



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104169301 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 26

(21) 申请号 201280070288. 9

代理人 左路

(22) 申请日 2012. 12. 10

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/579, 618 2011. 12. 22 US

C07K 16/28 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 08. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2012/057151 2012. 12. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/093707 EN 2013. 06. 27

(83) 生物保藏信息

PTA-12353 2011. 12. 22

PTA-12352 2011. 12. 22

(71) 申请人 瑞纳神经科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·I·西贝尔 E·D·帕斯夸

林家扬 J·F·查帕罗里格斯

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

权利要求书2页 说明书80页

序列表47页

(54) 发明名称

人生长激素受体拮抗剂抗体及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供了与生长激素受体 (GHR) 结合的拮抗性抗体。本发明进一步涉及使用这些抗体减少 IGF-1 水平和 / 或用于治疗 and / 或预防与过量 IGF-1 相关的疾病的治疗方法, 包括治疗肢端肥大症、巨人症、癌症、糖尿病肾病、关节炎和肺炎症。

1. 一种分离的 GHR 拮抗剂抗体,其与人和食蟹猴生长激素受体 (GHR) 特异性结合,并且当施用于受试者时,降低所述受试者血液中的胰岛素样生长因子 -1 (IGF-1) 水平。

2. 权利要求 1 的分离的 GHR 拮抗剂抗体,其中所述抗体包含与单克隆抗体 SS1 竞争结合人 GHR 的抗原结合区。

3. 权利要求 1 的分离的 GHR 拮抗剂抗体,其中所述抗体识别与由单克隆抗体 SS1 识别的人 GHR 上的表位相同或重叠的表位。

4. 权利要求 1-3 中任一项的分离的 GHR 拮抗剂抗体,其中所述抗体以小于约 10nM 的平衡解离常数与人 GHR 结合。

5. 权利要求 1-4 中任一项的分离的 GHR 拮抗剂抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区。

6. 一种分离的 GHR 拮抗剂抗体,其与生长激素受体 (GHR) 特异性结合,并且包括:包含 SEQ ID NO:1、15 或 16 的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 互补决定区一 (CDR1),包含 SEQ ID NO:114 或 115 的氨基酸序列的 VH CDR2,包含 SEQ ID NO:118 的氨基酸序列的 VH CDR3,包含 SEQ ID NO:99 的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) CDR1,包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的 VL CDR2,和包含 SEQ ID NO:106 的氨基酸序列的 VL CDR3。

7. 一种分离的 GHR 拮抗剂抗体,其与生长激素受体 (GHR) 特异性结合,并且包括重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL),所述重链可变区包含 SEQ ID NO:8 的 VH 序列的 VH 互补决定区一 (CDR1)、VH CDR2 和 VH CDR3,所述轻链可变区包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3。

8. 权利要求 7 的分离的 GHR 拮抗剂抗体,其中所述 VL 包含 SEQ ID NO:7 的 VL 序列的 CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3。

9. 权利要求 6-8 中任一项的分离的 GHR 拮抗剂抗体,其中所述 VH CDR1 包含 SEQ ID NO:1、15 或 16 的氨基酸序列,所述 VH CDR2 包含 SEQ ID NO:2 或 17 的氨基酸序列,所述 VH CDR3 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列,所述 VL CDR1 包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列,所述 VL CDR2 包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列,并且所述 VL CDR3 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列。

10. 权利要求 9 的分离的 GHR 拮抗剂抗体,其中所述 VH 包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列或其在并非 CDR 内的残基中具有一种或多种保守氨基酸置换的变体,并且所述 VL 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列或其在并非 CDR 内的氨基酸中具有一个或多个氨基酸置换的变体。

11. 权利要求 6-10 中任一项的分离的 GHR 拮抗剂抗体,其中所述抗体进一步包含免疫惰性恒定区。

12. 权利要求 11 的分离的 GHR 拮抗剂抗体,其中所述抗体具有选自下述的同种型: IgG₂、IgG_{2Δa}、IgG₄、IgG_{4Δb}、IgG_{4Δc}、IgG₄S228P、IgG_{4Δb} S228P 和 IgG_{4Δc} S228P。

13. 权利要求 11 的分离的 GHR 拮抗剂抗体,其中所述恒定区是无糖基化 Fc。

14. 权利要求 10 的分离的 GHR 拮抗剂抗体,其中所述抗体包括重链和轻链,其中所述重链包含 SEQ ID NO:134 或 133 的氨基酸序列,所述轻链包含 SEQ ID NO:135 的氨基酸序列。

15. 一种药物组合物,其包含权利要求 1-14 中任一项的抗体。

16. 一种细胞系,其重组产生权利要求 1-14 中任一项的抗体。

17. 一种核酸,其编码权利要求1-14中任一项的抗体的重链可变区和/或轻链可变区。
18. 一种用于减少有此需要的个体血液中的胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 水平的方法,其包括给所述个体施用治疗有效量的权利要求1-14中任一项的抗体。
19. 权利要求18的方法,其中所述 IGF-1 水平减少至少约40%。
20. 权利要求18的方法,其中所述 IGF-1 水平减少至少约60%。
21. 权利要求18的方法,其中所述个体具有选自肢端肥大症、巨人症、癌症、糖尿病肾病、关节炎和肺炎症的疾病。
22. 一种用于治疗有此需要的个体中的肢端肥大症的方法,其包括给所述个体施用有效量的权利要求1-14中任一项的抗体。
23. 一种用于治疗有此需要的个体中的巨人症的方法,其包括给所述个体施用有效量的权利要求1-14中任一项的抗体。
24. 一种用于治疗有此需要的个体中的癌症的方法,其包括给所述个体施用有效量的权利要求1-14中任一项的抗体。
25. 一种用于治疗有此需要的个体中的糖尿病肾病的方法,其包括给所述个体施用有效量的权利要求1-14中任一项的抗体。
26. 一种用于治疗有此需要的个体中的肺炎症的方法,其包括给所述个体施用有效量的权利要求1-14中任一项的抗体。
27. 一种用于治疗有此需要的个体中的关节炎的方法,其包括给所述个体施用有效量的权利要求1-14中任一项的抗体。

人生长激素受体拮抗剂抗体及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及拮抗人生长激素受体 (GHR) 的活性的抗体,例如全长抗体或其抗原结合部分。更具体而言,本发明涉及包含拮抗剂 GHR 抗体的组合物和使用这些抗体作为药剂的方法。拮抗剂 GHR 抗体可以在治疗上用于降低血浆和 / 或组织中的 IGF-1 水平,并且可以用于预防和 / 或治疗癌症、糖尿病肾病、关节炎、肺炎症以及生长病症包括肢端肥大症和巨人症。

背景技术

[0002] 生长激素 (促生长素) (GH) 是 22kDa 蛋白质,其在垂体前叶中合成并且由垂体前叶分泌。Kopchick 等人,2002,Endocrine Reviews,23(5):623-646。GH 通过直接作用于组织并刺激经由肝及其他组织的胰岛素样生长因子 -1 (IGF-1) 释放来充当关键内分泌生长调节物。Okada 等人,2001,Trends in Molecular Medicine7(3):126-132。依次地,IGF-1 作用于组织以刺激机体生长。

[0003] GH 通过生长激素受体 (GHR) 发信号,是不含固有酪氨酸激酶活性的单次跨膜蛋白质。生长激素受体 (GHR) 是 1 类细胞因子受体。Waters 等人,2006,Journal of Molecular Endocrinology,36,1-7。GHR 发信号涉及至少三种主要途径 STATs、MAPK 和 PI3- 激酶 /Akt 的作用。GHR 发信号的目前理解是 GHR 作为组成性同二聚体存在,其中信号转导通过配体诱导的受体亚单位再排列。Brown, R. J. 等人,2005,Nature Struct. Mol. Biol. 12:814 - 821。目前, GH 结合通过其将失活的预二聚化 GHR 转化为其活性发信号构象的机制仍不明确。Yang 等人,2008, Mol. Endocrinol22(4):978-988。GH 与二聚化的 GHR 的相互作用通过 GH 上的两个不对称结合位点介导,所述结合位点各自具有不同亲和力。Yang 等人,2008。

[0004] GHR 是广泛分布的。虽然最初在肝组织中鉴定,但它们已知存在于肝、骨、肾、脂肪、肌肉、眼、脑和心脏,以及免疫组织如 B 细胞、淋巴细胞、脾和胸腺中。GHR 拮抗剂例如培维索孟 (SOMAVERT®) 已开发用作治疗例如肢端肥大症的药物 (Kopchick 等人,2002)。

[0005] 异常高的 GH 水平已与许多病症相关。直接由高水平 GH 引起的两类病症是肢端肥大症和巨人症。与肢端肥大症相关的变化包括体毛粗化、皮肤变厚和变黑、皮脂和汗腺的扩大和过度活性,从而使得患者经常抱怨过度出汗和令人不快的体臭、下颌骨过度生长、喉软骨增生引起声音低沉和舌肥大。此外,这些患者中的过量 GH 负责关节软骨的增生,所述关节软骨可以经历坏死和侵蚀以及引起周围神经病的神经内纤维增生。过量 GH 还增加肾小管磷酸盐重吸收,并且导致轻度高磷血症。这些症状中的许多也在具有巨人症的患者中可见。

[0006] 肢端肥大症和巨人症的目前治疗通常旨在通过破坏垂体或药物治疗降低血浆和 / 或组织中的 IGF-1 水平。IGF-1 在 GH 介导的病症例如肢端肥大症和巨人症中的作用得到充分公认。Melmed 等人,1994, Amer. J. Med. 97:468-473。

[0007] 肢端肥大症和巨人症的目前治疗包括垂体切除、放射治疗、甲磺酸溴隐亭、生长抑素类似物和培维索孟。垂体切除是手术操作,并且如同任何手术操作一样,与显著的并发

症危险包括死亡率相关。同样还存在与垂体的放射治疗相关的危险。另外,放射治疗的功效可能延迟数年。此外,这些治疗模式不特异性针对产生 GH 的垂体部分,并且同样可能不利地影响邻近组织。甲磺酸溴隐亭是多巴胺样药物,其抑制 GH 的产生。近来,奥曲肽,长效生长抑素类似物也已用于治疗具有肢端肥大症和巨人症的患者,所述患者对手术、放射和 / 或甲磺酸溴隐亭是抗拒的。生长抑素类似物长期抑制胰岛素分泌,并且与增加的胰岛素抗性、胰岛素分泌受损和糖尿病危险相关。Baldelli 等人,2003, Clin. Endocrinol. (Oxf). 59(4):492-499。培维索孟是包含重组产生的聚乙二醇化人 GH 类似物的 GH 拮抗剂。用培维索孟治疗目前涉及每日皮下给药。

[0008] 尽管抗人 GHR 抗体已得到描述,但难以鉴定这样的单克隆抗体,其与人灵长类 GH 两者特异性结合,是高度亲和力的,具有高特异性,并且具有有力的拮抗活性。

发明内容

[0009] 还与非人灵长类 GHR 特异性结合的针对人 GHR 的高亲和力拮抗剂抗体将制备优良的治疗试剂。与结合食蟹猴 GHR 偶联的高亲和力结合导致与培维索孟相比较减少的给药频率,没有对胰岛素分泌的作用,其可以用于这些结合结构域在灵长类中以及以相同形式在人中作为药物的安全、活性和 / 或药物代谢动力学概况的临床前评估。本发明涉及这样的拮抗剂抗体,其与人 GHR 选择性相互作用并抑制人 GHR 功能,并且还与食蟹猴 GHR 特异性结合。

[0010] 在一些实施方案中,本发明提供了分离的拮抗剂抗体,其与 GHR 相互作用,并且当施用于个体时,降低个体血浆和 / 或组织中的 IGF-1 水平。抗体可以是例如单克隆抗体或者人、人源化或嵌合抗体。

[0011] 在一些实施方案中,本发明提供了分离的 GHR 拮抗剂抗体,其与人灵长类 GHR 特异性结合,并且当施用于受试者时,降低所述受试者血液中的 IGF-1 水平。

[0012] 在一些实施方案中,GHR 拮抗剂抗体可以包含与单克隆抗体 SS1 竞争结合人 GHR 的抗原结合区。在一些实施方案中,GHR 拮抗剂抗体可以识别与由单克隆抗体 SS1 识别的人 GHR 上的表位相同或重叠的表位。在一些实施方案中,GHR 拮抗剂抗体可以以小于约 10nM 的平衡解离常数与人 GHR 结合。在一些实施方案中,抗体可以以小于约 250nM、小于约 100nM 或小于约 10nM 的平衡解离常数与人 GHR 结合。

[0013] 在一些实施方案中,GHR 拮抗剂抗体可以包含重链可变区和轻链可变区。

[0014] 在一些实施方案中,本发明提供了分离的 GHR 拮抗剂抗体,其与 GHR 特异性结合,并且包括包含 SEQ ID NO:1、15 或 16 的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 互补决定区一 (CDR1),包含 SEQ ID NO:114 或 115 的氨基酸序列的 VH CDR2,包含 SEQ ID NO:118 的氨基酸序列的 VH CDR3,包含 SEQ ID NO:99 的氨基酸序列的轻链可变区 (VL) CDR1,包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的 VL CDR2,和包含 SEQ ID NO:106 的氨基酸序列的 VL CDR3。

[0015] 在一些实施方案中,本发明提供了分离的 GHR 拮抗剂抗体,其与生长激素受体 (GHR) 特异性结合,并且包括包含 SEQ ID NO:8 的 VH 序列的 VH 互补决定区一 (CDR1)、VH CDR2 和 VH CDR3 的重链可变区 (VH);以及包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的轻链可变区 (VL)。

[0016] 在一些实施方案中,VL 可以包含 SEQ ID NO:7 的 VL 序列的 CDR1、VL CDR2 和 VL

CDR3。

[0017] 在一些实施方案中,抗体可以包括包含 SEQ ID NO :1、15 或 16 的氨基酸序列的 VH CDR1,包含 SEQ ID NO :2 或 17 的氨基酸序列的 VH CDR2,包含 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的 VH CDR3,包含 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列的 VL CDR1,包含 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列的 VL CDR2,和包含 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的 VL CDR3。

[0018] 在一些实施方案中,抗体可以包括包含 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列或其在并非 CDR 内的残基中具有一种或多种保守氨基酸置换的变体,或者包含 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列或其在并非 CDR 内的氨基酸中具有一个或多个氨基酸置换的变体。

[0019] 在一些实施方案中,抗体可以进一步包含免疫惰性恒定区。在一些实施方案中,抗体可以具有选自下述的同种型: IgG₂、IgG_{2Δa}、IgG₄、IgG_{4Δb}、IgG_{4Δc}、IgG₄S228P、IgG_{4Δb} S228P 和 IgG_{4Δc} S228P。在一些实施方案中,恒定区可以是无糖基化 Fc。

[0020] 在一些实施方案中,抗体可以包括包含 SEQ ID NO :134 或 133 的氨基酸序列的重链,和包含 SEQ ID NO :135 的氨基酸序列的轻链。

[0021] 本发明还提供了包含本文所述 GHR 拮抗剂抗体中的任一种的药物组合物。

[0022] 本发明还提供了重组产生本文所述 GHR 拮抗剂抗体中的任一种的细胞系。

[0023] 本发明还提供了编码本文所述 GHR 拮抗剂抗体中的任一种的核酸。本发明还提供了编码本文所述 GHR 拮抗剂抗体中的任一种的重链可变区和 / 或轻链可变区的核酸。

[0024] 本发明还提供了包含有效量的本文所述 GHR 拮抗剂抗体中的任一种的试剂盒。

[0025] 还提供的是用于鉴定与人和食蟹猴 GHR 特异性结合的抗体的方法。在一些实施方案中,该方法包括:使与人 GHR 特异性结合的抗体与包含 SEQ ID NO :145 的氨基酸序列的多肽接触,并且测定抗体与多肽的结合。在一些实施方案中,该方法可以进一步包括选择与 SEQ ID NO :145 的氨基酸序列特异性结合的抗体。在一些实施方案中,结合的测定可以使用例如 ELISA、生物传感器或亲和柱进行。

[0026] 还提供的是用于减少有此需要的个体血液中的胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 水平的方法,其包括给个体施用治疗有效量的本文所述 GHR 拮抗剂抗体中的任一种。还提供的是用于减少有此需要的个体血液中的 IGF-1 水平的 GHR 拮抗剂抗体。在一些实施方案中,与施用前的 IGF-1 水平相比较,IGF-1 水平减少至少约 40%。在一些实施方案中,与施用前的 IGF-1 水平相比较,IGF-1 水平减少至少约 60%。

[0027] 在一些实施方案中,GHR 拮抗剂抗体可以肠胃外施用。

[0028] 还提供的是用于治疗与个体中的过量 IGF-1 表达相关的疾病的方法,其包括给有此需要的受试者施用有效量的本文所述 GHR 拮抗剂抗体中的任一种。还提供的是用于治疗或预防与过量 IGF-1 相关的疾病的 GHR 拮抗剂抗体。在一些实施方案中,疾病是肢端肥大症。在一些实施方案中,疾病是巨人症。在一些实施方案中,疾病是糖尿病肾病。在一些实施方案中,疾病是关节炎。在一些实施方案中,疾病是肺炎症。

[0029] 在一些实施方案中,疾病是癌症。在一些实施方案中,癌症选自膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、成胶质细胞瘤、头与颈癌、肾癌、口癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。皮肤癌可以是例如黑素瘤。

[0030] 在一些实施方案中,本发明提供了抑制具有肿瘤的个体中的肿瘤生长或进展的方法,其包括给有此需要的受试者施用有效量的本文所述 GHR 拮抗剂抗体中的任一种。还提

供的是用于抑制具有肿瘤的个体中的肿瘤生长或进展 GHR 拮抗剂抗体。

[0031] 在一些实施方案中,本发明提供了抑制个体中的癌细胞转移的方法,其包括给有此需要的受试者施用有效量的本文所述 GHR 拮抗剂抗体中的任一种。还提供的是用于抑制癌细胞转移的 GHR 拮抗剂抗体。

[0032] 在一些实施方案中,本发明提供了诱导具有肿瘤的个体中的肿瘤消退的方法,其包括给有此需要的受试者施用本文所述 GHR 拮抗剂抗体中的任一种。还提供的是用于诱导肿瘤消退的 GHR 拮抗剂抗体。

具体实施方式

[0033] 本发明涉及拮抗细胞外 GHR 功能包括其与 GH 的相互作用的抗体、肽和适体。更具体而言,本发明涉及制备拮抗剂 GHR 抗体的方法,包含这些抗体的组合物,和使用这些抗体作为药剂的方法。拮抗剂 GHR 抗体可以用于降低血浆 IGF-1 水平,并且可以用于预防和/或治疗 GH 相关病症,包括例如巨人症、肢端肥大症、糖尿病肾病、关节炎、肺炎症和某些癌症。

[0034] 一般技术

[0035] 除非另有说明,否则本发明的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,其在本领域的技术内。此类技术在文献中完全说明,例如 Molecular Cloning :A Laboratory Manual, second edition(Sambrook 等人,1989)Cold Spring Harbor Press ;Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait, 编辑, 1984) ;Methods in Molecular Biology, Humana Press ;Cell Biology :A Laboratory Notebook(J. E. Cellis, 编辑,1998)Academic Press ;Animal Cell Culture(R. I. Freshney, 编辑,1987) ;Introduction to Cell and Tissue Culture(J. P. Mather 和 P. E. Roberts,1998)Plenum Press ;Cell and Tissue Culture :Laboratory Procedures(A. Doyle, J. B. Griffiths 和 D. G. Newell, 编辑,1993-1998)J. Wiley and Sons ;Methods in Enzymology(Academic Press, Inc.) ;Handbook of Experimental Immunology(D. M. Weir 和 C. C. Blackwell, 编辑) ;Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J. M. Miller 和 M. P. Calos, 编辑,1987) ;Current Protocols in Molecular Biology(F. M. Ausubel 等人, 编辑,1987) ;PCR :The Polymerase Chain Reaction, (Mullis 等人, 编辑,1994) ;Current Protocols in Immunology(J. E. Coligan 等人, 编辑,1991) ;Short Protocols in Molecular Biology(Wiley 和 Sons,1999) ;Immunobiology(C. A. Janeway 和 P. Travers, 1997) ;Antibodies(P. Finch,1997) ;Antibodies :a practical approach(D. Catty., 编辑, IRL Press,1988-1989) ;Monoclonal antibodies :a practical approach(P. Shepherd 和 C. Dean, 编辑, Oxford University Press,2000) ;Using antibodies :a laboratory manual(E. Harlow 和 D. Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999) ;The Antibodies(M. Zanetti 和 J. D. Capra, 编辑, Harwood Academic Publishers,1995)。

[0036] 定义

[0037] 除非另有说明,否则下述术语应理解为具有下述含义:术语“分离的分子”(当分子是例如多肽、多核苷酸或抗体时)是这样的分子,由于其衍生起源或来源,其(1)不与其天然状态下伴随其的天然结合的组分结合,(2)基本上不含来自相同物种的其他分子,(3)由来自不同物种的分子表达,或(4)在自然界中不存在。因此,化学合成或在不同于它

天然源自其的细胞的细胞系统中表达的分子将是与其天然结合的组分“分离的”。使用本领域众所周知的纯化技术,分子还可以通过分离致使基本上不含天然结合的组分。分子纯度或同质性可以通过本领域众所周知的许多方法进行评价。例如,多肽样品的纯度可以使用聚丙烯酰胺凝胶电泳和凝胶的染色进行测定,以使用本领域众所周知的技术显现多肽。对于某些目的,更高的分辨率可以使用 HPLC 或本领域众所周知的用于纯化的其他方法提供。

[0038] “抗体”是通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点能够与靶特异性结合的免疫球蛋白分子,所述靶例如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等。如本文使用的,该术语不仅包含完整的多克隆或单克隆抗体,还包含(除非另有说明)其与完整抗体竞争特异性结合的任何抗原结合部分,(除非另有说明)包含抗原结合部分的融合蛋白,和包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子的其他修饰配置。抗原结合部分包括例如但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、结构域抗体(dAb,例如鲨鱼和骆驼科抗体)、包括互补决定区(CDR)的片段、单链可变片段抗体(ScFv)、大型抗体(maxibodies)、微型抗体、细胞内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR 和 bis-scFv、和含有免疫球蛋白的至少部分的多肽,所述部分足以对多肽赋予特异性抗原结合。抗体包括任何种类的抗体,例如 IgG、IgA 或 IgM(或其亚类),并且抗体无需具有任何特定种类。取决于其重链恒定区的抗体氨基酸序列,免疫球蛋白可以指定至不同种类。存在五个主要的免疫球蛋白种类:IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,并且这些中的几个可以再分成亚类(同种型),例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 和 IgA₂。对应于免疫球蛋白的不同种类的重链恒定区分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。免疫球蛋白的不同种类的亚单位结构和三维构型是众所周知的。

[0039] 抗体的“可变区”指单独或组合的抗体轻链的可变区和抗体重链的可变区。如本领域已知的,重和轻链的可变区各自自由通过三个互补决定区(CDR)(也称为高变区)连接的四个构架区(FR),并且促成抗体的抗原结合位点形成。如果主题可变区的变体是希望的,特别是具有在 CDR 区外(即,在构架区中)的氨基酸残基中的置换,则适当的氨基酸置换优选保守氨基酸置换可以通过比较主题可变区与其他抗体的可变区进行鉴定,所述其他抗体含有在与主题可变区相同的经典种类中的 CDR1 和 CDR2 序列(Chothia 和 Lesk, J Mol Biol 196(4):901-917, 1987)。

[0040] 如本领域已知的,抗体的“恒定区”指单独或组合的抗体轻链的恒定区或抗体重链的恒定区。

[0041] 可变区结构域的“互补决定区”或“CDR”是在可变区内的氨基酸残基,其依照 Kabat 的定义、Chothia、Kabat、Chothia 两者的积累、扩展、AbM、接触和/或构象定义或本领域众所周知的 CDR 测定的任何方法进行鉴定。抗体 CDR 可以鉴定为最初由 Kabat 等人定义的高变区。参见例如 Kabat 等人,1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, NIH, Washington D.C. CDR 的位置还可以鉴定为最初由 Chothia 及其他人描述的结构。参见例如 Chothia 等人,1989, Nature 342:877-883。其他 CDR 鉴定方法包括“AbM 定义”,其是 Kabat 和 Chothia 之间的妥协,并且使用 Oxford Molecular 的 AbM 抗体建模软件(现在的 Accelrys®)衍生,或 MacCallum 等人,1996, J. Mol. Biol., 262:732-745 中所述的,基于观察到的抗原接触的 CDR 的“接触定义”。在本文被称为 CDR 的“构象定义”的另一种方法中, CDR 的位置可以鉴定为对抗原结合作出焓贡献的残基。参见例如 Makabe 等人,2008, Journal of Biological

Chemistry, 283:1156-1166。另外其他的 CDR 边界定义可能不严格遵循上述方法之一,然而,将与 Kabat CDR 的至少部分重叠,尽管它们可能根据特定残基或残基组不显著影响抗原结合的预测或实验发现而缩短或加长。如本文使用的,CDR 可以指通过本领域已知的任何方法包括方法的组合限定的 CDR。本文使用的方法可以利用根据这些方法中的任一种限定的 CDR。对于含有超过一个 CDR 的任何给定实施方案,CDR 可以依照 Kabat、Chothia、扩展、AbM、接触和 / 或构象定义中的任一种进行限定。

[0042] 术语“单克隆抗体”(Mab) 指衍生自单个拷贝或克隆,包括例如任何真核、原核或噬菌体克隆的抗体,而不是它通过其产生的方法。优选地,本发明的单克隆抗体存在于均质或基本上均质的群体中。

[0043] 如本文使用的,“人源化”抗体指其为嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链、或其片段(例如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗体的其他抗原结合序列)的非人(例如鼠)抗体形式,其含有衍生自非人免疫球蛋白的最低限度序列。优选地,人源化抗体是这样的人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体 CDR 的残基替换为具有所需特异性、亲和力和能力的来自非人物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠或兔的 CDR 残基。

[0044] “人抗体”是具有氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列对应于由人产生的抗体的那种和 / 或已使用用于制备如本文公开的人抗体的技术中的任一种制备。人抗体的人定义特别排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0045] 术语“嵌合抗体”意指其中可变区序列衍生自一个物种并且恒定区序列衍生自另一个物种的抗体,例如其中可变区序列衍生自小鼠抗体并且恒定区序列衍生自人抗体的抗体。

[0046] 术语“表位”指能够在抗体的抗原结合区的一个或多个处由抗体识别并结合的分子部分。表位通常由分子例如氨基酸或糖侧链的表面分组组成,并且具有特异性三维结构特征以及比电荷特征。在一些实施方案中,表位可以是蛋白质表位。蛋白质表位可以是线性或构象的。在线性表位中,蛋白质和相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用点沿蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。“非线性表位”或“构象表位”包含在抗体与表位特异性结合的抗原蛋白质内的非邻接多肽(或氨基酸)。如本文使用的术语“抗原表位”定义为抗体可以与之特异性结合的抗原部分,如通过本领域众所周知的任何方法例如通过常规免疫测定法测定的。一旦测定在抗原上的所需表位,就能够例如使用在本说明书中描述的技术生成针对该表位的抗体。可替代地,在开发过程期间,抗体的生成和表征可以阐明关于期望表位的信息。根据该信息,随后能够竞争筛选与相同表位结合的抗体。实现这点的的方法是构建竞争和交叉竞争研究,以找到彼此竞争或交叉竞争结合 GHR 的抗体,例如竞争结合抗原的抗体。

[0047] 如本文使用的,术语“GHR”指任何形式的 GHR 及其保留 GHR 活性的至少部分的变体。除非另有说明,例如通过特别提及人 GHR, GHR 包括 GHR 的哺乳动物物种,例如人、犬、猫、马和牛的所有天然序列。一种示例性 GHR 作为 Genbank 登记号 AAA52555 (SEQ ID NO :140) 发现。

[0048] 如本文使用的,“GHR 拮抗剂抗体”指能够抑制 GHR 生物活性和 / 或由 GHR 发信号介导的一个或多个下游途径的抗体。GHR 拮抗剂抗体包含这样的抗体,其阻断、拮抗、抑制或减少(至任何程度包括显著程度)GHR 生物活性,包括由 GHR 发信号介导的下游途径,例如

GH 相互作用和 / 或针对 GH 的细胞应答的引发。为了本发明的目的,应明确理解术语“GHR 拮抗剂抗体”包含所有先前鉴定的形式、标题以及功能状态和特征,由此 GHR 自身、GHR 生物活性(包括但不限于其介导胰岛素样生长因子-1(IGF-1)表达的任何方面的能力)、或生物活性的结果以任何有意义的程度基本上无效、降低或中和。在一些实施方案中,GHR 拮抗剂抗体结合 GHR 并阻止与 GH 的相互作用。在一些实施方案中,GHR 拮抗剂抗体结合 GHR 并阻止 GHR 二聚化。GHR 拮抗剂抗体的例子在本文中提供。

[0049] 如本文使用的,术语“临床上有意义的”意指人中的血清 IGF-1 水平的至少 15% 或小鼠中的总血清 IGF-1 的至少 15% 减少。明确的是在血浆或血清中的测量可以充当血液中的水平测量的替代物。

[0050] 术语“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,以指任何长度,优选相对短(例如 10-100 个氨基酸)的氨基酸链。链可以是线性或分支的,它可以包含经修饰的氨基酸,和 / 或可以由非氨基酸间断。该术语还包含已天然或通过干预进行修饰的氨基酸链;例如二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰,例如与标记组分缀合。还包括在该定义内的是例如含有氨基酸的一种或多种类似物(包括例如非天然氨基酸等),以及本领域已知的其他修饰的多肽。应当理解多肽可以作为单链或结合链存在。

[0051] 如本领域已知的,如本文可互换使用的,“多核苷酸”或“核酸”指任何长度的核苷酸链,并且包括 DNA 和 RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基、和 / 或其类似物、或可以通过 DNA 或 RNA 聚合酶掺入链内的任何底物。多核苷酸可以包含经修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸及其类似物。如果存在的话,对核苷酸结构的修饰可以在链装配之前或之后赋予。核苷酸的序列可以通过非核苷酸组分间断。多核苷酸可以进一步在聚合后例如通过与标记组分缀合进行修饰。其他类型的修饰包括例如“帽”、天然存在的核苷酸中的一种或多种由类似物的置换、核苷酸间修饰例如具有不带电连接(例如甲基膦酸酯、磷酸三酯、亚磷酰胺(phosphoramidates)、氨基甲酸酯等)和具有带电连接(例如硫代硫酸酯、二硫代硫酸酯等)的那些、含有悬垂部分例如蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚 L-赖氨酸等)的那些、具有嵌合剂(例如吡啶、补骨脂素等)的那些、含有螯合剂的那些(例如金属、放射性金属、硼、氧化金属等)、含有烷化剂的那些、具有经修饰的连接(例如 α 异头核酸等)的那些,以及未经修饰形式的一种或多种多核苷酸。进一步地,糖中最初存在的羟基中的任一个均可以例如替换为膦酸基、磷酸基,由标准保护基团保护,或活化以制备与另外核苷酸的另外连接,或可以与固体载体缀合。5' 和 3' 末端 OH 可以是磷酸化的,或由胺或 1-20 个碳原子的有机封端基团部分取代。其他羟基还可以衍生为标准保护基团。多核苷酸还可以含有本领域一般已知的核糖或脱氧核糖的类似形式,包括例如 2'-O-甲基-、2'-O-烷基-、2'-氟或 2'-叠氮基-核糖、碳环糖类类似物、 α 或 β 异头糖、差向异构糖例如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物和无碱基核苷类似物例如甲基核苷。一种或多种磷酸二酯连接可以替换为可替代的连接基团。这些可替代的连接基团包括但不限于这样的实施方案,其中磷酸酯替换为 P(O)S(“硫代酸酯”)、P(S)S(“二硫代酸酯”)、(O)NR₂(“酰胺酯”)、P(O)R、P(O)OR'、CO 或 CH₂(“甲缩醛”),其中每个 R 或 R' 独立地是 H 或者取代或未取代的任选含有酯(-O-)连接的烷基(1-20C)、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳醛基(araldyl)。并非多核苷酸中的所有连接都必须是相同的。

先前描述适用于本文提及的所有多核苷酸,包括 RNA 和 DNA。

[0052] 如本文使用的,当如通过本文实施例 2 中公开的方法测量的,平衡解离常数等于或小于 20nM、优选小于约 6nM、更优选小于约 1nM、最优选小于约 0.2nM 时,抗体与 GHR “相互作用”。

[0053] 与表位“优先结合”或“特异性结合”(在本文中可互换使用)的抗体是本领域充分理解的术语,并且测定此类特异性或优先结合的方法也是本领域众所周知的。如果与分子和可替代细胞或物质的结合相比较,它与特定细胞或物质更频繁、更快速、以更大持续时间和/或更大亲和力反应或结合,则它被说成显示出“特异性结合”或“优先结合”。如果与抗体和其他物质的结合相比较,它以更大的亲和力、亲合力、更快速和/或以更大持续时间与靶结合,则它与靶“特异性结合”或“优先结合”。例如,与 GHR 表位特异性或优先结合的抗体是这样的抗体,与它和其他 GHR 表位或非 GHR 表位的结合相比较,它以更大的亲和力、亲合力、更快速和/或以更大持续时间与该表位结合。通过阅读该定义还应当理解,例如与第一靶特异性或优先结合的抗体(或部分或表位)可以与第二靶特异性或优先结合或者不特异性或优先结合。像这样,“特异性结合”或“优先结合”不一定要求(尽管它可以包括)专一结合。一般地但不一定,提及结合意指优先结合。

[0054] 如本文使用的,“基本上纯的”指至少 50% 纯(即不含污染物),更优选地,至少 90% 纯,更优选地,至少 95% 纯,再更优选地,至少 98% 纯,和最优选地至少 99% 纯的材料。

[0055] “宿主细胞”包括可以是或已经是用于掺入多核苷酸插入片段的一种或多种载体的接受者的个别细胞或细胞培养物。宿主细胞包括单一宿主细胞的后代,并且由于天然、偶然或有意突变,后代可以不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态中或在基因组 DNA 互补体中)。宿主细胞包括在体内由本发明的一种或多种多核苷酸转染的细胞。

[0056] 如本领域已知的,术语“Fc 区”用于限定免疫球蛋白重链的 C 末端区。“Fc 区”可以是天然序列 Fc 区或变体 Fc 区。尽管免疫球蛋白重链的 Fc 区的边界可以改变,但人 IgG 重链 Fc 区通常限定为从在位置 Cys226 处的氨基酸残基或从 Pro230 拉伸到其羧基末端。Fc 区中的残基编号是如 Kabat. Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991 中的 EU 指数的那种。免疫球蛋白的 Fc 区一般包括两个恒定结构域 CH2 和 CH3。如本领域已知的, Fc 区可以以二聚或单体形式存在。如本领域已知的, Fc 区可以以二聚或单体形式存在。

[0057] 如本领域已知的,“Fc 受体”和“FcR”描述与抗体的 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是天然序列人 FcR。此外,优选的 FcR 是结合 IgG 抗体(γ 受体)的 FcR,并且包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA(“活化受体”)和 Fc γ RIIB(“抑制受体”),其具有主要在其细胞质结构域中不同的相似的氨基酸序列。FcR 在 Ravetch 和 Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92; Capel 等人, 1994, Immunomethods, 4:25-34; 和 de Haas 等人, 1995, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 中综述。“FcR”还包括新生儿受体, FcRn, 其负责母源 IgG 对胎儿的转移(Guyer 等人, 1976, J. Immunol., 117:587; 和 Kim 等人, 1994, J. Immunol., 24:249)。

[0058] 如本文所用的,就抗体而言的术语“竞争”意指第一抗体或其抗原结合部分与表位结合的方式充分类似于第二抗体或其抗原结合部分的结合,从而使得与不存在第二抗体

的情况下的第一抗体结合相比较,第一抗体与其同源表位的结合结果在第二抗体的存在下可检测地降低。其中第二抗体与其表位的结合也在第一抗体的存在下可检测地降低的替代方案可以是但无需是这种情况。即,第一抗体可以抑制第二抗体与其表位的结合,而第二抗体无需抑制第一抗体与其各自适体的结合。然而,当每种抗体可检测地抑制其他抗体与其同源表位或配体的结合时,无论程度相同、更大还是更小,抗体都被说成彼此“交叉竞争”结合其各自的一个或多个表位。竞争和交叉竞争抗体均由本发明包含。与此类竞争或交叉竞争通过其发生的机制(例如立体阻碍、构象变化或与共同表位或其部分结合)无关,技术人员应当理解,基于本文提供的教导,包含此类竞争和/或交叉竞争抗体,并且可以用于本文公开的方法。

[0059] “功能 Fc 区”具有天然序列 Fc 区的至少一种效应子功能。示例性“效应子功能”包括 C1q 结合;补体依赖性细胞毒性;Fc 受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性;吞噬作用;细胞表面受体(例如 B 细胞受体)的下调等。此类效应子功能一般要求 Fc 区与结合结构域(例如抗体可变结构域)组合,并且可以使用本领域已知的用于评估此类抗体效应子功能的多种测定法进行评价。

[0060] “天然序列 Fc 区”包含与自然界中发现的 Fc 区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。“变体 Fc 区”包含这样的氨基酸序列,其由于至少一种氨基酸修饰不同于天然序列 Fc 区的那种,仍保留天然序列 Fc 区的至少一种效应子功能。优选地,变体 Fc 区具有与天然序列 Fc 区或亲本序列的 Fc 区相比较的至少一个氨基酸置换,例如在天然序列 Fc 区或亲本多肽的 Fc 区中的约一至约十个氨基酸置换,和优选地约一至约五个氨基酸置换。变体 Fc 区在本文中将优选具有与天然序列 Fc 区和/或与亲本多肽的 Fc 区的至少约 80%序列同一性,并且最优选地,与之至少约 90%序列同一性,更优选地,与之至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%序列同一性。

[0061] 如本文使用的,“治疗”是用于获得有利或所需临床结果的方法。为了本发明的目的,有利或所需临床结果包括但不限于下述中的一种或多种:减少起因于过量 GH 产生的异常 IGF-1 水平的发生或改善,和减少肢端肥大症、巨人症或癌症的一种或多种症状的发生或改善。GH 的过度产生通过例如垂体腺瘤或另一种非垂体肿瘤包括肺、胰腺、肾上腺或脑的其他部分的肿瘤引起。

[0062] “减少发生”意指减少严重性(其可以包括减少其他药物和/或一般用于该状况的治疗的需要和/或量(例如暴露于),减少持续时间和/或减少频率中的任一种。如本领域技术人员应当理解的,个体可以在其对抗治疗的应答方面改变,并且像这样,例如“减少发生的方法”反映基于下述合理预期施用 α -毒素拮抗剂抗体:此类施用可能引起特定个体中的发生中的此类减少。

[0063] “改善”意指与未施用 GHR 拮抗剂抗体相比较,一种或多种症状的减轻或改进。“改善”还包括症状持续时间中的缩短或减少。

[0064] 如本文使用的,药物、化合物或药物组合物的“有效剂量”或“有效量”是足以实现任何一种或多种有利或所需结果的量。对于预防用途,有利或所需结果包括消除或减少疾病的危险,减轻疾病的严重性,或延迟疾病的开始,包括疾病的生物化学、组织学和/或行为症状、其并发症和在疾病发展过程中呈现的中间病理学表型。对于治疗用途,有利或所需结果包括临床结果例如减少血清 IGF-1 水平或肢端肥大症、巨人症或癌症的一种或多种症

状,降低治疗疾病所需的其他药剂的剂量,增强另一种药剂的效应,和/或延迟患者疾病的进展。有效剂量可以在一次或多次施用中施用。为了本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效剂量是足以直接或间接实现预防或治疗性处理的量。如在临床背景下应当理解的,药物、化合物或药物组合物的有效剂量可以与另一种药物、化合物或药物组合物结合或不结合实现。因此,“有效剂量”可以在施用一种或多种治疗试剂的背景下考虑,并且单一试剂可以考虑以有效量给予,如果与一种或多种其他试剂结合,可以或实现期望结果。

[0065] “个体”或“受试者”是哺乳动物,更优选地,人。哺乳动物还包括但不限于农场动物、运动动物、宠物、灵长类、马、犬、猫、小鼠和大鼠。

[0066] 如本文使用的,“载体”意指构建体,其能够在宿主细胞中递送并优选表达一种或多种目的基因和/或一种或多种序列。载体的例子包括但不限于病毒载体、裸露 DNA 或 RNA 表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂相关的 DNA 或 RNA 表达载体、封装在脂质体中的 DNA 或 RNA 表达载体、和某些真核细胞例如生产细胞。

[0067] 如本文使用的,“表达控制序列”意指指导核酸转录的核酸序列。表达控制序列可以是启动子,例如组成性或诱导型启动子,或增强子。表达控制序列与待转录的核酸序列可操作地连接。

[0068] 如本文使用的,“药学可接受的载体”或“药学可接受的赋形剂”包括任何材料,当与活性成分组合时,所述材料允许成分保留生物活性并且与受试者的免疫系统不反应。例子包括但不限于标准药学载体中的任一种,例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳状液例如油/水乳状液、和多种类型的湿润剂。用于气溶胶或肠胃外施用的优选稀释剂是磷酸盐缓冲盐水(PBS)或生理(0.9%)盐水。包含此类载体的组合物通过众所周知的常规方法进行配制(参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences,第 18 版, A. Gennaro, 编辑, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; 和 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第 20 版, Mack Publishing, 2000)。

[0069] 如本文使用的,术语“ k_{on} ”指抗体与抗原结合的速率常数。具体地,速率常数(k_{on} 和 k_{off})和平衡解离常数使用全长和/或 Fab 抗体片段(即单价)和 GHR 进行测量。

[0070] 如本文使用的,术语“ k_{off} ”指抗体从抗体/抗原复合物中解离的速率常数。

[0071] 如本文使用的,术语“ K_D ”指抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0072] 本文提及“约”值或参数包括(并描述)涉及该值或参数本身的实施方案。例如,提及“约 X”的描述包括“X”的描述。数目范围包括限定该范围的数目在内。

[0073] 应当理解无论本文用语言“包含”描述了什么实施方案,还提供了以“由……组成”和/或“基本上由……组成”的方式描述的在其他方面相似的实施方案。

[0074] 当本发明的方面或实施方案就 Markush 组或其他替代方案分组而言进行描述时,本发明不仅包含作为整体列出的整个组,还包括个别的组的每个成员和主要组的所有可能亚组,以及不存在一个或多个组成员的主要组。本发明还设想了在本发明的任一个组成员中的一个或多个的明确排除。

[0075] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解相同的含义。在冲突的情况下,以本说明书包括定义为准。本说明书和权利要求自始至终,单词“包含”或变化应理解为暗示所述整数或整数组的包括,但不排除任何其他整数或整数组。除非上下文另有说明,单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。

在术语“例如”后的任何例子不意欲是详尽的或限制性的。

[0076] 尽管在本文中描述了示例性方法和材料,但与本文描述的那些相似或相等的方法和材料也可以用于本发明的实践或测试中。材料、方法和例子仅是举例说明性的并且不预期是限制性的。

[0077] 用于预防或治疗与过量 IGF-1 相关的病症的方法

[0078] 在一个方面,本发明提供了用于治疗或预防与个体中的过量 IGF-1 相关的病症的至少一种症状的方法,其包括给个体施用有效量的 GHR 拮抗剂抗体。在一些实施方案中,病症是肢端肥大症。在其他实施方案中,病症是巨人症。在其他实施方案中,病症是癌症。

[0079] 在一些实施方案中,方法可以涉及鉴定处于与过量 IGF-1 相关的疾病危险中的个体。另外,方法可以包括就与过量 IGF-1 相关的疾病的危险因素评估个体,就与过量 IGF-1 相关的疾病症状评估个体,或就与过量 IGF-1 相关的疾病诊断个体。在某些实施方案中,方法可以涉及其中疾病是肢端肥大症、巨人症或癌症的实现步骤。

[0080] 有利地,抗体的治疗施用导致更低的血液 IGF-1。优选地,血液 IGF-1 比施用前低至少约 10%。更优选地,血液 IGF-1 比抗体施用前低至少约 15%。更优选地,血液 IGF-1 比抗体施用前低至少约 20%。再更优选地,血液 IGF-1 比抗体施用前低至少约 30%。有利地,血液 IGF-1 比抗体施用前低至少约 40%。更有利地,血液 IGF-1 比抗体施用前低至少约 50%。非常优选地,血液 IGF-1 比抗体施用前低至少约 60%。最优选地,血液 IGF-1 比抗体施用前低至少约 70%。

[0081] 在一些实施方案中,GHR 拮抗剂抗体的治疗施用有利地导致肢端肥大症的一种或多种症状的减少发生和/或改善,所述症状包括例如但不限于过量 IGF-1 水平、过度出汗、令人不快的体臭、皮肤变厚、皮肤变黑、油性皮肤、小皮长出(皮赘)、疲劳、肌无力、由于扩大的声带和窦和/或喉软骨增生的声音低沉、严重打鼾、睡眠呼吸暂停、视力受损、头痛、巨舌、背痛、关节疼痛、关节活动受限、月经周期不规律、性欲降低、勃起功能障碍、手增大、足增大、更大和变宽的面部特征、下颌突出因此下颌牙延伸超过上面的(咬牙不正(underbite))、肝增大、心脏增大、肾增大、脾增大、胸部大小增加(桶状胸)、增加的粗体毛、饮食中的糖的不适当加工、糖尿病、高血压、尿中的钙增加、肾脏结石、胆结石、甲状腺膨胀(甲状腺肿)、心脏病、关节炎、结肠中的癌前生长(息肉)、腕管综合征、垂体机能减退、子宫肌瘤、周围神经病产生的神经内纤维增生、增生的关节软骨的坏死/或侵蚀、高磷血症和脊髓压迫症。

[0082] 患有肢端肥大症的个体可以用 GHR 拮抗剂抗体进行治疗。使用本领域众所周知的肢端肥大症的临床标准和预后指标,选择适合于 GHR 拮抗剂抗体治疗的个体。肢端肥大症的诊断或评价是本领域充分确定的。肢端肥大症严重性的评价可以基于本领域已知的测试进行,所述测试包括例如但不限于,血液 IGF-1 水平的测量,在口服葡萄糖攻击之前和之后的生长激素测量,和脑磁共振成像(MRI)以检测垂体肿瘤。在一些实施方案中,通过测试血液 IGF-1 水平测量改善肢端肥大症和/或肢端肥大症的症状,控制肢端肥大症和/或肢端肥大症的症状,减少肢端肥大症和/或肢端肥大症的症状的发生,或延迟肢端肥大症和/或肢端肥大症的症状的发展或进展。

[0083] 在一些实施方案中,GHR 拮抗剂抗体的治疗施用有利地导致巨人症的一种或多种症状的减少发生和/或改善,所述症状包括例如但不限于过量 IGF-1 水平、身高中的过度生

长、过度肌肉生长、过度器官生长、青春期延迟、复视、周边视觉困难、额部隆起、下颌突出、头痛、出汗增加经期紊乱、大手、大足、手指增厚、脚趾增厚、母乳释放、面部特征增厚、虚弱、肾上腺功能不全、尿崩症、性腺机能减退和甲状腺机能减退。

[0084] 患有巨人症的个体可以用 GHR 拮抗剂抗体进行治疗。使用本领域众所周知的巨人症的临床标准和预后指标,选择适合于 GHR 拮抗剂抗体治疗的个体。巨人症的诊断或评价是本领域充分确定的。巨人症严重性的评价可以基于本领域已知的测试进行,所述测试包括例如但不限于,头部计算机断层扫描 (CT) 或 MRI 扫描以检测垂体肿瘤,在口服葡萄糖攻击之前和之后的生长激素测量,血液催乳素水平的测量,血液 IGF-1 水平的测量,血液皮质醇水平的测量,血液雌二醇水平的测量,血液睾酮水平的测量和甲状腺激素水平的测量。在一些实施方案中,通过测量血液 IGF-1 水平测量改善巨人症和 / 或巨人症的症状,控制巨人症和 / 或巨人症的症状,减少巨人症和 / 或巨人症的症状的发生,或延迟巨人症和 / 或巨人症的症状的发展或进展。

[0085] 就本文描述的所有方法而言,提及 GHR 拮抗剂抗体还包括包含一种或多种另外试剂的组合物。这些组合物可以进一步包含合适的赋形剂例如药学可接受的赋形剂,包括本领域众所周知的缓冲液。本发明可以单独或与其他常规治疗方法组合使用。

[0086] GHR 拮抗剂抗体可以经由任何合适途径施用于个体。对于本领域普通技术人员显而易见的是本文描述的例子不预期是限制性的,而是可用技术的举例说明。相应地,在一些实施方案中, GHR 拮抗剂抗体依照已知方法施用于个体,所述已知方法例如静脉内施用,例如作为推注或作为经过一段时间的连续输注,通过肌内、腹膜内、脑脊髓内、经皮、皮下、关节内、舌下、滑膜内、经由吸入、鞘内、经口、吸入或局部途径。施用可以是全身的例如静脉内施用或局部的。商购可得的用于液体制剂的雾化器包括喷射雾化器和超声雾化器可用于施用。液体制剂可以直接雾化,并且冻干粉末可以在重构后雾化。可替代地, GHR 拮抗剂抗体可以使用碳氟化合物和计量吸入器气溶胶化,或作为冻干和磨碎粉末吸入。

[0087] 在一些实施方案中, GHR 拮抗剂抗体经由位点特异性或靶向局部递送技术进行施用。位点特异性或靶向局部递送技术的例子包括 GHR 拮抗剂抗体的多个可植入的储存来源或局部递送导管,例如输注导管、留置导管或套针、合成移植物、外膜包裹、分流器和支架或其他可植入装置、位点特异性载体、直接注射或直接应用。参见例如 PCT 公开号 WO 00/53211 和美国专利号 5,981,568。

[0088] GHR 拮抗剂抗体的多种制剂可以用于施用。在一些实施方案中, GHR 拮抗剂抗体可以纯 (neat) 施用。在一些实施方案中, GHR 拮抗剂抗体和药学可接受的赋形剂可以采取多种制剂的形式。药学可接受的赋形剂是本领域已知的,并且是促进药理学有效物质的施用的相对惰性的物质。例如,赋形剂可以给予形式或稠度,或充当稀释剂。合适的赋形剂包括但不限于稳定剂、湿润剂和乳化剂、用于改变渗透压的盐、封装剂、缓冲液和皮肤渗透增强剂。赋形剂以及用于肠胃外和非肠胃外药物递送的制剂在 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第 20 版 Mack Publishing(2000) 中阐述。

[0089] 在一些实施方案中,这些试剂配制用于通过注射 (例如腹膜内、静脉内、皮下、肌内等) 施用。相应地,这些试剂可以与药学可接受的媒介物例如盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液等等组合。特定剂量方案即剂量、定时和重复将取决于特定个体和个体的医疗史。

[0090] GHR 拮抗剂抗体可以使用任何合适的方法包括通过注射 (例如腹膜内、静脉内、皮

下、肌内等)进行施用。如本文描述的, GHR 抗体还可以经由吸入进行施用。一般地, 对于 GHR 抗体的施用, 初始候选剂量可以是约 2mg/kg。为了本发明的目的, 通常的日剂量可以范围为约 3 μ g/kg 至 30 μ g/kg 至 300 μ g/kg 至 3mg/kg、至 30mg/kg、至 100mg/kg 或更多中的任一种, 取决于上文提及的因素。例如, 可以使用约 1mg/kg、约 2.5mg/kg、约 5mg/kg、约 10mg/kg 和约 25mg/kg 的剂量。对于经过几天或更长时间的重复施用, 取决于状况, 治疗持续直至所需症状抑制发生或直至实现足够的治疗水平, 例如以减少血液 IGF-1 水平。示例性给药方案包括施用约 2mg/kg 的初始剂量, 随后为每周一次约 1mg/kg 的 GHR 抗体维持剂量, 或随后为每隔一周约 1mg/kg 的维持剂量。然而, 其他剂量方案可以是有用的, 取决于从业者希望实现的药物代谢动力学衰变模式。例如, 在一些实施方案中, 考虑了从每周一次到四次的给药。在其他实施方案中, 考虑了每月一次或每隔一个月一次或每三个月一次的给药。该治疗的进展容易地通过常规技术和测定法进行监控。给药方案(包括使用的 GHR 拮抗剂抗体)可以随着时间过去而改变。

[0091] 为了本发明的目的, GHR 拮抗剂抗体的适当剂量将取决于采用的 GHR 拮抗剂抗体(或其组合物)、待治疗症状的类型和严重性、试剂是施用用于预防还是治疗目的、先前治疗、患者的临床史和对试剂的应答、患者的血液 IGF-1 水平、患者的 IGF-1 合成和清除率、患者对于施用试剂的清除率、和主治医生的判断。通常, 临床医生将施用 GHR 拮抗剂抗体直至达到实现所需结果的剂量。剂量和/或频率可以经过治疗过程而改变。经验考虑例如半衰期一般将促成剂量的决定。例如, 与免疫系统相容的抗体例如人源化抗体或全人抗体可以用于延长抗体的半衰期, 并且预防抗体被宿主的免疫系统攻击。施用频率可以进行测定并经过治疗过程进行调整, 并且一般但不一定基于治疗和/或症状例如过量 IGF-1 水平的抑制和/或改善和/或延迟。可替代地, GHR 拮抗剂抗体的持续的连续释放制剂可以是适当的。用于实现持续释放的多种制剂和装置是本领域已知的。

[0092] 在一个实施方案中, 用于拮抗剂抗体的剂量可以凭经验在个体中进行测定, 所述个体已给予拮抗剂抗体的一次或多次施用。个体给予增加剂量的 GHR 拮抗剂抗体。为了评价功效, 可以跟踪疾病的指示剂。

[0093] GHR 拮抗剂抗体依照本发明方法的施用可以是连续或间断的, 取决于例如接受者的生理条件, 施用的目的是治疗还是预防, 和熟练从业者已知的其他因素。GHR 拮抗剂抗体的施用可以经过预先选择的时间段基本上继续或可以以一系列间隔剂量。

[0094] 在一些实施方案中, 可以存在超过一种拮抗剂抗体。可以存在至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种不同或更多种拮抗剂抗体。一般地, 这些 GHR 拮抗剂抗体可以具有不会不利地影响彼此的互补活性。GHR 拮抗剂抗体还可以与其他 GHR 拮抗剂或 GH 拮抗剂结合使用。例如, 可以使用下述 GH 拮抗剂中的一种或多种: 针对 GHR 的反义分子(包括针对编码 GHR 的核酸的反义分子)、GHR 抑制化合物(例如培维索孟)和 GHR 结构类似物。GHR 拮抗剂抗体还可以与其他试剂结合使用, 所述其他试剂作用于增强和/或补充试剂的有效性。

[0095] 依照本发明使用的 GHR 拮抗剂抗体的治疗制剂通过下述制备用于贮存: 以冻干制剂或水溶液的形式, 将具有所需纯度的抗体或肽与任选的药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合(Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第 20 版 Mack Publishing(2000))。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在采用的剂量和浓度时对于接受者

是无毒的,并且可以包含缓冲剂例如磷酸盐、柠檬酸盐及其他有机酸;盐例如氯化钠;抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯例如对烷基苯甲酸甲酯或丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂例如EDTA;糖例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子例如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂例如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0096] 含有GHR拮抗剂抗体的脂质体通过本领域已知的方法进行制备,所述方法例如Epstein等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:3688(1985);Hwang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA77:4030(1980);以及美国专利号4,485,045和4,544,545中所述。具有增强的循环时间的脂质体公开于美国专利号5,013,556中。特别有用的脂质体可以通过反相蒸发法生成,使用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物。脂质体通过限定孔径的滤器挤出,以获得具有所需直径的脂质体。

[0097] 活性成分还可以包载(entrapped)在例如通过分别在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗乳剂的凝聚技术或界面聚合法制备的微胶囊中,例如羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。此类技术公开于Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第20版Mack Publishing(2000)中。

[0098] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,所述基质以成形物品的形式,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚酐(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和7-乙基-L-谷氨酸盐的共聚物、无法降解的乙烯乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物例如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球体)、乙酸异丁酸蔗糖酯和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0099] 待用于体内施用的制剂必须是无菌的。这容易地通过例如经由无菌滤膜过滤实现。治疗性GHR拮抗剂抗体组合物一般置于具有无菌访问口的容器内,例如具有可由皮下注射针穿透的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。

[0100] 根据本发明的组合物可以以单元剂型形式例如片剂、丸剂、胶囊、粉末、粒剂、溶液或悬浮液或栓剂,用于经口、肠胃外或直肠施用,或通过吸入或吹入施用。

[0101] 为了制备固体组合物例如片剂,将主要活性成分与药学载体混合,所述药学载体例如常规制片剂成分例如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨糖醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树胶及其他药学稀释剂例如水,以形成含有本发明的化合物或其无毒药学可接受的盐的均质混合物的固体预制剂组合物。当将这些预制剂组合物称为均质的时,意指活性成分在组合物各处平均分散,从而使得组合物可以容易地再分成相等的有效单位剂型例如片剂、丸剂和胶囊。该固体预制剂组合物随后再分成含有0.1至约500mg本发明的活性成分的上述类型的单位剂型。新型组合物的片剂或丸剂可以进行包被或以其他方式进行化合,以提供供应延长作用的优点的剂型。例如,片剂或丸剂可以包含内部剂量和外部剂量组分,

后者以在前者上的包被的形式。两种组分可以通过肠溶层分开,所述肠溶层作用于抵抗胃中的崩解并允许内部组分完整经过十二指肠或延迟释放。多种材料可以用于此类肠溶层或包衣,此类材料包括多种聚合酸以及聚合酸与此类材料如紫草茸、鲸蜡醇和乙酸纤维素的混合物。

[0102] 合适的表面活性剂特别包括非离子试剂例如聚氧基乙烯基脱水山梨糖醇(例如 Tween™20、40、60、80 或 85)及其他山梨糖醇(例如 Span™20、40、60、80 或 85)。具有表面活性剂的组合物方便地包含 0.05-5%表面活性剂,并且可以是 0.1-2.5%。应当理解可以添加其他成分,例如甘露醇或需要时,其他药学可接受的媒介物。

[0103] 合适的乳剂可以使用商购可得的脂肪乳剂例如 Intralipid™、Liposyn™、Infonutrol™、Lipofundin™ 和 Lipiphysan™ 进行制备。活性成分可以溶解于预混合的乳剂组合物中,或可替代地它可以溶解于油(例如大豆油、向日葵油、棉籽油、芝麻油、玉米油或杏仁油)中,并且在与磷脂(例如卵磷脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂)和水混合后形成乳剂。应当理解可以添加其他成分例如甘油或葡萄糖,以调整乳剂的张力。合适的乳剂通常将含有高达 20%油,例如 5-20%。脂肪乳剂可以包含 0.1-1.0 μm,特别是 0.1-0.5 μm 的脂肪小滴,并且具有在 5.5-8.0 范围中的 pH。

[0104] 乳剂组合物可以通过将 GHR 拮抗剂抗体与 Intralipid™ 或其组分(大豆油、卵磷脂、甘油和水)混合制备的那些。

[0105] 用于吸入或吹入的组合物包括在药学可接受的、水性或有机溶剂中的溶液或悬浮液、或其混合物和粉末。液体或固体组合物可以含有合适的如上所述的药学可接受的赋形剂。在一些实施方案中,组合物通过经口或经鼻呼吸途径施用用于局部或全身效应。在优选无菌药学可接受的溶剂中的组合物可以通过使用气体得到雾化。雾化溶液可以直接从雾化装置呼吸,或雾化装置可以附着至面膜、塞条或间歇正压呼吸机。溶液、悬浮液或粉末组合物可以从以适当方式递送制剂的装置中优选经口或经鼻施用。

[0106] GHR 拮抗剂抗体

[0107] 本发明的方法使用 GHR 拮抗剂抗体,其阻断、抑制或减少(包括显著减少)GHR 生物活性,包括通过 GHR 发信号介导的下游途径。GHR 拮抗剂抗体应显示出下述特征中的一种或多种:(a) 与 GHR 结合;(b) 阻断 GHR 二聚化;(c) 阻断 GHR 与 GH 相互作用;(d) 阻断或降低 GHR 介导的 STAT5 磷酸化和/或其他下游发信号事件;(e) 阻断或降低 GHR 介导的 IGF-1 表达;和(f) 阻断 GHR 与其他有待鉴定的因子的相互作用。

[0108] 为了本发明的目的,抗体优选以抑制 GHR 发信号功能和 GH 相互作用的方式与 GHR 反应。在一些实施方案中,GHR 拮抗剂抗体特异性识别人和非人灵长类 GHR。在一些实施方案中,GHR 拮抗剂抗体结合人和非人灵长类 GHR。

[0109] 可用于本发明中的抗体可以包含单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段(例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc 等)、嵌合抗体、双特异性抗体、异源缀合抗体、单链(ScFv)、其突变体、包含抗体部分的融合蛋白(例如结构域抗体)、人源化抗体、以及任何其他经修饰的免疫球蛋白分子配置,其包含具有所需特异性的抗原识别位点,包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体和共价修饰的抗体。抗体可以是鼠、大鼠、人或任何其他起源(包括嵌合或人源化抗体)。

[0110] 在一些实施方案中,GHR 拮抗剂抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体是人

源化或人抗体。

[0111] GHR 拮抗剂抗体可以通过本领域已知的任何方法进行制备。用于产生人和小鼠抗体的一般技术是本领域已知的和 / 或在本文中描述。

[0112] GHR 拮抗剂抗体及其片段可以使用本领域已知的方法进行鉴定或表征,由此检测和 / 或测量 GHR 生物活性的减少、改善或中和。在一些实施方案中,GHR 拮抗剂抗体通过下述进行鉴定:使候选试剂与 GHR 一起温育,并且监控 GHR 的生物活性的结合和 / 或伴随减少或中和。结合测定法可以用一种或多种纯化的 GHR 多肽进行,或用天然表达或经转染以表达一种或多种 GHR 多肽的细胞进行。在一个实施方案中,结合测定法是竞争结合测定法,其中评估候选抗体与已知 GHR 拮抗剂竞争 GHR 结合的能力。测定法可以以多种形式包括 ELISA 形式进行。在一些实施方案中, GHR 拮抗剂抗体通过使候选抗体与 GHR 一起温育并且监控结合进行鉴定。在一些实施方案中,STAT5 磷酸化用于鉴定 GHR 拮抗剂抗体。例如,候选抗体与表达 GHR 的细胞一起温育,并且监控伴随 STAT5 磷酸化。

[0113] 在初始鉴定后,候选 GHR 拮抗剂抗体的活性可以通过已知测试靶向生物活性的生物测定法进一步证实并精炼。可替代地,生物测定法可以用于直接筛选候选物。用于鉴定并表征 GHR 拮抗剂抗体的一些方法在实施例中详细描述。

[0114] 本发明的 GHR 拮抗剂抗体显示出下述特征中的一种或多种:(a) 与 GHR 结合;(b) 阻断 GHR 二聚化;(c) 阻断 GHR 与 GH 相互作用;(d) 阻断或降低 GHR 介导的 STAT5 磷酸化;(e) 阻断或降低 GHR 介导的 IGF-1 表达;和 (f) 阻断 GHR 与其他有待鉴定的因子的相互作用。优选地,GHR 抗体具有这些特征中的两种或更多种。更优选地,抗体具有特征中的三种或更多种。更优选地,抗体具有特征中的四种或更多种。更优选地,抗体具有特征中的五种或更多种。最优选地,抗体具有所有六种特征。

[0115] GHR 拮抗剂抗体可以使用本领域众所周知的方法进行表征。例如,一种方法是鉴定它与之结合的表位,或“表位作图”。存在本领域已知的用于作图并表征蛋白质上的表位位置的许多方法,包括分辨抗体-抗原复合物的晶体结构、竞争测定法、基因片段表达测定法和基于合成肽的测定法,如例如 Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999 的第 11 章中所述。在另外的例子中,表位作图可以用于测定 GHR 拮抗剂抗体与之结合的序列。表位作图由多个来源例如 Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, 荷兰) 商购可得。表位可以是线性的,例如包含在单段氨基酸中,或由氨基酸的三维相互作用形成的构象表位,其可能不一定包含在单段中。不同长度(例如长至少 4-6 个氨基酸)的肽可以进行分离或合成(例如重组),并且用于使用 GHR 拮抗剂抗体的结合测定法中。在另一个例子中,通过使用衍生自 GHR 序列的重叠肽并测定通过 GHR 拮抗剂抗体的结合,GHR 拮抗剂抗体与之结合的表位可以在系统筛选中进行测定。根据基因片段表达测定法,编码 GHR 的开放读码框或随机或通过特异性遗传构建进行断裂,并且测定 GHR 的表达片段与待测试抗体的反应性。基因片段可以例如通过 PCR 产生,并且随后在反应性氨基酸的存在下,在体外转录并翻译成蛋白质。抗体与放射性标记的 GHR 片段的结合随后通过免疫沉淀和凝胶电泳进行测定。某些表位还可以通过使用在噬菌体颗粒(噬菌体文库)或酵母(酵母展示)表面上展示的随机肽序列的大型文库进行鉴定。可替代地,重叠肽片段的限定文库可以在简单结合测定法中测试与测试抗体的结合。在另外的例子中,可以进行抗原的诱变、结构域交换

实验和丙氨酸扫描诱变,以鉴定表位结合所需、足够和 / 或必要的残基。例如,结构域交换实验可以使用突变型 GHR 进行,其中 GHR 多肽的多个片段已替换(交换)为来自另一个物种的 GHR 或紧密相关但抗原上不同的蛋白质的序列。通过评价抗体与突变型 GHR 的结合,可以评价特定 GHR 片段对抗体结合的重要性。

[0116] 可以用于表征 GHR 拮抗剂抗体的另外一种方法是使用竞争测定法,使用已知与相同抗原结合的其他抗体,即在 GHR 上的多种片段,以测定 GHR 拮抗剂抗体是否结合与其他抗体相同的表位。竞争测定法是本领域技术人员众所周知的。

[0117] GHR 拮抗剂抗体与 GHR 的结合亲和力(K_D)可以是约 0.001–约 200nM。在一些实施方案中,结合亲和力是约 200nM、约 100nM、约 50nM、约 10nM、约 1nM、约 500pM、约 100pM、约 60pM、约 50pM、约 20pM、约 15pM、约 10pM、约 5pM、约 2pM 或约 1pM 中的任一种。在一些实施方案中,结合亲和力小于约 250nM、约 200nM、约 100nM、约 50nM、约 10nM、约 1nM、约 500pM、约 100pM、约 50pM、约 20pM、约 10pM、约 5pM 或约 2pM 中的任一种。

[0118] 测定抗体与 GHR 的结合亲和力的一种方法是通过测量抗体的单功能 Fab 片段的结合亲和力。为了获得单功能的 Fab 片段,抗体(例如 IgG)可以用木瓜蛋白酶切割或重组表达。抗体的 GHR Fab 片段的亲和力可以通过表面等离子共振(Biacore3000™ 表面等离子共振(SPR)系统, Biacore, INC, Piscataway NJ)进行测定,所述表面等离子共振配备预固定的链霉抗生物素蛋白传感器芯片(SA),使用 HBS-EP 运行缓冲液(0.01M HEPES、pH7.4、0.15NaCl、3mM EDTA、0.005% v/v 表面活性剂 P20)。生物素化的 GHR 可以稀释到 HBS-EP 缓冲液内至小于 0.5 μ g/mL 的浓度,并且使用可变接触时间跨越个别芯片通道进行注射,以实现两个抗原密度范围:50–200 应答单位(RU)用于详细的动力学研究或 800–1,000RU 用于筛选测定法。再生研究已显示在 25% v/v 乙醇中的 25mM NaOH 有效去除结合的 Fab,同时经过 200 次注射保持芯片上的 GHR 的活性。通常,纯化的 Fab 样品的系列稀释(跨越 0.1–10x 估计的 K_D 浓度)以 100 μ L/分钟注射 1 分钟,并且允许高达 2 小时的解离时间。Fab 蛋白质的浓度通过 ELISA 和 / 或 SDS-PAGE 电泳进行测定,使用已知浓度的 Fab(如通过氨基酸分析测定的)作为标准。使用 BIAevaluation 程序,通过使数据与 1:1 兰米尔结合模型(Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99–110)总体拟合,同时获得动力学结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(K_D)值计算为 k_{off}/k_{on} 。该方案适用于测定抗体与任何 GHR 的结合亲和力,所述任何 GHR 包括人 GHR、食蟹猴(cyno)GHR 和小鼠 GHR、以及不同形式的 GHR。抗体的结合亲和力一般在 25°C 下进行测量,但也可以在 37°C 下进行测量。

[0119] 相应地,本发明提供了下述中的任一种或包含具有如表 1 中发现的部分轻链序列和部分重链序列的抗体的组合物(包括药物组合物)。在表 1 中,有下划线的序列是根据 Kabat 的 CDR 序列,并且以粗体的序列是根据 Chothia 的 CDR 序列。抗体与人 GHR 的结合亲和力通过 Biacore™ 分析进行测定,并且显示于表 1 中。

[0120] 表 1

[0121]

mAb	轻链	重链	K _D (nM)
SS1	EIVLTQSPGTL SL SPGERATLSC <u>TATSSVSSSYLD</u> WYQQKPGQAPR LLIY <u>STSNLAS</u> GIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYC <u>HQYHRS</u> <u>TPT</u> FGGGTKVEIK(SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLV K PGGSLRLSCAAS <u>GFTFSD</u> AWMDWVRQAPGKGLEW VAE <u>IRSKANYHATYYA</u> ESVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCTL <u>IRDYWG</u> QGGLTVTVSS(SEQ ID NO: 8)	Fab: 1.6 在 37°C 下
SS3	EIVLTQSPGTL SL SPGERATLSC <u>TA</u> <u>TSSVSSSYLN</u> WYQQKPGQAPRLLI Y <u>STSNLAS</u> GIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYC <u>HQYHRFTPT</u> FGGGTKVEIK(SEQ ID NO: 9)	EVQLVESGGGLV K PGGSLRLSCAAS <u>GFTFSD</u> AWMDWVRQAPGKGLEW VAE <u>IRSKANNHATYYA</u> ESVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCTL <u>FRDYWG</u> QGGLTVTVSS(SEQ ID NO: 10)	Fab: 1.99 在 37°C 下 IgG _{2AA} : 1.7 在 25°C 下
SS4	EIVLTQSPGTL SL SPGERATLSC <u>TA</u> <u>TSSVSSSYLH</u> WYQQKPGQAPRLLI Y <u>STSNLAS</u> GIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYC <u>HQYHRSTPT</u> FGGGTKVEIK(SEQ ID NO: 11)	EVQLVESGGGLV K PGGSLRLSCAAS <u>GFTFSD</u> AWMDWVRQAPGKGLEW VAE <u>IRSKANNHATYYA</u> ESVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCTL <u>YRDYWG</u> QGGLTVTVSS(SEQ ID NO: 12)	Fab: 123.86 在 37°C 下; 28.40 在 25°C 下 IgG _{2AA} : 43.10 在 25°C 下
TM1	EIVLTQSPGTL SL SPGERATLSC <u>TA</u> <u>TSSVSSWYLH</u> WYQQKPGQAPRL LIY <u>STSNLAS</u> GIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYC <u>HQYHRST</u> <u>PT</u> FGGGTKVEIK(SEQ ID NO: 13)	EVQLVESGGGLV K PGGSLRLSCAAS <u>GFTFSD</u> AWMDWVRQAPGKGLEW VAE <u>IRSKANYHATYYA</u> ESVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCTL <u>IRDYWG</u> QGGLTVTVSS(SEQ ID NO: 8)	3.40 在 37°C 下(Fab)
TM9	EIVLTQSPGTL SL SPGERATLSC <u>TA</u> <u>TSSVSSSYLH</u> WYQQKPGQAPRLLI Y <u>STSNLAS</u> GIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYC <u>HQYHRGTPT</u> FGGGTKVEIK(SEQ ID NO: 14)	EVQLVESGGGLV K PGGSLRLSCAAS <u>GFTFSD</u> AWMDWVRQAPGKGLEW VAE <u>IRSKANNHATYYA</u> ESVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCTL <u>IRDYWG</u> QGGLTVTVSS(SEQ ID NO: 8)	3.30 在 37°C 下(Fab)

[0122] 本发明还提供了针对 GHR 的抗体的 CDR 部分。CDR 区的测定完全在本领域技术内。应当理解在一些实施方案中,CDR 可以是 Kabat 和 Chothia CDR 的组合(也称为“组合 CDR”或“扩展 CDR”)。在一些实施方案中,CDR 是 Kabat CDR。在其他实施方案中,CDR 是 ChothiaCDR。在其他实施方案中,CDR 是扩展、AbM、构象或接触 CDR。换言之,在具有超过一个 CDR 的实施方案中,CDR 可以是 Kabat、Chothia、扩展、AbM、构象、接触 CDR、或其组合中的任一种。

[0123] 表 2 提供了本文提供的 GHR 拮抗剂抗体的 CDR 序列的例子和结合亲和力。结合亲和力在 25°C 下进行测量,除了用星号(*)标记的之外。星号指示在 37°C 下测量的结合亲和力。

[0124] 表 2. 根据 Kabat(有下划线的)和 Chothia(粗体的)的 GHR 拮抗剂抗体和抗原结合 CDR 序列与结合亲和力(K_D)

[0125]

MAb		CDR1	CDR2	CDR3	K _D (nM)
SS4	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	28.40
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
SS1	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	1.56*
	LC	<u>TATSSVSSSYLN</u> (SEQ ID NO: 4)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
TM1	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	3.40*
	LC	<u>TATSSVSSWYLH</u> (SEQ ID NO: 22)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
TM2	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	4.42*
	LC	<u>TATSSVSSFYLH</u> (SEQ ID NO: 23)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
TM3	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	5.70*

[0126]

	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
TM5	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	4.40*
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SE Q ID NO: 25)	
TM6	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	7.88*
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRRTP</u> (SE Q ID NO: 32)	
TM7	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	5.73*
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRYTPT</u> (SE Q ID NO: 33)	
TM8	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	8.68*
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRHTPT</u> (S EQ ID NO: 34)	
TM9	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	3.30*
	LC	<u>TATSSVSSSYLHH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRGTPT</u> (S EQ ID NO: 36)	
TM10	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	7.80*
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSYPT</u> (SE Q ID NO: 37)	
TM11	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	7.94*
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSFPT</u> (SE Q ID NO: 38)	
TM12	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	12.74*
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSIPT</u> (SE Q ID NO: 39)	

[0127]

TM13	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17 和 2)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	6.12*
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSWPT</u> (S EQ ID NO: 40)	
TM14	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG</u> (S EQ ID NO: 26 和 27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	3.35*
	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SE Q ID NO: 25)	
TM15	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17 和 2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	3.35*
	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SE Q ID NO: 25)	
TM16	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG</u> (S EQ ID NO: 28 和 29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	1.99*
	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SE Q ID NO: 25)	
TM17	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19 和 20)	<u>FRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	16.90*
	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SE Q ID NO: 25)	
TM18	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19 和 20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO : 31(整体)和 21)	15.21*
	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SE Q ID NO: 25)	
TM19	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19 和 20)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	4.39*
	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SE Q ID NO: 25)	
SS2	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17 和 2)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	4.21*
	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SE Q ID NO: 25)	
SS3	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19 和 20)	<u>FRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	1.99*

[0128]

	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SEQ ID NO: 25)	
DM1	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO: 31(整体)和21)	18.48
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SEQ ID NO: 25)	
DM2	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO: 31(整体)和21)	86.41
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRTPT</u> (SEQ ID NO: 32)	
DM3	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO: 31(整体)和21)	192.54
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRTPT</u> (SEQ ID NO: 33)	
DM4	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO: 31(整体)和21)	1128.30
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRHTPT</u> (SEQ ID NO: 34)	
DM5	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO: 31(整体)和21)	217.35
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRQTPT</u> (SEQ ID NO: 35)	
DM6	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO: 31(整体)和21)	4.63
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRGTPT</u> (SEQ ID NO: 36)	
DM7	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO: 31(整体)和21)	7.08
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSYPT</u> (SEQ ID NO: 37)	
DM8	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO: 31(整体)和21)	7.55
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSFPT</u> (SEQ ID NO: 38)	

[0129]

DM9	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19 和 20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO : 31(整体)和 21)	70.69
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSIPT</u> (SE Q ID NO: 39)	
DM10	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19 和 20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO : 31(整体)和 21)	6.66
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSWPT</u> (S EQ ID NO: 40)	
DM11	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19 和 20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO : 31(整体)和 21)	5.76
	LC	<u>TATSSVSSWYLH</u> (SEQ ID NO: 22)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
DM12	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19 和 20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO : 31(整体)和 21)	4.92
	LC	<u>TATSSVSSFYLH</u> (SEQ ID NO: 23)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
DM13	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19 和 20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO : 31(整体)和 21)	7.96
	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
DM14	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19 和 20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO : 31(整体)和 21)	1.82
	LC	<u>TATSSVSSSYLN</u> (SEQ ID NO: 4)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
DM15	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19 和 20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	3.05
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SE Q ID NO: 25)	
DM16	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19 和 20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	4.73
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRRTPPT</u> (SE Q ID NO: 32)	
DM17	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19 和 20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	22.03

[0130]

	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRYTPT</u> (SEQ ID NO: 33)	
DM18	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	32.01
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRHTPT</u> (SEQ ID NO: 34)	
DM19	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	8.50
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRQTPT</u> (SEQ ID NO: 35)	
DM20	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	3.27
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRGTPT</u> (SEQ ID NO: 36)	
DM21	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	13.17
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSYPT</u> (SEQ ID NO: 37)	
DM22	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	5.55
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSFPT</u> (SEQ ID NO: 38)	
DM23	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	6.41
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSIPT</u> (SEQ ID NO: 39)	
DM24	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	4.76
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSWPT</u> (SEQ ID NO: 40)	
DM25	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	4.09
	LC	<u>TATSSVSSWYLH</u> (SEQ ID NO: 22)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	

[0131]

DM26	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	3.88
	LC	<u>TATSSVSSFYLH</u> (SEQ ID NO: 23)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
DM27	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	16.90
	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
DM28	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	2.00
	LC	<u>TATSSVSSSYLN</u> (SEQ ID NO: 4)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
DM29	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	2.93
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SE Q ID NO: 25)	
DM30	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	7.08
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRTPT</u> (SE Q ID NO: 32)	
DM31	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	0.94
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRTPT</u> (SE Q ID NO: 33)	
DM32	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	8.20
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRHTPT</u> (S EQ ID NO: 34)	
DM33	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	12.94
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRQTPT</u> (S EQ ID NO: 35)	
DM34	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>HQYHRGTPT</u> (S EQ ID NO: 36)	1.70

[0132]

	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	
DM35	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>HQYHRSYPT</u> (SEQ ID NO: 37)	1.80
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	
DM36	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	1.92
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSFPT</u> (SEQ ID NO: 38)	
DM37	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	2.09
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSIPT</u> (SEQ ID NO: 39)	
DM38	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	1.55
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSWPT</u> (SEQ ID NO: 40)	
DM39	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	2.03
	LC	<u>TATSSVSSWYLH</u> (SEQ ID NO: 22)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM40	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	3.43
	LC	<u>TATSSVSSFYLH</u> (SEQ ID NO: 23)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM41	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	1.49
	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM42	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	0.27
	LC	<u>TATSSVSSSYLN</u> (SEQ ID NO: 4)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	

[0133]

DM43	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	2.35
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SE Q ID NO: 25)	
DM44	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	54.47
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRRTP</u> (SE Q ID NO: 32)	
DM45	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	102.70
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRYTPT</u> (SE Q ID NO: 33)	
DM46	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	6.31
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRHTPT</u> (S EQ ID NO: 34)	
DM47	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	39.24
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRQTPT</u> (S EQ ID NO: 35)	
DM48	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	5.21
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRGTPT</u> (S EQ ID NO: 36)	
DM49	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	5.50
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSYPT</u> (SE Q ID NO: 37)	
DM50	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	6.25
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSFPT</u> (SE Q ID NO: 38)	
DM51	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	7.49

[0134]

	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSIPT</u> (SEQ ID NO: 39)	
DM52	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	4.75
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSWPT</u> (SEQ ID NO: 40)	
DM53	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	3.67
	LC	<u>TATSSVSSWYLH</u> (SEQ ID NO: 22)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM54	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	4.55
	LC	<u>TATSSVSSFYLH</u> (SEQ ID NO: 23)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM55	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	3.25
	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM56	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	1.59
	LC	<u>TATSSVSSSYLN</u> (SEQ ID NO: 4)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM57	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	0.97
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SEQ ID NO: 25)	
DM58	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	61.31
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRRTP</u> (SEQ ID NO: 32)	
DM59	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	19.35
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRYTPT</u> (SEQ ID NO: 33)	

[0135]

DM60	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17 和 2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	15.71
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRHTPT</u> (S EQ ID NO: 34)	
DM61	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17 和 2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	5.95
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRQTPT</u> (S EQ ID NO: 35)	
DM62	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17 和 2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	2.34
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRGTPT</u> (S EQ ID NO: 36)	
DM63	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17 和 2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	3.52
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSYPT</u> (SE Q ID NO: 37)	
DM64	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17 和 2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	3.89
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSFPT</u> (SE Q ID NO: 38)	
DM65	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17 和 2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	3.84
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSIPT</u> (SE Q ID NO: 39)	
DM66	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17 和 2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	2.89
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSWPT</u> (S EQ ID NO: 40)	
DM67	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17 和 2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	2.37
	LC	<u>TATSSVSSWYLH</u> (SEQ ID NO: 22)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
DM68	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、 15 和 16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17 和 2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	2.20

[0136]

	LC	<u>TATSSVSSFYLH</u> (SEQ ID NO: 23)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM69	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	1.12
	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM70	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	1.13
	LC	<u>TATSSVSSSYLN</u> (SEQ ID NO: 4)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM71	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	5.08
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SEQ ID NO: 25)	
DM72	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	16.35
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRRTP</u> (SEQ ID NO: 32)	
DM73	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	31.93
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRYTPT</u> (SEQ ID NO: 33)	
DM74	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	3.72
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRHTPT</u> (SEQ ID NO: 34)	
DM75	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	7.49
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRQTPT</u> (SEQ ID NO: 35)	
DM76	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	4.42
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRGTPT</u> (SEQ ID NO: 36)	

[0137]

DM77	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	3.10
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSYPT</u> (SEQ ID NO: 37)	
DM78	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	4.25
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSFPT</u> (SEQ ID NO: 38)	
DM79	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	2.80
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSIPT</u> (SEQ ID NO: 39)	
DM80	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	2.89
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSWPT</u> (SEQ ID NO: 40)	
DM81	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	2.50
	LC	<u>TATSSVSSWYLH</u> (SEQ ID NO: 22)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM82	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	1.54
	LC	<u>TATSSVSSFYLH</u> (SEQ ID NO: 23)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM83	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	0.59
	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM84	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG(S</u> EQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	1.13
	LC	<u>TATSSVSSSYLN</u> (SEQ ID NO: 4)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1M1	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG(S</u> SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	39.90

[0138]

	LC	<u>RATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 41)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1M2	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	40.40
	LC	<u>EATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 42)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1P1 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>XATSSVSSSYLH</u> , 其中X是T、R或E(SEQ ID NO: 146)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1M3	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	26.80
	LC	<u>TPTSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 43)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1M4	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	38.50
	LC	<u>TASSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 44)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1M5	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	56.00
	LC	<u>TATTSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 45)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1M6	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	48.70
	LC	<u>TATRSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 46)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1M7	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	37.10
	LC	<u>TATWSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 47)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1M8	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	51.10
	LC	<u>TATFSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 48)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	

[0139]

LIP4 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATXSVSSSYLH</u> , 其 中X是S、T、R、W或 F(SEQ ID NO: 100)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
LIM9	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	38.80
	LC	<u>TATSWVSSSYLH</u> (SE Q ID NO: 49)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
L1 M10	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	48.30
	LC	<u>TATSVVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 50)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
L1 M11	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	42.60
	LC	<u>TATSDVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 51)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
LIP5 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSXVSSSYLH</u> , 其 中X是S、W、V或D(SEQ ID NO: 101)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
L1 M12	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	45.30
	LC	<u>TATSSVGSSYLH</u> (SEQ ID NO: 52)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
L1 M13	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	38.80
	LC	<u>TATSSVWSSYLH</u> (SE Q ID NO: 53)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
LIP7 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVXSSYLH</u> , 其 中X是S、G或W(SEQ ID NO: 102)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	

[0140]

L1 M14	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	43.90
	LC	<u>TATSSVSPSYLH</u> (SEQ ID NO: 54)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
L1 M15	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	39.50
	LC	<u>TATSSVSQSYLH</u> (SEQ ID NO: 55)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
L1 M16	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	43.00
	LC	<u>TATSSVSASYLH</u> (SEQ ID NO: 56)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
LIP8 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSXSYLH</u> , 其 中X是S、P或Q(SEQ ID NO: 103)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
L1 M17	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	31.30
	LC	<u>TATSSVSSGYLH</u> (SEQ ID NO: 57)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
L1 M18	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	26.10
	LC	<u>TATSSVSSIYLH</u> (SEQ ID NO: 58)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
L1 M19	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	29.40
	LC	<u>TATSSVSSEYLH</u> (SEQ ID NO: 59)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
L1 M20	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	15.10
	LC	<u>TATSSVSSWYLH</u> (SEQ ID NO: 22)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
L1 M21	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	15.20

[0141]

	LC	<u>TATSSVSSFYLH</u> (SEQ ID NO: 23)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1P9 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSXYLH</u> , 其中X是S、G、I、E、W或F (SEQ ID NO: 104)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1 M22	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	52.40
	LC	<u>TATSSVSSSWLH</u> (SEQ ID NO: 60)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1 M23	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	37.90
	LC	<u>TATSSVSSSYVH</u> (SEQ ID NO: 61)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1 M24	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	37.20
	LC	<u>TATSSVSSSYFH</u> (SEQ ID NO: 62)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1 P11 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYXH</u> , 其中X是L、V或F(SEQ ID NO: 105)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1 M25	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	5.90
	LC	<u>TATSSVSSSYLD</u> (SEQ ID NO: 24)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1 M26	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	24.80
	LC	<u>TATSSVSSSYLP</u> (SEQ ID NO: 63)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1 M27	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	8.90

[0142]

	LC	<u>TATSSVSSSYLN</u> (SEQ ID NO: 4)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L1 P12 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLX</u> , 其中X是H、D、P或N (SEQ ID NO: 99)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
L3M1	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	19.20
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRFTPT</u> (SEQ ID NO: 25)	
L3M2	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	45.60
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRRTP</u> (SEQ ID NO: 32)	
L3M3	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	41.60
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRYTPT</u> (SEQ ID NO: 33)	
L3M4	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	48.40
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRHTPT</u> (SEQ ID NO: 34)	
L3M5	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	71.10
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRQTPT</u> (SEQ ID NO: 35)	
L3M6	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	19.80
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRGTPT</u> (SEQ ID NO: 36)	
L3P6 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	

[0143]

	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRXTPT</u> , 其中X是S、F、R、Y、H、Q或G(SEQ ID NO: 106)	
L3M7	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	29.90
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSYPT</u> (SEQ ID NO: 37)	
L3M8	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	31.90
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSEPT</u> (SEQ ID NO: 38)	
L3M9	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	28.20
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSIPT</u> (SEQ ID NO: 39)	
L3M10	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	28.60
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSAPT</u> (SEQ ID NO: 66)	
L3M11	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	34.80
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSWPT</u> (SEQ ID NO: 40)	
L3P7 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSXPT</u> , 其中X是T、Y、F、I、A或W(SEQ ID NO: 107)	
H2M1	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRAKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 64和65)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	10.10
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2M2	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRTKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 67和68)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	11.20

[0144]

	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2P4 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRXKANNHATYYAESVKG</u> , 其中X是S、A或T(SEQ ID NO: 108和109)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2M3	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSRANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 69和70)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	40.40
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2M4	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSEANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 71和72)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	13.10
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2P5 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSXANNHATYYAESVKG</u> , 其中X是K、R或E(SEQ ID NO: 110和111)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2M5	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKDNNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 73和74)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	11.60
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2M6	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKSNNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 75和76)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	15.00
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2M7	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKVNNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 77和78)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	12.70
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2M8	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKYNNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 79和80)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	12.90
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	

[0145]

H2M9	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKENNHATYYAESVKG</u> (S EQ ID NO: 81和82)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	12.00
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
H2P6 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKXNNHATYYAESVKG</u> , 其中X是A、D、S、V、Y或E(SEQ ID NO: 112和113)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
H2 M10	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANFHATYYAESVKG</u> (S EQ ID NO: 26和27)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	12.10
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
H2 M11	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANWHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 83和84)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	14.20
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
H2 M12	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANIHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 85和86)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	11.80
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
H2 M13	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANDHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 87和88)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	55.00
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
H2 M14	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANYHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 17和2)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	6.00
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
H2 M15	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANKHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 89和90)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	12.50
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
H2 M16	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANRHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 91和92)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	8.8

[0146]

	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2P8 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANXHATYYAESVKG</u> , 其中X是N、F、W、I、D、Y、K或R(SEQ ID NO: 114和115)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2 M17	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNWATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 93和94)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	7.50
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2 M18	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNIATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 95和96)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	9.30
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2 M19	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNYATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 97和98)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	7.20
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2 M20	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNFATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 28和29)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	8.0
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H2P9 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNXATYYAESVKG</u> , 其中X是H、W、I、Y或F(SEQ ID NO: 116和117)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H3M1	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IYRDYW</u> (SEQ ID NO: 31(整体)和21)	328.60
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
H3M2	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>TLFRDYW</u> (SEQ ID NO: 30)	26.80
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	

[0147]

H3M3	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>IRDYW</u> (SEQ ID NO: 3)	9.40
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
H3P1 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>XRDYW</u> , 其中X 是Y、F或I (SEQ ID NO: 118)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
H3VZ vari-ant	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>XYRDYW</u> , 其中X 是 L 或 I(SEQ ID NO: 119(整体)和 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
DM1 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>XYRDYW</u> , 其中X 是 L 或 I(SEQ ID NO: 119(整体)和 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRXTPT</u> , 其 中X是S、F、R、Y、 H、Q或G(SEQ ID NO: 106)	
DM2 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>XYRDYW</u> , 其中X 是 L 或 I(SEQ ID NO: 119(整体)和 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHR SXPT</u> , 其 中X是T、Y、F、I 或 W(SEQ ID NO: 122)	
DM3 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>XYRDYW</u> , 其中X 是 L 或 I(SEQ ID NO: 119(整体)和 21)	
	LC	<u>TATSSVSSXYLH</u> , 其 中X是S、W或F(SEQ ID NO: 120)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
DM4 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>XYRDYW</u> , 其中X 是 L 或 I(SEQ ID NO: 119(整体)和 21)	

[0148]

	LC	<u>TATSSVSSSYLX</u> , 其中X是H、D或N(SEQ ID NO: 121)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM5 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>XRDIW</u> , 其中X是Y、F或I(SEQ ID NO: 118)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRXTPT</u> , 其中X是S、F、R、Y、H、Q或G(SEQ ID NO: 106)	
DM6 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>XRDIW</u> , 其中X是Y、F或I(SEQ ID NO: 118)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSXPT</u> , 其中X是T、Y、F、I或W(SEQ ID NO: 122)	
DM7 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>XRDIW</u> , 其中X是Y、F或I(SEQ ID NO: 118)	
	LC	<u>TATSSVSSXYLH</u> , 其中X是S、W或F(SEQ ID NO: 120)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM8 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>XRDIW</u> , 其中X是Y、F或I(SEQ ID NO: 118)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLX</u> , 其中X是H、D或N(SEQ ID NO: 121)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
DM9 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANXHATYYAESVKG</u> , 其中X是N、F或Y (SEQ ID NO: 123和124)	<u>YRDIW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRXTPT</u> , 其中X是S、F、R、Y、H、Q或G(SEQ ID NO: 106)	
DM10 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANXHATYYAESVKG</u> , 其中X是N、F或Y (SEQ ID NO: 123和124)	<u>YRDIW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSXPT</u> , 其中X是T、Y、F、I或W(SEQ ID NO: 122)	

[0149]

DM11 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANXHATYYAESVKG</u> , 其中X是N、F或Y (SEQ ID NO: 123和124)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSXYLH</u> , 其 中X是S、W或F(SEQ ID NO: 120)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
DM12 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANXHATYYAESVKG</u> , 其中X是N、F或Y (SEQ ID NO: 123和124)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLX</u> , 其中 X是H、D或N(SEQ ID NO: 121)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
DM13 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNXATYYAESVKG</u> , 其中X是H或F (SEQ ID NO: 125和126)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRXTPT</u> , 其 中X是S、F、R、Y、 H、Q或G(SEQ ID NO: 106)	
DM14 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNXATYYAESVKG</u> , 其中X是H或F (SEQ ID NO: 125和126)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHR SXPT</u> , 其 中X是T、Y、F、I 或W(SEQ ID NO: 122)	
DM15 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNXATYYAESVKG</u> , 其中X是H或F (SEQ ID NO: 125和126)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSXYLH</u> , 其 中X是S、W或F(SEQ ID NO: 120)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
DM16 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNXATYYAESVKG</u> , 其中X是H或F (SEQ ID NO: 125和126)	<u>YRDYW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLX</u> , 其中 X是H、D或N(SEQ ID NO: 121)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SE Q ID NO: 6)	
TM1 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANXHATYYAESVKG</u> , 其中X是N或Y (SEQ ID NO: 127和128)	<u>XRDIW</u> , 其中X 是 Y 或 I(SEQ ID NO: 129)	

[0150]

	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRXTPT</u> , 其中X是S、F、R、Y、H或G(SEQ ID NO: 130)	
TM2 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANXHATYYAESVKG</u> , 其中X是N或Y (SEQ ID NO: 127和128)	<u>XRDIW</u> , 其中X是Y或I(SEQ ID NO: 129)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLH</u> (SEQ ID NO: 18)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSXPT</u> , 其中X是T、Y、F、I或W(SEQ ID NO: 122)	
TM3 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANXHATYYAESVKG</u> , 其中X是N或Y (SEQ ID NO: 127和128)	<u>XRDIW</u> , 其中X是Y或I(SEQ ID NO: 129)	
	LC	<u>TATSSVSSXYLH</u> , 其中X是S、W或F(SEQ ID NO: 120)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
TM4 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANXHATYYAESVKG</u> , 其中X是N或Y (SEQ ID NO: 127和128)	<u>XRDIW</u> , 其中X是Y或I(SEQ ID NO: 129)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLX</u> , 其中X是H、D或N(SEQ ID NO: 121)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRSTPT</u> (SEQ ID NO: 6)	
TM5 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANXHATYYAESVKG</u> , 其中X是N、F或Y (SEQ ID NO: 123和124)	<u>YRDIW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLX</u> , 其中X是H或D(SEQ ID NO: 131)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRXTPT</u> 其中X是S或F(SEQ ID NO: 132)	
TM6 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNXATYYAESVKG</u> , 其中X是H或F (SEQ ID NO: 125和126)	<u>YRDIW</u> (SEQ ID NO: 21)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLX</u> , 其中X是H或D(SEQ ID NO: 131)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRXTPT</u> 其中X是S或F(SEQ ID NO: 132)	
TM7 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>XRDIW</u> , 其中X是Y、F或I(SEQ ID NO: 118)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLX</u> , 其中X是H或D(SEQ ID NO: 131)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRXTPT</u> 其中X是S或F(SEQ ID NO: 132)	

[0151]

TM8 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANNHATYYAESVKG</u> (SEQ ID NO: 19和20)	<u>XYRDYW</u> , 其中X 是 L 或 I(SEQ ID NO: 119(整体)和 21)	
TM9 变体	LC	<u>TATSSVSSSYLX</u> , 其中 X是H或D(SEQ ID NO: 131)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRXTPT</u> 其 中 X 是 S 或 F(SEQ ID NO: 132)	
QM1 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANXHATYYAESVKG</u> , 其中X是N、F、W、I、D、Y、 K或R(SEQ ID NO: 114和115)	<u>XRDIYW</u> , 其中X 是Y、F或I (SEQ ID NO: 118)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLX</u> , 其中 X是H、D、P或N (SEQ ID NO: 99)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRXTPT</u> , 其 中X是S、F、R、Y、 H、Q或G(SEQ ID NO: 106)	
QM2 变体	HC	<u>GFTFSDAWMD</u> (SEQ ID NO: 1(整体)、15和16)	<u>EIRSKANXHATYYAESVKG</u> , 其中X是N、F、W、I、D、Y、 K或R(SEQ ID NO: 114和115)	<u>XRDIYW</u> , 其中X 是Y、F或I (SEQ ID NO: 118)	
	LC	<u>TATSSVSSSYLX</u> , 其中 X是H、D、P或N (SEQ ID NO: 99)	<u>STSNLAS</u> (SEQ ID NO: 5)	<u>HQYHRXPT</u> , 其 中X是T、Y、F、I、 A 或 W(SEQ ID NO: 107)	

[0152] 本发明还提供了制备这些抗体或多肽中的任一种的方法。本发明的抗体可以通过本领域已知的操作进行制备。多肽可以通过下述产生：抗体的蛋白酶解或其他降解、如上所述的重组方法（即，单一或融合多肽）或化学合成。抗体的多肽尤其是高达约 50 个氨基酸的较短多肽，方便地通过化学合成进行制备。化学合成的方法是本领域已知的，并且是商购可得的。例如，抗体可以通过采用固相方法的自动化多肽合成仪产生。还参见美国专利号 5,807,715；4,816,567；和 6,331,415。

[0153] 在一些实施方案中，抗体可以通过噬菌体展示技术进行制备并选择。参见例如美国专利号 5,565,332；5,580,717；5,733,743；和 6,265,150；以及 Winter 等人，Annu. Rev. Immunol. 12:433-455,1994。可替代地，噬菌体展示技术 (McCafferty 等人，Nature348:552-553,1990) 可以用于从来自未免疫接种供体的免疫球蛋白可变 (V) 结构域基因文库，在体外产生人抗体和抗体片段。根据该技术，将抗体 V 结构域基因框内克隆到丝状噬菌体例如 M13 或 fd 的主要或次要外壳蛋白质基因内，并且作为功能抗体片段在噬菌体颗粒表面上展示。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝，所以基于抗体的功能特性的选择也导致编码显示出这些特性的抗体的基因的选择。因此，噬菌体模拟 B 细胞的一些特性。噬菌体展示可以以多种形式进行；关于综述参见例如 Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology3:564-571,1993。V 基因区段的几个来源可以用于噬菌体展示。Clackson 等人，Nature352:624-628,1991，从衍生自免疫接种的小鼠脾的 V 基因的小型随机组合文库中分离抗噁唑酮抗体的多样阵列。可以构建来自未免疫接种的人供体的 V 基因文库，并且可以基本上遵循由 Mark 等人，J. Mol. Biol. 222:581-597,1991，或 Griffith 等人，EMBO J. 12:725-734,1993 描述的技术，分离针对抗原（包括自身抗原）的多样阵列的抗体。在天然免疫应答中，抗体基因以高速率累积

突变（体细胞高度突变）。引入的一些变化将赋予更高的亲和力，并且展示高亲和力表面免疫球蛋白的 B 细胞在后续抗原攻击过程中优先复制并分化。该天然过程可以通过采用称为“链改组”的技术进行模拟。（Marks 等人，*Bio/Technol.* 10:779-783, 1992）。在该方法中，可以通过将重和轻链 V 区基因顺次替换为得自未免疫接种供体的 V 结构域基因的天然存在变体储库（储库），来改善通过噬菌体展示获得的“一级”人抗体的亲和力。该技术允许产生亲和力在 pM-nM 范围中的抗体和抗体片段。用于制备极大型噬菌体抗体储库（也称为“一切根源的文库（“the mother-of-all libraries”）”）的策略已由 Waterhouse 等人，*Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266, 1993 描述。基因改组还可以用于由啮齿类抗体衍生人抗体，其中人抗体具有与起始啮齿类抗体相似的亲和力和特异性。根据也被称为“表位印迹”的方法，通过噬菌体展示技术获得的啮齿类抗体的重或轻链 V 结构域基因替换为人 V 结构域基因的储库，产生啮齿类-人嵌合体。对抗原的选择导致能够恢复功能抗原结合位点的人可变区的分离，即表位支配（印迹）配偶体的选择。当重复过程以便替换剩余啮齿类 V 结构域时，获得人抗体（参见 PCT 公开号 WO 93/06213）。与啮齿类抗体通过 CDR 移植的常规人源化不同，该技术提供不具有啮齿类起源的构架或 CDR 残基的全人抗体。

[0154] 在一些实施方案中，抗体可以使用杂交瘤技术进行制备。考虑可以操纵任何哺乳动物受试者包括人或由其的抗体产生细胞，以充当哺乳动物包括人、杂交瘤细胞系产生的基础。宿主动物的免疫接种途径和时间表一般与用于抗体刺激和产生的已建立的和常规的技术一致，如本文进一步描述的。通常，宿主动物用免疫原的量包括如本文描述的进行腹膜内、肌内、经口、皮下、足底内和 / 或皮内接种。

[0155] 杂交瘤可以由淋巴细胞和永生化的骨髓瘤细胞进行制备，使用 Kohler, B. 和 Milstein, C., 1975, *Nature* 256:495-497 的一般体细胞杂交瘤技术或如由 Buck, D. W. 等人，*In Vitro*, 18:377-381, 1982 修饰的体细胞杂交瘤技术。可获得的骨髓瘤系包括但不限于 X63-Ag8.653 和来自 Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA 的那些可以用于杂交中。一般地，该技术涉及使用促融剂例如聚乙二醇，或通过本领域技术人员众所周知的电方法，融合骨髓瘤细胞和淋巴样细胞。在融合后，使细胞与融合培养基分类，并且在选择性生长培养基例如次黄嘌呤氨基蝶呤胸腺嘧啶（HAT）培养基中生长，以消除非杂交的亲本细胞。补充有或未补充有血清的本文描述的培养基中的任一种可以用于培养分泌单克隆抗体的杂交瘤。作为细胞融合技术的另一种替代方法，EBV 永生化的 B 细胞可以用于产生本发明的 GHR 单克隆抗体。需要时，将杂交瘤或其他永生化的 B 细胞扩增并亚克隆，并且通过常规免疫测定法操作（例如放射性免疫测定法、酶免疫测定法或荧光免疫测定法）就抗免疫原活性测定上清液。

[0156] 可以用作抗体来源的杂交瘤包含产生对于 GHR 特异性的单克隆抗体或其部分的亲本杂交瘤的所有衍生的后代细胞。

[0157] 产生此类抗体的杂交瘤可以使用已知操作在体外或体内进行生长。需要时，通过常规免疫球蛋白纯化操作例如硫酸铵沉淀、凝胶电泳、透析、色谱法和超滤，可以从培养基或体液中分离单克隆抗体。如果存在的话，则不需要的活性可以下述得到去除：例如通过在由附着至固相的免疫原组成的吸附剂上运行制剂，并且从免疫原洗脱或释放所需抗体。用 GHR 多肽或含有使用双功能或衍生试剂与蛋白质缀合的靶氨基酸序列的片段免疫接种宿主动物，可获得抗体（例如单克隆抗体）群体，所述蛋白质在待免疫接种的物种中是免疫原性

的,例如钥孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂,所述双功能或衍生试剂例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羧基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$,其中 R 和 R^1 是不同烷基。

[0158] 需要时,目的 GHR 拮抗剂抗体(单克隆或多克隆)可以进行测序,并且多核苷酸序列随后可以克隆到载体内用于表达或繁殖。编码目的抗体的序列可以维持在宿主细胞中的载体中,并且宿主细胞随后可以扩增并冷冻用于未来使用。重组单克隆抗体在细胞培养中的产生可以通过本领域已知的方法从 B 细胞中克隆抗体基因来进行。参见例如 Tiller 等人,2008, *J. Immunol. Methods* 329, 112; 美国专利号 7, 314, 622。

[0159] 在一些实施方案中,多核苷酸序列可以用于遗传操作,以使抗体“人源化”或改善抗体的亲和力或其他特征。抗体还可以定制用于例如在犬、猫、灵长类、马和牛中。

[0160] 在一些实施方案中,全人抗体可以通过使用商购可得的小鼠来获得,所述小鼠已改造为表达特异性人免疫球蛋白蛋白质。设计为产生更期望(例如全人抗体)或更强的免疫应答的转基因动物也可以用于生成人源化或人抗体。此类技术的例子是来自 Abgenix, Inc. (Fremont, CA) 的 Xenomouse™ 以及来自 Medarex, Inc. (Princeton, NJ) 的 HuMAb-Mouse® 和 TC Mouse™。

[0161] 抗体可以通过下述重组制备:首先从宿主动物中分离抗体和抗体产生细胞,获得基因序列,并且使用基因序列在宿主细胞(例如 CHO 细胞)中重组表达抗体。可以采用的另一种方法是在植物(例如烟草)或转基因乳中表达抗体序列。用于在植物或乳中重组表达抗体的方法已得到公开。参见例如 Peeters 等人, *Vaccine* 19:2756, 2001; Lonberg, N. 和 D. Huszar *Int. Rev. Immunol* 13:65, 1995; 和 Pollock 等人, *J Immunol Methods* 231:147, 1999。用于制备抗体衍生物例如结构域、单链等的方法是本领域已知的。

[0162] 免疫测定法和流式细胞术分选技术例如荧光激活细胞分选(FACS)也可以用于分离对于 GHR 特异性的抗体。

[0163] 使用常规操作(例如通过使用能够与编码单克隆抗体的重和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针),容易地分离并测序编码单克隆抗体的 DNA。杂交瘤细胞充当此类 DNA 的优选来源。一旦分离, DNA 就可以置于表达载体(例如公开于 PCT 公开号 WO 87/04462 中的表达载体)内,所述表达载体随后转染到否则不产生免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞内,以获得在重组宿主细胞中的单克隆抗体合成,所述宿主细胞例如大肠杆菌(*E. coli*)细胞、猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞。参见例如 PCT 公开号 WO 87/04462。DNA 还可以例如通过下述进行修饰:置换关于人重和轻链恒定结构域的编码序列代替同源鼠序列, Morrison 等人, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851, 1984, 或使免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分共价连接。以这种方式,制备“嵌合”或“杂交”抗体,其具有本文的 GHR 单克隆抗体的结合特异性。

[0164] 抗体片段可以通过下述产生:抗体的蛋白酶解或其他降解、如上所述的重组方法(即,单一或融合多肽)或化学合成。抗体的多肽尤其是高达约 50 个氨基酸的较短多肽,方便地通过化学合成进行制备。化学合成的方法是本领域已知的,并且是商购可得的。例如,抗体可以通过采用固相方法的自动化多肽合成仪产生。还参见美国专利号 5, 807, 715; 4, 816, 567; 和 6, 331, 415。

[0165] 在一些实施方案中,多核苷酸包含编码抗体 SS1、SS3、SS4、TM1 或 TM9 的重链和 / 或轻链可变区的序列。编码目的抗体的序列可以维持在宿主细胞中的载体中,并且宿主细胞随后可以扩增并冷冻用于未来使用。载体(包括表达载体)和宿主细胞在本文中进一步描述。

[0166] 本发明包括亲和力成熟实施方案。例如,亲和力成熟的抗体可以通过本领域已知的操作产生(Marks 等人,1992, Bio/Technology, 10:779-783;Barbas 等人,1994, Proc Nat. Acad. Sci, USA91:3809-3813;Schier 等人,1995, Gene, 169:147-155;Yelton 等人, 1995, J. Immunol., 155:1994-2004;Jackson 等人,1995, J. Immunol., 154(7):3310-9; Hawkins 等人,1992, J. Mol. Biol., 226:889-896;和 PCT 公开号 W02004/058184)。

[0167] 下述方法可以用于调整抗体的亲和力并表征 CDR。表征抗体的 CDR 和 / 或改变(例如改善)多肽例如抗体的结合亲和力的一种方法称为“文库扫描诱变”。一般地,文库扫描诱变如下工作。使用领域公认的方法,将 CDR 中的一个或多个氨基酸位置替换为两个或更多个(例如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20)氨基酸。这生成小型克隆(在一些实施方案中,一个用于分析的每一个氨基酸位置)文库,各自具有两个或更多个成员的复杂性(如果在每一个位置处置换两种或更多种氨基酸)。一般地,文库还包括包含天然(未置换)氨基酸的克隆。来自每个文库的小数目的克隆例如约 20-80 个克隆(取决于文库的复杂性)就与靶多肽(或其他结合靶)的结合亲和力进行筛选,并且鉴定具有增加、相同、降低或无结合的候选物。用于测定结合亲和力的方法是本领域众所周知的。结合亲和力可以使用下述进行测定:例如检测结合亲和力中约 2 倍或更大的差异的 Biacore™ 表面等离子共振分析、Kinexa® 生物传感器、闪烁接近测定法、ELISA、ORIGEN® 免疫测定法、荧光猝灭、荧光转移和 / 或酵母展示。结合亲和力还可以使用合适的生物测定法进行筛选。当起始抗体已以相对高的亲和力例如约 10nM 或更低的 K_D 结合时, Biacore™ 是特别有用的。

[0168] 在一些实施方案中,使用领域公认的诱变方法(其中一些在本文中描述),将 CDR 中的每一个氨基酸位置替换(在一些实施方案中,一次一个)为所有 20 种天然氨基酸。这生成小型克隆(在一些实施方案中,一个用于分析的每一个氨基酸位置)文库,各自具有 20 个成员的复杂性(如果在每一个位置处置换所有 20 种氨基酸)。

[0169] 在一些实施方案中,待筛选的文库包含在两个或更多个位置中的置换,所述两个或更多个位置可以在相同 CDR 或者两个或更多个 CDR 中。因此,文库可以包含在一个 CDR 中的两个或更多个位置中的置换。文库可以包含在两个或更多个 CDR 中的两个或更多个位置中的置换。文库可以包括在 3、4、5 个或更多个位置中的置换,所述位置在二、三、四、五或六个 CDR 中发现。置换可以使用低冗余密码子进行制备。参见例如 Balint 等人,1993, Gene137(1):109-18 的表 2。

[0170] CDR 可以具有重链可变区 (VH)CDR3 和 / 或轻链可变区 (VL)CDR3。CDR 可以是 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2 和 / 或 VL CDR3 中的一个或多个。CDR 可以是 Kabat CDR、Chothia CDR、扩展 CDR、AbM CDR、接触 CDR(contact CDR) 或构象 CDR。

[0171] 具有改善结合的候选物可以进行测序,由此鉴定导致改善的亲和力(也称为“改善的”置换)的 CDR 置换突变体。结合的候选物还可以进行测序,由此鉴定保留结合的 CDR 置换。

[0172] 可以进行多轮筛选。例如,具有改善结合的候选物(各自包含在一个或多个 CDR 的一个或多个位置处的氨基酸置换)也可用于设计第二文库,其含有在每个改善的 CDR 位置处的至少原始和置换的氨基酸(即在其处置换突变体显示改善结合的 CDR 中的氨基酸位置)。该文库的制备、和筛选或选择在下文进一步讨论。

[0173] 文库扫描诱变还提供了用于表征 CDR 的方法,只要具有改善结合、相同结合、降低结合或无结合的克隆频率也提供与每个氨基酸位置对于抗体-抗原复合物的稳定性的重要性有关的信息。例如,如果当变成所有 20 种氨基酸时,CDR 的位置保持结合,则该位置鉴定为不太可能是抗原结合所需的位置。相反,如果 CDR 的位置仅在小百分比的置换中保持结合,则该位置鉴定为对于 CDR 功能重要的位置。因此,文库扫描诱变方法生成关于 CDR 中可以变成许多不同氨基酸(包括所有 20 种氨基酸)的位置,和 CDR 中不能改变或仅可以变成少数氨基酸的位置的信息。

[0174] 具有改善亲和力的候选物可以在第二文库中组合,所述第二文库包括改善的氨基酸、在该位置处的原始氨基酸,并且可以进一步包括在该位置处的另外置换,取决于需要或使用所需筛选或选择方法允许的文库复杂性。另外,需要时,邻近氨基酸位置可以随机化为至少两种或更多种氨基酸。邻近氨基酸的随机化可以允许突变型 CDR 中的另外构象弹性,其依次又可以允许或促进更大量的改善突变的引入。文库还可以包含在第一轮筛选中未显示改善亲和力的位置处的置换。

[0175] 使用本领域已知的任何方法,包括使用 Biacore™ 表面等离子共振分析的筛选,和使用本领域已知的用于选择的任何方法(包括噬菌体展示、酵母展示和核糖体展示)的选择,在第二文库中筛选或选择具有改善和/或改变的结合亲和力的文库成员。

[0176] 为了表达本发明的 GHR 抗体,可以首先使用上文描述的方法中的任一种获得编码 VH 和 VL 区的 DNA 片段。还可以使用本领域技术人员已知的标准方法,将多种修饰例如突变、缺失和/或添加引入 DNA 序列内。例如,诱变可以使用标准方法例如 PCR 介导的诱变进行,其中将突变的核苷酸引入 PCR 引物内,从而使得 PCR 产物含有所需突变或定点诱变。

[0177] 本发明包含对于表 1 中所示的可变区和表 2 中所示的 CDR 的修饰。例如,本发明包括包含不显著影响其特性的功能上等价的可变区和 CDR 的抗体,以及具有增强或降低的活性和/或亲和力的变体。例如,氨基酸序列可以突变以获得与 GHR 具有所需结合亲和力的抗体。多肽的修饰是本领域的常规实践,并且无需在本文中详细描述。经修饰的多肽的例子包括具有氨基酸残基的保守置换的多肽,不显著有害地改变功能活性或使多肽对于其配体的亲和力成熟(增强)的氨基酸的一种或多种缺失或添加,或使用化学类似物。

[0178] 氨基酸序列插入包括长度范围为一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合物,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N 末端甲硫氨酰残基的抗体或与附加表位融合的抗体。抗体分子的其他插入片段包括与酶或多肽的抗体的 N 或 C 末端的融合物,其增加抗体在血液循环中的半衰期。

[0179] 置换变体具有在抗体分子中被去除的至少一个氨基酸残基和在其位置中插入的不同残基。对于置换诱变极大有利的位点包括高变区,但构架改变也加以考虑。保守置换显示于表 3 中的“保守置换”的标题下。如果此类置换导致生物活性中的变化,则可引入表 3 中命名为“示例性置换”、或如下文提及氨基酸种类进一步描述的更大量的变化,并且筛选产物。

[0180] 表 3 :氨基酸置换

[0181]

原始残基	保守置换	示例性置换
Ala(A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg(R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn(N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp(D)	Glu	Glu; Asn
Cys(C)	Ser	Ser; Ala
Gln(Q)	Asn	Asn; Glu
Glu(E)	Asp	Asp; Gln
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile(I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸
Leu(L)	Ile	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys(K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met(M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe(F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Ser	Ser
Trp(W)	Tyr	Tyr; Phe

[0182]

Tyr(Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val(V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸

[0183] 抗体的生物特性中的大量修饰通过选择在其对维持下述的作用方面显著不同的置换实现 : (a) 在置换区域中的多肽主链的结构, 例如作为 β -片层或螺旋构象, (b) 分子在靶部位处的电荷或疏水性, 或 (c) 侧链的容积。天然存在的残基基于共同侧链特性分成组 :

[0184] (1) 非极性的 : 正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile ;

[0185] (2) 极性不含电荷 : Cys, Ser, Thr, Asn, Gln ;

[0186] (3) 酸性 (带负电) : Asp, Glu ;

[0187] (4) 碱性 (带正电) : Lys, Arg ;

[0188] (5) 影响链定向的残基 : Gly, Pro ; 和

[0189] (6) 芳香族 : Trp, Tyr, Phe, His。

[0190] 非保守置换通过用这些种类之一的成员交换另一类的成员进行制备。

[0191] 例如可以制备的一类置换是将抗体中的一个或多个半胱氨酸（其可以是化学反应性的）变成另一种残基，例如但不限于丙氨酸或丝氨酸。例如，可以存在非经典半胱氨酸的置换。置换可以在抗体的可变结构域的 CDR 或构架区或者恒定区中制备。在一些实施方案中，半胱氨酸是经典的。不涉及维持抗体的适当构象的任何半胱氨酸残基也可以一般用丝氨酸置换，以改善分子的氧化稳定性并阻止异常交联。相反，特别当抗体是抗体片段例如 Fv 片段时，一个或多个半胱氨酸键可以加入抗体中，以改善其稳定性。

[0192] 抗体还可以例如在重和 / 或轻链的可变结构域中进行修饰，例如以改变抗体的结合特性。可变区中的变化可以改变结合亲和力和 / 或特异性。在一些实施方案中，在 CDR 结构域内制备不超过一个至五个保守氨基酸置换。在其他实施方案中，在 CDR 结构域内制备不超过一个至三个保守氨基酸置换。例如，可以在一个或多个 CDR 区中制备突变，以增加或降低抗体对于 GHR 的 K_D ，以增加或降低 k_{off} ，或改变抗体的结合特异性。定点诱变技术是本领域众所周知的。参见例如 Sambrook 等人 and Ausubel 等人，同上。

[0193] 修饰或突变也可以在构架区或恒定区中制备，以增加 GHR 抗体的半衰期。参见例如 PCT 公开号 WO 00/09560。也可以制备构架区或恒定区中的突变，以改变抗体的免疫原性，以提供与另一种分子的共价或非共价结合的位点，或改变此类特性如补体固定、FcR 结合和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。根据本发明，单一抗体可以具有在可变结构域的 CDR 或构架区的任何一个或多个中或者恒定区中的突变。

[0194] 修饰还包括糖基化和非糖基化多肽，以及具有其他翻译后修饰的多肽，例如具有不同糖的糖基化、乙酰化和磷酸化。抗体在其恒定区中的保守位置处是糖基化的 (Jefferis 和 Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128; Wright 和 Morrison, 1997, TibTECH15:26-32)。免疫球蛋白的寡糖侧链影响蛋白质的功能 (Boyd 等人, 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe 和 Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180)，以及糖蛋白的部分之间的分子内相互作用，其可以影响糖蛋白的构象和呈现的三维表面 (Jefferis 和 Lund, 同上; Wyss 和 Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416)。基于特异性识别结构，寡糖还可以作用于将给定糖蛋白靶向某些分子。抗体的糖基化也已报道影响抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。特别地，由 CHO 细胞产生的抗体据报道具有改善的 ADCC 活性，所述 CHO 细胞具有四环素调节的 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) (催化二分 GlcNAc 形成的糖基转移酶) 表达 (Umana 等人, 1999, Nature Biotech. 17:176-180)。

[0195] 抗体的糖基化通常是 N 联或 O 联的。N 联指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链的附着。三肽序列天冬酰胺 -X- 丝氨酸、天冬酰胺 -X- 苏氨酸和天冬酰胺 -X- 半胱氨酸，其中 X 是除了脯氨酸之外的任何氨基酸，是碳水化合物部分与天冬酰胺侧链的酶促附着的识别序列。因此，多肽中的这些三肽序列中任一的存在产生潜在的糖基化位点。O 联糖基化指糖 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一与羟基氨基酸的附着，所述羟基氨基酸最通常为丝氨酸或苏氨酸，尽管还可以使用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸。

[0196] 对抗体添加糖基化位点方便地通过下述来实现：这样改变氨基酸序列，从而使得它含有上述三肽序列中的一种或多种（对于 N 联糖基化位点）。改变还可以通过对原始抗体的序列添加或置换一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基进行制备（对于 O 联糖基化位点）。

[0197] 抗体的糖基化模式也可以改变，而不改变潜在的核苷酸序列。糖基化在很大程度上

上取决于用于表达抗体的宿主细胞。因为用于表达作为潜在治疗剂的重组糖蛋白例如抗体的细胞类型很少是天然细胞,所以可以预期抗体的糖基化模式中的变化(参见例如 Hse 等人,1997, J. Biol. Chem. 272:9062-9070)。

[0198] 除宿主细胞的选择之外,在抗体的重组产生过程中影响糖基化的因素包括生长方式、培养基配方、培养物密度、氧合作用、pH、纯化方案等等。已提出多种方法以改变在特定宿主生物中实现的糖基化模式,包括引入或过表达涉及寡糖产生的某些酶(美国专利号 5,047,335;5,510,261 和 5,278,299)。糖基化或某些类型的糖基化可以从糖蛋白中酶促去除,例如使用内切糖苷酶 H(Endo H)、N-糖苷酶 F、内切糖苷酶 F1、内切糖苷酶 F2、内切糖苷酶 F3。此外,重组宿主细胞可以遗传改造为在处理某些类型的多糖中是有缺陷的。这些和相似技术是本领域众所周知的。

[0199] 其他修饰方法包括使用本领域已知的偶联技术,包括但不限于酶促方法、氧化置换和螯合。修饰可以例如用于附着用于免疫测定法的标记。经修饰的多肽使用本领域建立的操作进行制备,并且可以使用本领域已知的标准测定法进行筛选,所述标准测定法中的一些在下文和实施例中描述。

[0200] 在一些实施方案中,抗体包含经修饰的恒定区,其具有对人 Fc γ 受体增加或降低的结合亲和力,是免疫惰性或部分惰性的,例如不触发补体介导的裂解,不刺激抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),或不活化小胶质细胞;或在下述中的任何一种或多种中具有减少的活性(与未经修饰的抗体相比较):触发补体介导的裂解,刺激 ADCC 或活化小胶质细胞。恒定区的不同修饰可以用于实现效应子功能的最佳水平和/或组合。参见例如 Morgan 等人, Immunology 86:319-324, 1995;Lund 等人, J. Immunology 157:4963-9157:4963-4969, 1996;Idusogie 等人, J. Immunology 164:4178-4184, 2000;Tao 等人, J. Immunology 143:2595-2601, 1989;和 Jefferis 等人, Immunological Reviews 163:59-76, 1998。在一些实施方案中,恒定区如 Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624;PCT 申请号 PCT/GB99/01441;和/或英国专利申请号 9809951.8 中所述进行修饰。

[0201] 在一些实施方案中,抗体恒定区可进行修饰,以避免与 Fc γ 受体以及补体和免疫系统相互作用。用于制备此类抗体的技术在 WO 99/58572 中描述。例如如果抗体用于人中的临床试验和治疗中,则恒定区可改造为更类似人恒定区,以避免免疫应答。参见例如美国专利号 5,997,867 和 5,866,692。

[0202] 在一些实施方案中,恒定区如 Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624;PCT 申请号 PCT/GB99/01441;和/或英国专利申请号 9809951.8 中所述进行修饰。在此类实施方案中, Fc 可以是人 IgG₂ 或人 IgG₄。Fc 可以是含有突变 A330P331 至 S330S331 的人 IgG₂ (IgG_{2 Δ a}), 其中氨基酸残基参考野生型 IgG₂ 序列进行编号。Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624。在一些实施方案中,抗体包括包含下述突变的 IgG₄ 的恒定区 (Armour 等人, 2003, Molecular Immunology 40:585-593);E233F234L235 至 P233V234A235 (IgG_{4 Δ c}), 其中编号参考野生型 IgG₄。在另外一个实施方案中, Fc 是人 IgG₄E233F234L235 至 P233V234A235, 具有缺失 G236 (IgG_{4 Δ b})。在另一个实施方案中, Fc 是含有铰链稳定突变 S228 至 P228 的任何人 IgG₄Fc (IgG₄、IgG_{4 Δ b} 或 IgG_{4 Δ c}) (Aalberse 等人, 2002, Immunology 105, 9-19)。

[0203] 在一些实施方案中,抗体包括包含下述突变的人重链 IgG₂ 恒定区:A330P331 至 S330S331(氨基酸编号参考野生型 IgG₂ 序列)。Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624。

在另外其他实施方案中,恒定区对于N联糖基化是无糖基化的。在一些实施方案中,通过突变其为恒定区中的N-糖基化识别序列的部分的寡糖附着残基和/或侧翼残基,恒定区对于N联糖基化是无糖基化的。例如,N糖基化位点N297可以突变为例如A、Q、K或H。参见Tao等人,J. Immunology 143:2595-2601,1989;和Jefferis等人,Immunological Reviews 163:59-76,1998。在一些实施方案中,恒定区对于N联糖基化是无糖基化的。恒定区可以酶促(例如通过酶PNG酶去除碳水化合物)或通过糖基化缺陷的宿主细胞中表达而对于N联糖基化是无糖基化的。

[0204] 其他抗体修饰包括已如PCT公开号WO 99/58572中所述进行修饰的抗体。除针对靶分子的结合结构域之外,这些抗体还包含具有与人免疫球蛋白重链恒定区的全部或部分基本上同源的氨基酸序列的效应子结构域。这些抗体能够结合靶分子,而不触发显著补体依赖性裂解,或细胞介导的靶的破坏。在一些实施方案中,效应子结构域能够特异性结合FcRn和/或FcγRIIb。这些通常基于衍生自两个或更多个人免疫球蛋白重链CH2结构域的嵌合结构域。以这种方式修饰的抗体特别适用于慢性抗体治疗,以避免对于常规抗体治疗的炎性及其他不良反应。

[0205] 在一些实施方案中,抗体包含经修饰的恒定区,与未经修饰的抗体相比较,其具有对于FcRn增加的结合亲和力和/或增加的血清半衰期。

[0206] 在称为“种系化(germlining)”的过程中,VH和VL序列中的某些氨基酸可以突变以匹配在种系VH和VL序列中天然发现的那些。特别地,VH和VL序列中的构架区的氨基酸序列可以突变以匹配种系序列,以减少在抗体施用时的免疫原性危险。关于人VH和VL基因的种系DNA序列是本领域已知的(参见例如“Vbase”人种系序列数据库;还参见Kabat, E. A. 等人,1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH 公开号 91-3242; Tomlinson 等人, 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798; 和 Cox 等人, 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836)。

[0207] 可以制备的另一类氨基酸置换是去除抗体中的潜在蛋白酶解位点。此类位点可以在抗体的可变结构域的CDR或构架区中或者恒定区中出现。半胱氨酸残基的置换和蛋白酶解位点的去除可以降低抗体产物中的异质性危险,并且因此增加其同质性。另一类氨基酸置换是消除天冬酰胺-甘氨酸对,通过改变残基中的一个或两个,其形成潜在脱酰胺位点。在另一个例子中,本发明的GHR抗体的重链的C末端赖氨酸可以被切割。在本发明的多个实施方案中,GHR抗体的重和轻链可以任选包括信号序列。

[0208] 一旦获得编码本发明的VH和VL区段的DNA片段,这些DNA片段就可以通过标准重组DNA技术进一步操作,例如以将可变区基因转换为全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中,VL或VH编码DNA片段与编码另一种蛋白质的另一个DNA片段可操作地连接,所述另一种蛋白质例如抗体恒定区或弹性接头。如本上下文中使用的,术语“可操作地连接的”意指两个DNA片段这样连接,从而使得由两个DNA片段编码的氨基酸序列保持在框内。

[0209] 通过使VH编码DNA与编码重链恒定区(CH1、CH2和CH3)的另一种DNA分子可操作地连接,编码VH区的分离DNA可以转换为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如Kabat, E. A. 等人,1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH

公开号 91-3242), 并且包含这些区域的 DNA 片段可以通过标准 PCR 扩增获得。重链恒定区可以是 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区, 但最优选是 IgG₁ 或 IgG₂ 恒定区。IgG 恒定区序列可以是已知在不同个体中出现的多种等位基因或同种异型中的任一种, 例如 Gm(1)、Gm(2)、Gm(3) 和 Gm(17)。这些同种异型代表 IgG1 恒定区中的天然存在的氨基酸置换。对于 Fab 片段重链基因, VH 编码 DNA 可以与仅编码重链 CH1 恒定区的另一种 DNA 分子可操作地连接。CH1 重链恒定区可以衍生自重链基因中的任一种。

[0210] 通过使 VL 编码 DNA 与编码轻链恒定区 CL 的另一种 DNA 分子可操作地连接, 编码 VL 区的分离 DNA 可以转换为全长轻链基因 (以及 Fab 轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的 (参见例如 Kabat, E. A. 等人, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH 公开号 91-3242), 并且包含这些区域的 DNA 片段可以通过标准 PCR 扩增获得。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区。 κ 恒定区可以是已知在不同个体中出现的多种等位基因中的任一种, 例如 Inv(1)、Inv(2) 和 Inv(3)。 λ 恒定区可以衍生自这些 λ 基因中的任一种。

[0211] 为了制备 scFv 基因, 使 VH 和 VL 编码 DNA 片段与编码弹性接头的另一种片段可操作地连接, 从而使得 VH 和 VL 序列可以作为邻接单链蛋白质表达, 其中 VL 和 VH 区通过弹性接头连接 (参见例如 Bird 等人, 1988, Science242:423-426 ;Huston 等人, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:5879-5883 ;McCafferty 等人, 1990, Nature348:552-554。连接肽的例子是 (GGGGS)₃ (SEQ ID NO:144), 其桥接一个可变区的羧基末端和另一个可变区的氨基末端之间大约 3.5nm。其他序列的接头已得到设计并使用 (Bird 等人, 1988, 同上)。接头依次又可以进行修饰用于另外功能, 例如药物的附着或与固体载体的附着。如果仅使用单个 VH 和 VL, 则单链抗体可以是单价的, 如果使用两个 VH 和 VL, 则单链抗体可以是二价的, 或如果使用超过两个 VH 和 VL, 则单链抗体可以是多价的。可以生成双特异性或多价抗体, 其与 GHR 和另一种分子特异性结合。单链变体可以重组或合成产生。对于 scFv 的合成产生, 可以使用自动化合成仪。对于 scFv 的重组产生, 含有编码 scFv 的多核苷酸的合适质粒可以引入合适的宿主细胞内, 所述宿主细胞或是真核的例如酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞, 或是原核的例如大肠杆菌。编码目的 scFv 的多核苷酸可以通过常规操作例如多核苷酸的连接进行制备。所得的 scFv 可以使用本领域已知的标准蛋白质纯化技术进行分离。

[0212] 还包含其他形式的单链抗体例如双抗体。双抗体是二价、双特异性抗体, 其中 VH 和 VL 在单条多肽链上表达, 但使用太短而不允许相同链上的两个结构域之间配对的接头, 由此迫使结构域与另一条链的互补结构域配对, 并且产生两个抗原结合位点 (参见例如 Holliger, P. 等人, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:6444-6448 ;Poljak, R. J. 等人, 1994, Structure2:1121-1123)。

[0213] 包含两个共价连接的抗体的异源缀合抗体也在本发明的范围内。此类抗体已用于将免疫系统细胞靶向不希望有的细胞 (美国专利号 4, 676, 980), 并且用于治疗 HIV 感染 (PCT 公开号 WO 91/00360 和 WO 92/200373 ;EP 03089)。异源缀合抗体可以使用任何方便的交联方法进行制备。合适的交联剂和技术是本领域众所周知的, 并且在美国专利号 4, 676, 980 中描述。

[0214] 使用合成蛋白质化学的已知方法, 包括涉及交联剂的那些, 也可以在体外制备嵌合或杂交抗体。例如, 免疫毒素可以使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键进行构建。用

于该目的的合适试剂的例子包括亚氨基硫醇盐和甲基-4-巯基丁酸盐。

[0215] 本发明还包括包含来自本文公开抗体的一种或多种片段或区的融合蛋白。在一些实施方案中,可以制备包含与另一种多肽连接的本发明的 GHR 抗体的全部或部分的融合抗体。在另一个实施方案中,仅 GHR 抗体的可变结构域与多肽连接。在另一个实施方案中,GHR 抗体的 VH 结构域与第一多肽连接,而 GHR 抗体的 VL 结构域与第二多肽连接,所述第二多肽与第一多肽以这样的方式结合,从而使得 VH 和 VL 结构域可以彼此相互作用,以形成抗原结合位点。在另一个优选实施方案中,VH 结构域通过接头与 VL 结构域分离,从而使得 VH 和 VL 结构域可以彼此相互作用。VH-接头-VL 抗体随后与目的多肽连接。此外,可以制备融合抗体,其中两种(或更多种)单链抗体彼此连接。如果希望制备在单条多肽链上的二价或多价抗体,或如果希望制备双特异性抗体,则这是有用的。

[0216] 在一些实施方案中,提供了融合多肽,其包含 SEQ ID NO:7、9、11、13 或 14 中所示的可变轻链区的至少 10 个邻接氨基酸,和/或 SEQ ID NO:8、10 或 12 中所示的可变重链区的至少 10 个氨基酸。在其他实施方案中,提供了融合蛋白,其包含可变轻链区的至少约 10、至少约 15、至少约 20、至少约 25 或至少约 30 个邻接氨基酸,和/或可变重链区的至少约 10、至少约 15、至少约 20、至少约 25 或至少约 30 个邻接氨基酸。在另一个实施方案中,融合多肽包含轻链可变区和/或重链可变区,如选自 SEQ ID NO:7 和 8、9 和 10、11 和 12、13 和 8、以及 14 和 8 中的序列对中任一中所示。在另一个实施方案中,融合多肽包含一个或多个 CDR。在另外其他实施方案中,融合多肽包含 VH CDR3 和/或 VL CDR3。为了本发明的目的,融合蛋白含有一种或多种抗体和它在天然分子中与之不附着的另一种氨基酸序列,例如来自另一个起源的异源序列或同源序列。示例性异源序列包括但不限于“标签”例如 FLAG 标签或 6His 标签。标签是本领域众所周知的。

[0217] 融合多肽可以通过本领域已知的方法例如合成或重组进行制备。通常,本发明的融合蛋白通过使用本文描述的重组方法制备编码其的表达多核苷酸进行制备,尽管它们还可以通过本领域已知的其他方法包括例如化学合成进行制备。

[0218] 在其他实施方案中,其他经修饰的抗体可以使用 GHR 抗体编码核酸分子进行制备。例如,遵循说明书的教导,可以使用标准分子生物学技术制备“Kappa 体”(Ill 等人,1997, *Protein Eng.* 10:949-57)、“微型抗体”(Martin 等人,1994, *EMBO J.* 13:5303-9)、“双抗体”(Holliger 等人,同上)、或“Janusins”(Traunecker 等人,1991, *EMBO J.* 10:3655-3659 和 Traunecker 等人,1992, *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52)。

[0219] 例如,可以使用本文公开的抗体制备双特异性抗体,对于至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体。用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的(参见例如 Suresh 等人,1986, *Methods in Enzymology* 121:210)。例如,双特异性抗体或抗原结合片段可以通过杂交瘤的融合或 Fab' 片段的连接来产生。参见例如 Songsivilai&Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321, Kostelny 等人,1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553。传统上,双特异性抗体的重组产生基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条重链具有不同的特异性 (Millstein 和 Cuello, 1983, *Nature* 305, 537-539)。此外,双特异性抗体可以作为“双抗体”或“Janusins”形成。在一些实施方案中,双特异性抗体与 GHR 的两种不同表位结合。在一些实施方案中,上文描述的经修饰的抗体使用来自本文提供的 GHR 抗体的可变结构域或 CDR 区中的一种或多种进行制备。

[0220] 根据制备双特异性抗体的一种方法,具有所需结合特异性(抗体-抗原组合位点)的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定区序列融合。融合物优选具有免疫球蛋白重链恒定区,包含铰链的至少部分、CH2 和 CH3 区。优选具有第一重链恒定区(CH1),含有轻链结合所需的位点,存在于融合物的至少一个中。将编码免疫球蛋白重链融合物的 DNA 和需要时的免疫球蛋白轻链插入分开的表达载体内,并且共转染到合适的宿主生物体内。当构建中使用的三条多肽链的不相等比例提供最佳得率时,这提供了在实施方案中调整三种多肽片段的相互比例中的极大弹性。然而,当以相等比率的至少两条多肽链的表达导致高得率时,或当比率不具有特定意义时,能够将两条或所有三条多肽链的编码序列插入一种表达载体内。

[0221] 在一种方法中,双特异性抗体由杂交免疫球蛋白重链组成,具有在一个臂中的第一结合特异性和在另一个臂中的杂交免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)。免疫球蛋白轻链在双特异性分子仅一半中的该不对称结构,促进所需双特异性化合物与不希望有的免疫球蛋白链组合的分开。该方法在 PCT 公开号 WO 94/04690 中描述。

[0222] 本发明还提供了包含与试剂缀合(例如连接)的抗体的组合物,所述试剂促进与固体载体(例如生物素或抗生物素蛋白)的偶联。为了简单起见,一般提及抗体应理解为这些方法适用于本文描述的 GHR 结合和/或拮抗剂实施方案中的任一种。缀合一般指连接如本文描述的这些组分。连接(其一般将这些组分固定在接近结合中至少用于施用)可以以任何方式实现。例如,当各自具有能够与另一种反应的取代基时,试剂和抗体之间的直接反应是可能的。例如,在一种上的亲核基团例如氨基或巯基可能能够与在另一种上的含羰基基团例如酮或酸性卤化物,或与含有烷基的良好离去基团(例如卤化物)反应。

[0223] 抗体可以与许多不同载体结合。载体可以是活性和/或惰性的。众所周知的载体的例子包括聚丙烯、聚苯乙烯、聚乙烯、右旋糖酐、尼龙、淀粉酶、玻璃、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁石。为了本发明的目的,载体的性质可以是可溶的或不可溶的。本领域技术人员将理解用于结合抗体的其他合适载体,或能够使用例行实验确定载体。

[0224] 本发明的抗体或多肽可以与标记试剂连接,所述标记试剂例如荧光分子、放射性分子或本领域已知的任何其他标记。标记是本领域已知的,其一般(直接或间接)提供信号。

[0225] 多核苷酸、载体和宿主细胞

[0226] 本发明还提供了编码抗体中的任一种的多核苷酸,所述抗体包括本文描述的抗体片段和经修饰的抗体,例如具有受损的效应子功能的抗体。在另一个方面,本发明提供了制备本文描述的多核苷酸中的任一种的方法。多核苷酸可以通过本领域已知的操作进行制备并表达。相应地,本发明提供了多核苷酸或包含多核苷酸的组合物,包括药物组合物,所述多核苷酸编码下述中的任一种:抗体 SS1、SS3、SS4、TM1 或 TM9 或其具有拮抗 GHR 的能力的任何片段或部分。

[0227] 本发明还包含与任何此类序列互补的多核苷酸。多核苷酸可以是单链的(编码或反义)或双链的,并且可以是 DNA(基因组、cDNA 或合成的)或 RNA 分子。RNA 分子包括含有内含子并以一对一方式对应于 DNA 分子的 HnRNA 分子,和不含内含子的 mRNA 分子。另外的编码或非编码序列可以但无需存在于本发明的多核苷酸内,并且多核苷酸可以但无需与其他分子和/或载体材料连接。

[0228] 多核苷酸可以包含天然序列（即，编码抗体或其片段的内源序列）或可以包含此类序列的变体。多核苷酸变体含有一种或多种置换、添加、缺失和 / 或插入，从而使得相对于天然免疫反应性分子，编码多肽的免疫反应性不缩小。对编码多肽的免疫反应性的作用一般可以如本文描述的进行评价。变体优选与编码天然抗体或其片段的多核苷酸序列显示出至少约 70% 同一性、更优选至少约 80% 同一性、再更优选至少约 90% 同一性、和最优选至少约 95% 同一性。

[0229] 如果当如下所述就最大对应性进行比对时，两个多核苷酸或多肽序列中的核苷酸或氨基酸序列是相同的，则两个序列被说成是“相同的”。在两个序列之间的比较通常通过在比较窗上比较序列进行，以鉴定并比较序列相似性的局部区域。如本文使用的“比较窗”指至少约 20、通常 30 至约 75、或 40 至约 50 个邻接位置的区段，其中在两个序列最佳比对后，序列可以与具有相同数目的邻接位置的参考序列相比较。

[0230] 用于比较的序列的最佳比对可以使用 Lasergene[®] 生物信息学软件套件（DNASTAR[®], Inc., Madison, WI）中的 MegAlign[®] 程序进行，使用缺省参数。该程序体现下述参考文献中所述的几个比对方案：Dayhoff, M. O., 1978, A model of evolutionary change in proteins—Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M. O. (编辑) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC 第 5 卷, Suppl. 3, 第 345-358 页；Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis 第 626-645 页 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA；Higgins, D. G. 和 Sharp, P. M., 1989, CABIOS 5:151-153；Myers, E. W. 和 Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17；Robinson, E. D., 1971, Comb. Theor. 11:105；Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425；Sneath, P. H. A. 和 Sokal, R. R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA；Wilbur, W. J. 和 Lipman, D. J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730。

[0231] 优选地，“序列同一性百分比”通过在至少 20 个位置的比较窗上比较两个最佳比对的序列进行测定，其中与参考序列（其不含添加或缺失）相比较，比较窗中的多核苷酸或多肽序列的部分可以包含 20 百分比或更少、通常 5 至 15 百分比、或 10 至 12 百分比的添加或缺失（即缺口），用于两个序列的最佳比对。百分比通过下述进行计算：测定在其处相同核酸碱基或氨基酸残基在两个序列中出现的位置数目，以获得匹配位置数目，将匹配位置数目除以参考序列中的总位置数目（即窗口大小），并且将结果乘以 100，以获得序列同一性百分比。

[0232] 变体还可以或可替代地与天然基因或其部分或互补体基本上同源。此类多核苷酸变体能够在中等严格条件下与天然存在的编码天然抗体的 DNA 序列（或互补序列）杂交。

[0233] 合适的“中等严格条件”包括在 5X SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH8.0) 的溶液中预洗涤；在 50℃ -65℃、5X SSC 下杂交过夜；随后在 65℃ 下洗涤两次共 20 分钟，各自使用含有 0.1% SDS 的 2X、0.5X 和 0.2X SSC。

[0234] 如本文使用的，“高度严格条件”或“高严格性条件”是这样的：(1) 采用低离子强度 and 高温用于洗涤，例如在 50℃ 下的 0.015M 氯化钠 / 0.0015M 柠檬酸钠 / 0.1% 十二烷基硫酸

钠；(2) 在 42℃ 下在杂交过程中采用变性剂，例如甲酰胺，例如 50% (v/v) 甲酰胺与 0.1% 牛血清白蛋白 / 0.1% Ficoll / 0.1% 聚乙烯吡咯烷酮 / 以 pH6.5 含有 750mM 氯化钠、75mM 柠檬酸钠的 50mM 磷酸钠缓冲液；或 (3) 在 42℃ 下采用 50% 甲酰胺、5x SSC (0.75M NaCl、0.075M 柠檬酸钠)、50mM 磷酸钠 (pH6.8)、0.1% 焦磷酸钠、5x Denhardt's 溶液、超声处理的鲑精 DNA (50 μg/ml)、0.1% SDS 和 10% 右旋糖酐硫酸酯，伴随在 42℃ 下在 0.2x SSC (氯化钠 / 柠檬酸钠) 中的洗涤和在 55℃ 下在 50% 甲酰胺中的洗涤，随后为在 55℃ 下由含有 EDTA 的 0.1x SSC 组成的高严格性洗涤。技术人员应认识到如何根据需要调整温度、离子强度等，以适应诸如探针长度等等的因素。

[0235] 本领域普通技术人员应当理解由于遗传密码的简并性，存在编码如本文描述的多肽的许多核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些与任何天然基因的核苷酸序列具有最低限度同源性。然而，本发明具体考虑了由于密码子使用中的差异而改变的多核苷酸。进一步地，包含本文提供的多核苷酸序列的基因的等位基因在本发明的范围内。等位基因是由于一种或多种突变例如核苷酸缺失、添加和 / 或置换而改变的内源基因。所得的 mRNA 和蛋白质可以但无需具有改变的结构或功能。等位基因可以使用标准技术（例如杂交、扩增和 / 或数据库序列比较）进行鉴定。

[0236] 本发明的多核苷酸可以使用化学合成、重组方法或 PCR 获得。化学多核苷酸合成的方法是本领域众所周知的，并且无需在本文中详细描述。本领域技术人员可以使用本文提供的序列和商业 DNA 合成仪，以产生所需 DNA 序列。

[0237] 对于使用重组方法制备多核苷酸，包含所需序列的多核苷酸可以插入合适载体内，并且载体依次又可以引入合适的宿主细胞内用于复制和扩增，如本文进一步讨论的。多核苷酸可以通过本领域已知的任何方法插入宿主细胞内。通过经由直接摄取、胞吞作用、转染、F 交配或电穿孔引入外源多核苷酸来转化细胞。一旦引入，外源多核苷酸就可以作为非整合载体（例如质粒）在细胞内维持或整合到宿主细胞基因组内。如此扩增的多核苷酸可以通过本领域众所周知的方法从宿主细胞中分离。参见例如 Sambrook 等人，1989。

[0238] 可替代地，PCR 允许 DNA 序列的复制。PCR 技术是本领域众所周知的，并且在美国专利号 4,683,195、4,800,159、4,754,065 和 4,683,202 以及 PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis 等人，编辑，Birkhäuser Press, Boston, 1994 中描述。

[0239] 可以通过使用在适当载体中的分离 DNA 并将其插入合适的宿主细胞内来获得 RNA。当细胞复制并且 DNA 转录成 RNA 时，RNA 随后可以使用本领域技术人员众所周知的方法进行分离，如例如 Sambrook 等人，1989，同上中所述。

[0240] 合适的克隆载体可以根据标准技术进行构建，或可以选自本领域可获得的大量克隆载体。虽然选择的克隆载体可以根据预期使用的宿主细胞而改变，但有用的克隆载体一般具有自复制的能力，可以具有用于特定限制性核酸内切酶的单一靶，和 / 或可以携带可以用于选择含有载体的克隆的标记的基因。合适的例子包括质粒和细菌病毒，例如 pUC18、pUC19、Bluescript（例如 pBS SK+）及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌体 DNA、以及穿梭载体例如 pSA3 和 pAT28。这些和许多其他克隆载体可从商业厂商例如 BioRad、Stratagene 和 Invitrogen 获得。

[0241] 进一步提供了表达载体。表达载体一般是可复制的多核苷酸构建体，其含有根据本发明的多核苷酸。暗示表达载体必须可在宿主细胞中作为附加体或作为染色体 DNA 的整

合部分复制。合适的表达载体包括但不限于质粒,病毒载体包括腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒,粘粒和 PCT 公开号 WO 87/04462 中公开的一种或多种表达载体。载体组分一般可以包括但不限于下述中的一种或多种:信号序列;复制起点;一种或多种标记基因;合适的转录控制元件(例如启动子、增强子和终止子)。对于表达(即翻译),通常还需要一种或多种翻译控制元件,例如核糖体结合位点、翻译起始位点和终止密码子。

[0242] 含有目的多核苷酸的载体可通过许多适当方法中的任一种引入宿主细胞内,所述方法包括电穿孔,采用磷酸钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-右旋糖酐或其他物质的转染;微粒轰击;脂转染;和感染(例如当载体是感染剂如牛痘病毒时)。引入载体或多核苷酸的选择通常取决于宿主细胞的特征。

[0243] 本发明还提供了包含本文描述的多核苷酸中的任一种的宿主细胞。能够过表达异源 DNA 的任何宿主细胞均可以用于分离编码目的抗体、多肽或蛋白质的基因的目的。哺乳动物宿主细胞的非限制性例子包括但不限于 COS、HeLa 和 CHO 细胞。还参见 PCT 公开号 WO 87/04462。合适的非哺乳动物宿主细胞包括原核生物(例如大肠杆菌或枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*))和酵母(例如酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*S. pombe*)或乳酸克鲁维酵母(*K. lactis*))。优选地,宿主细胞表达的 cDNA 水平比宿主细胞中相应的内源目的抗体或蛋白质(如果存在的话)的那种高约 5 倍、更优选地高 10 倍、甚至更优选地高 20 倍。就与 GHR 或 GHR 结构域的特异性结合筛选宿主细胞通过免疫测定法或 FACS 来实现。可以鉴定过表达目的抗体或蛋白质的细胞。

[0244] 表达载体可以用于指导 GHR 拮抗剂抗体的表达。本领域技术人员熟悉表达载体的施用,以获得外源蛋白质在体内的表达。参见例如美国专利号 6,436,908;6,413,942;和 6,376,471。表达载体的施用包括局部或全身施用,包括注射、经口施用、粒子枪或插入导管的施用、和局部施用。在另一个实施方案中,表达载体直接施用于交感神经干或神经节,或冠状动脉、心房、心室或心包膜内。

[0245] 还可以使用含有表达载体或亚基因组多核苷酸的治疗组合物的靶向递送。受体介导的 DNA 递送技术在例如下述中描述:Findeis 等人, *Trends Biotechnol.*, 1993, 11:202; Chiou 等人, *Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer*, J. A. Wolff, 编辑, 1994; Wu 等人, *J. Biol. Chem.*, 1988, 263:621; Wu 等人, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269:542; Zenke 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87:3655; Wu 等人, *J. Biol. Chem.*, 1991, 266:338。对于在基因治疗方案中的局部施用,含有多核苷酸的治疗组合物以约 100ng 至约 200mg DNA 的范围施用。约 500ng 至约 50mg、约 1 μ g 至约 2mg、约 5 μ g 至约 500 μ g 和约 20 μ g 至约 100 μ g DNA 的浓度范围也可以用于基因治疗方案过程中。治疗多核苷酸和多肽可以使用基因递送媒介物进行递送。基因递送媒介物可以具有病毒或非病毒起源(一般参见, Jolly, *Cancer Gene Therapy*, 1994, 1:51; Kimura, *Human Gene Therapy*, 1994, 5:845; Connelly, *Human Gene Therapy*, 1995, 1:185; 和 Kaplitt, *Nature Genetics*, 1994, 6:148)。此类编码序列的表达可以使用内源哺乳动物或异源启动子引入。编码序列的表达可以是组成性或调节的。

[0246] 用于在所需细胞中递送所需多核苷酸和表达的基于病毒的载体是本领域众所周知的。示例性基于病毒的媒介物包括但不限于重组逆转录病毒(参见例如 PCT 公开号 WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218;

WO 91/02805 ;美国专利号 5,219,740 和 4,777,127 ;GB 专利号 2,200,651 ;和 EP 专利号 0345242)、基于甲病毒的载体(例如辛德毕斯病毒载体、塞姆利基森林病毒(ATCC VR-67 ;ATCC VR-1247)、罗斯河病毒(ATCC VR-373 ;ATCC VR-1246)和委内瑞拉马脑炎病毒(ATCC VR-923 ;ATCC VR-1250 ;ATCC VR 1249 ;ATCC VR-532))、和腺伴随病毒(AAV)载体(参见例如 PCT 公开号 WO 94/12649, WO 93/03769 ;WO 93/19191 ;WO 94/28938 ;WO 95/11984 和 WO 95/00655)。还可以采用如 Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147 中所述的与被杀死的腺病毒连接的 DNA 的施用。

[0247] 还可以采用非病毒递送媒介物和方法,包括但不限于与单独的被杀死腺病毒连接或未连接的多聚阳离子缩合的 DNA(参见例如 Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147) ;配体连接的 DNA(参见例如 Wu, J. Biol. Chem., 1989, 264:16985) ;真核细胞递送媒介物细胞(参见例如美国专利号 5,814,482 ;PCT 公开号 WO 95/07994 ;WO 96/17072 ;WO 95/30763 ;和 WO 97/42338)和核电荷中和或与细胞膜融合。还可以采用裸露 DNA。示例性裸露 DNA 引入方法在 PCT 公开号 WO 90/11092 和美国专利号 5,580,859 中描述。可以充当基因递送媒介物的脂质体在美国专利号 5,422,120 ;PCT 公开号 WO 95/13796 ;WO 94/23697 ;WO 91/14445 ;和 EP 0524968 中描述。另外的方法在 Philip, Mol. Cell Biol., 1994, 14:2411 以及 Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, 91:1581 中描述。

[0248] 组合物

[0249] 本发明还提供了包含有效量的本文描述的 GHR 抗体的药物组合物。此类组合物的例子以及如何配制也在本文中描述。在一些实施方案中,组合物包含一种或多种 GHR 抗体。在其他实施方案中,GHR 抗体识别 GHR。在其他实施方案中,GHR 抗体是人抗体。在其他实施方案中,GHR 抗体是人源化抗体。在一些实施方案中,GHR 抗体包含能够触发所需免疫应答,例如抗体介导的裂解或 ADCC 的恒定区。在其他实施方案中,GHR 抗体包含不触发不希望有或不期望的免疫应答,例如抗体介导的裂解或 ADCC 的恒定区。在其他实施方案中,GHR 抗体包含抗体的一个或多个 CDR(例如一、二、三、四、五个或在一些实施方案中,所有六个 CDR)。

[0250] 应当理解组合物可以包含超过一种 GHR 拮抗剂抗体(例如识别 GHR 的不同表位的 GHR 拮抗剂抗体的混合物)。其他示例性组合物包含识别一种或多种相同表位的超过一种 GHR 拮抗剂抗体,或与 GHR 的不同表位结合的不同种类的 GHR 拮抗剂抗体。

[0251] 在本发明中使用的组合物可以进一步包含以冻干制剂或水溶液的形式,药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington: The Science and practice of Pharmacy 第 20 版(2000) Lippincott Williams 和 Wilkins, 编辑 K. E. Hoover)。可接受载体、赋形剂或稳定剂在剂量和浓度时对于接受者是无毒的,并且可以包含缓冲剂例如磷酸盐、柠檬酸盐及其他有机酸 ;抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸 ;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵 ;氯化六甲双铵 ;苯扎氯铵、苄索氯铵 ;苯酚、丁醇或苯甲醇 ;对羟基苯甲酸烷基酯例如对烷基苯甲酸甲酯或丙酯 ;儿茶酚 ;间苯二酚 ;环己醇 ;3-戊醇 ;和间甲酚) ;低分子量(小于约 10 个残基)多肽 ;蛋白质例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白 ;亲水聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮 ;氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸 ;单糖、二糖及其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或右旋糖酐 ;螯合剂例如 EDTA ;糖例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇 ;成盐抗衡离子例如钠 ;金属络合物(例如 Zn-蛋白质络合物) ;和/或非离子表面活性剂例如 TWEENTM、PLURONICSTM 或聚乙二醇(PEG)。药学可接受的赋形剂在

本文中进一步描述。

[0252] GHR 拮抗剂抗体及其组合物还可以与其他试剂结合使用,所述其他试剂作用于增强和 / 或补充试剂的有效性。

[0253] 本发明还提供了包含本发明的多核苷酸中的任一种的组合物,包括药物组合物。在一些实施方案中,组合物包括包含编码如本文描述的抗体的多核苷酸的表达载体。在其他实施方案中,组合物包括包含编码本文描述的抗体中的任一种的多核苷酸的表达载体。在另外其他实施方案中,组合物包含下文 SEQ ID NO :142 和 SEQ ID NO :143 中所示的多核苷酸中的任一或两者。编码 SS1hIgG_{2Δa} GHR 拮抗剂抗体的重和轻链的核酸序列在下文显示:

[0254] SS1hIgG_{2Δa} 重链:

[0255] GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGGTGAAACCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGACGCCTGGATGGACTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGGCGAGATCAGAAGCAAGGCCAACTATCACGCCACCTACTACGCCGAGAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCCTGATTAGAGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCAGCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAAATGTTGTGTGCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAGGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCCATCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (SEQ ID NO :142)

[0256] SS1hIgG_{2Δa} 轻链:

[0257] GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCACCCCTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGTACCGCCACCAGCAGCGTGTCCAGCAGCTACCTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCAGACTGCTGATCTACAGCACCAGCAACCTGGCCAGCGGCATCCCCGACAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCACCAGTACCACAGAAGCACCCCCACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO :143)

[0258] 试剂盒

[0259] 本发明还提供了包含本文描述的抗体中的任一种或全部的试剂盒。本发明的试剂盒包括包含本文描述的 GHR 拮抗剂抗体的一个或多个容器,以及依照本文描述的方法中的任一种的使用说明书。一般地,这些说明书包含关于上述治疗性处理的 GHR 拮抗剂施用的描述。在一些实施方案中,试剂盒提供用于产生单一剂量施用单位。在某些实施方案中,试剂盒可以含有具有干燥蛋白质的第一容器和具有水性制剂的第二容器。在某些实施方案中,包括含有单室和多室预填充注射器(例如液体注射器和冻干剂注射器(lyosyringes))的试剂盒。

[0260] 在一些实施方案中,抗体是人抗体。在一些实施方案中,抗体是人源化抗体。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。与 GHR 抗体使用相关的说明书一般包括关于预期治疗的剂量、给药方案和施用途径的信息。容器可以是单位剂量、大包装(例如多剂量包)或亚单位剂量。在本发明的试剂盒中供应的说明书一般是在标签或包装说明书(例如在试剂盒中包括的纸片)上的书面说明书,但机器可读说明书(例如在磁盘或光学存储盘上携带的说明书)也是可接受的。

[0261] 本发明的试剂盒处于合适包装中。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶、罐、软包装(例如密封的 Mylar 或塑料袋)等等。还考虑的是用于与特定装置组合使用的包装,所述特定装置例如吸入器、鼻施用装置(例如喷雾器)或输注装置例如微型泵。试剂盒可以具有无菌访问口(例如容器可以是具有可由皮下注射针穿透的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。容器也可以具有无菌访问口(例如容器可以是具有可由皮下注射针穿透的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是 GHR 抗体。容器可以进一步包含第二药理学活性剂。

[0262] 试剂盒可以任选提供另外的组分例如缓冲剂和说明信息。通常,试剂盒包含容器和在容器上或与容器结合的标签或一种或多种包装说明书。

[0263] 生物保藏

[0264] 本发明的代表性材料于 2011 年 12 月 22 日保藏于美国典型培养物中心, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, USA。具有 ATCC 登记号 PTA-12352 的载体 SS1-HC 是编码 SS1 重链可变区的多核苷酸,并且具有 ATCC 登记号 PTA-12353 的载体 SS1-LC 是编码 SS1 轻链可变区的多核苷酸。根据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约以及其实施细则(布达佩斯条约)进行保藏。这确保保藏物从保藏日开始 30 年的活培养物的维持。保藏物可根据布达佩斯条约条款通过 ATCC 获得,并且服从在 Pfizer, Inc. 和 ATCC 之间的协议,其确保在有关美国专利的颁布后或者任何美国或外国专利申请对公众公开后,无论哪个在先,保藏物培养物后代对公众的永久和无限制的可用性,并且确保根据 35 U.S.C 章节 122 和依照其的行政长官章程(包括 37 C.F.R. 章节 1.14,其中特别提及 8860G638),通过对其授权的美国专利与商标局长决定的个人对后代的可用性。

[0265] 本申请的受让人已同意如果保藏材料的培养物在适当条件下培养时死亡或丢失或破坏,则材料将在通知后迅速替换为相同的另一种。保藏材料的可用性不应解释为实践本发明的许可违反任何政府依照其专利法的权威机构授予的权利。

[0266] 下述实施例仅提供用于举例说明性目的,并且不预期以任何方式限制本发明的范围。实际上,除本文所示并描述的那些之外,本发明的多种修饰根据前述说明书对于本领域技术人员将是显而易见的,并且落入所附权利要求的范围内。

[0267] 实施例

[0268] 实施例 1:生成并筛选 GHR 拮抗剂抗体

[0269] 用于动物免疫接种生成单克隆抗体的一般操作:

[0270] 使用 25 μ g 抗原 hGHR/Fc R&D Systems™ 目录号 1210-GR-050,在第 0、3、6 和 9 天时,将 Balb/c 小鼠注射 4 次。对于前 4 次注射,通过根据方案将重组蛋白质与 Gerbu 佐剂混合并涡旋来制备抗原。免疫原经由注射给予颈背、足垫和腹膜内。在第 11 天时的末次加强无需佐剂 i. v. 施用。在第 15 天时,对小鼠实施安乐死并且取出其脾。淋巴细胞通过与已建立的细胞系融合而永生化,以使用标准杂交瘤技术制备杂交瘤克隆,并且分布到 96 孔板内。允许克隆生长,并且随后如下所述通过使用免疫接种抗原的 ELISA 筛选加以选择。

[0271] 抗体的 ELISA 筛选:

[0272] 来自生长中的杂交瘤克隆的上清液培养基分别就其结合重组人 GHR/hFc 的能力进行筛选。用由 50 μ l 11 μ g/ml 抗原溶液包被过夜的 96 孔板进行测定。在每个步骤之间用含有 0.05% Tween™-20 的 PBS,从孔中洗涤过量试剂。将上清液加入板中,并且在室温下温育 2 小时。加入辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的山羊抗小鼠 Fc,以结合与抗原结合的小鼠抗体。随后加入 ABTS(2, 2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二钠盐)作为 HRP 的底物,以检测上清液中存在的小鼠抗体的量。通过阅读在 405nm 处的吸光度来定量抗体的相对量。选择分泌能够与人 GHR/hFc 结合的抗体的杂交瘤克隆。运行下一个测定法以检测针对 hFc 的抗体,从而使得它们可以被避免。进行进一步分析以表征所选克隆。

[0273] 实施例 2:测定抗体动力学和结合亲和力

[0274] 该实施例举例说明针对人和 cyno GHR 的 GHR 抗体的抗体动力学和结合亲和力的测定。

[0275] 在 25°C 下 GHR/Ab13IgG 相互作用的动力学和亲和力的测定

[0276] 在 Biacore™2000 生物传感器 (GE Lifesciences™,Piscataway NJ) 上测量小鼠抗 GHR 抗体 Ab13 对人和 cyno GHR 的亲和力。使用由制造商提供的说明书,使用来自 Biacore™小鼠抗体捕获试剂盒 (GE Lifesciences™,目录 #BR-1008-38) 的 Biacore™CM5 芯片和试剂,制备抗小鼠 Ig 传感器表面。

[0277] 如 Karlsson 等人,2006, Anal. Biochem 349, 136-147 中所述,使用动力学滴定方法运行动力学测定法。将小鼠抗体 Ab13 以 5 μ L/ 分钟的流速以 0.5 μ g/mL 捕获到下游流动池上,对于流动池 2、3 和 4 分别为 1 分钟、2 分钟和 4 分钟。流动池 1 用作参考表面。在抗体捕获后,以从低到高浓度的一系列注射,在所有流动池上以 30 μ L/ 分钟注射人或 cyno GHR(人或 cyno GHR 的细胞外结构域的氨基酸 31-235 的加上 his 标签的单体)。最高浓度对于人 GHR 为 400nM,并且对于 cyno GHR 为 2000nM;稀释因子为 5 倍。每次 GHR 注射为两分钟,在 400nM PCSK9 注射后的解离时间为 10 分钟。用运行缓冲液代替 GHR 进行相似组注射用于双重参考目的(如 Myszk, 1999, J. Mol. Recognit 12, 279-284 中所述的双重参考)。每个 GHR 稀释系列一式两份运行。在每个分析循环后,所有流动池用 10mM 甘氨酸 pH1.7 的一次三分钟注射再生。双重参考的传感图与具有质量转运结合模型的简单 1:1 兰米尔总体拟合(对于每个流动池使用局部 R_{max} 参数)。

[0278] 实验在 25°C 下使用 10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% (v/v) Tween-20™, pH7.4 的运行缓冲液进行。研究的结果在下表 4a 中概括。

[0279] 在 25℃下关于 SS1 和 Ab13-hFc 嵌合体的 GHR/IgG 相互作用的动力学和亲和力的测定

[0280] 在 Biacore™2000 生物传感器 (GE Lifesciences™, Piscataway NJ) 上, 测量人源化 GHR 抗体 SS1 和包含与人 Fc 结构域融合的 Ab13Fab 的嵌合分子 (“Ab13-hFc”) 对人和 cyno GHR 的亲和力。

[0281] 通过以 10 μL/ 分钟的流速, 用 400mM 乙基 -N-(3- 二乙基氨基丙基) 碳化二亚胺 (EDC, Biacore™) 和 100mM N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS, Biacore™) 的 1:1(v/v) 混合物活化 Biacore™CM4 传感器芯片的所有流动池 7 分钟, 制备抗人 Fc 传感器芯片。抗人 Fc 试剂 (山羊 F(ab')₂ 片段抗人 IgG Fc, Cappel 目录 #55053) 在 10mM 乙酸钠 pH5.0 中稀释至 60 μg/mL, 并且以 20 μL/ 分钟注射到所有流动池上 7 分钟。所有流动池用在 150mM 硼酸盐缓冲液 pH8.5 中的 100mM 乙二胺以 10 μL/ 分钟封闭 7 分钟。

[0282] 如 Katsamba 等人, 2006, Anal. Biochem 352, 208-221 中所述, 使用具有不同解离时间的方法运行动力学测定法。抗体以 10 μL/ 分钟的流速以 4 μg/mL 捕获到下游流动池 (流动池 2、3 和 4) 上 1 分钟。在每个流动池上捕获不同抗体。流动池 1 用作参考表面。在抗体捕获后, 分析物 (缓冲液、人 GHR 或 cyno GHR) 以 30 μL/ 分钟注射到所有流动池上两分钟。对于 GHR 分析, 使用人或 cyno GHR 的细胞外结构域的氨基酸 31-235 的加上 his 标签的单体。在分析物注射后, 监控解离 30 分钟 (对于 400nM GHR 循环) 或 30 秒 (所有其他循环), 随后为所有流动池用 75mM 磷酸的两次 30 秒注射的再生。使用这种方法分析 GHR 的 5 成员稀释系列, 其中最高浓度为 400nM, 并且稀释因子为 3 倍。缓冲液循环对于 30 分钟和 30 秒解离时间进行收集用于双重参考目的。双重参考的传感图与具有质量转运结合模型的简单 1:1 兰米尔总体拟合。

[0283] 实验在 25℃下使用 10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% (v/v) Tween-20™, pH7.4 的运行缓冲液进行。研究的结果在下表 4a 中概括。

[0284] 表 4a

[0285]

固定的	分析物							
	人 GHR				Cyno GHR			
	ka(1/Ms)	kd(1/s)	t ½ (分钟)	K _D (nM)	ka(1/Ms)	kd(1/s)	t ½ (分钟)	K _D (nM)
Ab13 ¹	4.2E+04	6.0E-04	19	14.3	1.4E+04	8.4E-04	13.8	58.7
Ab13-hFc ²	1.2E+05	6.9E-04	17	5.8	1.1E+05	2.0E-03	5.9	18.2
SSI ²	7.4E+04	7.7E-05	150	1.0	8.1E+04	1.0E-04	111.1	1.3
SSI(重复) ²	7.7E+04	6.4E-05	180	0.8	8.9E+04	1.1E-04	107.0	1.2
¹ 通过在抗小鼠 Ig 表面上的捕获而固定的抗体								
² 通过在抗人 Fc 表面上的捕获而固定的抗体								

[0286] 在 37℃下 GHR/Fab 相互作用 (使用固定的 Fab) 的动力学和亲和力的测定

[0287] 在 Biacore™T200 生物传感器 (GE Lifesciences™, Piscataway NJ) 上, 测量 GHR 抗体 SS1Fab 对人和 cyno GHR 的亲和力。

[0288] 通过以 10 μL/ 分钟的流速, 用 400mM EDC 和 100mM NHS 的 1:1(v/v) 混合物活化 Biacore™CM4 传感器芯片的所有流动池 7 分钟, 制备抗人 κ 传感器芯片。抗人 κ 试剂 (山

羊 F(ab')₂ 片段抗人 κ , Southern Biotech 目录 #2063-01) 在 10mM 乙酸钠 pH4.5 中稀释至 50 μ g/mL, 并且以 20 μ L/ 分钟注射到所有流动池上 7 分钟。所有流动池用在 150mM 硼酸盐缓冲液 pH8.5 中的 100mM 乙二胺以 10 μ L/ 分钟封闭 7 分钟。

[0289] 如 Katsamba 等人, 同上中所述, 使用具有不同解离时间的方法运行动力学测定法。Fab 以 10 μ L/ 分钟的流速以 2 μ g/mL 捕获到下游流动池 (流动池 2、3 和 4) 上 2 分钟。在每个流动池上捕获不同 Fab。流动池 1 用作参考表面。在 Fab 捕获后, 分析物 (缓冲液、人 GHR 或 cyno GHR) 以 30 μ L/ 分钟注射到所有流动池上两分钟。对于 GHR 分析, 使用人或 cyno GHR 的细胞外结构域的氨基酸 31-235 的加上 his 标签的单体。在分析物注射后, 监控解离 30 分钟 (对于 133nM 和 400nM GHR 循环) 或 60 秒 (所有其他循环), 随后为用 10mM 甘氨酸 pH1.7 的三次 30 秒注射的再生。使用这种方法分析 GHR 的 6 成员稀释系列, 其中最高浓度为 400nM, 并且稀释因子为 3 倍。缓冲液循环对于 30 分钟和 60 秒解离时间进行收集用于双重参考目的。双重参考的传感图与具有质量转运结合模型的简单 1:1 兰米尔总体拟合。

[0290] 实验在 37°C 下使用 10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% (v/v) Tween-20TM, pH7.4 的运行缓冲液进行。研究的结果在下表 4b 中概括。

[0291] 在 37°C 下 GHR/Fab 相互作用 (其中 hGHR-hFc 是固定的) 的动力学和亲和力的测定

[0292] 在 BiacoreTMT200 生物传感器 (GE LifesciencesTM, Piscataway NJ) 上, 测量 GHR 抗体 SS1Fab 对人和 cyno GHR 的亲和力。

[0293] 通过以 10 μ L/ 分钟的流速, 用 400mM EDC 和 100mM NHS 的 1:1 (v/v) 混合物活化 BiacoreTMCM4 传感器芯片的所有流动池 7 分钟, 制备抗人 Fc 传感器芯片。抗人 Fc 试剂 (针对人 IgG Fc 的山羊 F(ab')₂ 片段, Cappel 目录 #55053) 在 10mM 乙酸钠 pH5.0 中稀释至 60 μ g/mL, 并且以 20 μ L/ 分钟注射到所有流动池上 7 分钟。所有流动池用在 150mM 硼酸盐缓冲液 pH8.5 中的 100mM 乙二胺以 10 μ L/ 分钟封闭 7 分钟。

[0294] 如 Katsamba 等人, 同上中所述, 使用具有不同解离时间的方法运行动力学测定法。hGHR-hFc 融合蛋白 (R&D SystemsTM, 目录 #1210-GR) 以 10 μ L/ 分钟的流速以 2 μ g/mL 捕获到下游流动池, 对于流动池 2、3 和 4 分别为 30 秒、1 分钟和 2 分钟。流动池 1 用作参考表面。在 hGHR-hFc 捕获后, 分析物 (缓冲液、SS1Fab 或 Ab13Fab) 以 30 μ L/ 分钟注射到所有流动池上两分钟。在分析物注射后, 监控解离 30 分钟 (400nM Fab 循环) 或 60 秒 (所有其他循环), 随后为用 75mM 磷酸的两次 30 秒注射的再生。使用这种方法分析 Fab 的 5 成员稀释系列, 其中最高浓度为 400nM, 并且稀释因子为 3 倍。缓冲液循环在 30 分钟和 60 秒解离时间时进行收集用于双重参考目的。双重参考的传感图与具有质量转运结合模型的简单 1:1 兰米尔总体拟合 (对于每个流动池使用局部 Rmax 参数)。

[0295] 实验在 37°C 下使用 10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% (v/v) Tween-20TM, pH7.4 的运行缓冲液进行。研究的结果在下表 4b 中概括。

[0296] 表 4b

[0297]

固定的	分析物	ka(1/Ms)	kd(1/s)	t ½(分钟)	K _D (nM)
SS1 Fab ¹	人 GHR	1.38E+05	2.15E-04	53.7	1.6
SS1Fab ¹	cyno GHR	1.82E+05	5.76E-04	20.0	3.2
hGHR-hFc ²	SS1 Fab	3.74E+05	3.59E-04	32.2	1.0
hGHR-hFc ²	Ab13 Fab	1.47E+05	4.25E-03	2.7	28.8
¹ 通过在抗人 κ 表面上的捕获而固定的 Fab					
² 通过在抗人 Fc 表面上的捕获而固定的 hGHR-hFc					

[0298] 实施例 3 :STAT5 磷酸化体外测定法

[0299] 该实施例举例说明 GHR 抗体在体外 STAT5 磷酸化测定法中的作用。在该实施例中，使用人 GHR 过表达细胞和 cyno GHR 过表达细胞，在体外测试 GHR 抗体阻断 GHR 下游发信号的能力。

[0300] GH 通过 JAK/STAT 途径发信号。GH 与 GHR 的结合引起二聚化受体中的构象变化。该变化导致 JAK2 (Janus 相关激酶 2) 的细胞内磷酸化。JAK2 的磷酸化随后诱导 STAT5 (信号转导蛋白和转录激活子 5) 的磷酸化。磷酸化的 STAT5 易位至核，在其中它与 GH 依赖性基因的启动子序列结合。

[0301] GHR 拮抗剂抗体 Ab13 在体外测定法中测试其阻断 STAT5 的能力。HEK293 细胞用编码全长人 GHR 的 DNA (SEQ ID NO :140) 或编码全长 cyno GHR 的 DNA (SEQ ID NO :141) 进行瞬时转染。细胞在测试前在自由式培养基 (freestyle media) 中培养大约 60 小时。细胞用 DPBS (达尔贝科磷酸盐缓冲盐水) 洗涤，并且重悬浮于自由式培养基中，随后使用血球计进行计数。将 1×10^6 细胞 / 孔种植到 6 孔板中的 2ml 自由式培养基中。细胞在 37°C 下温育 2 小时，随后用在培养基中的 5、50 或 500nM Ab13 抗体进行处理。细胞在 37°C 下伴随轻轻混合与抗体一起温育 5 分钟。随后将 4.5nM GH (健豪宁) 加入除对照外的所有孔中。使细胞在 37°C 下伴随轻轻混合与 GH 一起温育 10 分钟。

[0302] 在与 GH 一起温育后，将具有 1X 蛋白酶抑制剂混合物 (Roche) 和 1mM 原钒酸钠 (BioLabs) 的 2ml 冰冷的 DPBS 加入每个孔中，并且将板置于冰上。将细胞转移至 5ml 管，并且向下旋转以产生细胞团块，并且抽吸洗涤缓冲液，留下细胞团块。

[0303] 来自 Millipore™ MILLIPLEX® MAP Cell Signaling Buffer and Detection Kit (目录 #48-602) 的试剂用于裂解并处理细胞团块。将具有 1X 蛋白酶抑制剂混合物和 1mM 原钒酸钠的 Millipore 裂解缓冲液以 200ul / 团块的体积加入每个团块中。将细胞涡旋并且在室温下伴随偶然涡旋温育 15 分钟。随后将具有 1X 蛋白酶抑制剂混合物和 1mM 原钒酸钠的 Millipore 测定缓冲液 2 以 300ul / 孔加入裂解产物中。

[0304] 将 Millipore™ MILLIPLEX® MAP Phospho STAT5A/B (Tyr694/699) MAPmate™ 珠 (目录 #46-641) 重悬浮于测定缓冲液 2 (来自 Millipore™ 试剂盒目录 #48-602) 中，并且以 25ul / 孔装载到 96 孔滤板 (在试剂盒中提供) 上。将 25ul / 孔的样品裂解产物加入孔中，并且使珠和样品在 4°C 下伴随振荡在黑暗中温育过夜。

[0305] 随后使用真空歧管 (manifold) 抽吸液体，并且使用 Millipore™ 试剂盒洗涤缓冲液洗涤剩余珠。加入 25ul Millipore™ 试剂盒检测抗体，并且在室温下伴随振荡在黑暗中温育 1 小时。检测抗体通过抽真空，并且加入 25ul 试剂盒链霉抗生物素蛋白 - 藻红蛋白，

并且在黑暗中伴随振荡温育 15 分钟。随后加入 25u1 试剂盒扩增缓冲液,并且伴随振荡在黑暗中温育 15 分钟。使用真空歧管抽吸液体,并且将珠重悬浮于 150u1 试剂盒测定缓冲液 2 中,并且在阅读板前在振荡器上混合 5 分钟。

[0306] 使用 Luminex™200 仪器阅读板,并且测量由样品发出的荧光信号。STAT5 测定法的结果显示于表 5 和 6 中。“Ave”指示平均荧光信号,并且“SEM”指示平均值的标准误。

[0307] 表 5 :使用人 GHR 转染的细胞的 STAT5 测定法

[0308]

行	处理	荧光信号
1	无 GH	21
2	4. 5nM GH	519
3	5nM Ab13+4. 5nM GH	225
4	50nM Ab13 加上 4. 5nM GH	26
5	500nM Ab13 加上 4. 5nM GH	28

[0309] 表 6 :使用 Cyno GHR 转染的细胞的 STAT5 测定法

[0310]

行	处理	荧光信号	
		Ave	SEM
1	无 GH	22	12
2	4.5 nM GH	562	29
3	5 nM Ab13 + 4.5nM GH	317	33
4	50 nM Ab13 加上 4.5nM GH	51	4

[0311] 用 4. 5nM GH 处理 GHR 转染的细胞刺激表达人 GHR (表 5, 第 2 行) 或 cyno GHR (表 6, 第 2 行) 的细胞中的 STAT5 发信号。Ab13 以剂量依赖性方式阻断 STAT5 发信号 (表 5, 第 3-5 行 ;表 6, 第 3 和 4 行)。

[0312] 使 Ab13 亲和力成熟并人源化,导致抗体 SS3 和 SS1 的选择。人源化 GHR 拮抗剂抗体 SS1 和 SS3 的重和轻链氨基酸序列显示于下文。

[0313] SS1hIgG2 Δ a 重链氨基酸序列

[0314] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLEWVAEIRSKANYHATYYAESVKGR
FTISRDDSKNTLYLQMSLKTEDTAVYYCTLRDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPP
CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEV
ESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO :
134)

[0315] 不含 C 末端赖氨酸的 SS1hIgG2 Δ a 重链氨基酸序列

[0316] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLEWVAEIRSKANYHATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLIRDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO : 133)

[0317] SS1hIgG2 Δ a 轻链氨基酸序列

[0318] EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCTATSSVSSSYLNWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRSTPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO :135)

[0319] SS3hIgG2 Δ a 重链氨基酸序列

[0320] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLEWVAEIRSKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLFRDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO : 136)

[0321] SS3hIgG2 Δ a 轻链氨基酸序列

[0322] EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCTATSSVSSSYLNWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRFTPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO :137)

[0323] SS1FcM 重链氨基酸序列

[0324] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLEWVAEIRSKANYHATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLIRDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV LHEALHSHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO : 138)

[0325] SS1FcM 轻链氨基酸序列

[0326] EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCTATSSVSSSYLNWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRSTPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO :139)

[0327] 使用 STAT5 磷酸化测定法测试抗体 SS3 和 SS1 (hIgG2 Δ a)。对于 STAT5 测定法, 培

养过表达全长人 GHR 的 HEK293 细胞或过表达全长 cyno GHR 的 HEK293 细胞,通过自动化细胞计数器进行计数,并且种植到 12 孔板中的加温自由式培养基中(在 1ml 培养基中的 5×10^5 细胞/孔)。允许细胞在 37℃ 下沉降 3 小时,随后用在培养基中的 2.5、5、50 或 500nM SS1 或 SS3 处理。细胞在 37℃ 下伴随轻轻混合与抗体一起温育 5 分钟。随后将 4.5nM 人生长激素(Pfizer)加入除对照外的所有孔中。使细胞在 37℃ 下伴随轻轻混合与 GH 一起温育 10 分钟。

[0328] 在与 GH 一起温育后,将具有 1X 蛋白酶抑制剂混合物(Roche)和 1mM 原钒酸钠(BioLabs)的 2ml 冰冷的 DPBS 加入每个孔中,并且将板置于冰上。将细胞转移至 5ml 管,并且向下旋转以产生细胞团块,并且抽吸洗涤缓冲液,留下细胞团块。

[0329] 来自 Millipore™ **MILLIPLEX**® MAP Cell Signaling Buffer and Detection Kit(目录 #48-602)的试剂用于裂解并处理细胞团块。将具有 1X 蛋白酶抑制剂混合物和 1mM 原钒酸钠的 Millipore™ 裂解缓冲液以 100ul/团块的体积加入每个团块中。将细胞涡旋并且在室温下伴随偶然涡旋温育 15 分钟。随后将具有 1X 蛋白酶抑制剂混合物和 1mM 原钒酸钠的 Millipore™ 测定缓冲液 2 以 200ul/孔加入裂解产物中。

[0330] 将 Millipore™ **MILLIPLEX**® MAP Phospho STAT5A/B(Tyr694/699)MAPmate™ 珠(目录 #46-641)重悬浮于测定缓冲液 2(来自 Millipore 试剂盒目录 #48-602)中,并且以 25ul/孔装载到 96 孔滤板(在试剂盒中提供)上。将 25ul/孔的样品裂解产物加入孔中,并且使珠和样品在 4℃ 下伴随振荡在黑暗中温育过夜。

[0331] 随后使用真空歧管抽吸液体,并且使用 Millipore™ 试剂盒洗涤缓冲液洗涤剩余珠。加入 25ul Millipore™ 试剂盒检测抗体,并且在室温下伴随振荡在黑暗中温育 1 小时。检测抗体通过抽真空,并且加入 25ul 试剂盒链霉抗生物素蛋白-藻红蛋白,并且在黑暗中伴随振荡温育 15 分钟。随后加入 25ul 试剂盒扩增缓冲液,并且伴随振荡在黑暗中温育 15 分钟。使用真空歧管抽吸液体,并且将珠重悬浮于 150ul 试剂盒测定缓冲液 2 中,并且在阅读板前在振荡器上混合 5 分钟。

[0332] 使用 Lumine200 仪器阅读板,并且测量由样品发出的荧光信号。STAT5 测定法的结果显示于表 7 和 8 中。

[0333] 表 7:使用人 GHR 转染的细胞的 STAT5 测定法

[0334]

行	处理	荧光信号	
		ave	SEM
1	无 GH	0.0	0
2	4.5 nM GH	252.6	46
3	2.5 nM SS1 + 4.5nM GH	60	4
4	5 nM SS1 + 4.5nM GH	22	16
5	50 nM SS1 + 4.5nM GH	0	0
6	500 nM SS1 + 4.5nM GH	5	4
7	2.5 nM SS3 + 4.5nM GH	100	63
8	5 nM SS3 + 4.5nM GH	48	27
9	50 nM SS3 + 4.5nM GH	0	0
10	500 nM SS3 + 4.5nM GH	0	0

[0335] 表 8 :使用 Cyno GHR 转染的细胞的 STAT5 测定法

[0336]

行	处理	荧光信号	
		ave	SEM
1	无 GH	1.6	2.4
2	4.5 nM GH	847	26.0
3	2.5 nM SS1 + 4.5nM GH	496	14.8
4	5 nM SS1 + 4.5nM GH	223	4.3
5	50 nM SS1 + 4.5nM GH	17	0.5
6	500 nM SS1 + 4.5nM GH	12	6.3
7	2.5 nM SS3 + 4.5nM GH	621	36.0
8	5 nM SS3 + 4.5nM GH	518	38.5
9	50 nM SS3 + 4.5nM GH	50	5.3
10	500 nM SS3 + 4.5nM GH	8	3.0

[0337] 用 4.5nM GH 处理 GHR 转染的细胞刺激表达人 GHR (表 7, 第 2 行) 或 cyno GHR (表 8, 第 2 行) 的细胞中的 STAT5 发信号。人源化 GHR 抗体 SS1 和 SS3 均以剂量依赖性方式阻断 STAT5 发信号 (表 7, 第 3-10 行; 表 8, 第 3-10 行)。

[0338] 实施例 4 :GHR 拮抗剂抗体有效降低食蟹猴中的血液 IGF-1 水平

[0339] 该实施例举例说明 GHR 拮抗剂抗体对食蟹猴中的血液 IGF-1 水平的作用。

[0340] 为了测定 GHR 拮抗剂单克隆抗体是否可以通过抑制 GHR 的功能来影响体内 IGF-1 水平, 在食蟹猴中测试鼠抗人 GHR 抗体 Ab13 的作用。IGF-1 水平是体内生长激素活性的生物标记。与体内基线水平相比较, 阻断 GHR 已显示导致 IGF-1 水平中的下降。

[0341] 为了测试 IGF-1 水平中的变化, 五只首次用于实验的雌性食蟹猴用在 1XPBS 中的 Ab13 或阴性对照小鼠 IgG1 的单个剂量进行 IV 注射。在第 1 天时, 两只猴用 30mg/kg Ab13 进行给药, 一只猴用 10mg/kg Ab13 进行给药, 并且两只猴用 30mg/kg 阴性对照猴 IgG1 进行给药。在下述时间点从所有动物获得血清样品: 剂量前, 剂量后 1 小时、4 小时、8 小时、12 小时、24 小时、48 小时、72 小时、96 小时、120 小时、144 小时、168 小时、216 小时、264 小时和 312 小时。

[0342] 使用 R&D Systems™ Quantikine™ 人 IGF-1 免疫测定法试剂盒 (目录 #DG100), 就相对基线相比较的 IGF-1 水平中的变化分析血清样品。关于范围为 24 小时至 312 小时的时间点的研究结果显示于表 9 中。

[0343] 表 9 :Ab13 对血清 IGF-1 水平的作用 (相对基线的改变%)

[0344]

处理	注射后时间点									
	24 小时	48 小时	72 小时	96 小时	120 小时	144 小时	168 小时	216 小时	264 小时	312 小时
10 mg/kg Ab13 (n=1)	-33.1	-46.2	-38.6	-48.8	-42.8	-31	-35.3	-36.8	-24.2	-3.4
30 mg/kg Ab13 (n=2)	-24.2 +/- 5.6	-53.7 +/- 0.1	-55.5 +/- 1.5	-62.65 +/- 1.85	-63.5 +/- 4.3	-63.05 +/- 7.15	-59.05 +/- 6.85	-51.2 +/- 8.5	-37.15 +/- 5.65	-4.5 +/- 6.9
30 mg/kg 对照 1 IgG1 (n=2)	3.75 +/-2.0 5	3.3 +/- 3.9	5.35 +/- 1.05	-2.75 +/- 2.95	-4.2 +/- 9.1	12.6 +/- 8.4	2.1 +/- 8	14.3 +/- 0.4	15.55 +/- 3.35	25.9 +/- 9.2

[0345] 表 9 中的数据显示 GHR 拮抗剂抗体 Ab13 剂量依赖性减少食蟹猴中的血清 IGF-1 水平。血清 IGF-1 水平到 30mg/kg Ab13 的单个剂量的静脉内施用后 96 小时降低至低于基线约 63%, 并且血清 IGF-1 水平直到抗体施用后约 144 小时保持在低于基线约 63%。血清 IGF-1 水平到 10mg/kg Ab13 的单个剂量的静脉内施用后 96 小时降低至低于对照约 48.8%。IGF-1 水平到 312 小时回到基线。相比之下, 在用 30mg/kg 对照 IgG1 给药的动物中的血清 IGF-1 水平在研究自始至终保持在约基线水平 (表 9)。这些结果证实用 GHR 拮抗剂抗体的处理有效降低血液中的 IGF-1 水平, 并且该效应是剂量依赖性的。

[0346] 实施例 5 :GHR 拮抗剂抗体有效降低食蟹猴中的血液 IGF-1、IGFBP-3 和 ALS 水平

[0347] 该实施例举例说明 GHR 拮抗剂抗体对食蟹猴中的血液 IGF-1、IGF 结合蛋白 3 (IGFBP-3) 和酸不稳定亚单位 (ALS) 水平的作用。

[0348] 为了测定 GHR 拮抗剂单克隆抗体是否可以通过抑制 GHR 的功能来影响体内 IGF-1、IGFBP-3 和 ALS 水平, 在食蟹猴中测试人源化抗人 GHR 抗体 SS1 的作用。进行剂量应答研究, 以测试在 SS1 的单个剂量后, 在 IGF-1、IGFBP-3 和 ALS 水平中的变化。八只首次用于实验的雌性食蟹猴用在 1X PBS 0.01% Tween™20 中的 SS1 或阴性对照人 IgG_{2A} 的单个剂量进行静脉内注射。在第 1 天时, 两只猴用 30mg/kg SS1 进行给药, 两只猴用 10mg/kg SS1 进行给药, 两只猴用 3mg/kg SS1 进行给药, 并且两只猴用 30mg/kg 阴性对照人 IgG_{2A} 进行给药。在下述时间点从所有动物获得血清样品: 剂量前、24 小时、48 小时、72 小时、120 小时、144 小时、192 小时、240 小时、336 小时、528 小时、696 小时。还在剂量后 864 小时从 30mg/kg SS1 和阴性对照处理的动物中获得血清。

[0349] 使用 R&D Systems™ Quantikine™ 人 IGF-1 免疫测定法试剂盒 (目录 #DG100), 就相对基线相比较的 IGF-1 水平中的变化分析血清样品。关于范围为 24 小时至 864 小时的时间点的研究结果显示于表 10 中。

[0350] 表 10 :SS1 对血清 IGF-1 水平的作用 (相对基线的改变%)

[0351]

处理	注射后时间										
	24 小时	48 小时	72 小时	120 小时	144 小时	192 小时	240 小时	336 小时	528 小时	696 小时	864 小时
SS1, 3 mg/kg	-43.6 +/- 0.5	-66.6 +/- 1.1	-67.1 +/- 1.6	-76.2 +/- 7.9	-68.4 +/- 1.1	-65.2 +/- 3.0	-34.5 +/- 17.8	64.2 +/- 0.6	85.1 +/- 46.0	49.2 +/- 11.3	
SS1, 10 mg/kg	-43.4 +/- 2.2	-62.6 +/- 5.5	-67.1 +/- 4.7	-73.5 +/- 2.1	-76.0 +/- 0.1	-74.0 +/- 0.2	-70.9 +/- 1.9	-61.4 +/- 0.6	25.7 +/- 11.8	31.7 +/- 15.2	
SS1, 30 mg/kg	-43.2 +/- 3.0	-63.2 +/- 5.0	-68.5 +/- 5.8	-75.2 +/- 5.2	-77.5 +/- 5.6	-77.2 +/- 3.3	-74.8 +/- 3.4	-73.3 +/- 0.7	-73.0 +/- 0.9	-70.4 +/- 1.1	-8.8 +/- 2.9
对照 IgG1, 30 mg/kg	-14.4 +/- 2.3	-47.1 +/- 3.5	-9.2 +/- 6.4	-6.6 +/- 2.3	0.8 +/- 1.4	6.8 +/- 12.4	4.9 +/- 14.8	3.7 +/- 15.7	23.6 +/- 14.9	42.0 +/- 26.3	25.4 +/- 8.4

[0352] 表 10 中的数据显示 GHR 拮抗剂抗体 SS1 剂量依赖性减少食蟹猴中的血清 IGF-1 水平。在用 30mg/kg IgG1 给药的对照动物中,血清 IGF-1 水平在用对照 IgG1 给药后 48 小时降低至低于基线约 47%,随后到给药后 144 小时回到基线水平,并且在研究剩余部分自始至终保持在约或超过基线水平 (表 10,最后一行)。相比之下,血清 IGF-1 水平到 3、10 或 30mg/kg SS1 的单个剂量的静脉内施用后 120 小时降低至低于基线水平约 75%。在用 SS1 处理的动物中的血清 IGF-1 水平直到剂量施用后 240 小时 (3mg/kg 剂量)、336 小时 (10mg/kg 剂量) 或 696 小时 (30mg/kg 剂量) 保持基本上低于基线。这些结果证实用 GHR 拮抗剂抗体的处理有效降低血液中的 IGF-1 水平,并且该效应是剂量依赖性的。

[0353] 使用 R&D Systems™ Quantikine™ 人 IGFBP-3 免疫测定法试剂盒 (目录 #DGB300), 就相对基线相比较的 IGFBP-3 水平中的变化分析血清样品。关于范围为 24 小时至 336 小时的时间点的研究结果显示于表 11 中。

[0354] 表 11 :SS1 对血清 IGFBP-3 水平的作用 (相对基线的改变%)

[0355]

处理	注射后时间								
	24 小时	48 小时	72 小时	96 小时	120 小时	144 小时	192 小时	312 小时	336 小时
SS1, 3 mg/kg	-18.75 +/- 1.25	-22.8 +/- 3.8	-36.45 +/- 6.65	-37.35 +/- 5.05	-38.25 +/- 4.85	-46.8 +/- 0.6	-32.55 +/- 1.35	22.4 +/- 1.9	28.15 +/- 12.25
SS1, 10 mg/kg	-23.95 +/- 3.35	-28.4 +/- 2.9	-37.9 +/- 2.4	-40.95 +/- 0.35	-46.4 +/- 1.1	-51.05 +/- 8.85	-45.95 +/- 6.35	-38.7 +/- 9.6	-42.25 +/- 1.85
SS1, 30 mg/kg	-10.6 +/- 4.6	-15.75 +/- 9.35	-22.95 +/- 16.15	-29.4 +/- 13.9	-38.15 +/- 9.45	-45.7 +/- 11.9	-31.05 +/- 16.05	-40.65 +/- 5.05	-39.45 +/- 0.85
对 照 IgG1, 30 mg/kg	2.95 +/- 0.75	-2.65 +/- 5.25	-1.75 +/- 6.25	-4 +/- 7.6	9 +/- 1.7	2.85 +/- 1.25	10.3 +/- 2.2	20.25 +/- 6.15	21.7 +/- 22.5

[0356] 表 11 中的数据显示 GHR 拮抗剂抗体 SS1 剂量依赖性减少食蟹猴中的血清 IGFBP-3 水平。血清 IGFBP-3 水平到 3、10 或 30mg/kg SS1 的单个剂量的静脉内施用后 72 小时分别降低至低于基线约 36%、38%或 23%。到给药后 144 小时,在用 3、10 或 30mg/kg SS1 处理的动物中的血清 IGFBP-3 水平分别降低至低于基线约 47%、51%或 46%。用 SS1 抗体的单个剂量处理的动物中的血清 IGFBP-3 到研究结束时回到基线水平。在用 30mg/kg 对照 IgG1 给药的动物中的血清 IGFBP-3 水平在研究自始至终保持在约基线水平(表 11,最后一行)。这些结果证实用 GHR 拮抗剂抗体的处理有效降低血液中的 IGFBP-3 水平。

[0357] 使用 BioVendor™Human ALS ELISA 试剂盒(目录 #RMEE35R),就相对基线相比较的 ALS 水平中的变化分析血清样品。关于范围为 24 小时至 336 的时间点的研究结果显示于表 12 中。

[0358] 表 12 :SS1 对血清 ALS 水平的作用(相对基线的改变%)

[0359]

处理	注射后时间								
	24 小时	48 小时	72 小时	96 小时	120 小时	144 小时	192 小时	312 小时	336 小时
SS1, 3 mg/kg	-23.0 +/- 4.0	-41.7 +/- 3.6	-45.4 +/- 0.9	-50.7 +/- 2.3	-48.0 +/- 0.4	-45.5 +/- 8.4	-50.7 +/- 8.8	-22.0 +/- 8.2	-23.7 +/- 6.4
SS1, 10 mg/kg	27.3 +/- 32.1	-9.4 +/- 23.4	-8.0 +/- 35.2	-24.1 +/- 23.6	-17.5 +/- 30.4	-46.5 +/- 1.9	-39.4 +/- 3.3	-38.7 +/- 4.1	-40.4 +/- 0.4
SS1, 30 mg/kg	3.9 +/- 4.2	-35.1 +/- 1.9	-34.9 +/- 10.5	-48.8 +/- 8.0	-41.2 +/- 13.9	-50.0 +/- 4.4	-50.2 +/- 2.0	-47.1 +/- 2.7	-50.1 +/- 4.4
对 照 IgG1, 30 mg/kg	8.6 +/- 3.5	-9.7 +/- 9.3	-2.6 +/- 2.3	-5.6 +/- 2.6	5.6 +/- 5.6	4.5 +/- 1.9	2.1 +/- 13.4	-0.5 +/- 2.7	-9.8 +/- 1.0

[0360] 表 12 中的数据显示 GHR 拮抗剂抗体 SS1 减少食蟹猴中的血清 ALS 水平。血清 ALS 水平到 3、10 或 30mg/kg SS1 的单个剂量的静脉内施用后 96 小时分别降低至约 51%、24%或 49%。用 SS1 抗体的单个剂量处理的动物中的血清 ALS 到研究结束时回到基线水平。在

用 30mg/kg 对照 IgG1 给药的动物中的血清 ALS 水平在研究自始至终保持在约基线水平（表 12, 最后一行）。这些结果证实用 GHR 拮抗剂抗体的处理有效降低血液中的 ALS 水平。

[0361] 动物进行皮下给药, 以测定 SS1 的皮下给药是否导致血液 IGF-1 和 ALS 水平的降低。六只首次用于实验的雌性食蟹猴用在 1X PBS0.01% Tween™20 中的 SS1 或阴性对照人 IgG_{2Δa} 的单个剂量进行静脉内或皮下注射。在第 1 天时, 两只猴用 3mg/kg SS1 进行静脉内给药, 两只猴用 3mg/kg SS1 进行皮下给药, 并且两只猴用 3mg/kg 阴性对照人 IgG_{2Δa} 进行皮下给药。在下述时间点从所有动物获得血清样品: 剂量前、24 小时、72 小时、120 小时、168 小时、216 小时、264 小时、312 小时、360 小时、408 小时、456 小时和 504 小时。

[0362] 使用 R&D Systems™ Quantikine™ 人 IGF-1 免疫测定法试剂盒（目录 #DG100）, 就相对基线相比较的 IGF-1 水平中的变化分析血清样品。关于范围为 24 小时至 360 小时的时间点的研究结果显示于表 13 中。

[0363] 表 13: SS1 对血清 IGF-1 水平的作用（相对基线的改变%）

[0364]

处理	注射后时间(小时)							
	24	72	120	168	216	264	312	360
SS1, 3 mg/kg SQ	-46.7 +/- 9.9	-62.5 +/- 2.5	-68.7 +/- 2.8	-65.6 +/- 4.1	-60.7 +/- 10.2	-40.9 +/- 25.6	-15.3 +/- 23.4	-4.2 +/- 22.6
SS1, 3 mg/kg IV	-35 +/- 4.4	-64.8 +/- 2.7	-71.6 +/- 1.8	-70.2 +/- 2.7	-64.5 +/- 0.5	-36.0 +/- 7.5	-30.3 +/- 7.0	-27.8 +/- 9.7
对照 IgG1, 3 mg/kg SQ	-1.7 +/- 3.9	-9.4 +/- 7.2	-4.2 +/- 5.8	6.2 +/- 2.9	2.3 +/- 9.1	0.5 +/- 12.4	4.1 +/- 17.9	-4.0 +/- 8.8

[0365] 表 13 中的数据显示当皮下 (SQ) 或静脉内 (IV) 施用, GHR 拮抗剂抗体 SS1 剂量依赖性减少食蟹猴中的血清 IGF-1 水平。血清 IGF-1 水平在用 3mg/kg SS1 的单个剂量的皮下 (SC) 或静脉内 (IV) 施用后 72 小时降低至低于对照约 63%。在用 SS1 处理的动物中的血清 IGF-1 水平直到 SQ 或 IV 给药后约 216 小时保持低于 60% 基线水平。在用 3mg/kg 对照 IgG1 皮下给药的动物中的血清 IGF-1 水平在研究自始至终保持在约基线水平（表 13, 最后一行）。这些结果证实用静脉内或皮下施用的 GHR 拮抗剂抗体的处理有效降低血液中的 IGF-1 水平。

[0366] 使用 BioVendor™ Human ALS ELISA 试剂盒（目录 #RMEE35R）, 就相对基线相比较的 ALS 水平中的变化分析血清样品。来自范围为 24 小时至 260 小时的时间点的研究结果显示于表 14 中。

[0367] 表 14: SS1 对血清 ALS 水平的作用（相对基线的改变%）

[0368]

处理	注射后时间(小时)						
	24	72	120	168	264	312	360
SS1 , 3 mg/kg SQ	-15.9 +/- 0.2	-42.7 +/- 0.5	-41.1 +/- 7.1	-33.7 +/- 6.5	-16.5 +/- 13.2	-5.0 +/- 13.6	-10.0 +/- 10.2
SS1 , 3 mg/kg IV	-4.5 +/- 4.6	-31.1 +/- 10.1	-37.5 +/- 9.4	-32.9 +/- 4.0	-9.3 +/- 2.5	-4.9 +/- 3.0	-9.7 +/- 9.6
对 照 IgG1 , 3 mg/kg SQ	4.7 +/- 5.3	7.5 +/- 5.9	4.0 +/- 22.0	8.3 +/- 13.9	16.1 +/- 6.2	16.0 +/- 14.6	9.5 +/- 13.3

[0369] 表 14 中的数据显示当皮下 (SQ) 或静脉内 (IV) 施用 3mg/kg SS1 时,拮抗剂抗体 SS1 剂量依赖性减少食蟹猴中的血清 ALS 水平。血清 ALS 水平在用 3mg/kg SS1 的单个剂量的皮下 (SQ) 施用后 72 小时降低至低于对照约 43%。ALS 水平在用 3mg/kg SS1 的单个剂量的静脉内 (IV) 施用后 72 小时降低至低于对照约 31%。血清 ALS 水平到 312 小时回到基线水平。在用 3mg/kg 对照 IgG1 给药的动物中的血清 ALS 水平在研究自始至终保持在或超过基线水平 (表 14,最后一行)。这些结果证实静脉内或皮下施用的 GHR 拮抗剂抗体的处理有效降低血液中的 ALS 水平。

[0370] 实施例 6 :与伊立替康组合的 GHR 拮抗剂抗体有效抑制小鼠癌症模型中的肿瘤

[0371] 该实施例举例说明 GHR 拮抗剂抗体对同基因小鼠癌症模型中的肿瘤生长的作用。

[0372] 为了测定 GHR 拮抗剂单克隆抗体是否可以抑制肿瘤生长,在同基因肿瘤模型中测试小鼠抗体 Ab11 的作用。Ab11 抗体是阻断小鼠 GHR 的小鼠 IgG1 抗体。CT26 细胞系用作结肠直肠癌的同基因小鼠模型。小鼠用肿瘤细胞进行注射,并且用单独或与伊立替康组合的 Ab11 抗体给药。阴性对照组和单独的伊立替康组也包括在研究中。

[0373] BALB/c 小鼠 (BALB/cAnNCr1) 得自 Charles River (Hollister, CA, USA), 并且维持在 Rinat 的动物设施中。当用于研究时,动物为 7 周龄,具有 22-23g 的初始体重。小鼠饲养在微隔离器 (microisolators) (空气过滤笼 (filter top cage)) 中的无病原体条件下,使用 12 小时光 /12 暗时间表,并且在实验自始至终喂养高压灭菌的标准饲料和水。

[0374] 小鼠未分化的结肠癌细胞系 CT26 (CRL-2638) 得自美国典型培养物中心 (ATCC; Manassas, VA, USA)。CT26 细胞在具有 L-谷氨酰胺 (10-040-CV) 的 RPMI1640, 1X (Cellgro™ Mediatech™, Inc., Manassas, VA, USA) 中生长,所述 RPMI 1640 含有 10% 胎牛血清 (43640) (JR Scientific™, Inc., Woodland, CA, USA) 和 1% 青霉素 - 链霉素溶液 (30-002-CI) (Cellgro™ Mediatech™, Inc., Manassas, VA, USA)。细胞通过与 Accutase (A6964-100ML) (Sigma™ Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) 一起的短暂温育进行收获,并且在新培养基中洗涤用于计数。使用 ViCell™、自动化计数器和活力计评价细胞计数和活力 (95.8%)。新培养基中的最终细胞悬浮液用 BD Matrigel™ Matrix 基膜 (356234) (BD Biosciences™, Bedford, MA, USA) 1:2 稀释用于注射。

[0375] 通过将 10^5 细胞皮下 (SC) 注射到 BALB/c 小鼠的左胁腹内起始肿瘤异种移植物。七天后,肿瘤已生长至大约 75-150mm³ 的体积。将动物分成具有大约相等的平均肿瘤体积和平均值的标准误的四组,并且随机分配以接受处理。对照组中的动物接受具有 10% 二甲基亚砜 (DMSO) (D2650-Sigma™ Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) 加上 10mg/kg 小鼠 IgG1 同

种型对照抗体的 1X PBS。伊立替康组中的动物接受 100mg/kg 盐酸伊立替康 (I1406-Sigma™ Aldrich) 加上 10mg/kg 小鼠 IgG1 同种型对照抗体。Ab11 组中的动物接受 10mg/kg Ab11 加上具有 10% DMSO 的 1X PBS。组合组中的动物接受 100mg/kg 伊立替康加上 10mg/kg Ab11。
[0376] 小鼠每第二至三天进行腹膜内 (IP) 给药。肿瘤体积和体重每周测量至少两次。研究是不知情的。在第 28 天时, 收集血液用于测量血清 IGF-1。

[0377] 肿瘤每 2-4 天用数显卡尺进行测量 (mm)。使用下式计算基线肿瘤体积: $V = d_2^2 \times (d_1/2)$, 其中 d_1 是肿瘤的最长直径, 并且 d_2 与 d_1 垂直。在研究结束时, 在研究仍是不知情的同时, 测定异常值并且从所有四组中排除。在第 14 天后的所有天时 (第 18、22、25 和 28 天), 其为 3X 平均值的标准误 < 平均值和 3X 平均值的标准误 > 平均值的肿瘤测定为异常值。还测量在研究结束时的肿瘤重量。

[0378] 使用小鼠 / 大鼠 IGF-1ELISA 试剂盒 (MG100) (R&D Systems™, Inc., Minneapolis, MN, USA), 通过 ELISA 测量血清 IGF-1。

[0379] 来自小鼠癌症模型研究的数据显示于下表 16 和 17 中。表 16 显示在对照动物、用 GHR 拮抗剂抗体 Ab11 处理的动物、用伊立替康处理的动物以及用 Ab11 和伊立替康两者处理的动物中的平均肿瘤体积 (以 mm^3 表示)。表 17 显示在对照动物、用 GHR 拮抗剂抗体 Ab11 处理的动物、用伊立替康处理的动物以及用 Ab11 和伊立替康两者处理的动物中, 在第 28 天时的平均肿瘤重量 (以克表示)。在表 15 和 16 中, 值作为用对照 IgG1 抗体、GHR 拮抗剂抗体、伊立替康、或 GHR 拮抗剂抗体和伊立替康的组合处理的每组动物的平均值给出。对于表 15 和 16 中的数据, * 指示相对于对照 $p < 0.05$, ** 指示相对于对照 $p < 0.01$, 并且 *** 指示相对于对照 $p < 0.001$ 。

[0380] 表 15. 在荷有 CT26 肿瘤的 BALB/c 小鼠中的肿瘤体积 (mm^3)。

[0381]

	对照		Ab11		伊立替康		Ab11 + 伊立替康		
	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	
第 7 天	108.6	8.1	107.8	8.7	104.3	7.7	106.9	7.3	
第 11 天	163.3	18.2	177.3	15.3	158.7	17.4	151.7	5.6	
第 13 天	209.3	19.4	265.3	21.3	193.8	17.7	183.3	18.4	
第 18 天	411.7	29.6	508.7	43.9	387.0	45.3	262.6	35.6	
第 22 天	794.3	81.0	897.3	56.9	676.2	50.2	487.3	68.8	
第 25 天	1204.6	158.6	1362.5	99.1	1053.7	88.3	745.1	87.0	**
第 28 天	1939.7	271.2	1897.2	172.5	1508.3	151.4	1092.1	132.2	***

[0382] 表 16. 在荷有 CT26 肿瘤的 BALB/c 小鼠中, 在第 28 天时的肿瘤重量 (以克表示) 和血清 IGF-1 水平 (ng/mL)。

[0383]

	对照		Ab11		伊立替康		Ab11 + 伊立替康	
	平均值	SEM	平均值	SEAM	平均值	SEM	平均值	SEM
肿瘤重量	1.9**g	0.2**g	1.9**g	0.3**g	1.2**g	0.2**g	0.8**g	0.1**g
血清 IGF-1	410.1 ng/mL	7.8 ng/mL	298.6 ng/mL	3.842*** ng/mL	454.9 ng/mL	14.93* ng/mL	278.0 ng/mL	13.89*** ng/mL

[0384] 表 15 显示在用与伊立替康组合的 GHR 拮抗剂抗体处理的动物中的平均肿瘤体积 (1092.1mm^3) 显著低于对照动物中的平均肿瘤体积 (1939.7mm^3)。

[0385] 表 16 显示与对照动物中的血清 IGF-1 水平 (410.1ng/mL) 相比较,在用单独 (298.6ng/mL) 或与伊立替康组合 (278ng/mL) 的 GHR 拮抗剂抗体处理的动物中显著更低的第 28 天平均血清 IGF-1 水平。这些结果证实用 GHR 拮抗剂抗体处理有效降低小鼠癌症模型的血液中的 IGF-1 水平。表 16 还显示与对照动物中的平均肿瘤重量 (1.9g) 相比较,在用与伊立替康组合的 GHR 拮抗剂抗体处理的动物中显著更低的第 28 天平均肿瘤重量 (0.8g)。用单独的伊立替康处理导致 1.2g 的平均肿瘤重量。这些结果证实用与伊立替康组合的 GHR 拮抗剂抗体的处理有效抑制小鼠癌症模型中的肿瘤生长。

[0386] 实施例 7:GHR 拮抗剂抗体有效减少胶原诱发性关节炎的小鼠模型中的疾病严重性

[0387] 该实施例举例说明 GHR 拮抗剂抗体对胶原诱发性关节炎的小鼠模型中的疾病严重性的作用。

[0388] 为了测定 GHR 拮抗剂单克隆抗体是否可以减少关节炎的疾病严重性,在胶原诱发性关节炎的小鼠模型中测试小鼠抗体 Ab11 的作用。

[0389] 四十四只雄性小鼠 (品系 B10. RIII-H2r H2-T18b1 (71NS) SnJ. 原种 #000457) 购自 Jackson Labs (Bar Harbor, ME), 并允许在到达后适应几天。在研究开始时,动物为大约 8 周龄。将小鼠随机指定至 10 只的 4 组,以接受类风湿性关节炎诱导。一组 4 只健康的未处理的小鼠作为对照进行分析。在第 0 天和第 15 天时,疾病组动物用异氟醚进行麻醉,并且用在具有 4mg/mL 补充的结核分枝杆菌 (*mycobacterium tuberculosis*) (Difco Laboratories, Detroit, MI) 的 $100\mu\text{l}$ 弗氏完全佐剂 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 中的 $200\mu\text{g}$ 牛 II 型胶原 (Elastin Products, Owensville, MO) 进行皮内注射。在第 -1 天时,动物预防性接受 Ab11 测试物品或媒介物对照的腹膜内 (IP) 注射。对于一个月的时期,遵循使用 3mg/kg 、 10mg/kg 或 30mg/kg Ab11 抗体或媒介物对照注射 (PBS 0.01% 聚山梨醇酯 20. JT Baker, 目录 #4116-04, Phillipsburg, NJ) 的每周两次 IP 给药。在第 -4 天、第 15 天和第 29 天时,小鼠用异氟醚进行麻醉,并且经由眶窦放血用于血清。将血清样品在 -20°C 下或以下冷冻直至分析时。

[0390] 每天对于所有四只爪观察并记录临床得分。实验在任何时间对于给药组的身份都是不知情的。根据下述标准测定得分:0 = 健康的;1 = 一只后爪或前爪关节受累或最低限度扩散的红斑和肿胀;2 = 两只后爪或前爪关节受累或轻度扩散的红斑和肿胀;3 = 三只后爪或前爪关节受累或中度扩散的红斑和肿胀;4 = 显著扩散的红斑和肿胀,或四个足趾关节受累;5 = 整只爪严重扩散的红斑和严重肿胀,不能弯曲足趾。

[0391] 在第 29 天时,将一半小鼠 (对于疾病组每组 5 只和来自健康对照组的 2 只小鼠) 处死,并且取出其前爪、后爪和膝,并且置于中性缓冲的福尔马林中。将前爪、后爪和膝固定 1-2 天,随后转移至脱钙器 4-5 天。将这些关节包埋,切片并用甲苯胺蓝染色。就炎症、血管翳的存在、软骨损害和骨损害,对爪和膝进行组织学评分。下述标准用于评分组织。炎症:0 = 正常;1 = 在受累关节的滑膜和关节周组织中的最低限度炎症细胞浸润;2 = 轻度浸润;如果是爪,则局限于受累关节;3 = 中度浸润伴随中度水肿;如果是爪,则局限于受累关节;4 = 影响大多数区域的显著浸润伴随显著水肿;5 = 严重扩散的浸润伴随严重水肿。

血管翳:0 = 正常;1 = 在软骨和软骨下骨中的最低限度血管翳浸润;2 = 在受累关节中的轻度浸润,伴随硬组织的边缘区带破坏;3 = 在受累关节中的中度浸润伴随中度硬组织破坏;4 = 关节体系结构的显著浸润,伴随显著破坏,大多数关节;5 = 与关节体系结构的总体或接近总体破坏相关的严重浸润,影响所有关节。软骨损害:0 = 正常;1 = 最低限度:甲苯胺蓝染色的最低限度至轻度丧失,伴随在受累关节中不明显的软骨细胞丧失或胶原破坏;2 = 轻度:甲苯胺蓝染色的轻度丧失,伴随在受累关节中的局灶性轻度(浅表)软骨细胞丧失和/或胶原破坏;3 = 中度:甲苯胺蓝染色的中度丧失,伴随在受累关节中的多局灶性中度(深度至中间区带)软骨细胞丧失和/或胶原破坏;4 = 显著的:甲苯胺蓝染色的显著丧失,伴随在大多数关节中的多局灶性显著(深度至深区带)软骨细胞丧失和/或胶原破坏;5 = 严重:甲苯胺蓝染色的严重丧失,伴随在所有关节中的多局灶性严重(深度至潮标)软骨细胞丧失和/或胶原破坏。骨再吸收:0 = 正常;1 = 最低限度:最低限度的再吸收区域,在低分辨率下不明显,在受累关节中的很少破骨细胞;2 = 轻度:数目更多的再吸收区域,在低分辨率下不明显,在受累关节中数目更多的破骨细胞;3 = 中度:髓小梁和皮质骨的明显再吸收,没有皮质中的全层缺损,丧失一些髓小梁,在低分辨率下明显的损伤,在受累关节中数目更多的破骨细胞;4 = 显著的:皮质骨中的全层缺损,通常伴随剩余皮质表面的轮廓的变形,髓骨的显著丧失,众多破骨细胞,影响大多数关节;5 = 严重:皮质骨中的全层缺损和所有关节的关节体系结构的破坏。

[0392] 每天测量并记录体重。对于每组计算从第14天(疾病体现)直到第29天在体重中的变化百分比。在第29天时,将一半小鼠(对于疾病组每组5只和来自健康对照组的2只小鼠)处死,并且取出其后爪并称重。

[0393] 来自第29天血液收集的血清就 Ab11 治疗抗体的水平进行分析。用 100 μ l/孔的在 1X PBS(Cellgro-Mediatech, Herndon, VA) 中的 5 μ g/ml 重组小鼠 GHR/Fc 嵌合体(R&D Systems. 目录 #1360-GR, Minneapolis, MN) 包被 Nunc96 孔 maxisorp ELISA 板(目录 #446612, Denmark)。Ab11 的 2 倍稀释系列用于标准曲线,其中最高稀释度为 0.03 μ g/ml。标准和样品在由在 1X PBS 中的 0.5% BSA(目录 #A7906, Sigma, St. Louis, MO) 组成的测定缓冲液中稀释,并且以 100 μ l/孔装载。在测定缓冲液中 1:2000 稀释的 HRP 缀合的兔抗小鼠 IgG1(Zymed, 目录 #61-0120, South San Francisco, CA) 用作检测抗体。ELISA 板使用 TMB 底物(目录 #50-76-02/50-65-02, KPL, Gaithersburg, MD) 进行显色,并且使用 1M 磷酸进行终止。在 Molecular Devices 微板阅读器上在 450nm 处阅读板。

[0394] 由在研究第15和第29天时收集的血清测量自身抗体。用 5 μ g/ml 牛 II 型胶原(Rockland, 目录 #001-001-104) 包被 Nunc ELISA 板。在测定缓冲液中 1:5000 稀释的过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠 IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch labs. 目录 #115-035-146, West Grove, PA) 用作检测抗体。ELISA 板使用 TMB 底物(目录 #50-76-02/50-65-02, KPL, Gaithersburg, MD) 进行显色,并且使用 1M 磷酸进行终止。在 Molecular Devices 微板阅读器上在 450nm 处阅读板。对于每个稀释度标绘光密度得分。

[0395] 来自基线、第15天和第29天血液收集的血清就 IGF-1 水平进行分析。使用 Quantikine Mouse IGF-1 免疫测定法试剂盒(R&D Systems. 目录 #MG100, Minneapolis, MN) 运行 ELISA。在 Molecular Devices 微板阅读器上在 450nm 处阅读板。对于每个时间点计算来自基线 IGF-1 的变化百分比。与对照相比较,用 Ab11 处理的动物显示在 IGF-1 水

平中的剂量依赖性降低（数据未示出）。

[0396] 在第 31 天时,将一半小鼠（对于疾病组每组 5 只和来自健康对照组的 2 只小鼠）处死,并且收集其腹股沟淋巴结并使用 FACS 分析来分析特异性细胞类型。通过轻轻推动淋巴样组织经过具有 3ml 注射器的橡胶活塞端的丝网,生成来自引流淋巴结的单细胞悬浮液。在收集后,将细胞在染色缓冲液（不含 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 的 DPBS 加上 1% 热灭活的 FCS, pH7.4-7.6）中洗涤,并且用抗 CD16-CD32(2.4G2, BD Biosciences, San Jose, CA) 进行封闭。将细胞再次洗涤,随后在黑暗中以 4℃ 下用对于下述细胞表面标记特异性的荧光标记的抗体染色 30 分钟:CD4(CD4-PerCP, BD Biosciences, 目录 #553052)、CD8(CD8-APC, BD Biosciences, 目录 #553035)、IgD(IgD-FITC, BD Biosciences, 目录 #553439)、以及 CD25(CD25-PE, BD Biosciences, 目录 #558642)。数据在 FACS Aria(BD Biosciences) 上获得,并且用 FACS Diva 软件进行分析。

[0397] 在第 31 天时,将一半小鼠（对于疾病组每组 5 只和来自健康对照组的 2 只小鼠）处死,并且收集其脾并使用 FACS 分析来分析特异性细胞类型。通过轻轻推动组织经过具有 3ml 注射器的橡胶活塞端的丝网,生成脾细胞的单细胞悬浮液。在收集后,将细胞在染色缓冲液（不含 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 的 DPBS 加上 1% 热灭活的 FCS, pH 7.4-7.6）中洗涤,并且用抗 CD16-CD32(2.4G2, BD Biosciences, San Jose, CA) 进行封闭。将细胞再次洗涤,随后在黑暗中以 4℃ 下用对于下述细胞表面标记特异性的荧光标记的抗体染色 30 分钟:CD4(CD4-PerCP, BD Biosciences, 目录 #553052)、CD8(CD8-APC, BD Biosciences, 目录 #553035)、IgD(IgD-FITC, BD Biosciences, 目录 #553439)、以及 CD25(CD25-PE, BD Biosciences, 目录 #558642)。数据在 FACS Aria(BD Biosciences) 上获得,并且用 FACS Diva 软件进行分析。

[0398] 在第 31 天时,将一半小鼠（对于疾病组每组 5 只和来自健康对照组的 2 只小鼠）处死,并且从媒介物处理的小鼠、3 和 10mg/kg Ab11 处理的小鼠以及健康对照小鼠中收集全血。不从 30mg/kg 处理的小鼠中收集血液。使用 ADVIA 120Hematology System(Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY),通过流式细胞术分析血液。计数白血细胞并以 1000 细胞 / 立方 mm 的单位报告。计数红血细胞并以一百万细胞 / 立方 mm 的单位报告。计数淋巴细胞和单核细胞并作为白血细胞的百分比报告。计数嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞并作为白血细胞的百分比报告。

[0399] 与对照相比较,用 GHR 拮抗剂抗体 Ab11 处理导致临床关节炎得分中的降低。例如,在第 21 天时,GHR 拮抗剂抗体处理的动物具有约 0.5 (30mg/kg 剂量)、约 0.7 (3mg/kg 剂量) 或约 1.1 (10mg/kg 剂量) 的临床得分（爪）。相比之下,在第 21 天时,对照动物具有约 1.8 的临床得分。在第 29 天,GHR 拮抗剂抗体处理的动物具有约 2-2.5 的临床得分（爪）。相比之下,在第 29 天时,对照动物具有约 3.5 的临床得分。

[0400] 这些结果证实用 GHR 拮抗剂抗体处理有效减少胶原诱发性关节炎的小鼠模型中的严重性。

[0401] 上文和本申请其他地方中引用的所有专利、专利申请、Genbank 条目、参考手册和出版物为了所有目的在此全文引入作为参考,其程度与每个个别出版物、专利和专利申请特别并个别指出引入作为参考相同。在引入的文献和相似材料中的一种或多种不同于本申请（包括但不限于限定的术语、术语使用、所述技术等等）或与本申请相矛盾的情况下,以

本申请为准。

[0001]

序列表

<110> 瑞纳神经科学公司
<120> 人生长激素受体拮抗剂抗体及其使用方法
<130> PC33925A
<150> 61/579,618
<151> 2011-12-22
<160> 146
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 1
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp
1 5 10

<210> 2
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
<400> 2
Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Tyr His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
<400> 3
Ile Arg Asp Tyr Trp
1 5

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
<400> 4
Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

[0002]

<400> 5

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

His Gln Tyr His Arg Ser Thr Pro Thr
1 5

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

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

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 8

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 8

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

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

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

[0003]

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Tyr His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Leu Ile Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 9

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Phe Thr
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 10
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 10

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

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

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

[0004]

35	40	45
Ala Glu Ile Arg Ser Lys 50	Ala Asn Asn His 55	Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr 65	Ile Ser Arg Asp Asp 70 75	Ser Lys Asn Thr 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser 85	Leu Lys Thr Glu Asp Thr 90	Ala Val Tyr 95
Tyr Cys Thr Leu Phe Arg Asp 100	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 105	Leu Val Thr 110
Val Ser Ser 115		
<210> 11		
<211> 108		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence		
<400> 11		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 1 5 10 15		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser 20 25 30		
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu 35 40 45		
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60		
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu 65 70 75 80		
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Thr 85 90 95		
Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100 105		
<210> 12		
<211> 115		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence		
<400> 12		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly 1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala 20 25 30		

[0005]

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

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Leu Tyr Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 13

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Trp
20 25 30

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

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

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

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

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 14
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 14

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

[0006]

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Gly Thr
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 15

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
1 5

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 16

Asp Ala Trp Met Asp
1 5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 17

Arg Ser Lys Ala Asn Tyr His Ala
1 5

<210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 18

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

[0007]

<400> 19

Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala
1 5

<210> 20

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Tyr Arg Asp Tyr Trp
1 5

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 22

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Trp Tyr Leu His
1 5 10

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 23

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Phe Tyr Leu His
1 5 10

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 24

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Asp
1 5 10

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

[0008]

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 25

His Gln Tyr His Arg Phe Thr Pro Thr
1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 26

Arg Ser Lys Ala Asn Phe His Ala
1 5

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 27

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Phe His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 28

Arg Ser Lys Ala Asn Asn Phe Ala
1 5

<210> 29

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 29

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn Phe Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 30

<211> 5

[0009]

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 30

Phe Arg Asp Tyr Trp
1 5

<210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 31

Ile Tyr Arg Asp Tyr Trp
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 32

His Gln Tyr His Arg Arg Thr Pro Thr
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 33

His Gln Tyr His Arg Tyr Thr Pro Thr
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 34

His Gln Tyr His Arg His Thr Pro Thr
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 35

[0010]

His Gln Tyr His Arg Gln Thr Pro Thr
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 36

His Gln Tyr His Arg Gly Thr Pro Thr
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 37

His Gln Tyr His Arg Ser Tyr Pro Thr
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 38

His Gln Tyr His Arg Ser Phe Pro Thr
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 39

His Gln Tyr His Arg Ser Ile Pro Thr
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 40

His Gln Tyr His Arg Ser Trp Pro Thr
1 5

<210> 41
<211> 12

[0011]

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 41
Arg Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 42
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 42
Glu Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 43
Thr Pro Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 44
Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 45
Thr Ala Thr Thr Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 46
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 46

[0012]

Thr Ala Thr Arg Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 47
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 47

Thr Ala Thr Trp Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 48
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 48

Thr Ala Thr Phe Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 49

Thr Ala Thr Ser Trp Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 50

Thr Ala Thr Ser Val Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 51

Thr Ala Thr Ser Asp Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 52
<211> 12

[0013]

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 52

Thr Ala Thr Ser Ser Val Gly Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 53
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 53

Thr Ala Thr Ser Ser Val Trp Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 54
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 54

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Pro Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 55
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 55

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Gln Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 56
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 56

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ala Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 57
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 57

[0014]

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Gly Tyr Leu His
1 5 10

<210> 58
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 58

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ile Tyr Leu His
1 5 10

<210> 59
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 59

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Glu Tyr Leu His
1 5 10

<210> 60
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 60

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Trp Leu His
1 5 10

<210> 61
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 61

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Val His
1 5 10

<210> 62
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 62

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Phe His
1 5 10

<210> 63
<211> 12

[0015]

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 63
Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Pro
1 5 10

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 64
Arg Ala Lys Ala Asn Asn His Ala
1 5

<210> 65
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 65
Glu Ile Arg Ala Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 66
His Gln Tyr His Arg Ser Ala Pro Thr
1 5

<210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 67
Arg Thr Lys Ala Asn Asn His Ala
1 5

<210> 68
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

[0016]

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
<400> 68
Glu Ile Arg Thr Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly
<210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
<400> 69
Arg Ser Arg Ala Asn Asn His Ala
1 5
<210> 70
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
<400> 70
Glu Ile Arg Ser Arg Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly
<210> 71
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
<400> 71
Arg Ser Glu Ala Asn Asn His Ala
1 5
<210> 72
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
<400> 72
Glu Ile Arg Ser Glu Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly

[0017]

<210> 73
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 73

Arg Ser Lys Asp Asn Asn His Ala
1 5

<210> 74
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 74

Glu Ile Arg Ser Lys Asp Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 75
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 75

Arg Ser Lys Ser Asn Asn His Ala
1 5

<210> 76
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 76

Glu Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 77

Arg Ser Lys Val Asn Asn His Ala
1 5

[0018]

<210> 78
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 78
Glu Ile Arg Ser Lys Val Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 79
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 79
Arg Ser Lys Tyr Asn Asn His Ala
1 5

<210> 80
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 80
Glu Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 81
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 81
Arg Ser Lys Glu Asn Asn His Ala
1 5

<210> 82
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 82
Glu Ile Arg Ser Lys Glu Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

[0019]

Val Lys Gly

<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 83

Arg Ser Lys Ala Asn Trp His Ala
1 5

<210> 84
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 84

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Trp His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 85
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 85

Arg Ser Lys Ala Asn Ile His Ala
1 5

<210> 86
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 86

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ile His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 87
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

[0020]

<400> 87

Arg Ser Lys Ala Asn Asp His Ala
1 5

<210> 88

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 88

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asp His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 89

Arg Ser Lys Ala Asn Lys His Ala
1 5

<210> 90

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 90

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Lys His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 91

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 91

Arg Ser Lys Ala Asn Arg His Ala
1 5

<210> 92

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

[0021]

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
<400> 92
Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Arg His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly
<210> 93
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
<400> 93
Arg Ser Lys Ala Asn Asn Trp Ala
1 5
<210> 94
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
<400> 94
Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn Trp Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly
<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
<400> 95
Arg Ser Lys Ala Asn Asn Ile Ala
1 5
<210> 96
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
<400> 96
Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn Ile Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly
<210> 97

[0022]

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 97
Arg Ser Lys Ala Asn Asn Tyr Ala
1 5

<210> 98
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 98
Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 99
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> Xaa can be H, D, P, or N

<400> 99
Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Xaa
1 5 10

<210> 100
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa can be S, T, R, W, or F

<400> 100
Thr Ala Thr Xaa Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 101
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

[0023]

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be S, W, V, or D

<400> 101

Thr Ala Thr Ser Xaa Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 102

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be S, G, or W

<400> 102

Thr Ala Thr Ser Ser Val Xaa Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 103

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be S, P, or Q

<400> 103

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Xaa Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 104

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa can be S, G, I, E, W, or F

<400> 104

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Xaa Tyr Leu His
1 5 10

<210> 105

<211> 12

<212> PRT

[0024]

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa can be L, V, or F

 <400> 105
 Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Xaa His
 1 5 10

 <210> 106
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa can be S, F, R, Y, H, Q, or G

 <400> 106
 His Gln Tyr His Arg Xaa Thr Pro Thr
 1 5

 <210> 107
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be T, Y, F, L, A, or W

 <400> 107
 His Gln Tyr His Arg Ser Xaa Pro Thr
 1 5

 <210> 108
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa can be S, A, or T

 <400> 108
 Arg Xaa Lys Ala Asn Asn His Ala
 1 5

[0025]

<210> 109
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa can be S, A, or T

<400> 109
Glu Ile Arg Xaa Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly

<210> 110
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be K, R, or E

<400> 110
Arg Ser Xaa Ala Asn Asn His Ala
1 5

<210> 111
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa can be K, R, or E

<400> 111
Glu Ile Arg Ser Xaa Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly

<210> 112
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

[0026]

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa can be A, D, S, V, Y, or E

<400> 112

Arg Ser Lys Xaa Asn Asn His Ala
 1 5

<210> 113
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa can be A, D, S, V, Y, or E

<400> 113

Glu Ile Arg Ser Lys Xaa Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 114
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa can be N, F, W, I, D, Y, K, or R

<400> 114

Arg Ser Lys Ala Asn Xaa His Ala
 1 5

<210> 115
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa can be N, F, W, I, D, Y, K, or R

<400> 115

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Xaa His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

[0027]

<210> 116
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa can be H, W, I, Y, or F

<400> 116

Arg Ser Lys Ala Asn Asn Xaa Ala
1 5

<210> 117
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa can be H, W, I, Y or F

<400> 117

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn Xaa Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 118
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be Y, F, or I

<400> 118

Xaa Arg Asp Tyr Trp
1 5

<210> 119
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE

[0028]

<222> (1)..(1)
 <223> Xaa can be L or I
 <400> 119
 Xaa Tyr Arg Asp Tyr Trp
 1 5
 <210> 120
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa can be S, W, or F
 <400> 120
 Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Xaa Tyr Leu His
 1 5 10
 <210> 121
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa can be H, D, or N
 <400> 121
 Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Xaa
 1 5 10
 <210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be T, Y, F, I, or W
 <400> 122
 His Gln Tyr His Arg Ser Xaa Pro Thr
 1 5
 <210> 123
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

[0029]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa can be N, F, or Y

<400> 123

Arg Ser Lys Ala Asn Xaa His Ala
1 5

<210> 124
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa can be N, F, or Y

<400> 124

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Xaa His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 125
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa can be H or F

<400> 125

Arg Ser Lys Ala Asn Asn Xaa Ala
1 5

<210> 126
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa can be H or F

<400> 126

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn Xaa Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

[0030]

<210> 127
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa can be N or Y

<400> 127
Arg Ser Lys Ala Asn Xaa His Ala
1 5

<210> 128
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa can be N or Y

<400> 128
Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Xaa His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 129
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be Y or I

<400> 129
Xaa Arg Asp Tyr Trp
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>

[0031]

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa can be S, F, R, Y, H or G

<400> 130

His Gln Tyr His Arg Xaa Thr Pro Thr
1                5

<210> 131
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> Xaa can be H or D

<400> 131

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Xaa
1                5                10

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa can be S or F

<400> 132

His Gln Tyr His Arg Xaa Thr Pro Thr
1                5

<210> 133
<211> 440
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 133

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

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

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

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Tyr His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50                55                60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

```

[0032]

65	70	75	80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr	85	90	95
Tyr Cys Thr Leu Ile Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr	100	105	110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro	115	120	125
Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val	130	135	140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala	145	150	155
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly	165	170	175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly	180	185	190
Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys	195	200	205
Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys	210	215	220
Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	225	230	235
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	245	250	255
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr	260	265	270
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	275	280	285
Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His	290	295	300
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	305	310	315
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln	325	330	335
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met	340	345	350
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	355	360	365
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	370	375	380

[0033]

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 385 390 395 400
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 405 410 415
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 420 425 430
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440
 <210> 134
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
 <400> 134
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30
 Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Tyr His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Leu Ile Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys

[0034]

195	200	205
Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys 210 215 220		
Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys 225 230 235 240		
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val 245 250 255		
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr 260 265 270		
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu 275 280 285		
Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His 290 295 300		
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys 305 310 315 320		
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln 325 330 335		
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met 340 345 350		
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro 355 360 365		
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn 370 375 380		
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu 385 390 395 400		
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val 405 410 415		
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln 420 425 430		
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 435 440		
<210> 135		
<211> 215		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence		
<400> 135		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 1 5 10 15		

[0035]

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

<210> 136

<211> 441

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 136

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

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

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

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

[0036]

```

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

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115        120        125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130        135        140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145        150        155        160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165        170        175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
180        185        190

Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195        200        205

Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
210        215        220

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
225        230        235        240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
245        250        255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
260        265        270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275        280        285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
290        295        300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
305        310        315        320

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
325        330        335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
340        345        350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
355        360        365

```

[0037]

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 370 375 380
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 385 390 395 400
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Glu Gln Gly Asn Val
 405 410 415
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 420 425 430
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 137
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
 <400> 137
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Phe Thr
 85 90 95
 Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

[0038]

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 138
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
 <400> 138
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30
 Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Tyr His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Leu Ile Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240

[0039]

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 245 250 255
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 275 280 285
 Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 290 295 300
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 305 310 315 320
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 325 330 335
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 340 345 350
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 355 360 365
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 370 375 380
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 385 390 395 400
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 405 410 415
 Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln
 420 425 430
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 139
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence
 <400> 139
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

[0040]

50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
65	70	75
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Thr		
	85	90
Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala		
	100	105
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser		
	115	125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu		
	130	135
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser		
	145	155
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
	165	170
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
	180	185
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys		
	195	200
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210	215
<210> 140		
<211> 638		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 140		
Met Asp Leu Trp Gln Leu Leu Leu Thr Leu Ala Leu Ala Gly Ser Ser		
1	5	10
Asp Ala Phe Ser Gly Ser Glu Ala Thr Ala Ala Ile Leu Ser Arg Ala		
	20	25
Pro Trp Ser Leu Gln Ser Val Asn Pro Gly Leu Lys Thr Asn Ser Ser		
	35	40
Lys Glu Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe		
	50	55
Ser Cys His Trp Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn Leu Gly		
	65	70
Pro Ile Gln Leu Phe Tyr Thr Arg Arg Asn Thr Gln Glu Trp Thr Gln		
	85	90
Glu Trp Lys Glu Cys Pro Asp Tyr Val Ser Ala Gly Glu Asn Ser Cys		
	100	105
		110

[0041]

Tyr	Phe	Asn	Ser	Ser	Phe	Thr	Ser	Ile	Trp	Ile	Pro	Tyr	Cys	Ile	Lys	115	120	125
Leu	Thr	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Val	Asp	Glu	Lys	Cys	Phe	Ser	Val	Asp	130	135	140
Glu	Ile	Val	Gln	Pro	Asp	Pro	Pro	Ile	Ala	Leu	Asn	Trp	Thr	Leu	Leu	145	150	155
Asn	Val	Ser	Leu	Thr	Gly	Ile	His	Ala	Asp	Ile	Gln	Val	Arg	Trp	Glu	165	170	175
Ala	Pro	Arg	Asn	Ala	Asp	Ile	Gln	Lys	Gly	Trp	Met	Val	Leu	Glu	Tyr	180	185	190
Glu	Leu	Gln	Tyr	Lys	Glu	Val	Asn	Glu	Thr	Lys	Trp	Lys	Met	Met	Asp	195	200	205
Pro	Ile	Leu	Thr	Thr	Ser	Val	Pro	Val	Tyr	Ser	Leu	Lys	Val	Asp	Lys	210	215	220
Glu	Tyr	Glu	Val	Arg	Val	Arg	Ser	Lys	Gln	Arg	Asn	Ser	Gly	Asn	Tyr	225	230	235
Gly	Glu	Phe	Ser	Glu	Val	Leu	Tyr	Val	Thr	Leu	Pro	Gln	Met	Ser	Gln	245	250	255
Phe	Thr	Cys	Glu	Glu	Asp	Phe	Tyr	Phe	Pro	Trp	Leu	Leu	Ile	Ile	Ile	260	265	270
Phe	Gly	Ile	Phe	Gly	Leu	Thr	Val	Met	Leu	Phe	Val	Phe	Leu	Phe	Ser	275	280	285
Lys	Gln	Gln	Arg	Ile	Lys	Met	Leu	Ile	Leu	Pro	Pro	Val	Pro	Val	Pro	290	295	300
Lys	Ile	Lys	Gly	Ile	Asp	Pro	Asp	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	Lys	Leu	Glu	305	310	315
Glu	Val	Asn	Thr	Ile	Leu	Ala	Ile	His	Asp	Ser	Tyr	Lys	Pro	Glu	Phe	325	330	335
His	Ser	Asp	Asp	Ser	Trp	Val	Glu	Phe	Ile	Glu	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	340	345	350
Pro	Asp	Glu	Lys	Thr	Glu	Glu	Ser	Asp	Thr	Asp	Arg	Leu	Leu	Ser	Ser	355	360	365
Asp	His	Glu	Lys	Ser	His	Ser	Asn	Leu	Gly	Val	Lys	Asp	Gly	Asp	Ser	370	375	380
Gly	Arg	Thr	Ser	Cys	Cys	Glu	Pro	Asp	Ile	Leu	Glu	Thr	Asp	Phe	Asn	385	390	395
Ala	Asn	Asp	Ile	His	Glu	Gly	Thr	Ser	Glu	Val	Ala	Gln	Pro	Gln	Arg	405	410	415

[0042]

Leu Lys Gly Glu Ala Asp Leu Leu Cys Leu Asp Gln Lys Asn Gln Asn
 420 425 430
 Asn Ser Pro Tyr His Asp Ala Cys Pro Ala Thr Gln Gln Pro Ser Val
 435 440 445
 Ile Gln Ala Glu Lys Asn Lys Pro Gln Pro Leu Pro Thr Glu Gly Ala
 450 455 460
 Glu Ser Thr His Gln Ala Ala His Ile Gln Leu Ser Asn Pro Ser Ser
 465 470 475 480
 Leu Ser Asn Ile Asp Phe Tyr Ala Gln Val Ser Asp Ile Thr Pro Ala
 485 490 495
 Gly Ser Val Val Leu Ser Pro Gly Gln Lys Asn Lys Ala Gly Met Ser
 500 505 510
 Gln Cys Asp Met His Pro Glu Met Val Ser Leu Cys Gln Gln Asn Phe
 515 520 525
 Leu Met Asp Asn Ala Tyr Phe Cys Glu Ala Asp Ala Lys Lys Cys Leu
 530 535 540
 Pro Val Ala Pro His Ile Lys Val Glu Ser His Ile Gln Pro Ser Leu
 545 550 555 560
 Asn Gln Glu Asp Ile Tyr Ile Thr Thr Glu Ser Leu Thr Thr Ala Ala
 565 570 575
 Gly Arg Pro Gly Thr Gly Glu His Val Pro Gly Ser Glu Met Pro Val
 580 585 590
 Pro Asp Tyr Thr Ser Ile His Ile Val Gln Ser Pro Gln Gly Leu Ile
 595 600 605
 Leu Asn Ala Thr Ala Leu Pro Leu Pro Asp Lys Glu Phe Leu Ser Ser
 610 615 620
 Cys Gly Tyr Val Ser Thr Asp Gln Leu Asn Lys Ile Met Pro
 625 630 635
 <210> 141
 <211> 637
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis
 <400> 141
 Met Asp Leu Trp Gln Leu Leu Leu Thr Phe Ala Leu Ala Gly Ser Ser
 1 5 10 15
 Asp Ala Phe Ser Gly Ser Glu Pro Thr Ala Ala Ile Leu Ser Arg Ala
 20 25 30
 Ser Trp Ser Leu Gln Ser Val Asn Pro Asp Leu Lys Thr Asn Ser Ser
 35 40 45
 Lys Glu Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe
 50 55 60

[0043]

```

Ser Cys His Trp Thr Asp Ala Val His His Gly Leu Lys Ser Leu Gly
65                               70                               75                               80

Pro Ile Gln Leu Phe Tyr Thr Arg Arg Asn Ile Gln Glu Gln Thr Gln
85                               90                               95

Glu Trp Lys Glu Cys Pro Asp Tyr Val Ser Ala Gly Glu Asn Ser Cys
100                             105                             110

Tyr Phe Asn Ser Ser Phe Thr Ser Val Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys
115                             120                             125

Leu Thr Ser Asn Gly Asp Thr Val Asp Gly Lys Cys Phe Ser Val Asp
130                             135                             140

Glu Ile Val Gln Pro Asp Pro Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu Leu
145                             150                             155                             160

Asn Val Ser Leu Thr Gly Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu
165                             170                             175

Ala Pro Pro Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr
180                             185                             190

Glu Leu Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp
195                             200                             205

Pro Ile Leu Ser Thr Ser Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys
210                             215                             220

Glu Tyr Glu Val Arg Val Arg Ser Lys Arg Arg Asn Ser Arg Asn Tyr
225                             230                             235                             240

Gly Glu Phe Ser Glu Val Leu Tyr Val Thr Leu Pro Gln Met Asn Gln
245                             250                             255

Phe Thr Cys Glu Glu Asp Phe Tyr Phe Pro Trp Leu Leu Ile Ile Ile
260                             265                             270

Phe Gly Ile Phe Gly Leu Thr Val Met Leu Phe Val Phe Leu Phe Ser
275                             280                             285

Lys Gln Gln Arg Ile Lys Met Leu Ile Leu Pro Pro Val Pro Val Pro
290                             295                             300

Lys Ile Lys Gly Ile Asp Pro Asp Leu Leu Lys Glu Gly Lys Leu Glu
305                             310                             315                             320

Glu Val Asn Thr Ile Leu Ala Ile His Asp Ser Tyr Lys Pro Glu Phe
325                             330                             335

His Ser Asp Asp Ser Trp Val Glu Phe Ile Glu Leu Asp Ile Asp Glu
340                             345                             350

Pro Asp Glu Lys Asn Glu Gly Ser Asp Thr Asp Arg Leu Leu Ser Ser
355                             360                             365

```

[0044]

Asp His Gln Lys Ser His Ser Asn Leu Gly Val Lys Asp Gly Asp Ser
 370 375 380
 Gly Arg Thr Ser Cys Tyr Glu Pro Asp Ile Leu Glu Thr Asp Phe Asn
 385 390 395 400
 Ala Asn Asn Ile His Glu Gly Thr Ser Glu Val Ala Gln Pro Gln Arg
 405 410 415
 Leu Lys Gly Glu Ala Asp Leu Leu Cys Leu Asp Gln Lys Asn Gln Asn
 420 425 430
 Lys Pro Pro Tyr His Asp Ala Cys Pro Ala Thr Gln Gln Pro Ser Val
 435 440 445
 Ile Gln Ala Glu Lys Asn Lys Pro Gln Pro Leu Pro Thr Asp Gly Ala
 450 455 460
 Glu Ser Thr His Gln Ala Ala His Ile Gln Leu Ser Asn Pro Ser Ser
 465 470 475 480
 Leu Ala Asn Ile Asp Phe Tyr Ala Gln Val Ser Asp Ile Thr Pro Ala
 485 490 495
 Gly Ser Val Val Leu Ser Pro Gly Gln Lys Asn Lys Ala Gly Met Ser
 500 505 510
 Gln Cys Asp Met His Leu Glu Met Val Ser Leu Cys Gln Glu Asp Phe
 515 520 525
 Ile Met Asp Asn Ala Tyr Phe Cys Glu Ala Asp Ala Lys Lys Cys Ile
 530 535 540
 Pro Val Ala Pro His Ile Lys Val Glu Ser His Ile Glu Pro Ser Phe
 545 550 555 560
 Asn Gln Glu Asp Ile Tyr Ile Thr Thr Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ala
 565 570 575
 Gly Arg Pro Gly Thr Thr Glu His Ile Pro Gly Ser Glu Met Pro Val
 580 585 590
 Pro Asp Tyr Thr Ser Ile His Ile Val Gln Ser Pro Gln Gly Leu Ile
 595 600 605
 Leu Asn Ala Thr Ala Leu Pro Leu Pro Gly Lys Glu Phe Leu Ser Ser
 610 615 620
 Cys Gly Tyr Val Ser Thr Asp Gln Leu Asn Lys Ile Met
 625 630 635
 <210> 142
 <211> 1323
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

[0045]

<400> 142
 gaggtgcagc tgggtggaate tggcggcggg etggtgaaac ctggcggcag cctgagactg 60
 agctgcgccg ccagcggtt cacttcagc gacgcctgga tggactgggt gcgccaggcc 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtggccgag atcagaagca aggcnaacta tcacgccacc 180
 tactacgccg agagcgtgaa gggccgggtt accatcagcc gggacgacag caagaacace 240
 ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg cctgttacta ctgcacctg 300
 attagagact actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcctc caaccaagggc 360
 ccacgtgtct tcccctggc gcctgtctc aggagcaact ccgagagcae agcggccctg 420
 ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tgtcttgaa ctcaggcgct 480
 ctgaccacgg gcgtgcacac ctcccggtt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540
 agcagcgtag tgaccgtgcc ctccagcaac ttccgcaacc agacctacac ctgcaacgta 600
 gatacacaagc ccagcaacac caaggaggac aagacagltg aggcnaalg ttgtctgag 660
 tgcgccctg gcccgacac acctgtggca ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa 720
 cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtea cgtgcgtggg ggtggacgtg 780
 agccacgaag accccgaggt ccagltcaac tggtagtgg acggcggtga ggtgcataat 840
 gccaaagaca agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtctc 900
 accgtcgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 960
 ggctcccat ctccatcga gaaaaccat tcaaaaacca aaggcgagcc ccgagaacca 1020
 cagggttaca cctgcctcc atccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1080
 tgcctgttca aaggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1140
 ccggagaaca actacaagac cacacctcc atgttgact ccgacggctc ctcttctc 1200
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtct ctcatgtctc 1260
 gtagtcatg aggtcttga caaccactac acacagaaga gcctctcct gtctcgggt 1320
 aaa 1323

<210> 143
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<400> 143
 gagatcgtgc tgacceagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60
 ctgagctgta ccgccaccag cagcgtgtcc agcagctacc tgaattgta tcagcagaag 120
 cccggccagg ccccagact gctgatctac agcaccagca acctggccag cggcatcccc 180
 gacagattca gggcagcgg ctccggcacc gacttcacc tgaccatcag ccggttgga 240
 cccgaggact tcgccgtgta ctactgccac cagtaccaca gaagcaccac caccctcggc 300
 ggaggcacca aggtggagat caaacgaact gggctgcac catctgtctt catcttccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtcctgct gaataacttc 420
 tatcccagag aggcnaaagt acagtggag gttgataacg cctccaatc ggtaacttc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcaact acagcctcag cagcaccctg 540
 acgtcagca aagcagacta cgagaacac aaagtctac cctgcgaagt caccatcag 600

[0046]

ggcctgaget cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt

645

<210> 144

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide linker

<400> 144

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 145

<211> 205

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 145

Glu	Pro	Lys	Phe	Thr	Lys	Cys	Arg	Ser	Pro	Glu	Arg	Glu	Thr	Phe	Ser
1				5					10					15	

Cys	His	Trp	Thr	Asp	Ala	Val	His	His	Gly	Leu	Lys	Ser	Leu	Gly	Pro
			20					25					30		

Ile	Gln	Leu	Phe	Tyr	Thr	Arg	Arg	Asn	Ile	Gln	Glu	Gln	Thr	Gln	Glu
		35					40					45			

Trp	Lys	Glu	Cys	Pro	Asp	Tyr	Val	Ser	Ala	Gly	Glu	Asn	Ser	Cys	Tyr
	50					55					60				

Phe	Asn	Ser	Ser	Phe	Thr	Ser	Val	Trp	Ile	Pro	Tyr	Cys	Ile	Lys	Leu
65					70				75						80

Thr	Ser	Asn	Gly	Asp	Thr	Val	Asp	Gly	Lys	Cys	Phe	Ser	Val	Asp	Glu
			85						90					95	

Ile	Val	Gln	Pro	Asp	Pro	Pro	Ile	Ala	Leu	Asn	Trp	Thr	Leu	Leu	Asn
			100					105					110		

Val	Ser	Leu	Thr	Gly	Ile	His	Ala	Asp	Ile	Gln	Val	Arg	Trp	Glu	Ala
		115					120					125			

Pro	Pro	Asn	Ala	Asp	Ile	Gln	Lys	Gly	Trp	Met	Val	Leu	Glu	Tyr	Glu
	130					135					140				

Leu	Gln	Tyr	Lys	Glu	Val	Asn	Glu	Thr	Lys	Trp	Lys	Met	Met	Asp	Pro
145					150					155					160

Ile	Leu	Ser	Thr	Ser	Val	Pro	Val	Tyr	Ser	Leu	Lys	Val	Asp	Lys	Glu
			165						170					175	

Tyr	Glu	Val	Arg	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Arg	Asn	Ser	Arg	Asn	Tyr	Gly
			180					185						190	

Glu	Phe	Ser	Glu	Val	Leu	Tyr	Val	Thr	Leu	Pro	Gln	Met
		195					200					205

<210> 146

[0047]

<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized and/or affinity matured antibody sequence

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be T, R, or E

<400> 146
Xaa Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10