



(10) 授权公告号 CN 109803680 B

(45) 授权公告日 2024. 05. 17

(21) 申请号 201780058544.5  
(22) 申请日 2017.08.01  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109803680 A  
(43) 申请公布日 2019.05.24

科克·W·约翰逊  
阿梅尔·M·米尔扎  
丹尼尔·H·贝丁格  
雷切尔·A·亨特 竹内俊彦  
吉兰吉特·考尔·阿卢瓦利亚  
罗宾·科特

(30) 优先权数据  
62/369,745 2016.08.01 US  
62/432,338 2016.12.09 US  
62/479,637 2017.03.31 US  
(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.03.22  
(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2017/044789 2017.08.01  
(87) PCT国际申请的公布数据  
W02018/026748 EN 2018.02.08

(74) 专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司 11018  
专利代理师 潘怀仁 康泉

(51) Int.Cl.  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 5/18 (2006.01)

(73) 专利权人 佐马美国有限公司  
地址 美国加利福尼亚  
(72) 发明人 拉裴尔·D·莱维  
哈森·伊萨弗拉斯  
艾格尼丝·肖邦·霍姆斯

(56) 对比文件  
W0 2004073587 A2,2004.09.02  
US 2009023655 A1,2009.01.22  
审查员 季璇馨

权利要求书2页 说明书64页  
序列表71页 附图43页

(54) 发明名称  
甲状旁腺激素受体1(PTH1R)抗体和其用途

(57) 摘要  
本公开大体涉及针对人类甲状旁腺激素受体1(PTH1R)的人类抗体和此类抗体在治疗癌症、恶性肿瘤体液性高钙血症(HHM)或原发性甲状旁腺功能亢进症(PHPT)和继发性甲状旁腺功能亢进症(SHPT)以及恶病质中的使用方法。

1. 一种人抗体, 其以 $2 \times 10^{-8}$ M或更小的亲和力 $K_d$ 与人甲状旁腺激素受体1 (PTH1R) 结合, 包括选自下述的CDR氨基酸序列:

i)

(a) SEQ ID NO: 45中阐述的重链CDR1氨基酸序列;

(b) SEQ ID NO: 46中阐述的重链CDR2氨基酸序列;

(c) SEQ ID NO: 47中阐述的重链CDR3氨基酸序列;

(d) SEQ ID NO: 149中阐述的轻链CDR1氨基酸序列;

(e) SEQ ID NO: 150中阐述的轻链CDR2氨基酸序列; 和

(f) SEQ ID NO: 151中阐述的轻链CDR3氨基酸序列; 或

ii)

(a) SEQ ID NO: 30中阐述的重链CDR1氨基酸序列;

(b) SEQ ID NO: 31中阐述的重链CDR2氨基酸序列;

(c) SEQ ID NO: 32中阐述的重链CDR3氨基酸序列;

(d) SEQ ID NO: 134中阐述的轻链CDR1氨基酸序列;

(e) SEQ ID NO: 135中阐述的轻链CDR2氨基酸序列; 和

(f) SEQ ID NO: 136中阐述的轻链CDR3氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的抗体, 其包含

i) 与SEQ ID NO: 2或7中阐述的重链可变区氨基酸序列至少90%一致的氨基酸序列; 和

ii) 与SEQ ID NO: 106或111中阐述的轻链可变区氨基酸序列至少90%一致的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体, 其进一步包含重链恒定区, 其中所述重链恒定区为被修饰或未被修饰的IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、其片段或其组合。

4. 根据权利要求1或2所述的抗体, 进一步包含重链恒定区, 其中所述重链恒定区为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

5. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体为XPA.85.012, 所述XPA.85.012的重链的氨基酸序列为SEQ ID NO: 2中阐述的, 并且所述XPA.85.012的轻链的氨基酸序列为SEQ ID NO: 106中阐述的。

6. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体为XPA.85.288, 所述XPA.85.288的重链的氨基酸序列为SEQ ID NO: 7中阐述的, 并且所述XPA.85.288的轻链的氨基酸序列为SEQ ID NO: 111中阐述的。

7. 根据权利要求1所述的抗体, 其进一步包含附着于所述轻链可变区的人类轻链恒定区。

8. 一种分离的核酸分子, 其包含编码根据权利要求1至7中任一项所述的重链和轻链的核苷酸序列。

9. 一种表达载体, 其包含与表达控制序列可操作地连接的根据权利要求8所述的核酸分子。

10. 一种宿主细胞, 其包含根据权利要求9所述的载体或根据权利要求8所述的核酸分子。

11. 根据权利要求10所述的宿主细胞, 其包含编码重链和轻链可变区的核酸分子, 其中

所述重链和轻链核酸由不同的核酸或在相同的核酸上表达。

12. 一种使用根据权利要求10或11所述的宿主细胞来产生抗体的方法,其包含在合适的条件下培养根据权利要求10或11所述的宿主细胞和回收所述抗体。

13. 一种抗体,其通过根据权利要求12所述的方法产生。

14. 一种无菌药物组合物,其包含根据权利要求1至7和13中任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。

15. 一种用于治疗与甲状旁腺激素或甲状旁腺激素相关蛋白表达增加有关的高钙血症的组合物,所述组合物包含根据权利要求1至7中任一项所述的抗体或根据权利要求14所述的药物组合物。

16. 一种用于治疗与甲状旁腺激素表达增加、甲状旁腺激素相关蛋白表达或甲状旁腺激素受体1 (PTH1R) 表达增加有关的疾病、病状或病症的组合物,所述组合物包含根据权利要求1至7中任一项所述的抗体或根据权利要求14所述的药物组合物,任选地,

其中所述疾病、病状或病症选自自由以下组成的组: PTH或PTHrP诱发的高钙血症、恶性肿瘤体液性高钙血症 (HHM)、原发性甲状旁腺功能亢进症 (PHPT)、继发性甲状旁腺功能亢进症 (SHPT) 和恶病质。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其中所述疾病为PHPT并且所述组合物用于施用至为非手术患者或手术失败的患者的受试者,或所述疾病为SHPT并且所述组合物用于施用至患有慢性肾病的受试者。

18. 一种用于治疗受试者中的PTH或PTHrP诱发的高钙血症和恶性肿瘤体液性高钙血症的组合物,包含根据权利要求1至7中任一项所述的抗体或根据权利要求14所述的药物组合物,其中所述抗体降低血清中钙水平。

19. 根据权利要求15至17中任一项所述的组合物,其中所述抗体静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮内或皮下施用。

## 甲状旁腺激素受体1 (PTH1R) 抗体和其用途

[0001] 本申请要求2016年8月1日提交的美国临时专利申请第62/369,745号、2016年12月9日提交的美国临时专利申请第62/432,338号和2017年3月31日提交的美国临时专利申请第62/479,637号的优先权,所述专利通过全文引用的方式并入本文。

[0002] 通过引用并入电子递交的材料

[0003] 通过全文引用的方式并入的是与本文同时提交的计算机可读核苷酸/氨基酸序列表且其标识如下:文件名:50986\_SeqListing.txt;大小:108,540字节,创建于2017年7月28日。

### 技术领域

[0004] 一般来说,本公开涉及甲状旁腺激素受体1 (PTH1R) 抗体和用于治疗与甲状旁腺激素表达增加、甲状旁腺激素相关蛋白表达或PTH1R表达增加相关的病状的治疗法,其包含向有需要的受试者施用治疗有效量的PTH1R抗体。

### 背景技术

[0005] G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR) 是一组将来自细胞外配体的信号转换成细胞内中继蛋白(relay protein),即异源三聚体GTP结合蛋白(G蛋白)中的信号的质膜受体。GPCR代表哺乳动物基因组中最大和最多样化的蛋白家族之一。(Hutchings等,2010 mAbs 2:6,594-606;Strader等,1994《生物化学年度评论(Annual Review of Biochemistry)》63:101-132)。GPCR的特征在于具有细胞外N-末端、7-跨膜跨越(transmembrane spanning, TM) 结构域和细胞内C-末端(Hutchings等,2010 mAbs 2:6,594-606)。在脊椎动物中,这些受体可以基于其在7个TM结构域内的序列相似性分类为家族,1类(视紫红质样家族)、2类(分泌素和粘附家族)、3类(谷氨酸家族)和F类(卷曲家族)(Hutchings等,2010 mAbs 2:6,594-606;Fredriksson等,2003《分子药理学(Mol Pharmacol.)》63(6):1256-72)。

[0006] 甲状旁腺激素受体(PTH1R) 是激活腺苷酸环化酶/cAMP信号传导途径的2类GPCR。类似于结合肽激素的所有2类GPCR,PTH1R具有相对大的(~160个氨基酸)N-末端细胞外结构域,在本文中称为N结构域,其在激素结合中起主要作用(Shimizu等,2004《生物化学杂志(J Biol Chem.)》280(3):1797-807)。已经标识了两种类型的PTH1R,即1型(PTH1R)和2型(PTH2R)。PTH1R介导两种多肽配体;甲状旁腺激素(PTH),即通过作用于骨骼和肾脏来调节血液中钙和无机磷酸盐水平的内分泌激素;及PTH相关蛋白(PTHrP),即在发展骨和其它组织中调节细胞分化和增殖计划的旁分泌因子的作用(Gardella等,2015《药理学评论(Pharmacol Rev.)》67(2):310-337)。PTH是骨重建和钙离子稳态的主要调节剂,通过结合和激活PTH1R发挥其作用(Shimizu等,2004《生物化学杂志》280(3):1797-807)。

### 发明内容

[0007] 本发明提供涉及抗甲状旁腺激素受体1 (PTH1R) 的抗体的材料、方法和用途。本公



开内容提供结合PTH1R的抗体。特别地,本公开提供在治疗癌症、恶性肿瘤体液性高钙血症(HHM)、原发性甲状旁腺功能亢进症(PHPT)、继发性甲状旁腺功能亢进症(SHPT)和恶病质中使用此等抗体的方法。

[0008] 在各种实施例中,本公开提供亲和力 $K_d$ 为 $10^{-6}$ M或更低的对PTH1R具有特异性的抗体。在各种实施例中,本公开提供亲和力 $K_d$ 为 $2 \times 10^{-6}$ M或更低的对PTH1R具有特异性的抗体。在示例性实施例中,本文所述的抗PTH1R抗体至少以 $10^{-6}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M或更低的亲和力结合。在其它实施例中,本文所述的抗体以相比于与PTH2R结合至少2-50倍、10-100倍、2倍、5倍、10倍、25倍、50倍或100倍,或20-50%、50-100%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%更高的亲和力(例如,优先与PTH1R结合)与PTH1R结合。在某些实施例中,通过表面等离子共振或KinExA分析来测量亲和力。

[0009] 在相关方面,抗体结合PTH1R的N末端部分。在又一方面,本公开涵盖不与甲状旁腺激素受体2(PTH2R)结合的抗体。在各个方面,抗体与细胞表面上的PTH1R结合。在某些方面,抗体与PTH1R变构结合。

[0010] 在优选实施例中,抗体是负调节剂抗体,任选地其中所述抗体能够将PTH或PTHrP与PTH1R之间的结合亲和力弱化至少约2倍,任选地至多1000倍。在其它实施例中,本文所述的抗体能够将PTH或PTHrP之间的结合亲和力弱化至少2-1000倍、10-100倍、2倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍或1000倍。

[0011] 在各种实施例中,抗体响应于甲状旁腺激素(PTH)或甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP)刺激受体而抑制细胞中的钙通量。在相关实施例中,抗体抑制PTH或PTHrP介导的环磷酸腺苷(cyclic adenosine mono-phosphate, cAMP)积聚。

[0012] 在一个实施例中,PTH1R抗体是单克隆抗体。

[0013] 在一个方面,本公开提供与甲状旁腺激素受体1(PTH1R)结合的抗体,其包含(a)图21或SEQ ID NO:27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93、96、99、102中阐述的重链互补性决定重复(CDR)1氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体;(b)图21或SEQ ID NO:28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、70、73、76、79、82、85、88、91、94、97、100、103中阐述的来自与(a)相同的重链可变区的重链CDR2氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体;及(c)图21或SEQ ID NO:29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、83、86、89、92、95、98、101、104中阐述的来自与(a)相同的重链可变区的重链CDR3氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体。

[0014] 在相关方面,本公开提供与甲状旁腺激素受体1(PTH1R)结合的抗体,其包含:(a)图21或SEQ ID NO:27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93、96、99、102中阐述的重链CDR1氨基酸序列或与其具有至少70%一致性的其变体;(b)SEQ ID NO:28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、70、73、76、79、82、85、88、91、94、97、100、103中阐述的来自与(a)相同的重链可变区的重链CDR2氨基酸序列,或与其具有至少70%一致性的其变体;及(c)SEQ ID NO:29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、83、86、89、92、95、98、101、104中阐述的来自与(a)相同的重链可变区的重链CDR3氨基酸序列,或与其具有至少70%一致性的其变体。

[0015] 在又一方面,本公开考虑与结合甲状旁腺激素受体1(PTH1R)的抗体结合的抗体,

其包含：(a) SEQ ID NO:27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93、96、99、102中阐述的重链CDR1氨基酸序列，或与其至少70%一致性的其变体；(b) 图21或SEQ ID NO:28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、70、73、76、79、82、85、88、91、94、97、100、103中阐述的独立选择的重链CDR2氨基酸序列，或与其具有至少70%一致性的其变体；及(c) 图21或SEQ ID NO:29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、83、86、89、92、95、98、101、104中阐述的独立选择的重链CDR3氨基酸序列，或与其具有至少70%一致性的其变体。

[0016] 在某些实施例中，重链CDR1、CDR2或CDR3氨基酸序列中的至少两个在图21或SEQ ID NO:27-104中阐述。在相关实施例中，重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列中的三个在图21或SEQ ID NO:27-104中阐述。

[0017] 在一些实施例中，本文考虑的抗体包含与图21或SEQ ID NO:1-26中阐述的重链可变区氨基酸序列至少85%一致的氨基酸序列。在一些实施例中，本文提供包含与图21或SEQ ID NO:1-26中阐述的重链可变区氨基酸序列至少95%一致的氨基酸序列的抗体。

[0018] 进一步考虑，本文所述的抗体包含具有与图21或SEQ ID NO:27-104中阐述的重链可变区中的所有三个HCDR，即HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列至少70%一致的氨基酸序列的多肽序列。

[0019] 在某些实施例中，本文考虑的抗体包含一个或多个已被来自另一人类抗体氨基酸序列的相应氨基酸替换的重链框架氨基酸。

[0020] 在一个实施例中，本文考虑的抗体进一步包含图21或SEQ ID NO:131-208中阐述的轻链CDR氨基酸序列中的任一个。在一些实施例中，抗体包含图21或SEQ ID NO:131-208中阐述的轻链CDR氨基酸序列中的至少两个。在其它实施例中，抗体包含图21或SEQ ID NO:131-208中阐述的轻链CDR氨基酸序列中的至少三个。

[0021] 在另一方面，本文所述的抗体包含(a) 图21或SEQ ID NO:131、134、137、140、143、146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、200、203、206中阐述的轻链CDR1氨基酸序列，或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体，或在图21中列出的其共有序列；(b) 图21或SEQ ID NO:132、135、138、141、144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、198、201、204、207中阐述的来自与(a)相同的轻链可变区的轻链CDR2氨基酸序列，或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体，或在图21中列出的其共有序列；及(c) 图21或SEQ ID NO:133、136、139、142、145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、196、199、202、205、208中阐述的来自与(a)相同的轻链可变区的轻链CDR3氨基酸序列，或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体，或在图21中列出的其共有序列。

[0022] 在替代实施例中，本文考虑的抗体包含：(a) 图21或SEQ ID NO:131、134、137、140、143、146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、200、203、206中阐述的轻链CDR1氨基酸序列，或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体；(b) 图21或SEQ ID NO:132、135、138、141、144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、198、201、204、207中阐述的独立选择的轻链CDR2氨基酸序列，或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体；及(c) 图21或SEQ ID NO:133、136、139、142、145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、

196、199、202、205、208中阐述的独立选择的轻链CDR3氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体。

[0023] 在某些实施例中,轻链CDR1、CDR2或CDR3氨基酸序列中的至少两个在图21或SEQ ID NO:131-208中阐述。

[0024] 进一步考虑,本文所述的抗体包含与图21或SEQ ID NO:105-130中阐述的轻链可变区氨基酸序列至少70%一致的氨基酸序列。在相关实施例中,抗体包含与图21或SEQ ID NO:105-130中阐述的轻链可变区氨基酸序列至少85%一致的氨基酸序列。在又一实施例中,抗体包含与图21或SEQ ID NO:105-130中阐述的轻链可变区氨基酸序列至少95%一致的氨基酸序列。在再一实施例中,抗体包含图21或SEQ ID NO:105-130中阐述的轻链可变区氨基酸序列。

[0025] 在又一实施例中,本文所述的抗体包含具有与图21或SEQ ID NO:131-208中阐述的轻链可变区的所有三个LCDR,即LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列至少70%一致的氨基酸序列的多肽序列。

[0026] 在某些实施例中,本文所述的抗体包含 (i) 与图21或SEQ ID NO:131-208中阐述的轻链可变区的所有三个LCDR,即LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列至少70%一致的氨基酸序列及 (ii) 与图21或SEQ ID NO:27-104中阐述的重链可变区的所有三个HCDR,即HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列至少70%一致的氨基酸序列。

[0027] 在另一方面,本公开提供与甲状旁腺激素受体1 (PTH1R) 结合的抗体,其包含轻链可变区和/或重链可变区,其中 (a) 轻链可变区包含至少选自SEQ ID NO:131、134、137、140、143、146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、200、203、206的CDR1或与其至少80%一致的序列,选自SEQ ID NO:132、135、138、141、144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、198、201、204、207的CDR2或与其至少80%一致的序列,和/或选自SEQ ID NO:133、136、139、142、145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、196、199、202、205、208的CDR3或与其至少80%一致的序列;并且/或其中 (b) 重链可变区包含至少选自SEQ ID NO:27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93、96、99、102的CDR1或与其至少80%一致的序列,选自SEQ ID NO:28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、70、73、76、79、82、85、88、91、94、97、100、103的CDR2或与其至少80%一致的序列,和/或选自SEQ ID NO:29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、83、86、89、92、95、98、101、104的CDR3或与其至少80%一致的序列。

[0028] 在相关实施例中,本文所述的抗体包含 (a) 轻链可变区,其包含至少选自SEQ ID NO:131、134、137、140、143、146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、200、203、206的CDR1或与其至少90%一致的序列,选自SEQ ID NO:132、135、138、141、144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、198、201、204、207的CDR2或与其至少90%一致的序列,和选自SEQ ID NO:133、136、139、142、145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、196、199、202、205、208的CDR3或与其至少90%一致的序列;并且/或其中 (b) 重链可变区包含至少选自SEQ ID NO:27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93、96、99、102的CDR1或与其至少90%一致的序列,选自SEQ ID NO:

28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、70、73、76、79、82、85、88、91、94、97、100、103的CDR2或与其至少90%一致的序列,和选自SEQ ID NO:29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、83、86、89、92、95、98、101、104的CDR3或与其至少90%一致的序列。

[0029] 在一些实施例中,本公开的抗体进一步包含重链恒定区,其中重链恒定区是被修饰或未被修饰的IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、其片段或其组合。

[0030] 在某些实施例中,提供其中一个或多个轻链框架氨基酸已被来自另一人类抗体氨基酸序列的相应氨基酸替换的抗体,任选地其中所述框架包含图1A和1B中列出的变化中的一种或多种。

[0031] 在一个方面,本公开的抗体选自由以下组成的组:XPA.85.012、XPA.85.017、XPA.85.288、XPA.85.328、XPA.85.329、XPA.85.330及XPA.85.349。

[0032] 在一个实施例中,本文所述的抗体进一步包含附着于所述轻链可变区的人类轻链恒定区。在一些实施例中,轻链恒定区是被修饰或未被修饰的 $\lambda$ 轻链恒定区、 $\kappa$ 轻链恒定区、其片段或其组合。

[0033] 在另一方面,本公开提供包含编码如本文所述的重链或轻链的核苷酸序列的分离的核酸分子。在各种实施例中,编码抗体可变区的核苷酸序列示于SEQ ID NO:209-234(重链)和235-260(轻链)中。

[0034] 在各种实施例中,核酸分子包含编码SEQ ID NO:105-130中任一个的轻链可变区氨基酸序列的核苷酸序列或其片段。在一个实施例中,核酸分子包含SEQ ID NO:235-260中任一个的轻链可变区核苷酸序列,或其片段。在又一实施例中,核酸分子包含编码SEQ ID NO:1-26中任一个的重链可变区氨基酸序列的核苷酸序列或其片段。在一个实施例中,核酸分子包含SEQ ID NO:209-234中任一个的重链可变区核苷酸序列,或其片段。本公开的核酸分子进一步包括所有核酸序列,其包括SEQ ID NO:209-260中的序列,及包含基于遗传密码多样性的简并密码子的核酸序列,其编码本文所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列或本文所述的任何HCDR或LCDR,并编码如SEQ ID NO:27-104和131-208中列出的CDR氨基酸序列,以及在高度严格的条件,如本文所述的条件下杂交成编码SEQ ID NO:1-26或105-130中列出的本文所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列或如SEQ ID NO:27-104或131-208中列出的本文所述的任何HCDR或LCDR的核酸序列的核酸。

[0035] 在一些实施例中,核酸分子编码与SEQ ID NO:105-130中列出的VL氨基酸序列至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%一致的VL氨基酸序列。在相关方面,VL氨基酸序列是共有序列。本公开的核酸分子包括在高度严格的条件,如本文所述的条件下杂交成编码SEQ ID NO:105-130的轻链可变区氨基酸序列或具有SEQ ID NO:235-260的轻链可变区核苷酸序列的核酸序列的核酸。在一些实施例中,核酸编码SEQ ID NO:131-208中列出的所述抗体的重链CDR的氨基酸序列。

[0036] 进一步考虑,本公开的核酸分子包含编码本文所述抗体中任一种的VH氨基酸序列的核苷酸序列,或其片段。在一些实施例中,核酸编码所述抗体的重链和/或轻链CDR的氨基酸序列。在一些实施例中,所述片段是包含重链和/或轻链CDR1-CDR3的连续片段。在一个实施例中,所述片段包含重链和/或轻链CDR1、CDR2或CDR3区中的至少一个、两个或三个,任选地具有不同的人类或人类共有框架,并且任选地具有1个、或至多2个、或至多3个CDR突变。

CDR氨基酸序列示于SEQ ID NO:27-104和131-208中。

[0037] 在相关方面,核酸分子包含编码SEQ ID NO:1-26的重链中的一个的重链可变区氨基酸序列的核苷酸序列,或其片段。在一个实施例中,核酸分子包含具有SEQ ID NO:209-234中列出的核苷酸序列或其片段的重链可变区。

[0038] 在一些实施例中,核酸分子编码与SEQ ID NO:1-26中列出的VH氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致的VH氨基酸序列。在相关方面,VH氨基酸序列是共有序列。本公开的核酸分子进一步包括在高度严格的条件,如本文所述的条件下杂交成编码SEQ ID NO:1-26的重链可变区氨基酸序列或具有SEQ ID NO:209-234中任一个的重链可变区核酸序列的核酸。

[0039] 进一步考虑,本公开的核酸可以编码选自图21中列出的抗体的抗体的全长轻链或重链,其中全长轻链或全长重链分别包含轻链恒定区或重链恒定区,轻链恒定区任选地包括未修饰或修饰的 $\kappa$ 或 $\lambda$ 区,并且重链恒定区包括任何类别,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD或IgE的未修饰或修饰的恒定区。修饰的IgG4恒定区包括含有突变Ser228Pro和Leu235Glu中的一个或多个的恒定区(Angal等,(1993)《分子免疫学(Mol.Immunol.)》30:105-108;Reddy等,(2000)《免疫学杂志(J.Immunol.)》164:1925-1933)。

[0040] 在一个方面,全长可变轻链抗体包含SEQ ID NO:105-130中列出的氨基酸序列。进一步考虑,编码全长轻链的核苷酸序列编码SEQ ID NO:105-130中列出的氨基酸序列,并包含SEQ ID NO:235-260中阐述的核苷酸序列。

[0041] 在一个方面,全长可变重链抗体包含SEQ ID NO:1-26中的任一个中的序列。进一步提供编码SEQ ID NO:1-26中列出的全长重链可变区氨基酸序列的核苷酸序列,并且其包含SEQ ID NO:209-234中的任一个中阐述的核苷酸序列。

[0042] 在又一方面,本公开提供包含本文考虑的核酸分子的表达载体,其与表达控制序列可操作地连接。还考虑包含本公开的表达载体或核酸分子的宿主细胞。在某些实施例中,本公开提供包含编码重链和轻链可变区的核酸分子的宿主细胞,其中重链和轻链核酸由不同的核酸或在相同的核酸上表达。

[0043] 在相关方面,本公开提供使用如本文所述的宿主细胞以产生抗体的方法,所述方法包含在合适的条件下培养宿主细胞并回收所述抗体。还提供通过本文公开的方法所产生的抗体。

[0044] 本公开进一步考虑包含如本文公开的抗体和药学上可接受的载体的无菌药物组合物。

[0045] 在另一方面,本公开提供治疗与甲状旁腺激素或甲状旁腺激素相关蛋白表达增加有关的高钙血症的方法,其包含向有需要的受试者施用治疗有效量的本文考虑的抗体或药物组合物的步骤。

[0046] 在另一方面,本公开提供治疗与甲状旁腺激素表达增加、甲状旁腺激素相关蛋白表达增加或PTH1R表达增加有关的疾病、病状或病症的方法,其包含向有需要的受试者施用治疗有效量的本文考虑的抗体或药物组合物的步骤。

[0047] 在另一方面,本公开提供治疗选自由以下组成的组的疾病、病状或病症的方法:癌症、PTH或PTHrP诱发的高钙血症、恶性肿瘤体液性高钙血症(HHM)、家族性低尿钙性高钙血症、结核病、结节病、原发性甲状旁腺功能亢进症(PHPT)、继发性甲状旁腺功能亢进症

(SHPT)和恶病质。

[0048] 在各种实施例中,疾病是PHPT并且受试者是非手术患者或手术失败的患者。在各种实施例中,疾病是SHPT并且受试者患有慢性肾病。

[0049] 在各种实施例中,本公开提供治疗癌症的方法,其中与未接受抗体的受试者相比,所述施用降低了受试者中癌症转移的发生率。

[0050] 在相关方面,本公开提供治疗癌症的方法,其包含向有需要的受试者施用治疗有效量的本文考虑的抗体或药物组合物。在某些实施例中,癌症选自由以下组成的组:骨癌、肺癌、肝细胞癌、胰腺癌、肾癌、纤维化癌、乳腺癌、骨髓瘤、鳞状细胞癌、结肠直肠癌和前列腺癌。在相关方面,癌症是转移性癌症。在相关方面,转移包括向骨或骨骼组织、肝、肺、肾或胰腺的转移。

[0051] 在各种实施例中,向有需要的受试者施用治疗有效量的本文考虑的抗体或药物组合物改善了高钙血症的一种或多种症状。

[0052] 在各种实施例中,向有需要的受试者施用治疗有效量的本文考虑的抗体或药物组合物改善了PTHrP诱发的HHM中的消耗综合征或恶病质的一种或多种症状。

[0053] 在各种实施例中,向有需要的受试者施用治疗有效量的本文考虑的抗体或药物组合物因降低高钙血症和/或消耗综合征而延长HHM存活。

[0054] 在各种实施例中,本文公开的抗体静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮内或皮下施用。在相关实施例中,本文公开的抗体与第二药剂组合施用。在相关实施例中,本文公开的抗体每周施用一次、每2周施用一次、每月施用两次、每月施用一次、每两个月施用一次或每三个月施用一次。

[0055] 在各种实施例中,抗体组合物可每周两次或每1、2或4周以0.3-30mg/kg的剂量范围静脉内、皮下或肌内施用。在各种实施例中,剂量可以是0.3、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或30mg/kg。在各种实施例中,抗体组合物可以0.3-3mg/kg、1到6mg/kg或2到6mg/kg的剂量范围,每周或每1、2或4周两次静脉内施用。或者,抗体组合物可每周两次或每1、2或4周以0.5-5mg/kg的剂量范围静脉内、皮下或肌内施用。

[0056] 在各种实施例中,本公开提供在治疗与甲状旁腺激素表达增加或甲状旁腺激素相关蛋白表达增加相关的病状或病症中施用包含本文公开的抗体或药物组合物的组合物的方法。

[0057] 在各种实施例中,本公开提供在治疗与高钙血症相关的病状或病症中施用包含本文公开的抗体或药物组合物的组合物的方法。

[0058] 在一个方面,PTH1R抗体是单克隆抗体(或其活性片段),其可以与来自多个物种的PTH1R交叉反应、对其进行检测、与其结合并将其中和(例如,本文公开的人类PTH1R抗体可以与小鼠PTH1R交叉反应、对其进行检测、与其结合并将其中和。本文公开的小鼠PTH1R抗体可以与人类PTH1R交叉反应、对其进行检测、与其结合并将其中和)。

[0059] 应理解,本文所述的每个特征或实施例或组合是本发明任何方面的非限制性的说明性实例,并且因此,意指可与本文所述的任何其它特征或实施例或组合进行组合。例如,在用如“一个实施例”、“一些实施例”、“某些实施例”、“又一实施例”、“特定示例性实施例”和/或“另一实施例”的语言描述特征的情况下,这些类型的实施例中的每一个都是旨在与本文所述的任何其它特征或特征组合进行组合的特征的非限制性实例,而不必列出每个可

能的组合。此类特征或特征组合适用于本发明的任何方面。在公开了落在范围内的值的实例的情况下,考虑这些实例中的任一个作为范围的可能端点,考虑此类端点之间的任何和所有数值,并且设想上端点和下端点的任何和所有组合。

[0060] 本文的标题是为了方便读者而并非旨在限制。根据具体实施方式和/或附图和/或权利要求,本发明的额外方面、实施例和变型将是显而易见的。

## 附图说明

[0061] 图1A-1B:所选克隆的轻链与亲本序列(parent sequence)的多序列比对。使用ClustalW算法针对亲本序列进行与XPA.85.012相关的克隆(图1A)或来自与XPA.85.017相关的克隆(图1B)的轻链氨基酸的多序列比对(Multiple sequence alignment,MSA)。使用CLCBio序列浏览软件,将此比对用来产生系统发生树(phylogenetic tree)。所述树以Newick格式导出。MSA以FASTA格式导出并通过EMBOSS程序,即Showalign运行以将所述比对转换为点标识格式。使用R语言编写脚本以将所述树与相应的由轻链家族进行颜色编码的点标识比对序列组合。分支线格式也对应于轻链家族,以使其易于以B/W格式读取。在所呈现的比对中,完整地显示亲本序列。在其它序列相同的情况下,残基显示为点。显示差异。使用IMGT编号系统标识的CDR区域由比对上的框调出。标识与亲本序列的框架差异。这是由通过软件程序(PHENom;XOMA(US)LLC)运行亲本序列轻链并查看结果中呈现的位置频率矩阵来完成的。如果序列中的框架变化朝向规范氨基酸,则其显示为(+),如果远离规范序列(就频率而言),则显示为(-)。如果在频率矩阵中没有看到残基,则其是在此位置中很少使用的氨基酸,且其由(R)指示,且氨基酸用方括号指示。当序列属于亲本序列的不同家族时,将最接近亲本序列的家族成员用作PHENom分析中的“种子”。

[0062] 图2:将亲本克隆XPA.85.012和XPA.85.017分别与其各自的高亲和力轻链变体XPA.85.288和XPA.85.287进行比较的代表性的SPR衍生的动力学数据。如示例方法中所述,IgG通过Fc区域被捕获到传感器表面,并且重组PTH1R N-末端ECD以200、50、12.5和3.125nM注射。

[0063] 图3A-3B:XPA.85.012和XPA.85.017在CHO K1(空心圆圈)和CHO人类PTH1R(实心方块)细胞上的结合曲线。XPA.85.012的结合曲线(图3A)。XPA.85.017的结合曲线(图3B)。两种抗体都与CHO人类PTH1R细胞上表达的PTH1R特异性结合。

[0064] 图4A-4B:XPA.85.012和XPA.85.017在PTH或PTHrP存在下结合。在饱和浓度的PTH或PTHrP存在或不存在下,将浓度递增的抗PTH1R抗体与CHO人类PTH1R细胞一起温育。用R-藻红蛋白抗人类IgG检测抗体结合,单独的抗体(空心圆圈)、具有2.5 $\mu$ M PTH的抗体(实心方块)和具有2.5 $\mu$ M PTHrP(实心菱形)的抗体。XPA.85.012的结合曲线(图4A)。XPA.85.017的结合曲线(图4B)。尽管在任一配体存在下与PTH1R结合的抗体减少,但两种抗体都在PTH或PTHrP存在下与PTH1R结合。

[0065] 图5A-5B:通过流式细胞术得到的XPA.85.012和XPA.85.017的结合速率(On-Rate)。将浓度递增的抗体与CHO人类PTH1R细胞一起温育一定时间量。用抗人类IgG APC检测抗体结合。对XPA.85.017运行时间进程,因为与XPA.85.012相比,其速率较慢(图5A)。在图中,随着温育时间延长,抗体结合曲线向左移动。这表明抗体尚未达到平衡,且抗体结合需要时间。XPA.85.012具有更快的结合速率(图5B)。1小时处的抗体结合(空心圆圈)具有与

24小时温育时间点(实心六边形)类似的EC50值。XPA.85.012可以在1小时内达到结合平衡,而XPA.85.017可能需要24小时来达到结合平衡。一旦两种抗体达到平衡,其就具有类似的EC50值。

[0066] 图6A-6D: XPA.85.012和XPA.85.017物种交叉反应性和差异结合谱。在饱和浓度的PTH或PTHrP存在或不存在下,将浓度递增的抗PTH1R抗体与表达PTH1R直接同源的细胞一起温育24小时。用R-藻红蛋白抗人类IgG检测抗体结合。XPA.85.012和XPA.85.017两者都与不同的PTH1R直接同源交叉反应,并且两种抗体都在配体、PTH(方形符号)或PTHrP(菱形符号)不存在下结合得更好。与表达人类PTH1R+/-PTH(图6A)或+/-PTHrP(图6B)的CHO细胞结合的抗体。与表达小鼠PTH1R+/-PTH(图6C)或+/-PTHrP(图6D)的CHO细胞结合的抗体。

[0067] 图7A-7C: 在PTH和PTHrP存在或不存在下与过表达人类PTH1R,即Saos-2结合的抗体。在饱和浓度的PTH或PTHrP存在或不存在下,将浓度递增的抗PTH1R抗体与Saos-2人类PTH1R细胞一起温育。XPA.85.328(图7A)、XPA.85.329(图7B)、XPA.85.330(图7C)。用R-藻红蛋白抗人类IgG检测抗体结合。单独的抗体(空心圆圈)、具有1 $\mu$ M PTH的抗体(实心方块)和具有3 $\mu$ M PTHrP的抗体(实心菱形)。在PTH或PTHrP存在下,所有三种抗体都显示与PTH1R的结合降低。

[0068] 图8: 抗PTH1R抗体与PTH1R特异性结合。将浓度递增的抗PTH1R抗体加入过表达人类PTH2R的CHO细胞中,并在4 $^{\circ}$ C下温育1小时(图8)。用FACS缓冲液将细胞洗涤两次,并用抗人类IgG APC检测抗体结合。所测试的抗体都未显示出与过表达人类PTH2R的CHO细胞的特异性结合。将抗KLH.G2用于结合的阴性对照。所有测试的抗体都对PTH1R具有特异性。

[0069] 图9A-9D: 抗PTH1R抗体抑制配体介导的cAMP积聚和钙动员。将人类PTH1RCHO1细胞在37 $^{\circ}$ C下与267nM(40 $\mu$ g/ml)的XPA.85.012(实心方块)或XPA.85.017(实心三角形)预温育30分钟,接着与浓度递增的PTH(1-34)(图9A和9C)或PTHrP(1-34)(图9B和9D)一起温育。两种抗体都抑制配体介导的cAMP积聚(Gs/PKA途径,图9A和9B)和钙动员(Gq/PKC途径,图9C和9D)。

[0070] 图10A-10D: 在通过轻链改组对XPA.85.017(空心圆)进行亲和力工程化之后,将稳定地过表达人类(图10A和10B)或小鼠PTH1R(图10C和10D)的CHO1细胞在37 $^{\circ}$ C下与267nM(40 $\mu$ g/ml)的变体IgG预温育30分钟,接着与浓度递增的PTH(1-34)在37 $^{\circ}$ C下诱导45分钟。变体IgG通过人类和小鼠PTH1R表现出对配体介导的cAMP积聚(Gs/PKA途径)的一定范围的抑制。

[0071] 图11A-11D在使用分别内源性表达天然人类和大鼠PTH1R的SaOS-2和UMR106细胞的cAMP分析中的变体和亲本IgG活性的比较。在通过PTH(1-34)或PTHrP(1-34)在37 $^{\circ}$ C下诱导cAMP积聚45分钟之前,将IgG(267nM或40 $\mu$ g/ml)与细胞在37 $^{\circ}$ C预温育30分钟。数据表示为平均值+SEM,并代表在单个(图11A和11D)或重复(图11B和11C)孔中测量的RLU的平均值。通过轻链改组对XPA.85.017进行的亲和力工程化产生XPA.85.287。此变体显示出对人类PTH1R(图11B)(空心方块)与亲本序列(实心方块)的活性的显著改进,且对大鼠PTH1R的活性几乎不变(图11C)。相反,XPA.85.012(实心三角形)的亲和力工程化产生变体XPA.85.288(空心三角形),显示出对天然人类PTH1R(图11A)以及天然大鼠PTH1R(图11C)两者的活性的显著改进。还发现XPA.85.288显著抑制表达天然人类PTH1R的SaOS-2细胞中的PTHrP诱发的cAMP(图11D)。



[0072] 图12A-12B:在使用人类PTH1R CHOK1(图12A)和小鼠PTH1R CHOK1(图12B)细胞的cAMP分析中的PTHrP(1-34)和浓度递增的XPA.85.287(XPA.85.017的亲合力工程化的变体)的浓度反应曲线。使用GraphPad Prism 6.0(GraphPad Software Inc.,加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego,CA))进行Schild回归分析,揭示浓度反应曲线的非平行向右移动。这些结果与变体IgG的非竞争性(变构)作用机制一致。

[0073] 图13A-13B:在使用人类PTH1R CHOK1(图13A)和小鼠PTH1R CHOK1(图13B)细胞的cAMP分析中的PTHrP(1-34)和浓度递增的XPA.85.288(XPA.85.012的亲合力工程化的变体)的浓度反应曲线。使用GraphPad Prism 6.0(GraphPad Software Inc.,加利福尼亚州圣地亚哥)进行Schild回归分析,揭示浓度反应曲线的非平行向右移动。这些结果与变体IgG的非竞争性(变构)作用机制一致。

[0074] 图14A-14B:PTH1R抗体对PTH刺激的Saos-2细胞分泌M-CSF的影响。在40 $\mu$ g/mL抗体存在下,用指定浓度的PTH(1-34)肽将融合后的Saos-2细胞治疗48小时。克隆XPA.85.017(三角形)与轻链交换的变体XPA.85.287(实心圆圈)和阴性对照IgG(空心圆圈)一起显示(图14A)。含有XPA.85.012重链的亲合力增强的轻链交换的变体中的五种显示出抑制受PTH刺激的M-CSF分泌(图14B)。对照IgG(空心圆圈)、XPA.85.288(实心圆圈)、XPA.85.342(倒三角形)、XPA.85.346(空心方块)、XPA.85.331(空心三角形)和XPA.85.327(实心方块)。

[0075] 图15A-15B:PPTH1R抗体对PTHrP刺激的Saos-2细胞分泌M-CSF的影响。在40 $\mu$ g/mL抗体存在下,用指定浓度的PTHrP(1-36)肽将融合后的Saos-2细胞治疗48小时。阴性对照IgG(空心圆圈)、XPA.85.328(倒三角形)、XPA.85.329(实心圆圈)、XPA.85.330(方块)。具有XPA.85.012重链的亲合力增强的轻链交换的变体中的三种显示出在40 $\mu$ g/mL的固定抗体浓度下抑制受PTHrP刺激的M-CSF分泌(图15A)。针对不同浓度的抗体测试12.5nM的固定PTHrP(1-36)浓度(图15B)。在单独的实验中,将亲本克隆XPA.85.012和XPA.85.017分别与其40 $\mu$ g/mL下的亲合力成熟的变体XPA.85.288和XPA.85.287进行比较(图15C)。

[0076] 图16A-16B:在200nM抗体存在下,PTH(图16A)和PTHrP(图16B)肽刺激hPTH1R介导的ERK1/2磷酸化的浓度反应曲线。将CHO-hPTH1R细胞在37 $^{\circ}$ C下与抗体一起温育10分钟,接着与浓度递增的肽配体一起温育5分钟,然后将细胞裂解并通过免疫分析确定ERK1/2磷酸化水平。显示的数据点是平均值 $\pm$ SEM。抗体:阴性对照IgG(空心圆圈)、XPA.85.012(实心圆圈)和XPA.85.017(实心三角形)。

[0077] 图17:使用甲状腺上皮小体摘除术(Thyroparathyroidectomized,TPTx)模型在体内测量的PTH1R抗体降低PTH(1-34)诱发的血清钙水平升高的能力。在开始PTH(1-34)输注前18小时,用PTH1R抗体XPA.85.017(Ab017)、XPA.85.287(Ab287)、XPA.85.288(Ab288)和BM2或同种型对照(15mg/kg)静脉内攻击斯泼累格·多雷(Sprague-Dawley,SD)雄性大鼠(n=5-6只/组)。在给药前(基线)、输注前(T0)、输注开始后2、4和6小时测量血清钙。

[0078] 图18A-18B:使用连续输注模型以模拟患有甲状旁腺功能亢进症患者中的PTH分泌过多的PTH1R抗体降低在体内测量的PTH(1-34)诱发的血清钙水平升高的能力。图18A,在正常的斯泼累格·多雷大鼠(Harlan)中持续皮下输注(Alzet微型泵,型号2ML1;10微升/小时,10微克/千克/天)hPTH(1-34)持续7天,以模拟患有甲状旁腺功能亢进症的患者中的PTH分泌过多。测量钙作为生物标志物,以评定泵植入后24小时由单次静脉内施用Ab288(2或10mg/kg;n=5只/组)、BM2(10mg/kg;n=5)或同种型对照(10mg/kg,n=2)所引起的体内中

和。测量泵植入前(给药前),泵植入后24小时、27小时(给药后3小时)、48小时、72小时、96小时、120小时、144小时及168小时的血清钙。图18B,在类似的研究中测试抗体,即Ab328、Ab329和Ab330(2mg/kg IV)以及Ab288,其中测量泵植入前(给药前),泵植入后24小时、27小时(给药后3小时)、48小时、72小时、96小时和120小时的血清钙。所有抗体都在给药后24小时和整个输注期间显著降低钙水平,其中Ab288和Ab328产生最显著的降低。

[0079] 图19A-19B:使用连续输注模型以模拟患有甲状旁腺功能亢进症患者中的高钙血症的PTH1R抗体降低在体内测量的PTHrP(1-34)诱发的血清钙水平升高的能力。通过在正常的斯泼累格·多雷大鼠(Harlan)中持续皮下输注(Alzet微型泵,型号2ML1;10微升/小时,100微克/千克/天)hPTHrP(1-36)持续6天,以模拟患有甲状旁腺功能亢进症的患者中的高钙血症,来评定抗PTH1R受体抗体对抑制PTHrP活性的影响。图19A,测量钙作为生物标志物,以评定泵植入后24小时由单次静脉内施用Ab288(2或10mg/kg;n=4只/组)、抗-PTHrP抗体MCB1.1(10mg/kg;n=5)或同种型对照(10mg/kg,n=3)所引起的体内中和。测量泵植入前(给药前),泵植入后24小时、26小时(给药后2小时)、48小时、72小时、96小时、120小时和144小时的血清钙。图19B,测量泵植入前(给药前),泵植入后26(给药后2小时)、48小时、96小时和144小时的体重。

[0080] 图20A-20E:PTH1R抗体XPA.85.349持续有效地减少小鼠结肠26肿瘤相关的高钙血症。测量总血清钙作为生物标志物,以评定由泵植入后24小时单次静脉内施用PTH1R抗体XPA.85.349(2mg/kg;n=6-8只/组或6mg/kg;n=5-8只/组)、针对结合的阴性对照抗KLH.G2(6mg/kg;n=2-3)、无治疗对照(n=5)所引起的体内中和(图20A显示平均血清总水平+/-S.E.M.)。测量随时间推移(给药前48小时和给药后48小时、72小时和120小时)的小鼠体重(图20B)和肿瘤重量(图20C)。也测量将2或6mg/kg PTH1R抗体XPA.85.349、抗-KLH.G2对照抗体给药后24小时、48小时、72小时和120小时或治疗前和没有肿瘤的动物中的小鼠血清中的PTHrP(图20D)和PTH1-84(图20E)水平。

[0081] 图21:重链(HC)互补决定区(CDR)、轻链(LC)互补决定区(CDR)和可变区的序列表。提供了XPA.85.332、XPA.85.012、XPA.85.345、XPA.85.329、XPA.85.326、XPA.85.328、XPA.85.288、XPA.85.342、XPA.85.333、XPA.85.343、XPA.85.327、XPA.85.330、XPA.85.334、XPA.85.344、XPA.85.346、XPA.85.331、XPA.85.347、XPA.85.017、XPA.85.341、XPA.85.335、XPA.85.340、XPA.85.339、XPA.85.287、XPA.85.336、XPA.85.337和XPA.85.338抗体的HC CDR和LC CDR和可变区及其各自的序列标识符(SEQ ID)编号。

## 具体实施方式

[0082] 本发明提供与抗PTH1R的人类抗体相关的材料、方法和用途。特别地,本公开提供此类抗体在治疗高钙血症、癌症、恶性肿瘤体液性高钙血症(HHM)、原发性甲状旁腺功能亢进症(PHPT)和继发性甲状旁腺功能亢进症(SHPT)及恶病质中的用途。

[0083] 本公开提供与甲状旁腺激素受体1(PTH1R)相互作用并抑制或阻断一种或多种功能效应,例如通过结合配偶体、PTH和PTHrP的信号传导的分子或药剂。本公开提供用于治疗高钙血症、癌症、恶性肿瘤体液性高钙血症(HHM)或原发性甲状旁腺功能亢进症(PHPT)、继发性甲状旁腺功能亢进症(SHPT)和恶病质的治疗剂。

[0084] 定义

- [0085] 本文使用的术语仅为了描述特定实施例的目的,而并非旨在限制。
- [0086] 如本文所用的“cAMP”是指环磷酸腺苷。
- [0087] 如本文所用的“CHO”是指中国仓鼠卵巢细胞。
- [0088] 如本文所用的“CHOK1”是指亲本CHO细胞系的亚克隆,其从成年中国仓鼠的卵巢衍生。
- [0089] 如本文所用的“ERK1/2”是指细胞外信号调节的激酶。
- [0090] 如本文所用的“FLAG”是可以添加到重组蛋白PTH1R中的多肽蛋白标签。
- [0091] 如本文所用的“HHM”是指恶性肿瘤体液性高钙血症。
- [0092] 如本文所用的“MAPK”是指丝裂原活化蛋白激酶。
- [0093] 如本文所用的“PTH”是指甲状旁腺激素。
- [0094] 如本文所用的“PTH1R”是指甲状旁腺激素受体1。也称为PTHr1。
- [0095] 如本文所用的“PHPT”是指原发性甲状旁腺功能亢进症。
- [0096] 本文所用的“PTHrP”是指甲状旁腺激素相关蛋白,也称为甲状旁腺激素样蛋白(PTHLP)或甲状旁腺激素样激素(PTHLP)。
- [0097] “免疫球蛋白”或“天然抗体”是四聚体糖蛋白。在天然存在的免疫球蛋白中,每个四聚体由两对相同的多肽链构成,每对具有一个“轻”链(约25kDa)和一个“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括约100到110个或更多个主要负责抗原识别的氨基酸的可变区。每条链的羧基末端部分限定主要负责效应子功能的恒定区。人类轻链分类为 $\kappa$ ( $\kappa$ )和 $\lambda$ ( $\lambda$ )轻链。重链分类为 $\mu$ ( $\mu$ )、 $\Delta$ ( $\Delta$ )、 $\gamma$ ( $\gamma$ )、 $\alpha$ ( $\alpha$ )和 $\epsilon$ ( $\epsilon$ ),并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,可变区和恒定区通过具有约12个或更多个氨基酸的“J”区连接,其中重链还包括具有约10个以上氨基酸的“D”区。一般参见《基础免疫学(Fundamental Immunology)》,第7章(Paul,W.编,第2版,纽约Raven出版社,(1989)) (出于所有目的通过全文引用的方式并入)。每个轻链/重链对的可变区形成抗体结合位点,使得完整的免疫球蛋白具有两个结合位点。
- [0098] 每条重链在一端都具有可变结构域(VH),接着是许多恒定结构域。每条轻链都具有在一端处的可变结构域(VL)和在其另一端处的恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。据信特定的氨基酸残基在轻链与重链可变结构域之间形成交界面(Chothia等,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》196:901-917,1987)。
- [0099] 免疫球蛋白可变结构域表现出由三个高变区或CDR连接的相对保守的框架区(framework region,FR)的相同的一般结构。从N末端到C末端,轻链和重链两者都包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。向每个结构域的氨基酸分配符合Kabat《具有免疫学意义的蛋白序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》(马里兰州贝塞斯达的国立卫生研究院(National Institutes of Health,Bethesda,Md.)(1987和1991))或Chothia及Lesk,《分子生物学杂志》196:901-917,1987;Chothia等,《自然(Nature)》342:878-883,1989的定义。
- [0100] 抗体的高变区是指抗体的CDR氨基酸残基,其负责抗原结合。高变区包含来自CDR的氨基酸残基[例如,轻链可变结构域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)及重链可变结构域中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3),如由Kabat等,《具有免疫学意义的蛋

白序列》,第5版,公共卫生局(Public Health Service),马里兰州贝塞斯达的国立卫生研究院(1991)所述]和/或来自高变环的那些残基(例如,轻链可变结构域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)及重链可变结构域中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3),如由[Chothia等,《分子生物学杂志》196:901-917(1987)所述]。CDR也已根据免疫遗传学(ImMunoGenTics)(IMGT)编号进行标识和编号(Lefranc,M.-P.,《免疫学家(The Immunologist)》,7,132-136(1999);Lefranc,M.-P.等,《发展与比较免疫学(Dev.Comp.Immunol.)》,27,55-77(2003),其将轻链和重链可变结构域中的CDR位置描述如下:CDR1,约为残基27到38;CDR2,约为残基56到65;和CDR3,约为残基105到116(种系)或残基105到117(重排)。在一个实施例中,考虑CDR位于与本文公开的那些链长度大致类似的抗体重链或轻链的轻链可变结构域中的约为残基26-31(L1)、49-51(L2)和88-98(L3)处及重链可变结构域中的约为残基26-33(H1)、50-58(H2)和97-111(H3)处。然而,本领域技术人员理解,当识别特定抗体的序列时,CDR残基的实际位置可以与上述的预计残基不同。

[0101] 框架或FR残基是除高变区残基之外的那些可变结构域残基。

[0102] 如本文所用的“重链可变区”是指包含所述抗体重链可变结构域的至少一个互补性决定区(complementarity determining region,CDR)的抗体分子区域。重链可变区可含有所述抗体重链中的一个、两个或三个CDR。

[0103] 如本文所用的“轻链可变区”是指包含所述抗体轻链可变结构域的至少一个互补性决定区(CDR)的抗体分子区域。轻链可变区可含有所述抗体轻链中的一个、两个或三个CDR,取决于抗体,其可以是 $\kappa$ 或 $\lambda$ 轻链。

[0104] 术语“抗体”以最广泛的含义使用,并且包括完全组装的抗体、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)、可以结合抗原的抗体片段(例如,Fab'、F'(ab)2、Fv、单链抗体、双链抗体、Fcabs)和包含前述的重组肽,只要其表现出所需的生物学活性即可。“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,每条链都包含可变区和恒定区。抗原结合部分可以通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学切割来产生。抗体片段或抗原结合部分尤其包括Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、结构域抗体(dAb)、互补性决定区(CDR)片段、CDR移植的抗体、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、微型抗体、线性抗体;螯合重组抗体、三抗体或双抗体、胞内抗体、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(camelized antibody)、含VHH的抗体或其变体或衍生物,及含有足以赋予与多肽结合的特异性抗原如一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR序列的免疫球蛋白的至少一部分的多肽,只要抗体保留所需的生物学活性即可。

[0105] “单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体(即除了可以微量存在的可能的天然存在的突变之外,构成群体的各个抗体是相同的)中获得的抗体。

[0106] 如本文所用的“抗体变体”是指在参考抗体可变区结构域的可变区中含有至少一个氨基酸取代、缺失或插入的抗体多肽序列。变体可以与未修饰的抗体基本上同源或基本上相同。

[0107] 如本文所用的“嵌合抗体”是指含有衍生自通常源自不同物种的两种不同抗体的序列的抗体(参见,例如,美国专利第4,816,567号)。最典型地,嵌合抗体包含人类和啮齿动物抗体片段,通常是人类恒定区和小鼠可变区。

[0108] “中和抗体”是能够消除或显著降低与其结合的靶抗原的生物学功能的抗体分子。因此,“中和”抗靶抗体能够消除或显著降低生物学功能,如酶活性、配体结合或细胞内信号传导。

[0109] “变构抗体”或“变构结合地抗体”,与不同于活性配体结合位点的PTH1R的一部分结合的抗体,即与受体的天然配体无竞争性。考虑变构抗体不会将PTH或PTHrP和PTH1R的结合亲和力明显地改变超过2倍。在各种实施例,抗体是与PTH1R变构结合的负调节剂,任选地,其中所述抗体能够将PTH或PTHrP与PTH1R之间的结合亲和力弱化至少约2倍,任选地至多1000倍。

[0110] “分离的”抗体是已经从其天然环境的组分中识别和分开并回收的抗体。其天然环境的污染组分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的材料,并且可包括酶、激素和其它蛋白质溶质或非蛋白质溶质。在优选实施例中,抗体将被纯化(1)至如通过劳里法(Lowry method)所确定的大于抗体的95重量%,且最优选大于99重量%, (2)至足以获得通过使用旋转杯式测序仪的具有N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)至通过在还原或非还原条件下使用考马斯蓝(Coomassie blue)或优选银染色的SDS-PAGE获得的同质性。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种成分将不存在。然而,通常,分离的抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0111] 如本文所用,“特异性结合”的抗体是“靶特异性”、“对靶具有特异性”或与靶抗原“免疫反应”的抗体,是指以比类似抗原更大的亲和力结合靶抗原的抗体或抗体物质。在本公开的一个方面,靶结合的多肽或其片段、变体或衍生物将以相比于其与其它即非人类物种的结合亲和力更大的亲和力与人类靶结合,但识别和结合靶的直接同源的结合多肽在所提供的范围内。

[0112] 例如,多肽,其为“对其同源抗原具有特异性”的抗体或其片段,指示抗体可变区以可检测的偏好识别并结合目标多肽(即,尽管家族成员之间可能存在局部的序列一致性、同源性或类似性,但由于结合亲和力的可测量差异,能够将目标多肽与同一家族的其它已知多肽区分开)。应理解,特异性抗体还可以通过与抗体可变区外的且特别是分子恒定区中的序列相互作用来与其它蛋白(例如,ELISA技术中的金黄色葡萄球菌蛋白A(*S.aureus* protein A)或其它抗体)相互作用。用以确定用于本公开方法中的抗体的结合特异性的筛选分析在本领域中众所周知并且是常规实践的。有关此类分析的全面论述,请参阅Harlow等(编),《抗体:实验室指南(Antibodies A Laboratory Manual)》;冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory);纽约州冷泉港(Cold Spring Harbor, NY) (1988),第6章。可以使用本领域已知的任何方法产生用于本方法的抗体。

[0113] 术语“表位”是指任何分子中能够在抗原结合区中的一个或多个处被选择性结合剂识别并被其结合的部分。表位通常由化学活性的分子表面群组成,如氨基酸或碳水化合物侧链,并且具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。如本文所用的表位可以是连续或非连续的表位。此外,表位可以是模拟物(模拟表位),因为其包含与用于产生抗体的表位相同的三维结构,但不包含或仅包含在靶中发现的用于刺激抗体免疫应答的氨基酸残基中的一些。如本文所用,不认为模拟表位是与由选择性结合剂结合的表位不同的抗原;选择性结合剂识别表位和模拟表位的相同三维结构。

[0114] 当与本公开的抗体物质和多肽一起使用时,术语“衍生物”是指通过诸如泛素化、

与治疗剂或诊断剂缀合、标记(例如用放射性核素或各种酶)、共价聚合物附着如PEG化(用聚乙二醇衍生化)和通过对通常不存在于人类蛋白质中的氨基酸如鸟氨酸进行化学合成的插入或取代的技术进行化学修饰的多肽。衍生物保留了本公开的未衍生化分子的结合性质。

[0115] 在本文中使用术语“治疗有效量”以指示本公开的靶特异性组合物的有效改善或减轻待治疗疾病的症状或体征的量。

[0116] 如关于本文方法所用的术语“治疗(treat/treated/treating/treatment)”是指暂时或永久地消除、减轻、抑制或改善事件、疾病或病状的临床症状、表现或进展的部分或全部。此类治疗不一定是绝对有用的。

[0117] 本方法提供靶特异性抗体、包括本文所述的靶特异性抗体的药物调配物的用途,所述抗体可包含本文列出的那些示例性序列,其片段、变体和衍生物。根据其重链的恒定结构域的氨基酸序列,可以将免疫球蛋白分为不同类别,即IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,可以将其进一步划分为子类或同种型,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。不同类别免疫球蛋白的子单元结构和三维构型是众所周知的。不同的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。如果本文公开的抗体包含恒定结构域,则所述抗体可以是这些子类或同种型中的任一种。

[0118] 本方法中所用的抗体可以表现出 $K_d$ 小于或等于约 $2 \times 10^{-6}M$ 、小于或等于约 $10^{-6}M$ 、或小于或等于约 $10^{-7}M$ 、或小于或等于约 $10^{-8}M$ 、或小于或等于约 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 或 $10^{-12}M$ 或更小的对一种或多种PTH1R抗原的结合亲和力。在一个实施例中,抗体的 $K_d$ 为至少 $2 \times 10^6M$ 。此类亲和力可以使用常规技术容易地确定,如通过平衡透析;通过使用表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)科技(例如,BIAcore2000仪器,使用由制造商概述的一般程序);通过使用 $^{125}I$ 标记的靶抗原的放射免疫分析;或通过以下实例中阐述的或本领域技术人员已知的另一种方法。例如,可以通过Scatchard等(《纽约科学院年鉴(Ann N.Y.Acad.Sci.)》,51:660,1949)的方法分析亲和力数据。

[0119] KinExA动力学排除分析也可用于测量抗体对其抗原的亲和力。KinExA科技测量溶液相中的结合事件,而不是溶液相与固相之间结合事件。另外,虽然许多测量结合事件的方法都需要通过固定或标记来修饰至少一种反应物,但在本研究下KinExA方法不需要修饰分子。据信KinExA方法允许测量比目前可用的其它方法更宽范围的结合常数。关于KinExA装置和抗体表征的操作的额外描述可从制造商(Sapidyne Instruments, Inc., 爱达荷州博伊西(Boise, ID))获得,并且可以在公开的文献例如美国专利第6,664,114号和Darling等,《动力学排除分析科技:分子相互作用的表征(Kinetic Exclusion Assay Technology: Characterization of Molecular Interactions)》《分析与药物开发科技(Assay and Drug Development Technologies)》,2004,2:647-657中找到。

[0120] 甲状旁腺激素受体1

[0121] 甲状旁腺激素受体1(PTH1R)由N末端细胞外结构域(N-ECD)、七个TM螺旋、三个EC、三个细胞内环(IC)和C末端细胞内结构域(C-ICD)组成(Thomas等,2008《骨与矿物研究杂志(J Bone Miner Res.)》24(5):925-934)。此蛋白质是甲状旁腺激素(PTH)和甲状旁腺激素相关肽(PTHrP)的受体。PTH1R的活性由G蛋白介导,所述G蛋白激活腺苷酸环化酶以及磷脂酰肌醇-钙第二信使系统。PTH1R在骨、肾和生长板中高度表达,并且在其它组织在整个发

育过程中的不同时间以较低水平表达(例如骨骼、心脏和乳腺)(Cheloha等,2015《自然评论:内分泌学(Nature Reviews Endocrinology)》11,712-724;Shimizu等,2004JBC 280(3):1797-807)。PTH和PTHrP升高都会导致高钙血症,其引起结石(肾结石)、骨质流失(骨吸收)和精神病性泛音(抑郁、焦虑、认知功能障碍、失眠、昏迷)症状。在癌症患者中,PTHrP水平升高导致破骨细胞性骨吸收和高钙血症增加,即一种称为恶性肿瘤体液性高钙血症的病状(Cheloha等,2015《自然评论:内分泌学》11,712-724)。

[0122] 恶性肿瘤体液性高钙血症

[0123] 恶性肿瘤体液性高钙血症(HHM)是由某些肿瘤过度产生PTHrP造成的(Hoare等,2002《肽(Peptides)》23:989-998)。HHM是特定癌症如乳腺癌和多发性骨髓瘤及肺癌的非常常见的并发症(Findlay等,1980《癌症研究(Cancer Research)》40,1311-1317)。2012年,在美国2.7%的癌症患者患有HHM(实体瘤和血液恶性肿瘤)。

[0124] 原发性甲状旁腺功能亢进症

[0125] 甲状旁腺病症包括甲状旁腺功能亢进症和甲状旁腺功能减退症。原发性甲状旁腺功能亢进症(PHPT)发生在原发性缺损位于甲状旁腺其本身中时,导致释放过量PTH(Shimizu等,2005JBC 280(3):1797-807)。PHPT可导致钙代谢障碍,从而引起如高钙血症、低磷血症、纤维性骨炎、肾石病和高血压的病症。PHPT也是高钙血症的最常见原因(Marcocci等,2011NEJM 365:2389-2397)。如在甲状旁腺功能亢进症病例中存在的PTH或如由于恶性肿瘤分泌而在癌症中经常存在的PTHrP的过度循环水平产生高钙血状态,这可以使人严重衰弱并可能致命(Shimizu等,2005JBC 280(3):1797-807)。

[0126] 甲状旁腺功能亢进症的疗法通常针对手术去除有害的甲状旁腺组织。患有HHM的患者通常不能通过手术治愈,并且必须进行通常针对预防骨吸收(双膦酸盐或降钙素)或促进肾脏的钙排泄(生理盐水利尿)的医学管理,其效果可变(Rosen等,《国际钙化组织(Calcif.Tissue Int.)》61,455-459)。

[0127] PTH1R抑制剂

[0128] PTH1R拮抗剂已显示在HHM和甲状旁腺功能亢进症的病例中有益(Dresner-Pollak等,1996《骨与矿物研究杂志》11,1061-1065;Cheloha等,2015《自然评论:内分泌学》11,712-724)。模拟激动剂肽作用的小分子配体的开发一直是PTH1R的挑战性目标。用于治疗HHM和PHPT的几种PTH1R抑制剂是本领域已知的(US 7,150,974;US 7,985,835;US 7,910,544)。

[0129] PTH1R抗体

[0130] 在各种实施例中,本公开提供亲和力 $K_d$ 为 $10^{-6}$ M或更低的对PTH1R具有特异性的抗体。在各种实施例中,本公开提供亲和力 $K_d$ 为 $2 \times 10^{-6}$ M或更低的对PTH1R具有特异性的抗体。在示例性实施例中,本文所述的抗PTH1R抗体至少以 $10^{-6}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M或更低的亲和力结合。在其它实施例中,本文所述的抗体以相比于与PTH2R结合至少2-50倍、10-100倍、2倍、5倍、10倍、25倍、50倍或100倍,或20-50%、50-100%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%更高的亲和力(例如,优先与PTH1R结合)与PTH1R结合。在某些实施例中,通过表面等离子共振或KinExA分析来测量亲和力。

[0131] 在相关方面,抗体结合PTH1R的N末端部分。在又一方面,本公开涵盖不与甲状旁腺激素受体2(PTH2R)结合的抗体。在各个方面,抗体与细胞表面上的PTH1R结合。在某些方面,

抗体与PTH1R变构结合。

[0132] 在优选实施例中,抗体是负调节剂抗体,任选地其中所述抗体能够将PTH或PTHrP与PTH1R之间的结合亲和力弱化至少约2倍,任选地至多1000倍。在其它实施例中,本文所述的抗体能够将PTH或PTHrP之间的结合亲和力弱化至少2-1000倍、10-100倍、2倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍或1000倍。

[0133] 在各种实施例中,抗体响应于甲状旁腺激素(PTH)或甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP)刺激受体而抑制细胞中的钙通量。在相关实施例中,抗体抑制PTH或PTHrP介导的环磷酸腺苷(cAMP)积聚。

[0134] 在一个实施例中,PTH1R抗体是单克隆抗体。

[0135] 在一个方面,本公开提供与甲状旁腺激素受体1(PTH1R)结合的抗体,其包含(a)图21或SEQ ID NO:27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93、96、99、102中阐述的重链互补性决定重复(CDR)1氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体;(b)图21或SEQ ID NO:28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、70、73、76、79、82、85、88、91、94、97、100、103中阐述的来自与(a)相同的重链可变区的重链CDR2氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体;及(c)图21或SEQ ID NO:29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、83、86、89、92、95、98、101、104中阐述的来自与(a)相同的重链可变区的重链CDR3氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体。

[0136] 在相关方面,本公开提供与甲状旁腺激素受体1(PTH1R)结合的抗体,其包含:(a)图21或SEQ ID NO:27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93、96、99、102中阐述的重链CDR1氨基酸序列或与其具有至少70%一致性的其变体;(b)SEQ ID NO:28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、70、73、76、79、82、85、88、91、94、97、100、103中阐述的来自与(a)相同的重链可变区的重链CDR2氨基酸序列,或与其具有至少70%一致性的其变体;及(c)SEQ ID NO:29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、83、86、89、92、95、98、101、104中阐述的来自与(a)相同的重链可变区的重链CDR3氨基酸序列,或与其具有至少70%一致性的其变体。

[0137] 在又一方面,本公开考虑与结合甲状旁腺激素受体1(PTH1R)的抗体结合的抗体,其包含:(a)SEQ ID NO:27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93、96、99、102中阐述的重链CDR1氨基酸序列,或与其至少70%一致性的其变体;(b)图21或SEQ ID NO:28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、70、73、76、79、82、85、88、91、94、97、100、103中阐述的独立选择的重链CDR2氨基酸序列,或与其具有至少70%一致性的其变体;及(c)图21或SEQ ID NO:29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、83、86、89、92、95、98、101、104中阐述的独立选择的重链CDR3氨基酸序列,或与其具有至少70%一致性的其变体。

[0138] 在某些实施例中,重链CDR1、CDR2或CDR3氨基酸序列中的至少两个在图21或SEQ ID NO:27-104中阐述。在相关实施例中,重链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列中的三个在图21或SEQ ID NO:27-104中阐述。

[0139] 在一些实施例中,本文考虑的抗体包含与图21或SEQ ID NO:1-26中阐述的重链可变区氨基酸序列至少85%一致的氨基酸序列。在一些实施例中,本文提供包含与图21或SEQ



ID NO:1-26中阐述的重链可变区氨基酸序列至少95%一致的氨基酸序列的抗体。

[0140] 进一步考虑,本文所述的抗体包含具有与图21或SEQ ID NO:27-104中阐述的重链可变区中的所有三个HCDR,即HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列至少70%一致的氨基酸序列的多肽序列。

[0141] 在另一实施例中,提供包含多肽的抗体,所述多肽具有与图21中的抗体序列的重链可变区中的所有三个HCDR或SEQ ID NO:27-104中列出的CDR至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的氨基酸序列。

[0142] 在相关实施例中,提供包含多肽的抗体,所述多肽具有与图21中的抗体序列的轻链可变区中的所有三个LCDR或SEQ ID NO:131-208中列出的CDR至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的氨基酸序列。

[0143] 在又一实施例中,提供包含多肽的抗体,所述多肽具有与图21中的抗体序列的重链和轻链可变区中的所有六个CDR或SEQ ID NO:27-104和131-208中列出的CDR至少约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多一致的氨基酸序列。

[0144] 在某些实施例中,本文考虑的抗体是其中一个或多个重链框架氨基酸已被来自另一人类抗体氨基酸序列的相应氨基酸替换的抗体。

[0145] 在一个实施例中,本文考虑的抗体进一步包含图21或SEQ ID NO:131-208中阐述的轻链CDR氨基酸序列中的任一个。在一些实施例中,抗体包含图21或SEQ ID NO:131-208中阐述的轻链CDR氨基酸序列中的至少两个。在其它实施例中,抗体包含图21或SEQ ID NO:131-208中阐述的轻链CDR氨基酸序列中的至少三个。

[0146] 在另一方面,本文所述的抗体包含(a)图21或SEQ ID NO:131、134、137、140、143、146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、200、203、206中阐述的轻链CDR1氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体,或在图21中列出的其共有序列;(b)图21或SEQ ID NO:132、135、138、141、144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、198、201、204、207中阐述的来自与(a)相同的轻链可变区的轻链CDR2氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体,或在图21中列出的其共有序列;及(c)图21或SEQ ID NO:133、136、139、142、145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、196、199、202、205、208中阐述的来自与(a)相同的轻链可变区的轻链CDR3氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体,或在图21中列出的其共有序列。

[0147] 在替代实施例中,本文考虑的抗体包含:(a)图21或SEQ ID NO:131、134、137、140、143、146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、200、203、206中阐述的轻链CDR1氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体;(b)图21或SEQ ID NO:132、135、138、141、144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、198、201、204、207中阐述的独立选择的轻链CDR2氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体;及(c)图21或SEQ ID NO:133、136、139、142、145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、

196、199、202、205、208中阐述的独立选择的轻链CDR3氨基酸序列,或其中一个或两个氨基酸已被改变的其变体。

[0148] 在某些实施例中,轻链CDR1、CDR2或CDR3氨基酸序列中的至少两个在图21或SEQ ID NO:131-208中阐述。

[0149] 进一步考虑,本文所述的抗体包含与图21或SEQ ID NO:105-130中阐述的轻链可变区氨基酸序列至少70%一致的氨基酸序列。在相关实施例中,抗体包含与图21或SEQ ID NO:105-130中阐述的轻链可变区氨基酸序列至少85%一致的氨基酸序列。在又一实施例中,抗体包含与图21或SEQ ID NO:105-130中阐述的轻链可变区氨基酸序列至少95%一致的氨基酸序列。在再一实施例中,抗体包含图21或SEQ ID NO:105-130中阐述的轻链可变区氨基酸序列。

[0150] 在又一实施例中,本文所述的抗体包含具有与图21或SEQ ID NO:131-208中阐述的轻链可变区的所有三个LCDR,即LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列至少70%一致的氨基酸序列的多肽序列。

[0151] 在某些实施例中,本文所述的抗体包含 (i) 与图21或SEQ ID NO:131-208中阐述的轻链可变区的所有三个LCDR,即LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列至少70%一致的氨基酸序列及 (ii) 与图21或SEQ ID NO:27-104中阐述的重链可变区的所有三个HCDR,即HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列至少70%一致的氨基酸序列。

[0152] 在另一方面,本公开提供与甲状旁腺激素受体1 (PTH1R) 结合的抗体,其包含轻链可变区和/或重链可变区,其中 (a) 轻链可变区包含至少选自SEQ ID NO:131、134、137、140、143、146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、200、203、206的CDR1或与其至少80%一致的序列,选自SEQ ID NO:132、135、138、141、144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、198、201、204、207的CDR2或与其至少80%一致的序列,和/或选自SEQ ID NO:133、136、139、142、145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、196、199、202、205、208的CDR3或与其至少80%一致的序列;并且/或其中 (b) 重链可变区包含至少选自SEQ ID NO:27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93、96、99、102的CDR1或与其至少80%一致的序列,选自SEQ ID NO:28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、70、73、76、79、82、85、88、91、94、97、100、103的CDR2或与其至少80%一致的序列,和/或选自SEQ ID NO:29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、83、86、89、92、95、98、101、104的CDR3或与其至少80%一致的序列。

[0153] 在相关实施例中,本文所述的抗体包含 (a) 轻链可变区,其包含至少选自SEQ ID NO:131、134、137、140、143、146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、200、203、206的CDR1或与其至少90%一致的序列,选自SEQ ID NO:132、135、138、141、144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、198、201、204、207的CDR2或与其至少90%一致的序列,和选自SEQ ID NO:133、136、139、142、145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、196、199、202、205、208的CDR3或与其至少90%一致的序列;并且/或其中 (b) 重链可变区包含至少选自SEQ ID NO:27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93、96、99、102的CDR1或与其至少90%一致的序列,选自SEQ ID NO:

28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、70、73、76、79、82、85、88、91、94、97、100、103的CDR2或与其至少90%一致的序列,和选自SEQ ID NO:29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、83、86、89、92、95、98、101、104的CDR3或与其至少90%一致的序列。

[0154] 在一些实施例中,本公开的抗体进一步包含重链恒定区,其中重链恒定区是被修饰或未被修饰的IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、其片段或其组合。

[0155] 在某些实施例中,提供其中一个或多个轻链框架氨基酸已被来自另一人类抗体氨基酸序列的相应氨基酸替换的抗体,任选地其中所述框架包含图1A和1B中列出的变化中的一种或多种。

[0156] 在一个方面,本公开的抗体选自由以下组成的组:XPA.85.012、XPA.85.017、XPA.85.288、XPA.85.328、XPA.85.329、XPA.85.330和XPA.85.349。

[0157] 在一个实施例中,本文所述的抗体进一步包含附着于所述轻链可变区的人类轻链恒定区。在一些实施例中,轻链恒定区是被修饰或未被修饰的 $\lambda$ 轻链恒定区、 $\kappa$ 轻链恒定区、其片段或其组合。

[0158] 在另一方面,本公开提供包含编码如本文所述的重链或轻链的核苷酸序列的分离的核酸分子。在各种实施例中,编码抗体可变区的核苷酸序列示于SEQ ID NO:209-234(重链)和235-260(轻链)中。

[0159] 在各种实施例中,核酸分子包含编码SEQ ID NO:105-130中任一个的轻链可变区氨基酸序列的核苷酸序列或其片段。在一个实施例中,核酸分子包含SEQ ID NO:235-260中任一个的轻链可变区核苷酸序列,或其片段。在又一实施例中,核酸分子包含编码SEQ ID NO:1-26中任一个的重链可变区氨基酸序列的核苷酸序列或其片段。在一个实施例中,核酸分子包含SEQ ID NO:209-234中任一个的重链可变区核苷酸序列,或其片段。本公开的核酸分子进一步包括所有核酸序列,其包括SEQ ID NO:209-260中的序列,且核酸序列包含基于遗传密码多样性的简并密码子,其编码本文所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列或本文所述的任何HCDR或LCDR,并编码如SEQ ID NO:27-104和131-208中列出的CDR氨基酸序列,以及在高度严格的条件,如本文所述的条件下杂交成编码SEQ ID NO:1-26或105-130中列出的本文所述抗体的重链和轻链可变区的氨基酸序列或如SEQ ID NO:27-104或131-208中列出的本文所述的任何HCDR或LCDR的核酸序列的核酸。

[0160] 在一些实施例中,核酸分子编码与SEQ ID NO:105-130中列出的VL氨基酸序列至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%一致的VL氨基酸序列。在相关方面,VL氨基酸序列是共有序列。本公开的核酸分子包括在高度严格的条件,如本文所述的条件下杂交成编码SEQ ID NO:105-130的轻链可变区氨基酸序列或具有SEQ ID NO:235-260的轻链可变区核苷酸序列的核酸序列的核酸。在一些实施例中,核酸编码SEQ ID NO:131-208中列出的所述抗体的重链CDR的氨基酸序列。

[0161] 进一步考虑,本公开的核酸分子包含编码本文所述抗体中任一种的VH氨基酸序列的核苷酸序列,或其片段。在一些实施例中,核酸编码所述抗体的重链和/或轻链CDR的氨基酸序列。在一些实施例中,所述片段是包含重链和/或轻链CDR1-CDR3的连续片段。在一个实施例中,所述片段包含重链和/或轻链CDR1、CDR2或CDR3区中的至少一个、两个或三个,任选地具有不同的人类或人类共有框架,并且任选地具有1个、或至多2个、或至多3个CDR突变。

CDR氨基酸序列示于SEQ ID NO:27-104和131-208中。

[0162] 在相关方面,核酸分子包含编码SEQ ID NO:1-26的重链中的一个的重链可变区氨基酸序列的核苷酸序列,或其片段。在一个实施例中,核酸分子包含具有SEQ ID NO:209-234中列出的核苷酸序列或其片段的重链可变区。

[0163] 在一些实施例中,核酸分子编码与SEQ ID NO:1-26中列出的VH氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致的VH氨基酸序列。在相关方面,VH氨基酸序列是共有序列。本公开的核酸分子进一步包括在高度严格的条件,如本文所述的条件下杂交成编码SEQ ID NO:1-26的重链可变区氨基酸序列或具有SEQ ID NO:209-234中任一个的重链可变区核酸序列的核酸。

[0164] 进一步考虑,本公开的核酸可以编码选自图21中列出的抗体的抗体的全长轻链或重链,其中全长轻链或全长重链分别包含轻链恒定区或重链恒定区,轻链恒定区任选地包括未修饰或修饰的 $\kappa$ 或 $\lambda$ 区,并且重链恒定区包括任何类别,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD或IgE的未修饰或修饰的恒定区。

[0165] 在一个方面,全长可变轻链抗体包含SEQ ID NO:105-130中列出的氨基酸序列。进一步考虑,编码全长轻链的核苷酸序列编码SEQ ID NO:105-130中列出的氨基酸序列,并包含SEQ ID NO:235-260中阐述的核苷酸序列。

[0166] 在一个方面,全长可变重链抗体包含SEQ ID NO:1-26中的任一个中的序列。进一步提供编码SEQ ID NO:1-26中列出的全长重链可变区氨基酸序列的核苷酸序列,并且其包含SEQ ID NO:209-234中的任一个中阐述的核苷酸序列。

[0167] 进一步考虑,本公开的抗体可以用作本领域众所周知的且在本文中描述的如本文所述的抗体以及衍生物和修饰的抗体的较小抗原结合片段。

[0168] 单克隆抗体

[0169] 单克隆抗体是指从基本上同质的抗体群体中获得的抗体。与通常包括针对相同或不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体通常具有高度特异性,并且可以针对单个抗原位点。除了其特异性之外,单克隆抗体的优点在于其通过同质培养物合成,不受其它具有不同特异性和特征的免疫球蛋白的污染。

[0170] 如下所述,本文考虑的抗体,包括本文所述的单克隆抗体、人源化抗体和其它抗体,通常重组地或通过体外或体内操纵遗传密码的其它方法产生,且因此不一定反映在大自然中发现的特定抗体。

[0171] 单克隆抗体可以通过Kohler等首次描述的杂交瘤方法制备(《自然》,256:495-7,1975)(Harlow及Lane;《抗体:实验室指南(Antibodies:A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press):纽约州冷泉港(1988);Goding,《单克隆抗体:原理与实践(Monoclonal Antibodies:Principles and Practice)》,第59-103页(学术出版社(Academic Press),1986),或可以通过重组DNA方法制备(参见,例如,美国专利第4,816,567号)。单克隆抗体也可以使用例如Clackson等(《自然》352:624-628,1991)和Marks等(《分子生物学杂志》222:581-597,1991)中描述的技术从噬菌体抗体文库中分离。产生单克隆抗体的额外方法是本领域普通技术人员所众所周知的。

[0172] 如通过上述方法产生的单克隆抗体通过常规免疫球蛋白纯化程序,例如蛋白A-Sepharose、疏水相互作用色谱法(hydrophobic interaction chromatography,HIC)、离子

交换色谱法、羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析和/或亲和色谱法,适当地从培养基、腹水或血清中分离。

[0173] 进一步考虑,本公开的抗体可以用作本领域众所周知的且在本文中描述的抗体的较小抗原结合片段。

[0174] 抗体片段

[0175] 抗体片段包含完整全长抗体的一部分,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')<sub>2</sub>、Fcab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,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);微型抗体;螯合重组抗体;三抗体或双抗体;胞内抗体;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的抗体;和由抗体片段形成的其它多肽。参见例如Holliger及Hudson,2005《自然生物科技(Nat.Biotech.)》23:1126-36;Eyer及Hruska,《兽医学(Veterinarni Medicina)》57:439-513,2012。

[0176] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,即由VL、VH、CL和CH结构域组成的单价片段,每个结构域都具有单个抗原结合位点,及残留的“Fc”片段,其名称反映了其容易结晶的能力。胃蛋白酶治疗产生F(ab')<sub>2</sub>片段,即包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段,其具有两个包含VH和VL抗体结构域的“单链Fv”或“scFv”抗体片段,其中这些结构域存在于单一多肽链中。优选地,Fv多肽进一步包含VH与VL结构域之间的使得Fv能够形成用于抗原结合的所需结构的多肽连接子(linker),产生单链抗体(scFv),其中VL和VH区通过合成连接子配对以形成单价分子,所述合成连接子使得VL和VH区能够被制成单一蛋白链(Bird等,《科学(Science)》242:423-426,1988和Huston等,《美国科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》85:5879-5883,1988)。关于scFv的综述,参见Pluckthun,《单克隆抗体药理学(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies)》,第1卷13,Rosenburg和Moore编,纽约州施普林格(Springer-Verlag),第269-315页(1994)中。Fd片段由VH和CH1结构域组成。

[0177] 额外的抗体片段包括结构域抗体(dAb)片段(Ward等,《自然》341:544-546,1989),其由VH结构域组成。双链抗体是二价抗体,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,但使用的连接子太短而不允许在同一链上的两个结构域之间配对,从而迫使结构域与另一链的互补结构域配对,并产生两个抗原结合位点(参见例如EP404,097;WO 93/11161;Holliger等,《美国科学院院报》90:6444-6448,1993和Poljak等,《结构(Structure)》2:1121-1123,1994)。双链抗体可以是双特异性或单特异性双链抗体。

[0178] 缺乏轻链的功能性重链抗体天然存在于铰口鲨(Greenberg等,《自然》374:168-73,1995)、须鲨(wobbegong shark)(Nuttall等,《分子免疫学》38:313-26,2001)和骆驼科动物(Hamers-Casterman等,《自然》363:446-8,1993;Nguyen等,《分子生物学杂志》275:413,1998)如骆驼、单峰骆驼、羊驼和美洲驼中。在这些动物中,抗原结合位点被还原成单个结构域,即VHH结构域。这些抗体仅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H2L2的重链的同型二聚体(称为“重链抗体”或“HCAbs”)。据报道,骆驼科动物VHH与含有铰链、CH2和CH3结构域且缺少CH1结构域的IgG2和IgG3恒定区重组(Hamers-Casterman等,同上)。例如,美洲驼IgG1是常规(H2L2)抗体同种型,其中VH与含有铰链、CH1、CH2和CH3结构域的恒定区重组,而美洲驼IgG2和IgG3是缺乏CH1结构域且不含轻链的仅重

链同种型。已发现骆驼科动物VHH结构域以高亲和力与抗原结合(Desmyter等,《生物化学杂志》276:26285-90,2001)并且在溶液中具有高稳定性(Ewert等,《生物化学(Biochemistry)》41:3628-36,2002)。经典的仅VH片段难以以可溶形式产生,但当框架残基被改变为更像VHH时,可以获得溶解度和特异性结合的改进。(参见,例如,Reichman等,《免疫方法杂志(J Immunol Methods)》1999,231:25-38)。产生具有骆驼科动物重链的抗体的方法描述于例如,美国专利公开第20050136049号和第20050037421号中。

[0179] 抗体重链的可变结构域,即分子量仅为15kDa的全功能性抗原结合片段,被称为纳米抗体(Cortez-Retamozo等,《癌症研究》64:2853-57,2004)。如Conrath等所述(《抗微生物剂与化疗(Antimicrob Agents Chemother)》45:2807-12,2001)或使用如Revets等,《生物治疗的专家意见(Expert Opin.Biol.Ther.)》5(1):111-24(2005)中所述的重组方法可以从免疫的单峰骆驼中产生纳米抗体文库。

[0180] 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(《免疫学杂志》165:7050-57,2000)和Willems等(《色谱杂志B:生物医学和生命科学中的分析技术(J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.)》786:161-76,2003)中。对于双抗体或三抗体,scFv分子与VL-CL(L)和VH-CH1(Fd)链中的一个或两个融合,例如,以产生三抗体,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。额外的基于Fab的双特异性形式描述于Wu等,mAbs 7:470-482,2015中。

[0181] 由通过肽连接子(无铰链)或通过IgG铰链与CH3融合的scFv组成的“微抗体”已描述于Olafsen等,《蛋白质工程、设计与选择(Protein Eng Des Sel.)》17(4):315-23,2004中。

[0182] 胞内抗体是表现出细胞内表达并且可以操纵细胞内蛋白质功能的单链抗体(Biocca等,《EMBO杂志(EMBO J.)》9:101-108,1990;Colby等,《美国科学院院报》,101:17616-21,2004)。包含保留细胞内区域中的抗体构建体的细胞信号序列的胞内抗体可以如Mhashilkar等(《EMBO杂志》14:1542-51,1995)和Wheeler等(《FASEB杂志(FASEB J.)》17:1733-5,2003)所述的方法产生。穿膜抗体(transbody)是其中蛋白转导结构域(protein transduction domain,PTD)与单链可变片段(scFv)抗体融合的细胞可渗透的抗体,Heng等(《医学假说(Med Hypotheses)》64:1105-8,2005)。

[0183] 进一步考虑的是对靶蛋白具有特异性的SMIP或结合结构域免疫球蛋白融合蛋白的抗体。这些构建体是包含与实现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的单链多肽。参见例如W003/041600,美国专利公开20030133939和美国专利公开20030118592。

[0184] 可以将一个或多个CDR共价或非共价地并入分子中以使其成为免疫粘附素。免疫粘附素可以合并CDR作为较大多肽链的一部分,可以将CDR共价连接到另一多肽链,或可以非共价地合并CDR。CDR允许免疫粘附素特异性地与特定目标抗原结合。

[0185] 因此,包含抗体重链可变区或轻链可变区的一个、两个和/或三个CDR(例如,单独或呈串联形式的单个CDR,2个、3个或其它多个CDR重复序列,或单独或呈串联重复序列形式的2个或3个CDR的组合;任选地,CDR或重复序列之间具有间隔区氨基酸序列)的多种组合物可以通过本领域已知的技术来产生。

[0186] 嵌合和人源化抗体

[0187] 由于嵌合或人源化抗体在人体中的免疫原性低于亲本非人类(例如小鼠)单克隆抗体的免疫原性,因此其可用于治疗具有更低过敏性反应风险的人类。

[0188] 嵌合单克隆抗体,其中非人类(例如小鼠)单克隆抗体的可变Ig结构域与人类恒定Ig结构域融合,可以使用本领域已知的标准程序来产生(参见Morrison等,《美国科学院院报》81,6841-6855(1984);及Boulianne等,《自然》312,643-646,(1984))。

[0189] 人源化抗体可通过多种方法实现,包括例如:(1)将非人类互补性决定区(CDR)移植到人类框架和恒定区上(本领域称为通过“CDR移植”进行人源化的过程),(2)移植整个非人类可变结构域,但通过替换表面残基将其“隐藏”在类人表面上(本领域称为“饰面”的过程),或者,(3)在确定不可能对抗原结合或蛋白折叠产生不利影响,但可能降低人类环境中的免疫原性的位置处取代人类氨基酸(例如,HUMAN ENGINEERING™)。在本公开中,人源化抗体将包括“人源化”、“饰面”和“HUMAN ENGINEERED™”抗体。这些方法公开于例如Jones等,《自然》321:522-525(1986);Morrison等,《美国科学院院报》,81:6851-6855(1984);Morrison和Oi,《免疫学进展(Adv. Immunol.)》,44:65-92(1988);Verhoeyer等,《科学》239:1534-1536(1988);Padlan,《分子免疫学》28:489-498(1991);Padlan,《分子免疫学》31:169-217(1994);Studnicka等,美国专利第5,766,886号;Studnicka等,《蛋白质工程(Protein Engineering)》7:805-814,1994;Co等,《免疫学杂志》152,2968-2976(1994);Riechmann等,《自然》332:323-27(1988);及Kettleborough等,《蛋白质工程》4:773-783(1991)中,其中每一篇都通过引用的方式并入本文。CDR移植技术是本领域已知的,参见例如Riechmann等,1988《自然》332:323-27)。额外的抗体人源化方法由Safdan等,《生物技术(Biotech. Gen. Eng. Rev.)》29:175-86,2013进行综述。

[0190] 来自转基因动物的人类抗体

[0191] 还可以使用不具有内源性免疫球蛋白产生且被工程化成含有人类免疫球蛋白基因座的转基因动物来产生针对靶蛋白的人类抗体。例如,WO 98/24893公开了具有人类Ig基因座的转基因动物,其中由于内源性重链和轻链基因座的失活,所述动物不产生功能性内源性免疫球蛋白。WO 91/00906还公开了能够对免疫原产生免疫应答的转基因非灵长类哺乳动物宿主,其中抗体具有灵长类恒定区和/或可变区,并且其中内源性免疫球蛋白编码基因座被取代或灭活。WO 96/30498和美国专利第6,091,001号公开了Cre/Lox系统用以修饰哺乳动物中免疫球蛋白基因座,如替换所有或部分恒定区或可变区以形成修饰的抗体分子的用途。WO 94/02602公开了具有经灭活的内源性Ig基因座和功能性人类Ig基因座的非人类哺乳动物宿主。美国专利第5,939,598号公开了制备转基因小鼠的方法,其中所述小鼠缺乏内源性重链,并表达包含一个或多个异种恒定区的外源性免疫球蛋白基因座。另见美国专利第6,114,598号、第6,657,103号和第6,833,268号;Green LL,《当前药物发现科技(Curr Drug Discovery Technol.)》,11(1),74-84,2014;Lee EC等,《自然生物科技》,32:356-363,2014;Lee EC和Owen M,《分子生物学方法(Methods Mol Biol.)》,901:137-48,2012)。

[0192] 使用上述转基因动物,可以对选定的抗原分子产生免疫应答,并且产生抗体的细胞可以从动物中去除并用于产生分泌人类单克隆抗体的杂交瘤。免疫方案、佐剂等是本领域已知的,并且用于例如转基因小鼠的免疫,如WO 96/33735中所述。此公开案公开了针对多种抗原分子包括IL-6、IL-8、TNF $\alpha$ 、人类CD4、L选择素、gp39和破伤风毒素的单克隆抗体。

可以测试单克隆抗体抑制或中和相应蛋白的生物学活性或生理学作用的能力。WO 96/33735公开了抗IL-8的单克隆抗体,其衍生自用IL-8免疫的转基因小鼠的免疫细胞,阻断IL-8诱发的嗜中性粒细胞功能。对用于使转基因动物免疫的抗原具有特异性的人类单克隆抗体也公开于WO 96/34096和美国专利申请第20030194404号;及美国专利申请第20030031667号中。

[0193] 可用于制备单克隆抗体的额外转基因动物包括Medarex HuMAb-**MOUSE**<sup>®</sup>,其描述于美国专利第5,770,429号和Fishwild等,《《自然生物科技》14:845-851(1996)》中,其含有来自未经重排的编码人类抗体重链和轻链的人类抗体基因的基因序列。HuMAb-**MOUSE**<sup>®</sup>的免疫使得能够产生针对靶蛋白的完全人类单克隆抗体。

[0194] 此外,Ishida等,《《克隆与干细胞(Cloning Stem Cells.)》4:91-102(2002)》描述了包含兆碱基大小的人类DNA区段且并有整个人类免疫球蛋白(hIg)基因座的转染色体小鼠(TransChromo Mouse)(TCMOUSE<sup>™</sup>)。TCMOUSE<sup>™</sup>具有完全多样化的hIg库,其包括IgG的所有子类(IgG1-G4)。用各种人类抗原使TCMOUSE<sup>™</sup>免疫产生包含人类抗体的抗体应答。

[0195] 另见Jakobovits等,《《美国科学院院报》90:2551(1993)》;Jakobovits等,《《自然》,362:255-258(1993)》;Bruggermann等,《《免疫学年鉴(Year in Immunol.)》,7:33(1993)》;和美国专利第5,591,669号、美国专利第5,589,369号、美国专利第5,545,807号;及美国专利公开第20020199213号。美国专利公开第20030092125号描述了使动物的免疫应答偏向所需表位的方法。人类抗体也可以通过体外活化的B细胞来产生(参见美国专利第5,567,610号和第5,229,275号)。

[0196] 来自显示科技的人体抗体

[0197] 用于制备重组人类抗体基因库及在丝状噬菌体(filamentous bacteriophage)表面上显示编码的抗体片段的科技的发展已经提供了直接制备人类抗体的手段。通过噬菌体科技产生的抗体作为细菌中的抗原结合片段,通常是Fv或Fab片段而产生,且因此缺乏效应子功能。效应子功能可以通过两种策略之一引入:可以将片段工程化成例如用于在哺乳动物细胞中表达的完整抗体,或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。

[0198] 举例来说,一种制备用于噬菌体显示技术的抗体文库的方法包含以下步骤:用靶抗原或其抗原部分使包含人类免疫球蛋白基因座的非人类动物免疫以产生免疫应答,从经免疫的动物中提取产生抗体的细胞;从提取的细胞中分离RNA,使RNA逆转录以产生cDNA,使用引物扩增cDNA,并将cDNA插入噬菌体显示载体中,使得抗体在噬菌体上表达。可以此方式获得本公开的重组靶特异性抗体。

[0199] 在另一实例中,可以从未经免疫的动物中提取产生抗体的细胞,从提取的细胞中分离RNA并使其逆转录以产生cDNA,使用引物扩增所述cDNA,并将其插入噬菌体显示载体中,使得抗体在噬菌体上表达。噬菌体显示过程通过在丝状噬菌体表面上显示抗体库,且随后通过其与所选抗原结合以选择噬菌体来模拟免疫选择。WO 99/10494中描述了一种此类技术,其描述了使用此类方法分离MPL和msk受体的高亲和力和功能性激动性抗体。本公开的抗体可以通过筛选重组组合抗体文库,例如IsCFv或Fab噬菌体显示文库来分离,所述重组组合抗体文库使用由衍生自人类淋巴细胞的mRNA制备的人类VL和VH cDNA来制备。制备和筛选此类文库的方法是本领域已知的。参见例如美国专利第5,969,108号。存在用于产生噬



菌体显示文库的市售试剂盒(例如,法玛西亚(Pharmacia)重组噬菌体抗体系统,目录号27-9400-01;和Stratagene SurfZAP.TM.噬菌体显示试剂盒,目录号240612)。还有其它可用于产生和筛选抗体显示文库的方法和试剂(参见,例如,Ladner等,美国专利第5,223,409号;Kang等,PCT公开第W0 92/18619号;Dower等,PCT公开第W0 91/17271号;Winter等,PCT公开第W0 92/20791号;Markland等,PCT公开第W0 92/15679号;Breitling等,PCT公开第W0 93/01288号;McCafferty等,PCT公开第W0 92/01047号;Garrard等,PCT公开第W0 92/09690号;Fuchs等,(1991)《生物/科技(Bio/Technology)》9:1370-1372;Hay等,(1992)《人类抗体杂交瘤(Hum.Antibod.Hybridomas)》3:81-85;Huse等,(1989)《科学》246:1275-1281;McCafferty等,《自然》(1990)348:552-554;Griffiths等,(1993)《EMBO杂志》12:725-734;Hawkins等,(1992)《分子生物学杂志》226:889-896;Clackson等,(1991)《自然》352:624-628;Gram等,(1992)《美国科学院院报》89:3576-3580;Garrad等,(1991)《生物/科技》9:1373-1377;Hoogenboom等,(1991)《核酸研究(Nuc Acid Res)》19:4133-4137;及Barbas等,(1991)《美国科学院院报》88:7978-7982,和Omidfar及Daneshpour,《药物发现的专家意见(Exp.Op.Drug Disc.)》10:651-669,2015。

[0200] 在一个实施例中,为了分离具有所需特征的对靶抗原具有特异性的人类抗体,筛选出人类VH和VL文库以选择具有所需特异性的抗体片段。此方法中所使用的抗体文库可以是如本文和本领域所述制备和筛选的scFv文库(McCafferty等,PCT公开第W0 92/01047号,McCafferty等,《自然》348:552-554(1990));和Griffiths等,《EMBO杂志》12:725-734(1993))。优选将靶蛋白用作抗原来筛选抗体文库。

[0201] 或者,抗体的Fd片段(VH-CH1)和轻链(VL-CL)通过PCR分别进行克隆,并在组合噬菌体显示文库中随机重组,然后可以对其进行选择以与特定抗原结合。Fab片段在噬菌体表面上表达,即与对其进行编码的基因物理连接。因此,通过抗原结合选择Fab共同选择了Fab编码序列,其可以随后扩增。通过几轮抗原结合和再扩增,即称为淘选(panning)的程序,富集并最终分离出对抗原具有特异性的Fab。

[0202] 1994年,描述了一种称为“导向选择”的抗体人源化方法。导向选择利用噬菌体显示技术的力量来实现小鼠单克隆抗体的人源化(参见Jespers,L.S.等,生物/科技12,899-903(1994))。为此,小鼠单克隆抗体的Fd片段可以与人类轻链文库组合显示,并且然后可以用抗原来选择所得杂交Fab文库。从而小鼠Fd片段提供了指导选择的模板。随后,将所选人类轻链与人类Fd片段文库组合。所得文库的选择完全产生人类Fab。

[0203] 已经描述了从噬菌体显示文库中获得人类抗体的各种程序(参见,例如,Hoogenboom等,《分子生物学杂志》,227:381(1991);Marks等,《分子生物学杂志》,222:581-597(1991);美国专利第5,565,332号和第5,573,905号;Clackson,T.和Wells,J.A.,TIBTECH 12,173-184(1994))。特别地,衍生自噬菌体显示文库的抗体的体外选择和进化已经成为一种强有力的工具(参见Burton,D.R.和Barbas III,C.F.,《免疫学进展》57,191-280(1994);Winter,G.等,《免疫学年度评论(Annu.Rev.Immunol.)》12,433-455(1994);美国专利公开第20020004215号和W0 92/01047;美国专利公开第20030190317号;及美国专利第6,054,287号和第5,877,293号。

[0204] 通过将一条表达为噬菌体蛋白融合物(例如,与M13基因III)的链与表达为可溶性片段的互补性链结合,使Fv片段在噬菌体表面上显示。考虑噬菌体可以是丝状噬菌体,如第

I类噬菌体:fd、M13、f1、If1、lke、ZJ/Z、Ff中的一种和第II类噬菌体Xf、Pf1和Pf3中的一种。噬菌体可以是M13,或fd或其衍生物。

[0205] 一旦选择了初始的人类VL和VH区段,“混合并匹配”其中筛选出所选VL和VH区段的不同配对以进行靶结合的实验,以选择优选的VL/VH对组合(参见,例如,Kang等,Proc.《美国科学院院报》88:11120-11123,1991)。另外,为了进一步改进抗体的品质,优选的VL/VH对的VL和VH区段可以随机突变,优选在VH和/或VL的CDR1、CDR2或CDR3区中的任一个内,在类似于负责天然免疫应答期间抗体的亲和力成熟的体内体细胞突变过程的过程中。这种体外亲和力成熟可以通过使用分别与VH CDR1、CDR2和CDR3或VL CDR1、CDR2和CDR3互补的PCR引物扩增VL和VH区来完成,所述引物已经“掺有”某些位置处的四个核苷酸碱基的随机混合物,使得所得PCR产物编码VL和VH区段,其中随机突变已被引入VH和/或VL CDR3区。可以重新筛选这些随机突变的VL和VH区段以与靶抗原结合。

[0206] 在从重组免疫球蛋白显示文库中筛选和分离出靶特异性抗体之后,可以从显示包中(例如,从噬菌体基因组中)回收编码所选抗体的核酸,并通过标准重组DNA技术将其亚克隆到其它表达载体中。如果需要,则可以进一步操作核酸以产生本公开的其它抗体形式,如下所述。为了表达通过筛选组合文库而分离的重组人类抗体,将编码抗体的DNA克隆到重组表达载体中并引入哺乳动物宿主细胞中,如本文所述。

[0207] 考虑噬菌体显示方法可以在细菌或宿主细胞的增变菌株中进行。增变菌株是具有遗传缺陷的宿主细胞,所述遗传缺陷使得在其内复制的DNA相对于其亲本DNA发生突变。示例增变菌株是NR9046mutD5和NR9046 mut T1。

[0208] 还考虑噬菌体显示方法可以使用辅助噬菌体进行。这是一种用于感染含有缺陷噬菌体基因组的细胞的噬菌体,且其功能是补充缺陷。缺陷型噬菌体基因组可以是其中一些编码基因序列的功能被去除的噬菌粒或噬菌体。辅助噬菌体的实例是M13K07、M13K07基因III第3号;和显示或编码与衣壳蛋白融合的结合分子的噬菌体。

[0209] 也使用如WO 92/01047中公开的分级双组合方法通过噬菌体显示筛选方法来产生抗体,其中将含有H或L链克隆的各个菌落用于感染编码另一条链(L或H)的完整克隆文库,并且所得双链特异性结合成员根据如其中所述的噬菌体显示技术来选择。此技术也公开于Marks等,《(生物/科技》,10:779-783(1992))中。

[0210] 在酵母、微生物和哺乳动物细胞表面上显示肽的方法也已用于标识抗原特异性抗体。参见,例如,美国专利第5,348,867号;第5,723,287号;第6,699,658号;Wittrup,《生物科技的当前意见(Curr Op.Biotech.)》12:395-99(2001);Lee等,《生物科技趋势(Trends in Biotech.)》21(1)45-52(2003);Surgeeva等,《先进药物输送评论(Adv.Drug Deliv.Rev.)》58:1622-54(2006)。抗体文库可以附着于酵母蛋白,如凝集素,有效地模拟免疫系统中B细胞对抗体的细胞表面显示。

[0211] 除了噬菌体显示方法之外,可以使用体外显示方法和微生物细胞显示,包括核糖体显示和mRNA显示来分离抗体(Amstutz等,《生物科技的当前意见》12:400-05,(2001))。使用核糖体显示来选择多肽描述于Hanes等,《(美国科学院院报》,94:4937-4942(1997))和颁发给川崎重工的美国专利第5,643,768号和第5,658,754号中。核糖体显示也可用于抗体的快速大规模突变分析。选择性诱变方法还提供了产生可以使用核糖体显示技术进行选择的具有改进活性的抗体的方法。

**[0212] 氨基酸序列变体**

**[0213]** 可以产生包含抗体的一个、两个、三个、四个、五个和/或六个CDR的修饰的多肽组合物,其中改变CDR以提供对靶分子的增加的特定性或亲和力。抗体CDR中的位点通常按顺序进行修饰,例如,通过首先用保守的选择取代(例如,疏水性氨基酸取代不同的疏水性氨基酸),且然后用更多不同的选择取代(例如,疏水性氨基酸取代带电的氨基酸),且然后可以在靶位点处进行缺失或插入。例如,使用围绕CDR的保守框架序列,产生与这些共有序列互补的PCR引物,以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和多肽序列的技术在本领域中是公认的[参见例如Sambrook等,《分子克隆:实验室指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第2版,纽约州冷泉港(1989)]。将扩增的CDR序列连接到合适的质粒中。包含一个、两个、三个、四个、五个和/或六个克隆的CDR的质粒任选地含有与CDR连接的额外的多肽编码区。

**[0214]** 可以通过下文更详细描述保守或非保守氨基酸取代进行修饰。“插入”或“缺失”优选在约1到20个氨基酸、更优选1到10个氨基酸的范围内。可以通过使用重组DNA技术系统在抗体多肽分子中进行氨基酸取代并分析所得重组变体的活性来引入变异。核酸改变可以在不同物种核酸不同的位点(可变位置)处或高度保守区(恒定区)中进行。本领域描述了改变抗体序列和表达可用于本公开的抗体多肽组合物的方法。参见,例如,美国专利8,569,462。

**[0215]** 如本文所用,术语“补救受体结合表位”是指IgG分子(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc区的表位,其负责延长IgG分子的体内血清半衰期。

**[0216]** 另一类变体是氨基酸取代变体。这些变体去除抗体分子中的至少一个氨基酸残基,并在其位置中插入不同的残基。考虑高变区或CDR区或框架区中的任一个内的取代诱变。保守取代涉及用同类中的另一成员替换氨基酸。非保守取代涉及用另一类中的成员替换这些类别中的一种的成员。

**[0217]** 基于所涉及残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性质的类似性进行保守氨基酸取代。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)和蛋氨酸(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);且带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸(Asp,D)和谷氨酸(Glu,E)。

**[0218]** 任何不涉及维持抗体的适当构象的半胱氨酸残基也可以被取代,通常被丝氨酸取代,以改进分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反,可以将半胱氨酸键加入抗体中以改进其稳定性(特别是当抗体是抗体片段如Fv片段时)。

**[0219] 改变的糖基化**

**[0220]** 还可以产生相对于亲本抗体具有修饰的糖基化模式的抗体变体,例如,去掉在抗体中发现的一个或多个碳水化合物部分,和/或添加抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。

**[0221]** 抗体的糖基化通常是N-连接的或O-连接的。N-连接是指碳水化合物部分附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸,其中X是除脯氨酸

外的任何氨基酸,是碳水化合物部分与天冬酰胺侧链的酶促附着的识别序列。多肽中这些三肽序列中任一个的存在产生了潜在的糖基化位点。因此,可以通过改变氨基酸序列将N-连接的糖基化位点加入抗体中,使得其含有这些三肽序列中的一种或多种。O-连接的糖基化是指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种附着于羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但是也可以使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。通过将一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基插入或取代原始抗体的序列,可以将O-连接的糖基化位点加入抗体中。

[0222] Fc聚糖影响IgG与Fc受体和C1q的结合,且因此对IgG效应子功能来说很重要。可以产生具有修饰的Fc聚糖和改变的效应子功能的抗体变体。例如,具有修饰的末端糖的抗体如唾液酸、核心岩藻糖、二等分N-乙酰葡萄糖胺和甘露糖残基可以具有改变的与Fc  $\gamma$  RIIIa受体的结合和改变的ADCC活性。在又一实例中,具有修饰的末端半乳糖残基的抗体可以具有改变的与C1q的结合和改变的CDC活性(Raju,《免疫学的当前意见(Curr.Opin.Immunol.)》20:471-78,2008)。

[0223] 还考虑在本方法中使用的是不具有或具有减少的岩藻糖基化的表现出改进的ADCC活性的抗体分子。本领域已知有多种实现此目的的方法。例如,ADCC效应子活性由抗体分子与Fc  $\gamma$  RIII受体的结合介导,已显示其依赖于CH2结构域的Asn-297处的N-连接的糖基化的碳水化合物结构。非岩藻糖基化抗体以增加的亲和力结合此受体并且比天然的岩藻糖基化抗体更有效地触发Fc  $\gamma$  RIII介导的效应子功能。例如,在敲除了 $\alpha$ -1,6-岩藻糖基转移酶的CHO细胞中重组产生非岩藻糖基化抗体导致抗体具有增加了100倍的ADCC活性(Yamane-Ohnuki等,《生物技术与生物工程(Biotechnol Bioeng.)》87:614-22(2004))。通过降低岩藻糖基化途径中此酶或其它酶的活性,例如通过siRNA或反义RNA治疗、工程细胞系敲除酶或用选择性糖基化抑制剂培养,可以实现类似效果(Rothman等,《分子免疫学》26:1113-23(1989))。一些宿主细胞株,例如Lec13或大鼠杂交瘤YB2/0细胞系天然产生具有低岩藻糖基化水平的抗体。(Shields等,《生物化学杂志》277:26733-40(2002);Shinkawa等,《生物化学杂志》278:3466-73(2003))。例如通过在过表达GnTIII酶的细胞中重组地产生抗体,二等分碳水化合物水平的增加也已被确定为增加ADCC活性(Umana等,《自然生物科技》17:176-80(1999))。已预测,仅存在两个岩藻糖残基中的一个可能足以增加ADCC活性(Ferrara等,《生物技术与生物工程》93:851-61(2006))。抗体的糖基化和方法在Niewa和Sato,《药物科学杂志(J.Pharmaceutical Sciences)》104:930-41,2015中进行综述。

[0224] 具有改变的效应子功能的变体

[0225] 考虑了用于本方法的抗体的其它修饰。在一个方面,可能期望在效应子功能方面修饰本文所用的抗体,例如,以增强抗体在治疗癌症中的有效性。一种修饰效应子功能的方法教导了可以将半胱氨酸残基引入Fc区中,从而允许在此区域中形成链间二硫键。由此产生的同型二聚体抗体可具有改进的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(antibody-dependent cellular cytotoxicity,ADCC)。参见Caron等,《实验医学杂志(J.Exp Med.)》176:1191-1195(1992))和Shopes,B.《免疫学杂志》148:2918-2922(1992))。具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚体抗体也可以使用异双功能交联剂来制备,如Wolff等,《癌症研究》53:2560-2565(1993))中所述。或者,可以将具有双Fc区的抗体工程化,且从而可以具有增强的补体裂解和ADCC能力。参见Stevenson等,《抗癌药物设计(Anti-Cancer Drug Design)》3:219-230(1989))。另外,已经显示CDR内的序列可以使抗体

与MHC II类结合并触发不需要的辅助T细胞应答。保守取代可以使抗体保留结合活性,但丧失其触发不需要的T细胞应答的能力。

[0226] 在本公开的某些实施例中,例如,可能期望使用抗体片段而不是完整的抗体来增加治疗功效。在这种情况下,可能期望修饰抗体片段以便延长其血清半衰期,例如,将如PEG或其它水溶性聚合物包括多糖聚合物的分子加入抗体片段中,以延长半衰期。

[0227] 补救受体结合表位优选构成其中来自Fc结构域的一个或两个环的任何一个或多个氨基酸残基被转移至抗体片段的类似位置的区域。甚至更优选地,转移来自Fc结构域的一个或两个环的三个或更多个残基。仍更优选地,表位取自Fc区(例如IgG)的CH2结构域并被转移至抗体的CH1、CH3或VH区,或多于一个的此类区。或者,表位取自Fc区的CH2结构域并被转移至抗体片段的CL区或VL区或这两者。

[0228] 因此,本公开的抗体可包含人类Fc部分、人类共有Fc部分或其保留与Fc补救受体相互作用的能力的变体,包括其中涉及二硫键合的半胱氨酸被修饰或去除、和/或其中甲硫氨酸被添加到N-末端处、和/或N末端20个氨基酸中的一个或多个被去除、和/或与补体如C1q结合位点相互作用的区域被去除和/或ADCC位点被移除的变体[参见,例如,Sarmay等,《分子免疫学》29:633-9(1992)]。

[0229] Shields等据告涉及与所有人类Fc受体结合的IgG1残基位于铰链近端的CH2结构域中,并分为如下两类:1)可与所有FcR直接相互作用的位置包括Leu234-Pro238、Ala327和Pro329(及可能的Asp265);2)影响碳水化合物性质或位置的位置包括Asp265和Asn297。影响与Fc受体II结合的额外IgG1残基如下:(最大效应)Arg255、Thr256、Glu258、Ser267、Asp270、Glu272、Asp280、Arg292、Ser298和(较小效应)His268、Asn276、His285、Asn286、Lys290、Gln295、Arg301、Thr307、Leu309、Asn315、Lys322、Lys326、Pro331、Ser337、Ala339、Ala378及Lys414。A327Q、A327S、P329A、D265A和D270A减少了结合。除了上文针对所有FcR标识的残基之外,使与Fc受体IIIA结合减少40%或更多的额外IgG1残基如下:Ser239、Ser267(仅Gly)、His268、Glu293、Gln295、Tyr296、Arg301、Val303、Lys338和Asp376。改进与FcRIIA结合的变体包括T256A、K290A、S298A、E333A、K334A和A339T。Lys414显示针对FcRIIA和FcRIIB的结合减少40%,Arg416针对FcRIIA和FcRIIA减少30%,Gln419对FcRIIA减少30%且对FcRIIB减少40%,并且Lys360对FcRIIA改进23%。另见Presta等,《生物化学学会学报(Biochem. Soc. Trans.)》30:487-490,2001),其通过全文引用的方式并入本文,其描述发现了IgG1的Fc区中的几个位置,其改进仅与特异性Fc $\gamma$ 受体(R)的结合或同时改进与一种类型的Fc $\gamma$ R的结合并减少与另一类型的结合。然后在体外抗体依赖性细胞毒性(ADCC)分析中测试具有改进的与Fc $\gamma$ RIIIa结合的所选IgG1变体,并且当使用外周血单核细胞或天然杀伤细胞时显示ADCC增强。

[0230] 例如,通过全文引用的方式并入本文的美国专利第6,194,551号,其描述了具有改变的效应子功能的变体,其含有人类IgG Fc区中的在氨基酸位置329、331或322(使用Kabat编号)处的突变,其中一些显示降低的C1q结合或CDC活性。作为另一实例,通过全文引用的方式并入本文的美国专利第6,737,056号,其描述了具有改变的效应子或Fc- $\gamma$ -受体结合的变体,其含有人类IgG Fc区中的在以下氨基酸位置处的突变: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),其中一些显示与降低的ADCC或CDC活性相关的受体结合谱。在这些中,声明在氨基酸位置238、265、269、270、327或329处的突变减少与FcRI的结合,声明在氨基酸位置238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438或439处的突变减少与FcRII的结合,并且声明在氨基酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435或437处的突变减少与FcRIII的结合。

[0231] 通过全文引用的方式并入本文的美国专利第5,624,821号,其报告了鼠科动物抗体的C1q结合活性可以通过使重链的氨基酸残基318、320或322突变进行改变,并且替换残基297(Asn)导致去除裂解活性。

[0232] 通过全文引用的方式并入本文的美国专利公开第20040132101号,其描述了具有在氨基酸位置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)处的突变的变体,其中在位置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处的突变可降低ADCC活性或减少与Fc $\gamma$ 受体的结合。

[0233] 共价修饰

[0234] 还考虑在本方法中使用包含共价修饰的抗体。如果适用,则其可以通过化学合成或通过抗体的酶促或化学切割来制备。通过使抗体的靶向氨基酸残基与能够与所选侧链或N-或C-末端残基反应的有机衍生剂反应,将抗体的其它类型的共价修饰引入分子中。

[0235] 半胱氨酰残基最常见地与 $\alpha$ -卤代乙酸酯(和相应的胺)如氯乙酸或氯乙酰胺反应,以得到羧甲基或羧酰胺甲基(carboxyamidomethyl)衍生物。半胱氨酰残基也通过与以下反应来衍生化:溴三氟丙酮、 $\alpha$ -溴- $\beta$ -(5-咪唑基)丙酸、氯乙酰基磷酸酯、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、对氯汞基苯甲酸酯(p-chloromercuribenzoate)、2-氯汞基-4-硝基苯酚或氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑。

[0236] 其它修饰包括脯氨酰和赖氨酸的组氨酰基、赖氨酰基、精氨酰基、酪氨酰基、谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基羟基化。制备此类修饰的方法公开于美国专利8,926,976和本领域中,所述专利通过引用的方式并入本文。

[0237] 羧基侧基(天冬氨酰基或谷氨酰基)通过与碳二亚胺(R-N.dbd.C.dbd.N-R')反应选择性地修饰,其中R和R'是不同的烷基,如1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳二亚胺或1-乙基-3-(4-氮杂-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺。此外,天冬氨酰基和谷氨酰基残基通过与铵离子反应转化为天冬酰胺酰基和谷氨酰胺酰基残基。

[0238] 其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 $\alpha$ -氨基的甲基化(T.E.Creighton,《蛋白质:结构和分子性质(Proteins:Structure and Molecular Properties)》,旧金山的W.H.弗里曼公司(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。

[0239] 另一种类型的共价修饰涉及将糖苷以化学或酶促方式偶联至抗体。这些程序是有

利的,因为其不需要在具有针对N-或O-连接的糖基化的糖基化能力的宿主细胞中产生抗体。取决于所用的偶联模式,糖可以附着于(a)精氨酸和组氨酸,(b)游离羧基,(c)游离巯基如半胱氨酸的游离巯基,(d)游离羟基如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的游离羟基,(e)芳香族残基如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳香族残基,或(f)谷氨酰胺的酰胺基。这些方法描述于W087/05330及Aplin和Wriston,(CRC《生物化学评论(Crit.Rev.Biochem.)》,第259-306页(1981))中。

[0240] 去除抗体上存在的任何碳水化合物部分可以通过化学或酶促方式完成。化学去糖基化需要将抗体暴露于化合物三氟甲磺酸或等效化合物中。此治疗导致切割除连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)外的大多数或所有糖,同时保持抗体完整。化学去糖基化由Hakimuddin等,《生物化学与生物物理学集刊(Arch.Biochem.Biophys.)》259:52(1987))和Edge等,《分析生物化学(Anal.Biochem.)》118:131(1981))描述。抗体上碳水化合物的酶促切割可以通过使用多种内切和外切糖苷酶来实现,如由Thotakura等,《酶学方法(Meth.Enzymol.)》138:350(1987))所述。

[0241] 抗体的另一种类型的共价修饰包含将抗体与多种非蛋白聚合物例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇、聚氧乙烯化山梨糖醇、聚氧乙烯化葡萄糖、聚氧乙烯化甘油、聚氧化烯或多糖聚合物如葡聚糖中的一种连接。此类方法是本领域已知的。

[0242] 衍生物

[0243] 如上所述,衍生物,当其与抗体物质及多肽一起使用时,是指通过诸如泛素化、与治疗剂或诊断剂缀合、标记(例如用放射性核素或各种酶)、共价聚合物附着如PEG化(用聚乙二醇衍生化)和通过对氨基酸如鸟氨酸进行化学合成的插入或取代的技术进行化学修饰的多肽。本文公开的抗体的衍生物也可用作治疗剂,并可用于本文的方法中。

[0244] 缀合的部分可以共价地或通过离子、范德华(van der Waals)或氢键并入抗体物质中或附着于抗体物质,例如,放射性核苷酸或由链霉抗生物素蛋白识别的生物素化核苷酸的并入。

[0245] 聚乙二醇(PEG)可附着于抗体物质,以提供更长的体内半衰期。PEG基团可以具有任何适当的分子量,并且可以是直链或支链的。PEG的平均分子量将优选在约2千道尔顿(“kD”)到约100kDa、更优选约5kDa到约50kDa、最优选约5kDa到约10kDa范围内。PEG基团通常将通过PEG部分上的天然或工程化的反应性基团(例如醛基、氨基、硫醇基或酯基)直到抗体物质上的反应性基团(例如醛基、氨基或酯基)的酰化或还原性烷基化而附着于本公开的抗体物质。可以使用本领域众所周知的技术进行向抗体物质中添加PEG部分。参见,例如,国际公开第W0 96/11953号和美国专利第4,179,337号。

[0246] 抗体物质与PEG的连接通常在水相中进行,并且可以通过反相分析HPLC容易地监测。PEG化的物质通过制备型HPLC进行纯化,并通过分析型HPLC、氨基酸分析和激光解吸质谱法进行表征。

[0247] 抗体缀合物

[0248] 抗体可以其“无饰的”或未缀合的形式施用,或可以直接与其它治疗剂或诊断剂缀合,或可以间接与包含此类其它治疗剂或诊断剂的载体聚合物缀合。在一些实施例中,抗体与细胞毒性剂如化学治疗剂、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(即放射性缀合物)缀合。合适的化学治疗剂包

括:道诺霉素、多柔比星、甲氨蝶呤和长春地辛(Rowland等,(1986)同上)。合适的毒素包括:细菌毒素,如白喉毒素;植物毒素,如蓖麻毒素;小分子毒素,如格尔德霉素(Mandler等,《国立癌症研究所杂志(J.Natl.Cancer Inst.)》92(19):1573-81(2000);Mandler等,《生物有机化学与药物化学通讯(Bioorg.Med.Chem.Letters)》10:1025-1028(2000);Mandler等,《生物缀合化学(Bioconjugate Chem.)》13:786-91(2002))、美登素(maytansinoid)(EP 1391213;Liu等,《美国科学院院报》93:8618-23(1996))、奥利斯他汀(auristatin)(Doronina等,《自然生物科技》21:778-84(2003)和卡里奇霉素(calicheamicin)(Lode等,《癌症研究》58:2928(1998);Hinman等,《癌症研究》53:3336-3342(1993))。抗体-药物缀合物和方法在Ducry L,mAbs.6(1),2014和Shen WC,AAPS.,17:3-7(2015)中进行综述。

[0249] 通过使用放射性同位素、亲和力标记物(如生物素、抗生物素蛋白等)、酶促标记物(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物(如FITC或罗丹明等)、顺磁原子等可以可检测地标记抗体。完成此类标记的程序是本领域众所周知的;例如,参见(Sternberger,L.A.等,《组织化学与细胞化学杂志(J.Histochem.Cytochem.)》18:315(1970);Bayer,E.A.等,《酶学方法》62:308(1979);Engval,E.等,《免疫学(Immunol.)》109:129(1972);Goding,J.W.《免疫方法杂志》13:215(1976))。

[0250] 抗体部分的缀合描述于美国专利第6,306,393号中。一般技术也描述于Shih等,《国际癌症期刊(Int.J.Cancer)》41:832-839(1988);Shih等,《国际癌症期刊》46:1101-1106(1990);及Shih等,美国专利第5,057,313号中。此一般方法涉及使具有氧化的碳水化合物部分的抗体组分与具有至少一个游离胺官能团且负载有多种药物、毒素、螯合剂、硼附加物或其它治疗剂的载体聚合物反应。此反应产生初始希夫碱(Schiff base)(亚胺)键,其可通过还原成仲胺来稳定,以形成最终缀合物。

[0251] 载体聚合物可以是,例如,氨基葡聚糖或具有至少50个氨基酸残基的多肽。用于将药物或其它药剂与载体聚合物缀合的各种技术是本领域已知的。可以使用多肽载体代替氨基葡聚糖,但多肽载体在链中应具有至少50个氨基酸残基,优选100-5000个氨基酸残基。氨基酸中的至少一些应该是赖氨酸残基或谷氨酸残基或天冬氨酸残基。赖氨酸残基的侧链胺及谷氨酰胺和天冬氨酸的侧链羧酸盐便于连接药物、毒素、免疫调节剂、螯合剂、硼附加物或其它治疗剂。合适的多肽载体的实例包括聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、其共聚物,以及这些氨基酸和其它氨基酸例如丝氨酸的混合聚合物,以在所得负载的载体和缀合物上赋予期望的溶解度。可以缀合抗体的药剂的实例包括本文所述的细胞毒性剂或化学治疗剂中的任一种。

[0252] 或者,可以通过将抗体组分与治疗剂直接缀合来制备缀合的抗体。除了治疗剂直接附着于氧化的抗体组分外,一般程序类似于间接缀合方法。例如,抗体的碳水化合物部分可以附着于聚乙二醇以延长半衰期。

[0253] 或者,治疗剂可以通过二硫键形成或使用异双功能交联剂如3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-琥珀酰酯(SPDP)来附着于还原的抗体组分的铰链区。Yu等,《国际癌症期刊》56:244(1994)。用于此类缀合的一般技术是本领域众所周知的。参见,例如,Wong,《蛋白缀合与交联化学(Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking)》(CRC出版社(CRC Press)1991);Upeslacis等,《单克隆抗体:原理和应用(Monoclonal Antibodies:Principles and Applications)》中的“通过化学方法修饰抗体(Modification of



Antibodies by Chemical Methods)”, Birch等(编), 第187-230页(威利-利斯公司(Wiley-Liss, Inc.) 1995); Price, 《单克隆抗体: 生产、工程和临床应用 (Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application)》中的“合成肽衍生的抗体的产生与表征 (Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies)”, Ritter等(编), 第60-84页(剑桥大学出版社 (Cambridge University Press), 1995)。本领域已知多种双功能蛋白偶联剂, 如3-(2-吡啶基二硫代) 丙酸N-琥珀酰亚胺酯 (SPDP)、亚氨基四氢噻吩 (IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如己二亚胺酸二甲酯 HCL)、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(如戊二醛 (glutareldehyde))、双叠氮化合物(如双(对叠氮基苯甲酰基) 己二胺)、双重氮衍生物(如双(对重氮基苯甲酰基) 乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯-2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

[0254] 抗体融合蛋白

[0255] 制备其中重组分子包含一种或多种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也是本领域技术人员已知的。例如, 抗体-假单胞菌外毒素A融合蛋白已由以下描述: Chaudhary等, 《自然》339:394 (1989)、Brinkmann等, 《美国科学院院报》88:8616 (1991)、Batra等, 《美国科学院院报》89:5867 (1992)、Friedman等, 《免疫学杂志》150:3054 (1993)、Wels等, 《国际癌症期刊》60:137 (1995)、Fominaya等, 《生物化学杂志》271:10560 (1996)、Kuan等, 《生物化学》35:2872 (1996) 和Schmidt等, 《国际癌症期刊》65:538 (1996)。含有白喉毒素部分的抗体-毒素融合蛋白已由以下描述: Kreitman等, 《白血病 (Leukemia)》7:553 (1993)、Nicholls等, 《生物化学杂志》268:5302 (1993)、Thompson等, 《生物化学杂志》270:28037 (1995) 和Vallera等, 《血液 (Blood)》88:2342 (1996)。Deonarain等, 《肿瘤靶向 (Tumor Targeting)》1:177 (1995) 已经描述了具有RNase部分的抗体-毒素融合蛋白, 而Linardou等, 《细胞生物物理学 (Cell Biophys.)》24-25:243 (1994) 制备出包含DNase I组分的抗体-毒素融合蛋白。白树毒素用作Wang等, 加利福尼亚州安纳海姆的第209届ACS全国会议摘要 (Abstracts of the 209th ACS National Meeting, Anaheim, CA), 1995年4月2日到6日, 第1部分, BIOT005的抗体-毒素融合蛋白中的毒素部分。作为又一实例, Dohlsten等, 《美国科学院院报》91:8945 (1994) 报告了一种包含葡萄球菌肠毒素-A的抗体-毒素融合蛋白。

[0256] 适用于制备此类融合蛋白的毒素的示例是蓖麻毒素、相思子毒素 (abrin)、核糖核酸酶、DNase I、葡萄球菌肠毒素-A、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菌内毒素。参见, 例如, Pastan等, 《细胞 (Cell)》47:641 (1986) 和Goldenberg, 《CA: 临床癌症杂志 (CA—A Cancer Journal for Clinicians)》44:43 (1994)。其它合适的毒素是本领域技术人员已知的。

[0257] 本公开的抗体还可以通过将抗体与前药活化酶缀合而用于ADEPT中, 所述前药活化酶将前药 (例如肽酰化学治疗剂, 参见W081/01145) 转化为活性抗癌药物。参见, 例如, W088/07378和美国专利第4,975,278号。

[0258] 可用于ADEPT的免疫缀合物的酶组分包括能够以此类方式作用于前药以便将其转化为其更具活性的细胞毒性形式的任何酶。

[0259] 可用于本公开的酶包括但不限于可用于将含磷酸酯的前药转化为游离药物的碱性磷酸酶; 可用于将含硫酸酯的前药转化为游离药物的芳基硫酸酯酶; 可用于将无毒的5-

氟胞嘧啶转化为抗癌药物,即5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶;可用于将含肽前药转化为游离药物的蛋白酶,如沙雷氏菌蛋白酶(*serratia proteas*)、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(如组织蛋白酶B和L);可用于转化含有D-氨基酸取代基的前药的D-丙氨酰羧肽酶;可用于将糖基化前药转化为游离药物的碳水化合物切割酶,如 $\alpha$ -半乳糖苷酶和神经氨酸酶;可用于将用 $\beta$ -内酰胺衍生的药物转化为游离药物的 $\beta$ -内酰胺酶;及青霉素酰胺酶,如青霉素V酰胺酶或青霉素G酰胺酶,其可用于将分别用苯氧基乙酰基或苯乙酰基在其胺氮处衍生的药物转化为游离药物。或者,具有酶活性的抗体(本领域也称为抗体酶)可用于将本公开的前药转化为游离活性药物(参见,例如,Massey,《自然》328:457-458 (1987))。抗体-抗体酶缀合物可如本文所述来制备,以将抗体酶递送至肿瘤细胞群。

[0260] 上述酶可通过本领域众所周知的技术如使用上述异双功能交联剂来与抗体共价结合。或者,可以使用本领域众所周知的重组DNA技术构建至少包含与本公开的酶的至少功能活性部分连接的本公开的抗体的抗原结合区的融合蛋白(参见,例如,Neuberger等,《自然》312:604-608(1984))。

[0261] 抗体的重组产生

[0262] 编码本文所述抗体的DNA可以使用常规程序来分离和测序(例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。通常这需要对编码抗体的DNA或优选mRNA(即cDNA)进行克隆。使用标准技术,例如聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)进行克隆和测序(参见,例如,Sambrook等,(1989)《分子克隆:实验室指南》,第1-3卷,冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press);Ausubel等,(编),《分子生物学协议(Protocols in Molecular Biology)》,约翰威立(John Wiley&Sons)(1994),其通过引用的方式并入本文)。

[0263] 使用标准技术进行测序(参见,例如,Sambrook等,(1989)《分子克隆:实验室指南》,第1-3卷,冷泉港出版社和Sanger,F.等,(1977)《美国科学院院报》74:5463-5467,其通过引用并入本文)。通过将克隆的核酸的序列与人类免疫球蛋白基因和cDNA的已发表的序列进行比较,技术人员将能够根据所测序的区域容易地确定(i)免疫球蛋白多肽(包括重链的同种型)的种系片段用途及(ii)重链和轻链可变区的序列,包括由N-区添加和体细胞突变过程产生的序列。免疫球蛋白基因序列信息的一个来源是马里兰州贝塞斯达的国立卫生研究院,国家医学图书馆,国家生物科技信息中心(National Center for Biotechnology Information)。

[0264] 一旦分离,可将DNA置于表达载体中,然后将所述载体转染到宿主细胞如大肠杆菌(*E.coli*)细胞、类人猿COS细胞、人类胚肾293细胞(例如293E细胞)、中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary,CHO)细胞或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中,以获得重组宿主细胞中单克隆抗体的合成。抗体的重组产生是本领域众所周知的。

[0265] 在替代实施例中,目标免疫球蛋白的氨基酸序列可以通过直接蛋白测序来确定。可以根据通用密码子表设计合适的编码核苷酸序列。

[0266] 为了抗体的重组产生,将对所述抗体进行编码的核酸分离并插入可复制的载体中以进一步克隆(扩增DNA)或用于表达。编码单克隆抗体的DNA易于使用常规程序来分离和测序(例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。许多载体可供使用。载体组分通常包括但不限于以下中的一种或多种:本领域已知和描述的信

号序列、复制起源、一个或多个选择性标志基因、增强子元素、启动子和转录终止序列。

[0267] 用于在本文载体中克隆或表达DNA的合适宿主细胞是上述原核生物细胞、酵母细胞或高等真核细胞。用于此目的的合适的原核生物包括真细菌,如革兰氏阴性(Gram-negative)或革兰氏阳性(Gram-positive)生物,例如肠杆菌科如埃希氏菌(*Escherichia*),例如大肠杆菌、肠杆菌、欧文氏菌(*Erwinia*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、变形杆菌(*Proteus*)、沙门氏菌(*Salmonella*)例如鼠伤寒沙门氏菌、沙雷氏菌例如粘质沙雷氏菌和志贺氏菌(*Shigella*),以及芽孢杆菌(*Bacilli*)如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) (例如,1989年4月12日公开的DD 266,710中公开的地衣芽孢杆菌41P),假单胞菌如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)和链霉菌。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌294(ATCC 31,446),但其它菌株如大肠杆菌B、大肠杆菌X1776(ATCC 31,537)和大肠杆菌W3110(ATCC 27,325)也是合适的。这些实例是说明性的而非限制性的。

[0268] 除原核生物外,真核微生物如丝状真菌或酵母是编码抗体载体的合适的克隆或表达宿主。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或常见的面包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的酵母。然而,许多其它属、种和菌株在本文中通常可用和有用,如裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母(*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)、威克海姆克鲁维酵母(*K. wickerhamii*) (ATCC24,178)、瓦提克鲁维酵母(*K. waltii*) (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K. drosophilae*) (ATCC 36,906)、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*) (EP 183,070);念珠菌;里氏木霉(*Trichoderma reesei*) (EP 244,234);粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*);许旺氏酵母(*Schwanniomyces*),如西方许旺氏酵母(*Schwanniomyces occidentalis*);及丝状真菌,例如,脉孢菌、青霉菌、弯颈霉(*Tolypocladium*)和曲霉属宿主,例如构巢曲霉(*A. nidulans*)和黑曲霉(*A. niger*)。

[0269] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞衍生自多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经标识了许多来自宿主如草地贪夜蛾(毛虫)、埃及伊蚊(蚊子)、白纹伊蚊(蚊子)、黑腹果蝇(果蝇)和家蚕的杆状病毒株和变体及相应的受纳昆虫宿主细胞。用于转染的多种病毒株是公共可获得的,例如,苜蓿银纹夜蛾NPV的L-1变体和家蚕NPV的Bm-5株,并且根据本公开,此类病毒可用作本文的病毒,特别是用于草地贪夜蛾细胞的转染。

[0270] 棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、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。

[0271] 有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是中国仓鼠卵巢细胞,包括CHOK1细胞(ATCC CCL61)、DXB-11、DG-44,及中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub等,《美国科学院院报》77:4216(1980));由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7, ATCC CRL 1651);人类胚肾系(293细胞或亚克隆的293细胞在悬浮培养物中生长, (Graham等,《普通病毒学杂志(J. Gen. Virol.)》36:59,1977);小仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);小鼠塞尔托利氏细胞(sertoli cell) (TM4, Mather, 《生殖生物学(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);人类宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细

胞(MDCK,ATCC CCL34);布法罗大鼠肝细胞(buffalo rat liver cell)(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人类肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人类肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT060562,ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等,《纽约科学院年鉴(Annals N.Y Acad.Sci.)》383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;及人类肝癌细胞系(Hep G2)。

[0272] 宿主细胞经上述表达或克隆载体转化或转染以产生抗体,并在适当修饰的常规培养基中培养,以诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的基因。另外,新载体和具有由选择性标志物分隔的多个转录单位拷贝的转染细胞系对于结合靶标的抗体的表达特别有用和优选。

[0273] 当使用重组技术时,抗体可以在细胞内,在周质空间中产生,或直接分泌到培养基中,包括从微生物培养物中分泌。如果抗体在细胞内产生,则作为第一步,微粒碎片,宿主细胞或裂解片段例如通过离心或超滤来去除。Better等,《科学》240:1041-43,1988;《ICSU短篇报告(ICSU Short Reports)》10:105(1990);及《美国科学院院报》90:457-461(1993)描述了对分泌到大肠杆菌周质空间中的抗体进行分离的程序。另见,(Carter等,《生物/科技》10:163-167(1992))。

[0274] 或者,可以使用原核或真核体外翻译在无细胞系统中合成抗体(参见Stech和Kubick,《抗体(Antibodies)》4:12-33,2015)。

[0275] 抗体组合物可以使用例如羟磷灰石色谱法、阳离子或禽类(avian)交换色谱法和亲和色谱法来纯化,亲和层析是优选的纯化技术。蛋白A作为亲和配体的适合性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于人类 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark等,《免疫方法杂志》62:1-13,1983)。推荐蛋白G用于所有小鼠同种型和人类 $\gamma 3$ (Guss等,《EMBO杂志》5:15671575(1986))。亲和配体所连接的基质最常是琼脂糖,但也有其它基质可用。机械稳定的基质,如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯,允许实现比琼脂糖可以实现的更快的流速和更短的加工时间。当抗体包含CH 3结构域时,Bakerbond ABX<sup>TM</sup>树脂(J.T.Baker,新泽西州菲利普斯堡(Phillipsburg,N.J.))可用于纯化。用于蛋白质纯化的其它技术,如在离子交换柱上分馏、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅色谱法、肝素SEPHAROSE<sup>®</sup>色谱法、阴离子或阳离子交换树脂色谱法(如聚天冬氨酸柱)、色谱聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀,根据待回收的抗体也是可用的。

[0276] 筛选方法

[0277] 有效的治疗依赖于标识没有显著毒性的有效药剂。可以通过本领域已知的方法筛选抗体的结合亲和力。例如,可以使用凝胶迁移分析、西方墨点法(Western blot)、放射性标记的竞争分析、通过色谱法的共分级、共沉淀、交联、ELISA、表面等离子共振、KinExA等,其描述于例如,《分子生物学的当前协议(Current Protocols in Molecular Biology)》(1999)纽约约翰威立,其通过全文引用的方式并入本文。

[0278] 评定抗PTH1R化合物的中和生物活性的方法是本领域已知的。参见,例如,国际专利申请W0 2004073587;Haramoto等,2007《口腔疾病(Oral Dis.)》13(1):23-31。

[0279] 评定PTH1R的生物活性和中和的额外方法(例如通过PTH1R抗体)是本领域已知的。例如,中和可以通过中和分析来测量,并表示为IC<sub>50</sub>值。通过确定引起第二分子或细胞活性的最大生物反应的半抑制所需的分子浓度,可以计算给定分子的IC<sub>50</sub>值。IC<sub>50</sub>越低,分子抑制所需蛋白活性的效价强度就越大。

[0280] 组合疗法

[0281] 本公开的PTH1R抗体可以与第二药剂一起施用,并且此组合可以用于治疗如本文所述的疾病或病症。在使用针对PTH1R的抗体的情况下,如果多于一种PTH1R抗体有效结合各自的靶抗原,则考虑,可以将针对靶抗原的不同表位的两种或更多种抗体混合,使得抗体组合针对待用PTH1R抑制剂治疗的病状或病症提供更进一步改进的功效。包含一种或多种本发明抗体的组合物可以施用于患有或易患与靶多肽PTH1R相关的或通过PTH1R阻断PTH或PTHrP的活性将得到改善的病状或病症的人或哺乳动物。

[0282] 两种治疗剂的同时施用不要求药剂同时或通过相同途径施用,只要在药剂发挥其治疗效果的时间段内存在重叠即可。考虑同时或依序施用,以及在不同天或周施用。

[0283] 或者,第二药剂可以是其它治疗剂,如细胞因子、生长因子、抑制剂和针对其它靶抗原的抗体。

[0284] 考虑本公开的治疗剂可以在相同的调配物中同时给予。进一步考虑,所述药剂以单独的调配物施用并同时施用,同时提及药剂在彼此的30分钟内给予。进一步考虑可以同时给予第二药剂。

[0285] 在另一方面,在施用其它组合物之前施用针对PTH1R的抗体。在先施用是指在用其它药剂治疗之前一周直到施用其它药剂之前30分钟的范围内施用抗体。进一步考虑在施用另一种组合物或药剂之后施用药剂。随后的施用意在描述抗体治疗后30分钟直到抗体施用后一周的施用。进一步考虑可以在施用PTH1R抗体之前或之后以此方式施用第二药剂。

[0286] 进一步考虑在适当时可以施用其它辅助疗法。例如,也可以向患者施用手术疗法、化学疗法、细胞毒性剂、光动力疗法或在适当情况下的放射疗法。

[0287] 进一步考虑当本文的治疗剂与第二药剂组合施用时,例如,其中第二药剂是细胞因子或生长因子,或化学治疗剂,施用还包括使用放射治疗剂或放射疗法。与抗体组合物组合施用的放射疗法由治疗医师确定,并以通常给予癌症治疗患者的剂量进行。

[0288] 细胞毒性剂是指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。此术语旨在包括放射性同位素(例如I131、I125、Y90和Re186)、化学治疗剂和毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或合成毒素或其片段。非细胞毒性剂是指不抑制或阻止细胞功能和/或不引起细胞破坏的物质。非细胞毒性剂可包括可被活化以具有细胞毒性的药剂。非细胞毒性剂可包括珠子、脂质体、基质或粒子(参见,例如,美国专利公开2003/0028071和2003/0032995,其通过引用的方式并入本文)。此类药剂可以与根据本公开的抗体缀合、偶联、连接或缔合。

[0289] 在一个实施例中,第二药剂是地诺单抗(denosumab)(**Xgeva®**, **Prolia®**)。在其它实施例中,第二药剂是双膦酸盐(例如唑来膦酸)。在其它实施例中,第二药剂是降钙素。

[0290] 考虑与本公开的抗体一起使用的化学治疗剂和其它药剂包括但不限于表1中列出的那些:

[0291]

<p><u>烷基化剂</u></p> <p><u>氮芥</u></p> <p>二氯甲基二乙胺</p> <p>环磷酰胺</p> <p>异环磷酰胺</p> <p>美法仑</p> <p>苯丁酸氮芥</p> <p><u>亚硝基脲</u></p> <p>卡莫司汀 (BCNU)</p> <p>洛莫司汀 (CCNU)</p> <p>司莫司汀 (甲基-CCNU)</p> <p><u>乙烯亚胺/甲基三聚氰胺</u></p> <p>三亚乙基三聚氰胺 (TEM)</p> <p>三亚乙基硫代磷酰胺</p> <p>(塞替派)</p> <p>六甲基三聚氰胺</p> <p>(HMM, 六甲蜜胺)</p>	<p><u>天然产品</u></p> <p><u>抗有丝分裂药物</u></p> <p><u>紫杉烷类</u></p> <p>紫杉醇</p> <p>长春花生物碱</p> <p>长春碱 (VLB)</p> <p>长春新碱</p> <p>长春瑞滨</p> <p>Taxotere® (多西他赛)</p> <p>雌莫司汀</p> <p>磷酸雌莫司汀</p> <p><u>表鬼臼毒素 (Epipodophylotoxins)</u></p> <p>依托泊苷</p> <p>替尼泊苷</p> <p><u>抗生素</u></p> <p>放线菌素 D</p> <p>道诺霉素 (红比霉素 (rubido-mycin))</p>
--	--

[0292]

<p><u>烷基磺酸盐</u> 白消安</p> <p><u>三嗪</u> 达卡巴嗪 (DTIC)</p> <p><u>抗代谢物</u> <u>叶酸类似物</u> 氨甲喋呤 三甲曲沙 培美曲塞 (多靶点抗叶酸剂)</p> <p><u>嘧啶类似物</u> 5-氟尿嘧啶 氟脱氧尿苷 吉西他滨 胞嘧啶阿拉伯糖苷 (AraC, 阿糖胞苷) 5-氮杂胞苷 2,2'-二氟脱氧胞苷</p> <p><u>嘌呤类似物</u> 6-巯嘌呤 6-硫鸟嘌呤 硫唑嘌呤 2'-脱氧助间型霉素 (喷司他丁) 赤式羟基壬基腺嘌呤 (erythrohydroxynonyl-adenine) (EHNA) 磷酸氟达拉滨 2-氯脱氧腺苷 (克拉屈滨, 2-CdA)</p> <p><u>I 型拓扑异构酶抑制剂</u> 喜树碱 拓扑替康 伊立替康</p> <p><u>生物反应调节剂</u> G-CSF GM-CSF</p>	<p>多柔比星 (阿霉素 (adria-mycin)) 米托蒽醌伊达比星 (mitoxantroneidarubicin) 博莱霉素 丝普卡霉素 (splicamycin) (光神霉素) 丝裂霉素 C 更生霉素 阿非科林</p> <p><u>酶</u> 左旋门冬酰胺酶 L-精氨酸酶</p> <p><u>放射增敏剂</u> 甲硝唑 米索硝唑 去甲基米索硝唑 哌莫硝唑 依他硝唑 尼莫拉唑 RSU 1069 EO9 RB 6145 SR4233 烟酰胺 5-溴脱氧尿苷 5-碘脱氧尿苷 溴脱氧胞苷</p> <p><u>其它药剂</u> 双膦酸盐</p> <p><u>RANKL 抑制剂</u> 地诺单抗</p> <p><u>铂配位络合物</u> 顺铂 卡铂 奥沙利铂 蒽二酮 米托蒽醌</p> <p><u>取代的脲</u></p>
---	--

[0293]

<p><b>分化药剂</b> 维甲酸衍生物</p> <p><b>激素和拮抗剂</b> <u>肾上腺皮质甾类/拮抗剂</u> 降钙素 泼尼松龙和等效物 地塞米松 氨鲁米特 (ainoglutethimide)</p> <p><u>孕激素</u> 己酸羟孕酮 乙酸甲羟孕酮 乙酸甲地孕酮</p> <p><u>雌激素</u> 己烯雌酚 乙炔雌二醇/等效物</p> <p><u>抗雌激素</u> 他莫昔芬</p> <p><u>雄激素</u> 丙酸睾酮 氟甲睾酮/等效物</p> <p><u>抗雄激素</u> 氟他胺 促性腺激素释放 激素类似物 亮丙瑞林</p> <p><u>非甾体抗雄激素</u> 氟他胺</p>	<p>羟基脲</p> <p><u>甲基胍衍生物</u> N-甲基胍 (MIH) 甲基苄胍</p> <p><u>肾上腺皮质抑制药</u> 米托坦 (<i>o,p'</i>-DDD) 氨鲁米特</p> <p><b>细胞因子</b> 干扰素 (<math>\alpha</math>、<math>\beta</math>、<math>\gamma</math>) 白细胞介素-2</p> <p><b>光敏剂</b> 血卟啉衍生物 Photofrin® 苯并卟啉衍生物 Npe6 锡初卟啉 (SnET2) 苯博瑞德-a (pheoboride-a) 细菌叶绿素-a 茶酞菁 酞菁 锌酞菁</p> <p><b>辐射</b> X-射线 紫外光 <math>\gamma</math> 辐射 可见光 红外辐射 微波辐射</p>
--	--

[0294] 表1:考虑与本公开的抗体一起使用的化学治疗剂和其它药剂

[0295] 治疗病症

[0296] 在另一实施例中,本文所述的任何类型的抗体都可用于所述方法中。在示例性实施例中,靶特异性抗体是人类、嵌合或人源化抗体。在另一示例性实施例中,靶标是人类且患者是人类患者。或者,患者可以是表达靶特异性抗体与之交叉反应的靶蛋白的哺乳动物。可以将抗体施用于表达抗体与之交叉反应的靶蛋白的非人类哺乳动物(例如灵长类动物),以用于兽医目的或作为人类疾病的动物模型。

[0297] 在一个实施例中,本公开提供治疗与PTH或PTHrP蛋白表达增加相关的高钙血症的方法,其包含向有需要的受试者施用治疗有效量的本文考虑的PTH1R抗体或药物组合物的步骤。

[0298] 在另一实施例中,本公开提供治疗与甲状旁腺激素表达增加、甲状旁腺激素相关



蛋白表达增加或PTH1R表达增加相关的疾病、病状或病症的方法,其包含向有需要的受试者施用治疗有效量的本文考虑的抗体或药物组合物的步骤。

[0299] 在另一实施例中,本公开提供治疗选自以下组成的组的疾病、病状或病症的方法:癌症、PTH或PTHrP诱发的高钙血症、恶性肿瘤体液性高钙血症(HHM)、家族性低尿钙性高钙血症、结核病、结节病、原发性甲状旁腺功能亢进症(PHPT)、继发性甲状旁腺功能亢进症(SHPT)和恶病质。

[0300] 在各种实施例中,向有需要的受试者施用治疗有效量的本文考虑的抗体或药物组合物改善了高钙血症的一种或多种症状。

[0301] 在各种实施例中,向有需要的受试者施用治疗有效量的本文考虑的抗体或药物组合物改善了包括PTHrP诱发的HHM中的消耗综合征在内的一种或多种症状,因降低高钙血症和/或消耗综合征而延长HHM存活。PTHrP和PTH1R已表明与乳腺癌和胃癌进展有关(Hoey等,2003《英国癌症杂志(Br J Cancer.)》88(4):567-573;Ito等,1997《胃肠病学(J Gastroenterol.)》32(3):396-400)。此外,PTHrP和PTH1R在乳腺肿瘤细胞中的过表达已显示出通过以自分泌方式刺激其的增殖来促进此类细胞在骨骼转移中的生长(Hoey等,2003《英国癌症杂志》88(4):567-573)。

[0302] 在一个实施例中,本公开提供治疗癌症或预防癌症复发的方法,其包含向有需要的受试者施用治疗有效量的本文考虑的PTH1R抗体或药物组合物。

[0303] 可以用本公开的抗体进行治疗的示例性病状或病症包括癌症,如选自以下组成的癌症:骨癌、肺癌、肝细胞癌、胰腺癌、肾癌、纤维化癌、乳腺癌、骨髓瘤、鳞状细胞癌、结肠直肠癌和前列腺癌。在相关方面,癌症是转移性癌症。在相关方面,转移包括向骨或骨骼组织、肝、肺、肾或胰腺的转移。考虑本文的方法减小受试者中的肿瘤大小或肿瘤负荷,和/或减少受试者中的转移。在各种实施例中,所述方法使肿瘤大小减小10%、20%、30%或更多。在各种实施例中,所述方法使肿瘤大小减小10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0304] 在一个实施例中,在需要所述治疗的动物中治疗癌症包含向动物施用有效量的PTH1R抗体或包含本文所述抗体的组合物。

[0305] 可通过本公开的方法治疗的病状优选在哺乳动物中发生。哺乳动物包括例如人类和其它灵长类动物,以及宠物或伴侣动物如狗和猫,实验动物如大鼠、小鼠和兔子,及农场动物如马、猪、绵羊和牛。

[0306] 药物组合物调配物

[0307] 为了将本公开的抗体施用于人类或测试动物,优选将抗体调配在包含一种或多种药学上可接受的载体的组合物中。短语“药学上或药理学上可接受的”是指当使用本领域众所周知的途径施用时不产生过敏或其它不良反应的分子实体和组合物,如下所述。“药学上可接受的载体”包括任何和所有临床上有用的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗延迟剂和吸收延迟剂等。

[0308] 另外,化合物可与水或普通有机溶剂形成溶剂化物。也考虑了此类溶剂化物。

[0309] 抗体通过任何合适的方式施用,包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内,并且如果需要局部治疗,则通过病灶内施用。肠胃外输注包括静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮内或皮下施用。另外,抗体可以通过脉冲输注来适当地施用,特别是在抗体剂量下降的情况下。

优选通过注射给予剂量,最优选静脉内、肌肉内或皮下注射,部分取决于施用是短暂的还是长期的。考虑了其它施用方法,包括局部施用,特别是经皮、经粘膜、直肠、口服或部分施用,例如通过靠近所需部位放置的导管。

[0310] 含有本文所述抗体作为活性成分的本公开的药物组合物取决于施用途可以含有药学上可接受的载体或添加剂。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、人类血清白蛋白(human serum albumin,HSA)、甘露醇、山梨糖醇、乳糖、药学上可接受的表面活性剂等。所用的添加剂根据本公开的剂型选自但不限于上述或其组合,视情况而定。

[0311] 药物组合物调配物将根据所选择的施用途(例如溶液、乳液)而变化。包含待施用的抗体的合适组合物可以生理学上可接受的载剂或载体形式制备。对于溶液或乳液,合适的载体包括例如水溶液或醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外载剂可包括氯化钠溶液、林格氏(Ringer's)右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或固定油。静脉内载剂可包括各种添加剂、防腐剂或流体、营养物或电解质补充剂。

[0312] 多种水性载体,例如无菌磷酸盐缓冲盐水溶液、抑菌水、水、缓冲水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸等,并且可包括用于增强稳定性的其它蛋白,如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等,其经温和的化学改性等。

[0313] 抗体的治疗调配物以冻干调配物或水溶液形式,通过将具有所需纯度的抗体与任选的生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来制备以便储存(《雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》第16版,Osol,A.编(1980))。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,且包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁基或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;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,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(如Zn-蛋白配合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0314] 本文的调配物还可含有所治疗的特定适应症所必需的多于一种活性化合物,优选具有不会对彼此产生不利影响的互补活性的活性化合物。此类分子合适地以对预期目的有效的量组合存在。

[0315] 活性成分也可以被包封在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如,分别在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、乳状液、纳米粒子和纳米胶囊)或粗乳液(macroemulsion)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。此类技术公开于《雷明顿氏药物科学》第16版,Osol,A.编(1980)中。

[0316] 用于体内施用的调配物必须是无菌的。这可以通过无菌过滤膜过滤而容易地完成。

[0317] 水性悬浮液可含有与适于制造水性悬浮液的赋形剂掺和的活性化合物。此类赋形剂是悬浮剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯胶;分散剂或润湿剂可以是天然存在的磷脂,例如卵磷脂,或环氧烷烃与脂肪酸的缩合产物(例如硬脂酸聚氧乙烯酯),或环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物(例如十七烷基-烯氧十六醇(heptadecaethyl-eneoxycetanol)),或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物(如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯),或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物(例如聚乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯)。水性悬浮液还可含有一种或多种防腐剂,例如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯。

[0318] 可将本文所述的抗体冻干以便储存,并且在使用前将其在合适的载体中重构。此技术已表明对常规免疫球蛋白有效。可以采用任何合适的冻干和重构技术。本领域技术人员将了解,冻干和重构可导致不同程度的抗体活性损失,并且可能必须调整使用水平以进行补偿。

[0319] 本文所述的PTH1R抗体可以与一种或多种额外抗体的共调配物形式制备和施用。在一个方面,所述抗体中的至少两种识别并结合不同的抗原。在另一方面,多种抗体中的至少两种可以特异性识别和结合相同抗原的不同表位。

[0320] 适于通过添加水来制备水性悬浮液的可分散粉末和颗粒提供与分散剂或润湿剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂掺和的活性化合物。合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂由上面已经提到的那些例证。

[0321] 根据所选的特定施用模式,这些调配物中的抗体的浓度可以广泛变化,例如小于约0.5%,通常为或至少约1%至多达15或20重量%,并且将主要基于流体体积、粘度等来选择。因此,用于肠胃外注射的典型药物组合物可以制成含有1ml无菌缓冲水和50mg抗体。用于静脉内输注的典型组合物可以制成含有250ml无菌林格氏溶液和150mg抗体。用于制备可肠胃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而易见的,并且更详细地描述于例如《雷明顿氏药物科学》第15版,Mack Publishing Company,宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton, Pa.) (1980)中。抗体的有效剂量在每次施用0.01mg至1000mg/kg体重的范围内。

[0322] 药物组合物可以呈无菌可注射水性、油性悬浮液、分散液或无菌粉末的形式,以临时制备无菌可注射溶液或分散液。悬浮液可以根据已知技术使用上面已提到的那些合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂来调配。无菌可注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如在1,3-丁二醇中的溶液。载体可以是溶剂或分散体介质,其含有例如水、乙醇、聚醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物、植物油、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的固定油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以采用任何温和的固定油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。另外,如油酸的脂肪酸可用于制备可注射剂。

[0323] 在所有情况下,所述形式必须是无菌的,并且必须是可易于注射程度的流体。可例如通过使用如卵磷脂这样的包衣、通过维持所需粒度(在分散体的情况下)及通过使用表面活性剂来维持合适的流动性。其在制造条件和储存条件下必须是稳定的,并且必须在防止微生物如细菌和真菌的污染作用下储存。可通过各种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下,将优选包括等

渗剂,例如糖或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中使用延迟吸收的药剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0324] 可用于施用的组合物可以与摄取或吸收增强剂一起调配以增加其功效。此类增强剂包括例如水杨酸盐、甘氨酸胆酸盐/亚油酸盐、甘氨酸盐、抑肽酶、杆菌肽、SDS、癸酸盐等。参见,例如,Fix(《药物科学杂志》,85:1282-1285(1996))及Oliyai和Stella(《药理学和毒理学年度回顾(Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.)》,32:521-544(1993))。

[0325] 考虑用于抑制靶活性的抗体组合物,其包括使靶与其同源受体或配体结合、靶介导信号传导等。特别地,组合物在基本上没有副作用的浓度下表现出抑制性质,且因此可用于延长的治疗方案。例如,抗体组合物与另一种毒性更强的细胞毒性剂的共同施用可以实现对所治疗的病状或病症的有益抑制,同时有效地减少患者中的毒副作用。

[0326] 另外,考虑用于本公开的组合物的亲水性和疏水性的性质很好地平衡,从而增强了其在体外和尤其是在体内使用两者中的效用,而缺乏此类平衡的其它组合物的效用显著降低。具体地,考虑用于本公开的组合物在水性介质中具有允许体内吸收和生物利用度的适当的溶解度,同时在脂质中还具有一定程度的允许化合物穿过细胞膜到达假定的作用位点的溶解度。因此,所考虑的抗体组合物在其被递送至靶抗原活性位点时是最有效的。

[0327] 施用和给药

[0328] 在一个方面,本公开的方法包括施用药物组合物的步骤。在某些实施例中,药物组合物是无菌组合物。

[0329] 使用任何医学上可接受的将治疗剂直接或间接引入哺乳动物受试者中的方法(其包括但不限于注射、口服、鼻内、局部、经皮、肠胃外、吸入喷雾、阴道或直肠施用)进行本公开的方法。如本文所用的术语肠胃外包括皮下、静脉内、肌内和脑池内注射,以及导管或输注技术。也考虑通过皮内、乳房内、腹膜内、鞘内、眼球后、肺内注射和/或在特定位置手术植入施用。

[0330] 在一个实施例中,通过直接注射到位点或通过可以在内部递送调配物的持续递送或持续释放机制在需要治疗的癌症或受影响组织的部位处进行施用。例如,能够持续递送组合物(例如,可溶性多肽,抗体或小分子)的可生物降解的微球或胶囊或其它可生物降解的聚合物构型可以包括在癌症位点附近或此位点处植入的本公开的调配物中。

[0331] 治疗组合物还可以在多个位点处递送给患者。多次施用可以同时进行或可以经一段时间施用。在某些情况下,提供治疗组合物的连续流是有益的。可以基于周期,例如每周一次、每2周一次、每月两次、每月一次、每两个月一次、或每三个月一次或以更长的间隔施用额外的疗法。

[0332] 给定剂量中的抗体组合物的量可以根据施用疗法的受试者的大小以及所治疗的病症的特征而变化。在示例性治疗中,可能需要施用约1毫克/天、5毫克/天、10毫克/天、20毫克/天、50毫克/天、75毫克/天、100毫克/天、150毫克/天、200毫克/天、250毫克/天、500毫克/天或1000毫克/天。这些浓度可以作为单一剂型或多剂量施用。首先在动物模型中且然后在临床测试中进行的标准剂量反应研究揭示特定疾病状态和患者群体的最佳剂量。

[0333] 本公开中还考虑,给定剂量中的PTH1R抗体的量可以根据施用治疗的受试者的大小以及所治疗的病症的特征而变化。抗体组合物可以0.1至15mg的剂量范围施用,每1、2或4周每周两次经30-60分钟静脉内输注,直到疾病进展或毒性不可接受。在各种实施例中,抗

体组合物可每周两次或每1、2或4周以0.3-30mg/kg的剂量范围静脉内、皮下或肌肉内施用。在各种实施例中,剂量可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或30mg/kg。在各种实施例中,抗体组合物可每周两次或每1、2或4周以0.3-3mg/kg、1至6mg/kg或2至6mg/kg的剂量范围静脉内施用。或者,抗体组合物可每周两次或每1、2或4周以0.5-5mg/kg的剂量范围静脉内、皮下或肌肉内施用。

[0334] 还将显而易见的是,如果将额外的治疗剂与本公开的治疗剂组合施用,则可以改变剂量。

[0335] 试剂盒

[0336] 作为额外的方面,本公开包括试剂盒,其包含一种或多种化合物或组合物,所述化合物或组合物以促进其用于实施本公开的方法的方式包装。在一个实施例中,此类试剂盒包括本文所述的包装在容器如密封瓶或密封器皿中的化合物或组合物,其中描述化合物或组合物在实施所述方法中的用途的标签贴在容器上或包括在包装中。优选地,化合物或组合物以单位剂型包装。试剂盒可以进一步包括适合于根据特定的施用途径来施用组合物或适合于实施筛选分析的装置。优选地,试剂盒含有描述抗体组合物用途的标签。

[0337] 根据以下旨在说明而非限制的实例,本公开的额外方面和细节将是显而易见的。

[0338] 实例

[0339] 实例1:发现与PTH1R结合的抗体

[0340] A.噬菌体淘选和营救

[0341] 为了标识结合PTH1R的抗体,使用原始scFv或Fab抗体噬菌体文库进行三轮细胞淘选(Schwimmer等2013《免疫方法杂志》391(1-2):60-71)。将 $\kappa$ 和 $\lambda$ 链文库一起淘选。对于第一轮噬菌体淘选,在FLAG肽(西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich))存在下,将约50X文库等效物在5%FCS/PBS中在RT下封闭1小时。然后针对不表达PTH1R受体的 $5 \times 10^7$ CHO-K1细胞取消选择针对CHO-K1(亲本细胞)的非特异性结合物。随后,在FLAG肽存在下,允许取消选择的细胞在37°C下与表达全长人类受体的 $1.5 \times 10^8$ CHO-PTH1R细胞结合2小时。然后用5%FCS-PBS洗涤受体结合的噬菌体,且然后用PBS洗涤。延长每轮连续淘选中洗涤的持续时间,以便提高选择的严格性。然后结合的噬菌体通过添加100mM三甲胺(TEA)洗脱缓冲液(默克(Merck)-TX1200-5)洗脱,并用等体积的pH 7.4的1M Tris-HCl中和。然后使用洗脱和中和的噬菌体感染OD600 ~ 0.5的表达cytFkpA伴侣变体的TG1细菌细胞(Levy等2013《免疫方法杂志》394(1-2):10-21)。感染在37°C下进行1小时,并以100rpm的速度振动。然后将细胞接种在补充有100 $\mu$ g/mL羧苄青霉素、34 $\mu$ g/mL氯霉素和2%葡萄糖的2YT琼脂糖板上,并将其在30°C下温育过夜。

[0342] 为了营救用于下一轮淘选的噬菌体,用辅助噬菌体M13K07(马塞诸塞州的纽英伦生物技术(New England Biolabs,MA))对50x-100x输出进行超感染。收获细胞并使其在37°C下生长,从OD600 ~ 0.05开始。当OD600 nm ~ 0.5时,在37°C下以100rpm旋转用感染复数(multiplicity of infection,MOI) ~ 20的M13K07将细胞感染1小时。感染后,将细胞造粒并转移至补充有50 $\mu$ g/mL卡那霉素、100 $\mu$ g/mL羧苄青霉素和0.2%阿拉伯糖的新2YT培养基中,以便允许伴侣cytFkpA的表达。细菌培养物在25°C下过夜生长后,在4°C下离心后收获噬菌体,且然后将沉淀的PEG用作下一轮淘选的输入。通过用于每轮淘选的噬菌体输入量相对于所得噬菌体输出滴度来监测选择富集。

[0343] 或者,使由第二轮淘选得到的营救的噬菌体与经工程化以表达人类PTH1R的CHO细胞结合。然后使用细胞分选方法分离与CHO-PTH1R细胞结合的噬菌体,所述细胞分选方法基于Siegel等,2002《分子生物学方法》178:219-226所述的方法。

[0344] B.筛选

[0345] 文库淘选输出由FACS筛选。使用标准方案制备含有所选克隆的周质细菌提取物的板。然后相对于与亲本CHO-K1细胞结合,通过FACS对所述板进行筛选以与在N末端具有FLAG标签的表达人类PTH1R的CHO细胞结合。抗FLAG标签单克隆抗体用作阳性对照以检测表达PTH1R的细胞。

[0346] 然后将结合PTH1R的抗体片段重新格式化为人类IgG1、IgG2或IgG4抗体。所选scFv或Fab片段的可变重链(VH)和可变轻链(VL)通过PCR扩增,被克隆到含有抗体恒定区序列的质粒载体中,并使用标准方法瞬时转染到293E细胞中以产生IgG2抗体进行进一步表征。如下所述,测试重新格式化的抗体的PTH1R结合且以功能分析形式。

[0347] 实例2:亲和力成熟

[0348] 基于初始结合和功能表征研究,选择两种抗体XPA.85.012和XPA.85.017以使用轻链改组进行亲和力成熟。

[0349] A.选择XPA.85.012亲和力成熟的变体

[0350] 轻链文库构建

[0351] 将XPA.85.012的VH区克隆到含有两个不同 $\kappa$ 链Fab文库的质粒DNA中。所得文库,即XPA85.012.010和XPA85.012.050的所得文库大小分别为 $7.6 \times 10^8$ cfu和 $2.1 \times 10^9$ cfu。使用TG1+cytFkpA细胞营救每个文库(50x文库等效物)(Levy等2013《免疫方法杂志》394(1-2):10-21)。

[0352] 噬菌体淘选和营救

[0353] 使用制造商的方案和20倍摩尔过量的生物素试剂,用EZ-Link NHS-PEG4-生物素(伊利诺伊州罗克福德的赛默飞科技(Thermo Scientific,Rockford,IL))将人类PTH1R受体(N-ECD PTH1R,明尼苏达州的安诺伦(R&D Systems,MN))的重组N-末端细胞外结构域生物素化。通过用Zeba™脱盐离心柱(7K MWCO)(伊利诺伊州罗克福德的赛默飞科技)旋转两次来去除非反应性NHS-PEG4-生物素。通过表面等离子共振(SPR)证实了N-ECD PTH1R的生物素化。

[0354] 对于第一轮噬菌体淘选,将100X文库等效物,即XPA85.012.010和XPA85.012.050(分别为 $7.6 \times 10^{10}$ cfu和 $2.1 \times 10^{11}$ cfu)在冰上在1mL 3%BSA/PBS中封闭1小时。通过向链霉抗生物素蛋白包衣的磁珠(Dynabeads™ M-280链霉抗生物素蛋白,加利福尼亚州卡尔斯巴德的赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific,Carlsbad,CA)中添加封闭的噬菌体,从封闭的噬菌体中取消选择针对链霉抗生物素蛋白的结合物,并将其在室温下旋转温育45分钟。将取消选择步骤再重复一次。使用磁体以将珠子从噬菌体中分离出来。在取消选择步骤的同时,通过在室温下旋转温育45分钟,使40pmole的生物素化的N-ECD PTH1R与链霉抗生物素蛋白包衣的磁珠结合。通过向与磁性链霉抗生物素蛋白珠结合的生物素化的N-ECD PTH1R中添加取消选择的噬菌体并旋转温育1.5小时来进行选择。选择后,未结合的噬菌体通过用3%BSA/PBS+0.1%Tween-20洗涤三次,每次5分钟,接着用3%BSA/PBS洗涤三次,每次5分钟并用PBS快速洗涤一次来去除。在最终洗涤步骤后通过在室温下旋转20分钟添加

100mM TEA从珠子中洗脱结合的噬菌体。添加等体积的pH 7.4的1M Tris-HCl中和洗脱的噬菌体,并添加pH 7.4的1mL 1M Tris-HCl中和珠子。将洗脱的和珠子结合的中和噬菌体分别用于感染对数生长的TG1+cytFkpA细菌细胞(OD600 ~ 0.5)。感染在无振动下在37℃下持续30分钟,接着在100rpm的振动下在37℃下额外温育30分钟。将细胞接种在补充有100μg/mL羧苄青霉素、34μg/mL氯霉素和2%葡萄糖(2YTCCG)琼脂生物分析板的2YT培养基上,并在30℃下温育过夜以使胞苔生长(lawn growth)过夜。刮下所有板并使细胞组合以制备细菌甘油储液。

[0355] 在准备用作下一轮的输入时,通过使用M13K07辅助噬菌体(加利福尼亚州卡尔斯巴德的纽英伦生物技术)进行重复感染营救了100X的前轮输出。这是通过用从前轮淘选出中刮下的细胞接种2YTCCG培养基来完成的。测量OD600 nm的起始培养物并将其调节至反映出~0.05的起始OD600 nm。使细胞在振动下在37℃下生长,直到细胞达到OD600 nm~0.5的对数生长期。在无振动下在37℃下用感染复数(MOI) = ~20的M13K07辅助噬菌体将细胞感染30分钟,接着在100rpm的振动下在37℃下额外温育30分钟。在37℃下感染后,将细胞造粒并转移至补充有25μg/mL卡那霉素、100μg/mL羧苄青霉素和0.2%L-阿拉伯糖的新2YT培养基中。使培养物在25℃下生长过夜。通过离心将噬菌体从细胞和碎片中分离出来,并回收所得上清液进行PEG-6000/NaCl沉淀。通过用于每轮淘选的输入量和所得噬菌体输出滴度来监测选择富集。

[0356] 对于第二轮和第三轮淘选,使用第一轮中遵循的相同解决方法阶段方案,但以下例外。用于第二轮淘选的噬菌体输入量为~ $1.0 \times 10^{10}$ cfu且用于第三轮的为~ $4.0 \times 10^8$ 至 $5 \times 10^{10}$ cfu。对于第二轮,选择使用10皮摩尔的生物素化抗原,且对于第三轮,使用1.0和0.4皮摩尔的生物素化抗原。在第二轮中,洗涤条件是用3%BSA/PBS+0.1%Tween-20洗涤五次,每次5分钟,接着用3%BSA/PBS洗涤五次,每次5分钟,并用PBS快速洗涤一次。在第三轮中,使用Kingfisher仪器(赛默飞世尔科技)实施两种洗涤条件,以在选择后从珠子中洗涤未结合的噬菌体。在第一洗涤条件下,将Kingfisher编程为用3%BSA/PBS-0.1%Tween-20洗涤珠子8次持续4分钟,接着用3%BSA/PBS洗涤8次持续4分钟,最后用1ml PBS洗涤。结合的噬菌体使用磁体进行收集并如前所述进行洗脱,其中洗脱的噬菌体和与珠子结合的噬菌体保持分离以进行TG1+cytFpKA感染、细菌甘油储备和单个克隆的挑选。在第二洗涤条件下,将Kingfisher编程为用3%BSA/PBS-0.1%Tween-20洗涤珠子5次持续4分钟,接着用3%BSA/PBS洗涤5次持续4分钟,最后在旋转下在4℃下用1ml 1%BSA/PBS洗涤过夜,接着是一次快速的PBS洗涤。结合的噬菌体使用磁体进行收集并如前所述进行洗脱,其中洗脱的噬菌体和与珠子结合的噬菌体保持分离以进行TG1+cytFkpA感染、细菌甘油储备和单个克隆的挑选。

[0357] B. 选择XPA.85.017亲和力成熟的变体

[0358] 轻链文库构建

[0359] 将XPA.85.017的VH区克隆到含有两个不同λ链Fab文库的质粒DNA中。所得文库,即XPA.85.017.010和XPA.85.017.031的所得文库大小分别为 $8.21 \times 10^8$ cfu和 $7.51 \times 10^8$ cfu。使用TG1+cytFkpA营救每个文库(50x文库等效物)(Levy等,2013《免疫方法杂志》394(1-2):10-21)

[0360] 噬菌体淘选和营救

[0361] 如上所述在人类PTH1R的重组N-末端细胞外结构域上进行淘选,除了对于第一轮

噬菌体淘选,在取消选择步骤的同时,允许10皮摩尔而不是40皮摩尔的生物素化的N-ECD PTH1R与链霉抗生物素蛋白包衣的磁珠结合之外。

[0362] 对于第二轮和第三轮淘选,使用第一轮中遵循的相同解决方法阶段方案,但以下例外。用于第二轮和第三轮淘选的噬菌体输入量为 $\sim 1.0 \times 10^{10}$  cfu。对于第二轮,选择使用1皮摩尔的生物素化抗原;对于第三轮,使用0.5和0.1皮摩尔的生物素化抗原。使用30分钟选择(而不是1.5小时)和0.5皮摩尔在第3轮中引入额外的淘选条件。在第二轮和第三轮选择后,使用Kingfisher仪器以从珠子中洗去未结合的噬菌体。在第二轮中,将Kingfisher编程为用PBS-0.1%TWEEN+3%BSA洗涤珠子5次持续5分钟,接着用3%BSA/PBS洗涤5次持续5分钟。在第三轮淘选中,用PBS-0.1%TWEEN+3%BSA洗涤珠子7次持续5分钟,接着用1X PBS+3%BSA洗涤7次5分钟,且最后用PBS快速洗涤。将具有 $500 \times$ 过量的冷N-ECD PTH1R抗原的过夜洗涤物加入具有不同选择持续时间的0.5和0.1皮摩尔臂中。

### [0363] C. 筛选

[0364] 通过标准方法制备含有用于筛选PTH1R结合物的分泌抗体片段的细菌周质提取物。为了评定轻链改组突变体的改进的结合动力学,使用表面等离子共振 (SPR) 进行粗抗体片段的解离速率 (off-rate) 筛选。初级抗体淘选和抗体发现已利用过表达全长人类PTH1R的CHO-K1细胞。进一步的测试表明,XPA.85.012和XPA.85.017克隆两者都与可溶性重组N-末端细胞外结构域 (ECD) 结合,所述克隆可用于基于SPR的高通量筛选和亲和力表征。

[0365] 使用直接结合分析形式在BIACORE 4000 (GE医疗 (GE Healthcare)) 上进行SPR筛选分析。在这些分析中,通过使用BIACORE胺偶联试剂盒 (GE医疗,新泽西州皮斯卡特维 (Piscataway, NJ)) 的标准胺偶联化学法制备CM5 BIACORE芯片。将人类PTH1R N-末端ECD (安诺伦) 在pH 4.5的乙酸盐中稀释至 $4 \mu\text{g/mL}$ 并注射5分钟。这固定了约1500RU的ECD。周质提取物用含有5mg/mL BSA的HBS-EP+(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05% v/v表面活性剂P20) (加利福尼亚州霍利斯特的天惠华 (Teknova, Hollister CA)) 以1:1稀释,并通过 $0.2 \mu\text{m}$  Millex GV滤板 (密理博 (Millipore)) 过滤,且然后以30微升/分钟的速度注射240秒,且进行300秒解离。每次PPE注射后的再生是20秒的pH 3.0的10mM甘氨酸。所用的运行缓冲液是具有2.5mg/mL BSA (西格玛奥德里奇,密苏里州圣路易斯 (St. Louis MO)) 的HBS-EP+。将BIACORE 4000软件中的稳定性早期报告点用于评估PPE结合水平并确定解离 (kd)。

[0366] 如实例1中所述,将具有改进解离速率的所选克隆重新格式化为IgG1、IgG2或IgG4抗体。图1A和1B显示了使用ClustalW算法针对亲本序列对12岁儿童 (图1A) 或17岁儿童 (图1B) 的轻链氨基酸家族进行多序列比对 (MSA)。

### [0367] 实例3: SPR的IgG亲和力和测量

[0368] 为了测量各种重新格式化的抗体的结合速率 ( $k_a$ ) 和解离速率 ( $k_d$ ) 常数,采用SPR方法。

[0369] 使用如制造商针对在BIACORE 4000系统 (GE医疗) 上捕获Ab的方案所述的标准胺偶联来制备抗人类IgG-Fc CM5传感器芯片 (GE医疗)。简而言之,将新鲜混合的1:1的0.1M N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 和0.4M 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 的溶液以10微升/分钟的速度注射10分钟来活化芯片表面。在活化注射后,将在pH 4.5的乙酸盐中的15ug/mL抗人类IgG-Fc抗体以10微升/分钟的速度注射10分钟来获得高密度捕获表面。将pH 8.5的1M乙醇胺盐酸盐-NaOH注射7分钟以封闭表面。所用的NHS、EDC和乙醇胺来自



BIACORE胺偶联试剂盒。

[0370] 使用具有2.5mg/mL BSA(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇)的HBS-EP+(天惠华)进行动力学分析。将抗体稀释至0.5μg/mL并捕获以获得100至200RU的表面密度。将PTH1R N末端ECD样品以200、50、12.5和3.125nM的四种浓度注射以及进行空白注射。以30微升/分钟进行注射240秒,具有360秒的解离时间。然后用一次60秒注射3M MgCl进行再生。

[0371] 数据使用BIACORE 4000评估软件进行分析,并通过减去空白流动细胞数据和平均的加括号的空白注射两者来进行双重参考。通过同时拟合解离速率( $k_d$ )和结合速率( $k_a$ )来拟合数据并将 $K_D$ 计算为 $K_D = k_d/k_a$ 。测量的速率常数如表2所示,且代表性数据包括在图2中。

[0372]	克隆	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
	XPA.85.012	1.3E+06	2.5E-02	2.0E-08
	XPA.85.017	3.5E+05	8.6E-04	2.5E-09
	XPA.85.287	3.6E+06	3.6E-04	9.9E-11
	XPA.85.288	7.8E+05	1.4E-04	1.8E-10
	XPA.85.326	3.8E+05	7.3E-05	1.9E-10
	XPA.85.327	7.4E+05	1.1E-04	1.5E-10
	XPA.85.328	5.6E+05	1.8E-04	3.2E-10
[0373]	XPA.85.329	3.4E+05	7.6E-05	2.2E-10
	XPA.85.330	4.7E+05	9.0E-05	1.9E-10
	XPA.85.331	1.6E+06	3.5E-04	2.2E-10
	XPA.85.332	2.4E+06	1.7E-03	7.1E-10
	XPA.85.333	1.8E+06	5.4E-04	3.0E-10
	XPA.85.334	8.6E+05	2.1E-04	2.5E-10
	XPA.85.335	8.0E+05	1.9E-03	2.4E-09
	XPA.85.336	1.1E+06	1.9E-02	1.7E-08
	XPA.85.337	6.1E+05	4.6E-04	7.5E-10
	XPA.85.338	1.3E+06	5.7E-04	4.3E-10
	XPA.85.339	2.9E+06	6.5E-04	2.2E-10
	XPA.85.340	1.4E+06	1.1E-03	7.5E-10
	XPA.85.341	1.9E+06	6.0E-04	3.1E-10
	XPA.85.342	2.3E+06	1.2E-03	5.2E-10
	XPA.85.343	1.1E+06	4.5E-04	4.2E-10
	XPA.85.344	1.3E+06	2.3E-04	1.8E-10
	XPA.85.345	2.3E+06	1.3E-03	5.6E-10
	XPA.85.346	4.5E+05	1.4E-04	3.1E-10
	XPA.85.347	8.8E+05	7.7E-04	8.7E-10

[0374] 表2:基于SPR的亲和力估计

[0375] 如使用捕获的抗体在此分析中测量的亲和力数据证明XPA.85.012和XPA.85.017克隆两者的亲和力成熟变体与人类重组ECD的亲和力结合(较低的 $K_D$ )增加。

[0376] 实例4:FACS结合分析

[0377] A.XPA.85.012和XPA.85.017与CHOK1和CHO人类PTH1R细胞的结合

[0378] 为了评定XPA.85.012和XPA.85.017对人类PTH1R的抗体结合特异性,将过表达人类PTH1R的CHO细胞用于基于流动的分析中。XPA.85.012和XPA.85.017的结合数据分别显示在图3A和3B中。CHOK1亲本细胞也用作阴性细胞系。将细胞接种在具有浓度增加的抗体的96孔v形底板(Costar:马萨诸塞州沃尔瑟姆的飞世尔科技(Fisher Scientific,Waltham,MA))中。将细胞和抗体在4℃下温育30分钟。接着用FACS缓冲液(DPBS中的0.5%BSA+0.1%

NaN<sub>3</sub>) 洗涤两次,将细胞与R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>片段山羊抗人类IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch,宾夕法尼亚州西格罗夫(Grove,PA))在4℃下一起温育20分钟。将细胞洗涤两次并重悬于FACS缓冲液中。使用BD Cytometer(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学(BD Biosciences, San Jose, CA))获取样品,并使用FlowJo(FlowJo, LLC, 俄勒冈州阿什兰(Ashland, OR))和Prism(GraphPad Software, 加利福尼亚州拉荷雅(La Jolla, CA))分析数据。

[0379] B.XPA.85.012和XPA.85.017在PTH和PTHrP存在和不存在下的结合亲和力

[0380] 为了评定抗体与PTH1R配体的差异结合,在饱和浓度的PTH和PTHrP存在或不存在下,将浓度递增的抗PTH1R抗体与CHO人类PTH1R细胞一起温育60分钟。XPA.85.012和XPA.85.017的结合数据分别显示在图4A和4B中。接着用FACS缓冲液(DPBS中的0.5%BSA+0.1%NaN<sub>3</sub>)洗涤两次,将细胞与R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>片段山羊抗人类IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch,宾夕法尼亚州西格罗夫)在4℃下一起温育20分钟。然后将细胞洗涤两次并重悬于FACS缓冲液中。使用BD Cytometer(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学)获取样品,并使用FlowJo(FlowJo, LLC, 俄勒冈州阿什兰)和Prism(GraphPad Software, 加利福尼亚州拉荷雅)分析数据。

[0381] C.XPA.85.012和XPA.85.017的动力学(结合速率)

[0382] SPR数据显示XPA.85.012的结合速度比XPA.85.017快。开发了基于流动的分析以证实两种抗体的结合速率。首先,通过流式细胞术评定XPA.85.017的结合速率(图5A)。将浓度递增的XPA.85.017与CHO人类PTH1R细胞一起温育一定的时间量,即5分钟至24小时。XPA.85.012的抗体结合显示在图5B中。总之,XPA.85.012可以在1小时内结合,而XPA.85.017可能需要24小时来结合。除24小时样品外,所有时间点都同时停止。然后将细胞用FACS缓冲液(DPBS中的0.5%BSA+0.1%NaN<sub>3</sub>)洗涤两次,并与别藻蓝蛋白(APC)AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>片段山羊抗人类IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch,宾夕法尼亚州西格罗夫)在4℃下一起温育20分钟。在两次洗涤后,将细胞重悬于FACS缓冲液中。使用BD Cytometer(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学)获取样品,并使用FlowJo(FlowJo, LLC, 俄勒冈州阿什兰)和Prism(GraphPad Software, 加利福尼亚州拉荷雅)分析数据。

[0383] D. 评定抗PTH1R抗体的物种交叉反应性

[0384] 将过表达PTH1R的CHO K1直接同源和内源性细胞系用于评定物种的交叉反应性。自行产生CHO人类PTH1R和CHO小鼠PTH1R细胞,并且UMR106和Saos-2购自ATCC。UMR106和Saos-2两者都是分别表达大鼠和人类PTH1R的骨肉瘤细胞系。所有四种细胞系用于评定物种交叉反应性。

[0385] 筛选抗PTH1R抗体与表达PTH1R直接同源的细胞系的结合和在配体存在或不存在下的差异结合(PTH或PTHrP)。为了评定抗体结合和差异结合,在饱和浓度的PTH和PTHrP存在或不存在下,将浓度递增的抗PTH1R抗体与所有四种细胞系一起温育。显示在存在和不存在PTH(图6A)或PTHrP(图6B)的情况下,针对表达人类PTH1R的CHO细胞的XPA.85.017和XPA.85.012抗体的结合数据。显示在存在和不存在PTH(图6C)或PTHrP(图6D)的情况下,针对表达小鼠PTH1R的CHO细胞的XPA.85.017和XPA.85.012抗体的结合数据。

[0386] 将抗体和细胞温育24小时以使结合速率较慢的抗体XPA.85.017达到平衡。接着用FACS缓冲液(DPBS中的0.5%BSA +0.1%NaN<sub>3</sub>)洗涤两次,将细胞与藻红蛋白AffiniPure F

(ab')<sub>2</sub>片段山羊抗人类IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch,宾夕法尼亚州西格罗夫)在4℃下一起温育20分钟。然后将细胞洗涤两次并重悬于FACS缓冲液中。使用BD Cytometer(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学)获取样品,并使用FlowJo(FlowJo,LLC,俄勒冈州阿什兰)和Prism(GraphPad Software,加利福尼亚州拉荷雅)分析数据。

[0387] E.在PTH1R配体存在或不存在下,在平衡条件下亲和力成熟的XPA.85.017变体与CHOK1,即CHO人类PTH1R和CHO小鼠PTH1R的结合

[0388] 为了表征抗体与PTH1R的结合,用CellTrace™ CFSE或CellTrace™ Violet标记细胞。将未标记的CHOK1亲本、用CellTrace™ CFSE标记的CHO人类PTH1R和用CellTrace™ Violet标记的CHO小鼠PTH1R合并在一起并用浓度递增的抗体染色。将抗体在4℃温育24小时,然后用FACS缓冲液(0.5%BSA,在DPBS中的0.1%NaN<sub>3</sub>)洗涤两次。然后将细胞与别藻蓝蛋白(APC)AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>片段山羊抗人类IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch,宾夕法尼亚州西格罗夫)在4℃下一起温育20分钟。接着进行两次洗涤,将细胞重悬于FACS缓冲液中。使用BD Cytometer(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学)获取样品,并使用FlowJo(FlowJo,LLC,俄勒冈州阿什兰)和Prism(GraphPad Software,加利福尼亚州拉荷雅)分析数据。与CHO人类PTH1R和CHO小鼠PTH1R细胞结合的抗体的EC<sub>50</sub>值显示在表3中。评定所选XPA.85.017抗体变体对CHO人类和CHO小鼠PTH1R细胞的差异结合,并且当任一PTH1R配体存在时显示结合减少。在配体不存在下观察到较低的EC<sub>50</sub>值(表4)。

抗 PTHR 抗体	EC <sub>50</sub> [nM]	
	CHO 人类 PTHR	CHO 小鼠 PTHR
XPA.85.012	0.7926	0.8866
XPA.85.017	0.7183	1.047
XPA.85.287	0.04398	0.2163
XPA.85.335	0.2651	0.384
XPA.85.336	0.3416	14.71
XPA.85.337	1.265	3.273
XPA.85.338	0.1806	0.6804
XPA.85.339	0.1423	0.2338
XPA.85.340	0.1674	0.322
XPA.85.341	0.202	0.3425

[0390] 表3:在平衡条件下CHO人类PTH1R和CHO小鼠PTH1R细胞上的XPA.85.017变体EC<sub>50</sub>值。

抗 PTHR 抗体	EC <sub>50</sub> [nM]					
	CHO 人类 PTHR			CHO 小鼠 PTHR		
	单独的抗体	抗体+ 1 uM PTH	抗体+ 3 uM PTHrP	单独的抗体	抗体+ 1 uM PTH	抗体+ 3 uM PTHrP
XPA.85.017	0.5984	19.47	6.595	1.137	1.962	11.77
XPA.85.287	0.09091	1.865	0.3042	0.2808	0.2061	1.515
XPA.85.339	0.09841	2.984	0.4791	0.2575	0.3273	18.68
XPA.85.341	0.1956	5.387	1.109	0.3371	0.7778	14.46

[0392] 表4:所选XPA.85.017变体的差分结合谱。

[0393] F.亲和力成熟的XPA.85.012变体与CHOK1,即CHO人类PTH1R、CHO小鼠PTH1R, UMR106和Saos-2细胞的结合

[0394] 为了表征抗体与PTH1R的结合,用CellTrace™ CFSE或CellTrace™ Violet标记细

胞。将未标记的人类PTH1R、用CellTrace™ CFSE标记的CHOK1和Saos-2及用CellTrace™ Violet标记的CHO小鼠PTH1R和UMR106合并在一起并用浓度递增的抗体染色。将抗体在4℃下温育1小时,接着用FACS缓冲液(DPBS中的0.5%BSA,0.1%NaN<sub>3</sub>)洗涤两次。然后将细胞与别藻蓝蛋白(APC) AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>片段山羊抗人类IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch,宾夕法尼亚州西格罗夫)在4℃下一起温育20分钟。接着进行两次洗涤,将细胞重悬于FACS缓冲液中。使用BD Cytometer(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学)获取样品,并使用FlowJo(FlowJo,LLC,俄勒冈州阿什兰)和Prism(GraphPad Software,加利福尼亚州拉荷雅)分析数据。所有抗体都识别在CHO人类PTH1R、CHO小鼠PTH1R和UMR106上表达的PTH1R。这些抗体也不与CHOK1亲本和Saos-2细胞非特异性结合(表5)。

抗体	CHOK1	CHO 人类 PTH1R	CHO 小鼠 PTH1R	UMR106
XPA.85.288	-	+	+	+
XPA.85.326	-	+	+	+
XPA.85.327	-	+	+	+
XPA.85.331	-	+	+	+
XPA.85.332	-	+	+	+
XPA.85.333	-	+	+	+
XPA.85.334	-	+	+	+
XPA.85.342	-	+	+	+
XPA.85.343	-	+	+	+
XPA.85.344	-	+	+	+
XPA.85.345	-	+	+	+
XPA.85.346	-	+	+	+
XPA.85.347	-	+	+	+

[0397] 表5:XPA.85.012变体的FACS结合谱。(+)指示结合且(-)指示没有结合。

[0398] G. 过表达人类PTH1R的Saos-2细胞对人类PTH1R的抗体结合特异性

[0399] 为了证实抗PTH1R抗体的特异性,在两种配体,即PTH或PTHrP存在或不存在下,针对过表达人类PTH1R的Saos-2细胞筛选抗体(图7A-7C)。

[0400] H. 使用过表达人类PTH2R的CHO细胞评定PTH2R交叉反应性

[0401] 针对过表达人类PTH2R的CHO细胞筛选抗PTH1R抗体(XPA.85.328、XPA.85.329和XPA.85.330)以确定受体交叉反应性(图8)。PTH2R与PTH1R具有51%的同源性。为了证实仅针对PTH1R的抗PTH1R抗体结合特异性,将浓度递增的抗体与CHO人类PTH2R在4℃下一起温育1小时。在两次洗涤后,将细胞与别藻蓝蛋白(APC) AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>片段山羊抗人类IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch,宾夕法尼亚州西格罗夫)在4℃下一起温育20分钟。将细胞洗涤两次并重悬于FACS缓冲液中。使用BD Cytometer(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学)获取样品,并使用FlowJo(FlowJo,LLC,俄勒冈州阿什兰)和Prism(GraphPad Software,加利福尼亚州拉荷雅)分析数据。如图8所示,所有抗体都未显示与CHO人类PTH2R的结合(即对PTH2R没有交叉反应性),并且对PTH1R具有特异性。将抗KLH.G2用于结合的阴性对照。

[0402] 实例5:功能分析

[0403] A. cAMP积聚分析

[0404] 在大多数(如果不是全部)细胞类型中,PTH1R的活化导致腺苷酸环化酶的刺激和

细胞内cAMP通过与Gs偶联的积聚,接着是蛋白激酶A(PKA)的刺激。纯化的重新格式化的IgG的功能活性通过测量其通过抑制Gs/PKA途径来拮抗PTH1R介导的cAMP积聚的能力来进行常规测试。

[0405] 使人类PTH1R CHOK1克隆22和小鼠PTH1R CHOK1细胞在用于CHO细胞的含有4mM L-谷氨酰胺和0.4mg/ml遗传霉素(Life Technologies;马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技)的ExCell 302无血清培养基(密苏里州圣路易斯的西格玛)中生长。在实验当天,通过离心(1500rpm,在室温下3分钟)收获细胞。轻轻吸出生长培养基,并将细胞在无钙或无镁的杜尔贝科氏磷酸盐缓冲盐水(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)(DPBS;Life Technologies;马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技)中洗涤一次。然后将细胞在室温下以1500rpm的速度第二次旋转减速持续3分钟。轻轻吸出洗涤溶液,并将细胞重悬于分析缓冲液[含有0.1%BSA和1mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx;密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇)的DPBS]中。细胞使用Vi-CELL(印地安纳州印第安纳波利斯的贝克曼库尔特(Beckman Coulter, Indianapolis, IN))进行计数,并使用分析缓冲液调节至 $2.5 \times 10^6$ 个活细胞/ml或50,000个细胞/孔的密度。将20微升/孔的细胞分配到96孔、白色、平底、组织培养物经处理的分析板(康宁(Corning))中。将细胞与5 $\mu$ l的6X IgG在37°C下预温育30分钟。在预温育后,通过添加5 $\mu$ l的6X配体[PTH(1-34)或PTHrP(1-34)]在37°C下诱导cAMP积聚45分钟。使用用于生物试剂盒的HitHunter cAMP(DiscoverX,加利福尼亚州弗里蒙特(Fremont, CA))按照制造商的说明测量cAMP积聚。人类PTH(1-34)购自生物技术(Bio-Techne)(明尼苏达州明尼阿波利斯(Minneapolis, MN)),且人类PTHrP(1-34)从西格玛奥德里奇(密苏里州圣路易斯)获得。两种肽的储液都在含有0.1%BSA的DPBS中制备,进行等分并储存在-80°C下。使用含有0.1%BSA和1mM IBMx的DPBS制备配体和IgG稀释液。使用FlexStation 3(加利福尼亚州森尼韦尔的分子仪器(Molecular Devices, Sunnyvale, CA))测量化学发光信号。数据以相对发光单位(relative luminescence unit, RLU)表示。使用GraphPad Prism 6.0(GraphPad Software Inc.,加利福尼亚州圣地亚哥)进行曲线拟合。

[0406] 将人类PTH1R CHOK1克隆22细胞在37°C下与267nM(40 $\mu$ g/ml)的XPA.85.012(实心方块)或XPA.85.017(实心三角形)一起预温育30分钟,接着用浓度递增的PTH(1-34)(图9A)或PTHrP(1-34)(图9B)诱导。两种抗体都抑制配体介导的cAMP积聚(Gs/PKA途径)。

[0407] 在通过轻链改组对XPA.85.017(空心圆圈)进行亲和力工程化后,将稳定过表达人类(图10A和图10B)或小鼠PTH1R(图10C和图10D)的CHOK1细胞与267nM(40 $\mu$ g/ml)的变体IgG在37°C下一起预温育30分钟,接着用浓度递增的PTH(1-34)在37°C下诱导45分钟。变体IgG在人类和小鼠PTH1R处表现出对配体介导的cAMP积聚(Gs/PKA途径)的一系列抑制。

[0408] SaOS-2和UMR106细胞从ATCC(弗吉尼亚州马纳萨斯(Manassas, VA))获得。使SaOS-2细胞在含有15%热灭活的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Hyclone;马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技)的McCoy's 5A(改良的)培养基(Life Technologies;马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技)中生长。使UMR106细胞在含有4.5g/L D-葡萄糖,补充有10%热灭活的FBS、1mM丙酮酸钠(Life Technologies;马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技)和2mM L-谷氨酰胺的杜尔贝科氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)中生长。将SaOS-2细胞以50,000个细胞/孔的密度接种在96孔分析板中持续3天,然后在不含FBS但补充有1%BSA的培养基中进行血清饥饿过夜。将UMR106细胞以35,000个细

胞/孔的密度接种于96孔分析板中持续1天,然后在不含FBS但补充有1%BSA的培养基中进行血清饥饿过夜。如先前针对CHOK1细胞系所述来测量IgG对cAMP积聚的拮抗作用。

[0409] 通过轻链改组对XPA.85.017进行的亲和力工程化产生XPA.85.287。此变体显示出针对人类PTH1R(图11B,空心方块)与亲本(实心方块)的活性的显著改进,而针对大鼠PTH1R(图11C)的活性几乎没有变化。相反,XPA.85.012(实心三角形)的亲和力工程化产生变体XPA.85.288(空心三角形),显示出针对人类PTH1R(数据未显示)以及大鼠PTH1R两者的活性的显著改进。还发现XPA.85.288显著抑制表达天然人类PTH1R的SaOS-2细胞中的PTHrP诱发的cAMP(图11D)。

[0410] 在使用人类PTH1R CHOK1(图12A)和小鼠PTH1R CHOK1(图12B)细胞的cAMP分析中对PTHrP(1-34)和浓度递增的XPA.85.287(XPA.85.017的亲和力工程化变体)进行浓度反应曲线确定。使用GraphPad Prism 6.0(GraphPad Software Inc.,加利福尼亚州圣地亚哥)进行Schild回归分析,揭示浓度反应曲线的非平行向右移动。这些结果与变体IgG的非竞争性(变构)作用机制一致。

[0411] 在使用人类PTH1R CHOK1(图13A)和小鼠PTH1R CHOK1(图13B)细胞的cAMP分析中对PTHrP(1-34)和浓度递增的XPA.85.288(XPA.85.012的亲和力工程化变体)进行浓度反应曲线确定。使用GraphPad Prism 6.0(GraphPad Software Inc.,加利福尼亚州圣地亚哥)进行Schild回归分析,揭示浓度反应曲线的非平行向右移动。这些结果与变体IgG的非竞争性(变构)作用机制一致。

#### [0412] B. 钙动员分析

[0413] 一些细胞类型中的PTH1R活化导致Gq偶联、磷脂酶C $\beta$ 活化和膜相关的磷脂酰肌醇水解形成磷酸肌醇,使细胞内钙增加并使钙依赖性酶包括蛋白激酶C(PKC)活化。纯化的重新格式化的抗PTH1R IgG的功能活性通过测量其通过抑制Gq/PKC途径来拮抗PTH1R介导的钙动员的能力进行测试。

[0414] 使人类PTH1R CHOK1克隆22和小鼠PTH1R CHOK1细胞在用于CHO细胞的含有4mM L-谷氨酰胺和0.4mg/ml遗传霉素(Life Technologies,马萨诸塞州沃尔瑟姆)的ExCell 302无血清培养基(密苏里州圣路易斯的西格玛)中生长。将细胞以在100微升/生长培养基孔中的35,000个细胞/孔接种于96孔、黑色/透明底、组织培养物经处理的聚-D-赖氨酸包衣的分析板(Corning BioCoat;纽约州康宁(Corning, NY))上并在37°C [5%CO<sub>2</sub>, 95%相对湿度]下温育过夜。第二天,根据制造商的说明制备含有5mM丙磺舒(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇)的100微升/孔的2X Calcium 5上样染料(加利福尼亚州森尼韦尔的分子仪器)并进行添加,并将板在37°C下温育30分钟。在温育后,从每个孔中手动取出25微升上样染料/生长培养基,接着添加25 $\mu$ l 10X测试IgG(在含有20mM HEPES的1X HBSS中制备抗体稀释液)。然后将板在37°C下再放回温育箱中30分钟。此后,将分析板在室温下以1500rpm的速度离心3分钟。然后将板置于预热至37°C的FlexStation 3(加利福尼亚州森尼韦尔的分子仪器)中,以在分析前平衡5分钟。在添加50 $\mu$ l 5X配体(PTH(1-34)或PTHrP(1-34))之前,每秒记录基础荧光持续19秒。每秒记录荧光持续1分钟,然后每6秒再记录2分钟。数据表示为“最大-最小”,并且使用GraphPad Prism 6.0(GraphPad Software Inc.,加利福尼亚州圣地亚哥)进行曲线拟合。人类PTH(1-34)购自生物技术(明尼苏达州明尼阿波利斯),且人类PTHrP(1-34)从西格玛奥德里奇(密苏里州圣路易斯)获得。在含有0.1%BSA的DPBS中制备两种肽的

储液,进行等分并在-80℃下储存。

[0415] 将人类PTH1R CHOK1克隆22细胞在37℃下与267nM(40μg/ml)的XPA.85.012(实心方块)或XPA.85.017(实心三角形)一起预温育30分钟,接着用浓度递增的PTH(1-34)(图9C)或PTHrP(1-34)(图9D)诱导。两种抗体都抑制配体介导的钙动员(Gs/PKA途径)。

	cAMP 分析人类 PTH1R CHOK1 配体 EC50 (pM)		cAMP 分析小鼠 PTH1R CHOK1 配体 EC50 (pM)		cAMP 分析 SaOS-2 (内源性人类 PTH1R)配体 EC50 (pM)		cAMP 分析 UMR106 (内源性大鼠 PTH1R)配体 EC50 (pM)	
	PTH(1-34)	PTHrP(1-34)	PTH(1-34)	PTHrP(1-34)	PTH(1-34)	PTHrP(1-34)	PTH(1-34)	PTHrP(1-34)
仅载剂	30.7±7.7 (10)	61.4±18.1 (3)	30.6±10.8 (5)	43.1±17.8 (3)	524.5±130.5 (6)	698.7±128.8 (4)	646.6±210.6 (8)	333.2±68.3 (6)
[0416] XPA.85.017 (亲本)	140.6±49.9 (4) 5 倍变化	967.6±491.0 (3) 16 倍变化	2811.0±1097.1 (3) 91 倍变化	3742.3±1288.1 (3) 87 倍变化	797.8±202.4 (2) 无变化	ND	23820±5968.1 (4) 37 倍变化	7776.7±1052.0 (3) 23 倍变化
XPA.85.287	908.3±341.3 (4) 29 倍变化	52700 (1) >100 倍变化	13640 (1) >100 倍变化	5766 (1) >100 倍变化	78600±18179 (3) >100 倍变化	62200±21400 (3) 89 倍变化	66700±16628 (3) >100 倍变化	11590 (1) 35 倍变化
XPA.85.335	42.9±5.3 (2)	ND	4545 (1)	ND	ND	6412 (1)	ND	ND
XPA.85.336	18.1±8.4 (2)	ND	144.4 (1)	ND	ND	23580 (1)	ND	ND
XPA.85.337	107.2±44.9 (2)	ND	219.4 (1)	ND	ND	27080 (1)	2877 (1)	ND
[0417]	XPA.85.338	244.5±28.9 (2)	ND	1802 (1)	ND	32790 (1)	32950 (1)	7861 (1)
	XPA.85.339	612.8±140.6 (2)	ND	1952 (1)	ND	24768±10586 (3)	31450 (1)	7900±21 (2)
	XPA.85.340	403.5±15.9 (2)	ND	614.2 (1)	ND	4169 (1)	11850 (1)	8100 (1)
	XPA.85.341	403.9±175.5 (2)	ND	2147 (1)	ND	38100 (1)	62990 (1)	13740 (1)

[0418] 表6在通过轻链改组衍生自亲和力工程化的XPA.85.017(亲本)的变体IgG存在下,PTH(1-34)和PTHrP(1-34)的pM的EC50值在267nM(40μg/ml)下测试变体IgG,并在37℃下诱导45分钟之前将其在37℃下与细胞一起预温育30分钟。相对于“仅载剂”对照组中的配体的EC50计算配体EC50的倍数变化。括号中指示了实验数目。ND=未确定(Not Determined)。

[0419]

	cAMP 分析 1 $\mu$ M 配体下的 SaOS-2 (内源性人类 PTH1R) 抑制%		cAMP 分析 1 $\mu$ M 配体下的 UMR106 (内源性大鼠 PTH1R) 抑制%	
配体	PTH(1-34)	PTHrP(1-34)	PTH(1-34)	PTHrP(1-34)
XPA.85.012 (亲本)	ND	0 (1)	0 (1)	0 (1)
XPA.85.288	79 (2)	79 (1)	73 (2)	45 (1)
XPA.85.329	79 (1)	90 (1)	50 (1)	41 (1)
XPA.85.330	85 (1)	89 (1)	55 (1)	56 (1)
XPA.85.331	67 (1)	72 (1)	42 (1)	37 (1)
XPA.85.332	ND	ND	ND	ND
XPA.85.333	ND	ND	ND	ND
XPA.85.334	ND	ND	ND	ND
XPA.85.342	0 (2)	17 (1)	6 (1)	0 (1)
XPA.85.343	ND	ND	ND	ND
XPA.85.344	ND	ND	ND	ND
XPA.85.345	ND	ND	ND	ND
XPA.85.346	72 (1)	75 (1)	40 (1)	31 (1)
XPA.85.347	ND	ND	ND	ND

[0420] 括号中指示了实验数目

[0421] ND=未确定

[0422] 表7在通过轻链改组衍生自亲和力工程化的XPA.85.012(亲本)的变体IgG存在下,由1 $\mu$ M的PTH(1-34)或PTHrP(1-34)介导的cAMP积聚的抑制百分比。变体IgG在267nM或40 $\mu$ g/ml下进行测试,并且在37 $^{\circ}$ C下诱导cAMP积聚45分钟之前在37 $^{\circ}$ C下与细胞一起预温育30分钟。数据代表重复孔中的平均RLU。

[0423]

抗体名称	cAMP 分析人类 PTH1R CHOK1 PTHrP(1-34) IC50 (nM)	cAMP 分析人类 PTH1R CHOK1 PTH(1-34) IC50 (nM)	cAMP 分析小鼠 PTH1R CHOK1 PTHrP(1-34) IC50 (nM)	cAMP 分析小鼠 PTH1R CHOK1 PTH(1-34) IC50 (nM)
XPA.85.012 (亲本)	ND	ND	ND	ND
XPA.85.328	7.06	11.82	2.23	ND
XPA.85.329	6.54	16.55	2.66	ND
XPA.85.330	8.23	10.6	2.82	ND
XPA.85.331	8.86	14.21	3.2	ND
XPA.85.332	5.03	12.1	2.3	ND
XPA.85.333	5.61	11.43	2.04	ND
XPA.85.334	12.39	51.19*	3.32	ND
XPA.85.342	ND	ND	ND	ND
XPA.85.343	17.77	14.38	3.87	ND
XPA.85.344	15.28	15.53	3.89	ND
XPA.85.345	12.14	14.19	2.53	ND
XPA.85.346	14.57	29.85*	3.57	ND
XPA.85.347	Partial	Partial	2.9	ND

[0424] \*曲线未达到稳定水平

[0425] ND=未确定

[0426] 表8通过轻链改组衍生自亲和力工程化的XPA.85.012(亲本)的变体IgG的IC50值。变体IgG在一系列浓度(0-66.67nM或10 $\mu$ g/ml)下进行测试,并在37 $^{\circ}$ C下通过PTH(1-34)或



PTHrP (1-34) 诱导cAMP积聚45分钟之前在37℃下与细胞一起预温育30分钟。数据代表重复孔中的平均RLU。变体表现出配体介导的cAMP积聚的一系列拮抗作用,特别是对抗人类PTH1R。

[0427] C.Saos-2成骨细胞分泌M-CSF

[0428] PTH和PTHrP作用于成骨细胞和骨细胞中表达的PTH1R受体,以刺激巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor,M-CSF)的产生和核因子 $\kappa$ -B配体的受体活化剂(RANKL)表面表达。由这些骨细胞造成的M-CSF产生和RANKL表达的增加驱动骨再吸收破骨细胞的分化和活化,这导致钙从骨中流出和骨脱矿质的水平增加。这两种生长因子都是PTH/PTHrP介导的人破骨细胞分化和活化所必需的(Matsuzaki等,1999《内分泌学(Endocrinology)》140:925-32;Itoh等,《2000年骨与矿物研究杂志(2000 Journal of bone and mineral research)》:美国骨与矿物研究学会(American Society for Bone and Mineral Research)的官方杂志15:1766-75)。

[0429] 为了评定这些抗体抑制PTH或PTHrP刺激的破骨细胞生长因子分泌的能力,采用使用成骨细胞细胞系Saos-2的M-CSF分泌实验。

[0430] 使Saos-2细胞(ATCC,弗吉尼亚州马纳萨斯)在37℃、5%CO<sub>2</sub>和饱和湿度下在15% McCoy's 5A培养基(Life Technologies)中生长,其中15%FBS(Hyclone/GE生命科学(GE Life Sciences),犹他州洛根(Logan,UT))以50,000个细胞/孔接种到生长培养基中的96孔培养板中,并使所述FBS形成融合的单层持续48小时。然后用含有10%FBS的MEM- $\alpha$ (Life Technologies)替换培养基并将其再培养72至96小时。培养基被从孔中吸出,并在与上述相同的基于MEM- $\alpha$ 的培养基中用2X抗体治疗进行替换。在培养基中添加PTH(1-34)或PTHrP(1-36)肽稀释液之前,将抗体治疗在37℃下温育20至30分钟。在加入分析孔后,稀释配体以达到所示的最终浓度。对于配体滴定实验,最终抗体浓度为40 $\mu$ g/mL(267nM)。将平板放回温育箱中并在37℃下温育48小时。然后,通过遵循制造商的说明测量人类M-CSF(MesoScale Diagnostics,马里兰州罗克维尔(Rockville MD))的基于板的免疫分析法分析来自治疗孔的上清液,并在Sector Imager 6000(MesoScale Diagnostics)上读取。对于抗体滴定实验,遵循相同的方案,除了使用固定浓度的配体(12.5nM PTHrP(1-36))并改变抗体浓度之外。

[0431] 亲和力成熟的抗体证明了抑制PTH刺激的Saos-2细胞分泌M-CSF增加的能力。抗体XPA.85.287使PTH(1-34)剂量反应曲线移动约7倍(1.2nM至8.7nM)(图14A)。在单独的实验中,轻链变体XPA.85.288、XPA.85.346、XPA.85.331和XPA.327都使PTH(1-34)剂量反应曲线移动大于10倍(图14B)。

[0432] 亲和力成熟的轻链变体还抑制PTHrP介导的Saos-2细胞分泌的M-CSF增加。在40 $\mu$ g/mL的固定抗体浓度下,XPA.85.328、XPA.329和XPA.85.330将PTHrP(1-36)刺激的M-CSF分泌剂量反应抑制大于200倍(图15A)。在单独的实验中,将亲本克隆XPA.85.012和XPA.85.017分别与其亲和力成熟的变体XPA.85.288和XPA.85.287进行比较。亲和力成熟的克隆显示出对PTHrP诱发的M-CSF分泌的显著抑制,而亲本克隆则没有(图15C)。还针对12.5nM的固定PTHrP(1-36)浓度评估了此效应的抗体剂量反应。XPA.85.328、XPA.329和XPA.85.330完全中和由12.5nM PTHrP治疗诱发的M-CSF产生,其中EC50分别为6.6nM、4.0nM和1.5nM(图15B)。

[0433] D. ERK磷酸化

[0434] MAPK (丝裂原活化蛋白激酶) ERK1/2 (细胞外信号调节激酶) 在配体刺激PTH1R后被磷酸化和活化。此途径活化代表了需要来自G蛋白介导的腺苷酸环化酶途径和 $\beta$ -抑制蛋白 ( $\beta$ -Arrestin) 介导途径两者的输入的会聚信号事件, 并且已被证明是肾钙转运所必需的 (Gesty-Palmer等, 2006 JBC 281:10856-64; Sneddon等, 2000《内分泌学》141:4185-93)。

[0435] 为了确定抗PTH1R抗体调节MAPK途径的能力, 进行了评估其在Thr202/Tyr204; Thr185/Tyr187处抑制PTH和PTHrP介导的ERK1/2磷酸化的能力的实验。

[0436] 将CHO-PTH1R细胞在具有0.5% BSA (西格玛) 的RPMI 1640 (Life Technologies) 中以 $1 \times 10^6$ 个细胞/毫升进行血清饥饿, 并在37°C和5% CO<sub>2</sub>下在振动平台上温育过夜。第二天, 将细胞在分析缓冲液 (PBS+0.5% BSA) 中以每孔100,000个细胞的密度接种到96孔U形底板中。随后, 将在分析缓冲液中稀释至400nM (2X-60 $\mu$ g/mL) 的每孔50 $\mu$ L的抗体加入细胞中。在37°C下温育10分钟后。将25微升/孔的稀释配体 (最终浓度为4X) 加入含有细胞和抗体的孔中, 并在37°C下温育5分钟。然后, 每孔加入100 $\mu$ L的冷PBS以终止反应。将板在4°C下离心3分钟并去除培养基。然后将80 $\mu$ L冰冷的MSD裂解缓冲液加入细胞中并重悬浮。将板在4°C下在振动平台上温育1小时以完全裂解细胞。按照制造商的说明使用MSD全细胞裂解物Phospho-ERK1/2试剂盒 (MesoScale Diagnostics目录号K11107D-1) 测量总的和磷酸化的ERK, 并在Sector Imager 6000 (MesoScale Diagnostics) 上读取。通过使用GraphPad Prism version 6.05 (GraphPad, 加利福尼亚州圣地亚哥) 中的S形剂量反应方程的非线性回归对曲线进行拟合。

[0437] 抗体XPA.85.012使PTH (1-34) 诱发的ERK1/2磷酸化的EC<sub>50</sub>增加了约9倍 (3.8nM至34.6nM) (图16A), 并且使PTHrP (1-34) 诱发的ERK1/2磷酸化的EC<sub>50</sub>增加了大约6倍 (EC<sub>50</sub>为10.6nM至62.5nM) (图16B)。抗体XPA.85.017使PTH (1-34) 诱发的ERK磷酸化的EC<sub>50</sub>增加了超过100倍 (3.8nM至>500nM) (图16A), 并且使PTHrP (1-34) 的EC<sub>50</sub>增加了大约80倍 (EC<sub>50</sub>为10.6nM至887nM) (图16B)。

[0438] 实例6: 可制造性改进

[0439] A. 评估所选抗体候选物的V区序列

[0440] 使用Human Engineering软件 (HE<sup>TM</sup>, 美国专利第5,766,886号) 评估所选抗体候选物的轻链和重链V区氨基酸序列的“非人类”氨基酸的存在, 并使用生物信息学软件评估N-连接的聚糖、氧化和脱酰胺信号。基于这些针对某些抗体的分析, 氨基酸变化通过位点定向诱变或基因合成来并入。

[0441] B. 所选抗体候选物的CHO-K1可制造性评定

[0442] 使用CHO-K1细胞中的瞬时表达来评估多抗体的可制造性。

[0443] 将编码轻链和重链V区的DNA分别克隆到含有抗体信号序列和轻链 (LC) 或重链 (HC) 恒定区的瞬时表达质粒中, 并转染到深孔96孔板中的悬浮适应CHO-K1细胞中。在1:1、2:1、4:1和1:2的LC:HC质粒比 (按重量比) 为测试表达质粒, 其中每次转染中的DNA量通过添加空质粒DNA来保持恒定。对每种抗体进行重复转染。将两种对照抗体, 即XB10和XE17分别包括作为高表达和低表达的对照。在转染后, 将板在CO<sub>2</sub>温育箱中的振动器平台上温育7天, 其中转染后24小时温度从37°C转变成32°C。使用具有蛋白A传感器尖端的Octet仪器分析上清液的抗体滴度。

[0444] 使用此分析评估所选抗体候选物的表达。基于对一些抗体观察到的结果,对编码HC和LC V区的DNA序列以及信号序列进行优化以在CHO细胞中表达(GeneArt)。然后重新测试优化的抗体的可制造性。在进行表达优化的情况下,虽然DNA序列不同,但轻链和重链V区的氨基酸序列保持相同,除非Human Engineering分析指示需要氨基酸改变。具有优化的DNA序列的抗体显示在表9B中。

[0445] 表9A.XPA.85.287、XPA.85.339、XPA.85.340和XPA.85.341

HC:LC 比	相对于 XB10 的滴度 (重复转染的平均结果)					
	XB10	XE17	XPA.85.287	XPA.85.339	XPA.85.340	XPA.85.341
<b>1:1</b>	<b>100</b>	<b>21</b>	49	50	77	71
<b>1:2</b>	51	15	<b>97</b>	<b>60</b>	<b>83</b>	<b>74</b>
<b>1:4</b>	17	8	47	16	62	19
<b>2:1</b>	40	6	16	16	21	17

[0447] 表9B.XPA.85.288、XPA.85.326和XPA.85.327及其表达优化的版本,XPA.85.328、XPA.85.329和XPA.85.330。

HC:L C 比	相对于 XB10 的滴度 (重复转染的平均结果)							
	XB10	XE17	原始 XPA.8 5.288	优化的 XPA.8 5.328	原始 XPA.8 5.326	优化的 XPA.8 5.329	原始 XPA.8 5.327	优化的 XPA.8 5.330
<b>1:1</b>	<b>100</b>	26	7	<b>78</b>	25	87	19	<b>125</b>
<b>1:2</b>	55	<b>30</b>	<b>14</b>	59	<b>86</b>	<b>91</b>	<b>75</b>	101
<b>1:4</b>	39	21	7	26	37	37	49	58
<b>2:1</b>	84	9	1	23	7	24	4	16

[0449] 表9C.XPA.85.331、XPA.85.332、XPA.85.333和XPA.85.334

HC:LC 比	相对于 XB10 的滴度 (重复转染的平均结果)					
	NXB1 0	NXE1 7	(XPA.85.3 31)	(XPA.85.3 32)	(XPA.85.3 33)	(XPA.85.3 34)
<b>1:1</b>	<b>100</b>	<b>29</b>	33	28	37	19
<b>1:2</b>	71	20	<b>75</b>	<b>68</b>	<b>98</b>	<b>28</b>
<b>1:4</b>	13	8	26	37	42	9
<b>2:1</b>	40	8	6	5	6	2

[0452] 表9.亲和力成熟的抗PTH1R抗体的CHO-K1可制造性评定结果。报告的值是相对于“高表达”对照抗体,即在1:1LC:HC比下设定为100的XB10的表达的。最高表达以粗体突出显示。对三种抗体进行表达优化。

[0453] 对于亲和力成熟的抗体XPA.85.287、XPA.85.339、XPA.85.340和XPA.85.341,在HC:LC比为1:2时观察到最高表达(表9A)。尽管在HC:LC比为1:1时的表达低于1:2时的表达,但在1:1比下达到的水平对于细胞系发育来说是可接受的。其它三种亲和力成熟的抗体,即XPA.85.288、XPA.85.326和XPA.85.327在1:1的HC:LC比下表现出非常低的表达。在V区DNA序列的表达优化后,对于所有这三种抗体,尤其是在HC:LC比为1:1时,观察到表达的显著改进。XPA.85.328(XPA.85.288的优化版本)显示相对于XPA.85.288增加了>10倍。XPA.85.329

(XPA.85.326的优化版本)显示相对于XPA.85.326增加了~3.5倍,且XPA.85.330(XPA.85.327的优化版本)显示相对于XPA.85.327增加了~6.5倍(表9B)。

[0454] 还评估了另外四种亲和力成熟的抗体,即XPA.85.331、XPA.85.332、XPA.85.333和XPA.85.324的CHO可制造性。所有四种抗体在HC:LC比为1:1时都显示出低表达,其≤表达较差的XE17抗体的表达(表9C)。在HC:LC比为1:2时,表达高出2-2.5倍。XPA.85.334表达降至低于此分析中的最低可接受水平以有资格启动细胞系开育而无需进一步改进表达。

[0455] 实例7:测量抗PTH1R受体抗体的体内作用

[0456] A. 甲状腺上皮小体摘除术(TPTx)模型

[0457] 在原发性甲状旁腺功能亢进症(关于PTH)和恶性肿瘤体液性高钙血症(关于PTHrP的HHM)的体内模型中对被发现与大鼠PTH1R交叉反应的抗人类PTH1R受体抗体进行测试。在甲状腺上皮小体摘除术(TPTx)模型中,内源性钙离子肽激素、PTH和降钙素的作用通过手术去除斯泼累格·多雷(SD)雄性大鼠(罗利的查尔斯河实验室(Charles River Laboratories, Raleigh))中的甲状腺和甲状旁腺来消除。然后在严格控制的设定中获得低术后血清钙水平。在麻醉下皮下植入甲状腺颗粒(L-甲状腺素T4,0.25mg;缓慢释放60天;美国创新研究(Innovative Research of America))。然后将颈静脉插管以连续输注PTH(1-34)(1.25微克/千克/小时,速度为1毫升/千克/小时)6小时。使用此模型以评估PTH1R抗体影响由PTH(1-34)静脉内输注诱发的血清钙水平升高的能力。

[0458] 为了确定抗PTH1R受体抗体是否能降低PTH(1-34)诱发的血清钙水平升高,在开始PTH(1-34)输注前18小时,用抗体XPA.85.017(Ab017)、XPA.85.287(Ab287)、XPA.85.288(Ab288)和BM2(抗PTH抗体)或同种型对照(15mg/kg)对斯泼累格·多雷(SD)雄性大鼠(n=5-6只/组)进行静脉内攻击(图17)。

[0459] 抗PTH抗体基于Abgenix的抗体ID#183(美国专利第US7,318,925B2号。对重链(HC)和轻链(LC)V区序列进行表达优化以在CHO细胞中产生,并与适当的限制性位点合成以进行克隆(GeneArt)。将DNA克隆到含有信号序列和LC或HC恒定区的瞬时表达质粒中。每个HC或LC都受人类CMV(hCMV)启动子和小鼠轻链3'非翻译区的控制。表达质粒还含有埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)复制起点,以允许在含有埃-巴二氏病毒核抗原的细胞系中复制。将使用Expi293表达系统(Life Technologies,加利福尼亚州卡尔斯巴德)的瞬时表达用于产生抗PTH抗体以进行体外和体内研究。抗体纯化在Aragen Bioscience(加利福尼亚州摩根山丘(Morgan Hill, CA))处进行。

[0460] 在给药前(基线)、输注前(T0)、输注开始后2、4和6小时测量血清钙。经最初的4小时输注,同种型组中的总钙水平上升。在接受Ab287的大鼠中,钙水平与同种型对照组的水平相当。接受Ab017的大鼠的钙水平略有下降。与同种型对照相比,接受BM2和Ab288的大鼠在整个输注期间具有显著较低水平的钙。

[0461] B. hPTH(1-34)输注模型

[0462] 为了进一步评估抗PTH1R受体抗体对钙血控制的影响,在正常的斯泼累格·多雷大鼠(Harlan)中持续皮下输注(Alzet微型泵,2ML1;10微升/小时,10微克/千克/天)hPTH(1-34)持续7天,以模拟患有甲状旁腺功能亢进症的患者中的PTH分泌过多。测量钙作为生物标志物,以评定泵植入后24小时由单次静脉内施用Ab288(2或10mg/kg;n=5只/组)、BM2(10mg/kg;n=5)或同种型对照(10mg/kg,n=2)所引起的体内中和(图18)。

[0463] 测量泵植入前(给药前),泵植入后24小时、27小时(给药后3小时)、48小时、72小时、96小时、120小时、144小时和168小时的血清钙。经最初的72小时输注,同种型组中的总钙水平上升。与同种型对照相比,接受BM2和Ab288(2和10mg/kg)的大鼠在给药后24小时和整个输注期间具有显著较低水平的钙:对2mg/kg Ab288的血清钙水平的影响与对10mg/kg BM2的血清钙水平的影响相当。10mg/kg Ab288产生显著的低钙血作用(图18A)。

[0464] 在类似的研究中测试抗体,即Ab328、Ab329和Ab330(2mg/kg IV),其中测量泵植入前(给药前),泵植入后24小时、27小时(给药后3小时)、48小时、72小时、96小时和120小时的血清钙。所有抗体都在给药后24小时和整个输注期间显著降低钙水平,其中Ab288和Ab328产生最显著的总血清钙水平降低(图18B)。

[0465] C.hPTHrP(1-36)输注模型

[0466] 类似地,通过在正常的斯泼累格·多雷大鼠(Harlan)中持续皮下输注(Alzet微型泵,型号2ML1;10微升/小时,100微克/千克/天)hPTHrP(1-36)持续6天,以模拟患有甲状旁腺功能亢进症的患者中的高钙血症,来评定抗PTH1R受体抗体对抑制PTHrP活性的影响。测量钙作为生物标志物,以评定泵植入后24小时由单次静脉内施用Ab288(2或10mg/kg;n=4只/组)、抗-PTHrP抗体MCB1.1(10mg/kg;n=5)或同种型对照(10mg/kg,n=3)所引起的体内中和。

[0467] 抗PTHrP抗体重链和轻链V区序列基于Onuma等,《抗癌研究(Anticancer Research)》24:2665-2674,2004。对重链(HC)和轻链(LC)V区序列进行表达优化以在CHO细胞中产生,并与适当的限制性位点合成(GeneArt),以克隆到含有信号序列和LC或HC恒定区的瞬时表达质粒中。每个HC或LC都受人类CMV(hCMV)启动子和小鼠轻链3'非翻译区的控制。表达质粒还含有埃-巴二氏病毒复制起点,以允许在含有埃-巴二氏病毒核抗原的细胞系中复制。将使用Expi293表达系统(Life Technologies,加利福尼亚州卡尔斯巴德)的瞬时表达用于产生抗PTHrP抗体以进行体外和体内研究。抗体纯化在Aragen Bioscience(加利福尼亚州摩根山丘)处进行。

[0468] 测量泵植入前(给药前),泵植入后24小时、26小时(给药后2小时)、48小时、72小时、96小时、120小时和144小时的血清钙(图19A)。测量泵植入前(给药前),泵植入后26小时(给药后2小时)、48小时、96小时和144小时的体重(图19B)。

[0469] 经最初的48小时输注,同种型组中的总钙水平上升。与同种型对照相比,接受MCB1.1和Ab288(2和10mg/kg)的大鼠在给药后24小时具有显著较低水平的钙。在Ab288(2和10mg/kg)的整个输注期间,这些较低的钙水平持续存在。2mg/kg Ab288对血清钙水平的影响比10mg/kg MCB1.1对血清钙水平的影响更明显。Ab288(10mg/kg)产生显著的低钙血作用。PTHrP(1-36)输注引起由Ab288(2和10mg/kg)预防的体重减轻。

[0470] 这表明抗PTH1R抗体可能具有健康益处并可能预防恶病质,所述恶病质是一种导致严重的体重减轻的脂肪和骨骼肌组织的消耗病症。

[0471] 试验研究已表明,输注一定剂量的PTH和PTHrP可使血清钙水平高于与死亡相关的14mg/dL。用抗PTH1R抗体治疗可以预防高钙血症(>14mg/dL),且因此可以预防HHM的死亡率(存活益处)。

[0472] D.肿瘤模型

[0473] 为了确定抗PTH1R受体抗体是否能降低肿瘤诱发的血清钙水平升高,在发现三个

不同肿瘤模型(分别为小鼠结肠C26、人类前列腺PC-3和人类肺癌HARA-B)中的血清钙升高之后,用抗体XPA.85.328 (Ab328) (10mg/kg)对6周龄CDF1雌性小鼠或无胸腺裸鼠(Athymic Nude) (NCr-nu/nu)进行静脉内攻击。培养相应的细胞,并且当获得所需数目的细胞时,在每只小鼠的右腹侧SC注射在0.1mL无血清培养基中的五百万( $5 \times 10^6$ )个C26细胞、1000万( $1 \times 10^7$ )个PC-3细胞或1000万( $1 \times 10^7$ )个HARA-B细胞。定期测量血清钙直到观察到高钙血症(>12mg/dL),通常为当肿瘤>1000mg时。然后用Ab328 10mg/kg iv治疗小鼠,并且在HARA-B模型中,用10mg/kg iv的同种型(阴性对照;抗KLH G2)治疗肿瘤>1g的单独一组小鼠,并确定给药后24小时的总钙水平。

[0474] 在所有三项试验研究中,用抗PTH1R抗体Ab328治疗使肿瘤诱发的高钙血症减少>3mg/dL,表明抗PTH1R抗体也可用于治疗其中肿瘤导致受试者的体内钙水平升高的癌症。

[0475] 抗PTH1R mAb,即XPA.85.349对小鼠结肠26肿瘤相关的高钙血症的疗效

[0476] 在肿瘤相关的高钙血症的小鼠结肠26模型中评估XPA.85.349 (Ab349),即XPA.85.288的表达优化的变体。在此研究中使用六周龄CDF1雌性小鼠或无胸腺裸鼠(NCr-nu/nu)。培养结肠26小鼠结肠肿瘤细胞,并在每只小鼠的右腹侧皮下注射在0.1mL无血清培养基中的七百五十万个细胞( $7.5 \times 10^6$ ),即C26细胞。定期测量血清钙直到观察到高钙血症(>12mg/dL),通常为当肿瘤>1000mg时。然后用2或6mg/kg的Ab349对小鼠进行静脉内治疗,并用6mg/kg的同种型(阴性对照;抗KLH G2)对肿瘤>1000mg的单独一组小鼠进行静脉内治疗。收集治疗前,治疗后24小时、48小时和72小时的肿瘤重量和血清样品。确定治疗后24小时、48小时、72小时和120小时的总钙水平。使用椭圆球( $1 \times w^2$ )/2= $\text{mm}^3$ 的方程计算肿瘤重量(mg),其中1和w是指每次测量时收集的较大和较小尺寸并假定单位密度( $1\text{mm}^3=1\text{mg}$ )。

[0477] 发现抗-PTH1R Ab349在给药后长达120小时的持续时段内有效地降低小鼠结肠26肿瘤相关的高钙血症(即显著降低总血清钙)(图20A)。在此肿瘤模型中,Ab349能够在24小时内完全逆转高钙血症。给药后长达120小时,施用Ab349对体重(图20B)或肿瘤重量(图20C)没有显著影响。

[0478] 在将Ab349抗体给药后的不同时间点下测量血清中PTHrP和PTH的水平。在高钙血症t0时期以2和6mg/kg静脉内施用抗体(n=2-6只小鼠/组)。在施用后24、48、72和120小时从眼眶后窦收集血样,并测量PTHrP(菲尼克斯医药公司(Phoenix Pharmaceuticals, Inc)-EI试剂盒,目录号:EK-056-04)和小鼠PTH 1-84 (QUIDEL小鼠PTH 1-84ELISA试剂盒,目录号:60-2305)的浓度。如图20D所示,在携带肿瘤的小鼠中血清PTHrP升高,并且尽管用Ab349治疗似乎没有显著改变PTHrP水平,但Ab349确实抑制PTHrP活性。然而,相反,用2或6mg/kg Ab349治疗在给药后长达120小时使PTH水平显著增加(图20E)。

[0479] 通过酶联免疫吸附分析(ELISA)进行血清药物浓度(serum drug concentration, SDC)测量。如下进行ELISA分析,用PBS中的1 $\mu\text{g/mL}$ 山羊抗人类Fc包衣ELISA板,在室温下用PBS/0.05% tween/1% BSA将板封闭1-4小时。添加PBS/tween/BSA中各种稀释度的血清样品,并将其在37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育1小时(在最后5分钟内,添加0.2 $\mu\text{g/mL}$ 生物素SP-缀合的山羊抗人类IgG(Fab'))。随后用PBS/tween对板进行冲洗,在室温下将其与1x DEA缓冲液中的Pierce对硝基苯磷酸二钠盐(pNPP)一起温育1小时。通过添加1N NaOH终止比色反应。在分光光度计上读取405nm下的板。SDC测量显示经120小时的时段Ab349正常排泄。

[0480] 进行几次药代动力学测量以在静脉内注射后创建Ab349的药代动力学特征。向

CDF1雌性小鼠施用2mg/kg或6mg/kg Ab349的单剂量大药丸。在施用Ab349后24、48、72和120小时从眼眶后窝收集血样,并通过ELISA测量其浓度。使用WinNonlin分析数据。2或6mg/kg Ab349后的药代动力学参数显示在(表10)中。当以6mg/kg给予时,Ab349显示在小鼠中具有高达48小时的半衰期。

[0481] 表10.Ab349的pK参数

[0482]

时间(小时)	2mg/kg	6mg/kg	
Co	7.2	47.8	ug/ml
AUCIast	414	1832	微克*小时/毫升
AUCinf	438	2116	"
t1/2	26	48	小时
Vz	172	195	ml/kg
Cl	4.6	2.8	毫升/小时/千克

[0483] 总之,这种高效PTH1R受体拮抗剂抗体有可能成为包括甲状旁腺功能亢进症、恶性肿瘤体液性高钙血症和可能的在一些癌症中见到的PTHrP介导的恶病质在内的多种适应症中的有价值的治疗剂。此外,Ab349抗体可以<2mg/kg、最大剂量<6mg/kg和延长的作用持续时间(即持续时间长于半衰期)有效地治疗高钙血症模型。

[0484] 预计本领域技术人员将想到在以上说明性实例中阐述的本公开的许多修改和变化。因此,只有如在所附权利要求中出现的此类限制才应放在本公开上。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 佐马美国有限公司
[0003]	<120> 甲状旁腺激素受体1 (PTH1R) 抗体和其用途
[0004]	<130> 27129/50986 PC
[0005]	<150> US 62/479,637
[0006]	<151> 2017-03-31
[0007]	<150> US 62/432,338
[0008]	<151> 2016-12-09
[0009]	<150> US 62/369,745
[0010]	<151> 2016-08-01
[0011]	<160> 260
[0012]	<170> PatentIn 3.5版本
[0013]	<210> 1
[0014]	<211> 123
[0015]	<212> PRT
[0016]	<213> 智人
[0017]	<400> 1
[0018]	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0019]	1 5 10 15
[0020]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0021]	20 25 30
[0022]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0023]	35 40 45
[0024]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
[0025]	50 55 60
[0026]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0027]	65 70 75 80
[0028]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0029]	85 90 95
[0030]	Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0031]	100 105 110
[0032]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0033]	115 120
[0034]	<210> 2
[0035]	<211> 123
[0036]	<212> PRT
[0037]	<213> 智人
[0038]	<400> 2



[0039]	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0040]	1 5 10 15
[0041]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0042]	20 25 30
[0043]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0044]	35 40 45
[0045]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
[0046]	50 55 60
[0047]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0048]	65 70 75 80
[0049]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0050]	85 90 95
[0051]	Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0052]	100 105 110
[0053]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0054]	115 120
[0055]	<210> 3
[0056]	<211> 123
[0057]	<212> PRT
[0058]	<213> 智人
[0059]	<400> 3
[0060]	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0061]	1 5 10 15
[0062]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0063]	20 25 30
[0064]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0065]	35 40 45
[0066]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
[0067]	50 55 60
[0068]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0069]	65 70 75 80
[0070]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0071]	85 90 95
[0072]	Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0073]	100 105 110
[0074]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0075]	115 120
[0076]	<210> 4
[0077]	<211> 123

[0078]	<212> PRT															
[0079]	<213> 智人															
[0080]	<400> 4															
[0081]	Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
[0082]	1				5					10					15	
[0083]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
[0084]				20				25						30		
[0085]	Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
[0086]			35					40					45			
[0087]	Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
[0088]		50					55					60				
[0089]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0090]	65					70				75					80	
[0091]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0092]				85					90					95		
[0093]	Ala	Arg	Gly	Tyr	Val	Val	Ala	Arg	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
[0094]				100					105					110		
[0095]	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser					
[0096]			115					120								
[0097]	<210> 5															
[0098]	<211> 123															
[0099]	<212> PRT															
[0100]	<213> 智人															
[0101]	<400> 5															
[0102]	Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
[0103]	1				5					10					15	
[0104]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
[0105]				20				25						30		
[0106]	Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
[0107]			35					40					45			
[0108]	Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
[0109]		50					55					60				
[0110]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0111]	65					70				75					80	
[0112]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0113]				85					90					95		
[0114]	Ala	Arg	Gly	Tyr	Val	Val	Ala	Arg	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
[0115]				100					105					110		
[0116]	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser					

[0117]	115	120
[0118]	<210> 6	
[0119]	<211> 123	
[0120]	<212> PRT	
[0121]	<213> 智人	
[0122]	<400> 6	
[0123]	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
[0124]	1 5 10 15	
[0125]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	
[0126]	20 25 30	
[0127]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0128]	35 40 45	
[0129]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
[0130]	50 55 60	
[0131]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0132]	65 70 75 80	
[0133]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0134]	85 90 95	
[0135]	Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
[0136]	100 105 110	
[0137]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser	
[0138]	115 120	
[0139]	<210> 7	
[0140]	<211> 123	
[0141]	<212> PRT	
[0142]	<213> 智人	
[0143]	<400> 7	
[0144]	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
[0145]	1 5 10 15	
[0146]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	
[0147]	20 25 30	
[0148]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0149]	35 40 45	
[0150]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
[0151]	50 55 60	
[0152]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0153]	65 70 75 80	
[0154]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0155]	85 90 95	

[0156]	Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0157]	100 105 110
[0158]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0159]	115 120
[0160]	<210> 8
[0161]	<211> 123
[0162]	<212> PRT
[0163]	<213> 智人
[0164]	<400> 8
[0165]	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0166]	1 5 10 15
[0167]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0168]	20 25 30
[0169]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0170]	35 40 45
[0171]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
[0172]	50 55 60
[0173]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0174]	65 70 75 80
[0175]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0176]	85 90 95
[0177]	Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0178]	100 105 110
[0179]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0180]	115 120
[0181]	<210> 9
[0182]	<211> 123
[0183]	<212> PRT
[0184]	<213> 智人
[0185]	<400> 9
[0186]	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0187]	1 5 10 15
[0188]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0189]	20 25 30
[0190]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0191]	35 40 45
[0192]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
[0193]	50 55 60
[0194]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

[0195]	65					70						75					80
[0196]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
[0197]						85						90					95
[0198]	Ala	Arg	Gly	Tyr	Val	Val	Ala	Arg	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
[0199]						100						105					110
[0200]	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser						
[0201]						115						120					
[0202]	<210>	10															
[0203]	<211>	123															
[0204]	<212>	PRT															
[0205]	<213>	智人															
[0206]	<400>	10															
[0207]	Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
[0208]	1					5						10				15	
[0209]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
[0210]						20						25				30	
[0211]	Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
[0212]						35						40				45	
[0213]	Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
[0214]						50						55				60	
[0215]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
[0216]	65						70					75					80
[0217]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
[0218]						85						90					95
[0219]	Ala	Arg	Gly	Tyr	Val	Val	Ala	Arg	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
[0220]						100						105					110
[0221]	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser						
[0222]						115						120					
[0223]	<210>	11															
[0224]	<211>	123															
[0225]	<212>	PRT															
[0226]	<213>	智人															
[0227]	<400>	11															
[0228]	Gln	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
[0229]	1					5						10				15	
[0230]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
[0231]						20						25				30	
[0232]	Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
[0233]						35						40				45	

[0234]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
[0235]	50 55 60
[0236]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0237]	65 70 75 80
[0238]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0239]	85 90 95
[0240]	Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0241]	100 105 110
[0242]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0243]	115 120
[0244]	<210> 12
[0245]	<211> 123
[0246]	<212> PRT
[0247]	<213> 智人
[0248]	<400> 12
[0249]	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0250]	1 5 10 15
[0251]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0252]	20 25 30
[0253]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0254]	35 40 45
[0255]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
[0256]	50 55 60
[0257]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0258]	65 70 75 80
[0259]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0260]	85 90 95
[0261]	Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0262]	100 105 110
[0263]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0264]	115 120
[0265]	<210> 13
[0266]	<211> 123
[0267]	<212> PRT
[0268]	<213> 智人
[0269]	<400> 13
[0270]	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0271]	1 5 10 15
[0272]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

[0273]	20	25	30
[0274]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[0275]	35	40	45
[0276]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
[0277]	50	55	60
[0278]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0279]	65	70	75
[0280]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0281]	85	90	95
[0282]	Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
[0283]	100	105	110
[0284]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
[0285]	115	120	
[0286]	<210> 14		
[0287]	<211> 123		
[0288]	<212> PRT		
[0289]	<213> 智人		
[0290]	<400> 14		
[0291]	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
[0292]	1	5	10
[0293]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0294]	20	25	30
[0295]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[0296]	35	40	45
[0297]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
[0298]	50	55	60
[0299]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0300]	65	70	75
[0301]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0302]	85	90	95
[0303]	Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
[0304]	100	105	110
[0305]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
[0306]	115	120	
[0307]	<210> 15		
[0308]	<211> 123		
[0309]	<212> PRT		
[0310]	<213> 智人		
[0311]	<400> 15		

[0312]	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0313]	1 5 10 15
[0314]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0315]	20 25 30
[0316]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0317]	35 40 45
[0318]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
[0319]	50 55 60
[0320]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0321]	65 70 75 80
[0322]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0323]	85 90 95
[0324]	Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0325]	100 105 110
[0326]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0327]	115 120
[0328]	<210> 16
[0329]	<211> 123
[0330]	<212> PRT
[0331]	<213> 智人
[0332]	<400> 16
[0333]	Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0334]	1 5 10 15
[0335]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0336]	20 25 30
[0337]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0338]	35 40 45
[0339]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
[0340]	50 55 60
[0341]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0342]	65 70 75 80
[0343]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0344]	85 90 95
[0345]	Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0346]	100 105 110
[0347]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0348]	115 120
[0349]	<210> 17
[0350]	<211> 123



[0351] <212> PRT  
 [0352] <213> 智人  
 [0353] <400> 17  
 [0354] Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 [0355] 1 5 10 15  
 [0356] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
 [0357] 20 25 30  
 [0358] Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0359] 35 40 45  
 [0360] Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 [0361] 50 55 60  
 [0362] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 [0363] 65 70 75 80  
 [0364] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0365] 85 90 95  
 [0366] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 [0367] 100 105 110  
 [0368] Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 [0369] 115 120  
 [0370] <210> 18  
 [0371] <211> 128  
 [0372] <212> PRT  
 [0373] <213> 智人  
 [0374] <400> 18  
 [0375] Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly  
 [0376] 1 5 10 15  
 [0377] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser  
 [0378] 20 25 30  
 [0379] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Leu Gln Trp Val  
 [0380] 35 40 45  
 [0381] Ser Ala Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Val Val  
 [0382] 50 55 60  
 [0383] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr  
 [0384] 65 70 75 80  
 [0385] Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0386] 85 90 95  
 [0387] Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
 [0388] 100 105 110  
 [0389] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

[0390]	115	120	125
[0391]	<210> 19		
[0392]	<211> 128		
[0393]	<212> PRT		
[0394]	<213> 智人		
[0395]	<400> 19		
[0396]	Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly		
[0397]	1 5 10 15		
[0398]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser		
[0399]	20 25 30		
[0400]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Leu Gln Trp Val		
[0401]	35 40 45		
[0402]	Ser Ala Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Val Val		
[0403]	50 55 60		
[0404]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr		
[0405]	65 70 75 80		
[0406]	Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0407]	85 90 95		
[0408]	Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly		
[0409]	100 105 110		
[0410]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
[0411]	115 120 125		
[0412]	<210> 20		
[0413]	<211> 128		
[0414]	<212> PRT		
[0415]	<213> 智人		
[0416]	<400> 20		
[0417]	Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly		
[0418]	1 5 10 15		
[0419]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser		
[0420]	20 25 30		
[0421]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Leu Gln Trp Val		
[0422]	35 40 45		
[0423]	Ser Ala Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Val Val		
[0424]	50 55 60		
[0425]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr		
[0426]	65 70 75 80		
[0427]	Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0428]	85 90 95		

[0429]	Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
[0430]	100 105 110
[0431]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0432]	115 120 125
[0433]	<210> 21
[0434]	<211> 128
[0435]	<212> PRT
[0436]	<213> 智人
[0437]	<400> 21
[0438]	Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
[0439]	1 5 10 15
[0440]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
[0441]	20 25 30
[0442]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Leu Gln Trp Val
[0443]	35 40 45
[0444]	Ser Ala Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Val Val
[0445]	50 55 60
[0446]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr
[0447]	65 70 75 80
[0448]	Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0449]	85 90 95
[0450]	Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
[0451]	100 105 110
[0452]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0453]	115 120 125
[0454]	<210> 22
[0455]	<211> 128
[0456]	<212> PRT
[0457]	<213> 智人
[0458]	<400> 22
[0459]	Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
[0460]	1 5 10 15
[0461]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
[0462]	20 25 30
[0463]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Leu Gln Trp Val
[0464]	35 40 45
[0465]	Ser Ala Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Val Val
[0466]	50 55 60
[0467]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr

[0468]	65				70				75				80			
[0469]	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0470]	85				90				95							
[0471]	Ala	Arg	Asp	Leu	Tyr	Gly	Ser	Tyr	Gly	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly
[0472]	100				105				110							
[0473]	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
[0474]	115				120				125							
[0475]	<210> 23															
[0476]	<211> 128															
[0477]	<212> PRT															
[0478]	<213> 智人															
[0479]	<400> 23															
[0480]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Arg	Pro	Gly	Gly
[0481]	1 5 10 15															
[0482]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Ser
[0483]	20				25				30							
[0484]	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Gln	Trp	Val
[0485]	35				40				45							
[0486]	Ser	Ala	Ile	Thr	Pro	Gly	Gly	Glu	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Val	Val
[0487]	50				55				60							
[0488]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr
[0489]	65				70				75				80			
[0490]	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0491]	85				90				95							
[0492]	Ala	Arg	Asp	Leu	Tyr	Gly	Ser	Tyr	Gly	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly
[0493]	100				105				110							
[0494]	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
[0495]	115				120				125							
[0496]	<210> 24															
[0497]	<211> 128															
[0498]	<212> PRT															
[0499]	<213> 智人															
[0500]	<400> 24															
[0501]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Arg	Pro	Gly	Gly
[0502]	1 5 10 15															
[0503]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Ser
[0504]	20				25				30							
[0505]	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Gln	Trp	Val
[0506]	35				40				45							

[0507]	Ser	Ala	Ile	Thr	Pro	Gly	Gly	Glu	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Val	Val
[0508]	50					55				60						
[0509]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr
[0510]	65					70				75					80	
[0511]	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0512]				85					90					95		
[0513]	Ala	Arg	Asp	Leu	Tyr	Gly	Ser	Tyr	Gly	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly
[0514]				100					105					110		
[0515]	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
[0516]				115				120					125			
[0517]	<210> 25															
[0518]	<211> 128															
[0519]	<212> PRT															
[0520]	<213> 智人															
[0521]	<400> 25															
[0522]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Arg	Pro	Gly	Gly
[0523]	1			5				10					15			
[0524]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Ser
[0525]				20				25					30			
[0526]	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Gln	Trp	Val
[0527]				35				40					45			
[0528]	Ser	Ala	Ile	Thr	Pro	Gly	Gly	Glu	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Val	Val
[0529]	50					55				60						
[0530]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr
[0531]	65					70				75					80	
[0532]	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0533]				85					90					95		
[0534]	Ala	Arg	Asp	Leu	Tyr	Gly	Ser	Tyr	Gly	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly
[0535]				100					105					110		
[0536]	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
[0537]				115				120					125			
[0538]	<210> 26															
[0539]	<211> 128															
[0540]	<212> PRT															
[0541]	<213> 智人															
[0542]	<400> 26															
[0543]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Arg	Pro	Gly	Gly
[0544]	1			5				10					15			
[0545]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Ser

[0546]	20	25	30
[0547]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Leu Gln Trp Val		
[0548]	35	40	45
[0549]	Ser Ala Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Val Val		
[0550]	50	55	60
[0551]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr		
[0552]	65	70	75
[0553]	Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0554]	85	90	95
[0555]	Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly		
[0556]	100	105	110
[0557]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
[0558]	115	120	125
[0559]	<210> 27		
[0560]	<211> 8		
[0561]	<212> PRT		
[0562]	<213> 智人		
[0563]	<400> 27		
[0564]	Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala		
[0565]	1	5	
[0566]	<210> 28		
[0567]	<211> 8		
[0568]	<212> PRT		
[0569]	<213> 智人		
[0570]	<400> 28		
[0571]	Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala		
[0572]	1	5	
[0573]	<210> 29		
[0574]	<211> 9		
[0575]	<212> PRT		
[0576]	<213> 智人		
[0577]	<400> 29		
[0578]	Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu		
[0579]	1	5	
[0580]	<210> 30		
[0581]	<211> 8		
[0582]	<212> PRT		
[0583]	<213> 智人		
[0584]	<400> 30		

[0585] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
[0586] 1 5  
[0587] <210> 31  
[0588] <211> 8  
[0589] <212> PRT  
[0590] <213> 智人  
[0591] <400> 31  
[0592] Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
[0593] 1 5  
[0594] <210> 32  
[0595] <211> 9  
[0596] <212> PRT  
[0597] <213> 智人  
[0598] <400> 32  
[0599] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu  
[0600] 1 5  
[0601] <210> 33  
[0602] <211> 8  
[0603] <212> PRT  
[0604] <213> 智人  
[0605] <400> 33  
[0606] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
[0607] 1 5  
[0608] <210> 34  
[0609] <211> 8  
[0610] <212> PRT  
[0611] <213> 智人  
[0612] <400> 34  
[0613] Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
[0614] 1 5  
[0615] <210> 35  
[0616] <211> 9  
[0617] <212> PRT  
[0618] <213> 智人  
[0619] <400> 35  
[0620] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu  
[0621] 1 5  
[0622] <210> 36  
[0623] <211> 8

[0624] <212> PRT  
[0625] <213> 智人  
[0626] <400> 36  
[0627] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
[0628] 1 5  
[0629] <210> 37  
[0630] <211> 8  
[0631] <212> PRT  
[0632] <213> 智人  
[0633] <400> 37  
[0634] Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
[0635] 1 5  
[0636] <210> 38  
[0637] <211> 9  
[0638] <212> PRT  
[0639] <213> 智人  
[0640] <400> 38  
[0641] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu  
[0642] 1 5  
[0643] <210> 39  
[0644] <211> 8  
[0645] <212> PRT  
[0646] <213> 智人  
[0647] <400> 39  
[0648] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
[0649] 1 5  
[0650] <210> 40  
[0651] <211> 8  
[0652] <212> PRT  
[0653] <213> 智人  
[0654] <400> 40  
[0655] Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
[0656] 1 5  
[0657] <210> 41  
[0658] <211> 9  
[0659] <212> PRT  
[0660] <213> 智人  
[0661] <400> 41  
[0662] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu



---

[0663]	1	5
[0664]	<210>	42
[0665]	<211>	8
[0666]	<212>	PRT
[0667]	<213>	智人
[0668]	<400>	42
[0669]	Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala	
[0670]	1	5
[0671]	<210>	43
[0672]	<211>	8
[0673]	<212>	PRT
[0674]	<213>	智人
[0675]	<400>	43
[0676]	Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala	
[0677]	1	5
[0678]	<210>	44
[0679]	<211>	9
[0680]	<212>	PRT
[0681]	<213>	智人
[0682]	<400>	44
[0683]	Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu	
[0684]	1	5
[0685]	<210>	45
[0686]	<211>	8
[0687]	<212>	PRT
[0688]	<213>	智人
[0689]	<400>	45
[0690]	Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala	
[0691]	1	5
[0692]	<210>	46
[0693]	<211>	8
[0694]	<212>	PRT
[0695]	<213>	智人
[0696]	<400>	46
[0697]	Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala	
[0698]	1	5
[0699]	<210>	47
[0700]	<211>	9
[0701]	<212>	PRT

[0702] <213> 智人  
[0703] <400> 47  
[0704] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu  
[0705] 1 5  
[0706] <210> 48  
[0707] <211> 8  
[0708] <212> PRT  
[0709] <213> 智人  
[0710] <400> 48  
[0711] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
[0712] 1 5  
[0713] <210> 49  
[0714] <211> 8  
[0715] <212> PRT  
[0716] <213> 智人  
[0717] <400> 49  
[0718] Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
[0719] 1 5  
[0720] <210> 50  
[0721] <211> 9  
[0722] <212> PRT  
[0723] <213> 智人  
[0724] <400> 50  
[0725] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu  
[0726] 1 5  
[0727] <210> 51  
[0728] <211> 8  
[0729] <212> PRT  
[0730] <213> 智人  
[0731] <400> 51  
[0732] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
[0733] 1 5  
[0734] <210> 52  
[0735] <211> 8  
[0736] <212> PRT  
[0737] <213> 智人  
[0738] <400> 52  
[0739] Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
[0740] 1 5

[0741] <210> 53  
[0742] <211> 9  
[0743] <212> PRT  
[0744] <213> 智人  
[0745] <400> 53  
[0746] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu  
[0747] 1 5  
[0748] <210> 54  
[0749] <211> 8  
[0750] <212> PRT  
[0751] <213> 智人  
[0752] <400> 54  
[0753] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
[0754] 1 5  
[0755] <210> 55  
[0756] <211> 8  
[0757] <212> PRT  
[0758] <213> 智人  
[0759] <400> 55  
[0760] Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
[0761] 1 5  
[0762] <210> 56  
[0763] <211> 9  
[0764] <212> PRT  
[0765] <213> 智人  
[0766] <400> 56  
[0767] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu  
[0768] 1 5  
[0769] <210> 57  
[0770] <211> 8  
[0771] <212> PRT  
[0772] <213> 智人  
[0773] <400> 57  
[0774] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
[0775] 1 5  
[0776] <210> 58  
[0777] <211> 8  
[0778] <212> PRT  
[0779] <213> 智人

[0780] <400> 58  
[0781] Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
[0782] 1 5  
[0783] <210> 59  
[0784] <211> 9  
[0785] <212> PRT  
[0786] <213> 智人  
[0787] <400> 59  
[0788] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu  
[0789] 1 5  
[0790] <210> 60  
[0791] <211> 8  
[0792] <212> PRT  
[0793] <213> 智人  
[0794] <400> 60  
[0795] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
[0796] 1 5  
[0797] <210> 61  
[0798] <211> 8  
[0799] <212> PRT  
[0800] <213> 智人  
[0801] <400> 61  
[0802] Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
[0803] 1 5  
[0804] <210> 62  
[0805] <211> 9  
[0806] <212> PRT  
[0807] <213> 智人  
[0808] <400> 62  
[0809] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu  
[0810] 1 5  
[0811] <210> 63  
[0812] <211> 8  
[0813] <212> PRT  
[0814] <213> 智人  
[0815] <400> 63  
[0816] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
[0817] 1 5  
[0818] <210> 64

[0819] <211> 8  
[0820] <212> PRT  
[0821] <213> 智人  
[0822] <400> 64  
[0823] Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
[0824] 1 5  
[0825] <210> 65  
[0826] <211> 9  
[0827] <212> PRT  
[0828] <213> 智人  
[0829] <400> 65  
[0830] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu  
[0831] 1 5  
[0832] <210> 66  
[0833] <211> 8  
[0834] <212> PRT  
[0835] <213> 智人  
[0836] <400> 66  
[0837] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
[0838] 1 5  
[0839] <210> 67  
[0840] <211> 8  
[0841] <212> PRT  
[0842] <213> 智人  
[0843] <400> 67  
[0844] Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
[0845] 1 5  
[0846] <210> 68  
[0847] <211> 9  
[0848] <212> PRT  
[0849] <213> 智人  
[0850] <400> 68  
[0851] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu  
[0852] 1 5  
[0853] <210> 69  
[0854] <211> 8  
[0855] <212> PRT  
[0856] <213> 智人  
[0857] <400> 69

[0858] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
[0859] 1 5  
[0860] <210> 70  
[0861] <211> 8  
[0862] <212> PRT  
[0863] <213> 智人  
[0864] <400> 70  
[0865] Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
[0866] 1 5  
[0867] <210> 71  
[0868] <211> 9  
[0869] <212> PRT  
[0870] <213> 智人  
[0871] <400> 71  
[0872] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu  
[0873] 1 5  
[0874] <210> 72  
[0875] <211> 8  
[0876] <212> PRT  
[0877] <213> 智人  
[0878] <400> 72  
[0879] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
[0880] 1 5  
[0881] <210> 73  
[0882] <211> 8  
[0883] <212> PRT  
[0884] <213> 智人  
[0885] <400> 73  
[0886] Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
[0887] 1 5  
[0888] <210> 74  
[0889] <211> 9  
[0890] <212> PRT  
[0891] <213> 智人  
[0892] <400> 74  
[0893] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu  
[0894] 1 5  
[0895] <210> 75  
[0896] <211> 8

[0897] <212> PRT  
[0898] <213> 智人  
[0899] <400> 75  
[0900] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
[0901] 1 5  
[0902] <210> 76  
[0903] <211> 8  
[0904] <212> PRT  
[0905] <213> 智人  
[0906] <400> 76  
[0907] Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala  
[0908] 1 5  
[0909] <210> 77  
[0910] <211> 9  
[0911] <212> PRT  
[0912] <213> 智人  
[0913] <400> 77  
[0914] Ala Arg Gly Tyr Val Val Ala Arg Leu  
[0915] 1 5  
[0916] <210> 78  
[0917] <211> 8  
[0918] <212> PRT  
[0919] <213> 智人  
[0920] <400> 78  
[0921] Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala  
[0922] 1 5  
[0923] <210> 79  
[0924] <211> 8  
[0925] <212> PRT  
[0926] <213> 智人  
[0927] <400> 79  
[0928] Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr  
[0929] 1 5  
[0930] <210> 80  
[0931] <211> 14  
[0932] <212> PRT  
[0933] <213> 智人  
[0934] <400> 80  
[0935] Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Ala Phe Asp Ile

[0936]	1	5	10
[0937]	<210> 81		
[0938]	<211> 8		
[0939]	<212> PRT		
[0940]	<213> 智人		
[0941]	<400> 81		
[0942]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala		
[0943]	1	5	
[0944]	<210> 82		
[0945]	<211> 8		
[0946]	<212> PRT		
[0947]	<213> 智人		
[0948]	<400> 82		
[0949]	Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr		
[0950]	1	5	
[0951]	<210> 83		
[0952]	<211> 14		
[0953]	<212> PRT		
[0954]	<213> 智人		
[0955]	<400> 83		
[0956]	Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Ala Phe Asp Ile		
[0957]	1	5	10
[0958]	<210> 84		
[0959]	<211> 8		
[0960]	<212> PRT		
[0961]	<213> 智人		
[0962]	<400> 84		
[0963]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala		
[0964]	1	5	
[0965]	<210> 85		
[0966]	<211> 8		
[0967]	<212> PRT		
[0968]	<213> 智人		
[0969]	<400> 85		
[0970]	Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr		
[0971]	1	5	
[0972]	<210> 86		
[0973]	<211> 14		
[0974]	<212> PRT		



[0975]	<213>	智人
[0976]	<400>	86
[0977]	Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Ala Phe Asp Ile	
[0978]	1	5 10
[0979]	<210>	87
[0980]	<211>	8
[0981]	<212>	PRT
[0982]	<213>	智人
[0983]	<400>	87
[0984]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala	
[0985]	1	5
[0986]	<210>	88
[0987]	<211>	8
[0988]	<212>	PRT
[0989]	<213>	智人
[0990]	<400>	88
[0991]	Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr	
[0992]	1	5
[0993]	<210>	89
[0994]	<211>	14
[0995]	<212>	PRT
[0996]	<213>	智人
[0997]	<400>	89
[0998]	Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Ala Phe Asp Ile	
[0999]	1	5 10
[1000]	<210>	90
[1001]	<211>	8
[1002]	<212>	PRT
[1003]	<213>	智人
[1004]	<400>	90
[1005]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala	
[1006]	1	5
[1007]	<210>	91
[1008]	<211>	8
[1009]	<212>	PRT
[1010]	<213>	智人
[1011]	<400>	91
[1012]	Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr	
[1013]	1	5

[1014]	<210>	92
[1015]	<211>	14
[1016]	<212>	PRT
[1017]	<213>	智人
[1018]	<400>	92
[1019]	Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Ala Phe Asp Ile	
[1020]	1	5 10
[1021]	<210>	93
[1022]	<211>	8
[1023]	<212>	PRT
[1024]	<213>	智人
[1025]	<400>	93
[1026]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala	
[1027]	1	5
[1028]	<210>	94
[1029]	<211>	8
[1030]	<212>	PRT
[1031]	<213>	智人
[1032]	<400>	94
[1033]	Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr	
[1034]	1	5
[1035]	<210>	95
[1036]	<211>	14
[1037]	<212>	PRT
[1038]	<213>	智人
[1039]	<400>	95
[1040]	Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Ala Phe Asp Ile	
[1041]	1	5 10
[1042]	<210>	96
[1043]	<211>	8
[1044]	<212>	PRT
[1045]	<213>	智人
[1046]	<400>	96
[1047]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala	
[1048]	1	5
[1049]	<210>	97
[1050]	<211>	8
[1051]	<212>	PRT
[1052]	<213>	智人

[1053] <400> 97  
[1054] Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr  
[1055] 1 5  
[1056] <210> 98  
[1057] <211> 14  
[1058] <212> PRT  
[1059] <213> 智人  
[1060] <400> 98  
[1061] Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Ala Phe Asp Ile  
[1062] 1 5 10  
[1063] <210> 99  
[1064] <211> 8  
[1065] <212> PRT  
[1066] <213> 智人  
[1067] <400> 99  
[1068] Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala  
[1069] 1 5  
[1070] <210> 100  
[1071] <211> 8  
[1072] <212> PRT  
[1073] <213> 智人  
[1074] <400> 100  
[1075] Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr  
[1076] 1 5  
[1077] <210> 101  
[1078] <211> 14  
[1079] <212> PRT  
[1080] <213> 智人  
[1081] <400> 101  
[1082] Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Ala Phe Asp Ile  
[1083] 1 5 10  
[1084] <210> 102  
[1085] <211> 8  
[1086] <212> PRT  
[1087] <213> 智人  
[1088] <400> 102  
[1089] Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala  
[1090] 1 5  
[1091] <210> 103

[1092]	<211> 8
[1093]	<212> PRT
[1094]	<213> 智人
[1095]	<400> 103
[1096]	Ile Thr Pro Gly Gly Glu Gly Thr
[1097]	1 5
[1098]	<210> 104
[1099]	<211> 14
[1100]	<212> PRT
[1101]	<213> 智人
[1102]	<400> 104
[1103]	Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Ala Phe Asp Ile
[1104]	1 5 10
[1105]	<210> 105
[1106]	<211> 114
[1107]	<212> PRT
[1108]	<213> 智人
[1109]	<400> 105
[1110]	Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Ser Val Gly
[1111]	1 5 10 15
[1112]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Phe
[1113]	20 25 30
[1114]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile
[1115]	35 40 45
[1116]	Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Lys Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
[1117]	50 55 60
[1118]	Arg Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1119]	65 70 75 80
[1120]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Arg Asp Phe Pro Leu
[1121]	85 90 95
[1122]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[1123]	100 105 110
[1124]	Pro Ser
[1125]	<210> 106
[1126]	<211> 119
[1127]	<212> PRT
[1128]	<213> 智人
[1129]	<400> 106
[1130]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

[1131]	1	5	10	15
[1132]	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Gly			
[1133]	20	25	30	
[1134]	Asp Gly His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
[1135]	35	40	45	
[1136]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro			
[1137]	50	55	60	
[1138]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
[1139]	65	70	75	80
[1140]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly			
[1141]	85	90	95	
[1142]	Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[1143]	100	105	110	
[1144]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser			
[1145]	115			
[1146]	<210> 107			
[1147]	<211> 114			
[1148]	<212> PRT			
[1149]	<213> 智人			
[1150]	<400> 107			
[1151]	Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Ser Val Gly			
[1152]	1	5	10	15
[1153]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Phe			
[1154]	20	25	30	
[1155]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile			
[1156]	35	40	45	
[1157]	Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[1158]	50	55	60	
[1159]	Arg Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[1160]	65	70	75	80
[1161]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Arg Asp Phe Pro Leu			
[1162]	85	90	95	
[1163]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
[1164]	100	105	110	
[1165]	Pro Ser			
[1166]	<210> 108			
[1167]	<211> 119			
[1168]	<212> PRT			
[1169]	<213> 智人			

[1170]	<400>	108
[1171]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly	
[1172]	1 5 10 15	
[1173]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ile	
[1174]	20 25 30	
[1175]	Asp Gly Leu Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro	
[1176]	35 40 45	
[1177]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser His Arg Phe Ser Gly Val Ser	
[1178]	50 55 60	
[1179]	Asp Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	
[1180]	65 70 75 80	
[1181]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser	
[1182]	85 90 95	
[1183]	Leu His Leu Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys	
[1184]	100 105 110	
[1185]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser	
[1186]	115	
[1187]	<210>	109
[1188]	<211>	119
[1189]	<212>	PRT
[1190]	<213>	智人
[1191]	<400>	109
[1192]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly	
[1193]	1 5 10 15	
[1194]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ile	
[1195]	20 25 30	
[1196]	Asp Gly Leu Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro	
[1197]	35 40 45	
[1198]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser His Arg Phe Ser Gly Val Ser	
[1199]	50 55 60	
[1200]	Asp Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	
[1201]	65 70 75 80	
[1202]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser	
[1203]	85 90 95	
[1204]	Leu His Leu Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys	
[1205]	100 105 110	
[1206]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser	
[1207]	115	
[1208]	<210>	110

[1209]	<211>	119
[1210]	<212>	PRT
[1211]	<213>	智人
[1212]	<400>	110
[1213]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly	
[1214]	1 5 10 15	
[1215]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ile	
[1216]	20 25 30	
[1217]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Ser Gly Gln Ser	
[1218]	35 40 45	
[1219]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
[1220]	50 55 60	
[1221]	Asp Thr Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[1222]	65 70 75 80	
[1223]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser	
[1224]	85 90 95	
[1225]	Leu His Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys	
[1226]	100 105 110	
[1227]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser	
[1228]	115	
[1229]	<210>	111
[1230]	<211>	119
[1231]	<212>	PRT
[1232]	<213>	智人
[1233]	<400>	111
[1234]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly	
[1235]	1 5 10 15	
[1236]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ile	
[1237]	20 25 30	
[1238]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Ser Gly Gln Ser	
[1239]	35 40 45	
[1240]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
[1241]	50 55 60	
[1242]	Asp Thr Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[1243]	65 70 75 80	
[1244]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser	
[1245]	85 90 95	
[1246]	Leu His Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys	
[1247]	100 105 110	

100



[1287]	Leu His Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[1288]	100 105 110
[1289]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
[1290]	115
[1291]	<210> 114
[1292]	<211> 119
[1293]	<212> PRT
[1294]	<213> 智人
[1295]	<400> 114
[1296]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
[1297]	1 5 10 15
[1298]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ile
[1299]	20 25 30
[1300]	Asp Gly Arg Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Pro
[1301]	35 40 45
[1302]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[1303]	50 55 60
[1304]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1305]	65 70 75 80
[1306]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
[1307]	85 90 95
[1308]	Ile His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1309]	100 105 110
[1310]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
[1311]	115
[1312]	<210> 115
[1313]	<211> 119
[1314]	<212> PRT
[1315]	<213> 智人
[1316]	<400> 115
[1317]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
[1318]	1 5 10 15
[1319]	Gln Pro Ala Ser Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ile
[1320]	20 25 30
[1321]	Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro
[1322]	35 40 45
[1323]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[1324]	50 55 60
[1325]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

[1326]	65	70	75	80
[1327]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser			
[1328]	85	90	95	
[1329]	Leu His Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys			
[1330]	100	105	110	
[1331]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser			
[1332]	115			
[1333]	<210> 116			
[1334]	<211> 119			
[1335]	<212> PRT			
[1336]	<213> 智人			
[1337]	<400> 116			
[1338]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly			
[1339]	1 5 10 15			
[1340]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ile			
[1341]	20 25 30			
[1342]	Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro			
[1343]	35 40 45			
[1344]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
[1345]	50 55 60			
[1346]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
[1347]	65 70 75 80			
[1348]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser			
[1349]	85 90 95			
[1350]	Leu His Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys			
[1351]	100 105 110			
[1352]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser			
[1353]	115			
[1354]	<210> 117			
[1355]	<211> 119			
[1356]	<212> PRT			
[1357]	<213> 智人			
[1358]	<400> 117			
[1359]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly			
[1360]	1 5 10 15			
[1361]	Gln Pro Ala Ser Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ile			
[1362]	20 25 30			
[1363]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro			
[1364]	35 40 45			

[1365]	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Glu	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
[1366]	50						55					60				
[1367]	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Thr	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
[1368]	65					70					75				80	
[1369]	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ser
[1370]					85					90					95	
[1371]	Leu	His	Phe	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys
[1372]				100					105					110		
[1373]	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser									
[1374]				115												
[1375]	<210>	118														
[1376]	<211>	119														
[1377]	<212>	PRT														
[1378]	<213>	智人														
[1379]	<400>	118														
[1380]	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
[1381]	1			5					10					15		
[1382]	Gln	Pro	Ala	Ser	Phe	Ser	Cys	Lys	Ser	Thr	Gln	Ser	Leu	Leu	Trp	Arg
[1383]				20					25					30		
[1384]	Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
[1385]			35					40					45			
[1386]	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Glu	Val	Ser	Gly	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
[1387]	50						55					60				
[1388]	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Glu	Ile
[1389]	65					70					75				80	
[1390]	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ser
[1391]					85					90					95	
[1392]	Ile	His	Phe	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
[1393]				100					105					110		
[1394]	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser									
[1395]				115												
[1396]	<210>	119														
[1397]	<211>	119														
[1398]	<212>	PRT														
[1399]	<213>	智人														
[1400]	<400>	119														
[1401]	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
[1402]	1			5					10					15		
[1403]	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ile

[1404]		20		25		30													
[1405]	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro			
[1406]		35						40					45						
[1407]	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Glu	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro			
[1408]		50					55					60							
[1409]	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile			
[1410]	65					70					75					80			
[1411]	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ser			
[1412]				85						90					95				
[1413]	Leu	His	Leu	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys			
[1414]				100					105					110					
[1415]	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser												
[1416]				115															
[1417]	<210>	120																	
[1418]	<211>	119																	
[1419]	<212>	PRT																	
[1420]	<213>	智人																	
[1421]	<400>	120																	
[1422]	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly			
[1423]	1			5					10					15					
[1424]	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ile			
[1425]				20					25				30						
[1426]	Asp	Gly	Phe	Asn	Tyr	Leu	Gln	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser			
[1427]		35						40					45						
[1428]	Pro	Gln	Leu	Leu	Val	His	Leu	Gly	Ser	Phe	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro			
[1429]		50					55					60							
[1430]	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Glu	Ile			
[1431]	65					70					75					80			
[1432]	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Gly			
[1433]				85						90					95				
[1434]	Leu	Gln	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
[1435]				100					105					110					
[1436]	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser												
[1437]				115															
[1438]	<210>	121																	
[1439]	<211>	119																	
[1440]	<212>	PRT																	
[1441]	<213>	智人																	
[1442]	<400>	121																	

[1443]	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
[1444]	1				5					10					15	
[1445]	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Phe	His	Asp
[1446]					20					25					30	
[1447]	His	Gly	Arg	Thr	His	Leu	Ser	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro
[1448]					35					40					45	
[1449]	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Phe	Glu	Ala	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
[1450]					50					55					60	
[1451]	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
[1452]	65									70					75	
[1453]	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Gly
[1454]										85					90	
[1455]	Ile	His	Leu	Pro	Pro	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
[1456]										100					105	
[1457]	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser									
[1458]																
[1459]	<210>	122														
[1460]	<211>	116														
[1461]	<212>	PRT														
[1462]	<213>	智人														
[1463]	<400>	122														
[1464]	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Gly	Gln
[1465]	1					5					10				15	
[1466]	Lys	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Tyr	Asn
[1467]						20					25				30	
[1468]	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Phe	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
[1469]						35					40				45	
[1470]	Ile	Tyr	Asp	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
[1471]						50					55				60	
[1472]	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln
[1473]	65										70				75	
[1474]	Thr	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gly	Thr	Trp	Asp	Asn	Ser	Arg
[1475]											85				90	
[1476]	Ser	Pro	Pro	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly
[1477]											100				105	
[1478]	Gln	Pro	Lys	Ala												
[1479]																
[1480]	<210>	123														
[1481]	<211>	110														

[1482]	<212>	PRT
[1483]	<213>	智人
[1484]	<400>	123
[1485]	Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln	
[1486]	1 5 10 15	
[1487]	Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Glu Lys Tyr Ala	
[1488]	20 25 30	
[1489]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Phe	
[1490]	35 40 45	
[1491]	Glu Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser	
[1492]	50 55 60	
[1493]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu	
[1494]	65 70 75 80	
[1495]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Trp Val Phe	
[1496]	85 90 95	
[1497]	Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala	
[1498]	100 105 110	
[1499]	<210>	124
[1500]	<211>	116
[1501]	<212>	PRT
[1502]	<213>	智人
[1503]	<400>	124
[1504]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln	
[1505]	1 5 10 15	
[1506]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Asn Thr Ser Asn Ile Gly Asn Asn	
[1507]	20 25 30	
[1508]	Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
[1509]	35 40 45	
[1510]	Ile Tyr Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser	
[1511]	50 55 60	
[1512]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Ser Gly Leu Gln	
[1513]	65 70 75 80	
[1514]	Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Asn Ser Leu	
[1515]	85 90 95	
[1516]	Asn Pro Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly	
[1517]	100 105 110	
[1518]	Gln Pro Lys Ala	
[1519]	115	
[1520]	<210>	125

[1521]	<211>	110
[1522]	<212>	PRT
[1523]	<213>	智人
[1524]	<400>	125
[1525]	Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln	
[1526]	1 5 10 15	
[1527]	Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Leu Gly Glu Lys Phe Val	
[1528]	20 25 30	
[1529]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Phe	
[1530]	35 40 45	
[1531]	Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ala Gly Ser	
[1532]	50 55 60	
[1533]	Asn Ser Gly Asn Arg Ala Thr Leu Thr Ile Arg Gly Thr Gln Ala Glu	
[1534]	65 70 75 80	
[1535]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Trp Val Phe	
[1536]	85 90 95	
[1537]	Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala	
[1538]	100 105 110	
[1539]	<210>	126
[1540]	<211>	110
[1541]	<212>	PRT
[1542]	<213>	智人
[1543]	<400>	126
[1544]	Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln	
[1545]	1 5 10 15	
[1546]	Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Phe Ile	
[1547]	20 25 30	
[1548]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Leu Leu Val Ile Phe	
[1549]	35 40 45	
[1550]	Glu Asp Asn Glu Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser	
[1551]	50 55 60	
[1552]	Asn Ser Gly Asn Ser Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Val	
[1553]	65 70 75 80	
[1554]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Trp Val Phe	
[1555]	85 90 95	
[1556]	Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala	
[1557]	100 105 110	
[1558]	<210>	127
[1559]	<211>	110

[1560]	<212>	PRT
[1561]	<213>	智人
[1562]	<400>	127
[1563]	Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln	
[1564]	1 5 10 15	
[1565]	Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Arg Tyr Val	
[1566]	20 25 30	
[1567]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Phe	
[1568]	35 40 45	
[1569]	Glu Asp Thr Gly Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser	
[1570]	50 55 60	
[1571]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu	
[1572]	65 70 75 80	
[1573]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Gly Thr Ser Trp Val Phe	
[1574]	85 90 95	
[1575]	Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala	
[1576]	100 105 110	
[1577]	<210>	128
[1578]	<211>	116
[1579]	<212>	PRT
[1580]	<213>	智人
[1581]	<400>	128
[1582]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln	
[1583]	1 5 10 15	
[1584]	Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Gly Ser Asn Ile Gly Ser Asn	
[1585]	20 25 30	
[1586]	Tyr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
[1587]	35 40 45	
[1588]	Ile Tyr Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Thr Pro Asp Arg Phe Ser	
[1589]	50 55 60	
[1590]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Val Ile Ala Gly Leu Gln	
[1591]	65 70 75 80	
[1592]	Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Asn Thr Leu	
[1593]	85 90 95	
[1594]	Asn Val Gly Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly	
[1595]	100 105 110	
[1596]	Gln Pro Lys Ala	
[1597]	115	
[1598]	<210>	129



[1599]	<211>	110
[1600]	<212>	PRT
[1601]	<213>	智人
[1602]	<400>	129
[1603]	Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln	
[1604]	1 5 10 15	
[1605]	Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asp Phe Gly Asp Lys Tyr Val	
[1606]	20 25 30	
[1607]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Leu Leu Val Ile Phe	
[1608]	35 40 45	
[1609]	Gln Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser	
[1610]	50 55 60	
[1611]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met	
[1612]	65 70 75 80	
[1613]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Asn Trp Val Phe	
[1614]	85 90 95	
[1615]	Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala	
[1616]	100 105 110	
[1617]	<210>	130
[1618]	<211>	112
[1619]	<212>	PRT
[1620]	<213>	智人
[1621]	<400>	130
[1622]	Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln	
[1623]	1 5 10 15	
[1624]	Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala	
[1625]	20 25 30	
[1626]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Phe	
[1627]	35 40 45	
[1628]	Glu Asn Arg Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	
[1629]	50 55 60	
[1630]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met	
[1631]	65 70 75 80	
[1632]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Trp	
[1633]	85 90 95	
[1634]	Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala	
[1635]	100 105 110	
[1636]	<210>	131
[1637]	<211>	6

[1638] <212> PRT  
[1639] <213> 智人  
[1640] <400> 131  
[1641] Gln Asp Ile Asn Asn Phe  
[1642] 1 5  
[1643] <210> 132  
[1644] <211> 3  
[1645] <212> PRT  
[1646] <213> 智人  
[1647] <400> 132  
[1648] Asp Ala Ser  
[1649] 1  
[1650] <210> 133  
[1651] <211> 9  
[1652] <212> PRT  
[1653] <213> 智人  
[1654] <400> 133  
[1655] Gln Gln Tyr Arg Asp Phe Pro Leu Thr  
[1656] 1 5  
[1657] <210> 134  
[1658] <211> 11  
[1659] <212> PRT  
[1660] <213> 智人  
[1661] <400> 134  
[1662] Gln Ser Leu Val Tyr Gly Asp Gly His Asn Tyr  
[1663] 1 5 10  
[1664] <210> 135  
[1665] <211> 3  
[1666] <212> PRT  
[1667] <213> 智人  
[1668] <400> 135  
[1669] Leu Gly Ser  
[1670] 1  
[1671] <210> 136  
[1672] <211> 9  
[1673] <212> PRT  
[1674] <213> 智人  
[1675] <400> 136  
[1676] Met Gln Gly Leu Gln Thr Pro Leu Thr

[1677]	1	5	
[1678]	<210>	137	
[1679]	<211>	6	
[1680]	<212>	PRT	
[1681]	<213>	智人	
[1682]	<400>	137	
[1683]	Gln Asp Ile Asn Asn Phe		
[1684]	1	5	
[1685]	<210>	138	
[1686]	<211>	3	
[1687]	<212>	PRT	
[1688]	<213>	智人	
[1689]	<400>	138	
[1690]	Asp Ala Ser		
[1691]	1		
[1692]	<210>	139	
[1693]	<211>	9	
[1694]	<212>	PRT	
[1695]	<213>	智人	
[1696]	<400>	139	
[1697]	Gln Gln Tyr Arg Asp Phe Pro Leu Thr		
[1698]	1	5	
[1699]	<210>	140	
[1700]	<211>	11	
[1701]	<212>	PRT	
[1702]	<213>	智人	
[1703]	<400>	140	
[1704]	Gln Ser Leu Leu His Ile Asp Gly Leu Thr Tyr		
[1705]	1	5	10
[1706]	<210>	141	
[1707]	<211>	3	
[1708]	<212>	PRT	
[1709]	<213>	智人	
[1710]	<400>	141	
[1711]	Glu Val Ser		
[1712]	1		
[1713]	<210>	142	
[1714]	<211>	9	
[1715]	<212>	PRT	

[1716]	<213>	智人
[1717]	<400>	142
[1718]	Met Gln Ser Leu His Leu Pro Ile Thr	
[1719]	1	5
[1720]	<210>	143
[1721]	<211>	11
[1722]	<212>	PRT
[1723]	<213>	智人
[1724]	<400>	143
[1725]	Gln Ser Leu Leu His Ile Asp Gly Leu Thr Tyr	
[1726]	1	5 10
[1727]	<210>	144
[1728]	<211>	3
[1729]	<212>	PRT
[1730]	<213>	智人
[1731]	<400>	144
[1732]	Glu Val Ser	
[1733]	1	
[1734]	<210>	145
[1735]	<211>	9
[1736]	<212>	PRT
[1737]	<213>	智人
[1738]	<400>	145
[1739]	Met Gln Ser Leu His Leu Pro Ile Thr	
[1740]	1	5
[1741]	<210>	146
[1742]	<211>	11
[1743]	<212>	PRT
[1744]	<213>	智人
[1745]	<400>	146
[1746]	Gln Ser Leu Leu His Ile Asp Gly Lys Thr Tyr	
[1747]	1	5 10
[1748]	<210>	147
[1749]	<211>	3
[1750]	<212>	PRT
[1751]	<213>	智人
[1752]	<400>	147
[1753]	Glu Val Ser	
[1754]	1	

[1755] <210> 148  
[1756] <211> 9  
[1757] <212> PRT  
[1758] <213> 智人  
[1759] <400> 148  
[1760] Met Gln Ser Leu His Phe Pro Ile Thr  
[1761] 1 5  
[1762] <210> 149  
[1763] <211> 11  
[1764] <212> PRT  
[1765] <213> 智人  
[1766] <400> 149  
[1767] Gln Ser Leu Leu His Ile Asp Gly Lys Thr Tyr  
[1768] 1 5 10  
[1769] <210> 150  
[1770] <211> 3  
[1771] <212> PRT  
[1772] <213> 智人  
[1773] <400> 150  
[1774] Glu Val Ser  
[1775] 1  
[1776] <210> 151  
[1777] <211> 9  
[1778] <212> PRT  
[1779] <213> 智人  
[1780] <400> 151  
[1781] Met Gln Ser Leu His Phe Pro Ile Thr  
[1782] 1 5  
[1783] <210> 152  
[1784] <211> 6  
[1785] <212> PRT  
[1786] <213> 智人  
[1787] <400> 152  
[1788] Gln Asp Ile Asn Asn Phe  
[1789] 1 5  
[1790] <210> 153  
[1791] <211> 3  
[1792] <212> PRT  
[1793] <213> 智人

[1794]	<400>	153	
[1795]	Asp Ala Ser		
[1796]	1		
[1797]	<210>	154	
[1798]	<211>	9	
[1799]	<212>	PRT	
[1800]	<213>	智人	
[1801]	<400>	154	
[1802]	Gln Gln Tyr Arg Asp Phe Pro Leu Thr		
[1803]	1	5	
[1804]	<210>	155	
[1805]	<211>	11	
[1806]	<212>	PRT	
[1807]	<213>	智人	
[1808]	<400>	155	
[1809]	Gln Ser Leu Leu His Ile Asp Gly Lys Ala Tyr		
[1810]	1	5	10
[1811]	<210>	156	
[1812]	<211>	3	
[1813]	<212>	PRT	
[1814]	<213>	智人	
[1815]	<400>	156	
[1816]	Glu Val Ser		
[1817]	1		
[1818]	<210>	157	
[1819]	<211>	9	
[1820]	<212>	PRT	
[1821]	<213>	智人	
[1822]	<400>	157	
[1823]	Met Gln Gly Leu His Leu Pro Pro Thr		
[1824]	1	5	
[1825]	<210>	158	
[1826]	<211>	11	
[1827]	<212>	PRT	
[1828]	<213>	智人	
[1829]	<400>	158	
[1830]	Gln Ser Leu Leu His Ile Asp Gly Arg Thr Tyr		
[1831]	1	5	10
[1832]	<210>	159	

[1833] <211> 3  
[1834] <212> PRT  
[1835] <213> 智人  
[1836] <400> 159  
[1837] Glu Val Ser  
[1838] 1  
[1839] <210> 160  
[1840] <211> 9  
[1841] <212> PRT  
[1842] <213> 智人  
[1843] <400> 160  
[1844] Met Gln Ser Ile His Phe Pro Leu Thr  
[1845] 1 5  
[1846] <210> 161  
[1847] <211> 11  
[1848] <212> PRT  
[1849] <213> 智人  
[1850] <400> 161  
[1851] Gln Ser Leu Leu His Ile Asp Gly Asn Thr Tyr  
[1852] 1 5 10  
[1853] <210> 162  
[1854] <211> 3  
[1855] <212> PRT  
[1856] <213> 智人  
[1857] <400> 162  
[1858] Glu Ile Ser  
[1859] 1  
[1860] <210> 163  
[1861] <211> 9  
[1862] <212> PRT  
[1863] <213> 智人  
[1864] <400> 163  
[1865] Met Gln Ser Leu His Phe Pro Ile Thr  
[1866] 1 5  
[1867] <210> 164  
[1868] <211> 11  
[1869] <212> PRT  
[1870] <213> 智人  
[1871] <400> 164

[1872]	Gln Ser Leu Leu His Ile Asp Gly Asn Thr Tyr
[1873]	1 5 10
[1874]	<210> 165
[1875]	<211> 3
[1876]	<212> PRT
[1877]	<213> 智人
[1878]	<400> 165
[1879]	Glu Ile Ser
[1880]	1
[1881]	<210> 166
[1882]	<211> 9
[1883]	<212> PRT
[1884]	<213> 智人
[1885]	<400> 166
[1886]	Met Gln Ser Leu His Phe Pro Ile Thr
[1887]	1 5
[1888]	<210> 167
[1889]	<211> 11
[1890]	<212> PRT
[1891]	<213> 智人
[1892]	<400> 167
[1893]	Gln Ser Leu Leu His Ile Asp Gly Lys Thr Tyr
[1894]	1 5 10
[1895]	<210> 168
[1896]	<211> 3
[1897]	<212> PRT
[1898]	<213> 智人
[1899]	<400> 168
[1900]	Glu Val Ser
[1901]	1
[1902]	<210> 169
[1903]	<211> 9
[1904]	<212> PRT
[1905]	<213> 智人
[1906]	<400> 169
[1907]	Met Gln Ser Leu His Phe Pro Ile Thr
[1908]	1 5
[1909]	<210> 170
[1910]	<211> 11



[1911] <212> PRT  
[1912] <213> 智人  
[1913] <400> 170  
[1914] Gln Ser Leu Leu Trp Arg Asp Gly Asn Thr Tyr  
[1915] 1 5 10  
[1916] <210> 171  
[1917] <211> 3  
[1918] <212> PRT  
[1919] <213> 智人  
[1920] <400> 171  
[1921] Glu Val Ser  
[1922] 1  
[1923] <210> 172  
[1924] <211> 9  
[1925] <212> PRT  
[1926] <213> 智人  
[1927] <400> 172  
[1928] Met Gln Ser Ile His Phe Pro Leu Thr  
[1929] 1 5  
[1930] <210> 173  
[1931] <211> 11  
[1932] <212> PRT  
[1933] <213> 智人  
[1934] <400> 173  
[1935] Gln Ser Leu Leu His Ile Asp Gly Lys Thr Tyr  
[1936] 1 5 10  
[1937] <210> 174  
[1938] <211> 3  
[1939] <212> PRT  
[1940] <213> 智人  
[1941] <400> 174  
[1942] Glu Val Ser  
[1943] 1  
[1944] <210> 175  
[1945] <211> 9  
[1946] <212> PRT  
[1947] <213> 智人  
[1948] <400> 175  
[1949] Met Gln Ser Leu His Leu Pro Ile Thr

[1950]	1	5	
[1951]	<210>	176	
[1952]	<211>	11	
[1953]	<212>	PRT	
[1954]	<213>	智人	
[1955]	<400>	176	
[1956]	Gln Ser Leu Leu His Ile Asp Gly Phe Asn Tyr		
[1957]	1	5	10
[1958]	<210>	177	
[1959]	<211>	3	
[1960]	<212>	PRT	
[1961]	<213>	智人	
[1962]	<400>	177	
[1963]	Leu Gly Ser		
[1964]	1		
[1965]	<210>	178	
[1966]	<211>	9	
[1967]	<212>	PRT	
[1968]	<213>	智人	
[1969]	<400>	178	
[1970]	Met Gln Gly Leu Gln Thr Pro Pro Thr		
[1971]	1	5	
[1972]	<210>	179	
[1973]	<211>	11	
[1974]	<212>	PRT	
[1975]	<213>	智人	
[1976]	<400>	179	
[1977]	Gln Ser Leu Phe His Asp His Gly Arg Thr His		
[1978]	1	5	10
[1979]	<210>	180	
[1980]	<211>	3	
[1981]	<212>	PRT	
[1982]	<213>	智人	
[1983]	<400>	180	
[1984]	Glu Ala Ser		
[1985]	1		
[1986]	<210>	181	
[1987]	<211>	9	
[1988]	<212>	PRT	

[1989]	<213>	智人
[1990]	<400>	181
[1991]	Met Gln Gly Ile His Leu Pro Pro Ala	
[1992]	1	5
[1993]	<210>	182
[1994]	<211>	8
[1995]	<212>	PRT
[1996]	<213>	智人
[1997]	<400>	182
[1998]	Ser Ser Asn Ile Gly Tyr Asn Tyr	
[1999]	1	5
[2000]	<210>	183
[2001]	<211>	3
[2002]	<212>	PRT
[2003]	<213>	智人
[2004]	<400>	183
[2005]	Asp Asn Asn	
[2006]	1	
[2007]	<210>	184
[2008]	<211>	12
[2009]	<212>	PRT
[2010]	<213>	智人
[2011]	<400>	184
[2012]	Gly Thr Trp Asp Asn Ser Arg Ser Pro Pro Trp Val	
[2013]	1	5 10
[2014]	<210>	185
[2015]	<211>	17
[2016]	<212>	PRT
[2017]	<213>	智人
[2018]	<400>	185
[2019]	Lys Leu Gly Glu Lys Tyr Glu Asp Thr Gln Ala Trp Asp Ser Ser Trp	
[2020]	1	5 10 15
[2021]	Val	
[2022]	<210>	186
[2023]	<211>	3
[2024]	<212>	PRT
[2025]	<213>	智人
[2026]	<400>	186
[2027]	Glu Asp Thr	

[2028]	1
[2029]	<210> 187
[2030]	<211> 8
[2031]	<212> PRT
[2032]	<213> 智人
[2033]	<400> 187
[2034]	Gln Ala Trp Asp Ser Ser Trp Val
[2035]	1 5
[2036]	<210> 188
[2037]	<211> 8
[2038]	<212> PRT
[2039]	<213> 智人
[2040]	<400> 188
[2041]	Thr Ser Asn Ile Gly Asn Asn Phe
[2042]	1 5
[2043]	<210> 189
[2044]	<211> 3
[2045]	<212> PRT
[2046]	<213> 智人
[2047]	<400> 189
[2048]	Asp Asp Asn
[2049]	1
[2050]	<210> 190
[2051]	<211> 12
[2052]	<212> PRT
[2053]	<213> 智人
[2054]	<400> 190
[2055]	Gly Thr Trp Asp Asn Ser Leu Asn Pro Pro Trp Val
[2056]	1 5 10
[2057]	<210> 191
[2058]	<211> 6
[2059]	<212> PRT
[2060]	<213> 智人
[2061]	<400> 191
[2062]	Asn Leu Gly Glu Lys Phe
[2063]	1 5
[2064]	<210> 192
[2065]	<211> 3
[2066]	<212> PRT

[2067] <213> 智人  
[2068] <400> 192  
[2069] Glu Asp Asn  
[2070] 1  
[2071] <210> 193  
[2072] <211> 8  
[2073] <212> PRT  
[2074] <213> 智人  
[2075] <400> 193  
[2076] Gln Ala Trp Asp Ser Ser Trp Val  
[2077] 1 5  
[2078] <210> 194  
[2079] <211> 6  
[2080] <212> PRT  
[2081] <213> 智人  
[2082] <400> 194  
[2083] Arg Leu Gly Asp Lys Phe  
[2084] 1 5  
[2085] <210> 195  
[2086] <211> 3  
[2087] <212> PRT  
[2088] <213> 智人  
[2089] <400> 195  
[2090] Glu Asp Asn  
[2091] 1  
[2092] <210> 196  
[2093] <211> 8  
[2094] <212> PRT  
[2095] <213> 智人  
[2096] <400> 196  
[2097] Gln Ala Trp Asp Ser Ser Trp Val  
[2098] 1 5  
[2099] <210> 197  
[2100] <211> 6  
[2101] <212> PRT  
[2102] <213> 智人  
[2103] <400> 197  
[2104] Lys Leu Gly Asp Arg Tyr  
[2105] 1 5

[2106]	<210>	198	
[2107]	<211>	3	
[2108]	<212>	PRT	
[2109]	<213>	智人	
[2110]	<400>	198	
[2111]	Glu Asp Thr		
[2112]	1		
[2113]	<210>	199	
[2114]	<211>	8	
[2115]	<212>	PRT	
[2116]	<213>	智人	
[2117]	<400>	199	
[2118]	Gln Ala Trp Gly Thr Ser Trp Val		
[2119]	1	5	
[2120]	<210>	200	
[2121]	<211>	8	
[2122]	<212>	PRT	
[2123]	<213>	智人	
[2124]	<400>	200	
[2125]	Gly Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr		
[2126]	1	5	
[2127]	<210>	201	
[2128]	<211>	3	
[2129]	<212>	PRT	
[2130]	<213>	智人	
[2131]	<400>	201	
[2132]	Asp Asp Asn		
[2133]	1		
[2134]	<210>	202	
[2135]	<211>	12	
[2136]	<212>	PRT	
[2137]	<213>	智人	
[2138]	<400>	202	
[2139]	Gly Thr Trp Asp Asn Thr Leu Asn Val Gly Gly Val		
[2140]	1	5	10
[2141]	<210>	203	
[2142]	<211>	6	
[2143]	<212>	PRT	
[2144]	<213>	智人	

[2145]	<400> 203	
[2146]	Asp Phe Gly Asp Lys Tyr	
[2147]	1	5
[2148]	<210> 204	
[2149]	<211> 3	
[2150]	<212> PRT	
[2151]	<213> 智人	
[2152]	<400> 204	
[2153]	Gln Asp Asn	
[2154]	1	
[2155]	<210> 205	
[2156]	<211> 8	
[2157]	<212> PRT	
[2158]	<213> 智人	
[2159]	<400> 205	
[2160]	Gln Ala Trp Asp Ser Asn Trp Val	
[2161]	1	5
[2162]	<210> 206	
[2163]	<211> 6	
[2164]	<212> PRT	
[2165]	<213> 智人	
[2166]	<400> 206	
[2167]	Lys Leu Gly Asp Lys Tyr	
[2168]	1	5
[2169]	<210> 207	
[2170]	<211> 3	
[2171]	<212> PRT	
[2172]	<213> 智人	
[2173]	<400> 207	
[2174]	Glu Asn Arg	
[2175]	1	
[2176]	<210> 208	
[2177]	<211> 10	
[2178]	<212> PRT	
[2179]	<213> 智人	
[2180]	<400> 208	
[2181]	Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Trp Val	
[2182]	1	5 10
[2183]	<210> 209	

[2184]	<211> 348
[2185]	<212> DNA
[2186]	<213> 智人
[2187]	<400> 209
[2188]	cagatgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggatcctc ggtgaaggtc 60
[2189]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
[2190]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaaactac 180
[2191]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
[2192]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtat 300
[2193]	gtagtagcca gactctgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tcagctca 348
[2194]	<210> 210
[2195]	<211> 348
[2196]	<212> DNA
[2197]	<213> 智人
[2198]	<400> 210
[2199]	cagatgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggatcctc ggtgaaggtc 60
[2200]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
[2201]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaaactac 180
[2202]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
[2203]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtat 300
[2204]	gtagtagcca gactctgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctcctca 348
[2205]	<210> 211
[2206]	<211> 348
[2207]	<212> DNA
[2208]	<213> 智人
[2209]	<400> 211
[2210]	cagatgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggatcctc ggtgaaggtc 60
[2211]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
[2212]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaaactac 180
[2213]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
[2214]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtat 300
[2215]	gtagtagcca gactctgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tcagctca 348
[2216]	<210> 212
[2217]	<211> 348
[2218]	<212> DNA
[2219]	<213> 智人
[2220]	<400> 212
[2221]	cagatgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggctcctc cgtgaagggtg 60
[2222]	tcctgcaagg cctccggcgg caccttctcc agctacgcca tctcctgggt gcgacaggcc 120



[2223]	ccaggccagg gcctggaatg gatgggcggc atcatcccca tcttcggcac cgccaactac	180
[2224]	gcccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgacg agtccacctc caccgcctac	240
[2225]	atggaactgt cctccctgcg gagecaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggctac	300
[2226]	gtggtggcca gactgtgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgagctca	348
[2227]	<210> 213	
[2228]	<211> 348	
[2229]	<212> DNA	
[2230]	<213> 智人	
[2231]	<400> 213	
[2232]	cagatgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggatcctc ggtgaaggtc	60
[2233]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc	120
[2234]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaactac	180
[2235]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgccgacg aatccacgag cacagcctac	240
[2236]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtat	300
[2237]	gtagtagcca gactctgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tcagctca	348
[2238]	<210> 214	
[2239]	<211> 348	
[2240]	<212> DNA	
[2241]	<213> 智人	
[2242]	<400> 214	
[2243]	cagatgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggctcctc cgtgaagggtg	60
[2244]	tcctgcaagg cctccggcgg caccttctcc agctacgcca tctcctgggt gcgacaggcc	120
[2245]	ccaggccagg gcctggaatg gatgggcggc atcatcccca tcttcggcac cgccaactac	180
[2246]	gcccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgacg agtccacctc caccgcctac	240
[2247]	atggaactgt cctccctgcg gagecaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggctac	300
[2248]	gtggtggcca gactgtgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgagctca	348
[2249]	<210> 215	
[2250]	<211> 348	
[2251]	<212> DNA	
[2252]	<213> 智人	
[2253]	<400> 215	
[2254]	cagatgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggatcctc ggtgaaggtc	60
[2255]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc	120
[2256]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaactac	180
[2257]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgccgacg aatccacgag cacagcctac	240
[2258]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtat	300
[2259]	gtagtagcca gactctgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tcagctca	348
[2260]	<210> 216	
[2261]	<211> 348	

[2262]	<212> DNA
[2263]	<213> 智人
[2264]	<400> 216
[2265]	cagatgcagc tggatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggatcctc ggtgaaggtc 60
[2266]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
[2267]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaactac 180
[2268]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
[2269]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtat 300
[2270]	gtagtagcca gactctgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tcagctca 348
[2271]	<210> 217
[2272]	<211> 348
[2273]	<212> DNA
[2274]	<213> 智人
[2275]	<400> 217
[2276]	cagatgcagc tggatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggatcctc ggtgaaggtc 60
[2277]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
[2278]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaactac 180
[2279]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
[2280]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtat 300
[2281]	gtagtagcca gactctgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tcagctca 348
[2282]	<210> 218
[2283]	<211> 348
[2284]	<212> DNA
[2285]	<213> 智人
[2286]	<400> 218
[2287]	cagatgcagc tggatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggatcctc ggtgaaggtc 60
[2288]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
[2289]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaactac 180
[2290]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
[2291]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtat 300
[2292]	gtagtagcca gactctgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tcagctca 348
[2293]	<210> 219
[2294]	<211> 348
[2295]	<212> DNA
[2296]	<213> 智人
[2297]	<400> 219
[2298]	cagatgcagc tggatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggatcctc ggtgaaggtc 60
[2299]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
[2300]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaactac 180

[2301]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac	240
[2302]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtat	300
[2303]	gtagtagcca gactctgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tcagctca	348
[2304]	<210>	220
[2305]	<211>	348
[2306]	<212>	DNA
[2307]	<213>	智人
[2308]	<400>	220
[2309]	cagatgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggtcctc cgtgaagggtg	60
[2310]	tcctgcaagg cctccggcgg caccttctcc agctacgcca tctcctgggt gcgacaggcc	120
[2311]	ccaggccagg gcctggaatg gatgggcggc atcatcccca tcttcggcac cgccaactac	180
[2312]	gcccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgcggacg agtccacctc caccgcctac	240
[2313]	atggaactgt cctccctgcg gagegaggac accgcctgt actactgcgc cagaggctac	300
[2314]	gtggtggcca gactgtgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgagctca	348
[2315]	<210>	221
[2316]	<211>	348
[2317]	<212>	DNA
[2318]	<213>	智人
[2319]	<400>	221
[2320]	cagatgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggatcctc ggtgaaggtc	60
[2321]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc	120
[2322]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaactac	180
[2323]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac	240
[2324]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtat	300
[2325]	gtagtagcca gactctgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tcagctca	348
[2326]	<210>	222
[2327]	<211>	339
[2328]	<212>	DNA
[2329]	<213>	智人
[2330]	<400>	222
[2331]	gatgttgtga tgactcagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc	60
[2332]	ttctcctgca agtccactca gagcctcctg tggcgtgatg gaaacaccta tttgtattgg	120
[2333]	tatctgcaga agccaggcca gtctccccag ctctcatct atgaagtttc cgccgattc	180
[2334]	tctggagtgc cagagagatt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actggaaaac	240
[2335]	agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtat acactttcct	300
[2336]	ctcactttcg gcggagggac caagctggag atcaaacgt	339
[2337]	<210>	223
[2338]	<211>	348
[2339]	<212>	DNA

[2340]	<213> 智人
[2341]	<400> 223
[2342]	cagatgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggatcctc ggtgaaggtc 60
[2343]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
[2344]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
[2345]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
[2346]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtat 300
[2347]	gtagtagcca gactctgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tcagctca 348
[2348]	<210> 224
[2349]	<211> 348
[2350]	<212> DNA
[2351]	<213> 智人
[2352]	<400> 224
[2353]	cagatgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggatcctc ggtgaaggtc 60
[2354]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
[2355]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
[2356]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
[2357]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtat 300
[2358]	gtagtagcca gactctgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tcagctca 348
[2359]	<210> 225
[2360]	<211> 348
[2361]	<212> DNA
[2362]	<213> 智人
[2363]	<400> 225
[2364]	cagatgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggatcctc ggtgaaggtc 60
[2365]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
[2366]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
[2367]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
[2368]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtat 300
[2369]	gtagtagcca gactctgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tcagctca 348
[2370]	<210> 226
[2371]	<211> 363
[2372]	<212> DNA
[2373]	<213> 智人
[2374]	<400> 226
[2375]	gaggtgcagc tgggtggagac tgggggaggt gtggtacggc ctggggggtc cctgagactc 60
[2376]	tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctctgcc a tgagctgggt ccgccagact 120
[2377]	ccaggggaagg aactgcagtg ggtctcagct attactcctg gtggtgaggg gacatactac 180
[2378]	gcagacgtcg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagga cacgctgtat 240

[2379]	ctgcaaatgg acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagatttg 300
[2380]	tacgggagct acggtgatgc ttttgatata tggggccaag ggacactggc caccgtcagc 360
[2381]	tca 363
[2382]	<210> 227
[2383]	<211> 363
[2384]	<212> DNA
[2385]	<213> 智人
[2386]	<400> 227
[2387]	gaggtgcagc tgggtggagac tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc 60
[2388]	tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctctgcca tgagctgggt ccgccagact 120
[2389]	ccagggaagg aactgcagtg ggtctcagct attactcctg gtggtgaggg gacatactac 180
[2390]	gcagacgtcg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagga cacgctgtat 240
[2391]	ctgcaaatgg acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagatttg 300
[2392]	tacgggagct acggtgatgc ttttgatata tggggccaag ggacactggc caccgtcagc 360
[2393]	tca 363
[2394]	<210> 228
[2395]	<211> 363
[2396]	<212> DNA
[2397]	<213> 智人
[2398]	<400> 228
[2399]	gaggtgcagc tgggtggagac tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc 60
[2400]	tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctctgcca tgagctgggt ccgccagact 120
[2401]	ccagggaagg aactgcagtg ggtctcagct attactcctg gtggtgaggg gacatactac 180
[2402]	gcagacgtcg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagga cacgctgtat 240
[2403]	ctgcaaatgg acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagatttg 300
[2404]	tacgggagct acggtgatgc ttttgatata tggggccaag ggacactggc caccgtcagc 360
[2405]	tca 363
[2406]	<210> 229
[2407]	<211> 363
[2408]	<212> DNA
[2409]	<213> 智人
[2410]	<400> 229
[2411]	gaggtgcagc tgggtggagac tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc 60
[2412]	tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctctgcca tgagctgggt ccgccagact 120
[2413]	ccagggaagg aactgcagtg ggtctcagct attactcctg gtggtgaggg gacatactac 180
[2414]	gcagacgtcg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagga cacgctgtat 240
[2415]	ctgcaaatgg acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagatttg 300
[2416]	tacgggagct acggtgatgc ttttgatata tggggccaag ggacactggc caccgtcagc 360
[2417]	tca 363

[2418]	<210>	230	
[2419]	<211>	363	
[2420]	<212>	DNA	
[2421]	<213>	智人	
[2422]	<400>	230	
[2423]	gaggtgcagc	tggtggagac	tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc 60
[2424]	tcctgtgcag	cctctggatt	caccttttagc agctctgccca tgagctgggt ccgccagact 120
[2425]	ccagggaagg	aactgcagtg	ggtctcagct attactcctg gtggtgaggg gacatactac 180
[2426]	gcagacgtcg	tgaagggccg	gttcaccatc tccagagaca attccaagga cacgctgtat 240
[2427]	ctgcaaatgg	acagcctgag	agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagatttg 300
[2428]	tacgggagct	acggtgatgc	ttttgatatac tggggccaag ggacactggc caccgtcagc 360
[2429]	tca	363	
[2430]	<210>	231	
[2431]	<211>	363	
[2432]	<212>	DNA	
[2433]	<213>	智人	
[2434]	<400>	231	
[2435]	gaggtgcagc	tggtggagac	tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc 60
[2436]	tcctgtgcag	cctctggatt	caccttttagc agctctgccca tgagctgggt ccgccagact 120
[2437]	ccagggaagg	aactgcagtg	ggtctcagct attactcctg gtggtgaggg gacatactac 180
[2438]	gcagacgtcg	tgaagggccg	gttcaccatc tccagagaca attccaagga cacgctgtat 240
[2439]	ctgcaaatgg	acagcctgag	agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagatttg 300
[2440]	tacgggagct	acggtgatgc	ttttgatatac tggggccaag ggacactggc caccgtcagc 360
[2441]	tca	363	
[2442]	<210>	232	
[2443]	<211>	363	
[2444]	<212>	DNA	
[2445]	<213>	智人	
[2446]	<400>	232	
[2447]	gaggtgcagc	tggtggagac	tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc 60
[2448]	tcctgtgcag	cctctggatt	caccttttagc agctctgccca tgagctgggt ccgccagact 120
[2449]	ccagggaagg	aactgcagtg	ggtctcagct attactcctg gtggtgaggg gacatactac 180
[2450]	gcagacgtcg	tgaagggccg	gttcaccatc tccagagaca attccaagga cacgctgtat 240
[2451]	ctgcaaatgg	acagcctgag	agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagatttg 300
[2452]	tacgggagct	acggtgatgc	ttttgatatac tggggccaag ggacactggc caccgtcagc 360
[2453]	tca	363	
[2454]	<210>	233	
[2455]	<211>	363	
[2456]	<212>	DNA	

[2457]	<213> 智人	
[2458]	<400> 233	
[2459]	gaggtgcagc tgggtggagac tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc	60
[2460]	tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctctgcca tgagctgggt ccgccagact	120
[2461]	ccagggaagg aactgcagtg ggtctcagct attactcctg gtggtgaggg gacatactac	180
[2462]	gcagacgtcg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagga cacgctgtat	240
[2463]	ctgcaaattg acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagatttg	300
[2464]	tacgggagct acggtgatgc ttttgatata tggggccaag ggacactggt caccgtcagc	360
[2465]	tca	363
[2466]	<210> 234	
[2467]	<211> 363	
[2468]	<212> DNA	
[2469]	<213> 智人	
[2470]	<400> 234	
[2471]	gaggtgcagc tgggtggagac tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc	60
[2472]	tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctctgcca tgagctgggt ccgccagact	120
[2473]	ccagggaagg aactgcagtg ggtctcagct attactcctg gtggtgaggg gacatactac	180
[2474]	gcagacgtcg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagga cacgctgtat	240
[2475]	ctgcaaattg acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagatttg	300
[2476]	tacgggagct acggtgatgc ttttgatata tggggccaag ggacactggt caccgtcagc	360
[2477]	tca	363
[2478]	<210> 235	
[2479]	<211> 324	
[2480]	<212> DNA	
[2481]	<213> 智人	
[2482]	<400> 235	
[2483]	gaaacgacac tcacgcagtc tccagcattc atgtcagcat ctgtgggaga cagagtcacc	60
[2484]	atcacttgcc aggcgagtca ggacattaac aactttttaa attggtatca gcagaaacca	120
[2485]	gggaaagccc ctaagttcct gatctacgat gcttccaatt tggaaaaagg ggtcccatca	180
[2486]	aagttcagtg ggcgtggatc tgggacagaa ttactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
[2487]	gaagatattg caacatatta ctgtcaacaa tategtgatt tcccgctcac cttcggccaa	300
[2488]	gggacacgac tggagattaa acgt	324
[2489]	<210> 236	
[2490]	<211> 339	
[2491]	<212> DNA	
[2492]	<213> 智人	
[2493]	<400> 236	
[2494]	gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc	60
[2495]	atctcctgca ggtctagtca gagcctcgtc tatggtgatg gacacaacta tttggcttgg	120

[2496]	tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggcc	180
[2497]	tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc	240
[2498]	agcagagtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaaggtct acaaactccg	300
[2499]	ctcactttcg gcggagggac caagctggag atcaaacgt	339
[2500]	<210>	237
[2501]	<211>	324
[2502]	<212>	DNA
[2503]	<213>	智人
[2504]	<400>	237
[2505]	gaaacgacac tcacgcagtc tccagcattc atgtcagcat ctgtgggaga cagagtcacc	60
[2506]	atcacttgcc aggcgagtca ggacattaac aacttttttaa attggtatca gcagaaacca	120
[2507]	gggaaagccc ctaagttcct gatctacgat gcttccaatt tggaaaaagg tgtcccatca	180
[2508]	aggttcagtg ggcgtggatc tgggacggaa ttactctca ccatcagcag cctacagcct	240
[2509]	gaagatattg ctacatatta ctgtcaacaa tategtgatt tcccgctcac cttcggccaa	300
[2510]	gggacacgac tggagattaa acgt	324
[2511]	<210>	238
[2512]	<211>	339
[2513]	<212>	DNA
[2514]	<213>	智人
[2515]	<400>	238
[2516]	gacatcgtga tgaccagac cccactgtcc ctgtccgtga cccctggcca gcctgcctcc	60
[2517]	atctcctgca agtcctccca gtccctgctg cacatcgacg gcctgacctc cctgtactgg	120
[2518]	tatctgcaga agcccgcca gccccccag ctgctgatct acgaggtgtc ccaccgggtc	180
[2519]	tccggcgtgt ccgacaagtt ctccggctcc ggcagcggca ccgacttcac cctgaccatc	240
[2520]	tcccggttg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagagcct gcactctgcc	300
[2521]	atcaccttcg gccagggcac ccggctggaa atcaagcgt	339
[2522]	<210>	239
[2523]	<211>	339
[2524]	<212>	DNA
[2525]	<213>	智人
[2526]	<400>	239
[2527]	gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc	60
[2528]	atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catattgatg gactgacctc tttgtattgg	120
[2529]	tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc ccaccgggtc	180
[2530]	tctggagtgt cagataagtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgacaatc	240
[2531]	agccgggttg aggctgagga tgttggagtt tattactgca tgcagagttt acaccttccg	300
[2532]	atcaccttcg gccaaggac acgactggag attaaacgt	339
[2533]	<210>	240
[2534]	<211>	339



[2535]	<212> DNA	
[2536]	<213> 智人	
[2537]	<400> 240	
[2538]	gatgtggtga tgacccagac ccctctgtcc ctgtccgtga cccctggcca gcctgcctcc	60
[2539]	atctcctgca agtcctccca gtccctgctg cacatcgacg gcaagaccta cctgtactgg	120
[2540]	tatctgcaga agtccggcca gtcccctcag ctgctgatct acgaggtgtc caaccgggtc	180
[2541]	tccggcgtgc ccgacacctt ctccggctct ggctctggca ccgacttcac cctgaagatc	240
[2542]	tcccgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagagcct gcacttcccc	300
[2543]	atcaccttcg gccagggcac ccggctggaa atcaagcgt	339
[2544]	<210> 241	
[2545]	<211> 339	
[2546]	<212> DNA	
[2547]	<213> 智人	
[2548]	<400> 241	
[2549]	gatgttgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccccggaca gccggcctcc	60
[2550]	atctcctgta agtctagtca gagcctcctg catattgatg gaaagaccta tttgtattgg	120
[2551]	tacctgcaga agtcaggcca gtctccacag ctctgatct atgaggtttc caaccgggtc	180
[2552]	tctggagtgc cagatacgtt cagtggcagc gggtcgggga cagatttcac actgaaaatc	240
[2553]	agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tactactgca tgcagagtct acactttccg	300
[2554]	atcaccttcg gccaggggac acgactggag attaaacgt	339
[2555]	<210> 242	
[2556]	<211> 324	
[2557]	<212> DNA	
[2558]	<213> 智人	
[2559]	<400> 242	
[2560]	gaaacgacac tcacgcagtc tccaacattc atgtcagcat ctgtgggaga cagagtcacc	60
[2561]	atcacttgcc aggcgagtca ggacattaac aactttttaa attggtatca gcagaaacca	120
[2562]	gggaaagccc ctaagttcct gatctacgat gcttccaatt tggaaaaagg tgtcccatca	180
[2563]	aggttcagtg ggcgtggatc tgggacggaa ttactctca ccatcagcag cctacagcct	240
[2564]	gaagatattg ctacatatta ctgtcaacaa tategtgatt tcccgctcac cttcggccaa	300
[2565]	gggacacgac tcgagattaa acgt	324
[2566]	<210> 243	
[2567]	<211> 339	
[2568]	<212> DNA	
[2569]	<213> 智人	
[2570]	<400> 243	
[2571]	gatgttgtga tgactcagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc	60
[2572]	atctcctgca agtcagtcga gagcctccta catattgatg gaaaggccta cttgtattgg	120
[2573]	tacctgcaga agccaggcca gtctccacac ctctaatcc gtgaagtctc caccgggttc	180

[2574]	tctggagtgt cagatagggt cactggcagc gggtcaggga cagatttcac attggaaatc	240
[2575]	agccgagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagggtt acaccttcct	300
[2576]	ccgacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaactg	339
[2577]	<210>	244
[2578]	<211>	339
[2579]	<212>	DNA
[2580]	<213>	智人
[2581]	<400>	244
[2582]	gatgttgtga tgactcagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc	60
[2583]	atctcctgca agtctagtca gagcctcctc catattgatg gaaggacctt tttgtattgg	120
[2584]	tacctgcaaa aggcaggcca gcctccgcag ctctgatct atgaagtttc caaccggttc	180
[2585]	tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
[2586]	agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtat acattttcct	300
[2587]	ctcactttcg gcggaggac caagctggag atcaaactg	339
[2588]	<210>	245
[2589]	<211>	339
[2590]	<212>	DNA
[2591]	<213>	智人
[2592]	<400>	245
[2593]	gatatttgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc	60
[2594]	attacctgca agtctagtca gagcctcctc catattgatg gaaacacctt tctgtattgg	120
[2595]	tacctgcaga ggccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaaatttc caaccggttc	180
[2596]	tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
[2597]	agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagttt acactttccg	300
[2598]	atcaccttcg gccaaaggac acgactggag attaaactg	339
[2599]	<210>	246
[2600]	<211>	339
[2601]	<212>	DNA
[2602]	<213>	智人
[2603]	<400>	246
[2604]	gacatcgtga tgaccagac ccctctgtcc ctgtccgtga cccctggcca gcctgccagc	60
[2605]	atctcctgca agtcctccca gtccctgctg cacatcgacg gcaacacctt cctgtactgg	120
[2606]	tatctgcagc ggccaggcca gcctccccag ctgtgatct acgagatctc caaccggttc	180
[2607]	tccggcgtgc ccgaccggtt ctctgggttc ggctctggca ccgacttcac cctgaagatc	240
[2608]	tccagagtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagagcct gcacttcccc	300
[2609]	atcaccttcg gccagggcac ccggctggaa atcaagcgt	339
[2610]	<210>	247
[2611]	<211>	339
[2612]	<212>	DNA

[2613]	<213> 智人
[2614]	<400> 247
[2615]	gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
[2616]	attacctgca agtctagtca gaggctcctc catattgatg gaaagaccta tttgtattgg 120
[2617]	ttcttgcaga agccaggcca gcctccacaa cttttgatct atgaagtttc caaccgggtc 180
[2618]	tctggagtgc cagatagggt cagtggcacc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
[2619]	agccgggtgg aggctgagga tgttggcggt tattactgca tgcaaagttt acactttccg 300
[2620]	atcaccttcg gccagggac acgactggag attaaacgt 339
[2621]	<210> 248
[2622]	<211> 348
[2623]	<212> DNA
[2624]	<213> 智人
[2625]	<400> 248
[2626]	cagatgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggatcctc ggtgaaggtc 60
[2627]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
[2628]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaaactac 180
[2629]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
[2630]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtat 300
[2631]	gtagtagcca gactctgggg ccagggaacc ctggtcaccg tcagctca 348
[2632]	<210> 249
[2633]	<211> 339
[2634]	<212> DNA
[2635]	<213> 智人
[2636]	<400> 249
[2637]	gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
[2638]	attacctgca agtctagtca gaggctcctc catattgatg gaaagaccta tttgtattgg 120
[2639]	ttcttgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc aaaccgcttc 180
[2640]	tctggagtgc cggatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
[2641]	agccgggtgg aggctgagga tgttgggctt tattactgca tgcagagttt acaccttccg 300
[2642]	atcaccttcg gccaaaggac acgactggag attaaacgt 339
[2643]	<210> 250
[2644]	<211> 339
[2645]	<212> DNA
[2646]	<213> 智人
[2647]	<400> 250
[2648]	gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
[2649]	atctcctgca ggtctagtca gaggctccta catattgatg gatttaatta tttgcaatgg 120
[2650]	tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgggtcc atttgggttc ttttcgggcc 180
[2651]	tccgggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actggaaaatc 240

[2652] agcagagttg aggctgagga tgttggactt tattactgca tgcaaggtct acaaactcct 300  
 [2653] cccactttcg gccctgggac caaagtggag atcaaacgt 339  
 [2654] <210> 251  
 [2655] <211> 339  
 [2656] <212> DNA  
 [2657] <213> 智人  
 [2658] <400> 251  
 [2659] gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60  
 [2660] atctcctgca agtctagtca gacgctgttt catgatcatg gaaggacgca cttgtcttgg 120  
 [2661] tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct ttgaagcttc caaccggttc 180  
 [2662] tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaagatc 240  
 [2663] agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaggtat acaccttcct 300  
 [2664] ccggctttcg gcggagggac caagctggag atcaaacgt 339  
 [2665] <210> 252  
 [2666] <211> 336  
 [2667] <212> DNA  
 [2668] <213> 智人  
 [2669] <400> 252  
 [2670] cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagt tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60  
 [2671] tcctgctctg gaagcagctc caacattggc tataattacg tatcctggta ccagcagttc 120  
 [2672] ccaggaacag cccccaact cctcatattat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180  
 [2673] gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240  
 [2674] actggggacg agcccgatta ttactgcgga acatgggata acagccggag tcctccttgg 300  
 [2675] gtgttcggcg gagggaccaa ggtgaccgtc ctaggt 336  
 [2676] <210> 253  
 [2677] <211> 318  
 [2678] <212> DNA  
 [2679] <213> 智人  
 [2680] <400> 253  
 [2681] tcctatgagc tgacacagcc atcctcagt tcagtgtccc caggacagac agccagcatc 60  
 [2682] acctgctctg gagataaatt gggggaaaaa tatgcttcct ggtatcaaca gaagccaggc 120  
 [2683] cagtcccttg tcctggatcat gtttgaagat acgaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180  
 [2684] ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctgaa 240  
 [2685] gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagtt ggggtgttcgg cggaggcacc 300  
 [2686] cagctgaccg tcctaggt 318  
 [2687] <210> 254  
 [2688] <211> 336  
 [2689] <212> DNA  
 [2690] <213> 智人

[2691]	<400> 254
[2692]	cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagag ggtcaccatc 60
[2693]	tcctgctctg gaaacacctc caacattgga aataattttg tatcctggta ccagcagctc 120
[2694]	ccaggaacag cccccaact cctcatttat gacgataata agcgaccctc agggattcct 180
[2695]	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagctaccc tgggcatctc cggactccag 240
[2696]	actggggacg aggccgatta ttactgcggc acatgggata acagcctgaa tcctccttgg 300
[2697]	gtgttcggcg gaggcacca gctgaccgtc ctaggt 336
[2698]	<210> 255
[2699]	<211> 318
[2700]	<212> DNA
[2701]	<213> 智人
[2702]	<400> 255
[2703]	tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtggccc caggacagac agccagcatc 60
[2704]	acctgctctg gagataattt gggggaaaaa tttgtttcct ggtatcaaca gaaggcaggc 120
[2705]	cagtcccctg tcttggtcat ctttgaagat aataagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
[2706]	ttcgttggt ccaactctgg gaacagagcc actctgacca tcagggggac ccaggctgaa 240
[2707]	gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagct ggggtgttcgg cggaggcacc 300
[2708]	cagctgaccg tcctaggt 318
[2709]	<210> 256
[2710]	<211> 318
[2711]	<212> DNA
[2712]	<213> 智人
[2713]	<400> 256
[2714]	tcctatgagc tgacacagcc accctcagtg tccgtggccc caggacagac agccaccatc 60
[2715]	acctgctctg gagatagatt gggcgataaa tttatctctt ggtatcagca gaagccaggc 120
[2716]	cagtcccctc tactggtcat ctttgaagat aacgaacggc cctcacggat ccctgagcga 180
[2717]	ttctctggct ccaactctgg caactctgcc actctgacca tcagcgggac ccaggctgta 240
[2718]	gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagtt ggggtgttcgg cggaggcacc 300
[2719]	cagctgaccg tcctaggt 318
[2720]	<210> 257
[2721]	<211> 318
[2722]	<212> DNA
[2723]	<213> 智人
[2724]	<400> 257
[2725]	tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtggccc caggacagac agcccgtatc 60
[2726]	acctgctctg gagataaatt gggggataga tatgtttcct ggtatcagca gaagccaggc 120
[2727]	cagtcccctg tgttggtcat gtttgaagat accgggcggc ccgcagggat ccctgagcga 180
[2728]	ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggcagaa 240
[2729]	gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg ggcacctcct gggttttcgg cggaggcacc 300

[2730]	cagctgaccg tcctaggt 318
[2731]	<210> 258
[2732]	<211> 336
[2733]	<212> DNA
[2734]	<213> 智人
[2735]	<400> 258
[2736]	cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
[2737]	tcctgctctg gaaccggctc caacattggc agtaattatg tcgcctggta tcagcaactc 120
[2738]	ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacgataata agcgaccctc agggactcct 180
[2739]	gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tggtcatcgc cggactccag 240
[2740]	actggggacg aggcgatta ttattgtgga acatgggata acaccctgaa tgttgggggg 300
[2741]	gtcttcggcg gaggcacca gctgaccgtc ctaggt 336
[2742]	<210> 259
[2743]	<211> 318
[2744]	<212> DNA
[2745]	<213> 智人
[2746]	<400> 259
[2747]	tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tccgtggccc ccggacagac agccaccatc 60
[2748]	acctgctcag gagatgattt cggcgataag tatgtgtctt ggtatcaaca gaagccaggc 120
[2749]	cagtcccctc tactggtcat ctttcaggat aacgagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
[2750]	ttctctggct ccaactctgg gaacactgcc actttgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
[2751]	gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcaatt ggggtgttcgg cggagggacc 300
[2752]	aaggtcaccg tcctaggt 318
[2753]	<210> 260
[2754]	<211> 324
[2755]	<212> DNA
[2756]	<213> 智人
[2757]	<400> 260
[2758]	tcctatgagc tgacacagcc accctcagtg tccgtggccc caggacagac agccaccatc 60
[2759]	acctgctctg gagataaatt gggggataaa tatgtttcct ggtatcagca gaagccaggc 120
[2760]	cagtcccctg tcttggtcat gtttgagaat cgtgaccggc cctcagggat ccctgaccga 180
[2761]	ttctctggct ccaattctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
[2762]	gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgcatgggt attcggcgga 300
[2763]	ggcaccacgc tgaccgtcct aggt 324



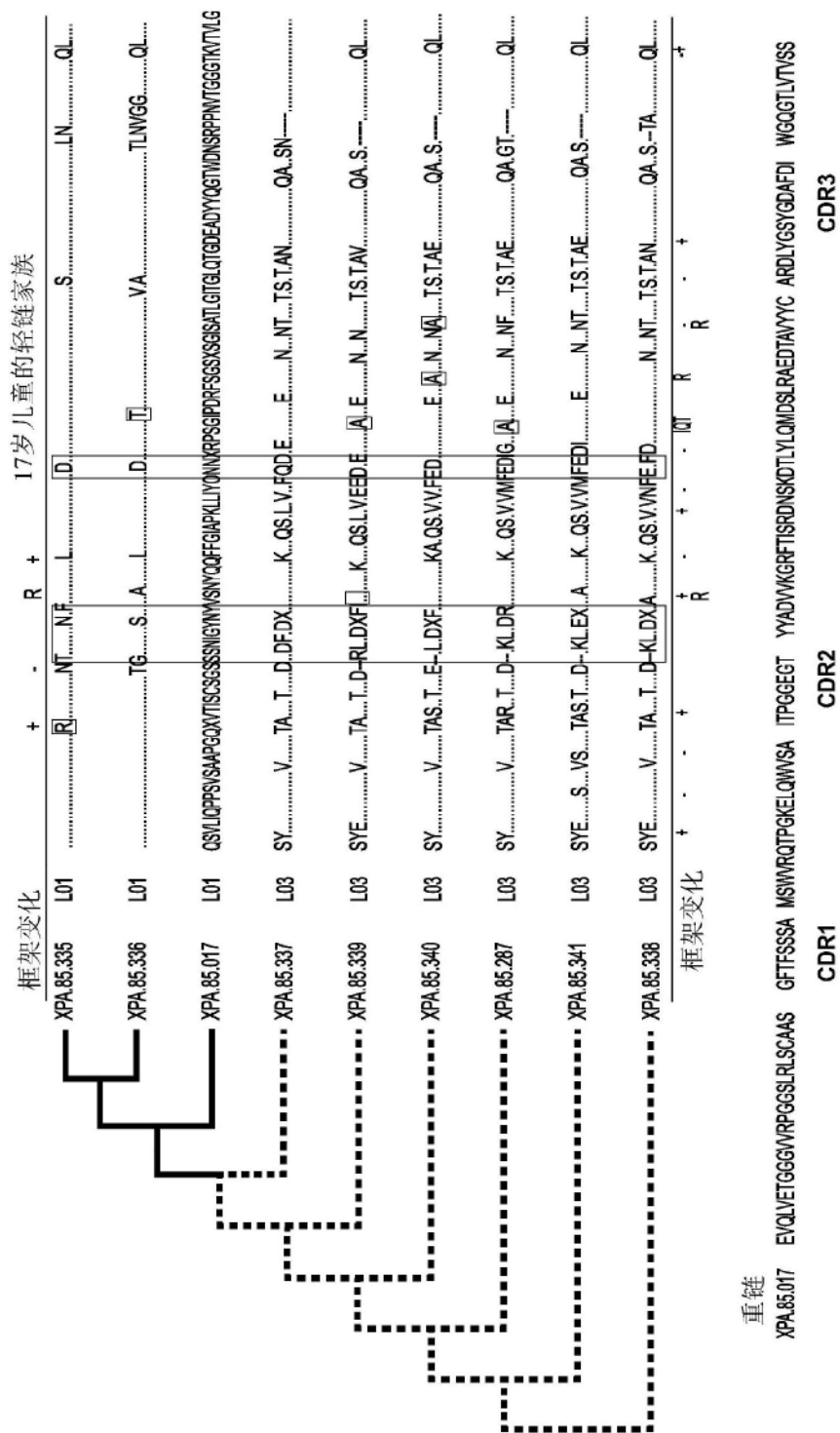


图1B



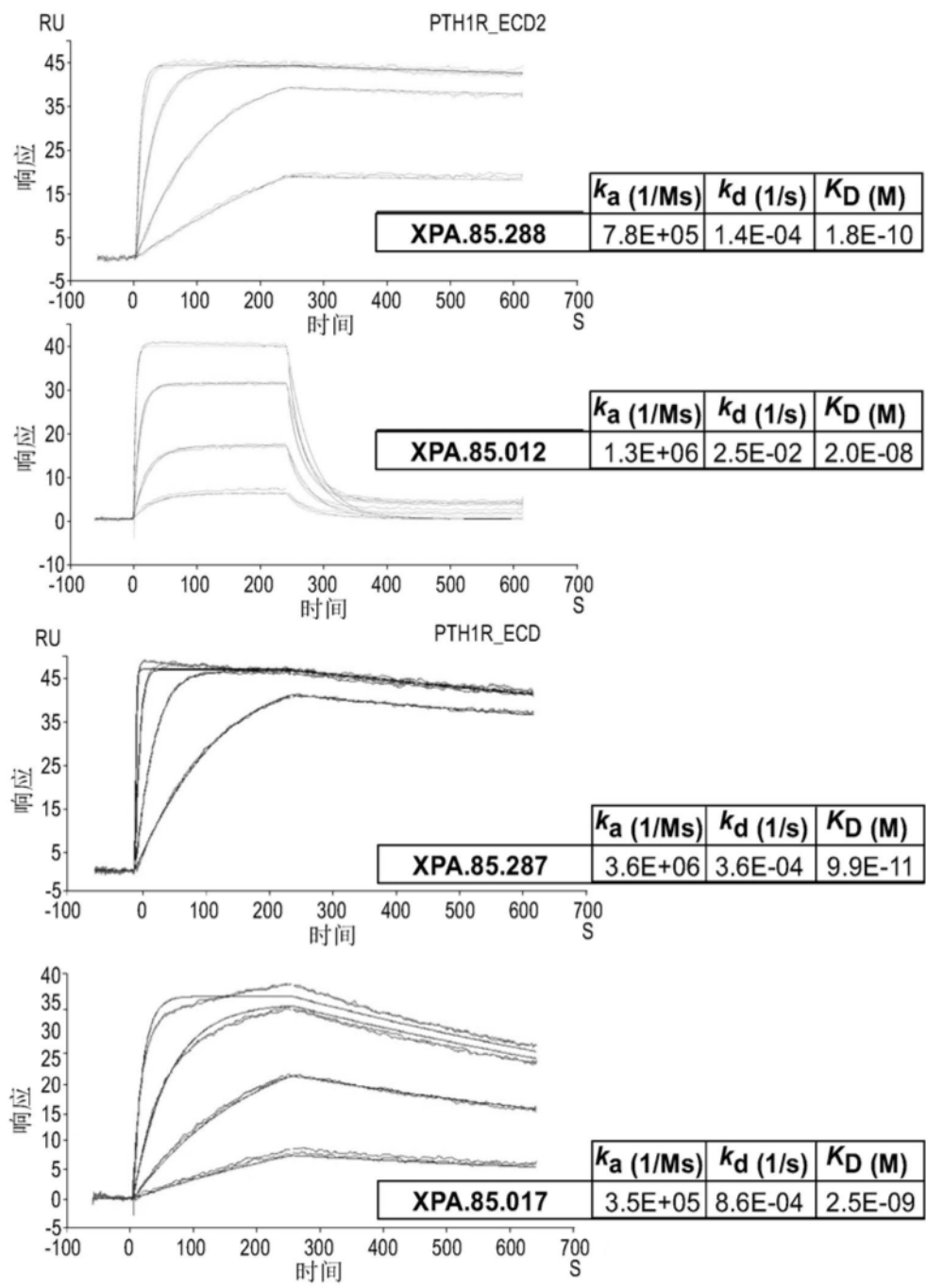


图2

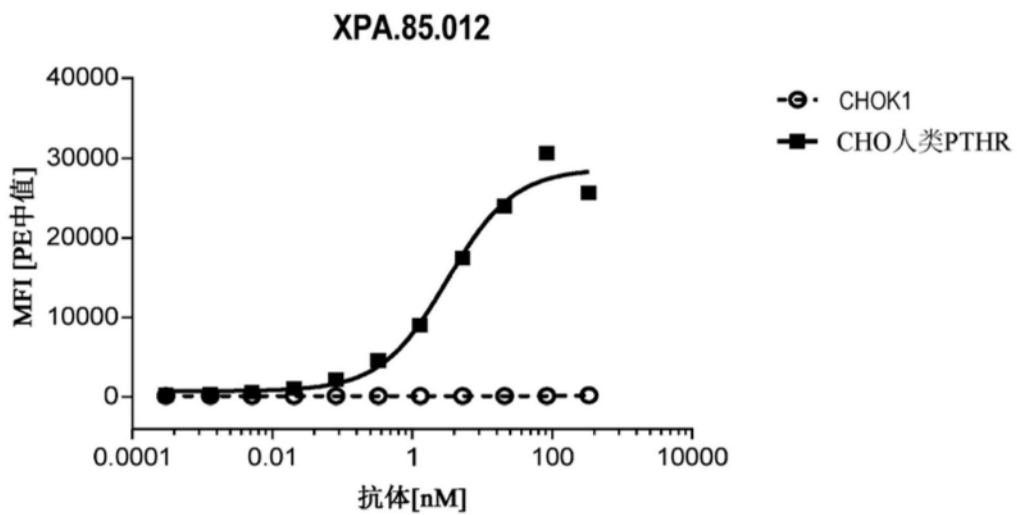


图3A

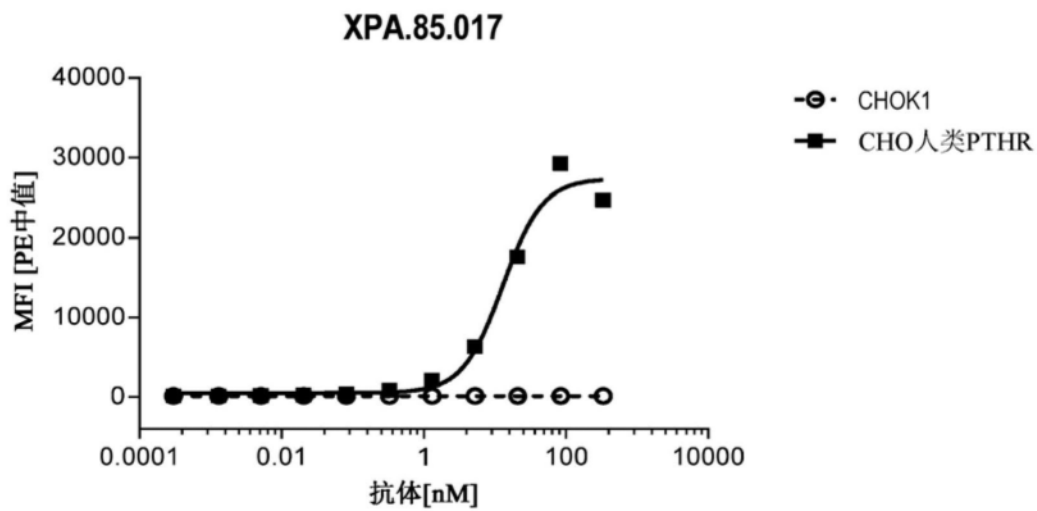


图3B

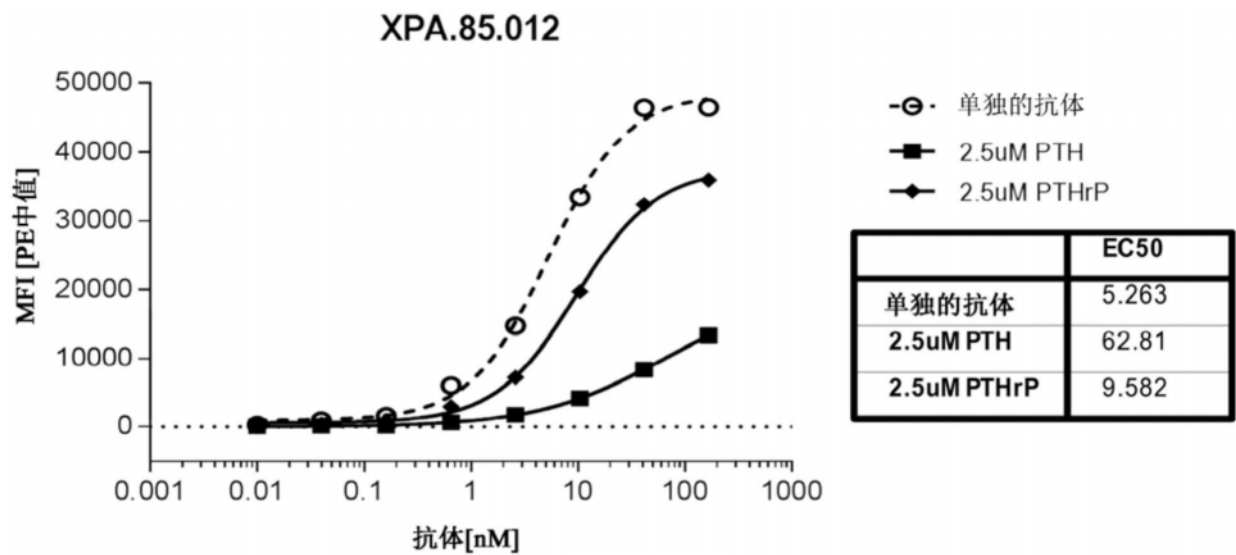


图4A

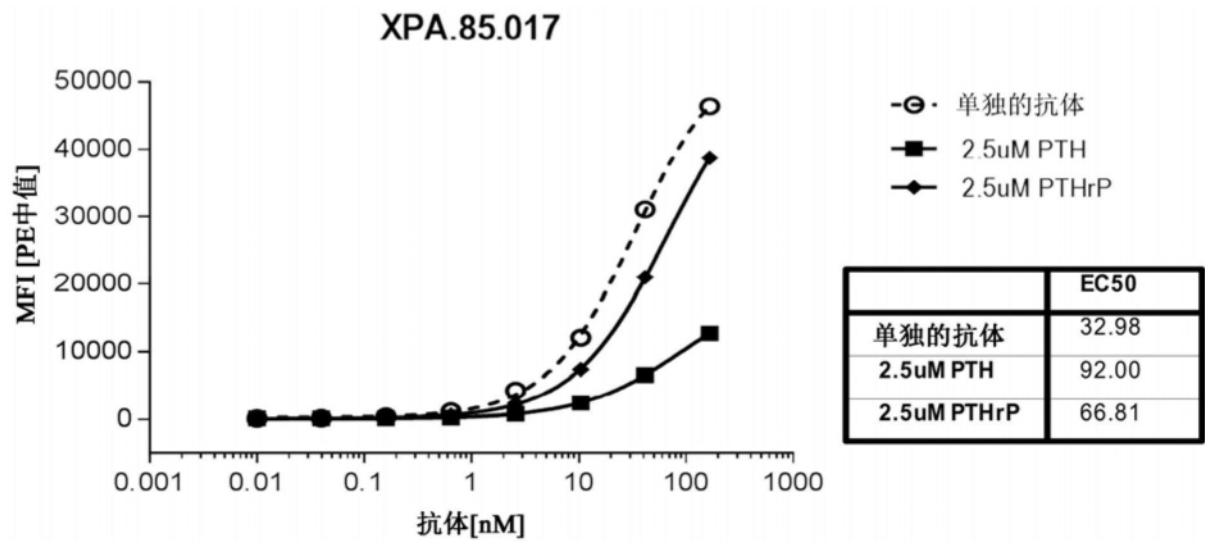


图4B

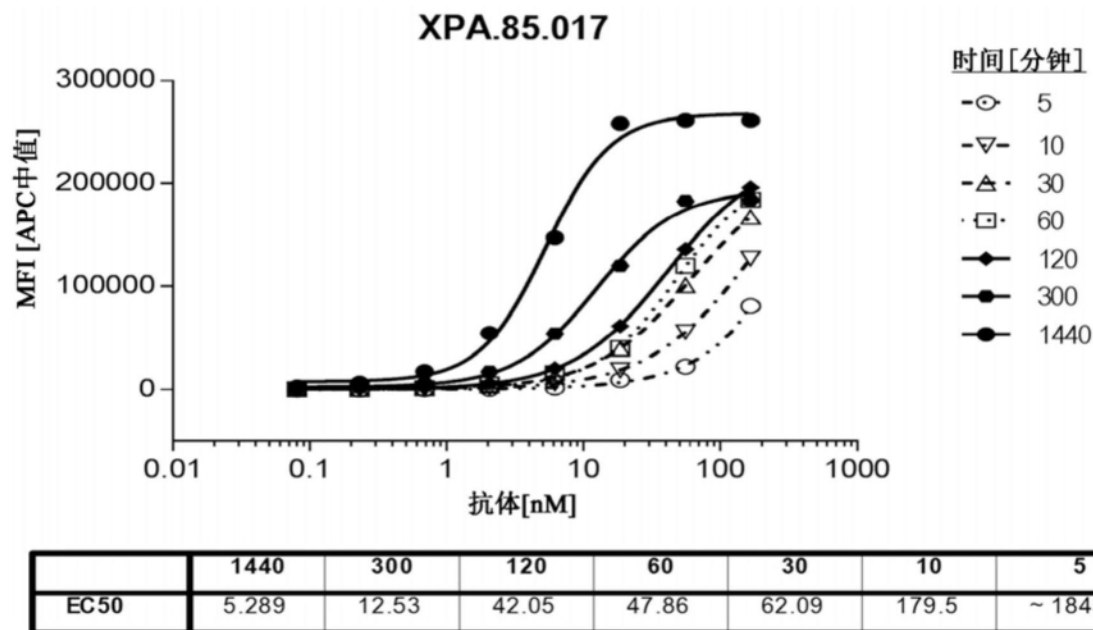


图5A

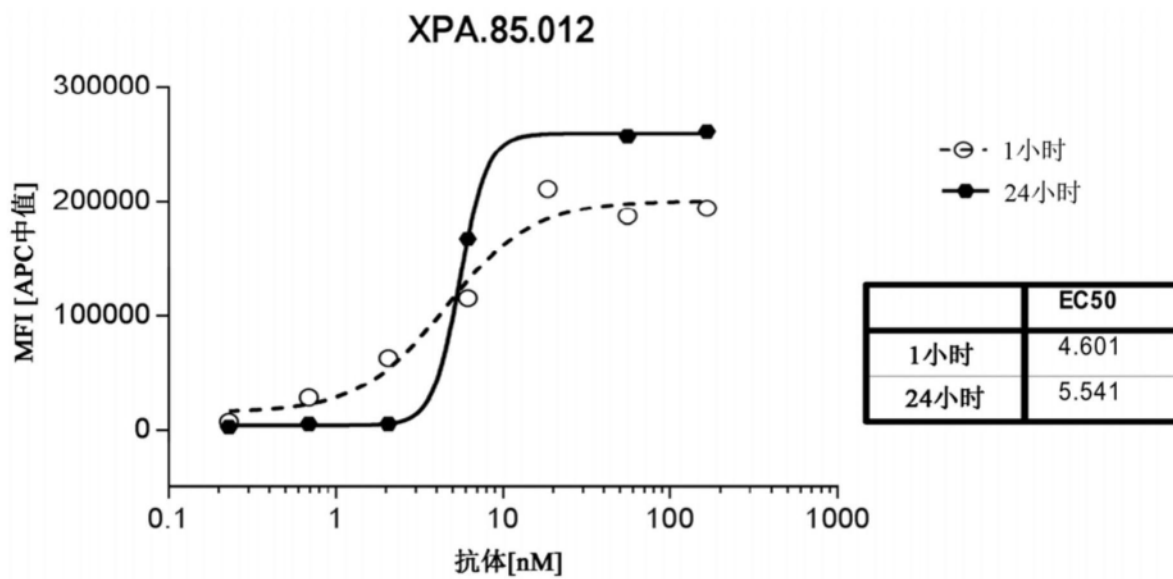


图5B

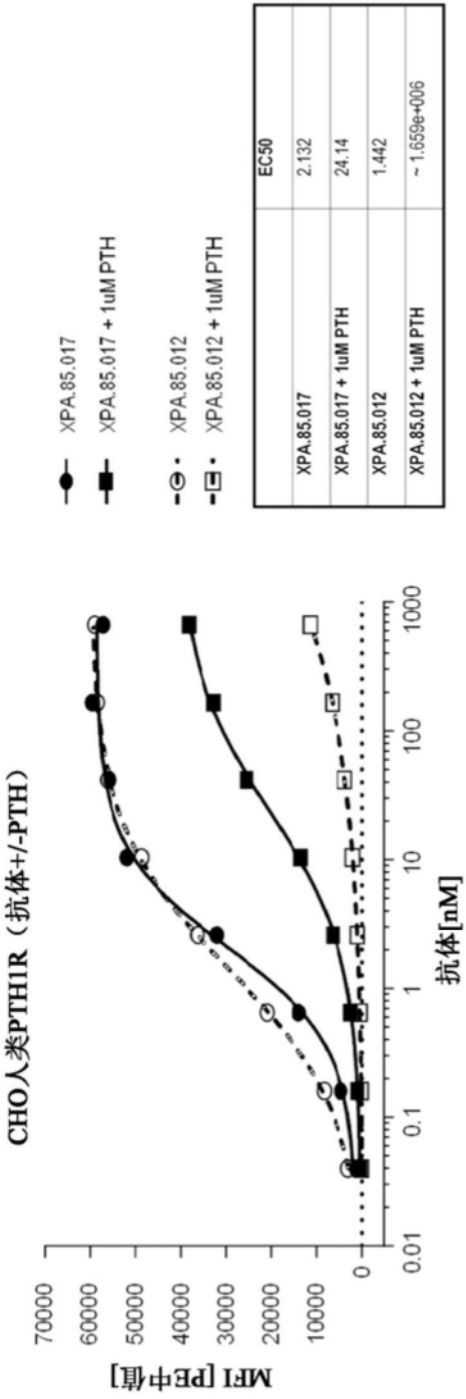


图6A

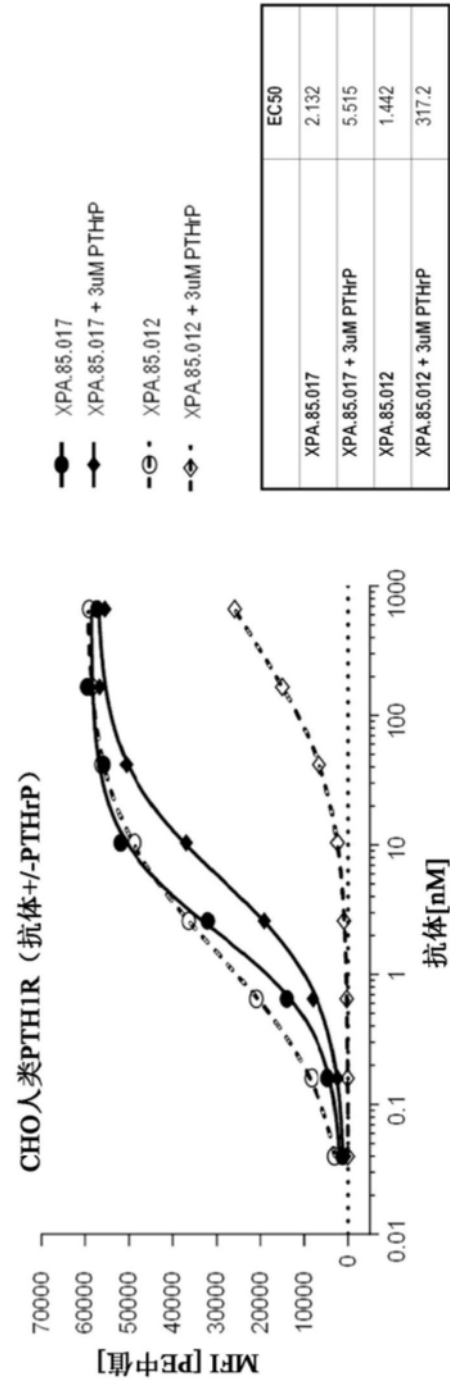


图6B

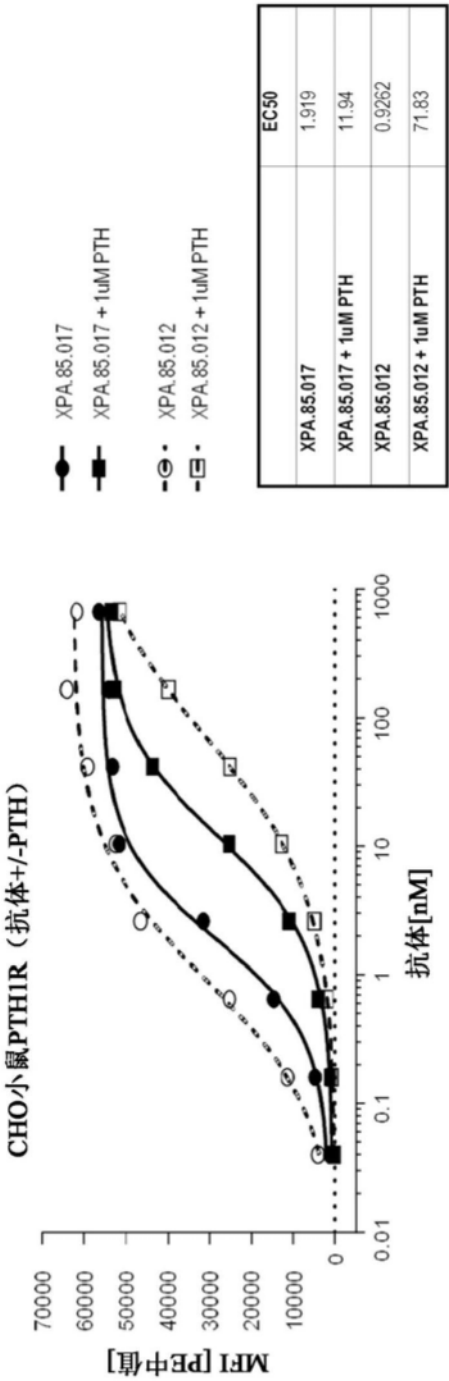


图6C

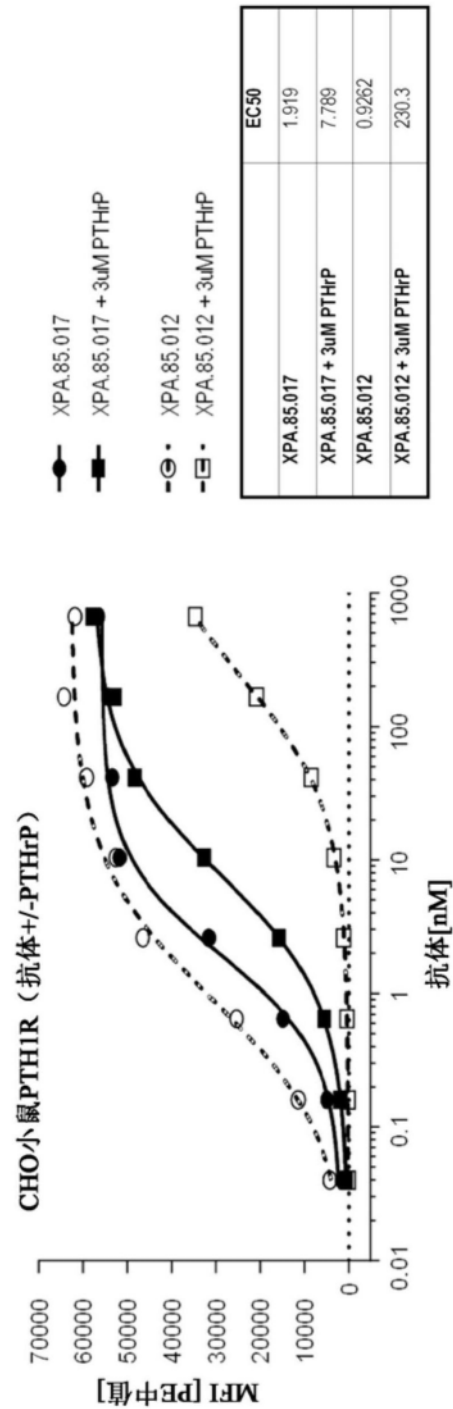


图6D



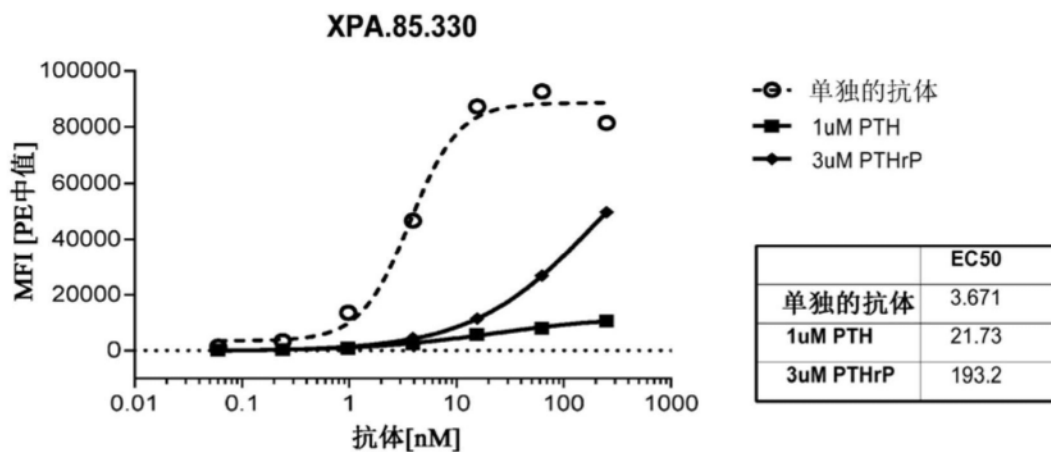


图7A

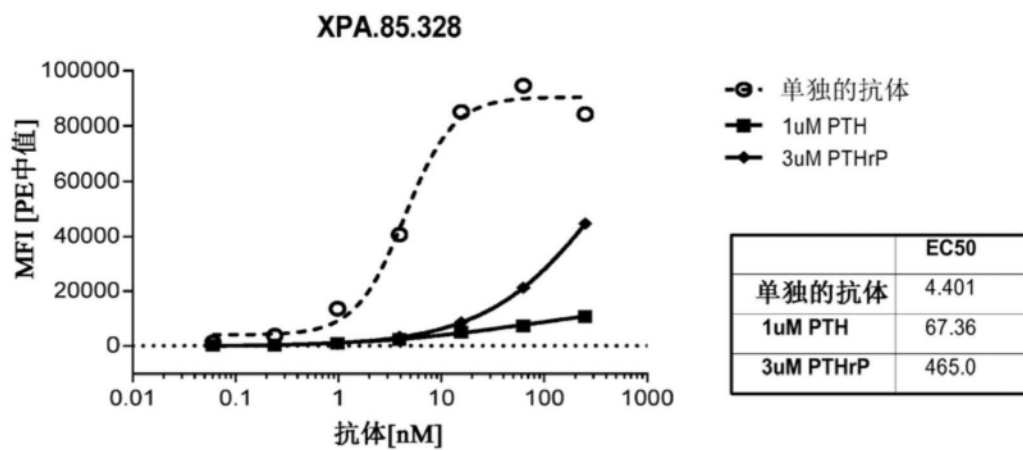


图7B

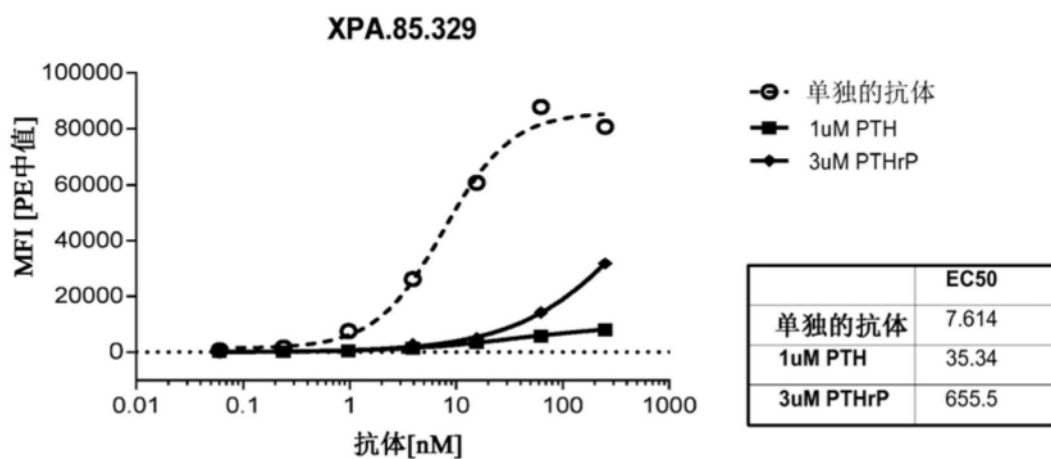


图7C

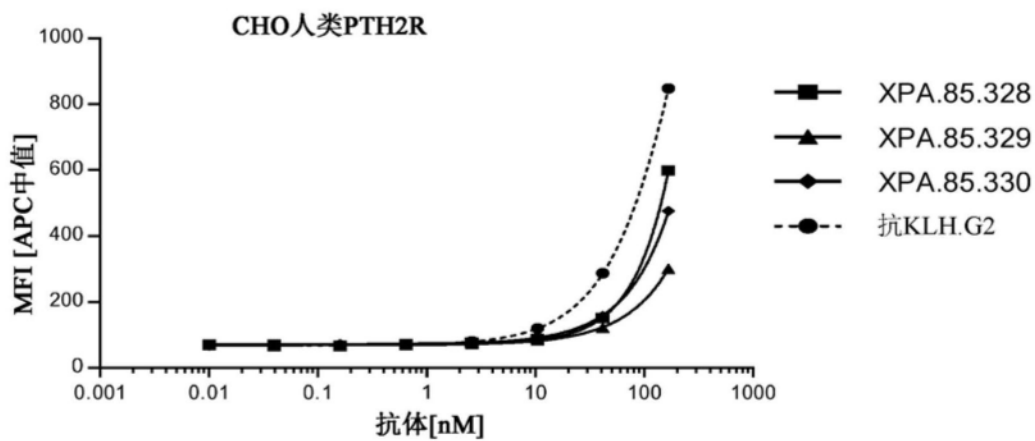


图8

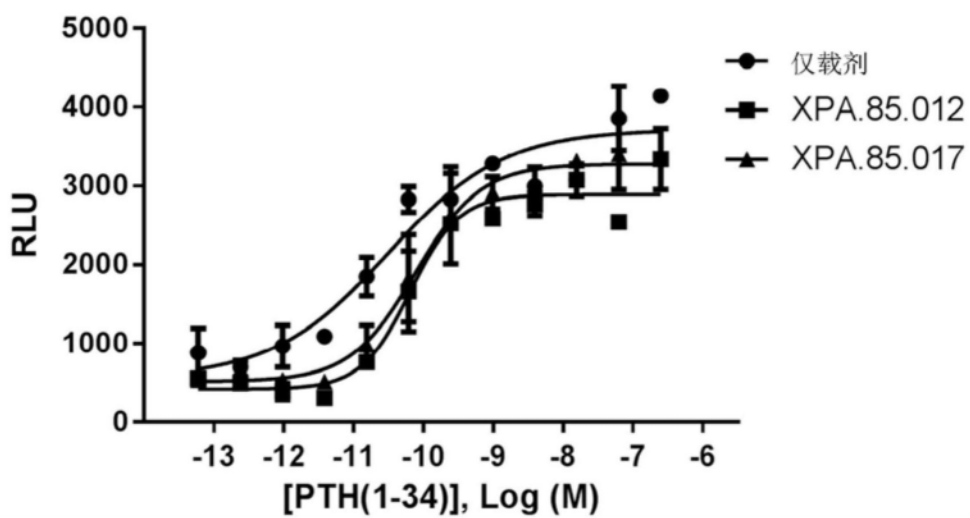


图9A

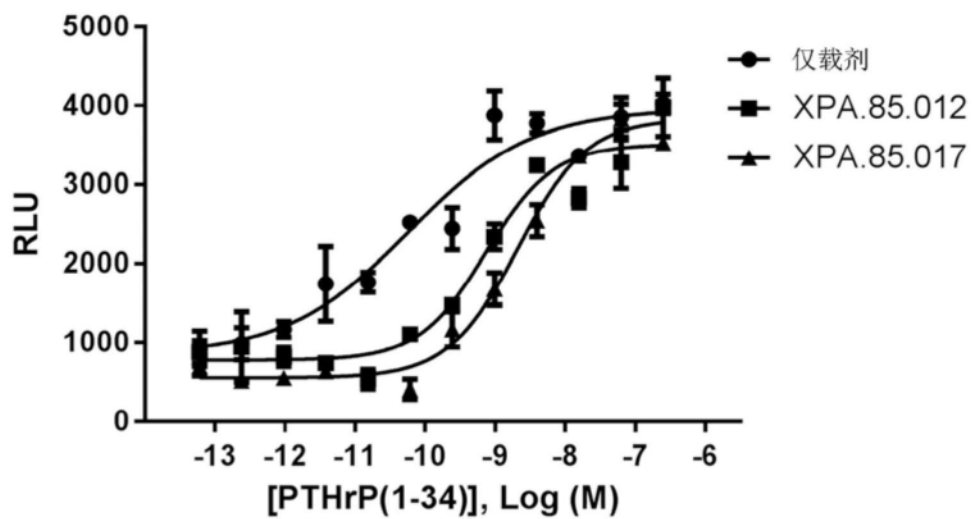


图9B

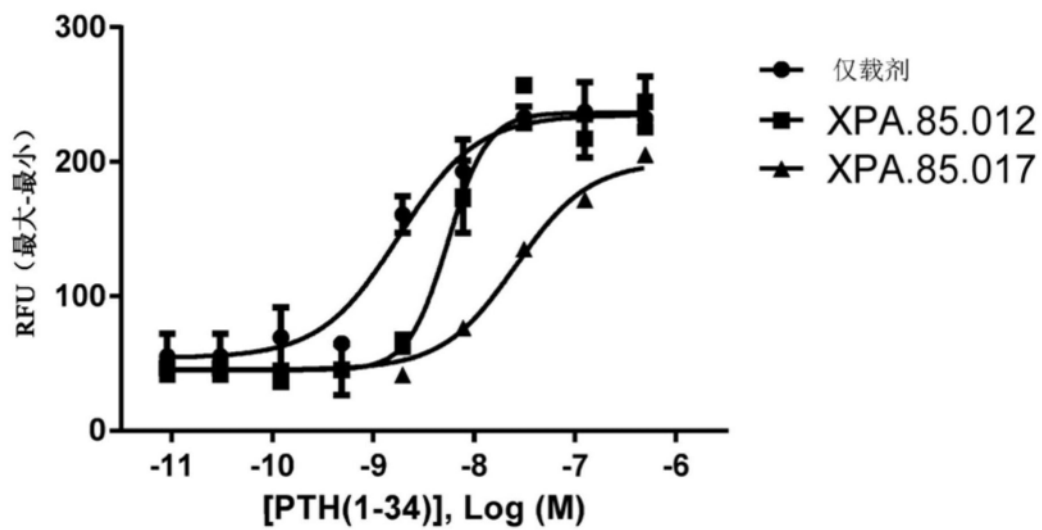


图9C

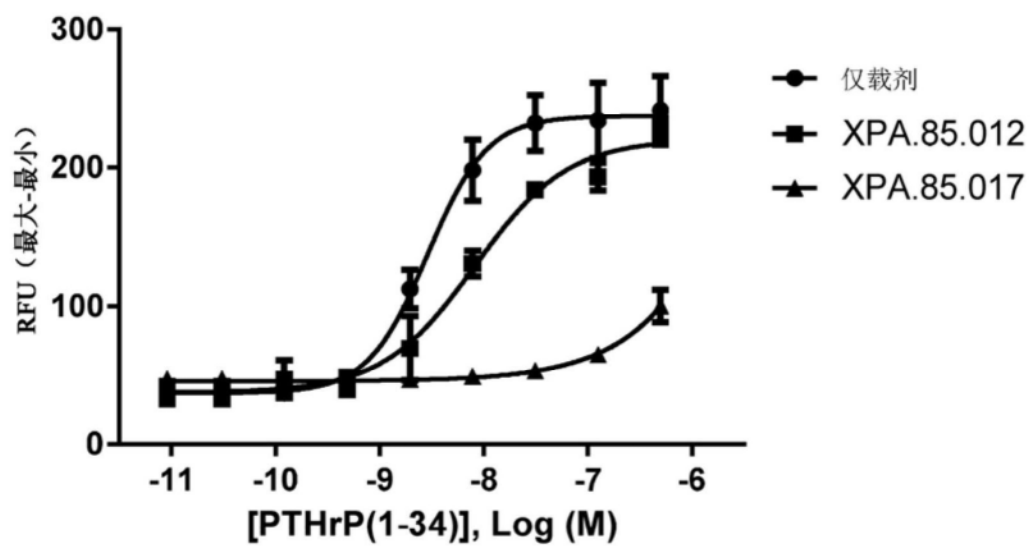


图9D

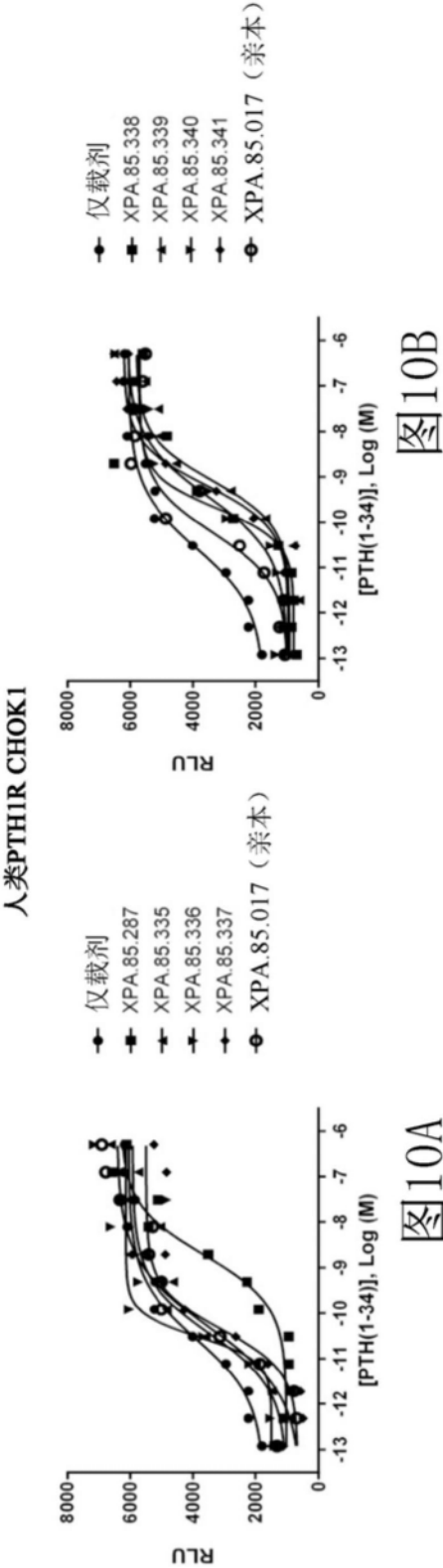


图10B

图10A

小鼠PTHrP CHOK1

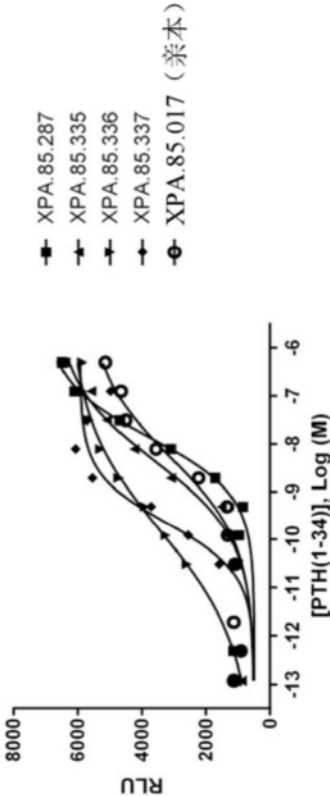


图10C

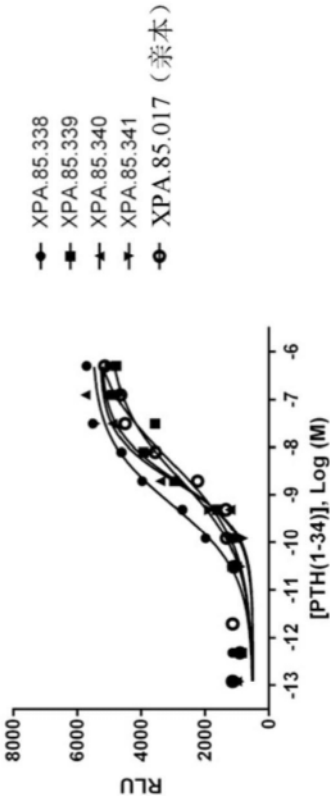
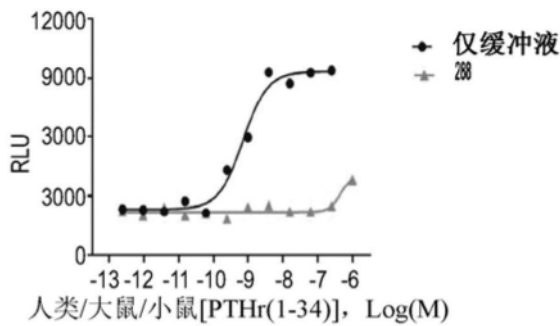
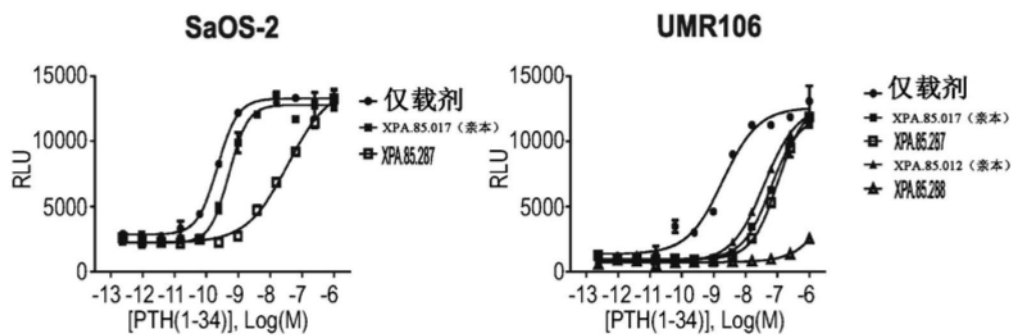
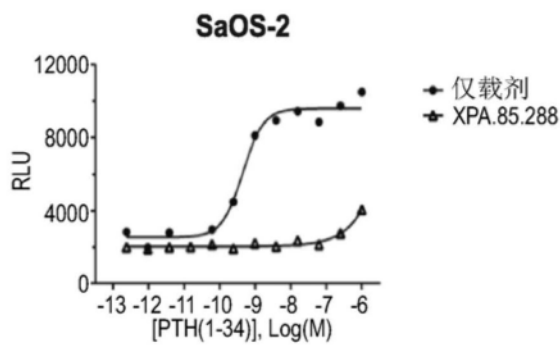


图10D



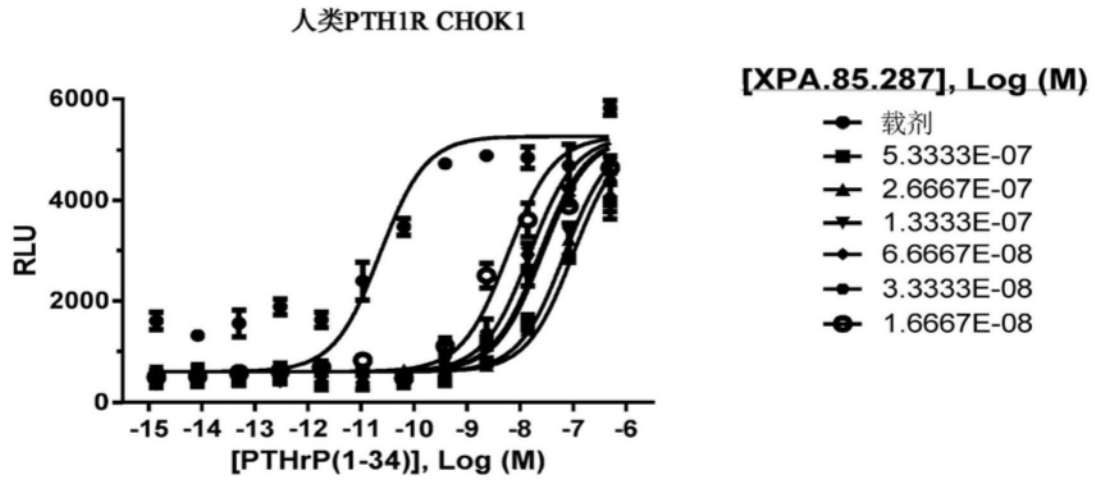


图12A

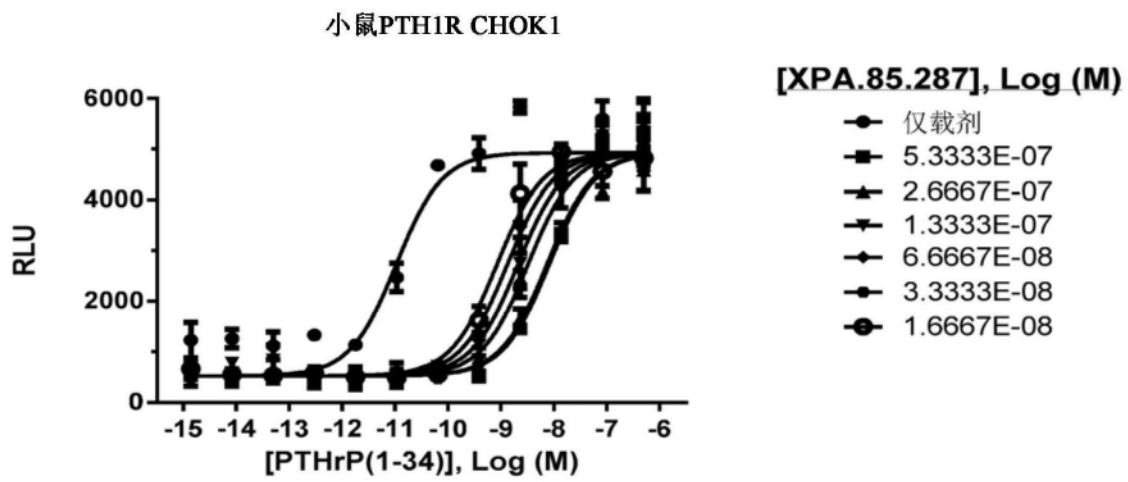


图12B



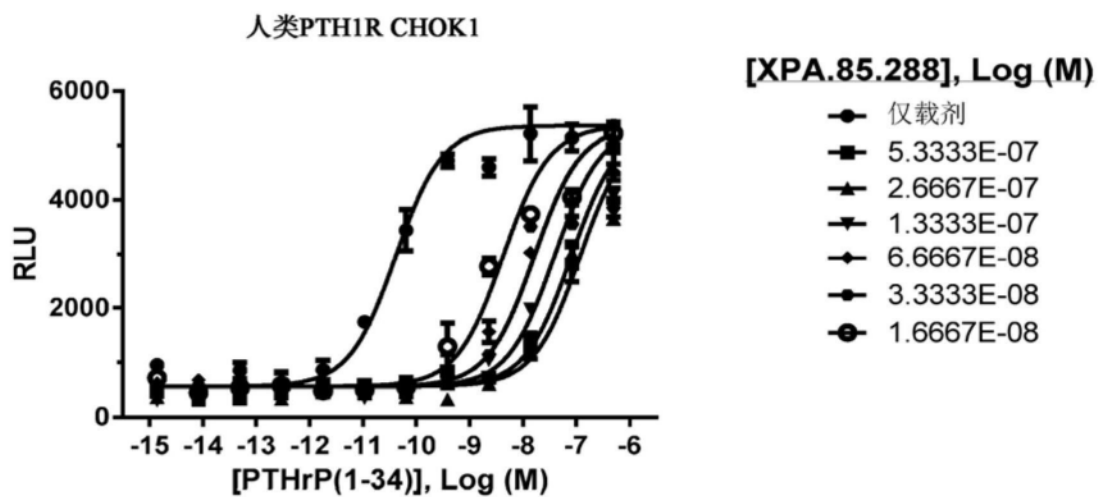


图13A

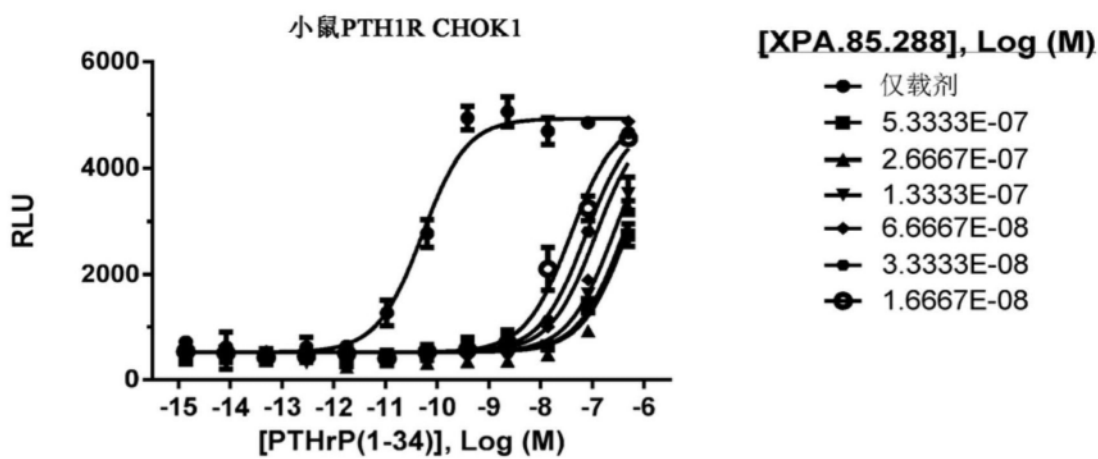


图13B

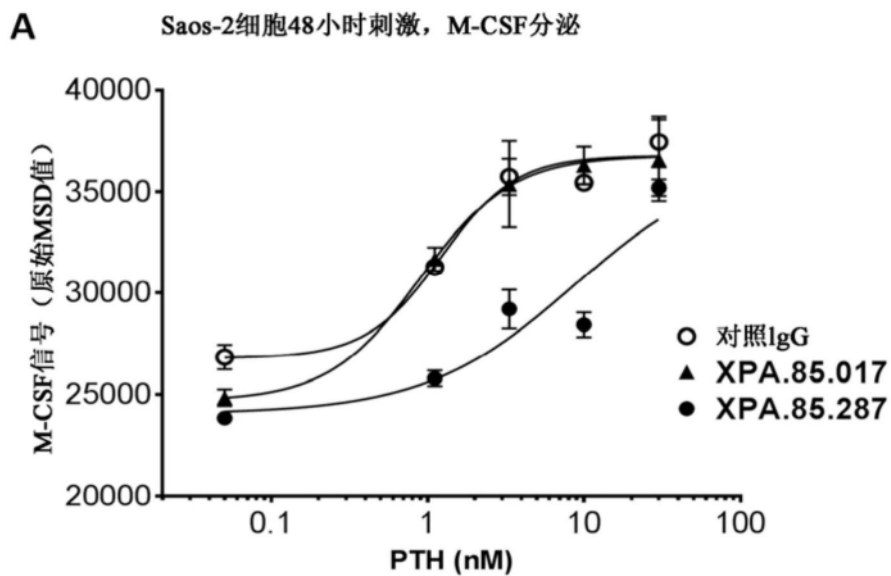


图14A

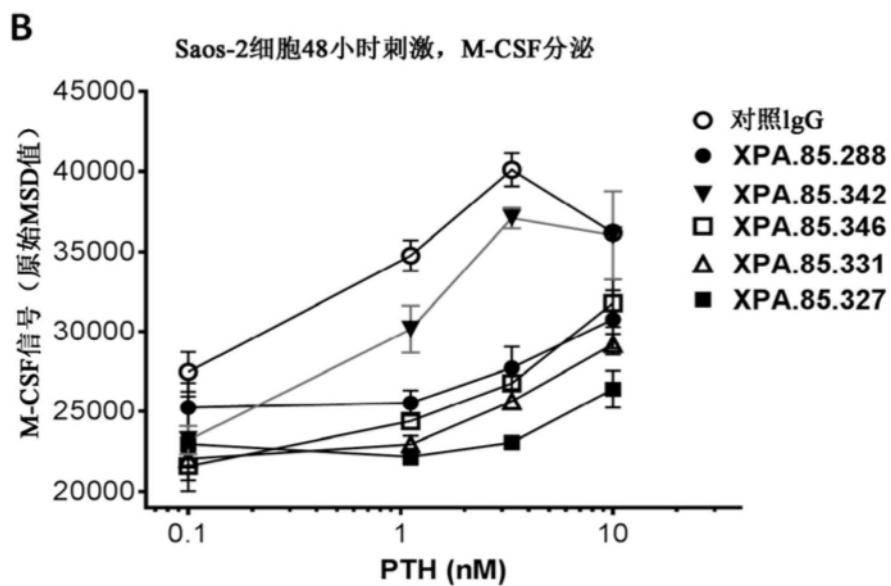


图14B

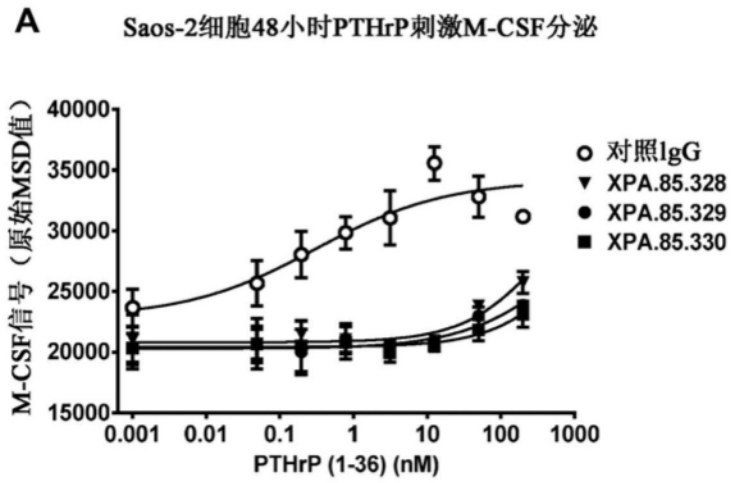


图15A

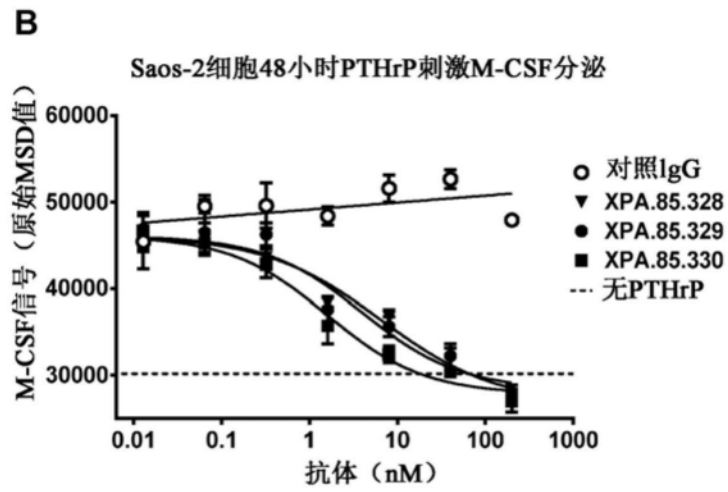


图15B

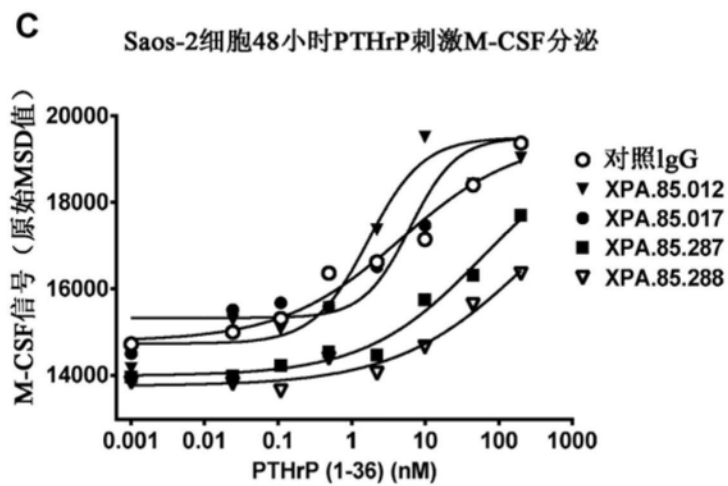


图15C

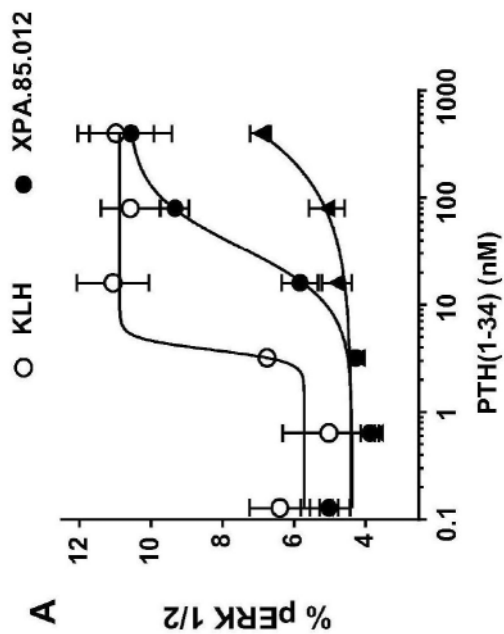


图16A

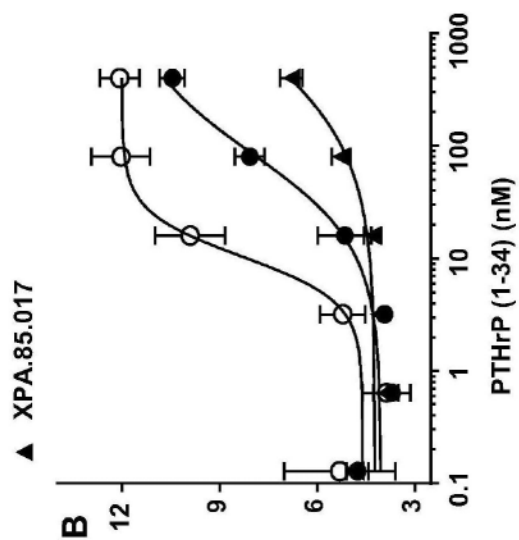


图16B

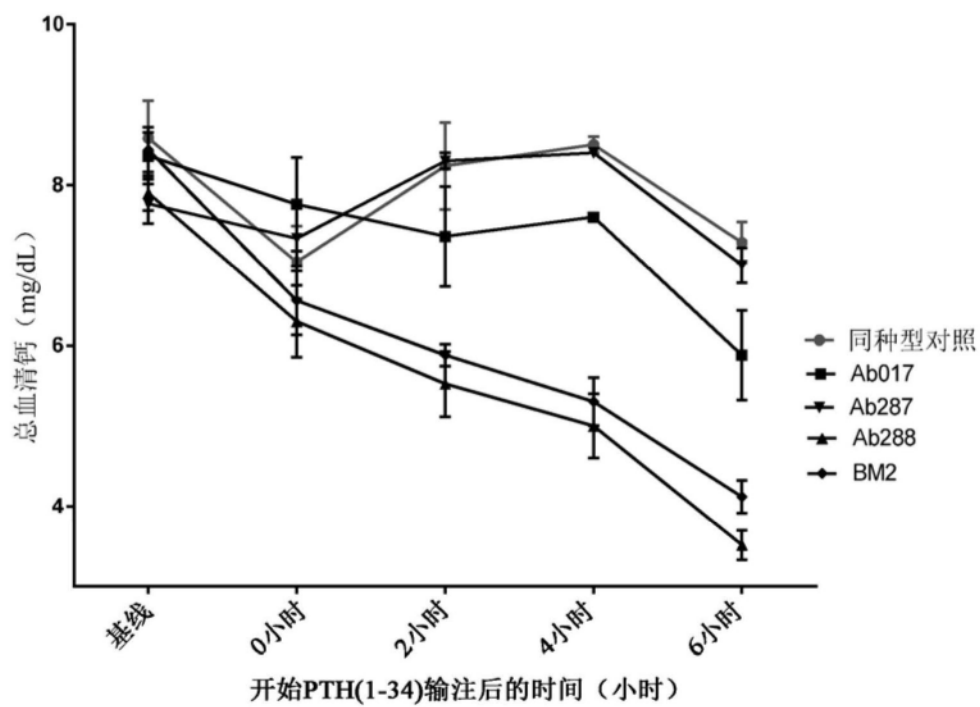


图17

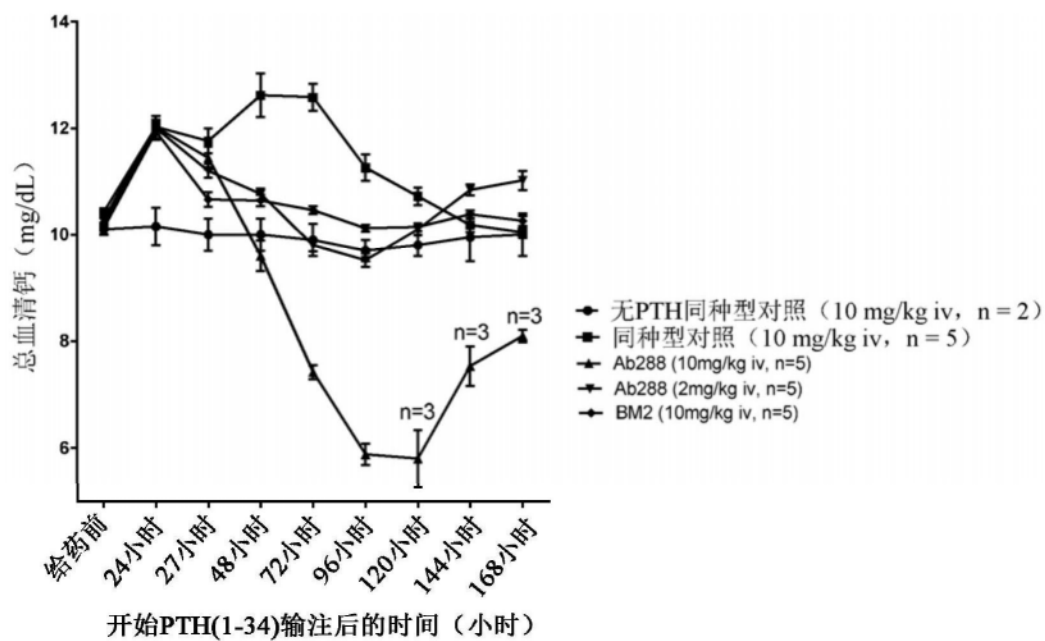


图18A

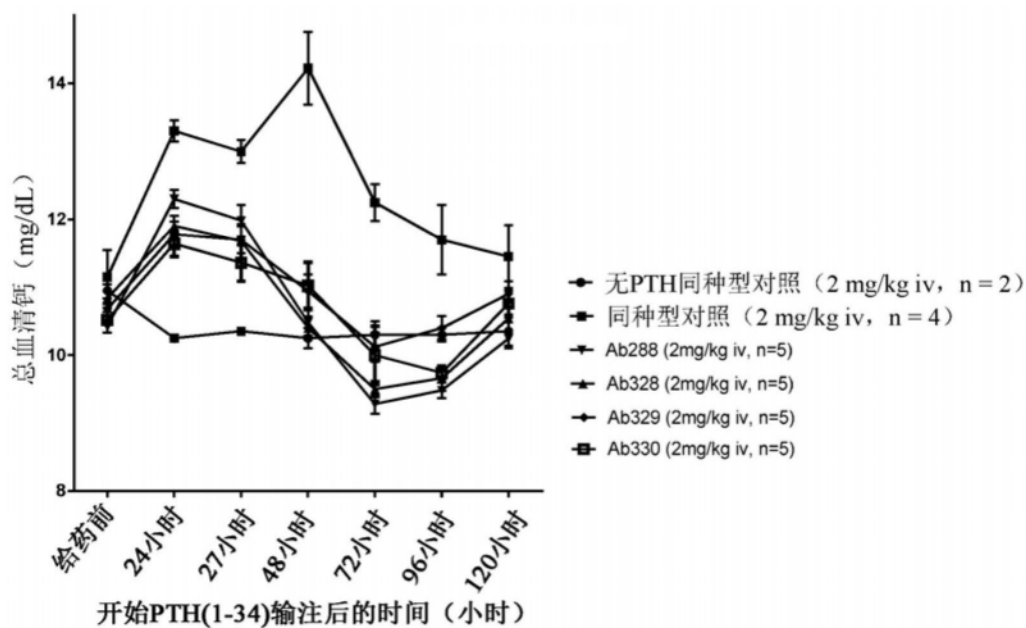


图18B

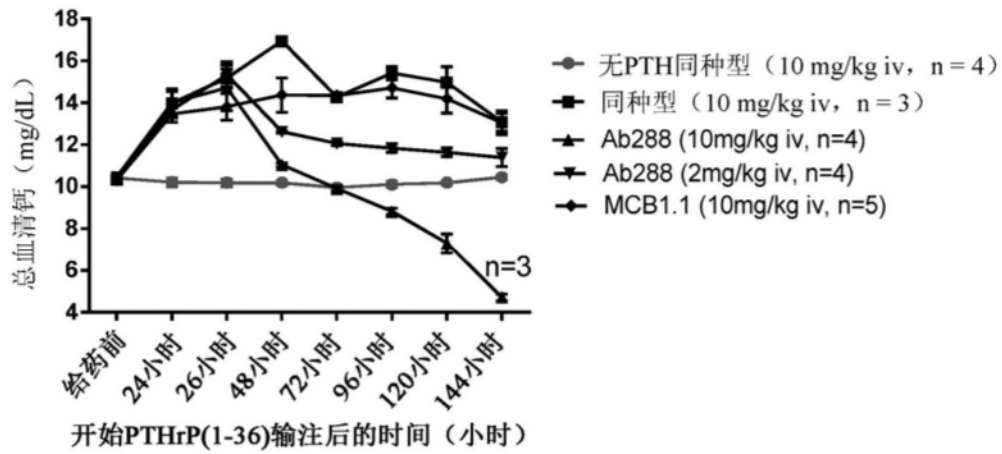


图19A

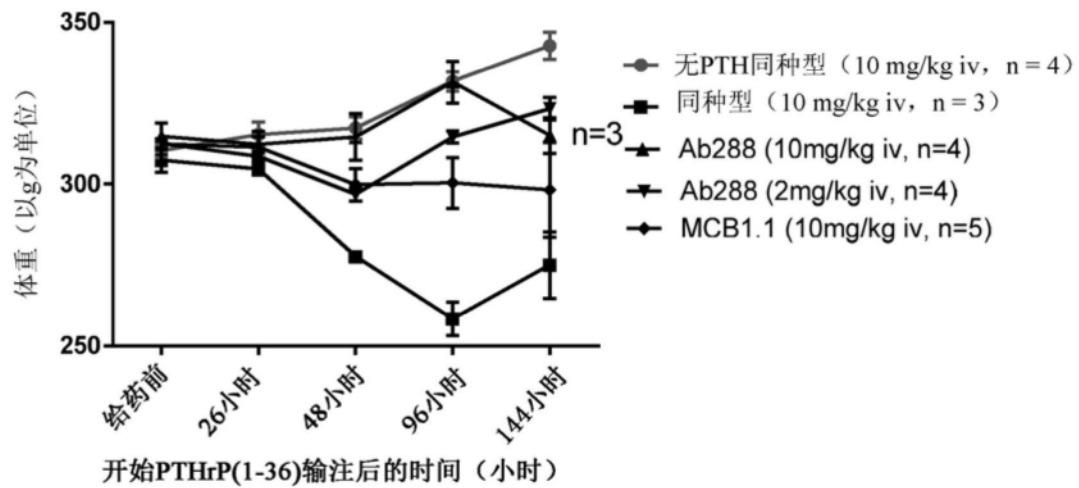


图19B

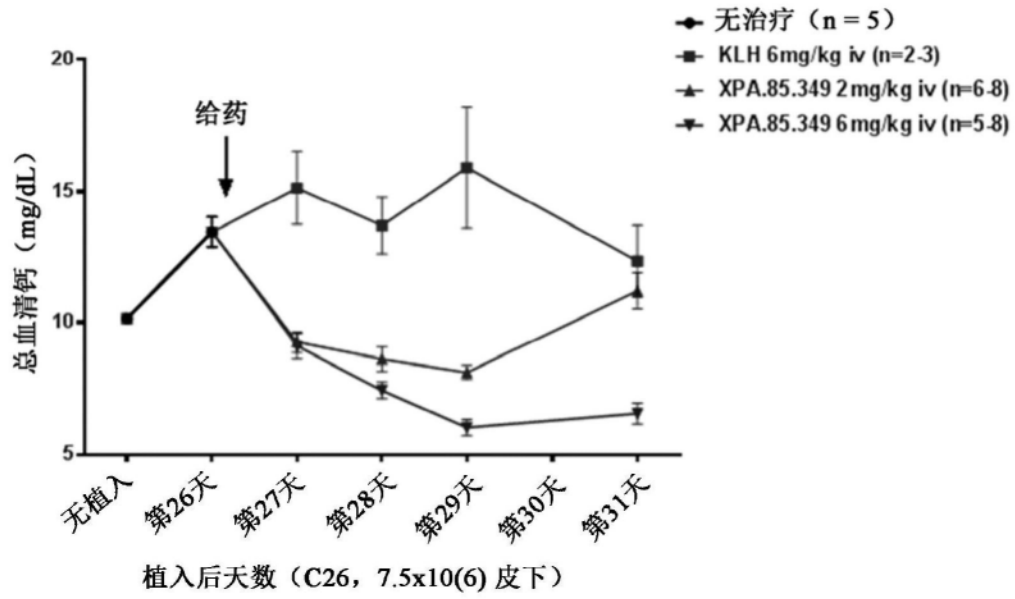


图20A

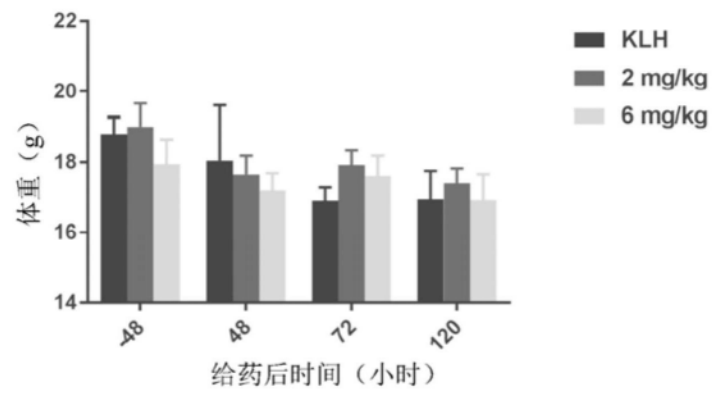


图20B

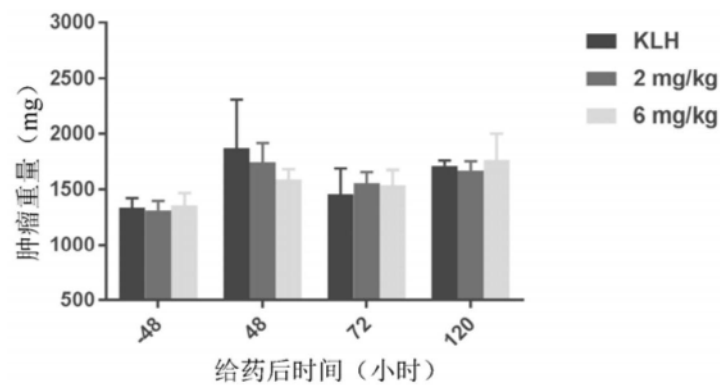


图20C



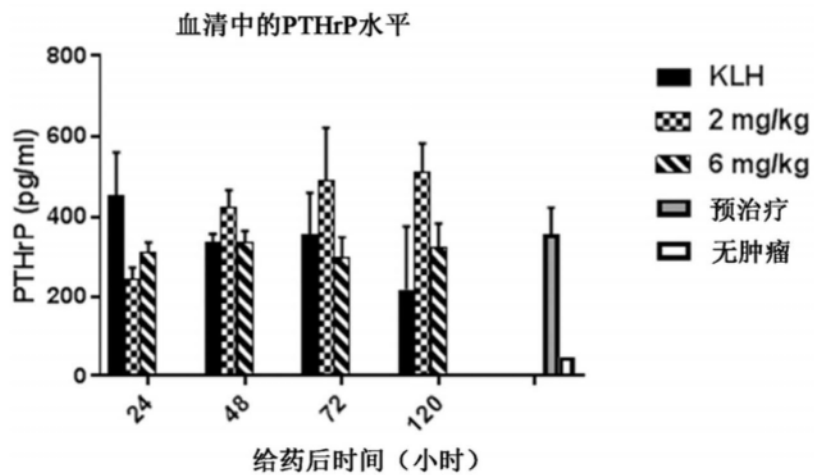


图20D

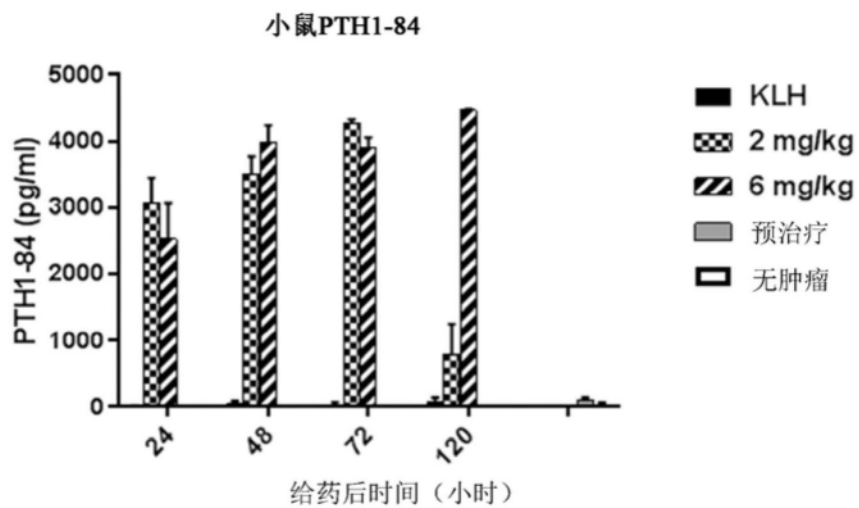


图20E

SEQ ID NO:	名称	序列
1	XPA.85.332 HC可变区	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
2	XPA.85.012 HC可变区	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
3	XPA.85.345 HC可变区	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
4	XPA.85.329 HC可变区	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
5	XPA.85.326 HC可变区	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
6	XPA.85.328 HC可变区	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
7	XPA.85.288 HC可变区	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
8	XPA.85.342 HC可变区	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
9	XPA.85.333 HC可变区	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
10	XPA.85.343 HC可变区	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
11	XPA.85.327 HC可变区	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
12	XPA.85.330 HC可变区	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
13	XPA.85.334 HC可变区	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
14	XPA.85.344 HC可变区	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF

图21

SEQ ID NO:	名称	序列
	HC可变区	QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDATVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
15	XPA.85.346	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF
	HC可变区	QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDATVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
16	XPA.85.331	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF
	HC可变区	QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDATVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
17	XPA.85.347	QMLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF
	HC可变区	QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDATVYVCARGYVVARLWGQGLTVTVSSASTKGPS
18	XPA.85.017	EVQLVETGGGVVRRPGGSLRLSCLAAASGTFSSSAMS WVRQTPGKELQWVSAITPGGEGTYYADV
	HC可变区	KGRFTISRDN SKDTLYLQMDSLRAEDTAVYVCARDLYGSGDAFDIWGQGLTVTVSSASTKGPS
19	XPA.85.341	EVQLVETGGGVVRRPGGSLRLSCLAAASGTFSSSAMS WVRQTPGKELQWVSAITPGGEGTYYADV
	HC可变区	KGRFTISRDN SKDTLYLQMDSLRAEDTAVYVCARDLYGSGDAFDIWGQGLTVTVSSASTKGPS
20	XPA.85.335	EVQLVETGGGVVRRPGGSLRLSCLAAASGTFSSSAMS WVRQTPGKELQWVSAITPGGEGTYYADV
	HC可变区	KGRFTISRDN SKDTLYLQMDSLRAEDTAVYVCARDLYGSGDAFDIWGQGLTVTVSSASTKGPS
21	XPA.85.340	EVQLVETGGGVVRRPGGSLRLSCLAAASGTFSSSAMS WVRQTPGKELQWVSAITPGGEGTYYADV
	HC可变区	KGRFTISRDN SKDTLYLQMDSLRAEDTAVYVCARDLYGSGDAFDIWGQGLTVTVSSASTKGPS
22	XPA.85.339	EVQLVETGGGVVRRPGGSLRLSCLAAASGTFSSSAMS WVRQTPGKELQWVSAITPGGEGTYYADV
	HC可变区	KGRFTISRDN SKDTLYLQMDSLRAEDTAVYVCARDLYGSGDAFDIWGQGLTVTVSSASTKGPS
23	XPA.85.287	EVQLVETGGGVVRRPGGSLRLSCLAAASGTFSSSAMS WVRQTPGKELQWVSAITPGGEGTYYADV
	HC可变区	KGRFTISRDN SKDTLYLQMDSLRAEDTAVYVCARDLYGSGDAFDIWGQGLTVTVSSASTKGPS
24	XPA.85.336	EVQLVETGGGVVRRPGGSLRLSCLAAASGTFSSSAMS WVRQTPGKELQWVSAITPGGEGTYYADV
	HC可变区	KGRFTISRDN SKDTLYLQMDSLRAEDTAVYVCARDLYGSGDAFDIWGQGLTVTVSSASTKGPS
25	XPA.85.337	EVQLVETGGGVVRRPGGSLRLSCLAAASGTFSSSAMS WVRQTPGKELQWVSAITPGGEGTYYADV
	HC可变区	KGRFTISRDN SKDTLYLQMDSLRAEDTAVYVCARDLYGSGDAFDIWGQGLTVTVSSASTKGPS
26	XPA.85.338	EVQLVETGGGVVRRPGGSLRLSCLAAASGTFSSSAMS WVRQTPGKELQWVSAITPGGEGTYYADV
	HC可变区	KGRFTISRDN SKDTLYLQMDSLRAEDTAVYVCARDLYGSGDAFDIWGQGLTVTVSSASTKGPS
27	XPA.85.332HCDR1	GGTFSSYA
28	XPA.85.332HCDR2	IIPIFGTA
29	XPA.85.332HCDR3	ARGYVVARL
30	XPA.85.012HCDR1	GGTFSSYA
31	XPA.85.012HCDR2	IIPIFGTA

图21 (续)

SEQ ID NO:	名称	序列
32	XPA.85.012HCDR3	ARGYVVARL
33	XPA.85.345HCDR1	GGTFSSYA
34	XPA.85.345HCDR2	IIPIFGTA
35	XPA.85.345HCDR3	ARGYVVARL
36	XPA.85.329HCDR1	GGTFSSYA
37	XPA.85.329HCDR2	IIPIFGTA
38	XPA.85.329HCDR3	ARGYVVARL
39	XPA.85.326HCDR1	GGTFSSYA
40	XPA.85.326HCDR2	IIPIFGTA
41	XPA.85.326HCDR3	ARGYVVARL
42	XPA.85.328HCDR1	GGTFSSYA
43	XPA.85.328HCDR2	IIPIFGTA
44	XPA.85.328HCDR3	ARGYVVARL
45	XPA.85.288HCDR1	GGTFSSYA
46	XPA.85.288HCDR2	IIPIFGTA
47	XPA.85.288HCDR3	ARGYVVARL
48	XPA.85.342HCDR1	GGTFSSYA
49	XPA.85.342HCDR2	IIPIFGTA
50	XPA.85.342HCDR3	ARGYVVARL
51	XPA.85.333HCDR1	GGTFSSYA
52	XPA.85.333HCDR2	IIPIFGTA
53	XPA.85.333HCDR3	ARGYVVARL
54	XPA.85.343HCDR1	GGTFSSYA
55	XPA.85.343HCDR2	IIPIFGTA
56	XPA.85.343HCDR3	ARGYVVARL
57	XPA.85.327HCDR1	GGTFSSYA
58	XPA.85.327HCDR2	IIPIFGTA
59	XPA.85.327HCDR3	ARGYVVARL
60	XPA.85.330HCDR1	GGTFSSYA
61	XPA.85.330HCDR2	IIPIFGTA

图21 (续)

SEQ ID NO:	名称	序列
62	XPA.85.330HCDR3	ARGYVVARL
63	XPA.85.334HCDR1	GGTFSSYA
64	XPA.85.334HCDR2	IIPIFGTA
65	XPA.85.334HCDR3	ARGYVVARL
66	XPA.85.344HCDR1	GGTFSSYA
67	XPA.85.344HCDR2	IIPIFGTA
68	XPA.85.344HCDR3	ARGYVVARL
69	XPA.85.346HCDR1	GGTFSSYA
70	XPA.85.346HCDR2	IIPIFGTA
71	XPA.85.346HCDR3	ARGYVVARL
72	XPA.85.331HCDR1	GGTFSSYA
73	XPA.85.331HCDR2	IIPIFGTA
74	XPA.85.331HCDR3	ARGYVVARL
75	XPA.85.347HCDR1	GGTFSSYA
76	XPA.85.347HCDR2	IIPIFGTA
77	XPA.85.347HCDR3	ARGYVVARL
78	XPA.85.017HCDR1	GTFSSSA
79	XPA.85.017HCDR2	ITPGGEGT
80	XPA.85.017HCDR3	ARDLYGSYGDAFDI
81	XPA.85.341HCDR1	GTFSSSA
82	XPA.85.341HCDR2	ITPGGEGT
83	XPA.85.341HCDR3	ARDLYGSYGDAFDI
84	XPA.85.335HCDR1	GTFSSSA
85	XPA.85.335HCDR2	ITPGGEGT
86	XPA.85.335HCDR3	ARDLYGSYGDAFDI
87	XPA.85.340HCDR1	GTFSSSA
88	XPA.85.340HCDR2	ITPGGEGT
89	XPA.85.340HCDR3	ARDLYGSYGDAFDI
90	XPA.85.339HCDR1	GTFSSSA
91	XPA.85.339HCDR2	ITPGGEGT

图21 (续)

SEQ ID NO:	名称	序列
92	XPA.85.339HCDR3	ARDLYGSYGDAFDI
93	XPA.85.287HCDR1	GFTFSSA
94	XPA.85.287HCDR2	ITPGGEGT
95	XPA.85.287HCDR3	ARDLYGSYGDAFDI
96	XPA.85.336HCDR1	GFTFSSA
97	XPA.85.336HCDR2	ITPGGEGT
98	XPA.85.336HCDR3	ARDLYGSYGDAFDI
99	XPA.85.337HCDR1	GFTFSSA
100	XPA.85.337HCDR2	ITPGGEGT
101	XPA.85.337HCDR3	ARDLYGSYGDAFDI
102	XPA.85.338HCDR1	GFTFSSA
103	XPA.85.338HCDR2	ITPGGEGT
104	XPA.85.338HCDR3	ARDLYGSYGDAFDI
105	XPA.85.332 LC可变区	ETTLTQSPAFMSASVGRVTITCQASQDINNFLNWYQQPKGAPKFLIYDASNLEKGVPSKFSRGSGTEFTLTISLQPEDIATYYCQYRDFPLTFGQGRLEIKRTVAAPS
106	XPA.85.012 LC可变区	DVMTQSPPLSLPTPEGEPAFISCRSSQSLVYGDGHNYLAWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQGLQTPLTFGGGTKLEIKRTVAAPS
107	XPA.85.345 LC可变区	ETTLTQSPAFMSASVGRVTITCQASQDINNFLNWYQQPKGAPKFLIYDASNLEKGVPSRFSGRSGTEFTLTISLQPEDIATYYCQYRDFPLTFGQGRLEIKRTVAAPS
108	XPA.85.329 LC可变区	DIVMTQTPLSLSVTPGQPAFISCKSSQSLHIDGLTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSHRFSGVSKFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQSLHLPITFGQGRLEIKRTVAAPS
109	XPA.85.326 LC可变区	DIVMTQTPLSLSVTPGQPAFISCKSSQSLHIDGLTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSHRFSGVSKFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQSLHLPITFGQGRLEIKRTVAAPS
110	XPA.85.328 LC可变区	DVMTQTPLSLSVTPGQPAFISCKSSQSLHIDGLTYLYWYLQKSGQSPQLLIYEVSNRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQSLHFPITFGQGRLEIKRTVAAPS
111	XPA.85.288 LC可变区	DVMTQTPLSLSVTPGQPAFISCKSSQSLHIDGLTYLYWYLQKSGQSPQLLIYEVSNRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQSLHFPITFGQGRLEIKRTVAAPS
112	XPA.85.342 LC可变区	ETTLTQSPTFMSASVGRVTITCQASQDINNFLNWYQQPKGAPKFLIYDASNLEKGVPSRFSGRSGTEFTLTISLQPEDIATYYCQYRDFPLTFGQGRLEIKRTVAAPS
113	XPA.85.333	DVMTQTPLSLSVTPGQPAFISCKSSQSLHIDGLTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEVSTRFSGVS

图21 (续)

SEQ ID NO:	名称	序列
	LC可变区	DRFTGSGSGTDFTLTLEISRVEAEDGVVYCMQGLHLPPTFGQGTKEIKRTVAAPS
114	XPA.85.343 LC可变区	DVMTQTPLSVTPGQPASISCKSSQSLHIDGRTYLYWLQKAGPPQLLIYEVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDGVVYCMQSIHFPLTFGGGTKEIKRTVAAPS
115	XPA.85.327 LC可变区	DIVMTQTPLSVTPGQPASITCKSSQSLHIDGNTYLYWLQRPQPPQLLIYEISNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDGVVYCMQSLHFPITFFGQGTREIKRTVAAPS
116	XPA.85.330 LC可变区	DIVMTQTPLSVTPGQPASISCKSSQSLHIDGNTYLYWLQRPQPPQLLIYEISNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDGVVYCMQSLHFPITFFGQGTREIKRTVAAPS
117	XPA.85.334 LC可变区	DIVMTQTPLSVTPGQPASITCKSSQSLHIDGNTYLYWLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDGVVYCMQSLHFPITFFGQGTREIKRTVAAPS
118	XPA.85.344 LC可变区	DVMTQTPLSVTPGQPASISCKSTQSLLRDNGNTYLYWLQKPGQSPQLLIYEVSGRFSGVP ERFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDGVVYCMQSIHFPLTFGGGTKEIKRTVAAPS
119	XPA.85.346 LC可变区	DIVMTQTPLSVTPGQPASITCKSSQSLHIDGNTYLYWLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDGVVYCMQSLHLPITFFGQGTREIKRTVAAPS
120	XPA.85.331 LC可变区	DVMTQSPPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLHIDGNLYLQWLQKPGQSPQLLVHLGSFRASGVP DRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDGVVYCMQGLQTPPTFFGPGTKVEIKRTVAAPS
121	XPA.85.347 LC可变区	DIVMTQTPLSVTPGQPASISCKSSQSLFHDHGRTHLSWYLOKPGQPPQLLIYEASNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDGVVYCMQGIHLPPAFGGGTKEIKRTVAAPS
122	XPA.85.017 LC可变区	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTITSCSGSSNIGYNYVSWYQQFPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFS GSKSGTSATLGTGLQGTGEADYCYCGTWDNSRSPWVFGGTQKVTVLGQPKA
123	XPA.85.341 LC可变区	SYELTQPSVSVSPGQTASITCSGDKLGEKYASWYQQKPGQSPVLVMFEDTKRPSGIPERFSGS NSGNTATLITISGTQAEADYCYQAWDSSWVFGGTQTLVLGQPKA
124	XPA.85.335 LC可变区	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTITSCSGNTSNIGNFVSWYQQLPGLTAPKLLIYDDNNKRPSGIPDRFS GSKSGTSATLGISGLQGTGEADYCYCGTWDNSLNPWVFGGTQTLVLGQPKA
125	XPA.85.340 LC可变区	SYVLTQPPSVSVAPGQTASITCSGDNLGEKFVSWYQQKAGQSPVLVIFEDNNKRPSGIPERFAGS NSGNRATLTIRGTQAEADYCYQAWDSSWVFGGTQTLVLGQPKA
126	XPA.85.339 LC可变区	SYELTQPPSVSVAPGQTATITCSGDRLGDKFIISWYQQKPGQSPVLVIFEDNERPSRIPERFSGS NSGNSATLITISGTQAEADYCYQAWDSSWVFGGTQTLVLGQPKA
127	XPA.85.287 LC可变区	SYVLTQPPSVSVAPGQTARTCSGDKLGDYVSWYQQKPGQSPVLVMFEDTGRPAGIPERFSGS NSGNTATLITISGTQAEADYCYQAWGTSWVFGGTQTLVLGQPKA
128	XPA.85.336	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTITSCSGTGSNIGSNYVAWYQQLPGLTAPKLLIYDDNNKRPSGTPDRFS

图21 (续)

SEQ ID NO:	名称	序列
	LC可变区	GSKSGTSATLVIAGLQTGDEADYYCGTWDNTLNVGGVFGGGTQLTVLGQPKA
129	XPA.85.337	SYVLTQPPSVSVAPGQTATITCSGDDDFGDKYVSWYQQKPGQSPLLVIFQDNERPSGIPERFSGS
	LC可变区	NSGNTATLTI SGTQAMDEADYYCQAWDSNWVFGGKVTVLGQPKA
130	XPA.85.338	SYELTQPPSVSVAPGQTATITCSGDKLGDYASWYQQKPGQSPVLVFMFENRDRPSGIPDRFSGS
	LC可变区	NSGNTATLTI SGTQAMDEADYYCQAWDSSTAWVFGGGTQLTVLGQPKA
131	XPA.85.332LCDR1	QDINNF
132	XPA.85.332LCDR2	DAS
133	XPA.85.332LCDR3	QQYRDFPLT
134	XPA.85.012LCDR1	QSLVYGDGHNY
135	XPA.85.012LCDR2	LGS
136	XPA.85.012LCDR3	MQGLQTPLT
137	XPA.85.345LCDR1	QDINNF
138	XPA.85.345LCDR2	DAS
139	XPA.85.345LCDR3	QQYRDFPLT
140	XPA.85.329LCDR1	QSLHIDGLTY
141	XPA.85.329LCDR2	EVS
142	XPA.85.329LCDR3	MQSLHLPIT
143	XPA.85.326LCDR1	QSLHIDGLTY
144	XPA.85.326LCDR2	EVS
145	XPA.85.326LCDR3	MQSLHLPIT
146	XPA.85.328LCDR1	QSLHIDGKTY
147	XPA.85.328LCDR2	EVS
148	XPA.85.328LCDR3	MQSLHFPIT
149	XPA.85.288LCDR1	QSLHIDGKTY
150	XPA.85.288LCDR2	EVS
151	XPA.85.288LCDR3	MQSLHFPIT
152	XPA.85.342LCDR1	QDINNF
153	XPA.85.342LCDR2	DAS
154	XPA.85.342LCDR3	QQYRDFPLT
155	XPA.85.333LCDR1	QSLHIDGKAY

图21 (续)



SEQ ID NO:	名称	序列
156	XPA.85.333LCDR2	EVS
157	XPA.85.333LCDR3	MQGLHLPPT
158	XPA.85.343LCDR1	QSLHIDGRTY
159	XPA.85.343LCDR2	EVS
160	XPA.85.343LCDR3	MQSIHFPLT
161	XPA.85.327LCDR1	QSLHIDGNTY
162	XPA.85.327LCDR2	EIS
163	XPA.85.327LCDR3	MQSLHFPIT
164	XPA.85.330LCDR1	QSLHIDGNTY
165	XPA.85.330LCDR2	EIS
166	XPA.85.330LCDR3	MQSLHFPIT
167	XPA.85.334LCDR1	QSLHIDGKTY
168	XPA.85.334LCDR2	EVS
169	XPA.85.334LCDR3	MQSLHFPIT
170	XPA.85.344LCDR1	QSLWRDNTY
171	XPA.85.344LCDR2	EVS
172	XPA.85.344LCDR3	MQSIHFPLT
173	XPA.85.346LCDR1	QSLHIDGKTY
174	XPA.85.346LCDR2	EVS
175	XPA.85.346LCDR3	MQSLHLPIT
176	XPA.85.331LCDR1	QSLHIDGFNY
177	XPA.85.331LCDR2	LGS
178	XPA.85.331LCDR3	MQGLQTPPT
179	XPA.85.347LCDR1	QSLFHDHGRTH
180	XPA.85.347LCDR2	EAS
181	XPA.85.347LCDR3	MQGIHLPPA
182	XPA.85.017LCDR1	SSNIGYNY
183	XPA.85.017LCDR2	DNN
184	XPA.85.017LCDR3	GTWDNSRSPWPV
185	XPA.85.341LCDR1	KLGEKYEDTQAWDSSWV

图21 (续)

SEQ ID NO:	名称	序列
186	XPA.85.341LCDR2	EDT
187	XPA.85.341LCDR3	QAWDSSWV
188	XPA.85.335LCDR1	TSNIGNNF
189	XPA.85.335LCDR2	DDN
190	XPA.85.335LCDR3	GTWDNSLPPWV
191	XPA.85.340LCDR1	NLGEKF
192	XPA.85.340LCDR2	EDN
193	XPA.85.340LCDR3	QAWDSSWV
194	XPA.85.339LCDR1	RLGDKF
195	XPA.85.339LCDR2	EDN
196	XPA.85.339LCDR3	QAWDSSWV
197	XPA.85.287LCDR1	KLGDY
198	XPA.85.287LCDR2	EDT
199	XPA.85.287LCDR3	QAWGTSWV
200	XPA.85.336LCDR1	GSNIGSNY
201	XPA.85.336LCDR2	DDN
202	XPA.85.336LCDR3	GTWDNTLNVGV
203	XPA.85.337LCDR1	DFGDKY
204	XPA.85.337LCDR2	QDN
205	XPA.85.337LCDR3	QAWDSNWV
206	XPA.85.338LCDR1	KLGDY
207	XPA.85.338LCDR2	ENR
208	XPA.85.338LCDR3	QAWDSSTAWV
209	XPA.85.332 HC N <sub>端</sub>	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGATCCTCGGTGAAGGTCCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGAGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAACTCCAGGCGAGTCCAGATACCGCGGACGAATCCACGAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATGTAGTAGC CAGACTCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCAGCTCA
210	XPA.85.012 HC N <sub>端</sub>	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGATCCTCGGTGAAGGTCCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGAGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAACTCCAGGCGAGTCCAGATACCGCGGACGAATCCACGAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATGTAGTAGC

图21 (续)

SEQ ID NO:	名称	序列
211	XPA.85.345 HC N端	CAGACTCTGGGCGCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGTGAGAACCTGGATCCTCGGTGAAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTACGCTGGTGGACAGCCCTGGACAGGCTTGGATGGAGGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAATCCAGGCGAGTACAGATTACCGCGGAGGAATCCACGAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATGTAGTAGC CAGACTCTGGGCGCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCACTCA
212	XPA.85.329 HC N端	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCGAAGTGAGAAACCCGGCTCCTCGGTGAAGTGTCTCTGCAAGGCTTCGG CGGCACCTTCTCAGCTACGCCATCTCCTGGGTGGACAGCCCGGAGGCTTGAATGGATGGCGCGCATCA TCCCCATCTTCGSCACCGCCAACTACGCCAGAAATCCAGGCGAGTGACCATCACCGCGGACGAGTCCACCTCC ACCGCTACATGGAACCTGCTCCTCGGAGCGGACACCGCCGTACTACTGCGCCAGAGGCTACGTGGTGGC CAGACTGTGGGCGCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCACTCA
213	XPA.85.326 HC N端	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGTGAGAACCTGGATCCTCGGTGAAGTGTCTCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGACAGCCCTGGACAGGCTTGGATGGAGGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAATCCAGGCGAGTGACCATCACCGCGGAGGAATCCACGAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATGTAGTAGC CAGACTCTGGGCGCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCACTCA
214	XPA.85.328 HC N端	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCGAAGTGAGAAACCCGGCTCCTCGGTGAAGTGTCTCTGCAAGGCTTCGG CGGCACCTTCTCAGCTACGCCATCTCCTGGGTGGACAGCCCGGAGGCTTGAATGGATGGCGCGCATCA TCCCCATCTTCGSCACCGCCAACTACGCCAGAAATCCAGGCGAGTGACCATCACCGCGGAGTCCACCTCC ACCGCTACATGGAACCTGCTCCTCGGAGCGGACACCGCCGTACTACTGTGCGCCAGAGGCTACGTGGTGGC CAGACTGTGGGCGCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCACTCA
215	XPA.85.288 HC N端	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGTGAGAACCTGGATCCTCGGTGAAGTGTCTCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGACAGCCCTGGACAGGCTTGGATGGAGGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAATCCAGGCGAGTGACCATCACCGCGGAGGAATCCACGAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATGTAGTAGC CAGACTCTGGGCGCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCACTCA
216	XPA.85.342 HC N端	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGTGAGAACCTGGATCCTCGGTGAAGTGTCTCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGACAGCCCTGGACAGGCTTGGATGGAGGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAATCCAGGCGAGTGACCATCACCGCGGAGGAATCCACGAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATGTAGTAGC CAGACTCTGGGCGCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCACTCA
217	XPA.85.333 HC N端	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGTGAGAACCTGGATCCTCGGTGAAGTGTCTCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGACAGCCCTGGACAGGCTTGGATGGAGGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAATCCAGGCGAGTGACCATCACCGCGGAGGAATCCACGAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATGTAGTAGC CAGACTCTGGGCGCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCACTCA
218	XPA.85.343	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGTGAGAACCTGGATCCTCGGTGAAGTGTCTCTGCAAGGCTTCTGG

图21(续)

SEQ ID NO:	名称	序列
	HC N端	AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGGACAGGCCCTGGACAAAGGCTTCAGTGGATGGAGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCGACAGAACTTCAGGGCAGAGTCACGATTAACCGGACGAATCCACGAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGCGCGTGATTAATGTCGAGAGAGGGTATGTAGTAGC CAGACTCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCTCAGCTCA
219	XPA.85.327 HC N端	CAGATGCAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGCCTGGATCCTCGGTGAAGTGTCTCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGACAGGCCCTGGACAAAGGCTTCAGTGGATGGAGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCGACAGAACTTCAGGGCAGAGTCACGATTAACCGGACGAATCCACGAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGCGCGTGATTAATGTCGAGAGAGGGTATGTAGTAGC CAGACTCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCTCAGCTCA
220	XPA.85.330 HC N端	CAGATGCAGTGGTGCAGTCTGGGGCCGAGTGAAGAACCCCGGCTCCTCCGTGAAGTGTCTCTGCAAGGCTTCTGG CGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGACAGGCCCTGGACAAAGGCTTCAGTGGATGGAGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCGACAGAACTTCAGGGCAGAGTCACGATTAACCGGACGAATCCACGAGC ACCGCCTACATGGAACTGTCTCCTCGGAGGAGGACACCGCGGTACTACTGCGGCAGAGGCTACGTGGTGGC CAGACTGTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCTCAGCTCA
221	XPA.85.334 HC N端	CAGATGCAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAACCCCGGCTCCTCCGTGAAGTGTCTCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGACAGGCCCTGGACAAAGGCTTCAGTGGATGGAGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCGACAGAACTTCAGGGCAGAGTCACGATTAACCGGACGAATCCACGAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGCGCGTGATTAATGTCGAGAGAGGGTATGTAGTAGC CAGACTCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCTCAGCTCA
222	XPA.85.344 HC N端	GATGTTGTGATGACTCAGACTCCACTCTCTCTGTCCTGTCACCCCTGGACAGCCGGCTCCTCTCTGCAAGGCTTCTGG TCAGAGCCTCTCTGGCGTGAAGGAAACACCTATTTGTATTTGTTATCTGCAAGGCCAGGCCAGTCTCCCCAGCTCC TCATCTATGAAGTTTCCGGCCGATTCTCTGGAGTGCCAGAGAGATTCAGTGGCAGCGGTCAGGACACAGATTTTCA CTGGAAATCAGCCGGGTGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTAATGCTGCAAGTATACACTTCTCTCTCACTTT CGGCGGAGGACCAAGCTGGAGATCAACGCT
223	XPA.85.346 HC N端	CAGATGCAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAACCCCGGCTCCTCCGTGAAGTGTCTCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGACAGGCCCTGGACAAAGGCTTCAGTGGATGGAGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCGACAGAACTTCAGGGCAGAGTCACGATTAACCGGACGAATCCACGAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGCGCGTGATTAATGTCGAGAGAGGGTATGTAGTAGC CAGACTCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCTCAGCTCA
224	XPA.85.331 HC N端	CAGATGCAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAACCCCGGCTCCTCCGTGAAGTGTCTCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGACAGGCCCTGGACAAAGGCTTCAGTGGATGGAGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCGACAGAACTTCAGGGCAGAGTCACGATTAACCGGACGAATCCACGAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGCGCGTGATTAATGTCGAGAGAGGGTATGTAGTAGC CAGACTCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCTCAGCTCA
225	XPA.85.347 HC N端	CAGATGCAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAACCCCGGCTCCTCCGTGAAGTGTCTCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGACAGGCCCTGGACAAAGGCTTCAGTGGATGGAGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCGACAGAACTTCAGGGCAGAGTCACGATTAACCGGACGAATCCACGAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGCGCGTGATTAATGTCGAGAGAGGGTATGTAGTAGC CAGACTCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCTCAGCTCA

图21 (续)

[illegible]

图21 (续)

SEQ ID NO:	名称	序列
233	XPA.85.337 HC N端	GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGAGGTGGTGTACGGCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGTGAGCCTCTGG ATTCAACCTTTAGCAGCTCTGCCATGAGCTGGTCCGCCAGACTCCAGGGAAGAACTCAGTGGTCTCAGCTATTAA CTCCTGGTGGTGGGGGACATACACGACGCTGTGAGGCCGTGTACCTGCCAGACAAATTCGAAGGAC ACGCTGTATCTGCAAAATGGACAGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGATTTGTACGGGAG CTACGGTGATGCTTTGATATCTGGGGCCAGGGACACTGGTCACCGTCAGCTCA
234	XPA.85.338 HC N端	GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGAGGTGGTGTACGGCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGTGAGCCTCTGG ATTCAACCTTTAGCAGCTCTGCCATGAGCTGGTCCGCCAGACTCCAGGGAAGAACTCAGTGGTCTCAGCTATTAA CTCCTGGTGGTGGGGGACATACACGACGCTGTGAGGCCGTGTACCATCTCCAGAGACAAATTCGAAGGAC ACGCTGTATCTGCAAAATGGACAGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGATTTGTACGGGAG CTACGGTGATGCTTTGATATCTGGGGCCAGGGACACTGGTCACCGTCAGCTCA
235	XPA.85.332 LC N端	GAAACGACACTCAGCAGCTCTCCAGCATTCATGTACGATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCATTGCGCAGGCGAG TCAGGACATTAACAACCTTTTAAATTTGGTATCAGCAGAAACAGGAAAGCCCTAAGTTCCTGTATCTAGTATGCTT CCAAATTTGGAAAGGGTCCCATCAAGTTTCAGTGGCGTGGATCTGGGACAGAAATTTACTCTCACCATCAGCAGC CTGCAGCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACATATCTCGTGATTTCCCGCTCACCTTCGGCCAGGGACACG ACTGGAGATTAAACGT
236	XPA.85.012 LC N端	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCGTCAACCTTGGAGAGCCGCCCTCCATCTCTCTGTCAGGTTAG TCAGAGCCTCGTCTATGTGATGACACAACTATTGCTGGTACCTGCAAGAACCCAGGAAAGCCCTAAGTTCCTGTATCTAGTATGCTT TGATCTATTGGGTTCTAATCGGGCTCCGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGACACAGATTTTACA CTGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGGTTTATTACTGATGCAAGGTCTACAAACTCCGCTCACTTT CGCGGGAGGACCAAGCTGGAGATCAACGT
237	XPA.85.345 LC N端	GAAACGACACTCAGCAGCTCTCCAGCATTCATGTACGATTCATGTGGGAGACAGAGTCACCATCATTGCGCAGGCGAG TCAGGACATTAACAACCTTTTAAATTTGGTATCAGCAGAAACAGGAAAGCCCTAAGTTCCTGTATCTAGTATGCTT CCAAATTTGGAAAGGGTGTCCCATCAAGTTTCAGTGGCGTGGATCTGGGACGGAAATTTACTCTCACCATCAGCAGC CTACAGCCTGAAGATATTGCTACATATTACTGTCAACATATCTCGTGATTTCCCGCTCACCTTCGGCCAGGGACACG ACTGGAGATTAAACGT
238	XPA.85.329 LC N端	GACATCGTGTGACCCAGACCCCTCTGTCCTGTCCGTGACCCCTGGCCAGCTGCTCCATCTCTCTGCAAGTCTCTC CCAGTCCCTGTGACATCGACGGCTGACCTACCTGTACTGGTATCTGCAAGAACCCAGGCGCCGCCCTCCAGTGC TGATCTACGAGGTGTCCACCGGTTCTCCGGCTGTCCGACAAAGTTCTCCGGCTCCGGCAGCGGACCCGACTTCACC CTGACCATCTCCCGGGTGAAGCCGAGGACGTGGCGTGTACTACTGATGCAAGAGCTGCACTCTGCCCATCACTT CGGCCAGGGCACCCGGCTGGAAATCAAGCTT
239	XPA.85.326 LC N端	GATATTGTGATGACCCAGACTCCCTCTCTCTGTCCTGACCCCTGGACAGCCGCCCTCCATCTCTCTGCAAGTCTAG TCAGAGCCTCTGATATTTGATGACTGACTATTTGTTATTTGGTACTGCAAGAACCCAGGCGCCGCCCTCCAGTCC TGATCTAAGATTTCACCGGTTCTCTGGAGTGTGAGTAAAGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGACAGATTTTACACA CTGACAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTGGAGTTTAACTGATGCAAGAGTTTACACCTTCCGATTCACCTT CGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGT
240	XPA.85.328 LC N端	GATGTGGTGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCCTGTCCGTGACCCCTGGCCAGCTGCTCCATCTCTCTGCAAGTCTCTC CCAGTCCCTGTGACATCAGCGGCAAGACTACCTGTACTGGTATCTGCAAGAGTCCGGCCAGTCCCTCCAGTGC

图21 (续)

SEQ ID NO:	名称	序列
241	XPA.85.288 LC N <sup>端</sup>	TGATCTACGAGGTGTCACACCGGTTCTCCGGCGTGCCGACACCTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTCACCTTCACCTCCTCCGGTGGAGCCGAGGACGTGGCGTGTA
242	XPA.85.342 LC N <sup>端</sup>	GATGTTGATGACCCAGTCTCCATCTCTGTCTCCGTCAACCCCGGACAGCCGGCCCTCCATCTCTGTAGTCTAGTCTCAGAGCCTCCTGCATATTGATGGAAGACCTATT
243	XPA.85.333 LC N <sup>端</sup>	TGAGAGCCTCCTACATATTGATGGAAGCCCTACTTGTATTGGTACCTTCGACGAAGCCAGGCCAGTCTCCACACCTCC
244	XPA.85.343 LC N <sup>端</sup>	TGATGCTATGAAAGTTTCCACCGGGTTCTCTGGAGTGCAGATAGTGTCTAGTGGCAGCGGTTCAGGACAGATTTTCACA
245	XPA.85.327 LC N <sup>端</sup>	TGATGCTATGAAATTTCCACCGGTTCTCTGGAGTGCAGATAGTGTCTAGTGGCAGCGGTTCAGGACAGATTTTCACA
246	XPA.85.330 LC N <sup>端</sup>	TGATGCTATGAAATTTCCACCGGTTCTCTGGAGTGCAGATAGTGTCTAGTGGCAGCGGTTCAGGACAGATTTTCACA
247	XPA.85.334 LC N <sup>端</sup>	TGATGCTATGAAAGTTTCCACCGGTTCTCTGGAGTGCAGATAGTGTCTAGTGGCAGCGGTTCAGGACAGATTTTCACA

图21 (续)



SEQ ID NO:	名称	序列
248	XPA.85.344 LC N端	CGGCCAGGGACACGACTGGAGATTAAACGT CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGATCTCGGTGAAGTCTCTCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTCGACAGCCCGGAGGCTTGGATGGAGGGATCA TCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGACAGAAATCCAGGCGAGTACAGATTACCGCGGAGGAATCCACGAGC ACAGCTACATGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTATTAATCTGTGCGAGAGGTATGTAGTAGC CAGACTCTGGGGCAGGAAACCTGGTCAACCTCAGCTCA GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTGTCTCGTCAACCCCTGGACAGCGGCCCTCCATTACCTGCAAGTCTAG TCAGAGCCTCTCTCATATTGATGGAAGACCTATTGTATTTGGTTCTTGCAGAACCCAGGCGAGCTCCACAGCTCC TGATCTATGAAGTTTCAACCGCTTCTCTGGAGTCCCGGATAGTTTCAGTGGCAGCGGTCAGGACAGATTTTCACA CTGAAATCAGCGGGTGGAGGCTGAGATGTTGGCTTTATTACTGTCATGCAAGTTTACACCTTCCGATCACTT CGCCAGGGACAGACTGGAGATTAAACGT GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCTGTCTCGCTCCCTGGAGAGCGGCCCTCCATCTCTCTGAGGCTAG TCAGAGCCTCTCTACATATTGATGGATTTAAATTATTTGCAATGGTACTTGCAGAACCCAGGCGAGTCTCCACAGCTCC TGGTCATTTGGGTTCTTTTCGGGCTCCGGGTCCTCTGACAGTTTCAGTGGCAGCTGATCAGGACAGATTTTACAC CTGGAATCAGCAGAGTTGAGGCTCAGGATGTTGCACTTTATTACTGTCATGCAAGTCTTACAACTCTCTCCACTTT CGCCCTGGGACCAAGTGGAGATCAACGT GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTGTCTCGTCAACCCCTGGACAGCGGCCCTCCATCTCTCTGCAAGTCTAG TCAGAGCCTGTTTCATGATCATGGAAGGACGCACTTGTCTTGGTACTTGCAGAACCCAGGCGAGCTCCACAGCTCC TGATCTTTGAAGCTTCCAAACCGTTCTCTGGAGTCCAGATAGGTTTCAGTGGCAGCGGTCAGGACAGATTTTCACA CTGAAGATCAGCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTATTACTGTCATGCAAGTTTACACCTTCTCTCCGGCTTT CGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAACGT CAGTCTGTGTTGACGCGCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCGGCGGCTCCATCTCTCTGCAAGTCTAG TCAGAGCCTGTTTCATGATCATGGAAGGACGCACTTGTCTTGGTACTTGCAGAACCCAGGCGAGCTCCACAGCTCC TGATCTTTGAAGCTTCCAAACCGTTCTCTGGAGTCCAGATAGGTTTCAGTGGCAGCGGTCAGGACAGATTTTCACA CTGAAGATCAGCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTATTACTGTCATGCAAGTTTACACCTTCTCTCCGGCTTT CGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAACGT CAGTCTGTGTTGACGCGCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCGGCGGCTCCATCTCTCTGCAAGTCTAG CTCCACATTTGGGTATAATTACGTATCCTGGTACGAGCTCCAGGAACAGCCCCAACTCTCTCATTTATGACA ATAATAAGCGACCTCAGGATTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAGTCTGGCAGCTCAGCCACCTTGGGCTACACC GGACTCCAGACTGGGGACGAGGCGGATTTATTTACTGCGGAACATGGGATAACAGCCGGAGTCTCTCTTGGGTGTTCTGG CGGAGGACCAAGGTGACCGTCTCTAGGT TCCTATGAGCTGACACAGCATCTCCTCAGTGTCTGCGGCCCGGCGGCTCCATCTCTCTGCAAGTCTAG ATTGGGGAAATAATATGCTTCTCTGGTATCAACAGAGCCAGGCTCCCTCTCTCTGTTGTTGTTGAGATAGGA AGCGCCCTCAGGATCCCTGAGGATTCCTCTGGCTCCAACTTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCC CAGGCTGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAGCATTTGGGTGTTCTGGCGGAGGACACCCAGCTGAC CGTCTTAGGT CAGTCTGTGCTGACGCGCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCGGCGGCTCCATCTCTCTGCAAGTCTAG CTCCACATTTGGAAATAATTTTGTATCTCTGGTACCAAGCTCCAGGAACAGCCCCAACTCTCTCATTTATGACG ATAATAAGCGACCTCAGGATTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAACTTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCC GGACTCCAGACTGGGGACGAGGCGGATTTATTTACTGCGGAACATGGGATAACAGCCCTGAAATCTCTCTCTGGGTGTTCTGG CGGAGGACCAAGGTGACCGTCTCTAGGT TCCTATGAGCTGACACAGCATCTCCTCAGTGTCTGCGGCCCGGCGGCTCCATCTCTCTGCAAGTCTAG ATTGGGGAAATAATATGCTTCTCTGGTATCAACAGAGCCAGGCTCCCTCTCTCTGTTGTTGTTGAGATAGGA AGCGCCCTCAGGATCCCTGAGGATTCCTCTGGCTCCAACTTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCC CAGGCTGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAGCATTTGGGTGTTCTGGCGGAGGACACCCAGCTGAC CGTCTTAGGT CAGTCTGTGCTGACGCGCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCGGCGGCTCCATCTCTCTGCAAGTCTAG CTCCACATTTGGAAATAATTTTGTATCTCTGGTACCAAGCTCCAGGAACAGCCCCAACTCTCTCATTTATGACG ATAATAAGCGACCTCAGGATTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAACTTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCC GGACTCCAGACTGGGGACGAGGCGGATTTATTTACTGCGGAACATGGGATAACAGCCCTGAAATCTCTCTCTGGGTGTTCTGG CGGAGGACCAAGGTGACCGTCTCTAGGT TCCTATGCTGACTCAGCCACCTCAGTGTCTGCGGCCCGGCGGCTCCATCTCTCTGCAAGTCTAG
249	XPA.85.346 LC N端	
250	XPA.85.331 LC N端	
251	XPA.85.347 LC N端	
252	XPA.85.017 LC N端	
253	XPA.85.341 LC N端	
254	XPA.85.335 LC N端	
255	XPA.85.340	

图21 (续)



SEQ ID NO:	名称	序列
	LC N端	TTTGGGGAAAAATTGTCTTCTGGTATCAACAGAGGCAGCCAGTCCCTCTCTTGGTCACTTTGAGATATAAGCGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTGGCTCCAACCTGGGAACAGAGCCACTCTGACCATCAGGGGACCCAGGCTGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTACGGGTGGGACAGCAGCTGGGTGTTTCGGCGGAGGCACCCAGCTGACCGTCTTAGGT
256	XPA.85.339 LC N端	TCCTATGAGCTGACACAGCCACCCCTCAGTGTCCGTGGCCCCCAGGACACAGAGCCACCATCATCCTGTCTGTGAGATAGATTGGGCGATAAATTATCTCTTGGTATCAGCAGAACCCAGGCCAGTCCCTCTACTGTGTCATCTTTGAAGATACGAAAGGCCCTCAGCGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGCAACTCTGCAACTCTGACCATCAGCGGACCCAGGCTGATGATGAGGCTGACTATTACTGTACGGGTGGGACAGCAGTTGGGTGTTTCGGCGGAGGCACCCAGCTGACCGTCTTAGGT
257	XPA.85.287 LC N端	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCCTCAGTGTCCGTGGCCCCCAGGACACAGAGCCCGTATCATCCTGTCTGTGAGATAAATTGGGGATAGATATGTTTCTTGGTATCAGCAGAACCCAGGCCAGTCCCTCTGTGTTGGTCAATGTTTGAAGATACCGGGCGCCCGCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGACCCAGGCAGAAAGATGAGGCTGACTATTACTGTACGGGTGGGACACCTCTCTGGGTTCGGCGGAGGCACCCAGCTGACCGTCTTAGGT
258	XPA.85.336 LC N端	CAGTCTGTGCTGACGACGCCGCCCTCAGTGTCTGGGCCCCCAGGACAGAAAGGTACCATCTCTCTGTCTGTGAAACCGGCTCCAACATTGGCAGTAATTATGTGGCTGGTATCAGCAACTCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCAATTTATGACGATAATAAGCGACCCCTCAGGGACTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGCAGCTGAGCCACCTGGTTCATCGCCGGACTCCAGACTGGGACGAGGCCGATTATTATGTGGAACATGGGATAACACCCCTGAATGTTGGGGGGTCTTTCGGCGGACCCAGCTGACCTCCTTAGGT
259	XPA.85.337 LC N端	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCCTCAGTGTCCGTGGCCCCCAGGACACAGAGCCACCATCATCCTGTCTCAGGAGATGATTTTCGGCGGATAAGTATGTCTTGGTATCAGCAGAACCCAGGCCAGTCCCTCTACTGTGTCATCTTTCAGGATAACGAGCGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACTGCCACTTTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTACGGGTGGGACAGCAATTGGGTGTTTCGGCGGAGGCACCAAGGTACACCGTCTTAGGT
260	XPA.85.338 LC N端	TCCTATGAGCTGACACAGCCACCCCTCAGTGTCCGTGGCCCCCAGGACACAGAGCCACCATCATCCTGTCTGTGAGATAAATTGGGGATAAATAATGCTTCTTGGTATCAGCAGAACCCAGGCCAGTCCCTCTGTCTTGGTCAATGTTTGAAGATCGTGAACCGGCCCTCAGGGATCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGATGAGGCTGACTATTACTGTACGGGTGGGACAGCAGCTGATGGGTATTCGGCGGAGGCACCCAGCTGACCGTCTTAGGT

图21(续)