



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113330030 A

(43) 申请公布日 2021.08.31

(21) 申请号 202080009781.4
(22) 申请日 2020.01.16
(30) 优先权数据
19152338.0 2019.01.17 EP
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.07.16
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/051015 2020.01.16
(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/148379 EN 2020.07.23
(71) 申请人 拜耳公司
地址 德国勒沃库森
(72) 发明人 R·奥埃特 P·桑德纳
J·R·克拉林 A·比那迪奥
A·L·弗雷塔斯德梅斯基塔巴尔巴

斯
L·诺布雷 H·苏亚雷斯
G·席尔瓦
(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
代理人 淳于媛 张广育
(51) Int.Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书41页
序列表54页 附图9页

(54) 发明名称

确定受试者是否适于用可溶性鸟苷酸环化酶 (sGC) 的激动剂治疗的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种用于确定人或动物受试者是否患有氧化应激,是否适于用抗氧化剂和/或自由基清除剂治疗,和/或是否适于用可溶性鸟苷酸环化酶 (sGC) 的激动剂,特别是用sGC的活化剂治疗的方法,所述方法包括以下步骤:提供来自所述受试者的组织或液体样本,并确定所述样品的特征是否在于包含无血红素β1亚基的sGC的存在、上调或过表达。

1. 一种用于确定人或动物受试者是否

- 患有氧化应激
- 适于用抗氧化剂和/或自由基清除剂治疗,和/或
- 适于用sGC的活化剂处理

的方法,所述方法包括以下步骤:

确定来自所述受试者的组织或液体样本的特征是否在于包含无血红素β1亚基的sGC的存在、上调或过表达。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的活化剂为选自以下的至少一种:

- 4-({(4-羧基丁基)[2-(2-{{4-(2-苯基乙基)苄基}氧基}苯基)乙基]氨基}甲基)苯甲酸

- 5-氯-2-(5-氯噻吩-2-磺酰氨基-N-(4-(吗啉-4-磺酰基)苯基)苯甲酰胺钠盐

- 2-(4-氯苯磺酰氨基)-4,5-二甲氧基-N-(4-(硫代吗啉-4-磺酰基)苯基)苯甲酰胺

- 1-{6-[5-氯-2-({4-反-4-}三氟甲基)环己基]苄基}氧基}苯基]吡啶-2-基}-5-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-羧酸

- 1-[6-(2-(2-甲基-4-(4-三氟甲氧基苯基)苄氧基)苯基)吡啶-2-基]-5-三氟甲基吡啶-4-羧酸

- 1[6-(3,4-二氯苯基)-2-吡啶基-5-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-羧酸

- 1-({2-[3-氯-5-(三氟甲基)苯基]-5-甲基-1,3-噻唑-4-基}甲基)-1H-吡啶-4-羧酸

- 4-({2-[3-(三氟甲基)苯基]-1,3-噻唑-4-基}甲基)苯甲酸

- 1-({2-[2-氟-3-(三氟甲基)苯基]-5-甲基-1,3-噻唑-4-基}甲基)-1H-吡啶-4-羧酸

- 3-(4-氯-3-{{(2S,3R)-2-(4-氯苯基)-4,4,4-三氟-3-甲基丁酰基}氨基}苯基)-3-环丙基丙酸

- 5-{{2-(4-羧基苯基)乙基}[2-(2-{{3-氯-4'-(三氟甲基)联苯-4-基}甲氧基}苯基)乙基]氨基}-5,6,7,8-四氢喹啉-2-羧酸分子式

- 5-{{(4-羧基丁基)[2-(2-{{3-氯-4'-(三氟甲基)联苯-4-基}甲氧基}苯基)乙基]氨基}-5,6,7,8-四氢喹啉-2-羧酸的分子式

- (1R,5S)-3-[4-(5-甲基-2-{{2-甲基-4-(哌啶-1-基羰基)苄基}氧基}苯基)-1,3-噻唑-2-基]-3-氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸

- 1-[6-(5-甲基-2-{{2-(四氢-2H-吡喃-4-基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-6-基}甲氧基}苯基)吡啶-2-基]-5-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-羧酸

- 4-[[{(4-羧基丁基)[2-[2-[[4-(2-苯基乙基)苯基]甲氧基}苯基]乙基]氨基}甲基]苯甲酸

- BAY 60-2770 4-({(4-羧基丁基)[2-(5-氟-2-{{40-(三氟甲基)联苯-4-基}甲氧基}苯基)乙基]氨基}甲基)苯甲酸)

- (S)-1-(6-(3-((4-(1-(环丙烷羰基)哌啶-4-基)-2-甲基苯基)氨基)-2,3-二氢-1H-茛-4-基)吡啶-2-基)-5-甲基-1H-吡啶-4-羧酸。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在确定所述样本的特征是否在于包含无血红素β1亚基的sGC的存在、上调或过表达的步骤中,使用结合分子,其选择性地结合包

含无血红素β1亚基的sGC。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述结合分子为抗体或其保留靶标结合能力的片段或衍生物,抗体模拟物或适配体。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中来自受试者的组织或液体样本为选自以下的至少一种:

- 心脏组织、
- 脉管系统、
- 肺组织、
- 肾组织、
- 肝组织、
- 肌肉组织、
- 皮肤组织和/或
- 血液。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中人或动物受试者

- 患有、
- 有风险发展为和/或
- 被诊断为

选自心脏、肾脏、肺、心血管、心肾和/或心肺疾病的病症。

7. 单克隆抗体,或其靶标结合片段或衍生物,或抗体模拟物或适配体,其选择性结合包含无血红素β1亚基的sGC。

8. 根据权利要求7所述的抗体、片段或衍生物,其包含以下的至少一种:

- a) 3条重链CDR和3条轻链CDR的组,该组选自根据表1的列表,和/或
- b) 3条重链CDR和3条轻链CDR的组,该组包含在表2的VH和VL序列中,和/或
- c) a) 或b) 的重链CDR/轻链CDR组合,条件是相对于a) 或b) 中指定的各个CDR,CDR中的至少一个具有最高达3个氨基酸置换,同时保持其与包含无血红素β1亚基的sGC结合的能力,和/或

d) a) 或b) 的重链CDR/轻链CDR组合,条件是相对于a) 或b) 中指定的各个CDR,CDR中的至少一个具有 $\geq 66\%$ 的序列同一性,同时保持其与包含无血红素β1亚基的sGC结合的能力,其中CDR嵌入适合的蛋白框架中以便能够结合包含无血红素β1亚基的sGC。

9. 根据权利要求7或8中任一项所述的抗体、片段或衍生物,其包含

- a) 根据表2的重链/轻链可变域序列对
- b) a) 的重链/轻链可变域序列对,条件是相对于表2中示出的各个SEQ ID No,其序列中的至少一个具有 $\geq 80\%$ 的序列同一性,同时保持其与包含无血红素β1亚基的sGC结合的能力,和/或

c) a) 的重链/轻链可变域序列对,条件是相对于表2中示出的各个SEQ ID No,其序列中的至少一个具有最高达10个氨基酸置换,同时保持其与包含无血红素β1亚基的sGC结合的能力。

10. 一种用于根据权利要求1-9中任一项所述的方法的伴随诊断,所述伴随诊断包含选择性结合包含无血红素β1亚基的sGC的结合分子。

11. 根据权利要求10所述的伴随诊断,其中所述结合分子为根据权利要求7-9中任一项所述的单克隆抗体、其片段或衍生物。

12. 一种用于治疗人或动物受试者的方法,所述人或动物受试者

- 患有、
- 有风险患有,和/或
- 被诊断为

选自心脏、肾脏、肺、心血管、心肾和/或心肺疾病的病症,该病症的进一步特征在于至少在特定靶组织中包含无血红蛋白 β 1亚基的sGC的存在、上调或过表达,所述方法包括给予治疗有效量的可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的活化剂。

13. 用于治疗人或动物受试者的可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的活化剂,所述人或动物受试者

- 患有或
- 有风险发展为和/或
- 被诊断为,

选自心脏、肾脏、肺、心血管、心肾和/或心肺疾病的病症,该病症的进一步特征在于至少在特定靶组织中包含无血红蛋白 β 1亚基的sGC的存在、上调或过表达。

14. 用于根据权利要求12或13中任一项所述的治疗的可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的活化剂,其中在来自所述受试者的组织或液体样本中确定所述样本的特征是否在于包含无血红蛋白 β 1亚基的sGC的存在、上调或过表达。

15. 一种用于确定人或动物受试者是否适于用可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的活化剂治疗的试剂盒,所述试剂盒包含选择性结合包含无血红蛋白 β 1亚基的sGC的结合分子。

确定受试者是否适于用可溶性鸟苷酸环化酶 (sGC) 的激动剂治疗的方法

[0001] 本发明提供了一种用于确定人或动物受试者是否患有氧化应激、是否适于用抗氧化剂和/或自由基清除剂治疗,和/或是否适于用可溶性鸟苷酸环化酶 (sGC) 的激动剂,特别是用可溶性鸟苷酸环化酶 (sGC) 的活化剂治疗的方法。

背景技术

[0002] 一氧化氮 (NO)、环磷酸鸟苷 (cGMP) 通路 (NO/cGMP通路) 对于调节细胞、组织和器官功能至关重要,并在健康和疾病中发挥重要作用。众所周知,NO/cGMP通路在疾病中起着关键作用,所述疾病包括心脏、肾脏、肺、心血管、心肾和心肺疾病,例如心力衰竭、慢性和急性肾脏疾病以及肺动脉高压。这由例如来自全基因组关联研究 (GWAS) 的遗传证据所证实,其显示该途径中的遗传改变与多种疾病的强相关性。

[0003] 简而言之,所述途径如下 (还参见图6):

[0004] 1. 例如由于内皮剪切应力,NO通过NO合酶催化,由L-精氨酸形成

[0005] 2. NO扩散至细胞中,并与可溶性鸟苷酸环化酶 (sGC) 的β亚基的血红素部分结合

[0006] 3. 结合至sGC的NO激活该酶,其然后催化GTP形成cGMP

[0007] 4. cGMP充当多个下游靶标的第二信使,如cGMP调节的蛋白激酶 (PKG、cGK-I/cGK-II)、cGMP调节的离子通道和cGMP调节的磷酸二酯酶 (PDE) 以及为磷酸化和/或去磷酸化的其他下游靶标

[0008] 5. cGMP被终止NO/cGMP信号的磷酸二酯酶 (PDE) 水解为无活性的GMP。

[0009] 由于NO/cGMP在细胞、组织和身体稳态中起着关键作用,cGMP水平的降低可能会产生不想要的甚至病理生理后果。解决这种情况的治疗方法包括

[0010] • 给予硝酸盐或NO供体,例如,在心绞痛的治疗中。相应的试剂酶促地或非酶促地释放NO,NO与sGC结合并激活后者,导致cGMP产生增加。该方法有一些缺点,如自由基形成、快速耐受性 (tachyphylaxia) 的生成和动力学限制。

[0011] • 给予PDE抑制剂,如西地那非 (Sildenafil)、伐地那非 (Vardenafil) 或他达拉非 (Tadalafil)。这些试剂已用于治疗勃起功能障碍 (ED)、肺动脉高压 (PAH) 和治疗良性前列腺增生 (BPH) 的体征和症状。该方法也有一些缺点,如需要足够高的NO产生和高内源性cGMP水平,所述足够高的NO产生和高内源性cGMP水平在患有ED、PAH或BPH的患者中通常很低。

[0012] 为了克服所述限制,已经尝试用适合的试剂直接刺激或激活sGC。该方法的优点为其为NO非依赖性、没有自由基形成,并且其不依赖于患者体内足够高的cGMP水平。

[0013] sGC为由一个α亚基和一个含有血红素的β亚基组成的异源二聚体。β亚基由四个结构域组成:N端HNOX结构域、PAS样结构域、卷曲螺旋 (coiled-coil) 结构域和C端催化结构域。β亚基的HNOX结构域包含具有Fe (II) 的血红素部分,其为NO的靶标。NO结合后,sGC活性增加,且形成cGMP。包含无血红素β1亚基的sGC也还称为apo-sGC。

[0014] sGC的β亚基的HNOX (血红素一氧化氮/氧结合) 结构域含有血红素辅基 (prosthetic heme group),并且是在各种生物体中发现的相关传感器蛋白家族的一部分。

HNOX结构域使用结合的血红素来感知气态配体,例如NO。

[0015] 广为接受的是,sGC刺激剂通过直接刺激sGC起作用,其不需要NO但需要血红素辅基。因此,这种化合物类型的sGC刺激剂被定义为NO非依赖性但血红素依赖性的sGC刺激剂。sGC刺激物结合于非氧化且含有血红素的sGC($\alpha 1/\beta 1$)的 α 亚基,所述sGC也称为野生型sGC,其导致胞内cGMP的NO非依赖性形成和增加(Stasch等人,2001;Stasch&Hobbs 2009)。此外,当NO结合于sGC时,sGC刺激剂增强NO对cGMP的影响。因此,sGC刺激剂还表现出与NO对cGMP产生的协同作用。咧唑衍生物YC-1为第一个记载的NO非依赖性但血红素依赖性的sGC刺激剂[Evgenov等人,2006.]。基于YC-1,发现了比YC-1更有效且没有显示出对磷酸二酯酶(PDE)的相关抑制的其他物质。这导致鉴定了吡唑并吡啶衍生物BAY 41-2272、BAY 41-8543和BAY 63-2521(Riociguat)[Evgenov等人,同上]。最近发现了其他化合物类型,其具有不同的药代动力学和不同的器官分布,这可能会影响其治疗潜力[Follmann等人J. Med Chem 2017]。野生型sGC的sGC刺激物的精确结合位点仍在争论中。如果从sGC中去除血红素基团,酶仍然具有可检测的催化基础活性,即cGMP仍在形成。无血红素的酶的剩余催化基础活性不能被任何上述刺激剂刺激,并且也不能被NO刺激[Evgenov等人,同上]。

[0016] 这一观察很重要,因为无血红素且氧化形式的sGC($\alpha 1/\beta 1$) (也称为apo-sGC) 优先存在于与氧化应激和其他病症相关的疾病中。目前的理解是,在氧化应激条件下, $\beta 1$ 亚基中的血红素基团的 Fe^{2+} 铁原子被氧化成 Fe^{3+} ,其破坏了血红素基团与 $\beta 1$ 亚基的结合并使酶血红素游离。随着BAY 58-2667(Cinaciguat)的发现,发现了一种能够激活无血红素apo-sGC的新化学物质。因此,BAY 58-2667是此类sGC活化剂的原型,且此化合物类型被定义为NO非依赖性且血红素非依赖性的sGC活化剂。这些物质的共同特征是,与NO结合时,它们仅对酶的活化有累加作用,并且氧化酶或无血红素的酶的活化明显高于含血红素的酶的活化[Evgenov等人,同上;J.P.Stasch等人,Br. J. Pharmacol. 136(2002),773;J.P.Stasch等人,J. Clin. Invest. 116(2006),2552]。光谱研究表明BAY 58-2667取代了 $\beta 1$ 亚基中的氧化的血红素基团,由于铁-组氨酸键的减弱,所述血红素基团仅微弱地连接至sGC。还已经表明,特征性sGC血红素结合基序(motif) Tyr-x-Ser-x-Arg对于血红素基团的带负电荷的丙酸的相互作用和BAY 58-2667的作用都是绝对必要的。因此,假设BAY 58-2667在sGC的结合位点与 $\beta 1$ 亚基中的血红素基团的结合位点相同。[J.P.Stasch等人,J. Clin. Invest. 116(2006),2552]。最近发现了其他类别的sGC活化剂,其在药代动力学和器官分布方面都不同,这可能会影响它们的治疗潜力。

[0017] 本发明的另一个目的为提供工具和方法以鉴定患有氧化应激和/或适于用抗氧化剂和/或自由基清除剂治疗的患者。

[0018] 本发明的另一个目的为提供工具和方法以鉴定适于用可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)激动剂,特别是用sGC活化剂治疗的患者。

发明内容

[0019] 根据本发明的独立权利要求的方法和手段可以满足这些和其他目的。从属权利要求涉及特定实施方案。

[0020] 本发明的实施方案

[0021] 在详细描述本发明之前,应理解本发明不限于所描述的装置或组合物的特定组成

部分或结构特征,或所描述的方法的工艺步骤,因为此类装置和方法可能变化。还应理解,本文中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并且不意图是限制性的。在相互不同的从属权利要求中叙述某些措施的纯粹事实并不表明不能有利地使用这些措施的组合。在权利要求中的任何附图标记不应被解释为限制范围。必须指出,除非上下文中另有明确规定,在本说明书和所附权利要求书中所用的单数形式“一(a)”、“一个(an)”和“该(the)”包括单数/复数对象。此外,在权利要求中,“包括”一词不排除其他要素或步骤。

[0022] 此外,应当理解,在给出由数值界定的参数范围的情况下,该范围被认为包括这些限定值。

[0023] 还应理解,本文公开的实施方案并不意味着被理解为彼此不相关的单个实施方案。与一个实施方案一起讨论的特征还意在与本文所示的其他实施方案一起公开。在一种情况下,如果特定特征没有在一个实施方案中公开,而在另一个实施方案中公开,技术人员将理解这并不一定意味着所述特征不打算与所述其他实施方案一起公开。技术人员将理解,本申请的主旨是还为其他实施方案公开所述特征,但这只是为了清楚的目的并且保持本说明书的长度易于管理。还应理解,本文提及的现有技术文件的内容以引用的方式并入,例如,为了实现目的,即,例如当讨论方法时,其细节记载于所述现有技术文件中。这种方法有助于保持本说明书的长度易于管理。

[0024] 根据本发明的一个方面,提供了一种用于确定人或动物受试者是否

[0025] • 患有氧化应激

[0026] • 是否适于用抗氧化剂和/或自由基清除剂治疗,和/或

[0027] • 是否适于用可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的激动剂,特别是用sGC的活化剂治疗的方法,

[0028] 所述方法包括以下步骤:

[0029] a) 提供来自所述受试者的组织或液体样本,和

[0030] b) 确定所述样品的特征是否在于包含无血红素 β 1亚基的sGC的存在、过表达或上调。

[0031] 根据本发明的一个方面,提供了一种用于确定人或动物受试者是否

[0032] • 患有氧化应激

[0033] • 是否适于用抗氧化剂和/或自由基清除剂治疗,和/或

[0034] • 是否适于用可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的活化剂治疗的方法,

[0035] 所述方法包括以下步骤:

[0036] a) 提供来自所述受试者的组织或液体样本,和

[0037] b) 确定所述样品的特征是否在于包含无血红素 β 1亚基的sGC的存在、过表达或上调。

[0038] 这包括用于确定人或动物受试者是否患有氧化应激/来自细胞正常氧化还原状态的干扰/活性氧与身体清除他们的能力间的不平衡的方法,所述方法包括以下步骤:

[0039] • 提供来自所述受试者的组织或液体样本,和

[0040] • 确定所述样本的特征是否在于包含无血红素 β 1亚基的sGC的存在、过表达或上调。

[0041] 这还包括用于确定人或动物受试者是否适于用抗氧化剂和/或自由基清除剂治疗

的方法,所述方法包括以下步骤:

[0042] • 提供来自所述受试者的组织或液体样本,和

[0043] • 确定所述样本的特征是否在于包含无血红素 $\beta 1$ 亚基的sGC的存在、过表达或上调。

[0044] 这还包括用于确定人或动物受试者是否适于用可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的活化剂治疗的方法,所述方法包括以下步骤:

[0045] • 提供来自所述受试者的组织或液体样本,和

[0046] • 确定所述样本的特征是否在于包含无血红素 $\beta 1$ 亚基的sGC的存在、过表达或上调。

[0047] 如本文所用,术语“包含无血红素 $\beta 1$ 亚基的sGC的存在”意指在所述样本中,可通过组织化学、免疫学或分子方法确定包含无血红素 $\beta 1$ 亚基的此类sGC。

[0048] 如本文所用,术语“包含无血红素 $\beta 1$ 亚基的sGC的过表达”意指与其在相同类型的组织的正常细胞(无疾病)中测量的水平相比,在类似条件下在给定组织的细胞中表达的包含无血红素 $\beta 1$ 亚基的sGC的水平升高至少5%,优选至少10%,更优选至少15%,甚至更优选至少20%,甚至更优选至少25%,甚至更优选至少30%或至少40%或至少50%。所述表达水平可以通过本领域已知的多种技术来测定,包括但不限于定量RT-PCR、蛋白质印迹、免疫组织化学和以上方法的适合的衍生方法。

[0049] 如本文所用,术语“包含无血红素 $\beta 1$ 亚基的sGC的上调”意指与其在相同类型的组织的正常细胞(无疾病)中测量的水平相比,在类似条件下在给定组织的细胞中包含无血红素 $\beta 1$ 亚基的sGC的表达的基因调控提高至少5%,优选至少10%,更优选至少15%,甚至更优选至少20%,甚至更优选至少25%,甚至更优选至少30%或至少40%或至少50%。

[0050] 如本文所用,术语“氧化应激被定义为活性氧(自由基、ROS)的产生与抗氧化防御之间的平衡紊乱。ROS包括但不限于超氧阴离子 $\cdot O^-$ 、过氧化氢 H_2O_2 、羟基自由基 $\cdot OH$ 、有机氢过氧化物 $ROOH$ 、烷氧基和过氧自由基 $RO\cdot$ 和 $ROO\cdot$ 、过氧亚硝酸盐 $ONOO^-$ 。

[0051] 如本文所用,术语“抗氧化剂”是指能够抑制另一实体的氧化的分子。氧化为一种可以产生自由基的化学反应,从而导致可以损害生物体的细胞的链式反应。例如硫醇或抗坏血酸(维生素C)的抗氧化剂会终止这些链式反应。抗氧化剂可分为初级抗氧化剂和次级抗氧化剂。生物抗氧化剂包括定义明确的酶,例如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、硒谷胱甘肽过氧化物酶和磷脂氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶。非酶生物抗氧化剂包括生育酚和生育三烯酚、类胡萝卜素、醌、胆红素、抗坏血酸、尿酸和金属结合蛋白。各种为脂质性和水溶性的抗氧化剂发现于细胞和组织的所有部分中,尽管每种特定的抗氧化剂通常表现出特征性的分布模式。所谓的卵硫醇,其为巯基组氨酸衍生物,还能非酶促地分解过氧化物。

[0052] 如本文所用,术语“自由基清除剂”涉及能够结合和解毒自由基的抗氧化剂亚组。实例包括丁硫氨酸亚砷亚胺、维生素C、吡哆美辛、布洛芬、N-乙酰半胱氨酸或阿司匹林。

[0053] 根据本发明的一个实施方案,所述可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的活化剂为一种激活氧化的、无血红素的sGC异二聚体($\alpha 1/\beta 1$ 或 $\alpha 2/\beta 1$)以催化cGMP的形成的分子。

[0054] 如本文所用,“活化剂”、“可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的活化剂”、“sGC活化剂”或“血红素非依赖性sGC活化剂”是与sGC的氧化或无血红素形式相互作用的活性化合物,其激活氧化或无血红素形式的sGC以催化cGMP的形成。应理解为与对照,即未处理的对照相比,

一种使cGMP的测定产量增加至少5%，优选至少10%，更优选至少15%，甚至更优选至少20%，甚至更优选至少25%，甚至更优选至少30%或至少40%或至少50%的化合物。当考虑本公开内容的教导时，适合的对照对于技术人员是显而易见的。对于技术人员而言，从相关文献中易于获得用于测定所述活化的适合的测定法。在本发明的一个实施方案中，使用下文描述的测定法“重组可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的体外活化”来测定所述活化。该测定法适于区分血红素依赖性sGC刺激剂和血红素非依赖性sGC活化剂。

[0055] 优选地，可溶性鸟苷酸环化酶为人可溶性鸟苷酸环化酶。

[0056] 根据本发明的一个实施方案，所述可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的活化剂为选自以下活化剂的至少一种：

[0057] • 4-({(4-羧基丁基)[2-(2-{{[4-(2-苯基乙基)苄基]氧基}苯基)乙基]氨基}甲基)苯基)苯甲酸

[0058] • 5-氯-2-(5-氯噻吩-2-磺酰氨基-N-(4-(吗啉-4-磺酰基)苯基)苯甲酰胺钠盐

[0059] • 2-(4-氯苯磺酰氨基)-4,5-二甲氧基-N-(4-(硫代吗啉-4-磺酰基)苯基)苯甲酰胺

[0060] • 1-{6-[5-氯-2-({4-反-4-}三氟甲基)环己基]苄基}氧基}苯基]吡啶-2-基}-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-羧酸

[0061] • 1-[6-(2-(2-甲基-4-(4-三氟甲氧基苯基)苄氧基)苯基)吡啶-2-基]-5-三氟甲基吡唑-4-羧酸

[0062] • 1[6-(3,4-二氯苯基)-2-吡啶基-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-羧酸

[0063] • 1-({2-[3-氯-5-(三氟甲基)苯基]-5-甲基-1,3-噻唑-4-基}甲基)-1H-吡唑-4-羧酸

[0064] • 4-({2-[3-(三氟甲基)苯基]-1,3-噻唑-4-基}甲基)苯甲酸

[0065] • 1-({2-[2-氟-3-(三氟甲基)苯基]-5-甲基-1,3-噻唑-4-基}甲基)-1H-吡唑-4-羧酸

[0066] • 3-(4-氯-3-{{(2S,3R)-2-(4-氯苯基)-4,4,4-三氟-3-甲基丁酰基}氨基}苯基)-3-环丙基丙酸

[0067] • 5-{{2-(4-羧基苯基)乙基}[2-(2-{{[3-氯-4'-(三氟甲基)联苯基-4-基]甲氧基}苯基)乙基]氨基}-5,6,7,8-四氢喹啉-2-羧酸分子式

[0068] • 5-{{(4-羧基丁基)[2-(2-{{[3-氯-4'-(三氟甲基)联苯-4-基]甲氧基}苯基)乙基]氨基}-5,6,7,8-四氢喹啉-2-羧酸的分子式

[0069] • (1R,5S)-3-[4-(5-甲基-2-{{[2-甲基-4-(哌啶-1-基羰基)苄基]氧基}苯基)-1,3-噻唑-2-基]-3-氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸

[0070] • 1-[6-(5-甲基-2-{{[2-(四氢-2H-吡喃-4-基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-6-基]甲氧基}苯基)吡啶-2-基]-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-羧酸

[0071] • 4-[[4-(羧基丁基)[2-[2-[[4-(2-苯基乙基)苯基]甲氧基]苯基]乙基]氨基]甲基]苯甲酸

[0072] • BAY 60-2770 4-({(4-羧基丁基)[2-(5-氟-2-{{[40-(三氟甲基)联苯-4-基]甲氧基}苯基)乙基]氨基}甲基)苯甲酸)。

[0073] 在以下出版物之一中公开了本发明上下文中的其他sGC活化剂：WO2013/157528、

W02015/056663、W02009/123316、W02016/001875、W02016/001876、W02016/001878、W02000/02851、W02012/122340、W02013/025425、W02014/039434、W02016/014463、W02009/068652、W02009/071504、W02010/015652、W02010/015653、W02015/033307、W02016/042536、W02009/032249、W02010/099054、W02012/058132、US2010/0216764、W001/19776、W001/19780、W001/19778、W002/070459、W002/070460、W002/070510、W002/070462、W02007/045366、W02007/045369、W02007/045433、W02007/045370、W02007/045367、W02014/012935、W02014/012934、W02011/141409、W02008/119457、W02008/119458、W02009/127338、W02010/102717、W02011/051165、W02012/076466、W02012/139888、W02013/157528、W02013/174736、W02014/012934、W02015/056663、W02017103888、W02017112617、W02016042536、W02016081668、W02016191335、W02016191334、W02016001875、W02016001876、W02016001878、W02016014463、W02016044447、W02016044445、W02016044446、W02015056663、W02015033307、W02015187470、W02015088885、W02015088886、W02015089182、W02014084312、W02014039434、W02014144100、W02014047111、W02014047325、W02013025425、W02013101830、W02012165399、W02012058132、W02012122340、W02012003405、W02012064559、W02011149921、W02011119518、W02011115804、W02011056511、CN101670106、TW201028152、W02010015653、W02010015652、W02010099054、W02010065275、W02009123316、W02009068652、W02009071504、W02009032249、US2009209556。

[0074] 根据本发明的一个实施方案,在确定所述样品的特征是否在于包含无血红蛋白 β 1亚基的sGC的存在、上调或过表达的步骤中,使用结合分子,其选择性地结合包含无血红蛋白 β 1亚基的sGC。

[0075] 如本文所用,术语“选择性地结合包含无血红蛋白 β 1亚基的sGC”意指此类结合分子对(i)包含无血红蛋白 β 1亚基的sGC比对(ii)包含天然的、含血红蛋白的 β 亚基的野生型sGC具有显著更高的结合亲和力和/或选择性。

[0076] 如本文所用,术语“结合亲和力”是指根据本发明的结合分子对其靶标——包含无血红蛋白 β 1亚基的sGC——的亲和力,并使用“ K_D ”值以数字表示。通常,较高的 K_D 值对应较弱的结合。在一些实施方案中,“ K_D ”通过放射性标记抗原结合测定法(MA)或使用例如BIAcoreTM-2000或BIAcoreTM-3000的表面等离子共振(SPR)测定法来测量。在某些实施方案中,“结合速率(on-rate)”或“缔合的速率”或“缔合速率(association rate)”或“ k_{on} ”和“解离速率(off-rate)”或“解离的速率”或“解离速率(dissociation rate)”或“ k_{off} ”也用表面等离子共振(SPR)技术测定。在额外的实施方案中,使用Octet® Systems (Pall Life Sciences)测量“ K_D ”、“ k_{on} ”和“ k_{off} ”。

[0077] 如本文所用,术语“选择性”描述根据本发明的结合分子的特征,以比其结合其他蛋白(包括天然的、包含血红蛋白的 β 亚基)低约1000倍、500倍、200倍、100倍、50倍或约10倍的 K_D 结合其靶标——包含无血红蛋白 β 1亚基的sGC,例如通过表面等离子共振(SPR)所测量的。

[0078] 如本文所用,术语根据本发明的结合分子的“更高的结合亲和力”和“更高的选择性”表明根据本发明的结合分子的相应参数对于包含无血红蛋白 β 1亚基的sGC比对于天然的、含血红蛋白的 β 亚基高至少5%,优选至少10%,更优选至少15%,甚至更优选至少20%,甚至更优选至少25%,甚至更优选至少30%或至少40%或至少50%。

[0079] 根据本发明的一个实施方案,所述结合分子为抗体或其保留靶标结合能力的片段或衍生物、抗体模拟物或适配体。

[0080] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,以指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于这样的氨基酸聚合物:其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另有说明,特定的多肽序列还隐含地包括其保守修饰的变体。

[0081] 本文中氨基酸可以通过它们通常已知的三字母符号或通过IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的一个字母符号来指代。同样,核苷酸可以用它们普遍接受的单字母代码来指代。

[0082] 如本文所用,术语“抗体”意指免疫球蛋白分子,其优选由通常通过二硫键相互连接的4条多肽链——2条重(H)链和2条轻(L)链组成。每条重链由重链可变区(在本文中缩写为VH)和重链恒定区组成。所述重链恒定区可以包含例如3个结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区组成。所述轻链恒定区由一个结构域(CL)组成。VH和VL区域可以进一步分成高变异性区域(称作互补决定区(CDR)),所述区域内夹杂着更保守的区域(称作框架区(FR))。每个VH和VL通常由3个CDR和最高达4个FR组成,从氨基末端至羧基末端,例如以下述次序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0083] 如本文所用,术语“互补决定区”(CDR;例如CDR1、CDR2和CDR3)指抗体可变域的氨基酸残基,其存在为抗原结合所必需。每个可变域通常具有三个CDR区,称为CDR1、CDR2和CDR3。每个互补决定区可以包含来自Kabat定义的“互补决定区”的氨基酸残基(例如,大约在轻链可变域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及在重链可变域中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))和/或来自“高变环”的那些残基(例如,大约在轻链可变域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及在重链可变域中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)(Chothia和Lesk;J Mol Biol 196:901-917(1987))。在一些情况下,互补决定区可以包含来自根据Kabat定义的CDR区的氨基酸和高变环的氨基酸。

[0084] 根据完整抗体的重链的恒定域的氨基酸序列,完整抗体可以被分为不同的“类别”。完整抗体有五个主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,且其中一些可以被进一步分为亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。用于本发明的优选类别的免疫球蛋白为IgG。

[0085] 对应于不同类别的抗体的重链恒定域分别被称为[α]、[δ]、[ϵ]、[γ]和[μ]。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。如本文所用,抗体为常规已知的抗体及其功能片段。

[0086] 抗体/免疫球蛋白的“功能片段”或“抗原结合抗体片段”或“片段”在此定义为保留抗原结合区的抗体/免疫球蛋白的片段(例如,IgG的可变区)。抗体的“抗原结合区”通常存在于抗体的一个或多个超可变区,例如CDR1、CDR2和/或CDR3区;然而,可变“框架”区还可以在抗原结合中发挥重要作用,例如通过为CDR提供支架。优选地,所述“抗原结合区”至少包含可变轻(VL)链的4至103位氨基酸残基和可变重(HL)链的5至109位氨基酸残基,更优选包含VL的3至107位氨基酸残基和VH的4至111位氨基酸残基,特别优选的为完整的VL和VH链

(VL的1至109位氨基酸和VH的1至113位氨基酸;根据WO 97/08320编号)。

[0087] 实例为

[0088] • CDR(互补决定区),

[0089] • 高变区,

[0090] • 可变域(Fv),

[0091] • IgG重链(由VH区、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区组成),

[0092] • IgG轻链(由VL区和CL区组成),和/或

[0093] • Fab和/或F(ab)₂。

[0094] 本发明的“功能片段”、“抗原结合抗体片段”或“抗体片段”包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂和Fv片段;双体;单域抗体(DAb)、线性抗体;单链抗体分子(scFv);和多特异性,例如由抗体片段形成的双特异性抗体和三特异性抗体(CA K Borrebaeck,编辑(1995)Antibody Engineering(Breakthroughs in Molecular Biology),Oxford University Press;R.Kontermann&S.Duebel,编辑(2001)Antibody Engineering(Springer Laboratory Manual),Springer Verlag)。“多特异性”或“多功能”抗体以外的抗体被理解为使其每个结合位点相同。F(ab')₂或Fab可以设计成最小化或完全去除CH1和CL结构域间产生的分子间二硫键相互作用。

[0095] 本文中术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C-末端区域,其含有恒定区的至少一部分。所述术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基末端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可能存在或可能不存在。除非本文另有说明,Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号根据EU编号系统,也称为EU索引,如在Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所记载。

[0096] 本发明中涵盖的抗体或抗原结合抗体片段的变体为其中维持了抗体或抗原结合抗体片段的结合活性的分子。

[0097] 本发明中涵盖的“结合蛋白”是例如抗体模拟物,例如亲合体(Affibody)、连接蛋白(Adnectins)、Anticalins、DARPin、高亲和性多聚体(Avimers)、纳米抗体(Nanobody)(由Gebauer M.等人,Curr.Opinion in Chem.Biol.2009;13:245-255;Nuttall S.D.等人,Curr.Opinion in Pharmacology 2008;8:608-617综述)。

[0098] “人”抗体或其抗原结合片段在此定义为不是嵌合的(例如,不是“人源化的”)并且不是(全部或部分地)来自非人物种的抗体。人抗体或其抗原结合片段可以源自人或可以为合成人抗体。在本文中“合成人抗体”定义为具有全部或部分计算机衍生自基于已知人抗体序列分析的合成序列的序列的抗体。人抗体序列或其片段的计算机设计可以例如通过分析人抗体或抗体片段序列的数据库并利用从那里获得的数据设计多肽序列来实现。人抗体或其抗原结合片段的另一个实例是由从人源的抗体序列文库(例如,这类文库是基于取自人天然来源的抗体)分离的核酸编码的抗体。人抗体的实例包括如在Söderlind等人,Nature Biotech.2000,18:853-856中记载的抗体。

[0099] 在本文中“人源化抗体”或其人源化抗原结合片段定义为这样的抗体:(i)源自非人源(例如,具有异源免疫系统的转基因小鼠),其抗体基于人种系序列;(ii)其中非人抗体的框架区的氨基酸通过基因工程部分交换为人氨基酸序列或(iii)CDR移植的,其中可变域

的CDR来自非人源,而可变域的一个或多个框架为人源的,且恒定域(如果存在)为人源的。

[0100] 在本文中“嵌合抗体”或其抗原结合片段定义为这样的抗体,其中可变域源自非人源且一些或全部恒定域源自人源。

[0101] 本文中所用术语“单克隆抗体”指由基本同质的抗体群获得的抗体,即除了可能的突变(例如,可能少量存在的天然发生的突变)外,构成群体的各个抗体是相同的。因此,术语“单克隆”表示该抗体的特征不是离散抗体的混合物。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相比,单克隆抗体制剂的每个单克隆抗体都针对抗原上的单个决定簇。除了其特异性之外,单克隆抗体制剂的优势在于它们通常不会被其他免疫球蛋白污染。术语“单克隆”不应解释为需要通过任一特定方法产生抗体。术语单克隆抗体具体包括嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。

[0102] “分离的抗体”为已被鉴定并从表达它的细胞的组分分离出的抗体。细胞的污染物组分为会干扰诊断或抗体治疗用途的物质,且可能包括酶、激素和其他蛋白质的或非蛋白质的溶质。

[0103] 如本文所用,抗体“特异性结合至”、“特异性于/针对”或“特异性识别”目的抗原(例如肿瘤相关的多肽抗原靶标),是以足够的亲和力结合抗原使得抗体可用作靶向表达抗原的细胞或组织的治疗剂,并且不与其他蛋白质显著交叉反应或不与前述抗原靶标的直向同源物和变体以外的蛋白质(例如突变形式、剪接变体或蛋白水解截短形式)显著交叉反应。如本文所用,术语“特异性识别”或“特异性结合至”或“特异性于/针对”特定多肽或特定多肽靶标上的表位可以例如通过抗体或其抗原结合片段展示,所述抗体或其抗原结合片段对小于约 10^{-4} M,或者小于约 10^{-5} M,或者小于约 10^{-6} M,或者小于约 10^{-7} M,或者小于约 10^{-8} M,或者小于约 10^{-9} M,或者小于约 10^{-10} M,或者小于约 10^{-11} M,或者小于约 10^{-12} M,或更少的抗原具有单价 K_D 。如果该抗体能够区分该抗原和一种或多种参考抗原,则抗体“特异性结合至”、“特异性于/针对”或“特异性识别”抗原。在其最通常的形式中,“特异的结合”、“特异性结合至”、“特异性于/针对”或“特异性识别”是指抗体区分目的抗原和无关抗原的能力,其例如根据以下方法之一确定。此类方法包括但不限于表面等离子共振(SPR)、蛋白质印迹、ELISA测试、RIA测试、ECL测试、IRMA测试和肽扫描。例如,可以进行标准ELISA测定。评分可以通过标准显色来进行(例如带有辣根过氧化物酶的二抗和带有过氧化氢的四甲基联苯胺)。某些孔中的反应通过光密度评分,例如在450nm处。典型的背景(=阴性反应)可以为0.10D;典型的阳性反应可以为10D。这意味着阳性/阴性差异大于5倍、10倍、50倍,且优选大于100倍。通常,结合特异性的测定不是通过使用单个参考抗原,而是一组约3至5个无关抗原(例如奶粉、BSA、转铁蛋白等)来进行的。

[0104] 如本文所用,术语“表位”包括能够特异性结合免疫球蛋白或T细胞受体的任何蛋白决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团(例如氨基酸或糖侧链,或其组合)组成,并且通常具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。

[0105] 与参考抗体“结合相同表位的抗体”或与参考抗体“竞争结合的抗体”指在竞争测定中阻断参考抗体与其抗原的结合达50%或更多的抗体,反之,参考抗体在竞争测定中阻断抗体与其抗原的结合达50%或更多。本文提供了示例性竞争测定。

[0106] 相对于参考多核苷酸或多肽序列的“序列同一性百分比(%)”分别定义为在比对序列并引入缺口后(如果需要的话),候选序列中的核酸或氨基酸残基分别与参考多核苷酸

或多肽序列中的核酸或氨基酸残基分别相同的百分比,以实现最大的序列同一性百分比。保守置换不被视为序列同一性的一部分。优选的是无缺口对齐。用于确定氨基酸序列同一性百分比目的的比对可以在本领域技术范围内的多种方式实现,例如,使用公开可得到的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MegaAlign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可确定比对序列的合适参数,包括在所比较的序列全长上实现最大对比所需的任何算法。

[0107] “序列同源性”表示相同或代表保守氨基酸置换的氨基酸的百分比。

[0108] 术语“成熟抗体”或“成熟的抗原结合片段”(例如成熟的Fab变体)包括抗体或抗体片段的衍生物,其表现出与给定的抗原,例如靶蛋白的胞外结构域的更强的结合——即以增加的亲和力结合。成熟是鉴定少量突变,例如在导致这种亲和力增加的抗体或抗体片段的6个CDR内的过程。成熟过程是将突变引入抗体和筛选鉴定改良结合物的分子生物学方法的组合。

[0109] 术语“药物制剂”/“药物组合物”指这样的制剂,其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在,并且不包含对将给予该制剂的受试者具有不可接受的毒性的额外成分。

[0110] 如本文所用,术语“载体”指这样的核酸分子,其能够增殖与其连接的另一核酸。该术语包括作为自身复制性核酸结构的载体以及并入其已被引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作连接的核酸的表达。此类载体在本文中被称为“表达载体”。

[0111] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”、“转化细胞”、“转染体”、“转染细胞”和“转导细胞”,其包括原代转化/转染/转导细胞及其衍生的不考虑传代次数的子代。子代在核酸含量上可能与亲本细胞不完全相同,但可能包含突变。具有与在最初转化的细胞中筛选或选择的功能或生物活性相同的功能或生物活性的突变子代包括在本文中。

[0112] 抗体的序列不同,不仅在其互补决定区(CDR)内,而且在框架(FR)内。这些序列差异编码于不同的V基因中。人抗体种系库已完全测序。约有50个功能性VH种系基因,根据序列同源性VH1、VH2、VH3、VH4、VH5和VH6,其可分为六个亚家族(Tomlinson等人,1992, J. Mol. Biol. 227, 776-798; Matsuda&Honjo, 1996, Advan. Immunol. 62, 1-29)。已知包含7个亚家族的约40个功能性VL κ 基因(Cox等人,1994, Eur. J. Immunol. 24, 827-836; Barbie&Lefranc, 1998, Exp. Clin. Immunogenet. 15, 171-183):Vkappa1、Vkappa2、Vkappa3、Vkappa4、Vkappa5、Vkappa6和Vkappa7。本文分别公开了属于人VH2亚家族的本发明的抗体的重链和属于人Vkappa1亚家族的本发明的抗体的轻链。已知属于同一亚家族的抗体的框架序列密切相关,例如包含人VH3亚家族成员的抗体都具有相当的稳定性(Honegger等人, 2009, Protein Eng Des Sel. 22 (3):121-134)。本领域熟知来自抗体的CDR可以移植到不同的框架上,同时保持相应来源抗体的特殊特征。在另一个实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段包含如表1中描述的本发明的抗体的至少一个CDR序列和人可变链框架序列。

[0113] 在优选的实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段包含如表1中描述的本发明的可变轻链或包含可变轻链的L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3序列的轻链抗原结合区,以及可变重链或包含可变重链抗体的H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3序列的重链抗原结合区,以及人可变轻链和人可变重链框架序列。

[0114] 本发明的抗体可以为IgG (例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) 或IgA、IgD、IgE、IgM, 而抗体片段可以为例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab'-SH或scFv。因此, 本发明的抗体片段可以是或可以包含以如本文所述的一种或多种方式表现的抗原结合区。

[0115] 在优选的实施方案中, 本发明的抗体或抗原结合抗体片段为单克隆的。

[0116] 在一些实施方案中, 分离本发明的抗体或其抗原结合片段或编码其的核酸。分离的生物组分 (例如核酸分子或蛋白质, 例如抗体) 是已与该组分天然存在其中的生物体的细胞中的其他生物组分 (即, 其他染色体和染色体外的DNA和RNA、蛋白质和细胞器) 中基本分离或从中纯化的生物组分。该术语还包括核酸和通过在宿主细胞中重组表达制备的蛋白以及化学合成的核酸。

[0117] 适配体是对预定靶标具有特异性结合特性的寡核苷酸。它们通过名为SELEX (“指数富集的配体系统进化”) 的组合过程从包含最高达10¹⁵个不同序列的随机合成文库中获得。适配体特性由它们的3D形状决定, 其由初级序列驱动分子内折叠产生。适配体3D结构非常适合通过氢键、静电和堆叠相互作用识别其同源靶标。适配体通常表现出高亲和力(K_d对小分子约为微摩尔(μM), 对蛋白为皮摩尔(pM))。例如, 在Blind和Blank 2015 (其通过引用并入本文) 中给出了关于生成靶标特异性适体的技术库的概述。适配体还可以被递送到胞内空间中, 如在Thiel和Giangrande (2010) 中所记载, 其通过引用并入本文。

[0118] 抗体生成

[0119] 本发明的抗体可源自重组抗体文库, 其基于已从大量健康志愿者的抗体中分离的氨基酸序列, 例如使用**n-CoDeR®**技术将完全人CDR重组到新的抗体分子中 (Carlson & **Söderlind**, *Expert Rev Mol Diagn.* 2001 May; 1(1):102-8)。或者, 例如Hoet RM等人, *Nat Biotechnol* 2005; 23(3):344-8中所述的作为完全人抗体噬菌体展示文库的抗体文库可用于分离(Apo-sGC) 特异性抗体。从人抗体文库中分离的抗体或抗体片段在本文中被认为是人抗体或人抗体片段。

[0120] 可以通过给予转基因动物免疫原来进一步制备人抗体, 所述转基因动物已经被改良响应于抗原挑战 (antigenic challenge) 以产生完整的人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有全部或部分人免疫球蛋白基因座, 其取代内源性免疫球蛋白基因座, 或其存在于染色体外或随机整合至动物的染色体中。例如, 可以进行基因工程小鼠的免疫, 尤其是hMAb小鼠的免疫 (例如VelocImmune **mouse®** 或 **XENOMOUSE®**)。

[0121] 可以使用杂交瘤技术产生其他抗体 (例如, 参见 **Köhler** 和 **Milstein** *Nature*. 1975 Aug 7; 256(5517):495-7), 产生例如可以转化为嵌合或人源化抗体的鼠、大鼠或兔抗体。人源化抗体及其制备方法在例如, Almagro和Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 中进行了综述, 并进一步描述于例如, Riechmann等人, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen等人, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); US专利号5, 821, 337, 7, 527, 791, 6, 982, 321和7, 087, 409; Kashmiri等人, *Methods* 36:25-34 (2005) (描述特异性决定区 (SDR) 移植); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (描述“表面重塑 (resurfacing)”) ; Dall'Acqua等人, *Methods* 36:43-60 (2005) (描述“FR改组 (FR shuffling)”) ; 和Osboum等人, *Methods* 36:61-68 (2005) 以及Klimka等人, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (描述FR改组的“引导选择 (guided selection)”方法)。

[0122] 提供了使用重组抗体文库产生抗体和免疫小鼠以及随后人源化的实例。

[0123] 肽变体

[0124] 本发明的抗体或抗原结合片段不限于本文提供的特定肽序列。相反,本发明还包括这些多肽的变体。参考本公开内容和常规可用的技术以及参考文献,技术人员将能够制备、测试和利用本文公开的抗体的功能性变体,同时理解这些具有结合apo-sGC能力的变体落入本发明的范围内。

[0125] 相对于本文公开的肽序列,变体可以包括,例如,具有至少一个改变的互补决定区(CDR)(超可变)和/或框架(FR)(可变)结构域/位置的抗体。

[0126] 通过改变CDR或FR区中的一个或多个氨基酸残基,技术人员通常可以产生突变的或多样化的抗体序列,例如可以针对抗原对其筛选新的或改进的特性。

[0127] 本发明的另一个优选实施方案为如表2中示出的其中选择VH和VL序列的抗体或抗原结合片段。技术人员可以使用表2中的数据来设计在本发明范围内的肽变体。优选通过改变一个或多个CDR区内的氨基酸来构建变体;变体还可能具有一个或多个改变的框架区。还可以在框架区中进行改变。例如,当与种系序列相比残基中存在偏差时,肽FR结构域可能改变。

[0128] 或者,使用例如由Knappik A.,等人,JMB 2000,296:57-86描述的方法,技术人员可以通过将本文公开的氨基酸序列与此类抗体的同类已知序列比较来进行相同的分析。

[0129] 此外,可以使用一种抗体作为进一步优化的起点,通过将抗体中的一个或多个氨基酸残基(优选在一个或多个CDR中的氨基酸残基)多样化来获得变体,并通过筛选所得抗体变体的集合得到具有改进特性的变体。特别优选的是CDR3的VL和/或VH中的一个或多个氨基酸残基的多样化。多样化可以通过例如使用三核苷酸诱变(TRIM)技术(**Virnekäs B.**等人,Nucl.Acids Res.1994,22:5600.)合成DNA分子的集合来完成。抗体或其抗原结合片段包括具有修饰/变异的分子,其包括但不限于例如导致改变的半衰期的修饰(例如Fc部分的修饰或其他分子如PEG的连接)、改变的结合亲和力或改变的ADCC或CDC活性。

[0130] 保守氨基酸变体

[0131] 可以制备保留本文所述抗体肽序列的整体分子结构的多肽变体。给定单个氨基酸的特性,技术人员将认识到一些合理的置换。氨基酸置换,即,“保守置换”,可以基于,例如,极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性,和/或所涉及的残基的两亲性质的相似性来进行。

[0132] 例如,(a)非极性(疏水)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸;(b)极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺;(c)带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸;以及(d)带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。置换通常可以在组(a)-(d)内进行。此外,甘氨酸和脯氨酸可以根据它们破坏 α -螺旋的能力相互置换。同样,某些氨基酸,如丙氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸和赖氨酸更常见于 α -螺旋中,而缬氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和苏氨酸更常见于 β 折叠片层中。甘氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺和脯氨酸通常发现于转角中。一些优选的置换可以在以下组中进行:(i)S和T;(ii)P和G;(iii)A、V、L和I。鉴于已知的遗传密码以及重组和合成DNA技术,有技能的科学家可以容易地构建编码保守氨基酸变体的DNA。

[0133] 糖基化变体

[0134] 在抗体包含Fc区的情况下,可以改变与其相连的糖类。哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分支的双触角寡糖,其通常通过N键连接至Asn297(使用Fc区的CH2结构域的Kabat EU编号);参见,例如,Wright等人Trends Biotechnol.15:26-32(1997)。

[0135] 在某些实施方案中,改变本文提供的抗体以增加或减少抗体被糖基化的程度。向抗体添加或删除糖基化位点可以通过改变表达系统(例如宿主细胞)和/或通过改变氨基酸序列从而产生或去除一个或多个糖基化位点来方便地完成。

[0136] 在本发明的一个实施方案中,通过在原核宿主中表达来制备具有降低的效应子功能的无糖基抗体或抗体衍生物。适合的原核宿主包括但不限于大肠杆菌(E.coli)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium),以及假单胞菌属(Pseudomonas)、链霉菌属(Streptomyces)和葡萄球菌属(Staphylococcus)内的多个种。

[0137] 在一个实施方案中,提供具有降低的效应子功能的抗体变体,其特征在于在所述抗体的Fc部分的CH2结构域中的保守N-连接位点处的修饰。在本发明的一个实施方案中,修饰包括重链糖基化位点处的突变以防止该位点处的糖基化。因此,在本发明的一个优选实施方案中,无糖基抗体或抗体衍生物通过重链糖基化位点处的突变(即使用Kabat EU编号的N297的突变)来制备并在合适的宿主细胞中表达。

[0138] 在本发明的另一个实施方案中,无糖基抗体或抗体衍生物具有降低的效应子功能,其中在所述抗体或抗体衍生物的Fc部分的CH2结构域中的保守N-连接位点的修饰包括去除CH2结构域聚糖,即去糖基化。这些无糖基抗体可以通过常规方法产生,然后酶促去糖基化。抗体的酶促去糖基化方法为本领域所熟知的(例如Winkelhake&Nicolson(1976),J Biol Chem.251(4):1074-80)。

[0139] 在本发明的另一个实施方案中,去糖基化可以使用糖基化抑制剂衣霉素来实现(Nose&Wigzell(1983),Proc Natl Acad Sci USA,80(21):6632-6)。即,修饰为防止在所述抗体的Fc部分的CH2结构域中保守N-连接位点处的糖基化。

[0140] 在一个实施方案中,提供了具有缺乏(直接或间接地)连接至Fc区的岩藻糖的糖结构的抗体变体。例如,此类抗体中岩藻糖的量可为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。岩藻糖的量是通过以下方式来确定的:计算相对于通过MALDI-TOF质谱测量的与Asn 297相连的所有糖结构(例如复合、杂合和高甘露糖结构)的总和,Asn297处糖链内的岩藻糖的平均量,例如,如在W0 2008/077546中所记载。Asn297指位于Fc区约第297位的天冬酰胺残基(Fc区残基的Eu编号);然而,由于抗体中的微小序列变异,Asn297还可能位于第297位的上游或下游约±3个氨基酸处,即第294位和第300位之间。此类岩藻糖基化变体可能具有提高的ADCC功能。

[0141] 与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺乏”抗体变体相关的出版物的实例包括:Okazaki等人J Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004)。

[0142] 能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括:蛋白质岩藻糖基化缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripk等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);和W0 2004/056312),和敲除细胞系,例如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因、FUT8、敲除CHO细胞(参见,例如Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006))。

[0143] 还提供具有等分型寡糖的抗体变体,例如,其中连接至抗体Fc区的双触角寡糖被GlcNAc等分。此类抗体变体可能具有降低的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的实例记载在例如WO 2003/011878;美国专利号6,602,684;和US 2005/0123546中。

[0144] 还提供了在连接至Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可能具有改善的CDC功能。此类抗体变体记载在例如,W01997/30087;W01998/58964;和W01999/22764中。

[0145] Fc区变体

[0146] 在某些实施方案中,可将一个或多个氨基酸修饰(例如置换)引入本文提供的抗体的Fc区(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),从而产生Fc区变体。

[0147] 在某些实施方案中,本发明涉及具有有一些但不是全部效应子功能的抗体变体,所述具有一些但不是全部效应子功能使其成为抗体在体内的半衰期是重要的,但某些效应子功能(例如补体和ADCC)是不必要或有害的应用中的理想候选。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的减少/削弱。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏Fc γ R结合能力(因此可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。在一些实施方案中,在Fc区中进行改变,其导致改变的(即,改善或减弱)C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0148] 在某些实施方案中,本发明涉及具有增加或减少的半衰期的抗体变体。具有增加的半衰期且与新生儿Fc受体(FcRn)(其负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人,J Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J Immunol.24:249(1994))结合增强的抗体记载在US2005/0014934(Hinton等人)中。那些抗体包含其中具有一个或多个置换的Fc区,其改善了Fc区与FcRn的结合。

[0149] 本发明的DNA分子

[0150] 本发明还涉及编码本发明抗体或其抗原结合片段的DNA分子。这些序列在某些情况下针对哺乳动物表达进行了优化。本发明的DNA分子不限于本文公开的序列,还包括其变体。本发明中的DNA变体可以通过参考它们在杂交中的物理特性来描述。技术人员将认识到,DNA可用于鉴定其补体,并且由于DNA为双链,使用核酸杂交技术可用于鉴定其等价物或同源物。还将认识到,杂交可以以小于100%的互补性发生。然而,如果选择适当条件,杂交技术可用于基于DNA序列与特定探针的结构相关性来区分它们。有关此类条件的指导参见Sambrook等人1989同上和Ausubel等人,1995(Ausubel,F.M.,Brent,R.,Kingston,R.E.,Moore,D.D.,Sedman,J.G.,Smith,J.A.,&Struhl,K.编辑(1995).Current Protocols in Molecular Biology.New York:John Wiley and Sons)。

[0151] 两条多核苷酸序列之间的结构相似性可以表示为在两条序列将彼此杂交的条件下的“严格性”的函数。如本文所用,术语“严格性”指条件不利于杂交的程度。严格的条件强烈不利于杂交,在这种条件下,只有结构最相关的分子才会相互杂交。相反,非严格条件有利于显示较低程度结构相关性的分子的杂交。因此,杂交严格性与两条核酸序列的结构关系直接相关。

[0152] 杂交严格性在许多因素的函数,包括整体DNA浓度、离子强度、温度、探针大小和破坏氢键的试剂的存在。促进杂交的因素包括高DNA浓度、高离子强度、低温、更长的探针尺寸和不存在破坏氢键的试剂。杂交通常分两个阶段进行:“结合”阶段和“洗涤”阶段。

[0153] 功能等价的DNA变体

[0154] 本发明范围内的另一类DNA变体可以参照其编码的产物进行描述。由于遗传密码的简并性,这些功能等价的多核苷酸的特征在于其编码相同的肽序列的事实。

[0155] 认识到本文提供的DNA分子的变体可以多种不同的方式进行构建。例如,它们可以构建为完全合成的DNA。有效合成寡核苷酸的方法是广泛可得的。参见Ausubel等人,第2.11节,增刊21(1993)。Overlapping oligonucleotides may be synthesized and assembled in a fashion first reported by Khorana等人,J.Mol.Biol.72:209-217(1971);还参见Ausubel等人,同上,第8.2节。优选地,合成DNA设计有方便的限制性位点,其在基因的5'和3'端进行改造以促进克隆至合适的载体中。

[0156] 如所指出的,产生变体的方法是从本文公开的DNA之一开始,然后进行定点诱变。参见Ausubel等人,同上,第8章,增刊37(1997)。在典型的方法中,目标DNA被克隆至单链DNA噬菌体载体中。分离单链DNA并与含有所需核苷酸改变的寡核苷酸杂交。合成互补链,并将双链噬菌体引入宿主中。一些产生的子代将含有所需突变体,其可以使用DNA测序进行确认。此外,增加子代噬菌体成为所需突变体的可能性的多种方法是可得的。这些方法为本领域技术人员所熟知,并且用于产生此类突变体的试剂盒为市售可得的。

[0157] 重组DNA构建体和表达

[0158] 本发明还提供了包含一种或多种本发明核苷酸序列的重组DNA构建体。本发明的重组构建体可与载体如质粒、噬菌粒、噬菌体或病毒载体结合使用,其中插入了编码本发明抗体或其抗原结合片段或其变体的DNA分子。

[0159] 本文提供的抗体、抗原结合部分或其变体可以通过在宿主细胞中重组表达编码轻链和重链或其部分的核酸序列来制备。为了重组表达抗体、抗原结合部分或其变体,可以用一种或多种携带编码轻链和/或重链或其部分的DNA片段的重组表达载体转染宿主细胞,使得轻链和重链在宿主细胞中表达。使用标准重组DNA方法来制备和/或获得编码重链和轻链的核酸,将这些核酸并入重组表达载体并将所述载体引入宿主细胞中,例如在Sambrook、Fritsch和Maniatis(编辑),Molecular Cloning;A Laboratory Manual,Second Edition,Cold Spring Harbor,N.Y.,(1989),Ausubel,F.M.等人(编辑)Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates,(1989)和在Boss等人的美国专利号4,816,397中所记载的那些。

[0160] 此外,可以将编码重链和/或轻链可变区的核酸序列转化为例如编码全长抗体链、Fab片段或scFv的核酸序列。编码VL或VH的DNA片段可以可操作地连接(使得由两个DNA片段编码的氨基酸序列在阅读框内)至编码例如抗体恒定区或柔性接头的另一个DNA片段。人重链和轻链恒定区的序列为本领域已知的(参见例如,Kabat,E.A.,等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,美国卫生和人类服务部,NIH出版号91-3242),并且包含这些区域的DNA片段可以通过标准PCR扩增获得。

[0161] 为了产生编码scFv的多核苷酸序列,可以将编码VH和VL的核酸可操作地连接至编码柔性接头的另一个片段,使得可以将VH和VL序列表达为连续的单链蛋白,其中VL和VH区由柔性接头连接(参见例如,Bird等人(1988)Science 242:423-426;Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;McCafferty et al.,Nature(1990)348:552-554)。

[0162] 为了表达抗体、其抗原结合片段或其变体,可以使用标准重组DNA表达方法(参见例如Goeddel;Gene Expression Technology.Methods in Enzymology 185,Academic Press,San Diego,Calif.(1990))。例如,可以将编码所需多肽的DNA插入表达载体中,然后将其转染至适合的宿主细胞中。适合的宿主细胞为原核细胞和真核细胞。原核宿主细胞的实例为例如细菌,真核宿主细胞的实例为酵母、昆虫和昆虫细胞、植物和植物细胞、转基因动物或哺乳动物细胞。在一些实施方案中,将编码重链和轻链的DNA插入至不同的载体中。在其他实施方案中,将编码重链和轻链的DNA插入至同一载体中。应当理解,表达载体的设计(包括调控序列的选择)受多种因素影响,例如宿主细胞的选择、所需蛋白质的表达水平以及表达是组成型还是诱导型。

[0163] 因此,本发明的一个实施方案还是包含载体或核酸分子的宿主细胞,其中宿主细胞可以为高等真核宿主细胞(例如哺乳动物细胞)、低等真核宿主细胞(例如酵母细胞)并且可以为原核细胞(例如细菌细胞)。

[0164] 本发明的另一个实施方案是一种使用宿主细胞产生抗体和抗原结合片段的方法,其包括在适合条件下培养宿主细胞并回收所述抗体。

[0165] 因此,本发明的另一个实施方案是用本发明的宿主细胞产生根据本发明的抗体并将这些抗体纯化至至少95%重量均质性。

[0166] 细菌表达

[0167] 用于细菌用途的有用的表达载体是通过将编码所需蛋白质的DNA序列与适合的翻译起始和终止信号一起在可操作的阅读阶段与功能启动子一起插入来构建的。载体将包含一种或多种表型选择标记和复制起点以确保维持载体,并且(如果需要)在宿主内提供扩增。用于转化的适合的原核宿主包括但不限于大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌,以及假单胞菌属、链霉菌属和葡萄球菌属内的多个种。

[0168] 细菌载体可以是例如基于噬菌体、基于质粒或基于噬菌粒的。这些载体可以包含可选择标记和细菌复制起点,所述复制起点来源于市售可得的质粒,其通常含有熟知的克隆载体pBR322(ATCC 37017)的元件。在转化适合的宿主菌株并且宿主菌株生长至适当细胞密度后,通过合适的方式(例如,温度变化或化学诱导)去抑制/诱导选定的启动子,并且将细胞额外培养一段时间。通常通过离心收获细胞,通过物理或化学方法破碎细胞,并保留所得的粗制提取物用于进一步纯化。

[0169] 在细菌系统中,可以根据所表达的蛋白质的预期用途有利地选择多种表达载体。例如,当要产生大量此类蛋白质时,为了产生抗体或筛选肽文库,例如,指导易于纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体可能是合乎需要的。

[0170] 因此,本发明的一个实施方案是包含编码本发明的新型抗体的核酸序列的表达载体。

[0171] 本发明的抗体或其抗原结合片段或其变体包括天然纯化的产物、化学合成过程的产物和通过重组技术从原核宿主产生的产物,所述原核宿主包括例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌以及假单胞菌属、链霉菌属和葡萄球菌属内的多个种,优选来自大肠杆菌细胞。

[0172] 哺乳动物表达

[0173] 用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调节序列包括指导哺乳动物细胞中的高水平

蛋白质表达的病毒元件,例如源自巨细胞病毒(CMV)的启动子/增强子(例如CMV启动子/增强子)、猿猴病毒40(SV40)的启动子/增强子(例如SV40启动子/增强子)、腺病毒的启动子/增强子(例如,腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))以及多瘤的启动子和/或增强子。抗体的表达可以是组成型或受调控的(例如通过添加或去除小分子诱导物(如四环素)与Tet系统结合进行诱导)。对于病毒调控元件及其序列的进一步描述,参见例如Stinski的U.S.5,168,062、Bell等人的U.S.4,510,245和Schaffner等人的U.S.4,968,615。重组表达载体还可以包括复制起点和选择标记(参见例如U.S.4,399,216、4,634,665和U.S.5,179,017)。适合的选择标记包括赋予药物抗性的基因,例如,G418、嘌呤霉素、潮霉素、杀稻瘟菌素(blasticidin)、zeocin/博来霉素(bleomycin)或甲氨蝶呤,或利用已引入载体的宿主细胞上的营养缺陷的选择标记,例如谷氨酰胺合成酶(Bebbington等人,Biotechnology(N Y).1992Feb;10(2):169-75)。例如,二氢叶酸还原酶(DHFR)基因赋予对甲氨蝶呤的抗性,neo基因赋予对G418的抗性,土曲霉(*Aspergillus terreus*)的bsd基因赋予对杀稻瘟菌素的抗性,嘌呤霉素N-乙酰转移酶赋予对嘌呤霉素的抗性,Sh ble基因产物赋予对zeocin的抗性,以及由大肠杆菌潮霉素抗性基因(hyg或hph)赋予的对潮霉素的抗性。选择标记(如DHFR或谷氨酰胺合成酶)还可用于与MTX和MSX结合的扩增技术。

[0174] 可以使用标准技术,例如电穿孔、核转染、磷酸钙沉淀、脂质体转染、基于聚阳离子的转染(例如基于聚乙烯亚胺(PEI)的转染和DEAE-葡聚糖转染)将表达载体转染至宿主细胞中。

[0175] 用于表达本文提供的抗体、其抗原结合片段或其变体的适合的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞),例如CHO-K1、CHO-S、CHO-K1SV[包括dhfr-CHO细胞,记载于Urlaub和Chasin,(1980)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4220和Urlaub等人,Cell.1983Jun;33(2):405-12,与DHFR选择标记一起使用,例如,在R.J.Kaufman和P.A.Sharp(1982)Mol.Biol.159:601-621中所记载;以及其他敲除细胞[其在Fan等人,Biotechnol Bioeng.2012Apr;109(4):1007-15中举例说明]、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞、HEK293细胞、HKB11细胞、BHK21细胞、CAP细胞、EB66细胞和SP2细胞。

[0176] 在以下表达系统中的表达还可能是瞬时或半稳定的:例如HEK293、HEK293T、HEK293-EBNA、HEK293E、HEK293-6E、HEK293-Freestyle、HKB11、Expi293F、293EBNALT75、CHO Freestyle、CHO-S、CHO-K-K1SV、CHOEBNALT85、CHOS-XE、CHO-3E7或CAP-T细胞(例如,Durocher等人,Nucleic Acids Res.2002 Jan 15;30(2):E9)。

[0177] 在一些实施方案中,表达载体被设计成使得表达的蛋白质分泌至宿主细胞在其中生长的培养基中。使用标准蛋白质纯化方法可以从培养基中回收抗体、其抗原结合片段或其变体。

[0178] 在昆虫细胞中的表达

[0179] 在昆虫宿主细胞中表达异源蛋白包括使用基于DNA载体的表达(例如重组质粒)或使用基于病毒的表达系统(例如杆状病毒表达系统(BEVS))。使用基于昆虫病毒的载体瞬时表达目标蛋白使用来自病毒的调控序列和衍生物,所述病毒例如苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)多衣壳核多角体病毒(AcMNPV)、家蚕(*Bombyx mori*)核多角体病毒(BmNPV)和黄杉毒蛾(*Orgyia pseudotsugata*)多衣壳核多角体病毒(OpMNPV)。用于昆虫宿主细胞表达的优选调控序列包括使用BmNPV IE-1反式激活因子、BmNPV HR3增强子和

Bm细胞质肌动蛋白启动子 (Farrell, Lu等人1998), 来自果蝇 (*Drosophila*) 肌动蛋白5c基因 (ac5) 的启动子区域 (Chung, Yang-Tsung等人1990)、来自OpMNPV的OpIE2启动子、来自AcMNPV的多角体蛋白 (poh) 和IE1启动子, 以及来自AcMNPV的增强子元件hr 1至hr5 (Ren, Linzhu等人2011)。

[0180] 抗体或抗原的表达可以是组成型或受调控的 (例如, 通过添加或去除小分子诱导物 (如四环素) 与用于昆虫细胞的野生型或修饰的四环素响应表达系统 (TRES) 相结合来诱导 (Wu, Tzong-Yuan等人2000), 或通过添加硫酸铜或氯化镉与果蝇金属硫蛋白基因启动子相结合来诱导 (Bunch, Thomas等人1988))。

[0181] 重组表达载体还可以包括复制起点和选择标记, 例如针对哺乳动物细胞所描述的那些。此外, 还可以包括用于简易克隆的位点特异性重组载体。该位点特异性重组区包括但不限于源自重组酶 (例如Flp和Cre) 的那些, 和所述重组酶的各自结合位点FRT和Lox以及这些的修饰版本 (Jensen, Ida 2017)。还可以使用转座酶和靶向转座子序列 (例如Mu, Tn7、IFP2、piggyback) 和这些的改造版本实现位点特异性重组 (Wang, Yongjie 2010)。可以使用标准技术, 例如电穿孔、核转染、磷酸钙沉淀、脂质体转染、基于聚阳离子的转染 (例如如在哺乳动物细胞表达系统中的基于聚乙烯亚胺 (PEI) 的转染和DEAE-葡聚糖转染) 将表达载体转染至宿主细胞中。

[0182] 本文提供的用于病毒载体、抗体、其抗原结合片段或其变体的瞬时或组成性表达的适合的昆虫宿主细胞包括但不限于草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 衍生的Sf21和Sf9、粉纹夜蛾 (*Trichopulsia ni*) 衍生的Tn5和High-Five、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 衍生的S2细胞以及这些的衍生物。

[0183] 在一些实施方案中, 表达载体被设计成使得表达的蛋白质分泌至宿主细胞在其中生长的培养基中。使用标准蛋白质纯化方法可以从培养基中回收抗体、其抗原结合片段或其变体。

[0184] 纯化

[0185] 本发明的抗体或其抗原结合片段或其变体可以通过熟知的方法从重组细胞培养物中回收和纯化, 所述熟知的方法包括但不限于硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、蛋白A层析、蛋白G层析、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。高效液相色谱 (“HPLC”) 也可用于纯化。参见, 例如, Colligan, *Current Protocols in Immunology*, 或 *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley&Sons, NY, NY, (1997-2001), 例如, 第1、4、6、8、9、10章, 各自以引用的方式全部并入本文。

[0186] 本发明的抗体或其抗原结合片段或其变体包括天然纯化的产物、化学合成过程的产物和通过重组技术从真核宿主 (包括, 例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞) 产生的产物。取决于在重组生产过程中使用的宿主, 本发明的抗体可以是糖基化的或可以是非糖基化的。此类方法在许多标准实验室手册中记载, 例如Sambrook, 同上, 第17.37-17.42节; Ausubel, 同上, 第10、12、13、16、18和20章。

[0187] 在优选实施方案中, 将抗体纯化 (1) 至大于95重量%的抗体, 其例如通过Lowry法、UV-Vis光谱法或通过SDS-毛细管凝胶电泳 (例如在Caliper LabChip GXII、GX 90或Biorad Bioanalyzer装置上) 来测定, 并且在其他优选实施方案中超过99重量%, (2) 至足以获得N

端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)至均质,其通过在还原或非还原条件下的SDS-PAGE,使用考马斯蓝或优选银染。分离的天然存在的抗体包括重组细胞内原位的抗体,因为抗体天然环境的至少一种成分将不存在。但是,通常,通过至少一个纯化步骤制备分离的抗体。

[0188] 根据本发明的一个实施方案,来自受试者的组织或液体样本为选自以下的至少一种:

- [0189] • 心脏组织,
- [0190] • 脉管系统,
- [0191] • 肺组织,
- [0192] • 肾组织,
- [0193] • 肝组织,
- [0194] • 肌肉组织,
- [0195] • 皮肤组织和/或
- [0196] • 血液。

[0197] 根据本发明的另一个实施方案,人或动物受试者

- [0198] • 患有,
- [0199] • 有风险发展为,和/或
- [0200] • 被诊断为
- [0201] 选自心脏、肾脏、肺、心血管、心肾和/或心肺疾病的病症。

[0202] 根据本发明的另一个实施方案,人或动物受试者

- [0203] • 患有,
- [0204] • 有风险发展为,和/或
- [0205] • 被诊断为

[0206] 选自慢性肾病(CKD)、糖尿病肾病(DKD)和心力衰竭(HF)(如射血分数保留的心力衰竭(HFpEF))的病症。

[0207] 根据本发明的另一个实施方案,人或动物受试者至少在特定靶组织中包含无血红素 β 1亚基的sGC。如所讨论的,所述靶组织可以为选自心脏组织、脉管系统、肺组织、肾组织、肝组织、肌肉组织、皮肤组织和/或血液的至少一种。

[0208] 根据本发明的另一个实施方案,确定样品的特征是否在于包含无血红素 β 1亚基的sGC的存在、上调或过表达的步骤为选自以下的至少一种:

- [0209] • ELISA
- [0210] • 免疫组织化学
- [0211] • 免疫印迹
- [0212] • 免疫沉淀
- [0213] • 放射免疫测定,和/或
- [0214] • 原位PCR

[0215] ELISA(酶联免疫吸附测定)是基于平板的测定技术,其设计用于检测和量化物质(例如肽、蛋白质、抗体和激素)。其他名称,例如酶免疫分析(EIA),也用于描述相同的技术。

[0216] 原位聚合酶链式反应(原位PCR)是一种强大的方法,其可检测冷冻的或石蜡包埋

的细胞或组织切片中的微量的稀有或单拷贝数的核酸序列,用于在细胞内定位这些序列。该方法的原理包括组织固定(以保持细胞形态)和随后的蛋白水解消化处理(为PCR试剂提供通向靶DNA的途径)。靶序列通过这些试剂扩增,然后通过标准免疫细胞化学方案进行检测。原位PCR结合了PCR或RT-PCR扩增的灵敏度以及对同一样本进行形态学分析的能力,因此它是诊断应用中有吸引力的工具。

[0217] 免疫组织化学(IHC),有时简称为免疫染色,涉及通过利用抗体特异性结合至生物组织中的抗原的原理,对组织切片细胞中的抗原(蛋白)进行选择性地成像的过程。IHC的名字来源于词根“免疫(immuno)”,指所述过程中使用的抗体,而“组织(histo)”意指组织(相对于免疫细胞化学)。

[0218] 免疫印迹,通常称为蛋白质印迹,是一种广泛使用的技术,用于通过抗体识别特定抗原。这涉及通过抗原-抗体特异性区域鉴定通常在复杂混合物中的蛋白质靶标。蛋白质通常被施加到凝胶上,根据大小、电荷或其他差异通过电泳分离,然后电泳转移至膜(通常是聚偏二氟乙烯或硝基纤维素)上。转移的蛋白质与膜表面结合,提供与抗体反应的通道用于检测。通过在含有蛋白质(酪蛋白或牛血清白蛋白)或洗涤剂-封闭剂的溶液中孵育膜来封闭所有剩余的结合位点。在用一抗探测特定靶标后,抗体-抗原复合物通过多种方法(例如荧光、化学发光)进行可视化,允许检测特定靶蛋白。

[0219] 免疫沉淀是一种下拉测定技术,其设计用于从复杂混合物中分离物质,例如肽、蛋白质、核酸、聚糖、化学制品和激素。靶物质(还称为猎物)的分离是由之前与大颗粒(例如带有或不带磁芯的琼脂糖(sepharose)或琼脂糖(agarose)珠)偶联的抗体/免疫球蛋白(还称为捕获抗体或诱饵)的特异性结合介导的。一旦靶物质与大颗粒-抗体复合物结合,可以使用物理方法(例如离心或磁力吸引)将其从复杂混合物中分离。在严格洗涤后,可以使用极端pH、高温、高盐浓度、洗涤剂、正构(orthosteric)或变构(allosteric)竞争剂、酶消化或任何其他破坏特异性抗体结合的实体或条件从下拉珠中洗脱靶物质。

[0220] 放射免疫测定(RIA)是一种使用放射性标记分子逐步形成免疫复合物的免疫测定。RIA是一种非常灵敏的用于测量物质浓度的体外测定技术,其通常通过使用抗体来测量抗原浓度(例如,血液中的激素水平)。

[0221] 根据本发明的另一方面,提供了选择性结合至sGC的单克隆抗体、或其靶标结合片段或衍生物、或抗体模拟物或适配体。

[0222] 根据本发明的另一个实施方案,包含以下至少一种的抗体、片段或衍生物

[0223] a) 3条重链CDR和3条轻链CDR的组,该组选自根据表1的列表,和/或

[0224] b) 3条重链CDR和3条轻链CDR的组,该组包含在表2的VH和VL序列中,和/或

[0225] c) a)或b)的重链CDR/轻链CDR组合,条件是相对于a)或b)中指定的各个CDR,CDR中的至少一个具有最高达3个氨基酸置换,同时保持其与包含无血红素β1亚基的sGC结合的能力,和/或

[0226] d) a)或b)的重链CDR/轻链CDR组合,条件是相对于a)或b)中指定的各个CDR,CDR中的至少一个具有≥66%的序列同一性,同时保持其与包含无血红素β1亚基的sGC结合的能力,

[0227] 其中CDR嵌入适合的蛋白框架中以便能够结合包含无血红素β1亚基的sGC。

[0228] 关于选项b),重要的是要理解在抗体的VH/VL序列为已知的情况下,CDR序列可以

用计算方法确定,例如在Kunik V,Ashkenazi S和Ofran Y,Nucleic Acids Research,第40卷,第W1期,2012年7月1日,第W521-W524页中所公开的。

[0229] 表1:本文公开的抗体的CDR序列

抗体名称	3条重链CDR和3条轻链CDR的组
[0230] TPP15715	LCDR1(SEQ ID NO 1)
	LCDR2(SEQ ID NO 2)
	LCDR3(SEQ ID NO 3)
	HCDR1(SEQ ID NO 5)
	HCDR2(SEQ ID NO 6)

[0231]

	HCDR3(SEQ ID NO 7)
TPP15717	LCDR1(SEQ ID NO 9)
	LCDR2(SEQ ID NO 1)
	LCDR3(SEQ ID NO 11)
	HCDR1(SEQ ID NO 13)
	HCDR2(SEQ ID NO 14)
	HCDR3(SEQ ID NO 15)
TPP16284	LCDR1(SEQ ID NO 17)
	LCDR2(SEQ ID NO 18)
	LCDR3(SEQ ID NO 19)
	HCDR1(SEQ ID NO 21)
	HCDR2(SEQ ID NO 22)
	HCDR3(SEQ ID NO 23)
TPP15714	LCDR1(SEQ ID NO 32)
	LCDR2(SEQ ID NO 33)
	LCDR3(SEQ ID NO 34)
	HCDR1(SEQ ID NO 36)
	HCDR2(SEQ ID NO 37)
	HCDR3(SEQ ID NO 38)
TPP15718	LCDR1(SEQ ID NO 40)
	LCDR2(SEQ ID NO 41)
	LCDR3(SEQ ID NO 42)
	HCDR1(SEQ ID NO 44)
	HCDR2(SEQ ID NO 45)
	HCDR3(SEQ ID NO 46)
TPP15720	LCDR1(SEQ ID NO 48)
	LCDR2(SEQ ID NO 49)
	LCDR3(SEQ ID NO 50)
	HCDR1(SEQ ID NO 52)
	HCDR2(SEQ ID NO 53)
	HCDR3(SEQ ID NO 54)
TPP15721	LCDR1(SEQ ID NO 56)
	LCDR2(SEQ ID NO 57)
	LCDR3(SEQ ID NO 58)

[0232]		HCDR1(SEQ ID NO 60)
		HCDR2(SEQ ID NO 61)
		HCDR3(SEQ ID NO 62)
	TPP15722	LCDR1(SEQ ID NO 64)
		LCDR2(SEQ ID NO 65)
		LCDR3(SEQ ID NO 66)
		HCDR1(SEQ ID NO 68)
		HCDR2(SEQ ID NO 69)
		HCDR3(SEQ ID NO 70)
	TPP19355	LCDR1(SEQ ID NO 72)
		LCDR2(SEQ ID NO 73)
		LCDR3(SEQ ID NO 74)
		HCDR1(SEQ ID NO 76)
		HCDR2(SEQ ID NO 77)
		HCDR3(SEQ ID NO 78)
	TPP19361	LCDR1(SEQ ID NO 80)
		LCDR2(SEQ ID NO 81)
		LCDR3(SEQ ID NO 82)
HCDR1(SEQ ID NO 84)		
HCDR2(SEQ ID NO 85)		
HCDR3(SEQ ID NO 86)		

[0233] 表2: 本文公开的抗体的重链/轻链可变域序列对

抗体名称	VL/VH 序列
TPP15715	VL(SEQ ID NO 4)
	VH(SEQ ID NO 8)
TPP15717	VL(SEQ ID NO 12)
	VH (SEQ ID NO 16)
TPP16284	VL(SEQ ID NO 20)
	VH(SEQ ID NO 24)
TPP15714	VL(SEQ ID NO 35)
	VH(SEQ ID NO 39)
TPP15718	VL(SEQ ID NO 43)
	VH(SEQ ID NO 47)

[0235]	TPP15720	VL(SEQ ID NO 51)
		VH(SEQ ID NO 55)
	TPP15721	VL(SEQ ID NO 59)
		VH(SEQ ID NO 63)
	TPP15722	VL(SEQ ID NO 67)
		VH(SEQ ID NO 71)
	TPP19355	VL(SEQ ID NO 75)
		VH(SEQ ID NO 79)
	TPP19361	VL(SEQ ID NO 83)
		VH(SEQ ID NO 87)

[0236] 表3:本文公开的抗体的全长轻链/重链序列对

	抗体名称	LC/LH 序列
	TPP15715	LC (SEQ ID NO 26)
		HC (SEQ ID NO 27)
	TPP15717	LC (SEQ ID NO 28)
		HC (SEQ ID NO 29)
	TPP16284	LC (SEQ ID NO 30)
		HC (SEQ ID NO 31)
	TPP15714	VL(SEQ ID NO 88)
		VH(SEQ ID NO 89)
[0237]	TPP15718	VL(SEQ ID NO 90)
		VH(SEQ ID NO 91)
	TPP15720	VL(SEQ ID NO 92)
		VH(SEQ ID NO 93)
	TPP15721	VL(SEQ ID NO 94)
		VH(SEQ ID NO 95)
	TPP15722	VL(SEQ ID NO 96)
		VH(SEQ ID NO 97)
	TPP19355	VL(SEQ ID NO 98)
		VH(SEQ ID NO 99)
	TPP19361	VL(SEQ ID NO 100)
		VH(SEQ ID NO 101)

[0238] 根据本发明的另一个实施方案,优选抗体为TPP16284、TPP19355和TPP19361。

[0239] 根据本发明的另一个实施方案,优选抗体为TPP16284和TPP19355。

[0240] 在一个实施方案中,相对于各个CDR,CDR中的至少一个具有 $\geq 66\%$ 、优选 $\geq 67\%$ 、更优选 $\geq 68\%$ 、 $\geq 69\%$ 、 $\geq 70\%$ 、 $\geq 71\%$ 、 $\geq 72\%$ 、 $\geq 73\%$ 、 $\geq 74\%$ 、 $\geq 75\%$ 、 $\geq 76\%$ 、 $\geq 77\%$ 、 $\geq 78\%$ 、 $\geq 79\%$ 、 $\geq 80\%$ 、 $\geq 81\%$ 、 $\geq 82\%$ 、 $\geq 83\%$ 、 $\geq 84\%$ 、 $\geq 85\%$ 、 $\geq 86\%$ 、 $\geq 87\%$ 、 $\geq 88\%$ 、 $\geq 89\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 91\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 93\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 的序列同一性或最优选 $\geq 99\%$ 的序列同一性。在另一个实施方案中,CDR中的至少一个已经通过亲和力成熟或其他修饰进行了修饰,产生相对于以上公开的序列的序列修饰。

[0241] 在一个实施方案中,相对于a)或b)中指定的各个CDR,CDR中的至少一个具有最高达2个,优选1个氨基酸置换。

[0242] 根据本发明的另一个实施方案,所述抗体、片段或衍生物包含

[0243] a) 根据表2的重链/轻链可变域序列对

[0244] b) a)的重链/轻链可变域序列对,条件是相对于表2中示出的各个SEQ ID No,其序列中的至少一个具有 $\geq 80\%$ 的序列同一性,同时保持其与包含无血红素B1亚基的sGC结合的能力,和/或

[0245] c) a)的重链/轻链可变域序列对,条件是相对于表2中示出的各个SEQ ID No,其序列中的至少一个具有最高达10个氨基酸置换,同时保持其与包含无血红素B1亚基的sGC结合的能力。

[0246] 根据本发明的另一个实施方案,所述抗体、片段或衍生物包含

[0247] a) 根据表3的全长轻链/重链序列对

[0248] b) a)的全长轻链/重链序列对,条件是相对于表3中示出的各个SEQ ID No,其序列中的至少一个具有 $\geq 80\%$ 的序列同一性,同时保持其与包含无血红素B1亚基的sGC结合的能力,和/或

[0249] c) a)的全长轻链/重链序列对,条件是相对于表3中示出的各个SEQ ID No,其序列中的至少一个具有最高达10个氨基酸置换,同时保持其与包含无血红素B1亚基的sGC结合的能力。

[0250] 在一个实施方案中,相对于表2或3中示出的各个SEQ ID No,序列中的至少一个具有 $\geq 81\%$ 、优选 $\geq 82\%$ 、更优选 $\geq 83\%$ 、 $\geq 84\%$ 、 $\geq 85\%$ 、 $\geq 86\%$ 、 $\geq 87\%$ 、 $\geq 88\%$ 、 $\geq 89\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 91\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 93\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 的序列同一性或最优选 $\geq 99\%$ 的序列同一性。

[0251] 在一个实施方案中,相对于表2中示出的各个SEQ ID No,序列中的至少一个具有最高达9个,优选最高达8个,更优选最高达7、6、5、4、3或2个并且最优选最高达1个氨基酸置换。

[0252] 根据本发明的另一个实施方案,至少一个如上所讨论的氨基酸置换是保守氨基酸置换。“保守氨基酸置换”比非保守置换对抗体功能具有更小的影响。尽管存在分类氨基酸的许多方法,但通常基于其结构和其R基团的一般化学特征将它们分为6个主要组。

[0253] 在一个实施方案中,“保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的置换。例如,在本领域已经限定了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有以下侧链的氨基酸

[0254] • 碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸),

[0255] • 酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸),

[0256] • 不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸),

[0257] • 非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸),

[0258] • β -支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和

[0259] • 芳香侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0260] 其他保守的氨基酸置换还可以跨氨基酸侧链家族而发生,例如当用天冬酰胺置换天冬氨酸以改变肽的电荷时。因此,例如,预测的HR结构域多肽中的非必需氨基酸残基优选由来自相同侧链家族或跨家族同系物(例如天冬酰胺置换天冬氨酸,谷氨酰胺置换谷氨酸)的另一个氨基酸残基取代。保守改变还可包括化学同源的非天然氨基酸的置换(即合成的非天然疏水性氨基酸取代亮氨酸,合成的非天然芳香族氨基酸取代色氨酸)。

[0261] 根据本发明的另一个实施方案,所述抗体

[0262] • 与由上述序列定义的抗体之一相比,对包含无血红蛋白 β 1亚基的sGC具有 $\geq 50\%$ 的靶标结合亲和力,如通过SPR测量,和/或

[0263] • 与由上述序列定义的抗体之一竞争结合包含无血红蛋白 β 1亚基的sGC。

[0264] 如本文所用,术语“竞争结合”用于指代由上述序列定义的抗体之一,意指实际抗体结合至相同的靶标、或靶表位或结构域或亚结构域的活性与上述序列定义的抗体一样,并且是后者的变体,或相关的或不同的。结合的效率(例如,动力学或热力学)可以与后者的效率相同或大于或小于后者的效率。例如,两种抗体的结合底物的平衡结合常数可能不同。

[0265] 根据本发明的另一个实施方案,抗体、片段或衍生物、或抗体模拟物或适配体用可检测标记标记。

[0266] 此类可检测标记是例如酶、发光标记、荧光标记、磷光标记、不透射线标记、放射性标记、可被另一种结合剂检测的部分、包含核苷酸的标记等。所述标记可以共价或非共价结合抗体、片段或衍生物、或抗体模拟物或适配体。

[0267] 根据本发明的另一方面,提供了用于根据任何上述描述的方法中的伴随诊断,该伴随诊断包含选择性结合包含无血红蛋白 β 1亚基的sGC的结合分子。伴随诊断(CDx)是一种用于治疗药物的伴随,以确定其对特定人的适用性的诊断测试或试剂盒。伴随诊断通常与药物共同开发,以根据确定治疗应答者和非应答者的生物学特征,帮助选择或排除用该特定药物治疗的患者组。伴随诊断基于伴随生物标志物开发,这些生物标志物可前瞻性地帮助预测可能的反应或严重毒性。

[0268] 根据一个实施方案,所述结合分子是抗体,或其保留靶标结合能力的片段或衍生物、抗体模拟物或适配体。

[0269] 根据另一个实施方案,所述结合分子是单克隆抗体、其片段或衍生物、或抗体模拟物或适配体,如本文另外所述。

[0270] 根据本发明的另一方面,提供了一种用治疗有效量的可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的激动剂治疗人或动物受试者的方法,所述人或动物受试者

[0271] • 患有,

[0272] • 有风险发展为,和/或

[0273] • 被诊断为

[0274] 选自心脏、肾脏、肺、心血管、心肾和/或心肺疾病的病症,该病症的进一步特征在于至少在特定靶组织中包含无血红素β1亚基的sGC的存在、上调或过表达。

[0275] 根据本发明的另一方面,提供了一种用治疗有效量的可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的活化剂治疗人或动物受试者的方法,所述人或动物受试者

[0276] • 患有,

[0277] • 有风险发展为,和/或

[0278] • 被诊断为

[0279] 选自心脏、肾脏、肺、心血管、心肾和/或心肺疾病的病症,该病症的进一步特征在于至少在特定靶组织中包含无血红素β1亚基的sGC的存在、上调或过表达。

[0280] 根据本发明的另一方面,提供了可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的活化剂(用于制备)治疗人或动物受试者(的药物)中的用途,所述人或动物受试者

[0281] • 患有或

[0282] • 有风险发展为

[0283] • 被诊断为,

[0284] 选自心脏、肾脏、肺、心血管、心肾和/或心肺疾病的病症,该病症的进一步特征在于至少在特定靶组织中包含无血红素β1亚基的sGC的存在、上调或过表达。

[0285] 根据本发明的另一方面,提供了一种用于确定人或动物受试者是否适于用可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的活化剂治疗的试剂盒,该试剂盒包含选择性结合包含无血红素β1亚基的sGC的结合分子。

[0286] 在一个实施方案中,所述结合分子为抗体,或其保留靶标结合能力的片段或衍生物,或抗体模拟物,或适配体。在另一个实施方案中,所述结合分子为本文所述的单克隆抗体、片段或衍生物。在另一个实施方案中,所述单克隆抗体、其片段或衍生物包含来自本文公开列表的至少一个VH/VL对,或其如本文公开的修饰变体。

[0287] 序列表

[0288] 以下序列构成本申请的公开内容的一部分。本申请还提供了与WIPO ST 25兼容的电子序列表。为避免疑问,如果下表中的序列与电子序列表中的序列存在差异,则该表中的序列应视为正确的。注意VH代表重链可变域,VL代表轻链可变域,CDR代表互补决定区。

编号	合格者		序列
[0289] 1	TPP15715_VL_5H10	LCDR1	TGSSSNIGAGYDVH

[0290]

2	TPP15715_VL_5H10	LCDR2	ENDRRPS
3	TPP15715_VL_5H10	LCDR3	AAWDDSLNGPL
4	TPP15715_VL_5H10	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVH WYQQLPGTAPKLLIYENDRRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPLFGGGT KLTVL
5	TPP15715_VH_5H10	HCDR1	NYAMS
6	TPP15715_VH_5H10	HCDR2	AISGSGGSTFYADSVKG
7	TPP15715_VH_5H10	HCDR3	DGTDAFDI
8	TPP15715_VH_5H10	VH	EVQLLESGLVQPGSLRLSCAASGFTFSNYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDGTDAF DIWGQGLVTVSS
9	TPP15717_VL_5D2	LCDR1	TGSSSNIGAGYVVH
10	TPP15717_VL_5D2	LCDR2	NNSQRPP
11	TPP15717_VL_5D2	LCDR3	ASWDDSLSGVV
12	TPP15717_VL_5D2	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYVVH WYQQLPGTAPKLLIYNNSQRPPGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLRSEDEADYYCASWDDSLSGVVFVGGGT KLTVL
13	TPP15717_VH_5D2	HCDR1	SYAMS
14	TPP15717_VH_5D2	HCDR2	AISGSGGSTYYADSVKG
15	TPP15717_VH_5D2	HCDR3	EQWLGAEGAFDI
16	TPP15717_VH_5D2	VH	EVQLLESGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEQWL AEGAFDIWGQGLVTVSS
17	TPP16284_VL_5C6	LCDR1	SGSSNIGNNAVN
18	TPP16284_VL_5C6	LCDR2	GNSNRPS
19	TPP16284_VL_5C6	LCDR3	QSYDSSLGV
20	TPP16284_VL_5C6	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNAVNW YQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGVVFGGGTKL TVL
21	TPP16284_VH_5C6	HCDR1	SYAMS
22	TPP16284_VH_5C6	HCDR2	GVSWNGSRTHYADSVKG

23	TPP16284_VH_5C6	HCDR3	ERLGKWFYFDL
24	TPP16284_VH_5C6	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRTHYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERLG KWYFDLWGRGTLTVSS
25	>sp Q02153-2 GUCYB1_鸟苷酸 环化酶可溶性亚基 β-1 的人同 种型 HSGC-2 OS=智人 OX=9606 GN=GUCY1B1		MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEE GQFLVRIHYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGEILQM FGKMFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDAL HDHLATIYPGMRAPSFRCCTDAEKGKGLILHYYSER EGLQDIVIGIHKTVAAQIHGTEIDMKVIQRNEECD HTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFEENGTQESRISPY TFCKAFPFIIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGN CSLLSVFSLVRPHIDISFHGILSHINTVFVLRKEGLL DVEKLECEDELGTGTEISCLRLKGQMIYLPEADSILF LCSPSVMNLDDLTRRGLYLSDIPLHDATRDLVLLG EQFREEYKLTQELEILTDRLQLTLRALEDEKKT TGIVGFNAFCSKHASGEGAMKIVNLLNDLYTRFDT LTDSRKNPFVYKVVETVGDKYMTVSGLPEPCIHHA RSICHLALDMMEIAGQVQVDGESVQITIGIHTGEV VTGVIGQRMPLYCLFGNTVNLTSRTETTGEK GKIN VSEYTYRCLMSPENSDPQFHLEHRGPVSMK GKKE PMQVWFLSRKNTGTEETKQDDD
26	TPP15715_5H10 全长轻链		QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVH WYQQLPGTAPKLLIYENDRRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLRSEDEADYYCAA WDDSLNGPLFGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLPFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS
27	TPP15715_5H10 全长重链		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTFYADSVKGRFTI SRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDGTDAF DIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP

[0291]

[0292]

		PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
28	TPP15717 全长轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVVH WYQQLPGTAPKLLIYNNSQRPPGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLRSEDEADYYCASWDDSLSGVVFVGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLPFPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGA V T V A W K A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S
29	TPP15717 全长重链	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A T E Q W L G A E G A F D I W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
30	TPP16284 全长轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVNW YQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGVFVGGGTKL TVLGQPKAAPSVTLPFPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKY AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS

[0293]

31	TPP16284 全长重链		EVQLLES GGGLVQP GGSRLR LSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGK GLEWVSGVSWNGSRTHYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERLG KWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWKYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV D KSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	TPP15714_VL_6B8	LCDR1	SGSSSNIGSNYVY
33	TPP15714_VL_6B8	LCDR2	RNNQRPS
34	TPP15714_VL_6B8	LCDR3	TAWDDSLSAVV
35	TPP15714_VL_6B8	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYW YQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEADYYCTAWDDSLSAVVFGGGT KLTVL
36	TPP15714_VH_6B8	HCDR1	NYVMS
37	TPP15714_VH_6B8	HCDR2	GVSWSNGSRTHYVDSVKR
38	TPP15714_VH_6B8	HCDR3	GLRYSSPFDF
39	TPP15714_VH_6B8	VH	EVQLLES GGGLVQP GGSRLR LSCAASGFTFSSNYVMS WVRQAPGK GLEWVSGVSWNGSRTHYVDSVKRRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLRY SSPFDFWG QGTLVTVSS
40	TPP-15718_VL_5A1	LCDR1	SGSSSNIGSNTVN
41	TPP-15718_VL_5A1	LCDR2	GNSNRPS
42	TPP-15718_VL_5A1	LCDR3	AVWDDSLNGWV
43	TPP-15718_VL_5A1	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNW YQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEADYYCAVWDDSLNGWVFGGGT KLTVL
44	TPP-15718_VH_5A1	HCDR1	RYGIH
45	TPP-15718_VH_5A1	HCDR2	VISYDGTNKYYADSVKG

46	TPP-15718_VH_5A1	HCDR3	ARSRWASLGAFDI
47	TPP-15718_VH_5A1	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGIH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGTNKYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARARSR WASLGAFDIWGQGLVTVSS
48	TPP-15720_VL_4G10	LCDR1	SGSGSNIGNNAVN
49	TPP-15720_VL_4G10	LCDR2	GNSNRPS
50	TPP-15720_VL_4G10	LCDR3	QSYGTSLSGSRVL
51	TPP-15720_VL_4G10	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSGSNIGNNAVN WYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLRSEDEADYYCQSYGTSLSGSRVLFGG GTKLTVL
52	TPP-15720_VH_4G10	HCDR1	KYWMH
53	TPP-15720_VH_4G10	HCDR2	SVSASGGSIIYADSVRG
54	TPP-15720_VH_4G10	HCDR3	GPFWSGYYRLDGLVDY
55	TPP-15720_VH_4G10	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRKYWM HWVRQTPGKGLEWVSSVSASGGSIIYADSVRGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPFW SGYYRLDGLVDYWGQGLVTVSS
56	TPP-15721_VL_4G5	LCDR1	SGSSSNIGNNAVN
57	TPP-15721_VL_4G5	LCDR2	RDDRLPS
58	TPP-15721_VL_4G5	LCDR3	SSYTTSSTVV
59	TPP-15721_VL_4G5	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVNW YQQLPGTAPKLLIYRDDRLPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEADYYCSSYTTSSTVVFGGGTKLTVL
60	TPP-15721_VH_4G5	HCDR1	RYAMS
61	TPP-15721_VH_4G5	HCDR2	GVSWNGSRTHYVGSVKR
62	TPP-15721_VH_4G5	HCDR3	ERLGKWFYDL
63	TPP-15721_VH_4G5	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMS WVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRTHYVGSVKRRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERLG KWYFDLWGQGLVTVSS
64	TPP-15722_VL_2A9	LCDR1	SGRSNIGSSVVS
65	TPP-15722_VL_2A9	LCDR2	GNNQRPS
66	TPP-15722_VL_2A9	LCDR3	TSYAGSNNLV

[0294]

67	TPP-15722_VL_2A9	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRNIGSSVVS WYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEADYYCTSYAGSNLNVFGGGTKL TVL	
68	TPP-15722_VH_2A9	HCDR1	SYSMN	
69	TPP-15722_VH_2A9	HCDR2	YISRSSGAIYYADSVKG	
70	TPP-15722_VH_2A9	HCDR3	ERLGKWFYFDL	
71	TPP-15722_VH_2A9	VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISRSSGAIYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERLGK WYFDLWGQGLTVTVSS	
72	TPP19355_VL_19C9	LCDR1	TGSSSNIGAGYDVH	
73	TPP19355_VL_19C9	LCDR2	GNSNRPS	
74	TPP19355_VL_19C9	LCDR3	SSYTQNSTRL	
75	TPP19355_VL_19C9	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVH WYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLRSEDEADYYCSSYTQNSTRLFGGGTK LTVL	
[0295]	76	TPP19355_VH_19C9	HCDR1	SYSMH
	77	TPP19355_VH_19C9	HCDR2	AISGSGGSTYYADSVKG
	78	TPP19355_VH_19C9	HCDR3	TPRRWGWSALDY
	79	TPP19355_VH_19C9	VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMH WVRQGP G KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTPRRW GWSALDYWGQGLTVTVSS
	80	TPP19361_VL_21C2	LCDR1	TGSSSNIGAGYDVH
	81	TPP19361_VL_21C2	LCDR2	GNSNRPS
	82	TPP19361_VL_21C2	LCDR3	AAWDDSVSGWV
	83	TPP19361_VL_21C2	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVH WYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSVSGWVFGGG TKLTVL
	84	TPP19361_VH_21C2	HCDR1	SYAMS
	85	TPP19361_VH_21C2	HCDR2	AISGSGGSTYYADSVKG
	86	TPP19361_VH_21C2	HCDR3	EVWGYSYDYVDY
	87	TPP19361_VH_21C2	VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS

[0296]

		WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVWGY SGYDYVDYWGQGLTVTVSS
88	TPP-15714_6B8 全长轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYW YQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEADYYCTAWDDSLSAVVFVGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS
89	TPP-15714_6B8 全长重链	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYVMS WVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRTHYVDSVKRRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRLRY SSPFDWVGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV D KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
90	TPP-15718_5A1 全长轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNW YQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEADYYCAVWDDSLNGWVFVGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS
91	TPP-15718_5A1 全长重链	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGIH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGTNKYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARARSR WASLGAFDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV

[0297]

		NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
92	TPP-15720_4G10 全长轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSGSNIGNNAVN WYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLRSEDEADYYCQSYGTSLSGSRVLFGG GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVC LISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
93	TPP-15720_4G10 全长重链	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRKYWM HWVRQTPGKGLEWVSSVSASGSIYYADSVRGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPFW SGYYRLDGLVDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
94	TPP-15721_4G5 全长轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVNW YQQLPGTAPKLLIYRDDRLPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEADYYCSSYTTSSVVFVGGGTKLT VLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCCLISDFY PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP TECS

[0298]

95	TPP-15721_4G5 全长重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMS WVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRTHYVGSVKRRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERLG KWYFDLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
96	TPP-15722_2A9 全长轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRNIGSSVSW YQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEADYYCTSYAGSNNLVFGGGTKL TVLGQPKAAPSVTLPFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKY AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS
97	TPP-15722_2A9 全长重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISRSSGAIYYADSVKGRFTI SRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERLGK WYFDLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0299]

98	TPP-19355_19C9 全长轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVH WYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLRSEDEADYYCSSYTQNSTRFLFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKY AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS
99	TPP-19355_19C9 全长重链	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMH WVRQGP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTPRRW GWSALDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
100	TPP-19361_21C2 全长轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVH WYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSVSGWVFGGG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS
101	TPP-19361_21C2 全长重链	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVWGY SGYDYVDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV

[0300]		<p>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG</p>
--------	--	---

[0301] 实验和附图

[0302] 尽管已经在附图和前述说明书中详细说明和描述了本发明,但是这样的说明和描述被认为是说明性或示例性的,而非限制性的;本发明不限于所公开的实施方案。通过研究附图、公开内容和所附权利要求,本领域技术人员在实践所要求保护的本发明时可以理解和实现所公开的实施方案的其他变型。任何参考标号不应被解释为限制范围。本文公开的全部氨基酸序列从N-末端到C-末端显示;本文公开的所有核酸序列均显示为5'→3'。

[0303] 材料和方法

[0304] 细胞培养

[0305] 将地贫夜蛾 (Sf9) 在含有1%青霉素/链霉素的Sf-900 III培养基中,在27°C 100rpm下常规培养。在使用补充有10%胎牛血清 (FCS) 的相同培养基的Sf9细胞中产生重组大鼠可溶性鸟苷酸环化酶 (sGC) 蛋白。为了表达大鼠wt-sGC,在杆状病毒感染前30分钟,还将0.1mM 5-氨基乙酰丙酸添加到培养物中。

[0306] 杆状病毒原液

[0307] 将编码大鼠 $\alpha 1$ 亚基的序列克隆至pVL1393中,其与strep标记序列($\alpha 1$ -StrepII)或源自水泡性口炎病毒 (VSV-G) 的糖蛋白的肽序列融合,随后是6xHis标记($\alpha 1$ -VSV-His),均位于 $\alpha 1$ 亚基的C端。将编码大鼠sGC的 $\beta 1$ 亚基和用苯丙氨酸取代血红素配体组氨酸的变体($\beta 1$ -H105F)的序列也克隆至pVL1393中。在H015F中,F105置换H105消除了血红素的结合,因为H105对血红素结合sGC非常重要。使用FlashBAC杆状病毒表达系统(Oxford Expression Technologies)生成重组杆状病毒,在Sf9细胞中扩增后,将杆状病毒原液储存在4°C。

[0308] 使用杆状病毒表达载体系统在Sf9细胞中产生重组大鼠wt-sGC和apo-sGC

[0309] 将生长至 $5-7 \times 10^6$ 细胞/mL的细胞密度的Sf9细胞,在感染前在新鲜培养基中稀释至 2×10^6 细胞/mL。将Sf9细胞用编码 $\beta 1$ HF和 $\alpha 1$ -StrepII或 $\alpha 1$ -VSV-His的杆状病毒原液以感染复数(MOI) 1.5 (0.5 $\alpha 1$:1 $\beta 1$ HF) 共感染,以在C端分别产生与Strep标记融合的大鼠apo-sGC或与VSV-G-His标记融合的大鼠apo-sGC。为了产生大鼠wt-sGC,将Sf9细胞与编码 $\alpha 1$ -StrepII和 $\beta 1$ 亚基的杆状病毒以MOI 4 (2 $\alpha 1$:2 $\beta 1$) 共感染。在27°C 100rpm下生长72小时后,通过以800xg、20min和4°C离心收集细胞,并将颗粒用于蛋白分离。

[0310] 含有重组大鼠wt-sGC和apo-sGC的细胞提取物的制备

[0311] 将 2×10^6 个Sf9细胞(表达在C端与Strep标记或VSV-G-His标记融合的大鼠apo-sGC)的颗粒以 1.4×10^7 细胞/mL重悬在50mM TAE pH7.6、0.5mM EDTA、7mM GSH、0.2mM PMSF、1 μ M胃酶抑素A和1 μ M亮抑蛋白酶肽(leupeptin)中,并在4°C下超声0.6秒。通过在13000xg、15min和4°C下离心去除细胞碎片,且将上清液立即用于活性测定和噬菌体展示。

[0312] 大鼠wt-sGC和apo-sGC的纯化

[0313] 所有纯化步骤均在4℃下进行。收集后,将细胞颗粒重新悬浮在裂解缓冲液(50mM TAE pH7.4、1mM EDTA、10mM DTT和1片抗蛋白酶混合物/50mL缓冲液)中,并用Avestin C5匀浆器在600bar下匀浆。将匀浆液在4℃下用250nM抗生物素蛋白和1mM PMSF孵育30分钟,并且以30000xg 1小时30分钟和4℃离心。将上清液过滤并立即以1mL/min上样至Tricorn 10/100中,其含有预先用缓冲液W(100mM Tris pH8、1M NaCl、1mM EDTA、1mM苯甲脒和10mM DTT)平衡的链球菌素(streptactin)超流大容量树脂。用至少10CV洗涤柱子后,用补充2.5mM脱硫生物素的缓冲液W洗脱蛋白。合并洗脱峰中包含的所有级分,并通过连续离心在50kDa-amicon中将其浓缩。此时,将大鼠wt-sGC进一步用0.5%吐温20在37℃下处理20分钟,以产生无血红素版本的wt蛋白。纯化的最后一步包括尺寸排阻色谱。为此,将浓缩的wt-和apo形式的sGC分别上样至Superdex 200 16/600柱上,该柱预先用配方缓冲液(50mM TAE pH7.6、150mM NaCl、1mM EDTA、10mM DTT、1mM苯甲脒和10%甘油)平衡。将含有蛋白质二聚体状态的级分合并,在50kDa-amicon中浓缩,速冻并在-80℃下储存在低蛋白质结合管中。通过SDS-Page评估蛋白的纯度,并通过Bradford法测定蛋白浓度。

[0314] 通过噬菌体展示选择大鼠apo-sGC结合分子

[0315] 使用BIOINVENT **n-CoDeR®** Fab Lambda Library选择靶向大鼠apo-sGC的抗体。使用预先用小鼠抗-VSV-G单克隆抗体(P5D4)包被的Dynabeads™ M-280绵羊抗小鼠IgG,从 1×10^7 Sf9细胞的粗提取物中分离与 $\alpha 1$ 亚基C端的VSV-G表位标记基因融合的大鼠apo-sGC。或者,将纯化的在C端与Strep标记融合的重组大鼠apo-sGC蛋白包被到Streptavidin Dynabeads™ M-280。通过将来自BIOINVENT **n-CoDeR®** Fab Lambda Library的约 10^{13} 噬菌体颗粒添加至用大鼠apo-sGC覆盖的磁性Dynabeads中,进行大鼠apo-sGC结合分子的分离。在4℃下孵育1小时后,彻底清洗未结合的噬菌体颗粒。使用具有结合噬菌体的磁性颗粒在37℃下感染处于指数生长阶段的大肠杆菌HB101F'菌株30分钟,使噬菌体从磁珠转移至细菌进行感染。保留氨苄青霉素抗性细菌并用于产生用于随后选择轮次的噬菌体颗粒。对于该策略,进行了三轮选择。使用已经描述的标准方法进行选择的噬菌体的保留、噬菌体基因III融合体的去除和单个克隆的分离。

[0316] 测定重新格式化为完整IgG的选定sFab的物种apo选择性

[0317] 为了通过ELISA测定单个IgG从带有血红素的版本中区分apo(无血红素)版本的大鼠sGC的能力,将5 μ g/mL的每种单独的IgG在Nunc®maxisorp 96孔板中包被,4℃下过夜。在至少16小时的吸附期后,在加入预先用0.5%(v/v)吐温处理的纯化的大鼠wt sGC蛋白以去除血红素基团(或未处理从而保留血红素)之前,用PBS-3%脱脂牛奶(v/v)封闭包被的maxisorp板。使用链霉亲和素-HRP检测出通过重新格式化的IgG分子成功捕获无血红素或带有血红素的wt大鼠sGC分子。

[0318] 通过蛋白质印迹(WB)和免疫组织化学(IHC)确定生物样本中选定的IgG的apo选择性。

[0319] 为了确定获得的抗体的apo选择性,在以下物质上测试选定的sFab的结合:a)纯化的sGC,包括WT sGC、氧化的WT sGC(+/-吐温,ODQ)和apo sGC(H105F),b)来自过表达sGC的细胞的细胞提取物,包括过表达WT sGC的细胞(处理的+/-ODQ)和过表达apo sGC(H105F)的细胞,c)来自表达sGC和处理的+/-ODQ的细胞系和原代细胞的细胞提取物,d)来自不同物种

的组织器官匀浆液,所述物种包括小鼠(例如WT和kiki小鼠)、大鼠(例如WT和RenTG或ZSF-1大鼠)和人体组织,包括但不限于心脏、肾脏和肺组织,以及e)来自不同物种的组织切片,所述物种包括小鼠(例如WT和kiki小鼠)、大鼠(例如WT和RenTG或ZSF-1大鼠)和人体组织,包括但不限于心脏、肾脏和肺组织。

[0320] 读出技术为根据WB和IHC的标准实验室方案进行的石蜡包埋和冷冻包埋组织切片的蛋白质印迹(WB)和免疫组织化学(IHC)。

[0321] 对于WB,例如使用变性凝胶和天然凝胶。除了选定的sFab,还测试了阴性对照AB(即TPP-9809)和阳性对照WT sGC(商业抗sGC α 1抗体和抗sGC β 1抗体)。测定条件包括,对于重组蛋白——0.1 μ g/泳道,150V运行3h;4-12%NuPage Bis Tris,MES。

[0322] 对于IHC,将样本解剖、速冻、OCT嵌入和冷冻保存。切割和固定后,用1xPBS缓冲液洗涤并染色载玻片,用5%DKS+0.5%皂苷(saponing)封闭,然后用一抗孵育过夜,洗涤3次(每次4分钟)后用二抗孵育60分钟。

[0323] 测定选定的sFab的物种交叉反应性

[0324] 为了测定单个IgG结合不同sGC直向同源物的能力,使用了大鼠和人sGC的突变H105F apo形式。简言之,将5 μ g/mL的每种单独的IgG在Nunc®maxisorp孔板中在4°C下包被过夜。在至少16小时的吸附期后,在加入大鼠或人sGC突变蛋白前,用PBS-3%脱脂牛奶(v/v)封闭包被的maxisorp板。用链霉亲和素-HRP检测出通过重新格式化的IgG分子成功捕获大鼠或人apo-sGC分子。

[0325] 重组可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的体外活化

[0326] 使用和不使用硝普钠以及使用和不使用血红素依赖性sGC抑制剂1H-1,2,4-噁二唑并[4,3a]喹啉-1-酮(ODQ),本发明的化合物对重组可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)调节的研究,通过以下参考文献中详细描述的方法进行:M.Hoenicka,E.M.Becker,H.Apeler,T.Sirichoke,H.Schroeder,R.Gerzer和J.-P.Stasch,"Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system:Stimulation by YC-1,nitric oxide,and carbon oxide",J.Mol.Med.77(1999),14-23。通过向样本缓冲液中加入吐温20(终浓度为0.5%)获得无血红素的鸟苷酸环化酶。

[0327] 如在WO 2012/139888中所记载的,sGC活化剂与NO供体2-(N,N-二乙氨基)-二氮烯2-氧化物(DEA/NO)的组合显示无协同作用,即DEA/NO的作用没有像对通过血红素依赖性机制起作用的sGC调节剂所预期的那样增强。此外,本发明的sGC活化剂的作用不被1H-1,2,4-噁二唑并[4,3a]喹啉-1-酮(ODQ)(一种可溶性鸟苷酸环化酶的血红素依赖性抑制剂)阻断,反而实际上被提高了。因此,该测试适用于区分血红素依赖性sGC刺激剂和血红素非依赖性sGC活化剂。

[0328] 附图

[0329] 图1和图7-9示出了如在上述实验部分描述的所述先导(lead)发现过程中通过ELISA获得的抗体的结果。可以确定十种抗体(TPP15715、TPP15717、TPP16284、TPP15714、TPP15718、TPP15720、TPP15721、TPP15722、TPP19355和TPP19361),其对无血红素的sGC(通过吐温处理获得)具有纳摩尔亲和力,而同种型对照(TPP9809和TPP5657)不结合。然后进一步分析TPP15715、TPP15717和TPP16284。通过SPR确定的亲和力如下:

	K_D (WT 大鼠 sGC 无血红素(吐温处理))	K_D (WT 大鼠 sGC 带有血红素)	
[0330]	TPP15715	50 nM	不结合
	TPP15717	42 nM	不结合
	TPP16284	139 nM	不结合
[0331]	TPP9809(同种型对照)	不结合	不结合

[0332] 图2-4和图10-13示出了十种各个IgG对来自大鼠和人的apo-sGC (H105F) 的物种反应性。发现十种选择的抗体结合大鼠和人的无血红素sGC。然后进一步分析TPP15715、TPP15717和TPP16284。通过SPR测定的亲和力如下：

	K_D (大鼠apo-sGC (H105F))	K_D (人apo-sGC (H105F))	
[0333]	TPP15715	59nM	148nM
	TPP15717	45nM	72nM
	TPP16284	67nM	146nM
	TPP9809 (同种型对照)	不结合	不结合

[0334] 图5A和B示出了抗体筛选过程的细节。

[0335] 参考文献

[0336] Bunch等人,Nucleic Acids Res. (1988)Feb 11;16 (3) :1043-61

[0337] Chung等人,Mol Cell Biol. (1990)Dec 10 (12) :6172-80

[0338] Evgenov等人,Nat Rev Drug Discov. (2006) Sep;5 (9) :755-68.

[0339] Farrell等人,Biotechnol Bioeng. (1998)Dec 20;60 (6) :656-63

[0340] Follmann等人,J. Med Chem (2017) Jun;22;60 (12) :5146-5161

[0341] Hoenicka等人, (1999) J Mol Med Jan;77 (1) :14-23

[0342] Hoet等人,Nature Biotechnology (2005) Mar;23 (3) ,344-348

[0343] Jensen等人,Protein J. (2017) Aug;36 (4) :332-342

[0344] Kunik等人,Nucleic Acids Res. (2012) ,40:W521-524

[0345] Ren等人,Afr J Biotechnol. (2011) 10 (44) :8930-8941

[0346] Stasch等人,Nature (2001) Mar 8;410 (6825) :212-5

[0347] Stasch等人,Br. J. Pharmacol. Jul;136 (2002) ,773-783

[0348] Stasch等人,J. Clin. Invest. Sep;116 (2006) ,2552-2561

[0349] Stasch&Hobbs,Handb Exp Pharmacol. (2009) ;191:277-308

[0350] Wang等人,J Virol Methods (2010) Jul;167 (1) :95-9

[0351] Wu等人,J Biotechnol. (2000) Jun 9;80 (1) :75-83

序列表

<110> 拜耳公司

<120> 确定受试者是否适于用可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的激动剂治疗的方法

<130> CP1210615P

<150> EP 19152338.0

<151> 2019-01-17

<160> 101

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 1

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 2

Glu Asn Asp Arg Arg Pro Ser

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 3

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Leu

1 5 10

<210> 4

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 4

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

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 5

Asn Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 6

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

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 7

Asp Gly Thr Asp Ala Phe Asp Ile

1 5

<210> 8

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 8

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Thr Asp Gly Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 9

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His

1 5 10

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 10
 Asn Asn Ser Gln Arg Pro Pro
 1 5
 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 11
 Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Val Val
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 12
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
 Tyr Val Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Asn Asn Ser Gln Arg Pro Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Ser
 85 90 95
 Leu Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 13

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 14

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 15

Glu Gln Trp Leu Gly Ala Glu Gly Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 16

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 16

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 17

Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn
 1 5 10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 18

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 19

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Val
 1 5 10

<210> 20
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 20
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30
 Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
 85 90 95
 Ser Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 21
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5
 <210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 22

Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly
<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工抗体序列
<400> 23
Glu Arg Leu Gly Lys Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10
<210> 24
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工抗体序列
<400> 24
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Leu Gly Lys Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 25
<211> 586
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工抗体序列

<400> 25

Met Tyr Gly Phe Val Asn His Ala Leu Glu Leu Leu Val Ile Arg Asn
 1 5 10 15
 Tyr Gly Pro Glu Val Trp Glu Asp Ile Lys Lys Glu Ala Gln Leu Asp
 20 25 30
 Glu Glu Gly Gln Phe Leu Val Arg Ile Ile Tyr Asp Asp Ser Lys Thr
 35 40 45
 Tyr Asp Leu Val Ala Ala Ala Ser Lys Val Leu Asn Leu Asn Ala Gly
 50 55 60
 Glu Ile Leu Gln Met Phe Gly Lys Met Phe Phe Val Phe Cys Gln Glu
 65 70 75 80
 Ser Gly Tyr Asp Thr Ile Leu Arg Val Leu Gly Ser Asn Val Arg Glu
 85 90 95
 Phe Leu Gln Asn Leu Asp Ala Leu His Asp His Leu Ala Thr Ile Tyr
 100 105 110
 Pro Gly Met Arg Ala Pro Ser Phe Arg Cys Thr Asp Ala Glu Lys Gly
 115 120 125
 Lys Gly Leu Ile Leu His Tyr Tyr Ser Glu Arg Glu Gly Leu Gln Asp
 130 135 140
 Ile Val Ile Gly Ile Ile Lys Thr Val Ala Gln Gln Ile His Gly Thr
 145 150 155 160
 Glu Ile Asp Met Lys Val Ile Gln Gln Arg Asn Glu Glu Cys Asp His
 165 170 175
 Thr Gln Phe Leu Ile Glu Glu Lys Glu Ser Lys Glu Glu Asp Phe Tyr
 180 185 190
 Glu Asp Leu Asp Arg Phe Glu Glu Asn Gly Thr Gln Glu Ser Arg Ile
 195 200 205
 Ser Pro Tyr Thr Phe Cys Lys Ala Phe Pro Phe His Ile Ile Phe Asp
 210 215 220
 Arg Asp Leu Val Val Thr Gln Cys Gly Asn Ala Ile Tyr Arg Val Leu
 225 230 235 240
 Pro Gln Leu Gln Pro Gly Asn Cys Ser Leu Leu Ser Val Phe Ser Leu
 245 250 255
 Val Arg Pro His Ile Asp Ile Ser Phe His Gly Ile Leu Ser His Ile
 260 265 270
 Asn Thr Val Phe Val Leu Arg Ser Lys Glu Gly Leu Leu Asp Val Glu
 275 280 285
 Lys Leu Glu Cys Glu Asp Glu Leu Thr Gly Thr Glu Ile Ser Cys Leu
 290 295 300

Arg Leu Lys Gly Gln Met Ile Tyr Leu Pro Glu Ala Asp Ser Ile Leu
 305 310 315 320
 Phe Leu Cys Ser Pro Ser Val Met Asn Leu Asp Asp Leu Thr Arg Arg
 325 330 335
 Gly Leu Tyr Leu Ser Asp Ile Pro Leu His Asp Ala Thr Arg Asp Leu
 340 345 350
 Val Leu Leu Gly Glu Gln Phe Arg Glu Glu Tyr Lys Leu Thr Gln Glu
 355 360 365
 Leu Glu Ile Leu Thr Asp Arg Leu Gln Leu Thr Leu Arg Ala Leu Glu
 370 375 380
 Asp Glu Lys Lys Lys Thr Asp Thr Gly Ile Val Gly Phe Asn Ala Phe
 385 390 395 400
 Cys Ser Lys His Ala Ser Gly Glu Gly Ala Met Lys Ile Val Asn Leu
 405 410 415
 Leu Asn Asp Leu Tyr Thr Arg Phe Asp Thr Leu Thr Asp Ser Arg Lys
 420 425 430
 Asn Pro Phe Val Tyr Lys Val Glu Thr Val Gly Asp Lys Tyr Met Thr
 435 440 445
 Val Ser Gly Leu Pro Glu Pro Cys Ile His His Ala Arg Ser Ile Cys
 450 455 460
 His Leu Ala Leu Asp Met Met Glu Ile Ala Gly Gln Val Gln Val Asp
 465 470 475 480
 Gly Glu Ser Val Gln Ile Thr Ile Gly Ile His Thr Gly Glu Val Val
 485 490 495
 Thr Gly Val Ile Gly Gln Arg Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly Asn
 500 505 510
 Thr Val Asn Leu Thr Ser Arg Thr Glu Thr Thr Gly Glu Lys Gly Lys
 515 520 525
 Ile Asn Val Ser Glu Tyr Thr Tyr Arg Cys Leu Met Ser Pro Glu Asn
 530 535 540
 Ser Asp Pro Gln Phe His Leu Glu His Arg Gly Pro Val Ser Met Lys
 545 550 555 560
 Gly Lys Lys Glu Pro Met Gln Val Trp Phe Leu Ser Arg Lys Asn Thr
 565 570 575
 Gly Thr Glu Glu Thr Lys Gln Asp Asp Asp
 580 585

<210> 26

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 26

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

<210> 27

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 27

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Asp Gly Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305		310		315		320									
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				325					330						335
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
				340					345						350
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
				355					360						365
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
				370					375						380
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
385															400
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				405											415
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
				420											430
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
				435											445
<210>	28														
<211>	217														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	人工抗体序列														
<400>	28														
Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln
1				5					10					15	
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Gly
				20					25					30	
Tyr	Val	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu
				35				40						45	
Leu	Ile	Tyr	Asn	Asn	Ser	Gln	Arg	Pro	Pro	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe
				50				55						60	
Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu
65					70					75				80	
Arg	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Trp	Asp	Asp	Ser
				85						90				95	
Leu	Ser	Gly	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly
				100						105				110	
Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu

115	120	125
Glu Leu Gln Ala Asn Lys	Ala Thr Leu Val Cys Leu	Ile Ser Asp Phe
130	135	140
Tyr Pro Gly Ala Val Thr	Val Ala Trp Lys Ala Asp	Ser Ser Pro Val
145	150	155
Lys Ala Gly Val Glu Thr	Thr Thr Pro Ser Lys Gln	Ser Asn Asn Lys
165	170	175
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr	Leu Ser Leu Thr Pro Glu	Gln Trp Lys Ser
180	185	190
His Arg Ser Tyr Ser Cys	Gln Val Thr His Glu Gly	Ser Thr Val Glu
195	200	205
Lys Thr Val Ala Pro Thr	Glu Cys Ser	
210	215	
<210> 29		
<211> 450		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工抗体序列		
<400> 29		
Glu Val Gln Leu Leu Glu	Ser Gly Gly Gly Leu Val	Gln Pro Gly Gly
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys	Ala Ala Ser Gly Phe Thr	Phe Ser Ser Tyr
20	25	30
Ala Met Ser Trp Val Arg	Gln Ala Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Val
35	40	45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser	Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr	Ala Asp Ser Val
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile	Ser Arg Asp Asn Ser Lys	Asn Thr Leu Tyr
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu	Arg Ala Glu Asp Thr Ala	Val Tyr Tyr Cys
85	90	95
Ala Thr Glu Gln Trp Leu	Gly Ala Glu Gly Ala Phe	Asp Ile Trp Gly
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr	Val Ser Ser Ala Ser Thr	Lys Gly Pro Ser
115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro	Ser Ser Lys Ser Thr Ser	Gly Gly Thr Ala
130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val	Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	Pro Val Thr Val

145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
	165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
	180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His			
	195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys			
	210	215	220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly			
225	230	235	240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
	245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
	260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
	275	280	285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
	290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
305	310	315	320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
	325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
	340	345	350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
	355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
	370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
385	390	395	400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	435	440	445
Pro Gly			
450			

<210> 30
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 30
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30
 Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
 85 90 95
 Ser Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 100 105 110
 Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 115 120 125
 Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 165 170 175
 Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 180 185 190
 Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 195 200 205
 Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215
 <210> 31
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 32

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr
 1 5 10

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 33

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 37

Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Val Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Arg

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 38

Gly Leu Arg Tyr Ser Ser Pro Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 39

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 39

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Leu Arg Tyr Ser Ser Pro Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 44

Arg Tyr Gly Ile His

1 5

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 45

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 46

Ala Arg Ser Arg Trp Ala Ser Leu Gly Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 47
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 47
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Arg Ser Arg Trp Ala Ser Leu Gly Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 48
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 48
 Ser Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 49

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 50

Gln Ser Tyr Gly Thr Ser Leu Ser Gly Ser Arg Val Leu

1 5 10

<210> 51

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 51

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gly Ser Arg Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 52

Lys Tyr Trp Met His

1 5

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 53

Ser Val Ser Ala Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 54

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 54

Gly Pro Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Arg Leu Asp Gly Leu Val Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 55

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 55

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Lys Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Val Ser Ala Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

				85						90				95			
Ala	Arg	Gly	Pro	Phe	Trp	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Arg	Leu	Asp	Gly	Leu	Val		
				100						105				110			
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
				115						120				125			

<210> 56
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 56

Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Asn	Asn	Ala	Val	Asn
1				5						10		

<210> 57
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 57

Arg	Asp	Asp	Arg	Leu	Pro	Ser
1				5		

<210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 58

Ser	Ser	Tyr	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Val	Val
1				5					10

<210> 59
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 59

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

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 60

Arg Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 61

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 61

Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Val Gly Ser Val Lys
 1 5 10 15

Arg

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 62

Glu Arg Leu Gly Lys Trp Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 63

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 63

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Val Gly Ser Val

50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Leu Gly Lys Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 64

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 64

Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Ser Val Val Ser

1 5 10

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 65

Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 66

Thr Ser Tyr Ala Gly Ser Asn Asn Leu Val

1 5 10

<210> 67

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 67

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Ser

20 25 30

Val Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Ser Tyr Ala Gly Ser Asn

85 90 95

Asn Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 68

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 69

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 69

Tyr Ile Ser Arg Ser Ser Gly Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 70

Glu Arg Leu Gly Lys Trp Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 71

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 71

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser Gly Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 75

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

<210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 76

Ser	Tyr	Ser	Met	His
1				5

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 77

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

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 81
 Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 82
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 82
 Ala Ala Trp Asp Asp Ser Val Ser Gly Trp Val
 1 5 10
 <210> 83
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 83
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
 85 90 95
 Val Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 <210> 84

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工抗体序列
<400> 84
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5
<210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工抗体序列
<400> 85
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 86
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工抗体序列
<400> 86
Glu Val Trp Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Tyr Val Asp Tyr
1 5 10
<210> 87
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工抗体序列
<400> 87
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

	35		40		45														
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val				
	50					55					60								
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr				
65					70				75					80					
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85				90					95						
Ala	Arg	Glu	Val	Trp	Gly	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Val	Asp	Tyr	Trp				
			100					105					110						
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
	115						120												
<210>	88																		
<211>	216																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	人工抗体序列																		
<400>	88																		
Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln				
1				5					10					15					
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn				
			20					25					30						
Tyr	Val	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu				
		35					40						45						
Ile	Tyr	Arg	Asn	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser				
	50					55						60							
Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg				
65					70						75				80				
Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu				
				85					90					95					
Ser	Ala	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln				
			100					105						110					
Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu				
			115					120						125					
Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr				
	130					135							140						
Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Lys				
145					150					155					160				
Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr				

	165		170		175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His					
	180		185		190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys					
	195		200		205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser					
	210		215		
<210> 89					
<211> 448					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 人工抗体序列					
<400> 89					
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					
1	5		10		15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr					
	20		25		30
Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
	35		40		45
Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Val Asp Ser Val					
	50		55		60
Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr					
65	70		75		80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95
Ala Arg Gly Leu Arg Tyr Ser Ser Pro Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly					
	100		105		110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe					
	115		120		125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu					
	130		135		140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp					
145	150		155		160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu					
	165		170		175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser					
	180		185		190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro					

195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
225	230	235
240		
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
320		
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
400		
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445
<210> 90		
<211> 216		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工抗体序列		
<400> 90		
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln		

1	5	10	15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn			
	20	25	30
Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
	35	40	45
Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
	50	55	60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg			
65	70	75	80
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu			
	85	90	95
Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln			
	100	105	110
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu			
	115	120	125
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr			
	130	135	140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys			
145	150	155	160
Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr			
	165	170	175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His			
	180	185	190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys			
	195	200	205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
	210	215	
<210> 91			
<211> 451			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工抗体序列			
<400> 91			
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr			
	20	25	30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			

35	40	45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Ala Arg Ser Arg Trp Ala Ser Leu Gly Ala Phe Asp Ile Trp		
100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
115	120	125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
130	135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
145	150	155
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
165	170	175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
180	185	190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
195	200	205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
210	215	220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
225	230	235
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
290	295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
325	330	335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
340	345	350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly
 450
 <210> 92
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 92
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30
 Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Gly Thr Ser Leu
 85 90 95
 Ser Gly Ser Arg Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 115 120 125
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 130 135 140

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 145 150 155 160
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 165 170 175
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 180 185 190
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 195 200 205
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215
 <210> 93
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 93
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Lys Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Val Ser Ala Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Pro Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Arg Leu Asp Gly Leu Val
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450
 <210> 94
 <211> 215
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 94

```

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

```

<210> 95

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 95

305	310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
	325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
	340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
	355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
385	390	395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
	405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	435	440	445
<210> 96			
<211> 215			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工抗体序列			
<400> 96			
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln			
1	5	10	15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Ser			
	20	25	30
Val Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
	35	40	45
Ile Tyr Gly Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
	50	55	60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg			
65	70	75	80
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Ser Tyr Ala Gly Ser Asn			
	85	90	95
Asn Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro			
	100	105	110
Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu			

115	120	125
Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro		
130	135	140
Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala		
145	150	155
Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala		
165	170	175
Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg		
180	185	190
Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr		
195	200	205
Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
210	215	
<210> 97		
<211> 448		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工抗体序列		
<400> 97		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
20	25	30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Ser Gly Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Glu Arg Leu Gly Lys Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		

145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
	165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
	180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
	195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
	210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
225	230	235	240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
	245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
	260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
	275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
	290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
305	310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
	325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
	340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
	355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
385	390	395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
	405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	435	440	445

<210> 98

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 98

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

<210> 99

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工抗体序列

<400> 99

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Thr Pro Arg Arg Trp Gly Trp Ser Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly
 450
 <210> 100
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 100
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
 85 90 95

Val Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215
 <210> 101
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工抗体序列
 <400> 101
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Val Trp Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Tyr Val Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435	440	445
Ser Pro Gly		
450		

IgG对WT大鼠sGC（含有血红素或无血红素）的结合特异性

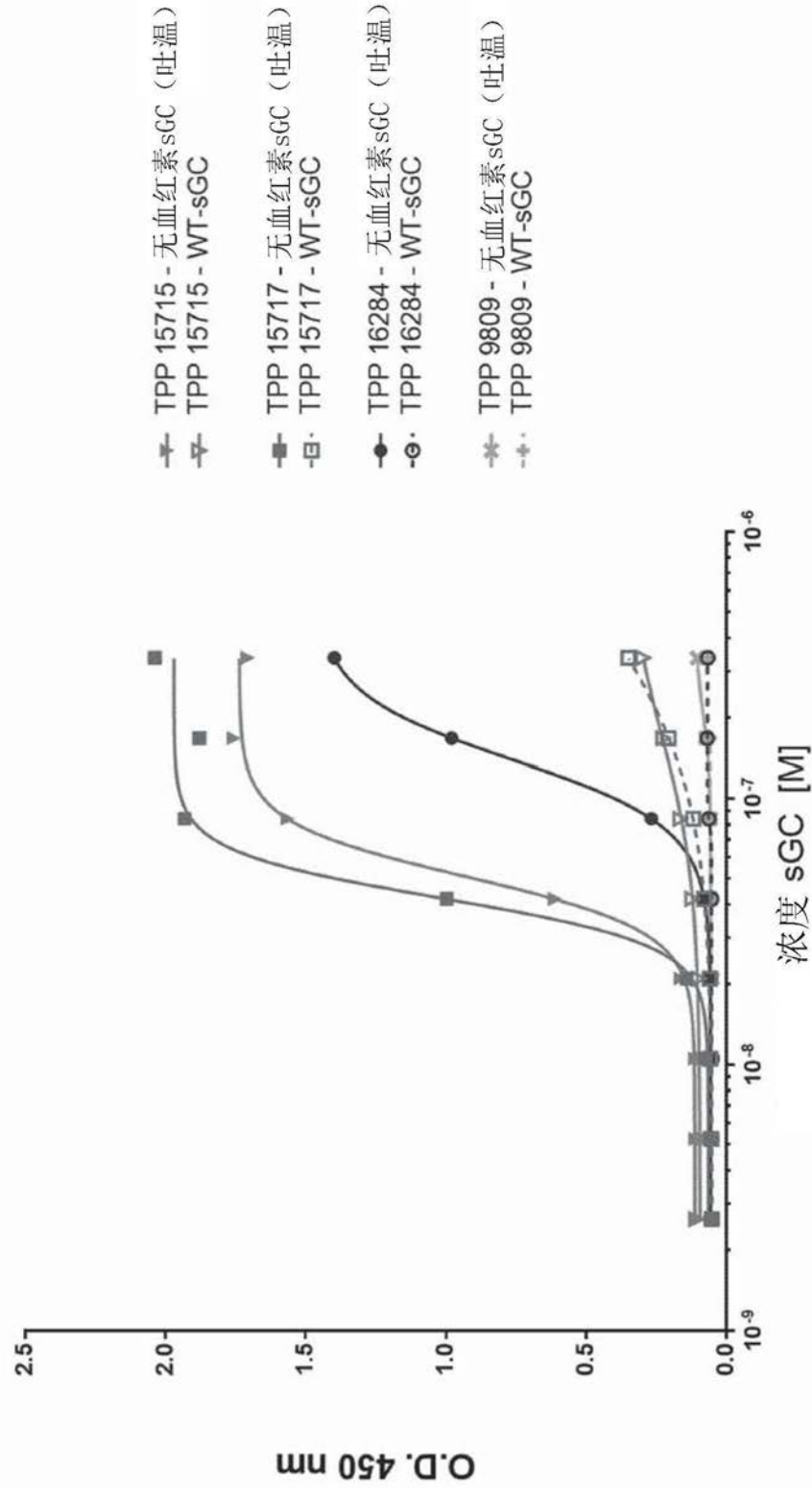


图1

IgG对来自大鼠和人的apo sGC (HI05F) 的物种反应性

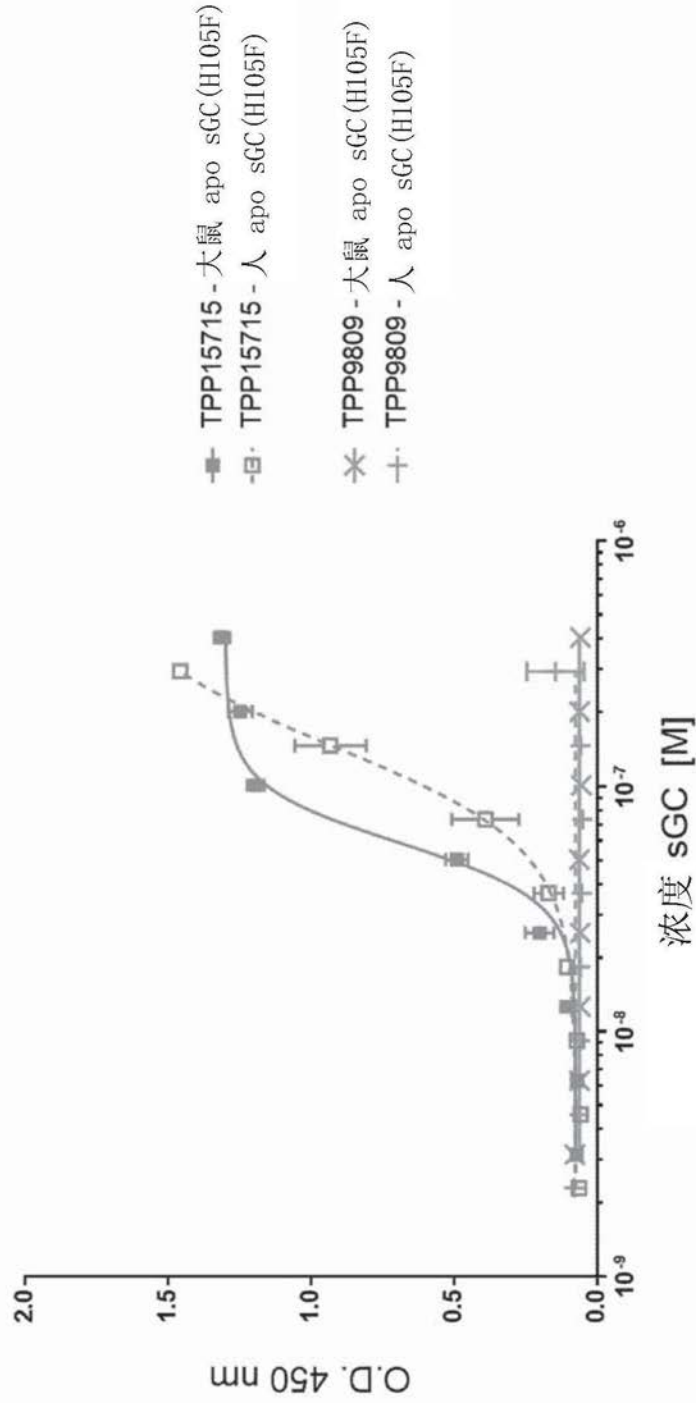


图2

IgG对来自大鼠和人的apo sGC (H105F) 的物种反应性

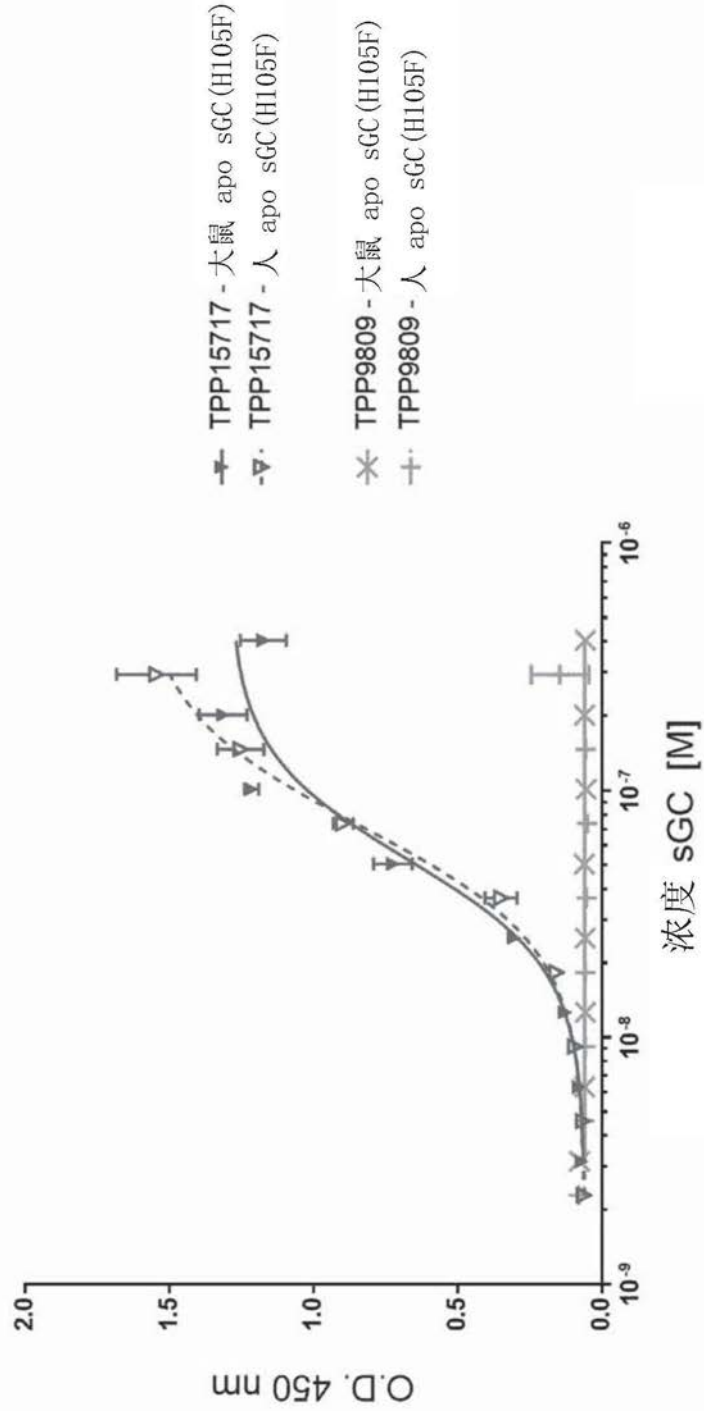


图3

IgG对来自大鼠和人的apo sGC (H105F) 的物种反应性

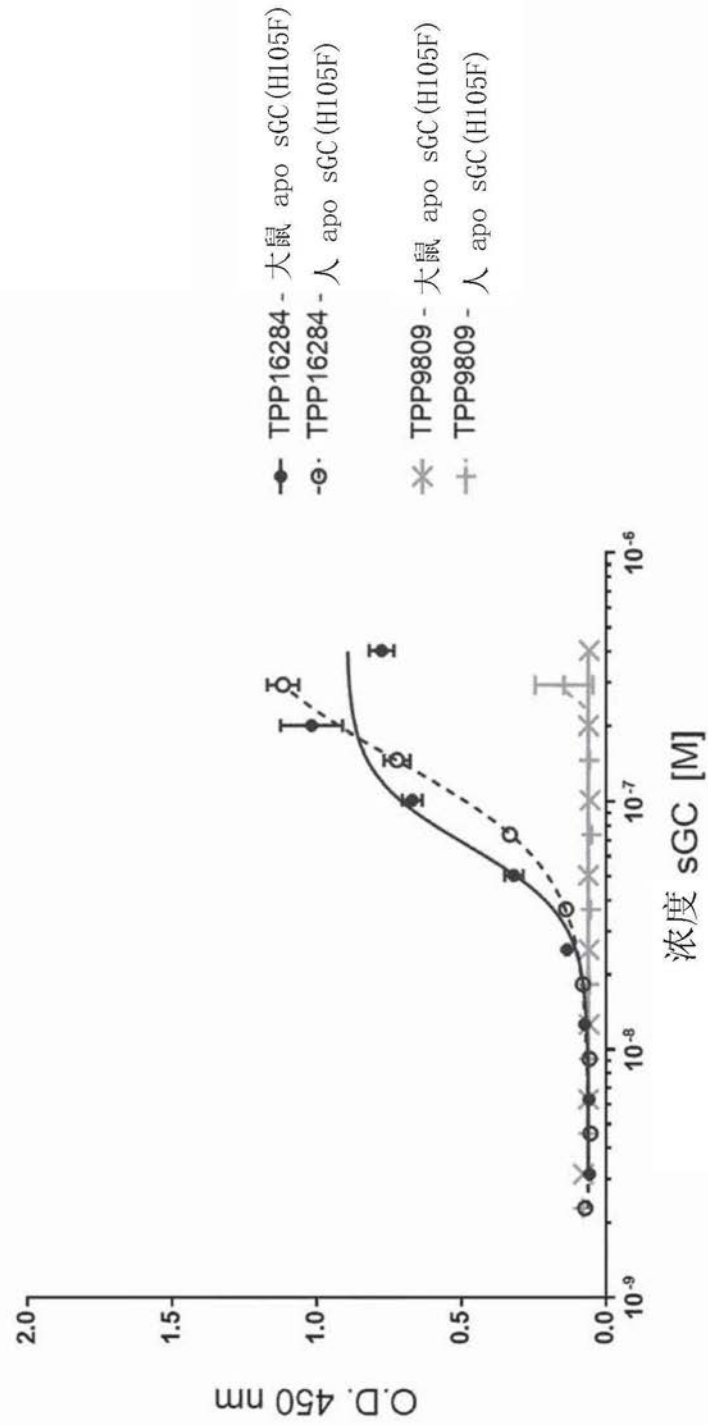


图4

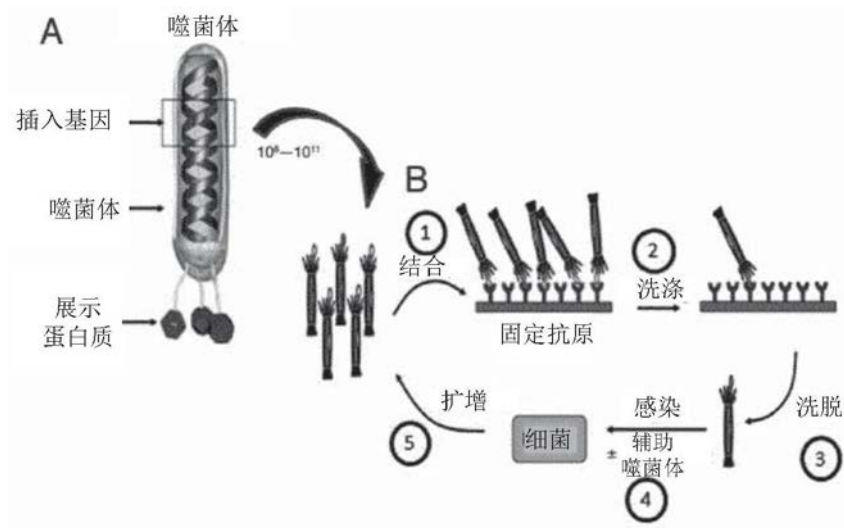


图5A

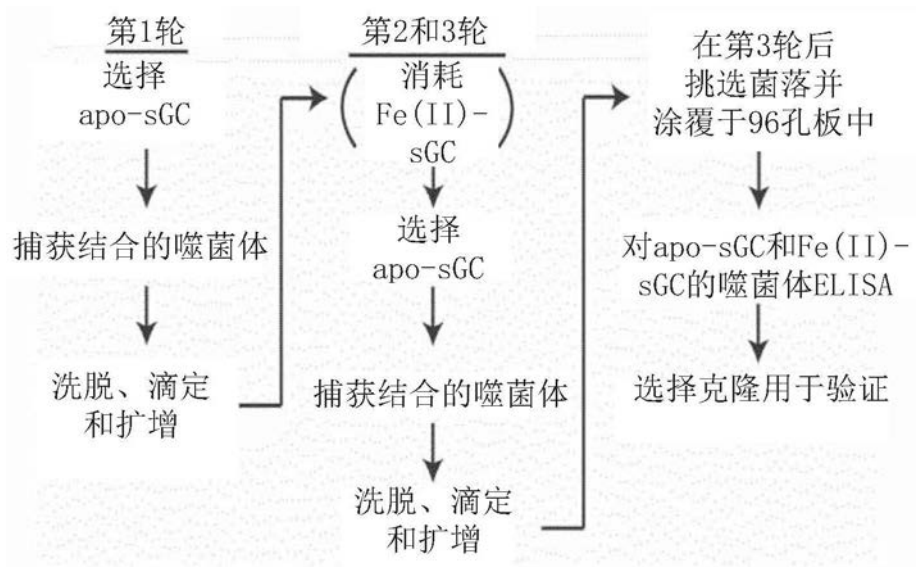


图5B

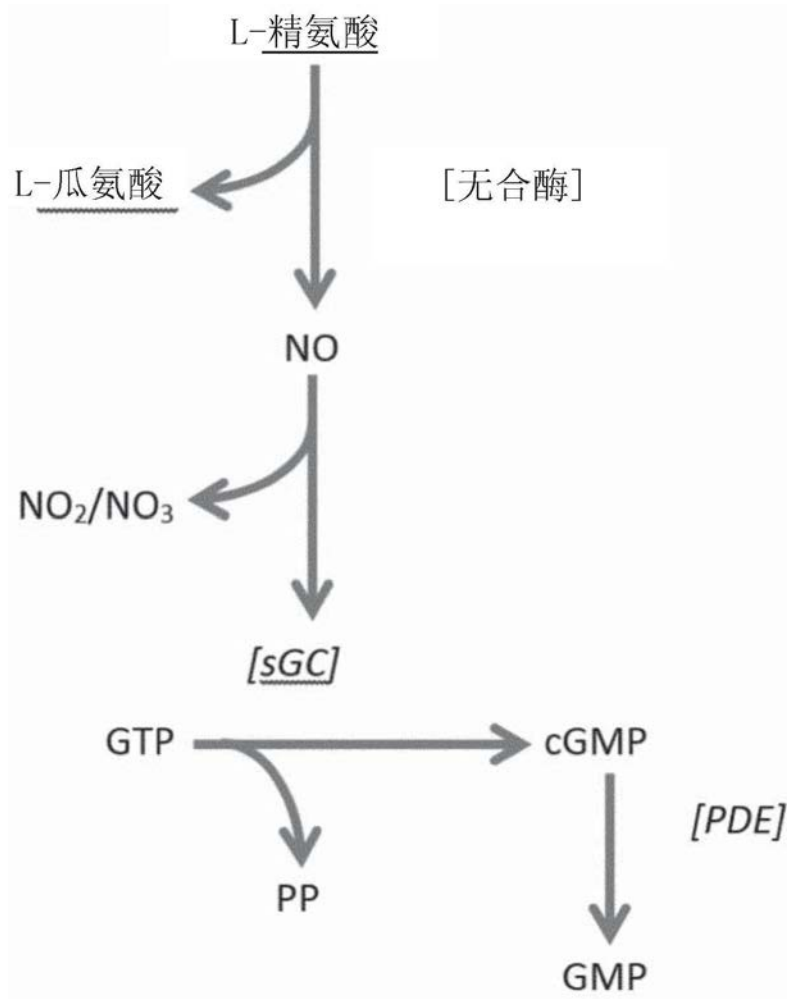


图6

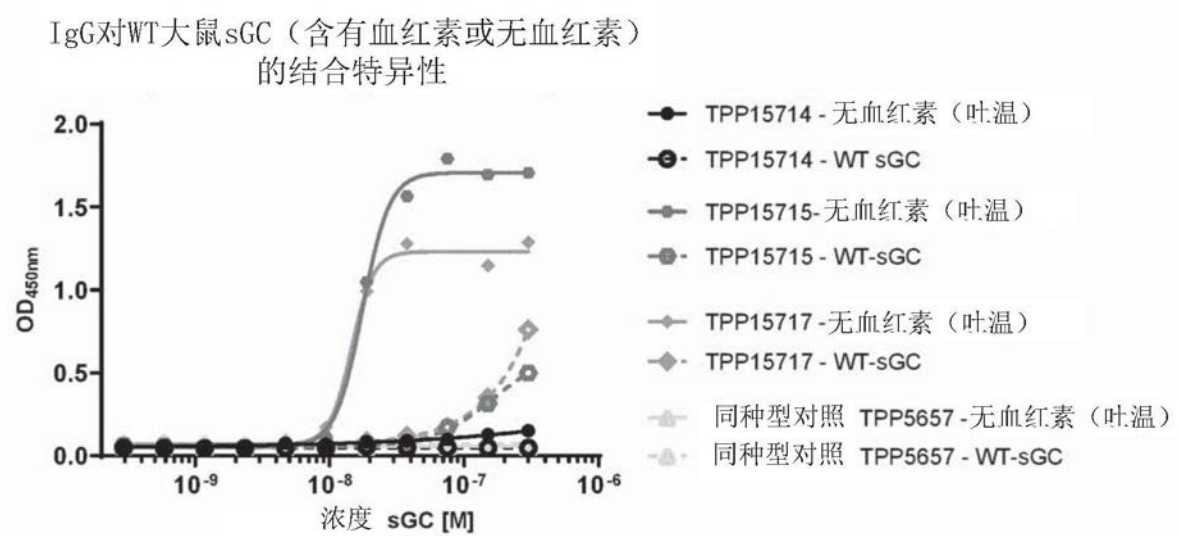


图7

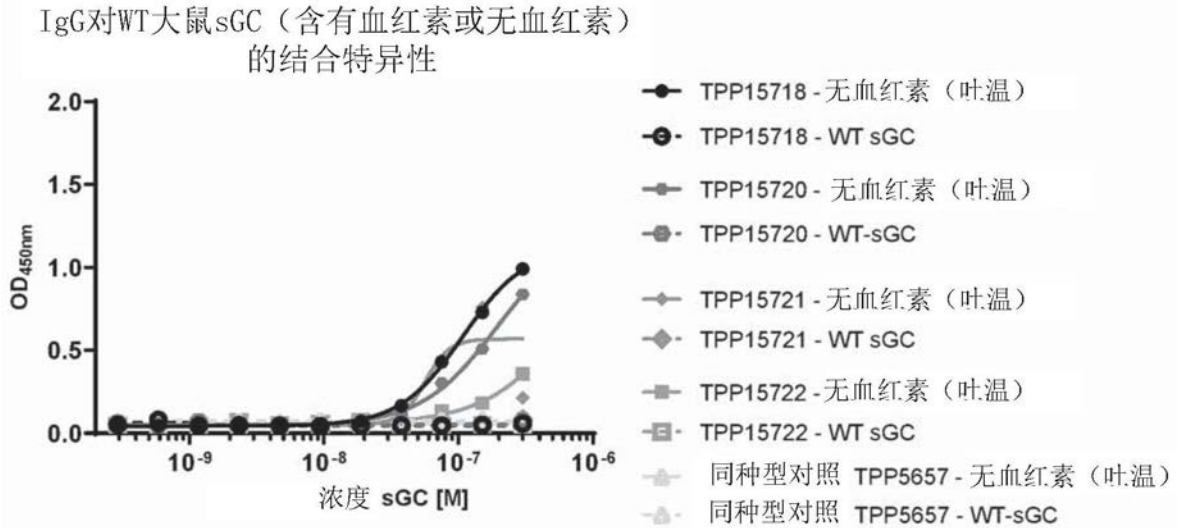


图8

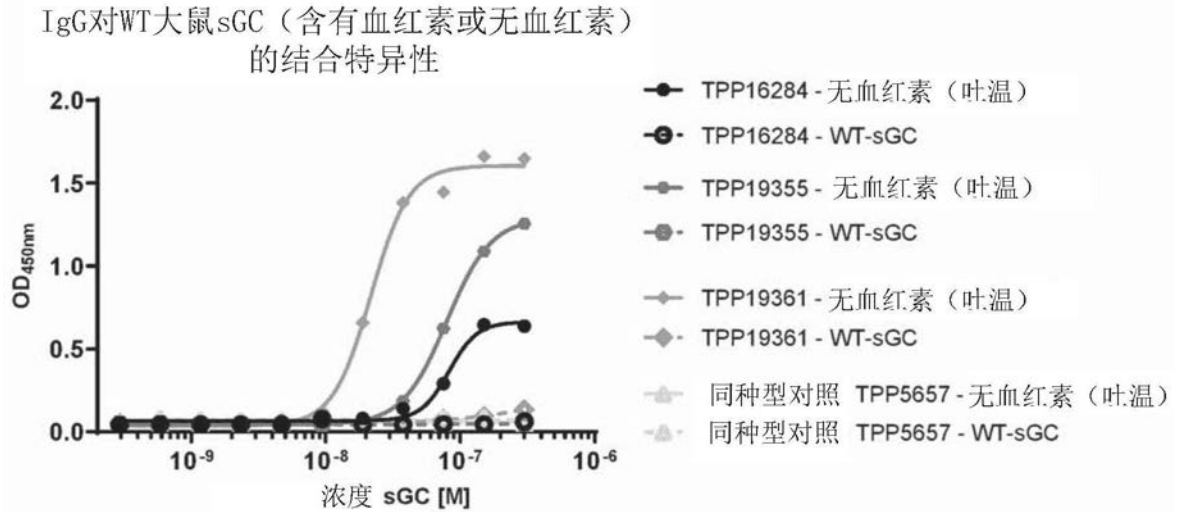


图9

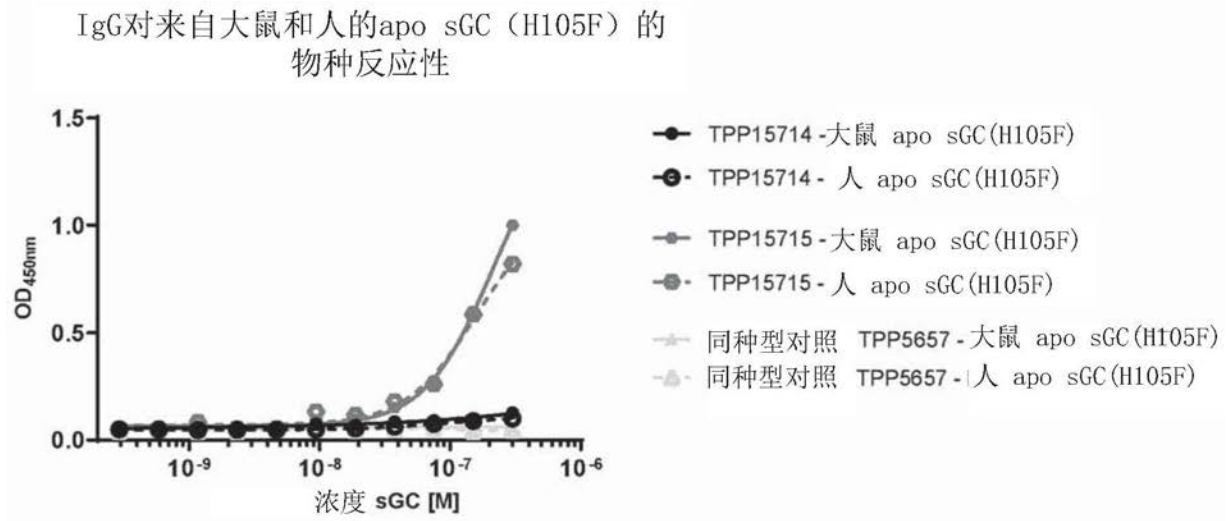


图10

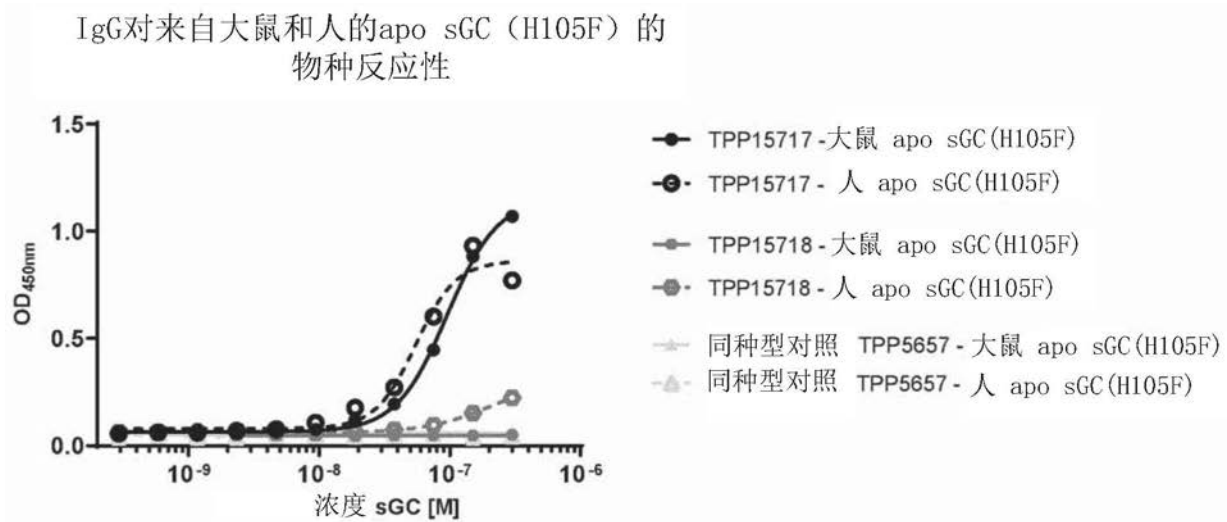


图11

IgG对来自大鼠和人的apo sGC (H105F) 的物种反应性

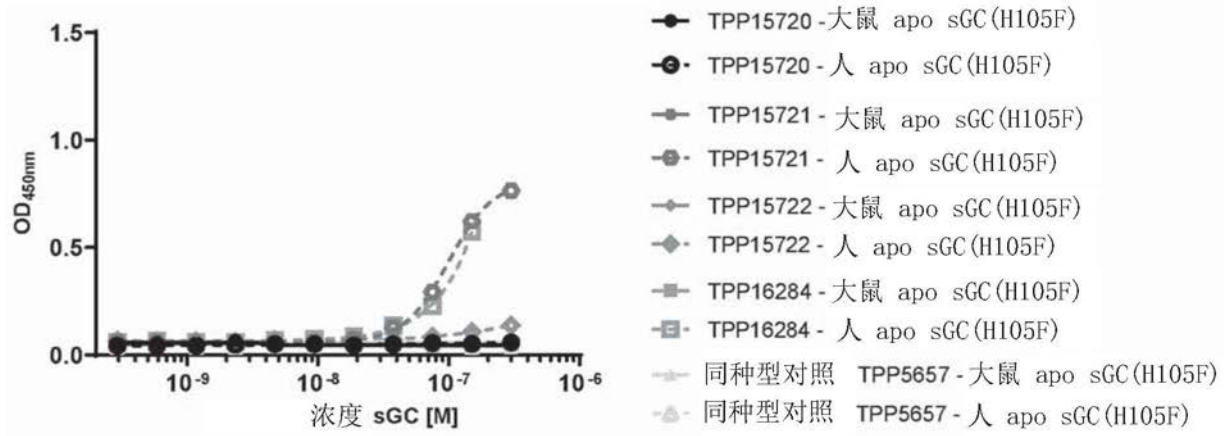


图12

IgG对来自大鼠和人的apo sGC (H105F) 的物种反应性

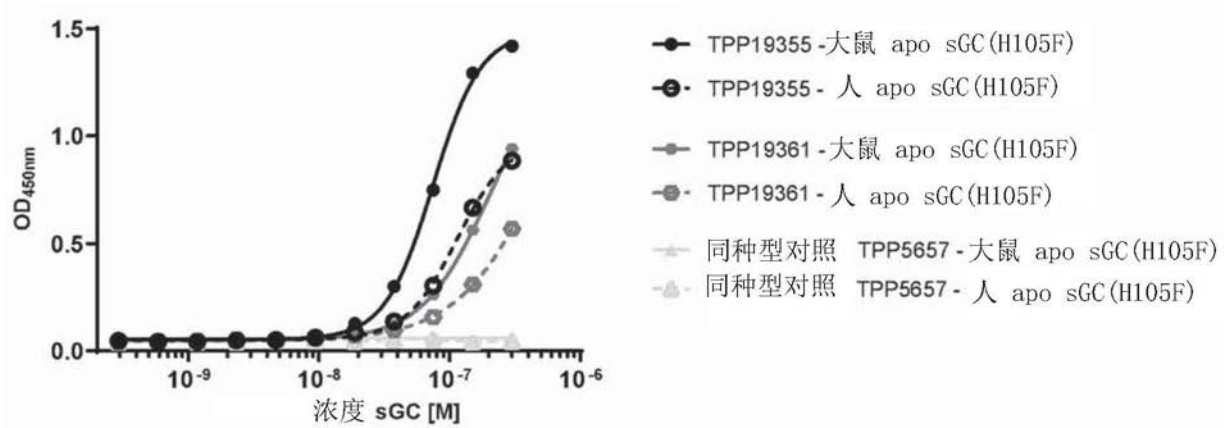


图13