(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201206954 A1
(43)公開日： 中華民國 101 (2012) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：100141324 (22)申請日： 中華民國 97 (2008) 年 01 月 30 日
(51)Int. Cl.： *C07K16/18 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
C12N15/11 (2006.01) *G01N33/566 (2006.01)*
(30)優先權：2007/02/02 美國 60/888,059
2007/12/19 美國 61/015,138
(71)申請人：安美基公司 (美國) AMGEN INC. (US)
美國
(72)發明人：莎蘇 芭芭拉 SASU, BARBRA (GB)；滿羽生 HANIU, MITSURU (JP)；包妮 湯瑪斯 查爾斯 BOONE, THOMAS CHARLES (US)；畢曉娟 BI, XIAO-JUAN (US)；李啟君 LEE, KI JEONG (KR)；亞維德森 泰拉 ARVEDSON, TARA (US)；溫德思 艾倫 WINTERS, AARON (US)；庫克 奇剛 COOKE, KEEGAN (US)；森 瑞克 SHENG, ZEQI (US)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：有 申請專利範圍項數：23 項 圖式數：34 共 363 頁

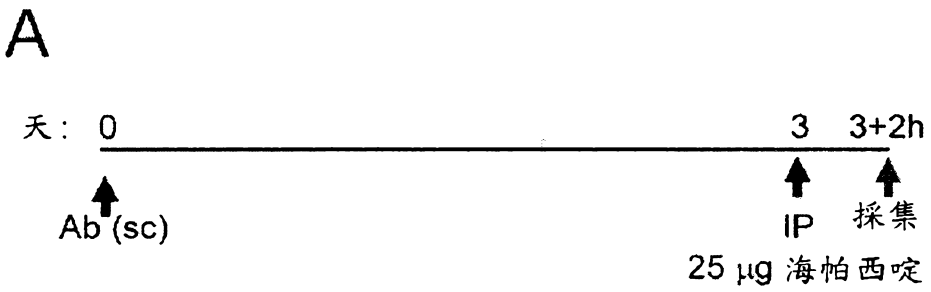
(54)名稱

海帕西啶（ＨＥＰＣＩＤＩＮ）、海帕西啶拮抗劑及使用方法

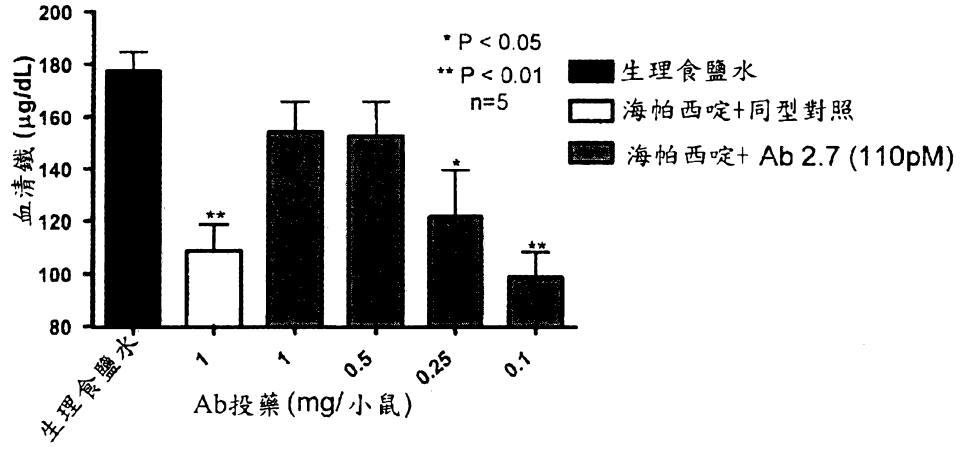
HEPCIDIN, HEPCIDIN ANTAGONISTS AND METHODS OF USE

(57)摘要

本發明係關於純化之正確摺疊的海帕西啶(hepcidin)、結合海帕西啶之抗體，以及製備及使用該等物質之方法。本發明亦提供治療海帕西啶相關病症之方法。



B


200
180
160
140
120
100
80
血清鐵 (μg/dL)
* P < 0.05
** P < 0.01
n=5
生理食鹽水
海帕西啶+同型對照
海帕西啶+ Ab 2.7 (110pM)
**
**
*
生理食鹽水
1
1
0.5
0.25
0.1
Ab投藥 (mg/小鼠)

(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201206954 A1
(43)公開日： 中華民國 101 (2012) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：100141324 (22)申請日： 中華民國 97 (2008) 年 01 月 30 日
(51)Int. Cl.： *C07K16/18 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
C12N15/11 (2006.01) *G01N33/566 (2006.01)*
(30)優先權：2007/02/02 美國 60/888,059
2007/12/19 美國 61/015,138
(71)申請人：安美基公司 (美國) AMGEN INC. (US)
美國
(72)發明人：莎蘇 芭芭拉 SASU, BARBRA (GB)；滿羽生 HANIU, MITSURU (JP)；包妮 湯瑪斯 查爾斯 BOONE, THOMAS CHARLES (US)；畢曉娟 BI, XIAO-JUAN (US)；李啟君 LEE, KI JEONG (KR)；亞維德森 泰拉 ARVEDSON, TARA (US)；溫德思 艾倫 WINTERS, AARON (US)；庫克 奇剛 COOKE, KEEGAN (US)；森 瑞克 SHENG, ZEQI (US)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：有 申請專利範圍項數：23 項 圖式數：34 共 363 頁

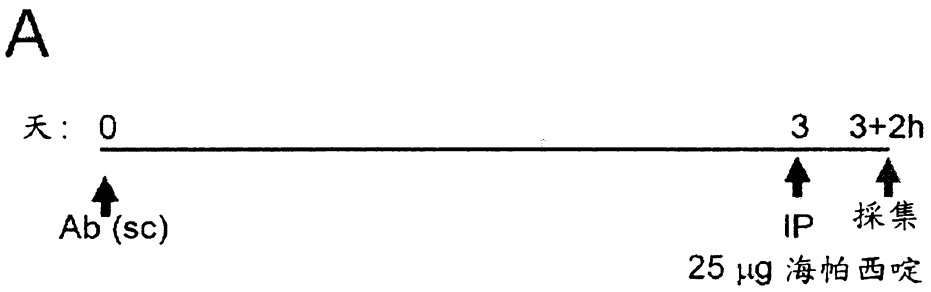
(54)名稱

海帕西啶（ＨＥＰＣＩＤＩＮ）、海帕西啶拮抗劑及使用方法

HEPCIDIN, HEPCIDIN ANTAGONISTS AND METHODS OF USE

(57)摘要

本發明係關於純化之正確摺疊的海帕西啶(hepcidin)、結合海帕西啶之抗體，以及製備及使用該等物質之方法。本發明亦提供治療海帕西啶相關病症之方法。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於海帕西啶、海帕西啶拮抗劑(包括結合海帕西啶之抗體)及其調節海帕西啶活性之能力。

本申請案主張2007年2月2日申請之美國臨時申請案第60/888,059號及2007年12月19日申請之美國臨時申請案第61/015,138號之權利，其以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

鐵為所有活的生物體生長發育所需之必需痕量元素。在哺乳動物中藉由控制鐵吸收、鐵再循環及鐵自儲存其之細胞中的釋放來調節鐵含量。鐵主要係在十二指腸及空腸上段中由腸上皮細胞吸收。存在如下反饋機制：在缺乏鐵之個體中增強鐵吸收且在鐵過量個體中降低鐵吸收(Andrews *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1:75 (2000)；Philpott, *Hepatology* 35:993 (2002)；Beutler等人，*Drug-Metab. Dispos.* 29:495 (2001))。藉由骨髓中之網狀內皮巨噬細胞、肝庫弗細胞(hepatic Kupffer cell)及脾使鐵自經降解紅血球再循環。鐵釋放係由膜鐵轉運蛋白(ferroportin)所控制，該膜鐵轉運蛋白為一種位於腸上皮細胞、巨噬細胞及肝細胞(能夠釋放鐵於血漿中之主要細胞)之細胞表面上的主要鐵輸出蛋白。海帕西啶與膜鐵轉運蛋白結合並藉由使其自細胞表面內化且發生降解而降低其功能活性。(Nemeth等人，*Science*, 306:2090-3, 2004；De domenico等人，Mol. Biol. Cell., 8:2569-2578, 2007)。

海帕西啶為調節鐵穩態之關鍵信號(Philpott, *Hepatology* 35:993 (2002)；Nicolas等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:4396 (2002))。高含量之人類海帕西啶造成鐵含量降低且反之亦然。導致缺乏海帕西啶活性之海帕西啶基因突變與年輕型血色素沈著症(一種嚴重鐵過量疾病)相關(Roetto等人，Nat. Genet., 33:21-22, 2003)。對小鼠之研究已證明海帕西啶在控制正常鐵穩態方面之作用(Nicolas等人，Nat. Genet., 34:97-101, 2003；Nicolas等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:4596-4601, 2002；Nicolas等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:8780-8785, 2001)。

此外，不斷有資料暗示在發炎期間海帕西啶與鐵螯合(參見例如Weinstein等人，Blood, 100:3776-36781, 2002；Kemna等人，Blood, 106:1864-1866, 2005；Nicolas等人，J. Clin. Invest., 110:1037-1044, 2002；Nemeth等人，J. Clin. Invest., 113:1271-1276, 2004；Nemeth等人，Blood, 101:2461-2463, 2003及Rivera等人，Blood, 105:1797-1802, 2005)。已在誘發脊椎動物之先天免疫系統之急性期反應的炎性刺激(諸如感染)之後觀察到海帕西啶基因表現發生大力上調。在小鼠中，展示海帕西啶基因表現因脂多醣(LPS)、松節油、弗氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant)及腺病毒感染而上調。海帕西啶表現係由發炎性細胞激素介白素-6(IL-6)誘發。海帕西啶表現與炎性貧血症之間的強相關性亦見於患有慢性炎性疾病(包括細菌、真菌及病毒性感染)之患者。

人類海帕西啶(一種具有抗微生物及鐵調節活性之25個胺基酸的肽)係由兩個新穎抗微生物肽研究小組獨立發現。(Krause等人，*FEBS Lett.* 480:147 (2000)；Park等人，*J. Biol. Chem.* 276:7806 (2001))。其亦被稱為LEAP-1(肝表現之抗微生物肽)。隨後在尋找由鐵調節之肝特異性基因中鑑別在小鼠中編碼83個胺基酸之前導肽(pre-propeptide)以及在大鼠及人類中編碼84個胺基酸之前導肽的海帕西啶cDNA(Pigeon等人，*J. Biol. Chem.* 276:7811 (2001))。首先使24個殘基之N-末端信號肽裂解以產生原海帕西啶(pro-hepcidin)，隨後將其進一步加工以產生見於血液及尿中之成熟海帕西啶。在人類尿液中，儘管亦存在較短的22及20個胺基酸之肽，但主要形式含有25個胺基酸。

值得注意的是，該成熟肽含有8個以4個二硫橋形式鍵聯之半胱胺酸殘基。Hunter等人(*J. Biol. Chem.*, 277:37597-37603 (2002))使用HPLC滯留時間與自尿純化之天然海帕西啶一致的化學合成海帕西啶藉由NMR而研究了海帕西啶的結構。Hunter等人報導其測定結果：海帕西啶摺疊成含有鄰位二硫鍵(C1-C8、C2-C7、C3-C6、C4-C5)之髮夾環結構。最近以來，亦報導使用Hunter等人之結構資訊及推理性NMR資料來推斷一致二硫鍵連接性分配，從而測定鱸魚海帕西啶之結構(Lauth等人，*J. Biol. Chem.*, 280:9272-9282 (2005))。然而，如本發明者在本文中所發現且揭示，確定海帕西啶結構具有不同於先前技術所教示之二硫鍵連接性。

美國專利公開案第2003/0187228號、第2004/0096987號、第2004/0096990號、第2005/0148025號、第2006/0019339號、第2005/0037971號及第2007/0224186號；美國專利第7,232,892號及第7,294,690號以及國際公開案第WO 02/98444號論述海帕西啶抗體，但未能揭示或提出本文中所揭示之海帕西啶之結構構形。

因此，本說明書說明海帕西啶之結構的測定以及海帕西啶之中心作用及其在鐵調節及對感染之先天免疫反應方面的關鍵功能。此外，本申請案尤其提供生物活性海帕西啶、針對生物活性海帕西啶之單株抗體、製造該等物質之方法、測定生物活性海帕西啶之方法及調節海帕西啶活性或其表現之方法及治療鐵穩態失調症之方法以及海帕西啶拮抗劑及海帕西啶促效劑。

【發明內容】

本發明之各種實施例大體而言係關於經純化之正確摺疊的人類海帕西啶、針對其之單株抗體、保留正確摺疊的人類海帕西啶之二硫鍵中之一或多者的海帕西啶變異體、製造該等物質之方法及使用該等物質偵測海帕西啶或調節海帕西啶活性之方法。

咸信本申請案為關於在C1-C8、C2-C4、C3-C6及C5-C7之間形成二硫鍵且預示緊湊及緊密摺疊之分子的生物活性人類海帕西啶二硫鍵連接性之首次報導。在一些實施例中，本發明提供具有與天然物質一致之二硫鍵連接性及等效生物活性的重組表現或合成產生之海帕西啶的大規模製

造。該重組或合成物質適用於治療需要其他海帕西啶之個體，且適用於製備偵測方法及套組中之已知海帕西啶標準物。正確摺疊的人類海帕西啶之大批製造亦使產生及測試與海帕西啶結合之單株抗體(尤其具高親和力及/或特異性之單株抗體)成為可能。該等單株抗體(例如)適用於海帕西啶偵測方法及診斷與治療方法。

在一態樣中，海帕西啶活性拮抗劑為一種與正確摺疊之成熟生物活性人類海帕西啶(SEQ ID NO: 9)以所需親和力結合的單株抗體。亦提供一種結合海帕西啶(SEQ ID NO: 9)且抑制海帕西啶之鐵調節活性的單株抗體。在一實施例中，單株抗體在約10^{-8} M或以下之EC_{50}下降低細胞內鐵濃度且/或增加循環鐵濃度。在其他實施例中，單株抗體在哺乳動物中展現使紅血球計數(數目)或血紅素或血容比水平增加及/或使網狀血球計數、網狀血球平均細胞容積及/或網狀血球血紅素含量正規化的特性。

在各種實施例中，單株抗體與海帕西啶之構形抗原決定基結合，該構形抗原決定基包含：SEQ ID NO: 9之胺基酸1至5中之任一者(例如胺基酸1、2、3、4或5)及/或SEQ ID NO: 9之胺基酸10至13中之任一者(例如胺基酸10、11、12或13)及/或SEQ ID NO: 9之胺基酸14至22中之任一者(例如胺基酸14、15、16、17、18、19、20、21或22)。在一相關態樣中，單株抗體與包含SEQ ID NO: 9之位置10處之Cys及SEQ ID NO: 9之位置13處之Cys的構形環及/或包含SEQ ID NO: 9之位置14處之Cys及SEQ ID NO: 9之位置22

處之Cys的構形環結合。

在各種實施例中，單株抗體可包括以下抗體中之任一者：抗體Ab43、2.7、2.41、R9、1C9、1S1、1S2、1S3、1S4、1S5、3B3、4E1、7A3、9D12、12B9、15E1、18D8、19C1、19D12、19H6、23F11及26F11；或保留該等抗體之CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2或CDRL3中之任一者、兩者、三者、四者、五者或六者且視情況包括該(等)CDR中之一或兩個突變的抗體；或保留該等抗體中之任一者之輕鏈或重鏈可變區的抗體；或結合於人類海帕西啶上與抗體Ab43、2.7、2.41、R9、1C9、1S1、1S2、1S3、1S4、1S5、3B3、4E1、7A3、9D12、12B9、15E1、18D8、19C1、19D12、19H6、23F11及26F11相同之抗原決定基或與該等抗體競爭結合人類海帕西啶達至少75%的抗體。

各種實施例亦提供編碼本文中所述之單株抗體中之任一者的核酸、包含該等核酸序列之載體及包含該等核酸或載體之宿主細胞。在一相關態樣中，提供重組產生該等單株抗體之方法，其包括培養上述宿主細胞使得核酸得以表現以便產生抗體且視情況自宿主細胞或培養基中回收該抗體。在一相關實施例中，提供一種由上述方法所產生之分離抗體或試劑。

在另一態樣中，提供一種偵測試樣中之人類海帕西啶的方法，其包含使來自人類之試樣與上述抗體中之任一者在可使抗體與人類海帕西啶結合之條件下接觸且偵測經結合

抗體。在一實施例中，將海帕西啶之第一抗體固定於固體支撐物上作為捕捉試劑且將海帕西啶之第二抗體用作偵測試劑。在一相關態樣中，藉由量測經結合抗體之量來量化海帕西啶在試樣中之量。該等偵測方法可用於多種診斷、預後及監控方法，其包括診斷海帕西啶相關病症之方法、區分炎性疾病與非炎性疾病之方法及監控使用海帕西啶拮抗劑之療法的方法。在該等方法中，高於某一臨限值之海帕西啶含量與海帕西啶相關病症(諸如海帕西啶相關貧血症)之存在有關，而低於該臨限值之含量指示患者不可能患有海帕西啶相關病症。同樣，高於某一臨限值之海帕西啶含量與炎性疾病之存在有關，而低於該臨限值之含量指示患者不可能患有炎性疾病。在一些實施例中，該等方法將診斷患有缺鐵性貧血症、炎性貧血症或混合性貧血症之患者。為監控旨在抑制海帕西啶含量之療法，低於某一臨限值之海帕西啶含量指示海帕西啶拮抗劑之劑量為治療有效的且高於該臨限值之含量指示海帕西啶拮抗劑之劑量不為治療有效的。

在另一態樣中，提供包含治療有效量之本文中所述之抗體中之任一者及醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑的醫藥組合物。亦提供該等抗體用於製備供治療具有高含量海帕西啶、海帕西啶相關病症、鐵穩態失調症或貧血症之人類用之藥物的用途。

各種實施例進一步提供使用該等抗體之方法，例如藉由投與治療有效量之該抗體來治療具有高含量海帕西啶或海

帕西啶相關病症或鐵穩態失調症之哺乳動物或患有貧血症之哺乳動物。在例示性實施例中，該哺乳動物為患有選自由以下各者組成之群之病狀的人類：非洲鐵過量症(African iron overload)、α地中海貧血症、阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)、貧血症、癌性貧血症、慢性病貧血症、炎性貧血症、動脈硬化或動脈粥樣硬化(包括冠狀動脈病、腦血管疾病或周邊閉塞性動脈疾病)、共濟失調、與鐵有關之共濟失調、無鐵傳遞蛋白質貧血、癌症、血漿銅藍蛋白缺乏、化療誘發性貧血症、慢性腎病(I、II、III、IV或V期)(包括末期腎病或慢性腎衰竭)、肝硬化、典型血色素沈著症、膠原蛋白誘發性關節炎(CIA)、海帕西啶過量(高海帕西啶)之病狀、先天性紅細胞生成異常性貧血、充血性心臟衰竭、克羅恩氏病(Crohn's disease)、糖尿病、鐵生物分布失調症、鐵穩態失調症、鐵代謝紊亂、膜鐵轉運蛋白疾病、膜鐵轉運蛋白突變血色素沈著症、葉酸缺乏症、弗里德里希氏共濟失調(Friedrich's ataxia)、索性脊髓病、格拉希氏症候群(gracile syndrome)、幽門螺旋桿菌(H. pylori)感染或其他細菌感染、哈勒沃登-施帕茨病(Hallervordan Spatz disease)、血色素沈著症、由轉鐵蛋白受體2突變引起之血色素沈著症、血紅素病、肝炎、肝炎(Brock綜合征)、C型肝炎、肝細胞癌、遺傳性血色素沈著症、HIV或其他病毒性疾病、亨廷頓氏病(Huntington's disease)、高鐵蛋白血症(hyperferritinemia)、低色素性小紅血球性貧血、血鐵過少症、抗胰島素症、缺鐵性貧血

症、缺鐵症、鐵過量症、海帕西啶過量之鐵缺乏病狀、年輕型血色素沈著症(HFE2)、多發性硬化症、轉鐵蛋白受體2、HFE、血幼素(hemojuvelin)、膜鐵轉運蛋白或其他鐵代謝基因之突變、新生兒血色素沈著症、與鐵有關之神經退化性疾病、骨質減少、骨質疏鬆症、胰腺炎、泛酸鹽激酶相關之神經退化性疾病、帕金森氏病(Parkinson's disease)、癩皮病、異食癖、紫質症、遲發性皮膚紫質症、假腦炎、肺血鐵質沈積症、紅血球病症、類風濕性關節炎、敗血病、鐵粒幼紅細胞性貧血、全身性紅斑性狼瘡症、地中海貧血症、中間型地中海貧血、輸血性鐵過量、腫瘤、血管炎、維生素B6缺乏症、維生素B12缺乏症及/或威爾遜氏病(Wilson's disease)。

在另一態樣中，提供藉由以治療有效量投與(a)海帕西啶活性拮抗劑或海帕西啶表現抑制劑及(b)紅血球生成刺激劑來治療患有貧血症之哺乳動物的方法。例示性海帕西啶活性拮抗劑包括結合人類海帕西啶之抗體。例示性海帕西啶表現抑制劑包括結合人類海帕西啶核酸之聚核苷酸或寡核苷酸。例示性紅血球生成刺激劑包括紅血球生成素、紅血球生成素促效劑變異體以及結合及活化紅血球生成素受體之肽或抗體。紅血球生成刺激劑包括(但不限於)依泊汀α、依泊汀β、依泊汀δ、依泊汀ω、依泊汀ι、依泊汀ζ及其類似物、模擬肽、模擬抗體及HIF抑制劑(參見美國專利公開案第2005/0020487號，其揭示內容全部以引用方式併入本文中)。詳言之，紅血球生成素包括(但不限於)如以下專

利或專利申請案中所揭示之紅血球生成素分子或其變異體或類似物，該等文獻各自以引用方式全部併入本文中：美國專利第4,703,008號、第5,441,868號、第5,547,933號、第5,618,698號、第5,621,080號、第5,756,349號、第5,955,422號及第5,856,298號；及WO 91/05867、WO 95/05465、WO 00/24893及WO 01/81405。在某些例示性實施例中，紅血球生成刺激劑係選自由人類紅血球生成素(SEQ ID NO: 72)及達貝泊汀(darbepoetin)α(SEQ ID NO: 73)組成之群。可根據該等方法治療之例示性貧血症形式包括炎性貧血症、癌性貧血症、化療誘發性貧血症、缺鐵性貧血症、鐵穩態失調症、膜鐵轉運蛋白疾病或由腎病引起之貧血症。亦提供治療患有對使用紅血球生成刺激劑之療法具有低反應性或甚至抵抗性之貧血症之哺乳動物的方法，其包含投與治療有效量之海帕西啶活性拮抗劑或者治療有效量之海帕西啶表現抑制劑。

在另一相關態樣中，亦提供用於治療與高海帕西啶含量相關之病症或海帕西啶相關病症或鐵穩態失調症或患有貧血症之哺乳動物的套組。在一例示性實施例中，該套組包括(a)海帕西啶活性拮抗劑或海帕西啶表現抑制劑及(b)紅血球生成刺激劑及(視情況)鐵。在另一例示性實施例中，該套組包括海帕西啶活性拮抗劑或海帕西啶表現抑制劑及貼於容器上或與容器封裝於一起之標籤，該標籤描述海帕西啶活性拮抗劑或海帕西啶表現抑制劑連同紅血球生成刺激劑之用法。在另一例示性實施例中，該套組包括紅血球

生成刺激劑及貼於容器上或與容器封裝於一起之標籤，該標籤描述紅血球生成刺激劑連同海帕西啶活性拮抗劑或海帕西啶表現抑制劑之用法。亦提供海帕西啶活性拮抗劑或海帕西啶表現抑制劑用於製備供連同紅血球生成刺激劑一起投與用之藥物的用途以及紅血球生成刺激劑用於製備供連同海帕西啶活性拮抗劑或海帕西啶表現抑制劑一起投與用之藥物的用途。在該等套組或用途中之任一者中，海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)及紅血球生成刺激劑可存在於獨立小瓶中或可一起被組合於單一醫藥組合物中。在另一實施例中，海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)或紅血球生成刺激劑或兩者可與鐵一起被組合於單一醫藥組合物中或可存在於獨立小瓶中。

在一不同態樣中，提供一種包含SEQ ID NO: 96的經純化之正確摺疊的生物活性非尿源性人類海帕西啶之組合物，其中在該組合物中至少80%、85%、90%、95%、98%或99%之人類海帕西啶具有C2-C4二硫鍵、C5-C7二硫鍵、C1-C8二硫鍵及C3-C6二硫鍵。在一些實施例中，人類海帕西啶已在細菌或其他非哺乳動物細胞中化學合成或產生。可藉由此項技術中已知之方法(包括異核單量子相關(heteronuclear single quantum correlation，HSQC), Morita等人，Protein Science, 12(6), 1216-1221 (2003))量化正確摺疊的蛋白質在溶液中之量。在一相關實施例中，提供使用該等經純化之人類海帕西啶組合物之方法，例如用於產生或篩檢單株抗體，用於鑑別海帕西啶結合搭配物或用於

測試包含抗體或特異性結合劑之組合物結合人類海帕西啶的能力。抗體之產生涉及(例如)使產生免疫球蛋白之細胞與經純化之人類海帕西啶組合物接觸且分離由該細胞所產生之免疫球蛋白。對於抗體或特異性結合劑之篩檢通常涉及(例如)使候選海帕西啶結合搭配物與經純化之人類海帕西啶組合物接觸且偵測候選海帕西啶結合搭配物與組合物中之人類海帕西啶之間所形成的複合物。在另一相關實施例中，該方法進一步包含向哺乳動物投與候選海帕西啶結合搭配物。測試抗體或特異性結合劑結合人類海帕西啶之能力涉及(例如)使其與經純化之人類海帕西啶組合物或其保留適當摺疊之片段接觸且偵測人類海帕西啶與該抗體或特異性結合劑之間所形成的複合物。

在一相關態樣中，提供一種使包含SEQ ID NO: 96之人類海帕西啶多肽再摺疊成正確摺疊之生物活性形式的方法，其包含(a)在促進變性之條件下使人類海帕西啶多肽暴露於離液劑，及(b)在促進恢復成正確摺疊及生物活性形式之條件下使(a)之產物暴露於氧化劑，及(c)回收包含生物活性人類海帕西啶多肽之溶液，其中至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%或以上之人類海帕西啶多肽具有C2-C4二硫鍵及C5-C7二硫鍵。可藉由此項技術中已知之方法(包括異核單量子相關(HSQC), Morita等人，Protein Science,

12(6), 1216-1221 (2003))量化正確摺疊的蛋白質在溶液中之量。在一實施例中，正確摺疊之生物活性海帕西啶在細胞基檢定中具有小於100 nM之EC_{50}。在另一實施例中，正確摺疊之生物活性海帕西啶在細胞基檢定中具有小於30 nM之EC_{50}。在一相關實施例中，(b)進一步包含使人類海帕西啶多肽與除空氣以外之氧化劑接觸。在另一實施例中，氧化在大於8之pH值下且在含有低於0.1%乙酸之溶液中發生。

在一不同態樣中，提供保留相同或相似二硫鍵連接性及/或相同或相似預測三維結構之人類海帕西啶變異體。在例示性實施例中，該變異體保留所有8個半胱胺酸殘基且進一步保留C2-C4二硫鍵及/或C5-C7二硫鍵。該等變異體可展現促效劑或拮抗劑活性，亦即保留或抑制海帕西啶生物活性(抗微生物或鐵調節活性)。在例示性實施例中，提供一種包含在長度上與SEQ ID NO: 96至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致之胺基酸序列的海帕西啶類似肽。海帕西啶變異體可展現下列特性中之一或多者：保留膜鐵轉運蛋白結合活性(亦即活化膜鐵轉運蛋白或抑制膜鐵轉運蛋白鐵運輸)、促進或抑制成熟人類海帕西啶(SEQ ID NO: 9)之鐵調節活性及/或降低或增加活體內循環鐵含量。

在另一態樣中，提供一種可偵測作為主要條帶並具有低於6 kd(例如3 kd±2)之近似分子量(如藉由在還原條件下進

行十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)所測定)的SEQ ID NO: 9之經純化成熟人類海帕西啶的抗體。

以上概述並不意欲限定本發明之每個態樣，且在其他部分(諸如實施方式)中描述其他態樣。預期整個文件係以統一揭示內容來敘述，且應瞭解即使在此文件之同一句子或段落或部分中並未發現本文中所描述之特徵一起的組合，亦涵蓋該等特徵之所有組合。

除上述以外，作為另一態樣，本發明可包括在任何情況下在範疇上比由本文中特定段落所定義之變體窄的本發明之所有實施例。舉例而言，本發明之某些態樣被描述為屬，且應瞭解屬之各成員單獨地為本發明之態樣。亦應瞭解被描述為屬或對屬之成員進行選擇的態樣涵蓋該屬之兩個或兩個以上成員之組合。

應瞭解儘管在各種情況下使用"包含"文字來介紹說明書中之各種實施例，但亦可使用"由.....組成"或"由.....基本上組成"文字來描述相關實施例。應注意術語"一"係指一或多個(種)，例如"一個免疫球蛋白分子"應被理解為表示一或多個免疫球蛋白分子。因而，術語"一"、"一或多個(種)"及"至少一個(種)"在本文中可互換使用。

亦應瞭解當描述值之範圍時，所描述之特徵可為範圍內所見之個別值。舉例而言，"約pH 4至約pH 6之pH值"可為(但不限於)pH 4、pH 4.2、pH 4.6、pH 5.1、pH 5.5等及該等值之間的任何值。另外，"約pH 4至約pH 6之pH值"不應被解釋為意謂所討論之調配物的pH值在儲存期間在pH 4至

pH 6之範圍內變化2個pH值單位，而是意謂溶液之pH的值可選於彼範圍，且於約彼pH值下溶液保持緩衝。在一些實施例中，當使用術語"約"時，其意謂所列數字加上或減去所列數字之5%、10%、15%或以上。可根據上下文確定所欲之實際變化。儘管申請者創立本文中所述之本發明之全部範疇，但申請者並不意欲主張其他人之先前技術著作中所描述之標的。因此，在藉由專利局(Patent Office)或其他實體或個體使得申請者關注處於申請專利範圍範疇內之法定先前技術的情況下，申請者保留在適用專利法下行使修正權利的權利以便重新定義此種申請專利範圍之標的從而明確將該法定先前技術或法定先前技術之明顯變化自此種申請專利範圍之範疇中排除。亦預期由該經修正的申請專利範圍所定義之本發明的變化為本發明之態樣。

【實施方式】

人類海帕西啶基因編碼84個殘基的前導肽(SEQ ID NO: 8)。相應cDNA及染色體組序列係分別示於SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO: 100中。首先使24個殘基的N-末端信號肽(SEQ ID NO: 8之殘基1-24)裂解以產生原海帕西啶，隨後將該原海帕西啶進一步藉由使前結構域(SEQ ID NO: 8之殘基25-59)裂解而進行加工以產生25個殘基的成熟海帕西啶(SEQ ID NO: 8之殘基60-84，在SEQ ID NO: 9中所示)。除主要25個胺基酸形式之外，可在尿中鑑別出長度為20或22個胺基酸之其他N-末端截短形式(20個胺基酸，SEQ ID NO: 96；及22個胺基酸，SEQ ID NO: 98)。成熟人類海帕

西啶含有八個在本文中依次被稱為C1至C8(自N-末端至C-末端編號)之半胱胺酸殘基。

關於海帕西啶在本文中所報導之新穎二硫鍵連接性及相應模型化三維結構亦使產生保留相同或相似二硫鍵連接性且適用作海帕西啶生物活性之調節劑的海帕西啶變異體成為可能。舉例而言，可設計且產生與海帕西啶受體結合且使海帕西啶受體活化之分子、與膜鐵轉運蛋白結合且引起膜鐵轉運蛋白內化之分子或相對於海帕西啶充當競爭性抑制劑之分子。

I.經純化之正確摺疊的人類海帕西啶組合物

可能需要使海帕西啶多肽"再摺疊"且氧化成適當三級結構且產生二硫鍵以便為生物學上有效的。可使用本文中所述之程序及此項技術中所熟知之其他程序實現再摺疊。該等方法包括(例如)在離液劑存在下使溶解多肽試劑暴露於通常高於7之pH值環境。離液劑為包括(但不限於)以下各物之化合物：鹽酸胍(guanidine hydrochloride)(胍鹽酸鹽(guanidinium hydrochloride)，GdnHCl)、硫酸胍、尿素、硫氰酸鈉、十二烷基肌胺酸鈉(sarcosyl)、十二烷基硫酸鈉、辛基硫酸鈉及/或其他能使蛋白質內之非共價分子間鍵結斷裂從而使多肽鏈呈現大體上無規構形的化合物。

在大多數情況下，再摺疊/氧化溶液亦將含有特定比率之還原劑及其氧化形式以產生特定氧化還原電位，此使得二硫鍵改組(disulfide shuffling)可發生以便形成半胱胺酸橋鍵。還原劑能夠轉移電子且(在此種情況下)"還原"各種

原子之間的鍵。在本發明之各種實施例的情況下，還原劑將破壞分子內及分子間相互作用(尤其彼等涉及二硫橋之相互作用)。根據本發明之各種實施例，例示性還原劑包括二硫蘇糖醇、麩胱甘肽、二硫赤藻糖醇或β-巯基乙醇。一些常用氧化還原對包括半胱胺酸/胱胺、麩胱甘肽/二硫雙GSH、氯化銅、二硫蘇糖醇DTT/二噻烷DTT及2-巯基乙醇(bME)/二硫bME。在許多情形下，可使用共溶劑來提高再摺疊效率。常用共溶劑包括甘油、各種分子量之聚乙二醇及精胺酸。

一旦再摺疊後，可藉由此項技術中已知之多種技術來評估海帕西啶多肽之二硫鍵連接性。在一態樣中，該技術為NEM部分還原烷基化；在另一態樣中，其為傅立葉轉換質譜法(FT-MS)。在實例1及4中比較詳細地論述NEM部分還原烷基化及FT-MS。

FT-MS(傅立葉轉換質譜法)可用於評估二硫鍵連接性。如此項技術中所知，FT-MS係基於帶電粒子在強大穩定磁場中旋轉之原理。藉由偵測由旋轉離子所產生之電流，可使用傅立葉轉換來確定離子之m/z。有利地，此程序使極高質量解析度及執行適宜聯合質譜分析實驗之能力成為可能。同時，其使蛋白水解片段在分析下之明確分配成為可能。(參見例如Marshall等人，Mass Spectrometry Reviews, 17:1-35, 1998；Lewis等人，Proc Natl Acad Sci U S A., 95:8596-601, 1998；Li等人，Anal Chem, 66:2077-83, 1994)。在實例1及4中比較詳細地論述FT-MS。

可藉由此項技術中已知之方法(包括異核單量子相關(HSQC), Morita等人，Protein Science, 12(6), 1216-1221 (2003))來量化正確摺疊的蛋白質在溶液中之量。錯誤摺疊的蛋白質(諸如海帕西啶)將在HSQC譜中具有獨特交叉峰。原則上藉由對該等峰值求積分來量化錯誤摺疊百分數。

II.海帕西啶拮抗劑

本發明之各種實施例提供兩種不同種類之海帕西啶拮抗劑的製法及用途：(a)海帕西啶活性拮抗劑或(b)海帕西啶表現抑制劑。

如本文中所用，"海帕西啶活性拮抗劑"意謂一種抑制人類海帕西啶鐵調節活性但並不抑制海帕西啶基因或海帕西啶mRNA之表現的物質。

如本文中所用，"海帕西啶表現抑制劑"意謂一種抑制海帕西啶基因或海帕西啶mRNA之表現的物質。

儘管海帕西啶活性拮抗劑與海帕西啶表現抑制劑皆歸入"海帕西啶拮抗劑"之一般種類，但兩者為互斥種類。

在一態樣中，海帕西啶活性拮抗劑可為一種例如藉由抑制海帕西啶與膜鐵轉運蛋白之間的結合、抑制受海帕西啶控制之細胞鐵滯留或促進膜鐵轉運蛋白依賴性鐵運輸來抑制海帕西啶之功能的物質。此類海帕西啶活性拮抗劑包括結合海帕西啶且抑制其活性之基於抗體或肽之特異性結合劑，包括本文中所述之抗體中之任一者；與膜鐵轉運蛋白結合但並不活化膜鐵轉運蛋白鐵運輸之海帕西啶變異體及

其衍生物；及結合海帕西啶且抑制其活性的分子量視情況低於約1000道爾頓之小分子有機化合物。

海帕西啶表現抑制劑包括與海帕西啶DNA或mRNA結合且抑制海帕西啶表現之聚核苷酸或寡核苷酸，包括抑制海帕西啶表現之反義寡核苷酸、抑制性RNA、DNA酶、核糖核酸酶、適體或其醫藥學上可接受之鹽。

A.抗海帕西啶抗體及特異性結合劑

本發明之各種實施例提供結合人類海帕西啶之抗體(包括單株抗體)、產生該等抗體之方法、使用該等抗體來偵測海帕西啶之方法、包括該等抗體之醫藥調配物、製備該等醫藥調配物之方法以及用該等醫藥調配物(包括與如下所述之紅血球生成刺激劑的組合療法)治療患者之方法。亦提供編碼該等抗體之核酸、包含該等核酸之載體及重組宿主細胞以及產生該等抗體之方法。

術語"抗體"係以最廣泛意義使用且包括經完全裝配之抗體、單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(包括雙特異性抗體)、可結合抗原之抗體片段(包括Fab'、$F'(ab)_2$、Fv、單鏈抗體、雙功能抗體)及包含上述物之重組肽(其限制條件為該等者顯示所需生物活性)。涵蓋完整分子及/或片段之多聚體或聚集體，包括化學衍生抗體。涵蓋任何同型類或子類(包括IgG、IgM、IgD、IgA及IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或任何異型之抗體。不同同型具有不同效應功能；舉例而言，IgG1及IgG3同型具有抗體依賴性細胞毒性(ADCC)活性。

在一些實施例中，該等抗體展現所需特徵，諸如如由K_D(平衡解離常數)所衡量的對海帕西啶之結合親和力在1×10^{-6} M或以下之範圍內或範圍降至10^{-16} M或更低(例如約10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、10^{-12}、10^{-13}、10^{-14}、10^{-15}、10^{-16} M或以下)。可在溶液平衡檢定中使用BIAcore及/或KinExA測定平衡解離常數，諸如實例13及14中所述。

在其他實施例中，抗體展現對於海帕西啶之特異性。如本文中所用，當與不同家族中之其他無關蛋白質相比，抗體對人類海帕西啶具有明顯較高之結合親和力且因此能夠區分人類海帕西啶時，該抗體對於人類海帕西啶"具有特異性"。在一些實施例中，該等抗體亦可與其他物種之海帕西啶(諸如鼠類、大鼠或靈長類海帕西啶)交叉反應；而在其他實施例中，該等抗體僅與人類或靈長類海帕西啶結合而不與齧齒動物海帕西啶明顯結合。在例示性實施例中，抗體與人類及食蟹猴海帕西啶結合但不與齧齒動物海帕西啶明顯結合。在一些實施例中，對於海帕西啶具特異性之抗體與同一家族之其他蛋白質交叉反應，而在其他實施例中，該等抗體使海帕西啶有別於其他相關家族成員(包括防禦素(defensin)或小鼠hepc2)。

在其他實施例中，單株抗體在活體外且較佳亦在活體內抑制(或中和)海帕西啶鐵調節活性。該等海帕西啶中和抗體在治療上適用於海帕西啶相關病症或鐵穩態失調症。可經由若干指標(例如鐵蛋白/鐵含量、紅血球計數、紅血球特徵(血紅素含量及/或細胞容積)、早期紅血球特徵(網狀

血球數目、血紅素含量或細胞容積)(Clinical Hematology，第三版，Lippincott, Williams及Wilkins；編者Mary L. Turgeon, 1999)、膜鐵轉運蛋白內化或鐵運輸)來量測海帕西啶中和活性。在一例示性實施例中，在約10^{-8} M或以下之EC_{50}下，單株抗體降低細胞內鐵濃度且/或增加循環鐵濃度。

在一些實施例中，如本文中所述之單株抗體拮抗人類海帕西啶之效應或抑制海帕西啶鐵調節活性。在一些實施例中，如本文中所述之單株抗體在約1×10^{-8} M或以下或約1×10^{-7} M或以下之EC_{50}下發揮效應。舉例而言，如由鐵蛋白檢定所測定，抗體可在約1×10^{-8} M或以下之EC_{50}下降低細胞中之細胞內鐵含量或可在約1×10^{-8} M或以下之EC_{50}下降低鐵蛋白表現。在其他實施例中，如本文中所述之單株抗體可使游離血清海帕西啶含量降低至少約20%、至少約30%、至少約40%、至少約50%、至少約60%、至少約70%、至少約80%或至少約90%。在其他實施例中，如本文中所述之單株抗體可使紅血球計數(數目)、紅血球平均細胞容積或紅血球血紅素含量增加，使血紅素增加，使血容比增加，使Tsat增加，使循環(或血清)鐵含量增加且/或使網狀血球計數、網狀血球平均細胞容積、網狀血球血紅素含量或網狀血球數目增加或正規化。

在特定例示性實施例中，本發明涵蓋：

1)保留抗體Ab43、2.7、2.41、R9、1C9、1S1、1S2、1S3、1S4、1S5、3B3、4E1、7A3、9D12、12B9、15E1、

18D8、19C1、19D12、19H6、23F11及26F11中之任一者的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2或CDRL3中之任一者、兩者、三者、四者、五者或六者且視情況包括該(等)CDR中之一或兩個突變的單株抗體；

2)保留抗體Ab43、2.7、2.41、R9、1C9、1S1、1S2、1S3、1S4、1S5、3B3、4E1、7A3、9D12、12B9、15E1、18D8、19C1、19D12、19H6、23F11及26F11中之任一者之所有CDRH1、CDRH2、CDRH3或重鏈可變區且視情況包括該(等)CDR中之一或兩個突變的單株抗體；

3)保留抗體Ab43、2.7、2.41、R9、1C9、1S1、1S2、1S3、1S4、1S5、3B3、4E1、7A3、9D12、12B9、15E1、18D8、19C1、19D12、19H6、23F11及26F11中之任一者之所有CDRL1、CDRL2、CDRL3或輕鏈可變區且視情況包括該(等)CDR中之一或兩個突變的單株抗體；

4)結合於與抗體Ab43、2.7、2.41、R9、1C9、1S1、1S2、1S3、1S4、1S5、3B3、4E1、7A3、9D12、12B9、15E1、18D8、19C1、19D12、19H6、23F11及26F11相同之成熟人類海帕西啶抗原決定基(例如如經由X射線晶體分析儀所測定)或包含SEQ ID NO: 9之胺基酸1-5內的胺基酸及/或由SEQ ID NO: 9之胺基酸10-13所形成之環內的胺基酸及/或由SEQ ID NO: 9之胺基酸14-22所形成之環內的胺基酸之構形抗原決定基的單株抗體；及

5)與抗體Ab43、2.7、2.41、R9、1C9、1S1、1S2、1S3、1S4、1S5、3B3、4E1、7A3、9D12、12B9、15E1、

18D8、19C1、19D12、19H6、23F11及26F11競爭結合成熟人類海帕西啶達超過約75%、超過約80%或超過約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%或95%之單株抗體。

在一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：16-21組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：28-33(2.7 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：40-45(2.41 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：52-57(R9 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：111-116(1C9 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：121-126(3B3 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：131-136(4E1 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：141-146(7A3 CDR)組成之群的胺基

酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：151-156(9D12 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：161-166(12B9 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：171-176(15E1 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：314-319(18D8 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：324-329(19C1 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：294-299(19D12 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：304-309(19H6 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：181-186(23F11 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID

NO：191-196(26F11 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO：203-205及131-133(1S1 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO: 214-216及144-146(1S2 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO: 225-227及164-166(1S3 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO: 236-238及174-176(1S4 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。在另一實施例中，該抗體包含選自由SEQ ID NO: 247-249及184-186(1S5 CDR)組成之群的胺基酸序列中之至少一個、兩個、三個、四個、五個或所有胺基酸序列。

在一些實施例中，該抗體包含所有三個輕鏈CDR、所有三個重鏈CDR或所有六個CDR。在一些例示性實施例中，抗體之兩個輕鏈CDR可與不同抗體之第三個輕鏈CDR組合。或者，尤其當CDR具有高度同源性時一抗體之CDRL1可與不同抗體之CDRL2及另一抗體之CDRL3組合。同樣，抗體之兩個重鏈CDR可與不同抗體之第三重鏈CDR組合；或尤其當CDR具有高度同源性時，一抗體之CDRH1可與不

同抗體之CDRH2及另一抗體之CDRH3組合。

亦可使用一致CDR。在一例示性實施例中，該抗體包含在SEQ ID NO: 74(XASNLES)、SEQ ID NO: 75(XQSNEE)及SEQ ID NO: 76(QQXNEX)、SEQ ID NO: 28(RASESVDSYGNSFMH)、SEQ ID NO: 77(WINTXSGVPTYADDFXG)、SEQ ID NO: 78(XXYYGX*A*Y)、SEQ ID NO: 19(TYGMS)、SEQ ID NO: 284(VIXYXXSNKYYADSVKG)、SEQ ID NO: 285 (WIXAXNGXXXXAXXXQX)、SEQ ID NO: 286(AQEGXAPDAFDI)、SEQ ID NO: 287(QAWYSSTNVX)、SEQ ID NO: 288 (QAWDSSTAXX)、SEQ ID NO: 289(QSDYSSXXX**)中所示之胺基酸序列中的一或多個胺基酸序列，其中X為任何胺基酸且*可缺失或可為任何胺基酸。

在另一例示性實施例中，該抗體包含抗體之輕鏈及/或重鏈可變區，例如SEQ ID NO: 15(Ab43重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 13(Ab43輕鏈可變區)；SEQ ID NO: 27(2.7重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 25(2.7輕鏈可變區)；SEQ ID NO: 39(2.41重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 37(2.41輕鏈可變區)；或SEQ ID NO: 51(R9重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 49(R9輕鏈可變區)；SEQ ID NO: 110(1C9重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 108(1C9輕鏈可變區)；或SEQ ID NO: 120(3B3重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 118(3B3輕鏈可變區)；SEQ ID NO: 130(4E1重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 128(4E1輕鏈可變區)；或SEQ ID NO: 140(7A3重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 138(7A3輕鏈可變區)；或SEQ ID NO:

150(9D12重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 148(9D12輕鏈可變區)；SEQ ID NO: 160(12B9重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 158(12B9輕鏈可變區)；SEQ ID NO: 170(15E1重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 168(15E1輕鏈可變區)；SEQ ID NO: 313(18D8重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 311(18D8輕鏈可變區)；SEQ ID NO: 323(19C1重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 321(19C1輕鏈可變區)；SEQ ID NO: 293(19D12重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 291(19D12輕鏈可變區)；SEQ ID NO: 303(19H6重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 301(19H6輕鏈可變區)；SEQ ID NO: 180(23F11重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 178(23F11輕鏈可變區)；SEQ ID NO: 190(26F11重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 188(26F11輕鏈可變區)；或SEQ ID NO: 202(1S1重鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 128(1S1輕鏈可變區)；SEQ ID NO: 213(1S2輕鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 140(1S2重鏈可變區)；SEQ ID NO: 224(1S3輕鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 160(1S3重鏈可變區)；SEQ ID NO: 235(1S4輕鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 170(1S4重鏈可變區)；或SEQ ID NO: 246(1S5輕鏈可變區)及/或SEQ ID NO: 190(1S5重鏈可變區)。

在一些實施例中，提供一種包含具有與選自由以下各者組成之群的胺基酸序列至少約65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99%以上一致之胺基酸序列之多肽的抗體：SEQ ID

NO: 15(Ab43重鏈可變區)、27(2.7重鏈可變區)、39(2.41重鏈可變區)、51(R9重鏈可變區)、110(1C9重鏈可變區)、120(3B3重鏈可變區)、130(4E1重鏈可變區)、140(7A3重鏈可變區)、150(9D12重鏈可變區)、160(12B9重鏈可變區)、170(15E1重鏈可變區)、313(18D8重鏈可變區)、323(19C1重鏈可變區)、293(19D12重鏈可變區)、303(19H6重鏈可變區)、180(23F11重鏈可變區)、190(26F11重鏈可變區)、202(1S1重鏈可變區)、13(Ab43輕鏈可變區)、25(2.7輕鏈可變區)、37(2.41輕鏈可變區)、49(R9輕鏈可變區)、108(1C9輕鏈可變區)、118(3B3輕鏈可變區)、128(4E1輕鏈可變區)、138(7A3輕鏈可變區)、148(9D12輕鏈可變區)、158(12B9輕鏈可變區)、168(15E1輕鏈可變區)、311(18D8輕鏈可變區)、321(19C1輕鏈可變區)、291(19D12輕鏈可變區)、301(19H6輕鏈可變區)、178(23F11輕鏈可變區)、188(26F11輕鏈可變區)、213(1S2輕鏈可變區)、224(1S3輕鏈可變區)、235(1S4輕鏈可變區)及246(1S5輕鏈可變區)，該多肽進一步包含在SEQ ID NO: 16-21(Ab43 CDR)、28-33(2.7 CDR)、40-45(2.41 CDR)、52-57(R9 CDR)、111-116(1C9 CDR)、121-126(3B3 CDR)、131-136(4E1 CDR)、141-146(7A3 CDR)、151-156(9D12 CDR)、161-166(12B9 CDR)、171-176(15E1 CDR)、314-319(18D8 CDR)、324-329(19C1 CDR)、294-299(19D12 CDR)、304-309(19H6 CDR)、181-186(23F11 CDR)、191-196(26F11 CDR)、203-205及131-133(1S1重鏈CDR)、214-216及144-146(1S2輕鏈

CDR)、225-227及164-166(1S3輕鏈CDR)、236-238及174-176(1S4輕鏈CDR)以及247-249及184-186(1S5輕鏈CDR)中所示之胺基酸序列中之至少一或多個胺基酸序列。在上述實施例之任一者中，該多肽包括包含一或兩個對SEQ ID NO: 16-21(Ab43 CDR)、28-33(2.7 CDR)、40-45(2.41 CDR)、52-57(R9 CDR)、111-116(1C9 CDR)、121-126(3B3 CDR)、131-136(4E1 CDR)、141-146(7A3 CDR)、151-156(9D12 CDR)、161-166(12B9 CDR)、171-176(15E1 CDR)、314-319(18D8 CDR)、324-329(19C1 CDR)、294-299(19D12 CDR)、304-309(19H6 CDR)、181-186(23F11 CDR)、191-196(26F11 CDR)、203-205及131-133(1S1重鏈CDR)、214-216及144-146(1S2輕鏈CDR)、225-227及164-166(1S3輕鏈CDR)、236-238及174-176(1S4輕鏈CDR)以及247-249及184-186(1S5輕鏈CDR)中所示之胺基酸序列中的任一者之修飾的序列。

亦提供抗體1C9、3B3、4E1、7A3、9D12、12B9、15E1、23F11及26F11中之每一者之全長輕鏈及重鏈的cDNA及胺基酸序列。編碼抗體1C9、3B3、4E1、7A3、9D12、12B9、15E1、23F11、26F11、1S2、1S3、1S4及1S5之全長輕鏈(包括恆定區)的cDNA序列係分別示於SEQ ID NO: 197、208、219、230、241、252、256、260、264、217、228、239及250中。抗體1C9、3B3、4E1、7A3、9D12、12B9、15E1、23F11、26F11、1S2、1S3、1S4及1S5之全長輕鏈(包括恆定區)之胺基酸序列係分別示

於SEQ ID NO: 198(其中殘基1-20相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、209(其中殘基1-19相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、220(其中殘基1-20相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、231(其中殘基1-20相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、242(其中殘基1-19相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、253(其中殘基1-20相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、257(其中殘基1-20相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、261(其中殘基1-19相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、265(其中殘基1-19相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、218(其中殘基1-22相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、229(其中殘基1-22相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、240(其中殘基1-22相當於信號肽且其餘為成熟多肽)及251(其中殘基1-22相當於信號肽且其餘為成熟多肽)中。

編碼抗體1C9、3B3、4E1、7A3、9D12、12B9、15E1、23F11、26F11及1S1之全長重鏈(包括恆定區)的cDNA序列係分別示於SEQ ID NO: 199、210、221、232、243、254、258、262、266及206中。抗體1C9、3B3、4E1、7A3、9D12、12B9、15E1、23F11、26F11及1S1之全長重鏈(包括恆定區)之胺基酸序列係分別示於SEQ ID NO: 200(其中殘基1-19相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、211(其中殘基1-19相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、222(其中殘基1-19相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、233(其中殘基1-19相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、244(無信號肽)、255(其中殘基1-19相當於信號肽且其餘為

成熟多肽)、259(其中殘基1-19相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、263(其中殘基1-20相當於信號肽且其餘為成熟多肽)、267(其中殘基1-19相當於信號肽且其餘為成熟多肽)及207(其中殘基1-19相當於信號肽且其餘為成熟多肽)中。

在本發明之一些實施例中，抗體包含SEQ ID NO: 207(1S1重鏈)之胺基酸20-467及SEQ ID NO: 220(1S1輕鏈)之胺基酸21-234；或SEQ ID NO: 233(1S2重鏈)之胺基酸20-466及SEQ ID NO: 218(1S2輕鏈)之胺基酸23-234；或SEQ ID NO: 255(1S3重鏈)之胺基酸20-466及SEQ ID NO: 229(1S3輕鏈)之胺基酸23-234；或SEQ ID NO: 259(1S4重鏈)之胺基酸20-466及SEQ ID NO: 240(1S4輕鏈)之胺基酸23-234；或SEQ ID NO: 267(1S5重鏈)之胺基酸20-466及SEQ ID NO: 251(1S5輕鏈)之胺基酸23-234。

如本文中所用之術語"單株抗體"係指獲自一群大體上同質之抗體之抗體(至於彼術語"抗體"係如本文中所定義)，亦即無論由融合瘤產生還是由重組DNA技術所產生，構成該群之個別抗體除可以微量存在之可能天然存在之突變或替代性後轉譯修飾以外為一致的。單株抗體之非限制性實例包括鼠類、兔、大鼠、雞、嵌合、人類化或人類抗體、完全裝配之抗體、多特異性抗體(包括雙特異性抗體)、可結合抗原之抗體片段(包括Fab'、$F'(ab)_2$、Fv、單鏈抗體、雙功能抗體)、最大抗體、奈米抗體及包含上述物之重組肽(其限制條件為該等者顯示所需生物活性)或其變異體或衍生物。人類化或修飾抗體序列使其更類似於人類之內容

係描述於例如Jones等人，Nature 321:522-525 (1986)；Morrison等人，Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851-6855 (1984)；Morrison及Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988)；Verhoeyer等人，Science 239:1534-1536 (1988)；Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991)；Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169-217 (1994)；及Kettleborough, C.A.等人，Protein Eng. 4(7):773-83 (1991)；Co, M. S.等人(1994), J. Immunol. 152, 2968-2976；Studnicka等人Protein Engineering 7: 805-814 (1994)中；其每一者以引用方式全部併入本文中。一種分離人類單株抗體之方法為使用噬菌體展示技術。噬菌體展示法係描述於例如Dower等人，WO 91/17271、McCafferty等人，WO 92/01047及Caton與Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-6454 (1990)中，其每一者以引用方式全部併入本文中。另一種分離人類單株抗體之方法使用不產生內源性免疫球蛋白且經工程化而含有人類免疫球蛋白基因座之轉殖基因動物。參見例如Jakobovits等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)；Jakobovits等人，Nature, 362:255-258 (1993)；Bruggermann等人，Year in Immuno., 7:33 (1993)；WO 91/10741、WO 96/34096、WO 98/24893或美國專利申請公開案第20030194404號、第20030031667號或第20020199213號；其各自以引用方式全部併入本文中。

"經分離"抗體係指已自其自然環境之組份中鑑別出且分離出的抗體(至於彼術語"抗體"係如本文中所定義)。其自

然環境之污染物組份為會干擾抗體之診斷性或治療性用途的物質且可包括酶、激素及其他蛋白質性或非蛋白質性溶質。在某些實施例中，抗體將被純化(1)至大於抗體之95重量%且最佳超過99重量%，(2)至足以獲得至少15個N-末端或內部胺基酸序列殘基之程度，或(3)至具有均一性(藉由在還原或非還原條件下使用庫馬斯藍(Coomassie blue)或較佳銀染色之SDS-PAGE得知)。經分離之天然存在的抗體包括重組細胞內之原位抗體，此係因為抗體自然環境中之至少一個組份將不會存在。然而，經分離之抗體通常將藉由至少一個純化步驟來製備。

"免疫球蛋白"或"天然抗體"為四聚醣蛋白。在天然存在之免疫球蛋白中，每個四聚體係由兩對一致之多肽鏈組成，各對具有一個"輕"鏈(約25 kDa)及一個"重"鏈(約50-70 kDa)。各鏈之胺基末端部分包括具有約100至110或更多個主要負責抗原識別之胺基酸的"可變"("V")區。各鏈之羧基末端部分界定主要負責效應功能之恆定區。免疫球蛋白可視其重鏈之恆定域之胺基酸序列而被分成不同種類。重鏈被分類為謬(μ)、德耳塔(Δ)、伽馬(γ)、阿爾法(α)及厄普西隆(ε)且將抗體之同型分別定義為IgM、IgD、IgG、IgA及IgE。若干該等者可被進一步分成子類或同型，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。不同同型具有不同效應功能；舉例而言，IgG1及IgG3同型具有抗體依賴性細胞毒性(ADCC)活性。人類輕鏈被分類為卡帕(κ)及拉姆達(λ)輕鏈。在輕鏈及重鏈之內，可變區及恆定區係由具

有約12或更多個胺基酸之"J"區域接合，其中重鏈亦包括具有約10或更多個胺基酸之"D"區域。通常參見Fundamental Immunology，第7章(Paul, W.編，第二版，Raven Press, N.Y. (1989))。

異型為可具有免疫原性且在人類中由特定等位基因編碼之抗體序列上(通常為恆定區上)之變體。已鑑別出五種人類IGHC基因(IGHG1、IGHG2、IGHG3、IGHA2及IGHE基因)之異型且分別將其指定為G1m、G2m、G3m、A2m及Em異型。已知至少18種Gm異型：nG1m(1)、nG1m(2)、G1m(1、2、3、17)或G1m(a、x、f、z)、G2m(23)或G2m(n)、G3m(5、6、10、11、13、14、15、16、21、24、26、27、28)或G3m(b1、c3、b5、b0、b3、b4、s、t、g1、c5、u、v、g5)。存在兩種A2m異型A2m(1)及A2m(2)。

關於抗體之結構及產生之詳細描述，參見Roth, D.B.及Craig, N.L., *Cell,* 94:411-414 (1998)，該文獻以引用方式全部併入本文中。簡言之，產生編碼重鏈及輕鏈免疫球蛋白序列之DNA之過程主要發生於發育B細胞中。在重排及接合各種免疫球蛋白基因片段之前，通常發現V、D、J及恆定(C)基因片段在單個染色體上相對地緊密接近。在B細胞分化期間，V、D、J(或在輕鏈基因之情況下僅V及J)基因片段之各適當家族成員中之一者經重組而形成重鏈及輕鏈免疫球蛋白基因之功能重排可變區。此基因片段重排過程似乎為連續的。首先，使得重鏈D與J接合，接著重鏈V

與DJ接合且輕鏈V與J接合。除V、D及J片段重排之外，經由在輕鏈之V及J片段接合且重鏈之D及J片段接合之位置處的可變重組在免疫球蛋白重鏈及輕鏈之初級譜(repertoire)中產生其他多變性。輕鏈中之該變化通常發生於V基因片段之最後密碼子及J片段之首個密碼子內。在D與J_H片段之間的重鏈染色體上出現接合之相似不精確性且可能遍及多達10個核苷酸。此外，可將若干核苷酸插入並非由染色體組DNA所編碼之D與J_H基因片段之間及V_H與D基因片段之間。該等核苷酸之添加被稱為N區多樣性。可變區基因片段之該等重排及可在該接合期間出現之可變重組的淨效應為產生初級抗體譜。

術語"高變"區係指互補判定區或CDR之胺基酸殘基(亦即如由Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第五版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)所描述，輕鏈可變域中之殘基24-34(L1)、50-56(L2)及89-97(L3)以及重鏈可變域中之31-35(H1)、50-65(H2)及95-102(H3))。甚至單個CDR儘管具有比含有所有CDR之完整抗原結合位點低之親和力，但其仍可識別且結合抗原。

高變"環"之殘基的替代性定義係由Chothia等人，*J. Mol.Biol. 196*: 901-917 (1987)描述為輕鏈可變域中之殘基26-32(L1)、50-52(L2)及91-96(L3)以及重鏈可變域中之殘基26-32(H1)、53-55(H2)及96-101(H3)。

"構架"或FR殘基為除高變區殘基以外之彼等可變區殘

基。

"抗體片段"包含完整免疫球蛋白之一部分(較佳完整抗體之抗原結合或可變區)且包括由抗體片段形成之多特異性(雙特異性、三特異性等)抗體。可藉由重組DNA技術或藉由酶促或化學裂解完整抗體來產生免疫球蛋白之片段。

抗體片段之非限制性實例包括Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv(可變區)、域抗體(dAb，含有VH域)(Ward等人，Nature 341:544-546, 1989)、互補判定區(CDR)片段、單鏈抗體(scFv，在單個多肽鏈上含有VH及VL域)(Bird等人，Science 242:423-426, 1988及Huston等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988，視情況包括多肽連接子；且視情況具有多特異性，Gruber等人，J. Immunol. 152: 5368 (1994))、單鏈抗體片段、雙功能抗體(在單個多肽鏈上具有與另一鏈之互補VL及VH域成對之VH及VL域)(EP 404,097；WO 93/11161；及Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993))、三功能抗體、四功能抗體、微型抗體(scFv經由肽連接子(無鉸鏈)或經由IgG鉸鏈與CH3融合)(Olafsen等人，Protein Eng Des Sel. 2004年4月，17(4):315-23)、線性抗體(串聯Fd片段(VH-CH1-VH-CH1)(Zapata等人，Protein Eng.,8(10):1057-1062 (1995)))、螯合重組抗體(crAb，其可結合於同一抗原上之兩個相鄰抗原決定基)(Neri等人，J Mol Biol. 246:367-73, 1995)、雙抗體(bibody)(雙特異性Fab-scFv)或三抗體(tribody)(三特異性Fab-(scFv)(2))(Schoonjans等

人，J Immunol. 165:7050-57, 2000；Willems等人，J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003)、亦可包含在細胞內保留或指導抗體之細胞信號序列(Mhashilkar等人，EMBO J 14:1542-51, 1995；Wheeler等人，FASEB J. 17:1733-5, 2003)的內抗體(Biocca等人，EMBO J. 9:101-108, 1990；Colby等人，Proc Natl Acad Sci U S A. 101:17616-21, 2004)、穿膜抗體(transbody)(含有與scFv融合之蛋白轉導域(PTD)的可滲透細胞之抗體)(Heng等人，Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005)、奈米抗體(約15 kDa重鏈可變域)(Cortez-Retamozo等人，Cancer Research 64:2853-57, 2004)、小分子免疫治療藥物(small modular immunopharmaceutical)(SMIP)(WO03/041600、美國專利公開案20030133939及美國專利公開案20030118592)、抗原結合域免疫球蛋白融合蛋白、駱駝化抗體(camelized antibody)(其中VH與含有鉸鏈、CH1、CH2及CH3域之恆定區重組)(Desmyter等人，J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001；Ewert等人，Biochemistry 41:3628-36, 2002；美國專利公開案第20050136049號及第20050037421號)、含VHH之抗體、重鏈抗體(HCAb，兩個具有H2L2結構之重鏈之同源二聚體)或其變異體或衍生物以及含有足以賦予多肽特異性抗原結合之免疫球蛋白之至少一部分(諸如CDR序列)的多肽，其限制條件為抗體保留所需生物活性。

術語"變異體"當與抗體結合使用時係指在可變區或相當於可變區之部分中含有至少一個胺基酸取代、缺失或插入

之抗體的多肽序列，其限制條件為變異體保留所需結合親和力或生物活性。此外，如本文中所述之抗體可在恆定區中具有胺基酸修飾以改良抗體之效應功能，包括半衰期或清除率、ADCC及/或CDC活性。舉例而言，該等修飾可提高抗體藥物動力學作用或提高抗體在治療癌症時之有效性。參見Shields等人，J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604 (2001)，該文獻以引用方式全部併入本文中。在IgG1之情況下，對恆定區(尤其鉸鏈或CH2區)之修飾可使效應功能(包括ADCC及/或CDC活性)增加或降低。在其他實施例中，IgG2恆定區被修飾以減少抗體-抗原聚集體形成。在IgG4之情況下，對恆定區(尤其鉸鏈區)之修飾可減少半抗體形成。

術語"修飾"當與本文中所述之抗體或多肽結合使用時包括(但不限於)一或多個胺基酸變化(包括取代、插入或缺失)；不干擾海帕西啶結合活性之化學修飾；藉由與治療劑或診斷劑接合進行之共價修飾；標記(例如使用放射性核種或各種酶)；共價聚合物連接，諸如聚乙二醇化(用聚乙二醇衍生化)；及藉由化學合成非天然胺基酸進行之插入或取代。在一些實施例中，本發明之經修飾多肽(包括抗體)將保留本發明之未經修飾分子之結合特性。

術語"衍生物"當與本發明之抗體或多肽結合使用時係指藉由與治療劑或診斷劑接合、標記(例如使用放射性核種或各種酶)、共價聚合物連接(諸如聚乙二醇化)(用聚乙二醇衍生化)及經由化學合成非天然胺基酸進行之插入或取

代而被共價修飾的抗體或多肽。在一些實施例中，本發明之衍生物將保留本發明之未衍生化分子之結合特性。

製造雙特異性或其他多特異性抗體之方法在此項技術中係已知的且包括化學交聯、使用白胺酸拉鏈[Kostelny等人，J. Immunol. 148:1547-1553, 1992]、雙功能抗體技術[Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993]、scFv二聚體[Gruber等人，J. Immunol. 152: 5368, 1994]、線性抗體[Zapata等人，Protein Eng. 8:1057-62, 1995]及螯合重組抗體[Neri等人，J Mol Biol. 246:367-73, 1995]。

因此，可藉由此項技術中已知之技術來產生多種包含抗體之重鏈可變區或輕鏈可變區之一個、兩個及/或三個CDR的組合物。

抗體之重組產生

亦提供視情況可操作地連接於為宿主細胞所識別之控制序列的編碼本文中所述之單株抗體之經分離核酸、包含該等核酸之載體及宿主細胞以及產生該等抗體之重組技術，該等技術可包含培養宿主細胞以便表現核酸且視情況自宿主細胞培養物或培養基中回收抗體。

可藉由蛋白質直接定序來測定所關注之免疫球蛋白之相關胺基酸序列且可根據通用密碼子表設計適當編碼核苷酸序列。或者，可使用習知程序(例如藉由使用能夠與編碼單株抗體之重鏈及輕鏈之基因特異性結合的寡核苷酸探針)自產生單株抗體之細胞中分離編碼單株抗體之染色體

組或cDNA且進行定序。

使用標準技術進行選殖(參見例如Sambrook等人(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide，第1-3卷，Cold Spring Harbor Press，該文獻以引用方式併入本文中)。舉例而言，可藉由反轉錄polyA+mRNA(較佳膜相關mRNA)來構建cDNA庫且使用對人類免疫球蛋白多肽基因序列具有特異性之探針篩檢該庫。然而在一實施例中，使用聚合酶鏈反應(PCR)來擴增編碼所關注之免疫球蛋白基因片段(例如輕鏈或重鏈可變片段)的cDNA(或全長cDNA之部分)。可容易地將擴增序列選殖入任何適當載體(例如表現載體、小基因載體或噬菌體展示載體)中。應瞭解，所用之特定選殖方法並非關鍵，只要有可能測定所關注之免疫球蛋白多肽之某些部分的序列即可。

抗體核酸之一種來源為藉由自經所關注之抗原免疫之動物中獲得B細胞且使其與永生細胞融合而產生的融合瘤。或者，可自經免疫動物之B細胞(或整個脾)中分離核酸。編碼抗體之核酸的另一種來源為(例如)經由噬菌體展示技術所產生之該等核酸的庫。可藉由標準技術(諸如淘選(panning))鑑別編碼所關注之肽(例如具有所需結合特徵之可變區肽)的聚核苷酸。

可測定編碼免疫球蛋白多肽之整個可變區的序列；然而有時將適於僅定序可變區之一部分(例如編碼CDR之部分)。使用標準技術進行定序(參見例如Sambrook等人(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide，第1-3卷，

Cold Spring Harbor Press及Sanger, F.等人(1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467，該等文獻以引用方式併入本文中)。藉由比較經選殖核酸之序列與人類免疫球蛋白基因及cDNA之公開序列，熟習此項技術者將能夠容易地視所定序之區而確定(i)融合瘤免疫球蛋白多肽(包括重鏈之同型)之生殖系片段使用及(ii)重鏈及輕鏈可變區之序列，包括由N區添加及體細胞突變過程所產生之序列。免疫球蛋白基因序列資訊之一來源為國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information), National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md。

如本文中所用，"經分離"核酸分子或"經分離"核酸序列為(1)自核酸之天然來源中通常與核酸分子締合之至少一種污染物核酸分子中鑑別出且分離出或(2)經選殖、擴增、標記或以別的方式使得有別於背景核酸以便可測定所關注之核酸之序列的核酸分子。經分離核酸分子在形式或背景方面不同於見於自然界之核酸分子。然而，經分離核酸分子包括含於通常表現抗體之細胞中之核酸分子，其中(例如)核酸分子處於不同於天然細胞之染色體位置處。

一旦分離後，可將DNA可操作地連接至表現控制序列或置於表現載體中，隨後將其轉染於不另外產生免疫球蛋白之宿主細胞中以便指導單株抗體在重組寄主細胞中之合成。抗體之重組產生在此項技術中係熟知的。

表現控制序列係指對於可操作連接之編碼序列在特定宿

主生物體中之表現所必需的DNA序列。適合於原核生物之控制序列(例如)包括啟動子、(視情況)操縱子序列及核糖體結合位點。已知真核細胞利用啟動子、多聚腺嘌呤信號及增強子。

核酸當與另一核酸序列處於功能關係時為可操作連接的。舉例而言，若前序列或分泌前導序列之DNA被表現為參與多肽之分泌的前體蛋白質(preprotein)，則可操作地將該前序列或分泌前導序列之DNA連接至多肽之DNA；若啟動子或增強子影響序列轉錄，則可操作地將該啟動子或增強子連接至編碼序列；或若核糖體結合位點被定位以有助於轉譯，則可操作地將該核糖體結合位點連接至編碼序列。一般而言，"可操作地連接"意謂所連接之DNA序列為鄰接的，並在分泌前導序列之情況下為鄰接的且處於閱讀相(reading phase)。然而，增強子並非必定鄰接。藉由在適宜限制性位點處之連接來實現連接。若該等位點不存在，則根據習知做法使用合成寡核苷酸接頭(adaptor)或連接子。

許多載體在此項技術中係已知的。載體組份可包括下列一或多者：信號序列(其可例如指導抗體之分泌)、複製起點、一或多個選擇性標記基因(其可例如賦予抗生素或其他藥物抗性，補足營養缺陷型缺陷或提供不可在培養基中獲得之關鍵營養素)、增強子元件、啟動子及轉錄終止序列，所有該等者在此項技術中係熟知的。

細胞、細胞株及細胞培養物通常可互換使用且在本文中

所有該等名稱包括子代。轉型體及轉型細胞包括在不考慮轉移數之情況下源自其之主要個體細胞及培養物。亦應瞭解，所有子代可能歸因於有意或無意突變而在DNA含量方面並非精確一致。包括如針對在初始轉型細胞中所篩檢的具有相同功能或生物活性之突變體子代。

例示性宿主細胞包括原核生物、酵母或高級真核生物細胞(亦即多細胞生物體)。原核宿主細胞包括真細菌，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體，例如腸桿菌科(*Enterobacteriaceae*)，諸如埃希氏菌屬(*Escherichia*)(例如大腸桿菌(*E. coli*))、腸桿菌屬(*Enterobacter*)、歐文氏菌屬(*Erwinia*)、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)、變形桿菌屬(*Proteus*)、沙門氏菌屬(*Salmonella*)(例如鼠傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*))、沙雷氏菌屬(*Serratia*)(例如黏質沙雷菌(*Serratia marcescans*))及志賀氏菌屬(*Shigella*)以及芽孢桿菌屬(*Bacilli*)(諸如枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)及地衣芽孢桿菌(*B. licheniformis*))、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)及鏈黴菌屬(*Streptomyces*)。真核微生物(諸如絲狀真菌或酵母)為重組多肽或抗體之適當選殖或表現宿主。在低級真核宿主微生物中最常使用釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或常見烘焙酵母。然而，若干其他菌屬、菌種及菌株在本文中通常為可利用且適用的，諸如有畢赤酵母屬(*Pichia*)(例如巴斯德畢赤酵母(*P. pastoris*))、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)；克魯維拉菌屬(*Kluyveromyces*)，亞羅酵母屬(*Yarrowia*)；念珠菌屬

(*Candida*)；裏氏木黴(*Trichoderma reesia*)；粗糙脈孢菌(*Neurospora crassa*)；許旺酵母屬(*Schwanniomyces*)，諸如西方許旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)；及絲狀真菌，諸如紅黴屬(*Neurospora*)、青黴屬(*Penicillium*)、彎頸黴屬(*Tolypocladium*)及麴黴屬(*Aspergillus*)宿主(諸如構巢麴黴(*A. nidulans*)及黑麴黴(*A. niger*))。

表現糖基化多肽或抗體之宿主細胞可源自於多細胞生物體。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別眾多桿狀病毒菌株及變異體以及來自諸如以下者之宿主之相應允許性昆蟲宿主細胞：草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白紋伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)(果蠅)及中國家蠶(*Bombyx mori*)。多種適於轉染該等細胞之病毒株可公開獲得，例如苜蓿丫紋夜蛾(Autographa californica)NPV之L-1變異體及中國家蠶NPV之Bm-5菌株。

脊椎動物宿主細胞亦為適當宿主且自該等細胞重組產生多肽或抗體已成為常規程序。適用哺乳動物宿主細胞株之實例為中國倉鼠卵細胞，包括CHOK1細胞(ATCC CCL61)、DXB-11、DG-44及中國倉鼠卵細胞/-DHFR(CHO，Urlaub等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；由SV40轉型之猴腎臟CV1株(COS-7，ATCC CRL 1651)；人類胚腎株(經次選殖而生長於懸浮培養物中之293細胞，[Graham等人，*J. Gen Virol. 36*:59 (1977)]；幼倉鼠

腎臟細胞(BHK，ATCC CCL 10)；小鼠賽托利細胞(mouse sertoli cell)(TM4，Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980))；猴腎臟細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎臟細胞(VERO-76，ATCC CRL-1587)；人類宮頸癌細胞(HELA，ATCC CCL 2)；犬腎臟細胞(MDCK，ATCC CCL 34)；布法羅大鼠肝細胞(buffalo rat liver cell)(BRL 3A，ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138，ATCC CCL 75)；人類肝細胞瘤細胞(Hep G2，HB 8065)；小鼠乳房腫瘤(MMT 060562，ATCC CCL 51)；TRI細胞(Mather等人，Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC5細胞或FS4細胞；或哺乳動物骨髓瘤細胞。

為了產生抗體，將宿主細胞以上述核酸或載體轉型或轉染且培養於適當時經改良之習知營養培養基中以誘發啟動子、選擇轉型體或擴增編碼所需序列之基因。此外，具有多個經選擇性標記隔開之轉錄單位複本的新穎載體及經轉染細胞株尤其適用於表現抗體。

可於多種培養基中培養用以產生本文中所述之抗體的宿主細胞。諸如漢姆氏F10(Ham's F10)(Sigma)、最低必需培養基(MEM，Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及達爾伯克改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)(DMEM，Sigma)之市售培養基適用於培養宿主細胞。此外，於Ham等人，Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnes等人，Anal. Biochem. 102:255 (1980)、美國專利第4,767,704號、第4,657,866號、第4,927,762號、第

4,560,655號或第5,122,469號、WO 90103430、WO 87/00195或美國專利參考案第30,985號中所描述之培養基中之任一者可用作宿主細胞之培養基。該等培養基中之任一者可根據需要補充以激素及/或其他生長因子(諸如胰島素、轉鐵蛋白或上皮生長因子)、鹽(諸如氯化鈉、鈣鹽、鎂鹽及磷酸鹽)、緩衝液(諸如HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如Gentamycin™藥)、痕量元素(其被定義為通常以微莫耳範圍內之最終濃度存在之無機化合物)及葡萄糖或等效能源。亦可包括熟習此項技術者已知之適當濃度的任何其他必需補充。培養條件(諸如溫度、pH值及其類似條件)為彼等先前對於選擇用於表現之宿主細胞所用之條件且應為一般熟習此項技術者所顯而易見。

一旦培養宿主細胞後，可於細胞內在周質空間中產生抗體或抗體可被直接分泌於培養基中。若在細胞內產生抗體，則作為第一步驟，(例如)藉由離心或超濾移除微粒碎片(宿主細胞或溶解片段)。

可使用(例如)羥磷灰石層析、陽離子或陰離子交換層析或較佳親和層析(使用所關注之抗原或蛋白質A或蛋白質G作為親和配位體)來純化抗體。蛋白質A可用於純化基於人類γ1、γ2或γ4重鏈之抗體(Lindmark等人，*J. Immunol. Meth. 62*:1-13 (1983))。對於所有小鼠同型及人類γ3推薦使用蛋白質G(Guss等人，EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。親和配位體所連接之基質大多數通常為瓊脂糖，但亦可利用其他基質。機械穩定性基質(諸如受控微孔玻璃或聚(苯乙

烯二乙烯基)苯)相較於使用瓊脂糖可能達成之效果而言允許比較快之流動速率及比較短之處理時間。當抗體包含C_H3域時，Bakerbond ABX™樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.)適用於純化。視欲回收之抗體而定，亦可能使用其他蛋白質純化技術，諸如乙醇沈澱、逆相HPLC、層析聚焦、SDS-PAGE及硫酸銨沈澱。

嵌合及人類化抗體

因為相較於親本齧齒動物單株抗體而言，嵌合或人類化抗體在人類中之免疫原性較低，所以其可用於治療人類且過敏風險會低得多。因此，在涉及向人類活體內投藥之治療應用中涵蓋該等抗體。

舉例而言，單獨地或以接合體形式反覆活體內投與人類之鼠類抗體將在接受者中導致免疫反應，有時將之稱為HAMA反應(人類抗小鼠抗體)。若需要反覆投藥，則HAMA反應可能限制醫藥之有效性。可藉由使用親水性聚合物(諸如聚乙二醇)對抗體作化學修飾或藉由使用遺傳工程法使抗體結合結構更類似於人類來降低抗體之免疫原性。

如本文中所用，短語"嵌合抗體"係指含有源自兩種通常源自於不同物種之不同抗體之序列的抗體。嵌合抗體最通常包含與人類恆定Ig域融合之齧齒動物單株抗體之可變Ig域。可使用此項技術中已知之標準程序產生該等抗體(參見Morrison, S. L.等人(1984) Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human

Constant Region Domains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855；及Boulianne, G. L.等人，Nature 312, 643-646. (1984))。儘管已證明一些嵌合單株抗體在人類中具有較低免疫原性，但齧齒動物可變Ig域仍能引起明顯的人類抗齧齒動物反應。

短語"人類化抗體"係指源自非人類抗體之抗體，通常為齧齒動物單株抗體。或者，人類化抗體可源自嵌合抗體。

可由多種方法獲得人類化抗體，包括(例如)：(1)將非人類互補判定區(CDR)接枝於人類構架及恆定區上(一種在此項技術中稱為經由"CDR接枝"進行人類化之方法)或(2)移植整個非人類可變域，但藉由置換表面殘基以類人表面來"掩蔽"該等可變域(一種在此項技術中稱為"鑲飾(veneering)"之方法)。該等方法揭示於(例如)Jones等人，Nature 321:522-525 (1986)；Morrison等人，Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851-6855 (1984)；Morrison及Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988)；Verhoeyer等人，Science 239:1534-1536 (1988)；Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991)；Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169-217 (1994)；及Kettleborough, C.A.等人，Protein Eng. 4(7):773-83 (1991)中，該等文獻各自以引用方式全部併入本文中。

CDR接枝涉及將來自小鼠重鏈及輕鏈可變Ig域之六個CDR中之一或多者引入人類可變Ig域之適當構架區中。此技術(Riechmann, L.等人，Nature 332, 323 (1988))利用保守構架區(FR1-FR4)作為支架(scaffold)以支撐主要與抗原

接觸之CDR環。然而CDR接枝之明顯的不利之處為，因為構架區之胺基酸能促進抗原結合且因為CDR環之胺基酸會影響兩個可變Ig域之締合，所以CDR接枝可能產生具有比原始小鼠抗體顯著低之結合親和力的人類化抗體。為保持人類化單株抗體之親和力，可藉由選擇最為接近地類似於原始小鼠抗體之構架區的人類構架區且藉由由抗原結合位點之電腦模型化所輔助的構架或CDR內之單個胺基酸的定點突變來改良CDR接枝技術(例如Co, M. S.等人(1994), J. Immunol. 152, 2968-2976)。

一種將抗體人類化之方法包含將非人類重鏈及輕鏈序列與人類重鏈及輕鏈序列比對，基於該比對進行選擇且以人類構架置換非人類構架，進行分子模型化以預測人類化序列之構形且與親本抗體之構形比較。在此方法之後為CDR區中會干擾CDR之結構之殘基的反覆回復突變，直至人類化序列模型之所預測構形極為近似於親本非人類抗體之非人類CDR的構形為止。該等人類化抗體可經進一步衍生以促進吸收及清除率(例如經由Ashwell受體)(參見例如美國專利第5,530,101號及第5,585,089號)。

已報導若干藉由合理設計對小鼠單株抗體進行人類化的方法(參見例如2002年7月11日所公開之20020091240、WO 92/11018及美國專利第5,693,762號、美國專利第5,766,866號)。

人類工程化™抗體

短語"人類工程化™抗體"係指源自非人類抗體之抗體，

通常為齧齒動物單株抗體或可能為嵌合抗體。抗體可變域之人類工程化™已由Studnicka[參見例如Studnicka等人，美國專利第5,766,886號；Studnicka等人，Protein Engineering 7: 805-814 (1994)]描述為一種降低免疫原性同時保持抗體分子之結合活性的方法。根據該方法，已對各可變區胺基酸賦以取代風險。以下列三種風險中之一者區分胺基酸取代：(1)低風險變化為降低免疫原性之可能性最大但破壞抗原結合之機會最小的彼等變化；(2)中等風險變化為能進一步降低免疫原性但影響抗原結合或蛋白質摺疊之機會較大的彼等變化；(3)高風險殘基為對於結合或保持抗體結構而言係重要的但帶有會影響抗原結合或蛋白質摺疊之最高風險的彼等殘基。歸因於脯胺酸之三維結構性角色，即使脯胺酸處通常為低風險位置，仍通常認為該脯胺酸處之修飾為至少中等的風險變化。

齧齒動物抗體之輕鏈及重鏈之可變區可藉由在經確定在人類環境中不可能不利影響抗原結合或蛋白質摺疊但可能降低免疫原性之位置處用人類胺基酸取代而進行人類工程化™。儘管可使用任何人類可變區(包括個別VH或VL序列或人類一致VH或VL序列或個別或一致人類生殖系序列)，但通常使用與齧齒動物序列具有最高一致性或同源性之人類序列來使取代數最小化。可改變在任何數目之低風險位置處或所有低風險位置處之胺基酸殘基。舉例而言，在經比對之鼠類及人類胺基酸殘基不同之各低風險位置處，引入胺基酸修飾以使用人類殘基置換齧齒動物殘基。此外，

可改變在任何數目之中等風險位置處或所有中等風險位置處之胺基酸殘基。在例示性實施例中，使所有低風險位置及中等風險位置自齧齒動物序列變為人類序列。

構建含有經修飾重鏈及/或輕鏈可變區之合成基因且使其與人類γ重鏈及/或κ輕鏈恆定區連接。任何類別或子類之任何人類重鏈及輕鏈恆定區可與人類工程化™抗體可變區組合使用。

來自經工程化而含有人類免疫球蛋白基因座之轉殖基因動物的抗體

亦可使用不產生內源性免疫球蛋白且經工程化而含有人類免疫球蛋白基因座之轉殖基因動物來產生海帕西啶之抗體。舉例而言，WO 98/24893揭示具有人類Ig基因座之轉殖基因動物，其中該等動物歸因於內源性重鏈及輕鏈基因座之失活而不會產生功能性內源性免疫球蛋白。WO 91/741亦揭示能夠發動對於免疫原的免疫反應之轉殖基因非靈長類哺乳動物宿主，其中抗體具有靈長類恆定區及/或可變區且其中編碼內源性免疫球蛋白之基因座經取代或失活。WO 96/30498揭示使用Cre/Lox系統來修飾哺乳動物中之免疫球蛋白基因座，諸如以便置換所有或一部分恆定區或可變區以形成經修飾抗體分子。WO 94/02602揭示具有失活內源性Ig基因座及功能性人類Ig基因座之非人類哺乳動物宿主。美國專利第5,939,598號揭示製造轉殖基因小鼠之方法，其中小鼠缺乏內源性重鏈且表現包含一或多個異種恆定區之外源性免疫球蛋白基因座。

使用如上所述之轉殖基因動物，可產生針對所選抗原分子的免疫反應，並可自該動物取得產生抗體之細胞且用於產生分泌人類源性單株抗體之融合瘤。免疫方案、佐劑及其類似者在此項技術中係已知的，且用於使(例如)如WO 96/33735中所述之轉殖基因小鼠免疫。可測試單株抗體抑制或中和相應蛋白質之生物活性或生理效應的能力。

亦參見Jakobovits等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)；Jakobovits等人，Nature, 362:255-258 (1993)；Bruggermann等人，Year in Immuno., 7:33 (1993)；及美國專利第5,591,669號、美國專利第5,589,369號、美國專利第5,545,807號；及美國專利申請案第20020199213號。美國專利申請案第20030092125號描述使動物之免疫反應偏向所需抗原決定基之方法。亦可由活體外活化B細胞產生人類抗體(參見美國專利第5,567,610號及第5,229,275號)。

藉由噬菌體展示技術產生抗體

製造重組人類抗體基因譜之技術及經編碼抗體片段於絲狀噬菌體表面上之展示法的進展已提供了另一種產生人類源性抗體之方法。噬菌體展示法係描述於例如Dower等人，WO 91/17271、McCafferty等人，WO 92/01047以及Caton及Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-6454 (1990)中，該等文獻各自以引用方式全部併入本文中。由噬菌體技術所產生之抗體通常係作為抗原結合片段(例如Fv或Fab片段)產生於細菌中且因此缺乏效應功能。

可由以下兩種策略中之一者引入效應功能：可將該等片段工程化成完整抗體以表現於哺乳動物細胞中或工程化成具有能夠觸發效應功能之第二結合位點的雙特異性抗體片段。

通常，藉由PCR來獨立選殖抗體之Fd片段(V_H-C_H1)及輕鏈(V_L-C_L)且隨機重組於組合噬菌體展示庫中，隨後可針對與特定抗原之結合對其進行選擇。使抗體片段表現於噬菌體表面上，且經由若干輪抗原結合及再擴增(一種稱為淘選之程序)來實現藉由抗原結合選擇Fv或Fab(及因此含有編碼抗體片段之DNA之噬菌體)。富集對抗原具特異性之抗體片段且最終加以分離。

亦可在用於將齧齒動物單株抗體人類化之方法(稱為"定向選擇")中使用噬菌體展示技術(參見Jespers, L. S.等人，Bio/Technology 12, 899-903 (1994))。對此，小鼠單株抗體之Fd片段可結合人類輕鏈庫被展示，且所得雜合Fab庫可隨後藉由抗原加以選擇。小鼠Fd片段藉此提供引導選擇之模板。隨後，使所選人類輕鏈與人類Fd片段庫組合。對所得庫之選擇獲得完完全人類類Fab。

已描述多種關於自噬菌體展示庫獲得人類抗體之程序(參見例如Hoogenboom等人，J. Mol. Biol., 227:381 (1991)；Marks等人，J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991)；美國專利第5,565,332號及第5,573,905號；Clackson, T.及Wells J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994))。尤其是，源自噬菌體展示庫之抗體之活體外選擇及進化已成為一種有效

手段(參見Burton, D. R.及Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994)；及Winter, G.等人，Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994)；美國專利申請案第20020004215號及WO 92/01047；2003年10月9日公開之美國專利申請案第20030190317號及美國專利第6,054,287號；美國專利第5,877,293號)。

Watkins,"Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178: 187-193及2003年3月6日所公開之美國專利申請公開案第20030044772號描述藉由捕捉轉印(capture lift)(一種涉及使候選結合分子固定於固體支撐物上之方法)來篩檢噬菌體表現抗體庫或其他結合分子之方法。

抗體片段

如上所述，抗體片段包含完整全長抗體之一部分，較佳包含完整抗體之抗原結合或可變區且包括由抗體片段形成之線性抗體及多特異性抗體。抗體片段之非限制性實例包括Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv、Fd、域抗體(dAb)、互補判定區(CDR)片段、單鏈抗體(scFv)、單鏈抗體片段、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、微型抗體、線性抗體、螯合重組抗體、三抗體或雙抗體、內抗體、奈米抗體、小分子免疫治療藥物(SMIP)、抗原結合域免疫球蛋白融合蛋白、駱駝化抗體、含VHH之抗體或其突變蛋白或衍生物以及含有足以賦予多肽特異性抗原結合之免疫球蛋白之至少

一部分(諸如CDR序列)的多肽，其限制條件為抗體保留所需生物活性。可藉由修飾全抗體產生該等抗原片段或使用重組DNA技術或肽合成重新合成該等抗原片段。

術語"雙功能抗體"係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包含在同一多肽鏈(VH VL)中與輕鏈可變域(VL)連接之重鏈可變域(VH)。藉由使用過短而使得同一鏈上之兩個域之間不可成對的連接子，迫使該等域與另一鏈之互補域成對，且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體更充分地描述於(例如)EP 404,097、WO 93/11161及Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)中。

"單鏈Fv"或"scFv"抗體片段包含抗體之V_H域及V_L域(其中該等域存在於單一多肽鏈中)，且視情況包含介於V_H域與V_L域之間的多肽連接子，此使Fv能夠形成抗原結合所需之結構(Bird等人，*Science* 242:423-426, 1988及Huston等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, 1988)。Fd片段由V_H域及C_H1域組成。

其他抗體片段包括由V_H域組成之域抗體(dAb)片段(Ward等人，*Nature* 341:544-546, 1989)。

"線性抗體"包含一對串聯Fd片段(V_H-C_H1-V_H-C_H1)，其形成一對抗原結合區。線性抗體可具有雙特異性或單特異性(Zapata等人，Protein Eng. 8:1057-62 (1995))。

由經由肽連接子(無鉸鏈)或經由IgG鉸鏈與CH3融合之scFv組成的"微型抗體"已描述於Olafsen等人，Protein Eng

Des Sel. 2004年4月；17(4):315-23中。

術語"最大抗體"係指與免疫球蛋白之Fc區共價連接之二價scFv，參見例如Fredericks等人，Protein Engineering, Design & Selection, 17:95-106 (2004)及Powers等人，Journal of Immunological Methods, 251:123-135 (2001)。

缺乏輕鏈之功能性重鏈抗體天然存在於某些動物物種(諸如護士鯊、斑紋鬚鯊及駱駝科(*Camelidae*)，諸如駱駝、單峰駝、羊駝及美洲駝)中。在該等動物中，抗原結合位點縮減至單個域(VH_H域)。該等抗體僅使用重鏈可變區形成抗原結合區，亦即該等功能性抗體為僅具有結構H_2L_2之重鏈同源二聚體(被稱為"重鏈抗體"或"HCAb")。據報導駱駝化V_{HH}與含有鉸鏈、CH2及CH3域且缺少CH1域之IgG2及IgG3恆定區重組。典型僅V_H之片段難以以可溶性形式產生，但當將構架殘基改成更類似於VH_H時可獲得溶解度及特異性結合方面之改良。(參見例如Reichman等人，J Immunol Methods 1999, 231:25-38)。已發現駱駝化V_{HH}域以高親和力與抗原結合(Desmyter等人，*J. Biol. Chem.* 276:26285-90, 2001)且在溶液中具有高穩定性(Ewert等人，*Biochemistry* 41:3628-36, 2002)。產生具有駱駝化重鏈之抗體之方法描述於例如美國專利公開案第20050136049號及第20050037421號中。替代性支架可由較為接近地匹配鯊魚V-NAR支架且可為長穿透環結構提供構架之類人類可變域構成。

因為重鏈抗體之可變域為分子質量僅為15 kDa之最小全

功能性抗原結合片段，所以此實體被稱為奈米抗體(Cortez-Retamozo等人，*Cancer Research* 64:2853-57, 2004)。可如Conrath等人(*Antimicrob Agents Chemother* 45: 2807-12, 2001)中所述自經免疫單峰駝產生奈米抗體庫。

內抗體為展現細胞內表現且可調控細胞內蛋白質功能之單鏈抗體(Biocca等人，*EMBO J.* 9:101-108, 1990；Colby等人，*Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:17616-21, 2004)。可如Mhashilkar等人(*EMBO J* 14:1542-51, 1995)及Wheeler等人(*FASEB J.* 17:1733-5. 2003)中所述產生包含保留細胞內區域中之抗體構建之細胞信號序列的內抗體。穿膜抗體為細胞可滲透性抗體，其中蛋白質轉導域(PTD)與單鏈可變片段(scFv)抗體融合(Heng等人，*Med Hypotheses.* 64:1105-8, 2005)。

另外涵蓋作為對靶標蛋白質具有特異性之SMIP或結合域免疫球蛋白融合蛋白的抗體。該等構建體為包含與為實現抗體效應功能所必需之免疫球蛋白域融合之抗原結合域的單鏈多肽。參見例如WO 03/041600、美國專利公開案20030133939及美國專利公開案20030118592。

多價抗體

在一些實施例中，可能需要產生多價或甚至多特異性(例如雙特異性、三特異性等)單株抗體。該抗體可具有針對靶標抗原之至少兩個不同抗原決定基之結合特異性或者其可結合於兩個不同分子，例如結合於靶標抗原且結合於細胞表面蛋白或受體。舉例而言，雙特異性抗體可包括一

結合於靶標之臂及另一結合於白血球上之觸發分子(諸如T細胞受體分子(例如CD2或CD3)，或IgG之Fc受體(FcγR)，諸如FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)及FcγRIII(CD16))的臂，以便使細胞防禦機制集中於表現靶標之細胞。在另一實例中，雙特異性抗體可用於使細胞毒性劑定位於表現靶標抗原之細胞。該等抗體具有靶標結合臂及結合細胞毒性劑(例如沙泊寧(saporin)、抗干擾素-60、長春花生物鹼、蓖麻毒素A鏈、甲胺喋呤或放射性同位素半抗原)之臂。可將多特異性抗體製備成全長抗體或抗體片段。

另外，本文中所揭示之抗海帕西啶抗體亦可加以構建而摺疊成多價形式，該等形式可改善結合親和力、特異性及/或增加血液中之半衰期。可藉由此項技術中已知之技術製備抗海帕西啶抗體之多價形式。

雙特異性或多特異性抗體包括交聯或"雜接合"抗體。舉例而言，雜接合形式之抗體之一者可與抗生物素蛋白偶合，另一者與生物素偶合。可使用任何適宜交聯法製造雜接合抗體。適當交鍵劑以及若干交聯技術在此項技術中係熟知的且被揭示於美國專利第4,676,980號中。設計另一種方法以藉由在scFv之C末端處添加抗生蛋白鏈菌素編碼序列來製造四聚體。抗生蛋白鏈菌素由四個亞單位組成，因此當摺疊scFv-抗生蛋白鏈菌素時，四個亞單位締合，從而形成四聚體(Kipriyanov等人，Hum Antibodies Hybridomas 6(3): 93-101 (1995)，該文獻之揭示內容以引用方式全部併入本文中)。

根據另一種製造雙特異性抗體之方法，可將抗體分子對之間的界面工程化以使自重組細胞培養物回收之雜二聚體的百分比最大化。一界面包含抗體恆定域之CH_3域之至少一部分。在該方法中，來自第一抗體分子之界面的一或多個小胺基酸側鏈經較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換。藉由以較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈而於第二抗體分子之界面上產生尺寸與大側鏈一致或類似之補償性"空腔"。此提供使雜二聚體之產率增加並超過其他不當最終產物(諸如同源二聚體)的機制。參見1996年9月6日公開之WO 96/27011。

自抗體片段產生雙特異性或多特異性抗體之技術亦已描述於文獻中。舉例而言，可使用化學鍵聯製備雙特異性或三特異性抗體。Brennan等人，Science, 229:81 (1985)描述一種使完整抗體發生蛋白水解分裂以產生$F(ab')_2$片段之程序。使該等片段在二硫醇錯合劑亞砷酸鈉存在下還原以使鄰近二硫醇穩定且防止分子間二硫鍵形成。隨後將所產生之Fab'片段轉化為硫硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。隨後藉由以巰基乙胺還原將Fab'-TNB衍生物之一者再轉化成Fab'-巰醇且與等莫耳量之另一Fab'-TNB衍生物混合以形成雙特異性抗體。所產生之雙特異性抗體可用作選擇性固定酶之試劑。Better等人，Science 240: 1041-1043 (1988)揭示由細菌分泌功能性抗體片段(參見例如Better等人，Skerra等人Science 240: 1038-1041 (1988))。舉例而言，Fab'-SH片段可直接自大腸桿菌回收且以化學方式偶合以形成雙特異

性抗體(Carter等人，Bio/Technology 10:163-167 (1992)；Shalaby等人，J. Exp. Med. 175:217-225 (1992))。

Shalaby等人，J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)描述完完全人類類化雙特異性抗體$F(ab')_2$分子之產生。由大腸桿菌獨立分泌各Fab'片段且使其經受活體外定向化學偶合以形成雙特異性抗體。由此所形成之雙特異性抗體能夠結合於過度表現HER2受體之細胞及正常人T細胞，且觸發人類細胞毒性淋巴細胞針對人類乳房腫瘤靶標之溶胞活性。

亦已描述各種直接由重組細胞培養物製造及分離雙特異性或多特異性抗體片段之技術。舉例而言，已使用白胺酸拉鏈(例如GCN4)產生雙特異性抗體。(通常參見Kostelny等人，J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992))。藉由基因融合將來自Fos及Jun蛋白之白胺酸拉鏈肽連接於兩個不同抗體之Fab'部分。在鉸鏈區將抗體同源二聚體還原以形成單體且隨後再氧化以形成抗體雜二聚體。該方法亦可用於產生抗體同源二聚體。

如上所述，雙功能抗體為雙特異性抗體之一實例。參見例如Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)。可藉由二硫鍵使二價雙功能抗體穩定。

亦可藉由非共價締合以$(scFv_2)_2$構型或雙四功能抗體形式產生穩定單特異性或雙特異性Fv四聚體。或者，兩個不同scFv可串聯接合以形成雙-scFv。

亦已報導另一種藉由使用單鏈Fv(sFv)二聚體製造雙特異性抗體片段之策略。參見Gruber等人，J. Immunol.

152:5368 (1994)。一種方法為使用連接子或二硫鍵連接兩個scFv抗體(Mallender及Voss, J. Biol. Chem. 269:199-2061994、WO 94/13806及美國專利第5,989,830號，該等文獻之揭示內容以引用方式全部併入本文中)。

或者，雙特異性抗體可為如Zapata等人，Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)中所述產生之"線性抗體"。簡言之，該等抗體包含一對串聯Fd片段(V_H-C_H1-V_H-C_H1)，其形成一對抗原結合區。線性抗體可具有雙特異性或單特異性。

亦涵蓋兩價以上之抗體。舉例而言，可製備三特異性抗體。(Tutt等人，J. Immunol. 147:60 (1991))。

"螯合重組抗體"為識別靶標抗原之相鄰及非重疊抗原決定基且具有足以同時結合於兩個抗原決定基之可撓性的雙特異性抗體(Neri等人，*J Mol Biol.* 246:367-73, 1995)。

雙特異性Fab-scFv("雙抗體")及三特異性Fab-(scFv)(2)("三抗體")之產生描述於Schoonjans等人(*J Immunol.* 165:7050-57, 2000)及Willems等人(*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 786:161-76, 2003)中。對於雙抗體或三抗體而言，scFv分子與VL-CL(L)及VH-CH_1(Fd)鏈之一或兩者融合(例如)以產生三抗體，其中兩個scFv與Fab之C末端融合，而在雙抗體中一個scFv與Fab之C末端融合。

在另一種方法中，在將游離半胱胺酸引入親本蛋白質中之後產生二聚體、三聚體及四聚體。使用具有可變數目

(兩個至四個)的馬來醯亞胺基團之肽基交聯劑來使所關注之蛋白質與游離半胱胺酸交聯(Cochran等人，Immunity 12 (3): 241-50 (2000)，該文獻之揭示內容全部併入本文中)。

抗體篩檢法

亦提供鑑別結合海帕西啶、交叉阻斷(cross-block)本文中之例示性抗體及/或抑制海帕西啶活性之抗體的方法。該等方法可利用本文中所提供之經高度純化之生物活性正確摺疊非尿源性人類海帕西啶(在細菌或非哺乳動物細胞中化學合成或產生)的組合物。

可針對結合親和力藉由此項技術中已知之方法篩檢抗體。舉例而言，可使用凝膠位移檢定、西方墨點法、放射性標記競爭檢定、層析共分級(co-fractionation by chromatography)、共同沈澱法、交聯法、ELISA及其類似方法，該等方法描述於(例如)Current Protocols in Molecular Biology (1999) John Wiley & Sons, NY中，該文獻以引用方式全部併入本文中。

為對結合於靶標抗原上之所需抗原決定基的抗體作初始篩檢，可進行諸如描述於Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow及David Lane編(1988)中之常規交叉阻斷檢定。亦可使用常規競爭性結合檢定，其中未知抗體以其抑制靶標與本發明之靶標特異性抗體結合之能力為表徵。可使用完整抗原、其片段(諸如胞外域)或線性抗原決定基。抗原決定基定位描述於Champe等人，J. Biol. Chem. 270: 1388-1394 (1995)中。

在活體外結合檢定之一種變體中，提供一種方法，其包含(a)使經固定海帕西啶與候選抗體接觸，及(b)偵測該候選抗體與該海帕西啶之結合性。在一替代性實施例中，將候選抗體固定且偵測海帕西啶之結合性。使用此項技術中所熟知之方法中之任一者實現固定，包括共價結合至支撐物、珠粒或層析樹脂，以及非共價高親和力相互作用，諸如抗體結合，或使用抗生蛋白鏈菌素/生物素結合，其中經固定化合物包括生物素部分。可(i)使用未經固定之化合物上之放射性標記，(ii)使用非固定化合物上之螢光標記，(iii)使用對非固定化合物具有免疫特異性之抗體，(iv)使用非固定化合物上可激發經固定化合物所連接之螢光支撐物的標記以及此項技術中所熟知且常規實施之其他技術來實現結合之偵測。

可藉由使海帕西啶與抗體接觸，在測試抗體存在及不存在之情況下比較海帕西啶活性且判定抗體之存在是否使海帕西啶之活性降低來鑑別抑制或中和人類海帕西啶活性之抗體。可使用適當動物模型(包括本文中所述之彼等者中之任一者)活體內評估特定抗體或抗體組合之生物活性。

在例示性實施例中，本發明包括用於鑑別與標靶抗原相互作用或抑制標靶抗原之生物活性(亦即抑制磷酸化、二聚化、配位體誘發之受體活化或細胞內信號傳導等)之抗體的高通量篩檢(high throughput screening ，HTS)檢定。HTS檢定可以有效方式篩檢大量化合物。基於細胞之HTS系統係用於研究標靶抗原與其結合搭配物之間的相互作

用。HTS檢定係設計用以鑑別具有所需特性之"化學靶物(hits)"或"先導化合物"，可由此設計修飾以改良所需特性。

在本發明之另一個實施例中，採用對於標靶抗原多肽具有合適結合親和力之CDRs內的胺基酸具有1、2、3或3個以上修飾之CDRs或抗體片段的高通量篩檢。

特異性結合劑

其他海帕西啶特異性結合劑可以例如基於抗體之CDRs或藉由各種肽或有機化合物庫中篩檢出展現所需對於人類海帕西啶之結合特性的肽或化合物來製備。海帕西啶特異性結合劑包括含有胺基酸序列與鼠類抗體Ab43(SEQ ID NO: 16-21)、鼠類抗體2.7(SEQ ID NO: 28-33)、鼠類抗體2.41(SEQ ID NO: 40-45)、大鼠抗體R9(SEQ ID NO: 52-57)，或人類抗體1C9(SEQ ID NO: 111-116)、人類抗體3B3(SEQ ID NO: 121-126)、人類抗體4E1(SEQ ID NO: 131-136)、人類抗體7A3(SEQ ID NO: 141-46)、人類抗體9D12(SEQ ID NO: 151-156)、人類抗體12B9(SEQ ID NO: 161-166)、人類抗體15E1(SEQ ID NO: 171-176)、人類抗體18D8(SEQ ID NO: 314-319)、人類抗體19C1(SEQ ID NO: 324-329)、人類抗體19D12(SEQ ID NO: 294-299)、人類抗體19H6(SEQ ID NO: 304-309)、人類抗體23F11(SEQ ID NO: 181-186)、人類抗體26F11(SEQ ID NO: 191-196)或人類抗體1S1(SEQ ID NO: 203-205及131-133)或人類抗體1S2(SEQ ID NO: 214-216及144-146)或人類抗體1S3(SEQ

ID NO: 225-227及164-166)或人類抗體1S4(SEQ ID NO: 236-238及174-176)或人類抗體1S5(SEQ ID NO: 247-249及184-186)之一或多個CDRs至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99%以上一致之肽。

海帕西啶特異性結合劑亦包括肽抗體(peptibody)。術語"肽抗體"係指包含連接於至少一個肽之抗體Fc域的分子。肽抗體之產生係大體描述於2000年5月4日公開之PCT公開案WO 00/24782中。任何該等肽可在存在連接子或不存在連接子之情況下串聯(亦即順次)連接。含有半胱胺醯基殘基之肽可與另一含有Cys之肽交聯，其中之任一者或兩者可與媒劑連接。具有一個以上Cys殘基之任何肽亦可形成肽內二硫鍵。可使任何該等肽衍生，例如可將羧基末端以胺基封端，可將半胱胺酸封端，或胺基酸殘基可經除胺基酸殘基以外之部分取代(參見例如Bhatnagar等人，J. Med. Chem. 39: 3814-9 (1996)及Cuthbertson等人，J. Med. Chem. 40: 2876-82 (1997)，該等文獻以引用方式全部併入本文中)。可類似於抗體之親和力成熟來優化肽序列，或者另外藉由丙胺酸掃描或無規突變或定點突變，接著篩檢以鑑別最佳結合物來改變肽序列。Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26: 401-24 (1997)。可將各種分子插入特異性結合劑結構中，例如插入特異性結合劑之肽部分本身內或特異性結合劑之肽與媒劑部分之間，同時保留

特異性結合劑之所需活性。可易於插入(例如)分子，諸如Fc域或其片段；聚乙二醇或其他相關分子，諸如葡聚糖；脂肪酸、脂質、膽固醇群、小碳水化合物、肽、如本文中所述之可偵測部分(包括螢光劑、放射性標記，諸如放射性同位素)、寡醣、寡核苷酸、聚核苷酸、干擾(或其他)RNA、酶、激素或其類似物。熟習此項技術者應瞭解適合於以此方式插入之其他分子，且該等分子涵蓋於本發明之範疇內。此包括將(例如)所需分子插入於兩個視情況由適當連接子接合之連續胺基酸之間。

亦涵蓋海帕西啶肽抗體之發展。蛋白質配位體與其受體之相互作用常常發生於相對較大之界面處。然而，如就人類生長激素及其受體而言所證明，在界面處僅少數關鍵殘基促成大部分結合能。Clackson等人，*Science* 267: 383-6 (1995)。大多數蛋白質配位體僅在恰當拓撲結構中展示結合抗原決定基或起與結合無關之作用。因此，僅"肽"長度(通常2至40個胺基酸)之分子可結合於給定較大蛋白質配位體之受體蛋白。該等肽可模擬大蛋白質配位體之生物活性("肽促效劑")或經由競爭性結合抑制大蛋白質配位體之生物活性("肽拮抗劑")。

噬菌體展示技術已作為有效方法出現於鑑別該等肽促效劑及拮抗劑之過程中。參見例如Scott等人Science 249: 386 (1990)；Devlin等人，Science 249: 404 (1990)；1993年6月29日頒布之美國專利第5,223,409號；1998年3月31日頒布之美國專利第5,733,731號；1996年3月12日頒布之美國專

利第5,498,530號；1995年7月11日頒布之美國專利第5,432,018號；1994年8月16日頒布之美國專利第5,338,665號；1999年7月13日頒布之美國專利第5,922,545號；1996年12月19日公開之WO 96/40987；及1998年4月16日公開之WO 98/15833(該等文獻各自以引用方式全部併入本文中)。在肽噬菌體展示庫中，可藉由與絲狀噬菌體之鞘蛋白融合來展示隨機肽序列。若需要，則可將所展示肽相對於受體之抗體固定胞外域進行親和性溶離。可藉由逐輪親和純化及再增殖而富集所保留噬菌體。可將最佳結合肽定序以鑑別肽之一或多個結構性相關家族內的關鍵殘基。參見例如Cwirla等人，Science 276: 1696-9 (1997)，其中鑑別兩個不同家族。肽序列亦可能暗示哪個殘基可藉由丙胺酸掃描或DNA水平上之突變而被安全置換。可形成突變庫且對其篩檢以進一步優化最佳結合物之序列。Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26: 401-24 (1997)。

蛋白質-蛋白質相互作用之結構分析亦可用來指出可模擬大蛋白質配位體之結合活性的肽。在此種分析中，晶體結構可顯示大蛋白質配位體之關鍵殘基之一致性及相對定位，可根據此設計肽。參見例如Takasaki等人，Nature Biotech 15: 1266-70 (1997)。該等分析方法亦可用於研究受體蛋白與肽(由噬菌體展示所選擇)之間的相互作用，該相互作用可提示為提高結合親和力對肽作進一步修飾。

在肽研究中其他方法與噬菌體展示展開競爭。肽庫可與乳糖抑制體之羧基末端融合且表現於大腸桿菌中。另一種

基於大腸桿菌之方法允許藉由與肽聚醣關聯脂蛋白(PAL)融合而展示於細胞外膜上。在下文中，該等及相關方法被總稱為"大腸桿菌展示"。在另一種方法中，在核糖體釋放之前停止隨機RNA之轉譯，從而產生仍與相關RNA連接之多肽庫。在下文中，此種及相關方法被總稱為"核糖體展示"。其他方法使用肽與RNA之化學鍵聯。參見例如Roberts及Szostak, Proc Natl Acad Sci USA, 94: 12297-303 (1997)。在下文中，此種及相關方法被總稱為"RNA-肽篩檢"。已開發出化學衍生肽庫，其中將肽固定於穩定非生物材料(諸如聚乙烯棒或溶劑可滲透性樹脂)上。另一化學衍生肽庫使用光微影來掃描固定於玻璃載片上之肽。在下文中，該等及相關方法被總稱為"化學-肽篩檢"。化學-肽篩檢之有利之處可在於其允許使用D-胺基酸及其他非天然類似物以及非肽元件。生物方法與化學方法綜述於Wells及Lowman, Curr. Opin. Biotechnol., 3: 355-62 (1992)中。

在概念上，可使用噬菌體展示及如上所述之其他方法發現任何蛋白質之肽模擬物。該等方法已被用於抗原決定基定位以便鑑別蛋白質-蛋白質相互作用中之關鍵胺基酸且作為用以發現新治療劑之線索。參見例如Cortese等人，Curr. Opin. Biotech. 7: 616-21 (1996)。目前將肽庫最常用於免疫研究，諸如抗原決定基定位。參見Kreeger, The Scientist 10(13):19-20 (1996)。

可針對結合於本文中所述之海帕西啶多肽或調節(亦即增加或降低)本文中所述之海帕西啶多肽之活性的能力篩

檢之化合物的來源包括(1)無機及有機化學庫、(2)天然產物庫及(3)由隨機肽或模擬肽、寡核苷酸或有機分子組成之組合庫。

化學庫可易於合成或可購自若干商業來源，且可包括已知化合物或經由天然產物篩檢鑑別為"化學靶物"或"先導物"之化合物的結構類似物。

天然產物庫之來源為微生物(包括細菌及真菌)、動物、植物或其他植被或海洋生物，且可藉由以下方式形成用於篩檢之混合物庫：(1)自土壤、植物或海洋微生物醱酵且提取醱酵液或(2)提取生物體本身。天然產物庫包括聚酮化合物、非核糖體肽及其(非天然存在)變異體。關於綜述，參見*Science* 282:63-68 (1998)。

組合庫係由大量肽、寡核苷酸或有機化合物組成且可易於藉由傳統自動合成法、PCR、選殖或專屬合成法製備。特別關注肽及寡核苷酸組合庫。所關注之其他庫包括肽、蛋白質、肽模擬物、多並行合成集合(multiparallel synthetic collection)、重組物及多肽庫。關於組合化學及由此所產生之庫的綜述，參見Myers, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:701-707 (1997)。關於肽模擬物庫之綜述及實例，參見Al-Obeidi等人，*Mol. Biotechnol,* 9(3):205-23 (1998)；Hruby等人，*Curr Opin Chem Biol,* 1(1):114-19 (1997)；Dorner等人，Bioorg Med Chem, 4(5):709-15 (1996)(烷基化二肽)。

海帕西啶特異性結合劑亦包括如由Hays等人*Trends In*

Biotechnology, 23(10):514-522 (2005)中所述之支架蛋白(該文獻以引用方式全部併入本文中)及如美國公開案第2006-0286603號及第2006-0223114號中所述之Avimer蛋白技術(兩文獻以引用方式全部併入本文中)。

抗體或特異性結合劑之篩檢法

亦提供鑑別結合海帕西啶及/或交叉阻斷本文中所述之例示性抗體及/或抑制海帕西啶活性之抗體或特異性結合劑的方法。該等方法可利用本文中所提供之經高度純化之生物活性正確摺疊非尿源性人類海帕西啶(在細菌或非哺乳動物細胞中化學合成或產生)的組合物。

可針對結合親和力藉由此項技術中已知之方法篩檢抗體或特異性結合劑。舉例而言，可使用凝膠位移檢定、西方墨點法、放射性標記競爭檢定、層析共分級、共同沈澱法、交聯法、ELISA及其類似方法，該等方法描述於(例如)Current Protocols in Molecular Biology (1999) John Wiley & Sons, NY中，該文獻以引用方式全部併入本文中。

為對結合於靶標抗原上之所需抗原決定基的抗體或特異性結合劑作初始篩檢，可進行諸如描述於Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow及David Lane編(1988)中之常規交叉阻斷檢定。亦可使用常規競爭性結合檢定，其中未知抗體以其抑制靶標與本發明之靶標特異性抗體結合之能力為表徵。可使用完整抗原、其片段(諸如胞外域)或線性抗原決定基。抗原決定基

定位描述於Champe等人，J. Biol. Chem. 270: 1388-1394 (1995)中。

在活體外結合檢定之一種變體中，本發明提供一種方法，其包含(a)使經固定海帕西啶與候選抗體或特異性結合劑接觸，及(b)偵測該候選抗體或特異性結合劑與該海帕西啶之結合性。在一替代性實施例中，將候選抗體或特異性結合劑固定且偵測海帕西啶之結合性。使用此項技術中所熟知之方法中之任一者實現固定，包括共價結合至支撐物、珠粒或層析樹脂，以及非共價高親和力相互作用，諸如抗體結合，或使用抗生蛋白鏈菌素/生物素結合，其中經固定化合物包括生物素部分。可(i)使用未經固定之化合物上之放射性標記，(ii)使用非固定化合物上之螢光標記，(iii)使用對非固定化合物具有免疫特異性之抗體，(iv)使用非固定化合物上可激發經固定化合物所連接之螢光支撐物的標記以及此項技術中所熟知且常規實施之其他技術來實現結合之偵測。

在一些實施例中，可藉由使海帕西啶與抗體(或特異性結合劑)接觸，在測試抗體(或特異性結合劑)存在及不存在之情況下比較海帕西啶活性且判定抗體(或特異性結合劑)之存在是否使海帕西啶之活性降低來鑑別抑制或中和人類海帕西啶活性之抗體或特異性結合劑。可使用適當動物模型(包括本文中所述之彼等者中之任一者)活體內評估特定抗體或特異性結合劑或抗體或特異性結合劑之組合的生物活性。

在一些實施例中，本發明亦涵蓋用以鑑別與靶標抗原相互作用或抑制靶標抗原之生物活性(亦即抑制磷酸化、二聚化、配位體誘發受體活化或細胞內信號轉導等)之抗體的高通量篩檢(HTS)檢定。HTS檢定使以有效方式篩檢大量化合物成為可能。為研究靶標抗原與其結合搭配物之間的相互作用，涵蓋細胞基HTS系統。對HTS檢定進行設計以鑑別具有所需特性之"化學靶物"或"先導化合物"，可根據此設計修飾以改良所需特性。

在另一實施例中，採用針對對CDR(其對靶標抗原多肽具有合適結合親和力)內的胺基酸具有1、2、3或3個以上之修飾之CDR或抗體片段的高通量篩檢。

B.抑制性寡核苷酸

可根據本文中所述之方法使用之海帕西啶表現抑制劑包括抑制劑寡核苷酸或聚核苷酸，包括其醫藥學上可接受之鹽，例如鈉鹽。非限制性實例包括：反義寡核苷酸[Eckstein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, *10*: 117-121 (2000)；Crooke, *Methods Enzymol.*, *313*: 3-45 (2000)；Guvakova等人，*J. Biol. Chem.*, *270*: 2620-2627 (1995)；Manoharan, *Biochim. Biophys. Acta, 1489*: 117-130 (1999)；Baker等人，*J. Biol. Chem.*, *272*: 11994-12000 (1997)；Kurreck, *Eur. J. Biochem.*, *270*: 1628-1644 (2003)；Sierakowska等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 12840-12844 (1996)；Marwick, *J. Am. Med. Assoc. 280*: 871 (1998)；Tomita及Morishita, *Curr. Pharm. Des.*, *10*:

797-803 (2004)；Gleave及Monia, *Nat. Rev. Cancer, 5*: 468-479 (2005)及Patil, *AAPS J. 7*: E61-E77 (2005)]、三鏈寡核苷酸[Francois等人，*Nucleic Acids Res., 16*: 11431-11440 (1988)以及Moser及Dervan, *Science, 238*: 645-650 (1987)]、核糖核酸酶/脫氧核糖核酸酶(DNA酶)[Kruger等人，*Tetrahymena. Cell, 31*: 147-157 (1982)；Uhlenbeck, *Nature, 328*: 596-600 (1987)；Sigurdsson及Eckstein, *Trends Biotechnol., 13*: 286-289 (1995)；Kumar等人，*Gene Ther., 12*: 1486-1493 (2005)；Breaker及Joyce, *Chem. Biol., 1*: 223-229 (1994)；Khachigian, *Curr. Pharm. Biotechnol., 5*: 337-339 (2004)；Khachigian, *Biochem. Pharmacol., 68*: 1023-1025 (2004)以及Trulzsch及Wood, *J. Neurochem., 88*: 257-265 (2004)]、小干擾RNA/RNAi[Fire等人，*Nature, 391*: 806-811 (1998)；Montgomery等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95*: 15502-15507 (1998)；Cullen, *Nat. Immunol., 3*: 597-599 (2002)；Hannon, *Nature, 418*: 244-251 (2002)；Bernstein等人，*Nature, 409*: 363-366 (2001)；Nykanen等人，*Cell, 107*: 309-321 (2001)；Gilmore等人，*J. Drug Target., 12*: 315-340 (2004)；Reynolds等人，*Nat. Biotechnol., 22*: 326-330 (2004)；Soutschek等人，*Nature, 432*: 173-178 (2004)；Ralph等人，*Nat. Med., 11:* 429-433 (2005)；Xia等人，*Nat. Med., 10*: 816-820 (2004)及Miller等人，*Nucleic Acids Res., 32*: 661-668 (2004)]、適體[Ellington及Szostak, *Nature, 346*:

818-822 (1990)；Doudna等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92*: 2355-2359 (1995)；Tuerk及Gold, *Science, 249*: 505-510 (1990)；White等人，*Mol. Ther., 4*: 567-573 (2001)；Rusconi等人，*Nature, 419*: 90-94 (2002)；Nimjee等人，*Mol. Ther., 14*: 408-415 (2006)；Gragoudas等人，*N. Engl. J. Med., 351*: 3805-2816 (2004)；Vinores, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 5673-679 (2003)以及Kourlas及Schiller等人，*Clin. Ther., 28*: 36-44 (2006)]或誘餌寡核苷酸[Morishita等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92*: 5855-5859 (1995)；Alexander等人，*J. Am. Med. Assoc., 294*: 2446-2454 (2005)；Mann及Dzau, *J. Clin. Invest., 106*: 1071-1075 (2000)以及Nimjee等人，*Annu. Rev. Med., 56*: 555-583 (2005)]。上述文獻據此以引用方式全部併入本文中，特別強調與設計、製備及使用抑制性寡核苷酸之方法有關之文獻的彼等章節。諸如Ambion Inc.(Austin, TX)、Darmacon Inc.(Lafayette, CO)、InvivoGen(San Diego, CA)及Molecular Research Laboratories, LLC(Herndon, VA)之供應商製造定製siRNA分子。此外，可利用商用套組產生定製siRNA分子，諸如SILENCER™ siRNA構建套組(Ambion Inc., Austin, TX)或psiRNA系統(InvivoGen, San Diego, CA)。

抑制性寡核苷酸可與靶標基因之編碼部分、基因中之3'或5'未轉譯區或內含子序列或者靶標mRNA中之編碼或內含子序列互補。內含子序列通常保守性較低且因此可提供

較大特異性。在一實施例中，抑制性寡核苷酸抑制一種物種之基因產物之表現，但其在另一物種中之同系物並非如此；在其他實施例中，抑制性寡核苷酸抑制基因於兩個物種(例如人類與靈長類或人類與鼠類)中之表現。

在一些實施例中，抑制性寡核苷酸能夠與海帕西啶基因或mRNA(SEQ ID NO: 99(小鼠)或SEQ ID NO: 100(人類)或其反向股)之至少8、9、10、11或12個連續鹼基在適度或高嚴格條件下雜交。在某些情況下，視互補區之長度而定，在不影響抑制功能之情況下可容許一個、兩個或兩個以上錯配。在一些實施例中，抑制性寡核苷酸為反義寡核苷酸、抑制性RNA(包括siRNA或RNAi或shRNA)、DNA酶、核糖核酸酶(視情況為錘頭狀核糖核酸酶)、適體或其醫藥學上可接受之鹽。在一實施例中，寡核苷酸與SEQ ID NO: 104之至少10個鹼基互補。在一實施例中，寡核苷酸靶向位於海帕西啶mRNA之3'未轉譯區附近之核苷酸。

以抑制性寡核苷酸靶向之mRNA位點的選擇

在寡核苷酸之設計中所使用之特異性序列可為含於靶標之經表現基因信使內之核苷酸的任何鄰近序列。可使用此項技術中已知之程式及算法來選擇合適靶標序列。此外，可利用經設計用來預測指定單股核酸序列之二級結構的程式且允許選擇彼等可能存在於摺疊mRNA之經暴露單股區中的序列來選擇最佳序列。用於設計合適寡核苷酸之方法及組合物可見於(例如)美國專利第6,251,588號中，該文獻內容以引用方式全部併入本文中。

已展示大多數mRNA含有若干二級及三級結構。RNA中之二級結構元件主要係由同一RNA分子之不同區域之間的Watson-Crick型相互作用形成。重要二級結構元件包括分子內雙股區、髮夾環、雙鏈體RNA中之突起(bulge)及內環。當二級結構元件彼此接觸或與單股區接觸而產生較複雜的三維結構時形成三級結構元件。若干研究者已量測大量RNA雙鏈體結構之結合能且已獲得一套可用於預測RNA之二級結構的法則(參見例如Jaeger等人，1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7706；及Turner等人，1988, Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17:167)。該等法則適用於鑑別RNA結構元件，且尤其適用於鑑別可為mRNA之片段的單股RNA區以確定siRNA、核糖核酸酶或反義技術之標靶。

反義寡核苷酸

已展示反義寡核苷酸於細胞中之組成性表現可能經由阻斷轉譯或防止拼接而抑制基因表現。適當抑制性寡核苷酸可為單股且含有(例如)長度為至少12、15或18個鹼基、與mRNA或DNA分子充分互補且對mRNA或DNA分子具特異性之片段使得其與mRNA或DNA分子雜交且抑制轉錄、拼接或轉譯。通常少於30個鹼基之長度上的互補性係綽綽有餘的。

支配抑制性寡核苷酸序列之靶標位點之因素包括寡核苷酸長度、結合親和力及靶標序列可及性。可針對序列抑制活性之效能藉由量測靶標蛋白質轉譯及靶標相關表型之抑制(例如細胞培養物中之細胞增殖之抑制)來活體外篩檢序

列。通常已知可使用反義寡核苷酸靶向RNA之大部分區域(5'及3'未轉譯區、AUG啟始、編碼、拼接點及內含子)。

可使用硫代磷酸酯反義寡核苷酸。修飾雜環或糖之磷酸二酯鍵亦可使效率提高。使用硫代磷酸酯來修飾磷酸二酯鍵。已將N3'-P5'胺基磷酸酯鍵描述為使寡核苷酸對核酸酶穩定及增加與RNA之結合。肽核酸(PNA)鍵為核糖及磷酸二酯骨架之完全置換且對核酸酶穩定，提高對RNA之結合親和力且不允許為RNAse H所裂解。其基本結構亦應經受修飾，此可使其作為反義組份最佳化。關於雜環之修飾，已證明某些雜環修飾在不干擾RNAse H活性之情況下加強反義效應。該修飾之一實例為C-5噻唑修飾。最終，亦可顧及糖之修飾。在細胞培養物中及活體內2'-O-丙基及2'-甲氧基乙氧基核糖修飾使寡核苷酸對核酸酶穩定。

預期具穩定性、具有對核酸酶之高抗性、具有適當藥物動力學性質以便允許以無毒性劑量運輸至靶標組織位點且具有橫穿質膜之能力的抑制性寡核苷酸用作治療劑。

短干擾RNA

短干擾(si)RNA技術(亦稱為RNAi)通常涉及由與特定序列同源之雙股RNA(dsRNA)所誘發的該序列之mRNA之降解，藉此"干擾"相應基因之表現。可藉由引入對應於任何所選基因之mRNA之所有或實質部分的dsRNA來壓製該基因。看來，當長dsRNA被表現時，其最初由核糖核酸酶III加工成長度為少至21至22個鹼基對之較短dsRNA寡核苷酸。因此，可藉由引入或表現相對較短之同源dsRNA來獲

得siRNA。例示性siRNA具有約21個核苷酸之有義鏈及反義鏈，其構成雙股RNA之約19個核苷酸並在各3'端處具有兩個核苷酸之懸垂物。實際上，使用相對較短之同源dsRNA可具有某些優勢。

哺乳動物細胞具有至少兩個受雙股RNA(dsRNA)影響之途徑。如上所述，在序列特異性siRNA途徑中，首先使起始dsRNA分裂為短干擾RNA。認為短干擾RNA提供使特異性信使RNA可被靶向以便降解的序列資訊。與此相反，藉由任何序列之dsRNA觸發非特異性途徑，只要其長度為至少約30個鹼基對即可。

非特異性效應因dsRNA活化以下兩種酶而出現：PKR，呈其活性形式時使轉譯起始因子eIF2磷酸化以停止所有蛋白質合成；及2',5'-寡腺苷酸合成酶(2',5'-AS)，其合成可活化RNase L(一種靶向所有mRNA之非特異性酶)之分子。非特異性途徑可使宿主呈現應激反應或病毒性感染反應且通常，較佳使非特異性途徑之效應最小化。重要地為，較長dsRNA似乎為誘發非特異性途徑所需且因此預期比約30個鹼基對短之dsRNA藉由RNAi實現基因抑制(參見Hunter等人，1975, J. Biol. Chem. 250:409-17；Manche等人，1992, Mol. Cell. Biol. 12:5239-48；Minks等人，1979, J. Biol. Chem. 254:10180-3；及Elbashir等人，2001, Nature 411:494-8)。

已證明siRNA為降低多種細胞類型之基因表現之有效方法。siRNA通常使基因表現降低至比使用反義技術所獲低

之水平且常常完全消除表現(參見Bass, 2001, Nature 411:428-9)。在哺乳動物細胞中，siRNA在低於通常用於反義實驗之濃度若干數量級的濃度下為有效的(Elbashir等人，2001, Nature 411:494-8)。

用以實現RNAi之雙股寡核苷酸較佳為小於30個鹼基對之長度，例如約25、24、23、22、21、20、19、18或17個鹼基對或更小之長度且含有與靶標mRNA充分互補之片段以便允許與靶標mRNA雜交。視情況dsRNA寡核苷酸可包括3'懸垂物末端。例示性2-核苷酸3'懸垂物可由任何類型之核糖核苷酸殘基組成且甚至可由2'-脫氧胸苷殘基組成，此可降低RNA合成成本且可增強siRNA在細胞培養基中及轉染細胞內之核酸酶抗性(參見Elbashi等人，2001, Nature 411:494-8)。例示性dsRNA可化學合成或使用合適表現載體活體外或活體內產生(參見例如Elbashir等人，2001, Genes Dev. 15:188-200)。在此項技術中已知，可由啟動子(諸如T7 RNA聚合酶啟動子)轉錄較長RNA。

在本發明之一些實施例中亦可使用50、75、100或甚至500個鹼基對或更多之較長dsRNA。儘管可視所處理細胞之性質、基因靶標及熟習此項技術者可易於辨識之其他因素而定使用其他濃度，但用於實現RNAi之dsRNA之例示性濃度為約0.05 nM、0.1 nM、0.5 nM、1.0 nM、1.5 nM、25 nM或100 nM。

siRNA技術之其他組合物、方法及應用提供於美國專利申請案第6,278,039號、第5,723,750號及第5,244,805號

中，該等申請案以引用方式全部併入本文中。

短髮夾RNA

與siRNA相比，shRNA在沉默長壽及輸送選擇方面提供優勢。關於綜述，參見例如Hannon等人，Nature, 431:371-378, 2004。已報導產生shRNA(其在細胞內被加工成具有類siRNA特性之短雙鏈體RNA)的載體(Brummelkamp等人，Science 296, 550-553, 2000；Paddison等人，Genes Dev. 16, 948-958 (2002))。該等載體提供可在將載體穩定整合於宿主細胞基因組中之後調控持續基因沉默之基因沉默試劑的可再生來源。此外，可易於以經設計用來輸送允許異位mRNA表現之DNA構建體之無數方法中的任一種方法將核心沉默"髮夾"卡匣插入反轉錄病毒、豆狀病毒或腺病毒載體中，從而有助於shRNA輸送至寬範圍之細胞類型中(Brummelkamp等人，Cancer Cell 2:243-247, 2002；Dirac, 等人，J. Biol. Chem. 278:11731-11734, 2003；Michiels等人，Nat. Biotechnol. 20:1154-1157, 2002；Stegmeie等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:13212-13217, 2005；Khvorova等人，Cell, 115:209-216 (2003))。

髮夾可以左手髮夾(亦即5'-反義-環-有義-3')或右手髮夾(亦即5'-有義-環-反義-3')形式組織成。siRNA亦可視髮夾組織而定在有義股或反義股之5'或3'端含有懸垂物。較佳，若存在任何懸垂物，則其處於髮夾之3'端上且包含1至6個鹼基。懸垂物可能未經修飾或可含有一或多種特異性或穩定化修飾，諸如2'位置之鹵素或O-烷基修飾或核苷酸

間修飾，諸如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或膦酸甲酯修飾。該等懸垂物可為核糖核酸、脫氧核糖核酸或核糖核酸與脫氧核糖核酸之組合。

另外，髮夾可進一步包含5'-最末端核苷酸上之磷酸酯基團。5'-最末端核苷酸之磷酸化係指存在一或多個連接於5'-末端核苷酸之糖部分之5'碳的磷酸酯基團。較佳，在將繼Dicer加工之後形成反義股之區域之5'端上僅存在一個磷酸酯基團。在一例示性實施例中，右手髮夾可包括不具有5'磷酸酯基團之5'端(亦即有義區之游離5'端)或可具有以防止磷酸化之方式經修飾的有義區之游離5'-最末端核苷酸的5'碳。此可藉由多種方法達成，包括(但不限於)添加磷酸化阻隔基團(例如5'-O-烷基)或消除5'-OH官能基(例如5'-最末端核苷酸為5'-脫氧核苷酸)。在髮夾為左手髮夾之情況下，較佳使5'-最末端核苷酸之5'碳位置磷酸化。

具有比26個鹼基對長之莖長度的髮夾可由Dicer加工，使得某些部分不為促進mRNA降解之所得siRNA之部分。因此可包含有義核苷酸之第一區及可包含反義核苷酸之第二區亦可含有一段互補(或至少大體上彼此互補)但與靶標mRNA相同或與靶標mRNA互補或不與靶標mRNA相同或不與靶標mRNA互補的核苷酸。儘管shRNA之莖可由除懸垂物外之互補或部分互補反義股及有義股組成，但shRNA亦可包括下列部分：(1)處於最終Dicer切割位點之遠端之分子部分，其含有大體上與靶標mRNA互補/同源之區域；及(2)處於Dicer切割位點之近端之莖區域(亦即鄰近於環之區

域)，其與靶標mRNA無關或僅部分相關(例如互補/同源)。可基於若干參數(包括(但不限於)熱力學特性或分布)來選擇該第二區域之核苷酸含量。

經修飾之shRNA可保留後Dicer加工之雙鏈體中之修飾。在例示性實施例中，在髮夾為於分子之3'端上含有2-6個核苷酸懸垂物之右手髮夾(例如5'-S-環-AS-3')的情況下，可將2'-O-甲基修飾添加至在髮夾之5'端之位置2、位置1及2或位置1、2及3處的核苷酸。具有該構型之髮夾之Dicer加工亦可保留完整有義股之5'端，因此保留後Dicer加工之雙鏈體中的化學修飾模式。呈該構型之3'懸垂物之存在可為尤其有利的，此係因為含有指定修飾模式之鈍端分子可進一步由Dicer以一定方式加工使得帶有2'修飾之核苷酸被移除。在存在/保留3'懸垂物之情況下，帶有有義修飾之核苷酸之所得雙鏈體可就沉默特異性及功能性而言具有極度有利之特性。例示性修飾模式之實例詳細描述於美國專利申請案公開案第2005/0223427號、國際公開案第WO 2004/090105號及第WO/2005/078094號中，該等文獻中之每一者的揭示內容以引用方式全部併入本文中。

shRNA可包含隨機或根據任何合理設計選擇程序選取之序列。舉例而言，合理設計算法描述於國際公開案第WO 2004/045543 A2號、美國專利申請公開案第2005/0255487號中，該等文獻之揭示內容以引用方式全部併入本文中。另外，可能需要完全或部分基於內部穩定性平均分布("AISP")或內部穩定性區域分布("RISP")選擇可有助於細

胞機器之接近或加工之序列。

核糖核酸酶

核糖核酸酶為能夠催化mRNA之特異性裂解從而防止轉譯之酶促RNA分子。(關於綜述，參見Rossi, 1994, Current Biology 4:469-471)。核糖核酸酶作用機制涉及核糖核酸酶分子與互補靶標RNA之序列特異性雜交，接著涉及內切核苷酸裂解事件。核糖核酸酶分子較佳包括(1)一或多個與靶標mRNA互補之序列及(2)造成mRNA裂解之所熟知催化序列或功能性等效序列(參見例如美國專利第5,093,246號，其以引用方式全部併入本文中)。

儘管使mRNA在位點特異性識別序列處裂解的核糖核酸酶可用於破壞靶標mRNA，但或者可使用錘頭狀核糖核酸酶。錘頭狀核糖核酸酶使mRNA在由與靶標mRNA形成互補鹼基對之側翼區所限定的位置處裂解。較佳，靶標mRNA具有以下的兩個鹼基之序列：5'-UG-3'。錘頭狀核糖核酸酶之構建及製備在此項技術中係熟知的且更為充分地描述於Haseloff及Gerlach, 1988, Nature 334:585-591；及PCT申請案第WO89/05852號中，該等文獻之內容以引用方式全部併入本文中。

基因靶向性核糖核酸酶可含有與靶標mRNA之兩個區域互補之雜交區域，該兩個區域中之每一者為至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個鄰接核苷酸(但其無需皆為相同長度)。

可將錘頭狀核糖核酸酶序列嵌入穩定RNA(諸如轉移

RNA(tRNA))中以提高活體內裂解效率(Perriman等人，1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:6175-79；de Feyter及Gaudron, Methods in Molecular Biology，第74卷，第43章，"Expressing Ribozymes in Plants"，由Turner, P. C編，Humana Press Inc., Totowa, N.J)。尤其為tRNA融合核糖核酸酶之RNA聚合酶III所介導之表現在此項技術中係熟知的(參見Kawasaki等人，1998, Nature 393:284-9；Kuwabara等人，1998, Nature Biotechnol. 16:961-5；及Kuwabara等人，1998, Mol. Cell 2:617-27；Koseki等人，1999, J. Virol 73:1868-77；Kuwabara等人，1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:1886-91；Tanabe等人，2000, Nature 406:473-4)。通常在給定靶標cDNA序列內存在若干潛在錘頭狀核糖核酸酶裂解位點。核糖核酸酶較佳經工程化以便使裂解識別位點位於靶標mRNA之5'端附近以提高效率且最小化非功能性mRNA轉錄物之細胞內積累。此外，使用位於編碼靶標mRNA之不同部分之靶標序列中的任何裂解識別位點將允許選擇性靶向一個或其他靶標基因。

本發明之核糖核酸酶亦包括RNA內切核糖核酸酶("Cech型核糖核酸酶")，諸如天然存在於嗜熱四膜蟲(Tetrahymena thermophila)中之一者(稱為IVS或L-19 IVS RNA)且已廣泛描述於Zaug等人，1984, Science, 224:574-578；Zaug等人，1986, Science 231:470-475；Zaug等人，1986, Nature 324:429-433；公開國際專利申請案第WO88/04300號；及Been等人，1986, Cell 47:207-216中。

Cech型核糖核酸酶具有8個鹼基對之活性位點，該活性位點與靶標RNA序列雜交，隨後發生靶標RNA裂解。本發明涵蓋彼等靶向存在於靶標基因或核酸序列中之8個鹼基對之活性位點序列的Cech型核糖核酸酶。

核糖核酸酶可由經修飾寡核苷酸(例如就改良穩定性、靶向性等而言)組成且應能化學合成得到或經由表現載體產生。因為不同於反義分子之核糖核酸酶具有催化性，所以較低細胞內濃度係為效率所需的。

在一些實施例中，可藉由首先鑑別足以由RNAi引起有效敲除之序列部分來設計核糖核酸酶。同一序列之諸部分可隨後被併入核糖核酸酶中。

三重螺旋形成

或者，可藉由靶向與基因之調節區域(亦即啟動子及/或增強子)互補之脫氧核糖核苷酸序列以形成可防止基因於體內靶標細胞中之轉錄的三重螺旋結構來降低靶標基因表現。(通常參見Helene, C., 1991, Anticancer Drug Des., 6:569-84；Helene, C.等人，1992, Ann. N.Y. Acad. Sci., 660:27-36；及Maher, L. J., 1992, Bioassays 14:807-15)。

欲用於三重螺旋形成以抑制轉錄之核酸分子較佳為單股且由脫氧核糖核苷酸組成。該等寡核苷酸之鹼基組成應經由Hoogsteen鹼基配對法則促進三重螺旋形成，此通常需要嘌呤或嘧啶之適當片段存在於雙鏈體之一股上。核苷酸序列可基於嘧啶，此將在所得三重螺旋之三個締合股上產生TAT及CGC三聯體。富含嘧啶分子向雙鏈體之單股之富

含嘌呤區域在與該股平行之方位上提供鹼基互補。此外，可選擇富含嘌呤(例如含有一段G殘基)之核酸分子。該等分子將與富含GC對之DNA雙鏈體形成三重螺旋，其中大多數嘌呤殘基位於靶標雙鏈體之單股上，從而在三重螺旋之三個股上產生CGC三聯體。

或者，可藉由產生所謂"之字形"核酸分子來增加可就三重螺旋形成而言被靶向之靶標序列。以交替5'-3'、3'-5'方式合成"之字形"分子，使得其與雙鏈體之第一股鹼基配對且隨後與另一股鹼基配對，從而消除適當嘌呤或嘧啶片段存在於雙鏈體之一股上的必要性。

DNA酶

或者，可使用DNA酶來抑制靶標基因之表現。DNA酶包括有反義與核糖核酸酶技術之某些機械特徵。對DNA酶進行設計以使其識別特定靶標核酸序列，此極為類似於反義寡核苷酸。然而其亦具有催化性且可特異性裂解靶標核酸。

目前存在兩種基本類型之DNA酶，其兩者皆由Santoro及Joyce鑑別(參見例如美國專利第6,110,462號)。10-23 DNA酶包含連接兩臂之環結構。該兩臂藉由識別特定靶標核酸序列而提供特異性，而環結構在生理條件下提供催化功能。

較佳，單一序列或大體單一序列為約18至22個核苷酸之G/C富集序列。高G/C含量有助於確保DNA酶與靶標序列之間的較強相互作用。可使該酶靶向信使之特異性反義識

別序列可分配於DNA酶之兩臂之間。

製造及投與DNA酶之方法可見於(例如)美國專利第6,110,462號中。另外，熟習此項技術者將認識到，如同反義寡核苷酸，DNA酶可視情況經修飾以提高穩定性且改善對降解之抗性。

抑制性寡核苷酸之輸送

抑制性寡核苷酸可藉由經由已置有編碼具有適當調節序列(包括啟動子)之抑制性寡核苷酸之DNA的載體(包括病毒載體或質體)轉型或轉染而直接投與或輸送至細胞，以使抑制性寡核苷酸表現於所需細胞中。已知方法包括標準瞬時轉染、穩定轉染及使用範圍介於反轉錄病毒至腺病毒之病毒輸送。涵蓋藉由複製或複製缺陷型載體輸送核酸抑制劑。亦可由組成性或誘導性啟動子系統驅動表現(Paddison等人，Methods Mol. Biol. 265:85-100, 2004)。在其他實施例中，表現可能處於組織或發育特異性啟動子之控制下。

舉例而言，可藉由使用諸如脂質轉染胺(Lipofectamine)2000(Life Technologies)或Oligofectamine(Life Technologies)之載體組合物進行轉染而引入載體。對於在共轉染編碼hGFP之pAD3後的哺乳動物細胞株，可使用螢光顯微鏡術來檢查轉染效率(Kehlenback等人，1998, J. Cell Biol. 141:863-74)。

輸送途徑將為提供如根據如上所述之標準所量測之最佳抑制效應者。藉由陽離子脂質體所介導之輸送、由反轉錄病毒載體輸送及直接輸送為有效的。

其他已知輸送方法描述於以下標題為"基因療法(Gene Therapy)"之章節中。

可在足以在抑制新蛋白質合成之後周轉(turnover)內源性庫之時間後藉由若干檢定中之任一者來評估抑制性寡核苷酸之有效性，該等檢定包括用於測定現有人類海帕西啶mRNA含量之逆轉錄酶聚合酶鏈反應或北方墨點分析或使用識別人類海帕西啶蛋白之抗體之西方墨點分析。儘管海帕西啶含量之"正常"範圍小於約25 ng/mL，但低於約10 ng/mL之量測值可指示海帕西啶之抑制。在另一實施例中，海帕西啶含量之"正常"範圍小於約10 ng/ml(如由質譜分析法所評估)且低於約2.5 ng/ml之量測值(如由質譜分析法所評估)可指示海帕西啶之抑制。

C.具有拮抗劑活性之海帕西啶多肽變異體

就人類海帕西啶多肽而論，涵蓋包括一或多個相對於天然成熟人類海帕西啶序列而言之取代、插入或缺失但保留所有八個半胱胺酸且抑制海帕西啶生物活性(例如抗微生物及/或鐵調節活性)的拮抗劑變異體。變異體可保留C2-C4及/或C5-C7二硫鍵且視情況亦保留C1-C8及C3-C6二硫鍵。亦涵蓋保留膜鐵轉運蛋白結合活性但不引起膜鐵轉運蛋白內化或降解之海帕西啶變異體以及保留海帕西啶受體結合活性但不活化膜鐵轉運蛋白受體之海帕西啶變異體。

易於如第IV章節(多肽變異體之產生)中所述製備拮抗劑變異體，且可在本文中所述之活體外或活體內檢定中之任一者中針對抑制海帕西啶鐵調節活性之能力對其進行篩

檢。

III.具有促效劑活性之海帕西啶多肽變異體

亦涵蓋包括一或多個相對於天然成熟人類海帕西啶序列而言之取代、插入或缺失但保留所有八個半胱胺酸且保留海帕西啶生物活性(例如抗微生物及/或鐵調節活性)的人類海帕西啶多肽之促效劑變異體。變異體可保留C2-C4及/或C5-C7二硫鍵且視情況亦保留C1-C8及C3-C6二硫鍵。亦涵蓋保留膜鐵轉運蛋白結合活性且/或保留海帕西啶受體結合活性之海帕西啶變異體。

易於如第IV章節(多肽變異體之產生)中所述製備促效劑變異體，且可在本文中所述之活體外或活體內檢定中之任一者中針對海帕西啶鐵調節活性之保持力對其進行篩檢。

IV.多肽變異體及衍生物之產生

可易於藉由一般熟習此項技術者所熟知之技術修飾本發明之海帕西啶多肽(包括海帕西啶變異體)或本發明之抗海帕西啶抗體。潛在突變包括一或多個殘基之插入、缺失或取代。插入或缺失較佳處於約1至5個胺基酸、更佳1至3個胺基酸且最佳1至2個胺基酸之範圍內。

缺失變異體為任何胺基酸序列之至少一個胺基酸殘基被移除的多肽。可在蛋白質之一或兩個末端處實現缺失或藉由移除多肽內(內部)之一或多個殘基來實現缺失。製備缺失變異體之方法為此項技術中之常規方法。參見例如Sambrook等人，(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide，第1-3卷，Cold Spring Harbor Press，其揭示內容

以引用方式全部併入本文中。

胺基酸序列插入包括長度範圍介於一個殘基至含有數百或更多個殘基之多肽之間的胺基及/或羧基末端融合以及一或多個胺基酸之內部序列插入。如同本文中所述之不同變異體類型中之任一者一樣，插入型變異體可經設計使得所得多肽保留與其所源自之親本多肽相同之生物學特性或展現與其所源自之親本多肽無關之新穎物理、化學及/或生物學特性。製備插入變異體之方法在此項技術中亦為常規且熟知的(Sambrook等人，見上述)。

包含本發明之多肽(包括海帕西啶變異體)或本發明之抗體及異源性多肽的融合蛋白為由本發明所涵蓋之特定類型之插入變異體。可與所關注之多肽融合的異源性多肽之非限制性實例包括具有長循環半衰期之蛋白質，諸如(但不限於)免疫球蛋白恆定區(例如Fc區域)；允許鑑別所關注之多肽之標記序列；有助於純化所關注之多肽之序列；及促進多亞基蛋白之形成之序列。

製造抗體融合蛋白之方法在此項技術中係熟知的。參見例如美國專利第6,306,393號，其揭示內容以引用方式全部併入本文中。在本發明之某些實施例中，產生可包括使嵌合scFv抗體與異源性蛋白部分連接之可撓性連接子的融合蛋白。適當連接子序列為彼等並不影響欲識別之所得融合蛋白之能力且結合由蛋白之V域所特異性結合之抗原決定基的序列(參見例如WO 98/25965，其揭示內容以引用方式全部併入本文中)。

取代變異體為多肽胺基酸序列中之至少一個殘基被移除且在移除該殘基之處插入不同殘基的彼等變異體。藉由選擇取代來實現多肽或抗體之生物特性之修飾，該等取代在其以下效應方面明顯不同：(a)維持取代區域內多肽骨架之結構，例如呈摺疊或螺旋構形；(b)維持靶標位點處之分子之帶電性或疏水性；或(c)維持大部分側鏈。在本發明之某些實施例中，設計取代變異體，亦即一或多個特定(與隨機相反)胺基酸殘基經特定胺基酸殘基取代。該等類型之典型變化包括保守性取代及/或以一殘基取代另一殘基(基於天然及取代殘基之相似特性)。

保守性取代展示於表1中。在"較佳取代"標題下可見最保守性取代。若該等取代未導致生物活性之變化，則可引入較多實質性變化且篩檢產物。

表1

原始	例示性	較佳殘基取代
Ala (A)	val、leu、ile	val
Arg (R)	lys、gln、asn	lys
Asn (N)	gln、his、asp、lys、gln	arg
Asp (D)	glu、asn	glu
Cys (C)	ser、ala	ser
Gln (Q)	asn、glu	asn
Glu (E)	asp、gln	asp
Gly (G)	ala	
His (H)	asn、gln、lys、arg	

Ile (I)	leu、val、met、ala、phe、正白胺酸	leu
Leu (L)	正白胺酸、ile、val、met、ala、phe	ile
Lys (K)	arg、gln、asn	arg
Met (M)	leu、phe、ile	leu
Phe (F)	leu、val、ile、ala、tyr	
Pro (P)	ala	
Ser (S)	thr	
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr、phe	tyr
Tyr (Y)	trp、phe、thr、ser	phe
Val (V)	ile、leu、met、phe、ala、正白胺酸	leu

具有共有側鏈特性之胺基酸殘基通常係如下歸類。

(1)疏水性：正白胺酸、met、ala、val、leu、ile；

(2)中性親水性：cys、ser、thr；

(3)酸性：asp、glu；

(4)鹼性：asn、gln、his、lys、arg；

(5)影響鏈取向之殘基：gly、pro；及

(6)芳族性：trp、tyr、phe。

抗體變異體

在某些實例中，製備抗體變異體，旨在修飾與抗原決定基結合直接有關之彼等胺基酸殘基。在其他實施例中，出

於本文中所論述之目的，需要修飾不與抗原決定基結合直接有關之殘基或在任何情況下不與抗原決定基結合有關之殘基。涵蓋CDR區及/或構架區中之任一者內之突變。

為確定哪些抗體胺基酸殘基對於抗原決定基識別及結合而言係重要的，可進行丙胺酸掃描突變以產生取代變異體。參見例如Cunningham等人，Science, 244:1081-1085 (1989)，其揭示內容以引用方式全部併入本文中。在該方法中，以丙胺酸殘基一次一個地置換個別胺基酸殘基且相對於未修飾抗體而言根據結合特異性抗原決定基之能力對所得抗海帕西啶抗體進行篩檢。對結合能力降低之經修飾抗體定序以確定哪個殘基發生改變，此表明其在結合或生物學特性中之重要性。

可藉由將隨機胺基酸變化引入親本抗體序列中之親和力成熟製備抗體之取代變異體。參見例如Ouwehand等人，Vox Sang 74(增刊2):223-232, 1998；Rader等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8910-8915, 1998；Dall'Acqua等人，Curr. Opin. Struct. Biol. 8:443-450, 1998，其揭示內容以引用方式全部併入本文中。親和力成熟涉及製備及篩檢抗海帕西啶抗體或其變異體且涉及自所得變異體中選出相對於親本抗海帕西啶抗體而言具有改良生物學特性(諸如增加之結合親和力)的彼等變異體。產生取代變異體之一種適宜方式為使用噬菌體展示之親和力成熟。簡言之，使若干高變區位點突變以在各位點處產生所有可能之胺基取代。因此所產生之變異體以單價方式被表現於絲狀噬菌

體顆粒表面上，其中該等變異體與封裝於各顆粒內之M13之基因III產物融合。隨後根據生物活性(例如結合親和力)篩選噬菌體展示之變異體。參見例如WO 92/01047、WO 93/112366、WO 95/15388及WO 93/19172。

當前抗體親和力成熟方法屬於兩種突變類別：隨機與非隨機。易錯PCR、增變菌株(Low等人，*J. Mol. Biol.* 260, 359-68, 1996)及飽和突變(Nishimiya等人，*J. Biol. Chem.* 275:12813-20, 2000；Chowdhury, P. S. *Methods Mol. Biol.* 178, 269-85, 2002)為隨機突變法(Rajpal等人，*Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8466-71, 2005)之典型實例。非隨機技術常常使用丙胺酸掃描或定點突變來產生特定突變蛋白之有限集合。以下進一步詳細描述某些方法。

經由淘選法進行之親和力成熟-通常在遞減量之抗原存在下經由對候選抗體之若干輪淘選進行重組抗體之親和力成熟。遞減每輪抗原之量選出對抗原具有最高親和力之抗體，藉此自一大堆起始物質中獲得高親和力抗體。經由淘選進行之親和力成熟在此項技術中係熟知的且(例如)描述於Huls等人(*Cancer Immunol Immunother.* 50:163-71, 2001)中。使用噬菌體展示技術之親和力成熟法描述於本文中別處且在此項技術中係已知的(參見例如Daugherty等人，*Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:2029-34, 2000)。

精確突變(Look-through mutagenesis)-精確突變(LTM)(Rajpal等人，*Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8466-71, 2005)提供一種迅速定位抗體結合位點之方法。對於

LTM，選取9個代表由20個天然胺基酸所提供之主要側鏈化學性質的胺基酸以便剖析在抗體之所有六個CDR中之每一位置處對結合之功能性側鏈貢獻。LTM於CDR內產生一系列單個位置突變，其中各"野生型"殘基經9個所選胺基酸之一者有系統地取代。將突變CDR組合以在不會阻止所有突變蛋白之定量展示的情況下產生複雜度及尺寸遞增之組合性單鏈可變片段(scFv)庫。在陽性選擇之後，對具有改良結合性之純系定序且定位有益突變。

易錯PCR-易錯PCR涉及核酸於不同選擇輪次之間的隨機化。隨機化因所用聚合酶之固有誤差率而以較低比率發生，但可藉由使用在轉錄期間具有高固有誤差率之聚合酶(Hawkins等人，J Mol Biol. 226:889-96, 1992)進行易錯PCR(Zaccolo等人，J. Mol. Biol. 285:775-783, 1999)而得以增強。在突變週期之後，使用此項技術中之常規方法選擇對抗原具有改良親和力之純系。

利用基因改組及定向進化之技術亦可用於製備抗海帕西啶抗體或其變異體且根據所需活性對其進行篩檢。舉例而言，Jermutus等人，Proc Natl Acad Sci U S A., 98(1):75-80 (2001)展示將所定製之基於核糖體展示之活體外選擇策略與藉由DNA改組達成之活體外多樣化組合以推算出scFv之解離速率或熱力學穩定性；Fermer等人，Tumour Biol. 2004年1月-4月；25(1-2):7-13報導組合使用噬菌體展示與DNA改組使親和力提高幾乎三個數量級。Dougherty等人，Proc Natl Acad Sci U S A. 2000年2月29日；

97(5):2029-2034報導(i)功能性純系以出人意料之高頻率存在於超突變庫中；(ii)功能增強的突變體良好呈現於該等庫中；且(iii)導致較高親和力之大多數scFv突變對應於遠離結合位點之殘基。

或者或另外，分析抗原抗體複合物之晶體結構以鑑別抗體與抗原之間的接觸點或使用電腦軟體模擬該等接觸點可為有益的。根據本文中所詳述之技術，該等接觸殘基及鄰近殘基為用於取代之候選者。一旦產生該等變異體後，如本文中所述使其經受篩檢且可選取在一或多個相關檢定中具有優良特性之抗體用於進一步開發。

具有經修飾碳水化合物之抗體

亦可產生相對於親本抗體而言具有經修飾糖基化模式之抗體變異體，例如添加或刪除結合於特異性結合劑或抗體之碳水化合物部分中之一或多者且/或添加或刪除特異性結合劑或抗體中之一或多個糖基化位點。

多肽(包括抗體)之糖基化通常為N-連接或O-連接。N-連接係指碳水化合物部分與天冬醯胺酸殘基之側鏈連接。三肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸及天冬醯胺酸-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸外之任何胺基酸)為碳水化合物部分與天冬醯胺酸側鏈之酶促連接的識別序列。該等三肽序列中之任一者於多肽中之存在產生潛在糖基化位點。因此，N-連接糖基化位點可藉由改變胺基酸序列使得其含有該等三肽序列中之一或多者而添加至特異性結合劑或抗體中。O-連接糖基化係指糖N-乙醯半乳胺糖、半乳糖或木糖中之一者與羥

基胺基酸的連接，該羥基胺基酸最常為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。O-連接糖基化位點可藉由使一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基插入或取代至初始特異性結合劑或抗體之序列中而添加至特異性結合劑或抗體中。

經改變之效應功能

可將半胱胺酸殘基移除或引入抗體或含有Fc之多肽之Fc區域中，藉此消除或增加該區域內之鏈間二硫鍵形成。因此所產生之同源二聚特異性結合劑或抗體可具有改良之內化能力及/或增加之補體介導性細胞殺死及抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。參見Caron等人，J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)及Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)。同源二聚特異性結合劑或抗體亦可如Wolff等人，Cancer Research 53:2560-2565 (1993)中所述使用異雙功能交聯劑來製備。或者，特異性結合劑或抗體可經工程化，其具有雙重Fc區域且藉此可具有增強之補體溶解及ADCC能力。參見Stevenson等人，*Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)。

已顯示CDR內之序列可導致抗體與MHC II類結合且觸發不當輔助性T細胞反應。保守性取代可使特異性結合劑或抗體保留結合活性但降低其觸發不當T細胞反應之能力。亦涵蓋移除重鏈或輕鏈之N-末端20個胺基酸中之一或多者。

在一些實施例中，本發明亦涵蓋產生具有改變的碳水化

合物結構從而導致效應因子活性改變之抗體分子，包括展現改良ADCC活性之海藻糖化不存在或減少之抗體分子。多種實現此舉之方法在此項技術中係已知的。舉例而言，藉由使抗體分子與FcγRIII受體結合來介導ADCC效應因子活性，已顯示此取決於在CH2域之Asn-297處N-連接糖基化之碳水化合物結構。非海藻糖化抗體以增加的親和力結合此受體且比天然海藻糖化抗體更有效觸發FcγRIII所介導之效應功能。舉例而言，非海藻糖化抗體在已敲除α-1,6-海藻糖基轉移酶之CHO細胞中的重組性產生導致ADCC活性增加100倍的抗體(Yamane-Ohnuki等人，Biotechnol Bioeng. 2004年9月5日; 87(5):614 -22)。可經由降低此酶或其他酶在海藻糖化途徑中之活性(例如經由siRNA或反義RNA處理)、使細胞株工程化以敲除該(等)酶或以選擇性糖基化抑制劑培養來實現相似效應(Rothman等人，Mol Immunol. 1989年12月; 26(12):1113-23)。某些宿主細胞株(例如Lec13或大鼠融合瘤YB2/0細胞株)天然產生具有較低海藻糖化程度之抗體。Shields等人，J Biol Chem. 2002年7月26日; 277(30):26733-40; Shinkawa等人，J Biol Chem. 2003年1月31日; 278(5):3466-73。亦已(例如經由在過度表現GnTIII酶之細胞中重組性產生抗體)確定對分碳水化合物含量之增加使ADCC活性增加。Umana等人，Nat Biotechnol. 1999年2月; 17(2):176-80。已預期僅缺乏兩個海藻糖殘基中之一者可足以提高ADCC活性。Ferrara等人，J Biol Chem. 2005年12月5日)。

其他共價修飾

多肽或抗體之共價修飾亦包括於本發明之範疇內。若可適用，則其可藉由化學合成或藉由酶促或化學裂解多肽或抗體來達成。可藉由使所靶向胺基酸殘基與能夠與所選側鏈或N或C末端殘基反應之有機衍生試劑反應來引入其他類型之共價修飾。

最通常使半胱胺醯基殘基與α-鹵代乙酸鹽(及相應胺)(諸如氯乙酸或氯乙醯胺)反應以得到羧甲基或羧醯胺基甲基衍生物。亦藉由與溴代三氟丙酮、α-溴-β-(5-咪唑基)丙酸、氯乙醯基磷酸鹽、N-烷基馬來醯亞胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基2-吡啶基二硫化物、對氯汞基苯甲酸鹽、2-氯汞基-4-硝基苯酚或氯-7-硝基苯并-2-氧雜-1,3-二唑反應而得到半胱胺醯基殘基。

因為焦碳酸二乙酯對於組胺醯基側鏈相對具有特異性，所以藉由與該試劑在pH 5.5-7.0下反應而得到組胺醯基殘基。對溴苯甲醯甲基溴化物亦適用；該反應較佳在0.1 M二甲胂酸鈉中在pH 6.0下進行。

離胺醯基及胺基末端殘基與丁二酸或其他羧酸酸酐反應。使用該等試劑來衍生化具有逆轉離胺醯基殘基之電荷的效應。其他適用於衍生化含α-胺基之殘基的試劑包括諸如吡啶甲醯亞胺酸甲酯之亞胺基酯、磷酸吡哆醛、吡哆醛、氯硼氫化物、三硝基苯磺酸、O-甲基異脲、2,4-戊二酮及與乙醛酸鹽之轉胺酶催化反應。

藉由與一或數種習知試劑(其中有苯甲醯甲醛、2,3-丁二

酮、1,2-環己二酮及茚三酮)反應來修飾精胺醯基殘基。精胺酸殘基之衍生化由於胍官能基之高pK_a而需要在鹼性條件下進行反應。此外，該等試劑可與離胺酸基團以及精胺酸ε-胺基反應。

可進行酪胺醯基殘基之特異性修飾，特別關注藉由與芳族重氮化合物或四硝基甲烷反應而將光譜標記引入酪胺醯基殘基中。最通常，使用N-乙醯咪唑及四硝基甲烷來分別形成O-乙醯基酪胺醯基物質及3-硝基衍生物。使用^{125}I或^{131}I碘化酪胺醯基殘基以製備用於放射免疫檢定之標記蛋白。

藉由與碳化二亞胺(R-N.dbd.C.dbd.N-R')反應來選擇性修飾羧基側基(天冬胺醯基或麩胺醯基)，其中R及R'為不同烷基，諸如1-環己基-3-(2-嗎啉基-4-乙基)碳化二亞胺或1-乙基-3-(4-氮鎓-4,4-二甲基戊基)碳化二亞胺。此外，將天冬胺醯基及麩胺醯基殘基藉由與銨離子反應轉化成天冬醯胺醯基及麩醯胺醯基殘基。

常常分別將麩醯胺醯基及天冬醯胺醯基殘基去醯胺化以形成相應麩胺醯基及天冬胺醯基殘基。該等殘基係在中性或鹼性條件下被去醯胺化。該等殘基之去醯胺化形式屬於本發明之範疇。

其他修飾包括脯胺酸及離胺酸之羥基化、絲胺醯基或羥丁胺醯基殘基之羥基之磷酸化、離胺酸、精胺酸及組胺酸側鏈之α-胺基之甲基化(T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San

Francisco，第79-86頁(1983))、N-末端胺之乙醯化及任何C末端羧基之醯胺化。

另一類型之共價修飾涉及使醣苷與特異性結合劑或抗體化學或酶促偶合。該等程序為有利的，因為其並不需要在具有N-或O-連接糖基化之糖基化能力之宿主細胞中產生多肽或抗體。視所用偶合模式而定，糖可連接於(a)精胺酸及組胺酸、(b)游離羧基、(c)游離硫氫基(諸如半胱胺酸之彼等硫氫基)、(d)游離羥基(諸如絲胺酸、蘇胺酸或羥基脯胺酸之彼等羥基)、(e)芳族殘基(諸如苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸之彼等殘基)或(f)麩醯胺酸之醯胺基。該等方法描述於1987年9月11日公開之WO 87/05330以及Aplin及Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem.，第259-306頁(1981)中。

可以化學或酶促方式實現任何存在於多肽或抗體上之碳水化合物部分的移除。化學去糖基化需要將特異性結合劑或抗體暴露於化合物三氟甲烷磺酸或等效化合物。該處理導致除連接糖(N-乙醯葡糖胺或N-乙醯半乳胺糖)外之大部分或所有糖裂解，同時使特異性結合劑或抗體保持完整。Hakimuddin等人，Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987)及Edge等人，Anal. Biochem., 118: 131(1981)描述化學去糖基化。可如由Thotakura等人，Meth. Enzymol. 138: 350 (1987)所描述藉由使用多種內切糖苷酶及外切糖苷酶來實現特異性結合劑或抗體上之碳水化合物部分的酶促裂解。

對本發明之海帕西啶活性拮抗劑(包括抗海帕西啶抗體或海帕西啶變異體)的另一類共價修飾包含使多肽、特異

性結合劑或抗體與多種非蛋白質聚合物(例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙氧基化多元醇、聚乙氧基化山梨糖醇、聚乙氧基化葡萄糖、聚乙氧基化甘油、聚環氧烷或多醣聚合物(諸如葡聚糖))中之一者連接。該等方法在此項技術中係已知的，參見例如美國專利第4,640,835號、第4,496,689號、第4,301,144號、第4,670,417號、第4,791,192號、第4,179,337號、第4,766,106號、第4,179,337號、第4,495,285號、第4,609,546號或EP 315 456。

V.基因療法

可藉由使用此項技術中已知之任何合適方法經由離體、原位或活體內進行基因療法而實現將海帕西啶促效劑或拮抗劑輸送至適當細胞。舉例而言，對於活體內療法而言，可將編碼所需海帕西啶活性拮抗劑或海帕西啶表現抑制劑之核酸單獨地或與載體、脂質體或沈澱物結合直接注入個體中，且在一些實施例中可注入需要表現海帕西啶活性拮抗劑或海帕西啶表現抑制劑之位點處。對於離體治療而言，移出個體細胞，將核酸引入該等細胞中，且將經修飾細胞直接或(例如)以囊封於植入患者中之多孔膜內的方式返回至個體體內。參見例如美國專利第4,892,538號及第5,283,187號。

存在多種可用於將核酸引入活細胞中之技術。該等技術視是否將核酸活體外轉移至培養細胞中或活體內轉移至所欲宿主之細胞中而變化。適用於將核酸活體外轉移至哺乳動物細胞中之技術包括使用脂質體、電穿孔、顯微注射、

細胞融合、化學處理、DEAE-葡聚糖及磷酸鹽沈澱法。其他活體內核酸轉移技術包括使用病毒載體(諸如腺病毒、疱疹單純I病毒、腺相關病毒或反轉錄病毒)轉染及基於脂質之系統。核酸及轉染試劑視情況與微粒締合。例示性轉染試劑或方法包括磷酸鈣或氯化鈣共同沈澱、DEAE-葡聚糖所介導之轉染、第四銨兩性DOTMA((二油醯氧基丙基)三甲銨溴化物，由GIBCO-BRL以脂質體(Lipofectin)形式商品化)(Felgner等人，(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417；Malone等人，(1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86, 6077-6081)；具有側接三甲銨頭部之親脂性麩胺酸二酯(Ito等人，(1990) Biochem. Biophys. Acta 1023, 124-132)；可代謝親本脂質，諸如陽離子脂質二(十八烷基)醯胺基甘胺醯基精胺(DOGS, Transfectam, Promega)及二棕櫚醯基磷脂醯基乙醇戊基精胺(DPPES)(J. P. Behr (1986) Tetrahedron Lett. 27, 5861-5864；J. P. Behr等人，(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6986)；可代謝第四銨鹽(DOTB、甲基硫酸N-(1-[2,3-二油醯氧基]丙基)-N,N,N-三甲銨(DOTAP)(Boehringer Mannheim)、聚(伸乙基亞胺)(PEI)、二油醯酯、ChoTB、ChoSC、DOSC)(Leventis等人，(1990) Biochim. Inter. 22, 235-241)；3β[N-(N',N'-二甲基胺基乙烷)-胺甲醯基]膽固醇(DC-Chol)、二油醯基磷脂醯基乙醇胺(DOPE)/3β[N-(N',N'-二甲基胺基乙烷)-胺甲醯基]膽固醇(DC-Chol)一比一混合物(Gao等人，(1991) Biochim. Biophys. Acta 1065, 8-14)；精胺、亞精胺、脂多

胺(lipopolyamine)(Behr等人，Bioconjugate Chem, 1994, 5: 382-389)；親脂性聚離胺酸(LPLL)(Zhou等人，(1991) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18)；具有過量磷脂醯膽鹼/膽固醇之[[(1,1,3,3-四甲基丁基)甲苯氧基]乙氧基]乙基]二甲基苄銨氫氧化物(DEBDA氫氧化物)(Ballas等人，(1988) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18)；溴化十六烷基三甲基銨(CTAB)/DOPE混合物(Pinnaduwage等人，(1989) Biochim. Biophys. Acta 985, 33-37)；與磷脂醯乙醇胺混合之麩胺酸與DOPE、CTAB、DEBDA、溴化二(十二烷基)銨(DDAB)及十八胺之親脂性二酯(TMAG)(Rose等人，(1991) Biotechnique 10, 520-525)；DDAB/DOPE(TransfectACE, GIBCO BRL)及帶有脂質之寡半乳糖。提高轉移效率之例示性轉染增強子試劑包括(例如)DEAE-葡聚糖、聚凝胺、溶酶體分裂性肽(Ohmori N I等人，Biochem Biophys Res Commun 1997年6月27日; 235(3):726-9)、基於軟骨素之蛋白聚糖、硫酸化蛋白聚糖、聚伸乙基亞胺、聚離胺酸(Pollard H等人，J Biol Chem, 1998 273 (13):7507-11)、整合素結合性肽CYGGRGDTP、直鏈葡聚糖壬醣、甘油、"繫栓"於寡核苷酸之3'-末端核苷間鍵處之膽甾醇基(Letsinger, R. L. 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86:(17):6553-6)、溶血磷脂、溶血磷脂醯膽鹼、溶血磷脂醯乙醇胺及1-油醯基溶血磷脂醯膽鹼。

在某些情形下，可能需要使用將含核酸之載體引至靶標細胞之試劑來輸送核酸。該等"靶向"分子包括對靶標細胞

上之細胞表面膜蛋白具特異性的抗體或靶標細胞上之受體的配位體。當使用脂質體時，結合於與內飲作用相關之細胞表面膜蛋白的蛋白質可用於靶向及/或促進吸收。該等蛋白質之實例包括對特定細胞類型具有嗜性之衣殼蛋白及其片段、在循環中經受內化之蛋白質之抗體及靶向細胞內定位且增強細胞內半衰期之蛋白質。在其他實施例中，可使用受體所介導之內飲作用。該等方法描述於(例如)Wu等人，1987或Wagner等人，1990中。關於目前已知之基因標記及基因療法方案之綜述，參見Anderson 1992。亦參見WO 93/25673及其中所引用之參考文獻。關於基因療法技術之其他綜述，參見Friedmann, Science, 244: 1275-1281 (1989)；Anderson, Nature，增刊第392卷，第6679號，第25-30頁 (1998)；Verma, Scientific American: 68-84 (1990)；及Miller, Nature, 357: 455460 (1992)。

VI.海帕西啶相關病症之診斷方法及使用海帕西啶拮抗劑之療法的監控

亦提供用於診斷海帕西啶相關病症(諸如海帕西啶相關貧血症或其他海帕西啶過量或海帕西啶缺乏之疾病)的方法，及監控療法(包括使用海帕西啶活性拮抗劑或海帕西啶表現抑制劑之療法)對於該疾病之有效性的方法。為確定海帕西啶相關貧血症之存在或不存在，使來自患者之生物試樣與本文中所揭示之抗海帕西啶抗體中之一或多者在足以允許形成免疫複合物之條件下及時間內接觸。隨後偵測抗海帕西啶抗體與生物試樣中之海帕西啶之間所形成的

免疫複合物。藉由量測抗體與海帕西啶之間所形成的免疫複合物之量來量化試樣中海帕西啶之量。在某些方法中，將生物試樣自患者分離且以本文中所揭示之抗海帕西啶抗體中之一或多者培育，且高於某一臨限值之抗體-海帕西啶複合物之量與海帕西啶相關貧血症之存在相關聯，且低於該臨限值之量指示該患者不可能具有海帕西啶相關貧血症。舉例而言，正常範圍內之量指示患者不可能具有海帕西啶相關貧血症。當由某些檢定(亦即共同擁有之美國專利申請案第11/880,313號及國際專利申請案第PCT/US2007/016477號中所描述的質譜分析技術，該等文獻之揭示內容以引用方式全部併入本文中)測定時血清海帕西啶之正常範圍通常小於10 ng/ml，但將視檢定及所測試群體之子集而變化。

亦提供區分炎性疾病與非炎性疾病之方法。為確定炎性疾病之存在或不存在，使來自患者之生物試樣與本文中所揭示之抗海帕西啶抗體中之一或多者在足以允許形成免疫複合物之條件下及時間內接觸。可使用此項技術中已知之各種免疫檢定，包括(但不限於)：使用諸如放射免疫檢定、ELISA(酶聯免疫吸附檢定)、"夾心"免疫檢定、免疫放射檢定(immunoradiometric assay)、凝膠擴散沈澱反應、免疫擴散檢定、原位免疫檢定(例如使用膠體金、酶或放射性同位素標記)、西方墨點法、沈澱反應、凝集檢定(例如凝膠凝集檢定、血球凝集檢定)、補體固定檢定、免疫螢光檢定、蛋白質A檢定及免疫電泳檢定等之技術的

競爭性及非競爭性檢定系統。在一實施例中，藉由偵測第一抗體上之標記來偵測抗體結合。在另一實施例中，藉由偵測第二抗體或試劑與第一抗體之結合來偵測第一抗體。在另一實施例中，標記第二抗體。許多用於偵測免疫檢定中之結合的方法在此項技術中係已知的且處於本發明之範疇內。Harlow & Lane之Antibodies: A Laboratory Manual (1988)或最近版本；Immunoassays: A Practical Approach, Oxford University Press, Gosling, J. P.(編)(2001)或最近版本；及/或Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人)，其定期更新。該等檢定之實例通常涉及連接於表面或基質之抗體、所添加之患者血清及允許複合物形成所用之時間；用以移除未結合複合物之適當洗滌程序、繼之以允許複合物之偵測之第二抗體的添加(夾心ELISA)或用以偵測抗體表面上之自由海帕西啶結合位點的海帕西啶之可偵測型式(競爭ELISA)。如由上述方法所偵測，高於某一臨限值之海帕西啶含量與炎性疾病之存在有關，且低於該臨限值之含量指示患者不可能患有炎性疾病。當海帕西啶含量在正常範圍內時患者不可能患有炎性疾病。當海帕西啶含量超過正常範圍(例如20 ng/ml)時，詳言之當含量處於20與1000 ng/ml之間時患者可能患有炎性疾病。例示性海帕西啶相關炎性疾病包括癌性貧血症、慢性病貧血症、炎性貧血症、化療誘發性貧血症、慢性腎病(I期、II期、III期、IV期或V期)、末期腎病、慢性腎衰竭、充血性心臟衰竭、癌症、類風濕性關節炎、全身性紅斑性狼瘡

症、克羅恩氏病、幽門螺旋桿菌感染或其他細菌感染、C型肝炎、HIV及其他病毒性疾病、動脈硬化、動脈粥樣硬化、肝硬化、胰腺炎、敗血病、血管炎、鐵缺乏、低色素性小紅血球性貧血及海帕西啶過量病狀。

在其他方法中，測試獲自患者之生物試樣的海帕西啶含量。使用本文中所揭示之抗海帕西啶抗體中之一或多者在足以允許形成免疫複合物之條件下及時間內培育生物試樣。隨後偵測生物試樣中海帕西啶與特異性結合於海帕西啶之抗體之間所形成的免疫複合物。用於該等方法中之生物試樣可為獲自患者且預期含有海帕西啶之任何試樣。適當生物試樣包括血液、血清、血漿、尿及骨髓。適當抗體包括來自人類細胞、齧齒動物、兔、山羊、駱駝或任何其他物種之抗體。

將生物試樣與抗體一起以反應混合物形式在足以允許於海帕西啶與對海帕西啶具有免疫特異性之抗體之間形成免疫複合物的條件下及時間內進行培育。舉例而言，可將生物試樣及一或多種抗海帕西啶抗體在4℃下培育24-48小時。

繼培育之後，測試反應混合物中免疫複合物之存在與否。可藉由多種已知技術(諸如放射免疫檢定(RIA)及酶聯免疫吸附檢定(ELISA))實現對抗海帕西啶抗體與存在於生物試樣中之海帕西啶之間所形成之免疫複合物的偵測。適當檢定在此項技術中係熟知的且詳細描述於學術文獻及專利文獻(Harlow及Lane, 1988)中。可使用之檢定包括(但不

限於)雙單株抗體夾心免疫檢定技術(美國專利第4,376,110號)；單株-多株抗體夾心檢定(Wide等人，1970)；"西方墨點"方法(美國專利第4,452,901號)；標記配位體之免疫沈澱(Brown等人，1980)；酶聯免疫吸附檢定(Raines及Ross, 1982)；免疫細胞化學技術，包括使用螢光染料(Brooks等人，1980)；及活性中和法(Bowen-Pope等人，1984)。其他免疫檢定包括(但不限於)描述於美國專利第3,817,827號、第3,850,752號、第3,901,654號、第3,935,074號、第3,984,533號、第3,996,345號、第4,034,074號及第4,098,876號中之彼等免疫檢定。

出於偵測目的，抗海帕西啶抗體可經標記或未經標記。未標記抗體可用於凝集檢定或與結合於免疫複合物之經標記偵測試劑(例如抗免疫球蛋白、蛋白質G、蛋白質A或凝集素及第二抗體或其抗原結合片段，該等者能夠與特異性結合於海帕西啶之抗體結合)組合使用。若抗海帕西啶抗體經標記，則報導基團(reporter group)可為此項技術中已知之任何適當報導基團，包括放射性同位素、螢光基團(例如螢光素或若丹明(rhodamine))、發光基團、酶、生物素及染料顆粒。本身可直接偵測之標記包括螢光或發光染料、金屬或金屬螯合物、電化學標記、放射性核種(例如32P、14C、125I、3H或131I)、磁性標記或珠粒(例如DYNABEADS)、順磁性標記或比色標記(例如膠體金、有色玻璃或塑性珠粒)。該等可偵測標記可直接與抗海帕西啶抗體或偵測試劑接合或可與連接於抗海帕西啶抗體或偵

測試劑之珠粒或顆粒締合。可經由結合經標記特異性結合搭配物而偵測之標記包括生物素、異羥基洋地黃毒甙元(digoxigenin)、麥芽糖、寡組胺酸、2,4-二硝基苯、苯基砷酸鹽、ssDNA或dsDNA。可藉由產生可偵測反應產物而間接偵測之間接標記包括此項技術中所熟知之各種酶，諸如鹼性磷酸酶、辣根過氧化物酶、β-半乳糖苷酶、黃嘌呤氧化酶、葡萄糖氧化酶或其他醣氧化酶或可分解適當受質以形成有色或螢光反應產物之螢光素酶。

在某些檢定中，將未標記抗海帕西啶抗體固定於一固體支撐物上以用作捕捉生物試樣中之海帕西啶之"捕捉劑"(或試劑)。固體支撐物可為一般熟習此項技術者已知之可連接抗體之任何物質。舉例而言，固體支撐物可為微量滴定盤中之測試孔或硝化纖維素或其他適當膜。或者，支撐物可為管狀物、珠粒、顆粒或盤狀物，諸如玻璃、玻璃纖維、乳膠或塑性材料(諸如聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯或聚氯乙烯)或多孔基質。其他物質包括瓊脂糖、葡聚糖、聚丙烯醯胺、耐綸(nylon)、葡聚糖凝膠(Sephadex)、纖維素或多醣。支撐物亦可為磁性顆粒或纖維光學感應器，諸如揭示於(例如)美國專利第5,359,681號中之彼等支撐物。經固定之抗海帕西啶抗體可為多株抗體或一或多種單株抗體(諸如彼等本文中所述者)或多株抗體與一或多種單株抗體之組合。可使用多種熟習此項技術者已知之技術將抗體固定於固體支撐物上，該等技術詳細描述於專利及學術文獻中。在本發明之內容中，術語"固定"係指非共價締合(諸

如吸附)及共價連接(其可為支撐物上之官能基與抗原之間直接鍵結或可為經由交聯劑鍵結)。涵蓋藉由吸附固定至微量滴定盤中之孔上或固定至膜上。在該等情況下，可藉由使抗海帕西啶抗體與固體支撐物在適當緩衝液中接觸適當長的時間來實現吸附。接觸時間隨溫度而變化，但通常為約1小時與約1天之間。一般而言，使塑料微量滴定盤(包括聚苯乙烯或聚氯乙烯)之孔與量之範圍介於約10 ng至約10 μg且較佳約100 ng至約1 μg的肽接觸足以固定足量之肽。

繼固定之後，通常將支撐物上之剩餘蛋白質結合位點阻斷。可使用一般熟習此項技術者已知之任何適當阻斷劑，包括牛血清白蛋白、Tween™ 20™(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)、熱鈍化正常山羊血清(NGS)或BLOTTO(亦含有防腐劑、鹽及消泡劑之脫脂奶粉緩衝溶液)。隨後使用懷疑含有海帕西啶之生物試樣培育支撐物。可應用純試樣，或更通常，可將試樣稀釋，通常稀釋於含有少量(0.1重量%-5.0重量%)蛋白質(諸如BSA、NGS或BLOTTO)之緩衝溶液中。一般而言，適當接觸時間(亦即培育時間)為一段足以偵測對於含有海帕西啶之試樣內之海帕西啶具有免疫特異性的抗體或抗原結合片段之存在的時間。較佳，接觸時間足以獲得為在結合與未結合抗體或抗體片段之間平衡時所獲得之結合水平之至少約95%的結合水平。一般熟習此項技術者將認識到，可易於藉由檢定在一段時間內發生之結合的水平來確定實現平衡所必需之時間。在室溫

下，約30分鐘之培育時間通常係足夠的。

可隨後藉由使用適當緩衝液(諸如含有0.1% Tween™ 20之PBS)洗滌固體支撐物來移除未結合試樣。結合於免疫複合物(藉由使捕捉劑與來自試樣之海帕西啶結合所形成)中之海帕西啶的偵測試劑可隨後被添加。該偵測試劑可為多株抗體或一或多種單株抗體(諸如彼等本文中所述者)或多株抗體與一或多種單株抗體(諸如彼等本文中所述者)或任何抗體之Fab部分之組合。偵測試劑可經直接標記，亦即其包含至少一種第一可偵測標記或"報導"分子。或者，偵測試劑可為未標記抗海帕西啶抗體。隨後藉由使經標記第二抗體或試劑與第一抗體結合來偵測此未標記抗海帕西啶(第一)抗體。舉例而言，若第一抗體為鼠類免疫球蛋白，則第二抗體可為經標記抗鼠類免疫球蛋白抗體。同樣，若第一抗體為兔免疫球蛋白，則第二抗體可為經標記抗兔免疫球蛋白抗體。

將偵測試劑與免疫複合物一起培育一段足以偵測結合抗體或其抗原結合片段之時間。可通常藉由檢定在一段時間內發生之結合的水平來確定適當的時間長度。隨後移除未結合標記或偵測試劑且使用適當檢定或分析儀器來偵測結合標記或偵測試劑。用於偵測報導基團之方法視報導基團之性質而定。對於放射性標記，閃爍計數或自動放射攝影法通常為適當的。光譜法可用於偵測染料、發光或化學發光部分及各種色原體、螢光標記及類似物。可使用與不同報導基團(通常放射性或螢光基團或酶)偶合之抗生物素蛋

白偵測生物素。通常可藉由添加受質(通常歷時特定一段時間)，接著對反應產物進行光譜或其它分析來偵測酶報導基團(包括辣根過氧化物酶、β-半乳糖苷酶、鹼性磷酸酶及葡萄糖氧化酶)。與所用特定方法無關，大於本底(亦即對於獲自具有正常海帕西啶含量之個體之生物試樣所觀測的含量)至少兩倍之結合偵測試劑的含量指示與海帕西啶之表現相關的病症之存在。

在替代性實施例中，試樣及偵測試劑可同時與捕捉劑接觸，而非依序添加。在另一替代性實施例中，可將試樣及偵測試劑一起預培育，隨後添加至捕捉劑中。其它變化易於為一般熟習此項技術者所瞭解。

在另一實施例中，藉由競爭性結合檢定測定存在於試樣中之海帕西啶的量。競爭性結合檢定依賴於經標記標準物(例如海帕西啶多肽或其免疫反應性部分)與測試試樣分析物(海帕西啶多肽)競爭結合有限量之抗海帕西啶抗體的能力。在分離游離海帕西啶與結合海帕西啶之後，藉由經結合/未結合海帕西啶與已知標準物之相關比率來量化海帕西啶。測試試樣中之海帕西啶多肽之量與結合於抗體之標準物之量成反比。為便於測定經結合之標準物之量，通常將抗體固定於固體支撐物上以便可便利地使結合於抗體之標準物及分析物與保持未結合之標準物及分析物分離。因此，在該等實施例中，本發明涵蓋使生物試樣與經標記成熟海帕西啶(或其保留海帕西啶之抗原性之經標記片段)及結合於成熟海帕西啶之抗體接觸且偵測所形成之抗體標記

海帕西啶複合物之量。

製備與固體支撐物或可偵測標記之接合物通常包含使用化學交聯劑。交聯試劑含有至少兩個反應性基團且通常被分成同官能交聯劑(含有相同反應性基團)與雜官能交聯劑(含有不同反應性基團)。可經由胺、硫氫基偶合或非特異性反應之同雙官能交聯劑可獲自許多商業來源。馬來醯亞胺、烷基及芳基鹵化物、α-鹵醯基及吡啶基二硫化物為硫醇反應性基團。馬來醯亞胺、烷基及芳基鹵化物及α-鹵醯基與硫氫基反應以形成硫醇醚鍵，而吡啶基二硫化物與硫氫基反應以產生混合型二硫化物。吡啶基二硫化物產物可裂解。亞胺基酯亦極適用於蛋白質-蛋白質交聯。

雜雙官能交聯劑具有兩個或兩個以上允許依序與蛋白質之特定基團接合從而使不當聚合或自接合最小化之不同反應性基團。當胺之修飾成問題時亦使用雜雙官能試劑。胺有時可見於大分子之活性位點處且對於該等胺之修飾可能導致活性喪失。其他部分(諸如硫氫基、羧基、苯酚及碳水化合物)可為更合適之靶標。兩步策略允許偶合可容許使胺修飾成具有其他可及基團之蛋白質的蛋白質。多種雜雙官能交聯劑(為成功接合各自組合不同屬性)可市面上購得。在一端具有胺反應性且在另一端具有硫氫基反應性之交聯劑為十分普通的。若使用雜雙官能試劑，則最不穩定基團通常首先發生反應以確保有效交聯且避免不當聚合。

如本文在實例27-28中所示，可用於診斷某些疾病病況(諸如炎性貧血症及癌性貧血症)的指標為成熟海帕西啶

(SEQ ID NO: 8之胺基酸60-84)之含量而非原海帕西啶(SEQ ID NO: 8之胺基酸25-84)之含量。因此，在一較佳實施例中，將結合於正確摺疊之成熟海帕西啶(SEQ ID NO: 9)之抗體用作捕捉劑與偵測試劑。亦可使用結合於天然存在之N-末端截短型式(例如缺少成熟海帕西啶之至多兩個或至多五個N-末端胺基酸)的抗體。涵蓋捕捉劑與偵測試劑之不同組合。舉例而言，捕捉劑可為結合於成熟海帕西啶之第一抗原決定基之單株抗體且偵測試劑可為結合於成熟海帕西啶之第二抗原決定基之不同單株抗體。較佳使用對於海帕西啶之不同抗原決定基具有特異性之抗體以便最小化捕捉劑與偵測試劑之間的競爭或干擾。或者，捕捉劑可為結合於成熟海帕西啶之多株抗體且偵測試劑可為單株抗體。作為另一替代性實施例，捕捉劑可為結合於成熟海帕西啶之單株抗體且偵測試劑可為多株抗體。在前述實施例之任一者中，捕捉劑或偵測試劑可為多株抗體與單株抗體之組合。

在一些實施例中，將成熟海帕西啶特異性單株抗體用作捕捉劑或偵測試劑或用作兩者。成熟海帕西啶特異性抗體完全不結合原海帕西啶或以使得抗體可區分成熟海帕西啶與原海帕西啶之較低親和力結合於原海帕西啶。舉例而言，此種單株抗體可結合於成熟海帕西啶之N-末端，或其可結合在原海帕西啶中不可偵測出(例如歸因於受前結構域遮蔽)的成熟海帕西啶之抗原決定基。

在利用結合於存在於成熟海帕西啶與原海帕西啶中之抗

原決定基之單株抗體的實施例中，涵蓋視情況進一步的改進。藉由自存在於同一試樣中之總海帕西啶(原海帕西啶加成熟海帕西啶)之量中減去存在於試樣中之原海帕西啶之量來確定單獨成熟海帕西啶之量。可藉由在如同如上所述之彼等者之技術中使用原海帕西啶特異性多株及/或單株抗體來確定原海帕西啶之量。原海帕西啶特異性抗體完全不結合成熟海帕西啶或以使得抗體可區分原海帕西啶與成熟海帕西啶之較低親和力結合於成熟海帕西啶。舉例而言，該等抗體可結合於唯存在於海帕西啶之前結構域(SEQ ID NO: 8之胺基酸25-59)中的線性或構形抗原決定基。在該等實施例中，可依序或同時測定總海帕西啶及原海帕西啶之量。因為原海帕西啶在血清中迅速降解成海帕西啶，所以在某些實施例中將弗林(furin)抑制劑添加至生物試樣中以防止或減少原海帕西啶的降解。

在利用結合於25-胺基酸成熟海帕西啶之單株抗體的一些實施例中，單株抗體並不結合降解產物(亦即海帕西啶-22及海帕西啶-20)。

在用以偵測總海帕西啶及原海帕西啶之同時檢定的一個實施例中，捕捉劑為結合於存在於成熟海帕西啶與原海帕西啶中之抗原決定基之抗體，且同時使用兩種偵測試劑。第一偵測試劑為結合於存在於成熟海帕西啶與原海帕西啶中之抗原決定基之經標記抗體且第二偵測試劑為經不同標記之原海帕西啶特異性抗體。舉例而言，第一偵測試劑係以可在第一波長下偵測出之螢光染料標記，而第二偵測試

劑係以可在第二波長下偵測出之螢光染料標記。因此，在此種實例中，捕捉劑將結合試樣中之總海帕西啶(成熟海帕西啶加原海帕西啶)，第一偵測試劑將偵測總海帕西啶之量且第二偵測試劑將偵測原海帕西啶之量。自總海帕西啶之量中減去原海帕西啶之量將獲得成熟海帕西啶之量。在其他替代性實施例中，可使用兩種不同捕捉劑：結合於存在於成熟海帕西啶與原海帕西啶中之抗原決定基之第一捕捉劑及作為原海帕西啶特異性抗體之第二捕捉劑，視情況使用結合存在於成熟海帕西啶與原海帕西啶中之抗原決定基之偵測試劑。

關於進行同時檢定之其他實施例在此項技術中係熟知的，包括(例如)Khan等人，Clin. Vaccine Immunol., 13 (1) 45-52 (2006年1月)中所描述之多路系統，其涉及差異編碼之螢光微珠套組。關於在單個表面上進行多個同時檢定之其他實施例包括具有複數個不連續、可尋址位置以便偵測複數個不同分析物之表面。該等格式包括蛋白質微陣列或"蛋白質晶片"(參見例如Ng及Ilag, J. Cell Mol. Med. 6: 329-340 (2002))及毛細管裝置(參見例如美國專利第6,019,944號)。在該等實施例中，各不連續表面位置具有固定不同分析物於各位置處以便偵測之不同抗體。表面可或者具有一或多個固定在表面之不連續位置處之不連續顆粒(例如微粒或奈米顆粒)，其中各組顆粒含有針對不同分析物之不同捕捉劑。

互補抗體對(結合於海帕西啶上之不同抗原決定基使得

配對適合於用於夾心檢定之抗體)係難以鑑別的。使用使競爭或干擾最小化之互補對可提高檢定之敏感度達20倍至50倍。在一些實施例中，本發明之免疫檢定能夠量測範圍介於0.01 ng/mL至10 μg/mL之海帕西啶含量。

適用於夾心免疫檢定之抗體對包括下列抗體對：

(1)當配對之一抗體為結合於與抗體1S1相同之抗原決定基或與抗體1S1競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體時，適當第二抗體可為：

(a)結合於與抗體23F11相同之抗原決定基或與抗體23F11競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體；或

(b)結合於與抗體15E1相同之抗原決定基或與抗體15E1競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體；或

(c)結合於與抗體12B9相同之抗原決定基或與抗體12B9競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體；

(2)當配對之一抗體為結合於與抗體12B9相同之抗原決定基或與抗體12B9競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體時，適當第二抗體可為：

(a)結合於與抗體18D8相同之抗原決定基或與抗體18D8競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少

約75%、80%、85%、90%或以上的抗體；或

(b)結合於與抗體19C1相同之抗原決定基或與抗體19C1競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體；或

(c)結合於與抗體19D12相同之抗原決定基或與抗體19D12競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體；或

(d)結合於與抗體19H6相同之抗原決定基或與抗體19H6競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體；或

(e)結合於與抗體1S1相同之抗原決定基或與抗體1S1競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體；或

(3)當配對之一抗體為結合於與抗體23F11相同之抗原決定基或與抗體23F11競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體時，適當第二抗體可為：

(a)結合於與抗體18D8相同之抗原決定基或與抗體18D8競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體；或

(b)結合於與抗體19C1相同之抗原決定基或與抗體19C1競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體；或

(c)結合於與抗體19D12相同之抗原決定基或與抗體

19D12競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體；或

(d)結合於與抗體19H6相同之抗原決定基或與抗體19H6競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體；或

(e)結合於與抗體1S1相同之抗原決定基或與抗體4E1競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體；或

(f)結合於與抗體3B3相同之抗原決定基或與抗體3B3競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體；

(4)當配對之一抗體為結合於與抗體15E1相同之抗原決定基或與抗體15E1競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體時，適當第二抗體可為：

(a)結合於與抗體1S1相同之抗原決定基或與抗體1S1競爭結合於SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶達至少約75%、80%、85%、90%或以上的抗體。

在一些實施例中，用於監控使用海帕西啶拮抗劑之療法之有效性的方法包括監控試樣中或動物(諸如人類患者)中之海帕西啶含量的變化。監控海帕西啶含量之方法可包含(a)培育在使用本文中所揭示之抗海帕西啶抗體中之一或多者進行治療之前獲自患者的第一生物試樣，其中在足以允許免疫複合物形成之條件下及時間內進行培育；(b)偵測生

物試樣中之海帕西啶與特異性結合海帕西啶之抗體或抗原結合片段之間所形成的免疫複合物；及視情況(c)在隨後時間(諸如繼使用本文中所揭示之抗海帕西啶抗體中之一或多者進行治療之後)使用采自患者之第二生物試樣重複步驟(a)及(b)；及(d)比較對於第一及第二生物試樣所偵測之免疫複合物的數量。

其他監控方法包括量測(a)海帕西啶與治療劑之間的複合物之血液(例如血清或血漿)循環含量及視情況(b)存在於循環中之游離海帕西啶之量。舉例而言，可使用結合於複合物之治療抗體部分的抗人類Fc抗體及結合於複合物之海帕西啶部分之"成對"抗海帕西啶抗體的Fab片段偵測海帕西啶與治療抗體之間的複合物。或者，可使用抗遺傳型抗體替代抗人類Fc抗體。作為另一替代性實施例，可使用含有非人類Fc(例如人類Fc經鼠類Fc置換)之抗海帕西啶抗體替代Fab片段。

作為另一實例，可在自生物試樣中移除海帕西啶治療抗體複合物之後使用已固定於固體支撐物上之抗人類Fc抗體或抗遺傳型抗體偵測游離海帕西啶。隨後量測保持不與固體支撐物結合之游離海帕西啶之量。游離海帕西啶之該含量可反映治療抗體在移除可得循環海帕西啶方面之有效性。

用於該等方法中之生物試樣可為獲自患者並將預期含有海帕西啶之任何試樣。例示性生物試樣包括血液、血清、血漿、尿及骨髓。可在開始治療之前或在治療方案之中途

獲得第一生物試樣。應以類似方式但在其他治療之後的某時獲得第二生物試樣。可在治療完成時或中途獲得第二生物試樣，其限制條件為至少一部分治療在第一與第二生物試樣的分離之間進行。

通常可如上所述進行兩種試樣之培育及偵測程序。第二試樣中之免疫複合物之數量相對於第一試樣有所減少指示海帕西啶含量降低且反映治療成功。亦可以類似方式分析游離血清海帕西啶，且游離血清海帕西啶之減少指示治療成功。

診斷方法或監控方法可適用之海帕西啶相關病症、炎性疾病及鐵穩態疾病或病症包括(但不限於)非洲鐵過量症、α地中海貧血症、阿茲海默氏症、貧血症、癌性貧血症、慢性病貧血症、炎性貧血症、動脈硬化或動脈粥樣硬化(包括冠狀動脈病、腦血管疾病或周邊閉塞性動脈疾病)、共濟失調、與鐵有關之共濟失調、無鐵傳遞蛋白質貧血、癌症、血漿銅藍蛋白缺乏症、化療誘發性貧血症、慢性腎/腎病(I、II、III、IV或V期)(包括末期腎病或慢性腎衰竭)、肝硬化、典型血色素沈著症、膠原蛋白誘發性關節炎(CIA)、海帕西啶過量(高海帕西啶)之病狀、先天性紅細胞生成異常性貧血、充血性心臟衰竭、克羅恩氏病、糖尿病、鐵生物分布失調、鐵穩態失調症、鐵代謝紊亂、膜鐵轉運蛋白疾病、膜鐵轉運蛋白突變血色素沈著症、葉酸缺乏症、弗里德里希氏共濟失調、索性脊髓病、格拉希氏症候群、幽門螺旋桿菌感染或其他細菌感染、哈勒沃登-施

帕茨病、血色素沈著症、由轉鐵蛋白受體2突變引起之血色素沈著症、血紅素病、肝炎、肝炎(Brock綜合征)、C型肝炎、肝細胞癌、海帕西啶缺乏症、遺傳性血色素沈著症、HIV或其他病毒性疾病、亨廷頓氏病、高鐵蛋白血症、低色素性小紅血球性貧血、血鐵過少症、抗胰島素症、缺鐵性貧血症、缺鐵症、鐵過量症、海帕西啶過量之鐵缺乏病狀、年輕型血色素沈著症(HFE2)、多發性硬化症、轉鐵蛋白受體2、HFE、血幼素、膜鐵轉運蛋白或其他鐵代謝基因之突變、新生兒血色素沈著症、與鐵有關之神經退化性疾病、骨質減少、骨質疏鬆症、胰腺炎、泛酸鹽激酶相關之神經退化性疾病、帕金森氏症、癩皮病、異食癖、紫質症、遲發性皮膚紫質症、假腦炎、肺血鐵質沈積症、紅血球病症、類風濕性關節炎、敗血病、鐵粒幼紅細胞性貧血、全身性紅斑性狼瘡症、地中海貧血症、中間型地中海貧血、輸血性鐵過量、腫瘤、血管炎、維生素B6缺乏症、維生素B12缺乏症及/或威爾遜氏病。

設定對於診斷本文中所述之疾病病況之合適臨限值及如本文中所述之預後監控的方法在此項技術中係熟知的。舉例而言，使用相同方案相對於來自充分代表性數目之患病個體(例如確認具有疾病或病狀之群體)之海帕西啶含量分析來自充分代表性數目之正常個體(例如未偵測出病狀的健康群體)之流體試樣中的海帕西啶含量。可確定使得區分大多數正常群體與大多數患病群體之臨限值截止點。或者，可根據資料確定陰性、不確定性及陽性結果之適用終

點值。舉例而言，可確定包括大多數正常群體之海帕西啶但排除幾乎所有患病群體之正常範圍(指示陰性結果)。相應地，可確定包括大多數患病群體之海帕西啶但排除幾乎所有正常群體之範圍(指示陽性結果)。同樣，可確定使得區分患有炎性貧血症之群體中之海帕西啶含量與患有缺鐵性貧血症之群體中之海帕西啶含量的臨限值。適用終點值可指示患者患有炎性貧血症、缺鐵性貧血症或混合性貧血症。臨限值之合適終點值可經確定以優化所需特異性或敏感性且亦可考慮到全部醫學及流行病學因素。欲考慮之因素包括實驗室測試之臨床目標及是否有必要有高陽性預測值或高陰性預測值以及疾病在測試群體中之流行率。

VII.海帕西啶活性拮抗劑之治療用途

亦提供結合人類海帕西啶之海帕西啶活性拮抗劑(包括本文中所述之單株抗體)用以治療有需要之個體的用途。在例示性實施例中，該個體可能處於高海帕西啶含量、海帕西啶相關病症、鐵穩態失調症或貧血症風險之下或患有海帕西啶相關病症、鐵穩態失調症或貧血症。

如本文中所用，"治療"係指對於處於疾病或病症之風險之下或具有患上疾病或病症之傾向之個體的預防性治療與對於患有疾病或病症之個體的治療性治療。

在預防性方法中投與治療劑可發生在不當疾病或病症之症狀表現之前，使得該疾病或病症得以預防或其進展得以延緩。因此，當與預防性方法結合使用時，術語"治療有效性"意謂在治療之後少數個體(平均)出現不當疾病或病症

或症狀之嚴重程度出現進展。

當與涉及在個體表現疾病或病症之症狀後投與治療劑的治療性方法結合使用時，術語"治療性有效性"意謂在治療之後疾病或病症之一或多種病徵或症狀得以改善或消除。

為達成治療目的，"哺乳動物"係指任何歸類為哺乳動物之動物，包括人類、家畜及農畜以及動物園動物、競技動物或玩賞動物，諸如狗、馬、貓、牛等。該哺乳動物較佳為人類。

如本文中所用，"海帕西啶相關病症"係指由破壞鐵穩態之異常海帕西啶含量(例如相對於貧血程度或所儲存鐵之海帕西啶過量或海帕西啶缺乏)所引起或與其相關聯的病狀。鐵穩態破壞可反過來導致繼發疾病，諸如貧血症。急性或慢性發炎病狀可引起海帕西啶表現上調，此可導致循環鐵含量降低且該循環鐵含量降低可導致貧血症或使現有貧血症惡化。例示性海帕西啶相關炎性疾病包括癌性貧血症、慢性病貧血症、炎性貧血症、化療誘發性貧血症、慢性腎病(I期、II期、III期、IV期或V期)、末期腎病、慢性腎衰竭、充血性心臟衰竭、癌症、類風濕性關節炎、全身性紅斑性狼瘡症、克羅恩氏病、*幽門螺旋桿菌感染*或其他細菌感染、C型肝炎、HIV及其他病毒性疾病、動脈硬化、動脈粥樣硬化、肝硬化、胰腺炎、敗血病、血管炎、鐵缺乏、低色素性小紅血球性貧血及海帕西啶過量病狀。

如本文中所用，短語"鐵穩態疾病(或病症)"係指個體鐵含量需要調節之病狀。其包括海帕西啶相關病症；與高含

量海帕西啶不相關然而將受益於海帕西啶活性抑制之病狀，諸如不由海帕西啶所引起之鐵穩態破壞；當異常鐵吸收、再循環、代謝或排泄導致正常鐵血液含量或組織分布遭受破壞時所產生之疾病；當鐵失調為另一疾病或病狀(諸如發炎、癌症或化療)之後果時所產生之疾病；由異常鐵血液含量或組織分布引起之疾病或病症；及可藉由調節鐵含量或分布而治療之疾病或病症。可導致海帕西啶過量之該等鐵穩態疾病或病症、海帕西啶相關病症及發炎病狀的非限制性實例包括非洲鐵過量症、α地中海貧血症、阿茲海默氏症、貧血症、癌性貧血症、慢性病貧血症、炎性貧血症、動脈硬化或動脈粥樣硬化(包括冠狀動脈病、腦血管疾病或周邊閉塞性動脈疾病)、共濟失調、與鐵有關之共濟失調、無鐵傳遞蛋白質貧血、癌症、血漿銅藍蛋白缺乏症、化療誘發性貧血症、慢性腎/腎病(I、II、III、IV或V期)(包括末期腎病或慢性腎衰竭)、肝硬化、典型血色素沈著症、膠原蛋白誘發性關節炎(CIA)、海帕西啶過量(高海帕西啶)之病狀、先天性紅細胞生成異常性貧血、充血性心臟衰竭、克羅恩氏病、糖尿病、鐵生物分布失調、鐵穩態失調症、鐵代謝紊亂、膜鐵轉運蛋白疾病、膜鐵轉運蛋白突變血色素沈著症、葉酸缺乏症、弗里德里希氏共濟失調、索性脊髓病、格拉希氏症候群、*幽門螺旋桿菌感染*或其他細菌感染、哈勒沃登-施帕茨病、血色素沈著症、由轉鐵蛋白受體2突變引起之血色素沈著症、血紅素病、肝炎、肝炎(Brock綜合征)、C型肝炎、肝細胞癌、遺

傳性血色素沈著症、HIV或其他病毒性疾病、亨廷頓氏病、高鐵蛋白血症、低色素性小紅血球性貧血、血鐵過少症、抗胰島素症、缺鐵性貧血症、缺鐵症、鐵過量症、海帕西啶過量之鐵缺乏病狀、年輕型血色素沈著症(HFE2)、多發性硬化症、轉鐵蛋白受體2、HFE、血幼素、膜鐵轉運蛋白或其他鐵代謝基因之突變、新生兒血色素沈著症、與鐵有關之神經退化性疾病、骨質減少、骨質疏鬆症、胰腺炎、泛酸鹽激酶相關之神經退化性疾病、帕金森氏症、癩皮病、異食癖、紫質症、遲發性皮膚紫質症、假腦炎、肺血鐵質沈積症、紅血球病症、類風濕性關節炎、敗血病、鐵粒幼紅細胞性貧血、全身性紅斑性狼瘡症、地中海貧血症、中間型地中海貧血、輸血性鐵過量、腫瘤、血管炎、維生素B6缺乏症、維生素B12缺乏及/或威爾遜氏病。

與鐵調節破壞有關之非炎性病狀包括(但不限於)維生素B6缺乏、維生素B12缺乏、葉酸缺乏症、癩皮病、索性脊髓病、假腦炎、巴金森氏病(Fasano等人，*J. Neurochem.* 96:909 (2006)及Kaur等人，*Ageing Res. Rev.*, 3:327 (2004))、阿茲海默氏症、冠心病、骨質減少及骨質疏鬆症(Guggenbuhl等人，*Osteoporos. Int.* 16:1809 (2005))、血紅素病及其他紅血球代謝病症(Papanikolaou等人，*Blood* 105:4103 (2005))及周邊閉塞性動脈疾病。

各種其他鐵指標及其濃度正常範圍列於表2中。

表 2

鐵指標	正常含量(範圍)
血清鐵	50-170 μg/dL
血紅素	11.5-18 g/dL
血容比	37-54%
紅血球計數(RBC)	4.6-6.2 x 10^{12}細胞/公升(男性) 4.25-5.4 x 10^{12}細胞/公升(女性)
平均紅血球血紅素量(MCH)	27-32 pg
紅血球血紅素平均濃度(MCHC)	32-36%
紅血球平均體積(MCV)	80-96 fL
紅血球分布寬度(RDW)	11.5-14.5%(電阻抗法)或10.2-11.8%(雷射光法)
網狀血球計數	18-158 x 10^{9}細胞/公升 (對於男性0.8-2.5%；對於女性0.8-4%)
總鐵結合力(TIBC)	250-450 μg/dL
轉鐵蛋白鐵飽和百分率(Tsat)	15-50%
鐵蛋白	12-120 μg/L
葉酸	3-16 ng/mL(血清)及130-628 ng/mL(紅血球)
維生素B12	200-900 pg/ml

患者之鐵指標含量超出表2中所列正常範圍指示該患者可受益於使用海帕西啶活性拮抗劑之治療。因為海帕西啶在鐵穩態中具有重要作用，所以海帕西啶含量及活性將與鐵穩態之破壞及/或鐵指標相關聯。高海帕西啶含量與低於表2中所示正常範圍之血清鐵含量、低血紅素及血容比、低或正常Tsat及高或正常鐵蛋白值、及C-反應性蛋白(CRP)升高或其他發炎標記所測得之高發炎病況相關聯。

如本文中所用，短語海帕西啶活性拮抗劑之"治療有效量"係指造成所需治療效應(亦即提供"治療功效")之量。例示性治療效應包括循環鐵含量增加或鐵利用性提高、紅血球計數提高、紅血球平均細胞容積增加、紅血球血紅素含量提高、血紅素增加(例如增加≥0.5 g/dL)、血容比提高、Tsat提高、網狀血球計數提高、網狀血球平均細胞容積提

高或正常化、網狀血球血紅素含量提高、或血清或血漿中之游離海帕西啶含量降低、或上述參數之任一者正常化。此類參數恢復至正常範圍不為治療功效所必需；舉例而言，在正常方向上可測量之變化(提高或降低)可由臨床醫師考慮為所需之治療效應。當用於個別活性成份單獨投與時，該術語係指該單獨成份。當用於組合時，該術語係指產生治療效應之各活性成份之組合量，無論是組合、連續或同時投與。舉例而言，在海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)與紅血球生成刺激劑連合投與之態樣中，治療有效量意指提高或正常化上述參數之任一者的組合量。

為便於診斷患者，諸如圖9B之決策樹可用於解釋海帕西啶含量，且可用以輔助使用者或解釋者決定治療療程及濃度讀數之顯著性。預測海帕西啶值在具有炎症鐵過量及膜鐵轉運蛋白疾病之患者中升高，在患有血色素沈著症、血紅素病及其他紅血球病症之患者中受到抑制。圖9B之決策樹顯示海帕西啶含量之測量如何簡化懷疑患有鐵代謝病症之患者的診斷及/或評估。圖9A展示在不測量海帕西啶含量之情況下的決策樹評估。

用於本文中所述之治療之組合物及本文中所述之治療方法可利用一或多種單獨使用或與其他治療劑組合使用以獲得所需效應的海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)。

組合療法

另外可有利地將兩種或兩種以上抗體(其結合於相同或不同靶標抗原)共同混合或將本發明之抗體與第二治療劑共投與以提供改良功效。同時投與兩種治療劑並不需要同時或藉由相同途徑投與該等試劑，只要在該等試劑發揮其治療效應期間的時段存在重疊即可。涵蓋同時或依序投與，如在不同日或週投與。

在例示性實施例中，本發明之方法包括投與單個抗體以及不同抗體之組合或"混合物"。該等抗體混合物可由於其含有利用不同效應機制之抗體而具有某些優勢。該等呈組合形式之抗體可展現協同治療效應。

尤其涵蓋使用海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)及紅血球生成刺激劑之組合療法。在各種實施例中，海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)及紅血球生成刺激劑可用於改善患有貧血症之患者的治療。詳言之，對尤其諸如紅血球生成素或其類似物(依泊汀α、依泊汀β、達貝泊汀α)之紅血球生成刺激劑療法具有低反應性(包括無反應)之患者將受益於使用海帕西啶活性拮抗劑或海帕西啶表現抑制劑的聯合治療。在一實施例中，組合療法包括使用至少一種結合於人類海帕西啶之抗體及至少一種紅血球生成刺激劑的治療。

亦涵蓋使用海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)及鐵螯合劑(使鐵儲存量於體內進行再分配)之組合療法。鐵螯合劑為能夠結合鐵且自組織或循環中移除鐵之試劑。實例包括去鐵胺(Desferal®)及去鐵斯若(deferasirox)

(Exjade®)及去鐵酮(1,2-二甲基-3-羥基吡啶-4-酮)。在一些實施例中，海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)及紅血球生成刺激劑可用於改善患有繼發於輸血依賴性鐵過量之鐵負荷病症或具有鐵分布不均病症(諸如弗里德里希氏共濟失調)之患者的治療。

如本文中所用，"紅血球生成刺激劑"意謂直接或間接導致紅血球生成素受體活化(例如藉由結合於受體且導致受體之二聚化或藉由刺激內源性紅血球生成素表現)之化合物。紅血球生成刺激劑包括結合於紅血球生成素受體且活化紅血球生成素受體之紅血球生成素及其變異體、類似物或衍生物；結合於紅血球生成素受體且活化該受體之抗體；或結合於紅血球生成素受體且活化紅血球生成素受體之肽；或視情況分子量小於約1000道爾頓且結合於紅血球生成素受體且活化紅血球生成素受體之小分子有機化合物。紅血球生成刺激劑包括(但不限於)依泊汀α、依泊汀β、依泊汀δ、依泊汀ω、依泊汀ι、依泊汀ζ及其類似物、聚乙二醇化紅血球生成素、胺甲醯基化紅血球生成素、模擬肽(包括EMP1/hematide)、模擬抗體及HIF抑制劑(參見美國專利公開案第2005/0020487號，其揭示內容以引用方式全部併入本文中)。例示性紅血球生成刺激劑包括紅血球生成素、達貝泊汀(darbepoetin)、紅血球生成素促效劑變異體及結合且活化紅血球生成素受體之肽或抗體(且包括美國專利申請公開案第2003/0215444號及第2006/0040858號中所報導之化合物，該等文獻中之每一者之揭示內容以

引用方式全部併入本文中)以及如以下專利或專利申請案中所揭示之紅血球生成素分子或其變異體或類似物，該等文獻各自以引用方式全部併入本文中：美國專利第4,703,008號、第5,441,868號、第5,547,933號、第5,618,698號、第5,621,080號、第5,756,349號、第5,767,078號、第5,773,569號、第5,955,422號、第5,830,851號、第5,856,298號、第5,986,047號、第6,030,086號、第6,310,078號、第6,391,633號、第6,583,272號、第6,586,398號、第6,900,292號、第6,750,369號、第7,030,226號、第7,084,245號、第7,217,689號；PCT公開案第WO 91/05867號、第WO 95/05465號、第WO 99/66054號、第WO 00/24893號、第WO 01/81405號、第WO 00/61637號、第WO 01/36489號、第WO 02/014356號、第WO 02/19963號、第WO 02/20034號、第WO 02/49673號、第WO 02/085940號、第WO 03/029291號、第WO 2003/055526號、第WO 2003/084477號、第WO 2003/094858號、第WO 2004/002417號、第WO 2004/002424號、第WO 2004/009627號、第WO 2004/024761號、第WO 2004/033651號、第WO 2004/035603號、第WO 2004/043382號、第WO 2004/101600號、第WO 2004/101606號、第WO 2004/101611號、第WO 2004/106373號、第WO 2004/018667號、第WO 2005/001025號、第WO 2005/001136號、第WO 2005/021579號、第WO

2005/025606 號、第 WO 2005/032460 號、第 WO 2005/051327 號、第 WO 2005/063808 號、第 WO 2005/063809 號、第 WO 2005/070451 號、第 WO 2005/081687 號、第 WO 2005/084711 號、第 WO 2005/103076 號、第 WO 2005/100403 號、第 WO 2005/092369號、第WO 2006/50959號、第WO 2006/02646 號、第 WO 2006/29094 號；及美國公開案第 US 2002/0155998 號、第 US 2003/0077753 號、第 US 2003/0082749 號、第 US 2003/0143202 號、第 US 2004/0009902 號、第 US 2004/0071694 號、第 US 2004/0091961 號、第 US 2004/0143857 號、第 US 2004/0157293 號、第 US 2004/0175379 號、第 US 2004/0175824 號、第 US 2004/0229318 號、第 US 2004/0248815 號、第 US 2004/0266690 號、第 US 2005/0019914 號、第 US 2005/0026834 號、第 US 2005/0096461 號、第 US 2005/0107297 號、第 US 2005/0107591 號、第 US 2005/0124045 號、第 US 2005/0124564 號、第 US 2005/0137329 號、第 US 2005/0142642 號、第 US 2005/0143292 號、第 US 2005/0153879 號、第 US 2005/0158822 號、第 US 2005/0158832 號、第 US 2005/0170457 號、第 US 2005/0181359 號、第 US 2005/0181482 號、第 US 2005/0192211 號、第 US 2005/0202538 號、第 US 2005/0227289 號、第 US 2005/0244409 號、第 US

2006/0088906號、第US 2006/0111279號。

紅血球生成素包括(但不限於)包含如SEQ ID NO: 72中所示之胺基酸序列的多肽。SEQ ID NO: 72之胺基酸1至165構成任何命名為依泊汀之分子(例如依泊汀α、依泊汀β、依泊汀δ、依泊汀ω、依泊汀ι、依泊汀γ、依泊汀ζ及其類似物)之成熟蛋白質。另外，依泊汀亦包括經一或多種水溶性聚合物(諸如聚乙二醇(包括PEG-EPO-β))化學修飾的上述依泊汀中之任一者。亦涵蓋與SEQ. ID NO: 72具有65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性且仍保持紅血球生成活性之紅血球生成素類似物。

重組性人類紅血球生成素之例示性序列、製造、純化及用途描述於若干專利公開案中，包括(但不限於)Lin美國專利4,703,008及Lai等人美國專利4,667,016，該等專利中之每一者以引用方式全部併入本文中。達貝泊汀為在rHuEPO之胺基酸序列中具有向兩種其他碳水化合物鏈提供之五個變化的高糖基化紅血球生成素類似物。更特定言之，達貝泊汀α在SEQ ID NO: 72之胺基酸殘基30及88處含有兩種其他N-連接碳水化合物鏈。達貝泊汀及其他紅血球生成素類似物之例示性序列、製造、純化及用途描述於若干專利公開案中，包括Strickland等人，91/05867、Elliott等人，WO 95/05465、Egrie等人，WO 00/24893及Egrie等人，WO 01/81405，該等公開案之每一者以引用方式全部併入本文中。天然存在或類似多肽之衍生物包括彼等經化

學修飾以(例如)連接水溶性聚合物(例如聚乙二醇化)、放射性核種或其他診斷性或靶向性或治療部分之衍生物。

術語"紅血球生成活性"意謂如在活體內檢定(例如低氧紅血球增生小鼠檢定)中所證明之刺激紅血球生成之活性。參見例如Cotes及Bangham, *Nature* 191:1065 (1961)。

醫藥調配物之投與及製備

在某些實施例中，可將用於實施本發明之方法之海帕西啶活性拮抗劑或抗體調配於包含適合於所需輸送方法之載劑的醫藥組合物中。合適載劑包括當與海帕西啶活性拮抗劑或抗體組合時保持海帕西啶之高親和力結合性且不與個體免疫系統反應的任何物質。實例包括(但不限於)若干標準醫藥載劑(諸如無菌磷酸鹽緩衝生理食鹽水溶液、抑菌水及其類似物)中之任一者。可使用多種水性載劑，例如水、緩衝水、0.4%生理食鹽水、0.3%甘胺酸及其類似物且可包括經受適度化學修飾之穩定性增強之其他蛋白質(諸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等)或其類似物。

調配物中之例示性抗體濃度可介於約0.1 mg/ml至約180 mg/ml或約0.1 mg/mL至約50 mg/mL、或約0.5 mg/mL至約25 mg/mL或者約2 mg/mL至約10 mg/mL之範圍內。可在pH緩衝溶液中(例如在pH值範圍介於約4.5至約6.5或約4.8至約5.5或者約5.0時)製備抗體之水性調配物。適合於此範圍內之pH值之緩衝液的實例包括乙酸鹽(例如乙酸鈉)、丁二酸鹽(諸如丁二酸鈉)、葡糖酸鹽、組胺酸、檸檬酸鹽及其他有機酸緩衝液。緩衝液濃度視(例如)緩衝液及調配物之

所需等滲性而可為約1 mM至約200 mM或約10 mM至約60 mM。

亦可使抗體穩定之滲透劑可包括於調配物中。例示性滲透劑包括多元醇，諸如甘露糖醇、蔗糖或海藻糖。儘管高滲或低滲溶液可為合適的，但水性調配物較佳為等滲的。調配物中之多元醇之例示性濃度可介於約1 w/v%至約15 w/v%之範圍內。

亦可將界面活性劑添加至抗體調配物中以降低所調配抗體之聚集且/或最小化微粒於調配物中之形成且/或降低吸附。例示性界面活性劑包括非離子界面活性劑，諸如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80)或泊洛沙姆(poloxamers)(例如泊洛沙姆188)。界面活性劑之例示性濃度可介於約0.001 w/v%至約0.5 w/v%或約0.005 w/v%至約0.2 w/v%或者約0.004 w/v%至約0.01 w/v%之範圍內。

在一實施例中，調配物含有以上所確定之試劑(亦即抗體、緩衝液、多元醇及界面活性劑)且基本上不含一或多種防腐劑，諸如苄醇、苯酚、間甲酚、氯丁醇及苄索氯銨(benzethonium Cl)。在另一實施例中，防腐劑可(例如)以範圍介於約0.1%至約2%或者約0.5%至約1%之濃度包括於調配物中。一或多種其他醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(諸如彼等描述於Remington's Pharmaceutical Sciences 第16版，Osol, A.編(1980)中者)可包括於調配物中，其限制條件為其並未不利地影響調配物之所需特徵。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對受

體無毒性且包括：其他緩衝劑；共溶劑；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；螯合劑，諸如EDTA；金屬複合物(例如Zn-蛋白複合物)；可生物降解聚合物，諸如聚酯；及/或鹽形成性平衡離子，諸如鈉。

藉由使具有所需純度之抗體與可選生理上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版，Osol, A.編(1980))混合來製備海帕西啶活性拮抗劑或抗體之治療調配物以便呈凍乾調配物或水溶液形式儲存。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對受體無毒性且包括：緩衝液，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六羥季銨；氯苄烷銨、苄索氯銨；苯酚、丁醇或苄醇；烷基對羥基苯甲酸酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(低於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩胺醯胺、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖、麥芽糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖類，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；鹽形成性抗衡離子，諸如鈉；金屬複合物(例如Zn-蛋白複合物)；及/或非離子表面活性劑，諸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

在一實施例中，合適調配物含有與滲透化且穩定化之滲透劑(諸如多元醇、山梨糖醇、蔗糖或氯化鈉)組合之等滲緩衝液(諸如磷酸鹽、乙酸鹽或TRIS緩衝液)。該滲透劑之一實例為5%山梨糖醇或蔗糖。此外，調配物可視情況包括界面活性劑以便防止聚集且穩定在0.01至0.02重量/體積%下。調配物之pH值可介於4.5-6.5或4.5-5.5之範圍內。抗體之醫藥調配物之其他例示性描述可見於US 2003/0113316及美國專利第6,171,586號中，該等專利各自以引用方式全部併入本文中。

本文中之調配物亦可含有一種以上為所治療之特定適應症所必需的活性化合物，較佳含有彼等具有彼此並無不利影響之互補活性的活性化合物。舉例而言，可能需要進一步提供免疫抑制劑。該等分子適當以組合形式以對所欲目標有效之量存在。

亦可(例如)分別藉由凝聚技術或界面聚合將活性成份包埋於所製備之微膠囊(例如羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊)中，包埋於膠狀藥物輸送系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米顆粒及奈米囊劑)或巨乳液中。該等技術揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences，第16版，Osol, A.編(1980)中。

亦涵蓋抗體之懸浮液及晶體形式。製造懸浮液及晶體形式之方法為熟習此項技術者已知。

欲用於活體內投藥之調配物必須為無菌的。在一些實施例中，本發明之組合物可藉由習知熟知殺菌技術殺菌。舉

例而言，易於藉由經由無菌過濾膜進行過濾來實現殺菌。所得溶液可經封裝以供使用或在無菌條件下過濾且凍乾，在投與之前將凍乾製劑與無菌溶液組合。

通常使用冷凍乾燥過程以穩定多肽以便長期儲存，尤其當多肽在液體組合物中相對不穩定時。冷凍乾燥循環通常由三步組成：冷凍、第一次乾燥及第二次乾燥；Williams及Polli, Journal of Parenteral Science and Technology，第38卷，第2期，第48-59頁(1984)。在冷凍步驟中，冷卻溶液直至其充分冷凍。在此步驟時溶液中之體積水形成冰。在藉由使用真空降低腔室壓至低於冰之蒸氣壓來進行之第一次乾燥階段冰昇華。最終，在第二次乾燥階段在低腔室壓及高存放溫度下移除吸附水或結合水。該過程產生稱為凍乾塊之物質。此後可在使用之前將該塊復水。

儘管抗菌劑之稀溶液有時用於產生用以非經腸投藥之藥物，但凍乾物質之標準復水規範為添回大量純水(通常相當於在冷凍乾燥期間所移除之體積)；Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy，第18卷，第11及12期，第1311-1354頁(1992)。

在某些情況下已指示賦形劑充當凍乾產物之穩定劑；Carpenter等人，Developments in Biological Standardization，第74卷，第225-239頁(1991)。舉例而言，已知賦形劑包括多元醇(包括甘露糖醇、山梨糖醇及甘油)；糖(包括葡萄糖及蔗糖)；及胺基酸(包括丙胺酸、甘胺酸及麩胺酸)。

此外，多元醇及糖亦通常用以保護多肽免於冷凍及乾燥所引發之損傷且以乾燥狀態增強儲存期間之穩定性。一般而言，糖(詳言之雙醣)在冷凍乾燥過程中與在儲存期間為有效的。亦報導其他類別之分子(包括單醣及雙醣及諸如PVP之聚合物)作為凍乾製品之穩定劑。

為用於注射，醫藥調配物及/或藥物可為適合於以如上所述之適當溶液復水之粉末。該等實例包括(但不限於)冷凍乾燥、旋轉乾燥或噴霧乾燥粉末、非晶形粉末、顆粒、沈澱物或微粒。為用於注射，調配物可視情況含有穩定劑、pH調節劑、界面活性劑、生物可用性改質劑及該等試劑之組合。

可製備持續釋放性製劑。持續釋放性製劑之合適實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物的半透性基質，該等基質呈成型物品形式，例如薄膜或微囊。持續釋放性基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與γ乙基-L-麩胺酸酯之共聚物、不可降解伸乙基-乙酸乙烯酯、諸如Lupron Depot™(由乳酸-乙醇酸共聚物及乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)組成之可注射性微球體)之可降解乳酸-乙醇酸共聚物及聚-D-(-)-3-羥丁酸。儘管諸如伸乙基-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸之聚合物能夠經100天釋放分子，但某些水凝膠經更短時限釋放蛋白質。當膠囊化抗體長時間保留於身體內時，其可由於暴露於37℃下之濕氣而變性或凝集從而導致生物活性喪失及免疫原性可能

之變化。可視所涉及之機制而設計合理方案以便穩定化。舉例而言，若發現聚集機制為經由硫代二硫化物互換而形成分子間S--S鍵，則可藉由修飾硫氫基殘基、凍乾酸性溶液、控制水份含量、使用適當添加劑及產生特定聚合物基質組合物來實現穩定化。

在某些實施例中，本發明之調配物可經設計成短效、快速釋放、長效或如本文中所述之持續釋放。因此，醫藥調配物亦可經調配以便控釋或緩釋。

組合物之治療有效量將變化且視疾病之嚴重程度及欲治療之個體之體重及全身狀況而定，但通常介於每次施用約1.0 μg/kg至約100 mg/kg或約10 μg/kg至約30 mg/kg或約0.1 mg/kg至約10 mg/kg或約1 mg/kg至約10 mg/kg體重之範圍內。可根據需要視病症或病狀之反應及個體對療法之耐受性而每日、隔日、每週、每月兩次、每月或在頻率上更多或更少投藥。可需要經較長時間(諸如4、5、6、7、8、10或12週或更長時間)之維持劑量直至病症症狀之所需抑制發生且可根據需要調節劑量。該療法之進展易於藉由習知技術及檢定加以監控。

可視疾病之病狀、個體之年齡、體重、全身健康狀況、性別及飲食、投藥間隔時間、投藥途徑、排出率及藥物組合而調節特定劑量。含有有效量之以上劑型之任一者較佳處於常規實驗之範圍內且因此較佳處於本發明之範疇內。

藉由任何合適方式全身或局部投與海帕西啶活性拮抗劑或抗體，該等方式包括經由非經腸、皮下、腹膜內、肺內

及鼻內且若局部療法需要，則進行病灶內投藥。非經腸途徑包括靜脈內、動脈內、腹膜內、硬膜外、鞘內投藥。此外，可適當藉由脈搏注射尤其以特異性結合試劑或抗體之遞減劑量投與特異性結合試劑或抗體。較佳藉由注射，最佳靜脈內或皮下注射(部分視投藥是否為暫時性或持續性而定)進行投藥。涵蓋其他投藥方法，包括表面(尤其經皮)、經黏膜、經直腸、經口或局部投藥，例如經由安置於所需部位附近之導管。在某些實施例中，以範圍介於0.01 mg/kg至100 mg/kg之劑量以範圍介於每日至每週至每月(例如每天、每隔一天、每隔兩天或每週2、3、4、5或6次)之頻次，較佳範圍介於0.1至45 mg/kg、0.1至15 mg/kg或0.1至10 mg/kg之劑量以每週2或3次之頻次或一月一次至多45 mg/kg靜脈內投與呈生理溶液形式之本發明之特異性結合試劑或抗體。

VIII.診斷及治療套組

為方便起見，可以套組(亦即預定量之試劑與進行診斷檢定之用法說明書之封裝組合)形式提供本文中所揭示之抗體。當抗體經酶標記時，該套組將包括酶所需之受質及輔因子(例如提供可偵測發色團或螢光團之受質前驅體)。此外，可包括其他添加劑，諸如穩定劑、緩衝液(阻斷緩衝液或溶胞緩衝液)及其類似物。各種試劑之相對量可在很大程度上變化以提供大體上優化檢定之敏感度之試劑溶液濃度。特定言之，該等試劑可以包括賦形劑之乾粉(通常凍乾)形式提供，該等乾粉呈溶解時將提供具有合適濃

度之試劑溶液。

亦提供適用於多種診斷檢定(包括例如免疫檢定，諸如ELISA(夾心式或競爭形式))之診斷試劑及包含一或多種該等試劑之套組。在某些實施例中，該等套組可包括至少一種本發明之第一肽(視情況為如本文中所述之經正確摺疊成熟海帕西啶標準物)或第一抗體或抗原結合片段、其功能性片段或其混合物及產生信號之構件。當使用該套組時套組之組份可經預先附著於固體支撐物上或可經塗佈於固體支撐物之表面上。在某些實施例中，信號產生構件可與本發明之抗體預先相關聯或可需要在使用前與一或多種組份(例如緩衝液、抗體-酶結合物、酶受質或其類似物)組合。套組亦可包括其他試劑，例如用於降低對固相表面之非特異結合性的阻斷試劑、洗滌試劑、酶受質及其類似物。固相表面可呈管、珠粒、微量滴定盤、微球體或其他適合於固定蛋白質、肽或多肽之物質之形式。較佳，催化化學發光或顯色產物形成或化學發光或顯色受質降低之酶為信號產生構件之組份。該等酶在此項技術中係熟知的。套組可包含本文中所述之捕捉劑及偵測試劑之任一者。視情況該套組亦可包含實現本發明之方法之用法說明書。

亦提供一種包含封裝於容器(諸如小瓶或瓶)中之海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)及紅血球生成刺激劑且進一步包含附著於或封裝於容器上之標籤的套組，該標籤描述容器之內容物且提供適應症及/或關於使用容器之內容物治療如本文中所述之一或多種疾病病況的用法說

明書。

在一態樣中，該套組係用於治療與海帕西啶含量升高相關聯之病症且包含海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)及紅血球生成刺激劑。該套組可視情況進一步包括用於經口或非經腸(例如靜脈內)投藥之鐵。在另一態樣中，該套組包含海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)及附著於或封裝於容器上之標籤，該標籤描述海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)與紅血球生成刺激劑之用法。在另一態樣中，該套組包含紅血球生成刺激劑及附著於或封裝於容器上之標籤，該標籤描述紅血球生成刺激劑與海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)之用法。在某些實施例中，海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)及紅血球生成刺激劑及(視情況)鐵係呈獨立小瓶形式或共同組合於同一醫藥組合物中。在另一態樣中，海帕西啶活性拮抗劑(或海帕西啶表現抑制劑)與鐵以單個醫藥組合物形式組合。在另一實施例中，紅血球生成刺激劑與鐵以單個醫藥組合物形式組合。

如以上組合療法章節中所討論，同時投與兩種治療劑並不需要同一時間或藉由同一途徑投與該等試劑，只要在該等試劑發揮其治療效應期間存在時間上之重疊即可。涵蓋同時或依序投與，如在不同日或週投與。

亦可製備本文中所揭示之治療及診斷套組，其包含本文中所揭示之抗體、肽、抗原結合片段或聚核苷酸之至少一者及使用組合物作為診斷試劑或治療劑之用法說明書。適

用於該等套組之容器可通常包含至少一個小瓶、試管、燒瓶、瓶、注射器或其他合適容器，該(等)診斷及/或治療組合物之一或多者可置於其中且較佳適當等分於其中。當亦提供第二治療劑時，該套組亦可含有第二不同容器，此第二診斷及/或治療組合物可置於其中。或者，可將複數種化合物製備成單個醫藥組合物且可將其封裝於單個容器構件(諸如小瓶、燒瓶、注射器、瓶或其他合適單個容器)中。本發明之套組通常亦將包括以緊密封閉方式含有該(等)小瓶以便商業銷售的構件，諸如該(等)所需小瓶保留於其中之注射或吹塑容器。當放射性標記、產色、螢光生成或其他類型之可偵測標記或偵測構件包括於該套組中時，可將標記試劑提供於與診斷或治療組合物本身相同之容器中或可將其或者置於第二不同容器構件中，此第二組合物可置於且適當等分於該第二不同容器構件中。或者，可將偵測試劑及標記製備於單個容器構件中且在大多數情況下，該套組通常亦將包括以緊密封閉方式含有該(等)小瓶以便商業銷售及/或便利封裝及輸送之構件。

亦提供實現本文中所述之診斷或監控方法之器件或裝置。該裝置可包括一試樣可輸入其中之腔室或管、一流體處理系統(視情況包括使該試樣直接流至該器件之閥門或泵、視情況自血液中分離血漿或血清之過濾器、用於添加捕捉劑或偵測試劑之混合室)及(視情況)一用於偵測與捕捉劑免疫複合物結合之可偵測標記之量的檢測器件。試樣可為被動式流動(例如藉由毛細管、靜水或一旦施用於試樣

後並不需要進一步操作器件之其他力)或主動式流動(例如藉由施加經由機械泵、電滲透泵、離心力或高氣壓所產生之力)或藉由主動力與被動力之組合而流動。

在相關實施例中，亦提供一處理器、一電腦可讀內存及一儲存於計算機可讀內存上且適合於在處理器上執行以完成本文中所述之方法之任一者及/或以計算結果形式得到海帕西啶之偵測含量及認為"正常"之臨限值位準之臨限值或範圍使得在"正常"範圍外之含量與如本文中所述之病狀之一或多者相關聯的常用程序。在某些實施例中，本發明進一步提供含有完成類似功能之程序或常用程序的電腦可讀介質。合適計算系統、環境及/或組態之實例包括個人電腦、服務器電腦、手持式或膝上型設備、多處理機系統、基於微處理機之系統、視訊轉接器、可編程消費者電子設備、網絡PC、迷你計算機、大型計算機、包括以上系統或設備之任一者之分布式計算環境或此項技術中已知之任何其他系統。

海帕西啶活性拮抗劑之非治療用途

本文中所揭示之抗體可用作靶標抗原之親和純化試劑或用於靶標抗原之診斷檢定中，例如偵測其於特定細胞、組織或血清中之表現。該等抗體亦可用於活體內診斷檢定。一般而言，為了達到該等目的，將抗體以放射性核種(諸如^{111}In、^{99}Tc、^{14}C、^{131}I、^{125}I、^{3}H、^{32}P或^{35}S)標記以便可使用免疫閃爍攝影術定位位點。

本文中所揭示之抗體可用於任何已知檢定方法，諸如競

爭性結合檢定、直接及間接夾心檢定(諸如ELISA)及免疫沈澱檢定。Zola, Monoclonal Antibodies : A Manual of Techniques，第147-158頁(CRC Press, Inc. 1987)。該等抗體亦可用於免疫組織化學分析以便使用此項技術中已知之方法標記細胞試樣。

實例

實例1--自尿純化海帕西啶

*純化：*人類海帕西啶係自敗血病患者之尿(經金黃色葡萄球菌(*S. aureus*)及肺炎鏈球菌(*S. peumoniae*)感染，商業上獲得且使用由Park等人，Journal Biol. Chem., 276:7806-7810, 2001所描述之方法純化)中分離。簡言之，將約2 L冷凍尿融解且經0.45及0.22 μ過濾器過濾，且裝填於10 mL柱床體積CM macroprep(BioRad)管柱上且使其與流速為每小時80 mL之PBS平衡。將管柱以PBS洗滌直至溶離劑之OD_{280}低於0.1。將海帕西啶以5%於水中之乙酸溶離。因為溶離劑含有數種其他肽，所以將該物質進一步藉由RP-HPLC(C18)使用含有0.1% TFA之乙腈相對於0.1% TFA水溶液之梯度純化。使用質譜儀分析含有海帕西啶之HPLC溶離份。

*肽量化：*在Agilent 1100高效液相層析(HPLC)系統上使用來自Antek Instruments(Houston, TX, USA)16之7000型CLND氮特異性偵測器進行CLND分析。於Agilent C3逆相管柱(5 μm，0.2 cm×5 cm)上使用緩衝液B相對於A之線性梯度(A=0.04% TFA水溶液；B=含有0.04% TFA之MeOH)、

0-80% B經14分鐘以0.5毫升/分鐘之流速實現層析分離。CLND條件為1050℃熱解溫度、PMT電壓700 V、範圍25 X及檢測器輸出1 V；在214 nm下偵測UV吸光度。使用溶解於DMSO中之咖啡鹼標準物(99%，Sigma-Aldrich)(標準物：8、80、160、320、640、1280、1920及4480奈克(ng)氮等效物)製備CLND反應校準曲線。將海帕西啶試樣溶解於已知體積之(50% MeOH/H_2O)中且由CLND反應與海帕西啶注射體積及氮計數之數學相關性來確定濃度。此方法用於量化所有後續海帕西啶製備方法。

實例2--CHO源性重組人類海帕西啶(rhHepc)表現及純化

藉由使用包含SEQ ID NO: 101並編碼人類原海帕西啶(SEQ ID NO: 102)之DNA轉染AM-1/細胞週期蛋白D中國倉鼠卵巢(AM-1/D CHO)細胞(參見美國專利第6,210,924號，其以引用方式全部併入本文中)來穩定表現人類海帕西啶。根據製造商建議使用Lipofectamine™ 2000(LF2000)試劑(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)進行轉染。簡言之，將4×10^6個AM-1/D CHO細胞在轉染於100-mm直徑塑料BD-Falcon™皮氏(Petri)培養皿(BD Biosciences, Bedford, MA)中之前塗佈於10 mL補充以5%胎牛血清、1×青黴素-鏈黴素及麩醯胺酸(Invitrogen)、非必需胺基酸(Invitrogen)、丙酮酸鈉及次黃嘌呤鈉/胸苷(HT)補充劑(Invitrogen)之達爾伯克改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)(D-MEM, Invitrogen)中歷時24小時。將約30 μg人類原海帕西啶質體DNA使用限制酶Pvu I(New England

Biolabs, Inc., Ipswich, MA)線性化且稀釋於2 mL OptiMEM(Invitrogen)中。將經稀釋之DNA與稀釋於2 mL OptiMEM中之75 μL LF2000混合且將混合物在室溫下培育20分鐘。將DNA-LF2000混合物添加至細胞中且培育隔夜以供轉染。在第二天，添加新鮮生長培養基且將細胞在37℃下以5% CO_2培養48小時且隨後以1:20及1:50之稀釋度塗佈於HT選擇培養基中。

在轉染之後約2週，存活細胞為藉由極限稀釋選殖於96孔板中之單細胞。使用抗原海帕西啶多株抗體測定純系之海帕西啶表現。基於西方分析，擴增純系118-34以供大規模產生。將約2-3×10^7個細胞用以接種一個Corning® CellBIND® 850 cm^2聚苯乙烯滾瓶(Corning Incorporated, Corning, NY)，且隨後使細胞以1:10擴增。將各滾瓶以250 mL高葡萄糖DMEM、10%經透析胎牛血清(FBS)、1×麩醯胺酸、1×非必需胺基酸及1×丙酮酸鈉(皆來自Invitrogen)接種。將10% CO_2/平衡空氣於培養基中鼓泡2-3秒，隨後封閉各滾瓶。將滾瓶在37℃下以0.75轉數/分(rpm)旋轉之輥筒架培育。當該等細胞為約85-90%長滿率時(在培養約5-6天之後)，丟棄生長培養基且將該等細胞以100 mL磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)及200 mL生產培養基洗滌，該生產培養基由50% D-MEM/50% Ham's F12、1×麩醯胺酸、1×非必需胺基酸、1×丙酮酸鈉(全部來自Invitrogen)及1.5%二甲亞碸(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)組成。

將含有人類海帕西啶之改良性培養基每7天採集一次且

隨後經0.45/0.1 μm乙酸纖維素過濾器(Corning Incorporated)過濾於10 ml柱床體積CM macroprep(BioRad)管柱上，且與流速為每小時80 ml之PBS平衡。將管柱以PBS洗滌直至溶離劑之OD_{280}低於0.1。將海帕西啶以5%於水中之乙酸溶離。藉由分析性RP-HPLC(C4管柱)檢定CM溶離份。偵測具有一內片之rhHepc 25、rhHepc 24、rhHepc 22、rhHepc 21、rhHepc 27及rhHepc 24。將合併CM裝填於半製備性C4 Vydac管柱(10×250 mm)上。將溶離份收集且藉由分析性RP-HPLC/MS檢定。根據靜質量及滯留時間合併rhHepc 25溶離份。

實例3--大腸桿菌源性重組人類海帕西啶表現及再摺疊

將包含SEQ ID NO: 101並編碼人類原海帕西啶(SEQ ID NO: 102)之DNA表現於大腸桿菌中。在培養之後，將細胞藉由離心收集，藉由微流化劑溶解且洗滌。將來自大腸桿菌糊狀物之包涵體以1:10之重量與體積比在室溫下溶解於6 M鹽酸胍、50 mM Tris-HCl、6 mM DTT(pH值為8.5)中1小時。隨後將混合物以1:25在4℃下稀釋於2 M尿素、50 mM Tris-HCl、160 mM精胺酸、3 mM半胱胺酸(pH值為8.5)中並攪拌3-4天。將該溶液藉由0.45 μM過濾淨化且引至5 mM檸檬酸鹽中，隨後使用濃HCl降低pH值至3.0。以3 MWCO膜進行10倍濃縮且與2 M尿素、5 mM檸檬酸(pH值為3.0)交換緩衝液。再次將混合物藉由離心淨化且以NaOH調節至pH值為4.5，隨後裝填於S-HP管柱。將管柱以20 mM乙酸鈉、250 mM NaCl、2 M尿素(pH值為4.5)運作。運

作達750 mM NaCl之梯度，同時藉由RP-MS檢定溶離份且根據預期質量及滯留時間合併。藉由以經由添加每mg原海帕西啶3 mU蛋白酶所獲之Kex蛋白酶培育而酶促分解蛋白質之前區段。將混合物在室溫下於包含30 mM TRIS(pH值為7.0)及5 mM $CaCl_2$之緩衝液中培育1.5小時。將合併物再次使用逆相HPLC純化。

實例4--海帕西啶之化學合成、純化及特性化

使用ABI433合成儀(Applied Biosystems, Foster City, CA)採用使用1.0 M N,N'-二環己基碳化二亞胺(DCC)/1-羥基苯并三唑水合物(HOBT)(1:1)偶合化學處理與N-甲基-吡咯啶酮(NMP)及20%(v/v)哌啶/NMP去保護化學處理的N^{α}-Fmoc/側鏈^{t}Bu正交保護策略(E. Atherton及R.C. Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1989)化學合成人類海帕西啶肽序列(*氪*-DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCCKT-*游離酸*，SEQ ID NO: 9)。將單胺基酸偶合循環(1 mmol標度)用於合成，且由58分鐘偶合時間及3+15分鐘Fmoc-去保護時間組成。將Fmoc-Thr(^{t}Bu)-Wang樹脂(0.12 mmol當量標度，Novabiochem)用於合成。將下列側鏈保護策略與N^{α}-Fmoc-保護胺基酸(Novabiochem)一起使用：Asp(^{t}Bu)、Asn(Trt)、Gln(Trt)、Thr(^{t}Bu)、His(Trt)、Cys(Trt)、Arg(Pbf)、Ser(^{t}Bu)及Lys(Boc)。繼樹脂上鏈裝配及移除N-末端Fmoc基團之後，將經側鏈保護及樹脂結合之人類海帕西啶肽衍生物以二氯甲烷(DCM)洗滌且乾燥。藉由以總體積為20 mL之三氟乙

酸(TFA)/H_2O/三異丙基矽烷(TIS)/3,6-二氧雜-1,8-辛烷-二硫醇(DODT)(v/v為92.5:2.5:2.5:2.5)之新近製備的混合物在緩慢攪拌(通常2至3小時)下處理來實現側鏈去保護及自固體支撐物分解。將溶液過濾以移除聚合固體支撐物且隨後蒸發。將殘餘物以冰冷乙醚(50 mL)處理且將沈澱肽藉由離心(在2,000 rpm下10分鐘)收集，隨後傾析醚溶液且在真空中乾燥該肽。

將乾燥肽在攪拌及超音波處理下於純TFA(2 mL)中複配，且隨後在攪拌下逐滴稀釋於由6 M胍(pH值為4.5)與6 M胍/0.5 M Tris/20 mM EDTA(pH值為8.5)之1:1組合所製備的新鮮緩衝溶液(100 mL)中。將Tris(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽(TCEP，1 mmol)添加至溶液中且攪拌2小時。隨後將經縮減之含有人類海帕西啶的溶液裝填於Phenomenex Jupiter 10 μm 300 Å C_{18} 250×21.2 mm管柱上以便製備性純化。使用含有0.1% TFA之乙腈相對於0.1% TFA水溶液之線性梯度實現層析分離。溶離梯度法為在20毫升/分鐘之流速下10-25% B歷時15分鐘，接著25-40% B歷時30分鐘。藉由LC/MS分析使用Waters Acquity UPLC-LCT Premier系統(Z-噴霧電離偶合飛行時間(TOF)質譜儀；管柱：Agilent Eclipse XDB-C_{18} 2.1×50 mm，1.8 mm)鑑別含有預期分子質量之經縮減人類海帕西啶及低於30%之任何其他質量可偵測之雜質的溶離份且加以合併。滯留時間(R_t)=5.27分鐘；$C_{113}H_{178}N_{34}O_{31}S_9$，計算分子量=2795.09 Da(單一同位素)；實驗觀測分子量=2795.70 Da。隨後將集合溶離份以

水及乙腈稀釋至1 L以提供25%(v/v)之近似最終乙腈組合物。在麩胱甘肽/二硫化麩胱甘肽(GSH/GSSG)氧化還原系統(300 mg GSSG及152 mg GSH)存在下在pH值為8.0~8.3(經28-30% NH_4OH調節之溶液，Baker)時伴以50-60 RPM攪拌實現二硫鍵形成歷時16-24小時。由分析性LC/MS監控二硫鍵形成之進展。

在16-24小時摺疊之後，隨後將含有人類海帕西啶之溶液以純TFA調節至pH值為2且蒸發乙腈溶劑組份。隨後將含有人類海帕西啶之粗製摺疊溶液裝填於Phenomenex Jupiter 10 μm，300 Å，C_{18}，250×21.2 mm管柱上以便製備性純化。溶離線性梯度法為在20毫升/分鐘之流速下10-25%緩衝液B歷時15分鐘，接著25-35%緩衝液B歷時40分鐘。藉由LC/MS於Waters Acquity UPLC-LCT Premier系統上分析溶離份，且合併含有>95%人類海帕西啶之溶離份並將之凍乾。將含有分子量相當於摺疊人類海帕西啶之物質但具有不良LC純度(50-95%)之溶離份合併，凍乾，再懸浮於不含TFA之30%乙腈/水(濃度為約0.1毫克肽/毫升)中，以飽和碳酸銨調節至pH值為7.5-8.0且保持24小時。使用Phenomenex Jupiter 10 μm，300 Å，C_{18}，250×10 mm管柱以5毫升/分鐘進行此第二人類海帕西啶集合物之半製備性規模純化，且合併含有>95%人類海帕西啶之溶離份並將之凍乾。人類海帕西啶之總產率為35 mg。滯留時間(R_t)=5.05分鐘；$C_{113}H_{170}N_{34}O_{31}S_9$，計算分子量=2787.03 Da(單一同位素)；實驗觀測分子量=2787.70 Da。藉由還原

性烷基化-肽作圖法以及傅立葉轉換離子回旋共振質譜分析 (Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry analysis)測定化學合成之人類海帕西啶之二硫鍵連接性。

實例5--合成、重組及尿海帕西啶之分析及比較

為證明天然、重組及合成物質之等效性，將如實例1中所述自尿純化之人類海帕西啶相對於CHO源性重組生成物質(實例2)、大腸桿菌源性重組生成物質(實例3)及化學合成物質(實例4)進行比較。比較IRMPD碎裂譜(圖1)。儘管直接序列分配對於所有觀測片段而言係不可能的，但所有試樣之MS/MS指紋圖譜係一致的。亦藉由碰撞活化解離(CAD)以及ECD使試樣解離且譜圖對於所有製備物而言係一致的。甚至生物分子離子之結構之少許變化可極大地改變其串聯質譜。因此，藉由該等不同解離技術所獲之所有四種海帕西啶製備物之等效性表明二硫鍵連接性對於所分析的所有四種形式之海帕西啶係一致的。

亦在圖2中比較所有四種海帕西啶製備物之一維^{1}H NMR譜且證實所有製備物係等效的。在實例2中說明所用方法。uhHepc之1D譜上之少量差異歸因於試樣之間的pH及鹽輕微錯配；此在組胺酸環質子共振及來自兩個非常接近於羧基之側接蘇胺酸殘基之共振上具有最顯著效應且與不同構形形式有關。某些試樣展示在順式構形中具有脯胺酸殘基之少量形式的小峰。當在純化過程期間酶促分解N-末端天冬胺酸時，CHO源性rhHepc含有少量(<5%)24-殘基

肽。

合成、重組表現及天然海帕西啶之結構一致性允許製備大批量正確摺疊製品以用於抗體生成及測試。

實例6--活體外海帕西啶活性鐵蛋白檢定

在活體外細胞檢定中針對鐵調節生物活性檢定根據實例1、2、3及4所純化或產生之人類海帕西啶。誘導表現於293細胞中之膜鐵轉運蛋白刺激鐵輸出且降低細胞內鐵含量且由此降低鐵蛋白含量(Nemeth等人，Science, 306:2090-2093, 2004)。可以劑量依賴性方式藉由海帕西啶處理降低膜鐵轉運蛋白之作用。已顯示此作用歸因於海帕西啶誘發性內化及膜鐵轉運蛋白降解且由此降低鐵輸出。

將表現四環素誘導性膜鐵轉運蛋白基因之293細胞以每孔50,000個細胞(70-80%密度)塗佈於96孔BioCoat塗佈有聚D離胺酸之板中的補充以5%胎牛血清及青黴素/鏈黴素/麩醯胺酸補充劑(Gibco BRL)之DMEM中。在以5% CO_2在37℃下培育隔夜之後，將該培養基置換為檢定培養基(如上所述，但補充以用於海帕西啶誘導之2.5 μg/ml多西環素、用於鐵補充孔之2.5 μg/ml檸檬酸鐵及用於海帕西啶處理孔之1 μg /ml海帕西啶)。將該板如上所述進一步培育17-20小時，隨後於冷PBS中洗滌該等孔且溶解於冰上的120 μl之1% Triton溶解緩衝液中歷時15分鐘。將100 μl溶解產物用於鐵蛋白分析(Olympus AU400臨床化學分析儀)且10 μl溶解產物用於BCA蛋白質檢定(Pierce)。將鐵蛋白結果根據蛋白質含量進行正規化。

以尿、重組或合成海帕西啶處理該等細胞皆使得鐵保持力提高，此表明所有三種製備物具有生物學活性。因為所有三種製備物展現相同二硫鍵連接性及生物活性，所以其可被視為等效物，從而允許使用合成及重組製備物用於抗體製造及測試。

實例7--藉由部分還原性烷基化進行尿海帕西啶之二硫鍵定位

使用兩種不同技術(NEM部分還原性烷基化及傅立葉轉換質譜分析(FT-MS))研究自尿純化之內源性人類海帕西啶肽之二硫鍵連接性。

簡言之，人類海帕西啶係由如下所述之敗血病患者之尿純化。使用3 mM TCEP之部分還原使海帕西啶中之二硫鍵隨時間逐步還原。由TCEP處理而化學還原之二硫鍵易於由NEM烷基化，且可藉由肽之序列分析鑑別NEM-烷基化半胱胺酸。此技術證明，海帕西啶之二硫鍵連接性不同於由Hunter等人(前述)所推斷之二硫鍵連接性。經直接測定之海帕西啶二硫鍵連接性C1-C8、C2-C4、C3-C6及C5-C7提供緊湊及緊密摺疊的分子。

*方法：*將經純化之海帕西啶(20-30 μg)溶解於0.1 M檸檬酸鹽緩衝液(100 μl)(pH 3.0)或0.1% TFA(100 μl)(pH 2.0)中且以3 μl 0.1 M參-(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽(TCEP)處理。TCEP之最終濃度為3 mM。在37℃下還原8分鐘。將部分還原海帕西啶立即以20 μl 0.5 M NEM處理，接著添加30 μl 1 M Tris緩衝液(pH 7.0)及100 μl 8 M鹽酸胍。溶液之pH值保

持低於6以防止二硫鍵重排。在室溫下進行NEM-烷基化20分鐘。使反應物直接經受使用Vydac C18管柱(2.1×150 mm)之逆相HPLC以純化烷基化肽。將經NEM改良之肽以25% B至50% B之線性梯度經30分鐘在每分鐘0.25 ml之流速下對於溶劑A使用0.1% TFA且對於溶劑B使用90%乙腈-0.1% TFA進行溶離。將NEM-衍生物收集，乾燥且在溶於15 μl 0.2% TFA-50%乙腈中之後由MALDI質譜儀分析。將試樣之一等份裝填至不鏽鋼板或金板上且與基質α-氰基-4羥基肉桂酸(4-HCCA)共結晶。使用裝備有337-nm氮雷射器之Voyager DE-STR飛行時間質譜儀(Perkin-ElmerBiosystems Inc.)獲得MALDI質譜。以線性模式用通常設定為25000 V之加速電壓以及95%之柵極電壓、0.05%之導線及150 ns之提取延遲時間進行量測。藉由使用氧化胰島素B鏈(MH+=3496.96)之標準物進行外部校準實現飛行時間與質量的換算。

對於各種NEM衍生物，選取含有2-NEM-Cys之衍生物來測定優先還原之半胱胺酸且對進一步還原的試樣進行如下序列分析：將2-NEM-衍生物溶解於20 μl 0.05% TEA中且以0.5 μl 2-巰基乙醇在45℃下還原20分鐘。使試樣直接經受肽定序。經NEM-標記之半胱胺酸歸因於異構形式而表現為PTH-Pro與PTH-Met之間的雙重峰。整合兩個峰以便量化NEM-Cys。將含有4至6種海帕西啶之NEM-衍生物之溶離份組合且以蛋白分解方式消化。將乾燥試樣再次於0.1 M Tris緩衝液中復水且以嗜熱菌蛋白酶(1 μg)消化。在

37℃下消化隔夜。使試樣經受使用Vydac C18管柱(2.1×150 mm)之逆相HPLC。將肽以2% B至35% B之線性梯度純化30分鐘且最終以60% B洗滌。將熱分解肽乾燥且於0.2% TFA-50%乙腈(15 μl)中復水。將試樣之一等份(1 μl)裝填於該板上且乾燥。添加上述基質4-HCCA且使其結晶以便進行MALDI質譜分析。將剩餘試樣定序以確定NEM-標記之位點。

串聯質譜分析(FTMS法)：使用在7特斯拉下運作之改良Bruker Q-FTMS獲取所有FTMS(傅立葉轉換質譜分析)資料。該儀器裝備有置於磁場之邊緣場中並距離離子單元之背面收集板約0.3 m之陰極電子長絲。以PEG300/600溶液使用標準Francel方程式外部校準該儀器。各校準物離子之計算質量相對於量測值的誤差低於1.0 ppm。使用前端四極子分離個別離子；在FTMS單元中採用以氬氣作為碰撞氣體之氣體輔助式動態捕獲來捕獲離子。

為進行IRMPD(紅外多光子解離)實驗，在15%-40%之雷射器功率下開啟Synrad CO_2雷射器200 ms。使用直接偵測模式在900 kHz之獲取頻寬下偵測離子且採集512 K數據點。將時域信號零充填一次且使用正弦視窗切趾，隨後進行幅度模式傅立葉轉換。

對於ECD(電子捕獲解離)串聯MS實驗，將電子長絲以1.8 A(V)加熱。相對於捕獲板上之電壓將+0.5 V偏壓施加於長絲上。對於MS3實驗，在IRMPD之後將所關注之子離子以CHEF線性調頻脈衝分離，其中對應於所關注離子之

回旋頻率之RF振幅下有凹陷(notch)。藉由"低能量"ECD使經分離之子離子進一步破碎；在開始電子輻照時將氫氣脈衝於離子單元中。

結果：將海帕西啶以pH值為2之TCEP部分還原，引起僅一個二硫鍵之初級還原(分解)且形成兩個緊密溶離峰，兩者在分子量上相當於2NEM烷基化產物(指定為2a及2b，圖3A)。為測定峰2a及2b中之NEM標記位點，藉由Edman降解法定序經純化之肽。對在位置C5處之PTH-NEM-半胱胺酸的偵測證明此殘基經還原且烷基化。亦發現C7之烷基化，但C8亦似乎經烷基化。序列殘留(一種通常對在所標記殘基後(尤其在較長定序產物中)之殘基賦予假陽性信號之所熟知現象)大概歸因於海帕西啶之高半胱胺酸及脯胺酸含量而為此分析中之明顯障礙(Grant等人，Meth. Emzymol., 289:395-419, 1997；Hunkapiller等人，Methods in protien sequence analysis. Clifton, New Jersey: Humana Press; 1982)。為檢驗第二NEM-標記位點，將經定序試樣於玻璃纖維過濾器上以溴化氰(CNBr)處理且再次定序。該等結果展示C7(而非C8)由NEM明顯烷基化。因此，推斷C5及C7為主要烷基化物質且由此C5-C7鍵在還原之前已存在。在峰2a中C4未經完全標記，其表明不存在存在於內源性人類海帕西啶之主要物質中之C4-C5鍵。

對峰2b進行類似分析。將C2明確確定為第一NEM烷基化位點且偵測出C4與C5具有大量烷基化產物。斷定C5位置處烷基化之存在係由如上所述之殘留現象所引起。由顯示

未發現C2-C5或C4-C5鍵之先前資料消除C2-C5鍵之可能性。該等結果與以下事實一致：若相鄰半胱胺酸C4與C5之間的二硫鍵存在於內源性海帕西啶製備物中，則其將必須以過低而不可偵測之濃度存在。此資料表明C2及C4為主要NEM-烷基化形式，藉此表明C2-C4二硫鍵連接性。

為還原更多二硫鍵，將試樣進一步以pH值為3之3 mM TCEP處理。MALDI質譜分析表明，層析譜中之主峰分別對應於4-、6-及8-NEM烷基化產物(圖3B)。部分還原及烷基化4-及6-NEM產物仍含有完整二硫鍵，而8-NEM產物為完全烷基化形式且由此不適用於分析。為測定殘餘二硫鍵，將該等4-及6-NEM衍生物組合且進一步以嗜熱菌蛋白酶在pH值為6.6下消化(保持低於pH 7以防止二硫鍵重排且因此分離仍含有二硫鍵之片段或由二硫鍵接合在一起之肽)。藉由Edman定序鑑別部分烷基化肽片段。在未經NEM標記之經分離肽片段中所鑑別之半胱胺酸對在烷基化之後仍與二硫鍵形成有關。肽Th-1展示兩個對應於IC(SEQ ID NO: 9之殘基6-7)及GMCCKT(SEQ ID NO: 9之殘基20-25)之序列。展示殘基22(C7)經NEM標記且由此不與連接兩個肽之雙硫橋有關。殘基7及23(C1及C8)皆未經標記，其表明兩個肽之間的鍵為C1-C8。肽Th-2展示單個序列(IFCCGCCHRSKC；SEQ ID NO: 9之殘基8-19)，其中將殘基10、13及14(C2、C4及C5)以NEM修飾且由此不由二硫鍵連接。將殘基11及19(C3及C6)偵測為未經修飾半胱胺酸。因為單體肽經分離，所以消除肽間二硫鍵之可能性且表明

存在C3-C6二硫鍵。該等肽之MALDI分析證明該等標識。

部分還原性烷基化肽產物之FTMS分析亦確認二硫鍵連接性且不對由Ednam降解所發現之殘留現象敏感。

圖6展示根據所有NEM部分烷基化分析所得到之複合二硫鍵連接性標識，其證明在人類尿海帕西啶中，天然二硫鍵連接性為C1-C8、C2-C4、C3-C6及C5-C7。

亦使用評估FTMS二硫鍵連接性。所得譜較為複雜且因為不直接觀測出標準b/y離子系列，所以直接序列標識有困難。其係大概歸因於肽中之四個完整二硫鍵。可基於精確質量量測假定數種標識。舉例而言，觀測到雙倍帶電離子具有698.7794之m/z，相當於1395.5443 Da之中性粒子質量。該精確質量表明此片段含有由單二硫鍵接合之兩個內部肽片段(DTHFPIC，SEQ ID NO: 9之殘基1-7及MCCKT，SEQ ID NO: 9之殘基21-25)。此片段之理論單一同位素質量為1395.5444(0.1 ppm質量一致)。不可假定與此質量一致之其他碎體離子(在不存在內部重排之情況下)超過10 ppm。通常使用低能量碎裂法(諸如IRMPD)並未觀測到內部碎體離子之形成。大概藉由在似乎引起新碎裂過程之完整分子中由四個二硫鍵所誘發之環狀結構而有助於觀測該等內部片段。在二硫鍵完全還原物質之IRMPD譜中未觀測到該等內部片段。

後續低能量ECD MS3實驗顯示m/z為698.7794之雙倍帶電子離子。在此MS3譜中所觀測之主要片段為兩個m/z為831.3585及550.212之單獨帶電離子，其分別對應於兩個內

部片段DTHFPIC(SEQ ID NO: 9之殘基1-7)及MCCKT(SEQ ID NO: 9之殘基21-25)。亦觀測到對應於SH基團喪失之較低強度離子。該等標識暗示該等兩個肽區域在完整結構中由二硫鍵連接；其表明C1與C7或C8連接。

對IRMPD譜中之大多數富於多電荷之離子進行類似MS3實驗。根據精確質量量測，將MS3片段指定為內部肽CHRSK(SEQ ID NO: 9之殘基14-18)及MCC(SEQ ID NO: 9之殘基21-23)，其暗示該等肽在如圖6中所示之完整分子中由二硫鍵連接。

具有二硫鍵連接性之人類海帕西啶之三維結構的所提出模型描述於圖7(右)中。

實例8--人類海帕西啶之NMR二硫鍵及結構分析

亦藉由NMR光譜法測定人類海帕西啶之結構。該等其中於形成二硫鍵之所有半胱胺酸殘基之質子之間直接觀測到NOE(核奧氏效應)的資料揭示如下二硫鍵連接性：與先前所引述之部分烷基化還原結果一致之C7-C23(C1-C8)、C11-C19(C3-C6)、C10-C13(C2-C4)及C14-C22(C5-C7)。該等實驗觀測結果允許確定海帕西啶之三維結構與先前所公開結構(Hunter等人，2002)有顯著差別。由CHO源性重組人類海帕西啶得到之結果顯示在用於該等實驗中之濃度及溫度條件下隨時間之最佳穩定性分布，其對於高品質溶液NMR研究具有重要作用。穩定性指示參數為如由展示於圖2中之NMR 1H線寬所量測之物質聚集百分數及分子於溶液中之單分散性程度。

NMR試樣及實驗：藉由將5% D_2O添加於獲自最後純化步驟之uhHepc水溶液中來製備NMR試樣。為便於NMR結構研究，製備CHO源性rhHepcidin於90% H_2O/10% D_2O及99.999% D_2O(Sigma-Aldrich)中之1 mM溶液。使未經調節之pH值接近3。使用裝備有TXI超低溫探針之Bruker DRX-600儀器在325 K下進行所有實驗。藉由標準2D NMR方法獲得譜標識及大多數NOE限制(參見Wuthrich, John Wiley & Sons, 1986)。根據2D ^{13}C HSQC譜獲得α及β-碳原子之^{13}C化學位移。該等譜標識得以進一步確認且由分析2D 1H-^{13}C HMBC實驗獲得立體特異性標識(參見Hansen, Biochemistry, 30:10457-66, 1991)。根據2D NOESY或雜交TOCSY-NOESY實驗獲得半胱胺酸間NOE(Kessler等人，Angew. Chem. Int. Edn Engl., 27:564, 1988)。根據以高數位分辨率(0.5 Hz)記錄之2D TOCSY實驗獲得$^3J_HN_H\alpha$(三鍵J偶合)。基於鄰近Hα-Hβ及C'-Hβ及兩鍵Cα-Hβ偶合模式獲得所有殘基(除C22以外)之立體特異性質子標識。C22顯示具有排除此殘基之立體特異性標識之簡併化學位移的Hβ質子。藉由在將來自H_2O之CHO源性rhHepc復水於D_2O溶液中之後記錄1D質子譜來追蹤H-D交換。藉由使用激發雕刻脈衝序列獲得水抑制。所有NMR譜之外部參比物為在0.0 ppm下之DSS(2,2-二甲基-2-矽雜戊烷-5-磺酸鈉鹽)。

二硫鍵連接性：藉由同核2D TOCSY與2D NOESY實驗之組合完全標識CHO源性rhHepc之質子譜；依序連接性標識展示於圖4中。藉由化學交換增寬屬於C13及C14之共振

(圖2)且僅在高溫及低pH值下可易於觀測。

將NOESY譜使用NMRPipe處理且使用Sparky軟件套件分析。將二維資料在維數上充零一次且使用貝爾正弦位移平方切趾函數(shifted sine-bell squared apodization function)進行傅立葉變換。基於NOESY峰體積且藉由使用"分離旋轉對近似值"來校準距離限制。根據與Stoke法則相符之在293 K下為~1.5 ns之亞甲基質子與在325 K為~65 ns之亞甲基質子之間的交叉馳豫($\left(\frac{\eta_{325}\times 293}{\eta_{293}\times 325}\approx 2.4\right)$)估算翻滾時間。該等相關時間對應於單分子於水溶液中之翻滾且證明雙旋轉近似值正確。

C7-C23(C1-C8)及C11-C19(C3-C6)二硫鍵之二硫鍵連接性表現為相應Hα質子之間的極強(2.1 Å)NOE相互作用。因為在肽中高度充斥β質子共振，所以通常難以觀測到該等質子之間的直接NOE連接性。然而，在TOCSY-NOESY中繼實驗中，Hβ-Hβ NOE峰呈現遠離對角線且可經明確標識。此實驗中所觀測之C10(Hβ)-C13(Hβ)(C2-C4)及C14(Hβ)-C22(Hβ)(C5-C7)NOE相互作用展示於圖5中。亦在pH值為~7及321 K下所記錄之2D NOESY譜中觀測到相對較強(~2.7 Å)C10(Hβ)-C13(Hβ)(C2-C4)NOE交叉峰，其中Hβ共振經充分分離(~60 Hz)。C14(Hβ)-C22(Hβ)(C5-C7)中繼NOE峰對於在2D NOESY中出現較短混合時間之微弱直接C14(Hα)-C22(Hβ)(C5-C7)相互作用具有較小貢獻。為移除此貢獻，在500 ms NOESY混合時間期間使用Hα共振

之預飽和進行2D TOCSY-NOESY實驗。此實驗展示幾乎相同C14(Hβ)-C22(Hβ)(C5-C7)交叉峰強度，此現象證實其主要由Hb質子(<3 Å)之間的相互作用引起。在不同半胱胺酸殘基對之間未觀測到其他NOE連接性。總而言之，該等結果證明圖6中所揭示之二硫鍵連接性且反駁先前所報導之二硫鍵連接性(Hunter等人，2002)。

海帕西啶之溶液NMR結構：3維結構計算基於質子間NOE限制，ϕ角之三鍵J-偶合常數($^{3}J_{H}{}^{N}{}_{H}{}^{\alpha}$)及對於使用TALOS軟件套件獲自Cα及Cβ化學位移值之Y角的寬鬆角限制。藉由CYANA 2.1(參見Guntert, Meth. Mol. Biol. 278:353-78, 2004)根據擴展幾何學計算結構且允許該等結構基於20,000步扭轉角動力學基模擬退火收斂。在計算後期，在實現收斂之後，基於經確定處於慢交換中之醯胺(獲自^{2}H交換實驗)併入氫鍵限制。此時，接著根據所提出連接性模式添加二硫鍵限制。在圖7中將由20個最低能量結構所計算之海帕西啶平均結構與獲自先前所公開結構集合(Hunter等人，2002，前述)之平均結構進行比較。兩個試驗展示類似β-摺疊組件且顯示β-髮夾環。兩種結構之間的最顯著差異為此環之卷曲，該卷曲在吾等結構中很可能由C2-C4及C5-C7二硫鍵確定。根據彼所報導之結構上之此顯著差異將對與分子結合之抗體表現徹底不同抗原決定基。

實例9--海帕西啶變異體之合成及活性

根據實例4中所描述之一般程序化學合成多種海帕西啶

變異體。合成在N末端處缺少5個胺基酸之海帕西啶變異體，稱為"海帕西啶20"或"hepc20"。亦合成其中所有8個半胱胺酸殘基經2-胺基丁酸置換而因此完全破壞形成二硫鍵之能力之線性海帕西啶變異體。亦合成C1-C8、C3-C6海帕西啶變異體，其中半胱胺酸2、4、5及7經2-胺基丁酸取代以便允許形成僅兩個二硫鍵(C1-C8及C3-C6)。

與所公開結果(Nemeth等人，Blood, 107:328-333, 2006)一致，N-末端截短變異體hepc20具有嚴重減弱生物活性。其中所有8個半胱胺酸殘基經替換之線性海帕西啶變異體亦為失活的。當分子處於完全還原態(亦即無二硫鍵連接性)時，使用含有天然半胱胺酸殘基之海帕西啶亦產生類似結果。然而，此還原物質不穩定且生物活性隨時間恢復。

實例10--針對KLH-接合物質之鼠類抗人類海帕西啶單株抗體的製備

在如下小鼠中產生人類海帕西啶特異性單株抗體(mAb)2.7及2.41。使用標準EDC化學處理使重組性表現及再摺疊人類海帕西啶與載體蛋白KLH結合，隨後投與動物。簡言之，將超過4倍莫耳量之EDC(Pierce)直接添加至含有等量人類海帕西啶及KLH之MES緩衝溶液中。使反應在RT下進行2小時。隨後將人類海帕西啶-KLH結合物乳化於1:1比例之完全傅氏佐劑(Complete Freund's Adjuvant)(Pierce)或RIBI(Sigma)與PBS(Gibco)中。在頸背及後腿處以皮下方式使用50 μg海帕西啶-KLH/乳化佐劑使

BDF1小鼠及C57BL/6免疫。14天後，皮下以及腹膜內輸送25 μg於RIBI佐劑中之人類海帕西啶-KLH以便進行第二次免疫。繼此免疫之後10天，抽血以評估抗人類海帕西啶血清濃度。

繼滴定抽血之後約2週，將1個C57Bl/6小鼠腹膜內補充以75 μg懸浮於PBS中之人類海帕西啶。繼此補充之後5天，將脾臟無菌地移除且處理以便融合。簡言之，將脾臟破壞成單細胞懸浮液且溶解RBC。將SP2/0.AG14骨髓瘤細胞與脾細胞以SP2/0與脾細胞之1:2.5比率混合。隨後使用電融合技術融合此細胞懸浮液。將所得融合瘤塗佈於使用富集生長培養基且藉由2個完全培養基互換來維持之96孔板中。在第二個培養基變化之後3天，根據抗人類海帕西啶特異性IgG經由ELISA篩檢融合瘤。簡言之，將100奈克/孔之Neutravidin(Pierce)塗佈於標準ELISA板上。將該等板洗滌且隨後以於PBS中之1% BSA、1% gt血清、0.5% Tween 20溶液阻斷。隨後將1奈克/孔之生物素標記人類海帕西啶添加至板中且培育1小時。在洗滌之後，將50 μl相關融合瘤上清液自培養板轉移於篩檢板上且將該等者再次培育1小時。在洗滌之後，使用多株山羊抗mu IgG Fc特異性HRP標記Ab偵測鼠類IgG-人類海帕西啶複合物。在適當洗滌之後，使用TMB(Pierce)目測複合物。隨後將藉由此方法所鑑別之陽性純系轉移至48孔板上以便擴增。

實例11--藉由病毒性免疫製備鼠類抗人類海帕西啶單株抗體Ab43

藉由下列病毒性免疫法在小鼠中產生人類海帕西啶特異性單株抗體Ab43。使用ViraPower腺病毒表現系統(產品目錄號K4930-00, Invitrogen, Carlsbad, CA)產生腺病毒表現性人類海帕西啶。帶有人類海帕西啶cDNA(rAd-hHepc)之重組性腺病毒構建如下：簡言之，藉由將人類海帕西啶基因插入pENTR1A(Invitrogen)中來構建pENTR-hHepc。使所得人類海帕西啶基因與attP DNA片段側接以便允許在pAd/CMV/V5-DEST中與attB DNA片段重組。藉由pENTR-hHepc與pAd/CMV V5-DEST使用LR選殖酶之間的重組反應構建PAd/CMV-hHepc。為產生rAd-hHepc，將pAd/CMV-hHepc藉由Pac I線性化且使用Lipofectamine 2000轉染於293T細胞中。將經轉染293T細胞培養直至觀測到約80%細胞病變效應(CPE)。經轉染細胞展示擴大且呈圓形形態，細胞溶解及可見噬菌斑。將含有RAd-hHepc之細胞收集且用於rAd-hHepc之擴增。將RAd-hHepC藉由CsCl梯度法純化且使用Adeno-X快速滴定套組(BD Biosciences, Palo Alto, CA)滴定。

將C57Bl/6小鼠以50 μl 1.25×10^{9}個感染單位(i.f.u)之rAd-hHepc於兩者後腿之四頭肌中得以免疫。在rAd-hHepc免疫之後10天將脾臟無菌地移除且處理以便融合。

實例12--大鼠抗人類海帕西啶單株抗體R9之產生

使用經改良之RIMMS法在大鼠中產生人類海帕西啶特異性單株抗體(mAb)。簡言之，使兩個8-10週齡雌性Lewis大鼠(Charles River Laboratory)各自在11天療程內接受5輪使

用人類海帕西啶-KLH結合蛋白之免疫。在每次免疫之前，將大鼠以氧氣與異氟烷之氣體混合物麻醉。對於在第0天進行第一次免疫，將10 μg抗原於體積為600 μl之傅氏完全佐劑(DIFCO)中乳化，將300 μl該抗原混合物沿大鼠之背部以50微升/部位皮下投與6個與汲皮淋巴結鄰近之部位，其中兩個部位處於頸背且兩個部位在腹股溝及小腿之兩側。將另外300 μl抗原混合物沿腹部投與至6個毗連部位，其中兩個在腋窩、大腿及小腿之兩側。除始終使用RIBI(Corixa CORP, 目錄號R700)佐劑之外，在第3天、第6天、第8天及第11天以類似方式提供加強免疫。

在最後一次免疫之後一天，藉由使用二氧化碳窒息對大鼠施加無痛致死術。將兩側腿彎部、表面腹股溝、腋窩及鰓部淋巴結無菌地分離且使用2×青黴素-鏈黴素-麩醯胺酸(Gibco)BD培養基洗滌兩次。將淋巴細胞自淋巴結中釋放且再次於BD培養基中洗滌單細胞懸浮液，隨後與小鼠骨髓瘤細胞Sp2/0-Ag14(ATCC，CRL-1581)以2.5:1之比率藉由電融合進行融合。簡言之，將細胞洗滌且以1x10^7細胞/毫升再懸浮於2 ml Cytofusion培養基C(Cytopulse Sciences)中且轉移至融合室中。藉由使用具有增強器400之ECM 2001(BTX Inc. San Diego)施加3個1500 V之脈衝30 μs，接著施加60 V之脈衝3秒來進行電融合。將細胞在RT下回收，30分鐘後以3×10^4細胞/孔平緩再懸浮且接種於96孔板中，將該板置於100 μl補充以10% FBS、5% Origen選殖因子(BioVeris™)、1×青黴素-鏈黴素-麩醯胺酸(Gibco)及

1×OPI(草醯乙酸、丙酮酸及胰島素)(Sigma)之BD培養基中。在培養24小時之後，將100 μl 2XHAT(0.1 mM次黃嘌呤、0.16 mM胸苷、4 mM胺基喋呤)(Sigma)添加至各自孔中。5天後更換培養基且在培育1週之後收集改良性培養基以便初步篩檢。將陽性純系擴增，單細胞選殖且由多重檢定確認。

實例13--完全人類抗體之產生

將Xenomouse™ IgG2κλ及IgG4κλ小鼠以KLH-接合之人類海帕西啶(SEQ ID NO: 9)使用標準方法免疫。以針對固定至板上之生物素標記人類海帕西啶之單一濃度篩檢23,040 IgG2上清液及11,520 IgG4上清液。根據此篩檢，使用抗體捕捉ELISA測試617 IgG2及1013 IgG4上清液關於與人類與小鼠生物素標記海帕西啶之結合性，其中所捕捉抗體之量限於使上清液之間的濃度差效應最小化。在抗體濃度範圍內量測溶液相海帕西啶抗體結合性之橋接ELISA中進一步表徵一流試樣(70 IgG2及110 IgG4)。此檢定提供抗體結合性之相對親和力分級。

來自IgG2及IgG4板之每一者之上清液指定如下：1C9(SEQ ID NO: 107-116)、3B3(SEQ ID NO: 117-126)、4E1(SEQ ID NO: 127-136)、7A3(SEQ ID NO: 137-146)、9D12(SEQ ID NO: 147-156)、12B9(SEQ ID NO: 157-166)、15E1(SEQ ID NO: 167-176)、18D8(SEQ ID NO: 310-319)、19C1(SEQ ID NO: 320-329)、19D12(SEQ ID NO: 290-299)、19H6(SEQ ID NO: 300-309)、23F11(SEQ

ID NO: 177-186)及26F11(SEQ ID NO: 187-196)。

由BIAcore測定該等抗體與人類海帕西啶之結合親和力，若如由BIAcore所估算之K_D低於100 pM，則由KinExA確認。引導抗體之K_D為1 pM與大於400 pM之間的範圍內。

藉由競爭ELISA測定與Hepc20(SEQ ID NO: 96)之相對物種交叉反應性及結合性。結果表明與人類海帕西啶相比之相對結合性為：低於食蟹猴海帕西啶(SEQ ID NO: 6)2倍、低於小鼠海帕西啶(SEQ ID NO: 80)500至>1000倍及低於犬海帕西啶(SEQ ID NO: 92)150至>1500倍。

實例14--抗體與人類及小鼠海帕西啶之結合性分析

使用BIAcore進行溶液平衡結合性分析以研究R9、Ab43、2.7及2.41抗體與重組性小鼠海帕西啶(SEQ ID NO: 80)及人類海帕西啶(SEQ ID NO: 9)之相互作用。

*製備BIAcore晶片表面：*根據製造商之用法說明書將蛋白質以10微升/分鐘之運作緩衝液(DPBS：Dulbecco磷酸鹽緩衝液Saline1X, GIBCO 14190，具有0.005% Biacore界面活性劑P-20)流速固定至BIAcore上。首先以100 μL EDC(75 mg/mL於水中之N-乙基-N-(二甲胺-丙基)碳化二亞胺，來自BIAcore)與NHS(11.5 mg/mL於水中之N-羥基琥珀醯亞胺，來自Biacore)之1:1混合物之注射液活化感應器晶片之羧化基質。以30微升/分鐘注射180 μL重組性人類海帕西啶或重組性鼠類海帕西啶(~20 μg/ml於10 mM乙酸鈉(Ph值為4.0)中)以固定於感應器晶片上。以100 μL乙醇胺注射液

(1.0 M，來自Biacore)使感應器晶片之過量反應性基團失活。

於經固定海帕西啶表面上之抗體/海帕西啶相互作用之平衡結合性分析：將固定濃度之抗體以各種濃度之海帕西啶在室溫下培育數小時，隨後穿過經固定海帕西啶表面。在每次試樣注射之後，藉由注射30 μL 10 nM甘胺酸(pH值為1.5)使表面再生。所獲結合信號與在溶液中呈平衡狀態之游離抗體成正比。使用一或雙曲線一位點式同源結合模型(KinExA™軟件，Sapidyne Instruments Inc., Boise ID)由競爭曲線之非線性回歸分析計算平衡解離常數(K_D)。表3概述與重組性小鼠及人類海帕西啶之R9、Ab43、2.7及2.41結合性的結果。

表3

抗體	人類海帕西啶	95% CI	小鼠海帕西啶	95% CI
R9	21 nM	13-28 nM	20 nM	13-27 nM
Ab43	560 pM	400-700 pM	14 nM	12-16 nM
2.7	110 pM	80-150 pM	40 nM	27-44 nM
2.41	50 pM	20-90 pM	30 nM	24-38 nM

實例15--抗人類海帕西啶抗體至重組性犬海帕西啶之結合性

下列實例描述針對重組性犬海帕西啶(rcyno)之各種抗體的KinExA及BIAcore結合性分析。

A)*與rcynoHepc之mAb 2.7及2.41結合性的KinExA溶液平衡結合性分析*。根據製造商之用法說明書將反應性凝膠6×珠粒(Pierce, Rockford, IL)預先塗以rcyno海帕西啶(SEQ ID NO: 6)且以BSA阻斷。將固定濃度之抗體2.7及2.41以各種濃度之rcyno海帕西啶在室溫下培育8小時，隨後穿過塗有

rcyno海帕西啶之珠粒。藉由經螢光(Cy5)標記之山羊抗鼠類IgG(H+L)抗體(Jackson Immuno Research, West Grove, PA)量化與珠粒結合之抗體之量。結合信號與呈平衡狀態之游離抗體之濃度成正比。使用雙曲線一位點式同源結合模型(KinExA™ Pro軟件)根據競爭曲線之非線性回歸獲得平衡離解常數(K_D)。該等結果闡明於表4中。

表4

抗體	K_D(對於rcynohepc)	95% CI
2.7	~16 pM	11~23 pM
2.41	~9 pM	6~14 pM

B)*與rcynoHepc之mAb R9及Ab43結合性的BIAcore溶液平衡結合性分析*。抗體表面固定：將抗體R9及Ab43固定於CM5晶片上。根據製造商之用法說明書以10微升/分鐘之運作緩衝液(DPBS：Dulbecco磷酸鹽緩衝液Saline1X, GIBCO 14190，具有0.005% BIAcore界面活性劑P-20)流速進行固定。首先以100 µl EDC(75 mg/mL於水中之N-乙基-N-(二甲胺-丙基)碳化二亞胺，來自BIAcore)與NHS(11.5 mg/mL於水中之N-羥基琥珀醯亞胺，來自BIAcore)之1:1混合物注射液活化感應器晶片之羧化基質。以30微升/分鐘注射180 µL抗體(~20 µg/ml於10 mM乙酸鈉(pH值為4.0)中)以固定於感應器晶片上。以100 µL乙醇胺注射液(1.0 M，來自BIAcore)使感應器晶片之過量反應性基團失活。

BIAcore分析：將固定濃度之rcynoHepc以各種濃度之mAb R9及Ab43在室溫下培育數小時，隨後穿過經固定抗體表面。所獲結合信號與在溶液中呈平衡狀態之自由

rcynoHepc成正比。使用一曲線一位點式同源結合模型(KinExA™軟件，Sapidyne Instruments Inc., Boise ID)由競爭曲線之非線性回歸分析計算平衡解離常數(K_D)。R9與Ab43顯示對rcyno海帕西啶之顯著結合親和力。該等結果闡明於表5中。

表5

抗體	K_D(對於rcynohepc)	95% CI
R9	~10 nM	9~12 nM
43	~100 pM	60~160 pM

實例16--在酶聯免疫吸附檢定(ELISA)中表徵海帕西啶特異性單株抗體結合活性

將96孔E.I.A./R.I.A.平底板(Costar 359)使用於0.1 M乙酸鈉(pH值為5.5)中之經生物素結合重組性人類海帕西啶或經生物素結合鼠類海帕西啶以100至1000 ng/ml在4℃下塗佈隔夜。將該等板以含有2% BSA及0.2%山羊血清(GIBCO)之PBS在室溫下阻斷1小時。在洗滌該等板之後，將50 μl融合瘤改良性培養基添加至各孔中且於震盪器上在RT下培育2小時。將該等板以洗滌液(0.05%於PBS中之Tween-20)洗滌3次且以50微升/孔之辣根過氧化物酶結合性山羊抗大鼠IgG(Chemicon)在RT下培育30分鐘。在洗滌該等板3次之後，添加50微升/孔之TMB受質(KPL)且使其在RT下培育5-10分鐘。經由添加50 μl 0.5 N H_2SO_4停止反應且於微定量盤式讀取器中在450 nm下讀取該板。將經免疫大鼠之抗血清用作陽性對照抗體且將僅培養基用作本底對照。

鑑別大鼠單株抗體R9對人類與鼠類海帕西啶具有特異

性。經由細胞分選儀(Becton Dickinson, FACSDiva)以每孔1個細胞分選融合瘤細胞株以便次選殖。

實例17--抗海帕西啶抗體識別不同結構抗原決定基

藉由評估抗體在與不同海帕西啶變異體形成前複合物之後結合成熟人類海帕西啶(SEQ ID NO: 9)之能力來評價抗人類海帕西啶抗體之抗原決定基特異性。

根據製造商之用法說明書將重組性海帕西啶以10微升/分鐘之運作緩衝液(DPBS：Dulbecco磷酸鹽緩衝液Saline1X, GIBCO 14190，具有0.005% BIAcore界面活性劑P-20)流速固定至CM5晶片上。首先以100 μL EDC(75 mg/mL於水中之N-乙基-N-(二甲胺-丙基)碳化二亞胺，來自BIAcore)與NHS(11.5 mg/mL於水中之N-羥基琥珀醯亞胺，來自BIAcore)之1:1混合物之注射液活化感應器晶片之羧化基質。以30微升/分鐘注射180 μL rhHepc(~20 μg/ml於10 mM乙酸鈉(pH值為4.0)中)以固定於感應器晶片上。以100 μL乙醇胺注射液(1.0 M，來自BIAcore)使感應器晶片之過量反應性基團失活。

用於前複合物之海帕西啶形式為：作為陽性對照之正確摺疊海帕西啶，C1-C8、C3-C6海帕西啶變異體(參見實例9)、海帕西啶20(N-末端截短形式，參見實例9)及線性海帕西啶(實例9)。將1 nM抗體溶液(2.41、2.7、43及R9)以10 nM各抗原在室溫下預培育數小時，隨後穿過經固定海帕西啶表面。所獲結合信號與在溶液中呈平衡狀態之游離抗體之濃度成正比。該等結果闡明於表6中。

表 6

	與海帕西啶表面之結合性				
抗體	無競爭	摺疊海帕西啶	C1-C8 C3-C6	Hepc20	線性海帕西啶
R9	100%	79%	63%	88%	100%
Ab43	100%	11%	25%	100%	100%
2.7	100%	2%	3%	3%	100%
2.41	100%	0%	1%	1%	99%

表 7 中闡明對表 6 中之資料的解釋以提供不同抗海帕西啶抗體結合不同抗原決定基之能力的表述。

表 7

	與溶液抗原決定基之結合性			
抗體	摺疊海帕西啶	C1-C8 C3-C6	Hepc20	線性海帕西啶
R9	+	+	+	-
Ab43	++++	+++	-	-
2.7	++++	++++	+++	-
2.41	++++	++++	+++	-

結合性範圍介於++++(對海帕西啶表面之0%抗體結合性且因此受溶液中之海帕西啶100%抑制)至(對海帕西啶表面之100%抗體結合性且因此不受溶液中之海帕西啶抑制)。該等資料指示就抗原性而言所有抗體需要摺疊肽。某些抗體在分子之N-末端處需要5個胺基酸(例如Ab43及在更小程度上為R9)。對於某些抗體(例如R9)，消除C2-C4及C5-C7二硫鍵極大降低海帕西啶分子之抗體識別作用。

實例18--在鐵反應性β-內醯胺酶檢定中可由抗海帕西啶抗體中和活體外海帕西啶活性

海帕西啶使膜鐵轉運蛋白內化且自細胞表面中移除，藉此抑制鐵釋放且提昇細胞內鐵濃度。活體外評價抗人類海帕西啶抗體對此海帕西啶所介導之鐵螯合的效

應。構建含有多西環素(doxycycline)誘導性膜鐵轉運蛋白(Fpn)表現構築體以及含有來自具有下列調節mRNA轉譯之核苷酸序列之鐵蛋白之5'鐵反應元(IRE)之一複本之β-內醯胺酶(BLA)表現構築體的293細胞株：(tcggccccgcctcctgccaccgcagattggccgctagccctccccgagcgccctgcctccgagggccggcgcaccataaaagaagccgccctagccacgtcccctcgcagttcggcggtcccgcgggtctgtctcttgcttcaacagtgtttggacggaacagatccgggactctcttccagcctccgaccgccctccgatttcctctccgcttgcaacctccggggaccatcttctcggccatctcctgcttctgggacctgccagcaccgtttttgtggttagctccttcttgccaacc)(SEQ ID NO: 103)。將該等采自70-80%長滿培養物之293/Fpn/BLA細胞以2.8×10^{5}細胞/毫升塗佈於含有5% FBS(Invitrogen目錄號10099-141)及PSQ(Invitrogen目錄號10378-016)之DMEM(Invitrogen目錄號11965)中，接著以90微升/孔(25,000細胞/孔)塗佈於BioCoat聚D離胺酸塗佈板(Becton-Dickinson目錄號35-6640)中且在37℃下以5% CO_2培育。在同一天結束時，製得具有100 μg/mL多西環素之檢定培養基溶液(DMEM 5% FBS PSQ)，將其以10微升/孔添加至該板中且將該板培育隔夜或培育至少20小時。次日，將培養基自孔中移除且置換為DMEM 5% FBS PSQ、2.5 μg/mL檸檬酸鐵、50 ng/mL合成人類海帕西啶及抗體連續稀釋液(2.7、2.41及Ab43，其如以下實例8及9中所述般產生)之預製得混合物，將所有物質製備於96孔聚丙烯深孔阻斷板中，隨後立即添加至檢定板上。將混合物以100微升/孔添加且在37℃及5% CO_2下於細胞培養恆溫箱中培

育隔夜。隨後將板自恆溫箱中移出且平衡至室溫10分鐘，隨後以20微升/孔添加經製備之Invitrogen GeneBlazer CCF4 A/M顯影試劑(Invitrogen Kit# K1085)且在黑暗中培育90分鐘。亦將顯影試劑添加至含有100 μL檢定培養基(DMEM 5% FBS PSQ)之不具有細胞之對照檢定板之16孔中且培育相同時間。隨後使用Envision Multilabel讀取器(Perkin-Elmer Inc.)藉由在409 nm下激發且在447 nm(藍色)及520 nm(綠色)下讀取發射光來讀取藍色及綠色螢光信號。該等結果描述於圖8-10中。確定mAB 43、2.7及2.41分別在1.380×10^{-8}、1.700×10^{-8}及1.636 10^{-8}之EC_{50}下降低細胞內鐵濃度。

實例19--抗海帕西啶抗體中和小鼠中之人類海帕西啶

在以足以產生低鐵反應之量投與人類海帕西啶之小鼠中活體內評價抗人類海帕西啶抗體之活性。在第0天時，使用抗人類海帕西啶之鼠類單株抗體(Ab2.7)對雌性C57BL/6小鼠進行皮下注射。對照小鼠接受鼠類IgG1作為同型對照。在第3天時，使小鼠接受25 μg大腸桿菌源性重組人類海帕西啶(rhHepc)之單次腹膜內注射。兩個小時後分析血清鐵含量。以生理食鹽水處理之對照動物具有正常血清鐵含量，而以海帕西啶及同型對照抗體處理之動物展示血鐵過少症。結果闡明於圖11中。1 mg與0.5 mg mAb2.7提供統計上顯著預防作用而免於低鐵反應。儘管在0.25 mg劑量之Ab 2.7下觀測到血鐵過少症減少，但將較低劑量(0.25及0.1 mg)定義為非中和劑量。統計表表示具有將所有組與

生理食鹽水對照進行比較之Dunnett事後檢驗的ANOVA。

實例20--經AAV運載之海帕西啶之抗體中和作用使正常早期紅血球特徵恢復

在小鼠中AAV所介導之人類海帕西啶表現產生與鐵喪失一致之低色性小紅血球性貧血。在該等過度表現人類海帕西啶之小鼠中活體內評價抗人類海帕西啶抗體之活性。給雄性C57Bl/6小鼠注射含有人類海帕西啶或β-半乳糖苷酶(β-gal)之表現卡匣之AAV(1.5×10^{12}顆粒/小鼠，靜脈內)以便作為陰性對照。將小鼠保持兩週以便組成性產生huHepc，隨後使用1毫克/小鼠之Ab 2.7或同型對照(muIgG1)以如圖12A中所示之各種投與頻次(每週1次、兩次及4次)進行處理。在第五天抽血以便測定血清鐵含量及早期紅血球(網狀血球)特徵(網狀血球計數、網狀血球血紅素含量(CHr)及網狀血球平均細胞容積(Retic. MCV))。

結果闡明於圖12B-12E中。在接收4次投與Ab2.7之小鼠中血清鐵含量恢復至正常，但對於同型對照確未恢復。所有接收Ab2.7之小鼠展示網狀血球產生提高。在給予4次及2次投與Ab 2.7之小鼠中網狀血球血紅素含量(CHr)為正常，但仍在使用1次投與之組或同型對照組中發現低色性。以4次及2次投與Ab2.7進行處理使網狀血球(Retic. MCV)恢復至正常體積，但小紅血球症仍存在於1次投與組及同型對照組中。與使用同型對照處理之注射有β-gal之動物進行統計比較以確定尋找正常紅血球特徵恢復(具有Dunnett事後檢驗之ANOVA)。

實例21--病毒性海帕西啶過度表現引起對紅血球生成素之低反應性

下列實例研究海帕西啶及海帕西啶活性拮抗劑對紅血球生成素低反應性小鼠之作用。

如圖13B中所示，在小鼠中AAV所介導之人類海帕西啶表現之滴定導致血清海帕西啶含量及劑量依賴性血鐵過少症提高。選擇AAV-人類海帕西啶之劑量以便提供紅血球生成素抵抗表型且於與在先前研究中在癌症患者試樣中所偵測之類似範圍內表現海帕西啶含量(如共同申請中並共同擁有之美國專利申請案第11/880,313號及國際專利申請案第PCT/US2007/016477號中所述，其揭示內容以引用方式全部併入本文中)。給雄性C57BL/6小鼠注射表現人類海帕西啶或GFP之AAV作為表現對照(每組n=4)。經由尾部靜脈給小鼠注射(人類海帕西啶，1×10^{12}至3×10^{12}顆粒/小鼠；GFP，3×10^{12}顆粒/小鼠)。使蛋白質表現以便發育兩週，隨後收集。在兩週時，自小鼠中收集血清且測定鐵及海帕西啶含量。結果報導於圖13B中。

為評價海帕西啶對紅血球生成素抵抗之效應，給雄性C57BL/6小鼠注射含有人類海帕西啶或GFP之表現卡匣之AAV(3×10^{12}顆粒/小鼠，肝門靜脈輸送)以便作為陰性對照(每組n=5)。將小鼠保持3週以便組成性產生人類海帕西啶，且隨後抽血以測定基線血紅素(Hb)含量。在第4週時將小鼠以達貝泊汀α(100微克/公斤/小鼠)或生理食鹽水處理作為陰性對照。在第5週時，再次量測血紅素含量。結

果展示於圖13A中。過度表現人類海帕西啶之小鼠對高劑量之達貝泊汀α具有抗性。對達貝泊汀α之抗性顯示高海帕西啶含量足以引起對紅血球生成素之低反應性。

實例22--在病毒性海帕西啶過度表現模型中使用海帕西啶活性拮抗劑與紅血球生成刺激劑之組合療法

以抗海帕西啶抗體處理具有紅血球生成素抵抗表型之小鼠使對使用達貝泊汀α進行處理之反應性恢復。給雄性C57BL/6小鼠注射含有編碼人類海帕西啶或GFP之基因之AAV(5×10^{12}顆粒/小鼠，靜脈內)以便作為表現對照(每組n=5)。在保持兩週以形成組成性蛋白表現之後，給小鼠抽血以測定基線血紅素(Hb)含量，隨後使用Ab 2.7(1毫克/小鼠)或同型對照以各種投與頻次處理。在第一次投藥次日，將該等鼠以達貝泊汀α(100 μg/kg，皮下)處理。投藥時程之示意圖發表於圖15A中。

海帕西啶之中和作用使對達貝泊汀α之反應性恢復。週一-週三-週五投與抗體導致如由Hb含量之增量所量測之對達貝泊汀α處理的部分反應；使用相同抗體投與但不進行達貝泊汀α處理之組未展示Hb含量升高。(參見圖15B)在每日(週一至週五)接收Ab 2.7投與之小鼠中獲得對達貝泊汀α之最大反應。(參見圖15C)。如由Hb含量所量測，兩份及三份劑量抗體與達貝泊汀α處理組合導致部分反應。(參見圖15D)。如圖15E中所示，對達貝泊汀α處理之抗體劑量及近似抗體劑量影響對抗海帕西啶抗體處理之整個Hb反應(結果不同於對照，其中使用Dunnett事後檢驗之ANOVA之

$p<0.01$以雙星號註釋)。因此，海帕西啶之抗體所介導之中和作用展示對於由海帕西啶含量升高所引起之貧血症的有效治療。

實例23--鼠類海帕西啶1之siRNA之設計及合成

*鼠類海帕西啶1 siRNA活體外篩檢：*將CHO-mHepcidin穩定細胞(Helen Kim)以30,000細胞/孔接種於96孔板中。第二天，藉由移除培養基且添加100 μl轉染複合物來轉染細胞。如下製造轉染複合物：將1 μl 100 μM siRNA添加至於管A中之125 μl Opti-MEM(Invitrogen #31985)中。在管B中，將15 μl TransIT-TKO轉染試劑(Mirus #MIR-2154)添加至125 μl Opti-MEM中。將兩個管在室溫下培育12分鐘。將兩管之內容物混合且在室溫下培育15分鐘，隨後添加至該等細胞中。在18小時後轉染後，移除培養基且使用100 μl 1×QuantiGene溶胞混合物(Panomics # QG 0502)溶解細胞。使用分支DNA檢定(QuantiGene檢定套組，Panomics # QG0003)分析溶解產物之mHepcidin及mCyclophilin A mRNA含量。參見表8關於CHO-mHepcidin細胞中之siRNA序列及mRNA敲除%。

*siRNA #6及#10轉換至pENTR-U6-shRNA表現構築體：*藉由2階段重疊PCR產生pENTR-U6-shRNA表現構築體。步驟1經由5'-PCR反應及3'-PCR反應產生2個重疊序列。5'-PCR反應產生含有attB1重組位點、hU6啟動子、siRNA有義序列、環及siRNA反義序列之序列。總體積為10 μl之反應如下：1×PCR Supermix(Invitrogen #10572-014)、1 μM attB-

111-U6正向引子(5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTTAGATCTGAATTCAATTTACGCGTGGGATCCAAG GTC-3'，SEQ ID NO: 105)、0.1 μM REV-U6-shRNA引子(對於#6：5'-CTTTTCTCATGAAAAAGGCTGCAGCT CTGTAGCGGTGTTTCGTCC-3'(SEQ ID NO: 63)及#10：5'-TACATCTCATGAATGTAGTCTGTC TCATCTGTCGGTGTTTCGTCC-3'(SEQ ID NO: 67)具有唯一性)及0.5 ng(1 μl)pSuppressor模板質體(IMGENEX #IMG-700)。3'-PCR反應產生含有shRNA有義、環及反義序列、PolIII終止子及attB2重組位點之序列。總體積為10 μl之反應如下：1×PCR Supermix(Invitrogen #10572-014)、1 μM AttB-202反向引子(GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTAAAAA，SEQ ID NO: 106)、0.1 μM FW-U6-shRNA引子(對於#6：5'-CTTTT TCATGAGAAAAGGCTGCAGCTCTGTAGCTTTTTACCCAGC-3'(SEQ ID NO: 63)及#10：5'-TACATTCATGAGATGTAGT CTGTCTCATCTGTCTTTTTACCCAGC-3'(SEQ ID NO: 67)具有唯一性)。兩個反應之PCR條件如下：3分鐘95℃循環1次、95℃ 45 s、52℃ 45 s、72℃ 45 s循環30次及5分鐘72℃循環1次。PCR之步驟2組合來自步驟1之5'及3'PCR產物用於退火/填充反應以產生全長序列：attB1-hU6啟動子-有義-環-反義-終止子-attB2。總體積為20 μl之反應如下：將來自步驟1之PCR產物：5'及3'PCR反應液混合且在熱循環器中使用下列條件運作：95℃ 2分鐘、52℃ 2分鐘、72℃ 2分鐘(循環5次)加72℃ 10分鐘。

藉由如下將Gateway BP重組於pDONR221中以產生pENTR構築體來重組PCR產物：將7.5 ng(1 μl) pDONR221(Invitrogen #12536-017)、1 μl 5×BP反應緩衝液(Invitrogen #52891)、1 μl BP選殖酶(Invitrogen #11789-013)及 2.5 μl重疊PCR產物混合在一起且在室溫下培育2小時。隨後添加1 μl蛋白酶K(Invitrogen #52895)且在37℃下培育10分鐘。將整個6 μl重組反應液轉移至One Shot Top10化學感受態細胞(Invitrogen #C4040-03)中且塗佈於LB-卡那黴素(LB-kanamycin)板上。選擇且擴增菌落。藉由使用M13FW及M13REV定序引子對U6-shRNA區域進行DNA定序來確認質體DNA。

表8

siRNA編號	siRNA序列(有義，5'-3')	在CHO-mHepcidin細胞中藉由siRNA之mRNA敲除%	在HEK293細胞中藉由AAV-shRNA之mRNA敲除%	SEQ ID NO:
1	UGU AAA UGC UGU AAC AAU U	95		58
2	GCU GUA AAU GCU GUA ACA A	95		59
3	GUG UGG UAU CUG UUG CAA A	96		60
4	GCA GAC AUU GCG AUA CCA A	90		61
5	AUA CCA AUG CAG AAG AGA A	94		62
6	CUA CAG AGC UGC AGC CUU U	95	69	63
7	GAA GAG AGA CAC CAA CUU C	88		64
8	ACU UCC CCA UCU GCA UCU U	27		65
9	CUG AGC AGC ACC ACC UAU C	86		66
10	ACA GAU GAG ACA GAC UAC A	96	81	67

11	CAA UGC AGA AGA GAA GGA A	86		68
12	AAU UCC CAG UGU GGU AUC U	65		69

實例24--在炎性貧血症之小鼠模型中使用海帕西啶表現抑制劑與紅血球生成刺激劑之組合療法

在如下之鼠類炎性貧血症模型中評價使用海帕西啶表現抑制劑與紅血球生成刺激劑之組合療法。

產生鼠類海帕西啶抑制之聚核苷酸海帕西啶表現抑制劑製備如下。在如實例23中所述之AAV表現系統中將經證明具有針對海帕西啶之活體外特異活性的siRNA(siRNA 6 CUACAGAGCUGCAGCCUUU(SEQ ID NO: 70)；siRNA 10 ACAGAUGAGACAGACUACA(SEQ ID NO: 71))轉化成shRNA。

給小鼠以門靜脈方式注射含有陰性對照shRNA(抗螢光素酶，2×10^{12}顆粒/小鼠)或特異性抗海帕西啶shRNA(shRNA 6，5×10^{11}顆粒/小鼠=低劑量；2×10^{12}顆粒/小鼠=培養基劑量；及shRNA10，2×10^{12}顆粒/小鼠=高劑量)之AAV病毒。在該等小鼠中藉由以流產布氏桿菌(Brucella abortus)(BA)(5×10^{8}顆粒/小鼠，提供7天，隨後採集)處理來誘發發炎。亦評價無發炎誘發及無shRNA處理之對照小鼠以測定未經處理動物中之平均海帕西啶含量。

使用MALDI-TOF質譜分析測定小鼠海帕西啶含量。使用MSIA-tips(具有經固定之抗小鼠海帕西啶抗體R9之親和性移液管)自小鼠血清中提取海帕西啶。將經提取之海帕西啶溶離於MALDI靶標上以供飛行時間質譜檢測。將人類

海帕西啶用作定量之內標物。

在注射shRNA之後25天測定血清海帕西啶及血清血紅素含量。以抗海帕西啶shRNA處理之小鼠展示海帕西啶含量對非發炎性水準之抑制。參見圖14A。海帕西啶mRNA含量與彼等血清海帕西啶之含量一致。

給平行組中之小鼠注射如上所述之病毒(陰性對照或海帕西啶特異性shRNA)且18天後以流產布氏桿菌處理以誘發炎性貧血症。在第19天時，給動物注射100 μg/kg Aranesp以刺激促紅血球形成性反應且一週以後(如上所述之同一採集時點)測定血紅素(Hb)含量。圖14B展示不進行發炎性處理之對照動物通常對Aranesp響應並伴有Hb升高3-4 g/dL，而以BA處理之動物對Aranesp反應遲鈍。與此相反，進行BA處理並接受海帕西啶表現抑制劑之小鼠展示對Aranesp響應。因此，以海帕西啶表現抑制劑進行處理以抑制海帕西啶至前發炎性水準並與Aranesp處理組合產生正常血紅蛋白含量。參見圖14B。該等結果展示以海帕西啶表現抑制劑進行處理恢復對Aranesp之反應性。

實例25--在炎性貧血症之小鼠模型中使用抗海帕西啶抗體與紅血球生成刺激劑之組合療法

在如下之鼠類炎性貧血症模型中亦評價使用海帕西啶活性拮抗劑與紅血球生成刺激劑之組合療法。

產生小鼠使得鼠類海帕西啶1經敲除且置換為人類海帕西啶。在第0天給雌性小鼠(人類海帕西啶表現與野生型同窩仔對照之純合子)注射流產布氏桿菌(2×10^8顆粒/小鼠，

腹膜內)且隨後在第6天抽血以評估血紅素含量。隨後在第6天至第9天以抗體2.7或同型對照抗體(1毫克/小鼠/天)處理小鼠。在第7天投與達貝泊汀α(100微克/公斤/小鼠)且在第13天評價Hb含量。此方案之示意圖展示於圖16A中。

仍具有小鼠海帕西啶1基因之野生型對照小鼠在存在或不存在Ab 2.7之情況下並不響應達貝泊汀α。(參見圖16B)。如由維持穩定血紅素含量所示，以抗體2.7處理之人類敲入型小鼠顯示對達貝泊汀α處理之反應性恢復。(參見圖16C)。

該等結果證明海帕西啶活性拮抗劑可用於在海帕西啶過量之條件下中和海帕西啶且在海帕西啶所介導之貧血症(諸如炎性貧血症)中恢復對紅血球生成試劑之反應性。

實例26--量測患者中之海帕西啶含量

如先前在同在申請中並共同擁有之美國專利申請案第11/880,313號及國際專利申請案第PCT/US2007/016477號中所述般量測人類患者中之海帕西啶含量，該等文獻之揭示內容以引用方式全部併入本文中。以下再現該方法。

自患有癌性貧血症之患者(獲自ProteoGenex)或志願者(對照)採集試樣。藉由SPE使用Oasis HLB mElution 96孔板(Waters, Milford, MA)提取100 μL各試樣、血清空白及由7個非零濃度(10、25、50、100、250、500、1000 ng/mL)組成之一式兩份校準標準物。洗滌溶劑為30%甲醇/水，且以氫氧化銨調節pH值為約10。溶離溶劑為90%甲醇/水溶液，且以乙酸調節pH值為約5。將SPE板以500 μL甲

醇活化且以500 μL水調節，隨後將100 μL血清試樣及200 μL內標物裝填於溶離板上，以350 μL水及350 μL洗滌溶劑洗滌。使用100 μL溶離溶劑進行溶離且以100 μL水稀釋。藉由LC-MS/MS分析所得200 μL溶離液。

將20 μl各提取試樣注入Polaris C18A，5 μm HPLC管柱(2.1×50 mm，Varian)中。LC流速設定為300微升/分鐘。HPLC移動相A為5:95甲醇/水且移動相B為95:5甲醇/水，兩者皆含有0.1%甲酸。梯度條件設定如下：0-0.1分鐘，等度2% B/98% A；0.1-4.5分鐘，2% B至95% B；4.5-4.9分鐘，95% B；4.9-5.0分鐘，95% B至2% B；5.0-6.0分鐘，等度2% B。

將來自Applied Biosystems(Foster City, CA)之具有Turbo ESI源之Sciex API4000三重四極質譜儀以離子躍遷為*m/z* 930.60至*m/z* 110.15之MRM模式用於海帕西啶偵測。藉由將海帕西啶及內標物之LC峰面積之比率與獲自一系列標準物之比率進行比較來實現量化，其中已知海帕西啶及內標物之量。

此實驗允許測定假定含有大量健康個體之對照群體中之海帕西啶的血清含量以及罹患癌性貧血症(AoC)之患者之海帕西啶的血清含量。該等結果展示於圖18中。

隨後分析各患者試樣之其他鐵指標濃度以確定患者是否患有發炎或缺鐵性貧血症(圖19)。該等參數量測如下：於Olympus AU400臨床實驗室分析儀上使用標準程序量測血清鐵、UIBC、鐵蛋白及CRP；使用標準ELISA方法(R & D

系統)量測sTfR。

實例27--市售DRG原海帕西啶ELISA並不偵測成熟海帕西啶

下列實例證明市售原海帕西啶ELISA套組(DRG Intl. Inc., Germany)不能夠偵測試樣中之成熟海帕西啶。

產生多種合成及重組海帕西啶製備物(包括合成產生之海帕西啶(如實例3中所述)、重組產生之海帕西啶(如實例2中所述)及自尿中分離之海帕西啶(如實例1中所述))以便評價與重組性原海帕西啶相比各海帕西啶製備物之反應性。海帕西啶試樣之每一者顯示活體外及活體內生物活性。市售原海帕西啶ELISA套組(DRG Intl. Inc., Germany)偵測重組性原海帕西啶(圖20A)，但不偵測多種成熟海帕西啶製備物(圖20B)。亦使用DRG原海帕西啶ELISA套組測試其他形式之海帕西啶，包括shHepc(合成產生之摺疊人類海帕西啶)、rhHepc(以前肽形式重組性表現於大腸桿菌中隨後摺疊且分解之物質)、shHepc20(在N-末端處缺少5個胺基酸之海帕西啶變異體)、shHepc ABU(由5-胺基丁酸(ABU)取代半胱胺酸殘基以消除二硫鍵形成之海帕西啶線性型式)、尿海帕西啶(自敗血病患者尿中純化)及C1-C8、C3-C6海帕西啶(歸因於在C2、C4、C5及C7處之ABU取代而缺少兩個二硫鍵連接之分子形式)。與根據成熟海帕西啶所觀測之結果類似，該等形式之海帕西啶不受DRG原海帕西啶ELISA偵測。

以上資料證實市售DRG原海帕西啶ELISA套組不能偵測

成熟海帕西啶。

實例28--在癌性貧血症(AoC)患者中海帕西啶(但非DRG原海帕西啶)與發炎相關聯

已嘗試使用DRG原海帕西啶ELISA套組來使海帕西啶與發炎性病況相關聯。(參見例如Hsu等人，Blood Purification, 24:311-16, 2006；Kemna等人，Blood, 106:1864-66, 2005；Ouz等人，Anadolu Kardiyoloji Dergisi, 6:239-42, 2006；Taes等人，Clinical Chemistry & Laboratory Medicine, 42:387-89, 2004；Theurl等人，Blood, 107:4142-48, 2006)。然而，此實例顯示使用DRG原海帕西啶ELISA套組所量測之原海帕西啶含量並不與患者之成熟海帕西啶含量相關聯，原海帕西啶含量亦不與患者之發炎性病況相關聯。

為可靠評估原海帕西啶濃度，在一系列不同緩衝液或血清中在25℃下培育60分鐘之後量測原海帕西啶標準物。藉由夾心免疫檢定使用用於捕捉之Ab2.7(Ab2.7偵測成熟海帕西啶中之抗原決定基)及用於偵測之生物素標記兔抗原海帕西啶多株抗體(其偵測前區段中之抗原決定基)來測定原海帕西啶濃度。展示於圖21中之結果證明在血清中原海帕西啶係不可偵測的，此表明其迅速發生降解。

西方墨點法實驗確認除非添加弗林抑制劑，否則原海帕西啶在血清中發生降解(圖22)。將原海帕西啶(2 mg)在37℃下培育12小時或立即添加，隨後在存在或不存在弗林抑制劑之情況下使僅培養基或含有10%胎牛血清之培養基

跑凝膠。將未還原試樣使用NuPage 4-12% Bis-Tris凝膠分離，點墨於硝化纖維素膜上且使用兔抗海帕西啶多株抗血清、接著抗兔HRP-接合之第二抗體偵測。

假定在血清中原海帕西啶具有不穩定性質，在患者試樣中使用DRG原海帕西啶ELISA套組所偵測之原海帕西啶含量升高可能反映原海帕西啶或另一蛋白質之N-末端部分分解。為確定血清原海帕西啶含量是否與血清海帕西啶含量相關，在對照供體及癌性貧血症(AoC)患者之血清中量測海帕西啶及原海帕西啶含量。使用同在申請中並共同擁有之美國專利申請案第11/880,313號及國際專利申請案第PCT/US2007/016477號中所述之基於質譜分析之定量方法測定海帕西啶濃度，該等申請案之揭示內容以引用方式全部併入本文中。在AoC患者(r=0.1014；NS)或對照供體(r=-0.1128；NS)中於由基於質譜分析之定量方法所量測之海帕西啶含量與由DRG原海帕西啶ELISA套組所量測之原海帕西啶含量之間未發現顯著相關性。(圖19)。因此，如由DRG原海帕西啶ELISA套組所量測之原海帕西啶含量升高不能用作海帕西啶含量之替代者。

為確定在患有發炎之患者中如由DRG原海帕西啶ELISA套組所量測之海帕西啶或原海帕西啶含量是否升高，將兩個指標與患者血清中之C-反應性蛋白(CRP)含量相比。CRP為發炎之公認標記。在癌性貧血症患者中觀測到CRP與海帕西啶含量之間的強相關性(圖24A)，但在該等患者中未觀測到CRP與DRG原海帕西啶之間的相關性(圖24B)。

正常供體展示CRP與海帕西啶或DRG原海帕西啶之間無顯著相關性，但在該等供體中CRP含量並未顯著升高，從而使相關性難以偵測。海帕西啶(但非原海帕西啶)展示在癌性貧血症患者中與CRP之相關性且因此可用作發炎之標記。

因為大多數常用實驗室參數受急性期反應影響，所以使區分炎性貧血症(AI)與缺鐵性貧血症(IDA)及混合性貧血症(AI與IDA之要素)複雜化。使用可溶性轉鐵蛋白受體(sTfR)及鐵蛋白(Ft)值之比已於文獻中描述為一種用以提供較為精確之診斷的方法。參見Punnonen等人，Blood, 89:1052-57, 1997。炎性貧血症特徵在於低sTfR/log Ft商(值低於1)，而高比值預示IDA。因此，sTfR/log Ft比值當與發炎性標記組合以輔助診斷混合性貧血症與純IDA時可充當三種病狀之精確預測值。

測試如由DRG原海帕西啶ELISA套組所量測之海帕西啶與原海帕西啶的輔助此診斷之能力。在AI中如由sTfR/log Ft所測定之海帕西啶含量升高。在AoC患者中海帕西啶含量與sTfR/log Ft值強烈有關(r=-0.6407；P<0.0001)。因此，在AoC患者中海帕西啶含量與sTfR/log Ft值強烈相關，此展示清楚相關性且輔助患者診斷(圖25A)。對於DRG原海帕西啶，未發現該相關性(圖25B)。

使用組合作為發炎之標記之CRP及sTfR/log Ft的決策樹，可將癌性貧血症患者再分成彼等患有AI、混合性貧血症、IDA及未知病因貧血症(稱為"其他類型")之患者(圖

17A)。觀測到具有高海帕西啶含量之患者全部患有AI或混合性貧血症。(圖26)。觀測到具有低或無海帕西啶含量之患者患有IDA或未知病因貧血症。如同在申請中並共同擁有之美國專利申請案第11/880,313號及國際專利申請案第PCT/US2007/016477號中所描述且以上詳細論述之基於質譜分析之定量方法所量測的海帕西啶含量可用於診斷炎性貧血症，該等文獻之揭示內容以引用方式全部併入本文中。

實例29--海帕西啶之夾心ELISA中之多株抗體

因為多株抗體表示針對免疫原之不同抗體之複雜混合物，所以其表示一種偵測存在於蛋白質中之所有可能之抗原決定基的方法。為確定針對海帕西啶之單株抗體夾心ELISA為可能的，使用針對KLH-接合之成熟人類海帕西啶之多株抗體進行初步實驗。

將來自多株兔抗血清之IgG塗佈於微量滴定盤上，將成熟海帕西啶稀釋且添加至該板上且使用來自相同來源之生物素標記IgG偵測經結合海帕西啶。所有抗體以10 μg/ml之濃度使用。如圖27所示，此實驗能夠偵測經結合海帕西啶，其表明其可能量測呈夾心格式之海帕西啶。然而此檢定之敏感度較低，其表明兩種抗體同時結合海帕西啶之能力可能為罕見情況。

實例30--海帕西啶之夾心免疫檢定中之單株抗體

下列實例描述一種用以測定試樣中之海帕西啶含量的夾心免疫檢定。

使用Biacore分析，測試經抗體1S1塗佈之表面上的海帕西啶與另一抗體之同時結合(圖28)。根據製造商之用法說明書使用0.005% P-20/PBS緩衝液連續流將抗Hepc抗體1S1固定於感應器晶片表面上。簡言之，藉由注入60 μL含有0.2 M N-乙基-N'-(二甲基胺基丙基)碳化二亞胺(EDC)及0.05 M N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)之混合物來活化感應器晶片表面上之羧基。接著注入濃度為20 μg/mL的稀釋於10 mM乙酸鹽(pH值為4.0)中之1S1。藉由注入60 μL 1 M乙醇胺使表面上之過量反應性基團失活。對於Ab 1S1表面而言，最終固定水平為5,000-6,000共振單位(RU)。亦於感應器晶片上製備空白模擬偶合參考表面。將20 nM大腸桿菌源性人類海帕西啶注射於1S1抗體表面上且與其結合。隨後將50 nM抗體2.7、23F11、26F11及1S1注射於海帕西啶/1S1表面上。在抗體注入之後，藉由注入30 μL 10 mM HCl(pH值為2.0)使該等表面再生。

對於複合物形式之結合存在高選擇性。用於上述競爭性檢定中之鼠類抗體2.7不能與1S1形成夾心對，且相較於23F11而言，26F11顯示與1S1同時結合於海帕西啶之能力顯著較低。

實例31--針對成熟海帕西啶之單株抗體可用於構建夾心ELISA

根據實例30中所獲之Biacore結果，針對與1S1"成對"之能力對先前已證明對海帕西啶具有反應性之1100種抗體進行篩檢。僅鑑別出11種抗體或約1%抗體為合適的。因此看

來形成可用於展開海帕西啶之夾心檢定之"對"的能力較為罕見。當將1S1及23F11裝配成夾心ELISA格式時，用於偵測海帕西啶含量之免疫檢定之敏感度得以改良50倍。如圖29中所示，該檢定證明能夠在50倍預先稀釋步驟之後量測正常血清中之海帕西啶含量。軸線表示海帕西啶含量預先稀釋度。

實例32--競爭性結合檢定

下列實例描述一種用以測定海帕西啶含量之競爭性結合檢定。在一方案中，存在於血清中之未標記海帕西啶與生物素標記海帕西啶競爭結合抗海帕西啶抗體(例如抗體2.7)。

使用不同濃度(1.4-300 ng/ml)之攙入緩衝液(5% BSA:I-阻斷緩衝液)、兔血清或混合人類血清中之海帕西啶標準物測定海帕西啶含量。將海帕西啶添加至等體積40 ng/mL之Ab2.7中且培育120分鐘。將25微升/孔之混合溶液添加至塗有1-2 μg/mL GxM捕捉抗體之黑色半區域板中。以0.25 nM添加25微升/孔之生物素標記海帕西啶。將板以板薄膜密封物覆蓋且在室溫(25℃)下於約≤200 RPM之板式震盪器上培育約60分鐘。洗滌該板且隨後添加50微升/孔之Poly辣根過氧化物酶擴增試劑(1:2000)。使該板靜置30分鐘且隨後以板式洗滌器使用PBS或KPL緩衝液洗滌6次。將該板輕拍乾燥且迅速添加發光受質(Femto或Pico)。以光度計(購自：Lmax 340)使用Femto或Pico受質對該板讀數，歷時1秒。結果表明在兔血清與緩衝液中海帕西啶在1-100

ng/ml之濃度範圍內皆為可量測的。(圖30)。

混合人類血清看來似乎具有大於20 ng/ml之現有海帕西啶含量。據測定對於各種隨機所選擇的血清，人類血清中之海帕西啶含量大體上在1-30 ng/ml之範圍內變化(圖31)。

使用上述所測定之兔血清中之海帕西啶標準物，測試24種來自正常人類個體之隨機血清。海帕西啶含量自不可偵測至超過50 ng/ml變化。參見圖32。該等值與經由同在申請中並共同擁有之美國專利申請案第11/880,313號及國際專利申請案第PCT/US2007/016477號中所述的基於質譜分析之定量方法所量測的海帕西啶含量之結果不符，後者通常給出低得多之值，其中該等專利申請案之揭示內容以引用方式全部併入本文中。

實例33--對獲得生物試樣中之海帕西啶濃度之各種方法的比較結果

對藉由各種技術(包括質譜分析(實例25)、競爭性ELISA(實例32)及夾心ELISA(實例30-31))所獲之海帕西啶含量進行比較。結果示於圖33中。

為了揭示案之完整性起見，明確將本文中所引用之所有專利文件及文獻文章以引用方式全部併入本說明書中。

僅為了說明本發明而闡述了以上描述及實例，而並非意欲存在限制性。因為熟習此項技術者可想到對體現本發明之精神及實質的所述實施例進行修改，所以應將本發明廣泛地解釋為包括屬於隨附申請專利範圍及其等效體之範疇

內的所有變化。

【圖式簡單說明】

圖1展示人類海帕西啶之所有四種製劑的IRMPD FTMS譜，其顯示所有三種合成及重組製劑與尿海帕西啶之等效性。

圖2展示人類海帕西啶之四種製劑的1D ^{1}H NMR譜，其顯示所有三種合成及重組製劑與尿海帕西啶之等效性。

圖3A展示經部分還原及烷基化之海帕西啶在pH值為2時之HPLC分析。

圖3B展示經部分還原及烷基化之海帕西啶在pH值為3時之HPLC分析。

圖4展示重組人類海帕西啶之主鏈指紋區之二維NOESY(深色)-TOCSY(淺色)覆蓋圖，其顯示主鏈共振分配。

圖5展示如實例8中所論述之ω1-解耦2D TOCSY及ω_1-解耦2D TOCSY-NOESY實驗的覆蓋圖。Hα質子之共振位置標有不完整箭頭。星號表示摺疊偽影(folding artifact)。

圖6為人類海帕西啶多肽之示意圖，其指示由兩種部分烷基化還原技術測定且由NMR確認之各種二硫鍵。

圖7展示由Hunter等人所獲(J. Biol. Chem., 277:37597-603, 2002)(左側)及如實例8中所測定(右側)之人類海帕西啶的一般主鏈結構。

圖8展示鼠類抗海帕西啶抗體Ab 43在β-內醯胺酶鐵反應檢定中降低細胞內鐵濃度之功能能力。

圖9展示鼠類抗海帕西啶抗體2.7在β-內醯胺酶鐵反應檢

定中降低細胞內鐵濃度之功能能力。

圖10展示鼠類抗海帕西啶抗體2.41在β-內醯胺酶鐵反應檢定中降低細胞內鐵濃度之功能能力。

圖11顯示抗海帕西啶抗體中和注射於小鼠中之人類海帕西啶。

圖12顯示對人類海帕西啶病毒性表現小鼠之抗體中和作用使正常早期紅血球特徵恢復。

圖13A展示海帕西啶之病毒性過度表現導致對紅血球生成素之低反應性。

圖13B展示腺病毒相關病毒(AAV)所介導之海帕西啶表現與所得血清鐵濃度的滴定結果。

圖14展示在炎性貧血症模型中抑制海帕西啶使對Aranesp®(達貝泊汀α)之反應性恢復。

圖15A展示實例22之實驗程序之示意圖。

圖15B-E顯示在病毒性過度表現海帕西啶之小鼠中抗海帕西啶抗體使對紅血球生成素之反應性恢復。

圖16展示在患有炎性貧血症之人類海帕西啶敲入(knock-in)小鼠中由抗海帕西啶抗體治療對海帕西啶之中和作用使對紅血球生成素之反應性恢復。

圖17A展示關於在無海帕西啶量測之情況下評估患者之鐵指標及疾病病況的決策樹。

圖17B展示關於使用海帕西啶含量量測來評估患者之理論決策樹。

圖18顯示海帕西啶含量在癌性貧血症(AoC)患者中升

高，但在正常患者中並不升高。

圖19顯示海帕西啶含量與炎性貧血症之診斷有關而與缺鐵性貧血症之診斷無關。

圖20展示市售DRG原海帕西啶ELISA不能偵測成熟海帕西啶。

圖21展示由夾心免疫檢定所量測之原海帕西啶濃度，其顯示原海帕西啶在血清中不可偵測。

圖22展示原海帕西啶西方墨點法(western blot)結果，其指示除非藉由弗林抑制劑(furin inhibitor)之存在加以保護，否則原海帕西啶在血清中發生降解。

圖23展示在患者試樣中海帕西啶含量與原海帕西啶含量(如由市售DRG原海帕西啶ELISA所量測)並不相關。

圖24A-B展示海帕西啶含量與如由C反應性蛋白所評估之炎性病況有關(A)，而原海帕西啶含量與如由C反應性蛋白所評估之炎性病況無關(B)。

圖25A-B展示海帕西啶含量有助於炎性貧血症之診斷(A)，而原海帕西啶含量並不有助於炎性貧血症之診斷(B)。

圖26A-B顯示海帕西啶含量與炎性貧血症之診斷有關(A)，而原海帕西啶含量與炎性貧血症之診斷無關(B)。

圖27顯示針對成熟海帕西啶之多株抗體可用於構建夾心ELISA。

圖28展示Biacore實驗結果，其顯示兩種單株抗體可立即與海帕西啶結合。

圖29顯示可使用針對成熟海帕西啶之單株抗體構建夾心ELISA。

圖30展示如由競爭性結合檢定所測定之存在於緩衝液、免血清及混合人類血清中之海帕西啶的濃度。

圖31顯示海帕西啶在人類血清中之量測結果。

圖32顯示使用競爭性結合檢定所量測之存在於正常人類血清中之海帕西啶的濃度。

圖33展示使用夾心ELISA、競爭性ELISA及質譜技術所量測且於隨機人類供體中所偵測之海帕西啶含量的比較結果。

圖34顯示具有高海帕西啶含量之AoC患者亦具有高C反應性蛋白(CRP含量)。

序列表

<110> 美商安美基公司

<120> 海帕西啶(HEPCIDIN)、海帕西啶拮抗劑及使用方法

<130> A-1156

<140> 097103507
<141> 2008-01-30

<150> 60/888,059 / 61/015,138
<151> 2007-02-07 / 2007-12-19

<160> 329

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 249
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 1
atggcactca gcactcggac ccaggctgcc tgtctcctgc ttctcctcct tgccagcctg 60

agcagcacca cctatctcca tcaacagatg agacagacta cagagctgca gcctttgcac 120

ggggaagaaa gcagggcaga cattgcgata ccaatgcaga agagaaggaa gagagacacc 180

aacttcccca tctgcatctt ctgctgtaaa tgctgtaaca attcccagtg tggtatctgt 240

tgcaaaaca 249

<210> 2
<211> 83
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 2

Met Ala Leu Ser Thr Arg Thr Gln Ala Ala Cys Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ser Leu Ser Ser Thr Thr Tyr Leu His Gln Gln Met Arg Gln
20 25 30

Thr Thr Glu Leu Gln Pro Leu His Gly Glu Glu Ser Arg Ala Asp Ile
35 40 45

Ala Ile Pro Met Gln Lys Arg Arg Lys Arg Asp Thr Asn Phe Pro Ile
50 55 60

Cys Ile Phe Cys Cys Lys Cys Cys Asn Asn Ser Gln Cys Gly Ile Cys
65 70 75 80

Cys Lys Thr

<210> 3
<211> 252
<212> DNA
<213> 褐家鼠

<400> 3
atggcactaa gcactcggat ccaggctgcc tgtctcctgc ttctcctcct ggccagcctg 60

agcagcggtg cctatctccg gcaacagacg agacagacta cggctctgca gccttggcat 120

ggggcagaaa gcaagactga tgacagtgcg ctgctgatgc tgaagcgaag gaagcgagac 180

accaacttcc ccatatgcct cttctgctgt aaatgctgta agaatttctc ctgtggtctc 240

tgttgcataa ca 252

<210> 4
<211> 84
<212> PRT
<213> 褐家鼠

<400> 4

Met Ala Leu Ser Thr Arg Ile Gln Ala Ala Cys Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ser Leu Ser Ser Gly Ala Tyr Leu Arg Gln Gln Thr Arg Gln
20 25 30

Thr Thr Ala Leu Gln Pro Trp His Gly Ala Glu Ser Lys Thr Asp Asp
35 40 45

Ser Ala Leu Leu Met Leu Lys Arg Arg Lys Arg Asp Thr Asn Phe Pro
50 55 60

Ile Cys Leu Phe Cys Cys Lys Cys Cys Lys Asn Ser Ser Cys Gly Leu
65 70 75 80

Cys Cys Ile Thr

<210> 5
<211> 78
<212> DNA
<213> 食蟹猴

<400> 5
gacacccact tccccatctg cattttctgc tgcggctgct gtcatcgatc aaagtgtggg 60

atgtgctgca ggacgtag 78

<210> 6
<211> 25
<212> PRT
<213> 食蟹猴

<400> 6

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg
1 5 10 15

Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Arg Thr
20 25

<210> 7
<211> 252
<212> DNA
<213> 智人

<400> 7
atggcactga gctcccagat ctgggccgct tgcctcctgc tcctcctcct cctcgccagc 60

ctgaccagtg gctctgtttt cccacaacag acgggacaac ttgcagagct gcaaccccag 120

gacagagctg gagccagggc cagctggatg cccatgttcc agaggcgaag gaggcgagac 180

acccacttcc ccatctgcat tttctgctgc ggctgctgtc atcgatcaaa gtgtgggatg 240

tgctgcaaga cg 252

<210> 8
<211> 84
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Met Ala Leu Ser Ser Gln Ile Trp Ala Ala Cys Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ser Leu Thr Ser Gly Ser Val Phe Pro Gln Gln Thr Gly
20 25 30

Gln Leu Ala Glu Leu Gln Pro Gln Asp Arg Ala Gly Ala Arg Ala Ser
35 40 45

Trp Met Pro Met Phe Gln Arg Arg Arg Arg Arg Asp Thr His Phe Pro
50 55 60

Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met
65 70 75 80

Cys Cys Lys Thr

<210> 9
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg
1 5 10 15

Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr
20 25

<210> 10

<400> 10
000

<210> 11

<400> 11
000

<210> 12
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 12
aacatcgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atatcctgca gagccagtga aagtgttgat agttatggca atagttttat gcactggtac 120

cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagaatct 180

ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattgat 240

cctgtggagg ctgatgatgc tgcaacctat tactgtcagc aaaataatga ggatcggacg 300

ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa 330

<210> 13
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

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

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Asp Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 14
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 14
cagatccagt tggtacagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60

tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca acctatggaa tgagctgggt gaaacaggct 120

ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct actctggagt gccaacatat 180

gctgatgact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240

ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc aagcttatgg 300

tactacggta gggcctttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca 357

<210> 15
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Arg Thr
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

Thr Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

Leu Trp Tyr Tyr Gly Arg Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 22

<400> 22
000

<210> 23

<400> 23
000

<210> 24
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 24
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atatcctgca gagccagtga aagtgttgat agttatggca atagttttat gcactggtac 120

cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240

cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcacc aaagtaatga ggagtacacg 300

ttcggagggg ggaccaagct ggaaataaaa 330

<210> 25
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

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

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Glu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 26
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人

<400> 26
cagatccagt tggtacagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60

tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca acctatggaa tgagctgggt gaaacaggct 120

ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaatacct actctggagt gccaacatat 180

gctgatgact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240

ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgg aagagaccac 300

tactacgggg aggttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 354

<210> 27
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Gly Arg Asp His Tyr Tyr Gly Glu Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

His Gln Ser Asn Glu Glu Tyr Thr
1 5

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

Thr Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

Asp His Tyr Tyr Gly Glu Val Ala Tyr
1 5

<210> 34

<400> 34
000

<210> 35

<400> 35
000

<210> 36
<211> 330
<212> DNA

<213> 智人

<400> 36
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atatcctgca gagccagtga aagtgttgat agttttggca tagttttat gcactggtac 120

cagctgaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240

cctgtggagg ctgatgatgt tgcaatttat tactgtcagc aaagtaatga ggagtacacg 300

ttcggagggg ggaccaagct ggaaataaaa 330

<210> 37
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

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

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Glu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 38
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人

<400> 38
cagatccagt tggtacagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60

tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca acctatggaa tgagctgggt gaaacaggct 120

ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct cctctggagt gccaacatat 180

gctgatgact tcatgggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240

ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacgt atttctgtgc aagagaccgc 300

tactacgggg aggttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaccgtctc tgca 354

<210> 39
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Ser Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Met Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Arg Tyr Tyr Gly Glu Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Phe Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Gln Gln Ser Asn Glu Glu Tyr Thr
1 5

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43

Thr Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44

Trp Ile Asn Thr Ser Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Met
1 5 10 15

Gly

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45

Asp Arg Tyr Tyr Gly Glu Val Ala Tyr
1 5

<210> 46

<400> 46
000

<210> 47

<400> 47
000

<210> 48
<211> 317
<212> DNA
<213> 智人

<400> 48
acatccagat gacccagtct ccttcactcc tgtcagcatc tgtgggagac agagtcactc 60

tcagctgcaa agcaagtcag aatatttaca agtacttaaa ctggtatcag caaaagcttg 120

gagaagctcc caaactcctg atatattata caaacagttt gcaaacgggc atcccatcaa 180

ggttcagtgg cagtggatct ggtacagatt tcacacttac catcagcagc ctgcagcctg 240

aagatgttgc cacatattac tgctatcagt ataacagtgg gcccacgttt ggagctggga 300

ccaagctgga actgaaa 317

<210> 49
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49

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

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

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

Tyr Tyr Thr Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 50
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 50
caggttactc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cttcccagac cctcagtctg 60

actttgctctt tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tatgtgtgag ctggattcgt 120

cagccttcag ggaagggtct ggagtggctg gcaactattt gttgggagga tagtaagggc 180

tacaaccctt ctctgaagaa ccggctcaca atctccaagg acacctccaa caaccaagca 240

ttcctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gataccgcca tatactactg tgctcggccc 300

cttaactacg gagggtatag tgagctagaa ttggattact ggggccaagg agtcatggtc 360

acagtctcct ca 372

<210> 51
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala Thr Ile Cys Trp Glu Asp Ser Lys Gly Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52

Lys Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Lys Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53

Tyr Thr Asn Ser Leu Gln Thr
1 5

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

Tyr Gln Tyr Asn Ser Gly Pro Thr
1 5

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

Thr Ser Gly Ile Cys Val Ser
1 5

<210> 56
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56

Thr Ile Cys Trp Glu Asp Ser Lys Gly Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

<210> 57
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 57

Pro Leu Asn Tyr Gly Gly Tyr Ser Glu Leu Glu Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 58
<211> 19
<212> RNA
<213> 智人

<400> 58

uguaaaugcu guaacaauu 19

<210> 59
<211> 19
<212> RNA
<213> 智人

<400> 59
gcuguaaaug cuguaacaa 19

<210> 60
<211> 19
<212> RNA
<213> 智人

<400> 60
gugugguauc uguugcaaa 19

<210> 61
<211> 19
<212> RNA
<213> 智人

<400> 61
gcagacauug cgauaccaa 19

<210> 62
<211> 19
<212> RNA
<213> 智人

<400> 62
auaccaaugc agaagagaa 19

<210> 63
<211> 19
<212> RNA
<213> 智人

<400> 63
cuacagagcu gcagccuuu 19

<210> 64
<211> 19
<212> RNA
<213> 智人

<400> 64
gaagagagac accaacuuc 19

<210> 65
<211> 19
<212> RNA
<213> 智人

<400> 65
acuuccccau cugcaucuu 19

<210> 66
<211> 19
<212> RNA
<213> 智人

<400> 66
cugagcagca ccaccuauc 19

<210> 67
<211> 19
<212> RNA
<213> 智人

<400> 67
acagaugaga cagacuaca 19

<210> 68
<211> 19
<212> RNA
<213> 智人

<400> 68
caaugcagaa gagaaggaa 19

<210> 69
<211> 19
<212> RNA
<213> 智人

<400> 69
aauucccagu gugguaucu 19

<210> 70

<400> 70
000

<210> 71

<400> 71
000

<210> 72
<211> 193
<212> PRT
<213> 智人

<400> 72

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 73
<211> 193
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<400> 74

Xaa Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 75
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<400> 75

Xaa Gln Ser Asn Glu Glu
1 5

<210> 76
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<400> 76

Gln Gln Xaa Asn Glu Xaa
1 5

<210> 77
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)

<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<400> 77

Trp Ile Asn Thr Xaa Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Xaa
1 5 10 15

Gly

<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa可為任何胺基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa可為任何胺基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa可為任何胺基酸或不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa可為任何胺基酸或不存在

<400> 78

Xaa Xaa Tyr Tyr Gly Xaa Xaa Ala Xaa Tyr
1 5 10

<210> 79
<211> 75
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 79
gacaccaact tccccatctg catcttctgc tgtaaatgct gtaacaattc ccagtgtggt 60

atctgttgca aaaca 75

<210> 80
<211> 25
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 80

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Lys Cys Cys Asn Asn
1 5 10 15

Ser Gln Cys Gly Ile Cys Cys Lys Thr
20 25

<210> 81
<211> 75
<212> DNA
<213> 褐家鼠

<400> 81
gacaccaact tccccatatg cctcttctgc tgtaaatgct gtaagaattc ctcctgtggt 60

ctctgttgca taaca 75

<210> 82
<211> 25
<212> PRT
<213> 褐家鼠

<400> 82

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys Leu Phe Cys Cys Lys Cys Cys Lys Asn
1 5 10 15

Ser Ser Cys Gly Leu Cys Cys Ile Thr
20 25

<210> 83
<211> 78
<212> DNA
<213> 綠猴

<400> 83
gacacccact tccccatctg cattttctgc tgcggctgct gtcatcgatc aaagtgtggg 60

atgtgctgca ggacgtag 78

<210> 84
<211> 25
<212> PRT
<213> 綠猴

<400> 84

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg
1 5 10 15

Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Arg Thr
20 25

<210> 85
<211> 75
<212> DNA
<213> 穴兔

<400> 85
gacacccact tccccatctg catcttctgc tgcagctgct gtaggaattc aaaatgtggg 60

atctgctgca agacc 75

<210> 86
<211> 25
<212> PRT
<213> 穴兔

<400> 86

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Ser Cys Cys Arg Asn
1 5 10 15

Ser Lys Cys Gly Ile Cys Cys Lys Thr
20 25

<210> 87
<211> 75

<212> DNA
<213> 狗

<400> 87
gacacccact tccccatctg catattctgc tgtggctgct gtaaaacacc gaagtgtggg 60

ctctgctgca taaca 75

<210> 88
<211> 25
<212> PRT
<213> 狗

<400> 88

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys Lys Thr
1 5 10 15

Pro Lys Cys Gly Leu Cys Cys Ile Thr
20 25

<210> 89
<211> 75
<212> DNA
<213> 狗

<400> 89
gacacccact tccccatctg catattctgc tgtggctgct gtaaaacacc gaagtgtggg 60

ttctgctgca ggacg 75

<210> 90
<211> 25
<212> PRT
<213> 狗

<400> 90

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys Lys Thr
1 5 10 15

Pro Lys Cys Gly Phe Cys Cys Arg Thr
20 25

<210> 91
<211> 75
<212> DNA
<213> 狗

<400> 91
gacacccact tccccatctg catattctgc tgtggctgct gtaaaacacc gaagtgtggg 60

ttgtgctgca agacg 75

<210> 92
<211> 25
<212> PRT
<213> 狗

<400> 92

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys Lys Thr
1 5 10 15

Pro Lys Cys Gly Leu Cys Cys Lys Thr
20 25

<210> 93
<211> 180
<212> DNA
<213> 智人

<400> 93
tctgttttcc cacaacagac gggacaactt gcagagctgc aaccccagga cagagctgga 60

gccagggcca gctggatgcc catgttccag aggcgaagga ggcgagacac ccacttcccc 120

atctgcattt tctgctgcgg ctgctgtcat cgatcaaagt gtgggatgtg ctgcaagacg 180

<210> 94
<211> 60
<212> PRT
<213> 智人

<400> 94

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

Asp Arg Ala Gly Ala Arg Ala Ser Trp Met Pro Met Phe Gln Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys
35 40 45

Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr
50 55 60

<210> 95
<211> 60
<212> DNA
<213> 智人

<400> 95
atctgcattt tctgctgcgg ctgctgtcat cgatcaaagt gtgggatgtg ctgcaagacg 60

<210> 96
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<400> 96

Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met
1 5 10 15

Cys Cys Lys Thr
20

<210> 97
<211> 66
<212> DNA
<213> 智人

<400> 97
ttccccatct gcattttctg ctgcggctgc tgtcatcgat caaagtgtgg gatgtgctgc 60

aagacg 66

<210> 98
<211> 22
<212> PRT

<213> 智人

<400> 98

Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys
1 5 10 15

Gly Met Cys Cys Lys Thr
20

<210> 99
<211> 1650
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 99
agtccttaga ctgcacagca gaacagaagg catgatggca ctcagcactc ggacccaggc 60

tgcctgtctc ctgcttctcc tccttgccag cctgagcagc accacctatc tccatcaaca 120

ggtgagcacc ccaggcccat tgtggtggga gagccaggtc ccaggcaggc aggagctgct 180

caccactgag tagttagaat ggctcaggag tgatggcagc tgctgacaag gaagagggtg 240

gtccttagtg ggagctggga agctgcacag gtgtccttga atagctactc tgttgtccta 300

ctgtggaaaa tgaagcatgg tgggagccaa acaaaagtgt tccttggctg tcccaccccg 360

tcagggcatt ctttaagcag cctttacatg agtattttat aaagaattac tgtggatagt 420

acaaaagaca atgggcagaa aaactctaat gaggaaggac cagaggtggg gctaagaggc 480

tgacagccag gcaaagtatt ctatgagaaa atgatacaga agtcgggcag tggtggcaca 540

tgcctttaat cccagcattt gggaggcaga ggcaggtgga tttctgagtt tgaatccagc 600

ctggtctaca aagtgagttt caagacagcc agggctacac agagaaatcc tgtctgaaaa 660

aaaaaaaaaa acaaaaaaag aaaaaaaaaa tgatacagaa gggtctggag agatggctta 720

gctgttagga acatttgatg cttgtgcata ggacctagag tcagttccca gcacccatgt 780

ggtggatcac aaccatcctg aactctactt ccagggtacc tgatgccttc tgccctagat 840

ggcagtcagc agtaagcatg catatgatac acataggcac tcaaggcaat cacaagaccc 900

ttggggactg tagggtctga taagtgaagc cagtgttggc aataaagggc tgtagaggtt 960

ctgctgtgcc gagctttgtg gacagctgtg cagatgatga tctgtcctgg aaagccacaa 1020

tccagatgaa tgtgctataa gccttttgtgc tatggggtga cctggttata agagataaga 1080

tgcagggaaa actgtccgga gtgtgcaaaa gcaaagaaag tgggtgcttt taggagcatc 1140

caaggaatgg tgaggggaca cagggcagta ggagccctte tagaaattct gtctaagcac 1200

agtccctaaa tctctgggga gaagctggca gagaaaagtc aggaagctat gccgggtact 1260

ccacaagatt caatacctct tctgctttca cagatgagac agactacaga gctgcagcct 1320

ttgcacgggg aagaaagcag ggcagacatt gcggtaagag catctgggac tccctccctg 1380

atccccagcc tctcccatgc ccaagctagg ctgcttacct ctctttcttt acacagatac 1440

caatgcagaa gagaaggaag agagacacca acttccccat ctgcatcttc tgctgtaaat 1500

gctgtaacaa ttcccagtgt ggtatctgtt gcaaaacata gcctagagcc acatcctgac 1560

ctctctacac ccctgcagcc cctcaacccc attatttatt cctgccctcc ccaccaatga 1620

ccttgaaata aagacgattt tattttcaaa 1650

<210> 100
<211> 2637
<212> DNA
<213> 智人

<400> 100
gactgtcact cggtcccaga caccagagca agctcaagac ccagcagtgg gacagccaga 60

cagacggcac gatggcactg agctcccaga tctgggccgc ttgcctcctg ctcctcctcc 120

tcctcgccag cctgaccagt ggctctgttt tcccacaaca ggtgagagcc cagtggcctg 180

ggtccttagc agggcagcag ggatgggaga gccaggcctc agcctagggc actggagaca 240

cccgagcact gagcagagct caggacgtct caggagtact ggcagctgaa caggaaccag 300

gacaggcacg gtggctcatg cctgtaatcc cagcactttg ggaggttgag gcaggcagcc 360

cacttgaggt cagtttgaga ccagcctggc caacatggta aaaccccgtc tctactaaaa 420

atacaaaagt tagccaggct tggtggcagg tgcctgtaat cccagctact cgggagactg 480

aggcaggaga attgcttgaa cccgcaaggt ggaggttgca cagtgagctg agattgcacc 540

actgcactcc agcctggcaa cagagcaaga ctccatctcc aaaaaagaac agaaatcaat 600

gaagcaccga gtgacaggga ctggaaggtc ctaattccat gggtatttac ggaaccccta 660

cgccgtgtgg agtcttattc tagacagtgg ggacgaggcc atgaacaagg tagatgagag 720

aggagattic tccatcctgg tcagggaatt tgttaaagac tgatgaaaac atgaataaat 780

aattgtgtct agtacattct attcgtgaat ctcataacag acagtggtag agtgaccgtg 840

acccattcgc cacacagtag agtcactttt ttggtttgtt ttttagagac agggtcttcc 900

tctgttgctg aggctggagt gcagtggtgc agtcatagtt cactgcagcc tcaacctcct 960

gtgctcaagc aatcctccca cctcagcgtc ccaagtagct gggacagcag gcacatgcca 1020

cgggttgggg gaccacaggc atggtcaagg ggctggcagt caagcaagtg tttcatgaga 1080

aagtgacagt tgaccttcgt cttggagggt gagagatgga ggcagcaaag acctaaggag 1140

aggacaagcc agcatagccc agggtcaggc tgaacaagag gagatggtgg gacttgggga 1200

taaggctgag gggtgggcag tccctaagtc ttgtgggcaa ccatgcagac actgattttt 1260

ccttggaata aagaggaagc ccccataagc tttttttttt ttttctgaga tagggtctcg 1320

ctctgtcgtt caggctggtg tgcagtggca tcatctgggc tcactgcaac ctccgcctcc 1380

cgggttcaag caattctcct gcctcagctt cccgagcagc tgggattaca ggcggctgcc 1440

accacgcccg gctaattttt gttttttag tagagacagg gtttcaccat gttggccaga 1500

ctggtcttga actcctgacc tcaggtgatt ctcccacctc ggcttcccaa agtgctggga 1560

ttacaggcgt gagccactgc gcccagcctc ctgtaggttt ttaaaatgga gaaaaccaca 1620

atctcactgg ccatgttttа aaaaacttaa tctgccagtc aggcaccatg gctcacacct 1680

gtaatcccag agttttggga ggccaaggta ggaagatcag ttgagcccag gagttcaaga 1740

ccagcttggg caacacaacc agaccccacc tctacaaaaa attaaaaaat tagccgggtg 1800

tggtggcgtg cacctgctgt cccagctact cgggaagctg aggcgggagc atcgcttgag 1860

cacaggaggt caaggctgca gggagctatg actgtgccac tgcactctgg cctgggcaac 1920

agaggaagac tctgtctaaa aaacaaacaa aaaaagtgac tctgctgtgt ggcaaatgga 1980

ttgaggggca agaatgcagg gaggtgtgtt aggaggctgg cactggcatc caggcagggg 2040

aaggtgatat cccaaagaag agtagcagct gtggaaagag gaggaggcgg atctgggagg 2100

tttttttttt taggaaaagc cgcccatggg aaggtgagca gaagcaagaa agcaaggccc 2160

ctcctaagag tccatttgag ctctgggttt aaaccactig gagaggagca ggttgccggg 2220

agccagtctc agaggtccac tgggcccccl gccatcctct gcacccccll ctgctttcac 2280

agacgggaca acttgcagag ctgcaacccc aggacagagc tggagccagg gccagctgga 2340

tggtgagcgc aacagtgatg ccttttcctag ccccctgctc cctccccatg ctaaggccgg 2400

ttccctgctc acattcccll ccttcccaca gcccatgttc cagaggcgaa ggaggcgaga 2460

cacccacttc cccatctgca ttttctgctg cggctgctgt catcgatcaa agtgtgggat 2520

gtgctgcaag acgtagaacc tacctgccct gcccccgtcc cctcccttcc ttatttattc 2580

ctgctgcccc agaacatagg tcttggaata aaatggctgg ttcttttgtt ttccaaa 2637

<210> 101
<211> 180
<212> DNA
<213> 智人

<400> 101
tctgttttcc cacaacagac gggacaactt gcagagctgc aaccccagga cagagctgga 60

gccagggcca gctggatgcc catgttccag aggcgaagga ggcgagacac ccacttcccc 120

atctgcattt tctgctgcgg ctgctgtcat cgatcaaagt gtgggatgtg ctgcaagacg 180

<210> 102
<211> 61
<212> PRT
<213> 智人

<400> 102

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

Gln Asp Arg Ala Gly Ala Arg Ala Ser Trp Met Pro Met Phe Gln Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly
35 40 45

Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr
50 55 60

<210> 103
<211> 301
<212> DNA
<213> 智人

<400> 103
tcggccccgc ctcctgccac cgcagattgg ccgctagccc tccccgagcg ccctgcctcc 60

gagggccggc gcaccataaa agaagccgcc ctagccacgt cccctcgcag ttcggcggtc 120

ccgcgggtct gtctcttgct tcaacagtgt ttggacggaa cagatccggg gactctcttc 180

cagcctccga ccgccctccg atttcctctc cgcttgcaac ctccgggacc atcttctcgg 240

ccatctcctg cttctgggac ctgccagcac cgttttlgtg gttagctcct tcttgccaac 300

c 301

<210> 104
<211> 75
<212> DNA
<213> 智人

<400> 104
gacacccact tccccatctg cattttctgc tgcggctgct gtcatcgatc aaagtgtggg 60

atgtgctgca agacg 75

<210> 105
<211> 66
<212> DNA
<213> 智人

<400> 105
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt agatctgaat tcaatttacg cgtgggatcc 60

aaggtc 66

<210> 106

<400> 106
000

<210> 107
<211> 336
<212> DNA
<213> 智人

<400> 107
gatattgtga tgacccagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtgatg gatacaacta tttggattgg 120

tacctgcaga agtcagggca gtctccacag cgcctgatct atatgggttc taatcgggcc 180

tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactccg 300

ctcactatcg gcggagggac caaggtggag atcaaa 336

<210> 108
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 108

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ser Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Leu Thr Ile Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 109
<211> 366
<212> DNA
<213> 智人

<400> 109
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgtcaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atttcatatg atggaagtaa tgaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtat attactgtgt gagagatgtg 300

tggttcgggg agtccctcca cggtttggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 110
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 110

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 111
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 111

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 112
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 112

Met Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 113

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 114
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 114

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 115
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 115

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 116
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 116

Asp Val Trp Phe Gly Glu Ser Leu His Gly Leu Asp Val
1 5 10

<210> 117
<211> 333
<212> DNA
<213> 智人

<400> 117
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcactg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgcactg ggggcagctc caacatcggg tcaggttttg ctatatactg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tttggtgaca acattcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctccgcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 118
<211> 111
<212> PRT
<213> 智人

<400> 118

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

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

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

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

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

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

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

<210> 119
<211> 351
<212> DNA
<213> 智人

<400> 119
caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggtta caccttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtga aaaaaacact 180

gcacagaaac tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagaggaa 300

ctaggggctt ttgatatctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcttc a 351

<210> 120
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 120

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Glu Lys Asn Thr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Glu Leu Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 121
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 121

Thr Gly Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ser Gly Phe Ala Ile Tyr
1 5 10

<210> 122
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 122

Gly Asp Asn Ile Arg Pro Ser
1 5

<210> 123
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 123

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
1 5 10

<210> 124
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 124

Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 125
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 125

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Glu Lys Asn Thr Ala Gln Lys Leu Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 126
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 126

Glu Glu Leu Gly Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 127
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 127
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcatcatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgtagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcactcac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 128
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 128

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

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

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

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

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

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

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

<210> 129
<211> 366
<212> DNA

<213> 智人

<400> 129
caggttcagc tggtgcagtc tggagatgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggtta cacctttatc aagtatggaa tcagttgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcggcgctt tcaatggtaa cacagactat 180

gcacggaacc tccaggccag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagagggc 300

tggaacgacg actacttctg cggtttggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 130
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 130

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Lys Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Gly Ala Phe Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Arg Asn Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Trp Asn Asp Asp Tyr Phe Cys Gly Leu Asp Val Trp
100 105 110

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

<210> 131
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 131

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 132
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 132

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 133
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 133

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr
1 5

<210> 134
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 134

Lys Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 135
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 135

Trp Ile Gly Ala Phe Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Arg Asn Leu Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 136
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 136

Glu Gly Trp Asn Asp Asp Tyr Phe Cys Gly Leu Asp Val
1 5 10

<210> 137
<211> 318
<212> DNA
<213> 智人

<400> 137
tatgagctga ctcagccacc ctcagtgtcc gtgtccccag gacagacagc cagcctcacc 60

tgctctggag ataaattggg ggatagatat gcttcctggt atcagcagaa gccaggccag 120

tcccctgtgc tggtcatcta tcaagatagc aagcggccct cagggatccc tgagcgattc 180

tctggctcca actctgggaa cacagccact ctgaccatca gcgggaccca ggctatggat 240

gaggctgact attactgtca ggcgtgggac agcagcactg catgtgtctt cggaactggg 300

accaaggtca ccgtccta 318

<210> 138
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 138

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

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

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

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

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

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

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

<210> 139
<211> 363
<212> DNA
<213> 智人

<400> 139
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccctcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atgaaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgttgaat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctttgt attactgtgc gagagccggt 300

atagcagcag cccttgatgc ttttgatatc tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360

tca 363

<210> 140
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人

<400> 140

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ala Gly Ile Ala Ala Ala Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 141
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 141

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Arg Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 142
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 142

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 143
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 143

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Cys Val
1 5 10

<210> 144
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 144

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 145
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 145

Val Ile Trp Tyr Asp Glu Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 146
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 146

Ala Gly Ile Ala Ala Ala Leu Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 147
<211> 333
<212> DNA
<213> 智人

<400> 147
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcactg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgcactg ggggcagctc caacatcggg tcaggttttg ctatatactg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatggtgaca acattcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctccgcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300

gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 148
<211> 111
<212> PRT
<213> 智人

<400> 148

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

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

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

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

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

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

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

<210> 149
<211> 351
<212> DNA
<213> 智人

<400> 149
caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtga aacaaacact 180

gcacagaaac tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagaggaa 300

ctaggggctt ttgatatctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcttc a 351

<210> 150
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 150

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Glu Thr Asn Thr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Glu Leu Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 151
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 151

Thr Gly Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ser Gly Phe Ala Ile Tyr
1 5 10

<210> 152
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 152

Gly Asp Asn Ile Arg Pro Ser
1 5

<210> 153
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 153

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
1 5 10

<210> 154
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 154

Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 155
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 155

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Glu Thr Asn Thr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 156
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 156

Glu Glu Leu Gly Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 157
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 157
tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccaccatc 60

acctgctctg gagataaatt gggggaaaga tatgcgtgtt ggtatcagca gaggccaggc 120

cagtcccctg tactggtcat ctatcaagat atcaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240

gatgaggctg actattctg tcaggcgtgg tacagcagca ccaatgtgct tttcggcgga 300

gggaccaagc tgaccgtcct a 321

<210> 158
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 158

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

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

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

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

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

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

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

<210> 159
<211> 363
<212> DNA
<213> 智人

<400> 159
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg ctgaaagtaa taaatactac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagcccag 300

gagggtatag cccctgacgc ttttgatatc tggggccaag gaacaatggt caccgtctct 360

tca 363

<210> 160
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人

<400> 160

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ala Gln Glu Gly Ile Ala Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 161
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 161

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Glu Arg Tyr Ala Cys
1 5 10

<210> 162
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 162

Gln Asp Ile Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 163
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 163

Gln Ala Trp Tyr Ser Ser Thr Asn Val Leu
1 5 10

<210> 164
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 164

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 165
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 165

Val Ile Trp Tyr Ala Glu Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 166
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 166

Ala Gln Glu Gly Ile Ala Pro Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 167
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 167
tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccaccatc 60

acctgctctg gagataaatt gggggaaaga tatgcgtgtt ggtatcagca gaggccaggc 120

cagtccccig tactggtcat ctatcaagat agcaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240

gatgaggctg actatttctg tcaggcgtgg tacagcagca ccaatgtgct tttcggcgga 300

gggaccaagc tgaccgtcct a 321

<210> 168
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 168

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

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

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

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

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

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

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

<210> 169
<211> 363
<212> DNA
<213> 智人

<400> 169
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg ctgaaagtaa taaatactac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagcccag 300

gagggtatag cccctgacgc ttttgatatc tggggccaag gaacaatggt caccgtctct 360

tca 363

<210> 170
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人

<400> 170

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ala Gln Glu Gly Ile Ala Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 171
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 171

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Glu Arg Tyr Ala Cys
1 5 10

<210> 172
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 172

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 173
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 173

Gln Ala Trp Tyr Ser Ser Thr Asn Val Leu
1 5 10

<210> 174

<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 174

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 175
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 175

Val Ile Trp Tyr Ala Glu Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 176
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 176

Ala Gln Glu Gly Ile Ala Pro Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 177
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 177
aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60

tcctgcaccc gcagcagtgg cagcattgcc agctactatg tgcagtggta ccagcagcgc 120

ccgggcagtt cccccaccac tgtgatctat gaggatagcc agagaccctc tggggtccct 180

gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240

ctgaagactg aggacgaggc tgactattat tgtcagtctt atgatagcag caatgtggta 300

ttcggcggag gaccaagct gaccgtccta 330

<210> 178
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 178

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

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

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

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

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

<210> 179
<211> 366
<212> DNA
<213> 智人

<400> 179
caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60

acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttggaa ctggatcagg 120

cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggttt 180

aatgattatg cagtatctgt gcaaagtcga ataaccatca acccagacac atccaagaac 240

cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300

agagggattg tcttctccta cgctatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 180
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 180

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Phe Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Val Ser Val Gln Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ile Val Phe Ser Tyr Ala Met Asp Val Trp
100 105 110

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

<210> 181
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 181

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Tyr Tyr Val Gln
1 5 10

<210> 182
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 182

Glu Asp Ser Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 183
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 183

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Val Val
1 5

<210> 184
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 184

Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn
1 5

<210> 185
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 185

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Phe Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val
1 5 10 15

Gln Ser

<210> 186
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 186

Gly Ile Val Phe Ser Tyr Ala Met Asp Val
1 5 10

<210> 187
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 187
tcctatgagc tgactcagcc cccctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60

acctgttctg gagataaaat gggggaaaga tatgcttgct ggtatcagca gaagccaggc 120

cagtccccta tactggtcat ctatcaagat accaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240

gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg tacagcagca ccaatgtggt attcggcgga 300

gggaccaagc tgaccgtcct a 321

<210> 188
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 188

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Met Gly Glu Arg Tyr Ala
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 189
<211> 363
<212> DNA
<213> 智人

<400> 189
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg ttggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagcccag 300

gagggtatgg cccctgatgc ttttgatatc tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360

tca 363

<210> 190
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人

<400> 190

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ala Gln Glu Gly Met Ala Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 191
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 191

Ser Gly Asp Lys Met Gly Glu Arg Tyr Ala Cys
1 5 10

<210> 192
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 192

Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 193
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 193

Gln Ala Trp Tyr Ser Ser Thr Asn Val Val
1 5 10

<210> 194
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 194

Asn Tyr Gly Met His

1 5

<210> 195
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 195

Val Ile Trp Tyr Val Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 196
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 196

Ala Gln Glu Gly Met Ala Pro Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 197
<211> 717
<212> DNA
<213> 智人

<400> 197
atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggtctctgg atccagtggg 60

gatattgtga tgacccagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 120

atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtgatg gatacaacta tttggattgg 180

tacctgcaga agtcagggca gtctccacag cgcctgatct atatgggttc taatcgggcc 240

tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 300

agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactccg 360

ctcactatcg gcggagggac caaggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 420

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 717

<210> 198
<211> 239
<212> PRT
<213> 智人

<400> 198

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

Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu His Ser Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60

Ser Gly Gln Ser Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Met Gly Ser Asn Arg Ala
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Leu Thr Ile Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 199
<211> 1401
<212> DNA
<213> 智人

<400> 199
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taaggggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagt tatggcatgc actgggtccg tcaggctcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttatt tcatatgatg gaagtaatga atactatgca 240

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gctgtatatt actgtgtgag agatgtgtgg 360

ttcggggagt ccctccacgg tttggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 420

tcagcctcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 480

gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 540

tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc 600

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcaactt cggcacccag 660

acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag 720

cgcaaatgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc 780

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 840

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 900

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc 960

cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 1020

tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaaa 1080

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccgggagga gatgaccaag 1140

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat gctggactcc 1260

gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380

ctctccctgt ctccgggtaa a 1401

<210> 200
<211> 467
<212> PRT
<213> 智人

<400> 200

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Glu Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Val Trp Phe Gly Glu Ser Leu His Gly Leu
115 120 125

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

```
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
145                 150                 155                 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
                165                 170                 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
            180                 185                 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys
    210                 215                 220

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu
225                 230                 235                 240

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
                245                 250                 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            260                 265                 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        275                 280                 285

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    290                 295                 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
305                 310                 315                 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                325                 330                 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
            340                 345                 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        355                 360                 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    370                 375                 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385                 390                 395                 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                405                 410                 415

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            420                 425                 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        435                 440                 445
```

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 201
<211> 366
<212> DNA
<213> 智人

<400> 201
caggttcagc tggtgcagtc tggagatgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggtta cacctttatc aagtatggaa tcagttgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcggcgctt tcaatggtaa cacagactat 180

gcacggaacc tccaggccag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagagggc 300

tggaacgacg actacttctc cggtttggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 202
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 202

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Lys Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Gly Ala Phe Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Arg Asn Leu
50 55 60

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

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

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

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

<210> 203
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 203

Lys Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 204
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 204

Trp Ile Gly Ala Phe Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Arg Asn Leu Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 205
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 205

Glu Gly Trp Asn Asp Asp Tyr Phe Ser Gly Leu Asp Val
1 5 10

<210> 206
<211> 1401
<212> DNA
<213> 智人

<400> 206
atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcag caacaggtgc ccactcccag 60

gttcagctgg tgcagtctgg agatgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120

tgcaaggctt ctggttacac ctttatcaag tatggaatca gttgggtgcg acaggcccct 180

ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc ggcgctttca atggtaacac agactatgca 240

cggaacctcc aggccagagt caccatgacc acagacacat ccacgagcac agcctacatg 300

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtatatt actgtgcgag agagggctgg 360

aacgacgact actttccgg tttggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 420

tcagcctcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 480

gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 540

tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc 600

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcaactt cggcacccag 660

acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag 720

cgcaaatgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc 780

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 840

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 900

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc 960

cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 1020

tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaaa 1080

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1140

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat gctggactcc 1260

gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380

ctctccctgt ctccgggtaa a 1401

<210> 207
<211> 467
<212> PRT
<213> 智人

<400> 207

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Asp Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

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

Glu Trp Met Gly Trp Ile Gly Ala Phe Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Ala
65 70 75 80

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Trp Asn Asp Asp Tyr Phe Ser Gly Leu
115 120 125

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
145 150 155 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys
210 215 220

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu

225 230 235 240

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 208
<211> 708
<212> DNA
<213> 智人

<400> 208
atggcctggt ctcctctcct cctcactctc ctcgctcact gcacagggtc ctgggcccag 60

tctgtgttga cgcagccgcc ctcactgtct ggggccccag ggcagagggt caccatctcc 120

tgcactgggg gcagctccaa catcgggtca ggttttgcta tatactggta ccagcagctt 180

ccaggaacag cccccaaact cctcatcttt ggtgacaaca ttcggccctc aggggtccct 240

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tccgccttcc tggccatcac tgggctccag 300

gctgaggatg aggctgatta ttactgccag tcctatgaca gcagcctgag tggttcggtt 360

ttcggcggag gaccaagct gaccgtccta agtcagccca aggctgcccc ctcggtcact 420

ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa gccaacaagg ccacactggt gtgtctcata 480

agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtcaag 540

gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc 600

tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg 660

catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gcccctacag aatgttca 708

<210> 209
<211> 236
<212> PRT
<213> 智人

<400> 209

Met Ala Trp Ser Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly
1 5 10 15

Ser Trp Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Gly Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Gly Ser Ser Asn Ile
35 40 45

Gly Ser Gly Phe Ala Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala
50 55 60

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile
85 90 95

Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr
100 105 110

Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
115 120 125

Val Leu Ser Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile
145 150 155 160

Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser
165 170 175

Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser
180 185 190

Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln

195 200 205

Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser
210 215 220

Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 210
<211> 1386
<212> DNA
<213> 智人

<400> 210
atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcag caacaggtgc ccactcccag 60

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccagc tatggtatca gctgggtgcg acaggcccct 180

ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc agcgcttaca atggtgaaaa aaacactgca 240

cagaaactcc agggcagagt caccatgacc acagacacat ccacgagcac agcctacatg 300

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag agaggaacta 360

ggggctttg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttcagc ctccaccaag 420

ggcccatcgg tcttcccccl ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 540

gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac 660

gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc 720

gagtgcccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttcct cttccccca 780

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 840

gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900

aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 960

ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020

aaaggcctcc cagccccca cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa 1080

ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1140

acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200

cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctccttcttc 1260

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380

ggtaaa 1386

<210> 211
<211> 462
<212> PRT
<213> 智人

<400> 211

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

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

Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Glu Lys Asn Thr Ala
65 70 75 80

Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Glu Leu Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
225 230 235 240

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
260 265 270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
275 280 285

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val

305 310 315 320

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
340 345 350

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
355 360 365

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 212
<211> 318
<212> DNA
<213> 智人

<400> 212
tatgagctga ctcagccacc tcagtgtcc gtgtccccag gacagacagc cagcctcacc 60

tgctctggag ataaattggg ggatagatat gcttcctggt atcagcagaa gccaggccag 120

tcccctgtgc tggtcatcta tcaagatagc aagcggccct cagggatccc tgagcgattc 180

tctggctcca actctgggaa cacagccact ctgaccatca gcgggaccca ggctatggat 240

gaggctgact attactgtca ggcgtgggac agcagcactg catctgtctt cggaactggg 300

accaaggtca ccgtccta 318

<210> 213
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 213

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

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

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

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

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

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

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

<210> 214
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 214

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Arg Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 215
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 215

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 216
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 216

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Ser Val
1 5 10

<210> 217
<211> 702
<212> DNA
<213> 智人

<400> 217
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcc 60

agatgttatg agctgactca gccacccgtc agtgtccgtg gccccaggaca gacagccagc 120

ctcacctgct ctggagataa attgggggat agatatgctt cctggtatca gcagaagcca 180

ggccagtccc ctgtgctggt catctatcaa gatagcaagc ggccctcagg gatccctgag 240

cgattctctg gctccaactc tgggaacaca gccactctga ccatcagcgg gacccaggct 300

atggatgagg ctgactatta ctgtcaggcg tgggacagca gcactgcatc tgtcttcgga 360

actgggacca aggtcaccgt cctaggtcag cccaaggcca accccactgt cactctgttc 420

ccgccctcct ctgaggagct ccaagccaac aaggccacac tagtgtgtct gatcagtgac 480

ttctacccgg gagctgtgac agtggcctgg aaggcagatg gcagccccgt caaggcggga 540

gtggagacca ccaaaccctc caaacagagc aacaacaagt acgcggccag cagctacctg 600

agcctgacgc ccgagcagtg gaagtcccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 660

gggagcaccg tggagaagac agtggccccct acagaatgtt ca 702

<210> 218
<211> 234
<212> PRT
<213> 智人

<400> 218

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

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

Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Ser Leu Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu
35 40 45

Gly Asp Arg Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp
100 105 110

Ser Ser Thr Ala Ser Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
115 120 125

Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
130 135 140

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
165 170 175

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
180 185 190

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
195 200 205

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
210 215 220

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230

<210> 219

<211> 702
<212> DNA
<213> 智人

<400> 219
atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 180

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcatcatcag cagactggag 300

cctgaagatt ttgtagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcactcac tttcggcgga 360

gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 420

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 702

<210> 220
<211> 234
<212> PRT
<213> 智人

<400> 220

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ile Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Val Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Ser Ser Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 221
<211> 1401
<212> DNA
<213> 智人

<400> 221
atggactgga cctggagcat cctttttctg gtggcagcag caacaggtgc ccactcccag 60
gttcagctgg tgcagtctgg agatgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120
tgcaaggctt ctggttacac ctttatcaag tatggaatca gttgggtgcg acaggcccct 180
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc ggcgctttca atggtaacac agactatgca 240
cggaacctcc aggccagagt caccatgacc acagacacat ccacgagcac agcctacatg 300
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtatatt actgtgcgag agagggctgg 360
aacgacgact actttgcgg tttggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 420
tcagcctcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 480
gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 540
tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc 600
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcaactt cggcacccag 660
acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag 720
cgcaaatgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc 780
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 840
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc 960
cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 1020
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaaa 1080
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1140
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat gctggactcc 1260
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
ctctccctgt ctccgggtaa a 1401

<210> 222
<211> 467
<212> PRT
<213> 智人

<400> 222

```
Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1               5                  10                  15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Asp Glu Val Lys Lys
            20                  25                  30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
        35                  40                  45

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

Glu Trp Met Gly Trp Ile Gly Ala Phe Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Ala
65                  70                  75                  80

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Trp Asn Asp Asp Tyr Phe Cys Gly Leu
        115                 120                 125

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
    130                 135                 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
145                 150                 155                 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
                165                 170                 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
            180                 185                 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys
    210                 215                 220

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu
225                 230                 235                 240

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
                245                 250                 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            260                 265                 270
```

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 223
<211> 318
<212> DNA
<213> 智人

<400> 223
tatgagctga ctcagccacc ctcagtgtcc gtgtccccag gacagacagc caccatcacc 60

tgctctggag ataaattggg ggaaagatat gcgtcttggt atcagcagag gccaggccag 120

tcccctgtac tggtcatcta tcaagatatc aagcggccct cagggatccc tgagcgattc 180

tctggctcca actctgggaa cacagccact ctgaccatca gcgggaccca ggctatggat 240

gaggctgact atttctgtca ggcgtggtac agcagcacca atgtgctttt cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta 318

<210> 224
<211> 106

<212> PRT
<213> 智人

<400> 224

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

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

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

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

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

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

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

<210> 225
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 225

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Glu Arg Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 226
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 226

Gln Asp Ile Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 227
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 227

Gln Ala Trp Tyr Ser Ser Thr Asn Val Leu
1 5 10

<210> 228
<211> 702
<212> DNA
<213> 智人

<400> 228
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctggtggct gagaggtgcc 60

agatgttatg agctgactca gccaccctca gtgtccgtgt ccccaggaca gacagccacc 120

atcacctgct ctggagataa attgggggaa agatatgcgt cttggtatca gcagaggcca 180

ggccagtccc ctgtactggt catctatcaa gatatcaagc ggccctcagg gatccctgag 240

cgattctctg gctccaactc tgggaacaca gccactctga ccatcagcgg gacccaggct 300

atggatgagg ctgactattt ctgtcaggcg tggtacagca gcaccaatgt gcttttcggc 360

ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccccтcggt cactctgttc 420

ccgccctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tggtgtgtct cataagtgac 480

ttctacccgg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcggga 540

gtggagacca ccacaccctc caaacaaagc aacaacaagt acgcggccag cagctatctg 600

agcctgacgc ctgagcagtg gaagtcccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 660

gggagcaccg tggagaagac agtggcccct acagaatgtt ca 702

<210> 229
<211> 234
<212> PRT
<213> 智人

<400> 229

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

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

Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu
35 40 45

Gly Glu Arg Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp Ile Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp Tyr
100 105 110

Ser Ser Thr Asn Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
115 120 125

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
130 135 140

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
165 170 175

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
180 185 190

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
195 200 205

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
210 215 220

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230

<210> 230
<211> 696
<212> DNA
<213> 智人

<400> 230
atggcatgga tccctctctt cctcggcgtc cttgcttact gcacaggatc cgtggcctcc 60

tatgagctga ctcagccacc ctcagtgtcc gtgtccccag gacagacagc cagcctcacc 120

tgctctggag ataaattggg ggatagatat gcttcctggt atcagcagaa gccaggccag 180

tcccctgtgc tggtcatcta tcaagatagc aagcggccct cagggatccc tgagcgattc 240

tctggctcca actctgggaa cacagccact ctgaccatca gcgggaccca ggctatggat 300

gaggctgact attactgtca ggcgtgggac agcagcactg catgtgtctt cggaactggg 360

accaaggtca ccgtcctagg tcagcccaag gccaacccca ctgtcactct gttcccgccc 420

tcctctgagg agctccaagc caacaaggcc acactagtgt gtctgatcag tgacttctac 480

ccgggagctg tgacagtggc ctggaaggca gatggcagcc ccgtcaaggc gggagtggag 540

accaccaaac cctccaaaca gagcaacaac aagtacgcgg ccagcagcta cctgagcctg 600

acgcccgagc agtggaagtc ccacagaagc tacagctgcc aggtcacgca tgaagggagc 660

accgtggaga agacagtggc ccctacagaa tgttca 696

<210> 231
<211> 232
<212> PRT
<213> 智人

<400> 231

Met Ala Trp Ile Pro Leu Phe Leu Gly Val Leu Ala Tyr Cys Thr Gly
1 5 10 15

Ser Val Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser
20 25 30

Pro Gly Gln Thr Ala Ser Leu Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp
35 40 45

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

Val Ile Tyr Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr
85 90 95

Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser
100 105 110

Thr Ala Cys Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
115 120 125

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
130 135 140

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
165 170 175

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
180 185 190

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
195 200 205

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
210 215 220

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230

<210> 232
<211> 1398
<212> DNA
<213> 智人

<400> 232
atggagttig ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagcgt ctggattcac cctcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggtatgatg aaagtaataa atactatgca 240

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gttgaatctg 300

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctttgtatt actgtgcgag agccggtata 360

gcagcagccc ttgatgcttt tgatatctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcttca 420

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 480

agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 540

tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca 600

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg cacccagacc 660

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 720

aaatgttgtg tcgagtgccc accgtgccca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 780

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc 840

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 900

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 960

gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 1020

aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg 1080

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1140

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 1260

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380

tccctgtctc cgggtaaa 1398

<210> 233
<211> 466
<212> PRT
<213> 智人

<400> 233

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu
35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Glu Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Gly Ile Ala Ala Ala Leu Asp Ala Phe Asp
115 120 125

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145 150 155 160

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
210 215 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
225 230 235 240

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 234
<211> 318
<212> DNA
<213> 智人

<400> 234

tatgagctga ctcagccacc ctcagtgtcc gtgtccccag gacagacagc caccatcacc 60

tgctctggag ataaattggg ggaaagatat gcgtcttggt atcagcagag gccaggccag 120

tcccctgtac tggtcatcta tcaagatagc aagcggccct cagggatccc tgagcgattc 180

tctggctcca actctgggaa cacagccact ctgaccatca gcgggaccca ggctatggat 240

gaggctgact atttctgtca ggcgtggtac agcagcacca atgtgctttt cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta 318

<210> 235
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 235

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

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

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

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

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

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

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

<210> 236
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 236

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Glu Arg Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 237
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 237

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 238
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 238

Gln Ala Trp Tyr Ser Ser Thr Asn Val Leu
1 5 10

<210> 239
<211> 702
<212> DNA
<213> 智人

<400> 239
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcc 60

agatgttatg agctgactca gccaccctca gtgtccgtgt ccccaggaca gacagccacc 120

atcacctgct ctggagataa attgggggaa agatatgcgt cttggtatca gcagaggcca 180

ggccagtccc ctgtactggt catctatcaa gatagcaagc ggccctcagg gatccctgag 240

cgattctctg gctccaactc tgggaacaca gccactctga ccatcagcgg gacccaggct 300

atggatgagg ctgactattt ctgtcaggcg tggtacagca gcaccaatgt gcttttcggc 360

ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccctcggt cactctgttc 420

ccgccctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tggtgtgtct cataagtgac 480

ttctacccgg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcggga 540

gtggagacca ccacaccctc caaacaaagc aacaacaagt acgcggccag cagctatctg 600

agcctgacgc ctgagcagtg gaagtcccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 660

gggagcaccg tggagaagac agtggccct acagaatgtt ca 702

<210> 240
<211> 234
<212> PRT
<213> 智人

<400> 240

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

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

Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu
35 40 45

Gly Glu Arg Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp Tyr
100 105 110

Ser Ser Thr Asn Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
115 120 125

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
130 135 140

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
165 170 175

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
180 185 190

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
195 200 205

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
210 215 220

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230

<210> 241
<211> 708
<212> DNA
<213> 智人

<400> 241
atggcctggt ctcctctcct cctcactctc ctcgctcact gcacagggtc ctgggcccag 60

tctgtgttga cgcagccgcc ctcactgtct ggggccccag ggcagagggt caccatctcc 120

tgcactgggg gcagctccaa catcgggtca ggttttgcta tatactggta ccagcagctt 180

ccaggaacag cccccaaact cctcatctat ggtgacaaca ttcggccctc aggggtccct 240

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tccgcctccc tggccatcac tgggctccag 300

gctgaggatg aggctgatta ttactgccag tcctatgaca gcagcctgag tggttcggta 360

ttcggcggag gaccaagct gaccgtccta agtcagccca aggctgcccc ctcggtcact 420

ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa gccaacaagg ccacactggt gtgtctcata 480

agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtcaag 540

gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc 600

tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg 660

catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gcccctacag aatgttca 708

<210> 242
<211> 236
<212> PRT
<213> 智人

<400> 242

Met Ala Trp Ser Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly
1 5 10 15

Ser Trp Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Gly Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Gly Ser Ser Asn Ile
35 40 45

Gly Ser Gly Phe Ala Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala
50 55 60

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile
85 90 95

Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr
100 105 110

Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
115 120 125

Val Leu Ser Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile
145 150 155 160

Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser
165 170 175

Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser
180 185 190

Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln
195 200 205

Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser
210 215 220

Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 243
<211> 1329
<212> DNA
<213> 智人

<400> 243
caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggtta caccttttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtga aacaaacact 180

gcacagaaac tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagaggaa 300

ctaggggctt ttgatatctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcttc agcctccacc 360

aagggcccat cggtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 420

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480

ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtcctc aggactctac 540

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc 600

aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 660

gtcgagtgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc 720

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacgtg cgtggtggtg 780

gacgtgagcc acgaagaccc cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 840

cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 900

gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 960

aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1020

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1080

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1140

gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctccttc 1200

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1260

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1320

ccgggtaaa 1329

<210> 244
<211> 443
<212> PRT
<213> 智人

<400> 244

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Glu Thr Asn Thr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Glu Leu Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

```
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn
            180                 185                 190

Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
        195                 200                 205

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro
    210                 215                 220

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225                 230                 235                 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
                245                 250                 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
            260                 265                 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
        275                 280                 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
    290                 295                 300

Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305                 310                 315                 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
                325                 330                 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
            340                 345                 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
        355                 360                 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
    370                 375                 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385                 390                 395                 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
                405                 410                 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
            420                 425                 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 245

<211> 318
<212> DNA
<213> 智人

<400> 245
tatgagctga ctcagccccc ctcagtgtcc gtgtccccag gacagacagc cagcatcacc 60

tgttctggag ataaaatggg ggaaagatat gcttcctggt atcagcagaa gccaggccag 120

tcccctatac tggtcatcta tcaagatacc aagcggccct cagggatccc tgagcgattc 180

tctggctcca actctgggaa cacagccact ctgaccatca gcgggaccca ggctatggat 240

gaggctgact attactgtca ggcgtggtac agcagcacca atgtggtatt cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta 318

<210> 246
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 246

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

Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Met Gly Glu Arg Tyr Ala Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 247
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 247

Ser Gly Asp Lys Met Gly Glu Arg Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 248
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 248

Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 249
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 249

Gln Ala Trp Tyr Ser Ser Thr Asn Val Val
1 5 10

<210> 250
<211> 702
<212> DNA
<213> 智人

<400> 250
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcc 60

agatgttatg agctgactca gccccctca gtgtccgtgt ccccaggaca gacagccagc 120

atcacctgtt ctggagataa aatgggggaa agatatgctt cctggtatca gcagaagcca 180

ggccagtccc ctatactggt catctatcaa gataccaagc ggccctcagg gatccctgag 240

cgattctctg gctccaactc tgggaacaca gccactctga ccatcagcgg gacccaggct 300

atggatgagg ctgactatta ctgtcaggcg tggtacagca gcaccaatgt ggtattcggc 360

ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccccтcggt cactctgttc 420

ccgccctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tggtgtgtct cataagtgac 480

ttctacccgg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcggga 540

gtggagacca ccacaccctc caaacaaagc aacaacaagt acgcggccag cagctatctg 600

agcctgacgc ctgaacagtg gaagtcccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 660

gggagcaccg tggagaagac agtggcccct acagaatgtt ca 702

<210> 251
<211> 234
<212> PRT
<213> 智人

<400> 251

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

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

Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Met
35 40 45

Gly Glu Arg Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Ile Leu Val Ile Tyr Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Tyr
100 105 110

Ser Ser Thr Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
115 120 125

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
130 135 140

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
165 170 175

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
180 185 190

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
195 200 205

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
210 215 220

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230

<210> 252
<211> 696
<212> DNA
<213> 智人

<400> 252
atggcatgga tccctctctt cctcggcgtc cttgcttact gcacaggatc cgtggcctcc 60

tatgagctga ctcagccacc ctcagtgtcc gtgtccccag gacagacagc caccatcacc 120

tgctctggag ataaattggg ggaaagatat gcgtgttggt atcagcagag gccaggccag 180

tcccctgtac tggtcatcta tcaagatatc aagcggccct cagggatccc tgagcgattc 240

tctggctcca actctgggaa cacagccact ctgaccatca gcgggaccca ggctatggat 300

gaggctgact atttctgtca ggcgtggtac agcagcacca atgtgctttt cggcggaggg 360

accaagctga ccgtcctagg tcagcccaag gctgcccccc cggtcactct gttcccgccc 420

tcctctgagg agcttcaagc caacaaggcc acactggtgt gtctcataag tgacttctac 480

ccgggagccg tgacagtggc ctggaaggca gatagcagcc ccgtcaaggc gggagtggag 540

accaccacac cctccaaaca aagcaacaac aagtacgcgg ccagcagcta tctgagcctg 600

acgcctgagc agtggaagtc ccacagaagc tacagctgcc aggtcacgca tgaagggagc 660

accgtggaga agacagtggc ccctacagaa tgttca 696

<210> 253
<211> 232
<212> PRT
<213> 智人

<400> 253

Met Ala Trp Ile Pro Leu Phe Leu Gly Val Leu Ala Tyr Cys Thr Gly
1 5 10 15

Ser Val Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser
20 25 30

Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Glu
35 40 45

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

Val Ile Tyr Gln Asp Ile Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr
85 90 95

Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp Tyr Ser Ser
100 105 110

Thr Asn Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
115 120 125

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
130 135 140

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
165 170 175

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
180 185 190

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
195 200 205

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
210 215 220

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230

<210> 254
<211> 1398
<212> DNA
<213> 智人

<400> 254
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggtatgctg aaagtaataa atactacgca 240

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agcccaggag 360

ggtatagccc ctgacgcttt tgatatctgg ggccaaggaa caatggtcac cgtctcttca 420

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 480

agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 540

tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca 600

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg cacccagacc 660

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 720

aaatgttgtg tcgagtgccc accgtgccca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 780

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc 840

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 900

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 960

gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 1020

aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg 1080

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1140

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 1260

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380

tccctgtctc cgggtaaa 1398

<210> 255
<211> 466
<212> PRT
<213> 智人

<400> 255

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Ala Glu Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Gln Glu Gly Ile Ala Pro Asp Ala Phe Asp
115 120 125

```
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145                 150                 155                 160

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
    210                 215                 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
225                 230                 235                 240

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
                245                 250                 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
        275                 280                 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
    290                 295                 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
305                 310                 315                 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
            340                 345                 350

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
        355                 360                 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
    370                 375                 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385                 390                 395                 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
                405                 410                 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
            420                 425                 430
```

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 256
<211> 696
<212> DNA
<213> 智人

<400> 256
atggcatgga tccctctctt cctcggcgtc cttgcttact gcacaggatc cgtggcctcc 60

tatgagctga ctcagccacc ctcagtgtcc gtgtccccag gacagacagc caccatcacc 120

tgctctggag ataaattggg ggaaagatat gcgtgttggt atcagcagag gccaggccag 180

tcccctgtac tggtcatcta tcaagatagc aagcggccct cagggatccc tgagcgattc 240

tctggctcca actctgggaa cacagccact ctgaccatca gcgggaccca ggctatggat 300

gaggctgact atttctgtca ggcgtggtac agcagcacca atgtgctttt cggcggaggg 360

accaagctga ccgtcctagg tcagcccaag gctgcccccc cggtcactct gttcccgccc 420

tcctctgagg agcttcaagc caacaaggcc acactggtgt gtctcataag tgacttctac 480

ccgggagccg tgacagtggc ctggaaggca gatagcagcc ccgtcaaggc gggagtggag 540

accaccacac cctccaaaca aagcaacaac aagtacgcgg ccagcagcta tctgagcctg 600

acgcctgagc agtggaagtc ccacagaagc tacagctgcc aggtcacgca tgaagggagc 660

accgtggaga agacagtggc ccctacagaa tgttca 696

<210> 257
<211> 232
<212> PRT
<213> 智人

<400> 257

Met Ala Trp Ile Pro Leu Phe Leu Gly Val Leu Ala Tyr Cys Thr Gly
1 5 10 15

Ser Val Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser
20 25 30

Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Glu
35 40 45

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

Val Ile Tyr Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr
85 90 95

Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp Tyr Ser Ser
100 105 110

Thr Asn Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
115 120 125

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
130 135 140

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
165 170 175

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
180 185 190

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
195 200 205

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
210 215 220

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230

<210> 258
<211> 1398
<212> DNA
<213> 智人

<400> 258
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taaggggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggtatgctg aaagtaataa atactacgca 240

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agcccaggag 360

ggtatagccc ctgacgcttt tgatatctgg ggccaaggaa caatggtcac cgtctcttca 420

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 480

agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 540

tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca 600

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg cacccagacc 660

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 720

aaatgttgtg tcgagtgccc accgtgccca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 780

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc 840

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 900

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 960

gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 1020

aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg 1080

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1140

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 1260

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380

tccctgtctc cgggtaaa 1398

<210> 259
<211> 466
<212> PRT
<213> 智人

<400> 259

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Ala Glu Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Gln Glu Gly Ile Ala Pro Asp Ala Phe Asp
115 120 125

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145 150 155 160

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

```
Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
    210                 215                 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
225                 230                 235                 240

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
                245                 250                 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
        275                 280                 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
    290                 295                 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
305                 310                 315                 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
            340                 345                 350

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
        355                 360                 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
    370                 375                 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385                 390                 395                 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
                405                 410                 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
            420                 425                 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
        435                 440                 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
    450                 455                 460

Gly Lys
465
```

<210> 260
<211> 705
<212> DNA
<213> 智人

<400> 260

atggcctggg ctccactact tctcaccctc ctcgctcact gcacaggttc ttgggccaat 60

tttatgctga ctcagcccca ctctgtgtcg gagtctccgg ggaagacggt aaccatctcc 120

tgcacccgca gcagtggcag cattgccagc tactatgtgc agtggtacca gcagcgcccg 180

ggcagttccc ccaccactgt gatctatgag gatagccaga gaccctctgg ggtccctgat 240

cggttctctg gctccatcga cagctcctcc aactctgcct ccctcaccat ctctggactg 300

aagactgagg acgaggctga ctattattgt cagtcttatg atagcagcaa tgtggtattc 360

ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaggt cagcccaagg ctgccccctc ggtcactctg 420

ttcccgccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt 480

gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 540

ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctat 600

ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat 660

gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttca 705

<210> 261
<211> 235
<212> PRT
<213> 智人

<400> 261

Met Ala Trp Ala Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly
1 5 10 15

Ser Trp Ala Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser
20 25 30

Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile
35 40 45

Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro
50 55 60

Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser
100 105 110

Tyr Asp Ser Ser Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
115 120 125

Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser
130 135 140

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser
145 150 155 160

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser
165 170 175

Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn
180 185 190

Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp
195 200 205

Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr
210 215 220

Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 262
<211> 1404
<212> DNA
<213> 智人

<400> 262
atgtctgtct ccttcctcat cttcctgccc gtgctgggcc tcccatgggg tgtcctgtca 60
caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 120
acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttggaa ctggatcagg 180
cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggttt 240
aatgattatg cagtatctgt gcaaagtcga ataaccatca acccagacac atccaagaac 300
cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 360
agagggattg tcttctccta cgctatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 420
tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 480
tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctacag 600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc 660
cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt 720
gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 780
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840
acgtgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 960
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 1020
aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc 1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac 1260
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380
agcctctccc tgtctccggg taaa 1404

<210> 263
<211> 468
<212> PRT

<213> 智人

<400> 263

```
Met Ser Val Ser Phe Leu Ile Phe Leu Pro Val Leu Gly Leu Pro Trp
1               5                  10                  15

Gly Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val
            20                  25                  30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser
        35                  40                  45

Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser
    50                  55                  60

Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Phe
65                  70                  75                  80

Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Gln Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp
                85                  90                  95

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu
            100                 105                 110

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ile Val Phe Ser Tyr Ala
        115                 120                 125

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
    130                 135                 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
145                 150                 155                 160

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
                165                 170                 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
            180                 185                 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
        195                 200                 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
    210                 215                 220

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
225                 230                 235                 240

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
                245                 250                 255

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            260                 265                 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        275                 280                 285
```

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
305 310 315 320

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro Gly Lys
465

<210> 264
<211> 696
<212> DNA
<213> 智人

<400> 264
atggcatgga tccctctctt cctcggcgtc cttgcttact gcacaggatc cgtggcctcc 60

tatgagctga ctcagccccc ctcagtgtcc gtgtccccag gacagacagc cagcatcacc 120

tgttctggag ataaaatggg ggaaagatat gcttgctggt atcagcagaa gccaggccag 180

tcccctatac tggtcatcta tcaagatacc aagcggccct cagggatccc tgagcgattc 240

tctggctcca actctgggaa cacagccact ctgaccatca gcgggaccca ggctatggat 300

gaggctgact attactgtca ggcgtggtac agcagcacca atgtggtatt cggcggaggg 360

accaagctga ccgtcctagg tcagcccaag gctgccccct cggtcactct gttcccgccc 420

tcctctgagg agcttcaagc caacaaggcc acactggtgt gtctcataag tgacttctac 480

ccgggagccg tgacagtggc ctggaaggca gatagcagcc ccgtcaaggc gggagtggag 540

accaccacac cctccaaaca aagcaacaac aagtacgcgg ccagcagcta tctgagcctg 600

acgcctgaac agtggaagtc ccacagaagc tacagctgcc aggtcacgca tgaagggagc 660

accgtggaga agacagtggc ccctacagaa tgttca 696

<210> 265
<211> 232
<212> PRT
<213> 智人

<400> 265

Met Ala Trp Ile Pro Leu Phe Leu Gly Val Leu Ala Tyr Cys Thr Gly
1 5 10 15

Ser Val Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser
20 25 30

Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Met Gly Glu
35 40 45

Arg Tyr Ala Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Ile Leu
50 55 60

Val Ile Tyr Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr
85 90 95

Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Tyr Ser Ser
100 105 110

Thr Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
115 120 125

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
130 135 140

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
165 170 175

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
180 185 190

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
195 200 205

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
210 215 220

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230

<210> 266
<211> 1398
<212> DNA

<213> 智人

<400> 266

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggtatgttg gaagtaataa atactatgca 240

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agcccaggag 360

ggtatggccc ctgatgcttt tgatatctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcttca 420

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 480

agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 540

tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca 600

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg cacccagacc 660

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 720

aaatgttgtg tcgagtgccc accgtgccca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 780

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc 840

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 900

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 960

gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 1020

aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg 1080

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1140

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 1260

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380

tccctgtctc cgggtaaa 1398

<210> 267
<211> 466
<212> PRT
<213> 智人

<400> 267

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

```
Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Val Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
65                  70                  75                  80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
                85                  90                  95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Gln Glu Gly Met Ala Pro Asp Ala Phe Asp
        115                 120                 125

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145                 150                 155                 160

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
    210                 215                 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
225                 230                 235                 240

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
                245                 250                 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
        275                 280                 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
    290                 295                 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
305                 310                 315                 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
            340                 345                 350

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
        355                 360                 365
```

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 268
<211> 711
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 268
atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60

aacatcgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120

atatcctgca gagccagtga aagtgttgat agttatggca atagttttat gcactggtac 180

cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagaatct 240

ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattgat 300

cctgtggagg ctgatgatgc tgcaacctat tactgtcagc aaaataatga ggatcggacg 360

ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa cgggctgatg ctgcaccaac tgtatccatc 420

ttcccaccat ccagtgagca gttaacatct ggaggtgcct cagtcgtgtg cttcttgaac 480

aacttctacc ccaaagacat caatgtcaag tggaagattg atggcagtga acgacaaaat 540

ggcgtcctga acagttggac tgatcaggac agcaaagaca gcacctacag catgagcagc 600

accctcacgt tgaccaagga cgagtatgaa cgacataaca gctatacctg tgaggccact 660

cacaagacat caacttcacc attgtcaag agcttcaaca ggaatgagtg t 711

<210> 269
<211> 237
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 269

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

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

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser
130 135 140

Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn
145 150 155 160

Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser
165 170 175

Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys
180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu
195 200 205

Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser
210 215 220

Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230 235

<210> 270
<211> 1419
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 270
atgggttggc tgtggaactt gctatcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag 60

atccagttgg tacagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120

tgcaaggctt ctgggtatac cttcacaacc tatggaatga gctgggtgaa acaggctcca 180

ggaaagggtt taaagtggat gggctggata aacacctact ctggagtgcc aacatatgct 240

gatgacttca agggacggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctatttg 300

cagatcaaca acctcaaaaa tgaggacacg gctacatatt tctgtgcaag cttatggtac 360

tacggtaggg cctttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctcagccaaa 420

acaacagccc catcggtcta tccactggcc cctgtgtgtg gaggtacaac tggctcctcg 480

gtgactctag gatgcctggt caagggttat ttccctgagc cagtgacctt gacctggaac 540

tctggatccc tgtccagtgg tgtgcacacc ttcccagctc tcctgcagtc tggcctctac 600

accctcagca gctcagtgac tgtaacctcg aacacctggc ccagccagac catcacctgc 660

aatgtggccc acccggcaag cagcaccaaa gtggacaaga aaattgagcc cagagtgccc 720

ataacacaga acccctgtcc tccactcaaa gagtgtcccc catgcgcagc tccagacctc 780

ttgggtggac catccgtctt catcttccct ccaaagatca aggatgtact catgatctcc 840

ctgagcccca tggtcacatg tgtggtggtg gatgtgagcg aggatgaccc agacgtccag 900

atcagctggt ttgtgaacaa cgtggaagta cacacagctc agacacaaac ccatagagag 960

gattacaaca gtactctccg ggtggtcagt gccctcccca tccagcacca ggactggatg 1020

agtggcaagg agttcaaatg caaggtcaac aacagagccc tcccatcccc catcgagaaa 1080

accatctcaa aacccagagg gccagtaaga gctccacagg tatatgtctt gcctccacca 1140

gcagaagaga tgactaagaa agagttcagt ctgacctgca tgatcacagg cttcttacct 1200

gccgaaattg ctgtggactg gaccagcaat gggcgtacag agcaaaacta caagaacacc 1260

gcaacagtcc tggactctga tggttcttac ttcatgtaca gcaagctcag agtacaaaag 1320

agcacttggg aaagaggaag tctttcgcc tgctcagtgg tccacgaggg tctgcacaat 1380

caccttacga ctaagaccat ctcccggtct ctgggtaaa 1419

<210> 271
<211> 473
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 271

Met Gly Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Ala Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Thr Tyr Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Ser Leu Trp Tyr Tyr Gly Arg Ala Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro
130 135 140

```
Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser
145                 150                 155                 160

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
                165                 170                 175

Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro
            180                 185                 190

Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val
        195                 200                 205

Thr Ser Asn Thr Trp Pro Ser Gln Thr Ile Thr Cys Asn Val Ala His
    210                 215                 220

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Val Pro
225                 230                 235                 240

Ile Thr Gln Asn Pro Cys Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Ala
                245                 250                 255

Ala Pro Asp Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
            260                 265                 270

Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val
        275                 280                 285

Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe
    290                 295                 300

Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu
305                 310                 315                 320

Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His
                325                 330                 335

Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg
            340                 345                 350

Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro
        355                 360                 365

Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met
    370                 375                 380

Thr Lys Lys Glu Phe Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe Leu Pro
385                 390                 395                 400

Ala Glu Ile Ala Val Asp Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn
                405                 410                 415

Tyr Lys Asn Thr Ala Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met
            420                 425                 430

Tyr Ser Lys Leu Arg Val Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu
        435                 440                 445
```

Phe Ala Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr
450 455 460

Lys Thr Ile Ser Arg Ser Leu Gly Lys
465 470

<210> 272
<211> 711
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 272
atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120

atatcctgca gagccagtga aagttttgat agttatggca atagttttat gcactggtac 180

cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 240

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 300

cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcacc aaagtaatga ggagtacacg 360

ttcggagggg ggaccaagct ggaaataaaa cgggctgatg ctgcaccaac tgtatccatc 420

ttcccaccat ccagtgagca gttaacatct ggaggtgcct cagtcgtgtg cttcttgaac 480

aacttctacc ccaaagacat caatgtcaag tggaagattg atggcagtga acgacaaaat 540

ggcgtcctga acagttggac tgatcaggac agcaaagaca gcacctacag catgagcagc 600

accctcacgt tgaccaagga cgagtatgaa cgacataaca gctatacctg tgaggccact 660

cacaagacat caacttcacc attgtcaag agcttcaaca ggaatgagtg t 711

<210> 273
<211> 237
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 273

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

His Gln Ser Asn Glu Glu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser
130 135 140

Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn
145 150 155 160

Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser
165 170 175

Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys
180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu
195 200 205

Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser
210 215 220

Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230 235

<210> 274
<211> 1383
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 274
atgggttggc tgtggaactt gctattcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag 60

atccagttgg tacagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120

tgcaaggctt ctgggtatac cttcacaacc tatggaatga gctgggtgaa acaggctcca 180

ggaaagggtt taaagtggat gggctggata aatacctact ctggagtgcc aacatatgct 240

gatgacttca agggacggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctatttg 300

cagatcaaca acctcaaaaa tgaggacacg gctacatatt tctgtggaag agaccactac 360

tacggggagg ttgcttactg gggccaaggg actctggtca ctgtctctgc agccaaaacg 420

acaccccccat ctgtctatcc actggccccct ggatctgctg cccaaactaa ctccatggtg 480

accctgggat gcctggtcaa gggctatttc cctgagccag tgacagtgac ctggaactct 540

ggatccctgt ccagcggtgt gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacact 600

ctgagcagct cagtgactgt cccctccagc acctggccca gccagaccgt cacctgcaac 660

gttgcccacc cggccagcag caccaaggtg gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtggt 720

tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa gtatcatctg tcttcatctt cccccaaag 780

cccaaggatg tgctcaccat tactctgact cctaaggtca cgtgtgttgt ggtagacatc 840

agcaaggatg atcccgaggt ccagttcagc tggtttgtag atgatgtgga ggtgcacaca 900

gctcagacga aaccccggga ggagcagatc aacagcactt tccgttcagt cagtgaactt 960

cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagttca aatgcagggt caacagtgca 1020

gctttccctg cccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca 1080

caggtgtaca ccattccacc tcccaaggag cagatggcca aggataaagt cagtctgacc 1140

tgcatgataa caaacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag 1200

ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttacttcgtc 1260

tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct 1320

gtgttacatg agggcctgca caaccaccat actgagaaga gcctctccca ctctcctggt 1380

aaa 1383

<210> 275
<211> 461
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 275

Met Gly Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Ala Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Thr Tyr Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Gly Arg Asp His Tyr Tyr Gly Glu Val Ala Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
130 135 140

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
145 150 155 160

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
195 200 205

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
210 215 220

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
225 230 235 240

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
275 280 285

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
305 310 315 320

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
325 330 335

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
355 360 365

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
370 375 380

Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
385 390 395 400

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly
405 410 415

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
420 425 430

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
435 440 445

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 276
<211> 711
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 276
atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120

atatcctgca gagccagtga aagtgttgat agttttggca tagttttat gcactggtac 180

cagctgaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 240

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 300

cctgtggagg ctgatgatgt tgcaatttat tactgtcagc aaagtaatga ggagtacacg 360

ttcggagggg ggaccaagct ggaaataaaa cgggctgatg ctgcaccaac tgtatccatc 420

ttcccaccat ccagtgagca gttaacatct ggaggtgcct cagtcgtgtg cttcttgaac 480

aacttctacc ccaaagacat caatgtcaag tggaagattg atggcagtga acgacaaaat 540

ggcgtcctga acagttggac tgatcaggac agcaaagaca gcacctacag catgagcagc 600

accctcacgt tgaccaagga cgagtatgaa cgacataaca gctatacctg tgaggccact 660

cacaagacat caacttcacc cattgtcaag agcttcaaca ggaatgagtg t 711

<210> 277
<211> 237
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 277

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

Val Asp Ser Phe Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Asn Glu Glu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser
130 135 140

Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn
145 150 155 160

Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser
165 170 175

Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys
180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu
195 200 205

Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser
210 215 220

Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230 235

<210> 278
<211> 1383
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 278
atgggttggc tgtggaactt gctattcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag 60

atccagttgg tacagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120

tgcaaggctt ctgggtatac cttcacaacc tatggaatga gctgggtgaa acaggctcca 180

ggaaagggtt taaagtggat gggctggata aacacctcct ctggagtgcc aacatatgct 240

gatgacttca tgggacggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctatttg 300

cagatcaaca acctcaaaaa tgaggacacg gctacgtatt tctgtgcaag agaccgctac 360

tacggggagg ttgcttactg gggccaaggg actctggtca ccgtctctgc agccaaaacg 420

acaccccccat ctgtctatcc actggccccct ggatctgctg cccaaactaa ctccatggtg 480

accctgggat gcctggtcaa gggctatttc cctgagccag tgacagtgac ctggaactct 540

ggatccctgt ccagcggtgt gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacact 600

ctgagcagct cagtgactgt ccccctccagc acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac 660

gttgcccacc cggccagcag caccaaggtg gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtggt 720

tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa gtatcatctg tcttcatctt cccccccaaag 780

cccaaggatg tgctcaccat tactctgact cctaaggtca cgtgtgttgt ggtagacatc 840

agcaaggatg atcccgaggt ccagttcagc tggtttgtag atgatgtgga ggtgcacaca 900

gctcagacgc aaccccggga ggagcagttc aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt 960

cccatcatgc atcaggactg gctcaatggc aaggagttca aatgcagggt caacagtgca 1020

gctttccctg cccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca 1080

caggtgtaca ccattccacc tcccaaggag cagatggcca aggataaagt cagtctgacc 1140

tgcatgataa cagacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag 1200

ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttacttcgtc 1260

tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct 1320

gtgttacatg agggcctgca caaccaccat actgagaaga gcctctccca ctctcctggt 1380

aaa 1383

<210> 279
<211> 461
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 279

Met Gly Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Ala Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys

```
            20                  25                  30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
        35                  40                  45

Thr Thr Tyr Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Ser Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala
65                  70                  75                  80

Asp Asp Phe Met Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
                85                  90                  95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
            100                 105                 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Tyr Gly Glu Val Ala Tyr Trp Gly
        115                 120                 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
    130                 135                 140

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
145                 150                 155                 160

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
                165                 170                 175

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
            180                 185                 190

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
        195                 200                 205

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
    210                 215                 220

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
225                 230                 235                 240

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
                245                 250                 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
            260                 265                 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
        275                 280                 285

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
    290                 295                 300

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
305                 310                 315                 320
```

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
325 330 335

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
355 360 365

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
370 375 380

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
385 390 395 400

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly
405 410 415

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
420 425 430

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
435 440 445

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 280
<211> 696
<212> DNA
<213> 褐家鼠

<400> 280
atggctccag tccaacttct agggcttttg ctgctctgcc tccgagccat gagatgtgac 60

atccagatga cccagtctcc ttcactcctg tcagcatctg tgggagacag agtcactctc 120

agctgcaaag caagtcagaa tatttacaag tacttaaact ggtatcagca aaagcttgga 180

gaagctccca aactcctgat atattataca aacagtttgc aaacgggcat cccatcaagg 240

ttcagtggca gtggatctgg tacagatttc acacttacca tcagcagcct gcagcctgaa 300

gatgttgcca catattactg ctatcagtat aacagtgggc ccacgtttgg agctgggacc 360

aagctggaac tgaaacgggc tgatgctgca ccaactgtat ctatcttccc accatccacg 420

gaacagttag caactggagg tgcctcagtc gtgtgcctca tgaacaactt ctatcccaga 480

gacatcagtg tcaagtggaa gattgatggc actgaacgac gagatggtgt cctggacagt 540

gttactgatc aggacagcaa agacagcacg tacagcatga gcagcaccct ctcgttgacc 600

aaggctgact atgaaagtca taacctctat acctgtgagg ttgttcataa gacatcatcc 660

tcacccgtcg tcaagagctt caacaggaat gagtgt 696

<210> 281
<211> 232
<212> PRT
<213> 褐家鼠

<400> 281

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Leu Arg Ala

1 5 10 15

Met Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala
20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile
35 40 45

Tyr Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Ala Pro Lys
50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Asn Ser
100 105 110

Gly Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp
115 120 125

Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Thr Glu Gln Leu Ala
130 135 140

Thr Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Leu Met Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Asp Ile Ser Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Thr Glu Arg Arg Asp Gly
165 170 175

Val Leu Asp Ser Val Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Met Ser Ser Thr Leu Ser Leu Thr Lys Ala Asp Tyr Glu Ser His Asn
195 200 205

Leu Tyr Thr Cys Glu Val Val His Lys Thr Ser Ser Ser Pro Val Val
210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230

<210> 282
<211> 1395
<212> DNA
<213> 褐家鼠

<400> 282
atgggcaggc ttacttcctc attcctgctg ctgattatcc ctgcatatgt cttgtctcag 60

gttactctga aagagtctgg ccctgggata ttgcagcctt cccagaccct cagtctgact 120

tgctctttct ctgggtttte actgagcact tctggtatat gtgtgagctg gattcgtcag 180

ccttcaggga agggtctgga gtggctggca actatttgtt gggaggatag taagggctac 240

aaccctctc tgaagaaccg gctcacaatc tccaaggaca cctccaacaa ccaagcattc 300

ctcaagatca ccagtgtgga cactgcagat accgccatat actactgtgc tcggcccctt 360

aactacggag ggtatagtga gctagaattg gattactggg gccaaggagt catggtcaca 420

gtctcctcag ctgaaacaac agccccatct gtctatccac tggctcctgg aactgctctc 480

aaaagtaact ccatggtgac cctgggatgc ctggtcaagg gctatttccc tgagccagtc 540

accgtgacct ggaactctgg agccctgtcc agcggtgtgc acaccttccc agctgtcctg 600

cagtctggac tctacactct caccagctca gtgactgtac cctccagcac ctggtccagc 660

caggccgtca cctgcaacgt agcccacccg gccagcagca ccaaggtgga caagaaaatt 720

gtgccaaggg aatgcaatcc ttgtggatgt acaggctcag aagtatcatc tgtcttcatc 780

ttcccccaa agaccaaaga tgtgctcacc atcactctga ctcctaaggt cacgtgtgtt 840

gtggtagaca ttagccagaa tgatcccgag gtccggttca gctggtttat agatgacgtg 900

gaagtccaca cagctcagac tcatgccccg gagaagcagt ccaacagcac tttacgctca 960

gtcagtgaac tccccatcgt gcaccgggac tggctcaatg gcaagacgtt caaatgcaaa 1020

gtcaacagtg gagcattccc tgcccccatc gagaaaagca tctccaaacc cgaaggcaca 1080

ccacgaggtc cacaggtata caccatggcg cctcccaagg aagagatgac ccagagtcaa 1140

gtcagtatca cctgcatggt aaaaggcttc tatccccag acatttatac ggagtggaag 1200

atgaacgggc agccacagga aaactacaag aacactccac ctacgatgga cacagatggg 1260

agttacttcc tctacagcaa gctcaatgta aagaaagaaa catggcagca gggaaacact 1320

ttcacgtgtt ctgtgctgca tgagggcctg cacaaccacc atactgagaa gagtctctcc 1380

cactctccgg gtaaa 1395

<210> 283
<211> 465
<212> PRT
<213> 褐家鼠

<400> 283

Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Ile Pro Ala Tyr
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Ile Cys Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala Thr Ile Cys Trp Glu Asp Ser Lys Gly Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn
85 90 95

Asn Gln Ala Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Leu Asn Tyr Gly Gly Tyr Ser Glu Leu

115 120 125

Glu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140

Glu Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu
145 150 155 160

Lys Ser Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe
165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser Gly
180 185 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Thr
195 200 205

Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Ser Ser Gln Ala Val Thr
210 215 220

Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile
225 230 235 240

Val Pro Arg Glu Cys Asn Pro Cys Gly Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser
245 250 255

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Thr Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr
260 265 270

Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asn Asp
275 280 285

Pro Glu Val Arg Phe Ser Trp Phe Ile Asp Asp Val Glu Val His Thr
290 295 300

Ala Gln Thr His Ala Pro Glu Lys Gln Ser Asn Ser Thr Leu Arg Ser
305 310 315 320

Val Ser Glu Leu Pro Ile Val His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Thr
325 330 335

Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Gly Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys
340 345 350

Ser Ile Ser Lys Pro Glu Gly Thr Pro Arg Gly Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365

Met Ala Pro Pro Lys Glu Glu Met Thr Gln Ser Gln Val Ser Ile Thr
370 375 380

Cys Met Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Thr Glu Trp Lys
385 390 395 400

Met Asn Gly Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met
405 410 415

Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys
420 425 430

Glu Thr Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
435 440 445

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 284
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa 可為任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> Xaa 可為任何天然存在之胺基酸

<400> 284

Val Ile Xaa Tyr Xaa Xaa Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 285
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa 可為任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa 可為任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(11)
<223> Xaa 可為任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(15)
<223> Xaa 可為任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> Xaa 可為任何天然存在之胺基酸

<400> 285

Trp Ile Xaa Ala Xaa Asn Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Gln
1 5 10 15

Xaa

<210> 286
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<400> 286

Ala Gln Glu Gly Xaa Ala Pro Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 287
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<400> 287

Gln Ala Trp Tyr Ser Ser Thr Asn Val Xaa
1 5 10

<210> 288
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<400> 288

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Xaa Xaa
1 5 10

<210> 289
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(9)
<223> Xaa可為任何胺基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(11)
<223> Xaa可為任何胺基酸或不存在

<400> 289

Gln Ser Asp Tyr Ser Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 290
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 290
cagtctgtgc tgactcagcc accctcaacg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gaagcaactc caacatcgga agtcaaactg ttaactggta ccagcaactc 120

ccaggaacgg ccccaaact cctcatcttt agtcatcatc accggccctc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240

tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggtgtggta 300

ttcggcggag ggaccaaact gaccgtccta 330

<210> 291
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 291

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

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

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

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

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

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

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

<210> 292
<211> 375
<212> DNA
<213> 智人

<400> 292
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggtc ccttagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca 180

gacttcgctg cacccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240

ctgtatctgc aaatgaacag cctgaacacc gaggacacag cagtgtatta ctgtacctca 300

tctcatagca gcgcctggta cggctacttc ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 293
<211> 125
<212> PRT
<213> 智人

<400> 293

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

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Phe Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Ser Ser His Ser Ser Ala Trp Tyr Gly Tyr Phe Gly Met
100 105 110

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

<210> 294
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 294

Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Gln Thr Val Asn
1 5 10

<210> 295
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 295

Ser His His His Arg Pro Ser
1 5

<210> 296
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 296

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val

1 5 10

<210> 297
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 297

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Ser
1 5 10

<210> 298
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 298

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Phe Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 299
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 299

Ser His Ser Ser Ala Trp Tyr Gly Tyr Phe Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 300
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 300
cagtctgtgc tgactctgtc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gaagcacctc caacatcgga agtaatactg taaattggtt ccagcagctc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatcttt agtaataatc agcggccctc aggggtccct 180

gaccgatttt ctgcctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240

tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcgtgggatg acagcctgaa tggtgtggta 300

ttcggcggag gaccaagct gaccgtccta 330

<210> 301
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 301

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

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

Thr Val Asn Trp Phe Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Phe Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 302
<211> 375
<212> DNA
<213> 智人

<400> 302
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggtc ccttagactc 60

tcctgtgcag cctctggaat cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt atcaaaagca agactgatga tgggacaaca 180

gactacgctg cacccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240

ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300

tctgatagca gcggctggta cggctactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 303
<211> 125
<212> PRT
<213> 智人

<400> 303

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Ser Asp Ser Ser Gly Trp Tyr Gly Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

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

<210> 304
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 304

Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 305
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 305

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 306
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 306

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val
1 5 10

<210> 307
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 307

Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser
1 5 10

<210> 308
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 308

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 309
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 309

Ser Asp Ser Ser Gly Trp Tyr Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 310

<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 310
cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttttg gaagcagctc caacatcgga agtaattctg taaactggta ccagcagctc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatcttt agtaatgatc agcggccctc aggggtccct 180

gaccgattct ctgggtccaa gtctggcacc tcagattccc tggccatcag tgggctccag 240

tctgaggatg aagctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggtgtggta 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 311
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 311

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

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

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

Ile Phe Ser Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 312
<211> 375
<212> DNA
<213> 智人

<400> 312
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctggggggtc ccttagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aatgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca 180

gactacgctg ctcccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaagacacg 240

ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300

tctgatagca gcggctggtt cgggtactac ggaatggacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 313

<211> 125
<212> PRT
<213> 智人

<400> 313

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

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

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

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

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asp Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Thr Ser Asp Ser Ser Gly Trp Phe Gly Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

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

<210> 314
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 314

Phe Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Asn
1 5 10

<210> 315
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 315

Ser Asn Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 316
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 316

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val
1 5 10

<210> 317
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 317

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser
1 5 10

<210> 318
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 318

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 319
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 319

Ser Asp Ser Ser Gly Trp Phe Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 320
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 320
cagtctgtgc tgactcagcc accctcaacg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttttg gaagcaactc caacatcgga agtcaaactg ttaactggta ccagcaactc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatcttt agtcatcatc accggccctc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240

tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca acatgggatg acagcctgaa tggtgtggta 300

ttcggcggag gaccaaact gaccgtccta 330

<210> 321
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 321

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

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

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

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

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

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

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

<210> 322
<211> 375
<212> DNA
<213> 智人

<400> 322
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggGtc ccttagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg gactggggtg ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca 180

gacttcgctg cacccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240

ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtacctca 300

tctcatagca gcgcctggta cggctacttc ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 323
<211> 125
<212> PRT
<213> 智人

<400> 323

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

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Phe Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Ser Ser His Ser Ser Ala Trp Tyr Gly Tyr Phe Gly Met
100 105 110

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

<210> 324
<211> 13
<212> PRT

<213> 智人

<400> 324

Phe Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Gln Thr Val Asn
1 5 10

<210> 325
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 325

Ser His His His Arg Pro Ser
1 5

<210> 326
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 326

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val
1 5 10

<210> 327
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 327

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Ser
1 5 10

<210> 328
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 328

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Phe Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 329
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 329

Ser His Ser Ser Ala Trp Tyr Gly Tyr Phe Gly Met Asp Val
1 5 10

201206954

發明專利說明書

分割案

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：100141324

※ 申請日：97.1.30 ※IPC 分類：~~[illegible]~~

原申請案號：097103507

C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

海帕西啶(HEPCIDIN)、海帕西啶拮抗劑及使用方法

HEPCIDIN, HEPCIDIN ANTAGONISTS AND METHODS OF USE

二、中文發明摘要：

本發明係關於純化之正確摺疊的海帕西啶(hepcidin)、結合海帕西啶之抗體，以及製備及使用該等物質之方法。本發明亦提供治療海帕西啶相關病症之方法。

三、英文發明摘要：

The invention relates to purified, correctly folded hepcidin, antibodies that bind hepcidin, and methods of making and using such materials. Also provide are methods of treated hepcidin-related disorders.

七、申請專利範圍：

1. 一種包含SEQ ID NO: 96中所示之胺基酸序列的生物活性純化非尿源非哺乳動物之人類海帕西啶的組合物，其中至少75%之該人類海帕西啶具有C2-C4二硫鍵、C5-C7二硫鍵、C1-C8二硫鍵及C3-C6二硫鍵。

2. 一種鑑別與人類海帕西啶結合之化合物的方法，其包含：

使候選化合物與如請求項1之組合物接觸；及

偵測該候選化合物與該組合物中之人類海帕西啶之間的複合物，其中複合物之偵測指示該候選化合物與人類海帕西啶結合。

3. 一種鑑別與人類海帕西啶結合之化合物的方法，其包含：

使候選化合物與如請求項1之組合物接觸；

偵測該候選化合物與該組合物中之人類海帕西啶之間的複合物，其中複合物之偵測指示該候選化合物與人類海帕西啶結合；及

將該候選化合物製成適於投與哺乳動物之藥物。

4. 一種活體外產生人類海帕西啶之抗體的方法，包含：

使產生免疫球蛋白之細胞與如請求項214之組合物接觸；及

分離由該細胞所產生之免疫球蛋白。

5. 一種測試包含抗體之組合物結合人類海帕西啶之能力的方法，其包含：

使該包含抗體之組合物與如請求項1之組合物接觸；及

偵測該抗體與人類海帕西啶之間的複合物，其中複合物之偵測指示該抗體與人類海帕西啶結合。

6. 一種使包含SEQ ID NO: 96中所示之胺基酸序列之人類海帕西啶多肽再摺疊成生物活性形式的方法，其包含：

(a)在促進變性之條件下使人類海帕西啶多肽暴露於離液劑(chaotropic agent)；

(b)在促進恢復成正確摺疊及生物活性形式之條件下使(a)之產物暴露於氧化劑；及

(c)回收包含該生物活性人類海帕西啶多肽之溶液，其中至少75%之該人類海帕西啶多肽至少具有C2-C4二硫鍵及C5-C7二硫鍵。

7. 如請求項6之方法，其中(b)包含使該人類海帕西啶多肽與空氣以外之氧化劑接觸。

8. 如請求項6之方法，其中該氧化劑包含麩胱甘肽。

9. 如請求項6之方法，其中(a)在低於5之pH發生。

10. 如請求項6之方法，其中(b)在含有低於0.1%乙酸之溶液中發生。

11. 如請求項6之方法，其中(b)在大於8之pH發生。

12. 如請求項6之方法，其中該離液劑為胍或其鹽。

13. 如請求項12之方法，其中該胍係以範圍介於約4 M至約6 M之濃度存在。

14. 如請求項6-13中任一項之方法，其進一步包含純化該人

類海帕西啶多肽。

15. 一種海帕西啶肽類似物，包含一個胺基酸序列與SEQ ID NO: 96中所示之胺基酸序列至少70%一致，其保留所有8個半胱胺酸且另保留C2-C4二硫鍵。

16. 一種海帕西啶肽類似物，包含一個胺基酸序列與SEQ ID NO: 96中所示之胺基酸序列至少70%一致，其保留所有8個半胱胺酸且另保留C5-C7二硫鍵。

17. 如請求項16之海帕西啶類似肽，其進一步保留C2-C4二硫鍵。

18. 如請求項15-17中任一項之海帕西啶類似肽，其保留膜鐵轉運蛋白結合活性。

19. 如請求項18之海帕西啶類似肽，其活化膜鐵轉運蛋白。

20. 如請求項15-17中任一項之海帕西啶類似肽，其降低活體內循環鐵含量。

21. 如請求項18之海帕西啶類似肽，其抑制膜鐵轉運蛋白鐵運輸。

22. 如請求項15-17中任一項之海帕西啶類似肽，其抑制SEQ ID NO: 9之成熟人類海帕西啶之鐵調節活性。

23. 如請求項15-17中任一項之海帕西啶類似肽，其增加活體內循環鐵含量。

八、圖式：

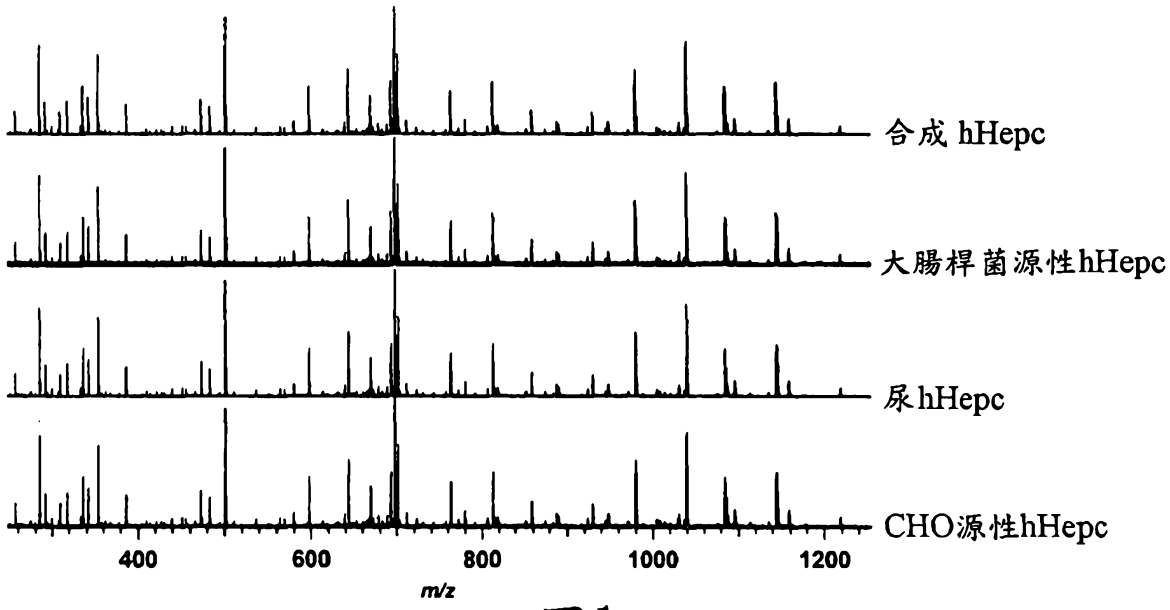
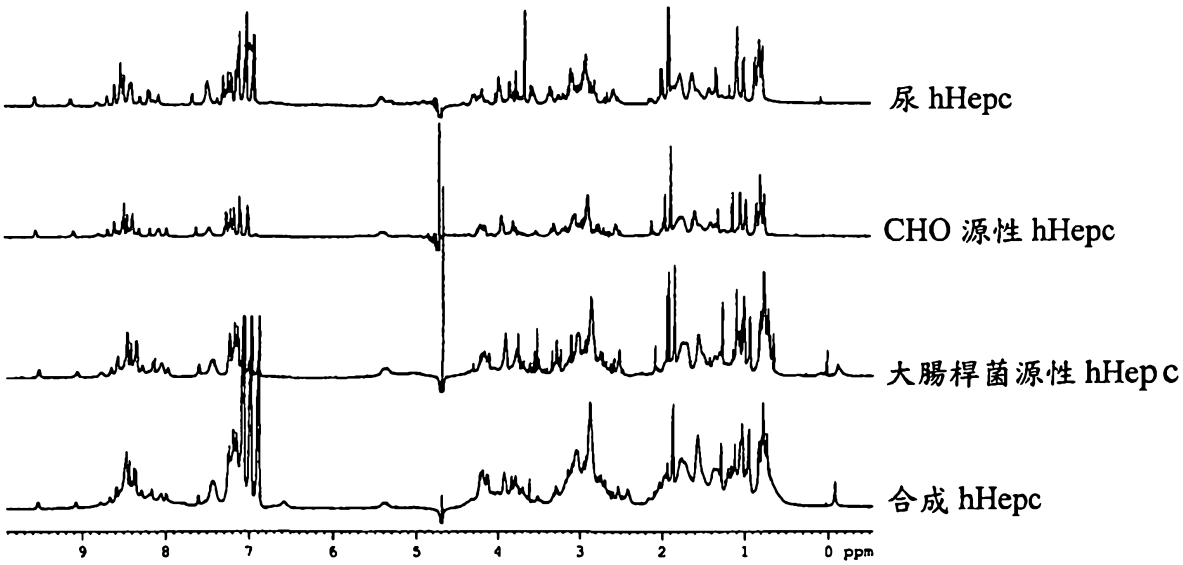

合成 hHepc
大腸桿菌源性hHepc
尿hHepc
CHO源性hHepc
400
600
800
1000
1200
m/z

圖1



*= 銨鹽

圖2

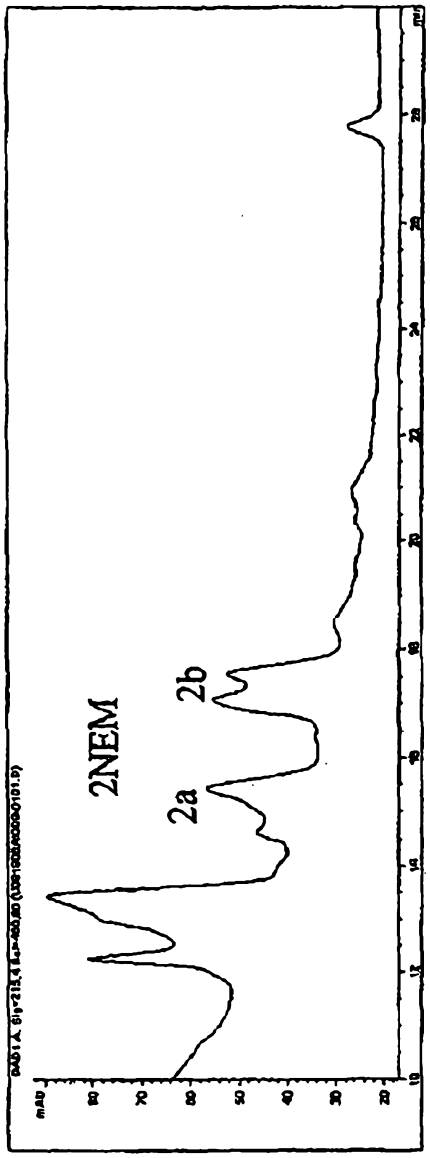


圖3A

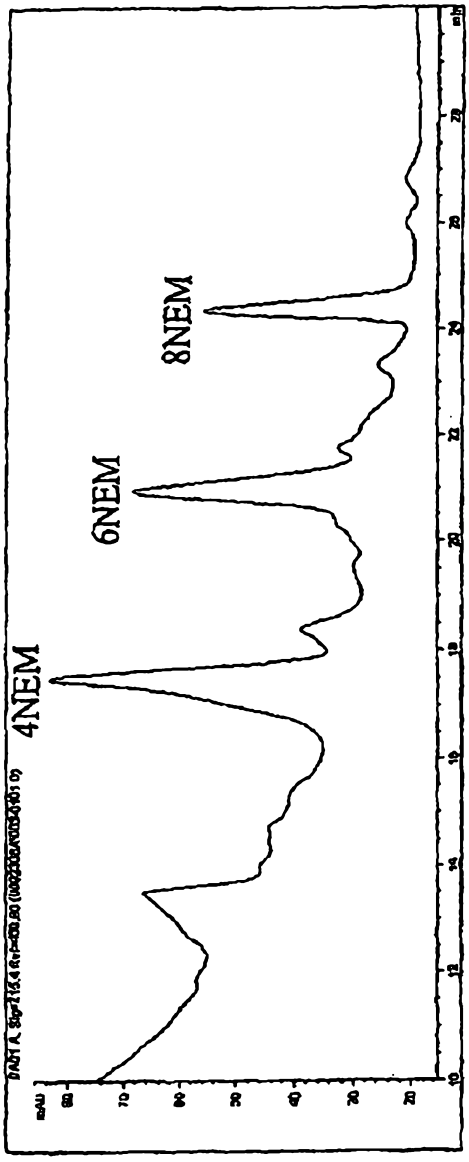


圖3B

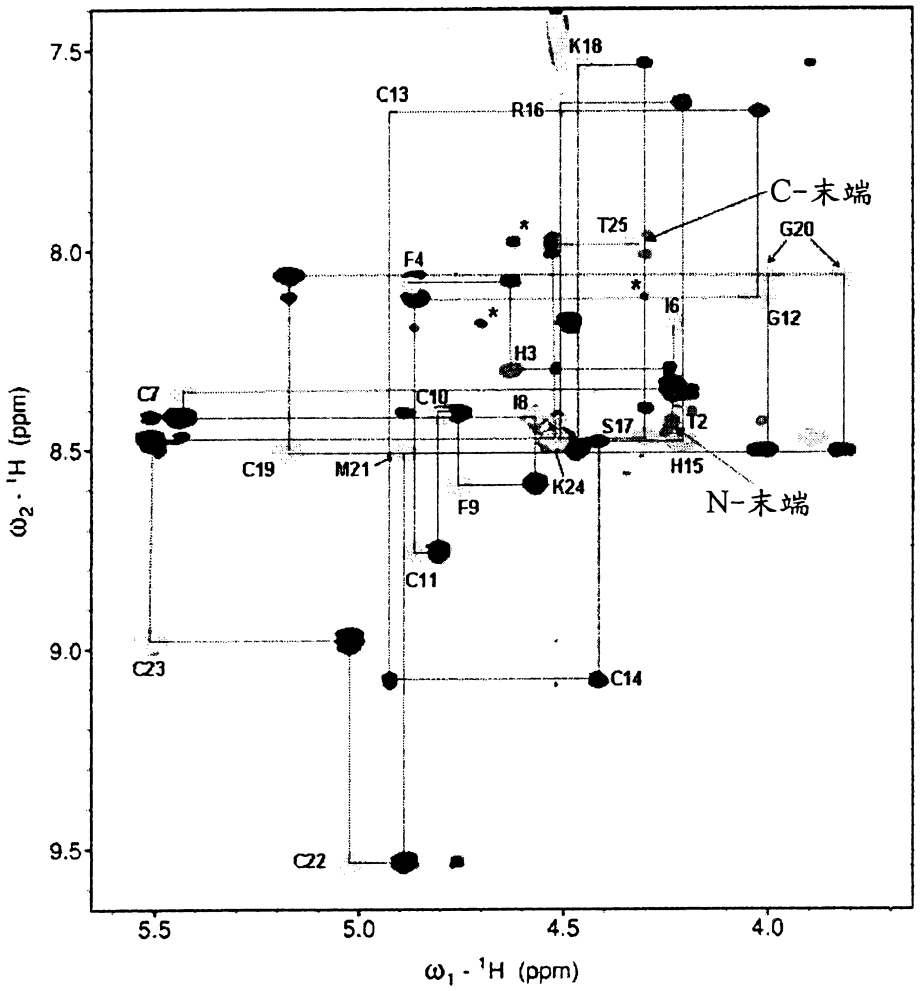

K18
C13
R16
C-末端
T25
G20
F4
I6
G12
H3
C7
C10
I8
S17
T2
C19
M21
K24
H15
N-末端
F9
C11
C23
C14
C22
7.5
8.0
8.5
9.0
9.5
5.5
5.0
4.5
4.0
ω2 - 1H (ppm)
ω1 - 1H (ppm)

圖4

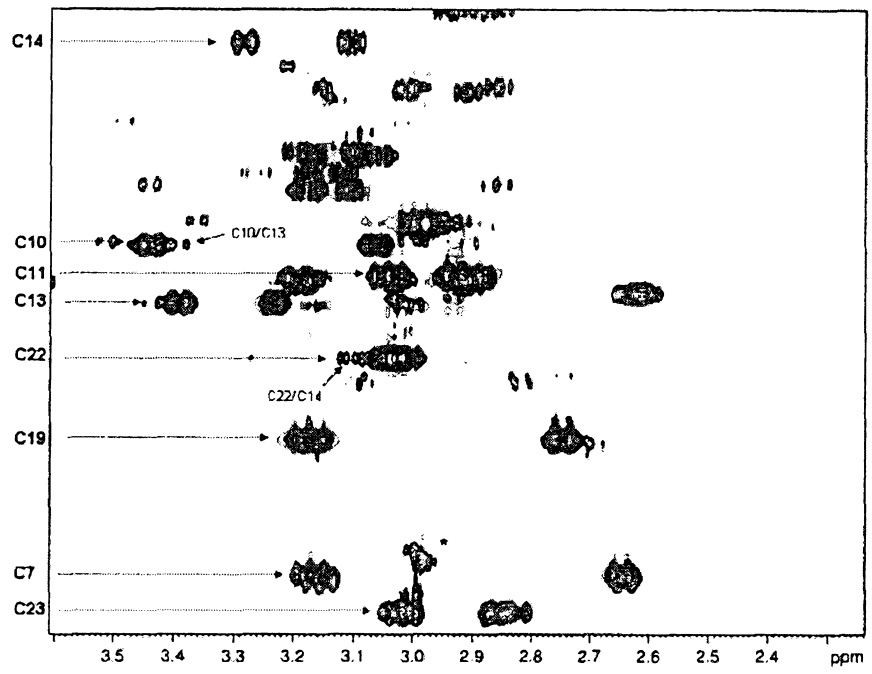

C14
C10
C11
C13
C22
C19
C7
C23
C10/C13
C22/C14
3.5
3.4
3.3
3.2
3.1
3.0
2.9
2.8
2.7
2.6
2.5
2.4
ppm

圖5



圖6

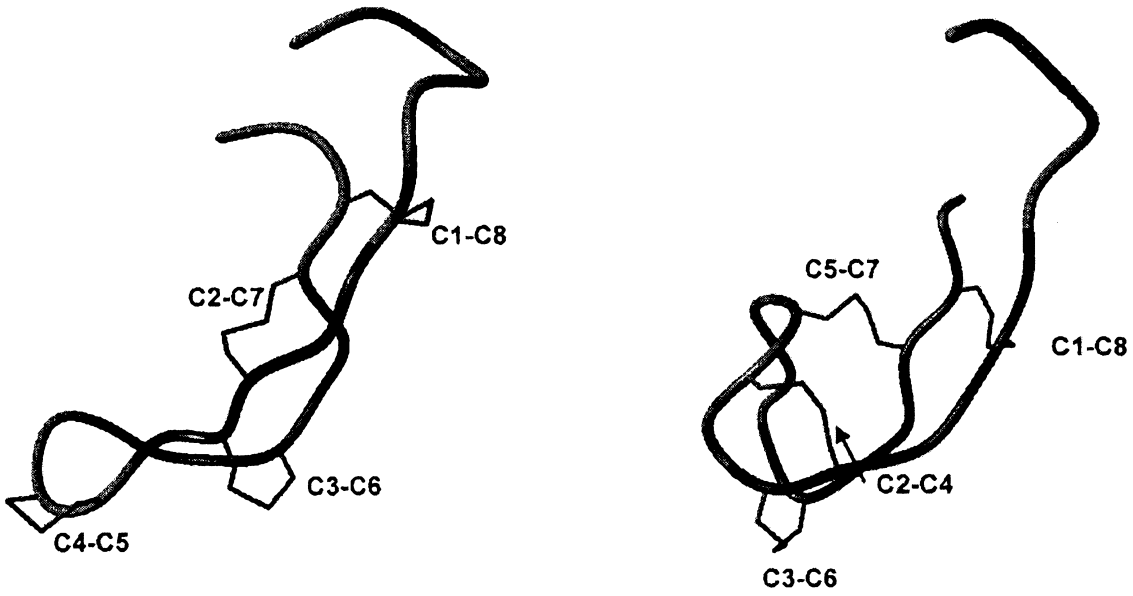


圖7

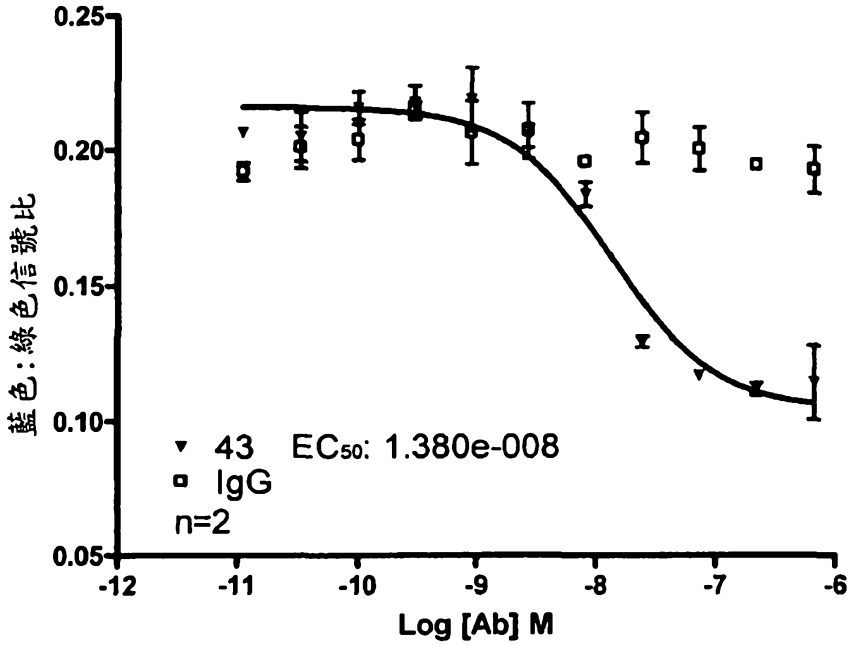

0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
藍色:綠色信號比
▼ 43 EC50: 1.380e-008
▫ IgG
n=2
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log [Ab] M

圖8

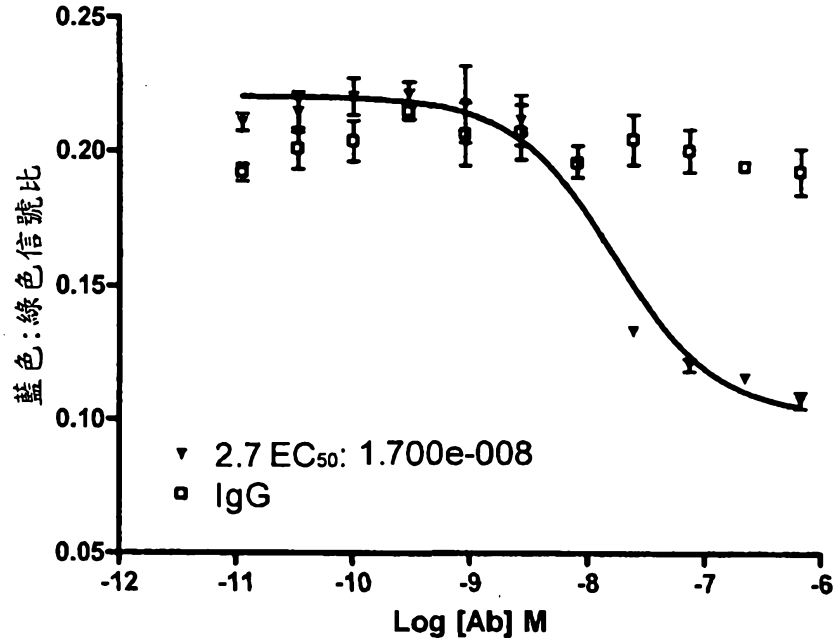

0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
藍色:綠色信號比
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log [Ab] M
2.7 EC50: 1.700e-008
IgG

圖9

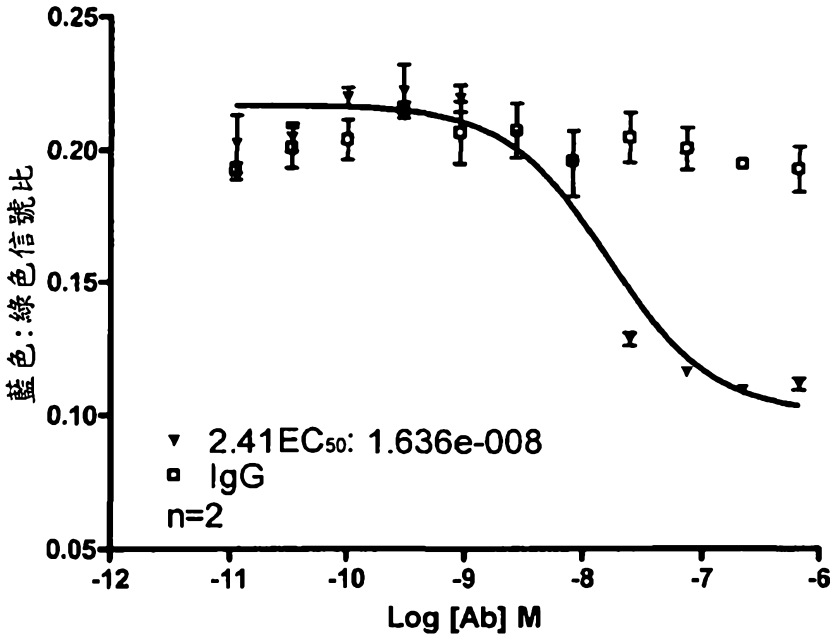

0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
藍色:綠色信號比
2.41EC50: 1.636e-008
IgG
n=2
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log [Ab] M

圖10

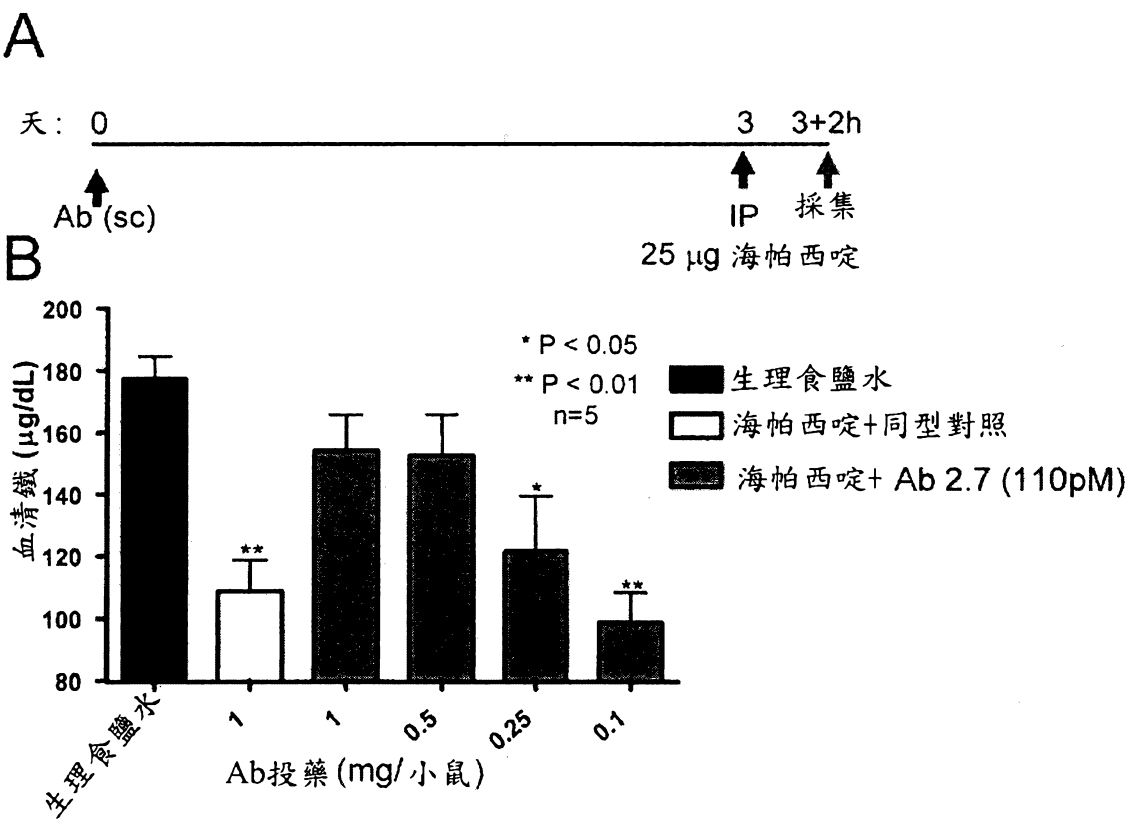

A
天： 0
3
3+2h
Ab (sc)
IP
採集
25 μg 海帕西啶
B
血清鐵 (μg/dL)
200
180
160
140
120
100
80
* P < 0.05
** P < 0.01
n=5
生理食鹽水
海帕西啶+同型對照
海帕西啶+ Ab 2.7 (110pM)
**
**
*
生理食鹽水
1
1
0.5
0.25
0.1
Ab投藥 (mg/小鼠)

圖11

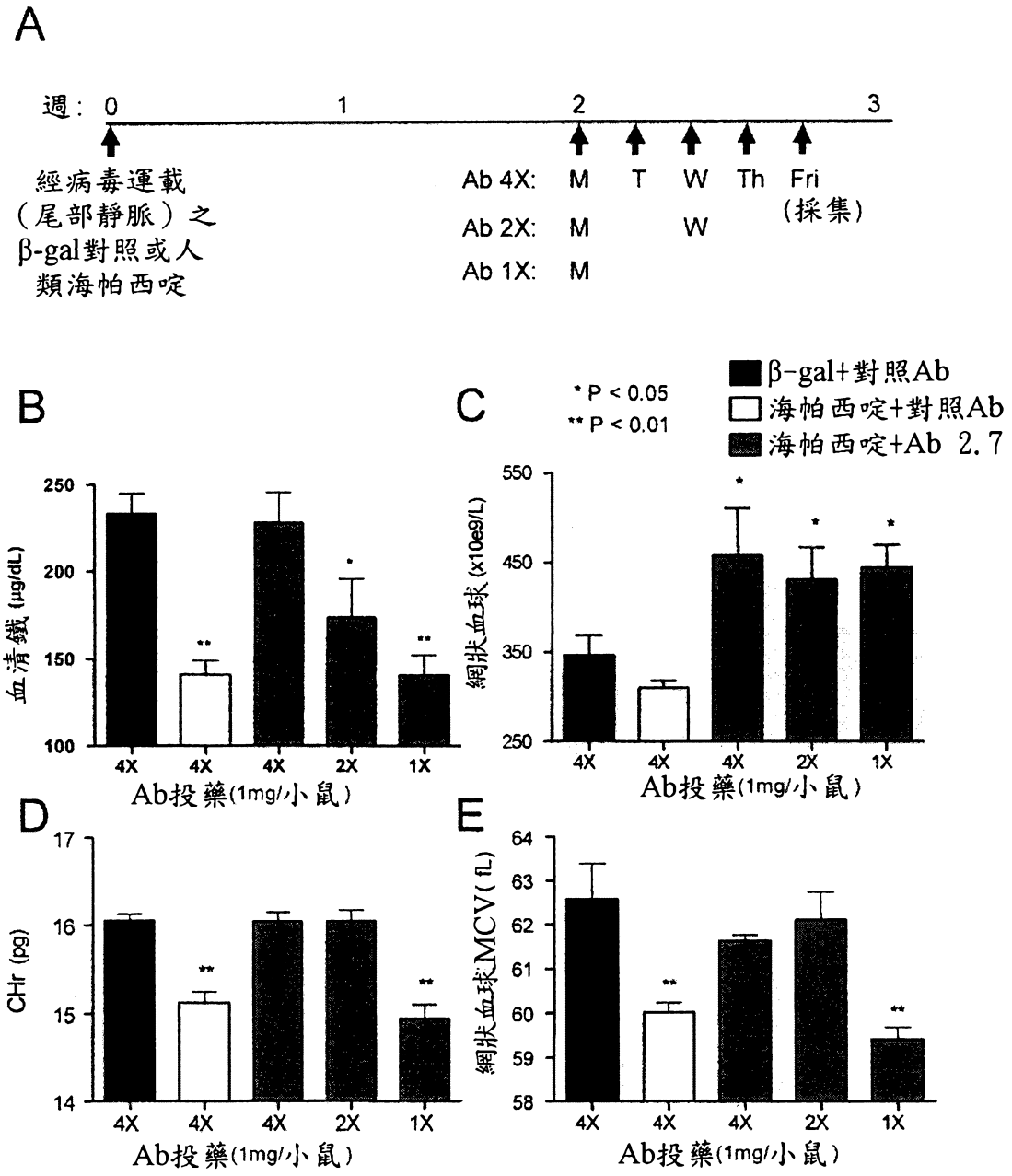

A
週：0
1
2
3
經病毒運載
（尾部靜脈）之
β-gal對照或人
類海帕西啶
Ab 4X: M T W Th Fri
Ab 2X: M W
Ab 1X: M
（採集）
B
血清鐵 (μg/dL)
250
200
150
100
4X 4X 4X 2X 1X
Ab投藥(1mg/小鼠)
C
* P < 0.05
** P < 0.01
β-gal+對照Ab
海帕西啶+對照Ab
海帕西啶+Ab 2.7
網狀血球 (x10e9/L)
550
450
350
250
4X 4X 4X 2X 1X
Ab投藥(1mg/小鼠)
D
CHr (pg)
17
16
15
14
4X 4X 4X 2X 1X
Ab投藥(1mg/小鼠)
E
網狀血球MCV(fL)
64
63
62
61
60
59
58
4X 4X 4X 2X 1X
Ab投藥(1mg/小鼠)

圖12

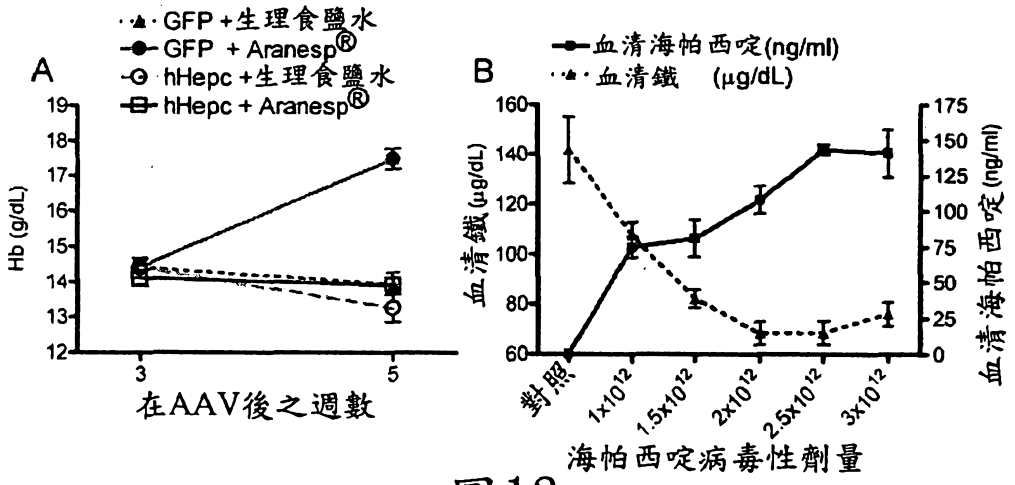

A
GFP +生理食鹽水
GFP + Aranesp®
hHepc +生理食鹽水
hHepc + Aranesp®
Hb (g/dL)
19
18
17
16
15
14
13
12
3
5
在AAV後之週數
B
血清海帕西啶(ng/ml)
血清鐵 (μg/dL)
血清鐵 (μg/dL)
160
140
120
100
80
60
175
150
125
100
75
50
25
0
血清海帕西啶 (ng/ml)
對照
1x10^12
1.5x10^12
2x10^12
2.5x10^12
3x10^12
海帕西啶病毒性劑量

圖13

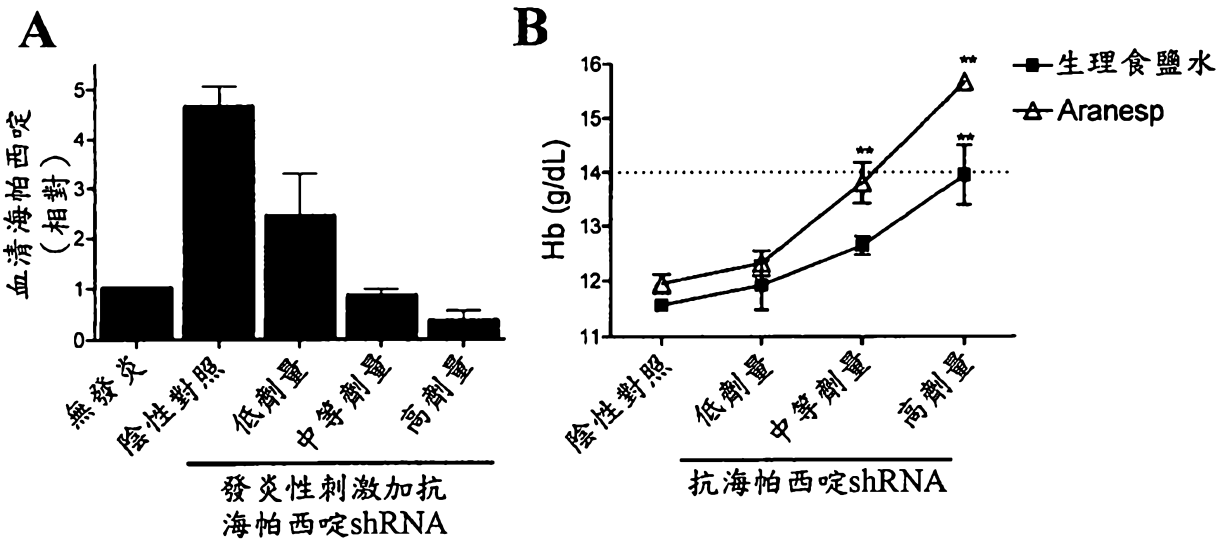

A
血清海帕西啶（相對）
0
1
2
3
4
5
無發炎
陰性對照
低劑量
中等劑量
高劑量
發炎性刺激加抗海帕西啶shRNA
B
Hb (g/dL)
11
12
13
14
15
16
**
生理食鹽水
Aranesp
陰性對照
低劑量
中等劑量
高劑量
抗海帕西啶shRNA

圖14

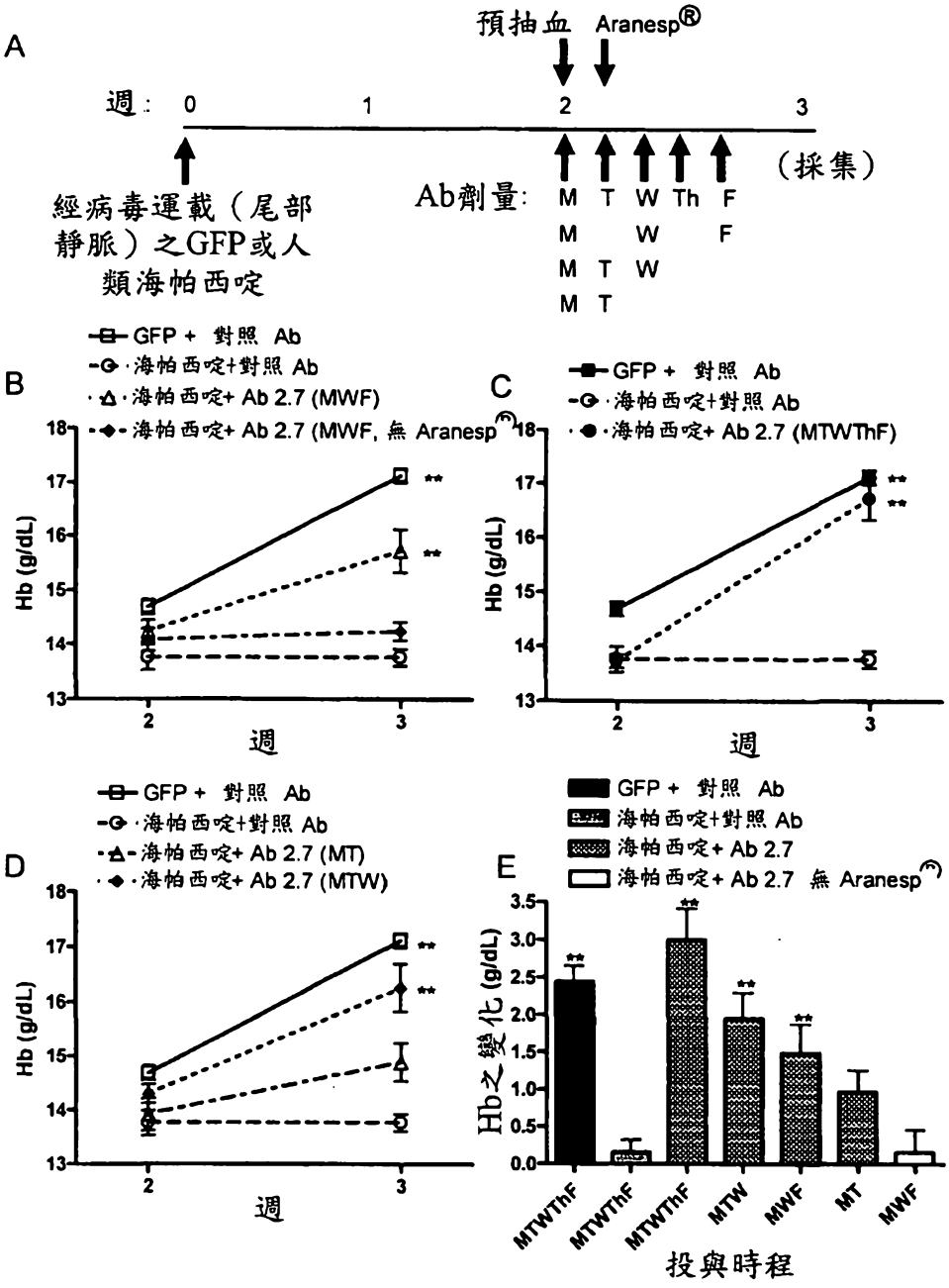

A
預抽血
Aranesp®
週：
0
1
2
3
（採集）
經病毒運載（尾部靜脈）之GFP或人類海帕西啶
Ab劑量:
M T W Th F
M W F
M T W
M T
B
GFP + 對照 Ab
海帕西啶+對照 Ab
海帕西啶+ Ab 2.7 (MWF)
海帕西啶+ Ab 2.7 (MWF, 無 Aranesp®)
Hb (g/dL)
週
C
GFP + 對照 Ab
海帕西啶+對照 Ab
海帕西啶+ Ab 2.7 (MTWThF)
Hb (g/dL)
週
D
GFP + 對照 Ab
海帕西啶+對照 Ab
海帕西啶+ Ab 2.7 (MT)
海帕西啶+ Ab 2.7 (MTW)
Hb (g/dL)
週
E
GFP + 對照 Ab
海帕西啶+對照 Ab
海帕西啶+ Ab 2.7
海帕西啶+ Ab 2.7 無 Aranesp®
Hb之變化 (g/dL)
MTWThF
MTWThF
MTWThF
MTW
MWF
MT
MWF
投與時程

圖15

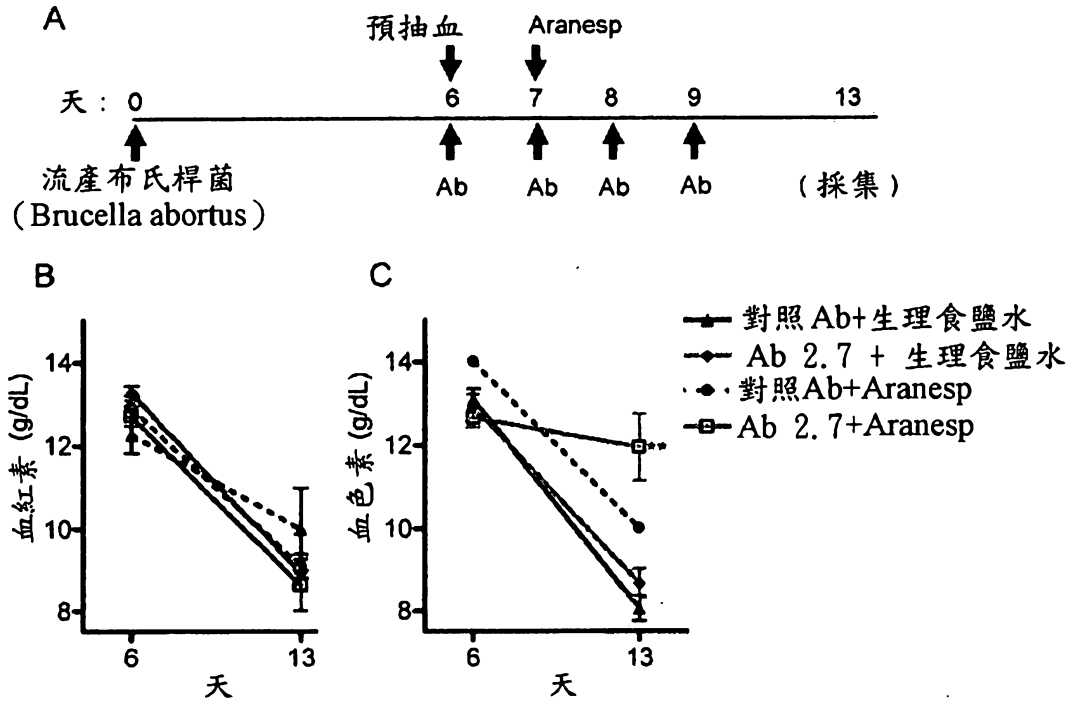

A
預抽血
Aranesp
天：0
6
7
8
9
13
流產布氏桿菌
(Brucella abortus)
Ab
Ab
Ab
Ab
(採集)
B
C
血紅素 (g/dL)
血色素 (g/dL)
14
12
10
8
6
13
天
對照Ab+生理食鹽水
Ab 2.7 + 生理食鹽水
對照Ab+Aranesp
Ab 2.7+Aranesp

圖16

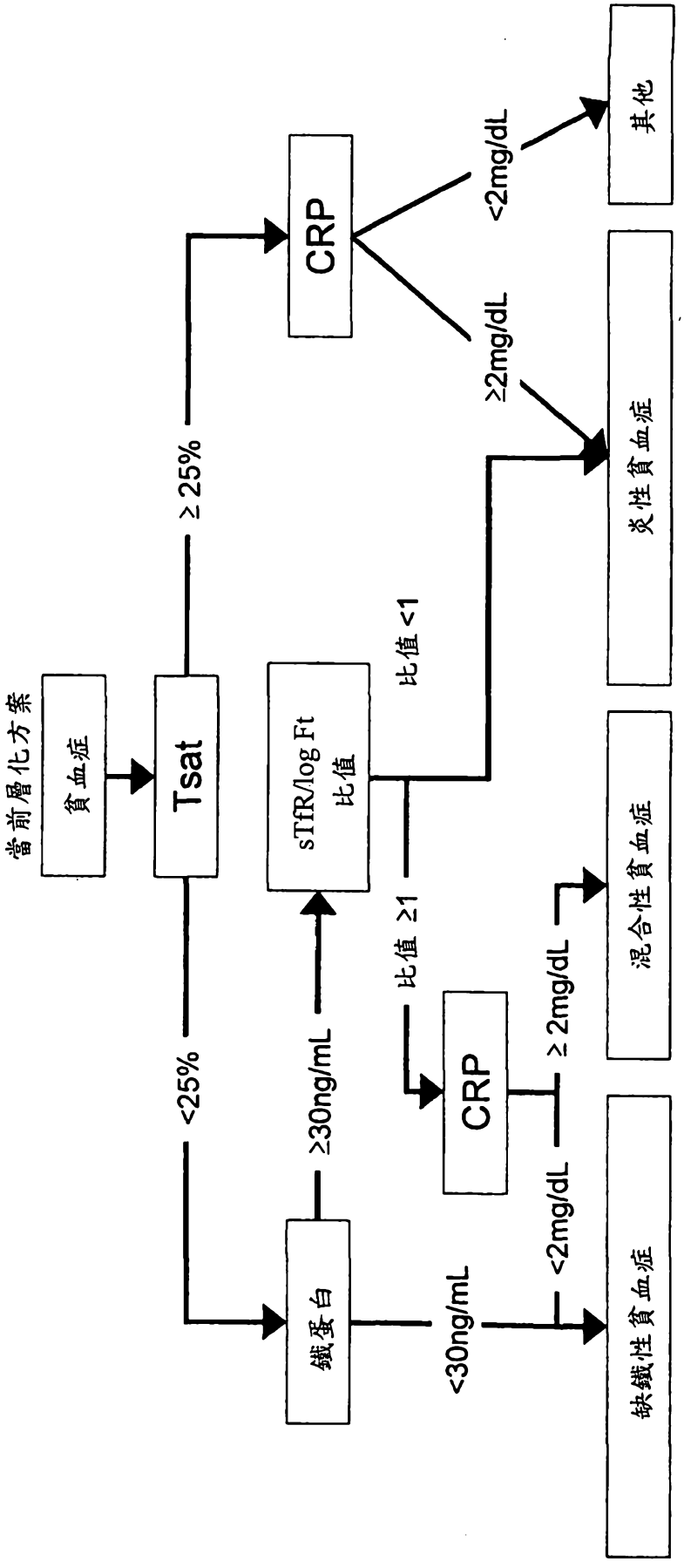

當前層化方案
貧血症
Tsat
≥ 25%
<25%
CRP
<2mg/dL
其他
≥2mg/dL
炎性貧血症
sTfR/log Ft
比值
比值 <1
≥30ng/mL
比值 ≥1
CRP
≥ 2mg/dL
混合性貧血症
鐵蛋白
<30ng/mL
<2mg/dL
缺鐵性貧血症

圖17A

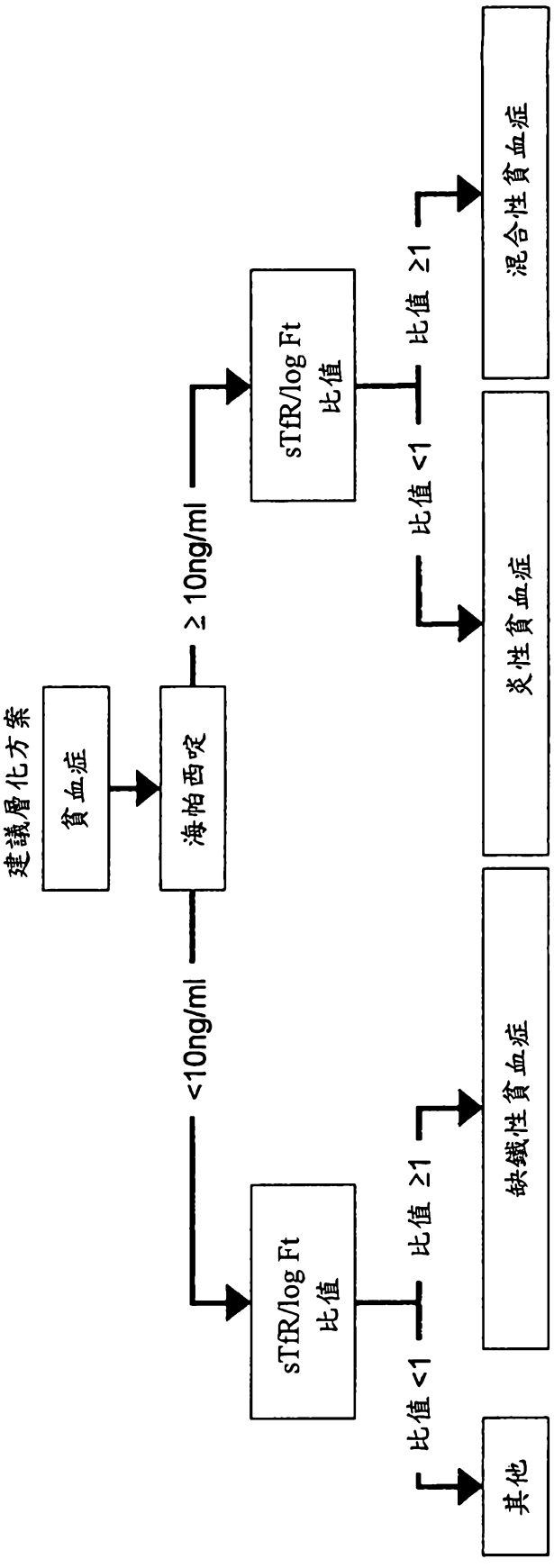

建議層化方案
貧血症
海帕西啶
≥ 10ng/ml
<10ng/ml
sTfR/log Ft
比值
比值 ≥1
比值 <1
混合性貧血症
炎性貧血症
缺鐵性貧血症
其他

圖17B

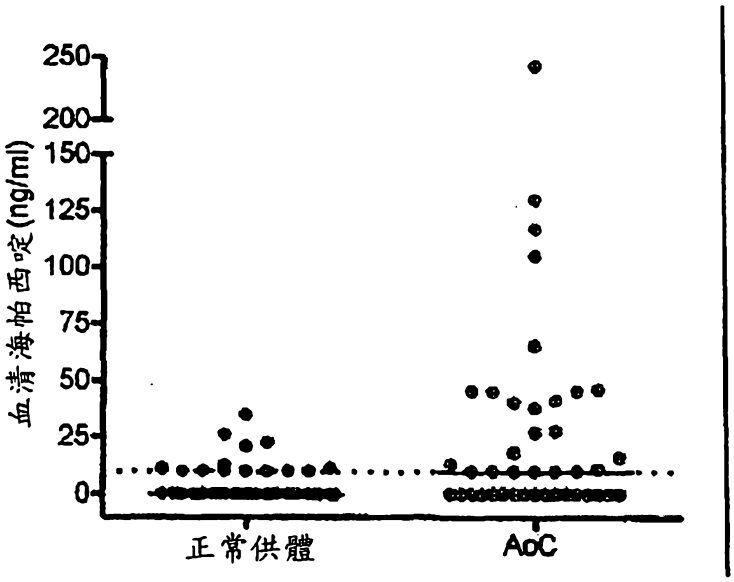


圖18

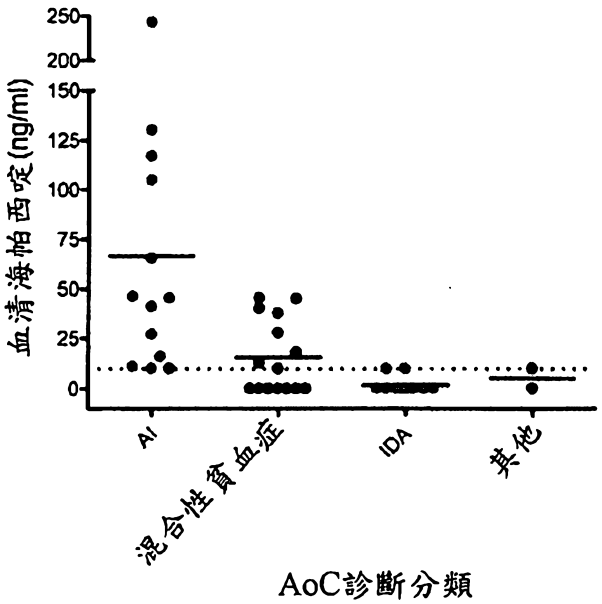

250
200
150
125
100
75
50
25
0
血清海帕西啶(ng/ml)
AI
混合性貧血症
IDA
其他
AoC診斷分類

圖19

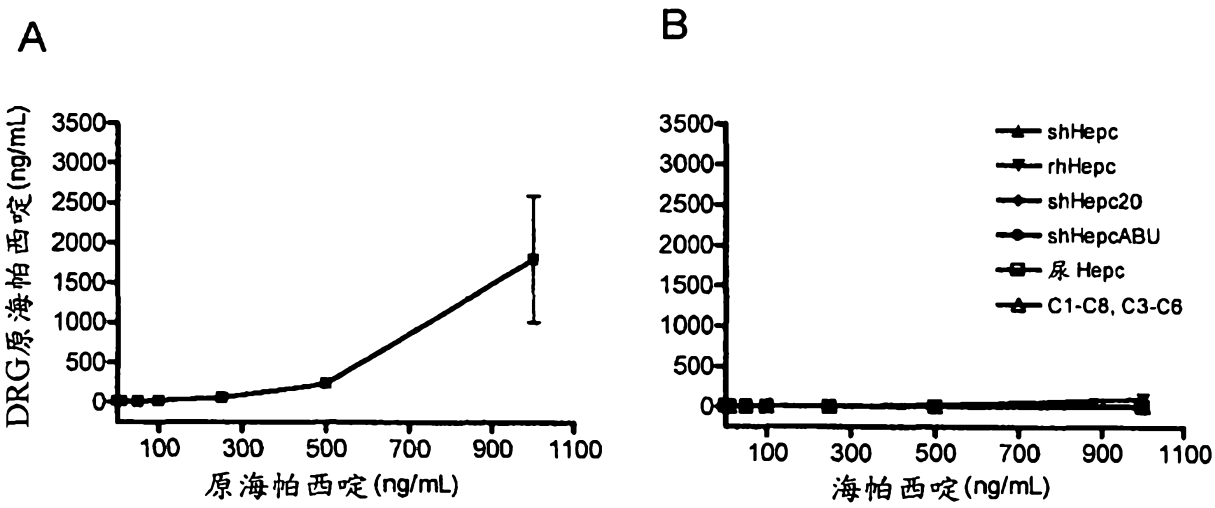

A
DRG原海帕西啶(ng/mL)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
100
300
500
700
900
1100
原海帕西啶(ng/mL)
B
shHepc
rhHepc
shHepc20
shHepcABU
尿 Hepc
C1-C8, C3-C6
海帕西啶(ng/mL)

圖20

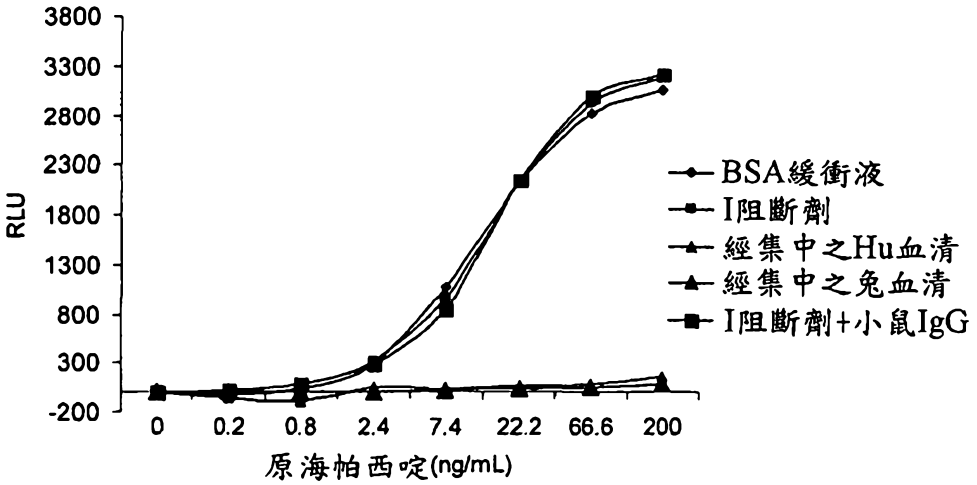

3800
3300
2800
2300
1800
1300
800
300
-200
RLU
0
0.2
0.8
2.4
7.4
22.2
66.6
200
原海帕西啶(ng/mL)
BSA緩衝液
I阻斷劑
經集中之Hu血清
經集中之兔血清
I阻斷劑+小鼠IgG

圖21

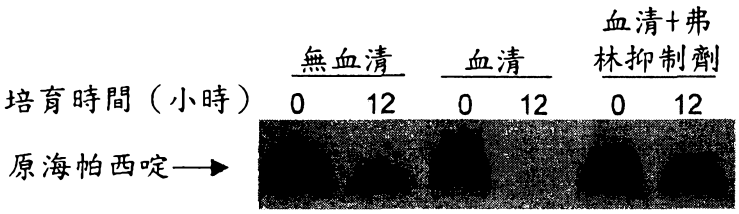


圖22

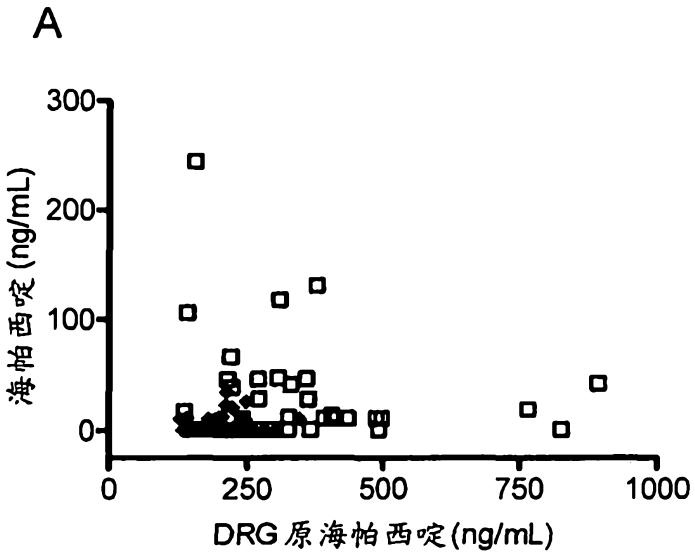


圖23

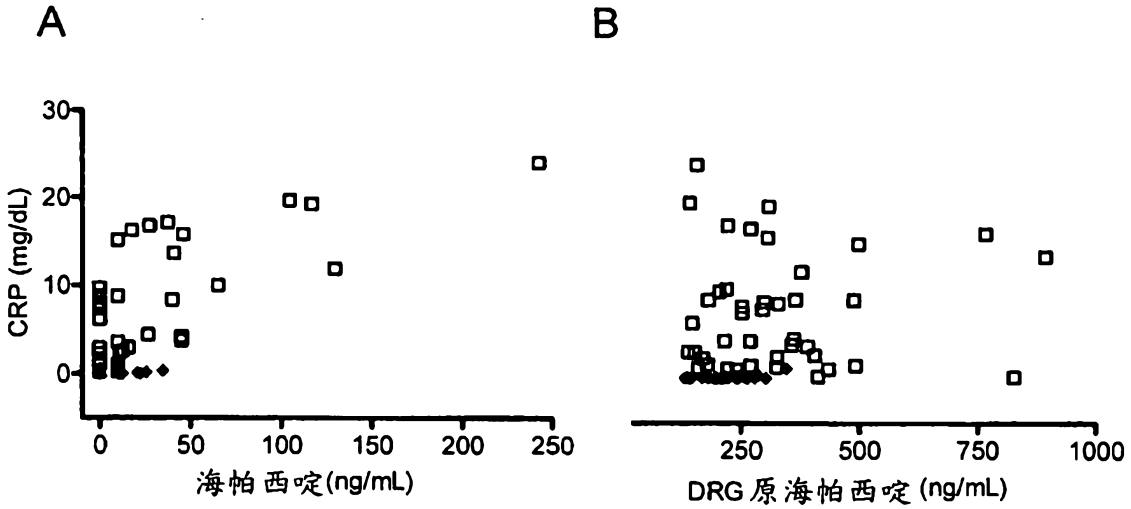

A
B
30
20
10
0
CRP (mg/dL)
0
50
100
150
200
250
海帕西啶(ng/mL)
250
500
750
1000
DRG原海帕西啶(ng/mL)

圖24

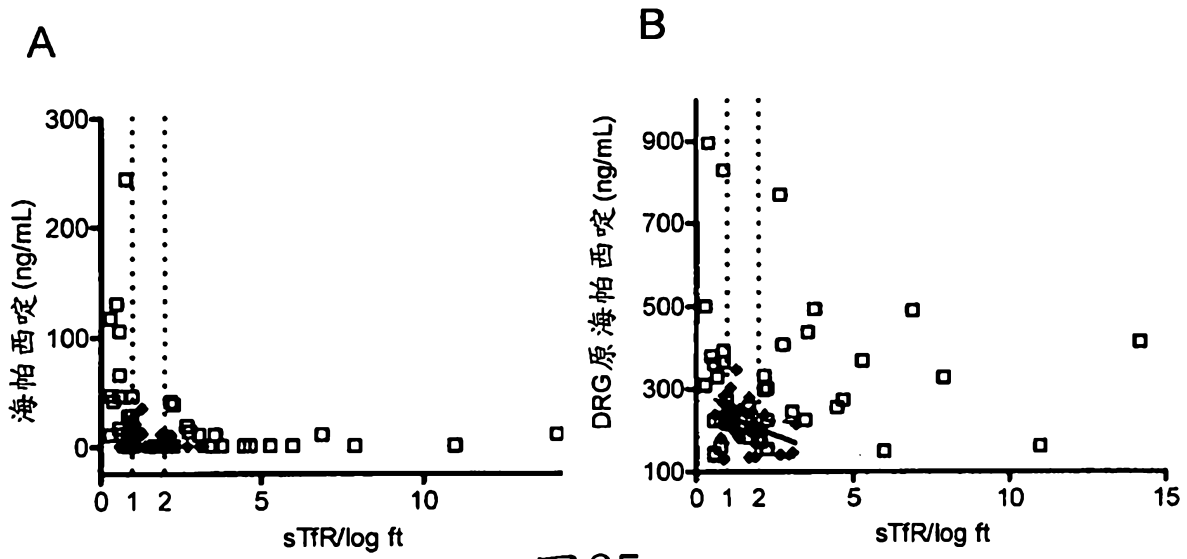

A
300
200
100
0
海帕西啶 (ng/mL)
0 1 2 5 10
sTfR/log ft
B
900
700
500
300
100
DRG原海帕西啶 (ng/mL)
0 1 2 5 10 15
sTfR/log ft

圖25

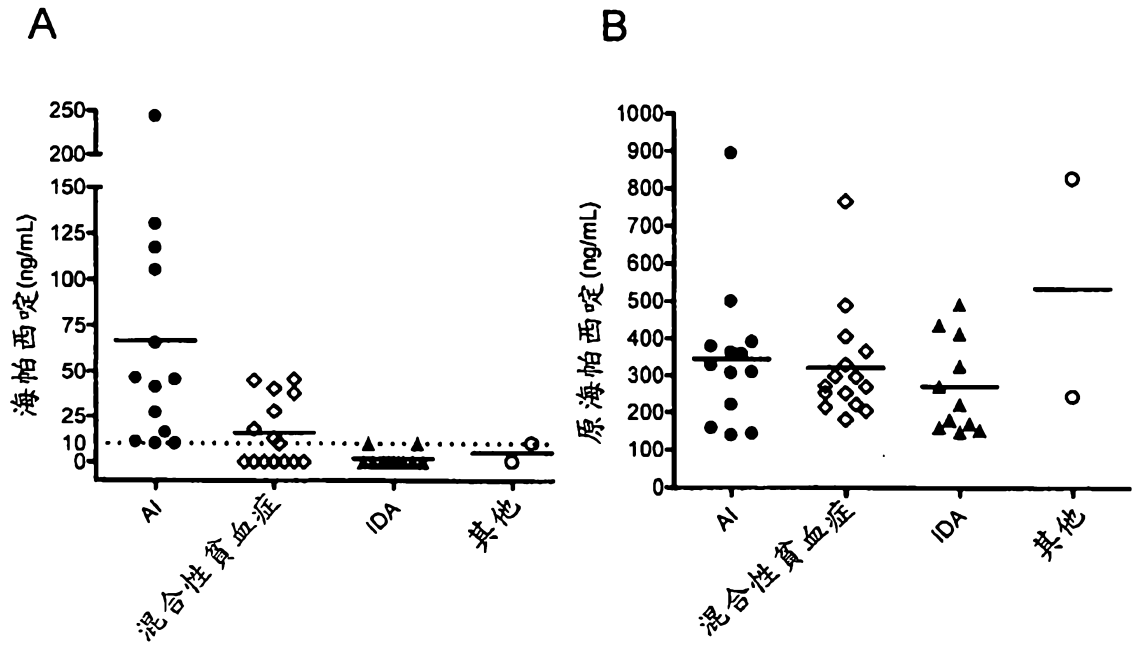

A
B
海帕西啶(ng/mL)
250
200
150
125
100
75
50
25
10
0
AI
混合性貧血症
IDA
其他
原海帕西啶(ng/mL)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
AI
混合性貧血症
IDA
其他

圖26

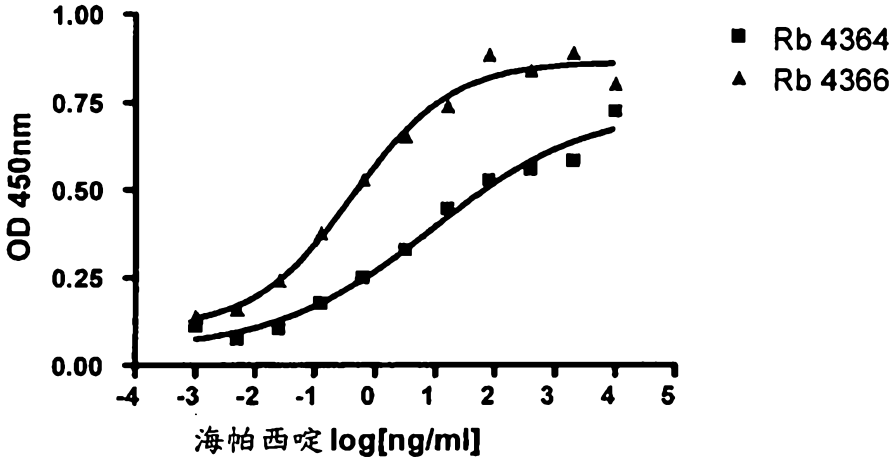

1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
OD 450nm
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
海帕西啶 log[ng/ml]
Rb 4364
Rb 4366

圖27

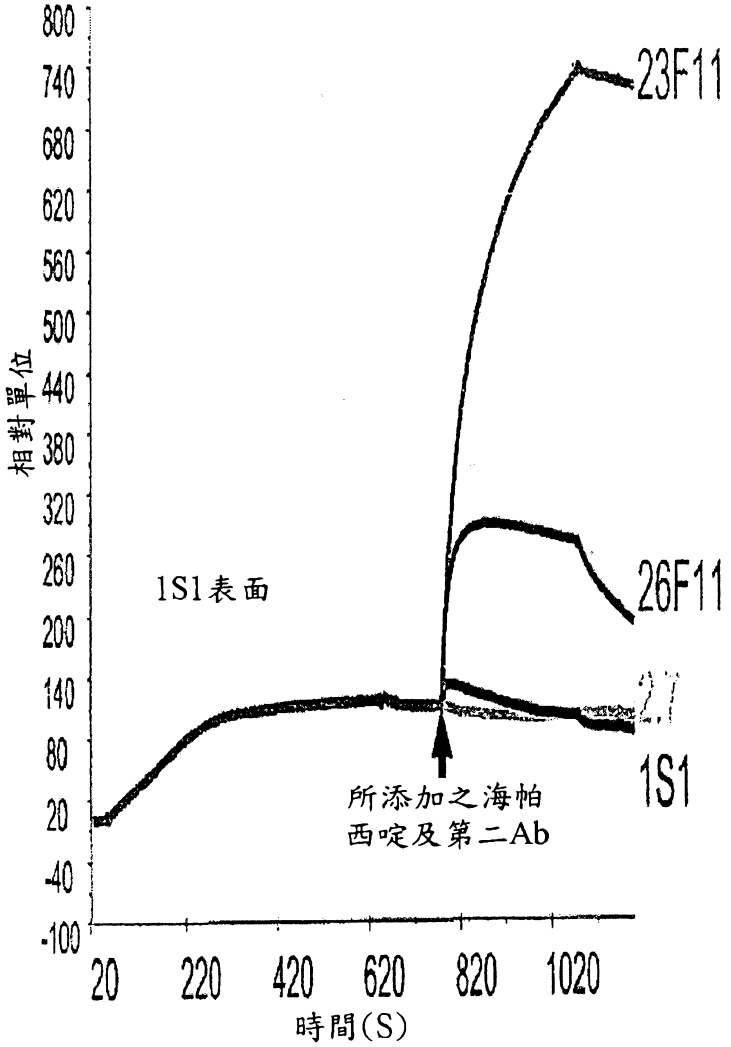

800
740
680
620
560
500
440
380
320
260
200
140
80
20
-40
-100
相對單位
20
220
420
620
820
1020
時間(S)
1S1表面
23F11
26F11
27
1S1
所添加之海帕
西啶及第二Ab

圖28

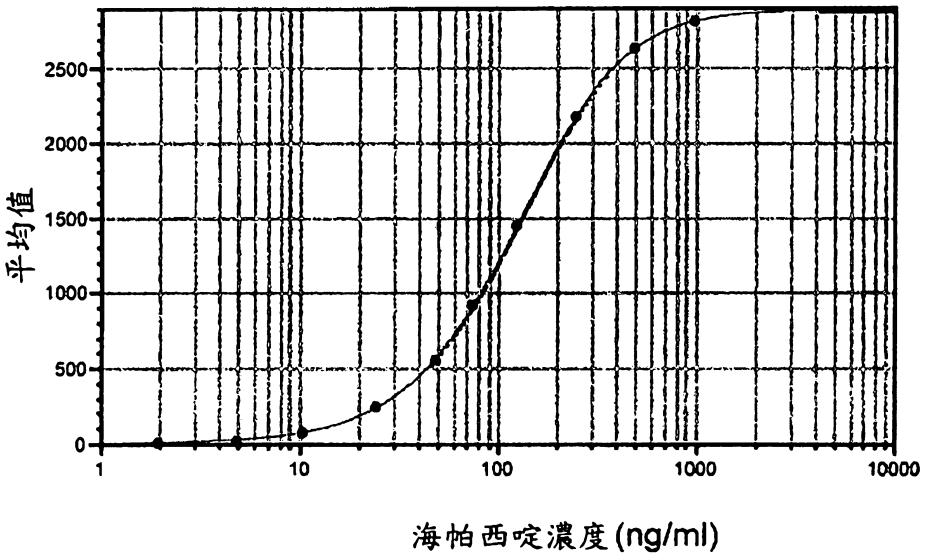


圖29

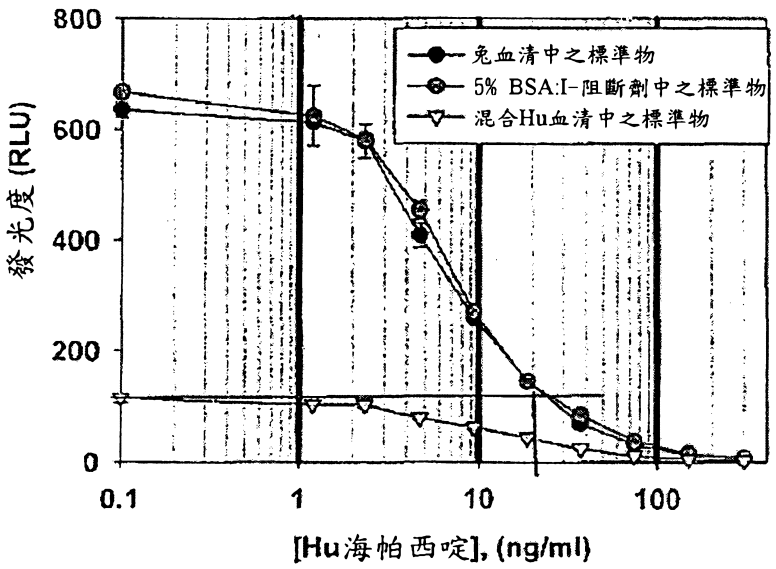

800
600
400
200
0
發光度 (RLU)
0.1
1
10
100
[Hu海帕西啶], (ng/ml)
免血清中之標準物
5% BSA:I-阻斷劑中之標準物
混合Hu血清中之標準物

圖30

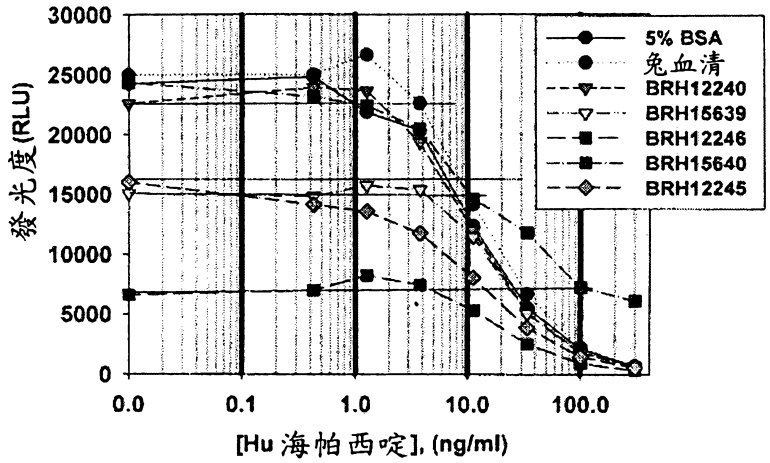

30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
發光度(RLU)
0.0
0.1
1.0
10.0
100.0
[Hu 海帕西啶], (ng/ml)
5% BSA
兔血清
BRH12240
BRH15639
BRH12246
BRH15640
BRH12245

圖31

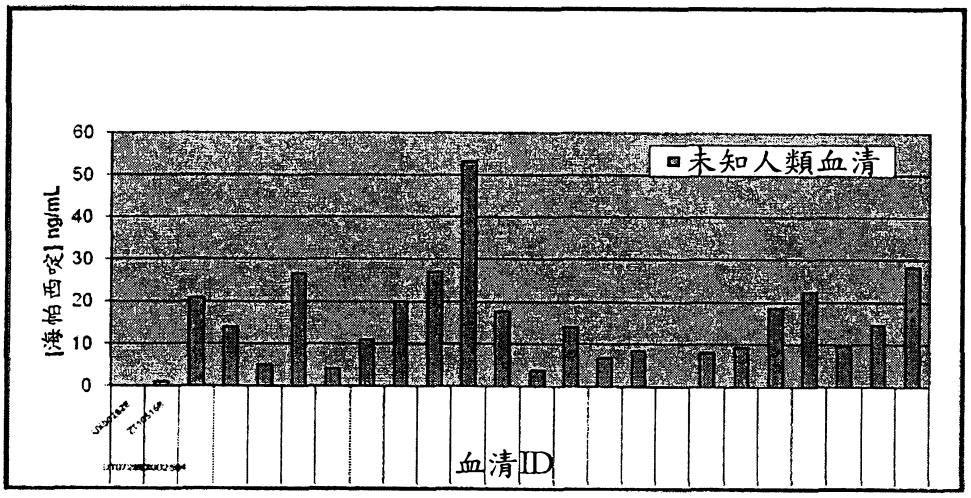


圖32

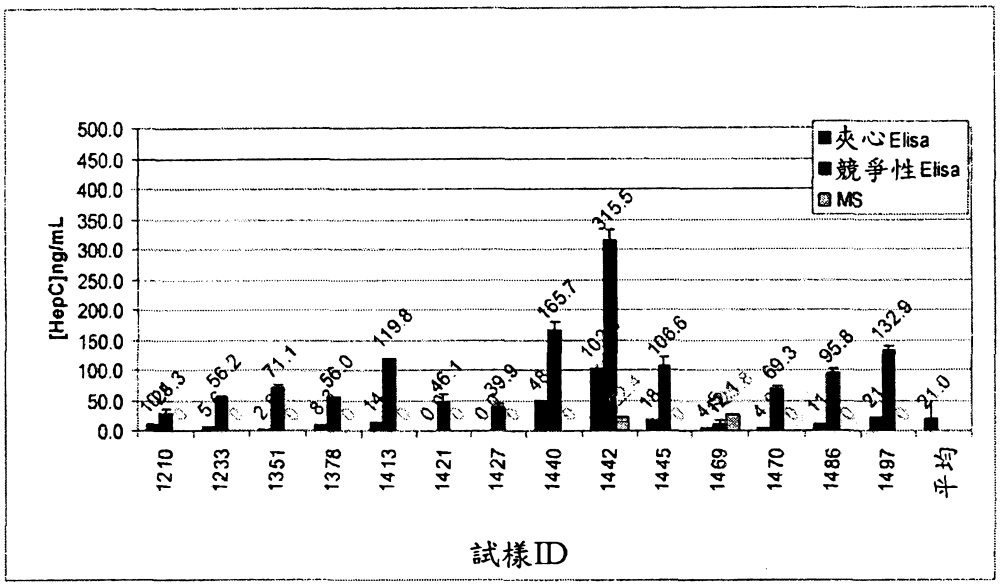

500.0
450.0
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
[HepC]ng/mL
夾心Elisa
競爭性Elisa
MS
315.5
165.7
119.8
108.6
95.8
69.3
56.2
56.0
46.1
39.9
1210
1233
1351
1378
1413
1421
1427
1440
1442
1445
1469
1470
1486
1497
平均
試樣ID

圖33

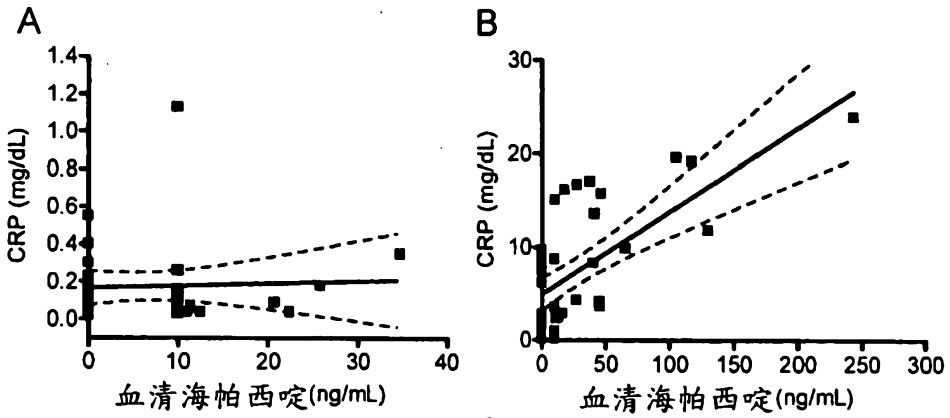

A
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
CRP (mg/dL)
0
10
20
30
40
血清海帕西啶(ng/mL)
B
30
20
10
0
CRP (mg/dL)
0
50
100
150
200
250
300
血清海帕西啶(ng/mL)

圖34