



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104781280 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 15

(21) 申请号 201380059370. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 11. 12

C07K 16/28(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 1/00(2006. 01)

61/725, 704 2012. 11. 13 US

A61P 23/00(2006. 01)

61/825, 112 2013. 05. 20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 05. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/069673 2013. 11. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/078306 EN 2014. 05. 22

(71) 申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 L·麦克唐纳

M·L·拉克鲁瓦-福拉丽什

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈迎春 黄革生

权利要求书2页 说明书28页

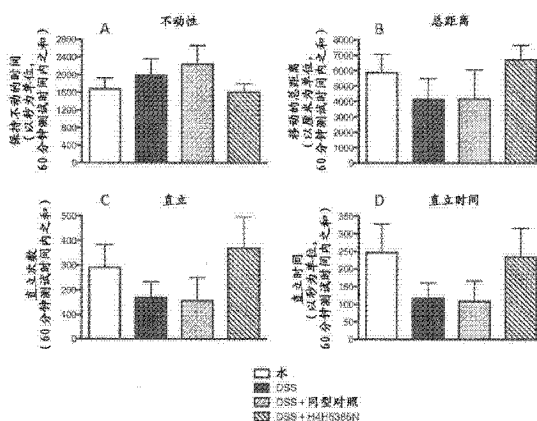
序列表53页 附图1页

(54) 发明名称

抗前动力蛋白受体 (PROKR) 抗体及其使用

(57) 摘要

本发明提供与前动力蛋白受体 (PROKR) 结合的抗体及其使用方法。根据本发明的某些实施方案, 抗体是与人类 PROKR1 和 / 或 PROKR2 结合的完全人源抗体。本发明包括与细胞表面表达的 PROKR1 和 / 或 PROKR2 结合的抗体。在某些实施方案中, 本发明的抗体能够阻断前动力蛋白 (PK) 介导的一种或多种 PROKR 的活化。本发明的抗体可用于治疗通过前动力蛋白信号传导介导的各种疾病和病症。



1. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与前动力蛋白受体 (PROKR) 特异性结合并阻断前动力蛋白介导的 PROKR 活化。

2. 权利要求 1 的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与细胞表面表达的 PROKR1 特异性结合。

3. 权利要求 1 的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与细胞表面表达的 PROKR2 特异性结合。

4. 权利要求 1 的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与细胞表面表达的 PROKR1 和细胞表面表达的 PROKR2 特异性结合。

5. 权利要求 1 的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与细胞表面表达的 PROKR1 特异性结合,但不与细胞表面表达的 PROKR2 结合。

6. 权利要求 1 至 5 任一项的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段阻断前动力蛋白 1 (PK1) 介导的 PROKR1 活化。

7. 权利要求 1 至 5 任一项的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段阻断前动力蛋白 2 (PK2) 介导的 PROKR1 活化。

8. 权利要求 1 至 5 任一项的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段阻断前动力蛋白 1 (PK1) 介导的 PROKR1 活化和前动力蛋白 2 (PK2) 介导的 PROKR1 活化。

9. 权利要求 6 的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段阻断 PK1 介导的 PROKR1 活化,  $IC_{50}$  小于 20nM,如使用表达 PROKR1 的细胞,在体外经 1-20nM 的 PK1 刺激后,用钙动员检测方法所测。

10. 权利要求 9 的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段阻断 PK1 介导的 PROKR1 活化,  $IC_{50}$  小于 10nM,如使用表达 PROKR1 的细胞,在体外经 1-20nM 的 PK1 刺激后,用钙动员检测方法所测。

11. 权利要求 7 的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段阻断 PK2 介导的 PROKR1 活化,  $IC_{50}$  小于 60nM,如使用表达 PROKR1 的细胞,在体外经 1-20nM 的 PK2 刺激后,用钙动员检测方法所测。

12. 权利要求 11 的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段阻断 PK2 介导的 PROKR1 活化,  $IC_{50}$  小于 20nM,如使用表达 PROKR1 的细胞,在体外经 1-20nM 的 PK2 刺激后,用钙动员检测方法所测。

13. 权利要求 1 至 12 任一项的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段和一个参照抗体竞争性结合于细胞表面表达的 PROKR1 或细胞表面表达的 PROKR2,所述参照抗体包含一个选自以下一组序列号的 HCVR/LCVR 序列对 :2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154 和 162/170。

14. 权利要求 1 至 12 任一项的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含 : (a) 一个重链可变区 (HCVR) 的互补决定区 (CDR),其具有一个选自以下一组序列号的氨基酸序列 :2、18、34、50、66、82、98、114、130、146 和 162 ;以及 (b) 一个轻链可变区 (LCVR) 的 CDR,其具有一个选自以下一组序列号的氨基酸序列 :10、26、42、58、74、90、106、122、138、154 和 170。

15. 权利要求 14 所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含选自以下一组序列号的一个 HCVR/LCVR 氨基酸序列对的重链和轻链 CDR :2/10、18/26、34/42、

50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154 和 162/170。

16. 权利要求 15 所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段分别包含选自以下一组序列号的 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 结构域: 4-6-8-12-14-16 ;20-22-24-28-30-32 ;36-38-40-44-46-48 ;52-54-56-60-62-64 ; 68-70-72-76-78-80 ;84-86-88-92-94-96 ;100-102-104-108-110-112 ; 116-118-120-124-126-128 ;132-134-136-140-142-144 ;148-150-152-156-158-160 和 164-166-168-172-174-176。

17. 权利要求 1 至 12 任一项的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含:(a) 一个重链可变区 (HCVR),其具有一个选自以下一组序列号的氨基酸序列:2、18、34、50、66、82、98、114、130、146 和 162 ;以及 (b) 一个轻链可变区 (LCVR),其具有一个选自以下一组序列号的氨基酸序列:10、26、42、58、74、90、106、122、138、154 和 170。

18. 权利要求 17 所述的分离的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含一个选自以下一组序列号的 HCVR/LCVR 氨基酸序列对:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154 和 162/170。

19. 一种医药组合物,其包含权利要求 1 至 18 任一项中的抗体或抗原结合片段,以及一种药学上可接受的载体或稀释剂。

20. 一种治疗或减轻疼痛的方法,该方法包括向有需要的受试者施用权利要求 19 的医药组合物。

21. 权利要求 20 的方法,其中所述疼痛是伤害性疼痛、内脏疼痛或炎性疼痛。

22. 权利要求 21 的方法,其中所述疼痛与选自下列一组病况的某一病况有关:炎症、术后切口、神经病变、骨折、烧伤、骨质疏松性骨折、骨癌、痛风、偏头痛和纤维肌痛。

23. 权利要求 20 的方法,其中所述疼痛是癌症相关疼痛。

## 抗前动力蛋白受体 (PROKR) 抗体及其使用

### 发明领域

[0001] 本发明涉及结合和 / 或阻断前动力蛋白受体 (PROKR1 和 / 或 PROKR2) 抗体及其抗原结合片段, 以及其使用方法。

### 技术背景

[0002] 前动力蛋白 (PK1 和 PK2) 是分泌型多功能趋化因子样肽。前动力蛋白与称为前动力蛋白受体 1 (PROKR1 或 PKR1) 和前动力蛋白受体 2 (PROKR2 或 PKR2) 的两个 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 相互作用, 从而发挥其生物学功能。PROKR1 和 PROKR2 彼此共享约 87% 的总氨基酸序列同一性。PK1 和 PK2 分别与 PROKR1 和 PROKR2 相互作用。在细胞水平上, 前动力蛋白受体活化后, 会引起钙动员、刺激磷酸肌醇转换, 并激活 MAP 激酶信号传导通路。在多细胞水平上, 前动力蛋白表现出血管生成活性, 诱导细胞增殖和迁移。前动力蛋白及其受体与几种人类癌症的发展有关, 并且业也证实参与伤害感受和疼痛传输。(请参阅如 Monnier and Samson, 2010, *Cancer Letters* 296 :144-149; 以及 Negri et al., 2009, *Int. Rev. Neurobiol.* 85 :145-157)。

[0003] 前动力蛋白信号传导系统是治疗和 / 或预防各种疾病和病症的潜在靶标。因此, 本领域中需要以前动力蛋白信号传导通路的一种或多种组分 (如前动力蛋白受体 [PROKR1 和 PROKR2]) 为靶标并调节这些组分的新型治疗剂。

### 发明简述

[0004] 本发明提供与前动力蛋白受体 (PROKR) 结合的抗体。本发明的抗体特别适用于抑制 PROKR 介导的信号传导及治疗由 PROKR 活性或前动力蛋白信号传导引起或与之相关的疾病和病症。根据某些实施方案, 本发明的抗 PROKR 抗体可用于在需要此抗体的受试者中治疗或减轻其疼痛。

[0005] 本发明的抗体可以是全长的 (如 IgG1 或 IgG4 抗体), 也可以仅包含抗原结合部分 (如 Fab、F(ab')<sub>2</sub> 或 scFv 片段), 并且可以经过修饰以影响其功能, 如消除残余效应子功能 (Reddy et al., 2000, *J. Immunol.* 164 :1925-1933)。

[0006] 本发明提供抗 PROKR 抗体或抗原结合片段, 其包含一个重链可变区 (HCVR), 后者具有一个选自以下一组序列号的氨基酸序列 : 2、18、34、50、66、82、98、114、130、146 和 162, 或一个基本上相似的序列, 其具有至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的序列同一性。

[0007] 本发明还提供一种抗体或抗体的抗原结合片段, 其包含一个轻链可变区 (LCVR), 后者具有一个选自以下一组序列号的氨基酸序列 : 10、26、42、58、74、90、106、122、138、154 和 170, 或一个基本上相似的序列, 其具有至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的序列同一性。

[0008] 本发明还提供一种抗体或其抗原结合片段, 其包含一个选自以下一组序列号的 HCVR 和 LCVR (HCVR/LCVR) 序列对 : 2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154 和 162/170。

[0009] 本发明还提供一种抗体或抗体的抗原结合片段,其包含一个重链 CDR3(HCDR3) 结构域,后者具有一个选自以下一组序列号的氨基酸序列:8、24、40、56、72、88、104、120、136、152 和 168,或一个基本上相似的序列,其具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%的序列同一性;以及一个轻链 CDR3(LCDR3) 结构域,后者具有一个选自以下一组序列号的氨基酸序列:16、32、48、64、80、96、112、128、144、160 和 176,或一个基本上相似的序列,其具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%的序列同一性。

[0010] 在某些实施方案中,抗体或抗体的抗原结合部分包含一个选自以下一组序列号的 HCDR3/LCDR3 氨基酸序列对:8/16、24/32、40/48、56/64、72/80、88/96、104/112、120/128、136/144、152/160 和 168/176。

[0011] 本发明还提供一种抗体或其片段,还包含一个重链 CDR1(HCDR1) 结构域,后者具有一个选自以下一组序列号的氨基酸序列:4、20、36、52、68、84、100、116、132、148 和 164,或一个基本上相似的序列,其具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%的序列同一性;一个重链 CDR2(HCDR2) 结构域,其具有一个选自以下一组序列号的氨基酸序列:6、22、38、54、70、86、102、118、134、150 和 166,或一个基本上相似的序列,其具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%的序列同一性;一个轻链 CDR1(LCDR1) 结构域,其具有一个选自以下一组序列号的氨基酸序列:12、28、44、60、76、92、108、124、140、156 和 172,或一个基本上相似的序列,其具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%的序列同一性;以及一个轻链 CDR2(LCDR2) 结构域,其具有一个选自以下一组序列号的氨基酸序列:14、30、46、62、78、94、110、126、142、158 和 174,或一个基本上相似的序列,其具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%的序列同一性。

[0012] 本发明的某些非限制性、示例性抗体和抗原结合片段分别包含 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 结构域,后者具有选自以下一组序列号的氨基酸序列:4-6-8-12-14-16(如 H1M6386N);20-22-24-28-30-32(如 H2M6385N);36-38-40-44-46-48(如 H4H6663P);52-54-56-60-62-64(如 H4H6669P);68-70-72-76-78-80(如 H4H6671P);84-86-88-92-94-96(如 H4H6680P);100-102-104-108-110-112(如 H4H6690P);116-118-120-124-126-128(如 H4H6696P);132-134-136-140-142-144(如 H4H6698P);148-150-152-156-158-160(如 H4H6701P);以及 164-166-168-172-174-176(如 H4H6706P)。

[0013] 在一个相关实施方案中,本发明包括一种抗 PROKR 抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或片段包含重链和轻链 CDR 结构域,后者衍生自选自以下一组序列号的重链和轻链可变区(HCVR/LCVR)序列:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154 和 162/170。用于识别 HCVR 和 LCVR 氨基酸序列内的 CDR 的方法和技术是本领域内众所周知的,可用于识别本文中公开的特定 HCVR 和 / 或 LCVR 氨基酸序列内的 CDR。可用于识别 CDR 边界的示例性约定包括如 Kabat 定义、Chothia 定义和 AbM 定义。总的来说,Kabat 定义基于序列变异性,Chothia 定义基于结构环区域的位置,AbM 定义是 Kabat 和 Chothia 方法之间的折衷。请参阅如 Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); AI-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273 :927-948(1997); 以及 Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :9268-9272(1989)。公共数据库也可用于识别抗体中的 CDR 序列。识别了参照抗体的 CDR

后,即可使用本领域中的常规方法很容易地产生具有与参照抗体相同或基本相似的结合特性的新抗体。

[0014] 在另一个方面,本发明提供编码抗 PROKR 抗体或其抗原结合片段的核酸分子。本发明还包括携带本发明的核酸的重组表达载体和引入此类载体的宿主细胞,以及通过在允许产生抗体的条件下培养宿主细胞及回收所产生的抗体来产生抗体的方法。

[0015] 在一个实施方案中,本发明提供一种抗体或其片段,其包含一个由选自以下一组序列号的核酸序列编码的 HCVR :1、17、33、49、65、81、97、113、129、145 和 161, 或一个基本上相同的序列,其具有至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的同源性。

[0016] 本发明还提供一种抗体或其片段,其包含一个由选自以下一组序列号的核酸序列编码的 LCVR :9、25、41、57、73、89、105、121、137、153 和 169, 或一个基本上相同的序列,其具有至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的同源性。

[0017] 本发明还提供一种抗体或抗体的抗原结合片段,其包含一个由选自以下一组序列号的核苷酸序列编码的 HCDR3 结构域 :7、23、39、55、71、87、103、119、135、151 和 167, 或一个基本上相同的序列,其具有至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的同源性; 以及一个由选自以下一组序列号的核苷酸序列编码的 LCDR3 结构域 :15、31、47、63、79、95、111、127、143、159 和 175, 或一个基本上相同的序列,其具有至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的同源性。

[0018] 本发明还提供一种抗体或其片段,其还包含一个由选自以下一组序列号的核苷酸序列编码的 HCDR1 结构域 :3、19、35、51、67、83、99、115、131、147 和 163, 或一个基本上相同的序列,其具有至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的同源性; 一个由选自以下一组序列号的核苷酸序列编码的 HCDR2 结构域 :5、21、37、53、69、85、101、117、133、149、和 165, 或一个基本上相同的序列,其具有至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的同源性; 一个由选自以下一组序列号的核苷酸序列编码的 LCDR1 结构域 :11、27、43、59、75、91、107、123、139、155 和 171, 或一个基本上相同的序列,其具有至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的同源性; 以及一个由选自以下一组序列号的核苷酸序列编码的 LCDR2 结构域 :13、29、45、61、77、93、109、125、141、157 和 173, 或一个基本上相同的序列,其具有至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的同源性。

[0019] 根据某些实施方案,抗体或其片段包含由以下序列号的核酸序列编码的重链和轻链 CDR 序列 :1 和 9 (如 H1M6386N)、17 和 25 (如 H2M6385N)、33 和 41 (如 H4H6663P)、49 和 57 (如 H4H6669P)、65 和 73 (如 H4H6671P)、81 和 89 (如 H4H6680P)、97 和 105 (如 H4H6690P)、113 和 121 (如 H4H6696P)、129 和 137 (如 H4H6698P)、145 和 153 (如 H4H6701P), 或 161 和 169 (如 H4H6706P)。

[0020] 本发明包括具有经修饰的糖基化模式的抗 PROKR 抗体。在某些应用中,修饰以去除不想要的糖基化位点,或去除抗体寡糖链上存在的岩藻糖基基团,可能会很有用。

[0021] 在另一个方面,本发明提供一种包含一种抗 PROKR 抗体或其抗原结合片段的医药组合物及一种药学上可接受的载体。在一个相关方面,本发明提供一种包含一种抗 PROKR 抗体和一种第二治疗剂的组合的组合物。在一个实施方案中,所述第二治疗剂是与抗 PROKR 抗体有利结合的任何治疗剂。可与抗 PROKR 抗体有利结合的示例性治疗剂包括但不限于其他抑制 PROKR 活性的治疗剂 (包括其他抗体或其抗原结合片段、肽抑制剂、小分子拮抗剂、

天然产物等),及/或虽然不直接与 PROKR 结合,但可干扰、阻断或减弱 PROKR 介导的活性或信号传导的治疗剂。

[0022] 在又一个方面,本发明提供使用本发明的抗 PROKR 抗体或抗体的抗原结合部分抑制 PROKR 活性的方法,其中所述方法包括给予治疗有效量的包含本发明的抗体或抗体的抗原结合片段的医药组合物的方法。治疗的病症是通过去除、抑制或降低 PROKR 活性而得以改善、减轻、抑制或预防的任何疾病或病况。本发明的抗 PROKR 抗体或抗体片段可以起到阻止 PROKR 与一种或多种前动力蛋白之间相互作用的效果。

[0023] 本发明还包括将本发明的抗 PROKR 抗体或抗体的抗原结合部分用于生产药物,以治疗患者中与 PROKR 活性相关或由其引起的疾病或病症。

[0024] 在审阅随后的详细说明后,其他实施方案将变得明显。

#### 附图的简要说明

[0025] 图 1 是 DSS 诱发大肠炎小鼠模型旷场行为的总结。如图所示,小鼠分别接受以下任一处理:单用水、单用 DSS、DSS+ 同型对照抗体,或 DSS+ 抗体 H4H6385N。图 1A 以秒为单位显示保持不动的时间;图 1B 以厘米为单位显示移动的总距离;图 1C 显示直立次数;图 1D 以秒为单位显示直立时间。所有参数均在 60 分钟的测试时间内测量。

#### 详细说明

[0026] 在说明本发明之前先声明一下,应该理解,本发明并不局限于所说明的特定方法和实验条件,因为这些方法和条件可以变化。还应理解,本文中使用的术语仅用于说明特定实施方案的目的,并非意在限制本发明,因为本发明的范围将仅由所附的权利要求书来限定。

[0027] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属技术领域普通技术人员通常理解的含义。本文中使用的术语“大约”,当用于指某一列举的特定数值时,意为该数值可在与列举数值相差不大于 1% 的范围内变化。例如,本文中使用的表达“约 100”包括 99 和 101 以及此两者之间的所有数值(如 99.1、99.2、99.3、99.4 等)。

[0028] 尽管与本文所述的方法和材料相似或相当的任何方法和材料都可用于本发明的实践或测试,但现在说明的是首选的方法和材料。

#### 定义

[0029] 本文中使用的表述“前动力蛋白受体”、“PROKR”、“PKR”等意在包含 PROKR1 和 PROKR2 两者。术语“PROKR1”和“PROKR2”指人类 PROKR1 或 PROKR2 蛋白,除非有说明为来自非人类物种(如“小鼠 PROKR1”、“小鼠 PROKR2”、“猴 PROKR1”、“猴 PROKR2”等)。人类 PROKR1 具有序列号为 177 的氨基酸序列。人类 PROKR2 具有序列号为 178 的氨基酸序列。小鼠(小家鼠)PROKR1 具有如 NCBI 参照序列号 NP\_067356.2 所列的氨基酸序列;小鼠 PROKR2 具有如 NCBI 参照序列号 NP\_659193.3 所列的氨基酸序列;大鼠(褐家鼠)PROKR1 具有如 NCBI 参照序列号 NP\_620433.1 所列的氨基酸序列;大鼠 PROKR2 具有如 NCBI 参照序列号 NP\_620434.1 所列的氨基酸序列;食蟹猴(食蟹猕猴)PROKR1 具有如 GenBank 登录号 EHH55625.1 所列的氨基酸序列;食蟹猴 PROKR2 具有如 GenBank 登录号 EHH65528.1 所列的氨基酸序列。

[0030] “抗 PROKR 抗体”指与 PROKR1 和/或 PROKR2 特异性结合的抗体。本文中使用的“与 PROKR 结合的抗体”或“抗 PROKR 抗体”包括与 PROKR 蛋白的可溶性片段(如包含 PROKR1

或 PROKR2N 端细胞外部分的多肽 [请参阅如本文中的实施例 4], 或其一种或多种细胞外环) 结合的抗体及其抗原结合片段。“与 PROKR 结合的抗体”或“抗 PROKR 抗体”这一表述, 还包括与细胞表面表达的 PROKR1 和 / 或 PROKR2 结合的抗体。“细胞表面表达的 PROKR”这一表述, 是指体外或体内在细胞表面表达的一种或多种 PROKR 蛋白, 使得所述 PROKR 蛋白的至少一部分 (如 N 端细胞外部分和 / 或一个或多个细胞外环) 暴露于细胞膜的细胞外侧, 进而可与抗体的抗原结合部分接触。“细胞表面表达的 PROKR”包括天然表达在细胞表面上及经人工改造以在细胞表面表达的 PROKR。

[0031] “与细胞表面表达的 PROKR1 特异性结合”的抗体是指这样一种抗体, 即可以检测到其与细胞表面上表达 PROKR1 的细胞之间的结合, 但检测不到其与相当的细胞表面上不表达 PROKR1 的细胞之间的结合。同样地, “与细胞表面表达的 PROKR2 特异性结合”的抗体是指这样一种抗体, 即可以检测到其与细胞表面上表达 PROKR2 的细胞之间的结合, 但检测不到其与相当的细胞表面上不表达 PROKR2 的细胞之间的结合。如本文实施例 3 中所示, 评估抗体是否与细胞表面表达的 PROKR1 和 / 或 PROKR2 结合的示例性方法是流式细胞术 (FACS)。

[0032] 本文中使用的术语“抗体”是指任何包含至少一个与特定抗原 (如 PROKR) 特异性结合或与其相互作用的互补决定区 (CDR) 的抗原结合分子或分子复合物。术语“抗体”包括包含 4 条多肽链 (通过二硫键相互连接的两条重 [H] 链和两条轻链 [L]) 的免疫球蛋白分子及其多聚体 (如 IgM)。每条重链均包含一个重链可变区 (本文中缩写为 HCVR 或  $V_H$ ) 和一个重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域, 即  $C_H1$ 、 $C_H2$  和  $C_H3$ 。每条轻链均包含一个轻链可变区 (本文中缩写为 LCVR 或  $V_L$ ) 和一个轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域 ( $C_L1$ )。  $V_H$  和  $V_L$  区可进一步细分成高变区, 称为互补决定区 (CDR), 其间散布有更保守的称为构架区 (FR) 的区域。每个  $V_H$  和  $V_L$  均由三个 CDR 和四个 FR 组成, 从氨基端到羧基端按以下顺序排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施方案中, 抗 PROKR 抗体 (或其抗原结合部分) 的 FR 可能与人类种系序列相同, 也可能经过天然或人工修饰。可基于两个或多个 CDR 的比对分析来确定氨基酸共有序列。

[0033] 本文中使用的术语“抗体”还包括完整抗体分子的抗原结合片段。本文中使用的抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等术语包括与抗原特异性结合而形成复合物的任何天然存在的、可以酶促方式获得的、合成的或基因改造的多肽或糖蛋白。抗体的抗原结合片段可以利用任何合适的标准技术, 例如蛋白水解消化或涉及操纵和表达编码抗体可变区和任选恒定区的 DNA 的重组基因工程技术, 从例如完整的抗体分子衍生。此类 DNA 是已知的及 / 或很容易从如市售来源、DNA 文库 (包括如噬菌体抗体文库) 获得, 或可以合成。该 DNA 可以测序且以化学方法或分子生物学技术加以操纵, 例如将一个或多个可变区和 / 或恒定结构域排列成一种合适的构型, 或引入密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或删除氨基酸等。

[0034] 抗原结合片段的非限制性实例包括: (i) Fab 片段; (ii)  $F(ab')_2$  片段; (iii) Fd 片段; (iv) Fv 片段; (v) 单链 Fv (scFv) 分子; (vi) dAb 片段; 以及 (vii) 由模拟抗体高变区 (如孤立的互补决定区 [CDR], 如 CDR3 肽) 或 FR3-CDR3-FR4 构型约束肽的氨基酸残基组成的最小识别单位。其他工程分子, 如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域删除的抗体、嵌合抗体、CDR 嫁接抗体、双抗体、三聚抗体、四聚抗体、微型抗体、纳米抗体 (如单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小模块化免疫药物 (SMIP), 以及鲨鱼可变 IgNAR 结构域, 也包括在本



文中使用的“抗原结合片段”这一表述中。

[0035] 抗体的抗原结合片段通常会包含至少一个可变结构域。可变结构域可以是任何大小或具有任何氨基酸组成,且通常会包含至少一个邻近一个或多个框架序列或位于其中的CDR。在含有与 $V_L$ 结构域相关联之 $V_H$ 结构域的抗原结合片段中,该 $V_H$ 结构域和 $V_L$ 结构域彼此的相对位置可为任何合适的排列。例如,可变结构域可以是二聚化的且含有 $V_H$ - $V_H$ 、 $V_H$ - $V_L$ 或 $V_L$ - $V_L$ 二聚体。或者,抗体的抗原结合片段可包含一个单体 $V_H$ 或 $V_L$ 结构域。

[0036] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可包含与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。在本发明的抗体的抗原结合片段内可发现的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包括:(i) $V_H$ - $C_H1$ ;(ii) $V_H$ - $C_H2$ ;(iii) $V_H$ - $C_H3$ ;(iv) $V_H$ - $C_H1$ - $C_H2$ ;(v) $V_H$ - $C_H1$ - $C_H2$ - $C_H3$ ;(vi) $V_H$ - $C_H2$ - $C_H3$ ;(vii) $V_H$ - $C_L$ ;(viii) $V_L$ - $C_H1$ ;(ix) $V_L$ - $C_H2$ ;(x) $V_L$ - $C_H3$ ;(xi) $V_L$ - $C_H1$ - $C_H2$ ;(xii) $V_L$ - $C_H1$ - $C_H2$ - $C_H3$ ;(xiii) $V_L$ - $C_H2$ - $C_H3$ ;以及(xiv) $V_L$ - $C_L$ 。在可变结构域和恒定结构域的任何构型中,包括上述任何示例性构型,该可变结构域和恒定结构域可直接相互连接或可通过一个完整或部分铰链区或连接区连接。铰链区可包含至少2个(如5、10、15、20、40、60个或以上)氨基酸,其在一个单一肽分子中相邻的可变结构域和/或恒定结构域之间形成柔性或半柔性连接。此外,本发明的抗体的抗原结合片段可包含上述可变结构域和恒定结构域的任何构型的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体),其中可变结构域和恒定结构域以非共价键相互连接及/或与一个或多个单体 $V_H$ 或 $V_L$ 结构域(如通过二硫键)连接。

[0037] 如同完整的抗体分子,抗原结合片段可以是单特异性或多特异性(例如双特异性)。抗体的多特异性抗原结合片段通常会包含至少两个不同的可变结构域,其中每个可变结构域都能够与另一种抗原或同一抗原的不同表位特异性结合。任何多特异性抗体形式,包括本文中所公开的示例性双特异性抗体形式,均可利用本领域内可利用的常规技术,使其适应于涉及本发明的抗体的抗原结合片段的用途。

[0038] 本文中使用的术语“人源抗体”意在包括含有衍生自人类种系免疫球蛋白序列的可变结构域和恒定结构域的抗体。本发明的人源抗体可包括并非由人类种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(如通过体外随机诱变或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变所引入的突变),如可在CDR中,尤其是在CDR3中包含的氨基酸残基。但是,本文中使用的术语“人源抗体”并不意图包括这样的抗体,其中衍生自另一哺乳动物物种如小鼠的CDR序列被嫁接到人类框架序列

[0039] 本文中使用的术语“重组人源抗体”意在包括所有以重组方法制备、表达、产生或分离的人源抗体,如用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(将在下文中进一步说明),从重组的、组合的人源抗体文库中分离的抗体(将在下文中进一步说明),从人类免疫球蛋白基因转基因动物(如小鼠)分离的抗体(请参阅如Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20 :6287-6295),或者以任何其他涉及将人类免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列上的方法所制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人源抗体含有衍生自人类种系免疫球蛋白序列的可变结构域和恒定结构域。但在某些实施方案中,此类重组人源抗体经受体外诱变(或当使用人类Ig序列转基因动物时,经受体内体细胞诱变),从而使得该重组抗体的 $V_H$ 区和 $V_L$ 区的氨基酸序列成为这样的序列:它们虽然衍生自人类种系 $V_H$ 序列和 $V_L$ 序列并与人类种系 $V_H$ 序列和 $V_L$ 序列相关联,但并非天然存在于体内人类抗体种系谱中。

[0040] 人源抗体可以两种与铰链异质性有关的形式存在。在第一种形式中,免疫球蛋白分子包含一个约 150-160kDa 的稳定的四链构建物,其中两个二聚体由一个重链间二硫键连接在一起。在第二种形式中,二聚体并非由重链间二硫键连接在一起,而是形成一个由共价偶联的轻链和重链(半抗体)组成的约 75-80kDa 的分子。这些形式的分离一直极为困难,甚至在亲和纯化之后也是如此。

[0041] 第二种形式在各种完整 IgG 同型中的出现频率是由于但不限于与抗体的铰链区同型相关的结构差异。人类 IgG4 铰链的铰链区内单个氨基酸替换可将第二种形式 (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30 :105) 的出现频率显著地降低到利用人类 IgG1 铰链时通常观察到的水平。本发明包括在铰链区、 $C_H2$  区或  $C_H3$  区中包含一个或多个突变的抗体。所述突变可能是合乎需要的,例如在生产抗体时用于提高所需抗体形式的产率。

[0042] 本文中使用的“分离的抗体”意为从其自然环境的至少一个组分中识别、分离和/或回收的抗体。例如,从生物体的至少一个组分或从抗体天然存在或天然产生的组织或细胞中分离或移除的抗体,就是符合本发明之目的“分离的抗体”。“分离的抗体”也包括重组细胞内的原位抗体。分离的抗体是经过至少一个纯化或分离步骤的抗体。按照某些实施方案,分离的抗体可基本上不含其他细胞物质和/或化学物质。

[0043] 本文中使用的“中和”或“阻断”抗体意在指与 PROKR 结合后产生以下效果的抗体:(i) 抑制前动力蛋白(如 PK1 或 PK2)和 PROKR 之间的相互作用;(ii) 抑制或减弱前动力蛋白介导的 PROKR 活化;以及/或(iii) 导致抑制 PROKR 的至少一种生物学功能。中和或阻断 PROKR 的抗体并不需要导致完全抑制,只要该抑制效应可用适当的检测方法检测到即可。用于检测 PROKR 抑制的示例性检测方法是本领域内已知的,并在本文的具体实施例中阐述。

[0044] 与衍生该抗体的相应种系序列相比,本文中所公开的抗 PROKR 抗体可在重链和轻链可变结构域的框架区和/或 CDR 区包含一个或多个氨基酸的替换、插入和/或缺失。通过将本文中所公开的氨基酸序列与从如公共抗体序列数据库可获得的种系序列相比,可轻易证实此类突变。本发明包括衍生自本文中所公开的任何氨基酸序列的抗体及其抗原结合片段,其中一个或多个框架区和/或 CDR 区内的一个或多个氨基酸突变为衍生该抗体的种系序列的相应残基,或突变为另一个人种系序列的相应残基,或突变为相应的种系序列残基的保守氨基酸替换(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。本发明所属技术领域普通技术人员从本文中所公开的重链和轻链可变区序列开始,能够轻易地产生多种包含一个或多个单个种系突变或其组合的抗体及其抗原结合片段。在某些实施方案中,上述  $V_H$  和/或  $V_L$  结构域内的所有框架和/或 CDR 残基均回复突变为在衍生该抗体的原始种系序列中发现的残基。在其他实施方案中,只有某些残基被回复突变为原始种系序列,如仅在 FR1 的前 8 个氨基酸或 FR4 的后 8 个氨基酸中发现的突变残基,或仅在 CDR1、CDR2 或 CDR3 中发现的突变残基,被回复突变为原始种系序列。在其他实施方案中,一个或多个框架和/或 CDR 残基突变为一个不同种系序列(即一个不同于最初衍生该抗体的种系序列的种系序列)的相应残基。此外,本发明的抗体可在框架区和/或 CDR 区内包含两个或多个种系突变的任何组合,如其中某些单个残基突变为特定种系序列的相应残基,而某些其他不同于原始种系序列的残基则保持不变或突变为另一个种系序列的相应残基。获得包含一个或多个种系突变的抗体和抗原结合片段之后,就可轻易地测试其一种或多种所需的特性,如结合特异

性改善、结合亲和力提高、拮抗或激动生物学特性改善或增强（视情况而定）、免疫原性下降等。以此一般方式所获的抗体和抗原结合片段均包括在本发明的范围内。

[0045] 本发明还包括包含本文中所公开的任何 HCVR、LCVR 和 / 或 CDR 氨基酸序列之变异体的抗 PROKR 抗体, 该变异体含有一个或多个保守氨基酸替换。例如, 本发明包括含有 HCVR、LCVR 和 / 或 CDR 氨基酸序列的抗 PROKR 抗体, 相对于本文中所公开的任何 HCVR、LCVR 和 / 或 CDR 氨基酸序列, 该氨基酸序列含有如 10 个或以下、8 个或以下、6 个或以下、4 个或以下等保守氨基酸替换。

[0046] 术语“表位”是指一个抗原决定簇, 其与抗体分子可变区中称为互补位的特异性抗原结合位点相互作用。单个抗原可有一个以上的表位。因此, 不同的抗体可与一个抗原的不同区域结合并产生不同的生物学效应。表位可以是构象或线性的。构象表位是由线性多肽链不同链段在空间上并置的氨基酸产生的。线性表位是由多肽链上相邻的氨基酸残基产生的。在某些情况下, 表位可包括抗原上的糖类、磷酸基, 或磺酰基基团。

[0047] 术语“显著同一性”或“基本相同”, 当用于指核酸或其片段时, 表明当该核酸或其片段与另一个核酸（或其互补链）的适当核苷酸插入或缺失进行最佳比对时, 如通过任何众所周知的序列同一性算法, 如 FASTA、BLAST 或 Gap 所测定（如下文中所讨论）, 至少约 95% 的核苷酸碱基, 更好的情况是至少约 96%、97%、98% 或 99% 的核苷酸碱基有核苷酸序列同一性。在某些情况下, 与参照核酸分子具有显著同一性的核酸分子可编码具有与参照核酸分子所编码的多肽相同或基本上相似的氨基酸序列的多肽。

[0048] 当应用于多肽时, 术语“基本相似性”或“基本上相似”意指两个肽序列进行最佳比对时（如使用默认缺口权重的 GAP 或 BESTFIT 程序）, 共享至少 95% 的序列同一性, 更好的情况是共享至少 98% 或 99% 的序列同一性。较好的情况是, 不相同的残基位置之间的差异是保守氨基酸替换。“保守氨基酸替换”是指一个氨基酸残基由含有化学性质（如电荷或疏水性）相似的侧链（R 基团）的另一个氨基酸残基所替换。总的来说, 保守氨基酸替换将不会显著改变蛋白质的功能性质。在两个或更多个氨基酸序列之间的差异在于保守替换的情况下, 可上调序列同一性百分比或相似程度, 以校正替换的保守性质。进行此类调整的方法是本领域内技术人员所熟知的。请参阅如 Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24 :307-331。含有化学性质相似侧链的几类氨基酸的实例包括：(1) 脂肪族侧链：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸；(2) 脂肪族-羟基侧链：丝氨酸和苏氨酸；(3) 含酰胺侧链：天冬酰胺和谷氨酰胺；(4) 芳香族侧链：苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸；(5) 碱性侧链：赖氨酸、精氨酸和组氨酸；(6) 酸性侧链：天冬氨酸和谷氨酸；以及 (7) 含硫侧链：半胱氨酸和甲硫氨酸。首选的几组保守氨基酸替换是：缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸, 以及天冬酰胺-谷氨酰胺。或者, 保守替换是 PAM250 对数似然矩阵（如 Gonnet et al. (1992) *Science* 256 :1443-1445 中所公开）出现正值的任何变化。“适度保守”的替换是 PAM250 对数似然矩阵出现非负值的任何变化。

[0049] 多肽的序列相似性（也被称为序列同一性）通常是使用序列分析软件进行测量。蛋白质分析软件使用分配给各种替换、缺失和其他修饰, 包括保守氨基酸替换的相似性指标来匹配相似的序列。例如, GCG 软件包含诸如 Gap 和 Bestfit 等程序, 可用于（使用默认参数）确定密切相关的多肽, 如来自不同生物物种的同源多肽或野生型蛋白及其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。请参阅如 GCG 版本 6.1。还可以使用 GCG 版本 6.1

中的 FASTA 程序（使用默认或推荐参数）来比较多肽序列。FASTA（如 FASTA2 和 FASTA3）提供查询序列和检索序列之间最佳重叠区域的比对和序列同一性百分比（Pearson (2000)，同上文）。将本发明的序列与包含大量来自不同生物体的序列的数据库进行比较时的另一首选算法是 BLAST 计算机程序，特别是 BLASTP 或 TBLASTN（使用默认参数）。请参阅如 Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215 :403-410 和 Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 :3389-402。

#### 抗体的生物学特性

[0050] 本发明包括与细胞表面表达的 PROKR1 和 / 或细胞表面表达的 PROKR2 特异性结合的抗 PROKR 抗体及其抗原结合片段。例如，本发明提供的抗 PROKR 抗体可以：(a) 与细胞表面表达的 PROKR1 特异性结合，但不与细胞表面表达的 PROKR2 特异性结合；(b) 与细胞表面表达的 PROKR2 特异性结合，但不与细胞表面表达的 PROKR1 特异性结合；或 (c) 同时与细胞表面表达的 PROKR1 和细胞表面表达的 PROKR2 特异性结合。可以使用任何允许检测抗体与表达 PROKR 的细胞结合的检测形式测试和评估抗 PROKR 抗体与细胞表面表达的 PROKR 特异性结合的能力。可用于确定抗体是否与细胞表面表达的 PROKR 特异性结合的一个示例性检测形式在本文实施例 3 中阐述。在此实施例中，通常不表达 PROKR 的细胞（如 HEK293 细胞）被改造以表达 PROKR1 或 PROKR2，然后通过流式细胞仪使用可检测到的标记的第二抗体确定与表达 PROKR 的细胞结合的抗体。与细胞表面表达的 PROKR 发生“特异性抗体结合”，意指流式细胞仪显示有可检测到的结合的细胞百分比超过 1%。使用此检测形式时，结合百分比为 1% 至 10% 的抗体通常被视为具有“弱阳性”结合，但出于本文公开之目的，仍被视为是“与细胞表面表达的 PROKR 特异性结合”的抗体。但根据某些实施方案，与细胞表面表达的 PROKR 发生特异性抗体结合，意指流式细胞仪显示有可检测到的结合的细胞百分比超过 10%、超过 20%、超过 30%、超过 40%、超过 50% 或以上。

[0051] 本发明还包括与 PROKR1 和 / 或 PROKR2 的一个或多个可溶性片段结合的抗 PROKR 抗体。例如，本文提供与包含全部或部分 PROKR 蛋白的 N 端细胞外部分的 PROKR1 或 PROKR2 的可溶性片段特异性结合的抗体。此类示例性可溶 PROKR1 和 PROKR2 构建物在本文实施例 4 中阐述。如实施例 4 中所示，通过表面等离子共振（25°C，pH 7.4）测定包含与人类 Fc 组分融合的 PROKR1（序列号：177）第 1 至 62 位氨基酸或 PROKR2（序列号：178）第 1 至 53 位氨基酸的融合蛋白与抗 PROKR 抗体的结合。使用实施例 4 中的检测形式或相似的检测方法可以量化抗 PROKR 抗体与可溶性 PROKR 分子的结合，如以平衡解离常数 ( $K_D$ ) 和 / 或解离半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 来测量。

[0052] 因此，本发明提供与可溶性人源 PROKR1（如 N 端部分）结合的  $K_D$  小于约 5nM、小于约 3nM、小于约 2nM、小于约 1.5nM、小于约 600pM、小于约 550pM、小于约 500pM、小于约 450pM、小于约 400pM、小于约 350pM、小于约 300pM、小于约 250pM、小于约 200pM、小于约 150pM，或小于约 100pM 的抗 PROKR 抗体。上述  $K_D$  系通过表面等离子共振（如使用本文实施例 4 中所界定的检测形式）或一种基本上相似的检测方法来测定。

[0053] 本发明还包括与可溶性人源 PROKR1（如 N 端部分）结合的解离半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 大于约 5 分钟、大于约 10 分钟、大于约 15 分钟、大于约 20 分钟、大于约 25 分钟、大于约 30 分钟、大于约 35 分钟、大于约 40 分钟、大于约 45 分钟、大于约 50 分钟、大约 55 分钟、大于约 60 分钟、大于约 75 分钟、大于约 100 分钟、大于约 150 分钟、大于约 200 分钟，或大于约 250

分钟或以上的抗 PROKR 抗体及其抗原结合片段。上述  $t_{1/2}$  系通过表面等离子共振（如使用本文实施例 4 中所界定的检测形式）或一种基本上相似的检测方法来测定。

[0054] 本发明提供与可溶性人源 PROKR2（如 N 端部分）结合的  $K_D$  小于约 150nM、小于约 130nM、小于约 100nM、小于约 90nM、小于约 80nM、小于约 75nM、小于约 70nM、小于约 65nM、小于约 60nM、小于约 55nM、小于约 50nM、小于约 45nM、小于约 40nM、小于约 35nM、小于约 30nM、小于约 25nM、小于约 20nM、小于约 15nM、小于约 10nM、小于约 5nM、小于约 3nM 或以下的抗 PROKR 抗体。上述  $K_D$  系通过表面等离子共振（如使用本文实施例 4 中所界定的检测形式）或一种基本上相似的检测方法来测定。

[0055] 本发明还包括与可溶性人源 PROKR2（如 N 端部分）结合的的解离半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 大于约 1 分钟、大于约 2 分钟、大于约 3 分钟、大于约 4 分钟、大于约 5 分钟、大于约 10 分钟、大于约 20 分钟、大于约 30 分钟、大于约 40 分钟或以上的抗 PROKR 抗体及其抗原结合片段。上述  $t_{1/2}$  系通过表面等离子共振（如使用本文实施例 4 中所界定的检测形式）或一种基本上相似的检测方法来测定。

[0056] 本发明还包括阻断前动力蛋白介导的 PROKR1 和 / 或 PROKR2 活化的抗 PROKR 抗体及其抗原结合片段。可以测量抗 PROKR 抗体阻断前动力蛋白介导的 PROKR1 和 / 或 PROKR2 活化的能力,如使用本文实施例 5 中所阐述的检测形式进行测量。使用此检测方法时,通常不表达人源 PROKR 的细胞（即 HEK293 细胞）被改造以表达 PROKR1 或 PROKR2。在此检测形式下,PROKR 活化的程度由前动力蛋白 1(PK1) 或前动力蛋白 2(PK2)（如使用约 1 至 20nM 浓度的 PK1 或 PK2）处理后（在存在或不存在抗 PROKR 抗体的情况下）出现的钙动员表示。在此检测形式下,前动力蛋白介导的 PROKR 活化的抑制计算为  $IC_{50}$  值（即抑制 50% 的 PK 介导的钙通量时所需要的抗体浓度）或阻断百分比。本发明包括的抗 PROKR 抗体可阻断:(a) PK1 介导的 PROKR1 活化;(b) PK2 介导的 PROKR1 活化;(c) PK1 介导的 PROKR2 活化;及 / 或 (d) PK2 介导的 PROKR2 活化。例如,本发明包括阻断 PK1 介导的 PROKR1 活化时  $IC_{50}$  小于约 20nM、小于约 18nM、小于约 16nM、小于约 14nM、小于约 12nM、小于约 10nM、小于约 9nM、小于约 8nM、小于约 7nM,或小于约 6nM 或以下的抗 PROKR 抗体。上述  $IC_{50}$  系使用实施例 5 中的检测形式（如使用约 1nM 至约 20nM 的 PK1）或一种基本上相似的检测方法进行测量。本发明还包括阻断 PK2 介导的 PROKR1 活化时  $IC_{50}$  小于约 60nM、小于约 50nM、小于约 20nM 或小于约 20nM 的抗 PROKR 抗体。上述  $IC_{50}$  系使用实施例 5 中的检测形式（如使用约 1nM 至约 20nM 的 PK2）或一种基本上相似的检测方法进行测量。

[0057] 本发明还包括在各种动物疼痛模型中抑制或降低疼痛反应的抗 PROKR 抗体。

[0058] 本发明的抗 PROKR 抗体的其他生物学活性,将随着本文具体实施例中所述的内容而对本领域内普通技术人员变得明显。

#### 抗原表位作图及相关技术

[0059] 本发明包括与位于选自以下一组 PROKR1 分子的一个或多个区域或链段内的一个或多个氨基酸相互作用的抗 PROKR 抗体:(a) N 端细胞外区域（序列号 177, 第 1 至 62 位氨基酸）;(b) 细胞外环 1（序列号 177, 第 120 至 146 位氨基酸）;(c) 细胞外环 2（序列号 177, 第 201 至 232 位氨基酸）;以及 / 或细胞外环 3（序列号 177, 第 304 至 322 位氨基酸）。

[0060] 本发明还包括与位于选自以下一组 PROKR2 分子的一个或多个区域或链段内的一个或多个氨基酸相互作用的抗 PROKR 抗体:(a) N 端细胞外区域（序列号 178, 第 1 至 54 位

氨基酸) ;(b) 细胞外环 1(序列号 178,第 110 至 137 位氨基酸) ;(c) 细胞外环 2(序列号 178,第 193 至 221 位氨基酸) ;以及 / 或细胞外环 3(序列号 178,第 297 至 310 位氨基酸)。

[0061] 抗体结合的表位可包含位于上述任何 PROKR1 和 / 或 PROKR2 区域或链段内由 3 个或更多个(如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或以上) 氨基酸组成的单个连续序列。或者,该表位可包含位于上述一个或多个 PROKR 分子区域或链段内的多个非连续氨基酸(或氨基酸序列)。例如,本发明的抗体可与位于 PROKR1 的 N 端细胞外区域内的一个或多个氨基酸相互作用,也可以与位于一个或多个 PROKR1 细胞外环内的一个或多个氨基酸相互作用。

[0062] 本领域内普通技术人员所熟知的各种技术都可用于确定抗体是否与多肽或蛋白质内的“一种或多个氨基酸相互作用”。示例性技术包括如 Antibodies, Harlow and Lane(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY) 中所述的常规交叉阻断检测、丙氨酸扫描突变分析、肽印迹分析(Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248 :443-463) 和肽切割分析。此外,还可采用诸如抗原的表位切除、表位提取和化学修饰等方法(Tomer, 2000, *Protein Science* 9 :487-496)。可用于识别与抗体相互作用的多肽内氨基酸的另一种方法是通过质谱法检测氢 / 氘交换。总的来说,氢 / 氘交换方法涉及用氘标记目标蛋白质,随后将抗体与氘标记的蛋白质结合。然后,将蛋白质 / 抗体复合物转移到水中,以允许在除了由抗体(其保持氘标记)所保护的残基以外的所有残基处发生氢 - 氘交换。抗体解离后,对目标蛋白质进行蛋白酶切割和质谱分析,由此显示对应于与抗体相互作用的特定氨基酸的氘标记的残基。请参阅例如 Ehring(1999) *Analytical Biochemistry* 267 (2) :252-259 ;Engen and Smith(2001) *Anal. Chem.* 73 :256A-265A。X 射线晶体学也可以用于抗原 / 抗体复合物的表位作图。

[0063] 本发明还包括与本文所描述的任何特异性示例性抗体(如 H1M6386N、H2M6385N、H4H6663P、H4H6669P、H4H6671P、H4H6680P、H4H6690P、H4H6696P、H4H6698P、H4H6701P、H4H6706P 等) 结合于同一表位的抗 PROKR 抗体。同样地,本发明还包括与本文所描述的任何特异性示例性抗体(如 H1M6386N、H2M6385N、H4H6663P、H4H6669P、H4H6671P、H4H6680P、H4H6690P、H4H6696P、H4H6698P、H4H6701P、H4H6706P 等) 竞争性结合于 PROKR1 和 / 或 PROKR2 的抗 PROKR 抗体。

[0064] 使用本领域中已知的常规方法,人们可以很容易地确定某一抗体是否与参照抗 PROKR 抗体结合于同一表位或与参照抗 PROKR 抗体竞争性结合。例如,为了确定某一待测抗体是否与本发明的参照抗 PROKR 抗体结合于同一表位,就让参照抗体与 PROKR 蛋白结合。然后,评估待测抗体与 PROKR 分子结合的能力。如果待测抗体在与参照抗 PROKR 抗体饱和结合之后能够与 PROKR 结合,就可以得出待测抗体和参照抗 PROKR 抗体与不同表位结合的结论。否则,如果待测抗体在与参照抗 PROKR 抗体饱和结合之后不能与 PROKR 分子结合,则待测抗体就可能与本发明的参照抗 PROKR 抗体所结合的同表位结合。然后可以进行其他常规实验(如肽突变和结合分析),以证实所观察到的待测抗体之缺乏结合实际上是由于待测抗体与参照抗体结合于同一表位所致,还是由于空间阻断(或另一种现象)导致所观察到的缺乏结合。此类实验可通过 ELISA、RIA、Biacore、流式细胞术或本领域中可用的其他任何定量或定性抗体结合检测方法来进行。根据本发明的某些实施方案,如果如 1 倍、5 倍、10 倍、20 倍或 100 倍过量的一种抗体抑制另一种抗体的结合达至少 50%,但更好的情

况是 75%、90% 或甚至 99%，如在竞争性结合检测中所测量（请参阅如 Junghans et al., Cancer Res. 1990 :50 :1495-1502），则这两种抗体就结合于同一（或重叠）表位。或者，如果抗原中降低或消除一种抗体结合的几乎所有氨基酸突变都能降低或消除另一种抗体的结合，则这两种抗体就被视为结合于同一表位。如果降低或消除一种抗体结合的氨基酸突变中仅有某个亚组的突变能够降低或消除另一种抗体的结合，则这两种抗体就被视为结合于“重叠表位”。

[0065] 为了确定某一抗体是否与参照抗 PROKR 抗体竞争性结合，则在两个方向实施上述结合方法：在第一个方向，让参照抗体在饱和条件下与 PROKR 蛋白结合，随后评估待测抗体与 PROKR 分子的结合。在第二个方向，让待测抗体在饱和条件下与 PROKR 分子结合，随后评估参照抗体与 PROKR 分子的结合。如果在两个方向上都只有第一个（饱和）抗体能够与 PROKR 分子结合，则可以得出待测抗体和参照抗体与 PROKR 竞争性结合的结论。如同本领域内普通技术人员所熟知的，与参照抗体竞争性结合的抗体未必与参照抗体结合于同一表位，而是可结合于某个重叠或相邻表位，从而在空间上阻断参照抗体的结合。

#### 人源抗体的制备

[0066] 用于产生单克隆抗体，包括完全人源单克隆抗体的方法是本领域已知的。任何此类已知的方法都可在本发明的情况下用于产生与人类 PROKR 特异性结合的人源抗体。

[0067] 采用 VELOCIMMUNETM 技术或其他产生单克隆抗体的相似方法，初步分离出对 PROKR 具有高亲和力的含有一个人类可变区 and 一个小鼠恒定区的嵌合抗体。如下面实验部分中所显示，确定并选择具有所需特性，包括亲和力、选择性、表位等的抗体。小鼠恒定区以所需的人类恒定区替换，以产生本发明的完全人源抗体，如野生型或经过修饰的 IgG1 或 IgG4。选定的恒定区可因具体用途而异，高亲和力抗原结合和靶标特异性特征则保留在可变区内。

#### 生物等效物

[0068] 本发明的抗 PROKR 抗体和抗体片段包括某些蛋白，其含有的氨基酸序列不同于所述抗体的氨基酸序列，但保留了与人类 PROKR 结合的能力。当与亲本序列相比时，此类变异体抗体和抗体片段包含一个或多个氨基酸添加、缺失或替换，但显示出与所述抗体基本上等同的生物学活性。同样地，当与所公开的序列相比时，本发明的编码抗 PROKR 抗体的 DNA 序列含有的序列包含一个或多个核苷酸的添加、缺失或替换，但可编码与本发明的抗 PROKR 抗体或抗体片段生物学上基本等效的抗 PROKR 抗体或抗体片段。此类变异体的氨基酸和 DNA 序列的实例已在上面讨论。

[0069] 如果例如两种抗原结合蛋白或抗体是医药等效物或医药替换物，当在相似实验条件下以单剂或以多剂方式以相同摩尔剂量给药时，其吸收速率和程度未显示出显著差异，则视它们具有生物等效性。对于某些抗体，如果它们的吸收程度相当但吸收速率并不相当，也将视为是等效物或医药替换物，并仍可视为具有生物等效性，因为吸收速率的差异是有意设计并反映在标签上，而且此类差异对于达到有效的体内药物浓度并不重要（如慢性用途），并认为对于所研究的特定医药产品在医学上并不重要。

[0070] 在一个实施方案中，如果两种抗原结合蛋白在安全性、纯度和药效方面没有临床意义上的差异，则它们具有生物等效性。

[0071] 在一个实施方案中，如果患者可以在参照产品和生物产品之间转换一次或多次而

预期不会增加出现副作用的风险,包括与无转换的连续治疗相比在免疫原性方面没有临床意义上的变化或有效性降低,则这两种抗原结合蛋白具有生物等效性。

[0072] 在一个实施方案中,如果两种抗原结合蛋白在使用条件下都通过一种或多种共同的作用机制起作用,且此类机制是已知的,则它们具有生物等效性。

[0073] 生物等效性可通过体内和体外方法来证明。生物等效性的测量方法包括如 (a) 人体或其他哺乳类动物的体内试验,其中血液、血浆、血清或其他生物体液中抗体或其代谢物的浓度作为时间的函数来测量;(b) 已与人体体内试验生物利用度数据建立了相关性并可合理预测人体体内试验生物利用度数据的体外试验;(c) 人体或其他哺乳类动物的体内试验,其中抗体(或其靶标)的适当的急性药理作用是作为时间的函数来测量的;以及 (d) 有良好对照的临床试验,可确定抗体的安全性、疗效,或生物利用度或生物等效性。

[0074] 可通过如对无助于生物学活性的残基或序列进行各种替换,或删除无助于生物学活性的端部或内部残基或序列,来构建本发明的抗 PROKR 抗体的生物等效变异体。例如,可删除或以其他氨基酸替换对于生物学活性无关紧要的半胱氨酸残基,以防在复性时形成不必要或不正确的分子内二硫键。在其他情况下,生物等效抗体可包括包含修饰所述抗体的糖基化特征的氨基酸改变(如消除或去除糖基化的突变)的抗 PROKR 抗体变异体。

#### 物种选择性和物种交叉反应性

[0075] 本发明包括与人类 PROKR(如细胞表面表达的人类 PROKR1 和/或细胞表面表达的人类 PROKR2) 结合,但不与来自其他物种的 PROKR 结合的抗 PROKR 抗体。本发明还包括与人类 PROKR(如细胞表面表达的人类 PROKR1 和/或细胞表面表达的人类 PROKR2) 结合,并同时与来自一个或多个非人类物种的一个或多个 PROKR 蛋白结合的抗 PROKR 抗体。本发明还包括阻断前动力蛋白介导的人类 PROKR1 和/或人类 PROKR2 活化,但不阻断前动力蛋白介导的一种或多种非人类 PROKR 活化的抗 PROKR 抗体。本发明还包括阻断前动力蛋白介导的人类 PROKR1 和/或人类 PROKR2 活化,也阻断前动力蛋白介导的一种或多种非人类 PROKR 活化的抗 PROKR 抗体。

[0076] 例如,本发明的抗 PROKR 抗体可结合及/或阻断人类 PROKR1 和/或人类 PROKR2,并可结合及/或阻断(或不结合或不阻断,视情况而定)一种或多种小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔子、山羊、绵羊、牛、马、骆驼、食蟹猴、狨猴、猕猴或黑猩猩的 PROKR1 或 PROKR2。例如,如本文实施例 5 中所显示,本发明的某些示例性抗体阻断 PK1 介导的人类 PROKR1 活化,还阻断 PK1 介导的猴 PROKR1 活化(如 H4H6696、H4H6698、H4H6701 和 H4H6385)。另一方面,抗体 H1M6386 表现出强效的阻断 PK1 介导的人类 PROKR1 活化的作用,但并未表现出任何可检测到的对 PK1 介导的猴 PROKR1 活化的阻断作用。在审阅了本文所提供的具体实施例后,对本领域内普通技术人员而言,本发明的示例性抗 PROKR 抗体的其他交叉反应/交叉阻断模式将变得明显。

#### 多特异性抗体

[0077] 本发明的抗体可以是单特异性、双特异性或多特异性。多特异性抗体可以是特异于一个靶多肽的不同表位,或者可以包含特异于一个以上靶多肽的抗原结合结构域。请参阅如 Tutt et al.,1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al.,2004, Trends Biotechnol. 22:238-244。本发明的抗 PROKR 抗体可以与另一个功能性分子(如另一种肽或蛋白质)连接或共表达。例如,抗体或其片段可以与一个或多个其他分子实体(如另一



种抗体或抗体片段)功能性地连接(如通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其他方式),以产生具有第二结合特异性的双特异性或多特异性抗体。例如,本发明包括双特异性抗体,其中免疫球蛋白的一个臂特异于人类 PROKR 或其片段,而免疫球蛋白的另一个臂则特异于第二治疗靶标或共轭至治疗性基团。本发明包括双特异性抗体,其包含一个与 PROKR1 特异性结合的第一抗原结合结构域和一个与 PROKR2 特异性结合的第二抗原结合结构域。

[0078] 可以在本发明的情况下使用的示例性双特异性抗体形式涉及使用一个第一免疫球蛋白(Ig)C<sub>H</sub>3 结构域和一个第二 Ig C<sub>H</sub>3 结构域,其中第一和第二 Ig C<sub>H</sub>3 结构域彼此相差至少一个氨基酸,且与没有氨基酸差异的双特异性抗体相比,其中至少一个氨基酸差异降低了双特异性抗体与蛋白 A 的结合。在一个实施方案中,第一 Ig C<sub>H</sub>3 结构域与蛋白 A 结合,而第二 Ig C<sub>H</sub>3 结构域含有一个降低或消除其与蛋白 A 结合的突变,如 H95R 修饰(按照 IMGT 外显子编号;按照 EU 编号为 H435R)。第二 C<sub>H</sub>3 还可以包含 Y96F 修饰(按照 IMGT 编号;按照欧盟编号为 Y436F)。可在第二 C<sub>H</sub>3 内发现的其他修饰包括:对于 IgG1 抗体:D16E、L18M、N44S、K52N、V57M 和 V82I(按照 IMGT 编号;按照 EU 编号分别为 D356E、L358M、N384S、K392N、V397M 和 V422I);对于 IgG2 抗体:N44S、K52N 和 V82I(按照 IMGT 编号;按照欧盟编号为 N384S、K392N 和 V422I);对于 IgG4 抗体:Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q 和 V82I(按照 IMGT 编号;按照欧盟编号为 Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q 和 V422I)。上述双特异性抗体形式的变体也包括在本发明的范围内。

#### 治疗处方和施用

[0079] 本发明提供包含本发明的抗 PROKR 抗体或其抗原结合片段的医药组合物。本发明的医药组合物是与合适的载体、辅料及改善转移、递送、耐受性等特性的其他试剂一起配制的。在以下这本所有药剂化学师都熟知的处方集里可以找到许多合适的处方:雷明登药理学大全(Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA)。这些处方包括如粉剂、糊剂、油膏、凝胶、蜡剂、油剂、脂类、阳离子或阴离子脂质体(如 LIPOFECTINTM, Life Technologies, Carlsbad, CA)、DNA 共轭物、无水性吸收糊剂、水包油或油包水乳剂、乳胶状卡波蜡(各种分子量的聚乙二醇)、半固体状凝胶及含有卡波蜡的半固体状混合物。还请参阅 Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations"(胃肠外制剂之辅料汇编),PDA(1998)J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0080] 施予患者的抗体剂量可因患者年龄和体重、靶疾病、病况、给药途径等因素而异。首选剂量通常是按照体重或体表面积来计算的。本发明的抗体用于治疗成年患者中与 PROKR 活性有关的病症或疾病时,静脉施用本发明的抗体可能是有利的,通常是单剂,剂量为约 0.01 至约 20 毫克/公斤体重,更好的情况是约 0.02 至约 7 毫克/公斤体重、约 0.03 至约 5 毫克/公斤体重,或约 0.05 至约 3 毫克/公斤体重。可以根据病况的严重程度调整治疗的频率和持续时间。可以根据经验确定抗 PROKR 抗体的有效剂量和给药日程安排;例如,可通过定期评估来监测患者的进展并相应调整剂量。此外,可以使用本领域内众所周知的方法进行剂量的跨物种类推(如 Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351)。

[0081] 已知有各种药物递送系统可用于本发明的医药组合物的给药,如脂质体封装、微颗粒、微胶囊、能表达突变病毒的重组细胞、受体介导的胞吞作用(请参阅如 Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432)。给药方法包括但不限于皮内、肌内、腹腔内、静脉、皮下、鼻内、硬膜外及口服途径。该组合物可经由任何方便的途径给药,例如,输注或推注、经

上皮或粘膜（如口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等）吸收，并可与其他生物活性剂一起给药。可以全身或局部给药。

[0082] 本发明的医药组合物可用标准针头和注射器经皮下或静脉给药。此外，对于皮下给药，笔型给药装置可方便地用于本发明的医药组合物的给药。此类笔型给药装置可以重复或一次性使用。可重复使用的笔型给药装置一般采用一种可更换的容纳医药组合物的药筒。一旦药筒内所有医药组合物均已施用、药筒变空，则可方便地丢弃空药筒，并用一个含有医药组合物的新药筒更换。该笔型给药装置即可重复使用。在一次性使用的笔型给药装置中，无可更换的药筒。相反，该一次性使用的笔型给药装置自带一个预充有医药组合物的贮液器。该贮液器内的医药组合物用完后，整个装置则被丢弃。

[0083] 许多可重复使用的笔型和自动注射给药装置已用于本发明的医药组合物的皮下给药。其实例包括但不限于 AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC™ 笔 (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25™ 笔、HUMALOG™ 笔、HUMALIN 70/30™ 笔 (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEN™ I、II 和 III 型 (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD™ 笔 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™ 及 OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany)，此处仅举几例而已。用于皮下注射本发明的医药组合物的一次性使用的笔型给药装置的实例包括但不限于 SOLOSTAR™ 笔 (Sanofi-Aventis)、FLEXPEN™ (Novo Nordisk)、KWIKPEN™ (Eli Lilly)、SURECLICK™ 自动注射器 (Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany)、EPIPEN (Dey, L.P.) 及 HUMIRA™ 笔 (Abbott Labs, Abbott Park IL)，此处仅举几例而已。

[0084] 在某些情况下，该医药组合物可用一种控释系统给药。在一个实施方案中，可使用一种泵（请参阅 Langer, 同上；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14 :201）。在另一个实施方案中，可采用聚合物材料；请参阅 Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida。在又一个实施方案中，可将一种控释系统置于该组合物靶标附近，从而只需要使用全身性剂量的一小部分（请参阅如 Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138）。其他控释系统在 Langer, 1990, Science 249 :1527-1533 的综述中也被论及。

[0085] 注射用制剂可包括静脉、皮下、皮内和肌内注射及滴注等剂型。这些注射用制剂可通过已知的方法制备。例如，可以将上述抗体或其盐溶解、悬浮或乳化在常规用于注射的无菌水性介质或油性介质中，以制备该注射用制剂。注射用水性介质有例如生理盐水、含葡萄糖和其他助剂的等渗溶液等，可结合使用合适的增溶剂，如醇（如乙醇）、多元醇（如丙二醇、聚乙二醇）、非离子型表面活性剂 [如聚山梨醇酯 80、HCO-50（氢化蓖麻油的聚氧乙烯（50mol）加合物）] 等。油性介质可采用例如芝麻油、豆油等，可结合使用增溶剂，如苯甲酸苯甲酯、苯甲醇等。如此制备的注射液最好充入一种适当的安瓿瓶中。

[0086] 有利的是，上述口服或肠道外使用的医药组合物已制备成单位剂量剂型，以容纳一剂活性成分。此类单位剂量剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊、注射液（安瓿瓶中）、栓剂等。每单位剂量剂型含有的上述抗体的量一般为约 5 至约 500 毫克；尤其是对于注射剂，首选的

是其他剂型含有的上述抗体的量为约 5 至约 100 毫克,以及约 10 至约 250 毫克。

#### 抗体的治疗用途

[0087] 本发明包括一些方法,其包括向需要含抗 PROKR 抗体的治疗组合物的受试者给药。治疗组合物可包含本文中所公开的任何抗 PROKR 抗体或其片段。本文中使用的表达“有需要的受试者”意指表现出与 PROKR 活性有关或由其引起的疾病或病症的一种或多种症状或体征,或将受益于抑制或减少 PROKR 信号传导的人或非人类动物。

[0088] 可使用本发明的抗 PROKR 抗体治疗的示例性疾病和病症包括疼痛病症(如急性、慢性或突破性疼痛)。可使用本发明的抗 PROKR 抗体治疗的示例性疼痛病症类型包括伤害性疼痛、内脏疼痛(如因炎症肠病/肠易激综合征、间质性膀胱炎、胰腺炎、子宫内膜异位症、慢性骨盆疼痛综合征等引起的疼痛),以及与炎症(如炎症肌痛)、术后切口(如术后疼痛)、神经病变(如糖尿病性神经病变)、坐骨神经痛、疱疹后神经痛、肌筋膜疼痛综合征、关节炎、镰状细胞病、肠神经缺血、跛行疼痛、骨折、烧伤、骨质疏松性骨折、痛风、偏头痛、纤维肌痛、复杂区域性疼痛综合征、急性疱疹性疼痛等有关的疼痛。

[0089] 本发明的抗 PROKR 抗体还可用于治疗或预防癌症相关疼痛。“癌症相关疼痛”包括如骨癌疼痛,包括已转移至骨骼的癌症引起的疼痛(如乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肉瘤、肾癌、多发性骨髓瘤等)。“癌症相关疼痛”还包括更通常与癌症病症有关的疼痛,如例如肾细胞癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈部癌、前列腺癌、恶性神经胶质瘤、骨肉瘤、结直肠癌、胃癌、恶性间皮瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、滑膜肉瘤、甲状腺癌或黑素瘤。

[0090] 本发明的抗体还可用于治疗与病理性血管生成(如肿瘤、血管生成性眼部疾病等)有关及/或由其引起的的疾病和病症。可以用本发明的抗 PROKR 抗体治疗的其他疾病和病症包括例如胃肠道疾病(如涉及平滑肌收缩的疾病)、先天性巨结肠症、多囊性卵巢综合症、卡尔曼综合征、类风湿关节炎和骨关节炎。本发明的抗 PROKR 抗体还可用于治疗生育问题。

#### 联合治疗和处方

[0091] 本发明提供一些方法,其包括与一种或多种其他治疗剂联合施用本文所述的含任何示例性抗 PROKR 抗体的医药组合物。可与本发明的抗 PROKR 抗体结合或联合施用的其他示例性治疗剂包括例如减轻疼痛的其他生物制剂,如抗 NGF 抗体、抗 PAR2 抗体、抗 ASIC 抗体(如抗 ASIC1、抗 ASIC2、抗 ASIC3 和抗 ASIC4 抗体)、抗 GFR $\alpha$  抗体,以及非生物治疗剂,如抗病毒剂、抗生素、止痛剂、皮质类固醇、类阿片和/或 NSAID。

[0092] 本发明的抗 PROKR 抗体还可以与一种或多种癌症治疗剂结合或联合施用,如例如 EGFR 拮抗剂(例抗 EGFR 抗体[如西妥昔单抗或帕尼单抗]或 EGFR 小分子抑制剂[如吉非替尼或厄洛替尼])、另一个 EGFR 家族成员(如 Her2/ErbB2、ErbB3 或 ErbB4)的拮抗剂,如抗 ErbB2、抗 ErbB3 或抗 ErbB4 抗体,或 ErbB2、ErbB3 或 ErbB4 活性的小分子抑制剂)、EGFRvIII 拮抗剂(如与 EGFRvIII 特异性结合的抗体)、cMET 拮抗剂(如抗 c-MET 抗体)、IGF1R 拮抗剂(如抗 IGF1R 抗体)、B-raf 抑制剂(如威罗菲尼、索拉非尼、GDC-0879、PLX-4720)、PDGFR- $\alpha$  抑制剂(如抗 PDGFR- $\alpha$  抗体)、PDGFR- $\beta$  抑制剂(如抗 PDGFR- $\beta$  抗体)、VEGF 拮抗剂(如 VEGF 陷阱,请参阅如美国专利申请 7,087,411[本文中也称为“VEGF 抑制融合蛋白”])、抗 VEGF 抗体(如贝伐单抗)、VEGF 受体的小分子激酶抑制剂(如舒尼替尼、索拉非尼或帕唑帕尼)、DLL4 拮抗剂(如美国专利申请 2009/0142354 中公开的抗 DLL4 抗

体,如 REGN421)、Ang2 拮抗剂(如美国专利申请书 2011/0027286 中公开的抗 Ang2 抗体,如 H1H685P)、FOLH1 拮抗剂(如抗 FOLH1 抗体)、PRLR 拮抗剂(如抗 PRLR 抗体)、STEAP1 或 STEAP2 拮抗剂(如抗 STEAP1 抗体或抗 STEAP2 抗体)、TMPRSS2 拮抗剂(如抗 TMPRSS2 抗体)、MSLN 拮抗剂(如抗 MSLN 抗体)、CA9 拮抗剂(如抗 CA9 抗体)、尿路斑块蛋白拮抗剂(如抗尿路斑块蛋白抗体)、CD20 拮抗剂(如抗 CD20 抗体,如利妥昔单抗)等。

[0093] 与本发明的抗 PROKR 抗体联合施用可能会很有益的其他治疗剂包括细胞因子抑制剂,包括小分子细胞因子抑制剂及与细胞因子(如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18)结合的抗体,或其各自受体的拮抗剂,以及抗 IgE 抗体、抗 TNF 抗体等。

[0094] 可在即将施用本发明的抗 PROKR 抗体之前、同时或之后不久施用其他活性治疗成分;(出于本文公开的目的,此类给药方案被视为是与其他活性治疗成分“联合“施用抗 PROKR 抗体)。本发明包括医药组合物,其中本发明的抗 PROKR 抗体与一种或多种其他活性治疗成分共同配制,如本文别处所述。

#### 给药方案

[0095] 根据本发明的某些实施方案,可在限定时程内向受试者施用多剂抗 PROKR 抗体。根据本发明的这个方面,施用方法包括向受试者序贯施用多剂本发明的抗 PROKR 抗体。本文中使用的“序贯施用”是指抗 PROKR 抗体的每一剂量是在不同时间点施予受试者的,如在不同的治疗日,两次给药之间以预定的时间间隔(如数小时、数天、数周或数月)隔开。本发明包括一些方法,其包括向患者序贯施用抗 PROKR 抗体的单剂初始剂量,随后施用一剂或多剂第二剂量,然后可选择地施用一剂或多剂第三剂量。

[0096] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指施用本发明的抗 PROKR 抗体的时间序列。因此,“初始剂量”是在治疗方案开始时施用的剂量(也称为“基线剂量”);“第二剂量”是在初始剂量后施用的剂量;“第三剂量”是在第二剂量后施用的剂量。初始剂量、第二剂量和第三剂量都可以含有相同的抗 PROKR 抗体量,但一般而言,给药频率可能彼此不同。但在某些实施方案中,在治疗过程中包含在初始剂量、第二剂量和/或第三剂量中的抗 PROKR 抗体的量彼此不同(如适当上调或下调)。在某些实施方案中,在治疗方案开始时,作为“负荷剂量”施用两个或更多个(如 2、3、4 或 5 个)剂量,随后在较不频繁的基础上施用后续剂量(如“维持剂量”)。

[0097] 在本发明的一个示例性实施方案中,每剂第二剂量和/或第三剂量都紧接前一剂量后 1 至 26 周(如 1、1<sup>1/2</sup>、2、2<sup>1/2</sup>、3、3<sup>1/2</sup>、4、4<sup>1/2</sup>、5、5<sup>1/2</sup>、6、6<sup>1/2</sup>、7、7<sup>1/2</sup>、8、8<sup>1/2</sup>、9、9<sup>1/2</sup>、10、10<sup>1/2</sup>、11、11<sup>1/2</sup>、12、12<sup>1/2</sup>、13、13<sup>1/2</sup>、14、14<sup>1/2</sup>、15、15<sup>1/2</sup>、16、16<sup>1/2</sup>、17、17<sup>1/2</sup>、18、18<sup>1/2</sup>、19、19<sup>1/2</sup>、20、20<sup>1/2</sup>、21、21<sup>1/2</sup>、22、22<sup>1/2</sup>、23、23<sup>1/2</sup>、24、24<sup>1/2</sup>、25、25<sup>1/2</sup>、26、26<sup>1/2</sup>周或以上)时施用。本文中所使用的短语“紧接前一剂量”意指在多次施用的序列中,在向患者施用序列中的下一剂量之前(两剂之间没有其他剂量)施用的抗 PROKR 抗体的剂量。

[0098] 根据本发明的这一方面,施用方法可包括向患者施用任何数量的第二剂量和/或第三剂量的抗 PROKR 抗体。例如,在某些实施方案中,仅向患者施用单剂第二剂量。在其他实施方案中,则向患者施用两剂或更多剂(如 2、3、4、5、6、7、8 或以上)第二剂量。同样地,在某些实施方案中,仅向患者施用单剂第三剂量。在其他实施方案中,则向患者施用两剂或更多剂(如 2、3、4、5、6、7、8 或以上)第三剂量。

[0099] 在涉及多剂第二剂量的实施方案中,每剂第二剂量都可以按照与其他第二剂量相同的频率给药。例如,每剂第二剂量都可以紧接在前一剂量后 1 至 2 周时给患者施用。同样地,在涉及多剂第三剂量的实施方案中,每剂第三剂量都可以按照与其他第三剂量相同的频率给药。例如,每剂第三剂量都可以紧接在前一剂量后 2 至 4 周时给患者施用。或者,在实施治疗方案的过程中,可以改变向患者施用第二和 / 或第三剂量的频率。根据临床检查后确定的个体患者的需要,也可以由医师在治疗过程中调整给药频率。

#### 抗体的诊断用途

[0100] 本发明的抗 PROKR 抗体也可用于检测和 / 或测量样本中一种或多种 PROKR 蛋白或表达 PROKR 的细胞,例如用于诊断目的。例如,抗 PROKR 抗体或其片段可用于诊断特征为 PROKR1 或 PROKR2 异常表达(如过度表达、表达不足、缺乏表达等)的病况或疾病。用于 PROKR 的示例性诊断分析可包括如用本发明的抗 PROKR 抗体接触采自患者的样本,其中该抗 PROKR 抗体用可检测的标记或报告分子进行标记。或者,在诊断应用中可以将未标记的抗 PROKR 抗体与具有可检测标记的第二抗体结合使用。可检测标记或报告分子可以是放射性同位素,如  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$  或  $^{125}\text{I}$ ; 荧光或化学发光基团,如异硫氰酸荧光素或若丹明; 或可以是酶,如碱性磷酸酶、 $\beta$  半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或荧光素酶。可用于检测或测量样本中 PROKR 的特异性检测方法包括酶联免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)及荧光激活细胞分选术(FACS)。

[0101] 根据本发明,可用于 PROKR 诊断分析的样本包括采自患者的含有在正常或病理条件下可检测到的 PROKR 蛋白或其片段量的任何组织或体液样本。总的来说,将测量采自健康患者(如未患有与异常 PROKR 水平或活性相关的疾病或病况的患者)的特定样本中的 PROKR 水平,以初步建立基线或标准 PROKR 水平。然后,可以将此基线 PROKR 水平与采自可疑患有 PROKR 相关疾病或病况的个体的样本中测量的 PROKR 水平进行比较。

#### 实施例

[0102] 举出以下实施例是为了向本领域内普通技术人员就如何制造和使用本发明的方法和组合物提供一个完整的公开和说明,并非是为了限制发明人视为其发明的范围。业已作出许多努力以确保所用数字的准确性(如量、温度等),但也应考虑到某些实验误差和偏差。除非另有说明,份数是重量份数,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,压力为大气压或接近大气压。

#### 实施例 1、人源抗前动力蛋白受体抗体的产生

[0103] 为了产生抗 PROKR 抗体,将体内具有编码人类免疫球蛋白重链和  $\kappa$  轻链可变区的 DNA 的 VELOCIMMUNE<sup>®</sup> 小鼠用经过改造以表达人类 PROKR1 或人类 PROKR2 的小鼠成纤维细胞系(MG87)免疫。通过使用经过改造以表达人类 PROKR 的细胞的细胞结合检测方法监测抗体的免疫反应。达到所需的免疫应答后,即采集脾细胞并使其与小鼠骨髓瘤细胞融合,以保存其活力并形成杂交瘤细胞系。筛选和选择杂交瘤细胞系,以识别产生 PROKR 特异性抗体的细胞系。使用这种技术来获得抗 PROKR 嵌合抗体(即具有人类可变结构域和小鼠恒定区的抗体),包括命名为 H1M6386N 和 H2M6385N 的抗体。

[0104] 抗 PROKR 抗体也可以直接从抗原阳性的 B 细胞分离,而无需与骨髓瘤细胞融合,如 US 专利申请书 2007/0280945A1 中所述。使用这种方法来获得几种完全人源抗 PROKR 抗

体（即具有人类可变结构域和人类恒定结构域的抗体）；以这种方式产生的示例性抗体分别命名如下：H4H6663P、H4H6669P、H4H6671P、H4H6680P、H4H6690P、H4H6696P、H4H6698P、H4H6701P 和 H4H6706P。

[0105] 按照本实施例的方法产生的示例性抗 PROKR 抗体的某些生物学性质在下面的实施例中详细说明。

#### 实施例 2、重链和轻链可变区氨基酸序列

[0106] 表 1 列出了选定的抗 PROKR 抗体的重链和轻链可变区氨基酸序列及其相应的抗体标识符。

表 1

抗体名称	序列号：							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
6386N	2	4	6	8	10	12	14	16
6385N	18	20	22	24	26	28	30	32
6663P	34	36	38	40	42	44	46	48
6669P	50	52	54	56	58	60	62	64
6671P	66	68	70	72	74	76	78	80
6680P	82	84	86	88	90	92	94	96
6690P	98	100	102	104	106	108	110	112
6696P	114	116	118	120	122	124	126	128
6698P	130	132	134	136	138	140	142	144
6701P	146	148	150	152	154	156	158	160
6706P	162	164	166	168	170	172	174	176

[0107] 本文中通常根据以下命名法来引用抗体：Fc 前缀（如“H1M”、“H4H”），接着是数字标识符（如“6386”、“6385”、“6663”等，如表 1 所示），接着是“P”或“N”后缀。因此，根据这种命名法，本文中可将抗体称为如“H1M6386N”、“H2M6385N”、“H4H6663P”等。本文中所使用的抗体命名中的 Fc 前缀表明该抗体的特定 Fc 区。例如，“H1M”抗体具有小鼠 IgG1 的 Fc，而“H4H”抗体具有人类 IgG4 的 Fc。如同本领域内普通技术人员所熟知，可以使用常规方法将具有特定 IgG 同型的抗体（如“H4H”）转换成具有不同 IgG 同型的抗体（如 H1H、H1M、H2M 等）；但在任何情况下，表 1 中所示的数值标识符表示的可变结构域（包括 CDR）都将保持不变，而且预期无论 Fc 结构域的性质为何，其结合特性将相同或基本相似。

#### 实施例 3、通过流式细胞仪测定抗 PROKR 抗体与细胞表面 PROKR1 和 PROKR2 之间的结合

[0108] 测试了按照实施例 1 产生的抗 PROKR 抗体与人类、小鼠和猴 PROKR1 和 PROKR2 结合的能力。在这些实验中，HEK293 细胞经过改造以表达人类 PROKR1；人类 PROKR2；小鼠 PROKR1；小鼠 PROKR2；食蟹猴 PROKR1；或食蟹猴 PROKR2。通过流式细胞仪检测抗人 PROKR 抗体与表达 PROKR 的细胞系的结合。实验方案列在下面，实验结果在表 2 中总结。

[0109] 使用含 1mM EDTA 的 PBS 收集贴壁细胞，然后洗涤细胞并重悬于含有 5% FBS 的冷 PBS 中。在结合实验中，各抗 PROKR 抗体分别添加至重悬了 250,000 个细胞的含有 5% FBS 的 500  $\mu$ l PBS 中（抗体终浓度为 13nM）。在室温下孵育 20 分钟后，用含有 5% FBS 的 PBS 洗涤细胞。然后将识别人类 Fc (Jackson Immuno Research, #115-135-205) 或小鼠 Fc (BD Pharmingen, #550826) 并与别藻蓝蛋白共轭连接的第二抗体加入细胞混合物中，终浓度为 13.3nM。冰浴孵育 20 分钟后，洗涤细胞并重悬于含有 5% FBS 的 PBS 中，然后在

FACSCalibur(BD Biosciences) 流式细胞仪中进行分类和分析,以测定候选抗体的相对结合。仅含第二抗体的细胞样品用作 FACS 门控的阴性对照。比较用抗人 PROKR 抗体染色的细胞的直方图与仅用第二抗体染色的细胞的直方图。通过 FlowJo 软件((Tree Star) 计算 PROKR FACS 结合信号超过仅用第二抗体时观察到的信号的细胞的百分比(“结合百分比”)。结合百分比大于 10%时,用抗 PROKR 抗体染色的样品被记录为 FACS 阳性(表 1 中的“阳性”)。结合百分比低于 1%或在亲本细胞上检测到信号(即背景信号)时,用抗人 PROKR 抗体染色的样品被记录为 FACS 阴性(表 1 中的“阴性”)。结合百分比为 1%至 10%时,用抗人 PROKR 抗体染色的样品被记录为弱阳性(表 1 中的“弱阳性”)。ND = 未测定。

表 2:流式细胞仪测定的抗 PROKR 抗体与表达人类、小鼠或猴 PROKR1 或 PROKR2 的 HEK293 细胞之间的结合

抗体	人 类 PROKR1	人 类 PROKR2	小 鼠 PROKR1	小 鼠 PROKR2	猴 PROKR1	猴 PROKR2
H4H6663P	阳性	阳性	未测定	未测定	未测定	未测定
H4H6669P	阴性	阴性	未测定	未测定	未测定	未测定
H4H6671P	阴性	阴性	未测定	未测定	未测定	未测定
H4H6680P	阴性	阴性	未测定	未测定	未测定	未测定
H4H6690P	阳性	阴性	未测定	未测定	未测定	未测定
H4H6696P	阳性	阴性	未测定	未测定	未测定	未测定
H4H6698P	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
H4H6701P	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
H4H6706P	阴性	阴性	未测定	未测定	未测定	未测定
H2M6385N	弱阳性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
H1M6386N	弱阳性	阳性	阴性	阴性	阴性	阴性

[0110] 如表 2 所示,5 种抗体同时与表达人类 PROKR1 和人类 PROKR2 的细胞结合: H4H6663P、H4H6698P、H4H6701P、H2M6385N 和 H1M6386N(H2M6385N 和 H1M6386N 与表达人类 PROKR1 的细胞之间仅有很弱的结合)。所测试的抗体中有 2 种与表达人类 PROKR1 的细胞结合,但不与表达人类 PROKR2 的细胞结合:H4H6690P 和 H4H6696P。

[0111] 同时与表达人类 PROKR1 和人类 PROKR2 的细胞结合的抗体 H4H6698P 和 H4H6701P,也表现出与表达小鼠和猴 PROKR1 和 PROKR2 的细胞之间的阳性结合。与表达人类 PROKR1 的细胞之间仅有很弱的结合的抗体 H2M6385N,与表达小鼠和猴 PROKR1 的细胞之间的结合为阴性,但与表达小鼠和猴 PROKR2 的细胞之间的结合为阳性。

[0112] 因此,如本实施例中所阐述,本发明包括:(a) 与人类 PROKR1 和人类 PROKR2 特异性结合的抗体;(b) 与人类 PROKR1 和人类 PROKR2 及非人类物种(如小鼠和猴)的 PROKR1 和 PROKR2 特异性结合的抗体;以及(c) 与人类 PROKR1 特异性结合,但不与人类 PROKR2 特异性结合的抗体。具有除在本实施例中特别阐述的结合特异性之外的结合特异性模式的抗 PROKR 抗体也包括在本发明的范围之内。

实施例 4、通过表面等离子共振 (Biacore) 测定抗 PROKR 抗体与 PROKR1 和 PROKR2 结合的平衡结合常数

[0113] 在 25°C 通过使用实时表面等离子共振生物传感器 (Biacore 4000) 检测的表面动力学, 测定了抗原与按照实施例 1 产生的选定纯化抗 PROKR 抗体结合的平衡解离常数 ( $K_D$  值)。在这些实验中, 抗体被捕获在通过直接胺偶联至 Biacore CM5 传感器芯片而产生的山羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体 (GE Healthcare, #BR-1008-38) 或小鼠抗人 IgG (Fc) 单克隆抗体 (GE Healthcare, #BR-1008-39) 表面上。使用 HBS-EP (10mM HEPES、150mM 氯化钠、3mM EDTA、0.05% 表面活性剂 P20 ; pH 值 7.4) 作为运行缓冲液和样品缓冲液进行了动力学实验。通过向捕获的抗体表面注射 2 种浓度 (25nM 和 100nM) 的人类 PROKR1 (1-62)-hFc (序列号 : 179) 和人类 PROKR2 (1-53)-hFc (序列号 : 180), 测定了抗原 - 抗体结合速率。对抗体 - 抗原结合进行了 90 秒监测, 对抗体 - 抗原解离进行了 360 秒监测。使用 Scrubber 软件版本 2.0c 产生的数据确定动力学结合速率 ( $k_a$ ) 和解离速率 ( $k_d$ ) 常数。通过动力学速率常数计算结合解离平衡常数 ( $K_D$ ) 和解离半衰期 ( $t_{1/2}$ ) :  $K_D = k_d/k_a$  和  $t_{1/2} = \ln(2)/k_d$ 。结果在表 3 (PROKR1 结合) 和表 4 (PROKR2 结合) 中显示 (NB = 未观察到结合)。

表 3 : 抗 PROKR 抗体与人类 PROKR1 结合的结合动力学

抗体	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
H1M6386N	$2.12 \times 10^5$	$1.03 \times 10^{-3}$	$4.85 \times 10^{-9}$	11
H4H6385N	$2.94 \times 10^5$	$1.36 \times 10^{-4}$	$4.61 \times 10^{-10}$	85
H4H6663P	$5.83 \times 10^5$	$6.20 \times 10^{-3}$	$1.06 \times 10^{-8}$	2
H4H6669P	$2.36 \times 10^5$	$6.23 \times 10^{-5}$	$2.64 \times 10^{-10}$	186
H4H6671P	$1.98 \times 10^5$	$3.62 \times 10^{-4}$	$1.83 \times 10^{-9}$	32
H4H6680P	$2.31 \times 10^5$	$4.55 \times 10^{-5}$	$1.97 \times 10^{-10}$	254
H4H6690P	$5.45 \times 10^5$	$1.59 \times 10^{-3}$	$2.92 \times 10^{-9}$	7
H4H6696P	$3.17 \times 10^5$	$7.27 \times 10^{-4}$	$2.30 \times 10^{-9}$	16
H4H6698P	$2.55 \times 10^5$	$2.87 \times 10^{-4}$	$1.12 \times 10^{-9}$	40
H4H6701P	$3.85 \times 10^5$	$4.12 \times 10^{-4}$	$1.07 \times 10^{-9}$	28
H4H6706P	$1.96 \times 10^5$	$2.13 \times 10^{-4}$	$1.09 \times 10^{-9}$	54

表 4 : 抗 PROKR 抗体与人类 PROKR2 结合的结合动力学

抗体	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
H1M6386N	未观察到结合	未观察到结合	未观察到结合	未观察到结合



H4H6385N	$4.89 \times 10^5$	$5.39 \times 10^{-3}$	$1.10 \times 10^{-8}$	2
H4H6663P	$1.04 \times 10^5$	$1.34 \times 10^{-2}$	$1.29 \times 10^{-7}$	1
H4H6669P	未观察到结合	未观察到结合	未观察到结合	未观察到结合
H4H6671P	未观察到结合	未观察到结合	未观察到结合	未观察到结合
H4H6680P	$5.99 \times 10^4$	$2.53 \times 10^{-4}$	$4.23 \times 10^{-9}$	46
H4H6690P	未观察到结合	未观察到结合	未观察到结合	未观察到结合
H4H6696P	$7.63 \times 10^5$	$1.63 \times 10^{-2}$	$2.14 \times 10^{-8}$	1
H4H6698P	$5.33 \times 10^5$	$8.57 \times 10^{-3}$	$1.61 \times 10^{-8}$	1
H4H6701P	$8.91 \times 10^5$	$2.15 \times 10^{-3}$	$2.41 \times 10^{-9}$	5
H4H6706P	未观察到结合	未观察到结合	未观察到结合	未观察到结合

[0114] 如表 3 所示, 11 种抗 PROKR 抗体表现出与人类 PROKR1(1-62)-hFc 蛋白的结合, 且  $K_D$  值为 197nM 至 10.6nM。如表 4 所示, 11 种抗 PROKR 抗体中有 6 种表现出与人类 PROKR2(1-53)-hFc 蛋白的结合, 且  $K_D$  值为 2.41nM 至 129nM。在该检测形式下, 有 5 种抗体 (H1M6386N、H4H6669P、H4H6671P、H4H6690P 和 H4H6706P) 没有表现出与人类 PROKR2(1-53)-hFc 蛋白的任何可测量到的结合。

实施例 5、在经过改造以稳定表达 PROKR1 或 PROKR2 的细胞中, 抗 PROKR 抗体抑制前动力蛋白介导的钙动员的能力

[0115] 如下所述, 在体外用基于细胞的检测方法测定了抗 PROKR 抗体通过其配体前动力蛋白 1(PK1) 和前动力蛋白 2(PK2) 阻断 PROKR1 和 PROKR2 活化的能力。

[0116] 对 HEK293 细胞进行了修饰, 以分别稳定表达人类 PROKR1(293/hPROKR1)、人类 PROKR2(293/hPROKR2)、小鼠 PROKR1(293/mPROKR1)、大鼠 PROKR1(293/rPROKR1)、食蟹猴 PROKR1(293/mfPROKR1) 或食蟹猴 PROKR2(293/mfPROKR2)。在这些实验中, 在完全生长培养基 [DME 高葡萄糖 (Irvine Scientific, #9033)、10% 胎牛血清 (Irvine Scientific, #3000A)、1% 青霉素 / 链霉素 / 谷氨酰胺 (GIBCO, #10378) 和 500  $\mu$ g/ml G418(GIBCO, #11811-098)] 中维持表达 PROKR 的细胞系。

[0117] 使用 Fluo-4NW 钙离子检测试剂盒 (Invitrogen, #F36206) 测量细胞内钙水平。为了评估抗 PROKR 抗体抑制人类 PK1 或人类 PK2 依赖性钙动员的能力, 将表达 PROKR1 或 PROKR2 的细胞接种在 96 孔检测板中, 每孔接种 20000 至 50000 个细胞, 在完全生长培养基中培养, 并使其在 37°C 和 5%  $CO_2$  下过夜生长。第二天, 按照制造商的说明, 将细胞培养基更换成 Fluo-4NW 试剂盒检测缓冲液, 并添加钙指示剂染料。对于抑制曲线, 将抗人 PROKR 抗体加入细胞混合液中, 终浓度为 17pM 至 1  $\mu$ M, 并孵育 1 小时 (在 37°C 孵育 30 分钟, 然后在室温下孵育 30 分钟)。然后加入人类 PK1(Cell Sciences ;#CRV015B) 或 hPK2(ProSci Inc. ;#40-190), 以产生各抗体剂量 - 反应并达到恒定的配体浓度 (如相应表中所示)。使

用 FLIPR Tetra 高通量细胞筛选系统 (Molecular Devices) 每秒测量一次相对荧光单位 (RFU), 至少测量 50 秒。对于 hPK1 和 hPK2 剂量 - 反应曲线, 将每种配体加入没有抗体的细胞混合液中, 浓度为 70pM 至 500nM, 然后测定 RFU 值。计算每孔的最大 - 最小 RFU, 并通过四参数逻辑方程以一条 8 或 12 点的反应曲线来确定  $EC_{50}/IC_{50}$  值 (GraphPad Prism)。结果在表 5-8 中显示。在表 8 所示的实验中, 1nM hPK1 是在两种检测方法中都用到的恒定浓度。

表 5 :hPK1 或 hPK2 刺激表达人类和猴 PROKR1 和 PROKR2 的 HEK293 细胞的  $EC_{50}$  值, 以及用于  $IC_{50}$  测定恒定配体浓度

		$EC_{50}$ (nM) / 配体常数 (nM)			
		人 PROKR1	人 PROKR2	猴 PROKR1	猴 PROKR2
hPK1 配体	实验 1	6.2 / 20	未测定	69 / 20	未测定
	实验 2	14.3 / 20	8.7 / 10	未测定	未测定
	实验 3	2.2 / 1	12.7 / 20	5 / 5	22.6 / 25
hPK2 配体	实验 1	30.7 / 20	未测定	未测定	未测定
	实验 2	未测定	156 / 9	未测定	未测定
	实验 3	0.6 / 1	3.7 / 5	0.1 / 0.5	0.3 / 0.5

表 6 :抗 PROKR 抗体抑制 hPK1 或 hPK2 刺激的表达人类 PROKR1 和人类 PROKR2 的 HEK293 细胞内钙通量的  $IC_{50}$  值

抗体	hPROKR1 + PK1		hPROKR1 + PK2		hPROKR2 + PK1		hPROKR2 + PK2	
	$IC_{50}$ (nM)	阻断(%)	$IC_{50}$ (nM)	阻断(%)	$IC_{50}$ (nM)	阻断(%)	$IC_{50}$ (nM)	阻断(%)
H1M6386N	14.9*	92.03*	16.2*	66.60*	未测定	未测定	未测定	未测定

H4H6663P	>1000**	15.48**	未测定	未测定	未观察到阻断**	0**	未观察到阻断**	0**
H4H6669P	14**	52.42**	未测定	未测定	未观察到阻断**	0**	未观察到阻断**	0**
H4H6671P	14.5**	45.00**	未测定	未测定	未观察到阻断**	0**	未观察到阻断**	0**
H4H6680P	16.4**	51.05**	未测定	未测定	未观察到阻断**	0**	未观察到阻断**	0**
H4H6690P	>1000**	24.70**	未测定	未测定	未观察到阻断**	0**	未观察到阻断**	0**
H4H6696P	13.1***	101.04** *	>300** *	32.85** *	未观察到阻断***	0***	未观察到阻断***	0***
H4H6698P	8.5***	100.58** *	>300** *	40.03** *	未观察到阻断***	0***	未观察到阻断***	0***
H4H6701P	6.6***	98.55***	>300** *	56.62** *	>300** *	48.56** *	>300** *	60.80** *
H4H6706P	11.2**	59.12**	未测定	未测定	未观察到阻断**	0**	未观察到阻断**	0**
H4H6385N	6.3***	100.89** *	55.1***	77.52** *	未观察到阻断***	0***	未观察到阻断***	0***

ND :未测定

NB :未观察到阻断

\* =使用了表 5 实验 1 中所示的恒定配体浓度

\*\* =使用了表 5 实验 2 中所示的恒定配体浓度

\*\*\* =使用了表 5 实验 3 中所示的恒定配体浓度

表 7 :抗 PROKR 抗体抑制 hPK1 或 hPK2 刺激的表达猴 PROKR1 和猴 PROKR2 的 HEK293 细胞内钙通量的 IC<sub>50</sub>值

	MfPROKR1 + PK1	MfPROKR1 +	MfPROKR2 +	MfPROKR2 +
--	----------------	------------	------------	------------

抗体	PK2		PK1		PK2			
	IC <sub>50</sub> (nM)	阻断(%)	IC <sub>50</sub> (nM)	阻断(%)	IC <sub>50</sub> (nM)	阻断(%)	IC <sub>50</sub> (nM)	阻断(%)
H1M6386N	未观察到阻断*	0*	未测定	未测定	未测定	未测定	未测定	未测定
H4H6696P	31***	93.91***	>300***	67.92***	未观察到阻断***	0***	未观察到阻断***	0***
H4H6698P	32.9***	99.34***	63.9***	85.74***	未观察到阻断***	0***	未观察到阻断***	0***
H4H6701P	6.4***	100.67***	>300***	50.53***	>300***	21.36***	>300***	61.21***
H4H6385N	6.7***	100.82***	51.8***	93.70***	未观察到阻断***	0***	未观察到阻断***	0***

ND :未测定

NB :未观察到阻断

\* =使用了表 5 实验 1 中所示的恒定配体浓度

\*\* \* =使用了表 5 实验 3 中所示的恒定配体浓度

表 8 :抗 PROKR 抗体抑制 hPK1 刺激的表达小鼠 PROKR1 和大鼠 PROKR1 的 HEK293 细胞内钙通量的 IC<sub>50</sub>值

抗体	mPROKR1 + PK1		rPROKR1 + PK1	
	IC <sub>50</sub> (nM)*	阻断(%)	IC <sub>50</sub> (nM)**	阻断(%)
H4H6669P	未观察到阻断	0	未测定	未测定
H4H6671P	未观察到阻断	0	未测定	未测定
H4H6680P	未观察到阻断	0	未测定	未测定
H4H6696P	未观察到阻断	0	未观察到阻断	0
H4H6698P	未观察到阻断	0	未观察到阻断	0
H4H6701P	> 300	20.85	未观察到阻断	0
H4H6385N	未观察到阻断	0	未观察到阻断	0

ND :未测定

NB :未观察到阻断

\* =观察到的 hPK1EC<sub>50</sub>值 (无抗体) 为 0.9nM

\*\* \* =观察到的 hPK1EC<sub>50</sub>值 (无抗体) 为 0.7nM

[0118] 测试了 11 种抗 PROKR1 抗体对 hPK1 介导的 293/hPROKR1 细胞内钙动员的抑制。如表 6 所示, 4 种抗体 (H4H6385N、H4H6701P、H4H6698P 和 H4H6696P) 阻断了 > 98% 的 PROKR1 活性, IC<sub>50</sub>值为 6.3nM 至 13.1nM。另一种抗 PROKR 抗体 H1M6386N 阻断了 > 92% 的 hPK1 介导的 293/hPROKR1 细胞内钙动员, IC<sub>50</sub>值为 14.9nM。4 种抗 PROKR 抗体 (H4H6669P、

H4H6671P、H4H6680P、H4H6706P) 阻断了 45% 至 60% 的 hPK1 介导的 293/hPROKR1 细胞内钙动员,  $IC_{50}$  值为 11.2nM 至 16.4nM。2 种抗 PROKR 抗体 (H4H6663P 和 H4H6690P) 阻断了不到 25% 的 hPK1 介导的 293/hPROKR1 细胞内钙动员。

[0119] 还测试了 5 种抗 PROKR 抗体对 hPK2 介导的 293/hPROKR1 细胞内钙动员的抑制, 如表 6 所示。抗 PROKR 抗体 H4HM6385N 阻断了 > 77% 的 hPK2 介导的 293/hPROKR1 细胞内钙动员,  $IC_{50}$  值为 55.1nM, 而另外 2 种抗 PROKR 抗体 (H1M6386N 和 H4H6701P) 阻断了约 67% 至 57% 的钙动员,  $IC_{50}$  值分别为 16.2nM 和 > 300nM。两种抗 PROKR 抗体 (H4H6696P 和 H4H6698P) 分别阻断了约 40% 和 33% 的 hPK2 介导的 293/hPROKR1 细胞内钙动员,  $IC_{50}$  值均 > 300nM。

[0120] 还测试了 10 种抗 PROKR 抗体对人类 PROKR2 功能的抑制, 如表 6 所示。在检测条件下, H4H6701P 阻断了 hPK1 或 hPK2 介导的 293/hPROKR2 细胞内钙动员。该抗体阻断了约 49% 的 hPK1 介导的钙动员, 并阻断了约 61% 的 hPK2 介导的钙动员,  $IC_{50}$  值均 > 300nM。测试的其他抗体都未阻断 hPK1 或 hPK2 介导的 293/hPROKR2 细胞内钙动员。

[0121] 还进一步测试了 5 种抗 PROKR 抗体抑制 hPK1 介导的表达食蟹猴 PROKR1 的细胞内钙通量的能力, 如表 7 所示。4 种抗体 (H4H6385N、H4H6701P、H4H6696P 和 H4H6698P) 阻断了 > 90% 的 hPK1 介导的 293/MfPROKR1 细胞内钙动员,  $IC_{50}$  值为 6.4nM 至 32.9nM。没有检测到抗体 H1M6386N 对 hPK1 介导的 293/MfPROKR1 细胞内钙动员的阻断。还测试了 4 种抗 PROKR 抗体抑制 hPK2 介导的表达食蟹猴 PROKR1 的细胞内钙通量的能力, 如表 7 所示。抗 PROKR 抗体 H4H6385N 阻断了约 94% 的 hPK2 介导的 293/MfPROKR1 细胞内钙动员,  $IC_{50}$  值为 51.8nM。另一种抗 PROKR 抗体 H4H6698P 阻断了近 86% 的 hPK2 介导的 293/MfPROKR1 细胞内钙动员,  $IC_{50}$  值为 63.9nM。测试的其他 2 种抗 PROKR 抗体 (H4H6696P 和 H4H6701P) 分别阻断了约 68% 和 51% 的 hPK2 介导的 293/MfPROKR1 细胞内钙动员,  $IC_{50}$  值均 > 300nM。还测试了这 4 种抗体抑制 hPK1 或 hPK2 介导的表达猴 PROKR2 的细胞内钙通量的能力, 如表 7 所示。H4H6701P 阻断了约 21% 的 hPK1 介导的钙动员, 并阻断了 61% 的 hPK2 介导的钙动员,  $IC_{50}$  值均 > 300nM。在检测条件下, 测试的其他 3 种抗体未阻断 hPK1 或 hPK2 介导的 293/mfPROKR2 细胞内钙动员。

[0122] 测试了 7 种抗 PROKR 抗体阻断 hPK1 介导的表达小鼠 PROKR1 的细胞内钙通量的能力, 如表 8 所示。H4H6701P 阻断了约 21% 的 hPK1 介导的 293/mPROKR1 细胞内钙动员,  $IC_{50}$  值为 > 300nM, 在此测试中, 其他 6 种抗体未显示阻断钙动员。测试了 4 种抗 PROKR 抗体阻断 hPK1 介导的表达大鼠 PROKR1 的细胞内钙通量的能力, 如表 8 所示。在检测条件下, 测试的抗 PROKR 抗体均未阻断 hPK1 对 293/rPROKR1 的刺激。

实施例 6、抗 PROKR 抗体抑制前动力蛋白介导的经过改造可诱导性表达 PROKR1 或 PROKR2 的细胞内钙动员的能力

[0123] 如下所述, 在体外用基于细胞的检测方法测定了抗人 PROKR 抗体通过其配体前动力蛋白 1 (PK1) 和前动力蛋白 2 (PK2) 阻断前动力蛋白受体 1 (PROKR1) 和前动力蛋白受体 2 (PROKR2) 活化的能力。

[0124] 对 CHO 细胞进行了修饰, 以分别可诱导性表达人类 PROKR1 (CHO/hPROKR1)、人类 PROKR2 (CHO/hPROKR2)、小鼠 PROKR1 (CHO/mPROKR1) 或小鼠 PROKR2 (CHO/mPROKR2)。在这些实验中, 在完全生长培养基 [DME 高葡萄糖 (Irvine Scientific, #9033)、10% 胎牛血清

(Irvine Scientific, #3000A)、1%青霉素 / 链霉素 / 谷氨酰胺 (GIBCO, #10378) 和 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418 (GIBCO, #11811-098)] 中产生和维持表达 PROKR 的细胞系。为了诱导 PROKR 表达, 在存在 0.5mg/mL 强力霉素的情况下培养 CHO 细胞系达 16 至 24 小时。以相同的方式处理未诱导的细胞, 但不添加强力霉素。如 FACS 所测定, 即使在不存在诱导剂时, CHO 细胞也有 PROKR 表面染色, 但染色程度低于诱导剂存在时的情况。

[0125] 按照制造商的说明, 使用 Fluo-4NW 钙离子检测试剂盒 (Invitrogen, #F36206) 测量细胞内钙水平。为了评估抗 PROKR 抗体抑制人类 PK1 或人类 PK2 依赖性钙动员的能力, 在存在或不存在强力霉素的情况下培养 CHO 细胞系, 然后将细胞接种在 96 孔检测板中, 每孔接种 125000 个细胞, 在 Fluo-4NW 检测缓冲液中, 37°C 和 5%  $\text{CO}_2$  下孵育 1 小时。然后, 向每孔中添加等体积的 Fluo-4NW 试剂盒检测缓冲液及钙指示剂染料。对于抑制曲线, 将抗人 PROKR 抗体加入细胞混合液中, 终浓度为 1.0  $\mu\text{M}$  至 1.3nM, 并孵育 1 小时 (在 37°C 孵育 30 分钟, 然后在室温下孵育 30 分钟)。然后将恒定浓度的 hPK1 或 hPK2 (如相应图中所示) 加入已与抗体预孵育的细胞混合液中, 并使用 FLIPR Tetra (Molecular Devices) 每秒测量一次相对荧光单位 (RFU), 至少测量 50 秒。对于 hPK1 和 hPK2 剂量 - 反应曲线, 将每种配体加入没有抗体的细胞混合液中, 浓度为 10pM 至 300nM, 然后测定 RFU 值 (如同抗体抑制曲线)。计算每种浓度的最大 - 最小 RFU, 并通过四参数逻辑方程以一条 8 或 12 点的反应曲线来确定  $\text{EC}_{50}/\text{IC}_{50}$  值 (GraphPad Prism)。配体  $\text{EC}_{50}$  值或平均  $\text{EC}_{50}$  值 ( $\pm\text{SEM}$ ) 在表 9 中显示。

表 9 : 未诱导的和诱导的 CHO/hPROKR1、CHO/hPROKR2、CHO/mPROKR1 和 CHO/mPROKR2 细胞系中的配体  $\text{EC}_{50}$  值

细胞系	配体 $\text{EC}_{50}$ (nM)	
	hPK1	hPK2
CHO/hPROKR1 (未诱导)	48 ( $\pm 14.3$ )	1.4 ( $\pm 0.58$ )
CHO/hPROKR1 (诱导)	2.0 ( $\pm 0.82$ )	1.6 ( $\pm 0.96$ )
CHO/hPROKR2 (诱导)	40 ( $\pm 34.95$ )	9.8 ( $\pm 9.4$ )
CHO/mPROKR1 (未诱导)	8.3	0.8
CHO/mPROKR1 (诱导)	1.5	9.6
CHO/mPROKR2 (未诱导)	112	18
CHO/mPROKR2 (诱导)	4.5	2.2

[0126] 测试了 4 种抗 PROKR1 抗体抑制 hPK1 和 hPK2 介导的未诱导或诱导的 CHO/hPROKR1、CHO/hPROKR2、CHO/mPROKR1 和 CHO/mPROKR2 细胞系内的钙动员。未诱导的 CHO/hPROKR1 细胞系中的阻断结果在表 10 中显示。

表 10 : 在未诱导的 CHO/hPROKR1 细胞系中阻断 hPK1 和 hPK2 诱导的钙通量

抗体	未诱导的 CHO/hPROKR1 中的 $\text{IC}_{50}$ (nM)	
	PK1	PK2
H4H6385N	14.2 ( $\pm 9.43$ )*	20.0 ( $\pm 10.4$ )**
H4H6701P	4.1**	21.9***
H4H6696P	3.8**	19.1***
H4H6698P	3.1**	27.4***

\* H4H6385N 的  $\text{IC}_{50}$  值是采用了 40nM 或 80nM 恒定 hPK1 浓度的实验的平均值

\* \* 采用了 40nM 恒定 hPK1 浓度的实验

\* \* \* 采用了 4nM 恒定 hPK2 浓度的实验

[0127] 如表 10 所示,测试的所有 4 种抗体 (H4HM6385N、H4H6701P、H4H6696P 和 H4H6698P) 都将 hPK1 介导的未诱导的 CHO/hPROKR1 细胞系 (低 hPROKR1 表达细胞) 内的钙通量阻断至接近基线水平,  $IC_{50}$  值为 3.1nM 至 14.2nM。这 4 种抗体也将 hPK2 介导的未诱导的 CHO/hPROKR1 细胞系内的钙通量阻断至接近基线水平,  $IC_{50}$  值为 19.1nM 至 27.4nM。使用 PK1 或 PK2 进行配体活化后,在诱导的 CHO/hPROKR1 细胞系 (高 hPROKR1 表达细胞) 内未观察到阻断。在诱导的 CHO/hPROKR2 细胞系中,测试的抗体都没有显示对 hPK1 或 hPK2 介导的钙通量的阻断。未诱导的 CHO/hPROKR2 细胞中,配体活化很弱且不一致 (数据未显示),因此无法评估抗体阻断。在相同的检测条件下,测试的抗 PROKR 抗体都没有阻断 hPK1 或 hPK2 对未诱导或诱导的 CHO/mPROKR1 和 CHO/mPROKR2 细胞系的刺激。

[0128] 本实施例的结果证实,抗 PROKR 抗体 H4H6385N、H4H6701P、H4H6696P 和 H4H6698P 有效地阻断 PK1 和 PK2 介导的 PROKR1 信号传导。

实施例 7、DSS 诱发结肠炎模型中抗 PROKR 抗体的疗效

[0129] 在本实施例中,评估了抗 PROKR 抗体 H4H6385N 在口服葡聚糖硫酸钠 (DSS, 4% w/v 于饮用水中) 或水 (对照) 7 天后减弱旷场行为改变的能力。

[0130] 在本实验中使用人源化 Prokr1 小鼠 (雄性和雌性小鼠混合, 21-31 周龄), 其中小鼠 Prokr1 基因的编码序列被替换为相应的人类 PROKR1 序列。各组小鼠分别接受同型对照抗体 30mg/kg (皮下注射)、H4H6385N 30mg/kg (皮下注射), 或不接受注射。抗体给药后 24 小时开始施用 DSS。然后在自动旷场装置 (Kinder Scientific SmartFrame, Poway, CA) 中对所有小鼠进行测试。

[0131] 先前已观察到, DSS 诱发的结肠炎会改变旷场检测的 4 个参数: 保持不动的时间 (不动性)、探索性活动的总量 (总距离)、小鼠后肢站立 (直立) 次数, 以及小鼠后肢站立时间 (直立时间)。该实验结果表达为 60 分钟测试期间执行各行为所花费的总时间之和或各行为总次数之和 (根据需要), 如图 1A-1D 中所示 (所有数据都以组平均  $\pm$  SEM 表示。每组小鼠数量 = 8-9 只 / 组)。

[0132] 如图 1A-1D 中所总结, 在 DSS 施用条件相当的情况下, 与未处理和接受同型对照处理的小鼠相比, 施用 DSS 之前接受了示例性抗 PROKR 抗体 H4H6385N 的小鼠表现出旷场行为的改善 (即不动性降低、总距离增加和直立增加)。

[0133] 本发明之范围不受本文所述特定实施方案之限制。的确, 除了本文所述内容以外, 对于本发明所属技术领域普通技术人员而言, 基于上述说明和附图, 本发明之各种修改形式也将变得明显。这些修改形式也将包括在所附权利要求中。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 瑞泽恩制药公司

&lt;120&gt; 抗前动力蛋白受体 (PROKR) 抗体及其使用

&lt;130&gt; 9700-WO

&lt;140&gt; 待指定

&lt;141&gt; 同时提交

&lt;150&gt; 61/725,704

&lt;151&gt; 2012-11-13

&lt;150&gt; 61/825,112

&lt;151&gt; 2013-05-20

&lt;160&gt; 180

&lt;170&gt; 用于 Windows 版本 4.0 的 FastSEQ 软件

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 348

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 1

```

aacgtgcagc tgggtggagtc tggggggagge ttggttaagc ctgggggggtc ccttagactc 60
tctctgtgtag cctccggatt cacttttcgct aacgcctgga tgacctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctggagtg ggttggccgt attaaaagta aaactgatgg tgggacaacg 180
gaccaegctg cccccgtgaa aggcagatgc atcgtctcaa gagatgatgc aaaaagcacg 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag cagtatatta ttgtaccaat 300
tatgcttttc aactctgggg ccagggggaca ttggtcaccg tctcttca 348

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 2

```

Asn Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asn Ala
20           25           30

```

[0002]



Trp Met Thr 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 His Ala Ala  
 50 55 60  
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser 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 Asn Tyr Ala Phe Gln Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 3  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 3  
 ggattcactt tcgctaacgc ctgg 24

<210> 4  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 4  
 Gly Phe Thr Phe Ala Asn Ala Trp  
 1 5

<210> 5  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 5  
 attaaaagta aaactgatgg tgggacaacg 30

<210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT

[0003]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 6

Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr  
1 5 10

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 7

accaattatg cttttcaact c

21

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 8

Thr Asn Tyr Ala Phe Gln Leu  
1 5

<210> 9

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 9

gatattgtga tgaccagac tocactctcc tcacttgtca ccettggaca gtcggcctcc 60  
atctcctgca ggtctagtca aggcctogta cacagtgatg gaaacaccta tttgagttgg 120  
cttcaccaga ggocaggoca goctocaaga ctccctaattt ataagatttc taaccgggtc 180  
tctgggggtcc cagacagatt cactggcagt ggggcagga cagatttcac actgaaaatc 240  
agcagggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaatctac acaatttcct 300  
cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaaa 336

<210> 10

<211> 112

[0004]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 10

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Leu Val Thr Leu Gly
 1           5           10           15
Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Gly Leu Val His Ser
          20           25           30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu His Gln Arg Pro Gly Gln Pro
          35           40           45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50           55           60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ala 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 Ser
          85           90           95
Thr Gln Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110

```

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 11

caaggcctcg tacacagtga tggaaacacc tat

33

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 12

```

Gln Gly Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
 1           5           10

```

<210> 13

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

[0005]

<220>

<223> 合成的

<400> 13

aagatttct

9

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 14

Lys Ile Ser

1

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 15

atgcaatcta cacaatttcc tcggacg

27

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 16

Met Gln Ser Thr Gln Phe Pro Arg Thr

1

5

<210> 17

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 17

[0006]

```

gaggtgcagg tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggc ccttagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgtctgga tgacctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gactggagtg ggttggccgt attaaaagca aaattgaagg tgggacaaca 180
gactacgctg catccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgactc aaaaaaacag 240
cagtcctctg aaatgaacag cctgaaaagc gaggacacag ccgtttatta ctgttcacaa 300
ggtcacttag cttactgggg ccaggggaacc ctggtcacag tctctca 348
    
```

<210> 18  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 18  
 Glu Val Gln Val 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 Val  
 20 25 30  
 Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Lys Ser Lys Ile Glu Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Gln Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Ser Thr Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Ile Val Ser Ser  
 115

<210> 19  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 19  
 ggattcactt tcagtaacgt ctgg 24

<210> 20  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

[0007]

<400> 20  
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Val Trp  
1 5

<210> 21  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 21  
attaaaagca aaattgaagg tgggacaaca 30

<210> 22  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 22  
Ile Lys Ser Lys Ile Glu Gly Gly Thr Thr  
1 5 10

<210> 23  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 23  
tccacaggtc acttagotta c 21

<210> 24  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 24  
Ser Thr Gly His Leu Ala Tyr  
1 5

[0008]

<210> 25  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 25  
 gatattgtga tgacccagac tccactotcc tcacctgtct cccttggaca gccggcctcc 60  
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaagcaccta cttgagttgg 120  
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcttaattt ataagatttc taaccggttc 180  
 tetgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagga cagatttcac actgaaaatc 240  
 agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggatt tattaactgca tgcaagctac acaatttccg 300  
 acgttcggcc aagggaacaa ggtggaaatc aaa 333

<210> 26  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 26  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asp Gly Ser Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro  
 35 40 45  
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 85 90 95  
 Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 27  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 27  
 caaagcctcg tacacagtga tggaagcacc tac

33

[0009]

<210> 28  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 28  
 Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Ser Thr Tyr  
 1 5 10

<210> 29  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 29  
 aagatttct

9

<210> 30  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 30  
 Lys Ile Ser  
 1

<210> 31  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 31  
 atgcaagcta caccaatttcc gacg

24

<210> 32  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0010]



<220>

<223> 合成的

<400> 32

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr  
1 5

<210> 33

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 33

```
gaggtgcagc tgggtggagtc gggggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc cettagactc 60
tctctgtcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagttgggt cegccagggt 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagta aaactgatgg tgggacaaca 180
gactacgctg cacccgtgaa aggcagatcc accatctcaa gagatgatcc aaaaaacaag 240
ctgtatctgc aaatgtacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccact 300
cgaagtatgc agtactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctcctca 348
```

<210> 34

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 34

```
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 Val 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 Pro Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Tyr Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Thr Arg Ser Met Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115
```

<210> 35

[0011]

<211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 35  
 ggattcactt tcagtaacgc ctgg

24

<210> 36  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 36  
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp  
 1 5

<210> 37  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 37  
 attaaaagta aaactgatgg tgggacaaca

30

<210> 38  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 38  
 Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr  
 1 5 10

<210> 39  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0012]

<220>

<223> 合成的

<400> 39

accactcgaa gtatgcagta c

21

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 40

Thr Thr Arg Ser Met Gln Tyr

1

5

<210> 41

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 41

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60  
atctctgca ggtctagtca aagctctgta cacagtgatg gatacaccta cttgaattgg 120  
cttcagcaga gccagggcca gctccaaga ctctaattt ataagatttc taaccgggtc 180  
tctgggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagga cagatttcac actgaaaatc 240  
agcaggggtgg aagctgagga tctggcatt tattactgca tgcaggctac acaatttcog 300  
acgttcggcc aagggaccaa ggtggaaatc aaa 333

<210> 42

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 42

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15  
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30  
Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro  
35 40 45  
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

[0013]

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 85 90 95  
 Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 43  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 43  
 caaagcctcg tacacagtga tggatacacc tac 33

<210> 44  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 44  
 Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Tyr Thr Tyr  
 1 5 10

<210> 45  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 45  
 aagatttct 9

<210> 46  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 46

[0014]

Lys Ile Ser  
1

<210> 47  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 47  
atgcaggeta caccaatttec gaag 24

<210> 48  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 48  
Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr  
1 5

<210> 49  
<211> 354  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 49  
gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgacctgggt ccgcccaggct 120  
ccaggggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagga aaaatgatgg tgggacaata 180  
gactacgctg cacccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgatte aaaaaacacg 240  
ctgtatctac aaatgaacag cctgagaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtatcccc 300  
agtgggagct actacggcta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 50  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

[0015]

<400> 50  
 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 Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Lys Arg Lys Asn Asp Gly Gly Thr Ile 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 Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Ile Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 51  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 51  
 ggatttcactt tcagtaacgc ctgg 24

<210> 52  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 52  
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp  
 1 5

<210> 53  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 53  
 attaaaagga aaaatgatgg tgggacaata 30

[0016]

<210> 54  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 54  
 Ile Lys Arg Lys Asn Asp Gly Gly Thr Ile  
 1 5 10

<210> 55  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 55  
 atccccagtg ggagctacta cggctac 27

<210> 56  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 56  
 Ile Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr  
 1 5

<210> 57  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 57  
 gatattgtga tgaccagac tcaactctcc tcacctgtca cccttggaca gcgggcctcc 60  
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120  
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcttaattt ataagatttc taaccggttt 180  
 tetggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcc aotgaaaatc 240  
 agcagggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattaetgca tgcaaaactac acaatttccc 300

[0017]

acttttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa

333

<210> 58  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 58  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro  
 35 40 45  
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala 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 Thr  
 85 90 95  
 Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 59  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 59  
 caaagcctcg tacacagtga tggaaacacc tac

33

<210> 60  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 60  
 Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr  
 1 5 10

<210> 61  
 <211> 9

[0018]



<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 61

aagatttct

9

<210> 62

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 62

Lys Ile Ser

1

<210> 63

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 63

atgcaacta cacaatttcc cact

24

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 64

Met Gln Thr Thr Gln Phe Pro Thr

1

5

<210> 65

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0019]

<223> 合成的

<400> 65

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtaaagc ctgggggggct ccttagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggcctggagtg ggttggccgt attaaaagca gaagtgatgg tgggacaaca 180
gactacgctg caccctgtaa aggcagattc accatttcga gagatgattc aaaaaatacg 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccttgtatta ctgttcccc 300
cctggggagtc actacggcta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

```

<210> 66

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 66

```

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 Arg Ser 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 Asn Thr
65          70          75          80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
85          90          95
Tyr Cys Ser Pro Pro Gly Ser His Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100         105         110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 67

```

ggattcactt tcagtaacgc ctgg

```

24

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

[0020]

<220>

<223> 合成的

<400> 68

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp  
1 5

<210> 69

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 69

attaaaagca gaagtgatgg tgggacaaca

30

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 70

Ile Lys Ser Arg Ser Asp Gly Gly Thr Thr  
1 5 10

<210> 71

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 71

tccccccctg ggagtcacta eggctac

27

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 72

[0021]

Ser Pro Pro Gly Ser His Tyr Gly Tyr  
1 5

<210> 73  
<211> 333  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 73  
gatattgtga tgaaccagac tccactctcc tcacctgtca ccocttgaca gcgggcctcc 60  
atctcctgca ggtctagtea aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120  
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaattt ataagatttc taaccggttc 180  
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240  
agcagggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttccc 300  
acttttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa 333

<210> 74  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 74  
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15  
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30  
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro  
35 40 45  
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60  
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala 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  
Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 75  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

[0022]

<400> 75  
caaagcctcg tacacagtga tggaaacacc tac

33

<210> 76  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 76  
Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr  
1 5 10

<210> 77  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 77  
aagatttct

9

<210> 78  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 78  
Lys Ile Ser  
1

<210> 79  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 79  
atgcaagota cacaatttcc cact

24

<210> 80

[0023]

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 80  
 Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr  
 1 5

<210> 81  
 <211> 354  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 81  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc cottagactc 60  
 tcctgtgcag tctctggatt cacttctcagt aacgcctgga tgacctgggt ccgccagact 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagga aaaatgaggg tgggacaata 180  
 gactacgctg caccctgtaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacc 240  
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccccc 300  
 agtgggagct attatggeta ctgggggacag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 82  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 82  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala  
 20 25 30  
 Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Lys Arg Lys Asn Glu Gly Gly Thr Ile 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 Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

[0024]

<210> 83  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 83  
 ggattcaactt tcagtaacgc ctgg

24

<210> 84  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 84  
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp  
 1 5

<210> 85  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 85  
 attaaaagga aaaatgaggg tgggacaata

30

<210> 86  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 86  
 Ile Lys Arg Lys Asn Glu Gly Gly Thr Ile  
 1 5 10

<210> 87  
 <211> 27

[0025]

<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 87  
accgccagtg ggagctatta tggctac 27

<210> 88  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 88  
Thr Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr  
1 5

<210> 89  
<211> 333  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 89  
gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60  
atctctctgca ggtctagtca aagctctgtg cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120  
cttcagcaga ggccaggcca gctccaaga ctcttaattt ataagatttc taaccggttc 180  
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagga cagatttcac actgaaaatc 240  
agcaggggtgg aagctgagga tgtegggact tattactgca tgcaaacctac gcaatttccc 300  
acttttggcc aggggaccaa gotggagatc aaa 333

<210> 90  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 90  
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15  
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30  
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro

[0026]



	35		40		45														
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Ile	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro				
	50					55					60								
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile				
65					70					75					80				
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Thr				
				85					90					95					
Thr	Gln	Phe	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105					110						

<210> 91  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 91  
 caaagcctcg tgcacagtga tggaaacacc tac 33

<210> 92  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 92  
 Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr  
 1 5 10

<210> 93  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 93  
 aagatttct 9

<210> 94  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

[0027]

<223> 合成的

<400> 94

Lys Ile Ser  
1

<210> 95

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 95

atgcaacta cgcaatttcc caact

24

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 96

Met Gln Thr Thr Gln Phe Pro Thr  
1 5

<210> 97

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 97

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggc ccttagactc 60  
tctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgectgga tgagctgggt ccgcccagget 120  
ccaggggaagg ggotggagtg ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca 180  
gaccacgetg caccctgaa aggcagatto accatctcaa gagatgattc aaaaaacaag 240  
ctgtatctgc aatgaacac cttgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300  
ggacatagct cctactgggg ccaggggaacc ctgggtcaccg tctcctca 348

<210> 98

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

[0028]

<220>

<223> 合成的

<400> 98

```

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 His 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 Thr Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85           90           95
Tyr Cys Thr Thr Gly His Ser Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100          105          110
Thr Val Ser Ser
 115

```

<210> 99

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 99

ggattcaactt tcagtaacgc ctgg

24

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 100

```

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp
 1           5

```

<210> 101

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0029]

<223> 合成的

<400> 101

attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca

30

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 102

Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr

1 5 10

<210> 103

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 103

accacaggga atagctccta c

21

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 104

Thr Thr Gly His Ser Ser Tyr

1 5

<210> 105

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 105

gatattgtga tgaccacagac tcaactctcc tcaactgtca cccttggaca gcgggctcc 60

[0030]

```

atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta ottgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcttaattt ataagatttc taaccgggtc 180
tctggggtec cagacagatt cagtggcagt ggggcagga cagatttcac actgaaaatc 240
agcaggggtg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttccc 300
acttttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa 333
    
```

<210> 106  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 106  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro  
 35 40 45  
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala 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  
 Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 107  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 107  
 caaagcctcg tacacagtga tggaaacacc tac 33

<210> 108  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 108  
 Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr  
 1 5 10

[0031]

<210> 109  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 109  
 aagatttct

9

<210> 110  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 110  
 Lys Ile Ser  
 1

<210> 111  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 111  
 atgcaagcta cacaatttcc cact

24

<210> 112  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 112  
 Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr  
 1 5

<210> 113  
 <211> 348

[0032]

<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

```

<400> 113
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggagge ttggtaaagc ctgggggggct ccttagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgacctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggetggagtg ggttggccgt attaaaatca aaactgatgg tgggacaaca 180
gactacgctg caccctgtaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
ctgtatctgc aatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
ggacatacct cctactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctctctca 348

```

<210> 114  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

```

<400> 114
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 Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35           40           45
Gly Arg Ile Lys Ile 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 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 Gly His Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100           105           110
Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 115  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

```

<400> 115
ggattcactt tcagtaacgc ctgg

```

24

<210> 116

[0033]

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 116  
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp  
 1 5

<210> 117  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 117  
 attaaaatca aaactgatgg tgggacaaca 30

<210> 118  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 118  
 Ile Lys Ile Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr  
 1 5 10

<210> 119  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 119  
 accacaggac atacctccta c 21

<210> 120  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0034]



<220>

<223> 合成的

<400> 120

Thr Thr Gly His Thr Ser Tyr  
1 5

<210> 121

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 121

```

gatattgtga tgaaccagac tccactctcc tcacctgtca ccttggaca gcgggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtea aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gctccaaga ctctaattt ataagatttc taaccggttc 180
tctggggctc cagacagatt cagtggcagt ggggcagga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttccc 300
acttttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa 333
    
```

<210> 122

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 122

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala 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
Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
    
```

<210> 123

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

[0035]

<220>

<223> 合成的

<400> 123

caaagcctcg tacacagtga tggaaacacc tac

33

<210> 124

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 124

Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr

1

5

10

<210> 125

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 125

aagatttct

9

<210> 126

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 126

Lys Ile Ser

1

<210> 127

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0036]

<400> 127  
atgcaagcta cacaatttcc cact 24

<210> 128  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 128  
Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr  
1 5

<210> 129  
<211> 348  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 129  
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggc ccttagactc 60  
tctctgtcag cctctggatt cactttcagt aatgtctgga tgacttgggt ccgccaggct 120  
ccaggggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaacca aaactgatgg tgggacaaca 180  
gactacgctg cacccgtgaa aggcagatc accatctcaa gagatgatc aaaaaactcg 240  
ctgtatctgc aaatgagcag cotgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300  
ggacatacct cctaactggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 130  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 130  
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 Val  
20 25 30  
Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Gly Arg Ile Lys Thr 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 Asn Ser  
65 70 75 80  
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

[0037]

Tyr Cys Thr Thr Gly His Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 131  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 131  
 ggattcaactt tcagtaatgt etgg

24

<210> 132  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 132  
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Val Trp  
 1 5

<210> 133  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 133  
 attaaaaacca aaactgatgg tgggacaaca

30

<210> 134  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 134  
 Ile Lys Thr Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr  
 1 5 10

[0038]

<210> 135  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 135  
 accacaggac atacctccta c 21

<210> 136  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 136  
 Thr Thr Gly His Thr Ser Tyr  
 1 5

<210> 137  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 137  
 gatattgtga tgaccagac tcaactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60  
 atctcctgca ggtctagtea aagcctcgta cacagtgatg gaaacaceta cttgagttgg 120  
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcttaattt ataagatttc taaccgggtc 180  
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagga cagatttcac actgaaaatc 240  
 agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttccc 300  
 acttttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa 333

<210> 138  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 138  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly

[0039]

```

      1             5             10             15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
      20             25             30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
      35             40             45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50             55             60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala 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
Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100             105             110
    
```

<210> 139  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 139  
 caaagcctcg tacacagtga tggaaacacc tac

33

<210> 140  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 140  
 Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr  
 1 5 10

<210> 141  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 141  
 aagatttct

9

<210> 142  
 <211> 3  
 <212> PRT

[0040]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 142

Lys Ile Ser

1

<210> 143

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 143

atgcaagcta caccaatttcc cact

24

<210> 144

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 144

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr

1

5

<210> 145

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 145

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggc ccttagactc 60
tctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgacctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggcctggagtg ggttggcogt actaaaacca aaactgaagg tgggacaaca 180
gactacgctg cacccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacaag 240
ctgtatctgc aaatgaacag cotgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaact 300
ggacatattt tttattgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctctctca 348

```

<210> 146

<211> 116

[0041]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 146

```

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 Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35                40                45
Gly Arg Thr Lys Thr Lys Thr Glu 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 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 Gly His Ile Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
                100                105                110
Thr Val Ser Ser
                115

```

<210> 147

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 147

ggattcactt tcagtaacgc ctgg

24

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 148

```

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp
 1                5

```

<210> 149

<211> 30

<212> DNA

[0042]



<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 149

actaaaacca aaactgaagg tgggacaaca

30

<210> 150

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 150

Thr Lys Thr Lys Thr Glu Gly Gly Thr Thr  
1 5 10

<210> 151

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 151

accactggac atatttttta t

21

<210> 152

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 152

Thr Thr Gly His Ile Phe Tyr  
1 5

<210> 153

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

[0043]

<400> 153  
 gatattgtga tgaccagac tccactotcc tcacctgtca cccttgaca gccggctcc 60  
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120  
 cttcagcaga gccagggcca gcctccaaga ctctcaattt ataagatttc taaccgggtc 180  
 tetggggctc cagacagatt cagtggcagt ggggcagga cagatttcac actgaaaatc 240  
 agcaggggtg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttccc 300  
 acttttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa 333

<210> 154  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 154  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro  
 35 40 45  
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala 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  
 Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 155  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 155  
 caaagcctcg tacacagtga tggaaacacc tac 33

<210> 156  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

[0044]

<400> 156  
Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr  
1 5 10

<210> 157  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 157  
aagatttct 9

<210> 158  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 158  
Lys Ile Ser  
1

<210> 159  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 159  
atgcaagcta caccaatttcc cact 24

<210> 160  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 160  
Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr  
1 5

[0045]

<210> 161  
 <211> 354  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 161  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagge ttgataaagc cggggggggtc ccttagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccagget 120  
 ccaggggaagg ggotggagtg ggttggccgt attaaaagga aaagtgatgg tgggacaaca 180  
 gactacgctg caccctgaa aggcagattc accatttcaa gagatgatte aaaaaacacg 240  
 atgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccccc 300  
 agtgggagct actacggeta ctggggccag ggaaccctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 162  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 162  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile 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 Arg Lys Ser 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 Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Thr Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 163  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 163

[0046]

ggattcactt tcagtaacgc ctgg

24

<210> 164

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 164

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp

1

5

<210> 165

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 165

attaaaagga aaagtgatgg tgggacaaca

30

<210> 166

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 166

Ile Lys Arg Lys Ser Asp Gly Gly Thr Thr

1

5

10

<210> 167

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 167

acccccagtg ggagctacta cggctac

27

<210> 168

<211> 9

[0047]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 168

Thr Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr  
1 5

<210> 169

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 169

```

gatattgtga tgacceagac tccactctcc tcacctgtca ccocttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtc aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta ottgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gectccaaga ctcttaattt ataagatttc taaccggttc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttccc 300
acttttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa 333

```

<210> 170

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 170

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala 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
Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

```

<210> 171

[0048]

<211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 171  
 caaagcctcg tacacagtga tggaaacacc tac

33

<210> 172  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 172  
 Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr  
 1 5 10

<210> 173  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 173  
 aagatttct

9

<210> 174  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 174  
 Lys Ile Ser  
 1

<210> 175  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0049]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 175

atgcaagcta cacaaatttcc cact

24

&lt;210&gt; 176

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 176

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr

1

5

&lt;210&gt; 177

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 177

Met Glu Thr Thr Met Gly Phe Met Asp Asp Asn Ala Thr Asn Thr Ser  
1 5 10 15Thr Ser Phe Leu Ser Val Leu Asn Pro His Gly Ala His Ala Thr Ser  
20 25 30Phe Pro Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Met Pro Leu Asp Glu  
35 40 45Asp Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val  
50 55 60Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn  
65 70 75 80Phe Ile Phe Ile Ala Ala Leu Val Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu  
85 90 95Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala  
100 105 110Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu  
115 120 125Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Thr Ser Val Asn Tyr Leu Arg  
130 135 140Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile  
145 150 155 160Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys  
165 170 175Gln Thr Ala Thr Gly Leu Ile Ala Leu Val Trp Thr Val Ser Ile Leu  
180 185 190Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile  
195 200 205Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp  
210 215 220

[0050]



Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Ile Phe Gly Ile Glu  
 225 230 235 240  
 Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser  
 245 250 255  
 Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile  
 260 265 270  
 Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Val Leu Met Cys  
 275 280 285  
 Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr  
 290 295 300  
 Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr  
 305 310 315 320  
 Leu Thr Ala Phe Tyr Ile Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met  
 325 330 335  
 Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asp Thr Val Lys Tyr  
 340 345 350  
 Phe Lys Lys Ile Met Leu Leu His Trp Lys Ala Ser Tyr Asn Gly Gly  
 355 360 365  
 Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ile Gly Met Pro Ala Thr  
 370 375 380  
 Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys  
 385 390

<210> 178  
 <211> 384  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 178

Met Ala Ala Gln Asn Gly Asn Thr Ser Phe Thr Pro Asn Phe Asn Pro  
 1 5 10 15  
 Pro Gln Asp His Ala Ser Ser Leu Ser Phe Asn Phe Ser Tyr Gly Asp  
 20 25 30  
 Tyr Asp Leu Pro Met Asp Glu Asp Glu Asp Met Thr Lys Thr Arg Thr  
 35 40 45  
 Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val Ile Gly Ile Ala Leu Ala Gly Ile Met  
 50 55 60  
 Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn Phe Val Phe Ile Ala Ala Leu Thr Arg  
 65 70 75 80  
 Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala  
 85 90 95  
 Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala Ile Ile Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys  
 115 120 125  
 Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn  
 130 135 140  
 Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro  
 145 150 155 160  
 Leu Lys Pro Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser Phe Leu Ile Ala Leu  
 165 170 175  
 Val Trp Met Val Ser Ile Leu Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Ala

[0051]

				180						185					190
Thr	Glu	Thr	Val	Leu	Phe	Ile	Val	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ile	Phe	Cys
				195				200					205		
Gly	Gln	Ile	Trp	Pro	Val	Asp	Gln	Gln	Leu	Tyr	Tyr	Lys	Ser	Tyr	Phe
		210				215						220			
Leu	Phe	Ile	Phe	Gly	Val	Glu	Phe	Val	Gly	Pro	Val	Val	Thr	Met	Thr
225					230					235					240
Leu	Cys	Tyr	Ala	Arg	Ile	Ser	Arg	Glu	Leu	Trp	Phe	Lys	Ala	Val	Pro
				245					250					255	
Gly	Phe	Gln	Thr	Glu	Gln	Ile	Arg	Lys	Arg	Leu	Arg	Cys	Arg	Arg	Lys
			260					265					270		
Thr	Val	Leu	Val	Leu	Met	Cys	Ile	Leu	Thr	Ala	Tyr	Val	Leu	Cys	Trp
			275				280					285			
Ala	Pro	Phe	Tyr	Gly	Phe	Thr	Ile	Val	Arg	Asp	Phe	Phe	Pro	Thr	Val
	290					295					300				
Phe	Val	Lys	Glu	Lys	His	Tyr	Leu	Thr	Ala	Phe	Tyr	Val	Val	Glu	Cys
305					310					315					320
Ile	Ala	Met	Ser	Asn	Ser	Met	Ile	Asn	Thr	Val	Cys	Phe	Val	Thr	Val
				325					330					335	
Lys	Asn	Asn	Thr	Met	Lys	Tyr	Phe	Lys	Lys	Met	Met	Leu	Leu	His	Trp
			340					345					350		
Arg	Pro	Ser	Gln	Arg	Gly	Ser	Lys	Ser	Ser	Ala	Asp	Leu	Asp	Leu	Arg
		355					360					365			
Thr	Asn	Gly	Val	Pro	Thr	Thr	Glu	Glu	Val	Asp	Cys	Ile	Arg	Leu	Lys
	370					375					380				

&lt;210&gt; 179

&lt;211&gt; 289

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 179

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

[0052]

```

      130              135              140
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
145              150              155              160
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
      165              170              175
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
      180              185              190
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
      195              200              205
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
      210              215              220
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
225              230              235              240
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
      245              250              255
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
      260              265              270
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      275              280              285
Lys

```

<210> 180

<211> 280

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 180

```

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

```

[0053]

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

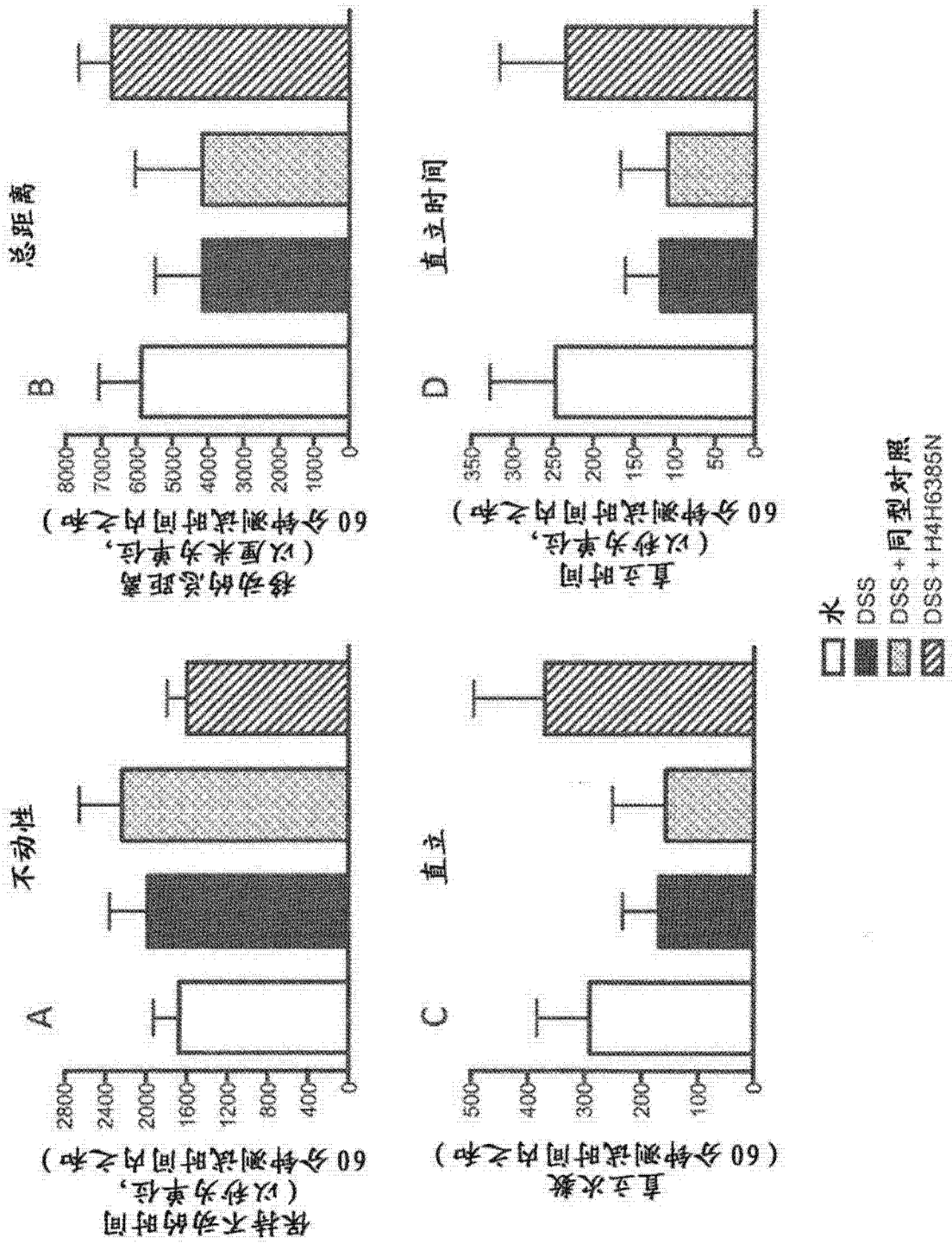


图 1