



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108026180 A

(43)申请公布日 2018.05.11

(21)申请号 201680049820.7

(22)申请日 2016.08.26

(30)优先权数据

62/211,642 2015.08.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/049127 2016.08.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/040342 EN 2017.03.09

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 翟倩婷 P·J·卡特

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 史文静 黄革生

(51)Int.Cl.

G07K 16/44(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书3页 说明书57页

序列表14页 附图32页

(54)发明名称

抗羟腐胺赖氨酸抗体及其用途

(57)摘要

本发明提供抗羟腐胺赖氨酸抗体及其在检测和分离含羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽中的用途,以及包含抗羟腐胺赖氨酸抗体的组合物和试剂盒。

1. 一种特异性结合多肽中的羟腐胺赖氨酸的分离的抗体,其中所述抗体结合具有不同的羟腐胺赖氨酸侧翼氨基酸序列的含羟腐胺赖氨酸的多肽。

2. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体不结合多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸。

3. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体结合多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的抗体,其中所述抗体对含羟腐胺赖氨酸的多肽表现900nM或更小的结合亲和力(K_D)。

5. 如权利要求3所述的抗体,其中所述抗体表现出(i)对含羟腐胺赖氨酸的多肽为300nM或更小的结合亲和力(K_D)和(ii)对含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽为200nM或更小的结合亲和力(K_D)。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的抗体,其中所述抗体是抗原结合片段。

8. 如权利要求1、2和4-7中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:13或14的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3;和/或其中轻链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。

9. 如权利要求8所述的抗体,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:24或25的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列;和/或所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。

10. 如权利要求1和3-7中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:11或12的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;和/或其中轻链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-L3。

11. 如权利要求10所述的抗体,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:27或28的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列;和/或所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列。

12. 如权利要求1和3-7中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H3;和/或其中所述轻链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HVR-L3。

13. 如权利要求12所述的抗体,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列;和/或所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列。

14. 一种结合多肽中的羟腐胺赖氨酸的分离的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:13或14的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3;和/或其中轻链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列的HVR-L1,

(ii) 包含SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。

15. 如权利要求14所述的分离的抗体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:24或25的氨基酸序列;和/或所述轻链可变区包含SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列。

16. 如权利要求14所述的分离的抗体,其中所述重链包含SEQ ID NO:33或34的氨基酸序列;和/或所述轻链包含SEQ ID NO:29或30的氨基酸序列。

17. 一种特异性结合多肽中的羟腐胺赖氨酸的分离的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含(i) 包含SEQ NO:11或12的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;和/或其中轻链可变区包含(i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-L3。

18. 如权利要求17所述的分离的抗体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:27或28的氨基酸序列;和/或所述轻链可变区包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列。

19. 如权利要求17所述的分离的抗体,其中所述重链包含SEQ ID NO:36或37的氨基酸序列;和/或所述轻链包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

20. 一种特异性结合多肽中的羟腐胺赖氨酸的分离的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含(i) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H3;和/或其中所述轻链可变区包含(i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii) 包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HVR-L3。

21. 如权利要求20所述的分离的抗体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;和/或所述轻链可变区包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

22. 如权利要求20所述的分离的抗体,其中所述重链包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列;和/或所述轻链包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。

23. 如权利要求1-22中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体与检测剂连接。

24. 一种分离的核酸,其包含编码权利要求1-22中任一项的抗体的序列。

25. 一种包含权利要求24的核酸的载体。

26. 如权利要求25所述的载体,其是表达载体。

27. 一种包含权利要求24的核酸的宿主细胞。

28. 一种生产抗体的方法,包括在产生抗体的条件下培养权利要求27所述的宿主细胞。

29. 如权利要求28所述的方法,还包括回收由所述宿主细胞产生的抗体。

30. 一种用于检测样品中含羟腐胺赖氨酸的多肽的方法,包括以下步骤:(a) 使样品与权利要求1-22中任一项所述的抗体接触;和(b) 检测样品中与多肽结合的抗体。

31. 如权利要求30所述的方法,其中所述抗体与检测剂连接。

32. 如权利要求30所述的方法,其中通过使用第二活性剂来检测与所述多肽结合的抗体。

33. 如权利要求31所述的方法,其中所述检测剂是化学发光标记、发色团、荧光团、磁性

粒子、染料、放射性标记或酶。

34. 如权利要求30-33中任一项所述的方法,其中所述检测是通过一种或多种选自酶联免疫吸附测定、放射免疫测定、免疫沉淀、层析、免疫组织化学、免疫荧光、表面等离子体共振、荧光-活化细胞分选和质谱的测定法。

35. 如权利要求30-34中任一项所述的方法,其中所述样品是生物样品。

36. 如权利要求35所述的方法,其中所述生物样品包含细胞或组织。

37. 如权利要求35所述的方法,其中所述生物样品是流体。

38. 一种分离样品中含羟腐胺赖氨酸的多肽的方法,包括以下步骤:(a)将样品与权利要求1-22中任一项所述的抗体接触;(b)分离与抗体结合的多肽。

39. 如权利要求38所述的方法,其中所述抗体被固定到固体表面。

40. 如权利要求38-39中任一项所述的方法,其中所述样品是生物样品。

41. 如权利要求40所述的方法,其中所述生物样品包含细胞或组织。

42. 如权利要求40所述的方法,其中所述生物样品是流体。

43. 一种组合物,包含权利要求1-23中任一项所述的抗体。

44. 一种试剂盒,包含权利要求1-23中任一项所述的抗体或权利要求43所述的组合物。

45. 如权利要求44所述的试剂盒,进一步包含一种或多种用于在检测样品中含羟腐胺赖氨酸的多肽的方法中使用所述抗体的活性剂。

46. 如权利要求44所述的试剂盒,进一步包含一种或多种在分离样品中含羟腐胺赖氨酸的多肽的方法中使用所述抗体的活性剂。

抗羟腐胺赖氨酸抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年8月28日提交的美国临时专利申请No.62/211,642的优先权,其内容通过引用整体并入本文。

[0003] 以ASCII文本文件提交序列列表

[0004] 以下提交的ASCII文本文件的内容通过引用整体并入本文:序列列表的计算机可读形式(CRF)(文件名:146392034440SEQLIST.txt,记录日期:2016年8月25日,大小:42KB)。

技术领域

[0005] 本发明涉及用于检测和分离含羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽的方法和试剂。

[0006] 背景

[0007] 不寻常的氨基酸,羟腐胺赖氨酸($N\epsilon$ -(4-氨基-2-羟丁基)-赖氨酸,hypusine)是翻译后修饰的赖氨酸。真核翻译起始因子5A(eIF5A)是目前唯一已报道含有羟腐胺赖氨酸的天然存在的蛋白质(Cooper等人,Cell.,29:791-797,1982;Park等,PNAS,78:2869-2873,1981)。用羟腐胺赖氨酸修饰eIF5A涉及两种酶促反应。首先,脱氧羟腐胺赖氨酸合酶(DHS)将亚精胺的丁胺部分转移到eIF5A的一个特定赖氨酸残基(人eIF5A上的残基K50)的 ϵ -氨基上,产生脱氧羟腐胺赖氨酸。其次,通过脱氧羟腐胺赖氨酸羟化酶(DOHH)催化的羟基化完成了羟腐胺赖氨酸的生物合成(Park等人,PNAS,103:51-56,2006)。由于大多数已知的eIF5A功能,如翻译延伸、RNA结合和核糖体结合依赖于羟腐胺赖氨酸化,所以羟腐胺赖氨酸化的eIF5A似乎是活性形式(Jao等人,J.Cell.Biochem.,97:583-598,2006;Saini等人,Nature,459:118-121,2009)。eIF5A以及DHS和DOHH的氨基酸序列在整个真核生物中高度保守,并且在古细菌和真核生物中细胞增殖绝对需要脱氧羟腐胺赖氨酸/羟腐胺赖氨酸(Jansson等人,J.Bacteriol.,182:1158-1161 2000;Park等人,Biol.Signals.,6:115-123)。转化为羟腐胺赖氨酸的赖氨酸残基(K50)以及eIF5A中该修饰位点周围的主要序列高度保守,这突出表明这种不寻常的蛋白质修饰在整个真核生物进化过程中的重要性。然而,尽管对它们进行了大量的鉴定,但除了eIF5A以外,还没有报道过其它的羟腐胺赖氨酸化的蛋白质(Cooper等人,Cell.,29:791-797,1982;Sievert等人,Mol.Cell Proteomics,11:1289-1305,2012)。

[0008] 基于抗体的亲和纯化被广泛用于富集低丰度蛋白质以进行鉴定。该方法已成功用于蛋白质赖氨酸乙酰化(Kim等人,Mol.Cell.,23:607-618,2006;Zhang等人,Mol.Cell Proteomics,8:215-225,2009),精氨酸甲基化(Ong等人,Nat.Methods,1:119-126,2004)和酪氨酸磷酸化(Pandey等人,PNAS,97:179-184,2000;Rikova等人,Cell,131:1190-1203,2007)的整体分析。然而,由于PTM的小尺寸,高亲和力翻译后修饰(PTM)特异性和序列非依赖性抗体对于目的PTM不容易获得。另外,先前没有报道PTM特异性背景独立抗体的复杂结构。已经报道了几种抗-羟腐胺赖氨酸或抗脱氧羟腐胺赖氨酸性抗体,包括多克隆抗体(Clement等人,Eur.J.Biochem.,270:4254-4263,2003;Cracchiolo等人,Gynecol.Oncol.,

94:217-222,2004) 和单克隆抗体 (Bergeron等人, J. Med. Chem., 41 (20) :3888-3900,1998)。然而,这些抗体是针对eIF5A肽产生的,并且表征为与eIF5A结合。因此,它们可能不适合用于鉴定具有不同羟腐胺赖氨酸侧翼序列的新型羟腐胺赖氨酸化的蛋白质。此外,多克隆抗体不容易获得,并且尚未报道单克隆抗体的序列。因此,放射性标记的亚精胺和GC7(一种DHS抑制剂)仍然是用于eIF5A功能研究的最常用的工具。仍然需要开发在独立于羟腐胺赖氨酸侧翼的氨基酸序列的多肽上与羟腐胺赖氨酸结合的高亲和力抗-羟腐胺赖氨酸抗体。发现这种抗-羟腐胺赖氨酸抗体可以允许鉴定和分离新的羟腐胺赖氨酸化的多肽。

[0009] 本文引用的所有参考文献(包括专利申请、专利公布和科学文献)通过引用整体并入本文,如同每个单独的参考文献被具体地且单独地指示为通过引用并入本文。

发明内容

[0010] 本文提供了抗羟腐胺赖氨酸抗体,包含其的组合物以及使用其的方法。

[0011] 本文提供了与翻译后修饰(PTM),即羟腐胺赖氨酸,结合的pan抗-羟腐胺赖氨酸抗体,其具有对侧翼氨基酸序列最小的依赖性。这些抗体可与羟腐胺赖氨酸和脱氧羟腐胺赖氨酸结合或选择性地结合到羟腐胺赖氨酸,但不结合脱氧羟腐胺赖氨酸。

[0012] 在一个方面,本文提供了与多肽中的羟腐胺赖氨酸特异性结合的分离的抗体,其中所述抗体结合含羟腐胺赖氨酸的多肽,该多肽具有不同的羟腐胺赖氨酸的侧翼氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体不结合多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸。在一些实施方案中,抗体与多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸结合。在本文的任何实施方案中,抗体可表现出对含羟腐胺赖氨酸的多肽为900nM或更小的结合亲和力(K_D)。在另一个实施方案中,抗体表现出(i)对含羟腐胺赖氨酸的多肽为300nM或更小的结合亲和力(K_D),和(ii)对含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽为200nM或更小的结合亲和力(K_D)。在本文的任何实施方案中,本文所述的抗体可以是单克隆抗体。在本文的任何实施方案中,本文所述的抗体可以是抗原结合片段。在本文的一些实施方案中,抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:13或14的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3;和/或其中轻链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。在另一个实施方案中,重链可变区包含与SEQ ID NO:24或25的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列;和/或轻链可变区包含与SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。在本文的一些实施方案中,抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:11或12的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;和/或其中轻链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-L3。在另一个实施方案中,重链可变区包含与SEQ ID NO:27或28的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列;和/或轻链可变区包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列。在本文的一些实施方案中,抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H3;和/或其

中轻链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HVR-L3。在另一个实施方案中, 重链可变区包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列; 和/或轻链可变区包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施方案中, 抗体与检测剂连接。

[0013] 在一个方面, 本文提供了与多肽中的羧基赖氨酸结合的分离的抗体, 其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中所述重链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:13或14的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或其中轻链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。在另一个实施方案中, 重链可变区包含SEQ ID NO:24或25的氨基酸序列; 和/或轻链可变区包含SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列。在又一个实施方案中, 重链包含SEQ ID NO:33或34的氨基酸序列; 和/或轻链包含SEQ ID NO:29或30的氨基酸序列。在一些实施方案中, 抗体与检测剂连接。

[0014] 另一方面, 本文提供了与多肽中的羧基赖氨酸特异性结合的分离的抗体, 其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中所述重链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:11或12的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或其中轻链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-L3。在另一个实施方案中, 重链可变区包含SEQ ID NO:27或28的氨基酸序列; 和/或轻链可变区包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列。在又一个实施方案中, 重链包含SEQ ID NO:36或37的氨基酸序列; 和/或轻链包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。在一些实施方案中, 抗体与检测剂连接。

[0015] 又一方面, 本文提供了与多肽中的羧基赖氨酸特异性结合的分离的抗体, 其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中所述重链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或其中轻链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HVR-L3。在另一个实施方案中, 重链可变区包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列; 和/或轻链可变区包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在又一个实施方案中, 重链包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列; 和/或轻链包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。在一些实施方案中, 抗体与检测剂连接。

[0016] 另一方面, 本文提供了分离的核酸, 其包含编码上文和本文所述的任何抗体的序列。又一方面, 本文提供了包含本文所述的核酸的载体。在一个实施方案中, 载体是表达载体。又一方面, 本文提供了包含本文所述的核酸的宿主细胞。在一些实施方案中, 宿主细胞表达并产生抗体。

[0017] 另一方面, 本文提供了产生抗体的方法, 其包括在产生抗体的条件下培养本文所述并包含本文所述的核酸的任何宿主细胞。在一些实施方案中, 该方法还包括回收由宿主细胞产生的抗体。

[0018] 在一个方面,本文提供了用于检测样品中含羟胺赖氨酸的多肽的方法,其包括以下步骤:(a)使样品与上文和本文所述的抗体接触;和(b)检测样品中与多肽结合的抗体。在一个实施方案中,抗体与检测剂连接。在一个实施方案中,通过使用第二活性剂检测与多肽结合的抗体。在另一个实施方案中,检测剂是化学发光标记、发色团、荧光团、磁性粒子、染料、放射性标记或酶。在本文方法的一些实施方案中,所述检测是通过一种或多种选自酶联免疫吸附测定、放射免疫测定、免疫沉淀、层析、免疫组织化学、免疫荧光、表面等离子共振、荧光激活细胞分选和质谱的测定。在本文的任何实施方案中,样品可以是生物样品。在另一个实施方案中,生物样品包含细胞或组织。在另一个实施方案中,生物样品是流体。

[0019] 在又一方面,本文提供了用于分离样品中含羟胺赖氨酸的多肽的方法,其包括以下步骤:(a)使样品与上文和本文所述的抗体接触;(b)分离与抗体结合的多肽。在另一个实施方案中,抗体被固定到固体表面。在本文的任何实施方案中,样品可以是生物样品。在另一个实施方案中,生物样品包含细胞或组织。在另一个实施方案中,生物样品是流体。

[0020] 另一方面,本文提供了包含上文和本文所述的抗体的组合物。

[0021] 在一个方面,本文提供了包含上文和本文描述的抗体或其组合物的试剂盒。在一个实施方案中,试剂盒进一步包含一种或多种在用于检测样品中含羟胺赖氨酸的多肽的方法中使用所述抗体的活性剂。在另一个实施方案中,试剂盒进一步包含一种或多种在用于分离样品中含羟胺赖氨酸的多肽的方法中使用抗体的活性剂。

[0022] 应该理解,可以组合本文描述的各种实施方案的一个、一些或全部特性以形成本发明的其他实施方案。本发明的这些和其他方面对于本领域的技术人员将变得显而易见。本发明的这些和其他实施方案通过下面的详细描述进一步描述。

[0023] 附图的简要说明

[0024] 图1A-D是示出pan抗-羟胺赖氨酸抗体的重链和轻链可变结构域的图。图1A)mAbHpu24的轻链可变区(SEQ ID NO:20)和mAbHpu24.B的轻链可变区(SEQ ID NO:21);图1B)mAbHpu24的重链可变区(SEQ ID NO:24)和mAbHpu24.B的重链可变区(SEQ ID NO:25);图1C)mAbHpu98的轻链可变区(SEQ ID NO:23),mAbHpu98.61的轻链可变区(SEQ ID NO:23)和mAbHpu91的轻链可变区(SEQ ID NO:22);和图1D)mAbHpu98的重链可变区(SEQ ID NO:27),mAbHpu98.61的重链可变区(SEQ ID NO:28)和mAbHpu91的重链可变区(SEQ ID NO:26)。高亮了亲本抗体(mAbHpu24或mAbHpu98)和亲和力成熟变体(mAbHpu24.B或mAbHpu98.61)之间的序列差异。还高亮了mAbHpu91和紧密相关的mAbHpu98和mAbHpu98.61抗体之间的序列差异。

[0025] 图2A-C是一系列示出mAbHpu24,mAbHpu91和mAbHpu98特异性识别羟胺赖氨酸的图。图2A)通过对未纯化的杂交瘤上清液的ELISA所示出的抗羟胺赖氨酸抗体不依赖于侧翼序列与羟胺赖氨酸化肽结合。表1中提供了肽(P1至P6)的序列。实心条指示抗羟胺赖氨酸抗体与羟胺赖氨酸化肽结合的数据。带星号(*)的实心条表示抗羟胺赖氨酸抗体与非羟胺赖氨酸化肽结合的数据。图2B)用于使用羟胺赖氨酸化所需的酶DHS和DOHH的融合蛋白在293细胞中过表达成熟eIF5A的构建体设计。图2C)如Western印迹分析所示,天然完整蛋白eIF5A中特异性结合于羟胺赖氨酸的抗-羟胺赖氨酸抗体。

[0026] 图3A-C是一系列示出pan抗羟胺赖氨酸抗体的特异性表征的图。3A)羟胺赖氨酸和脱氧羟胺赖氨酸的结构。图3B)FabHpu24和FabHpu91仅与羟胺赖氨酸相互作用,而

mAbHpu98能够结合羟腐胺赖氨酸和脱氧羟腐胺赖氨酸。使用Octet RED仪器通过在链霉亲和素生物传感器上固定生物素化的P1含羟腐胺赖氨酸的肽(显示为1或品红色),P1-脱氧羟腐胺赖氨酸化肽(显示为2或橙色)或非羟腐胺赖氨酸化肽(显示为3或蓝色),然后浸入200nM的抗Hpu Fabs中进行结合分析。图3C) FabHpu98残基V_H Y52对于与脱氧羟腐胺赖氨酸和羟腐胺赖氨酸的双重结合是必需的。P1-Hpu表示P1含羟腐胺赖氨酸的肽(显示为1或品红色),P1-脱氧表示P1-脱氧羟腐胺赖氨酸化肽(显示为2或橙色),并且P1表示非羟腐胺赖氨酸化肽(显示为3或蓝色)。

[0027] 图4A-B是一系列示出亲和力成熟的抗羟腐胺赖氨酸抗体增加的抗原结合的图。图4A) FabHpu24或FabHpu24.B与固定的P1-Hpu肽或P1-脱氧Hpu肽结合的代表性生物传感器传感图。图4B) FabHpu98或FabHpu98.61与固定的P1-Hpu肽或P1-脱氧Hpu肽结合的代表性生物传感器传感图。以200nM(红色),66.7nM(橙色),22nM(绿色),7.4nM(蓝色),2.4nM(紫色)的浓度范围注射Fab,并且显示拟合曲线(黑色)。

[0028] 图5A-E是一系列示出FabHpu24或FabHpu24.B与各种含羟腐胺赖氨酸的肽结合的代表性生物传感器传感图的图。用于FabHpu24或FabHpu24.B结合至固定的:图5A) P2-Hpu,图5B) P3-Hpu,图5C) P4-Hpu,图5D) P5-Hpu,图5E) P6-Hpu的代表性生物传感器传感图。以200nM(红色),66.7nM(橙色),22nM(绿色),7.4nM(蓝色),2.4nM(紫色)的浓度范围注射Fab,并且显示拟合曲线(黑色)。

[0029] 图6A-F是一系列示出FabHpu98或FabHpu98.61与各种含羟腐胺赖氨酸或脱氧羟腐胺赖氨酸的肽结合的代表性生物传感器传感图的图。用于FabHpu98或FabHpu98.61与固定的:图6A) P2-Hpu,图6B) P2-脱氧Hpu,图6C) P3-Hpu,图6D) P4-Hpu,图6E) P5-Hpu,图6F) P6-Hpu结合的代表性生物传感器传感图。以200nM(红色),66.7nM(橙色),22nM(绿色),7.4nM(蓝色),2.4nM(紫色)的浓度范围注射Fab,并且显示拟合曲线(黑色)。

[0030] 图7A-B是考马斯蓝染色的凝胶,示出亲和力成熟的抗-羟腐胺赖氨酸抗体给出羟腐胺赖氨酸化的蛋白eIF5A更好的回收。图7A) 考马斯蓝染色示出内源性eIF5A被mAbHpu24.B免疫沉淀比被mAbHpu24更多。图7B) 考马斯蓝染色示出内源性eIF5A被mAbHpu98.61比mAbHpu98拉低更多。

[0031] 图8A-B是与Fab片段结合的含羟腐胺赖氨酸的肽的电子密度图。图8A) 模拟退火mFo-dFc省略图(显示为 $3.0 \times \text{RMSD}$),示出与FabHpu24复合的羟腐胺赖氨酸的电子密度。图8B) 模拟退火mFo-dFc省略图(显示为 $3.0 \times \text{RMSD}$),示出与FabHpu98复合的羟腐胺赖氨酸的电子密度。箭头表示含羟腐胺赖氨酸的肽。

[0032] 图9A-B是一系列示出FabHpu24和FabHpu98与羟腐胺赖氨酸的替代结合模式的图。图9A) 与含羟腐胺赖氨酸的C1肽(黄色,由直线箭头表示)复合的FabHpu24 Fab V_L(橙红色,右叶)和V_H(蓝色,左叶)结构域。图9B) 与含羟腐胺赖氨酸的C1肽(黄色,由直线箭头表示)复合的FabHpu98Fab的V_L(紫色,左叶)和V_H(深青色,右叶)。

[0033] 图10A-B是一系列示出用于羟腐胺赖氨酸相互作用的氢键网络的图。图10A) FabHpu24与含羟腐胺赖氨酸的C1肽的广泛氢键网络。立体图示出V_H(蓝色,左叶),V_L(橙红色,右叶)和C1肽(黄色,箭头所示),由虚线(橙色)表示假定氢键,如图所示,长度为 \AA 。图10B) FabHpu98与具有V_H(品红,左叶),V_L(深青色,右叶)的肽C1和C1肽(黄色,箭头所示)的广泛氢键网络。

[0034] 图11A-C是一系列示出比较羟腐胺赖氨酸和脱氧羟腐胺赖氨酸与FabHpu98结合的图。图11A) 示出羟腐胺赖氨酸的羟基位置和V_H Y52侧链移位的同晶型Fo-Fo差异图,以5.0 × rmsd显示。图11B) 在FabHpu98:羟腐胺赖氨酸复合物中,羟腐胺赖氨酸的羟基与V_L S94和V_H Y52都形成氢键。图11C) 在FabHpu98:脱氧羟腐胺赖氨酸复合物中,V_L S94和V_H Y52形成氢键。箭头表示含羟腐胺赖氨酸的肽。

[0035] 图12A-D是一系列示出亲和力成熟的Fab与羟腐胺赖氨酸的结合的结构图。图12A) 与C1肽(GSG-Hpu-GSG,黄色,箭头所示)结合的FabHpu24V_L(橙红色,右叶)和V_H(蓝色,左叶)和FabHpu24.B V_L(橙红色,右叶)和V_H(绿色,左叶)。CDR H2和H3中的构象变化增加了用于羟腐胺赖氨酸相互作用的接触面积。图12B) FabHpu24.B与含羟腐胺赖氨酸的肽C1的广泛氢键网络。图12C) 与C1肽(GSG-Hpu-GSG,由箭头表示)结合的FabHpu98V_L(紫色,左侧部分)和V_H(青色,右侧部分)和FabHpu98.61V_L(紫色,左侧部分)和V_H绿色,右侧部分)的比较。图12D) FabHpu24.B的T33与羟腐胺赖氨酸形成额外的H-键。箭头表示含羟腐胺赖氨酸的肽。

[0036] 图13是示出以对羟腐胺赖氨酸周围的氨基酸序列最小的依赖性,本文所述的任何抗-羟腐胺赖氨酸抗体与假定的含羟腐胺赖氨酸的多肽的羟腐胺赖氨酸结合的模拟模型的图。箭头表示含羟腐胺赖氨酸的蛋白质。

[0037] 详细说明

[0038] I. 定义

[0039] 在详细描述本发明之前,应该理解,本发明不限于特定的组合物或生物系统,其当然可以变化。还应该理解的是,本文使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,而不意在限制。

[0040] 如在本说明书和所附权利要求中所使用的,除非内容另外明确指出,否则单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指示物。因此,例如,对“分子”的提及可选地包括两种或更多种这样的分子的组合等。

[0041] 本文所用的术语“约”指本领域技术人员易于知道的各值的通常误差范围。本文中提到的“约”某个值或参数包括(和描述)指向该值或参数本身的实施方案。

[0042] 应该理解,本文描述的本发明的方面和实施方案包括“包括”,“由.....组成”和“基本上由...组成”方面和实施方案。

[0043] 本文中的术语“抗体”以最广泛的含义使用并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人源抗体、人抗体、嵌合抗体和抗体片段,只要它们展现出所需的抗原结合活性即可。

[0044] “亲和力”指分子(例如,抗体)的单一结合位点及其结合配偶物(例如,抗原)之间非共价相互作用的强度总和。除非另外指出,否则如本文所用,“结合亲和力”指反映结合对子的成员(例如,抗体和抗原)之间1:1相互作用的固有结合亲和力。通常可以由解离常数(K_D)代表分子X对其配偶物Y的亲和力。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量,包括本文所述的那些方法。在下文中描述用于测量结合亲和力的具体示意性和示例性实施方案。

[0045] “亲和力成熟的”抗体指在一个或多个高变区(HVR)中具有一个或多个改变的抗体,其中与不拥有这些改变的亲本抗体相比,这类改变导致抗体对抗原的亲和力改善。

[0046] 术语“抗羟腐胺赖氨酸抗体”和“与多肽中的羟腐胺赖氨酸结合的抗体”可互换使用,是指能够以足够的亲和力与含羟腐胺赖氨酸的多肽中的羟腐胺赖氨酸结合的抗体,使

得抗体可用作检测、诊断或分离含羟腐胺赖氨酸的多肽的试剂。在一个实施方案中,如通过放射免疫测定法(RIA)测量的,抗羟腐胺赖氨酸抗体与非羟腐胺赖氨酸化的多肽的结合程度比抗羟腐胺赖氨酸抗体与羟腐胺赖氨酸化的蛋白质的结合小约10%。在某些实施方案中,结合含羟腐胺赖氨酸的多肽中的羟腐胺赖氨酸的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ 的解离常数(K_D) (例如 10^{-8}M 或更小,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。在一些实施方案中,抗-羟腐胺赖氨酸抗体还结合多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸。

[0047] 术语“抗脱氧羟腐胺赖氨酸抗体”和“与多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸结合的抗体”可互换使用,是指能够以足够的亲和力结合含脱氧羟腐胺赖氨酸蛋白的多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸的抗体,使得抗体可用于作为检测、诊断或分离含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽的试剂。在一些实施方案中,结合脱氧羟腐胺赖氨酸的抗体也结合多肽中的羟腐胺赖氨酸。在一个实施方案中,如通过放射免疫测定法(RIA)所测量的,抗脱氧羟腐胺赖氨酸抗体与非脱氧羟腐胺赖氨酸化的多肽的结合程度比抗体与脱氧羟腐胺赖氨酸多肽结合小约10%。在某些实施方案中,在含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽中结合脱氧羟腐胺赖氨酸的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ 的解离常数(K_D) (例如 10^{-8}M 或更小,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。

[0048] 在一些实施方案中,抗-羟腐胺赖氨酸抗体结合相同多肽(例如含羟腐胺赖氨酸和脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽)上的羟腐胺赖氨酸和脱氧羟腐胺赖氨酸。在一些实施方案中,所述抗体结合不同多肽(例如,含羟腐胺赖氨酸而不含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽和含脱氧羟腐胺赖氨酸而不含羟腐胺赖氨酸的多肽)上羟腐胺赖氨酸和脱氧羟腐胺赖氨酸。在一些实施方案中,抗-羟腐胺赖氨酸抗体不结合多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸。

[0049] “结合”或“特异性结合”通常指以足够亲和力的两个分子之间的结合(例如在抗体和一个或多个靶标之间,抗-羟腐胺赖氨酸抗体和羟腐胺赖氨酸或抗-羟腐胺赖氨酸抗体和脱氧羟腐胺赖氨酸)之间的结合。优选地,如例如通过放射免疫测定法(RIA)所测量的,抗体与无关分子的结合程度比抗体与靶标结合小约10%。在一些实施方案中,结合其靶标的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数(K_D)。

[0050] 术语“抗体与具有不同羟腐胺赖氨酸侧翼的氨基酸序列的含羟腐胺赖氨酸的多肽或含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽结合”是指在可变的周围肽或蛋白质序列的背景下特异性识别羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸的抗体。此类抗体在至少两种具有不同羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸侧翼的氨基酸序列的多肽中与羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸结合。在某些实施方案中,这样的抗体以对羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸周围的氨基酸序列的最小依赖性与多肽中的羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸结合,例如,抗体以小于25%、20%、15%、10%、7%、5%、2%或1%的亲和力变化结合两种或更多种在羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸周围具有不同氨基酸序列的多肽。

[0051] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全部抗体”在本文中可互换使用,是指具有与天然抗体结构基本相似或具有包含如在此定义的Fc区的重链的抗体。

[0052] “抗体片段”指与完整抗体不同的分子,其包含完整抗体的一部分且结合完整抗体结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab' _SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0053] “Fab”片段含有轻链的可变和恒定结构域以及重链的可变结构域和第一恒定结构域(CH1)。F(ab)²抗体片段包含一对Fab片段,其通常通过铰链半胱氨酸在其羧基末端附近共价连接。其他抗体片段的化学偶联也是已知的。

[0054] “Fv”由紧密非共价结合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。从这两个结构域的折叠发出(emanate)贡献用于抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体抗原结合特异性的六个高变环(各来自H链和L链的三个环)。但是,甚至单个可变结构域(或仅包含对抗原特异性的三个Hs的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,虽然亲和力通常低于整个结合部位。

[0055] 抗体的“类”指由其重链拥有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五个主要类别的抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些类别中的几种可以进一步划分成亚类(同种型),例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同类别免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0056] 术语“Fc区”在本文中用来定义免疫球蛋白重链的含有至少一部分恒定区的C端区域。该术语包括天然序列Fc区和变异Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。除非本文中另外说明,否则Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号根据如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中所述的EU编号体系,也称作EU索引。

[0057] “构架”或“FR”指除高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由以下4个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR序列和FR序列通常按以下顺序出现在V_H(或V_L)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0058] 本文中使用时,术语“高变区”、“HVR”或“HV”指抗体可变结构域的区域,其序列高度可变和/或形成结构确定的环。通常,抗体包含6个HVR:3个在V_H(H1、H2、H3)中,并且3个在V_L(L1、L2、L3)中。在天然抗体中,H3和L3展示这6个HVR的最大多样性,并且尤其H3被认为在赋予抗体精细的特异性方面发挥独特的作用。参见,例如Xu等人,Immunity 13:37-45(2000);Johnson和Wu,在Methods in Molecular Biology 248:1-25中(Lo编Human Press,Totowa,NJ,2003)。事实上,仅由重链组成的天然存在的骆驼科抗体在缺乏轻链的情况下是有功能的且稳定的。参见,例如Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-448(1993);Sheriff等人,Nature Struct.Biol.3:733-736(1996)。

[0059] 本文使用和涵盖了许多HVR描述。Kabat互补决定区(CDR)是基于序列变异性,并且是最常用的(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版。Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))。Chothia改为指结构环的位置(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。AbM HVR代表Kabat HVR与Chothia结构环之间的折衷,并被Oxford Molecular的AbM抗体建模软件所使用。“接触”HVR是基于可获得的复合物晶体结构的分析。这些HVR中每一个的残基在下面注明。

	环	Kabat	Chothia	接触
	L1	L24-L34	L26-L34	L30-L36
	L2	L50-L56	L50-L56	L46-L55
[0060]	L3	L89-L97	L91-L96	L89-L96
	H1	H31-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 编号)
	H1	H31-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 编号)
	H2	H50-H65	H53-H56	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H93-H101

[0061] HVR可以包括如下的“延伸的HVR”： V_L 中的24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56 (L2)和89-97或89-96 (L3) 和 V_H 中的26-35 (H1)、50-65或49-65 (H2) 和93-102、94-102或95-102 (H3)。

[0062] 除非另有指示，否则可变结构域残基 (HVR残基和框架区残基) 根据上文的Kabat等人来编号。

[0063] 术语“如Kabat中的可变结构域残基编号”或“如Kabat中的氨基酸位置编号”及其变体是指上文Kabat等中抗体编译的用于重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用此编号系统，实际的线性氨基酸序列可包含对应可变结构域的FR或HVR缩短或插入的更少的或额外的氨基酸。例如，重链可变结构域可以在H2的残基52后包括单个氨基酸插入 (根据Kabat, 残基52a) 和在重链FR残基82之后包括插入的多个残基 (例如，根据Kabat, 残基82a、82b和82c等)。对于给定的抗体，残基的Kabat编号可以通过在抗体序列的同源性区域与“标准”Kabat编号序列的比对来确定。

[0064] Kabat编号系统通常在涉及可变结构域中的残基时使用 (大约轻链的1-107个残基和重链的1-113个残基) (例如，Kabat等人, Sequences of Immunological Interest, 第5版。“EU编号系统”或“EU索引 (EU index)”通常在涉及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时使用 (例如，上文的Kabat等人, 所报道的EU索引)。“Kabat中的EU索引”意指人IG1EU抗体的残基编号。除非本文中另外指明，对抗体可变结构域中残基号码的涵义表示Kabat编号系统的残基编号 (例如，参见美国临时申请60/640,323号, EU编号的附图)。

[0065] 术语“可变区”或“可变结构域”指抗体重或轻链中牵涉抗体结合抗原的结构域。天然抗体的重链和轻链可变结构域 (分别为 V_H 和 V_L) 一般具有类似的结构，其中每个结构域包含4个保守的框架区 (FR) 和3个高变区 (HVR)。(参见例如Kindt等人, Kuby Immunology, 第6版, W.H. Freeman and Co., 第91页 (2007))。单个 V_H 或 V_L 结构域可以足以赋予抗原结合特异性。此外，可以分别使用来自结合抗原的抗体的 V_H 或 V_L 结构域筛选互补 V_L 或 V_H 结构域的文库来分离结合特定抗原的抗体。见例如, Portolano等人, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson等人, Nature 352:624-628 (1991)。

[0066] 在用于本文时，术语“单克隆抗体”指从一群基本上同质的抗体获得的抗体，即构成群体的各个抗体是相同的和/或结合相同表位，除了例如含有天然存在的突变或在单克隆抗体制备物的生成期间发生的可能的变体抗体外，此类变体一般以极少量存在。与通常包含针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制备物不同，单克隆抗体制备物的每

种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。如此,修饰语“单克隆”指示抗体自一群基本上同质的抗体获得的特性,而不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如,可以通过多种技术来生成要依照本发明使用的单克隆抗体,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法、和利用含有所有或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,本文中描述了用于生成单克隆抗体的此类方法和其它例示性方法。

[0067] “裸抗体”指未与异源模块(例如细胞毒性部分)或放射性标记物缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物配制剂中。

[0068] “天然抗体”指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚糖蛋白,由二硫化物键合的两条相同轻链和两条相同重链构成。从N至C端,每条重链具有一个可变区(V_H),又称作可变重链结构域或重链可变结构域,接着是三个恒定结构域(CH1、CH2、和CH3)。类似地,从N至C端,每条轻链具有一个可变区(V_L),又称作可变轻链结构域或轻链可变结构域,接着是一个恒定轻(CL)结构域。根据其恒定结构域氨基酸序列,抗体轻链可归入两种类型中的一种,称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。

[0069] “分离的抗体”指已经与其天然环境的组分分开的抗体。在一些实施方案中,抗体纯化至大于95%或99%的纯度,如通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或层析(例如,离子交换或反相HPLC)测定的。关于用于评估抗体纯度的方法的综述,参见例如Flatman等人,J.Chromatogr.B848:79-87(2007)。

[0070] “分离的核酸”指已经与其天然环境的组分分开的核酸分子。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中含有的核酸分子,但是核酸分子在染色体外或在与其天然染色体位置不同的染色体位置处存在。

[0071] “编码抗羟腐胺赖氨酸抗体的分离的核酸”指编码抗体重和轻链(或其片段)的一种或多种核酸分子,包括单一载体或不同载体中的此类核酸分子,和存在于宿主细胞中的一个或多个位置的此类核酸分子。

[0072] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”、和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且指已经导入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”,其包括原代的经转化的细胞及自其衍生的后代而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可以与亲本细胞不完全相同,而是可以含有突变。本文中包括具有与在初始转化细胞中筛选或选择的相同功能或生物学活性的突变体后代。在一些实施方案中,宿主细胞是分离的(即,与其天然环境的组分分离的)。

[0073] 在用于本文时,术语“载体”指能够增殖与其连接的另一种核酸的核酸分子。该术语包括作为自身复制型核酸结构的载体及整合入接受其导入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其有效连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0074] 相对于参照多肽序列,将“氨基酸序列同一性百分数(%)”定义为比对序列并根据需要引入空位以实现最大序列同源性百分数并且不考虑任何保守性置换作为序列同一性的部分之后,候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分数。为了确定氨基酸序列同一性百分数的比对可以按本领域能力范围内的多种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数,包括为实现正在比较的全长序列范围内最大比对所需要的任何算法。然而,出于本文目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生氨基

酸序列同一性%值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc. 授权, 并且源代码已经随用户文档提交至华盛顿特区20559的美国版权局, 在那里它以美国版权登记号TXU510087登记。从Genentech, Inc., South San Francisco, 加利福尼亚州可公开获得ALIGN-2程序或可以从源代码汇编。应当将ALIGN-2程序汇编在UNIX操作系统(包括数字式UNIX V4.0D)上使用。全部序列比较参数由ALIGN-2程序设定并且不变动。

[0075] 在使用ALIGN-2比较氨基酸序列的情况下, 如下计算给定氨基酸序列A与给定氨基酸序列B、同给定氨基酸序列B或针对给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性% (这可以备选地描述为与给定氨基酸序列B、同给定氨基酸序列B或针对给定氨基酸序列B具有或包含某个氨基酸序列同一性%的给定氨基酸序列A):

[0076] $100 \times \frac{X}{Y}$

[0077] 其中X是由序列比对程序ALIGN-2在该程序的A和B比对结果中评定为相同匹配的氨基酸残基的数目, 并且其中Y是B中氨基酸残基的总数。将可以理解在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时, A相对于B的氨基酸序列同一性%将不等于B相对于A的氨基酸序列同一性%。除非另外特别声明, 否则本文所用的全部氨基酸序列同一性值%如紧接前段中所述那样使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0078] 术语“包装插页”用于指治疗产品的商业包装中通常包含的用法说明书, 其含有涉及此类治疗产品应用的信息。

[0079] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物(例如, 牛、绵羊、猫、犬、和马)、灵长类(例如, 人和非人灵长类诸如猴)、兔、和啮齿类(例如, 小鼠和大鼠)。在某些实施方案中, 个体或受试者是人。

[0080] 如本文所用, 术语“样品”或“生物样品”是指从目的受试者, 细胞或组织获得或衍生的组合物。样品包括但不限于来自个体的组织、全血、血清或血浆。样品还包括但不限于组织、细胞或从组织或细胞获得的流体。

[0081] 如本文所使用的, “帮助评估”的方法是指有助于进行临床确定(例如, 过敏反应的风险)的方法, 并且对于确定性评估可能是或可能不是确凿的。

[0082] 如本文所使用的, “参考值”可以是绝对值; 相对价值; 具有上限和/或下限的值; 一系列的值; 平均值; 中位值; 均值; 或与特定对照或基线值相比较的值。

[0083] 术语“检测(动)”或“检测(名)”以最广泛的含义使用, 以包括特定分子的定性和定量测量, 本文中是特定分析物分子, 例如含羟腐胺赖氨酸多肽中的羟腐胺赖氨酸或含脱氧羟腐胺赖氨酸中的脱氧羟腐胺赖氨酸的测量。在一个方面, 本文描述的检测方法用于识别样品中目的分析物分子的纯粹存在。另一方面, 检测方法可用于量化样品中分析物分子的数量。又一方面, 该方法可用于确定目的分析物分子对靶分子的相对结合亲和力。

[0084] 术语“检测剂”, “检测剂”, “检测剂”和“检测剂”可互换使用, 指的是直接通过标记物检测抗羟腐胺赖氨酸抗体的试剂, 例如磁性的、发色团的、染料的、荧光的、酶的、放射性的或化学发光的标记, 其可以与抗羟腐胺赖氨酸抗体连接, 或者间接通过标记的第二活性剂, 例如特异性结合抗羟腐胺赖氨酸抗体的抗体或受体。第二活性剂的实例包括但不限于抗体、抗体片段、可溶性受体、受体片段等。

[0085] 术语“测定表面”或“表面”是指其上可以固定捕获剂而用于免疫测定的基质。合适的测定表面包括聚合物测定板、芯片、流动卡、磁珠、树脂、纤维素聚合物海绵等。

[0086] 术语“捕获剂”或“捕获试剂”是指能够结合和捕获样品中的靶分子或分析物分子(例如含羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽)的活性剂(例如抗-羟腐胺赖氨酸抗体)。可以将捕获剂或试剂固定在例如固体基质上,例如微粒或微珠、微量滴定板、柱树脂、芯片、流动卡、磁珠、纤维素聚合物海绵等。

[0087] 当在本文中使用时,术语“标记”是指直接或间接地与试剂如核酸探针、多肽或抗体缀合或融合且便于与之共轭或融合的试剂的检测或捕获的化合物或组合物。标记本身是可检测的(例如,放射性同位素、荧光、光致发光、化学发光或电化学发光标记),在与另一分子结合后可检测的,或者在酶标记的情况下可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0088] 术语“靶分子”是指本文所述的抗体的特异性结合靶标。在一个实施方案中,靶分子是含羟腐胺赖氨酸的多肽中的羟腐胺赖氨酸或含羟腐胺赖氨酸的多肽。在一个实施方案中,靶分子是含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸或含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽。

[0089] 如本文所用的“分析物”和“分析物分子”是指通过本发明的方法分析的分子,并且包括但不限于含羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽。

[0090] 术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”可互换使用以表示氨基酸聚合物或一组两种或更多种相互作用或结合的氨基酸聚合物。

[0091] “多肽”是指含有通过肽键连接的两个或更多个氨基酸的肽或蛋白质,并且包括肽、寡聚物、蛋白质等。多肽可以含有天然的、修饰的或合成的氨基酸。多肽也可以天然修饰,例如通过翻译后加工,或者化学修饰,例如酰胺化酰化、交联等。

[0092] II. 抗羟腐胺赖氨酸抗体

[0093] 在一个方面,本发明提供了与多肽中的羟腐胺赖氨酸结合的分离的抗体。在一些实施方案中,本文所述的抗-羟腐胺赖氨酸抗体具有以下特征中的一个或多个:(1)与多肽中的羟腐胺赖氨酸结合;(2)不与多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸结合;(3)与多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸结合;(4)与具有不同羟腐胺赖氨酸侧翼氨基酸序列的含羟腐胺赖氨酸的多肽中的羟腐胺赖氨酸结合;(5)与具有不同脱氧羟腐胺赖氨酸侧翼氨基酸序列的含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸结合;(6)以900nM或更小的结合亲和力与含羟腐胺赖氨酸的多肽中的羟腐胺赖氨酸结合;和(7)以300nM或更小的结合亲和力与含羟腐胺赖氨酸的多肽中的羟腐胺赖氨酸结合,并且以200nM或更小的结合亲和力与含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸结合。

[0094] 在一个方面,本发明提供了与多肽中的羟腐胺赖氨酸结合的分离的抗体,其中所述抗体结合具有不同羟腐胺赖氨酸侧翼氨基酸序列的含羟腐胺赖氨酸的多肽。在一些实施方案中,抗体不与多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸结合。在一些实施方案中,抗体与多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸结合。在一些实施方案中,抗体结合表1中所示的肽(例如,选自SEQ ID NO: 56-69的一种或多种)。

[0095] 在一个方面,本文所述的抗-羟腐胺赖氨酸抗体是单克隆抗体。在一个方面,本文描述的抗-羟腐胺赖氨酸抗体是抗体片段(包括抗原结合片段),例如Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。在一个方面中,本文所述的任何抗-羟腐胺赖氨酸抗体是纯化的。

[0096] 在一个方面,本文提供了包含重链可变区和轻链可变区的抗-羟腐胺赖氨酸抗体,

其中所述重链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:13或14的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或其中轻链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。

[0097] 在一个方面, 本文提供了包含重链可变区和轻链可变区的抗-羟胺赖氨酸抗体, 其中所述重链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:11或12的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或其中轻链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-L3。

[0098] 在一个方面, 本文提供了包含重链可变区和轻链可变区的抗-羟胺赖氨酸抗体, 其中所述重链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或其中轻链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HVR-L3。

[0099] 在一个方面, 本文提供了包含重链可变区和轻链可变区的抗-羟胺赖氨酸抗体, 其中所述重链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或其中所述轻链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。

[0100] 在一个方面, 本文提供了包含重链可变区和轻链可变区的抗-羟胺赖氨酸抗体, 其中所述重链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或其中轻链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。

[0101] 在一个方面, 本文提供了包含重链可变区和轻链可变区的抗-羟胺赖氨酸抗体, 其中所述重链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或其中轻链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-L3。

[0102] 在一个方面, 本文提供了包含重链可变区和轻链可变区的抗-羟胺赖氨酸抗体, 其中所述重链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3; 和/或其中轻链可变区包含 (i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-L3。

[0103] 本文所述的抗-羟胺赖氨酸抗体可包含任何合适的框架可变结构域序列, 只要该抗体保留结合多肽中的羟胺赖氨酸的能力。在一些实施方案中, 抗体保留结合多肽中羟胺赖氨酸和脱氧羟胺赖氨酸的能力。如本文所用, 重链框架区被命名为“HC-FR1-FR4”, 并且轻链框架区命名为“LC-FR1-FR4”。在一些实施方案中, 抗-羟胺赖氨酸抗体包含SEQ ID NO:46, 50, 51和53 (分别为HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3和HC-FR4) 的重链可变结构域

框架序列。在一些实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体包含SEQ ID NO:47,50,52和53(分别为HC-FR1,HC-FR2,HC-FR3和HC-FR4)的重链可变结构域框架序列。在一些实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体包含SEQ ID NO:48,50,52和53(分别为HC-FR1,HC-FR2,HC-FR3和HC-FR4)的重链可变结构域框架序列。在一些实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体包含SEQ ID NO:49,50,52和53(分别为HC-FR1,HC-FR2,HC-FR3和HC-FR4)的重链可变结构域框架序列。在一些实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体包含SEQ ID NO:38,40,42和45(分别为LC-FR1,LC-FR2,LC-FR3和LC-FR4)的轻链可变区框架序列。在一些实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体包含SEQ ID NO:39,41,43和45(分别为LC-FR1,LC-FR2,LC-FR3和LC-FR4)的轻链可变区框架序列。在一些实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体包含SEQ ID NO:39,41,44和45(分别为LC-FR1,LC-FR2,LC-FR3和LC-FR4)的轻链可变区框架序列。

[0104] 在一个实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体包含含有框架序列和高变区的重链可变结构域,其中框架序列分别包含HC-FR1-HC-FR4序列SEQ ID NO:46-49(HC-FR1),SEQ ID NO:50(HC-FR2),SEQ ID NO:51或52(HC-FR3)和SEQ ID NO:53(HC-FR4);HVR-H1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;HVR-H2包含SEQ ID NO:13或14的氨基酸序列;并且HVR-H3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体包含含有框架序列和高变区的重链可变结构域,其中框架序列分别包含HC-FR1-HC-FR4序列SEQ ID NO:46-49(HC-FR1),SEQ ID NO:50(HC-FR2),SEQ ID NO:51或52(HC-FR3)和SEQ ID NO:53(HC-FR4);HVR-H1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;HVR-H2包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且HVR-H3包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体包含含有框架序列和高变区的重链可变结构域,其中框架序列分别包含HC-FR1-HC-FR4序列SEQ ID NO:46-49(HC-FR1),SEQ ID NO:50(HC-FR2),SEQ ID NO:51或52(HC-FR3)和SEQ ID NO:53(HC-FR4);HVR-H1包含SEQ ID NO:11或12的氨基酸序列;HVR-H2包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;并且HVR-H3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体包含含有框架序列和高变区的轻链可变结构域,其中框架序列分别包含LC-FR1-LC-FR4序列SEQ ID NO:38或39(LC-FR1),SEQ ID NO:40或41(LC-FR2),SEQ ID NO:42-44(LC-FR3)和SEQ ID NO:45(LC-FR4);HVR-L1包含SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列;HVR-L2包含SEQ ID NO:4或5的氨基酸序列;并且HVR-L3包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体包含含有框架序列和高变区的轻链可变结构域,其中框架序列分别包含LC-FR1-LC-FR4序列SEQ ID NO:38或39(LC-FR1),SEQ ID NO:40或41(LC-FR2),SEQ ID NO:42-44(LC-FR3)和SEQ ID NO:45(LC-FR4);HVR-L1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;HVR-L2包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且HVR-L3包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体包含含有框架序列和高变区的轻链可变结构域,其中框架序列分别包含LC-FR1-LC-FR4序列SEQ ID NO:38或39(LC-FR1),SEQ ID NO:40或41(LC-FR2),SEQ ID NO:42-44(LC-FR3)和SEQ ID NO:45(LC-FR4);HVR-L1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;HVR-L2包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;并且HVR-L3包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列。在这些抗体的一个实施方案中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:24或25的氨基酸序列,并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列。在这些抗体的一个实施方案中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:27或28的氨基酸序列,并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列。在这些抗体的一个实施方案中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:

26的氨基酸序列,并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在这些抗体的一个实施方案中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在这些抗体的一个实施方案中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在这些抗体的一个实施方案中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列,并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列。在这些抗体的一个实施方案中,重链可变结构域包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列,并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列。

[0105] 在一些实施方案中,重链HVR序列包含以下:

[0106] a) HVR-H1 (DYAMI (SEQ ID NO:9));

[0107] b) HVR-H2 (IIYGGSNKLAYAKWA (SEQ ID NO:13) 或IIYGVINDLAYAKWA (SEQ ID NO:14));和

[0108] c) HVR-H3 (GYGSMDGYDRLNL (SEQ ID NO:17))。

[0109] 在一些实施方案中,重链HVR序列包含以下:

[0110] a) HVR-H1 (TYTIN (SEQ ID NO:10));

[0111] b) HVR-H2 (DIWSDGNTYYANWA (SEQ ID NO:15));和

[0112] c) HVR-H3 (DSWDTSIYYGLDL (SEQ ID NO:18))。

[0113] 在一些实施方案中,重链HVR序列包含以下:

[0114] a) HVR-H1 (TYTMN (SEQ ID NO:11);或HCTMN (SEQ ID NO:12);

[0115] b) HVR-H2 (DIYTDGNTYYANWA (SEQ ID NO:16));和

[0116] c) HVR-H3 (DSWDASSYYGLDL (SEQ ID NO:19))。

[0117] 在一些实施方案中,重链FR序列包含以下:

[0118] a) HC-FR1 (QEQLKESGGRLVAPGTPLTLTCTVSGFDIS (SEQ ID NO:46); QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSAFSL (SEQ ID NO:47); QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSL (SEQ ID NO:48);或QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSACSLY (SEQ ID NO:49)

[0119] b) HC-FR2 (WVRQAPKGGLEWIG (SEQ ID NO:50);

[0120] c) HC-FR3 (KGRFTISRTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCAR (SEQ ID NO:51);或KGRFTISKSTTVDLKITSPTTEDTATYFCAR (SEQ ID NO:52));和

[0121] d) HC-FR4 (WGQGLVTVSS (SEQ ID NO:53))。

[0122] 在一些实施方案中,轻链HVR序列包含以下:

[0123] a) HVR-L1 (QSSETVYRGDWLS (SEQ ID NO:1);或RSRQRVYLGDWLS (SEQ ID NO:2));

[0124] b) HVR-L2 (DASYLAS (SEQ ID NO:4);或DASFRGD (SEQ ID NO:5));和

[0125] c) HVR-L3 (LGGYYDDADDT (SEQ ID NO:7))。

[0126] 在一些实施方案中,轻链HVR序列包含以下:

[0127] a) HVR-L1 (QASEDIKRYLA (SEQ ID NO:3));

[0128] b) HVR-L2 (AASKLAS (SEQ ID NO:6));和

[0129] c) HVR-L3 (QQGYTSSNVNNA (SEQ ID NO:8);或QQGYTSTNVNNA (SEQ ID NO:72))。

[0130] 在一些实施方案中,轻链FR序列包含以下:

[0131] a) LC-FR1 (AAV_LTQTSPVSAAVGGT_VTISC (SEQ ID NO:38);或AIKMTQTPSSVSAAVGGT_VTINC (SEQ ID NO:39));

[0132] b) LC-FR2 (WFQKKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:40); 或 WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:41));

[0133] c) LC-FR3 (GVSSRFSGSGSGTHFTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO:42); GVSSRFTGSGSGTEYTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO:43); 或 GVSSRFKSGSGTEYTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO:44)); 和

[0134] d) LC-FR4 (FGGGTEVVVK (SEQ ID NO:45))。

[0135] 在一些实施方案中, 本文提供了结合多肽中的羟胺赖氨酸的抗-羟胺赖氨酸抗体, 其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中所述抗体包含:

[0136] (a) 重链可变结构域, 其包含:

[0137] (1) 包含选自 SEQ ID NO:46-49 的氨基酸序列的 HC-FR1;

[0138] (2) 包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列的 HVR-H1;

[0139] (3) 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HC-FR2;

[0140] (4) 包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列的 HVR-H2;

[0141] (5) 包含 SEQ ID NO:51 或 52 的氨基酸序列的 HC-FR3;

[0142] (6) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-H3; 和

[0143] (7) 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HC-FR4,

[0144] 和/或

[0145] (b) 轻链可变结构域, 其包含:

[0146] (1) 包含 SEQ ID NO:38 或 39 的氨基酸序列的 LC-FR1;

[0147] (2) 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的 HVR-L1;

[0148] (3) 包含 SEQ ID NO:40 或 41 的氨基酸序列的 LC-FR2;

[0149] (4) 包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的 HVR-L2;

[0150] (5) 包含选自 SEQ ID NO:42-44 的氨基酸序列的 LC-FR3;

[0151] (6) 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的 HVR-L3; 和

[0152] (7) 包含 SEQ ID NO:45 的氨基酸序列的 LC-FR4。

[0153] 在一些实施方案中, 本文提供了与多肽中的羟胺赖氨酸结合的抗-羟胺赖氨酸抗体, 其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中所述抗体包含:

[0154] (a) 重链可变结构域, 其包含:

[0155] (1) 包含选自 SEQ ID NO:46-49 的氨基酸序列的 HC-FR1;

[0156] (2) 包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列的 HVR-H1;

[0157] (3) 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HC-FR2;

[0158] (4) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H2;

[0159] (5) 包含 SEQ ID NO:51 或 52 的氨基酸序列的 HC-FR3;

[0160] (6) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-H3; 和

[0161] (7) 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HC-FR4,

[0162] 和/或

[0163] (b) 轻链可变结构域, 其包含:

[0164] (1) 包含 SEQ ID NO:38 或 39 的氨基酸序列的 LC-FR1;

[0165] (2) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的 HVR-L1;

- [0166] (3) 包含SEQ ID NO:40或41的氨基酸序列的LC-FR2;
- [0167] (4) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2;
- [0168] (5) 包含选自SEQ ID NO:42-44的氨基酸序列的LC-FR3;
- [0169] (6) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3;和
- [0170] (7) 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的LC-FR4。
- [0171] 在一些实施方案中,本文提供了结合多肽中的羟胺赖氨酸的抗-羟胺赖氨酸抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述抗体包含:
- [0172] (a) 重链可变结构域,其包含:
- [0173] (1) 包含选自SEQ ID NO:46-49的氨基酸序列的HC-FR1;
- [0174] (2) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H1;
- [0175] (3) 包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的HC-FR2;
- [0176] (4) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2;
- [0177] (5) 包含SEQ ID NO:51或52的氨基酸序列的HC-FR3;
- [0178] (6) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H3;和
- [0179] (7) 包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的HC-FR4,
- [0180] 和/或
- [0181] (b) 轻链可变结构域,其包含:
- [0182] (1) 包含SEQ ID NO:38或39的氨基酸序列的LC-FR1;
- [0183] (2) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1;
- [0184] (3) 包含SEQ ID NO:40或41的氨基酸序列的LC-FR2;
- [0185] (4) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2;
- [0186] (5) 包含选自SEQ ID NO:42-44的氨基酸序列的LC-FR3;
- [0187] (6) 包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HVR-L3;和
- [0188] (7) 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的LC-FR4。
- [0189] 在一些实施方案中,本文提供了结合多肽中的羟胺赖氨酸的抗-羟胺赖氨酸抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述抗体包含:
- [0190] (a) 重链可变结构域,其包含:
- [0191] (1) 包含选自SEQ ID NO:46-49的氨基酸序列的HC-FR1;
- [0192] (2) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H1;
- [0193] (3) 包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的HC-FR2;
- [0194] (4) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2;
- [0195] (5) 包含SEQ ID NO:51或52的氨基酸序列的HC-FR3;
- [0196] (6) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;和
- [0197] (7) 包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的HC-FR4,
- [0198] 和/或
- [0199] (b) 轻链可变结构域,其包含:
- [0200] (1) 包含SEQ ID NO:38或39的氨基酸序列的LC-FR1;
- [0201] (2) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1;
- [0202] (3) 包含SEQ ID NO:40或41的氨基酸序列的LC-FR2;

[0203] (4) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2;

[0204] (5) 包含选自SEQ ID NO:42-44的氨基酸序列的LC-FR3;

[0205] (6) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-L3;和

[0206] (7) 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的LC-FR4。

[0207] 在一些实施方案中,本文提供了结合多肽中的羟腐胺赖氨酸的抗-羟腐胺赖氨酸抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述抗体包含:

[0208] (a) 重链可变结构域,其包含:

[0209] (1) 包含选自SEQ ID NO:46-49的氨基酸序列的HC-FR1;

[0210] (2) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-H1;

[0211] (3) 包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的HC-FR2;

[0212] (4) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2;

[0213] (5) 包含SEQ ID NO:51或52的氨基酸序列的HC-FR3;

[0214] (6) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;和

[0215] (7) 包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的HC-FR4,

[0216] 和/或

[0217] (b) 轻链可变结构域,其包含:

[0218] (1) 包含SEQ ID NO:38或39的氨基酸序列的LC-FR1;

[0219] (2) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L1;

[0220] (3) 包含SEQ ID NO:40或41的氨基酸序列的LC-FR2;

[0221] (4) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2;

[0222] (5) 包含选自SEQ ID NO:42-44的氨基酸序列的LC-FR3;

[0223] (6) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-L3;和

[0224] (7) 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的LC-FR4。

[0225] 在一个方面,本文提供了抗-羟腐胺赖氨酸抗体,其包含含有SEQ ID NO:24或25的氨基酸序列的重链可变结构域和/或包含含有SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列的轻链可变结构域,包括那些序列的翻译后修饰。在一个方面,本文提供了抗-羟腐胺赖氨酸抗体,其包含含有SEQ ID NO:27或28的氨基酸序列的重链可变结构域和/或包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的轻链可变结构域,包括那些序列的翻译后修饰。在一个方面,本文提供了抗-羟腐胺赖氨酸抗体,其包含含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的重链可变结构域和/或包含含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变结构域,包括那些序列的翻译后修饰。

[0226] 在一个方面,本文提供了抗-羟腐胺赖氨酸抗体,其包含含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链可变结构域和/或包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变结构域,包括那些序列的翻译后修饰。在一个方面,本文提供了抗-羟腐胺赖氨酸抗体,其包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变结构域和/或包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的轻链可变结构域,包括那些序列的翻译后修饰。在一个方面,本文提供的抗-羟腐胺赖氨酸抗体包含含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变结构域和/或包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的轻链可变结构域,包括那些序列的翻译后修饰。在一个方面,本文提供了抗-羟腐胺赖氨酸抗体,其包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链可变结构域和/或包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的轻链可变结构域,包括那些序列的翻译后修饰。在一

个方面,本文提供了抗-羟腐胺赖氨酸抗体,其包含含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的重链可变结构域和/或包含含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变结构域,包括那些序列的翻译后修饰。

[0227] 在一些实施方案中,本文提供了包含重链可变结构域的反-羟腐胺赖氨酸抗体,所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:24或25的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文提供了包含重链可变结构域的反-羟腐胺赖氨酸抗体,所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文提供了包含重链可变结构域的反-羟腐胺赖氨酸抗体,所述重链可变结构域包含与SEQ ID NO:27或28的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%的序列同一性的氨基酸序列包含相对于参考序列的置换、插入或缺失,但包含该氨基酸序列的抗体保留与多肽中的羟腐胺赖氨酸结合的能力。在一些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的氨基酸序列包含相对于参考序列的置换、插入或缺失,但包含该氨基酸序列的抗体保留与多肽中的羟腐胺赖氨酸和脱氧羟腐胺赖氨酸结合的能力。在一些实施方案中,置换、插入或缺失(例如1、2、3、4或5个氨基酸)发生在HVR外部的区域(即FR中)。

[0228] 在一些实施方案中,本文提供了包含轻链可变结构域的反-羟腐胺赖氨酸抗体,所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文提供了包含轻链可变结构域的反-羟腐胺赖氨酸抗体,所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文提供了包含轻链可变结构域的反-羟腐胺赖氨酸抗体,所述轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的氨基酸序列含有相对于参考序列的置换、插入或缺失,但包含该氨基酸序列的抗体保留与多肽中的羟腐胺赖氨酸结合的能力。在一些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的氨基酸序列含有相对于参考序列的置换、插入或缺失,但包含该氨基酸序列的抗体保留与多肽中的羟腐胺赖氨酸和脱氧羟腐胺赖氨酸结合的能力。在一些实施方案中,置换、插入或缺失(例如1、2、3、4或5个氨基酸)发生在HVR外部的区域(即FR中)。

[0229] 在一些实施方案中,本文提供了包含如图1B或图1D所示的重链可变结构域的反-羟腐胺赖氨酸抗体。例如,本文提供了包含如图1B所示的抗体Hpu24的重链可变结构域的反-羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,本文提供了包含如图1B所示的抗体Hpu24.B的重链可变结构域的反-羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,本文提供了包含如图1D所示的抗体Hpu98的重链可变结构域的反-羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,本文提供了包含如图1D所示的抗体Hpu98.61的重链可变结构域的反-羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施

方案中,本文提供了包含如图1D所示的抗体Hpu91的重链可变结构域的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。

[0230] 在一些实施方案中,本文提供了包含如图1A或图1C所示的轻链可变结构域的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。例如,本文提供了包含如图1A所示的抗体Hpu24的轻链可变结构域的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,本文提供了包含如图1A所示的抗体Hpu24.B的轻链可变结构域的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,本文提供了包含如图1C所示的抗体Hpu98的轻链可变结构域的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,本文提供了包含如图1C所示的抗体Hpu98.61的轻链可变结构域的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,本文提供了包含如图1C所示的抗体Hpu91的轻链可变结构域的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。

[0231] 在一个方面,本发明提供了包含选自图1B或图1D所示的重链可变结构域和选自图1A或图1C所示的轻链可变结构域的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。例如,本文提供了包含如图1B所示的抗体Hpu24,如图1B所示的抗体Hpu24.B,如图1D所示的抗体Hpu91,如图1D所示的抗体Hpu98或如图1D所示的抗体Hpu98.61的重链可变结构域以及如图1A所示的抗体Hpu24,如图1A所示的抗体Hpu24.B,如图1C所示的抗体Hpu91,如图1C所示的抗体Hpu98或如图1C所示的抗体Hpu98.61的轻链可变结构域的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。

[0232] 在一个方面,本发明提供了一种抗-羟腐胺赖氨酸抗体,包含(a)选自图1B或图1D所示的一个、两个或三个VH HVR和/或(b)选自图1A或图1C中所示的一个、两个或三个VL HVR。例如,本文提供的抗-羟腐胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1B所示的Hpu24的一个、两个或三个Chothia VH HVR和/或(b)来自图1A所示的Hpu24的一个、两个或三个Chothia VL HVR。在一些实施方案中,本文提供的抗-羟腐胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1B所示的Hpu24.B的一个、两个或三个Chothia VH HVR和/或(b)来自图1A所示的Hpu24.B的一个、两个或三个Chothia VL HVR。在一些实施方案中,本文提供的抗-羟腐胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1D所示的Hpu91的一个、两个或三个Chothia VH HVR和/或(b)来自图1C所示的Hpu91的一个、两个或三个Chothia VL HVR。在一些实施方案中,本文提供的抗-羟腐胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1D所示的Hpu98的一个、两个或三个Chothia VH HVR和/或(b)来自图1C所示的Hpu98的一个、两个或三个Chothia VL HVR。在一些实施方案中,本文提供的抗-羟腐胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1D所示的Hpu98.61的一个、两个或三个Chothia VH HVR和/或(b)来自图1C所示的Hpu98.61的一个、两个或三个Chothia VL HVR。在一些实施方案中,本文提供的抗-羟腐胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1B所示的Hpu24的一个、两个或三个Kabat VH HVR和/或(b)来自图1A所示的Hpu24的一个、两个或三个Kabat VL HVR。在一些实施方案中,本文提供的抗-羟腐胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1B所示的Hpu24.B的一个、两个或三个Kabat VH HVR和/或(b)来自图1A所示的Hpu24.B的一个、两个或三个Kabat VL HVR。在一些实施方案中,本文提供的抗-羟腐胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1D所示的Hpu91的一个、两个或三个Kabat VH HVR和/或(b)来自图1C所示的Hpu91的一个、两个或三个Kabat VL HVR。在一些实施方案中,本文提供的抗-羟腐胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1D所示的Hpu98的一个、两个或三个Kabat VH HVR和/或(b)来自图1C所示的Hpu98的一个、两个或三个Kabat VL HVR。在一些实施方案中,本文提供的抗-羟腐胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1D所示的Hpu98.61的一个、两个或三个Kabat VH HVR和/或(b)来自图1C所示的Hpu98.61的一个、两个或三个Kabat

VL HVR。在一些实施方案中,本文提供的抗-羟胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1B所示的Hpu24的一个、两个或三个Contact VH HVR和/或(b)来自图1A所示的Hpu24的一个、两个或三个Contact VL HVR。在一些实施方案中,本文提供的抗-羟胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1B所示的Hpu24.B的一个、两个或三个Contact VH HVR和/或(b)来自图1A所示的Hpu24.B的一个、两个或三个Contact VL HVR。在一些实施方案中,本文提供的抗-羟胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1D所示的Hpu91的一个、两个或三个Contact VH HVR和/或(b)来自图1C所示的Hpu91的一个、两个或三个Contact VL HVR。在一些实施方案中,本文提供的抗-羟胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1D所示的Hpu98的一个、两个或三个Contact VH HVR和/或(b)来自图1C所示的Hpu98的一个、两个或三个Contact VL HVR。在一些实施方案中,本文提供的抗-羟胺赖氨酸抗体包含(a)来自图1D所示的Hpu98.61的一个、两个或三个Contact VH HVR和/或(b)来自图1C所示的Hpu98.61的一个、两个或三个Contact VL HVR。

[0233] 在一些实施方案中,本文提供了包含含有SEQ ID NO:33或34的氨基酸序列的重链;和/或含有SEQ ID NO:29或30的氨基酸序列的轻链的抗-羟胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,本文提供了包含含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链和/或含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链的抗-羟胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,本文提供了包含含有SEQ ID NO:36或37的氨基酸序列的重链;和/或含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链的抗-羟胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体与多肽中的羟胺赖氨酸结合。

[0234] 在一些实施方案中,本文提供了包含含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链和/或含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的轻链的抗-羟胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,本文提供了包含含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链和/或含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链的抗-羟胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,本文提供了包含含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链和/或含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链的抗-羟胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,本文提供了包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的重链和/或含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链的抗-羟胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,本文提供了包含含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链和/或含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链的抗-羟胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体与多肽中的羟胺赖氨酸结合。

[0235] 在本文的一些实施方案中,所述抗-羟胺赖氨酸抗体与多肽中的羟胺赖氨酸和脱氧羟胺赖氨酸结合。在本文的一些实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体不与多肽中的脱氧羟胺赖氨酸结合。

[0236] 通过本领域已知的和本文实施例中描述的各种测定法,可以鉴定、筛选或表征本文提供的抗-羟胺赖氨酸抗体的物理/化学性质和/或生物活性。提供了在体内和/或体外具有这种性质(例如物理性质)或活性(例如生物活性)的抗体。在某些实施方案中,测试本发明的抗体的这种性质(例如物理性质)或活性(例如生物活性)。

[0237] 1. 抗体亲和力

[0238] 在某些实施方案中,本文提供的与多肽中的羟胺赖氨酸结合的抗-羟胺赖氨酸抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_D)。在一些实施方案中,本文提供的

与多肽中的羟腐胺赖氨酸结合的抗-羟腐胺赖氨酸抗体具有1nM或更小,10nM或更小,20nM或更小,40nM或更小,60nM或更小,80nM或更小,100nM或更小,150nM或更小,200nM或更小,250nM或更小,300nM或更小,350nM或更小,400nM或更小,450nM或更小,500nM或更小,550nM或更小,600nM或更小,650nM或更小,700nM或更小,750nM或更小,800nM或更小或900nM或更小的解离常数(K_D)。在一些实施方案中,本文提供的与多肽中的羟腐胺赖氨酸结合的抗-羟腐胺赖氨酸抗体具有1mM或更小,5mM或更小,10mM或更小,15mM或更小,20mM或更小,25mM或更小,30mM或更小,35mM或更小,40mM或更小,45mM或更小,50mM或更小,55mM或更小,60mM或更小,65mM或更小,70mM或更小/75mM或更小,80mM或更小,85mM或更小,90mM或更小,95mM或更小,或100mM或更小的解离常数(K_D)。在某些实施方案中,本文提供的结合多肽中的羟腐胺赖氨酸抗体的抗-羟腐胺赖氨酸抗体具有如本文表2所示的 K_D 。在某些实施方案中,本文所述的抗-羟腐胺赖氨酸抗体不结合多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸。在另一个实施方案中,不结合多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸的抗-羟腐胺赖氨酸抗体对含羟腐胺赖氨酸的多肽表现出至少900nM或更小的结合亲和力(K_D)。在某些实施方案中,本文所述的抗-羟腐胺赖氨酸抗体结合多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸。在另一个实施方案中,结合脱氧羟腐胺赖氨酸抗体的抗-羟腐胺赖氨酸抗体表现出(i)针对含羟腐胺赖氨酸的多肽为300nM或更小的结合亲和力(K_D)和(ii)针对含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽为200nM或更小的结合亲和力(K_D)。在某些实施方案中,本文提供的结合多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸的抗-羟腐胺赖氨酸抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_D)。在一些实施方案中,本文提供的结合多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸的抗-羟腐胺赖氨酸抗体具有1nM或更小,5nM或更小,10nM或更小,15nM或更小,20nM或更小,30nM或更小,40nM或更小,50nM或更小,60nM或更小,70nM或更小,80nM或更小,90nM或更小,100nM或更小,110nM或更小,120nM或更小130nM或更小,140nM或更小,150nM或更小,160nM或更小,170nM或更小,180nM或更小,190nM或更小或200nM或更小的解离常数(K_D)。在一些实施方案中,本文提供的结合多肽中的脱氧羟腐胺赖氨酸的抗-羟腐胺赖氨酸抗体具有如本文表2所示的 K_D 。在本文的一些实施方案中,抗-羟腐胺赖氨酸抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:24或25的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列;所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。在本文的一些实施方案中,抗-羟腐胺赖氨酸抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列;所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列。在本文的一些实施方案中,抗-羟腐胺赖氨酸抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:27或28的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列;所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体是抗原结合片段。

[0239] 在一个实施方案中,使用**BIACORE**[®]表面等离子体共振测定来测量 K_D 。例如,使用**BIACORE**[®]T200 (Biacore,Uppsala,瑞典)的测定用NeutrAvidin包被的CM5芯片以约300个响应单位(RU)进行,并以 $<10RU$ 捕获生物素化的抗原(例如含羟胺赖氨酸的多肽)。在一个实施方案中,在注射之前,在10mM HEPES,pH7.4,0.15M NaCl和0.005%表面活性剂P20中连续稀释本文所述的抗-羟胺赖氨酸抗体(例如抗-羟胺赖氨酸Fab片段)以流过固定的肽(例如含羟胺赖氨酸的肽)。通过同时拟合缔合和解离传感图,使用简单的一对一Langmuir结合模型(**BIACORE**[®]Evaluation Software version 3.2)计算缔合率(k_{on})和解离率(k_{off})。平衡解离常数(K_D)以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果通过上述表面等离子体共振测定的结合速率超过 $10^6M^{-1}s^{-1}$,则可以在存在如光谱仪测量的浓度增加的抗原(例如,含羟胺赖氨酸的多肽)的情况下,在25℃,在PBS中20nM抗-羟胺赖氨酸抗体(Fab形式),pH7.2下,通过使用测量荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的增加或减少的荧光淬灭技术来确定结合速率,所述光谱仪例如装有停流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或具有搅拌比色皿的8000系列SLM-AMINCO[™]分光光度计(ThermoSpectronic)。

[0240] 2. 结合测定和其他测定

[0241] 在一个方面中,例如通过诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、放射免疫测定、表面等离子体共振、色谱法、免疫沉淀、免疫荧光、荧光激活细胞分选等的已知方法测试本发明的抗-羟胺赖氨酸抗体的抗原结合活性。

[0242] 另一方面,竞争测定可用于鉴定与本文所述抗体(例如Hpu98)竞争结合多肽中的羟胺赖氨酸和/或脱氧羟胺赖氨酸的抗体。在某些实施方案中,这种竞争性抗体结合与由本文所述的抗-羟胺赖氨酸抗体(例如Hpu98)结合的共同表位(例如,线性或构象性表位)。在Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols”,Methods in Molecular Biology第1卷,66(Humana Press,Totowa,NJ)中提供了绘制抗体结合表位的具体的示例性方法。

[0243] 在示例性的竞争测定中,在包含与多肽中的羟胺赖氨酸(例如Hpu24)结合的第一标记和正在测试其与第一抗体竞争结合多肽中的羟胺赖氨酸的能力的第二未标记抗体的溶液中孵育含羟胺赖氨酸的固定化多肽。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将含羟胺赖氨酸的固定化多肽在包含第一标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中孵育。在允许第一抗体与含羟胺赖氨酸的多肽结合的条件下孵育后,去除过量的未结合的抗体,并测量与固定化的含羟胺赖氨酸的多肽缔合的标记的量。如果相对于对照样品,测试样品中与含羟胺赖氨酸的固定化多肽缔合的标记量显著降低,则表明第二抗体与第一抗体竞争结合多肽中的羟胺赖氨酸。参见Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual ch.14(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。在一些实施方案中,所述多肽含脱氧羟胺赖氨酸。在一些实施方案中,第一抗体与多肽中的脱氧羟胺赖氨酸结合。在一些实施方案中,第二抗体与多肽中的羟胺赖氨酸结合。

[0244] 另一方面,可以使用测定法来鉴定本文所述的抗-羟胺赖氨酸抗体,例如实施例1中描述的结合测定法。在一些实施方案中,使用本文描述的方法如通过ELISA筛选含有候选抗-羟胺赖氨酸抗体的样品。在一些实施方案中,将含有候选抗-羟胺赖氨酸抗体的样品置于与羟胺赖氨酸化肽接触,其中使用本领域中的标准技术(例如ELISA)检测候选

抗-羟腐胺赖氨酸抗体与羟腐胺赖氨酸化肽的结合。在一些实施方案中,将含有候选抗-羟腐胺赖氨酸抗体的样品置于与脱氧羟腐胺赖氨酸化肽接触,其中使用本领域中的标准技术(例如ELISA)检测候选抗-羟腐胺赖氨酸抗体与脱氧羟腐胺赖氨酸化肽的结合。在一些实施方案中,将候选抗-羟腐胺赖氨酸抗体与羟腐胺赖氨酸化肽和/或脱氧-羟腐胺赖氨酸化肽的结合和候选抗-羟腐胺赖氨酸抗体与非羟腐胺赖氨酸化肽的结合进行比较。在一些实施方案中,所述羟腐胺赖氨酸化肽是如表1中所示的羟腐胺赖氨酸化肽。在一些实施方案中,所述羟腐胺赖氨酸化肽是选自以下的一种或多种:P1-Hpu (SEQ ID NO:56), P2-Hpu (SEQ ID NO:59), P3-Hpu (SEQ ID NO:62), P4-Hpu (SEQ ID NO:64), P5-Hpu (SEQ ID NO:66) 和P6-Hpu (SEQ ID NO:68)。在一些实施方案中,脱氧羟腐胺赖氨酸化肽是如表1中所示的脱氧羟腐胺赖氨酸化肽。在一些实施方案中,脱氧羟腐胺赖氨酸化肽是选自P1-脱氧 (SEQ ID NO:57) 和P2-脱氧 (SEQ ID NO:60) 组成组中的一种或多种。在一些实施方案中,非羟腐胺赖氨酸化肽是如表1所示的羟腐胺赖氨酸化肽。在一些实施方案中,非羟腐胺赖氨酸化肽是选自以下的一种或多种:P1 (SEQ ID NO:58), P2 (SEQ ID NO:61), P3 (SEQ ID NO:63), P4 (SEQ ID NO:65), P5 (SEQ ID NO:67) 和P6 (SEQ ID NO:69)。

[0245] 另一方面,本文提供了用于选择结合两种或更多种羟腐胺赖氨酸化肽和/或脱氧羟腐胺赖氨酸化肽的pan抗羟腐胺赖氨酸抗体的测定法和方法。在一些实施方案中,用于选择结合两种或更多种羟腐胺赖氨酸化肽的pan抗羟腐胺赖氨酸抗体的方法包括以下步骤:a) 使候选抗体与选自以下的两种或更多种羟腐胺赖氨酸化肽接触:P1-Hpu (SEQ ID NO:56), P2-Hpu (SEQ ID NO:59), P3-Hpu (SEQ ID NO:62), P4-Hpu (SEQ ID NO:64), P5-Hpu (SEQ ID NO:66) 和P6-Hpu (SEQ ID NO:68); b) 确定候选抗体是否与所述两种或更多种羟腐胺赖氨酸化肽结合,其中与所述两种或更多种羟腐胺赖氨酸化肽的结合表明所述候选抗体是pan抗羟腐胺赖氨酸抗体;和c) 选择pan抗羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,所述方法进一步包括使选择的pan抗羟腐胺赖氨酸抗体与选自以下的一种或多种脱氧羟腐胺赖氨酸化肽接触的步骤:P1-脱氧 (SEQ ID NO:57) 和P2-脱氧 (SEQ ID NO:60), 并确定pan抗-羟腐胺赖氨酸抗体是否结合一种或多种脱氧羟腐胺赖氨酸。在一些实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:使选择的pan抗羟腐胺赖氨酸抗体与一种或多种选自P1 (SEQ ID NO:58), P2 (SEQ ID NO:61), P3 (SEQ ID NO:63), P4 (SEQ ID NO:65), P5 (SEQ ID NO:67) 和P6 (SEQ ID NO:69) 的非羟腐胺赖氨酸化肽接触,并确定pan抗-羟腐胺赖氨酸抗体是否结合一种或多种非羟腐胺赖氨酸化肽。在一些实施方案中,用于选择结合两种或更多种脱氧羟腐胺赖氨酸化肽的pan抗羟腐胺赖氨酸抗体的方法包括以下步骤:a) 使候选抗体与选自以下的两种或更多种脱氧羟腐胺赖氨酸化肽接触:P1-脱氧 (SEQ ID NO:57) 和P2-脱氧 (SEQ ID NO:60); b) 确定所述候选抗体是否结合所述两种或更多种脱氧羟腐胺赖氨酸化肽,其中与所述两种或更多种脱氧羟腐胺赖氨酸化肽的结合指示所述候选抗体是pan抗羟腐胺赖氨酸抗体;和c) 选择pan抗羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,所述方法进一步包括使选择的pan抗羟腐胺赖氨酸抗体与选自以下的一种或多种羟腐胺赖氨酸化肽接触:P1-Hpu (SEQ ID NO:56), P2-Hpu (SEQ ID NO:59), P3-Hpu (SEQ ID NO:62), P4-Hpu (SEQ ID NO:64), P5-Hpu (SEQ ID NO:66) 和P6-Hpu (SEQ ID NO:68) 以及确定所述pan抗羟腐胺赖氨酸抗体是否结合所述一种或更多种羟腐胺赖氨酸化肽的步骤。在一些实施方案中,该方法进一步包括使选择的pan抗羟腐胺赖氨酸抗体与一种或多种选自P1 (SEQ ID NO:58), P2 (SEQ ID NO:61), P3

(SEQ ID NO:63), P4 (SEQ ID NO:65), P5 (SEQ ID NO:67) 和 P6 (SEQ ID NO:69) 的非羟胺赖氨酸化肽接触, 并确定 pan 抗-羟胺赖氨酸抗体是否结合一种或多种非羟胺赖氨酸化肽。在一些实施方案中, 用于选择结合一种或多种脱氧羟胺赖氨酸化肽和一种或多种羟胺赖氨酸化肽的 pan 抗羟胺赖氨酸抗体的方法包括以下步骤: a) 使候选抗体与选自以下的一种或多种脱氧羟胺赖氨酸化肽: P1-脱氧 (SEQ ID NO:57) 和 P2-脱氧 (SEQ ID NO:60) 以及选自以下的一种或多种羟胺赖氨酸化肽: P1-Hpu (SEQ ID NO:56), P2-Hpu (SEQ ID NO:59), P3-Hpu (SEQ ID NO:62), P4-Hpu (SEQ ID NO:64), P5-Hpu (SEQ ID NO:66) 和 P6-Hpu (SEQ ID NO:68) 接触; b) 确定所述候选抗体是否与所述一种或多种脱氧羟胺赖氨酸化肽和一种或多种羟胺赖氨酸化肽结合, 其中与所述一种或多种脱氧羟胺赖氨酸化肽和一种或多种羟胺赖氨酸化肽的结合表明所述候选抗体是 pan 抗-羟胺赖氨酸抗体; 和 c) 选择 pan 抗羟胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中, 所述方法还包括使 pan 抗羟胺赖氨酸抗体与一种或多种选自 P1 (SEQ ID NO:58), P2 (SEQ ID NO:61), P3 (SEQ ID NO:63), P4 (SEQ ID NO:65), P5 (SEQ ID NO:67) 和 P6 (SEQ ID NO:69) 的非羟胺赖氨酸化肽接触, 并确定 pan 抗羟胺赖氨酸抗体是否结合一种或多种非羟胺赖氨酸化肽。在一些实施方案中, 选择的 pan 抗-羟胺赖氨酸抗体结合羟胺赖氨酸和脱氧羟胺赖氨酸。在一些实施方案中, 选择的 pan 抗-羟胺赖氨酸抗体与羟胺赖氨酸结合但不结合脱氧羟胺赖氨酸结合。

[0246] 在用于选择 pan 抗-羟胺赖氨酸抗体的方法的一些实施方案中, 步骤 a) 包括测试单个候选抗体与羟胺赖氨酸化肽和/或脱氧羟胺赖氨酸化肽的结合。在用于选择 pan 抗-羟胺赖氨酸抗体的方法的一些实施方案中, 步骤 a) 包括测试多个候选抗体与羟胺赖氨酸化肽和/或脱氧羟胺赖氨酸化肽的结合。在用于选择 pan 抗-羟胺赖氨酸抗体的方法的一些实施方案中, 步骤 c) 包括从所测试的多个候选抗体中选择一种或多种 pan 抗-羟胺赖氨酸抗体。例如, 选择 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 但不超过 500 个与羟胺赖氨酸化肽和/或脱氧羟胺赖氨酸化肽结合的 pan 抗-羟胺赖氨酸抗体。可以使用本领域已知的组合抗体文库方法中的许多手段中的任何来获得在本文提供的选择 pan 抗-羟胺赖氨酸抗体的方法中测试的多种抗体, 所述方法包括但不限于杂交瘤文库, 噬菌体展示文库, 例如使用由衍生自哺乳动物细胞 (例如人类细胞、小鼠细胞、大鼠细胞、兔细胞等) 的 mRNA 制备的轻链可变结构域和重链可变结构域 cDNA 制备的 scFv 噬菌体展示文库, 溶液相文库, 固相文库和合成文库方法, 例如使用亲和层析选择的合成文库方法。制备和筛选这些文库的方法在本领域中是已知的。除用于产生杂交瘤文库和噬菌体展示文库 (例如, Pharmacia 重组噬菌体抗体系统, 目录号 27-9400-01; 和 Stratagene SurfZAP™ 噬菌体展示试剂盒, 目录号 240612) 的商业上可获得的试剂盒之外, 特别适用于产生和筛选抗体文库的方法和试剂的例子可见于例如 Ladner 等人, 美国专利号 5,223,409; PCT 公开号 WO 92/18619; PCT 公开号 WO 91/17271; PCT 公开号 WO 92/20791; PCT 公开号 WO 92/15679; PCT 公开号 WO 93/01288; PCT 公开号 WO 92/01047; 和 PCT 公开号 WO 92/09690。

[0247] 另一方面, 本文提供了其中抗羟胺赖氨酸抗体与羟胺赖氨酸化肽结合的产生抗-羟胺赖氨酸抗体 (例如 pan 抗-羟胺赖氨酸抗体) 的方法。在一些实施方案中, 产生结合羟胺赖氨酸化肽的抗-羟胺赖氨酸抗体的方法包括在产生抗-羟胺赖氨酸抗体的

条件下培养包含本文描述的核酸的宿主细胞(例如,本文所述的宿主细胞)。在一些实施方案中,该方法进一步包括回收由宿主细胞产生的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。在另一方面,本文提供了其中抗羟腐胺赖氨酸抗体结合脱氧羟腐胺赖氨酸化肽的产生抗-羟腐胺赖氨酸抗体(例如,pan抗-羟腐胺赖氨酸抗体)的方法。在一些实施方案中,产生结合脱氧羟腐胺赖氨酸化肽的抗-羟腐胺赖氨酸抗体的方法包括在产生抗-羟腐胺赖氨酸抗体的条件下培养包含本文所述的核酸的宿主细胞(例如,本文所述的宿主细胞)。在一些实施方案中,该方法进一步包括回收由宿主细胞产生的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。另一方面,本文提供了一种产生结合羟腐胺赖氨酸化肽但不结合脱氧羟腐胺赖氨酸化肽的pan抗羟腐胺赖氨酸抗体的方法。在一些实施方案中,产生结合羟腐胺赖氨酸化肽但不结合脱氧羟腐胺赖氨酸化肽的pan抗-羟腐胺赖氨酸抗体的方法包括在产生pan抗-羟腐胺赖氨酸抗体的条件下培养包含本文所述的核酸的宿主细胞(例如,本文所述的宿主细胞)。在一些实施方案中,所述方法进一步包括回收由宿主细胞产生的pan抗-羟腐胺赖氨酸抗体。

[0248] III. 抗体制备

[0249] 本文所述的抗体使用本领域可用于产生抗体的技术来制备,其示例性方法在以下部分中更详细地描述。

[0250] 1. 抗体片段

[0251] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段和下文描述的其他片段。关于某些抗体片段的综述,见Hudson等人.Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见例如Pluckthün,引自The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编著,(Springer-Verlag,New York,第269-315页(1994);还参见W0 93/16185;和US专利号5,571,894和5,587,458。关于包含救援受体(salvage receptor)结合表位残基和具有增加的体内半寿期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,见US专利号5,869,046。

[0252] 双体抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是双价或双特异性的。参见例如EP404,097;W0 1993/01161;Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003);和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 906444-6448(1993)。三体抗体和四体抗体还在Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)中描述。

[0253] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis, Inc.,Waltham,MA;参见例如US专利号6,248,516B1)。

[0254] 可以通过多种技术产生抗体片段,所述多种技术包括但不限于蛋白酶解消化完整抗体以及由重组宿主细胞产生(例如,大肠杆菌或噬菌体),如本文所述。

[0255] 2. 源自文库的抗体

[0256] 可通过筛选组合文库的具有期望的一种或多种活性的抗体分离本发明的抗体。例如,本领域已知用于生成噬菌体展示文库和筛选此类文库的具有期望的结合特征的抗体的多种方法。此类方法在例如Hoogenboom等人,Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人编辑,Human Press,Totowa,NJ,2001)中综述并在,例如,McCafferty等人,Nature 348:552-554;Clackson等人,Nature 352:624-628(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Marks和Bradbury,Methods in Molecular Biology

248:161-175 (Lo, 编辑, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu 等人, J. Mol. Biol. 338 (2): 299-310 (2004); Lee 等人, J. Mol. Biol. 340 (5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34): 12467-12472 (2004); 和 Lee 等人, J. Immunol. Methods 284 (1-2): 119-132 (2004) 中进一步描述。

[0257] 在某些噬菌体展示方法中, V_H 和 V_L 基因的库通过聚合酶链式反应 (PCR) 分别克隆并在噬菌体文库中随机重组, 其然后可以筛选抗原结合噬菌体, 如 Winter 等人, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994) 中所述。噬菌体通常展示抗体片段, 作为单链抗体 Fv (scFv) 片段或作为 Fab 片段展示。来自经免疫的来源的文库提供了对免疫原高亲和力的抗体而不需要构建杂交瘤。备选地, 可以克隆初始库 (例如, 从人) 以对广泛范围的非自身以及自身抗原提供单个来源的抗体而没有任何免疫, 如 Griffiths 等人, EMBO J, 12: 725-734 (1993) 所述。最后, 也可以通过克隆来自干细胞的未重排的 V 基因区段, 并使用含有随机序列的 PCR 引物以编码高度可变的 CDR3 区并且实现体外重排, 合成地制备初始文库, 如 Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992) 所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括, 例如: 美国专利号 5, 750, 373, 和美国专利公开号 2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936 和 2009/0002360。

[0258] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段在本文被认为是人抗体或人抗体片段。

[0259] 3. 抗体变体

[0260] 在某些实施方案中, 构思了本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如, 可能想要改善该抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。可以通过向编码抗体的核苷酸序列引入适宜修饰或通过肽合成制备该抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如, 从抗体的氨基酸序列内部缺失残基和/或将残基插入所述氨基酸序列中和/或置换所述氨基酸序列中的残基。可以产生缺失、插入和置换的任意组合以获得最终构建体, 只要所述最终构建体拥有想要的特征, 例如抗原结合作用。

[0261] a) 置换变体、插入变体和缺失变体

[0262] 在某些实施方案中, 提供具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换诱变的目的位点包括 HVR 和 FR。表 A 中在“优选置换”的标题下显示保守性置换。在表 A 中在“示例性置换”的标题下提供了更实质的变化, 并且参考氨基酸侧链类别在下面进一步描述。可以将氨基酸置换引入目的抗体中并且对产物筛选所需的活性, 例如, 保留/改善的抗原结合作用。

[0263] 表 A

原始残基	示例性置换	优选的置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser

原始残基	示例性置换	优选的置换
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
[0265] Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0266] 可以根据常见的侧链特性分组氨基酸：

[0267] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0268] (2) 中性亲水：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0269] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0270] (4) 碱性：His、Lys、Arg；

[0271] (5) 影响链方向的残基：Gly、Pro；

[0272] (6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

[0273] 非保守性置换将使这些类别之一的成员交换为另一个类别的成员。

[0274] 一个置换变体类型涉及置换亲本抗体的一个或多个高变区残基。通常，经选择用于进一步研究的所得变体将相对于亲本抗体在某些生物学特性方面（例如，增加的亲和力）具有修饰（例如，改善）和/或将具有亲本抗体的基本上保留的某些生物学特性。示例性置换变体是亲和力成熟抗体，所述抗体可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术如本文所述的那些技术便利地产生。简而言之，将一个或多个HVR残基突变并且将变体抗体在噬菌体上展示并筛选特定生物学活性（例如结合亲和力）。

[0275] 可以在HVR中做出改变（例如，置换），例如以改善抗体亲和力。可以在HVR“热点”（即，在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子所编码的残基（参见例如Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)）和/或接触抗原的残基中做出这类改变，同时对所产生的变体V_H或V_L测试结合亲和力。已经例如在Hoogenboom等人，引自Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等人，编著，Human Press, Totowa, NJ, (2001)中描述了通过构建次级文库并从中重新选择实现亲和力成熟。在亲和力成熟的一些实施方案

中,通过多种方法(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)中的任一种方法,将多样性引入所选择用于成熟的可变基因中。随后产生次级文库。随后筛选该文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及HVR导向的方案,其中将几个HVR残基(例如,一次4-6个残基)随机分组。可以特别地鉴定参与抗原结合的HVR残基,例如,使用丙氨酸扫描法诱变或建模。特别地经常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0276] 在某些实施方案中,可以在一个或多个HVR中发生置换、插入或缺失,只要这类改变基本上不降低抗体结合抗原的能力。例如,可以在HVR中做出基本上不降低结合亲和力的保守性改变(例如,如本文中提供的保守性置换)。这类改变可以例如是在HVR中的抗原接触残基外部。在上文提供的变体V_H和V_L序列的某些实施方案中,每个HVR或者不予改变或含有不多于一个、两个或三个氨基酸置换。

[0277] 一种用于鉴定可以被靶向用于诱变的抗体残基或区域的有用方法称作“丙氨酸扫描法诱变法”,如Cunningham和Wells(1989) *Science* 244:1081-1085所述。在这种方法中,鉴定一个残基或靶残基组(例如,带电荷残基如arg、asp、his、lys和glu)并且用中性或带负电荷的氨基酸(例如,丙氨酸或聚丙氨酸)替换以确定该抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在对于初始置换显示功能敏感性的氨基酸位置处引入其他置换。备选地或额外地,测定抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和抗原之间的接触点。可以将这类接触残基和邻近残基作为置换候选物打靶或消除。可以筛选变体以确定它们是否含有所需的特性。

[0278] 氨基酸序列插入包括长度从1个残基至含有成百个或更多个残基的多肽间变动的氨基端和/或羧基端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入性变体包括抗体的N末端或C末端与酶(例如针对ADEPT的酶)或增加该抗体血清半寿期的多肽融合。

[0279] b) 糖基化变体

[0280] 在某些实施方案中,本文提供的抗体被改变以增加或降低抗体被糖基化的程度。对抗体添加或缺失糖基化位点可以通过改变氨基酸序列从而使得产生或移除一个或多个糖基化位点而方便地实现。

[0281] 当抗体包含Fc区时,可以改变附着于其的糖类。由哺乳动物细胞生产的天然抗体通常包含分支的、二分支的寡糖,所述寡糖一般通过N连接附着于Fc区的CH₂结构域的Asn297。参见,例如,Wright等人TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可包括多种糖类,例如甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖、和唾液酸,以及附着于二分支寡糖结构的“茎干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可以制造本发明的抗体中寡糖的修饰以创造具有某些提高的性质的抗体变体。

[0282] 在一个实施方案中,提供的抗体变体具有缺少(直接或间接)附着于Fc区的岩藻糖的糖类结构。例如,此类抗体中岩藻糖的量可以为从1%至80%,从1%至65%,从5%至65%或从20%至40%。通过计算糖链内Asn297处的岩藻糖的平均量相对于附着于Asn 297(例如,复合、杂合和高甘露糖结构)的全部糖基结构的总和测定岩藻糖的量,如通过MALDI-TOF质谱法测量,如,例如WO 2008/077546中所述。Asn297指位于Fc区中约297位(Fc区残基的Eu编号)的天冬酰胺残基;然而,Asn297也可位于297位的约±3个氨基酸上游或下游,即位置294和300之间,这是由于抗体中微小的序列变异。此类岩藻糖化变体可具有提高的ADCC功能。参见,例如,美国专利公开号US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa

Hakko Kogyo Co.,Ltd)。涉及“去岩藻糖化的”或“岩藻糖缺陷的”抗体变体的公开的实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人,J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够生产去岩藻糖化的抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖化缺陷的Lec13CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);US专利申请号US 2003/0157108A1,Presta,L;和WO 2004/056312A1,Adams等人,特别在实施例11中),和敲除细胞系,例如 α -1,6-岩藻糖转移酶基因FUT8敲除的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);和WO2003/085107)。

[0283] 提供的抗体变体还具有二分的寡糖,例如,其中附着于抗体Fc区的二分支寡糖被GlcNAc二分。此类抗体变体可具有降低的岩藻糖化。此类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684(Umana等人);和US 2005/0123546(Umana等人)中。也提供了在附着于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体描述于例如WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.);和WO 1999/22764(Raju,S.)中。

[0284] c) Fc区变体

[0285] 在某些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入到本文提供的抗体的Fc区中,从而生成Fc区变体。Fc区变体可以包含人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区),所述序列在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如置换)。

[0286] 在某些实施方案中,本发明考虑了具有一些但并非全部效应子功能的抗体变体,这使得其是这样的应用的理想的候选者,所述应用中抗体的体内半寿期是重要的然而某些效应子功能(例如补体和ADCC)是不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定法以确认CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定法以确保抗体缺少Fc γ R结合(因此可能缺少ADCC活性),但保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞—NK细胞仅表达Fc γ R1,然而单核细胞表达Fc γ R1、Fc γ R2和Fc γ R3。造血细胞上的FcR表达在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的464页上的表3中总结。用于评估目的分子的ADCC活性的体外测定法的非限制性实例描述于美国专利号5,500,362(参见,例如Hellstrom,I.等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))中。备选地,可以采用非放射性测定法(参见,例如,流式细胞术的ACT1™非放射性细胞毒性测定法(CellTechnology, Inc.Mountain View,CA;和CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定法(Promega, Madison, WI)。用于此类测定法的有用的效应子细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地或额外地,目的分子的ADCC活性可以在体内评估,例如在动物模型中,例如Clynes等人Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中公开的。也可以进行C1q结合测定法以确认抗体不能结合C1q并因此缺少CDC活性。参见,例如,WO 2006/029879和WO

2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定法(参见,例如,Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);和Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。FcRn结合和体内清除/半寿期测定也可以使用本领域已知的方法进行(参见,例如,Petkova,S.B.等人,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0287] 具有降低的效应子功能的抗体包含在Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个具有置换的那些抗体(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或多个处具有置换的Fc突变体,包括具有残基265和297置换为丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0288] 描述了具有提高的或减弱的与FcR结合的某些抗体变体。(参见,例如,美国专利号6,737,056;WO 2004/056312和Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。

[0289] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有提高ADCC的一个或多个氨基酸置换的Fc区,例如Fc区的位置298、333和/或334处(残基的EU编号)的置换。

[0290] 在一些实施方案中,在Fc区进行改变,其导致改变的(即提高的或减弱的)C1q结合和/或补体依赖的细胞毒性(CDC),例如,如美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人J.Immunol.164:4178-4184(2000)中所述。

[0291] 具有增加的半寿期和提高的与新生儿Fc受体(FcRn)结合的抗体在US2005/0014934A1(Hinton等人)中描述,所述新生儿Fc受体负责母体IgG转移至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))。那些抗体包含其中具有提高Fc区与FcRn的结合的一个或多个置换的Fc区。此类Fc变体包括在Fc区残基:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434中的一个或多个处具有置换的那些,例如Fc区残基434的置换(美国专利号7,371,826)。

[0292] 关于Fc区变体的其他实例也参见Duncan&Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;和WO 94/29351。

[0293] d) 半胱氨酸工程化的抗体变体

[0294] 在某些实施方案中,产生半胱氨酸改造的抗体是理想的,例如,“thioMAb”,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基置换。在特别的实施方案中,被置换的残基存在于抗体的易接近的位点处。通过用半胱氨酸置换那些残基,从而将反应性硫醇基团放置于抗体的可接近位点处并可用于缀合抗体至其他部分,例如检测剂,以产生抗体缀合物,如本文另外所述。在某些实施方案中,以下残基中的任何一个或多个可被半胱氨酸置换:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。可以如,例如美国专利号7,521,541中所述地生成半胱氨酸改造的抗体。

[0295] e) 抗体衍生物

[0296] 在某些实施方案中,还可进一步修饰本文提供的抗体以含有本领域已知的并且容易获得的额外的非蛋白质部分。适合于抗体的衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/顺丁烯二酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物),和葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烷化多元醇(例如

丙三醇)、聚乙烯醇,及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性可在生产中具有优势。聚合物可具有任意分子量,并且可为分支的或无分支的。附着于抗体的聚合物的数目可不同,并且如果附着多于一个聚合物,它们可以是相同或不同的分子。一般而言,用于衍生化的聚合物的数量和/或类型可以基于如下考虑确定,包括但不限于,待改善的抗体的特别的性质或功能。

[0297] 在另一个实施方案中,提供了抗体和可以通过暴露于辐射选择性地加热的非蛋白质部分的缀合物。在一个实施方案中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605(2005))。辐射可以具有任何波长,并且包括但不限于,这样的波长,所述波长不伤害普通细胞,但将非蛋白质部分加热至杀死抗体-非蛋白质部分临近的细胞的温度。

[0298] 4. 载体、宿主细胞和重组方法

[0299] 为了重组生产本发明的抗体,分离编码它的核酸,并将其插入可复制载体,用于进一步克隆(DNA扩增)或表达。可使用常规流程容易的分离编码抗体的DNA并测序(如使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异结合的寡核苷酸探针)。可利用许多载体。载体的选择部分取决于将要使用的宿主细胞。通常,宿主细胞是原核或真核(通常是哺乳动物)起源的。会领会,可以将任何同种型的恒定区用于此目的,包括IgG、IgM、IgA、IgD、和IgE恒定区,而且此类恒定区可以自任何人或动物物种获得。

[0300] 使用原核宿主细胞生成抗体

[0301] a) 载体构建

[0302] 可使用标准重组技术来获得编码本发明抗体的多肽组分的多核苷酸序列。可从抗体生成细胞诸如杂交瘤细胞分离期望的多核苷酸序列并测序。或者,可使用核苷酸合成仪或PCR技术合成多核苷酸。一旦得到,将编码多肽的序列插入能够在原核宿主中复制并表达异源多核苷酸的重组载体。为了本发明,可使用本领域可获得的且知道的许多载体。适宜载体的选择将主要取决于将要插入载体的核酸的大小和将要用载体转化的具体宿主细胞。根据其功能(扩增或表达异源多核苷酸,或二者兼之)及其与它在其中驻留的具体宿主细胞的相容性,每种载体含有多种组分。载体组分通常包括但不限于复制起点、选择标志基因、启动子、核糖体结合位点(RBS)、信号序列、异源核酸插入片段、和转录终止序列。

[0303] 一般而言,与宿主细胞一起使用的质粒载体包含衍生自与这些宿主相容物种的复制子和控制序列。载体通常携带复制位点,以及能够在转化细胞中提供表型选择的标志序列。例如,通常用衍生自大肠杆菌物种的质粒pBR322转化大肠杆菌。pBR322包含编码氨苄青霉素(Amp)和四环素(Tet)抗性的基因,由此提供轻松鉴定转化细胞的手段。pBR322、其衍生物、或其它微生物质粒或噬菌体还可包含或经修饰而包含可被微生物生物体用于表达内源蛋白质的启动子。Carter等人,美国专利5,648,237中详细记载了用于表达特定抗体的pBR322衍生物的实例。

[0304] 另外,可将包含与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体用作这些宿主的转化载体。例如,可使用噬菌体诸如λGEM.TM.-11来构建可用于转化易感宿主细胞诸如大肠杆菌LE392的重组载体。

[0305] 本发明的表达载体可包含两种或多种启动子-顺反子对,它们编码每一种多肽组分。启动子是位于顺反子上游(5')的非翻译调控序列,它调控顺反子的表达。原核启动子通

常分成两类,诱导型的和组成性的。诱导型启动子指响应培养条件的变化(如营养物的存在与否或温度变化)而启动受其控制的顺反子的升高水平转录的启动子。

[0306] 众所周知受到多种潜在宿主细胞识别的大量启动子。通过限制酶消化切下源DNA中的启动子并将分离的启动子序列插入本发明的载体,由此可将选择的启动子与编码轻链或重链的顺反子DNA可操作连接。天然启动子序列和许多异源启动子都可用于指导靶基因的扩增和/或表达。在有些实施方案中,使用异源启动子,因为与天然靶多肽启动子相比,它们通常容许所表达靶基因的更高转录和更高产量。

[0307] 适用于原核宿主的启动子包括PhoA启动子、 β -半乳糖苷酶和乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、和杂合启动子诸如tac或trc启动子。然而,在细菌中有功能的其它启动子(诸如其它已知的细菌或噬菌体启动子)也是合适的。它们的核苷酸序列已经发表,由此熟练工作人员能够使用提供任何所需限制位点的接头或衔接头将它们与编码靶轻链和重链的顺反子可操作连接(Siebenlist等人,Cell120:269(1980))。

[0308] 在本发明的一个方面中,重组载体内的每个顺反子都包含指导所表达多肽穿膜转运的分泌信号序列组分。一般而言,信号序列可以是载体的组分,或者它可以是插入载体的靶多肽DNA的一部分。为了本发明而选择的信号序列应当是受到宿主细胞识别并加工(即被信号肽酶切除)的信号序列。对于不识别并加工异源多肽的天然信号序列的原核宿主细胞,将信号序列用选自例如下组的原核信号序列替代:碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp、或热稳定的肠毒素II(STII)前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA和MBP。在本发明的一个实施方案中,表达系统的两个顺反子中都使用的信号序列是STII信号序列或其变体。

[0309] 在另一个方面中,依照本发明的免疫球蛋白的生成可在宿主细胞的细胞质中发生,因此不需要在每个顺反子内存在分泌信号序列。在那点上,免疫球蛋白轻链和重链在细胞质内表达、折叠和装配而形成功能性免疫球蛋白。某些宿主菌株(如大肠杆菌trxB-菌株)提供有利于二硫键形成的细胞质条件,从而容许所表达蛋白质亚基的正确折叠和装配。Proba和Pluckthun Gene,159:203(1995))。

[0310] 本发明的抗体还可以通过使用表达系统产生,其中可以调节表达的多肽组分的数量比例,以使本发明的分泌和正确组装的抗体的产量最大化。这种调节至少部分通过同时调节多肽组分的翻译强度来完成。

[0311] 用于调节翻译强度的一种技术公开于Simmons等人的美国专利号5,840,523。它利用顺反子内翻译起始区域(TIR)的变体。对于给定的TIR,可以产生一系列具有一定范围的翻译强度的氨基酸或核酸序列变体,由此提供用于调整该因子以用于特定链的期望表达水平的便利手段。可以通过常规诱变技术产生TIR变体,其导致密码子改变,这可以改变氨基酸序列。在某些实施方案中,核苷酸序列的变化是沉默的。TIR中的改变可以包括例如Shine-Dalgarno序列的数量或间隔的改变,以及信号序列的改变。产生突变信号序列的一种方法是在不改变信号序列的氨基酸序列(即改变是沉默的)的编码序列开始时产生“密码子库”。这可以通过改变每个密码子的第三个核苷酸位置来完成;另外,一些氨基酸,例如亮氨酸、丝氨酸和精氨酸具有多个第一和第二位置,这可能增加制备文库的复杂性。这种诱变方法在Yansura等人(1992)Methods:A Companion to Methods in Enzymol.4:151-158中描述。

[0312] 在一个实施方案中,为其中的每个顺反子产生具有一定范围的TIR强度的一组载

体。该限制性组提供各种TIR强度组合下各链表达水平的比较以及所需抗体产物的产量。TIR强度可以通过量化报道基因的表达水平来确定,如Simmons等人详细描述在美国专利5,840,523中。基于翻译强度比较,选择期望的个体TIR以在本发明的表达载体构建体中组合。

[0313] 适于表达本发明抗体的原核宿主细胞包括古细菌(Archaeobacteria)和真细菌(Eubacteria),诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体。有用细菌的实例包括埃希氏菌属(*Escherichia*) (如大肠埃希氏菌*E. coli*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*) (如枯草芽孢杆菌*B. subtilis*)、肠杆菌属(*Enterobacteria*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) (如铜绿假单胞菌*P. aeruginosa*)物种、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、变形菌属(*Proteus*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、透明颤菌属(*Vitreoscilla*)、或副球菌属(*Paracoccus*)。在一个实施方案中,使用革兰氏阴性细胞。在一个实施方案中,使用大肠杆菌细胞作为本发明的宿主。大肠杆菌菌株的实例包括菌株W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, 第2卷, Washington, D.C., 美国微生物学学会, 1987, 第1190-1219页; ATCC保藏号27,325)及其衍生物,包括具有基因型W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3lac Iq lac L8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41kanR的菌株33D3 (美国专利号5,639,635)。其它菌株及其衍生物,诸如大肠杆菌294 (ATCC 31,446)、大肠杆菌B、大肠杆菌 λ 1776 (ATCC 31,537) 和大肠杆菌RV308 (ATCC 31,608)也是合适的。这些实例只是例示而非限制。本领域知道用于构建具有指定基因型的任何上述细菌衍生物的方法,参见例如Basset al., Proteins 8:309-314 (1990)。通常必需考虑复制子在细菌细胞中的可复制性来选择适宜的细菌。例如,在使用众所周知的质粒诸如pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410来提供复制子时,大肠杆菌、沙雷氏菌属、或沙门氏菌属物种可能适于用作宿主。通常,宿主细胞应当分泌最小量的蛋白水解酶,而且可能希望在细胞培养中掺入额外的蛋白酶抑制剂。

[0314] b) 抗体生成

[0315] 用上述表达载体转化宿主细胞,并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当改动的常规营养培养基中进行培养。

[0316] 转化即将DNA导入原核宿主,使得DNA能够进行复制,或是作为染色体外元件或是通过染色体成分。根据所用宿主细胞,使用适于这些细胞的标准技术进行转化。采用氯化钙的钙处理通常用于具有坚固细胞壁屏障的细菌细胞。另一种转化方法采用聚乙二醇/DMSO。使用的还有一种技术是电穿孔。

[0317] 在本领域知道的且适于培养选定宿主细胞的培养基中培养用于生成本发明多肽的原核细胞。合适培养基的实例包括添加了必需营养补充物的LB培养基(Luria broth)。在有些实施方案中,培养基还含有根据表达载体的构建而选择的选择剂,以选择性容许包含表达载体的原核细胞生长。例如,向用于培养表达氨苄青霉素抗性基因的细胞的培养基中添加氨苄青霉素。

[0318] 除了碳、氮、和无机磷酸盐来源以外,还可含有适当浓度的任何必需补充物,或是单独加入或是作为与另一种补充物或培养基的混合物,诸如复合氮源。任选的是,培养基可含有一种或多种选自下组的还原剂:谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、巯基乙酸盐/酯、二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇。

[0319] 在合适的温度培养原核宿主细胞。在某些实施方案中,对于培养大肠杆菌,生长温

度范围是约20℃至约39℃；约25℃至约37℃；或约30℃。主要取决于宿主生物体，培养基的pH可以是范围为约5至约9的任何pH。在某些实施方案中，对于大肠杆菌，pH为约6.8至约7.4，或约7.0。

[0320] 如果本发明的表达载体中使用诱导型启动子，那么在适于激活启动子的条件下诱导蛋白质表达。在本发明的一个方面中，使用PhoA启动子来控制多肽的转录。因此，为了诱导，在磷酸盐限制培养基中培养经过转化的宿主细胞。在某些实施方案中，磷酸盐限制培养基是C.R.A.P培养基（参见例如Simmons et al., *J. Immunol. Methods* 263:133-147 (2002)）。根据所采用的载体构建物，可采用多种其它诱导物，正如本领域所知道的。

[0321] 在一个实施方案中，所表达的本发明多肽分泌到宿主细胞的周质中并从中回收。蛋白质回收通常牵涉破坏微生物，通常通过诸如渗透压震扰 (osmotic shock)、超声处理或裂解等手段。一旦细胞遭到破坏，可通过离心或过滤清除细胞碎片或整个细胞。可以通过例如亲和树脂层析进一步纯化蛋白质。或者，蛋白质可能转运到培养液中并从中分离。可从培养液清除细胞，并将培养物上清液过滤和浓缩，用于进一步纯化所生成蛋白质。可使用普遍知道的方法诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和Western印迹分析进一步分离和鉴定所表达蛋白质。

[0322] 在本发明的一个方面中，通过发酵过程大量进行抗体生产。多种大规模补料-分批发酵流程可用于生产重组蛋白。大规模发酵具有至少1000升的容量，并且在某些实施方案中，约1,000至100,000升的容量。这些发酵罐使用搅拌器叶轮来分配氧和养分，尤其是葡萄糖。小规模发酵通常指在体积容量不超过约100升的发酵罐中进行的发酵，范围可以是约1升至约100升。

[0323] 在发酵过程中，通常在将细胞在合适条件下培养至期望密度（如OD₅₅₀约180-220，在此阶段细胞处于早期稳定期）后启动蛋白质表达的诱导。根据所采用的载体构建物，可使用多种诱导物，正如本领域知道的和上文描述的。可在诱导前将细胞培养更短的时间。通常将细胞诱导约12-50小时，但是可使用更长或更短的诱导时间。

[0324] 为了提高本发明多肽的产量和质量，可修改多项发酵条件。例如，为了改善所分泌抗体多肽的正确装配和折叠，可使用过度表达伴侣蛋白诸如Dsb蛋白 (DsbA、DsbB、DsbC、DsbD和/或DsbG) 或FkpA (具有伴侣活性的一种肽基脯氨酰-顺式，反式-异构酶) 的额外载体来共转化宿主原核细胞。已经证明伴侣蛋白促进在细菌宿主细胞中生成的异源蛋白质的正确折叠和溶解度。Chen等人, *J. Biol. Chem.* 274:19601-19605 (1999) ; Georgiou等人, 美国专利6,083,715; Georgiou等人, 美国专利6,027,888; Bothmann和Pluckthun (2000) , *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105 (2000) ; Ramm和Pluckthun (2000) , *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113 (2000) ; Arie等人, *Mol. Microbiol.* 39:199-210 (2001) 。

[0325] 为了将所表达异源蛋白质（尤其是对蛋白水解敏感的异源蛋白质）的蛋白水解降至最低，可将蛋白水解酶缺陷的某些宿主菌株用于本发明。例如，可修饰宿主细胞菌株，在编码已知细菌蛋白酶的基因中进行遗传突变，诸如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI及其组合。可以获得有些大肠杆菌蛋白酶缺陷菌株，参见例如Joly等人, (1998), 同上; Georgiou等人, 美国专利5,264,365; Georgiou等人, 美国专利5,508,192; Hara等人, *Microbial Drug Resistance* 2:63-72 (1996) 。

[0326] 在一个实施方案中，在本发明的表达系统中使用蛋白水解酶缺陷且经过过度表达

一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的大肠杆菌菌株作为宿主细胞。

[0327] c) 抗体纯化

[0328] 在一个实施方案中,进一步纯化本文中生成的抗体蛋白以获得基本上同质的制品,用于进一步的测定和使用。可采用本领域知道的标准蛋白质纯化方法。下面的流程是合适纯化流程的例示:免疫亲和或离子交换柱上的分馏、乙醇沉淀、反相HPLC、硅土或阳离子交换树脂诸如DEAE上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀、和使用例如SephadexG-75的凝胶过滤。

[0329] 在一个方面中,将固定在固相上的蛋白A用于本发明抗体产物的免疫亲和纯化。蛋白A是来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的41kD细胞壁蛋白质,它以高亲和力结合抗体Fc区。Lindmark等人, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)。蛋白A固定其上的固相可以是具有玻璃或石英表面的柱子或可控孔径玻璃柱或硅胶柱。在有些应用中,柱子以诸如甘油等试剂包被,从而可能防止污染物的非特异粘附。

[0330] 作为纯化的第一步,将衍生自如上所述细胞培养物的制备物施加到蛋白A固定化固相上,使得目的抗体特异结合蛋白A。然后清洗固相以清除与固相非特异结合的污染物。最终,通过洗脱从固相回收目的抗体。

[0331] 使用真核宿主细胞生成抗体:

[0332] 用于真核宿主细胞的载体通常包括如下一种或多种非限制性组分:信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。

[0333] a) 信号序列组分

[0334] 在真核宿主细胞中使用的载体还可在目的成熟蛋白质或多肽的N端包含信号序列或具有特异切割位点的其它多肽。选择的异源信号序列可以是受到宿主细胞识别并加工(即被信号肽酶切除)的异源信号序列。在哺乳动物细胞表达中,可利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导,例如单纯疱疹病毒gD信号。将这些前体区的DNA符合读框地连接到编码抗体的DNA。

[0335] b) 复制起点

[0336] 通常,哺乳动物表达载体不需要复制起点组分。例如,通常可以使用SV40起点,只是因为它包含早期启动子。

[0337] c) 选择基因组分

[0338] 表达和克隆载体可包含选择基因,也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质:(a) 赋予对抗生素或其它毒素的抗性,如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素;(b) 补足相应的营养缺陷;或(c) 提供不能从复合培养基获得的关键营养物。

[0339] 选择方案的一个实例利用药物来阻滞宿主细胞的生长。经异源基因成功转化的那些细胞生成赋予药物抗性的蛋白质,因而幸免于选择方案。此类显性选择的实例使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0340] 适于哺乳动物细胞的选择标志的另一个实例是能够鉴定有能力摄取抗体核酸的细胞的选择标志,诸如DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白I和II、灵长类金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0341] 例如,在一些实施方案中,首先通过将所有转化子在含有甲氨蝶呤 (Mtx, DHFR的一种竞争性拮抗剂) 的培养基中进行培养来鉴定经DHFR选择基因转化的细胞。在一些实施方

案中,在采用野生型DHFR时,适宜的宿主细胞是DHFR活性缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系(如ATCC CRL-9096)。

[0342] 或者,可通过在含有针对选择标志的选择剂诸如氨基糖苷抗生素如卡那霉素、新霉素或G418的培养基中培养细胞来选择经编码抗体、野生型DHFR蛋白、和另一种选择标志诸如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH)的DNA序列转化或共转化的宿主细胞(特别是包含内源DHFR的野生型宿主)。参见美国专利4,965,199。宿主细胞可以包括NS0、CHOK1或衍生物,包括谷氨酰胺合成酶(GS)缺陷的细胞系。使用GS作为哺乳动物细胞的选择性标记的方法描述于美国专利号5,122,464和美国专利号5,891,693。

[0343] d) 启动子组分

[0344] 表达和克隆载体通常包含受到宿主生物体识别的启动子,且与编码目的多肽(例如抗体)的核酸可操作连接。已知真核细胞的启动子序列。例如,事实上,所有真核基因都具有富含AT区,它位于起始转录的位点上游约25至30个碱基处。在许多基因的转录起点上游70至80个碱基处发现的另一种序列是CNCAAT区,其中N可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的3'端是AATAAA序列,它可能是向编码序列的3'端添加聚腺苷酸(polyA)尾的信号。在某些实施方案中,任何或所有这些序列合适的插入真核表达载体中。

[0345] 在哺乳动物宿主细胞中由载体转录受到例如从病毒(诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(诸如2型腺病毒)、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒、和猿猴病毒40(SV40))基因组获得的、来自异源哺乳动物启动子(如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子)的、来自热休克启动子的启动子的控制,倘若这些启动子与宿主细胞系统相容的话。

[0346] 方便的以SV40限制性片段的形式获得SV40病毒的早期和晚期启动子,该片段还包含SV40病毒复制起点。方便的以HindIII E限制性片段的形式获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利4,419,446中公开了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达DNA的系统。美国专利4,601,978中记载了该系统的一种修改。还可参见Reyes等人, *Nature* 297:598-601 (1982),其描述了在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下表达人 β -干扰素cDNA。或者,可使用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

[0347] e) 增强子元件组分

[0348] 通常通过在载体中插入增强子序列来提高高等真核细胞对编码本发明抗体的DNA的转录。现在知道来自哺乳动物基因(例如球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、 α -胎蛋白和胰岛素基因)的许多增强子序列。通常,但是,可以使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括SV40复制起点晚期侧的增强子(bp100-270)、人巨细胞病毒早期启动子增强子、小鼠巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期侧的增强子、和腺病毒增强子。还可参见Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982),其描述了激活真核启动子的增强子元件。增强子可剪接到载体中,位于抗体多肽编码序列的5'或3'位置,但是通常位于启动子的5'位点。

[0349] f) 转录终止组分

[0350] 在真核宿主细胞中使用的表达载体还可以包含终止转录和稳定mRNA所必需的序列。此类序列通常可从真核或病毒DNA或cDNA非翻译区的5'端和偶尔的3'端获得。这些区域包含在编码抗体的mRNA的非翻译区中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止组分是牛生长激素聚腺苷酸化区。参见W094/11026及其中公开的表达载体。

[0351] g) 宿主细胞的选择和转化

[0352] 适于克隆或表达本文载体中的DNA的宿主细胞包括本文描述的高等真核细胞,包括脊椎动物宿主细胞。脊椎动物细胞在培养(组织培养)中的繁殖已经成为常规流程。有用哺乳动物宿主细胞系的实例有经SV40转化的猴肾CV1系(COS-7, ATCC CRL1651)、人胚肾系(293细胞或为悬浮培养而亚克隆的293细胞, Graham等人, *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977))、幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL10)、中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CH0, Urlaub等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))、小鼠塞托利(Sertoli)细胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980))、猴肾细胞(CV1, ATCC CCL70)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL1587)、人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL2)、犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL34)、牛鼠(buffalorat)肝细胞(BRL3A, ATCC CRL1442)、人肺细胞(W138, ATCC CCL75)、人肝细胞(HepG2, HB8065)、小鼠乳瘤(MMT060562, ATCC CCL51)、TRI细胞(Mather等人, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982))、MRC5细胞、FS4细胞;CHOK1细胞或衍生物和人肝细胞瘤(hepatoma)系(HepG2)。

[0353] 为了生成抗体,用上文所述表达或克隆载体转化宿主细胞,并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当改动的常规营养培养基中进行培养。

[0354] h) 宿主细胞的培养

[0355] 可在多种培养基中培养用于生成本发明抗体的宿主细胞。商品化培养基诸如Ham氏F10(Sigma)、极限必需培养基(MEM, Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、和Dulbecco氏修改Eagle氏培养基(DMEM, Sigma)适于培养宿主细胞。另外,可使用下列文献中记载的任何培养基作为宿主细胞的培养基:Ham等人, *Meth. Enz.* 58:44 (1979); Barnes等人, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980); 美国专利4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 5,122,469; W090/03430; W087/00195; 或美国专利复审30,985。任何这些培养基可根据需要补充激素和/或其它生长因子(诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐(诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂(诸如HEPES)、核苷酸(诸如腺苷和胸苷)、抗生素(诸如GENTAMYCINTM药物)、痕量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以适宜浓度含有本领域技术人员知道的任何其它补充物。培养条件诸如温度、pH等即为表达而选择的宿主细胞先前所用的,这对于普通技术人员是显然的。

[0356] i) 抗体的纯化

[0357] 在使用重组技术时,可在细胞内生成抗体,或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体,那么首先可以通过例如离心或超滤清除微粒碎片,或是宿主细胞或是裂解片段。如果含Fc多肽分泌到培养基中,那么可以首先使用商品化蛋白质浓缩滤器(例如Amicon或MilliporePellicon超滤单元)浓缩来自这些表达系统的上清液。可在任何上述步骤中包括蛋白酶抑制剂诸如PMSF以抑制蛋白水解,而且可包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0358] 可使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析(亲和层析是常规技术)来纯化从细胞制备的抗体组合物。蛋白A作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于人 γ 1、 γ 2、或 γ 4重链的抗体(Lindmark等人, *J. Immunol. Methods.* 62:1-13 (1983))。蛋白G推荐用于所有小鼠同种型和人 γ 3(Gussetal., *EMBOJ.* 5:1567-1575 (1986))。亲和配体所附着的基质可以是琼脂糖,但是可使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯能获得比琼

脂糖更快的流速和更短的加工时间。若抗体包含CH3结构域,则可使用Bakerbond ABX™树脂(J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.)进行纯化。根据待回收的抗体,也可使用其它蛋白质纯化技术诸如离子交换柱上的分馏、乙醇沉淀、反相HPLC、硅土上的层析、肝素SEPHAROSE™上的层析、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。

[0359] 在任何初步纯化步骤之后,可将含有目的抗体和污染物的混合物进行进一步纯化,例如通过低pH疏水相互作用层析,其使用pH约2.5-4.5的洗脱缓冲液,在低盐浓度(如约0-0.25M盐)进行。

[0360] 一般而言,制备用于研究,测试和临床应用的抗体的多种方法学在本领域中是公认的,与上述方法学一致和/或本领域技术人员认为对于特定的目的抗体合适。

[0361] IV. 组合物

[0362] 可以通过将具有希望的纯度的这种抗体与一种或多种可选的可接受载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑,1980)混合,以冻干制剂或水溶液的形式制备本文所述的抗羟胺赖氨酸抗体的组合物或制剂。可接受载体不限于:缓冲剂,如磷酸、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯己双铵;氯苄烷铵;苄索氯铵;苯酚;丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性可接受载体进一步包括分散剂,如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,如rHuPH20(**HYLENEX**®,Baxter International,Inc.)。包括rhuPH20的某些示例性sHASEGP和使用方法描述于美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。

[0363] 示例性冻干抗体制剂描述于美国专利号6,267,958中。水性抗体制剂包括描述于美国专利号6,171,586和WO 2006/044908中的那些,后一种制剂包含组氨酸-乙酸缓冲液。

[0364] 根据需要,本文的组合物还可以含有多于一种活性成分(例如,检测剂,第二活性剂等)。这些活性成分适合以对预期目的有效的量组合存在。

[0365] 可以将抗羟胺赖氨酸抗体包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如分别在胶体药物递送系统(例如,脂质体,白蛋白微球,微乳液,纳米颗粒和纳米胶囊)中或粗滴乳状液中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。这些技术在Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编,(1980年)。

[0366] 可以制备持续释放制品。持续释放制品的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,所述基质呈成形制成品的形式,例如,薄膜或微胶囊。

[0367] 用于体内施用的制剂通常是无菌的。无菌性可以容易地完成,例如通过无菌滤膜过滤。

[0368] V. 用于诊断和检测的方法和组合物

[0369] 在某些实施方案中,本文提供的任何抗-羟胺赖氨酸抗体可用于检测样品中含

羟腐胺赖氨酸的多肽的存在。如本文所用的术语“检测”涵盖定量或定性检测。在某些实施方案中,样品是生物样品。在实施方案中,生物样品包含细胞或组织,例如来自器官的组织。在一些实施方案中,组织是但不限于乳房组织、皮肤组织、脑组织、肝组织、肾组织、卵巢组织、子宫组织、宫颈组织、心脏组织、肺组织或淋巴样组织。在一些实施方案中,细胞是但不限于循环肿瘤细胞、从组织分离的细胞、细胞系。在一些实施方案中,生物样品是流体,例如灌洗液、细胞裂解液、血浆、血液或血清。本文所述的样品使用本领域常规方法进行处理,以便允许检测样品中的多肽。

[0370] 在一个实施方案中,提供了用于诊断或检测方法的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。另一方面,提供了检测样品中含羟腐胺赖氨酸的多肽的存在的方法。在某些实施方案中,该方法包括使样品与如本文所述的抗羟腐胺赖氨酸抗体在允许抗羟腐胺赖氨酸抗体与含羟腐胺赖氨酸的多肽结合的条件下接触,并检测抗羟腐胺赖氨酸抗体和含羟腐胺赖氨酸的多肽之间是否形成复合物。另一方面,提供了检测样品中含脱氧羟腐胺赖氨酸多肽的存在的方法。在某些实施方案中,所述方法包括使所述样品与本文所述的抗羟腐胺赖氨酸抗体在允许所述抗羟腐胺赖氨酸抗体与所述含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽结合的条件下接触,并且检测所述抗羟腐胺赖氨酸抗体和含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽之间是否形成复合物。这样的方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中,使用抗-羟腐胺赖氨酸抗体来选择适合用治疗剂治疗的受试者,例如,其中多肽中的羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸是用于选择患者的生物标志物。

[0371] 在某些实施方案中,提供了包含检测剂或与检测剂连接的(在本文中也称为“缀合的”)抗-羟腐胺赖氨酸抗体。检测剂(在本文中也称为“标记”)包括但不限于包括但不限于,直接检出的标记物或部分(如荧光、发色、电子致密、化学发光和放射性标记物),以及间接检出(例如借助酶促反应或分子相互作用)的部分,如酶或配体。示例性标记物包括但不限于放射性同位素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I、荧光团如稀土元素螯合物或荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹磺酰、伞形酮、萤光素酶例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利号4,737,456)、萤光素、2,3-二氢二氮杂萘二酮、辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,其与利用过氧化氢来氧化染料前体的酶如HRP、乳过氧化物酶或微过氧化物酶偶联、生物素/抗生物素蛋白、自旋标记物、噬菌体标记物、稳定的自由基、地高辛配基等。在一些实施方案中,检测剂是化学发光底物、发色团、荧光团、磁性粒子、染料、放射性标记或酶。

[0372] 抗-羟腐胺赖氨酸抗体或第二活性剂(例如抗体)与检测剂的缀合是免疫测定技术中的标准操作程序。例如,参见O'Sullivan等人,“Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay”,*Methods in Enzymology*, J.J.Langone和H.Van Vunakis 编, Vol.73(Academic Press, New York, N.Y., 1981), 第147-166页。常规方法可用于将标记部分与蛋白质或多肽共价结合。例如,可以使用偶联剂如二醛、碳化二亚胺、二马来酰亚胺、双亚胺酸酯、双重氮化的联苯胺等来用上述荧光标记、化学发光标记和酶标记标记抗体。参见,例如,美国专利3,940,475(荧光测定法)美国专利号3,645,090(酶);Hunter等人,1962,*Nature*, 144:945;David等人,1974,*Biochemistry*, 13:1014-1021;Pain等人,1981,*J. Immunol Methods*, 40:219-230;和Nygren

J., 1982, Histochem and Cytochem, 30:407-412。

[0373] 在一些实施方案中,使用第二活性剂来检测结合含羟胺赖氨酸和/或脱氧羟胺赖氨酸的多肽的抗-羟胺赖氨酸抗体。第二活性剂可以是本领域常规用于检测抗体的任何活性剂。在一些实施方案中,第二活性剂是抗体。在一些实施例中,第二活性剂与本文所述的检测剂连接。

[0374] 在一个方面,本发明提供了用于检测样品中含羟胺赖氨酸的多肽的方法,其包括以下步骤:(a)使样品与本文所述的抗-羟胺赖氨酸抗体接触;和(b)检测样品中与多肽结合的抗-羟胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体与本文所述的检测剂连接。在一些实施方案中,使用本文所述的第二活性剂检测与多肽结合的抗-羟胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,检测剂是化学发光底物、发色团、荧光团、磁性粒子、染料、放射性标记或酶。在一些实施方案中,所述检测是通过本文描述的一种或多种测定法,例如但不限于一种或多种选自酶联免疫吸附测定、放射免疫测定、免疫沉淀、层析、免疫组织化学、免疫荧光、表面等离子体共振、荧光激活细胞分选和质谱的测定。在一些实施方案中,样品是如本文所述的生物样品。在一些实施方案中,生物样品包含细胞或组织。在一些实施方案中,生物样品是流体。

[0375] 在一个方面,本发明提供了用于检测样品中的含脱氧羟胺赖氨酸的多肽的方法,包括以下步骤:(a)使样品与本文所述的抗-羟胺赖氨酸抗体接触;和(b)检测样品中与多肽结合的抗-羟胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,抗-羟胺赖氨酸抗体与本文所述的检测剂连接。在一些实施方案中,使用本文所述的第二活性剂检测与多肽结合的抗-羟胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,检测剂是化学发光底物、发色团、荧光团、磁性粒子、染料、放射性标记或酶。在一些实施方案中,所述检测是通过本文描述的一种或多种测定法,例如但不限于一种或多种选自酶联免疫吸附测定、放射免疫测定、免疫沉淀、层析、免疫组织化学、免疫荧光、表面等离子体共振、荧光激活细胞分选和质谱的测定。在一些实施方案中,样品是如本文所述的生物样品。在一些实施方案中,生物样品包含细胞或组织。在一些实施方案中,生物样品是流体。

[0376] 本领域已知的方法可用于检测抗-羟胺赖氨酸抗体和含羟胺赖氨酸和/或脱氧羟胺赖氨酸的多肽之间的结合。可以使用ELISA、表面等离子体共振(例如**BIAcore®**)、**Immuncap®**、RIA(RadioImmunoAssay)、免疫沉淀、层析、免疫组织化学、免疫荧光、荧光激活细胞分选和质谱分析。测定可以是均质的、半均质的或非均质的。例如,大多数ELISA使用抗体和/或配体来捕获和检测靶蛋白。这些ELISA可以使用均质、半均质或非均质测定形式来最大化灵敏度或降低基质干扰。

[0377] 均质测定采用这样的形式,其中捕获剂(例如抗-羟胺赖氨酸抗体)和检测剂(例如,检测剂、第二活性剂等)两者与含有靶蛋白(例如,含羟胺赖氨酸和/或含脱氧羟胺赖氨酸的多肽)的基质样品以液相反应进行同时预孵育。然后将捕获剂-靶蛋白-检测剂复合物捕获在固相上(如链霉亲和素包被的ELISA板上),洗涤,并通过检测捕获到表面的检测剂的量来定量(例如如果检测剂是酶,则添加适当的底物溶液)。半均质测定利用其中单独的捕获剂与基质样品在液相反应中预孵育的形式。然后将捕获剂-靶蛋白复合物捕获在固相上,洗涤,然后与检测剂孵育,洗涤并定量。非均质测定不使用任何液相预孵育步骤,而是使用连续步骤。将捕获剂捕获到固相中,洗涤,然后加入含有靶蛋白的基质样品并通过捕获

剂结合,洗涤,检测剂结合,洗涤,最后定量。

[0378] 通过在测定程序之前或在测定程序之后使捕获剂(例如抗-羟腐胺赖氨酸抗体)不溶解,例如在有或没有事先使用例如硝酸和还原剂(如美国专利号3,645,852或Rotmans等,1983,J.Immunol.Methods,57:87-98中所述)活化载体的情况下,通过吸附到不溶于水的基质或表面上(美国专利号3,720,760),或例如使用戊二醛或碳化二亚胺交联而非共价或共价耦合,可以将捕获剂固定到固相上。在一些实施方案中,固定化后的捕获剂(例如抗-羟腐胺赖氨酸抗体)可用于结合来自样品的靶分子(例如,含羟腐胺赖氨酸和/或含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽)。

[0379] 本文所述的任何固相或表面(例如小片、Sephadex、聚氯乙烯、塑料珠、微粒、测定板或由聚乙烯和聚苯乙烯制造的测试管)可用于本文方法的一些实施方案中。用于固定化的固相或表面可以是任何惰性载体或运载体,其基本上不溶于水且可用于免疫测定,包括例如表面、颗粒、多孔基质、纤维素聚合物海绵(**ImmunoCAP®**,Phadia)等。通常使用的载体的实例包括小片、Sephadex、聚氯乙烯、塑料珠、微粒、测定板或由聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯等制造的测试管。此类载体包括96孔微量滴定板,以及颗粒状物质,如滤纸、琼脂糖、交联葡聚糖和其他多糖。或者,反应性水不溶性基质如美国专利No.3,969,287;3,691,016;4,195,128;4,247,642;4,229,537;和4,330,440中描述的溴化氰活化的碳水化合物和反应性底物适用于捕获剂固定。在一个实施方案中,将固定的捕获剂涂布在可以用于一次分析几个样品的微量滴定板上,优选多孔微量滴定板上。

[0380] 根据需要,用可以通过非共价或共价相互作用或物理连接来连接的捕获剂(例如抗-羟腐胺赖氨酸抗体)包被固相。用于连接的技术包括在美国专利No.4,376,110和其中引用的参考文献中所述的那些。如果利用捕获剂与板的共价连接,则板或其他固相可与交联剂一起与捕获剂一起孵育。通常用于将捕获剂附着到固相基质上的交联剂包括例如1,1-双(重氮乙酰基)-2-苯基乙烷,戊二醛,N-羟基琥珀酰亚胺酯,例如具有4-叠氮基水杨酸的酯,同双官能亚氨酸酯,包括二琥珀酰亚胺酯如3,3'-二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯),和双官能马来酰亚胺如双-N-马来酰亚胺-1,8-辛烷。衍生剂如甲基-3-[(对叠氮基苯基)二硫代]丙亚胺酸酯产生能够在光存在下形成交联的可光活化中间体。通常用封闭剂处理包被的固相材料,所述封闭剂非特异性地结合并饱和结合位点以防止游离分析物分子不期望地结合到板的孔上的过量结合位点。合适的封闭剂的实例包括例如明胶、牛血清白蛋白、蛋清蛋白、酪蛋白和脱脂奶。封闭处理通常在环境温度条件下进行约1-4小时,优选约1.5-3小时。

[0381] 待分析的本文所述的样品根据需要进行稀释并且可以加入到固定相中。可以用于稀释的缓冲液包括例如(a)含有0.5%BSA,0.05%TWEEN20TM,去污剂(P20),5mM EDTA,0.25%Chaps表面活性剂,0.2%β-γ球蛋白和0.35M NaCl,pH 7.0的磷酸盐缓冲盐水(PBS);(b)含有0.5%BSA和0.05%P20的PBS;(c)含有0.5%BSA,0.05%P20,5mM EDTA和0.35M NaCl,pH6.35的PBS;(d)含有0.5%BSA,0.05%P20,5mM EDTA,0.2%β-γ球蛋白和0.35M NaCl的PBS;(e)含有0.5%BSA,0.05%P20,5mM EDTA,0.25%Chaps和0.35M NaCl的PBS;和(f)含有0.5%P20的PBS。

[0382] 选择本文所述样品和捕获剂(例如,羟腐胺赖氨酸抗体)的孵育条件以使测定的灵敏度最大化并使解离最小化。孵化时间主要取决于温度。

[0383] 选择本文所述方法中使用的孵育缓冲液的pH以维持捕获剂(例如抗-羟腐胺赖氨酸

酸抗体)与被分析物(例如含羟腐胺赖氨酸的多肽)的显著水平的特异性结合。在一些实施方案中,孵育缓冲液的pH为约6-9.5(包括pH约6-7)。在一些实施方案中,孵育缓冲液的pH约为7.2。可以使用各种缓冲液以在该步骤期间实现并保持期望的pH,包括硼酸盐、磷酸盐、碳酸盐、Tris-HCl或Tns-磷酸盐、乙酸盐、巴比妥等。然而,使用的特定缓冲液通常不是关键的,并且在单独的测定中,一种缓冲液可能优于另一种。

[0384] 可以用洗涤溶液将样品与固定化的捕获剂(例如抗-羟腐胺赖氨酸抗体)分离以从系统中去除非特异性分子,例如不含羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽。洗涤液通常是缓冲液。上述孵育缓冲液是合适的洗涤溶液。洗涤溶液的pH值如上所述来确定用于孵育缓冲液。在一个实施方案中,洗涤溶液的pH为约6-9,更优选约6-7。洗涤可以进行一次或多次。洗涤溶液的温度可以为约0-40℃,更优选约4-30℃。可以使用自动洗板机。

[0385] 在从系统除去非特异性分子(例如不含羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽)之后,可以将捕获的分析物分子(例如,含羟腐胺赖氨酸和/或含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽)与检测剂接触。将分析物分子与检测剂接触的温度和时间主要取决于所采用的检测手段。例如,当使用与链霉亲和素缀合的辣根过氧化物酶(HRP)(SA-HRP)作为检测手段时,检测剂优选与捕获的分析物孵育约0.5-2小时,更优选约1小时。如上所述洗涤系统以从系统中除去未结合的检测剂,并通过加入过氧化物酶底物并在室温下孵育平板约15分钟或直至可见良好的颜色。在一个实施方案中,在未结合的分析物已经从系统洗涤之后,将摩尔过量的检测剂添加到系统中。

[0386] 通过从未固定的相中洗去未结合的检测剂并使用适合于标签的检测方法测量与分析物结合的检测剂的量来确定结合到捕获剂(例如抗-羟腐胺赖氨酸抗体)上的(例如,含羟腐胺赖氨酸和/或含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽)的量。在一个实施方案中,标记部分是酶。在酶部分的情况下,显色的量是捕获分析物的量的直接测量。例如,当HRP是标记部分时,通过定量光密度(O.D.)吸光度(例如,在450nm)来检测颜色。在另一个实施方案中,直接测定与捕获剂结合的分析物的量。可以扩增未标记的检测剂的信号以用与标记部分缀合的抗检测剂抗体进行检测。例如,可以用HRP标记的绵羊抗小鼠IgG抗体扩增结合靶分子的未标记小鼠抗体的信号。使用适合于标签的检测方法来检测标签部分。例如,HRP可以通过使HRP与量热的底物反应并在450nm吸光度下测量反应后的底物的光密度来检测。

[0387] 系统的pH和/或温度可以变化以识别结合靶分子的分子。

[0388] 可以使用阳性对照来开发测定、评估测定灵敏度、和/或使用该测定的对照。可以在本文所述的任何方法中使用阳性对照。在一些实施方案中,所述测定包括测试不结合脱氧羟腐胺赖氨酸的阳性对照抗-羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,所述测定包括测试结合于羟腐胺赖氨酸的阳性对照抗-羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,检测并比较抗羟腐胺赖氨酸抗体与样品中含羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽的结合,以及阳性对照抗体与含羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽的结合。

[0389] 可以使用阴性对照来开发测定、评估测定灵敏度、和/或使用对照进行测定。可以在本文所述的任何方法中使用阴性对照。在一些实施方案中,所述测定包括测试不结合脱氧羟腐胺赖氨酸的阴性对照抗-羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,检测并比较抗-羟腐胺赖氨酸抗体与样品中含羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽的结合,以及阴性对照抗体与含羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽的结合。

[0390] 在一个方面,本发明提供了用于分离样品中含羟腐胺赖氨酸的多肽的方法,包括以下步骤:(a)使样品与本文所述的抗羟腐胺赖氨酸抗体接触;和(b)分离与抗体结合的多肽。在一些实施方案中,抗-羟腐胺赖氨酸抗体与本文所述的检测剂连接。在一些实施方案中,使用本文所述的第二活性剂检测与多肽结合的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,检测剂是化学发光底物、发色团、荧光团、磁性粒子、染料、放射性标记或酶。在一些实施方案中,所述检测是通过本文描述的一种或多种测定法,例如但不限于一种或多种选自酶联免疫吸附测定、放射免疫测定、免疫沉淀、层析、免疫组织化学、免疫荧光、表面等离子体共振、荧光激活细胞分选和质谱的测定。在一些实施方案中,如本文所述将抗体固定到固体表面。在一些实施方案中,样品是如本文所述的生物样品。在一些实施方案中,生物样品包含细胞或组织。在一些实施方案中,生物样品是流体。

[0391] 在一个方面,本发明提供了用于分离样品中含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽的方法,包括以下步骤:(a)使样品与本文所述的抗-羟腐胺赖氨酸抗体接触;和(b)分离与抗体结合的多肽。在一些实施方案中,抗-羟腐胺赖氨酸抗体与本文所述的检测剂连接。在一些实施方案中,使用本文所述的第二活性剂检测与多肽结合的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,检测剂是化学发光底物、发色团、荧光团、磁性粒子、染料、放射性标记或酶。在一些实施方案中,所述检测是通过本文描述的一种或多种测定法,例如但不限于一种或多种选自酶联免疫吸附测定、放射免疫测定、免疫沉淀、层析、免疫组织化学、免疫荧光、表面等离子体共振、荧光激活细胞分选和质谱的测定。在一些实施方案中,如本文所述将抗体固定到固体表面。在一些实施方案中,样品是如本文所述的生物样品。在一些实施方案中,生物样品包含细胞或组织。在一些实施方案中,生物样品是流体。

[0392] 可以使用本领域中的标准技术(例如本文所述的那些技术)分离含羟腐胺赖氨酸的多肽和含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽。例如,可以通过免疫亲和或离子交换柱、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅或阳离子交换树脂上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀和凝胶过滤来分离含羟腐胺赖氨酸的多肽和含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽。

[0393] 分离的含羟腐胺赖氨酸的多肽和含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽可以使用本领域的标准技术来鉴定。例如,分离的多肽的氨基酸序列可以通过标准测序方法获得。作为另一个实例,分离的多肽的物理性质也可以通过使用质谱测定来确定。

[0394] 制成品或试剂盒

[0395] 本发明还提供用于本文所述方法中的试剂盒。

[0396] 在一个方面,本发明提供了包含本文所述的抗-羟腐胺赖氨酸抗体或其组合物的试剂盒。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含一种或多种在用于检测样品中含羟腐胺赖氨酸的多肽的方法中使用抗-羟腐胺赖氨酸抗体的活性剂。在一些实施方案中,所述试剂盒在用于检测样品中含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽的方法中进一步包含一种或多种用于使用抗-羟腐胺赖氨酸抗体的活性剂。在一些实施方案中,一种或多种活性剂是本文所述的缓冲液、固体表面、检测剂、第二活性剂、阳性对照或阴性对照。在一些实施方案中,阳性对照包括含羟腐胺赖氨酸的多肽。在本文的一些实施方案中,阴性对照包括含非羟腐胺赖氨酸的多肽。在本文的一些实施方案中,阳性对照是含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽。在本文的一些实施方案中,阴性对照是含非脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽。在一些实施方案中,样品是生物样品。在一些实施方案中,生物样品含有细胞或组织。在一些实施方案中,生物样品是流体。

[0397] 在一个方面,本发明提供了包含本文所述的抗-羟腐胺赖氨酸抗体或其组合物的试剂盒。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含一种或多种在用于分离样品中含羟腐胺赖氨酸的多肽的方法中使用抗-羟腐胺赖氨酸抗体的活性剂。在一些实施方案中,所述试剂盒在用于分离样品中的含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽的方法中进一步包含一种或多种用于使用抗-羟腐胺赖氨酸抗体的活性剂。在一些实施方案中,一种或多种活性剂是本文所述的缓冲液、固体表面、检测剂、第二活性剂、阳性对照或阴性对照。在一些实施方案中,阳性对照包括含羟腐胺赖氨酸的多肽。在本文的一些实施方案中,阴性对照包括含非羟腐胺赖氨酸的多肽。在本文的一些实施方案中,阳性对照是含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽。在本文的一些实施方案中,阴性对照是含非脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽。在一些实施方案中,样品是生物样品。在一些实施方案中,生物样品含有细胞或组织。在一些实施方案中,生物样品是流体。

[0398] 在本文的一些实施方案中,试剂盒包含与本文所述的检测剂连接的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。在一些实施方案中,检测剂是化学发光底物、发色团、荧光团、磁性粒子、染料、放射性标记或酶。

[0399] 本发明的试剂盒可进一步包含根据本文所述的任何方法使用的任何说明书。在一些实施方案中,说明书包括根据本文所述的任何方法用抗羟腐胺赖氨酸抗体检测样品中含羟腐胺赖氨酸的多肽的描述。在一些实施方案中,说明书包括根据本文所述的任何方法用抗羟腐胺赖氨酸抗体分离样品中含羟腐胺赖氨酸的多肽的描述。在一些实施方案中,说明书包括根据本文所述的任何方法用抗羟腐胺赖氨酸抗体检测样品中含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽的描述。在一些实施方案中,说明书包括根据本文所述的任何方法用抗羟腐胺赖氨酸抗体分离样品中含脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽的描述。说明书可以在标签或包装插页上提供。试剂盒可以任选地包含另外的组分,例如用于实施本文所述方法的缓冲液和试剂。

[0400] 试剂盒的试剂(例如抗-羟腐胺赖氨酸抗体)可以在容器中。本发明的试剂盒处于合适的包装中。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶子、罐子、软包装(例如密封的聚脂薄膜或塑料袋)等。还考虑了与特定装置组合使用的包装,例如用于ELISA测定中的信号检测的装置。

[0401] 以下是本发明的方法和组合物的实例。应该理解,给定以上提供的一般描述,可以实践各种其他实施例。

实施例

[0402] 实施例1:抗-羟腐胺赖氨酸抗体的鉴定和表征

[0403] 产生以对周围氨基酸序列最低依赖性结合在多肽中的羟腐胺赖氨酸的抗-羟腐胺赖氨酸抗体。这种抗-羟腐胺赖氨酸抗体在本文中也被称为“pan抗-羟腐胺赖氨酸抗体”。

[0404] 材料和方法

[0405] Fab生产和纯化

[0406] 先前开发了用于自动固相合成羟腐胺赖氨酸化肽的正交保护的羟腐胺赖氨酸试剂,其具有显著提高的产率和>95%的纯度(Song等人,J.Org.Chem.,80:3677-3681,2015)。为了产生pan羟腐胺赖氨酸抗体,用匙孔血蓝蛋白或甲状腺球蛋白偶联的I1和I2肽(YenZym Antibodies,South San Francisco,CA)的混合物免疫10只兔。在3轮免疫(增强之间3周)

后,通过ELISA筛选兔对含羟腐胺赖氨酸的肽相对于相应的非羟腐胺赖氨酸化肽的结合选择性。具有最高结合选择性的四只兔进行一轮额外免疫。然后产生兔单克隆抗体(Abcam, Burlingame, CA) (Chen等人, J. Virol., 87:10232-10243, 2013)。通过ELISA筛选来自杂交瘤孔的上清液对于羟腐胺赖氨酸化的和匹配的未经羟腐胺赖氨酸化肽的结合(表1)。选择能够结合所有具有侧翼序列的羟腐胺赖氨酸化肽(例如羟腐胺赖氨酸化的eIF5A肽)的五个杂交瘤克隆用于进一步表征。

[0407] 表1. 羟腐胺赖氨酸化肽的总结¹

应用和肽名称	肽序列	SEQ ID NO:
免疫		
I1	Hpu -peg ₆ -C	SEQ ID NO: 54
I2	GSG-Hpu-GSG-peg ₆ -C	SEQ ID NO: 55
筛选		
P1-Hpu	生物素-peg ₆ -GSG-Hpu-GSG	SEQ ID NO: 56
P1-脱氧	生物素-peg ₆ -GSG-脱氧 Hpu-GSG	SEQ ID NO: 57
P1	生物素-peg ₆ -GSG-K-GSG	SEQ ID NO: 58
P2-Hpu	生物素-peg ₆ -STSKTG-Hpu-HGHAK	SEQ ID NO: 59
P2-脱氧	生物素-peg ₆ -STSKTG-脱氧 Hpu-HGHAK	SEQ ID NO: 60
[0408] P2	生物素-peg ₆ -STSKTG-K-HGHAK	SEQ ID NO: 61
P3-Hpu	生物素-GG-DEEAL-Hpu-QLAEWVS	SEQ ID NO: 62
P3	生物素-GG-DEEAL-K-QLAEWVS	SEQ ID NO: 63
P4-Hpu	生物素-GG-AAAA-Hpu-AAAA-Hpu-AAAA-Hpu-A	SEQ ID NO: 64
P4	生物素-GG-AAAA-Hpu-AAAA-K-AAAA-Hpu-A	SEQ ID NO: 65
P5-Hpu	GW-Hpu-PMSRSSGRVYYFNGG-生物素	SEQ ID NO: 66
P5	GW-K-PMSRSSGRVYYFNGG-生物素	SEQ ID NO: 67
P6-Hpu	生物素-GGLELD-Hpu-WASLW	SEQ ID NO: 68
P6	生物素-GGLELD-K-WASLW	SEQ ID NO: 69
结晶		
C1	GSG-Hpu-GSG	SEQ ID NO: 70
[0409] C2	GSG-脱氧 Hpu-GSG	SEQ ID NO: 71

[0410] 1peg6表示聚乙二醇;Hpu表示羟腐胺赖氨酸;脱氧Hpu表示脱氧羟腐胺赖氨酸。肽的氨基末端被生物素或乙酰基封闭。肽的羧基末端被酰胺基团加帽。

[0411] 通过使用RNeasy Mini Kit提取RNA,使用SuperScript III RT-PCR系统进行逆转录,使用SMARTer RACER 5'试剂盒(Clontech Laboratories)和TA克隆进行扩增,获得抗体序列。CHO细胞用质粒转染并培养2周。通过蛋白A亲和层析(5ml HiTrap MabSelect SuRe柱,GE Healthcare)纯化IgG。Fab片段通过木瓜蛋白酶消化制备。将IgG分子与木瓜蛋白酶以20:1的摩尔比在20mM磷酸盐pH6.5,150mM NaCl,20mM半胱氨酸盐酸盐和4mM EDTA中孵育。在37°C 4小时后,通过加入30mM碘乙酰胺淬灭反应。通过MabSelect SuRe层析从Fc片段和未消化的IgG中分离Fab片段并收集流过物。Fab片段在10mM Tris-HCl 8.0和100mM NaCl中的SuperDex D75柱(GE Healthcare)上进一步纯化。

[0412] 抗-羟腐胺赖氨酸抗体对eIF5A的特异性

[0413] Flag-标记的人WT或K50A eIF5A在人胚胎肾293T细胞中与Myc标记的DHS和HA标记的DOHH一起表达。将转染的293T细胞在裂解缓冲液(50mM Tris-HCl,150mM NaCl,2mM

EDTA, 1% Triton-X100和蛋白酶抑制剂混合物, pH 7.4) 中裂解。离心(30分钟, 16,000g和4℃)后收集上清液。然后通过western印迹分析样品以确定每种抗-羟腐胺赖氨酸单克隆抗体的特异性。

[0414] 结果

[0415] 如先前所述(Song等人, *J. Org. Chem.*, 80:3677-3681, 2015) 制备羟腐胺赖氨酸并用于合成一组不同的羟腐胺赖氨酸化肽(表1)。将10只兔交替地用缀合匙孔血蓝蛋白或甲状腺球蛋白的乙酰基-羟腐胺赖氨酸-peg6-C-酰胺和乙酰基-GSG-羟腐胺赖氨酸-GSG-peg6-C-酰胺肽免疫。经过3轮免疫后, 10只兔中的4只进行单克隆抗体产生, 因为它们通过ELISA显示出对含羟腐胺赖氨酸的肽比它们的非羟腐胺赖氨酸化的对等物具有稍高的反应。通过ELISA筛选未纯化的兔杂交瘤上清液以选择性结合用于免疫的羟腐胺赖氨酸化肽, 并进一步筛选阳性孔与一组不同的羟腐胺赖氨酸化肽结合(表1)。发现7,680个杂交瘤上清液中的146个选择性结合用于免疫接种的羟腐胺赖氨酸化肽, 但不结合对应的非羟腐胺赖氨酸化肽。这146个杂交瘤上清液中的5个与所有的羟腐胺赖氨酸化肽结合, 且与对应的非羟腐胺赖氨酸化肽具有最小的结合。这5只兔单克隆抗体被分子克隆、重组表达、纯化并表征。证实这5只兔单克隆抗体中的三只mAbHpu24、mAbHpu91和mAbHpu98识别所有不同的羟腐胺赖氨酸化肽, 但不识别对应的未修饰的肽(图1A-D和图2A)。这些结果表明, 这些抗-羟腐胺赖氨酸抗体具有与许多不同的羟腐胺赖氨酸化的蛋白相互作用的潜力, 而与羟腐胺赖氨酸的一级序列和二级结构环境无关, 即pan抗-羟腐胺赖氨酸抗体。

[0416] 表征了抗羟腐胺赖氨酸抗体与天然完整eIF5A蛋白中的羟腐胺赖氨酸结合的能力。将人胚胎肾293细胞与编码flag标记的野生型(或K50A变体)eIF5A和通过自我切割T2A肽接头融合到HA标记的DOHH的myc标记的DHS的质粒共转染(Ryan等人, *J. Gen. Virol.*, 72:2727-2732, 1991)(图2B)。使用抗flag或抗羟腐胺赖氨酸抗体对全细胞裂解物进行SDS-PAGE和Western印迹分析。野生型和K50A突变型eIF5A蛋白以与用抗flag抗体印迹显示的相似量进行表达(图2C)。3种抗-羟腐胺赖氨酸抗体检测转染的野生型eIF5A, 但不检测缺乏羟腐胺赖氨酸化所需赖氨酸的K50A变体。抗-羟腐胺赖氨酸抗体也识别内源性eIF5A, 其绝大部分是羟腐胺赖氨酸化的(Park等人, *PNAS*, 103:51-56, 2006)。

[0417] 随后筛选pan羟腐胺赖氨酸抗体与生物合成中间体脱氧羟腐胺赖氨酸的结合(图3A)。尽管FabHpu91与FabHpu98的差异在于可变结构域中的仅8个氨基酸(图1C-D和图3B), 但只有FabHpu98结合了脱氧羟腐胺赖氨酸。来自FabHpu91的单个氨基酸残基在FabHpu98的等同位置被引入以理解脱氧羟腐胺赖氨酸特异性的基础。如通过生物层干涉测量法(Octet)所判断的, FabHpu98 Y52W变体优选羟腐胺赖氨酸而不是脱氧羟腐胺赖氨酸, 如FabHpu91(图3C)。制备FabHpu91 W52Y等同物并且发现其具有改善的结合脱氧羟腐胺赖氨酸的能力, 以及削弱的结合羟腐胺赖氨酸的能力(图3C)。因此, V_H Y52可以作用为确定对于羟腐胺赖氨酸和脱氧羟腐胺赖氨酸的结合特异性的开关。

[0418] 实施例2: 抗-羟腐胺赖氨酸抗体的亲和力成熟

[0419] 使用噬菌体展示技术来进一步增强pan抗羟腐胺赖氨酸抗体的亲和力。

[0420] 材料和方法

[0421] 用于亲和力成熟的噬菌体展示

[0422] 为了改善大肠杆菌中兔FabHpu24和FabHpu98的噬菌体展示, 合成了细菌密码子优

化的兔FabHpu24和FabHpu98序列(Genewiz),并将其克隆到噬菌体展示载体中。通过Kunkel诱变产生噬菌体展示文库(Kunkel等人,PNAS,82:488-492,1985)。在每个文库中,使用核苷酸碱基的70-10-10-10混合物与过量的野生型核苷酸合成的简并寡核苷酸,在相同CDR环上的每个位置引入突变。因此,所得文库以约50%的频率有利于野生型残基。根据标准方案进行所有噬菌体制备(Bostrom等人,Methods Mol.Biol.,525:353-376,2009)。简言之,将96孔Maxisorp板在4℃用5μg/ml NeutrAvidin包被过夜,随后用Superblock™ T20(PBS)封闭缓冲液在20℃封闭1小时。对于第1轮,在500nM浓度振荡10分钟后在平板上捕获P1-Hpu肽。除去过量的肽后,将100μl文库噬菌体(封闭缓冲液中 3×10^{12} 个微粒/ml)加入到每个孔中,并将平板在室温下孵育1小时。然后用PBS中的0.05%(v/v) Tween 20将平板洗涤10次。用0.1M HCl和0.5M KCl将结合的噬菌体从平板上洗脱20min,用等体积的1M Tris-HCl pH 7.5中和并扩增用于随后的轮次。从第2轮开始,Fab展示噬菌体首先与降低浓度的生物素化肽混合并在NeutrAvidin包被的孔上捕获15min。几轮后,将选择的克隆重新格式化为IgG并瞬时转染到Expi293细胞(LiFc Technologies,Grand Island,NY)中。

[0423] 生物层干涉测量

[0424] 用Octet RED 96系统(ForteBio,Menlo Park,CA)通过生物层干涉测量法检测肽和Fab之间的相互作用。将肽固定在链霉亲和素包被的传感器尖端(ForteBio)上。在使用之前,将传感器尖端浸泡1min的1x动力学缓冲液。将Fabs调整至200nM的浓度。用于Octet的微孔板每孔填充200μl缓冲液或样品。数据由Octet Data Acquisition 7.0软件自动生成。

[0425] 表面等离子体共振分析

[0426] 在Biacore模型T200(Biacore,Uppsala,瑞典)上测量表面等离子体共振数据。Biacore CM5芯片用约300RU的NeutrAvidin包被,并且捕获生物素化的抗原<10RU。将Fab片段在10mM HEPES pH7.4,0.15M NaCl和0.005%表面活性剂P20中的系列稀释液流过固定化肽并且使用1:1Langmuir结合模型来计算每个Fab:抗原对的 k_{on} 、 k_{off} 和 K_D 。

[0427] eIF5A的免疫沉淀

[0428] 收集4块板(150mm)的亚汇合293T细胞,并在5ml冰冷的裂解缓冲液(50mM Tris-HCl,150mM NaCl,2mM EDTA,1% Triton-X100和蛋白酶抑制剂混合物,pH 7.4)。离心(30min, 5×10^4g ,4℃)后收集上清液,并稀释1、2、4或8倍。将来自每个稀释液的样品(500μl)加入预先装载5μg纯化的mAbHpu24、mAbHpu24.B、mAbHpu98或mAbHpu98.61的50μl蛋白A dynabeads(Invitrogen)中,并在4℃孵育4小时。然后将珠子用裂解缓冲液洗涤3次,并在70℃下与50μl的1×NuPAGE LDS样品缓冲液孵育10min。电泳后蛋白质通过考马斯蓝染色显现。

[0429] 结果

[0430] FabHpu98和FabHpu24对P1羟腐胺赖氨酸化肽的结合亲和力(K_D) (表2)分别为~113nM和~192nM。先前的研究已经表明,eIF5A是许多不同细胞类型中丰富的羟腐胺赖氨酸化的蛋白质(Cooper等人,Cell,29:791-797,1982)。需要抗体对羟腐胺赖氨酸的高度亲和力以增加识别低丰度羟腐胺赖氨酸化的蛋白质的可能性。

[0431] 为了潜在地更好地支持用于锚定羟腐胺赖氨酸的核心氢键网络,改造侧重于外周CDR残基。基于复合物的结构(参见实施例3),FabHpu24的CDR L1、L2、H2和FabHpu98的CDR H1、H2、L3多样化。在使用生物素-peg6-GSG-羟腐胺赖氨酸-GSG(P1)肽和序列分析进行几轮

噬菌体文库选择后,目的克隆在Expi293细胞中表达为Fab片段,通过SPR纯化并测试其与羟腐胺赖氨酸的结合。改进的V_L和V_H序列(L1,L2,H2)的组合产生FabHpu24.B变体,其对于羟腐胺赖氨酸化肽P1具有比其亲本克隆高32倍的结合亲和力(图1A-B)。FabHpu24.B以6nM的K_D维持对羟腐胺赖氨酸的特异性,其对脱氧羟腐胺赖氨酸的结合非常弱(表2)。相比之下,FabHpu98的亲合力成熟产生FabHpu98.61造成了与羟腐胺赖氨酸(18nM K_D)和脱氧羟腐胺赖氨酸(20nM K_D)的高亲和力结合(图1C-D和表2)。

表 2. Pan 抗羟腐胺赖氨酸 Fab 片段的结合常数¹

肽	FabHpu 24 K _D (nM)	FabHpu24 .B K _D (nM)	Fold	FabHpu 98 K _D (nM)	FabHpu98 .61 K _D (nM)	倍数
P1-Hpu	192 ± 35	6 ± 2	32	119 ± 60	15 ± 3	7.9
P1- 脱 氧 Hpu P1	>1000	>1000		118 ± 61	17 ± 4	6.9
P2-Hpu	157 ± 12	13 ± 5	12	204 ± 40	78 ± 14	2.6
P2- 脱 氧 Hpu P2	>1000	>1000		158 ± 13	86 ± 22	1.8
P3-Hpu	>1000	186 ± 60	>5	>1000	>1000	
P3	>1000	>1000		>1000	>1000	
P4-Hpu	541 ± 331	32 ± 15	17	228 ± 43	91 ± 16	2.5
P4	>1000	>1000		>1000	>1000	
P5-Hpu	96 ± 19	7 ± 3	13	176 ± 33	70 ± 21	2.5
P5	>1000	>1000		>1000	>1000	
P6-Hpu	176 ± 55	61 ± 11	2.9	>1000	229 ± 40	>4.4
P6	>1000	>1000		>1000	>1000	

[0434] 1Hpu表示羟腐胺赖氨酸;脱氧Hpu表示脱氧羟腐胺赖氨酸。亲和力测量(平均值±SD)通过表面等离子体共振进行。将结合亲和力的成倍改进(显示为“倍数”)计算为亲本和对应的亲和力成熟抗体的K_D值的比率。

[0435] 基于这些结构,突变位于外围CDR环并且预计不会接触肽中的其他残基。为了评估增加的亲和力是否由于改善了与羟腐胺赖氨酸或侧翼序列的相互作用,针对6对羟腐胺赖氨酸化的或非羟腐胺赖氨酸化肽(图4A-B、图5A-E和图6A-F)评估选定的Fab。亲和力成熟的IgG可以以比它们的亲本克隆具有更高的最大结合(R_{max})结合所有的羟腐胺赖氨酸化肽,但不与匹配的非羟腐胺赖氨酸化肽结合(表2)。抗-羟腐胺赖氨酸抗体具有轻微的序列偏好,例如,FabHpu98.61弱结合于P3含羟腐胺赖氨酸的肽,而它对其他肽具有更好的反应(图6A-F)。第三,FabHpu24.B与羟腐胺赖氨酸化肽结合最好,而FabHpu98.61保留了结合含脱氧羟腐胺赖氨酸的肽的能力。因此,FabHpu24.B和FabHpu98.61的组合似乎适合于发现不同的

潜在的经过羟腐胺赖氨酸修饰的和经过脱氧羟腐胺赖氨酸修饰的蛋白质。

[0436] 为了研究亲和力成熟的抗体是否会导致下拉潜在的羟腐胺赖氨酸化的蛋白质的效率提高,使用mAbHpu24、mAbHpu24.B、mAbHpu98和mAbHpu98.61来免疫沉淀来自一系列293T细胞裂解物稀释液的内源性eIF5A蛋白质。在所有裂解物稀释液中亲本mAbHpu24免疫沉淀eIF5A,而具有12倍亲和力改善的mAbHpu24.B显著增强了eIF5A的回收(图7A-B)。此外,即使mAbHpu98.61仅具有与P2-Hpu肽结合的2倍亲和力改善(图7A-B,表2),mAbHpu98.61在回收eIF5A方面也大大优于mAbHpu98。因此,亲和力成熟pan羟腐胺赖氨酸抗体可以更有效地富集潜在的新型低丰度羟腐胺赖氨酸化的蛋白质。

[0437] 实施例3:与羟腐胺赖氨酸化肽或脱氧羟腐胺赖氨酸化肽复合的抗体的结构分析

[0438] 通过结构分析来表征与羟腐胺赖氨酸化或脱氧羟腐胺赖氨酸化肽复合的pan抗-羟腐胺赖氨酸抗体。

[0439] 材料和方法

[0440] X-射线晶体学结构分析

[0441] 将纯化的FabHpu24浓缩至10mg/ml,并且在采用坐滴法结晶之前以1:2的摩尔比与乙酰基-GSG-羟腐胺赖氨酸-GSG-酰胺肽混合。FabHpu24的复合物的优化结晶条件是4°C下20%聚乙二醇(peg)3350,0.1M双-三丙烷pH 7.0和0.2M磷酸钾/磷酸钠。为了收集数据,在液氮中快速冷冻之前,将晶体在冷冻保护剂溶液(25%甘油,20%PEG 3350,0.1M双-三丙烷pH 7.0和0.2M磷酸钾/磷酸钠)中短暂浸泡,并且在光束线ALS 5.0.2处收集数据组。

[0442] 将纯化的FabHpu24.B浓缩至10mg/ml,并且在通过坐滴法结晶之前以1:4的摩尔比与乙酰基-GSG-羟腐胺赖氨酸-GSG-酰胺肽(C1)混合。FabHpu24.B的复合物的优化结晶条件是19°C下14%peg6000,0.5M NaCl。为了收集数据,在液氮中快速冷冻之前,将晶体在冷冻保护剂溶液(35%乙二醇,14%peg6000,0.5M NaCl和1mM C1肽)中短暂浸泡,并且在光束线ALS5.0.2处收集数据组。

[0443] 将纯化的FabHpu98浓缩至15mg/ml,并在通过坐滴法结晶之前以1:4的摩尔比与乙酰基-GSG-羟腐胺赖氨酸-GSG-酰胺肽(C1)或乙酰基-GSG-脱氧羟腐胺赖氨酸-GSG肽(C2)混合。FabHpu98复合物的优化结晶条件是4°C下20%peg8000和0.5M Li₂SO₄。为了收集数据,在液氮中快速冷冻之前,将晶体在冷冻保护剂溶液(30%乙二醇,5%PEG 8000,0.4M Li₂SO₄,30%乙二醇和1mM对应肽)中短暂浸泡,在Advanced Photon Source (APS)的光束线22-IDG处收集数据组。

[0444] 用HKL2000软件包(Otwinowski等人,Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. Macromolecular Crystallography, Academic Press, pp.307-326,1997)处理所有X射线衍射数据组。通过Phenix软件包中的Phaser,通过分子替换来确定结构,其中利用建立在同源Fab(蛋白质数据库[PDB]4HBC)上的起始模型(Adams等人,Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 66:213-221,2010和McCoy等人,J. Appl. Crystallogr. 40:658-674,2007)。

[0445] 结果

[0446] FabHpu24-羟腐胺赖氨酸化肽复合物

[0447] 在**2.0Å**分辨率下测定FabHpu24-羟腐胺赖氨酸化的C1肽复合物的X射线结晶学结构以获得对抗体与羟腐胺赖氨酸结合的分子洞察(表3)。该复合物在P2₁空间群中结晶,其

中在不对称单位 (0.15\AA 的rmsd) 中具有两个每相似的FabHpu24-羟腐胺赖氨酸复合物。在模拟退火mFo-dFc省略电子密度图(图8A)中,羟腐胺赖氨酸的4-氨基-2-羟基丁基清晰可见,但羟腐胺赖氨酸的其余不可见。这些观察结果表明FabHpu24仅结合羟腐胺赖氨酸而不结合侧翼氨基酸残基。实际上,羟腐胺赖氨酸插入到由FabHpu24的重链和轻链可变结构域形成的深袋中(图9A)。结合羟腐胺赖氨酸的袋掩埋了约为 301\AA^2 的溶剂暴露的总表面积,其中分别由 V_H 和 V_L 链提供 112\AA^2 和 189\AA^2 。

表 3. 结构数据总结和精修统计¹

	羟腐胺赖氨酸 -FabHpu24	羟腐胺赖氨酸- FabHpu24.B	羟腐胺赖氨酸- FabHpu98	脱氧羟腐胺赖氨酸 -FabHpu98	羟腐胺赖氨酸- FabHpu98.61
数据收集					
空间群	P21	P21	C222	C222	C2
细胞尺寸					
a,b,c (Å)	42.4, 167.3,	69.1, 168.0,	106.0 ,	105.6 ,	130.1 ,
[0448]	68.3	84.9	294.1, 68.7	294.0, 68.8	75.8, 120.6
α,β,γ (°)	90, 98.9, 90	90, 99.7, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 120.7, 90
分辨率(Å)	50-1.85 (1.92-1.85)	50-2.40 (2.49-2.40)	50.0-1.95 (2.0-1.95)	50.0-2.0 (2.07-2.00)	40.0-1.9 (2.0-1.9)
Rsym (%)	6.6 (54.5)	7.4 (52.9)	7.5 (78.5)	7.5 (88.4)	9.0 (55.2)
最高壳中的 $CC_{1/2}$	0.719	0.776	0.615	0.605	0.808
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	30.7 (2.0)	15.4 (2.3)	22.0 (2.2)	16.0 (2.2)	9.9 (2.1)
完整性(%)	99.9 (99.9)	100 (99.9)	99.8 (99.0)	99.9 (99.8)	97.7 (95.3)
冗余	3.8 (3.6)	1.9 (1.9)	7.4 (6.5)	7.1 (5.6)	3.4 (3.3)
精修					
分辨率(Å)	43.0-2.0	49.0-2.4	41.2-1.95	42.9-1.98	37.2-1.9
特有反射的 No.	79689	74274	78403	74438	77821
No. Fabs	2	4	2	2	2
No.结合肽	2	4	1	1	2
Rwork / Rfree (%)	19.2 / 22.5	20.1 / 24.8	17.7 / 21.8	17.9 / 22.3	21.2 / 24.9
No. 原子					
[0449]					
蛋白质	6392	12730	6423	6429	6289
溶剂	266	277	262	155	254
r.m.s 偏差					
键长度 (Å)	0.006	0.004	0.013	0.013	0.005
键角度 (°)	1.02	0.882	1.48	1.48	1.083
Ramachandran					
有利的(%)	96.2	96.3	97.5	96.7	97.2
允许的(%)	3.8	3.5	2.4	3.0	2.54
离群值(%)	0.0	0.2	0.1	0.4	0.24

[0450] 1括号中的值用于最高分辨率的壳。

[0451] 羟腐胺赖氨酸结合袋主要由互补决定区 (CDR) L1、L3和H3中的残基组成。在可用于极性相互作用的羟腐胺赖氨酸侧链上仅有3个杂原子(图3A)。检查羟腐胺赖氨酸-FabHpu24

界面揭示了在羟腐胺赖氨酸远端(-4-氨基-2-羟基丁基)包括氢键和盐桥相互作用的相互作用网络。具体而言,因为其通过分析连续静电统计学(ACE)预测的pKa为9.8,所以在结晶条件下,羟腐胺赖氨酸的末端氨基中的第一个杂原子(11-N)可能带正电荷(Schaefer等人,The Journal of Physical Chemistry,100:1578:1599,1996)。杂原子(11-N)通过V_L D96的盐桥锚定在袋的底部,2个额外的氢键与V_L D95的侧链和V_H Y92的主链羰基结合。此外,V_L D96通过氢键被V_H Y100b和V_L Y92稳定。第二个杂原子,即羟腐胺赖氨酸的9-羟基与V_L D95、V_H Y100b和水分子形成氢键。此外,由V_H D100配位的水分子还与第三个杂原子(7-N)相互作用,该第三个杂原子(7-N)预测的pKa为10.2,并且还与V_L Y93的羰基形成氢键。相反,如稀疏电子密度所表明的,羟腐胺赖氨酸的近端可以更灵活。这并不意外,因为脂肪链只能被疏水性相互作用限制。尽管如此,羟腐胺赖氨酸的近端部分起着间隔物的作用,允许远端到达结合袋的底部。

[0452] FabHpu98羟腐胺赖氨酸和脱氧羟腐胺赖氨酸复合物

[0453] FabHpu98具有双重特异性,因为它结合了羟腐胺赖氨酸和脱氧羟腐胺赖氨酸。FabHpu98-羟腐胺赖氨酸和FabHpu98-脱氧羟腐胺赖氨酸复合物晶体在相同条件下生长,其X射线晶体学结构在**2.0 Å**分辨率下测定。该复合物在C222空间群中结晶,其中在非对称单位中有两个相似的FabHpu98结晶(rmsd为**0.764 Å**)。一个FabHpu98分子与羟腐胺赖氨酸或脱氧羟腐胺赖氨酸形成复合物,而另一个FabHpu98分子处于未复合形式,因为其互补位被分子间接触阻断。

[0454] 在FabHpu98复合物中,羟腐胺赖氨酸或脱氧羟腐胺赖氨酸也分别结合在由V_H和V_L界面构成的深袋中,分别具有**148 Å²**和**156 Å²**的掩埋表面V_H和V_L链(图9B)。羟腐胺赖氨酸被倾斜滑入FabHpu98的结合袋中,但几乎垂直于FabHpu24的可变结构域之间的突出。2个的羟腐胺赖氨酸部分相对于彼此以46°的角度突出。

[0455] 在FabHpu98-羟腐胺赖氨酸复合物中,4-氨基-2-羟基丁基也被静电相互作用和氢键完全掩埋和配位,而羟腐胺赖氨酸的其余被半掩埋。在袋底部,羟腐胺赖氨酸的末端氨基(11-N)与V_H框架残基N35、D95和有序水分子形成氢键。末端氨基也通过静电相互作用与V_H D50相互作用。所有这些接触残基通过与相邻残基的氢键网络进一步定位(图10B)。杂原子(7-N)与V_L Y92的羰基和硫酸根离子形成氢键。后者在特异性和亲和性上是不可或缺的,因为使用HEPES和Tris缓冲液的表面等离子体共振(SPR)实验显示FabHpu98以相似的亲和力结合羟腐胺赖氨酸或脱氧羟腐胺赖氨酸。

[0456] 芳香族残基明显地提供了对于羟腐胺赖氨酸或脱氧羟腐胺赖氨酸的脂族部分有利的疏水环境。与FabHpu24的羟腐胺赖氨酸复合物不同,附近的残基也在模拟退火mFo-dFc省略电密度图中显示(图8B)。该模型显示只有肽骨架原子与FabHpu98接触。

[0457] 脱氧羟腐胺赖氨酸和羟腐胺赖氨酸相互作用的比较

[0458] 羟腐胺赖氨酸和脱氧羟腐胺赖氨酸采用类似的构象插入由FabHpu98构成的深袋中。但是,在脱氧羟腐胺赖氨酸和羟腐胺赖氨酸相互作用方面存在差异。首先,通过使用来自FabHpu98:羟腐胺赖氨酸模型的相位计算的Fo(羟腐胺赖氨酸)-Fo(脱氧羟腐胺赖氨酸)差异图中明确显示了羟腐胺赖氨酸的羟基基团(图11A)。羟腐胺赖氨酸的羟基与V_L S94、V_H Y52和硫酸根离子形成氢网络(图11B)。

[0459] 如前所述, V_H Y52功能对于脱氧羟腐胺赖氨酸相互作用是不可缺的。羟腐胺赖氨酸的羟基与 V_L S94(3.0 \AA)和 V_H Y52侧链(3.0 \AA)形成2个相对较长的氢键(图11B)。在处于FabHpu98-脱氧羟腐胺赖氨酸复合物中时,与羟基的2个氢键不再存在。相反, V_H Y52显示侧链运动并朝向 V_L S94突出,并且显然形成(2.8 \AA)氢键(图11C)。这些观察结果与诱变和SPR研究一致。与野生型FabHpu98(图3C)相比, V_H Y52F突变体对含羟腐胺赖氨酸的肽表现出较弱的结合亲和力,可能是由于氢键的缺失。此外, V_H Y52F突变可能由于其不能与 V_L S94形成氢键而消除与脱氧羟腐胺赖氨酸的可检测的相互作用。因此, V_H 残基Y52在与脱氧羟腐胺赖氨酸的相互作用中起关键作用。

[0460] FabHpu24.B羟腐胺赖氨酸化肽复合物

[0461] 在 2.4 \AA 分辨率下测定FabHpu24.B-羟腐胺赖氨酸化的C1肽复合物的晶体结构以更好地理解FabHpu24.B的30倍亲和力改善的分子基础。FabHpu24.B的晶体与FabHpu24同晶,尽管晶胞是FabHpu24的两倍大。虽然FabHpu24.B的一级序列与其亲本FabHpu24在CDRL1、L2和H2中不同,但仅在CDR H2中观察到骨架构象变化,这进一步推动CDR H3朝向羟腐胺赖氨酸部分(图12A)。因此,FabHpu24.B V_H D100和 V_L Y28之间的氢键产生更大的接触面积以包含羟腐胺赖氨酸。除了第三个杂原子(7-N)与FabHpu24.B中的 V_H G100a的羰基直接形成氢键而不是配位水外,羟腐胺赖氨酸显然利用相同氢网络锚定在深袋中(图12B)。此外,与羟腐胺赖氨酸相邻的侧翼残基也参与了与FabHpu24.B的相互作用。 V_H M99的羰基和 V_H D56侧链与C1肽的骨架形成氢键。另外, V_H 残基D56也与肽S6中侧翼残基的侧链相互作用。这些结果可解释FabHpu24.B和具有不同侧翼序列(6nM至186nM)的羟腐胺赖氨酸之间的结合亲和力的差异。虽然在FabHpu24-羟腐胺赖氨酸复合物中只观察到了羟腐胺赖氨酸,侧翼序列也影响了FabHpu24和羟腐胺赖氨酸之间的相互作用。然而,FabHpu24.B能够结合所有6种合成的羟腐胺赖氨酸化肽。

[0462] FabHpu98.61羟腐胺赖氨酸化肽复合物

[0463] 在 2.2 \AA 分辨率下测定FabHpu98.61-羟腐胺赖氨酸化的C1肽复合物的X-射线结晶学结构,以获得对抗体与羟腐胺赖氨酸结合的分子洞察。该复合物在C2空间群中结晶,在不对称单位(rmsd为 0.14 \AA)具有两个每每类似FabHpu98.61-羟腐胺赖氨酸复合物。FabHpu98.61和FabHpu98以非常相似的方式结合于羟腐胺赖氨酸化的C1肽,除了其中C27和C32形成二硫化物的CDR H1环(图12C)。结果,FabHpu98.61 CDR H1靠向 V_H W9并且可以改善它对羟腐胺赖氨酸的包装。另外, V_H T33移动的更近并与羟腐胺赖氨酸的11-N形成另一个H-键,其他相互作用保持不变。

[0464] 序列

[0465] Hpu24轻链CDR1氨基酸序列(Kabat)

[0466] QSSETVYRGDWLS (SEQ ID NO:1)

[0467] Hpu24.B轻链CDR1的氨基酸序列(Kabat)

[0468] RSRQRVYLGDWLS (SEQ ID NO:2)

[0469] Hpu91、Hpu98和Hpu98.61轻链CDR1的氨基酸序列(Kabat)

[0470] QASEDIKRYLA (SEQ ID NO:3)

[0471] Hpu24轻链CDR2的氨基酸序列(Kabat)

- [0472] DASYLAS (SEQ ID NO:4)
- [0473] Hpu24.B轻链CDR2的氨基酸序列 (Kabat)
- [0474] DASFRGD (SEQ ID NO:5)
- [0475] Hpu91、Hpu98和Hpu98.61轻链CDR2的氨基酸序列 (Kabat)
- [0476] AASKLAS (SEQ ID NO:6)
- [0477] Hpu24和Hpu24.B轻链CDR3的氨基酸序列 (Kabat)
- [0478] LGGYYDDADDT (SEQ ID NO:7)
- [0479] Hpu98和Hpu98.61轻链CDR3的氨基酸序列 (Kabat)
- [0480] QQGYTSSNVNNA (SEQ ID NO:8)
- [0481] Hpu24和Hpu24.B重链CDR1的氨基酸序列 (Kabat)
- [0482] DYAMI (SEQ ID NO:9)
- [0483] Hpu91重链CDR1的氨基酸序列 (Kabat)
- [0484] TYTIN (SEQ ID NO:10)
- [0485] Hpu98重链CDR1的氨基酸序列 (Kabat)
- [0486] TYTMN (SEQ ID NO:11)
- [0487] Hpu98.61重链CDR1的氨基酸序列 (Kabat)
- [0488] HCTMN (SEQ ID NO:12)
- [0489] Hpu24重链CDR2的氨基酸序列 (Kabat)
- [0490] IYGGSNKLAYAKWA (SEQ ID NO:13)
- [0491] Hpu24.B重链CDR2的氨基酸序列 (Kabat)
- [0492] IYGVINDLAYAKWA (SEQ ID NO:14)
- [0493] Hpu91重链CDR2的氨基酸序列 (Kabat)
- [0494] DIWSDGNTYYANWA (SEQ ID NO:15)
- [0495] Hpu98和Hpu98.61重链CDR2的氨基酸序列 (Kabat)
- [0496] DIYTDGNTYYANWA (SEQ ID NO:16)
- [0497] Hpu24和Hpu24.B重链CDR3的氨基酸序列 (Kabat)
- [0498] GYGSMGDYDRLNL (SEQ ID NO:17)
- [0499] Hpu91重链CDR3的氨基酸序列 (Kabat)
- [0500] DSWDTSIYYGLDL (SEQ ID NO:18)
- [0501] Hpu98和Hpu98.61重链CDR3的氨基酸序列 (Kabat)
- [0502] DSWDASSYYGLDL (SEQ ID NO:19)
- [0503] Hpu24轻链可变区的氨基酸序列
- [0504]
- AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSETVYRGDWLSWFQKKPGQPPKLLIYDASYLASGVSSRFSGSGSGTHFTLTI
SGVQCDDAATYYCLGGYYDDADDTFGGGTEVVVK (SEQ IDNO:20)
- [0505] Hpu24.B轻链可变区的氨基酸序列
- [0506]
- AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCRSRQRVYLGDWLSWFQKKPGQPPKLLIYDASFRGDGVSSRFSGSGSGTHFTLTI
SGVQCDDAATYYCLGGYYDDADDTFGGGTEVVVK (SEQ IDNO:21)

[0507] Hpu91轻链可变区的氨基酸序列

[0508]

AIKMTQTPSSVSAAVGGTIVTINCQASEDIKRYLAWYQQKPGQPPKLLIYAASKLASGVSSRFTGSGSGTEYTLTISG
VQCDDAATYYCQQGYTSTNVNNAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:22)

[0509] Hpu98和Hpu98.61轻链可变区的氨基酸序列

[0510]

AIKMTQTPSSVSAAVGGTIVTINCQASEDIKRYLAWYQQKPGQPPKLLIYAASKLASGVSSRFKSGSGTEYTLTISG
VQCDDAATYYCQQGYTSSNVNNAFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:23)

[0511] Hpu24重链可变区的氨基酸序列

[0512]

QEQLKESGGRLVAPGTPLTLTCTVSGFDISDYAMIWVRQAPGKGLEWIGIYGGSNKLAYAKWAKGRFTISRTSTTV
DLKITSPTTEDTATYFCARGYGSMDGYDRLNLWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:24)

[0513] Hpu24.B重链可变区的氨基酸序列

[0514]

QEQLKESGGRLVAPGTPLTLTCTVSGFDISDYAMIWVRQAPGKGLEWIGIYGVINDLAYAKWAKGRFTISRTSTTV
DLKITSPTTEDTATYFCARGYGSMDGYDRLNLWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:25)

[0515] H p u 9 1 重 链 可 变 区 的 氨 基 酸 序 列

QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSASFSLSTYTINWVRQAPGKGLEWIGDIWSDGNTYYANWAKGRFTISKSTTVDL
KITSPTTEDTATYFCARDSWDTSIYYGLDLWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:26)

[0516] Hpu98重链可变区的氨基酸序列

[0517]

QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSTYTMNWVRQAPGKGLEWIGDIYTDGNTYYANWAKGRFTISKSTTVDL
KITSPTTEDTATYFCARDSWDASSYYGLDLWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:27)

[0518] Hpu98.61重链可变区的氨基酸序列

[0519]

QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSACSLYHCTMNWVRQAPGKGLEWIGDIYTDGNTYYANWAKGRFTISKSTTVDL
KITSPTTEDTATYFCARDSWDASSYYGLDLWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:28)

[0520] Hpu24轻链的氨基酸序列

[0521]

AAVLTQTPSPVSAAVGGTIVTISCQSSETVYRGDWLSWFQKKPGQPPKLLIYDASYLASGVSSRFSGSGSGTHFTLTI
SGVQCDDAATYYCLGGYYDDADDTFGGGTEVVVKGDPVAPTIVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVD
GTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO:29)

[0522] Hpu24.B轻链的氨基酸序列

[0523]

AAVLTQTPSPVSAAVGGTIVTISCRSRQRVYLGDWLSWFQKKPGQPPKLLIYDASFRGDVSSRFSGSGSGTHFTLTI
SGVQCDDAATYYCLGGYYDDADDTFGGGTEVVVKGDPVAPTIVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVD
GTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO:30)

[0524] Hpu91轻链的氨基酸序列

[0525]

AIKMTQTPSSVSAAVGGTIVTINCQASEDIKRYLAWYQQKPGQPPKLLIYAASKLASGVSSRFTGSGSGTEYTLTISG

VQCDDAATYYCQQGYTSTNVNNAFGGGTEVVVKGDPVAPT VLIFFPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDG
TTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO:31)

[0526] Hpu98和Hpu98.61轻链的氨基酸序列

[0527]

AIKMTQTPSSVSAAVGGT VTI NCQASEDIKRYLAWYQQKPGQPPKLLIYAASKLASGVSSRFKSGSGTEYTLTISG
VQCDDAATYYCQQGYTSSNVNNAFGGGTEVVVKGDPVAPT VLIFFPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDG
TTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO:32)

[0528] Hpu24重链的氨基酸序列

[0529]

QEQLKESGGRLVAPGTPLTLTCTVSGFDISDYAMIWVRQAPGKGLEWIGI IYGGSNKLAYAKWAKGRFTI SRTSTTV
DLKITSPTTEDTATYFCARGYGSMDGYDRNLNWGQGLTVTVSSGQPKGPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLP
EPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPT (SEQ ID
NO:33)

[0530] Hpu24.B重链的氨基酸序列

[0531]

QEQLKESGGRLVAPGTPLTLTCTVSGFDISDYAMIWVRQAPGKGLEWIGI IYGVINDLAYAKWAKGRFTI SRTSTTV
DLKITSPTTEDTATYFCARGYGSMDGYDRNLNWGQGLTVTVSSGQPKGPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLP
EPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPT (SEQ ID
NO:34)

[0532] Hpu91重链的氨基酸序列

[0533]

QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSAFSLSTYTI NWVRQAPGKGLEWIGDIWSDGNTYYANWAKGRFTI SKTSTTVDL
KITSPTTEDTATYFCARDSWDTSIYYGLDLWGQGLTVTVSSGQPKGPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEP
VTVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPT (SEQ ID
NO:35)

[0534] Hpu98重链的氨基酸序列

[0535]

QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSTYTMNWVRQAPGKGLEWIGDIYTDGNTYYANWAKGRFTI SKTSTTVDL
KITSPTTEDTATYFCARDSWDASSYYGLDLWGQGLTVTVSSGQPKGPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEP
VTVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPT (SEQ ID
NO:36)

[0536] Hpu98.61重链的氨基酸序列

[0537]

QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSACSLYHCTMNWVRQAPGKGLEWIGDIYTDGNTYYANWAKGRFTI SKTSTTVDL
KITSPTTEDTATYFCARDSWDASSYYGLDLWGQGLTVTVSSGQPKGPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEP
VTVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPT (SEQ ID
NO:37)

[0538] Hpu24和Hpu24.B轻链FR1的氨基酸序列

[0539] AAVLTQTPSPVSAAVGGT VTI SC (SEQ ID NO:38)

[0540] Hpu91、Hpu98和Hpu98.61轻链FR1的氨基酸序列

- [0541] AIKMTQTPSSVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO:39)
- [0542] Hpu24和Hpu24.B轻链FR2的氨基酸序列
- [0543] WFQKKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:40)
- [0544] Hpu91、Hpu98和Hpu98.61轻链FR2的氨基酸序列
- [0545] WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:41)
- [0546] Hpu24和Hpu24.B轻链FR3的氨基酸序列
- [0547] GVSSRFSGSGSGTHFTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO:42)
- [0548] Hpu91轻链FR3的氨基酸序列
- [0549] GVSSRFTGSGSGTEYTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO:43)
- [0550] Hpu98和Hpu98.61轻链FR3的氨基酸序列
- [0551] GVSSRFKSGSGSGTEYTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO:44)
- [0552] Hpu24、Hpu24.B、Hpu91、Hpu98和Hpu98.61轻链FR4的氨基酸序列FGGGTEVVVK (SEQ ID NO:45)
- [0553] Hpu24和Hpu24.B重链FR1的氨基酸序列
- [0554] QEQLKESGRLVAPGTPLTLTCTVSGFDIS (SEQ ID NO:46)
- [0555] Hpu91重链FR1的氨基酸序列
- [0556] QSVEESGRLVTPGTPLTLTCTVSAFSL (SEQ ID NO:47)
- [0557] Hpu98重链FR1的氨基酸序列
- [0558] QSVEESGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSL (SEQ ID NO:48)
- [0559] Hpu98.61重链FR1的氨基酸序列
- [0560] QSVEESGRLVTPGTPLTLTCTVSACSLY (SEQ ID NO:49)
- [0561] Hpu24、Hpu24.B、Hpu91、Hpu98和Hpu98.61重链FR2的氨基酸序列
- [0562] WVRQAPGKLEWIG (SEQ ID NO:50)
- [0563] Hpu24和Hpu24.B重链FR3的氨基酸序列
- [0564] KGRFTISRTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCAR (SEQ ID NO:51)
- [0565] Hpu91、Hpu98和Hpu98.61重链FR3的氨基酸序列
- [0566] KGRFTISKSTTVDLKITSPTTEDTATYFCAR (SEQ ID NO:52)
- [0567] Hpu24、Hpu24.B、Hpu91、Hpu98和Hpu98.61重链FR4的氨基酸序列
- [0568] WGQGLVTVSS (SEQ ID NO:53)
- [0569] Hpu91轻链CDR3的氨基酸序列 (Kabat)
- [0570] QQGYTSTNVNNA (SEQ ID NO:72)

<110> 基因泰克公司(GENENTECH, INC.)
 豪夫迈·罗氏有限公司(F. HOFFMANN-LA ROCHE AG)
 翟倩婷(ZHAI, Qianting)
 P·J·卡特(CARTER, Paul J.)

<120> 抗羟胺赖氨酸抗体及其用途

<130> 146392034440

<140> 未指定
 <141> 随同同时

<150> US 62/211,642
 <151> 2015-08-28

<160> 72

<170> FastSEQ for Windows版本4.0

<210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 1
 Gln Ser Ser Glu Thr Val Tyr Arg Gly Asp Trp Leu Ser
 1 5 10

<210> 2
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 2
 Arg Ser Arg Gln Arg Val Tyr Leu Gly Asp Trp Leu Ser
 1 5 10

<210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 3
 Gln Ala Ser Glu Asp Ile Lys Arg Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 4
 Asp Ala Ser Tyr Leu Ala Ser
 1 5

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 5
 Asp Ala Ser Phe Arg Gly Asp
 1 5

<210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 6
 Ala Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 7
 Leu Gly Gly Tyr Tyr Asp Asp Ala Asp Asp Thr
 1 5 10

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT

[0001]

[0002]

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 8
 Gln Gln Gly Tyr Thr Ser Ser Asn Val Asn Asn Ala
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 9
 Asp Tyr Ala Met Ile
 1 5
 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 10
 Thr Tyr Thr Ile Asn
 1 5
 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 11
 Thr Tyr Thr Met Asn
 1 5
 <210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 12
 His Cys Thr Met Asn
 1 5
 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 13
 Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Asn Lys Leu Ala Tyr Ala Lys Trp Ala
 1 5 10 15
 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 14
 Ile Ile Tyr Gly Val Ile Asn Asp Leu Ala Tyr Ala Lys Trp Ala
 1 5 10 15
 <210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 15
 Asp Ile Trp Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
 1 5 10
 <210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 16
 Asp Ile Tyr Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体
 <400> 17
 Gly Tyr Gly Ser Met Asp Gly Tyr Asp Arg Leu Asn Leu
 1 5 10

<210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体
 <400> 18
 Asp Ser Trp Asp Thr Ser Ile Tyr Tyr Gly Leu Asp Leu
 1 5 10

<210> 19
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体
 <400> 19
 Asp Ser Trp Asp Ala Ser Ser Tyr Tyr Gly Leu Asp Leu
 1 5 10

<210> 20
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体
 <400> 20
 Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Glu Thr Val Tyr Arg Gly
 20 25 30
 Asp Trp Leu Ser Trp Phe Gln Lys Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Tyr Asp
 85 90 95
 Asp Ala Asp Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

[0003]

<210> 21
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体
 <400> 21
 Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Ser Arg Gln Arg Val Tyr Leu Gly
 20 25 30
 Asp Trp Leu Ser Trp Phe Gln Lys Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Phe Arg Gly Asp Gly Val Ser Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Tyr Asp
 85 90 95
 Asp Ala Asp Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 22
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体
 <400> 22
 Ala Ile Lys Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Lys Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
 65 70 75 80
 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Ser Thr Asn
 85 90 95
 Val Asn Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 23
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体
 <400> 23
 Ala Ile Lys Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Lys Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
 65 70 75 80
 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Val Asn Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 24
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 24
 Gln Glu Gln Leu Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asp Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Asn Lys Leu Ala Tyr Ala Lys Trp Ala
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 85 90 95
 Gly Tyr Gly Ser Met Asp Gly Tyr Asp Arg Leu Asn Leu Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

[0004]

<400> 25
 Gln Glu Gln Leu Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asp Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Gly Val Ile Asn Asp Leu Ala Tyr Ala Lys Trp Ala
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 85 90 95
 Gly Tyr Gly Ser Met Asp Gly Tyr Asp Arg Leu Asn Leu Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 26
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 26
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Ala Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Asp Ile Trp Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
 65 70 75 80
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser
 85 90 95
 Trp Asp Thr Ser Ile Tyr Tyr Gly Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 27
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 27
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Thr

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

<210> 28
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 28
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Ala Cys Ser Leu Tyr His Cys Thr
 20 25 30
 Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Asp Ile Tyr Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
 65 70 75 80
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser
 85 90 95
 Trp Asp Ala Ser Ser Tyr Tyr Gly Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 29
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 29
 Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Glu Thr Val Tyr Arg Gly
 20 25 30
 Asp Trp Leu Ser Trp Phe Gln Lys Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Tyr Asp
 85 90 95
 Asp Ala Asp Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly
 100 105 110
 Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp Gln
 115 120 125
 Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr Phe
 130 135 140
 Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr Thr
 145 150 155 160
 Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr Tyr
 165 170 175
 Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser His
 180 185 190
 Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val Val Gln
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
 210 215

<210> 30
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 30
 Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Ser Arg Gln Arg Val Tyr Leu Gly
 20 25 30
 Asp Trp Leu Ser Trp Phe Gln Lys Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Phe Arg Gly Asp Gly Val Ser Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Tyr Asp
 85 90 95
 Asp Ala Asp Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly
 100 105 110
 Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp Gln
 115 120 125
 Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr Phe
 130 135 140
 Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr Thr
 145 150 155 160
 Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr Tyr
 165 170 175

[0005]

Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser His
 180 185 190
 Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val Val Gln
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
 210 215

<210> 31
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

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

<210> 32
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

[0006]

<400> 32
 Ala Ile Lys Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Lys Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
 65 70 75 80
 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Val Asn Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly Asp
 100 105 110
 Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp Gln Val
 115 120 125
 Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr Phe Pro
 130 135 140
 Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr Thr Gly
 145 150 155 160
 Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr Tyr Asn
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser His Lys
 180 185 190
 Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val Val Gln Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Asp Cys
 210

<210> 33
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 33
 Gln Glu Gln Leu Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asp Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Asn Lys Leu Ala Tyr Ala Lys Trp Ala
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 85 90 95
 Gly Tyr Gly Ser Met Asp Gly Tyr Asp Arg Leu Asn Leu Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr

130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val
 165 170 175
 Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr
 180 185 190
 Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr
 210 215 220

<210> 34
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 34
 Gln Glu Gln Leu Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asp Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Gly Val Ile Asn Asp Leu Ala Tyr Ala Lys Trp Ala
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 85 90 95
 Gly Tyr Gly Ser Met Asp Gly Tyr Asp Arg Leu Asn Leu Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val
 165 170 175
 Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr
 180 185 190
 Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr
 210 215 220

<210> 35
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

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

<210> 36
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 36
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Asp Ile Tyr Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
 65 70 75 80
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser
 85 90 95

[0007]

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

<210> 37
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 37
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Ala Cys Ser Leu Tyr His Cys Thr
 20 25 30
 Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Asp Ile Tyr Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
 65 70 75 80
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser
 85 90 95
 Trp Asp Ala Ser Ser Tyr Tyr Gly Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser
 180 185 190
 Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr
 210 215 220

[0008]

<210> 38
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 38
 Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys
 20

<210> 39
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 39
 Ala Ile Lys Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys
 20

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 40
 Trp Phe Gln Lys Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 41
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 42
 <211> 32

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 42
 Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

 <210> 43
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 43
 Gly Val Ser Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

 <210> 44
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 44
 Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 45
 Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 1 5 10

 <210> 46
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 46
 Gln Glu Gln Leu Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asp Ile Ser
 20 25 30

 <210> 47
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 47
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Ala Phe Ser Leu Ser
 20 25

 <210> 48
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 48
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25

 <210> 49
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 49
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Ala Cys Ser Leu Tyr
 20 25

 <210> 50

[0009]

[0010]

<211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 50
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

 <210> 51
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 51
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys
 1 5 10 15
 Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 20 25 30

 <210> 52
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 52
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys
 1 5 10 15
 Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 20 25 30

 <210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 53
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

 <210> 54
 <211> 1
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> Xaa = 在羧基端用(PEG)6-半胱氨酸修饰的羟腐胺赖氨酸

 <400> 54
 Xaa
 1

 <210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <220>
 <221> 变体
 <222> 4
 <223> Xaa = 羟腐胺赖氨酸

 <220>
 <221> 变体
 <222> 7
 <223> Xaa = 在羧基端用(PEG)6-半胱氨酸修饰的甘氨酸

 <400> 55
 Gly Ser Gly Xaa Gly Ser Xaa
 1 5

 <210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> Xaa = 在氨基端用(PEG)6-半胱氨酸修饰的甘氨酸

 <220>
 <221> 变体
 <222> 4

[0011]

<223> Xaa = 羟脯胺赖氨酸
 <400> 56
 Xaa Ser Gly Xaa Gly Ser Gly
 1 5
 <210> 57
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> Xaa = 在氨基端用生物素-(PEG)6修饰的甘氨酸
 <220>
 <221> 变体
 <222> 4
 <223> Xaa = 脱氧羟脯胺赖氨酸
 <400> 57
 Xaa Ser Gly Xaa Gly Ser Gly
 1 5
 <210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> Xaa = 在氨基端用生物素-(PEG)6修饰的甘氨酸
 <400> 58
 Xaa Ser Gly Lys Gly Ser Gly
 1 5
 <210> 59
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> Xaa = 在氨基端用生物素-(PEG)6修饰的丝氨酸
 <220>
 <221> 变体
 <222> 7
 <223> Xaa = 羟脯胺赖氨酸
 <400> 59
 Xaa Thr Ser Lys Thr Gly Xaa His Gly His Ala Lys
 1 5 10
 <210> 60
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> Xaa = 在氨基端用生物素-(PEG)6修饰的丝氨酸
 <220>
 <221> 变体
 <222> 7
 <223> Xaa = 脱氧羟脯胺赖氨酸
 <400> 60
 Xaa Thr Ser Lys Thr Gly Xaa His Gly His Ala Lys
 1 5 10
 <210> 61
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> Xaa = 在氨基端用生物素-(PEG)6修饰的丝氨酸
 <400> 61
 Xaa Thr Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His Ala Lys
 1 5 10

[0012]

<210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> Xaa = 生物素化的甘氨酸
 <220>
 <221> 变体
 <222> 8
 <223> Xaa = 羟胺赖氨酸
 <400> 62
 Xaa Gly Asp Glu Glu Ala Leu Xaa Gln Leu Ala Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 <210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> Xaa = 生物素化的甘氨酸
 <400> 63
 Xaa Gly Asp Glu Glu Ala Leu Lys Gln Leu Ala Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 <210> 64
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> Xaa = 生物素化的甘氨酸
 <220>
 <221> 变体
 <222> 7
 <223> Xaa = 羟胺赖氨酸
 <220>
 <221> 变体
 <222> 12
 <223> Xaa = 羟胺赖氨酸
 <220>
 <221> 变体
 <222> 17
 <223> Xaa = 羟胺赖氨酸
 <400> 64
 Xaa Gly Ala Ala Ala Ala Xaa Ala Ala Ala Ala Xaa Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Xaa Ala
 <210> 65
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> Xaa = 生物素化的甘氨酸
 <220>
 <221> 变体
 <222> 7
 <223> Xaa = 羟胺赖氨酸
 <220>
 <221> 变体
 <222> 17
 <223> Xaa = 羟胺赖氨酸
 <400> 65
 Xaa Gly Ala Ala Ala Ala Xaa Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Xaa Ala
 <210> 66
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

[0013]

<223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 3
 <223> Xaa = 羟胺赖氨酸
 <220>
 <221> 变体
 <222> 18
 <223> Xaa = 生物素化的甘氨酸
 <400> 66
 Gly Trp Xaa Pro Met Ser Arg Ser Ser Gly Arg Val Tyr Tyr Phe Asn
 1 5 10 15
 Gly Xaa
 <210> 67
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 18
 <223> Xaa = 生物素化的甘氨酸
 <400> 67
 Gly Trp Lys Pro Met Ser Arg Ser Ser Gly Arg Val Tyr Tyr Phe Asn
 1 5 10 15
 Gly Xaa
 <210> 68
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> Xaa = 生物素化的甘氨酸
 <220>
 <221> 变体
 <222> 8
 <223> Xaa = 羟胺赖氨酸
 <400> 68
 Xaa Gly Leu Leu Glu Leu Asp Xaa Trp Ala Ser Leu Trp
 1 5 10
 <210> 69
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> Xaa = 生物素化的甘氨酸
 <400> 69
 Xaa Gly Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp
 1 5 10
 <210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 4
 <223> Xaa = 羟胺赖氨酸
 <400> 70
 Gly Ser Gly Xaa Gly Ser Gly
 1 5
 <210> 71
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> 变体
 <222> 4
 <223> Xaa = Deoxy羟胺赖氨酸
 <400> 71
 Gly Ser Gly Xaa Gly Ser Gly
 1 5

<210> 72
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

[0014] <220>
<223> 合成构建体

<400> 72
Gln Gln Gly Tyr Thr Ser Thr Asn Val Asn Asn Ala
1 5 10

轻链可变区

Kabat 编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Hpu24	A	A	V	L	T	Q	T	P	S	P	V	S	A	A	V	G	G	T	V	T	I	S	C	Q	S	S	E	T	V	Y	R	G	D	W	L	S	W	F	Q	K	K	P
Hpu24.B	A	A	V	L	T	Q	T	P	S	P	V	S	A	A	V	G	G	T	V	T	I	S	C	R	S	R	Q	R	V	Y	L	G	D	W	L	S	W	F	Q	K	K	P

Kabat 编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
Hpu24	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	Y	L	A	S	G	V	S	S	R	F	S	G	G	S	G	T	H	F	T	L	T	I	S	G	V	Q	C	D	D	
Hpu24.B	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	F	R	G	D	G	V	S	S	R	F	S	G	G	S	G	T	H	F	T	L	T	I	S	G	V	Q	C	D	D	

Kabat 编号	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
Hpu24	A	A	T	Y	Y	C	L	G	G	Y	Y	D	D	A	D	D	F	G	G	T	E	V	V	V	K
Hpu24.B	A	A	T	Y	Y	C	L	G	G	Y	Y	D	D	A	D	D	F	G	G	T	E	V	V	K	

图1A

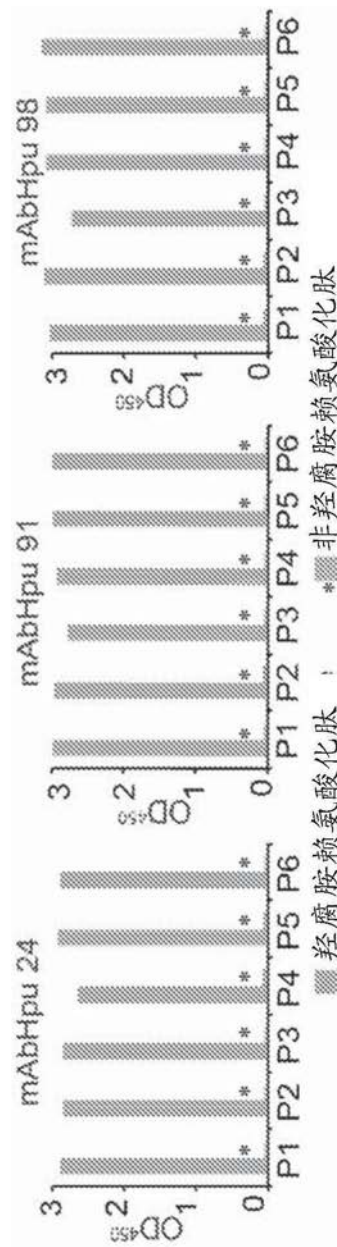


图2A



图2B

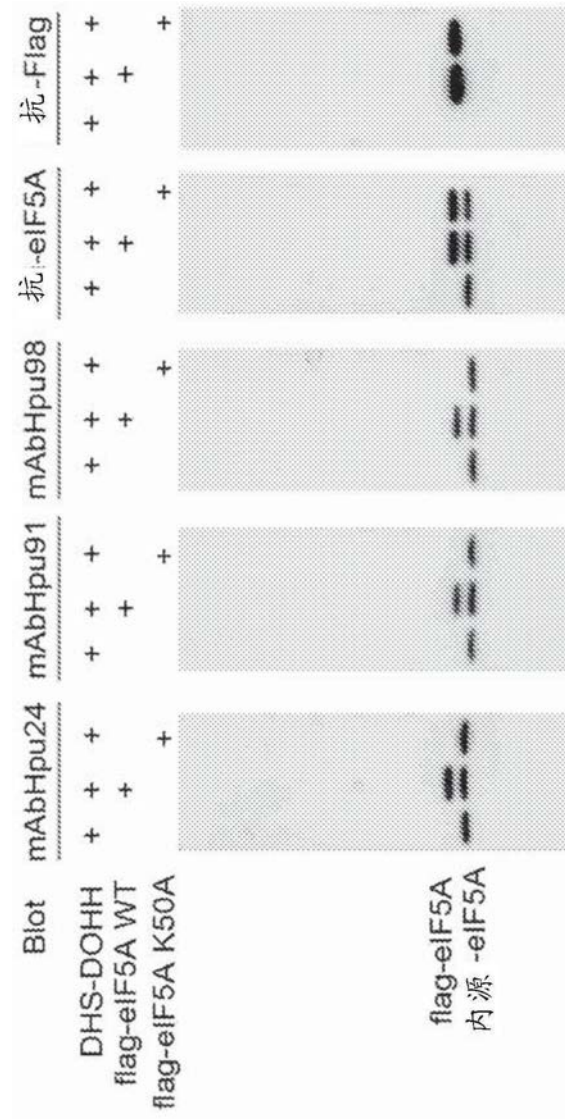


图2C

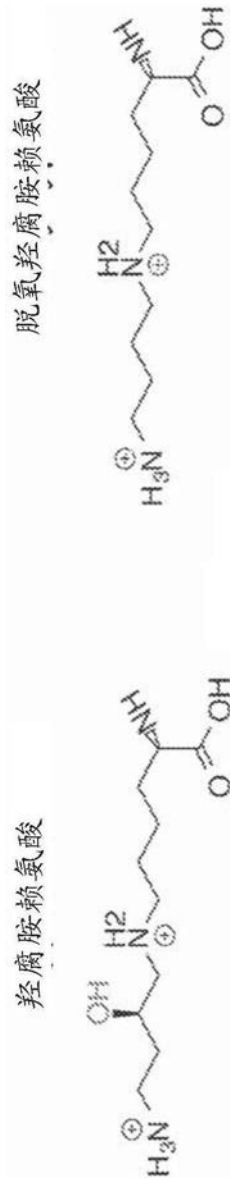


图3A

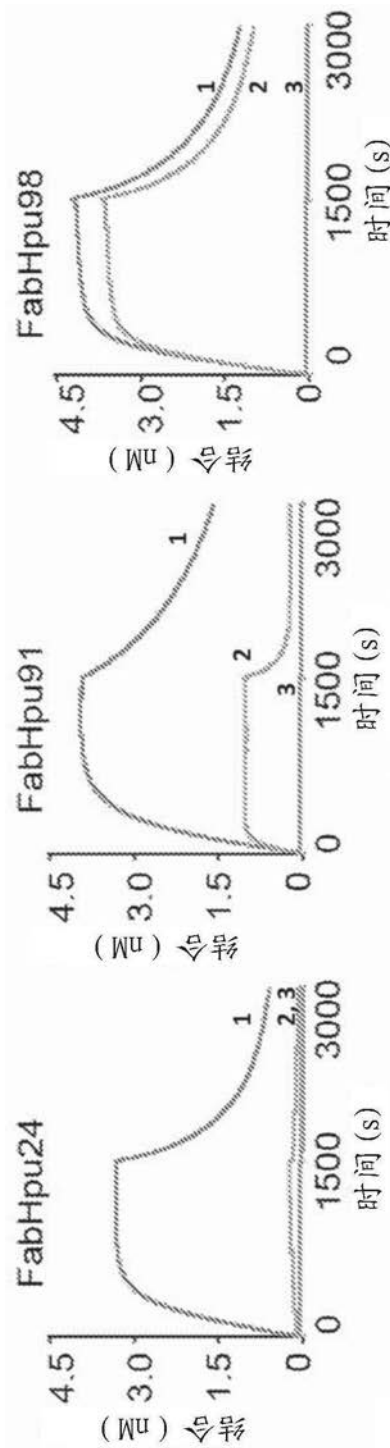


图3B

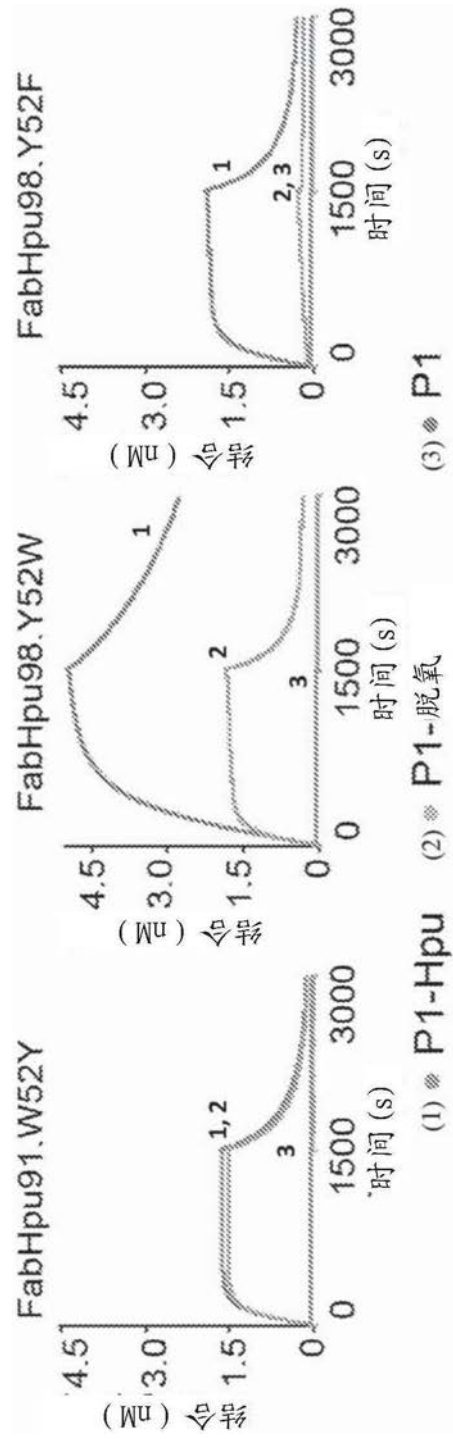


图3C

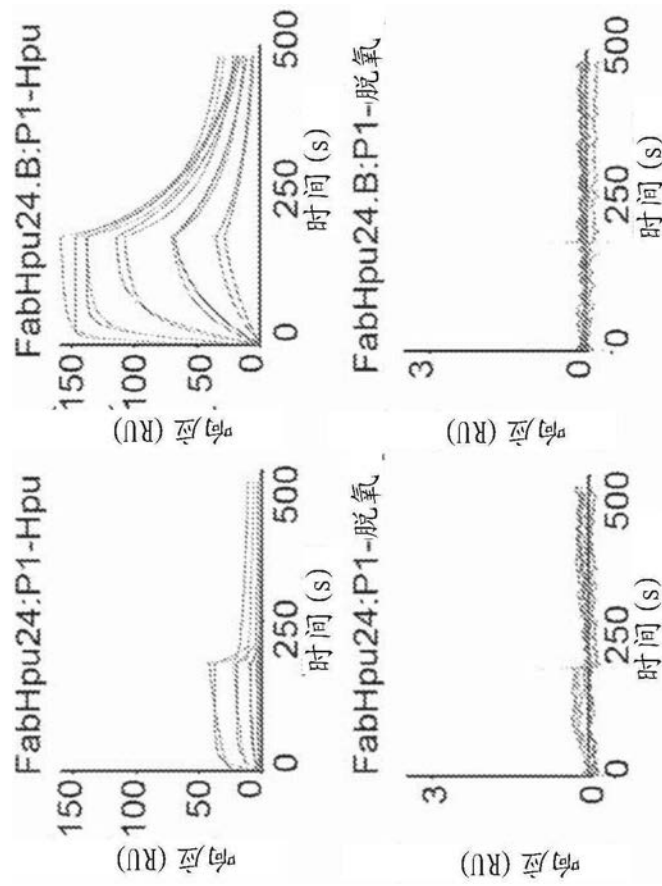


图4A

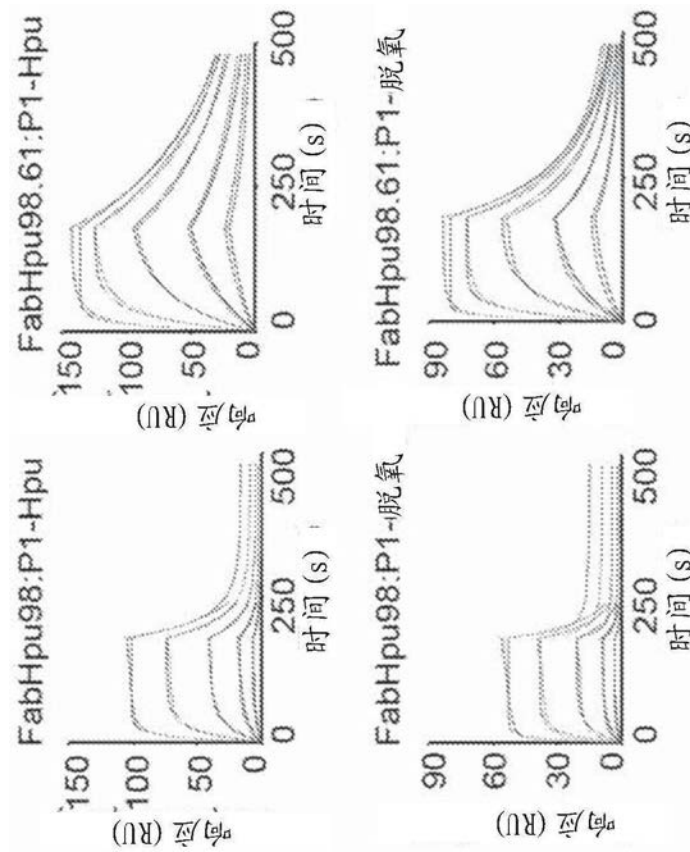


图4B

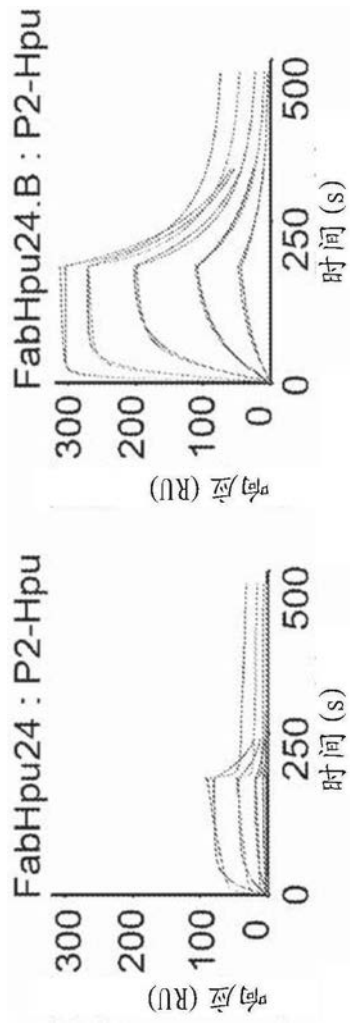


图5A

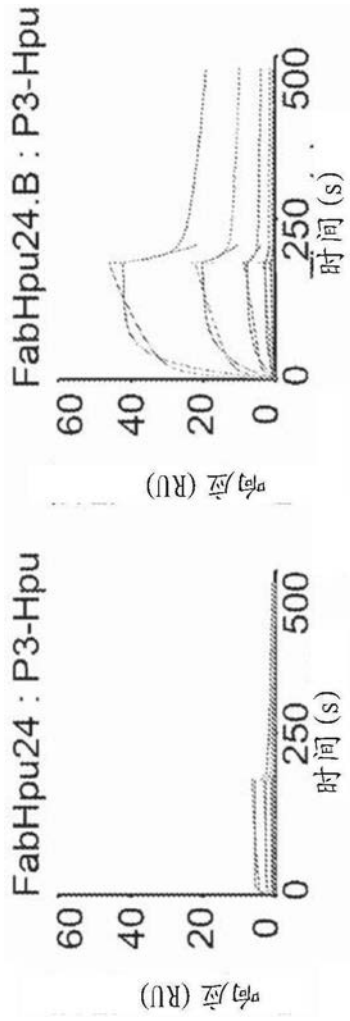


图5B

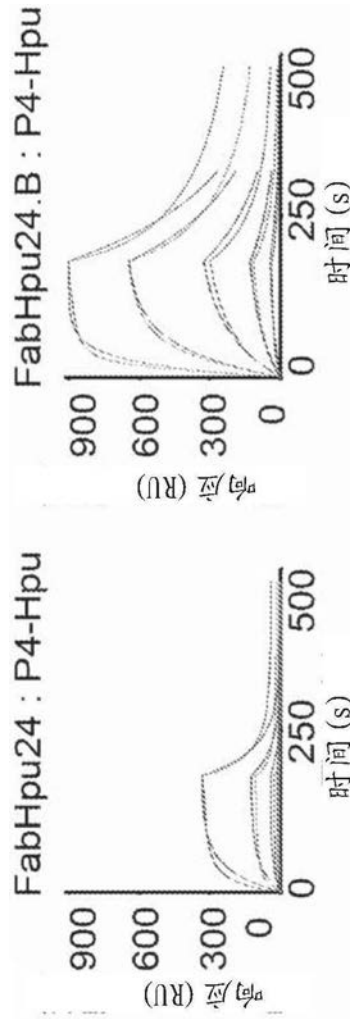


图5C

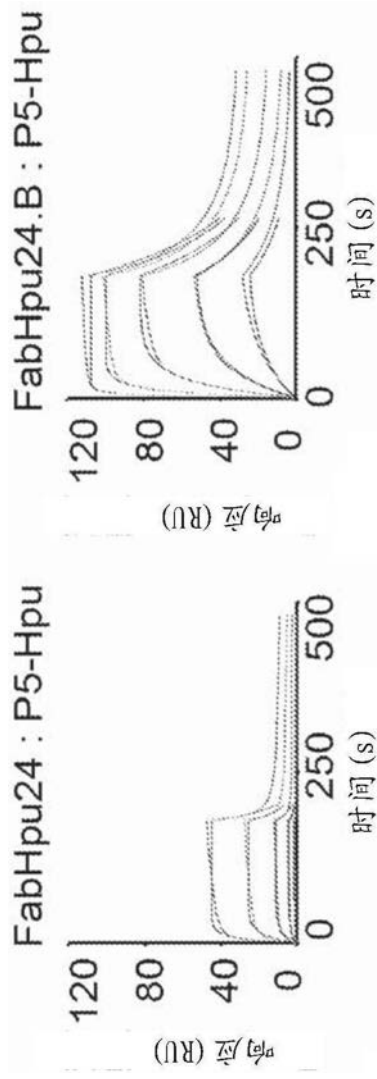


图5D

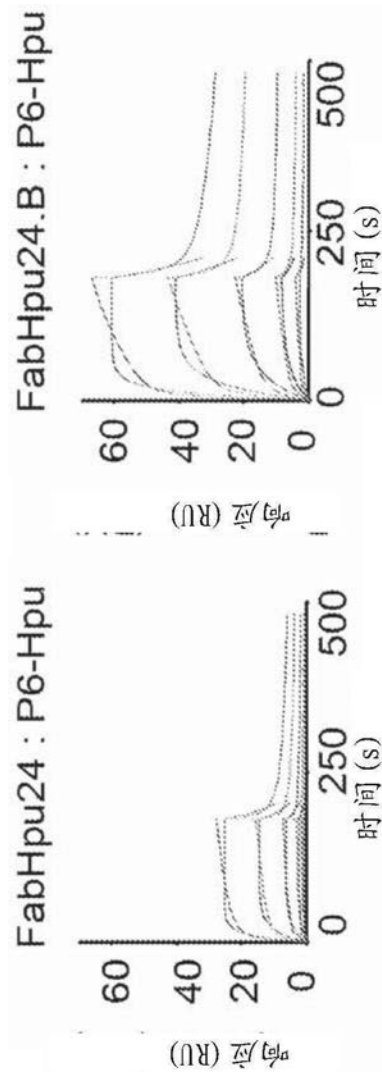


图5E

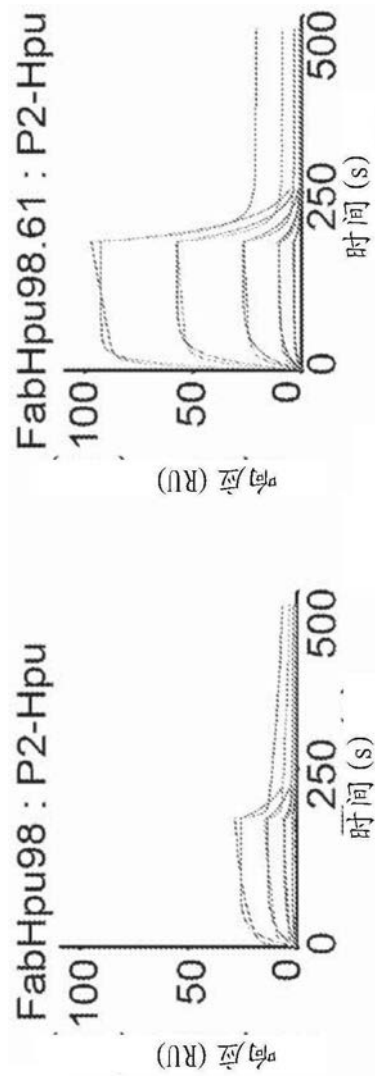


图6A

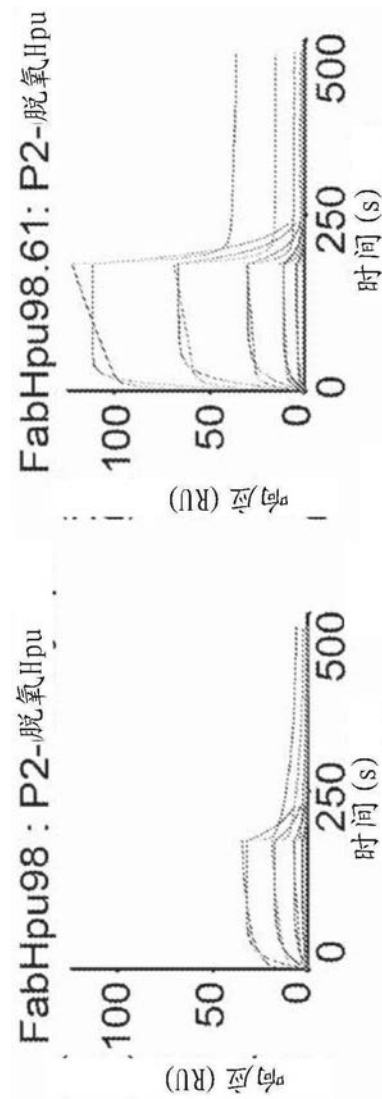


图6B



图6C

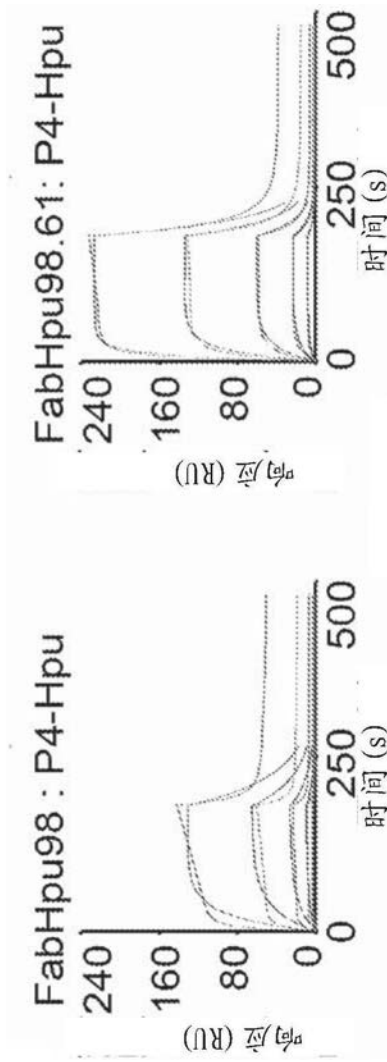


图6D

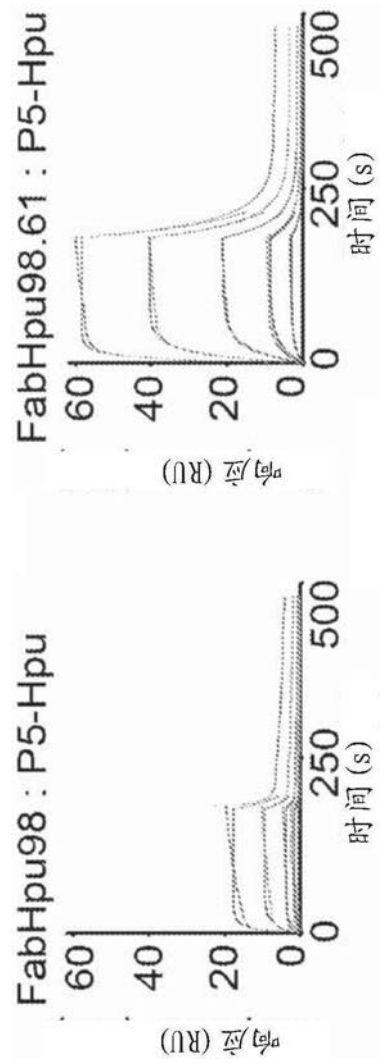


图6E

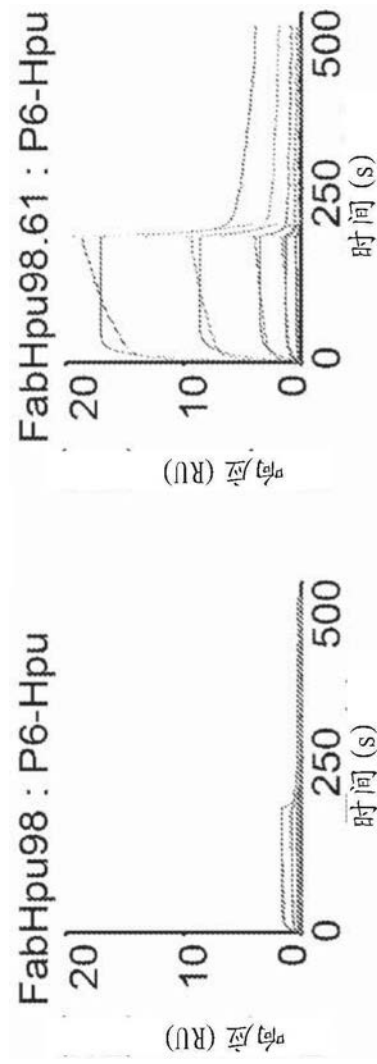


图6F

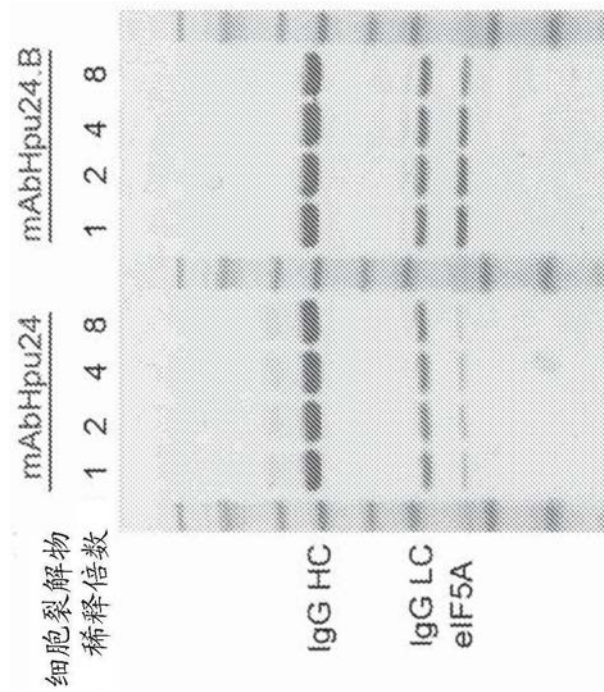


图7A

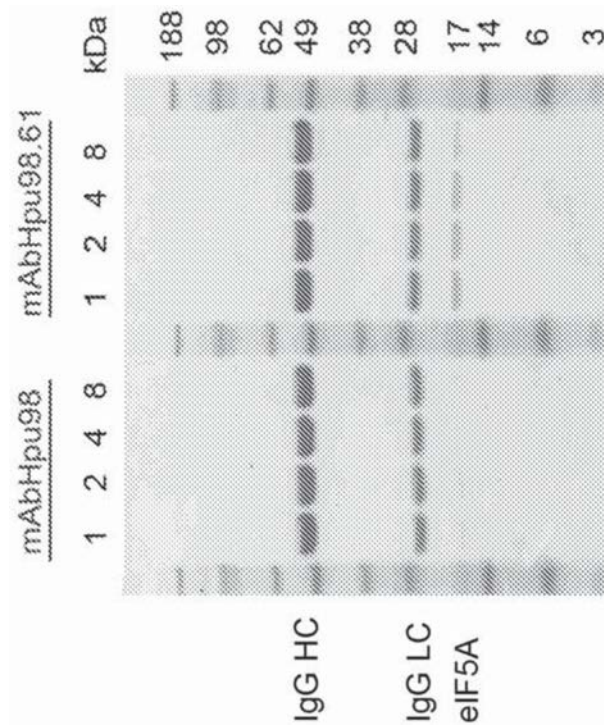


图7B

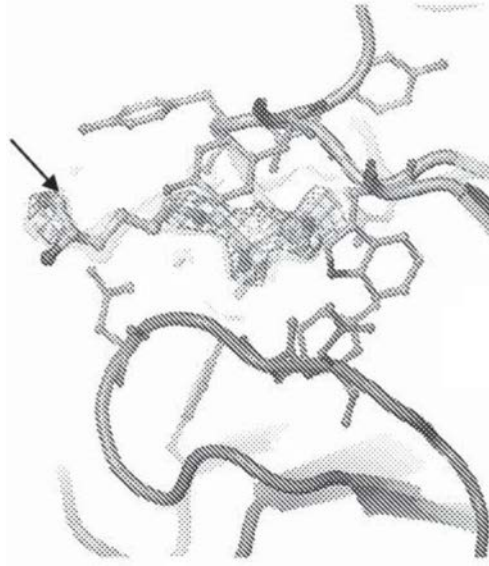
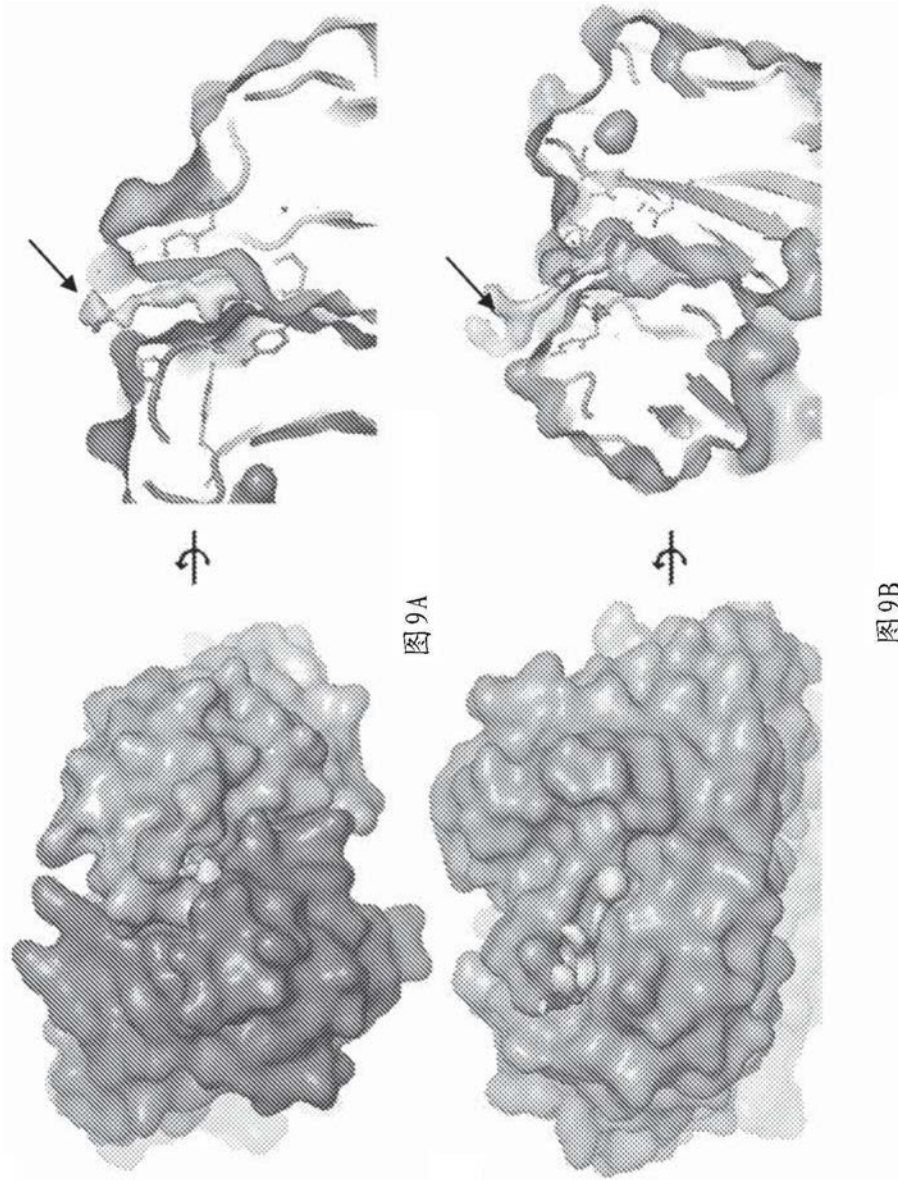


图8A



图8B



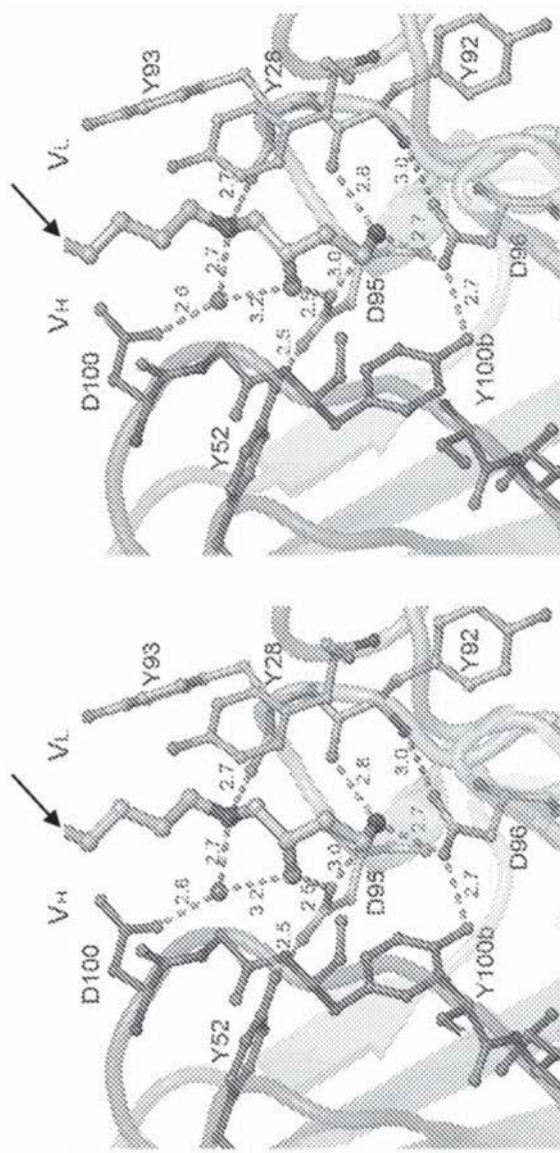


图10A

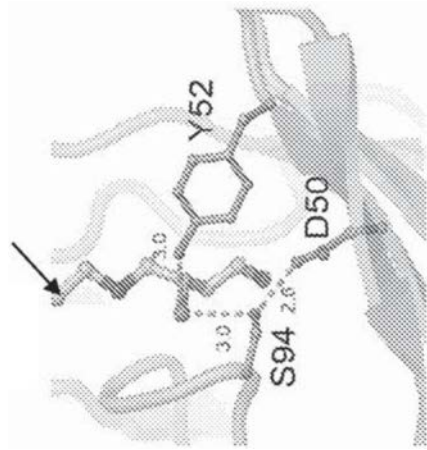


图11B

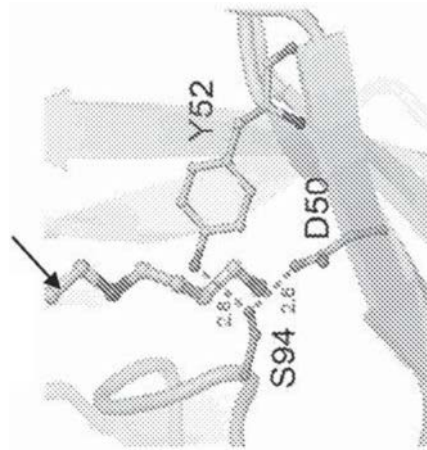


图11C

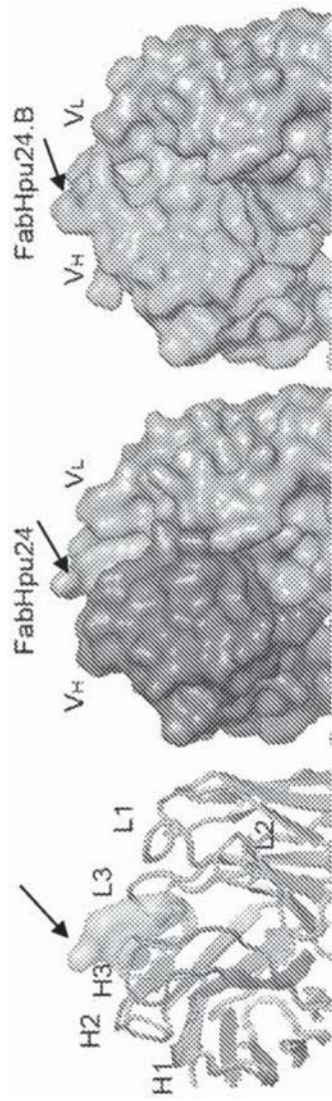


图12A

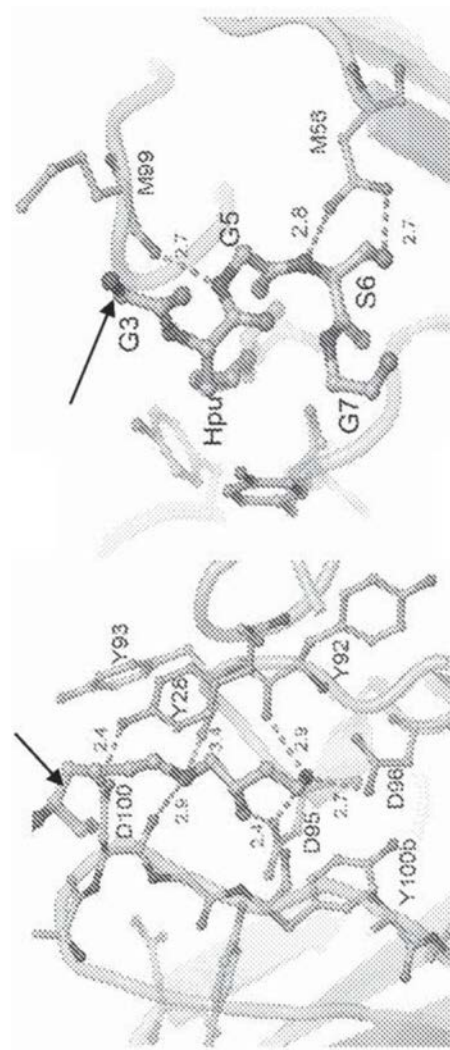


图12B

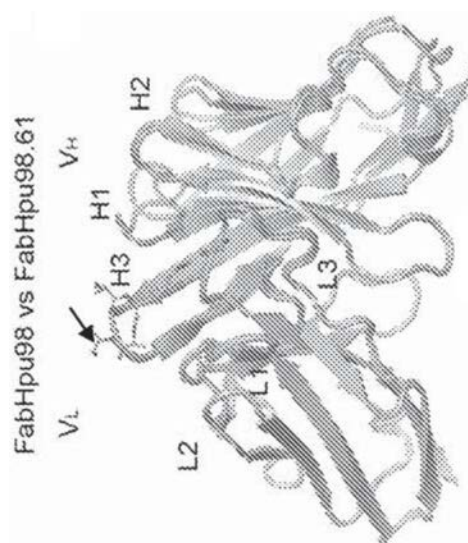


图12C

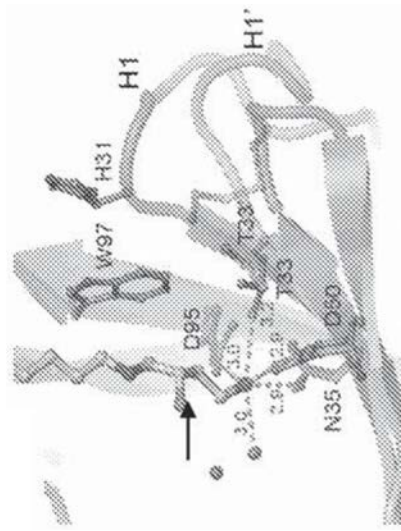


图12D

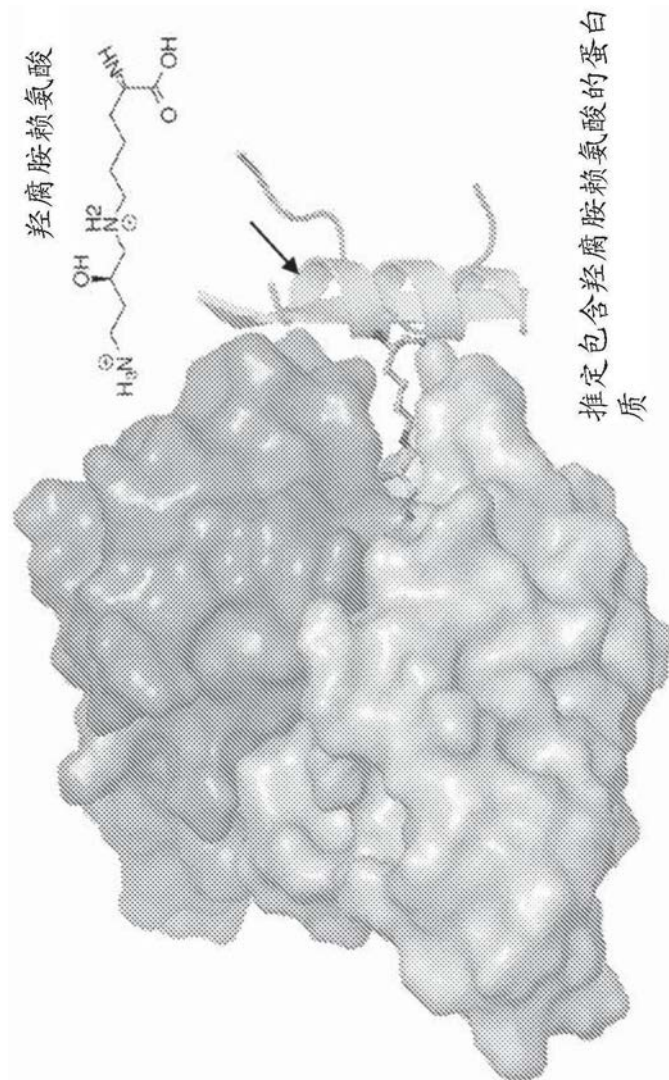


图13

专利名称(译)	抗羟腐胺赖氨酸抗体及其用途		
公开(公告)号	CN108026180A	公开(公告)日	2018-05-11
申请号	CN201680049820.7	申请日	2016-08-26
申请(专利权)人(译)	豪夫迈·罗氏有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	豪夫迈·罗氏有限公司		
[标]发明人	翟倩婷 PJ卡特		
发明人	翟倩婷 P·J·卡特		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6812 C07K16/18 C07K16/44 C07K2317/34 G01N33/521 G01N33/5308 G01N33/533 G01N33/6872 G01N2800/50		
代理人(译)	史文静		
优先权	62/211642 2015-08-28 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	环	Kabat	Chothia	接触
<p>本发明提供抗羟腐胺赖氨酸抗体及其在检测和分离含羟腐胺赖氨酸和/或脱氧羟腐胺赖氨酸的多肽中的用途，以及包含抗羟腐胺赖氨酸抗体的组合物和试剂盒。</p>	L1	L24-L34	L26-L34	L30-L36
	L2	L50-L56	L50-L56	L46-L55
	L3	L89-L97	L91-L96	L89-L96
	H1	H31-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 编号)
	H1	H31-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 编号)
	H2	H50-H65	H53-H56	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H93-H101