



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101282992 B

(45) 授权公告日 2013. 02. 13

(21) 申请号 200680037572. 0

A61P 3/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 10. 05

A61P 21/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006. 01)

60/725, 738 2005. 10. 12 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2008. 04. 09

CN 1355881 A, 2002. 06. 26, 全文.

(86) PCT申请的申请数据

CN 1449410 A, 2003. 10. 15, 全文.

PCT/US2006/038817 2006. 10. 05

WO 2004037861 A2, 2004. 05. 06, 全文.

(87) PCT申请的公布数据

审查员 黄丽君

W02007/047112 EN 2007. 04. 26

(73) 专利权人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 J·戴维斯 B·E·琼斯

A·I·科里特科 P·J·米切尔

R·C·史密斯

L·O·奥布莱恩(尼托比亚斯) R·王

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C07K 16/22 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 30 页

序列表 80 页 附图 11 页

(54) 发明名称

抗肌抑制素抗体

(57) 摘要

鉴定抗肌抑制素抗体,其特征具有具有高亲和力和,并且可以是嵌合抗体、人源化抗体或完全人抗体、抗体的免疫交联物或其抗原结合片段。本发明的抗体用于在哺乳动物和禽类物种中增加肌肉质量、增加骨密度或用于治疗多种疾病。

1. 抗肌抑制素单克隆抗体,其包含序列如 SEQ ID NO:98 所示的轻链可变区和序列如 SEQ ID NO:138 所示的重链可变区。
2. 抗肌抑制素单克隆抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含:
 - a) 在 CDRH1 为 SEQ ID NO:40 的肽,
 - b) 在 CDRH2 为 SEQ ID NO:60 的肽,和
 - c) 在 CDRH3 为 SEQ ID NO:72 的肽,并且其中所述轻链可变区包含:
 - a) 在 CDRL1 为 SEQ ID NO:9 的肽,
 - b) 在 CDRL2 为 SEQ ID NO:18 的肽,和
 - c) 在 CDRL3 为 SEQ ID NO:34 的肽。
3. 根据权利要求 1 或 2 的抗肌抑制素单克隆抗体,其中所述单克隆抗体是全长抗体。
4. 根据权利要求 1 或 2 的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体还包含选自 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA、IgE、IgM 和 IgD 的重链恒定区。
5. 包含根据权利要求 1 至 4 中任一项的单克隆抗体的药物组合物。
6. 权利要求 5 的药物组合物,其还包含可药用的载体。
7. 有效量的根据权利要求 1 至 4 中任一项的单克隆抗体在制备药物中的用途,所述药物用于在需要其的受试者中增加肌肉质量。

抗肌抑制素抗体

发明领域

[0001] 本发明在药物领域内,特别是抗肌抑制素的单克隆抗体的领域内。更具体地本发明涉及高亲和力嵌合抗肌抑制素抗体、人源化抗肌抑制素抗体或人抗肌抑制素抗体以及抗体用于治疗、预防或诊断哺乳动物和禽类物种中的多种疾病或病症的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 转化生长因子 β (TGF- β) 蛋白质超家族的成员参与胚胎发育和成年组织的体内稳态。TGF- β 超家族成员共有共同的结构,包括蛋白质的分泌所需要的肽信号序列和氨基末端片段,所述氨基末端片段是从大的前体蛋白质的羧基末端蛋白水解切割的大约 105-140 个氨基酸,从而产生成熟蛋白。成熟蛋白的特征在于高度保守的半胱氨酸残基,而成熟蛋白的活性形式是经蛋白水解切割的前蛋白的二硫键连接的同型二聚体 (Gray, A., 和 Maston, A., Science, 247 :1328, 1990)。

[0004] 肌抑制素,也称作生长分化因子 8 (GDF-8) 是 TGF- β 蛋白质超家族的成员。肌抑制素与其他 TGF- β 家族成员共有结构相似性。其包含充当分泌信号的疏水性氨基末端和对于蛋白酶解加工是重要的保守的 RSRR 结构域。蛋白质切割产生氨基末端潜在相关肽 (latency associated peptide) 和形成生物活性的同型二聚体的羧基末端成熟信号肽。肌抑制素主要在发育中的和成年的骨骼肌中表达并且作用为骨骼肌的负调节物。成年小鼠中肌抑制素的全身性过量表达导致肌萎缩 (Zimmers, 等人, Science, 296 :1486-1488, 2002), 然而相反地,肌抑制素敲除小鼠的特征在于为骨骼肌的过度生长和超常增生,从而导致比它们的野生型同胞仔 (littermate) 大 2 至 3 倍的肌肉质量以及脂肪积累的减少 (McPherron, 等人 Nature, 387 :83-90, 1997)。已报导具有肌抑制素敲除突变的人与严重的肌肥厚 (muscle hypertrophy) 相关 (Scheulke, 等人, New Eng. J. Med. 350 :2682, 2004)。

[0005] 目前可获得的用于治疗肌萎缩或将受益于肌肉质量和 / 或肌肉力量的增加的疾病或病症 (包括,例如肌营养不良、虚弱、废用性萎缩和恶病质以及与肌萎缩关联的疾病例如肾病、心力衰竭或疾病和肝病) 的疗法非常有限。由于其作为骨骼肌生长的负调节物的作用,肌抑制素是用于治疗或预防干预此类疾病或病症或监控此类疾病或病症的进程的希望的靶。除了其在骨骼肌调节中的直接作用外,肌抑制素还可以参与其他的生理过程,包括前脂肪细胞 (preadipocyte) 至脂肪细胞的分化 (Kim 等人 BBRC, 281 :902-906, 2001) 和间接参与葡萄糖的体内稳态 (McPherron, A 和 Lee S-J. JCI 109 :595, 2002) 以及骨形成的抑制 (Hamrick, M. Mol. Cell Evol. Biol. 27:2388-91, 2003 ;Hamrick 等人 Calcif Tissue Int. 71 :63, 2002)。因此,肌抑制素特异性拮抗剂例如肌抑制素特异性抗体也可证明在治疗、预防或监控疾病或病症例如受益于增加骨的密度的疾病或病症 (例如骨质疏松症)、II 型糖尿病、代谢综合征、肥胖症和骨关节炎中是有用的。

[0006] 肌抑制素是跨物种高度保守的;人、小鼠、大鼠、鸡、火鸡和家牛中的肌抑制素的成熟形式的氨基酸序列是 100% 的同一 (参见图 2 和 3)。在牛中存在天然发生的肌抑制素突变,该突变与肌肉加倍的表型关联 (McPherron, 等人 PNAS, 94 :12457-61, 1997)。由于肌抑制素在序列和功能上是跨物种高度保守的,因此抗肌抑制素抗体不仅在人中而且还在其他

哺乳动物（包括，例如家养动物（例如，狗和猫）、运动动物（例如，马）、食物来源动物（例如，牛、猪和羊））以及在禽类物种（例如，鸡、火鸡、鸭和其他猎禽和家禽）中提供了增加肌肉质量、或治疗或预防上面所列的此类疾病或病症的具有前景的方法。

[0007] 生长分化因子 11，也称作 GDF-11 或 BMP-11，是与肌抑制素最同源的 TGF- β 蛋白质超家族的成员。人肌抑制素的成熟形式与 GDF-11 的氨基酸序列具有大约 90% 的同一性；然而，GDF-11 相对于 GDF-8 在更广泛的组织中表达，包括骨髓、脑、心脏、肾脏和肺以及肌肉和脂肪组织 (Nakashima, 等人 Mech. of Development 80 :185, 1999)。GDF-11 敲除小鼠具有多种畸形而在出生后 24 小时内死亡。特别地，小鼠展示额外的肋骨对、缺少肾脏和显示胃、脾和胰脏的缺陷 (McPherron 等人, Nature Genetics 22 :260, 1999 ;Esquela 和 Lee, Dev. Biol. 257 :356, 2003 ;Harmon 等人, Devpt. 131 :6163, 2004)。最近发现人 GDF-11 控制时间窗 (temporal window)，在所述时间窗期间多能祖先保持产生不同的神经后代的能力 (Kim, J. 等人 Science 308 :1927-1930, 2005)。

[0008] 存在对相对于与其他 TGF- β 超家族蛋白质特别是 GDF-11 的结合，优先结合肌抑制素的抗肌抑制素抗体的治疗性需要。此外，存在对肌抑制素特异性抗体的需要，所述抗体以高亲和力特别是高于它们借以结合 GDF-11 的亲力的亲和力（即如例如由更低的 K_D 值显示的更强的亲和力）结合肌抑制素，从而允许患者接受的剂量水平被减少至最低，因而这可使用这样的抗体的给药频率比使用以更低的亲和力（即，更高的 K_D ）与肌抑制素结合的抗体的给药频率更低。高亲和力抗体也是想要的，因为其可以使给患者施用抗体的途径更灵活，因为例如相对于皮下施用，静脉内施用的药物是较不想要的。为了产生具有最低有效治疗剂量的治疗性抗肌抑制素抗体，也存在对在生物活性测定法中具有较低的或有利的 IC_{50} 值的肌抑制素特异性抗体的需要。也希望提供对于肌抑制素是特异性的抗体，其中由患者接受该抗体诱发的对该抗体的任何免疫反应减少至最小。本发明满足这些需要和提供相关的有利方面。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明的抗体是拮抗或中和与肌抑制素或其部分相关的至少一种体外或体内生物学活性或性质的嵌合的、人源化的或完全人的抗肌抑制素单克隆抗体和其抗原结合部分。优选，本发明的抗体不以显著高于背景的水平结合由成熟的肌抑制素优选人肌抑制素的氨基酸 40-64（包括界限）、43-57 或 45-59 组成的肽。

[0011] 在一个实施方案中，本发明的抗体在体外肌抑制素 /SBE 报告基因测定（参见实施例 5）中具有低于或等于大约 40nM、30nM、25nM、20nM 或 10nM，更优选低于或等于大约 5nM、4nM、3nM、2nM 或 1nM 的 IC_{50} 。优选，本发明的抗体在体外肌抑制素 /SBE 报告基因测定中具有比抗体在体外 GDF-11/SBE 报告基因测定（如此处实施例 5 中所描述的）中的 IC_{50} 低至少 20% 或 50%，更优选至少大约 2 倍、3 倍或 4 倍的 IC_{50} 。

[0012] 在一个实施方案中，本发明抗体的特征在于对于肌抑制素的强结合亲和力 (K_D)，即，低于大约 $4.2 \times 10^{-9}M$ 或 $4.0 \times 10^{-9}M$ ，优选低于大约 $4.6 \times 10^{-10}M$ 、 $4.0 \times 10^{-10}M$ 或 $2 \times 10^{-10}M$ 和更优选低于大约 $8 \times 10^{-11}M$ 、 $7 \times 10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 或 $1.4 \times 10^{-12}M$ 。可选择地，本发明的抗体的特征在于肌抑制素的 K_D 不大于大约 $4.2 \times 10^{-9}M$ 或 $4.0 \times 10^{-9}M$ ，优选不大于大约 $4.6 \times 10^{-10}M$ 、 $4.0 \times 10^{-10}M$ 或 $2 \times 10^{-10}M$ 和更优选不大于大约 $8 \times 10^{-11}M$ 、 $7 \times 10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 或 $1.4 \times 10^{-12}M$ 。

[0013] 在另一个实施方案中,本发明的抗肌抑制素抗体的特征在于其优先结合肌抑制素,比与 GDF-11 蛋白质的结合超过至少 20%、30% 或 40%。优选,相对于与 GDF-11 的结合优先结合肌抑制素的本发明的抗体的另外特征在于具有低于大约 $4.2 \times 10^{-9}\text{M}$ 或 $4.0 \times 10^{-9}\text{M}$, 优选低于大约 $4.6 \times 10^{-10}\text{M}$ 、 $4.0 \times 10^{-10}\text{M}$ 或 $2 \times 10^{-10}\text{M}$ 和更优选低于大约 $5 \times 10^{-12}\text{M}$ 或 $1.4 \times 10^{-12}\text{M}$ 的对于肌抑制素的 K_D 。在另一个实施方案中,相对于与 GDF-11 的结合优先结合肌抑制素的本发明的抗体的另外特征在于在体外肌抑制素 /SBE 报告基因测定中具有低于或等于大约 40nM、20nM 或 10nM, 更优选低于或等于大约 5nM、4nM、3nM、2nM 或 1nM 的 IC_{50} 。

[0014] 在另一个实施方案中,本发明的抗肌抑制素单克隆抗体包含具有选自 SEQ ID NO: 74-102、140、141 和 142 的氨基酸序列的轻链可变区 (“LCVR”) 多肽 (图 9)。在另一个实施方案中,本发明的抗肌抑制素单克隆抗体包含具有选自 SEQ ID NO: 103-138 的氨基酸序列的重链可变区 (“HCVR”) 多肽 (图 10)。

[0015] 在另一个实施方案中,本发明的抗肌抑制素单克隆抗体包含:(i) 包含选自 SEQ ID NO: 74-102、140、141 和 142 的氨基酸序列的 LCVR 多肽,和 (ii) 包含选自 SEQ ID NO: 103-138 的氨基酸序列的 HCVR 多肽。在优选实施方案中,包含 LCVR 多肽的本发明的抗体还包含 HCVR 多肽,所述 LCVR 多肽含有具有下表 1 中所示的 SEQ ID NO 的氨基酸序列,所述 HCVR 多肽包含具有相应于下表 1 中特定 LCVR 的 HCVR 多肽的 SEQ IDNO 的氨基酸序列。例如,包含含有 SEQ ID NO: 88 的氨基酸序列的 LCVR 多肽的本发明的抗体优选还包含含有 SEQ ID NO: 103 或 119 的氨基酸序列的 HCVR 多肽。

[0016] 表 1

[0017] (本发明的优选 Ab 的序列)

[0018] LCVR HCVR (SEQ ID NO)

[0019]	74	103
[0020]	75	104
[0021]	76	104
[0022]	77	103 或 113
[0023]	78	105
[0024]	79	103
[0025]	80	106
[0026]	81	103, 104, 107, 108, 109, 110, 112, 114, 117, 118
[0027]	82	104
[0028]	83	111
[0029]	84	112
[0030]	85	113
[0031]	86	103, 108, 115
[0032]	87	116
[0033]	88	103, 119
[0034]	89	103, 120, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133,
[0035]		134
[0036]	90	103, 121, 122

[0037]	91	121
[0038]	92	103, 121
[0039]	93	120
[0040]	94	120
[0041]	95	120, 137
[0042]	96	120, 135
[0043]	97	120
[0044]	98	120, 138
[0045]	99	120, 136, 138
[0046]	100	120
[0047]	101	135
[0048]	102	136
[0049]	140	137
[0050]	141	123
[0051]	142	138

[0052] 在另一个实施方案中,如由本领域内可获得的测定法(例如,竞争 ELISA)所证明的,本发明的单克隆抗体是可与竞争抗体竞争对人肌抑制素的结合的抗体,其中所述竞争抗体包含具有选自:(i)SEQ ID NO:98 和 138 以及(ii)SEQ ID NO:74 和 103 的序列的两个多肽

[0053] 在一个实施方案中,本发明的抗肌抑制素抗体具有重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含具有下列氨基酸序列:CDRH1(SEQ ID NO:42)、CDRH2(SEQ ID NO:71) 和 CDRH3(SEQ ID NO:72) 的 CDR 区(参见图 7);和/或其中轻链可变区包含具有下列氨基酸序列:CDRL1(SEQ ID NO:12)、CDRL2(SEQ ID NO:154) 和 CDRL3(SEQ ID NO:37) 的 CDR 区(参见图 6)。优选,如图 7 中所示的抗体中一样,本发明抗体的重链 CDR 全部一起在一个抗体中,如图 6 中所示的抗体中一样,本发明抗体的轻链 CDR 全部一起在一个抗体中。

[0054] 本发明的抗肌抑制素单克隆抗体可另外包含选自人(或基本上人来源的)IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA、IgE、IgM 和 IgD,优选 IgG₁ 或 IgG₄ 的重链恒定区。本发明的抗肌抑制素单克隆抗体可以另外包含人 κ 或 λ 轻链恒定区。当将抗体用作人的治疗剂或预防剂时,恒定区优选基本上或完全是人来源的。当将抗体用作非人动物或非人动物的卵的治疗剂或预防剂时,恒定区优选基本上来源于其中要将该抗体用作治疗剂的动物。(参见,例如,Clarkson, C. 等人, Mol. Imm. 30:1195-1204, 1993;美国申请号 2002/01651350;和 Genbank 登录号 X69797、U03778、X16701、X07174、AB016711)。

[0055] 此处涉及不同的抗体形式。例如,本发明的抗肌抑制素单克隆抗体可包含或由完整的抗体(即,全长,具有完整 Fc 区的)、基本上完整的抗体、其抗原结合部分(例如, Fab、Fab'、F(ab')₂) 或单链 Fv 片段组成。要理解此处所有此类抗体形式都包含在本文中以及在术语“抗体”内。此外,可用可检测的标记对本发明的抗体进行标记,将其固定在固相上和/或与异源化合物例如酶或聚乙二醇分子缀合。此外,本发明的抗体被认为是单克隆来源的,即使它们在糖基化模式上可以不同。

[0056] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含本发明的抗肌抑制素单克隆抗体的药物

组合物。本发明的药物组合物还可包含可药用的载体。在所述药物组合物中,本发明的抗肌抑制素单克隆抗体是活性成分。优选药物组合物包含同质的或基本上同质的本发明的抗肌抑制素单克隆抗体的群体。用于治疗用途的组合物是无菌的和可以是冻干的(任选补充以合适的稀释剂)。

[0057] 本发明提供了在需要其的动物,优选哺乳动物或禽类物种,优选人中抑制至少一种肌抑制素的生物学活性的方法,其包括对所述哺乳动物或禽类物种施用治疗有效量的、或预防有效量的或中和肌抑制素或抑制肌抑制素的量的本发明的抗肌抑制素单克隆抗体。本发明还提供了增加肌肉质量或治疗或预防通过中和或拮抗肌抑制素生物学活性而改善的疾病或障碍或病症的方法,该方法包括对需要该治疗或预防的患者(例如,人)施用治疗或预防有效量的本发明的单克隆抗体。

[0058] 本发明包括用于药物制造的本发明的抗肌抑制素单克隆抗体,所述药物用于给哺乳动物(优选人)施用,通过对所述哺乳动物施用治疗有效量或预防有效量的本发明的抗肌抑制素单克隆抗体在需要其的哺乳动物(优选人)中治疗例如,虚弱、恶病质、年龄相关少肌症(age-related sarcopenia)、肌萎缩或肌无力、肌病、肌营养不良、骨质疏松症、肥胖症、COPD、肾衰竭或疾病、肝衰竭或疾病、心力衰竭或疾病、代谢综合征和 II 型糖尿病。

[0059] 本发明包括制造品,所述制造品包含包装材料和包括在所述包装材料内的本发明的抗体,其中包装材料包含标明抗体中和肌抑制素活性或减少存在于系统中的肌抑制素水平的说明书。

[0060] 本发明还提供了编码本发明的抗体的核酸;包含该核酸的一个载体(或多个载体),所述核酸任选地与用该载体转化的宿主细胞识别的控制序列有效连接;包含该载体的宿主细胞;用于产生本发明的抗体的方法,其包括培养宿主细胞以使核酸表达和任选地从宿主细胞培养基回收抗体。

[0061] 附图概述

[0062] 图 1 显示人前肌抑制素的氨基酸序列,信号序列以下划线标示,位于羧基末端的形成肌抑制素成熟形式单体的蛋白质部分以粗体字母标示。

[0063] 图 2 显示单体人成熟的肌抑制素的氨基酸序列。活性人肌抑制素是通过二硫键结合的该多肽的同型二聚体。该序列与小鼠、大鼠、鸡、火鸡、狗、马和猪的成熟的肌抑制素的序列同一。

[0064] 图 3 显示多种哺乳动物和禽类物种的成熟肌抑制素的氨基酸序列的比对。

[0065] 图 4 显示人肌抑制素与人 GDF-11 的成熟形式的氨基酸序列的比对。

[0066] 图 5 显示本发明的抗体的示例性亲本抗体 YN41 的 HCVR 和 LCVR 的氨基酸序列。该图进一步显示编码 YN41 抗体的 HCVR 和 LCVR 的示例性核苷酸序列。

[0067] 图 6 显示本发明的多种抗体的 LCVR 的 CDR 的氨基酸序列。

[0068] 图 7 显示本发明的多种抗体的 HCVR 的 CDR 的氨基酸序列。

[0069] 图 8 显示轻链 κ 恒定区(所述恒定可在本发明抗体的全长轻链的产生中有效连接至本发明抗体的 LCVR)的氨基酸序列和 IgG4 恒定区结构域(所述结构域在本发明的抗体的全长重链的产生中有效连接至本发明的抗体的 HCVR)的氨基酸序列。本图还显示编码轻链 κ 恒定区的示例性核苷酸序列和编码重链 IgG4 结构域的示例性核苷酸序列。

[0070] 图 9 显示本发明的多种抗体的 LCVR 的氨基酸序列的比对。CDR 结构域在第一个抗

体序列中以下划线标示。

[0071] 图 10 显示本发明的多种抗体的 HCVR 的氨基酸序列的比对。CDR 结构域在第一个抗体序列中以下划线标示。

[0072] 发明详述

[0073] 本发明提供能够特在体外和 / 或体内中和或拮抗至少一种肌抑制素的活性的嵌合、人源化或完全人的抗肌抑制素单克隆抗体或其抗原结合部分,其进一步的特征在于在体外肌抑制素 /SBE 报告基因测定中显示 IC_{50} 低于大约 40nM、20nM 或 10nM,更优选低于或等于大约 5nM、4nM、3nM、2nM 或 1nM 和 / 或优选显示与肌抑制素的强结合亲和力。本发明的抗体进一步的特征在于它们优先结合肌抑制素,比与肌抑制素最近的同源物 GDF-11 的结合强至少 20%。

[0074] 定义

[0075] 当在此处使用时,术语“成熟的肌抑制素”(对于人、鼠类、大鼠、鸡、火鸡、狗、马和猪物种参见 SEQ ID NO :2)是指在肌抑制素的 375 个氨基酸的前蛋白形式的 Arg 266 处蛋白水解切割后产生的蛋白质的单体或同型二聚体形式。当在此处使用时,术语“肌抑制素”是指成熟肌抑制素。当在此处使用时,术语“前肌抑制素 (promyostatin)”或“肌抑制素的前蛋白形式”,当用于指人蛋白时,是指包含 SEQ ID NO :1 中显示的序列、作为单体或同型二聚体的蛋白质。

[0076] 全长抗体(当其天然存在时)是由通过二硫键互相连接的 4 条肽链(2 条重(H)链(当全长时大约为 50-70kDa)和 2 条轻(L)链(当全长时大约为 25kDa))组成的免疫球蛋白分子。各条链的氨基末端部分包含大约 100-110 或更多个氨基酸的主要负责抗原识别的可变区。各条链的羧基末端部分确定了主要负责效应子作用的恒定区。

[0077] 轻链分类为 κ 或 λ 链并且由本领域内已知的特定恒定区表征。重链分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ 链,并将抗体的同种型分别定义为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE,这些同种型中的几种可另外的分为亚类(同种型)例如, IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 和 IgA₂。各重链类型的特征在于本领域内已知的特定恒定区。不同种类的抗体的亚基结构和三维构型在本领域内是熟知的。各重链由 N 末端重链可变区(在此处为“HCVR”)和重链恒定区组成。对于 IgG、IgD 和 IgA,重链恒定区由三个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成;和对于 IgM 和 IgE,由 4 个结构域(CH1、CH2、CH3 和 CH4)组成。各轻链由轻链可变区(在此处为“LCVR”)和轻链恒定区 CL 组成。HCVR 和 LCVR 区域可另外被再分成高变区(称为互补性决定区域(CDR)),其间散布更加保守的称为构架区(FR)的区域。各 HCVR 和 LCVR 由 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成,从氨基末端至羧基末端按下列顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。此处重链的 3 个 CDR 称为“CDRH1、CDRH2 和 CDRH3”,轻链的 3 个 CDR 称为“CDRL1、CDRL2 和 CDRL3”。CDR 包含大多数与抗原形成特异性相互作用的残基。CDR3 通常是抗体结合部位中分子多样性的最大来源。按照熟知的常规[例如, Kabat, “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) 或 Al-Lazikani 等人, J. Mol. Biol. 273 :927-948, 1997 中描述的 Chothia 编号方案,也参见国际互联网网址 <http://www.rubic.rdg.ac.uk/~andrew/bioinf.org/abs>]来将氨基酸分配至各链。抗体结合特定抗原的功能能力极大地受到 6 个 CDR 的影响。

[0078] 关于本发明的抗肌抑制素单克隆抗体(或简单地,“本发明的单克隆抗体”),术语

“抗体”，如此处所用的，是指单克隆抗体。除非此处另外指出，此处所用的术语“单克隆抗体”是指嵌合抗体、人源化抗体或完全人抗体。优选本发明的单克隆抗体存在于同质的或基本上同质的群体中。可使用例如本领域内熟知的杂交瘤技术以及重组技术、噬菌体展示技术、合成技术或此类技术的组合或本领域内熟知的其他技术产生发明的单克隆抗体。“单克隆抗体”是指从单个拷贝或克隆（包括例如任何真核、原核或噬菌体克隆）产生的抗体，而不是借以产生其的方法。“单克隆抗体”可以是完整的抗体（包含完整的或全长的 Fc 区）、基本上完整的抗体或抗体的包含抗原结合部分的部分或片段，例如，嵌合抗体、人源化抗体或人抗体的 Fab 片段、Fab' 片段或 F(ab')₂ 片段。

[0079] 各轻链 / 重链对的可变区形成了抗体的抗原结合位点。因此，完整的 IgG 抗体具有两个结合位点。除了在双功能或双特异性抗体中外，两个结合位点相同。如此处所用的，“抗原结合部分”或“抗原结合区”或“抗原结合片段”此处可互换，表示可变区内抗体分子部分，其包含与抗原相互作用和赋予抗体对于抗原的其特异性和亲和力的氨基酸残基。该抗体部分包括保持抗原结合残基的恰当构象所必需的构架氨基酸残基。优选，本发明的抗体的抗原结合区的 CDR 是鼠类来源的或基本上是鼠类来源的，其中某些氨基酸残基被改变以提高特定的活性（参见，例如，图 6 和 7）。优选，本发明抗体的构架区是人来源的或基本上是人来源的（至少 95%、97% 或 99% 的人来源；见例如图 9 和 10）。在另一个实施方案中，抗原结合区或抗原结合区的 CDR 可来源于其他非人物种，包括但不限于兔子、大鼠或仓鼠。在其他实施方案中，抗原结合区可以完全是人来源的或基本上是人源的，其具有某些氨基酸残基经改变以提高特定的活性例如亲和力或特异性（参见，例如，图 6 和 7 的以粗体印刷和下划线标示的氨基酸位置）。

[0080] 此外，此处所用的“单克隆抗体”可以是可通过用连接体序列连接编码 LCVR 和 HCVR 的 DNA 产生的单链 Fv 片段。（参见，Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编著, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页, 1994）。要理解无论是否指定片段或部分，此处所用的术语“抗体”包括这样的片段或部分以及单链形式。只要蛋白质保持特异性或优先结合其预期的靶（即，表位或抗原）的能力，其就可包含在术语“抗体”的范围内。

[0081] “单克隆抗体的群体”是指同质的或基本上同质的抗体群体（即，群体中至少大约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%，更优选至少大约 97% 或 98% 或最优选至少 99% 的抗体在 ELISA 测定中竞争相同的抗原或表位）。抗体可以被或可以不被糖基化并且仍然可落于本发明的范围内。如果单克隆抗体具有同一的氨基酸序列，尽管它们可以在翻译后修饰例如糖基化模式中不同，但它们可以是同质的。

[0082] “变体”抗肌抑制素抗体，此处是指通过在亲本抗体序列中添加、缺失和 / 或取代一个或多个氨基酸残基而导致在氨基酸序列上与“亲本”抗肌抑制素抗体的氨基酸序列不同的分子。在优选实施方案中，变体在亲本抗体的一个或多个 CDR 区中包含一个或多个氨基酸取代。例如，变体可在亲本抗体的一个或多个 CDR 区中包含至少一个（例如，从大约 1 至大约 10 个，和优选从大约 2 至大约 5 个）取代。关于变体序列的同一性或同源性，此处定义为在比对序列和如果需要引入空位（以获得最大的百分数序列同一性）后，变体序列中与亲本抗体的残基相同的氨基酸残基的百分数。抗体序列中的 N 末端、C 末端或内部的延伸、缺失或插入不应当解释为影响序列的同一性或同源性。变体保留了结合肌抑制素的能力。

力并且优选具有优于亲本抗体的性质。例如,变体在 SBE/ 报告基因测定中可以具有更强的结合亲和力、更低的 IC_{50} 或增强的抑制肌抑制素的生物学活性的能力。此处特定目的变体抗体是当与亲本抗体相比时,在生物活性上展示至少大约 5 倍,优选至少大约 10 倍,和更优选至少大约 20、30 或 50 倍增强的抗体。

[0083] 此处的“亲本”抗体是由用于变体的制备的氨基酸序列编码的抗体。亲本抗体可以具有鼠类构架区,但优选具有人构架区。亲本抗体可以是鼠类(参见,例如,此处的图 x)抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0084] 此处所用的术语“特异性结合是指这样的情况,其中特定结合对的一个成员不显著地结合除了其特异性结合伴侣外的分子(如可通过本领域可获得的技术例如竞争 ELISA、BIACORE 测定或 KINEXA 测定测量的。当例如本发明抗体的抗原结合结构域对于许多抗原具有的特定表位是特异性的,也可使用该术语,在该情况下,具有抗原结合结构域的特异性抗体将能够特异性结合具有该表位的不同抗原。因此,本发明的单克隆抗体特异性结合 GDF8 和 GDF11。

[0085] 此处使用的术语“优先结合”是指这样的情况,其中抗体对特异性抗原的结合,如通过本领域可获得的技术例如竞争 ELISA 或使用 BIACORE 或 KINEXA 测定法的 K_D 测量所测量的,比其对不同的抗原的结合大至少大约 20%。因此,本发明的单克隆抗体相对于对 GDF-11 的结合优先结合 GDF-8。类似地,抗体可优先于相同抗原内的不同表位而与抗原内的一个表位优先结合。

[0086] 术语“表位”是指分子的能够被抗体在一个或多个抗体的抗原结合区域识别和结合的部分。表位通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或糖的侧链组成并且具有特定的三维结构特征和特定的电荷特征。“抑制性表位”和/或“中和表位”)是指当在完整分子(在本案中,肌抑制素)的背景中时和当被对于该表位是特异性的抗体所结合时在体内或体外导致分子或包含该分子的生物的生物学活性的丧失或减小的表位。

[0087] 术语“表位”,如此处所用的,还指在动物优选哺乳动物例如小鼠或人中具有抗原和/或免疫原性活性的多肽的部分。术语“抗原性表位”,如此处所用的,定义为多肽的抗体可特异性结合(如可通过本领域内熟知的任何方法例如通过常规免疫测定法确定的)的部分。抗原表位不需要一定是免疫原性的,但可以是免疫原性的。“免疫原性表位”,如此处所用的,定义为多肽的在动物中引起抗体应答(通过本领域内已知的任何方法确定的)的部分。(参见,例如,Geysen 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :3998-4002(1983))。

[0088] 关于本发明的抗体,术语“生物学性质”或“生物活性”、“活性”、“生物学活性”此处可互换使用,其包括但不限于表位/抗原亲和力和特异性,在体内或体外中和或拮抗肌抑制素的活性的能力、肌抑制素/SBE 报告基因测定法中的 IC_{50} 或体外活性测定法中其他的、抗体的体内稳定性和抗体的免疫原性质。抗体的其他可鉴定的生物学性质包括例如交叉反应性(即,通常地,与被靶向的肽的非人同源物或其他蛋白质或组织的交叉反应性)和在哺乳动物细胞中保持蛋白质的高表达水平的能力。可使用本领域承认的技术观察或测量或估量上述性质或特征而不限受体结合、细胞因子或生长因子的产生和/或分泌、爪蟾属(Xenopus)动物冠发育、信号转导和使用来自不同来源包括人、灵长类动物或当需要时任何其他所需来源的组织切片的免疫组织化学,所述技术包括但不限于 ELISA、竞争 ELISA、表面等离子共振分析、体外和体内中和测定法。

[0089] 此处使用的术语“肌抑制素的活性”是指与活性肌抑制素蛋白质关联的一种或多种生理生长调节或形态发生活性。例如，活性肌抑制素是骨骼肌质量的负调节物。活性肌抑制素也可调节肌肉特异性酶（例如，肌酸激酶）的产生、刺激成肌细胞增殖和调控前脂肪细胞分化成脂肪细胞。

[0090] 关于本发明的抗体的活性，此处使用的术语“抑制”或“中和”是指基本上拮抗、抑制、阻止、限制、减缓、中断、消除、终止、减少或逆转例如要被抑制的那些（包括但不限于生物学活性或性质、疾病或病症）的进程或严重性的能力。抑制或中和优选是至少大约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或更高。

[0091] 术语“分离的”，当用于核酸或蛋白质（例如，抗体）方面时，是指被鉴定的并且从至少一种通常在其天然来源中与其结合的污染物分离的核酸序列和蛋白质。优选，“分离的抗体”是基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体（例如，本发明的药物组合物包含特异性结合肌抑制素的分离的抗体并且基本不含特异性结合除了肌抑制素以外的抗原的抗体）。

[0092] 术语“Kabat 编号”和“Kabat 标记”此处可互换使用。在本领域内承认的这些术语是指给抗体的重链和轻链可变区中比其他氨基酸残基更可变（即，高变的）的氨基酸残基编号的系统（Kabat, 等人, Ann. NY Acad. Sci. 190 :382-93 (1971) ;Kabat, 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH 公开号 No. 91-3242 (1991)）。

[0093] 当将其置于与另一种多核苷酸的功能关系中时，多核苷酸被“有效连接”。例如，如果启动子或增强子影响序列的转录那么它们有效连接至编码序列。当编码肽的多核苷酸有效连接时，优选当它们处于相同的可读框中时，所述肽“有效连接至”另一个肽。

[0094] 术语“个体”、“受试者”和“患者”此处可互换使用，意指动物优选哺乳动物（包括非灵长类和灵长类动物）或禽类物种，包括但不限于鼠类、猿、人、哺乳动物农场动物（farm animal）（例如，牛、猪、羊）、哺乳动物运动动物（例如，马）和哺乳动物宠物（例如，狗和猫）；优选该术语是指人。术语也指禽类物种，包括但不限于鸡和火鸡。在某些实施方案中，受试者，优选哺乳动物（优选人）另外的特征在于患有可受益于肌抑制素的减少的水平或减少的生物活性的疾病或障碍或病症。在另一个实施方案中受试者（优选哺乳动物优选人）另外表征为处于发生可受益于肌抑制素的减少的水平或肌抑制素的减少的生物活性的障碍、疾病或病症的风险中。

[0095] 术语“载体”包括能够运输其所连接的另一种核酸的核酸分子，包括但不限于质粒和病毒载体。某些载体能够在它们被导入的宿主细胞中自主复制，而其他载体可在导入宿主细胞后被整合入宿主细胞的基因组，从而随着宿主基因组被复制。此外，某些载体能够指导有效连接至其的基因的表达。这样的载体此处称为“重组表达载体”（或简称为“表达载体”），示例性载体在本领域内是熟知的。

[0096] 如此处所用的，措辞“细胞”、“宿主细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”此处可互换使用，包括作为本发明的任何分离的多核苷酸或包含编码本发明的 HCVR、LCVR 或单克隆抗体的序列的任何重组载体的受者的单个细胞或细胞培养物。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代，由于天然的、意外的或有意的突变和 / 或改变，后代可以不必与原始亲本细胞完全同一（在形态学上或在总 DNA 套（DNA complement）上）。宿主细胞包括在体内或体外用一个或

多个重组载体或表达本发明的单克隆抗体或其轻链或重链的多核苷酸转化、转导或感染的细胞。包含本发明的重组载体（稳定地掺入宿主染色体或没有）的宿主细胞也可称为“重组宿主细胞”。用于本发明的优选的宿主细胞是 CHO 细胞（例如，ATCC CRL-9096）、NS0 细胞、SP2/0 细胞和 COS 细胞（ATCC 例如，CRL-1650、CRL-1651）、HeLa（ATCC CCL-2）。用于本发明的其他宿主细胞包括植物细胞、酵母细胞、其他哺乳动物细胞和原核细胞。

[0097] 抗体表征

[0098] 本发明涉及以高亲和力特异性结合肌抑制素的分离的单克隆抗体。本发明的抗体优选是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体或其抗原结合部分。此外，本发明的抗体在体内或体外中和肌抑制素的生物学活性。本发明的抗肌抑制素单克隆抗体对肌抑制素的特异性结合允许本发明的抗体被用作肌抑制素相关性病症、疾病或障碍（即，受益于降低肌抑制素的水平或拮抗或抑制肌抑制素的生物学活性的病症、疾病或障碍）的治疗剂或预防剂。

[0099] 在优选实施方案中，本发明提供了以低于大约 $4.2 \times 10^{-9} \text{M}$ 或 $4.0 \times 10^{-9} \text{M}$ ，优选低于大约 $4.6 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $4.0 \times 10^{-10} \text{M}$ 或 $2 \times 10^{-10} \text{M}$ 和更优选低于大约 $8 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 $7 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 或 $1.4 \times 10^{-12} \text{M}$ 的对于肌抑制素的结合亲和力 (K_D) 结合肌抑制素或其部分的抗肌抑制素单克隆抗体。可选择地，本发明的抗体表征为对肌抑制素的 K_D 不高于大约 $4.2 \times 10^{-9} \text{M}$ 或 $4.0 \times 10^{-9} \text{M}$ ，优选不高于大约 $4.6 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $4.0 \times 10^{-10} \text{M}$ 或 $2 \times 10^{-10} \text{M}$ 和更优选不高于大约 $8 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 $7 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 或 $1.4 \times 10^{-12} \text{M}$ 。抗体亲和力可以通过下文实施例所描述的确定。

[0100] 优选，此处描述的由强结合亲和力所表征的本发明的这些抗体在体外肌抑制素 / SBE 报告基因测定中也具有低于 40nM、30nM、25nM、20nM 或 10nM，更优选低于或等于大约 5nM、4nM、3nM、2nM 或 1nM 的 IC_{50} 。甚至更优选地，此处描述的由强结合亲和力所表征的抗体在体外肌抑制素 / SBE 报告基因测定中具有 IC_{50} 比抗体在体外 GDF-11 / SBE 报告基因测定（如此处实施例 5 中所描述的）中的 IC_{50} 低至少 20%，更优选至少大约 2 倍、3 倍或 4 倍。优选此处描述的由强结合亲和力表征的本发明的此类抗体的进一步的特征在于如通过本领域的技术例如通过竞争 ELISA 测定法或通过 BIACORE 或 KINEXA 测定测量的，它们优先与 GDF-8 反应，超过与 GDF-11 的反应至少 20%，从而证明抗体对 GDF-8 的亲和力比对 GDF-11 的亲和力高至少 20%（即，更低的 K_D ）。优选此处描述的由强结合亲和力所表征的本发明的这些抗体的进一步特征在于它们不结合由成熟的肌抑制素优选人肌抑制素的氨基酸 40-64（包含界限）、43-57 或 45-59 组成的肽。

[0101] 在另一个优选实施方案中，本发明提供了抗肌抑制素单克隆抗体，其具有的 IC_{50} 在体外肌抑制素 / SBE 报告基因测定中低于或等于大约 40nM、30nM、25nM、20nM 或 10nM，更优选低于或等于大约 5nM、4nM、3nM、2nM 或 1nM。甚至更优选，抗肌抑制素单克隆抗体在体外肌抑制素 / SBE 报告基因测定中的 IC_{50} 比该抗体在体外 GDF-11 / SBE 报告基因测定（如此处实施例 5 中所描述的）中的 IC_{50} 低至少大约 2 倍、3 倍或 4 倍。具有上述 IC_{50} 的本发明抗体的进一步特征在于对于肌抑制素的 K_D 低于大约 $4.2 \times 10^{-9} \text{M}$ 或 $4.0 \times 10^{-9} \text{M}$ ，优选低于大约 $4.6 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $4.0 \times 10^{-10} \text{M}$ 或 $2 \times 10^{-10} \text{M}$ 和更优选低于大约 $8 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 $7 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 或 $1.4 \times 10^{-12} \text{M}$ 的；可选择地，对于肌抑制素的 K_D 不大于大约 $4.2 \times 10^{-9} \text{M}$ 或 $4.0 \times 10^{-9} \text{M}$ ，优选不大于大约 $4.6 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $4.0 \times 10^{-10} \text{M}$ 或 $2 \times 10^{-10} \text{M}$ 和更优选不大于大约 $8 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 $7 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 或 $1.4 \times 10^{-12} \text{M}$ ，该对于肌抑制素的 K_D 比该抗体具有的对于 GDF-11 的 K_D 低至少大

约 20%。具有上述 IC_{50} 的本发明的抗体的进一步的特征可在于,如使用本领域内可获得的方法例如 ELISA 测定法或竞争 ELISA 测定法或例如使用 BIACORE 或 KINEXA 测定法测量的 K_D 值测量的,当与它们结合 GDF-11 的能力相比,它们优先结合肌抑制素至少大约 20%,优选至少大约 2 倍、3 倍或 4 倍。具有上述 IC_{50} 的本发明的抗体的进一步的特征可在于(例如,在 ELISA 测定中)其不以显著高于背景的水平结合由成熟的肌抑制素(优选人肌抑制素)的氨基酸 40-64(包括界限)、43-57 或 45-59 的组成的肽。

[0102] 优选,就本发明的抗体的优先结合而被检测的肌抑制素和 GDF-11 多肽都是成熟蛋白(优选哺乳动物或禽类来源的,甚至更优选人来源的)的同型二聚体形式。然而,就本发明的抗体的优先结合而被检测的肌抑制素和 GDF-11 多肽可以是成熟蛋白的单体形式或前蛋白形式。

[0103] 可使用本领域内广泛已知的杂交瘤方法(参见例如, Kohler 等人, Nature, 256 : 495, 1975) 或可使用重组 DNA 方法(例如,如美国专利号 4, 816, 567 中所描述的)制备单克隆抗体。通常,可通过将合适的无限增殖细胞系(例如,骨髓瘤细胞系例如 SP2/0)与被免疫的动物的抗体产生性细胞融合来产生杂交瘤。从用目的抗原免疫的动物获得抗体产生性细胞,优选脾或淋巴节的抗体产生性细胞。可使用选择培养条件分离融合的细胞(杂交瘤),然后通过有限稀释对其进行克隆。就针对抗原的单克隆抗体的产生测定其中杂交瘤生长的培养基。优选,通过免疫沉淀或通过体外结合测定法例如放射免疫测定(RIA)或 ELISA 确定杂交瘤细胞产生的 mab 的结合特异性。可通过合适的筛选测定法选择产生具有希望的结合性质的抗体的细胞。用于这样的分离和筛选的方法在本领域内是熟知的。

[0104] 可使用产生或分离本发明的抗体的其他合适的方法,所述方法包括例如从文库选择重组抗体(例如,单链 Fv 或 Fab)的方法或依赖于能够产生人抗体谱的转基因动物(例如,小鼠)免疫的方法(参见例如, Jakobovits 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 2551-2555, 1993 ; Jakobovits 等人, Nature, 362 : 255-258, 1993 ; Lonberg 等人, 美国专利号 5, 545, 806 ; Surani 等人, 美国专利号 5, 545, 807)。

[0105] 本发明和术语“抗体”也包括包含来源于不同物种的部分的单链抗体和嵌合抗体、人源化抗体或灵长类源化(primatized)(嫁接 CDR 的)抗体以及嵌合的或嫁接 CDR 的单链抗体等。可通过常规技术化学地、合成地将这些抗体的不同部分连接在一起,或可使用遗传工程技术将其制备为连续的蛋白质。例如,可表达编码嵌合的或人源化的链的核酸来产生连续的蛋白质。参见例如,美国专利号 4, 816, 567 ;欧洲专利号 0, 125, 023 B1 ;美国专利号 4, 816, 397 ;欧洲专利号 0, 120, 694 B1 ;WO 86/01533 ;欧洲专利号 0, 194, 276 B1 ;美国专利号 5, 225, 539 ;欧洲专利号 0, 239, 400 B1 和美国专利号 5, 585, 089 和 5, 698, 762。关于灵长类源化抗体也参见, Newman, R. 等人 BioTechnology, 10 : 1455-1460, 1993, 关于单链抗体, 参见 Ladner 等人, 美国专利号 4, 946, 778 和 Bird, R. E. 等人, Science, 242 : 423-426, 1988。

[0106] 此外,也可产生抗体的功能性部分,包括嵌合抗体、人源化抗体、人抗体或单链抗体的抗原结合部分。上述抗体的功能性部分保留了其所来源的全长抗体的至少一种抗原结合功能和/或生物学功能或生物活性。优选功能性部分保留相应的全长抗体的抗原结合功能(例如,结合哺乳动物的肌抑制素的成熟形式的能力)。特别优选的功能性部分或片段保留抑制哺乳动物成熟肌抑制素的一种或多种功能或生物活性特征例如结合活性、信号传导

活性和 / 或细胞应答的刺激的能力。例如,在一个实施方案中,功能性部分或片段可抑制成熟的肌抑制素与一种或多种其配体的相互作用和 / 或可抑制一种或多种受体介导的功能。

[0107] 能够结合成熟的肌抑制素 (的抗体部分或片段包括但不限于 Fv、Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段并且包含在本发明内。可通过酶促切割或通过重组技术产生此类片段。例如,木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割可以分别产生 Fab 或 F(ab')₂ 片段。最小的抗原结合片段是 Fv,其由 HCVR 和 LCVR 结构域组成。Fab 片段由在恒定区之间通过二硫链共价连接的 HCVR-CH1 和 LCVR-CL 结构域组成。为克服当在宿主细胞内共表达时 Fv 中的非共价连接的 HCVR 和 LCVR 结构域分离的倾向,可构建所谓的单链 (sc)Fv 片段 (scFv),在该片段中柔性的和足够长的多肽将 HCVR 的 C 末端连接至 LCVR 的 N 末端或将 LCVR 的 C 末端连接至 HCVR 的 N 末端。最常使用的连接体是 15 个残基 (Gly₄Ser)₃ 的肽,但其他连接体在本领域内也是已知的。也可使用其中已在天然终止位点的上游导入一个或多个终止密码子的抗体基因产生以许多种截短的形式存在的抗体。例如,可设计编码 F(ab')₂ 重链部分的嵌合基因以包含编码重链的 CH₁ 结构域和铰链区的 DNA 序列。

[0108] 使用富集技术例如噬菌体展示 (Matthews DJ 和 Wells JA. Science. 260 :1113-7, 1993)、核糖体展示 (Hanes, 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95 :14130-5, 1998)、细菌展示 (Samuelson P., 等人, Journal of Biotechnology. 96 :129-54, 2002) 或酵母展示 (Kieckhefer MC, 等人, Protein Engineering, 10 :1303-10, 1997) 从文库选择抗体片段已证明是经典的杂交瘤技术的成功的另一种选择 (近年来的综述 :Little M. 等人, Immunology Today, 21 : 364-70, 2000 ;)。

[0109] 变体抗体

[0110] 针对肌抑制素或包含本发明的免疫原性表位的蛋白质产生的鼠类单克隆抗体或人抗体 (在例如转基因小鼠中产生的) 是亲本抗体。可使用本领域内熟知的方法进一步改变鼠类亲本抗体以产生抗体的嵌合形式或人源化形式。此类嵌合抗体或人源化抗体可用于进一步变异或诱变的亲本抗体。可另外的在 CDR 结构域内 (参见例如,图 6 和 7) 诱变处理本发明的亲本抗体以产生具有本发明的最优化的目的性质 (例如,结合亲和力、IC₅₀、特异性等) 的变体抗体。氨基酸取代的变体抗体是优选的,具有亲本抗体分子的至少一个氨基酸残基被除去,然后在其位置插入不同的残基。进行取代型诱变的最吸引人的位点包括 CDR 区,但也涉及 FR 的改变。保守性氨基酸取代是优选的。如果这样的取代导致抗体的生物学活性改变,那么可导入更实质的改变,即非保守性氨基酸的改变,并且筛选产物。

[0111] 用于产生取代型变体的常规方法是使用噬菌体展示的亲和力成熟法。简而言之,突变几个 CDR 区的位点以在各位点上产生所有可能的氨基酸取代。所产生的抗体变体作为与包装在各颗粒内的 M13 的基因 III 产物的融合在丝状噬菌体颗粒上以单价形式展示。然后就此处公开的它们的生物学活性 (例如,结合亲和力、特异性、IC₅₀) 筛选噬菌体展示的变体。为了鉴定用于修饰的候选 CDR 区的位点,可进行丙氨酸分区诱变以鉴定显著促进抗原结合的 CDR 区的残基。可选择地,或另外地,分析抗原 - 抗体复合物的晶体结构对于鉴定抗体和肌抑制素之间的接触点可以是有益的。该接触残基和相邻的残基是按照此处详述的或本领域内已知的技术进行取代的候选残基。可选择地,或另外地,当 CDR 有效连接至可变区或当 CDR 不依赖于其他可变区序列时可在一个或多个残基位置对一个或多个 CDR 序列进行随机诱变,然后使用重组 DNA 技术将改变的 CDR 返回至可变区。一旦产生这样的变体抗体

后,如此处所描述的将成组变体进行筛选,可选择在一个或多个在相关测定中具有优良性质的抗体以进行进一步开发。

[0112] 可取代(通常用丝氨酸)不参与保持本发明的抗肌抑制素抗体的适当构象的任何半胱氨酸残基以改善分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反地,可向抗体中加入半胱氨酸键以提高其稳定性(特别是当抗体是抗体片段例如 Fv 片段时)。

[0113] 另一种类型的抗体的氨基酸变体改变了抗体的原始糖基化模式。改变是指缺失一个或多个抗体中发现的糖类部分,和/或加入一个或多个在亲本抗体中不存在的糖基化位点。

[0114] 抗体的糖基化通常是 N 连接或 O 连接的。N 连接是指将糖类部分附着至天冬酰胺残基的侧链。当 X 是除了脯氨酸外的任何氨基酸时,三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸是糖类部分至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的存在产生了潜在的糖基化位点。O 连接的糖基化是指将糖 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种附着至羟氨基酸(最常见地丝氨酸或苏氨酸,尽管也可使用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸)。

[0115] 通过改变氨基酸序列以使其包含一个或多个上述三肽序列(对于 N 连接的糖基化位点)来常规地实现向抗体加入糖基化位点。还可通过向原始抗体序列加入一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或用所述残基进行取代(对于 O 连接的糖基化位点)来产生改变(对于 O 连接的糖基化位点)。

[0116] 序列

[0117] 本发明的优选单克隆抗体具有 LCVR 和/或 HCVR,所述 LCVR 包含具有选自 SEQ ID NO:74-102、140、141 和 142 的序列的肽(图 9),所述 HCVR 包含具有选自 SEQ ID NO:103-138 的序列的肽(图 10)。在优选实施方案中,包含 LCVR 多肽的本发明抗体还包含 HCVR 多肽,所述 LCVR 多肽含有具有此处的表 1 中所示的 SEQ ID NO 的氨基酸序列,所述 HCVR 多肽包含具有相应于表 1 中的特定 LCVR 的 HCVR 多肽的 SEQ ID NO 的氨基酸序列。本领域技术人员将认识到本发明的抗体不限于此处的图 9 和 10 中所述的 HCVR 和 LCVR 的特定序列,而且还包括保持本发明的抗体的抗原结合能力和其他功能性质的这些序列的变体。使用此处描述的本领域内已知的技术可从提供的序列衍生出此类变体。

[0118] 此外,本发明的单克隆抗体是与成熟的人肌抑制素(或其部分)的结合被包含两个多肽的竞争性单克隆抗体竞争性抑制的抗体,所述多肽具有选自 (i)SEQ ID NO:98 和 138 以及 (ii)SEQ ID NO:74 和 103 的序列。可通过本领域技术人员熟知的测定法例如竞争 ELISA 测定法测量抗体之间的该竞争抑制。

[0119] 优选,本发明的与上面定义的竞争性抗体竞争的抗体的进一步的特征在于如通过本领域内的技术例如通过竞争 ELISA 或通过 BIACORE 或 KINEXA 测定法测量的,其优先结合 GDF-8,超过与 GDF-11 的结合至少 20%、30%或 40%,从而证明抗体对 GDF-8 的亲合力比对 GDF-11 的高至少 20%、30%或 40%(即,更低的 K_D)。优选,本发明的与上面定义的竞争性抗体竞争的抗体的进一步的特征在于具有的对于肌抑制素的 K_D 低于大约 $4.2 \times 10^{-9}M$ 或 $4.0 \times 10^{-9}M$,优选低于大约 $4.6 \times 10^{-10}M$ 、 $4.0 \times 10^{-10}M$ 或 $2 \times 10^{-10}M$ 和更优选低于大约 $8 \times 10^{-11}M$ 、 $7 \times 10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 或 $1.4 \times 10^{-12}M$;或可选择地特征在于对于肌抑制素的 K_D 不高于大约 $4.2 \times 10^{-9}M$ 或 $4.0 \times 10^{-9}M$,优选不高于大约 $4.6 \times 10^{-10}M$ 、 $4.0 \times 10^{-10}M$ 或 $2 \times 10^{-10}M$ 和

更优选不高于大约 $8 \times 10^{-11}\text{M}$ 、 $7 \times 10^{-11}\text{M}$ 、 $5 \times 10^{-12}\text{M}$ 或 $1.4 \times 10^{-12}\text{M}$ 和 / 或进一步的特征在于在体外肌抑制素 /SBE 报告基因测定中具有 IC_{50} 低于或等于大约 40nM、20nM 或 10nM, 更优选低于或等于大约 5nM、4nM、3nM、2nM 或 1nM。

[0120] 甚至更优选, 本发明的与上面定义的竞争性抗体竞争的抗体的进一步的特征在于在体外肌抑制素 /SBE 报告基因测定中 IC_{50} 低于或等于大约 40nM、30nM、25nM、20nM 或 10nM, 更优选低于或等于大约 5nM、4nM、3nM、2nM 或 1nM。甚至更优选, 在体外肌抑制素 /SBE 报告基因测定中, 抗肌抑制素单克隆抗体的 IC_{50} 至少比抗体在体外 GDF-11/SBE 报告基因测定 (如此处实施例 5 中所描述的) 中的 IC_{50} 低至少大约 2 倍、3 倍或 4 倍。甚至更优选, 本发明的与上面定义的竞争性抗体竞争的抗体的进一步的特征在于不结合由成熟的肌抑制素优选人肌抑制素的氨基酸 40-64 (包括界限)、43-57 或 45-59 组成的肽。

[0121] 在一个实施方案中, 本发明的抗肌抑制素抗体具有重链可变区和轻链可变区, 其中重链可变区包含具有下列氨基酸序列: CDRH1 (SEQ ID NO:42)、CDRH2 (SEQ ID NO:71) 和 CDRH3 (SEQ ID NO:72) 的 CDR 区; 和 / 或其中轻链可变区包含具有下列氨基酸序列: CDRL1 (SEQ ID NO:12)、CDRL2 (SEQ ID NO:154) 和 CDRL3 (SEQ ID NO:37) 的 CDR 区。优选, 本发明的抗体的重链 CDR 示于图 7 中, 本发明的抗体的轻链 CDR 区示于图 6 中。

[0122] 还涉及的是: 本发明的抗肌抑制素抗体包含 HCVR, 所述 HCVR 包含含有选自 SEQ ID NO:38-41 的序列的 CDRH1 和 / 或含有选自 SEQ ID NO:43-70 和 73 的序列的 CDRH2 和 / 或包含 SEQ ID NO:72 的序列的 CDRH3。在另一个实施方案中, 本发明的抗肌抑制素抗体包含 LCVR, 所述 LCVR 包含含有选自 SEQ ID NO:9-11 的序列的 CDRL1 和 / 或含有选自 SEQ ID NO:13-23 的序列的 CDRL2 和 / 或含有选自 SEQ ID NO:24-36 的序列的 CDRL3。在优选实施方案中, 本发明的抗肌抑制素抗体包含含有选自 SEQ ID NO:38-42 的序列的 CDRH1 和 / 或含有选自 SEQ ID NO:43-70 和 73 的序列的 CDRH2 和 / 或含有 SEQ ID NO:72 的序列的 CDRH3, 并且还包含 LCVR, 所述 LCVR 包含含有选自 SEQ ID NO:9-11 的序列的 CDRL1 和 / 或含有选自 SEQ ID NO:13-23 的序列的 CDRL2 和 / 或含有选自 SEQ ID NO:24-36 的序列的 CDRL3。

[0123] 具有本发明的 CDR 的结构通常是抗体重链或轻链序列或其实质部分, 其中 CDR 位于相应于天然存在的 HCVR 和 LCVR 的 CDR 的位置 (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept of HHS, 1991)。优选, 在人构架区中以下式: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 代表的连续序列的形式提供各链 (重链和轻链) 的三个 CDR 区。当与 CDR 以所述顺序排列为连续序列时, 重链或轻链的 FR1、FR2、FR3 和 FR4 组合形成完整的构架区。优选, 本发明抗体的构架区是人、人源化的或基本上人来源的。

[0124] 在人源化抗体 (所述抗体在人中用于治疗用途) 中, 构架序列优选完全或基本上是人来源的 (即, 至少 90%、92%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的人来源)。优选本发明的人源化抗体、人抗体或嵌合抗体的轻链构架区示于图 9, 其由具有 SEQ ID NO:143 的 FR1、具有 SEQ ID NO:144 的 FR2、具有 SEQ ID NO:145 的 FR3 和具有 SEQ ID NO:146 或 147 的 FR4 组成。优选本发明的人源化抗体、人抗体或嵌合抗体的重链构架区示于图 10, 其由具有 SEQ ID NO:148 或 149 的 FR1、具有 SEQ ID NO:150 或 151 的 FR2、具有 SEQ ID NO:152 或 153 的 FR3、具有 SEQ ID NO:139 的 FR4 组成。例如抗体 3-74/C1E4 包含轻链可变区, 其含有具有 SEQ ID NO:143 的 FR1、具有 SEQ ID NO:9 的 CDR1、具有 SEQ ID NO:144 的 FR2、具有 SEQ ID NO:18 的 CDR2、具有 SEQ ID NO:145 的 FR3、具有 SEQ ID NO:25 的 CDR3 和具有 SEQ ID

NO:146 的 FR4。抗体 3-74/C1E4 还包含重链可变区,其含有具有 SEQ ID NO:149 的 FR1、具有 SEQ ID NO:40 的 CDR1、具有 SEQ ID NO:151 的 FR2、具有 SEQ ID NO:60 的 CDR2、具有 SEQ ID NO:153 的 FR3、具有 SEQ ID NO:72 的 CDR3 和具有 SEQ ID NO:139 的 FR4。在用于非人动物的抗体中,构架区序列可以基本上来源于人基因组(优选用在当期为胚胎或新生时的非人动物中)或来源于其中其被治疗性使用的动物的基因组。

[0125] 在一个实施方案中,本发明的抗肌抑制素抗体进一步的特征在于其为在体内或体外拮抗或中和至少一种肌抑制素的活性的嵌合抗体、人源化抗体或完全人抗体或其抗原结合部分,在所述抗肌抑制素抗体中,可变区的全部或部分受到此处的 SEQ ID NO 中所示的特定序列的限制。其中可变区的全部或部分受到此处的 SEQ ID NO 中显示的特定序列限制的本发明的抗肌抑制素抗体的进一步的特征在于如通过本领域内的技术例如通过竞争 ELISA 或通过 BIACORE 或 KINEXA 测定法测量的,其优先结合 GDF-8,超过与 GDF-11 的结合至少 20%、30%或 40%,从而证明抗体对 GDF-8 的亲和力比对 GDF-11 的高至少 20%、30%或 40%(即,更低的 K_D)。优选,其中可变区的全部或部分受到此处的 SEQ ID NO 中显示的特定序列限制的本发明的抗体的进一步的特征在于具有的对于肌抑制素的 K_D 低于大约 $4.2 \times 10^{-9}M$ 或 $4.0 \times 10^{-9}M$,优选低于大约 $4.6 \times 10^{-10}M$ 、 $4.0 \times 10^{-10}M$ 或 $2 \times 10^{-10}M$ 和更优选低于大约 $8 \times 10^{-11}M$ 、 $7 \times 10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 或 $1.4 \times 10^{-12}M$;或可选择地特征在于对于肌抑制素的 K_D 不高于大约 $4.2 \times 10^{-9}M$ 或 $4.0 \times 10^{-9}M$,优选不高于大约 $4.6 \times 10^{-10}M$ 、 $4.0 \times 10^{-10}M$ 或 $2 \times 10^{-10}M$ 和更优选不高于大约 $8 \times 10^{-11}M$ 、 $7 \times 10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 或 $1.4 \times 10^{-12}M$ 和/或进一步的特征在于在体外肌抑制素/SBE 报告基因测定中具有 IC_{50} 低于或等于大约 40nM、20nM 或 10nM,更优选低于或等于大约 5nM、4nM、3nM、2nM 或 1nM。

[0126] 甚至更优选,其中可变区的全部或部分受到此处的 SEQ ID NO 中显示的特定序列限制的本发明的抗肌抑制素抗体的进一步的特征在于在体外肌抑制素/SBE 报告基因测定中的 IC_{50} 低于或等于大约 40nM、30nM、25nM、20nM 或 10nM,更优选在体外肌抑制素/SBE 报告基因测定中低于或等于大约 5nM、4nM、3nM、2nM 或 1nM。甚至更优选,在体外肌抑制素/SBE 报告基因测定中,抗肌抑制素单克隆抗体的 IC_{50} 至少比抗体在体外 GDF-11/SBE 报告基因测定中的 IC_{50} 低至少大约 2 倍、3 倍或 4 倍(如此处实施例 5 中所描述的)。甚至更优选,其中可变区的全部或部分受到此处的 SEQ ID NO 中显示的特定序列限制的本发明的抗肌抑制素抗体的进一步的特征在于不结合由成熟的肌抑制素优选人肌抑制素的氨基酸 40-64(包括界限)、43-57 或 45-59 组成的肽。

[0127] 抗体的表达

[0128] 本发明还涉及表达本发明的抗肌抑制素单克隆抗体或其部分的细胞系。可使用本领域内已知的标准技术产生和分离产生本发明的单克隆抗体的细胞系。优选细胞系包括 COS、CHO、SP2/0、NS0 和酵母(可从公共保藏库(repository)例如 ATCC,美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),Manassas,VA 获得)。

[0129] 可使用广泛的宿主表达系统表达本发明的抗体,所述表达系统包括原核(细菌)和真核表达系统(例如酵母、杆状病毒、植物、哺乳动物和其他动物细胞、转基因动物和杂交瘤细胞)以及噬菌体展示表达系统。合适的细菌表达载体的实例是 pUC119,合适的真核表达载体是经修饰的具有减弱的 DHFR 选择系统的 pcDNA3.1 载体。其他抗体表达系统在本领域内也是已知的并且为此处所涉及。

[0130] 可通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白的轻链和重链基因来制备本发明的抗体。为了重组表达抗体,用一个或多个具有 DNA 片段(其编码抗体的免疫球蛋白轻链和/或重链)的重组表达载体对宿主细胞进行转化、转导、感染等等,从而使得轻链和/或重链在宿主细胞中表达。可在一个载体中从与重链和轻链有效连接的不同的启动子独立地表达重链和轻链,或可选择地,可在两个载体(一个表达重链,一个表达轻链)中从与重链和轻链有效连接的不同的启动子独立地表达重链和轻链。任选地可在不同的宿主细胞中表达重链和轻链。优选,将重组抗体分泌入培养宿主细胞的、从中可回收或纯化抗体的培养基。可使用标准的重组 DNA 方法获得抗体的重链和轻链基因,将这些基因掺入重组表达载体,并将所述载体导入宿主细胞。在例如 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis(编著), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 第 2 版, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; Ausubel, 等人(编著) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1989 中描述了这些标准的重组 DNA 技术。

[0131] 可通过将编码 HCVR 的 DNA 有效连接至编码重链恒定区(CH1、CH2 和 CH3)的另一种 DNA 分子来将分离的编码 HCVR 区的 DNA 转变成全长重链基因。人重链恒定区基因的序列在本领域内是已知的。参见,例如, Kabat, 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH 公开号 No. 91-3242 (1991)。可以例如通过标准的 PCR 扩增获得包含这些区域的 DNA 片段。重链恒定区可以是任何类型(例如, IgG、IgA、IgE、IgM 或 IgD)、种类(class)(例如, IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄)或亚类恒定区和 Kabat(同上)中描述的其任何异型变体。可选择地,抗原结合部分可以是 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、Fd 或单链 Fv 片段(scFv)。对于 Fab 片段重链基因,可将编码 HCVR 的 DNA 有效连接至只编码重链 CH1 恒定区的另一个 DNA 分子。

[0132] 可通过将编码 LCVR 的 DNA 有效连接至编码轻链恒定区 CL 的另一个 DNA 分子来将分离的编码 LCVR 区的 DNA 转变成全长轻链基因(以及转变成 Fab 轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列在本领域内是已知的。参见,例如, Kabat, 同上。可通过标准的 PCR 扩增获得包含这些区域的 DNA 片段。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区。

[0133] 为产生 scFv 基因,将编码 HCVR 和 LCVR 的 DNA 片段有效连接至编码柔性连接体(例如编码氨基酸序列 (Gly₄-Ser)₃)的另一个片段,这样 HCVR 和 LCVR 序列可以表达为连续的单链蛋白质,其中 LCVR 和 HCVR 通过柔性连接体连接。参见,例如, Bird, 等人, *Science* 242:423-6, 1988; Huston, 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83, 1988; McCafferty, 等人, *Nature* 348:552-4, 1990。

[0134] 为表达本发明的抗体,将如上所述获得的编码部分或全长轻链和/或重链的 DNA 插入表达载体以使基因有效连接至转录和翻译控制序列。选择与使用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达控制序列。可将抗体轻链基因和抗体重链基因插入分开的载体或更常见地,将两个基因插入相同的表达载体。通过标准方法将抗体基因插入表达载体。此外,重组表达载体可编码有助于抗肌抑制素单克隆抗体的轻链和/或重链从宿主细胞分泌的信号肽。可将抗肌抑制素单克隆抗体的轻链和/或重链基因克隆入载体以使信号肽符合读框地有效连接至抗体链基因的氨基末端。信号肽可以是免疫球蛋白的信号肽或异源信号肽。

[0135] 除了抗体的重链和/或轻链基因外,本发明的重组表达载体还携带控制宿主细胞

中抗体链基因的表达的调控序列。术语“调控序列”希望包括启动子、增强子和当需要时控制抗体链基因的转录或翻译的其他表达控制元件（例如，多腺苷酸化信号）。表达载体的设计（包括调控序列的选择）可以依赖于这样的因素例如待转化的宿主细胞的选择、希望的蛋白质的表达水平。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调控序列包括在哺乳动物细胞中指导高水平蛋白质表达的病毒元件，例如来自细胞巨细胞病毒（CMV）、猿猴病毒 40（SV40）、腺病毒（例如，腺病毒主要晚期启动子（AdMLP））和多瘤病毒的启动子和 / 或增强子。

[0136] 除了抗体的重链和 / 或轻链基因和调控序列外，本发明的重组表达载体还可具有额外的序列，例如在宿主细胞中调控载体的复制的序列（例如，复制起点）和一个或多个选择标记基因。选择标记基因有助于已导入载体的宿主细胞的选择。例如，通常选择标记基因在已导入载体的宿主细胞中提供对药物例如 G418、潮霉素或氨甲蝶呤的抗性。优选选择标记基因包括二氢叶酸还原酶（DHFR）基因（用于使用氨甲蝶呤进行选择 / 扩增的 DHFR 负型宿主细胞）、neo 基因（用于 G418 选择）和在 GS 阴性细胞系（例如 NS0）中用于选择 / 扩增的谷氨酰胺合成酶（GS）。

[0137] 为了表达轻链和 / 或重链，通过标准的技术例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染、转导、感染等将编码重链和 / 或轻链的表达载体导入宿主细胞。尽管理论上可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明的抗体，但真核细胞是优选的，最优选哺乳动物宿主细胞，因为此类细胞更可能装配和分泌正确折叠的和具有免疫活性的抗体。优选的用于表达本发明的重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢（CHO 细胞）（包括 Urlaub 和 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4216-20, 1980 中描述的、与例如 Kaufman 和 Sharp, J. Mol. Biol. 159 :601-21, 1982 中描述的 DHFR 选择标记一起使用的 DHFR-CHO 细胞）、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2/0 细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞时，通过一段时间培养宿主细胞来产生抗体，所述时间足以允许抗体在宿主细胞中表达或更优选允许抗体分泌入其中宿主细胞生长的培养基中。可使用标准的纯化方法从宿主细胞和 / 或培养基回收抗体。

[0138] 还可通过常规的技术将宿主细胞用于产生完整抗体的部分或片段例如 Fab 片段或 scFv 分子。本领域技术人员理解上述方法的变化在本发明的范围之内。例如，可能希望用编码本发明的抗体的轻链或重链的 DNA 转染宿主细胞。也可以使用重组 DNA 技术除去一些或所有编码对于结合肌抑制素不是必需的轻链或重链之一或轻链和重链二者的 DNA。本发明的抗体也包括从此类截短的 DNA 分子表达的分子。

[0139] 在用于本发明的抗体的重组表达的优选系统中，通过例如磷酸钙介导的转染将编码抗体的重链和抗体的轻链的重组表达载体导入 DHFR-CHO 细胞。在重组表达载体内，抗体的重链和轻链基因各自有效连接至增强子 / 启动子调控元件（例如，来源于 SV40、CMV、腺病毒等的调控元件，例如 CMV 增强子 / AdMLP 启动子调控元件或 SV40 增强子 / AdMLP 启动子调控元件）以驱动高水平基因转录。重组表达载体还具有 DHFR 基因，该基因允许使用氨甲蝶呤选择 / 扩增来选择已用载体转染的 CHO 细胞。培养选择的转化体宿主细胞以使抗体的重链和轻链表达，并且从培养基回收完整的抗体。使用标准的分子生物学技术制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化体、培养宿主细胞和从培养基回收抗体。本发明的抗体或其抗原结合部分可在动物（例如，小鼠）中表达，所述动物是人免疫球蛋白基因的转基因的动物（参见，例如，Taylor, 等人, Nucleic Acids Res. 20 :6287-95, 1992）。

[0140] 表达后,可按照本领域内的标准方法纯化本发明的完整抗体、其二聚体、单个轻链和重链或其他免疫球蛋白形式,所述方法包括硫酸铵沉淀法、离子交换层析、亲和层析、反相柱层析、疏水作用柱层析、凝胶电泳等。对于药物用途,至少大约 90%、92%、94%或 96%的同质性的基本上纯的免疫球蛋白是优选的,98 至 99%或更高的同质性是最优选的。在某种程度上纯化或纯化达到希望的同质性后,如此处指示的,则可治疗或预防性使用肽。

[0141] 嵌合抗体

[0142] 如此处所用的,术语“嵌合抗体”包括单价、二价或多价免疫球蛋白。单价嵌合抗体是通过二硫键将嵌合重链与嵌合轻链结合而形成的二聚体。二价嵌合抗体是两个重链-轻链二聚体通过至少一个二硫键结合而形成的四聚体。

[0143] 抗体的嵌合重链包含来源于对于肌抑制素是特异的非人抗体的重链的抗原结合区,该抗原结合区有效连接至人或基本上人(或与抗原结合区来源的物种不同的特种)的重链恒定区的至少一部分例如 CH1 或 CH2,或优选连接至全长重链恒定区。用在人中的抗体的嵌合轻链包含完全或基本上来源于对肌抑制素特异性的非人抗体的轻链的抗原结合区,该抗原结合区有效连接至人或基本上人(或与抗原结合区来源的物种不同的特种)的轻链恒定区(CL)的至少一部分,或优选连接至全长轻链恒定区。也可按照已知的方法步骤通过单个多肽链的恰当结合来制备具有嵌合重链和轻链的抗体、片段或衍生物,所述重链和轻链具有相同或不同的可变区结合特异性。

[0144] 通过该方法,将表达嵌合重链的宿主与表达嵌合轻链的宿主分开培养,分开回收免疫球蛋白链,然后使其结合。可选择地,可共培养宿主,使链在培养基中自发结合,然后回收装配的免疫球蛋白或片段。用于产生嵌合抗体的方法在本领域内是已知的(参见,例如,美国专利号:6,284,471、5,807,715、4,816,567 和 4,816,397)。

[0145] 人源化抗体

[0146] 优选用于治疗目的的本发明的抗体可具有来源于哺乳动物(其中所述抗体将被用作治疗剂)的构架区和恒定区的序列(达到其在抗体中存在的程度),以减少该哺乳动物引发针对治疗性抗体的免疫应答的可能性。人源化抗体是特别有益的,因为它们被认为对于治疗应用是有价值的并且避免在使用啮齿类动物的抗体的情况下经常观察到的人抗小鼠抗体应答。此外,在人源化抗体中,效应子部分是人的,这样其可更好地与人免疫系统的其他部分相互作用(例如,通过依赖于补体的细胞毒性或抗体依赖性细胞毒作用更有效地破坏靶细胞)。还有,注射的人源化抗体比例如鼠类抗体具有与天然发生的人抗体的半衰期更相似的半衰期,因而允许更少量和更低频率的给药。此处使用的术语“人源化抗体”是指包含不同来源的抗体的部分的抗体,其中至少一个部分是来源于人的。例如,人源化抗体可包含来源于具有必需的特异性的非人来源(例如小鼠)的抗体和来源于人来源的抗体的部分,所述部分通过常规技术(例如,合成)化学地连接在一起或使用基因工程技术作为连续多肽被制备。

[0147] 优选,“人源化抗体”具有来源于非人抗体(优选小鼠单克隆抗体)的 CDR,而构架区和恒定区(达到其存在的程度)(或其有意义的或实质的部分,即至少大约 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%)由存在于人种系免疫球蛋白区域(参见, the International ImMunoGeneTics 数据库)或存在于其重组或突变的形式中的核酸序列信息编码,无论所述抗体是否在人细胞中产生。可从人源化抗体 CDR 所来源的非人

亲本抗体的 CDR 优化该人源化抗体的 CDR, 以产生希望的性质例如特异性、亲和力和容量 (capacity)。当与亲本 CDR 相比时, 优化的 CDR 可具有氨基酸取代、添加和 / 或缺失。例如, 图 6 和 7 中中下划线标示和以粗体印刷的 CDR 的氨基酸位置是已从图 5 中显示的亲本 CDR 优化的位置。非人 (例如, 鼠类) 抗体的人源化形式包括完整的抗体、基本上完整的抗体、包含抗原结合位点的抗体部分, 或包含 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 或单链 Fv 片段的抗体部分。人源化抗体优选包含来源于非人免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体还可包含在接受体抗体和引入的 CDR 或构架序列中都未发现的残基。通常, 人源化抗体将基本上包含至少一个和通常两个可变结构域的全部, 在所述可变结构域中, CDR 区中的所有或基本上所有氨基酸对应于非人免疫球蛋白的 CDR 区, 并且 FR 区中的所有或基本上所有氨基酸是人免疫球蛋白共有序列的氨基酸。人源化抗体最好还包含至少免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的一部分, 通常为人免疫球蛋白的恒定区的部分。[Jones 等人, Nature, 321 :522-525 (1986) ; Riechmann 等人, Nature, 332 :323-329 (1988) ; 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2 : 593-596 (1992).]

[0148] 可使用本领域内常规使用的方法将人源化抗体进行体外诱变 (或, 当使用人 Ig 序列的转基因动物时, 进行体内体细胞诱变), 从而, 人源化重组抗体的 HCVR 和 LCVR 区的构架区氨基酸序列是这样的序列, 即当所述序列来源于与人种系 HCVR 和 LCVR 序列相关的序列时, 其可以是非天然地存在于体内人抗体种系库内。要理解人源化重组抗体的 HCVR 和 LCVR 的构架区的这些氨基酸序列与人种系序列至少 90%、92%、94%、95%、96%、98% 或最优选至少 99% 的同一。优选, 将保留亲本抗体 (例如, 鼠类抗体或通常从其衍生人源化抗体的抗体) 的维持或影响结合部位结构的那些构架残基。可通过例如亲本抗体或 Fab 片段的 X 射线晶体分析法鉴定这些残基, 从而鉴定抗原结合位点的三维结构。

[0149] 本发明的人源化抗体可包含或衍生自人种系轻链构架。在特定的实施方案中, 轻链种系序列选自人 VK 序列, 包括但不限于 A1、A10、A11、A14、A17、A18、A19、A2、A20、A23、A26、A27、A3、A30、A5、A7、B2、B3、L1、L10、L11、L12、L14、L15、L16、L18、L19、L2、L20、L22、L23、L24、L25、L4/18a、L5、L6、L8、L9、01、011、012、014、018、02、04 和 08。在某些实施方案中, 此轻链人种系构架选自 V1-11、V1-13、V1-16、V1-17、V1-18、V1-19、V1-2、V1-20、V1-22、V1-3、V1-4、V1-5、V1-7、V1-9、V2-1、V2-11、V2-13、V2-14、V2-15、V2-17、V2-19、V2-6、V2-7、V2-8、V3-2、V3-3、V3-4、V4-1、V4-2、V4-3、V4-4、V4-6、V5-1、V5-2、V5-4 和 V5-6。关于不同种系序列的描述, 参见 PCT W02005/005604。

[0150] 在其他实施方案中, 本发明的人源化抗体可包含或衍生自人种系重链构架。在特定的实施方案中, 该重链人种系构架选自 VH1-18、VH1-2、VH1-24、VH1-3、VH1-45、VH1-46、VH1-58、VH1-69、VH1-8、VH2-26、VH2-5、VH2-70、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-16、VH3-20、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-33、VH3-35、VH3-38、VH3-43、VH3-48、VH3-49、VH3-53、VH3-64、VH3-66、VH3-7、VH3-72、VH3-73、VH3-74、VH3-9、VH4-28、VH4-31、VH4-34、VH4-39、VH4-4、VH4-59、VH4-61、VH5-51、VH6-1 和 VH7-81。关于不同的种系序列的描述参见 PCT W0 2005/005604。

[0151] 在特定的实施方案中, 轻链可变区和 / 或重链可变区包含构架区或至少构架区的一部分 (例如, 包含 2 或 3 个亚区例如 FR2 和 FR3)。在某些实施方案中, 至少 FRL1、FRL2、FRL3 或 FRL4 是完全人的。在其他实施方案中, 至少 FRH1、FRH2、FRH3 或 FRH4 是完全人的。

在一些实施方案中,至少 FRL1、FRL2、FRL3 或 FRL4 是种系序列(例如,人种系)或包含特定构架的人共有序列。在其他实施方案中,至少 FRH1、FRH2、FRH3 或 FRH4 是种系序列(例如,人种系)或包含特定构架的人共有序列。在优选实施方案中,构架区是人构架区。

[0152] 通常,可这样产生人源化抗体,即获得编码抗体(例如鼠类抗体或通过杂交瘤产生的抗)的 HCVR 和 LCVR 的核酸序列(所述抗体结合本发明的肌抑制素表位),鉴定了所述 HCVR 和 LCVR(非人)中的 CDR,然后将编码该 CDR 的核酸序列嫁接至选择的编码人构架的核酸序列上。任选地,可通过随机诱变或在特定的位置进行诱变以在将 CDR 区嫁接入构架区之前在 CDR 中用不同的氨基酸取代一个或多个氨基酸来最优化 CDR 区。可选择地,使用本领域技术人员可获得的方法,可在插入人构架区之后优化 CDR 区。优选,选择人构架氨基酸序列以使所得的抗体可能适合在人中体内施用。这可基于例如包含该人构架序列的抗体的以前的施用进行确定。优选,人构架序列本身将不具有显著的免疫原性。

[0153] 可选择地,可将待人源化抗体的构架氨基酸序列与已知的人构架序列进行比较,所述人构架序列被用于 CDR- 嫁接,并以它们包含与结合肌抑制素的亲本抗体例如鼠类抗体的序列高度相似的序列为基础来被选择。已分离了许多人构架序列并且在本领域内报导了它们的序列。这增加了所得的 CDR 嫁接的人源化抗体将基本上保持亲本抗体的抗原结合结构,从而保持亲本抗体的结合亲和力的可能性,所述 CDR 嫁接的人源化抗体包含嫁接至选择的人构架(以及也可能有人恒定区)上的亲本(例如,鼠类)的 CDR 或亲本抗体的优化的 CDR。为保持显著程度的抗原结合亲和力,选择的人构架区优选是预期适合用于体内施用即非免疫原性的构架区。

[0154] 在任一方法中,获得编码优选鼠类抗肌抑制素抗体的 HCVR 和 LCVR 区的 DNA 序列。用于克隆编码免疫球蛋白的核酸序列的方法在本领域内是熟知的。此类方法可以例如包括使用合适的引物通过聚合酶链式反应(PCR)扩增待克隆的免疫球蛋白编码序列。文献中已报导了适合于扩增免疫球蛋白核酸序列,并且特别是鼠类 HCVR 和 LCVR 序列的引物。在克隆这样的免疫球蛋白编码序列后,通过本领域内熟知的方法对其进行测序。

[0155] 在将编码 CDR 的序列嫁接至选择的编码人构架的序列上后,则表达所得的编码“人源化”可变重链序列和可变轻链序列的 DNA 序列以产生结合肌抑制素的人源化 Fv 或人源化抗体。人源化 HCVR 和 LCVR 可表达为完整的抗肌抑制素抗体分子的一部分,即,表达为与人恒定结构域序列的融合蛋白,所述人恒定结构域序列的 DNA 编码序列可从商购可获得的文库获得或使用例如上述用于获得 DNA 序列的方法中或本领域内的一种方法获得。然而,HCVR 和 LCVR 序列也可在恒定序列不存在的情况下表达,从而产生人源化抗肌抑制素 Fv。然而,人恒定序列至可变区的融合是潜在想要的,因为所得的人源化抗肌抑制素抗体可具有人效应子作用。

[0156] 用于合成编码已知序列的蛋白质的 DNA 的方法在本领域内是熟知的。通过使用这样的方法,合成编码主(subject)人源化 HCVR 和 LCVR 序列(与或不与恒定区)的 DNA 序列,然后将其在适合用于重组抗体表达的载体系统中进行表达。这可在任何载体系统中实现,所述载体系统提供了以与人恒定结构域序列的融合蛋白形式表达并且结合以产生功能性(抗原结合)抗体或抗体片段的主人源化 HCVR 和 LCVR 序列。

[0157] 人恒定结构域序列在本领域内是熟知的,并且已在文献中进行了报导。优选人恒定轻链序列包括 κ 和 λ 恒定轻链序列。优选人恒定重链序列包括人 IgG₁、人 IgG₂、人 IgG₃、

人 IgG₄ 和提供改变的效应子作用（例如增加的体内半衰期、减少的 Fc 受体结合、改变的脱酰胺作用谱等）的其突变形式。

[0158] 如果存在，人构架区优选来源于人抗体可变区，其具有与抗原结合区供体（即，亲本抗体）的类似或相当区域的序列相似性。人源化抗体的来源于人的部分的构架区的其他来源包括人可变共有序列（参见例如，Kettleborough, C. A. 等人 Protein Engineering 4 : 773-783(1991) ;Carter 等人, WO 94/04679。例如，如 Kabat 等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, NIH, U. S. Government Printing Office(1991) 中所述，可将用于获得非人部分的抗体或可变区的序列与人序列比较。在特别优选的实施方案中，人源化抗体链的构架区来源于人可变区，所述可变区与非人供体的可变区具有至少大约 60% 的总的序列同一性，优选至少大约 70% 的总的序列同一性和更优选至少大约 85% 的总的序列同一性。人部分也可来源于人抗体，所述人抗体当与非人供体的相当部分（例如，FR）相比时在使用s的特定部分（例如，FR）内具有至少大约 65% 的序列同一性和优选至少大约 70% 的序列同一性。。

[0159] 另外描述的可使用的涉及人源化小鼠抗体的方法的参考文献是例如 Queen 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :2869, 1991 ;美国专利号 5, 693, 761 ;美国专利号 4, 816, 397 ;美国专利号 5, 225, 539 ;Levitt, M. , J. Mol. Biol. 168 :595-620, 1983 中描述的计算机程序 ABMOD 和 ENCAD ;可基本上按照 Winter 和其同事的方法进行人源化 [Jones 等人, Nature, 321 :522-525(1986) ;Riechmann 等 人, Nature, 332 :323-327(1988) ;Verhoeyen 等 人, Science, 239 :1534-1536(1988)]。

[0160] 人抗体

[0161] 作为人源化的另一选择，可产生人抗体。可使用本领域内已知的多种技术包括噬菌体展示文库产生人抗体。Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol. , 227 :381(1991) ;Marks 等人, J. Mol. Biol. , 222 :581(1991)。Cole 等人和 Boerner 等人的技术也可用于人单克隆抗体的制备。Cole 等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 第 77 页 (1985) 和 Boerner 等人, J. Immunol. , 147(1) :86-95(1991)。类似地，可通过将人免疫球蛋白基因座导入转基因动物例如其中内源免疫球蛋白基因已被部分或完全失活的小鼠来制备人抗体。在例如用包含本发明的免疫原性表位的抗原免疫后，获得在所有方面（包括基因重排、装配和抗体谱）与人中看到的非常相似的完全人抗体产生谱。在例如美国专利号 5, 545, 807、5, 545, 806、5, 569, 825、5, 589, 369、5, 591, 669、5, 625, 126、5, 633, 425、5, 661, 016 和下列科学出版物 :Marks 等人, BioTechnology 10 :779-783, 1992 ;Lonberg 等人, Nature 368 :856-859, 1994 ;Morrison, Nature 368 :812-13, 1994 ;Fishwild 等 人, Nature Biotechnology 14 :845-51, 1996 ;Neuberger, Nature Biotechnology 14 :826(1996) ;Lonberg 和 Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 :65-93(1995) 和 Jobkobovits 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551, 1993 中描述了该方法。

[0162] 也在 Bruggemann 等人 Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86 :6709-6713(1989) 中描述了将人免疫球蛋白基因导入小鼠从而产生能够通过具有人序列的抗体对抗原应答的转基因小鼠。存在几种用于生成产生人抗体的哺乳动物的策略。特别地，存在“微小基因座”方法，在该方法中通过包含来自 Ig 基因座的片段（单个基因）（参见，例如，美国专利 5, 545, 807、5, 545, 806、5, 625, 825、5, 625, 126、5, 633, 425、5, 661, 016、5, 770, 429、

5,789,650 和 5,814,318、5,612,205、5,721,367、5,789,215)、YAC 导入 Ig 基因座的大的和基本上的种系片段[见 Mendez 等人 *Nature Genetics* 15:146-156(1997), Green 和 Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495(1998)]以及通过使用微细胞融合导入完整的或基本上完整的基因座(参见欧洲专利申请号 EP 0 843961 A1)来模拟外源 Ig 基因座。

[0163] 当使用本领域技术人员可获得的方法时,例如当用包含本发明的免疫原性表位的多肽免疫任何转基因小鼠(所述小鼠能够通过具有人序列的抗体应答)时,该小鼠可用于产生本发明的抗肌抑制素抗体。

[0164] 用途

[0165] 本发明的抗体用于此处描述的治疗、预防和研究应用。本发明的抗体可用于诊断与人肌抑制素的表达相关的障碍或疾病。以相似的方式,可在测定中使用本发明的抗体监控进行肌抑制素相关性病症治疗的受试者的肌抑制素水平。研究应用包括利用本发明的抗体和标记来检测样品中例如人体液中或细胞或组织提取物中的肌抑制素的方法。可使用具有修饰或不具有修饰的本发明的抗体,并且通过可检测部分的共价附着或非共价附着标记所述本发明的抗体。可检测部分可以是能够直接或间接产生可检测信号的任何部分。例如,可检测部分可以是放射性同位素例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I 、荧光化合物或化学发光化合物例如异硫氰酸荧光素、罗丹明或萤光素;或酶例如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶。可使用本领域内已知的用于将抗体分开缀合至可检测部分的任何方法,包括由 Hunter, 等人, *Nature* 144:945,1962;David, 等人, *Biochemistry* 13:1014,1974;Pain, 等人, *J. Immunol. Meth.* 40:219,1981;和 Nygren, *J. Histochem. And Cytochem.* 30:407,1982 描述的方法。

[0166] 许多种用于测量肌抑制素的常规方案包括例如 ELISA、RIA 和 FACS 在本领域内是已知的,其提供了诊断肌抑制素的表达的改变的或异常的水平的基础。使用本领域内已知的任何技术例如通过将包含肌抑制素多肽的样品与例如抗体在适合形成抗原:抗体复合物的条件下结合来确定正常或标准的表达值。用可检测的物质直接或间接地标记抗体以帮助检测结合或未结合的抗体。合适的可检测的物质包括多种酶、辅基、荧光材料、发光材料和放射性材料。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉抗生物素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺(dichlorotriazinylamine) 荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺;以及放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。(参见,例如,Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987))。通过不同的方法例如光度测定法定量所形成的标准复合物的量。然后将在样品中表达的肌抑制素多肽的量与标准值对比。

[0167] 为方便起见,可在试剂盒中提供本发明的抗体,所述试剂盒是预先确定的量的试剂和进行诊断测定的说明书的包装组合。当用酶标记抗体时,试剂盒将包含底物和酶所需要的辅因子(例如,提供可检测的发色团或荧光基团的底物前体)。此外,可以包括其他添加剂例如稳定剂、缓冲液(例如,封闭缓冲液或裂解缓冲液)等。可以宽泛地变化多种试剂的相对量以提供基本上使测定的灵敏度最优化的试剂的溶液浓度。特别地,可以以干粉(通常为冻干的)的形式提供包含赋形剂的试剂,所述试剂在溶解后可提供具有合适浓度的试剂溶液。

[0168] 抗体的治疗用途

[0169] 肌抑制素在肌肉的发育和许多相关的障碍或疾病中起着重要作用。在成人中，主要在骨骼肌中检测到肌抑制素 mRNA，虽然也在脂肪组织和心脏组织中也发现更低的浓度 (Sharma, M., 等到, J. Cell Physiol. 180 :1, 1999)。肌抑制素敲除小鼠具有比它们的野生型同胞仔高 2 至 3 倍的肌肉质量。增加的肌肉质量是纤维过度生长和超常增生造成的 (McPherron, A., 等人 Nature 387 :83-90, 1997 和 Zhu, X. 等人, FEBS Letters 474 :71)。此外，肌抑制素敲除小鼠积累了比其野生型同胞仔更少的脂肪，但表现正常和健康。最近也显示肌抑制素是脂肪生成的重要调节物 (Rebbapragada, A., 等人, Mol. and Cell. Bio. 23 : 7230-7242, 2003)。此外，近来已在肌抑制素缺陷型小鼠中研究了骨结构和含量 (Hamrick M. W., 等人, J. Orthopaedic Research 21 :1025, 2003 ; Hamrick, M. W., 等人, Calcif Tissue Int 71 :63, 2002)。

[0170] 因此，包含本发明的抗肌抑制素单克隆抗体的药物组合物可用于增加肌肉质量，增加骨的密度，减少肌萎缩，或可用于治疗或预防其中肌抑制素的存在引起或促成不希望的病理效应或肌抑制素水平的减少在哺乳动物（优选人）中具有治疗益处的病症，包括但不限于肌萎缩、肌肉损伤、手术、被损伤的肌肉的修复、虚弱、年龄相关少肌症、废用性萎缩、骨质疏松症、骨关节炎、韧带生长和修复、肥胖症、体脂肪积累的抑制、肥胖症、任何类型的肌营养不良、重症监护性肌病 (critical care myopathy)、酒精中毒性肌病、恶病质（例如，癌症相关性或 HIV 诱导的或由 COPD、慢性肺病、从脓毒症的恢复、肾衰竭、肝衰竭、心力衰竭或疾病引起的）、代谢综合征、烧伤后肌萎缩和 II 型糖尿病。废用性萎缩可由许多因素或偶然事件造成，所述因素或偶然事件包括导致长期不能运动 (prolonged immobility) 或废用或卧床休养的任何障碍或疾病或状态，包括但不限于实体器官 (solid organ) 移植、关节置换术、中风、脊髓损伤、从重度烧伤恢复、久坐的慢性血液透析 (sedentary chronic hemodialysis)、脓毒症后恢复和暴露于微重力。因为肌抑制素在序列和功能上是跨物种高度保守的，因此本发明的抗体可用于增加肌肉质量，增加骨的密度或治疗或预防非人哺乳动物或禽类物种 [例如，家养动物（例如，狗和猫）、运动动物（例如，马）、食物来源动物（例如，牛、猪和羊）、禽类物种（例如，鸡、火鸡、其他猎禽或家禽）] 中的病症，其中肌抑制素的存在引起或促成不希望的病理效应或肌抑制素水平的降低具有治疗益处。

[0171] 此处涉及本发明的抗肌抑制素单克隆抗体用于治疗或预防至少一种上述疾病的用途，在所述疾病中肌抑制素的活性是有害的或其受益于生物活性肌抑制素的水平降低。此外，涉及本发明的抗肌抑制素单克隆抗体用于药物制造的用途，所述药物用于治疗至少一种上述病症。

[0172] 如此处所用的，术语“治疗”、“进行治疗”等是指获得希望的药理学和 / 或生理学效应。就完全或部分地预防疾病或其症状而言，效应可以是预防性的和 / 或就部分或完全治愈疾病和 / 或可归因于该疾病的不利影响而言效应是治疗性的。如此处使用的，“治疗”包括施用本发明的化合物以治疗哺乳动物特别是人中的疾病或病症，并且包括：(a) 在可以是对该疾病易感但还未被诊断为患有其的受试者中预防疾病发生；(b) 抑制疾病，即，使其停止发展；和 (c) 减轻疾病，即，使疾病或障碍消退或减轻其症状或并发症。可调整剂量方案以提供最适宜的希望的应答（例如，治疗性或预防性应答）。例如，可施用快速灌注射剂 (single bolus)，可在一段时间内施用几次分开的剂量或可按照治疗状况的紧迫性所指示

的按比例减少或增加剂量。

[0173] 药物组合物

[0174] 可将本发明的抗体掺入适合用于给受试者施用的药物组合物中。本发明的化合物可以以单剂量或多剂量的单独地或与可药用的载体、稀释剂和 / 或赋形剂组合施用。设计适合用于选择的施用模式的用于施用的药物组合物,根据需要使用可药用的稀释剂、载体、和 / 或赋形剂例如分散剂、缓冲剂、表面活性剂、防腐剂、增溶剂、等渗剂、稳定剂等。按照例如 Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, Gennaro, 编著, Mack Publishing Co., Easton, PA 1995 (其提供了对于医生通常是已知的配制剂技术的概要) 中的常规技术设计所述组合物。

[0175] 可通过使用标准的施用技术 (包括口服、静脉内、腹膜内、皮下、肺的、经皮肤、肌肉内、鼻内、口腔、舌下或栓剂施用) 对处于此处描述的病状的风险中或展示所述病状的受试者施用包含本发明的抗肌抑制素单克隆抗体的药物组合物。

[0176] 本发明的药物组合物优选是“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的抗体。“治疗有效量”是指在必要的剂量和时间的情况下有效地获得希望的治疗结果的量。抗体的治疗有效量可根据因素例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体或抗体部分在个体中引发希望的应答的能力而变化。治疗有效量也是其中抗体的治疗有益效应超过其任何毒性或有害效应的量。“预防有效量”是指在必要的剂量和时间的情况下有效地获得希望的预防结果的量。通常,由于在疾病之前或在疾病的早期将预防性剂量用于受试者,因此预防有效量将低于治疗有效量。

[0177] 治疗有效量或预防有效量是至少为受试者提供治疗益处所必需的活性剂的最低剂量,但低于毒性剂量。换言之,本发明的抗体的治疗有效量是在哺乳动物优选人中增加肌肉质量、增加骨的密度或治疗病症的量,所述病症中,肌抑制素的存在引起或促成不希望的病理效应或肌抑制素水平的减少在哺乳动物优选人中导致有益的治疗效应,所述病症包括但不限于肌萎缩、肌肉损伤、术后虚弱 (surgery frailty)、年龄相关少肌症、废用性萎缩、骨质疏松症、骨关节炎、韧带生长和修复、肥胖症、体脂肪积累的抑制、任何类型的肌营养不良、重症监护性肌病、恶病质 (例如,癌症相关性或 HIV 诱导的或由 COPD、肾衰竭、肝衰竭、心力衰竭或疾病引起的)、代谢综合征和 II 型糖尿病。废用性萎缩可由许多因素或偶然事件造成,所述因素或偶然事件包括导致长期不能运动或废用或卧床休养的任何障碍或疾病或状态,包括但不限于实体器官移植、关节置换术、中风、脊髓损伤、从重度烧伤恢复、久坐的慢性血液透析、脓毒症后恢复和暴露于微重力。

[0178] 本发明抗体的施用途径可以是口服、肠胃外、通过吸入或局部的。优选,可将本发明的抗体掺入适合用于肠胃外施用的药物组合物。此处使用的术语肠胃外包括静脉内、肌肉内、皮下、直肠、阴道或腹膜内施用。通过静脉内或腹膜内或皮下注射进行的外周全身性递送是优选的。用于这样的注射的合适的媒介物在本领域内是已知的。

[0179] 药物组合物通常在制造和在提供的容器 (包括例如密封的小瓶或注射器) 中贮存,的条件下必须是无菌的和稳定的。因此,在产生制剂后可对药物组合物进行过滤灭菌或使其是微生物学可接受的。用于静脉内输注的典型组合物可具有多至 250-1000ml 的液体 (例如无菌林格 (Ringer) 溶液、生理盐水、葡萄糖溶液和 Hank 溶液) 体积和治疗有效剂量 (例如,1 至 100mg/mL 或更高) 的抗体浓度。剂量可依赖于疾病的类型和严重程度而变化。如在

医学领域内所熟知的,用于任何一个受试者的剂量依赖于许多因素,包括患者的身材大小、体表面积、年龄、待施用的特定化合物、性别、施用的时间和途径、总体健康状况和同时施用的其他药物。典型剂量可以在例如 0.001 至 1000 μg 的范围内;然而,低于或高于该示例范围的剂量是可以预期的,特别是考虑到上述因素时。日常肠胃外给药方案可以是每天大约 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至大约 100mg/kg 的总体重,优选大约 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 10mg/kg 和更优选大约 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 1mg/kg,甚至更优选大约 0.5 至 10mg/kg 的体重。通过定期估量来监控进程。对于在数天或更长时间内的重复施用,根据病症,重复治疗直至发生希望的疾病症状的抑制。然而,其他给药方案可以是有用的,并且不能由此排除。根据医生希望获得的药物动力学衰减模式,可通过抗体的单次推注施用、多次推注施用或连续输注施用来递送希望的剂量。

[0180] 对抗体的这些建议的量进行大量的治疗性判断。选择合适的剂量和日程中的关键因素是获得的结果。本文中考虑的因素包括正进行治疗的特定疾病、被治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床情况、疾病的病因、抗体递送的位置、抗体的特定类型、施用方法、施用日程和医生已知的其他因素。

[0181] 可将本发明的治疗剂冷冻或冻干以进行贮存和在使用之前将其在合适的无菌载体中重建。冻干和重建可导致不同程度的抗体活性丢失。可能需要调整剂量来补偿。通常, pH6 至 pH8 是优选的。

[0182] 制造品

[0183] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含用于治疗或预防上述疾病或病症的材料的制造品。制造品包括容器和标签。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器和试管。可用许多种材料例如玻璃或塑料形成容器。容器装有对于预防或治疗疾病或病症是有效的本发明的组合物并且可具有无菌入口(例如容器可以是静脉内施用溶液袋(intravenous solution bag)或具有可用皮下注射针穿透的塞子的小瓶)。组合物中的活性剂是本发明的抗肌抑制素抗体。容器上的或与其连接的标签标明组合物用于治疗选择的病病症。制造品还可包含第二容器,所述第二容器包含可药用的缓冲液例如磷酸缓冲的盐溶液、林格溶液和葡萄糖溶液。其还可包含在商业和用户立场考虑希望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器和具有使用说明的说明书。

[0184] 仅以举例说明的目的提供下列实施例,并且不希望其以任何方式限定本发明的范围。

[0185] 实施例

[0186] 实施例 1:ELISA 测定法

[0187] A. 肌抑制素和 GDF-11 包被的平板

[0188] 在 ELISA 测定中检测本发明的小鼠/人嵌合抗肌抑制素 Fab,在所述测定法中测量 Fab 对以不同浓度包被在 96 孔上的成熟的肌抑制素(二聚体形式)的结合。

[0189] 用 50 μl 人重组肌抑制素(安迪生物有限公司(R&D systems),无载体的,首先重悬于 4mM HCl 中,然后以在碳酸盐缓冲液, pH 9.6 中 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 进行包被)或 50 μl 重组人 GDF-11(派柔泰克有限公司(Peprotech, Inc.),货号 120-11,无载体的,首先重悬于 4mM HCl 中,然后以在碳酸盐缓冲液, pH 9.6 中的 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 进行包被)包被两个 96 孔板的各孔。将平板在 4°C 下温育过夜。抽吸孔,用 PBST(PBS+0.1% Tween-20)洗涤 2 次。用每孔 200 μl 封闭缓冲液(1%的 PBST 中的 BSA,进行 1 小时)封闭平板。

[0190] 将待检测的来自周质提取物 (periplasmic extract) 的 Fab 连续稀释入 PBST。向 GDF-8 和 GDF-11 包被的平板柱 (plate column) 中加入 50 微升的各 Fab 溶液。将平板在室温下温育 1 小时。然后用 PBST 洗涤孔 3 次。

[0191] 向各孔加入碱性磷酸酶缀合的二抗 (50 μ l 以 1 : 1000 在 PBST 中稀释的山羊抗小鼠 κ AP (南方生物技术公司 (Southern Biotech)))，并且在室温下温育 30 分钟。然后用 PBST 洗涤孔 3 次。向各孔加入 50 微升的显色底物 (AMP/PMP)，然后让其在室温下显色。以 560nm 的 OD 读取孔的吸光度。对于各 Fab，获得滴定曲线，并且报告了参照 Fab 的曲线的中点 (mid point) 处的相对 OD。

[0192] 这些数据证明所有受试 Fab 结合与平板结合的人成熟肌抑制素，与 GDF11 发生交叉反应。

[0193] B. Fab 捕获 ELISA

[0194] 用 50 μ l 在碳酸盐缓冲液中的 2 μ g/ml 的山羊抗人 κ 抗体包被 96 孔板。将平板在 4°C 下温育过夜。抽吸孔，并用 PBST (PBS+0.1% Tween-20) 洗涤 2 次。用每孔 200 μ l 封闭缓冲液 (PBST 中 1% 的 BSA，进行 1 小时) 封闭平板。

[0195] 将待检测的来自周质提取物的 Fab 在 37°C 下在平板上的柱子中 2 小时以进行捕获。在用 PBST 洗涤 3 次后，向捕获的 Fab 的各柱子中加入 50 μ l 12 倍连续稀释的生物素化肌抑制素 (从 100nM 至 780pM)，并且在 37°C 下温育 1 小时。然后用 PBST 洗涤平板，在 37°C 下与 PBST 一起温育 1 至 3 小时。

[0196] 向各孔加入碱性磷酸酶缀合的 Neutravidin (皮尔斯公司 (Pierce)，以 1 : 1000 在 PBST 中稀释的)，然后在室温下温育 2 分钟。然后用 PBST 洗涤孔 3 次。向各孔加入 50 微升的显色底物 (AMP/PMP)，然后让其在室温下显色。以 560nm 的 OD 读取孔的吸光度。报导了与参照 Fab 的最大 OD 的吸光度相比的相对 OD。

[0197] 所有受试的本发明的 Fab 都结合可溶性的人成熟肌抑制素。

[0198] 实施例 2 肌抑制素中和测定

[0199] 通过标准的方法从阶段 8-9 囊胚期爪蟾胚胎取出外胚层外植体并将其在 18°C 下在 0.5 $\times$ MBS (1 $\times$ MBS : 88mM NaCl、1mM KCl、0.7mM CaCl₂、1mM MgSO₄、5mM HEPES、2.5mM NaHCO₃、1 : 1000v/v 艮他霉素、0.1% 牛血清清蛋白) (加入了生长因子 (GDF8 或 GDF11) 的以 + 标示或指明) 中培养 18 小时，经历该时间，对照胚胎达到早期神经胚期 (阶段 15-16)。对外植体照相，并且使用设计用于动物冠定量的图像分析算法测量各外植体的长度。未用生长因子或 Fab (对照) 处理的外植体长成球形表皮。肌抑制素和 GDF-11 在这些外胚层外植体中诱导使外植体延长并且形成哑铃状结构的中胚层。当就中和活性进行检测时，在整个培养期长度中将抗体或 Fab 加入含有肌抑制素的培养基中，然后估量它们抑制生长因子诱导的延伸运动的能力。以 25ng/ml 向外植体加入肌抑制素。以 20 μ g/ml 加入待测试的抗体或 Fab。将针对无关抗原产生的 Fab 用作对照。可将商购可获得的单克隆抗小鼠 GDF8 抗体作为对照进行检测，这一抗体在用纯化的小鼠 GDF8 免疫的山羊中产生，并由厂商证明当以大约 10-20 μ g/ml 的存在时，中和由 25ng/ml 的鼠类 GDF8 引发的爪蟾动物冠的延伸 (安迪生物有限公司 (R&D Systems) 货号 MAB788)。

[0200] ImagePro (v4. 5. 1. 22, 来自美迪赛博公司 (Media Cybernetics)) 用于图象处理。写入宏指令以使图像处理自动化。宏指令处理图像和记录以比特为单位的长度。如本领域

内已知的可使用可供选择的测量方法。本发明的抗体在动物冠测定中涉及中和 GDF8 的活性。

[0201] 实施例 3 :Fab 的亲合力测量

[0202] 使用包含 CM4 传感器芯片的 **BIAcore**[®] 2000 仪器测量本发明的抗肌抑制素 Fab 的亲合力 (K_D) 和 k_{on} 以及 k_{off} 率。**BIAcore**[®] 利用表面等离子共振的光学性质来检测葡聚糖生物传感器基质中的相互作用的分子的蛋白质浓度的改变。除了已指出的,所有试剂和材料均购自百克 AB 公司 (**BIAcore**[®] AB) (Upsala, Sweden)。在 25°C 下进行所有测量。将包含 Fab 的样品溶解在 HBS-EP 缓冲液 (150mM 氯化钠、3mM EDTA、0.05% (w/v) 表面活性剂 P-20 和 10mM HEPES, pH7.4) 中。使用氨偶联化学将肌抑制素或 GDF-11 (安迪生物有限公司 (R&D Systems)) 固定在 CM4 芯片的流动室上。使用 0.1M N-羟基琥珀酰亚胺和 0.1M 3-(N,N-二甲氨基) 丙基-N-乙基碳二胺的 1 : 1 混合物以 20 μ l/ 分钟的流速活化流动室 (1-4)。以 10 μ l/ 分钟的流速,对单个流动室手动注射肌抑制素或 GDF-11 (在 10mM 醋酸钠中的 2.5 μ g/mL, pH4.5)。监测表面密度,直至各流动室达到大约 150 个反应单位 (RU) 的表面密度。用 50 μ l 1M 乙醇胺-HCl, pH8.5 (10 μ l/ 分钟) 的注射封闭表面。为确保完全除去任何非共价结合的肌抑制素或 GDF-11,两次注射 15 μ l 的 10mM 甘氨酸, pH1.5。用于动力学实验的运行缓冲液包含 10mM HEPES, pH7.4、150mM NaCl、0.005% P20。

[0203] 在最大流速 (100 μ l/ 分钟) 进行动力结合数据的收集。各分析循环由 : (i) 对所有 4 个流动室进行 250 μ l Fab (以 2 倍的稀释增量 (dilution increment) 从 50nM 至 0.4nM 的浓度范围) 注射,其中以流动室 1 作变参照流动室 ; (ii) 20 分钟的解离 (缓冲液流动), (iii) 通过两次 15 μ l 10mM 甘氨酸, pH1.5 的注射再生 GDF-8 或 GDF-11 表面, (iv) 15 μ l 运行缓冲液的空白注射,和 (v) 在下一个循环开始之前进行 2 分钟的稳定时间。按照流动室 2 减去流动室 1, 流动室 3 减去流动室 1 和流动室 4 减去流动室 1 来监控信号。以随机的顺序一式两份注射样品和缓冲液空白。使用 SCRUBBER (生物分子相互作用分析中心 (Center for Biomolecular Interaction Analysis), Univ. of Utah) 软件处理数据。通过使用 ClampXP (生物分子相互作用分析中心, Univ. of Utah) 将生物传感器数据拟合简单的关联模型来确定每一个循环的结合和解离率,从而得出 k_{on} 和 k_{off} 速率常数 ; 使用关系式 $K_d = k_{off}/k_{on}$ 计算平衡结合常数 K_d 。当在上面的测定中测量时, Fab 41-1 和 412-6 分别具有 4.16nM (4.16×10^{-9} M) 和 0.46nM (4.6×10^{-10} M) 的对于 GDF-8 的亲合力,以及分别具有 8.96nM 和 0.81nM 的对于 GDF-11 的亲合力 ; 相对于 GDF-11, 两种 Fab 对于 GDF-8 的相对特异性都优先大约 2 倍。(表 2)

[0204]

表 2

[0205]

Fab	GDF-8			GDF-11		
	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$ ($\times 10^{-6}$)	$k_{off} (sec^{-1})$ ($\times 10^3$)	$K_d (nM)$ 计算值	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$ ($\times 10^{-6}$)	$k_{off} (sec^{-1})$ ($\times 10^3$)	$K_d (nM)$ 计算值
41-1	1.16	4.82	4.16	1.04	9.32	8.96
412-6	3.59	1.66	0.46	5.09	4.10	0.81

[0206] 实施例 4 :Mab 的亲合力的测量

[0207] 使用 Sapidyne KINEXA 测定法确定本发明的全长单克隆抗体的结合亲和力测量。使用本发明的抗体预包被 NHS 激活的快速流动琼脂糖珠子 (GE 健康护理公司 (GE Healthcare)) (每 ml 的珠子 50 μ g 抗肌抑制素抗体), 并且用 1M Tris-HCl, pH8.0 中的 10mg/ml BSA 进行封闭。然后在室温下将 2pM、4pM 和 40pM 的本发明的抗体 (例如 3-74/C1E4) 与不同浓度 (例如, 2.4pM 至 10nM, 连续稀释) 的肌抑制素一起在运行缓冲液 (PBS、0.005% (v/v) Tween-20 和 1mg/ml 卵清蛋白) 中温育 10 小时。为确定平衡时游离抗体的存在, 使各样品通过包被肌抑制素的珠子。然后通过使在运行缓冲液中以 1 : 4000 稀释的荧光 (Cy5) 标记的山羊抗人 Fc 抗体 (杰克免疫研究公司 (Jackson Immuno Research)) 的溶液通过珠子来定量结合珠子的抗体的量。测量的荧光信号与平衡时游离抗体的浓度成正比。以一式两份测量肌抑制素的各浓度。使用多重曲线、单点同质结合模型 (one-site homogeneous binding model) (KINEXA 软件) 从竞争曲线的非线性回归获得平衡解离常数 (K_D)。

[0208] 也使用 Sapidyne KINEXA 测定确定 GDF-8 的结合速率常数 (k_{on})。使用上述的相同条件将 2pM 的抗体与 20pM GDF-8 混合。在不同的时间上, 使用上述的用于平衡结合的条件就游离的抗体探测样品, 然后使用 KINEXA 软件使所得的时间依赖性拟合以确定结合速率 (k_{on})。使用表达式 $k_{off} = K_D \times k_{on}$ 计算解离速率常数 (k_{off})。使用描述的测定法测量全长单克隆抗体 3-74/C1E4 (有效连接至 IgG₄ Fc 区), 获得的结果描述于下面的表 3 中。

[0209]

表 3

[0210]

Mab	K_D , pM (95% CI)	K_{on} , $M^{-1}s^{-1}$ (95% CI)	计算的 K_{off} , s^{-1}
3-74/C1E4	1.39 (0.20–3.58)	1.49×10^6 (1.39 – 1.58×10^6)	2.08×10^{-6}

[0211] 实施例 5 肌抑制素 /SBE 报告基因测定法

[0212] 在该报告基因测定中, 当分子例如肌抑制素、GDF-11 或其他 TGF- β 超家族成员结合其自身受体从而触发产生能够结合 SBE 的磷酸化 SMAD 复合物的 SMAD 信号传导时, 编码 SMAD 结合元件 (“SBE”) (更具体地 (CAGA)₁₂) 下游的报告基因 (即萤光素酶基因) 的质粒表达萤光素酶蛋白质。以前报导 CAGA 序列为 TGF- β 诱导的基因 PAI-1 的启动子内的 TGF- β 应答序列 (Denner 等人, EMBO J., 17:3091–3100, 1998)。暴露于细胞的活性肌抑制素的量与产生的萤光素酶的量直接成正比, 所述萤光素酶的量与产生的并且为可测量的光量直接成正比。抑制剂 (例如, 结合肌抑制素的抗体) 的存在减少了能够激活 SBE 的肌抑制素的量, 这最终导致光的产生减少。在此处引用的国际公开号 WO 2004/037861 中也描述了该测定法。

[0213] 要了解肌抑制素 /SBE 报告基因测定法不限于此处描述的确定的条件, 也可使用其他类型的细胞, 例如 293HEK (ATCC) 或 A204 Rhabso 肌肉瘤细胞 (Rhabdomyosarcoma cell) (参见, 例如, Whittemore, 等人 BBRC, 200:965–71, 2003); 可使用其他类型的报告基因例如 CAT、 β -gal、GFP 和用于细胞生长的其他生长条件和测定条件, 包括在反应中可使用不同量的肌抑制素。本领域技术人员将能够容易地确定测定是否落在肌抑制素 /SBE 报

告基因测定的范围内,这根据其是否具有被导入宿主细胞的包含位于报告基因的上游的 SBE 元件的载体,其中使用的 SBE 元件应答 SMAD,所述 SMAD 是响应肌抑制素结合肌抑制素的受体而产生的。R. S. Thies, 等人, Growth Factors, 18 :251-259, 2001 描述了相似的测定法而 Wittemore, L. 等人, BBRC, 300 :965-971, 2003 描述了对响应肌抑制素结合其受体而产生的 SMAD 起反应的 SBE 元件。

[0214] 在该测定中,将 T-75 培养瓶中的 293E 细胞(艾格生物技术公司(Edge Biosystems))培养在 DMEM/F12 培养基(1 : 1)(吉布克公司(Gibco)10565-042)和 10% FBS 中。用 100 μ l lipofectamine 2000(英俊公司(Invitrogen)11668-019)、5ml OptiMEM I(吉布克公司(Gibco)51985-034)和 30 μ g SB-萤光素酶 DNA 的混合物在 37°C 转染细胞,进行 4 小时。除去转染混合物,加入完全培养基,在 37°C 下进行 1 小时。然后对细胞进行胰蛋白酶消化,并且以 2×10^6 个细胞/ml 重悬于完全培养基中,用 50 μ l 在 Biocoat 96 孔板(BD 35-6461)的各个孔中进行涂板,在 37°C 下温育 1 小时。在完成温育后,用 100 μ l 各待测 Fab 替换培养基,所述 Fab 1 : 2 连续稀释并在 37°C 下与在完全培养基中的 40ng/ml 肌抑制素(安迪生物公司(R&D Systems)788-G8)或 GDF-11(安迪生物公司(R&D Systems))的 1 : 1 的溶液一起预温育 1 小时。

[0215] 将平板在 37°C、5% CO₂ 中放置过夜,第二天向各孔中加入 100 μ l Glo 裂解缓冲液和 Bright-Glo 萤光素酶试剂(普洛麦格公司(Promega))的 1 : 1 的混合物,通过移液管抽吸进行混合。将 150 μ l 该混合物转移至白色 96 孔板,然后使用发光计测量发光。然后将发光对 Fab 的浓度作图,计算各 Fab 对于肌抑制素和 GDF-11 的 IC₅₀。

[0216] 使用上述条件检测的 Fab 产生下面的表 4 中所列的 IC₅₀ 值。

[0217]

表 4

[0218]

Fab	IC ₅₀ GDF8	IC ₅₀ GDF11
41H-A7	10nM	40nM
41L3F12	40nM	100nM
41C1A2	1nM	1.2nM
41C1A4	1nM	2nM
41C1E4	1nM	4nM
41C12A4	1nM	4nM
41C2A4	1nM	4nM
3-74/C1E4	1nM	4nM

[0219] 实施例 6 药物动力学

[0220] 可以以 1mg/kg 的剂量在单次静脉内(IV)或腹膜内(IP)施用后在 C57B6/SCID 小

鼠中估量本发明抗体的药物动力学 (PK)。使动物接受上述剂量的未标记的和 ^{125}I 标记的抗体的混合物, 基于血清中的 ^{125}I 放射性和注射的剂量的特异性活性确定血清浓度。将静脉内或腹膜内施用的抗体的血清浓度对时间作图。

[0221] 实施例 7 对肌肉质量和力量的体内效应

[0222] 为确定本发明的抗体是否在体内阻断肌抑制素的活性, 在成年 SCID 小鼠中检测本发明的抗体。SCID 小鼠患有严重的联合免疫缺陷 (severe combined immune deficiency), 从而在注射本发明的抗体后不能产生免疫反应。肌肉质量用作用本发明抗体处理的小鼠中肌抑制素活性的指标。

[0223] 对雌性 SCID/CB 17 小鼠 (泰克生物技术公司 (Taconic Biotechnology)) 称重并分入 10 个组。将 PBS 缓冲液中的本发明的抗体 (41C1E4) 以不同的剂量 (10、5 和 2mg/kg) 在第 0 和第 7 天皮下注射入小鼠。在对照组中, 在第 0 和第 7 天以 10mg/kg 将 IgG 皮下注射入小鼠。在第 14 天, 使用握力检测计 (例如, 型号 1027csx, 哥伦布仪器公司 (Columbus Instruments)) 测量肌肉的力量 (前肢的力量)。处死动物, 并且通过核磁共振 (NMR) 估量肌肉质量。也测量腓肠肌和四头肌肌肉的湿重以及体重。结果 (不同参数的平均值和标准误差) 示于下面的表 5 中。用 Box Cox 转化法 (Box Cox transformation method) 转换数据以使数据标准化。使用 JMP 5.1 软件 (SAS 有限公司) 通过统计学方法鉴定各个参数的极端值并将其从数据集中排除。使用 ANOVA 和学生 t 检验确定统计学上的显著性。低于 0.05 的 p 值被认为是显著的。对于所有受试参数, 以 5mg/kg 和 10mg/kg 进行检测的抗体相对于对照 IgG 组导致统计学上显著的结果。对于 NMR 肌肉、四头肌湿重和腓肠肌湿重参数, 相对于对照 IgG 组, 以 2mg/kg 进行检测的抗体导致统计学上显著的结果。

[0224] 表 5

[0225]

研究组	初始 BW (g)	终 BW (g)	NMR 肌肉 (g)	四头肌湿重 (mg)	腓肠肌湿重 (mg)	握力 (牛顿)
对照 IgG	19.82± 0.35	20.89± 0.33	15.17± 0.27	159.92± 4.13	92.84±1.99	2.89± 0.08
41C1E4 2mg/kg	19.92± 0.32	21.78± 0.22	16.27± 0.13	172.07± 1.53	102.13±0.88	2.99± 0.07
41C1E4 5mg/kg	19.94± 0.34	21.9± 0.37	16.54± 0.39	185.27± 4.67	108.16±2.3	3.23± 0.04
41C1E4 10mg/kg	19.9± 0.34	22.3± 0.4	16.99± 0.27	190.03± 3.2	109.5±2.03	3.18± 0.08

[0226] BW = 体重

序列表

<110> 伊莱利利公司 (ELI LILLY AND COMPANY)

<120> 抗肌抑制素抗体

<130>X-17251

<140>US 60/725,738

<141>2005-10-12

<160>158

<170>PatentIn 版本 3.3

<210>1

<211>375

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>1

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

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

<210>2

<211>109

<212>PRT

<213>人

<400>2

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

<210>3

<211>109

<212>PRT

<213> 羊属物种 (Ovis sp.)

<400>3

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

<210>4

<211>109

<212>PRT

<213> 人

<400>4

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

<210>5

<211>339

<212>DNA

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>5

gaggtgaagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttagtgaagc	ctggagggtc	cctgaaactc	60
tcctgtgcag	cctctggact	cactttcagt	aggtatggca	tgtcttgggt	tcgccagact	120
ccggagagga	ggctggagtg	ggctgcagcc	attaatagtc	atggtggttag	cacctactat	180
tcagacactg	tgaaggccg	attcaccatt	tccagagaca	atgccaagaa	caccctgtac	240
ctgcaaatga	acagtctgag	gtctgaggac	acagccttgt	attactgtgc	aagacttccg	300
gactactggg	gccaaggcac	cacggtcacc	gtttcctca			339

<210>6

<211>324

<212>DNA

$\langle 210 \rangle_8$

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>8

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

<210>9

<211>12

<212>PRT

<213> 小鼠属物种 (Mus sp.)

<400>9

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

<210>10

<211>12

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>10

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210>11

<211>12

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>11

Arg Ala Leu Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210>12

<211>12

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(3)..(3)

<223>X 是 S 或 L

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(4)..(4)

<223>X 是 S 或 Q

<400>12

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

<210>13

<211>7

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>13

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210>14

<211>7

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>14

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ala
1 5

<210>15

<211>7

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>15

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Thr
1 5

<210>16

<211>7

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>16

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Asn
1 5

<210>17

<211>7

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>17

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Asp
1 5

<210>18

<211>7

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>18

Ser Thr Ser Asn Leu Val Ala
1 5

<210>19

<211>7

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>19

Ser Thr Ser Asn Leu Val Phe
1 5

<210>20

<211>7

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>20

Ser Thr Ser Asn Leu Thr Trp
1 5

<210>21

<211>7

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>21

Ser Thr Ser Asn Leu Met Asp
1 5

<210>22

<211>7

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>22

Ser Thr Ser Asn Leu Val Tyr
1 5

<210>23

<211>7

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>23

Ser Thr Ser Asn Leu Val Trp
1 5

<210>24

<211>9

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>24

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr
1 5

<210>25

<211>9

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>25

Gln His Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr
1 5

<210>26

<211>9

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>26

Gln Asn Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr
1 5

<210>27

<211>9

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>27

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Phe Phe Thr

1 5

<210>28

<211>9

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>28

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Gln Phe Thr

1 5

<210>29

<211>9

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>29

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

1 5

<210>30

<211>9

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>30

Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

1 5

<210>31

<211>9

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>31

Gln Leu Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr

1 5

<210>32

<211>9

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>32

Gln Pro Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr

1 5

<210>33

<211>9

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>33

Gln His Tyr Leu Gly Tyr His Phe Thr

1 5

<210>34

<211>9

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>34

Gln His His Ser Gly Tyr His Phe Thr
1 5

<210>35

<211>9

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>35

Gln His Tyr Ser Gly Tyr His Trp Thr
1 5

<210>36

<211>9

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>36

Gln Trp Tyr Ser Gly Tyr His Phe Thr
1 5

<210>37

<211>9

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(2)..(2)

<223>X 是 Q、N、H、L、P 或 W

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(3)..(3)

<223>X 是 Y 或 H

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(4)..(4)

<223>X 是 S 或 L

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(7)..(7)

<223>X 是 H、F、Q 或 T

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(8)..(8)

<223>X 是 F 或 W

<400>37

Gln Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Xaa Xaa Thr

1

5

<210>38

<211>10

<212>PRT

<213> 小鼠属物种

<400>38

Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210>39

<211>10

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>39

Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr Thr Met Ser

1 5 10

<210>40

<211>10

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>40

Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr Pro Met Ser

1 5 10

<210>41

<211>10

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>41

Gly Leu Asn Phe Ser Arg Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210>42

<211>10

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(3)..(3)

<223>X 是 T 或 N

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(8)..(8)

<223>X 是 G、T 或 P

<400>42

Gly Leu Xaa Phe Ser Arg Tyr Xaa Met Ser
1 5 10

<210>43

<211>17

<212>PRT

<213> 小鼠属物种

<400>43

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210>44

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>44

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210>45

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>45

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210>46

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>46

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

<210>47

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>47

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

<210>48

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>48

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

<210>49

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>49

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

<210>50

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>50

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

<210>51

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>51

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

<210>52

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>52

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

<210>53

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>53

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

<210>54

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>54

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

<210>55

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>55

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

1 5 10 15

Gly

<210>56

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>56

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

1 5 10 15

Gly

<210>57

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>57

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

1 5 10 15

Gly

<210>58

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>58

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

<210>59

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>59

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

<210>60

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>60

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210>61

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>61

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

Gly

<210>62

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>62

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

Gly

<210>63

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>63

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

<210>64

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>64

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

<210>65

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>65

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

<210>66

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>66

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

<210>67

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>67

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

<210>68

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>68

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

<210>69

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>69

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

<210>70

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>70

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

<210>71

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(1)..(1)

<223>X 是 A、R 或 H

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(2).. (2)

<223>X 是 I 或 Q

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(3).. (3)

<223>X 是 N、T 或 K

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(4).. (4)

<223>X 是 S 或 A

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(5).. (5)

<223>X 是 H、S、V、L、M、N、G、D、W、R、A、Y、K、P、T、I 或 E

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(7).. (7)

<223>X 是 G 或 S

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(10).. (10)

<223>X 是 Y 或 K

<400>71

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ser Thr Xaa Tyr Ser Asp Thr Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210>72

<211>4

<212>PRT

<213>小鼠属物种

<400>72

Leu Pro Asp Tyr

1

<210>73

<211>17

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>73

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

1

5

10

15

Gly

<210>74

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>74

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 Arg Ala Ser Gln 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 Ala 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 Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210>75

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>75

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 Arg Ala Ser 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 Thr 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 Gln Asn Tyr Ser Gly Tyr His
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210>76

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>76

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 Arg Ala Ser 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 Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Phe
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210>77

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>77

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 Arg Ala Ser 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 Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Gln
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

105

〈213〉 人造

〈223〉 合成构建体

 $\langle 400 \rangle_{78}$

〈213〉 人造

〈223〉 合成构建体

<400>79

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	Arg	Ala	Ser	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	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Gln	
85				90				95								
Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
100				105												

<210>80

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>80

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	Arg	Ala	Ser	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	Gln	Gln	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Ser
85				90				95							
Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
100				105											

<210>81

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>81

```
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 Arg Ala Ser 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 Thr 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 Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
          85           90           95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105
```

<210>82

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>82

```
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 Arg Ala Ser 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	Ala	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	Gln	Leu	Tyr	Ser	Gly	Tyr	His
						85					90				95
Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
						100					105				

<210>83

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>83

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	Arg	Ala	Ser	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	Thr	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	Gln	Pro	Tyr	Ser	Gly	Tyr	His
							85				90				95
Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
						100					105				

<210>84

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>84

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	Arg	Ala	Ser	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	Asn	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	Gln	His	Tyr	Ser	Gly	Tyr	His
			85					90					95		
Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210>85

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>85

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	Arg	Ala	Ser	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 Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Gln			
	85	90	95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105		

<210>86

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>86

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 Arg Ala Ser 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 Ala 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 Gln His Tyr Ser Gly Tyr His			
	85	90	95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105		

<210>87

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>87

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	Arg	Ala	Ser	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	Asp	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	Gln	His	Tyr	Ser	Gly	Tyr	His
			85					90					95		
Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210>88

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>88

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	Arg	Ala	Ser	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	Ala	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	Gln	Pro	Tyr	Ser	Gly	Tyr	His
			85					90					95		

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

<210>89

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>89

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 Arg Ala Ser 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 Val Ala 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 Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210>90

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>90

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 Arg Ala Ser 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 Val Ala 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 Gln His Tyr Leu Gly Tyr His
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210>91

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>91

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 Arg Ala Leu 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 Ala 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 Gln His Tyr Leu Gly Tyr His
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210>92

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>92

```

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 Arg Ala Ser 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 Ala 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 Gln His Tyr Leu Gly Tyr His
           85           90           95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100           105

```

<210>93

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>93

```

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 Arg Ala Ser 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

```


<220>

<223> 合成构建体

<400>95

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	Arg	Ala	Ser	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	Met	Asp	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	Gln	His	Tyr	Ser	Gly	Tyr	His
			85						90					95	
Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100						105						

<210>96

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>96

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	Arg	Ala	Ser	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	Val	Tyr	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 Gln His Tyr Ser Gly Tyr His			
	85	90	95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105		

<210>97

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>97

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 Arg Ala Ser 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 Val Trp 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 Gln His Tyr Ser Gly Tyr His			
	85	90	95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105		

<210>98

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>98

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	Arg	Ala	Ser	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	Val	Ala	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	Gln	His	His	Ser	Gly	Tyr	His
				85					90					95	
Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210>99

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>99

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	Arg	Ala	Ser	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	Val	Ala	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	Gln	His	Tyr	Ser	Gly	Tyr	His
				85					90					95	
Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				

105

〈213〉 人造

〈223〉 合成构建体

 $\langle 400 \rangle 100$

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	Arg	Ala	Ser	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	Val	Ala	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	Gln	Trp	Tyr	Ser	Gly	Tyr	His
				85					90					95	
Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

〈213〉 人造

〈223〉 合成构建体

 $\langle 400 \rangle 101$

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 Arg Ala Ser 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 Val Tyr 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 Gln His His Ser Gly Tyr His
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210>102

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>102

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 Arg Ala Ser 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 Val Tyr 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 Gln His Tyr Ser Gly Tyr His
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210>103

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>103

```

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

```

<210>104

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>104

```

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 Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
           20           25           30

```

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

<210>105

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>105

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

<210>106

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>106

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

<210>107

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>107

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 Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

$\langle 211 \rangle 113$

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>109

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

<210>110

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>110

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	Leu	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val

$\langle 211 \rangle 113$

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>112

```

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

```

<210>113

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>113

```

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 Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
          20           25           30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

```

$\langle 211 \rangle 113$

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>115

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

<210>116

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>116

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	Leu	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr
		20					25					30			
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val

$\langle 211 \rangle 113$

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>118

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

<210>119

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>119

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 Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

$\langle 211 \rangle 113$

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>121

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

Ser

<210>122

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>122

```
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 Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
20           25           30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45
```

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

<210>123

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>123

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

<210>124

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>124

```

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

```

<210>125

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>125

```

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 Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
           20           25           30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45

```

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

Ser

<210>126

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>126

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

Ser

<210>127

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>127

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

<210>128

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>128

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 Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser His Ile Lys Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90	95
Ala Arg Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	Leu Val Thr Val Ser		
100	105	110	
Ser			

<210>129

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>129

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

<210>130

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>130

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

<210>131

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>131

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

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

Ser

<210>132

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>132

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

Ser

<210>133

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>133

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

<210>134

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>134

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

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

<210>135

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>135

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

<210>136

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>136

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

<210>137

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>137

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

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

Ser

<210>138

<211>113

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>138

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

Ser

<210>139

<211>11

<212>PRT

<213> 人

<400>139

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

<210>140

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>140

```
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 Arg Ala Ser 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 Val Tyr 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 Gln His His Ser Gly Tyr His
           85           90           95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100           105
```

<210>141

<211>108

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<400>141

```
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 Arg Ala Ser 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
```


<400>143

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
 20

<210>144

<211>15

<212>PRT

<213> 人

<400>144

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

<210>145

<211>32

<212>PRT

<213> 人

<400>145

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

<210>146

<211>10

<212>PRT

<213> 人

<400>146

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210>147

<211>10

<212>PRT

<213> 人

<400>147

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210>148

<211>25

<212>PRT

<213> 人

<400>148

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
20 25

<210>149

<211>25

<212>PRT

<213> 人

<400>149

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210>150

<211>25

<212>PRT

<213> 人

<400>150

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210>151

<211>14

<212>PRT

<213> 人

<400>151

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

<210>152

<211>32

<212>PRT

<213> 人

<400>152

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210>153

<211>32

<212>PRT

<213> 人

<400>153

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210>154

<211>7

<212>PRT

<213> 人造

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(6)..(6)

<223>X 是 A、V、T 或 M

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(7)..(7)

<223>X 是 S、A、T、N、W、D 或 Y

<400>154

Ser Thr Ser Asn Leu Xaa Xaa

1 5

<210>155

<211>106

<212>PRT

<213> 人

<400>155

Val Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35 40 45

Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
50						55				60					
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
65					70				75					80	
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
				85					90					95	
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
				100				105							

<210>156

<211>315

<212>DNA

<213> 人

<400>156

gtggctgcac catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact	60
gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt acagtggaag	120
gtggataacg ccttccaatc gggtaactcc caggagagtg tcacagagca ggacagcaag	180
gacagcacct acagcctcag cagcaccttg acgctgagca aagcagacta cgagaaacac	240
aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc	300
aacaggggag agtgc	315

<210>157

<211>315

<212>DNA

<213> 人

<400>157

gtggctgcac catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact	60
gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt acagtggaag	120
gtggataacg ccttccaatc gggtaactcc caggagagtg tcacagagca ggacagcaag	180
gacagcacct acagcctcag cagcaccttg acgctgagca aagcagacta cgagaaacac	240
aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc	300
aacaggggag agtgc	315

<210>158

<211>970

<212>DNA

<213> 人

<400>158

ggcccatcgg tcttcccgt agcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc	60
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgtg gaactcaggc	120
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	180
gctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acgaagacct acacctgcaa	240
cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagtcca aatatgggtcc	300
cccatgccca ccctgccccag cacctgagtt cctgggggga ccatcagtct tcctgttccc	360
cccaaaacct aaggacactc tcatgatctc cggaccctt gaggtcacgt gcgtgggtgt	420
ggacgtgagc caggaagacc ccgagggtcca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaggt	480
gcataatgcc aagacaaagc cgcggggagga gcagttcaac agcacgtacc gtgtgggtcag	540
cgctctcacc gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggctctc	600
caacaaaggc ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg	660
agagccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag	720
cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggaaagcaa	780
tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt	840
cttctcttac agcaggctaa ccgtggacaa gagcagggtg caggagggga atgtcttctc	900
atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc	960
tctgggttga	970

1	<u>MQKLQLCVYI</u> <u>YLFMLIVAGP</u> <u>VDLNENSEQK</u> ENVEKEGLCN	40
41	ACTWRQNTKS SRIEAIKIQI LSKLRLETAP NISKDVIRQL	80
81	LPKAPPLREL IDQYDVQRDD SSDGSLEDDD YHATTETIIT	120
121	MPTESDFLMQ VDGKPKCCFF KFSSKIQYNK VVKAQLWIYL	160
161	RPVETPTTVF VQILRLIKPM KDGTRYTGIR SLKLDMPGT	200
201	GIWQSIDVKT VLQNWLKQPE SNLGIEIKAL DENGHD LAVT	240
241	FPGPGEDGLN PFLEVKVTD T PKRSRRDFGL DCDEHSTESR	280
281	<u>CCRYPLTVDF</u> <u>EAFGWDWIIA</u> <u>PKRYKANYCS</u> <u>GECEFVFLQK</u>	320
321	<u>YPHTHLVHQA</u> <u>NPRGSAGPCC</u> <u>TPTKMSPINM</u> <u>LYFNGKEQII</u>	360
361	YGKIPAMVVD RCGCS 376 (SEQ ID NO:1)	

图 1 前肌抑制素

1	DFGLDCDEHS TESRCCRYPL TVDFEAFGWD WIIAPKRYKA	40
41	<u>NYCSGECEFV</u> <u>FLQYPHTHL</u> <u>VHQANPRGSA</u> GPCCTPTKMS	80
81	PINMLYFNGK EQIIYGKIPA MVVDRCGCS 109 (SEQ ID NO:2)	

图 2 成熟肌抑制素 (人, 鼠, 大鼠, 鸡, 火鸡, 狗, 马, 猪)

		58
chicken	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQYPHTH	
dog	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQYPHTH	
horse	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQYPHTH	
sheep	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFLFLQYPHTH	
cow	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQYPHTH	
pig	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQYPHTH	
		109
chicken	<u>LVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS</u>	<u>SEQ ID</u>
dog	<u>LVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS</u>	2
horse	<u>LVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS</u>	2
sheep	<u>LVHQANPKGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPGMVVDRCGCS</u>	3
cow	<u>LVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGEGQIIYGKIPAMVVDRCGCS</u>	2
pig	<u>LVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS</u>	2

图 3 成熟肌抑制素

Myostatin	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK	
GDF-11	NLGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK	
Myostatin	<u>ANYCSGECEFVFLQYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTK</u>	
GDF-11	<u>ANYCSGQCEYMFQMOKYPHTHLVQANPRGSAGPCCTPTK</u>	
Myostatin	MSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS	(SEQ ID NO:2)
GDF-11	MSPINMLYFNDKQQIIYGKIPGMVVDRCGCS	(SEQ ID NO:4)

图 4 肌抑制素 :GDF-11 同源性

YN41 HCVR DNA

5' - GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTC
CCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACTTTCAGTAGGTATGGCA
TGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGAGGAGGCTGGAGTGGGTCCGAGCC
ATTAATAGTCATGGTGGTAGCACCTACTATTTCAGACACTGTGAAGGGCCG
ATTCACCATTTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGA
ACAGTCTGAGGTCTGAGGACACAGCCTTGTATTACTGTGCAAGACTTCCG
GACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTTTCCTCA (SEQ ID NO: 5)

YN41 HCVR 氨基酸

EVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGLTFS RYGMSWVRQT PERRLEWVAA
INSHGGSTYY SDTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRSED TALYYCARLP
DYWGQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 7)

YN41 LCVR (κ) DNA

5' - GAAAATGTGCTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGA
AAAGGTCACCATGACCTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCAGTTACT
TGCACTGGTACCAGCAGAAAGTCAGGTGCCTCCCCCAAACCTCTGGATCTAT
AGCACATCCAACCTTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGG
GTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATG
CTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTACAGTGGTTACCACTTCACGTTTCGGC
TCGGGGACCAAGCTGGAAATGAAA (SEQ ID NO: 6)

YN41 LCVR (κ) 氨基酸

ENVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCRASSSVS SSYLHWYQQK SGASPKLWIY
STSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSVE AEDAATYYCQ QYSGYHFTFG
SGTKLEMK (SEQ ID NO: 8)

图 5 亲本抗体

	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
YN41	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAS</u>	13	<u>QQYSGYHFT</u>	24
41-1	<u>RASQSVSSSYLH</u>	10	<u>STSNLAA</u>	14	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41-2	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QNYSGYHFT</u>	26
41-3	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAS</u>	13	<u>QQYSGYFFT</u>	27
41-4	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAS</u>	13	<u>QQYSGYQFT</u>	28
41-5	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAS</u>	13	<u>QQYSGYTFT</u>	29
41-6	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAS</u>	13	<u>QQYSGYQFT</u>	28
41-8	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAS</u>	13	<u>QQYSGYSFT</u>	30
41-9	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41-10	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41-11	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAA</u>	14	<u>QLYSGYHFT</u>	31
41-12	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41-13	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41-14	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41-15	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41-17	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QPYSGYHFT</u>	32
41-18	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAN</u>	16	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41-19	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41-20	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAS</u>	13	<u>QQYSGYQFT</u>	28
411-1	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QHYSGYHFT</u>	25
411-2	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAA</u>	14	<u>QHYSGYHFT</u>	25
411-4	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAA</u>	14	<u>QHYSGYHFT</u>	25
411-5	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QHYSGYHFT</u>	25
411-6	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAA</u>	14	<u>QHYSGYHFT</u>	25
411-7	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAD</u>	17	<u>QHYSGYHFT</u>	25
411-10	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QHYSGYHFT</u>	25
411-11	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QHYSGYHFT</u>	25
411-12	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QHYSGYHFT</u>	25
411-13	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAT</u>	15	<u>QHYSGYHFT</u>	25
411-15	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAA</u>	14	<u>QPYSGYHFT</u>	32
411-16	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAA</u>	14	<u>QPYSGYHFT</u>	32
412-1	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLVA</u>	18	<u>QHYSGYHFT</u>	25
412-5	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLVA</u>	18	<u>QHLYGYHFT</u>	33
412-6	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLVA</u>	18	<u>QHYSGYHFT</u>	25
412-8	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLVA</u>	18	<u>QHLYGYHFT</u>	33
412-9	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLVA</u>	18	<u>QHLYGYHFT</u>	33
412-13	<u>RALSSVSSSYLH</u>	11	<u>STSNLAA</u>	14	<u>QHLYGYHFT</u>	33
412-14	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAA</u>	14	<u>QHLYGYHFT</u>	33
412-15	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAA</u>	14	<u>QHLYGYHFT</u>	33
412-16	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLAA</u>	14	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41L2-A1	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLVF</u>	19	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41L2-A2	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLTW</u>	20	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41L2-A3	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLMD</u>	21	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41L2-E3	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLVY</u>	22	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41L2-E9	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLVW</u>	23	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41L3-F12	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLVA</u>	18	<u>QHHSGYHFT</u>	34
41L3-G2	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLVA</u>	18	<u>QHYSGYHFT</u>	35
41L3-G6	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLVA</u>	18	<u>QWYSGYHFT</u>	36
41H-A7	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLVA</u>	18	<u>QHYSGYHFT</u>	25
41H-B8	<u>RASSSVSSSYLH</u>	9	<u>STSNLVA</u>	18	<u>QHYSGYHFT</u>	25

图6 轻链 CDR 比对

41H-D6	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-D11	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E11	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E5	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E7	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E9	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-E12	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-F10	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41H-F12	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
41C1A2	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVY	22	QHYSGYHFT	25
41C1A4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVY	22	QHHSGYHFT	34
41C1C1	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHWT	35
41C1E4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHHSGYHFT	34
41C2A1	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHWT	35
41C2A4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHHSGYHWT	36
41C2E4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVY	22	QHYSGYHWT	35
41C2G8	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVY	22	QHYSGYHFT	25
3-74/C1A2	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVY	22	QHYSGYHFT	25
3-74/C1A4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVY	22	QHHSGYHFT	34
3-74/C1E4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHYSGYHFT	25
3-74/C2A4	RASSSVSSSYLH	9	STSNLVA	18	QHHSGYHWT	36
共有序列	RAX ₃ X ₄ SVSSSYLH	12	STSNLX ₆ X ₇	154	QX ₂ X ₃ X ₄ GYX ₇ X ₈ T	37
	X ₃ :S 或 L		X ₆ :A, V, T 或 M		X ₂ :Q, N, H, L, P 或 W	
	X ₄ :S 或 Q		X ₇ :S, A, T, N, W, D 或 Y		X ₃ :Y 或 H	
					X ₄ :S 或 L	
					X ₇ :H, F, Q 或 T	
					X ₈ :F 或 W	

图6(续)

Fab	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
YN41	GLTFSRYGMS	38	AINSHGGSTYYSDTVKG	43	LPDY	72
41-1	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
41-2	GLTFSRYGMS	38	AINSRGGSTYYSDTVKG	45	LPDY	72
41-3	GLTFSRYGMS	38	AINSRGGSTYYSDTVKG	45	LPDY	72
41-4	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
41-5	GLTFSRYGMS	38	AINSVGGSTYYSDTVKG	46	LPDY	72
41-6	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
41-8	GLTFSRYGMS	38	AINSEGGSTYYSDTVKG	47	LPDY	72
41-9	GLTFSRYGMS	38	AINSRGGSTYYSDTVKG	45	LPDY	72
41-10	GLTFSRYGMS	38	AINSIGGSTYYSDTVKG	48	LPDY	72
41-11	GLTFSRYGMS	38	AINSRGGSTYYSDTVKG	45	LPDY	72
41-12	GLTFSRYGMS	38	AINSMGGSTYYSDTVKG	49	LPDY	72
41-13	GLTFSRYGMS	38	AINSTGGSTYYSDTVKG	50	LPDY	72
41-14	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
41-16	GLTFSRYGMS	38	AINSKGGSTYYSDTVKG	51	LPDY	72
41-17	GLTFSRYGMS	38	AINSPGGSTYYSDTVKG	52	LPDY	72
41-18	GLTFSRYGMS	38	AINSGGGSTYYSDTVKG	53	LPDY	72
41-19	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
41-20	GLTFSRYGMS	38	AINSYGGSTYYSDTVKG	54	LPDY	72
411-1	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYADSVKG	73	LPDY	72
411-2	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
411-4	GLTFSRYGMS	38	AINSMGGSTYYSDTVKG	49	LPDY	72
411-5	GLTFSRYGMS	38	AINSRGGSTYYSDTVKG	45	LPDY	72
411-6	GLTFSRYGMS	38	AINSWGGSTYYSDTVKG	55	LPDY	72
411-7	GLTFSRYGMS	38	AINSAGGSTYYSDTVKG	56	LPDY	72
411-10	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
411-11	GLTFSRYGMS	38	AINSDGGSTYYSDTVKG	57	LPDY	72
411-12	GLTFSRYGMS	38	AINSGGGSTYYSDTVKG	53	LPDY	72
411-13	GLTFSRYGMS	38	AINSLGGSTYYSDTVKG	58	LPDY	72
411-14	GLTFSRYGMS	38	AINSNGGSTYYSDTVKG	59	LPDY	72
411-16	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
412-1	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
412-5	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
412-6	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
412-8	GLTFSRYTMS	39	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
412-9	GLTFSRYTMS	39	AIKSSGGSTYYSDTVKG	61	LPDY	72
412-13	GLTFSRYTMS	39	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
412-14	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
412-15	GLTFSRYTMS	39	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
412-16	GLTFSRYGMS	38	AINSSGGSTYYSDTVKG	44	LPDY	72
41L2-A1	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41L2-A2	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41L2-A3	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41L2-E3	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41L2-E9	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41L3-F12	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41L3-G2	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41L3-G6	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41H-A7	GLTFSRYPMS	40	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41H-B8	GLNFSRYGMS	41	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41H-D6	GLTFSRYGMS	38	AIKSSGGSTYYSDTVKG	61	LPDY	72
41H-D11	GLTFSRYGMS	38	AIKSNGGSTYYSDTVKG	62	LPDY	72
41H-E11	GLTFSRYGMS	38	RITSSGGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
41H-E4	GLTFSRYGMS	38	HIKSSGGSTYYSDTVKG	64	LPDY	72
41-E5	GLTFSRYGMS	38	AITSSGGSTKYSDTVKG	65	LPDY	72

图7 重链 CDR 比对

41H-E7	GLTFSRYGMS	38	AIKASGGSTYYSDTVKG	66	LPDY	72
41H-E9	GLTFSRYGMS	38	AIKSSGGSTYYSDTVKG	67	LPDY	72
41H-E12	GLTFSRYGMS	38	AIKSLGGSTYYSDTVKG	68	LPDY	72
41H-F10	GLTFSRYGMS	38	AITSMGGSTYYSDTVKG	69	LPDY	72
41H-F12	GLTFSRYGMS	38	AQTSSGGSTYYSDTVKG	70	LPDY	72
41C1A2	GLTFSRYPMS	40	RITSSGGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
41C1A4	GLTFSRYPMS	40	RITSSGGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
41C1C1	GLTFSRYPMS	40	AIKSSGGSTYYSDTVKG	61	LPDY	72
41C1E4	GLTFSRYPMS	40	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41C2A1	GLTFSRYPMS	40	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41C2A4	GLTFSRYPMS	40	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
41C2E4	GLTFSRYPMS	40	AIKSSGGSTYYSDTVKG	61	LPDY	72
41C2G8	GLTFSRYPMS	40	RITSSGGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
3-74/C1A2	GLTFSRYPMS	40	RITSSGGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
3-74/C1A4	GLTFSRYPMS	40	RITSSGGSTYYSDTVKG	63	LPDY	72
3-74/C1E4	GLTFSRYPMS	40	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72
3-74/C2A4	GLTFSRYPMS	40	AITSSGGSTYYSDTVKG	60	LPDY	72

共有序列 GLX₃FSRYX₈MS 42
X₃: T 或 N
X₈: G, T 或 P

X₁X₂X₃X₄X₅GX₇STX₁₀YSDTVKG 71
X₁: A, R 或 H
X₂: I 或 Q
X₃: N, T 或 K
X₄: S 或 A
X₅: H, S, V, L, M, N, G, D, W, R, A, Y, K, P, T, I 或 E
X₇: G 或 S
X₁₀: Y 或 K

图 7(续)

κ 恒定区 (SEQ ID NO: 155)

VAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

κ 恒定 DNA (SEQ ID NO: 156)

GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC
GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC
AACAGGGGAGAGTGTC

IgG4S->P δ K (SEQ ID NO: 157)

GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVERSKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

IgG4S->P δ K DNA (SEQ ID NO: 158)

GGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCC
GCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAA
CGTAGATCACAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCC
CCCATGCCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCTCTGGGGGACCATCAGTCTTCTCTGTTCCC
CCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGT
GGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGT
GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGGCCTCCCGTCTCTCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
TCTGGGTTGA

图 8

图 9 (续)

	CDR1	CDR2	CDR3	SEQ ID NO:
41L3-F12	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			98
41L3-G2	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			99
41L3-G6	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			100
41H-A7	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			89
41H-B8	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			89
41H-D6	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			89
41H-D11	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			89
41H-E11	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			89
41H-E4	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			89
41H-E5	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			89
41H-E7	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			89
41H-E9	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			89
41H-E12	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			89
41H-F10	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			89
41H-F12	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			89
41C1A2	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			96
41C1A4	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			101
41C1C1	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			99
41C1E4	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			98
41C2A1	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			99
41C2A4	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			141
41C2E4	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			102
41C2G8	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			96
3-74/C1A2	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			95
3-74/C1A4	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			140
3-74/C1E4	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			98
3-74/C2A4	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASSVSS _{SV} SLHWYQQKPGAPRL _{LY} STSNLV _{AGI} IPDRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y QCHSGYH _{FT} FGG _{TK} VEIK			142
L-FR1	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC}			SEQ ID NO: 143
L-FR2	WYAAKPGQAPRL _{LY}			SEQ ID NO: 144
L-FR3	GIDPRFSGSGSGTD _{FTLT} ISRLEPEDFAVY _Y C			SEQ ID NO: 145
L-FR4	FGG _{TK} VEIK			SEQ ID NO: 146
L-FR4B	FGG _{TK} LEIK			SEQ ID NO: 147

图 10 (续)

	CDR1	CDR2	CDR3	SEQ ID NO:
41L2-E9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	120
41L3-F12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	120
41L3-G2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	120
41L2-G6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	120
41H-A7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	123
41H-B8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	124
41H-D6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	125
41H-D11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	126
41H-E11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	127
41H-E4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	128
41-E5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	129
41H-E7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	130
41H-E9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	131
41H-E12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	132
41H-F10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	133
41H-F12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYGMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	134
41C1A2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	135
41C1C1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	136
41C1E4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	137
41C2A1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	123
41C2A4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	123
41C2E4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	136
41C2G8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLEWVS	AISSGGSTYYSDTVKGRFTISR	135
3-74/C1A2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLVWS	RIITSSGGSTYYSDTVKGRFTISR	137
3-74/C1A4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLVWS	RIITSSGGSTYYSDTVKGRFTISR	137
3-74/C1E4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLVWS	RIITSSGGSTYYSDTVKGRFTISR	138
3-74/C2A4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG	FTSRYPMSWVRQAPGKGLVWS	RIITSSGGSTYYSDTVKGRFTISR	138
H-FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS			SEQ ID NO: 148
H-FR1B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS			SEQ ID NO: 149
H-FR2	WVRQAPGKGLEWVS			SEQ ID NO: 150
H-FR2B	WVRQAPGKGLVWS			SEQ ID NO: 151
H-FR3	RFTISRDNKNTLYIQMNSLRAEDTAVYYCAR			SEQ ID NO: 152
H-FR3B	RFTISRDNKNTLYIQMNSLRAEDTAVYYCAR			SEQ ID NO: 153
H-FR4	WGQGTLLTVSS			SEQ ID NO: 139