

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810003930.7

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年7月16日

[11] 公开号 CN 101220098A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

[22] 申请日 2003.10.22

[21] 申请号 200810003930.7

分案原申请号 200380101816.3

[30] 优先权

[32] 2002.10.22 [33] US [31] 60/419964

[71] 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

共同申请人 剑桥抗体科技有限公司

[72] 发明人 G·M·维尔德曼 M·V·达维斯

宋克宁 N·M·沃尔夫曼

K·格罗夫-布里奇斯 A·菲尔德

C·拉塞尔

V·瓦尔格-阿彻

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 黄可峻

权利要求书3页 说明书76页 附图18页

[54] 发明名称

抗 GDF-8 的中和抗体及其用途

[57] 摘要

本发明涉及抗 GDF-8 的中和抗体及其用途。本发明所公开的内容提供了新的抗生长分化因子-8 (GDF-8) 的抗体,具体地,提供了人抗体,以及抗体片段,包括在体外和/或体内抑制 GDF-8 活性的那些。本发明所公开的内容也提供了用于诊断、预防或治疗肌肉或骨退行性障碍,或胰岛素代谢失调的方法。

1. 一种分离的抗体或抗体片段，其包含选自SEQ ID NO: 2，或包含SEQ ID NO: 2的片段；以及其中所述抗体或抗体片段能与GDF-8或BMP-11特异性结合。
2. 权利要求1的抗体，所述抗体包含SEQ ID NO: n的氨基酸序列，其中n为4、6、43、44、45、46、47或48。
3. 权利要求1的抗体，其中所述抗体能与包含列于SEQ ID NO: 54的氨基酸序列的蛋白特异性结合。
4. 权利要求3的抗体，其中SEQ ID NO: 54具有下述至少一种特征：
 - (a) SEQ ID NO: 54的第二个氨基酸是甲硫氨酸；
 - (b) SEQ ID NO: 54的第三个氨基酸是丝氨酸；和
 - (c) SEQ ID NO: 54的第五个氨基酸是异亮氨酸。
5. 权利要求1的抗体，其中所述抗体是人抗体。
6. 权利要求1的抗体，其中所述抗体是IgG₁或IgG₄。
7. 权利要求1的抗体，其中所述抗体的氨基酸序列被修饰以减少或改变效应子功能。
8. 权利要求7的抗体，其中所述抗体还含有SEQ ID NO: 53的氨基酸序列，所述氨基酸序列在相应于SEQ ID NO: 53的氨基酸117或氨基酸120处的残基被修饰。
9. 权利要求1的抗体，其中所述抗体是IgG_{1λ}或IgG_{1κ}。
10. 一种药物组合物，所述组合物包含权利要求1的抗体。
11. 一种分离的编码权利要求1抗体的核酸。
12. 一种表达载体，所述载体包含权利要求11的核酸。
13. 一种宿主细胞，所述细胞包含权利要求12的载体。
14. 权利要求11的核酸，其中所述核酸包含SEQ ID NO: n的核苷酸序列，其中n为1、3或5。
15. 一种制备与GDF-8特异性反应的抗体的方法，所述方法包括：

(a) 提供编码可变区核酸的起始库,该可变区包括要被取代的CDR3或缺失CDR3编码区;

(b) 将该库与编码如SEQ ID NO: n中所述的氨基酸序列的供体核酸结合,其中n是从43-48的整数,使得该供体核酸插入该库的CDR3区中,以致提供了一种编码可变区的核酸的产物库;

(c) 表达该产物库的核酸;

(d) 筛选特异于GDF-8的特异性抗原结合片段; 和

(e) 收集该特异性抗原结合片段或编码该结合片段的核酸。

16. 一种通过权利要求15的方法产生的抗体。

17. 一种用于鉴定GDF-8抑制剂的方法,所述方法包括:

(a) 制备包含权利要求1的抗体和GDF-8的第一结合混合物;

(b) 测定第一混合物中抗体与GDF-8之间的结合量;

(c) 制备包含抗体、GDF-8、受试化合物的第二结合混合物;

和

(d) 测定第二混合物中抗体与GDF-8之间的结合量。

18. 权利要求1的抗体在制备增加肌肉强度或质量的药物中的用途。

19. 权利要求1-9中任一项的抗体在制备用于治疗或预防哺乳动物中至少一种肌肉、骨或葡萄糖体内稳态疾病的药物中的用途。

20. 权利要求19的用途,其中所述哺乳动物是人。

21. 权利要求19的用途,其中所述疾病是神经肌肉障碍。

22. 权利要求19的用途,其中所述疾病是肌肉营养不良、Duchenne氏肌肉营养不良、肌肉萎缩、器官萎缩、腕管综合征、充血性阻塞性肺病,少肌症,恶病质、肌肉萎缩综合征或肌萎缩性侧索硬化。

23. 权利要求19的用途,其中所述疾病是肥胖症或脂肪组织病。

24. 权利要求19的用途,其中所述疾病是X综合征、葡萄糖耐量降低、创伤诱导的胰岛素抗性 or II型糖尿病。

25. 权利要求1-9中任一项的抗体在制备用于哺乳动物中(a) 修复肌肉损伤, (b) 增加肌肉质量或强度, 和(c) 增加葡萄糖耐量当中至少之一的药物中的用途。

26. 权利要求25的用途, 其中所述(a)的损伤的肌肉是心肌或(b)隔膜。

27. 权利要求19-26任一的用途, 其中所述抗体以有效剂量给予哺乳动物, 所述有效剂量选自 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $150\text{ mg}/\text{kg}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $100\text{ mg}/\text{kg}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $50\text{ mg}/\text{kg}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $20\text{ mg}/\text{kg}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $10\text{ mg}/\text{kg}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $1\text{ mg}/\text{kg}$ 、 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ - $1\text{ mg}/\text{kg}$ 、 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ - $100\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ - $1\text{ mg}/\text{kg}$ 以及 $500\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ - $1\text{ mg}/\text{kg}$ 。

抗 GDF-8 的中和抗体及其用途

本申请是申请日为 2003 年 10 月 22 日的发明创造名称为“抗 GDF-8 的中和抗体及其用途”的中国专利申请（国家申请号为 No. 200380101816.3, 国际申请号为 PCT/IB2003/004748）的分案申请。

本申请要求 2002 年 10 月 22 日递交的美国临时系列号 60/419,964 的优先权，其全文在此引用作为参考。

技术领域

本发明技术领域涉及抗生长分化因子-8 (GDF-8) 的抗体，具体地，涉及人抗体，以及抗体片段，特别是在体外和/或体内抑制 GDF-8 活性的那些。该技术领域进一步涉及诊断、预防或治疗肌肉或骨退行性障碍，或胰岛素代谢失调。

背景技术

生长分化因子-8 (GDF-8)，也称为肌肉生长抑制素 (myostatin)，是一种分泌蛋白，还是结构相关的生长因子—转化生长因子- β (TGF- β) 超家族的一员，所有结构相关的生长因子都具有生理学上重要的生长调节和形态发生活性 (Kingsley 等. (1994) *Genes Dev.*, 8: 133-146; Hoodless 等. (1998) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 228: 235-272)。类似于 TGF- β ，人 GDF-8 被合成为 375 个氨基酸长的前体蛋白。该前体 GDF-8 蛋白形成同型二聚体。在加工过程中，氨基末端前肽在 Arg-266 处裂解。该裂解前肽，称为“潜在性相关肽” (LAP)，可与上述同型二聚体保持非共价结合，因此使该复合体失活 (Miyazono 等. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 6407-6415; Wakefield 等. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 7646-7654; Brown 等. (1990) *Growth Factors*, 3: 35-43; 和 Thies 等. (2001) *Growth Factors*, 18: 251-259)。成熟 GDF-8 与前肽的复合体通常称为“小潜在性复合体” (small latent complex) (Gentry 等. (1990) *Biochemistry*, 29: 6851-6857; Derynck 等. (1995) *Nature*, 316: 701-705; 和 Massague (1990) *Ann. Rev. Cell Biol.*, 12: 597-641)。也已知其他蛋白能结合成熟 GDF-8 并抑制其生物活性。上述抑制性蛋白包括卵泡抑素和卵泡抑素相关蛋白 (Gamer 等. (1999) *Dev. Biol.*, 208: 222-232)。

来自于不同物种推断的氨基酸序列的比对表明 GDF-8 在进化过程中高度保守 (McPherron 等. (1997) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*

A. , 94: 12457-12461)。事实上,人、小鼠、大鼠、猪和鸡 GDF-8 序列的 C 末端区域是 100% 同一的,而在狒狒、牛和绵羊中仅有 3 个氨基酸不同。斑马鱼 (zebrafish) GDF-8 差异最大;然而与人仍具有 88% 同一性。

该高度保守暗示 GDF-8 具有重要功能。GDF-8 在发育和成熟的骨骼肌中高表达,并发现与肌肉中及骨发生中关键生物学过程的调节相关。例如,GDF-8 敲除转基因小鼠表现为明显肥大和骨骼肌过度增生 (McPherron 等. (1997) *Nature*, 387: 83-90) 以及改变的骨皮质结构 (Hamrick 等. (2000) *Bone*, 27 (3): 343-349)。在牛的 GDF-8 自发突变中也明显出现类似的骨骼肌质量增加 (Ashmore 等. (1974) *Growth*, 38: 501-507; Swatland 等. (1994) *J. Anim. Sci.* , 38: 752-757; McPherron 等. (1997) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* , 94: 12457-12461; 和 Kambadur 等. (1997) *Genome Res.* , 7: 910-915)。已有研究指出与 HIV 感染相关的肌肉萎缩伴随着 GDF-8 表达的增加 (Gonzalez-Cadavid 等. (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* , 95: 14938-14943)。GDF-8 也与肌肉特异性酶 (如,肌酸激酶) 的产生和成肌细胞的增殖相关 (WO 00/43781)。除了其生长调节和形态发生特性外,GDF-8 被认为也与许多其他生理过程相关,包括 II 型糖尿病发展中葡萄糖内稳态,葡萄糖耐量降低,代谢综合征 (如 X 综合征),诸如烧伤或氮失调的创伤诱导的胰岛素抗性和脂肪组织病 (如,肥胖症) (Kim 等. (2001) *BBRC*, 281: 902-906)。

许多人和动物病症与肌肉组织机能上受损相关,如,肌肉营养不良 (包括 Duchenne 氏肌肉营养不良),肌萎缩性侧索硬化 (ALS),肌肉萎缩,器官萎缩,虚弱,充血性阻塞性肺,少肌症 (sarcopenia),恶病质和由其他疾病和病症引发的肌肉萎缩综合征。迄今,极少可靠的或有效的疗法已被发展用于治疗这些病症。

也有许多病症与骨质损失相关,包括骨质疏松症和骨关节炎,特别是在老年人和/或绝经后的妇女中。此外,代谢性骨病和骨障碍包括由于长期糖皮质激素治疗导致的低骨量,生殖腺早衰,雄激素遏抑,维生素 D 缺乏,继发性甲状旁腺功能亢进症,营养缺乏和神经性厌食。当前用于这些病症可行的疗法是通过抑制骨再吸收作用而进行的。对于这些疗法而言,促进新骨生成的疗法将是所需的可选疗法。

因此，特别地在人中，存在发展促使肌肉质量和/或强度和/或骨密度全面增加的新疗法的需要。

发明内容

本发明的目的之一是提供用于肌肉和/或骨相关病症的安全及有效的治疗方法。

本发明的另一目的是提供在脊椎动物中增加肌肉质量和/或骨强度和/或密度的方法。

本发明的另一目的是提供在体内安全及有效的 GDF-8 抑制剂。

本发明的另一目的是提供具有高特异性和亲和力的结合 GDF-8 的人抗体及其片段。

因此，提供了用于治疗肌肉和骨退行性障碍的方法。该方法也用于正常动物中以增加肌肉质量和骨密度。也提供了新的人抗 GDF-8 抗体，称为 Myo29, Myo28 和 Myo22，以及由其衍生的抗体和抗原结合片段。本发明的抗体具有许多用途。首先，所述抗体能够以高亲和力结合成熟 GDF-8。其次，所披露的抗体在体外和体内都抑制 GDF-8 活性，已通过例如 ActRIIB 结合的抑制和报道基因测定而证实。最后，所披露的抗体可抑制与骨骼肌质量及骨密度负调节相关的 GDF-8 活性。

本发明的某些实施方案包含 Myo29, Myo28 或 Myo22 的 Fv 片段的 V_H 和/或 V_L 区。另外的实施方案包含一或更多这些 V_H 和 V_L 区的任一互补决定区 (CDR)。其他的实施方案包含 Myo29, Myo28 或 Myo22 的 V_H 区的 H3 片段。

本发明其他方面提供了含有本发明抗体或它们抗原结合片段的组合物，以及它们在抑制或中和 GDF-8 的方法中的用途，包括治疗人或动物的方法。本发明的抗体也用于治疗或预防所需增加肌肉组织或骨密度的病症。例如，本发明所披露的抗体可用于治疗修补损伤的肌肉，如心肌、隔膜等。疾病和病症的实例包括诸如肌肉营养不良（包括 Duchenne 氏肌肉营养不良）的肌肉和神经肌肉障碍；肌萎缩性侧索硬化；肌肉萎缩；器官萎缩；虚弱；腕管综合征；充血性阻塞性肺病；少肌症；恶病质和其他肌肉萎缩综合征；脂肪组织病（如，肥胖症）；II 型糖尿病；葡萄糖耐量降低；代谢综合征（如 X 综合征）；诸如烧伤或氮失调的创伤诱导的胰岛素抗性；和骨退行性疾病（如，骨关节炎和骨质疏松症）。

此外，本发明所披露的抗体可用作在生物样品中定量或定性检测 GDF-8 或其片段的诊断工具。所检测到的 GDF-8 的存在或数量与上述所列的一或多种医学疾病相关。

本发明的另一发面提供了一种分离的核酸，其包含编码来自 Myo29, Myo28 或 Myo22 的 Fv 片段的 V_H 或 V_L 区的序列。也披露了一种分离的核酸，其包含编码来自本发明所披露的任一 V_H 和 V_L 区的至少一个 CDR 的序列。另一方面提供了包含上述核酸的宿主细胞。

还在本发明的另一方面提供了产生衍生自 Myo29, Myo28 或 Myo22 的 V_H 或 V_L 区的新的 V_H 和 V_L 区和/或包含上述区域的全部或部分的功能性抗体的方法。

本发明另外的目的将在下列描述中部分提出，以及部分在该描述中显而易见，或通过本发明的实践可被得知。依靠在附属权利要求中特别指出的要素和组合可认识到并获得本发明的各种目的、方面和优点。

可以理解前述一般描述和随后详细描述仅是示范性和解释性的，并不限制本发明权利要求的保护范围。

附图说明

图 1 显示了生物素化的 GDF-8 和 BMP-11 结合 ActRIIB 受体，它们分别具有 15 ng/ml 和 40 ng/ml 的 ED_{50} 。

图 2 显示了通过本发明 scFv 片段抑制 GDF-8 和 ActRIIB 受体结合。如图，Myo29, Myo28 和 Myo22 的 scFv 的 IC_{50} 分别为 2.4 nM, 1.7 nM 和 60 nM。

图 3A 和 3B 显示了在 ActRIIB 结合测定中 Myo29 与 10 ng/ml 生物素标记的 GDF-8 或 BMP-11 预温育抑制了 GDF-8 或 BMP-11 与 ActRIIB 的结合，其具有 0.2-0.4 nM 的 IC_{50} 。

图 4B 和 4C 描述了 pGL3 (CAGA)₁₂ 报告基因测定的结果，其中测试了 Myo29。图 4A 显示了基线条件，即，GDF-8、BMP-11 和活化素诱导的报告基因活性。图 4B 和 4C 显示了 Myo29 以剂量-响应方式减少 GDF-8 活性，其具有 15-30 ng/ml 的 IC_{50} ，并以同样的程度抑制 BMP-11 的生物活性。图 4D 阐明了在该测定中 Myo29 并不影响活化素的活性。

图 5 显示 Myo22, Myo28 和 Myo29 表位作图的结果。Myo29 的表位定位在成熟 GDF-8 的氨基酸 72 到氨基酸 88; 对于 Myo22, 定位在氨基酸 1 到氨基酸 44; 对于 Myo28, 定位在氨基酸 1 到氨基酸 98。

图 6 显示了 Myo29 表位取代分析的结果。对于 Myo29 结合 GDF-8 而言, 成熟 GDF-8 中残基 Lys-78, Pro-81 和 Asn-83 似乎起重要作用。

图 7 描述了用 Myo29 和 Myo28 进行免疫沉淀试验的结果。来自表达 GDF-8 的 CHO 细胞的条件培养液用 Myo29 或 Myo28 进行免疫沉淀, 该 CHO 细胞用 ^{35}S -甲硫氨酸/半胱氨酸进行放射性标记。接着通过还原条件下的 SDS-PAGE 分析免疫沉淀。凝胶上的条带被鉴定为成熟 GDF-8, GDF-8 前肽和未被加工的 GDF-8。

图 8 描述了 C57B6/SCID 小鼠接受作为单次静脉内 (IV) 或腹膜内 (IP) 给药的 1 mg/kg 剂量的 Myo29 的药物代谢动力学研究结果。Myo29 显示了大约一周的延长的终末半衰期和约 1ml/hr/kg 的低清除率。在腹膜内 (IP) 注射后吸收率约为 77%。

图 9 显示了用不同剂量 Myo29 (60, 10 和 1mg/kg) 或载体 (PBS) 每周一次处理的雄性 C57B6/SCID 小鼠中四头肌质量的比较结果。用 Myo29 在 10 和 60 mg/kg 剂量水平下处理四周导致肌肉质量在统计学上分别显著增加 19%和 23%。

图 10A 和 10B 显示了用不同剂量 Myo29 (10, 5, 2.5 和 1 mg/kg) 或 PBS 每周一次持续四周处理的雌性 CB17 SCID 小鼠中腓肠肌和四头肌质量。与对照载体相比, 用 Myo29 处理的小鼠中肌肉质量增加了 10-20%。

图 11A 和 11B 分别显示了用不同剂量 Myo29 (10, 5, 2.5 和 1 mg/kg) 或 PBS 每周一次持续十二周处理的雌性 CB17 SCID 小鼠中腓肠肌和四头肌肌肉质量。用 Myo29 处理的小鼠显示肌肉质量增加了 12-28%。

图 12 显示了用 Myo29 (10 和 5 mg/kg) 或 PBS 每周一次持续十二周处理的雌性 CB17 SCID 小鼠中, 通过握力计测定的前肢肌肉强度。用 Myo29 在 5 mg/kg 和 10 mg/kg 下处理的小鼠中前肢强度分别增加了 17%和 23%。

发明详述

I. 定义

在本文中使用的术语“抗体”指免疫球蛋白或其部分，并包含任何含有抗原结合位点的多肽，与其来源、由来物种、生产方法以及特性无关。作为一个非限制性实例，术语“抗体”包括人、猩猩、小鼠、大鼠、山羊、绵羊和鸡抗体。所述术语包括但不限于多克隆、单克隆、单特异性、多特异性、非特异性、人源化、单链、嵌合、合成、重组、杂合、突变和 CDR 移植抗体。对于本发明目的而言，除非另有说明，其也包括诸如 Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、dAb 的抗体片段，和其他保留抗原结合功能的抗体片段。

例如，可通过传统的杂交瘤技术 (Kohler 和 Milstein (1975) *Nature*, 256: 495-499), 重组 DNA 技术 (美国专利第 4,816,567 号) 或使用抗体文库的噬菌体展示技术 (Clackson 等. (1991) *Nature*, 352: 624-628; Marks 等. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597) 制备抗体。关于不同的其他抗体生产技术，参见 *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow 等., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。

术语“抗原结合区”指抗体分子的一部分，其包含与抗原的部分或全部特异性结合或互补的区域。其中抗原较大，抗体仅结合该抗原的特定部分。“表位”或“抗原决定簇”是抗原分子的一部分，其负责与抗体的抗原结合区特异性相互作用。一或多个抗体可变区可提供一个抗原结合区 (如，所谓的由 V_H 区组成的 Fd 抗体片段)。一个抗原结合区包含一个抗体轻链可变区 (V_L) 和一个抗体重链可变区 (V_H)。

术语“库 (repertoire)”指遗传学上不同的核苷酸集合，如全部或部分衍生自编码表达免疫球蛋白的序列的 DNA 序列。所述序列通过体内重排产生，如对于 H 链而言，重排 V, D 和 J 片段和如对于 L 链而言，重排 V 和 J 片段。可选地，所述序列可通过体外刺激和响应重排发生而产生自细胞系。可选地，所述序列的部分或全部可获得自通过组合如未重排的 V 片段与 D 和 J 片段，通过核苷酸合成、随机诱变和其他披露于美国专利第 5,565,332 号的方法。

术语“特异性相互作用”或“特异性结合”或类似术语指两个分子形成的在生理条件下相对稳定的复合物。所述术语也适用于，如特异于特定表位的抗原结合区，该表位为许多抗原所携带，在这种情况下，带有抗原结合区的抗体可结合带有该表位的各种抗原。因此，例

如，只要抗体能结合 BMP-11 和 GDF-8 两者所带有的表位，其就可特异性结合 BMP-11 和 GDF-8。

特异性结合的特点在于高亲和力和低至中容量。非特异性结合通常具有低亲和力和中至高容量。通常，当亲和常数 K_d 高于 $10^6 M^{-1}$ 或优选高于 $10^8 M^{-1}$ 时，认为结合是特异性的。必要时，通过改变结合条件减少非特异性结合而基本上不影响特异性结合。上述条件为本领域所公知，且本领域技术人员使用常规技术就可选择合适的条件。所述条件通常用抗体浓度、溶液离子强度、温度、供结合时间、非相关分子（如，血清白蛋白、乳酪蛋白）浓度等来限定。条件的实例列于实施例 4、7 和 10 中。

短语“基本上如...所述”指相应的 CDR、 V_H 或 V_L 区与本文所述序列的指定区域是同一的或是高度相似的。例如，上述取代包括从 CDR（H1, H2, H3, L1, L2 或 L3）序列的任意 5 个氨基酸中取代 1 或 2 个。

术语“TGF- β 超家族”指结构相关的生长因子家族。有关的生长因子家族为本领域所公知（Kingsley 等. (1994) *Genes Dev.*, 8: 133-146; Hoodless 等. (1998) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 228: 235-72）。TGF- β 超家族包括骨形成蛋白（BMP）、活化素、抑制素、苗勒氏抑制物质、胶质细胞衍生的神经营养因子和数量上仍在增加的诸如 GDF-8（肌肉生长抑制素）的生长分化因子（GDF）。许多上述蛋白在结构上和/或功能上与 GDF-8 相关。例如，也称为 GDF-11 的人 BMP-11 在氨基酸水平上与 GDF-8 具有 90% 的同一性（Gamer 等. (1999) *Dev. Biol.* 208, 222-232; Nakshima 等. (1999) *Mech. Dev.*, 80: 185-189）。

术语“GDF-8”指特定的生长分化因子-8 以及，合适时，在结构上或功能上与 GDF-8 相关的因子，例如，BMP-11 和其他属于 TGF- β 超家族的因子。该术语指 GDF-8 全长未加工的前体形式，也指翻译后裂解产生的成熟和前肽形式。该术语也指 GDF-8 的任一片段和变体，所述片段和变体保持至少某些与于本文中所讨论的包括序列已被修饰的成熟 GDF-8 相关的生物活性。人成熟 GDF-8 氨基酸序列提供于 SEQ ID NO: 49。本发明涉及的 GDF-8 来自所有的脊椎动物，包括但不限于，人、牛、鸡、小鼠、大鼠、猪、绵羊、火鸡、狒狒和鱼（关于序列信

息，参见如，McPherron 等. (1997) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 94: 12457-12461).

术语“成熟 GDF-8”指来自于被裂解的 GDF-8 前体蛋白的羧基末端区的蛋白。成熟 GDF-8 可以单体、同型二聚体或以 GDF-8 潜在性复合体的形式存在。基于此情形，成熟 GDF-8 可在这些不同形式的任一或全部之间建立平衡。在其生物活性形式中，成熟 GDF-8 也称为“活性 GDF-8”。

术语“GDF-8 前肽”指来自于被裂解的 GDF-8 前体蛋白的氨基末端区的多肽。GDF-8 前肽能与成熟 GDF-8 上的前肽结合区结合。

术语“GDF-8 潜在性复合体”指在成熟 GDF-8 同型二聚体和 GDF-8 前肽之间形成的蛋白复合体。据信两个 GDF-8 前肽与同型二聚体中两分子成熟 GDF-8 结合形成失活的四聚复合体。该潜在性复合体可包括取代 GDF-8 前肽的其他 GDF 抑制剂，或除一种或多种该 GDF-8 前肽之外的其他 GDF 抑制剂。

术语“GDF-8 活性”指与活性 GDF-8 蛋白相关的一种或多种生理学上生长调节或形态发生活性。例如，活性 GDF-8 是一种骨骼肌质量的负调节剂。活性 GDF-8 也能调节肌肉特异性酶（如，肌酸激酶）的产生，刺激成肌细胞增殖以及调节前脂肪细胞分化为脂肪细胞。在体内及体外测定 GDF-8 活性方法的实例列于实施例 2、3、6 和 13 中。

术语“GDF-8 抑制剂”包括任何能抑制 GDF-8 活性、表达、加工或分泌的试剂。上述抑制剂包括蛋白质、抗体、肽、肽模拟物、核酶、反义寡核苷酸、双链 RNA 和其他能特异性抑制 GDF-8 的小分子。上述抑制剂被认为“抑制”、“中和”或“减少”GDF-8 的生物活性。

术语“中和”、“抑制”和它们的同源词指相对于在缺乏该相同抑制剂条件下的 GDF-8 活性，通过 GDF-8 抑制剂减少了 GDF-8 的活性。所述活性减少优选至少约 10%，20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%或更高。

术语“处理”在本文中可与术语“治疗方法”可交换地使用，并指治疗性处理及预防/预防性措施。那些需要处理的可包括已经患特定的医学疾病的个体和最终患该病症的那些（即，那些需要预防性措施的）。

术语“分离的”指基本上不含有其天然周围介质的分子。例如，分离的蛋白基本上不含有细胞物质或来自衍生其的细胞或组织源的其他蛋白。该术语用于制剂时，其中分离的蛋白是足够地纯以作为治疗组合物给药，或至少 70%-80%(w/w) 纯，更优选地，至少 80%-90%(w/w) 纯，甚至更优选地，90-95% 纯；以及，最优选地，至少 95%，96%，97%，98%，99% 或 100% (w/w) 纯。

术语“哺乳动物”指照此分类的任何动物，包括人、驯养和从事畜牧的动物、动物园动物、从事体育活动的动物或宠物，如狗、马、猫、绵羊、猪、牛等。

术语“有效剂量”或“有效量”指引起患者症状改善或所需生物学结果（如，增加骨骼肌质量和/或骨密度）的化合物的数量。上述数量应足够以减少与骨骼肌质量和骨密度负调节相关的 GDF-8 活性。以下章节中描述了测定有效量的方法。

II. 抗 GDF-8 抗体和抗原结合片段

A. 人抗体 Myo29, Myo28 和 Myo22

本发明所公开的内容提供了新的抗 GDF-8 抗体及其抗原结合片段。上述抗体的非限制性例证的实施方案命名为 Myo29, Myo28 和 Myo22。这些例证的实施方案以人 IgG₁ 抗体的形式提供。

本发明的抗体具有独特及有益的特性。首先，这些结合成熟 GDF-8 的抗体具有高亲和力。其次，本发明的抗体可在体外和体内抑制 GDF-8 活性，例如通过 ActRIIB 结合抑制和受体基因测定来证实。本发明的抗体也能特异性结合和/或抑制 BMP-11 的活性，例如，通过 ActRIIB 结合抑制和受体基因测定来证实。最后，本发明所披露的抗体可抑制与骨骼肌质量和骨密度负调节相关的 GDF-8 活性。

在一个例证的实施方案中，本发明所披露的抗体能特异性结合 GDF-8 和 BMP-11。据推测该抗体也可与其他蛋白反应，例如，那些属于 TGF- β 超家族的，诸如苗勒氏抑制物质、胶质细胞衍生的神经营养因子或除了 GDF-8 之外的生长和分化因子。在某一实施方案中，Myo29 与包含与 SEQ ID NO: 49 的氨基酸 72 至 88 同一的序列的蛋白反应。在另一个实施方案中，Myo29 结合包含序列 Lys-Xaa1-Xaa2-Pro-Xaa3-Asn (SEQ ID NO: 54) 的蛋白，其中 Xaa1, Xaa2 和 Xaa3 分别是任意氨基酸。在另一个实施方案中，至少符合下

列条件之一：(1) Xaa1=Met, (2) Xaa=Ser 和 (3) Xaa3=Ile; 所有的条件彼此互相独立。在其他实施方案中, Myo22 识别成熟 GDF-8 序列中起始的 44 个 N 末端氨基酸 (SEQ ID NO: 49 的氨基酸 1-44) 中的表位。

本领域普通技术人员可认识到本发明的抗体可用于检测、测定和抑制与那些上述规定所不同的蛋白。一般而言, 本发明的抗体可用于包含与列于 SEQ ID NO: 49 的 GDF-8 成熟形式序列中至少 100, 80, 60, 40 或 20 个连续氨基酸的任一序列具有至少约 70%, 80%, 90%, 95% 或更多同一性的序列的任何蛋白。上述蛋白非限制性实例包括 GDF-8 序列, 其衍生自在本发明说明书中所述的不同物种。通过标准的比对算法测定同一性百分数, 例如, Altschul 等. (1990) *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 描述的局部相似性基本查询工具 (BLAST), Needleman 等. (1970) *J. Mol. Biol.*, 48: 444-453 描述的算法, 或 Meyers 等. (1988) *Comput. Appl. Biosci.*, 4: 11-17 描述的算法。

B. 可变区

也称为免疫球蛋白的完整抗体通常是由每条大约 25kDa 的两条轻 (L) 链和每条大约 50kDa 的两条重 (H) 链组成的糖基化蛋白四聚体。在抗体中存在两种类型的轻链, 称为 λ 和 κ 。基于重链恒定区的氨基酸序列, 免疫球蛋白可分为五种主要类型: A, D, E, G 和 M, 以及其中一些可进一步分为亚型 (同种型), 如 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 和 IgA₂。不同类型免疫球蛋白的亚基结构和三维构象为本领域众所周知。关于抗体结构的综述, 参见 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow 等., 1988。简单而言, 每条轻链都由 N-末端可变 (V) 区 (V_L) 和恒定 (C) 区 (C_L) 组成。每条重链都由 N-末端 V 区, 三或四个 C 区以及铰链区组成。最接近 V_H 的 C_H 区被指定为 C_H1。V_H 和 V_L 区包括四个称为骨架区的相对保守的序列区域 (FR1, FR2, FR3 和 FR4), 其形成三个超变序列区 (互补决定区, CDRs) 的支架。CDR 包含最多的负责与抗原特异性相互作用的残基。CDR 是指 CDR1, CDR2 和 CDR3。因此, 重链上的 CDR 组件称为 H1, H2 和 H3, 这时轻链上的 CDR 组件称为 L1, L2 和 L3。在抗体结合位点中 CDR3 是分子多样性最大的来源。例如, H3 可短至两个氨基酸残基或长于 26 个残基。最小的抗原结合片段是 Fv, 其由 V_H 和 V_L 区

组成。Fab 片段(抗原结合片段)由 V_H - C_H1 和 V_L - C_L 区通过在恒定区之间的二硫键共价连接组成。当在宿主细胞中共表达时,为克服 Fv 中 V_H 和 V_L 区非共价连接导致的解离趋向,可构建通常称作为单链(sc)Fv 片段(scFv),其中在 V_H 的 C-末端与 V_L 的 N-末端之间或在 V_L 的 C-末端与 V_H 的 N-末端之间存在柔性的和足够长的多肽接头。最常用的接头是具有 15 个残基 $(Gly_4Ser)_3$ 的肽,但其他接头也为本领域所公知。

通过编码不同区域的多胚系基因的使用以及多种体细胞事件形成了抗体多样性。体细胞事件包括可变基因片段与多样性(D)和连接(J)基因片段重排产生完整的 V_H 区以及可变和连接基因片段重排产生的完整 V_L 区。其自身的重排过程是不精确的,导致在 V(D)J 连接处缺失或添加氨基酸。在发育的 B 细胞中这些多样性机制出现在抗原暴露前。在抗原刺激后,在 B 细胞中表达抗体的基因经历了体细胞突变。基于估计的胚系基因片段的数目,这些片段的随机重排,以及随机 V_H - V_L 配对,可产生 1.6×10^7 个不同的抗体(Fundamental Immunology, 第 3 版, ed. Paul, Raven Press, New York, NY, 1993)。当考虑到其他有助于抗体多样性的加工(如体细胞突变)时,预计能有超过 1×10^{10} 个不同抗体产生(Immunoglobulin Genes, 第 2 版., eds. Jonio 等., Academic Press, San Diego, CA, 1995)。因为许多加工与抗体多样性产生相关,所以独立得到的具有相同抗原特异性的单克隆抗体不太可能具有同样的氨基酸序列。

因此,本发明进一步提供了新的衍生自人免疫球蛋白基因文库的 CDRs。带有本发明 CDR 的结构通常是抗体重链或轻链序列或它们的实质部分,其中 CDR 位于相应于天然存在的 V_H 和 V_L 的 CDR 的位置。可通过 Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, eds. Kabat 等., 1991 中所描述的方法来测定免疫球蛋白可变区的结构和位置。

本发明所披露的抗体、它们的 scFV 片段、 V_H 和 V_L 区和 CDR 的 DNA 和氨基酸(AA)序列列于序列表中并在表 1 中列举。为了方便起见, V_H 和 V_L 区中每个 CDR 的位置列于表 2 中。鉴定了在 Myo29, Myo28 和 Myo22 中除了 V_H 和 V_L 区之外的重链和轻链序列。

表1: scFv, V_H 和 V_L 区及CDRs的DNA和氨基酸序列

	Myo29	Myo28	Myo22
scFv的DNA序列	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:1
scFv的氨基酸序列	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:2
VH的DNA序列	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:3
VH的氨基酸序列	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:4
VL的DNA序列	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:5
VL的氨基酸序列	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:6
scFv的胚系DNA序列	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:19	
scFv的胚系氨基酸序列	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:20	
VH的胚系DNA序列	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:21	
VH的胚系氨基酸序列	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:22	
VL胚系DNA序列	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:23	
VL胚系氨基酸序列	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:24	
H1的氨基酸序列	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:43
H2的氨基酸序列	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:44
H3的氨基酸序列	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:45
L1的氨基酸序列	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:46
L2的氨基酸序列	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:47
L3的氨基酸序列	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:48

表2: scFv中的CDR位置

CDR	Myo29 (SEQ ID NO:26)	Myo28 (SEQ ID NO:20)	Myo22 (SEQ ID NO:2)
H1	31 - 35	31 - 35	31 - 35
H2	50 - 66	50 - 66	50 - 66
H3	99 - 106	99 - 110	99 - 113
L1	157 - 167	160 - 173	163 - 176
L2	183 - 189	189 - 195	192 - 198
L3	222 - 228	228 - 233	231 - 242

本发明披露了可进一步包含抗体恒定区或其部分的抗体。例如，V_L区的C-末端可附着在抗体轻链恒定区末端上，该轻链恒定区包括人C_κ或C_λ链，优选C_λ链。同样地，基于V_H区的特异性抗原结合片段的C-末端可附着在免疫球蛋白重链的全部或部分的末端上，该免疫球蛋白

白重链衍生自任一同种型抗体，如 IgG，IgA，IgE 和 IgM，以及该同种型的任一亚型，特别是 IgG₁ 和 IgG₄。在例证的实施方案中，抗体包含人 IgG_{1λ} 的重链和轻链 C-末端片段。轻链 λ 的 C-末端片段的 DNA 和氨基酸序列分别列于 SEQ ID NO : 50 和 SEQ ID NO : 51 中。IgG₁ 重链 C-末端片段的 DNA 和氨基酸序列分别列于 SEQ ID NO : 52 和 SEQ ID NO : 53 中。

本发明的某些实施方案包含 Myo29，Myo28 或 Myo22 的 Fv 片段的 V_H 和/或 V_L 区。另外的实施方案包含一个或多个这些 V_H 和 V_L 区任一的互补决定区 (CDR)。一个实施方案包含 Myo29，Myo28 或 Myo22 的 V_H 区的一个 H3 片段。在某些实施方案中，本发明的 V_H 和 V_L 区是胚系的，即使用常规的分子生物学技术改造这些区的骨架区 (FR) 以与人胚系基因产物的连续氨基酸序列相匹配。在另一个实施方案中，骨架序列仍保留与胚系的差异。

C. 修饰的抗体及其片段

本发明另一方面提供了一种用于获得特异于 GDF-8 的抗体结合区的方法。本领域技术人员应理解本发明的抗体不限于表 1 中所陈列的 V_H 和 V_L 的特定序列，但也包括这些仍保留抗原结合活性序列的变体。这种变体可衍生自使用本领域公知技术提供的序列。在 FR 或 CDR 中可进行氨基酸取代、缺失或添加。虽然在骨架区中的改变通常意在改善抗体稳定性和减少免疫原性，但是在 CDR 中的改变通常意在增加抗体对其目标的亲和力。上述亲和力增加的改变通常是通过以经验为主的改变 CDR 区和测试抗体来确定。上述改变可根据描述于 Antibody Engineering, 第 2 版, ed. Borrebaeck, Oxford University Press, 1995 中的方法进行。

制备是本文所述的 V_H 区的氨基酸序列变体的 V_H 区的方法包含在本发明所披露的 V_H 区氨基酸序列中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸，任选地将这样提供的 V_H 区与一种或多种 V_L 区组合，并测试 V_H 区或 V_H/V_L 组合或组合物与 GDF-8 的特异性结合，任选地，测试上述抗原结合区中和 GDF-8 活性的能力。V_L 区可具有基本上如本文所述的氨基酸序列。

一种类似的方法可应用于本文所披露的 V_L 区的一种或多种序列变体与一种或多种 V_H 区的结合。

本发明另一方面提供了一种制备与 GDF-8 特异性反应的抗原结合片段的方法。该方法包括：

(a) 提供编码 V_H 区核酸的起始库，该 V_H 区包括要被取代的 CDR3 或缺失 CDR3 编码区；

(b) 将该库与编码基本上如本文中所述的 V_H CDR3 (即，H3) 氨基酸序列的供体核酸结合，使得该供体核酸插入该库的 CDR3 区中，以致提供了一种编码 V_H 区核酸的产物库；

(c) 表达该产物库的核酸；

(d) 筛选特异于 GDF-8 的特异性抗原结合片段；和

(e) 收集该特异性抗原结合片段或编码其的核酸。

此外，一种类似的方法可用于将本发明的 V_L CDR3 (即，L3) 与编码 V_L 区核酸的库结合，该 V_L 区包括要被取代的 CDR3 或缺失 CDR3 编码区。

使用重组 DNA 技术，可将编码本发明 CDR (如，CDR3) 的序列导入缺失 CDR (如，CDR3) 的可变区库中。例如，Marks 等。(Bio/Technology (1992) 10: 779-783) 描述了产生抗体可变区库的方法，其中定向于或邻近可变区 5' 末端的通用引物被用于通用引物与人 V_H 基因的第三骨架区的连接，以提供缺失 CDR3 的 V_H 可变区库。该库可与特定抗体的 CDR3 结合。使用类似技术，本发明 CDR3 衍生序列可与缺失 CDR3 的 V_H 或 V_L 区的库混合，并且该混合的完整 V_H 或 V_L 区可与同源 V_L 或 V_H 区结合以提供本发明的特异性抗原结合片段。接着，该库在诸如 WO 92/01047 的噬菌体展示系统的适合的宿主系统中展示，使得可筛选合适的抗原结合片段。

类似的混合或组合技术也披露于 Stemmer (Nature (1994) 370: 389-391) 中，其描述了与 β -内酰胺酶基因相关的技术，但据观察，该方法可用于抗体的制备。

另一种可选方法是使用随机诱变一或多种选定的 V_H 和/或 V_L 基因以产生在整个可变区范围中的突变，来产生带有本发明 CDR 衍生序列的新的 V_H 或 V_L 区。该技术描述于 Gram 等。(Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. (1992) 89: 3576-3580) 中，其使用了易错聚合酶链式反应。

另一种可使用的方法是直接诱变 V_H 或 V_L 基因的 CDR 区。该技术披露于 Barbas 等. (Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. (1994) 91: 3809-3813) 和 Schier 等. (J. Mol. Biol. (1996) 263: 551-567) 中。

同样地, 一或多个, 或所有三个 CDR 可移植入 V_H 或 V_L 区的库中, 接着筛选特异于 GDF-8 的特异性结合配体或结合片段。

免疫球蛋白可变区的主要部分至少包含 CDR 区以及任选地, 它们之间的骨架区, 该骨架区来自如在本文中所述的 scFv 片段。该部分也包括至少约 50% 的 FR1 和 FR4 任一或全部, 该 50% 是 FR1 C-末端的 50% 和 FR4 N-末端的 50%。在该可变区 N-末端或 C-末端添加的残基可以是通常与天然存在的可变区不相关的那些。例如, 通过重组 DNA 技术产生的本发明的特异性抗原结合片段的结构可导致编码接头的 N-或 C-末端残基导入, 该接头的导入有利于克隆或其他操作步骤。其他操作步骤包括在本发明可变区与其他蛋白序列包括免疫球蛋白重链、其他可变区 (如, 在双体产生中) 或如下更详细讨论的蛋白标记的连接处导入接头。

尽管在实施例中说明的实施方案包含 V_H 和 V_L 区的“匹配”对, 本发明也包含含有单一可变区的结合片段, 该单一可变区衍生自任一 V_H 或 V_L 区序列, 特别是 V_H 区。就任一单链特异性结合区而言, 这些区可用于筛选能结合 GDF-8 的可形成双区特异性抗原结合区的互补区。可通过使用在 WO 92/01047 中披露的称为分级双重组合合法的噬菌体展示筛选方法进行筛选, 在该方法中含有任一 H 或 L 链克隆的单独克隆被用于感染编码其他链 (L 或 H) 的克隆的完整文库, 以及筛选所产生的双链特异性抗原结合区, 与诸如那些在参考文献中描述的噬菌体展示技术是一致的。该技术也披露于 Marks 等., 同上。

可通过化学方法将抗体与放射性核素、药物、大分子或其他试剂连接或将其用于产生包含一或多个本发明的 CDR 的融合蛋白。

在含有 V_H - V_L 对的抗体融合蛋白中这些链 (通常为 V_H) 之一和其他蛋白被合成为单一的多肽链。在不同于抗体的这些产物类型中, 通常具有额外的功能元件; 小分子的活性部分, 或缀合的或融合的大分子的主要分子结构特征。

除了上述氨基酸序列改变之外，抗体也可被糖基化、聚乙二醇化或连接上白蛋白或非蛋白质聚合物。例如，本发明所披露的抗体可连接多种非蛋白质聚合物之一，如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯，这些方法列于美国专利第 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 或 4,179,337 号中。例如，通过共价连接聚合物化学修饰抗体可增加它们的循环半衰期。聚合物的实例和方法以及它们所修饰的肽也示于美国专利第 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285 和 4,609,546 号中。

在其他实施方案中，可修饰抗体以具有改变的糖基化类型（即，改变原始的或天然的糖基化类型）。在本文中使用的“改变”意指一或多个碳水化合物部分缺失、和/或添加一或多个糖基化位点到原始抗体上。通过改变氨基酸序列以包含糖基化位点共有序列来实现在本发明所披露的抗体上添加糖基化位点是本领域众所周知的。其他增加抗体上碳水化合物部分数量的方法是通过化学或酶偶联糖苷到抗体的氨基酸残基上。这些方法描述于 WO 87/05330 中，以及于 Aplin 和 Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 22: 259-306 中。可通过在 Hakimuddin 等. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 52; 和 Edge 等. (1981) *Anal. Biochem.*, 118: 131 和 Thotakura 等. (1987) *Meth. ENZYMOLOGY*, 138: 350 中所描述的化学或酶方法来实现除去抗体上出现的任一碳水化合物部分。

本发明的抗体也可标记有可检测的或功能性标记。可检测的标记包括诸如 ^{131}I 或 ^{99}Tc 的放射性标记，使用本领域公知的常规化学反应可将其连接在本发明的抗体上。也包括诸如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的酶标记。还包括诸如生物素的化学部分，其通过与诸如标记的抗生物素蛋白的特定相关的可检测部分结合而被检测。

其中 CDR 序列与列于 SEQ ID NO: n 中，其中 n 为 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 或 48 的那些仅具有非实质性差异的抗体也包括在本发明的范围中。非实质性差异包括较少的氨基酸改变，这样的取代即在 CDR 序列的任意 5 个氨基酸中取代 1 或 2 个氨基酸。通常，氨基酸为具有相似电荷、疏水性或立体化学特性的相关氨基酸所取代。这样的取代应为本领域的公知常识。不像

在 CDR 中, 在结构骨架区 (FR) 中可进行更实质性的改变而不会对抗体结合特性产生不利影响。FR 的改变, 包括但不限于, 人源化非人源骨架区或工程化某些对抗原接触或对稳定结合位点起重要作用的骨架区残基, 如改变恒定区的类型或亚型, 该改变可改变诸如 Fc 受体结合的效应子作用的特定氨基酸残基 (Lund 等. (1991) *J. Immun.* 147: 2657-2662 和 Morgan 等. (1995) *Immunology* 86: 319-324), 或改变恒定区所衍生自的物种。抗体在重链的 C_H2 区中可具有突变以减少或改变效应子作用, 如, Fc 受体结合和补体激活。例如, 抗体可具有诸如在美国专利第 5,624,821 和 5,648,260 号中所描述的那些突变。例如, 在 IgG₁ 或 IgG₂ 重链中, 上述突变可在 SEQ ID NO: 53 的氨基酸残基 117 和 120 上产生, 这些残基代表了 IgG₁ Fc 的一部分 (这些残基相应于 IgG₁ 或 IgG₂ 全长序列中氨基酸 234 和 237)。抗体也可具有突变以稳定免疫球蛋白两条重链之间的二硫键, 如披露于 Angal 等. (1993) *Mol. Immunol.* 30: 105-108 中的在 IgG₄ 绞链区中的突变。

D. 核酸、克隆和表达系统

本发明还提供了一种分离的编码本发明抗体或结合片段的核酸。根据本发明内容的核酸可包含 DNA 或 RNA, 并且可以是全合成或部分合成的。除非上下文另有要求, 本文中所提及的核苷酸序列包含具有特定序列的 DNA 分子, 以及包含其中 U 取代了 T 的具有特定序列的 RNA 分子。

本发明的核酸包含如本文中所列出的本发明的 CDR 或 V_H 或 V_L 区的编码序列。

本发明也提供了以质粒、载体、转录或表达盒形式的构建体, 其包含至少一种上述本发明的核酸。

本发明也提供了一种宿主细胞, 其包含一或多种上述构建体。在本文中提供的编码任一 CDR (H1, H2, H3, L1, L2 或 L3)、V_H 或 V_L 区、或特异性抗原结合片段的核酸作为本发明的一方面, 也提供了一种生产编码产物的方法。该方法包括编码核酸的表达。可通过在合适的条件下培养含有核酸的重组宿主细胞实现表达。接着, 使用任意合适的技术分离和/或纯化通过表达产生的 V_H 或 V_L 区、或特异性抗原结合片段, 然后在适当时使用。

可提供分离的和/或纯化的根据本发明内容的特异性抗原结合片段、 V_H 和/或 V_L 区、以及编码核酸分子和载体，如从它们的天然污染物中分离和/或纯化，以基本上纯或均一的形式提供，或就核酸而言，除编码具有所需功能多肽的序列外，不含有或基本上不含有其他来源的核酸或基因。

在多种不同宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是众所周知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞和酵母及杆状病毒系统。在本领域中可获得用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、NSO小鼠黑色素瘤细胞和许多其他细胞。常用的细菌宿主是大肠杆菌。关于适合产生抗体的细胞，参见Gene Expression Systems, eds. Fernandez等., Academic Press, 1999。任何与本发明相容的细胞可用于产生本发明所披露的抗体。

可选择或构建设合适的载体，该载体含有合适的调节序列，包括启动子序列、终止子序列、多腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因和其他合适的序列。载体可以是质粒或病毒，如合适的噬菌体或噬菌粒。为了解详情，参见例如，Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 第2版., Sambrook等., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989。例如，在制备核酸构建体、诱变、测序、DNA导入细胞和基因表达、以及分析蛋白中，用于处理核酸的许多公知的技术和方案详细描述于Current Protocols in Molecular Biology, 第2版., Ausubel等. eds. , John Wiley & Sons, 1992。

因此，本发明另一方面提供了一种包含本文所披露的核酸的宿主细胞。还在另一方面提供了一种包括将上述核酸导入宿主细胞的方法。所述导入可使用任何可获得的技术。对于真核细胞而言，合适的技术包括磷酸钙转染、二乙氨基乙基葡聚糖 (DEAE-Dextran)、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其他病毒的转导，如牛痘，或对于昆虫细胞而言，杆状病毒。对于细菌细胞而言，合适的技术可包括氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体的转染。

在导入后可接着促使或允许核酸的表达，如，通过在适合于表达该基因的条件下培养宿主细胞。

E. 生物保藏

编码非胚系 scFv 的 Myo29, Myo28 或 Myo22 的噬菌粒载体 pCANTAB6 单独转化的大肠杆菌培养物于 2002 年 10 月 2 日保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 保藏号分别为 PTA-4741, PTA-4740 和 PTA-4739。保藏单位的地址是 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110, U. S. A.

II. 治疗疾病的方法和其它用途

本发明的抗体可用于预防、诊断或治疗人或动物中不同的医学疾病。该抗体可用于抑制或减少一或多种与 GDF-8 或相关蛋白有关的活性。最优选地, 相对于 GDF-8 不与抗体结合的情况, 该抗体抑制或减少一或多种 GDF-8 的活性。在某些实施方案中, 相对于不结合一或多种本发明所披露抗体的成熟 GDF-8 蛋白活性, 当结合一或多种本发明所披露抗体时, GDF-8 活性被抑制至少 50%, 优选至少 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 72, 76, 78, 80, 82, 84, 86 或 88%, 更优选至少 90, 91, 92, 93 或 94%, 以及甚至更优选至少 95%到 100%。在 pGL3 (CAGA)₁₂ 报告基因测试 (RGA) 或 ActRIIB 受体测试中可测定对 GDF-8 活性的抑制, 报告基因测试描述于 Thies 等. (Growth Factors (2001) 18: 251-259) 中以及阐述于实施例 2 和 9 中, 受体测试阐述于实施例 3 和 6 中。

由本发明抗体诊断、治疗或预防的医学疾病是肌肉或神经肌肉障碍; 诸如肥胖症的脂肪组织障碍; II 型糖尿病; 葡萄糖耐量降低; 代谢综合征(如 X 综合征); 诸如烧伤或氮失调的创伤诱导的胰岛素抗性; 或诸如骨质疏松症的骨退行性疾病。

其他由本发明所披露的抗体诊断、治疗或预防的医学疾病是与骨质丢失相关的疾病, 包括骨质疏松症, 特别是在老年人和/或绝经后的妇女中, 糖皮质激素诱导的骨质疏松症, 骨质减少、骨关节炎, 和骨质疏松症相关的骨折。其他作为目标的代谢性骨病和骨障碍包括由于长期糖皮质激素治疗导致的低骨量, 生殖腺早衰, 雄激素遏抑, 维生素 D 缺乏, 继发性甲状旁腺功能亢进症, 营养缺乏和神经性厌食。本发明抗体优选用于预防、诊断或治疗哺乳动物中, 特别是在人类中的上述医学疾病。

本发明的抗体或抗体组合物以治疗有效量的形式给予。一般而言, 治疗有效量可随着患者的年龄、身体状况和性别, 以及所患有的医学

疾病的严重程度而改变。剂量可决定于医师，如需要，可调整以与所观察到的疗效相适应。上述化合物的毒性和疗效可通过在细胞培养或试验动物中执行标准的药理学方法来测定，如，测定 LD₅₀（试验对象 50% 致死剂量）和 ED₅₀（试验对象 50% 有效剂量）。治疗指数指毒性和疗效之间的剂量比，可表示为 LD₅₀/ED₅₀。优选具有大的治疗指数的抗体。

获得自细胞培养试验和动物研究的数据可用于计算在人体中使用的剂量范围。上述化合物的剂量优选处于循环浓度的范围内，包括具有很少毒性或无毒性的 ED₅₀。在该范围内剂量基于所采用的剂型和给药途径可改变。对于本发明所使用的任何抗体而言，治疗有效剂量可最初从细胞培养试验中确定。在动物模型中可计算剂量以获得循环血浆浓度范围，包括在细胞培养试验中测定的 IC₅₀（即达到症状的半最大抑制的受试抗体浓度）。例如，通过高效液相色谱可测定血浆水平。通过合适的生物测定可检测任何特定剂量的效果。合适的生物测定的实例包括 DNA 复制测定、基于转录的测定、GDF-8 蛋白/受体结合测定、肌酸激酶测定、基于前脂肪细胞分化的测定、基于脂肪细胞中葡萄糖摄取的测定，和免疫测定。

一般而言，试用组合物使得抗体或它们结合片段以 1μg/kg-150 mg/kg、1μg/kg-100 mg/kg、1μg/kg-50 mg/kg、1μg/kg-20 mg/kg、1μg/kg-10 mg/kg、1μg/kg-1 mg/kg、10 μg/kg-1 mg/kg、10 μg/kg-100 μg/kg、100 μg/kg-1 mg/kg、以及 500 μg/kg-1 mg/kg 的剂量给予。优选地，抗体以快速浓注射剂形式给予，以达到服药后最大时间长度内抗体循环水平最大化的目的。在以快速浓注射剂给药后也可采用连续输注。

用本发明所披露的抗体治疗、诊断或预防上述医学疾病的方法中也可使用 TGF-β 超家族中其他蛋白。许多这些蛋白在结构上与 GDF-8 相关，如 BMP-11。因此，另外的实施方案提供了治疗上述疾病的方法，该方法通过单独给予患者能抑制 BMP-11 或活化素的抗体或与诸如抗 GDF-8 中和抗体的其他 TGF-β 抑制剂联合给予。本发明的抗体也可用于治疗与 BMP-11 相关或由其介导的疾病或病症。参见，如美国专利第 5,639,638 和 6,437,111 号。

本发明的抗体也用于在体内或体外检测属于诸如 BMP-11 和 GDF-8 的 TGF-β 超家族蛋白的存在。通过把这些蛋白的存在或水平与医学疾

病相联系，本领域技术人员可诊断相关的医学疾病。所述的医学疾病可通过上述本发明所披露的抗体来诊断。

上述检测方法在本领域众所周知，包括 ELISA、放射性免疫测定、免疫印迹、蛋白质印迹、免疫荧光检验法、免疫沉淀法和其他类似的技术。抗体可进一步以包括一或多种这些技术的诊断试剂盒形式提供来检测蛋白（如，GDF-8）。该试剂盒可含有其他组分、包装、说明书或其他有助于检测蛋白和使用该试剂盒的物质。

如果抗体意在诊断目的，可能需要对其进行修饰，例如，用配体（如生物素）或可检测的标记基团（如荧光基团、放射性同位素或酶）修饰。若有要求，该抗体（无论是多克隆的还是单克隆的）可使用常规技术标记。合适的标记包括荧光团、发色团、放射性原子、高电子密度试剂、酶和含有特异性结合配体的配体。通常可检测酶的活性。例如，可通过用分光光度计定量检测辣根过氧化物酶将四甲基联苯胺（TMB）转化为蓝色素的能力。其他合适的标记可包括生物素和抗生物素蛋白或抗生物素蛋白链菌素、IgG 和蛋白 A，以及本领域已知的许多受体-配体对。其他修饰或可能进行的修饰为本领域普通技术人员所显而易见，且被认为与本发明的范围等同。

还在本发明另一方面提供了一种鉴定用于治疗肌肉和骨疾病的治疗剂的方法。合适的筛选方法，如基于 ELISA 的鉴定法，为本领域所公知。在上述筛选方法中，通过将本发明的抗体与诸如 GDF-8、BMP-11、活化素的配体结合形成第一结合混合物；并测定第一结合混合物（ M_0 ）中配体和抗体之间的结合量。通过将抗体、配体和要被筛选的化合物或试剂结合形成第二结合混合物，并测定第二结合混合物（ M_1 ）中配体和抗体之间的结合量。接着比较第一和第二结合混合物的结合量，例如，通过计算 M_1/M_0 比值。如果与所观察到的第一结合混合物比较，在第二结合混合物中结合减少了，那么认为该化合物或试剂能抑制 GDF-8 活性。结合混合物的配方和最优化为本领域所显而易见的，上述结合混合物也可含有所需用于增强或优化结合的缓冲液和盐类，以及在本发明的筛选方法中可包括额外的对照试验。

若发现化合物能减少抗体-配体结合至少约 10%（即， $M_1/M_0 < 0.9$ ），优选地大于约 30%，则该化合物可得到鉴定，接着，如果需要，在诸如 ActRIIB 结合测定（实施例 2）和其他基于细胞以及描述于实施例

13、15 和 16 中的体内测定的其他鉴定法中再次筛选具有抑制 GDF-8 活性的化合物。

III. 药物组合物及给药方法

本发明提供了包含本发明所披露抗体的组合物。上述组合物可适于制药用途及给患者施用。该组合物通常包含一或多种本发明的抗体和药学上可接受的赋形剂。本文中使用的术语“药学上可接受的赋形剂”包括与药物施用相容的溶剂、分散剂、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等任一或全部。使用上述介质和试剂作为药学上活性物质为本领域众所周知。该组合物也含有其他能提供补充、额外或增强的治疗功能的活性化合物。该药物组合物也可与指导施用的说明书一起包含于容器、包装或分配器中。

本发明的药物组合物可配制与其所需的给药途径相容。实现给药的方法为本领域普通技术人员所公知。也有可能获得可局部或经口给药或能通过粘膜传递的组合物。例如，该给药方式可以是静脉内、腹膜内、肌内、腔内、皮下或经皮给药。

用于皮内或皮下应用的溶液或悬浮液通常包括一或多种下列组分：诸如注射用水的无菌稀释剂、盐溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂；诸如苯醇或尼泊金甲酯的抗细菌剂；诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠的抗氧化剂；诸如乙二胺四乙酸的螯合剂；诸如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐的缓冲液；和诸如氯化钠或葡萄糖的用于调节张力的试剂。可用诸如盐酸或氢氧化钠的酸或碱调节 pH。上述制剂可包装在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量管形瓶中。

适于注射的药物组合物包括无菌含水溶液或分散液以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内给药而言，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor™ EL (BASF, Parsippany, NJ) 或磷酸盐缓冲液 (PBS)。在所有情况下，组合物应为无菌并且其流动性应当达到容易注射的程度。在生产和储存的条件下它必须是稳定的，并且必须防止诸如细菌和真菌的微生物的污染作用。所述载体可以是溶剂或分散剂，例如含有水、乙醇、多元醇（如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等）及其合适的混合物。例如，可通过包被诸如卵磷脂的包衣剂、保持分散液所需的粒度以及通过使用表面活性剂保持

合适的流动性。可通过各种抗菌剂和抗真菌剂，例如，对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等实现抑制微生物的作用。在很多场合中，优选在所述组合物中包括等渗剂，例如，糖、诸如甘露糖醇、山梨醇的多元醇和氯化钠。可通过在组合物中加入延长吸收的试剂，如单硬脂酸铝和凝胶，延长可注射组合物的吸收时间。

口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体。它们可装在凝胶胶囊中或压成片剂。为了达到口服治疗给药的目的，所述抗体可与赋形剂混合并以片剂或胶囊形式使用。药学上相容的接合剂和/或佐剂材料可添加作为所述组合物的一部分。所述片剂、丸剂、胶囊等能包含以下成分中的任意一种或包含具有相似性质的化合物：诸如微晶纤维素的粘合剂，黄蓍胶或明胶；诸如淀粉或乳糖的赋形剂；诸如藻酸、Primogel™或玉米淀粉的分散剂；诸如硬脂酸镁或 Sterotes™ 的润滑剂；诸如胶状二氧化硅的滑动剂；诸如蔗糖或糖精的甜味剂；或诸如薄荷、水杨酸甲酯或柠檬香剂的香味剂。

为了通过吸入给药，抗体以气溶胶喷雾形式从压力容器或分液器或喷雾器中递送，所述压力容器或分液器包括合适的推进剂，例如，诸如二氧化碳的气体。

也可通过粘膜或经皮方式全身给药。例如，在抗体包含 Fc 部分的情况下，组合物可经 FcRn 受体介导途径（美国专利第 6,030,613 号）通过黏膜（如，肠、口腔或肺）传递。例如，通过使用锭剂、鼻腔喷雾剂、吸入器或栓剂可实现经粘膜给药。为达到经皮给药的目的，活性化合物可配制为本领域的软膏剂、油膏剂、凝胶或霜剂。为达到经粘膜或经皮给药目的，在该制剂中使用适合穿透屏障的渗透剂。所述渗透剂为本领域所普遍公知，并包括，例如去污剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物

本发明所披露的抗体可与载体一起制备，所述载体能保护该化合物免于从体内快速清除，诸如控制释放制剂，包括植入和微胶囊化递送系统。可使用可生物降解的、生物相容的聚合物，诸如亚乙基乙酸酯、聚酐、聚甘油酸、胶原、聚原酸酯以及聚乳酸。制备上述试剂的方法对本领域技术人员来说是显而易见的。含有于此所披露的抗体的脂质体悬浮液也可用作药理学上可接受载体。根据本领域技术人

员公知的方法，例如美国专利第 4, 522, 811 号所述的，可制备这些脂质体悬浮液。

为了便于给药以及剂量的一致性，以剂量单位形式配制口服或肠胃外组合物是有利的。本文所用的剂量单位指适合作为要被治疗患者的单位剂量的、在物理上独立的单位；每个单位含有预定数量的活性化合物，它是计算出能与必需的药物载体一起产生所需疗效的用量。有关本发明剂量单位形式的规定，是由活性化合物的特性和要获得的特定疗效，以及本领域中在将上述活性化合物用于治疗个体所固有的局限性而决定的，并且直接取决于这些因素。

下列实施例提供了本发明的例证性实施方案而不以任何方式限制本发明。本领域普通技术人员应认识到许多其他实施方案也包含于本发明的范围内。

在本申请全文中所有引用的参考文献、专利以及公开的专利申请的全部内容在此引用作为参考。

具体实施方式

实施例

实施例 1: GDF-8 的纯化

将来自选定的表达重组人 GDF-8 蛋白(成熟 GDF-8 和 GDF-8 前肽)细胞系的条件培养液酸化至 pH 6.5，然后先上 80 × 50 mm POROS™ HQ 阴离子交换柱，再上 80 × 50 mm POROS™ SP 阳离子交换柱 (PerSeptive Biosystems, Foster City, CA)。流出液调至 pH 5.0，然后上 75 × 20 mm POROS™ SP 阳离子交换柱 (PerSeptive Biosystems) 并用 NaCl 梯度洗脱。收集由 SDS-PAGE 证实的含有 GDF-8 潜在性复合体的级分，用三氟乙酸 (TFA) 酸化至 pH 2-3，然后加入 200 ml 0.1 % TFA 以降低粘度。接着，将该收集级分上 250 × 21.2 mm C₅ 柱 (Phenomenex, Torrance, CA)，在该柱前有 60 × 21.2 mm 的保护柱 (Phenomenex)，并用 TFA/乙腈梯度洗脱以将成熟 GDF-8 与 GDF-8 前肽分离。含有成熟 GDF-8 的所收集级分通过冻干法浓缩以除去乙腈并添加 20 ml 0.1% TFA。然后，将该样品上加热至 60°C 的 250 × 10 mm C₅ 柱 (Phenomenex) 以便于分离。重复该步骤直至不再得到更多的分离物。接着收集含有成熟 GDF-8 的级分，并加入 40%乙腈，然后上 600 × 21.2 BioSep™

S-3000 体积排阻柱 (Phenomenex), 在该柱前有 60×21.2 的保护柱。收集含有纯化的成熟 GDF-8 级分并浓缩用于随后的试验中。

在 SDS-PAGE 中, 纯化的成熟 GDF-8 作为一条宽带在非还原条件下移动至 25 kDa 处并在还原条件下移动至 13 kDa 处。鼠 GDF-8 相似的 SDS-PAGE 图谱已报道于 McPherron 等. (Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. (1997) 94: 12457-12461) 中, 并反映出成熟蛋白的二聚体特性。以类似的方法将活性成熟 BMP-11 二聚体从来自表达重组人 BMP-11 细胞系的条件培养液中纯化。

将活性成熟 BMP-11 从来自表达重组人 GDF-8 前肽/成熟 BMP-11 嵌合蛋白细胞系的条件培养液中纯化。在 50 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl 中的该条件培养液以 1ml/min 的速度加载于 10 ml TALON™ 柱上 (Clonetech, Palo Alto, CA)。结合的蛋白用 50 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 500 mM 咪唑洗脱。含有 GDF-8 前肽/BMP-11 潜在性复合体的收集级分用 10% TFA 酸化至 pH 为 3。接着, 将该收集级分上 250×4.6 mm Jupiter C4 柱 (Phenomenex, Torrance, CA), 将该柱子加热至 60°C 以为更好地分离成熟 BMP-11 和 GDF-8 前肽, 并用 TFA/乙腈梯度洗脱。含有成熟 BMP-11 的收集级分通过冻干法浓缩。在 SDS-PAGE 中, 纯化的成熟 BMP-11 在非还原条件下移动至 25 kDa 处并在还原条件下移动至 12 kDa 处。

实施例 2: 纯化的重组人 GDF-8 的生物活性

为阐明 GDF-8 的活性, 使用表达荧光素酶的报告载体 pGL3 (CAGA)₁₂ 开发报告基因测定法 (RGA)。先前报道 CAGA 序列是位于 TGF- β 诱导基因 PA1-1 启动子中的 TGF- β 响应序列 (Denner 等. (1998) EMBO J., 17: 3091-3100)。

用碱性荧光素酶报告质粒 pGL3 (Promega, Madison, WI) 制备含有 12 CAGA 盒的报告载体。将来自腺病毒主要晚期启动子 (-35/+10) 的 TATA 盒和转录起始位点插入 BgIII 与 HindIII 位点之间。含有 12 个 CAGA 盒 AGCCAGACA 重复的寡核苷酸退火并克隆入 XhoI 位点。用 FuGENE™ 6 转染试剂 (Boehringer Mannheim, Germany) 将 pGL3 (CAGA)₁₂ 瞬间转染人横纹肌肉瘤细胞系 A204 (ATCC HTB-82)。在转染后, 在 48 孔培养板上细胞在补充有 2 mM 谷氨酰胺、100 U/ml 链霉素、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素和 10% 胎牛血清的 McCoy's 5A 培养液中培养 16 小时。

接着, 细胞于 37°C 在含有谷氨酰胺、链霉素、青霉素和 1 mg/ml 牛血清白蛋白的 McCoy's 5A 培养液中用或不用 10 ng/ml GDF-8 处理 6 小时。使用荧光素酶测定系统 (Promega) 定量测定受试细胞中的荧光素酶。

图 4A 显示了 GDF-8 最多活化报告构建体 10 倍, 具有 10 ng/ml 的 ED₅₀, 表明纯化的重组 GDF-8 具有生物活性。BMP-11 和活化素具有类似的生物反应。

实施例 3: 在 ActRIIB 结合测定中纯化的 GDF-8 的结合特性

在冰上以 20 摩尔 EZ-Link 磺基-NHS-生物素 (Pierce, Rockford, Illinois, Cat. No. 21217) 对 1 摩尔 GDF-8 复合体的比率生物素化 GDF-8 潜在性复合体 2 小时。使用 0.5% TFA 降低 pH 值以终止反应, 并将该复合体上 C₄ Jupiter 250 × 4.6 mm 层析柱 (Phenomenex) 以使成熟 GDF-8 与 GDF-8 前肽分离。收集 TFA/CH₃CN 梯度洗脱的生物素化成熟 GDF-8 级分, 将该级分浓缩并使用 MicroBCA™ 蛋白质测定试剂盒 (Pierce, Rockford, IL, Cat. No. 23235) 定量。

生物素化成熟 BMP-11 以上述同样的方式制备自 BMP-11 潜在性复合体。在 96 孔平底测定培养板 (Costar, NY, Cat. No. 3590) 上包被重组 ActRIIB-Fc 嵌合体 (R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat. No. 339-RB/CF), 于 4°C 在 1 μg/ml 0.2M 碳酸钠缓冲液中反应过夜。然后, 用 1 mg/ml 牛血清白蛋白封闭培养板, 接着根据下列 ELISA 方案进行洗涤: 100 μl 不同浓度的生物素化 GDF-8 或 BMP-11 的等分试样加入到封闭的 ELISA 培养板上, 温育 1 小时, 洗涤, 以及通过抗生物素蛋白链菌素-辣根过氧化物酶 (SA-HRP, BD Pharmingen, San Diego, CA, Cat. No. 13047E) 再接着添加 TMB (KPL, Gaithersburg, MD, Cat. No. 50-76-04) 来检测 GDF-8 或 BMP-11 的结合量。比色法用 Molecular Devices 酶标仪在 450 nm 下进行。

如图 1 所示, 结合 ActRIIB, 推定的 GDF-8 II 型受体, 的生物素化 GDF-8 和 BMP-11 分别具有 15 和 40 ng/ml 的 ED₅₀, 表明对于 GDF-8 和 BMP11, 在体外结合测定中 ActRIIB 结合测定是敏感的。

实施例 4: 通过 GDF-8 scFv 噬菌体文库淘选分离 Myo22

使用作为所述的 1.38×10^{10} 文库 (Vaughan 等. (1996) Nature Biotech., 14: 309-314) 发展版本的 scFv 噬菌体文库筛选特异于

GDF-8 的抗体。可溶的 GDF-8 蛋白 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 在 50 mM, pH 9.6 的碳酸钠缓冲液中) 包被于微量培养板的孔上, 于 4°C 反应过夜。用 PBS 洗涤孔, 并于 37°C 在 MPBS (含 3% Marvel 脱脂奶粉的 PBS) 中封闭 2 小时。在 100 μl 的 3% MPBS 中的纯化的噬菌体 (10^{12} 转导单位 (tu)) 加入封闭的孔中并在室温下温育 1 小时。先用 PBST (含 0.1% v/v Tween™ 20) 洗孔 10 次, 再用 PBS 洗孔 10 次。用 100 μl 100 mM 三乙胺在室温下洗脱结合的噬菌体颗粒 10 分钟, 然后马上用 50 μl 1M pH 7.4 Tris-HCl 中和。用洗脱的噬菌体感染 10 ml 指数式生长大肠杆菌 TG1。感染的细胞在 2TY 肉汤培养基中于 37°C 固定培养 30 分钟, 接着于 37°C 通风 30 分钟后, 然后在 2TYAG 培养板上划线接种并于 30°C 温育过夜。从培养板中挖出的克隆置于 10 ml 2TY 肉汤培养基中并添加 15% 甘油, 储存于 -70°C。

用辅助噬菌体重感染来自第一轮淘选育种的甘油备用培养物, 并对之拯救以提供用于第二轮淘选的 scFv 抗体表达噬菌体颗粒。用这种方法总共进行三轮淘选。

实施例 5: 从 scFv 文库中淘选 Myo28 和 Myo29

使用生物素化 GDF-8 蛋白 (bioGDF-8) 筛选可溶供选物。BioGDF-8 使用浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。使用实施例 4 所述的 scFv 文库。纯化的 scFv 噬菌体 (10^{12} tu) 在 100 μl 3% MPBS 中封闭 30 分钟, 然后加入生物素化抗原并在室温下温育 1 小时。噬菌体/抗原添加到 50 μl Dynal™ M280 抗生物素蛋白链菌素磁珠中, 该磁珠已于 37°C 在 1 ml 3% MPBS 中封闭 1 小时并在室温下再温育 15 分钟。使用磁性网架 (magnetic rack) 捕获磁珠并在含有 0.1% (v/v) Tween™ 20 的 1 ml 3% MPBS 中洗涤四次, 然后在 PBS 中洗涤三次。在最后一次 PBS 洗涤后, 磁珠悬浮于 100 μl PBS 中并用于感染 5 ml 指数式生长的大肠杆菌 TG-1 细胞。细胞和噬菌体于 37°C 温育 1 小时 (30 分钟固定, 30 分钟以 250 转/分摇动), 接着在 2TYAG 培养板上铺开。培养板于 30°C 温育过夜, 第二天可见克隆。从培养板上刮下克隆产物并按如上所述拯救噬菌体。按如上所述进行第二轮可溶性供选物的筛选。

实施例 6: ActRIIB 受体抑制测定和筛选

在含有 100 μl 2TYAG 的 96 孔培养板中挑选如实施例 4 和 5 所述获得的克隆产物。通过在指数式生长的培养物上清液中添加 1 mM IPTG

诱导 scFv 产生，并于 30°C 温育过夜。基本上如实施例 3 所述，筛选具有抑制 bioGDF-8 结合 ActRIIB 能力的含有 scFv 培养物上清液的粗提物。对该测定进行轻微改良，其中在时间分辨荧光测定法 (TRF) 中使用钬标记的抗生物素蛋白链菌素并使用 DELFIA™ 试剂盒 (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) 检测 bioGDF-8 的结合。挑选与不相关克隆比较显示了更强抑制结合信号的阳性克隆并测定以确证活性。

在上述抑制测定中测试纯化的 scFv，该 scFv 通过受体抑制筛选鉴定来自阳性克隆。scFv 浓度滴定法用于确定克隆效价，在该测定中效价通过 IC₅₀ 值测定。图 2 显示了试验结果。当在这些试验中测定时，Myo29, Myo28 和 Myo22 的 scFv's IC₅₀ 分别为 2.4 nM、1.7 nM 和 60 nM。因此，这些抗体是 GDF-8 活性的有效抑制剂。

实施例 7: 通过噬菌体 ELISA 鉴定特异性

为测定抗体的特异性，对于来自 ActRIIB 筛选的抗 GDF-8 阳性克隆和不相关蛋白进行噬菌体 ELISA。单独含有噬菌粒的大肠杆菌克隆在每孔含有 100 μl 2TYAG 培养液的 96 孔培养板中温育。添加 M13K07 辅助噬菌体进行 10 的指数式生长培养物的重复感染 (moi)，并且培养板在于 37°C 温育超过 1 小时。培养板在台式离心机中以 2000 转/分离心 10 分钟。除去上清液并将细胞沉淀再悬浮于 100 μl 2TYAK 中，然后于 30°C 摇动温育过夜。第二天，培养板以 2000 转/分离心 10 分钟，将每个孔的 100 μl 含有噬菌体的上清液转移入新鲜的 96 孔培养板中。在进行 ELISA 前，噬菌体样品在室温下在终浓度为 3% MPBS 中封闭 1 小时。

1 μg/ml 的 GDF-8 或不相关蛋白在 96 孔微量培养板上于 4°C 包被过夜。包被后，从孔中除去溶液，接着培养板在室温下在 3% MPBS 中封闭 1 小时。用 PBS 冲洗培养板，然后在每个孔中添加 50 μl 的预封闭的噬菌体。培养板在室温下温育 1 小时，然后用 3 次更换的 PBST 洗涤，接着用 3 次更换的 PBS 洗涤。在每个孔中，加入 50 μl 1:5000 抗-M13-HRP 缀合物 (Pharmacia) 稀释液，并将培养板在室温下温育 1 小时。每块培养板先用 PBST 洗涤 3 次，再用 PBS 洗涤 3 次。在每个孔中加入 50 μl 的 TMB 底物并温育直至显色。添加 25 μl 0.5 M H₂SO₄

停止反应。使用酶标仪测读 450nm 处吸收率以测定所产生的信号。证实了与 GDF-8 的特异性结合。

实施例 8: scFv 测序、转化为 IgG 以及胚系化 (Gernlining)

在 2TYAG 培养板上划线接种中和 scFv 的大肠杆菌克隆,并于 30°C 温育过夜。通过使用 pCANTAB6 载体序列寡核苷酸扩增来自 scFv 克隆的 V_H 和 V_L 区,对来自这些培养板的三份相同的克隆进行测序。scFv 片段的 DNA 序列用于制备 Myo29, Myo28 和 Myo22 IgG's, 这些 DNA 序列分别为 SEQ ID NO : 13, SEQ ID NO : 7 和 SEQ ID NO : 1。

使用 PCR 及特异性克隆引物扩增来自 scFv 克隆的重链和轻链 V 区。用合适的限制性内切酶消化 PCR 产物并将其亚克隆入含有人 IgG₁ 重链恒定区 (对于 V_H 区) 或含有人 λ 轻链恒定区 (对于 V_L 区) 的载体。可通过对来自分离的大肠杆菌克隆的质粒 DNA 测序来检验质粒中 V 区的错误插入。质粒通过标准技术制备自大肠杆菌培养物,并使用标准技术将重链和轻链构建体共转染入 COS 细胞中。使用蛋白 A 琼脂糖凝胶 (Sephrose) (Pharmacia, Peapack, NJ) 纯化分泌的 IgG 并将缓冲液交换为 PBS。

使用 scFv 克隆的测序数据来鉴定对于每个克隆的重链和轻链而言最接近的胚系序列。合适的突变通过使用标准定向诱变技术以及适当的突变引物得到制备。通过测序分析确证 scFv 序列的突变。对于 Myo28 和 Myo29 而言,其胚系 scFv 以及 V_H 和 V_L 区序列分别列于 SEQ ID NO : 19 和 SEQ ID NO : 25。

实施例 9: 抗体的生物活性

图 3A 显示了 Myo29 与生物素化的 GDF-8 预温育,如实施例 3 所述,在 ActRIIB 结合测定中 Myo29 在 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下抑制 GDF-8 与 ActRIIB 的结合,具有 0.2-0.4 nM 的 IC_{50} 。类似地在图 3B 中,Myo29 抑制生物素化 BMP-11 与 ActRIIB 结合,并具有相同的 IC_{50} 。

在体外生物测定中 Myo29 也阻断 GDF-8 活性。作为实例,当 GDF-8 与 Myo29 在室温下预温育 1 小时时,在基本上如实施例 2 所述进行的 RGA 测定中 GDF-8 生物活性减少了。图 4C 显示了在 Myo29 存在以及对 GDF-8 的 ED_{50} 为 20 ng/ml 的条件下, pGL3 (CAGA)₁₂ 报告活性的诱导。Myo29 减少 GDF-8 诱导是以剂量-响应的方式,具有 15-30 ng/ml (0.1-0.2 nM) 的 IC_{50} 。Myo29 也能以同样程度抑制 BMP-11 的生物活

性(图 4B)。相反,在该测定中活化素并不受 Myo29 影响(图 4D),推测是由于在 GDF-8 和活化素之间与 GDF-8 和 BMP-11 相比同源性相对较低的缘故。

在 RGA 和 ActRIIB 结合测定中也测试了 Myo22 和 Myo28。这两个抗体都阻断 GDF-8 和 BMP-11 活性。例如对于 Myo28,其 IC_{50} 为 0.2-0.35 nM。

实施例 10: Myo22, Myo28 和 Myo29 表位作图

为定位抗体的确切表位,代表列于 SEQ ID NO: 49 的成熟 GDF-8 完整序列的 48 个重叠的 13 残基肽使用斑点合成技术(Molina 等. (1996) Peptide Research, 9: 151-155; Frank 等. (1992) Tetrahedron, 48: 9217-9232) 在纤维素纸上直接合成。肽之间的重叠部分具有 11 个氨基酸。在该阵列中,丝氨酸残基取代了半胱氨酸残基以减少由于半胱氨酸存在而引发的新增的化学反应。纤维素膜用聚乙二醇修饰,Fmoc-保护的氨基酸购自 Abimed(Lagenfeld, Germany)。通过偶联 β -丙氨酸间隔分子将该阵列固定在纤维素膜上,并使用如前所述的标准 DIC(二异丙基碳二亚胺)/HOBt(羟基苯并三唑)偶联化学反应来合成肽(Molina 等. (1996) Peptide Research, 9: 151-155; Frank 等. (1992) Tetrahedron, 48: 9217-9232)。

使用 Abimed ASP 222 机器人点样活化的氨基酸。手工进行洗涤和脱保护步骤,并在最后一个合成循环后将肽 N-末端乙酰化。在肽合成后,纤维素膜先在甲醇中洗涤 10 分钟,再在阻断剂(TBST(含有 0.1% (v/v) Tween™ 20)和 1% (w/v)酪蛋白的 Tris-缓冲盐)中洗涤 10 分钟。然后,将膜与 2.5 μ g/ml 的抗 GDF-8 抗体在阻断剂中轻微摇动温育 1 小时。在用阻断剂洗涤 3 次,每次 10 分钟后,膜与 HRP-标记的二抗(在阻断剂中含量为 0.25 μ g/ml)温育 30 分钟。然后,膜先用阻断剂洗涤 3 次,每次 10 分钟,再用 TBST 洗涤 2 次,每次 10 分钟。使用 SuperSignal™ West 试剂(Pierce)和数码相机(Alphananotech Fluoromager)使结合抗体可见。图 5 显示了结果。具体地,从图 5 中可见,Myo29 识别的表位定位于成熟 GDF-8 的氨基酸 72 与 88 之间。另一方面,Myo22 识别成熟 GDF-8 序列起始的 44 个 N 末端氨基酸(SEQ ID NO: 49 的氨基酸 1-44)中的表位。最后,Myo28

识别的表位包含了位于成熟 GDF-8 起始的 98 个 N-末端氨基酸中的残基。

为进一步鉴定 Myo29 识别的表位，使用点合成进行缺失与取代分析。在取代分析中，肽的每个残基用除了半胱氨酸外 20 个天然氨基酸单独取代。如上所述进行合成反应及结合测定。结果示于图 6，在第一行中，起始两列和最后三列代表野生型肽对照物。结果证明了当 Lys-78, Pro-81 和 Asn-83 分别单独突变为其他氨基酸时，Myo29 与肽的结合亲和力明显降低。因此，Myo29 识别包含 Lys-Xaa1-Xaa2-Pro-Xaa3-Asn (SEQ ID NO: 54) 的序列，其中 Xaa1, Xaa2 和 Xaa3 分别是任意氨基酸，或 Xaa1 = Met, Xaa2 = Ser 以及 Xaa3 = Ile, 彼此互相独立。

实施例 11: GDF-8 的免疫沉淀反应

为评估 Myo29 和 Myo28 与成熟 GDF-8 及 GDF-8 复合体的结合，进行免疫沉淀反应研究。表达 GDF-8 的 CHO 细胞用 ^{35}S -甲硫氨酸和 ^{35}S -半胱氨酸标记。来自这些细胞的含有 GDF-8 蛋白（成熟 GDF-8 和潜在性复合体）的 100 μl 条件培养液与 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Myo29 或 Myo28 于 4°C 温育 1 小时。加入蛋白 A-Sepharose™ 并于 4°C 温育过夜。收集免疫沉淀物，再悬浮于还原样品缓冲液中并用 SDS-PAGE 分析。固定凝胶，并用放射自显影增强剂溶液增强，干燥，以及进行放射自显影。图 7 显示了 Myo29 和 Myo28 都能免疫沉淀成熟 GDF-8、GDF-8 潜在性复合体和未加工的 GDF-8。通过蛋白质印迹测定，这两个抗体在非还原条件下都能结合 GDF-8 二聚体。

实施例 12: 药物代谢动力学

在以 1 mg/kg 剂量的单次静脉内 (IV) 或腹膜内 (IP) 给药后，在 C57B6/SCID 小鼠中评估 Myo29 的药物代谢动力学 (PK)。给予该动物上列剂量的未标记的和 ^{125}I -标记的 Myo29 混合物，并基于血清中 ^{125}I 放射性强度以测定血清浓度以及该注射剂量的特异性活性。图 8 显示了对于静脉内或腹膜内施用 Myo29 而言，血清浓度对时间所作的图。

Myo29 显示了大约一周的延长的终末半衰期和约 1ml/hr/kg 的低清除率。分布的初期容量 (initial volume) 约为 83 ml/kg。分布的表观容量 (apparen volume) 约为 227 ml/kg。在注射后约 6 小时，Myo29 达到峰值浓度。在腹膜内注射后吸收率约为 77%。

实施例 13: Myo29 对肌肉质量和强度的体内效应

为确定 Myo29 是否在体内阻断 GDF-8 活性,在成年 SCID 小鼠中测试 Myo29。SCID 小鼠具有严重联合免疫缺陷,并因此在注射诸如 Myo29 的人抗体后无法产生免疫反应。在用 Myo29 处理的小鼠中, GDF-8 活性用肌肉质量作为指示。

称重雄性 C57B6 SCID 八周大小的小鼠,并根据体重均匀地分为 8 组。将处于 PBS 缓冲液中的 Myo29 以不同剂量 (60, 10 和 1 mg/kg) 每周一次注射入小鼠腹腔内。在第一周给予两倍剂量。载体 (PBS) 处理的或未处理的小鼠用作为对照。该处理持续四周。肌肉质量通过在处理后解剖并称重腓肠肌和四头肌来评估。在处理四周后,在所有用 Myo29 处理的组中肌肉质量增加了 10-23%,用更高剂量处理的组能达到显著性水平 (图 9, $p < 0.01$)。

在另一个实例中,雌性 CB17 SCID 小鼠用 Myo29 每周一次以不同剂量 (10, 5, 2.5 和 1 mg/kg) 处理 4 或 12 周。再者,用 Myo29 处理 4 周可引起腓肠肌和四头肌重量增加 10%-20% (图 10A 和 10B)。更长时间的处理 (12 周) 则引起肌肉质量更多的增加 (12%-28%),在所有用 Myo29 处理的组中均达到统计学上显著性水平 (图 11A 和 11B)。

为确定增加的肌肉质量是否导致更强壮的肌肉,用握力计测定前肢肌肉强度 (1027 csx 型, Columbus Instruments, Columbus, OH)。处理 12 周后,与载体对照相比,用 5 mg/kg 或 10 mg/kg Myo29 处理的小鼠中前肢强度分别提高了 17%和 23% ($p < 0.01$, 图 12)。该研究结果证明了 Myo29 在体内抑制 GDF-8 活性并导致肌肉质量和肌肉强度显著增加。

实施例 14: 治疗代谢失调

注入抑制性抗体的 GDF-8 抑制剂可用于治疗代谢失调,如 II 型糖尿病、葡萄糖耐量降低、代谢综合征 (如 X 综合征)、创伤诱导的胰岛素抗性 (如烧伤或氮失调) 和脂肪组织病 (如,肥胖症)。本发明的抗 GDF-8 抗体可用于治疗疾病发作或具有确定的代谢病的患者。

使用已公认的肥胖症、胰岛素抗性和 II 型糖尿病鼠动物模型来确证抗 GDF-8 抗体用于治疗代谢失调,如 II 型糖尿病和/或肥胖症的疗效,该动物模型包括 ob/ob, db/db 和携带致死黄色突变的品系。也可通过给予包括 C57BL/6J 的某些品系的小鼠高脂肪或高卡路里饮食

以诱发胰岛素抗性。类似于人，这些啮齿动物发展为胰岛素抗性、高胰岛素血症、异常脂血症、以及葡萄糖内稳态的劣化所引发的高血糖症。可基于血清中葡萄糖、胰岛素和脂质的测定结果来评估试验结果。通过胰岛素耐量测试和葡萄糖耐量测试来确定改善胰岛素敏感度的手段。更多的敏感度技术可包括使用血糖正常的一高胰岛素血症夹子（clamp）来评估甘油酯对照和胰岛素敏感度的改善。此外，该夹子（clamp）技术可允许定量评估葡萄糖主要分布组织（肌肉、脂肪和肝脏）在改善的甘油酯对照试验中所起的作用。

在一研究中，用诸如 Myo29（腹膜内注射）的抗 GDF-8 抗体或载体处理 1 周至 6 个月。该处理方案可不同，可进行不同剂量和治疗用药法（如，每日一次、每周一次或每周两次注射）的测试。与安慰剂处理的小鼠相比，可预计到用抗 GDF-8 抗体处理的小鼠具有更多的葡萄糖摄取、增加的糖酵解和糖原合成、更低的游离脂肪酸和血清甘油三酯。

抗 GDF-8 抑制性抗体也用于预防疾病和/或用于减少疾病的严重程度和/或症状。可预期抗 GDF-8 抗体可以皮下注射方式给予，经常地每天一次和偶尔地每月一次。治疗持续时间从一个月到几年。

为测试在人体中抗 GDF-8 的临床疗效，鉴定患有或处于 II 型糖尿病危险中的受试者并随机分入治疗组。治疗组包括安慰剂组和给予抗体（不同剂量）的一到三组。预期在一个月到三年后评估个体葡萄糖代谢的改变。可预期接受治疗的个体将具有改善的症状。

抗体作为单一活性化合物给药或与其他化合物或组合物联合给药。当作为单一活性化合物给药或与其他化合物或混合物联合给药时，取决于症状的严重程度和疾病的进展，剂量优选从约 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -20 mg/kg 。选择用于临床治疗的合适的有效剂量范围如下：1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -20 mg/kg 、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -10 mg/kg 、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1 mg/kg 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1 mg/kg 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1 mg/kg 以及 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1 mg/kg 。治疗用药法和结果的实例概述于表 3 中。

表 3: 临床病例的实例

患者编号	治疗前状况	治疗用药法	结果
患者 1	无临床症状, II 型糖尿病	每 4 周一次, 每次 0.01-1 mg/kg, 持 续 48 周	预防了 II 型糖尿病
患者 2	轻度临床症状 的 X 综合征	每周一次, 每次 0.01-20 mg/kg, 持续 4 周或更久	改善了胰岛素耐量 和葡萄糖代谢, 以 及低血压
患者 3	晚期 II 型糖尿 病	每周两次, 每次 0.01-20 mg/kg, 持续 6 周或更久	改善了临床症状, 减少了症状的严重 程度和 / 或增加了 肌肉密度 / 身体脂 肪比值
患者 4	严重的胰岛素 抗性和肥胖症	每日一次, 每次 0.01-20 mg/kg,, 持续 6 周或更久	改善了临床症状, 减少了症状的严重 程度和 / 或减少了 身体脂肪

根据本说明书中所引用参考文献的教导可最彻底地理解本说明书, 所有参考文献的全文在此引用作为参考。说明书中的实施方案提供了本发明实施方案的例证而不应解释为限制本发明的范围。本领域技术人员应认识到许多其他实施方案包括在本发明的权利要求中, 且意在于说明书和实施例仅被认为是例证的, 下列权利要求表明了本发明的真正范围和精神。

 序列表

<110> Wyeth
Cambridge Antibody Technology

<120> 抗 GDF-8 的中和抗体及其用途

<130> 8702.020-304

<160> 54

<170> PatentIn 3.1 版

<210> 1

<211> 786

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagge ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtg gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccate tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtga gagaatgggg      300
ccctgtactg gtggaagctg ctacgacacc cttggcaact ggggccgggg caccctggtc      360
accgtctcga gtggaggcgg cggttcagge ggaggtggct ctggcggtgg cggaagtgca      420
cagtctgtgc tgacgcagcc gcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccate      480
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcaa      540

```

cttccaggcg cggccccaa actcctcatc aggggtaatg gcaatcggcc ctcagggtc 600
 cctgaccgat tctctgtctc caagtctggc tactcagcct ccctggccat cactgggctg 660
 cagcctgccg atgagggtgt ttattactgc cagtcctatg acagcagtct gagtggttcg 720
 aagggtttcg gccaaaggac caagctgacc gtcctaggtg cggccgcaca tcatcatcac 780
 catcac 786

<210> 2

<211> 262

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

<210> 3

<211> 372

<212> DNA

<213> 人

<400> 3

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttage agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtga gagaatgggg      300
ccctgtactg gtggaagctg ctacgacacc cttggcaact ggggccgggg caccctggtc      360
accgtctcga gt                                                    372

```

<210> 4

<211> 124

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

```

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

```

```

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

```

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

<210> 5

<211> 336

<212> DNA

<213> 人

<400> 5

cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcaa 120

cttccaggcg cggcccccaa actcctcatc aggggtaatg gcaatcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctgtctc caagtctggc tactcagcct ccctggccat cactgggctg 240

cagcctgccg atgagggtgt ttattactgc cagtcctatg acagcagtct gagggttcg 300

aagggttcg gccaaaggac caagctgacc gtccta 336

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

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

Leu Ile Arg Gly Asn Gly Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Val Ser Lys Ser Gly Tyr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Pro Ala Asp Glu Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Lys Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 7

<211> 774

<212> DNA

<213> 人

<400> 7

```

caggtcacct tgaaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agatatgtca tcaactgggt ccgccaggt      120
ccaggaaggg ggctggaatg ggtctcagct attagtgtta ctggtggtag cacggcctac      180
gcagactccg tgaggggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ttgcaaatga atagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtac gaaaggacag      300
tggaacggg gaagttacta ctttgactac tggggccggg gaaccctggt caccgtctcg      360
agtggaggcg gcggttcagg cggaggtggc tctggcggtg gcggaagtgc acagtctgtg      420
ctgacgcagc cgcctcagt gtctggggcc ccagggcaga gggtcaccat ctctgcact      480
gggagcagct ccaacatcgg ggacggttat gatgtacact ggtatcagca gcttccagga      540
acagccccc aactcctcat ctatggtaac agtcatcggc cctcaggggt ccctgaccga      600
ttctctggct ccaagtctga cacctctgcc tcctggcca tcaactgggt ccaggttgag      660
gatgaggctg attattctg ccactcctat gacggcagtg tgagtggctg gattttcggc      720
ggagggacca agctgaccgt cctaggtgag gccgcacatc atcatcacca tcac          774

```

<210> 8

<211> 258

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Val Thr Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Thr Lys Gly Gln Trp Glu Arg Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro
 130 135 140

Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr
145 150 155 160

Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln
 165 170 175

Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser His
 180 185 190

Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Asp Thr
 195 200 205

Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Val Glu Asp Glu Ala Asp
 210 215 220

Tyr Phe Cys His Ser Tyr Asp Gly Ser Val Ser Gly Trp Ile Phe Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala His His His His
 245 250 255

His His

<210> 9

<211> 363

<212> DNA

<213> 人

<400> 9

caggtcacct tgaaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttagt agatatgtca tcaactgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggaatg ggtctcagct attagtgtta ctggtggtag cacggcctac 180

gcagactccg tgaggggccc gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ttgcaaatga atagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtac gaaaggacag 300
 tgggaacggg gaagttacta ctttgactac tggggccggg gaaccctggt caccgtctcg 360
 agt 363

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Val Thr Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Thr Lys Gly Gln Trp Glu Arg Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11

<211> 336

<212> DNA

<213> 人

<400> 11

cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tectgcactg ggagcagctc caacatcggg gacggttatg atgtacactg gtatcagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcadc tatggtaaca gtcateggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtctgac acctctgect cctggccat cactgggctc 240
 caggttgagg atgaggctga ttatttctgc cactcctatg acggcagtgt gagtggctgg 300
 attttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggt 336

<210> 12

<211> 111

<212> PRT

<213> 人

<400> 12

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Asp Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Val Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys His Ser Tyr Asp Gly Ser
85 90 95

Val Ser Gly Trp Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 13

<211> 747

<212> DNA

<213> 人

<400> 13

caggtgcagc tggtgcaatc tgggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gtggtggtag cacaagctac 180

gcacagaagt tccagggcag agtcacatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagacgag 300
aactgggggt tcgaccctg gggccaggga accctggtca cgtctcag tggaggcggc 360
ggttcaggcg gaggtggctc tggcgggtggc ggaagtgcac tttcctatga gctgactcag 420
ccaccctcag tgtccgtgtc tccaggacag acagccacca ttacctgctc tggacatgca 480
ctgggggaca aatttgtttc ctggtatcag cagggatcag gccagtcccc tgtattggtc 540
atctatgacg ataccacagc gccctcaggg atccctgggc gattctctgg ctccaactct 600
gggaacacag ccaactctgac catcagcggg acccaggcta tggatgaggc tgactatfff 660
tgtcaggcgt gggacagcag cttcgtatc ggcggaggga ccaaggtcac cgtcctaggt 720
gcggccgcac atcatcatca ccatcac 747

<210> 14

<211> 249

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Glu Asn Trp Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Ala Leu Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
130 135 140

Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly His Ala
145 150 155 160

Leu Gly Asp Lys Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Gly Ser Gly Gln Ser
165 170 175

Pro Val Leu Val Ile Tyr Asp Asp Thr Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro
180 185 190

Gly Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile
195 200 205

Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp
210 215 220

Asp Ser Ser Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

225

230

235

240

Ala Ala Ala His His His His His His

245

<210> 15

<211> 351

<212> DNA

<213> 人

<400> 15

caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gtggtggtag cacaagctac 180

gcacagaagt tccagggcag agtcacatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagacgag 300

aactgggggt tcgaccctg gggccaggga accctggtca ccgtctcgag t 351

<210> 16

<211> 117

<212> PRT

<213> 人

<400> 16

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

1

5

10

15

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Glu Asn Trp Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 17

<211> 315

<212> DNA

<213> 人

<400> 17

tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtctc caggacagac agccaccatt 60

acctgctctg gacatgcact gggggacaaa tttgtttcct ggtatcagca gggatcaggc 120

cagtccctg tattggtcat ctatgacgat acccagcggc cctcagggat ccctgggcca 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgaggctg actatTTTTg tcaggcgtgg gacagcagct tcgtattcgg cggagggacc 300
 aaggtcaccg tccta 315

<210> 18

<211> 105

<212> PRT

<213> 人

<400> 18

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

Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly His Ala Leu Gly Asp Lys Phe Val
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Gly Ser Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Asp Asp Thr Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Phe Val Phe
 85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 19

<211> 774

<212> DNA

<213> 人

<400> 19

gaggtccagt tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tctgtgcag cctctggatt cacctttagt agatatgtca tcaactgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggaatg ggtctcagct attagtgtta ctggtggtag cacggcctac 180
gcagactccg tgaggggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ttgcaaatga atagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggacag 300
tgggaacggg gaagttacta ctttgactac tggggccggg gaaccctggg caccgtctcg 360
agtggaggcg gcggttcagg cggaggtggc tctggcggtg gcggaagtgc acagtctgtg 420
ctgacgcagc cgccctcagt gtctggggcc ccagggcaga gggtcaccat ctctgcaact 480
gggagcagct ccaacatcgg ggacggttat gatgtacact ggtatcagca gcttccagga 540
acagcccca aactcctcat ctatggtaac agtcateggc cctcaggggt ccctgaccga 600
ttctctggct ccaagtctgg tacctctgcc tcctggcca tcaactgggct ccaggctgag 660
gatgaggctg attattactg ccaactcctat gacggcagtg tgagtggctg gattttcggc 720
ggaggacca agctgaccgt cctaggtgcg gccgcacatc atcatcacca tcac 774

<210> 20

<211> 258

<212> PRT

<213> 人

<400> 20

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Val Thr Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Gln Trp Glu Arg Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro
 130 135 140

Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln
 165 170 175

Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser His
 180 185 190

Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr
 195 200 205

Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp
 210 215 220

Tyr Tyr Cys His Ser Tyr Asp Gly Ser Val Ser Gly Trp Ile Phe Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala His His His His
 245 250 255

His His

<210> 21

<211> 363

<212> DNA

<213> 人

<400> 21

gaggtccagt tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agatatgtca tcaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggaatg ggtctcagct attagtgtta ctggtggtag cacggcctac 180
 gcagactccg tgaggggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ttgcaaatga atagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggacag 300
 tgggaacggg gaagttacta ctttgactac tggggccggg gaaccctggt caccgtctcg 360
 agt 363

<210> 22

<211> 121

<212> PRT

<213> 人

<400> 22

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Val Thr Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

<400> 24

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser Tyr Asp Gly Ser
 85 90 95

Val Ser Gly Trp Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 25

<211> 747

<212> DNA

<213> 人

<400> 25

caggtgcagc tgggtgcaate tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gtggtggtag cacaagctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagacgag 300
 aactgggggt tcgaccctg gggccaggga accctggcca cgtctcag tggaggcggc 360
 ggttcaggcg gaggtggctc tggcgggtgc ggaagtgcac tttcctatga gctgactcag 420
 ccaccctcag tgtccgtgtc tccaggacag acagccagca ttacctgctc tggacatgca 480
 ctgggggaca aatttgttc ctggtatcag cagaagccag gccagtcccc tgtattggtc 540
 atctatgacg ataccacgcg gccctcaggg atccctgagc gattctctgg ctccaactct 600
 gggaacacag ccaactctgac catcagcggg acccaggcta tggatgaggc tgactattac 660
 tgtcaggcgt gggacagcag cttegtatc ggcggaggga ccaaggtcac cgtcctaggt 720
 gcggccgcac atcaccatca ccatcac 747

<210> 26

<211> 249

<212> PRT

<213> 人

<400> 26

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

acctgctctg gacatgcact gggggacaaa tttgtttcct ggtatcagca gaagccaggc 120
cagtcccctg tattggtcat ctatgacgat acccagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggetatg 240
gatgaggctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagct tcgtattcgg cggagggacc 300
aaggtcaccg tecta 315

<210> 30

<211> 105

<212> PRT

<213> 人

<400> 30

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Ala Leu Gly Asp Lys Phe Val
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Asp Asp Thr Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Phe Val Phe

85

90

95

Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 31

Ser Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 32

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

Gly

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 33

Asp Glu Asn Trp Gly Phe Asp Pro
1 5

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 34

Ser Gly His Ala Leu Gly Asp Lys Phe Val Ser
1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 35

Asp Asp Thr Gln Arg Pro Ser
1 5

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

Gly

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 39

Gly Gln Trp Glu Arg Gly Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 40

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 44

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

Gly

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 45

Met Gly Pro Cys Thr Gly Gly Ser Cys Tyr Asp Thr Leu Gly Asn
1 5 10 15

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 46

ccaacaaggc cacactggtg tgttcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtgg 120
 cctggaaggc agatagcagc cccgtcaagg cgggagtgga gaccaccaca ccctccaaac 180
 aaagcaacaa caagtacgcg gccagcagct atctgagcct gacgcctgag cagtggaagt 240
 cccacagaag ctacagctgc caggtcacgc atgaaggag caccgtggag aagacagtgg 300
 ccctacaga atgttcatag 320

<210> 51

<211> 106

<212> PRT

<213> 人

<400> 51

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 52

<211> 992

<212> DNA

<213> 人

<400> 52

cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg 60
 gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt 120
 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggetgtccta cagtctcag 180
 gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct 240
 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca 300
 aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc ctggggggac 360
 cgtcagtctt cctcttcccc caaaaccca aggacacct catgatctcc cggaccctg 420
 aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt 480
 acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca 540
 gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg 600
 agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 660
 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaggaga 720
 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg 780
 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc 840

tggactccga cggtccttc ttctctata gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc 900
 agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc 960
 agaagagcct ctccctgtcc ccgggtaaat ga 992

<210> 53

<211> 330

<212> PRT

<213> 人

<400> 53

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 54

<211> 6

<212> PRT

<213> 任意

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2).. (3)

<223> 任意氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> 任意氨基酸

<400> 54

Lys Xaa Xaa Pro Xaa Asn
1 5

1

1

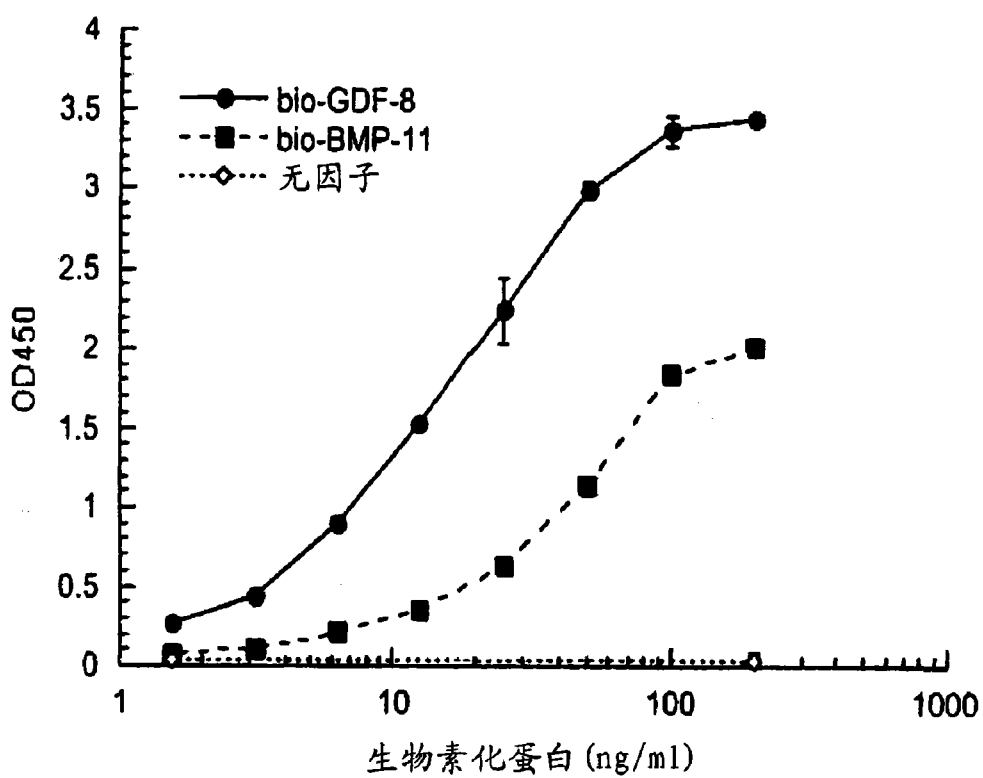


图 1

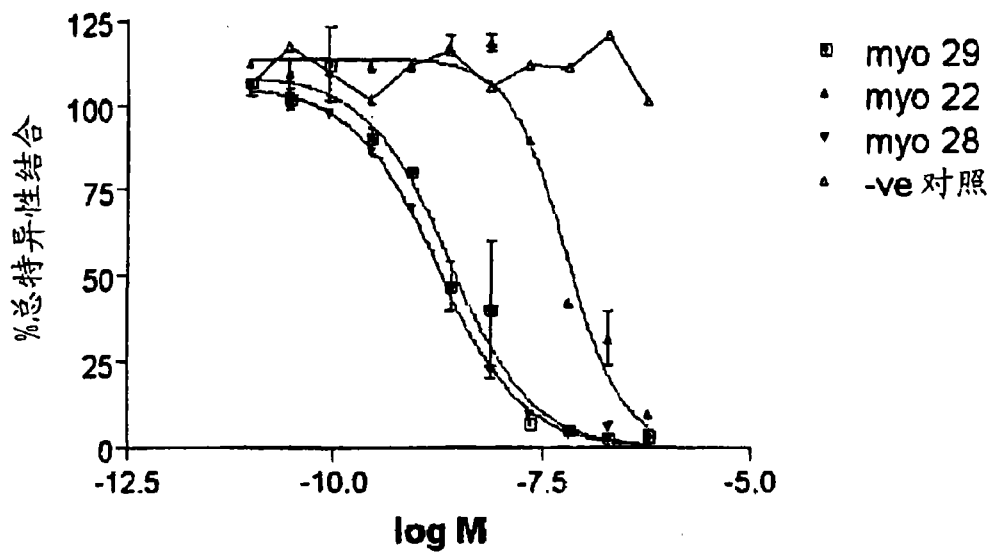


图 2

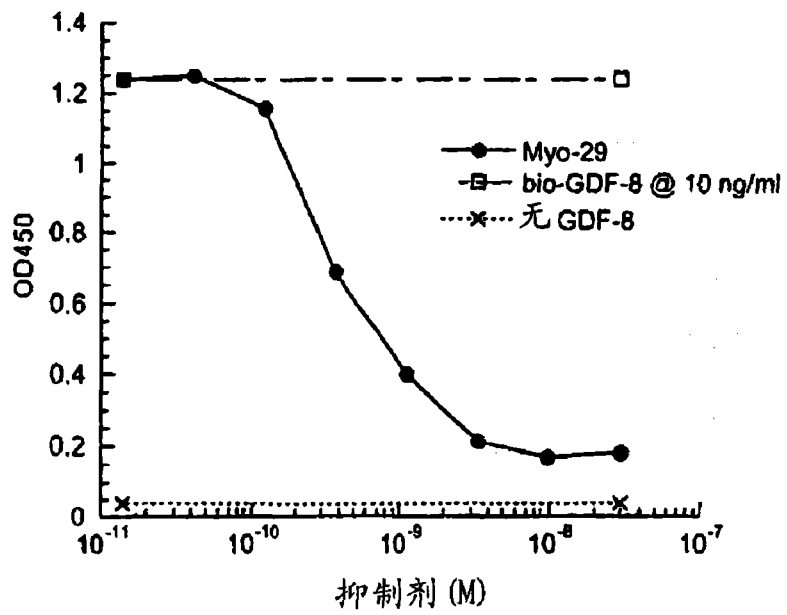


图 3A

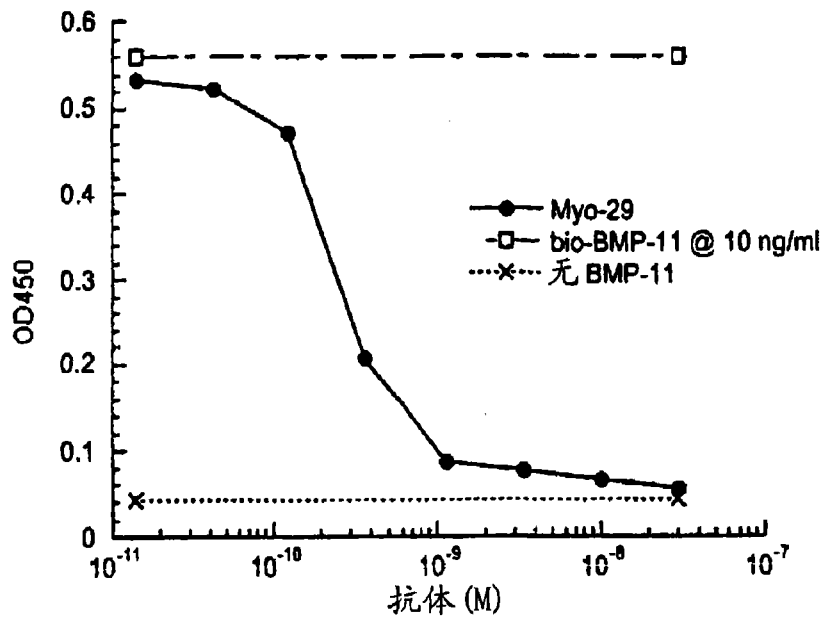


图 3B

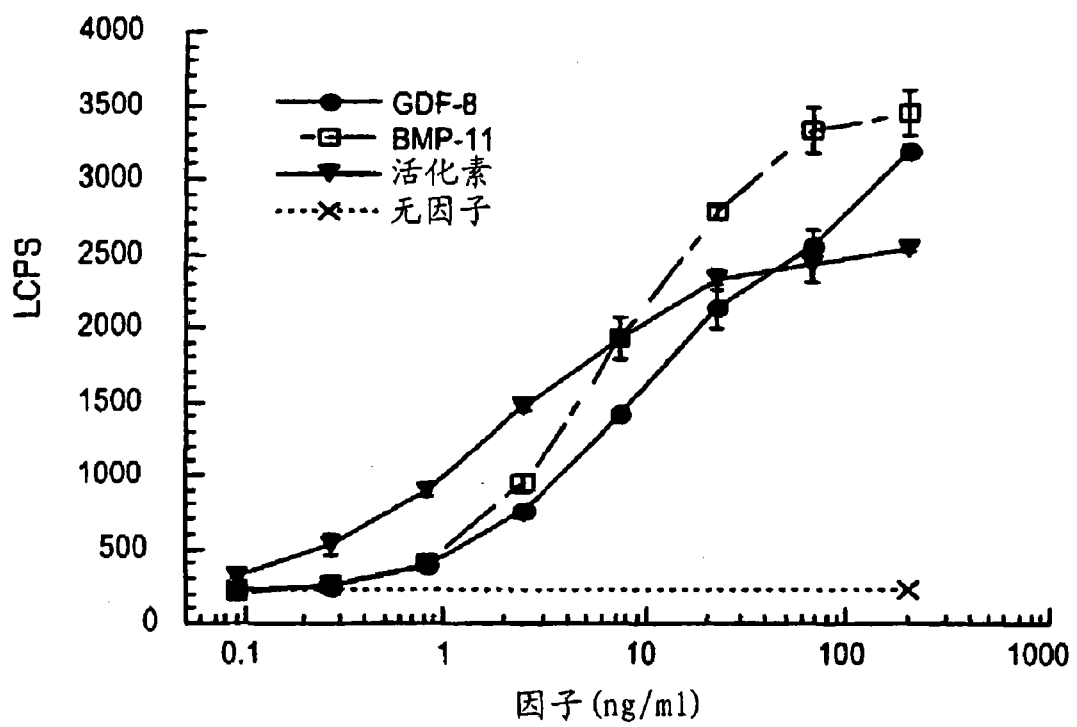


图 4A

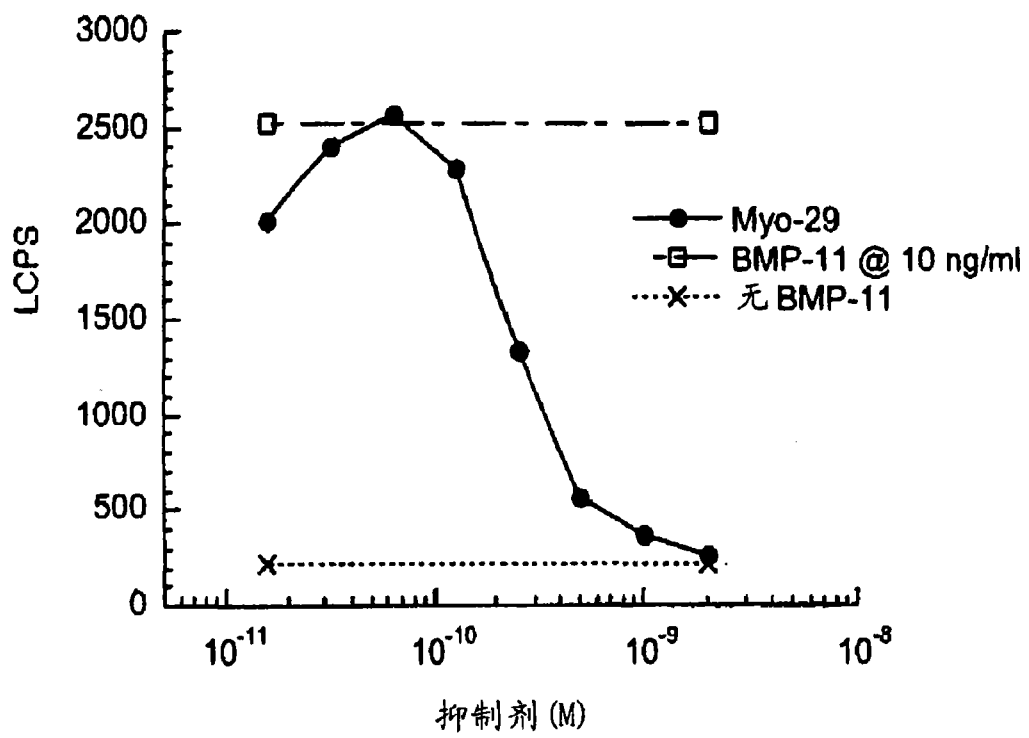


图 4B

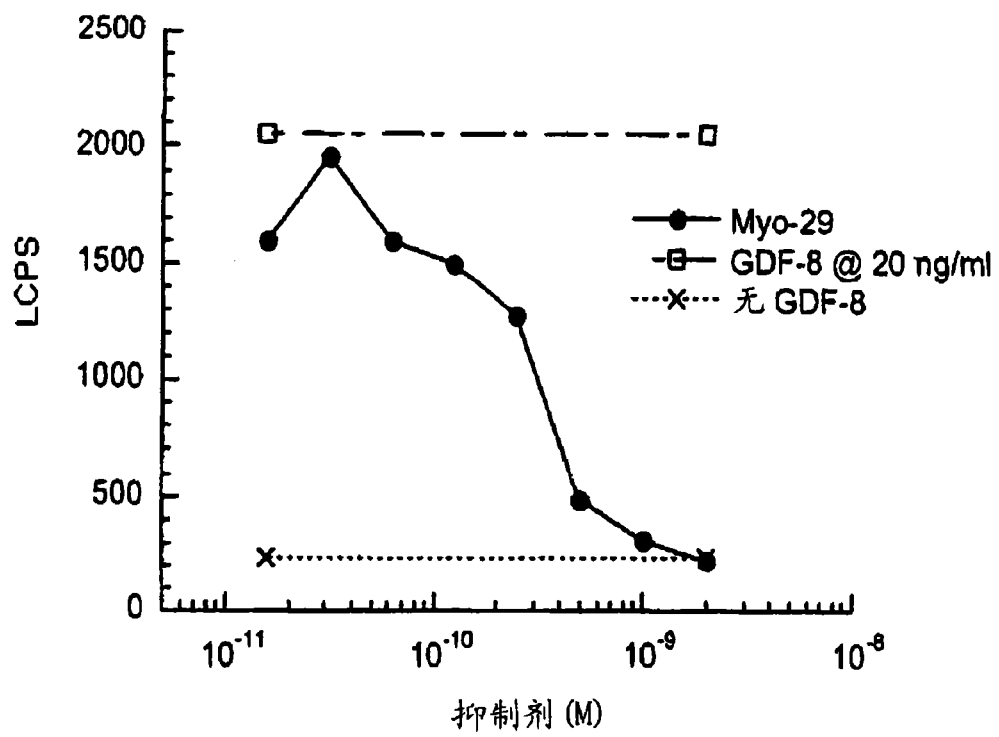


图 4C

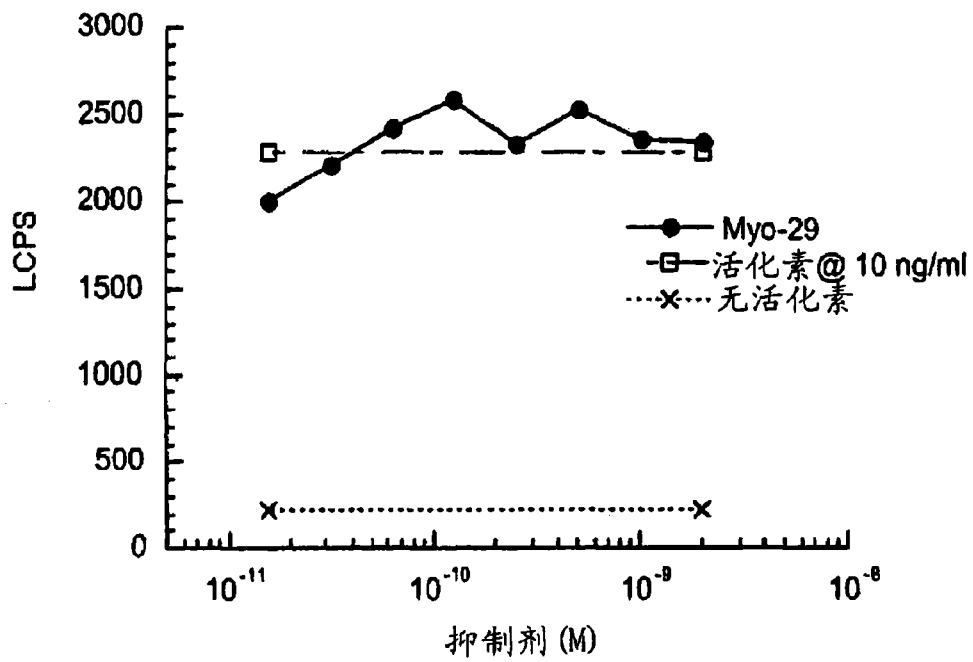


图 4D

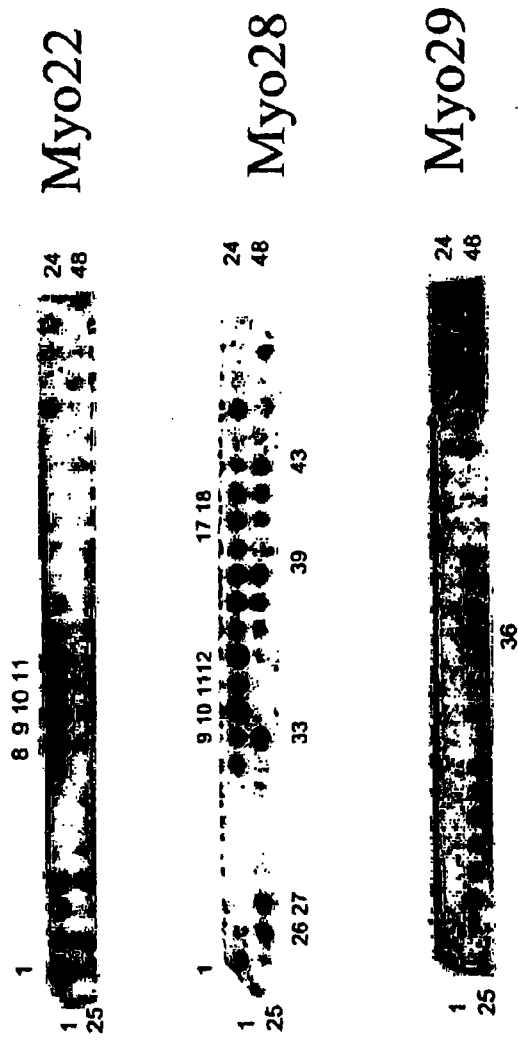


图 5

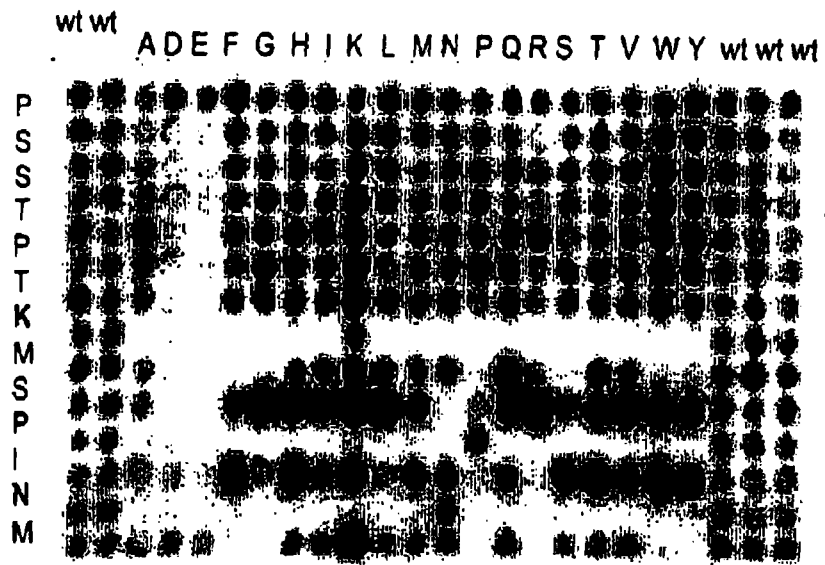


图 6

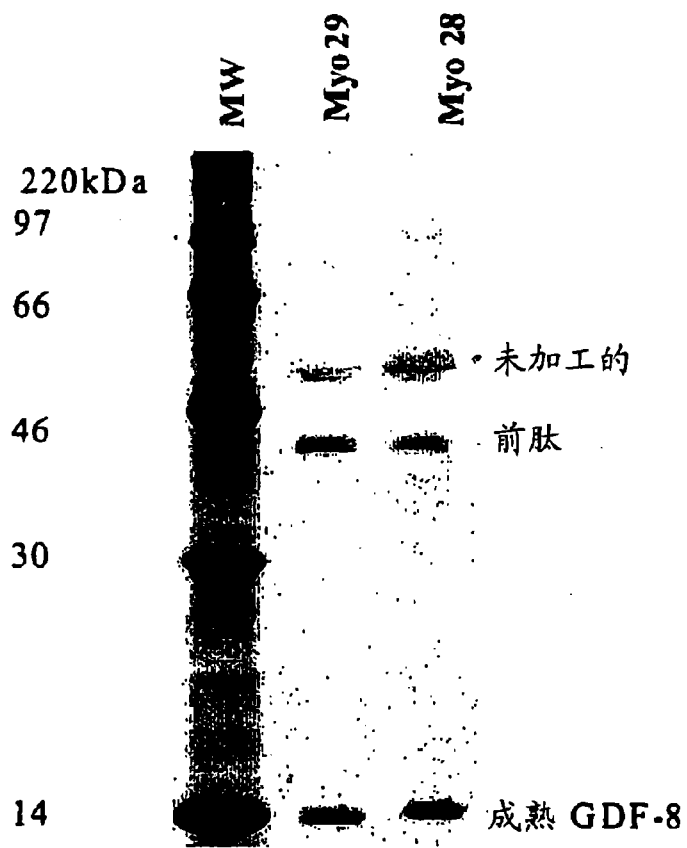


图 7

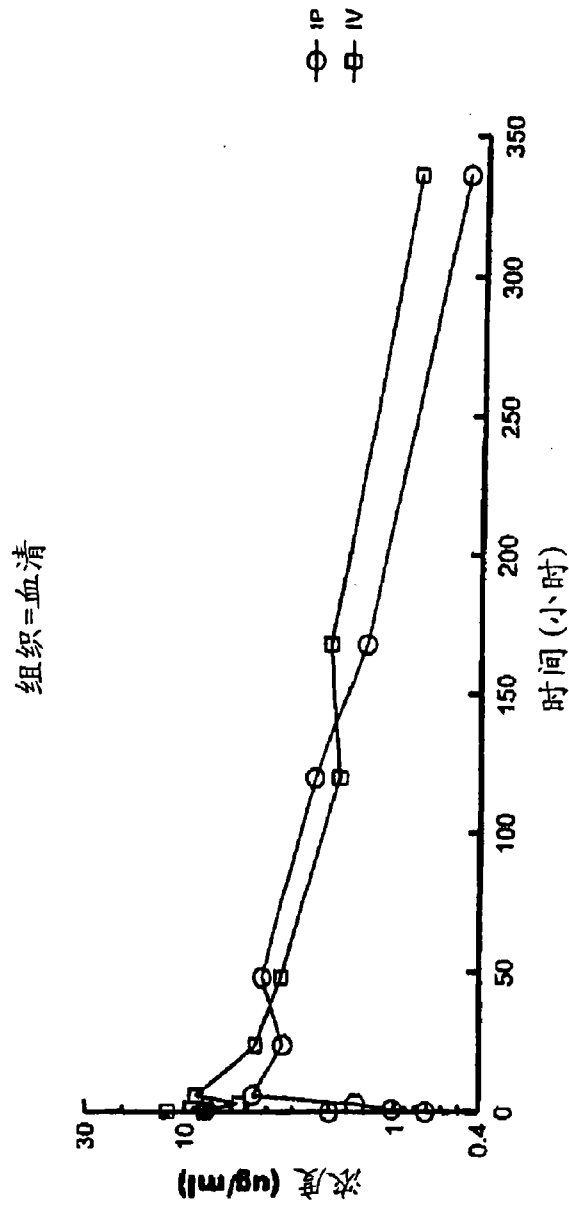


图 8

P

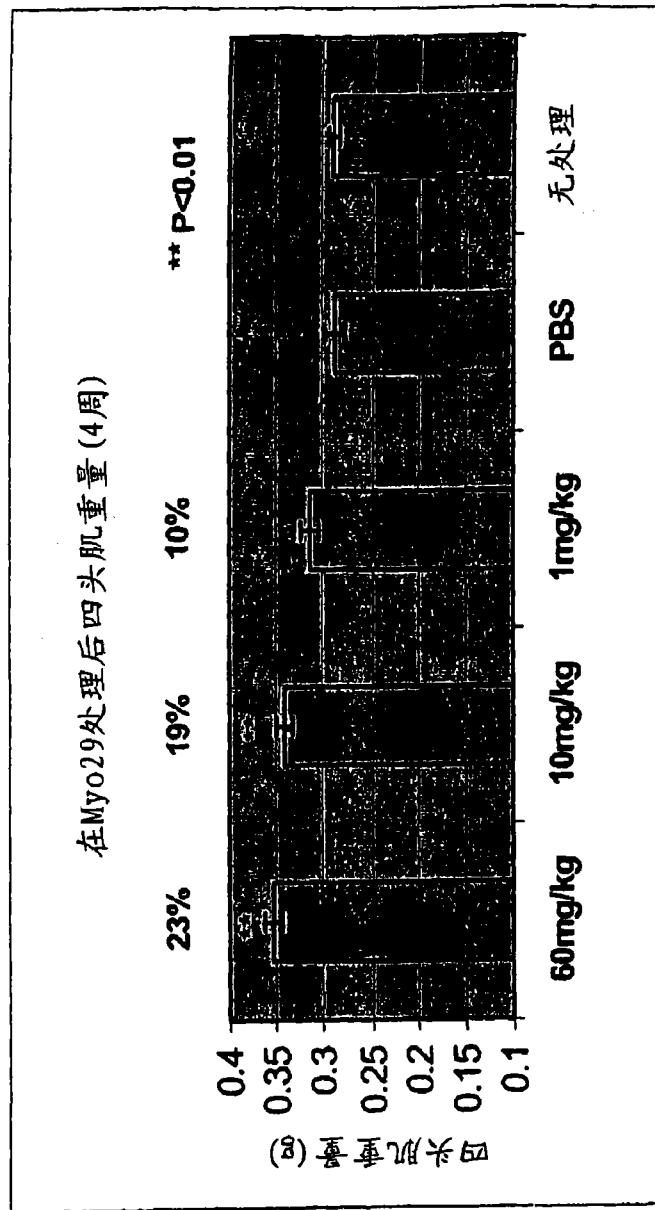


图 9

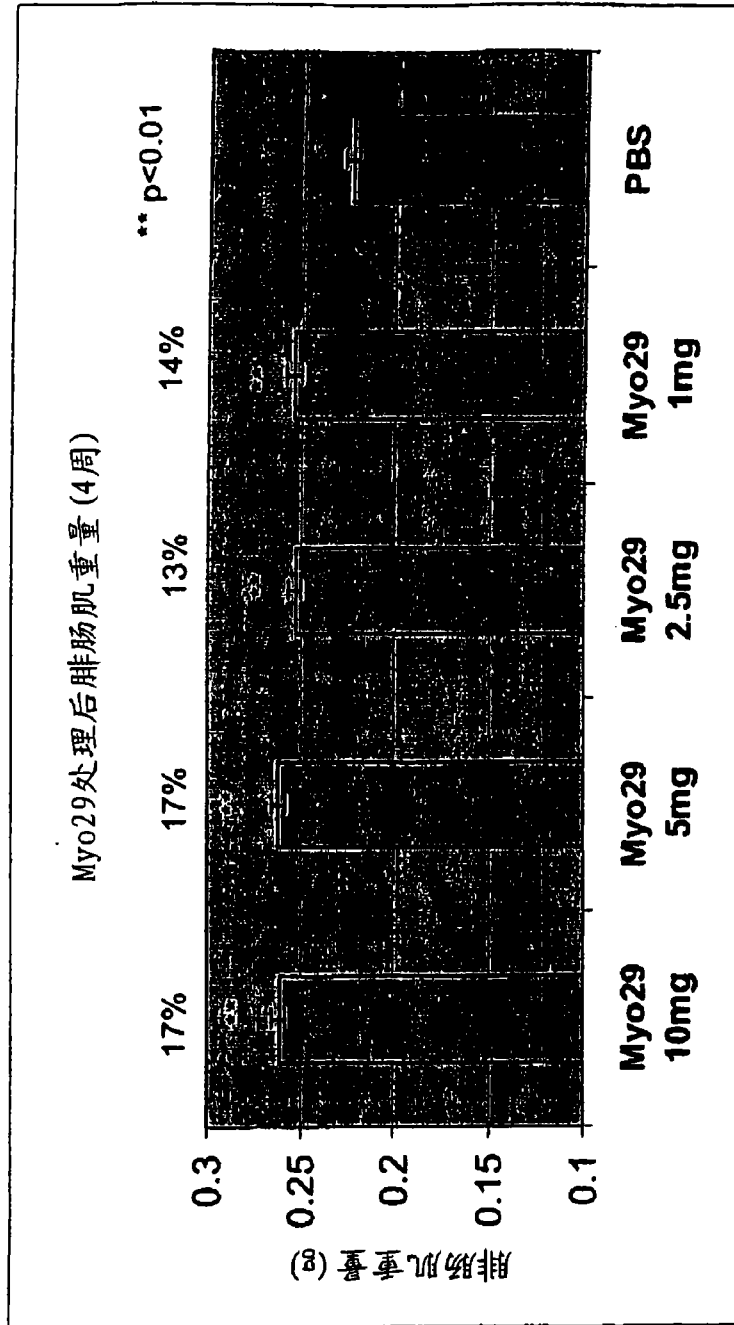


图 10A

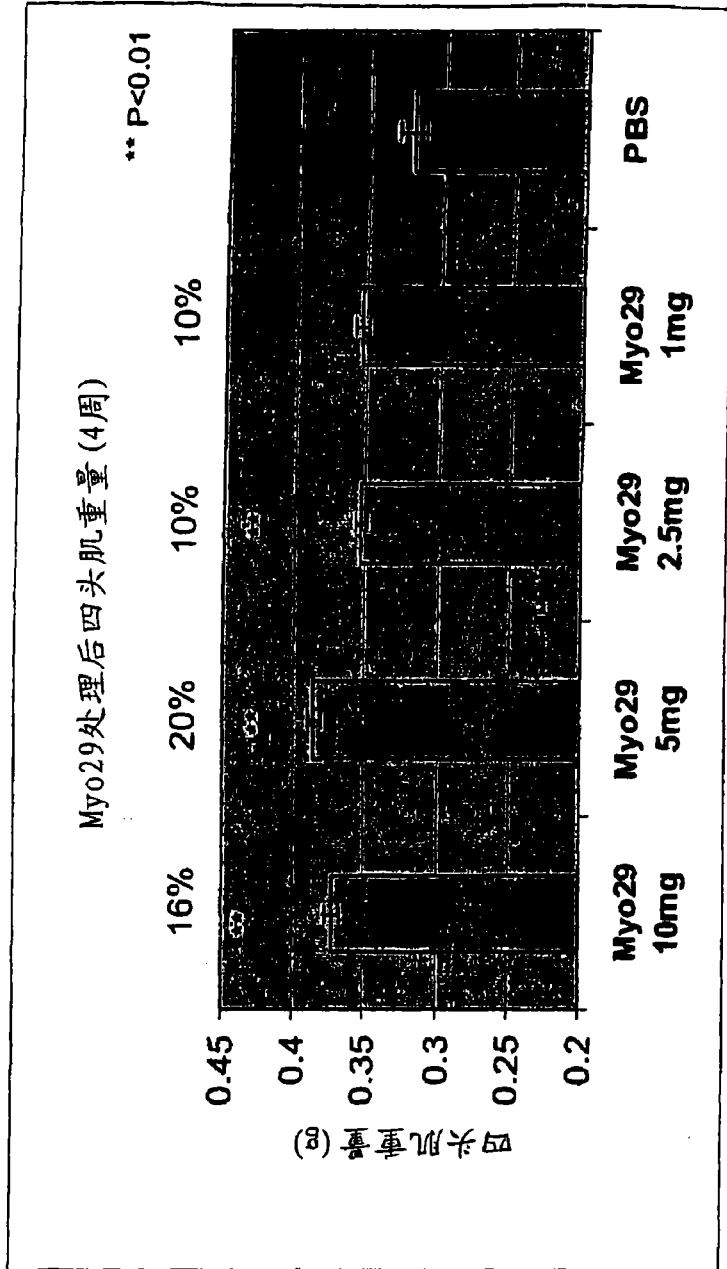


图 10B

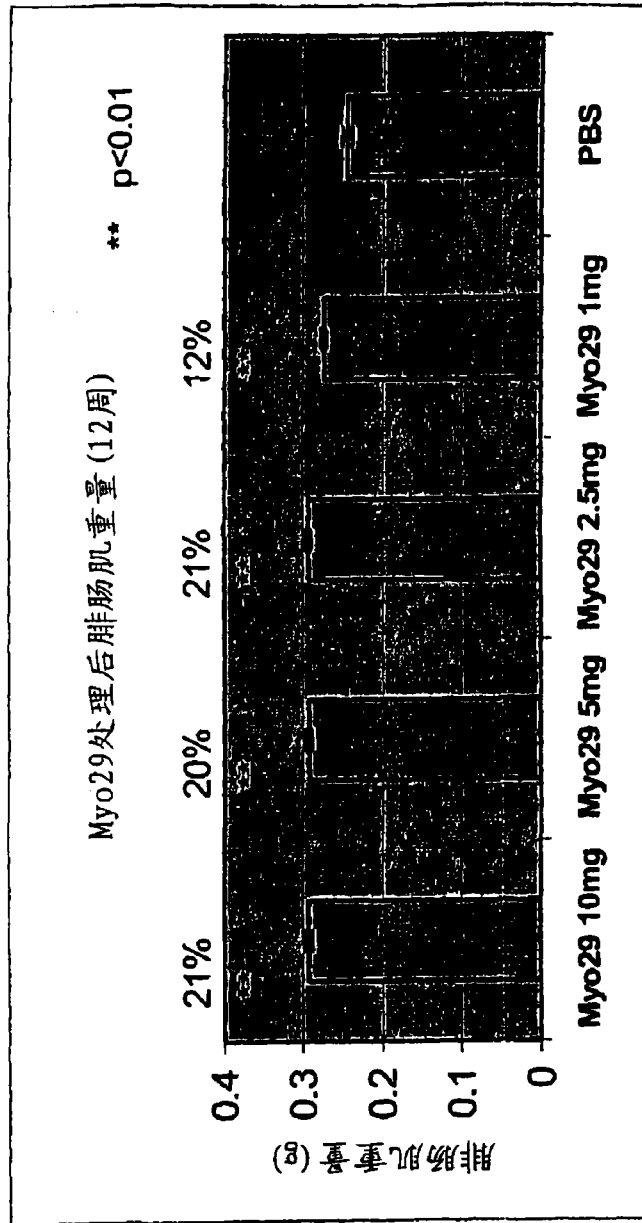


图 11A

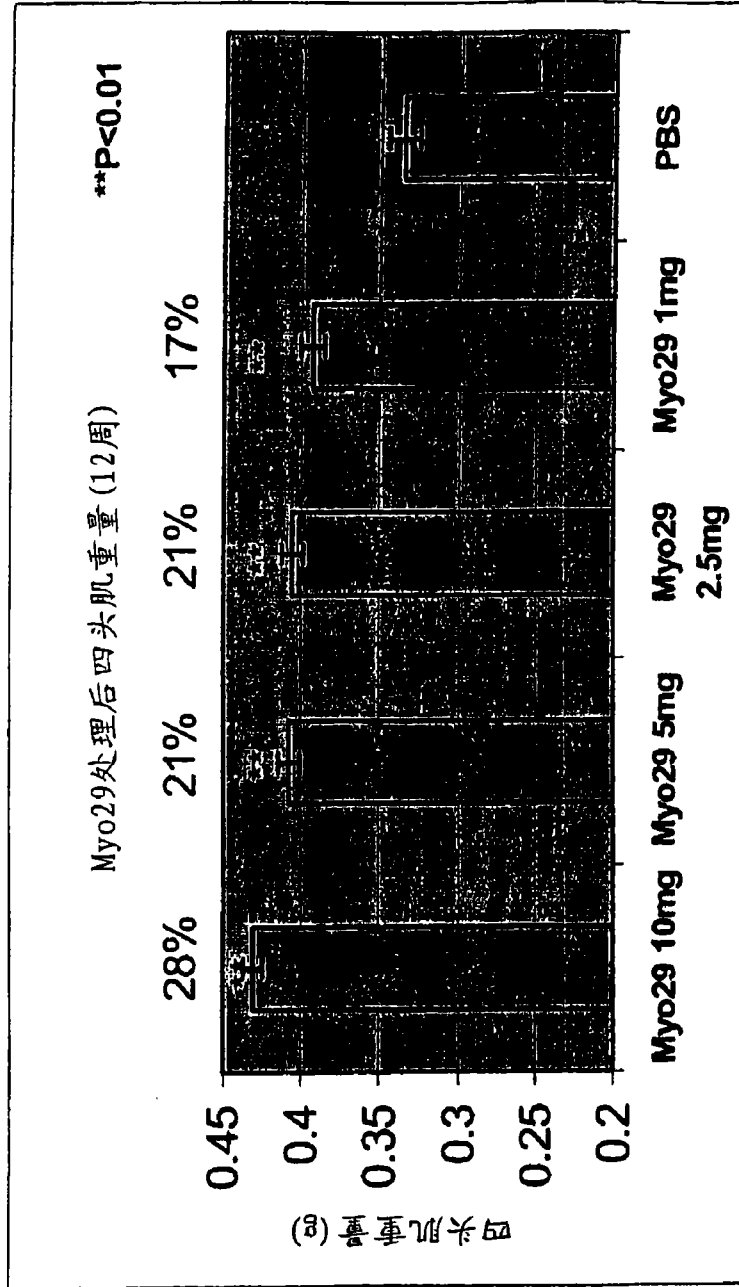


图 11B

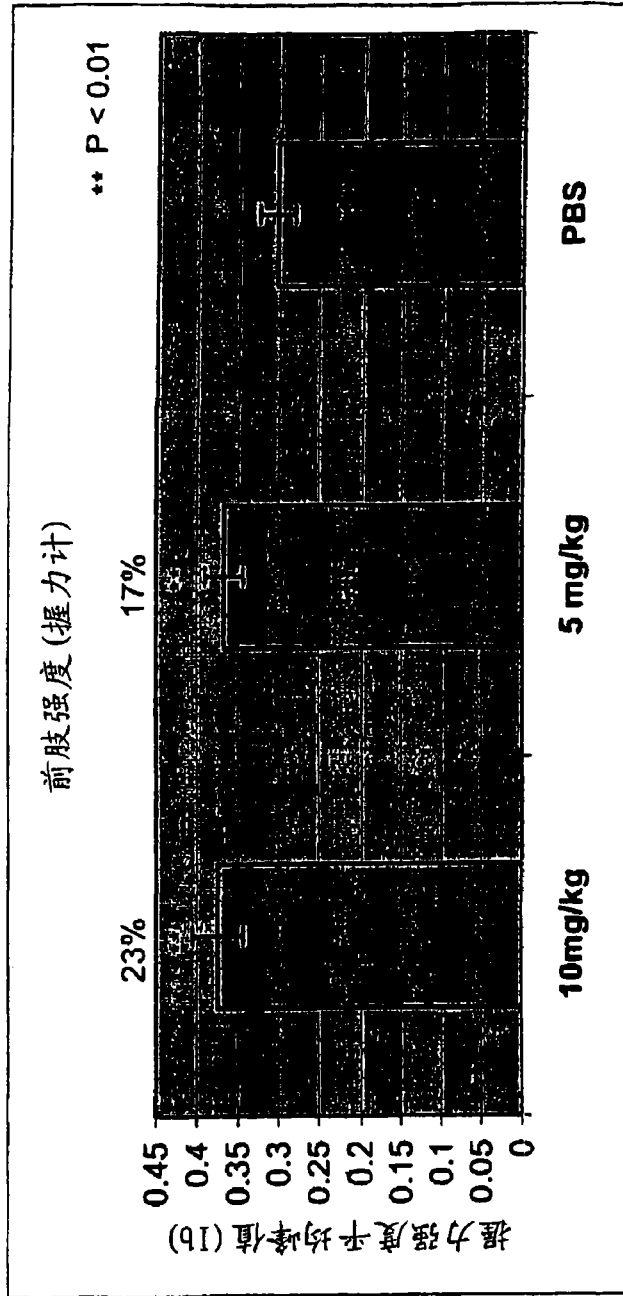


图 12