSASLAISGLRSADETYYC
26H3K (c)	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFTFTINSLQPEDIATYFC
1A10K (d)	AASILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC

表1(續)

輕鏈	CDR3	FR4
1A10K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
11E7K1	QQYDYWPPLT	FGGGTRVEIK
11E7K2	QKYDSAPFT	FGPGTKVDIK
2F12K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
14E4L	GTWDSSLSAGRV	FGGGTKLTVL
3A5K	QQANSFPWT	FGQGTNVEIK
10D7K	QQVNSFPGT	FGQGTKVEIK
27D8K	QQYNDWPT	FGGGTKVEIK
18A11K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
20D7K	QQYDSSPPT	FGGGTKVAIK
23H6K	QQYDDWPPVT	FGQGTRLEIK
27G8L	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
26C7K	QQYDDWPT	FGGGTRVEIK

26H3K	QQYDNLPCS	FGQGTKLEIK
19G6K	QQFDNLPIT	FGQGTRLEIK
22B2K	QQYDILPYS	FGQGTDLLEIK
24A2K	QQYDDWPT	FGGGTKVEIK
26E9K	QQYNNWPPLT	FGGGTKVEIK
22F5K	QQYHDWPPLS	FGGGTKVEIK
26C10K	QQYDSSPPT	FGGGTKVEIK
17C8K	QQYDDWPPLT	FGGGTTVEIK
25C9k	QQADSFPT	FGQGTKVEIK
19E6L	QAWDSSTVV	FGGGTKLTVL
26G2k	QQADSFPT	FGRGTKVEIK
27G8L (a)	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
27G8L (b)	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
26H3K (c)	QQYDNLPS	FGQGTKLEIK
1A10K (d)	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK

表2：重鏈之序列分析

重鏈	FR1	CDR1	FR2
1A10H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLN	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
11E7H1	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
11E7H2	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
2F12H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTVT	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
14E4H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
3A5H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLN	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
10D7H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
27D8H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DNYMS	WIRQAPGKGLEWVS
18A11H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLS	DLSIH	WVRQAPGKGLEWMG
20D7H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCTASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
23H6H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26G2H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
27G8H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYWMS	WVRQASGKGLEWVA
26C7H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26H3H	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	GYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
19G6H	QVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWIS
22B2H	EVQLVQSGAEVKEPGESLKISCKGSGYIFT	SYWIA	WVRQLPGKGLEWMG

24A2H	QVQLVESGGDLVEPGGSLRLSCAASGFTFR	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26E9H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFR	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
19E6H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
22F5H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
25C9H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFN	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26C10H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTFS	DYYMS	WIRQTPGKGLEWVS
17C8H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWLS
1A10H(a)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLN	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
27G8H(b)	EVQLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFS	SYWMS	WVRQASGKGLEWVA

表2(續)

重鏈	CDR2	FR3
1A10H	GFDPAEGKIISAQKFQD	RVTMTDDTSTD TAYMELSSLRSEDSAVYYCAT
11E7H1	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDN AKNSLYLQ LNSLRAEDTAVYYCAR
11E7H2	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDN SKNTLHLQM NSLRAEDTAVYYCAR
2F12H	GFDPDQGETIYAQKFQG	RVTMTEDTSTD TAYMELRSLRSEDTAVYYCTT
14E4H	YISNSGSV VYYADSVKG	RFTISRHN AKNSLYLQM NSLRADDTAVYYCAR
3A5H	GFDPAEGKIISAQKFQD	RVTMTDDTSTD TAYMELSSLRSEDSAVYYCAT
10D7H	YISSTGSAMYDADSVKG	RFTISRDN AKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR
27D8H	YISSSGSATYYADSVKG	RFTISRDN AKNSLYLQM SSLRAEDTAVYYCAR
18A11H	GFDPDQGETIYAQKFQG	RVTMTEDTSTD TAYMELSSLKSEDTAVYYCAT
20D7H	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDN AKNSLYLQM DSLRAEDTAVFYCAR
23H6H	YISSSGSAMYSADSVKG	RFTISRDN AKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR
26G2H	YISSIGSAIHYADSVKG	RFTISRDN AKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR
27G8H	NIKQDGSEKYYYVDSVKG	RFTISRDN AKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR
26C7H	YISRVGSTTYADSVKG	RFTISRDN AKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR
26H3H	IIPYDSDTRYSPSFQG	QVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMFYCAS
19G6H	YISSSGSTMYADSVKG	RFTISR VNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR
22B2H	IIDPNDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSIHTAYLQWSSLKASDTAMYYCAT
24A2H	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDN PKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR
26E9H	YISSSGSTSYCADSVKG	RFTISRDN AKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR
19E6H	AISGSGGSTYYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAK
22F5H	YISSTGSTLYADSVKG	RFTISRDN AKNSLYLQM DSLRADDAVYYCTR
25C9H	YISSSGSAIHYADSVKG	RFTISRDN AKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR
26C10H	YISSSGSAIHYADSVKG	RFTISRDN AKNSLYLQM DSLRAEDTAVFYCAR

17C8H	YISNSGSAMYYADSVKG	RFTISRDNARNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
1A10H (a)	GFDPAEGKIISAQKFQD	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR
27G8H (b)	NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNARNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAR

表2(續)

重鏈	CDR3	FR4
1A10H	LDFSSWFDP	WGQGTLLTVSS
11E7H1	DYSSGWFYFDY	WGRGTLTVSS
11E7H2	EHWNYAFDI	WGQGTMTVSS
2F12H	ESSSAWFDP	WGQGTLLTVSS
14E4H	DRSSAWDEAFDI	WGQGTMTVSS
3A5H	LDFSSWFDP	WGQGTLLTVSS
10D7H	EFSSGWSYFDY	WGQGTLLTVSS
27D8H	DYSSGWYYFDY	WGQGTLLTVSS
18A11H	GSSSSWFDP	WGQGTLLTVSS
20D7H	EHSSGYWYFDL	WGRGALTVSS
23H6H	EYSSGWYYFDY	WGRGTLTVSS
26G2H	EYSSGWAYFDY	WGQGTLLTVSS
27G8H	EGGYDWNADYYGMDV	WGQGTTLTVSS
26C7H	DYSSGWYYFDY	WGQGTLLTVSS
26H3H	HRLWLGEFPGPLNI	WGQGTMTVSS
19G6H	DRSSGLVSFDY	WGQGTLLTVSS
22B2H	HRLWLGTLPGGFYI	WGQGTMTVSS
24A2H	DFSSGYYYFDY	WGHGTLTVSS
26E9H	DYSSGWFYFDY	WGQGTLLTVSS
19E6H	APYSSSWALGLGMDV	WGQGTTLTVSS
22F5H	EYSSGWFFFDY	WGQGTLLTVSS
25C9H	EYSSGWAYFDY	WGQGTLLTVSS
26C10H	DHSSGYWYFDL	WGRGTLTVSS
17C8H	EYSSGWFFES	WGQGTLLTVSS
1A10H (a)	LDFSSWFDP	WGQGTLLTVSS
27G8H (b)	EGGYDWNADYYGMDV	WGQGTTLTVSS

進一步分析抗體之胺基酸序列的相似性。將κ輕鏈分成三組，且產生各組之共同序列。存在三種具有λ輕鏈之抗體，其中無一者彼此

具有足以形成可產生共同序列之相關序列組的相似性。所產生之變異體中之兩者在λ輕鏈中有所不同。將重鏈分成四組，其中單一重鏈歸入第五組，且產生組1至組4之共同序列。此等結果展示於下表3(a)及表3(b)中；共同序列展示於序列表中。圓括號中之數字表示序列表中之SEQ ID NO。

表3(a)：根據κ輕鏈將抗體分組，具有相應重鏈

κ 組1 (10個成員)	重鏈組 (H1-H5)	κ 組2 (9個成員)	重鏈組 (H1-H5)	κ 組3 (4個成員)	重鏈組 (H1-H5)
20D7K(10)	H1(38)	11E7K2(3)	H1(31)	22B2K(16)	H4(45)
11E7K1(2)	H1(30)	10D7K(7)	H1(35)	19G6K(15)	H1(44)
26C10K(20)	H1(51)	3A5K(6)	H2(34)	26H3K(14)	H4(43)
23H6K(11)	H1(39)	1A10K(1)	H2(29)	26H3K(c)(27)	H4(43)
26C7K(13)	H1(42)	25C9K(22)	H1(50)		
24A2K(17)	H1(46)	26G2K(24)	H1(40)		
27D8K(8)	H1(36)	18A11K(9)	H2(37)		
22F5(19)	H1(49)	2F12K(4)	H2(32)		
26E9K(18)	H1(47)	1A10K(d)(28)	H2(53)		
17C8K(21)	H1(52)				

表3(b)：根據λ輕鏈將抗體分組，具有相應重鏈

λ鏈 (3種抗體，無共同序列)	重鏈組 (H1-H5)
14E4(5)	H1(33)
27G8(12)	H3(41)
27G8(a)(25)	H3(54)
27G8(b)(26)	H3(54)
19E6(23)	H5(48)

共同序列內之CDR邊界(如先前所論述，其可能不同)如下：κ組1：CDR1 24-35、CDR2 51-57、CDR3 90-99；κ組2：CDR1 24-34、CDR2 51-56、CDR3 89-97；κ組3：CDR1 24-34、CDR2 50-56、CDR3

89-97；重鏈組1：CDR1 31-35、CDR2 50-66、CDR3 99-110；重鏈組2：CDR1 31-35、CDR2 50-66、CDR3 99-107；重鏈組3：CDR1 31-35、CDR2 50-66、CDR3 99-114；及重鏈組4：CDR1 31-35、CDR2 50-66、CDR3 99-114。

實例3：功能檢定

此實例描述用於表徵抗體之各種檢定。

HUT78黏附檢定

藉由在4°C下用稀釋於磷酸鹽緩衝液(pH 9.0)中之20 µg/mL MAdCAM-1(或類似濃度之人類IgG1作為塗布對照)塗布96孔盤隔夜來製備經塗布之盤(例如Costar® 3368 96孔盤；Corning Incorporated Life Sciences, Lowell MA)。移除塗層，且用100 µl 3% BSA/PBS阻斷盤，在室溫下培育1小時或1小時以上。用漢克氏平衡鹽溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)洗滌盤三次。

將生長至匯合之HUT78細胞(展現具有誘導/輔助表型之成熟T細胞株之特徵之人類T細胞淋巴瘤細胞株；ATCC TIB 161)製成小球且於HBSS中洗滌三次，接著以適當濃度再懸浮於HBSS中以得到於50 µl中之約30,000個細胞。

將待測試之抗體稀釋至兩倍最終濃度，且接著以1:4滴定於含有1% BSA及1 mM Mn^{2+} 的無鈣、無鎂HBSS中。將50 µl抗體滴定液或對照添加至VEE底盤之各孔中，繼而添加50 µl HUT78細胞。將細胞及抗體在4°C下培育30分鐘，接著添加至經塗布之盤中且在37°C下培育40分鐘。在室溫下於HBSS中洗滌經塗布盤上之細胞三次，在洗滌之間輕拍除去HBSS。將黏附細胞於-20°C下進行冷凍-解凍，繼而添加100 µl CyQuant®染色/溶解緩衝液(基於螢光之細胞定量檢定中所用之緩衝液，適用於高產量篩選Molecular Probes®；Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA)。在485 nm激發及530 nm發射下，例如使

用多標記微定量盤讀取器 Tecan GENiosPro(Tecan Group Ltd. Männedorf, Switzerland)來定量各孔之螢光信號。

人類CD4+細胞黏附檢定

在4°C下用人類MAdCAM-1-Fc或人類IgG(3 µg/ml，於20 mM磷酸鹽緩衝液(pH 9.0)、130 mM NaCl中)以100微升/孔塗布盤隔夜，接著在室溫下用200微升/孔阻斷試劑(於PBS中之3%牛血清白蛋白)阻斷至少2小時。接著用黏附緩衝液(30 mM HEPES(pH 7.4)、120 mM NaCl、1 mM MnCl₂、10 µg/ml人類IgG)洗滌盤三次。

製備待測試抗體之連續稀釋液，且將其添加至盤中(35微升/孔)；添加經分離之CD4⁺ T細胞(250,000個細胞/35微升/孔)，且在4°C下將盤培育2小時。用黏附緩衝液洗滌三次後，在-20°C下將盤冷凍隔夜。添加偵測試劑(100微升/孔CyQUANT®試劑；Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA)，且在37°C下將盤培育45分鐘。藉由在485 nm激發及530 nm發射下讀取螢光來測定結果。

結合人類CD4+CD45RA-記憶T細胞之EC₅₀

洗滌人類周邊血液單核細胞(PBMC；新鮮的或經冷凍與解凍，例如於含2% FBS之磷酸鹽緩衝鹽水中)，且將其再懸浮於含1% BSA、含或不含1 mM MnCl₂(視實驗而定；Mn²⁺為MAdCAM-1結合所必需)之HEPES緩衝液(30 mM HEPES+140 mM NaCl)中，且塗鋪於96孔盤中(10⁶個細胞/孔)。將細胞與10 µg/ml人類IgG一起於冰上培育30分鐘以阻斷非專一性結合。接著將細胞與經生物素標記之抗α4β7抗體的連續稀釋液一起在96孔盤中於冰上培育1小時，繼而添加抗生蛋白鏈菌素-藻紅素之1:100稀釋液(PE；Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA)、4 µl CD3-太平洋藍(Pacific Blue)、CD4-PerCP-Cy5.5及CD45RA-異硫氰酸螢光素(FITC)(BD Biosciences, San Jose CA)達100 µl之最終體積，且於冰上再培育1小

時。用HEPES緩衝液(相應地含或不含 MnCl_2)洗滌細胞兩次，且接著固定於200 μl HEPES緩衝液加0.5%三聚甲醛(又，相應地含或不含 MnCl_2)中。使用螢光活化細胞分選器(FACS)，例如BDTM LSR II桌面式流式細胞儀(BD Biosciences, San Jose CA)測定結合CD4+CD45RA-記憶T細胞之陽性 $\alpha 4\beta 7$ 抗體之百分率。CD4CD45RA-記憶細胞上50%之 $\alpha 4\beta 7$ 位點由 $\alpha 4\beta 7$ 抗體結合之 $\alpha 4\beta 7$ 抗體濃度即定義為 EC_{50} 。

阻斷MAdCAM-1-Fc與人類CD4+CD45RA-記憶T細胞結合之 IC_{50}

洗滌PBMC(如先前所述為新鮮的或經冷凍)，且將其再懸浮於含1% BSA及1 mM MnCl 之HEPES緩衝液(30 mM HEPES+140 nM NaCl)中，達 10^7 個細胞/毫升之最終濃度。如先前所述阻斷細胞；阻斷後，將細胞與抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體之連續稀釋液(或適當對照)一起在96孔盤中於冰上培育30分鐘，且接著與0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 經生物素標記之MAdCAM-1-Fc蛋白一起再培育1小時。

於含1 mM MnCl 之HEPES緩衝液中洗滌兩次後，如先前所述用抗生蛋白鏈菌素-PE之1:100稀釋液、4 μl CD3-太平洋藍、CD4-PerCP-Cy5.5及CD45RA-FITC處理細胞，達100 μl 之最終體積。於冰上培育1小時後，用含1 mM MnCl 之HEPES緩衝液洗滌細胞兩次，且接著固定於200 μl 緩衝液加0.5%三聚甲醛中。如先前所述，藉由螢光活化細胞分選器(FACS)分析來測定結合CD4+CD45RA-記憶T細胞之陽性MAdCAM-1-Fc之百分率。MAdCAM-1-Fc與CD4CD45RA-記憶細胞上之 $\alpha 4\beta 7$ 的結合50%受抑制之 $\alpha 4\beta 7$ 抗體濃度即定義為 IC_{50} 。

已活化T細胞上之視黃酸對 $\alpha 4\beta 7$ 之誘導

在存在或不存在視黃酸(1000 nM)之情況下利用抗CD3(結合於盤，5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、人類IL-2(20 ng/ml)活化經分離之人類PBMC，歷時7天。用染色緩衝液(PBS加0.5% BSA及1 mM MnCl)洗滌經活化之細胞兩次，且與100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 人類Ig一起培育30分鐘以阻斷非專一性結合。首

先在抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體之連續稀釋液中於冰上培育細胞30分鐘，且接著再用1 $\mu\text{g/ml}$ 經生物素標記之MAdCAM-1-Fc染色30分鐘。用染色緩衝液洗滌兩次後，用抗生蛋白鏈菌素-PE(1:1000)將細胞染色30分鐘。藉由例如用FACSCalibur™(BD Biosciences, San Jose CA)進行螢光活化細胞分選來分析細胞。可將以此方式製備之細胞用於其他實驗，諸如競爭檢定。

競爭檢定

亦藉由實質上如Fiscella等人，*Nature Biotechnology* 21:302-307; 2003所述之螢光微容量檢定技術或FMAT來檢測 $\alpha 4\beta 7$ 抗體與其他抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體及/或抗 $\beta 7$ 抗體競爭結合表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞之能力。簡言之，藉由例如用編碼 $\alpha 4$ 之核酸及表現 $\beta 7$ 之核酸短暫共轉染細胞來製備表現高含量 $\alpha 4\beta 7$ 的細胞。以類似方式，使用適於穩定轉染之細胞及方案來製備穩定細胞株。藉由例如使用針對 $\alpha 4$ 之抗體、針對 $\beta 7$ 之抗體及/或配位體(亦即，MAdCAM-1，例如MAdCAM-1-Fc融合蛋白)進行FACS來篩選經轉染之細胞。可對細胞進行數輪分選及選擇以得到具有可再現、高含量之 $\alpha 4\beta 7$ 表現的純系細胞株。

與S250N突變體結合

亦評估抗體識別 $\beta 7$ 鏈中S250N點突變體之能力，其已知對ACT-1結合至關重要(*J Immunol.* 159:1497, 1997)。以與先前關於製備表現高含量 $\alpha 4\beta 7$ 的細胞所述類似之方式來製備短暫共表現在 β 鏈中具有S250N突變之 $\alpha 4\beta 7$ 的293細胞(參考文獻)。

簡言之，使用細胞解離溶液收集總共 1×10^6 個經轉染細胞以供概況分析，且以1000 rpm向下旋轉5分鐘。接著在4°C、震盪下，用0.5 ml阻斷緩衝液(1%山羊血清/PBS)阻斷細胞30分鐘至1小時。對於MAdCAM-1-Fc染色，在4°C、震盪下，於 Mn^{2+} 緩衝液(30 mM HEPES+1%山羊血清中之1 mM MnCl_2)中培育細胞1小時。接著將細胞

以 1000 rpm 向下旋轉 5 分鐘，且添加 0.5 ml 新鮮阻斷緩衝液以及 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 一次抗體，繼而在 4°C、震盪下培育 30 分鐘至 1 小時。用 4 ml 冷 PBS(每次洗滌)洗滌兩次後，添加於 0.5 ml 阻斷緩衝液中之二次抗體(亦即，山羊抗 IgG-藻紅素共軛抗體；Southern Biotech，經 1:250 稀釋或 0.1 微克/ 10^6 個細胞)，且在 4°C 下培育細胞 20-30 分鐘。最後一次用 4 ml 冷 PBS 洗滌細胞，接著再懸浮於 0.5 ml FACS 緩衝液中以供概況分析。

與單一核苷酸多形性(SNP)結合

對於 $\alpha 4$ 次單元之 SNP 分析，藉由聚合酶鏈反應(PCR)擴增來自 90 名代表不同種族群之個體(180 個單倍體基因組)的 $\alpha 4$ 基因外顯子 1-28，且隨後定序。鑑別 $\alpha 4$ 基因之編碼區中之三個候選 SNP，且三者之一引起胺基酸變化(Arg878Gln)。以類似方式進行 $\beta 7$ 次單元之 SNP 分析，對來自 90 名代表不同種族群之個體(180 個單倍體基因組)的 $\beta 7$ 基因外顯子 2-15 之編碼區進行 PCR 擴增，且隨後定序。鑑別三個 SNP，且其中兩者引起胺基酸變化。將內部 SNP 分析資料與 NCBI 資料庫(NCBI：國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information)，國家衛生研究院(National Institutes of Health，NIH)之國家醫學圖書館(National Library of Medicine，NLM)的分部)之資訊相比較。僅在 $\alpha 4$ 次單元中引起 Gln878Arg 之 A/G 突變以高頻率發生-在內部 SNP 與公共資料庫中分別為 20% 或 30%。其他 SNP 以低頻率發生。此資訊概述於下表 4 中。

表 4：人類 $\beta 7$ 及 $\alpha 4$ 中 SNP 之頻率

	SNP	替代性對偶基因頻率-NCBI 資料庫	替代性對偶基因頻率-內部分析	位置
$\beta 7$	E97V	NA	A(0.989)/T(0.019)	細胞外
	R213S	C(0.975)/A(0.25)	無觀測資料	細胞外

	G611E	NA	無觀測資料	細胞外
	G629S	NA	A(0.989)/T(0.019)	細胞外
	H672Y	NA	無觀測資料	細胞外
$\alpha 4$	V824A	T(0.972)/C(0.028)	無觀測資料	細胞外
	Q878R	A(0.648)/G(0.352)	A(0.783)/G(0.217)	細胞外
	R1007S	NA	無觀測資料	細胞內

產生代表 $\alpha 4$ 與 $\beta 7$ 之胞外域中改變胺基酸之SNP($\alpha 4\beta 7$ (E97V)、 $\alpha 4\beta 7$ (R213S)、 $\alpha 4\beta 7$ (G629S)、 $\alpha 4$ (V824A) $\beta 7$ 、 $\alpha 4$ (Q878R) $\beta 7$)的點突變構築體。將各點突變構築體連同野生型搭配物表現構築體一起轉染至293細胞中。首先用1 $\mu\text{g/ml}$ 人類IgG或抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體將經轉染之293細胞染色，用PBS洗滌，且用藻紅素共軛之二次抗體山羊抗人類IgG染色。用PBS洗滌後，藉由例如使用FACSCalibur™(BD Biosciences, San Jose CA)進行螢光活化細胞分選來分析細胞。各抗體染色之螢光染色強度(幾何平均值)展示於下表5中。

表5：與SNP結合

	野生型	E97V	R213S	G629S	V824A	Q878R
IgG	8	7	7	7	7	7
1A10	122	135	31	80	102	70
3A5	124	135	31	80	110	71
2F12	129	134	37	80	112	73
18A11	92	105	30	63	82	56
22B2	97	108	58	65	85	58
26H3	93	106	49	62	82	55
27G8	102	116	59	68	88	58
26G2	99	113	38	64	86	58
17C8	93	96	49	58	74	51
19G6	94	108	46	59	67	46
25C9	96	106	33	59	77	51

此等結果指示所測試之所有抗體皆與 $\alpha 4\beta 7$ 之已知SNP結合。

在下表6中比較若干不同檢定中各種 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗體之活性。

表6：表徵針對 $\alpha 4\beta 7$ 之抗體

抗體	HUT78黏附 IC ₅₀ (ng/ml)	MAdCAM-1競爭IC ₅₀ (ng/mL)	CD4+CD45RA-細胞 結合EC ₅₀ (ng/mL)	a4b7(S250N) 結合
1A10	6.1	6.2	4.9	-
3A5	7.5	6.2	5.6	-
2F12	11.4	4.6	3.3	-
18A11	7.4	7.3	4.7	-
22B2	3.7	23.2	5.1	-
26H3	8.9	14.1	9.3	-
27G8	14.9	8.7	6.3	-
26G2	6.9	99.6	32.6	+
17C8	6.8	31.1	22.9	+
19G6	12.2	103.3	32.9	+
25C9	13.7	77.6	NA	+

Soler等人報導稱為維多珠單抗之人類化抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體之結合專一性(J Pharmacol Exp Ther 330:864; 2009)。據報導，此抗體對記憶CD4+ T淋巴細胞具有0.042 $\mu\text{g/ml}$ (42 ng/ml)之EC₅₀。維多珠單抗亦抑制可溶性MAdCAM-1與 $\alpha 4\beta 7^{\text{hi}}$ 記憶T細胞結合，其IC₅₀為0.034 $\mu\text{g/ml}$ (34 ng/ml)。相比之下，表6中所示之許多抗體對記憶T細胞(亦即，CD4+CD45RA-細胞)具有小於10 ng/ml之EC₅₀，且其中所有抗體皆具有小於35 ng/ml之EC₅₀(在此檢定中，所有抗體亦具有大於0.1 ng/ml之EC₅₀)。另外，表6中所示之數種抗體在MAdCAM競爭檢定中顯示小於10 ng/ml之IC₅₀，且許多抗體顯示小於30 ng/ml之IC₅₀(在此檢定中，所有抗體亦展現大於0.1 ng/ml之IC₅₀)。儘管Soler等人並未提及維多珠單抗結合 $\alpha 4\beta 7$ 之S250N突變體之能力，但已知維多珠單抗所來源之鼠類抗體ACT-1不能結合S250N突變體(Tidswell等人，J Immunol

159:1497; 1997)，且根據Soler等人，維多珠單抗與ACT-1展現相同抗原專一性。因此，維多珠單抗亦不會結合S250N突變體，與表6中所示之數種抗體形成對比。

實例4：其他分析

選擇在上述功能檢定中具有不同特性之數種代表性抗體用於如下所述之其他分析。

與人類 $\alpha 4\beta 7$ 之結合親和力

為量測人類抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體之細胞結合親和力，可使用量測溶液相中之結合事件的動力學排阻檢定(Kinetic Exclusion Assay)來計算平衡解離常數 K_d 。實質上如先前Xie等人，*J. Imm. Methods* 304:1 (2005)及Rathanaswami等人，*Anal. Biochem.* 373:52 (2008)所述，使用KinExA®技術(Sapidyne Instruments, Boise, ID)。簡言之，將表現人類 $\alpha 4\beta 7$ 之HUT78細胞以1:3自約 50^6 個細胞/毫升滴定至約400個細胞/毫升，且接著在4°C下用最終濃度為2或30 pM之mAb 2F12或18A11及30或500 pM之17C8平衡18小時。藉由KinExA®技術使上清液通過預塗有山羊抗人類Fc之PMMA珠粒來量測平衡狀態下上清液中剩餘之游離抗體，且用山羊抗人類(H+L) Cy5偵測(實質上如Rathanaswami等人，*Biochem Biophys Research Commun*:1004 (2005)所述)。使用KinExA®軟體，藉由將所有指定曲線同時擬合於單一 K_d 值之「n曲線分析」來獲得平衡解離常數(K_d)(Rathanswami等人，2005及Xie等人，同上)；結果展示於下表7中。

表7：抗體之結合親和力

抗體	K_d (pM)	比率 (低Ab)	誤差%	低 K_d	高 K_d
2F12	4.56	0.44	3.80	1.94	11.12
18A11	0.90	2.22	4.40	0.23	2.29
17C8	29.36	1.02	3.58	12.09	74.53

此等抗體在KinExA®檢定中顯示大於0.05 pM，但小於80 pM、小於15 pM或小於5 pM之 K_d 。

PK/PD特徵

在靜脈內(IV；5 mg/kg)或皮下(SC；0.5或5 mg/kg)投藥之後對雄性獼猴體內三種完全人類抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體進行單劑量藥物動力學(PK)及藥效學(PD)研究。在靜脈內投與5 mg/kg後，觀測到中樞循環中類似的初始PK暴露(C_0 ；零時濃度)及分布。皮下投藥後， C_{max} (血清中之最大濃度)與AUC(濃度-時間曲線下之面積)在0.5-5 mg/kg皮下劑量範圍內對於所有三種抗體展現與劑量成比例。皮下投藥後，三種測試抗體之絕對生物可用性在44%至68%之範圍內。

利用PE共軛之抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體27G8來定量抗體處理之前及之後T細胞上之游離 $\alpha 4\beta 7$ 。藉由在抗體處理之前及之後、於所測試之10 mg/ml抗體存在下用PE共軛之抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體27G8染色來控制背景值。利用與處理前相比各抗體之游離 $\alpha 4\beta 7$ 位點之百分率來確定部分飽和度。使用CD4-PerCP、CD99-APC及CD28-FITC來區分原初細胞、中樞記憶細胞及效應記憶細胞。因獼猴記憶細胞群體之可變性及有限檢定敏感性而顯示原初T細胞上 $\alpha 4\beta 7$ 之部分飽和度。對於18A11處理，所有三個劑量組自第1天至第14天保持飽和。第29天，所有三個組皆失去覆蓋。在2F12與17C8處理中，第14天於低劑量(0.5 mg/Kg)組中觀測到失去目標覆蓋。

除偵測游離 $\alpha 4\beta 7$ 以外，亦藉由在不存在或存在10 mg/ml抗體之情況下用PE共軛之抗人類抗體A35染色來確定目標飽和度。藉由將樣本與10 mg/ml抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體一起預培育，接著用抗人類抗體染色來估算全部 $\alpha 4\beta 7$ 位點。對於各樣本，利用由抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體佔據之全部 $\alpha 4\beta 7$ 位點之百分率來確定目標飽和度。三種完全人類抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體顯示在靜脈內投與5 mg/kg後14天內， $\alpha 4\beta 7$ 之飽和度平均維持於81%至100%。

使用直接 $E_{\max}$ 模型對血清抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體濃度及相應 $\alpha 4\beta 7$ 受體飽和度數據進行PK/PD模擬。該模型估算出以下PD參數： $E_{\max}$ (最大 $\alpha 4\beta 7$ 受體飽和度)為92%， EC_{50} (達到50% $E_{\max}$ 之抗 $\alpha 4\beta 7$ 抗體濃度)為52 ng/mL，且 E_0 (初始 $\alpha 4\beta 7$ 受體飽和度)為18%。所有三種抗體對飽和 $\alpha 4\beta 7$ 受體皆展現有效的活體內PD作用，其中在獼猴體內之平均 $t_{1/2}$ 為約3-5天。

序列表

<110> 美商安美基公司

<120> α -4- β -7 雜二聚體專一性拮抗抗體

<130> A-1459-_____-NP

<140> 099107689

<141> 2010-03-16

<150> 61/162,154; 61/306,829

<151> 2009-03-20; 2010-02-22

<160> 72

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
85 90 95

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

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Tyr Trp Pro Pro
85 90 95

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

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

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

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
 85 90 95

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

<210>	5
<211>	111
<212>	PRT
<213>	智人

<400> 5

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

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

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ile Leu Asp Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

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

Ser Ala Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210>	6
<211>	107
<212>	PRT
<213>	智人

<400> 6

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ile Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Asn Asn Trp
20 25 30

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

Phe Ala Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 8
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Thr
85 90 95

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

<210> 9
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
85 90 95

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

<210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Ala Ile Lys
100 105

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Trp Pro Pro
85 90 95

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

<210> 12

<211> 110

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

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

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

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

Ile Tyr His Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Asn
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Trp Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

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

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

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

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

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

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 Ser Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Thr Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Asp Val 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 Thr Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ile Leu Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 17
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

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

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

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

Phe Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Cys Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Trp Pro Thr
85 90 95

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

<210> 18
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Val Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asp
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro
85 90 95

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

<210> 19
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

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

Glu Gly Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asp
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Ala Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Asp Trp Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 20
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 20

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

Glu Gly Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Val Thr Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Ser Gln Ser Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 21
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 21

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Trp Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 23
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

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

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

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

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

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

<210> 24
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 25
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

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

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

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

Ile Tyr His Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 26
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

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

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

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

Ile Tyr His Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 27

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

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

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

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

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 28

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
85 90 95

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

<210> 29
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

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

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

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

Gly Gly Phe Asp Pro Ala Glu Gly Lys Ile Ile Ser Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 31
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu His Trp Asn Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Val Thr Asp Leu
20 25 30

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

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

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

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

Thr Thr Glu Ser Ser Ser Ala Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Val Val Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Ser Ser Ala Trp Asp Glu Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

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

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

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

Gly Gly Phe Asp Pro Ala Glu Gly Lys Ile Ile Ser Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35

<211> 120

<212> PRT

<213> 智人

<400> 35

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Thr Gly Ser Ala Met Tyr Asp Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Phe Ser Ser Gly Trp Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36

<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Ser Asp Leu
20 25 30

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 38
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 38

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 39
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 39

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Met Tyr Ser Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ile Gly Ser Ala Ile His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Tyr Ser Ser Gly Trp Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41
<211> 125
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Asp Trp Asn Tyr Ala Asp Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 42
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Arg Val Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43
<211> 123
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys

	85		90		95
Ala Ser His	Arg Leu Trp Leu Gly Glu Phe Pro Gly Pro Leu Asn Ile				
	100		105		110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		
<210>	44				
<211>	120				
<212>	PRT				
<213>	智人				
<400>	44				
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly					
1	5		10		15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr					
	20		25		30
Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile					
	35		40		45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Met Tyr Tyr Ala Asp Ser Val					
	50		55		60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Val Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr					
	65		70		75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95
Ala Arg Asp Arg Ser Ser Gly Leu Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln					
	100		105		110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		
<210>	45				
<211>	123				
<212>	PRT				
<213>	智人				
<400>	45				
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Glu					
1	5		10		15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr					
	20		25		30
Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met					
	35		40		45
Gly Ile Ile Asp Pro Asn Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe					
	50		55		60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile His Thr Ala Tyr					
	65		70		75
					80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr His Arg Leu Trp Leu Gly Thr Leu Pro Gly Gly Phe Tyr Ile
100 105 110

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

<210> 46
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Cys Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Ala Pro Tyr Ser Ser Ser Trp Ala Leu Gly Leu Gly Met Asp
100 105 110

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

<210> 49
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Thr Gly Ser Thr Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Thr Arg Glu Tyr Ser Ser Gly Trp Phe Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Tyr Ser Ser Gly Trp Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51

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

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

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

35	40	45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile His Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
80		
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys		
85	90	95
100	105	110
Ala Arg Asp His Ser Ser Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg		
115	120	
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210> 52		
<211> 120		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 52		
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly		
1	5	10
15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr		
20	25	30
Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu		
35	40	45
Ser Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Ala Met Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
100	105	110
Ala Arg Glu Tyr Ser Ser Gly Trp Phe Phe Phe Glu Ser Trp Gly Gln		
115	120	
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210> 53		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 53		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Asn Asp Leu		
20	25	30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Ala Glu Gly Lys Ile Ile Ser Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 54
<211> 125
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Asp Trp Asn Tyr Ala Asp Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 55
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈共同序列

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (2).. (2)
<223> X可為Val、Leu或Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3).. (3)
<223> X可為Met或Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (4)
<223> X可為Met或Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5).. (5)
<223> X可為Met或Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9).. (9)
<223> X可為Ala或Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13).. (13)
<223> X可為Leu或Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14).. (14)
<223> X可為Phe或Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18).. (18)
<223> X可為Gly、Arg或Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21).. (21)
<223> X可為Val或Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28).. (28)
<223> X可為Thr或Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30).. (30)
<223> X可為thr、Asn或Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30).. (30)
<223> X可為Thr、Asn或Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31).. (31)
<223> X可為Thr、Asp或Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32).. (32)
<223> X可為Asn、Asp或Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (33).. (33)
<223> X可為Tyr或不存在

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (35).. (35)
<223> X可為Val或Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (40).. (40)
<223> X可為Ser或Lys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (42).. (42)
<223> X可為Ser或Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (44).. (44)
<223> X可為Ser、Pro或Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50).. (50)
<223> X可為Phe或Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (54).. (54)
<223> X可為Thr、Ala或Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (61).. (61)
<223> X可為Ala或Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (71).. (71)
<223> X可為Glu或Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (78).. (78)
<223> X可為Ser或Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (80).. (80)
<223> X可為Gln或Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (81).. (81)
<223> X可為Pro或Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (88).. (88)
<223> X可為Phe、Cys或Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (93).. (93)
<223> X可為His、Asn或Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (94).. (94)
<223> X可為Asp、Asn、Tyr或Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (95).. (95)
<223> X可為Trp或Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (97).. (97)
<223> X可為Pro或不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (98).. (98)
<223> X可為Val、Leu或不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99).. (99)
<223> X可為Thr或Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (102).. (102)
<223> X可為Gln或Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (105).. (105)
<223> X可為Arg、Thr或Lys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (106).. (106)
<223> X可為Leu或Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (107).. (107)
<223> X可為Glu或Ala

<400> 55

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

Glu Xaa Ala Thr Xaa Ser Cys Arg Ala Ser Gln Xaa Val Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Leu Xaa Trp Tyr Gln Gln Xaa Pro Xaa Gln Xaa Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Xaa Gly Ala Ser Xaa Arg Ala Thr Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Xaa Phe Thr Leu Thr Ile Ser Xaa Leu Xaa
65 70 75 80

Xaa Glu Asp Phe Ala Val Tyr Xaa Cys Gln Gln Tyr Xaa Xaa Xaa Pro
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Xaa Ile Lys
100 105

<210> 56
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈共同序列

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (11).. (11)
<223> X可為Val或Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12).. (12)
<223> X可為Ser或Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15).. (15)
<223> X可為Val或Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28).. (28)
<223> X可為Asp或Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29).. (29)
<223> X可為Ile或Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30).. (30)
<223> X可為Ser、Ile、Asn或Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31).. (31)
<223> X可為Ser或Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32).. (32)
<223> X可為Trp或Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (38).. (38)
<223> X可為Arg或Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (42).. (42)
<223> X可為Lys、Met或Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43).. (43)
<223> X可為Ala或Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45).. (45)
<223> X可為Lys或Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (46).. (46)
<223> X可為Val或Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (49).. (49)
<223> X可為Tyr或Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50).. (50)
<223> X可為Ser、Ala或Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (51).. (51)
 <223> X可為Ala或Thr

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (53).. (53)
 <223> X可為Ser、Ile、Asn或Thr

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55).. (55)
 <223> X可為Gln或Glu

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (56).. (56)
 <223> X可為Ser或Asn

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (60).. (60)
 <223> X可為Ser或Leu

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (65).. (65)
 <223> X可為Ser或Arg

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (72).. (72)
 <223> X可為Ala或Thr

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76).. (76)
 <223> X可為Ser或Asn

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (83).. (83)
 <223> X可為Phe或Val

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (85).. (85)
 <223> X可為Thr或Asn

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (87).. (87)
 <223> X可為Tyr或Cys

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (90).. (90)
 <223> X可為Gln或Lys

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (91).. (91)
 <223> X可為Ala、Val或Tyr

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (92).. (92)
 <223> X可為Asp或Asn

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94).. (94)
 <223> X可為Phe或Ala

 <220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (96).. (96)
<223> X可為Trp、Gly或Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (100).. (100)
<223> X可為Gln、Arg或Pro

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (103).. (103)
<223> X可為Lys或Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (105).. (105)
<223> X可為Glu或Asp

<400> 56

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

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

Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Leu Xaa Xaa Gly Val Pro Xaa Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Xaa Ala Xaa Tyr Xaa Cys Gln Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Pro Xaa
85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Val Xaa Ile Lys
100 105

<210> 57
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈共同序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2).. (2)
<223> X可為Ile或Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22).. (22)
<223> X可為Ser或Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30).. (30)
<223> X可為Ser、Asn或Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31).. (31)

<223> X可為Asn、Thr或Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (43).. (43)

<223> X可為Ala或Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (51).. (51)

<223> X可為Ala或Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (56).. (56)

<223> X可為Thr或Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (76).. (76)

<223> X可為Asn或Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (77).. (77)

<223> X可為Gly或Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (87).. (87)

<223> X可為Phe或Tyr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (91).. (91)

<223> X可為Phe或Tyr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (93).. (93)

<223> X可為Asn或Ile

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (96).. (96)

<223> X可為Cys、Ser、Ile或Tyr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (97).. (97)

<223> X可為Ser或Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (103).. (103)

<223> X可為Lys、Arg或Asp

<400> 57

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Xaa	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Xaa	Xaa	Tyr
		20					25						30		

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Xaa Cys Gln Gln Xaa Asp Xaa Leu Pro Xaa
85 90 95

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

<210> 58
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈共同序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X可為Gly或Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X可為Lys或Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> X可為Thr、Val或Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> X可為Ser、Arg或Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> X可為Tyr或Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (40)..(40)
<223> X可為Ala或Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(48)
<223> X可為Val、Ile或Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (53)..(53)
<223> X可為Ser、Arg或Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (54)..(54)
<223> X可為Ser、Thr、Val或Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> X可為Ala、Thr或Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58)..(58)
<223> X可為thr、Val、Met、Ile、Leu或Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (59).. (59)
 <223> X可為Tyr或His

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (60).. (60)
 <223> X可為Tyr、Ser、Asp或Cys

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (73).. (73)
 <223> X可為Asp、Val或His

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (75).. (75)
 <223> X可為Ala或Pro

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76).. (76)
 <223> X可為Lys或Arg

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (83).. (83)
 <223> X可為Met或Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (84).. (84)
 <223> X可為Asp、Asn或Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (89).. (89)
 <223> X可為Glu或Asp

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (91).. (91)
 <223> X可為Thr或Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94).. (94)
 <223> X可為Phe或Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97).. (97)
 <223> X可為Ala或Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99).. (99)
 <223> X可為Glu或Asp

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (100).. (100)
 <223> X可為His、Tyr、Phe或Arg

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (103).. (103)
 <223> X可為Gly或Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (104).. (104)
 <223> X可為Tyr、Trp或Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (105).. (105)
 <223> X可為Asp或noe

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (106).. (106)
 <223> X可為Trp、Ala、Phe、Tyr、Ser、Val或Glu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (107).. (107)
 <223> X可為Tyr、Phe、Ser或Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (109).. (109)
 <223> X可為Asp或Glu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (110).. (110)
 <223> X可為Leu、Tyr、Ser或Ile

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (113).. (113)
 <223> X可為Arg、Gln或His

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (115).. (115)
 <223> X可為Ala或Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (116).. (116)
 <223> X可為Leu或Met

<400> 58

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Xaa Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Asp Xaa
 20 25 30

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

Ser Tyr Ile Ser Xaa Xaa Gly Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Xaa Xaa Ser Leu Arg Ala Xaa Asp Xaa Ala Val Xaa Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Xaa Xaa Ser Ser Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Phe Xaa Xaa Trp Gly
 100 105 110

Xaa Gly Xaa Xaa Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 59
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 重鏈共同序列

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29).. (29)
 <223> X可為Leu或Val

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30).. (30)
 <223> X可為Asn、Thr或Ser

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (34).. (34)
 <223> X可為Met或Ile

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (54).. (54)
 <223> X可為Ala或Gln

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55).. (55)
 <223> X可為Glu或Asp

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (57).. (57)
 <223> X可為Lys或Glu

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (58).. (58)
 <223> X可為Ile或Thr

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (60).. (60)
 <223> X可為Ser或Tyr

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (66).. (66)
 <223> X可為Asp或Gly

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (72).. (72)
 <223> X可為Asp、Arg或Glu

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (77).. (77)
 <223> X可為Asp或Ser

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (79).. (79)
 <223> X可為Ala或Val

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (84).. (84)
 <223> X可為Ser或Arg

 <220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (87).. (87)
<223> X可為Arg或Lys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (91).. (91)
<223> X可為Ser或Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (97).. (97)
<223> X可為Ala或Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (98).. (98)
<223> X可為Thr或Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99).. (99)
<223> X可為Leu、Glu或Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (100).. (100)
<223> X可為Asp或Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (101).. (101)
<223> X可為Phe或Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (103).. (103)
<223> X可為Ser或Ala

<400> 59

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Xaa Xaa Asp Leu
20 25 30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Ile Xaa Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 60
<211> 125

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈共同序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13).. (13)
<223> X可為Gln或Lys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16).. (16)
<223> X可為Gly或Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89).. (89)
<223> X可為Glu或Asp

<400> 60

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Asp Trp Asn Tyr Ala Asp Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 61
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈共同序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13).. (13)
<223> X可為Lys或Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28).. (28)
<223> X可為Ser或Ile

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31).. (31)
 <223> X可為Gly或Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (35).. (35)
 <223> X可為Gly或Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (40).. (40)
 <223> X可為Met或Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (52).. (52)
 <223> X可為Tyr或Asp

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (54).. (54)
 <223> X可為Tyr或Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (77).. (77)
 <223> X可為Asn或His

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94).. (94)
 <223> X可為Phe或Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (98).. (98)
 <223> X可為Ser或Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (105).. (105)
 <223> X可為Glu或Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (106).. (106)
 <223> X可為Phe或Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (109).. (109)
 <223> X可為Pro或Gly

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (110).. (110)
 <223> X可為Leu或Phe

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (111).. (111)
 <223> X可為Asn或Tyr

<400> 61

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Xaa Phe Thr Xaa Tyr
 20 25 30

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

Gly Ile Ile Xaa Pro Xaa Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Xaa Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Xaa Tyr Cys
85 90 95

Ala Xaa His Arg Leu Trp Leu Gly Xaa Xaa Pro Gly Xaa Xaa Xaa Ile
100 105 110

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

<210> 62
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FLAG (註冊商標) 肽

<400> 62

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 63
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 63
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggggtattagc agctggtag cctggtatca acagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccaatt tggaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caaattacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 64
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人

<400> 64
caggtccagc tggtagcagc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ttcccgata caccctcagt gatttatcca tccactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt ttgatcctc aagatggtga aacaatctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgcgc aacgggggagc 300
agctcgtcct gggtcgaccc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc tagt 354

<210> 65
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 65
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctcccgggga aagagccacc 60
ctctctctgca gggccagtca gagtgttagt agcaacttag tctggtatca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catttatggc gcatccacca gggccactgg tatccagcc 180
aggttcagtgc gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcaa tatgatgact ggcctccgct cactttcggc 300
ggagggacca cgggtggagat caaa 324

<210> 66
<211> 360
<212> DNA
<213> 智人

<400> 66
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg gctttcatac attagtaata gtggtagtgc catgtactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaggaa ctcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt actactgtgc gagagagtat 300
agcagtggtc ggttcttctt tgagtcctgg ggccagggaa ccttggtcac cgtctctagt 360

<210> 67
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 67
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtttgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc agctggttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaatctcct gatctatggt gcatccagtt tacaaaatgg ggtccatta 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 68
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人

<400> 68
caggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ttccggata caccgtcact gatttatcca tgactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt ttgatcctc aagatggtga aacaatctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
atggagctga gaagcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtac aacagaaagc 300
agctcggcct ggttcgaccc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc tagt 354

<210> 69
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 69
cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccggcat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaagggtg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg ttga 324

<210> 70
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 70
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 71
<211> 981
<212> DNA
<213> 智人

<400> 71
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
aaatgttgtg tcgagtgcct accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc atgatctccc ggacctctga ggtcacgtgc 420

```

gtgggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc      480
gtggaggtgc ataatgcca gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt      540
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc      600
aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg      660
cagcccccag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaagc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac      840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac      900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc      960
tccctgtctc cgggtaaatg a                                          981

```

<210> 72
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 72

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

公告本

申請專利範圍

103.年10月3日修正補充

P.1-4

1. 一種經分離之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白，其具有包含SEQ ID NO:52之CDR1、CDR2及CDR3之重鏈可變區，及SEQ ID NO:21之CDR1、CDR2及CDR3之輕鏈可變區。
2. 如請求項1之經分離之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白，其中該輕鏈可變區與SEQ ID NO:21至少90%相同，及該重鏈可變區與SEQ ID NO:52至少90%相同。
3. 如請求項2之經分離之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白，其中該輕鏈可變區包含SEQ ID NO:21，及該重鏈可變區包含SEQ ID NO:52。
4. 如請求項1至3中任一項之經分離之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白，其進一步包含輕鏈恆定區及重鏈恆定區。
5. 如請求項4之經分離之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白，其中該輕鏈恆定區係 κ 型輕鏈恆定區；

及該重鏈恆定區係選自由以下組成之群：

a')IgD抗體之恆定區；

b')IgE抗體之恆定區；

c')IgM抗體之恆定區；

d')IgG1抗體之恆定區；

e')IgG2抗體之恆定區；

f')IgG3抗體之恆定區；

g')IgG4抗體之恆定區；及

h')在鉸鏈區中具有至少一個減少H鏈內二硫鍵形成趨勢之突變的IgG4抗體之恆定區。

6. 如請求項4之經分離之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白，其中

該輕鏈恆定區係選自由以下組成之群：

- a)包含SEQ ID NO:70之多肽；
- b)與SEQ ID NO:70至少90%相同之多肽；
- c)併入一或多個轉譯後修飾之a)之多肽；及
- d)具有SEQ ID NO:70所述胺基酸序列之多肽，其中已移除一個、兩個、三個、四個或五個N端及/或C端胺基酸；

及該重鏈恆定區係選自由以下組成之群：

- a')包含SEQ ID NO:72之多肽；
- b')與SEQ ID NO:72至少90%相同之多肽；
- c')併入一或多個轉譯後修飾之a')之多肽；及
- d')具有SEQ ID NO:72所述胺基酸序列之多肽，其中已移除一個、兩個、三個、四個或五個N端及/或C端胺基酸。

7. 一種經分離之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白，其具有重鏈可變區及輕鏈可變區，其中該重鏈可變區係由編碼SEQ ID NO:52之核酸所編碼，及其中該輕鏈可變區係由編碼SEQ ID NO:21之核酸所編碼。
8. 如請求項7之經分離之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白，其中該編碼重鏈可變區之核酸包含SEQ ID NO:66，及該編碼輕鏈可變區之核酸包含SEQ ID NO:65。
9. 如請求項7或8之經分離之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白，其進一步包含輕鏈恆定區及重鏈恆定區，其中該輕鏈恆定區係由編碼SEQ ID NO:70之核酸所編碼，及該重鏈恆定區係由編碼SEQ ID NO:72之核酸所編碼。
10. 如請求項9之經分離之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白，其進一步包含輕鏈恆定區及重鏈恆定區，其中該輕鏈恆定區係由包含SEQ ID NO:69之核酸所編碼，及該重鏈恆定區係由包含SEQ

ID NO:71之核酸所編碼。

11. 一種組合物，其包含如請求項1至10中任一項之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白及生理學上可接受之稀釋劑、賦形劑或載劑。
12. 一種經分離之核酸，其編碼如請求項1至10中任一項之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白。
13. 一種載體，其包含如請求項12之核酸。
14. 一種經分離之宿主細胞，其經如請求項13之載體轉染或轉型。
15. 一種製備 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白之方法，其包含在促進表現之條件下培養如請求項14之宿主細胞，及自培養基回收該蛋白。
16. 一種如請求項1至10中任一項之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白之用途，其係用於製造作為 $\alpha 4\beta 7$ 抑制劑之藥物。
17. 一種如請求項1至10中任一項之 $\alpha 4\beta 7$ 雜二聚體專一性抗原結合蛋白之用途，其係用於製造用以抑制表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞運輸至包含表現MAdCAM-1之細胞之組織的藥物。
18. 一種如請求項11之組合物之用途，其係用於製造用以治療個體罹患特徵在於表現 $\alpha 4\beta 7$ 之細胞不當運輸至包含表現MAdCAM-1之細胞的組織之病狀的藥物。
19. 如請求項18之用途，其中該病狀為發炎性腸病。
20. 如請求項19之用途，其中該病狀係選自由以下組成之群：潰瘍性結腸炎、克羅恩氏病(Crohn's disease)、乳糜瀉(非熱帶性口瘡)、與血清陰性關節病相關之腸病、顯微結腸炎(microscopic colitis)或膠原性結腸炎(collagenous colitis)、嗜伊紅血球性胃腸炎，及直腸結腸切除術(proctocolectomy)及迴腸肛門吻合術(ileoanal anastomosis)後所致之貯袋炎(pouchitis)。

21. 如請求項18之用途，其中該病狀係選自由以下組成之群：胰臟炎、胰島素依賴性糖尿病、乳房炎、膽囊炎、膽管炎、膽管周圍炎、慢性支氣管炎、慢性竇炎、哮喘及移植物抗宿主疾病。