

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680013511.0

[51] Int. Cl.

C07K 16/22 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 4 月 16 日

[11] 公开号 CN 101163719A

[22] 申请日 2006.4.20

[21] 申请号 200680013511.0

[30] 优先权

[32] 2005.4.22 [33] US [31] 60/674,082

[86] 国际申请 PCT/US2006/014943 2006.4.20

[87] 国际公布 WO2006/116002 英 2006.11.2

[85] 进入国家阶段日期 2007.10.22

[71] 申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72] 发明人 J·戴维斯 C·D·迪金森

黄立华 B·E·琼斯

D·M·马奎斯 S·W·罗林森

唐 鹰 P·E·瓦扬古

J·D·沃特金斯

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 6 页 说明书 80 页 序列表 82 页

[54] 发明名称

TGF β 1 特异性抗体

[57] 摘要

提供了相对于成熟 TGF β 2 和成熟 TGF β 3 而言特异于成熟 TGF β 1 的抗体。所抗体以重链 CDR3GYRX₁X₂X₃Y 为特征, 其中 X₁ 是 W 或 A; X₂ 是 F 或 L; X₃ 是 A、E 或 Y。

1. 相对于成熟 TGF β 2 和成熟 TGF β 3 而言特异性结合于成熟 TGF β 1 的分离的结合组合物, 所述组合物包含具有结合位点的第一部分, 所述第一部分包含 GYRX₁X₂X₃Y (SEQ ID NO: 4); 其中: X₁ 是 W 或 A; X₂ 是 F 或 L; 且 X₃ 是 A、E 或 Y。

2. 权利要求 1 的组合物, 其中所述第一部分还包含至少如下序列之一:

i. GYX₁FX₂DYNX₃X₄ (SEQ ID NO: 2); 其中: X₁ 是 T 或 D; X₂ 是 T、E 或 F; X₃ 是 M、I、L 或 V; 且 X₄ 是 H、V 或 A; 或

ii. X₁X₂YPYDGX₃TGX₄NX₅KX₆KS (SEQ ID NO: 3); 其中: X₁ 是 Y、Q 或 S; X₂ 是 I 或 V; X₃ 是 D 或 E; X₄ 是 Y、T、H 或 L; X₅ 是 Q、K、P 或 S; 且 X₆ 是 F 或 Y。

3. 权利要求 2 的组合物, 其还包含第二部分, 所述第二部分包含结合位点 X₁QWDX₂X₃X₄PA (SEQ ID NO: 7); 其中: X₁ 是 Q 或 S; X₂ 是 L、D 或 P; X₃ 是 N 或 R; 且 X₄ 是 P、F、Y 或 R。

4. 权利要求 3 的组合物, 其中所述第二部分还包含至少如下序列之一:

i. X₁AX₂X₃X₄VX₅YMH (SEQ ID NO: 5); 其中: X₁ 是 R、Y、E 或 Q; X₂ 是 S 或 T; X₃ 是 S、V 或 A; X₄ 是 S 或 L; X₅ 是 S、P、L 或 Y; 或

ii. ATSNX₁AX₂ (SEQ ID NO: 6); 其中: X₁ 是 L、N 或 P; 且 X₂ 是 S、K、Y、L、M、F、E、Q、R 或 H。

5. 权利要求 1 的重组结合组合物, 其中:

a) 所述第一部分:

i) 与成熟人 TGF β 1 有免疫反应性;

ii) 与成熟灵长类 TGF β 1 有免疫反应性;

iii) 是抗纯化或重组产生的人 TGF β 1 蛋白或其片段而产生;

iv) 是单克隆抗体、Fab、Fv、scFv、F(ab)₂ 或抗体可变结构域的部分;

v) 具有至少一个、两个、三个或四个保守的取代;

vi) 被嵌入在人或人源化的抗体框架内; 或

vii) 包含抗体重链的可变区、Fab、Fv、scFv 或 F(ab)₂ 的部分。

6. 权利要求 5 的结合组合物, 其为单克隆抗体, 包含:

a) 重链可变区(HCVR), 其具有:

I. 选自包含 GYX₁FX₂DYNX₃X₄ [SEQ ID NO: 2]序列的 CDR1; 其中: X₁ 是 T 或 D; X₂ 是 T、E 或 F; X₃ 是 M、I、L 或 V; 且 X₄ 是 H、V 或 A; 和

II. 选自包含 X₁X₂YPYDGX₃TGX₄NX₅KX₆KS [SEQ ID NO: 3]序列的 CDR2; 其中: X₁ 是 Y、Q 或 S; X₂ 是 I 或 V; X₃ 是 D 或 E; X₄ 是 Y、T、H 或 L; X₅ 是 Q、K、P 或 S; 且 X₆ 是 F 或 Y; 和

III. 选自包含 GYRX₁X₂X₃Y [SEQ ID NO: 4]序列的 CDR3; 其中: X₁ 是 W 或 A; X₂ 是 F 或 L; 且 X₃ 是 A 或 E; 和

b) 轻链可变区(LCVR), 其具有:

I. 选自包含 X₁AX₂X₃X₄VX₅YMH [SEQ ID NO: 5]序列的 CDR1; 其中: X₁ 是 R、Y、E 或 Q; X₂ 是 S 或 T; X₃ 是 S、V 或 A; X₄ 是 S 或 L; X₅ 是 S、P、L 或 Y; 和

II. 选自包含 ATSNX₁AX₂ [SEQ ID NO: 6]序列的 CDR2; 其中: X₁ 是 L、N 或 P; 且 X₂ 是 S、K、Y、L、M、F、E、Q、R 或 H; 和

III. 选自包含 X₁QWDX₂X₃X₄PA [SEQ ID NO: 7]序列的 CDR3; 其中: X₁ 是 Q 或 S; X₂ 是 L、D 或 P; X₃ 是 N 或 R; 且 X₄ 是 P、F、Y 或 R。

7. 权利要求 6 的单克隆抗体, 其中:

a) 所述 HCVR 具有:

I. 包含 SEQ ID NO: 8 的 FR1 框架;

II. 包含 SEQ ID NO: 9 的 FR2 框架;

III. 包含 SEQ ID NO: 10 的 FR3 框架; 和

IV. 包含 SEQ ID NO: 11 的 FR4 框架; 且

b) 所述 LCVR 具有:

I. 包含 SEQ ID NO: 12 的 FR1 框架;

II. 包含选自 SEQ ID No: 13-36 的序列的 FR2 框架;

III. 包含 SEQ ID NO: 37 的 FR3 框架; 和

IV. 包含 SEQ ID NO: 38 的 FR4 框架。

8. 权利要求 7 的单克隆抗体，其：

a) 还包括人或人源化恒定区；

b) 还包括 IgG4 恒定区，其包含：

I. 包含 SEQ ID NO:40 的重链序列；和

II. 包含 SEQ ID NO: 41 的轻链序列；

c) 是 Fab 片段；

d) 是 Fv 片段；

e) 是 scFv 片段；

f) 是 F(ab)2 片段；

g) 融合于人恒定区；

h) 被可检测地标记；

i) 是冻干的；

j) 由分离的核酸分子编码；

k) 由有效连接在表达载体中的分离的核酸分子编码；

l) 由有效连接在表达载体中的分离的核酸分子编码，所述表达载体整合到宿主细胞中；

m) 是嵌合抗体；

n) 缀合于其他化学部分；

o) 是无菌的；或

p) 是药物组合物。

9. 权利要求 8 的单克隆抗体，其包含：

a) 具有选自 SEQ ID NO: 42-86 的序列的 LCVR；和

b) 具有选自 SEQ ID NO: 87-125 的序列的 HCVR。

10. 权利要求 9 的单克隆抗体，其为：

a) 人源化的；

b) 融合于人恒定区；

c) Fab 片段；

- d) Fv 片段;
- e) scFv 片段;
- f) F(ab)2 片段;
- g) 包含选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 和 IgD 的恒定区;
- h) 被可检测地标记;
- i) 冻干的;
- j) 嵌合抗体;
- k) 用于制备施用于灵长类的药物, 所述药物用于治疗这样的病况:
 - 1. 肾病;
 - 2. 慢性肾病;
 - 3. 晚期肾病;
 - 4. 纤维化疾病、紊乱或病况; 或
 - 5. 肾纤维化;
- l) 缀合于其他化学部分;
- m) 无菌的; 或
- n) 包含药物组合物。

11. 权利要求 10 的单克隆抗体, 其包含:

- 1. 包含 SEQ ID NO: 42 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 87、88、89、90、91、92 的 HCVR;
- 2. 包含 SEQ ID NO: 43 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 90、95 的 HCVR;
- 3. 包含 SEQ ID NO: 44 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 93 或 94 的 HCVR;
- 4. 包含 SEQ ID NO: 45、46、47、48、49、50、52、53、54 或 55 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 96 的 HCVR;
- 5. 包含 SEQ ID NO: 51 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 97、98、99、100、101、102、103、104 的 HCVR。

12. 权利要求 8 的单克隆抗体, 包含如下 LCVR 和 HCVR:

- 1. 包含 SEQ ID NO: 56 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 105、106、107、109、110 的 HCVR;

2. 包含 SEQ ID NO: 57 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 107 的 HCVR;
3. 包含 SEQ ID NO: 58 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 106 的 HCVR;
4. 包含 SEQ ID NO: 60 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 108 的 HCVR;
5. 包含 SEQ ID NO: 61 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 110、111 的 HCVR;
6. 包含 SEQ ID NO: 62、63、64、66、67、68、69 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 112 的 HCVR;
7. 包含 SEQ ID NO: 69 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 112、113、114、115 的 HCVR; 或
8. 包含 SEQ ID NO: 70、71、72 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 116 的 HCVR.
13. 权利要求 8 的单克隆抗体, 包含如下 LCVR 和 HCVR:
 1. 包含 SEQ ID NO: 72、73 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 117 的 HCVR;
 2. 包含 SEQ ID NO: 74 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 118、119 的 HCVR;
 3. 包含 SEQ ID NO: 73 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 119 的 HCVR;
 4. 包含 SEQ ID NO: 75 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 96、117 的 HCVR;
 5. 包含 SEQ ID NO: 76 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 117 的 HCVR;
 6. 包含 SEQ ID NO: 77、78、79 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 96 的 HCVR;
 7. 包含 SEQ ID NO: 80 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 120、121、122 的 HCVR;
 8. 包含 SEQ ID NO: 81 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 117、120、121、122、123 的 HCVR;
 9. 包含 SEQ ID NO: 82、84 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 117 的 HCVR;
 10. 包含 SEQ ID NO: 83 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 117、124 的 HCVR;
 11. 包含 SEQ ID NO: 84 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 117 的 HCVR;

-
12. 包含 SEQ ID NO: 85 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 91 的 HCVR;
 13. 包含 SEQ ID NO: 86 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 117、125 的 HCVR;
 14. 或包含 SEQ ID NO: 82 的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 89 的 HCVR.
 14. 使用权利要求 6 的结合组合物的方法,其包括将所述结合组合物与包含抗原的生物学样品接触,从而形成 TGF β 1 结合组合物:抗原复合物。
 15. 权利要求 14 的方法,其中所述生物学样品来自人,且其中所述结合组合物是单克隆抗体。
 16. 检测试剂盒,其包括权利要求 6 的所述结合组合物,和:
 - a) 关于使用所述结合组合物进行所述检测的说明书材料; 或
 - b) 分隔所述结合组合物的区室。

TGF β 1 特异性抗体

发明领域

本发明一般地涉及与 TGF β 1 蛋白相关的组合物。具体地, 本发明提供了纯化的结合组合物, 可用于例如诊断、治疗和预防细胞增生、自身免疫/炎症、心血管和纤维化紊乱的相关试剂, 以及可用于评估外源化合物对这类蛋白质的核酸和氨基酸序列表达的影响的相关试剂。

发明背景

作为分泌性多肽因子的转化生长因子 β (TGF- β)超家族中的第一个成员, TGF- β 1 是在大约 20 年前发现的。随后该家族成员大量增加, 现在包括超过 30 个脊椎动物成员和无脊椎动物(如蠕虫和苍蝇)中一打左右的结构和功能上相关的蛋白质(见如 Attisano 和 Lee-Hoeflich, 2001 Gen. Biol. 2, review 30101; Moustakas 等人 2001 J. Cell Sci. 114:4359; Wrana, 2000 Cell 100:189)。TGF β 家族的成员控制着很多细胞功能, 且其活性对于众多发育和稳态过程的调控至关重要。

作为这个家族的一员, TGF β 1 参与多种细胞过程, 如细胞扩增和分化、迁移、分化、凋亡、胚胎发育、胞外基质形成、骨骼发育、创伤愈合、造血作用以及免疫和炎症反应(见如 Roberts 和 Sporn 1990 Peptide Growth Factors and Their Receptors, 419-72 页, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany; Massagué, J. 1998 Annu. Rev. Biochem 67:753)。

另外, 临床前和临床数据显示, TGF β 1 是在间质纤维化中基质蛋白质沉积的主要促成者, 而且它还参与大量相关的纤维化疾病状态的起始和进展, 包括在所有形式的慢性肾病 (CRD) 中普遍存在的肾纤维化。肾纤维化的程度与慢性肾衰竭 (CRF, 也称作晚期肾病 (ESRD)) 的发展呈正相关, 并可导致死亡、长期透析或肾移植。

TGF β 通过能影响大多数肾细胞的复杂多样的事件而与 CRF 相关联 (Bottinger, 2002, J. Am. Soc. Nephrol. 13:2600)。这些事件最终导致肾小管间质纤维化和肾小球硬化症,并使肾单位功能丧失,最终导致慢性肾衰竭。在三种 TGF β 同工型中,TGF β 1 在介导慢性肾病的发展中处于主导地位,不仅因为它是最优势表达的同工型,而且因为 TGF β 2 和 β 3 都是通过上调 TGF β 1 的表达而介导其效应的(Yu, 2003, Kid. Int. 64, 844)。因此,要阻止诸如慢性肾病这样的紊乱的有害效应,就需要调整 TGF β 1 的表达。

因此,通过提供可用于诊断、预防和治疗纤维化紊乱如慢性肾病的组合物,新的 TGF β 1 结合组合物的发现能满足本领域中这一需要。

发明概述

本发明部分基于性能改良的结合组合物的发现,相对于成熟 TGF β 2 和/或成熟 TGF β 3 而言,其能特异性和/或选择性结合成熟 TGF β 1 并中和成熟 TGF β 1。

这些结合组合物含有:(a)第一部分,包含至少如下序列之一:a) GYRX₁X₂X₃Y [SEQ ID NO: 4]; 其中 X₁ 是 W 或 A; X₂ 是 F 或 L; 且 X₃ 是 A、E 或 Y; b) GYX₁FX₂DYNX₃X₄ [SEQ ID NO: 2]; 其中 X₁ 是 T 或 D; X₂ 是 T、E 或 F; X₃ 是 M、I、L 或 V; 且 X₄ 是 H、V 或 A; 或 c) X₁X₂YPYDGX₃TGX₄NX₅KX₆KS [SEQ ID NO: 3]; 其中 X₁ 是 Y、Q 或 S; X₂ 是 I 或 V; X₃ 是 D 或 E; X₄ 是 Y、T、H 或 L; X₅ 是 Q、K、P 或 S; 且 X₆ 是 F 或 Y; 和/或(b)第二部分,包含至少如下序列之一: X₁QWDX₂X₃X₄PA [SEQ ID NO: 7]; 其中 X₁ 是 Q 或 S; X₂ 是 L、D 或 P; X₃ 是 N 或 R; 且 X₄ 是 P、F、Y 或 R; X₁AX₂X₃X₄VX₅YMH [SEQ ID NO: 5]; 其中 X₁ 是 R、Y、E 或 Q; X₂ 是 S 或 T; X₃ 是 S、V 或 A; X₄ 是 S 或 L; X₅ 是 S、P、L 或 Y; 或 ATSNX₁AX₂ [SEQ ID NO: 6]; 其中 X₁ 是 L、N 或 P; 且 X₂ 是 S、K、Y、L、M、F、E、Q、R 或 H; 结合组合物也可以 a)所述第一部分包含至少两种所述序列; b)所述第一部分包含三种所述序列; c)所述第二部分包含至少两种所述序列; d)所述第二部分包含三种

所述序列；e)所述第一部分包含至少两种所述序列且所述第二部分包含三种所述序列；f)所述第二部分包含至少两种所述序列且所述第一部分包含三种所述序列；或g)所述第一部分包含三种所述序列且所述第二部分包含三种所述序列；其中结合组合物的结合位点：与人 TGF β 1 多肽特异性地免疫反应；与鼠 TGF β 1 多肽特异性地免疫反应；针对纯化或重组产生的人 TGF β 1 蛋白或其片段而产生；为单克隆抗体、抗体的 Fab、Fv、scFv、F(ab)2 或可变结构域；具有至少一个、两个或三个保守取代；或处于人或人源化抗体的框架内；其中结合组合物：为抗体分子；为单克隆抗体分子；为双链抗体；为三链抗体；为四链抗体；为微型抗体分子；为单克隆抗血清；被可检测地标记；是冻干的；是无菌的；或处于缓冲组合物中；其中结合组合物是性能改良的单克隆抗体。

优选实施方案的详细描述

I. 概述

应理解本发明不只局限于这里描述的特定组合物、方法和技术，因为这类组合物、方法和技术当然是可以变化的。也应理解这里使用的术语仅仅是描述具体的实施方案，而非旨在限制本发明的范围。本发明的范围只在附属的权利要求书中加以限制。

除非在上下文中另行清楚地说明，这里以及附属权利要求书中使用的单数形式的单词，如“一”、“一个/一种”和“该”，包括其相应的复数指代。因此，例如，提及“一种生物”包括一种或多种不同的生物体，提及“一种细胞”包括一种或多种这样的细胞，而提及“一种方法”包括提及本领域普通技术人员已知的相当的步骤和方法等等。

除非另有说明，这里使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的意思一致。适当的方法和材料将在下面描述，当然与这里描述的相似或相当的方法和材料可以用来实施或检验本发明。这里讨论的所有出版物、专利申请、专利和其它的参考资料仅仅因其在本申请递交日前披露的内容而予以提供。绝不应阐释为承认本发明不能因其在

先发明而居先于任何此类公开。这里提到的所有出版物、专利申请、专利和其它的参考资料（包括所有的图片、附图、照片、图表、超级连接和其它形式的浏览器执行代码）因引述其教导（如上下文所清楚地显示的那样）而以其整体引入作为参考。

II. 定义

“结合组合物”是指对至少一种其它分子实体或结合配偶体具有选择性和/或特异性结合亲和力的分子实体。通常，所述结合是指在自然生理上相关的相互作用，可以是共价或非共价的，可包括多蛋白质复合物成员，包括但不局限于载体化合物、二聚体或多聚体配偶体。结合组合物作为整体或部分可以是天然衍生的（如分离和/或纯化）或合成产生。通常，结合组合物有至少一个区域[作为非限制的例子，如表面、形状（如腔、凹陷、裂缝或突出）、分子排布或空间构型]能特异性地和/或选择性地与结合配偶体上某范围或区域的特定空间和/或极性构造“拟合”、“结合”或互补。因此，例如，当结合组合物足够靠近潜在的结合配偶体时，结合组合物和配偶体就特异性和/或选择性地相互结合。与结合配偶体配对的结合组合物的非限制性实例有：抗原-抗体和半抗原-结合位点。抗体结合组合物的非限制性实例有：抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体、微型抗体、Fab 片段（包括如二聚体或三聚体的 Fab）、Fv 片段、scFv 片段、F(ab)₂ 片段等（有关本发明所涵盖的抗体结合组合物的非限制性实例，见如 Hudson & Souriau 2003 Nature Medicine 9:129-34）。单克隆抗体结合组合物是来源于大量的基本上同源的抗体群（即构成抗体群的单个抗体基本上相同（如，他们可以来源于单个细胞类型的克隆）），因而在这个意义上，它是单克隆抗体。但是这并非意味着限制它的特定起源。这样的抗体可以在通常不产生抗体的细胞如 CHO、NSO 或 COS 细胞中容易地生产。另外，通过遗传改造细胞，表达和组装轻链和重链多肽以形成抗体产物，这样的抗体可以在其它类型的细胞中产生，特别是哺乳动物细胞，甚至是植物细胞。另外，这样的链可以化学合成，但是由于其特异于给定的抗原决定簇，依这里使

用的“单克隆抗体”术语的本质含义，他们仍然是单克隆抗体。因此，这里使用的术语单克隆抗体更大程度上旨在表征抗体分子的特异性和纯度，而非仅指所述抗体产生的机理。

“结合位点”是指分子实体上参与特异性地和/或选择性地结合另一分子实体的特定区域、范围或构型。结合位点的非限制性实例是构成抗体互补决定区（CDR）的连续氨基酸序列。在一个实施方案中，本发明的结合位点包含具有表1所示通式的序列。在另一个非限制性实施方案中，结合位点包含表1中序列的组合。另一个非限制性实例是，结合位点是由在 Fab 片段的 8 个 β 折叠的边缘上构成重链和轻链可变区的 6 个 CDR 环的氨基酸序列的三维构型和空间构造形成(如见 Chothia 和 Lesk, 1987 *J. Mol. Biol.* 196:901-17)。本发明披露的 CDR 可以并入/嵌入框架或分子结构, 如象 CDR 移植那样。在一个实施方案中, 带有本发明 CDR 的结构通常是抗体的重链或轻链序列或其实质部分, 其中, CDR 位于天然出现的由重排免疫球蛋白基因编码的抗体可变结构域的 VH 和 VL 的 CDR 的相应位置上。免疫球蛋白可变结构域的结构和位置的测定可以参考(Kabat 等人, 1987 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 第 4 版. US Department of Health and Human Services, 以及其更新材料, 目前可在因特网上获得 (<http://immuno.b-me.nwu.edu>)). 互补决定区通常如 Kabat 所定义, 但也可以根据 Chothia (*J. Mol. Biol.* 196:901-17)和/或 MacCallum (*J. Mol. Biol.* 262:732-45)的定义获悉。给定特定 CDR 所嵌入的氨基酸序列, 本领域技术人员能够常规确定哪些个氨基酸残基构成该特定的 CDR。另外, 在 CDR 移植中, 可以移植临近 Kabat VH CDR1 的由 Chothia 所定义的环境残基。

在一个实施方案中, 本发明的 CDR 序列可以通过重组 DNA 技术引入到缺少 CDR 区的可变结构域的所有组成成分中。例如, Marks 等人(1992 *BioTechnology* 10:779-83)描述了产生抗体可变结构域所有组成成分的方法。其中, 使用定向或临近可变结构域 5'端的共有序列引物以及人 VH 基因第三个框架区的共同序列引物, 以提供缺失 CDR3 的 VH 可变结构域的所有组成成分。Marks 等人还描述了此所有组成成分如何与特定抗体的

CDR3 序列组合（如本文所述）。使用类似的技术，本发明的 CDR3 序列可以与缺失 CDR3 的 VH 或 VL 结构域的所有组成成分改组，并将改组的完整 VH 或 VL 结构域与同源的 VL 或 VH 结构域组合，以提供本发明特异性的结合组合物成员。或者，用类似的策略，CDR3 可与本发明的其它 CDR 组合。这样，所有组成成分可以在合适的宿主体系如 W092/01047 的噬菌体展示系统中展示，以便筛选合适的特异性结合成员。

结合组合物:TGF β 1 复合物

这里使用的术语“结合组合物:TGF β 1 复合物”指的是由结合组合物特异性地和/或选择性地结合 TGF β 1 蛋白所形成的结合组合物和 TGF β 1 蛋白质的复合物。在优选的实施方案中，所有提及的 TGF β 1 是指“成熟的”灵长类 TGF β 1 蛋白。在更加优选的实施方案中，所有提及的 TGF β 1 是指成熟的人 TGF β 1 蛋白（见如 NCBI 登录号: P01137, 描述了人转化生长因子 β 1 前体（TGF- β 1）的氨基酸序列及其成熟部分）。在每一情况下，通篇提及的 TGF β 1 是指成熟的、生物活性形式的 TGF β 1 [TGF β 1 是作为无活性的“潜伏”复合物从细胞中分泌出来，包括与两个前体片段非共价复合形成的 TGF β 1 同源二聚体，其上通常连有若干潜在 TGF β 1 结合蛋白质之一（见如 Annes 等人, 2003 J. Cell Science 116:217-24; Miyazono 等人, 1993 Growth Factors 8:11-22; Munger 等人, 1997 Kidney Int. 51:1376-82; Oklu & Hesketh 2000 Biochem. J. 352:601-10）。此潜伏的 TGF β 1 复合物代表抵御“疏忽”活化的重要安全措施，能稳定潜伏的 TGF β 1 并将其靶向胞外基质，从而隐蔽在此处（Taipale 等人, 1998 Adv. Cancer Res. 75:87-134）。因此，胞外基质作为贮库，在这里 TGF β 1 可以容易地被活化而不需要新的细胞合成。TGF β 1 作为潜伏的复合物分泌势必需要存在调控活化的步骤，其最可能通过能优先降解 TGF β 1 前体片段从而释放出高度稳定的成熟活性 TGF β 1 二聚体形式的蛋白酶的活动来介导]。

结合组合物的特异性结合意味着结合组合物具有通常以天然活性构象形式识别 TGF β 1 区域的结合位点。例如，针对 TGF β 1 产生并识别 TGF

$\beta 1$ 表位的抗体能通过特异性结合形成结合组合物: TGF $\beta 1$ 复合物。通常, 结合组合物: TGF $\beta 1$ 蛋白复合物的形成可以允许对生物样品(如与其他蛋白质和生物制剂组成的混合物)中的 TGF $\beta 1$ 进行检测。本发明的结合组合物的表位可以用这里或本领域(见如 G. Tribbick 2002 Journal of Immunological Methods 267:27-35; Woods 和 Hamuro 2001 Journal of Cellular Biochemistry Supplement 37:89-98)描述的技术测定, 和/或用这里描述的竞争结合的方法测定。在优选的实施方案中, 本发明结合组合物的表位包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基 YYVGRK; 在另一个实施方案中, 本发明结合组合物的表位包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基 YYVGRK 和 SEQ ID NO: 1 的 YSKV; 在另外的实施方案中, 本发明结合组合物的表位包含来自 SEQ ID NO: 1 中 YYVGRK 的至少 1、2、3、4、5 或 6 个相邻或不相邻的残基和/或来自 SEQ ID NO: 1 中 YSKV 的至少 1、2、3 或 4 个相邻或不相邻的残基(涵盖这样的实施方案, 以包括其中任何和所有的组合, 例如但不限于: YYVGRK 和 SEQ ID NO: 1 的 KV; 或 YVGRK 和 SEQ ID NO: 1 的 Y 和 KV(所有这样的组合只要使用计算机算法和众所周知的数学公式进行排列和组合就能得到)。例如, 在又一优选的实施方案中, 依据本发明结合组合物阻止针对同一抗原如 TGF $\beta 1$ 的竞争性结合组合物随后形成结合复合物的能力, 在功能上定义本发明的表位(这样的竞争结合在这里有描述)。

这里使用的术语“特异性结合”是指特异性结合对中一个成员与除其特异性结合配偶体外的其他分子不表现出显著结合的情形。这个术语也适用于抗原结合结构域特异于许多抗原上所携带的特定表位的情形, 在这种情况下, 带有抗原结合结构域的特异性结合成员能结合携带所述表位的不同抗原。因而, 特异于成熟 TGF $\beta 1$ 的结合组合物“对除其特异性结合的配偶体(即成熟 TGF $\beta 1$)外的其他分子无显著的结合”。

对于结合组合物而言的短语“特异性结合”或“特异性免疫反应”是指在异源蛋白质或其他生物成分群存在时确定结合组合物存在的结合反应。因此, 在指定的免疫测定条件下, 指定的结合组合物能结合特异的蛋白质而

不显著地结合样品中的其他蛋白质。在这种条件下,对结合组合物的特异性结合需要根据其对特定蛋白质有特异性而筛选出来的结合组合物。例如,可针对人活性二聚体形式的 TGF β 1 (其成熟氨基酸序列单体如[SEQ ID NO:1]所述)产生结合组合物如抗体,随后进行选择,以获得只与该 TGF β 1 蛋白特异性免疫反应而不与其他蛋白质反应的抗体。这样的结合组合物能区分与人 TGF β 1 蛋白高度同源的蛋白质,例如,其他的人 TGF β 同工物(如人 TGF β 2 或人 TGF β 3)。在优选的实施方案中,本发明结合组合物对成熟 TGF β 1 的特异性等于或比其相对于成熟 TGF β 2 和/或成熟 TGF β 3 的特异性高 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、85、90、95、100、125、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500 或 10,000 倍。在另一优选的实施方案中,本发明组合物的特异性对前面所列人 TGF β 2 有特殊的特异性数值,而对人 TGF β 3 有不同的特异性数值,例如对成熟 TGF β 1 的特异性等于或大于其相对于成熟 TGF β 2 特异性的 100 倍,而等于或大于其相对于成熟 TGF β 3 特异性的 900 倍。任何这样的组合都囊括在内。

本发明的结合组合物优选中和 TGF β 1,且对 TGF β 1 的解离常数(Kd)优选少于约 100 pM、95 pM、90 pM、85 pM、80 pM、75 pM、70 pM、65 pM、60 pM、55 pM、50 pM、45 pM、40 pM、35 pM、30 pM、25 pM、20 pM、15 pM、14 pM、13 pM、12 pM、11 pM 或 10 pM;更优选少于约 10 pM、9.9 pM、9.8 pM、9.7 pM、9.6 pM、9.5 pM、9.4 pM、9.3 pM、9.2 pM、9.1 pM、9.0 pM、8.9 pM、8.8 pM、8.7 pM、8.6 pM、8.5 pM、8.4 pM、8.3 pM、8.2 pM、8.1 pM、8.0 pM、7.9 pM、7.8 pM、7.7 pM、7.6 pM、7.5 pM、7.4 pM、7.3 pM、7.2 pM、7.1 pM、7.0 pM、6.9 pM、6.8 pM、6.7 pM、6.6 pM、6.5 pM、6.4 pM、6.3 pM、6.2 pM、6.1 pM、6.0 pM、5.9 pM、5.8 pM、5.7 pM、5.6 pM、5.5 pM、5.4 pM、5.3 pM、5.2 pM、5.1 pM 或 5.0 pM;甚至更优选少于约 5.0 pM、4.9 pM、4.8 pM、

4.7 pM、4.6 pM、4.5 pM、4.4 pM、4.3 pM、4.2 pM、4.1 pM、4.0 pM、3.9 pM、3.8 pM、3.7 pM、3.6 pM、3.5 pM、3.4 pM、3.3 pM、3.2 pM、3.1 pM、3.0 pM、2.9 pM、2.8 pM、2.7 pM、2.6 pM、2.5 pM、2.4 pM、2.3 pM、2.2 pM、2.1 pM、2.0 pM、1.9 pM、1.8 pM、1.7 pM、1.6 pM、1.5 pM、1.4 pM、1.3 pM、1.2 pM、1.1 pM、1.0 pM; 以及甚至更更优选少于约 9.9 pM、9.8 pM、9.7 pM、9.6 pM、9.5 pM、9.4 pM、9.3 pM、9.2 pM、9.1 pM、9.0 pM、8.9 pM、8.8 pM、8.7 pM、8.6 pM、8.5 pM、8.4 pM、8.3 pM、8.2 pM、8.1 pM、8.0 pM、7.9 pM、7.8 pM、7.7 pM、7.6 pM、7.5 pM、7.4 pM、7.3 pM、7.2 pM、7.1 pM、7.0 pM、6.9 pM、6.8 pM、6.7 pM、6.6 pM、6.5 pM、6.4 pM、6.3 pM、6.2 pM、6.1 pM、6.0 pM、5.9 pM、5.8 pM、5.7 pM、5.6 pM、5.5 pM、5.4 pM、5.3 pM、5.2 pM、5.1 pM、5.0 pM、5.0 nM、4.9 pM、4.8 pM、4.7 pM、4.6 pM、4.5 pM、4.4 pM、4.3 pM、4.2 pM、4.1 pM、4.0 pM、3.9 pM、3.8 pM、3.7 pM、3.6 pM、3.5 pM、3.4 pM、3.3 pM、3.2 pM、3.1 pM、3.0 pM、2.9 pM、2.8 pM、2.7 pM、2.6 pM、2.5 pM、2.4 pM、2.3 pM、2.2 pM、2.1 pM、2.0 pM、1.9 pM、1.8 pM、1.7 pM、1.6 pM、1.5 pM、1.4 pM、1.3 pM、1.2 pM、1.1 pM、1.0 pM、0.9 pM、0.8 pM、0.7 pM、0.6 pM、0.5 pM、0.4 pM、0.3 pM、0.2 pM、0.1 pM 或 0.01 pM。结合组合物的解离常数(K_d)可以用本领域的任何方法测定,例如 BIAcore™,改造 Karlsson 等人 1991 J. Immunol. Methods 145, 299-340 的方法。其他的描述见 Jonsson, 等人, 1993 Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson 等人, 1991 Biotechniques 11:620-7; Johnsson 等人, 1995 J. Mol. Recognit. 8:125-31; 以及 Johnsson 等人, 1991 Anal. Biochem. 198:268-77。

这里使用的术语“ K_{on} ”旨在表示正向或复合物形成反应的结合或速率常数或比反应速率,度量单位为 $M^{-1}sec^{-1}$ 。这里使用的术语“ K_{off} ”是旨在表示抗体从抗体/抗原复合物上解离的解离或离解常数或速率常数或比反应速率,度量单位为 1/秒。这里使用的术语“ K_d ”旨在表示特定抗原-抗体反应的解离常数。它可以根据公式 $K_{off}/K_{on}=K_d$ 计算。结合组合物的亲和力

通常与更低 k_{off} 而非更高的 k_{on} 相关,但是不受理论束缚,改进的 k_{off} 和 k_{on} 均包括在实施方案中。在更加优选的实施方案中,本发明的结合组合物是高效价的抗体或其片段,通常表现出低 k_{off} 值。在甚至更加优选的实施方案中,本发明 Fab 片段实施方案的 k_{on} 速率比相当的 Fab (如 PCT/US2004/018921;US60485,820 中描述的 mAb2471) 提高至少 1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3 或 2.4 倍。在另一个实施方案中,本发明组合物的 k_{off} 速率比相当的结合组合物 (如 Fab 或 mAb) 提高至少 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、130、150、195、200、225、250、260、270、280、290 或 300 倍。

优选与 TGF β 2 和/或 TGF β 3 相比,抗体结合组合物特异性地和/或选择性地结合 TGF β 1;更优选与人 TGF β 2 和/或人 TGF β 3 相比,抗体结合组合物特异性地和/或选择性地结合人 TGF β 1。优选这样的抗体与 TGF β 2 和/或 TGF β 3 的交叉反应低于约 20% (用解离常数的比值检测),交叉反应更优选低于约 15%,甚至更优选交叉反应低于约 10%,甚至更优选交叉反应低于约 9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或 1%。

此外,抗体结合组合物还优选识别活性而非潜伏形式的 TGF β 1;更优选识别活性而非潜伏形式的人 TGF β 1。

中和

就结合组合物而言,术语“中和”或“拮抗”是指结合组合物特异性和/或选择性结合另一分子实体,而导致消除或抑制为结合组合物所结合的分子实体的生物学效应物功能的情形。就“TGF β 1”而言,术语“中和”或“拮抗”旨在表示结合组合物与 TGF β 1 结合或相互作用而导致抑制 TGF β 1 所诱导的生物活性。评估 TGF β 1 生物活性的抑制可以通过检测 TGF β 1 生物活性的一种或多种体内或体外指示物,例如,但不限制于受体结合抑制,纤维化抑制,趋化性抑制或 TGF β 1 结合测定中信号转导的抑制 (有关所涵盖的中和测定的非限制的实例,见如 EP 0 945 464)。在非限制性实施方案中,结合组合物中和或拮抗 TGF β 1 活性的能力可以用在这里实施例

描述的测定法进行评估。

结合组合物的中和活性，如在抗体的实施方案中，可以用本领域认可的方法检测。在非限制例子中，可以采用或改良 Randall 等人(1993) (J. Immunol Methods 164, 61-67)的 TGF 测定法实施检测。这种测定基于 TGF β 1 和 TGF β 2 抑制白介素 5 (IL-5)诱导红白血病细胞系 TF1 增值的能力，以及 TGF β 特异性结合组合物逆转 TGF β 的抑制的能力。据报道，这种测定快速、可重复，且灵敏度可检测小于 500 fg/ml TGF β 1 和 5-10 pg/ml TGF β 2。据报道，这种检测对其他抑制分子(如 β 干扰素、 γ 干扰素和 TNF- α)的敏感性要低 100-1000 倍。据报道，通过纳入针对 TGF β 1 或 TGF β 2 的特异性中和抗体，这种检测也能够特异于 TGF β 1 或 TGF β 2，识别这些分子所有的容易获得的重组分子种类以及从人和牛血小板中产生的天然蛋白质，并检测血清样品中的 TGF β 。

这里报道的或本领域已知的其他测定法也包含在内。例如，大鼠抗 Thy1.1 模型是充分确立的血管系膜增生性肾小球肾炎的模型(见如 Morita, 等人 1998 Am J Kidney Dis 31:559-73; Bagchus, 等人 1986 Lab. Invest. 55:680-7 和 Yamamoto 和 Wilson 1987 Kidney Int. 32:514-25), 向该模型中注射抗定位在血管系膜细胞表面的 Thy 抗原的抗体能诱导系膜溶解，引起系膜细胞一段过补偿性增生，从而导致提高尿蛋白质(尿蛋白)的水平。抗 Thy1.1 肾炎模型在很多方面类似人 IgA 肾炎或 Henoch-Schonein 紫癜 (O'Donoghue 等人 1991 J Clin Invest 88:1522-30)，而且这种模型通过测定测试组合物实现尿蛋白剂量相关下降的能力，已经用来检验肾病的潜在治疗手段(见如 Burg, 等人 1997 Lab Invest 76:505-16; Johnson 等人 1995 Kidney Int 47:62-9)。在优选实施方案中，本发明的结合组合物能使此种模型中的尿蛋白降低，大于或等于 10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、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%或80%。在这样的模型中，尿蛋白下降的范围在任何两个这样显示的数值之间的实施方案也包含在内，所述范围可以包括或不包括边界点数值的任何一个或两个，如 $>12\%$ 且 $\leq 42\%$ 的范围。

另外，可以采用 Sharma 的 db/db 糖尿病小鼠检测模型（见如 2000 PNAS 97:8015-20）证明对肾脏中 TGF β 生物作用的长期抑制能有效地阻止由于糖尿病导致的肾衰竭，或者可以采用 Sharma STZ 糖尿病小鼠模型（1996 Diabetes 45, 522-30）来测试结合组合物缓解或预防糖尿病性肾病的能力。此外，Ueberham 等人（2003 Hepatology 37(5):1067-78）还描述了在肝脏纤维化的双转基因小鼠模型中由四环素调控的基因表达体系，在这个表达体系中，TGF $\beta 1$ 的表达是在饮用水添加或除去强力霉素氢氯化物进行调控，从而能随意地开关 TGF $\beta 1$ 的表达。在这种动物的肝脏中增加 TGF 的表达可导致纤维化疾病状态，甚至是在肝脏重量降低 59%后，这种纤维化疾病状态都可通过关闭 TGF $\beta 1$ 的表达而逆转。通过将本发明的结合组合物与强力霉素氢氯化物关闭 TGF $\beta 1$ 表达的作用进行比较，使用这种模型可以评估本发明结合组合物抑制 TGF $\beta 1$ 生物功能的作用。在使用在这里描述的 HT-2 细胞增殖测定的具体实施方案中，与用类似的结合组合物（如在 PCT/US2004/018921; US 60/485,820 中描述的 mAb2471）在同样或相似的测定条件下得到的 IC₅₀ 值相比，申请人优选包含 IC₅₀ $\geq$ 至少 50、60、70、80、90、100、105、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425 或 450 倍的结合组合物实施方案。还包含如前面定义的 IC₅₀ 提高范围在这样两个数值间（可以包括或不包括任何一个或两个的边界点，如相对于 mAb2471，IC₅₀ 提高范围 >80 倍且 ≤ 100 倍）的实施方案。

抗体

本发明的抗体结合组合物包括，例如但不限于多克隆、单克隆、多

特异性、人、人源化或嵌合抗体，单链抗体，Fab 片段，F(ab')片段，由 Fab 表达文库产生的片段，抗独特型 (anti-Id) 抗体 (包括本发明的抗体的抗独特型抗体) 和前面任何一种的表位结合片段。

这里使用的术语“抗体”是指免疫球蛋白组合物以及免疫球蛋白组合物的免疫学活性部分，如含有能特异性地和/或选择性地结合抗原的结合位点的结合组合物分子。本发明的免疫球蛋白组合物可以是任何型 (如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)，任何类 (如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2) 或亚类的免疫球蛋白分子。优选抗体是本发明的人抗原结合抗体片段，如但不局限于 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、单链 Fv (scFv)、单链抗体、二硫键连接的 Fv (sdFv) 以及包含 VL 或 VH 结构域的片段。包括单链抗体在内的抗原结合抗体片段，可以仅包含可变区或与如下的整体或部分组合：铰链区、CH1、CH2 或 CH3 结构域或其组合。在本发明中也包括但不局限于抗原结合片段，所述片段也可以由可变区和铰链区的任何组合组成，如 CH1、CH2 或 CH3 结构域或其组合。本发明的抗体可以来自包括鸟类和哺乳动物在内的任何动物。抗体优选来自人、灵长类、鼠 (如小鼠和大鼠)、驴、兔子、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡。

这里使用的词语“人抗体”包括但不局限于具有人免疫球蛋白氨基酸序列的抗体，例如包括但不局限于从人免疫球蛋白文库 (如人生殖系文库) 或含有一个或多个个人免疫球蛋白转基因且不表达内源免疫球蛋白的动物 (如这里描述的或在美国专利 No. 5,939,598 中教导的) 中分离到的抗体。

结合组合物可以是单特异性的、双特异性的、三特异性的或有更高的多特异性。多特异性抗体可以特异于靶蛋白质、多肽 (或其片段) 的不同表位，或特异于 TGF β 1 以及异源表位两者，如异源 TGF β 同工型或固相支持物材料 (见如 WO 2093/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt 等人 (1991) J. Immunol. 147:60-69; 美国专利 No. 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 或 5,601,819; 或 Kostelny 等人 (1992) J. Immunol. 148:1547-1553)。

结合组合物可以根据其所识别或选择性地和/或特异性地结合的 TGF

$\beta 1$ 蛋白（或其片段）的表位或部分进行描述或详细说明。表位或多肽部分可以象在这里描述的那样详细说明：如 N 末端和 C 末端位置、相邻氨基酸残基的大小、或在附表和/或附图中列出、或象这里描述的那样。另外，特异性结合表位、多肽、蛋白质、多肽或蛋白质片段的抗体也可以特殊地排除在本发明之外。例如，申请人保留有条件地主张特异结合表位、多肽、蛋白质、多肽或蛋白质片段的抗体的权利。相应地，本发明涵盖能特异性地结合多肽或蛋白质或其片段的第一或其他的抗体，同时，排除例如也可能通过结合不同的表位而选择性地结合相同蛋白质或多肽或体片段的第二或其他的抗体。在优选实施方案中，申请人有条件地主张相对于 TGF $\beta 2$ 和/或 TGF $\beta 3$ 而言，特异性地和/或选择性地结合 TGF $\beta 1$ 同工型且中和 TGF $\beta 1$ 的结合组合物，其含有至少一个如下结合位点，所述结合位点包含：来自 QQWNGNPPA [SEQ ID NO: 126] 的至少四个相邻氨基酸；来自 QQWDSNPPA [SEQ ID NO: 127] 的至少六个相邻氨基酸；来自 YIYPYNGDTGYNQKFKS [SEQ ID NO: 128] 的至少五个相邻氨基酸（其中所述至少五个相邻氨基酸之一是 D）；或来自 GYTFTDYTMH [SEQ ID NO: 129] 的至少五个相邻氨基酸。

本发明的抗体也可以依据他们的交叉反应进行描述或详细说明。不与靶蛋白质、多肽或其片段的任何其他类似物、直系同源物、旁系同源物或同源物结合的抗体囊括在内。

本发明还包括选择性地结合这样的多肽的抗体，所述多肽由在严格杂交条件下（如这里描述的）与人 TGF $\beta 1$ 多核苷酸序列稳定杂交的多核苷酸编码。

结合组合物也可以依据它对蛋白质或多肽或其片段或表位的结合亲和力和力进行表征或详细说明。在另一个实施方案中，结合组合物（如抗体或抗体结合片段）的结合亲和力优选包括例如（用这里描述的测定方法）显示低于如下解离常数或 K_d （或在下面定义的两个数之间的范围，这个范围可以包括也可以不包括任何一个或两个边界点）的结合亲和力： 5×10^{-2} M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-4} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6}

M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 4.9×10^{-12} M、 4.8×10^{-12} M、 4.7×10^{-12} M、 4.6×10^{-12} M、 4.5×10^{-12} M、 4.4×10^{-12} M、 4.3×10^{-12} M、 4.2×10^{-12} M、 4.1×10^{-12} M、 4.0×10^{-12} M、 3.9×10^{-12} M、 3.8×10^{-12} M、 3.7×10^{-12} M、 3.6×10^{-12} M、 3.5×10^{-12} M、 3.4×10^{-12} M、 3.3×10^{-12} M、 3.2×10^{-12} M、 3.1×10^{-12} M、 3.0×10^{-12} M、 2.9×10^{-12} M、 2.8×10^{-12} M、 2.7×10^{-12} M、 2.6×10^{-12} M、 2.5×10^{-12} M、 2.4×10^{-12} M、 2.3×10^{-12} M、 2.2×10^{-12} M、 2.1×10^{-12} M、 2.0×10^{-12} M、 1.9×10^{-12} M、 1.8×10^{-12} M、 1.7×10^{-12} M、 1.6×10^{-12} M、 1.5×10^{-12} M、 1.4×10^{-12} M、 1.3×10^{-12} M、 1.2×10^{-12} M、 1.1×10^{-12} M、 1.0×10^{-12} M、 0.9×10^{-12} M、 0.8×10^{-12} M、 0.7×10^{-12} M、 0.6×10^{-12} M、 0.5×10^{-12} M、 0.4×10^{-12} M、 0.3×10^{-12} M、 0.2×10^{-12} M、 0.1×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M 或 10^{-15} M。

本发明也包含用任何本领域已知的测定竞争结合的方法，如这里描述或参考的免疫测定，来测定竞争性抑制结合组合物与 TGF β 1 表位结合的抗体。在优选实施方案中，抗体竞争性抑制至少 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%或 91%，至少 90%、89%、88%、87%、86%；至少 85%，至少 80%，至少 75%，至少 70%，至少 60%或至少 50%（或在两个这样数值之间的范围，可以包括或不包括任何一个或两个边界点）的表位结合。

本发明的抗体可以作为 TGF β 1（或其片段）的拮抗剂。例如，本发明的抗体或结合组合物能部分或完全地破坏 TGF β 1 与同源受体/配体之间的相互作用。优选本发明的抗体结合 TGF β 1 或其部分的抗原表位。

本发明同样包含能结合配体并阻止其与受体结合（如通过空间位阻）的抗体。同样地包含抑制受体激活但不抑制受体结合的配体结合抗体。

本发明的抗体可以用来但不局限于在体内或体外诊断和治疗方法中纯化、检测或寻靶 TGF β 1 或其片段。例如，在免疫测定中，本发明的抗体被用作定性和/或定量地测定生物样品中 TGF β 1 或其片段的水平（见如 Harlow 和 Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)）。

结合组合物可以单独使用，也可以与其他组合物组合使用。而且，结合组合物如抗体可以重组融合到异源多肽的 N 端或 C 端，或化学缀合（包括共价和非共价缀合）到多肽或其他组合物上。例如，本发明的抗体可重组融合或缀合到可用作检测测定标记的分子上以及效应分子如异源多肽、药物、放射性核素或毒素上（见如 WO 92/08495；WO 91/14438；WO 89/12624；美国专利 No. 5,314,995；和 EP 396,387）。

结合组合物包括例如将任何类型的分子通过共价附着到例如抗体上而得到修饰的衍生物，从而所述共价附着并不阻止抗体产生抗独特型反应。例如，抗体衍生物包括但不限于经糖基化、酰基化、PEG 化、磷酸化、酰胺化、以及通过已知保护/封端基团衍生、蛋白水解切割、连接到细胞配体或其他蛋白质等修饰的抗体。众多化学修饰的任何一种可以用已知的技术进行实施，如包括但不限于特异性化学切割、酰基化、配制、衣霉素的代谢合成等。另外，衍生物可以含有一种或多种非经典氨基酸。结合组合物可以由本领域已知的任何合适的方法产生。例如，制备单克隆抗体可以用本领域已知的任何技术，如 Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Harlow 和 Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); Breitling 和 Dübel 1999 *Recombinant Antibodies* (John Wiley 和 Sons, New York); H. Zola, *Monoclonal Antibodies* (Garland Press); 以及 James W. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (Academic Press)。

这里使用的术语“单克隆抗体”并不局限于用特定的技术（如杂交瘤技术）产生的抗体。用杂交瘤技术生产和筛选特异性抗体的方法是常规方法而且在本领域是已知的。术语“单克隆抗体”是指来源于单个克隆的抗体，包括任何真核、原核或噬菌体克隆，而不是指产生抗体所用的方法。

能识别特异性表位的抗体片段可以用已知的技术产生。例如，本发明的 Fab 和 F(ab')₂ 片段可以通过对免疫球蛋白分子进行蛋白酶水解切割而产生，使用酶如木瓜蛋白酶（产生 Fab 片段）或胃蛋白酶（产生 F(ab')₂

片段)。F(ab')₂ 片段含有可变区、轻链的恒定区和轻链 CH1 结构域。例如，结合组合物也可以用本领域已知的多种噬菌体展示方法产生，其中，携带功能性抗体结构域编码多核苷酸序列的噬菌体颗粒将功能性抗体结构域展示在噬菌体颗粒的表面上。

在具体的实施方案中，用噬菌体展示方法展示由所有组成成分或组合抗体文库（如人或鼠）表达的抗原结合结构域。表达结合目的抗原的抗原结合结构域的噬菌体可以用抗原进行筛选或鉴定，如利用标记的抗原，或将抗原结合或捕获在固体表面或珠子上。经噬菌体筛选后，分离噬菌体上的抗体编码区并用来产生完整抗体，包括人抗体或任何其他期望的抗原结合片段，并在任何期望的宿主，包括这里或在文献上描述的哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌中表达。

也可以利用本领域已知的方法，采用重组生产 Fab、Fab'和 F(ab')₂ 片段的技术，如 WO 92/122324; Mullinax 等人 BioTechniques 1992 12(6):864-9; 和 Sawai 等人 1995 AJRI 34:26-34; 及 Better 等人 1988 Science 240:1041-3。生产单链 Fv 和抗体的实施例包括例如美国专利 4,946,778 和 5,258,498; Huston 等人 1991 Methods in Enzymology 203:46-88; Shu 等人 1993 PNAS USA 90:7995-9; 和 Skerra 等人 1988 Science 240: 1038-40。在一些应用中，包括在人体内以及在体外检测测定中使用抗体，优选使用根据本领域已知的方法生产的人源化或人抗体。

这里的人源化抗体是指结合期望的抗原、这里描述的一个或多个互补决定区（CDR）已嵌入在框架区内、经体内引入人宿主系统后（如在肠胃外施用后）很少可能产生有害免疫原性反应的结合组合物。通常，CDR 供体区域适当地嵌入在人框架区内，以提高抗原结合和/或降低免疫原性。有用的框架区可以用本领域已知的方法鉴定，如通过(1)对 CDR 与框架残基的相互作用进行建模，以鉴定对于抗原结合重要的框架残基；(2)通过序列比较鉴定特定位置上不常见的框架残基（见如美国专利 No. 5,585,089, Riechmann 等人 Nature 332:323 (1988)）；或(3)根据经验鉴定。

下表 1 (a 和 b) 中显示的是本发明中具体单克隆抗体结合组合物实施

方案中的可变重链和轻链互补决定区 (CDR)。CDR 区用标准的氨基酸单字母编码和标准的 CDR 编号方式表示 (即随着 CDR 数值的升高, 对应着其越靠近典型的 IgG 重链或轻链结构中的恒定结构域; 如 VH CDR3 比 VH1 CDR1 更靠近 CH1 结构域)。

具体的 CDR 实施方案一般用描述 CDR 种类的氨基酸通式来表示。同样, 使用标准的单字母氨基酸代码, 并用字母“X”表示可取代的氨基酸残基, 其氨基酸残基在特定 CDR 中的位置用数值从最低 (最靠 CDR 氨基端) 到最高 (最靠 CDR 羧基端) 排列的下标数字表示。如在 VH CDR2 中, X_1 是最靠 CDR 氨基末端的残基, 而最靠羧基末端的可取代残基是 X_6 。使用这些通式, 本领域普通技术人员能够确定本发明中包含的可变重链或轻链区域 (V_L 或 V_H) 实施方案中每一个指定位置上所有可能的 CDR 实施方案。只需利用氨基酸代码在特定 CDR 通式中的每一个特定 X 残基上产生所有可能的取代, 就可以确定可能的氨基酸序列的任何具体示例。所有这样的实施方案都包含在本发明中。

此外, 本发明还同等地包含可能的 CDR 组合中的所有可能的 V_L 或 V_H 实施方案。如通过提供的信息, 可以很容易地计算出有 72 种可能的 VH CDR1、384 种可能的 VH CDR2 和 12 种可能的 VH CDR3, 从而在本发明结合组合物的特定可变重链抗体实施方案中产生总计 $72 \times 384 \times 12$ 种可能的 V_H CDR 组合。本发明也包含所有这样的组合。类似的推理适用任何 VL CDR 以及轻链可变结构域 V_L 所包含的所有可能组合。例如, 有 192 种可能的 VL CDR1、12 种可能的 VL CDR2 和 48 种可能的 VL CDR3, 从而在本发明的组合物的特定可变轻链抗体实施方案中产生总计 $192 \times 12 \times 48$ 种可能的 V_L CDR 组合。类似地, 本发明也包含特定结合组合物实施方案中的 V_H 和 V_L 组对的所有可能的组合。

表 1a 结合组合物的 CDR 重链通式

重链 CDR		
CDR1	CDR2	CDR3
GYX ₁ FX ₂ DYNX ₃ X ₄ *	X ₁ X ₂ YPYDGX ₃ TGX ₄ NX ₅ KX ₆ KS **	GYRX ₁ X ₂ X ₃ Y ***
[SEQ ID NO: 2]	[SEQ ID NO: 3]	[SEQ ID NO: 4]

- * 对于 VH CDR1: X₁ 为 T 或 D; X₂ 为 T、E 或 F; X₃ 为 M、I、L 或 V; 而 X₄ 为 H、V 或 A。
- **对于 VH CDR2: X₁ 为 Y、Q 或 S; X₂ 为 I 或 V; X₃ 为 D 或 E; X₄ 为 Y、T、H 或 L; X₅ 为 Q、K、P 或 S; 而 X₆ 为 F 或 Y。
- *** 对于 VH CDR3: X₁ 为 W 或 A; X₂ 为 F 或 L; 而 X₃ 为 A、E 或 Y。

表 1b 结合组合物的 CDR 轻链通式

轻链 CDR		
CDR1	CDR2	CDR3
X ₁ AX ₂ X ₃ X ₄ VX ₅ YMH *	ATSNX ₁ AX ₂ **	X ₁ QWDX ₂ X ₃ X ₄ PA ***
[SEQ ID NO: 5]	[SEQ ID NO: 6]	[SEQ ID NO: 7]

- * 对于 VL CDR1: X₁ 为 R、Y、E 或 Q; X₂ 为 S 或 T; X₃ 为 S、V 或 A; X₄ 为 S 或 L; X₅ 为 S、P、L 或 Y。
- **对于 VL CDR2: X₁ 为 L、N 或 P; 而 X₂ 为 S、K、Y、L、M、F、E、Q、R 或 H。
- ***对于 VL CDR3: X₁ 为 Q 或 S; X₂ 为 L、D 或 P; X₃ 为 N 或 R; 而 X₄ 为 P、F、Y 或 R。

本发明还包含这样的抗体结合组合物, 其中本发明所涵盖的 CDR 以适当的取向嵌入或携带在人抗体框架区内, 从而能使结合组合物相对于成熟 TGF β 2 和/或成熟 TGF β 3 而言, 特异性地和/或选择性地结合成熟 TGF β 1 并中和成熟 TGF β 1。可以用本领域已知的技术将特定的 CDR 嵌入或放置在适当的框架内。本发明中采用的可变结构域可以来自任何生殖系或为

重排的人源可变结构域，或可以是依据已知的人可变结构域的共有序列合成的可变结构域。

优选可变结构域框架不显著地影响结合组合物实施方案中的抗 TGF β 1 抗体的生物学性能，即相对于成熟 TGF β 2 和/或 TGF β 3 而言，特异性地和/或选择性地结合并中和成熟 TGF β 1 的能力。更优选框架在对人受试者施用（如肠胃外）时又不引发额外的显著免疫原性反应。优选的框架序列可以是在人抗体中天然出现的序列或若干人抗体的共有序列。本发明实施方案中抗体的重链可变区框架序列的非限制性实施例包括 VH 区段 DP-5 (Tomlinson 等人 1992 *J. Mol. Biol.* 227:776-98) 和 J 区段 JH4、JH1 或 JH5 (Ravetch 等人 1981 *Cell* 27:583-91)。Vk 区段 L1 (Cox 等人 1994 *Eur. J. Immunol.* 24:827-36) 和 J 区段 Jk4 (Hieter 等人 1982 *J. Biol. Chem.* 10:1516-22) 是轻链可变区框架序列的非限制性实例。在优选实施方案中，HCVR ER1 框架包含 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS [SEQ ID NO: 8]; HCVR FR2 框架包含 WVRQAPGQGLEWMG [SEQ ID NO: 9]; HCVR FR3 框架包含 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR [SEQ ID NO: 10]; HCVR FR4 框架包含 WGQGTLVTVSS [SEQ ID NO: 11]。在另一优选实施方案中，LCVR FR1 框架包含 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [SEQ ID NO: 12]; LCVR FR2 框架包含选自 [SEQ ID NO: 13-36] 的序列；LCVR FR3 框架包含 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC [SEQ ID NO: 37]; LCVR FR4 框架包含 FGQGTKLEIK [SEQ ID NO: 38]。在更优选的实施方案中，此类框架区可含有改变、缺失、添加、取代或其任意组合。而且，优选以任意组合取代、缺失或添加 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸的框架。

在一个实施方案中，用来嵌入本发明抗体结合组合物 CDR 的优选重链恒定区包括例如 IgG 恒定区。在更优选的实施方案中，IgG 恒定区是如下所示的 IgG1 恒定区或 IgG4 恒定区。

IgG1 [SEQ ID NO: 39]:

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG; 或

IgG4 [SEQ ID NO: 40]

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNDHKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL
G

本发明优选的轻链恒定区序列是如下所示的 κ 链恒定区:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO: 41]

在另一优选实施方案中, 抗体结合组合物含有 IgG1 重链恒定区或 IgG4 重链恒定区和 κ 轻链恒定区。

使用这里提供的信息, 普通技术人员能建立本发明的 mAb 实施方案, 如 No. 46P-L1-6, 其所具有的轻链包含:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCEASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLI
YATSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWDLNPP
AFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA

KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO: 130] 其中:

LCVR FR1 框架=DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC;

VL CDR1=式 $X_1AX_2X_3X_4VX_5YMH$ (其中 X_1 为 R、Y、E 或 Q; X_2 为 S 或 T; X_3 为 S、V 或 A; X_4 为 S 或 L; 而 X_5 为 S、P、L 或 Y) 的 EASSSVSYMH;

LCVR FR2 框架= WYQQKPGKAPKPLIY;

VL CDR2=式 $ATSNX_1AX_2$ (其中 X_1 为 L、N 或 P; 而 X_2 为 S、K、Y、L、M、F、E、Q、R 或 H) 的 ATSNLAS;

LCVR FR3 框架=GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC;

VL CDR3=式 $X_1QWDX_2X_3X_4PA$ (其中 X_1 为 Q 或 S; X_2 为 L、D 或 P; X_3 为 N 或 R; 而 X_4 为 P、F、Y 或 R) 的 QQWDLNPPA;

LCVR FR4 框架= FGQGTKLEIK; 且

轻链恒定区=

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC;

其所具有的重链包含:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQG
LEWMGYIYPYDGDGTGYNQKFKSRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD
DTAVYYCARGYRWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG [SEQ ID NO: 131] 其中:

HCVR FR1 框架=QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS;

VH CDR1=式 GYX₁FX₂DYNX₃X₄ (其中 X₁ 为 T 或 D; X₂ 为 T、E 或 F; X₃ 为 M、I、L 或 V; 而 X₄ 为 H、V 或 A) 的 GYTFTDYNMH;

HCVR FR2 框架=WVRQAPGQGLEWMG;

VH CDR2=公式 X₁X₂YPYDGX₃TGX₄NX₅KX₆KS (其中 X₁ 为 Y、Q 或 S; X₂ 为 I 或 V; X₃ 为 D 或 E; X₄ 为 Y、T、H 或 L; X₅ 为 Q、K、P 或 S, 而 X₆ 为 F 或 Y) 的 YIYPYDGDGTGYNQKFKS;

HCVR FR3 框架=

RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR;

VH CDR3=式 GYRX₁X₂X₃Y (其中 X₁ 为 W 或 A; X₂ 为 F 或 L; 而 X₃ 为 A、E 或 Y) 的 GYRWFAY;

HCVR FR4 框架=WGQGTLVTSS; 且

重链恒定区=

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNV₂DHKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL
G.

编码抗体的核苷酸

本发明还涵盖核酸分子, 其含有编码本发明结合组合物或其片段或本发多肽序列的多核苷酸序列。用任何本领域已知的方法可以获得多核苷酸并测定多核苷酸的核苷酸序列。例如, 如果已知多肽序列 (如抗体或其片段), 可以简单地任何计算机算法中利用遗传密码的简并性确定编码多肽的多核苷酸, 得到的序列信息可以用来装配例如化学合成的寡核苷酸 (如 Kutmeier 等人(1994) BioTechniques 17:242 所述), 简单地说, 这种

方法包括合成含有编码多肽序列的部分序列的重叠寡核苷酸、退火并连接这些寡核苷酸，然后用聚合酶链式反应扩增连接的寡核苷酸。

可选地，编码本发明多肽序列的多核苷酸可以从任何适当来源的核酸中产生。如果得不到含有特定抗体编码核酸的克隆，但抗体分子的序列是已知的，那么编码免疫球蛋白的核酸就可以化学合成或从适当的来源中获得。例如，来源可以是抗体的 cDNA 文库，或由 poly A+ RNA 产生的 cDNA 文库，或从任何能表达目的抗体的组织或细胞中分离，例如用能与目的多核苷酸序列 3'和 5'端杂交的合成引物通过 PCR 筛选能表达本发明的抗体的杂交瘤细胞，或通过使用特异于特定基因序列的寡核苷酸探针进行克隆以鉴定例如来自编码抗体的 cDNA 文库的 cDNA 克隆，从而产生抗体的核酸分子。

用本领域已知的任何方法可以将扩增的核酸克隆到可复制的克隆载体上。抗体的核苷酸和相应氨基酸序列一经测定，就可以用本领域已知的任何方法操纵抗体的核苷酸序列（如重组 DNA 技术、定点诱变、PCR 等）创建氨基酸取代、缺失和/或插入，从而产生具有不同氨基酸序列的抗体（见如 Sambrook 等人和 Ausubel 等人编辑，新版，*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY）。

在具体的实施方案中，可用已知的方法（如比较其他重链和轻链可变区的已知氨基酸序列以确定序列高变区）检查重链和/或轻链可变结构域的氨基酸序列以鉴定互补决定区（CDR）序列。利用常规的重组 DNA 技术，可以将这里描述的一个或两个 CDR 插入到适当的框架区内，如插入到人框架区，以降低免疫原性。框架区可以是天然存在的或共有的框架区（或这里所教导的），并且优选是人框架区（关于人框架区的清单，见如 Chothia 等人 1998 *J. Mol. Biol.* 278: 457-79）。一般来讲，为了鉴定人框架内可能影响抗原结合位点完整性从而影响抗原结合的残基，可以将供体和选择的人受体序列与衍生自抗体库的若干序列模板进行比对。鉴定“不变残基”（Kabat 等人 1991）和“关键残基”（Chothia 等人 1989），并针对序列模板筛选序列，分别确定供体抗原结合环 L1-L3、H1 和 H2 的经典分配

(canonical-classassignments) (Martin & Thornton, 1996 Mol. Biol. 263:800–15 at <http://www.bioinf.org.uk/>)。此外, 将 VH/VL 界面的残基 (Chothia 等人 1985) 和在核心位置上结构保守的残基 (Chothia 等人 1989) 与相应的供体和受体残基进行比较。依据蛋白质数据库 (Protein Data Bank) (Berman 等人 2000 Nucl. Acids Res. 28(1):235-42) 中已知结构的其他抗体的信息, 对这些位点上不匹配的供体和受体框架残基进行分析。用作外源 V 区人源化模板的人源框架的选择将随后决定对哪些个残基进行人源化。从已知晶体结构的抗体、生殖系或非生殖系选择同源模板, 或者可任选衍生自可得数据库的共有序列 (关于这方面的综述, 见 Routledge 等人 (Routledge 等人 1993 in Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man (Clark, M. 编辑, 14-44 页, Academic Titles, Nottingham, UK; 和 B. Lo, 2004 Antibody Engineering: Methods and Protocols, Humana Press))。人源化抗体的另一个策略是选择最接近人生殖系的序列 (Tomlinson 等人 1992) 做为框架接受供体 CDR。这种生殖系方法是依据与最佳拟合策略一样的原理, 但仅在数据库中查找生殖系序列 (见如 V BSASE, 它是从上千个发表的序列 (包括 Genbank 和 EMBL 数据库目前发布的序列) 汇编而成的关于所有人生殖系可变区序列的综合词典。V BASE 数据库作为人抗体基因的测序和绘图的外延工作, 以及关于其分析的用户友好工具, 是 MRC 蛋白质工程中心 (Cambridge, UK) 经过几年开发展而形成的。生殖系框架法非常有用, 因为人生殖系序列不出现具有潜在的免疫原性的体细胞高突变。也可以用共有的人生殖系策略将 CDR 移植或嵌入在人框架中, 其中使用人亚型之一作为框架 (见如 Presta 等人 1993 J. Immunol 151:2623–32; Couto 等人 1994 Hybridoma, 13:215–9; Couto 等人 1995 Cancer Res. (Suppl.), 55, 5973s–7s; Werther 等人 1996 J. Immunol., 157:4986–95; O'Connor 等人 1998 Protein Engng 11:321–8)

由框架区和 CDR 组合产生的多核苷酸优选编码特异性地和/或选择性地结合 TGF β 1 (或其表位) 的抗体 (或其片段)。这如这里讨论的, 在框架区

优选进行一个或多个氨基酸取代，以改进抗体对其抗原的结合。

另外，可用此类方法取代或缺失可变区一个或多个参与形成链内二硫键的半胱氨酸残基，以产生缺乏一个或多个链内二硫键的抗体分子。对多核苷酸的其他改变包含在本发明中，并落在本领域普通技术人员如分子生物学的能力范围内。

另外，这些技术可改造用于生产单链抗体(见如美国专利 No. 4,946,778; Bird, Science 242:423-42 (1988); Huston, 等人 PNAS 85:5879-5883 (1988) 和 Ward 等人 Nature 334:544-54 (1989))。通过氨基酸接桥将重链和轻链片段的 Fv 区连在一起产生单链多肽，从而形成单链抗体。也可以使用在大肠杆菌中组装功能性 Fv 片段的技术 (Skerra 等人 (1988) Science 242: 1038-1041)。

多肽片段

本发明也包含结合组合物的片段。“多肽片段或区段”包含这里描述的序列的一部分或 SEQ ID NO: 多肽序列的一部分的氨基酸序列。蛋白质和/或多肽片段或区段可以是游离形式的，或它们可构成较大多肽或蛋白质的一部分，其中所述片段或区段形成部分或区域，如这里 SEQ ID NO: 中连接到融合蛋白质上的单个一连续区域。

多肽区段优选拥有长度至少大约 7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、110、120、130、140 或 150 个的连续氨基酸。在这里上下文中的“大约”包括这里描述的具体说明的范围或数值，并且也包括在片段的任何一端或两端相差几个氨基酸残基(如加或减 5 个、加或减 4 个、加或减 3 个、加或减 2 个、加或减 1 个氨基酸残基)造成的不同于所述数值的数值。本发明中也包含编码这样的多肽片段的多核苷酸。

而且，本发明涵盖包含多个所述氨基酸区段或片段(如指定长度的非

重叠的区段)的蛋白质或多肽。通常,多个应为至少2个,更通常的是至少3个,并且优选为至少4、5、6、7、8、9个或更多。尽管提供了区段的最小长度,但是也包含了针对任何特定多个区段的不同大小的最大长度,如多达3个的区段可以总计含有1个长度为7个相邻氨基酸的区段和两个另外的非重叠区段,各自长12个氨基酸。

还优选如此表征结构或功能结构域如片段或其组合的多肽片段或区段(及其相应的多核苷酸片段):例如,包含互补决定区(CDR如VL或VH: CDR1、CDR2或CDR3)、可变区(如重链或轻链的可变区,VL或VH)、框架区(FH1、2、3或4)、D或J区、恒定区(如C_L、C_H1、C_H2或C_H3)、铰链区、Fc γ 受体结合区、 α 螺旋和 α 螺旋形成区、 β 折叠和 β 折叠形成区、转角和转角形成区、卷曲和卷曲形成区、亲水区、疏水区、 α 两性区、 β 两性区、柔性区、环区、发夹结构域、 β - α - β 基序、螺旋束、 α/β 圆桶、上下 β 圆桶、果酱卷(jelly roll)或瑞士卷(Swiss roll)基序、跨膜结构域、表面形成区、底物结合区、跨膜区、接头、免疫原性区、表位区和高抗原指数区。而且,本发明也包含编码这些结构域的多核苷酸。

其他优选的多肽区段是生物活性片段。生物活性片段与结合组合物多肽(或其片段)表现出相似但不一定相同的活性,如Fab、Fv、scFv或F(ab')₂。编码这些多肽片段的多核苷酸也包含在本发明中。

多核苷酸片段优选编码显示出功能活性的多肽。词语“功能活性”包含能实现一个或多个已知功能活性的多肽区段。这样的功能活性包括但不限于生物活性、抗原性(能结合或与多肽竞争结合本发明多肽的抗体结合组合物)、免疫原性(能产生与本发明多肽结合的抗体)、能与本发明多肽形成多聚体,以及能结合这里描述的多肽的受体或配体。

可以用多种方法测定多肽(包括片段、变体、衍生物和其类似物)的功能活性。例如,在测定结合或与本发明的全长多肽竞争结合本发明多肽的抗体的能力时,可以使用本领域已知的多种免疫测定,包括但不限于竞争和非竞争测定体系,使用的技术如放射性免疫测定、ELISA(酶链免疫吸附试验)、“夹心”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀反应、免

疫扩散测定、原位免疫测定（例如，用胶体金、酶或放射性同位素标记）、western 印迹、沉淀反应、凝集测定（如凝胶凝集测定、血凝测定、补体结合测定、免疫荧光测定、蛋白质 A 测定和免疫电泳测定等）。

在另一个实施方案中，通过检测第一抗体上的标记实现抗体结合的检测。在另一个实施方案中，通过检测第二抗体或试剂对第一抗体的结合来检测第一抗体。在另外的实施方案中，对第二抗体进行标记。用于检测免疫测定中的结合的很多方法在本领域是已知的，而且在本发明的范围内。

在另一个实施方案中，当鉴定配体时，或评估本发明多肽片段、变体或衍生物形成多聚体的能力时，可以用如还原或非还原凝胶层析、蛋白质亲和层析和亲和印迹（通常见 Phizicky 等人(1995) *Microbial. Rev.* 59:94-123）检测结合。在另一个实施方案中，可以用普通的技术测定多肽结合其底物的生理学关系（如信号转导）。另外，这里描述的测定法（见如申请的“实施例”部分）或本领域已知的其他测定法可以常规地用来测定结合组合物（其片段、变体、衍生物及其类似物）调节 TGF β 1 在体外或体内的相关的生物学活性的能力。

生产抗体的方法

抗体结合组合物的生产可以用本领域已知的任何方法，特别是用化学合成或优选用重组表达技术。

结合组合物或片段、衍生物或其类似物（如本发明抗体的重链或轻链或本发明的单链抗体）的重组表达需要构建含有抗体编码多核苷酸的表达载体。一旦获得本发明抗体分子或抗体重链或轻链或其部分（优选含有重链或轻链的可变结构域区）编码多核苷酸的序列，就可以用已知的重组 DNA 技术制备用于生产抗体分子的载体。

可以用本领域已知的方法构建含有结合组合物编码序列和适当的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括但不限于体外重组 DNA 技术、合成技术和体内遗传重组。因而，本发明包含可复制载体，其含有有效连接于启动子的、编码本发明抗体（或其片段）、或其重链或轻链、

或重链或轻链的可变结构域或 CDR 的核苷酸序列。这样的载体可以包括如编码抗体分子恒定区的核苷酸序列（见如 WO 86/05807; WO 89/01036; 或美国专利 No. 5,122,464），并且抗体的可变结构域可克隆到这样的载体上以表达整个重链或轻链或其任何一部分。

一般来讲，用常规技术将表达载体转移到宿主细胞中，然后培养转染的细胞产生抗体或其部分。因而，本发明也涵盖含有有效连接于异源启动子的、编码本发明抗体或其重链或轻链，或本发明单链抗体的多核苷酸的宿主细胞。正如这里详述的或在本领域已知的那样，在表达双链抗体的优选实施方案中，编码重链和轻链的载体可以在宿主细胞中共表达，以表达完整的免疫球蛋白分子。

可以利用各种宿主表达载体系统表达本发明的抗体分子。这样的宿主表达系统提供产生并随后纯化任何目的编码序列的工具。但是，当用适当的核苷酸编码序列转化或转染时，宿主表达系统细胞也原位提供本发明的抗体分子。这些细胞包括但不限于用含有抗体编码序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌微生物（如大肠杆菌，枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）），用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母（如酵母（*Saccharomyces*），毕赤酵母（*Pichia*）），用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体（如杆状病毒）感染的昆虫细胞体系，用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体（如花椰菜花叶病毒 CaMV；烟草花叶病毒 TMV）感染或用重组质粒表达载体（如 Ti 质粒）转化的植物细胞体系，或含有来源于哺乳动物细胞基因组的启动子（如金属硫蛋白启动子）或来源于哺乳动物病毒启动子（如腺病毒晚期启动子，牛痘病毒 7.5 k 启动子）的重组表达构建体的哺乳动物细胞体系（如 COS、CHO、BHK、293、3T3 细胞）。

优选使用象大肠杆菌这样的细菌细胞，更优选使用真核细胞表达重组抗体分子。例如，哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢细胞（CHO），与载体如来自人巨细胞病毒的主要即早期基因启动子一起，是抗体的有效表达系统（Foecking 等人（1986）*Gene* 45:101；Cockett 等人（1990）*Bio/Technology* 8:2）。

在细菌体系中，可以依据所表达抗体分子的目的用途有利地选择很多表达载体。例如，当要生产大量蛋白质时，象生产抗体分子的制药组合物，就需要用那些指导融合蛋白质产物高水平表达且容易纯化的载体。这样的载体包括但不局限于大肠杆菌表达载体 pUR278 (Ruther 等人 EMBO J. 2: 1791 (1983))，其中可以将抗体编码序列分别与 lac Z 编码区同读框连接到该载体上，从而产生融合蛋白质)，pIN 载体(Inouye 和 Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3 101-3 109 (1985); Van Heeke 和 Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989))等等。也可以用 pGEX 载体以与谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 形成融合蛋白的方式表达外源多肽。

通常，这样的融合蛋白质是可溶性的，并且容易从裂解的细胞中通过吸附并结合到谷胱甘肽-琼脂糖珠基质上，并随后在游离谷胱甘肽存在下洗脱的方式纯化。设计的 pGEX 载体包括凝血酶或 Xa 因子蛋白酶切割位点，以便将克隆的靶基因产物从 GST 部分解离下来。用来表达外源基因的一种昆虫体系是苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核多角体病毒 (AcNPV) 体系。AcNPV 病毒是草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中生长。抗体编码序列可以分别克隆到病毒的非必需区 (如多角体蛋白基因) 并置于 AcPNV 启动子 (如多角体启动子) 控制之下。

在哺乳动物宿主细胞中，可以利用很多以病毒为基础的表达体系。在腺病毒用作表达载体的情况下，目的抗体编码序列可以连接到腺病毒转录/翻译控制复合物上，如晚期启动子和三重前导序列。然后，通过体内或体外重组，将此嵌合基因插入到腺病毒基因组中。在病毒基因组非必需区 (如 E1 或 E3 区) 的插入所产生的重组病毒能够存活并在侵染的宿主细胞中表达抗体分子 (见如 Logan 和 Shenk, 1984 PNAS 81:355-9)。要有效地翻译插入的抗体编码序列，需要特异性的起始信号。这些信号包括例如 ATG 起始密码子和邻近序列。而且，起始密码子必须与期望的编码序列处于同一阅读框内，从而确保能正确地翻译整个插入物。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是多种来源，包括天然存在的和合成的。

表达效率可以通过纳入适当的转录增强子元件、转录终止子等而得到

提高（见如 Bittner 等人 1987 *Methods in Enzymol.* 153:5 1-4）。另外，选择能调节插入序列表达或以期望的特定方式修饰和加工基因产物的宿主细胞菌株。蛋白质产物的这类修饰（如糖基化）和加工（如切割）对蛋白质的功能非常重要。

不同的宿主细胞对蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰有特征性和特异性的机制。选择适当的细胞系或宿主体系以确保对所表达的外源蛋白质进行正确的修饰和加工。为此，使用拥有正确加工初始转录物、糖基化和磷酸化的细胞机器的真核宿主细胞。这样的哺乳动物宿主细胞包括但不限于 CHO、VERY、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3、W138，特别是乳腺癌细胞系如 BT483、Hs578T、HTB2、BT20 和 T47D 以及正常的乳腺细胞系如 CRL7030 和 Hs578Bst。

本发明包含将抗体重组融合或化学缀合（包括共价接合和非共价缀合）到多肽（或其部分，优选含有多肽的至少 10、20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 个相邻氨基酸）上，以产生融合蛋白质。融合不需要是直接的，而是可以通过接头序列进行。

运用本领域已知的方法，融合或缀合到多肽上的抗体也可以在体外免疫测定中和纯化方法中使用（见如 Harbor 等人 同前，和 WO 9312 1232; EP 439,095; Naramura 等人(1994) *Immunol. Lett.* 39:9 1-9; 美国专利 No. 5,474,981; Gillies, 等人 1992 *PNAS* 89:1428-32; Fell 等人 1991 *J. Immunol.* 146:2446-52）。

本发明还包括组合物，其含有融合或缀合到除可变区外的抗体结构域上的多肽(或其片段)。例如，本发明的多肽(或其片段)可以融合或缀合到抗体恒定区、D 或 J 区、Fc 区或其部分。融合到本发明多肽(或其片段)上的抗体部分可以包括恒定区、铰链区、CH1 结构域、CH2 结构域和/或 CH3 结构域或完整结构域或其部分的任意组合。多肽(或其片段)也可以融合或缀合到这里描述的抗体部分以形成多聚体。例如，融合到本发明多肽(或其片段)上的 Fc 部分可以通过 Fc 部分之间的二硫键形成二聚体。更高的多聚体形式可通过将多肽融合到 IgA 和 IgM 部分上而形成。将本发明多肽(或

其片段)融合或缀合到抗体部分上的方法是已知的(见如美国专利 No. 5,336,603; 5,622,929; 5,359,046; 5,349,053; 5,447,851; 5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; WO 96/04388; WO9106,570; Ashkenazi 等人(1991) PNAS 88: 10535-10539; Zheng 等人 (1995) J. Immunol. 154:5590-5600; 和 Vie 等人 (1992) PNAS 89: 11337- 11341)。

正如在这里讨论的,多肽、多肽片段可以融合或缀合到这里描述的或本领域已知的抗体部分上,以提高其在体内的半衰期。此外,多肽、多肽片段还可以融合或缀合到抗体部分上以促进纯化。一个实例是含有人 CD4 多肽头两个结构域和哺乳动物免疫球蛋白重链或轻链恒定区多种结构域的嵌合蛋白质(见如 EP 394,827; Traunecker 等人 (1988) Nature 331:84-86)。

在很多情况下,融合蛋白质的 Fc 部分在治疗和诊断中很有用处,因而能提高药代动力学特性(见如 EPA232,262)。可任地,在表达、检测并纯化融合蛋白质以后,可有利地将 Fc 部分缺失。例如,如果融合蛋白质用作免疫接种的抗原,Fc 部分可能阻碍治疗和诊断。如在药物研发中,为了高通量筛选测定以鉴定 hIL-5 的拮抗剂,将人蛋白质如 hIL-5 融合到 Fc 部分上(见如 Bennett 等人 (1995) J. Molecular Recognition 8:52-58; Johanson 等人 (1995) J. Biol. Chem. 270:9459-9471)。

而且,结合组合物(或其片段)可以融合到标记物序列上,如多肽上,以促进纯化。在优选的实施方案中,标记物氨基酸序列是六组氨酸肽,如在 pQE 载体(QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA)以及其他可以通过商业获得的载体上提供的标签。六组氨酸为纯化融合蛋白提供便利(Gentz 等人 (1989) PNAS 86:821-824)。可用于纯化的其他肽标签包括例如“HA”标签,其对应于衍生自流感病毒红血球凝集素蛋白的表位(Wilson 等人(1984) Cell 37:767)和“flag”标签。

本发明还包含缀合到诊断剂或治疗剂上的抗体或其片段。例如,抗体可用于诊断性地监测肿瘤的发展和进展,作为临床试验程序的一部分,以确定给定治疗方案的功效。将抗体偶联于可检测物质能促进检测。可检测

物质的例子包括例如多种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射活性材料、使用多种正电子发射断层照相技术的正电子发射金属，以及非放射活性顺磁性金属离子。可检测物质可以直接或用已建立的技术通过中间体（如本领域已知的接头）间接地偶联或缀合于抗体(或其片段)(有关可缀合于抗体用作本发明诊断剂的金属离子，见如美国专利 No. 4,741,900)。合适的酶的例子包括但不局限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱脂酶；合适的辅基复合物包括但不局限于链霉亲和素/生物素以及亲和素/生物素；合适的荧光材料包括但不局限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基氨基荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白；发光材料的例子包括但不局限于鲁米诺；生物发光材料的例子包括但不局限于荧光素酶、萤光素酶和水母发光蛋白；合适的放射活性材料的例子包括 I^{125} 、 I^{131} 、 I^{111} 或 Tc^{99} 。

本发明结合组合物也可以附着在固相支持物上，这在免疫测定或靶抗原纯化中尤为有用。这样的固相支持物包括但不局限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。将治疗部分缀合于抗体的技术是已知的，见如 Amon 等人 “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”，in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld 等人 (编辑), 243-56 页 (Alan R. Liss, Inc.1985); Hellstrom, 等人 “Antibodies For Drug Delivery”，in *Controlled Drug Delivery* (第 2 版), Robinson 等人(编辑), 623-53 页 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”，in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera 等人 (编辑), 475-506 页 (1985); “Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy”，in *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, Baldwin 等人 (编辑), 303-16 页 (Academic Press 1985), 和 Thorpe 等人 “The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates,” *Immunol. Rev.* 62: 119-58 (1982)。

B 免疫测定

可通过多种免疫测定方法测定特定蛋白质如 TGF β 1, 例如包括但不限于竞争和非竞争测定体系,使用的技术包括但不限于 western 印迹、放射性免疫测定、ELISA (酶链免疫吸附试验)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体结合测定、免疫放射计量测定、荧光免疫测定和蛋白质 A 免疫测定。关于免疫学和免疫测定方法的一般综述见 Stites 和 Terr (编辑) (1991) Basic and Clinical Immunology (第 7 版)。而且,本发明的免疫测定能够以多种形式进行,这在下面的文献中被广泛综述: Maggio (编辑) (1980) Enzyme Immunoassay CRC Press, Boca Raton, Florida; Gosling J P 2000 Immunoassays: A Practical Approach (Practical Approach Series) Oxford Univ Press; Diamandis 和 Christopoulos, 1996 Immunoassay Academic Press, San Diego, CA; Tijan (1985) "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays," Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam; Wild, D. (编辑), 2001 The Immunoassay Handbook (第 2 版) Nature Pub Group; James T. Wu, 2000 Quantitative Immunoassay: A Practical Guide for Assay Establishment, Troubleshooting, and Clinical Application, Amer Assn for Clinical Chemistry, Brousseau 和 Beaudet (编辑) Manual of Immunological Methods CRC Press Boca Raton, Florida; 以及 Harlow 和 Lane Antibodies, A Laboratory Manual, 同前。也见 Chan (编辑) (1987) Immunoassay: A Practical Guide Academic Press, Orlando, FL; Price 和 Newman (编辑) (1991) Principles and Practice of Immunoassays Stockton Press, NY; 和 Ngo (编辑) (1988) Non-isotopic Immunoassays Plenum Press, NY。

可用多种本领域已知的方法实施免疫测定。简单地说,测定蛋白质的免疫测定可以是竞争性也可以是非竞争性的结合测定。在竞争性结合测定

中，待分析样品与标记的分析物竞争结合已结合在固体表面的捕获试剂上的特异性结合位点。优选捕获试剂为这里描述的与 TGF β 1 特异性反应的抗体。结合到捕获试剂上的标记分析物的浓度与样品中存在的游离分析物的量成反比。

在竞争结合免疫测定中，存在于样品中的靶蛋白质与标记蛋白质竞争结合特异性结合组合物。例如，象抗体这样的结合组合物能特异性地和/或选择性地与靶蛋白质反应。结合组合物可以结合到固体表面以实现结合的标记蛋白质与非结合标记蛋白质的分离。可选地，竞争结合测定可在液相中进行，并且本领域多种已知的技术可以用来从非结合标记蛋白质中分离结合的标记蛋白质。分离后，对结合的标记蛋白质的量进行测定。存在于样品中的蛋白质的量与标记蛋白质的结合量成反比。

可选地，可进行无需分离步骤的均质免疫测定。在这些免疫测定中，蛋白质上的标记因蛋白质结合到其特异性结合组合物上而发生改变。标记蛋白质上的这种改变能导致标记物发射的信号增加或降低，从而在免疫测定的结束时通过检测标记物，可以检测或定量蛋白质。

当细胞与标记的结合配偶体或对蛋白质具有已知的结合亲和力的抗体（如 ^{125}I -抗体）接触并一起孵育，并对测试样品对结合组合物的结合亲和力进行测定时，竞争测定也非常有用。然后分离结合的和游离的标记结合组合物以评估蛋白质结合的程度。测试化合物的结合量与结合到已知来源的标记结合配偶体的量成反比。可以用众多技术中的任何一种从游离蛋白质中分离结合蛋白质，以评估蛋白质结合的程度。这种分离步骤通常包括诸如粘附到过滤器上、然后洗涤、粘附到塑胶上然后洗涤，或对细胞膜离心这样的操作。活细胞也可以用来筛选药物对 TGF β 蛋白介导功能（如第二信使的水平、如细胞扩增、磷酸肌醇库的变化、使用荧光素酶类测定的转录等等）的影响。一些检测方法可以消除分离步骤，如亲近敏感检测体系。

也可以用多种非竞争性免疫测定法对蛋白质进行定性或定量分析。例如，可使用双位点固相夹心免疫测定。在这种类型的测定中，将蛋白质结

合组合物（如抗体）附着到固相支持物上。对第二蛋白质结合组合物（也可以是抗体，而且在不同的位点结合蛋白质）进行标记。在蛋白质两个位点都发生结合后，将未结合的标记结合组合物除去，对结合到固相上的标记的结合组合物的量进行测定。标记的结合组合物的结合量与样品中蛋白质的量成正比。

前面描述的免疫测定形式采用标记的测定成分。标记可以根据本领域众所周知的方法直接或间接地偶联于期望的测定成分。可以采用多种标记和方法。常规上使用掺入 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P 的放射标记物。非放射标记包括能结合抗体、荧光团、化学发光剂、酶的蛋白质，和可作为标记蛋白质特异性结合对成员的抗体。标记的选择取决于所需的灵敏度、与化合物缀合的难易、稳定性需要以及可用的设备。关于可使用的多种标记或信号产生体系的综述见美国专利 No. 4,391,904。

抗体结合组合物与特定蛋白质的反应也可以用多种免疫测定方法测定。关于通过免疫测定技术对应用于抗体测定的免疫学和免疫测定操作的综述见 Stites 和 Terr (编辑) Basic and Clinical Immunology (第7版) 同前; Maggio (编辑) Enzyme Immunoassay, 同前; 以及 Harlow 和 Lane Using Antibodies, A Laboratory Manual, 同前..

简单地说，检测血清与靶蛋白质反应的免疫测定可以是竞争性或非竞争性的结合测定。在竞争性结合测定中，样品分析物与标记分析物竞争结合已结合在固体表面的捕获试剂的特异性结合位点。捕获试剂优选纯化的重组蛋白质。也可以使用其他来源的蛋白质，包括分离或部分纯化的天然存在的蛋白质。非竞争性测定包括夹心测定，其中，样品分析物结合在两个分析物特异性结合试剂之间。结合组合物之一用作捕获试剂而结合到固体表面。第二结合组合物被标记并用来通过可视方式或通过设备测量或检测形成的复合物。可使用捕获试剂与标记的结合组合物的多种组合。很多种类类似于前面描述不同的免疫测定形式、分离技术和标记可用来测定蛋白质。

例如，用 Western 印迹分析可以评估目的抗体免疫沉淀特定抗原的能

力。本领域熟练技术人员对于改变参数以增加抗体对抗原的结合而降低背景应当有渊博的知识，如用琼脂糖珠对细胞裂解物进行预清洗。关于免疫沉淀方案的讨论还可以见 Ausubel 等人编辑，1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, 卷 1, John Wiley & Sons, Inc., New York。

ELISA 试验包括制备抗原、用抗原包被 96 孔的微量滴定板、将缀合于可检测化合物例如酶底物（辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）的目的抗体加到孔内并孵育一段时间，并检测抗原的存在。在 ELISA 中，目的抗体不是必需缀合于可检测化合物；相反，可将缀合有可检测化合物的第二抗体（它能识别目的抗体）加到孔内。此外，也可以用抗体而不是抗原包被微孔。在这种情况下，缀合有可检测化合物的第二抗体可以在将目的抗原加到包被微孔内后再加入。普通技术人员无需过度实验即可确定调整哪些参数以提高信号，以及使用 ELISA 的哪些其他变通形式（见如 Ausubel 等人编辑，1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, 卷 1, John Wiley & Sons, Inc., New York）。

抗体对抗原的结合亲和力以及抗体-抗原相互作用的结合和解离速率可用例如竞争结合测定予以确定。一个非限制性的例子为放射性免疫测定，包括在逐渐增加非标记抗原的情况下将标记的抗原（如 ^3H 或 ^{125}I ）与目的抗体孵育，然后检测结合到标记抗原上的抗体的量。目的抗体对特定抗原的亲和力以及结合解离速率可以用 Scatchard 作图分析得到的数据进行确定。与第二抗体的竞争也可用例如放射性免疫测定予以确定。在这种情况下，抗原与缀合有标记化合物（ ^3H 或 ^{125}I ）的目的抗体在逐渐增加非标记第二抗体的量的情况下孵育。

物理变体

本发明也包含氨基酸序列与这里描述的氨基酸序列基本上相似和/或相同的多肽序列。氨基酸序列相似性或序列同一性可通过最佳化残基匹配的方式测定。当考虑为了配对而进行保守取代时，这种情况就改变了。保守取代通常包括在下面的组中进行取代：甘氨酸、丙氨酸；缬氨酸、异亮

氨酸、亮氨酸；天冬氨酸、谷氨酸；天冬酰胺、谷酰胺；丝氨酸、苏氨酸；赖氨酸、精氨酸和苯丙氨酸、酪氨酸。也见 Needleham 等人 (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; Sankoff 等人 (1983) Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison 第一章, Addison-Wesley, Reading, MA; 以及来自 IntelliGenetics, Mountain View, CA; 和 the University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WI. 的软件包。

本发明包含但不局限于与本申请特定序列标识符所编码的多肽在功能上相关的多肽序列。功能相关的多肽包括与结合组合物共有的功能性特征（如选择性地和/或特异性地结合 TGF β 1 而不结合 TGF β 2 和/或 3 的能力）的任何多肽。这类功能相关的多肽包括但不局限于在这里描述的序列编码的氨基酸序列内添加或取代氨基酸残基，特别是导致沉默变化的氨基酸添加或取代，因而产生功能等同的多肽。氨基酸取代可以基于相关残基在极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性方面的相似性。

例如，非极性（疏水）氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸；极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷酰胺；带正电荷的（碱性）氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸；而带负电荷的（酸性）氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。

而且，非经典氨基酸或化学氨基酸类似物可以被取代或添加到多肽序列中。非经典氨基酸通常包括但不局限于例如普通氨基酸的 D-异构体；2,4-二氨基丁酸、氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、g-Abu、e-Ahx、6-氨基己酸、Aid、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、同型瓜氨酸、胱氨酸 (cystic acid)、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基甘氨酸、b-丙氨酸、氟氨基酸、设计的氨基酸，如 b-甲基氨基酸、Ca-甲基氨基酸、Na-甲基氨基酸以及一般的氨基酸类似物。而且，氨基酸可以是右旋性的(D)或左旋性的(L)。

为便于操作增加肽部分是本领域熟知和常规的技术。而且，结合组合物（包括其任何片段，尤其是表位）可以与免疫球蛋白[如 IgA、IgE、IgG、IgM 的恒定结构域部分，或其部分（CH1、CH2、CH3）以及包括完整结构域和其部分的任意组合]组合，从而产生嵌合多肽。这样的融合蛋白质能促进纯化，并通常用来增加蛋白质在体内的半衰期。例如，这已由包含人 CD4 多肽头两个结构域和哺乳动物免疫球蛋白重链或轻链的恒定区多种结构域的嵌合蛋白质得到证明（EP 394,827; Traunecker 等人 1988 Nature 331:84-6）。以二硫键连接的二聚体结构（归因于 IgG 结构域）的融合蛋白质在结合及中和其他分子方面也比单体分泌蛋白质或单独的蛋白质片段更有效（Fountoulakis 等人 1995 J. Biochem. 15 270:3958-64）。已经证明，将抗原（如胰岛素）缀合于 Fc γ R 结合配偶体如 IgG 或 Fc 片段，能促进抗原穿过上皮屏障递送到免疫系统（见如 WO 96/22024 和 WO 99/104813）。

另外，融合蛋白质可包含免疫球蛋白分子恒定区的多个部分以及人蛋白质或其部分。在很多情况下，融合蛋白质中的 Fc 部分在治疗和诊断中很有益处，因而，可以例如提高药代动力学特性。可选地，在表达、检测和纯化融合蛋白质后，可能期望将 Fc 部分缺失。例如，如果融合蛋白质被用来作为免疫原进行免疫接种，Fc 部分会阻碍治疗和/或诊断。例如在药物研发中，将人蛋白质与 Fc 部分融合以通过高通量筛选测定来鉴定拮抗剂。

而且，可组合其他蛋白质类似的功能结构域以形成新的构建体。例如，蛋白质结合或其他区段可以在不同的新融合多肽或片段之间“交换”。因而，展现出新组合特异性的新嵌合多肽将由蛋白质结合特异性与其他功能结构域功能性连接而成。另外，融合构建体可以通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组技术产生。

“基本纯的”指核酸、蛋白质或多肽从其天然环境中分离并与其他杂质蛋白质、核酸和其他生物制剂分离和/或分开。纯度或“分离”可以用标准方法检测，通常至少约 50% 纯，更通常至少约 60% 纯，通常至少约 80% 纯，常至少约 85% 纯，更通常至少约 90% 纯，优选至少约 95% 纯，更优

选至少约 98% 纯，以及在最优选的实施方案中至少 99% 纯。同样的概念适用于结合组合物，如本发明的抗体。例如，可能期望从重组细胞蛋白质或多肽中纯化多肽。

蛋白质或多肽的“溶解性”可用以 Svedberg 单位度量的沉降来反应，所述 Svedberg 单位度量特定条件下的分子沉降速率。过去经典地用分析超速离心实施对沉降速率的测定，但现在通常用标准超速离心机实施（见 Freifelder 1982 Physical Biochemistry (第 2 版) W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA; 以及 Cantor 和 Schimmel (1980) Biophysical Chemistry 第 1-3 部分, W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA)。在粗略测定时，含有推测的可溶性多肽的样品在标准的完整大小超速离心机中以约 50K rpm 旋转约 10 分钟，可溶性分子将保留在上清中。可溶性颗粒或多肽通常小于约 30S，更通常小于约 15S，通常小于 10S，且更通常小于 6S，在特定实施方案中优选小于约 4S，以及更优选小于约 3S。多肽或片段的溶解性取决于环境和多肽。很多参数影响多肽的溶解性，包括温度、电解液环境、多肽的大小和分子特征以及溶剂的性质。通常，多肽使用的温度范围为约 4℃ 到约 65℃。通常使用的温度高于约 18℃，且更通常高于约 22℃。对于诊断目的，温度通常约为室温或更暖和一些，但低于测定成分的变性温度。尽管在某些条件下，在原位或体外，温度可以调高或调低，但对于治疗目的而言，温度通常是体温，对人而言通常约为 37℃。多肽的大小和结构一般处于基本上稳定状态，通常不是变性状态。多肽可以与其他有四级结构的多肽缔合以赋予溶解性，或以接近天然磷脂双层相互作用的方式与磷脂或去污剂缔合。

溶剂通常是一类用来保存生物活的生物学兼容缓冲液，通常接近生理溶剂。溶剂通常呈中性 pH，通常为大约 5 至 10，优选约 7.5。在一些情况中，添加去污剂，通常是温和的非变性去污剂，如 CHS（胆固醇半琥珀酸酯）或 CHAPS（3-[3-胆酰胺丙基]-二甲氨基）-1-丙磺酸内盐）；或浓度足够低，以避免显著地破坏蛋白质的结构或生理特性。在优选实施方案中，本发明结合组合物的溶解度（pH 5.0-6.0 和 150 mM NaCl）高于 10、15、

20、25、30、35 或 40 mg/ml, 在更优选的实施方案中, 高于 41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50 mg/ml, 又在更优选的实施方案中, 高于 51、52、53、54、55、56、57、58、59 或 60 mg/ml, 在甚至更优选的实施方案中要高于 65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140 或 150 mg/ml (或在任何两个这样的数值之间的范围, 这个范围可以包括或不包括任何一个或两个边界点)。

变体

本发明涉及包含或由与本发明多肽序列 (或其片段) 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 同一性的氨基酸序列组成的多肽。可以用本领域已知的方法确定特定序列与结合组合物序列是否呈现出同一性。

在这样的序列对比中, 一条序列通常作为参照序列, 用测试序列与其比较。当使用序列比较算法时, 将测试和参照序列输入计算机中, 如有必要, 随后指定坐标, 并指定序列算法程序的参数。然后, 序列比较算法依据指定程序的参数计算测试序列相对于参照序列的序列同一性百分比。

用于比较的序列最佳比对可以用 Smith 和 Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482 的局部同源算法、Needlman 和 Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443 的同源比对算法、Pearson 和 Lipman (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444 的相似性查找方法、这些算法的计算机执行 (Wisconsin 遗传软件包中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)、由 DNASTAR 公司 (Madison, Wisconsin) 出产的 LASERGENE 生物信息学计算包、由 Notredame 等人发展的序列比对方法 (如 3Dcoffee 或 Tcoffee in, e.g., Nucleic Acids Res. 2004:32 (Web Server issue):W37-40; Nucleic Acids Res. 2003 年 7 月 1 日; 31(13):3503-6; 或 Pharmacogenomics. 2002 年 1 月; 3(1):131-4) 或通过视觉检查 (通常见 Ausubel 等人 同前)。通过确定最佳比对比较核苷酸或氨基酸序列的其他方法是已知的 (见如 Peruski 和 Peruski, The

Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997); Wu 等人(编辑), "**Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins**," in **Methods in Gene Biotechnology**, 123-151 页 (CRC Press, Inc. 1997); 或 Bishop (编辑), **Guide to Human Genome Computing**, 第 2 版 (Academic Press, Inc. 1998))。

与其他氨基酸序列呈现出或具有至少大约 95% 的序列同一性的多肽可以包括每 100 个氨基酸长度的测试氨基酸链中高达 5 个氨基酸的改变。换句话说, 与第二条氨基酸序列同一性至少为 95% 的第一条氨基酸序列可以因为氨基酸残基的插入、缺失或取代而与第二条序列有高达氨基酸残基总数 5% 的差异。多肽氨基酸残基的改变可以出现在氨基或羧基端的位置或这两个末端位置之间的任何地方, 或分别散布在序列的残基中, 或分别散布在序列内一个或多个相邻氨基酸残基氨基酸区间、部分或片段中。事实上, 可以用本领域已知的方法确定任何特定多肽序列与其他序列例如文中表 1 所示的序列是否呈现出至少大约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的相似性。

本发明包含的变体可以含有编码区、非编码区或两者改变。而且, 也优选以任何组合取代、缺失或的添加 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸的变体。非天然存在的变体可通过诱变技术产生, 或通过蛋白质工程或重组 DNA 技术的已知的方法直接合成。产生这样的变体能提高或改变结合组合物多肽(或其片段)的特征。例如, 可在本发明分泌多肽(或其片段)的 N 端或 C 端缺失一个或多个氨基酸, 而其生物学功能并不实质性地丧失。例如, Ron 等人 (1993 J. Biol. Chem. 268:2984-8) 报道在甚至缺失 3、8 或 27 个氨基端的氨基酸残基后, 变体 KGF 蛋白质依然具有发夹结合活性。例如, 当从分泌形式的 N 端或 C 端除去少部分残基时, 可保留抗原性和/或免疫原性(如缺失变体诱导和/或结合识别成熟形式多肽的抗体的能力)。缺少了蛋白质 N-或 C-端残基的多肽是否保留这样的活性, 可以容易地用这里描述或本领域已知的常规方法测定。因而, 本发明也包含

表现出如免疫原性或抗原性这样的生物学活性的多肽变体。这样的变体包括用本领域已知的一般规则选择的对其活性影响很小的缺失、插入、倒换、重复和取代。例如由 Bowie 等人 (1990) *Science* 247: 1306-1310 提供的关于制备表型沉默的氨基酸取代的教导。

除了使用保守氨基酸取代, 本发明的其他变体包括但不限于(i)用一个或多个非保守氨基酸残基取代, 其中, 取代的氨基酸残基可以是或不是由遗传密码编码的氨基酸残基; 或(ii)用一个或多个具有取代基团的氨基酸残基取代; 或(iii)将成熟多肽与其他化合物融合, 如能提高多肽稳定性和/或溶解性的化合物(如聚乙二醇); 或(iv)将多肽与额外的氨基酸(如 IgG Fc 融合区肽、或前导或分泌序列、或促进纯化的序列)融合。在给定本申请教导例如详细说明独特多核苷酸和多肽序列的情况下, 所有这样的变体都在分子生物学领域技术人员的能力范围内。

例如, 其中以其他荷电或中性氨基酸取代荷电氨基酸的多肽变体可以产生具有改良特征(如聚集减少)的多肽。由于聚集物的免疫原性, 药物制剂的聚集既降低活性又提高清除(Pinckard 等人(1967) *Clin. Exp. Immunol.* 2:331-340; Robbins 等人(1987) *Diabetes* 36:838-845; Cleland 等人(1993) *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems* 10:307-377)。在优选的实施方案中, 本发明的结合组合物在适宜 pH/缓冲体系(这里描述的或本领域已知的)中配制, 其在大约 1-10°C, 更优选在 2-8°C, 甚至更优选在 3-7°C 以及更优选在 5-6°C 的温度范围条件下孵育至少 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 个月后不呈现显著的聚集。

本发明的另一实施方案还涵盖包含本发明氨基酸序列的组合物, 所述氨基酸序列含有至少 1 个氨基酸取代, 但不超过 50 个氨基酸取代, 甚至更优选不超过 40 个氨基酸取代, 还更优选不超过 30 个氨基酸取代, 甚至还优选不超过 20 个氨基酸取代, 或不超过 15 个氨基酸取代。当然, 以递增的优选次序, 非常优选包含本发明氨基酸序列的肽或多肽, 所述氨基酸序列含有至少一个但不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸取代。在特定的实施方案中, 在本发明多肽序列或其片段中添加、取代和/或缺失

的数目至少为 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、10-50 或 50-150，其中保守氨基酸的取代比非保守氨基酸的取代更优选。

治疗用途

本发明也提供具有有益治疗价值的试剂。本发明的治疗性结合组合物包括但不局限于本发明的抗体结合组合物（包括这里描述的其片段、类似物和衍生物）和编码他们（包括这里描述的其片段、类似物和衍生物及抗独特型抗体）的核酸分子。这样的抗体可以用来调节、治疗、抑制、改善或预防 TGF β 1（或其片段）异常表达和/或活性相关疾病、紊乱或病况，包括但不局限于这里描述的任何一个或多个疾病、紊乱、综合症或病况。TGF β 1 异常表达和/或活性相关疾病、紊乱或病况的治疗、改善和/或预防包括但不局限于改善与这些疾病、紊乱或病况相关的症状。

例如，与 TGF β 1 异常表达或异常信号传导相关的疾病或紊乱是 TGF β 1 拮抗剂如本发明结合组合物的靶标。本发明包含以结合组合物为基础的治疗，它包括对动物，优选是哺乳动物，更优选是灵长类动物（如人）施用结合组合物，以调节、治疗、抑制、影响或改善一种或多种这里描述披露的疾病、紊乱或病况。例如，尽管不受理论的限制，已经表明特异于人 TGF β 的抗体在治疗过表达 TGF β 受体（TGFR）疾病的动物模型中很有效。已经证明 TGF β 的抗血清在治疗肾小球肾炎(Border 等人 1990 Nature 346:371-4)、肺纤维化(Gir 等人 1993 Thorax 48:959-66) 方面很有效。因而，本发明特征改良的新结合组合物将在改善病况、状态或疾病如 TGF β 1 相关的纤维化疾病和病况方面有效。

本发明重组的和/或分离的结合组合物如抗体，可以纯化并施用于受试者进行治疗。这些试剂可与其他活性或惰性成分（如常规的可药用载体或稀释剂如免疫佐剂）以及生理上无害的稳定剂和赋形剂组合使用。这些组合产品可以经过滤除菌、配制为剂量形式，如冻干并放在剂量瓶中或在稳定的水性制品中保存。本发明也考虑使用抗体或其结合片段，包括不是补

体结合的形式。

包含在本发明中另一治疗手段包括将试剂、制剂或组合物用任何常规的施用技术（如但不限于局部注射、吸入或系统施用）对受试者直接施用。本发明也提供药物包装或试剂盒（即药包或药盒），其中含有一个或多个填装本发明组合物一种或多种成分的容器以及说明书，如处理说明书（通常以管理药物或生物产品生产、使用或销售的政府机构所规定的形式）。施用方法包括静脉内、腹膜内或肌肉内施用，透皮扩散等等。可药用载体包括水、盐、缓冲液及 Merck Index, Merck & Co., Rahway, NJ 描述的其他化合物。

这里包含的其他异常发育条件在以 Northern 印迹分析显示拥有 TGF β 1 mRNA 的细胞类型中是已知的（见如 Berkow (编辑) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck & Co., Rahway, N.J.; Thorn 等人 Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, N.Y.; 和 Rich (编辑) Clinical Immunology; Principles and Practice, Mosby, St. Louis (新版)以及下文）。发育或功能性异常（如神经、免疫或造血系统的异常）造成显著的医学异常和病况，可利用这里提供的组合物对之进行预防或治疗。

本发明中包含的另一治疗手段包括将试剂、制剂或组合物用常规的施用技术（如但不限于局部注射、吸入或系统施用）直接施用于受试者。所包含的试剂、制剂或组合物可以用这里描述的或本领域已知的任何方法寻靶。调节疾病、紊乱、病况、综合症等的试剂、制剂或组合物的实际剂量取决于很多因素，包括生物体的大小和健康，但是本领域普通技术人员能用下面教导描述的方法和技术决定临床剂量（见如 Spilker (1984) Guide to Clinical Studies and Developing Protocols, Raven Press Books, Ltd., New York, 7-13、54-60 页；Spilker (1991) Guide to Clinical Trials, Raven Press, Ltd., New York, 93-101 页；Craig 和 Stitzel (编辑 1986) Modern Pharmacology, 第 2 版, Little, Brown and Co., Boston, 127-33 页；Speight (编辑 1987) Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical

Pharmacology and Therapeutics, 第3版, Williams & Wilkins, Baltimore, 50-56 页; Tallarida 等人 (1988) **Principles in General Pharmacology**, Springer-Verlag, New York, 18-20 页; 和 美国专利 No. 4,657,760; 5,206,344 或 5,225,212)。通常, 在任何可药用载体中每天对成年人施用包括端值在内的大约 0.5 fg/ml 至 500 ug/ml 的最终浓度。而且, 动物试验为人类治疗有效剂量的确定提供了可信的指导。有效剂量的种间缩放比例依据本领域已知的原则实施 (如见 Mordenti 和 Chappell (1989) "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," in **Toxicokinetics and New Drug Development**; Yacobi 等人(编辑) Pergamon Press, NY)。

有效剂量也可以用来自体外或动物模型试验体系的剂量反应曲线外推得出。例如, 对于抗体, 剂量通常为受体体重的 0.1 mg/kg 到 100 mg/kg。剂量优选为受体体重的 0.1 mg/kg 至 20 mg/kg, 更优选为受体体重的 1 mg/kg 至 10 mg/kg。通常, 同源特异性抗体比异源特异性抗体的半衰期长 (如人抗体比来源于其他物种 (如小鼠) 的抗体在人宿主中持续时间长, 可能是由于宿主对外源组合物的免疫反应)。因而, 如果对人受试者施用抗体, 采用更低剂量的人抗体和更低的施用频率通常是可能的。而且, 通过修饰 (如脂质化), 以提高摄取和组织渗透 (如在大脑中), 可减少本发明抗体的施用剂量和频率。

本发明也提供药物包装或试剂盒, 其含有一种或多种填充本发明组合物一个或多个成分的容器以及说明书, 如关于处理的说明书 (通常, 以管理药物或生物产品的生产、使用或销售的政府机构所指导的方式)。

有效治疗需要的试剂量取决于很多因素, 包括施用方式、靶位点、患者的生理状态和施用的其他药物。因而, 应当滴定治疗剂量以最优化安全性和功效。通常这些试剂在体外使用的剂量可以为原位施用量提供有用的指导。为治疗特定紊乱而进行的有效剂量的动物试验还可以为人用剂量提供预测性的指导。在如 Gilman 等人(编辑) (1990) **Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics** (第8版) Pergamon Press; 和 (1990) **Remington's Pharmaceutical Sciences** (第17版) Mack Publishing

Co., Easton, PA 中描述着各种需要考虑的事项。其中和下文讨论了施用方法, 如用于口服、静脉内、腹膜内或肌肉内施用, 透皮扩散等等。可药用载体包括水、盐、缓冲液以及例如 Merck Index, Merck & Co., Rahway, NJ 中描述的其他化合物。具备合适载体的情况下, 平常预期的剂量范围是小于 1 mM 浓度。通常小于 10 μ M 浓度, 常常小于 100 nM 浓度, 优选小于 10 pM 浓度 (皮摩尔), 最优选小于 1 fM 浓度 (飞摩尔)。通常使用缓释制剂或缓释容器以进行连续施用。

可以对待治疗宿主直接施用结合组合物, 或取决于化合物的大小, 可能期望在施用前将它们缀合于载体蛋白质如卵白蛋白或血清白蛋白。治疗制剂可以以任何常规剂型施用。尽管单独施用活性成分是可能的, 但是优选作为药物制剂呈现。制剂通常包括至少一种这里定义的活性成分和一种或多种其可接受的载体。每一载体在与其他成分相容并对患者无害的意义上应当是药物和生理都可接受的。制剂包括适于口服、直肠、鼻或肠胃外 (包括皮下、肌肉内和皮内) 施用的那些制剂。制剂可以方便地以单位剂量的形式呈现, 并且可以用制药领域众所周知的任何方法制备。见如 Gilman 等人 (编辑) (1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics (第 8 版) Pergamon Press; 和 (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences (第 17 版) Mack Publishing Co., Easton, PA; Avis 等人 (编辑) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, NY; Lieberman, 等人 (编辑) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, NY; 和 Lieberman 等人 (编辑) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, NY. 本发明的治疗可以与其他治疗剂 (如 ACE 抑制剂) 组合或联合使用。

本发明也提供药物组合物。这样的组合物包括如在可药用载体中的治疗有效量的本发明组合物。正如在这里使用的, 术语“可药用载体”意味着有美国联邦管理机构或美国州政府的调控/管理机构批准的载体, 或由美国药典或其他药典中罗列的载体, 本领域技术人员一般认可其在动物如哺乳动物尤其是在灵长类动物如人属灵长类中的使用。

这里使用的术语“载体”是指与本发明的组合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。药物载体通常是无菌的液体，如水或油（包括石油、动物、植物或合成来源的油，如花生油、豆油、矿物油、芝麻油等等）。通常，当药物组合物通过静脉内施用时，优选无菌水作为载体。也可以用盐溶液和水性葡萄糖和甘油溶液作为液体载体，特别是用于注射液。

合适的药物赋形剂包括例如但不限于淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等等。如果需要，本发明的组合物也可以含有小量的润湿剂或乳化剂或 pH 缓冲剂。

本发明的组合物可以是溶液、混悬液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、持续释放制剂等，或者可配制成栓剂（用传统的粘合剂和/或载体，如甘油三酯）。合适药物载体的其他例子在 E.W. Martin 新版 Remington's Pharmaceutical Sciences 中描述。这样制剂含有治疗有效量的本发明组合物，优选为纯化形式，以及适量载体以提供对受试者的正确施用。传统上，制剂将适合施用方式。

在优选的实施方案中，组合物依据常规方法配制成为适合对人静脉内施用的药物组合物。通常，静脉内施用的组合物是无菌的等压缓冲溶液。需要的时候，组合物也包括增溶剂和局部麻醉剂如利多卡因，以促进注射部位的舒适性。成分一般分开提供或混合成单位剂量形式，如以冻干粉或无水浓缩物放在密封容器中（如标有活性剂数量的安瓿或小袋）。当组合物通过输注施用时，可以用含有无菌药物级的水或盐的输注瓶进行分配。当通过注射施用时，可提供安瓿中的注射用无菌水或盐以便在施用前混合各种成分。

本发明的组合物可以中性的或盐的形式配制。可药用盐包括但不限于阴离子盐（如从盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等衍生而来的盐）和阳离子盐（如从钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基乙醇胺、组氨酸、普鲁卡因等衍生而来的盐）。

纤维化疾病、紊乱或病况

结合组合物如抗体，可用于纤维化疾病相关病况的治疗。胞外基质组分的积累或胞外基质组分对多种细胞、组织和器官中正常细胞原料的替换可导致引起疾病的纤维化。累积性的纤维化是致命的，可导致很多器官如肾脏的最终衰竭。临床前和临床数据都表明，TGF β 1 是间质纤维化中基质蛋白质沉积的主要促成者，而且参与很多相关纤维化疾病状态（包括在各种形式的慢性肾脏疾病（CRD）中很常见的肾脏纤维化）的起始和发展。肾脏纤维化的程度与慢性肾衰竭（CRF，也称作晚期肾病（ESRFD））的发展成正相关，它可以导致长期透析或肾移植或死亡。TGF β 1 是在实验方面最相关，且在人和动物研究与这类纤维化进程关联的细胞因子。

TGF β 1 对胞外基质的深刻影响（包括刺激胞外基质组分合成以及抑制其降解的作用）已经是很多综述的主题（见如 Rocco & Ziyadeh 1991 in *Contemporary Issues in Nephrology* v.23, "Hormones, autocoids and the kidney" 编辑 Jay Stein, Churchill Livingston, New York 391-410 页；Roberts 等人 1988 *Rec. Prog. Hormone Res.* 44:157-97）。TGF β 1 能以多种协同方式诱导胞外基质的积聚，例如，TGF β 1 刺激主要胞外基质组分（包括 I 型胶原、IV 型胶原、纤连蛋白和层粘连蛋白）mRNA 的表达和蛋白质的产生(Sharma 和 Ziyadeh 1997 *Semin Nephrol* 17:80-92)。同时，TGF β 1 通过抑制消化基质的蛋白酶（如血浆酶原激活因子、胶原酶、弹性蛋白酶和基质溶素）产生并通过激活这些蛋白酶的抑制因子（如金属蛋白酶和血浆酶原激活因子的抑制因子 1）而阻止胞外基质的降解（Sharma 和 Ziyadeh 1995 *Kidney Int* 51:S34-6）。TGF β 1 也能上调整合蛋白和 ECM 的细胞表面受体，从而增强细胞与特异性 ECM 蛋白质结合的能力（Heino 等人 1989 *J Biol Chem* 264:380-8）。另外，TGF β 1 也具有趋化特性，吸引 ECM 细胞如成纤维细胞和噬菌细胞（Reibman 等人 1991 *PNAS* 88:6805-9）。而且，TGF β 1 具有特殊的能力诱导其自身表达，从而潜在地扩大异常纤维化的进程（Kim 等人 1990 *Mol Cell Biol* 10:1492-7）。

TGF β 1 牵涉到如下疾病、综合症和/或病况：

●肾病——如慢性肾病(CRD)、慢性肾衰竭(CRF)、晚期肾病(ESRD)、肾小球肾炎(GN)(包括系膜增生GN、毛细血管系膜GN、膜质GN、病灶节GN、免疫GN和新月形GN)、肾小球硬化症、肾硬化、膜质肾病、免疫球蛋白A(IgA)肾病、肾间质纤维化、病灶节肾小球硬化症、接受环孢素的移植患者的肾纤维化、慢性肾移植排斥、HIV相关的肾病、肾细胞超敏反应、伴随慢性肾病的肾小管间质纤维化,包括起源于尿道阻塞或止痛剂相关的肾病或一段急性肾衰竭之后继发(如来源于肾局部缺血的急性肾衰竭)(Spurgeon 等人 *Am. J Physiol Renal Physiol* 288:F568-F577, 2005);与如肾小球内皮细胞损伤或其他微脉管内皮细胞损伤相关的肾血栓性微血管病,如与惊厥前、内毒血症、辐射接触相关的肾血栓性微血管病;肾血管炎、病灶坏死肾小球肾炎、糖尿病性肾病[TGF β 1 通过影响大多数肾脏细胞的复杂多样的事件而与CRF相关(Bottinger, 2002, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2600)。这些事件最终导致管间质纤维化和肾小球硬化症,导致肾单位功能的丧失,并最终导致慢性肾衰竭。在TGF β 的三种同工型中,TGF β 1在介导慢性肾病的发展中处于主导地位,不但因为TGF β 1是最优势表达的同工型,而且因为TGF β 2和TGF β 3通过上调TGF β 1的表达而介导其效应(Yu, 2003 *Kid. Int.* 64:844)。体内和体外的研究都暗示TGF β 1在包括与I型和II型糖尿病相关的并发症(如肾小球硬化症和肾小管间质纤维化)在内的糖尿病性肾病致病机理中的作用(Ziyadeh 1998 *Cur. Pract. Med.* 1:87-9)。TGF β 的抗血清有效治疗肾小球硬化症(Border 等人 1990 *Nature* 346:371-4)];纤维化肾病[TGF β 1介导肾细胞肥大,通过诱导细胞周期蛋白依赖性激酶的抑制因子如p27Kip1和p21Cip2干扰细胞周期正常调控而引起的糖尿病性肾病的另一个特征(Wolf 和 Ziyadeh 1999 *Kidney Int* 56:393-405)。这些抑制因子也因高糖和糖尿病状态而增加(Wolf 等 2001 *Am J Pathol*;158:1091-1100; Wolf 等人 1999 *Diabetologia* 42:1425-32; Wolf 等人 1997 *Am J Physiol* 273:F348-56)。它们抑制细胞周期蛋白依赖性激酶的活性,主要是细胞周期蛋白依赖性激酶2/细胞周期蛋白E激酶(Liu 和 Preisig 1999 *Am J Physiol* 277:F186-94),因而抑制眼癌蛋白质的磷酸化

并将细胞阻抑在 G1 晚期。细胞进入有蛋白质合成而无 DNA 复制的阶段, 并经历细胞肥大。因而, TGF β 1 在细胞水平上引起了转化为糖尿病性肾病的病理生理特征的改变]; 实验糖尿病性肾病; 超敏肾硬化[由于肾小球的结构和过滤特性很大程度上是由血管系膜和肾小球膜的胞外基质组合物决定的, TGF β 1 对肾脏有深刻的影响就不足为奇了。TGF β 1 介导糖尿病性肾病的病理变化 (Ziyadeh 1998 *Cur Prac Med* 1:87-89)。在增生性肾小球肾炎 (Border 等人 1990 *Kidney Int.* 37:689-695) 和糖尿病性肾病 (Mauer 等人(1984) *J. Clin. Invest.* 74:1143-1155) 中系膜基质的积聚是这些疾病清楚且主要的病理特征。在人糖尿病性肾小球硬化症 (晚期肾病) 中 TGF β 1 的水平提高 (Yamamoto 等人 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1814-1818)。在很多动物模型中已经发现 TGF β 1 是肾纤维化发生的重要介质 (Phan 等人 1990 *Kidney Int.* 37:426; Okuda 等人 1990 *J. Clin. Invest.* 86:453)。已经用 TGF β 的抗血清 (Border 等人 1990 *Nature* 346:371) 和胞外基质蛋白质即结合 TGF β 1 的核心蛋白聚糖(decorin) (Border 等人 1992 *Nature* 360:361-363; 也见如 Border 和 Noble 1994 *N. Engl. J. Med.* 331:1286-92; Border 等人 1989 *Semin. Nephrol.* 9:307-17; Han 等人 2000 *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F628-34; 和 Ziyadeh, 等人 2000 *PNAS* 97:8015-20), 在大鼠中证明了对实验诱导的肾小球肾炎的抑制]。因此, 本发明的结合组合物可用于治疗、改善、调节、诊断和/或抑制上述疾病、紊乱、综合症和/或病况。

●肝病——如肝硬化、肝脏纤维化[肝脏纤维化是对肝细胞坏死或损伤的常见反应, 可由广泛的多种试剂诱发, 如任何破坏肝动态平衡的过程 (特别是炎症、毒素伤害或改变的肝脏血流) 和肝脏感染 (病毒、细菌、真菌和寄生虫)。众多由先天性代谢错误引起的储存紊乱通常与纤维化有关, 包括脂质异常 (Gaucher 疾病)、糖原储存疾病 (特别是 III、IV、VI、IX 和 X 型)、1-抗胰胰岛素缺陷、外源物质的储存, 如在铁超负荷综合症 (血色沉着病) 和铜储存疾病 (Wilson 疾病) 中见到的; 有毒代谢物的积聚 (如在酪氨酸血症、果糖血症和半乳糖血症) 和过氧化物酶体紊乱 (Zellweger

综合症)。很多化学药品和药物能引起纤维化,特别是乙醇、甲氨蝶呤、异烟肼、酚丁、甲基多巴、氯丙嗪、甲苯磺丁脲和乙胺碘呋酮。肝脏循环紊乱(如慢性心衰、Budd-Chiari 综合症、静脉闭塞病、门静脉血栓症)和胆汁流动慢性阻塞能导致纤维化。最后,先天性肝脏纤维化是常染色体隐形畸形。

全世界大多数人具有慢性病毒性肝炎或与乙醇或肥胖有关的脂肪肝炎,但其他诱导纤维化的伤害包括如寄生虫病(如血吸虫病)、肝细胞或胆上皮细胞的自身免疫攻击、新生儿肝脏疾病、代谢紊乱包括 Wilson 血色沉着病和各种储存病、慢性炎症病况(如肉状瘤病)、药物毒性(如甲氨蝶呤或维生素 A 过多症)和先天性的或后天性的血管错乱。

肝星形细胞(HSC)是肝脏纤维化中 ECM 的重要细胞来源(Li 和 Friedman 1999 *J. Gastroenterol. Hepatol.* 14:618-33)。HSC 位于迪赛的窦周间隙中,它将肝细胞与窦样内皮分开。就如描述的一样,肝脏伤害通常激活静止的 HSC,从而导致他们随后的增殖和活化。活化的 HSC 随后经历表型转分化为有收缩性的肌成纤维细胞(MFB),肌成纤维细胞表达平滑肌的肌动蛋白和过量的在肝脏纤维化中看见的 ECM 分子。HSC 转分化为 MFB 是由于肝脏纤维化对压力和伤害反应的主要调节因子 TGF β 1 的过表达(Gressner 等人 2002 *Front Biosci.* 7:d793-807)。TGF β 1 是在肝纤维化的效应细胞中已知的最强大的纤维发生诱导因子(Schuppan 等人 2003 *Cell Death Differ.* 10 Supl 1:S59-67)。因而,在肝纤维化的组织和血清中活性 TGF β 1 的水平升高,并且已经显示 TGF β 1 在转基因鼠中的过表达和外源 TGF β 1 的应用能诱导器官的纤维化(Kanzler 等人 1999 *Am. J. Physiol.* 276:G1059-68; Sanderson 等人 1995 *PNAS* 2572-76)。此外,实验性的纤维化可通过抗 TGF β 1 治疗来抑制,如用中和性抗体或可溶性 TGF 受体(George 等人 1999 *PNAS* 12719-24; Qi 等人 1999 *PNAS* 2345-49)。活化的 HSC/MFB 中看到的 TGF β 1 的表达、TGF β 1 上调 ECM 表达的效力和 HSC 上 TGF 受体的表达已是广泛接受的模型,在此模型中,由 TGF β 1 活化的 HSC/MFB 持续的自分泌/旁分泌刺激是促进器官纤维化

的主要的纤维化发生的反应。因而, 预测 TGF β 1 的减少能降低肝脏纤维化的发生(Wu 和 Zern 2000 *J. Gastroenterol.* 35:665-72)]。

●肺病——如肺纤维化 (Giri 等人 *Thorax* 48, 959-966, 1993); 特发性肺纤维化; 成人呼吸窘迫综合症; 隐发性组织肺炎, 不明性细支气管炎 (BO), 移植相关的不明性细支气管炎; 药物诱导的肺病; 辐照诱导的肺病; 在哮喘和肺气肿中呼吸道周围的局部纤维化; 超敏性局限性肺炎; 隐发性组织肺炎 (COP); 慢性阻塞性肺病 (COPD); 急性间质局限性肺炎 (AIP); 石棉沉着症; 与自身免疫紊乱相关的间质性肺纤维化, 如全身狼疮红斑和硬皮病, 化学制品接触或过敏反应; 哮喘; 新生儿慢性肺病 (CLD) [TGF β 1 的失控表达在很多慢性肺病包括哮喘、肺纤维化和新生儿慢性肺病 (CLD) 的呼吸道异常发展的病理中起到重要的作用 (Holgate 等人 2001 *Int Arch Allergy Immunol* 124 1-3:253-8; Khalil 等人 2001 *Thorax* 56 12:907-15; Lecart 等人 2000 *Biol Neonate* 77 4:217-23; Pulleyn 等人 2001 *Hum Genet* 109 6:623-7; Sagara 等人 2002 *J Allergy Clin Immunol* 110 2:249-54; Sheppard, 2001 *Chest* 120 1 Suppl:49S-53S; Strieter, 2001 *Chest* 120 1 Suppl:77S-85S; Toti 等人 1997 *Pediatr Pulmonol* 24 1:22-8)。活性 TGF β 1 在小鼠肺泡表面的过表达导致有力的纤维化反应, 而用抗体或诱骗物抑制 TGF β 1 能消除由博来霉素诱导的纤维化 (Kelly 等人 2003 *Cur. Pharm. Des.* 9:3949)。而且, 对全部肺 mRNA 芯片的微阵列分析显示, 大多数已知的 TGF β 1 诱导的基因在实验性诱导的纤维化过程中都上调 (Kaminski 等人 2000 *PNAS* 97:1778-83)]。

●心血管疾病——动脉硬化症[TGF β 与动脉硬化症相关, 见如 T.A. McCaffrey: 2000 “TGF- β s and TGF- β Receptors in Atherosclerosis” *Cytokine and Growth Factor Reviews* 11:103-114]]; 肥大心脏生长 (Schultz 等人 2002 *J Clin Invest.* 109 (6): 787-96; Brand 和 Schneider 1995 *J. Mol. Cell Cardiol.* 27:518); 渐进性全身硬化[在老化的维管结构中 TGF β 1 的增加相平行的是纤连蛋白水平的显著增加 (Li 等人 1999)。这些变化毋庸置疑地影响着从弹性的管道向纤维化/僵硬的管道转变]; 机械诱导的微血

管纤维化；肉状瘤病；心室纤维化；辐照诱导的局部缺血性心脏病[已有报道，对于因 Hodgkin 病和乳腺癌而用辐照治疗的患者由于局部缺血性心脏病死亡的风险显著提高。某些细胞因子和生长因子，如 TGF β 1，可以刺激辐照诱导的内皮增生、成纤维细胞增生、胶原沉积和纤维化，导致加剧的动脉硬化病变]；动脉损伤（Wolf 等人. 1994 J. Clin. Invest. 93, 1172-8）；慢性静脉不足（CVI）；经皮转腔冠状血管成形术或支架后的再狭窄病变（PTCA）；Hermansky-Pudlak 综合症；多肌炎；硬皮病；皮炎；嗜曙红细胞筋膜炎；硬斑病，或与 Raynaud 综合症的出现相关的硬斑病；非梗塞心肌的内部冠状维管结构的血管周围的纤维化；损伤诱导的增生，如再狭窄；与胶原血管病相关的动脉硬化症纤维化[TGF β 1 是动脉壁渐进性增厚的因素，这种增厚是由于在气球血管成形术后平滑肌细胞增生和动脉中胞外基质沉积造成的。由于这种增厚使再狭窄动脉的直径可以减少 90%，由于直径的大部分减少是由于胞外基质而不是平滑肌细胞体，仅仅通过减少大量的胞外基质的沉积而使血管张大 50%是可能的。在体内转染 TGF β 1 基因的未损伤猪动脉中，TGF β 1 基因的表达与胞外基质的合成和增生都有关（Nabel 等人 1993 PNAS 90:10759-63）；组织细胞增生症（嗜曙红细胞肉芽瘤）；

●软组织纤维化——（Border 和 Ruoslahti 1992 J Clin Inv 90:1-7; Border 和 Noble 1994 N Engl J Med 331:1286-91）；勃起功能紊乱（Moreland, R. 1998 Int J Impot Res 10:113-20）；类风湿性关节炎（Wahl 等人 1993 J. Exp. Medicine 177, 225-30）。

●创伤愈合——皮肤结疤；灼伤；肥大结疤；瘢痕疙瘩的形成；结膜结疤(Cordeiro MF, 2003 Clin Sci (Lond). 104(2): 181-7) [用不同浓度的 TGF β 1 处理胎儿的创伤能造成这些创伤显著的疤痕，这表明 TGF β 直接参与皮肤结疤（Sullivan 等人 1995 J Pediatr Surg 30:198-203）。已经表明向大鼠愈合创伤的边缘注射中和性 TGF β 1 抗体可抑制结疤但不影响创伤愈合的速率或创伤的抗张强度。同时，血管生成减少，创伤中巨噬细胞和单核细胞的数目减少，且疤痕组织中无组织的胶原纤维沉积的数量减少

(Shah 等人 1992 Lancet 339:213-4; Shah 等人 1994 J. Cell Science 107:1137-57; Shah 等人 1995 J Cell Sci. 108:985-1002)。通常用反义 TGF β 1 治疗的小鼠创伤中会出现减少疤痕的反应 (Choi 等人 1996 Immunol Cell Biol 74:144-50)。合成的 TGF β 1 拮抗剂的局部应用减少猪灼伤和切除手术创伤以及兔子皮肤切除创伤的疤痕 (Huang, 等人 2002 FASEB J 16:1269-70; Werner 和 Grose 2003 Physiol Rev 83(3): 835-70)。

●炎症疾病——炎症肠病 (IBD), 如 Crohn 病 (CD) 和溃疡性结肠炎 (UC) [肠炎有赖于炎症细胞因子特别是 IFN- γ 与 TGF β 1 活性之间的平衡 (Strober 等人 1997 Immunol. Today 18:61-4; Neurath 等人 1996 J. Exp. Med. 183, 2605-16; Ludviksson 等人 1997 J. Immunol. 159; Boirivant 等人 1998 J. Exp. Med. 188, 1929-39; Powrie 等人 1996 J. Exp. Med. 183, 2669-74)。内脏中由免疫学上介导的组织损伤与炎症细胞因子产生的增加相关, 这些因子能激活多种不同细胞类型中的转录因子 NF κ -B]; 类风湿性关节炎 (RA); 滑膜增生[在人类类风湿性关节炎的滑液中 TGF β 1 的水平提高 (Lotz 等人 1990 J. Immunol. 144:4189-94)。过量的 TGF β 1 形成称作骨赘的令人疼痛的骨关节副产物, 滑膜增生和在 RA 中的炎症 (Hamilton 等人 1991 PNAS 88:7180-4)。在鼠关节炎模型中抑制内源 TGF β 1 能阻止骨赘的形成并削弱软骨修复, 这暗示 TGF β 1 在这些病理事件中的作用 (Scharstuhl 等人 2002 Immunol. 169:507-14)];

●细胞增生疾病——众多数据证明 TGF β 1 不仅具有转化潜力, 而且也能在体内和体外驱使恶性发展、入侵和转移 (Derynck 等人 2001 Nat. Genet 29:117-29; Cui 等人 1996 Cell 86:531-42)。超增生状态、疾病、紊乱、综合症和/或病况的例子包括但不限于结肠、腹部、骨骼、乳腺、消化系统、肝脏、胰腺、腹膜、内分泌系统 (如肾上腺、甲状旁腺、垂体、睾丸、卵巢、胸腺或甲状腺)、眼睛、头部、颈部、神经系统 (中枢神经系统和外周神经系统)、淋巴系统、骨盆、皮肤、脾、胸腔和泌尿生殖系统的赘生物。同样地, 其他超增生病况包括但不限于高 γ 球蛋白血症、淋巴增生病况、病变蛋白血症、紫癜、肉状肿瘤病、错构瘤、Sezary 综合症、

Waldenström 巨球蛋白血症、Gaucher 病综合症、组织细胞增生症和其他的超增生状态。

尽管 TGF β 1 有肿瘤抑制物活性, 肿瘤细胞通常表现出这种生长因子产量的增加(Derynck 等人 1987 *Cancer Res.* 47:707-12; Dickson 等人 1987 *PNAS* 84:837-41), 而且相当多的证据证明它有通过在肿瘤微环境中影响肿瘤细胞入侵和变化而促进肿瘤的作用。现在清楚, TGF β 1 既可以作为肿瘤的抑制物, 又可以作为肿瘤发展、入侵和转移的重要的刺激物。在肿瘤发生的早期, 如当肿瘤还是良性的时候, TGF β 能直接作用在癌细胞上抑制肿瘤的生长。但是, 随着肿瘤的发展, 遗传和/或生化变化允许 TGF β 1 通过它在癌细胞本身和肿瘤非恶性基质细胞类型上的多效活性而刺激肿瘤的发展。TGF β 1 对入侵和转移的刺激可能是比其肿瘤抑制作用更重要的临床结果, 因为大多数肿瘤保留有功能的 TGF β 信号传导通路 (Akhurst 和 Derynck 2001 *Trends Cell Biol.* 11:S44-51)。

有充足的证据表面在细胞增生疾病中 TGF β 1 的过量产生与不良预后相关 (Tsushima 等人 1996 *Gastroenterology* 110:375-82; Adler 等人 1999 *J. Urol.* 161:182-7)。有几种类型的癌症, 其中由肿瘤产生的 TGF β 1 可能是有害的。MATLyLu 大鼠前列腺癌细胞 (Steiner 和 Barrack 1992 *Mol. Endocrinol.* 6:15-25) 和 MCF-7 人乳腺癌细胞 (Arteaga 等人 1993 *Cell Growth and Differ.* 4:193-201) 在转染表达小鼠 TGF β 1 的载体后变得更具有肿瘤发生性和转移性。TGF β 1 在人前列腺和晚期胃癌中与血管发生、转移和不良预后相关 (Wikstrom, P. 等人 (1998) *Prostate* 37:19-29; Saito, H 等人 (1999) *Cancer* 86: 1455-62)。在乳腺癌中, 不良预后与 TGF β 1 水平的提高有关 (Dickson 等人 1987 *PNAS* 84:837-41; Kasid 等人 1987; *Cancer Res.* 47:5733-8; Daly 等人 1990 *J. Cell Biochem.* 43:199-211; Barrett-Lee 等人 1990 *Br. J. Cancer* 61:612-7; King 等人 1989 *J. Steroid Biochem.* 34:133-8; Welch 等人 1990 *PNAS* 87:7678-82; Walker 等人 1992 *Eur. J. Cancer* 238:641-4), 而且它莫西芬治疗 (Butta 等人 1992 *Cancer Res.* 52:4261-4) 所诱导的 TGF β 1 与用它莫西芬治疗乳腺癌失败有关 (Thompson 等人

1991 Br. J. Cancer 63:609-14)。抗 TGF β 1 抗体在无胸腺小鼠中抑制人乳腺癌细胞 MDA-231 的生长(Arteaga 等人 1993 J. Clin. Invest. 92:2569-76), 这是一种与脾自然杀伤细胞活性的增加有关的治疗。转染潜伏 TGF- β 1 的 CHO 细胞也表现出 NK 活性降低和在裸鼠中肿瘤生长的增加(Wallick 等人 1990 J. Exp. Med. 172:1777-84)。因而, 由乳腺肿瘤分泌的 TGF β 1 可能造成内分泌免疫抑制。TGF β 1 的高血浆浓度意味着晚期乳腺癌患者的不良预后(Anscher 等人 1993 N. Engl. J. Med. 328:1592-8)。在高剂量的化学疗法和自体同源骨髓移植前有高 TGF β 1 循环的患者处于肝血管阻塞疾病(所有患者中 15-50% 的人死亡率高达 50%)和先天性间质局限性肺炎(所有患者的 40-60%)的高风险之中。这些发现显示, TGF β 1 血浆水平的提高能鉴定出风险患者, 且降低 TGF β 1 能降低乳腺癌患者的发病率和这些治疗的死亡率。

很多恶性细胞分泌 TGF β 1, 这提示 TGF β 1 的产生能为肿瘤细胞提供逃避宿主免疫监视的机制。破坏携带肿瘤宿主中 TGF β 1 信号转导的白细胞亚群的建立为免疫治疗癌症提供潜在的手段。具有破坏 T 细胞中 TGF β 1 信号转导的转基因动物模型能根除通常致死的 TGF β 1 过表达淋巴瘤 EL4(Gorelik 和 Flavell, 2001 Nature Medicine 7(10): 1118-22)。肿瘤细胞中 TGF β 1 分泌的下调导致宿主中免疫原性的恢复, 而对 TGF β 1 不敏感的 T 细胞导致加速分化和自身免疫, 这些要素对于耐受宿主抗击自身抗原表达肿瘤可能是必要的。TGF β 1 的免疫抑制效应也与 HIV 患者亚群中基于 CD4/CD8 T 细胞计数其免疫反应比预期的要低相关(Garba 等人 2002 J. Immunology 168:2247-54)。TGF β 1 中和性抗体能逆转培养物中的这种效应, 意味着其他的 TGF β 1 抗体抑制物具有逆转在此 HIV 患者亚群中出现的免疫抑制作用。

TGF β 1 的肿瘤抑制/肿瘤促进的双重作用在过表达 TGF β 1 的角质细胞转基因体系中清楚地得到证明。尽管转基因体系对良性皮肤病变的形成更具有抗性, 在转基因体系中转移性转化速率大幅增加(Cui 等人 1996 Cell 86(4): 531-42)。在原发性肿瘤中由恶性细胞产生的 TGF β 1 随着肿瘤发展

到晚期而增加。对许多重大上皮癌的研究表明,由人类癌症产生的 TGF β 1 产量的增加是在肿瘤发展中相对晚期的事件。此外,肿瘤相关的 TGF β 1 还为肿瘤细胞提供了选择优势并促进肿瘤的发展。TGF β 1 对细胞/细胞和细胞/基质间的相互作用的影响导致更大的入侵和转移倾向。肿瘤相关的 TGF β 1 可以允许肿瘤细胞逃避免疫监视,因为象在患攻击性脑瘤或乳腺癌的患者中见到的那样, TGF β 1 是活化的淋巴细胞克隆增值的有效抑制物 (Arteaga 等人 1993 J. Clin. Invest. 92:2569-76)。TGF β 1 能抑制制管张素的产生。癌症治疗的形式,如辐照治疗和化学治疗,能诱导肿瘤中活化的 TGF β 1 的产生,从而,选择抵抗 TGF β 1 的生长抑制效应的恶性细胞的生长。因而,这些抗癌治疗增大风险并加速肿瘤恶化的发展。阻止 TGF β 1 介导的信号转导的试剂在这样的情形中可能是非常有效的治疗策略。肿瘤细胞对 TGF β 1 的抗性可抵消辐照治疗和化学治疗的大部分细胞毒性效应,基质中治疗依赖性的 TGF β 1 的活化甚至是有害的,因为它能使微环境更有益于肿瘤的发展,并促成组织损伤导致纤维化。前列腺癌细胞表达高水平的 TGF β 1,它似乎能通过刺激血管发生和抑制针对肿瘤细胞的免疫反应而提高前列腺癌的生长和转移。前列腺癌细胞通常丢失他们的 TGF β 受体并获得对 TGF β 1 抗增生和促凋亡效应的抗性。因而, TGF β 1 高表达和 TGF β 受体表达的丢失与人前列腺癌患者尤其不利的预后相关 (Wikstrom 等人 2000 Scand J Urol Nephrol. 34(2): 85-94)。在肝细胞癌中 (HCC), TGF β 1 表达的诱导伴随着肝病灶和节结中 TGF β 1 受体表达的丢失,使肝细胞改变以逃避 TGF β 1 诱导的细胞凋亡,从而赋予改变的肝细胞在肝癌发生期间的生长优势 (Lim 2003 Mech Ageing Dev. 124(5): 697-708)。在头部和颈部鳞状上皮细胞癌中,早期的 TGF β 1 过表达为肿瘤提供了有利的微环境 (Lu 等人 2004 Cancer Res 64(13): 4405-10); 结组合物可以通过直接或间接地相互作用来调节、改善、治疗、预防和/或诊断超增生性疾病、病况、紊乱或综合症 (如赘生物)。例如,通过阻止细胞增生的抑制作用进而调节超增生状态 (如 TGF β 1 抑制 T 淋巴细胞、淋巴因子活化的杀伤细胞、NK 细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞和 B 细胞的

增生和功能性分化 (Letterio 和 Roberts 1998 “Regulation of the immune response by TGF Beta” *Ann Rev Immunol* 16:137-61); 或通过增加免疫反应 (如通过提高参与超增生病况的蛋白质的免疫原性); 或通过引起特定细胞类型 (如 T 细胞) 的增生、分化或动员。使用本发明组合物期望的效应也通过提高现存的免疫反应或通过起始新的免疫反应而实现。或者, 期望的结果以通过降低或阻断现存的免疫反应或通过预防起始新的免疫反应而实现。对异常增生细胞的局部施用可以通过本领域任何已知的方法或这里讨论的技术实现, 如但不局限于转染、电穿孔、细胞显微注射或用载体 (如脂质体、脂质转染或裸多核苷酸)。“细胞增生病况”指任何人或动物疾病、综合症、紊乱、病况或状态, 影响任何细胞、组织、任何位点、或器官、组织的任意组合或身体部位, 其特征在于细胞、细胞群或组织的一个或多个局部异常增生, 不管是良性或恶性的]。

●神经疾病——神经疤痕 (Logan 等人, 1994 *Eur. J. Neurosci.* 6:355-63)、脑血管异常、Alzheimer 病 (Masliah 等人 2001 *Neurochemistry International* 39:393-400) [中前脑回中 TGF β 1 的 mRNA 水平与该脑区中脑血管淀粉样沉积物的相对程度呈正相关, 这提示 TGF β 1 在人脑血管异常中可能的作用。在星形胶质细胞中过表达 TGF β 1 的转基因小鼠出现 Alzheimer 病样的脑血管异常, 包括血管周围的星形胶质细胞发生、微血管基膜增厚和没有实质变性的硫代黄素 S-阳性淀粉样肽的积聚。脑中 TGF β 1 的长期过表达导致结构和功能伤害, 令人联想起淀粉样血管病的 AD 病例中的情形 (Buckwalter 等人 2002 *Ann N Y Acad Sci.* 977:87-95)]; 增生的视网膜病 (Chaturvedi 等人 2002 *Diabetes Care* 25:2320-7); TGF β 1 过量产生相关纤维化增生病况相关的其他眼睛疾病包括视网膜重黏附手术、白内障取出、眼内晶状体移植、以及青光眼排除手术后伴随的增生玻璃体视网膜病。

●造血生成状态/病况——[在血管生成内源刺激物和抑制物之间的天然存在的平衡中抑制性影响通常占优势 (见如 Rastinejad 等人 *Cell* 56345-355 (1989))。当在正常生理条件下发生新血管生成时, 如伤口愈合、

器官再生、胚胎发育和女性生殖过程，血管生成受到严格的调控，并在空间和时间上定界。在病理学上的血管生成中，如实体瘤形成过程中，因为肿瘤性和非肿瘤性疾病的持续发展，这些调控失败，而失调的血管生成可变成病态。很多严重的疾病是受异常的新血管生成支配的，包括如实体瘤生长和转移、关节炎、一些类型的眼病和牛皮癣，见如 Moses 等人 1991 Biotech. 9630-634; Folkman 等人 1995 N. Engl. J. Med., 333:1757-63; Auerbach 等人 1985 J. Microvasc. Res. 29:401-11; Folkman, "Advances in Cancer Research," Klein 好 Weinhouse 编辑, Academic Press, New York, pp. 175-203 (1985); Patz, 1982 Am. J. Ophthalmol. 94:715-43; 和 Folkman 等人 1983 Science 221:719-25 的综述。肿瘤血管生成对肿瘤生长和入侵至关重要，因为血管传送营养和氧气给肿瘤细胞，并允许肿瘤细胞入侵血液系统，从而导致转移。TGF β 1 在若干检测中作为血管生成有效的诱导剂 (Roberts 等人 1986 PNAS 83:4167-71; Madri 等人 1988 J. Cell Biol. 106:1375-84; Yang & Moses 1990 J. Cell Biol. 111:731-74; Gajdusek 等人 1993 J. Cell. Physiol. 157:133-44; Choi 和 Ballermann 1995 J. Biol. Chem. 270:21144-50)，而 TGF 信号转导组分缺陷型小鼠模型表明 TGF β 1 在正常血管发育中的重要性。而且，TGF β 1 及其受体 ALK-5 和 ALK-1 可能参与血管生成的血管成熟期 (见如 Bull Acad Natl Med. 2000; 184 (3):537-44)。在大量的病理条件下，血管生成促成疾病状态，如积累的重要数据提示实体瘤的形成依赖于血管生成 (见如 Folkman 和 Klagsbrun 1987 Science 235:442-7)。在本发明的另一个实施方案中，提供结合组合物的施用以治疗、改善、调节、诊断和/或抑制与心血管生成或造血细胞扩增有关的疾病、紊乱、综合症和/或病况。可利用结合组合物以预期的方式影响的恶性和转移病况包括但不局限于恶性肿瘤、实体瘤和如这里描述的或本领域已知的其他癌症 (有关这类紊乱、综合症的综述见如 Fishman 等人 Medicine, 新版, J. B. Lippincott Co., Philadelphia 2002)。例如，可利用本发明的组合物影响的癌症包括但不局限于实体瘤 (包括前列腺、肺、乳腺、卵巢、胃、胰腺、喉、食道、睾丸、肝脏、腮腺、胆管、结肠、直肠、子

宫颈、子宫、子宫内膜、肾、膀胱、甲状腺癌)、原发性肿瘤和转移瘤、黑素瘤、成胶质细胞瘤、Kaposi 肉瘤、平滑肌肉瘤、非小细胞肺癌、结肠直肠癌、晚期恶性肿瘤和血液肿瘤如白血病。

●**传染——脓毒症**[TGF β 1 大幅地改变小鼠感染利什曼原虫的过程。遗传学上的抗性小鼠在施用 TGF β 1 后变得对利什曼原虫感染易感。TGF β 1 能加剧疾病, 而 TGF β 1 抗体能终止疾病的发展 (Barral-Netto 等人 1992 *Science* 257:545-7)]。

●**脱发——秃头症**; 脱发[中和性抗 TGF β 1 抗体能以剂量依赖的方式逆转由雄激素引起的角化细胞的生长抑制, 这提示来自秃头皮肤乳头细胞的由雄激素诱导的 TGF β 1 介导在雄激素秃头症中的头发生长抑制, 因而在人模式秃头中发挥作用(Inui 等人 2002 *FASEB J.* 16(14): 1967-9)]; 因此, 本发明提供了能改善、调节、治疗、预防和/或诊断血管生成相关的疾病和/或紊乱的方法, 包括对此需要的受试者施用有效量的结合组合物。

参考下面的实施例能最好地理解本发明的广泛范围。这些实施例并不旨在将本发明限制于具体的实施方案。

实施例

一般方法

这里描述的很多标准方法在例如 Sambrook 等人(2001) Molecular Cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY; 及其相关网站 (www.MolecularCloning.com); Ausubel 等人 Biology Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; 或 Ausubel 等人(1987 和增刊) Current Protocols in Molecular Biology Wiley/Greene, NY; Bartlett & Stirling (2003) PCR Protocols: Methods in Molecular Biology Vol. 226 Humana Press, NJ 中有描述或提及。蛋白质纯化方法包括诸如硫酸铵沉淀、柱层析、电泳、离心、结晶等等方法; 见如 Ausubel 等人 (1987 和定期的增刊); Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification," Methods in Enzymology 卷 182, 以及此丛书的其他卷:

Coligan 等人 (1995 和增刊) Current Protocols in Protein Science John Wiley & Sons, New York, NY; Matsudaira (编辑) (1993) A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Academic Press, San Diego, CA; 以及制造商关于使用蛋白质纯化产品的文献, 如 Pharmacia, Piscataway, NJ, 或 Bio-Rad, Richmond, CA。与重组技术组合允许融合于合适的区段 (表位标签), 如 FLAG 序列或可融合的等同物, 如通过蛋白酶可切除的序列。见如, Hochuli (1989) Chemische Industrie 12:69-70; Hochuli (1990) "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent" in Setlow (编辑) Genetic Engineering, Principle and Methods 12:87-98, Plenum Press, NY; 和 Crowe 等人 (1992) QIAexpress: The High Level Expression and Protein Purification System QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CA。

在 Hertenberg 等人 (编辑) 第 5 版 1996 Weir's Handbook of Experimental Immunology 卷 1-4, Blackwell Science; Bierer 等人 Eds. (2004) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY; 和 Methods in Enzymology 卷: 70, 73, 74, 84, 92, 93, 108, 116, 121, 132, 150, 162 和 163 Elsevier, USA. 中描述标准的免疫学技术。

实施例 1: 用 CDR 和人框架构建并筛选 Fab 片段

使用标准方法表征和合成抗体可变区单突变的 CDR 文库 (见如 Wu 等人 1998 PNAS 95:6037-42)。用噬菌体 M13 表达载体构建文库, 其含有由这里描述的人恒定区和可变区框架序列与本发明 CDR 序列一起组成的抗体轻链和重链基因。在一些情况下, 靶 CDR 在核苷酸退火前先予以缺失。采用基于密码子的诱变, 进行寡核苷酸合成, 以产生本发明的 CDR 序列。

最初通过捕获筛选 (lift) 来筛选文库以鉴定最高亲和力的变体。捕获筛选方法 (Watkins, 2002 Methods Mol. Biol. 178:187-93) 在本领域内是已知的并且在 WO/0164751 和 US2002/0098189 中有描述。随后, 期望的克隆

在 ELISA 和这里描述的细胞增殖能力测定中固定的抗原上滴定以进一步表征。在这样的筛选后，测定目的克隆的解离常数 (K_d)、结合速率 (K_{on}) 和解离速率 (K_{off})。

如这里描述的或本领域已知的，为鉴定潜在的包含本发明嵌入供体 CDR 的抗体结合组合物，将合成的 CDR 文库插入到缺失模板上。采用标准的诱变技术 (Kunkel, 1985 PNAS 82:488-92) 用诱变寡核苷酸库替换特定的 CDR。通常，除了 CDRH1，用 Kabat 定义的系统将 CDR 放置在框架内，CDRH1 是 Kabat 和 Chothia 定义的总和。诱变寡核苷酸与缺失相应 CDR 的尿苷化噬菌体模板退火。

退火就是将反应在 85°C 孵育 5 分钟后，再慢慢冷却到 20°C，为期 45 分钟。将退火样品放在冰上，加入 T4 DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶以产生双链 DNA，反应在 4°C 孵育 5 分钟，然后再在 37°C 孵育 90 分钟。反应物用酚萃取，乙醇沉淀，将得到的 DNA 电转化到 DH10B 细胞中。将 XL0LR 细胞加入到反应物中以允许噬菌体扩增，之后用文库铺板。噬菌体储液的制备是将 8 ml 生长培养基加到平板上，随后在 4°C 孵育最少 4 小时。收获含噬菌体的培养基，离心澄清，并添加叠氮化钠 (0.02%) 作为防腐剂。

用在 Watkins 等人 1998 Anal Biochem 256: 169-77; 和 Watkins, 2002 Methods Mol. Biol., 178:187-93 描述的噬菌斑筛选对文库进行最初筛选。随后，将含有由结合到固定化抗人 κ 抗体上的不同噬菌斑表达的 Fab 的滤膜与生物素化 TGF β 1 (生物素-TGF β 1)、Neutravidin-碱性磷酸酶 (NA-AP) 孵育，其间简单地洗涤。对目的克隆测序并用 ELISA 进一步表征。ELISA 通常以 0.4 μ g/ml TGF β 1、TGF β 2 或 TGF β 3 在 4°C 过夜包被 Costar 3366 微孔板。随后，在向每个孔中加入 100 μ l 封闭液 (10 mg/ml BSA 洗涤液) 前，将微孔板洗涤两次。Fab 的稀释液在包被孔内在 22°C 孵育 1.5 小时。洗涤后，加入抗人 κ -碱性磷酸酶缀合物并在 22°C 孵育 1 小时。在充分地洗涤后，加入比色底物，测定在 A560 处的吸收以鉴定阳性克隆。

用 ELISA 检测 Fab

在一个非限制性实例中,采用的 ELISA 是以 0.4 ug/ml TGF β 1、TGF β 2 或 TGF β 3 (用包被缓冲液将 TGF β 1 (R&D Systems, Cat # 240-B/CF, 239 ug/ml), TGF β 2 (RDI, Cat # RDI-1035, 50 ug/ml) 和 TGF β 3 (RDI, Cat # RDI-1036/CF, 50 ug/ml)稀释到 0.4 ug/mL)在 4°C 过夜包被 Coster 3366 微孔板。随后在向每个孔加入 100 ul 封闭液 (10 mg/ml BSA 洗涤液)前洗涤平板两次。本发明的 Fab 稀释液在包被孔内在 22°C 孵育 1.5 小时。洗涤后,加入抗人 κ -碱性磷酸酶缀合物并在 22°C 孵育 1 小时。在充分地洗涤后,加入比色底物,测定在 A560 处的吸收。

在另一个例子中,本发明的结合组合物用竞争性 ELISA 试验进行测试。通常进行液相测定,其中能与抗原竞争结合到结合组合物(如抗体)上的化合物首先与液相中的抗体结合,随后测定抗体与抗原结合的程度。

材料:

碳酸盐包被缓冲液包括 50 mM 碳酸钠 pH 9.6。抗原是用包被缓冲液稀释到 0.4 ug/ml 的 TGF β 1 (R&D Systems, Cat # 240-B/CF, 239 ug/ml), TGF- β 2 (RDI, Cat # RDI-1035, 50 ug/ml) 和 TGF- β 3 (RDI, Cat # RDI-1036/CF, 50 ug/ml)。洗涤缓冲液由 0.02 M Tris pH 7.4、0.15 M NaCl、0.1% Tween 20 和溶于洗涤缓冲液的 10 mg/ml BSA (Sigma A-4503)即封闭液。用作阳性对照的蛋白质是小鼠抗人 TGF β 1、2 或 3 (R&D Systems, cat# 1D11)、小鼠抗人 TGF- β 2 (R&D Systems, cat# BAF302)和小鼠抗人 TGF- β 3 (R&D Systems, cat# BAF243), 利用封闭液将其稀释到 1 ug/ml。使用的检测抗体缀合物是抗小鼠 κ -过氧化物酶缀合物 (Southern Biotech, cat# 1050-05), 其工作浓度是用封闭液做 1:2000 稀释。用作颜色反应的底物是邻苯二胺 (OPD) 片 (Sigma cat# P-6912), 它被溶解在底物缓冲液 (0.1 M Na_2HPO_4 , 以 0.05 M 柠檬酸调 pH 到 5.0) 中。OPD 底物的工作液 (即用于每个 196 微孔板的体积) 是在每块板显色前新鲜制备的, 即将 1x5 mg OPD 片溶解在 12.5 ml 的底物缓冲液中, 随后加入 5 ul 30% 的 H_2O_2 。

方案:

用抗原 (0.4 ug/ml TGF- β 1、2 或 3, 每孔加 50 ul) 包被单个 96 孔板, 然后用胶带密封, 在 4°C 保存 16-20 小时。随后用前面描述的洗涤缓冲液将平板洗涤 2 次, 然后向每个孔中加入 100 ul 封闭液 (10 mg/ml BSA 洗涤缓冲液)。在 22°C 孵育大约 1 小时后, 用洗涤缓冲液将平板洗涤 2 次。然后, 每个孔中加入 100 ul 用缓冲液稀释的样品或用 PBS 稀释的对照, 并在 22°C 孵育 1.5 小时。孵育后, 用洗涤缓冲液将平板洗涤 6 次, 然后每个孔加入 100 ul 的抗小鼠 κ -过氧化物酶缀合物 (用封闭液按 1:2000 稀释) 或 SA-HRP (用封闭液按 1:10,000 稀释)。测试样品在 22°C 孵育 1 小时, 然后每个孔中加入 100 ul 的 OPD 底物。在显色后 (大约 10 分钟), 测定 96 孔板在 490 nm 处的吸收。

在这种情况下 Fab 实施方案成功的结果是 TGF β 1 在 490 nm 处产生的吸收大于 1.6 个单位, 而 TGF β 2 和 TGF β 3 则表现出显著更低的吸收值, 从而这表明对 TGF β 1 的特异性和/或选择性结合。

在基于细胞的测定中检测 mAb

为了测试本发明结合组合物中和 TGF β 生物活性以及中和特定 TGF β 同工物的能力, 采用 Tsang 等人 (1995 Cytokine 7:389-97) 的 HT-2 细胞增殖测定。用 HT-2 细胞增殖测定确定 Fab 和 mAb 组合物在体外的效价。简单地说, HT-2 细胞在 IL-4 存在时增殖但在 TGF β 存在时经历细胞凋亡。TGF β 诱导的细胞死亡可以通过添加 TGF β 1 中和性 Fab 或 mAb 而阻止。

人细胞系 HT-2 响应 IL-4 而增殖, 但 IL-4 诱导的增殖被 TGF β 1、TGF β 2 或 TGF β 3 抑制。因而, 对 TGF β 1 具有特异性和/或选择性的结合组合物是中和性的, 如果它能阻止 TGF β 1 对 IL-4 诱导的 HT-2 细胞的正常抑制效应的话。因而, 如果将足够的 TGF β 1 特异性结合组合物添加到含有 TGF β 1 的 HT-2 细胞混合物中, IL-4 诱导的细胞增殖应当无限制地进行下去。因而, 在存在特定 TGF β 同工型和 IL-4 增殖信号的情况下, 使用 HT-2 测定评估本发明结合组合物的剂量反应中和能力。用商业化的比色细胞增

殖检测（如 Promega 的 CellTiter 96® Aqueous 一种溶液细胞增殖测定）评估细胞增殖的程度。

用补加 10% FBS、青霉素/链霉素分别为 100 U/ml 和 100 ug/ml、50 uM β -巯基乙醇和 10 ng/ml 人 IL-2（R&D Systems）的 RPMI 1640 培养基维持 HT-2 细胞。用 Jouan CR422 离心机以 1000 RPM 离心细胞，并用 PBS 重悬。用 PBS 洗涤 2 次后，最后用测定培养基（含有无酚红的 RPMI 1640，补加 2% FBS、青霉素/链霉素分别为 100 U/ml 和 100 ug/ml，以及 50 uM β -巯基乙醇）以 0.15×10^6 细胞/ml 重悬细胞。向 96 孔板的每个孔中加入 50 ul 溶于测定培养基中的细胞。在向细胞生物测定中加入测试 mAb 前，不同浓度的 mAb 与 300 pg/ml 测定培养基中的 TGF β 1、TGF- β 2 或 TGF- β 3 预孵育。孵育 30 分钟后，向细胞中加入 50 ul 的 TGF β /Fab 混合物，随后立即加入 50 ul 含有 45 ng/ml 鼠 IL-4（终浓度 15 ng/ml）的测定培养基。在孵育 20-48 小时后，加入 35 ul CellTiter 96 水性溶液（Promega Corp）。在 37°C 潮湿的含 5% CO₂ 空气的条件下继续孵育 2-3 小时后，用 CellTiter 96® 比色测定（产生的甲臞产物的量——作为 490 nm 处测定的吸收值测量——与培养物中活细胞的数目直接呈正相关）在 ELISA 读板机上在 490 nm 处进行定量分析测定。下表 2 显示的是模型数据。

表 2 HT-2 体外细胞生物测定：

抗 TGF β 1 mAb 结合组合物	相对于 mAb2471 IC50 提高的倍数
21D1	106.8+16.1
DM4	391.0+5.2
DM7	140.0+29.2
C27	401.0+132.3

用 HT-2 细胞增殖测定在体外确定本发明 Fab 和 mAb 结合组合物的效价。在存在 IL-4 时 HT-2 细胞增殖，但在存在 TGF β 时经历细胞凋亡。TGF β 诱导的细胞死亡通过添加 TGF β 中和性组合物（如本发明的 Fab

或 mAb) 而阻止。与鼠 IgG1 FAB#2471 相比, 本发明结合组合物在阻止 TGF β 诱导的细胞死亡方面表现出至少大于 100 倍或更高的中和效价。mAb 组合物的 IC₅₀ 范围大约在 0.1-1.0 ng/ml (mAb2471 的 IC₅₀ 大约是 0.1 ng/ml)。

测定 Fab 的动力学常数

用 KinExA 3000 设备 (Sapidyne Inst. Inc.) 测定结合常数。简单地说, 将抗原共价偶联到 alzactone 珠子上, 用设备检测本发明游离的 Fab 结合组合物与珠子的结合。为了测定 K_d, 每一含有 20 pM Fab (对 mAb, 其浓度为 200 pM) 和递减系列稀释抗原 (0-250 nM) 的管在含有 1%BSA、0.02%叠氮化物和 0.01% Tween-20 的 PBS 中于 25℃孵育 1-6 天。孵育后, 每一平衡样品中游离的 Fab 在 KinExA 3000 上依据生产厂商的说明进行测定。K_d 值用 KinExA 3000 软件测定。

为了测定 K_{on}, 2nM 的各 Fab 根据生产厂商的说明利用注射法与 0-240 nM 抗原混合, 并检测未结合的 Fab。得到的数据用来在 KinExA 3000 软件中计算 K_{on}。K_{off} 通过使用公式 $K_d = K_{off}/K_{on}$ 而计算。

测定 Mab 的动力学常数

测定动力学常数可选的方法是已知的, 例如, 用 BIAcore® 2000 设备测定结合组合物对人 TGF- β 1 (R&D Systems, Cat # 240-B/CF), TGF- β 2 (RDI, Cat # RDI-1035) 和 TGF- β 3 (RDI, Cat # RDI-1036/CF) 的亲合力。BIAcore® 2000 利用表面胞质团共振的光学属性检测在右旋糖苷生物传感器基质中相互作用分子的蛋白质浓度的变化。除非特别说明, 所有的试剂和材料购自 BIAcore® AB (Uppsala, Sweden)。所有检测在室温进行。样品溶解在 HBS-EP 缓冲液中 (150 mM 氯化钠, 3 mM EDTA, 0.01% (w/v) 表面活性剂 P-20, 和 10 mM HEPES, pH7.4)。重组蛋白质 A 用胺偶联试剂盒以 400-450 个反应单位 (RU) 的水平固定在 CM4 感受器芯片的所有四个流动室中。

用多轮分析评估结合。每一轮是在流速为 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的条件下进行测定, 并包括如下步骤: 注射 12 μl 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗体结合组合物, 注射 250 μl TGF β 1 (开始用 5nM, 每一轮用 2 倍系列稀释到 0.13 nM, 每个浓度注射 2 次), 随后是短的 (5 min) 或长的 (120 min) 延迟解离, 并用 pH 1.5、50 μl 、10 nM 的甘氨酸盐酸盐再生。每轮结合和解离速率的测定是通过 ClamXP (Center for Biomolecular Interaction Analysis, Univ. of Utah) 利用简单结合模型对生物传感器数据对进行拟合来提取 K_{on} 和 K_{off} 速率常数; 用 $K_{\text{d}}=K_{\text{on}}/K_{\text{off}}$ 的关系计算平衡结合常数。下表 3 显示了本发明组合物的模型数据。

表 3 本发明 Fab 和 mAb 结合亲和力和动力学测定。

	Fab结合数据 (Kinexa)			mAb结合数据 (Biacore)		
	$k_{\text{on}}(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$ ($\times 10^{-6}$)	$k_{\text{off}}(\text{sec}^{-1})$, calc. ($\times 10^6$)	K_{d} (pM)	$k_{\text{on}}(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$ ($\times 10^{-7}$)	$k_{\text{off}}(\text{sec}^{-1})$, ($\times 10^5$)	$K_{\text{d}}(\text{pM})$ (calc)
2471	1.7	664	406	nd	nd	nd
21D1	4.0	3.4	0.9	1.3 ± 0.1	$< 0.6 \pm 0.6$	$< 0.5 \pm 0.5$
DM4	4.2	5.1	1.2	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.9	0.9 ± 0.4
DM7	4.5	2.3	0.5	1.3 ± 0.3	$< 0.7 \pm 0.4$	$< 0.5 \pm 0.4$
C27	4.1	17	4.2	1.3 ± 0.1	0.8 ± 0.5	0.6 ± 0.4
23A3	4.8	19	4.0	1.9 ± 0.4	1.0 ± 0.8	0.8 ± 0.6

用 Kinexa 测定平衡 (K_{d}) 和动力学 (K_{on}) 结合参数 (K_{off} 从 K_{d} 和 K_{on} 中计算)。mAb 的平衡和动力学结合参数的测定用 Biacore。平衡结合常数 K_{d} 从测定的 K_{on} 和 K_{off} 中计算。与鼠 IgG1 Fab#2471 进行比较。由于非常低的解离, 21D1 和 Dm7 的 K_{off} 超过可检测的上限, 可能是非常慢, 因而, 计算的 K_{d} 值也超过上限。数值是重复测量的平均值 ($n=3-4$)。

Mab 特异性的测定

用 BIAcore 方法测定本发明 mAb 组合物结合其他实体的能力, 特别是潜伏形式的 TGF- β 1 或 TGF- β 3。所有测量在室温进行。样品溶解在 HBS-EP 缓冲液中 (150 mM 氯化钠、3 mM EDTA、0.01% (w/v) 表面活性剂 P-20, 和 10 mM HEPES, pH7.4)。重组蛋白质 A 用胺偶联试剂盒以 400-500 个反应单位 (RU) 的水平固定在 CM4 感受器芯片的所有四个流

动室上。

用多轮分析评估结合。每一轮在流速为 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的条件进行, 包括如下步骤: 注射 15 μl 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗体结合组合物, 注射 250 μl 5 nM 的 TGF β 1 或 5 nM 潜伏的 TGF β 1, 或 5 nM TGF β 3, 然后是短的 (5 分钟) 延迟解离, 并注射 2 次 50 μl 10 mM、pH 1.5 的甘氨酸盐酸盐进行再生。用设备控制软件测定捕获第一 Mab 后的信号量, 然后是配体的信号量。由于信号与捕获的蛋白质量是成比例的, 捕获的配体的化学计量就很容易计算 (表 4)。

表 4 TGF β 1、潜伏 TGF β 1 和 TGF β 3 与 Mab 的结合 (配体的测试浓度为 5 nM)

Mab	配体结合的化学计量		
	TGF - α 1	潜伏的 TGF- α 1	TGF- α 3
21D1	1.29	0.05	0.16
DM4	1.55	0.03	ND
DM7	1.23	0.04	0.54
C27	1.74	0.08	ND
23A3	1.63	0.07	1.26

TGF β 1 的特异性

结合组合物 mAb 对 TGF α 3 的亲合力是用 BIAcore 方法测定的。所有测定在室温进行。样品溶解在 HBS-EP 缓冲液中 (150 mM 氯化钠、3 mM EDTA、0.01% (w/v) 表面活性剂 P-20, 和 10 mM HEPES, pH7.4)。重组蛋白质 A 用胺偶联试剂盒以 400-500 个反应单位 (RU) 的水平固定在 CM4 感受器芯片的所有四个流动室上。用多轮分析评估结合。每一轮在流速为 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的条件下进行, 包括如下步骤: 注射 15 μl 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗体结合组合物, 注射 250 μl TGF α 3 (从 5 nM 起始, 每轮用 2 倍的系列稀释到 0.13 nM, 每个浓度注射 2 次), 然后是短的 (5 分钟) 延迟解离, 并用注射 2

次 50 μ l 10 mM、pH1.5 的甘氨酸盐酸盐进行再生。

依据不同 TGF β 3 的浓度达到的平衡信号，通过测定 TGF β 3 注射的最后 10 秒期间的平均信号确定亲和力，然后将在所有 TGF β 3 浓度下得到的信号与简单结合平衡模型在 SCRUBBER (Center for Biomolecular Interaction Analysis, Univ. of Utah) 中拟合。测试的本发明人 mAb 组合物的 K_d 和特异性的模型数据——用 TGF β 3 结合的 K_d 除以 TGF β 1 结合的 K_d (这里) 进行计算)——在下表 5 中显示。

表 5 结合组合物测试的 mAb 对 TGF β 3 结合的亲和力和相对特异性。

显示的误差代表多次重复测量 ($n=3$) 的标准偏差。

Mab	K_d (TGF- β 3), nM	特异性 ($K_{d,\beta 3}/K_{d,\beta 1}$)
21D1	4.90	9800
DM4	0.53 ± 0.01	621
DM7	1.16 ± 0.18	2320
C27	2.20	3670
23A3	0.66 ± 0.04	1050

实施例 2: 肝脏纤维化胆管连接体内模型

用胆管连接模型以与 Arias 等人报道的 (BMC Gastroenterology 3(29), 2003) 相似的方式评估抗 TGF β 1 治疗的体内功效。简单地说，为了达到目的，通过吸入异氟烷 (2-3%) 来麻痹雄性 Sprague Dawley 大鼠 (250-300 g)。将腹部刮开并用聚维酮碘 (betadine) 和 70% 乙醇擦洗。在无菌条件下，在中线切割 (~4 cm)，分离总胆管并在两个位置上以 6-0 手术线结扎，相距约 1 厘米，然后在结扎线之间横切。用 4-0 缝合线使腹壁闭合，使皮肤钉合。在手术当日开始，其后每 7 天施用抗 TGF β 1 组合物和同型小鼠对照 mAb (IgG)。在术后 4 天和 12 天，麻醉大鼠进行血清肝脏酶、全部血计数和肝组织学研究 (三色和 H&E 染色) 以测定治疗的效果。

实施例 3: 肺纤维化体内模型

有很多可获得的模型用以评估抗 TGF β 组合物对肺纤维化的体内功效。例如, 用博来霉素模型以 Pittet 等人报道的方式 JCI 107, 1537-1544, (2001) 实施以评估抗 TGF β 方法中的改善。另一模型是呼吸道肠道病毒 1/L 模型 (见如 Bellum 等人 Am. J. Pathol, 150, 2243; 或 London 等人 Clin. Immunol. 103, 284; 和 London 等人 Exp. Mol. Pathol, 72, 24-36)。简单地说, 第一天用小鼠通过鼻孔应用 1×10^7 pfu (共 30 μ l) 呼吸道肠道病毒 1/L, 随后的第 3、7、12 天应用不同浓度的本发明抗 TGF β 结合组合物或这里描述的或本领域已知的同型对照 mAb。在治疗期间, 监测动物的呼吸窘迫迹象、体重的减少和死亡率。在起始治疗的第 14 天, 对动物实施安乐死, 制备肺样品进行组织病理学检查, 以评估肺病的发展和/或进程 (分析羟脯氨酸的含量以测定纤维化)。

实施例 4: 抗 Thy1.1 肾小球肾炎体内模型

大鼠抗 Thy1.1 模型是充分建立的系膜增生性肾小球肾炎的模型 (见如 Morita 等人 1998 Am J Kidney Dis 31:559-73; Bagchus 等人 1986 Lab. Invest. 55:680-7 以及 Yamamoto 和 Wilson 1987 Kidney Int. 32:514-25), 向其中注射抗定位在系膜细胞表面的 Thy 抗原的抗体能诱导系膜裂解, 随后一段系膜细胞过度补偿性增生可导致尿蛋白质 (尿蛋白) 水平的提高。抗 Thy1.1 肾炎模型在很多方面类似人 IgA 肾炎或 Henoch-Schonlein 紫癜 (O'Donoghue 等人, 1991 J Clin Invest 88:1522-30), 通过测定测试组合物影响尿蛋白剂量相关的下降的能力 (见如 Burg 等人 1997 Lab Invest 76:505-16; Johnson 等人 1995 Kidney Int 47:62-9), 此模型已用来测试对肾病潜在的治疗方法。

为了用这样的模型测试本发明的结合组合物, 分别标记的雄性 Aprague Dawley 大鼠 (200-260 g, 约 9 周龄) 用自由获取食物和水的标准饮食预处理 5 天以适应水土。在预处理的第 5 天测定前体尿蛋白。在后眼

眶取血前,用颜色记号在尾巴上标记并标记耳朵,以对大鼠进行个体鉴定,然后依据第一天的体重随机分成5组。

处理组进行盲法研究,在研究的最后一天用非盲法。在一开始就通过阴茎血管对各组注射 1.25 mg 的 Thy1.1mAb 或 PBS 作为对照。结合组合物用标准条件或这里描述的条件制备和纯化。对照小鼠 IgG1 mAb(11513)是蛋白质 A 纯化的材料,并重悬在 PBS pH 7.2 中,购自 Harlan Bioproducts for Science, Indianapolis, IN 46229-0176。

小鼠 α -Thy1.1 是用 2×10^6 L 小鼠杂交瘤细胞培养液中产生的。条件培养基经混合、浓缩到 18 $\times$, 随后纯化。大约 746 mL 收获的浓缩上清与 1.5 M 甘氨酸/3.0 M 氯化钠 pH 8.9 混合,并加到用 1.5 M 甘氨酸/3.0 M 氯化钠 pH 8.9 预平衡的干净的 137 ml 蛋白质 A 琼脂糖凝胶柱上。然后用 1.5 M 甘氨酸/3.0 M 氯化钠 pH 8.9 洗涤蛋白质 A 柱子。用 pH 3.0 100 mM 的柠檬酸洗脱柱子。将选择的对应 IgG 的洗脱组分汇合,用 1M NaOH 调 pH 值到 7.4,并加到用 pH 7.4 的 PBS/氯化钠平衡的 318 ml 的 Pharmacia Superdex 200 柱子上。将对应 IgG 大小的峰汇合并分装保存在 -20°C 。

施用抗 Thy1.1 mAb 1 小时后,用同型或本发明抗 TGF β 1 抗体组合物对动物皮下给药。在第 7 天再次用抗体给药。在下面四个处理组中对动物进行检测:

- 1) 假处理; 注射 PBS
- 2) 以大约 12.5 mg/kg 或 2.5 mg/剂量注射抗 Thy1.1 和同型对照抗体
- 3) 以大约 5 mg/kg 或 1 mg/剂量注射抗 Thy1.1 和 DM4 抗体
- 4) 以大约 12.5 mg/kg 或 2.5 mg/剂量注射抗 Thy1.1 和 DM7 抗体
- 5) 以大约 12.5 mg/kg 或 2.5 mg/剂量注射抗 Thy1.1 和 C27 抗体

在第-5 和 13 天将大鼠放在代谢笼中 24 小时。在第 14 天,用二氧化碳杀死大鼠,并通过心脏穿刺取血用于分析。左肾用含 4%多聚甲醛的 PBS 液固定并保存在 70%乙醇中以用于后面的组织学分析。如果任何大鼠是垂死的,用二氧化碳杀死并处理,测定尿蛋白质和血尿氮的浓度。根据生产厂商的说明用 HITACHI911 自动分析仪分析尿蛋白和血尿氮(BUN)浓度,

对照来自 Biorad.

下表 6 中的模型数据表明, 本发明的结合组合物有消弱体内肾损伤和减少与抗 Thy1.1 mAb 诱导的肾损伤相关的蛋白尿升高的显著的能力

Thy1.1 Ab	Ab 组	研究序号	第 14 天的尿蛋白 (mg/24 hrs)			对照 IgG 的%	
			剂量 (mg)	AVG.	SE.	AVG.	SE.
			假处理	7.0	3.0		
2.5 mg/kg	21-D1	HS4606	0	73.4	9.5	100.0	14.3
t.v.			0.1	65.7	7.3	88.5	11.1
			0.5	35.2	6.2	42.5	9.3
			1	29.1	3.8	33.3	5.8
			假处理	9.9	2.3		
2.5 mg/kg	DM4	HS4607	0	67.2	6.5	100.0	11.3
t.v.			0.1	54.7	6.2	78.1	10.8
			0.5	49.7	6.2	69.4	10.7
			1	28.9	4.7	33.2	8.2

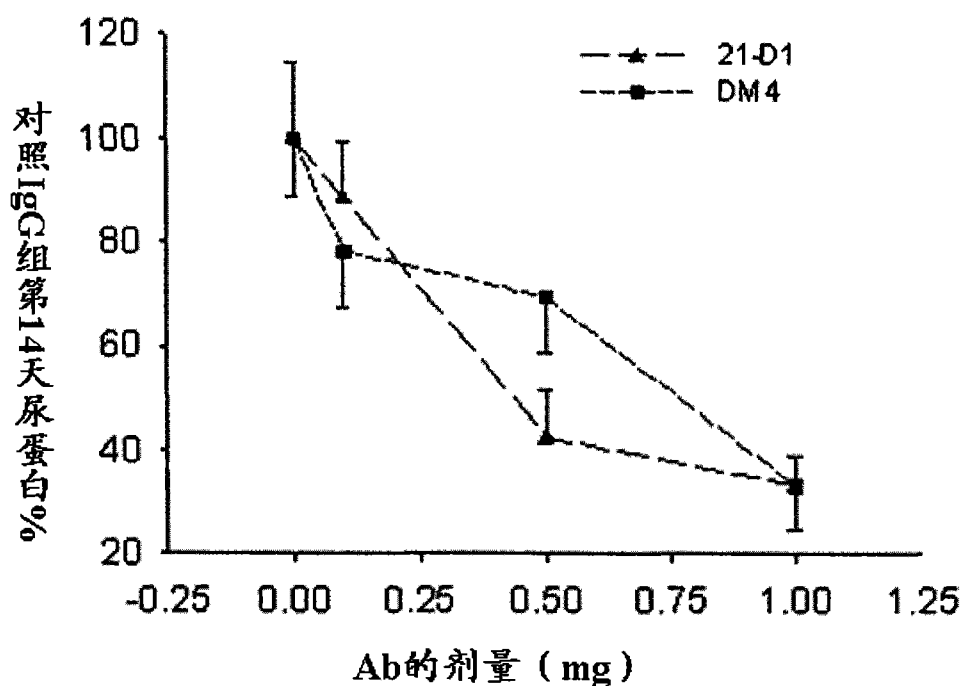


表 6 用 2.5 mg/kg 的 α -Thy1.1 mAb i.v. 注射大鼠, 30 分钟后用 1 mg 的赫赛汀(Herceptin)进行 21D1 和 DM4 的研究。在第 7 天施用第二剂量的抗 TGF β 1 和对照 mAb, 在第 14 天对动物实施安乐死。21D1 和 DM4 mAb

结合组合物均以剂量依赖的方式降低尿蛋白的水平。

实施例 5: TGF α 1 结合组合物的表位图谱

用 H/Dex 与化学标记的组合来绘制本发明的 TGF α 1 结合组合物（如抗体）的表位。由于 H/D 交换和化学修饰都依赖于氨基酸残基的溶剂可及性，可在结合组合物 TGF β 1 复合物形成后用溶剂可及性的变化来鉴定参与抗体结合的残基。在 H/D 交换或化学修饰之后，以前结合的抗原经蛋白酶消化为肽切割片段，从而允许用 LC/MS 比较片段之间的分子量，以确定结合复合物形成后 H/D 交换或化学修饰中哪些个氨基酸残基被封闭。

蛋白质表面化学标记

将在 4 mM 盐酸溶液中的 15 μ g 1 mg/ml 的 TGF α 1 等份试样转移到塑胶瓶中，并将 180 μ g 对照或本发明的 TGF α 1 抗体组合物加入其中（TGF- α 1/抗体=1/2 的摩尔比）。将磷酸缓冲盐水（PBS）加到每个瓶中，终体积为 150 μ L，使之在室温孵育至少 10 分钟以形成结合复合物，之后进行蛋白质表面标记。对于化学标记，将 7.5 μ L 5 mg/mL 的羟基琥珀酰亚胺乙酸酯（AHSE）溶液加到每个复合物瓶中，然后将混合物在室温孵育（AHSE/抗体=200/1 的摩尔比）。在不同的时间（如 10、20 和 60 分钟），通过混合含 50 μ L 1 mg/mL K 的 0.1 M tris 缓冲液 pH 8.0 使 50 μ L 混合溶液淬灭。直接用这里描述的 LC/MS 分析溶液。每个样品剩余的溶液用 3-5 μ L 50 mg/mL DTT 溶液在 37°C 处理 10-15 分钟以诱导成熟 TGF α 1 二硫键的形成。

还原的蛋白质溶液随后用 3 μ L 0.1 mg/mL 胰凝乳蛋白酶溶液在 37°C 处理 2-3 小时，然后用 1 μ L 0.25 mg/mL Glu-C 溶液在 37°C 再处理 2-3 小时。反应通过加入 0.5 μ L 冰醋酸淬灭，然后用 Waters 2795 HPLC 和 Micromass LTC Premier 质谱通过 LC/MS 分析。HPLC 使用 Zorbax, SB C18, 2.1 $\times$ 50nm，于室温用含乙腈的 0.15% 甲酸梯度洗脱蛋白质和肽。完整蛋白质需 14 分钟运行时间，蛋白酶消化物需 75 分钟运行时间。

对于 TGF α 1 表面或内部或结构上靠近表位的赖氨酸残基(K), 在测试组合物结合 TGF α 1 后, 赖氨酸氨基基团的乙酰化被部分或完全地封闭。通过比较复合样品 (TGF- α 1 + 结合 TGF- α 1 的抗体) 或非复合样品 (TGF- α 1 + 不结合 TGF- α 1 的对照抗体) 中肽的乙酰化程度, 可以鉴定因形成结合复合物而封闭其乙酰化的氨基酸残基。下表 7 显示的是在这样的 LC/MS 分析中得到的乙酰化数据的一个模型。

表 7 用 LC/MS 获得的每摩尔肽中乙酰化氨基基团的摩尔数

乙酰化 时间	复合物	乙酰化摩尔数/肽摩尔数											
		1-6	9-21	22-30	22-32	31-39	33-43	51-62	53-62	66-90	91-112	91-99	100-112
10 min	TGF α 1 + 对照	0.97	0.10	0.07	0.94	0.74	0.22	0.64	0.60	0.00	1.09	1.28	0.03
	TGF α 1 + 21D1	0.95	0.09	0.07	0.95	0.78	0.26	0.50	0.45	0.00	0.49	0.71	0.02
	TGF α 1 + DM4*	0.91	0.10	0.04	0.88	0.56	0.05	0.31	0.29	0.00	0.35	0.59	0.02
	TGF α 1 + DM4#	0.91	0.07	0.06	0.92	0.62	0.13	0.30	0.28	0.00	0.39	0.66	0.02
20 min	TGF α 1 + 对照	1.00	0.25	0.14	0.99	0.89	0.35	0.82	0.79	0.00	1.32	1.57	0.05
	TGF α 1 + 21D1	1.00	0.27	0.15	1.00	0.95	0.42	0.76	0.71	0.00	1.01	0.96	0.04
	TGF α 1 + DM4*	1.00	0.23	0.06	0.95	0.76	0.09	0.52	0.51	0.00	0.55	0.81	0.03
	TGF α 1 + DM4#	1.00	0.21	0.12	0.97	0.85	0.22	0.59	0.58	0.00	0.63	0.88	0.04
60 min	TGF α 1 + 对照	0.97	0.67	0.30	1.03	1.03	0.56	0.87	0.82	0.00	1.68	1.85	0.10
	TGF α 1 + 21D1	0.97	0.79	0.36	1.08	1.21	0.73	0.93	0.92	0.00	1.24	1.39	0.08
	TGF α 1 + DM4*	0.91	0.80	0.16	0.99	0.95	0.26	0.85	0.80	0.00	0.91	1.13	0.08
	TGF α 1 + DM4#	0.99	0.66	0.36	1.06	1.10	0.51	0.93	0.91	0.00	1.14	1.25	0.09

*和#表示两个不同批号的 DM4 抗体被分别表征。

给定这样的模型数据, 对于几种 TGF α 1 肽片段, 特别是显示的短时间的乙酰化 (如 10 分钟), TGF α 1: 抗体的复合物和对照之间的差异是可以辨别的。包含 31-39、33-43、53-62 和 91-112 残基的片段证明了这样的

可辨别的差异。片段 31-39 和 33-43 都含有 K37 残基。含有 K26 和 K31 的片段 22-32 与对照没有表现出差异，因而片段 31-39 的乙酰化差异可以归结于在形成抗原抗体复合物后封闭了 K37 的乙酰化。

对于每一个测试的抗体，片段 53-62 和 91-112 在测试范围内都展示出的持久性的差异。片段 53-62 在乙酰化的上限范围表现出降低的差异，但是在低 AHSE/抗体比率的情况下，这样的差异在整个范围内保持不变。不受理论的束缚，这样数据的一个解释是 K60 不直接参与抗原：抗体的结合，但它与结合复合物充分接近，从而封闭 AHSE 对 K60 残基的可及性，从而封闭乙酰化。不过，可选地，K60 可构成由测试抗体所定义的表位。

片段 91-112 在整个测试范围内都表现出乙酰化差异，这提示此片段上三个赖氨酸残基（K95、K97、K110）中的至少一个参与形成结合组合物：TGF β 1 复合物。为了鉴定相关的赖氨酸残基，还用 Glu-C 处理胰凝乳蛋白酶消化物，产生另外两个片段：91-99 和 100-112。后者（片段 100-112）含有 K110，但是它没有表现出显著的乙酰化差异，这提示它对于溶剂或化学修饰而言都是不可及的。

前者（片段 91-99）含有 K95 和 K97，进一步用以 AHSE 处理的非复合的 TGF β 1 进行测试，通过 MS/MS 分析以确定单乙酰化分子的洗脱时间，并定量 K95 和 K97 乙酰化的程度（在这样的条件下的模型数据在下表 8 中给出）。这样的数据表明，不管有无复合物形成，K97 的乙酰化保持不变。但是本发明抗体组合物的存在显著地影响 K95 的乙酰化，这说明 K95 直接参与结合复合物的形成。

表 8 K95 和 K97 的乙酰化

乙酰化 时间	TGF β 1 和抗体复合物	乙酰化 (%)	
		K97	K95
10 min	TGF- β 1 +对照	54	73
	TGF- β 1 +LA307-21D1	51	20
	TGF- β 1 +LA307-DM4*	44	16

	TGF-α1+LA307-DM4#	46	18
20 min	TGF-α1+对照	71	86
	TGF-α1+LA307-21D1	66	27
	TGF-α1 +LA307-DM4*	59	22
	TGF-α1+LA307-DM4#	63	25
	TGF-α1 +对照	87	95
60 min	TGF-α1+LA307-21D1	86	53
	TGF-α1+LA307-DM4*	75	38
	TGF-α1+LA307-DM4#	82	42

*和#表示两个不同批号的 DM4 抗体被分别表征。

H/D 交换

在表位绘图中, 氘氢(H/D)交换技术类似于蛋白质表面标记/MS, 但是, H/D 交换不是残基特异性的, 因而, 可以检测任何氨基酸残基的变化。在结合组合物:TGF β 1 复合物与非复合成熟 TGF- α 1 蛋白的比较中, 复合蛋白质的分子量比非复合 TGF- α 1 低大约 20 Da (或在 100% D₂O 时为 30 Da), 因而通过计算复合和非复合 TGF- α 1 的 D₂O 重量差异, 能够表明成熟 TGF- α 1 二聚体中大约 30 个氨基酸残基可能参与形成本发明的结合复合物。

用 Microcon (30 kD)超滤蛋白质浓缩器 (Millipore) 通过连续浓缩和稀释将 120 μ g 小份 (~140 或 280 μ L) 抗体溶液换成 PBS 缓冲液。用 PBS 进行连续 2 次浓缩和稀释后, 将抗体溶液浓缩、取出, 用 PBS 调整终体积为 70 μ L。然后, 向每个抗体瓶中加入含有 10 μ L 1 mg/mL TGF- α 1 的 4 mM HCl 溶液和 2 μ L 1 M pH 8.0 的 tris 缓冲液以形成 TGF- α 1:抗体复合物。制备 TGF- α 1 的对照样品, 将 70 μ L 1 $\times$ PBS、含 20 μ L TGF- α 1 的 4 mM HCl 溶液和 2 μ L 1 M pH 8.0 的 tris 缓冲液混合。随后, 将 9 μ L 的 TGF- α 1 或 TGF- α 1 抗体复合物转移到微型塑胶瓶中, 然后加入 21 μ L 的 100% D₂O 形成 70% D₂O 的溶液。将溶液在室温孵育 10 分钟, 然后在 0°C

孵育 1 分钟。

孵育后，淬灭 H/D 交换，加入 15 μ L 1%甲酸溶液(0°C)和 4 μ L 2 mg/mL 胃蛋白酶溶液(0°C)，然后在 0°C 孵育 5 分钟以消化蛋白质。消化物立即人工注射到柱子上，进行 LC/MS 分析（除了装管和 HPLC 柱子浸在冰水浴中外，其余的正如前面描述的一样）。

成熟 TGF- β 1 由于形成二硫键，在低 pH 值(约 2.5)和低温时能抗胃蛋白酶消化。结果，尽管消化时间比较长，酶:蛋白质浓度比较高，但是产生较少量的切割肽，而大部分 TGF- β 1 仍然完整。可鉴定的 TGF- β 1 蛋白酶水解片段通常在蛋白质的 C 末端和中间区域产生(如片段 58-64 或 61-64)。下表 9 中显示了这样的片段在 D/H 交换后的质量变化（delta 质量）的模型数据。片段 61-64 的 delta 质量接近于零，而片段 58-64 的 delta 质量约为 1 Da，这提示免于氘交换的区域—在与本发明的结合组合物形成复合物后—含有氨基酸残基 58-61。

表 9 TGF β 1 经 D/H 交换后可鉴定的胃蛋白酶水解肽的 delta 质量

Delta 质量(100% D ₂ O)*	TGF- β 1 胃蛋白酶水解肽					
	61-64	59-64	58-64	58-61	91-104	90-104
DM4 (n=3)的平均值	0.04	-0.87	-1.02	-0.30	-1.85	-1.87
DM4 (n=3)的 SD	0.01	0.11	0.21	0.05	0.30	0.30
21D1 (n=1)	0.01	-0.34	-0.99	-0.18	-1.90	-1.51

TGF β 1 诱变

TGF β 1 (正常)	(1)	1	ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPY	50
TGF β 1 (突变)	(1)	ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRDLGWKVVHEPKGYHANFCLGPCPY		
TGF β 1 (正常)	(51)	51	IWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQ	100
TGF β 1 (突变)	(51)	IWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLTILYYVGRTPKVEQ		
TGF β 1 (正常)	(101)	101	LSNMIVRSCKCS-	113
TGF β 1 (突变)	(101)	LSNMIVRSCKCS-[SEQ ID NO: 130]		

为了进一步详细说明本发明结合组合物的表位, 用传统诱变技术鉴定对于与本发明组合物形成结合复合物关键的 TGF β 1 残基。用 TGF β 3/TGF β RII 复合物的晶体结构 (2002 Nat Struct Biol. 3:203-8) 作为模型来详细说明重要的 TGF β 1 蛋白诱变位点: R25K、K26R、V33I、P87T、V89L 和 K95T (如上所示)。

利用特异于 TGF β 同工型的结合组合物以及商业上可获得的能阻止 TGF β 1 结合于其同源受体 (TGF β RII) 的 mAb (1D11 和 240; R&D Systems) 来测试与 TGF β 1 突变蛋白质结合的能力。测试由激光诱导的解离/离子化飞行时间质谱分析进行。将测试 mAb [如特异性结合 TGF β 1 的 mAb3821 和 2471 (在 PCT/US2004/018921; US 60/485,820 中披露)] 和对照 [如结合所有三种 TGF β 同工型的 mAb1D11] 混合 (提供与 (突变蛋白质或野生型) TGF β 1 蛋白质形成复合物的机会), 固定在检测芯片上, 发射激光, 随后用标准化的软件在生产条件下 (Ciphergen Diagnostics) 进行分析。

模型结果表明, 在 TGF β 1/TGF β RII 结合界面上的独特氨基酸残基亚群有别于其他 TGF β 同工型 (TGF β 2 和 TGF β 3)。测试 mAb#2471 (对 TGF β 1 具有特异性结合亲和力) 结合野生型 TGF β 1 的速率比结合 TGF β 1 突变蛋白质高 5 倍, 而 mAbs3821 和 1D11 结合 TGF β 1 突变蛋白质的速率比野生型 TGF β 1 低 2.5 倍。

序列表

- SEQ ID NO: 1 是灵长类成熟 TGF β 1 氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 2 是灵长类 VHCDR1 氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 3 是灵长类 VHCDR2 氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 4 是灵长类 VHCDR3 氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 5 是灵长类 VLCDR1 氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 6 是灵长类 VLCDR2 氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 7 是灵长类 VLCDR3 氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 8 是灵长类 HCVR FR1 框架氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 9 是灵长类 HCVR FR2 框架氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 10 是灵长类 HCVR FR3 框架氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 11 是灵长类 HCVR FR4 框架氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 12 是灵长类 LCVR FR1 框架氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 13-36 是灵长类 LCVR FR2 框架氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 37 是灵长类 LCVR FR3 框架氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 38 是灵长类 LCVR FR4 框架氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 39 是灵长类 IgG1 重链恒定区氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 40 是灵长类 IgG4 重链恒定区氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 41 是灵长类 IgG4 轻链恒定区氨基酸序列。
- SEQ ID NO: 42-86 是灵长类轻链可变区氨基酸序列
- SEQ ID NO: 87-125 是灵长类 HCVR 重链氨基酸序列。

<110> 伊莱利利公司

<120> TGF β 1 特异性抗体

<130> X-16598

<160> 135

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 1

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
100 105 110

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 灵长类

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa 在位置 3 = Thr 或 Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa 在位置 5 = Thr、Glu 或 Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa 在位置 9 = Met、Ile、Leu 或 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa 在位置 10 = His、Val 或 Ala

<400> 2
Gly Tyr Xaa Phe Xaa Asp Tyr Asn Xaa Xaa
1 5 10

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> 灵长类

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 在位置 1 = Tyr、Gln 或 Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 在位置 2 = Ile 或 Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa 在位置 8 = Asp 或 Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11).. (11)

<223> Xaa 在位置 11 = Tyr、Thr、His 或 Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13).. (13)

<223> Xaa 在位置 13 = Gln、Lys、Pro 或 Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15).. (15)

<223> Xaa 在位置 15 = Phe 或 Tyr

<400> 3

Xaa Xaa Tyr Pro Tyr Asp Gly Xaa Thr Gly Xaa Asn Xaa Lys Xaa Lys

1

5

10

15

Ser

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> 灵长类

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4).. (4)

<223> Xaa 在位置 4 = Trp 或 Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> Xaa 在位置 5 = Phe 或 Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6).. (6)

<223> Xaa 在位置 6 = Ala、Glu 或 Tyr

<400> 4

Gly Tyr Arg Xaa Xaa Xaa Tyr

1	5
<210> 5	
<211> 10	
<212> PRT	
<213> 灵长类	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (1).. (1)	
<223> Xaa 在位置 1 = Arg、Tyr、Glu 或 Gln	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (3).. (3)	
<223> Xaa 在位置 3 = Ser 或 Thr	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (4).. (4)	
<223> Xaa 在位置 4 = Ser、Val 或 Ala	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (5).. (5)	
<223> Xaa 在位置 5 = Ser 或 Leu	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (7).. (7)	
<223> Xaa 在位置 7 = Ser、Pro、Leu 或 Tyr	
<400> 5	
Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Val Xaa Tyr Met His	
1	5 10
<210> 6	
<211> 7	
<212> PRT	
<213> 灵长类	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	

<222> (5).. (5)

<223> Xaa 在位置 5 = Leu、Asn 或 Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7).. (7)

<223> Xaa 在位置 7 = Ser、Lys、Tyr、Leu、Met、Phe、Glu、Gln、Arg 或 His

<400> 6

Ala Thr Ser Asn Xaa Ala Xaa

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 灵长类

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1).. (1)

<223> Xaa 在位置 1 = Gln 或 Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> Xaa 在位置 5 = Leu、Asp 或 Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6).. (6)

<223> Xaa 在位置 6 = Asn 或 Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7).. (7)

<223> Xaa 在位置 7 = Pro、Phe、Tyr 或 Arg

<400> 7

Xaa Gln Trp Asp Xaa Xaa Xaa Pro Ala

1 5

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 8

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 9

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 10

Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 11

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 12
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 12
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 13
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 14
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 灵长类

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

<210> 16
 <211> 15

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 16

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 17

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 18

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 19

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 20

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 21

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 22

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 23

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 24

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 25

<211> 15
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 25
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 26
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 27
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 28
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 29

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
1 5 10 15

- <210> 30
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> 灵长类

- <400> 30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Trp Ile Tyr
1 5 10 15

- <210> 31
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> 灵长类

- <400> 31

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
1 5 10 15

- <210> 32
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> 灵长类

- <400> 32

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
1 5 10 15

- <210> 33
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> 灵长类

- <400> 33

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 34
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 35
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 36
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Trp Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 37
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 37
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 38
 <211> 10

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 38

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 39

<211> 328

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 39

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser

1 5 10 15

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe

20 25 30

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly

35 40 45

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu

50 55 60

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr

65 70 75 80

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys

85 90 95

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

100 105 110

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

115 120 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 40

<211> 326

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 40

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 41
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 42
<211> 106
<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 42

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 43

<211> 106

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 43

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 44
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 44
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 45
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 45
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Leu Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 46

<211> 106

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 46

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 47
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 47
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Glu Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 48
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 49
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 49
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Thr Ser Asn Asn Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 50
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 50

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Met Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 51

<211> 106

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 51

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 52
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 52
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Phe Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 53
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 53

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Asp Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 54
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 54
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Arg Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 55
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 灵长类

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

<210> 56
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 56
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 57
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 57
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 58
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 58

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 59

<211> 106

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 59

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 60
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 60
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 61
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 61

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 62

<211> 106

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 62

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 63
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 63
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Leu Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 64
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 64
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Ser Ser Val Leu Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 65

<211> 106

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 65

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 66

<211> 106

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 66

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 67

<211> 106

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 67

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 68
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 68
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Tyr Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 69
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 69

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 70

<211> 106

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 70

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 71
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 71
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 72
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 72
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 73
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 73
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 74
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 74

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ala Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 75

<211> 106

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 75

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ala Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 76
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 76
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 77
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 77

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 78

<211> 106

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 78

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Arg Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 79
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 79
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Pro Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 80
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 80
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 81
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 81
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 82
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 82

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 83

<211> 106

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 83

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 84
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 84
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 85
<211> 106
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 85

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 86

<211> 106

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 86

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 87
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 87
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Glu Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 88
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 88
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 89

<211> 115

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 89

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

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

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

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 90
<211> 116
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 90
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 91
<211> 116
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 91
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 92
<211> 116
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 92
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 93
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 93
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 94
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 94

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 95

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 95

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 96
<211> 116
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 96
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 97
<211> 116
<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 97

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

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

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

Gly Tyr Val Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 98

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 98

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

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

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

Gly Gln Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 99
<211> 116
<212> PRT
<213> 灵长类

<400> 99
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 100
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 灵长类

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

<210> 101
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 101
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly His Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 102

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 102

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Leu Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 103

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 103

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Lys Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 104

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 104

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Ile Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 105

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 105

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 106

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 106

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

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

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

Gly Ser Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 107

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 107

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

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

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

Gly Ser Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 108

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 108

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 109

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 109

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 110

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 110

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 111

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 111

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 112

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 112

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 113
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 113
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 114
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 114
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 115

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 115

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Val Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 116

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 116

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 117

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 117

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 118

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 118

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 119
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 119
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 120
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 120

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Ser Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 121

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 121

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Tyr
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 122

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 122

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Ser Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 123

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 123

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 124

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 124

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 125

<211> 116

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 125

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 126
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 126
 Gln Gln Trp Asn Gly Asn Pro Pro Ala
 1 5

<210> 127
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 127
 Gln Gln Trp Asp Ser Asn Pro Pro Ala
 1 5

<210> 128
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 128
 Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Ser

<210> 129
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 129
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met His
 1 5 10

<210> 130
 <211> 213

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 130

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Glu Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr

35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 131
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 131

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 132

<211> 213

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 132

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 133
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> 灵长类

<400> 133

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 134

<211> 442

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 134

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<210> 135

<211> 213

<212> PRT

<213> 灵长类

<400> 135

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210