



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102597775 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201080048214. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 09. 24

G01N 33/557(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/246, 079 2009. 09. 25 US

61/306, 324 2010. 02. 19 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 04. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/050312 2010. 09. 24

(87) PCT申请的公布数据

W02011/038301 EN 2011. 03. 31

(71) 申请人 佐马技术有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 马克·莱斯利·怀特 玛丽娜·勒尔

约翰·科尔宾 罗伯特·鲍尔

丹尼尔·贝丁格

(74) 专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司

公司 11018

代理人 康泉 王珍仙

权利要求书 9 页 说明书 84 页

序列表 285 页 附图 19 页

(54) 发明名称

筛选方法

(57) 摘要

本发明提供了肽结合试剂,例如抗体,其展示动力学调节生物信号复合物例如受体-配体复合物的结合和信号转导的能力;鉴定此类多肽结合试剂的方法,制备此类多肽结合试剂的方法,包含此类多肽结合试剂的组合物,和使用此类多肽结合试剂的方法。

1. 一种鉴定调节信号复合物的第一组分与第二组分之间的结合的候选动力学调节抗体的方法,包括如下步骤:

(a) 测量在测试抗体存在的情况下,所述第一组分对于所述第二组分的结合亲和力或结合率参数,

(b) 测量在所述测试抗体不存在的情况下,所述第一组分对于所述第二组分的结合亲和力或结合率参数;和

(c) 当所述测试抗体在步骤(a)和(b)测量的结合亲和力或结合率参数上显示1.5倍至1000倍差异,则将所述测试抗体鉴定为候选动力学调节抗体。

2. 权利要求1所述的方法,其中如果所述测试抗体使所述第一组分与所述第二组分之间的结合亲和力或结合率参数增强至约1.5倍至1000倍,则所述测试抗体被鉴定为候选正调节抗体。

3. 权利要求2所述的方法,其中所述测试抗体使所述第一组分与所述第二组分之间的结合亲和力或结合率参数增强至约2倍至200倍。

4. 权利要求1所述的方法,其中如果所述测试抗体使所述第一组分与所述第二组分之间的结合亲和力或结合率参数减弱至约2/3至1/1000倍,则所述测试抗体被鉴定为候选负调节抗体。

5. 权利要求4所述的方法,其中所述测试抗体使所述第一组分与所述第二组分之间的结合亲和力或结合率参数减弱至约1/2至1/200倍。

6. 一种鉴定调节信号复合物的第一组分与第二组分之间的结合的候选动力学调节抗体的方法,包括如下步骤:

(a) (i) 测量在所述第二组分存在的情况下测试抗体对于所述第一组分的结合亲和力或结合率参数,或(ii) 测量在所述第一组分存在的情况下测试抗体对于所述第二组分的结合亲和力或结合率参数;和

(b) (i) 测量在所述第二组分不存在的情况下,所述测试抗体对于所述第一组分的结合亲和力或结合率参数,或

(ii) 测量在所述第一组分不存在的情况下所述测试抗体对于所述第二组分的结合亲和力或结合率参数;和

(c) 当所述测试抗体在步骤(a)和(b)中测量的结合亲和力或结合率参数上显示1.5倍至1000倍差异时,将所述测试抗体鉴定为候选动力学调节抗体。

7. 权利要求6所述的方法,其中如果步骤(a)中测量的结合亲和力或结合率参数的强度为步骤(b)中测量的结合亲和力或结合率参数的约1.5倍至1000倍,则所述测试抗体被鉴定为候选正调节抗体。

8. 权利要求7所述的方法,其中步骤(a)中测量的结合亲和力或结合率参数的强度为步骤(b)中测量的结合亲和力或结合率常数的约2倍至200倍。

9. 权利要求6的方法,其中如果步骤(b)中测量的结合亲和力或结合率参数的强度为步骤(a)中测量的结合亲和力或结合率参数的约1.5倍至1000倍,则所述测试抗体被鉴定为候选负调节抗体。

10. 权利要求9所述的方法,其步骤(b)中测量的结合亲和力或结合率参数的强度为步骤(a)中测量的结合亲和力或结合率参数的约2倍至200倍。

11. 权利要求 6-10 中任一项所述的方法,其中测量所述测试抗体对于单独的所述第一组分的结合亲和率或结合率参数。

12. 权利要求 6-11 中任一项所述的方法,其中测量所述测试抗体对于单独的所述第二组分的结合亲和力和结合率参数。

12A. 权利要求 1-12 中任一项所述的方法,其中所述测试抗体对于包含第一组分和第二组分的复合物的结合亲和力和 KD 为约 $10^{-5}M^{-1}$ 或更小,并且所述测试抗体不可检测地结合单独的所述第一组分或单独的所述第二组分。

13. 权利要求 1-12 中任一项所述的方法,其中如果选自 (A) 所述测试抗体对于包含所述第一组分 (C1) 和所述第二组分 (C2) 的复合物的结合亲和力或结合率参数,任选地 $K_{[C1C2]M}$, (B) 所述第一组分对于包含抗体和所述第二组分的复合物的结合亲和力或结合率参数,任选地 $K_{[MC2]C1}$,或 (C) 所述第二组分对于包含抗体和所述第一组分的复合物的结合亲和力或结合率参数,任选地 $K_{[MC1]C2}$,的结合亲和力或结合率参数的强度为选自 (1) 所述测试抗体对于单独的所述第二组分的结合亲和力或结合率参数,任选地 K_{MC2} ,或 (2) 所述测试抗体对于单独的所述第一组分的结合亲和力或结合率参数,任选地 K_{MC1} ,的约 1.5 倍至 1000 倍,那么所述测试抗体 (M) 被鉴定为候选正调节抗体。

14. 权利要求 13 所述的方法,其中 (A)、(B) 或 (C) 的任一个或多个的结合亲和力或结合率参数的强度为 (1) 或 (2) 的任一个或多个的结合亲和力或结合率参数的约 2 倍或 200 倍。

15. 权利要求 13 所述的方法,其中 (A)、(B) 或 (C) 的任一个或多个的结合亲和力或结合率参数的强度为 (1) 和 (2) 两者的结合亲和力或结合率参数的约 1.5 倍至 1000 倍。

16. 权利要求 13 所述的方法,其中 (A)、(B) 或 (C) 的任一个或多个的结合亲和力或结合率参数的强度为 (1) 和 (2) 两者的结合亲和力或结合率参数的约 2 倍至 200 倍。

17. 权利要求 13-16 中任一项所述的方法,其中 (1) 的结合亲和力或结合率参数强于 (2) 的结合亲和力或结合率参数。

18. 权利要求 13-16 中任一项所述的方法,其中 (2) 的结合亲和力或结合率参数强于 (1) 的结合亲和或结合率参数。

19. 权利要求 13 所述的方法,其中所述结合亲和力为平衡离解常数 K_D ,并且 $K_{[C1C2]M}$ 、 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2}$ 的任一个或多个为 K_{MC2} 或 K_{MC1} 的任一个或多个的约 2/3 至 1/1000。

20. 权利要求 19 所述的方法,其中 $K_{[C1C2]A}$ 为 K_{MC2} 的约 2/3 至 1/1000。

21. 权利要求 19 所述的方法,其中 $K_{[AC2]C1}$ 为 K_{MC2} 的约 2/3 至 1/1000。

22. 权利要求 19 所述的方法,其中 $K_{[AC1]C2}$ 为 K_{MC2} 的约 2/3 至 1/1000。

23. 权利要求 19 所述的方法,其中 $K_{[C1C2]A}$ 为 K_{MC1} 的约 2/3 至 1/1000。

24. 权利要求 19 所述的方法,其中 $K_{[AC2]C1}$ 为 K_{MC1} 的 2/3 至 1/1000。

25. 权利要求 19 所述的方法,其中 $K_{[AC1]C2}$ 为 K_{MC1} 的约 2/3 至 1/1000。

26. 权利要求 13 所述的方法,其中所述结合亲和力是平衡缔合常数 K_A ,并且 $K_{[C1C2]M}$ 、 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2}$ 的任一个或多个为 K_{MC2} 或 K_{MC1} 的任一个或多个的约 1.5 倍至 1000 倍。

27. 权利要求 1-12 所述的方法,其中如果选自 (1) 测试抗体对于单独的所述第二组分 (C2) 的结合亲和力或结合率参数,任选地 K_{MC2} , (2) 测试抗体对于单独的所述第一组分 (C1) 的结合亲和力或结合率参数,任选地 K_{MC1} ,的结合亲和力或结合率参数的强度为选自 (A) 测

试抗体对于包含所述第一组分和第二组分的复合物的结合亲和力或结合率参数,任选地 $K_{[C1C2]M}$, (B) 所述第一组分对于包含所述抗体和所述第二组分的结合亲和力或结合率参数,任选地 $K_{[MC2]C1}$, 或 (C) 所述第二组分对于包含所述抗体和所述第一组分的结合亲和力或结合率参数,任选地 $K_{[MC1]C2}$, 的结合亲和力或结合率参数的约 1.5 倍至 1000 倍,则所述测试抗体 (M) 被鉴定为候选负调节抗体。

28. 权利要求 27 所述的方法,其中 (1) 或 (2) 的任一个或多个的结合亲和力或结合率参数的强度为 (A)、(B) 或 (C) 的任一个或多个的结合亲和力或结合率参数的约 2 倍或 200 倍。

29. 权利要求 27 所述的方法,其中 (1) 或 (2) 的任一个或多个的结合亲和力或结合率参数的强度为所有 (A)、(B) 和 (C) 的结合亲和力或结合率参数的约 1.5 倍至 1000 倍。

30. 权利要求 27 所述的方法,其中 (1) 或 (2) 的任一个或多个的结合亲和力或结合率参数的强度为所有 (A)、(B) 和 (C) 的结合亲和力或结合率参数的约 2 倍至 200 倍。

31. 权利要求 27-30 中任一项所述的方法,其中 (1) 的结合亲和力或结合率参数强于 (2) 的结合亲和力或结合率参数。

32. 权利要求 27-30 中任一项所述的方法,其中 (2) 的结合亲和力或结合率参数强于 (1) 的结合亲和力或结合率参数。

33. 权利要求 27 所述的方法,其中所述结合亲和力是平衡离解常数 K_D , 并且 K_{MC2} 或 K_{MC1} 的任一个为 $K_{[C1C2]M}$ 、 $K_{[C2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2}$ 的任一个的约 2/3 至 1/1000。

34. 权利要求 33 所述的方法,其中 K_{MC2} 为 $K_{[C1C2]M}$ 的约 2/3 至 1/1000。

35. 权利要求 33 所述的方法,其中 K_{MC2} 为 $K_{[MC2]C1}$ 的约 2/3 至 1/1000。

36. 权利要求 33 所述的方法,其中 K_{MC2} 为 $K_{[MC1]C2}$ 的约 2/3 至 1/1000。

37. 权利要求 33 所述的方法,其中 K_{MC1} 为 $K_{[C1C2]M}$ 的约 2/3 至 1/1000。

38. 权利要求 33 所述的方法,其中 K_{MC1} 为 $K_{[MC2]C1}$ 的约 2/3 至 1/1000。

39. 权利要求 33 所述的方法,其中 K_{MC1} 为 $K_{[MC1]C2}$ 的约 2/3 至 1/1000。

40. 权利要求 27 所述的方法,其中所述结合亲和力为平衡缔合常数 K_A , 并且 K_{MC2} 或 K_{MC1} 的任一个或多个为 $K_{[C1C2]M}$ 、 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2}$ 的任一个或多个的约 1.5 倍至 1000 倍。

41. 权利要求 1-40 中任一项所述的方法,其中,在步骤 (a) 中,将所述测试抗体和所述第二组分与多个不同浓度的所述第一组分接触。

42. 权利要求 1-40 中任一项所述的方法,其中,在步骤 (a) 中,将所述测试抗体和所述第一组分与多个不同浓度的所述第二组分接触。

43. 权利要求 1-40 中任一项所述的方法,其中,在步骤 (a) 中,将多个不同浓度的所述测试抗体与所述第一组分和所述第二组分接触。

44. 权利要求 2-6 中任一项所述的方法,其中所述测试抗体结合的抗原是所述第一组分并且所述测试抗体与所述第一组分的浓度相比较处于饱和浓度。

45. 权利要求 2-6 中任一项所述的方法,其中所述测试抗体结合的抗原是所述第二组分并且所述测试抗体与所述第二组分的浓度相比较处于饱和浓度。

46. 权利要求 44 或 45 所述的方法,其中所述测试抗体的浓度大于或等于所述测试抗体对于包含所述第一组分和所述第二组分的复合物的 K_D 。

47. 权利要求 46 所述的方法,其中所述第二组分的浓度低于所述测试抗体对于所述第

一组分的 K_D 。

48. 权利要求 47 所述的方法,其中所述第一组分的浓度对于所述第一组分对所述第二组分的结合处于饱和浓度。

49. 权利要求 48 所述的方法,其中所述第一组分的浓度在所述第一组分与所述第二组分的相互作用的约 EC_{20} 至 EC_{80} 的范围内。

50. 权利要求 2-6 中任一项所述的方法,其中在一个或多个浓度的所述第二组分存在的情况下将一个或多个浓度的所述测试抗体与多个不同浓度的所述第一组分接触。

51. 权利要求 2-6 中任一项所述的方法,其中在一个或多个浓度的所述第一组分存在的情况下将一个或多个浓度的所述测试抗体与多个不同浓度的所述第二组分接触。

52. 权利要求 7-8 或 13-26 中任一项所述的方法,其中所述测试抗体对于包含所述第一组分和所述第二组分的复合物处于饱和浓度。

53. 权利要求 52 所述的方法,其中所述测试抗体的浓度大于或等于所述测试抗体对于包含所述第一组分和所述第二组分的复合物的 K_D 。

54. 权利要求 53 所述的方法,其中所述第二组分的浓度大于所述第二组分对于所述第一组分的 K_D 。

55. 权利要求 54 所述的方法,其中所述第一组分的浓度对于所述第二组分为饱和浓度。

56. 权利要求 7-8 或 13-26 中任一项所述的方法,其中所述测试抗体对于包含所述第一组分和所述第二组分的复合物处于饱和浓度。

57. 权利要求 56 所述的方法,其中所述抗体的浓度在所述第一组分与所述第二组分的相互作用的约 EC_{20} 至 EC_{80} 的范围内。

58. 权利要求 57 所述的方法,其中所述第二组分的浓度大于所述第二组分对于所述第一组分的 K_D 。

59. 权利要求 58 所述的方法,其中所述第一组分的浓度对于所述第二组分处于饱和浓度。

60. 权利要求 9-10 或 27-40 中任一项所述的方法,其中所述测试抗体结合的抗原是所述第一组分并且所述测试抗体对于所述第一组分处于饱和浓度。

61. 权利要求 60 所述的方法,其中所述抗体的浓度在所述第一组分与所述第二组分的相互作用的约 EC_{20} 至 EC_{80} 的范围内。

62. 权利要求 61 所述的方法,其中所述第二组分的浓度大于所述第二组分对于所述第一组分的 K_D 。

63. 权利要求 62 所述的方法,其中所述第一组分的浓度对于所述第二组分处于饱和浓度。

64. 权利要求 9-10 或 27-40 中任一项所述的方法,其中所述测试抗体结合的抗原是所述第二组分并且所述测试抗体对于所述第二组分处于饱和浓度。

65. 权利要求 60 所述的方法,其中所述抗体的浓度在所述第一组分与所述第二组分的相互作用的约 EC_{20} 至 EC_{80} 的范围内。

66. 权利要求 61 所述的方法,其中所述第二组分的浓度大于所述第二组分对于所述第一组分的 K_D 。

67. 权利要求 62 所述的方法,其中所述第一组分的浓度对于所述第二组分而言为饱和浓度。

68. 权利要求 1-67 中任一项所述的方法,其还包括在步骤 (a) 之前,测定多个测试抗体对包含所述第一组分和所述第二组分的复合物的结合亲和力,任选地具有为 10^{-5} M 的平衡离解常数 K_D 或更强的结合亲和力。

69. 权利要求 1-68 中任一项所述的方法,其还包括在步骤 (a) 之前,测定多个测试抗体对所述第一组分的结合亲和力,任选地具有为 10^{-5} M 的平衡离解常数 K_D 或更强的结合亲和力。

70. 权利要求 1-69 中任一项所述的方法,其还包括在步骤 (a) 之前,测定多个测试抗体对所述第二组分的结合亲和力,任选地具有为 10^{-5} M 的平衡离解常数 K_D 或更强的结合亲和力。

71. 权利要求 1-70 中任一项所述的方法,其还包括在步骤 (a) 之前,通过将一个或多个不同的突变引入亲代抗体来产生多种测试抗体,所述测试抗体是亲代抗体的变体。

72. 权利要求 1-71 中任一项所述的方法,其还包括测量在所述测试抗体存在和不存在的条件下,所述第一组分对于结合伴侣的结合亲和力或结合率参数,其中所述结合伴侣不是所述第二组分。

73. 权利要求 72 所述的方法,其中所述结合伴侣是诱饵受体、清除受体或备用信号途径组分。

74. 权利要求 72 或 73 所述的方法,其包括鉴定不显著改变所述第一组分对于所述结合伴侣的结合亲和力或结合率参数的测试抗体。

75. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述测试抗体选自抗体片段、scFv、Fab、CDR、啮齿类动物抗体、哺乳动物抗体、人抗体、嵌合抗体和人源化抗体。

76. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述测试抗体是单克隆抗体。

77. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合亲和力或结合率参数选自前述任一项的平衡缔合常数 K_A 、平衡离解常数 K_D 、结合速率、解离速率和替代参数。

78. 权利要求 77 所述的方法,其中所述替代参数是所述第一组分在亚饱和浓度的所述第一组分或所述第二组分下对所述第二组分的结合的量或水平。

79. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述测试抗体、所述第一组分或所述第二组分全部存在于溶液中。

80. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中将所述测试抗体、所述第一组分和所述第二组分之一连接于固相。

81. 权利要求 80 所述的方法,其中所述连接是非共价的。

82. 权利要求 80 所述的方法,其中将所述测试抗体、所述第一组分和所述第二组分之一包被在珠粒上。

83. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一组分或所述第二组分的至少一种在细胞表面上表达。

84. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一组分在细胞表面上表达并且所述第二组分在不同细胞表面上表达。

85. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一组分是可溶性配体并且所述第

二组分是膜结合受体。

86. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一组分是膜结合受体并且所述第二组分是可溶性配体。

87. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一组分是膜结合配体并且所述第二组分是膜结合受体。

88. 权利要求 86 或 87 所述的方法,其中所述膜结合受体选自 7-跨膜受体、G 蛋白偶联受体 (GPCR)、肾上腺素能受体、神经递质受体、嗅觉受体、阿片样物质受体、趋化因子受体、视紫质、受体酪氨酸激酶、生长因子受体、整联蛋白和 toll 样受体。

89. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一组分是酶并且所述第二组分是所述酶的底物。

90. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一组分是两种或更多种化合物的复合物。

91. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第二组分是两种或更多种化合物的复合物。

92. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一组分是细胞因子或趋化因子并且所述第二组分是所述第一组分的受体。

93. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一组分是生长因子并且所述第二组分是所述第一组分的受体。

94. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一组分是 IL-1 β 并且所述第二组分是 I 型 IL-1 受体 (IL-1RI)。

95. 前述权利要求中任一项所述的方法,其还包括测量在所述测试抗体存在和不存在的条件下,所述第一组分和 / 或所述第二组分对于第三组分的结合亲和力或结合率参数。

96. 权利要求 95 的方法,其中所述第一组分是 IL-1 β , 所述第二组分是 IL-1RI, 并且所述第三组分是 IL-1 受体辅助蛋白 (IL-1RAcP)。

97. 权利要求 96 所述的方法,其还包括鉴定测试抗体,在所述测试抗体存在或不存在的条件下,所述测试抗体在 IL-1 β 与 IL-1RAcP 之间的结合亲和力或结合率参数上未展示超过 2 倍差异。

98. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一组分是 GCSF 并且所述第二组分是 GCSFR。

99. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一组分是 GCSFR 并且所述第二组分是 GCSF。

100. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一组分是 TNF α 并且所述第二组分是 TNFR1 或 2。

101. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一组分是 TNFR1 或 2 并且所述第二组分是 TNF α 。

102. 前述权利要求中任一项所述的方法,其还包括重新克隆和表达步骤 (c) 中鉴定的抗体。

103. 前述权利要求中任一项所述的方法,其还包括纯化步骤 (c) 中鉴定的抗体。

104. 前述权利要求中任一项所述的方法,其还包括测定步骤 (c) 中鉴定的抗体的序

列。

105. 前述权利要求中任一项所述的方法,其还包括添加或替换 Fc 区域或其片段。

106. 前述权利要求中任一项所述的方法,其还包括利用无菌的药理学上可接受的稀释剂将包含步骤(c)中鉴定的所述测试抗体的至少 3 个 CDR 的抗体配制在无菌组合物中。

107. 前述权利要求中任一项所述的方法,其还包括给动物施用包含步骤(c)中鉴定的所述测试抗体的至少 3 个 CDR 的抗体。

108. 前述权利要求中任一项所述的方法,其还包括测量在所述测试抗体存在和不存在的条件下由所述信号复合物介导的信号转导的水平。

109. 权利要求 108 所述的方法,其中在磷酸化测量、离子流测定、分子运输测定或基因表达测定中测量由所述信号复合物介导的信号转导的水平。

110. 权利要求 108-109 中任一项所述的方法,其中所述测试抗体使所述信号复合物的所述第一组分的 EC_{50} 增加至约 1.5 倍至约 1000 倍。

111. 权利要求 108-109 中任一项所述的方法,其中所述测试抗体未显著改变对由所述第一组分产生的信号转导的最大激动剂反应。

112. 权利要求 108-109 中任一项所述的方法,其中所述测试抗体使对由所述信号复合物产生的信号转导的最大激动剂反应减小至约 2/3 至 1/1000。

113. 权利要求 108-109 中任一项所述的方法,其中所述测试抗体使由所述信号复合物产生的信号转导的 EC_{50} 减小至约 2/3 至 1/1000。

114. 权利要求 108-109 中任一项所述的方法,其中所述候选抗体增加对由所述第一组分产生的信号转导的最大激动剂反应至少 10%。

115. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述候选抗体未显著地减少对所述第一组分、所述第二组分或包含所述第一和所述第二组分的复合物的清除。

116. 由前述权利要求中任一项所述的方法鉴定的抗体。

117. 一种正调节抗体,其以 $10^{-5}M$ 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 SEQ ID NOS:1-88 中任一项的分泌蛋白质,其能够使所述分泌蛋白质与其信号转导伴侣之间的结合亲和力 K_D 增加至约 1.5 至 1000 倍。

118. 权利要求 117 所述的抗体,其中所述正调节抗体能够使所述分泌蛋白质与其信号转导伴侣之间的结合亲和力 K_D 增加至约 2 倍至 200 倍。

119. 一种负调节抗体,其以 $10^{-5}M$ 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 SEQ ID NOS:1-88 中任一项的分泌蛋白质,其能够使所述分泌蛋白质与其信号转导伴侣之间的结合亲和力 K_D 减小至 2/3 至 1/1000。

120. 权利要求 119 所述的抗体,其中所述负调节抗体能够使所述分泌蛋白质与其信号转导伴侣之间的结合亲和力 K_D 减小至约 1/2 至 1/200。

121. 一种正调节抗体 (M),其增强所述第一组分 (C1) 对信号复合物的所述第二组分 (C2) 的结合,所述抗体特征在于下列平衡离解常数 K_D 的结合性质:(i) 所述抗体以 $10^{-5}M$ 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 C1、C2 或包含 C1 和 C2 的复合物 (C1C2) 的至少一种,和 (ii) $K_{[C1C2]M}$ 、 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2}$ 的任一个或多个为 K_{MC2} 或 K_{MC1} 的任一个或多个的约 2/3 至 1/1000,其中 C1 或 C2 为 SEQ ID NOS:1-88 中任一项的分泌蛋白质。

122. 权利要求 121 所述的正调节抗体,其中 $K_{[C1C2]M}$ 、 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2}$ 的任一个或多个为

K_{MC2} 或 K_{MC1} 的任一个的约 1/2 至 1/200。

123. 权利要求 121 所述的正调节抗体, 其中 $K_{[C1C2]M}$ 、 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2}$ 的任一个或多个为 K_{MC2} 或 K_{MC1} 的约 2/3 至 1/1000。

124. 一种负调节抗体 (M), 其减弱所述第一组分 (C1) 对信号复合物的所述第二组分 (C2) 的结合, 所述抗体的特征在于下列平衡离解常数 K_D 的结合性质: (i) 所述抗体以 $10^{-5}M$ 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 C1、C2 或包含 C1 和 C2 的复合物 (C1C2) 的任一种, 和 (ii) K_{MC2} 或 K_{MC1} 的任一个或多个为 $K_{[C1C2]M}$ 、 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2}$ 的任一个或多个的约 2/3 至 1/1000, 其中 C1 或 C2 为 SEQ ID NOS:1-88 中任一项的分泌蛋白质。

125. 权利要求 124 的负调节抗体, 其中 K_{AC2} 或 K_{AC1} 的任一个或多个为 $K_{[C1C2]M}$ 、 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2}$ 的任一个或多个的约 1/2 至 1/200。

126. 权利要求 124 的负调节抗体, 其中 K_{AC2} 或 K_{AC1} 的任一个或多个为 $K_{[C1C2]M}$ 、 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2}$ 的约 2/3 至 1/1000。

127. 一种正调节抗体, 其以 $10^{-5}M$ 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 (i) IL-1 β 、(ii) IL-1R1 或 (iii) 包含 IL-1 β 和 IL-1R1 的复合物的任一种, 所述抗体能够使 IL-1 β 与 IL-1R1 之间的结合亲和力 K_D 增强至约 1.5 倍至 1000 倍。

128. 一种负调节抗体, 其以 $10^{-5}M$ 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 (i) IL-1 β 、(ii) IL-1R1 或 (iii) 包含 IL-1 β 和 IL-1R1 的复合物的任一种, 所述抗体能够使 IL-1 β 与 IL-1R1 之间的结合亲和力 K_D 减弱至约 2/3 至 1/1000。

129. 一种正调节抗体, 其以 $10^{-5}M$ 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 (i) TNF α 、(ii) TNFR1 或 (iii) 包含 TNF α 和 TNFR1 的复合物的任一种, 所述抗体能够使 TNF α 与 TNFR1 之间的结合亲和力 K_D 增强至约 1.5 倍至 1000 倍。

130. 一种负调节抗体, 其以 $10^{-5}M$ 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 (i) TNF α 、(ii) TNFR1 或 (iii) 包含 TNF α 和 TNFR1 的复合物的任一种, 所述抗体能够使 TNF α 与 TNFR1 之间的结合亲和力 K_D 减弱至约 2/3 至 1/1000。

131. 一种正调节抗体, 其以 $10^{-5}M$ 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 (i) TNF α 、(ii) TNFR1 或 (iii) 包含 TNF α 和 TNFR2 的复合物的任一种, 所述抗体能够使 TNF α 与 TNFR2 之间的结合亲和力 K_D 增强至约 1.5 倍至 1000 倍。

132. 一种负调节抗体, 其以 $10^{-5}M$ 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 (i) TNF α 、(ii) TNFR1 或 (iii) 包含 TNF α 和 TNFR2 的复合物的任一种, 所述抗体能够使 TNF α 与 TNFR2 之间的结合亲和力 K_D 减弱至约 2/3 至 1/1000。

133. 一种正调节抗体, 其以 $10^{-5}M$ 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 (i) GCSF、(ii) GCSFR 或 (iii) 包含 GCSF 和 GCSFR 的复合物的任一种, 所述抗体能够使 GCSF 与 GCSFR 之间的结合亲和力 K_D 增强至约 1.5 倍至 1000 倍。

134. 一种负调节抗体, 其以 $10^{-5}M$ 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 (i) GCSF、(ii) GCSFR 或 (iii) 包含 GCSF 和 GCSFR 的复合物的任一种, 所述抗体能够使 GCSF 与 GCSFR 之间的结合亲和力 K_D 减弱至约 2/3 至 1/1000。

135. 一种正调节抗体, 其以 $10^{-5}M$ 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 (i) 胰岛素、(ii) 胰岛素受体或 (iii) 包含胰岛素和胰岛素受体的复合物的任一种, 所述抗体能够使胰岛素与胰岛素受体之间的结合亲和力 K_D 增强至约 1.5 倍至 1000 倍。

136. 一种负调节抗体,其以 10^{-5} M 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 (i) 胰岛素、(ii) 胰岛素受体或 (iii) 包含胰岛素和胰岛素受体的复合物的任一种,所述抗体能够使胰岛素与胰岛素受体之间的结合亲和力 K_D 减弱至约 2/3 至 1/1000。

137. 权利要求 117-136 中任一项所述的抗体,其为纯化的单克隆抗体。

138. 编码权利要求 116-137 所述的抗体的任一个的多核苷酸。

139. 编码权利要求 116-137 所述的抗体的任一个的重链的多核苷酸。

140. 编码权利要求 116-137 所述的抗体的任一个的轻链的多核苷酸。

141. 包含权利要求 138-140 所述中任一项的多核苷酸的宿主细胞。

142. 包含权利要求 139 和 140 所述的多核苷酸的宿主细胞。

143. 一种产生抗体的方法,包括在适合的条件将权利要求 141-142 所述的宿主细胞培养在培养基中,然后从所述宿主细胞或培养基分离所述抗体。

144. 由权利要求 143 所述的方法产生的抗体。

145. 一种制备无菌药物组合物的方法,包括将无菌的药学上可接受的稀释剂添加至前述权利要求 120-141 或 148 中任一项所述的抗体中。

146. 一种无菌组合物,其包含前述权利要求中任一项所述的抗体和无菌的药学上可接受的稀释剂。

147. 一种给哺乳动物施用组合物的方法,包括施用权利要求 146 所述的无菌组合物。

148. 权利要求 147 所述的方法,其中所述施用增强包含所述分泌蛋白质的复合物的信号转导。

149. 权利要求 147 所述的方法,其中所述施用减弱包含所述分泌蛋白质的复合物的信号转导。

150. 权利要求 72 所述的方法,其中所述第一组分是 IL-1 β ,所述第二组分是 IL-1R1,并且所述结合伴侣是 IL-1R2 或 IL-1 辅助蛋白。

151. 权利要求 72 所述的方法,其中所述第一组分是 TNF α ,所述第二组分是 TNFR1,并且所述结合伴侣是 TNFR2。

152. 权利要求 72 所述的方法,其中所述第一组分是 TNF α ,所述第二组分是 TNFR2,并且所述结合伴侣是 TNFR1。

筛选方法

[0001] 交叉参考相关申请

[0002] 本申请要求 2009 年 9 月 25 日提交的第 61/246,079 号美国临时专利申请和 2010 年 2 月 19 提交的第 61/306,324 号美国临时专利申请的优先权权益,所述临时专利申请的每一个通过引用整体并入本文。

[0003] 领域

[0004] 本发明涉及筛选多肽结合剂例如抗体的方法,所述多肽结合剂展示动力学调节生物信号复合物例如受体-配体复合物的结合和信号转导的能力。本发明还涉及特征在于期望的动力学调节性质的特异性多肽结合剂。

[0005] 附录的合并

[0006] 本申请包括随本申请一起提交的 2009 年 9 月 25 日创建的表,附录 A,“41726_SecretedProteins.txt”(大小 255KB)。该 ASCII 文本文件中包含的材料由此根据 37C.F.R. § 1.52(e)(5) 通过引用整体并入本文。

[0007] 背景

[0008] 大多数抗体药物常规地通过筛选结合细胞表面受体或其同源配体的抗体,并且鉴定特异性阻断或刺激受体信号转导活性的抗体来进行鉴定。许多抗体药物通过结合配体或受体,从而消除配体结合以及激活受体的能力来阻断信号转导途径。此类阻断抗体通过阻止受体-配体复合物的形成来按化学计量介导它们的作用。相反地,某些抗体药物结合并且激活受体的信号转导。此类激动剂抗体可通过模拟配体的天然活性介导它们的作用,从而不需要配体的存在来激活信号转导。

[0009] 概述

[0010] 本发明提供了多肽结合剂(称为“动力学调节药物”或“动力学调节剂”)的新型种类,所述多肽结合剂具有正或负调节牵涉靶及其信号转导伴侣的细胞途径活性的期望的性质。靶和/或其信号转导伴侣可以是内源或外源化合物,性质上可以是蛋白质或非蛋白质,但其任选地可排除离子和盐。本发明还提供了鉴定此类动力学调节剂的新型方法,所述方法基于它们对于靶对其信号转导伴侣之间的结合动力学的影响,或基于所述动力学调节剂对以复合形式相对于以未复合形式存在的靶(和/或其信号转导伴侣)的差异结合。多肽结合剂可结合靶、其信号转导伴侣和/或包含靶及其信号转导伴侣的复合物。该发现使得能够设计可鉴定适合用于治疗用途的细胞途径活性的调节剂的生物物理筛选测定法。

[0011] 在某些方面,提供了鉴定调节靶与其信号转导伴侣之间的结合动力学的多肽结合剂的测定法。靶的非限定性实例包括例如附录 A 中所示的登录号(或 SEQ ID NOS: 1-88)中任一项的分泌性蛋白。此类分泌性蛋白包括许多分泌性膜结合受体。随同的附录 A 列出了由 Swissprot/EMBL 数据库(参见,例如,Boeckmann 等人“The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003”,Nucleic Acids Res. 31: 365-370(2003)汇编的人分泌性蛋白。附录 A 显示了数据库中分泌性蛋白的氨基酸序列的 Swissprot 登录号、所述蛋白的名称(和所有首字母缩写或相关名称)以及氨基酸序列的长度。如本文中所使用的,“信号转导伴侣”是靶的结合伴侣(当其与靶结合时,形成信号复合

物) 或为信号复合物的部分(其可激活或抑制细胞途径)。此类动力学调节剂多肽结合剂的存在改变(增强或减小)靶对于其信号转导伴侣的表现结合亲和力,从而改变靶对于激活细胞途径的剂量-反应。可选择地,改变(增加或减小)靶对于其信号转导伴侣的结合率或改变(增加或减小)靶对于其信号转导伴侣的解离速率的动力学调节剂多肽结合剂也可改变(增加或减小)与信号转导伴侣复合的靶的停留时间,改变受体内化率和/或改变被信号转导伴侣复合物激活或去活化的信号转导蛋白的磷酸化程度。此类改变可显著改变通过靶与信号转导伴侣的复合产生的不同信号转导途径的相对激活,从而改变靶对于激活细胞途径的剂量-反应。预期此类动力学调节剂具有优于常规治疗性药物的有利方面,包括提高的安全性(safety profile)、改变的清除率、更宽的治疗窗(therapeutic window)和更低频率的给药。在靶是待给患者施用的外源化合物时,作为利用靶的辅助疗法的动力学调节剂的施用可改变(例如,减少)靶的给药的总量(每天、每周或每月)和/或频率。

[0012] 本发明提供了鉴定作为多肽结合剂(不包括常规小分子药物例如具有约 1000 道尔顿或更低的分子量的非聚合有机化合物)的候选动力学调节药物的方法。特别地涉及的多肽结合剂的实例包括抗体,包括其抗原结合片段、肽体(peptibody)、多肽和肽(任选地缀合于其它肽部分或非肽部分)。抗体的实例包括单克隆抗体、包含两条重链和两条轻链的四聚体免疫球蛋白、单链抗体、单结构域抗体、抗体片段、scFv、Fab、CDR、啮齿类动物抗体、哺乳动物抗体、人抗体、嵌合抗体和人源化抗体。

[0013] 本发明提供了鉴定候选多肽结合剂例如抗体的方法,所述多肽结合剂调节信号复合物的第一组分与第二组分(靶与信号转导伴侣,或反之亦然)之间的结合。这样的第一组分和/或第二组分的实例包括附录 A 的分泌性蛋白(或 SEQ ID NOS:1-88)和此类分泌性蛋白的内源或外源信号转导伴侣的任一种,或本文中描述的配体或受体或跨膜蛋白的任一种。在某些实施方案中,第一组分和第二组分是多肽。在示例性具体实施方案中,第一组分和第二组分是内源的。

[0014] 在一个方面,鉴定候选动力学调节药物的方法包括(a)测量在测试多肽结合剂例如抗体存在的情况下,所述第一组分对于所述第二组分的结合亲和力或结合率参数,(b)测量在所述测试多肽结合剂不存在的情况下,所述第一组分对于所述第二组分的结合亲和力或结合率参数;和(c)当所述测试多肽结合剂在于步骤(a)和(b)中测量的结合亲和力或结合率参数上展示至少 1.5 倍差异时,将所述测试多肽结合剂鉴定为候选动力学调节药物。图 1 显示举例说明某些示例性实施方案的示意图。在某些实施方案中,结合亲和力或结合率参数的差异在约 1.5 倍(即,50%)至任选地约 1000 倍、或约 1.5 倍至约 100 倍、或约 2 倍至 25 倍、或约 2 倍至 50 倍、或约 1.5 倍至约 25 倍、或约 1.5 倍至约 50 倍之间、例如约 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、17 倍、18 倍、19 倍或 20 倍、或达到 500 倍、或达到 200 倍、或达到 150 倍、或达到 100 倍、或达到 90 倍、或达到 80 倍、或达到 70 倍、或达到 60 倍、或达到 50 倍、或达到 40 倍、或达到 30 倍。在某些实施方案中,如果测试多肽结合剂增强所述第一组分与所述第二组分之间的结合亲和力或结合率参数(例如,减小的 K_D , 或增加的 K_A , 或减小的解离速率/结合速率比率,或增加的结合速率/解离速率比率,或增加的结合速率,或减小的解离速率),那么所述测试多肽结合剂被鉴定为候选正调节剂。在其它实施方案中,如果所述测试多肽试剂减小所述第一组分与所述第二组分之间的结合亲和力或结合率参数(例如,增加的 K_D , 或减

小的 K_A , 或增加的解离速率 / 结合速率比率, 或减小的结合速率 / 解离速率比率, 或减小的结合速率, 或增加的解离速率), 那么所述测试多肽试剂被定义为候选负调节剂。

[0015] 在某些可选择的实施方案中, 当更强的结合率参数 (例如, 增加的缔合或停留时间, 通过增加的结合速率或减小的解离速率) 导致增加的所期望信号转导途径的相对激活时, 甚至当结合亲和力未被可检测地改变时, 通过确定期望倍数的结合率参数的增强, 将测试多肽结合剂鉴定为候选正调节剂。当更小的结合率参数 (例如, 减弱的缔合或停留时间, 通过减小的结合速率或增加的解离速率) 导致增加的所期望信号转导途径的相对激活, 甚至当结合亲和力未被可检测地改变时, 通过确定结合率参数的期望的倍数减小, 将测试多肽结合剂鉴定为候选正调节剂。类似地, 当更强的结合率参数 (例如, 增加的缔合或停留时间, 通过增加的结合速率或减小的解离速率) 导致减小的所期望信号转导途径的相对激活时, 甚至当结合亲和力未被可检测地改变时, 通过确定结合率参数的期望的倍数增强, 将测试多肽结合剂鉴定为候选负调节剂。当更弱的结合率参数 (例如, 减少的缔合或停留时间, 通过减小的结合速率或增加的解离速率) 导致减少的所期望信号转导途径的相对激活, 甚至当结合亲和力未被可检测地改变时, 通过确定结合率参数的期望的倍数减弱, 将测试多肽结合剂鉴定为候选负调节剂。

[0016] 在另一个方面, 鉴定候选动力学调节药物的方法包括 (a) (i) 测量在所述第二组分存在的情况下, 测试多肽结合剂例如抗体对所述第一组分的结合亲和力或结合率参数, 或 (ii) 测量在所述第一组分存在的情况下, 测试多肽结合剂对所述第二组分的结合亲和力或结合率参数; 和 (b) (i) 测量在所述第二组分不存在的情况下, 所述测试多肽结合剂对所述第一组分的结合亲和力或结合率参数, 或 (ii) 测量在所述第一组分不存在的情况下, 所述测试多肽结合剂对所述第二组分的结合亲和力或结合率参数; 和 (c) 当所述测试多肽结合剂在步骤 (a) 和 (b) 中测量的结合亲和力或结合率参数上展示 1.5 倍至 100 倍差异时, 将所述测试多肽结合剂鉴定为候选动力学调节药物。图 2 显示举例说明某些示例性实施方案的示意图, 其中在第二组分存在或不存在的条件下测量相互作用。

[0017] 在某些实施方案中, 步骤 (a) 和 (b) 中测量的结合亲和力或结合率参数的差异在约 1.5 倍 (即, 50%), 至任选地约 1000 倍, 或约 1.5 倍至约 100 倍, 或约 2 倍至 25 倍, 或约 2 倍至约 50 倍, 或约 1.5 倍至约 25 倍, 或约 1.5 倍至约 50 倍之间, 例如至少 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、17 倍、18 倍、19 倍或 20 倍, 或达到 500 倍, 或达到 200 倍, 或达到 150 倍, 或达到 100 倍, 或达到 90 倍, 或达到 80 倍, 或达到 70 倍, 或达到 60 倍, 或达到 50 倍, 或达到 40 倍, 或达到 30 倍。在某些实施方案中, 如果步骤 (a) 中测量的结合亲和力或结合率参数大于步骤 (b) 中测量的结合亲和力或结合率参数, 则所述测试多肽结合剂被鉴定为候选正调节剂。在其它实施方案中, 如果步骤 (b) 中测量的结合亲和力或结合率参数大于步骤 (a) 中测量的结合亲和力或结合率参数, 则所述测试多肽结合剂被鉴定为候选负调节剂。

[0018] 可以以其中同时或相继地筛选多种多肽结合剂 (例如, 至少 5、10、15、20、25、30、35、40、50、100、150、200、500、1,000、10,000 或 25,000 种) 的高通量测定法的形式进行上述方法中的任何方法。在某些实施方案中, 所述方法还包括任选地在测量结合亲和力或结合率参数的差异之前, 测定多种测试多肽结合剂 (例如抗体) 对 (a) 所述第一组分、(b) 所述第二组分或 (c) 包含所述第一组分和第二组分的复合物的任一种的结合亲和力。还可以

以其中同时或相继地筛选多种多肽结合剂（例如，至少 5、10、15、20、25、30、35、40、50、100、150、200、500 或 1000 种）的高通量测定法的方式进行文库的此种预筛选。在某些实施方案中，多种筛选的测试多肽结合剂是通过将一个或多个不同突变引入亲代多肽结合剂来制备的亲代多肽结合剂的变体。

[0019] 在其它实施方案中，可筛选多肽结合剂与不同结合伴侣（例如诱饵受体、清除作用受体或备选信号途径组分）相比较对第一组分或第二组分作用的选择性。此类方法可包括鉴定不显著改变第一组分或第二组分对于不同结合伴侣（此类结合伴侣既不是第一组分也不是第二组分）的结合亲和力或结合率参数的多肽结合剂。

[0020] 可在其中第一组分、第二组分和多肽结合剂的一种或多种存在于溶液中的测定中，或在其中第一组分、第二组分和多肽结合剂的一种或多种连接于固相（共价或非共价地）的测定中，或在其中第一组分、第二组分以及多肽结合剂的一种或多种在细胞表面上表达的测定中进行结合亲和力或结合率参数的上述测量中的任一测量。第一组分和 / 或第二组分各自本身可以是多种化合物的复合物。第一组分和 / 或第二组分（例如，靶或信号转导伴侣或反之亦然）可以是可溶性的或膜结合的配体或受体，包括但不限于 7- 跨膜受体、G- 蛋白偶联受体 (GPCR)、肾上腺素能受体、神经递质受体、嗅觉受体、阿片样物质受体、趋化因子受体、视紫质、受体酪氨酸激酶、生长因子受体、整联蛋白以及 toll- 样受体、酶或底物。

[0021] 上述方法中的任一方法还可包括重新克隆和表达，或合成和表达，或合成候选动力学调节多肽结合剂；纯化所述动力学调节剂和 / 或测定其序列；添加或替换 Fc 区域或其片段；利用无菌的药理学上可接受的稀释剂将动力学调节剂或变体（例如包含亲代抗体的相同 CDR 的至少 3 个或 6 个 CDR 的抗体）配制于无菌组合物中；和 / 或给动物施用所述动力学调节剂或变体。

[0022] 上述方法中的任一方法还可包括测量在所述测试多肽结合剂存在和不存在的情况下，由信号复合物介导的信号转导的水平，和确定所述测试多肽结合剂是否额外地是激动剂、部分激动剂、拮抗剂或部分拮抗剂。在某些实施方案中，所述激动剂或部分激动剂是变构激动剂。

[0023] 在相关方面，本发明提供了通过上述方法的任一方法或本文中其它地方描述的方法的任一方法鉴定的多肽结合剂例如抗体。

[0024] 在分开的方面，本发明还提供了具有期望的特征的多肽结合剂。在某些实施方案中，本发明提供了正调节剂，所述正调节剂以约 10^{-5}M 或更小，例如， 10^{-6}M 或更小，或 10^{-7}M 或更小，或 10^{-8}M 或更小（其中更小的数表示更大的结合亲和力）的平衡离解常数 K_D 结合靶，例如附录 A（或 SEQ ID NOS:1-88）中任一项的分泌性蛋白，和 (b) 能够使所述靶与其信号转导伴侣之间的结合亲和力 K_D 增加至约 1.5 倍（即，50%）至任选地约 1000 倍，或约 1.5 倍至约 100 倍，或约 2 倍至 25 倍，或约 2 倍至约 50 倍，或约 1.5 倍至约 25 倍，或约 1.5 倍至约 50 倍，例如至少 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、17 倍、18 倍、19 倍或 20 倍，或达到 500 倍，或达到 200 倍，或达到 150 倍，或达到 100 倍，或达到 90 倍，或达到 80 倍，或达到 70 倍，或达到 60 倍，或达到 50 倍，或达到 40 倍，或达到 30 倍。在其它实施方案中，本发明提供了负调节剂，所述负调节剂 (a) 以约 10^{-5}M 或更小，例如 10^{-6}M 或更小，或 10^{-7}M 或更小，或 10^{-8}M 或更小的平衡离解常数 K_D 结合

靶,例如附录 A(或 SEQ ID NOS:1-88)中任一项的分泌性蛋白,和(b)能够使所述靶与其信号转导伴侣之间的结合亲和力 K_D 减小至 $2/3$ (即,50%)至任意地约 $1/1000$,或约 $2/3$ 至约 $1/100$,或约 $1/2$ 至 $1/25$ 倍,或约 $1/2$ 至约 $1/50$,或约 $2/3$ 至约 $1/25$,或约 $2/3$ 至约 $1/50$,例如至少 $2/3$ 、 $1/2$ 、 $1/3$ 、 $1/4$ 、 $1/5$ 、 $1/6$ 、 $1/7$ 、 $1/8$ 、 $1/9$ 、 $1/10$ 、 $1/11$ 、 $1/12$ 、 $1/13$ 、 $1/14$ 、 $1/15$ 、 $1/16$ 、 $1/17$ 、 $1/18$ 、 $1/19$ 或 $1/20$,或 $1/500$,或 $1/200$,或 $1/150$,或 $1/100$,或 $1/90$,或 $1/80$,或 $1/70$,或 $1/60$,或 $1/50$,或 $1/40$,或 $1/30$ 。

[0025] 还可将此类多肽结合剂中的任何多肽结合剂经历纯化,以获得大体上均质的组合物,例如具有至少约 90%、95%、97%、98%、99% 或 99.5% 的纯度。

[0026] 本发明还提供了制备无菌药物组合物的方法(所述方法包括以例如治疗有效量向此类多肽结合剂、此类多肽结合剂的无菌组合物中加入无菌的药学上可接受的稀释剂)和施用此类无菌组合物例如以调节(增强或减弱)包含分泌性蛋白的复合物的信号转导的方法。

[0027] 应理解,本文中描述的每一个特征或实施方案或组合是本发明的任何方面的非限定性的说明性实例,这样其意指可与本文中描述的任何其它特征或实施方案或组合组合。例如,当用语言例如“一个实施方案”、“某些实施方案”、“其它实施方案”、“特定的示例性实施方案”和/或“另一个实施方案”描述特征时,这些类型的实施方案的每一个是意欲与本文中描述的任何其它特征或组合特征组合而不必列出每一个可能的组合的特征的非限定性实例。此类特征或特征的组用于本发明的任何方面。类似地,当方法描述鉴定特征在于某些特征的多肽结合剂例如抗体时,本发明也涉及特征在于那些特征的多肽结合剂。当公开落在范围内的值的实例时,设想这些实例中的任一实例作为范围的可能端点,设想这样的端点之间的任何和所有数值,并且可预期上端点与下端点的任何和所有组合。

[0028] 在考虑下列本发明的详细说明后,本发明的许多另外方面和有利方面对于本领域技术人员将变得很显然,所述详细说明描述了其目前优选的实施方案。本申请中提及的所有美国专利、美国专利申请公布、美国专利申请、外国专利、外国专利申请以及非专利公布通过引用整体并入本文。

[0029] 附图简述

[0030] 图 1 是举例说明在测试多肽结合剂存在或不存在的条件下进行的结合的测量的示意图。

[0031] 图 2 是举例说明在第二复合物组分存在或不存在的条件下进行的结合的测量的示意图。

[0032] 图 3 显示预测的动力学调节抗体在(A)不同配体浓度;(B)不同调节剂浓度(非激动剂抗体);和(C)不同调节剂浓度(激动剂抗体)上对信号转导活性的作用。

[0033] 图 4 显示来自检测蛋白质-蛋白质相互作用的调节的平衡溶液亲和力测量的模拟数据。

[0034] 图 5 显示 XOMA 052 对 IL-1 β 与 IL-1sRI(A) 以及与 IL-1sRII(B) 结合的亲和力的影响。

[0035] 图 6 显示(A)XOMA 052 以 IL-1 β 对于细胞测定的 EC_{50} 来中和 IL-1 β 活性,和(B,C) IL-1 β 与 IL-1sRI 的相互作用的负亲和力调节导致改变的对 IL-1 β 的细胞剂量-反应,从而导致 IC_{50} 的增加。

- [0036] 图 7 显示注射抗体 /IL-1 β 复合物后 48 小时保留在循环中的总 IL-1 β 的量。
- [0037] 图 8 是 T2D 中不同药物类型调节 IL-1 β 活性的图示。
- [0038] 图 9 显示来自如实施例 2 中所述, 鉴定调节 GCSF-GCSFR 结合相互作用的抗体的固相亲和力和测量测定的结果。
- [0039] 图 10 显示 A10 (B6) 抗体对 GCSFR- 转染的 BAF3 细胞的 GCSF 依赖性结合。
- [0040] 图 11 显示来自鉴定调节 hINS-INSR 结合相互作用的抗体的基于细胞的亲和力测量测定的样本结果。
- [0041] 图 12 显示来自测量测试抗体对 hINS-INSR 结合相互作用的调节的基于细胞的亲和力测量测定的样本结果。
- [0042] 图 13 显示来自测量测试抗 -INSR 抗体刺激 pIRS-1 磷酸化的能力的测定的示例性结果。
- [0043] 图 14 是显示在固定浓度的不同测试抗体存在或不存在的情况下来自 pIRS-1 测定的胰岛素 EC50 值的表。
- [0044] 图 15 显示饲喂高脂饮食并且用部分激动剂抗 -INSR 抗体处理的 20 周龄 DIO 小鼠的血糖水平 :A. 葡萄糖水平的线形图。B. 显示在部分激动剂抗 -INSR 抗体注射后血糖的统计上显著降低的葡萄糖水平的条形图。
- [0045] 图 16 举例说明部分激动剂抗 -INSR 抗体的施用改善 DIO 小鼠的血糖控制 :A. 葡萄糖耐量测试时间过程 ;B. 空腹血糖水平 ;C. 葡萄糖耐量测试 ;曲线下面积 (AUC)。
- [0046] 图 17 显示正调节剂抗 -INSR 抗体增强 DIO 小鼠的胰岛素敏感性 :A. 胰岛素耐量测试时间过程 ;B. 空腹血糖水平 ;C. 胰岛素耐量测试 ;曲线下面积 (AUC)。
- [0047] 图 18 显示正调节剂抗 -INSR 抗体改善 DIO 小鼠的血糖控制 :A. 葡萄糖耐量测试时间过程 ;B. 空腹血糖水平 ;C. 胰岛素耐量测试 ;曲线下面积 (AUC)。
- [0048] 图 19 举例说明与对内源配体的剂量反应相比较的来自部分变构激动剂的剂量反应 (A) 或在变构激动剂存在或不存在的情况下由配体产生的激活 (B)。
- [0049] 图 20 显示与对内源配体的剂量反应相比较的来自正变构调节剂抗体的剂量反应 (A) 或在正变构调节剂抗体存在和不存在的情况下内源配体的剂量反应 (B)。
- [0050] 图 21 举例说明一组单独的部分变构激动剂相对于内源配体胰岛素的激活参数。数据获自 Akt 在 Ser473 上的磷酸化%的测量。
- [0051] 图 22 举例说明在 10ug/ml 部分变构激动剂抗体存在的情况下, 相对于在阴性对照抗体存在的情况下对内源配体的最大反应的胰岛素的激活性质。数据获自 Akt 在 Ser473 上的磷酸化%的测量。
- [0052] 详述
- [0053] 本发明提供了作为多肽结合剂的动力学调节药物、其用途以及鉴定所述动力学调节药物的多种方法。此类动力学调节剂可通过改变信号复合物组分的装配和解离的动力学速率常数 (kinetic rate constant) 或通过其它机制 (包括改变信号复合物的结构状态 (例如通过结合过渡态 (transition state)) 和加速信号转导的激活) 诱导对细胞反应的正或负作用。
- [0054] 信号复合物的调节可导致对信号输入的敏感性的增强或减弱以及信号转导的伴随增强或减弱。此类动力学调节剂的施用增强或减弱细胞途径的敏感性和 / 或细胞

反应的绝对水平。本发明的动力学调节剂,取决于它们的性质,可用作调节剂、增强剂 (potentiator)、调控剂 (regulator)、效应物或敏化物 (sensitizer)。

[0055] 许多抗体药物通过结合细胞表面受体或其同源配体并且消除配体结合及激活受体的能力来阻断信号转导途径。此类阻断药物通过阻止受体-配体复合物的形成来化学计量地介导它们的作用。然而,大当被异常激活时与疾病相关的多数途径,在正常生物学中也具有正常的发育或内环境稳定 (homeostatic) 作用。该观察对于免疫系统尤其如此,在所述免疫系统中高效力细胞因子例如 TNF- α 和 IL-6 在病理背景中驱动炎症但在感染的控制中也具有重要的有益作用。某些疾病的成功治疗因而可能需要减弱而非完全抑制信号途径来恢复正常生理状态,从而具有可接受的副作用特征。预期由本发明提供的动力学调节剂提供此类有利方面。

[0056] 其它治疗性药物通过结合细胞表面受体和改变受体的活性影响细胞信号转导途径。此类直接激动剂药物可通过模拟配体的天然活性来介导它们的作用,从而具有固有活性,即它们不需要配体的存在来介导它们的作用。其它治疗性药物通过结合配体来影响细胞信号转导途径。此类间接激动剂药物可通过改变配体稳定性或效价来介导它们的作用。

[0057] 生物过程通常以连续而非二分 (binary) 方式被调控,从而在许多情况下,途径活性的调节可以是比完全途径阻断或刺激更适当的治疗策略。对途径活性的调节而非对完全途径阻断或刺激进行功能性的基于细胞的筛选是很费力的并且可能不容易以高通量方式来容易地进行,因为此类筛选通常需要已知浓度的测试化合物并且可能对测试化合物制剂中的任何杂质敏感。特别地,对途径活性的调节进行高通量功能性的基于细胞的筛选的能力因不能透过细胞的分子 (其不能进入细胞内环境),特别地因在所使用的产生系统中可具有不同的表达水平、纯度和稳定性的程度的重组生物分子而受到限制。此外,某些结合相互作用可能对功能性筛选的测量不具有信号转导输出 (例如,在诱饵受体、诱饵底物或靶的无活性形式的情况下),这使得难以鉴定干扰这些相互作用的试剂。

[0058] 本发明克服了这些不利方面并且提供了以高通量方式鉴定期望的活性和期望的潜能的正和负动力学调节剂的方法。

[0059] 定义

[0060] 术语“化合物”是指任何化合物,有机的或无机的,内源或外源的,包括但不限于多肽、蛋白质、肽、小分子、核酸 (例如, DNA 和 RNA)、碳水化合物、脂质、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、肽模拟物、聚酮 (polyketides) 及其衍生物、结构类似物或组合。“内源的”意指天然存在于哺乳动物中的,然而“外源的”意指非天然存在于哺乳动物中的,例如施用的外源化合物。

[0061] 术语“多肽结合剂”是指能够特异性结合抗原例如靶或其信号转导伴侣,或能够以可测量的结合亲和力结合抗原的多肽。多肽结合剂的实例包括抗体、肽体、多肽和肽 (任选地缀合于其它肽部分或非肽部分)。多肽结合剂可结合的抗原可包括任何蛋白质或非蛋白质分子,所述分子能够引起抗体反应,或能够以大于非特异性结合的可检测的结合亲和力结合多肽结合剂。动力学调节多肽结合剂结合的抗原可包括靶、靶的信号转导伴侣和 / 或包含靶和其信号转导伴侣的复合物。

[0062] 术语“抗体”以最广义使用,包括完全装配的抗体、四聚体抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体 (例如,双特异性抗体)、可结合抗原的抗体片段 (例如, Fab'、

F' (ab)₂、Fv、单链抗体、双链抗体) 以及包含前述抗体的重组肽(只要它们展示期望的生物活性)。“免疫球蛋白”或“四聚体抗体”是由两条重链和两条轻链组成的四聚体糖蛋白,所述重链和轻链各自包含可变区和恒定区。抗原结合部分可通过重组 DNA 技术或通过酶促或化学切割完整抗体来产生。抗体片段或抗原结合部分包括,除其它以外,Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、结构域抗体(dAb)、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、单链抗体片段、嵌合抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体、微小抗体(minibody)、线性抗体;螯合重组抗体、三抗体或双抗体、内抗体(intrabody)、纳米抗体、小模块免疫药物(SMIP)、抗原-结合-结构域免疫球蛋白融合蛋白、骆驼化抗体、含 VHH 抗体或其变体或衍生物,以及包含免疫球蛋白的至少一部分的多肽,所述部分足以赋予所述多肽特异性抗原结合,例如 1、2、3、4、5 或 6 个 CDR 序列,只要所述抗体保持期望的生物活性即可。

[0063] “单克隆抗体”是指获自大体上同源的抗体群体的抗体,即,除了可以以少量存在的可能天然发生的突变外,包括所述群体的单一抗体是相同的。

[0064] 如本文中所使用的“抗体变体”是指在天然抗体可变区结构域中包含至少一个氨基酸置换、缺失或插入的抗体多肽序列。变体可与未修饰的抗体大体上同源或大体上同一。

[0065] 如本文中所使用的,“嵌合抗体”是指包含来源于通常源自不同物种的两种不同的抗体(参见,美国专利 No. 4, 816, 567) 的序列的抗体。最常见地,嵌合抗体包含人和啮齿类动物的抗体片段,通常是人恒定区和小鼠可变区。

[0066] “中和抗体”是能够消除或显著减弱其结合的抗原的生物功能的抗体分子。因此,“中和”抗体能够消除或显著减弱生物功能,例如酶活性、配体结合或细胞内信号转导。

[0067] “分离的”抗体是已被鉴定并且与其天然环境的组分分离和从其回收的抗体。其天然环境的污染组分是可干扰所述抗体的诊断或治疗用途的物质,并且可包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在优选实施方案中,抗体将被纯化为(1) 如通过 Lowry 法测定的,按抗体重量计高于 95%,最优选按重量计高于 99%,(2) 足以通过使用旋杯式序列分析仪(spinning cup sequenator) 获得 N 末端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度,或(3) 通过在还原或非还原条件下使用考马斯蓝或优选银染法进行的 SDS-PAGE 纯化(均为均质)。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境的至少一个组分可以不存在。然而,通常地分离的抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0068] 如本文中所使用的,“特异性结合”是“抗原特异性的”,是“特异于”抗原的或与抗原“免疫反应的”的抗体是指以大于对于相似序列的其它抗原的亲力的亲和力结合抗原的本发明的抗体或多肽结合剂。在一个方面,本发明的多肽结合剂或其片段、变体或衍生物将以其对其它物种(即非人物种)的相似抗原的结合亲和力相比较更大的亲和力结合人抗原,但识别并且结合靶的直系同源物的多肽结合剂在本发明的范围内。

[0069] 例如,作为“特异于”其同源抗原的抗体或其片段的多肽结合剂显示抗体的可变区识别并且以可检测的偏爱性结合期望的抗原(例如,当期望的抗原是多肽时,抗体的可变区能够通过结合亲和力的可测量的差异区别抗原多肽与相同家族的其它已知多肽,尽管在家族成员之间可能存在局部序列同一性、同源性或相似性)。应理解,特异性抗体也可通过与抗体的可变区外的序列,特别地分子的恒定区中的序列的相互作用与其它蛋白质(例如,在 ELISA 技术中,金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) 蛋白 A 或其它抗体) 相互作用。用于本发明的方法的测定多肽结合剂例如抗体的结合特异性的筛选测定法在本领域是公知的并且

在本领域中进行常规地实施。关于此类测定法的综述,参见 Harlow 等人(编),*Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), 第 6 章。用于本发明的抗体可使用本领域已知的任何方法来产生。

[0070] 术语“表位”是指任何分子的能够被选择性结合剂在一个或多个抗原结合区上识别和结合的部分。表位通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或糖类侧链组成,并且具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。本文中使用的表位可以是连续的或非连续的。

[0071] 术语“衍生物”,当与本发明的多肽结合剂和多肽结合使用时,是指通过这类技术(如遍在蛋白化、至治疗剂或诊断剂的缀合、标记(例如,利用放射性核素或不同的酶)、共价聚合物连接例如 PEG 化(利用聚乙二醇的衍生化)和通过通常不存在于人蛋白质中的氨基酸例如鸟氨酸的化学合成产生的插入或置换)来化学修饰的多肽。衍生物保持本发明的未衍生的分子的结合性质。

[0072] “可检测的部分”或“标记”是指可通过分光光度计、光化学、生物化学、免疫化学或化学方法检测的组合物。例如,有用的标记包括 ^{32}P 、 ^{35}S 、荧光染料、电子致密试剂、酶(例如,常用于 ELISA 的)、生物素-链霉抗生物素蛋白、地高辛、半抗原和针对其的抗血清或单克隆抗体是可获得的蛋白质或具有与另一种标记的核酸分子的序列互补性的核酸分子。可检测的部分通常产生可测量的信号,例如放射性、生色或荧光信号,所述信号可用于定量样品中结合的可检测部分的量。

[0073] “肽”或“寡肽”是短氨基酸序列,通常在长度上为 3 至 100 个氨基酸残基并且包括天然存在的氨基酸残基和残基的非天然存在类似物(其可被单独使用或可与天然存在的氨基酸残基组合使用以给肽提供特殊构象特异性或特殊生物活性,例如对蛋白酶解的抗性)。肽包括肽序列的重复,可包括 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个拷贝的头尾或头头相接排列的氨基酸序列。可将肽缀合于非肽部分,例如[扩展]。肽包括二聚体、三聚体或高级多聚体(例如,通过缀合于其它聚合物或非聚合物部分例如 PEG 形成的)。

[0074] “多肽”是更长的氨基酸序列,通常在长度上为 100 或更多个氨基酸残基,并且包括天然存在的氨基酸残基和残基的非天然存在类似物,所述类似物可被单独使用或可与天然存在的氨基酸残基组合使用以给多肽提供特殊构象特异性或特殊生物活性,例如对蛋白酶解的抗性。

[0075] 如本文中所使用的,“肽”是包含一个或多个融合至所有或部分免疫球蛋白(Ig)恒定区的肽的融合多肽。参见,例如,美国专利 No. 6,660,843。肽可以是结合抗原的任何天然存在或重组制备或化学合成的肽。肽可以是重复的,可包括 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个拷贝的头尾或头头相接排列的氨基酸序列。Ig 恒定区的部分可包括至少一个恒定区结构域(例如,CH1、CH2、CH3 和 / 或 CH4)、多个结构域(例如,CH2 和 CH3)、多个拷贝的结构域(例如,CH2-CH2)、保持期望的活性的恒定结构域的任何片段,例如负责循环中免疫球蛋白的延长的半衰期的清道夫受体表位,或其任何组合。

[0076] “小”分子或“小”有机分子在本文中被定义为具有约 1000 道尔顿或更小的分子量的非聚合物有机化合物。

[0077] 如本文中所使用的,“信号复合物”是蛋白质和 / 或内源或外源化合物的装配体,其可介导细胞信号的转导。信号复合物的实例包括但不限于与膜结合受体结合的配体、与底

物结合的酶和与传播参与信号级联的生化反应相关的任何细胞分子。信号复合物还可包括共受体、辅因子、支架蛋白、变构调节剂和许多其它类型的参与细胞信号转导的蛋白质和分子。信号复合物可短暂形成或可长期形成。信号复合物的分子成份 (constituent) 或组分可随时间过去而变化并且可取决于各组分的激活状态和细胞环境。信号复合物可经历可化学修饰和调节,所述修饰和调节可诱导连串的对复合物的作用,包括转导活性的微妙改变、完全灭活和基本灭活或正调节及负调节。信号复合物的组分可以是蛋白质,例如附录 A(或 SEQ ID NOS :1-88) 中任一项的分泌性蛋白,其可与其它蛋白质和 / 或化合物缔合存在于复合物中 (“复合的”) 或与其分开地存在 (“未复合的”)。

[0078] 术语“治疗有效量”在本文中用于表示有效地改善或减轻与信号复合物的异常 (例如,异常高或异常低) 信号转导相关的疾病的症状或体征的本发明的动力学调节剂组合物的量。

[0079] 如本文中所使用的,“结合”是两种或更多种不同的分子实体之间物理缔合,其因由一种或多种弱力 (包括氢键、范德瓦尔斯、离子-偶极和疏水作用) 和强力离子键组成的非共价相互作用的特定网络而引起。结合的水平或程度可用亲和力来测量。亲和力或“结合亲和力”是两个或更多个不同分子实体之间的结合相互作用的强度的量度,其可通过平衡结合常数或动力学结合率参数来确定。适当的常数或参数以及它们的测量单位的实例在本领域是公知的,包括但不限于平衡结合常数 (K_A), 例如,约 $10^5 M^{-1}$ 或更高,约 $10^6 M^{-1}$ 或更高,约 $10^7 M^{-1}$ 或更高,约 $10^8 M^{-1}$ 或更高,约 $10^9 M^{-1}$ 或更高,约 $10^{10} M^{-1}$ 或更高,约 $10^{11} M^{-1}$ 或更高或约 $10^{12} M^{-1}$ 或更高;平衡离解常数 (K_D), 例如,约 $10^{-5} M$ 或更小,或约 $10^{-6} M$ 或更小,或约 $10^{-7} M$ 或更小,或约 $10^{-8} M$ 或更小,或约 $10^{-9} M$ 或更小,或约 $10^{-10} M$ 或更小,或约 $10^{-11} M$ 或更小,或约 $10^{-12} M$ 或更小;结合速率 (例如,秒⁻¹, mol⁻¹) 和解离速率 (例如,秒⁻¹)。在 K_A 的情况下,更高的值表示“更强”或“增强的”结合亲和力,而在 K_D 的情况下,更低的值表示“更强”或“增强的”结合亲和力。如本文中所使用的,“增强的”结合率参数表示增加的停留时间、更快的缔合或更慢的解离。如本文中所使用的“减弱的”结合率参数表示减少的停留时间、更慢的缔合或更快的解离。在结合速率的情况下,更高的值表示更快或更频繁的缔合,从而通常导致增强的结合亲和力。在解离速率的情况下,更低的数值通常表示更慢的解离,从而通常导致更强的结合亲和力。然而,结合速率与解离速率的比率表明结合亲和力,如在后面更详细地解释的。

[0080] 可直接或间接测量两种化合物之间,例如抗体与抗原之间或信号复合物的第一组分和第二组分之间的亲和力。可使用表示亲和力和 / 或与亲和力成比例的替代性质进行亲和力的间接测量。此类替代性质包括:信号复合物的第一组分与第二组分的结合的量或水平,或预示着第一组分对第二组分的表观结合亲和力或与第一组分对第二组分的表观结合亲和力相关的第一组分或第二组分的生物物理特征。具体实例包括在第一组分或第二组分的亚饱和浓度上测量第一组分对第二组分的结合的量或水平。可测量的其它生物物理特征包括但不限于第一组分和第二组分之一或两者的净分子电荷、旋转活性 (rotational activity)、扩散速率、解链温度 (melting temperature)、静电牵引 (electrostatic steering) 或构象。可测量的其它生物物理特征包括测定在不同温度、pH 或离子强度的影响下结合相互作用的稳定性。

[0081] 测量的亲和力取决于进行测量所使用的确切条件,包括,除许多其它因素外,结合

组分的浓度、测定设置、结合组分的效价、缓冲液组成、pH、离子强度和温度以及添加至结合反应的其它组分例如变构调节剂和调控剂。可将定量和定性方法用于测量结合相互作用的绝对强度和相对强度。

[0082] 表观亲和力是在其中亲和力在结合反应中被条件或组分例如变构调节剂、抑制剂、结合组分效价等改变的条件下，两种或更多种不同分子实体之间的结合相互作用的强度的量度。

[0083] 如本文中所使用的，“亚饱和浓度”是结合反应中显著低于结合亲和力 K_D 的一种或多种组分的浓度和 / 或在结合反应中低于占据其它组分的所有结合位点所需的浓度的一种组分的浓度。在亚饱和条件下，结合反应中显著百分比的结合组分之一具有可用的结合位点。

[0084] 如本文中所使用的，“生物物理测定法”是以绝对或相对方式测量至少两种化合物之间的结合、缔合、解离、结合亲和力、结合水平或结合率参数的任何方法。生物物理测定法通常在体外进行并且可用纯化的结合组分、未纯化的组分、细胞结合的组分以及纯化的组分与细胞结合的组分的组合来进行。

[0085] 激动剂是用于描述结合并且激活信号复合物组分的信号转导的一种类型的配体或药物的术语。改变信号复合物组分（例如受体）的活性的能力（也称为激动剂的功效）是区别其与拮抗剂（一种也结合信号复合物组分但不激活信号复合物组分的信号转导的受体配体）的性质。激动剂的功效可以是正的，引起信号复合物组分的活性增加，或可以是负的，引起信号复合物组分的活性的减弱。完全激动剂结合并且激活信号复合物组分，在该信号复合物上展示完全的功效。部分激动剂也结合并且激活给定的信号复合物组分，但相对于完全激动剂在所述信号复合物组分上只具有部分功效。反激动剂是结合与该信号复合物组分的激动剂相同的信号复合物组分结合位点并且逆转信号复合物组分的组成型活性的试剂。反激动剂产生激动剂的相反药理作用。共激动剂与其它共激动剂一起作用以一起产生期望的作用。

[0086] 在不同方面，本文中公开的激动剂用作变构激动剂。它们结合受体的部分，所述部分与活性配体结合位点不同，并且未明显改变配体与受体的结合亲和力，例如它们使结合亲和力的改变小于 2 倍或 3 倍。它们也未明显地影响其受体的配体激活的 EC_{50} ，例如它们使 EC_{50} 的改变小于 2 倍或 3 倍。此类变构激动剂以最大激动剂反应组成型地激活受体，所述最大激动剂反应为配体的最大激动剂反应的 80% 或更低，例如 15% - 80%、20-80%、20-60%、20% - 40% 或 15% - 30%。在某些实施方案中，变构激动剂以最大激动剂反应组成型地激活受体，所述最大激动剂反应为配体的最大激动剂反应的至少约 15%、20%、25%、30%、35%、40%；和达到配体的最大激动剂反应的 45%、50%、55%、60%、65%、70%、75% 或 80%。应理解，可设想这些范围端点的任何端点的任何组合而不必引述每一个可能的组合。在其它实施方案中，本发明提供了以 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} M 或更小（其中更小的数值表示更大的结合亲和力）的 K_D 亲和力结合受体的变构激动剂。不希望受本发明的理论束缚，变构激动剂的弱激动剂活性用于模拟天然基线配体激活水平的作用，同时允许外源施用的配体具有其正常作用。在某些实施方案中，变构激动剂是部分变构激动剂。拮抗剂阻断激动剂对受体的激活。选择性激动剂对于一种特定类型的信号复合物组分具有选择性。此外，其还可以是上述类型的任何类型。在示例性实施方案中，本发明提供了变构激动剂多

肽结合剂,例如抗体,所述多肽结合剂以至少 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} M 或更小(其中更小的数值表示更大的结合亲和力)的亲和力结合附录 A(或 SEQ ID NOS:1-88)中的任何分泌性蛋白,和 (a) 当在体外测定中测量时展示为天然配体的最大激动剂活性的 20% -80% 的最大激动剂活性, (b) 当存在时,对配体对于受体的 EC50 的改变不超过 2 倍,以及 (c) 当存在时,对配体对于受体的 KD 的改变不超过 2 倍。

[0087] 激动剂的效力通常利用其 EC50 值的倒数来确定。可通过测定引起激动剂的半数最大生物反应所需的激动剂的浓度来计算给定的激动剂的 EC50 值。EC50 值越低,激动剂的效力越大。

[0088] 拮抗剂是一种类型的配体或药物,其在结合信号复合物组分(例如,受体)时本身不引发生物反应,但阻断或减弱激动剂介导的反应。拮抗剂对它们的同源信号复合物组分可具有亲和力但不具有功效,并且结合会破坏相互作用,从而抑制激动剂或反激动剂在受体上的功能。拮抗剂通过结合信号复合物组分上的活性位点或变构位点来介导它们的作用,或它们在通常不参与信号复合物组分的活性的生物调控的唯一结合位点上相互作用。拮抗剂活性可以是可逆的或不可逆的,这取决于拮抗剂-受体复合物的寿命,这从而取决于结合信号复合物组分的拮抗剂的性质。大部分拮抗剂通过与内源配体或底物在受体上的结构确定的结合位点上竞争来发挥它们的效力。

[0089] 拮抗剂未显示激活它们所结合的信号复合物组分的功效。然而,一旦结合,拮抗剂可抑制激动剂、反激动剂和部分激动剂的功能。在功能性拮抗剂测定中,剂量-反应曲线测量一系列浓度的拮抗剂逆转激动剂的活性的能力的效力。拮抗剂的效力通常通过其 IC50 值来确定。可通过测定引起激动剂的最大生物反应的一半抑制所需的拮抗剂的浓度来计算给定的拮抗的 IC50 值。IC50 越低,拮抗剂的效力越大。

[0090] 竞争性拮抗剂在与配体或激动剂相同的结合位点(活性部位)可逆地结合信号复合物组分,但不激活信号复合物组分,从而与激动剂竞争信号复合物组分上的相同结合位点。非竞争性或变构拮抗剂结合与激动剂的结合位点分开的结合位点,通过该分开的结合位点将它们的作用施加于该信号复合物组分。因此,它们不与激动剂竞争结合。无竞争拮抗剂与非竞争性拮抗剂相异在于在它们可结合分开的变构结合位点之前,它们需要信号复合物组分激活。

[0091] 鉴定动力学调节剂的方法

[0092] 不受本发明的理论束缚,本公开内容提供了信号复合物的两个组分(第一组分, C1 和第二组分, C2) 与动力学调节剂 (M) 之间的相互作用的动力学干扰 (kinetic perturbation) 可在被数学上描述为:

[0093]
$$K' C1C2 = KC1C2 \frac{(1+M/K_{MC1}) (1+M/K_{MC2})}{(1+M/K_{[C1C2]M})}$$

[0094]
$$(1+M/K_{[C1C2]M})$$

[0095] 其中组分之间的结合平衡常数 (K'_{C1C2}) 的变化是组分之间的平衡常数 (K_{C1C2})、动力学调节剂浓度 (M)、动力学调节剂对于复合物的亲和力 ($K_{[C1C2]M}$) 和动力学调节剂对于第一组分 (K_{MC1}) 或第二组分 (K_{MC2}) 的亲力的函数。

[0096] 在其中信号复合物是受体-配体复合物并且调节剂是抗体的情况下,抗体对受体-配体相互作用的动力学干扰在数学上可被描述为:

$$[0097] \quad K'_{RL} = K_{RL} \frac{\left(1 + \frac{A}{K_{AR}}\right) \left(1 + \frac{A}{K_{AL}}\right)}{\left(1 + \frac{A}{K_{[RL]A}}\right)}$$

[0098] 其中受体-配体结合平衡常数 (K'_{RL}) 的变化是受体-配体平衡常数 (K_{RL})、抗体浓度 (A)、抗体对于复合物的亲和力 ($K_{[RL]A}$) 和抗体对于受体 (K_{AR}) 或配体 (K_{AL}) 的亲合力的函数。

[0099] 动力学调节剂以使靶对于其信号转导伴侣的结合亲和力或结合率参数减弱或增强的方式结合靶或其信号转导伴侣、或靶与信号转导伴侣的复合物。例如,当靶是受体或配体时,配体对于其受体的结合亲和力或结合率参数在动力学调节剂存在的情况下被减弱或增强。具有完全阻断活性的动力学调节剂在该分析中代表了边界条件,因为当 $K_{[C1C2]M}$ 充分高时, K'_{C1C2} 接近无穷大。该模型的一个含意 (implication) 是当动力学调节剂的浓度 ($[M]$) 高于动力学调节剂/抗原相互作用的平衡离解常数 (K_D) 足以饱和结合配体时,信号转导调节的程度不依赖于动力学调节剂浓度 ($[M]$)。因此,相互作用的调节与对于复合物的亲和力相对对于组分的亲和力的比率相关,其中 $[M]$ 大于调节剂与其抗原的 K_D 。

[0100] 本公开内容提供了:动力学调节剂与靶和/或其信号转导伴侣相互作用的生物物理性质可用于预测动力学调节剂对靶信号转导途径的功能作用。因此,可基于它们的对于以复合形式存在的靶(和/或其信号转导伴侣)相对于以未复合形式存在的靶(和/或其信号转导伴侣)的相对亲和力来鉴定改变信号转导途径的动力学调节剂。本发明预期可以以下列方式预测动力学调节剂(M)对信号复合物的两个组分(第一组分, C1 和第二组分, C2)之间的相互作用的动力学干扰:

[0101] $K_{[C1C2]M}$ 或 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2} < K_{MC2}$ 或 K_{MC1} 导致正动力学调节

[0102] $K_{[C1C2]M}$ 或 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2} = K_{MC2}$ 或 K_{MC1} 不导致动力学调节

[0103] $K_{[C1C2]M}$ 或 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2} > K_{MC2}$ 或 K_{MC1} 导致负动力学调节

[0104] 在其中信号复合物是受体(R)-配体(L)复合物,并且动力学调节剂是抗体(A)的情况下,可以以下列方式预测动力学干扰:

[0105] $K_{[RL]A}$ 或 $K_{[AL]R}$ 或 $K_{[AR]L} < K_{AL}$ 或 K_{AR} 导致正动力学调节

[0106] $K_{[RL]A}$ 或 $K_{[AL]R}$ 或 $K_{[AR]L} = K_{AL}$ 或 K_{AR} 不导致动力学调节

[0107] $K_{[RL]A}$ 或 $K_{[AL]R}$ 或 $K_{[AR]L} > K_{AL}$ 或 K_{AR} 导致负动力学调节

[0108] 在某些实施方案中,动力学调节剂例如抗体(A)可通过其在第一组分或第二组分的任何给定的亚饱和浓度(例如配体(L)浓度)上改变结合相互作用例如受体(R)-配体(L)相互作用的能力来鉴定,如图3A中所描述的。图3A中的数据产生自可逆的相互作用模型,假定受体配体相互作用的亲和力为10pM、500pM或10nM。动力学调节剂可有效地使受体配体相互作用的亲和力和相应的剂量反应从500pM相互作用偏移至如所描绘的10pM(正调节剂)或10nM(负调节剂)。在某些实施方案中,动力学调节剂在给定的配体浓度上将产生更高水平的R-L结合,使测定曲线向左偏移(正调节)。在其它实施方案中,动力学调节剂在给定的配体浓度上产生更低水平的R-L结合,使测定曲线向右偏移(负调节)。在某些实施方案中,偏移是一致的,如图3A显示的。在其它实施方案中,偏移是不一致的,这反映了复合物中包括其它因子例如辅助蛋白、受体内化等。将图3A的500pM亲和力处的数据用于

产生图 3B 和 3C, 其中描述了不同浓度的非激动剂 (图 3B) 或激动剂 (图 3C) 抗体对信号转导的作用, 假定抗原的浓度是固定。

[0109] 对于举例说明性靶, 胰岛素受体的结合特征与功能作用的相互关系描述于下面表 1 中。

[0110] 表 1

[0111]

[0112]

靶结合特征			KD 比率	功能作用
R	L	R-L		
-	-	+	$K_{[RL]A} < K_R, K_L$	正调节
-	+	+	$K_{[AL]R} < K_L$	正调节
+	-	+	$K_{[AR]L} < K_R$	正调节
-	+	+	$K_{[AL]R} > K_L$	负调节
+	-	+	$K_{[AR]L} > K_R$	负调节

[0113] 显示预测的效应匹配结合特征的数据的举例说明性实例示于下面表 2 中。

[0114] 表 2

[0115]

Ab	靶结合特征			KD 比率	功能作用(pAKT 测定, 相对于同种型对照 Ab 的胰岛素 EC ₅₀ 的倍数减少) [#]
	R	L	R-L		
预测的	-	-	+	$K_{[RL]\Lambda} < K_R, K_L$	正调节
Ab078	范围外*		3.4e-10		3.3
Ab085	未结合		2e-10		8.9
预测的	+	-	+	$K_{[AR]L} < K_R$	正调节
Ab001	1.2e-8		1.16e-10	103.4	9.7
Ab079	9.6e-9		4.96e-10	19.4	6.7
Ab080	1.2e-8		6.8e-10	17.6	8.4
Ab083	7.6e-9		3.76e-10	20.2	8.5
预测的	+	-	+	$K_{[AR]L} = K_R$	非调节剂
Ab037	1.08e-10		8e-11	1.4	无改变
Ab053	1.48e-10		9.6e-11	1.5	无改变
Ab062	1.24e-10		1.08e-10	1.1	无改变

[0116] * 在胰岛素不存在的情况下该克隆的结合是明显的,但不足以强至在该测定中被精确地测量。

[0117] [#] 在测试抗体的饱和浓度 (2-20ug/ml) 下进行测定。在 10ug/ml 同种型对照 Ab 存在的情况下胰岛素 EC₅₀ = 0.44nM。

[0118] 因此,调节剂与靶、其信号转导伴侣和 / 或包含靶和其信号转导伴侣的复合物之间的相互作用的结合性质通常预示着动力学调节剂对靶信号转导途径的功能作用。取决于被研究的靶,可能需要考虑某些其它因素。这些因素包括:(1) 动力学调节剂的浓度、靶的浓度和 / 或其信号转导伴侣的浓度(例如,如果动力学调节剂浓度([M])显著大于动力学调节剂与其抗原之间的结合的 K_D,则预测得到最优化), (2) 所使用的动力学调节剂的结构形式,例如单价体(monovalent)对二价体(divalent)或双价体(bivalent), (3) 靶间 / 靶内交联,这可限制靶的构象和 / 或引起靶激活, (4) 动力学调节剂通过立体化学或变构机制改变信号复合物的装配或停靠或改变信号复合物的另外组分的能力, (5) 信号转导途径特异性性质,例如因引入“瓶颈(bottleneck)”的疾病而引起的信号途径的改变, (6) 信号转导途径的负 / 正反馈调节, (7) 信号复合物的组分的清除 / 内化率的改变, (8) 靶中使配体结合与激活解偶联或差异改变的改变,例如调节剂增强配体结合但将其受体捕获在脱敏状

态,或调节剂减弱配体结合但诱导其正在激活的受体的构象变化。

[0119] 在某些方面,本发明提供了用于测量在测试多肽试剂存在或不存在的条件下,信号复合物的第一组分对信号复合物的第二组分的差异结合的方法。在这些方面,当存在第一组分或第二组分差异的亚饱和浓度时,优选观察到差异结合。在某些优选实施方案中,可减小第一组分或第二组分的浓度以提供亚饱和条件。

[0120] 在某些方面,本发明提供了用于测量测试多肽结合剂例如抗体对以复合形式和未复合形式存在的靶和 / 或其信号转导伴侣的差异结合的方法。在这些方面,当存在亚饱和浓度的测试多肽结合剂时,优选观察到差异结合。在某些优选实施方案中,可减小测试多肽结合剂的浓度以提供亚饱和条件。

[0121] 在某些实施方案中,使用对照化合物在测试多肽试剂不存在的情况下进行测试,所述对照化合物优选为属于结构与测试多肽试剂相似的种类的化合物,但其结合对待测试的信号复合物没有影响的不同抗原。例如,测试抗体的对照可以是结合无关抗原例如钥孔血蓝蛋白 (KLH) 的同种型匹配的抗体。

[0122] 对于正调节剂,在给定的 C1 的亚饱和浓度上,更高的 C1 亲和力将反映在正调节剂存在的情况下更高的 C1 对 C2 结合的信号上。动力学调节剂的优先结合将反映在与单独的 C1 或单独的 C2 的信号相比较更高的包含 C1 和 C2 的复合物的信号上。在某些方面,可存在动力学调节剂对 C1 和 C2 的复合物的结合,但无可测量的对单独的 C1 或单独的 C2 的结合。

[0123] 对于负调节剂,在给定的 C1 的亚饱和浓度上,更低的 C1 亲和力将反映在调节剂存在的情况下更低的 C1 对 C2 结合的信号上。动力学调节剂的优先结合将反映在与动力学调节剂对 C1 和 C2 的复合物的结合的信号相比较更高的动力学调节剂对单独的 C1 或单独的 C2 的结合的信号上。

[0124] 本发明提供了鉴定候选多肽结合剂例如抗体的方法,所述多肽结合剂调节信号复合物的第一组分和第二组分之间的结合。这样的第一组分和 / 或第二组分的实例包括附录 A (或 SEQ ID NOS :1-88) 的分泌性蛋白的任何分泌性蛋白以及此类分泌性蛋白的内源或外源信号转导伴侣,其可以是蛋白质或非蛋白质的,但其任选地可不包括离子和盐。在某些实施方案中,第一组分和第二组分是多肽。在示例性具体实施方案中,第一组分和第二组分是内源的。

[0125] 其它实例包括 TNF α 、CD3、CD4、CD20、VEGF-A、CD25、HER-2、EGFR、CD33、CD52、EPO、胰岛素、INSR、人生长激素、GM-CSF、G-CSF、IL-2、TPO、神经生长因子 (NGF、NT-3、NT-4、GDNF)、IFN β 、TGF β 、TNF α 、FGFR4、CETP、瘦素受体、IL-10、IL-10 受体 α 、IL-10 受体 β 、生长激素受体、IL-13 受体、IL-18 受体、IL-2 受体 α 亚基、补体因子 C5a、IL-17 受体、IL-20 受体、IL-3 受体、IL-4 受体、IL-5 受体、IL-9 受体、干扰素 I 型受体 1 (IFNAR1)、干扰素 I 型受体 2 (IFNAR2)、淋巴细胞功能抗原 -3 受体、单核细胞趋化蛋白 1 配体、NGF 受体、IL-6、IL-6 受体之任一种。它们的序列在本领域是公知的并且来自 NCBI 的基因库数据库的代表性登录号和氨基酸序列示于下面。NCBI 手册 [Internet]. Bethesda (MD) :国立医学图书馆 (US),美国国家生物技术信息中心 ;2002 年 10 月 . 第 18 章。参照序列 (RefSeq) 项目。提及本文中附录 A 或 SEQ ID NOS :1-88 所示的任何蛋白质包括提及其任何天然存在的人等位基因变体,例如包括与 SEQ ID NO :1-88 中任一项的代表性序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性的氨基酸序列的那些等位基因变体,或包

含由可以例如在严格杂交条件（例如在 42℃ 下于 50% 甲酰胺, 5X SSC, 20mM Na • P04, pH 6.8 中杂交 ; 然后在 1X SSC 中 55℃ 下洗涤 30 分钟）下使用编码 SEQ ID NOs :1-88 中任一项或其片段的核酸分子（在长度上为至少约 20、30、40、50 或更多个碱基）从人基因组 DNA 或 cDNA 文库获得的核酸分子编码的氨基酸序列的那些等位基因变体。

[0126]

靶	登录号	SEQ ID NO:
TNF α	NP_000585	1
T 细胞受体 β 链 CD3 区域; TCR CD3	AAB27501	2
CD3 抗原, δ 亚基同种型 B 前体	NP_001035741	3
CD3 抗原, δ 亚基同种型 A 前体	NP_000723	4
T 细胞表面糖蛋白 CD3 γ 链	P09693	5
T 细胞表面糖蛋白 CD3 γ 链前体	ACA05963	6
T 细胞表面糖蛋白 CD3 ϵ 链	P07766	7
T 细胞表面糖蛋白 CD3 δ 链	P04234	8
T 细胞表面糖蛋白 CD3 δ 链前体	ACA05962	9
T 细胞表面糖蛋白 CD3 ζ 链	P20963	10
CD4	P01730	11
CD4 抗原(p55), 同种型 CRA_a	EAW88739	12
CD20	P11836 NP_068769.2 或	13

[0127]

	NP_690605.1	
跨膜结构域 4(membrane-spanning 4-domain), 亚家族 A, 成员 1	NP_690605	14
跨膜 结构域 4, 亚家族 A, 成员 3 同种型 a	NP_006129	15
跨膜 结构域 4, 亚家族 A, 成员 3 同种型 b	NP_001026979	16
跨膜 结构域 4, 亚家族 A, 成员 3 同种型 c	NP_001026836	17
VEGF-A	P15692	18
血管内皮生长因子 A 同种型 a 前体	NP_001020537	19
血管内皮生长因子 A 同种型 b 前体	NP_003367	20
血管内皮生长因子 A 同种型 c 前体	NP_001020538	21
血管内皮生长因子 A 同种型 d 前体	NP_001020539	22
血管内皮生长因子 A 同种型 e 前体	NP_001020540	23
血管内皮生长因子 A 同种型 f 前体	NP_001020541	24
血管内皮生长因子 A 同种型 g 前体	NP_001028928	25
CD25(白细胞介素 2 受体, α 链前体)	NP_000408	26
HER-2	AAA75493	27
EGFR	AAH94761;	28
表皮生长因子受体同种型 a 前体	NP_005219 或 P00533	29
表皮生长因子受体同种型 b 前体	NP_958439	30
表皮生长因子受体同种型 c 前体	NP_958440	31
表皮生长因子受体同种型 d 前体	NP_958441	32
CD33 抗原同种型 1 前体	NP_001763	33

[0128]

CD33 抗原同种型 2 前体	NP_001076087	34
CD33 抗原(gp67), 同种型 CRA_a	EAW71994	35
CD33 抗原(gp67), 同种型 CRA_b	EAW71995	36
CD33 抗原(gp67), 同种型 CRA_c	EAW71996	37
CD52 抗原前体	NP_001794	38
EPO	CAA26095	39
胰岛素	AAA59172	40
INSR	P06213	41
胰岛素受体同种型 短前体	NP_001073285	42
胰岛素受体同种型 长前体	NP_000199	43
人生长激素	AAA72260	44
GM-CSF	AAA52578	45
G-CSF	P09919	46
IL-2	AAB46883	47
TPO	AAB33390	48
NGF	AAH32517	49
神经生长因子, β 多肽前体	NP_002497	50
NT-3	P20783	51
神经营养因子 3 同种型 1 前蛋白原	NP_001096124	52
神经营养因子 3 同种型 2 前蛋白原	NP_002518	53
NT-4	AAA60154	54
链 A, 脑源性神经营养因子, 神经营养因子-4	1B8M_A	55
链 B, 脑源性神经营养因子, 神经营养因子-4	1B8M_B	56
GDNF	P39905	57
胶质细胞源性神经营养因子同种型 1	NP_000505	58

[0129]

前蛋白原		
胶质细胞源性神经营养因子同种型 2 前体	NP_954701	59
胶质细胞源性神经营养因子同种型 3	NP_954704	60
IFN	P01574	61
TGF	AAA36738	62
FGFR4	AAB25788	63
成纤维细胞生长因子受体 4 同种型 1 前体	NP_998812	64
成纤维细胞生长因子受体 4 同种型 2 前体	NP_075252	65
CETP	P11597	66
瘦素受体	P48357	67
IL-10	P22301	68
IL-10 受体 α	EAW67343	69
IL-10 受体 β	AAH01903	70
生长激素受体	P10912	71
IL-13 受体	CAA70021	72
IL-18 受体	AAH93977	73
IL-2 受体 α 亚基	P01589	74
补体因子 C5a	NP_001726	75
IL-17 受体	AAB99730	76
IL-20 受体	Q9UHF4	77
IL-3 受体	AAA59148	78
IL-4 受体	CAA36672	79
IL-5 受体	CAA01794	80

[0130]

IL-9 受体	AAB30844	81
干扰素 I 型受体 1(IFNAR1)	P17181	82
干扰素 I 型受体 2(IFNAR2)	P48551	83
淋巴细胞功能抗原-3 受体	P19256	84
单核细胞趋化蛋白 1 配体	P13500 或 NP_002973	85
NGF 受体	AAB59544	86
IL-6	NP_000591	87
IL-6 受体	NP_000556	88

[0131] 在一个方面, 鉴定候选动力学调节药物的方法包括 (a) 测量在测试多肽结合剂例如抗体存在的情况下, 所述第一组分对于所述第二组分的结合亲和力或结合率参数, (b) 测量在所述测试多肽结合剂不存在的情况下, 所述第一组分对于所述第二组分的结合亲和力或结合率参数; 和 (c) 当所述测试多肽结合剂在于步骤 (a) 和 (b) 中测量的结合亲和力或结合率参数上显示至少 1.5 倍差异时, 将所述测试多肽结合剂鉴定为候选动力学调节药物。在某些实施方案中, 结合亲和力或结合率参数的差异在约 1.5 倍 (即, 50%) 至任选地约 1000 倍之间, 或约 1.5 倍至约 100 倍之间, 或约 2 倍至 25 倍之间, 或约 2 倍至约 50 倍之间, 或约 1.5 倍至约 25 倍之间, 或约 1.5 倍至约 50 倍之间。

[0132] 在某些实施方案中, 如果测试多肽试剂增强所述第一组分与所述第二组分之间的结合亲和力或结合率参数, 则测试多肽结合剂被鉴定为候选正调节剂。在其它实施方案中, 如果测试多肽试剂减弱所述第一组分与所述第二组分之间的结合亲和力或结合率参数, 则测试多肽试剂被鉴定为候选负调节剂。

[0133] 具体的结合亲和力值或结合率参数值的改变 (增加或减小) 是表示“增强的”(或更强的) 还是“减弱的”(或更弱的) 结合亲和力或结合率参数取决于参数的值和其单位, 并且在本领域是公知的。例如, 在参数 K_A 的情况下, 更高的值表示“增强的”结合亲和力, 这样约 $10^6 M^{-1}$ 的 K_A 比约 $10^5 M^{-1}$ 的 K_A 强。作为另一个实例, 在参数 K_D 的情况下, 更低的值表示“增强的”结合亲和力, 这样约 $10^{-6} M$ 的 K_D 比约 $10^{-5} M$ 的 K_D 更强。相反地, 在 K_A 的情况下, 更低的值表示“减弱的”结合亲和力, 这样, 约 $10^5 M^{-1}$ 的 K_A 与约 $10^6 M^{-1}$ 的 K_A 相比较是减弱的结合亲和力。作为另一个实例, 在 K_D 的情况下, 更高的值表示“减弱的”结合亲和力, 这样约 $10^{-5} M$ 的 K_D 与约 $10^{-6} M$ 的 K_D 相比较是减弱的结合亲和力。

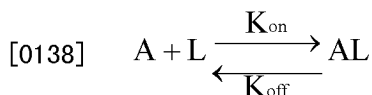
[0134] 如本文中所使用的, “增强的”结合率参数表示增加的停留时间、更快的缔合或更慢的解离。如本文中所使用的, “减弱的”结合率参数表示减少的停留时间、更慢的缔合或更快的解离。

[0135] 结合亲和力还可通过结合速率与解离速率结合率参数的比率来确定。通常, 在结合率的情况下, 更高的值表示更快或更强的缔合或增加的停留时间, 并且通常导致更强的

结合亲和力。相反地,更低的结合率的值表示更慢或更弱的缔合或减少的停留时间,并且通常导致更弱的结合亲和力。通常,在解离速率的情况下,更高的值表示更快的离解或减少的停留时间,并且通常导致更弱的结合亲和力。相反地,更低的解离速率的值表示更慢的离解或增加的停留时间,并且通常导致更强的结合亲和力。这是因为解离速率对结合速率或结合速率对解离速率的比率表示如下列公式中所示的结合亲和力。

$$[0136] \quad \text{亲和力} \begin{cases} K_D = \frac{[A][L]}{[AL]} = \frac{\text{off-rate}}{\text{on-rate}} \\ K_A = \frac{[AL]}{[A][L]} = \frac{\text{on-rate}}{\text{off-rate}} \end{cases} \text{作图:解离速率;结合速率}$$

[0137] 其中



[0139] 即使当结合亲和力是不可检测的或未被显著改变时,然而,停留时间的改变,即增加的停留时间(通过增加的结合速率或减小的解离速率)或减少的停留时间(通过减小的结合速率或增加的解离速率)仍然可导致信号转导途径的差异激活。例如,在某些情况下,当受体可激活两个不同途径时,所述途径相异在于完全作用所需的受体激活的程度。一个信号途径可在低水平的受体激活或停留时间上被完全激活,而第二途径的完全激活需要更高水平的受体激活或停留时间。

[0140] 在另一个方面,鉴定候选动力学调节药物的方法包括 (a) (i) 测量在所述第二组分存在的情况下,测试多肽结合剂例如抗体对于所述第一组分的结合亲和力或结合率参数,或 (ii) 测量在所述第一组分存在的情况下,测试多肽结合剂对于所述第二组分的结合亲和力或结合率参数;和 (b) (i) 测量在所述第二组分不存在的情况下,所述测试多肽结合剂对于所述第一组分的结合亲和力或结合率参数,或 (ii) 测量在所述第一组分不存在的情况下所述测试多肽结合剂对于所述第二组分的结合亲和力或结合率参数;和 (c) 当所述测试多肽结合剂在于步骤 (a) 和 (b) 中测量的结合亲和力或结合率参数上显示至少 1.5 倍(即,50%)的差异时,将所述测试多肽结合剂鉴定为候选动力学调节药物。

[0141] 在某些实施方案中,如步骤 (a) 中测量的结合亲和力或结合率参数的强度为步骤 (b) 中测量的结合亲和力或结合率参数的至少 1.5 倍(即,50%),那么测试多肽结合剂被鉴定为候选正调节剂。在具体实施方案中,步骤 (a) 中测量的结合亲和力或结合率参数的强度为步骤 (b) 中测量的结合亲和力或结合率参数的约 1.5 倍(即,50%)至任意地约 1000 倍(步骤 (a) 对步骤 (b)),或约 1.5 倍至约 100 倍,或约 2 倍至 25 倍,或约 2 倍至约 50 倍,或约 1.5 倍至约 25 倍,或约 1.5 倍至约 50 倍,例如至少 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、17 倍、18 倍、19 倍或 20 倍,或达到 500 倍,或达到 200 倍,或达到 150 倍,或达到 100 倍,或达到 90 倍,或达到 80 倍,或达到 70 倍,或达到 60 倍,或达到 50 倍,或达到 40 倍,或达到 30 倍。

[0142] 在其它实施方案中,如果步骤 (b) 中测量的结合亲和力或结合率参数的强度为步骤 (a) 中测量的结合亲和力或结合率参数的至少 1.5 倍(即,50%),那么测试多肽结合剂被鉴定为候选负调节剂。在具体实施方案中,步骤 (b) 中测量的结合亲和力或结合率参数的强度为步骤 (a) 中测量的结合亲和力或结合率参数的约 1.5 倍(即,50%)至任意地约

1000 倍 (步骤 (b) 对步骤 (a)), 或约 1.5 倍至约 100 倍, 或约 2 倍至 25 倍, 或约 2 倍至约 50 倍, 或约 1.5 倍至约 25 倍, 或约 1.5 倍至约 50 倍, 例如至少 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、17 倍、18 倍、19 倍或 20 倍, 或达到 500 倍, 或达到 200 倍, 或达到 150 倍, 或达到 100 倍, 或达到 90 倍, 或达到 80 倍, 或达到 70 倍, 或达到 60 倍, 或达到 50 倍, 或达到 40 倍, 或达到 30 倍。

[0143] 在某些实施方案中, 测量测试多肽结合剂对于单独的第一组分的结合亲和力或结合率参数。在某些实施方案中, 测量测试多肽结合剂对于单独的第二组分的结合亲和力或结合率参数。

[0144] 在某些实施方案中, 如果选自 (A) 测试多肽结合剂对于包含第一组分和第二组分的复合物的结合亲和力或结合率参数, 任选地 $K_{[C1C2]M}$, (B) 第一组分对于包含多肽结合剂和第二组分的复合物的结合亲和力或结合率参数, 任选地 $K_{[MC2]C1}$, 或 (C) 第二组分对于包含多肽结合剂和第一组分的复合物的结合亲和力或结合率参数, 任选地 $K_{[MC1]C2}$, 的一个或多个结合亲和力或结合率参数的强度为选自 (1) 测试多肽结合剂对于单独的第二组分的结合亲和力或结合率参数, 任选地 K_{MC2} , 或 (2) 测试多肽结合剂对于单独的第一组分的结合亲和力或结合率参数, 任选地 K_{MC1} , 的一个或多个结合亲和力或结合率参数的至少 1.5 倍, 那么测试多肽结合剂被鉴定为候选正调节剂。在某些实施方案中, (A)、(B) 或 (C) 的任一个或多个的具体结合亲和力或结合率参数的强度为 (1) 或 (2) 的任一个或多个的结合亲和力或结合率参数的约 1.5 倍 (即, 50%) 至任选地约 1000 倍; 或可选择地, 约 1.5 倍至约 100 倍, 或约 2 倍至 25 倍, 或约 2 倍至约 50 倍, 或约 1.5 倍至约 25 倍, 或约 1.5 倍至约 50 倍, 例如至少 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、17 倍、18 倍、19 倍或 20 倍, 或达到 500 倍, 或达到 200 倍, 或达到 150 倍, 或达到 100 倍, 或达到 90 倍, 或达到 80 倍, 或达到 70 倍, 或达到 60 倍, 或达到 50 倍, 或达到 40 倍, 或达到 30 倍。例如, 在某些实施方案中, (A)、(B) 或 (C) 的任一个或多个的结合亲和力或结合率参数强于 (1) 和 (2) 的结合亲和力或结合率参数。在某些实施方案中, (1) 的结合亲和力或结合率参数比 (2) 的结合亲和力或结合率参数强。在其它实施方案中, (2) 的结合亲和力或结合率参数比 (1) 的结合亲和力或结合率参数强。在某些实施方案中, 测量和比较两个或更多个结合亲和力或结合率参数, 例如解离速率和结合速率, 或 K_A 和 K_D , 或其任何组合。

[0145] 在具体的实施方案中, 其中所测量的结合亲和力是平衡离解常数 K_D , $K_{[C1C2]M}$ 、 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2}$ 的任一个为 K_{MC2} 或 K_{MC1} 的任一个的例如约 2/3 至任选地 1/1000。类似地, 其中所测量的结合亲和力是解离速率, (A) $[C1C2]$ 与 M 或 (B) $[MC2]$ 与 C1 或 (C) $[MC1]$ 与 C2 之间的解离速率的任一个为 (1) M 与 C2 或 (2) M 与 C1 之间的解离速率的任一个的例如约 2/3 至任选地 1/1000。在一个示例性实施方案中, $K_{[C1C2]M}$ 为 K_{MC2} 的约 2/3 至任选地 1/1000。在另一个示例性实施方案中, $K_{[MC2]C1}$ 为 K_{MC2} 的约 2/3 至任选地 1/1000。在另一个示例性实施方案中, $K_{[MC1]C2}$ 为 K_{MC2} 的约 2/3 至任选地 1/1000。在另一个示例性实施方案中, $K_{[C1C2]M}$ 为 K_{MC1} 的约 2/3 至任选地 1/1000。在另一个示例性实施方案中, $K_{[MC2]C1}$ 为 K_{MC1} 的约 2/3 至任选地 1/1000。在另一个示例性实施方案中, $K_{[MC1]C2}$ 为 K_{MC1} 的约 2/3 至任选地 1/1000。对于 (A) $[C1C2]$ 与 M、或 (B) $[MC2]$ 与 C1 或 (C) $[MC1]$ 与 C2 之间的每一个解离速率, 与 (1) M 与 C2 或 (2) M 与 C1 之间的每一个解离速率相比较, 可预期类似的实例。

[0146] 相反地,当所测量的结合亲和力为平衡缔合常数 K_A 时, $K_{[C1C2]M}$ 、 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2}$ 的任一个为 K_{MC2} 或 K_{MC1} 的任一个的例如约 1.5 倍至任选地 1000 倍。类似地,当所测量的结合亲和力为结合速率时,(A) $[C1C2]$ 与 M、或 (B) $[MC2]$ 与 C1、或 (C) $[MC1]$ 与 C2 之间的结合速率的任一个为 (1)M 与 C2 或 (2)M 与 C1 之间的结合速率的任一个的例如约 1.5 倍至任选地 1000 倍。在一个示例性实施方案中, $K_{[C1C2]M}$ 为 K_{MC2} 的约 1.5 倍至任选地 1000 倍。在另一个示例性实施方案中, $K_{[MC2]C1}$ 为 K_{MC2} 的约 1.5 倍至任选地 1000 倍。在另一个示例性实施方案中, $K_{[MC1]C2}$ 为 K_{MC2} 的约 1.5 倍至任选地 1000 倍。在另一个示例性实施方案中, $K_{[C1C2]M}$ 为 K_{MC1} 的约 1.5 倍至任选地 1000 倍。在另一个示例性实施方案中, $K_{[MC2]C1}$ 为 K_{MC1} 的约 1.5 倍至任选地 1000 倍。在另一个示例性实施方案中, $K_{[MC1]C2}$ 为 K_{MC1} 的约 1.5 倍至任选地 1000 倍。对于 (A) $[C1C2]$ 与 M、或 (B) $[MC2]$ 与 C1 或 (C) $[MC1]$ 与 C2 之间的每一个结合速率,与 (1)M 与 C2 或 (2)M 与 C1 之间的每一个结合速率相比较,可预期类似的实例。

[0147] 在某些实施方案中,如果选自 (1) 测试多肽结合剂对于单独的第二组分的结合亲和力或结合率参数,任选地 K_{MC2} ,或 (2) 测试多肽结合剂对于单独的第一组分的结合亲和力或结合率参数,任选地 K_{MC1} ,的一个或多个结合亲和力或结合率参数的强度为选自 (A) 测试多肽结合剂对于包含第一组分和第二组分的复合物的结合亲和力或结合率参数,任选地 $K_{[C1C2]M}$, (B) 第一组分对于包含多肽结合剂和第二组分的复合物的结合亲和力或结合率参数,任选地 $K_{[MC2]C1}$,或 (C) 第二组分对于包含多肽结合剂和第一组分的复合物的结合亲和力或结合率参数,任选地 $K_{[MC1]C2}$,的一个或多个结合亲和力或结合率参数的至少约 1.5 倍,那么测试多肽结合剂被鉴定为候选负调节剂。在某些实施方案中,(1) 或 (2) 的任一个或多个的具体结合亲和力或结合率参数的强度为 (A)、(B) 或 (C) 的任一个或多个的结合亲和力或结合率参数的约 1.5 倍 (即,50%) 至任选地约 1000 倍;或可选择地,约 1.5 倍至约 100 倍,或约 2 倍至 25 倍,或约 2 倍至约 50 倍,或约 1.5 倍至约 25 倍,或约 1.5 倍至约 50 倍,例如至少 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、17 倍、18 倍、19 倍或 20 倍,或达到 500 倍,或达到 200 倍,或达到 150 倍,或达到 100 倍,或达到 90 倍,或达到 80 倍,或达到 70 倍,或达到 60 倍,或达到 50 倍,或达到 40 倍,或达到 30 倍。在某些实施方案中,(1) 或 (2) 的任一个的结合亲和力或结合率参数都强于 (A)、(B) 和 (C) 的结合亲和力或结合率参数。在某些实施方案中,(1) 的结合亲和力或结合率参数强于 (2) 的结合亲和力或结合率参数。在其它实施方案中,(2) 的结合亲和力或结合率参数强于 (1) 的结合亲和力或结合率参数。在某些实施方案中,测量和比较两个或更多个结合亲和力或结合率参数,例如解离速率和结合速率,或 K_A 和 K_D ,或其任何组合。

[0148] 在具体实施方案中,当所测量的结合亲和力为平衡离解常数 K_D 时, K_{MC2} 或 K_{MC1} 的任一个为 $K_{[C1C2]M}$ 、 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2}$ 的任一个的例如约 2/3 至任选地 1/1000。类似地,当所测量的结合亲和力为解离速率时,(1)M 与 C2 或 (2)M 与 C1 之间的解离速率的任一个为 (A) $[C1C2]$ 与 M、或 (B) $[MC2]$ 与 C1 或 (C) $[MC1]$ 与 C2 之间的解离速率的任一个的例如约 2/3 至任选地 1/1000。在一个示例性实施方案中, K_{MC2} 为 $K_{[C1C2]M}$ 的约 2/3 至任选地 1/1000。在另一个示例性实施方案中, K_{MC2} 为 $K_{[MC2]C1}$ 的约 2/3 至任选地 1/1000。在另一个示例性实施方案中, K_{MC2} 为 $K_{[MC1]C2}$ 的约 2/3 至任选地 1/1000。在另一个示例性实施方案中, K_{MC1} 为 $K_{[C1C2]M}$ 的约 2/3 至任选地 1/1000。在另一个示例性实施方案中, K_{MC1} 为 $K_{[MC2]C1}$ 的约 2/3 至任选地 1/1000。在另一个示例性实施方案中, K_{MC1} 为 $K_{[MC1]C2}$ 的约 2/3 至任选地 1/1000。对于 (1)

M 与 C2 或 (2)M 与 C1 之间的每一个解离速率,与 (A) [C1C2] 与 M、或 (B) [MC2] 与 C1 或 (C) [MC1] 与 C2 之间的每一个解离速率相比较,可预期类似的实例。

[0149] 相反地,当结合亲和力为平衡缔合常数 K_A 时, K_{MC2} 或 K_{MC1} 的任一个为 $K_{[C1C2]M}$ 、 $K_{[MC2]C1}$ 或 $K_{[MC1]C2}$ 的任一个的例如约 1.5 倍至任选地 1000 倍。类似地,当所测量的结合亲和力为结合速率时, (1)M 与 C2 或 (2)M 与 C1 之间的结合速率的任一个为 (A) [C1C2] 与 M、或 (B) [MC2] 与 C1、或 (C) [MC1] 与 C2 之间的结合速率的任一个的例如约 1.5 倍至任选地 1000 倍。在一个示例性实施方案中, K_{MC2} 为 $K_{[C1C2]M}$ 的约 1.5 倍至任选地 1000 倍。在另一个示例性实施方案中, K_{MC2} 为 $K_{[MC2]C1}$ 的约 1.5 倍至任选地 1000 倍。在另一个示例性实施方案中, K_{MC2} 为 $K_{[MC1]C2}$ 的约 1.5 倍至任选地 1000 倍。在另一个示例性实施方案中, K_{MC1} 为 $K_{[C1C2]M}$ 的约 1.5 倍至任选地 1000 倍。在另一个示例性实施方案中, K_{MC1} 为 $K_{[MC2]C1}$ 的约 1.5 倍至任选地 1000 倍。在另一个示例性实施方案中, K_{MC1} 为 $K_{[MC1]C2}$ 的约 1.5 倍至任选地 1000 倍。对于 (1)M 与 C2 或 (2)M 与 C1 之间的每一个结合速率,与 (A) [C1C2] 与 M、或 (B) [MC2] 与 C1 或 (C) [MC1] 与 C2 之间的每一个结合速率相比较,可预期类似的实例。

[0150] 在这些实施方案的任一个中,可将测试多肽结合剂和第二组分与多个不同浓度的所述第一组分接触。在这些实施方案的任一个中,可将测试多肽结合剂和第一组分与多个不同浓度的所述第二组分接触。在这些实施方案的任一个中,可将多个不同浓度的测试多肽结合剂与所述第一组分和所述第二组分接触。

[0151] 当测定测试多肽结合剂对第一组分与第二组分之间的结合相互作用的影响时,在某些具体实施方案中,当测试多肽结合剂的抗原是第一组分例如配体时,所述测试多肽结合剂与第一组分的浓度相比较处于饱和浓度。可选择地,当测试多肽结合剂的抗原为第二组分例如受体时,所述测试多肽结合剂与第二组分的浓度相比较处于饱和浓度。在某些实施方案中,测试多肽结合剂的浓度高于或等于测试多肽结合剂对于包含第一组分和第二组分的复合物的 K_D 。在其它实施方案中,第二组分的浓度低于测试多肽结合剂对于第一组分例如配体的 K_D 。在其它实施方案中,第一组分例如配体的浓度处于第一组分与第二组分例如受体的结合的亚饱和浓度。在某些实施方案中,第一组分例如配体的浓度在第一组分与第二组分的相互作用的约 EC_{20} 至 EC_{80} 的范围内。在某些实施方案中,在一个或多个浓度的第二组分例如配体存在的情况下,将一个或多个浓度的测试多肽结合剂与多个不同浓度的第一组分例如受体接触。在某些实施方案中,在一个或多个浓度的第一组分例如配体存在的情况下,将一个或多个浓度的测试多肽结合剂与多个不同浓度的第二组分例如受体接触。

[0152] 当测定测试多肽结合剂与复合的靶和 / 或信号转导伴侣相对于对未复合的靶和 / 或信号转导伴侣的差异结合以鉴定正调节剂时,在某些实施方案中,测试多肽结合剂对于包含第一组分和第二组分的复合物处于饱和浓度。在某些实施方案中,测试多肽结合剂的浓度大于或等于测试多肽结合剂对于包含第一组分例如配体和第二组分例如受体的复合物的 K_D 。在其它实施方案中,第二组分例如受体的浓度大于第二组分例如受体对于第一组分例如配体的 K_D 。在其它实施方案中,第一组分例如配体的浓度对于第二组分例如受体是饱和浓度。在其它实施方案中,测试多肽结合剂对于包含第一组分和第二组分的复合物处于亚饱和浓度。在某些实施方案中,多肽结合剂的浓度在第一组分与第二组分的相互作用的约 EC_{20} 至 EC_{80} 的范围内。在某些实施方案中,第二组分例如受体的浓度大于第二组分例如受体对于第一组分例如配体的 K_D 。在某些实施方案中,第一组分例如配体的浓度对于第

二组分例如受体是饱和浓度。

[0153] 当测定测试多肽结合剂对复合的靶和 / 或信号转导伴侣相对于对未复合的靶和 / 或信号转导伴侣的差异结合以鉴定负调节剂时,在某些实施方案中,当测试多肽结合剂结合的抗原是第一组分例如配体时,测试多肽结合剂对于第一组分处于亚饱和浓度。当测试多肽结合剂结合的抗原是第二组分例如受体时,测试多肽结合剂对于第二组分处于亚饱和浓度。在其它实施方案中,多肽结合剂的浓度在第一组分与第二组分的相互作用的约 EC_{20} 至 EC_{80} 的范围内。在其它实施方案中,第二组分例如受体的浓度大于第二组分例如受体对于第一组分例如配体的 K_D 。在其它实施方案中,第一组分例如配体的浓度对于第二组分例如受体是饱和浓度。

[0154] 在某些实施方案中,方法还包括测定多种测试多肽结合剂例如抗体与 (a) 第一组分、(b) 第二组分或 (c) 包含第一组分和第二组分的复合物的任一个的结合亲和力。在某些具体实施方案中,多肽结合剂具有特征例如在于约 $10^{-5}M$ 或更小,或约 $10^{-6}M$ 或更小,或约 $10^{-7}M$ 或更小,或约 $10^{-8}M$ 或更小的平衡离解常数 K_D 的结合亲和力,其中更低的 K_D 表示更强的结合亲和力。在某些实施方案中,所筛选的多种测试多肽结合剂是通过向亲代多肽结合剂引入一个或多个不同突变制备的亲代多肽结合剂的变体。

[0155] 在其它实施方案中,可筛选多肽结合剂与不同结合伴侣 (例如诱饵受体、清除受体或备用的信号途径组分) 相比对第一组分或第二组分作用的选择性。此类方法可包括鉴定不显著改变第一组分或第二组分对于不同结合伴侣 (这样的结合伴侣既不是第一组分也不是第二组分) 的结合亲和力或结合率参数的多肽结合剂。在某些实施方案中,多肽结合剂的存在使第一组分或第二组分对于不同结合伴侣的结合亲和力或结合率参数改变不超过 5 倍,或不超过 10 倍,或不超过 20 倍,或不超过 30 倍,或不超过 40 倍,或不超过 50 倍。

[0156] 上述方法的任何方法还可包括测量在测试多肽结合剂存在和不存在的条件下由信号复合物介导的信号转导的水平,和确定测试多肽结合剂是否额外地是激动剂、部分激动剂、拮抗剂或部分拮抗剂。可在本领域已知的任何体外或体内测定法 (包括但不限于磷酸化测定中的信号转导、离子流测定法、分子运输测定法或基因表达测定法) 中测量拮抗或激动。

[0157] 在某些实施方案中,测试多肽结合剂使第一组分例如配体与第二组分例如受体的相互作用的剂量 - 反应曲线偏移 (正或负地)。偏移可表现为至少约 1.5 倍,例如约 1.5 倍至约 1000 倍的增加的或减少的 EC_{50} 。在某些实施方案中,测试多肽结合剂不显著改变由信号复合物的第一组分与第二组分的相互作用产生的信号的最大激动剂反应。在其它实施方案中,测试多肽结合剂本身用作拮抗剂 (例如,减小由所述信号复合物产生的信号转导的最大激动剂反应) 或激动剂 (例如,增加由所述信号复合物产生的信号转导的最大激动剂反应)。

[0158] 当测试多肽结合剂用作拮抗剂或部分拮抗剂时,最大激动剂反应可被减小至例如约 2/3 至约 1/100,或约 1/2 至约 1/25,或约 2/3 至约 1/50;或减小约 10%、25%、50% (1.5 倍)、75%、减小至 1/2、1/3 或 1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9 或 1/10。可选择地,当测试多肽结合剂用作激动剂或部分激动剂时,最大激动剂反应可增加例如至少约 10%、25%、50% (1.5 倍)、75%、增加至 2 倍、3 倍或 4、5、6、7、8、9、10 倍。此外,当测试多肽结合剂用作拮抗剂或部分拮抗剂时, IC_{50} 可以为 1×10^{-5} 或更小。测试多肽结合剂可显示其它期望的特征,

例如测试多肽结合剂不显著减少所述第一组分或所述第二组分或包含所述第一组分和第二组分的所述信号复合物的清除率。

[0159] 在相关方面,本发明提供了通过上文中或本申请的任何地方描述的任何方法鉴定的抗体。

[0160] 具有期望的特征的多肽结合剂

[0161] 本发明还提供了多肽结合剂例如抗体,其具有某些期望的特征。在某些实施方案中,本发明提供了正调节剂,所述正调节剂 (a) 以约 10^{-5} M 或更小,例如 10^{-6} M 或更小,或 10^{-7} M 或更小,或 10^{-8} M 或更小的平衡离解常数 K_D 结合靶,例如附录 A (或 SEQ ID NOS :1-88) 中任一项的分泌性蛋白或本文中描述的配体、受体或组分的任一种,和 (b) 能够将所述靶与其信号转导伴侣之间的结合亲和力 K_D 增加至至少约 1.5 倍 (即,50%);或增加至约 1.5 倍至任选地约 1000 倍,或 1.5 倍至约 100 倍,或约 2 倍至 25 倍,或约 2 倍至约 50 倍,或约 1.5 倍至约 25 倍,或约 1.5 倍至约 50 倍,例如至少约 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、17 倍、18 倍、19 倍或 20 倍,或达到约 500 倍,或达到约 200 倍,或达到约 150 倍,或达到约 100 倍,或达到约 90 倍,或达到约 80 倍,或达到约 70 倍,或达到约 60 倍,或达到约 50 倍,或达到约 40 倍,或达到约 30 倍。

[0162] 在其它实施方案中,本发明提供了负调节剂,所述负调节剂 (a) 以约 10^{-5} M 或更小,例如 10^{-6} M 或更小,或 10^{-7} M 或更小,或 10^{-8} M 或更小的平衡离解常数 K_D 结合靶,例如附录 A (或 SEQ ID NOS :1-88) 中任一项的分泌性蛋白或本文中描述的配体、受体或组分的任一种,和 (b) 能够使所述分泌性蛋白与其信号转导伴侣之间的结合亲和力 K_D 减小至至多约 $2/3$ (即,50%);或减小至约 $2/3$ 至任选地约 $1/1000$,或 $2/3$ 至约 $1/100$,或约 $1/2$ 至 $1/25$,或约 $1/2$ 至约 $1/50$,或约 $2/3$ 至约 $1/25$,或约 $2/3$ 至约 $1/50$,例如至多约 $2/3$ 、 $1/2$ 、 $1/3$ 、 $1/4$ 、 $1/5$ 、 $1/6$ 、 $1/7$ 、 $1/8$ 、 $1/9$ 、 $1/10$ 、 $1/11$ 、 $1/12$ 、 $1/13$ 、 $1/14$ 、 $1/15$ 、 $1/16$ 、 $1/17$ 、 $1/18$ 、 $1/19$ 或 $1/20$,或达到约 $1/500$,或达到约 $1/200$,或达到约 $1/150$,或达到约 $1/100$,或达到约 $1/90$,或达到约 $1/80$,或达到约 $1/70$,或达到约 $1/60$,或达到约 $1/50$,或达到约 $1/40$,或达到约 $1/30$ 。

[0163] 在某些实施方案中,本发明提供了增强信号复合物的第一组分 (C1) 与第二组分 (C2) 的结合的调节抗体,所述抗体特征在于下列平衡离解常数 K_D 的结合性质:(i) 所述抗体以约 10^{-5} M 或更小,例如 10^{-6} M 或更小,或 10^{-7} M 或更小,或 10^{-8} M 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 C1、C2 或包含 C1 和 C2 的复合物 (C1C2) 的任一种;(ii) $K_{[C1C2]A}$ 、 $K_{[AC2]C1}$ 或 $K_{[AC1]C2}$ 的任一个比 K_{AC2} 或 K_{AC1} 的任一个小至少约 50% (1.5 倍),其中 C1 或 C2 是靶和其信号转导伴侣,任选地附录 A (或 SEQ ID NOS :1-88) 中任一项的分泌性蛋白。在某些实施方案中, $K_{[C1C2]A}$ 、 $K_{[AC2]C1}$ 或 $K_{[AC1]C2}$ 的任一个为 K_{AC2} 或 K_{AC1} 的任一个的约 $2/3$ 至任选地约 $1/1000$;或 $2/3$ 至约 $1/100$,或约 $1/2$ 至 $1/25$ 、或约 $1/2$ 至约 $1/50$ 、或约 $2/3$ 至约 $1/25$,或约 $2/3$ 至约 $1/50$,例如至多约 $2/3$ 、 $1/2$ 、 $1/3$ 、 $1/4$ 、 $1/5$ 、 $1/6$ 、 $1/7$ 、 $1/8$ 、 $1/9$ 、 $1/10$ 、 $1/11$ 、 $1/12$ 、 $1/13$ 、 $1/14$ 、 $1/15$ 、 $1/16$ 、 $1/17$ 、 $1/18$ 、 $1/19$ 或 $1/20$,或达到约 $1/500$,或达到约 $1/200$,或达到约 $1/150$,或达到约 $1/100$,或达到约 $1/90$,或达到约 $1/80$,或达到约 $1/70$,或达到约 $1/60$,或达到约 $1/50$,或达到约 $1/40$,或达到约 $1/30$ 。在某些实施方案中, $K_{[C1C2]A}$ 、 $K_{[AC2]C1}$ 或 $K_{[AC1]C2}$ 的任一个为 K_{AC2} 和 K_{AC1} 的至多约 $2/3$ 至任选地约 $1/1000$,或 $2/3$ 至约 $1/100$,或约 $1/2$ 至 $1/25$,或约 $1/2$ 至约 $1/50$ 、或约 $2/3$ 至约 $1/25$,或约 $2/3$ 至约 $1/50$,例如至多约 $2/3$ 、 $1/2$ 、 $1/3$ 、 $1/4$ 、 $1/5$ 、 $1/6$ 、 $1/7$ 、 $1/8$ 、 $1/9$ 、 $1/10$ 、 $1/11$ 、 $1/12$ 、 $1/13$ 、 $1/14$ 、 $1/15$ 、 $1/16$ 、 $1/17$ 、 $1/18$ 、 $1/19$ 或 $1/20$,或达到约

1/500,或达到约 1/200,或达到约 1/150,或达到约 1/100,或达到约 1/90,或达到约 1/80,或达到约 1/70,或达到约 1/60,或达到约 1/50,或达到约 1/40,或达到约 1/30。

[0164] 在某些实施方案中,本发明提供了减弱信号复合物的第一组分 (C1) 与第二组分的结合的负调节抗体,所述抗体的特征在于下列平衡离解常数 K_D 的结合性质:(i) 所述抗体以约 10^{-5} M 或更小,例如, 10^{-6} M 或更小,或 10^{-7} M 或更小,或 10^{-8} M 或更小的平衡离解常数 K_D 结合 C1、C2 或包含 C1 和 C2 的复合物 (C1C2) 的任一种,和 (ii) K_{AC2} 或 K_{AC1} 的任一个比 $K_{[C1C2]A}$ 、 $K_{[AC2]C1}$ 或 $K_{[AC1]C2}$ 的任一个低至少约 50% (1.5 倍),其中 C1 或 C2 是靶和其信号转导伴侣,任选地附录 A (或 SEQ ID NOS :1-88) 中任一项的分泌性蛋白。在某些实施方案中, K_{AC2} 或 K_{AC1} 的任一个为 $K_{[C1C2]A}$ 、 $K_{[AC2]C1}$ 或 $K_{[AC1]C2}$ 的任一个的至多约 2/3 至任选地 1/1000 ;或 2/3 至约 1/100,或约 1/2 至 1/25、或约 1/2 至约 1/50、或约 2/3 至约 1/25,或约 2/3 至约 1/50,例如至多约 2/3、1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9、1/10、1/11、1/12、1/13、1/14、1/15、1/16、1/17、1/18、1/19 或 1/20,或达到约 1/500,或达到约 1/200,或达到约 1/150,或达到约 1/100,或达到约 1/90,或达到约 1/80,或达到约 1/70,或达到约 1/60,或达到约 1/50,或达到约 1/40,或达到约 1/30。在某些实施方案中, K_{AC2} 或 K_{AC1} 的任一个为所有 $K_{[C1C2]A}$ 、 $K_{[AC2]C1}$ 或 $K_{[AC1]C2}$ 的至多约 2/3 ;或 2/3 至任选地约 1/1000 ;或 2/3 至约 1/100,或约 1/2 至 1/25、或约 1/2 至约 1/50、或约 2/3 至约 1/25,或约 2/3 至约 1/50,例如至多约 2/3、1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9、1/10、1/11、1/12、1/13、1/14、1/15、1/16、1/17、1/18、1/19 或 1/20,或达到约 1/500,或达到约 1/200,或达到约 1/150,或达到约 1/100,或达到约 1/90,或达到约 1/80,或达到约 1/70,或达到约 1/60,或达到约 1/50,或达到约 1/40,或达到约 1/30。

[0165] 此类多肽结合剂的任一种优选是纯化的和大体上均质的,例如纯度为至少约 90%、95%、97%、98%、99% 或 99.5%。在某些实施方案中,多肽结合剂是单克隆抗体。

[0166] 本发明还提供了制备无菌药物组合物的方法 (其包括以治疗有效量向此类多肽结合剂、此类多肽结合剂的无菌组合物中加入无菌的药理学上可接受的稀释剂) 和施用此类无菌组合物例如以调节 (增强或减弱) 包含所述分泌性蛋白的复合物的信号转导的方法。

[0167] 信号复合物

[0168] 基因的激活、代谢的改变、细胞的连续增殖和死亡以及运动的刺激或抑制是一些可由信号复合物介导的对细胞外刺激的细胞反应。基因激活导致进一步的细胞效应,因为许多响应基因的蛋白质产物包括酶和转录因子本身。作为信号转导级联的结果产生的转录因子可反过来激活更多的基因。因此初始刺激物可触发整个基因组群的表达,这反过来可导致许多复杂生理事件的激活。这些事件包括通过胰岛素刺激的增加的葡萄糖从血流的吸收和由细菌产物刺激的嗜中性粒细胞至感染部位的迁移。

[0169] 神经递质是能够结合离子通道蛋白以形成复合物,从而导致它们开放以允许特定离子快速流动穿过质膜的配体。这导致细胞膜电位的改变并且对于过程例如电化学冲动的神经传导是非常重要的。例如,神经递质乙酰胆碱在某些突触上的结合打开允许 Na^+ 进入的通道并且起始神经冲动或肌肉收缩。配体可以是游离可溶的,或可见于其它细胞的表面上或细胞外基质内。这样的细胞表面或细胞外基质配体,当它们彼此接触时,例如当吞噬细胞将抗原呈递至淋巴细胞时,或在粘附于细胞基质时,如当成纤维细胞的细胞表面上的整联蛋白衔接 (engage) 纤连蛋白时,在细胞之间传导信号。

[0170] 大多数哺乳动物细胞需要刺激以不仅控制细胞分泌而且还控制存活。在生长因子

刺激不存在的情况下,程序化细胞死亡接着在大多数细胞中发生。对细胞外刺激的这类需要是在单细胞和多细胞生物体的背景中控制细胞行为所必需的。应理解信号转导途径对生物过程极为重要并且许多疾病归因于它们的失调。

[0171] 信号转导可通过受体介导,所述受体可位于细胞内,例如类固醇激素、甲状腺激素、维甲酸 (retinoic acid) 和维生素 D3 的衍生物的受体,或可位于细胞表面上,或可存在于细胞表面或细胞内,例如配体门控的离子通道受体。信号转导还可通过运输小分子的跨膜转运蛋白例如葡萄糖转运蛋白,或离子通道例如钠通道、钾通道、钙通道或其它阳离子通道,或氯化物通道或碳酸氢盐通道或其它阴离子通道来介导。许多离子通道响应结合小信号分子或配体而开放或关闭。某些离子通道由细胞外配体门控;某些由细胞内配体门控。通常,配体不是当通道开放时被运输的物质。ABC (“ATP- 结合盒”) 转运蛋白是将配体- 结合结构域暴露在一个表面和将 ATP 结合结构域暴露在另一个表面上的跨膜蛋白。此类 ABC 转运蛋白的某些实例包括囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR); 磺酰脲受体 (SUR) TAP, 与抗原加工相关的转运蛋白; SPGP, 肝细胞用于将胆汁酸的盐泵出进入胆汁的转运蛋白; 和多药抗药性 (MDR) 转运蛋白, 其将化学治疗药物泵出癌细胞, 从而降低它们的效力。该家族中的基因的突变与多种疾病关联, 包括: ALD 基因- 肾上腺脑白质营养不良、SUR 基因- 糖尿病、CFTR 基因- 囊性纤维化、MDR 基因- 癌症的多药抗药性。一系列 ABC 转运蛋白、它们的别名 (如果有的话)、染色体定位和假定的功能示于下面 (参见 Luckie 等人, Current Genomics, 2003, 4, 109-121) :

[0172] ABCA1 ABC1 9q31.1 普遍存在的胆固醇流出至 HDL 上

[0173] ABCA2 ABC2 9q34 2 脑抗药性

[0174] ABCA3 ABC3, ABCC 16p13.3 肺

[0175] ABCA4 ABCR 1p22.1-p21 杆细胞光感受器 (Rod photoreceptor) N- 亚视黄基 (retinylidene)-PE 流出

[0176] ABCA5 17q24 肌肉、心脏、睾丸

[0177] ABCA6 17q24 肝

[0178] ABCA7 19p13.3 脾、胸腺

[0179] ABCA8 17q24 卵巢

[0180] ABCA9 17q24 心脏

[0181] ABCA10 17q24 肌肉、心脏

[0182] ABCA12 2q34 胃

[0183] ABCA13 7p11-q11 在所有组织中较低

[0184] ABCB1 PGY1, MDR 7p21 肾上腺、肾、脑多药抗药性

[0185] ABCB2 TAP1 6p21 所有细胞肽运输

[0186] ABCB3 TAP2 6p21 所有细胞肽运输

[0187] ABCB4 PGY3 7q21.1 肝 PC 运输

[0188] ABCB5 7p14 普遍存在的

[0189] ABCB6 MTABC3 2q36 线粒体铁运输

[0190] ABCB7 ABC7 Xq12-q13 线粒体 Fe/S 簇运输

[0191] ABCB8 MABC1 7q36 线粒体

- [0192] ABCB9 12q24 心脏、脑
- [0193] ABCB10 MTABC2 1q42 线粒体
- [0194] ABCB11 SPGP 2q24 肝胆汁盐运输
- [0195] ABCC1 MRP1 16p13.1 肺、睾丸、PBMC 抗药性
- [0196] ABCC2 MRP2 10q24 肝 有机阴离子流出
- [0197] ABCC3 MRP3 17q21.3 肺、肠、肝抗药性
- [0198] ABCC4 MRP4 13q32 前列腺核苷运输
- [0199] ABCC5 MRP5 3q27 普遍存在的核苷运输
- [0200] ABCC6 MRP6 16p13.1 肾、肝
- [0201] CFTR ABCC7 7q31.2 外分泌组织氯离子通道
- [0202] ABCC8 SUR1 11p15.1 胰 磺酰脲受体
- [0203] ABCC9 SUR2 12p12.1 心脏、肌肉
- [0204] ABCC10 MRP7 6p21 在所有组织中较低
- [0205] ABCC11 16q11-q12 在所有组织中较低
- [0206] ABCC12 16q11-q12 在所有组织中较低
- [0207] ABCD1 ALD Xq28 过氧化物酶体 VLCFA 运输调控
- [0208] 4Current Genomics, 2003, 第 4 卷, No. 3Luckie 等人
- [0209] (表 1) 继续....
- [0210] 符号 别名 定位 表达功能
- [0211] ABCD2 ALDL1, ALDR 12q11-q12 过氧化物酶体
- [0212] ABCD3 PXMP1, PMP70 1p22-p21 过氧化物酶体
- [0213] ABCD4 PMP69, P70R 14q24.3 过氧化物酶体
- [0214] ABCE1 OABP, RNS4I 4q31 卵巢、睾丸、脾寡腺苷酸结合蛋白
- [0215] ABCF1 ABC50 6p21.33 普遍存在的
- [0216] ABCF2 7q36 普遍存在的
- [0217] ABCF3 3q25 普遍存在的
- [0218] ABCG1 ABC8, White 21q22.3 普遍存在的胆固醇运输
- [0219] ABCG2 ABCP, MXR, BCRP 4q22 胎盘, 肠毒素流出, 抗药性
- [0220] ABCG4 White2 11q23 5 59 肝
- [0221] ABCG5 White3 2p21 17 肝、肠固醇运输

[0222] ABCG8 2p21 17 肝, 肠固醇运输。细胞表面受体识别绝大部分细胞外信号分子。跨膜受体横跨细胞的质膜, 受体的一部分在细胞的外部 (细胞外结构域), 另一部分在细胞的内部 (细胞内结构域)。信号转导通常因配体与其细胞外结构域的结合而发生。

[0223] 配体与细胞表面受体的结合通常在细胞内部刺激一系列事件, 不同类型的受体刺激不同细胞内反应。受体通常只对特异性配体的结合起作出反应。当结合时, 配体通常通过诱导受体的细胞内部分的形状或构象的改变来起始信号穿过质膜的传导。通常, 这样的构象改变导致受体中包含的酶促活性的激活或将结合位点暴露于细胞内的其它信号蛋白。当这些蛋白质与受体结合时, 它们本身可变得具有活性并且将信号传播至细胞质中。

[0224] 在真核细胞中, 大多数被配体 / 受体相互作用激活的细胞内蛋白质通常具有酶促

活性。此类酶包括酪氨酸激酶、异三聚体 G 蛋白、小 GTP 酶、各种丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶、磷酸酶、脂质激酶和水解酶。某些受体 - 刺激的酶产生特定的第二信使, 包括环核苷酸例如, 环 AMP (cAMP) 和环 GMP (cGMP)、磷脂酰肌醇衍生物, 例如磷脂酰肌醇 - 三磷酸 (PIP3)、二酰甘油 (DAG) 和肌醇三磷酸 (IP3)。其它激活的蛋白质与衔接蛋白质 (adapter protein) 相互作用。衔接蛋白质促进其它信号蛋白之间的相互作用, 并且协调产生对特定刺激物的适当的细胞反应所必需的其它信号复合物的形成。酶和衔接蛋白质都响应多种第二信使分子。

[0225] 存在许多不同种类的识别不同细胞外信号分子的跨膜受体。实例包括 :G 蛋白偶联受体 (GPCR) 例如, 肾上腺素能受体、神经递质受体、嗅觉受体、阿片样物质受体、趋化因子受体和视紫质 ;受体酪氨酸激酶例如生长因子受体 ;整联蛋白 ;和 toll- 样受体。

[0226] 在某些情况下, 信号复合物组分可以是超过一种信号复合物的成员, 所述信号复合物各自包含不同的复合物组分并且行使不同的信号转导功能 (例如, 配体可结合超过一种同源受体)。在某些情况下, 配体可结合一种或多种诱饵受体。诱饵受体是结合配体, 从而抑制其对其正常受体的结合的受体。例如, 受体 VEGF-1 可阻止血管内皮生长因子 (VEGF) 结合 VEGFR-2。信号复合物组分与一种结合伴侣的结合对与另一种结合伴侣的结合的差异调节应当允许生物信号转导的高度靶向调控。在某些情况下, 信号复合物组分可以是以特定构象形式被捕获的突变体或变体形式, 例如使得复合物组成型激活或失活。在某些情况下, 受体可以以特定的构象例如配体结合的构象被捕获。在某些情况下, 信号复合物组分可以是配体的突变体或变体形式, 或模拟物或类似物。

[0227] 测试多肽结合剂的类型和来源 :肽和多肽

[0228] 许多天然或随机肽或多肽的文库是商购可得的或容易合成的。可选择地, 以细菌、真菌、植物和动物提取物的形式存在的天然肽或多肽的文库是可获得的或容易产生的。此外, 可通过常规化学、物理和生物化学方法容易地修饰天然或合成产生的文库和化合物, 并且可将所述文库和化合物用于产生组合文库。可进行另外的衍生或修饰, 例如酰化、烷化、酯化、酰胺化。

[0229] 能够特异性结合抗原的蛋白质支架的文库也是可获得的。此类蛋白质包括 : Adnectins、Affibodies、Anticalins、DARPin、改造的 Kunitz- 型抑制剂、四连接素 (tetranectins)、A- 结构域蛋白、脂质运载蛋白 (lipocalins)、重复蛋白例如锚蛋白重复蛋白、免疫蛋白、 α 2p8 肽、昆虫防卫素 A、PDZ 结构域、蝎毒素、PHD 指、TEM-1 β - 内酰胺酶、纤连蛋白 III 型结构域、CTLA-4、T 细胞受体、knottins、新制癌菌素 (neocarzinostatin)、碳水化合物结合模块 4-2、绿色荧光蛋白、硫氧还蛋白 (Gebauer&Skerra, Curr. Opin. Chem. Biol. 13 :245-55 (2009) ;Gill&Damle, Curr. Opin. Biotech 17 :653-58 (2006) ;Hosse 等人, Protein Sci. 15 :14-27 (2006) ;Skerra, Curr. Opin. Biotech 18 :295-3-4 (2007))。

[0230] 用于在组合文库中进行筛选的许多不同方法在本领域是已知的, 包括 :生物文库、空间可寻址平行固相或溶液相文库 ;需要去卷积的合成文库法 ;“一珠一化合物”文库法 ;和使用亲和层析选择的合成文库法。

[0231] 可使用公知的技术鉴定结合信号复合物或其组分的肽而无需过度实验。在这方面, 应指出用于筛选肽文库的能够特异性结合抗原的肽的技术在本领域是公知的 (参见, 例如, 美国专利 No. 5, 556, 762、5, 750, 373、4, 708, 871、4, 833, 092、5, 223, 409、5, 403, 484、

5, 571, 689, 5, 663, 143 ; 第 WO 84/03506 号 和 第 W084/03564 号 PCT 公 布 ;Geysen 等 人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 81 :3998-4002(1984) ;Geysen 等 人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 82 :178-182(1985) ;Geysen 等 人, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149(1986) ;Geysen 等 人, J. Immunol. Moth. , 102 :259-274(1987) ;Schoofs 等 人, J. Immunol. , 140 :611-616(1988), Cwirla, S. E. 等 人 (1990)Proc. Natl Acad. Sci. USA, 87 :6378 ;Lowman, H. B. 等 人 (1991)Biochemistry, 30 :10832 ;Clackson, T. 等 人 (1991) Nature, 352 :624 ;Marks, J. D. 等 人 (1991), J. Mol. Biol. , 222 :581 ;Kang, A. S. 等 人 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 :8363 以及 Smith, G. P. (1991)Current Opin. Biotechnol. , 2 :668)。

[0232] 可使用已知的肽合成方法化学合成肽,或可使用重组技术制备和纯化肽。肽在长度上通常为至少约 3 个氨基酸,可选择地在长度上为至少约 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100 个氨基酸或更多个氨基酸,其中此类肽能够优选特异性结合信号复合物或其组分。

[0233] 在这方面,噬菌体 (phage) 展示是允许筛选大的肽文库以鉴定这类文库的能够特异性结合抗原的成员的一个公知技术。噬菌体展示是籍以将变异多肽作为与外壳蛋白融合的融合蛋白在噬菌体颗粒表面上展示的技术 (Scott, J. K. 和 Smith, G. P. (1990) Science 249 :386)。噬菌体展示的功用在于可快速且高效地分选选择性地随机化的蛋白质变体 (或随机克隆的 cDNA) 的大文库的以高亲和力结合抗原的那些序列。肽 (Cwirla, S. E. 等 人 (1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 :6378) 或蛋白质 (Lowman, H. B. 等 人 (1991) Biochemistry, 30 :10832 ;Clackson, T. 等 人 (1991)Nature, 352 :624 ;Marks, J. D. 等 人 (1991), J. Mol. Biol. , 222 :581 ;Kang, A. S. 等 人 (1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 :8363) 文库在噬菌体上的展示已被用于筛选数百万种多肽或肽的具有特异性结合性质的多肽或肽 (Smith, G. P. (1991)Current Opin. Biotechnol. , 2 :668)。

[0234] 虽然大多数噬菌体展示法使用丝状噬菌体,但 λ 形噬菌体展示系统 (WO 95/34683 ;U. S. 5, 627, 024)、T4 噬菌体展示系统 (Ren, ZJ. 等 人 (1998)Gene215 :439 ;Zhu, Z. (1997)CAN 33 :534 ;Jiang, J. 等 人 (1997)can 128 :44380 ;Ren, ZJ. 等 人 (1997) CAN 127 :215644 ;Ren, Z-J. (1996)Protein Sci. 5 :1833 ;Efimov, V. P. 等 人 (1995)Virus Genes 10 :173) 和 T7 噬菌体展示系统 (Smith, G. P. and Scott, J. K. (1993)Methods in Enzymology, 217, 228-257 ;U. S. 5, 766, 905) 也是已知的。

[0235] 产生肽文库和筛选这些文库的方法也公开于美国专利 No. 5, 723, 286、5, 432, 018、5, 580, 717、5, 427, 908、5, 498, 530、5, 770, 434、5, 734, 018、5, 698, 426、5, 763, 192 和 5, 723, 323 中。

[0236] 测试多肽结合剂:抗体的类型或来源

[0237] 术语“抗体”以最广义使用,包括完全装配的抗体、四聚体抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体 (例如,双特异性抗体)、可结合抗原的抗体片段 (例如, Fab'、F' (ab)₂、Fv、单链抗体、双链抗体) 以及包含上述抗体的重组肽,只要它们显示期望的活

性即可。“免疫球蛋白”或“四聚体抗体”是由两条重链和两条链轻组成的四聚体糖蛋白，所述每条轻链和重链包含可变区和恒定区。抗原结合部分可通过重组 DNA 技术或通过酶促或化学切割完整抗体来产生。抗体片段或抗原结合部分包括，除其它以外，Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、结构域抗体 (dAb)、互补决定区 (CDR) 片段、单链抗体 (scFv)、单链抗体片段、嵌合抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体、微小抗体、线性抗体；整合重组抗体、三抗体或双抗体、内抗体、纳米抗体、小模块免疫药物 (SMIP)、抗原-结合-结构域免疫球蛋白融合蛋白、骆驼化抗体、含 VHH 抗体或其变体或衍生物，以及包含免疫球蛋白的至少一部分的多肽，所述部分足以赋予所述多肽特异性抗原结合，例如 1、2、3、4、5 或所有 6 个 CDR 序列，只要所述抗体保持期望的生物活性即可。

[0238] 在天然存在的免疫球蛋白中，每一个四聚体由两个相同的多肽链对组成，每一个对具有一条“轻”（约 25kDa）链和一条“重”链（约 50-70kDa）。每一条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的约 100 至 110 或更多个氨基酸的可变区。每一条链的羧基末端部分界定了主要负责效应子功能的恒定区。人轻链被分类为卡帕 (kappa) (κ) 和兰姆达 (lambda) (λ) 轻链。重链被分类为缪 (μ)、德耳塔 (Δ)、伽马 (γ)、阿尔法 (α) 和伊普西龙 (ϵ)，并且将抗体的同种型分别定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变和恒定区通过约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含约 10 多个氨基酸的“D”区。通常参见，基础免疫学 (Fundamental Immunology)，第 7 章 (Paul, W., 编著，第 2 版，Raven Press, N. Y. (1989)) (为了所有目的通过引用整体并入本文)。每一个轻链/重链对的可变区形成抗体结合位点以便完整免疫球蛋白具有两个结合位点。

[0239] 每一条链重链在一个末端具有可变结构域 (V_H)，后接许多恒定结构域。每一条轻链在一个末端具有可变链结构域 (V_L) 并且在其另一端具有恒定结构域；轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐，并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。据认为特定的氨基酸残基形成轻链与重链可变结构域之间的界面 (Chothia 等人, J. Mol. Biol. 196 : 901-917, 1987)。

[0240] 免疫球蛋白可变结构域展示通过三个高变区或 CDR 连接的相对保守的构架区 (FR) 的相同一般结构。从 N 端至 C 端，轻链和重链都包含结构域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。按照 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (国立卫生研究院, Bethesda, Md. (1987 和 1991)) 或 Chothia&Lesk, (J. Mol. Biol. 196 :901-917, 1987) ;Chothia 等人, (Nature342 :878-883, 1989) 的定义将氨基酸分配至每一个结构域。

[0241] 抗体的高变区是指负责抗原结合的抗体的 CDR 氨基酸残基。高变区包括来自 CDR 的氨基酸残基（轻链可变结构域中的残基 24-34 (L1)、50-56 (L2) 和 89-97 (L3) 以及重链可变结构域中的 31-35 (H1)、50-65 (H2) 和 95-102 (H3)，如由 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版. 公共卫生署, 国立卫生研究院, Bethesda, Md. (1991) 所描述的）和 / 或来自高变环的那些残基（轻链可变结构域中的残基 26-32 (L1)、50-52 (L2) 和 91-96 (L3) 以及重链可变结构域中的 26-32 (H1)、53-55 (H2) 和 96-101 (H3)，如由 Chothia 等人, J. Mol. Biol. 196 :901-917 (1987) 描述的）。

[0242] 构架或 FR 残基是除了高变区残基外的那些可变结构域残基。

[0243] 如本文中所使用的“重链可变区”是指抗体分子的区域，其包含所述抗体重链可变结构域的至少一个互补决定区 (CDR)。重链可变区可包含所述抗体重链的 1、2 或 3 个

CDR。

[0244] 如本文中所使用的“轻链可变区”是指抗体分子的区域,其包含所述抗体轻链可变结构域的至少一个互补决定区(CDR)。轻链可变区可包含所述抗体轻链的1、2或3个CDR,所述轻链可以是卡帕或兰姆达轻链(取决于抗体)。

[0245] 取决于它们的重链的恒定结构域的氨基酸序列,可将免疫球蛋白分配至不同种类IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,所述种类还可进一步分成亚类或同种型例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。不同种类的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是公知的。不同同种型具有不同的效应子功能;例如,IgG1和IgG3同种型具有ADCC活性。本发明的抗体,如果其包含恒定结构域,则可以具有这些亚类或同种型、其变体或其有序列、或不同同种型的杂合体(例如,IgG1/IgG2杂合体)的任一种。

[0246] 在示例性实施方案中,本发明的抗体可以包含人卡帕(κ)或人兰姆达(λ)轻链或来源于其的氨基酸序列或其杂合体(任选地与人重链或来源于其的序列一起),或以单链、二聚体、四聚体(例如,两条重链和两条轻链)或其它形式一起包含重链和轻链。

[0247] 单克隆抗体是指获自大体上均质的抗体群体的抗体。单克隆抗体通常是高度特异性的,并且可针对单个抗原位点,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂相反。除了它们的特异性外,单克隆抗体是有利的,因为它们通过均质培养(homogeneous culture)合成,未被具有不同特异性和特征的其它免疫球蛋白污染。

[0248] 按照本发明使用的单克隆抗体可利用首先由Kohler等人(Nature, 256: 495-7, 1975)描述的杂交瘤方法来制备,或可利用重组DNA法(参见,例如,美国专利No. 4, 816, 567)来制备。单克隆抗体还可使用例如Clackson等人(Nature 352:624-628, 1991)和Marks等人(J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991)中描述的技术从噬菌体抗体文库分离而来。

[0249] 在杂交瘤方法中,免疫小鼠或其它适当的宿主动物例如仓鼠或猕猴以引发淋巴细胞,所述淋巴细胞产生或能够产生特异性结合用于免疫的蛋白质的抗体(Harlow&Lane; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1988))。

[0250] 抗体的重组产生

[0251] 本发明还包括编码本发明的抗体的核酸分子。在某些实施方案中,不同的核酸分子编码抗原特异性抗体的重链可变区和轻链可变区。在其它实施方案中,相同的核酸分子编码抗原特异性抗体的重链和轻链可变区。

[0252] 可使用常规方法(例如,通过使用能够特异性结合编码单克隆抗体的重链和轻链的寡核苷酸探针)从分泌抗体的杂交瘤细胞分离编码本发明的单克隆抗体的DNA,并且测定其序列。序列测定通常需要分离至少一部分目的基因或cDNA。通常这需要克隆编码单克隆抗体的DNA或,优选地mRNA(即,cDNA)。使用标准技术(参见,例如,Sambrook等人(1989)Molecular Cloning: A Laboratory Guide,第1-3卷,Cold Spring Harbor Press,将其通过引用并入本文)进行克隆。例如,可通过逆转录polyA+mRNA,优选膜结合mRNA来构建cDNA文库,然后使用特异于人免疫球蛋白多肽基因序列的探针筛选文库。在使得能够鉴定在特定条件下彼此杂交的多核苷酸的条件下进行核苷酸探针反应和其它核苷酸杂交反应。

[0253] 一组示例性条件如下：在 42℃ 于 50% 甲酰胺, 5X SSC, 20mM Na•P04, pH 6.8 中严格杂交；然后在 55℃ 下 1X SSC 中洗涤 30 分钟。用于计算等同杂交条件和 / 或选择其它条件以获得期望的严格性水平的公式是公知的。在本领域应理解, 等同的严格性的条件可通过温度和缓冲液或盐浓度的变化来实现, 如 Ausubel 等人 (编), *Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons(1994), pp. 6.0.3 至 6.4.10 中所描述的。杂交条件的变动可通过经验来确定或基于探针的鸟苷 / 胞嘧啶 (GC) 碱基配对的长度和百分比来精确地计算。可如 Sambrook 等人 (编), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York(1989), pp. 9.47 至 9.51 中所述计算杂交条件。

[0254] 在一个实施方案中, 使用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增编码目的免疫球蛋白基因区段 (例如, 轻链可变区段) 的 cDNA (或全长 cDNA 的部分)。可容易地将扩增的序列克隆进入任何适当的载体例如表达载体、微基因 (minigene) 载体或噬菌体展示载体。应理解, 所使用的克隆的具体方法不是至关重要的, 只要可能测定目的免疫球蛋白多肽的某些部分的序列即可。如本文中所使用的, “分离的” 核酸分子或 “分离的” 核酸序列是这样的核酸分子, 所述核酸分子 (1) 已被鉴定并且与至少一种通常在所述核酸的天然来源中与其结合的污染性核酸分子分离, 或 (2) 被克隆、扩增、标记或以其它方式区分背景核酸, 以便目的核酸的序列可被测定, 被认为是分离的。分离的核酸分子与其在自然界中被发现的形式或环境不同。因此分离的核酸分子与当其存在于天然细胞中时的核酸分子是有区别的。然而, 分离的核酸分子包括包含在通常表达所述抗体的细胞中的核酸分子, 在所述细胞中, 例如, 所述核酸分子存在于与天然细胞的染色体位置不同的染色体位置中。

[0255] 用于克隆和测序的 RNA 的一个来源是通过从转基因小鼠获得 B 细胞, 然后将 B 细胞与永生化细胞融合产生的杂交瘤。可选择地, RNA 可从经免疫的动物的 B 细胞 (或整个脾) 分离而来。当使用除杂交瘤外的来源时, 可能期望筛选编码具有特异性结合特征的免疫球蛋白或免疫球蛋白多肽的序列。用于此类筛选的一个方法是使用噬菌体展示技术。噬菌体展示在本文中被进一步描述并且在本领域是公知的。参见, 例如, Dower 等人, WO 91/17271, McCafferty 等人, WO 92/01047 以及 Caton 和 Koprowski, (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6450-54(1990)), 将所述文献的每一个通过引用并入本文。在一个实施方案中, 分离来自经免疫的转基因小鼠的 cDNA (例如, 总脾 cDNA), 将聚合酶链式反应用于扩增编码一部分免疫球蛋白多肽例如 CDR 区的 cDNA 序列, 然后将扩增的序列插入噬菌体载体。通过标准噬菌体展示技术例如淘选鉴定编码目的肽例如具有期望的结合特征的可变区肽的 cDNA。

[0256] 随后测定扩增的或克隆的核酸的序列。通常测试编码免疫球蛋白多肽的整个可变区的序列, 然而有时只测定一部分可变区 (例如编码 CDR 的部分) 的序列就足够了。通常, 被测序的部分在长度上为至少 30 个碱基, 更常见地将测定编码可变区的长度的至少约 1/3 或至少约 1/2 的碱基的序列。

[0257] 可对从 cDNA 文库分离的克隆进行测序, 或当使用 PCR 时, 在亚克隆扩增的序列或通过直接 PCR 后, 测定扩增的区段的序列。使用标准技术 (参见, 例如, Sambrook 等人 (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, 第 1-3 卷, Cold Spring Harbor Press 和 Sanger, F. 等人 (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467, 将它们通过引用并入本文) 进行测序。通过将克隆的核酸的序列与人免疫球蛋白基因和 cDNA 的公布的序列相比

较,本领域技术人员将轻易地能够确定(取决于测序的区域):(i) 杂交瘤免疫球蛋白多肽(包括重链的同种型)的种系区段惯用法(germline segment usage)和(ii) 重链和轻链可变区的序列,包括因 N-区域添加和体细胞突变过程而产生的序列。免疫球蛋白基因序列的一个来源是美国国家生物技术信息中心,国立医学图书馆,国立卫生研究院, Bethesda, Md。

[0258] 分离后,可将 DNA 置于表达载体中,随后将所述载体转染进入宿主细胞例如大肠杆菌(E. coli)细胞、猿猴 COS 细胞、人胚胎肾 293 细胞(例如,293E 细胞)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞(所述宿主细胞否则不产生免疫球蛋白),以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。抗体的重组产生在本领域是公知的。

[0259] 表达控制序列是指在特定宿主生物体中表达有效连接的编码序列所必需的 DNA 序列。适合于原核生物的控制序列例如包括启动子,任选地操纵子序列,和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号和增强子。

[0260] 在可选择的实施方案中,可通过直接蛋白质测序来测定目的免疫球蛋白的氨基酸序列。可按照通用密码子表设计适当的编码核苷酸序列。

[0261] 可通过将适当的核苷酸变化引入编码 DNA 或通过肽合成来制备期望的抗体的氨基酸序列变体。此类变体包括例如抗体的氨基酸序列内的残基的缺失、和/或插入和/或置换。产生缺失、插入和置换的任何组合以获得终构建体,只要终构建体具有期望的特征即可。氨基酸的变化也可改变抗体的翻译后加工,例如糖基化位点的数目或位置。

[0262] 利用本领域已知的多种方法制备编码抗体的氨基酸序列变体的核酸分子。此类方法包括但不限于,从天然来源分离(在天然存在氨基酸序列变体的情况下)或通过抗体的早期制备的变体或非变体形式的寡核苷酸介导的(或定向)诱变、PCR 诱变和盒式诱变进行制备。

[0263] 本发明还提供了编码本发明的抗体的分离的核酸(任选地有效地连接于被宿主细胞识别的控制序列)、包含所述核酸的载体和宿主细胞以及用于产生抗体的重组技术,所述技术可包括培养宿主细胞以便表达核酸和任选地,从宿主细胞培养物或培养基回收抗体。用于抗体产生的不同系统和方法由 Birch&Racher(Adv. Drug Deliv. Rev. 671-685(2006))进行了综述。

[0264] 为了进行抗体的重组产生,分离编码其的核酸,将所述核酸插入可复制载体以进一步克隆(DNA 的扩增)或以进行表达。使用常规方法(例如,通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)容易地分离编码单克隆抗体的 DNA,并且测定其序列。许多载体是可获得的。载体组分通常包括但不限于如下序列的一个或多个序列:信号序列、复制起始点、一个或多个选择标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0265] 用于克隆或表达存在于本文的载体中的 DNA 的适当宿主细胞是原核细胞、酵母细胞或高等真核细胞。用于该目的适当的原核生物包括细菌例如革兰阴性或革兰阳性生物,例如,肠杆菌科(Enterobacteriaceae)例如埃希氏菌属(Escherichia)例如大肠杆菌、肠杆菌属(Enterobacter)、欧文氏菌属(Erwinia)、克雷伯菌属(Klebsiella)、变形杆菌属(Proteus)、沙门菌属(Salmonella)例如鼠伤寒沙门菌(Salmonella typhimurium)、沙雷氏菌属(Serratia)例如粘质沙雷氏菌(Serratia marcescans)和志贺菌属(Shigella)

以及杆菌属 (*Bacilli*) 例如枯草杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽胞杆菌 (*B. licheniformis*) (例如, 公开于 1989 年 4 月 12 日公布的 DD 266,710 的地衣芽胞杆菌 41P)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 例如绿脓杆菌 (*P. aeruginosa*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。一种优选大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294(ATCC 31,446), 虽然其它菌株例如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776(ATCC 31,537) 和大肠杆菌 W3110(ATCC 27,325) 也是适合的。这些实例是举例说明性的而非限定性的。

[0266] 除了原核生物外, 真核微生物例如丝状真菌或酵母也是用于编码抗体的载体的适当的克隆或表达宿主。酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或普通面包酵母 (*baker's yeast*) 是在低等真核宿主微生物中最常使用的。然而, 许多其它属、种和株系也是通常可获得的并且用于本文中, 例如裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*); 克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主例如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、*K. wickerhamii* (ATCC 24,178)、克鲁维酵母 (*K. waltii*) (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilum*) (ATCC36,906)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 和马克斯克鲁维酵母 (*K. marxianus*); 耶氏酵母 (*Yarrowia*) (EP 402,226); 毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) (EP183,070); 念珠菌属 (*Candida*); 里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) (EP 244,234); 粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*); 许旺酵母属 (*Schwanniomyces*) 例如西方许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*); 和丝状真菌例如链孢霉属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主例如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*)。

[0267] 用于表达糖基化抗体的适当宿主细胞来源于多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。许多杆状病毒株系和变体以及来自宿主例如草地贪夜蛾 (毛虫)、埃及斑蚊 (蚊子)、白纹伊蚊 (蚊子)、黑腹果蝇 (果蝇) 和家蚕的相应的允许昆虫宿主细胞已被鉴定。用于转染的多种病毒株系是公共可得的, 例如苜蓿银纹夜蛾的 L-1 变体 NPV 和家蚕的 Bm-5 变体 NPV, 并且此类病毒可在本文中用作根据本发明的病毒, 特别地用于转染草地贪夜蛾细胞。

[0268] 棉花、玉米、马铃薯、大豆、牵牛花、番茄、烟草、浮萍和其它植物细胞的植物细胞培养物也可用作宿主。

[0269] 有用的哺乳动物宿主细胞系的实例为中国仓鼠卵巢细胞, 包括 CHOK1 细胞 (ATCC CCL61)、DXB-11、DG-44 和中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216(1980)); 用 SV40 转化的猴肾 CV1 品系 (COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚肾品系 (用以以悬浮培养方式生长的亚克隆的 293 或 293 细胞 (Graham 等人, *J. Gen. Virol.* 36:59,1977); 幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10); 小鼠塞尔托利细胞 (TM4, Mather, (*Biol. Reprod.* 23:243-251,1980); 猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2); 犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34); 水牛鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺癌 (MMT060562, ATCC CCL51); TRI 细胞 (Mather 等人, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68(1982)); MRC 5 细胞; FS4 细胞; 以及人肝癌品系 (Hep G2)。

[0270] 用上述用于抗体产生的表达或克隆载体转化或转染宿主细胞, 将其培养于在适当

情况下改良的常规培养基中以诱导启动子,选择转化体,或扩增编码期望的序列的基因。此外,具有多个拷贝的通过选择标记分隔的转录单位的新载体和转染的宿主细胞系对于表达结合期望的抗原的抗体是特别有用的和优选的。

[0271] 可将包含期望的抗体核酸序列的宿主细胞培养在多种培养基中。商购可得的培养基例如 Ham's F10 (Sigma)、最小必需培养基 (Minimal Essential Medium) (MEM)、(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 和达尔伯克氏改良伊格尔培养基 ((DMEM), Sigma) 适合用于培养所述宿主细胞。此外, Ham 等人 (Meth. Enz. 58 :44, 1979), Barnes 等人, Anal. Biochem. 102 :255 (1980), 美国专利 No. 4, 767, 704 ; 4, 657, 866 ; 4, 927, 762 ; 4, 560, 655 或 5, 122, 469 ; WO 90/103430 ; WO 87/00195 ; 或第 30, 985 号美国专利公布中描述的任何培养基可用作用于所述宿主细胞的培养基。这些培养基的任一种必要时可补充以激素和 / 或其它生长因子 (例如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐 (例如氯化钠、氯化钙、氯化镁和磷酸盐)、缓冲液 (例如 HEPES)、核苷酸 (例如腺苷和胸苷)、抗生素 (例如 GENTAMYCIN™ 药物)、痕量元素 (定义为通过以微摩尔范围内的终浓度存在的无机化合物) 和葡萄糖或等价的能量来源。还可以本领域技术人员已知的适当浓度包括任何其它必需补充物。培养条件例如温度、pH 等为先前与被选择用于表达的宿主细胞一起使用的培养条件,所述培养条件对于本领域技术人员来说是显然的。

[0272] 当使用重组技术时,抗体可在细胞内、周质空间中产生,或被直接分泌入培养基,包括来自微生物培养物。如果抗体在细胞内产生,作为第一步骤,通过例如离心或超滤除去颗粒碎片 (宿主细胞或裂解的碎片)。Better 等人 (Science 240 :1041-43, 1988 ; ICSU Short Reports 10 :105 (1990) ; 和 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :457-461 (1993) 描述了用于分离被分泌至大肠杆菌的周质空间的抗体的方法。[也参见, (Carter 等人, Bio/Technology 10 :163-167 (1992))]。

[0273] 可使用例如羟基磷灰石层析阳离子或阴离子交换层析以及亲和层析来纯化从微生物或哺乳动物细胞制备的抗体组合物,亲和层析是优选纯化技术。蛋白 A 作为亲和配体的适合性取决于存在于抗体中的任何免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人 γ 1、 γ 2 或 γ 4 重链的抗体 (Lindmark 等人, J. Immunol. Meth. 62 :1-13, 1983)。蛋白 G 被推荐用于所有小鼠同种型和用于人 γ 3 (Guss 等人, EMBO J. 5 :1567-1575 (1986))。亲和配体所连接的基质最常见地是琼脂糖,但其它基质也是可用的。机械上稳定的基质例如可控孔度玻璃或聚 (苯乙烯二乙烯基) 苯允许获得比使用琼脂糖可达到的更快的流速和更短的处理时间。当抗体包含 C_H 3 结构域时, Bakerbond ABX™ 树脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.) 用于纯化。取决于待回收的抗体,用于蛋白质纯化的其它技术例如离子交换柱上进行的分级分离、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅土上进行的层析、肝素 SEPHAROSE™ 上进行的层析、阴离子或阳离子交换树脂 (例如聚天冬氨酸柱) 上进行的层析、层析聚焦、SDS-PAGE 以及硫酸铵沉淀也是可用的。

[0274] 抗体片段

[0275] 抗体片段包含一部分完整全长抗体,优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段 ; 双链抗体 ; 线性抗体 ; 单链抗体分子 (例如, scFv) ; 多特异性抗体片段例如双特异性、三特异性等抗体 (例如, 双链抗体、三链抗体、四链抗体) ; 微小抗体 ; 螯合重组抗体 ; 三抗体或双抗体 ; 内抗体 ; 纳米抗体 ; 小模块免疫药

物 (SMIP)、结合-结构域免疫球蛋白融合蛋白;骆驼化抗体;含 VHH 抗体;和从抗体片段形成的其它多肽。参见例如 Holliger&Hudson (Nat. Biotech. 23 (9) 1126-36 (2005))

[0276] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段 (称为“Fab”片段,由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H 结构域组成的单片段,每一个片段具有单个抗原结合位点)和残留的“Fc”片段 (其名称反映了其容易结晶的能力)。胃蛋白酶处理产生 $F(ab')_2$ 片段 (包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段),其具有两个“单链 Fv”,或者“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。优选,Fv 多肽还在 V_H 与 V_L 结构域之间包含多肽连接体 (所述连接体使得能使 Fv 形成用于抗原结合的期望的结构),从而导致单链抗体 (scFv),其中 V_L 和 V_H 区通过合成的连接体配对形成单价分子,所述连接体使得它们能够被产生为单蛋白质链 (Bird 等人, Science 242 :423-426, 1988, and Huston 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :5879-5883, 1988). 关于 sFv 的综述,参见 Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页 (1994)。Fd 片段由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成。

[0277] 其它抗体片段包括结构域抗体 (dAb) 片段 (Ward 等人, Nature 341 :544-546, 1989), 其由 V_H 结构域组成。双链抗体是双价抗体,在所述双价抗体中 V_H 和 V_L 结构域表达在单个多肽链上,但使用太短以至不允许相同链上的两个结构域配对,从而迫使所述结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合位点 (参见例如, EP 404, 097 ;WO 93/11161 ;Holliger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448, 1993, 和 Poljak 等人, Structure 2 :1121-1123, 1994)。双链抗体可以是双特异性或单特异性的。

[0278] 缺乏轻链的功能性重链抗体天然存在于铰口鲨 (Greenberg 等人, Nature 374 :168-73, 1995)、毯状鲨 (wobbegong shark) (Nuttall 等人, Mol Immunol. 38 :313-26, 2001) 和骆驼科 (Hamers-Casterman 等人, Nature 363 :446-8, 1993 ;Nguyen 等人, J. Mol. Biol. 275 :413, 1998) 例如骆驼、单峰骆驼、羊驼和骆马 (llamas) 中。抗原结合位点在这些动物中减少至单个结构域 (VHH 结构域)。这些抗体只使用重链可变区形成抗原结合区,即,这些功能性抗体是仅具有结构 H_2L_2 的重链的同二聚体 (称为“重链抗体”或“HCAb”)。骆驼 VHH 据报导与包含铰链、CH2 和 CH3 结构域但缺乏 CH1 结构域的 IgG2 和 IgG3 恒定区重组 (Hamers-Casterman 等人, 同上)。例如,骆马 IgG1 是常规 (H_2L_2) 抗体同种型,其中 V_H 与包含铰链、CH1、CH2 和 CH3 结构域的恒定区重组,然而骆马 IgG2 和 IgG3 是缺乏 CH1 结构域并且不包含轻链的唯重链同种型。已发现骆驼 V_{HH} 结构域以高亲和力结合抗原 (Desmyter 等人, J. Biol. Chem. 276 :26285-90, 2001) 并且在溶液中具高度稳定性 (Ewert 等人, Biochemistry 41 :3628-36, 2002)。经典的唯 V_H 片段难以以可溶性形式产生,但当将构架残基改变得更加 VH_H 样时可获得溶解度和特异性结合的改善。(参见,例如, Reichman 等人, J Immunol Methods 1999, 231 :25-38.)。用于产生具有骆驼重链的抗体的方法描述于例如第 20050136049 号和第 20050037421 号美国专利公布中。

[0279] 抗体重链的可变结构域具有 15kDa 的分子量,并且被称为纳米抗体 (Cortez-Retamozo 等人, Cancer Research 64 :2853-57, 2004)。可如 Conrath 等人 (Antimicrob Agents Chemother 45 :2807-12, 2001) 中所述从经免疫的单峰驼或使用 Revets 等人, Expert Opin. Biol. Ther. 5 (1) :111-24 (2005) 中所述的重组方法产生纳米抗体文库。

[0280] 双特异性 Fab-scFv(“双抗体”)和三特异性 Fab-(scFv)(2)(“三抗体”)的产生描述于 Schoonjans 等人(J Immunol. 165:7050-57,2000)和 Willems 等人(JChromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.786:161-76,2003)中。为了产生双抗体或三抗体,将 scFv 分子与 VL-CL(L)和 VH-CH₁(Fd)链之一或两者融合,例如,以产生三抗体(其中两个 scFv 与 Fab 的 C-末端融合),而在双抗体中,一个 scFv 与 Fab 的 C-末端融合。

[0281] 由通过肽连接体(无铰链的)或通过 IgG 铰链与 CH3 融合的 scFv 组成的“微小抗体”已描述于 Olafsen 等人,Protein Eng Des Sel. 2004Apr;17(4):315-23. 中。

[0282] 内抗体是显示细胞内表达并且可操纵细胞内蛋白质功能的单链抗体(Biocca 等人,EMBO J. 9:101-108,1990;Colby 等人,Proc Natl Acad Sci U SA. 101:17616-21,2004)。可如 Mhashikar 等人(EMBO J 14:1542-51,1995)和 Wheeler 等人(FASEB J. 17:1733-5. 2003)中所述产生包含在细胞内区域保留抗体构建体的细胞信号序列的内抗体。反式抗体(Transbody)是细胞渗透性抗体,其中蛋白质转导结构域(PTD)与单链可变片段(scFv)抗体融合 Heng 等人(Med Hypotheses. 64:1105-8,2005)。

[0283] 还涉及的是作为 SMIP 或特异于抗原的结合结构域免疫球蛋白融合蛋白的抗体。这些构建体是单链多肽,其包含与进行抗体效应子功能所必需的免疫球蛋白结构域融合的抗原结合结构域。参见,例如,W003/041600、第 20030133939 号美国专利公布和第 20030118592 号美国专利公布。

[0284] 可将一个或多个 CDR 共价地或非共价地整合入分子以使其成为免疫粘附素。免疫粘附素可包含 CDR 作为更大的多肽链的部分,可共价地将 CDR 连接于另一个多肽链,或可非共价地包含 CDR。CDR 允许免疫粘附素特异性结合特定的目的抗原。

[0285] 因此,可利用本领域已知的技术产生多种包含抗体的重链可变区或轻链可变区的 1、2 和 / 或 3 个 CDR 的组合物。

[0286] 多特异性抗体

[0287] 在某些实施方案中,可能期望产生具有针对相同或不同分子的至少两个不同表位的结合特异性的本发明的多特异性(例如双特异性)抗体。双特异性抗体的实例可结合抗原的两个不同表位。可选择地,可将抗原特异性抗体臂与结合细胞表面分子例如 T 细胞受体分子(例如,CD2 或 CD3)或 IgG(Fc γ R)的 Fc 受体例如 Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)和 Fc γ RIII(CD16)的臂组合,以将细胞防御机制集中至期望的抗体。双特异性还可用于将细胞毒性剂定位至表达或吸收期望的抗原的细胞。此类抗体具有抗原结合臂和结合细胞毒性剂(例如,皂草素、抗干扰素-60、长春花生物碱、蓖麻蛋白 A 链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原)的臂。可将双特异性抗体制备为全长抗体或抗体片段(例如,F(ab')₂ 双特异性抗体)。

[0288] 根据用于制备双特异性抗体的另一个方法,可改造一对抗体分子之间的界面以使从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比最大化。优选界面包含抗体恒定结构域的 C_H3 结构域的至少一部分。在该方法中,来自第一抗体分子的界面的一个或多个小氨基酸侧链被更大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)置换。通过用更小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)置换大氨基酸侧链在第二抗体分子的界面产生针对大侧链的相同或相似大小的补偿“腔”。这提供了用于使异二聚体的收率增加超过其它不想要的终产物例如同二聚体的机制。参见 1996 年 9 月 6 日公布的 W096/27011。

[0289] 双特异性抗体包括交联或“异源缀合 (heteroconjugate)”抗体。例如,可将异源缀合物中的抗体之一偶联于抗生物素蛋白,将另一个偶联于生物素。可使用任何常规交联方法制备异源缀合抗体。适当的交联剂以及许多交联技术在本领域是公知,并且描述于美国专利 No. 4,676,980 中。

[0290] 用于从抗体片段产生双特异性抗体的技术也已描述于文献中。例如,可使用化学键制备双特异性抗体。Brennan 等人 (Science 229:81-83,1985) 描述了其中将完整抗体进行蛋白水解切割以产生 $F(ab')_2$ 片段的方法。在二硫醇络合剂亚砷酸钠存在的情况下还原这些片段以稳定邻近的二硫醇并且防止分子间二硫化物形成。随后将产生 Fab' 片段转化成硫代硝基苯甲酸酯 (thionitrobenzoate) (TNB) 衍生物。随后通过用巯基乙胺还原将 Fab' -TNB 衍生物之一转化成 Fab' -硫氢基,将其与等摩尔量的其它 Fab' -TNB 衍生物混合以形成双特异性抗体。将产生的双特异性抗体用作用于选择性固定酶的试剂。在其它实施方案中,可将直接从大肠杆菌回收的 Fab' -SH 片段体外化学偶联以形成双特异性抗体。(Shalaby 等人, J. Exp. Med. 175:217-225(1992))。

[0291] Shalaby 等人, J. Exp. Med. 175:217-225(1992) 描述了完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的产生。从大肠杆菌分别分泌每一个 Fab' 片段,将其经历体外直接化学偶联以形成双特异性抗体。所形成的双特异性抗体能够结合过表达 HER2 受体的细胞和正常人 T 细胞,以及触发人细胞毒性淋巴细胞抗人乳腺肿瘤抗原的裂解活性。

[0292] 还已描述了用于从重组细胞培养物制备和分离双特性抗体片段的多种技术。例如,已使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体。(Kostelny 等人, J. Immunol. 148:1547-1553, 1992)。通过基因融合将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽连接于两个不同抗体 Fab' 部分。在铰链区还原抗体同二聚体以形成单体,随后再氧化以形成抗体异二聚体。该方法还可用于产生抗体同二聚体。由 Hollinger 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993) 描述的“双链抗体”技术已提供了用于制备双特异性抗体片段的可选择机制。

[0293] 片段包含通过连接体连接于轻链可变区 (V_L) 的重链可变区 (V_H),所述连接体太短以至于不允许在相同链上的两个结构域配对。因此,一个片段上的 V_H 和 V_L 结构域被迫与另一个片段的互补 V_L 和 V_H 结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。用于通过使用单链 Fv (sFv) 二聚体制备双特异性抗体片段的另一个策略也已被报导。参见 Gruber 等人, J. Immunol. 152:5368(1994)。

[0294] 可选择地,双特异性抗体可以是如 Zapata 等人, Protein Eng. 8:1057-62(1995) 中所述产生的“线性抗体”。线性抗体包含一对串联 Fd 片段 (V_H - C_H1 - V_H - C_H1),所述片段形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性或单特性的。

[0295] 在其它实施方案中,双特异性抗体可以是整合重组抗体 (CRAb)。整合重组抗体识别抗原的邻近且非重叠的表位,并且柔性足以同时结合两个表位 (Neri 等人, J Mol Biol. 246:367-73,1995)。

[0296] 还涉及具有超过两个效价的抗体。例如,可制备三特异性抗体。(Tutt 等人, J. Immunol. 147:60,1991)。

[0297] 嵌合和人源化抗体

[0298] 因为嵌合或人源化抗体在人中的免疫原性不及亲代鼠单克隆抗体,因此可将它们用于治疗过敏性反应风险低得多的人。

[0299] 可使用本领域已知的标准方法（参见 Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81,6841-6855(1984) ;和 Boulianne 等人, Nature 312,643-646, (1984)）产生嵌合单克隆抗体,其中将小鼠单克隆抗体的可变 Ig 结构域与人恒定 Ig 结构域融合。虽然某些嵌合单克隆抗体已证明在人中免疫原性较低,但小鼠可变 Ig 结构域仍可导致明显的人抗小鼠反应。

[0300] 可通过多种方法获得人源化抗体,所述方法包括例如:(1) 将非人互补决定区(CDR) 移植至人构架和恒定区上(在本领域称为通过“CDR 移植”人源化的过程)(2) 移植完整非人可变结构域,但通过替换表面残基用人样表面“掩饰(cloaking)”它们(在本领域称为“镶饰(veneering)”的过程),或可选择地,(3) 替换经确定不可能不利地影响抗原结合或蛋白质折叠但可能在人环境中减小免疫原性的位置上的人氨基酸(在本领域称为 HUMAN ENGINEERING™ 的过程)。在本发明中,人源化抗体包括“人源化的”、“镶饰的”和“HUMANENGINEERED™”抗体。这些方法公开于例如 Jones 等人, Nature 321 :522525(1986) ;Morrison 等 人, Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 81 :6851-6855(1984) ;Morrison 和 Oi, Adv. Immunol., 44 :65-92(1988) ;Verhoeyer 等 人, Science 239 :1534-1536(1988) ;Padlan, Molec. Immun. 28 :489-498(1991) ;Padlan, Molec. Immunol. 31 :169-217(1994) ;Kettleborough 等 人, Protein Eng. 4 :773-783(1991) ;Studnicka 等 人, 美国专利 No. 5, 766, 886 ;Studnicka 等人 (Protem Eng 7 :805-814, 1994) 中,将所述每一个文献通过引用并入本文。

[0301] 来自转基因动物的人抗体

[0302] 还可使用转基因动物来产生针对抗原的人抗体,所述转基因动物不具有内源免疫球蛋白产生并且经改造包含人免疫球蛋白基因座。例如, W098/24893 公开了具有人 Ig 基因座的转基因动物,其中所述动物因内源重链和轻链基因座的失活而不产生功能性内源免疫球蛋白。W0 91/00906 也公开了能够对免疫原产生免疫反应的转基因非灵长类哺乳动物宿主,其中所述抗体具有灵长类动物恒定区和 / 或可变区,并且其中编码内源免疫球蛋白的基因座被置换或灭活。W0 96/30498 和美国专利 No. 6, 091, 001 公开了 Cre/Lox 系统用于修饰哺乳动物的免疫球蛋白基因座例如以替换所有或部分恒定区或可变区来形成经修饰的抗体分子的用途。W0 94/02602 公开了具有已失活的内源 Ig 基因座和功能性人 Ig 基因座的非人哺乳动物宿主。美国专利 No. 5, 939, 598 公开了制备转基因小鼠的方法,在所述转基因小鼠中,小鼠不存在内源重链,并且表达包括一个或多个异基因 (xenogeneic) 恒定区的外源免疫球蛋白基因座。也参见,美国专利 No. 6, 114, 598、6, 657, 103 和 6, 833, 268。

[0303] 通过使用上述转基因动物,可对所选择的抗原产生免疫反应,可从动物取出抗体产生性细胞,将其用于产生分泌人单克隆抗体的杂交瘤。免疫方案、佐剂等在本领域是已知的,并且用于例如转基因小鼠的免疫,如 W0 96/33735 中所描述的。本公布公开了抗多种抗原(包括 IL-6、IL-8、TNF α 、人 CD4、L 选择蛋白、gp39 和破伤风毒素)的单克隆抗体。可测试单克隆抗体的抑制或中和相应蛋白质的生物活性或生理作用的能力。W0 96/33735 公开了来源于用 IL-8 免疫的转基因小鼠的免疫细胞的抗 IL-8 单克隆抗体阻断 IL-8 诱导的嗜中性粒细胞的功能。具有对用于免疫转基因动物的抗原具有特异性的人单克隆抗体也公开于 W0 96/34096 和第 20030194404 号美国专利申请 ;和第 20030031667 号美国专利申请中。

[0304] 对于制备单克隆抗体是有用的其它转基因动物包括 Medarex HuMAb-MOUSE®, 描述于美国专利 No. 5, 770, 429 和 Fishwild 等人 (Nat. Biotechnol. 14 :845-851(1996))

中,所述动物包含来自未重排的编码人抗体的重链和轻链的人抗体基因的基因序列。HuMAb-MOUSE®的免疫使得能够产生针对抗原的完全人单克隆抗体。

[0305] 同样地,Ishida 等人 (Cloning Stem Cells. 4 :91-102(2002)) 也描述了包含百万碱基大小的人 DNA 片段并且整合了完整人免疫球蛋白 (hIg) 基因座的 TransChromo 小鼠 (TCMOUSE™)。TCMOUSE™具有 hIg 的完全多样性库 (diverse repertoire),包括 IgG 的所有亚类 (IgG1-G4)。利用不同人抗原免疫 TCMOUSE™产生包括人抗体的抗体反应。

[0306] 也参见 Jakobovits 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551(1993);Jakobovits 等人, Nature, 362 :255-258(1993);Bruggermann 等人, Year in Immunol., 7 :33(1993);和美国专利 No. 5, 591, 669、美国专利 No. 5, 589, 369、美国专利 No. 5, 545, 807;和第 20020199213 号美国专利公布。第 20030092125 号美国专利公布描述了用于使动物的免疫反应偏向期望的表位的方法。人抗体也可通过体外活化的 B 细胞来产生(参见美国专利 No. 5, 567, 610 和 5, 229, 275)。

[0307] 来自展示技术的人抗体

[0308] 用于制备重组人抗体基因库和在丝状噬菌体表面上展示编码的抗体片段的技术的发展已提供了用于直接制备人抗体的方法。通过噬菌体技术产生的抗体在细菌中产生为抗原结合片段 - 通常 Fv 或 Fab 片段,从而缺乏效应子功能。可通过下列两个策略之一引入效应子功能:可将片段改造成完全抗体以在哺乳动物细胞中表达,或将其改造成具有能够触发效应子功能的第二结合位点的双特异性抗体片段。

[0309] 本发明涉及用于产生抗原特异性抗体或其抗原结合部分的方法,所述方法包括步骤:在噬菌体上合成人抗体的文库,用抗原或其部分筛选文库,分离结合抗原的噬菌体,然后从该噬菌体获得抗体。例如,用于制备用于噬菌体展示技术的抗体文库的一个方法包括下列步骤:用抗原或其抗原性部分免疫包含免疫球蛋白基因座的非人动物以产生免疫反应,从经免疫的动物提取抗体产生性细胞;从提取的细胞分离 RNA,逆转录 RNA 以产生 cDNA,使用引物扩增所述 cDNA,将所述 cDNA 插入噬菌体展示载体以便在噬菌体上表达抗体。本发明的重组抗原特异性抗体可以这样获得。在另一个实例中,可从未被免疫的动物提取抗体产生性细胞,从提取的细胞分离 RNA,将其逆转录以产生 cDNA,使用引物扩增所述 cDNA,将其插入噬菌体展示载体以便在噬菌体上表达抗体。噬菌体展示过程模拟通过在丝状噬菌体的表面上展示抗体库,随后通过它们对选择的抗原的结合来选择噬菌体进行的免疫选择。一种这样的技术公开于 WO 99/10494 中,该专利申请描述了使用这样方法分离 MPL 和 msk 受体的高亲和力和功能性激动性抗体。本发明的抗体可通过筛选使用人 V_L 和 V_H cDNA(从来源于人淋巴细胞的 mRNA 制备的)制备的重组组合抗体文库,优选 scFv 噬菌体展示文库来分离。用于制备和筛选此类文库的方法在本领域是已知的。参见例如,美国专利 No. 5, 969, 108。存在商购可得的用于产生噬菌体展示文库的试剂盒(例如,Pharmacia 重组噬菌体抗体系统,目录编号 (catalog no.) 27-9400-01 和 Stratagene SurfZAP.™。噬菌体展示试剂盒,目录编号 240612)。还存在可用于产生和筛选抗体展示文库的其它方法和试剂(参见,例如,Ladner 等人的美国专利 No. 5, 223, 409;Kang 等人的第 WO 92/18619 号 PCT 公布;Dower 等人的第 WO 91/17271 号 PCT 公布;Winter 等人的第 WO 92/20791 号 PCT 公布;Markland 等人的第 WO92/15679 号 PCT 公布;Breitling 等人的第 WO 93/01288 号 PCT 公布;McCafferty 等人的第 WO 92/01047 号 PCT 公布;Garrard 等人的第 WO92/09690

号 PCT 公布;Fuchs 等人 (1991)Bio/Technology 9:1370-1372;Hay 等人 (1992)Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85;Huse 等人 (1989)Science246:1275-1281;McCafferty 等人, Nature(1990)348:552-554;Griffiths 等人 (1993)EMBO J 12:725-734;Hawkins 等人 (1992)J. Mol. Biol. 226:889-896;Clackson 等人 (1991)Nature 352:624-628;Gram 等人 (1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580;Garrad 等人 (1991)Bio/Technology 9:1373-1377;Hoogenboom 等人 (1991)Nuc Acid Res 19:4133-4137;和 Barbas 等人 (1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982。

[0310] 在一个实施方案中,为了分离特异于抗原的具有期望的结合特征的人抗体,筛选人 V_H 和 V_L 文库以选择具有期望的特异性的抗体片段。用于该方法的抗体文库优选是如本文中和本领域中所描述的制备和筛选的 scFv 文库 (McCafferty 等人,第 W0 92/01047 号 PCT 公布, McCafferty 等人 (Nature348:552-554(1990)) 和 Griffiths 等人 (EMBO J 12:725-734(1993)))。优选使用抗原筛选 scFv 抗体文库。

[0311] 可选择地,通过 PCR 对抗体的 Fd 片段 (V_H-C_H1) 和轻链 (V_L-C_L) 进行分开克隆,然后将其在重组噬菌体展示文库中进行随机重组,随后可针对与特定抗原的结合选择所述文库。Fab 片段在噬菌体表面上表达,即物理地连接于编码它们的基因。因此,通过抗原结合选择 Fab 共选择了 Fab 编码序列,随后扩增所述序列。通过几轮抗原结合和再扩增 (称为淘选的方法),富集特异于抗原的 Fab,最终将其分离。

[0312] 在 1994 年,描述了称为“导向选择 (guided selection)”的用于人源化抗体的方法。导向选择利用噬菌体展示技术的力量来人源化小鼠单克隆抗体 (参见 Jespers, L. S. 等人, Bio/Technology 12,899-903(1994))。为此,可将小鼠单克隆抗体的 Fd 片段与人轻链文库组合展示,随后利用抗原选择所得的杂交 Fab 文库。小鼠 Fd 片段从而提供了指导选择的模板。随后,将所选择的人轻链与人 Fd 片段文库组合。所得文库的选择产生完整人 Fab。

[0313] 已描述了多种用于从噬菌体展示文库衍生人抗体的方法 (参见,例如, Hoogenboom 等人, J. Mol. Biol., 227:381(1991);Marks 等人, J. Mol. Biol., 222:581-597(1991);美国专利 No. 5,565,332 和 5,573,905;Clackson, T. 和 Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184(1994))。具体地,来源于噬菌体展示文库的抗体的体外选择和进化已变成强大的工具 (参见 Burton, D. R., and Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57,191-280(1994);Winter, G. 等人, Annu. Rev. Immunol. 12,433-455(1994);第 20020004215 号美国专利公布和 W0 92/01047;第 20030190317 号美国专利公布;和美国专利 No. 6,054,287 和 5,877,293。

[0314] Watkins, “Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift,” Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display:Methods and Protocols 178:187-193(2002) 和 2003 年 3 月 6 日公布的第 20030044772 号美国专利公布,描述了通过捕获提升 (capture lift) 筛选噬菌体表达的抗体文库或其它结合分子的方法,一种包括将候选结合分子固定在固体载体上的方法。

[0315] 通过表达为噬菌体蛋白质融合物 (例如,利用 M13 基因 III) 的一条链与表达为可溶性片段的互补链的缔合将 Fv 片段展示在噬菌体的表面。预期噬菌体可以是丝状噬菌体例如 I 类噬菌体:fd、M13、f1、If1、lke、ZJ/Z、Ff 之一和 II 类噬菌体 Xf、Pf1 和 Pf3 之一。噬菌体可以是 M13 或 fd 或其衍生物。

[0316] 当选择初始人 V_L 和 V_H 区段时,可进行“混合与匹配”实验(其中针对抗原结合筛选不同的初始选择的 V_L 和 V_H 区段对)以选择优选 V_L/V_H 对组合。此外,为了提高抗体的质量,可在类似于在天然免疫反应过程中负责抗体的亲和力成熟的体内体细胞突变过程的过程中,优选在 V_H 和 / 或 V_L 的 CDR1、CDR2 或 CDR3 区域的任一个内随机突变优选 V_L/V_H 对的 V_L 和 V_H 区段。该体外亲和力成熟可通过使用分别与 V_H CDR1、CDR2 和 CDR3 或 V_L CDR1、CDR2 和 CDR3 互补的 PCR 引物扩增 V_L 和 V_H 区来实现,所述引物在某些位置“掺入”4 个核苷酸碱基的随机混合物以便所得的 PCR 产物编码已将随机突变引入 V_H 和 / 或 V_L CDR3 区的 V_L 和 V_H 区段。重新筛选这些随机突变的 V_L 和 V_H 区段与抗原的结合。

[0317] 在从重组免疫球蛋白展示文库筛选和分离抗原特异性抗体后,可从展示包装(例如,从噬菌体基因组)回收编码选择的抗体的核酸,利用标准重组 DNA 技术将其亚克隆入其它表达载体。如果需要,还可进一步操纵所述核酸以产生本发明的其它抗体形式,如下文中所描述的。为了表达通过筛选组合文库分离的重组人抗体,将编码所述抗体的 DNA 克隆入重组表达载体,并且引入哺乳动物宿主细胞,如本文中所描述的。

[0318] 设想可在细菌或宿主细胞的增变株中进行噬菌体展示法。增变株是具有引起在其内复制的 DNA 相对于其亲代 DNA 被突变的遗传缺陷的宿主细胞。示例性增变株为 NR9046mutD5 和 NR9046mut T1。

[0319] 还设想可在辅助噬菌体中进行噬菌体展示法。这是用于感染包含缺陷噬菌体基因组的细胞并且用于互补缺陷的噬菌体。缺陷噬菌体基因组可以是去除了某些功能编码基因序列的噬菌粒或噬菌体。辅助噬菌体的实例为 M13K07、M13K07 基因 III no. 3、超级噬菌体;和展示或编码融合至外壳蛋白的结合分子的噬菌体。

[0320] 还可使用 WO 92/01047 中公开的层次二元组合法(hierarchical dual combinatorial approach)通过噬菌体展示筛选法来产生抗体,在所述层次二元组合法中将包含 H 或 L 链克隆的单个菌落用于感染编码其它链(L 或 H)的克隆的完全文库,然后按照噬菌体展示技术例如本文中公开的那些噬菌体展示技术选择所得的两链特异性结合成员。该技术也公开于 Marks 等人(Bio/Technology, 10 :779-783(1992))中。

[0321] 用于在病毒、酵母、微生物和哺乳动物细胞的表面展示多肽的方法也已被用于鉴定抗原特异性抗体。参见,例如,美国专利 No. 5, 348, 867 ;5, 723, 287 ;6, 699, 658 ;Wittrup, Curr Op. Biotech. 12 :395-99(2001) ;Lee 等人, Trends in Biotech. 21(1)45-52(2003) ;Surgeeva 等人, Adv. Drug Deliv. Rev. 58 :1622-54(2006)。还可将抗体文库与酵母蛋白质例如凝集素,有效地模拟由免疫系统的 B 细胞产生的抗体的细胞表面展示。

[0322] 除了噬菌体展示法外,还可使用体外展示法(包括核糖体展示和 mRNA 展示)来分离抗体(Amstutz 等人, Curr. Op. Biotech. 12 :400-05(2001))。使用核糖体展示来进行多肽的选择描述于 Hanes 等人(Proc. Natl Acad Sci USA, 94 :4937-4942(1997))以及属于 Kawasaki 的美国专利 No. 5, 643, 768 和 5, 658, 754 中。核糖体展示也用于抗体的快速大规模突变分析。选择性诱变法也提供了产生具有增加的活性的抗体的方法,可使用核糖体展示技术选择所述抗体。

[0323] 改变的糖基化

[0324] 还可产生抗体变体,所述抗体变体相对于亲代抗体具有改变的糖基化模式,例如,缺失一个或多个在所述抗体中发现的糖基化部分,和 / 或添加了一个或多个不存在于所述

抗体中的糖基化位点。

[0325] 抗体的糖基化通常是 N-连接的或 O-连接的。N-连接的是指糖部分与天冬酰胺残基的侧链的连接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸（其中 X 是除了脯氨酸外的任何氨基酸）是糖部分至天冬酰胺侧链的酶促连接的识别序列。这些三肽序列的任一个在多肽中的存在产生潜在的糖基化位点。因此，可通过改变氨基酸序列（以便其包含一个或多个这些三肽序列）来将 N-连接的糖基化位点加入抗体。O-连接的糖基化是指糖 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一连接至羟氨基酸，最常见地丝氨酸或苏氨酸（虽然也可使用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸）的连接。可通过将一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基插入原始抗体的序列来将 O-连接的糖基化位点加入抗体。

[0326] Fc 聚糖影响 IgG 与 Fc 受体和 C1q 的结合，从而对于 IgG 的效应子功能是非常重要的。可产生具有修饰的 Fc 聚糖和改变的效应子功能的抗体变体。例如，具有修饰的末端糖例如唾液酸、核心岩藻糖、二等分 N-乙酰葡萄糖胺和甘露糖残基的抗体可具有改变的对 Fc RIIIa 受体的结合和改变的 ADCC 活性。在其它实例中，具有修饰的半乳糖残基的抗体可具有改变的对 C1q 的结合和改变的 CDC 活性 (Raju, Curr. Opin. Immunol. 20 :471-78(2008))。

[0327] 还涉及了不具有岩藻糖基化或减小的岩藻糖基化的抗体分子，所述抗体分子展示提高的 ADCC 活性。实现该目的多种方法在本领域是已知的。例如，ADCC 效应子活性通过抗体与 Fc γ RIII 受体的结合介导，已显示所述结合依赖于 CH2 结构域的 Asn-297 上的 N-连接的糖基化的糖结构。非岩藻糖基化的抗体以增加的亲和力结合该受体并且比天然岩藻糖基化抗体更高效地触发 Fc γ RIII-介导的作用。例如，CHO 细胞（其中 α -1,6-岩藻糖基转移酶已被敲除）中非岩藻糖基化抗体的重组产生导致具有增加至 100 倍的 ADCC 活性的抗体 (Yamane-Ohnuki 等人, Biotechnol Bioeng. 87 :614-22(2004))。可通过减小岩藻糖基化途径中该酶或其它酶的活性，例如通过 siRNA 或反义 RNA 处理、改造细胞系以敲除所述酶或利用选择性糖基化抑制剂进行培养 (Rothman 等人, Mol Immunol. 26 :1113-23(1989)) 来实现类似作用。某些宿主细胞品系例如 Lec13 或大鼠杂交瘤 YB2/0 细胞系天然产生具有更低的岩藻糖化水平的抗体。(Shields 等人, J Biol Chem. 277 :26733-40(2002) ;Shinkawa 等人, J Biol Chem. 278 :3466-73(2003))。平分的糖类水平的增加（例如通过在过表达 GnTIII 酶的细胞中重组产生抗体）也被确定增加 ADCC 活性 (Umana 等人, Nat Biotechnol. 17 :176-80(1999))。已预测两个岩藻糖残基中只要一个不存在可足以增加 ADCC 活性 (Ferrara 等人, Biotechnol Bioeng. 93 :851-61(2006))。

[0328] 具有改变的效应子功能的变体

[0329] 设想了抗体的其它修饰。在一个方面，可能期望在效应子功能方面对本发明的抗体进行修饰，例如，以增强抗体治疗癌症的功效 (Natsume 等人, Drug Design Dev' t&Ther. 3 :7-16(2009))。示例性效应子功能包括 C1q 结合 ;CDC ;Fc 受体结合 ;ADCC ;吞噬作用 ;细胞表面受体（例如 B 细胞受体 ;BCR）的下调等。用于修饰效应子功能的一个方法教导 :可将半胱氨酸残基引入 Fc 区，从而允许在该区域中形成链间二硫键。所产生的同二聚体抗体可具有增强的内化能力和 / 或增强的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。参见 Caron 等人 (J. Exp Med. 176 :1191-1195(1992)) 和 Shopes, B. (J. Immunol. 148 :2918-2922(1992))。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体也可使用如 Wolff 等人 (Cancer Research 53 :2560-2565(1993)) 中描述的异双功能交联剂来制

备。可选择地, 可对抗体进行工程改造, 所述抗体具有双 Fc 区, 从而可具有增强的补体溶解 (complement lysis) 和 ADCC 能力。参见 Stevenson 等人 (Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989))。此外, 已显示 CDR 内的序列可引起抗体结合 MHC II 类并且触发不想要的辅助 T 细胞反应。保守置换可允许抗体保持结合活性但丧失其触发不想要的 T 细胞反应的能力。也参见 Steplewski 等人 (Proc Natl Acad Sci U S A. 85:4852-56 (1998)), 所述文献描述了其中鼠可变区与人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 和 $\gamma 4$ 恒定区连接的嵌合体。

[0330] 在本发明的某些实施方案中, 可能期望使用抗体片段而非完整抗体来例如增加肿瘤穿透。在该情况下, 可能期望修饰抗体片段以增加其血液半衰期, 例如, 给抗体片段添加分子例如 PEG 或其它水溶性聚合物 (包括多糖聚合物) 以延长半衰期。这也可以例如通过将清道夫受体结合表位整合入抗体片段 (例如, 通过抗体片段的适当区域的突变或通过将表位整合入肽标签, 随后例如, 通过 DNA 或多肽合成将其在任一末端或在中间融合至抗体片段) 来实现 (参见, 例如, W096/32478)。

[0331] 清道夫受体结合表位优选构成区域, 在所述区域中来自 Fc 结构域的一个或两个环的任一或多个氨基酸残基被转移至抗体片段的类似部分。甚至更优选地, 转移来自 Fc 结构域的一个或两个环的 3 个或更多个残基。更优选的, 表位获得 Fc 区 (例如, IgG 的) 的 CH2 结构域, 并且被转移至抗体的 CH1、CH3 或 VH 区或超过一个这样的区域。可选择地, 表位获自 Fc 区的 CH2 结构域并且被转移至抗体片段的 C_L 区或 V_L 区或两者。也参见第 W0 97/34631 号和第 W0 96/32478 号国际申请, 所述申请描述了 Fc 变体和它们与清道夫受体的相互作用。

[0332] 因此, 本发明的抗体可包含人 Fc 部分、人共有 Fc 部分或保留与 Fc 清道夫受体相互作用的能力的其变体, 包括其中参与二硫键合的半胱氨酸被修饰或除去的变体, 和 / 或其中在 N 末端添加 met 和 / 或除去 N 端 20 个氨基酸的一个或多个, 和 / 或除去与补体相互作用的区域例如 C1q 结合位点, 和 / 或除去 ADCC 位点的变体 [参见, 例如, Sarmay 等人, Molec. Immunol. 29:633-9 (1992)]。

[0333] 先前的研究将人和鼠 IgG 上针对 FcR 的结合位点定主要位至由 IgG 残基 233-239 组成的下铰链区 (lower hinge region)。其它研究提出另外的宽广区段, 例如 Gly316-Lys338 (对于 Fc 受体 I)、Lys274-Arg301 和 Tyr407-Arg416 (对于人 Fc 受体 III), 或在下铰链外部发现少数特异性残基例如 Asn297 和 Glu318 (对于与鼠 Fc 受体 II 相互作用的鼠 IgG2b)。人 IgG1Fc 片段与人 Fc 受体 IIIA 的 3.2-Å 晶体结构的报导将 IgG1 残基 Leu234-Ser239、Asp265-Glu269、Asn297-Thr299 和 Ala327-Ile332 描绘为参与结合 Fc 受体 IIIA。已有人基于晶体结构建议, 除了下铰链 (Leu234-Gly237) 外, IgG CH2 结构域环 FG (残基 326-330) 和 BC (残基 265-271) 中的残基可能在结合 Fc 受体 IIA 中起作用。参见 Shields 等人 (J. Biol. Chem., 276:6591-604 (2001)), 通过引用整体并入本文。Fc 受体结合位点内的残基的突变可导致改变的效应功能, 例如改变的 ADCC 或 CDC 活性, 或改变的半衰期。如上所述, 潜在突变包括一个或多个残基的插入、缺失或置换, 包括利用丙氨酸的置换、保守置换、非保守置换或利用来自不同 IgG 亚类的相同位置上的对应氨基酸残基的置换 (例如用该位置上的对应的 IgG2 残基置换 IgG1 残基)。

[0334] Shields 等人报导参与结合所有人 Fc 受体的 IgG1 残基位于靠近铰链的 CH2 结构域内并且落入如下两个种类: 1) 可直接与所有 FcR 相互作用的位置包括 Leu234-Pro238、

Ala327 和 Pro329 (和可能地 Asp265) ;2) 影响糖类性质或位置的位置, 包括 Asp265 和 Asn297。影响与 Fc 受体 II 的结合的其它 IgG1 残基如下: (最大影响) Arg255、Thr256、Glu258、Ser267、Asp270、Glu272、Asp280、Arg292、Ser298, 和 (不太影响) His268、Asn276、His285、Asn286、Lys290、Gln295、Arg301、Thr307、Leu309、Asn315、Lys322、Lys326、Pro331、Ser337、Ala339、Ala378 以及 Lys414。A327Q、A327S、P329A、D265A 和 D270A 减弱结合。除了上文中针对所有 FcR 鉴定的残基外, 减弱与 Fc 受体 IIIA 的结合 40% 或更多的其它 IgG1 残基如下: Ser239、Ser267 (仅有 Gly)、His268、Glu293、Gln295、Tyr296、Arg301、Val303、Lys338 和 Asp376。增强与 FcRIIIA 的结合的变体包括 T256A、K290A、S298A、E333A、K334A 和 A339T。Lys414 显示对于 FcRIIA 和 FcRIIB 的结合减弱 40%, Arg416 显示对于 FcRIIA 和 FcRIIIA 的结合减弱 30%, Gln419 显示与 FcRIIA 的结合减弱 30%, 以及与 FcRIIB 的结合减少 40%, Lys360 显示与 FcRIIIA 的结合增强 23%。也参见 Presta 等人 (Biochem. Soc. Trans. 30 :487-490, 2001), 通过引用整体并入本文, 所述文献描述了 IgG1 的 Fc 区中的几个位置, 所述位置被发现只增强对特定 Fc γ 受体 (R) 的结合或者同时增强与一种类型的 Fc γ R 的结合并且减弱与另一种类型的结合。随后在体外抗体 - 依赖细胞性细胞毒性 (ADCC) 测定中测试所选择的具有增强的与 Fc γ RIIIa 的结合的 IgG1 变体, 当使用外周血单核细胞或天然杀伤细胞时, 所述变体显示 ADCC 的增强。

[0335] 例如, 美国专利 No. 6, 194, 551 (通过引用整体并入本文) 描述了具有改变的效应子功能的变体, 所述变体在人 IgG Fc 区中, 在氨基酸位置 329、331 或 322 (使用 Kabat 编号) 上包含突变, 所述突变中的一些展示减弱的 C1q 结合或 CDC 活性。作为另一个实例, 美国专利 No. 6, 737, 056 (通过引用整体并入本文) 描述了具有改变的效应子或 Fc- γ -受体结合的变体, 所述变体在人 IgG Fc 区中, 在氨基酸位置 238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 或 439 (使用 Kabat 编号) 上包含突变, 所述变体中的一些展示与减弱的 ADCC 或 CDC 活性相关的受体结合特征。在这些突变中, 氨基酸位置 238、265、269、270、327 或 329 上的突变据称减弱与 FcRI 的结合, 氨基酸位置 238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438 或 439 上的突变据称减弱与 FcRII 的结合, 氨基酸位置 238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435 或 437 上的突变据称减弱与 FcRIII 的结合。

[0336] 美国专利 No. 5, 624, 821 (通过引用整体并入本文) 报导了鼠抗体的 C1q 结合活性可通过突变重链的氨基酸残基 318、320 或 322 来改变并且置换残基 297 (Asn) 导致裂解活性的去除。

[0337] 第 20040132101 号美国专利公布 (通过引用整体并入本文) 描述了在氨基酸位置 240、244、245、247、262、263、266、299、313、325、328 或 332 (使用 Kabat 编号) 或位置 234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330 或 332 (使用 Kabat 编号) 上具有突变的变体, 其在位置 234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、

313、325、327、328、329、330 或 332 上的突变可减弱 ADCC 活性或减弱与 Fc γ 受体的结合。

[0338] Chappel 等人 (Proc Natl Acad Sci U S A. 88 :9036-40(1991)) (通过引用整体并入本文) 报导了 IgG1 的嗜细胞活性是其重链 CH2 结构域的固有特性。IgG1 的氨基酸残基 234-237 的任何残基上的点突变显著降低或消除其活性。需要将所有 IgG1 残基 234-237 (LLGG) 置换至 IgG2 和 IgG4 中来恢复完全结合活性。观察到包含完整 ELLGGP 序列 (残基 233-238) 的 IgG2 抗体比野生型 IgG1 更具活性。

[0339] Isaacs 等人 (J Immunol. 161 :3862-9(1998)) (通过引用整体并入本文) 报导了对于 Fc γ R 结合是至关重要的基序内的突变 (谷氨酸 233 至脯氨酸、亮氨酸 / 苯丙氨酸 234 至缬氨酸以及亮氨酸 235 至丙氨酸) 完全阻止靶细胞的消耗。谷氨酸 318 至丙氨酸的突变消除了小鼠 IgG2b 的效应功能并且也减弱了人 IgG4 的效力。

[0340] Armour 等人 (Mol Immunol. 40 :585-93(2003)) (通过引用整体并入本文) 鉴定了 IgG1 变体, 所述变体与激活性受体 Fc γ RIIa 反应的效率为野生型 IgG1 的至多 1/10, 但其对抑制性受体 Fc γ RIIb 的结合只减弱至 1/4。氨基酸 233-236 的区域中和 / 或氨基酸位置 327、330 和 331 上产生突变。也参见 WO 99/58572, 通过引用整体并入本文。

[0341] Xu 等人 (J Biol Chem. 269 :3469-74(1994)) (通过引用整体并入本文) 报导了将 IgG1 Pro331 突变成 Ser 显示减弱的 C1q 结合并且实际上消除了裂解活性。相反地, 在 IgG4 中用 Pro 置换 Ser331 赋予 IgG4Pro331 变体部分裂解活性 (40%)。

[0342] Schuurman 等人 (Mol Immunol. 38 :1-8(2001)) (通过引用整体并入本文) 报导了将参与重链间键形成的铰链半胱氨酸之一 Cys226 突变成丝氨酸导致更稳定的重链间连接。将 IgG4 铰链序列 Cys-Pro-Ser-Cys 突变成 IgG1 铰链序列 Cys-Pro-Pro-Cys 也显著地稳定了重链之间的共价相互作用。

[0343] Angal 等人 (Mol Immunol. 30 :105-8(1993)) (通过引用整体并入本文) 报导了将 IgG4 的氨基酸位置 241 上的丝氨酸突变成脯氨酸 (在 IgG1 和 IgG2 的该位置上发现的) 导致均质性抗体的产生以及与原始嵌合 IgG4 相比较延长了血清半衰期和改善了组织分布。

[0344] 共价修饰

[0345] 本发明的多肽结合剂例如抗体的共价修饰也包括在本发明的范围内。如果适用, 则可通过化学合成或通过酶促或化学切割多肽结合剂来制备它们。可通过将多肽结合剂的靶向氨基酸残基与有机衍生剂 (其能够与选择的侧链或 N- 或 C- 末端残基反应) 反应来将多肽结合剂的其它类型的共价修饰引入分子。

[0346] 半胱氨酰残基最常见地与 α - 卤代乙酸 (和对应的胺) 例如氯乙酸或氯乙酰胺反应, 以产生羧甲基或羧酰胺甲基衍生物。还通过与溴化三氟丙酮 (bromotrifluoroacetone)、 α - 溴 - β - (5- 咪唑基) 丙酸、氯乙酰磷酸酯 (chloroacetyl phosphate)、N- 烷基马来酰亚胺、3- 硝基 - 2- 吡啶基二硫化物、甲基 2- 吡啶基二硫化物、对 - 氯汞苯甲酸酯、2- 氯汞基 - 4- 硝基苯酚或氯 - 7- 硝基苯并 - 2- 氧杂 - 1,3- 二唑反应来衍生半胱氨酰残基。

[0347] 通过在 pH 5.5-7.0 下与焦碳酸二乙酯反应来衍生组氨酰残基, 因为该试剂对组氨酰基侧链具有相对特异性。对溴苯酰甲基溴也是有用的; 优选在 pH6.0 下于 0.1M 二甲基胍酸钠中进行反应。

[0348] 将赖氨酰残基和氨基末端残基与琥珀酸酐或其它羧酸酐反应。利用这些试剂的衍

生化具有反转赖氨酸残基的电荷的作用。用于衍生含 α -氨基的残基的其它适当试剂包括酰亚胺酯例如：甲基吡啶亚胺甲酯、磷酸吡哆醛、吡哆醛、硼氯化物 (chloroborohydride)、三硝基苯磺酸、O-甲基异脲、2,4-戊二酮和转氨酶 - 催化的与乙醛酸的反应。

[0349] 通过与一种或几种常规试剂 (其中有苯基乙二醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮和茚三酮) 反应来修饰精氨酸残基。精氨酸残基的衍生化因胍功能性基团的高 pKa 而需要在碱性条件下进行反应。此外,这些试剂可与赖氨酸的基团以及精氨酸 ϵ -氨基反应。

[0350] 可进行酪氨酸残基的特异性修饰,通过与芳香族重氮化合物或四硝基甲烷反应将光谱标记引入酪氨酸残基是特别有趣的。最常见地,将 N-乙酰咪唑和四硝基甲烷用于分别形成 O-乙酰酪氨酸种类和 3-硝基衍生物。使用 ^{125}I 或 ^{131}I 碘化酪氨酸残基以制备用于放射性测定的标记蛋白质。

[0351] 通过与碳二亚胺 ($\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$) 反应选择性修饰羧基侧基团 (天冬氨酸基或谷氨酸基),其中 R 和 R' 是不同的烷基例如 1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳二亚胺或 1-乙基-3-(4-氮阳离子-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺。此外,通过与铵离子反应将天冬氨酸残基和谷氨酸残基转化成天冬酰胺残基和谷氨酰胺残基。

[0352] 谷氨酰胺残基和天冬酰胺残基通常脱去酰胺基分别成为对应的谷氨酸残基和天冬氨酸残基。这些残基在中性或碱性条件下脱去酰胺基。这些残基的脱酰胺形式落在本发明的范围内。

[0353] 其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酸或苏氨酸残基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化 (T.E.Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H.Freeman&Co., San Francisco, 第 79-86 页 (1983))、N 末端胺的乙酰化和任何 C 末端羧基的酰胺化。

[0354] 另一种类型的共价修饰包括将糖苷化学或酶促偶联至多肽结合剂。这些方法是有利的,因为它们不需要在宿主细胞中产生多肽结合剂,所述宿主细胞具有进行 N- 或 O- 连接的糖基化的糖基化能力。取决于所使用的偶联模式,可将糖连接于 (a) 精氨酸和组氨酸, (b) 游离羧基, (c) 游离巯基例如半胱氨酸的巯基, (d) 游离羟基例如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的羟基, (e) 芳香族残基例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的残基,或 (f) 谷氨酰胺的酰胺基。这些方法描述于 W087/05330 和 Aplin 及 Wriston (CRC Crit. Rev. Biochem., 第 259-306 页 (1981)) 中。

[0355] 可化学地或酶促地除去存在于多肽结合剂上的任何糖部分。化学去糖基化需要将多肽结合剂暴露于化合物三氟甲磺酸或等同化合物。该处理导致大多数或所有糖 (除连接糖 (N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺)) 的切割,同时保持多肽结合剂完整。化学去糖基化由 Hakimuddin 等人 (Arch. Biochem. Biophys. 259 :52 (1987)) 和 Edge 等人 (Anal. Biochem. 118 :131 (1981)) 进行了描述。可通过使用多种内切 - 和外切 - 糖苷酶来进行多肽结合剂上的糖部分的酶促切割,如由 Thotakura 等人 (Meth. Enzymol. 138 :350 (1987)) 描述的。

[0356] 另一个类型的多肽结合剂的共价修饰包括将多肽结合剂连接至多种非蛋白质聚合物之一,例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧乙烯多元醇、聚氧乙烯山梨醇、聚氧乙烯葡萄糖、聚氧乙烯甘油、聚氧烯烃 (polyoxyalkylene) 或多糖聚合物例如葡聚糖。此类方法在本领域是已知的,参见,例如美国专利 No. 4,640,835 ;4,496,689 ;4,301,144 ;4,670,417 ;

4, 791, 192、4, 179, 337、4, 766, 106、4, 179, 337、4, 495, 285、4, 609, 546 或 EP 315 456。

[0357] 衍生物

[0358] 衍生物是指通过这样的技术如遍在蛋白化、标记（例如，利用放射性核素或多种酶）、共价聚合物连接例如 PEG 化（利用聚乙二醇的衍生化）和通过化学合成氨基酸例如鸟氨酸进行的插入或置换修饰的多肽结合剂，包括抗体。本发明的多肽结合剂的衍生物例如抗体也用作治疗剂并且可通过本发明的方法产生。

[0359] 可共价地或通过离子键、范德瓦尔斯力或氢键将缀合的部分整合入或连接于多肽结合剂，例如放射性核素或被链霉抗生物素蛋白识别的生物素化核苷酸的整合。

[0360] 可将聚乙二醇 (PEG) 连接于多肽结合剂以提供更长的体内半衰期。PEG 基团可具有任何方便的分子量并且可以是线性或分枝的。PEG 的平均分子量优选在约 2 千道尔顿 (“kD”) 至约 100kDa 之间，更优选约 5kDa 至约 50kDa 之间，最优选约 5kDa 至约 10kDa 之间。通常通过 PEG 部分上的天然或改造的反应性基团（例如，醛、氨基、巯基或酯基团）与多肽结合剂上的反应性基团（例如，醛、氨基或酯基团）的酰化或还原烷基化来将 PEG 基团连接于本发明的多肽结合剂。可使用本领域公知的技术将 PEG 部分添加至多肽结合剂。参见例如，第 WO 96/11953 号国际公布和美国专利 No. 4, 179, 337。

[0361] 多肽结合剂与 PEG 的连接通常在水相中发生并且可通过反向分析 HPLC 容易地监控。通过制备型 HPLC 纯化 PEG 化的物质，然后通过分析 HPLC、氨基酸分析和激光解吸质谱法进行表征。

[0362] 抗体缀合物

[0363] 可将多肽结合剂可以以“裸露”或未缀合的形式进行施用，或可被直接缀合于其它治疗剂或诊断剂，或可被间接缀合于包含这样的其它治疗剂或诊断剂的载体聚合物。在某些实施方案中，将多肽结合剂缀合于细胞毒性剂例如化学治疗剂、药物、生长抑制剂、毒素（例如，细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素或其片段）或放射性同位素（例如，放射性缀合物）。适当的化学治疗剂包括：道诺霉素、多柔比星、甲氨蝶呤和长春地辛 (Rowland 等人 (1986) 同上)。适当的毒素包括：细菌毒素例如白喉毒素；植物毒素例如蓖麻蛋白；小分子毒素例如格尔德霉素 (Mandler 等人 J. Natl. Cancer Inst. 92(19) : 1573-81(2000) ;Mandler 等人 Bioorganic&Med. Chem. Letters10 :1025-1028(2000) ;Mandler 等人 Bioconjugate Chem. 13. 786-91(2002))、类美坦素 (EP 1391213 ;Liu 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 :8618-23(1996))、auristatins(Doronina 等人, Nat. Biotech. 21 :778-84(2003) 和加利车霉素 (Lode 等人 Cancer Res. 58 :2928(1998) ;Hinman 等人 Cancer Res. 53 :3336-3342(1993))。

[0364] 可通过使用放射性同位素、亲和力标记（例如生物素、抗生物素蛋白等）、酶促标记（例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等）荧光或发光或生物发光标记（例如 FITC 或罗丹明等）、顺磁性原子等可检测地标记多肽结合剂。用于实现这样的标记的方法在本领域是公知的；例如，参见 (Sternberger, L. A. 等人, J. Histochem. Cytochem. 18 :315(1970) ;Bayer, E. A. 等人, Meth. Enzym. 62 :308(1979) ;Engval, E. 等人, Immunol. 109 :129(1972) ;Goding, J. W. J. Immunol. Meth. 13 :215(1976))。

[0365] 多肽结合剂部分的缀合描述于美国专利 No. 6, 306, 393 中。一般技术也描述于 Shih 等人, Int. J. Cancer 41 :832-839(1988) ;Shih 等人, Int. J. Cancer46 :

1101-1106(1990);和 Shih 等人,美国专利 No. 5,057,313 中。该一般方法包括将具有氧化的糖部分的多肽结合剂组分与载体聚合物(所述载体聚合物具有至少一个游离胺官能团并且载有多个药物、毒素、螯合剂、硼附加物或其它治疗剂)反应。该反应导致初始希夫碱(亚胺)键合,所述键合可通过还原成仲胺以形成终缀合物来稳定。

[0366] 载体聚合物可以是例如氨基葡聚糖或至少 50 个氨基酸残基的多肽。用于将药物或其它试剂缀合于载体聚合物的多种技术在本领域是已知的。可使用多肽载体而非氨基葡聚糖,但多肽载体应当在链中具有至少 50 个氨基酸残基,优选 100-5000 个氨基酸残基。至少某些氨基酸应当是赖氨酸残基或谷氨酸或天冬氨酸残基。赖氨酸残基的侧氨基以及谷氨酰胺和天冬酰胺的侧羧基方便用于连接药物、毒素、免疫调节剂、螯合剂、硼附加物或其它治疗剂。适当的多肽载体的实例包括多聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、其共聚物,以及此类氨基酸与其它氨基酸例如丝氨酸的混合聚合物,以给所得的负荷载体 (loaded carrier) 和缀合物赋予期望的溶解度性质。

[0367] 可选择地,可通过将多肽结合剂组分与治疗剂直接缀合来制备缀合的多肽结合剂。一般方法与间接缀合方法类似,除了将治疗剂直接连接于氧化的多肽结合剂组分外。例如,可将多肽结合剂的糖部分连接于聚乙二醇以延长半衰期。

[0368] 可选择地,可通过二硫键形成或使用异双功能交联剂例如 N-琥珀酰 3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯 (SPDP) 将治疗剂连接在还原的抗体组分的铰链区。Yu 等人, Int. J. Cancer 56 :244(1994)。用于这样的缀合的一般技术在本领域是公知的。参见,例如, Wong, Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking(CRC Press 1991);Upeslakis 等人, " Modification of Antibodies by Chemical Methods", 于 Monoclonal Antibodies: Principles and Applications 中, Birch 等人(编), 第 187-230 页 (Wiley-Liss, Inc.1995);Price, " Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies ", 于 Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application 中, Ritter 等人(编),第 60-84 页 (Cambridge University Press 1995)。多种双功能蛋白质偶联剂在本领域是已知的,例如 N-琥珀酰亚胺基-(2-吡啶二硫代)丙酸酯 (SPDP)、亚氨基硫杂环戊烷 (IT)、酰亚胺酯的双功能衍生物(例如己二酸二甲酯 HCL)、活性酯(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(例如戊二醛)、双-叠氮基化合物(例如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双-重氮基衍生物(例如双-(对-重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如 2,6-二异氰酸甲苯酯)和双-活性氟化合物(例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

[0369] 抗体融合蛋白

[0370] 制备抗体融合蛋白的方法在本领域是公知的。参见,例如,美国专利 No. 6,306,393。包含白细胞介素-2 部分的抗体融合蛋白由 Boleti 等人, Ann. Oncol. 6 :945(1995), Nicolet 等人, Cancer Gene Ther. 2 :161(1995), Becker 等人, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 93 :7826(1996), Hank 等人, Clin. Cancer Res. 2 :1951(1996) 和 Hu 等人, Cancer Res. 56 :4998(1996) 进行了描述。此外, Yang 等人 (Hum. Antibodies Hybridomas 6 :129(1995)) 描述了包含 F(ab')₂ 片段和肿瘤坏死因子 α 部分的融合蛋白。抗体融合蛋白的其它实例由 Pastan 等人, Nat. Reviews Cancer 6 :559-65(2006) 进行了描述。

[0371] 用于制备其中重组分子包含一个或多个抗体组分和毒素或化学治疗剂的抗

体-毒素融合蛋白的方法对于本领域技术人员来说是已知的。例如,抗体-假单胞菌外毒素 A 融合蛋白已由 Chaudhary 等人, *Nature* 339 :394(1989), Brinkmann 等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 88 :8616(1991), Batra 等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 89 :5867(1992), Friedman 等人, *J. Immunol.* 150 :3054(1993), Wells 等人, *Int. J. Can.* 60 :137(1995), Fominaya 等人, *J. Biol. Chem.* 271 :10560(1996), Kuan 等人, *Biochemistry* 35 :2872(1996) 和 Schmidt 等人, *Int. J. Can.* 65 :538(1996) 进行了描述。包含白喉毒素部分的抗体-毒素融合蛋白已由 Kreitman 等人, *Leukemia* 7 :553(1993), Nicholls 等人, *J. Biol. Chem.* 268 :5302(1993), Thompson 等人, *J. Biol. Chem.* 270 :28037(1995) 和 Vallera 等人, *Blood* 88 :2342(1996) 进行了描述。Deonarain 等人, *Tumor Targeting* 1 :177(1995) 已描述了具有 RNA 酶部分的抗体-毒素融合蛋白,而 Linardou 等人, *Cell Biophys.* 24-25 :243(1994) 产生了包含 DNA 酶 I 组分的抗体-毒素融合蛋白。白树毒素在 Wang 等人,第 209 届美国化学会会议的摘要 (Abstracts of the 209th ACS National Meeting), Anaheim, Calif., 1995 年 4 月 2-6 日,第 1 部分, BIOT005 的抗体-毒素融合蛋白中用作毒素部分。作为另外的实例, Dohlsten 等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 91 :8945(1994) 报导了包含葡萄球菌属肠毒素-A 的抗体-毒素融合蛋白。

[0372] 适合用于此类融合蛋白的制备的毒素的实例是蓖麻蛋白、相思豆毒蛋白、核糖核酸酶、DNA 酶 I、葡萄球菌肠毒素 A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞杆菌内毒素。参见,例如, Pastan 等人, *Cell* 47 :641(1986) 和 Goldenberg, CA—A *Cancer Journal for Clinicians* 44 :43(1994)。其它适当的毒素对于本领域技术人员来说是已知的。

[0373] 还可通过将抗体缀合于前体药物活化酶来将本发明的抗体用于 ADEP,所述酶可将前体药物(例如,肽基化学治疗剂,参见 W081/01145)转化成活性抗癌药物。参见,例如, W088/07378 和美国专利 No. 4, 975, 278。

[0374] 用于 ADEPT 的免疫缀合物的酶组分包括任何酶,所述酶能够以这样的方式作用于前体药物以将其转化成其更具活性的细胞毒性形式。

[0375] 用于本发明的酶包括但不限于:碱性磷酸酶;芳基硫酸酯酶;胞嘧啶脱氨酶、5-氟尿嘧啶;蛋白酶,例如沙雷氏菌属 (*serratia*) 蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(例如组织蛋白酶 B 和 L);D-丙氨酰羧肽酶;碳水化合物-切割酶例如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸酶; β -内酰胺酶;和青霉素酰胺酶,例如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。可选择地,具有酶促活性的抗体,在本领域也称为抗体酶,可用于将本发明的前体药物转化成游离活性药物(参见,例如, Massey, *Nature* 328 :457-458(1987))。可如在本文中对于抗体酶至肿瘤细胞群体的递送所描述的制备抗体-抗体酶缀合物。

[0376] 可利用本领域公知的技术例如使用上面论述的异双功能交联剂将上述酶共价连接至抗体。可选择地,可使用本领域公知的重组 DNA 技术(参见,例如, Neuberger 等人, *Nature* 312 :604-608(1984))构建融合蛋白,所述融合蛋白包含连接于本发明的酶的至少功能性活性部分的本发明的抗体的至少抗原结合区。

[0377] 药物组合物的配制

[0378] 为了给人或测试哺乳动物施用本发明的多肽结合剂,优选将多肽结合剂配制于包含一种或多种无菌的药理学上可接受的载体的无菌组合物中。短语“药理学上或药理上可接受

的”是指当使用下文中描述的本领域公知的途径施用时不产生过敏或其它不利反应的分子实体和组合物。“药学上可接受的载体”包括任何或所有临床上有用的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。

[0379] 利用任何适当的方法（包括胃肠外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内施用）施用多肽结合剂，并且若需要用于局部治疗，进行病灶内施用。胃肠外输注包括静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、真皮内或皮下施用。优选通过注射，最优选静脉内或皮下注射给药，部分取决于施用是短暂的还是长期的。设想了其它施用方法，包括局部，特别是经皮、透膜（transmucosal）、直肠、口服或局域施用（例如通过靠近期望位点放置的导管）。

[0380] 包含本发明的多肽结合剂作为活性成分的本发明的药物组合物可包含无菌的药学上可接受的载体或添加剂，取决于施用途径。此类载体或添加剂的实例包括水、药学上可接受的有机溶剂、胶原、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯树胶、酪蛋白、明胶、琼脂、双甘油、甘油、丙二醇、聚乙二醇、凡士林、石蜡、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白（HSA）、甘露醇、山梨醇、乳糖、药学上可接受的表面活性剂等。所使用的添加剂选自但不限于上述试剂或其组合（适当时），取决于本发明的剂型。对于溶液或乳剂，适当的载体包括例如水溶液或酒精 / 水溶液、乳剂或悬浮液，包括盐水和缓冲的介质。胃肠外媒介物可包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖（Ringer's dextrose）、葡萄糖和氯化钠、乳酸化林格氏或不挥发油。静脉内媒介物可包括不同的添加剂、防腐剂或液体、营养物或电解质补充剂。多种水性载体是适当的，例如无菌磷酸盐缓冲盐水、抑菌水、水、缓冲水、0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸等，并且可包括其它蛋白质以增强稳定性，例如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等，将其经历温和化学修饰等。

[0381] 通过将具有期望的纯度的多肽结合剂与任选的生理上可接受载体、赋形剂或稳定剂（雷明顿药物科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）第 16 版，Osol, A. 编（1980））混合，以冻干制剂或水溶液的形式制备多肽结合剂的治疗性制剂以用于贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所使用的剂量和浓度上对受者是无毒的，并且包括缓冲剂例如磷酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐和其它有机酸；抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂（例如十八烷基二甲基苄基氯化铵；六甲氯铵；苯扎氯铵、苄索氯铵；苯酚、丁醇或苯甲醇；对羟基苯甲酸烷基酯例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间-甲酚）；低分子量（少于约 10 个残基）多肽；蛋白质，例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它糖类包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂例如 EDTA；糖例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐抗衡离子例如钠；金属络合物（例如，Zn-蛋白质络合物）；和 / 或非离子型表面活性剂例如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇（PEG）。

[0382] 还可将活性成分捕获在例如通过凝聚技术或通过界面聚合法（例如，分别在胶体给药系统（例如，脂质体、白蛋白微胶囊、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊）中或粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-（甲基丙烯酸甲酯）微胶囊）制备的微胶囊中。此类技术公开于雷明顿药物科学，第 16 版，Osol, A. 编 1980）中。

[0383] 待用于体内施用的制剂必须是无菌的。这可通过经无菌滤膜过滤来容易地实现。

[0384] 多肽结合剂在此类制剂中的浓度变化很大,例如从按重量计低于约 0.5% (通常为或至少约为 1%) 至多至 15 或 20%,并且根据所选择的具体施用模式,主要基于终体积、粘度等来进行选择。因此,可制备用于胃肠外注射的典型药物组合物达到包含 1ml 无菌缓冲水和 50mg 多肽结合剂。可制备用于静脉内输注的典型组合物达到包含 250ml 的无菌林格氏溶液和 150mg 多肽结合剂。用于制备可胃肠外施用的组合物的实际方法对于本领域技术人员来说是已知的或显然的并且更详细地描述于例如雷明顿药物科学,第 15 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980) 中。多肽结合剂的有效剂量在 0.01mg 至 1000mg/kg 体重 / 施用的范围内。

[0385] 药物组合物可以以无菌注射水溶液、油性悬浮液、用于无菌注射液或分散体的临时制备的分散体或无菌粉剂的形式存在。可使用上文中提及的那些适当的分散剂或湿润剂或悬浮剂按照已知的技术配制悬浮液。无菌注射制剂也可以是非毒性胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射液或悬浮液,例如 1,3- 丁二醇中的溶液。载体可以是包含例如水、乙醇、多元醇 (例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其适当的混合物、植物油、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液的溶剂或分散介质。此外,无菌不挥发油被常规地用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可使用任何温和的不挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸例如油酸用于注射剂的制备。

[0386] 在所有情况下,所述形式必须是无菌的并且必须具有达到可容易注射的程度的流动性。可以例如通过使用包衣例如卵磷脂,通过在分散体的情况下维持所需颗粒大小以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。其在制造和贮存条件下必须是稳定的并且必须进行防腐处理以抗微生物例如细菌和真菌的污染作用。可利用各种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下,期望包含等渗剂例如糖或氯化钠。注射组合物的延长的吸收可通过在组合物中使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来产生。

[0387] 可用摄取或吸收促进剂配制用于施用的组合物来增强它们的功效。此类促进剂包括例如水杨酸盐、甘胆酸盐 / 亚油酸盐、乙醇酸盐、抑肽酶、杆菌肽、SDS、癸酸盐等。参见,例如,Fix (J. Pharm. Sci., 85 :1282-1285 (1996)) 以及 Oliyai 和 Stella (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32 :521-544 (1993))。

[0388] 生物物理测定法

[0389] 可通过分子生物物理方法研究复杂的生物事件,所述方法将它们当作可按照统计力学、热力学和化学动力学来理解的相互作用单元的系统。

[0390] 核磁共振 (NMR)、等温滴定量热法、动态光散射、表面等离子共振技术、双偏振极化干涉测量技术通常用于评估化合物是否有效地结合测试抗原、结合的化学计量学、任何相关的构象变化和鉴定混杂抑制剂。(参见,例如,Correia J. J&Detrich H. W. (编)“Biophysical Tools for Biologists 第 2 卷.”Methods in Cell Biol 89(2) (2008))。

[0391] 荧光成像技术以及电子显微镜术、x- 射线晶体学、核磁共振谱法 (NMR spectroscopy) 和原子力显微镜术 (AFM) 通常用于使生物意义的结构可见。可使用技术例如双偏振极化干涉测量技术和圆二色性测量结构的构象变化。使用光摄或 AFM 进行的分子的直接操纵也可用于监控其中力和距离都在纳米尺度上的生物事件。

[0392] 用于生物物理学的许多技术是可获得的,包括:原子力显微镜术、生物光子学(biophotonics)、生物传感器和生物电子学、钙成像、量热法、圆二色性、低温生物学、双偏振极化干涉测量技术、电生理学、荧光、显微术、神经影像、中子自旋回波光谱法(neutron spin echo spectroscopy)、膜片钳、核磁共振波谱法、x-射线晶体学。在某些实施方案中,本发明的测定可利用可检测的部分。可检测的部分可以是能够直接或间接产生可测量信号例如放射性、生色、发光或荧光信号的任何部分,其可用于定量样品中结合的可检测的部分或标记的量。本领域已知的可检测的标记包括放射性同位素例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I 、电致化学发光标记(electrochemiluminescent label)(例如与底物结合的基于钌(Ru)的催化剂等)、发光或生物发光标记(例如,钍、钷)、荧光或化学发光化合物,例如异硫氰酸荧光素、罗丹明或萤光素、酶(例如,酶,例如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶)、比色标记(colorimetric label)例如胶体金、有色玻璃或塑料珠粒(例如,聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等)、顺磁性原子或磁化剂、电子致密试剂、含荧光染料的纳米或微米珠粒、纳米晶体、量子点、量子珠粒、纳米标签(nanotag)、具有荧光标记的树状聚合物、微转发器(micro-transponder)、电子供体分子或分子结构或反光颗粒。微粒可以是纳米晶体或量子点。纳米晶体是吸收光的光子,随后再发射不同波长的光子的物质(荧光基团)。此外,可将其其它荧光标记或第二抗体缀合于纳米晶体。纳米晶体可来源于例如 Invitrogen 和 Evident Technologies(Troy, N. Y.) 商购获得。其它标记包括 E)-5-[2-(甲氧羰基)乙烯基]胞苷,其为非荧光分子,当经历紫外线(UV)照射时产生产物 3- β -D-呋喃核糖基-2,7-二氧代吡啶并[2,3-d]嘧啶,该产物显示强荧光信号。条形码标记描述于第 20070037195 号美国专利公布中。

[0393] 本领域已知的多种测定法可用于本发明,例如竞争性结合测定法、直接和间接夹心测定法、免疫沉淀测定法、荧光共振能量转移(FRET)、电子免疫测定法、表面等离子共振技术(SPR)和纳米颗粒衍生的技术。

[0394] 竞争性结合测定法依赖于标记的标准(例如,多肽结合剂所结合的抗原或其片段)与测试样品中的抗原竞争结合多肽结合剂的能力。测试样品中抗原的量与与抗体结合的标准的量成反比。为了有利于测定结合的标准的量,抗体在竞争前或竞争后通常是溶解的,以便结合的抗原可方便地与未结合的抗原分离。在可选择的实施方案中,竞争性结合测定法测量经标记的多肽结合剂与未标记的多肽结合剂竞争结合抗原或其片段的能力。

[0395] 夹心测定法通常包括使用两种抗体,每一种抗体能够结合待检测和/或定量的蛋白质的不同免疫原性部分或表位。在夹心测定法中,测试样品中的分析物通常被固定在固相上的第一多肽结合剂结合,然后第二多肽结合剂结合所述分析物,从而形成不溶性三部分复合物。参见,例如,美国专利 No. 4,376,110。第二多肽结合剂本身可使用可检测部分标记(直接夹心测定法)或可使用用可检测的部分标记的抗免疫球蛋白抗体(间接夹心测定法)来测量。例如,一种类型的夹心测定法是酶联免疫吸附测定法(ELISA),在该情况下可检测部分是酶。参见,例如,第 18 章,Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel 等人编, John Wiley & Sons, New York, NY(1995)。

[0396] 测定法的另一个实例包括荧光共振能量转移(FRET)发射。例如,用 FRET 供体分子标记一种化合物并且用 FRET 受体分子标记其结合伴侣,或反之亦然。当结合在结合伴侣之间发生时,FRET 供体和 FRET 受体分子被拉拢靠近并且以特定波长发射荧光。可使用窄

带通滤波器阻挡除标记的波长之外的所有波长。FRET 分子对在本领域是商购可得的（例如，来自 Invitrogen），并且可按照制造商的方案来进行使用。使用光学成像技术例如 CCD 照相机来检测 FRET 发射。

[0397] 测定法的另一个实例是生物发光共振能量转移 (BRET)，例如其使用 WO/06086883 中描述的生物传感器。

[0398] 另一种类型的测定法包括利用电子供体进行标记。用电子供体标记一种分子，并且将相互作用分子与电触点结合，或反之亦然。当结合在结合伴侣之间发生时，标记提供电子给电触点。参见，例如，Ghindilis, *Biochem Soc Trans.* 28 :84-9 (2000) 和 Dai 等人，*Cancer Detect Prev.* 29 :233-40 (2005)，其描述了用于电子免疫测定的方法。随后利用 A 至 D (模拟 - 数字转换) 交换器读取电触点并且进行定量。电子计数越高，相互作用发生越多。

[0399] 能够单分子检测的标记的一个实例是将等离子共振颗粒 (PRP) 作为光学报告子，如 Schultz 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 :996-1001 (2000)，通过引用并入本文) 中所描述的。PRP 是例如直径 40-100nm 的金属纳米颗粒，其因金属中的导电电子的集体共振（表面等离子共振）而散射光。与纳米颗粒相关的等离子共振的强度、峰波长和谱带宽度取决于颗粒的大小、形状和材料组成以及局部环境。通过在制备过程中影响这些参数，可形成具有在可见光谱范围内的任何地方的散射峰的 PRP。对于球形 PRP，峰散射波长和散射效率随半径增大而增加，提供了用于产生不同着色标记的方法。通过在制备过程中调整球的终半径，例如可重现性地制备峰值散射波长在数纳米的靶向波长内的银球群。因为 PRP 是明亮的但为纳米尺度的，因此可将它们用作单分子检测的指示剂；即，视野中结合的 PRP 的存在可表示单个结合事件。表面等离子共振检测器系统的实例是 BIAcore 测定系统。参见，例如，Malmquist, *J Molec Recognition*, 7 :1-7 (1994)。

[0400] 还可使用纳米颗粒衍生的技术来检测分子相互作用。参见，例如，Ao 等人，*Anal Chem.* 78 :1104-6 (2006)，其描述了金纳米颗粒猝灭，Tang 等人，*Biosens Bioelectron.* 2005 年 11 月 30 日，其描述了抗体检测中的 SiO₂/Au 纳米颗粒表面，和 Lieu 等人，*J Immunol Methods.* 307 :34-40 (2005)，其描述了用于固体基质室温磷光免疫测定法 (solid substrate-room temperature phosphorescence immunoassay) (SS-RTP-IA) 的含二溴荧光素的二氧化硅纳米颗粒。

[0401] 可在测定中进行结合亲和力或结合率参数的任何上述测量，在所述测定中第一组分、第二组分和多肽结合剂的一种或多种存在于溶液中，或在所述测定中将第一组分、第二组分和多肽结合剂的一种或多种连接于固相（共价地或非共价地），或在所述测定中将第一组分、第二组分和多肽结合剂的一种或多种在细胞表面上表达。第一组分和 / 或第二组分各自本身可以是多个化合物的复合物。

[0402] 溶液相生物物理测定法

[0403] 在某些实施方案中，可使用溶液相生物物理测定法鉴定动力学调节剂。“溶液相”测定法意指其中待测量的相互作用在液体中发生的测定法。溶液亲和力测定法是测量平衡时相互作用的平衡离解常数（也称为“亲和力”或“ K_D ”）的有用工具。如果调节剂可结合形成复合物（例如，受体 / 相互作用）的蛋白质并且调节剂改变该相互作用的亲和力，那么可将溶液亲和力测定法用于测定在动力学调节剂存在和不存在的条件下相互作用的亲和力。

其也可用于测量在复合物组分的固定浓度范围内对调节剂的剂量反应。

[0404] 本公开内容提供了用于平衡溶液亲和力测量的新型应用。此类测定法使得能够基于它们差异调节靶 - 信号转导伴侣相互作用的亲和力的能力表征和分层前导候选物 (lead candidate)。先前关于监控因抑制性或位阻型药物引起的亲和力的减小的工作利用过量的与结合伴侣之一预复合的药物, 并且通常利用表面等离子共振 (SPR) 技术或放射配体测定技术来进行。在某些方面, 本公开内容允许使用结合只有存在当配体或受体或其它蛋白质结合伴侣已形成它们的复合物时才存在的表位的药物。

[0405] 实施例 1 描述了用于使用模型蛋白质 - 蛋白质复合物进行平衡溶液亲和力测量的方法。所有可逆结合相互作用在理论上可以是可通过药物调节的和可在与所述形式非常相似的测定中监控的亲和力。配体和受体在测定形式中的作用可被转换并且这样做可用作系统正确发挥功能的验证。可使用任何相互作用伴侣对而不仅仅是受体 - 配体对。

[0406] 此类技术用作用于定量待研究的游离 (未结合的) 结合伴侣的定量的高敏感性方法。当利用固定浓度的一种结合伴侣 (B) 进行该分析并且另一种结合伴侣 (A) 在高于和低于相互作用的 K_D 值的至少一个对数的宽浓度范围内变化时, 则可测量未结合的 B 的量, 然后将数据与产生相互作用的 K_D 值的模型拟合。可在不同浓度的动力学调节药物存在或不存在的条件下进行该实验, 从而允许详细地表征亲和力增强。通过测量游离结合伴侣 B 而非目的药物, 可不依赖于药物 - 复合物相互作用测定 A-B 相互作用亲和力的监控。

[0407] 此类测定可用于筛选调节结合相互作用的亲和力的药物。这可用于药物疗法和更灵敏的诊断和分析测定法的开发。此外, 所述测定允许甚至对于识别只在复合物已形成后才产生的表位的药物, 详尽地表征亲和力调节的程度。本公开内容允许针对它们在亲和力调节中的效力分层和分级多种药物候选物。

[0408] 固相生物物理测定法

[0409] 在某些实施方案中, 可使用固相生物物理测定法鉴定动力学调节剂。“固相”意指可将本发明的测试化合物或复合物组分附着于其上的非水性、惰性基质。本文中包括的固相的实例包括部分或完全由玻璃 (例如, 可控孔度玻璃)、多糖 (例如, 琼脂糖)、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇、金属硅、金属合金、anopol、聚合物、尼龙或微阵列例如蛋白质芯片形成的固相。在某些实施方案中, 取决于上下文, 固相可包括测试板的孔、过滤器、膜、色谱树脂或珠粒。该术语还包括分开的颗粒的不连续固相, 例如美国专利 No. 4, 275, 149 中描述的那些固相。

[0410] 在某些实施方案中, 使用本领域已知的任何方法将测试化合物或复合物组分附着至或连接至固相, 所述方法包括但不限于共价键合或通过选择性结合对 (例如, 生物素与抗生物素蛋白、谷胱甘肽与 GST、组氨酸标签与 Ni) 的间接附着。

[0411] 许多固相测定形式在本领域是已知的, 包括微量培养板、珠粒、树脂、芯片等。例如, FMAT™ (荧光微体积数字图象测定技术 (fluorimetric microvolume assay technology); Applied Biosystems, Foster City, CA) 系统可使用与具有荧光标记的或生物素化的配体的珠粒结合的细胞或受体。这具有用作完全均相测定形式的潜能。可使用 Luminex™ 系统 (Luminex Corp., Austin, TX) 应用实际上相同的形式, 其中使用相似的基于珠粒的系统。FMAT™ 与 Luminex™ 测定形式之间的主要差异在于检测的方法。Luminex™ 平台使珠粒流过光学流动池以测量来自珠粒的荧光发射, FMAT™ 使非常靠近微量板的孔的底的

狭窄平面中的荧光成像。可选择地电化学发光系统因它们的高灵敏性和均相的能力而可容易地适用于筛选亲和力调节剂。这些系统,例如 Tricorder™(BioVeris Corp., Washington D. C.) 使用钨衍生的电化学检测技术。可针对该系统进行最优化的测定形式与其它系统相似,主要差异在于电化学发光标记技术和检测仪器的使用。

[0412] 适当的测定法包括经设计用以检测相互作用调节剂对标记的(例如,生物素化的)靶对于其结合伴侣的亲力的调节的基于微量板的测定法。测定可以是均相的或半均相的。均相测定是其中将所有组分混合在一起,温育,然后分析的测定。半均相测定是其中大部分反应作为复杂混合物发生,但在加入终试剂和分析之前需要清洗步骤,与典型的分步装配夹心测定法(其中加入每一种组分,然后在加入下一种组分之前将其清洗掉)相反。在某些实施方案中,测定法是免疫测定法。在某些实施方案中,测定法是半均相酶免疫测定法(EIA),其允许通过使用捕获在 EIA 板上的标记的(例如,生物素化的)分析物的量作为读出来监控结合伴侣的平衡结合常数的调节。在平衡,或几乎平衡的环境中在充分低于饱和度的标记的分析物的浓度上,平衡亲和力常数的变化导致或多或少的分析物保留在微量板上。

[0413] 在某些实施方案中,可如下构建用于动力学调节剂的测定法。将分析物的结合伴侣固定在微量板例如 EIA 板上。然后用无关蛋白质或封闭试剂(例如,牛血清白蛋白、酪蛋白、ChemiBlock™(Millipore, Billerica, MA)、无关 IgG 等或封闭试剂的任何组合)封闭板。在封闭后,洗涤板,然后向孔中加入调节剂、标记的分析物(例如生物素化的分析物)和缀合于可检测部分例如酶或荧光基团的第二检测试剂(例如,链霉抗生物素蛋白)的混合物。多种可检测的部分在本领域是已知的,包括酶例如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶,其作用于多种比色、荧光或发光底物。铈可用于时间分辨荧光检测,荧光基团可用于直接荧光。也可使用具有多种标记的抗配体检测抗体,这避免对生物素化配体的需要,只要所使用的抗体可检测受体-结合的配体即可。在其它实施方案中,可使用被直接缀合于荧光基团或比色酶的配体。

[0414] 通常将板温育数小时以允许多种相互作用达到平衡。温育后,洗涤板,立即用报告底物(例如比色、荧光或发光底物)进行显影。捕获在板上的标记的分析物越多,来自第二检测试剂(例如,链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶)的信号越强。如果调节剂增强相互作用的亲和力,那么结合于板的标记的(例如生物素化的)分析物的量将比在动力学调节剂不存在的情况下的所述量更大。如果调节剂减弱相互作用的亲和力,那么结合于板的标记的(例如生物素化的)分析物的量比在动力学调节剂不存在的情况下的所述量更小。

[0415] 微量板测定法可于用于以几种方式监控亲和力调节。在某些实施方案中,使用固定的多肽结合剂浓度,并且在多个孔上滴定标记的分析物。这将亲和力调节作用显示为滴定曲线相对于在动力学调节剂不存在的情况下的相同分析物的滴定曲线的偏移。

[0416] 在某些实施方案中,当在调节剂不存在的情况下进行标记的分析物的滴定时,可选用于单一标记分析物浓度测定的浓度。该浓度应当落在正好高于分析物的滴定曲线的底部(EC_{10-20})。这允许配体-受体相互作用的亲和力的任何增强调节以产生测试的信号的可容易观察的偏移。一旦确定标记的分析物的敏感浓度,可以以筛选模式进行测定,在所述筛选模式中,在单点分析中测试粗制或纯化的调节剂样品的亲和力调节作用。同样地,也在标记的分析物的固定浓度上通过调节剂的滴定进行测定以显示调节剂作用的剂量反应。

[0417] 在某些实施方案中,分析物分子的标记(例如,生物素化)可影响该分子的结合亲和力或稳定性。如果情况如此,那么可利用其中将未标记的分析物用于实验/平衡相的可选择的测定形式。当在检测前清洗掉样品时,可加入步骤(其中加入最优化量的标记的分析物进行更短的时间量,将其清洗掉,然后检测)。这可允许在平衡相中被结合的分析物用作标记的分析物的竞争剂。由于平衡步骤中预结合的未标记的分析物的量更高,从而减弱了标记的分析物结合板的能力,因此亲和力增强抗体产生更弱的测定信号。也使用第二报告分子或加入分层的检测试剂以增强信号来开发平均相测定的其它形式。这些类型的改进对于本领域技术人员来说是已知的。示例性固相亲和力测定法描述于实施例 2 中。

[0418] 基于细胞的生物物理测定法

[0419] 在某些实施方案中,使用基于细胞的生物物理测定法来鉴定动力学调节剂。“基于细胞的”意指其中待测试的信号复合物的至少一个组分存在于细胞表面上的测定法。此类测定法对于检测牵涉构象敏感性蛋白质的结合相互作用的调节剂可以是特别有利的,所述构象敏感性蛋白质是例如跨膜受体,包括:G 蛋白偶联受体(GPCR;例如蕈毒碱乙酰胆碱受体、腺苷受体、肾上腺受体、GABA 受体、血管紧张素受体、大麻素受体、胆囊收缩素受体、多巴胺受体、胰高血糖素受体、亲代谢性谷氨酸盐受体、组胺受体、嗅觉受体、阿片样物质受体、毛柳苷受体、胰泌素受体、血清素受体、生长抑素受体、钙敏感受体、趋化因子受体、1-磷酸-鞘氨醇(S1P)受体);受体酪氨酸激酶(例如红细胞生成素受体、胰岛素受体、胰岛素样生长因子 1 受体、Eph 受体);鸟苷酸环化酶受体(例如钠尿肽的受体、鸟苷蛋白受体);和离子型受体(例如烟碱样乙酰胆碱受体、甘氨酸受体、5-HT₃受体、P2X 受体)。许多人质膜受体列于由斯坦福大学的研究小组维持的人质膜受体组(Human Plasma Membrane Receptome)数据库中(Ben-Shlomo 等人,“Signaling Receptome:A Genomic and Evolutionary Perspective of Plasma Membrane receptors Involved in Signal Transduction”(Science Signaling STKE, Vol. 2003, Issue 187, pp. re9, 2003 年 6 月 17 日);也参见 Ben-Shlomo 等人, *Molecular Endocrinology* 21(8):2009-2014);公布和数据库的每一个条目通过引用整体并入本文。关于受体酪氨酸激酶受体(Grassot 等人, 2003, “RTKdb:database of receptor tyrosine kinase” *Nucleic Acids Res* 31:353-358)、G 蛋白偶联受体(Horn 等人, 2003, “GPCRDB information system for G protein-coupled receptors” *Nucleic Acids Res* 31:294-297)、嗅觉受体(Skoufos 等人, 2000, “Olfactory receptor database:a sensory chemoreceptor resource” *Nucleic Acids Res* 28:341-343)、促甲状腺素受体突变(Fuhrer 等人, 2003 “The thyrotropin receptor mutation database:2003 年更新” *Thyroid* 13:1123-1126)、细胞核受体(Patterson 等人, 1994 “The androgen receptor gene mutations database” *Nucleic Acids Res* 22:3560-3562; Gottlieb 等人, 1998, “The androgen receptor gene mutations database” *Nucleic Acids Res* 26:234-238)和内分泌干扰素受体(Nakata 等人, 1999, “Development of the receptor database(RDB):application to the endocrine disruptor problem” *Bioinformatics* 15:544-552)的数据库的其它数据库是已知的;将这些公布和数据库的每一个的每一个条目通过引用整体并入本文。由加利福尼亚-洛杉矶大学的研究小组维持的配体-受体伴侣数据库(<http://dip.doe-mbi.ucla.edu/dip/DLRP.cgi>)包括趋化因子、TNF、成纤维细胞生长因子(FGF)和 TGF β 配体的受体的亚组;将公布和数据库的

每一个条目通过引用整体并入本文。细胞信号转导数据库联盟 (Alliance for Cellular Signaling database) 包含关于许多信号转导基因的详尽信息;将公布和数据库的每一个条目通过引用整体并入本文。同样地,反应组 (reactome) 数据库 (Joshi-Tope 等人, 2005 “Reactome:a knowledgebase of biological pathways”Nucleic Acids Res 33:D428-D432) 和人蛋白质参照数据库 (Human Protein Reference Database) (Peri 等人, 2003, “Development of human protein reference database as an initial platform for approaching systems biology in humans,”Genome Res13:2363-2371) 代表了人生物学中核心途径和反应的蛋白质-蛋白质相互作用的专业来源;将这些公布和数据库的每一个的每一个条目通过引用整体并入本文。

[0420] 可使用多种细胞类型,只要待调节的信号复合物的一个组分存在于膜表面上或膜中即可。细胞可从内源或外源基因表达信号复合物组分。用于将外源基因引入宿主细胞以便宿主细胞表达所述基因产物的方法在本领域是公知的。[参见例如 Sambrook 等人, Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 第 3 版, Cold Spring Harbor, New York(2001)]。可使用贴壁或悬浮细胞。可使用原代细胞培养物、细胞系或改造的细胞系。适当的细胞类型可包括:CHO、IM-9、HEK 293 和 3T3。

[0421] 可使用几种测定形式。在某些实施方案中,可使用受体占据测定法 (receptor occupancy assay)。在某些实施方案中,对细胞进行血清饥饿以除去任何结合的配体,然后测量在配体存在或不存在的条件下调节剂对预温育的细胞的结合。可使用任何适当的检测系统来检测调节剂结合。例如,可用亲和力或表位标签标记调节剂,然后用同源结合种类例如金属离子、谷胱甘肽、抗-标签抗体检测所述调节剂。适当的标签在本领域是公知的,包括:c-myc、FLAG、poly-His、V5、HA、谷胱甘肽 S-转移酶 (GST)、钙调蛋白-结合肽 (CBP)、共价但可分离的 NorpD 肽 (CYD)、strep-标签、蛋白 C 的重链 (HPC) 和麦芽糖-结合蛋白 (MBP)。可选择地,可用缀合于检测试剂例如比色酶(例如,碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶)、荧光蛋白(例如,藻红蛋白)、荧光染料(例如, Alexa Fluor®, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) 或其它适当的试剂的特异性抗体例如物种特异性抗体或抗-Fc 抗体检测调节剂。预期正动力学调节剂对于暴露于配体的细胞显示比对于未暴露于配体的细胞更大的结合亲和力。预期负动力学调节剂对于暴露于配体细胞显示比对于未暴露于配体的细胞更低的结合亲和力。示例性受体占据测定法示于实施例 4 中。

[0422] 在其它实施方案中,标记的配体测定法可用于测量在测试多肽结合剂存在或不存在的条件下配体对细胞的差异结合。标记的配体测定法的实例描述于实施例 5 中。

[0423] 信号转导测定法

[0424] 在本公开内容的生物物理筛选中鉴定的试剂的正或负调节活性可通过测量在测试多肽结合剂存在或不存在的条件下信号转导的水平来确认。

[0425] 信号转导是指细胞籍以将一种类型的信号或刺激转化成另一种信号或刺激的任何过程。细胞内信号转导主要通过第二信使分子例如:钙;亲脂分子例如二酰甘油、神经酰胺、类花生酸和溶血磷脂酸;一氧化氮来进行。因此第二信使的水平或定位的变化可用于测量信号转导。

[0426] 常见信号转导途径的实例包括:cAMP 依赖性途径(在人中,cAMP 通过激活蛋白激酶 A 来工作)、MAPK/ERK 途径(将细胞内反应与生长因子对细胞表面受体的结合偶联的途

径);和 IP₃/DAG 途径(磷脂酶 C 切割磷脂磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(PIP₂)产生二酰甘油(DAG)和肌醇 1,4,5-三磷酸酯(IP₃)。DAG 保持与膜结合,IP₃ 作为可溶性结构被释放入细胞溶胶。随后 IP₃ 通过细胞溶胶扩散以结合 IP₃ 受体(内质网中的特定钙通道)。这些通道特异于钙并且只允许钙移动通过。这引起钙的细胞溶胶浓度增加,从而引起细胞内变化和活性的级联反应。此外,钙和 DAG 一起作用以激活蛋白激酶 C,该酶继续磷酸化其它分子,导致改变的细胞活性)。

[0427] 信号转导测定法可以例如检测细胞蛋白质的水平、定位、相互作用或翻译后修饰。基因表达也可用于测量信号转导。

[0428] 用于测量由信号复合物介导的信号转导的水平的许多测定法在本领域是可获得的。参见,例如:Dove, Nat. Methods 3:223-229(2006);

[0429] 测定的选择将取决于待调节的信号转导途径的性质。可获得的测定试剂盒包括:用于测定 c-Fos、c-Jun、G 蛋白、G 蛋白嵌合体克隆、GPCR、NF-κB p50/p65、NF-κB p65 和 p38MAPK 的试剂盒;磷蛋白测定试剂盒,例如用于磷酸苏氨酸和磷酸酪氨酸;用于测定第二信使例如钙、cAMP、cGMP 和 PIP₃ 的试剂盒;用于测定小 GTP 酶例如 Cdc42、Rac、Rap、Ras 和 Rho 的试剂盒;和 STAT 测定试剂盒(参见例如 www.biocompare.com)。可获得的试剂盒包括 ELISA 和检测非磷酸化的或磷酸化的目的蛋白质的磷酸特异性 ELISA,提取亚细胞组分的分离试剂盒,利用许多检测方法的酶促测定法和靶向测定法。试剂盒可获得用于测量途径例如与细胞凋亡、细胞骨架/细胞外基质、神经科学、一氧化氮/细胞应激、蛋白质磷酸化相关的那些途径的信号转导(参见例如 sigmaaldrich.com)。

[0430] 可在单个配体或测试化合物浓度点上测量测试化合物对信号转导活性的作用。可选择地或此外,可使用多个配体或测试化合物浓度点进行信号转导测定。

[0431] 用于测量信号转导的示例性方法包括但不限于钙流测定法(calcium flux assay)、磷酸化测定法、基因表达测定法、分子运输测定法和本领域技术人员已知的其它方法。

[0432] 用于测定因细胞信号转导而导致的细胞内钙的变化的方法在本领域是公知的。参见,例如, Walsh 等人 J. Biol. Chem., 283:16971-16984, 2008 和 Janas 等人, Clin Exp Immunol. 139:439-446, 2005。简而言之,首先用抑制细胞中钙积累的试剂培养适当的细胞,所述试剂是例如吲哚美辛、荧光染料例如 URA-2、FLUO-3、FLUO-4、钙-3、钙-4、钙-5 和钙绿-1/AM(Molecular Devices, Sunnyvale, CA), Rhod-4NW(ABD Bioquest, Sunnyvale, CA)(所述荧光染料报告因钙结合时荧光信号的改变而起的细胞内钙的增加)或生物传感器发光蛋白例如水母荧光蛋白和 PHOTINA®(Perkin Elmer, Waltham, MA)(其提供了响应细胞内钙的升高的发光信号)。随后将细胞与本发明的多肽接触,使用这样的技术如流式细胞术、荧光成像板读数器(Fluorometric Imaging Plate Reader)(FLIPR)、共聚焦荧光显微镜、钙芯片法(例如,Cell Kinetics, Lod, Israel)或本领域已知的其它钙检测法测定细胞内钙水平的变化。

[0433] 酪氨酸或丝氨酸磷酸化测定法常用于测定参与受体激活的细胞途径的激活,用于检测磷酸酪氨酸的方法在本领域可容易地获得。取样方案公开于例如 Walsh 等人, J. Biol. Chem., 283:16971-16984, 2008 和 Ausubel 等人, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, New York, N. Y., Ch. 18.4.1-18.4.7, 1997 中。将适当的细胞

与本发明的多肽接触,进行足以诱导细胞激活的时间,例如 15 至 30 分钟,将细胞裂解,在 SDS-PAGE 凝胶上分辨蛋白质。随后用抗磷酸酪氨酸或抗磷酸丝氨酸抗体探测凝胶,使用本领域已知的技术例如化学发光来估量水平、类型和蛋白质特异性磷酸化。磷酸化的诱导也可在测定法(例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)和其它基于微量板的测定法例如,可获自 Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD)的试剂盒,或来自 BD Biosciences, (San Jose, CA) 或 Millipore (Billerica, MA) 的基于流式细胞术的测定法)中,使用对磷酸酪氨酸或磷酸丝氨酸具有特异性的抗体以及对处于磷酸化状态的受体和/或其它蛋白质具有特异性的抗体来测量。

[0434] 用于检测基因表达的方法在本领域是公知的。使用本领域已知的技术测定通过将细胞与本发明的多肽接触诱导的基因表达,所述技术包括但不限于下游信号转导事件的 mRNA 或目的转录物的 Northern 印迹检测、报告基因测定法、差异显示、扣除 DNA 测定法(subtractive DNA assay)和基因表达系列分析(SAGE)(参见例如, Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N. Y., 第 4 和 25 章, 1996, 2001 和 2007)。此外,基因阵列例如 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 阵列也可用于测定细胞群体或受试者在与本发明的多肽接触后的基因表达水平。

[0435] 使用本领域已知的技术测定通过将细胞与本发明的多肽接触诱导的分子运输,所述技术包括但不限于脂筏测定法(lipid raft assay)和胞饮测定法。在一个实施方案中,将细胞与本发明的多肽接触进行足以允许信号诱导的时期,裂解细胞,通过蔗糖密度梯度离心分离脂质与非脂质材料。信号蛋白可从于蔗糖梯度中解析的不同脂筏级分分离,本发明的多肽的影响信号转导的能力通过与本发明的多肽接触之前和之后分离的脂筏的膜结合蛋白质组成的变化来测定。参见例如, Petrie 等人, *J Immunol.* 165 :1220-7, 2000 ; Chamberlain 等人, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 :5619-24, 2001 ; Janas 等人, *Clin Exp Immunol.* 139 :439-446, 2005。分子的胞饮和运输可使用电子显微镜技术,通过测量 [¹⁴C] 蔗糖的吸收 (Chow 等人, *The FASEB Journal.* 12 :823-830, 1998), 使用流式细胞术以及本领域已知的其它技术来测定。

[0436] 胞饮测定法的实例示于实施例 6 中。

[0437] 在某些方面,将生物物理筛选与功能筛选组合以鉴定只具有动力学调节性质(即无进一步的拮抗剂或激动剂性质)的多肽结合剂,或鉴定额外具有激动性或拮抗性性质的动力学调节剂。具有动力学调节和激动性性质的药物可影响内源靶的亲合力和功效,从而显著扩展了针对给定的靶的治疗干预可能性的全部组成(repertoire)。

[0438] 从现有化合物产生动力学调节药物的方法

[0439] 可在本文中描述的测定法中测试任何多肽结合剂以测定它们的动力学调节性质。在一个实施方案中,如果多肽结合剂被确定为不具有动力调节性质,那么可将其与其抗原一起用于复合物中,以进行免疫、淘选等,以获得结合其它多肽结合剂,所述多肽结合剂结合不同表位并且可以更可能地产生动力学调节作用。

[0440] 亲代多肽结合剂的变体可通过使用本领域技术人员已知的任何方法引入突变或化学衍生(包括缀合)来产生。随后可在本文中公开的测定法中筛选变体,以鉴定具有期望的动力学调节性质的那些变体。亲代多肽结合剂可以不具有动力学调节活性,或可以优选具有期望增强、减弱或以某种其它方式改变的现有动力学调节性质。

[0441] 用于产生亲代药物或药物候选物的许多方法在本领域是可获得的。

[0442] 制备氨基酸序列变体

[0443] 设想了产生包含抗体的 1、2、3、4、5 和 / 或 6 个 CDR 或多肽结合剂的经修饰的多肽组合物,其中 CDR 或非 CDR 区被改变以提供增加的对抗原的特异性或亲和力,或以提供增强的靶与其信号转导伴侣之间的结合亲和力的调节。例如,抗体 CDR 内的位点通常可以例如这样来进行连续修饰:首先用保守选择进行置换(例如,疏水性氨基酸置换不同的疏水性氨基酸),接着用更不相似的选择进行置换(例如,疏水性氨基酸置换带电荷的氨基酸),然后可在靶向位点上产生缺失或插入。例如,通过使用围绕 CDR 的保守构架序列,产生与这些共有序列互补的 PCR 引物来扩增位于引物区域之间的抗原特异性 CDR 序列。用于克隆和表达核苷酸以及多肽序列的技术在本领域已良好地建立[参见例如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 2 版, Cold Spring Harbor, New York (1989)]。将扩增的 CDR 序列连接入适当的质粒。包含 1、2、3、4、5 和 / 或 6 个克隆的 CDR 的质粒任选地包含编码连接于 CDR 的区域的额外多肽。

[0444] 筛选包含修饰的 CDR 的多肽结合剂对原始抗原的结合亲和力。此外,进一步测试抗体或多肽中和其抗原的活性的能力。例如,可如实施例中所示分析本发明的多肽以测定它们干扰靶的生物活性的能力。

[0445] 可通过在下文中更详细描述保守或非保守氨基酸置换进行修饰。“插入”或“缺失”优选在约 1 至 20 个氨基酸,更优选 1 至 10 个氨基酸的范围内。可通过使用重组 DNA 技术在抗体多肽分子中系统性产生氨基酸的置换来引入变异,然后测定所得的重组变体的活性。可在在来自不同物种的核酸(可变位置)不同的位点上或在高度保守区域(恒定区)中的位点上产生核酸改变。用于改变抗体序列和表达用于本发明的抗体多肽组合物的方法在下文中进行了更详细描述。

[0446] 氨基酸序列插入包括长度在 1 个残基至包含 100 个或更多个残基的多肽之间的氨基末端和 / 或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有 N 末端甲硫氨酰残基的抗体或与表位标签或清道夫受体表位融合的抗体(包括抗体片段)。抗体分子的其它插入变体包括在例如 N 端或 C 端与增加所述抗体的血清半衰期的多肽的融合。

[0447] 术语“已附加表位的”是指与附加表位融合的抗体。附加表位多肽具有足够的残基来提供可针对其产生抗其的抗体的表位,但仍足够短以便其不干扰抗体的活性。附加表位优选是充分唯一的以便针对其的抗体基本上不与其它表位交叉反应。适当的标签多肽通常具有至少 6 个氨基酸残基并且通常为约 8-50 个氨基酸残基(优选约 9-30 个残基)。实例包括 flu 血凝素(HA) 标签多肽及其抗体 12CA5(Field 等人, *Mol. Cell. Biol.* 8: 2159-2165(1988)); c-myc 标签及其 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 抗体(Evan 等人, *Mol. Cell. Biol.* 5: 3610-16(1985)); 以及单纯疱疹病毒糖蛋白 D(gD) 标签及其抗体(Paborsky 等人, *Protein Engineering* 3: 547-53(1990))。其它示例性标签是多组氨酸序列,通常约 6 个组氨酸残基,其允许使用镍螯合来分离所标记的化合物。本领域公知且常规使用的其它标记和标签例如 FLAG® 标签(Eastman Kodak, Rochester, NY) 包括在本发明中。

[0448] 如本文中所使用的,术语“清道夫受体结合表位”是指负责增加 IgG 分子的体内血清半衰期的 IgG 分子(例如, IgG₁、IgG₂、IgG₃ 或 IgG₄) 的 Fc 区域的表位。

[0449] 另一个类型的变体是氨基酸置换变体。此类变体使抗体分子内的至少一个氨基酸残基被除去,同时在其位置上插入不同的残基。设想了高变区或 CDR 区或构架区的任一个内的置换诱变。保守置换包括用其种类的另一个成员置换氨基酸。非保守置换包括用另一种类的成员置换这些种类之一的成员。

[0450] 基于所涉及残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和 / 或两亲性性质产生保守氨基酸置换。例如,非极性(疏水性)氨基酸包括丙氨酸(Ala, A)、亮氨酸(Leu, L)、异亮氨酸(Ile, I)、缬氨酸(Val, V)、脯氨酸(Pro, P)、苯丙氨酸(Phe, F)、色氨酸(Trp, W)和甲硫氨酸(Met, M);极性中性氨基酸包括甘氨酸(Gly, G)、丝氨酸(Ser, S)、苏氨酸(Thr, T)、半胱氨酸(Cys, C)、酪氨酸(Tyr, Y)、天冬酰胺(Asn, N)和谷氨酰胺(Gln, Q);带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸(Arg, R)、赖氨酸(Lys, K)和组氨酸(His, H);和带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸(Asp, D)和谷氨酸(Glu, E)。

[0451] 不参与维持抗体的正确构象的任何半胱氨酸残基也可通常被丝氨酸置换,以提高分子的氧化稳定性和阻止异常交联。相反地,可向抗体添加半胱氨酸键以提高其稳定性(特别地当抗体是抗体片段例如 Fv 片段时)。

[0452] 亲和成熟

[0453] 亲和成熟通常包括制备和筛选在亲代抗体的 CDR 内具有置换的抗体变体,选择具有改良的生物性质例如相对于亲代抗体更强的结合亲和力的变体。用于产生此类置换变体的常规方法是使用噬菌体展示进行的亲和力成熟。简而言之,将几个高变区位点(例如 6-7 个位点)突变以在每一个位点上产生所有可能的氨基酸置换。所产生的抗体变体作为与包装在每一个颗粒内的 M13 的基因 III 产物的融合物以单价形式从线形状噬菌体颗粒展示。随后筛选噬菌体展示的变体的生物活性(例如结合亲和力)。参见例如,WO 92/01047、WO 93/112366、WO 95/15388 和 WO 93/19172。

[0454] 目前的抗体亲和力成熟法属于两个诱变类型:随机性的和非随机性的。易错 PCR、增变细菌株(Low 等人, J. Mol. Biol. 260, 359-68(1996)) 和饱和诱变(Nishimiya 等人, J. Biol. Chem. 275:12813-20(2000); Chowdhury, P. S. Methods Mol. Biol. 178, 269-85(2002)) 是随机诱变法的典型实例(Rajpal 等人, Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 8466-71(2005))。非随机技术通常使用丙氨酸扫描或定向诱变来产生特定变体的有限集合。某些方法在下文中进行更详细地描述。

[0455] 通过淘选法进行的亲和力成熟—重组抗体的亲和力成熟通常通过在递减量的抗原存在的情况下进行几轮候选抗体的淘选来进行。每轮递减抗体量选择具有最高的针对抗原的亲和力的抗体,从而从起始材料的大库产生高亲和力的抗体。通过淘选进行的亲和力成熟在本领域是公知的并且描述于例如 Huls 等人(Cancer Immunol Immunother. 50: 163-71(2001)) 中。使用噬菌体展示技术进行亲和力成熟的方法描述于本文中其它地方并且在本领域是已知的(参见例如, Daugherty 等人, Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 2029-34(2000))。

[0456] 精确(Look-through)诱变—精确诱变(LTM)(Rajpal 等人, Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 8466-71(2005)) 提供了用于快速定位抗体结合位点的方法。关于 LTM, 代表由 20 个天然氨基酸提供的主要侧链化学的 9 个氨基酸被选择用以剖析功能侧链对抗体的所有 6 个 CDR 中的每一个位置上的结合的贡献。LTM 在 CDR 内产生一系列位置单突变,其中每

一个“野生型”残基被 9 个选择的氨基酸之一系统置换。组合突变的 CDR 以产生增加复杂性和大小而不阻止所有变体的定量展示的组合单链可变片段 (scFv) 文库。在阳性选择后, 对具有更强的结合亲和力的克隆进行测序, 定位有益的突变。

[0457] 易错 PCR—易错 PCR 包括随机化不同选择轮之间的核酸。随机化可因所使用的聚合酶的固有错误率而以较低比率发生, 但可在转录过程中使用具有高固有错误率的聚合酶 (Hawkins 等人, J Mol Biol. 226 :889-96(1992)) 通过易错 PCR (Zaccolo 等人, J. Mol. Biol. 285 :775-783(1999)) 增强。在突变循环后, 使用本领域的常规方法选择具有更强的对于抗原的结合亲和力的克隆。

[0458] DNA 改组—核酸改组是用于更短或更小的多核苷酸的体外或体内同源重组以产生变异多核苷酸的方法。DNA 改组已描述于美国专利 No. 6, 605, 449、美国专利 6, 489, 145、WO 02/092780 和 Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 :10747-51(1994) 中。通常, DNA 改组由 3 个步骤组成: 利用 DNA 酶 I 对待改组的基因进行片段化, 随机杂交片段以及在 DNA 聚合酶存在的情况下通过 PCR 装配或填充片段化基因 (有性 PCR), 和利用常规 PCR 扩增装配的产物。

[0459] DNA 改组与易错 PCR 相异在于其是反向链式反应。在易错 PCR 中, 聚合酶起始位点的数目和分子的数目呈指数增加。相反地, 在随机多核苷酸的核酸装配或改组中, 起始位点的数目和随机多核苷酸的数目 (但非大小) 随时间过去减少。

[0460] 在抗体的情况下, DNA 改组允许例如所有 CDR1 与所有 CDR2 与所有 CDR3 自由组合缔合。预期多个家族的序列可在相同的反应中被改组。此外, 改组通常保留相对顺序, 以便例如 CDR1 不会在 CDR2 的位置上被发现。稀有改组体 (shufflant) 可包含大量最好 (例如最高亲和力) 的 CDR 并且可基于它们的优良亲和力选择这些稀有改组体。

[0461] 可用于 DNA 改组的模板多核苷酸可以是 DNA 或 RNA。取决于待重组或装配的基因或更短或更小的多核苷酸的大小, 其可具有不同的长度。优选, 模板多核苷酸为 50bp 至 50kb。模板多核苷酸通常应当是双链。

[0462] 预期可在基因选择的初始步骤中, 将具有与模板多核苷酸同一的区域和与模板多核苷酸异源的区域的双链核酸多核苷酸加入模板多核苷酸。还预期可在初始步骤中将两个不同的但相关的多核苷酸模板混合。

[0463] 丙氨酸扫描—可进行丙氨酸扫描诱变来鉴定对抗原结合具有重大贡献的高变区残基。Cunningham 和 Wells (Science 244 :1081-1085(1989))。鉴定靶向残基的残基或组 (例如, 带电残基例如 arg、asp、his、lys 和 glu), 利用中性或带负电荷的氨基酸 (最常见地丙氨酸或多聚丙氨酸) 置换所述残基以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后通过置换位点或对置换位点引入另外或其它变体细化对所述置换显示功能敏感性的那些氨基酸位置。

[0464] 计算机辅助设计—可选择地, 或此外, 有益地分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体与抗原之间的接触点, 或使用计算机软件建立此类接触点的模型。此类接触残基和相邻残基是用于根据本文中建立的技术进行置换的候选残基。当产生此类变体后, 将一小组变体经历本文中描述的筛选, 选择在一个或多个相关测定中具有优良性质的抗体以进一步开发。

[0465] 动力学调节药物的有利方面

[0466] 与标准治疗例如竞争性拮抗剂、激动剂和配体置换相比较, 预期动力学调节药物

提供了作为治疗剂的几个有利方面。此类有利方面可包括下面概述的有利方面。

[0467] (1) 自限性活性。在饱和水平上,动力学调节药物因对药物的活性的不依赖于浓度的限制而具有减小的毒效应的潜能。具有有限的协同性的调节剂对它们的作用具有天花板水平,无论施用的剂量是多少。与常规药物不同,动力学调节剂达到超出其调节剂的浓度的增加对功能没有额外的作用的饱和。该作用受到调节剂与内源信号复合物组分(例如配体)之间的协同性(正或负)的程度限制。协同地确定的边界(cooperativity-defined boundary)在给药方案方面增强了动力学调节药物的安全特征。因此,可以以比常规药物频率高得多的剂量施予动力学调节药物,同时维持有利的总体安全特征,从而因维持药物的持续饱和水平的能力而提供增强的功效。

[0468] (2) 复合物组分依赖性激活/抑制限制了副作用。与激动剂或拮抗剂不同,动力学调节剂在内源复合物组分(例如配体)不存在的情况下是无活性的并且只有当适当的,例如当复合物组分(例如配体)存在时才具有活性。如果动力学调节剂不具有可察觉的激动作用或拮抗作用,那么其可提供另一种优于常规配体的有力的治疗有利优势,即只当内源激动剂存在时才选择性调高或调低反应的能力。这些性质使得动力学调节药物能够增加靶的内源时空调节。

[0469] (3) 因更大的靶选择性、组织或亚型特异性而导致的体内减小的脱靶效应。动力学调节药物可结合除复合物组分之间相互作用的位点外的位点。此类变构结合位点未面临与正构位点相同的进化压力,因此更具多样性。因此,可通过靶向变构位点获得更大的选择性。当在整个靶亚型中正构位点的序列高度保守时,这是特别有利的。

[0470] (4) 更宽的治疗窗。正动力学调节剂可区别激活和非激活的受体状态,然而激动剂无差别地激活所有受体状态。不具有可察觉的激动作用的动力学调节剂从而具有比激动剂更宽的治疗窗。此外,正动力学调节剂可具有减小的对受体脱敏和/或耐受性的易感性,这可显著扩展可能的治疗应用的范围。负动力学调节剂使得能够减弱信号转导而不完全阻断其。这可以是有益的,例如,在受体介导病理功能同时介导生理上有用的功能的情况下。

实施例

[0471] 实施例 1

[0472] 使用平衡溶液亲和力测量法测定在测试化合物存在或不存在的条件下受体-配体的亲和力

[0473] A. 模型系统

[0474] 本实施例描述了用于使用模型信号复合物,例如受体-配体复合物进行的平衡溶液亲和力测量的方法。此处所述的模型系统使用具有固定的配体的珠粒,这样可用抗受体 Cy5 配体标记的多克隆抗体测定和检测游离受体。

[0475] 将结合伴侣之一(在该情况下为配体)固定于固相,所述固相可利用自动搅拌器悬浮,从而允许形成小型柱床。通常支持物是聚甲基丙烯酸酯(PMMA)、琼脂糖或其它相容性材料的珠粒。利用荧光标记的、生物素化的或以其它方式加标签的分子检测处于其结合状态的其它结合伴侣(在该情况下为受体)。

[0476] 来自 Sapidyne Instruments 的 KinExa™ 仪可用于利用动力学排除测定法(kinetic exclusion assay)(KinExA)进行亲和力分析。简而言之,将相互作用的复合物组

分（在该情况下为受体与配体）在测试多肽结合剂存在或不存在的条件下以不同的已知浓度混合在一起，使其达到平衡。将包含配体、游离受体和配体-受体复合物的样品牵引快速通过小珠粒柱，所述小珠粒柱已偶联或包被有复合物组分之一（在该情况下为配体或等同竞争性结合剂）。游离受体与珠粒上的配体结合。然后将针对受体的第二标记例如 Cy5 荧光标记的第二抗体通过柱子。标记的第二抗体结合已结合的受体。缓冲液清洗除去过量标记，使珠粒柱上的荧光信号与原始样品中游离受体的量成正比。将珠粒床置于荧光检测器附近以允许荧光信号水平读出。

[0477] 制备一批具有固定的配体的珠粒。可使用多种珠粒类型，包括 PMMA、琼脂糖、聚苯乙烯等。可使用本领域技术人员已知的多种方法将配体偶联至珠粒。以低于预测的受体-配体相互作用的 K_D 的浓度制备受体的原液。应当用多个浓度的无配体的受体进行实验以测定可使用的受体的最低浓度。在测定中通过不断降低受体浓度，亲和力测定变得愈来愈精确。对于 500pM 的相互作用，50pM 的受体浓度应当允许精确的 K_D 测量。必须使用足够的受体来获得足够的信号和提供所需的动态范围。

[0478] 当测定最优化的受体浓度时，制备具有和不具有测试化合物的受体的 2X 原液（如果最终的期望浓度是 50pM，那么配制 100pM 的溶液）。

[0479] 产生 2X 浓度的配体的一系列稀释物。该稀释物系列应当理想地包含为相互作用的 K_D 值的至少 10 倍和至多 1/10 的点。12 个点的滴定 + 零 - 配体样品通常足以涵盖该类型的 1 : 2 稀释度系列的范围。

[0480] 将等体积的配体滴定系列与受体和受体 + 测试化合物样品混合，使这些物质达到平衡。取决于相互作用的动力学，这可花费数小时至数周的时间。如果相互作用的动力学的任何一个已知，可将它们用于估计达到平衡的时间。反应以很慢的但指数的速率接近真实平衡，这样就可能不必等待高亲和力相互作用达到真实平衡，因为在数天中其通常完成超过 95%。然而，重要地理解该关系并且批判性地评价其。

[0481] 一旦达到所需温育时间，立即制备 Cy5 标记的抗-受体抗体的稀释物。重要地标记的分子能够结合其配体（在该情况下为受体），当与其结合伴侣（在该情况下为配体）结合时，否则测定将几乎不具有或不具有信号。对于此处描述的测定形式，1 μ g/mL 的抗-受体 Cy5 标记的多克隆抗体的溶液是适当的。

[0482] 将 KinExa 样品入口管放入样品瓶内。随后 KinExa 仪分析每一个样品中的游离受体的浓度，将其以游离受体 % 对配体浓度作图。将曲线与模型拟合，测定 K_D 值。使用下列公式产生的示例性结果示于图 4 中，其中 R 是受体浓度，L 是配体浓度。

[0483]

$$R_{\text{游离}} = \frac{(R_{\text{tot}} - L_{\text{tot}} - K_D)}{2} \pm \sqrt{\frac{(L_{\text{tot}} + R_{\text{tot}} + K_D)^2}{2} - L_{\text{tot}} \cdot R_{\text{tot}}}$$

[0484] B. IL-1 β 信号复合物

[0485] IL-1 β 高效细胞因子，其驱动急性期炎症反应并且在先天性免疫应答中具有关键作用。虽然高水平的 IL-1 β 牵涉炎症性疾病例如类风湿性关节炎、炎性肠病、急性呼吸窘迫综合征和 2 型糖尿病，但低水平对胰腺 β 细胞功能、增殖和存活、肠上皮细胞存活以及对损伤的神经元反应具有有益作用。如在许多受体-配体系统中一样，IL-1 β 信号转导

是复杂的,多个配体与几个受体的膜结合和可溶性形式相互作用 (Dinarello, Arthritis Rheum. 52(7):1960-1967,2005)。IL-1 β 信号转导活性由单个受体、IL-1 受体 I 型 (IL-1RI) 和其共受体 IL-1 受体辅助蛋白 (IL-1RAcP) 介导。第二 IL-1 家族成员 IL-1 α 通过相同的受体复合物发出信号,但未牵涉炎症性疾病。IL-1 β 活性在严格的生理控制之下,多个负调节的水平包括:过量 IL-1 β 的中和和胞吞作用由诱饵受体 IL-1 受体 II 型 (IL-1RII) 介导;循环 IL-1 β 的抑制由其受体的多个可溶性形式 (sRI、RII 和 sRAcP) 介导;和由抑制性 IL-1 同源物 IL-1 受体拮抗剂 (IL-1Ra) 产生的竞争性抑制。该受体-配体系统的复杂性对抗-IL-1 β 抗体的产生提出挑战。有人提出调节该途径的最佳治疗剂可选择性地使高水平 IL-1 β 信号转导降至更低的有益的水平,同时允许可溶性受体中和 IL-1 β 活性以及受体-介导的途径清除 IL-1 β 而不干扰 IL-1 α 信号转导或 IL-1Ra 活性。

[0486] 生物物理测定

[0487] 设置 KinExA 测定以测量在测试化合物 (抗-IL-1 β 抗体 XOMA052, 参见 U. S. 7, 531, 166) 存在或不存在的条件下游离配体 (IL-1 β) 在配体-受体 (IL-1sRI 或 IL-1sRII) 混合物的样品中的浓度。

[0488] 使用 KinExA 技术 (Sapidyne, Inc) 测定 IL-1 β $\pm$ XOMA 052 结合可溶性 IL-1 受体 (IL-1sRI :R&D Systems, cat#260-100/CF, 和 IL-1sRII :R&D Systems, cat#263-2R-050/CF) 的平衡离解常数 (K_D)。通过用 1% BSA 样品缓冲液将 150nM 至 4pM 的 PBS (0.01M 磷酸盐, pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.02% 叠氮化物) 中的可溶性受体系列稀释成单独的或与 XOMA 052 混合的 IL-1 β 的恒定结合位点浓度 (1 至 5nM) 来进行平衡实验。为了获得 K_D -控制的数据, 结合位点浓度不超过 K_D 两倍 (IL-1 β = 1nM 和 IL-1 β $\pm$ XOMA 052 = 5nM)。对于所有其中存在 XOMA 052 的实验, 使抗体浓度对 IL-1 β 维持在 100 倍摩尔过量以确保所有细胞因子被 XOMA 052 结合。在测定开始之前将 IL-1 β ($\pm$ XOMA052) + 受体混合物在室温下 ($\sim 22^\circ\text{C}$) 温育 12-2 小时以允许复合物形成达到平衡。在温育期后, 将包含受体、IL-1 β $\pm$ XOMA 052 和 IL-1sR/IL-1 β 复合物 $\pm$ XOMA 052 的混合物抽吸通过固相 (由受体-封闭抗-IL-1 β 抗体-偶联珠粒组成) 以捕获未与受体结合的 IL-1 β ($\pm$ XOMA 052)。验证捕获抗体与受体而非与 XOMA 052 完全竞争。捕获的 IL-1 β 与保留在平衡反应中的未被受体结合的游离 IL-1 β 的浓度成正比, 样品缓冲液中使用多克隆抗-IL-1 β 抗体 (R&D Systems, AB-201-NA), 然后使用藻红蛋白-缀合的抗-山羊 IgG 二抗 (Jackson ImmunoResearch laboratory cat#705-116-147) 进行检测。将结合信号转化成作为在受体不存在的情况下的对照的比例的相对值。对于所有平衡实验测量每一个样品的两个重复。使用 KinExA 软件 (2.4 版; Sapidyne Instruments) 将平衡滴定数据与 1 : 1 结合模型拟合。重复这些测量总共 5 次 (对于 sRI) 和 3 次 (对于 sRII)。结果显示 XOMA 052 使 IL-1 β 结合 IL-1sRI 的结合亲和力从 2nM 减弱至 10nM, 但对 IL-1 β 结合 IL-1sRII 的结合亲和力没有影响, 所述结合亲和力保持在 2nM (图 5)。使用表面等离子共振术 (SPR) 的测量与这些结果一致。

[0489] 可进行该测定法的另一个变型以给潜在药物候选物彼此之间分级。当已进行完全 K_D 溶液平衡实验后, 产生曲线的对数线性部分上的信号所需的条件是已知的。选择略低于在动力学调节药物不存在的情况下的相互作用的 EC_{50} 值的配体浓度。随后可在几个浓度上测试各药物候选物。这允许分析对药物的剂量反应和潜在药物候选物之间的相对效力的比较。

[0490] 功能测定

[0491] 进行功能测定以确认预测：信号复合物组分的亲和力的减小将引起对 IL-1 β 的细胞剂量 - 反应的偏移。

[0492] MRC-5IL-6 释放测定

[0493] 将 MRC-5 人肺成纤维细胞 (ATCC, Manassas, VA) 以 5000 个细胞 / 孔于具有 10% 胎牛血清 (FBS; Hyclone) 的 MEM 完全生长培养基 (Invitrogen) 中接种至无菌 96 孔组织培养板中。在 37°C 下用 5% CO₂ 温育过夜后, 除去上清液, 并且替换为包含指定浓度的重组人 IL-1 β (Peprotech, cat. 200-001B) + 对照 IL-1 β - 封闭抗体 (WO 2006/081139)、抗体 - KLH (钥孔血蓝蛋白) 同种型对照抗体 (IgG2; 克隆 KLH8. G2(XOMA)) 或 XOMA 052 的任一种的培养基。

[0494] 进行抗体效力测定 (图 6A), 其中在加入至 MRC-5 细胞之前用指定的抗体在 37°C 下预温育重组人 IL-1 β , 进行 1 小时, 以 100pg/ml 的终浓度加入 IL-1 β 。

[0495] 使用递增量的在加入至 MRC-5 细胞之前用 100 倍摩尔过量的抗体在室温下预温育过夜的 IL- β 进行 IL-1 β 剂量 - 反应测定 (图 6B)。

[0496] 在 37°C 用 5% CO₂ 温育 20 小时后, 取出细胞上清液, 将其按照估计的 IL-6 浓度稀释, 按照制造商的说明书利用 ELISA (Quantikine™ human IL-6ELISA, R&D Systems, cat#D6050) 测定其中的人 IL-6。以一式二份或一式三份建立和测定所有样品。

[0497] 全血 IL-8 诱导测定

[0498] 利用静脉穿刺术将正常人血收集至含有硫酸肝素的收集管中。使用递增量的在加入至全血之前在含有 10% FBS 的 RPMI (Invitrogen) 中用 10 倍摩尔过量的 XOMA 052 在 37°C 预温育 1 小时的 IL- β 进行 IL-1 β 剂量 - 反应测定。将样品在 37°C 于 96 孔圆底板 (Corning Costar, cat#3799) 中温育 6 小时, 随后以 0.5% 的终浓度用 Triton X-100 裂解 10 分钟。将裂解物以 2000rpm 离心 5 分钟以除去碎片, 然后转移至干净的板中。在重复离心步骤后, 将裂解物转移至 -80°C 冰箱中进行过夜贮存。第二天上午, 使裂解物解冻, 按照试剂商的说明书利用 ELISA (Quantikine human IL-8ELISA, R&D Systems, cat#D8000C) 测试其中的人 IL-8。以一式二份或一式三分建立和测定所有样品。结果示于图 6C 中。

[0499] 结果

[0500] 虽然 XOMA 052 对 IL-1 β 的结合在高浓度的 IL-1 β 下不消除信号复合物形成, 然而其在生理和病理相关浓度上是 IL-1 β 活性的强有力抑制剂。XOMA052 在 MRC-5 细胞因子释放测定中完全中和 100pg/mL 的 IL-1 β , 观察到低 pM 范围内的 IC₅₀。这与利用对照封闭抗体 (图 6A) 观察到的中和相当, 并且效力为重组 IL-1ra 的约 10 倍。

[0501] 动力学干扰模型预测信号复合物组分的亲和力的减小引起对 IL-1 β 的细胞剂量 - 反应的偏移。当 XOMA 052 对 IL-1 β 的浓度处于摩尔过量时, 所述抗体在 MRC-5 细胞 IL-6 释放测定中使 IL-1 β 的剂量反应曲线的 EC₅₀ 相对于在同种型对照抗体存在的情况下 IL-1 β 的剂量反应曲线的 EC₅₀ 增加至 60 倍 (815pM 相对 12pM 的 EC₅₀ 值)。在相同条件下, IL-1 β 封闭抗体在宽广的 IL-1 β 浓度范围上几乎完全消除细胞反应 (图 6B)。

[0502] 在全血中在 IL-8 表达的刺激中 (图 6C), 在大鼠 NRKE 细胞中在 cingl 表达的刺激中以及在 PBMC 中在 IL-8 表达的刺激中看到类似的对于 XOMA052 的剂量 - 反应偏移, 证明该效应对于特定的测定系统不是唯一的。因此, 在其中高水平的 IL-1 β 引起病状 (例如,

在胰腺 β 细胞中)的生理条件下, XOMA052 将中和过量的 IL-1 β , 同时潜在地允许持续的低水平有益的信号转导。此外, XOMA 052 可允许与 IL-1 β 活性的完全阻断相比较更好的先天性免疫系统对感染的反应性。当抗体的浓度足够高以至结合所有可获得的 IL-1 β 时, 由 XOMA 052 介导的信号转导的减弱的程度不依赖于抗体的浓度。在这些条件下, 伴随的信号输出只取决于配体的浓度。

[0503] 虽然减小 IL-1 β 对于 IL-1RI 的亲合力引起信号转导的减弱, 但对 IL-1RII 的高效结合的维持非常重要, 因为 IL-1RII 在响应细胞上用作诱饵受体以减弱对 IL-1 β 的敏感性。此外, IL-1RII 介导的 IL-1 β 的中和是重要的用于清除 IL-1 β 的途径。当治疗性抗体对其目的抗原的结合中断生理清除途径时, 抗体的延长的半衰期和高亲合力可引起抗体/抗原复合物的积累。虽然此类复合物通常是无活性的, 但其可以是维持抗体的过量水平以确保与抗体解离的任何抗原被游离抗体迅速再结合所必需的。

[0504] 我们已显示虽然 XOMA 052 减弱 IL-1 β 结合 IL-1RI 的亲合力, 但其不类似地减弱其对 IL-1RII 的结合。此外, XOMA 052 不阻断 sRAcP 对 IL-1 β /sRII 复合的结合。IL-1 β /XOMA 052 复合结合 IL-1RII 和 RAcP 的能力可允许通过正常生理机制清除和中和细胞因子, 从而减少长寿命复合物的积累。此外, 中和可溶性受体对 XOMA 052/IL-1 β 复合物的结合的保留应当允许这些分子调节活性, 从而避免在它们的清除之前由复合物产生的潜在系统活性。

[0505] 为了测试 IL-1 β /XOMA 052 复合物结合 IL-1 受体的能力是否影响清除率, 我们用游离的(与非结合同种型对照抗体一起温育的)或用 XOMA 052 或对照封闭抗-IL-1 β 抗体(BM5)预复合的重组人 IL-1 β 注射小鼠, 在 48 小时后按照试剂盒说明书利用 ELISA(BD OptEIA™ 人 IL-1 β ELISA 组, BD Biosciences, San Jose, CA, cat#557953) 测量循环中保留的总的可测量的 IL-1 β 的量。在两个分开的实验中, 用 100 μ l 每一种用人 IL-1 β 预复合的抗体(1mg/kg 抗体和 20ng IL-1 β /小鼠)静脉内注射($n = 4$ /组)C57B/6 小鼠。48 小时后 BM5-IL-1 β 和 XOMA 052-IL-1 β 复合的抗体的循环水平的数据示于图 7 中。在研究 1 中, 至注射后 48 小时, 7.7% 的与 BM5 复合的 IL-1 β 保留在循环中; 然而, 在相同的时期中, 只有 1.7% 的 XOMA 052-IL-1 β 复合物得到保留($p = 0.006$)。在研究 2 中, 至注射后 48 小时, 8.1% 的与 BM5 复合的 IL-1 β 保留在循环中, 然而只有 1.8% 的 XOMA 052-IL-1 β 复合物得到保留($p = 0.02$)。虽然与任一抗体复合的 IL-1 β 比游离 IL-1 β 更慢地从循环清除, 但与 XOMA052 结合的 IL-1 β 比与封闭抗体结合的 IL-1 β 更快速地清除。在 48 小时后, 与与封闭抗体结合的 IL-1 β 相比较在血清中检测到低至平均 5/23 的与 XOMA052 结合的 IL-1 β 。在相同的时间上, 总抗体的浓度彼此不同, 这表明差异不是因不同抗体的差异清除导致的。

[0506] 我们在此处概述的减弱而非阻断 IL-1 β 的方法可对 2 型糖尿病的疾病缓和和所需的 IL-1 β 信号转导的最佳减弱产生重要的见识, 所述糖尿病逐渐被视为炎症性疾病。有证据表明高水平 IL-1 β 通过引起 β 细胞功能障碍和细胞凋亡而成为该疾病的病理学的基础。然而, 低水平的 IL-1 β 活性是刺激的胰岛素释放的最高水平以及 β 细胞增殖和存活所必需的。利用 ANAKINRA® (rhuIL-1ra) 治疗患者增强了胰岛素分泌和血糖控制, 但因药物的快速清除而需要频繁给药。完全中和 IL-1 β 活性的封闭抗体将不允许 IL-1 β 的低水平信号转导。动力学调节(或调控)抗体例如 XOMA 052 应当减少 IL-1 β 活性, 从而在 IL-1 β

的更高浓度上允许更低水平的信号转导,从而在 T2D 患者中在有益的范围调控 IL-1 β 活性(参见图 8)。

[0507] 我们已在此处描述了重组抗体,所述重组抗体差异调节配体结合多种受体的亲和力,从而允许配体活性的背景依赖性减弱。人们逐渐理解,许多受体-配体系统由多个配体和受体组成,所述系统产生复杂的背景依赖性细胞效应。对于某些受体系统,这些效应在低水平上是有益的,但在高水平上是病理性的,并且在机制上难以通过单克隆抗体治疗达到。在治疗上将抗体用作“变阻器(rheostat)”而非“二分式开关(binary switch)”的能力将额外水平的微妙及复杂引入设计用于调节疾病相关靶的活性的治疗性抗体。

[0508] 实施例 2

[0509] 使用固相亲和力测量方法鉴定动力学调节剂

[0510] 此处描述的测定法可用于任何两个相互途径的结合剂,其中一个可被标记(例如,生物素化)并且另一个可被固定在 EIA 板上。本实施例使用结合其受体(GCSFR)的粒细胞集落刺激因子(GCSF)作为模型系统。用于该系统的方法描述于下文中。如果要使用不同系统可能需要最优化的多个条件包括:板包被条件(时间、温度、浓度和缓冲液)、分析物标记条件以及标记的(例如,生物素化的)分析物的浓度。

[0511] 使用下文中描述的测定法鉴定 GCSF-GCSFR 结合相互作用的抗体调节剂。

[0512] 使用 PEG₄ 生物素(Pierce Protein Research Products cat#21329, Rockford, IL)通过激活的 NHS 化学方法将纯化的 GCSF(R&D Systems Minneapolis, MN)生物素化。以 100uL/孔将 2ug/mL 的 PBS 中的 GCSFR(R&D Systems Minneapolis, MN)包被在 EIA 板(Nunc, Rochester, NY)上,在振荡器上于 37°C 下温育 1 小时。随后用牛血清白蛋白(BSA)和 ChemiBlock™(Millipore Billerica, MA)封闭溶液将板在振荡器上于室温下封闭至少半小时。不干扰反应物并且充分封闭 EIA 板上的非特异性结合的任何封闭溶液可用于该测定。

[0513] 在稀释板上制备样品。可以以周质提取物(PPE)的形式筛选来自从用 GCSF/GCSFR 复合物(Biosite Inc., San Diego, CA)免疫的小鼠产生的 Omniclonal™ 噬菌体展示文库的 Fab 片段。为了进行单点测定,将 PPE 样品与以 0.15ug/mL 于封闭缓冲液中制备的生物素化的 GCSF 以 1:1 混合,然后将 50uL 该溶液加至 EIA 板上。纯化来自单点测定的潜在命中(图 9A),使用配体的滴定以 1.8ug/mL Fab 浓度进一步测试(图 9B),或以 0.075ug/mL 的固定配体浓度在不同的滴定上进行测试(图 9C)。将 50uL/孔的该抗体-GCSF-生物素溶液加入已封闭的 EIA 板,在振荡器上于室温下温育超过 1 小时。将单独的 PBS 和封闭缓冲液的阴性对照包括在该单点测定中以确定约 0.830D405nm 的本底信号水平。还将 5ug/mL 的纯化的 Fab F5 包括为阳性对照,从筛选的早期轮选择所述 Fab F5。随后将 50uL 的 5ug/mL 的封闭缓冲液中的链霉抗生物素标记的碱性磷酸酶(Zymed South San Francisco, CA)加至所有孔中。生物素化的分析物和抗体混合物保留在孔中并且不被去除或洗掉。随后将板在振荡器上于室温下再温育超过 1 小时(在大多数测定中使用 3-4 小时的总反应时间;然而更长的温育允许更慢的反应获得平衡)。随后彻底清洗板,利用 100uL/孔的对-硝基苯基磷酸盐(PNPP;Pierce Protein Research Products Rockford, IL)显影。在使板显影 5 至 15 分钟后,使用 100uL/孔的 1M NaOH 终止反应。在微量板读数器上于 405nm 处读取吸光度。

[0514] 图 9A 显示一式三份的抗 -GCSF/GCSFR Fab PPE 的筛选测定中单点的结果。在几种在生物素化 GCSF:Fab 混合物的固定浓度上测试的 Fab 克隆存在的情况下观察到与对照相比较生物素化的 GCSF 对 GCSFR 结合的增强或抑制,表示通过筛选对正和负调节抗体的鉴定。图 9B 显示在正调节 Fab、B2 (E4) 之一存在和不存在的条件下 GCSF-生物素的滴定的结果。生物素化的 GCSF 结合曲线在抗体 B2 (E4) 存在的情况下向左偏移。这表明在所述抗体存在的情况下增强的配体受体相互作用的亲和力。图 9C 显示针对固定浓度的生物素化的 GCSF,其它正调节 Fab、B4 (F5) 以及弱调节或非调节 Fab B6 (A10) 的滴定的结果。B4 (F5) Fab 以抗体剂量依赖性方式增强生物素化的 GCSF 对板结合的受体的结合。

[0515] 实施例 3

[0516] 使用细胞结合测量法鉴定 GCSF-GCSFR 结合的动力学调节剂

[0517] 本实施例描述了基于 FACS 的测定法测量在配体 (重组人 GCSF (rhGCSF), R&D Systems, Minneapolis, MN) 存在或不存在的条件下测试化合物 (例如抗体) 对 GCSFR 转染的细胞的差异结合的用途。在 ELISA 测定中筛选来自噬菌体文库 (参见实施例 2) 的抗 -GCSF/GCSFR 抗体以鉴定特异于对 GCSF-GCSFR 复合物的结合的抗体。因为这些抗体是复合物特异性的,因此数学模型预测它们将调节 GCSF 对 GCSFR 结合的动力学。

[0518] BaF3 是不对人 GCSF 反应但对该家族的其它细胞因子反应的鼠淋巴细胞细胞系。将该细胞系维持在 RPMI (Gibco/Invitrogen)/10 % FBS (Hyclone/Thermo Scientific, Waltham, MA) /+2ng/mL 鼠 IL-3 (R&D Systems) 中。使用电穿孔将人 GCSFR 基因 (Origene, Rockville, MD) 稳定地转染入 BaF3 细胞系 (Alexion AAC 621), 然后利用 G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 进行选择。使用缀合有藻红蛋白的抗 -GCSFR α (CD114) 抗体 [554538 (LMM741) BD Biosciences, San Jose, CA] 通过 FACS 分析确认表达。用人 GCSF 刺激转染的细胞导致增殖性反应,表明了功能配体 / 受体相互作用。

[0519] 用 PBS/2 % FBS/0.1 % 叠氮化物洗涤 BaF3/GCSFR 细胞 (1×10^6 个细胞 / 样品) 2 次,随后用稀释至相同缓冲液中的 rhGCSF 在冰上温育 15 分钟。在 rhGCSF (0、1、10 或 100ng/mL) 存在或不存在的条件下加入 5ug/mL 的 GCSF/GCSFR 测试抗体,在冰上温育 1 小时,然后加入 10ug/mL 藻红蛋白标记的山羊抗人 IgG (H+L) (Jackson Labs, Bar Harbor, ME), 在冰上再温育 1 小时。如果测试抗体结合 GCSF/GCSFR 复合物,那么第二抗体结合所述测试抗体并且使细胞染色。观察到几种测试抗体在 GCSF 存在的情况下但非在 GCSF 不存在的条件下结合 BaF3/GCSFR 细胞。这些抗体经显示不结合 GCSFR 或 GCSF,从而只结合 GCSF/GCSFR 信号复合物,这表明它们可正调节 GCSF/GCSFR 复合物的信号转导。抗体 A10 (B6) 的示例性数据 (参见实施例 2) 示于图 10 中。利用浓度递增的 rhGCSF 和固定浓度的 A10 (B6) 处理细胞导致与用 rhGCSF 和无关抗体 (KLH8-G2) 染色的细胞相比较测定中平均荧光指数 (MFI) 读出的剂量依赖性增加。

[0520] 实施例 4

[0521] 使用基于细胞的抗体亲和力测量法鉴定 INS-INSR 结合的动力学调节剂

[0522] 本实施例描述了基于流式细胞术 (FACS) 的测定法用于测量在人胰岛素 (hINS) 存在或不存在的条件下抗体对细胞的差异结合的用途。在测定中筛选来自噬菌体展示文库的抗 -胰岛素受体 (INSR) 抗体以鉴定 INS-INSR 结合的调节剂。

[0523] IM-9 细胞获自美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 并且维持在 RPMI1640+10 %

FBS 中。在用于测定之前,在无血清 RPMI 1640 中清洗细胞,计数,在 RPMI 1640+0.5% BSA(Sigma-Aldrich) 中将浓度调整至 2×10^6 个细胞 /ml。将细胞在该培养基中培养过夜,这样被称为“血清饥饿的”。将这些细胞洗涤 1 次,以 2×10^6 个细胞 /ml 重悬浮于含有 0.5% BSA 和 0.01% 叠氮化钠的 PBS(FACS 缓冲液) 中。

[0524] 将暴露于胰岛素的细胞重悬浮于补充有 70nM 人胰岛素 (Sigma-Aldrich, St.Louis,MO) 的 FACS 缓冲液中。将两个细胞群体 (+hINS) 或 (-hINS) 于 4℃ 下温育 30 分钟,用 FACS 缓冲液洗涤 1 次,然后以 2×10^6 个细胞 /ml 重悬浮于 FACS 缓冲液中。将 25 微升的细胞等分涂铺在 96 孔板中,与 25ul 抗体或 PPE 混合,在冰上温育 1 小时。

[0525] 随后用 FACS 缓冲液洗涤细胞 1 次,通过加入 25ul 适当的缀合有荧光染料的第二抗体来检测抗体的结合。如果利用含有 myc- 标记的抗体的 PPE 进行初始温育,那么向孔中加入 25ul 抗 -c-myc 抗体 (Roche) 1/1000 稀释物,将细胞在冰上温育 30 分钟。随后用 FACS 缓冲液洗涤细胞 1 次,通过加入缀合有藻红蛋白的抗 -小鼠 IgG 来显示抗 -c-myc 的结合。在最后 15 分钟的冰上温育后,洗涤细胞,将沉淀重悬浮于 FACS 缓冲液中。在 FACSscan™(Becton-Dickinson, Milipitas, CA) 上分析细胞,在 FlowJo™(Treestar, Ashland, OR) 和 Microsoft Excel™ 中分析数据。

[0526] 本测定允许检测 4 种类型的抗体,其实例示于图 11 中:

[0527] 1. 当将它们暴露于人胰岛素时只结合 IM-9 细胞(专门结合 INS/INSR 复合物)的抗体

[0528] 2. 当将它们暴露于人胰岛素时更强地结合 IM-9 细胞(优先结合 INS/INSR 复合物)的抗体

[0529] 3. 当将它们暴露于人胰岛素时不太强地结合 IM-9 细胞(优先结合未复合的 INSR)的抗体

[0530] 4. 不依赖于 IM9 细胞对人胰岛素的暴露结合 IM-9 细胞(同样地结合未复合的 INSR 和 INS/INSR 复合物)的抗体

[0531] 如果抗体对 INS/INSR 复合物的结合:抗体对未复合的 INSR 的结合的比率大于 1.3,那么将抗体评定为预测的正调节剂。如果抗体对 INS/INSR 复合物的结合:抗体对未复合的 INSR 的结合的比率小于 0.6,那么抗体被评定为预测的负调节剂。如果抗体对 INS/INSR 复合物的结合:抗体对未复合的 INSR 的结合的比率大于 0.9 但小于 1.1,那么抗体被评定为预测的非调节剂。

[0532] 如上所述(除了使用适应悬浮培养的用 hINSR 或 muINSR 转染的 CHO-K1 而非 IM-9 细胞外)进行实验,将暴露于胰岛素的细胞重悬浮于补充有 150nM 而非 70nM 的人胰岛素的 FACS 缓冲液中。

[0533] 综述许多在功能测定中具有正或负调节活性的抗-INSR 抗体的 FACS 结合数据。发现负调节剂具有约 0.7 或更小的结合比率+胰岛素/-胰岛素,大部分具有 0.5 或更小的比率。发现正调节剂具有约 1.0 或更多的结合比率+胰岛素/-胰岛素,大部分具有 1.3 或更多的比率。结合比率示于下面表 3 中。因此在配体存在或不存在的条件下,调节抗体对受体的差异结合活性的比率通常预示着其调节功能(正或负)。

[0534] 表 3

[0535]

抗体	功能活性(通过 <i>pAKT</i> 和/或 <i>pIRS-1</i> 测定)	在胰岛素存在或不存在的条件下(+胰岛素/-胰岛素)结合人 <i>INSR CHO-K1</i> 的克隆的对数转化的数据 <i>MFI</i> 比率下的 <i>FACS</i> 面积
Ab050	负调节剂	0.32
Ab052	负调节剂	0.30

[0536]

抗体	功能活性(通过 pAKT 和/或 pIRS-1 测定)	在胰岛素存在或不存在的情况下(+胰岛素/-胰岛素)结合人 INSR CHO-K1 的克隆的对数转化的数据 MFI 比率下的 FACS 面积
Ab055	负调节剂	0.64
Ab057	负调节剂	0.56
Ab061	负调节剂	0.29
Ab063	弱负调节剂	0.71
Ab065	负调节剂	0.28
Ab070	负调节剂	0.53
Ab072	负调节剂	0.37
Ab074	负调节剂	0.44
Ab081	负调节剂	0.42
Ab059	正调节剂	34.25
Ab076	正调节剂	0.98
Ab077	正调节剂	2.12
Ab078	正调节剂	66
Ab079	正调节剂	1.30
Ab080	正调节剂	1.37
Ab083	正调节剂	3.03

[0537] 实施例 5

[0538] 使用基于细胞的配体亲和力测量法鉴定动力学调节剂

[0539] 本实施例描述了基于 FACS 测定法测量在测试化合物（抗 INSR 抗体）存在或不存在的条件下配体（人胰岛素）对细胞的差异结合的用途。在测定中筛选来自噬菌体展示文库的 INSR 抗体以鉴定 INS-INSR 复合物的调节剂。

[0540] 从美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 获得 IM 9 细胞, 将其维持在 RPMI1640+10% FBS 中。在用于测定之前, 在无血清 RPMI 1640 中洗涤细胞, 计数, 在 RPMI 1640+0.5% BSA(Sigma-Aldrich) 中将其浓度调整至 2×10^6 个细胞 /ml。将细胞在该培养基中培养过夜, 这样被称为“血清饥饿的”。洗涤这些细胞一次, 将其以 2×10^6 个细胞 /ml 重悬于包含 0.5%

BSA 的 PBS(结合缓冲液)中。

[0541] 将血清饥饿的细胞在室温下预暴露于 INSR 抗体 15 分钟,随后用不同浓度的购自 R&D Systems 的生物素化的人胰岛素在室温下再温育另外 30 分钟。通过向该混合物中加入链霉抗生物素-藻红蛋白的 1/100 稀释物,在室温下再进行 15 分钟来显现生物素化的胰岛素的结合。随后用结合缓冲液洗涤细胞一次,将其重悬浮于等体积的含有 0.5% BSA、0.1% 叠氮化钠和 2% 多聚甲醛的 PBS 中。在 FACScan™(Becton-Dickinson, Milipitas, CA) 上分析细胞,在 FlowJo™(Treestar, Ashland, OR) 和 Microsoft Excel™ 中分析数据。

[0542] 图 12 显示在不同的胰岛素浓度上在抗-INSR 抗体存在或不存在的条件下生物素化的胰岛素对 IM9 细胞的结合。抗体 83-7 增强生物素化的胰岛素的结合;抗体 MA-20 减弱了生物素化胰岛素的结合;对照小鼠 IgG 对生物素化的胰岛素的结合没有影响。

[0543] 实施例 6

[0544] 使用磷酸化测定法确认动力学调节

[0545] 被 INSR 磷酸化的底物蛋白包括称为胰岛素受体底物 1(IRS-1) 的蛋白质。形成 pIRS-1 的 IRS-1 磷酸化最终导致胰岛素应答组织外膜上的高亲和力葡萄糖转运蛋白(Glut4) 分子的增加,从而导致葡萄糖从血液至这些组织中的吸收增加。使用 Luminex® 技术平台(Luminex Corp., Austin, TX) 开发 pIRS-1 测定法。开发了测试的两个模式:(a) 在固定浓度的胰岛素上滴定测试抗体,和 (b) 在固定浓度的抗体上滴定胰岛素。在测定中测试基于它们对复合的 INSR 和未复合的 INSR(参见实施例 4 和 5) 的差异结合选择的抗胰岛素受体(INSR) 抗体以鉴定 INS-INSR 复合物的调节剂。

[0546] 细胞处理和裂解

[0547] 将 IM-9 细胞血清饥饿 16 至 20 小时,然后计数,离心,用 PBS 洗涤一次,将其以约 2×10^6 个细胞/ml 重悬浮于 RPMI+0.5% Sigma Cohn V BSA(于 4°C 下贮存的过滤灭菌的 10% 的 RPMI 中的原液)中。

[0548] 在 RPMI+0.5% BSA 中制备胰岛素的 2X 浓缩液(Sigma I-9278(10mg/ml) 1.77mM 于 4°C 下贮存的液体原液)的稀释物。标准胰岛素滴度可包括例如:6.25nM、1.56nM、0.39nM、0.097nM、0.024nM、0.006nM、0.0015nM、0nM 的 4 倍系列稀释。

[0549] 按照制造商的说明书将 Milliplex MAP Cell Signalling 缓冲液和检测试剂盒(Millipore 目录编号 48-602) 以及 Phospho-IRS-1MAP Mates(Millipore 目录编号 46-627) 用于检测 pIRS-1 水平。简而言之,制备含有 50uL/孔的 2X 处理培养基(含有 0.5% BSA+/- 测试抗体的 RPMI) 的 V 形底板,每孔加入重悬浮于 50uL RPMI+0.5% BSA 中的 1×10^6 个细胞血清饥饿的 IM-9 细胞。在胰岛素处理之前,(a) 作为单一抗体浓度的大体积(bulk) 抗体/细胞混合物(随后用于含有胰岛素的系列稀释物的孔),或 (b) 通过将细胞直接加入含有抗体的系列稀释物和掺入 0.1nM 的胰岛素的孔进行抗体预处理,进行 15 分钟。将板置于 37°C 培养箱中,以 1500rpm 在 RT 下离心持续 3 分钟的处理时间(总共 15 分钟)。通过倒置和轻轻地吸掉除去上清液,通过使用多通道移液器用 100uL 按照下面表 1 制备的 100uL 裂解缓冲液(在即将使用前加入不稳定组分,即蛋白酶抑制剂和 benzonase) 研磨 3 次来裂解处理的细胞沉淀。将板在振荡器上于室温下放置 30 分钟,以 3000rpm 离心 10 分钟以澄清裂解物,除去可能在研磨过程中产生的任何气泡。取出 50uL 澄清的裂解物,将其以 1:1 稀释于 50uL 的来自检测试剂盒的测试缓冲液-1(AB-1) 中,研磨 2 至 3 次以进行混合,将

50u1 加至 25u1/ 孔的稀释的珠粒的顶上的滤板膜上（参见上文）。

[0550] 表 1 :裂解缓冲液组分

[0551]

[0552]

裂解缓冲液	100							
	10 孔	20 孔	25 孔	30 孔	40 孔	50 孔	60 孔	孔
	1 ml	2 mls	2.5mls	3 mls	4 mls	5 mls	6mls	10mls
裂解缓冲液 (Millipore cat. # 43-040)	1	2	2.5	3	4	5	6	10
SDS 20%原液	0.045	0.09	0.1125	0.135	0.18	0.225	0.27	0.45
MgCl 50mM(Invitrogen cat. # Y02016)	0.02	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1	0.12	0.2
蛋白酶抑制剂 (50X)(Millipore cat. # 20-201)	0.02	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1	0.12	0.2
Benzonase EMD 1.01697.0002 @ 250ug/ml	0.004	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02	0.024	0.04

[0553] 滤板膜 (Millipore Catalog#MABVN1250) 用 25u1 AB-1/ 孔预湿润。使用 Millipore 多头抽真空装置从滤板抽吸预湿润缓冲液, 小心不要使膜干燥, 任何剩余的液体从滤板的底部形成印迹。每孔加入 25u1 的 1X 珠粒悬浮液 (pIRS-1 珠粒 (Millipore 目录编号 46-627) (通过从 20X 浓缩物稀释至 AB-1 缓冲液中并且可选地涡旋和超声 3 次, 每次 5 秒来预制备的)。

[0554] 用板密封器覆盖滤板, 用铝铂覆盖以防止曝光, 在板振荡器上 (在 Labline 上设置 7-8, Bellco 板振荡器或相似型号) 于室温下温育 2 小时或可选地在 4℃温育过夜。

[0555] Luminex 检测

[0556] 抽吸滤板, 它们的底形成印迹。珠粒保留在孔中, 用 100u1 AB-1 洗涤, 将其在振荡器上放置 1-2 分钟。抽吸板, 然后重复清洗步骤。

[0557] 加入 25u1/ 孔 1X 生物素化的检测抗体 (从 20X 原液稀释至 AB-1 缓冲液中), 将板在振荡器上于室温下温育 1 小时。抽吸板, 使它们的底形成印迹。加入 25u1/ 孔的从 25X 原液稀释至 AB-1 缓冲液中的 1X 链霉抗生物素蛋白藻红蛋白, 将板在振荡器上于室温下温育 15 分钟。向每一个孔中加入 25u1 扩增缓冲液 (Millipore 目录编号 48-602), 然后将板在振荡器上于室温下再温育 15 分钟。抽吸板, 将珠粒重悬浮于 150uL AB-1 中, 在 Luminex®

仪上读数。

[0558] 结果

[0559] 图 13 显示在固定浓度的代表性测试抗体存在的情况下来自胰岛素的滴定的 pIRS-1 测定结果。对 MFI 进行标准化以便将曲线拟合最大值调整至 100%。某些抗体（正调节剂）使胰岛素滴定曲线偏移至左边。其它抗体（负调节剂）使胰岛素滴定曲线偏移至右边。观察到调节的不同量级。图 13 中的数据显示抗体产生增加至 9 倍，或在胰岛素敏感性方面下降至 1/24。

[0560] 图 14 是显示在固定浓度的不同测试抗体存在或不存在的情况下来自 pIRS-1 测定的胰岛素 EC50 值的表。按照 EC50 比率 +Ab/-Ab 给结果分级。

[0561] 实施例 7

[0562] TNF- α /TNFR 结合的动力学调节剂的鉴定

[0563] TNF α 调节剂的期望的性质将是减弱 TNF α 的病理水平的信号转导同时允许足够的信号转导支持先天免疫反应。此类 TNF α 调节剂的鉴定通过选择减小 TNF α 对于其一种或两种受体的亲和力的多肽结合剂（例如抗体）来实现。减小的 TNF α 对于其受体的亲和力反映在许多标准分析测量上，例如更快的解离速率、更慢的结合速率、更慢的缔合常数和更高的离解常数。备选地，这可通过多肽结合剂相对于 TNF α -TNFR 对单独的 TNF α 的优先结合（例如，更强的结合信号）来检测。对于 TNF α -TNFR 复合物的结合信号的不存在表示完全阻断和未被被选择。

[0564] 本实施例描述了测定法测量在测试化合物（TNF α 结合多肽）存在或不存在的情况下配体（人 TNF α ）对 TNFR1 或 TNFR2 的差异结合的用途。因为 TNFR1 和 TNFR2 据认为在生物途径中起着不同作用，因此可能期望选择性调节这两个受体的活性（例如，TNF α 主要通过 TNFR1 相互作用减小炎症反应，而 TNFR2 的表达在炎症性结肠炎模型中提供了保护作用；TNFR1 的上调在缺血预处理（ischemic preconditioning）模型中提供了神经保护作用）。TNF α 对两个受体的结合的选择性调节可在不同疾病中提供益处（Schneider 等人 Eur. J. Immunol. 39(7):1743-53(2009)；Mukai 等人, J. Biochem. 146(2):167-72(2009)；Pradillo 等人 J. Cereb. Flow Metab. 25(2):193-203(2005)）。从来源例如首次用于实验的噬菌体展示文库和杂交瘤重新获得 TNF α -结合多肽，或者将所述所述结合多肽产生为 TNF α 结合多肽的已知的变体例如，英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗、HUMICADE™、戈利木单抗、atacicept 和依那西普。

[0565] 可使用下文描述的测定法鉴定 TNF α -TNFR 结合相互作用的抗体调节剂。

[0566] 使用 PEG₄ 生物素（Pierce Protein Research Products cat#21329, Rockford, IL）通过激活的 NHS 化学方法将纯化的 TNF (cat#210-TA-010, R&D Svstems Minneapolis, MN) 生物素化。以 100uL/孔将 2ug/mL 的 PBS 中的 TNFR1 或 TNFR2 (cat#636-R1-025 或 1089-R2-025, R&D Systems Minneapolis, MN) 包被在 EIA 板（Nunc, Rochester, NY）上，在振荡器上于 37°C 下温育 1 小时。随后用牛血清白蛋白（BSA）和 ChemiBlock™（Millipore Billerica, MA）封闭溶液将板在振荡器上于室温下封闭至少半小时。不干扰反应物并且充分封闭 EIA 板上的非特异性结合的任何封闭溶液可用于该测定。

[0567] 在稀释板上制备样品。可以以周质提取物（PPE）或杂交瘤上清液的形式筛选 TNF α -结合 scFv 或 Fab。为了进行单点测定，将 PPE 样品与以 0.15ug/mL 于封闭缓冲液中

制备的生物素化的 TNF 以 1 : 1 混合,然后将 50uL 该溶液加至 EIA 板上。纯化来自单点测定的潜在命中,使用配体的滴定进一步测试,或以固定配体浓度上在不同的滴定上进行测试。将 50uL/ 孔的该抗体 -TNF- 生物素溶液加入已封闭的 EIA 板,在振荡器上于室温下温育超过 1 小时。将单独的 PBS 和封闭缓冲液的阴性对照包括在该单点测定中以确定本底信号水平。生物素化的分析物和抗体混合物保留在孔中并且不被去除或洗掉。随后将板在振荡器上于室温下再温育超过 1 小时(在大多数测定中使用 3-4 小时的总反应时间;然而更长的温育允许更慢的反应获得平衡)。随后彻底清洗板,利用 100uL/ 孔的对 - 硝基苯基磷酸盐(PNPP ;Pierce Protein Research Products Rockford,IL) 显影。在使板显影 5 至 15 分钟后,使用 100uL/ 孔的 1M NaOH 终止反应。在微量板读数器上于 405nm 处读取吸光度。

[0568] 进行功能测定以确认信号复合物组分的亲和力的减小可引起针对 TNF α 的细胞剂量 - 反应的偏移。多种基于细胞的测定法可用于该目的,包括例如美国专利 7,524,502 和 7,179,893 以及美国申请 2009/0155205 中描述的测定法。

[0569] 中和 L929 细胞的 TNF α - 诱导的细胞毒性

[0570] 将 TNF α - 敏感性 L929 小鼠成纤维细胞于含有 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI 培养基中以 5×10^4 个细胞的密度接种在 96 孔组织培养板中。通过将 L929 细胞加入含有重组 TNF α (500pg/mL) 的 RPMI+FBS 培养基中,在 37°C 下与期望的测试浓度的抗 -TNF α 抗体或抗 -KLH(钥孔血蓝蛋白)同种型对照抗体一起预温育 1 小时来进行抗体效力测定。使用递增量的 TNF α 进行 TNF α 剂量 - 反应测定,所述 TNF α 在加入至 L929 细胞之前用 100 倍摩尔过量的抗体在室温下预温育过夜。随后将板 37°C 下于 5% CO₂ 中温育过夜(18-24 小时)。

[0571] 为了测定对 TNF α - 诱导的细胞的细胞毒性的作用,从每一个孔取出 100uL 培养基,加入 50uL 5mg/mL 的 PBS 中的 3, (4,4- 二甲基噻唑 -2- 基) 2,5- 二苯基 - 溴化四唑(MTT ;Sigma Chemical Co.,St.Louis,Mo.)。随后将在 37°C 下温育 4 小时。然后向每一个孔中加入 50uL 20% 十二烷基硫酸钠(SDS),将板在 37°C 下温育过夜。测量 570/630nm 处的光密度,绘制每一个样品的曲线,利用标准方法测定 IC₅₀。以一式二份或一式三分建立和测定所有样品。

[0572] 对 HUVEC 上 ELAM-1 和 / 或 ICAM-1 表达的抑制

[0573] TNF α 诱导内皮细胞粘附分子例如 ELAM-1 和 ICAM-1 的表面表达。在体外测定中测试抗 -TNF α 抗体中和人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中 TNF α 刺激的膜结合 ICAM-1 和 / 或 ELAM-1 的产生的能力。

[0574] 简而言之,将 HUVEC(ATCC No. CRL 1730) 在 TNF α 和不同浓度的测试或对照抗体存在的情况下培养在 96 孔板中。随后使用商购可得的检测试剂,通过细胞裂解和酶联免疫吸附测定法(ELISA) 评估膜结合 ICAM-1 和 / 或 ELAM-1 的定量相对表达。将 HUVEC 以 5×10^4 个细胞 / 孔的密度接种在 96 孔板中,通过在 37°C、5% CO₂ 下温育至少 2 小时使其附着于板。

[0575] 通过加入至含有重组 TNF α 的 HUVEC 培养基中,用期望的测试浓度的抗 -TNF α 抗体或抗 -KLH(钥孔血蓝蛋白)同种型对照抗体在 37°C 预温育 1 小时来进行抗体效力测定。使用递增量的在加入 HUVEC 之前在室温下用 100 倍摩尔过量的抗体预温育过夜的 TNF α 进行 TNF α 剂量 - 反应测定。随后将板在 37°C 下 5% CO₂ 中温育 24 小时。在温育后,除去培养基,用 PBS 洗涤细胞。裂解细胞,测定裂解物中 ICAM-1 和 / 或 ELAM-1 的存在。为了进行测定,使用商购可得的试剂(例如,sICAM-1 Module set ;Bender Medsystems,Towcester,

UK) 通过标准 ELISA 分析澄清的裂解物中可溶性 ICAM-1 或 ELAM-1 的存在。以一式二份或一式三份重复建立和测定所有样品。

[0576] Hs 27 细胞中 TNF α 诱导的 IL-6 的上调的抑制

[0577] 通过暴露于 TNF α 可诱导人包皮成纤维细胞产生 IL-6。通过用重组 TNF α 和测试抗体共温育细胞,然后使用商购可得的 IL-6 检测系统测定随后分泌入培养基的 IL-6 水平来评估抗 -TNF α 抗体抑制该表达的上调的能力。

[0578] TNF α - 敏感性人包皮成纤维细胞 Hs 27 (例如,来自欧洲动物细胞培养物保藏中心 (European Collection of Animal Cell Cultures) (ECACC no. 94041901)) 以 2×10^4 个细胞的密度于含有 10% 胎牛血清的 DMEM+Glutamax 培养基中接种在 96 孔组织培养板中,通过在 37°C 温育过夜将其粘附于板。通过加入至含有重组 TNF α 的 Hs 27 培养基中,用期望的测试浓度的抗 -TNF α 抗体或抗 -KLH (钥孔血蓝蛋白) 同种型对照抗体在 37°C 预温育 1 小时来进行抗体效力测定。使用递增量的在加入至 Hs 27 细胞之前在室温下用 100 倍摩尔过量的抗体预温育过夜的 TNF α 进行 TNF α 剂量 - 反应测定。随后将板在 37°C、5% CO₂ 中温育过夜 (18-24 小时)。温育后,从板中取出培养基,将其转移至 U 形底 96 孔板以进行测定。使用商业 ELISA 系统 (例如, R&D Systems, 如上所述的) 分析培养基中 IL-6 的存在。以一式二份或一式三份建立和测定所有样品。

[0579] 实施例 8

[0580] 部分激动剂抗 -INSR 抗体对 DIO 小鼠的血糖控制的作用

[0581] 在饮食诱导肥胖 (DIO) 模型中, C57BL/6 小鼠可在约 12-14 周的高脂肪饮食 (HFD) 后产生胰岛素抗性。在该模型中评估显示在体外表现为部分激动剂或正调节剂的抗 -INSR 抗体以确定此类抗体是否体内增强胰岛素敏感性和 / 或血糖控制。

[0582] 为了确定部分激动剂抗 -INSR 抗体是否降低空腹血糖,使 20 周龄 DIO 小鼠 (对于 HFD, 14 周; n = 8/ 组) 禁食 5 小时,用部分激动剂抗体 Ab030 和 Ab037 或同种型对照 (5mg/kg) 进行静脉内攻击。在其它对照研究中,用胰岛素 (0.5U/kg) 处理 DIO 小鼠,或用同种型对照 (5mg/kg) 给饲喂正常饮食 (ND) 的年龄匹配的小鼠施用。在注射前 (时间 = 0) 和施用后 1、2 和 4 小时获取血糖样品。与年龄匹配的对照相比较,在 1 小时的时间点上在 DIO 小鼠 (HFD- 饲喂的 / 同种型对照) 中观察到增加的血糖,这与饲喂 HFD 的动物中的胰岛素抗性一致 (图 15A)。胰岛素或部分激动剂抗体的任一种的施用导致统计上显著的血糖的减小 ($p < 0.05$; 单尾 t- 检验) (图 15B)。没有一种抗体在任何时间点上诱导低血糖症 (定义为低于 36mg/dL 的血糖)。这些结果表明抗 -INSR 部分激动剂抗体安全有效地降低空腹血糖。

[0583] 为了进一步评估部分激动剂抗 -INSR 抗体对血糖控制的作用,用 Ab037 (0.1、1.0 或 9mg/kg) 或同种型对照 (1.0mg/kg) 腹膜内 (IP) 注射 18 周龄 DIO 小鼠 (对于 HFD, 12 周; n = 8/ 组)。作为另外的对照,用同种型对照 (1.0mg/kg) 给年龄匹配的对照小鼠施用,或给 DIO 小鼠施用胰岛素 (0.75U/kg; IP)。通过使动物禁食 16 小时 (始于抗体施用后约 8 小时),注射葡萄糖 (1.0U/kg),然后跟踪血糖 2 小时以上来在抗体施用 (胰岛素后 30 分钟) 后 24 小时进行葡萄糖耐量试验 (GTT)。在该实验中, HFD 对空腹血糖 (图 16B) 或快速注射后峰值血糖 (图 16A) 没有显著影响。然而,在 DIO 小鼠中,部分激动剂抗体相对同种型对照 (当以 1.0mg/kg 或高于 1.0mg/kg 的剂量施用时) 显著降低空腹血糖 (图 16B) 和在 9.0mg/

kg 上减少 GTT 曲线下面积 (AUC) (图 16C)。

[0584] 该结果证明抗-INSR 部分激动剂抗体可在体内降低空腹血糖并且改善血糖控制。

[0585] 实施例 9

[0586] 正调节剂抗-INSR 抗体对 DIO 小鼠的血糖控制的作用

[0587] 为了确定正调节剂抗-INSR 抗体是否在体内增强胰岛素敏感性,给 18 周龄 DIO 小鼠 (n = 8/组) 腹膜内注射 Ab001 (正调节剂) (0.1、1.0 或 10mg/kg)、部分激动剂抗体 (Ab037) (10mg/kg) 或同种型对照 (1.0mg/kg)。施用同种型对照 (1.0mg/kg) 的饲喂 ND 的年龄匹配的小鼠用作另外的对照 (图 17A)。24 小时后,通过在 5 小时禁食后施用胰岛素 (0.5U/kg) 来进行胰岛素耐量试验 (ITT),监控血糖水平 2 小时以上。HFD 对空腹血糖 (图 17B) 或 ITT AUC (图 17C) 相对于常规饮食没有显著影响,并且部分激动剂抗体 (Ab037) 和正调节剂抗体 (Ab001) 施用都不导致相对于同种型对照处理的 DIO 动物统计上显著更低的 AUC ITT (图 17C)。部分激动剂抗体 Ab037 显著降低空腹血糖,而正调节剂抗体 Ab001 诱导朝向降低的空腹血糖的非统计上显著的剂量依赖性趋势。

[0588] 在接下来的一周,在额外施用一剂抗体后在相同动物上进行 GTT (图 18A)。在该研究中,HFD 导致与对照饲喂的动物相比较空腹血糖 (图 18B) 和 GTT AUC (图 18C) 的非统计上显著的增加。与同种型对照处理的 DIO 小鼠相比较,部分激动剂抗体和正调节剂抗体在所有测试的剂量上显著降低了空腹血糖。此外,部分激动剂抗体和正调节剂抗体相对于同种型对照在 10mg/kg 上显著减少 GTT AUG。

[0589] 这些结果表明对 INSR 具有特异性的部分激动剂和正调节剂抗体改善了糖尿病受试者的血糖控制。

[0590] 实施例 10

[0591] 抗受体的变构激动剂抗体的淘选

[0592] 展示比游离受体更大的对受体/配体的复合物的结合的激动剂抗体的选择增加了鉴定不与配体竞争并且不阻断或减少配体对受体的变构位点的结合的抗体的概率。结合靶受体上与内源结合位点不同的位点的该类型的抗体称为变构激动剂 (Kenakin 等人, J Receptors and Signal Transduction, 27:247-259, 2007; Jahns 等人, J Am Coll Cardiol. 36:1280-87, 2000; May 等人, Ann Rev Toxicol. 47:1-51, 2007)。

[0593] 上述筛选激动剂抗体的方法对于变构激动剂的筛选也是有用的。测试抗体与受体配体复合物的优先结合与变构活性一致,然而测试抗体与游离受体的优先结合与同胰岛素竞争变构位点的抗体一致。所述筛选用于通过消除一些 (如果不是所有的) 竞争性激动剂来富集变构激动剂的候选克隆库。

[0594] 变构抗体不太可能干扰配体的结合亲和力和功效,从而不太可能干扰最大配体信号转导或对配体的最大敏感性。变构抗体可展示一系列来自弱部分激动剂的激动至与内源配体相似的激动水平。部分变构激动剂可引发最大信号转导反应,所述反应在量级上显著低于内源配体的最大反应。在某些应用中,在持续的次最大信号激活优于最大信号激活的情况下,部分激动剂抗体优于完全激动剂抗体。从图 19 和图 20 中显示的剂量反应曲线的比较来看,部分变构激动剂与正变构调节剂 (敏化剂) 之间的区别特征是很明显的,所述图显示了部分变构激动剂 (图 19) 和正变构调节剂 (敏化剂) 抗体 (图 20) 的不同结合曲线,如使用对 INSR 具有特异性的抗体举例说明的。

[0595] 图 19A 举例说明了与对内源配体（胰岛素）的剂量反应相比较的来自部分变构激动剂的剂量反应的实例，图 19B 显示了在变构激动剂存在或不存在的条件下通过配体产生的激活。图 20A 显示与对内源配体的剂量反应相比较来自正变构调节剂抗体的剂量反应，而图 20B 显示在结合 INSR 的正变构调节剂抗体存在和不存在的条件下内源配体（胰岛素）的剂量反应曲线。图 21 提供了一组部分变构激动剂相对于内源配体的激活参数。由部分变构激动剂产生的信号激活的性质与获自相同初步筛选方法的变构调节剂的不同。

[0596] 非竞争性部分变构激动剂抗体可提供优于竞争性激动剂的治疗有利方面，其中有益地是，具有通过部分激动剂和内源配体同时产生的独立信号激活。例如，不受理论束缚，部分变构激动剂可用于信号转导途径的基础激活同时仍然允许响应内源配体水平的短暂波动。在某些情况下，在其中该种类的部分变构激动剂存在的条件下，内源配体的剂量反应将展示基线（组成型的或基础的）信号转导水平的增加以及将达到相同或更大的对内源配体的最大反应而几乎无或无配体 EC50 的显著改变。例如，图 19B 显示在部分变构激动剂存在和不存在的条件下内源配体的剂量反应，图 22 显示相对于在阴性对照抗体存在的条件下对内源配体的最大反应，在部分变构激动剂抗体存在的条件下的胰岛素的最大激活。图 22 显示部分变构激动剂抗体 Ab037 和 Ab040 当与相同测定内的阴性对照抗体相比较时对通过胰岛素产生的剂量反应的 EC50 和 Akt 在 Ser473 上的最大磷酸化几乎没有或没有显著影响。

[0597] 实施例 21

[0598] 测量抗-INSR 抗体对胰岛素对于 INSR 的结合亲和力的调节的测定

[0599] 为了测定调节抗体影响胰岛素对胰岛素受体的结合的能力，在针对 INSR 的单克隆抗体存在和不存在的条件下测量未修饰的胰岛素结合在经血清饥饿的 CHOK1 细胞 (hINSR8-CHOK1) 的表面上表达的人 INSR 的亲和力。KinExA 测定法已被开发用以测量细胞培养基中极低水平的胰岛素。该测定法使得胰岛素与表达 INSR 的细胞的结合可通过测定胰岛素从细胞培养基消耗的水平来进行测量。随着胰岛素开始结合细胞，细胞培养基中胰岛素的浓度下降。通过使用表达 INSR 的细胞的滴定和测量游离胰岛素%，可使用 KinExA 软件估计 INS-INSR 相互作用的亲和力。该测定法被用于测量由不同抗-INSR 抗体显示的对胰岛素结合活性的调节的程度。

[0600] 使 hINSR8-CHOK1 细胞经历血清饥饿过夜，随后通过沉淀细胞且以 2X 最高稀释度的终测定浓度 (3.5×10^7 至 2.0×10^7 个细胞/mL 于含有 500 μ g/mL BSA 和 0.1% 叠氮化钠 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 的 PBS 的测定稀释缓冲液 (Teknova, Hollister CA) 中的浓度重悬浮来制备用于测定。制备细胞的 2 倍系列稀释物，产生 10 个点的稀释物系列，也使用无细胞对照。将细胞悬浮液等分入聚丙烯测定管，每管 2mL 体积。对于这些细胞悬浮液，向每一个管中加入 1mL 的 40 μ g/mL 测试抗体（或对于 Ab078, 100 μ g/mL），轻轻混合，在冰上温育 30-45 分钟。与阴性对照人 IgG2 抗-KLH 抗体相比较测试所使用的抗体。向每一个管中加入 1mL 200pM 胰岛素以建立 50pM (300pg/mL) 的终胰岛素浓度 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。将样品在 4°C 温育过夜，进行 18 小时，随后离心以沉淀细胞，取出上清液以进行测试。

[0601] 使用用抗胰岛素单克隆抗体包被的珠粒进行 KinExA 3000 分析。将 2 克聚（甲基丙烯酸甲酯）(PMMA) 珠粒 (Säpidyne, Boise, ID) 悬浮于 9mL 包含 65 μ g/mL 的克隆 D6C4

小鼠抗胰岛素单克隆抗体 (Fitzgerald Industries, Acton MA) 的测定缓冲液 PBS 中。将珠粒在室温下旋转 6 小时,随后将其静置。用含有 50mg/mL BSA 级分 V(Sigma-Aldrich, St.Louis,MO) 的 PBS 替换上清液,于 4℃下旋转过夜。所使用的检测溶液是 0.15 μg/mL 的具有 1ug/mL 链霉抗生物素蛋白-PE (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的测定稀释缓冲液中的生物素化的小鼠抗胰岛素克隆 D3E7 (Fitzgerald Industries, Acton MA)。在 KinExA 3000 上,以 0.25mL/ 分钟注射样品,进行 240 秒,随后在电泳缓冲液 (具有 0.05% 叠氮化钠的 PBS) 中漂洗 60 秒,随后注射检测溶液,进行 240 秒,然后以 1mL/ 分钟进行最终 90 秒的洗涤。测量早期初始时间点与接近电泳结束的时间点的电压差,将其用于计算亲和力。细胞上的 INSR 浓度经估计为 2.5×10^5 个受体 / 细胞。使用 KinExA 软件 (Säpidyne, Boise ID) 测定亲和力,通过在 Prism(GraphPad Software, La Jolla CA.) 中进行非线性拟合来计算 EC50。

[0602] 许多抗-INSR 抗体增强胰岛素对于细胞的亲和力,如下面表 4 中所显示的。所测试的抗体之一将胰岛素对于细胞的亲和力减小至约 1/3。

[0603] 表 4

[0604] 胰岛素亲和力和 IC50 表

[0605]

抗体	K _D (pM)	EC50 (pM)	亲和力的 倍数偏移
IgG2-KLH	272	365	1.0
Ab037	271	471	1.0
Ab001	49	104	+5.6
Ab053	228	33	+1.2
Ab062	762	760	- 2.8
Ab078	41	80	+ 6.6
Ab079	12.1	40	+22.5
Ab080	11.2	34	+24.3
Ab083	13.7	39	+19.9
Ab085	34	70	+ 8.0

[0606] 这些数据举例说明了本文中描述的筛选方法产生增强胰岛素对于胰岛素受体的结合亲和力的正调节剂抗体。

[0607] 根据上述内容,应理解,虽然为了举例说明已在本文中描述了本发明的具体实施方案,但可进行实施方案的各种变动、变化和组合而不偏离本发明的精神和范围。此类变动、变化和组合意欲由下列权利要求包括。

[0001]

序列表

<110> 佐马技术有限公司

<120> 筛选方法

<130> 27129/41726

<150> 61/246,079

<151> 2009-09-25

<150> 61/306,324

<151> 2010-02-19

<160> 88

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 233

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> TNF- α

<300>

<308> GenBank / NP_000585

[0002]

<309> 2010-09-19

<313> (1)..(233)

<400> 1

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala

1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe

20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe

35 40 45

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro

50 55 60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser

65 70 75 80

Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro

85 90 95

Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu

100 105 110

Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser

115 120 125

Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly

[0003]

130	135	140
Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala		
145	150	155 160
Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro		
	165	170 175
Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu		
	180	185 190
Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu		
195	200	205
Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly		
210	215	220
Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
225	230	
<210>	2	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<220>		
<221>	MISC_FEATURE	
<223>	T 细胞受体 β 链 CD3 区; TCR CD3	

[0004]

<300>

<308> GenBank / AAB27501

<309> 2000-07-14

<313> (1)..(15)

<400> 2

Cys Ala Ser Ser Ser Asp Ser Gly Arg Leu His Asp Gln Tyr Phe

1 5 10 15

<210> 3

<211> 127

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CD3 抗原, δ 亚基同种型 B 前体

<300>

<308> GenBank / NP_001035741

<309> 2010-09-12

<313> (1)..(127)

<400> 3

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu

1 5 10 15

[0005]

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg

20

25

30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val

35

40

45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile

50

55

60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys

65

70

75

80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Thr Ala Asp Thr Gln

85

90

95

Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp

100

105

110

Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys

115

120

125

<210> 4

<211> 171

<212> PRT

<213> 智人

<220>

[0006]

<221> MISC_FEATURE

<223> CD3 抗原, δ 亚基同种型 A 前体

<300>

<308> GenBank / NP_000723

<309> 2010-09-12

<313> (1)..(171)

<400> 4

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu

1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg

20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val

35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile

50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys

65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys

85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val

100 105 110

[0007]

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His

115

120

125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg

130

135

140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr

145

150

155

160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys

165

170

<210> 5

<211> 182

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> T 细胞表面糖蛋白 CD3 γ 链

<300>

<308> Swiss-Prot / P09693

<309> 2010-08-10

<313> (1)..(182)

<400> 5

[0008]

Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu

1 5 10 15

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys

20 25 30

Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala

35 40 45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe

50 55 60

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp

65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro

85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala

100 105 110

Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val

115 120 125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln

130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr

145 150 155 160

[0009]

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
165 170 175

Asn Gln Leu Arg Arg Asn
180

<210> 6

<211> 182

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> T 细胞表面糖蛋白 CD3 γ 链前体

<300>

<308> GenBank / ACA05963

<309> 2008-02-22

<313> (1)..(182)

<400> 6

Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu
1 5 10 15

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys
20 25 30

[0010]

Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala

35

40

45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe

50

55

60

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp

65

70

75

80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro

85

90

95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala

100

105

110

Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val

115

120

125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln

130

135

140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr

145

150

155

160

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly

165

170

175

Asn Gln Leu Arg Arg Asn

180

[0011]

<210> 7

<211> 207

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> T 细胞表面糖蛋白 CD3 ϵ 链

<300>

<308> Swiss-Prot / P07766

<309> 2010-08-10

<313> (1)..(207)

<400> 7

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser

1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr

20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr

35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys

50 55 60

[0012]

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 8

<211> 171

[0013]

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> Swiss-Prot / P04234

<309> 2010-08-10

<313> (1)..(171)

<400> 8

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu

1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg

20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val

35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile

50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys

65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys

85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val

100 105 110

[0014]

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His

115

120

125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg

130

135

140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr

145

150

155

160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys

165

170

<210> 9

<211> 171

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> T 细胞表面糖蛋白 CD3 δ 链前体

<300>

<308> GenBank / ACA05962

<309> 2008-02-20

<313> (1)..(171)

<400> 9

[0015]

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu

1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg

20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val

35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile

50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys

65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys

85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val

100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His

115 120 125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg

130 135 140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr

145 150 155 160

[0016]

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys

165

170

<210> 10

<211> 164

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> T 细胞表面糖蛋白 CD3 ζ 链

<300>

<308> Swiss-Prot / P20963

<309> 2010-08-10

<313> (1)..(164)

<400> 10

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu

1

5

10

15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys

20

25

30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala

35

40

45

[0017]

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr

50

55

60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

65

70

75

80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met

85

90

95

Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn

100

105

110

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met

115

120

125

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly

130

135

140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala

145

150

155

160

Leu Pro Pro Arg

<210> 11

<211> 458

<212> PRT

[0018]

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CD4

<300>

<308> Swiss-Prot / P01730

<309> 2010-09-07

<313> (1)..(458)

<400> 11

Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu

1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gln Gly Lys Lys Val Val Leu Gly Lys

20 25 30

Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser

35 40 45

Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn

50 55 60

Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala

65 70 75 80

Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile

[0019]

85	90	95
Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu		
100	105	110
Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn		
115	120	125
Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu		
130	135	140
Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly		
145	150	155 160
Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu		
165	170	175
Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys		
180	185	190
Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser		
195	200	205
Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro		
210	215	220
Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp		
225	230	235 240
Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu		

[0020]

245	250	255
Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu		
260	265	270
Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu		
275	280	285
Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys		
290	295	300
Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg Ala Thr		
305	310	315 320
Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro		
325	330	335
Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser		
340	345	350
Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp		
355	360	365
Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile		
370	375	380
Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val Gln Pro Met Ala Leu Ile		
385	390	395 400
Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile		

[0021]

405

410

415

Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met

420

425

430

Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro

435

440

445

His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile

450

455

<210> 12

<211> 458

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CD4 抗原(p55), 同种型 CRA_a

<300>

<308> GenBank / EAW88739

<309> 2010-02-04

<313> (1)..(458)

<400> 12

Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu

[0022]

1	5	10	15
Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gln Gly Lys Lys Val Val Leu Gly Lys			
20	25	30	
Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser			
35	40	45	
Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn			
50	55	60	
Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala			
65	70	75	80
Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile			
85	90	95	
Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu			
100	105	110	
Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn			
115	120	125	
Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu			
130	135	140	
Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly			
145	150	155	160
Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu			

[0023]

	165	170	175
Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys			
	180	185	190
Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser			
	195	200	205
Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro			
	210	215	220
Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp			
225	230	235	240
Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu			
	245	250	255
Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu			
	260	265	270
Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu			
	275	280	285
Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys			
	290	295	300
Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg Ala Thr			
305	310	315	320
Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro			

[0024]

325	330	335	
Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser			
340	345	350	
Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp			
355	360	365	
Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile			
370	375	380	
Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val Gln Pro Met Ala Leu Ile			
385	390	395	400
Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile			
405	410	415	
Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met			
420	425	430	
Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro			
435	440	445	
His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile			
450	455		

<210> 13
<211> 297
<212> PRT

[0025]

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CD20

<300>

<308> Swiss-Prot / P11836

<309> 2010-09-07

<313> (1)..(297)

<400> 13

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro
1 5 10 15

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg
20 25 30

Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu
35 40 45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile
50 55 60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile
65 70 75 80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile

[0026]

85	90	95
Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu		
100	105	110
Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile		
115	120	125
Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser		
130	135	140
His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro		
145	150	155
160		
Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn		
165	170	175
Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly		
180	185	190
Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile		
195	200	205
Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys		
210	215	220
Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile		
225	230	235
240		
Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro		

[0027]

245

250

255

Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu

260

265

270

Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser

275

280

285

Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro

290

295

<210> 14

<211> 297

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 跨膜结构域 4, 亚家族 A, 成员 1

<300>

<308> NCBI / NP_690605

<309> 2010-08-29

<313> (1)..(297)

<400> 14

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro

[0028]

1	5	10	15
Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg			
20	25	30	
Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu			
35	40	45	
Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile			
50	55	60	
Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile			
65	70	75	80
Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile			
85	90	95	
Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu			
100	105	110	
Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile			
115	120	125	
Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser			
130	135	140	
His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro			
145	150	155	160
Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn			

[0029]

165	170	175	
Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly			
180	185	190	
Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile			
195	200	205	
Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys			
210	215	220	
Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile			
225	230	235	240
Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro			
245	250	255	
Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu			
260	265	270	
Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser			
275	280	285	
Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro			
290	295		
<210>	15		
<211>	214		
<212>	PRT		
<213>	智人		

[0030]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 跨膜结构域 4, 亚家族 A, 成员 3 同种型 a

<300>

<308> NCBI / NP_006129

<309> 2010-09-12

<313> (1)..(214)

<400> 15

Met Ala Ser His Glu Val Asp Asn Ala Glu Leu Gly Ser Ala Ser Ala

1 5 10 15

His Gly Thr Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro Glu Glu Leu Asn Thr Ser

20 25 30

Val Tyr Gln Pro Ile Asp Gly Ser Pro Asp Tyr Gln Lys Ala Lys Leu

35 40 45

Gln Val Leu Gly Ala Ile Gln Ile Leu Asn Ala Ala Met Ile Leu Ala

50 55 60

Leu Gly Val Phe Leu Gly Ser Leu Gln Tyr Pro Tyr His Phe Gln Lys

65 70 75 80

His Phe Phe Phe Phe Thr Phe Tyr Thr Gly Tyr Pro Ile Trp Gly Ala

85 90 95

[0031]

Val Phe Phe Cys Ser Ser Gly Thr Leu Ser Val Val Ala Gly Ile Lys

100

105

110

Pro Thr Arg Thr Trp Ile Gln Asn Ser Phe Gly Met Asn Ile Ala Ser

115

120

125

Ala Thr Ile Ala Leu Val Gly Thr Ala Phe Leu Ser Leu Asn Ile Ala

130

135

140

Val Asn Ile Gln Ser Leu Arg Ser Cys His Ser Ser Ser Glu Ser Pro

145

150

155

160

Asp Leu Cys Asn Tyr Met Gly Ser Ile Ser Asn Gly Met Val Ser Leu

165

170

175

Leu Leu Ile Leu Thr Leu Leu Glu Leu Cys Val Thr Ile Ser Thr Ile

180

185

190

Ala Met Trp Cys Asn Ala Asn Cys Cys Asn Ser Arg Glu Glu Ile Ser

195

200

205

Ser Pro Pro Asn Ser Val

210

<210> 16

<211> 168

<212> PRT

<213> 智人

[0032]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 跨膜结构域 4, 亚家族 A, 成员 3 同种型 b

<300>

<308> NCBI / NP_001026979

<309> 2010-09-20

<313> (1)..(168)

<400> 16

Met Ala Ser His Glu Val Asp Asn Ala Glu Leu Gly Ser Ala Ser Ala

1 5 10 15

His Gly Thr Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro Glu Glu Leu Asn Thr Ser

20 25 30

Val Tyr Gln Pro Ile Asp Gly Ser Pro Asp Tyr Gln Lys Ala Lys Leu

35 40 45

Gln Val Leu Gly Phe Cys Ser Ser Gly Thr Leu Ser Val Val Ala Gly

50 55 60

Ile Lys Pro Thr Arg Thr Trp Ile Gln Asn Ser Phe Gly Met Asn Ile

65 70 75 80

Ala Ser Ala Thr Ile Ala Leu Val Gly Thr Ala Phe Leu Ser Leu Asn

85 90 95

[0033]

Ile Ala Val Asn Ile Gln Ser Leu Arg Ser Cys His Ser Ser Ser Glu

100

105

110

Ser Pro Asp Leu Cys Asn Tyr Met Gly Ser Ile Ser Asn Gly Met Val

115

120

125

Ser Leu Leu Leu Ile Leu Thr Leu Leu Glu Leu Cys Val Thr Ile Ser

130

135

140

Thr Ile Ala Met Trp Cys Asn Ala Asn Cys Cys Asn Ser Arg Glu Glu

145

150

155

160

Ile Ser Ser Pro Pro Asn Ser Val

165

<210> 17

<211> 91

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 跨膜结构域 4, 亚家族 A, 成员 3 同种型 c

<300>

<308> NCBI / NP_001026836

<309> 2010-09-20

<313> (1)..(91)

[0034]

<400> 17

Met Asn Ile Ala Ser Ala Thr Ile Ala Leu Val Gly Thr Ala Phe Leu

1 5 10 15

Ser Leu Asn Ile Ala Val Asn Ile Gln Ser Leu Arg Ser Cys His Ser

20 25 30

Ser Ser Glu Ser Pro Asp Leu Cys Asn Tyr Met Gly Ser Ile Ser Asn

35 40 45

Gly Met Val Ser Leu Leu Leu Ile Leu Thr Leu Leu Glu Leu Cys Val

50 55 60

Thr Ile Ser Thr Ile Ala Met Trp Cys Asn Ala Asn Cys Cys Asn Ser

65 70 75 80

Arg Glu Glu Ile Ser Ser Pro Pro Asn Ser Val

85 90

<210> 18

<211> 232

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> VEGF-A

[0035]

<400> 18

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly

20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu

65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro

85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His

100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys

115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val

130 135 140

[0036]

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp
165 170 175

Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys
180 185 190

His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn
195 200 205

Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr
210 215 220

Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
225 230

<210> 19

<211> 412

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 血管内皮生长因子 A 同种型 a 前体

<300>

[0037]

<308> NCBI / NP_001020537

<309> 2010-09-20

<313> (1)..(412)

<400> 19

Met Thr Asp Arg Gln Thr Asp Thr Ala Pro Ser Pro Ser Tyr His Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg

35 40 45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe

50 55 60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala

65 70 75 80

Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu

85 90 95

Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly

100 105 110

Ala Arg Lys Pro Gly Ser Trp Thr Gly Glu Ala Ala Val Cys Ala Asp

115 120 125

[0038]

Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly

130

135

140

Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro

145

150

155

160

His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg

165

170

175

Ala Ser Glu Thr Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu

180

185

190

Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro

195

200

205

Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met

210

215

220

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

225

230

235

240

Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser

245

250

255

Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu

260

265

270

Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg

275

280

285

[0039]

Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln

290

295

300

His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu

305

310

315

320

Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys

325

330

335

Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys

340

345

350

Leu Met Pro Trp Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser

355

360

365

Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys

370

375

380

Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu

385

390

395

400

Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg

405

410

<210> 20

<211> 395

<212> PRT

<213> 智人

[0040]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 血管内皮生长因子 A 同种型 b 前体

<300>

<308> NCBI / NP_003367

<309> 2010-09-20

<313> (1)..(395)

<400> 20

Met Thr Asp Arg Gln Thr Asp Thr Ala Pro Ser Pro Ser Tyr His Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg

35 40 45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe

50 55 60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala

65 70 75 80

Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu

85 90 95

Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly

[0041]

100	105	110	
Ala Arg Lys Pro Gly Ser Trp Thr Gly Glu Ala Ala Val Cys Ala Asp			
115	120	125	
Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly			
130	135	140	
Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro			
145	150	155	160
His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg			
165	170	175	
Ala Ser Glu Thr Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu			
180	185	190	
Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro			
195	200	205	
Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met			
210	215	220	
Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp			
225	230	235	240
Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser			
245	250	255	
Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu			

[0042]

260	265	270
Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg		
275	280	285
Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln		
290	295	300
His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu		
305	310	315
320		
Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys		
325	330	335
Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu		
340	345	350
Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser		
355	360	365
Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn		
370	375	380
Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg		
385	390	395

<210> 21

<211> 389

<212> PRT

[0043]

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 血管内皮生长因子 A 同种型 c 前体

<300>

<308> NCBI / NP_001020538

<309> 2010-09-12

<313> (1)..(389)

<400> 21

Met Thr Asp Arg Gln Thr Asp Thr Ala Pro Ser Pro Ser Tyr His Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg

35 40 45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe

50 55 60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala

65 70 75 80

Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu

[0044]

85	90	95
Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly		
100	105	110
Ala Arg Lys Pro Gly Ser Trp Thr Gly Glu Ala Ala Val Cys Ala Asp		
115	120	125
Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly		
130	135	140
Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro		
145	150	155 160
His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg		
165	170	175
Ala Ser Glu Thr Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu		
180	185	190
Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro		
195	200	205
Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met		
210	215	220
Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp		
225	230	235 240
Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser		

[0045]

245	250	255
Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu		
260	265	270
Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg		
275	280	285
Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln		
290	295	300
His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu		
305	310	315
Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys		
325	330	335
Lys Ser Arg Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe		
340	345	350
Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser		
355	360	365
Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys		
370	375	380
Asp Lys Pro Arg Arg		
385		

[0046]

<210> 22

<211> 371

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 血管内皮生长因子 A 同种型 d 前体

<300>

<308> NCBI / NP_001020539

<309> 2010-09-20

<313> (1)..(371)

<400> 22

Met Thr Asp Arg Gln Thr Asp Thr Ala Pro Ser Pro Ser Tyr His Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg

35 40 45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe

50 55 60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala

[0047]

65	70	75	80
Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu			
85	90	95	
Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly			
100	105	110	
Ala Arg Lys Pro Gly Ser Trp Thr Gly Glu Ala Ala Val Cys Ala Asp			
115	120	125	
Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly			
130	135	140	
Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro			
145	150	155	160
His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg			
165	170	175	
Ala Ser Glu Thr Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu			
180	185	190	
Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro			
195	200	205	
Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met			
210	215	220	
Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp			

[0048]

225	230	235	240
Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser			
245	250	255	
Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu			
260	265	270	
Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg			
275	280	285	
Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln			
290	295	300	
His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu			
305	310	315	320
Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln			
325	330	335	
Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys			
340	345	350	
Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys			
355	360	365	
Pro Arg Arg			
370			

[0049]

<210> 23

<211> 354

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 血管内皮生长因子 A 同种型 e 前体

<300>

<308> NCBI / NP_001020540

<309> 2010-09-12

<313> (1)..(354)

<400> 23

Met Thr Asp Arg Gln Thr Asp Thr Ala Pro Ser Pro Ser Tyr His Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg

35 40 45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe

50 55 60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala

[0050]

65	70	75	80
Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu			
85	90	95	
Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly			
100	105	110	
Ala Arg Lys Pro Gly Ser Trp Thr Gly Glu Ala Ala Val Cys Ala Asp			
115	120	125	
Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly			
130	135	140	
Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro			
145	150	155	160
His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg			
165	170	175	
Ala Ser Glu Thr Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu			
180	185	190	
Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro			
195	200	205	
Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met			
210	215	220	
Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp			

[0051]

225	230	235	240
Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser			
245	250	255	
Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu			
260	265	270	
Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg			
275	280	285	
Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln			
290	295	300	
His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu			
305	310	315	320
Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln			
325	330	335	
Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys			
340	345	350	
Lys Met			

<210> 24

<211> 327

<212> PRT

<213> 智人

[0052]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 血管内皮生长因子 A 同种型 f 前体

<300>

<308> NCBI / NP_001020541

<309> 2010-09-20

<313> (1)..(327)

<400> 24

Met Thr Asp Arg Gln Thr Asp Thr Ala Pro Ser Pro Ser Tyr His Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg

35 40 45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe

50 55 60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala

65 70 75 80

Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu

85 90 95

[0053]

Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly			
100	105	110	
Ala Arg Lys Pro Gly Ser Trp Thr Gly Glu Ala Ala Val Cys Ala Asp			
115	120	125	
Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly			
130	135	140	
Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro			
145	150	155	160
His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg			
165	170	175	
Ala Ser Glu Thr Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu			
180	185	190	
Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro			
195	200	205	
Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met			
210	215	220	
Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp			
225	230	235	240
Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser			
245	250	255	

[0054]

Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu

260

265

270

Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg

275

280

285

Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln

290

295

300

His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu

305

310

315

320

Lys Cys Asp Lys Pro Arg Arg

325

<210> 25

<211> 371

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 血管内皮生长因子 A 同种型 g 前体

<300>

<308> NCBI / NP_001028928

<309> 2010-09-20

[0055]

<313> (1)..(371)

<400> 25

Met Thr Asp Arg Gln Thr Asp Thr Ala Pro Ser Pro Ser Tyr His Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg

35 40 45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe

50 55 60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala

65 70 75 80

Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu

85 90 95

Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly

100 105 110

Ala Arg Lys Pro Gly Ser Trp Thr Gly Glu Ala Ala Val Cys Ala Asp

115 120 125

Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly

130 135 140

[0056]

Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro
145 150 155 160

His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg
165 170 175

Ala Ser Glu Thr Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu
180 185 190

Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro
195 200 205

Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met
210 215 220

Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp
225 230 235 240

Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser
245 250 255

Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu
260 265 270

Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg
275 280 285

Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln
290 295 300

[0057]

His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu
305 310 315 320

Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln
325 330 335

Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys
340 345 350

Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Ser Leu Thr
355 360 365

Arg Lys Asp
370

<210> 26

<211> 272

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CD25 (白细胞介素 2 受体, α 链前体)

<300>

<308> NCBI / NP_000408

<309> 2010-09-12

[0058]

<313> (1)..(272)

<400> 26

Met Asp Ser Tyr Leu Leu Met Trp Gly Leu Leu Thr Phe Ile Met Val

1 5 10 15

Pro Gly Cys Gln Ala Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro

20 25 30

His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn

35 40 45

Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr

50 55 60

Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys

65 70 75 80

Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro

85 90 95

Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro

100 105 110

Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro

115 120 125

Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val

130 135 140

[0059]

Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His
145 150 155 160

Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg
165 170 175

Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln
180 185 190

Phe Pro Gly Glu Glu Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu
195 200 205

Ser Glu Thr Ser Cys Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr
210 215 220

Glu Met Ala Ala Thr Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln
225 230 235 240

Val Ala Val Ala Gly Cys Val Phe Leu Leu Ile Ser Val Leu Leu Leu
245 250 255

Ser Gly Leu Thr Trp Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Arg Arg Thr Ile
260 265 270

<210> 27

<211> 1255

<212> PRT

<213> 智人

[0060]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> HER-2

<300>

<308> GenBank / AAA75493

<309> 1995-09-18

<313> (1)..(1255)

<400> 27

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu

1

5

10

15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys

20

25

30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His

35

40

45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr

50

55

60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val

65

70

75

80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu

85

90

95

[0061]

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

100

105

110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro

115

120

125

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

130

135

140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln

145

150

155

160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn

165

170

175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys

180

185

190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser

195

200

205

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

210

215

220

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys

225

230

235

240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu

245

250

255

[0062]

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val

260

265

270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg

275

280

285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu

290

295

300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln

305

310

315

320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys

325

330

335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu

340

345

350

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys

355

360

365

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp

370

375

380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe

385

390

395

400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro

405

410

415

[0063]

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg

420

425

430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu

435

440

445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly

450

455

460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val

465

470

475

480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr

485

490

495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His

500

505

510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys

515

520

525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys

530

535

540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys

545

550

555

560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys

565

570

575

[0064]

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp			
580	585	590	
Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu			
595	600	605	
Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln			
610	615	620	
Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys			
625	630	635	640
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Val Ser			
645	650	655	
Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly			
660	665	670	
Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg			
675	680	685	
Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly			
690	695	700	
Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu			
705	710	715	720
Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys			
725	730	735	

[0065]

Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile

740

745

750

Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu

755

760

765

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg

770

775

780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu

785

790

795

800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg

805

810

815

Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly

820

825

830

Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala

835

840

845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe

850

855

860

Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp

865

870

875

880

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg

885

890

895

[0066]

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val			
900	905	910	
Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala			
915	920	925	
Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro			
930	935	940	
Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met			
945	950	955	960
Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe			
965	970	975	
Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu			
980	985	990	
Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu			
995	1000	1005	
Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr			
1010	1015	1020	
Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly			
1025	1030	1035	
Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg			
1040	1045	1050	

[0067]

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu		
1055	1060	1065
Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser		
1070	1075	1080
Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu		
1085	1090	1095
Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser		
1100	1105	1110
Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val		
1115	1120	1125
Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro		
1130	1135	1140
Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro		
1145	1150	1155
Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Ala Lys Thr Leu		
1160	1165	1170
Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly		
1175	1180	1185
Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala		
1190	1195	1200

[0068]

Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp

1205

1210

1215

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro

1220

1225

1230

Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr

1235

1240

1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val

1250

1255

<210> 28

<211> 1091

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> EGFR

<300>

<308> GenBank / AAH94761

<309> 2005-07-28

<313> (1)..(1091)

<400> 28

[0069]

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln

20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe

35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn

50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys

65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val

85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr

100 105 110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn

115 120 125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Gly Gln Lys

130 135 140

Cys Asp Pro Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu

145 150 155 160

[0070]

Asn Cys Gln Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly

165

170

175

Arg Cys Arg Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala

180

185

190

Ala Gly Cys Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys

195

200

205

Phe Arg Asp Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu

210

215

220

Tyr Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr

225

230

235

240

Ser Phe Gly Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val

245

250

255

Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu

260

265

270

Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys

275

280

285

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu

290

295

300

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile

305

310

315

320

[0071]

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe

325

330

335

Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr

340

345

350

Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn

355

360

365

Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg

370

375

380

Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile

385

390

395

400

Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val

405

410

415

Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp

420

425

430

Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn

435

440

445

Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu

450

455

460

Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser

465

470

475

480

[0072]

Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu			
485	490	495	
Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln			
500	505	510	
Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly			
515	520	525	
Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro			
530	535	540	
His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr			
545	550	555	560
Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His			
565	570	575	
Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro			
580	585	590	
Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala			
595	600	605	
Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg			
610	615	620	
Arg Arg His Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu			
625	630	635	640

[0073]

Arg Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln

645

650

655

Ala Leu Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val

660

665

670

Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro

675

680

685

Glu Gly Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu

690

695

700

Ala Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val

705

710

715

720

Met Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys

725

730

735

Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys

740

745

750

Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr

755

760

765

Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu

770

775

780

Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val

785

790

795

800

[0074]

Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu

805

810

815

Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro

820

825

830

Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His

835

840

845

Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr

850

855

860

Phe Gly Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser

865

870

875

880

Ile Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile

885

890

895

Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser

900

905

910

Arg Pro Lys Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg

915

920

925

Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu

930

935

940

Pro Ser Pro Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu

945

950

955

960

[0075]

Asp Met Asp Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln

965

970

975

Gly Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser

980

985

990

Leu Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn

995

1000

1005

Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg

1010

1015

1020

Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp

1025

1030

1035

Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Gly Glu Trp Leu Val Trp Lys Gln

1040

1045

1050

Ser Cys Ser Ser Thr Ser Ser Thr His Ser Ala Ala Ala Ser Leu

1055

1060

1065

Gln Cys Pro Ser Gln Val Leu Pro Pro Ala Ser Pro Glu Gly Glu

1070

1075

1080

Thr Val Ala Asp Leu Gln Thr Gln

1085

1090

<210> 29

<211> 1210

[0076]

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 表皮生长因子受体 同种型 a 前体

<300>

<308> NCBI / NP_005219

<309> 2010-09-12

<313> (1)..(1210)

<400> 29

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln

20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe

35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn

50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys

65 70 75 80

[0077]

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val

85

90

95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr

100

105

110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn

115

120

125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu

130

135

140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu

145

150

155

160

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

165

170

175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro

180

185

190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln

195

200

205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg

210

215

220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys

225

230

235

240

[0078]

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp			
245	250	255	
Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro			
260	265	270	
Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly			
275	280	285	
Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His			
290	295	300	
Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu			
305	310	315	320
Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val			
325	330	335	
Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn			
340	345	350	
Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp			
355	360	365	
Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr			
370	375	380	
Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu			
385	390	395	400

[0079]

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp

405

410

415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln

420

425

430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu

435

440

445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser

450

455

460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu

465

470

475

480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu

485

490

495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro

500

505

510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn

515

520

525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly

530

535

540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro

545

550

555

560

[0080]

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro

565

570

575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val

580

585

590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp

595

600

605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys

610

615

620

Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly

625

630

635

640

Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu

645

650

655

Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His

660

665

670

Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu

675

680

685

Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu

690

695

700

Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser

705

710

715

720

[0081]

Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu

725

730

735

Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser

740

745

750

Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser

755

760

765

Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser

770

775

780

Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp

785

790

795

800

Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn

805

810

815

Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg

820

825

830

Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro

835

840

845

Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala

850

855

860

Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp

865

870

875

880

[0082]

Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp

885

890

895

Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser

900

905

910

Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu

915

920

925

Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr

930

935

940

Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys

945

950

955

960

Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln

965

970

975

Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro

980

985

990

Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp

995

1000

1005

Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe

1010

1015

1020

Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu

1025

1030

1035

[0083]

Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn		
1040	1045	1050
Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg		
1055	1060	1065
Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp		
1070	1075	1080
Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro		
1085	1090	1095
Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln		
1100	1105	1110
Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro		
1115	1120	1125
His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln		
1130	1135	1140
Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala		
1145	1150	1155
Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln		
1160	1165	1170
Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys		
1175	1180	1185

[0084]

Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln

1190

1195

1200

Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala

1205

1210

<210> 30

<211> 628

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 表皮生长因子受体 同种型 b 前体

<300>

<308> NCBI / NP_958439

<309> 2010-09-12

<313> (1)..(628)

<400> 30

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala

1

5

10

15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln

20

25

30

[0085]

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe

35

40

45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn

50

55

60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys

65

70

75

80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val

85

90

95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr

100

105

110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn

115

120

125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu

130

135

140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu

145

150

155

160

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

165

170

175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro

180

185

190

[0086]

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln

195

200

205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg

210

215

220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys

225

230

235

240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp

245

250

255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro

260

265

270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly

275

280

285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His

290

295

300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu

305

310

315

320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val

325

330

335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn

340

345

350

[0087]

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp

355

360

365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr

370

375

380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu

385

390

395

400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp

405

410

415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln

420

425

430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu

435

440

445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser

450

455

460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu

465

470

475

480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu

485

490

495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro

500

505

510

[0088]

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
515 520 525

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

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
565 570 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
595 600 605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
610 615 620

Thr Tyr Gly Ser
625

<210> 31

<211> 405

<212> PRT

<213> 智人

[0089]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 表皮生长因子受体 同种型 c 前体

<300>

<308> NCBI / NP_958440

<309> 2010-09-20

<313> (1)..(405)

<400> 31

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln

20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe

35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn

50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys

65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val

85 90 95

[0090]

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr

100

105

110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn

115

120

125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu

130

135

140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu

145

150

155

160

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

165

170

175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro

180

185

190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln

195

200

205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg

210

215

220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys

225

230

235

240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp

245

250

255

[0091]

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro			
260	265	270	
Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly			
275	280	285	
Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His			
290	295	300	
Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu			
305	310	315	320
Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val			
	325	330	335
Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn			
340	345	350	
Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp			
355	360	365	
Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr			
370	375	380	
Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu			
385	390	395	400
Ile Thr Gly Leu Ser			
405			

[0092]

<210> 32

<211> 705

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 表皮生长因子受体 同种型 d 前体

<300>

<308> NCBI / NP_958441

<309> 2010-09-20

<313> (1)..(705)

<400> 32

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln

20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe

35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn

50 55 60

[0093]

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys			
65	70	75	80
Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val			
	85	90	95
Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr			
	100	105	110
Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn			
	115	120	125
Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu			
	130	135	140
His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu			
145	150	155	160
Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met			
	165	170	175
Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro			
	180	185	190
Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln			
	195	200	205
Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg			
	210	215	220

[0094]

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225 230 235 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260 265 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
275 280 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305 310 315 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380

[0095]

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu

385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp

405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln

420 425 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu

435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser

450 455 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu

465 470 475 480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu

485 490 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro

500 505 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn

515 520 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly

530 535 540

[0096]

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro

545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro

565 570 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val

580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp

595 600 605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys

610 615 620

Thr Tyr Gly Pro Gly Asn Glu Ser Leu Lys Ala Met Leu Phe Cys Leu

625 630 635 640

Phe Lys Leu Ser Ser Cys Asn Gln Ser Asn Asp Gly Ser Val Ser His

645 650 655

Gln Ser Gly Ser Pro Ala Ala Gln Glu Ser Cys Leu Gly Trp Ile Pro

660 665 670

Ser Leu Leu Pro Ser Glu Phe Gln Leu Gly Trp Gly Gly Cys Ser His

675 680 685

Leu His Ala Trp Pro Ser Ala Ser Val Ile Ile Thr Ala Ser Ser Cys

690 695 700

[0097]

His

705

<210> 33

<211> 364

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CD33 抗原同种型 1 前体

<300>

<308> NCBI / NP_001763

<309> 2010-08-04

<313> (1)..(364)

<400> 33

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala

1 5 10 15

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln

20 25 30

Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro

35 40 45

[0098]

Tyr Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly

50

55

60

Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln

65

70

75

80

Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro

85

90

95

Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp

100

105

110

Asn Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser

115

120

125

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

130

135

140

Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn

145

150

155

160

Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile

165

170

175

Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr

180

185

190

His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr

195

200

205

[0099]

Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu			
210	215	220	
Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr			
225	230	235	240
Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly			
245	250	255	
Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala			
260	265	270	
Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys			
275	280	285	
Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly			
290	295	300	
Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr			
305	310	315	320
Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu			
325	330	335	
Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys			
340	345	350	
Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln			
355	360		

[0100]

<210> 34
<211> 237
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> CD33 抗原同种型 2 前体

<300>
<308> NCBI / NP_001076087
<309> 2010-08-01
<313> (1)..(237)

<400> 34

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Asp Leu Thr His
1 5 10 15

Arg Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys
20 25 30

Asn Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro
35 40 45

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

Thr His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly

[0101]

65	70	75	80
Thr Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr			
	85	90	95
Glu Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr			
	100	105	110
Thr Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala			
	115	120	125
Gly Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu			
	130	135	140
Ala Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg			
	145	150	155
Lys Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr			
	165	170	175
Gly Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro			
	180	185	190
Thr Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp			
	195	200	205
Glu Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser			
	210	215	220
Lys Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln			

[0102]

225

230

235

<210> 35

<211> 221

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CD33 抗原(gp67), 同种型 CRA_a

<300>

<308> GenBank / EAW71994

<309> 2006-12-18

<313> (1)..(221)

<400> 35

Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Asp Leu Thr His

1 5 10 15

Arg Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys

20 25 30

Asn Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro

35 40 45

Ile Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr

[0103]

50

55

60

Thr His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly

65

70

75

80

Thr Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr

85

90

95

Glu Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Trp Lys Gln Glu Thr Arg Ala

100

105

110

Gly Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu

115

120

125

Ala Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg

130

135

140

Lys Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr

145

150

155

160

Gly Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro

165

170

175

Thr Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp

180

185

190

Glu Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser

195

200

205

Lys Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln

[0104]

210

215

220

<210> 36

<211> 364

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CD33 抗原(gp67), 同种型 CRA_b

<300>

<308> GenBank / EAW71994

<309> 2006-12-18

<313> (1)..(364)

<400> 36

Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala

1

5

10

15

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln

20

25

30

Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro

35

40

45

Tyr Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly

[0105]

50

55

60

Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln

65

70

75

80

Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro

85

90

95

Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp

100

105

110

Asn Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser

115

120

125

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

130

135

140

Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn

145

150

155

160

Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile

165

170

175

Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr

180

185

190

His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr

195

200

205

Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu

[0106]

210	215	220	
Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr			
225	230	235	240
Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly			
	245	250	255
Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala			
	260	265	270
Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys			
	275	280	285
Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly			
	290	295	300
Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr			
305	310	315	320
Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu			
	325	330	335
Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys			
	340	345	350
Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln			
	355	360	

[0107]

<210> 37

<211> 237

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CD33 抗原(gp67), 同种型 CRA_c

<300>

<308> GenBank / EAW71996

<309> 2006-12-18

<313> (1)..(237)

<400> 37

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Asp Leu Thr His

1 5 10 15

Arg Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys

20 25 30

Asn Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro

35 40 45

Ile Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr

50 55 60

Thr His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly

[0108]

65	70	75	80
Thr Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr			
	85	90	95
Glu Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr			
100	105	110	
Thr Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala			
115	120	125	
Gly Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu			
130	135	140	
Ala Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg			
145	150	155	160
Lys Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr			
165	170	175	
Gly Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro			
180	185	190	
Thr Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp			
195	200	205	
Glu Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser			
210	215	220	
Lys Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln			

[0109]

225 230 235

<210> 38

<211> 61

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CD52 抗原前体

<300>

<308> NCBI / NP_001794

<309> 2010-07-04

<313> (1)..(61)

<400> 38

Met Lys Arg Phe Leu Phe Leu Leu Thr Ile Ser Leu Leu Val Met

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Pro Ser Ala Ser Ser Asn Ile Ser Gly Gly Ile Phe Leu Phe

35 40 45

Phe Val Ala Asn Ala Ile Ile His Leu Phe Cys Phe Ser

[0110]

50

55

60

<210> 39

<211> 193

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> EPO - 红细胞生成素

<300>

<308> GenBank / CAA26095

<309> 2006-11-14

<313> (1)..(193)

<400> 39

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu

1

5

10

15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu

20

25

30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Gln Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu

35

40

45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu

[0111]

50	55	60	
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg			
65	70	75	80
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu			
	85	90	95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser			
100	105	110	
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly			
115	120	125	
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu			
130	135	140	
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile			
145	150	155	160
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu			
	165	170	175
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp			
180	185	190	
Arg			

<210> 40

[0112]

<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 胰岛素

<300>
<308> GenBank / AAA59172
<309> 2001-02-12
<313> (1)..(110)

<400> 40

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
20 25 30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
35 40 45

Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
50 55 60

Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
65 70 75 80

[0113]

Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys

85

90

95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

100

105

110

<210> 41

<211> 1382

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> INSR

<300>

<308> Swiss-Prot / P06213

<309> 2010-09-07

<313> (1)..(1382)

<400> 41

Met Gly Thr Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Ala Ala Pro Leu Leu Val

1

5

10

15

Ala Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ala Ala Gly His Leu Tyr Pro Gly

20

25

30

[0114]

Glu Val Cys Pro Gly Met Asp Ile Arg Asn Asn Leu Thr Arg Leu His			
35	40	45	
Glu Leu Glu Asn Cys Ser Val Ile Glu Gly His Leu Gln Ile Leu Leu			
50	55	60	
Met Phe Lys Thr Arg Pro Glu Asp Phe Arg Asp Leu Ser Phe Pro Lys			
65	70	75	80
Leu Ile Met Ile Thr Asp Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Tyr Gly Leu			
	85	90	95
Glu Ser Leu Lys Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Ser			
100	105	110	
Arg Leu Phe Phe Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Val His Leu			
115	120	125	
Lys Glu Leu Gly Leu Tyr Asn Leu Met Asn Ile Thr Arg Gly Ser Val			
130	135	140	
Arg Ile Glu Lys Asn Asn Glu Leu Cys Tyr Leu Ala Thr Ile Asp Trp			
145	150	155	160
Ser Arg Ile Leu Asp Ser Val Glu Asp Asn Tyr Ile Val Leu Asn Lys			
	165	170	175
Asp Asp Asn Glu Glu Cys Gly Asp Ile Cys Pro Gly Thr Ala Lys Gly			
180	185	190	

[0115]

Lys Thr Asn Cys Pro Ala Thr Val Ile Asn Gly Gln Phe Val Glu Arg

195

200

205

Cys Trp Thr His Ser His Cys Gln Lys Val Cys Pro Thr Ile Cys Lys

210

215

220

Ser His Gly Cys Thr Ala Glu Gly Leu Cys Cys His Ser Glu Cys Leu

225

230

235

240

Gly Asn Cys Ser Gln Pro Asp Asp Pro Thr Lys Cys Val Ala Cys Arg

245

250

255

Asn Phe Tyr Leu Asp Gly Arg Cys Val Glu Thr Cys Pro Pro Pro Tyr

260

265

270

Tyr His Phe Gln Asp Trp Arg Cys Val Asn Phe Ser Phe Cys Gln Asp

275

280

285

Leu His His Lys Cys Lys Asn Ser Arg Arg Gln Gly Cys His Gln Tyr

290

295

300

Val Ile His Asn Asn Lys Cys Ile Pro Glu Cys Pro Ser Gly Tyr Thr

305

310

315

320

Met Asn Ser Ser Asn Leu Leu Cys Thr Pro Cys Leu Gly Pro Cys Pro

325

330

335

Lys Val Cys His Leu Leu Glu Gly Glu Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr

340

345

350

[0116]

Ser Ala Gln Glu Leu Arg Gly Cys Thr Val Ile Asn Gly Ser Leu Ile

355

360

365

Ile Asn Ile Arg Gly Gly Asn Asn Leu Ala Ala Glu Leu Glu Ala Asn

370

375

380

Leu Gly Leu Ile Glu Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Lys Ile Arg Arg Ser

385

390

395

400

Tyr Ala Leu Val Ser Leu Ser Phe Phe Arg Lys Leu Arg Leu Ile Arg

405

410

415

Gly Glu Thr Leu Glu Ile Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Ala Leu Asp Asn

420

425

430

Gln Asn Leu Arg Gln Leu Trp Asp Trp Ser Lys His Asn Leu Thr Ile

435

440

445

Thr Gln Gly Lys Leu Phe Phe His Tyr Asn Pro Lys Leu Cys Leu Ser

450

455

460

Glu Ile His Lys Met Glu Glu Val Ser Gly Thr Lys Gly Arg Gln Glu

465

470

475

480

Arg Asn Asp Ile Ala Leu Lys Thr Asn Gly Asp Gln Ala Ser Cys Glu

485

490

495

Asn Glu Leu Leu Lys Phe Ser Tyr Ile Arg Thr Ser Phe Asp Lys Ile

500

505

510

[0117]

Leu Leu Arg Trp Glu Pro Tyr Trp Pro Pro Asp Phe Arg Asp Leu Leu
515 520 525

Gly Phe Met Leu Phe Tyr Lys Glu Ala Pro Tyr Gln Asn Val Thr Glu
530 535 540

Phe Asp Gly Gln Asp Ala Cys Gly Ser Asn Ser Trp Thr Val Val Asp
545 550 555 560

Ile Asp Pro Pro Leu Arg Ser Asn Asp Pro Lys Ser Gln Asn His Pro
565 570 575

Gly Trp Leu Met Arg Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln Tyr Ala Ile Phe
580 585 590

Val Lys Thr Leu Val Thr Phe Ser Asp Glu Arg Arg Thr Tyr Gly Ala
595 600 605

Lys Ser Asp Ile Ile Tyr Val Gln Thr Asp Ala Thr Asn Pro Ser Val
610 615 620

Pro Leu Asp Pro Ile Ser Val Ser Asn Ser Ser Ser Gln Ile Ile Leu
625 630 635 640

Lys Trp Lys Pro Pro Ser Asp Pro Asn Gly Asn Ile Thr His Tyr Leu
645 650 655

Val Phe Trp Glu Arg Gln Ala Glu Asp Ser Glu Leu Phe Glu Leu Asp
660 665 670

[0118]

Tyr Cys Leu Lys Gly Leu Lys Leu Pro Ser Arg Thr Trp Ser Pro Pro

675

680

685

Phe Glu Ser Glu Asp Ser Gln Lys His Asn Gln Ser Glu Tyr Glu Asp

690

695

700

Ser Ala Gly Glu Cys Cys Ser Cys Pro Lys Thr Asp Ser Gln Ile Leu

705

710

715

720

Lys Glu Leu Glu Glu Ser Ser Phe Arg Lys Thr Phe Glu Asp Tyr Leu

725

730

735

His Asn Val Val Phe Val Pro Arg Lys Thr Ser Ser Gly Thr Gly Ala

740

745

750

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

755

760

765

Asn Val Thr Val Ala Val Pro Thr Val Ala Ala Phe Pro Asn Thr Ser

770

775

780

Ser Thr Ser Val Pro Thr Ser Pro Glu Glu His Arg Pro Phe Glu Lys

785

790

795

800

Val Val Asn Lys Glu Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Arg His Phe Thr

805

810

815

Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gln Ala Cys Asn Gln Asp Thr Pro Glu Glu

820

825

830

[0119]

Arg Cys Ser Val Ala Ala Tyr Val Ser Ala Arg Thr Met Pro Glu Ala

835

840

845

Lys Ala Asp Asp Ile Val Gly Pro Val Thr His Glu Ile Phe Glu Asn

850

855

860

Asn Val Val His Leu Met Trp Gln Glu Pro Lys Glu Pro Asn Gly Leu

865

870

875

880

Ile Val Leu Tyr Glu Val Ser Tyr Arg Arg Tyr Gly Asp Glu Glu Leu

885

890

895

His Leu Cys Val Ser Arg Lys His Phe Ala Leu Glu Arg Gly Cys Arg

900

905

910

Leu Arg Gly Leu Ser Pro Gly Asn Tyr Ser Val Arg Ile Arg Ala Thr

915

920

925

Ser Leu Ala Gly Asn Gly Ser Trp Thr Glu Pro Thr Tyr Phe Tyr Val

930

935

940

Thr Asp Tyr Leu Asp Val Pro Ser Asn Ile Ala Lys Ile Ile Ile Gly

945

950

955

960

Pro Leu Ile Phe Val Phe Leu Phe Ser Val Val Ile Gly Ser Ile Tyr

965

970

975

Leu Phe Leu Arg Lys Arg Gln Pro Asp Gly Pro Leu Gly Pro Leu Tyr

980

985

990

[0120]

Ala Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Leu Ser Ala Ser Asp Val Phe Pro Cys			
995	1000	1005	
Ser Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp Glu Val Ser Arg Glu Lys Ile			
1010	1015	1020	
Thr Leu Leu Arg Glu Leu Gly Gln Gly Ser Phe Gly Met Val Tyr			
1025	1030	1035	
Glu Gly Asn Ala Arg Asp Ile Ile Lys Gly Glu Ala Glu Thr Arg			
1040	1045	1050	
Val Ala Val Lys Thr Val Asn Glu Ser Ala Ser Leu Arg Glu Arg			
1055	1060	1065	
Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val Met Lys Gly Phe Thr Cys			
1070	1075	1080	
His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val Val Ser Lys Gly Gln Pro			
1085	1090	1095	
Thr Leu Val Val Met Glu Leu Met Ala His Gly Asp Leu Lys Ser			
1100	1105	1110	
Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Ala Glu Asn Asn Pro Gly Arg			
1115	1120	1125	
Pro Pro Pro Thr Leu Gln Glu Met Ile Gln Met Ala Ala Glu Ile			
1130	1135	1140	

[0121]

Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala Lys Lys Phe Val His Arg

1145

1150

1155

Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val Ala His Asp Phe Thr Val

1160

1165

1170

Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg Asp Ile Tyr Glu Thr Asp

1175

1180

1185

Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met

1190

1195

1200

Ala Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val Phe Thr Thr Ser Ser Asp

1205

1210

1215

Met Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Thr Ser Leu Ala

1220

1225

1230

Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu Ser Asn Glu Gln Val Leu Lys Phe

1235

1240

1245

Val Met Asp Gly Gly Tyr Leu Asp Gln Pro Asp Asn Cys Pro Glu

1250

1255

1260

Arg Val Thr Asp Leu Met Arg Met Cys Trp Gln Phe Asn Pro Lys

1265

1270

1275

Met Arg Pro Thr Phe Leu Glu Ile Val Asn Leu Leu Lys Asp Asp

1280

1285

1290

[0122]

Leu His Pro Ser Phe Pro Glu Val Ser Phe Phe His Ser Glu Glu

1295

1300

1305

Asn Lys Ala Pro Glu Ser Glu Glu Leu Glu Met Glu Phe Glu Asp

1310

1315

1320

Met Glu Asn Val Pro Leu Asp Arg Ser Ser His Cys Gln Arg Glu

1325

1330

1335

Glu Ala Gly Gly Arg Asp Gly Gly Ser Ser Leu Gly Phe Lys Arg

1340

1345

1350

Ser Tyr Glu Glu His Ile Pro Tyr Thr His Met Asn Gly Gly Lys

1355

1360

1365

Lys Asn Gly Arg Ile Leu Thr Leu Pro Arg Ser Asn Pro Ser

1370

1375

1380

<210> 42

<211> 1370

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胰岛素受体同种型短前体

<300>

[0123]

<308> NCBI / NP_001073285

<309> 2010-09-19

<313> (1)..(1370)

<400> 42

Met Ala Thr Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Ala Ala Pro Leu Leu Val

1 5 10 15

Ala Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ala Ala Gly His Leu Tyr Pro Gly

20 25 30

Glu Val Cys Pro Gly Met Asp Ile Arg Asn Asn Leu Thr Arg Leu His

35 40 45

Glu Leu Glu Asn Cys Ser Val Ile Glu Gly His Leu Gln Ile Leu Leu

50 55 60

Met Phe Lys Thr Arg Pro Glu Asp Phe Arg Asp Leu Ser Phe Pro Lys

65 70 75 80

Leu Ile Met Ile Thr Asp Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Tyr Gly Leu

85 90 95

Glu Ser Leu Lys Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Ser

100 105 110

Arg Leu Phe Phe Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Val His Leu

115 120 125

[0124]

Lys Glu Leu Gly Leu Tyr Asn Leu Met Asn Ile Thr Arg Gly Ser Val

130

135

140

Arg Ile Glu Lys Asn Asn Glu Leu Cys Tyr Leu Ala Thr Ile Asp Trp

145

150

155

160

Ser Arg Ile Leu Asp Ser Val Glu Asp Asn Tyr Ile Val Leu Asn Lys

165

170

175

Asp Asp Asn Glu Glu Cys Gly Asp Ile Cys Pro Gly Thr Ala Lys Gly

180

185

190

Lys Thr Asn Cys Pro Ala Thr Val Ile Asn Gly Gln Phe Val Glu Arg

195

200

205

Cys Trp Thr His Ser His Cys Gln Lys Val Cys Pro Thr Ile Cys Lys

210

215

220

Ser His Gly Cys Thr Ala Glu Gly Leu Cys Cys His Ser Glu Cys Leu

225

230

235

240

Gly Asn Cys Ser Gln Pro Asp Asp Pro Thr Lys Cys Val Ala Cys Arg

245

250

255

Asn Phe Tyr Leu Asp Gly Arg Cys Val Glu Thr Cys Pro Pro Pro Tyr

260

265

270

Tyr His Phe Gln Asp Trp Arg Cys Val Asn Phe Ser Phe Cys Gln Asp

275

280

285

[0125]

Leu His His Lys Cys Lys Asn Ser Arg Arg Gln Gly Cys His Gln Tyr
290 295 300

Val Ile His Asn Asn Lys Cys Ile Pro Glu Cys Pro Ser Gly Tyr Thr
305 310 315 320

Met Asn Ser Ser Asn Leu Leu Cys Thr Pro Cys Leu Gly Pro Cys Pro
325 330 335

Lys Val Cys His Leu Leu Glu Gly Glu Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr
340 345 350

Ser Ala Gln Glu Leu Arg Gly Cys Thr Val Ile Asn Gly Ser Leu Ile
355 360 365

Ile Asn Ile Arg Gly Gly Asn Asn Leu Ala Ala Glu Leu Glu Ala Asn
370 375 380

Leu Gly Leu Ile Glu Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Lys Ile Arg Arg Ser
385 390 395 400

Tyr Ala Leu Val Ser Leu Ser Phe Phe Arg Lys Leu Arg Leu Ile Arg
405 410 415

Gly Glu Thr Leu Glu Ile Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Ala Leu Asp Asn
420 425 430

Gln Asn Leu Arg Gln Leu Trp Asp Trp Ser Lys His Asn Leu Thr Ile
435 440 445

[0126]

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

[0127]

Lys Ser Asp Ile Ile Tyr Val Gln Thr Asp Ala Thr Asn Pro Ser Val
610 615 620

Pro Leu Asp Pro Ile Ser Val Ser Asn Ser Ser Ser Gln Ile Ile Leu
625 630 635 640

Lys Trp Lys Pro Pro Ser Asp Pro Asn Gly Asn Ile Thr His Tyr Leu
645 650 655

Val Phe Trp Glu Arg Gln Ala Glu Asp Ser Glu Leu Phe Glu Leu Asp
660 665 670

Tyr Cys Leu Lys Gly Leu Lys Leu Pro Ser Arg Thr Trp Ser Pro Pro
675 680 685

Phe Glu Ser Glu Asp Ser Gln Lys His Asn Gln Ser Glu Tyr Glu Asp
690 695 700

Ser Ala Gly Glu Cys Cys Ser Cys Pro Lys Thr Asp Ser Gln Ile Leu
705 710 715 720

Lys Glu Leu Glu Glu Ser Ser Phe Arg Lys Thr Phe Glu Asp Tyr Leu
725 730 735

His Asn Val Val Phe Val Pro Arg Pro Ser Arg Lys Arg Arg Ser Leu
740 745 750

Gly Asp Val Gly Asn Val Thr Val Ala Val Pro Thr Val Ala Ala Phe
755 760 765

[0128]

Pro Asn Thr Ser Ser Thr Ser Val Pro Thr Ser Pro Glu Glu His Arg

770

775

780

Pro Phe Glu Lys Val Val Asn Lys Glu Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu

785

790

795

800

Arg His Phe Thr Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gln Ala Cys Asn Gln Asp

805

810

815

Thr Pro Glu Glu Arg Cys Ser Val Ala Ala Tyr Val Ser Ala Arg Thr

820

825

830

Met Pro Glu Ala Lys Ala Asp Asp Ile Val Gly Pro Val Thr His Glu

835

840

845

Ile Phe Glu Asn Asn Val Val His Leu Met Trp Gln Glu Pro Lys Glu

850

855

860

Pro Asn Gly Leu Ile Val Leu Tyr Glu Val Ser Tyr Arg Arg Tyr Gly

865

870

875

880

Asp Glu Glu Leu His Leu Cys Val Ser Arg Lys His Phe Ala Leu Glu

885

890

895

Arg Gly Cys Arg Leu Arg Gly Leu Ser Pro Gly Asn Tyr Ser Val Arg

900

905

910

Ile Arg Ala Thr Ser Leu Ala Gly Asn Gly Ser Trp Thr Glu Pro Thr

915

920

925

[0129]

Tyr Phe Tyr Val Thr Asp Tyr Leu Asp Val Pro Ser Asn Ile Ala Lys			
930	935	940	
Ile Ile Ile Gly Pro Leu Ile Phe Val Phe Leu Phe Ser Val Val Ile			
945	950	955	960
Gly Ser Ile Tyr Leu Phe Leu Arg Lys Arg Gln Pro Asp Gly Pro Leu			
	965	970	975
Gly Pro Leu Tyr Ala Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Leu Ser Ala Ser Asp			
980	985	990	
Val Phe Pro Cys Ser Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp Glu Val Ser Arg			
995	1000	1005	
Glu Lys Ile Thr Leu Leu Arg Glu Leu Gly Gln Gly Ser Phe Gly			
1010	1015	1020	
Met Val Tyr Glu Gly Asn Ala Arg Asp Ile Ile Lys Gly Glu Ala			
1025	1030	1035	
Glu Thr Arg Val Ala Val Lys Thr Val Asn Glu Ser Ala Ser Leu			
1040	1045	1050	
Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val Met Lys Gly			
1055	1060	1065	
Phe Thr Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val Val Ser Lys			
1070	1075	1080	

[0130]

Gly Gln Pro Thr Leu Val Val Met Glu Leu Met Ala His Gly Asp		
1085	1090	1095
Leu Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Ala Glu Asn Asn		
1100	1105	1110
Pro Gly Arg Pro Pro Pro Thr Leu Gln Glu Met Ile Gln Met Ala		
1115	1120	1125
Ala Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala Lys Lys Phe		
1130	1135	1140
Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val Ala His Asp		
1145	1150	1155
Phe Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg Asp Ile Tyr		
1160	1165	1170
Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu Leu Pro Val		
1175	1180	1185
Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val Phe Thr Thr		
1190	1195	1200
Ser Ser Asp Met Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Thr		
1205	1210	1215
Ser Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu Ser Asn Glu Gln Val		
1220	1225	1230

[0131]

Leu Lys Phe Val Met Asp Gly Gly Tyr Leu Asp Gln Pro Asp Asn

1235

1240

1245

Cys Pro Glu Arg Val Thr Asp Leu Met Arg Met Cys Trp Gln Phe

1250

1255

1260

Asn Pro Lys Met Arg Pro Thr Phe Leu Glu Ile Val Asn Leu Leu

1265

1270

1275

Lys Asp Asp Leu His Pro Ser Phe Pro Glu Val Ser Phe Phe His

1280

1285

1290

Ser Glu Glu Asn Lys Ala Pro Glu Ser Glu Glu Leu Glu Met Glu

1295

1300

1305

Phe Glu Asp Met Glu Asn Val Pro Leu Asp Arg Ser Ser His Cys

1310

1315

1320

Gln Arg Glu Glu Ala Gly Gly Arg Asp Gly Gly Ser Ser Leu Gly

1325

1330

1335

Phe Lys Arg Ser Tyr Glu Glu His Ile Pro Tyr Thr His Met Asn

1340

1345

1350

Gly Gly Lys Lys Asn Gly Arg Ile Leu Thr Leu Pro Arg Ser Asn

1355

1360

1365

Pro Ser

1370

[0132]

<210> 43
<211> 1382
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 人生长激素

<300>
<308> NCBI / NP_000199
<309> 2010-09-12
<313> (1)..(1382)

<400> 43

Met Ala Thr Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Ala Ala Pro Leu Leu Val

1 5 10 15

Ala Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ala Ala Gly His Leu Tyr Pro Gly

20 25 30

Glu Val Cys Pro Gly Met Asp Ile Arg Asn Asn Leu Thr Arg Leu His

35 40 45

Glu Leu Glu Asn Cys Ser Val Ile Glu Gly His Leu Gln Ile Leu Leu

50 55 60

[0133]

Met Phe Lys Thr Arg Pro Glu Asp Phe Arg Asp Leu Ser Phe Pro Lys
65 70 75 80

Leu Ile Met Ile Thr Asp Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Tyr Gly Leu
85 90 95

Glu Ser Leu Lys Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Ser
100 105 110

Arg Leu Phe Phe Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Val His Leu
115 120 125

Lys Glu Leu Gly Leu Tyr Asn Leu Met Asn Ile Thr Arg Gly Ser Val
130 135 140

Arg Ile Glu Lys Asn Asn Glu Leu Cys Tyr Leu Ala Thr Ile Asp Trp
145 150 155 160

Ser Arg Ile Leu Asp Ser Val Glu Asp Asn Tyr Ile Val Leu Asn Lys
165 170 175

Asp Asp Asn Glu Glu Cys Gly Asp Ile Cys Pro Gly Thr Ala Lys Gly
180 185 190

Lys Thr Asn Cys Pro Ala Thr Val Ile Asn Gly Gln Phe Val Glu Arg
195 200 205

Cys Trp Thr His Ser His Cys Gln Lys Val Cys Pro Thr Ile Cys Lys
210 215 220

[0134]

Ser His Gly Cys Thr Ala Glu Gly Leu Cys Cys His Ser Glu Cys Leu			
225	230	235	240
Gly Asn Cys Ser Gln Pro Asp Asp Pro Thr Lys Cys Val Ala Cys Arg			
	245	250	255
Asn Phe Tyr Leu Asp Gly Arg Cys Val Glu Thr Cys Pro Pro Pro Tyr			
	260	265	270
Tyr His Phe Gln Asp Trp Arg Cys Val Asn Phe Ser Phe Cys Gln Asp			
275	280	285	
Leu His His Lys Cys Lys Asn Ser Arg Arg Gln Gly Cys His Gln Tyr			
290	295	300	
Val Ile His Asn Asn Lys Cys Ile Pro Glu Cys Pro Ser Gly Tyr Thr			
305	310	315	320
Met Asn Ser Ser Asn Leu Leu Cys Thr Pro Cys Leu Gly Pro Cys Pro			
	325	330	335
Lys Val Cys His Leu Leu Glu Gly Glu Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr			
	340	345	350
Ser Ala Gln Glu Leu Arg Gly Cys Thr Val Ile Asn Gly Ser Leu Ile			
355	360	365	
Ile Asn Ile Arg Gly Gly Asn Asn Leu Ala Ala Glu Leu Glu Ala Asn			
370	375	380	

[0135]

Leu Gly Leu Ile Glu Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Lys Ile Arg Arg Ser			
385	390	395	400
Tyr Ala Leu Val Ser Leu Ser Phe Phe Arg Lys Leu Arg Leu Ile Arg			
	405	410	415
Gly Glu Thr Leu Glu Ile Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Ala Leu Asp Asn			
	420	425	430
Gln Asn Leu Arg Gln Leu Trp Asp Trp Ser Lys His Asn Leu Thr Ile			
	435	440	445
Thr Gln Gly Lys Leu Phe Phe His Tyr Asn Pro Lys Leu Cys Leu Ser			
450	455	460	
Glu Ile His Lys Met Glu Glu Val Ser Gly Thr Lys Gly Arg Gln Glu			
465	470	475	480
Arg Asn Asp Ile Ala Leu Lys Thr Asn Gly Asp Gln Ala Ser Cys Glu			
	485	490	495
Asn Glu Leu Leu Lys Phe Ser Tyr Ile Arg Thr Ser Phe Asp Lys Ile			
	500	505	510
Leu Leu Arg Trp Glu Pro Tyr Trp Pro Pro Asp Phe Arg Asp Leu Leu			
	515	520	525
Gly Phe Met Leu Phe Tyr Lys Glu Ala Pro Tyr Gln Asn Val Thr Glu			
530	535	540	

[0136]

Phe Asp Gly Gln Asp Ala Cys Gly Ser Asn Ser Trp Thr Val Val Asp			
545	550	555	560
Ile Asp Pro Pro Leu Arg Ser Asn Asp Pro Lys Ser Gln Asn His Pro			
	565	570	575
Gly Trp Leu Met Arg Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln Tyr Ala Ile Phe			
	580	585	590
Val Lys Thr Leu Val Thr Phe Ser Asp Glu Arg Arg Thr Tyr Gly Ala			
	595	600	605
Lys Ser Asp Ile Ile Tyr Val Gln Thr Asp Ala Thr Asn Pro Ser Val			
	610	615	620
Pro Leu Asp Pro Ile Ser Val Ser Asn Ser Ser Ser Gln Ile Ile Leu			
625	630	635	640
Lys Trp Lys Pro Pro Ser Asp Pro Asn Gly Asn Ile Thr His Tyr Leu			
	645	650	655
Val Phe Trp Glu Arg Gln Ala Glu Asp Ser Glu Leu Phe Glu Leu Asp			
	660	665	670
Tyr Cys Leu Lys Gly Leu Lys Leu Pro Ser Arg Thr Trp Ser Pro Pro			
	675	680	685
Phe Glu Ser Glu Asp Ser Gln Lys His Asn Gln Ser Glu Tyr Glu Asp			
	690	695	700

[0137]

Ser Ala Gly Glu Cys Cys Ser Cys Pro Lys Thr Asp Ser Gln Ile Leu

705 710 715 720

Lys Glu Leu Glu Glu Ser Ser Phe Arg Lys Thr Phe Glu Asp Tyr Leu

725 730 735

His Asn Val Val Phe Val Pro Arg Lys Thr Ser Ser Gly Thr Gly Ala

740 745 750

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

755 760 765

Asn Val Thr Val Ala Val Pro Thr Val Ala Ala Phe Pro Asn Thr Ser

770 775 780

Ser Thr Ser Val Pro Thr Ser Pro Glu Glu His Arg Pro Phe Glu Lys

785 790 795 800

Val Val Asn Lys Glu Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Arg His Phe Thr

805 810 815

Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gln Ala Cys Asn Gln Asp Thr Pro Glu Glu

820 825 830

Arg Cys Ser Val Ala Ala Tyr Val Ser Ala Arg Thr Met Pro Glu Ala

835 840 845

Lys Ala Asp Asp Ile Val Gly Pro Val Thr His Glu Ile Phe Glu Asn

850 855 860

[0138]

Asn Val Val His Leu Met Trp Gln Glu Pro Lys Glu Pro Asn Gly Leu
865 870 875 880

Ile Val Leu Tyr Glu Val Ser Tyr Arg Arg Tyr Gly Asp Glu Glu Leu
885 890 895

His Leu Cys Val Ser Arg Lys His Phe Ala Leu Glu Arg Gly Cys Arg
900 905 910

Leu Arg Gly Leu Ser Pro Gly Asn Tyr Ser Val Arg Ile Arg Ala Thr
915 920 925

Ser Leu Ala Gly Asn Gly Ser Trp Thr Glu Pro Thr Tyr Phe Tyr Val
930 935 940

Thr Asp Tyr Leu Asp Val Pro Ser Asn Ile Ala Lys Ile Ile Ile Gly
945 950 955 960

Pro Leu Ile Phe Val Phe Leu Phe Ser Val Val Ile Gly Ser Ile Tyr
965 970 975

Leu Phe Leu Arg Lys Arg Gln Pro Asp Gly Pro Leu Gly Pro Leu Tyr
980 985 990

Ala Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Leu Ser Ala Ser Asp Val Phe Pro Cys
995 1000 1005

Ser Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp Glu Val Ser Arg Glu Lys Ile
1010 1015 1020

[0139]

Thr Leu Leu Arg Glu Leu Gly Gln Gly Ser Phe Gly Met Val Tyr

1025

1030

1035

Glu Gly Asn Ala Arg Asp Ile Ile Lys Gly Glu Ala Glu Thr Arg

1040

1045

1050

Val Ala Val Lys Thr Val Asn Glu Ser Ala Ser Leu Arg Glu Arg

1055

1060

1065

Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val Met Lys Gly Phe Thr Cys

1070

1075

1080

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

1085

1090

1095

Thr Leu Val Val Met Glu Leu Met Ala His Gly Asp Leu Lys Ser

1100

1105

1110

Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Ala Glu Asn Asn Pro Gly Arg

1115

1120

1125

Pro Pro Pro Thr Leu Gln Glu Met Ile Gln Met Ala Ala Glu Ile

1130

1135

1140

Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala Lys Lys Phe Val His Arg

1145

1150

1155

Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val Ala His Asp Phe Thr Val

1160

1165

1170

[0140]

Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg Asp Ile Tyr Glu Thr Asp

1175

1180

1185

Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met

1190

1195

1200

Ala Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val Phe Thr Thr Ser Ser Asp

1205

1210

1215

Met Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Thr Ser Leu Ala

1220

1225

1230

Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu Ser Asn Glu Gln Val Leu Lys Phe

1235

1240

1245

Val Met Asp Gly Gly Tyr Leu Asp Gln Pro Asp Asn Cys Pro Glu

1250

1255

1260

Arg Val Thr Asp Leu Met Arg Met Cys Trp Gln Phe Asn Pro Lys

1265

1270

1275

Met Arg Pro Thr Phe Leu Glu Ile Val Asn Leu Leu Lys Asp Asp

1280

1285

1290

Leu His Pro Ser Phe Pro Glu Val Ser Phe Phe His Ser Glu Glu

1295

1300

1305

Asn Lys Ala Pro Glu Ser Glu Glu Leu Glu Met Glu Phe Glu Asp

1310

1315

1320

[0141]

Met Glu Asn Val Pro Leu Asp Arg Ser Ser His Cys Gln Arg Glu

1325

1330

1335

Glu Ala Gly Gly Arg Asp Gly Gly Ser Ser Leu Gly Phe Lys Arg

1340

1345

1350

Ser Tyr Glu Glu His Ile Pro Tyr Thr His Met Asn Gly Gly Lys

1355

1360

1365

Lys Asn Gly Arg Ile Leu Thr Leu Pro Arg Ser Asn Pro Ser

1370

1375

1380

<210> 44

<211> 192

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 人生长激素

<300>

<308> GenBank / AAA72260

<309> 1993-04-27

<313> (1)..(192)

<400> 44

Met Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu

[0142]

1	5	10	15
Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe			
20	25	30	
Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn			
35	40	45	
Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn			
50	55	60	
Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser			
65	70	75	80
Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser			
85	90	95	
Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr			
100	105	110	
Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg			
115	120	125	
Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr			
130	135	140	
Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn			
145	150	155	160
Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr			

[0143]

165

170

175

Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe

180

185

190

<210> 45

<211> 144

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> GM-CSF

<300>

<308> GenBank / AAA52578

<309> 1994-11-08

<313> (1)..(144)

<400> 45

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile

1

5

10

15

Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His

20

25

30

Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp

[0144]

35

40

45

Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe

50

55

60

Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys

65

70

75

80

Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met

85

90

95

Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser

100

105

110

Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys

115

120

125

Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu

130

135

140

<210> 46

<211> 207

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> Swiss-Prot / P09919

<309> 2010-08-10

<313> (1)..(207)

[0145]

<400> 46

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln

1 5 10 15

Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro

20 25 30

Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu

35 40 45

Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys

50 55 60

Leu Val Ser Glu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu

65 70 75 80

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser

85 90 95

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His

100 105 110

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile

115 120 125

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala

130 135 140

[0146]

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
145 150 155 160

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
165 170 175

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
180 185 190

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
195 200 205

<210> 47
<211> 153
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> IL-2

<300>
<308> GenBank / AAB46883
<309> 1997-02-11
<313> (1)..(153)

<400> 47

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

[0147]

1	5	10	15
Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu			
20	25	30	
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile			
35	40	45	
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe			
50	55	60	
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu			
65	70	75	80
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys			
85	90	95	
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile			
100	105	110	
Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala			
115	120	125	
Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe			
130	135	140	
Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr			
145	150		

[0148]

<210> 48
<211> 353
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> TPO

<300>
<308> GenBank / AAB33390
<309> 1995-07-27
<313> (1)..(353)

<400> 48

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala
1 5 10 15

Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val
20 25 30

Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser
35 40 45

Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala
50 55 60

Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys

[0149]

65	70	75	80
Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met			
	85	90	95
Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly			
	100	105	110
Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu			
	115	120	125
Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp			
	130	135	140
Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val			
145	150	155	160
Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala			
	165	170	175
Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu			
	180	185	190
Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr			
	195	200	205
Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly			
	210	215	220
Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu			

[0150]

225	230	235	240
Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly			
	245	250	255
Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro			
	260	265	270
Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu			
	275	280	285
Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr			
	290	295	300
Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu			
305	310	315	320
His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser			
	325	330	335
Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu			
	340	345	350
Gly			
<210> 49			
<211> 299			
<212> PRT			
<213> 智人			

[0151]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> NGF

<300>

<308> GenBank / AAH32517

<309> 2008-06-09

<313> (1)..(299)

<400> 49

Gly Arg Val Gly Ala Gly Ser Arg Arg Gly Ala Gln Arg Val Leu Ala

1 5 10 15

Ser Gly Arg Ala Val Gln Gly Ala Gly Trp His Ala Gly Pro Lys Leu

20 25 30

Ser Ser Ala Ser Gly Pro Asn Asn Ser Phe Thr Lys Gly Ala Ala Phe

35 40 45

Tyr Pro Gly His Thr Glu Val His Ser Val Met Ser Met Leu Phe Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile Pro Gln Val His Trp Thr

85 90 95

[0152]

Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu Arg Arg Ala Arg Ser Ala

100

105

110

Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala Gly Gln Thr Arg Asn Ile

115

120

125

Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg Arg Leu Arg Ser Pro Arg

130

135

140

Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg Glu Ala Ala Asp Thr Gln Asp

145

150

155

160

Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro Phe Asn Arg Thr His Arg

165

170

175

Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser

180

185

190

Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr

195

200

205

Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn

210

215

220

Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro

225

230

235

240

Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn

245

250

255

[0153]

Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp

260

265

270

Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val

275

280

285

Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala

290

295

<210> 50

<211> 241

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 神经生长因子, β 多肽前体

<300>

<308> NCBI / NP_002497

<309> 2010-08-03

<313> (1)..(241)

<400> 50

Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ile

1

5

10

15

[0154]

Gln Ala Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile

20

25

30

Pro Gln Ala His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu

35

40

45

Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala

50

55

60

Gly Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg

65

70

75

80

Arg Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg Glu

85

90

95

Ala Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro

100

105

110

Phe Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile Phe

115

120

125

His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly

130

135

140

Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu

145

150

155

160

Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu

165

170

175

[0155]

Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile
180 185 190

Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val
195 200 205

Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg
210 215 220

Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg
225 230 235 240

Ala

<210> 51
<211> 257
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> NT-3

<300>
<308> Swiss-Prot / P20783
<309> 2010-09-07
<313> (1)..(257)

[0156]

<400> 51

Met Ser Ile Leu Phe Tyr Val Ile Phe Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Ile

1 5 10 15

Gln Gly Asn Asn Met Asp Gln Arg Ser Leu Pro Glu Asp Ser Leu Asn

20 25 30

Ser Leu Ile Ile Lys Leu Ile Gln Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Leu

35 40 45

Ser Lys Gln Met Val Asp Val Lys Glu Asn Tyr Gln Ser Thr Leu Pro

50 55 60

Lys Ala Glu Ala Pro Arg Glu Pro Glu Arg Gly Gly Pro Ala Lys Ser

65 70 75 80

Ala Phe Gln Pro Val Ile Ala Met Asp Thr Glu Leu Leu Arg Gln Gln

85 90 95

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

100 105 110

Glu Pro Pro Pro Leu Tyr Leu Met Glu Asp Tyr Val Gly Ser Pro Val

115 120 125

Val Ala Asn Arg Thr Ser Arg Arg Lys Arg Tyr Ala Glu His Lys Ser

130 135 140

[0157]

His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys Asp Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr
145 150 155 160

Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu
165 170 175

Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu
180 185 190

Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile
195 200 205

Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val
210 215 220

Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile
225 230 235 240

Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg
245 250 255

Thr

<210> 52

<211> 270

<212> PRT

<213> 智人

[0158]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 神经生长因子 3 同种型 1 前蛋白原

<300>

<308> NCBI - NP_001096124

<309> 2010-07-25

<313> (1)..(270)

<400> 52

Met Val Thr Phe Ala Thr Ile Leu Gln Val Asn Lys Val Met Ser Ile

1 5 10 15

Leu Phe Tyr Val Ile Phe Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Ile Gln Gly Asn

20 25 30

Asn Met Asp Gln Arg Ser Leu Pro Glu Asp Ser Leu Asn Ser Leu Ile

35 40 45

Ile Lys Leu Ile Gln Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Leu Ser Lys Gln

50 55 60

Met Val Asp Val Lys Glu Asn Tyr Gln Ser Thr Leu Pro Lys Ala Glu

65 70 75 80

Ala Pro Arg Glu Pro Glu Arg Gly Gly Pro Ala Lys Ser Ala Phe Gln

85 90 95

[0159]

Pro Val Ile Ala Met Asp Thr Glu Leu Leu Arg Gln Gln Arg Arg Tyr			
100	105	110	
Asn Ser Pro Arg Val Leu Leu Ser Asp Ser Thr Pro Leu Glu Pro Pro			
115	120	125	
Pro Leu Tyr Leu Met Glu Asp Tyr Val Gly Ser Pro Val Val Ala Asn			
130	135	140	
Arg Thr Ser Arg Arg Lys Arg Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly			
145	150	155	160
Glu Tyr Ser Val Cys Asp Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser			
165	170	175	
Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile			
180	185	190	
Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg Cys			
195	200	205	
Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Lys			
210	215	220	
His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu			
225	230	235	240
Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp			
245	250	255	

[0160]

Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr
260 265 270

<210> 53

<211> 257

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 神经生长因子 3 同种型 2 前蛋白原

<300>

<308> NCBI / NP_002518

<309> 2010-09-19

<313> (1)..(257)

<400> 53

Met Ser Ile Leu Phe Tyr Val Ile Phe Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Ile

1 5 10 15

Gln Gly Asn Asn Met Asp Gln Arg Ser Leu Pro Glu Asp Ser Leu Asn

20 25 30

Ser Leu Ile Ile Lys Leu Ile Gln Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Leu

35 40 45

[0161]

Ser Lys Gln Met Val Asp Val Lys Glu Asn Tyr Gln Ser Thr Leu Pro			
50	55	60	
Lys Ala Glu Ala Pro Arg Glu Pro Glu Arg Gly Gly Pro Ala Lys Ser			
65	70	75	80
Ala Phe Gln Pro Val Ile Ala Met Asp Thr Glu Leu Leu Arg Gln Gln			
	85	90	95
Arg Arg Tyr Asn Ser Pro Arg Val Leu Leu Ser Asp Ser Thr Pro Leu			
100	105	110	
Glu Pro Pro Pro Leu Tyr Leu Met Glu Asp Tyr Val Gly Ser Pro Val			
115	120	125	
Val Ala Asn Arg Thr Ser Arg Arg Lys Arg Tyr Ala Glu His Lys Ser			
130	135	140	
His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys Asp Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr			
145	150	155	160
Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu			
	165	170	175
Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu			
180	185	190	
Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile			
195	200	205	

[0162]

Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val

210

215

220

Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile

225

230

235

240

Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg

245

250

255

Thr

<210> 54

<211> 210

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> NT-4

<300>

<308> GenBank / AAA60154

<309> 1995-01-08

<313> (1)..(210)

<400> 54

[0163]

Met Leu Pro Leu Pro Ser Cys Ser Leu Pro Ile Leu Leu Leu Phe Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Phe Leu Ala Pro Glu Trp Asp Leu Leu Ser Pro Arg Val Val Leu

35 40 45

Ser Arg Gly Ala Pro Ala Gly Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Ala

50 55 60

Gly Ala Phe Arg Glu Ser Ala Gly Ala Pro Ala Asn Arg Ser Arg Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Asp Ala Val Ser Gly Trp Val Thr Asp Arg Arg Thr Ala Val Asp

100 105 110

Leu Arg Gly Arg Glu Val Glu Val Leu Gly Glu Val Pro Ala Ala Gly

115 120 125

Gly Ser Pro Leu Arg Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Arg Cys Lys Ala Asp

130 135 140

Asn Ala Glu Glu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys Arg Gly

145 150 155 160

[0164]

Val Asp Arg Arg His Trp Val Ser Glu Cys Lys Ala Lys Gln Ser Tyr

165

170

175

Val Arg Ala Leu Thr Ala Asp Ala Gln Gly Arg Val Gly Trp Arg Trp

180

185

190

Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Thr Leu Leu Ser Arg Thr Gly

195

200

205

Arg Ala

210

<210> 55

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 链 A, 脑源性神经营养因子, 神经营养因子-4

<300>

<308> GenPept / 1B8M_A

<309> 1999-04-01

<313> (1)..(119)

<400> 55

[0165]

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile

1

5

10

15

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser

20

25

30

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

35

40

45

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr

50

55

60

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys

65

70

75

80

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys

85

90

95

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr

100

105

110

Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg

115

<210> 56

<211> 130

<212> PRT

<213> 智人

[0166]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 链 B, 脑源性神经营养因子, 神经营养因子-4

<300>

<308> GenPept

<309> 1999-04-01

<313> (1)..(130)

<400> 56

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

1 5 10 15

Cys Asp Ala Val Ser Gly Trp Val Thr Asp Arg Arg Thr Ala Val Asp

20 25 30

Leu Arg Gly Arg Glu Val Glu Val Leu Gly Glu Val Pro Ala Ala Gly

35 40 45

Gly Ser Pro Leu Arg Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Arg Cys Lys Ala Asp

50 55 60

Asn Ala Glu Glu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys Arg Gly

65 70 75 80

Val Asp Arg Arg His Trp Val Ser Glu Cys Lys Ala Lys Gln Ser Tyr

85 90 95

[0167]

Val Arg Ala Leu Thr Ala Asp Ala Gln Gly Arg Val Gly Trp Arg Trp

100

105

110

Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Thr Leu Leu Ser Arg Thr Gly

115

120

125

Arg Ala

130

<210> 57

<211> 211

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> GDNF

<300>

<308> Swiss-Prot / P39905

<309> 2010-08-10

<313> (1)..(211)

<400> 57

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr

1

5

10

15

[0168]

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

20

25

30

Ala Glu Asp Arg Ser Leu Gly Arg Arg Arg Ala Pro Phe Ala Leu Ser

35

40

45

Ser Asp Ser Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro Asp Gln Phe Asp Asp Val

50

55

60

Met Asp Phe Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg Leu Lys Arg Ser Pro Asp

65

70

75

80

Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala

85

90

95

Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg

100

105

110

Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr

115

120

125

Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr

130

135

140

Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu

145

150

155

160

Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln

165

170

175

[0169]

Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp

180

185

190

Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys

195

200

205

Gly Cys Ile

210

<210> 58

<211> 211

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胶质细胞源性神经营养因子同种型 1 前蛋白原

<300>

<308> NCBI / NP_000505

<309> 2010-09-20

<313> (1)..(211)

<400> 58

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr

1

5

10

15

[0170]

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

20

25

30

Ala Glu Asp Arg Ser Leu Gly Arg Arg Arg Ala Pro Phe Ala Leu Ser

35

40

45

Ser Asp Ser Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro Asp Gln Phe Asp Asp Val

50

55

60

Met Asp Phe Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg Leu Lys Arg Ser Pro Asp

65

70

75

80

Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala

85

90

95

Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg

100

105

110

Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr

115

120

125

Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr

130

135

140

Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu

145

150

155

160

Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln

165

170

175

[0171]

Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp
180 185 190

Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys
195 200 205

Gly Cys Ile
210

<210> 59

<211> 185

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胶质细胞源性神经营养因子同种型 2 前体

<300>

<308> NCBI / NP_954701

<309> 2010-09-20

<313> (1)..(185)

<400> 59

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr
1 5 10 15

[0172]

Ala Ser Ala Phe Pro Leu Pro Ala Ala Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro

20

25

30

Asp Gln Phe Asp Asp Val Met Asp Phe Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg

35

40

45

Leu Lys Arg Ser Pro Asp Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu

50

55

60

Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys

65

70

75

80

Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala

85

90

95

Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu

100

105

110

Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr

115

120

125

Thr Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val

130

135

140

Ser Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp

145

150

155

160

Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys

165

170

175

[0173]

His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile

180

185

<210> 60

<211> 133

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 胶质细胞源性神经营养因子同种型 3

<300>

<308> NCBI / NP_954704

<309> 2010-03-14

<313> (1)..(133)

<400> 60

Met Gly Cys Arg Gly Cys Leu Pro Gly Ala Ala Pro His Arg Val Arg

1

5

10

15

Leu Pro Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly

20

25

30

Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn

35

40

45

[0174]

Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe

50

55

60

Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Lys

65

70

75

80

Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val

85

90

95

Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe

100

105

110

Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys

115

120

125

Arg Cys Gly Cys Ile

130

<210> 61

<211> 187

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> IFN- β

<300>

[0175]

<308> Swiss-Prot / P01574

<309> 2010-08-10

<313> (1)..(187)

<400> 61

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser

1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg

20 25 30

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg

35 40 45

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu

50 55 60

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile

65 70 75 80

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser

85 90 95

Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val

100 105 110

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu

115 120 125

[0176]

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys

130

135

140

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser

145

150

155

160

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr

165

170

175

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn

180

185

<210> 62

<211> 431

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> TGF- β

<300>

<308> GenBank / AAA36738

<309> 1993-08-03

<313> (1)..(431)

<400> 62

[0177]

Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala

1 5 10 15

Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser

20 25 30

Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser

35 40 45

Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu

50 55 60

Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro

65 70 75 80

Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly

85 90 95

Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser

100 105 110

Thr Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr

115 120 125

Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys

130 135 140

Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu

145 150 155 160

[0178]

Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile			
165	170	175	
Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile			
180	185	190	
Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu			
195	200	205	
Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu			
210	215	220	
Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg			
225	230	235	240
His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser			
245	250	255	
Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn			
260	265	270	
Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe			
275	280	285	
Arg Ser Ile Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser			
290	295	300	
Lys Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu			
305	310	315	320

[0179]

Asn Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr

325

330

335

Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu

340

345

350

Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn

355

360

365

Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His

370

375

380

Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln

385

390

395

400

Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile

405

410

415

Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His

420

425

430

<210> 63

<211> 802

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> FGFR4

[0180]

<300>

<308> GenBank / AAB25788

<309> 1993-06-28

<313> (1)..(802)

<400> 63

Met Arg Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Val Leu Leu Ser Val Pro Gly

1 5 10 15

Pro Pro Val Leu Ser Leu Glu Ala Ser Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro

20 25 30

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

35 40 45

Leu Gly Gln Pro Val Arg Leu Cys Cys Gly Arg Ala Glu Arg Gly Gly

50 55 60

His Trp Tyr Lys Glu Gly Ser Arg Leu Ala Pro Ala Gly Arg Val Arg

65 70 75 80

Gly Trp Arg Gly Arg Leu Glu Ile Ala Ser Phe Leu Pro Glu Asp Ala

85 90 95

Gly Arg Tyr Leu Cys Leu Ala Arg Gly Ser Met Ile Val Leu Gln Asn

100 105 110

Leu Thr Leu Ile Thr Gly Asp Ser Leu Thr Ser Ser Asn Asp Asp Glu

[0181]

115	120	125
Asp Pro Lys Ser His Arg Asp Pro Ser Asn Arg His Ser Tyr Pro Gln		
130	135	140
Gln Ala Pro Tyr Trp Thr His Pro Gln Arg Met Glu Lys Lys Leu His		
145	150	155
160		
Ala Val Pro Ala Gly Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly		
165	170	175
Asn Pro Thr Pro Thr Ile Arg Trp Leu Lys Asp Gly Gln Ala Phe His		
180	185	190
Gly Glu Asn Arg Ile Gly Gly Ile Arg Leu Arg His Gln His Trp Ser		
195	200	205
Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Thr Cys		
210	215	220
Leu Val Glu Asn Ala Val Gly Ser Ile Arg Tyr Asn Tyr Leu Leu Asp		
225	230	235
240		
Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro		
245	250	255
Ala Asn Thr Thr Ala Val Val Gly Ser Asp Val Glu Leu Leu Cys Lys		
260	265	270

[0182]

Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Val
275 280 285

Ile Asn Gly Ser Ser Phe Gly Ala Asp Gly Phe Pro Tyr Val Gln Val
290 295 300

Leu Lys Thr Ala Asp Ile Asn Ser Ser Glu Val Glu Val Leu Tyr Leu
305 310 315 320

Arg Asn Val Ser Ala Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly
325 330 335

Asn Ser Ile Gly Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro
340 345 350

Glu Glu Asp Pro Thr Trp Thr Ala Ala Ala Pro Glu Ala Arg Tyr Thr
355 360 365

Asp Ile Ile Leu Tyr Ala Ser Gly Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Leu
370 375 380

Leu Leu Ala Gly Leu Tyr Arg Gly Gln Ala Leu His Gly Arg His Pro
385 390 395 400

Arg Pro Pro Ala Thr Val Gln Lys Leu Ser Arg Phe Pro Leu Ala Arg
405 410 415

Gln Phe Ser Leu Glu Ser Gly Ser Ser Gly Lys Ser Ser Ser Ser Leu
420 425 430

[0183]

Val Arg Gly Val Arg Leu Ser Ser Ser Gly Pro Ala Leu Leu Ala Gly

435

440

445

Leu Val Ser Leu Asp Leu Pro Leu Asp Pro Leu Trp Glu Phe Pro Arg

450

455

460

Asp Arg Leu Val Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln

465

470

475

480

Val Val Arg Ala Glu Ala Phe Gly Met Asp Pro Ala Arg Pro Asp Gln

485

490

495

Ala Ser Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asn Ala Ser Asp Lys

500

505

510

Asp Leu Ala Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Val Met Lys Leu Ile Gly

515

520

525

Arg His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Val Cys Thr Gln Glu Gly

530

535

540

Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu Cys Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu

545

550

555

560

Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Pro Asp Leu Ser Pro Asp Gly

565

570

575

Pro Arg Ser Ser Glu Gly Pro Leu Ser Phe Pro Val Leu Val Ser Cys

580

585

590

[0184]

Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Gln Tyr Leu Glu Ser Arg Lys Cys
595 600 605

Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn
610 615 620

Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Gly Val His His Ile
625 630 635 640

Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Ser Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met
645 650 655

Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val
660 665 670

Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser
675 680 685

Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Ser Leu Leu Arg Glu
690 695 700

Gly His Arg Met Asp Arg Pro Pro His Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Gly
705 710 715 720

Leu Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe
725 730 735

Lys Gln Leu Val Glu Ala Leu Asp Lys Val Leu Leu Ala Val Ser Glu
740 745 750

[0185]

Glu Tyr Leu Asp Leu Arg Leu Thr Phe Gly Pro Tyr Ser Pro Ser Gly
755 760 765

Gly Asp Ala Ser Ser Thr Cys Ser Ser Ser Asp Ser Val Phe Ser His
770 775 780

Asp Pro Leu Pro Leu Gly Ser Ser Ser Phe Pro Phe Gly Ser Gly Val
785 790 795 800

Gln Thr

<210> 64

<211> 802

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NCBI / NP_998812

<309> 2010-09-08

<313> (1)..(802)

<400> 64

Met Arg Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Val Leu Leu Ser Val Pro Gly
1 5 10 15

Pro Pro Val Leu Ser Leu Glu Ala Ser Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro
20 25 30

[0186]

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

35

40

45

Leu Gly Gln Pro Val Arg Leu Cys Cys Gly Arg Ala Glu Arg Gly Gly

50

55

60

His Trp Tyr Lys Glu Gly Ser Arg Leu Ala Pro Ala Gly Arg Val Arg

65

70

75

80

Gly Trp Arg Gly Arg Leu Glu Ile Ala Ser Phe Leu Pro Glu Asp Ala

85

90

95

Gly Arg Tyr Leu Cys Leu Ala Arg Gly Ser Met Ile Val Leu Gln Asn

100

105

110

Leu Thr Leu Ile Thr Gly Asp Ser Leu Thr Ser Ser Asn Asp Asp Glu

115

120

125

Asp Pro Lys Ser His Arg Asp Pro Ser Asn Arg His Ser Tyr Pro Gln

130

135

140

Gln Ala Pro Tyr Trp Thr His Pro Gln Arg Met Glu Lys Lys Leu His

145

150

155

160

Ala Val Pro Ala Gly Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly

165

170

175

Asn Pro Thr Pro Thr Ile Arg Trp Leu Lys Asp Gly Gln Ala Phe His

180

185

190

[0187]

Gly Glu Asn Arg Ile Gly Gly Ile Arg Leu Arg His Gln His Trp Ser

195

200

205

Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Thr Cys

210

215

220

Leu Val Glu Asn Ala Val Gly Ser Ile Arg Tyr Asn Tyr Leu Leu Asp

225

230

235

240

Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro

245

250

255

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

260

265

270

Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Val

275

280

285

Ile Asn Gly Ser Ser Phe Gly Ala Asp Gly Phe Pro Tyr Val Gln Val

290

295

300

Leu Lys Thr Ala Asp Ile Asn Ser Ser Glu Val Glu Val Leu Tyr Leu

305

310

315

320

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

325

330

335

Asn Ser Ile Gly Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro

340

345

350

[0188]

Glu Glu Asp Pro Thr Trp Thr Ala Ala Ala Pro Glu Ala Arg Tyr Thr

355

360

365

Asp Ile Ile Leu Tyr Ala Ser Gly Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Leu

370

375

380

Leu Leu Ala Gly Leu Tyr Arg Gly Gln Ala Leu His Gly Arg His Pro

385

390

395

400

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

405

410

415

Gln Phe Ser Leu Glu Ser Gly Ser Ser Gly Lys Ser Ser Ser Ser Leu

420

425

430

Val Arg Gly Val Arg Leu Ser Ser Ser Gly Pro Ala Leu Leu Ala Gly

435

440

445

Leu Val Ser Leu Asp Leu Pro Leu Asp Pro Leu Trp Glu Phe Pro Arg

450

455

460

Asp Arg Leu Val Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln

465

470

475

480

Val Val Arg Ala Glu Ala Phe Gly Met Asp Pro Ala Arg Pro Asp Gln

485

490

495

Ala Ser Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asn Ala Ser Asp Lys

500

505

510

[0189]

Asp Leu Ala Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Val Met Lys Leu Ile Gly			
515	520	525	
Arg His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Val Cys Thr Gln Glu Gly			
530	535	540	
Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu Cys Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu			
545	550	555	560
Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Pro Asp Leu Ser Pro Asp Gly			
	565	570	575
Pro Arg Ser Ser Glu Gly Pro Leu Ser Phe Pro Val Leu Val Ser Cys			
580	585	590	
Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Gln Tyr Leu Glu Ser Arg Lys Cys			
595	600	605	
Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn			
610	615	620	
Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Gly Val His His Ile			
625	630	635	640
Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Ser Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met			
	645	650	655
Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val			
660	665	670	

[0190]

Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser

675

680

685

Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Ser Leu Leu Arg Glu

690

695

700

Gly His Arg Met Asp Arg Pro Pro His Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Gly

705

710

715

720

Leu Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe

725

730

735

Lys Gln Leu Val Glu Ala Leu Asp Lys Val Leu Leu Ala Val Ser Glu

740

745

750

Glu Tyr Leu Asp Leu Arg Leu Thr Phe Gly Pro Tyr Ser Pro Ser Gly

755

760

765

Gly Asp Ala Ser Ser Thr Cys Ser Ser Ser Asp Ser Val Phe Ser His

770

775

780

Asp Pro Leu Pro Leu Gly Ser Ser Ser Phe Pro Phe Gly Ser Gly Val

785

790

795

800

Gln Thr

<210> 65

[0191]

<211> 762
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 成纤维细胞生长因子受体 4 同种型 2 前体

<300>
<308> NCBI / NP_075252
<309> 2010-09-20
<313> (1)..(762)

<400> 65

Met Arg Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Val Leu Leu Ser Val Pro Gly
1 5 10 15

Pro Pro Val Leu Ser Leu Glu Ala Ser Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro
20 25 30

Cys Leu Ala Pro Ser Leu Glu Gln Gln Glu Gln Glu Leu Thr Val Ala
35 40 45

Leu Gly Gln Pro Val Arg Leu Cys Cys Gly Arg Ala Glu Arg Gly Gly
50 55 60

His Trp Tyr Lys Glu Gly Ser Arg Leu Ala Pro Ala Gly Arg Val Arg
65 70 75 80

[0192]

Gly Trp Arg Gly Arg Leu Glu Ile Ala Ser Phe Leu Pro Glu Asp Ala			
85	90	95	
Gly Arg Tyr Leu Cys Leu Ala Arg Gly Ser Met Ile Val Leu Gln Asn			
100	105	110	
Leu Thr Leu Ile Thr Gly Asp Ser Leu Thr Ser Ser Asn Asp Asp Glu			
115	120	125	
Asp Pro Lys Ser His Arg Asp Pro Ser Asn Arg His Ser Tyr Pro Gln			
130	135	140	
Gln Ala Pro Tyr Trp Thr His Pro Gln Arg Met Glu Lys Lys Leu His			
145	150	155	160
Ala Val Pro Ala Gly Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly			
165	170	175	
Asn Pro Thr Pro Thr Ile Arg Trp Leu Lys Asp Gly Gln Ala Phe His			
180	185	190	
Gly Glu Asn Arg Ile Gly Gly Ile Arg Leu Arg His Gln His Trp Ser			
195	200	205	
Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Thr Cys			
210	215	220	
Leu Val Glu Asn Ala Val Gly Ser Ile Arg Tyr Asn Tyr Leu Leu Asp			
225	230	235	240

[0193]

Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro

245

250

255

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

260

265

270

Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Val

275

280

285

Ile Asn Gly Ser Ser Phe Gly Ala Asp Gly Phe Pro Tyr Val Gln Val

290

295

300

Leu Lys Thr Ala Asp Ile Asn Ser Ser Glu Val Glu Val Leu Tyr Leu

305

310

315

320

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

325

330

335

Asn Ser Ile Gly Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro

340

345

350

Gly Thr Gly Arg Ile Pro His Leu Thr Cys Asp Ser Leu Thr Pro Ala

355

360

365

Gly Arg Thr Lys Ser Pro Thr Leu Gln Phe Ser Leu Glu Ser Gly Ser

370

375

380

Ser Gly Lys Ser Ser Ser Ser Leu Val Arg Gly Val Arg Leu Ser Ser

385

390

395

400

[0194]

Ser Gly Pro Ala Leu Leu Ala Gly Leu Val Ser Leu Asp Leu Pro Leu

405

410

415

Asp Pro Leu Trp Glu Phe Pro Arg Asp Arg Leu Val Leu Gly Lys Pro

420

425

430

Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Arg Ala Glu Ala Phe Gly

435

440

445

Met Asp Pro Ala Arg Pro Asp Gln Ala Ser Thr Val Ala Val Lys Met

450

455

460

Leu Lys Asp Asn Ala Ser Asp Lys Asp Leu Ala Asp Leu Val Ser Glu

465

470

475

480

Met Glu Val Met Lys Leu Ile Gly Arg His Lys Asn Ile Ile Asn Leu

485

490

495

Leu Gly Val Cys Thr Gln Glu Gly Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu Cys

500

505

510

Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro

515

520

525

Gly Pro Asp Leu Ser Pro Asp Gly Pro Arg Ser Ser Glu Gly Pro Leu

530

535

540

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

545

550

555

560

[0195]

Gln Tyr Leu Glu Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg

565

570

575

Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly

580

585

590

Leu Ala Arg Gly Val His His Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Ser Asn

595

600

605

Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg

610

615

620

Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Trp

625

630

635

640

Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu

645

650

655

Glu Leu Phe Ser Leu Leu Arg Glu Gly His Arg Met Asp Arg Pro Pro

660

665

670

His Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Gly Leu Met Arg Glu Cys Trp His Ala

675

680

685

Ala Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Ala Leu Asp

690

695

700

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

705

710

715

720

[0196]

Phe Gly Pro Tyr Ser Pro Ser Gly Gly Asp Ala Ser Ser Thr Cys Ser
725 730 735

Ser Ser Asp Ser Val Phe Ser His Asp Pro Leu Pro Leu Gly Ser Ser
740 745 750

Ser Phe Pro Phe Gly Ser Gly Val Gln Thr
755 760

<210> 66

<211> 493

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CETP

<300>

<308> Swiss-Prot / P11597

<309> 2010-08-10

<313> (1)..(493)

<400> 66

Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1 5 10 15

[0197]

Ala Cys Ser Lys Gly Thr Ser His Glu Ala Gly Ile Val Cys Arg Ile

20

25

30

Thr Lys Pro Ala Leu Leu Val Leu Asn His Glu Thr Ala Lys Val Ile

35

40

45

Gln Thr Ala Phe Gln Arg Ala Ser Tyr Pro Asp Ile Thr Gly Glu Lys

50

55

60

Ala Met Met Leu Leu Gly Gln Val Lys Tyr Gly Leu His Asn Ile Gln

65

70

75

80

Ile Ser His Leu Ser Ile Ala Ser Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ala

85

90

95

Lys Ser Ile Asp Val Ser Ile Gln Asn Val Ser Val Val Phe Lys Gly

100

105

110

Thr Leu Lys Tyr Gly Tyr Thr Thr Ala Trp Trp Leu Gly Ile Asp Gln

115

120

125

Ser Ile Asp Phe Glu Ile Asp Ser Ala Ile Asp Leu Gln Ile Asn Thr

130

135

140

Gln Leu Thr Cys Asp Ser Gly Arg Val Arg Thr Asp Ala Pro Asp Cys

145

150

155

160

Tyr Leu Ser Phe His Lys Leu Leu Leu His Leu Gln Gly Glu Arg Glu

165

170

175

[0198]

Pro Gly Trp Ile Lys Gln Leu Phe Thr Asn Phe Ile Ser Phe Thr Leu

180

185

190

Lys Leu Val Leu Lys Gly Gln Ile Cys Lys Glu Ile Asn Val Ile Ser

195

200

205

Asn Ile Met Ala Asp Phe Val Gln Thr Arg Ala Ala Ser Ile Leu Ser

210

215

220

Asp Gly Asp Ile Gly Val Asp Ile Ser Leu Thr Gly Asp Pro Val Ile

225

230

235

240

Thr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser His His Lys Gly His Phe Ile Tyr Lys

245

250

255

Asn Val Ser Glu Asp Leu Pro Leu Pro Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu

260

265

270

Gly Asp Ser Arg Met Leu Tyr Phe Trp Phe Ser Glu Arg Val Phe His

275

280

285

Ser Leu Ala Lys Val Ala Phe Gln Asp Gly Arg Leu Met Leu Ser Leu

290

295

300

Met Gly Asp Glu Phe Lys Ala Val Leu Glu Thr Trp Gly Phe Asn Thr

305

310

315

320

Asn Gln Glu Ile Phe Gln Glu Val Val Gly Gly Phe Pro Ser Gln Ala

325

330

335

[0199]

Gln Val Thr Val His Cys Leu Lys Met Pro Lys Ile Ser Cys Gln Asn
340 345 350

Lys Gly Val Val Val Asn Ser Ser Val Met Val Lys Phe Leu Phe Pro
355 360 365

Arg Pro Asp Gln Gln His Ser Val Ala Tyr Thr Phe Glu Glu Asp Ile
370 375 380

Val Thr Thr Val Gln Ala Ser Tyr Ser Lys Lys Lys Leu Phe Leu Ser
385 390 395 400

Leu Leu Asp Phe Gln Ile Thr Pro Lys Thr Val Ser Asn Leu Thr Glu
405 410 415

Ser Ser Ser Glu Ser Val Gln Ser Phe Leu Gln Ser Met Ile Thr Ala
420 425 430

Val Gly Ile Pro Glu Val Met Ser Arg Leu Glu Val Val Phe Thr Ala
435 440 445

Leu Met Asn Ser Lys Gly Val Ser Leu Phe Asp Ile Ile Asn Pro Glu
450 455 460

Ile Ile Thr Arg Asp Gly Phe Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly Phe
465 470 475 480

Pro Glu His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
485 490

[0200]

<210> 67

<211> 1165

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 瘦素受体

<300>

<308> Swiss-Prot / P48357

<309> 2010-09-07

<313> (1)..(1165)

<400> 67

Met Ile Cys Gln Lys Phe Cys Val Val Leu Leu His Trp Glu Phe Ile

1 5 10 15

Tyr Val Ile Thr Ala Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg

20 25 30

Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu

35 40 45

Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr

50 55 60

[0201]

Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser

65 70 75 80

Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp

85 90 95

Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val

100 105 110

Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn

115 120 125

Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val

130 135 140

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His

145 150 155 160

Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro

165 170 175

Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu

180 185 190

Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr

195 200 205

Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser

210 215 220

[0202]

Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro			
225	230	235	240
Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser			
	245	250	255
Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys			
	260	265	270
Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val			
275	280	285	
Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr			
290	295	300	
Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser			
305	310	315	320
Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe			
	325	330	335
Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys			
	340	345	350
Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp			
355	360	365	
Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val			
370	375	380	

[0203]

Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys			
385	390	395	400
Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His			
	405	410	415
Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile			
	420	425	430
Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg			
	435	440	445
Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu			
	450	455	460
Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His			
465	470	475	480
Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr			
	485	490	495
Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp			
	500	505	510
Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys			
	515	520	525
Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys			
	530	535	540

[0204]

Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys			
545	550	555	560
Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu			
	565	570	575
Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys			
	580	585	590
Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala			
	595	600	605
Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn			
	610	615	620
Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met			
625	630	635	640
Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys			
	645	650	655
Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser			
	660	665	670
Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn			
	675	680	685
Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu			
690	695	700	

[0205]

Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile

705 710 715 720

Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser

725 730 735

Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser

740 745 750

Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met

755 760 765

Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys

770 775 780

Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His

785 790 795 800

Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met

805 810 815

Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp

820 825 830

Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Val

835 840 845

Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser His

850 855 860

[0206]

Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro Asn Pro Lys Asn			
865	870	875	880
Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Pro Glu Thr Phe Glu			
	885	890	895
His Leu Phe Ile Lys His Thr Ala Ser Val Thr Cys Gly Pro Leu Leu			
	900	905	910
Leu Glu Pro Glu Thr Ile Ser Glu Asp Ile Ser Val Asp Thr Ser Trp			
	915	920	925
Lys Asn Lys Asp Glu Met Met Pro Thr Thr Val Val Ser Leu Leu Ser			
	930	935	940
Thr Thr Asp Leu Glu Lys Gly Ser Val Cys Ile Ser Asp Gln Phe Asn			
945	950	955	960
Ser Val Asn Phe Ser Glu Ala Glu Gly Thr Glu Val Thr Tyr Glu Asp			
	965	970	975
Glu Ser Gln Arg Gln Pro Phe Val Lys Tyr Ala Thr Leu Ile Ser Asn			
	980	985	990
Ser Lys Pro Ser Glu Thr Gly Glu Glu Gln Gly Leu Ile Asn Ser Ser			
	995	1000	1005
Val Thr Lys Cys Phe Ser Ser Lys Asn Ser Pro Leu Lys Asp Ser			
	1010	1015	1020

[0207]

Phe Ser Asn Ser Ser Trp Glu Ile Glu Ala Gln Ala Phe Phe Ile

1025

1030

1035

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

1040

1045

1050

Ser Glu Gly Leu Asp Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Asn Phe Pro

1055

1060

1065

Glu Glu Asn Asn Asp Lys Lys Ser Ile Tyr Tyr Leu Gly Val Thr

1070

1075

1080

Ser Ile Lys Lys Arg Glu Ser Gly Val Leu Leu Thr Asp Lys Ser

1085

1090

1095

Arg Val Ser Cys Pro Phe Pro Ala Pro Cys Leu Phe Thr Asp Ile

1100

1105

1110

Arg Val Leu Gln Asp Ser Cys Ser His Phe Val Glu Asn Asn Ile

1115

1120

1125

Asn Leu Gly Thr Ser Ser Lys Lys Thr Phe Ala Ser Tyr Met Pro

1130

1135

1140

Gln Phe Gln Thr Cys Ser Thr Gln Thr His Lys Ile Met Glu Asn

1145

1150

1155

Lys Met Cys Asp Leu Thr Val

1160

1165

[0208]

<210> 68

<211> 178

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> IL-10

<300>

<308> Swiss-Prot / P22301

<309> 2010-09-10

<313> (1)..(178)

<400> 68

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val

1 5 10 15

Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His

20 25 30

Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe

35 40 45

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

50 55 60

[0209]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> IL-10 受体 α

<300>

<308> GenBank / AAA17896

<309> 1994-05-04

<313> (1)..(578)

<400> 69

Met Leu Pro Cys Leu Val Val Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ser Leu Arg

1 5 10 15

Leu Gly Ser Asp Ala His Gly Thr Glu Leu Pro Ser Pro Pro Ser Val

20 25 30

Trp Phe Glu Ala Glu Phe Phe His His Ile Leu His Trp Thr Pro Ile

35 40 45

Pro Asn Gln Ser Glu Ser Thr Cys Tyr Glu Val Ala Leu Leu Arg Tyr

50 55 60

Gly Ile Glu Ser Trp Asn Ser Ile Ser Asn Cys Ser Gln Thr Leu Ser

65 70 75 80

Tyr Asp Leu Thr Ala Val Thr Leu Asp Leu Tyr His Ser Asn Gly Tyr

85 90 95

[0211]

Arg Ala Arg Val Arg Ala Val Asp Gly Ser Arg His Ser Asn Trp Thr

100

105

110

Val Thr Asn Thr Arg Phe Ser Val Asp Glu Val Thr Leu Thr Val Gly

115

120

125

Ser Val Asn Leu Glu Ile His Asn Gly Phe Ile Leu Gly Lys Ile Gln

130

135

140

Leu Pro Arg Pro Lys Met Ala Pro Ala Asn Asp Thr Tyr Glu Ser Ile

145

150

155

160

Phe Ser His Phe Arg Glu Tyr Glu Ile Ala Ile Arg Lys Val Pro Gly

165

170

175

Asn Phe Thr Phe Thr His Lys Lys Val Lys His Glu Asn Phe Ser Leu

180

185

190

Leu Thr Ser Gly Glu Val Gly Glu Phe Cys Val Gln Val Lys Pro Ser

195

200

205

Val Ala Ser Arg Ser Asn Lys Gly Met Trp Ser Lys Glu Glu Cys Ile

210

215

220

Ser Leu Thr Arg Gln Tyr Phe Thr Val Thr Asn Val Ile Ile Phe Phe

225

230

235

240

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

245

250

255

[0212]

Gln Leu Tyr Val Arg Arg Arg Lys Lys Leu Pro Ser Val Leu Leu Phe
260 265 270

Lys Lys Pro Ser Pro Phe Ile Phe Ile Ser Gln Arg Pro Ser Pro Glu
275 280 285

Thr Gln Asp Thr Ile His Pro Leu Asp Glu Glu Ala Phe Leu Lys Val
290 295 300

Ser Pro Glu Leu Lys Asn Leu Asp Leu His Gly Ser Thr Asp Ser Gly
305 310 315 320

Phe Gly Ser Thr Lys Pro Ser Leu Gln Thr Glu Glu Pro Gln Phe Leu
325 330 335

Leu Pro Asp Pro His Pro Gln Ala Asp Arg Thr Leu Gly Asn Gly Glu
340 345 350

Pro Pro Val Leu Gly Asp Ser Cys Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ser Thr
355 360 365

Asp Ser Gly Ile Cys Leu Gln Glu Pro Ser Leu Ser Pro Ser Thr Gly
370 375 380

Pro Thr Trp Glu Gln Gln Val Gly Ser Asn Ser Arg Gly Gln Asp Asp
385 390 395 400

Ser Gly Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Glu Gly Arg Ala Gly Asp Thr
405 410 415

[0213]

Gln Gly Gly Ser Ala Leu Gly His His Ser Pro Pro Glu Pro Glu Val

420

425

430

Pro Gly Glu Glu Asp Pro Ala Ala Val Ala Phe Gln Gly Tyr Leu Arg

435

440

445

Gln Thr Arg Cys Ala Glu Glu Lys Ala Thr Lys Thr Gly Cys Leu Glu

450

455

460

Glu Glu Ser Pro Leu Thr Asp Gly Leu Gly Pro Lys Phe Gly Arg Cys

465

470

475

480

Leu Val Asp Glu Ala Gly Leu His Pro Pro Ala Leu Ala Lys Gly Tyr

485

490

495

Leu Lys Gln Asp Pro Leu Glu Met Thr Leu Ala Ser Ser Gly Ala Pro

500

505

510

Thr Gly Gln Trp Asn Gln Pro Thr Glu Glu Trp Ser Leu Leu Ala Leu

515

520

525

Ser Ser Cys Ser Asp Leu Gly Ile Ser Asp Trp Ser Phe Ala His Asp

530

535

540

Leu Ala Pro Leu Gly Cys Val Ala Ala Pro Gly Gly Leu Leu Gly Ser

545

550

555

560

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

565

570

575

[0214]

Ser Glu

<210> 70

<211> 325

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> IL-10 受体 β

<300>

<308> GenBank / AAH01903

<309> 2006-07-15

<313> (1)..(325)

<400> 70

Met Ala Trp Ser Leu Gly Ser Trp Leu Gly Gly Cys Leu Leu Val Ser

1 5 10 15

Ala Leu Gly Met Val Pro Pro Pro Glu Asn Val Arg Met Asn Ser Val

20 25 30

Asn Phe Lys Asn Ile Leu Gln Trp Glu Ser Pro Ala Phe Ala Lys Gly

35 40 45

[0215]

Asn Leu Thr Phe Thr Ala Gln Tyr Leu Ser Tyr Arg Ile Phe Gln Asp			
50	55	60	
Lys Cys Met Asn Thr Thr Leu Thr Glu Cys Asp Phe Ser Ser Leu Ser			
65	70	75	80
Lys Tyr Gly Asp His Thr Leu Arg Val Arg Ala Glu Phe Ala Asp Glu			
	85	90	95
His Ser Asp Trp Val Asn Ile Thr Phe Cys Pro Val Asp Asp Thr Ile			
100	105	110	
Ile Gly Pro Pro Gly Met Gln Val Glu Val Leu Ala Asp Ser Leu His			
115	120	125	
Met Arg Phe Leu Ala Pro Lys Ile Glu Asn Glu Tyr Glu Thr Trp Thr			
130	135	140	
Met Lys Asn Val Tyr Asn Ser Trp Thr Tyr Asn Val Gln Tyr Trp Lys			
145	150	155	160
Asn Gly Thr Asp Glu Lys Phe Gln Ile Thr Pro Gln Tyr Asp Phe Glu			
	165	170	175
Val Leu Arg Asn Leu Glu Pro Trp Thr Thr Tyr Cys Val Gln Val Arg			
	180	185	190
Gly Phe Leu Pro Asp Arg Asn Lys Ala Gly Glu Trp Ser Glu Pro Val			
195	200	205	

[0216]

Cys Glu Gln Thr Thr His Asp Glu Thr Val Pro Ser Trp Met Val Ala
210 215 220

Val Ile Leu Met Ala Ser Val Phe Met Val Cys Leu Ala Leu Leu Gly
225 230 235 240

Cys Phe Ala Leu Leu Trp Cys Val Tyr Lys Lys Thr Lys Tyr Ala Phe
245 250 255

Ser Pro Arg Asn Ser Leu Pro Gln His Leu Lys Glu Phe Leu Gly His
260 265 270

Pro His His Asn Thr Leu Leu Phe Phe Ser Phe Pro Leu Ser Asp Glu
275 280 285

Asn Asp Val Phe Asp Lys Leu Ser Val Ile Ala Glu Asp Ser Glu Ser
290 295 300

Gly Lys Gln Asn Pro Gly Asp Ser Cys Ser Leu Gly Thr Pro Pro Gly
305 310 315 320

Gln Gly Pro Gln Ser
325

<210> 71

<211> 638

<212> PRT

<213> 智人

[0217]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 生长激素受体

<300>

<308> Swiss-Prot / P10912

<309> 2010-08-10

<313> (1)..(638)

<400> 71

Met Asp Leu Trp Gln Leu Leu Leu Thr Leu Ala Leu Ala Gly Ser Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Trp Ser Leu Gln Ser Val Asn Pro Gly Leu Lys Thr Asn Ser Ser

35 40 45

Lys Glu Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe

50 55 60

Ser Cys His Trp Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn Leu Gly

65 70 75 80

Pro Ile Gln Leu Phe Tyr Thr Arg Arg Asn Thr Gln Glu Trp Thr Gln

85 90 95

[0218]

Glu Trp Lys Glu Cys Pro Asp Tyr Val Ser Ala Gly Glu Asn Ser Cys

100

105

110

Tyr Phe Asn Ser Ser Phe Thr Ser Ile Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys

115

120

125

Leu Thr Ser Asn Gly Gly Thr Val Asp Glu Lys Cys Phe Ser Val Asp

130

135

140

Glu Ile Val Gln Pro Asp Pro Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu Leu

145

150

155

160

Asn Val Ser Leu Thr Gly Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu

165

170

175

Ala Pro Arg Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr

180

185

190

Glu Leu Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp

195

200

205

Pro Ile Leu Thr Thr Ser Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys

210

215

220

Glu Tyr Glu Val Arg Val Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr

225

230

235

240

Gly Glu Phe Ser Glu Val Leu Tyr Val Thr Leu Pro Gln Met Ser Gln

245

250

255

[0219]

Phe Thr Cys Glu Glu Asp Phe Tyr Phe Pro Trp Leu Leu Ile Ile Ile

260

265

270

Phe Gly Ile Phe Gly Leu Thr Val Met Leu Phe Val Phe Leu Phe Ser

275

280

285

Lys Gln Gln Arg Ile Lys Met Leu Ile Leu Pro Pro Val Pro Val Pro

290

295

300

Lys Ile Lys Gly Ile Asp Pro Asp Leu Leu Lys Glu Gly Lys Leu Glu

305

310

315

320

Glu Val Asn Thr Ile Leu Ala Ile His Asp Ser Tyr Lys Pro Glu Phe

325

330

335

His Ser Asp Asp Ser Trp Val Glu Phe Ile Glu Leu Asp Ile Asp Glu

340

345

350

Pro Asp Glu Lys Thr Glu Glu Ser Asp Thr Asp Arg Leu Leu Ser Ser

355

360

365

Asp His Glu Lys Ser His Ser Asn Leu Gly Val Lys Asp Gly Asp Ser

370

375

380

Gly Arg Thr Ser Cys Cys Glu Pro Asp Ile Leu Glu Thr Asp Phe Asn

385

390

395

400

Ala Asn Asp Ile His Glu Gly Thr Ser Glu Val Ala Gln Pro Gln Arg

405

410

415

[0220]

Leu Lys Gly Glu Ala Asp Leu Leu Cys Leu Asp Gln Lys Asn Gln Asn
420 425 430

Asn Ser Pro Tyr His Asp Ala Cys Pro Ala Thr Gln Gln Pro Ser Val
435 440 445

Ile Gln Ala Glu Lys Asn Lys Pro Gln Pro Leu Pro Thr Glu Gly Ala
450 455 460

Glu Ser Thr His Gln Ala Ala His Ile Gln Leu Ser Asn Pro Ser Ser
465 470 475 480

Leu Ser Asn Ile Asp Phe Tyr Ala Gln Val Ser Asp Ile Thr Pro Ala
485 490 495

Gly Ser Val Val Leu Ser Pro Gly Gln Lys Asn Lys Ala Gly Met Ser
500 505 510

Gln Cys Asp Met His Pro Glu Met Val Ser Leu Cys Gln Glu Asn Phe
515 520 525

Leu Met Asp Asn Ala Tyr Phe Cys Glu Ala Asp Ala Lys Lys Cys Ile
530 535 540

Pro Val Ala Pro His Ile Lys Val Glu Ser His Ile Gln Pro Ser Leu
545 550 555 560

Asn Gln Glu Asp Ile Tyr Ile Thr Thr Glu Ser Leu Thr Thr Ala Ala
565 570 575

[0221]

Gly Arg Pro Gly Thr Gly Glu His Val Pro Gly Ser Glu Met Pro Val

580

585

590

Pro Asp Tyr Thr Ser Ile His Ile Val Gln Ser Pro Gln Gly Leu Ile

595

600

605

Leu Asn Ala Thr Ala Leu Pro Leu Pro Asp Lys Glu Phe Leu Ser Ser

610

615

620

Cys Gly Tyr Val Ser Thr Asp Gln Leu Asn Lys Ile Met Pro

625

630

635

<210> 72

<211> 380

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> IL-13 受体

<300>

<308> GenBank / CAA70021

<309> 2008-10-07

<313> (1)..(380)

<400> 72

[0222]

Met Ala Phe Val Cys Leu Ala Ile Gly Cys Leu Tyr Thr Phe Leu Ile

1

5

10

15

Ser Thr Thr Phe Gly Cys Thr Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ile Lys Val

20

25

30

Asn Pro Pro Gln Asp Phe Glu Ile Val Asp Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr

35

40

45

Leu Tyr Leu Gln Trp Gln Pro Pro Leu Ser Leu Asp His Phe Lys Glu

50

55

60

Cys Thr Val Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg Asn Ile Gly Ser Glu Thr

65

70

75

80

Trp Lys Thr Ile Ile Thr Lys Asn Leu His Tyr Lys Asp Gly Phe Asp

85

90

95

Leu Asn Lys Gly Ile Glu Ala Lys Ile His Thr Leu Leu Pro Trp Gln

100

105

110

Cys Thr Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Ser Trp Ala Glu Thr Thr Tyr

115

120

125

Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp

130

135

140

Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly

145

150

155

160

[0223]

Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu

165

170

175

Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gly

180

185

190

Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys

195

200

205

Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg

210

215

220

Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro

225

230

235

240

Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu

245

250

255

Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr

260

265

270

Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr Leu Val Thr Ala Thr Val

275

280

285

Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr Asn Glu Thr Arg Gln Leu

290

295

300

Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile Tyr Cys Ser Asp Asp Gly

305

310

315

320

[0224]

Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys Trp Glu Gly Glu Asp Leu
325 330 335

Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu
340 345 350

Ile Leu Val Ile Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Arg Lys Pro Asn Thr
355 360 365

Tyr Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr
370 375 380

<210> 73

<211> 541

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> IL-18 受体

<300>

<308> GenBank / AAH93977

<309> 2006-07-17

<313> (1)..(541)

<400> 73

[0225]

Met Asn Cys Arg Glu Leu Pro Leu Thr Leu Trp Val Leu Ile Ser Val			
1	5	10	15
Ser Thr Ala Glu Ser Cys Thr Ser Arg Pro His Ile Thr Val Val Glu			
	20	25	30
Gly Glu Pro Phe Tyr Leu Lys His Cys Ser Cys Ser Leu Ala His Glu			
	35	40	45
Ile Glu Thr Thr Thr Lys Ser Trp Tyr Lys Ser Ser Gly Ser Gln Glu			
	50	55	60
His Val Glu Leu Asn Pro Arg Ser Ser Ser Arg Ile Ala Leu His Asp			
65	70	75	80
Cys Val Leu Glu Phe Trp Pro Val Glu Leu Asn Asp Thr Gly Ser Tyr			
	85	90	95
Phe Phe Gln Met Lys Asn Tyr Thr Gln Lys Trp Lys Leu Asn Val Ile			
	100	105	110
Arg Arg Asn Lys His Ser Cys Phe Thr Glu Arg Gln Val Thr Ser Lys			
	115	120	125
Ile Val Glu Val Lys Lys Phe Phe Gln Ile Thr Cys Glu Asn Ser Tyr			
	130	135	140
Tyr Gln Thr Leu Val Asn Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Asn Cys Lys Lys			
145	150	155	160

[0226]

Leu Leu Leu Glu Asn Asn Lys Asn Pro Thr Ile Lys Lys Asn Ala Glu			
165	170	175	
Phe Glu Asp Gln Gly Tyr Tyr Ser Cys Val His Phe Leu His His Asn			
180	185	190	
Gly Lys Leu Phe Asn Ile Thr Lys Thr Phe Asn Ile Thr Ile Val Glu			
195	200	205	
Asp Arg Ser Asn Ile Val Pro Val Leu Leu Gly Pro Lys Leu Asn His			
210	215	220	
Val Ala Val Glu Leu Gly Lys Asn Val Arg Leu Asn Cys Ser Ala Leu			
225	230	235	240
Leu Asn Glu Glu Asp Val Ile Tyr Trp Met Phe Gly Glu Glu Asn Gly			
245	250	255	
Ser Asp Pro Asn Ile His Glu Glu Lys Glu Met Arg Ile Met Thr Pro			
260	265	270	
Glu Gly Lys Trp His Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Glu Asn Ile Gly			
275	280	285	
Glu Ser Asn Leu Asn Val Leu Tyr Asn Cys Thr Val Ala Ser Thr Gly			
290	295	300	
Gly Thr Asp Thr Lys Ser Phe Ile Leu Val Arg Lys Ala Asp Met Ala			
305	310	315	320

[0227]

Asp Ile Pro Gly His Val Phe Thr Arg Gly Met Ile Ile Ala Val Leu			
325	330	335	
Ile Leu Val Ala Val Val Cys Leu Val Thr Val Cys Val Ile Tyr Arg			
340	345	350	
Val Asp Leu Val Leu Phe Tyr Arg His Leu Thr Arg Arg Asp Glu Thr			
355	360	365	
Leu Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Ala Phe Val Ser Tyr Leu Lys Glu			
370	375	380	
Cys Arg Pro Glu Asn Gly Glu Glu His Thr Phe Ala Val Glu Ile Leu			
385	390	395	400
Pro Arg Val Leu Glu Lys His Phe Gly Tyr Lys Leu Cys Ile Phe Glu			
405	410	415	
Arg Asp Val Val Pro Gly Gly Ala Val Val Asp Glu Ile His Ser Leu			
420	425	430	
Ile Glu Lys Ser Arg Arg Leu Ile Ile Val Leu Ser Lys Ser Tyr Met			
435	440	445	
Ser Asn Glu Val Arg Tyr Glu Leu Glu Ser Gly Leu His Glu Ala Leu			
450	455	460	
Val Glu Arg Lys Ile Lys Ile Ile Leu Ile Glu Phe Thr Pro Val Thr			
465	470	475	480

[0228]

Asp Phe Thr Phe Leu Pro Gln Ser Leu Lys Leu Leu Lys Ser His Arg

485

490

495

Val Leu Lys Trp Lys Ala Asp Lys Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Arg Phe

500

505

510

Trp Lys Asn Leu Leu Tyr Leu Met Pro Ala Lys Thr Val Lys Pro Gly

515

520

525

Arg Asp Glu Pro Glu Val Leu Pro Val Leu Ser Glu Ser

530

535

540

<210> 74

<211> 272

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> IL-2 受体 α 亚基

<300>

<308> Swiss-Prot / P01589

<309> 2010-09-07

<313> (1)..(272)

<400> 74

[0229]

Met Asp Ser Tyr Leu Leu Met Trp Gly Leu Leu Thr Phe Ile Met Val			
1	5	10	15
Pro Gly Cys Gln Ala Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro			
	20	25	30
His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn			
	35	40	45
Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr			
	50	55	60
Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys			
65	70	75	80
Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro			
	85	90	95
Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro			
	100	105	110
Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro			
	115	120	125
Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val			
	130	135	140
Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His			
145	150	155	160

[0230]

Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg

165

170

175

Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln

180

185

190

Phe Pro Gly Glu Glu Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu

195

200

205

Ser Glu Thr Ser Cys Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr

210

215

220

Glu Met Ala Ala Thr Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln

225

230

235

240

Val Ala Val Ala Gly Cys Val Phe Leu Leu Ile Ser Val Leu Leu Leu

245

250

255

Ser Gly Leu Thr Trp Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Arg Arg Thr Ile

260

265

270

<210> 75

<211> 1676

<212> PRT

<213> 智人

<220>

[0231]

<221> MISC_FEATURE

<223> 补体因子 C5a

<300>

<308> NCBI / NP_001726

<309> 2010-09-20

<313> (1)..(1676)

<400> 75

Met Gly Leu Leu Gly Ile Leu Cys Phe Leu Ile Phe Leu Gly Lys Thr

1 5 10 15

Trp Gly Gln Glu Gln Thr Tyr Val Ile Ser Ala Pro Lys Ile Phe Arg

20 25 30

Val Gly Ala Ser Glu Asn Ile Val Ile Gln Val Tyr Gly Tyr Thr Glu

35 40 45

Ala Phe Asp Ala Thr Ile Ser Ile Lys Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Phe

50 55 60

Ser Tyr Ser Ser Gly His Val His Leu Ser Ser Glu Asn Lys Phe Gln

65 70 75 80

Asn Ser Ala Ile Leu Thr Ile Gln Pro Lys Gln Leu Pro Gly Gly Gln

85 90 95

Asn Pro Val Ser Tyr Val Tyr Leu Glu Val Val Ser Lys His Phe Ser

100 105 110

[0232]

Lys Ser Lys Arg Met Pro Ile Thr Tyr Asp Asn Gly Phe Leu Phe Ile

115

120

125

His Thr Asp Lys Pro Val Tyr Thr Pro Asp Gln Ser Val Lys Val Arg

130

135

140

Val Tyr Ser Leu Asn Asp Asp Leu Lys Pro Ala Lys Arg Glu Thr Val

145

150

155

160

Leu Thr Phe Ile Asp Pro Glu Gly Ser Glu Val Asp Met Val Glu Glu

165

170

175

Ile Asp His Ile Gly Ile Ile Ser Phe Pro Asp Phe Lys Ile Pro Ser

180

185

190

Asn Pro Arg Tyr Gly Met Trp Thr Ile Lys Ala Lys Tyr Lys Glu Asp

195

200

205

Phe Ser Thr Thr Gly Thr Ala Tyr Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu

210

215

220

Pro His Phe Ser Val Ser Ile Glu Pro Glu Tyr Asn Phe Ile Gly Tyr

225

230

235

240

Lys Asn Phe Lys Asn Phe Glu Ile Thr Ile Lys Ala Arg Tyr Phe Tyr

245

250

255

Asn Lys Val Val Thr Glu Ala Asp Val Tyr Ile Thr Phe Gly Ile Arg

260

265

270

[0233]

Glu Asp Leu Lys Asp Asp Gln Lys Glu Met Met Gln Thr Ala Met Gln
275 280 285

Asn Thr Met Leu Ile Asn Gly Ile Ala Gln Val Thr Phe Asp Ser Glu
290 295 300

Thr Ala Val Lys Glu Leu Ser Tyr Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Asn Asn
305 310 315 320

Lys Tyr Leu Tyr Ile Ala Val Thr Val Ile Glu Ser Thr Gly Gly Phe
325 330 335

Ser Glu Glu Ala Glu Ile Pro Gly Ile Lys Tyr Val Leu Ser Pro Tyr
340 345 350

Lys Leu Asn Leu Val Ala Thr Pro Leu Phe Leu Lys Pro Gly Ile Pro
355 360 365

Tyr Pro Ile Lys Val Gln Val Lys Asp Ser Leu Asp Gln Leu Val Gly
370 375 380

Gly Val Pro Val Thr Leu Asn Ala Gln Thr Ile Asp Val Asn Gln Glu
385 390 395 400

Thr Ser Asp Leu Asp Pro Ser Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly
405 410 415

Val Ala Ser Phe Val Leu Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu
420 425 430

[0234]

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

[0235]

Ala Thr Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Ala Ala Val Asp Ser Ala

595

600

605

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

610

615

620

Gln Phe Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu

625

630

635

640

Asn Asn Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn

645

650

655

Ala Asn Ala Asp Asp Ser Gln Glu Asn Asp Glu Pro Cys Lys Glu Ile

660

665

670

Leu Arg Pro Arg Arg Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala

675

680

685

Lys Tyr Lys His Ser Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys

690

695

700

Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu

705

710

715

720

Gly Pro Arg Cys Ile Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser

725

730

735

Gln Leu Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg Leu

740

745

750

[0236]

His Met Lys Thr Leu Leu Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser Tyr

755

760

765

Phe Pro Glu Ser Trp Leu Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg Lys

770

775

780

Gln Leu Gln Phe Ala Leu Pro Asp Ser Leu Thr Thr Trp Glu Ile Gln

785

790

795

800

Gly Val Gly Ile Ser Asn Thr Gly Ile Cys Val Ala Asp Thr Val Lys

805

810

815

Ala Lys Val Phe Lys Asp Val Phe Leu Glu Met Asn Ile Pro Tyr Ser

820

825

830

Val Val Arg Gly Glu Gln Ile Gln Leu Lys Gly Thr Val Tyr Asn Tyr

835

840

845

Arg Thr Ser Gly Met Gln Phe Cys Val Lys Met Ser Ala Val Glu Gly

850

855

860

Ile Cys Thr Ser Glu Ser Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys Ser

865

870

875

880

Ser Lys Cys Val Arg Gln Lys Val Glu Gly Ser Ser Ser His Leu Val

885

890

895

Thr Phe Thr Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu His Asn Ile Asn Phe

900

905

910

[0237]

Ser Leu Glu Thr Trp Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Thr Leu Arg
915 920 925

Val Val Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Val Thr Leu
930 935 940

Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro
945 950 955 960

Tyr Arg Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile
965 970 975

Leu Ser Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu
980 985 990

Ser Gln Glu Gly Ile Asn Ile Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Ser Ala
995 1000 1005

Glu Ala Glu Leu Met Ser Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe His
1010 1015 1020

Tyr Leu Glu Thr Gly Asn His Trp Asn Ile Phe His Ser Asp Pro
1025 1030 1035

Leu Ile Glu Lys Gln Lys Leu Lys Lys Lys Leu Lys Glu Gly Met
1040 1045 1050

Leu Ser Ile Met Ser Tyr Arg Asn Ala Asp Tyr Ser Tyr Ser Val
1055 1060 1065

[0238]

Trp Lys Gly Gly Ser Ala Ser Thr Trp Leu Thr Ala Phe Ala Leu

1070

1075

1080

Arg Val Leu Gly Gln Val Asn Lys Tyr Val Glu Gln Asn Gln Asn

1085

1090

1095

Ser Ile Cys Asn Ser Leu Leu Trp Leu Val Glu Asn Tyr Gln Leu

1100

1105

1110

Asp Asn Gly Ser Phe Lys Glu Asn Ser Gln Tyr Gln Pro Ile Lys

1115

1120

1125

Leu Gln Gly Thr Leu Pro Val Glu Ala Arg Glu Asn Ser Leu Tyr

1130

1135

1140

Leu Thr Ala Phe Thr Val Ile Gly Ile Arg Lys Ala Phe Asp Ile

1145

1150

1155

Cys Pro Leu Val Lys Ile Asp Thr Ala Leu Ile Lys Ala Asp Asn

1160

1165

1170

Phe Leu Leu Glu Asn Thr Leu Pro Ala Gln Ser Thr Phe Thr Leu

1175

1180

1185

Ala Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Leu Gly Asp Lys Thr His Pro

1190

1195

1200

Gln Phe Arg Ser Ile Val Ser Ala Leu Lys Arg Glu Ala Leu Val

1205

1210

1215

[0239]

Lys Gly Asn Pro Pro Ile Tyr Arg Phe Trp Lys Asp Asn Leu Gln		
1220	1225	1230
His Lys Asp Ser Ser Val Pro Asn Thr Gly Thr Ala Arg Met Val		
1235	1240	1245
Glu Thr Thr Ala Tyr Ala Leu Leu Thr Ser Leu Asn Leu Lys Asp		
1250	1255	1260
Ile Asn Tyr Val Asn Pro Val Ile Lys Trp Leu Ser Glu Glu Gln		
1265	1270	1275
Arg Tyr Gly Gly Gly Phe Tyr Ser Thr Gln Asp Thr Ile Asn Ala		
1280	1285	1290
Ile Glu Gly Leu Thr Glu Tyr Ser Leu Leu Val Lys Gln Leu Arg		
1295	1300	1305
Leu Ser Met Asp Ile Asp Val Ser Tyr Lys His Lys Gly Ala Leu		
1310	1315	1320
His Asn Tyr Lys Met Thr Asp Lys Asn Phe Leu Gly Arg Pro Val		
1325	1330	1335
Glu Val Leu Leu Asn Asp Asp Leu Ile Val Ser Thr Gly Phe Gly		
1340	1345	1350
Ser Gly Leu Ala Thr Val His Val Thr Thr Val Val His Lys Thr		
1355	1360	1365

[0240]

Ser Thr Ser Glu Glu Val Cys Ser Phe Tyr Leu Lys Ile Asp Thr			
1370	1375	1380	
Gln Asp Ile Glu Ala Ser His Tyr Arg Gly Tyr Gly Asn Ser Asp			
1385	1390	1395	
Tyr Lys Arg Ile Val Ala Cys Ala Ser Tyr Lys Pro Ser Arg Glu			
1400	1405	1410	
Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ser His Ala Val Met Asp Ile Ser Leu			
1415	1420	1425	
Pro Thr Gly Ile Ser Ala Asn Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu Val			
1430	1435	1440	
Glu Gly Val Asp Gln Leu Phe Thr Asp Tyr Gln Ile Lys Asp Gly			
1445	1450	1455	
His Val Ile Leu Gln Leu Asn Ser Ile Pro Ser Ser Asp Phe Leu			
1460	1465	1470	
Cys Val Arg Phe Arg Ile Phe Glu Leu Phe Glu Val Gly Phe Leu			
1475	1480	1485	
Ser Pro Ala Thr Phe Thr Val Tyr Glu Tyr His Arg Pro Asp Lys			
1490	1495	1500	
Gln Cys Thr Met Phe Tyr Ser Thr Ser Asn Ile Lys Ile Gln Lys			
1505	1510	1515	

[0241]

Val Cys Glu Gly Ala Ala Cys Lys Cys Val Glu Ala Asp Cys Gly			
1520	1525	1530	
Gln Met Gln Glu Glu Leu Asp Leu Thr Ile Ser Ala Glu Thr Arg			
1535	1540	1545	
Lys Gln Thr Ala Cys Lys Pro Glu Ile Ala Tyr Ala Tyr Lys Val			
1550	1555	1560	
Ser Ile Thr Ser Ile Thr Val Glu Asn Val Phe Val Lys Tyr Lys			
1565	1570	1575	
Ala Thr Leu Leu Asp Ile Tyr Lys Thr Gly Glu Ala Val Ala Glu			
1580	1585	1590	
Lys Asp Ser Glu Ile Thr Phe Ile Lys Lys Val Thr Cys Thr Asn			
1595	1600	1605	
Ala Glu Leu Val Lys Gly Arg Gln Tyr Leu Ile Met Gly Lys Glu			
1610	1615	1620	
Ala Leu Gln Ile Lys Tyr Asn Phe Ser Phe Arg Tyr Ile Tyr Pro			
1625	1630	1635	
Leu Asp Ser Leu Thr Trp Ile Glu Tyr Trp Pro Arg Asp Thr Thr			
1640	1645	1650	
Cys Ser Ser Cys Gln Ala Phe Leu Ala Asn Leu Asp Glu Phe Ala			
1655	1660	1665	

[0242]

Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys

1670

1675

<210> 76

<211> 866

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> IL-17 受体

<300>

<308> GenBank / AAB99730

<309> 1998-01-30

<313> (1)..(866)

<400> 76

Met Gly Ala Ala Arg Ser Pro Pro Ser Ala Val Pro Gly Pro Leu Leu

1

5

10

15

Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Pro Gly Gly Ala Ser

20

25

30

Leu Arg Leu Leu Asp His Arg Ala Leu Val Cys Ser Gln Pro Gly Leu

35

40

45

[0243]

Asn Cys Thr Val Lys Asn Ser Thr Cys Leu Asp Asp Ser Trp Ile His

50

55

60

Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser Ser Pro Lys Asp Leu Gln Ile Gln Leu

65

70

75

80

His Phe Ala His Thr Gln Gln Gly Asp Leu Phe Pro Val Ala His Ile

85

90

95

Glu Trp Thr Leu Gln Thr Asp Ala Ser Ile Leu Tyr Leu Glu Gly Ala

100

105

110

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

115

120

125

Phe Glu Phe Leu Ser Lys Leu Arg His His His Arg Arg Trp Arg Phe

130

135

140

Thr Phe Ser His Phe Val Val Asp Pro Asp Gln Glu Tyr Glu Val Thr

145

150

155

160

Val His His Leu Pro Lys Pro Ile Pro Asp Gly Asp Pro Asn His Gln

165

170

175

Ser Lys Asn Phe Leu Val Pro Asp Cys Glu His Ala Arg Met Lys Val

180

185

190

Thr Thr Pro Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile Thr

195

200

205

[0244]

Val Glu Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser Phe Thr Leu Trp
210 215 220

Asn Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser Phe Pro His Met
225 230 235 240

Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile Pro Ala Pro Arg
245 250 255

Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu Arg Asn
260 265 270

Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln Pro Phe Phe Ser
275 280 285

Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr Val Ser Cys Pro
290 295 300

Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp Tyr Met Pro Leu Trp
305 310 315 320

Val Tyr Trp Phe Ile Thr Gly Ile Ser Ile Leu Leu Val Gly Ser Val
325 330 335

Ile Leu Leu Ile Val Cys Met Thr Trp Arg Leu Ala Gly Pro Gly Ser
340 345 350

Glu Lys Tyr Ser Asp Asp Thr Lys Tyr Thr Asp Gly Leu Pro Ala Ala
355 360 365

[0245]

Asp Leu Ile Pro Pro Pro Leu Lys Pro Arg Lys Val Trp Ile Ile Tyr			
370	375	380	
Ser Ala Asp His Pro Leu Tyr Val Asp Val Val Leu Lys Phe Ala Gln			
385	390	395	400
Phe Leu Leu Thr Ala Cys Gly Thr Glu Val Ala Leu Asp Leu Leu Glu			
	405	410	415
Glu Gln Ala Ile Ser Glu Ala Gly Val Met Thr Trp Val Gly Arg Gln			
	420	425	430
Lys Gln Glu Met Val Glu Ser Asn Ser Lys Ile Ile Val Leu Cys Ser			
	435	440	445
Arg Gly Thr Arg Ala Lys Trp Gln Ala Leu Leu Gly Arg Gly Ala Pro			
	450	455	460
Val Arg Leu Arg Cys Asp His Gly Lys Pro Val Gly Asp Leu Phe Thr			
465	470	475	480
Ala Ala Met Asn Met Ile Leu Pro Asp Phe Lys Arg Pro Ala Cys Phe			
	485	490	495
Gly Thr Tyr Val Val Cys Tyr Phe Ser Glu Val Ser Cys Asp Gly Asp			
	500	505	510
Val Pro Asp Leu Phe Gly Ala Ala Pro Arg Tyr Pro Leu Met Asp Arg			
	515	520	525

[0246]

Phe Glu Glu Val Tyr Phe Arg Ile Gln Asp Leu Glu Met Phe Gln Pro

530

535

540

Gly Arg Met His Arg Val Gly Glu Leu Ser Gly Asp Asn Tyr Leu Arg

545

550

555

560

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

565

570

575

Trp Gln Val Arg Cys Pro Asp Trp Phe Glu Cys Glu Asn Leu Tyr Ser

580

585

590

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

595

600

605

Pro Leu Leu Pro Pro Gly Thr Gly Ile Val Lys Arg Ala Pro Leu Val

610

615

620

Arg Glu Pro Gly Ser Gln Ala Cys Leu Ala Ile Asp Pro Leu Val Gly

625

630

635

640

Glu Glu Gly Gly Ala Ala Val Ala Lys Leu Glu Pro His Leu Gln Pro

645

650

655

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

660

665

670

Glu Glu Gly Ala Leu Val Ala Ala Val Glu Pro Gly Pro Leu Ala Asp

675

680

685

[0247]

Gly Ala Ala Val Arg Leu Ala Leu Ala Gly Glu Gly Glu Ala Cys Pro

690

695

700

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

705

710

715

720

Val Asp Pro Glu Asp Ser Pro Leu Gly Ser Ser Thr Pro Met Ala Ser

725

730

735

Pro Asp Leu Leu Pro Glu Asp Val Arg Glu His Leu Glu Gly Leu Met

740

745

750

Leu Ser Leu Phe Glu Gln Ser Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Gly Cys

755

760

765

Ser Arg Pro Ala Met Val Leu Thr Asp Pro His Thr Pro Tyr Glu Glu

770

775

780

Glu Gln Arg Gln Ser Val Gln Ser Asp Gln Gly Tyr Ile Ser Arg Ser

785

790

795

800

Ser Pro Gln Pro Pro Glu Gly Leu Thr Glu Met Glu Glu Glu Glu

805

810

815

Glu Glu Gln Asp Pro Gly Lys Pro Ala Leu Pro Leu Ser Pro Glu Asp

820

825

830

Leu Glu Ser Leu Arg Ser Leu Gln Arg Gln Leu Leu Phe Arg Gln Leu

835

840

845

[0248]

Gln Lys Asn Ser Gly Trp Asp Thr Met Gly Ser Glu Ser Glu Gly Pro

850

855

860

Ser Ala

865

<210> 77

<211> 553

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> IL-20 受体

<300>

<308> Swiss-Prot / Q9UHF4

<309> 2010-09-07

<313> (1)..(553)

<400> 77

Met Arg Ala Pro Gly Arg Pro Ala Leu Arg Pro Leu Pro Leu Pro Pro

1

5

10

15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Pro Trp Gly Arg Ala Val Pro Cys

20

25

30

[0249]

Val Ser Gly Gly Leu Pro Lys Pro Ala Asn Ile Thr Phe Leu Ser Ile			
35	40	45	
Asn Met Lys Asn Val Leu Gln Trp Thr Pro Pro Glu Gly Leu Gln Gly			
50	55	60	
Val Lys Val Thr Tyr Thr Val Gln Tyr Phe Ile Tyr Gly Gln Lys Lys			
65	70	75	80
Trp Leu Asn Lys Ser Glu Cys Arg Asn Ile Asn Arg Thr Tyr Cys Asp			
85	90	95	
Leu Ser Ala Glu Thr Ser Asp Tyr Glu His Gln Tyr Tyr Ala Lys Val			
100	105	110	
Lys Ala Ile Trp Gly Thr Lys Cys Ser Lys Trp Ala Glu Ser Gly Arg			
115	120	125	
Phe Tyr Pro Phe Leu Glu Thr Gln Ile Gly Pro Pro Glu Val Ala Leu			
130	135	140	
Thr Thr Asp Glu Lys Ser Ile Ser Val Val Leu Thr Ala Pro Glu Lys			
145	150	155	160
Trp Lys Arg Asn Pro Glu Asp Leu Pro Val Ser Met Gln Gln Ile Tyr			
165	170	175	
Ser Asn Leu Lys Tyr Asn Val Ser Val Leu Asn Thr Lys Ser Asn Arg			
180	185	190	

[0250]

Thr Trp Ser Gln Cys Val Thr Asn His Thr Leu Val Leu Thr Trp Leu

195

200

205

Glu Pro Asn Thr Leu Tyr Cys Val His Val Glu Ser Phe Val Pro Gly

210

215

220

Pro Pro Arg Arg Ala Gln Pro Ser Glu Lys Gln Cys Ala Arg Thr Leu

225

230

235

240

Lys Asp Gln Ser Ser Glu Phe Lys Ala Lys Ile Ile Phe Trp Tyr Val

245

250

255

Leu Pro Val Ser Ile Thr Val Phe Leu Phe Ser Val Met Gly Tyr Ser

260

265

270

Ile Tyr Arg Tyr Ile His Val Gly Lys Glu Lys His Pro Ala Asn Leu

275

280

285

Ile Leu Ile Tyr Gly Asn Glu Phe Asp Lys Arg Phe Phe Val Pro Ala

290

295

300

Glu Lys Ile Val Ile Asn Phe Ile Thr Leu Asn Ile Ser Asp Asp Ser

305

310

315

320

Lys Ile Ser His Gln Asp Met Ser Leu Leu Gly Lys Ser Ser Asp Val

325

330

335

Ser Ser Leu Asn Asp Pro Gln Pro Ser Gly Asn Leu Arg Pro Pro Gln

340

345

350

[0251]

Glu Glu Glu Glu Val Lys His Leu Gly Tyr Ala Ser His Leu Met Glu

355

360

365

Ile Phe Cys Asp Ser Glu Glu Asn Thr Glu Gly Thr Ser Leu Thr Gln

370

375

380

Gln Glu Ser Leu Ser Arg Thr Ile Pro Pro Asp Lys Thr Val Ile Glu

385

390

395

400

Tyr Glu Tyr Asp Val Arg Thr Thr Asp Ile Cys Ala Gly Pro Glu Glu

405

410

415

Gln Glu Leu Ser Leu Gln Glu Glu Val Ser Thr Gln Gly Thr Leu Leu

420

425

430

Glu Ser Gln Ala Ala Leu Ala Val Leu Gly Pro Gln Thr Leu Gln Tyr

435

440

445

Ser Tyr Thr Pro Gln Leu Gln Asp Leu Asp Pro Leu Ala Gln Glu His

450

455

460

Thr Asp Ser Glu Glu Gly Pro Glu Glu Glu Pro Ser Thr Thr Leu Val

465

470

475

480

Asp Trp Asp Pro Gln Thr Gly Arg Leu Cys Ile Pro Ser Leu Ser Ser

485

490

495

Phe Asp Gln Asp Ser Glu Gly Cys Glu Pro Ser Glu Gly Asp Gly Leu

500

505

510

[0252]

Gly Glu Glu Gly Leu Leu Ser Arg Leu Tyr Glu Glu Pro Ala Pro Asp

515

520

525

Arg Pro Pro Gly Glu Asn Glu Thr Tyr Leu Met Gln Phe Met Glu Glu

530

535

540

Trp Gly Leu Tyr Val Gln Met Glu Asn

545

550

<210> 78

<211> 378

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> IL-3 受体

<300>

<308> GenBank / AAA59148

<309> 1995-01-06

<313> (1)..(378)

<400> 78

Met Val Leu Leu Trp Leu Thr Leu Leu Leu Ile Ala Leu Pro Cys Leu

1

5

10

15

[0253]

Leu Gln Thr Lys Glu Asp Pro Asn Pro Pro Ile Thr Asn Leu Arg Met

20

25

30

Lys Ala Lys Ala Gln Gln Leu Thr Trp Asp Leu Asn Arg Asn Val Thr

35

40

45

Asp Ile Glu Cys Val Lys Asp Ala Asp Tyr Ser Met Pro Ala Val Asn

50

55

60

Asn Ser Tyr Cys Gln Phe Gly Ala Ile Ser Leu Cys Glu Val Thr Asn

65

70

75

80

Tyr Thr Val Arg Val Ala Asn Pro Pro Phe Ser Thr Trp Ile Leu Phe

85

90

95

Pro Glu Asn Ser Gly Lys Pro Trp Ala Gly Ala Glu Asn Leu Thr Cys

100

105

110

Trp Ile His Asp Val Asp Phe Leu Ser Cys Ser Trp Ala Val Gly Pro

115

120

125

Gly Ala Pro Ala Asp Val Gln Tyr Asp Leu Tyr Leu Asn Val Ala Asn

130

135

140

Arg Arg Gln Gln Tyr Glu Cys Leu His Tyr Lys Thr Asp Ala Gln Gly

145

150

155

160

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

165

170

175

[0254]

Ser Gln Ser Ser His Ile Leu Val Arg Gly Arg Ser Ala Ala Phe Gly

180

185

190

Ile Pro Cys Thr Asp Lys Phe Val Val Phe Ser Gln Ile Glu Ile Leu

195

200

205

Thr Pro Pro Asn Met Thr Ala Lys Cys Asn Lys Thr His Ser Phe Met

210

215

220

His Trp Lys Met Arg Ser His Phe Asn Arg Lys Phe Arg Tyr Glu Leu

225

230

235

240

Gln Ile Gln Lys Arg Met Gln Pro Val Ile Thr Glu Gln Val Arg Asp

245

250

255

Arg Thr Ser Phe Gln Leu Leu Asn Pro Gly Thr Tyr Thr Val Gln Ile

260

265

270

Arg Ala Arg Glu Arg Val Tyr Glu Phe Leu Ser Ala Trp Ser Thr Pro

275

280

285

Gln Arg Phe Glu Cys Asp Gln Glu Glu Gly Ala Asn Thr Arg Ala Trp

290

295

300

Arg Thr Ser Leu Leu Ile Ala Leu Gly Thr Leu Leu Ala Leu Val Cys

305

310

315

320

Val Phe Val Ile Cys Arg Arg Tyr Leu Val Met Gln Arg Leu Phe Pro

325

330

335

[0255]

Arg Ile Pro His Met Lys Asp Pro Ile Gly Asp Ser Phe Gln Asn Asp

340

345

350

Lys Leu Val Val Trp Glu Ala Gly Lys Ala Gly Leu Glu Glu Cys Leu

355

360

365

Val Thr Glu Val Gln Val Val Gln Lys Thr

370

375

<210> 79

<211> 825

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> IL-1 受体

<300>

<308> GenBank / CAA36672

<309> 2008-10-07

<313> (1)..(825)

<400> 79

Met Gly Trp Leu Cys Ser Gly Leu Leu Phe Pro Val Ser Cys Leu Val

1

5

10

15

[0256]

Leu Leu Gln Val Ala Ser Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro

20

25

30

Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met

35

40

45

Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu

50

55

60

Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly

65

70

75

80

Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala

85

90

95

Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys

100

105

110

Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn

115

120

125

Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser

130

135

140

Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala

145

150

155

160

Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn

165

170

175

[0257]

Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys

180

185

190

Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr

195

200

205

Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser

210

215

220

Tyr Arg Glu Pro Phe Glu Gln His Leu Leu Leu Gly Val Ser Val Ser

225

230

235

240

Cys Ile Val Ile Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Tyr Val Ser Ile Thr

245

250

255

Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln Ile Pro Asn Pro Ala Arg Ser

260

265

270

Arg Leu Val Ala Ile Ile Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser Gln Trp Glu

275

280

285

Lys Arg Ser Arg Gly Gln Glu Pro Ala Lys Cys Pro His Trp Lys Asn

290

295

300

Cys Leu Thr Lys Leu Leu Pro Cys Phe Leu Glu His Asn Met Lys Arg

305

310

315

320

Asp Glu Asp Pro His Lys Ala Ala Lys Glu Met Pro Phe Gln Gly Ser

325

330

335

[0258]

Gly Lys Ser Ala Trp Cys Pro Val Glu Ile Ser Lys Thr Val Leu Trp

340

345

350

Pro Glu Ser Ile Ser Val Val Arg Cys Val Glu Leu Phe Glu Ala Pro

355

360

365

Val Glu Cys Glu Glu Glu Glu Glu Val Glu Glu Glu Lys Gly Ser Phe

370

375

380

Cys Ala Ser Pro Glu Ser Ser Arg Asp Asp Phe Gln Glu Gly Arg Glu

385

390

395

400

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

405

410

415

Glu Glu Asn Gly Gly Phe Cys Gln Gln Asp Met Gly Glu Ser Cys Leu

420

425

430

Leu Pro Pro Ser Gly Ser Thr Ser Ala His Met Pro Trp Asp Glu Phe

435

440

445

Pro Ser Ala Gly Pro Lys Glu Ala Pro Pro Trp Gly Lys Glu Gln Pro

450

455

460

Leu His Leu Glu Pro Ser Pro Pro Ala Ser Pro Thr Gln Ser Pro Asp

465

470

475

480

Asn Leu Thr Cys Thr Glu Thr Pro Leu Val Ile Ala Gly Asn Pro Ala

485

490

495

[0259]

Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ser Leu Ser Gln Ser Pro Cys Pro Arg Glu

500

505

510

Leu Gly Pro Asp Pro Leu Leu Ala Arg His Leu Glu Glu Val Glu Pro

515

520

525

Glu Met Pro Cys Val Pro Gln Leu Ser Glu Pro Thr Thr Val Pro Gln

530

535

540

Pro Glu Pro Glu Thr Trp Glu Gln Ile Leu Arg Arg Asn Val Leu Gln

545

550

555

560

His Gly Ala Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala Pro Thr Ser Gly Tyr Gln

565

570

575

Glu Phe Val His Ala Val Glu Gln Gly Gly Thr Gln Ala Ser Ala Val

580

585

590

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

595

600

605

Leu Leu Ala Ser Ser Ala Val Ser Pro Glu Lys Cys Gly Phe Gly Ala

610

615

620

Ser Ser Gly Glu Glu Gly Tyr Lys Pro Phe Gln Asp Leu Ile Pro Gly

625

630

635

640

Cys Pro Gly Asp Pro Ala Pro Val Pro Val Pro Leu Phe Thr Phe Gly

645

650

655

[0260]

Leu Asp Arg Glu Pro Pro Arg Ser Pro Gln Ser Ser His Leu Pro Ser

660

665

670

Ser Ser Pro Glu His Leu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Lys Val Glu Asp

675

680

685

Met Pro Lys Pro Pro Leu Pro Gln Glu Gln Ala Thr Asp Pro Leu Val

690

695

700

Asp Ser Leu Gly Ser Gly Ile Val Tyr Ser Ala Leu Thr Cys His Leu

705

710

715

720

Cys Gly His Leu Lys Gln Cys His Gly Gln Glu Asp Gly Gly Gln Thr

725

730

735

Pro Val Met Ala Ser Pro Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly Asp Arg Ser

740

745

750

Ser Pro Pro Thr Thr Pro Leu Arg Ala Pro Asp Pro Ser Pro Gly Gly

755

760

765

Val Pro Leu Glu Ala Ser Leu Cys Pro Ala Ser Leu Ala Pro Ser Gly

770

775

780

Ile Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Ser Phe His Pro Ala Pro Gly

785

790

795

800

Asn Ala Gln Ser Ser Ser Gln Thr Pro Lys Ile Val Asn Phe Val Ser

805

810

815

[0261]

Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser

820

825

<210> 80

<211> 420

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> IL-5 受体

<300>

<308> GenBank / CAA01794

<309> 1995-09-28

<313> (1)..(420)

<400> 80

Met Ile Ile Val Ala His Val Leu Leu Ile Leu Leu Gly Ala Thr Glu

1

5

10

15

Ile Leu Gln Ala Asp Leu Leu Pro Asp Glu Lys Ile Ser Leu Leu Pro

20

25

30

Pro Val Asn Phe Thr Ile Lys Val Thr Gly Leu Ala Gln Val Leu Leu

35

40

45

[0262]

Gln Trp Lys Pro Asn Pro Asp Gln Glu Gln Arg Asn Val Asn Leu Glu
50 55 60

Tyr Gln Val Lys Ile Asn Ala Pro Lys Glu Asp Asp Tyr Glu Thr Arg
65 70 75 80

Ile Thr Glu Ser Lys Cys Val Thr Ile Leu His Lys Gly Phe Ser Ala
85 90 95

Ser Val Arg Thr Ile Leu Gln Asn Asp His Ser Leu Leu Ala Ser Ser
100 105 110

Trp Ala Ser Ala Glu Leu His Ala Pro Pro Gly Ser Pro Gly Thr Ser
115 120 125

Ile Val Asn Leu Thr Cys Thr Thr Asn Thr Thr Glu Asp Asn Tyr Ser
130 135 140

Arg Leu Arg Ser Tyr Gln Val Ser Leu His Cys Thr Trp Leu Val Gly
145 150 155 160

Thr Asp Ala Pro Glu Asp Thr Gln Tyr Phe Leu Tyr Tyr Arg Tyr Gly
165 170 175

Ser Trp Thr Glu Glu Cys Gln Glu Tyr Ser Lys Asp Thr Leu Gly Arg
180 185 190

Asn Ile Ala Cys Trp Phe Pro Arg Thr Phe Ile Leu Ser Lys Gly Arg
195 200 205

[0263]

Asp Trp Leu Ser Val Leu Val Asn Gly Ser Ser Lys His Ser Ala Ile

210

215

220

Arg Pro Phe Asp Gln Leu Phe Ala Leu His Ala Ile Asp Gln Ile Asn

225

230

235

240

Pro Pro Leu Asn Val Thr Ala Glu Ile Glu Gly Thr Arg Leu Ser Ile

245

250

255

Gln Trp Glu Lys Pro Val Ser Ala Phe Pro Ile His Cys Phe Asp Tyr

260

265

270

Glu Val Lys Ile His Asn Thr Arg Asn Gly Tyr Leu Gln Ile Glu Lys

275

280

285

Leu Met Thr Asn Ala Phe Ile Ser Ile Ile Asp Asp Leu Ser Lys Tyr

290

295

300

Asp Val Gln Val Arg Ala Ala Val Ser Ser Met Cys Arg Glu Ala Gly

305

310

315

320

Leu Trp Ser Glu Trp Ser Gln Pro Ile Tyr Val Gly Asn Asp Glu His

325

330

335

Lys Pro Leu Arg Glu Trp Phe Val Ile Val Ile Met Ala Thr Ile Cys

340

345

350

Phe Ile Leu Leu Ile Leu Ser Leu Ile Cys Lys Ile Cys His Leu Trp

355

360

365

[0264]

Ile Lys Leu Phe Pro Pro Ile Pro Ala Pro Lys Ser Asn Ile Lys Asp

370

375

380

Leu Phe Val Thr Thr Asn Tyr Glu Lys Ala Gly Ser Ser Glu Thr Glu

385

390

395

400

Ile Glu Val Ile Cys Tyr Ile Glu Lys Pro Gly Val Glu Thr Leu Glu

405

410

415

Asp Ser Val Phe

420

<210> 81

<211> 31

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> GenBank / AAB30844

<309> 2001-03-06

<313> (1)..(31)

<400> 81

Gln Ala Ala Arg Ser Ile Leu Gly Lys Gly Trp Thr Leu Glu Ser Glu

1

5

10

15

Ala Leu Arg Arg Asp Met Gly Thr Trp Leu Leu Ala Cys Ile Cys

20

25

30

[0265]

<210> 82

<211> 557

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 干扰素 I 型受体

<300>

<308> Swiss-Prot / P17181

<309> 2010-09-07

<313> (1)..(557)

<400> 82

Met Met Val Val Leu Leu Gly Ala Thr Thr Leu Val Leu Val Ala Val

1 5 10 15

Ala Pro Trp Val Leu Ser Ala Ala Ala Gly Gly Lys Asn Leu Lys Ser

20 25 30

Pro Gln Lys Val Glu Val Asp Ile Ile Asp Asp Asn Phe Ile Leu Arg

35 40 45

Trp Asn Arg Ser Asp Glu Ser Val Gly Asn Val Thr Phe Ser Phe Asp

50 55 60

[0266]

Tyr Gln Lys Thr Gly Met Asp Asn Trp Ile Lys Leu Ser Gly Cys Gln			
65	70	75	80
Asn Ile Thr Ser Thr Lys Cys Asn Phe Ser Ser Leu Lys Leu Asn Val			
	85	90	95
Tyr Glu Glu Ile Lys Leu Arg Ile Arg Ala Glu Lys Glu Asn Thr Ser			
	100	105	110
Ser Trp Tyr Glu Val Asp Ser Phe Thr Pro Phe Arg Lys Ala Gln Ile			
	115	120	125
Gly Pro Pro Glu Val His Leu Glu Ala Glu Asp Lys Ala Ile Val Ile			
	130	135	140
His Ile Ser Pro Gly Thr Lys Asp Ser Val Met Trp Ala Leu Asp Gly			
145	150	155	160
Leu Ser Phe Thr Tyr Ser Leu Val Ile Trp Lys Asn Ser Ser Gly Val			
	165	170	175
Glu Glu Arg Ile Glu Asn Ile Tyr Ser Arg His Lys Ile Tyr Lys Leu			
	180	185	190
Ser Pro Glu Thr Thr Tyr Cys Leu Lys Val Lys Ala Ala Leu Leu Thr			
	195	200	205
Ser Trp Lys Ile Gly Val Tyr Ser Pro Val His Cys Ile Lys Thr Thr			
	210	215	220

[0267]

Val Glu Asn Glu Leu Pro Pro Pro Glu Asn Ile Glu Val Ser Val Gln
225 230 235 240

Asn Gln Asn Tyr Val Leu Lys Trp Asp Tyr Thr Tyr Ala Asn Met Thr
245 250 255

Phe Gln Val Gln Trp Leu His Ala Phe Leu Lys Arg Asn Pro Gly Asn
260 265 270

His Leu Tyr Lys Trp Lys Gln Ile Pro Asp Cys Glu Asn Val Lys Thr
275 280 285

Thr Gln Cys Val Phe Pro Gln Asn Val Phe Gln Lys Gly Ile Tyr Leu
290 295 300

Leu Arg Val Gln Ala Ser Asp Gly Asn Asn Thr Ser Phe Trp Ser Glu
305 310 315 320

Glu Ile Lys Phe Asp Thr Glu Ile Gln Ala Phe Leu Leu Pro Pro Val
325 330 335

Phe Asn Ile Arg Ser Leu Ser Asp Ser Phe His Ile Tyr Ile Gly Ala
340 345 350

Pro Lys Gln Ser Gly Asn Thr Pro Val Ile Gln Asp Tyr Pro Leu Ile
355 360 365

Tyr Glu Ile Ile Phe Trp Glu Asn Thr Ser Asn Ala Glu Arg Lys Ile
370 375 380

[0268]

Ile Glu Lys Lys Thr Asp Val Thr Val Pro Asn Leu Lys Pro Leu Thr

385 390 395 400

Val Tyr Cys Val Lys Ala Arg Ala His Thr Met Asp Glu Lys Leu Asn

405 410 415

Lys Ser Ser Val Phe Ser Asp Ala Val Cys Glu Lys Thr Lys Pro Gly

420 425 430

Asn Thr Ser Lys Ile Trp Leu Ile Val Gly Ile Cys Ile Ala Leu Phe

435 440 445

Ala Leu Pro Phe Val Ile Tyr Ala Ala Lys Val Phe Leu Arg Cys Ile

450 455 460

Asn Tyr Val Phe Phe Pro Ser Leu Lys Pro Ser Ser Ser Ile Asp Glu

465 470 475 480

Tyr Phe Ser Glu Gln Pro Leu Lys Asn Leu Leu Leu Ser Thr Ser Glu

485 490 495

Glu Gln Ile Glu Lys Cys Phe Ile Ile Glu Asn Ile Ser Thr Ile Ala

500 505 510

Thr Val Glu Glu Thr Asn Gln Thr Asp Glu Asp His Lys Lys Tyr Ser

515 520 525

Ser Gln Thr Ser Gln Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Asn Glu Asp Glu Ser

530 535 540

[0269]

Glu Ser Lys Thr Ser Glu Glu Leu Gln Gln Asp Phe Val

545

550

555

<210> 83

<211> 515

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> Swiss-Prot / P48551

<309> 2010-09-07

<313> (1)..(515)

<400> 83

Met Leu Leu Ser Gln Asn Ala Phe Ile Phe Arg Ser Leu Asn Leu Val

1

5

10

15

Leu Met Val Tyr Ile Ser Leu Val Phe Gly Ile Ser Tyr Asp Ser Pro

20

25

30

Asp Tyr Thr Asp Glu Ser Cys Thr Phe Lys Ile Ser Leu Arg Asn Phe

35

40

45

Arg Ser Ile Leu Ser Trp Glu Leu Lys Asn His Ser Ile Val Pro Thr

50

55

60

His Tyr Thr Leu Leu Tyr Thr Ile Met Ser Lys Pro Glu Asp Leu Lys

65

70

75

80

[0270]

Val Val Lys Asn Cys Ala Asn Thr Thr Arg Ser Phe Cys Asp Leu Thr			
85	90	95	
Asp Glu Trp Arg Ser Thr His Glu Ala Tyr Val Thr Val Leu Glu Gly			
100	105	110	
Phe Ser Gly Asn Thr Thr Leu Phe Ser Cys Ser His Asn Phe Trp Leu			
115	120	125	
Ala Ile Asp Met Ser Phe Glu Pro Pro Glu Phe Glu Ile Val Gly Phe			
130	135	140	
Thr Asn His Ile Asn Val Met Val Lys Phe Pro Ser Ile Val Glu Glu			
145	150	155	160
Glu Leu Gln Phe Asp Leu Ser Leu Val Ile Glu Glu Gln Ser Glu Gly			
165	170	175	
Ile Val Lys Lys His Lys Pro Glu Ile Lys Gly Asn Met Ser Gly Asn			
180	185	190	
Phe Thr Tyr Ile Ile Asp Lys Leu Ile Pro Asn Thr Asn Tyr Cys Val			
195	200	205	
Ser Val Tyr Leu Glu His Ser Asp Glu Gln Ala Val Ile Lys Ser Pro			
210	215	220	
Leu Lys Cys Thr Leu Leu Pro Pro Gly Gln Glu Ser Glu Ser Ala Glu			
225	230	235	240

[0271]

Ser Ala Lys Ile Gly Gly Ile Ile Thr Val Phe Leu Ile Ala Leu Val

245

250

255

Leu Thr Ser Thr Ile Val Thr Leu Lys Trp Ile Gly Tyr Ile Cys Leu

260

265

270

Arg Asn Ser Leu Pro Lys Val Leu Asn Phe His Asn Phe Leu Ala Trp

275

280

285

Pro Phe Pro Asn Leu Pro Pro Leu Glu Ala Met Asp Met Val Glu Val

290

295

300

Ile Tyr Ile Asn Arg Lys Lys Lys Val Trp Asp Tyr Asn Tyr Asp Asp

305

310

315

320

Glu Ser Asp Ser Asp Thr Glu Ala Ala Pro Arg Thr Ser Gly Gly Gly

325

330

335

Tyr Thr Met His Gly Leu Thr Val Arg Pro Leu Gly Gln Ala Ser Ala

340

345

350

Thr Ser Thr Glu Ser Gln Leu Ile Asp Pro Glu Ser Glu Glu Glu Pro

355

360

365

Asp Leu Pro Glu Val Asp Val Glu Leu Pro Thr Met Pro Lys Asp Ser

370

375

380

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

385

390

395

400

[0272]

Pro Leu Gln Asp Pro Phe Pro Glu Glu Asp Tyr Ser Ser Thr Glu Gly

405

410

415

Ser Gly Gly Arg Ile Thr Phe Asn Val Asp Leu Asn Ser Val Phe Leu

420

425

430

Arg Val Leu Asp Asp Glu Asp Ser Asp Asp Leu Glu Ala Pro Leu Met

435

440

445

Leu Ser Ser His Leu Glu Glu Met Val Asp Pro Glu Asp Pro Asp Asn

450

455

460

Val Gln Ser Asn His Leu Leu Ala Ser Gly Glu Gly Thr Gln Pro Thr

465

470

475

480

Phe Pro Ser Pro Ser Ser Glu Gly Leu Trp Ser Glu Asp Ala Pro Ser

485

490

495

Asp Gln Ser Asp Thr Ser Glu Ser Asp Val Asp Leu Gly Asp Gly Tyr

500

505

510

Ile Met Arg

515

<210> 84

<211> 250

<212> PRT

<213> 智人

[0273]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 淋巴细胞功能抗原-3 受体

<300>

<308> Swiss-Prot / P19256

<309> 2010-09-10

<313> (1)..(250)

<400> 84

Met Val Ala Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu Ser Val

1 5 10 15

Val Cys Leu Leu His Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys Phe Ser Gln Gln

20 25 30

Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His Val Pro Ser Asn

35 40 45

Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asp Lys Val Ala

50 55 60

Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys Asn Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

[0274]

Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro Asn Ile Thr Asp			
100	105	110	
Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Glu Ser Leu Pro Ser Pro Thr			
115	120	125	
Leu Thr Cys Ala Leu Thr Asn Gly Ser Ile Glu Val Gln Cys Met Ile			
130	135	140	
Pro Glu His Tyr Asn Ser His Arg Gly Leu Ile Met Tyr Ser Trp Asp			
145	150	155	160
Cys Pro Met Glu Gln Cys Lys Arg Asn Ser Thr Ser Ile Tyr Phe Lys			
165	170	175	
Met Glu Asn Asp Leu Pro Gln Lys Ile Gln Cys Thr Leu Ser Asn Pro			
180	185	190	
Leu Phe Asn Thr Thr Ser Ser Ile Ile Leu Thr Thr Cys Ile Pro Ser			
195	200	205	
Ser Gly His Ser Arg His Arg Tyr Ala Leu Ile Pro Ile Pro Leu Ala			
210	215	220	
Val Ile Thr Thr Cys Ile Val Leu Tyr Met Asn Gly Ile Leu Lys Cys			
225	230	235	240
Asp Arg Lys Pro Asp Arg Thr Asn Ser Asn			
245	250		

[0275]

<210> 85

<211> 99

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 单核细胞趋化蛋白 1 配体

<300>

<308> Swiss-Prot / P13500

<309> 2010-09-07

<313> (1)..(99)

<400> 85

Met Lys Val Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ile Ala Ala Thr

1 5 10 15

Phe Ile Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val

20 25 30

Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu

35 40 45

Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val

50 55 60

[0276]

Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln

65 70 75 80

Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr

85 90 95

Pro Lys Thr

<210> 86

<211> 427

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> NGF 受体

<300>

<308> GenBank / AAB59544

<309> 1995-08-11

<313> (1)..(427)

<400> 86

Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu

1 5 10 15

[0277]

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys
20 25 30

Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn
35 40 45

Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys
50 55 60

Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr
65 70 75 80

Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser
85 90 95

Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly
100 105 110

Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys
115 120 125

Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr
130 135 140

Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His
145 150 155 160

Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln
165 170 175

[0278]

Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro
180 185 190

Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr
195 200 205

Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile
210 215 220

Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln
225 230 235 240

Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys
245 250 255

Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe
260 265 270

Lys Arg Trp Asn Ser Cys Lys Gln Asn Lys Gln Gly Ala Asn Ser Arg
275 280 285

Pro Val Asn Gln Thr Pro Pro Pro Glu Gly Glu Lys Leu His Ser Asp
290 295 300

Ser Gly Ile Ser Val Asp Ser Gln Ser Leu His Asp Gln Gln Pro His
305 310 315 320

Thr Gln Thr Ala Ser Gly Gln Ala Leu Lys Gly Asp Gly Gly Leu Tyr
325 330 335

[0279]

Ser Ser Leu Pro Pro Ala Lys Arg Glu Glu Val Glu Lys Leu Leu Asn

340

345

350

Gly Ser Ala Gly Asp Thr Trp Arg His Leu Ala Gly Glu Leu Gly Tyr

355

360

365

Gln Pro Glu His Ile Asp Ser Phe Thr His Glu Ala Cys Pro Val Arg

370

375

380

Ala Leu Leu Ala Ser Trp Ala Thr Gln Asp Ser Ala Thr Leu Asp Ala

385

390

395

400

Leu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Ile Gln Arg Ala Asp Leu Val Glu Ser

405

410

415

Leu Cys Ser Glu Ser Thr Ala Thr Ser Pro Val

420

425

<210> 87

<211> 212

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> IL-6

<300>

<308> NCBI / NP_000591

[0280]

<309> 2010-09-19

<313> (1)..(212)

<400> 87

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu

1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro

20 25 30

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr

35 40 45

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile

50 55 60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser

65 70 75 80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala

85 90 95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu

100 105 110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr

115 120 125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln

[0281]

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

<210> 88
<211> 468
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> IL-6 受体

<300>
<308> NCBI / NP_000556

[0282]

<309> 2010-09-19

<313> (1)..(468)

<400> 88

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro

1 5 10 15

Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg

20 25 30

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro

35 40 45

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys

50 55 60

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg

65 70 75 80

Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys

85 90 95

Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val

100 105 110

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser

115 120 125

Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr

[0283]

130	135	140	
Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp			
145	150	155	160
Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys			
	165	170	175
Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met			
	180	185	190
Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe			
	195	200	205
Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val			
210	215	220	
Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp			
225	230	235	240
Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg			
	245	250	255
Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp			
	260	265	270
Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His			
	275	280	285
Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser			

[0284]

290

295

300

Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser

305

310

315

320

Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr

325

330

335

Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr

340

345

350

Ser Leu Pro Val Gln Asp Ser Ser Ser Val Pro Leu Pro Thr Phe Leu

355

360

365

Val Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Gly Thr Leu Leu Cys Ile Ala Ile

370

375

380

Val Leu Arg Phe Lys Lys Thr Trp Lys Leu Arg Ala Leu Lys Glu Gly

385

390

395

400

Lys Thr Ser Met His Pro Pro Tyr Ser Leu Gly Gln Leu Val Pro Glu

405

410

415

Arg Pro Arg Pro Thr Pro Val Leu Val Pro Leu Ile Ser Pro Pro Val

420

425

430

Ser Pro Ser Ser Leu Gly Ser Asp Asn Thr Ser Ser His Asn Arg Pro

435

440

445

Asp Ala Arg Asp Pro Arg Ser Pro Tyr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Tyr

[0285]

450 455 460

Phe Phe Pro Arg
465

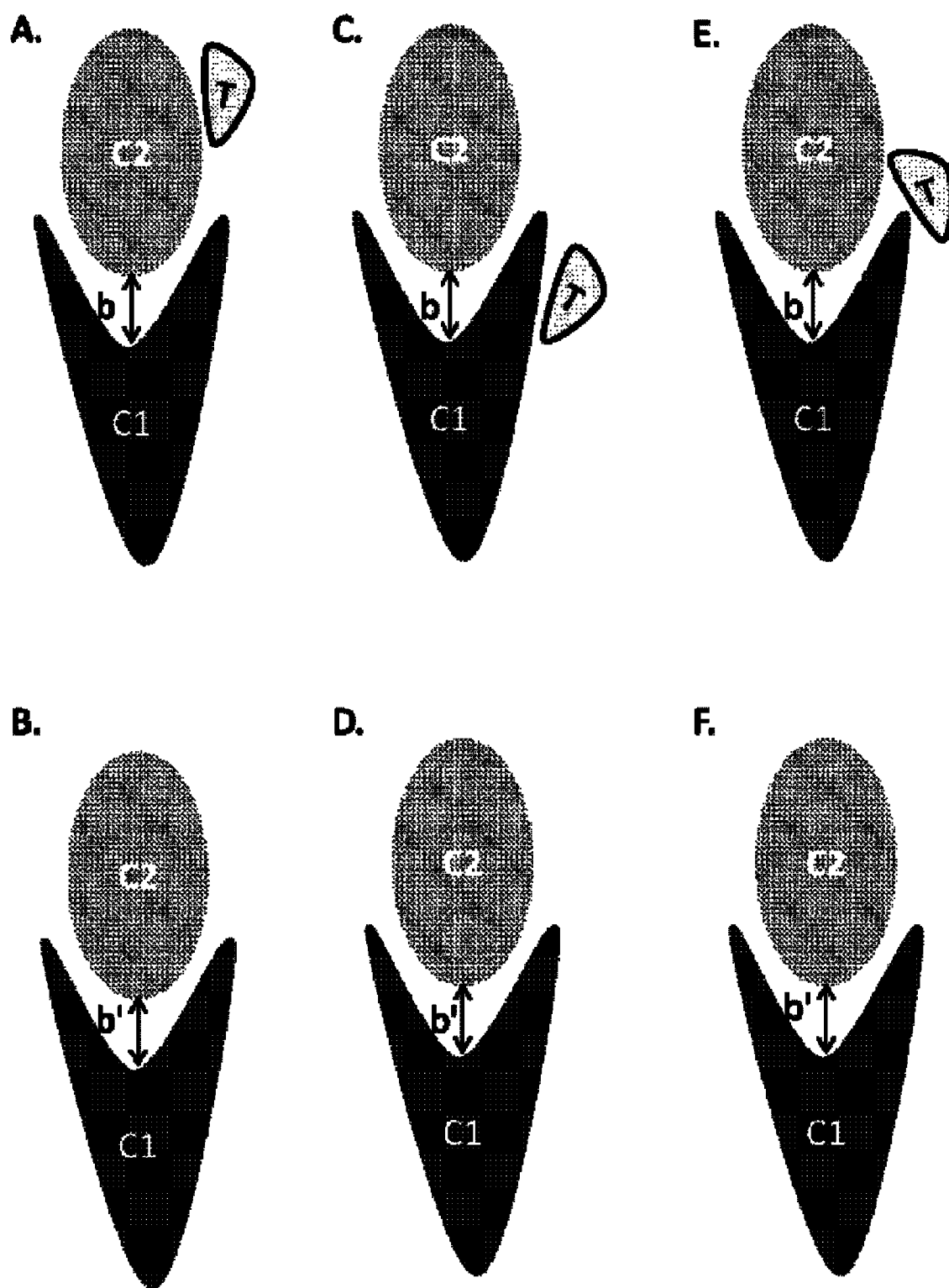


图1:举例说明结合测定构型 +/- 测试多肽结合剂的示意图。

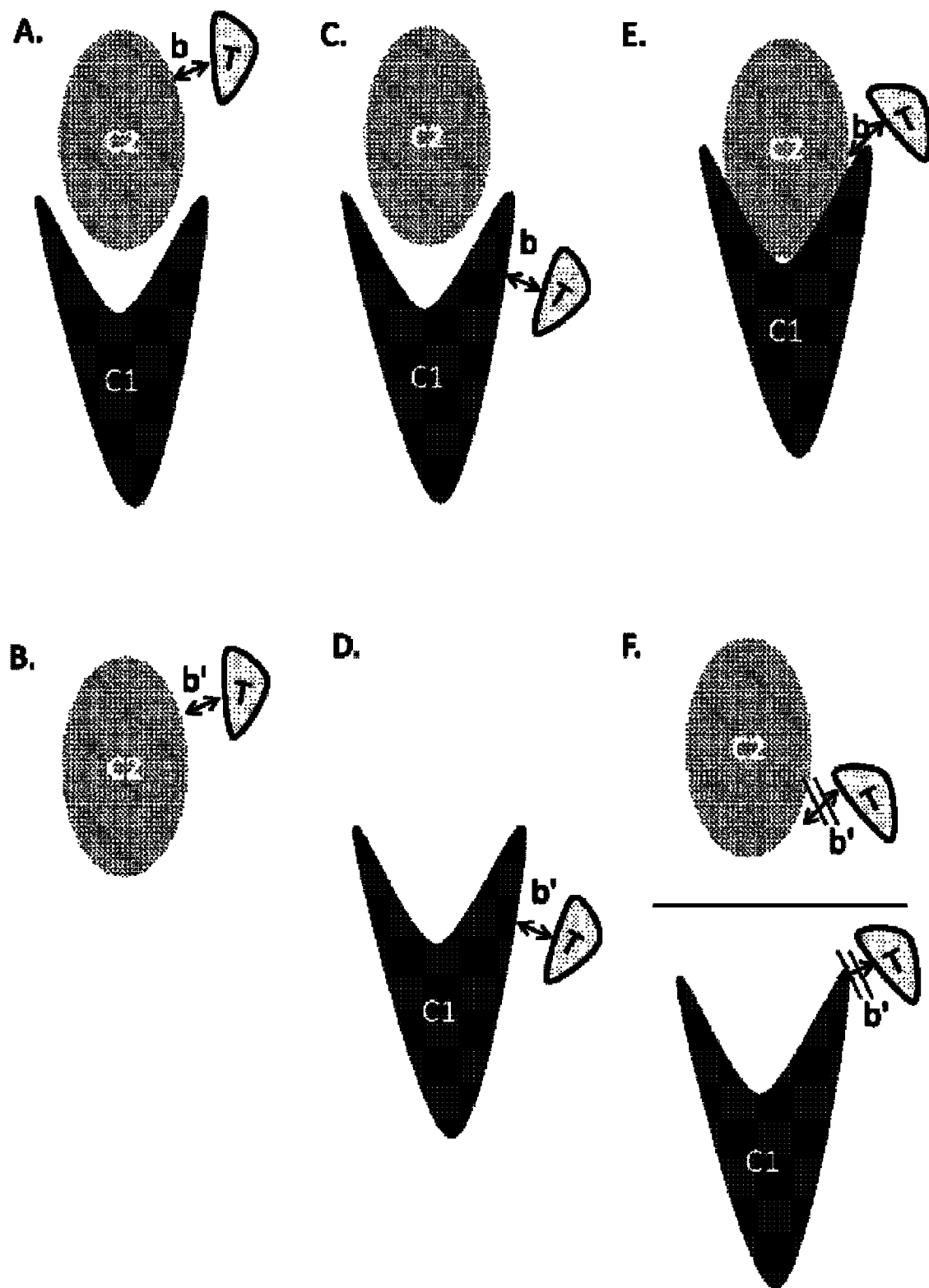


图 2: 举例说明结合测定构型 +/- 第二复合物组分的示意图。

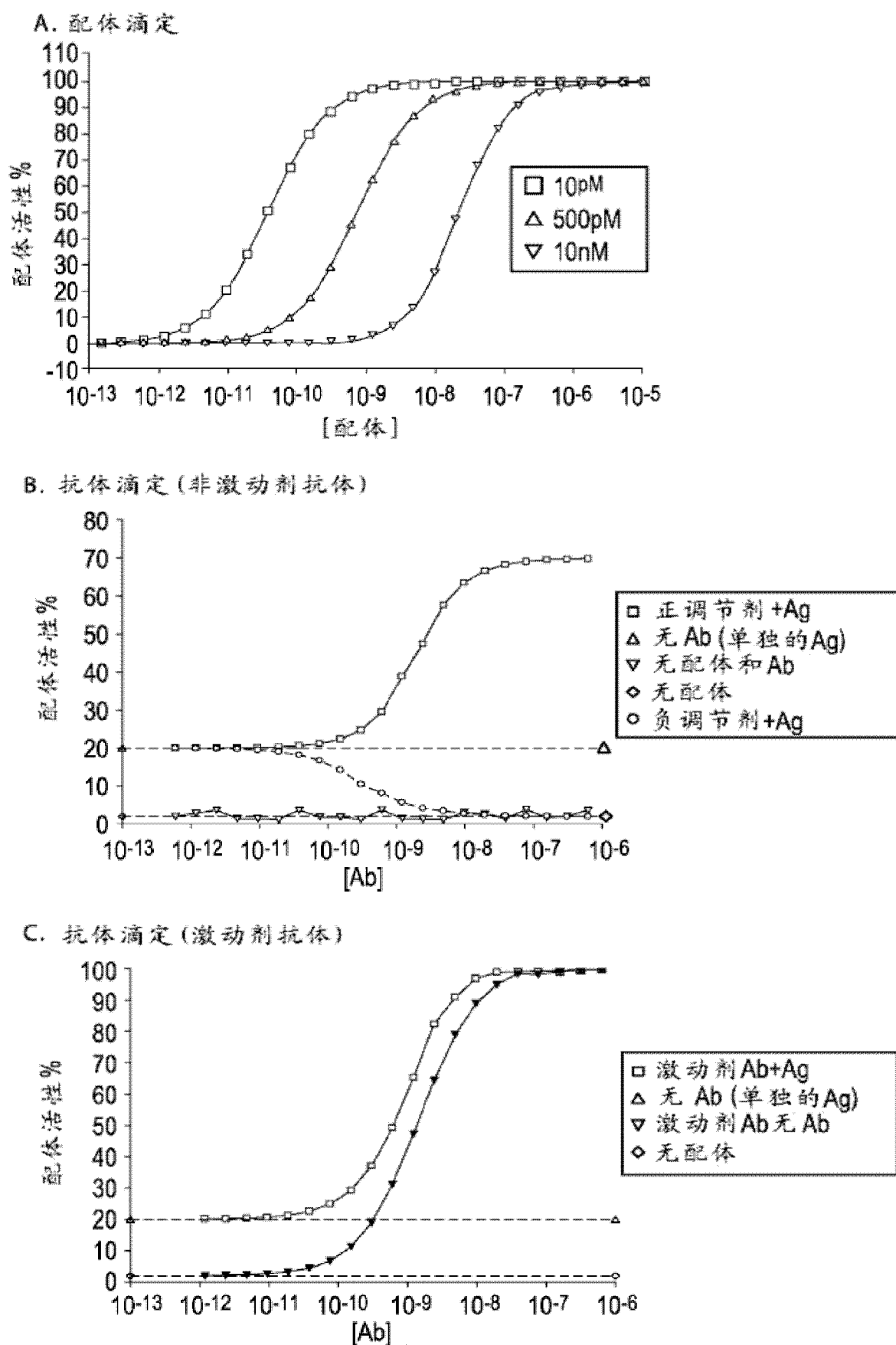


图3:显示预测的动力学调节剂对信号转导活性的作用的模拟数据。

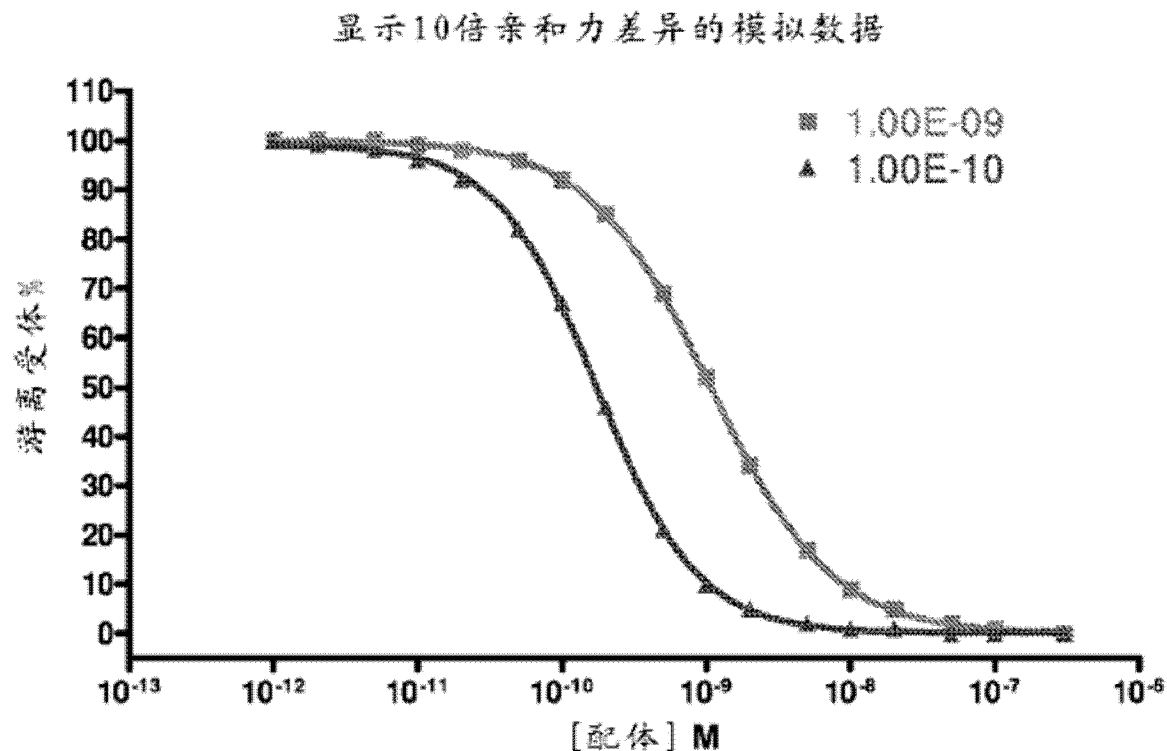


图 4. 来自检测蛋白质 - 蛋白质相互作用的调节的平衡溶液亲和力测量法的模拟数据。这在 y 轴上显示了游离或未结合受体的量, 在 x 轴上显示 配体浓度。

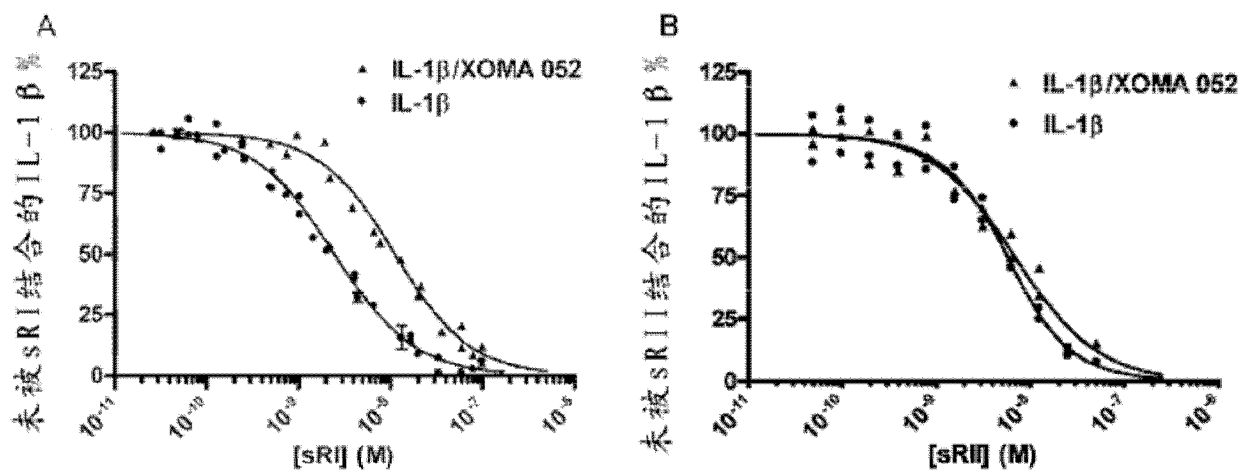


图 5 XOMA052 减小 IL-1 β 对 IL-1sRI (A) 结合的亲和力, 但对 IL-1 β 对 IL-1 sRII (B) 结合的亲和力没有影响。

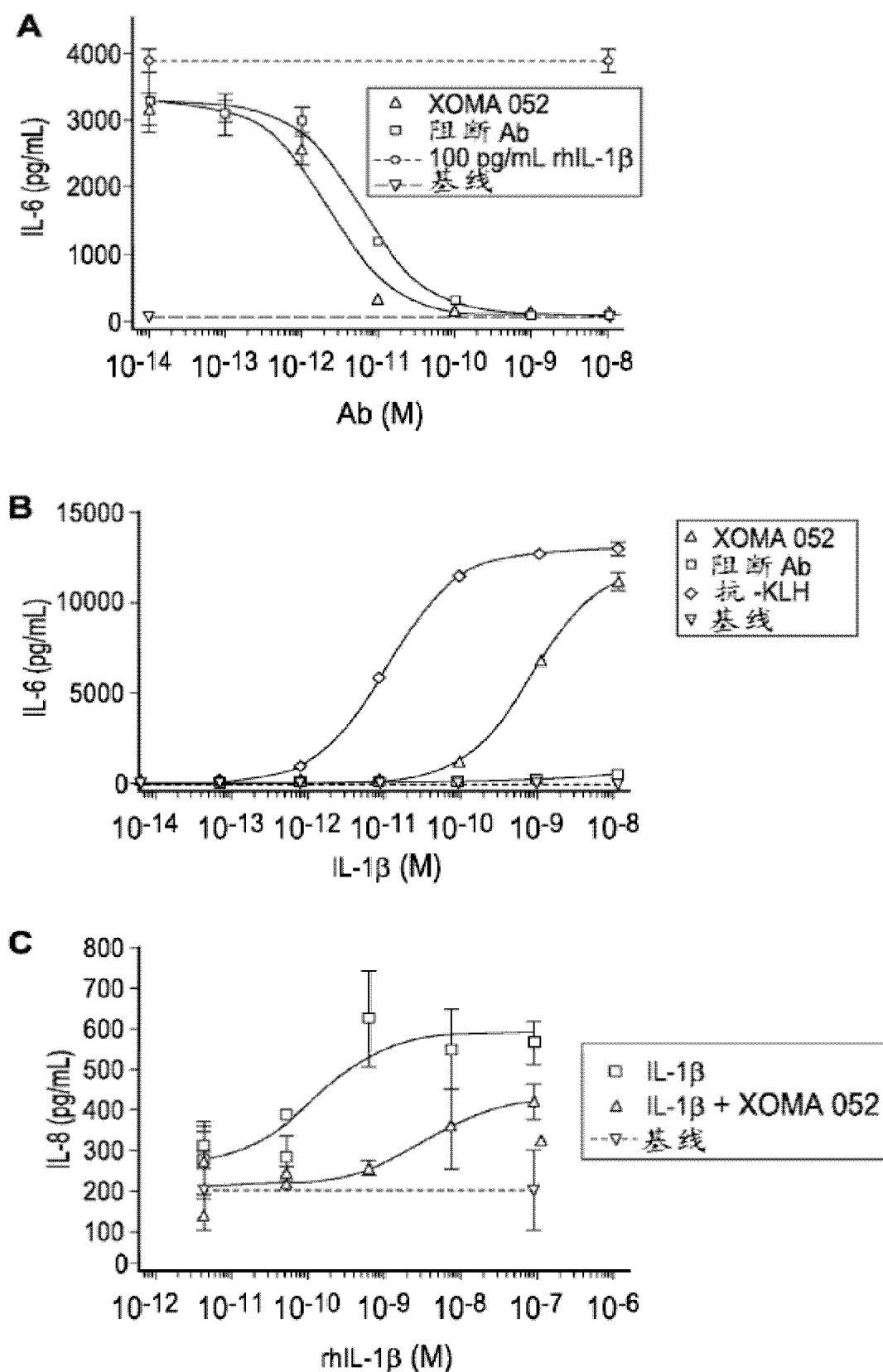


图6 IL-1 与 IL-1 sRI 相互作用的负亲和力调节导致改变的对 IL-1 的细胞剂量 - 反应

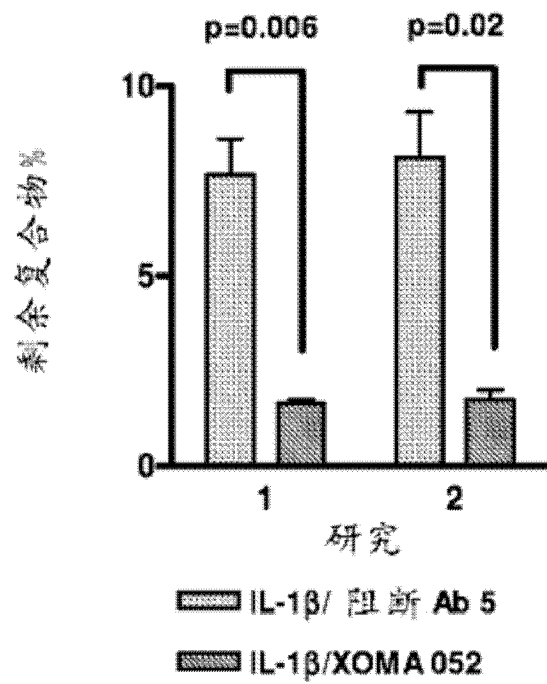


图 7. 当与 XOMA 052 结合时 IL-1 β 比当与阻断抗体结合时更快地清除

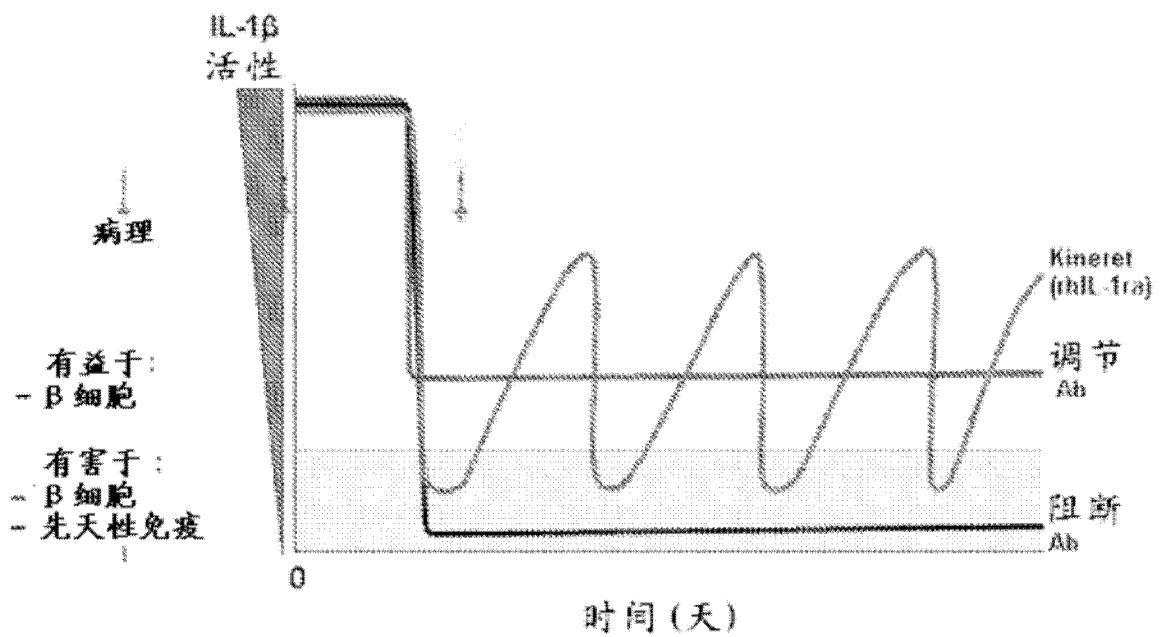
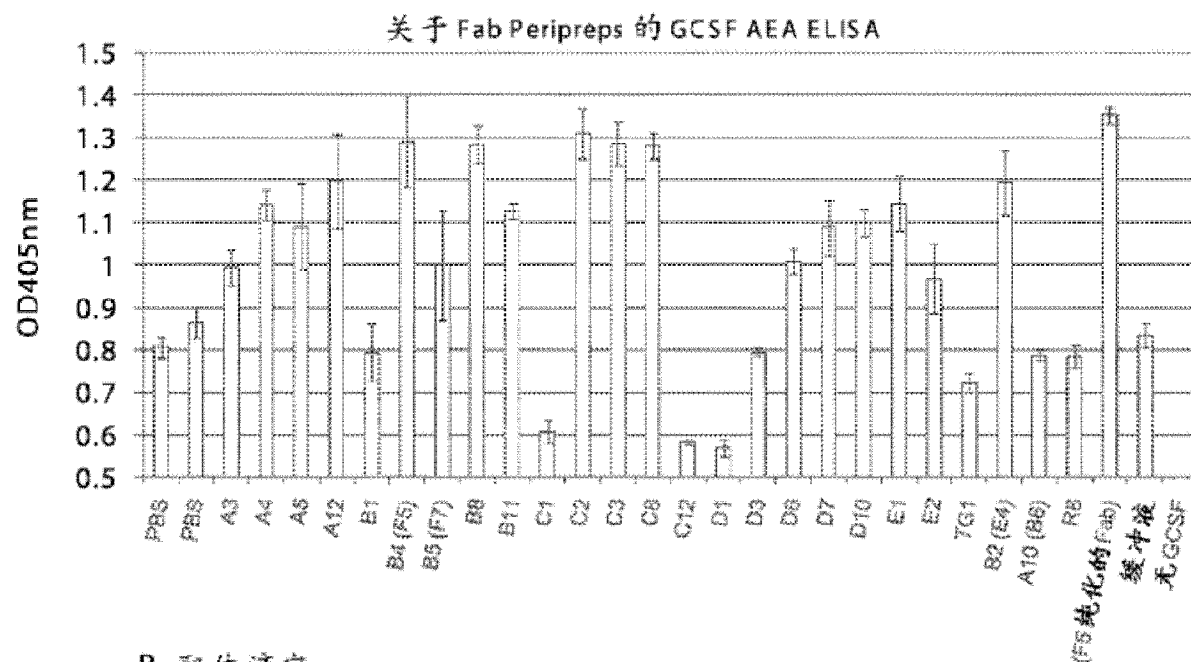
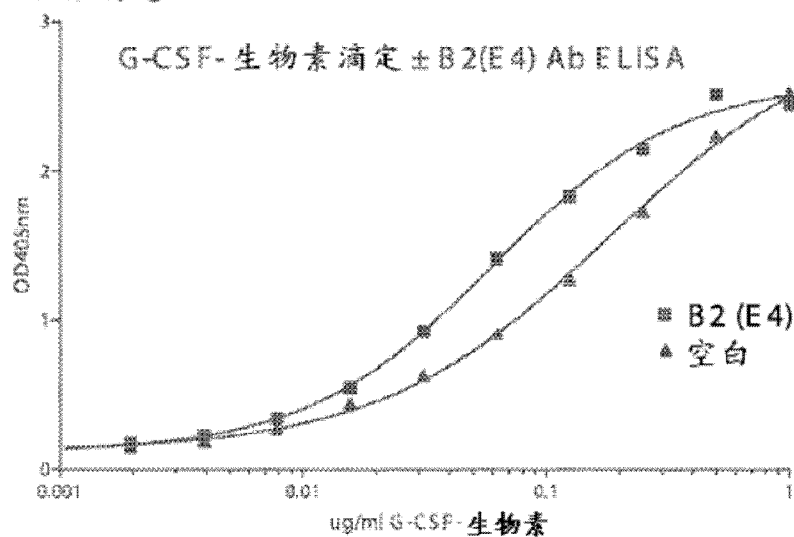


图 8. 在 T2D 中 IL-1 β 活性被不同药物类型调节的举例说明

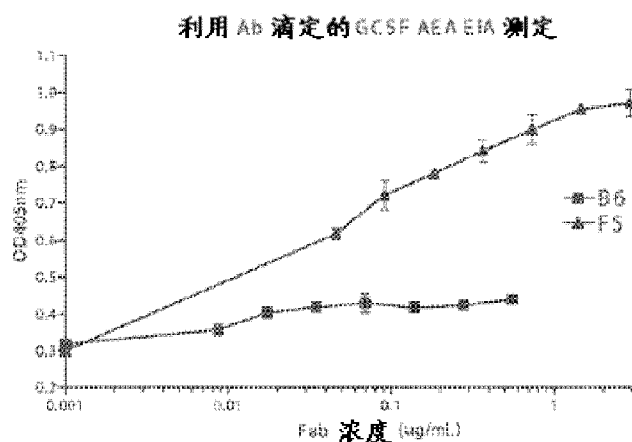
A. 单点测定 (固定浓度的抗体和配体)



B. 配体滴定



C. 抗体滴定



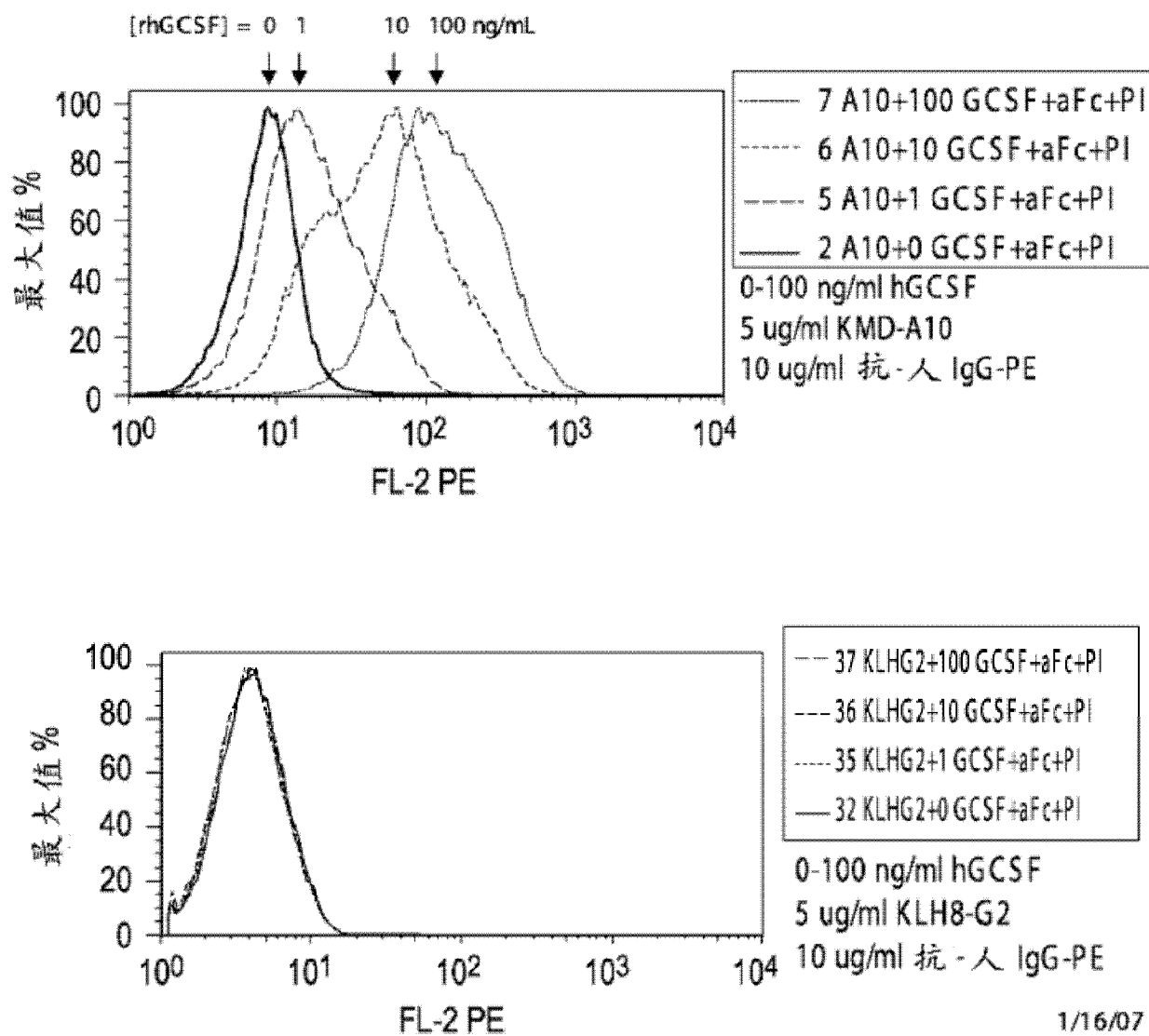


图 10 :A10(B6) 抗体对 GCSFR 转染的 BAF3 细胞的 GCSF 依赖性结合

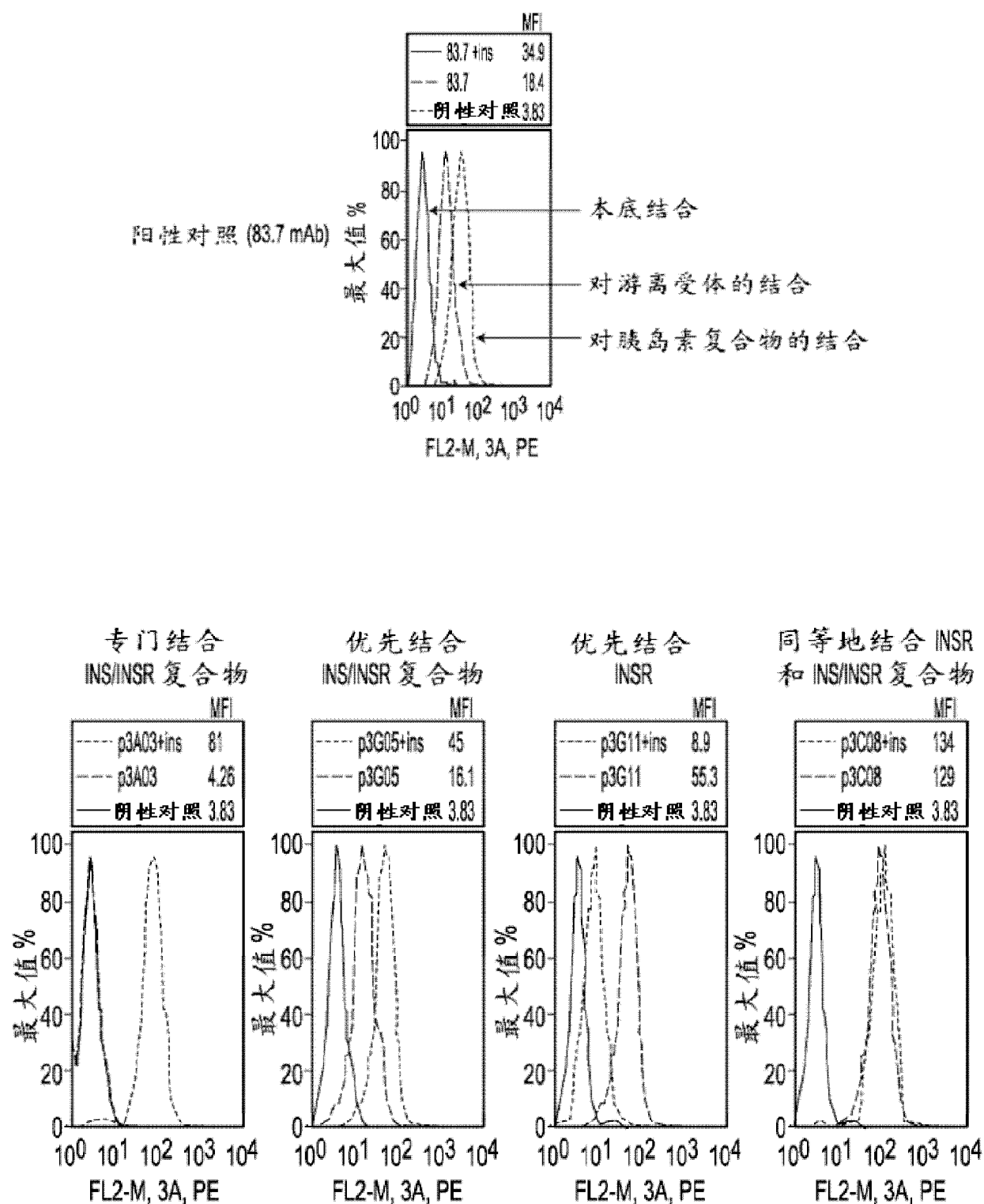


图 11. 显示在胰岛素存在和不存在的条件下结合 IM-9 细胞测试抗体的受体占据筛选的示例性结果

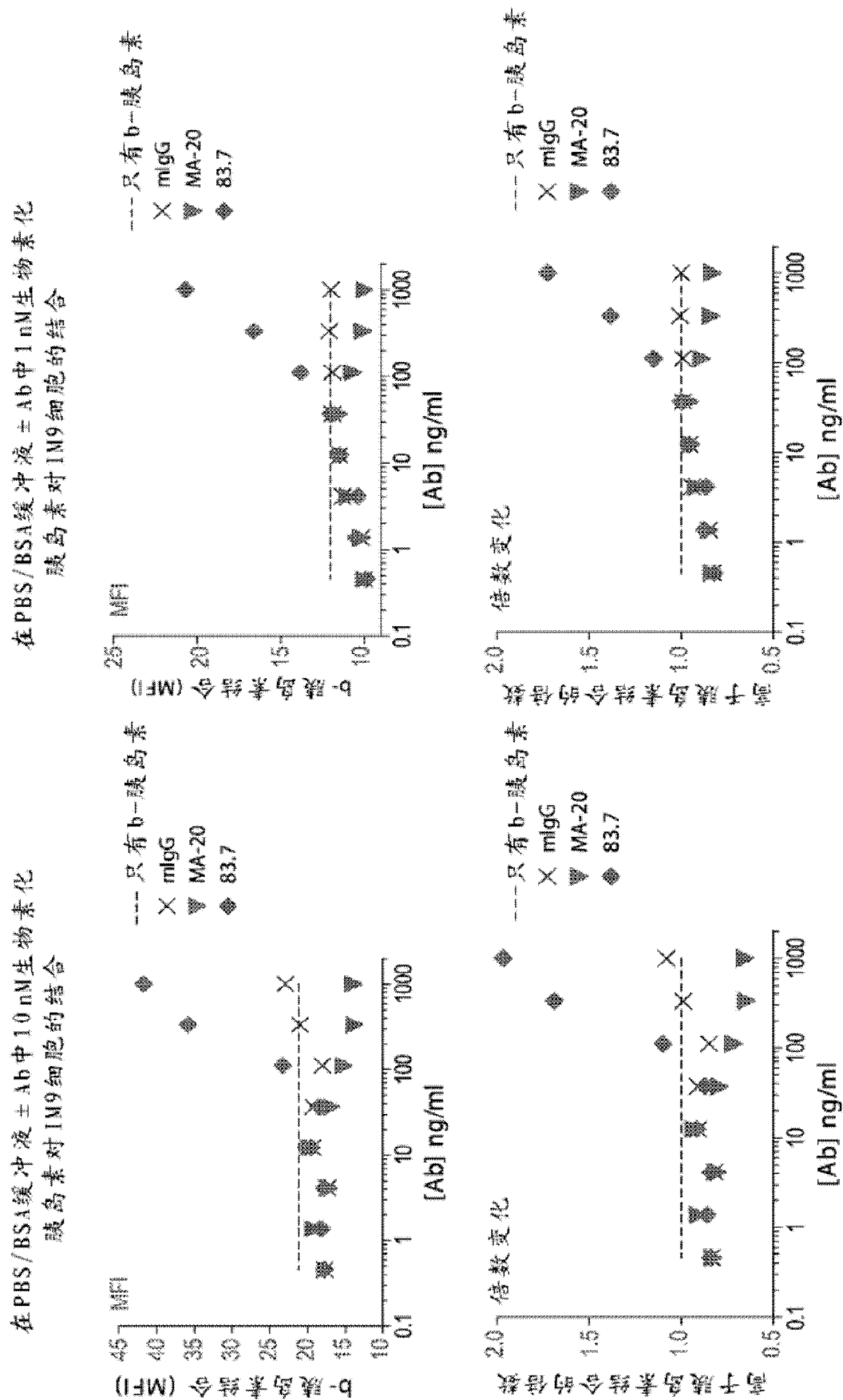


图 12:显示测试抗体对胰岛素与胰岛素受体结合的作用的生物素化配体筛选的示例性结果

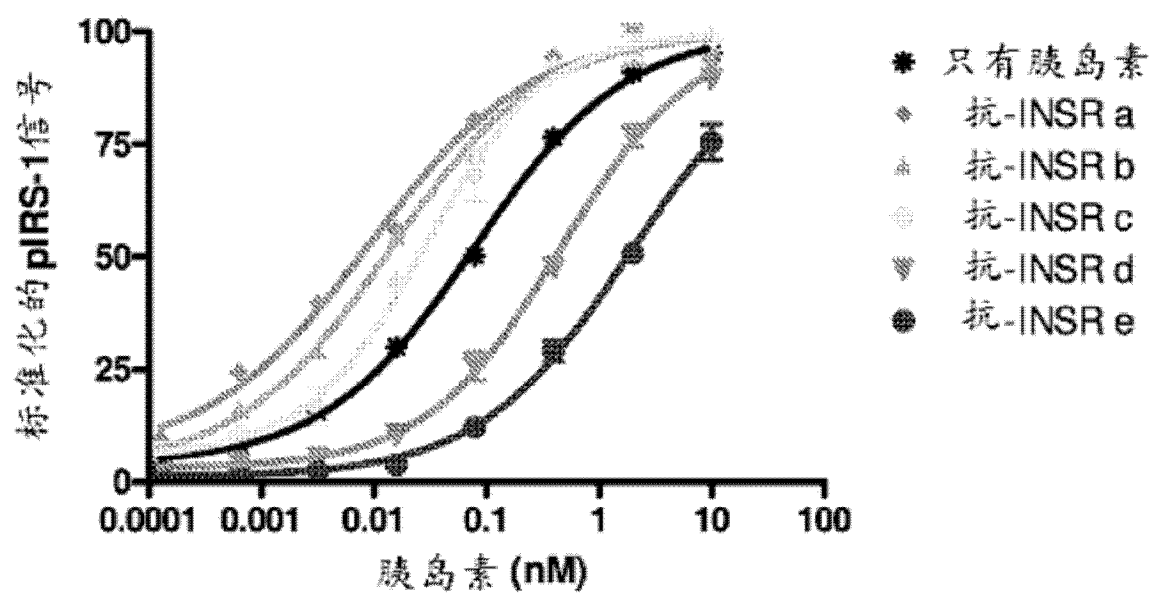
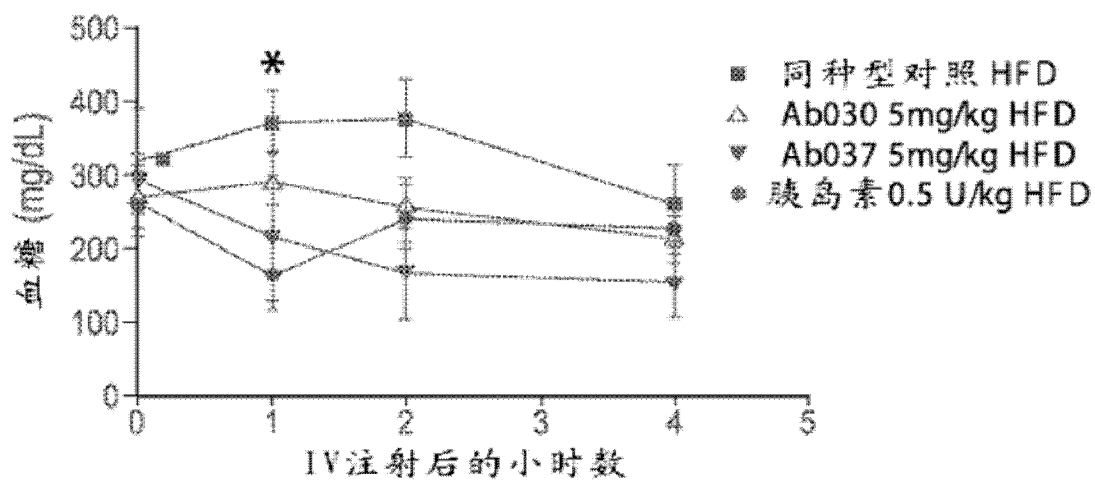


图 13. 测量测试抗体刺激 pIRS-1 磷酸化的能力的测定的示例性结合

抗- INSR Ab	Ab 种类	[Ab] (ug/ml)	胰岛素 EC50 (nM)		胰岛素 EC50 的倍数变化			Ab 性质
			单独的 胰岛素	胰岛素 + 抗体	-Ab EC50/+Ab EC50	+Ab EC50/-Ab EC50	纯对 变化	
Ab001	IgG2	5.00	0.11	0.0048	23.32	0.04	23.32	具有 显著 正调节 的 Ab
Ab002	IgG2	2.50	0.12	0.0166	7.32	0.14	7.32	
Ab003	IgG2	2.25	0.12	0.0171	7.11	0.14	7.11	
Ab004	IgG2	5.00	0.13	0.0239	5.34	0.19	5.34	
Ab005	Fab	2.50	0.08	0.0188	4.48	0.22	4.48	
Ab006	IgG2	1.25	0.13	0.0367	3.47	0.29	3.47	
Ab007	IgG2	5.00	0.11	0.0346	3.22	0.31	3.22	不具有 显著调节 的 Ab
Ab008	Fab	0.63	0.08	0.0270	3.11	0.32	3.11	
Ab009	IgG2	5.00	0.13	0.0461	2.77	0.36	2.77	
Ab010	IgG2	2.50	0.12	0.0463	2.62	0.38	2.62	
Ab011	IgG2	2.50	0.13	0.0719	1.78	0.56	1.78	
Ab012	IgG2	2.50	0.08	0.0504	1.67	0.60	1.67	
Ab013	IgG2	1.25	0.08	0.0540	1.56	0.64	1.56	具有 显著 负调节 的 Ab
Ab014	IgG2	5.00	0.11	0.0984	1.13	0.88	1.13	
Ab015	IgG2	1.25	0.20	0.2450	0.82	1.23	1.23	
Ab016	IgG2	1.25	0.20	0.2714	0.74	1.36	1.36	
Ab017	IgG2	2.50	0.20	0.2747	0.73	1.37	1.37	
Ab018	IgG2	5.00	0.09	0.2969	0.29	3.48	3.48	

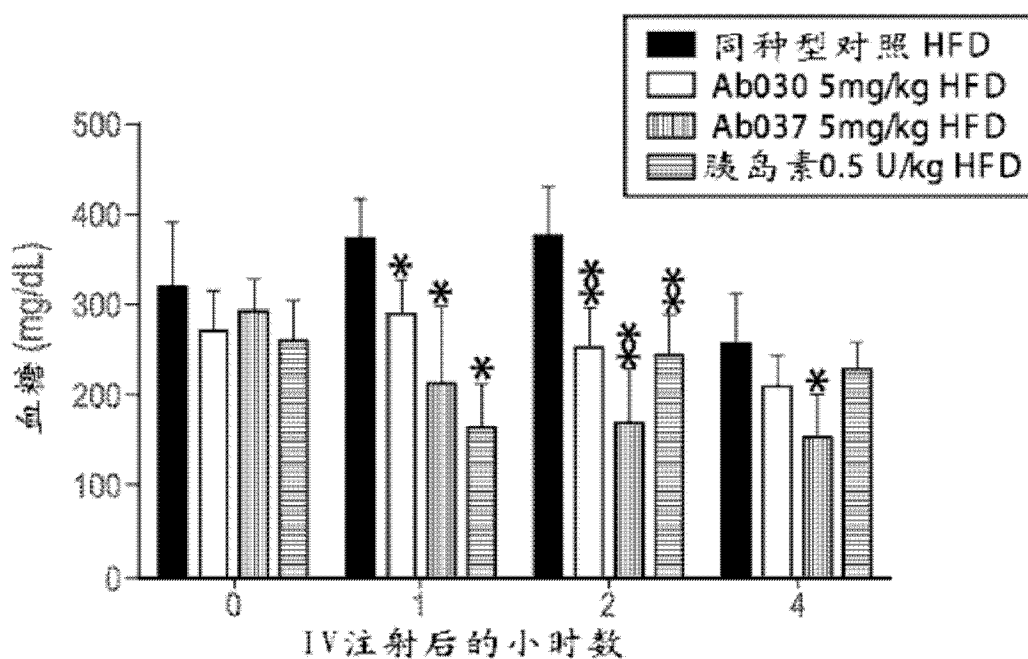
图 14. 按照 EC50 比率 +Ab/-Ab 分级的 pIRS-1 测定的胰岛素 EC50 值的表

A.



* $P < 0.01$ (单尾) 与 HFD/同种型相比较的 ND/同种型

B.



* $P \leq 0.01$ (双尾) 与 HFD/同种型相比较

* $P \leq 0.01$ (双尾) 与 HFD/同种型相比较

图 15 用部分激动剂抗-INSR 抗体处理的 D10 小鼠的血糖水平

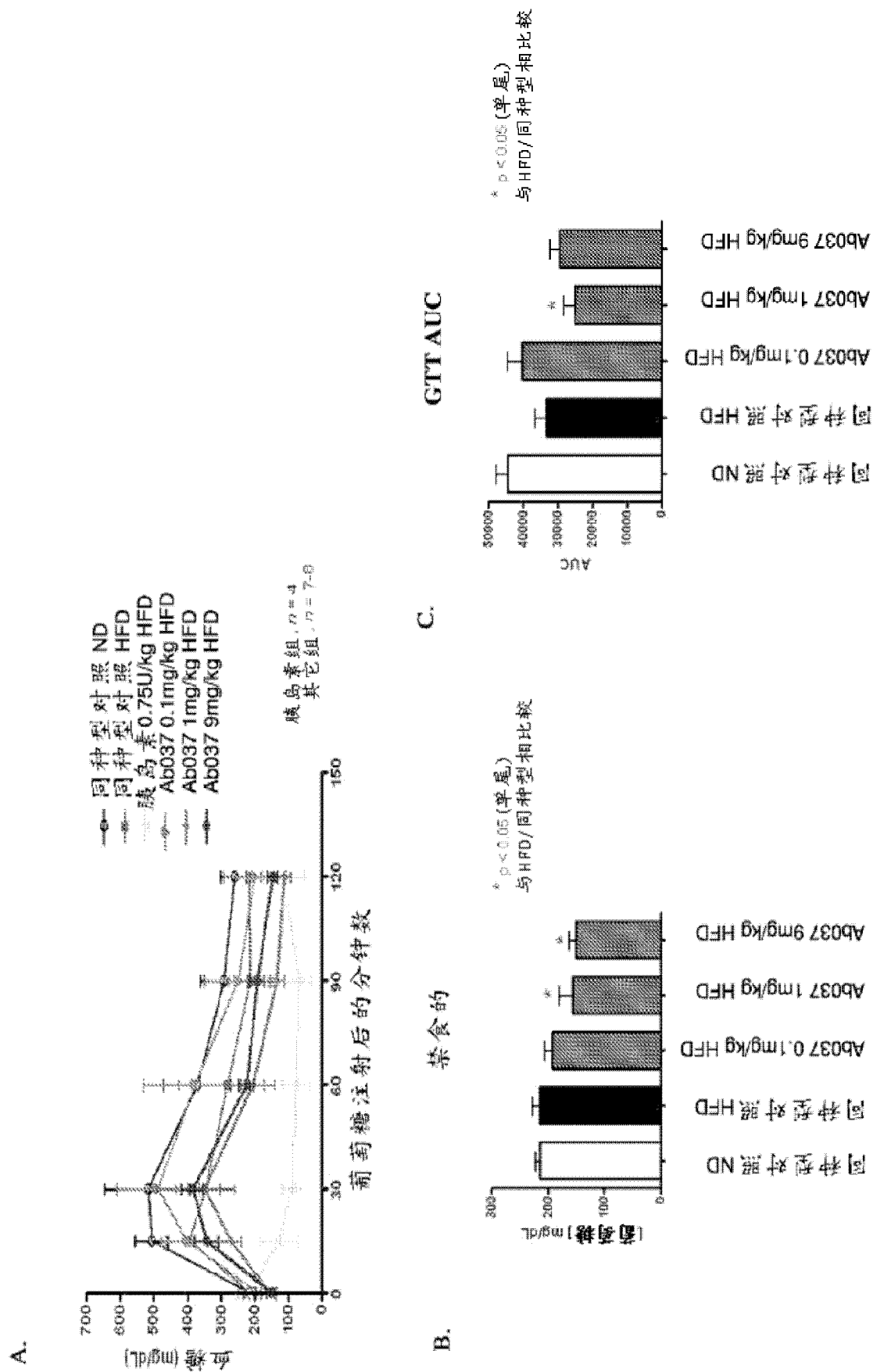
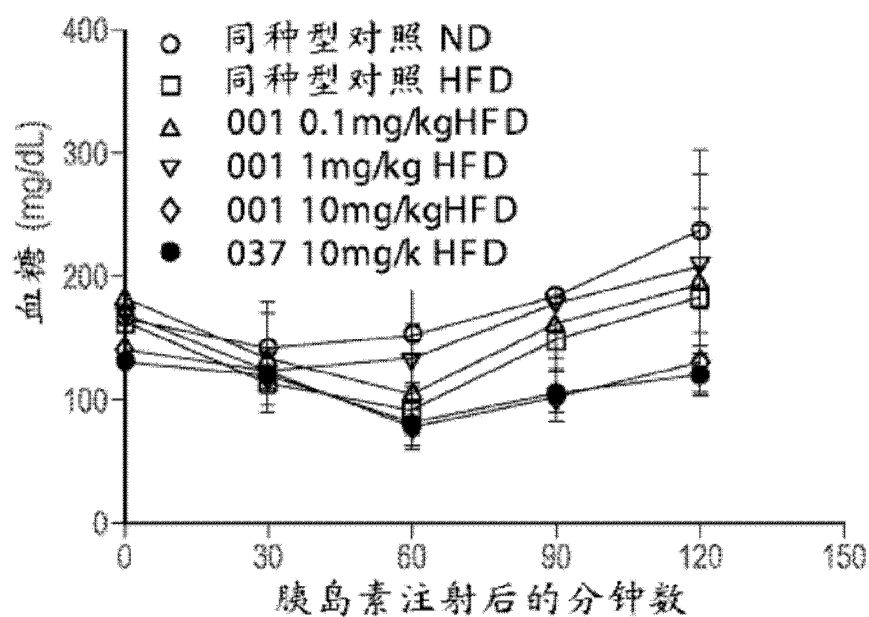


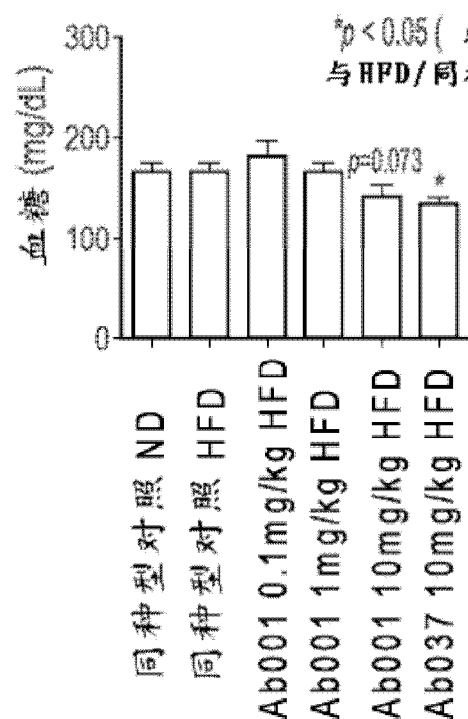
图 16

A.



B.

禁食的



C.

ITT AUC

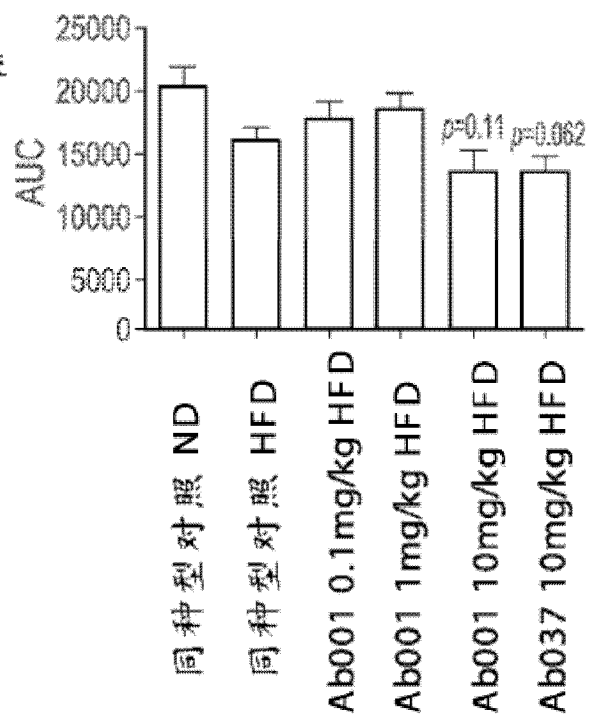


图 17

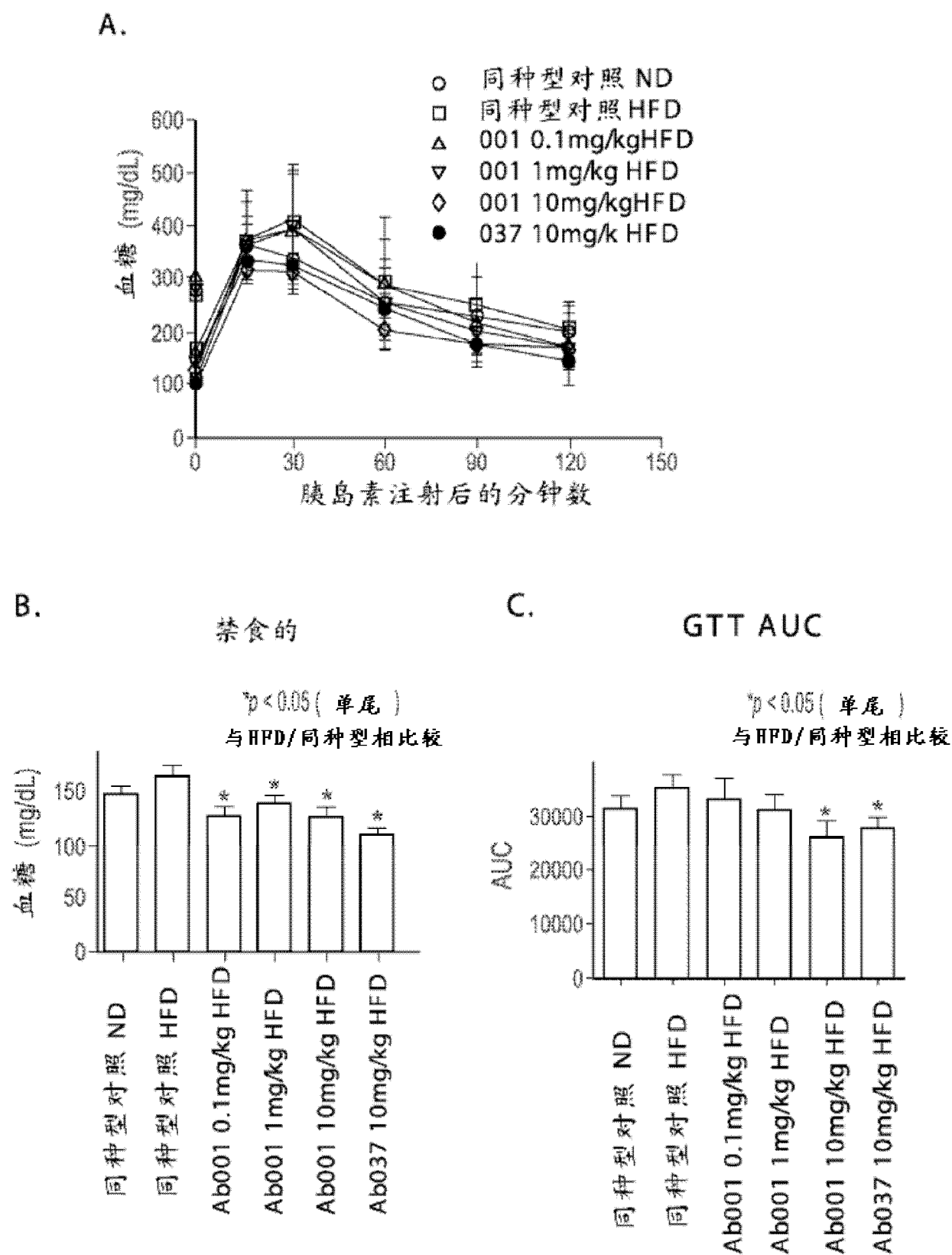
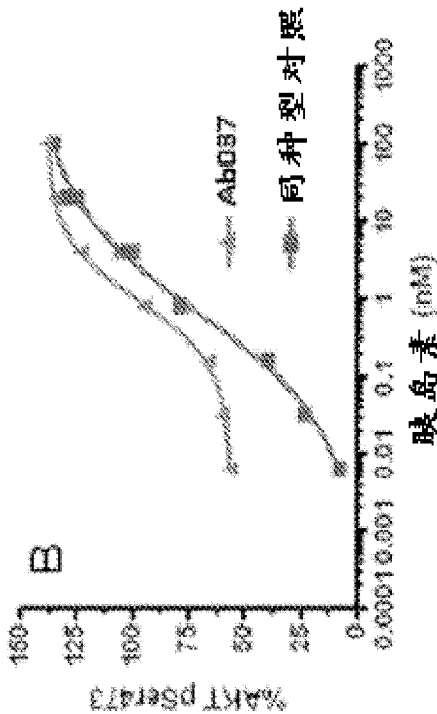


图 18

在激动剂抗体存在或不存在的条件下通过胰岛素产生的pAkt激活



通过激动剂抗体或胰岛素产生的pAkt激活

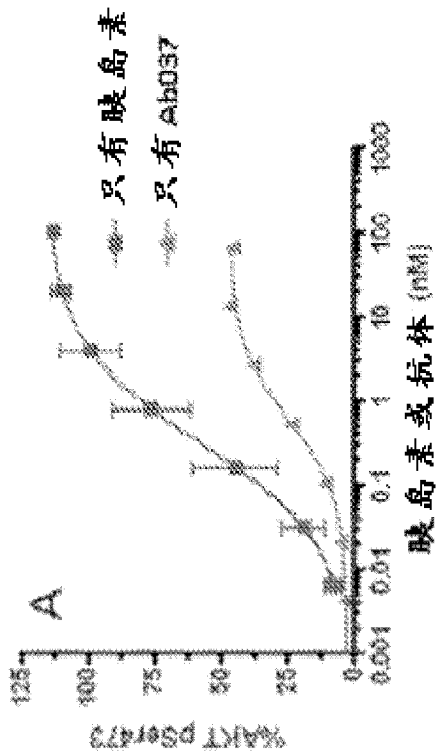
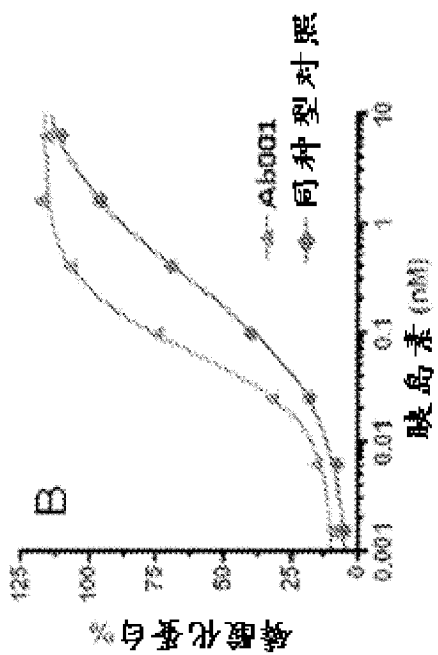


图 19

在敏化物抗体存在或不存在的条件下通过胰岛素产生的pAkt激活



通过单独的敏化物抗体或胰岛素产生的pAkt激活

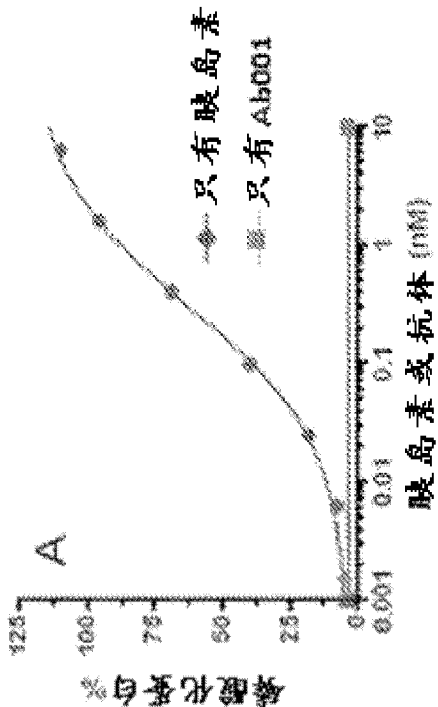


图 20

用于测试的改造的胰岛素受体细胞系	从Sigmoidal剂量-反应曲线拟合测定的测定参数	人胰岛素	Ab037	Ab030	Ab040	Ab018
人 <i>INSR</i> CHO-K1	通过单独的胰岛素或抗体产生的pAkt相对最大激活	100%	44%	47%	19%	36%
	单独的胰岛素或抗体的 EC_{50} (nM)	0.6	0.8	12	4	1
	单独的胰岛素或抗体的希尔系数	0.8	0.9	1.8	1.4	1.4
小鼠 <i>INSR</i> CHO-K1	通过单独的胰岛素或抗体产生的pAkt的相对最大激活	100%	29%	37%	25%	26%
	单独的胰岛素或抗体的 EC_{50} (nM)	3.4	1.4	11	4	3
	单独的胰岛素或抗体的希尔系数	0.7	1	1.7	1.3	1

图 21

用于测试的 改造的胰岛素 受体细胞系	从Sigmoidal 剂量-反应曲线 拟合测定的 测定参数	测定 1		测定 2	
		人胰岛素 和10 μg/ml 对照 抗体	人胰岛素 和10 μg/ml Ab037	人胰岛素 和10 μg/ml 对照 抗体	人胰岛素 和10 μg/ml Ab040
人 <i>INSR</i> <i>CHO-K1</i>	在10 μg/ml抗体 存在的情况下pAkt 的相对最大激活	100 ± 5%	93 ± 2%	100 ± 3%	85 ± 1%
	在10 μg/ml抗体 存在的情况下 胰岛素的EC50 (nM)	0.7 ± 0.3	1 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.3 ± 0.1
小鼠 <i>INSR</i> <i>CHO-K1</i>	在10 μg/ml抗体 存在的情况下pAkt 的相对最大激活	100 ± 2%	99 ± 1%	100 ± 3%	98 ± 1%
	在10 μg/ml抗体 存在的情况下 胰岛素的EC50 (nM)	3.9 ± 0.6	2.1 ± 0.4	3 ± 1	0.6 ± 0.2

图 22