

1. 抗体或其抗原结合片段，其特异性地结合于包含 SEQ ID NO :46 所示的氨基酸序列的硬化素多肽，其中所述的抗体或片段结合于 SEQ ID NO :46 的第 56-146 位的氨基酸序列。
2. 权利要求 1 的抗体或抗原结合片段，其中所述抗体或片段结合于 SEQ ID NO :94 所示的序列。
3. 权利要求 1 的抗体或抗原结合片段，其中所述抗体或片段结合于 SEQ ID NO :67 所示的序列。
4. 权利要求 1 的抗体或抗原结合片段，其特异性地结合于 SEQ ID NO :46 的至少 4 个连续的氨基酸。
5. 前述任一项权利要求所述的抗体或抗原结合片段，其能够增加哺乳动物的骨矿物质密度或骨矿物质含量。
6. 前述任一项权利要求所述的抗体或抗原结合片段，其以小于或等于 $10^{-6}M$ ，小于或等于 $10^{-7}M$ ，或者小于或等于 $10^{-8}M$ 的亲和力 K_D 与包含示于 SEQ ID NO :46 的氨基酸序列的硬化素多肽结合。
7. 前述任一项权利要求所述的抗体或抗原结合片段，其是多克隆或单克隆抗体。
8. 前述任一项权利要求所述的抗体或其抗原结合片段，其是人的、人源化的或者嵌合的。
9. 前述任一项权利要求所述的抗体或其抗原结合片段，其选自 $F(ab')_2$ 、Fab、Fab'、Fd 和 Fv。
10. 宿主细胞，如杂交瘤，其能够产生或者表达前述任一项权利要求所述的抗体或片段。
11. 编码权利要求 1-9 中任一项的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。
12. 权利要求 10 的宿主在表达所述抗体或片段中的用途。
13. 组合物，其包含权利要求 1-9 中任一项权利要求所述的抗体或其抗原结合片段，和药学上可接受的载体。
14. 权利要求 1-9 中任一项的抗体或抗原结合片段在增加温血动物或人的骨矿物质含量和 / 或骨矿物质密度的方法中的使用。
15. 权利要求 14 的抗体或其结合片段，其用于治疗骨质减少、骨质疏松、骨折、软骨发育不全、颅骨锁骨发育不良、内生软骨瘤病、纤维性发育不良、戈谢病、低磷酸盐血症性佝偻病、马方综合症、多发性遗传性外生骨疣、神经纤维瘤病、成骨不全、骨硬化症、脆弱性骨硬化、硬化损伤、牙周病、假关节病和化脓性骨髓炎。
16. 权利要求 14 的抗体或其结合片段，其中用于治疗贫血状态、由类固醇引起的状况、由肝素引起的状况、骨髓疾病、坏血病、营养不良、缺钙、特发性骨质疏松、先天性骨质减少或骨质疏松、酒精中毒、慢性肝病、衰老、绝经后状态、月经过少、闭经、怀孕、糖尿病、甲状腺功能亢进、库欣病、肢端肥大病、性腺功能减退、制动术或废用、反射交感性营养不良综合症、暂时局部骨质疏松、和骨软化症。

用于增加骨矿化的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为 2004 年 6 月 15 日、申请号为 200480023326.0 的同名申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明总体上涉及制药学产品和方法；具体而言，本发明涉及适于增加骨矿物质含量的方法和组合物。这些组合物和方法可用于治疗多种状况，包括例如骨质减少、骨质疏松、骨折以及以骨矿物质密度低作为疾病标志的其它疾病。

[0003] 发明背景

[0004] 在人的一生中存在两个或三个明显的骨质变化阶段（参阅 Riggs, West J. Med. 154 :63-77, 1991）。第一个阶段男性和女性都有，发展达到骨质峰值。这第一个阶段是通过软骨内生长板的线性生长以及由于一定比率骨膜并置引起的径向生长而实现的。第二个阶段对于骨小梁（扁骨，诸如椎骨和骨盆）而言在大约 30 岁开始，而对于皮层骨（例如四肢中的长骨）而言在大约 40 岁开始，并持续至老年。这个阶段的特点是骨缓慢流失，而且在男性和女性中都存在。在女性中还存在骨流失的第三个阶段，最有可能是因为绝经后雌激素缺乏所致。仅是在这个阶段，女性可能额外由皮层骨流失 10% 骨质，而由小梁区室内流失 25%（参阅 Riggs, 见上文）。

[0005] 在多种状况中会引起骨矿物质含量流失，而且可能导致重大的医学问题。例如，骨质疏松是使人衰弱的疾病，其特征是骨骼的骨质和矿物质密度显著下降，骨结构退化（包括骨显微结构退化），以及患病个体中骨易碎性和骨折易感性相应增加。在美国，在大约 2500 万人中发现了临床骨质减少（骨矿物质密度比年轻成年人骨平均值低 1-2.5 个标准偏差），这种状况是骨质疏松在人体中的前期表现。在美国另有 700-800 万患者诊断患有临床骨质疏松（定义为骨矿物质含量比成熟年轻成年人骨低 2.5 个标准偏差以上）。骨质疏松对于保健系统而言是最费钱的疾病之一，在美国每年花费数百亿美元。除了保健相关费用以外，长期居家护理和失业时间加重了这种疾病的财政和社会负担。全世界大约有 7500 万人有患上骨质疏松的危险。

[0006] 人群中骨质疏松的频率随年龄而增加，而且在白人中主要女性中存在（在美国占骨质疏松患者的 80%）。老年人中骨骼易碎性和骨折易感性的增加会由于这个群体意外摔倒的风险较大而加重。在美国每年报道超过 150 万例骨质疏松相关骨折。髋骨、腕骨、和椎骨骨折是与骨质疏松有关的最常见损伤。特别是髋骨骨折对于患者而言极其不舒服且费用高昂，而且对于女性而言与高比率的死亡率和发病率有关。

[0007] 尽管已经注意到骨质疏松会由于骨质减少而增加骨折风险，然而目前可用于骨骼疾病的治疗都不能实质性增加成年人的骨密度。所有医生强烈感觉到需要能够增加成年人骨密度的药物，特别是在骨质减少和骨质疏松中有风险的腕骨、脊柱和髋骨中增加骨密度的药物。

[0008] 目前用于预防骨质疏松的策略可以为个体提供一些益处，但是不能确保解决该疾病。这些策略包括对老龄患者而言缓和身体活动（特别是承重活动），在饮食中添加适量

钙,且避免消费含有酒精或烟草的产品。对于出现了临床骨质减少或骨质疏松的患者而言,所有现行治疗药物和策略均致力于通过抑制骨吸收过程来减少骨质进一步流失,但骨吸收过程是组成性地存在的骨重建过程的天然成分。

[0009] 例如,现在用雌激素处方阻止骨流失。然而,对患者是否有任何长期益处以及对75岁以上患者究竟是否有任何效果存在一些争论。此外,一般认为使用雌激素会增加乳癌和子宫内膜癌的风险。

[0010] 对绝经后妇女还建议饮食添加大剂量钙,无论是否添加维生素D。然而,大剂量的钙常常具有不舒服的胃肠副作用,而且必须连续监测血清和尿液钙水平(参阅 Khosla 和 Riggs, Mayo Clin. Proc. 70 :978-982, 1995)。

[0011] 曾经提议的其它治疗剂包括降钙素、二膦酸酯类、同化类固醇和氟化钠。然而,这些治疗剂所具有的不良副作用(例如,降钙素和类固醇可能引起恶心并激发免疫反应,二膦酸酯类和氟化钠可能抑制骨折修复,尽管骨密度有适度增加)可能阻止其使用(参阅 Khosla 和 Riggs, 见上文)。

[0012] 目前实行的治疗策略尚未涉及刺激或增强新骨质生长的药物。本发明提供了可用于增加骨矿化、由此可用于治疗期望增加骨质的多种状况的组合物和方法。另外,本发明还具有其它相关优势。

[0013] 发明概述

[0014] 如上所述,本发明提供了TGF- β 结合蛋白的新类别或家族,以及用于选择增加骨矿物质含量和骨矿物质密度的化合物的测定法、增加骨矿物质含量和骨矿物质密度的化合物、以及在治疗或预防多种疾病时利用这些化合物的方法。

[0015] 本发明的一个方面提供了分离的核酸分子,其中所述核酸分子选自下组:(a)包含SEQ ID NO:1、5、7、9、11、13、或15或者其互补序列的分离核酸分子;(b)在高严谨条件下与(a)的核酸分子特异杂交的分离核酸分子;和(c)依照(a)或(b)且编码TGF- β 结合蛋白的分离核酸分子。本发明的相关方面提供了分离的核酸分子,所述核酸分子仅仅与上文定义序列之一的一部分杂交(例如,对于(a)而言,可以是与选自SEQ ID NO:1第156位-第539位或第555位-第687位核苷酸的至少20、25、50、或100个核苷酸的探针发生杂交)。应当显而易见的是,杂交所采取的必需严谨性可以根据探针长度而变化。例如,对于长度为25个核苷酸的探针而言,高严谨条件可以包括:60mMTris pH 8.0、2mM EDTA、5x Denhardt氏溶液、6x SSC、0.1% (w/v)N-月桂基肌氨酸、0.5% (w/v)NP-40(nonidet P-40)于45°C保温过夜,随后用0.2x SSC/0.1% SDS于45-50°C清洗两次。对于低严谨条件下长度为100个核苷酸的探针而言,合适的条件可以包括:5x SSPE、5x Denhardt氏溶液和0.5% SDS于42-50°C保温过夜,随后用2x SSPE(或2x SSC)/0.1% SDS于42-50°C清洗两次。

[0016] 本发明的相关方面提供了与SEQ ID NO:1、5、7、9、11、13、或15具有同源性的分离核酸分子,使用Wilbur-Lipman算法测定同源性水平为50%、60%、75%、80%、90%、95%、或98%的核酸分子。这些分离分子的代表性实例包括例如编码包含序列SEQ ID NO:2、6、10、12、14或16或是与这些序列具有同源性的蛋白质的核酸分子,使用Wilbur-Lipman算法测定其同源性水平为50%、60%、75%、80%、90%、95%、或98%。

[0017] 分离的核酸分子的长度通常小于100kb,而且,在某些实施方案中,长度小于50kb、25kb、10kb、或甚至5kb。另外,在其它实施方案中,分离的核酸分子不是存在于其它

无关核酸分子的“文库”中（例如 BAC 亚克隆，诸如 GenBank 编号 AC003098 和 EMB 编号 AQ171546 中所述）。然而，分离的核酸分子可以在相关分子的文库中找到（例如，对于改组而言，诸如美国专利号 5,837,458、5,830,721、和 5,811,238 中所述）。最后，本文所述分离的核酸分子不包括编码 Dan、Cerberus、Gremlin、或 SCGF（美国专利号 5,780,263）的核酸分子。

[0018] 本发明还提供了包含上文所述核酸分子的克隆载体以及包含与上文所述核酸分子之一可操作连接的启动子（例如调控序列）的表达载体。合适启动子的代表性实例包括组织特异性启动子和基于病毒的启动子（例如基于 CMV 的启动子诸如 CMV I-E、SV40 早期启动子、和 MuLVLTR）。表达载体也可以基于或衍生自病毒（例如“病毒载体”）。病毒载体的代表性实例包括单纯疱疹病毒载体、腺病毒载体、腺病毒伴随病毒载体、和逆转录病毒载体。还提供了包含或含有任何上述载体的宿主细胞（包括例如人、猴、狗、大鼠、或小鼠起源的宿主细胞）。

[0019] 本发明的其它方面提供了生成 TGF- β 结合蛋白的方法，包括如下步骤：在一定条件下将上述包含载体的宿主细胞培养足够时间以生成 TGF- β 结合蛋白。在其它实施方案中，可以进一步纯化通过这种方法生成的蛋白质（例如通过柱层析、亲和纯化、等等）。由此，基于本申请的公开内容，可以容易的生成由上文所述核酸分子编码的分离蛋白质（例如 SEQ ID NO :2、4、6、8、10、12、14、或 16）。

[0020] 还应当注意，可以以融合蛋白的形式生成上述蛋白质或其片段。例如，本发明的一个方面提供了含有第一多肽区段和第二多肽区段的融合蛋白，该第一多肽区段包含由上文所述核酸分子编码的 TGF- β 结合蛋白或其长度为至少 10、20、30、50、或 100 个氨基酸的部分，该第二多肽区段包含非 TGF- β 结合蛋白。在某些实施方案中，第二多肽可以是适于纯化或识别的标签（例如包含多个阴离子氨基酸残基的多肽 - 参阅美国专利号 4,851,341）、标记物（例如绿色荧光蛋白或碱性磷酸酶）或毒性分子（例如蓖麻毒素）。

[0021] 本发明的另一个方面提供了能够与上文所述 TGF- β 结合蛋白类别（例如人 BEER）特异结合的抗体。在各种实施方案中，所述抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体（例如人或鼠起源的）。在其它实施方案中，该抗体是保留了完整抗体的结合特性的抗体片段（例如 F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、或 Fv 片段，甚至是 CDR）。还提供了能够生成或表达上述抗体的杂交瘤和其它细胞。

[0022] 本发明的相关方面提供了检测 TGF- β 结合蛋白的方法，包括如下步骤：在一定条件下将上文所述抗体保温足够时间以容许所述抗体与 TGF- β 结合蛋白结合，并检测结合。在多种实施方案中，抗体可以结合于固相支持物上以便于清洗或分离，和 / 或是标记的（例如使用选自下组的标记物：酶、荧光蛋白、和放射性同位素）。

[0023] 本发明的其它方面提供了在高严谨条件下与依照 SEQ ID NO :1、3、5、7、9、11、13、15、17、或 18 或者其互补序列的核酸分子杂交的分离寡核苷酸。在另一些实施方案中，寡核苷酸可以存在于编码 SEQ ID NO :2、4、6、8、10、12、14、或 16 的序列中。在某些实施方案中，寡核苷酸的长度是至少 15、20、30、50、或 100 个核苷酸。在另一些实施方案中，寡核苷酸是用另一种分子（例如酶、荧光分子、或放射性同位素）标记的。还提供了能够特异扩增编码 TGF- β 结合蛋白的上文所述核酸分子的全部或部分的引物。在用于本文时，术语“特异扩增”应当理解为指扩增上述 TGF- β 结合蛋白而非其它 TGF- β 结合蛋白诸如 Dan、Cerberus、

Gremlin、或 SCGF(美国专利号 5,780,263) 的引物。

[0024] 本发明的相关方面提供了用于检测编码 TGF- β 结合蛋白的核酸分子的方法，包括如下步骤：在高严谨条件下将上文所述寡核苷酸保温，并检测所述寡核苷酸的杂交。在某些实施方案中，寡核苷酸可以是标记的和 / 或结合于固相支持物上。

[0025] 本发明的其它方面提供了能够切割编码上文所述 TGF- β 结合蛋白（例如 SEQ ID NO :2、6、8、10、12、14、或 16）之一的 RNA 的核酶。这些核酶可以由 DNA、RNA（包括 2'-O- 甲基核糖核酸）、核酸类似物（例如具有硫代磷酸酯键的核酸）或其混合物组成。还提供了编码这些核酶的核酸分子（例如 DNA 或 cDNA），以及能够表达或生成核酶的载体。载体的代表性实例包括质粒、逆转座子、粘粒、和基于病毒的载体（例如至少部分由逆转录病毒、腺病毒、或腺伴随病毒产生的病毒载体）。还提供了包含这些载体的宿主细胞（例如人、狗、大鼠、或小鼠细胞）。在某些实施方案中，宿主细胞可以是经载体稳定转化的。

[0026] 本发明的另一些方面提供了通过人工合成或是体外或体内转录来生成核酶的方法。在另一些实施方案中，由此生成的核酶可以进一步纯化和 / 或配制成药物组合物（例如核酶或编码核酶的核酸分子以及制药学可接受载体或稀释剂）。类似的，可以将本文所述反义寡核苷酸和抗体或是选择的其它分子配制成药物组合物。

[0027] 本发明的其它方面提供了包含与依照 SEQ ID NO :1、3、5、7、9、11、13、或 15 或者其互补序列的核酸分子发生杂交的核酸分子的反义寡核苷酸，其中所述寡核苷酸抑制上文所述 TGF- β 结合蛋白（例如人 BEER）的表达。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度是 15、20、25、30、35、40、或 50 个核苷酸。优选的是，寡核苷酸的长度小于 100、75、或 60 个核苷酸。应当显而易见的是，寡核苷酸可以由一种或多种核酸类似物、核糖核酸、或脱氧核糖核酸组成。另外，寡核苷酸可以通过一种或多种键修饰，包括例如共价键，诸如硫代磷酸酯键、磷酸三酯键、磷酸甲酯键、亚甲基（甲基亚氨基）键、吗啉基键、酰胺键、聚酰胺键、短链烷基糖间键、环烷基糖间键、短链杂原子糖间键、和杂环糖间键。美国专利号 5,989,912 提供了嵌合寡核苷酸的一个代表性实例。

[0028] 本发明的另一个方面提供了用于增加骨矿化的方法，包括将有效量的上文所述核酶导入温血动物。在相关方面，这些方法包括如下步骤：在有助于核酸分子转录生成核酶的条件下，将有效量的上文所述能够生成期望核酶的核酸分子或载体导入患者。

[0029] 本发明的其它方面提供了转基因非人动物。在一个实施方案中，提供了其生殖细胞和体细胞中含有编码上文所述 TGF- β 结合蛋白的核酸分子的转基因动物，所述核酸分子可操作连接了对被导入到该动物或处于胚胎阶段的该动物祖先的基因表达有效的启动子，条件是所述动物不包括人。在其它实施方案中，提供了转基因敲除动物，包括其生殖细胞和体细胞在与编码上文所述 TGF- β 结合蛋白的核酸分子发生杂交的内源核酸分子的至少一个等位基因中包含破坏的动物，其中与不含该破坏的动物相比，所述破坏阻止由所述等位基因转录信使 RNA，条件是所述动物不包括人。在各种实施方案中，所述破坏指核酸缺失、替代、或插入。在其它实施方案中，转基因动物指小鼠、大鼠、绵羊、猪、或狗。

[0030] 本发明的另一些方面提供了用于检测 TGF- β 结合蛋白基因表达的试剂盒，包含装有核酸分子的容器，其中所述核酸分子选自下组：(a) 包含 SEQ ID NO :1、3、5、7、9、11、13、15、100、或 101 的核苷酸序列的核酸分子；(b) 包含 (a) 中核苷酸序列的互补序列的核酸分子；(c) 作为 (a) 或 (b) 的片段、长度为至少 15、20、30、50、75、或 100 个核苷酸的核酸

分子。还提供了用于检测 TGF- β 结合蛋白的试剂盒，其中包含装有本文所述 TGF- β 结合蛋白抗体之一的容器。

[0031] 例如，本发明的一个方面提供了用于测定选择的分子是否能够增加骨矿物质含量的方法，包括下列步骤：(a) 将一种或多种候选分子与由依照权利要求 1 的核酸分子编码的 TGF- β 结合蛋白和选定的 TGF- β 家族蛋白成员（例如 BMP-5 或 6）混合；(b) 测定候选分子是否改变 TGF- β 家族成员的信号传导，或是否改变 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员的结合。在某些实施方案中，所述分子可改变 TGF- β 作为间充质细胞分化正调节物发挥功能的能力。在本发明的这个方面，候选分子可能通过例如减少（例如抑制）或增加（例如增强）信号传导或结合而改变信号传导或结合。

[0032] 本发明的还有一个方面提供了用于测定选择的分子是否能够增加骨矿物质含量的方法，包括如下步骤：测定选择的分子是否抑制 TGF- β 结合蛋白与骨或其类似物的结合。骨或其类似物的代表性实例包括羟磷灰石和通过活组织检查得到的原代人骨样品。

[0033] 在上文所述方法的某些实施方案中，选择的分子包含在分子混合物中，而且该方法还包括分离一种或多种在测定中有功能的分子的步骤。在还有一个实施方案中，将 TGF- β 家族的蛋白结合于固相支持物上并测量 TGF- β 结合蛋白的结合，或者将 TGF- β 结合蛋白结合于固相支持物上并测量 TGF- β 蛋白的结合。

[0034] 利用诸如上文所述方法，可以对多种分子测定它们通过抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族蛋白相结合来增加骨矿物质含量的能力。这些分子的代表性实例包括蛋白质或肽、有机分子、和核酸分子。

[0035] 本发明的其它相关方面提供了用于在温血动物中增加骨矿物质含量的方法，包括如下步骤：对温血动物施用治疗有效量的通过本文所述测定法鉴别的分子。本发明的另一个方面提供了用于在温血动物中增加骨矿物质含量的方法，包括如下步骤：对温血动物施用治疗有效量的抑制 TGF- β 结合蛋白与包括骨形态发生蛋白 (BMP) 在内的 TGF- β 超家族蛋白相结合的分子。合适分子的代表性实例包括反义分子、核酶、核酶基因、和特异识别 TGF- β 结合蛋白并改变其活性的抗体（例如人源化抗体）。

[0036] 本发明的另一个方面提供了用于在温血动物中增加骨矿物质含量的方法，包括下列步骤：(a) 将指导如下分子表达的载体导入归巢至骨的细胞，所述分子可抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族蛋白和骨形态发生蛋白 (BMP) 相结合；并 (b) 对温血动物施用含有该载体的细胞。在用于本文时，应当理解，若细胞在外周施用后定位于骨基质内，则它们“归巢至骨”。在一个实施方案中，这些方法还包括在导入步骤前由骨髓分离归巢至骨的细胞。在另一个实施方案中，归巢至骨的细胞选自 CD34+ 细胞和成骨细胞。

[0037] 本发明的其它方面提供了抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 超家族蛋白相结合的（优选分离的）分子。

[0038] 在另一些实施方案中，可以以组合物的形式提供分子，而且还可以包括骨再吸收的抑制剂。这些抑制剂的代表性实例包括降钙素、雌激素、二膦酸酯、具有抗再吸收活性的生长因子、和它莫西芬。

[0039] 可以在上文所述治疗性方案中使用的分子的代表性实例包括例如核酶、核酶基因、反义分子、和 / 或抗体（例如人源化抗体）。根据这些分子的选择，它们可用于改变、拮抗、或刺激本文所述 TGF- β 结合蛋白家族成员的信号传导或结合。

[0040] 在本发明的多种实施方案中,上文所述分子以及治疗或预防方法可用于诸如骨质疏松、骨软化、牙周病、坏血病、库欣病、骨折等状况以及由于四肢固定和使用类固醇引起的状况。

[0041] 本发明还提供了与 TGF- β 结合蛋白硬化素 (SOST) 特异结合的抗体,并提供了含有由硬化素 (sclerostin) 中与 TGF- β 超家族成员诸如骨形态发生蛋白相互作用的区域衍生的硬化素肽的免疫原。在一个实施方案中,本发明提供了与硬化素多肽特异结合的抗体或其抗原结合片段,所述硬化素多肽包含 SEQ ID NO :2、6、8、14、46、或 65 所示氨基酸序列,其中所述抗体竞争性抑制 SOST 多肽与 (i) 骨形态发生蛋白 (BMP) I 型受体结合位点和 (ii) BMP II 型受体结合位点中至少其一的结合,其中 BMP I 型受体结合位点能够与包含 GenBank 编号 NM_004329 (SEQ ID NO :102)、D89675 (SEQ ID NO :103)、NM_001203 (SEQ ID NO :104)、S75359 (SEQ ID NO :105)、NM_030849 (SEQ ID NO :106)、D38082 (SEQ ID NO :107)、NP_001194 (SEQ ID NO :108)、BAA19765 (SEQ ID NO :109)、或 AAB33865 (SEQ ID NO :110) 所示氨基酸序列的 BMP I 型受体多肽结合,而且其中 BMP II 型受体结合位点能够与包含 GenBank 编号 U25110 (SEQ ID NO :111)、NM_033346 (SEQ ID NO :112)、Z48923 (SEQ ID NO :114)、CAA88759 (SEQ ID NO :115)、或 NM_001204 (SEQ ID NO :113) 所示氨基酸序列的 BMP II 型受体多肽结合。在另一个实施方案中,本发明提供了与硬化素多肽特异性结合并削弱硬化素均二聚体形成的抗体或其抗原结合片段,其中所述硬化素多肽包含 SEQ ID NO :2、6、8、14、46、或 65 所示氨基酸序列。

[0042] 在本发明的某些特殊实施方案中,所述抗体是多克隆抗体。在其它实施方案中,所述抗体是单克隆抗体,例如小鼠、人、大鼠、或仓鼠单克隆抗体。本发明还提供了能够生成该单克隆抗体的杂交瘤细胞或宿主细胞。在本发明的其它实施方案中,所述抗体是人源化抗体或嵌合抗体。本发明还提供了生成该人源化或嵌合抗体的宿主细胞。在某些实施方案中,所述抗体的抗原结合片段是 F(ab')₂、Fab'、Fab、Fd 或 Fv 片段。本发明还提供了作为单链抗体的抗体,并提供了能够表达该单链抗体的宿主细胞。在另一个实施方案中,本发明提供了包含这些抗体和制药学可接受载体的组合物。

[0043] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含 SOST 多肽中至少 21 个连续氨基酸且不超过 50 个连续氨基酸的肽的免疫原,所述 SOST 多肽包含 SEQ ID NO :2、6、8、14、46、或 65 所示氨基酸序列,其中所述肽能够在非人动物中引发与该 SOST 多肽特异性结合并竞争性抑制 SOST 多肽与 (i) 骨形态发生蛋白 (BMP) I 型受体结合位点和 (ii) BMP II 型受体结合位点中至少其一的结合的抗体,其中 BMP I 型受体结合位点能够与包含 GenBank 编号 NM_004329 (SEQ ID NO :102)、D89675 (SEQ ID NO :103)、NM_001203 (SEQ ID NO :104)、S75359 (SEQ ID NO :105)、NM_030849 (SEQ ID NO :106)、D38082 (SEQ ID NO :107)、NP_001194 (SEQ ID NO :108)、BAA19765 (SEQ ID NO :109) 或 AAB33865 (SEQ ID NO :110) 所示氨基酸序列的 BMP I 型受体多肽结合,而且其中 BMP II 型受体结合位点能够与包含 GenBank 编号 U25110 (SEQ ID NO :111)、NM_033346 (SEQ ID NO :112)、Z48923 (SEQ ID NO :114)、CAA88759 (SEQ ID NO :115) 或 NM_001204 (SEQ ID NO :113) 所示氨基酸序列的 BMP II 型受体多肽结合。本发明还提供了包含 SOST 多肽中至少 21 个连续氨基酸且不超过 50 个连续氨基酸的肽的免疫原,所述 SOST 多肽包含 SEQ ID NO :2、6、8、14、46、或 65 所示氨基酸序列,其中所述肽能够在非人动物中引发与该 SOST 多肽特异结合并削弱硬化素均二聚体

形成的抗体。

[0044] 在某些特殊实施方案中，本发明的免疫原与载体分子相关联。在某些实施方案中，载体分子是载体多肽，而且在特定实施方案中，载体多肽是匙孔血蓝蛋白。

[0045] 本发明还提供了用于生成与 SOST 多肽特异结合的抗体的方法，包括用包含 SOST 多肽中至少 21 个连续氨基酸且不超过 50 个连续氨基酸的肽的免疫原免疫非人动物，其中 (a) 所述 SOST 多肽包含 SEQ ID NO :2、6、8、14、46、或 65 所示氨基酸序列；(b) 所述抗体竞争性抑制 SOST 多肽与 (i) 骨形态发生蛋白 (BMP) I 型受体结合位点和 (ii) BMP II 型受体结合位点中至少其一结合；(c) BMP I 型受体结合位点能够与包含 GenBank 编号 NM_004329 (SEQ ID NO :102)、D89675 (SEQ ID NO :103)、NM_001203 (SEQ ID NO :104)、S75359 (SEQ ID NO :105)、NM_030849 (SEQ ID NO :106)、D38082 (SEQ ID NO :107)、NP_001194 (SEQ ID NO :108)、BAA19765 (SEQ ID NO :109) 或 AAB33865 (SEQ ID NO :110) 所示氨基酸序列的 BMP I 型受体多肽结合；且 (d) BMP II 型受体结合位点能够与包含 GenBank 编号 U25110 (SEQ ID NO :111)、NM_033346 (SEQ ID NO :112)、Z48923 (SEQ ID NO :114)、CAA88759 (SEQ ID NO :115) 或 NM_001204 (SEQ ID NO :113) 所示氨基酸序列的 BMP II 型受体多肽结合。

[0046] 在另一个实施方案中，本发明提供了用于生成与 SOST 多肽特异结合的抗体的方法，所述 SOST 多肽包含 SEQ ID NO :2、6、8、14、46、或 65 所示氨基酸序列，该方法包括用包含 SOST 多肽中至少 21 个连续氨基酸且不超过 50 个连续氨基酸的肽的免疫原免疫非人动物，所述 SOST 多肽包含 SEQ ID NO :2、6、8、14、46、或 65 所示氨基酸序列，其中所述抗体削弱 SOST 均二聚体的形成。

[0047] 在参考下文详述和附图后，本发明的这些和其它方面将变得清楚。另外，将包括本文所列的更加详细描述某些流程或组合物（例如质粒等）的各种参考文献在内的文件完整收录作为参考。

[0048] 附图简述

[0049] 图 1 是比较人 Dan、人 Gremlin、人 Cerberus、和人 Beer 氨基酸序列的示意图。箭头指示半胱氨酸主链。

[0050] 图 2 概括了对多种人组织测量 TGF- β 结合蛋白基因、尤其是人 Beer 基因表达的结果。使用半定量逆转录 - 聚合酶链式反应 (RT-PCR) 流程由自总 RNA 合成的第一链 cDNA 扩增该基因的一部分（实施例 2A 中有更详细的描述）。

[0051] 图 3A-3D 概括了由小鼠胚胎切片的 RNA 原位杂交获得的结果，其中使用与小鼠 Beer 转录本互补的 cRNA 探针（实施例 2B 中有更详细的描述）。小图 3A 是 10.5dpc 胚胎的横切片。小图 3B 是 12.5dpc 胚胎的纵切片。小图 3C 和 3D 是 15.5dpc 胚胎的纵切片。

[0052] 图 4A-4C 通过 western 印迹分析例示了三种不同的多克隆抗体对它们各自抗原的特异性（实施例 4 中有更详细的描述）。图 4A 显示了抗人 Beer 抗体对人 Beer 抗原有特异反应性，对人 Dan 或人 Gremlin 却没有。图 4B 显示了抗人 Gremlin 抗体对人 Gremlin 抗原有反应性，对人 Beer 或人 Dan 却没有。图 4C 显示了抗人 Dan 抗体对人 Dan 有反应性，对人 Beer 或人 Gremlin 却没有。

[0053] 图 5 通过 western 印迹分析例示了 TGF- β 结合蛋白 Beer 对 BMP-5 和 BMP-6 而非 BMP-4 的选择性（实施例 5 中有更详细的描述）。

[0054] 图 6 证明了 TGF- β 结合蛋白 Beer 与 BMP-5 之间的离子相互作用的解离常数在

15–30nM 范围内。

[0055] 图 7 展示了 SOST(硬化素) 多肽及其最密切同源物中包含特征性胱氨酸结的区域的比对。形成胱氨酸结的三对二硫键以实线显示。以虚线显示的一对额外二硫键对这个家族而言是独特的, 它在 3D 结构中连接两个 β 发夹尖端。所述多肽是 SOST : 硬化素 (SEQ ID NO :126) ;CGHB : 人绒毛膜促性腺激素 β (SEQ ID NO :127) ;FSHB : 促卵泡激素 β 亚基 (SEQ ID NO :128) ;TSHB : 促甲状腺素 β 链前体 (SEQ ID NO :129) ;VWF : Von Willebrand 因子 (SEQ ID NO :130) ;MUC2 : 人粘液素 2 前体 (SEQ ID NO :131) ;CER1 : Cerberus1(Xenopuslaevis 同系物) (SEQ ID NO :132) ;DRM : gremlin (SEQ ID NO :133) ;DAN : (SEQ ID NO :134) ;CTGF : 结缔组织生长因子前体 (SEQ ID NO :135) ;NOV : NovH(肾胚细胞瘤过度表达基因蛋白同系物) (SEQ ID NO :136) ;CYR6 : (SEQ ID NO :137) 。

[0056] 图 8 例示了 SOST 核核心区的 3D 模型 (SOST_Core)。

[0057] 图 9 展示了 SOST 均二聚体的核心区的 3D 模型。

[0058] 图 10A 和 10B 提供了来自五种不同动物的头蛋白氨基酸序列比对 : 人 (NOGG_HUMAN, SEQ ID NO :138) ; 鸡 (NOGG_CHICK, SEQ ID NO :139) ; 非洲爪蟾 (NOGG_XENLA, SEQ ID NO :140) ; NOGG_FUGRU, SEQ ID NO :141 ; 和斑马鱼 (NOGG_ZEBRA, SEQ ID NO :142) ; 以及来自人 (SOST_HUMAN, SEQ ID NO :46) 、大鼠 (SOST_RAT, SEQ ID NO :65) 、和小鼠 (SOST_Mouse, SEQ ID NO :143) 的 SOST。

[0059] 图 11 例示了头蛋白 /BMP-7 复合物结构。BMP 均二聚体以表面模式显示在图的底部。头蛋白均二聚体以卡通模式显示在 BMP 二聚体的顶部。圆圈描绘了 N 端结合区、核心区、和 N 端与核心区之间的接头。

[0060] 图 12 描绘了位于 SOST N 端区的潜在 BMP 结合片段的 3D 模型。BMP 二聚体以表面模式显示, 而潜在的 BMP 结合片段以棍模式显示。指出了拟合到 BMP 表面上疏水口袋内的苯丙氨酸残基。

[0061] 发明详述

[0062] 定义

[0063] 在详细阐述本发明前, 先行阐明下文将用到的某些术语的定义、列出并定义缩写可能有助于理解本发明。

[0064] “分子”应当理解为包括蛋白质或肽 (例如具有期望结合特性的抗体、重组结合伙伴、肽) ;核酸 (例如 DNA、RNA、嵌合核酸分子、和诸如 PNA 等核酸类似物) ;以及有机或无机化合物。

[0065] “TGF- β ”应当理解为包括任何已知的或新的 TGF- β 超家族成员, 它也包括骨形态发生蛋白 (BMP)。

[0066] “TGF- β 受体”应当理解为指对 TGF- β 超家族的特定成员 (包括骨形态发生蛋白 (BMP)) 特异的受体。

[0067] “TGF- β 结合蛋白”应当理解为指具有针对 TGF- β 超家族特定成员或成员亚群 (包括骨形态发生蛋白 (BMP)) 的特异结合亲和力的蛋白质。TGF- β 结合蛋白的具体实例包括由 SEQ ID NO :1、5、7、9、11、13、15、100、和 101 编码的蛋白质。

[0068] 抑制“TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族蛋白和骨形态发生蛋白 (BMP) 结合”应当理解为指通过清除或阻止 TGF- β 与 TGF- β 结合蛋白结合, 容许 TGF- β 或骨形态发生蛋白

(BMP) 的激活,或是容许包括骨形态发生蛋白 (BMP) 在内的 TGF- β 家族成员与它们各自受体结合的分子。这种抑制可以通过例如抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 超家族的特定成员相结合的分子来实现。

[0069] “载体”指能够指导期望蛋白质表达的装配体。载体必需包含与目的基因可操作连接的转录启动子元件。载体可以由脱氧核糖核酸 (“DNA”)、核糖核酸 (“RNA”)、或二者组合 (例如 DNA-RNA 嵌合物) 组成。可选的是,载体可以包含多聚腺苷酸化序列、一个或多个限制位点、以及一个或多个选择标记,诸如新霉素磷酸转移酶或潮霉素磷酸转移酶。另外,根据选择的宿主细胞和采用的载体,本文所述载体中还可以掺入了其它遗传元件,诸如复制起点、额外的核酸限制位点、增强子、赋予转录以可诱导性的序列、和选择标记。

[0070] “分离的核酸分子”指未整合到生物体的基因组 DNA 中的核酸分子。例如,已经与真核细胞的基因组 DNA 分离开的编码 TGF- β 结合蛋白的 DNA 分子就是分离的 DNA 分子。分离的核酸分子的另一个实例是未整合到生物体的基因组中的化学合成核酸分子。分离的核酸分子可以是基因组 DNA、cDNA、RNA,或是至少部分由核酸类似物组成。

[0071] “分离的多肽”指本质上不含在自然界中与该多肽相关联的污染性细胞成分诸如碳水化合物、脂质、或其它蛋白质性杂质的多肽。优选的是,这些分离的多肽是至少大约 90% 纯、更优选至少大约 95% 纯、最优选至少大约 99% 纯。在某些实施方案中,若特定蛋白质制剂标称在用考马斯蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶上显现单一条带,则它包含分离的多肽。术语“分离的”在提及有机分子 (例如有机小分子) 时意味着根据本领域众所周知的方法 (例如 NMR、熔点) 的测定,该化合物超过 90% 纯。

[0072] “硬化性骨化病”是 Hansen(1967) (Hansen, H. G., sklerosteose. Opitz, H. ; Schmid, F.,《Handbuch der Kinderheilkunde》,柏林,Springer 出版社,6 1967,第 351–355 页) 用于命名在许多病例中与 van Buchem 弥漫性骨皮质增生相似、但可能在骨变化的放射学表现和存在食指与中指的不对称皮肤并指方面有所不同的疾病的术语。在这种状况中,颌骨具有异常方正的外观。

[0073] “人源化抗体”指其中单克隆抗体的鼠或其它非人动物互补决定区已经由鼠或非人动物免疫球蛋白的重链和轻链可变区转移至人可变区中的重组蛋白。

[0074] 在用于本文时,“抗体片段”指抗体的一部分,诸如 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 等等。无论结构如何,抗体片段都与完整抗体所识别的相同抗原结合。例如,抗 TGF- β 结合蛋白单克隆抗体片段与 TGF- β 结合蛋白的表位结合。

[0075] 术语“抗体片段或抗原结合片段”还包括通过与特定抗原结合、形成复合物而像抗体那样发挥作用的任何合成或基因工程化蛋白质。例如,抗体片段包括由轻链可变区组成的分离片段、由重链和轻链可变区组成的“Fv”片段、其中轻链和重链可变区以肽接头相连的重组单链多肽分子 (“scFv 蛋白”)、和由模拟高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位。

[0076] “可检测标记物”指能够与多肽部分诸如抗体部分或核酸部分缀合而产生可用于诊断的分子的分子或原子。可检测标记物的实例包括螯合剂、光敏剂、放射性同位素、荧光剂、顺磁离子、酶、和其它标记物部分。

[0077] 在用于本文时,“免疫缀合物”指包含抗 TGF- β 结合蛋白抗体或抗体片段以及可检测标记物或效应分子的分子。优选的是,免疫缀合物在缀合后具有与缀合前大致相同或只是略微降低的与 TGF- β 结合蛋白相结合的能力。

[0078] 缩写 :TGF- β -“转化生长因子- β ”;TGF- β BP-“转化生长因子- β 结合蛋白”(一种代表性 TGF- β BP 命名为“H. Beer”);BMP-“骨形态发生蛋白”;PCR-“聚合酶链式反应”;RT-PCR-其中首先使用逆转录酶 (RT) 将 RNA 转录成 DNA 的 PCR 程序;cDNA-通过将 RNA 序列复制成 DNA 形式而产生的任何 DNA。

[0079] 如上所述,本发明提供了 TGF- β 结合蛋白的新类别,以及用于在温血动物中增加骨矿物质含量的方法和组合物。简而言之,本发明基于如下意外发现:编码 TGF- β 结合蛋白家族新成员的基因中的突变会导致特征为骨矿物质含量比正常个体高 1-4 倍的罕见状况(硬化性骨化病)。由此,正如下文将更为详细的讨论,这项发现导致了可用于选择抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 蛋白家族和骨形态发生蛋白 (BMP) 结合的分子的测定法以及利用这些分子来增加温血动物(包括例如人)骨矿物质含量的方法的开发。

[0080] 称为硬化性骨化病 (sclerosteosis) 的疾病的讨论

[0081] 硬化性骨化病是人体中与异常骨矿物质密度有关的疾病。硬化性骨化病是 Hansen (1967) (Hansen, H. G. , Sklerosteose. Opitz, H. ;Schmid, F. ,《Handbuch der Kinderheilkunde》,柏林, Springer 出版社,6 1967,第 351-355 页) 用于命名在许多病例中与 van Buchem 弥漫性骨皮质增多症相似、但可能在骨变化的放射学表现和存在食指与中指的不对称皮肤并指方面有所不同的疾病的术语。

[0082] 现在知道硬化性骨化病是成年人中以广泛散布的骨硬化损伤为特征的常染色体半显性疾病。这种状况是渐进的。硬化性骨化病还具有与并指(两个或多个手指合并在一起)有关的发育状态。硬化性骨化病综合症与身材高大有关,许多患病个体的身高达到 6 英尺或更高。纯合子的骨矿物质含量可以比正常个体高 1 至 6 倍,而骨矿物质密度可以比正常值(例如来自未患病的兄弟姐妹)高 1 至 4 倍。

[0083] 硬化性骨化病综合症主要发生于荷兰血统的南非白人。南非白人人群中每 140 个人有大约 1 人是突变型基因的携带者(杂合子)。突变显示 100% 的外显率。有杂合子中骨矿物质密度增加而无相关病理(并指或头骨过度生长)的有趣报道。

[0084] 在硬化性骨化病患者中没有观察到垂体 - 下丘脑轴的异常。具体而言,看来不存在生长激素和皮质素过度生成。另外,患病个体的性激素水平是正常的。然而,骨周转标志物(成骨细胞特异性碱性磷酸酶、骨钙蛋白、1 型前胶原 C' 前肽 (PICP)、和总碱性磷酸酶(参阅 Comier, C. , Curr. Opin. Rheu. 7 :243, 1995)) 指示存在与疾病有关的过度成骨细胞活性,但是,根据骨再吸收标志物(吡啶啉、脱氧吡啶啉、N- 端肽、尿液羟脯氨酸、血浆抗酒石酸酸性磷酸酶、和半乳糖基羟赖氨酸(参阅 Comier, 见上文)) 的测量,存在正常至略微降低的破骨细胞活性。

[0085] 硬化性骨化病的特征是患病个体一生中全身骨骼内骨的持续沉积。在纯合子中,骨矿物质的持续沉积导致缺乏机械刺激受体的骨骼部位(头骨、颌骨、颅骨)过度生长。在患有硬化性骨化病的纯合子中,头骨的骨过度生长导致头颅压缩,最终由于对脑干的过度流体静力压而导致死亡。在骨骼的所有其它部分,存在普遍且弥散的硬化。长骨的皮层区域大大增厚,导致骨强度实质性增加。小梁连接的厚度增加,继而增加骨小梁的强度。硬化骨在 x 射线下显示异常的不透明。

[0086] 正如实施例 1 中更为详细的描述,已经将引起硬化性骨化病综合症的罕见基因突变定位于人 17 号染色体中编码 TGF- β 结合蛋白家族(其代表性实例称为“H. Beer”)新成

员的区域。正如下文更为详细的描述,根据这个发现,骨矿化的机制得到更加充分的理解,从而能够开发用于选择增加骨矿化的分子的测定法,并且将这些分子用于增加骨矿物质含量,并用于预防多种疾病。

[0087] TGF- β 超家族

[0088] 转化生长因子- β (TGF- β) 超家族包括共享共同序列元件和结构基元(在二级和三级两种水平上) 的多种生长因子。已知这个蛋白质家族发挥影响多种细胞类型的广谱生物学反应。许多 TGF- β 家族成员在胚胎发育过程中在模式形成和组织特化中具有重要功能;在成年人中, TGF- β 家族成员涉及例如伤口愈合、骨修复和骨重建、以及免疫系统的调控。除了 TGF- β 以外,该超家族还包括骨形态发生蛋白(BMP)、激活素、抑制素、生长和分化因子(GDF)、以及神经胶质衍生的神经营养因子(GDNF)。初步分类是通过将特定蛋白质归入一般亚家族的一般序列特征而制定的。由于更小组成员之间更严格的序列保守性,有可能在亚家族内进一步分层。在某些情况中,诸如 BMP-5、BMP-6 和 BMP-7,更小组成员之间的氨基酸同一性可以高到 75%。这个同一性水平使得一个代表性序列能够说明亚组中将它与更大家族其它成员区分的关键生物化学元件。

[0089] 已经测定了 TGF- β 2 的晶体结构。TGF- β 2 单体的一般折叠包含通过三个二硫桥形成的稳定的致密半胱氨酸结样结构。通过一个二硫桥稳定化的二聚化是反向平行的。

[0090] TGF- β 通过诱导 I 和 II 型受体的异型寡聚复合物的形成而进行信号传导。TGF- β 信号的转导涉及跨膜丝氨酸 / 苏氨酸激酶受体的这两种不同的 I 型和 II 型亚家族。已经鉴定了至少 7 种 I 型受体和 5 种 II 型受体(参阅 Kawabata 等, Cytokine Growth Factor Rev. 9 :49-61, 1998; Miyazono 等, Adv. Immunol. 75 :115-57, 2000)。TGF- β 家族成员通过与具有丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性的受体结合来启动它们的细胞作用。每个 TGF- β 家族成员与 I 型和 II 型受体的特征性组合相结合,二者都是信号传导所需要的。在 TGF- β 受体激活的现行模型中,首先 TGF- β 配体与 II 型受体(TbR-II) 结合,后者在细胞膜中以寡聚物形式与激活的激酶一起存在。此后,在缺乏 TbR-II 时不能与配体结合的 I 型受体(TbR-I) 被募集到复合物中而形成配体/II 型/I 型三元复合物。然后,TbR-II 主要在近膜区域中富含甘氨酸和丝氨酸残基的结构域(GS 结构域) 内磷酸化 TbR-I,并由此激活 TbR-I。然后,激活后的 I 型受体激酶磷酸化 Smad 蛋白家族的特定成员,后者转位至细胞核,在那里它们将调控特定基因的转录。

[0091] 骨形态发生蛋白(BMP) 是决定人体骨矿物质密度的关键调控蛋白

[0092] 对骨形成的认识方面的一项主要进展是骨形态发生蛋白(BMP)(也称为生骨蛋白(OP))的鉴定,它在体内调节软骨和硬骨分化。BMP/OP 通过一系列级联事件诱导软骨内骨分化,包括软骨形成、软骨肥大和钙化、血管入侵、成骨细胞分化、以及硬骨形成。如上所述,BMP/OP(BMP 2-14, 以及生骨蛋白 1 和 2 即 OP-1 和 OP-2)(参阅例如 GenBank P12643(BMP-2)、GenBank P12645(BMP3)、GenBank P55107(BMP-3b, 生长 / 分化因子 10(GDF-10))、GenBank P12644(BMP4)、GenBank P22003(BMP5)、GenBank P22004(BMP6)、GenBank P18075(BMP7)、GenBank P34820(BMP8)、GenBank Q9UK05(BMP9)、GenBank O95393(BM10)、GenBank O95390(BMP11, 生长 / 分化因子 11 前体(GDF-11))、GenBank O95972(BM15)) 是 TGF- β 超家族的成员。BMP/OP 亚家族成员之间惊人的进化保守性说明它们在动物的正常发育和功能方面至关重要。此外,多种形式 BMP/OP 的存在提出了关于这

种明显冗余的生物学相关性的重要问题。除了胎后软骨发生和硬骨发生以外, BMP/OP 在骨骼发生(包括颅面和牙齿组织的发育)中和在胚胎发育和包括肾在内的实质器官的器官发生中发挥多种作用。现在认识到依赖改动共同(和少数)分子机制以推动特化组织和器官出现的本质。BMP/OP 超家族是在调用高度保守羧基末端区域内具有氨基酸基序微小变异的分子异构体来编制多种特化功能时天性节约的精致实例。

[0093] BMP 以大型前体蛋白的形式合成。二聚化后, BMP 在细胞内进行蛋白水解切割, 产生羧基末端成熟蛋白, 然后由细胞分泌出去。BMP 像其它 TGF- β 家族成员一样通过与 I 型和 II 型丝氨酸 / 苏氨酸激酶受体二者协同结合来启动信号转导。可以以 BMP 作为配体的 I 型受体包括 BMPR-IA(也称为 ALK-3)、BMPR-IB(也称为 ALK-6)、ALK-1、和 ALK-2(也称为 ActR-I)。至于 II 型受体, BMP 与 BMP II 型受体(BMPR-II)、II 型激活素(ActR-II)、和 IIB 型激活素(ActR-IIB)结合。(参阅 Balemans 等, 见上文, 及其中引用的参考文献)。GenBank 数据库中提供了 BMP I 型受体多肽的多核苷酸序列及所编码的氨基酸序列, 例如 GenBank NM_004329(SEQ ID NO:102, 由 SEQ ID NO:116 编码)、D89675(SEQ ID NO:103, 由 SEQ ID NO:117 编码)、NM_001203(SEQ ID NO:104, 由 SEQ ID NO:118 编码)、S75359(SEQ ID NO:105, 由 SEQ ID NO:119 编码)、NM_030849(SEQ ID NO:106, 由 SEQ ID NO:120 编码)、和 D38082(SEQ ID NO:107, 由 SEQ ID NO:121 编码)。GenBank 数据库中还提供了 I 型受体的其它多肽序列, 例如 NP_001194(SEQ ID NO:108)、BAA19765(SEQ ID NO:109)、和 AAB33865(SEQ ID NO:110)。GenBank 数据库中提供了 BMP II 型受体多肽的多核苷酸序列及所编码的氨基酸序列, 包括例如 U25110(SEQ ID NO:111, 由 SEQ ID NO:122 编码)、NM_033346(SEQ ID NO:112, 由 SEQ ID NO:123 编码)、NM_001204(SEQ ID NO:113, 由 SEQ ID NO:124 编码)、和 Z48923(SEQ ID NO:114, 由 SEQ ID NO:125 编码)。GenBank 数据库中还提供了 II 型受体的其它多肽序列, 例如 CAA88759(SEQ ID NO:115)。

[0094] 与其它胱氨酸结蛋白相似, BMP 形成均二聚体结构(Scheufler 等, J. Mol. Biol. 287:103-15, 1999)。根据对 BMP/TGF- β 家族进行的进化痕迹分析, BMP I 型受体结合位点和 II 型受体结合位点定位于 BMP 结构的表面 (Innis 等, Protein Eng. 13:839-47, 2000)。I 型受体结合位点在 BMP 上的定位后来通过 BMP-2/BMP 受体 IA 复合物的 x 射线结构得到了确认 (Nickel 等, J. Joint Surg. Am. 83A(增刊 1(Pt 1)):S7-S14, 2001)。预测的 II 型受体结合位点非常符合 TGF- β 3/TGF- β II 型受体复合物的 x 射线结构 (Hart 等, Nat. Struct. Biol. 9:203-208, 2002), 它与 BMP/BMP 受体 IIA 系统高度相似。

[0095] BMP 拮抗作用

[0096] BMP 和激活素亚家族通过诸如 TGF- β 结合蛋白进行意义重大的翻译后调控。存在精细的胞外控制系统, 由此合成并输出高亲和力的拮抗剂, 随后与 BMP 或激活素选择性结合而破坏它们的生物学活性(W. C. Smith, TIG 15(1):3-6, 1999)。已经鉴定了许多这样的天然拮抗剂, 而且根据序列差异, 由于缺乏一级序列保守性, 这些拮抗剂似乎已经独立进化。这些拮抗剂的早期研究凸现了与 BMP-2 和 BMP-4 相互作用并中和它的不同偏爱。在脊椎动物中, 拮抗剂包括头蛋白、chordin、chordin 样、卵泡抑素、FSRP、DAN/Cerberus 蛋白家族和硬化素(SOST)(参阅 Balemans 等, 见上文, 及其引用的参考文献)。拮抗或抑制作用的机制似乎对不同拮抗剂是不同的(Iemura 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:9337-9342, 1998)。

[0097] BMP拮抗剂头蛋白上的I型和II型受体结合位点也已定位。头蛋白以高亲和力与BMP结合(Zimmerman等,1996)。关于头蛋白/BMP-7复合物结构的一项研究揭示了这两种蛋白质之间的结合相互作用(Groppe等,Nature 420:636-42,2002)。头蛋白-BMP-7结构在BMP信号传导复合物模型上的叠加显示,头蛋白的结合有效地掩蔽了BMP-7上的两对结合表位(即BMP I型和II型受体结合位点)。头蛋白中富含半胱氨酸的支架序列的前面是称为“夹子”的大约20个氨基酸残基的N端区段(第28-48位残基)。I型受体结合位点被头蛋白夹子结构域的N端部分占据,而II型受体结合位点被该夹子结构域的羧基末端部分占据。头蛋白C端附近的核心区中两条 β 链也与BMP-7在II型受体结合位点处接触。这种结合模式使得头蛋白二聚体能够有效封闭BMP二聚体上的所有受体结合位点(两个I型和两个II型受体结合位点)。

[0098] 新的TGF- β 结合蛋白

[0099] 如上所述,本发明提供了与人DAN、人Gremlin和人Cerberus、以及SCGF(美国专利号5,780,263)相比具有几乎相同的半胱氨酸(二硫化物)支架、但是在核苷酸水平几乎没有同源性的TGF- β 结合蛋白新种类(背景资料通常参阅Hsu, D. R., Economides, A. N., Wang, X., Eimon, P. M., Harland, R. M.,“非洲爪蟾背化因子Gremlin鉴定为拮抗BMP活性的分泌型蛋白新家族”(The Xenopus Dorsalizing Factor Gremlin Identifies a Novel Family of Secreted Proteins that Antagonize BMP Activities), Molecular Cell 1:673-683,1998)。

[0100] 编码TGF- β 结合蛋白的核酸分子新种类的代表性实例公开于SEQ ID NO:1、5、7、9、11、13、15、100、和101。本文公开的多核苷酸编码称为Beer的多肽,在本文中也称为硬化素或SOST。这类结合蛋白的代表性成员也应当理解为包括TGF- β 结合蛋白的变体(例如SEQ ID NO:5和7)。在用于本文时,“TGF- β 结合蛋白变体基因”(例如编码TGF- β 结合蛋白变体的分离的核酸分子)指编码具有属SEQ ID NO:2、10、12、14、16、46、或65修饰形式的氨基酸序列的多肽的核酸分子。这些变体包括TGF- β 结合蛋白基因的天然存在的多态性或等位基因变体,以及包含这些氨基酸序列的保守氨基酸替代的合成基因。本领域技术人员知道有多种标准可指示肽或多肽中特定位置的氨基酸是否相似。例如,相似氨基酸或保守氨基酸替代即氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代,包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、组氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β 分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、和芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)的氨基酸。被认为更难分类的脯氨酸与具有脂肪族侧链的氨基酸(例如Leu、Val、Ile、和Ala)具有相同性质。在某些情况下,用谷氨酰胺替代谷氨酸或是用天冬酰胺替代天冬氨酸被认为是相似替代,因为谷氨酰胺和天冬酰胺分别是谷氨酸和天冬氨酸的酰胺衍生物。

[0101] TGF- β 结合蛋白基因的其它变体形式是包含本文所述核苷酸序列的插入或缺失的核酸分子。可以通过测定基因是否与具有核苷酸序列SEQ ID NO:1、5、7、9、11、13、15、100、或101的核酸分子在严谨条件下发生杂交来鉴定TGF- β 结合蛋白变体基因。另外,TGF- β 结合蛋白变体基因应当编码具有半胱氨酸主链的蛋白质。

[0102] 或者,可以通过序列比较来鉴定TGF- β 结合蛋白变体基因。在用于本文时,若两

种氨基酸序列的氨基酸残基在进行比对以寻求最大对应性时相同，则这两种氨基酸序列具有“100%氨基酸序列同一性”。类似的，若两种核苷酸序列的核苷酸残基在进行比对以寻求最大对应性时相同，则这两种核苷酸序列具有“100%核苷酸序列同一性”。序列比较可以使用标准软件程序来进行，诸如由 DNASTAR（麦迪逊，威斯康星）生产的 LASERGENE 生物信息学计算套装中包含的程序。本领域技术人员众所周知通过测定最佳比对来比较两种核苷酸或氨基酸序列的其它方法（参阅例如 Peruski 和 Peruski,《因特网和新生物学：基因组和分子研究的工具》(The Internet and the New Biology :Tools for Genomic and Molecular Research), ASM 出版公司, 1997 年; Wu 等编，“核酸和蛋白质的信息超级高速公路和计算机数据库”(Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins),《基因生物技术方法》(Methods in Gene Biotechnology), 第 123-151 页, CRC 出版公司, 1997 年; 和 Bishop 编,《人类基因组计算指南》(Guide to Human Genome Computing), 第 2 版, Academic 出版公司, 1998 年）。

[0103] TGF- β 结合蛋白变体应当与 SEQ ID NO:2、6、10、12、14、16、46、或 65 具有至少 50%、优选超过 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或 95% 的氨基酸序列同一性。或者，可以通过与 SEQ ID NO:1、5、9、11、13、15、100、或 101 具有至少 70% 的核苷酸序列同一性来鉴定 TGF- β 结合蛋白变体。此外，本发明涵盖与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:100 具有超过 75%、80%、85%、90%、或 95% 同一性的 TGF- β 结合蛋白基因变体。不管用于鉴定 TGF- β 结合蛋白变体基因或 TGF- β 结合蛋白变体的具体方法如何，TGF- β 结合蛋白变体或由 TGF- β 结合蛋白变体基因编码的多肽可以在功能上由例如它与 TGF- β 蛋白家族选定成员结合和 / 或抑制其信号传导的能力或者它与抗 TGF- β 结合蛋白抗体特异结合的能力来表征。

[0104] 本发明包括 TGF- β 结合蛋白基因的功能片段。在本发明的内容中，TGF- β 结合蛋白基因的“功能片段”指编码或是 (1) 具有上文所述功能活性或是 (2) 与抗 TGF- β 结合蛋白抗体特异结合的 TGF- β 结合蛋白多肽一部分的核酸分子。例如，本文所述 TGF- β 结合蛋白基因的功能片段包括核苷酸序列 SEQ ID NO:1、5、9、11、13、15、100、或 101 的一部分。

[0105] 2. TGF- β 结合蛋白基因的分离

[0106] 编码 TGF- β 结合蛋白的 DNA 分子可以通过使用基于例如 SEQ ID NO:1 的多核苷酸探针筛选人类 cDNA 或基因组文库获得。例如，制备 cDNA 文库的第一步是使用本领域技术人员众所周知的方法分离 RNA。一般而言，RNA 分离技术包括破碎细胞的方法，抑制由 RNA 酶指导的 RNA 降解的方法，以及由 DNA、蛋白质、和多糖污染物分离 RNA 的方法。例如，可以如下分离总 RNA：将组织在液氮中冻结，用臼和杵将冻结的组织磨碎以裂解细胞，用酚 / 氯仿溶液抽提磨碎的组织以除去蛋白质，并通过用氯化锂进行的选择性沉淀由剩余污染物分离 RNA（参阅例如 Ausubel 等编，《分子生物学简略方案》(Short Protocols in Molecular Biology), 第 3 版, 第 4-1 至 4-6 页, John Wiley & Sons, 1995 年 [“Ausubel, 1995”]; Wu 等,《基因生物技术方法》(Methods in Gene Biotechnology), 第 33-41 页, CRC 出版公司, 1997 年 [“Wu, 1997”])。或者，可以如下分离总 RNA：用异硫氰酸胍抽提磨碎的组织，用有机溶剂抽提，并使用差速离心由污染物分离 RNA（参阅例如 Ausubel, 1995, 第 4-1 至 4-6 页；Wu, 1997, 第 33-41 页）。

[0107] 为了构建 cDNA 文库，优选由总 RNA 制剂分离 poly(A)⁺RNA。可以使用 oligo(dT)-纤

维素层析的标准技术由总 RNA 分离 Poly(A)⁺RNA(参阅例如 Ausubel, 1995, 第 4-11 至 4-12 页)。可以使用本领域众所周知的技术由 poly(A)⁺RNA 合成双链 cDNA 分子(参阅例如 Wu, 1997, 第 41-46 页)。此外,可以使用商品化试剂盒来合成双链 cDNA 分子(例如 Life Technologies 公司, 盖瑟斯堡, 马里兰; CLONTECH Laboratories 公司, 帕洛阿尔托, 加利福尼亚; Promega 公司, 麦迪逊, 威斯康星; 和 Stratagene Cloning Systems, 拉霍亚, 加利福尼亚)。

[0108] 可以修改用于获得 TGF- β 结合蛋白 cDNA 克隆的基本方法, 构建富含 TGF 结合蛋白特异性 cDNA 分子的扣除后 cDNA 文库。用于构建扣除文库的技术对于本领域技术人员而言是众所周知的(参阅例如 Sargent, “差异表达基因的分离”(Isolation of Differentially Expressed Genes), Meth. Enzymol. 152 :423, 1987; 和 Wu 等编, “扣除和完整 cDNA 文库的构建和筛选”(Construction and Screening of Subtracted and Complete Expression cDNA Libraries),《基因生物技术方法》(Methods in Gene Biotechnology), 第 29-65 页, CRC 出版公司, 1997 年)。

[0109] 多种克隆载体适于构建 cDNA 文库。例如,可以在衍生自噬菌体的载体中构建 cDNA 文库, 诸如 λ gt10 载体(参阅例如 Huynh 等, “在 λ gt10 和 λ gt11 中构建和筛选 cDNA 文库”(Constructing and Screening cDNA Libraries in λ gt10 and λ gt11),《DNA 克隆: 实用方法》(DNA Cloning: A Practical Approach), 第 1 卷, Glover 编, 第 49 页, IRL 出版社, 1985 年; Wu, 1997, 第 47-52 页)。或者,可以将双链 cDNA 分子插入质粒载体, 诸如 pBluescript 载体(Stratagene Cloning Systems, 拉霍亚, 加利福尼亚)、LambdaGEM-4(Promega 公司, 麦迪逊, 威斯康星)、或其它商品化载体。还可以由美国典型培养物收藏中心(罗克维尔, 马里兰)获得合适的克隆载体。

[0110] 为了扩增克隆的 cDNA 分子, 使用标准技术将 cDNA 文库导入原核宿主。例如,可以将 cDNA 文库导入可以由 Life Technologies 公司(盖瑟斯堡, 马里兰)获得的感受态大肠杆菌 DH5 细胞。

[0111] 可以通过本领域众所周知的方法构建人类基因组 DNA 文库(参阅例如 Ausubel, 1995, 第 5-1 至 5-6 页; Wu, 1997, 第 307-327 页)。可以如下分离基因组 DNA: 用去污剂 Sarkosyl 裂解组织, 用蛋白酶 K 消化裂解物, 通过离心由裂解物中清除不溶碎片, 使用异丙醇由裂解物沉淀核酸, 并在氯化铯密度梯度上纯化重悬的 DNA。

[0112] 可以通过随机剪切基因组 DNA 或是通过用限制性核酸内切酶部分消化基因组 DNA 来获得适于构建基因组文库的 DNA 片段。可以依照常规技术将基因组 DNA 片段插入诸如噬菌体或粘粒等载体, 诸如使用限制酶消化来提供合适末端, 使用碱性磷酸酶处理来避免不合乎要求的 DNA 分子连接, 并用合适连接酶进行连接。用于这些操作的技术在本领域是众所周知的(参阅例如 Ausubel, 1995, 第 5-1 至 5-6 页; Wu, 1997, 第 307-327 页)。

[0113] 还可以通过聚合酶链式反应(PCR)用具有基于本文所述人 TGF- β 结合蛋白基因核苷酸序列的核苷酸序列的寡核苷酸引物获得编码 TGF- β 结合蛋白的核酸分子。例如《分子生物学方法第 15 卷 PCR 方案: 通用方法和应用》(Methods in Molecular Biology, Vol. 15 :PCR Protocols :Current Methods and Applications)(White 编, 第 211-215 页, Humana 出版公司, 1993 年)中 Yu 等, “使用聚合酶链式反应来筛选噬菌体文库”(Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries)一文提供了用 PCR 筛选文库

的常规方法。此外,例如《分子生物学方法,第 15 卷,PCR 方案:通用方法和应用》(Methods in Molecular Biology, Vol. 15 :PCR Protocols :Current Methods and Applications) (White 编,第 317-337 页, Humana 出版公司,1993 年) 中 Preston,“使用简并寡核苷酸引物和聚合酶链式反应来克隆基因家族成员”(Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members) 一文描述了使用 PCR 分离相关基因的技术。

[0114] 或者,可以由商业来源获得人基因组文库,诸如 Research Genetics(亨茨维尔,阿拉巴马) 和美国典型培养物保藏中心(罗克维尔,马里兰)。可以使用本文所述和本领域知道的标准方法,用一种或多种基于 SEQ ID NO :1 的多核苷酸探针筛选含有 cDNA 或基因组克隆的文库(参阅例如 Ausubel,1995,第 6-1 至 6-11 页)。

[0115] 如本文所述生成的抗 TGF- β 结合蛋白抗体也可用于由 cDNA 文库分离编码 TGF- β 结合蛋白的 DNA 序列。例如,可以用抗体筛选 λ gt11 表达文库,或者可以在杂合体选择和翻译后用抗体免疫筛选(参阅例如 Ausubel,1995,第 6-12 至 6-16 页;Margolis 等,“用抗体和蛋白质探针筛选 λ 表达文库”(Screening λ expression libraries with antibody and protein probes),《DNA 克隆 2:表达系统》(DNA Cloning2 :Expression Systems),第 2 版,Glover 等编,第 1-14 页,牛津大学出版社,1995 年)。

[0116] 可以使用标准方法测定 TGF- β 结合蛋白 cDNA 或 TGF- β 结合蛋白基因组片段的序列。此外,可以使用已充分确立的技术诸如缺失分析(通常参阅 Ausubel,1995,见上文)来完成包含 TGF- β 结合蛋白启动子或调控元件的基因组片段的鉴定。

[0117] 或者,可以通过使用共同引发的长寡核苷酸和本文所述核苷酸序列合成 DNA 分子来获得 TGF- β 结合蛋白基因(参阅例如 Ausubel,1995,第 8-8 至 8-9 页)。已确立的使用聚合酶链式反应的技术提供了合成长度为至少 2kb 的 DNA 分子的能力(Adang 等,Plant Mol. Biol. 21 :1131,1993;Bambot 等,PCR Methods and Applications 2 :266,1993;Dillon 等,“使用聚合酶链式反应来快速构建合成基因”(Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes),《分子生物学方法第 15 卷 PCR 方案:通用方法和应用》(Methods in Molecular Biology),Vol. 15 :PCR Protocols :Current Methods and Applications,White 编,第 263-268 页, Humana 出版公司,1993 年;Holowachuk 等,PCR Methods Appl. 4 :299,1995)。

[0118] 3. TGF- β 结合蛋白基因的生成

[0119] 可以使用本文所述流程,通过用具有基于 SEQ ID NO :1、5、9、11、13、15、100、或 101 的核苷酸序列的多核苷酸探针筛选各种 cDNA 或基因组文库来获得编码 TGF- β 结合蛋白基因变体的核酸分子。还可以通过人工合成来构建 TGF- β 结合蛋白基因变体。例如,可以设计这样的核酸分子,其编码与 SEQ ID NO :2、6、8、10、12、14、16、46、或 65 的氨基酸序列相比具有保守氨基酸变化的多肽。换言之,可以获得这样的变体,其包含 SEQ ID NO :2、6、8、10、12、14、16、46、或 65 中的一个或多个氨基酸替代,其中用烷基氨基酸替代 TGF- β 结合蛋白氨基酸序列中的烷基氨基酸、用芳香族氨基酸替代 TGF- β 结合蛋白氨基酸序列中的芳香族氨基酸、用含硫氨基酸替代 TGF- β 结合蛋白氨基酸序列中的含硫氨基酸、用含羟基的氨基酸替代 TGF- β 结合蛋白氨基酸序列中的含羟基氨基酸、用酸性氨基酸替代 TGF- β 结合蛋白氨基酸序列中的酸性氨基酸、用碱性氨基酸替代 TGF- β 结合蛋白氨基酸序列中的碱

性氨基酸、或用二元单羧基氨基酸替代 TGF- β 结合蛋白氨基酸序列中的二元单羧基氨基酸。例如，在常见氨基酸中，“保守氨基酸替代”解释为属于下列同一分组的氨基酸之间的替代：(1) 甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、和异亮氨酸；(2) 苯丙氨酸、酪氨酸、和色氨酸；(3) 丝氨酸和苏氨酸；(4) 天冬氨酸和谷氨酸；(5) 谷氨酰胺和天冬酰胺；以及 (6) 赖氨酸、精氨酸、和组氨酸。在进行这些替代时，如果有可能的话，重要的是要维持图 1 中描绘的半胱氨酸主链。

[0120] 可以通过用核苷酸取代 SEQ ID NO:1、5、9、11、13、15、100、或 101 中所述的核苷酸而在 TGF- β 结合蛋白基因中导入保守氨基酸变化。可以通过例如寡核苷酸介导的诱变、接头扫描诱变、使用聚合酶链式反应的诱变、诸如此类来获得这些“保守氨基酸”变体（参阅 Ausubel, 1995, 第 8-10 至 8-22 页；McPherson 编，《定向诱变：实用方法》(Directed Mutagenesis :A Practical Approach), IRL 出版社, 1991 年）。可以使用标准方法测定这些变体的功能活性，诸如本文所述测定法。或者，可以通过与抗 TGF- β 结合蛋白抗体特异结合的能力来鉴定 TGF- β 结合蛋白多肽变体。

[0121] 可以进行核酸分子的常规缺失分析，以获得编码 TGF- β 结合蛋白多肽的核酸分子的“功能片段”。例如，可以用 Ba131 核酸酶消化具有核苷酸序列 SEQ ID NO:1 的 DNA 分子以获得一系列嵌套缺失体。然后将片段以正确读码框插入表达载体，分离表达的多肽，并测试其活性或与抗 TGF- β 结合蛋白抗体结合的能力。核酸外切酶消化的替代方法是使用寡核苷酸介导的诱变，以导入缺失或终止密码子以确定产生期望片段。或者，可以使用聚合酶链式反应合成 TGF- β 结合蛋白基因的特定片段。

[0122] 例如 Treuter 等, Mol. Gen. Genet. 240 :113, 1993 ;Content 等, “由人干扰素诱导的 42kDa 2-5A 合成酶的表达和初步缺失分析” (Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa2-5A synthetase induced by human interferon),《生物学干扰素系统, ISIR-TNO 干扰素系统会议录》(Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems), Cantell 编, 第 65-72 页, Nijhoff, 1987 ; Herschman, “EGF 受体” (The EGF Receptor),《动物细胞增殖的控制》(Control of Animal Cell Proliferation), 第 1 卷, Boynton 等编, 第 169-199 页, Academic 出版社, 1985 年； Coumaillieau 等, J. Biol. Chem. 270 :29270, 1995 ;Fukunaga 等, J. Biol. Chem. 270 :25291, 1995 ;Yamaguchi 等, Biochem. Pharmacol. 50 :1295, 1995 ;Meisel 等, Plant Mol. Biol. 30 :1, 1996 描述了用于蛋白质功能分析的标准技术。

[0123] 本发明还涵盖具有保守氨基酸变化的 TGF- β 结合蛋白基因功能片段。

[0124] 通过测定与上文所述 SEQ ID NO:1、5、9、11、13、15、100、或 101 以及 SEQ ID NO:2、6、10、12、14、16、46、或 65 核苷酸和氨基酸序列的同一性水平，可以根据结构来鉴定 TGF- β 结合蛋白变体基因。根据结构来鉴定基因变体的候选方法是测定编码潜在 TGF- β 结合蛋白基因变体的核酸分子是否能够与具有 SEQ ID NO:1、5、9、11、13、15、100、或 101 的核苷酸序列或者其长度为至少 15 或 20 个核苷酸的部分的核酸分子在严谨条件下发生杂交。作为严谨杂交条件的实例，具有 TGF- β 结合蛋白序列变体的核酸分子能够与具有来自 SEQ ID NO:1 的序列的核酸分子的片段在含有例如 5xSSPE (1xSSPE = 180mM 氯化钠、10mM 磷酸钠、1mM EDTA (pH7.7)、5xDenhardt 氏溶液 (100xDenhardt 氏溶液 = 2% (w/v) 牛血清清蛋白、2% (w/v) 菲科尔、2% (w/v) 聚乙烯吡咯烷酮) 和 0.5% SDS 的缓冲液中于 55-60°C 保温过

夜后相结合。高严谨度的杂交后清洗通常在 0.5xSSC (1xSSC = 150mM 氯化钠、15mM 柠檬酸三钠) 中或在 0.5xSSPE 中于 55–60°C 进行。

[0125] 不管 TGF- β 结合蛋白基因变体的具体核苷酸序列如何, 该基因编码可通过其功能活性或是它与抗 TGF- β 结合蛋白抗体特异结合的能力来表征的多肽。更具体的说, TGF- β 结合蛋白基因变体编码展示由本文所述人 TGF- β 结合蛋白基因编码的多肽的至少 50%、优选超过 60%、70%、80%、或 90% 活性的多肽。

[0126] 4. TGF- β 结合蛋白在培养细胞中的生成

[0127] 为了表达 TGF- β 结合蛋白基因, 必须将编码该多肽的核酸分子在表达载体中与控制转录表达的调控序列可操作连接, 然后导入宿主细胞。除了转录调控序列诸如启动子和增强子以外, 表达载体还可以包含翻译调控序列和适于选择携带表达载体的细胞的标记基因。适于在真核细胞中生成外源蛋白的表达载体通常包含 (1) 编码细菌复制起点和抗生素抗性标记的原核 DNA 元件, 从而提供表达载体在细菌宿主中的生长和选择; (2) 控制转录起始的真核 DNA 元件, 诸如启动子; 和 (3) 控制转录本加工的 DNA 元件, 诸如转录终止 / 多聚腺苷酸化序列。

[0128] 优选在哺乳动物细胞中表达本发明的 TGF- β 结合蛋白。哺乳动物宿主细胞的实例包括非洲绿猴肾细胞 (Vero ;ATCC CRL 1587)、人胚胎肾细胞 (293-HEK ;ATCC CRL 1573)、幼仓鼠肾细胞 (BHK-21 ;ATCC CRL 8544)、犬肾细胞 (MDCK ;ATCC CCL 34)、中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-K1 ;ATCC CCL61)、大鼠垂体细胞 (GH1 ;ATCC CCL82)、HeLa S3 细胞 (ATCCCCL2.2)、大鼠肝癌细胞 (H-4-II-E ;ATCC CRL 1548)、SV40 转化的猴肾细胞 (COS-1 ;ATCC CRL 1650)、和鼠胚胎细胞 (NIH-3T3 ;ATCC CRL 1658)。

[0129] 对于哺乳动物宿主而言, 转录和翻译调控信号可以衍生自病毒来源, 诸如腺病毒、牛乳头瘤病毒、猿猴病毒、诸如此类, 其中调控信号与具有高表达水平的特定基因相关联。合适的转录和翻译调控序列还可以由哺乳动物基因获得, 诸如肌动蛋白、胶原蛋白、肌球蛋白和金属硫蛋白基因。

[0130] 转录调控序列包括足以指导 RNA 合成起始的启动子区。合适的真核启动子包括小鼠金属硫蛋白 I 基因的启动子 (Hamer 等, J. Mol. Appl. Genet. 1 :273, 1982)、疱疹病毒的 TK 启动子 (McKnight, Cell 31 :355, 1982)、SV40 早期启动子 (Benoist 等, Nature 290 :304, 1981)、劳氏肉瘤病毒启动子 (Gorman 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 :6777, 1982)、巨细胞病毒启动子 (Foecking 等, Gene 45 :101, 1980)、和小鼠乳癌病毒启动子 (通常参阅 Etcheverry, “基因工程蛋白质在哺乳动物细胞培养物中的表达” (Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture), 《蛋白质工程: 原理和实践》(Protein Engineering :Principles and Practice), Cleland 等编, 第 163–181 页, John Wiley & Sons 公司, 1996 年)。

[0131] 或者, 如果原核启动子受到真核启动子的调控的话, 可以使用原核启动子诸如 T3 噬菌体 RNA 聚合酶启动子来控制 TGF- β 结合蛋白基因在哺乳动物细胞中的表达 (Zhou 等, Mol. Cell. Biol. 10 :4529, 1990; Kaufman 等, Nucleic Acids Res. 19 :4485, 1991)。

[0132] 也可以在细菌、酵母、昆虫、或植物细胞中表达 TGF- β 结合蛋白基因。可用于在原核宿主中表达 TGF- β 结合蛋白多肽的合适启动子对于本领域技术人员而言是众所周知的, 包括能够识别 T4、T3、Sp6、和 T7 聚合酶的启动子、 λ 噬菌体的 PR 和 PL 启动子、大肠杆

菌的 trp、recA、热休克、lacUV5、tac、lpp-lacSpr、phoA、和 lacZ 启动子、枯草芽孢杆菌的启动子、芽孢杆菌噬菌体的启动子、链霉菌的启动子、 λ 噬菌体的 int 启动子、pBR322 的 bla 启动子、和氯霉素乙酰基转移酶基因的 CAT 启动子。原核启动子的综述见 Glick, J. Ind. Microbiol. 1 :277, 1987, Watson 等,《基因的分子生物学》(Molecular Biology of the Gene), 第 4 版, Benjamin Cummins, 1987 年; 和 Ausubel 等, 1995。

[0133] 优选的原核宿主包括大肠杆菌和枯草芽孢杆菌。合适的大肠杆菌菌株包括 BL21 (DE3)、BL21 (DE3) pLysS、BL21 (DE3) pLysE、DH1、DH4I、DH5、DH5I、DH5IF'、DH5IMCR、DH10B、DH10B/p3、DH11S、C600、HB101、JM101、JM105、JM109、JM110、K38、RR1、Y1088、Y1089、CSH18、ER1451、和 ER1647 (参阅例如 Brown 编,《Molecular Biology Labfax》, Academic 出版社, 1991 年)。枯草芽孢杆菌的合适菌株包括 BR151、YB886、MI119、MI120、和 B170 (参阅例如 Hardy, “芽孢杆菌克隆方法”(Bacillus Cloning Methods),《DNA 克隆:实用方法》(DNA Cloning :A Practical Approach), Glover 编, IRL 出版社, 1985 年)。

[0134] 用于在原核宿主中表达蛋白质的方法对于本领域技术人员而言是众所周知的 (参阅例如 Williams 等,“使用质粒载体在大肠杆菌中表达外源蛋白并纯化特异多克隆抗体”(Expression of foreign proteins in E.coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies),《DNA 克隆 2:表达系统》(DNA Cloning 2:Expression Systems), 第 2 版, Glover 等编, 第 15 页, 牛津大学出版社, 1995 年; Ward 等,“抗体的基因操作和表达”(Genetic Manipulation and Expression of Antibodies),《单克隆抗体:原理和应用》(Monoclonal Antibodies :Principles and Applications), 第 137 页, Wiley-Liss 公司, 1995 年; 和 Georgiou, “蛋白质在芽孢杆菌中的表达”(Expression of Proteins in Bacteria),《蛋白质工程:原理和实践》(Protein Engineering :Principles and Practice), Cleland 等编, 第 101 页, John Wiley & Sons 公司, 1996 年)。

[0135] 杆状病毒系统为将克隆的 TGF- β 结合蛋白基因导入昆虫细胞提供了有效手段。合适的表达载体基于苜蓿银蚊夜蛾多核型多角体病毒 (AcMNPV), 而且包含众所周知的启动子, 诸如果蝇热休克蛋白 (hsp) 70 的启动子、苜蓿银蚊夜蛾核型多角体病毒立即 - 早期基因启动子 (ie-1) 和延迟早期 39K 启动子、杆状病毒 p10 启动子、和果蝇金属硫蛋白启动子。合适的昆虫宿主细胞包括衍生自 IPLB-Sf-21 即秋粘虫 pupal 卵巢细胞系的细胞系, 诸如 Sf9 (ATCC CRL 1711)、Sf21AE、和 Sf21 (Invitrogen 公司, 圣迭哥, 加利福尼亚)、以及果蝇 Schneider-2 细胞。已确立的用于在杆状病毒系统中生成重组蛋白的技术参阅 Bailey 等,“杆状病毒载体的操作”(Manipulation of Baculovirus Vectors),《分子生物学方法第 7 卷:基因转移和表达方案》(Methods in Molecular Biology), Volume 7 :Gene Transfer and Expression Protocols, Murray 编, 第 147-168 页, Humana 出版公司, 1991 年; Patel 等,“杆状病毒表达系统”(The baculovirus expression system),《DNA 克隆 2:表达系统》(DNA Cloning 2:Expression Systems), 第 2 版, Glover 等编, 第 205-244 页, 牛津大学出版社, 1995 年; Ausubel, 1995, 第 16-37 至 16-57 页; Richardson 编,《杆状病毒表达方案》(Baculovirus Expression Protocols), Humana 出版公司, 1995 年; 和 Lucknow,“昆虫细胞表达技术”(Insect Cell Expression Technology),《蛋白质工程:原理和实践》(Protein Engineering :Principles and Practice), Cleland 等编, 第 183-218 页, John Wiley &

Sons 公司, 1996 年。

[0136] 用于在酵母中表达的启动子包括来自 GAL1(半乳糖)、PGK(磷酸甘油酸激酶)、ADH(乙醇脱氢酶)、AOX1(乙醇氧化酶)、HIS4(组氨醇脱氢酶)等等的启动子。已经设计了许多酵母克隆载体, 而且易于获得。这些载体包括基于 YIp 的载体诸如 YIp5、YRp 载体诸如 YRp17、YE_p 载体诸如 YE_p13、和 YC_p 载体诸如 YC_p19。本领域技术人员将认识到, 有多种载体适于在酵母细胞中进行表达。

[0137] 也可以将表达载体导入植物原生质体、完整的植物组织、或分离的植物细胞。例如 Miki 等, “用于将外源 DNA 导入植物的流程”(Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants),《植物分子生物学和生物技术方法》(Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology), Glick 等编, 第 67-88 页 (CRC 出版社, 1993 年) 中提供了培养植物组织的通用方法。

[0138] 可以使用多种标准技术将表达载体导入宿主细胞, 包括磷酸钙转染、脂质体介导的转染、微弹介导的投递、电穿孔诸如此类。优选的是, 对转染细胞进行选择和增殖, 以提供包含了稳定整合到宿主细胞基因组中的表达载体的重组宿主细胞。例如 Ausubel, 1995 和 Murray 编,《基因转移和表达方案》(Gene Transfer and Expression Protocols), Humana 出版社, 1991 年描述了用于将载体导入真核细胞和使用显性选择标记来选择这些稳定转化体的技术。Ausubel, 1995 还提供了用于将表达载体导入细菌、酵母、昆虫、和植物细胞的方法。

[0139] 使用哺乳动物细胞系统表达和回收外源蛋白的通用方法参阅例如 Etcheverry, “在哺乳动物细胞培养物中表达基因工程蛋白质”(Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture),《蛋白质工程: 原理和实践》(Protein Engineering: Principles and Practice), Cleland 等编, 第 163 页, Wiley-Liss 公司, 1996 年。用于回收由细菌系统生产的蛋白质的标准技术参阅例如 Grisshammer 等, “由大肠杆菌细胞纯化过度生产的蛋白质”(Purification of over-produced proteins from E. coli cells),《DNA 克隆 2 :表达系统》(DNA Cloning 2 :Expression Systems), 第 2 版, Glover 等编, 第 59-92 页, 牛津大学出版社, 1995 年。已确立的用于由杆状病毒系统分离重组蛋白的方法参阅 Richardson 编,《杆状病毒表达方案》(Baculovirus Expression Protocols), Humana 出版公司, 1995 年。

[0140] 更普遍地, 可以通过标准技术来分离 TGF- β 结合蛋白, 诸如亲和层析、大小排阻层析、离子交换层析、HPLC 诸如此类。本领域技术人员可以设计 TGF- β 结合蛋白分离和纯化的其它变化。例如, 可以使用如下文所述获得的抗 TGF- β 结合蛋白抗体通过免疫亲和纯化来分离大量蛋白质。

[0141] 5. 针对 TGF- β 结合蛋白的抗体的生成

[0142] 本发明提供了与本文详细描述的硬化素特异结合的抗体。例如, 可以使用表达载体的产物作为抗原以获得针对 TGF- β 结合蛋白的抗体。也可以使用由本文提供的任一硬化素多肽序列 (SEQ ID NO: 2、6、8、10、12、14、16、46、和 65) 衍生的肽来制备与硬化素特异结合的抗体。特别有用的抗 TGF- β 结合蛋白抗体与 SEQ ID NO: 2、6、8、10、12、14、16、46、或 65 的 TGF- β 结合蛋白“特异结合”, 但不与其它 TGF- β 结合蛋白诸如 Dan、Cerberus、SCGF、或 Gremlin 结合。本发明的抗体 (包括其片段和衍生物) 可以是多克隆抗体, 或者尤其是

单克隆抗体。抗体可以属于任何免疫球蛋白类别,可以是例如 IgG(包括 IgG 的同种型,对人而言本领域已知有 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄)、IgE、IgM、或 IgA 抗体。可以由禽类或哺乳动物获得抗体,优选例如从鼠、大鼠、人、或其它灵长类获得。如果需要,抗体可以是内在化抗体。

[0143] 可以使用本领域技术人员众所周知的方法来制备针对重组 TGF- β 结合蛋白的多克隆抗体(参阅例如 Green 等,“多克隆抗血清的生成”(Production of Polyclonal Antisera),《免疫化学方案》(Immunochemical Protocols), Manson 编,第 1-5 页, Humana 出版社,1992 年;Williams 等,“使用质粒载体在大肠杆菌中表达外源蛋白并纯化特异多克隆抗体”(Expression of foreign proteins in E.coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antitodies),《DNA 克隆 2: 表达系统》(DNA Cloning 2: Expression Systems), 第 2 版, Glover 等编, 第 15 页, 牛津大学出版社, 1995 年)。虽然多克隆抗体通常是在诸如大鼠、小鼠、兔、山羊、或绵羊等动物中产生的,但是本发明的抗 TGF- β 结合蛋白抗体也可以衍生自低于人类的灵长类抗体。用于在狒狒中形成在诊断和治疗上有用的抗体的通用技术参阅例如 Goldenberg 等,国际专利发表号 WO 91/11465, 1991 年; 和 Losman 等, Int. J. Cancer 46 :310, 1990。

[0144] 抗体应当包含至少一个可变区结构域。可变区结构域可以是任何大小或氨基酸组成,而且通常包含至少一个包埋在框架序列中、负责抗原结合的高变氨基酸序列。一般而言,术语可变区结构域(V)可以是免疫球蛋白重链(V_H)和 / 或轻链(V_L)可变区的任何合适排列。因此,例如,V 区结构域可以是单体,而且是能够以可接受的亲和力与抗原独立结合的 V_H 或 V_L 结构域。或者,V 区结构域可以是二聚体,而且包括 V_H-V_H、V_H-V_L、或 V_L-V_L 二聚体,其中 V_H 和 V_L 链非共价相连(下文缩写为 F_v)。然而,如果需要,两条链可以直接地(例如经由两个可变区之间的二硫键)或是通过接头(例如肽接头)而共价偶联,形成单链结构域(下文缩写为 scF_v)。

[0145] 可变区结构域可以是任何天然存在的可变结构域或其改造形式。改造形式指使用重组 DNA 工程技术产生的可变区结构域。这些改造形式包括例如通过在天然抗体的氨基酸序列中进行插入、缺失、或改变而由天然抗体可变区产生的形式。这个类别的具体实例包括包含来自一种抗体的至少一个 CDR 和可选地一个或多个框架氨基酸、而剩余可变区结构域来自另一种抗体的改造后可变区结构域。

[0146] 可变区结构域可以以 C 端氨基酸共价连接至少一个其它抗体结构域或其片段。因此,例如,当可变区结构域中存在 V_H 结构域时,它可以与免疫球蛋白 C_H1 结构域或其片段相连。类似的,V_L 结构域可以与 C_k 结构域或其片段相连。这样的话,例如,抗体可以是 Fab 片段,其中抗原结合结构域包含其 C 端分别与 CH1 和 C_k 结构域共价相连的关联 V_H 和 V_L 结构域。CH1 结构域可以用氨基酸进一步延伸,以便例如提供在 Fab' 片段中发现的铰链区结构域,或提供其它结构域,诸如抗体 CH2 和 CH3 结构域。

[0147] 抗体片段的另一种形式是编码单一互补决定区(CDR)的肽。可以通过构建编码目的抗体 CDR 的基因来获得 CDR 肽(“最小识别单位”)。例如,通过使用聚合酶链式反应,由抗体生成细胞的 RNA 合成可变区来制备这些基因(参阅例如 Larrick 等, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2 :106, 1991; Courtenay-Luck, “单克隆抗体的基因操作”(Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies),《单克隆抗体: 生产、

改造、和临床应用》(Monoclonal Antibodies :Production, Engineering and Clinical Application), Ritter 等编, 第 166 页, 剑桥大学出版社, 1995 年; 和 Ward 等, “抗体的基因操作和表达”(Genetic Manipulation and Expression of Antibodies), 《单克隆抗体 :原理和应用》(Monoclonal Antibodies :Principles and Applications), Birch 等编, 第 137 页, Wiley-Liss 出版社, 1995 年)。

[0148] 用于本发明的抗体通常是通过常规免疫和细胞融合流程制备的单克隆抗体, 或是使用任何合适的标准化学技术诸如还原或酶促切割和 / 或消化技术 (例如用胃蛋白酶处理) 由其衍生的片段。更具体的说, 可以采用多种技术来生成单克隆抗 TGF- β 结合蛋白抗体。可以通过本领域技术人员众所周知的方法来获得针对特定抗原的啮齿类单克隆抗体 (参阅例如 Kohler 等, Nature 256 :495, 1975; 和 Coligan 等编, 《免疫学通用方案》(Current Protocols in Immunology), 1 :2. 5. 1-2. 6. 7, John Wiley & Sons, 1991 [“Coligan”]; Picksley 等, “针对大肠杆菌中表达的蛋白质的单克隆抗体的生成”(Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli), 《DNA 克隆 2 :表达系统》(DNA Cloning 2 :Expression Systems), 第 2 版, Glover 等编, 第 93 页, 牛津大学出版社, 1995)。

[0149] 简而言之, 可以如下获得单克隆抗体 :给小鼠注射包含 TGF- β 结合蛋白基因产物的组合物, 通过采集血清样品而确认抗体生成的存在, 切除脾以获得 B 淋巴细胞, 融合 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞以生成杂交瘤, 克隆杂交瘤, 选择生成针对该抗原的抗体的阳性克隆, 培养生成针对该抗原的抗体的克隆, 并由杂交瘤培养物分离所述抗体。

[0150] 另外, 本发明的抗 TGF- β 结合蛋白抗体可以衍生自人单克隆抗体。人单克隆抗体是由经过加工而响应于抗原激发生成特异人抗体的转基因小鼠获得的。在这种技术中, 将人重链和轻链基因座元件导入由内源重链和轻链基因组包含靶向破坏的胚胎干细胞系衍生的小鼠品系。转基因小鼠能够合成对人抗原特异的人抗体, 而且小鼠可用于生成分泌人抗体的杂交瘤。用于由转基因小鼠获得人抗体的方法参阅例如 Green 等, Nature Genet. 7 :13, 1994; Lonberg 等, Nature 368 :856, 1994; 和 Taylor 等, Int. Immun. 6 :579, 1994。

[0151] 可以通过多种完全确立的技术由杂交瘤培养物分离和纯化单克隆抗体。这些分离技术包括使用蛋白 A Sepharose 的亲和层析、大小排阻层析、和离子交换层析 (参阅例如 Coligan, 第 2. 7. 1-2. 7. 12 页和第 2. 9. 1-2. 9. 3 页; Baines 等, “免疫球蛋白 G(IgG) 的纯化”(Purification of Immunoglobulin G(IgG)), 《分子生物学方法》(Methods in Molecular Biology), 第 10 卷, 第 79-104 页, Humana 出版公司, 1992)。

[0152] 对于特殊用途, 可能需要制备抗 TGF- β 结合蛋白抗体的片段。可以通过例如抗体的蛋白水解来获得这些抗体片段。可以通过常规方法用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整抗体来获得抗体片段。例如, 可以通过酶促切割来生成抗体片段, 例如用胃蛋白酶酶促切割抗体而生成 5S 片段, 称为 F(ab')₂。可以用硫醇还原剂进一步切割这个片段而生成 3.5S Fab' 单价片段。可选的是, 可以使用由切割二硫键而生成的巯基的封闭基因进行切割反应。或者, 使用胃蛋白酶的酶促切割直接产生两个单价 Fab 片段和一个 Fc 片段。这些方法参阅例如 Goldenberg, 美国专利号 4,331,647; Nisonoff 等, Arch Biochem. Biophys. 89 :230, 1960; Porter, Biochem. J. 73 :119, 1959; Edelman 等, Methods in Enzymology 1 :422, Academic 出版社, 1967; 和 Coligan, 第 2. 8. 1-2. 8. 10 页和 2. 10. -2. 10. 4。

[0153] 还可以使用切割抗体的其它方法,诸如分离重链而形成单价轻链-重链片段,进一步切割片段,或者其它酶促、化学、或基因技术,只要片段能够与完整抗体所识别的抗原相结合即可。

[0154] 或者,抗体可以是通过重组 DNA 技术获得的重组或改造的抗体,该技术涉及编码抗体可变区和 / 或恒定区的 DNA 的操作和再表达。这些 DNA 是已知的,和 / 或易于由 DNA 文库获得,包括例如噬菌体抗体库(参阅 Chiswell, D. J. 和 McCafferty, J., Tibtech. 10 : 80-84, 1992),或者需要的话,可以人工合成。标准分子生物学和 / 或化学流程可用于 DNA 的测序和操作,例如,用于导入密码子以产生半胱氨酸残基,或是用于根据需要修饰、添加、或缺失其它氨基酸或结构域。

[0155] 可以制备一种或多种包含编码可变区和 / 或恒定区的 DNA 的可复制型表达载体,并用于转化将在其中进行抗体生产的合适细胞系,例如非生产性骨髓瘤细胞系,诸如小鼠 NS0 系,或细菌,诸如大肠杆菌。为了获得有效转录和翻译,每个载体中的 DNA 序列应当包含合适的调控序列,特别是与可变结构域序列可操作相连的启动子和前导序列。用于以这种方式生成抗体的具体方法通常是众所周知且常规使用的。例如,基本的分子生物学流程参阅 Maniatis 等,《分子克隆》,冷泉港实验室,纽约,1989;DNA 测序参阅 Sanger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 :5463, 1977; 和 Amersham 国际上市公司测序手册;定点诱变的方法参阅 Kramer 等, Nucleic Acids Res. 12 :9441, 1984; Anglian Biotechnology 公司手册; Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :488-92, 1985; Kunkel 等, Methods in Enzymol. 154 : 367-82, 1987。另外,许多发表物详述了适用于通过操作 DNA、生成表达载体、并转化合适细胞来制备抗体的技术,综述例如参阅 Mountain, A. 和 Adair, J. R.,《生物技术和基因工程综述》Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Tombs, M. P. 编, 10, 第 1 章, 1992, Intercept, Andover, 英国; 和国际专利说明书编号 WO 91/09967。

[0156] 在某些实施方案中,依照本发明的抗体可以附着了一个或多个效应或报道分子,而且本发明延伸至这些经修饰的蛋白质。报道分子可以是可检测部分或标记物,诸如酶、细胞毒性剂、或其它报道分子,包括染料、放射性核素、发光基团、荧光基团、或生物素、诸如此类。可以放射性标记 TGF- β 结合蛋白特异性免疫球蛋白或其片段以用于诊断或治疗应用中。本领域知道用于放射性标记抗体的技术。参阅例如 Adams, 1998, In Vivo 12 :11-21; Hiltunen, 1993, Acta Oncol. 32 :831-9。下文更为详细的描述了治疗性应用,而且可以包括与其它治疗剂一起使用 TGF- β 结合蛋白特异性抗体(或其片段)。可以将效应或报道分子通过任何可供利用的氨基酸侧链、末端氨基酸、或抗体中存在的碳水化合物功能基团(如果有的话)附着于抗体上,条件是这种附着或附着过程不会对该分子的结合特性和效用产生不利影响。具体的功能基团包括例如任何游离氨基、亚氨基、硫醇基、羟基、羧基、或醛基。抗体与效应和 / 或报道分子的附着可以经由效应或报道分子中的这些基团和合适功能基团来实现。连接可以是直接的,或者经由间隔或架桥基团而间接连接。

[0157] 效应分子包括例如抗肿瘤剂、毒素(诸如细菌(诸如铜绿假单胞菌外毒素 A)或植物来源的酶促活性毒素及其片段(例如蓖麻毒素及其片段;植物白树毒素,来自 Bryonia dioica 的 bryodin,诸如此类。参阅例如 Thrush 等, Annu. Rev. Immunol. 14 :49-71, 1996; Frankel 等, Cancer Res. 56 :926-32, 1996);生物学活性蛋白,例如酶;核酸及其片段诸如 DNA、RNA 及其片段;天然存在的和合成的聚合物(例如多糖和聚烯烃聚合物诸如聚乙二醇

及其衍生物) ; 放射性核素, 特别是放射性碘化物; 和螯合金属。合适的报道基团包括螯合金属、荧光化合物、或者可以通过 NMR 或 ESR 光谱学检测的化合物。特别有用的效果基团是加利车霉素 (calichaemicin) 及其衍生物 (参阅例如南非专利说明书编号 85/8794、88/8127、和 90/2839)。

[0158] 熟悉本领域的人知道众多其它毒素, 包括化疗剂、抗有丝分裂剂、抗生素、凋亡诱导物 (或“凋亡原”, 参阅例如 Green 和 Reed, Science 281 :1309–1312, 1998) 诸如此类, 本文提供的实例意图例示而非限制本发明的范围和精神。具体的抗肿瘤剂包括毒害细胞和抑制细胞的试剂, 例如烷化剂, 诸如氮芥 (例如苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、或尿嘧啶氮芥) 及其衍生物、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺、白消安、或顺铂; 抗代谢物诸如氨甲蝶呤、氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、氟乙酸或氟柠檬酸, 抗生素诸如博来霉素 (例如硫酸博来霉素)、阿霉素、道诺霉素、丝裂霉素 (例如丝裂霉素 C)、放线菌素 (例如放线菌素 D)、普卡霉素、加利车霉素 (calichaemicin) 及其衍生物、或埃斯波霉素 (esperamicin) 及其衍生物; 有丝分裂抑制剂, 诸如鬼臼亚乙苷、长春新碱、或长春碱及其衍生物; 生物碱, 诸如椭圆玫瑰树碱; 多元醇, 诸如紫杉萜酯-I 或紫杉萜酯-II; 激素, 诸如雄激素 (例如屈他雄酮或睾内酯)、孕激素 (例如乙酸甲地孕酮或乙酸甲羟孕酮)、雌激素 (例如二甲基己烯雌酚二磷酸、聚磷酸雌二醇、或雌氮芥磷酸)、或抗雌激素药 (例如它莫西芬); 葡萄糖, 诸如米托葡萄糖; 脲, 诸如羟基脲; 肽, 诸如丙卡巴肽; 或咪唑, 诸如达卡巴嗪。

[0159] 融合金属包括配位数为 2–8 (含) 的二价或三价金属融合物。这些金属的具体实例包括锝 (Tc)、铼 (Re)、钴 (Co)、铜 (Cu)、金 (Au)、银 (Ag)、铅 (Pb)、铋 (Bi)、铟 (In)、镓 (Ga)、钇 (Y)、铽 (Tb)、钆 (Gd)、和钪 (Sc)。一般而言, 金属优选是放射性核素。具体的放射性核素包括 ^{99m}Tc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{58}Co 、 ^{60}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{195}Au 、 ^{199}Au 、 ^{110}Ag 、 ^{203}Pb 、 ^{206}Bi 、 ^{207}Bi 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{160}Tb 、 ^{153}Gd 、和 ^{47}Sc 。

[0160] 融合金属可以是例如与任何合适多配位融合剂融合的上述金属类别之一, 融合剂是例如无环或环状多胺、聚醚 (例如冠醚及其衍生物)、聚酰胺、卟啉、和碳环衍生物。一般而言, 融合剂的类型将取决于使用的金属。然而, 在依照本发明的缀合物中特别有用的一类融合剂包括无环和环状多胺, 尤其是多氨基羧酸, 例如二亚乙三胺五乙酸及其衍生物; 大环胺, 诸如环状三氮杂和四氮杂衍生物 (例如国际专利说明书编号 WO 92/22583 中所述); 和聚酰胺, 尤其是去铁胺及其衍生物。

[0161] 在将抗体中的硫醇基用作附着点时, 这可以通过与效应或报道分子中存在的硫醇反应性基团的反应来实现。这些基团的实例包括 α -卤代羧酸或酯诸如碘乙酰胺、酰亚胺诸如马来酰亚胺、乙烯基砜、或二硫化物。国际专利说明书编号 WO 93/06231、WO 92/22583、WO 90/091195、和 WO 89/01476 概括和更具体描述了这些和其它合适连接流程。

[0162] 用于选择可增加骨密度的分子的测定法

[0163] 如上所述, 本发明提供了用于选择和 / 或分离能够增加骨密度的化合物的方法。例如, 在本发明的一个方面, 提供了用于测定选择的分子 (例如候选试剂) 是否能够增加骨矿物质含量的方法, 包括下列步骤: (a) 将选择的分子与 TGF- β 结合蛋白和选择的 TGF- β 蛋白家族成员混合 (或接触), 并 (b) 测定所选择的分子是否刺激 TGF- β 蛋白家族的信号传导, 或是否抑制 TGF- β 结合蛋白与至少一种 TGF- β 蛋白家族成员结合。在某些实施方

案中,该分子可增强 TGF- β 作为间充质细胞分化正调节物发挥功能的能力。

[0164] 在本发明的其它方面,提供了用于测定选择的分子(候选试剂)是否能够增加骨矿物质含量的方法,包括下列步骤:(a)将选择的分子暴露于(接触、混合、联合)表达TGF- β 结合蛋白的细胞,并(b)测定暴露的细胞中TGF- β 结合蛋白的表达(或活性)是否降低,或TGF- β 结合蛋白的活性是否降低,并由此测定该化合物是否能够增加骨矿物质含量。在一个实施方案中,所述细胞选自来自骨活组织检查标本的自发转化或未转化的正常人骨和大鼠顶骨成骨细胞。用于检测TGF- β 结合蛋白表达水平的方法可以以本领域已知的和本文描述的多种测定法形式来实现。可以使用免疫测定法来检测并量化TGF- β 结合蛋白的表达,包括例如逆向免疫电泳(CIEP)、放射免疫测定法、放射免疫沉淀、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、免疫印迹测定法诸如点印迹测定法和Western印迹、抑制或竞争测定法、以及三明治测定法(参阅美国专利号4,376,110和4,486,530;还可参阅《抗体:实验室指南》Antibodies:A Laboratory Manual,见上文)。这些免疫测定法可以使用对TGF- β 结合蛋白特异的抗体,诸如本文所述的抗硬化素抗体,或者可以使用对附着于TGF- β 结合蛋白上的报道分子特异的抗体。还可以通过量化与TGF- β 结合蛋白配体相结合的TGF- β 结合蛋白的量来测定多肽表达水平。例如,可以通过表面激光共振(SPR)来检测样品中硬化素与BMP的结合。或者,可以量化编码该特定TGF- β 结合蛋白的mRNA的表达水平。

[0165] 下文实施例5和6提供了这些测定法的代表性实施方案。简而言之,首先将TGF- β 超家族的家族成员或TGF- β 结合蛋白结合在固相上,随后添加候选分子。然后向测定反应中添加经过标记的TGF- β 超家族家族成员或TGF- β 结合蛋白(即无论将哪种多肽结合在固相上,经过标记的多肽均是前者的配体),清洗固相,并测定固相支持物上结合的或标记的TGF- β 超家族成员或TGF- β 结合蛋白的量。适于如本文所述用于增加骨矿物质含量的分子是以统计学显著方式降低TGF- β 结合蛋白与TGF- β 超家族成员结合的那些分子。显然,适于在本发明中使用的测定法不应当受限于实施例2和3中描述的实施方案。具体而言,可以改变众多参数,诸如通过将TGF- β 结合到固相上,或是通过完全取消固相。

[0166] 在本发明的其它方面,提供了用于测定所选择的分子是否能够增加骨矿物质含量的方法,包括下列步骤:(a)将选择的分子(候选试剂)暴露于(接触、混合、联合)表达TGF- β 的细胞,并(b)测定由所述暴露的细胞表达的TGF- β 的活性是否改变,并由此测定该化合物是否能够增加骨矿物质含量。与本文所述方法类似,可以采用非常多种方法来评估由选择的待测化合物引起的TGF- β 结合蛋白表达的变化。在本发明的一个实施方案中,候选试剂是与本文所公开的TGF- β 结合蛋白硬化素结合的抗体。

[0167] 在本发明的一个优选实施方案中,提供了用于鉴定调控TGF- β 信号传导途径的抗体的方法,包括在足以容许抗体+SOST(抗体/SOST)复合物形成的条件下将与SOST多肽特异结合的抗体接触SOST肽,包括但不限于本文所公开的肽,然后测定SOST/抗体复合物的水平(例如对其量进行量化)以确定调控TGF- β 信号传导途径的抗体的存在。可以使用SPR或本领域已知的和本文公开的任何不同免疫测定法来进行该方法,包括ELISA、免疫印迹、诸如此类。TGF- β 信号传导途径包括这样的信号传导途径,BMP借助该途径与细胞上的I型和II型受体结合而刺激或诱导调控骨矿物质含量的途径。在本发明的某些优选实施方案中,与SOST特异结合的抗体刺激或增强用于增加骨矿物质含量的途径。可以使用本文所公开的用于检测抗体与SOST特异性肽结合的方法来鉴定这样的抗体。

[0168] 本发明的方法还可以通过检测抗体是否与位于 SOST 上 BMP 所结合的区域或其部分内的 SOST 肽结合而用于鉴定削弱、抑制（包括竞争性抑制）、或阻止 BMP 与 SOST 多肽结合的抗体，所述 SOST 肽诸如是 SOST 氨基末端的肽和包含 SOST 氨基末端氨基酸残基及部分核心区（停泊核心）的肽（例如 SEQ ID NO :47-64、66-73、和 92-95）。本发明的方法还可用于鉴定削弱、阻止、或抑制 SOST 均二聚体形成的抗体。可以通过检测抗体与衍生自 SOST 核心或羧基末端区的肽（例如 SEQ ID NO :74-91 和 96-99）的结合来鉴定与 SOST 特异结合的这种抗体。

[0169] 在本发明的另一个实施方案中，提供了用于测定选择的分子是否能够增加骨矿物质含量的方法，包括下列步骤：(a) 将选择的分子（候选试剂）与 TGF- β 结合蛋白及选择的 TGF- β 蛋白家族成员相混合或接触，并 (b) 测定该选择的分子是否上调 TGF- β 蛋白家族的信号传导，或是否抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 蛋白家族结合。在某些实施方案中，该分子可增强 TGF- β 作为间充质细胞分化正调节物发挥功能的能力。

[0170] 与上文所述方法类似，可以采取非常多种方法来评估由选择的待测化合物引起的 TGF- β 刺激。下文实施例 6 中提供了这样的一种代表性方法（还可参阅 Durham 等，Endo. 136 :1374-1380）。

[0171] 在本发明的另一个方面，提供了用于测定选择的分子（候选试剂）是否能够增加骨矿物质含量的方法，包括测定选择的分子是否抑制 TGF- β 结合蛋白与骨或其类似物结合的步骤。在用于本文时，应当理解，骨或其类似物指羟磷灰石，或是由骨粉、碎骨、或完整骨组成的表面。与上文所述方法类似，可以采用非常多种方法来评估对 TGF- β 结合蛋白定位在骨基质的抑制。下文实施例 7 中描述了这样的一种代表性方法（还可参阅 Nicolas 等，Calcif. Tissue Int. 47 :206-12, 1995）。

[0172] 在本发明的一个实施方案中，与硬化素多肽特异结合的抗体或其抗原结合片段能够竞争性抑制 TGF- β 家族成员与硬化素多肽结合。可以依照本文所述任何方法来测定所述抗体或抗体片段削弱或阻断 TGF- β 家族成员诸如 BMP 与硬化素结合的能力。与硬化素特异结合的抗体或其片段可能通过削弱硬化素均二聚体形成而削弱、阻断、或阻止 TGF- β 家族成员与硬化素结合。与硬化素特异结合的抗体还可用于通过抑制或削弱硬化素与 BMP 结合来鉴定硬化素活性。或者，可以将抗体或其片段掺入基于细胞的测定法中或其中硬化素具有确定活性的动物模型中，以测定该抗体是否改变（以统计学显著方式增加或减少）该活性。与硬化素特异结合的抗体或其片段可用于检验这种抗体在信号转导途径中的作用以及由此调控（刺激或抑制）信号转导途径的作用。优选的是，抗体与 SOST 的结合导致对信号转导途径的刺激或诱导。

[0173] 虽然本文所述方法可以是对单个待测分子的分析，但是本发明不应当受限于此。具体而言，选择的分子可以包含在化合物混合物中。因此，所述方法还可以包括分离抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员结合的分子的步骤。

[0174] 候选分子

[0175] 可以对非常多种分子测定它们抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员结合的能力。下文更为详细讨论的代表性实例包括有机分子（例如有机小分子）、蛋白质或肽、以及核酸分子。根据下文讨论显而易见的是，可以在本文所述测定法中采用本文所述候选分子，同样显而易见的是，还可以在多种诊断和治疗背景中采用这些分子。

[0176] 1. 有机分子

[0177] 可以对众多有机小分子测定它们抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员结合的能力。例如,在本发明的一个实施方案中,合适的有机分子可以选自化学文库(其中单独测定化学药品),或是选自组合化学文库(其中一次测定多种化合物),然后拆分以确定并分离最有活性的化合物。

[0178] 这些组合化学文库的代表性实例参阅 Arafiotis 等,“自动生成具有期望特性的化学药品的系统和方法”(System and method of automatically generating chemical compounds with desired properties),美国专利号 5,463,564 ;Armstrong, R. W.,“经由多成分组合阵列合成的使用来合成有机化合物的组合阵列”(Synthesis of combinatorial arrays of organic compounds through the use of multiple component combinatorial array syntheses), WO95/02566 ;Baldwin, J. J. 等,“磺胺药物衍生物及其用途”(Sulfonamide derivatives and their use), WO 95/24186 ;Baldwin, J. J. 等,“组合二氢苯并吡喃文库”(Combinatorial dihydrobenzopyran library), WO 95/30642 ;Brenner, S.,“用于制备组合文库的新试剂盒”(Newkit for preparing combinatorial libraries), WO 95/16918 ;Chenera, B. 等,“与树脂结合的芳香族碳环化合物文库的制备”(Preparation of library of resin-bound aromatic carbocyclic compounds), WO 95/16712 ;Ellman, J. A.,“Solid phase and combinatorial synthesis of benzodiazepine compounds on a solid support”,美国专利号 5,288,514 ;Felder, E. 等,“新型组合化合物文库”(Novel combinatorial compound libraries), WO 95/16209 ;Lerner, R. 等,“编码的组合化学文库”(Encoded combinatorial chemical libraries), WO 93/20242 ;Pavia, M. R. 等,“用于由结构多样性全体文库制备和选择制药学有用非肽化合物的方法”(A method for preparing and selecting pharmaceutically useful non-peptide compounds from a structurally diverse universal library), WO 95/04277 ;Summerton, J. E. 和 Weller, D. D.,“吗啉亚基组合文库和方法”(Morpholino-subunit combinatorial library and method), 美国专利号 5,506,337 ;Holmes, C.,“Methods for the Solid Phase Synthesis of Thiazolidinones, Metathiazanones, and Derivatives thereof”, WO 96/00148 ;Phillips, G. B. 和 Wei, G. P.,“苯并咪唑的固相合成”(Solid-phase Synthesis of Benzimidazoles), Tet. Letters 37 :4887-90, 1996 ;Ruhland, B. 等,“结构多样性 β -内酰胺固相支持的组合合成”(Solid-supported Combinatorial Synthesis of Structurally Diverse β -Lactams), J. Amer. Chem. Soc. 118 :253-4, 1996 ;Loo, G. C. 等,“The Identification of Cyclooxygenase-1 Inhibitors from 4-Thiazolidinone Combinatorial Libraries”, Bioorg. and Med. Chem. Letters 6 :707-12, 1996。

[0179] 2. 蛋白质和肽

[0180] 同样可以采用广泛的蛋白质和肽作为 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员结合的抑制剂的候选分子。

[0181] a. 组合肽文库

[0182] 可以通过筛选组合肽文库获得作为 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员结合的推定抑制剂的肽分子。这些文库或是可以由本领域技术人员制备(参阅例如美国专利号 4,528,266 和 4,359,535,以及专利合作条约发布号 WO 92/15679、WO 92/15677、WO

90/07862、W090/02809)，或是可以由商业途径购买(例如New England Biolabs的Ph. D. TM噬菌体展示肽库试剂盒)。

[0183] b. 抗体

[0184] 本发明提供了与硬化素多肽特异结合的抗体和使用这些抗体的方法。本发明还提供了可用于生成和分析这些抗体的硬化素多肽免疫原。所述抗体可用于阻断或削弱作为TGF- β 结合蛋白的硬化素多肽与配体特别是骨形态发生蛋白的结合，而且还可阻断或削弱该硬化素多肽与一种或多种其它配体的结合。

[0185] 诸如抑制TGF- β 结合蛋白与一种或多种TGF- β 蛋白家族成员(包括一种或多种骨形态发生蛋白(BMP))结合的抗体这样的分子应当理解为指例如通过消除或阻止TGF- β 成员与TGF结合蛋白结合而使得激活TGF- β 家族成员或BMP、或是使得TGF- β 家族成员(包括一种或多种BMP)与它们各自的受体结合的分子。

[0186] 本发明还提供了可用于生成和/或鉴定能够抑制、阻止、或削弱TGF- β 结合蛋白硬化素与一种或多种BMP结合的抗体或其片段的肽和多肽免疫原。本发明还提供了可用于生成和/或鉴定能够抑制、阻止、或削弱(例如以统计学显著方式降低)硬化素均二聚体形成的抗体或其片段的肽和多肽免疫原。本发明的抗体可用于增加骨的矿物质含量和矿物质密度，由此改善导致骨矿物质含量流失的众多状况，包括例如疾病、遗传素质、导致骨使用缺乏的事故(例如由于骨折)、影响骨再吸收或杀死骨形成细胞的治疗剂、和正常衰老。

[0187] 还可以通过依照本领域技术人员知道的和本文描述的方法分析TGF- β 结合蛋白的一级、二级、和三级结构以确定更有可能在宿主动物中产生抗原性应答的氨基酸序列来选择可用于硬化素特异抗体的免疫和/或分析的多肽或肽。参阅例如Novotny, Mol. Immunol. 28 :201-207, 1991; Berzofsky, Science 229 :932-40, 1985。建模和x射线晶体学数据也可用于预测和/或确定TGF- β 结合蛋白的哪些部分或区域与TGF- β 结合蛋白配体诸如BMP的哪些部分相互作用。可以设计并制备包含相互作用的那些部分或区域之内或周围的氨基酸序列的TGF- β 结合蛋白肽免疫原。这些抗体可用于阻断或削弱TGF- β 结合蛋白与相同配体结合，还可阻断或削弱TGF- β 结合蛋白与一种或多种其它配体结合。

[0188] 本发明所涵盖的抗体或其抗原结合片段包括能够与硬化素特异结合并竞争性抑制TGF- β 多肽(诸如BMP)与硬化素结合的抗体。例如，本发明所涵盖的抗体竞争性抑制硬化素多肽与BMP上的BMP I型受体位点或BMP II型受体结合位点结合，或者竞争性抑制硬化素与BMP上的I型和II型受体结合位点二者结合。不希望受限于理论，当抗硬化素抗体竞争性抑制BMP多肽上的I型和/或II型结合位点与硬化素结合、由此阻断硬化素的拮抗活性时，BMP上的受体结合位点即可用于结合I型和II型受体，由此增加骨矿化。当该配体对的每一个配偶体都形成均二聚体时，通常存在TGF- β 结合蛋白(诸如硬化素)与TGF- β 多肽(诸如BMP)之间的结合相互作用。因此，除了使用硬化素特异抗体通过竞争性抑制硬化素与BMP结合来阻断、削弱、或阻止硬化素与BMP结合以外，硬化素特异抗体(还)可用于阻断或削弱硬化素均二聚体形成。

[0189] 例如，在与人BMP-7的一个二聚体形成的复合物中分离到作为BMP拮抗剂、有能力以高亲和力与BMP结合的人头蛋白的一个二聚体(Zimmerman等，见上文)，并通过多波长不规则衍射(MAD)进行了分析(Groppe等，Nature 420 :636-42, 2002)。如上所述，这项研究揭示了头蛋白二聚体可以有效阻断BMP上的所有受体结合位点(两个I型和两个II型受

体结合位点)。头蛋白上与 BMP-7 接触的氨基酸位置可用于其它 TGF- β 结合蛋白诸如硬化素 (SOST) 与 BMP 之间的相互作用的建模,由此有助于设计可以作为免疫原用于产生阻断或削弱这种相互作用的抗体的肽。

[0190] 在本发明的一个实施方案中,与 SOST 多肽特异结合的抗体或其抗原结合片段可竞争性抑制 SOST 多肽与位于骨形态发生蛋白 (BMP) 上的 BMP I 型受体结合位点和 BMP II 型受体结合位点中至少其一或二者的结合。SOST 上这些抗体与之结合的表位可以包含或包含于位于 SOST 多肽 N 端的连续氨基酸序列 (SEQ ID NO :46 大约第 1-56 位氨基酸)。该多肽还可以包含连接 N 端区域与核心区域的短接头肽序列,例如 SEQ ID NO :92(人) 和 SEQ ID NO :93(大鼠) 中提供的多肽。人 SOST(例如 SEQ ID NO :46) 的较短的代表性 N 端肽序列包括 SEQ ID NO :47-51,而大鼠 SOST(例如 SEQ ID NO :65) 的较短的代表性 N 端肽序列包括 SEQ ID NO :57-60。

[0191] 与 SOST 多肽特异结合并例如通过阻断或抑制与 BMP 上与一个或多个 I 型和 II 型受体结合位点对应的氨基酸结合而阻断或竞争性抑制 SOST 多肽与 BMP 结合的抗体也可与包含对应于 SOST 核心区域 (SEQ ID NO :46 的大约第 57-146 位氨基酸) 的氨基酸序列的肽特异结合。包含该核心区域的多肽还可包含在 N 端和 C 端之一或二者延伸的额外氨基酸,例如包含可用于将多肽与载体分子缀合的半胱氨酸残基。例如,人和大鼠 SOST 的代表性核心多肽分别包含 SEQ ID NO :94 和 SEQ ID NO :95 所示氨基酸序列。这些抗体还可与较短多肽序列结合。代表性人 SOST 核心肽序列提供于 SEQ ID NO :66-69,而代表性大鼠 SOST 核心序列提供于 SEQ ID NO :70-73。

[0192] 在另一个实施方案中,与 SOST 多肽特异结合的抗体削弱(抑制、阻止、或阻断,例如以统计学显著方式降低)SOST 均二聚体形成。因为 SOST 与 BMP 之间的相互作用可能涉及 SOST 的均二聚体和 BMP 的均二聚体,所以阻止或削弱 SOST 均二聚体形成的抗体因而可改变骨矿物质密度,优选增加骨矿物质密度。在一个实施方案中,与 SOST 核心区域结合的抗体可阻止均二聚体形成。这些抗体还可与包含对应于核心区域的连续氨基酸序列(例如 SEQ ID NO :74、75、和 98(人 SOST) 以及 SEQ ID NO :76 和 99(大鼠 SOST))的肽结合。与位于 SOST 多肽 C 端区域的表位 (SEQ ID NO :46 或 65 的大约第 147-190 位氨基酸) 结合的抗体也可削弱均二聚体形成。例如,代表性的人和大鼠 SOSTC 端多肽分别包含 SEQ ID NO :96 和 SEQ ID NO :97 所示氨基酸序列。这些抗体还可与较短多肽序列结合。代表性的人 SOST C 端肽序列提供于 SEQ ID NO :78-81,而代表性的大鼠 SOST C 端序列提供于 SEQ ID NO :86-88。

[0193] 抗体可与之特异结合的本文所公开的 SOST 多肽和肽可以用作免疫原。本发明的这些免疫原可用于免疫动物以产生体液免疫应答,导致与位于 BMP 上的 I 型或 II 型受体结合位点或者二者(包括由 SOST N 端区域衍生的肽)特异结合或可阻止 SOST 均二聚体形成的抗体的生成。

[0194] 可用作免疫原的这些 SOST 多肽和肽也可用于筛选包含抗体的样品的方法中,例如纯化抗体、抗血清、或细胞培养物上清液的样品或是可能包含一种或多种对 SOST 特异的抗体的任何其它生物学样品。这些肽还可用于从生物学样品中鉴定和选择一个或多个生成与 SOST 特异结合的抗体的 B 细胞的方法(例如噬斑形成测定法等等)中。然后可以将 B 细胞作为 SOST 特异抗体编码多核苷酸的来源,通过本领域知道的和本文描述的重组分子

生物学技术进行克隆和 / 或修饰。

[0195] “生物学样品”在用于本文时在某些实施方案中指包含至少一种对 SOST 多肽特异的抗体的样品，而且可以通过由受试者或生物学来源获得血样、活组织检查样本、组织外植体、器官培养物、或者任何其它组织或细胞制品来获得生物学样品。样品还可以指其中形态学完整性或物理状态已经通过例如解剖、分解、溶解、分级、匀浆、生化或化学抽提、粉碎、冻干、超声、或用于处理衍生自受试者或生物学来源的样品的任何其它手段被破坏的组织或细胞制品。受试者或生物学来源可以是人或非人动物、原代细胞培养物（例如体外免疫的 B 细胞）、或适于培养的细胞系，包括但不限于包含染色体整合的或游离的重组核酸序列的遗传工程化细胞系、永生化或可永生细胞系、体细胞杂交细胞系、已分化或可分化细胞系、经转化细胞系、诸如此类。

[0196] 还可以通过合成总体代表 SOST 多肽的整个多肽序列、但每个只是与系列内的另一种肽共有 SOST 氨基酸序列一部分的一系列肽来制备 SOST 肽免疫原。这种交叠部分将优选至少 4 个氨基酸，更优选 5、6、7、8、9、或 10 个氨基酸。每种肽可用于免疫动物，由动物采集血清，并在测定法中进行测试以鉴定哪只动物生成削弱或阻断 SOST 与 TGF- β 蛋白结合的抗体。然后依照本领域知道的和本文描述的方法由这些经鉴定的免疫动物制备抗体。

[0197] 根据本文提供的公开书可以容易的制备抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员结合的抗体。特别有用的是与 SEQ ID NO :2、6、8、10、12、14、16、46、或 65 的 TGF- β 结合蛋白“特异结合”、但不与其它 TGF- β 结合蛋白（诸如 Dan、Cerberus、SCGF、或 Gremlin）结合的抗 TGF- β 结合蛋白抗体。在本发明的内容中，抗体理解为包括单克隆抗体、多克隆抗体、单链的、嵌合的、CDR 移植的免疫球蛋白、抗独特型抗体、及其抗体片段（例如 Fab、Fd、Fab'、和 F(ab')₂、Fv 可变区、和互补决定区）。如上所述，若抗体以大于或等于 $10^7 M^{-1}$ 、优选大于或等于 $10^8 M^{-1}$ 的 Ka 与 TGF- β 结合蛋白结合，且与其它 TGF- β 结合蛋白不结合或者以小于或等于 $10^6 M^{-1}$ 的 Ka 结合，则理解为该抗体是对所述 TGF- β 结合蛋白特异的，或是对该特定 TGF- β 家族成员是特异的。抗体对其相关抗原的亲和力还常常表述为解离常数 K_d ，而且，若抗 SOST 抗体以小于或等于大约 $10^{-5} M$ 、更优选小于或等于大约 $10^{-6} M$ 、仍然更优选小于或等于大约 $10^{-7} M$ 、且仍然更优选小于或等于大约 $10^{-8} M$ 的 K_d 与 TGF- β 家族成员结合，则该抗 SOST 抗体与该 TGF- β 家族成员可特异结合。另外，本发明的抗体优选阻断、削弱、或抑制（例如以统计学显著性降低）TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员结合。本领域普通技术人员可以容易的测定单克隆抗体或结合配偶体的亲和力以及对结合的抑制（参阅 Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51 :660-672, 1949）。还可以通过表面激元共振 (SPR; BIACore, Biosensor, 皮斯卡塔韦, 新泽西) 来测定亲和力。对于表面激元共振，可将靶分子固定在固相上，并暴露于沿流动槽流过的流动相中的配体。如果发生配体与固定化靶的结合，那么局部折射率发生变化，导致 SPR 角发生变化，这可以通过检测折射光的强度变化来实时监测。可以分析 SPR 信号的变化速率以得到结合反应的结合和解离相的表观速率常数。这些数值的比率就是表观平衡常数（亲和力）（参阅例如 Wolff 等, Cancer Res. 53 :2560-65, 1993）。

[0198] 依照本发明的抗体可以属于任何免疫球蛋白类别，例如 IgG、IgE、IgM、IgD、或 IgA，而且可以是构成一个类别的不同同种型之任一（诸如人 IgG 类别的 IgG1、IgG2、IgG3、和 IgG4）。它可以由动物获得或衍生，例如禽类（例如鸡）和哺乳动物，包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔、或其它啮齿类、牛、马、绵羊、山羊、骆驼、人、或其它灵长类。抗体可以是内在

化抗体。

[0199] 可以使用本领域众所周知的方法来生成对 TGF- β 结合蛋白（诸如 SOST）特异的抗体、多克隆抗血清、或单克隆抗体。还可以生成这样的抗体，即设计成具有期望特性的基因工程化免疫球蛋白 (Ig) 或 Ig 片段。例如，作为例示而非限制，抗体可以包括重组 IgG，它是嵌合的融合蛋白，具有至少一个来自第一种哺乳动物物种的可变区 (V) 结构域和至少一个来自第二种不同哺乳动物物种的恒定区结构域。最常见的是，嵌合抗体具有鼠源可变区序列和人源恒定区序列。这样的鼠 / 人嵌合免疫球蛋白可以是通过将赋予对抗原的结合特异性的由鼠抗体衍生的互补决定区 (CDR) 移植到由人衍生的 V 区框架区和由人衍生的恒定区中而“人源化”的。可以通过蛋白水解消化或可选地通过蛋白水解消化后继以二硫键的温和还原和烷化来生成这些分子的片段。或者，还可以通过重组遗传工程技术来生成这些片段。

[0200] 某些优选抗体是在本文所述体外测定法中抑制或阻断 TGF- β 结合蛋白活性的那些抗体。通常可以使用免疫检测方法来测定抗体对 TGF- β 结合蛋白的结合特性，包括例如可以由本领域普通技术人员容易执行的酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、免疫沉淀、免疫印迹、逆向免疫电泳、放射免疫测定法、斑点印迹测定法、抑制或竞争测定法、诸如此类（参阅例如美国专利号 4,376,110 和 4,486,530 ;Harlow 等，《抗体：实验室指南》Antibodies :A Laboratory Manual, 冷泉港实验室, 1988）。

[0201] 免疫原可以包括表达 TGF- β 结合蛋白的细胞、纯化或部分纯化的 TGF- β 结合多肽、或者其变体或片段（即肽），或者由 TGF- β 结合蛋白衍生的肽。可以通过蛋白水解切割较大多肽，或者通过重组分子方法学来生成这些肽，或者可以化学合成。例如，本文提供了编码 TGF- β 结合蛋白的核酸序列，由此本领域技术人员能够常规制备 TGF- β 结合蛋白以用作免疫原。可以通过本文描述的和本领域知道的方法化学合成肽。或者，可以通过蛋白水解切割 TGF- β 结合蛋白而生成肽，并通过本领域知道的方法分离单个肽，诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳或任何数目的液相层析或其它分离方法。可用作免疫原的肽通常可能具有来自 TGF- β 结合蛋白氨基酸序列（诸如本文所述）的至少 4 或 5 个连续氨基酸且优选具有 TGF- β 结合蛋白的至少 6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、19、或 20 个连续氨基酸的氨基酸序列。某些其它优选肽免疫原包含 TGF- β 结合蛋白序列的至少 6 个、但不超过 12 个或更多连续氨基酸，而其它优选肽免疫原包含 SOST 多肽的至少 21 个但不超过 50 个连续氨基酸。其它优选肽免疫原包含 TGF- β 结合蛋白序列的 21-25 个、26-30 个、31-35 个、36-40 个、41-50 个、或 21 与 100 之间（含）、100 与 190（含）之间任何整数数目的连续氨基酸。

[0202] 正如本文所公开的，本领域普通技术人员可以容易的由多种温血动物生成多克隆抗体，诸如马、牛、多种禽类、兔、小鼠、绵羊、山羊、狒狒、或大鼠。通常，与佐剂诸如弗氏完全或不完全佐剂或是 Ribi 佐剂系统 (Corixa 公司, 西雅图, 华盛顿) 一起，通过腹膜内、肌肉内、眼内、皮内、或皮下注射，用 TGF- β 结合蛋白或其 13-20 个氨基酸或本文所述（优选通过戊二醛的交联与匙孔血蓝蛋白缀合）的独特肽免疫动物。还可参阅例如 Harlow 等，见上文。一般而言，在第一次注射后，动物将依照可以根据抗原、佐剂（如果有的话）、和 / 或具体动物物种等而改变的优选方案接受一次或多次加强免疫。通过对动物定期采血并在免疫测定法中制备和分析血清以测定特异抗体滴度来监测免疫应答，所述免疫测定法诸如 ELISA 或 Ouchterlony 扩散测定法等等。特别优选的多克隆抗血清将在这些测定法之

一(诸如 ELISA)中给出可检测信号,优选比背景高至少 3 倍。一旦动物的滴度在其对所述蛋白质的反应性方面达到了稳定状态,就可以通过每周采血或通过给动物放血而容易地获得较大量的抗血清。

[0203] 然后可以由这些血清纯化与 TGF- β 结合蛋白或肽特异结合的多克隆抗体,例如通过使用蛋白 A 的亲和层析。或者,可以进行这样的亲和层析,其中将 TGF- β 结合蛋白或肽或是对特定经免疫动物物种的 Ig 恒定区特异的抗体固定在合适的固相支持物上。

[0204] 可用于本发明的抗体包括通过本文描述的和本领域知道的常规免疫和细胞融合流程制备的单克隆抗体。可以使用常规技术容易的生成单克隆抗体(参阅例如 Kohler 等, Nature 256 :495, 1975 ;Coligan 等编,《免疫学通用方案》(Current Protocols in Immunology), 1 :2. 5. 1-2. 6. 7, John Wiley & Sons, 1991[“Coligan”];美国专利号 RE 32, 011、4, 902, 614、4, 543, 439、和 4, 411, 993, 将它们收入本文作为参考;还可参阅《单克隆抗体,杂交瘤:生物学分析的新尺度》(Monoclonal Antibodies, Hybridomas :A New Dimension in Biological Analyses), Plenum 出版社, Kennett、McKearn、和 Bechtol 编, 1980;和《抗体:实验室指南》(Antibodies :A Laboratory Manual), Harlow 和 Lane 编, 冷泉港实验室出版社, 1988, 也将它们收入本文作为参考;Picksley 等,“针对在大肠杆菌中表达的蛋白质的单克隆抗体的生成”(Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli),《DNA 克隆 2:表达系统》(DNA Cloning 2 :Expression Systems), 第 2 版, Glover 等编, 第 93 页, 牛津大学出版社, 1995)。可以使用任何合适的标准技术由它们衍生抗体片段,诸如蛋白水解消化或可选地蛋白水解消化(例如使用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶)后继以二硫键的温和还原和烷化。或者,还可以通过重组遗传工程技术生成这些片段。

[0205] 简而言之,在一个实施方案中,如本文所述,用 TGF- β 结合蛋白或其一个部分或一个区域,包括一个区域内的肽免疫受试者动物,诸如大鼠或小鼠或仓鼠。可以将该蛋白质与佐剂诸如弗氏完全或不完全佐剂或 Ribi 佐剂混合,以增加由此产生的免疫应答。初次免疫后 1-3 周,可以给动物再次免疫另一次加强免疫,并使用本文所述测定法测试与蛋白质的反应性。一旦动物在对所注射蛋白质的反应性方面达到了稳定状况,即处死动物,并收获包含大量 B 细胞的器官,诸如脾和淋巴结。将收获的脾和 / 或淋巴结细胞悬浮液与合适的药物敏化骨髓瘤细胞融合,以产生分泌单克隆抗体的“杂交瘤”。合适的骨髓瘤系包括例如 NS-0、SP20、NS-1(ATCC No. TIB 18)、和 P3X63-Ag 8. 653(ATCC No. CRL 1580)。

[0206] 可以将淋巴样(例如脾)细胞和骨髓瘤细胞与膜融合促进剂诸如聚乙二醇或非离子去污剂一起混合数分钟,然后以低密度涂布在支持杂交瘤细胞生长但不支持未融合的骨髓瘤细胞生长的选择培养基上。融合后,可以将细胞置于装有合适培养基(诸如 RPMI 1640 或 DMEM(经 Dulbecco 氏修改的 Eagles 氏培养基)(JRH Biosciences, 列涅萨, 堪萨斯)以及额外成分诸如胎牛血清(FBS, 即购自 Hyclone, 洛根, 犹他或 JRH Biosciences))的培养皿中。另外,培养基应当含有选择性容许融合的脾和骨髓瘤细胞生长的试剂,诸如 HAT(次黄嘌呤、氨基蝶呤、和胸苷)(Sigma Chemical 公司, 圣路易斯, 密苏里)。大约 7 天后,可以筛选由此产生的融合细胞或杂交瘤,以确定与 TGF- β 结合蛋白(取决于使用的抗原)有反应性、且阻断、削弱、或抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员结合的抗体的存在。优选生成与硬化素或其变体特异结合的单克隆抗体的杂交瘤。

[0207] 有多种测定法可用于测定与本发明蛋白质有反应性的抗体的存在，包括例如逆向免疫电泳、放射免疫测定法、放射免疫沉淀、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、斑点印迹测定法、western 印迹、免疫沉淀、抑制或竞争测定法、和三明治测定法（参阅美国专利号 4, 376, 110 和 4, 486, 530；还可参阅《抗体：实验室指南》Antibodies :A Laboratory Manual, Harlow 和 Lane 编，冷泉港实验室出版社，1988）。通过例如有限稀释克隆或通过软琼脂噬斑分离来克隆杂交瘤，并再次测定。由此，可以分离出生成与期望蛋白质反应的抗体的杂交瘤。

[0208] 可以由杂交瘤培养物的上清液分离来自杂交瘤培养物的单克隆抗体。用于生产鼠单克隆抗体的候选方法是将杂交瘤细胞注射到同基因小鼠（例如经过处理（例如降植烷引发）小鼠）的腹腔内，以促进含有单克隆抗体的腹水的形成。可以通过多种完全确立的技术来分离和纯化单克隆抗体。这些分离技术包括使用蛋白 A Sepharose 的亲和层析、大小排阻层析、和离子交换层析（参阅例如 Coligan, 第 2.7.1-2.7.12 页和第 2.9.1-2.9.3 页；Baines 等，“免疫球蛋白 G(IgG) 的纯化”(Purification of Immunoglobulin G(IgG)),《分子生物学方法》(Methods in Molecular Biology), 第 10 卷, 第 79-104 页, Humana 出版公司, 1992）。可以使用根据抗体的具体特性（例如重链或轻链同种型、结合特异性等）选择的合适配体通过亲和层析来纯化单克隆抗体。固定在固相支持物上的合适配体的实例包括蛋白 A、蛋白 G、抗恒定区（轻链或重链）抗体、抗独特型抗体、和 TGF- β 结合蛋白或者其片段或变体。

[0209] 另外，本发明的抗 TGF- β 结合蛋白抗体可以是人单克隆抗体。可以通过本领域普通技术人员熟悉的多种技术来生成人单克隆抗体。这些方法包括但不限于埃波二氏病毒 (EBV) 转化人外周血细胞（例如包含 B 淋巴细胞）、体外免疫人 B 细胞、融合来自经过免疫的携带插入的人免疫球蛋白基因的转基因小鼠的脾细胞、由人免疫球蛋白 V 区噬菌体文库进行分离、或本领域知道的和基于本文公开书的其它流程。例如，可以由经过改造而应答抗原刺激生成特异人抗体的转基因小鼠获得人单克隆抗体。用于由转基因小鼠获得人抗体的方法参阅例如 Green 等, Nature Genet. 7 :13, 1994 ;Lonberg 等, Nature 368 :856, 1994 ;Taylor 等, Int. Immun. 6 :579, 1994 ;美国专利号 5,877, 397 ;Bruggemann 等, Curr. Opin. Biotechnol. 8 :455-58, 1997 ;Jakobovits 等, Ann. N. Y. Acad. Sci. 764 :525-35, 1995。在这种技术中，将人重链和轻链基因座的元件导入由包含内源重链和轻链基因座靶向破坏的胚胎干细胞系衍生的小鼠品系（还可参阅 Bruggemann 等, Curr. Opin. Biotechnol. 8 :455-58, 1997）。例如，人免疫球蛋白转基因可以是在小鼠淋巴组织中进行 B 细胞特异性 DNA 重排和超变的微型基因构建体或酵母人工染色体上的转基因座 (transloci)。可以通过免疫转基因小鼠来获得人单克隆抗体，然后它们可能生成对该抗原特异的人抗体。可以依照本文所述方法将经免疫的转基因小鼠的淋巴细胞用于生成分泌人抗体的杂交瘤。还可以由经免疫动物的血液获得含有人抗体的多克隆血清。

[0210] 用于生成人 TGF- β 结合蛋白特异性单克隆抗体的另一种方法包括通过 EBV 转化使人外周血细胞永生化。参阅例如美国专利号 4,464,456。这样的生成与 TGF- β 结合蛋白（或其变体或片段）特异结合的单克隆抗体的永生化 B 细胞系（或类淋巴母细胞细胞系）可以通过本文提供的免疫检测方法进行鉴定，例如 ELISA，然后通过标准克隆技术进行分离。生成抗 TGF- β 结合蛋白抗体的类淋巴母细胞细胞系的稳定性可以依照本领域知道

的方法通过将经转化细胞系与鼠骨髓瘤融合生成鼠 - 人杂交瘤细胞系而得到改进 (参阅例如 Glasky 等, Hybridoma 8 :377-89, 1989)。用于生成人单克隆抗体的还有一种方法是体外免疫, 它包括用抗原引发人脾 B 细胞, 随后将经引发的 B 细胞与异源杂合融合配偶体融合。参阅例如 Boerner 等, J. Immunol. 147 :86-95, 1991。

[0211] 在某些实施方案中, 依照本领域知道的 (WO 92/02551; 美国专利号 5,627,052; Babcock 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 :7843-48, 1996) 和本文描述的分子生物学技术, 选择生成抗 SOST 抗体的 B 细胞并由该 B 细胞克隆轻链和重链可变区。优选通过选择生成与 SOST 特异结合的抗体的细胞而由脾、淋巴结、或外周血样品分离来自经免疫动物的 B 细胞。还可以由人分离 B 细胞, 例如由外周血样品。用于检测生成具有期望特异性的抗体的单个 B 细胞的方法在本领域是众所周知的, 例如通过噬斑形成、荧光激活的细胞分拣术、体外刺激及随后检测特异性抗体、诸如此类。用于选择生成特异抗体的 B 细胞的方法包括例如在含有 SOST 或其肽片段的软琼脂中制备 B 细胞的单细胞悬浮液。由 B 细胞生成的特异抗体与抗原的结合导致复合物的形成, 它可以免疫沉淀物形式观察到。选择出生成特异抗体的 B 细胞后, 可以依照本领域知道的和本文描述的方法通过分离并扩增 DNA 或 mRNA 来克隆该特异抗体基因。

[0212] 对于特定用途, 可能需要抗 TGF- β 结合蛋白抗体的片段。抗体片段 F(ab')₂、Fab、Fab'、Fv、Fc、Fd 保留了完整抗体的抗原结合位点, 因而与同一表位结合。可以依照常规方法, 通过例如抗体的蛋白水解例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整抗体, 来获得由抗体衍生的这些抗原结合片段。例如, 可以通过用胃蛋白酶酶促切割抗体以提供称为 F(ab')₂ 的 5S 片段而生成抗体片段。还可以用硫醇还原剂进一步切割这个片段以生成 3.5S Fab' 单价片段。可选的是, 可以使用针对由切割二硫键产生的巯基的封闭基团进行切割反应。或者, 使用木瓜蛋白酶的酶促切割直接生成两个单价 Fab 片段和一个 Fc 片段。这些方法参阅例如 Goldenberg, 美国专利号 4,331,647; Nisonoff 等, Arch. Biochem. Biophys. 89 :230, 1960; Porter, Biochem. J. 73 :119, 1959; Edelman 等, 《酶学方法》(Methods in Enzymology) 1 :422, Academic 出版社, 1967; 和 Coligan, 第 2.8.1-2.8.10 页和第 2.10.-2.10.4 页。可以采用用于切割抗体的其它方法, 诸如分离重链以形成单价轻链 - 重链片段 (Fd), 进一步切割片段, 或者其它酶促、化学、或基因工程技术, 只要片段与完整抗体所识别的抗原结合即可。

[0213] 抗体片段还可以是像抗体那样与特定抗原结合而形成复合物的任何合成的或基因工程化蛋白质。例如, 抗体片段包括由轻链可变区组成的分离片段、由重链和轻链可变区组成的“Fv”片段、其中轻链和重链可变区以肽接头相连的重组单链多肽分子 (scFv 蛋白)、和由模拟高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位。本发明的抗体优选包含至少一个可变区结构域。可变区结构域可以是任何大小或氨基酸组成, 而且通常包含至少一个负责抗原结合且与一个或多个框架序列相邻或处于同一读码框的高变氨基酸序列。在一般术语中, 可变区 (V) 结构域可以是免疫球蛋白重链 (V_H) 和 / 或轻链 (V_L) 可变结构域的任何合适排列。因此, 例如, V 区结构域可以是单体, 而且可以是能够以可接受的亲和力与抗原独立结合的 V_H 或 V_L 结构域。或者, V 区结构域可以是二聚体, 包括 V_H-V_H、V_H-V_L、或 V_L-V_L 二聚体。优选的是, V 区二聚体包含非共价相连的至少一个 V_H 链和至少一个 V_L 链 (下文称为 F_v)。如果需要, 两条链可以共价偶联而形成单链 (scF_v), 这种连接或是直接的, 例如经由两个可变

结构域之间的二硫键，或是通过接头，例如肽接头。

[0214] 可变区结构域可以是任何天然存在的可变结构域或其加工形式。加工形式指使用重组 DNA 工程技术产生的可变区结构域。这些加工形式包括例如通过特定抗体氨基酸序列中的插入、缺失、或改变而由特定抗体可变区产生的那些形式。具体实例包括包含来自第一种抗体的至少一个 CDR 和可选地一个或多个框架氨基酸、而剩余可变区结构域来自第二种抗体的工程化可变区结构域。

[0215] 可变区结构域可以在 C 端氨基酸共价连接至少一个其它抗体结构域或其片段。因此，例如，当可变区结构域中存在 V_H 结构域时，它可以与免疫球蛋白 C_H1 结构域或其片段相连。类似的， V_L 结构域可以与 C_K 结构域或其片段相连。这样的话，例如，抗体可以是 Fab 片段，其中抗原结合结构域包含其 C 端分别与 $CH1$ 和 C_K 结构域共价相连的关联 V_H 和 V_L 结构域。 $CH1$ 结构域可以用氨基酸进一步延伸，例如为了提供在 Fab' 片段中存在的铰链区或铰链区结构域的一部分，或是为了提供其它结构域，诸如抗体 $CH2$ 和 $CH3$ 结构域。

[0216] 抗体片段的另一种形式是包含单个互补决定区 (CDR) 的肽。可以通过构建编码目的抗体的 CDR 的多核苷酸来获得 CDR 肽（“最小识别单位”）。例如，通过使用聚合酶链式反应，以抗体生成细胞的 mRNA 作为模板合成可变区，由此制备这些多核苷酸（参阅例如 Larrick 等, Methods :A Companion to Methods in Enzymology 2 :106, 1991；Courtenay-Luck, “单克隆抗体的基因操作”(Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies),《单克隆抗体：生产、改造、和临床应用》(Monoclonal Antibodies : Production, Engineering and Clinical Application), Ritter 等编, 第 166 页, 剑桥大学出版社, 1995 年；和 Ward 等, “抗体的基因操作和表达”(Genetic Manipulation and Expression of Antibodies),《单克隆抗体：原理和应用》(Monoclonal Antibodies : Principles and Applications), Birch 等编, 第 137 页, Wiley-Liss 出版社, 1995 年）。

[0217] 或者，抗体可以是通过使用重组 DNA 技术获得的重组或工程化抗体，该技术涉及编码抗体可变区和 / 或恒定区的 DNA 的操作和再表达。这些 DNA 是已知的和 / 或易于由 DNA 文库获得的，包括例如噬菌体 - 抗体文库（参阅 Chiswell 和 McCafferty, Tibtech. 10 : 80-84, 1992），或是需要的话，可以人工合成。标准分子生物学和 / 或化学流程可用于 DNA 的测序和操作，例如，用于导入密码子以产生半胱氨酸残基，或是用于根据需要修饰、添加、或缺失其它氨基酸或结构域。

[0218] 还可以依照本发明生成对 TGF- β 结合蛋白特异的嵌合抗体，包括人源化抗体。嵌合抗体具有至少一个衍生自第一种哺乳动物物种的恒定区结构域和至少一个衍生自第二种不同哺乳动物物种的可变区结构域（参阅例如 Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 :6851-55, 1984）。在优选实施方案中，可以通过将编码至少一个衍生自非人单克隆抗体的可变区结构域（诸如衍生自小鼠、大鼠、或仓鼠单克隆抗体的可变区）的多核苷酸序列克隆到包含编码至少一个人恒定区的核苷酸序列的载体中来构建嵌合抗体（参阅例如 Shin 等, Methods Enzymol. 178 :459-76, 1989；Walls 等, Nucleic Acids Res. 21 :2921-29, 1993）。例如，可以将编码鼠单克隆抗体轻链可变区的多核苷酸序列插入包含编码人 κ 轻链恒定区序列的核苷酸序列的载体中。在分开的载体中，可以在与编码人 IgG 恒定区（例如人 IgG1 恒定区）的序列相同的读码框中克隆编码单克隆抗体重链可变区的多核苷酸序列。可以根据对特定抗体所期望的效应物功能（例如补体固定、与特定 Fc 受体结合、等）来

选择特定的人恒定区。优选的是，构建的载体将转染到真核细胞中用于稳定表达嵌合抗体。本领域知道的用于生成嵌合抗体的另一种方法是同源重组（例如美国专利号 5,482,856）。[0219] 可以对非人 / 人嵌合抗体进行进一步的基因工程改造以生成“人源化”抗体。这样的人源化抗体可以包含由非人哺乳动物物种的免疫球蛋白衍生的多个 CDR、至少一个人可变框架区、和至少一个人免疫球蛋白恒定区。可用于设计人源化抗体的策略可包括例如（作为例示而非限制）鉴定与嵌合抗体中的非人框架区最同源的人可变框架区。不希望受限于理论，这样的策略可以增加人源化抗体保持对 TGF- β 结合蛋白的特异结合亲和力的可能性，在有些优选实施方案中，可以是对 TGF- β 结合蛋白或其变体或片段本质上相同的亲和力，而在某些其它优选实施方案中，可以是对 TGF- β 结合蛋白更高的亲和力。参阅例如 Jones 等, Nature 321 :522-25, 1986 ;Riechmann 等, Nature 332 :323-27, 1988。因此，设计这样的人源化抗体可能包括测定非人可变区的 CDR 环构象和结构决定簇，例如通过计算机建模，然后将 CDR 环和决定簇与已知的人 CDR 环结构和决定簇进行比较。参阅例如 Padlan 等, FASEB9 :133, -39, 1995 ;Chothia 等, Nature 342 :377-383, 1989。计算机建模还可用于比较通过与非人可变区的序列同源性选择的人结构模板。参阅例如 Bajorath 等, Ther. Immunol. 2 :95-103, 1995 ;EP-0578515-A3。若非人 CDR 的人源化导致结合亲和力降低，则计算机建模可能有助于鉴定能够通过定点或其它诱变技术改变以部分、完全、或超最佳（即提高到高于未人源化抗体的水平）恢复亲和力的特定氨基酸残基。本领域普通技术人员熟悉这些技术，而且容易的领会对这些设计策略的众多变化和修改。

[0220] 用于制备人源化抗体的这种方法称为饰面 (veneering)。在用于本文时，术语“饰面 FR”和“重组饰面 FR”指用人 FR 残基选择性取代例如啮齿类重链或轻链 V 区的 FR 残基，以提供包含本质上保留了所有天然 FR 多肽折叠结构的抗原结合位点的异种分子。饰面技术是基于这样的理解，即抗原结合位点的配体结合特征主要由重链和轻链 CDR 对在抗原结合表面内的结构和相对定位决定。Davies 等, Ann. Rev. Biochem. 59 :439-73, 1990。因此，只有在其中 CDR 结构、它们彼此的相互作用、和它们与剩余 V 区结构域的相互作用得到小心维持的情况下，才可以保持人源化抗体的抗原结合特异性。通过使用饰面技术，可以用人残基选择性取代免疫系统易于遭遇的外部（例如溶剂可到达的）FR 残基，以提供具有微弱免疫原性或是基本上无免疫原性的经饰面表面的杂合分子。

[0221] 饰面方法利用了由 Kabat 等（《免疫学关心的蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest)，第 4 版，美国健康和公共事业部，美国政府印刷厂，1987）编制的人抗体可变结构域、Kabat 数据库更新、和其它可得到的美国和外国数据库（核酸和蛋白质二者）中可以获得的序列数据。可以由已知的人和鼠抗体片段的三维结构推导 V 区氨基酸的溶剂可及性。首先，将目的抗体分子可变结构域的 FR 与由上述来源获得的相应的人可变结构域 FR 序列进行比较。然后一个残基一个残基的比较最同源的人 V 区与相应的鼠氨基酸。使用本领域众所周知的重组技术，用人模块中存在的残基取代鼠 FR 中与人对应物不同的残基。只对至少部分暴露（溶剂可及）的部分进行残基转换，而且要注意可能对 V 区结构域三级结构有显著影响的氨基酸替代，诸如脯氨酸、甘氨酸和带电荷氨基酸。

[0222] 通过这种方式，由此产生的“经饰面”抗原结合位点可被设计成保持啮齿类 CDR 残基、与 CDR 实质相邻的残基、经鉴定埋藏或大部埋藏（溶剂不可及）的残基、被认为参与重

链和轻链结构域之间非共价（即静电和疏水）接触的残基、和被认为影响 CDR 环“规范的”三级结构的 FR 保守结构区的残基。然后将这些设计标准用于制备将抗原结合位点的重链和轻链二者的 CDR 联合到人中出现的 FR 中的重组核苷酸序列，它可用于转染哺乳动物细胞以表达展示啮齿类抗体分子抗原特异性的重组人抗体。

[0223] 用于选择与 TGF- β 结合蛋白或其变体或片段特异结合的抗体的另一种方法是噬菌体展示。参阅例如 Winter 等, Annu. Rev. Immunol. 12 :433-55, 1994 ;Burton 等, Adv. Immunol. 57 :191-280, 1994。可以在能够进行筛选以选择与 TGF- β 结合蛋白或其变体或片段特异结合的 Ig 片段 (Fab, Fv, sFv, 或其多聚体) 的噬菌体载体中构建人或鼠免疫球蛋白可变区基因组合文库。参阅例如美国专利号 5,223,409 ;William D. Huse 等, “在噬菌体 λ 中生成免疫球蛋白集合的大型组合文库” (Generation of a Large Combinational Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda), Science 246 :1275-1281, 1989 年 12 月; 还可参阅 L. Sastry 等, “在大肠杆菌中克隆免疫学集合以生成单克隆催化性抗体:重链可变区特异 cDNA 文库的构建” (Cloning of the Immunological Repertoire in Escherichia coli for Generation of Monoclonal Catalytic Antibodies: Construction of a Heavy Chain Variable Region-Specific cDNA Library), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :5728-5732, 1989 年 8 月; 还可参阅 Michelle Alting-Mees 等, “单克隆抗体表达文库:杂交瘤的快速候选方法” (Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas), Strategies in Molecular Biology 3 :1-9, 1990 年 1 月; Kang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :4363-66, 1991; Hoogenboom 等, J. Mol. Biol. 227 :381-388, 1992; Schlebusch 等, Hybridoma 16 :47-52, 1997 及其中引用的参考文献。可以由 Stratagene (拉霍亚, 加利福尼亚) 获得的一种商品化系统能够通过重组技术生成抗体。简而言之, 由 B 细胞群分离 mRNA, 并用于在 λ ImmunoZap (H) 和 λ ImmunoZap (L) 载体中生成重链和轻链免疫球蛋白 cDNA 表达文库。随后将阳性噬斑转变成能够由大肠杆菌高水平表达单克隆抗体片段的非溶胞质粒。或者, 可以将包含多种编码 Ig 可变区片段的多核苷酸序列的文库插入丝状噬菌体的基因组, 诸如 M13 或其变体, 其读码框与编码噬菌体外壳蛋白的序列相同。融合蛋白可以是外壳蛋白与轻链可变区结构域和 / 或与重链可变区结构域的融合体。依照某些实施方案, 还可在噬菌体颗粒上展示免疫球蛋白 Fab 片段 (参阅例如美国专利号 5,698,426)。可以单个筛选这些载体, 或是共表达以形成 Fab 片段或抗体 (参阅 Huse 等, 见上文; 还可参阅 Sastry 等, 见上文)。

[0224] 类似的, 也可以采用常规酶促消化或掺入编码特异结合抗体的基因的可变区的重组 DNA 技术来构建抗体的部分或片段, 诸如 Fab 和 Fv 片段。在一个实施方案中, 使用针对可变区的核苷酸引物由生成目的单克隆抗体的杂交瘤扩增编码可变区的基因。这些引物可以由本领域普通技术人员合成, 或是由商业途径购买。Stratagene (拉霍亚, 加利福尼亚) 出售针对小鼠和人可变区的引物, 包括例如针对 $V_{H\alpha}$ 、 $V_{H\beta}$ 、 $V_{H\gamma}$ 、 $V_{H\delta}$ 、 $C_{H\alpha}$ 、 V_L 和 C_L 区的引物。这些引物可用于扩增重链或轻链可变区, 然后可以分别将它们插入载体, 诸如 ImmunoZAP™ H 或 ImmunoZAP™ L (Stratagene)。然后可以将这些载体导入大肠杆菌、酵母、或基于哺乳动物的系统以进行表达。可以使用这些技术生成大量的包含 V_H 和 V_L 结构域融合体的单链蛋白质 (参阅 Bird 等, Science 242 :423-426, 1988)。另外, 这些技术可用于将“鼠源”抗体变

成“人”抗体,而不改变抗体的结合特异性。

[0225] 在本发明的某些特定实施方案中,组合噬菌体文库也可用于非人可变区的人源化。参阅例如 Rosok 等, J. Biol. Chem. 271 :22611-18, 1996 ;Rader 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 :8910-15, 1998。可以通过本领域知道的和本文描述的免疫检测方法筛选噬菌体文库,以选择目的 Ig 可变区片段,并通过标准技术测定如此选择的噬菌体中插入的免疫球蛋白基因的 DNA 序列。参阅 Sambrook 等,《分子克隆:实验室指南》(Molecular Cloning :A Laboratory Manual),冷泉港出版社,2001。然后可以将选择的 Ig 编码序列克隆到另一种合适载体中以表达 Ig 片段,或者可选地克隆到包含 Ig 恒定区的载体中以表达完整免疫球蛋白链。

[0226] 在某些其它实施方案中,本发明涵盖多聚体抗体片段形式的 SOST 特异性抗体。有用的方法学通常参阅例如 Hayden 等, Curr Opin. Immunol. 9 :201-12, 1997 ;Coloma 等, Nat. Biotechnol. 15 :159-63, 1997。例如,可以通过噬菌体技术生成多聚体抗体片段,以形成微型抗体 (miniantibodies) (美国专利号 5,910,573) 或 diabodies (Holliger 等, Cancer Immunol. Immunother. 45 :128-130, 1997)。

[0227] 在本发明的某些实施方案中,对 SOST 特异的抗体可以是作为胞内蛋白表达的抗体。这些胞内抗体也可称为 intrabodies,而且包含 Fab 片段,或优选包含 scFv 片段 (参阅例如 Lecerf 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 :4764-49, 2001)。可以修饰 CDR 区侧翼的框架区以改进 intrabody 在胞内还原环境中的表达水平和溶解度 (参阅例如 Worn 等, J. Biol. Chem. 275 :2795-803, 2000)。可以将 intrabody 导向特定细胞定位或细胞器,例如通过构建包含编码 introbody 可变区的多核苷酸序列的载体,该多核苷酸序列可以与编码细胞内特定靶抗原的多核苷酸序列可操作融合 (参阅例如 Graus-Porta 等, Mol. Cell Biol. 15 :1182-91, 1995 ;Lener 等, Eur. J. Biochem. 267 :1196-205, 2000)。可以通过技术人员可用的多种技术将 intrabody 导入细胞,包括经由基因治疗载体、或脂质混合物 (例如 Provecin™, Imgenex 公司, 圣迭哥, 加利福尼亚)、或依照光化学内在化方法。

[0228] 将氨基酸突变导入对 TGF- β 结合蛋白特异的免疫球蛋白分子可用于提高对 TGF- β 结合蛋白的特异性或亲和力,或是改变效应物功能。可以通过针对特定残基的定点诱变来生成对 TGF- β 结合蛋白具有更高亲和力的免疫球蛋白。计算机辅助的三维分子建模可用于鉴定有待改变以改进对 TGF- β 结合蛋白的亲和力的氨基酸残基。参阅例如 Mountain 等, Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 10 :1-142, 1992。或者,可以在 M13 噬菌体中构建 CDR 组合文库,并筛选具有改进亲和力的免疫球蛋白片段。参阅例如 Glaser 等, J. Immunol. 149 :3903-3913, 1992 ;Barbas 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :3809-13, 1994 ;美国专利号 5,792,456。

[0229] 还可以通过定点诱变来改变效应物功能。参阅例如 Duncan 等, Nature 332 :563-64, 1988 ;Morgan 等, Immunology 86 :319-24, 1995 ;Eghtedarzadeh-Kondri 等, Biotechniques 23 :830-34, 1997。例如,免疫球蛋白 Fc 部分上糖基化位点的突变可能改变免疫球蛋白固定补体的能力。参阅例如 Wright 等, Trends Biotechnol. 15 :26-32, 1997。恒定区结构域中的其它突变可能改变免疫球蛋白固定补体或影响抗体依赖性细胞毒性的能力。参阅例如 Duncan 等, Nature 332 :563-64, 1988 ;Morgan 等, Immunology 86 :319-24, 1995 ;Sensel 等, Mol. Immunol. 34 :1019-29, 1997。

[0230] 依照某些实施方案,可以将本文所述任何 Ig 分子的非人、人、或人源化重链和轻链可变区构建成单链 Fv (scFv) 多肽片段 (单链抗体)。参阅例如 Bird 等, Science 242 : 423-426, 1988 ; Huston 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :5879-5883, 1988。可以通过将编码 scFv 多肽的多核苷酸序列以相同读码框与编码任何已知效应物蛋白的至少一种多核苷酸序列相连来生成多功能 scFv 融合蛋白。这些方法在本领域是已知的, 参阅例如 EP-B1-0318554、美国专利号 5, 132, 405、美国专利号 5, 091, 513、和美国专利号 5, 476, 786。例如, 效应物蛋白可以包括免疫球蛋白恒定区序列。参阅例如 Hollenbaugh 等, J. Immunol. Methods 188 :1-7, 1995。效应物蛋白的其它实例是酶。作为非限制性实例, 这样的酶可以提供治疗目的的生物学活性 (参阅例如 Siemers 等, Bioconjug. Chem. 8 :510-19, 1997), 或者可以提供诊断用途的可检测活性, 诸如辣根过氧化物酶催化的多种众所周知的底物转变成可检测产物。scFv 融合蛋白的还有一些其它实例包括 Ig- 毒素融合体, 或免疫毒素, 其中 scFv 多肽与毒素相连。

[0231] 在某些实施方案中, 可以将 scFv 或本文所述任何抗体片段与容许检测融合蛋白与抗原 (例如 TGF- β 结合蛋白) 之间的特异结合的肽或多肽结构域融合。例如, 融合多肽结构域可以是用于通过本领域技术人员熟悉的多种技术来检测 scFv 融合蛋白与 TGF- β 结合蛋白的结合的亲和标签多肽。肽标签的实例包括亲和素、链霉亲和素、或 His (例如多组氨酸)。检测技术还可以包括例如亲和素或链霉亲和素融合蛋白与生物素或生物素模拟序列的结合 (参阅例如 Luo 等, J. Biotechnol. 65 :225, 1998 及其中引用的参考文献)、用可检测模块 (例如标记模块) 直接共价修饰融合蛋白、融合蛋白与特定的经标记报道分子的非共价结合、包含具有酶活性的部分的融合蛋白对可检测底物的酶促修饰、或融合蛋白在固相支持物上的 (共价或非共价) 固定。可用于构建 scFv 融合蛋白的其它亲和多肽可以包括链霉亲和素融合蛋白 (参阅例如 WO 89/03422、美国专利号 5, 489, 528、美国专利号 5, 672, 691、WO 93/24631、美国专利号 5, 168, 049、美国专利号 5, 272, 254) ; 亲和素融合蛋白 (参阅例如 EP 511, 747) ; 酶, 诸如谷胱甘肽-S-转移酶; 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 蛋白 A 多肽。

[0232] 可以依照众所周知的用于核酸切割、连接、转化、和转染的多种流程, 使用多种表达载体来扩增并表达编码与本文所述 TGF- β 结合蛋白特异结合的抗体或其片段的多核苷酸。由此, 在某些实施方案中, 优选在原核宿主中表达抗体片段, 诸如埃希氏大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (参阅例如 Pluckthun 等, Methods Enzymol. 178 :497-515, 1989)。在某些其它实施方案中, 优选在真核宿主细胞中表达抗体或其片段, 包括酵母 (例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、和巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*))、动物细胞 (包括哺乳动物细胞)、或植物细胞。合适的动物细胞的实例包括但不限于骨髓瘤 (诸如小鼠 NSO 系)、COS、CHO 或杂交瘤细胞。植物细胞的实例包括烟草、玉米、大豆和稻细胞。

[0233] 一旦得到了合适的抗体, 即可以通过本领域普通技术人员众所周知的许多技术进行分离或纯化 (参阅《抗体:实验室指南》Antibodies :A Laboratory Manual, Harlow 和 Lane 编, 冷泉港实验室出版社, 1988)。合适的技术包括肽或蛋白质亲和柱 (包括使用附着于柱基质上的抗恒定区抗体)、HPLC 或 RP-HPLC、蛋白 A 或蛋白 G 柱上的纯化、或这些技术的任意组合。

[0234] c. 突变的 TGF- β 结合蛋白

[0235] 正如此处和下文实施例（例如实施例 8 和 9）中所述，与天然 TGF- β 结合蛋白竞争阻断特定 TGF- β 家族成员活性的能力的改变形式的 TGF- β 结合蛋白应当会导致骨密度增加。由此，与 TGF- β 家族成员结合、但不抑制 TGF- β 家族成员功能的 TGF- β 结合蛋白突变体将符合这下标准。突变体必须有效竞争 TGF- β 结合蛋白的内源抑制性功能。

[0236] d. 蛋白质的生成

[0237] 本文所述多肽包括 TGF 结合蛋白硬化素及其变体和与硬化素特异结合的抗体或其片段。编码这些多肽的多核苷酸包括与所述基因和分离的核酸分子本质上相似的基因衍生物，以及（如果合适的话）由这些基因及其衍生物编码的蛋白质（包括肽和多肽）。在用于本文时，若 (a) 核苷酸序列衍生自上文所述基因和核酸分子的编码区，而且包括例如上文所述序列的一部分或序列的等位基因变异，或者编码抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员结合的分子；(b) 核苷酸序列能够在中等、高、或很高严谨度下与本发明的核苷酸序列杂交（参阅 Sambrook 等，《分子克隆：实验室指南》Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第 2 版, 冷泉港实验室出版社, 纽约, 1989）；和 / 或 (c) DNA 序列由于 (a) 或 (b) 中所定义的 DNA 序列的遗传密码而是简并的，则认为该核苷酸序列是“本质上相似的”。另外，本文公开的核酸分子包括互补和非互补序列二者，条件是所述序列在其它方面达到本文所列标准。在本发明的内容中，高严谨度指标准杂交条件（例如 5x SSPE、0.5% SDS, 于 65°C, 或相当的条件）。

[0238] 使用例如 P/C Gene or Intelligenetics Suite (Intelligenetics, 芒廷维尤, 加利福尼亚) 的疏水性绘图功能，或者依照 Kyte 和 Doolittle (J. Mol. Biol. 157 :105-132, 1982) 描述的方法，可以由主要翻译产物预测由本文所述核酸分子编码的蛋白质的结构。

[0239] 可以以酸性或碱性盐或是中性形式制备本发明的蛋白质。另外，可以通过氧化或还原修饰个别氨基酸残基。此外，可以对氨基酸或核酸序列进行多种替代、缺失、或添加，其净效应是保持或者进一步增强或降低突变型或野生型蛋白质的生物学活性。此外，例如由于遗传密码的简并性，编码相同氨基酸序列的核苷酸序列中可能存在可观的变异。

[0240] 本文公开的蛋白质的其它衍生物包括该蛋白质与其它蛋白质或多肽的缀合物。这可以通过例如合成 N 端或 C 端融合蛋白来实现，它们的添加有助于蛋白质的纯化或鉴定（参阅美国专利号 4,851,341；还可参阅 Hopp 等, Bio/Technology 6 :1204, 1988）。或者，可以构建融合蛋白，诸如 Flag®/TGF- β 结合蛋白，以帮助蛋白质的鉴定、表达、和分析。

[0241] 可以使用本文所述多种技术来构建本发明的蛋白质。另外，可以通过合成包含突变序列且侧翼为限制位点从而能够连接天然序列片段的寡核苷酸而在特定位置导入突变。连接后，由此产生的重建序列编码具有期望氨基酸插入、替代、或缺失的衍生物。

[0242] 或者，可以采用由寡核苷酸介导的位点特异（或区段特异）诱变流程来提供特定密码子根据需要的替代、缺失、或插入遭到改变的改变后基因或核酸分子。上文所列用于产生改变的示例性方法描述于 Walder 等, Gene 42 :133, 1986；Bauer 等, Gene 37 :73, 1985；Craik, BioTechniques, 1985 年 1 月, 12-19；Smith 等,《基因工程：原理和方法》Genetic Engineering :Principles and Methods, Plenum 出版社, 1981；以及 Sambrook 等, 见上文。还可以利用与所需缺失邻近的便利限制性内切酶位点来构建蛋白质的缺失或截短衍生物（例如可溶性胞外部分）。限制性消化后，可以补平粘端并重连 DNA。上文所列用于产生

改变的例示性方法公开于 Sambrook 等,《分子克隆 : 实验室指南》Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 第 2 版, 冷泉港实验室出版社, 1989。

[0243] 在本发明核酸分子中进行的突变优选保持编码序列的读码框。此外, 突变将优选不产生在转录后能够杂交而生成二级 mRNA 结构诸如将对 mRNA 翻译产生不利影响的环或发夹的互补区。尽管可以预定突变位点, 然而本质上不必预定突变的性质。例如, 为了选择指定位点处突变体的最佳特征, 可以在目标密码子处进行随机诱变, 并对表达的突变体筛选生物学活性的获得或丧失或保持。或者, 可以通过合成包含突变序列且其侧翼为限制位点从而能够连接天然序列片段的寡核苷酸而将突变导入特定位置。连接后, 由此产生的重建序列编码具有期望氨基酸插入、替代、或缺失的衍生物。

[0244] 还可以采用诸如 PCR 诱变、化学诱变 (Drinkwater 和 Klinedinst, PNAS 83 : 3402-3406, 1986)、通过强迫核苷酸错掺 (例如 Liao 和 Wise, Gene88 :107-111, 1990)、或使用随机诱变寡核苷酸 (Horwitz 等, Genome 3 :112-117, 1989) 等技术来构建编码本发明蛋白质的核酸分子。

[0245] 本发明还提供了通过培养包含能够表达上文所述基因的载体的宿主细胞而进行的对上文所述基因和核酸分子的操作和表达。这些载体或载体构建体包括合成的或 cDNA 衍生的编码期望蛋白质的核酸分子, 其可操作地连接合适的转录或翻译调控元件。合适的调控元件可以衍生自多种来源, 包括细菌、真菌、病毒、哺乳动物、昆虫、或植物基因。合适调控元件的选择取决于选择的宿主细胞, 而且可以由本领域普通技术人员容易的完成。调控元件的实例包括转录启动子和增强子或 RNA 聚合酶结合序列、转录终止子、和核糖体结合序列, 包括翻译起始信号。

[0246] 可以通过非常多原核和真核宿主细胞容易的表达编码本文所述任何蛋白质的核酸分子, 包括细菌、哺乳动物、酵母或其它真菌、病毒、昆虫、或植物细胞。用于转化或转染这些细胞以表达外源 DNA 的方法在本领域是众所周知的 (参阅例如 Itakura 等, 美国专利号 4,704,362 ;Hinnen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 :1929-1933, 1978 ;Murray 等, 美国专利号 4,801,542 ;Upshall 等, 美国专利号 4,935,349 ;Hagen 等, 美国专利号 4,784,950 ;Axel 等, 美国专利号 4,399,216 ;Goeddel 等, 美国专利号 4,766,075 ;和 Sambrook 等,《分子克隆 : 实验室指南》Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 第 2 版, 冷泉港实验室出版社, 1989 ;关于植物细胞参予 Czako 和 Marton, Plant Physiol. 104 :1067-1071, 1994 ;和 Paszkowski 等, Biotech. 24 :387-392, 1992)。

[0247] 适于执行本发明的细菌宿主细胞包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 以及假单胞菌属、链霉菌属和葡萄球菌属中的多个物种, 以及本领域普通技术人员众所周知的和本文描述的许多其它细菌物种。细菌宿主细胞的代表性实例包括大肠杆菌 DH5 α (Stratagene, 拉霍亚, 加利福尼亚)。

[0248] 细菌表达载体优选包含在宿主细胞中发挥功能的启动子、一种或多种可选择表型标记、和细菌复制起点。代表性启动子包括 β -内酰胺酶 (青霉素酶) 和乳糖启动子系统 (参阅 Chang 等, Nature 275 :615, 1978)、T7 RNA 聚合酶启动子 (Studier 等, Meth. Enzymol. 185 :60-89, 1990)、 λ 启动子 (Elvin 等, Gene87 :123-126, 1990)、trp 启动子 (Nichols 和 Yanofsky, Meth. in Enzymology 101 :155, 1983)、和 tac 启动子 (Russell 等, Gene 20 :231, 1982)。代表性选择标记包括多种抗生素抗性标记, 诸如卡那霉素或氨苄青霉

素抗性基因。适于转化宿主细胞的许多质粒在本领域是众所周知的,包括例如 pBR322(参阅 Bolivar 等, Gene 2 :95, 1977)、pUC 质粒 pUC18、pUC19、pUC118、pUC119(参阅 Messing, Meth. in Enzymology 101 :20-77, 1983; 和 Vieira 和 Messing, Gene 19 :259-268, 1982)、以及 pNH8A、pNH16a、pNH18a、和 Bluescript M13(Stratagene, 拉霍亚, 加利福尼亚)。

[0249] 适于执行本发明的酵母和真菌宿主细胞包括例如粟酒裂殖酵母 (*Saccharomyces pombe*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、毕赤酵母属 (*Pichia*) 或克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*), 以及曲霉属 (*Aspergillus*) 的多个物种 (McKnight 等, 美国专利号 4,935,349)。适用于酵母和真菌的表达载体包括例如用于酵母的 YCp50(ATCC No. 37419), 以及 amdS 克隆载体 pV3(Turnbull, Bio/Technology 7 :169, 1989)、YRp7(Struhl 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 :1035-1039, 1978)、YEpl3(Broach 等, Gene 8 :121-133, 1979)、pJDB249、和 pJDB219(Beggs, Nature 275 :104-108, 1978) 及其衍生物。

[0250] 在酵母中使用的优选启动子包括来自酵母糖酵解基因 (Hitzeman 等, J. Biol. Chem. 255 :12073-12080, 1980; Alber 和 Kawasaki, J. Mol. Appl. Genet. 1 :419-434, 1982) 或乙醇脱氢酶基因 (Young 等,《为了化学药品的微生物基因工程》Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals, Hollaender 等编, 第 355 页, Plenum 出版社, 纽约, 1982; Ammerer, Meth. Enzymol. 101 :192-201, 1983) 的启动子。在真菌载体中有用的启动子的实例包括衍生自构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 糖酵解基因的启动子, 诸如 adh3 启动子 (McKnight 等, EMBO J. 4 :2093-2099, 1985)。表达单元还可以包含转录终止子。合适的终止子的实例是 adh3 终止子 (McKnight 等, 见上文, 1985)。

[0251] 与细菌载体一样, 酵母载体通常将包含选择标记, 它可以是展示显性表型的多种基因之一, 针对所述显性表型存在表型测定法能够选择转化子。优选的选择标记是补足宿主细胞营养缺陷、提供抗生素抗性、或使得细胞能够利用特定碳源的选择标记, 包括 leu2(Broach 等, 同上)、ura3(Botstein 等, Gene 8 :17, 1979)、或 his3(Struhl 等, 同上)。另一种合适的选择标记是 cat 基因, 它赋予酵母细胞以氯霉素抗性。

[0252] 用于转化真菌的技术在文献中是众所周知的, 描述于例如 Beggs, 同上; Hinnen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 :1929-1933, 1978; Yelton 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :1740-1747, 1984; 和 Russell, Nature 301 :167-169, 1983。宿主细胞的基因型可以包含遗传缺陷, 其可通过表达载体上存在的选择标记得到弥补。具体宿主和选择标记的选择完全属于本领域普通技术人员的水平之内。

[0253] 用于转化酵母的方案对于本领域普通技术人员而言是众所周知的。例如, 可以通过制备酵母球状体 (参阅 Hinnen 等, PNAS75 :1929, 1978) 或者通过碱性盐诸如 LiCl 处理 (参阅 Itoh 等, J. Bacteriology 153 :163, 1983) 而容易的用 DNA 进行转化。还可以如 Cullen 等, Bio/Technology 5 :369, 1987 所述使用聚乙二醇来进行真菌转化。

[0254] 病毒载体包括包含指导编码上文所述期望蛋白的分离核酸分子表达的启动子的那些载体。非常多启动子可用于本发明的内容, 包括例如诸如 MoMLV LTR、RSV LTR、Friend MuLV LTR、腺病毒启动子 (Ohno 等, Science 265 :781-784, 1994)、新霉素磷酸转移酶启动子 / 增强子、晚期细小病毒启动子 (Koering 等, Hum. Gene Therap. 5 :457-463, 1994)、疱疹 TK 启动子、SV40 启动子、金属硫蛋白 IIa 基因增强子 / 启动子、巨细胞病毒立即早期启动子、和巨细胞病毒立即晚期启动子等启动子。在本发明的特别优选实施方案中,

启动子是组织特异性启动子（参阅例如 WO 91/02805 ;EP 0,415,731 ;和 WO 90/07936）。合适的组织特异性启动子的代表性实例包括神经特异性烯醇化酶启动子、血小板衍生生长因子 β 启动子、骨形态发生蛋白启动子、人 α -chimaerin 启动子、突触蛋白 I 启动子和突触蛋白 II 启动子。除了上述启动子以外，可以使用其它病毒特异启动子（例如逆转录病毒启动子（包括上文所述启动子以及诸如 HIV 启动子等其它启动子）、肝炎、疱疹（例如 EBV）、和细菌、真菌、或寄生虫（例如疟疾）特异性启动子，从而靶向受病毒、细菌、真菌、或寄生虫感染的特定细胞或组织。

[0255] 适于执行本发明的哺乳动物细胞包括例如 COS、CHO、SaOS、骨肉瘤、KS483、MG-63、原代成骨细胞、和人或哺乳动物骨髓基质。用于执行本发明的哺乳动物表达载体将包含能够指导克隆的基因、核酸分子、或 cDNA 转录的启动子。优选的启动子包括病毒启动子和细胞启动子。骨特异性启动子包括骨唾液酸蛋白的启动子和骨钙蛋白的启动子。病毒启动子包括巨细胞病毒立即早期启动子 (Boshart 等, Cell 41 :521-530, 1985)、巨细胞病毒立即晚期启动子、SV40 启动子 (Subramani 等, Mol. Cell. Biol. 1 :854-864, 1981)、MMTV LTR、RSV LTR、金属硫蛋白-1、腺病毒 E1a。细胞启动子包括小鼠金属硫蛋白-1 启动子 (Palmiter 等, 美国专利号 4,579,821)、小鼠 V_k 启动子 (Bergman 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 7041-7045, 1983 ;Grant 等, Nucleic Acids Res. 15 :5496, 1987)、和小鼠 V_H 启动子 (Loh 等, Cell 33 :85-93, 1983)。启动子的选择将至少部分取决于期望的表达水平或待转染的受体细胞系。

[0256] 这些表达载体还可以在启动子下游和编码目的肽或蛋白质的 DNA 序列上游包含一套 RNA 剪接位点。优选的 RNA 剪接位点可以由腺病毒 / 或免疫球蛋白基因获得。表达载体中还在目的编码序列下游包含多聚腺苷酸化信号。合适的多聚腺苷酸化信号包括来自 SV40 的早期或晚期多聚腺苷酸化信号 (Kaufman 和 Sharp, 同上)、来自腺病毒 5 E1B 区的多聚腺苷酸化信号、和人生长激素基因终止子 (DeNoto 等, Nucleic Acids Res. 9 :3719-3730, 1981)。表达载体可以在启动子与 RNA 剪接位点之间包含非编码性病毒前导序列，诸如腺病毒 2 三元前导序列。优选的载体还可以包含增强子序列，诸如 SV40 增强子。表达载体还可以包含编码腺病毒 VA RNA 的序列。合适的表达载体可以由商业来源获得（例如 Stratagene, 拉霍亚, 加利福尼亚）。

[0257] 可以通过例如磷酸钙介导的转染 (Wigler 等, Cell 14 :725, 1978 ;Corsaro 和 Pearson, Somatic Cell Genetics 7 :603, 1981 ;Graham 和 Van der Eb, Virology 52 : 456, 1973)、电穿孔 (Neumann 等, EMBO J. 1 :841-845, 1982)、或 DEAE- 葡聚糖介导的转染 (Ausubel 等编,《分子生物学通用方案》Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons 公司, 纽约, 1987) 将包含克隆的 DNA 的载体构建体导入培养的哺乳动物细胞。为了鉴定稳定转染了载体或整合了克隆的 DNA 的细胞，通常将选择标记与目的基因或 cDNA 一起导入细胞中。在培养的哺乳动物细胞中使用的优选选择标记包括赋予药物（诸如新霉素、潮霉素、和氨甲蝶呤）抗性的基因。选择标记可以是可扩增选择标记。优选的可扩增选择标记是 DHFR 基因和新霉素抗性基因。选择标记的综述见 Thilly, Mammalian Cell Technology, Butterworth 出版社, 斯托纳姆, 马萨诸塞, 将其收入本文作为参考。

[0258] 将包含合适载体的哺乳动物细胞培养一段时间，通常是 1-2 天，从而开始表达目的 DNA 序列。然后进行药物选择以选择出以稳定方式表达该选择标记的细胞的生长。对于

用可扩增的选择标记转染的细胞而言,可以逐步提高药物浓度以选择克隆的序列的拷贝数增加,从而提高表达水平。对表达所导入序列的细胞选择和筛选目的蛋白以期望形式或期望水平的生成。然后可以克隆满足这些标准的细胞,并放大规模用于生产。

[0259] 用于转染哺乳动物细胞的方案对于本领域普通技术人员而言是众所周知的。代表性方法包括磷酸钙介导的转染、电穿孔、脂转染、逆转录病毒、腺病毒、和原生质体融合介导的转染(参阅 Sambrook 等,见上文)。还可以在注射到哺乳动物(或其它动物)的肌肉中后由肌肉细胞或其它合适细胞摄取裸露的载体构建体。

[0260] 使用昆虫细胞和植物宿主细胞来生产多肽的方法在本领域是知道的,而且本文有所描述。本领域知道的众多昆虫宿主细胞也可用于本发明。例如,关于以杆状病毒为载体在昆虫细胞中表达异源 DNA 序列的综述参阅 Atkinson 等, Pestic. Sci. 28 :215-224, 1990。本领域知道的众多载体和植物宿主细胞也可用于本发明,例如以发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 为载体在植物细胞中表达基因和核酸分子(其综述参阅 Sinkar 等, J. Biosci. Bangalore 11 :47-58, 1987)。

[0261] 在本发明的相关方面,可以在转基因动物中表达本发明的蛋白质,所述转基因动物的生殖细胞和体细胞中包含编码期望蛋白质的基因,其可操作连接有效表达该基因的启动子。或者,可以以相似方式制备缺乏期望基因的转基因动物(例如“敲除”小鼠)。可以在多种非人动物中制备这些转基因动物,包括小鼠、大鼠、兔、绵羊、狗、山羊、和猪(参阅 Hammer 等, Nature 315 :680-683, 1985; Palmiter 等, Science 222 :809-814, 1983; Brinster 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :4438-4442, 1985; Palmiter 和 Brinster, Cell 41 :343-345, 1985; 和美国专利号 5,175,383、5,087,571、4,736,866、5,387,742、5,347,075、5,221,778、和 5,175,384)。简而言之,将包含待表达核酸分子及位于适当位置的表达控制序列的表达载体导入受精卵的原核,例如通过显微注射。通过对组织样品的 DNA 进行印迹分析来检测所注射 DNA 的整合。优选导入的 DNA 被掺入到动物的生殖系,使得它传代给动物后代。可以通过组织特异启动子或是通过能够调控地表达转基因的可诱导启动子诸如金属硫蛋白基因启动子(Palmiter 等, 1983, 见上文)来实现组织特异表达。

[0262] 可以例如如下纯化蛋白质:培养合适的宿主和载体系统以生成本文所述重组翻译产物;然后通过多种纯化流程处理来自这些细胞系的上清液、或蛋白质包涵体、或不将蛋白质分泌到上清液中的完整细胞,以分离期望的蛋白质。例如,首先使用商品化蛋白质浓缩滤器诸如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元浓缩上清液。浓缩后,可以将浓缩液施加到合适的纯化基质上,诸如例如结合于合适支持物上的抗蛋白质抗体(例如与待分离的多肽特异结合的抗体)。或者,可以采用阴离子或阳离子交换树脂来纯化蛋白质。再或者,可以采用一次或多次反相高效液相层析(RP-HPLC)步骤来进一步纯化蛋白质。分离本发明蛋白质的其它方法在本领域是众所周知的。

[0263] 可以通过本领域知道的和本文描述的技术来测定分离的多肽的纯度,诸如凝胶电泳和层析方法。优选的是,这些分离的多肽是至少大约 90% 纯、更优选至少大约 95% 纯、且最优选至少大约 99% 纯。在某些特定实施方案中,若根据 SDS-PAGE 分析及随后考马斯蓝染色没有检测到其它非期望蛋白质,则在本发明的内容中认为蛋白质是“分离的”。在其它实施方案中,可以分离期望的蛋白质,使得根据 SDS-PAGE 分析及随后银染不会检测到其它非期望蛋白质。

[0264] 3. 核酸分子

[0265] 在本发明的其它方面,提供了能够抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员结合的核酸分子。例如,在一个实施方案中,提供了特异抑制 TGF- β 结合蛋白核酸序列表达的反义寡核苷酸分子(通常参阅 Hirashima 等,《RNA 分子生物学:新观点》(Molecular Biology of RNA :New Perspectives), M. Inouye 和 B. S. Dudock 编,1987, Academic 出版社,圣迭戈,第 401 页;寡核苷酸:基因表达的反义抑制物(Oligonucleotides :Antisense Inhibitors of Gene Expression), J. S. Cohen 编,1989, MacMillan 出版社,伦敦;Stein 和 Cheng, Science 261 :1004-1012, 1993; WO 95/10607; 美国专利号 5,359,051; WO92/06693; 和 EP-A2-612844)。简而言之,构建这些分子,使得它们与转录的 TGF- β 结合蛋白 mRNA 序列的一个区域互补并能够形成 Watson-Crick 碱基配对。由此产生的双链核酸干扰 mRNA 的后续加工,从而阻止蛋白质表达(见实施例 10)。

[0266] 在本发明的其它方面,提供了能够抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员结合的核酶。在用于本文时,“核酶”意欲包括包含用于特异识别的反义序列和 RNA 切割酶活性的 RNA 分子。催化链在较高化学计量浓度下切割靶 RNA 中的特定位点。非常多核酶可用于本发明中,包括例如锤头核酶(例如 Forster 和 Symons, Cell 48 :211-220, 1987; Haseloff 和 Gerlach, Nature 328 :596-600, 1988; Walbot 和 Bruening, Nature 334 :196, 1988; Haseloff 和 Gerlach, Nature 334 :585, 1988 中所述);发夹核酶(例如 Haseloff 等, 1993 年 10 月 19 日发布的美国专利号 5,254,678; 和 Hempel 等, 1990 年 3 月 26 日发布的欧洲专利发布号 0 360 257 中所述);和基于四膜虫核糖体 RNA 的核酶(参阅 Cech 等, 美国专利号 4,987,071)。本发明的核酶通常由 RNA 组成,但是也可以由 DNA、核酸类似物(例如硫代磷酸酯)、或其嵌合体(例如 DNA/RNA/RNA)组成。

[0267] 4. 标记物

[0268] 可以用多种化合物标记上文和下文所述基因产物或任何候选分子,包括例如荧光分子、毒素、和放射性核素。荧光分子的代表性实例包括荧光素、Phycobilis 蛋白质诸如藻红蛋白、罗丹明、Texas 红、和萤光素酶。毒素的代表性实例包括蓖麻毒素、相思豆毒素、白喉毒素、霍乱毒素、gelonin、美洲商陆抗病毒蛋白、tritin、志贺氏杆菌毒素、和假单胞菌外毒素 A。放射性核素的代表性实例包括 Cu-64、Ga-67、Ga-68、Zr-89、Ru-97、Tc-99m、Rh-105、Pd-109、In-111、I-123、I-125、I-131、Re-186、Re-188、Au-198、Au-199、Pb-203、At-211、Pb-212、和 Bi-212。另外,上文所述抗体也可以标记或缀合配体结合对中的一种配偶体。代表性实例包括亲和素-生物素、链霉亲和素-生物素、和核黄素-核黄素结合蛋白。

[0269] 本领域普通技术人员可以容易的完成用于用上文所列代表性标记物缀合或标记本文所述分子的方法(参阅单端孢霉烯抗体缀合物 Trichothecene Antibody Conjugate, 美国专利号 4,744,981; 抗体缀合物(Antibody Conjugate), 美国专利号 5,106,951; 荧光物质和标记技术(Fluorogenic Materials and Labeling Techniques), 美国专利号 4,018,884; 用于诊断和治疗的金属放射性核素标记的蛋白质(Metal Radionuclide Labeled Proteins for Diagnosis and Therapy), 美国专利号 4,897,255; 和用于改进螯合动力学的金属放射性核素螯合的化合物(Metal Radionuclide Chelating Compounds for Improved Chelation Kinetics), 美国专利号 4,988,496; 还可参阅 Inman,《酶学方法, 第 34 卷, 亲和技术、酶纯化:第二部分》(Methods In Enzymology, Vol. 34, Affinity

Techniques, Enzyme Purification) :Part B, Jakoby 和 Wilchek 编, Academic 出版社, 纽约, 第 30 页, 1974; 还可参阅 Wilchek 和 Bayer, “生物分析应用中的亲和素 - 生物素复合物”(The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications), Anal. Biochem. 171: 1-32, 1988)。

[0270] 药物组合物

[0271] 如上所述, 本发明还提供了包含上文所述抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员结合的分子之一以及制药学或生理学可接受载体、赋形剂、或稀释剂的多种药物组合物。一般而言, 这些载体在所采用的剂量和浓度对受者而言应当是无毒的。通常, 这些组合物的制备需要组合治疗剂与缓冲剂、抗氧化剂诸如抗坏血酸、低分子量 (小于大约 10 个残基) 多肽、蛋白质、氨基酸、包括葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、或糊精在内的碳水化合物、螯合剂诸如 EDTA、谷胱甘肽和其它稳定剂、和赋形剂。合适稀释剂的实例是与非特异血清蛋白混合的中性缓冲盐水或盐水。

[0272] 可以制备本发明的药物组合物以用于提供多种不同路径的施用。一般而言, 根据施用模式来选择载体的类型。可以配制药物组合物以用于任何合适的施用方式, 包括例如局部、口服、鼻、鞘内、直肠、阴道、舌下、或肠胃外施用, 包括皮下、静脉内、肌肉内、胸骨内、海绵体内、intrameatal、或尿道内注射或输液。药物组合物 (例如用于口服施用或通过注射来投递) 可以是液体的形式 (例如酏剂、糖浆、溶液、乳状液、或悬浮液)。液体药物组合物可以包含例如一种或多种下列成分: 无菌稀释剂诸如注射用水、盐水溶液、优选生理盐水、Ringer 氏溶液、等渗氯化钠、可以担当溶剂或悬浮介质的不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇、或其它溶剂; 抗细菌剂; 抗氧化剂; 融合剂; 缓冲剂诸如乙酸盐、柠檬酸盐、或磷酸盐; 以及用于调节渗透压的试剂, 诸如氯化钠或葡萄糖。肠胃外制剂可以封装在安瓿、一次性注射器、或由玻璃或塑料制成的多剂量药瓶内。优选使用生理盐水, 而且可注射的药物组合物优选是无菌的。

[0273] 本文所述组合物可以配制成缓释的 (即诸如在施用后实行缓慢释放化合物的胶囊或海绵体的配方)。通常可以使用众所周知的技术来制备这些组合物, 并通过例如口服、直肠、或皮下植入或是通过期望靶部位的植入来进行施用。缓释配方可以包含散布在载体基质中和 / 或包含在由速率控制膜包围的储库中的试剂。用于这些配方的载体是生物相容的, 而且可以是生物可降解的; 优选的是, 配方提供了相对恒定水平的活性成分释放。缓释配方中所包含的活性成分的量取决于植入部位、释放的速率和期望持续时间、以及待治疗或预防的状况的本质。在这个方面有用的例示性载体包括聚 (丙交酯 - 共 - 乙交酯)、聚丙烯酸酯、胶乳 (latex)、淀粉、纤维素、葡聚糖、诸如此类的微粒。其它例示性延迟释放载体包括包含非液体亲水核 (例如交联多糖或寡糖) 和可选地包含两亲化合物诸如磷脂的外层的超分子生物载体 (参阅例如美国专利号 5,151,254 和 PCT 申请 WO 94/20078、WO/94/23701、和 WO 96/06638)。

[0274] 在另一个例示性实施方案中, 采用生物可降解微球体 (例如聚乳酸聚乙醇酸酯) 作为本发明组合物的载体。合适的生物可降解微球体公开于例如美国专利号 4,897,268、5,075,109、5,928,647、5,811,128、5,820,883、5,853,763、5,814,344、5,407,609、和 5,942,252。经修饰的乙型肝炎核心蛋白载体系统, 诸如 WO/9940934 及其引用的参考文献中所述的那些, 也可用于许多应用中。另一种例示性载体 / 投递系统采用包含微粒 - 蛋白

质复合物的载体,诸如美国专利号 5,928,647 中所述的那些,它们能够在宿主中诱导 I 类限制性细胞毒性 T 淋巴细胞应答。

[0275] 在另一个例示性实施方案中,采用磷酸钙核心颗粒作为本发明组合物的载体或受控释放基质。例示性磷酸钙颗粒公开于例如已发表专利申请号 WO/0046147。

[0276] 对于包含编码抗 SOST 抗体和 / 或调控剂的多核苷酸(从而原位生成该多肽和 / 或调控剂)的药物组合物而言,多核苷酸可以存在于本领域普通技术人员知道的多种投递系统中,包括核酸以及细菌、病毒、和哺乳动物表达系统。用于将 DNA 掺入这些表达系统的技术对于本领域普通技术人员而言是众所周知的。如下列文献中所述,DNA 还可以是“裸露的”,例如Ulmer 等,Science 259 :1745-1749,1993 和综述 Cohen,Science 259 :1691-1692,1993。可以通过将 DNA 包被在能够高效转运到细胞中的生物可降解珠上来增加裸露 DNA 的摄取。

[0277] 在包括例如口服、肠胃外、静脉内、鼻内、和肌肉内施用和配方在内的多种治疗方案中使用本文所述特定组合物的合适剂量和治疗方案的发展在本领域是众所周知的,出于例示的一般性目的,下文将对其中一些作简要讨论。

[0278] 在某些应用中,可以通过口服施用而对动物投递本文公开的药物组合物。如此,可以用惰性稀释剂或可同化的可食用载体配制这些组合物,或者可以将它们包裹在硬壳或软壳明胶胶囊中,或者可以将它们压缩成片剂,或者可以将它们直接掺入膳食食品中。

[0279] 在某些情况下,通过肠胃外、静脉内、肌肉内、或甚至腹膜内途径投递本文公开的药物组合物将是合乎需要的。这些方法对于本领域技术人员而言是众所周知的,下列专利对其中一些有进一步描述,例如美国专利号 5,543,158、5,641,515、和 5,399,363。在某些实施方案中,可以在与表面活性剂诸如羟丙基纤维素适当混合的水中制备活性化合物作为游离基或制药学可接受盐的溶液。还可以在甘油、液体聚乙二醇、及其混合物和在油中制备分散体。在贮存和使用的常规条件下,这些制剂通常将包含防腐剂以预防微生物的生长。

[0280] 适于注射用途的例示性制药学形式包括无菌水溶液或分散体以及用于临场制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉剂(例如参阅美国专利号 5,466,468)。在所有情况中,该形式必须是无菌的,而且流动性必须达到易于注射的程度。它在制造和贮存条件下必须是稳定的,而且必须预防微生物诸如细菌和真菌的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇、诸如此类)、及其合适混合物和 / 或植物油。例如可以通过使用涂层诸如卵磷脂、在分散体的情况下通过维持所需颗粒大小、和 / 或通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。对微生物作用的预防通过多种抗细菌和抗真菌试剂变得容易,例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞、诸如此类。在许多情况中,优选包含等渗剂,例如糖类或氯化钠。可以通过在组合物中使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现可注射组合物的延迟吸收。

[0281] 在一个实施方案中,对于水溶液的肠胃外施用,如果需要,溶液应当适当缓冲,并首先用足够的盐或葡萄糖使得液体稀释剂等渗。这些特定水溶液尤其适于静脉内、肌肉内、皮下、和腹膜内施用。在这方面,本领域技术人员根据本公开书将知道可以采用的无菌水性介质。例如,可以将一个剂量溶于 1ml 等渗 NaCl 溶液,或是添加到 1000ml 皮下输液中,或是注射到建议的输液部位(参阅例如《雷明顿氏制药科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第 15 版,第 1035-1038 页和第 1570-1580 页)。根据待治疗患者的状况,可能有

必要对剂量进行一些改变。此外,对于人类施用,制剂当然优选达到 FDA 生物制剂标准办公室要求的无菌、热原性、以及一般安全性和纯度标准。

[0282] 在本发明的另一个实施方案中,本文公开的组合物可以配制成中性或盐形式。例示性的制药学可接受盐包括(由蛋白质的游离氨基形成的)酸加成盐,以及用无机酸诸如例如盐酸或磷酸或者有机酸诸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成的盐。由游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,诸如例如钠、钾、铵、钙、或铁的氢氧化物,和有机碱,诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸、葡鲁卡因等。配制后,将以与剂量形式相容的方式和诸如治疗上有效的量施用溶液。

[0283] 载体还可以包含任何和所有溶剂、分散介质、媒介、涂层、稀释剂、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体、诸如此类。这些介质和试剂对制药学活性物质的使用在本领域是众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容,否则涵盖它在药物组合物中的使用。还可以将补充性活性成分掺入组合物中。术语“制药学可接受的”指在施用于人后不产生过敏或相似的不利反应的分子实体和组合物。

[0284] 在某些实施方案中,使用脂质体、纳米胶囊、微粒、脂质颗粒、囊泡、诸如此类将本发明的组合物导入合适的宿主细胞/生物体。具体而言,可以将本发明的组合物包裹到脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球体、或纳米颗粒等中,如此配制用于投递。或者,可以将本发明的组合物共价或非共价结合到这些载体媒介的表面上。

[0285] 脂质体和脂质体样制剂作为潜在药物载体的形成和使用在本领域技术人员中通常是知道的(参阅例如 Lasic, Trends Biotechnol. 16(7) :307-21, 1998; Takakura, Nippon Rinsho 56(3) :691-95, 1998; Chandran 等, Indian J. Exp. Biol. 35(8) :801-09, 1997; Margalit, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 12(2-3) :233-61, 1995; 美国专利号 5,567,434; 美国专利号 5,552,157; 美国专利号 5,565,213; 美国专利号 5,738,868; 和美国专利号 5,795,587,明确将每一篇完整收入本文作为参考)。

[0286] 脂质体已经成功用于其它方法通常难以转染的多种细胞类型,包括 T 细胞悬浮液、原代肝细胞培养物和 PC 12 细胞(Renneisen 等, J. Biol. Chem. 265(27) :16337-42, 1990; Muller 等, DNA Cell Biol. 9(3) :221-29, 1990)。另外,脂质体没有基于病毒的投递系统通常所具有的 DNA 长度限制。脂质体已经有效用于将基因、多种药物、放射性治疗剂、酶、病毒、转录因子、变构效应物、诸如此类导入多种培养细胞系和动物。此外,脂质体的使用似乎与全身投递后的自身免疫应答或不可接受的毒性无关。

[0287] 在某些实施方案中,脂质体是由分散在水性介质中且自发形成多层同心双层囊泡(也称为多层囊泡(MLV))的磷脂形成的。

[0288] 或者,在其它实施方案中,本发明提供了本发明组合物的制药学可接受的纳米胶囊配方。纳米胶囊通常能够以稳定且可再生的方式包裹化合物(参阅例如 Quintanar-Guerrero 等, Drug Dev. Ind. Pharm. 24(12) :1113-28, 1998)。为了避免由于细胞内聚合物过载引起的副作用,可以使用能够在体内降解的聚合物来设计这些超细颗粒(大小为 0.1 μm 左右)。可以如下列文献中所述制作这些颗粒,例如 Couvreur 等, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 5(1) :1-20, 1988; zur Muhlen 等, Eur. J. Pharm. Biopharm. 45(2) :149-55, 1998; Zambaux 等, J. Controlled Release 50(1-3) :31-40, 1998; 和美国专利号 5,145,684。

[0289] 另外,本发明的药物组合物可以与包装材料一起置于容器中,后者提供了关于这些药物组合物的用法的说明书。一般而言,这些说明书将包括描述试剂浓度的确实表述,以及在某些实施方案中可能包括重建药物组合物所必需的赋形剂成分或稀释剂(例如水、盐水、或PBS)的相对量。

[0290] 治疗方法

[0291] 本发明还提供了用于增加骨的矿物质含量和矿物质密度的方法。简而言之,众多状况导致骨矿物质含量流失,包括例如疾病、遗传素质、导致骨使用缺乏的事故(例如由于骨折)、影响骨再吸收或杀死骨形成细胞的治疗剂、和正常衰老。通过使用本文所述抑制TGF- β 结合蛋白与TGF- β 家族成员结合的分子,可以治疗或预防这些状况。在用于本文时,应当理解,若在选择的部位骨矿物质含量以统计学显著方式(例如大于标准偏差的一半)有所增加,则骨矿物质含量增加了。

[0292] 可以用本文所述分子来治疗导致骨矿物质含量流失的非常多种状况。可以通过采用众所周知的技术(参阅例如《哈里森氏内科医学原理》(Harrison's Principles of Internal Medicine),McGraw-Hill公司)的临床诊断来鉴定具有这些状况的患者。可以治疗的疾病的代表性实例包括其中骨的生长或发育异常的发育不良。这些状况的代表性实例包括软骨发育不全、颅骨锁骨发育不良、内生软骨瘤病、纤维性发育不良、戈谢病、低磷酸盐血症性佝偻病、马方综合症、多发性遗传性外生骨疣、神经纤维瘤病、成骨不全、骨硬化症、脆弱性骨硬化、硬化损伤、骨折、牙周病、假关节病、和化脓性骨髓炎。

[0293] 可以治疗或预防的其它状况包括骨质减少(即引起骨矿物质含量或密度低于年轻时峰值骨骼矿物质含量超过1个标准偏差的状况)的非常多种原因。这些状况的代表性实例包括贫血状态、由类固醇引起的状况、由肝素引起的状况、骨髓疾病、坏血病、营养不良、缺钙、特发性骨质疏松、先天性骨质减少或骨质疏松、酒精中毒、慢性肝病、衰老、绝经后状态、月经过少、闭经、怀孕、糖尿病、甲状腺功能亢进、库欣病、肢端肥大病、性腺功能减退、制动术或废用、反射交感性营养不良综合症、暂时局部骨质疏松、和骨软化症。

[0294] 在本发明的一个方面,通过对温血动物施用治疗有效量的抑制TGF- β 结合蛋白与TGF- β 家族成员结合的分子来增加骨矿物质含量或密度。可以治疗的温血动物的实例包括脊椎动物和哺乳动物二者,包括例如人、马、牛、猪、绵羊、狗、猫、大鼠、和小鼠。治疗性分子的代表性实例包括核酶、核酶基因、反义寡核苷酸、和抗体(例如人源化抗体或本文所述任何其它抗体)。

[0295] 在本发明的其它方面,提供了用于增加骨密度的方法,包括下列步骤:将指导抑制TGF- β 结合蛋白与TGF- β 家族成员结合的分子表达的载体导入归巢至骨的细胞,并将包含载体的细胞施用于温血动物。简而言之,可以直接由患者的骨(例如由骨髓获得的细胞,诸如CD34+、成骨细胞、骨细胞、诸如此类)、由外周血、或由培养物获得归巢至骨的细胞。

[0296] 可以将指导抑制TGF- β 结合蛋白与TGF- β 家族成员结合的分子表达的载体导入细胞。合适载体的代表性实例包括病毒载体,诸如疱疹病毒载体(参阅美国专利号5,288,641)、腺病毒载体(例如W094/26914、W0 93/9191;Kolls等,PNAS 91(1):215-219,1994;Kass-Eisler等,PNAS 90(24):11498-502,1993;Guzman等,Circulation 88(6):2838-48,1993;Guzman等,Cir.Res. 73(6):1202-1207,1993;Zabner等,Cell 75(2):207-216,1993;Li等,Hum.Gene Ther. 4(4):403-409,1993;Caillaud等,Eur.

J. Neurosci. 5(10) :1287-1291, 1993; Vincent 等, Nat. Genet. 5(2) :130-134, 1993; Jaffe 等, Nat. Genet. 1(5) :372-378, 1992; 和 Levrero 等, Gene 101(2) :195-202, 1991)、腺伴随病毒载体 (WO 95/13365; Flotte 等, PNAS 90(22) :10613-10617, 1993)、杆状病毒载体、细小病毒载体 (Koering 等, Hum. Gene Therap. 5 :457-463, 1994)、痘病毒载体 (Panicali 和 Paoletti, PNAS 79 :4927-4931, 1982; 和 Ozaki 等, Biochem. Biophys. Res. Comm. 193(2) :653-660, 1993) 和逆转录病毒载体 (例如 EP 0, 415, 731、WO 90/07936、WO 91/0285、WO 94/03622、WO 93/25698、WO 93/25234、美国专利号 5, 219, 740、WO 93/11230、和 WO 93/10218)。同样可以构建包含来自不同病毒或非病毒来源的不同元件的混合物 (例如启动子、包膜序列、诸如此类) 的病毒载体。在多种实施方案中, 可以在下文所述方法和组合物中采用或是病毒载体自身或是包含病毒载体的病毒颗粒。

[0297] 在本发明的其它实施方案中, 可以通过多种技术施用编码抑制 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员结合的分子的核酸分子自身, 包括例如与聚 L- 赖氨酸 DNA 复合物缀合的脱唾液酸血清类粘蛋白 (ASOR) 的施用 (Cristano 等, PNAS 92122-92126, 1993)、与杀死的腺病毒相连的 DNA (Curie 等, Hum. Gene Ther. 3(2) :147-154, 1992)、由细胞转染剂介导的导入 (DMRIE-DOPE, Vical, 加利福尼亚)、直接 DNA 注射 (Acsadi 等, Nature 352 :815-818, 1991)、DNA 配体 (Wu 等, J. Biol. Chem. 264 :16985-16987, 1989)、脂转染 (Felgner 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 :7413-7417, 1989)、脂质体 (Pickering 等, Circ. 89(1) :13-21, 1994; 和 Wang 等, PNAS 84 :7851-7855, 1987); 微弹轰击 (Williams 等, PNAS 88 :2726-2730, 1991)、和编码蛋白质的核酸分子自身单独的 (Vile 和 Hart, Cancer Res. 53 :3860-3864, 1993) 或采用 PEG- 核酸复合物的直接投递。可以由本发明载体表达的分子的代表性实例包括核酶和反义分子, 上文对二者都有更为详细的讨论。

[0298] 骨矿物质含量增加的确定可以使用 X 射线 (例如双重能量 X 射线吸收谱学或“DEXA”) 来直接测定, 或是通过骨周转标志物 (诸如成骨细胞特异性碱性磷酸酶、骨钙蛋白、I 型前胶原 C' 前肽 (PICP)、和总碱性磷酸酶; 参阅 Comier, C., Curr. Opin. Rheu. 7 :243, 1995) 或骨再吸收标志物 (吡啶啉、脱氧吡啶啉、N- 端肽、尿液羟脯氨酸、血浆抗酒石酸酸性磷酸酶、和半乳糖基羟赖氨酸; 参阅 Comier, 见上文) 来推断。还可以由体重计算骨质的数量, 或是通过本领域知道的其它方法 (参阅 Guinness-Hey, Metab. Bone Dis. and Relat. Res. 5 :177-181, 1984)。

[0299] 对于本领域技术人员而言显而易见的是, 施用的数量和频率当然将取决于诸如正在治疗的适应证的本质和严重程度、期望的响应、患者的状况、等等因素。通常, 可以通过如上所述多种技术来施用组合物。

[0300] 提供下列实施例作为示例而绝非限制。

实施例

[0301] 实施例 1: 硬化性骨化病作图到人第 17 号染色体长臂

[0302] 造成人硬化性骨化病的缺陷的遗传作图将造成此疾病的基因定位于人第 17 号染色体中编码新 TGF- β 结合蛋白家族成员的区域。在硬化性骨化病人群中, 骨骼的矿物质密度相对于未患病人员而言展示出较大的增加。头部的骨同样呈现出生长过度。硬化性骨化病患者通常是健康的, 尽管他们可能显示出出生时不同程度的并指 (趾) 现象和不同程度

的头颅压迫以及头骨中的神经压迫。

[0303] 与硬化性骨化病相关的基因缺陷的连锁分析通过对采集自有此病史的 24 个南非 Afrikaner 家族的 DNA 样品进行纯合性作图来完成。(Sheffield 等, 1994, Human Molecular Genetics 3 :1331-1335. “3 号染色体上 Bardet-Biedl 综合症位点的鉴定以及有效同源性作图方法的评估 (Identification of a Bardet-Biedl syndrome locus on chromosome 3 and evaluation of an efficient approach to homozygosity mapping) ”)。南非 Afrikaner 人群从遗传上说是均一的;该人群是从几个世纪前殖民于此地区的少数建立者繁衍而来的,并且,自从建立以来他们已由于地理和社会屏障而被隔离。在 Afrikaner 群落之外的世界各地,硬化性骨化病都是罕见的,这显示出该建立者群体中存在基因突变,且后来随着人口的增多,突变的数目也有所增加。纯合性作图的应用是以一定的假设为基础的,即在来自同血缘家族和隔离人群的受影响个体中邻近隐性突变的 DNA 作图标记很可能是纯合的。

[0304] 选择来自常染色体的一组 371 个微型卫星标记 (Research Genetics, Set 6) 测定取自硬化性骨化病患者样品的 DNA 集合的类型。用于此项分析的 DNA 样品来自 24 个家庭的 29 名硬化性骨化病患者、59 名未患病的家庭成员和同一种群的一组无关对照个体。所述集合由 4-6 个个体组成,他们或者是患病个体、来自血亲家族的患病个体、父母和未患病的兄弟姐妹,或者是无关的对照。在无关个体组和大部分患病个体或家庭成员组中,所述标记的分析显示各个标记有几种等位基因大小。标记之一,即 D17S1299 呈现出纯合的迹象:在数个患病个体集合中都是一条带。

[0305] 用 D17S1299 区 (在 17q12-q21) 的总共 19 个标记对所有 24 个硬化性骨化病家族进行了分型。来自每个家族的患病个体显示出在此区域是纯合的,而 29 个个体中有 25 个对于核心单倍体是纯合的;他们各自在 D17S1787 和 D17S930 之间具有相同的等位基因。其它四个个体具有匹配此单倍体的一条染色体和不匹配的另一条染色体。总而言之,这些数据有力的显示了此 3 megabase 区域包含了硬化性骨化病突变。对此 3 megabase 区域中大部分外显子的序列分析识别出了新 TGF- β 结合蛋白编码序列中的无义突变 (在 SEQ ID NO: 1 的序列第 117 位 C 突变成 T 产生了终止密码子)。此突变显示出对于硬化性骨化病患者和 Afrikaner 后代携带者而言是独特的。此基因的特性通过鉴定其内含子中的突变 (内含子 +3 位置处 A 突变成 T) 得到进一步的证实,所述突变导致已确诊为硬化性骨化病的单个无关患者中 mRNA 加工不正确。

[0306] 实施例 2:TGF- β 结合蛋白基因表达的组织特异性

[0307] A. 利用 RT-PCR 进行人 beer 基因表达:

[0308] 利用商品化的试剂盒 (“用于第一条 cDNA 链合成的 Superscript 预扩增体系 (Preamplification System for First-Strand cDNA Synthesis)”, Life Technologies, Rockville, MD) 从以下总 RNA 样品中制备第一链 cDNA:人脑、人肝、人脾、人的胸腺、人的胎盘、人的骨骼肌、人的甲状腺、人的垂体、人的成骨细胞 (NH0st, 来自 Clonetics Corp., San Diego, CA)、人骨肉瘤细胞系 (Saos-2, ATCC#HTB-85)、人的硬骨、人的骨髓、人的软骨、长尾黑颚猴 (vervet monkey) 的骨骼、酿酒酵母和人外周血单核细胞。除了以下种类是自己制备的之外,所有的 RNA 样品均购买获得 (Clontech, Palo Alto, CA):人的成骨细胞、人的骨肉瘤细胞系、人的硬骨、人的软骨和长尾黑颚猴的骨骼。这些自备的 RNA 样品是使用商品化

的试剂盒（“TRI 试剂”，Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) 制备。

[0309] 对这些样品进行 PCR，并另外用人基因组样品进行 PCR 作为对照。有义 Beer 寡核苷酸引物的序列为：5' -CCGGAGCTGGAGAACACAAG-3' (SEQ ID NO :19)。反义 Beer 寡核苷酸引物的序列为：5' -GCACTGGCCGGAGCACACC-3' (SEQ ID NO :20)。此外，用针对人 β -肌动蛋白基因的引物进行 PCR 作为对照。有义 β -肌动蛋白寡核苷酸引物的序列为：5' -AGGCCAACCGCGAGAAGATGA CC-3' (SEQ ID NO :21)。反义 β -肌动蛋白寡核苷酸引物的序列为：5' -GAAGTCCAGGGCGACGTAGCA-3' (SEQ ID NO :22)。用标准条件在 25 μ l 反应体系中进行 PCR，退火温度为 61°C。用 Beer 引物进行 32 个循环的 PCR，而用 β -肌动蛋白引物则进行 24 个循环。

[0310] 扩增后，将来自各次反应的 12 μ l 样品通过琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色进行分析。参阅图 2A。

[0311] B. 小鼠胚胎切片的 RNA 原位杂交：

[0312] 用制造商的方案，以反义和有义方向将全长小鼠 Beer cDNA (Sequence ID No. 11) 克隆入 pCR2.1 载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中。用 Ambion, Inc (Austin, TX) 提供的体外转录试剂合成 35S- α -GTP- 标记的 cRNA 有义和反义转录产物。按照 Lyons 等的方案 (J. Cell Biol. 111 :2427-2436, 1990) 进行原位杂交。

[0313] 小鼠 Beer cRNA 探针检测正在发育的小鼠胚胎的神经管、肢芽、血管和硬化软骨中表达的特异信息。图 3 的模块 A 显示了肢 (1) 芽顶端外胚层脊背 (apical ectodermal ridge, aer)、血管 (bv) 和神经管 (nt) 中的表达。模块 B 显示了大脑第 4 脑室 (4) 中的表达。模块 C 显示了下颌 (ma) 颈椎骨 (cv) 中、枕骨 (oc)、上颌 (pa) 和血管 (bv) 中的表达。模块 D 显示了肋骨 (r) 和心脏瓣膜 (va) 中的表达。模块 A 是 10.5dpc 胚胎的横切片。模块 B 是 12.5dpc 胚胎的纵切片，而模块 C 和 D 是 15.5dpc 胚胎的纵切片。

[0314] ba = 鳃弓, h = 心脏, te = 端脑 (前脑), b = 脑, f = 额鼻块, g = 肠, h = 心脏, j = 颚, 1i = 肝, 1u = 肺, ot = 耳泡 (otic vesicle), ao = , sc = 脊髓, skm = 骨骼肌, ns = 鼻窦, th = 胸腺, to = 舌, f1 = 前肢, di = 横膈膜

[0315] 实施例 3：重组 Beer 蛋白质的表达和纯化

[0316] A. 在 COS-1 细胞中的表达：

[0317] 用以下 PCR 寡核苷酸引物扩增编码全长人 Beer 蛋白的 DNA 序列：5' 寡核苷酸引物的序列为 5' -AAGCTTGGTACCATGCAGCTCCCAC-3' (SEQ ID NO :23)，并且包含 HindIII 限制性酶切位点 (粗体)，之后是 Beer 基因的 19 个核苷酸，其在推测的氨基末端起始密码子 (ATG) 之前 6bp 开始。3' 寡核苷酸引物的序列为 5' -AAGCTTCTACTTGTCATCGTCGTCC TTGTAGTCGTAGCGTTCTCCAGCT-3' (SEQ ID NO :24)，并包含 HindIII 限制性酶切位点 (粗体)，之后是反向互补终止密码子 (CTA)，其后是 FLAG 表位的反向互补序列 (下划线，Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)，该互补序列侧翼是 Beer 羧基末端 5 个氨基酸的编码核苷酸的反向互补序列。经 TA 克隆 PCR 产物（“原创的 TA 克隆试剂盒”，Invitrogen, Carlsbad, CA）并通过 DNA 测序筛选各个克隆。然后将序列已证实的克隆用 HindIII 消化，并用商品化的试剂（“QIAquick Gel Extraction Kit”，Qiagen Inc., Valencia, CA）在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行纯化。然后用 T4 DNA 连接酶将此片段连接至经 HindIII 消化、磷酸酶处理的 pcDNA3.1 质粒 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 上。转化大肠杆菌 DH10B，并铺在

含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上。通过基于 PCR 的筛选鉴定携带正确定向的预期重组子的菌落, 所用 5' 引物相应于 pcDNA3.1 中的 T7 启动子 / 启动位点, 而 3' 引物具有序列 5' -GCACTGGCCGGAGCACACC-3' (SEQ ID NO :25), 其相应于内在 Beer 序列的反向互补序列。已克隆片段的序列通过 DNA 测序证实。

[0318] 利用 COS-1 细胞 (ATCC# CRL-1650) 进行转染。按制造商提供的方案, 利用商品化的试剂盒 (“DEAE-葡聚糖转染试剂盒”, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 转染 50 μg 表达质粒 pcDNA-Beer-Flag。转染后的最终培养基是含 0.1% 胎牛血清的 DMEM (Life Technologies, Rockville, MD)。培养 4 天后, 去掉培养基。利用抗-FLAG® M2 单克隆抗体 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) 通过 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析重组 Beer 的表达。用抗-FLAG M2 亲和柱 (“哺乳动物瞬时表达体系”, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) 进行重组 BEER 蛋白质的纯化。用抗-FLAG M2 单克隆抗体通过 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析柱层析产物。

[0319] B. 在 SF9 昆虫细胞中的表达 :

[0320] 用标准条件和以下引物经 PCR 扩增人 Beer 基因序列 :

[0321] 有义引物 :

[0322] 5' -GTCGTCCGATCCATGGGTGGCAGGCCCTCAAGAATGAT-3' (SEQ ID NO :26)

[0323] 反义引物 :

[0324] 5' -GTCGTCAAGCTTCTACTTGTACATCGTCCTTGTAGTCGTAGGCCTCTCCAGCTCGGC-3' (SBQ ID NO :27)

[0325] 产生的 cDNA 包含具有两个修饰的 Beer 编码区。N 末端分泌信号被去除, 并将 FLAG 表位标签 (Sigma) 读框一致地融合入插入片段 C- 末端。添加 BamH1 和 HindIII 克隆位点, 并将基因亚克隆入 pMELBac 载体 (Invitrogen) 中, 以便用标准方法转移入杆状病毒表达载体中。

[0326] 用 Bac-N-Blue 转染试剂盒 (Invitrogen) 制备表达 Beer 蛋白质的重组杆状病毒并按照制造商的说明书进行纯化。

[0327] 将 SF9 细胞 (Invitrogen) 保持在含 10% 胎牛血清的 TNM_FH 培养基 (Invitrogen) 中。为了进行蛋白质表达, 以大于 10 的 MOI 感染旋转烧瓶中的 SF9 培养物。5 天内每天采集培养基和细胞样品, 用抗-FLAGM2 单克隆抗体 (Sigma) 或抗-Beer 兔多克隆抗血清通过蛋白质印迹监测 Beer 的表达。

[0328] 5 天后, 离心收获杆状病毒感染的 SF9 细胞, 并用高盐抽提缓冲液 (1.5M NaCl, 50mM Tris pH 7.5) 从细胞沉淀中提取细胞相关蛋白质。离心使提取物 (每 300ml 培养物 20ml) 澄清, 用 4 升 Tris 缓冲盐 (150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.5) 透析 3 次, 并再次离心澄清。将此高盐组分加到 Hitrap Heparin (Pharmacia; 床体积 5ml) 上, 柱子用 HEPES 缓冲盐水 (25mM HEPES 7.5, 150mM NaCl) 粗洗, 并用 150mM NaCl 至 1200mM NaCl 梯度洗脱被结合的蛋白质。在大约 800mM NaCl 处观察到 Beer 洗脱。在含 Beer 的组分中加入 10% 甘油和 1mM DTT 并冻存于 -80°C。

[0329] 实施例 4 : 抗 Beer、Gremlin 和 Dan 的多克隆抗体的制备和检测

[0330] A. 抗原的制备 :

[0331] 用标准方法扩增人 Beer、人 Gremlin 和人 Dan 的 DNA 序列, 所用的寡核苷酸引物如

下：

[0332] H. Beer

[0333] 有义 :5' -GACTTGGATCCCAGGGTGGCAGCGTTC-3' (SEQ ID NO :28)

[0334] 反义 :5' -AGCATAAGCTTCTAGTAGGCCTCTCCAG-3' (SEQ ID NO :29)

[0335] H. Gremlin

[0336] 有义 :5' -GACTTGGATCCGAAGGGAAAAAGAAAGGG-3' (SEQ ID NO :30)

[0337] 反义 :5' -AGCATAAGCTTTAATCCAAATCGATGGA-3' (SEQ ID NO :31)

[0338] H. Dan

[0339] 有义 :5' -ACTACGAGCTGGCCCCACCACCCATCAACAAG-3' (SEQ ID NO :32)

[0340] 反义 :5' -ACTTAGAAGCTTCAGTCCTCAGCCCCCTCTCC-3' (SEQ ID NO :33)

[0341] 在各情况下,所列举的引物扩增除了分泌信号序列之外的整个编码区。其中,对于 Beer 和 Gremlin 而言,包含在位点 BamHI/HindIII 处、对于 Dan 而言包含在位点 SacI/HindIII 亚克隆入细菌表达载体 pQE-30 (Qiagen Inc., Valencia, CA) 的限制性切点。pQE30 在克隆区的 5' 末端包含了 6×His 标签的编码序列。将完成的构建体转化入大肠杆菌菌株 M-15/pRep (Qiagen Inc) 并测序查证各个克隆。在 M-15/pRep 中的蛋白质表达和纯化 (与偶联在琼脂糖上的 Ni-NTA 结合的 6× 组氨酸亲和标签) 依照制造商的说明书 (Qiagen, The QIAexpressionist) 进行。

[0342] 利用增溶作用在 6M 胨中大量回收大肠杆菌来源的 Beer 蛋白质,并透析至 2~4M 胨中,以防止在贮存期间沉淀。Gremlin 和 Dan 蛋白质则通过溶解于 6M 胨中得到更大量的回收,纯化后的肽浓度达到 0.5M。

[0343] B. 多克隆抗体的产生和检测 :

[0344] 按照标准方案 (R & R 抗体, Stanwood, WA ;用于兔免疫和抗血清回收的标准方案 (standard protocol for rabbit immunization and antisera recovery); 分子生物学中的简洁方法 (Short Protocols in Molecular Biology). 第二版 1992. 11. 37~11. 41, 投稿人 Helen M. Cooper 和 Yvonne Paterson ;用重要的生物溶液产生鸡抗血清 (chicken antisera was generated with Strategic Biosolutions), Ramona, CA) 在兔子和鸡宿主中产生针对三种抗原中每一种的多克隆抗体。

[0345] 通过 Western 印迹法筛选兔抗血清和鸡蛋 IgY 组分的活性。经 PAGE 分离三种抗原中的每一种并转染至 0.45um 的硝酸纤维素膜 (Novex, San Diego, CA) 上。将膜切成条,每条包含大约 75ng 抗原。将这些膜条用 3% 的 Blotting Grade Block (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 封闭并在 1X Tris 缓冲盐水 (TBS)/0.02% TWEEN 缓冲液中洗 3 次。将这些膜条与一抗 (免疫前放血,将兔抗血清或鸡蛋 IgY 用封闭缓冲液稀释,稀释范围为 1 : 100 至 1 : 10,000) 一起温和摇动保温 1 小时。再用 1X TBS/0.02% TWEEN 洗三次,然后与二抗 (缀合了驴抗兔抗体的过氧化物酶, Amersham Life Science, Piscataway, NJ ;或缀合了驴抗鸡抗体的过氧化物酶, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 一起保温 1 小时。最后再用 1X TBS/0.02% TWEEN 洗三次,并将膜条用 Lumi-Light Western 印迹底物显色 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)。

[0346] C. 抗体交叉反应性检测 :

[0347] 在完成以上章节所描述的流程之后,将 Beer、Gremlin 或 Dan 的硝酸纤维素膜条与

它们各自的兔抗血清或鸡蛋 IgY 稀释液 (1 : 5000 和 1 : 10,000) 以及剩余两种抗原的抗血清或鸡蛋 IgY (稀释 1 : 1000 和 1 : 5000 倍) 一起保温。提高不匹配抗体的水平以检测只有在提高浓度下才可能被观察到的那些抗体的低亲和力结合。按照上述流程, 所用方案和呈色时间对于所有三种结合情况而言都是相同的。对于任一种被检测抗原而言都未观察到抗原交叉反应性。

[0348] 实施例 5 :Beer 与 TGF- β 超家族蛋白质的相互反应

[0349] 用免疫沉淀方法研究 Beer 与来自不同系统发生支的 TGF- β 超家族蛋白质的相互作用。已纯化的 TGF β -1、TGF β -2、TGF β -3、BMP-4、BMP-5、BMP-6 和 GDNF 获自商品化途径 (R&D systems ;Minneapolis, MN)。代表性方案如下。将部分纯化的 Beer 在 HEPES 缓冲盐水 (25mM HEPES 7.5, 150mM NaCl) 中透析。在 300 μ l IP 缓冲液 (150mM NaCl, 25mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 1.4mM β -巯基乙醇, 0.5% triton X 100 和 10% 甘油) 中进行免疫沉淀。在存在或缺失 500ng FLAG 表位 - 标记 Beer 的条件下将 30ng 重组人 BMP-5 蛋白质 (R&D systems) 加到 15 μ l FLAG 亲和基质 (Sigma ;St Louis MO) 中。将蛋白质在 4°C 保温 4 小时, 并随后用 IP 缓冲液洗涤与亲和基质相联的蛋白质 5 次 (每次 1ml)。用 60 μ l 1X SDS PAGE 样品缓冲液从亲和基质上洗脱被结合的蛋白质。用 SDS PAGE 拆分蛋白质并用抗-BMP-5 抗血清 (Research Diagnostics, Inc) 通过 western 印迹检测与 Beer 相连的 BMP-5 (见图 5)。

[0350] BEER 配体结合试验 :

[0351] 将 FLAG-Beer 蛋白质 (20ng) 加入 100 μ l PBS/0.2% BSA 中, 并吸附于预先用抗 FLAG 单克隆抗体 (Sigma ;St Louis MO) 包被并用含 10% BSA 的 PBS 封闭的 96 孔微量滴定板的各个孔中。这一过程在室温进行 60 分钟。除去此蛋白质溶液并漂洗各孔以去除未结合的蛋白质。在各孔中加入浓度范围从 10pM 至 500nM 的溶于 PBS/0.2% BSA 的 BMP-5, 并在室温保温 2 小时。去除结合溶液并用 200 μ l 体积的 PBS/0.2% BSA 漂洗平板三次。然后用 BMP-5 抗血清通过 ELISA (F. M. Ausubel et al (1998) 分子生物学通用方法 (Current Protocols in Mol Biol.) 卷 211.2. 1-11.2. 22) 检测 BMP-5 的水平。通过从总的结合中扣除非特异性结合来计算特异性结合, 并用 LIGAND 软件 (Munson 和 Podbard, Anal. Biochem. , 107, p220-239, (1980) 进行分析。

[0352] 在此方法的修饰方案中, 将 Bee r 进行改造并表达为人 Fc 融合蛋白。同样的, 改造配体 BMP 并将其表达为小鼠 Fc 融合蛋白。将这些蛋白质一起保温并如 Mellor 等所述用均一时间解析荧光检测法进行检测 (G. W. Mellor 等, J of Biomol Screening, 3(2)91-99, 1998)。

[0353] 实施例 6 :有关 TGF- β 结合蛋白与 TGF- β 家族成员结合的抑制作用的筛选试验

[0354] 重复上述试验, 其中有两处不同。首先, BMP 浓度固定为先前所确定的 Kd。其次, 拮抗剂候选物的集合以固定浓度加入 (如果是小有机分子集合则为 20 μ M, 在抗体研究中则为 1 μ M)。这些 TGF- β 结合蛋白结合的候选分子 (拮抗剂) 包括商品化来源的有机化合物或代表不同化学结构的内部合并物。用 DMSO 将这些化合物制备成贮液并在标准实验条件下以小于 1% 的终体积加入检测孔中。将它们与 BMP 和 BEER 一起室温保温 2 小时, 去除溶液并如前所述对被结合的 BMP 进行定量。在缺乏化合物或抗体的条件下观察到抑制了 40% 的 BMP 结合的试剂被认为是此相互作用的拮抗剂。这些试剂基于滴定试验被进一

步评估为潜在的抑制剂,所述的滴定试验用于测定它们的抑制作用常数以及它们对 TGF- β 结合蛋白结合亲和力的影响。还可进行可比较的特异性对照试验以确定已经鉴定的拮抗剂的选择性特征,该研究使用了依赖于 BMP 配体作用的检测法(例如,BMP/BMP 受体竞争性试验)。

[0355] 实施例 7 :对 TGF- β 结合蛋白定位于骨基质的抑制作用

[0356] 对 Nicolas 的方法(Nicolas, V. Calcif Tissue Int 57 :206, 1995)加以修改,用于评估对定位于骨基质(羟磷灰石)的抑制作用。简而言之,如 Nicolas(同上文)所述制备¹¹⁵I-标记的 TGF- β 结合蛋白。将羟磷灰石加入装备了聚丙烯滤膜(Polyfiltroninc, Weymouth MA)的 96 孔微量滴定板的各孔中。将 TGF- β 结合蛋白加入含 0.2% 白蛋白的 PBS 缓冲液中。用此缓冲液将含有基质的孔漂洗 3 次。被吸附的 TGF- β 结合蛋白用 0.3M NaOH 洗脱并定量。

[0357] 通过将 TGF- β 结合蛋白与待测分子一起保温并如上所述将混合物施加到基质上来进行抑制剂的鉴定。用含 0.2% 白蛋白的 PBS 缓冲液将基质洗 3 次。被吸附的 TGF- β 结合蛋白用 0.3M NaOH 洗脱并定量。在无化合物或抗体的条件下观察到抑制了 40% TGF- β 结合蛋白结合的试剂被认为是骨定位抑制剂。这些抑制剂通过剂量反应试验测定其抑制常数及其对 TGF-B 结合蛋白结合亲和力的影响而被进一步定性。

[0358] 实施例 8 :TGF- β 结合蛋白突变体的构建

[0359] A. 诱变 :

[0360] pBluescript SK 中的全长 TGF- β 结合蛋白 cDNA 被用作诱变的模板。简而言之,利用适当的引物(参阅上文讨论部分)以及 Vent DNA 聚合酶(New England Biolabs, Beverly, MA)通过聚合酶链式反应产生 DNA 片段。在 57°C 退火温度下利用制造商提供的缓冲液进行聚合酶链式反应 23 个循环。然后将产物暴露于两种限制性酶中,并在用琼脂糖凝胶电泳进行分离后,连接回其中的匹配序列已通过酶促消化去除的 pRBP4-503 中。通过 DNA 测序检验突变体的完整性。

[0361] B. 突变体 TGF- β 结合蛋白的哺乳动物细胞表达和分离

[0362] 将突变体 TGF- β 结合蛋白 cDNAs 转移入实施例 3 中所述的 pcDNA3.1 哺乳动物表达载体。在核实序列后,将产生的构建体转染入 COS-1 细胞,并如实施例 3 所述纯化分泌的蛋白质。

[0363] 实施例 9

[0364] 动物模型 -I

[0365] 过表达 BEER 基因的转基因小鼠的产生

[0366] 利用分离自 CITB 小鼠基因组 DNA 文库(由 Research Genetics, Huntsville, AL 分装)的大约 200kb BAC 克隆 15G5 测定小鼠 Beer 基因的全序列及其 5' 和 3' 侧翼区。将包含完整基因体以及大约 17kb 的 5' 侧翼区和大约 20kb 的 3' 侧翼序列的 41kb SalI 片段亚克隆入 SuperCosI 粘粒载体(Stratagene, La Jolla, CA)的 BamHI 位点,并于大肠杆菌株 DH10B 中增殖。然后用常规方式分别凝胶纯化来自此粘粒构建体且包括完整小鼠 Beer 基因以及 17kb 和 14kb 的 5' 和 3' 侧翼序列的 35kb MluI-AviII 限制性片段(Sequence No. 6),并将它用于小鼠受精卵的显微注射(DNX Transgenics; US Patent No. 4,873,191)。以存活后代中有 5-30% 的频率获得其中所克隆的 DNA 片段随机整合入基因组中的建立者

动物。通过对提取自诸如尾端等小量小鼠组织的基因组 DNA 进行 Southern 印迹分析来确定转基因的存在。用以下方案提取 DNA :在 55℃用含 200mM NaCl,100mM Tris pH8.5,5mM EDTA,0.2% SDS 和 0.5mg/ml 蛋白酶 K 的裂解缓冲液消化组织过夜。次日,将 DNA 用酚 / 氯仿 (50 : 50) 抽提一次,用氯仿 / 异戊醇 (24 : 1) 抽提一次并用酒精沉淀。将各 DNA 样品 8-10 μg 重悬于 TE (10mM Tris pH7.5,1mM EDTA) 中,用诸如 EcoRI 等限制性内切酶消化,进行凝胶电泳并转移至诸如 HyBondN+ (Amersham, Arlington Heights, IL) 等带电荷的尼龙膜上。然后将所产生的滤膜与来自小鼠 Beer 基因座的 DNA 的放射性标记片段杂交,所述片段能识别来自内源基因座的片段和来自转基因的不同大小的片段二者。将建立者动物与正常非转基因小鼠交配产生足够数目的转基因和非转基因后代,在其中测定 Beer 基因过表达的效应。为了进行这些试验,用各个年龄 (例如,1 天、3 周、6 周、4 个月) 的动物进行许多不同的试验,所述试验被设计成探知总的骨骼形成、骨矿物质密度、骨矿物质含量、破骨细胞和成骨细胞的活性、软骨内骨化的程度、软骨形成等。转基因的转录活性可通过从各种组织中提取 RNA 并借助 RT-PCR 检测法进行测定,该 RT-PCR 检测法利用了转基因所来源的小鼠株系 (129Sv/J) 和用于 DNA 显微注射的小鼠株系 [(C57BL/6J × SJL/J)F2] 之间单核苷酸多态性的优势。

[0367] 动物模型 -II

[0368] 通过同源重组破坏小鼠 Beer 基因

[0369] 可用胚胎干 (ES) 细胞同源重组灭活内源小鼠 Beer 基因并随后产生具有功能丧失的突变的动物。将诸如大肠杆菌 β - 半乳糖苷酶基因等报道基因插入打靶载体中,从而使其表达受内源 Beer 基因启动子和翻译起始信号的调控。以此方式,可以测定携带目标等位基因的动物中 Beer 基因表达的空间和时间模式。

[0370] 打靶载体的构建首先是将来自 pGT-N29 (New England Biolabs, Beverly, MA) 的药物可筛选的由磷酸甘油酸激酶 (PGK) 启动子驱动的新霉素抗性基因 (neo) 盒克隆入克隆载体 pSP72 (Promega, Madison, WI) 中。利用 PCR 使 PGKneo 盒的两侧具有噬菌体 P1 loxP 位点,它是 P1 Cre 重组酶的识别位点 (Hoess et al., PNAS USA, 79 :3398, 1982)。这使得后来可以去除打靶 ES 细胞或 ES 细胞来源动物中的 neo- 抗性标记 (US Patent 4,959,317)。PCR 引物包含 34 个核苷酸 (ntd) 的 loxP 序列、与 PGKneo 盒 5' 和 3' 末端互补的 15-25ntd 以及用于克隆入 pSP72 的限制性酶识别位点 (在有义引物中是 BamHI,而在反义引物中是 EcoRI)。有义引物是 5' -AATCTGGATCCATAACTCGTATAGCATACATTACGAAGTTATCTGCAG GATTCGAGGCCCT-3' (SEQ ID NO :34);反义引物是 5' -AATCTGAATTCCACCGGTGTTAATTAAA TAACTTCGTATAATGTATGCTATACGA AGTTATAGATCTAGAG TCAGCTTCTGA-3' (SEQ ID NO :35)。

[0371] 下一步是将含有大肠杆菌 β - 半乳糖苷酶基因和来自 pSV β (Clontech, Palo Alto, CA) 的 SV40 聚腺苷酸化信号的 3.6kbXhoI-HindIII 片段克隆入 pSP72-PGKneo 质粒。通过由 BAC 克隆 15G5 扩增 2.4kb 片段得到来自小鼠 Beer 基因座的同源物的“短臂”。该片段的 3' 末端与 Beer 基因的翻译起始位点一致,且 PCR 中所用的反义引物还包括与 β - 半乳糖苷酶基因 5' 末端互补的 30ntd,从而使其编码区能与 Beer 起始位点读框一致地融合。将“短臂”引入 pSP72-β gal-PGKneo 质粒所采用的方法是在 β -gal 基因上游的位点线性化质粒,然后将此片段与“短臂”PCR 产物一起共转化,并选择其中 PCR 产物通过同源重组被整合了的质粒。用于“短臂”扩增的有义引物包括与 pSP72 载体互补的 30ntd,从而使得

此重组得以进行。有义引物的序列是 5' -ATTAGGTGACACTATAGAACTCGAGCAGCTGAAGCTTAAC CACATGGTGGCTCACACCAT-3' (SEQ ID NO :36), 而反义引物的序列是 5' -AACGACGGCCAGTG AATCCGTAATCATGGTCATGCCAGGTGGAGGAGGGCA-3' (SEQ ID NO :37)。

[0372] 通过由 BAC 克隆 15G5 扩增 6.1kb 片段而得到 Beer 基因座的“长臂”, 所用引物中还引入了切点稀有的限制性酶位点 SgrAI、FseI、AscI 和 PacI。具体而言, 有义引物的序列是 5' -ATTACCACCGGTGACACCCGCTTCCTGACAG-3' (SEQ ID NO :38); 反义引物的序列是 5' -AT TACTTAATTAAACATGGCGCGCCATATGGCCGGCCCCATAATTGCGCGCATCGTTAATT-3' (SEQ ID NO :39)。将所产生的 PCR 产物克隆入 TA 载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中作为中间产物。

[0373] 小鼠 Beer 基因打靶构建体还包括第二个可选择标记, 即在劳氏肉瘤病毒长末端重复元件 (RSV LTR) 调控下的单纯疱疹病毒胸苷激酶基因 (HSVTK)。此基因的表达使得哺乳动物细胞对 gancyclovir 敏感 (且不能生存); 因此它是用于对抗选择其中所述构建体通过非重组活动发生整合的新霉素抗性细胞的便利方法 (美国专利 5,464,764)。使用使其随后可克隆入“长臂”-TA 载体质粒的 FseI 和 AscI 位点内的引物, 自 pPS1337 扩增 RSVLTR-HSVTK 盒。对于此 PCR 而言, 有义引物的序列是 5' -ATTACGGCCGGCCGCAA GGAATTCAAGA TCTGA-3' (SEQ ID NO :40); 反义引物的序列是 5' -ATTACGGCGCGCCCCTCACAGGCCGCACCCAGCT-3' (SEQ ID NO :41)。

[0374] 打靶载体构建中的最后步骤包括将含“长臂”和 RSVLTR-HSVTK 基因的 8.8kb SgrAI-AscI 片段克隆入 pSP72-“短臂”- β gal-PGKneo 质粒的 SgrAI 和 AscI 位点。在电穿孔进入 ES 细胞之前用 AscI 或 PacI 消化将此打靶载体线性化。

[0375] 实施例 10: 反义链介导的 Beer 失活

[0376] 以重叠格式制备 17- 个核苷酸的反义寡核苷酸, 以此方式, 第一寡核苷酸的 5' 末端与 Beer 转录物的翻译起始 AUG 重叠, 接连着的寡核苷酸的 5' 末端相对于 Beer AUG 而言沿 5' 方向滚动增加的 5 个核苷酸处 (最多在离其 50 个核苷酸处)。设计并制备对应的对照寡核苷酸, 所用的碱基组成相当, 但在序列中重新分布以抑制其与编码 mRNA 的任何显著杂交。通过阳离子脂质投递而将试剂投递至待测细胞体系 (P. L. Felgner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 :7413, 1987)。将 2 μ g 反义寡核苷酸加入 100 μ l 简化血清培养基 (Opti-MEM I 简化血清培养基, Life Technologies, Gaithersburg MD) 中, 并在 100 μ l 简化血清培养基中与 Lipofectin 试剂 (6 μ l) (Life Technologies, Gaithersburg MD) 混合。将这些试剂混合后, 在室温络合 30 分钟, 并将混合物加入预先接种的 MC3T3E21 或 KS483 细胞中。培养这些细胞并回收 mRNA。利用 RT-PCR 并结合 Beer 特异引物监测 Beer mRNA。此外, 收集分开的实验孔并如实施例 4 所述通过 western 印迹法鉴定蛋白质水平。收获细胞后, 重悬于裂解缓冲液 (50mM Tris pH 7.5, 20mM NaCl, 1mM EDTA, 1% SDS) 中并收集可溶性蛋白。将此材料加至 10-20% 梯度变性 SDS PAGE 中。将被分开的蛋白质转移至硝酸纤维素滤膜上, 并利用如上所述的抗体试剂进行 western 印迹分析。平行地, 将对照寡核苷酸加入相同的培养物中并重复实验操作。如果与对照混合的寡核苷酸相比, 在各情况下用反义寡核苷酸处理导致 50% 的改变, 则 Beer mRNA 或蛋白质水平的降低被认为是显著的。此方法能使得选择性失活基因并随后对组织培养模型中的矿物化结节进行表型表征。

[0377] 实施例 11: 硬化素核心区的模型模拟

[0378] 同源性识别技术 (例如, PSI-BLAST (Altschul 等, Nucleic Acids Res. 25 :

3389-402(1997)、FUGUE(Shi 等, J. Mol. Biol. 310 :243-57(2001)) 暗示 SOST(SOST_Core)的核心区采取了胱氨酸结折叠的形式。FUGUE 是检测序列与结构之间同源性的灵敏方法。实验测定的 3D 结构已知的人绒毛膜促性腺激素 β (hCG- β) 通过 FUGUE(Shi 等, 同上) 被确定为 SOST_Core 最接近的同源物。因此, hCG- β 被用作结构模板来构建 SOST_Core 的 3D 模型。

[0379] SOST_Core 与其密切同源物的序列比对如图 7 中所示。在序列比对所显示的同源物中, 只有 hCG- β (CGHB) 具有已知的 3D 结构。SOST_Core 和 hCG- β 之间的序列同一性大约为 25%。在整个家族中有 8 个 CYS 残基是保守的, 加强了 SOST_Core 和 hCG- β 之间整体结构的相似性。在“结”构型中三对胱氨酸 (1-5, 3-7, 4-8) 形成二硫键 (在图 7 中以实心线表示), 它是胱氨酸 - 结折叠的特征。在图 7 中显示为虚线的一个额外二硫键 (2-6) 对于此家族而言是独特的, 将此家族蛋白质与其它胱氨酸 - 结家族蛋白质 (例如, TGF- β , BMP) 区别开来。

[0380] 用 PDB(Berman 等, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 58(Pt 6 Pt1) : 899-907(2002)) 登录号 1HCN, 以 hCG- β 的 3D 结构 (Wu et al., Structure 2 : 545-58(1994)) 作为结构模板模拟 SOST_Core。用 MODELER(Sali & Blundell, J. Mol. Biol. 234 :779-815(1993)) 对模型进行计算。最佳模型的快照如图 8 中所示。

[0381] 大部分胱氨酸 - 结蛋白质形成二聚体, 因为在单体中缺乏疏水核心 (Scheufler 等, 同上; Schlunegger 和 Grutter, J. Mol. Biol. 231 :445-58(1993)); Wu 等, 同上)。SOST 很可能遵循相似的规则并形成均二聚体以提高其稳定性。构建二聚体化 SOST_Core 区的模型有几个难题, 因为 (1) SOST_Core 和 hCG- β 之间的序列相似性较低 (25%) ; (2) hCG- β 不形成均二聚体, 而是与 hCG- α 形成杂二聚体; 且 (3) 在来自不同家族的二聚体化胱氨酸 - 结蛋白质中观察到许多相对构象不同的单体 (例如, PDGF, TGF- β , 神经营养蛋白, IL-17F, 促性腺激素), 这表明 SOST 的二聚体构象可能明显与 hCG- α / β 杂二聚体构象不同。在构建模型时, 用结构叠加技术与手工调整相结合, 将 hCG- α 置换为来自杂二聚体结构 (1HCN) 的 hCG- β , 然后按照假 hCG- β 均二聚体结构建立 SOST_Core 均二聚体。最后的模型如图 9 中所示。

[0382] 实施例 12 : 模拟 SOST-BMP 相互作用

[0383] 此实施例描述了 BMP 上 I 型和 II 型受体的蛋白质模拟, 其中涉及 BMP 和 SOST 之间的相互作用。

[0384] 竞争性研究证实了 SOST 与 I 型和 II 型受体竞争性结合 BMP。在基于 ELISA 的竞争性试验中, BMP-6 与硬化素 - 包被的表面 (300ng/孔) 以高亲和力 ($K_d = 3.4\text{nM}$) 选择性地相互作用。提高量的 BMP 受体 IA(FC 融合构建体) 可与硬化素竞争结合 BMP-6 (11nM) ($IC_{50} = 114\text{nM}$)。10 倍摩尔浓度过量的 BMP 受体足以使硬化素与 BMP-6 的结合减少大约 50%。用 BMP 受体 II-FC 融合蛋白 ($IC_{50} = 36\text{nM}$) 和 DAN ($IC_{50} = 43\text{nM}$) 也观察到此竞争作用。该检测法的特异性表现为在硬化素和 rActivinR1B-FC 融合蛋白之间缺乏与 BMP-6 结合的竞争作用, 所述的 rActivinR1B-FC 融合蛋白是不结合 BMP 的 TGF- β 受体家族成员。

[0385] BMP 多肽上的 I 型和 II 型受体结合位点已被作图, 并且在空间上是分离的 (Scheufler 等, 同上文; Innis 等, 同上文; Nickel 等, 同上文; Hart 等, 同上文)。头蛋白是以高亲和力与 BMP 结合的另一种 BMP 拮抗剂, 它通过头蛋白的 N 末端部分在 I 型和 II 型受

体结合位点处都与 BMP 接触 (Groppe 等, 同上文)。在接近 C 末端的核心区内的两条 β -链也在 II 型受体结合位点处接触 BMP。

[0386] 手工调校的头蛋白和 SOST 的序列比对显示这两种多肽在蛋白质 N 末端部分之间和核心区之间共有序列相似性。氨基酸序列比对如图 10 中所示。形成特征性 cys- 结的半胱氨酸残基在头蛋白和 SOST 之间是保守的。总体序列同一性是 24%, 而 N 末端结合区 (序列比对位置 1-45) 内的序列同一性是 33%。在头蛋白 N- 末端结合区内的两个残基, 即在序列比对中第 21 位的 Leu (L) 和第 23 位的 Glu (E), 据报道在 BMP 结合中起重要作用 (Groppe 等, 同上文)。这两个残基在 SOST 中也是保守的。核心区 (序列比对的第 131-228 位) 内的序列相似性大约为 20%, 但 cys- 结骨架被保持, 且足够数目的关键残基是保守的, 这证实了头蛋白和 SOST 之间的同源性。

[0387] 此外还将头蛋白结构与 SOST 比较以了解两个 SOST 单体是如何二聚体化的。正如图 11 中所示的, 头蛋白结构暗示 N 末端区和核心区之间的接头不仅在连接这两个区域之间起作用, 还形成了两头蛋白单体之间二聚化界面的部分。头蛋白和 SOST 之间的一个主要差异是 N 末端区和核心区之间的接头在 SOST 中要低得多。

[0388] SOST 的 C 末端区可能在 SOST 二聚化的过程中发挥作用。头蛋白的序列结束于核心区, 而 SOST 则有一额外的 C 末端区。在头蛋白结构中, 两个头蛋白单体的 C 末端以二硫键连接。因而, SOST 的 C 末端区开始向两个单体的界面靠近, 并且可能有助于二聚化。此外, 二级结构预测显示 SOSR C 末端区的某些部分有形成螺旋的趋势。SOST 中的该区域可能负责二聚化活性, 有可能是通过螺旋 - 螺旋堆积实现的, 这模拟了头蛋白中较长接头的功能。头蛋白和 SOST 结构之间的另一差异是在 SOST 核区内序列比对的第 169-185 位的氨基酸插入序列 (见图 10)。此插入延长了 β - 发夹, 它指向头蛋白结构中的二聚化界面 (在图 11 中显示为在单体中间且在 C 末端半胱氨酸残基上方的环形区)。此延长的 β - 发夹还可能有助于 SOST 二聚化。

[0389] 实施例 13 :SOST 肽免疫原的设计和制备

[0390] 此实施例描述了 SOST 肽免疫原的有关设计, 所述免疫原用于免疫动物并产生阻断 BMP 和 SOST 之间相互作用以及阻止 SOST 单体形成二聚体的抗体。

[0391] BMP 结合片段

[0392] SOST 和头蛋白之间的总体相似性以及这两种多肽在 N 末端区之间的相似性显示 SOST 可能以类似头蛋白的方式与 BMP 相互作用。即, SOST 的 N 末端区可能与 BMP 上 I 型和 II 型受体结合位点都相互作用, 而核心区的部分 (图 10 中氨基酸序列比对的第 190-220 位) 可能与 II 型受体结合位点相互作用, 从而使得特异于这些 SOST 区的抗体可能阻断或削弱 BMP 对 SOST 的结合。

[0393] 大鼠和人 SOST 的这些 SOST 多肽片段的氨基酸序列提供如下。

[0394] SOST_N_ 接头 :N 末端区 (包括与核心区连接的短接头)

[0395] 人 :

[0396] QGWQAFKNDATEI IPELGEYPEPPPELENNKTMNRAENGGRPPHHPFETKDVEYS (SEQ ID NO : 92)

[0397] 大鼠 :

[0398] QGWQAFKNDATEI IPGLREYYPEPPQELENNQTMNRAENGGRPPHHPYDTKDVEYS (SEQ ID NO :

93)

[0399] SOST_核心_结合 :可能在其 II 型受体结合位点处接触 BMP 的核心区部分 (在两个末端处都稍有延长以包含 CYS 残基锚) :

[0400] 人 :CIPDRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVASC (SEQ ID NO :94)

[0401] 大鼠 :CIPDRYRAQRVQLCPGGAAPRSRKVRLVASC (SEQ ID NO :95)

[0402] SOST 二聚化片段

[0403] SOST 的 C 末端区域有可能涉及 SOST 均二聚体的形成 (见实施例 12)。延长的 β - 发夹也可能在均二聚体的形成中发挥作用。特异性地结合这些区域的抗体可阻止或削弱 SOST 单体的二聚化, 这可能反过来干扰 SOST 和 BMP 之间的相互作用。在大鼠和人 SOST 中相应于这些区域的多肽片段如下。

[0404] SOST_C :C 末端区域

[0405] 人 :LTRFHNQSELKDFGTEAARPQKGRKPRPRARSAKANQAELENAY (SEQ ID NO :96)

[0406] 大鼠 :LTRFHNQSELKDFGPETARPQKGRKPRPRARGAKANQAELENAY (SEQ ID NO :97)

[0407] SOST_核心_二聚体 :SOST 二聚化中可能涉及的核心区部分 (在两个末端处都稍有延长以包含 CYS 残基锚) :

[0408] 人 :CGPARLLPNAIGRGKWWRPSGPDFRC (SEQ ID NO :98)

[0409] 大鼠 :CGPARLLPNAIGRVKWWRPNPGPDFRC (SEQ ID NO :99)

[0410] SOST N- 末端的 BMP 结合片段

[0411] 以头蛋白 /BMP-7 复合物结构 (蛋白质数据库录入号 :1M4U) 和氨基酸序列比对 (见图 10) 为基础模拟关键的 SOSTN 末端结合区 (图 10 中序列比对的第 1-35 位) 以鉴定有可能与 BMP 相互作用的 SOST N 末端氨基酸残基。SOST 模型如图 12 中所示。在比较模型中, SOST 序列中序列比对第 8 位 (见箭头所指和附属的文字说明) 处的苯丙氨酸 (Phe, F) 伸入 BMP 二聚体表面上的疏水性口袋内。在 BMP 和 I 型受体复合物结构中观察到同样的“结入孔”特征 (Nickel 等, 同上文), 其中受体的 Phe85 嵌入同一口袋中, 这是针对 TGF-β 超家族成员的配体 -I 型受体识别中的关键特征 (包括例如 TGF-β 家族、BMP 家族, 等等)。依照该模型, 脯氨酸 (Pro) 介导的转角也是保守的, 它使 N 末端结合片段沿 BMP 二聚体表面延伸, 从 I 型受体结合位点运动至复合物另一侧的 II 型受体结合位点。接近结合片段羧基末端的另一 Pro 介导的转角也是保守的, 它与接头区连接。在图 12 中可明显显示了 SOST 和 BMP 之间的广泛接触。

[0412] 肽免疫原

[0413] 将肽设计成包含预计与 BMP 蛋白质相接触的 SOST N- 末端区。肽序列如下所示。为了免疫动物, 将肽序列设计成交迭的, 并将一额外的半胱氨酸加至 C 末端以便于与 KLH 交联。然后将所述肽用于免疫动物。免疫原的肽序列如下。

[0414] 人 SOST :

[0415] QGWQAFKNDATEIIPELGEY (SEQ ID NO :47)

[0416] TEIIPELGEYYPEPPPELENN (SEQ ID NO :48)

[0417] PEPPPELENNKTMNRAENGG (SEQ ID NO :49)

[0418] KTMNRAENGGRPPHHPFETK (SEQ ID NO :50)

[0419] RPPHHPFETKDVSEYS (SEQ ID NO :51)

- [0420] 具有额外半胱氨酸的人 SOST 肽：
- [0421] QGWQAFKNDATEIIPELGEY-C (SEQ ID NO :52)
- [0422] TEIIPELGEYPEPPPELENN-C (SEQ ID NO :53)
- [0423] PEPPPELENNKTMNRAENGG-C (SEQ ID NO :54)
- [0424] KTMNRAENGGRPPHHPFETK-C (SEQ ID NO :55)
- [0425] RPPHHPFETKDVSEYS-C (SEQ ID NO :56)
- [0426] 大鼠 SOST：
- [0427] QGWQAFKNDATEIIPGLREYPEPP (SEQ ID NO :57)
- [0428] PEPPQELENNQTMNRAENGG (SEQ ID NO :58)
- [0429] ENGGRPPHHPYDTKDVEYS (SEQ ID NO :59)
- [0430] TEIIIPGLREYPEPPQELENN (SEQ ID NO :60)
- [0431] 具有额外半胱氨酸的大鼠 SOST 肽：
- [0432] QGWQAFKNDATEIIPGLREYPEPP-C (SEQ ID NO :61)
- [0433] PEPPQELENNQTMNRAENGG-C (SEQ ID NO :62)
- [0434] ENGGRPPHHPYDTKDVEYS-C (SEQ ID NO :63)
- [0435] TEIIIPGLREYPEPPQELENN-C (SEQ ID NO :64)
- [0436] 以下肽被设计成包含预计与 BMP 蛋白质接触的核心区部分的氨基酸。将半胱氨酸加到各肽的 C 末端以便与 KLH 连接，并将连接后的肽用于免疫动物。在停泊性核心 N 末端肽中，内部的半胱氨酸被改变成丝氨酸以避免与 KLH 的双重连接。
- [0437] 针对人 SOST：
- [0438] 未添加半胱氨酸残基的氨基酸序列：
- [0439] 停泊_核心_N-末端_肽：IPDRYRAQRVQLLCPGGEAP (SEQ ID NO :66)
- [0440] 停泊_核心_C 末端_肽：QLLCPGGEAPRARKVRLVAS (SEQ ID NO :67)
- [0441] 停泊_核心_N-末端_肽：IPDRYRAQRVQLLCPGGEAP-C (SEQ ID NO :68)
- [0442] 停泊_核心_C 末端_肽：QLLCPGGEAPRARKVRLVAS-C (SEQ ID NO :69)
- [0443] 针对大鼠 SOST：
- [0444] 无半胱氨酸残基添加或取代的氨基酸序列：
- [0445] 停泊_核心_N-末端_肽：IPDRYRAQRVQLLSPGG (SEQ ID NO :70)
- [0446] 停泊_核心_C 末端_肽：PGGAAPRSRKVRLVAS (SEQ ID NO :71)
- [0447] 有半胱氨酸加入和取代的肽免疫原：
- [0448] 停泊_核心_N-末端_肽：IPDRYRAQRVQLLSPGG-C (SEQ ID NO :72)
- [0449] 停泊_核心_C 末端_肽：PGGAAPRSRKVRLVAS-C (SEQ ID NO :73)
- [0450] SOST 内有可能相互作用而形成 SOST 均二聚体的两个区域包括头蛋白中不存在的 SOST 核心区域的氨基酸。被设计成包含此序列的人 SOST 肽具有与 KLH 缀合的 C 末端或 N 末端半胱氨酸。对于大鼠 SOST 肽而言，将一半胱氨酸加到序列 (SEQ ID NO :76) 的羧基末端。用与 KLH 缀合的肽免疫动物。
- [0451] 对于人 SOST：
- [0452] CGPARLLPNAIGRGKWWRPS (SEQ ID NO :74)
- [0453] IGRGKWWRPSGPDFRC (SEQ ID NO :75)

- [0454] 对于大鼠 SOST :
- [0455] PNAIGRVKWWRPNGPDR (SEQ ID NO :76)
- [0456] 添加了半胱氨酸的大鼠 SOST 肽
- [0457] PNAIGRVKWWRPNGPDR-C (SEQ ID NO :77)
- [0458] SOST 内有可能相互作用而形成 SOST 均二聚体的第二个区域包括 C 末端区。将肽免疫原设计成包括此区域内的氨基酸序列 (见下文)。为了与 KLH 缀合, 将一半胱氨酸残基加至 C 末端, 并用缀合后的肽免疫动物。
- [0459] 适于人 SOST :
- [0460] KRLTRFHNS ELKDFGTEAA (SEQ ID NO :78)
- [0461] ELKDFGTEAA RPQKGRKPRP (SEQ ID NO :79)
- [0462] RPQKGRKPRP RARSakanqa (SEQ ID NO :80)
- [0463] RARSakanqa ELENAY (SEQID NO :81)
- [0464] 在 C 末端添加了半胱氨酸的肽免疫原 :
- [0465] KRLTRFHNS ELKDFGTEAA-C (SEQ ID NO :82)
- [0466] ELKDFGTEAA RPQKGRKPRP-C (SEQ ID NO :83)
- [0467] RPQKGRKPRP RARSakanqa-C (SEQ ID NO :84)
- [0468] RARSakanqa ELENAY-C (SEQ ID NO :85)
- [0469] 对于大鼠 SOST :
- [0470] KRLTRFHNSELKDFGPETARPQ (SEQ ID NO :86)
- [0471] KGRKPRPRARGAKANQAELENAY (SEQ ID NO :87)
- [0472] SELKDFGPETARPQKGRKPRPRAR (SEQ ID NO :88)
- [0473] 在 C 末端添加了半胱氨酸的肽免疫原 :
- [0474] KRLTRFHNSELKDFGPETARPQ-C (SEQ ID NO :89)
- [0475] KGRKPRPRARGAKANQAELENAY-C (SEQ ID NO :90)
- [0476] SELKDFGPETARPQKGRKPRPRAR-C (SEQ ID NO :91)
- [0477] 实施例 14 : 检测抗体与 TGF- β 结合蛋白的结合的检测法
- [0478] 此实施例描述了用于检测例如抗体或抗体片段等配体与硬化素的结合的检测法。
- [0479] 依照制造商 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 的方案并如美国专利 6,395,511 中所述制备 FLAG® - 硬化素融合蛋白。用抗 FLAG® - 单克隆抗体 (Sigma Aldrich) 包被 96 孔微量滴定板的各孔, 然后用溶于 PBS 的 10% BSA 封闭。将融合蛋白 (20ng) 加入 100 μ l PBS/0.2% BSA 中并在室温吸附于 96 孔板上 60 分钟。去除此蛋白质溶液, 并漂洗各孔, 以去除未结合的融合蛋白。将诸如 BMP-4、BMP-5、BMP-6 或 BMP-7 等 BMP 稀释于 PBS/0.2% BSA 中, 并以 10pM 至 500nM 范围的浓度加入各孔中。室温保温 2 小时后, 去除结合溶液, 并用 200 μ l 体积的 PBS/0.2% BSA 漂洗平板三次。依照标准 ELISA 技术用特异于 BMP 的多克隆抗血清或单克隆抗体以及适当酶缀合的第二步试剂检测 BMP 与硬化素的结合 (参阅, 例如, Ausubel 等, 分子生物学通用方法 (Current Protocols in Mol Biol.) Vol 2 11.2.1-11.2.22 (1998))。通过从总结合量中扣除非特异性结合来计算特异性结合并用 LIGAND 软件进行分析 (Munson 和 Podbard, Anal. Biochem. 107 :220-39 (1980))。
- [0480] 此外还用均一时间解析荧光检测法探测硬化素与 BMP 的结合 (Mellor 等, J

Biomol. Screening, 3 :91-99 (1998))。依照本领域已知及本文所述方法将编码硬化素的多核苷酸序列与重组核酸构建体中的人免疫球蛋白恒定区有效连接，并表达为人 Fc- 硬化素融合蛋白。同样的，改造 BMP 配体并表达为 BMP- 小鼠 Fc 融合蛋白。将这两个融合蛋白一起保温并如 Mellor 等所述进行检测。

[0481] 实施例 15：针对抑制 TGF- β 家族成员与 TGF- β 结合蛋白相结合的抗体的筛选试验

[0482] 此实施例描述了用于检测抑制 TGF- β 家族成员与硬化素相结合的抗体的方法。基本上如实施例 14 中所述进行 ELISA，不同之处在于 BMP 浓度固定为其 Kd 值（例如，通过 BIACore 分析测定）。此外，将抗体或抗体文库或集合以 1 μ M 的浓度加入孔中。将抗体与 BMP 和硬化素在室温保温 2 小时，去除溶液，如上文所述对结合的 BMP 进行定量（参阅实施例 14）。抑制无抗体存在情况下所观察到的 BMP 结合达 40% 的抗体被认为是此相互作用的拮抗物。通过进行滴定试验测定其抑制常数以及它们对 TGF-B 结合蛋白结合亲和力的作用，将这些抗体作为潜在的抑制剂进一步评估。还可用依赖于 BMP 配体作用的检测法（例如，BMP/BMP 受体竞争性试验）进行可比较的特异性对照试验，以确定已鉴定的拮抗物的选择性曲线。

[0483] 实施例 16：对 TGF- β 结合蛋白定位于骨基质的抑制

[0484] 利用 Nicolas (Calcif. Tissue Int. 57 :206-12 (1995)) 方法的修改版本进行骨基质定位的抑制作用的评估。简而言之，如 Nicolas (同上文) 所述制备 125 I- 标记的 TGF- β 结合蛋白。将羟磷灰石加入配备了聚丙烯滤膜 (Polyfiltroninc, Weymouth MA) 的 96 孔微量滴定板的各孔中。将 TGF- β 结合蛋白稀释于含 0.2% 白蛋白的 PBS 缓冲液中并随后加入孔中。用含 0.2% 白蛋白的 PBS 缓冲液漂洗包含基质的孔三次。用 0.3M NaOH 洗脱被吸附的 TGF- β 结合蛋白并随后进行定量。

[0485] 通过将 TGF- β 结合蛋白与抗体一起保温并如上所述将此混合物施加到基质中来鉴定抑制或削弱硬化素 TGF- β 结合蛋白与羟磷灰石结合的抗体。将所述基质用含 0.2% 白蛋白的 PBS 缓冲液洗 3 次。用 0.3M NaOH 洗脱被吸附的硬化素并随后进行定量。与无抗体存在条件下观察到的结合水平相比，对硬化素与羟磷灰石的结合水平至少抑制 40% 的抗体被认为是骨定位的抑制剂。在剂量反应试验中对这种抗体进一步定性，以测定其抑制常数和它对 TGF-B 结合蛋白结合亲和力的影响。

[0486] 综上所述，尽管为了便于说明的目的在此描述了本发明的特殊实施方案，但是可以对它们进行各种修改而并不偏离本发明的精神和范围。因此，本发明并不只局限于所附的权利要求。

[0487] 本发明包括下述内容：

[0488] 1. 与硬化素多肽特异结合的抗体或其抗原结合片段，所述硬化素多肽包含 SEQ ID NO :2、6、8、14、46、或 65 所示氨基酸序列，其中所述抗体竞争性抑制该硬化素多肽与 (i) 骨形态发生蛋白 (BMP) I 型受体结合位点和 (ii) BMP II 型受体结合位点中至少其一的结合，其中 BMP I 型受体结合位点能够与包含选自下组的序列中所示的氨基酸序列的 BMP I 型受体多肽结合：GenBank 编号 NM_004329 (SEQ ID NO :102)、D89675 (SEQ ID NO :103)、NM_001203 (SEQ ID NO :104)、S75359 (SEQ ID NO :105)、NM_030849 (SEQ ID NO :106)、D38082 (SEQ ID NO :107)、NP_001194 (SEQ ID NO :108)、BAA19765 (SEQ ID NO :109)、和

AAB33865 (SEQ ID NO :110) ,而且其中 BMP II 型受体结合位点能够与包含选自下组的序列中所示的氨基酸序列的 BMP II 型受体多肽结合 :GenBank 编号 U25110 (SEQ ID NO :111) 、 NM_033346 (SEQ ID NO :112) 、 Z48923 (SEQ ID NO :114) 、 CAA88759 (SEQ ID NO :115) 、 和 NM_001204 (SEQ ID NO :113) 。

[0489] 2. 与硬化素多肽特异性结合且削弱硬化素均二聚体形成的抗体或其抗原结合片段, 其中所述硬化素多肽包含 SEQ ID NO :2、6、8、14、46、或 65 所示氨基酸序列。

[0490] 3. 项目 1 或 2 的抗体, 其中所述抗体是多克隆抗体。

[0491] 4. 项目 1 或 2 的抗体, 其中所述抗体是单克隆抗体。

[0492] 5. 项目 4 的抗体, 其中所述单克隆抗体选自下组 : 小鼠单克隆抗体、人单克隆抗体、大鼠单克隆抗体、和仓鼠单克隆抗体。

[0493] 6. 生成项目 4 所述抗体的杂交瘤细胞。

[0494] 7. 能够表达项目 4 所述抗体的宿主细胞。

[0495] 8. 项目 1 或 2 的抗体, 其中所述抗体是人源化抗体或嵌合抗体。

[0496] 9. 能够表达项目 8 抗体的宿主细胞。

[0497] 10. 项目 1 或 2 的抗体, 其中所述抗原结合片段选自下组 :F(ab')₂ 、 Fab' 、 Fab 、 Fd 和 Fv 。

[0498] 11. 项目 1 或 2 的抗体, 其中包含单链抗体。

[0499] 12. 能够表达项目 11 所述抗体的宿主细胞。

[0500] 13. 包含依照项目 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段以及生理学可接受载体的组合物。

[0501] 14. 包含含有 SOST 多肽的至少 21 个连续氨基酸且不超过 50 个连续氨基酸的肽的免疫原, 所述 SOST 多肽包含 SEQ ID NO :2、6、8、14、46、或 65 所示氨基酸序列, 其中所述肽能够在非人动物中引发与 SOST 多肽特异结合、并竞争性抑制 SOST 多肽与 (i) 骨形态发生蛋白 (BMP) I 型受体结合位点和 (ii) BMP II 型受体结合位点中至少其一的结合的抗体, 其中 BMP I 型受体结合位点能够与包含选自下组的序列中所示的氨基酸序列的 BMP I 型受体多肽结合 :GenBank 编号 NM_004329 (SEQ ID NO :102) 、 D89675 (SEQ ID NO :103) 、 NM_001203 (SEQ ID NO :104) 、 S75359 (SEQ ID NO :105) 、 NM_030849 (SEQ ID NO :106) 、 D38082 (SEQ ID NO :107) 、 NP_001194 (SEQ ID NO :108) 、 BAA19765 (SEQ ID NO :109) 、 和 AAB33865 (SEQ ID NO :110) , 而且其中 BMP II 型受体结合位点能够与包含选自下组的序列中所示的氨基酸序列的 BMP II 型受体多肽结合 :GenBank 编号 U25110 (SEQ ID NO :111) 、 NM_033346 (SEQ ID NO :112) 、 Z48923 (SEQ ID NO :114) 、 CAA88759 (SEQ ID NO :115) 、 和 NM_001204 (SEQ ID NO :113) 。

[0502] 15. 包含含有 SOST 多肽的至少 21 个连续氨基酸且不超过 50 个连续氨基酸的肽的免疫原, 所述 SOST 多肽包含 SEQ ID NO :2、6、8、14、46、或 65 所示氨基酸序列, 其中所述肽能够在非人动物中引发与 SOST 多肽特异结合并削弱硬化素均二聚体形成的抗体。

[0503] 16. 项目 14 或 15 的免疫原, 其中所述肽与载体分子相连。

[0504] 17. 项目 16 的免疫原, 其中所述载体分子是载体多肽。

[0505] 18. 项目 17 的免疫原, 其中所述载体多肽是匙孔血蓝蛋白。

[0506] 19. 用于生成与 SOST 多肽特异结合的抗体的方法, 包括用依照项目 14 的免疫原

免疫非人动物,其中(a)所述SOST多肽包含SEQ ID NO:2、6、8、14、46、或65所示氨基酸序列;(b)所述抗体竞争性抑制SOST多肽与(i)骨形态发生蛋白(BMP)I型受体结合位点和(ii)BMP II型受体结合位点中至少其一的结合;(c)BMP I型受体结合位点能够与包含选自下组的序列中所示的氨基酸序列的BMP I型受体多肽结合:GenBank编号NM_004329(SEQ ID NO:102)、D89675(SEQ ID NO:103)、NM_001203(SEQ ID NO:104)、S75359(SEQ ID NO:105)、NM_030849(SEQ ID NO:106)、D38082(SEQ ID NO:107)、NP_001194(SEQ ID NO:108)、BAA19765(SEQ ID NO:109)、和AAB33865(SEQ ID NO:110);且(d)BMP II型受体结合位点能够与包含选自下组的序列中所示的氨基酸序列的BMP II型受体多肽结合:GenBank编号U25110(SEQ ID NO:111)、NM_033346(SEQ ID NO:112)、Z48923(SEQ ID NO:114)、CAA88759(SEQ ID NO:115)、和NM_001204(SEQ ID NO:113)。

[0507] 20. 用于生成与SOST多肽特异结合的抗体的方法,所述SOST多肽包含SEQ ID NO:2、6、8、14、46、或65所示氨基酸序列,该方法包括用依照项目15的免疫原免疫非人动物,其中所述抗体可削弱硬化素均二聚体的形成。

[0001]

序列表

<110> Celltech R & D, Inc.

<120> 用于增加骨矿化的组合物和方法

<130> 60117-136

<140>

<141> 2004-06-15

<160> 143

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 2301

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapien)

<400> 1			
agaggcctgtg ctactggaag gtggcggtgcc ctcctctggc tggtaaccatg cagctccac	60		
tggccctgtg tctcgctgtc ctgcgtggta acacagccctt ccgtgttagt gaggggccagg	120		
ggtggcaggc gttcaagaat gatggcacgg aaatcatccc cgagctcgga gagtaccccg	180		
agccctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaacccg ggccggagaaac ggagggcggc	240		
ctccccacca ccccttttag accaaagacg tgcggagta cagctgcgcg gagctgcact	300		
tcaccggcta cgtgaccgat gggcgtgcc gcagcgccaa gccggtcacc gagctgggt	360		
gctccggcca gtgcggcccg gcgcgcctgc tgcccaacgc catggccgc gcaagtgt	420		
ggcgcacccat tagggcccgac ttccgtcga tcccgaccc ctaccgcgc cagcgcgtc	480		
agctgtgtg tcccggtgtt gaggccgc gcgcgcggaa ggtgcgcgt gtggcctgt	540		
gcaagtgcac ggcgcctacc cgcgtccaca accagtggta gctcaaggac ttccggacc	600		
aggccgcctg ggcgcagaag ggccggaagc cgcggccccc gcggccggc gccaaagcca	660		
accaggcgcg acgtggagaac gcctactaga gcgcgcgcgc gcgcctcccc accggcggc	720		
gcgcgcgcgc tgaacccgatt cccacattt ctgtcctctg cgcgtgtt gattgtttat	780		
atccatgtt aaatgcgtc aaccagggc agggggctga gacccgtccag gccttgaggaa	840		
atccggcgc cggcaaggc cccctcagc cgcgcagctg aggggtccca cggggcagg	900		
gagggaattt agagtacac agactgagcc acgcagcccc gcctctgggg cgcctactt	960		
ttgcgtgtcc cacttcagag gaggcagaaa tggaaagcatt tcaccgcgc tggtgtttt	1020		
agggagccgt gtgggatgtt gaaagtcccg gtagtggta agaaagtgtt ataaagattcc	1080		
cccttgcacc tcgcgtccca tcagaaaggc tgaggcgtc gcagcaca agactgggg	1140		
caactgtgtg tgggtttct agtctggct ctgcactaa ttgcgtgtt accttgaaac	1200		
tacacaattt tccttcggga cctcaattt cactttgtaa aatgagggtt gaggtggaa	1260		
taggatctcg aggagactat tggcataatgat tccaaggac tccagtgcct ttgaatggg	1320		
cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagtgcatt gattcagtg	1380		
caaggctact tcgcgtccca agatgtgttgc tgctctttc tgacagcaca agatgaaaaa	1440		
caaacagaaa aaaaaaaaaa agagtttat ttaggctga cataattacg gtcgacaaac	1500		
tcttggaaat agctatgtc cttccgcggcc tgggtttttt ggatgtttgg ctacccatcc	1560		
ccctccatct caaaagaaaata acatcatcca ttgggtttaga aaaggaggagg gtccgagggt	1620		
ggtgggaggg atagaatca catccgcggc aacttccca agagcagcat cccctccccc	1680		
accatcatcc atgtttttt agtccatcc tcgcacccatc gaagagaagt gaaagggtca aggacactgg	1740		
ccttgcggc cggaggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ctttttgaga	1800		
caccggcttc tgcccccac acggacatttgcctt agaaaaacaggc ttcttactgc	1860		
tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttggggaaa aactacaagt	1920		
gctgtacata tgctgaaaaa ctgcagagca taatagctgc cacccaaaaa tctttttgaa	1980		
aatattttcc agacacacttc ttacttttgc tgtagttttt aattttttttt aaaaaaaaaat	2040		
ttaaaacaga agccatcagc atatggaaatc ctgcaggact ggtcggtttt ttggcaattc	2100		
ttccacgtgg gactgttcca agaaatggaa agtaggtttt tttaaagagt taagttacat	2160		
attttttttcc tcacttaatgt tattttatgca aaaaatttttc ttgttagagaa tgacaatgtt	2220		
aatattgttt tatgaattaa cagtcgttcc ttccagagtc cagagacatt gttataaaag	2280		
acaatgaatc atgaccggaaa g	2301		

<210> 2

<211> 213

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr			
1	5	10	15
Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp			
20	25	30	
Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro			
35	40	45	
Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg			
50	55	60	

[0002]

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

<210> 3
 <211> 2301
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 3

agagccgtgt	ctactggaaag	gtggcgtgcc	ctccctctggc	tggtaccatg	cagctccac	60
tggccctgtg	tctcgctgc	ctgctggta	acacagcctt	ccgtgtatgt	gagggctagg	120
gggtggcaggc	gttcaagaat	gatgccacgg	aaatcatccc	cgagctcgga	gagtaccccg	180
agccctcacc	ggagctggag	aacaacaagg	ccatgaacccg	ggcggagaac	ggagggcggc	240
ctccccca	ccccctttag	accaaagacg	tgtccgagta	cagctccgc	gagctgact	300
tcacccgcta	cgtgacccat	ggggcgtgcc	gcagcgcac	gccggtacc	gagctggtgt	360
gctccggcca	gtgccccccg	gcgcgcctgc	tgcccaacgc	catggccgc	ggcaagtgg	420
ggcgacctag	tggggccgac	ttccgcgtca	tcccccaccc	ctaccgcgc	cagcgcgtc	480
agetcgtgt	tcccggtgt	gaggcgcgc	gcgcgcgca	ggtgcgcctg	gtggccteg	540
gcaagtca	gcccgcacc	cggtccaca	accagtcgg	gctcaaggac	ttcgggaccc	600
aggccgctcg	gcccggaaag	ggccggaaac	cgccggcccg	cgccggagac	gccaaaggca	660
accaggccga	gttggagaac	gcctactaga	gcccgcgc	gcccccccc	accggcggc	720
gccccggccc	tgaaccccg	ccccacattt	ctgtccctgc	cgcgtgttt	aatgttttat	780
atttcattgt	aatatgcgtc	aacccaggcc	agggggctga	gacccctccag	gcccgtgag	840
atccggcgc	ccggcaaggc	ccccctcagc	ccgcgcacgt	agggggttca	cggggcagg	900
gagggaaattg	agagtcacag	acactgagcc	acgcagcccc	gccttgggg	ccgcctactt	960
ttgctgttcc	cacitccagag	gaggcagaaa	tggaaagcatt	ttcacccccc	tgggtttta	1020
agggagcggt	gtgggagtgg	gaaagtccag	ggactggta	agaaaagtgg	ataagattcc	1080
cccttgcacc	tcgtcgccca	tcaaaaaagcc	tgaggcgtgc	ccagagcaca	agactgggg	1140
caactgtaga	tgtggttt	actgtctgt	ctgcactaa	tttgcgtgt	aaccttgaa	1200
tacacaatttcc	tccttggaa	cctcaatttcc	cactttgtaa	aatagggtt	gaggtggaa	1260
taggatctcg	aggagactat	tggcatatga	ttcaaggac	tccagtcct	tttgaatgg	1320
cagaggttag	agagagagag	agaaagagag	agaatgaatg	cagttgcatt	gattcagtgc	1380
caaggctact	tcccaatttcc	agagttgtga	tgtctcttc	tgacagccaa	agatgaaaaa	1440
caaaacagaaa	aaaaaaatgt	aatatggctg	cataattacat	gctgacaaac	1500	
tcttggaa	agctatgtc	cttccccc	ttgggttttgc	ctacccccc	1560	
cccctccat	caaaaataa	acatcatca	ttggggatgt	aaaggagagg	gtccggggt	1620
ggtggggagg	atagaaatca	cattccccc	aacttccaa	agagcagcat	ccctccccg	1680
acccatagcc	atgtttaaa	gtcacccccc	gaagagaagt	gaaaggttca	aggacactgg	1740
ccttgcaggc	ccggaggagc	agccatcaca	aactcacaga	ccagcacatc	ctttttgaga	1800
caccgccttc	tgcaccac	tcacggacac	attctgcct	agaaaacagc	ttcttactgc	1860
tcttacatgt	gtggcatat	tttacactaa	aaaaatata	ttggggaaa	aactacaagt	1920
gctgtacata	tgtggagaaa	ctgcagagca	taatagctgc	cacccaaaaa	tcttttggaa	1980
aatcatttcc	agacaaccc	ttactttctg	tgtgttttt	aattgttaaa	aaaaaaaaatgt	2040
tttaaacacg	agcacatgac	atataaagcc	ctgcaggact	ggtcgttttt	ttggcaatc	2100
ttccacgtgg	gactgttca	caagatgaa	agtagtgg	tttaaaaggt	taagttacat	2160
atttattttc	tcaactaagt	tatttatgca	aaagggtttt	tttgcggaaa	tgacaatgtt	2220
aatattgtt	tatgttattaa	cagtgttcc	ttccagagtc	cagagacatt	gttataaaag	2280
acaatgaatc	atgaccgaaa	g				2301

<210> 4
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4

Met	Gln	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Cys	Leu	Val	Cys	Leu	Leu	Val	His	Thr
1				5				10				15			
Ala	Phe	Arg	Val	Val	Glu	Gly									

[0003]

20

<210> 5
<211> 2301
<212> DNA
<213> 智人

<400> 5

agaggcctgtg ctactggaa gtggcgcc ctcctctggc tggattaccatg cagctccccac
tggccctgtg tctcatctgc ctgtgttac acacacgcctt ccgtgttagtg gagggcccaagg
ggtggcaggc gtcaagaat gatgcacgg aaatcatccg cgagctcggg gatgaccgg
acgcctccacc ggagctggg aacaagaaga ccatgaaacc ggggagaac ggaggcggc
ctccccacca cccctttgg accaaaagac tgcgtggata cagtgcggc gagtcgact
taccccgcta cgtgaccggat gggccgtgcc gcagggccaa gcccgttacc gagctgggt
gtcccgcca gtgcggcccg gcgegcctgc tgcccaacgc catggccgc gcaagtgg
ggcgaccctag tggggccgac ttccgtgtca tccccgaccg ctaccggcgg cagcgctgc
agctgtgtc tccgggtgtt gaggccggc gcgegcggaa ggtgcgtgtc tgccctcg
gcaagtgcga ggcgttcac cgttccaca accagtcgg gtciaaggag ttccgggg
aggccgtcg ggcgcagaag ggccggaaagc cgccggccccc egcccgaggc gccaaaggcca
accaggccga gctggagaac gcctactaga gcccggccgc gcccctcccc accggccggc
gccccggcccg tgaaccccgcc ccccacattt ctgttctctg cgcgtgtttt gatgttttat
atttcattgt aaatgcctgc aaccggggc agggtgggtt gacttccag gccctggagga
atccccgggg cccggcggc cccctccage cgcgcgtgtc aggggttccca gggggcagg
gagggaattt agagtcacag acactgaccc acgcagcccccc gcccgttggg cgccttacc
tttgtgttcc cacttcggag gaggcggaaaa ttggaaacattt ttacccggcc tgggggtttta
agggagccgt gtgggagttt gaaagtccag ggacttggta agaaagtggg ataaagattcc
cccttgcacc tcgtgtccca tcagaaagcc tgaggcgtgc ccagagcacca agactgggg
caactgttaga tgggttttctt agtccgtgtc ctgcactaa ctgtgtgtt acacttggaa
tacacaattt ccttcggga cctcaattt cacttggta aatgggggtt gagggtggaa
taggtatctcg aggagactat tggcatatga ttccaaaggac tccagtgtt tttatgtgg
cagagggttag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagtgttccattt gattcgtgc
caagggtact tccagaattt agagggtgtt gtcgttccattt tgacagccaa agatggaaaa
caaacagaaaa aaaaaaaaaaagta aagacttcat tttatgtgtca catatttacg gctgacaaaac
tccgttggaaa agctatgtc cttcccgacc tggcttcccc ggatgtttgg tttatgtgg
ccctccatet caaagaaaata acatcatcca ttggggtaga aaaaaaaaaaaggggggg
ggtggggaggat atagaaaatca catccggccccc aacttccaa agagcagcat ccctccccc
accatcatggc atgtttttaa gtcaccccttcc gaagagaagt gaaagggttca aggacactgg
ccttgcaggc ccgaggggcgc agccatcaca aacttcacaga ccagcacatc ccttttgg
caccgccttc tgccacccac tcacggacac attttgtccctt agaaaacagc tttctatgc
tettatcatgt gatggcatat cttacactaa aagaatattt ttggggggaaa aactacaagt
gtctgtatca tgcgtggaaaa ctcggcggca taatgtgc caccggggaaa ttttttgg
aatcattttc agacaaccccttacttctgt tttttttttt aatgtttttt aaaaaaaaaaag
tttaaacaga agcacatgac atatggaaagc ctgcaggact ggtcggtttt tttggcaattc
ttccacgttgg gacttgttca caagaatgaa agtagtgggtt tttaaagagt taagttcat
attttttttt tcacttaagt tttttatgtca aaaaaaaaaaagtttttttccatgttgg
aatattgtttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
acaatgaatc atgaccggaaa g

<210> 6
<211> 213
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

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

[0004]

Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly
 180 185 190
 Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
 195 200 205
 Leu Glu Asn Ala Tyr
 210

<210> 7
<211> 2301
<212> DNA
<213> 智人

<400> 7
 agagccctgtg ctactggaaag gtggcgtgcc ctcctctggc tggtaccatg cagctccac
 tggccctgtg tcicgtctgc ctgtctgtac acacagccct ccgttagtg gaggggccagg
 ggtggcagge gtiacaagaat gatgcacccg aaatacatccg cgagctcgga gatgtaccccg
 acectccacg ggagctggag aacaacaaga ccatgaaacgg gggggagaaac ggaggggccgc
 ctccccacca cccctttgg accaaaagacg tgtcgagta cagctgcgcg gagctgcact
 tcacccgcta cgtgaccggat gggcgtgcc gcagcgccaa gccggtcacc gagctggtgt
 gctccggeca gtgcggcccg gcgcgcctgc tgcccaaacgc catcgccgc ggcagaatgtt
 ggcgaccatag tggcccccac ttccgtctca tcccccacgg ctacgcgcg cagcgcgtge
 agctgtctgg tcccggtgtt gaggccgcgc gcgcgcgcaaa ggtgcgtctg tgccctcg
 gcaagtgtcaa ggcgccteacc cgcttcacaca accagtcggaa gtciaaggac ttccggaccc
 aggccgtctg gccgcagaag gggcggaaagc cgccggcccg cgcccgaggc gccaaaggcca
 accaggccga gctggagaaac gcctactaga gcccgcgcg gcccctcccc accggccggc
 gccccggccc tgaacccgcg ccccacattt ctgtctctgt cgctgtttt gatgttttat
 atttcattgt aaatgtctgc aaccctggc agggggctgtg gactcttcag ggccctggagg
 atccccggcc cggcgaaggc ccccttcage cgcgcagtc aggggtccca cggggcagg
 gagggaaatgg agagtcacac agatcgcc acgcgcgc cgcctctggg cgcctactt
 ttgtctggtcc cacttcagag gaggcagaaaa tggaaagcatt ttccacccccc tggggttta
 agggagcgggt gtgggagttt gaaagtccag ggacggtta agaaagtgg ataagattcc
 ccccttgaccc tcgcgtccca tcagaaagcc tgaggcgtgc ccagagcaca agactgggg
 caactgttaga tgggtttct agtcgtctgt ctgcactaa ctgtctgtt accttgcac
 tacacaattt ctttcggga cctcaatttc cactttgtaa ataggggttgg gaggtggaa
 taggtatctc agaggacatg ttgcataatga ttcaaaaggac tcacgtgtct ttgtatgg
 cagagggttag agagagagag agaaagagag agaaatgtt cagttgcatt gattcagtgc
 caagggtact tccagaattt agagttgtg tgctcttc tgacagccaa agatgaaaaaa
 caaacagaaa aaaaaaaatgt aagatgttat ttatgtctgtc catatattacg gctgacaaac
 tcttggaaagc agctatgtc cticccaccc tggcttcccc ggatgtttgg ttcacccac
 cccctccatct caaaaatata acatcatcca tggggtaga aaaggagagg gtcggagggt
 ggtggggggg atagaaaatca catccggccc aacttccaa agagcagcat ccctccccc
 acccatagcc atgtttttaa gtcaccccttcc gaagagaagt gaaagggttca aggacactgg
 ctttgcggcc cggaggggac agccatcaca aactacaga ccagcacatc cttttgaga
 cacccgcctc tgcccccacac tcacggacac attttgtctt agaaaacagc ttcttactgc
 ttttacatgt gatggccatc ttacactaa aagaatattt ttggggggaa aactacaatgt
 gctgtatata tgcgtggaaaa ctgcagagca taataatgc caccaaaaaa tctttttgaa
 aatcattttc agacaacctc ttacttctg tggtagttt aatgtttaaa aaaaaaaatgt
 tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgtttt ttggcaattc
 ttccacgtttt gacttgtcca caagaatgtt agtagtgggtt tttaaaagagt taatgttat
 attttttttc tcaactttagt tattttgtca aaagggtttt ttgttagagaa tgacaatgtt
 aatattgtt tattgtatata cagttgtttc ttccagagtc cagagacatt gtaataaaag
 acaatgaatc atgaccggaaa g

<210> 8
<211> 213
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8
 Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr
 1 5 10 15
 Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
 20 25 30
 Ala Thr Glu Ile Ile Arg Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
 35 40 45
 Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
 50 55 60
 Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
 65 70 75 80
 Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
 85 90 95
 Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala
 100 105 110
 Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser
 115 120 125
 Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val

[0005]

130	135	140	
Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg			
145 150 155 160			
Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln			
165 170 175			
Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly			
180 185 190			
Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu			
195 200 205			
Leu Glu Asn Ala Tyr			
210			
<210> 9			
<211> 642			
<212> DNA			
<213> 猴 (Cercopithecus pygerythrus)			
<400> 9			
atgcagctcc cactggccct gtgttcttgc tgcctgctgg tacacgcagg cttccgtgtta	60		
gtggaggccc aggggtggca ggcccttcaag aatgatgcca cggaaatcat ccccgagctc	120		
ggagagttacc ccggaggcttc accggagctg gagaacaaca agaccatgaa cggggcggag	180		
aatggaggccc ggcctcccca ccacccctt gagaccaaag acgtgtccga gtacagctgc	240		
cgagagttgc acttcacccg ctactgtgacc gatggggcgt gecgcagcgc caagecagtc	300		
accggatgg tggtgtccgg ccactgcggc cccgcacgccc tgctgccccaa cgccatcggc	360		
cgcggcaagt ggtggccccc gagttccgcgt gcatccccca ccgctaccgc	420		
gcccggcggc tgccatgtgttcccggt ggtggccgcgc cgcgcgcgc caagggtgcgc	480		
ctgggtggccct cgtgcacatgc caagcgcctc acccgcttcc acaaccagtc ggagctcaag	540		
gacttcggc tcggccgcag aaggccgga agccgcggcc ccgcgcggc	600		
ggggccaaag ccaatcaggc cgagctggag aacgcctact ag	642		
<210> 10			
<211> 213			
<212> PRT			
<213> 猴			
<400> 10			
Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Ala			
1 5 10 15			
Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp			
20 25 30			
Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro			
35 40 45			
Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg			
50 55 60			
Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys			
65 70 75 80			
Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser			
85 90 95			
Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala			
100 105 110			
Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser			
115 120 125			
Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val			
130 135 140			
Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg			
145 150 155 160			
Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln			
165 170 175			
Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly			
180 185 190			
Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu			
195 200 205			
Leu Glu Asn Ala Tyr			
210			
<210> 11			
<211> 638			
<212> DNA			
<213> 鼠 (Mus musculus)			
<400> 11			
atgcagccct cactagccccc gtgcctcatc tgcttacttg tgcacgctgc cttctgtgtct	60		
gtggaggccc aggggtggca agccctcagg aatgatgcca cagaggctat cccaggccctt	120		
ggagagttacc ccggaggcttc tcctgagaac aaccagacca tgaaccgggc ggagaatggc	180		
ggcagacccccc cccacccatcc ctatgacgcc aaagggtgtgt ccgagatcacag ctggccgcgc	240		
ctgcactaca cccgccttcc gacagacggc ccatgcggca gcgcacccggc ggtcacccgg	300		

[0006]

<210> 12
<211> 211
<212> PRT
<213> 鼠

<400> 12
 Met Gln Pro Ser Leu Ala Pro Cys Leu Ile Cys Leu Leu Val His Ala
 1 5 10 15
 Ala Phe Cys Ala Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Arg Asn Asp
 20 25 30
 Ala Thr Glu Val Ile Pro Gly Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
 35 40 45
 Glu Asn Asn Gln Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg Pro Pro
 50 55 60
 His His Pro Tyr Asp Ala Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys Arg Glu
 65 70 75 80
 Leu His Tyr Thr Arg Phe Leu Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser Ala Lys
 85 90 95
 Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala Arg Leu
 100 105 110
 Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Val Lys Trp Trp Arg Pro Asn Gly Pro
 115 120 125
 Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val Gln Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ser Arg Lys Val Arg Leu Val
 145 150 155 160
 Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln Ser Glu
 165 170 175
 Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Thr Ala Arg Pro Gln Lys Gly Arg Lys
 180 185 190
 Pro Arg Pro Gly Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu Leu Glu
 195 200 205
 Asn Ala Tyr
 210

<210> 13
<211> 674
<212> DNA
<213> 大鼠 (*Rattus norvegicus*)

<400> 13
gaggaccgg tgcccttct ccttctggca ccatgcagct ctcaactagcc cttgccttg
cctgcctgt tgtacatgc gccttcgttg ctgtggagag ccagggttgg caaggcttca
agaatgtgc cacagaatac atcccgggac tcagagatca cccagagccc ctcaggaaac
tagagaacaac ccagaccatg aaccggggcc agaaacggagg cagaccccc caccatcctt
atgacaccaa agacgtgtc gagtagactg gcccggagct gcaactacacc cgcttcgtga
ccgcacggcc gtcggcggagt gccaaggggg tcaaccgggtt ggtgtgtcg ggccagggtcg
gccccggcgc gctgtgtccc aacgcacatcg ggcgcgtgaa gtgggtggcgc cggaaacggac
ccgacttccg ctgcattcccg gatgcgttacc ggcgcgcagcg ggtgcacgtg ctgtgccccgg
gcggcggggc gcccggcgtcg cgcaagggtgc gtctgggtggc ctcgtlcaag tcaagcgcc
tcacacccgtt ccacaacccag tggaggtca aggacttcgg actctgagacc ggcggggccgc
agaagggtcg caagccggcc ccccgccccc gggggagccaa agccaaaccag ggcggagctgg
agaacgccta ctat

<210> 14
<211> 213
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 14
 Met Gln Leu Ser Leu Ala Pro Cys Leu Ala Cys Leu Leu Val His Ala
 1 5 10 15
 Ala Phe Val Ala Val Glu Ser Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
 20 25 30
 Ala Thr Glu Ile Ile Pro Gly Leu Arg Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Gln
 35 40 45
 Glu Leu Glu Asn Asn Gln Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
 50 55 60
 Pro Pro His His Pro Tyr Asp Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys

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

<210> 15

<211> 532

<212> DNA

<213> 牛 (Bos torus)

<400> 15

agaatgtatgc cacagaaatc atccccgagc tggcgagta ccccgagccct ctgccagagc	60
tgaacaacaa gaccatgaac cggcgaggaga acggaggggag acctcccccac caccctttg	120
agaccaaaga cgcctccgag tacagctgcc gggagctgca cttcacccgc tacgtgaccg	180
atgggcgtg ccgcagcgc aagccggta ccgagctgtt gtgctgggc cagtgcggcc	240
cggcgcgcct gctgccaac gcatacgcc gggcaagtgt gtggcgccca agcggggcccg	300
acttccgtc catccccgac cgctaccggcg cgcagcgggt gcagctgttg tgcctggcg	360
gcccggcgcc gcgcgcgc aaggtgcgc tggtggctc gtgcaagtgc aagcgcccta	420
ctcgcttcca caaccagtcc gagctaagg acttcgggcc cgaggccgcg cggccgcaaa	480
cggccggaa gctggggccc cgccggggg gacccaaage cagccggcc ga	532

<210> 16

<211> 176

<212> PRT

<213> 牛

<400> 16

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

<210> 17

<211> 35828

<212> DNA

<213> 鼠

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(35828)

<223> n = A, T, C 或 G

<400> 17

[0008]

cgcgttttgg tgagcagcaa tattgcgtt cgatgaccc ttgcgtttag attgataacct	60
ctgctgcaca aaaggcaatc gaccgagctg gaccagcgc ttcgtacac cgttccttc	120
gaacttattc gcaatggagt gtcatccatc aaggacngcc tgcataaaa ttgtgtctac	180
cacgcagcgg caatcgaaaa ccctcagecc gtcgacataa tctacaacat cagcccttgg	240
atccctgcgtg atgaggccagc gcaaaacaag gtaaccgtca tgccgatata gttcaaaagg	300
aaaccctgggt ttgatcacaa cattgaaacg ttgatcgaaa acgcgtgaa aaacgctgt	360
gaatgtgcgg cgctggatgt cacaagcaa atggcagcag acaagaagc gatggatgaa	420
ctggccttct atgtccgcac ggccatcatg atgaaatgtt tccccgggt tggtatcgg	480
cagcagtgcc gtcgatata tgcaattgtt aattattatc attcgggtt ccittccgg	540
gatccgcctt ttacggggc ggcgaccccg cgggtttcg ctatitgtaa aatatttccg	600
gtttaaggcg tttcggttct tcitcgtcat aacttaatgt ttttatttaa aataccctct	660
gaaaagaaag gaaacgacag gtgtgaaag cgagctttt ggctctgtc gttccttcc	720
tctgttttg tccgtgaaat gaacaatgga agtcaacaaa aacgagagct tatcgatgt	780
aaggcggtcaa acatgaaat tcggccgc ataatacgac tcactatagg gatcgaccc	840
tactccccgc gcatgaagcg gaggagctgg acttcgcattt cccagagacg cccccaacc	900
cccaaaggatc ctgaccctcg ccitcattcc ctctggctt ggcttggcg gggtaagg	960
taccacgttc tcttaacagg tggctgggtt gtccttgcg cgcgtgtcat gtacagctg	1020
cctagttctg cagtgggtt accgtggat gtctgccttc gttgcattgg caacgggatg	1080
acgttacat ctgggtgtt agctttctc gtccgtgtca gggaaatccaa ataccctaaa	1140
ataccctaga agaggaatg gctgacccaa gggtttctgt gtttgccttccg ataaagtgg	1200
acttagatgg aaaaaaaaaa aatgataaaatc acccgagccaa tctgaaatattt cttccattt	1260
geaccactag gaaatgttta tattattgtt ctcgtatgtt ttcttattttt aaaaagaaaa	1320
cttttagtcat gtttattataa agaatttctc agcagtggga gagaaccaat attaacacca	1380
agataaaaagt tggcatgtc cacatttgcg gaaatccac gttgggtttt catgaatgt	1440
aagaccctat ttattaaatg cctaacttctt gttttgcac acttagaagg gatggccgg	1500
atggctgagg ggctgtttaagg atcttcaat gtcattacatg tttttttttt gtcctgcacc	1560
taggaccitc igcciaaccctt gcagcagcagc cagagggtt tcacatgatt agtctcagac	1620
acttggggc aggttgcattt tactgcattt ctatattccaa tacggggcac actatgttgc	1680
tcaaaacacca tatgggtttt acttttccatc acgggtgggtt tcatcatgtt gcatgttgc	1740
acggttgcgtt tgggtttaga gagttttttt atatggaccc acttttccatc attctgtca	1800
cgtggctgtt cattttttttt cttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	1860
agttttttttt cttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	1920
agaaggccagg gggctttggcg gtctcaggag cttttttttt gttttttttt gttttttttt	1980
ttatctgcag taggtttttttt agggcatatgtt ttcggactgtt gttttttttt gttttttttt	2040
tccctttttttt tctatgttccaa tcttgcattt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	2100
aactgcatac cttaaaaggccaa gctttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	2160
gggtttttttt cttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	2220
ctcaggccgtt gagggccagg gggagggtttt gggaggccgtt tttttttttt gttttttttt	2280
tggacaggccg tctttttttt cttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	2340
cctttttttt cttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	2400
tatccctttttt taggtttttttt gggactttttt gggactttttt tttttttttt gttttttttt	2460
taaattttttt gttttttttt gggactttttt gggactttttt tttttttttt gttttttttt	2520
tcttaacttcc cttttttttt gggactttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	2580
actgtttttttt ccagggtttttt aggattttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	2640
ttttttttttt cttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	2700
agttttttttt cttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	2760
gtactttttttt acggggactt cttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	2820
aagcatcagg cttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	2880
ccccccccccccc acccccaacca gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	2940
ggcacaggccg gataataatgtt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3000
attttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3060
ttgggtttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3120
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3180
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3240
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3300
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3360
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3420
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3480
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3540
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3600
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3660
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3720
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3780
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3840
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3900
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	3960
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	4020
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	4080
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	4140
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	4200
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	4260
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	4320
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	4380
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	4440
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	4500
ttttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	4560

[0009]

ttgtgctcca tagaggcttc ctgggtacac agcagettcc ctgtcctgg gattcccaa	4620
gagaactccc taccactgga cttacagaag ttctatttgc tgggtaaacg gtcaacagc	4680
tttggcttt ggtggacgggt gcatactgct gtatcagctc aagagctcat tcacgaatga	4740
acacacacac acacacacac acacacacac acacaagcta attttgatat gcttaacta	4800
gctcgtac tgggcatttc tgaacatccc tgaagttagc acacatttcc ctcgtgtt	4860
cctggcttaa caccttctaa atctatattt tatcttgc gcccgttac cttctgagaa	4920
gcccttaggg ccacttccct tcgcacacac atttgtggat gtttcttc ctgcagctc	4980
taaaatctgt ccctctgcct ctgagccatg gaaacagccc aataactigag tttagacataa	5040
aaacgtctt agccaaactt tcgatctaat tttagacaata aacttactt gttgtggaaat	5100
ccttaagatt ctctcatgacc tccttcacat ggcacgatg tgaagcttta ttacaattt	5160
ttattgtatca aactactca taaaaagcca gttgttttc acctgtctaa ggaaggaaca	5220
aaattcatcc ttaactgatc tgtgcaccc tcacaatcca tacgaatata ttaagagttac	5280
taagattttt gttgtgagag tcacatgtta cagaatgtac agctttgaca aggtgcattcc	5340
tttggatgcc gaagtgcaccc gctgtttccatc tctgggtctg ttttggaaagc	5400
aatgtcttcc aagcaacttt aggaggatgg atgtggaaac agcggttcac tttagcatcc	5460
cgtacgacaa tcccgtaaa gctgtacatt ctgtiacaga ctggggaaagc tgccagactt	5520
aaggccaggg ccctatggtc cctttaatc cctgtacac ccaacccgag cccttcct	5580
ccagccgttc tggcttcactc actctggata gatggagaac acggccitgc tagttaaagg	5640
agtgtggctt cacccttc acatggcgtt gttgtgtcat ccttcatttc ggaactctgg	5700
ggcatttcgc cttaacttcc tcttttggat ctacaggaaat ctggggaaagc tgccagactt	5760
ccttgcgtat gggggagctg gatctttggat ctggatgtt ctgtgttagt ttttccccat	5820
ccttgcgtat accctatcta tatacttacca ctggcatag tggccctcgat tctggagect	5880
gccttcaggc tgggttcgg ggaccatgtc cctggttct ccccagata tgggttccac	5940
agtgttcaact gcccgtgtt gctgaacaaa ggggggattt catcccaagag ctccgggtcc	6000
ttttgggtac actgtcaaga taaaatggat actggccctt ctctgaccac ttgcagagct	6060
ctgggcctt gtgggtacac tgctaaagata aatggatata tggcccttcctt ctatccact	6120
gcgtacatc tgggtacagg aatccattac tgaaaaaaacc aggggtttagg agcagggagg	6180
tagtggcgtt gctgaatgtc ttggcgacta accaatgaat accagagttt ggatctctag	6240
aatacttttta aaatctgggt gggcagatgt gcttcctgt aatcccaagaa ctggggaggc	6300
ggagacagg aatcatcaga gcaaaacttgc taaccagaat agcaaaacac tgagctctgg	6360
gtctgtgtt gatcttgcctt ttaacatata agagagagaa taaaacattt aagaagacag	6420
tagatgcctt ttttaaagccc ccacatgcac attggacaatgt tggcgttta acacacat	6480
gcactcatgt gaaccaggca tgcacactcg ggcttatcac acacataatt taaaagagag	6540
agtgtggagag gagatgtcact attagatgtt acaggaaatgt gtgagtgtc acacccatgc	6600
acacagacat gtgtgcagg gatgtggaaa ggagcctggg ttgtgtata agagggagcc	6660
atcatgtt tctaaggagg gctgtgttggatggcgttgtt gtgggttggg actggagcat	6720
gtttgttaat gggatgtcctc ctgtggggaa agggggatggc gggccacctg cagagggtcc	6780
cactgtccatc cgggatcgtt aaaagccctt gctgtttactt ttaggtataa gcccggagaga	6840
gaaaggtagg aaagtgggg gactccatc tctgtatgtt gaggatctgg gcaagtagag	6900
gtgcgtttaa ggttagaaaaa ggggtgcaga ggagatgttc ttaatctgg gtcagcgtt	6960
ttttccaaa taatgcctgtt gatgtggatggcgttggcatttactca ctcagcagaa	7020
ggatgtatgtt gcccggggaa tggcggatgttggcatttccctgg tctggaaagaa	7080
ctccatctt cagaaggaga tggatgttgc tttatggccatc cgggggtccaca ggtgttttgg	7140
gcccctgggg gactccatc actgggtat gtttacatc tggatgttgc tggccaggcac	7200
tggccctgggg ctttgttttctt gtttgcgttt ttttgcgtttt tttagacatgg actcttgc	7260
ttgtatgttgc tcaatcttgc aatcttacttgc tttatggccatc gttgtgttgc ttcagcagaa	7320
ggatgtatgtt ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	7380
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	7440
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	7500
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	7560
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	7620
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	7680
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	7740
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	7800
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	7860
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	7920
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	7980
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8040
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8100
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8160
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8220
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8280
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8340
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8400
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8460
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8520
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8580
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8640
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8700
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8760
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8820
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8880
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	8940
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	9000
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	9060
tttgcctctg ggggggggggatgggggtggatgggggtggatggggggatggggggatgggggg	9120

[0010]

[0011]

[0012]

[0013]

[0014]

acctggagct ggcagtggc agctgcagt atagatgtct gcaagaaaaga tctgaaaaga	27420
gggaggaga tgaaggaccc agaggaccac cgacctctgc tgccigacaa agctgcagga	27480
ccagtcctc ctacagatgg gagacagagg cgagagatga atggicaggg gaggagtcag	27540
agaaaaggaga gggtgaggca gagaccaaag gaggaaaca cttgtcgct acagctactg	27600
actgagtacc agctgcgtt cagacgcca atgccaaggc tcggctgtatc atggcaccc	27660
gtgggactcc tagccagtg ctggcagagg ggagtgcgtatc atggtgcatg gtttggat	27720
gatctgaatg tggtccagcc ctatgttcc tccagttgtt gggataaagc accctgacca	27780
aagctacttt ttgttgtt ttttgttggt tggttttcg aggccagggtt	27840
tctctgtatc acccttagtgc tcctggaaatcactctgtt accagggttgc ctcgaactc	27900
agaaatcccc ctgcctgtc ctcctaaatgt ctggattaaatggccctgc caccactgccc	27960
ggcccaaagc tacitaaaga gagagagagg aatgtataag tattataatt ccaggttata	28020
gttcattgtt gttagattgg agtcttcata ttccaggtaa tctccacacag acatgccaca	28080
aaacaaccc ttctacgaaa tcttcatgg actcccttc ccagtaattc taaactgtgt	28140
caaataatcaca agaaaatgtt acatgtcagc tctttaacatgtt ttttgttgc ttttgttgc	28200
ctcattgttca agtactggg agatggaaatc ttacatgtt gtcagcattt ggagcagagc	28260
ctttgtgtt tgtagatgtt ttttgtgtt ctccatgtt ccatactggg agagggggcc	28320
tggggagagac ccatacacc tttgtgttcc tatgttccatc gacgtgttcc ttgggaaatgt	28380
ctagcaagaa ggccttcctt ggatcacca ccacccgtca cctccagaaac tcagagccaa	28440
attaaactttt ctgttgtactt tcgtcaaaatc acatgtcggtc tgggttgtatc cactgtcaat	28500
ggggaaacaga ctggcttggg tggataactt gtacattgtt taatgttctatc aaatggaaat	28560
tccttatagat aaaaagaaaa tttagtggca cacatgtt ggccttggg gaggctggct	28620
tgttcccttcc cgaggagggtt ggcgtttaagg tggtaatgtt catgttgcata aatggggccaa	28680
tatatgaggg tctgggttca caagaaggcc tggtaatata aagactgtt aatggggccaa	28740
gtctggagaa ggtcaatcaca gagagtttcc caacttcgtt cccatcacaca cacacacacaca	28800
cacacacacaca cacacacacaca ccacaaatggg aaaaaggaaatc aaaaatctgtt	28860
gagcaatgtt agtactttttt attgttgtt gttgtgtgtt actctgtgtt ccatgttca	28920
tcttgccttcc tggatgttcc accctggatc aaaaatgtt cccttgcgttgcatacaacc aactctgttcc	28980
ctgtgtgttcc acgttttttctt taaagctgtt gtcgtgttcc ctgttagcat caggccagact	29040
tgcagccatc tacatatgtt cagccctgtt gtcgttccat ggtgtatgtt ctttcagaat	29100
ttcagaaatgtt catctgttgc tccaggatcc cctgtactt cccttgcgttcc cgaggccgtt	29160
gactctgttcc tggggggggaa gcaacgttcc tccctggggc aagtataaca ttttgttgc	29220
tcttcccttcc tggatgttcc accctggatc aaaaatgtt cccttgcgttgcatacaacc aactctgttcc	29280
ttctcccttcc tggatgttcc accctggatc aaaaatgtt cccttgcgttgcatacaacc aactctgttcc	29340
tttagacataa gctttggcctt attccccccatc tagcttttccat tttttttactt ctttcaaaacc	29400
attctgtgttcc ttccacatgtt tttagtgcctt ctcccttccat cctgttgc tttttcccttcc	29460
gagtcgcctt cagtcgttcc aggtgtatgtt tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	29520
tggatgttcc tggatgttcc accctggatc aaaaatgtt cccttgcgttgcatacaacc aactctgttcc	29580
ggggaaatccctt tttttttactt ctttcaaaacc aaaaaggagggg ttcagttgttcc agggggggcc	29640
ccatgggttca agaactgttcc acggatccatg gtgtatgttcc ctttccatcc aagcacttag	29700
gaggcaaaatgttcc aagggttccatc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	29760
tgctttagtgcgtt gtgtgtgttgcgtt gtgtgtgttgcgtt tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	29820
aaaatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	29880
tataccatgtt gtgtgtgttgcgtt tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	29940
tagacatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30000
cccttgcataatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30060
attctcaaaatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30120
tegacttccatc aaaggatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30180
gctcatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30240
caaaaggatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30300
tactttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30360
tggaaactgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30420
aagagatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30480
cccaaggatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30540
tctgttccatc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30600
ccttccatc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30660
gtggaaatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30720
aactgtatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30780
getttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30840
ccagccatc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30900
aacaggccatc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	30960
ttatctgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31020
cccatttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31080
ctatgttccatc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31140
aagggttccatc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31200
acttaatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31260
ccttccatc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31320
ttaaacatcttccatc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31380
cataaggatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31440
ctttagtgcgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31500
tggggccgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31560
tacaatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31620
actatgttccatc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31680
ccatggatgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31740
ttttagtgcgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31800
tactggccatc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31860
gaaactgttcc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	31920
ctggccatc tttttttactt ctttcaaaacc aactctgttcc	

[0015]

<210> 18

<211> 9301

<212> DNA
(212) 酸

〈213〉 智人

<400> 18

agaa gtcttt,

gaaa catggg
-att taaaaa

gctt taaaaa

<400> 18	
tagaggagaa gtctttgggg aggggtttgct ctgagcacac cccttccct ccctccgggg	60
ctggggaaaa catggggaccat gcccgtcccc agccctgtctc catggctgg catgaagcag	120
agaggggcttaaaaaaggcg accgtgtctc ggctggagac cagagcctgt gctacttgaa	180

[0016]

ggggcgtgc	cctcctctgg	ctggtaccat	gcagctccca	ctggccctgt	gtctcgctg	240
cctgctgta	cacacagcct	tccgtgttagt	ggagggccag	gggtggcagg	cgttcaaga	300
tgatgccacg	aaaatcatcc	ccgagctcg	agagtacccc	gagccctcac	cggagctgga	360
gaacaacaag	accatgaacc	ggggggagaa	cggaggccgg	cctccccacc	acccttttg	420
gaccaaagg	atgggttgg	ggagagaaat	ctttagaaaa	gatctctgggg	aggtttttag	480
aacttctt	tggggaggctt	ggaagactgg	gttagacc	gtgaagattt	ctggcctctg	540
ccagcactgg	tcgaggaaaca	gtctgcctg	gaggtggggg	aagaatggct	cgctgggtgca	600
gccttcaaat	tcaggcgcag	aggcatgagg	caacagacgc	ttgttagag	ccagggcagg	660
gaggacgctg	gggtgttgg	ggtagatggc	caggccatca	gaacaggc	aggggctcag	720
aaaagaaaag	gttcaagaag	atctccct	ggaatata	tgccacacgt	cagctgctgg	780
taccactgg	aaggaaaca	ggtttagggg	cctccatcc	acagaacagc	acctgtgggg	840
cacccggacac	tctatgtgg	ttgttgtgt	ccccaccaca	caagaccaca	tcatggaaatc	900
cccaggaggt	gaaccccccag	ctcgaaagg	aagaacagg	ttccaggcac	tcagtaactt	960
ggtagtgaga	agagctgagg	igtgttgc	ttgtatcca	actgcgaat	agccctgggt	1020
tgtgggggg	tgtgggggg	agatctcc	aaagcgttgg	ggggggaggc	cagagggca	1080
ccccgtcgt	gtgcatttgc	catggc	ccaggaggt	ggcacttgg	ggaatgggg	1140
ttttcgccac	agttttagcc	cctgacatgg	gtcagctga	gtccaggccc	tggaggggg	1200
agcagcatcc	tctgtgcagg	agtagggaca	tctgtctca	gcagccaccc	cagtcacaa	1260
cttgcctat	tccaggggag	ggagaaggaa	gaggaa	gggttcttgg	tcaggccigc	1320
acagagaagc	ccaggcgtaca	gtgtcatc	ggttataaa	ttggcaggaa	tcctgaggcc	1380
atggggcgt	ctgaaatgac	atttcagact	aagagttcc	ctgtctctg	gcccattatcc	1440
agttggcaga	gaagtcact	gcccacgtc	ctggacc	cccccccc	ccitcacaacc	1500
tgtgggact	atgggtgct	aaaaagg	actgcattgg	aggccagcc	ggaccctccg	1560
tcttcaaaat	ggaggacaag	ggccctcc	cccacagc	cccttcttgg	caaggtcagc	1620
tgggctccag	cgactcgtt	aaggcgttga	agaaacccaa	acacaaaat	tccaccttgc	1680
tggactcaca	cgagggca	cagccctga	ggaaggcaca	tgctcaaaac	aaagtcatga	1740
tctcagagg	aagtgcgtt	cctaggggc	cttattctga	aaagccgca	aatgccccct	1800
tcctggca	aatgcccccc	tgaccacaca	cacattcc	ccctgcagag	gtgaggatgc	1860
aaaccagccc	acagaccaga	aagcagcccc	agacgatgc	agtggccaca	tctccctgc	1920
tgtgttgc	tttcagagt	gggggtgggg	gttgcctt	ttgttgc	tctggtttgg	1980
tcttaagact	attttattt	cttcttgc	atttgc	tatccatgt	aaaccttttg	2040
gggtggact	gtactcaca	gacggcagg	tatttttttt	gttccaccc	atctaagcc	2100
accataggag	acatgttca	ggtgtgtc	ggggatcagg	ccaggcctcg	gagcccaatc	2160
tctgcgtcc	caggaggtat	caccatgagg	cgccccattca	gataacacag	aacaagaaat	2220
gtgcccagca	gagggccagg	tcaatgtt	tggcagctga	acctgttagt	tttgggtcag	2280
agtcagggc	ccctatgtt	ggaagaatgac	gacagttttt	ggggccctc	agctccatcc	2340
ccageccagg	cetccatgg	atgtcgaac	gecagac	cacttgc	ggagccaaaa	2400
gggtgtgg	ccccaggaa	ttgggtcc	ggatgc	ccagcc	ccagccat	2460
ttttcttgg	ctggccctca	gtatttctat	tgataatgg	gggggttgg	acactgcctt	2520
tgatccctt	caagtcata	gaatttctgt	cttgcatttgc	cccccttgc	tccctcgcc	2580
ccacagcage	tgcccttattt	ttttttttt	acttgc	tttgc	ttccatcccc	2640
gtccaccctt	cccaagttgg	tggaaaggaa	atttggg	aggcagag	aggcagaagg	2700
tgtgttgc	acttaccctg	cccaaggcc	ggacccttgc	gcacaatgt	gctttcagct	2760
ataagaagac	cccaagaaag	aatatgtat	aataatacat	aacagccgac	gctttcagct	2820
atatgttcca	aatgggtattt	tctgcatttgc	gtgtgtat	gattaactcg	caatgcgttgg	2880
ggcggccat	tttgcagaca	ggaagaagag	agaggtaa	gaaacttgc	aagatgacac	2940
ctgcagttag	cgatggagcc	cttgcgtttt	ttttttttt	tttttttttgc	tcgggggg	3000
cagggtgc	aggagatctt	tccaccatgt	ctagagc	tttttttttgc	tcgcaataga	3060
tgttcagg	caaaaccc	tggagacagg	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	3120
gacggccgg	tccaggccag	gggtggcc	gggggggg	acccacac	ggccctctt	3180
ccacagacgt	gtccgat	agctgcgtc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	3240
ggccgtgg	cageccaa	ccggcacc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	3300
cgcgcgtct	gcaccaac	atccgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	3360
tccgcgtcat	ccccggcc	taccgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	3420
aggccgcgg	cgccgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	3480
gtttccacaa	ccagtgg	ctcaaggact	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	3540
gccgaa	ccggcccc	ccggcacc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	3600
cctactag	cccgcc	cccccc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	3660
cccacattt	tgtcttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	3720
accaggc	gggggttgg	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	3780
ccctcagcc	cgccag	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	3840
cactgagca	ccggcccc	ccggcacc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	3900
aggcagaaat	ggaagat	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	3960
aaatgttcc	gactgtttaa	gaaatgtt	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	4020
cagaagac	ggccgttgc	caagacaa	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	4080
gttcttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	4140
ctcaatttcc	acttttgg	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	4200
ggcatatgt	tccaaggact	ccagtgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	4260
gaaagagaga	gaatgtat	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	4320
gagttgtat	gtcttctt	gacagccaa	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	4380
agagtctt	tatgttgc	atatttac	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	4440
ttcccagct	ggccccc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	4500
catcatccat	ttgggttagaa	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	4560
atccgc	acttccaa	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	4620
tcaccc	aagagaatgt	aaaggttca	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	4680
gccatcacaa	actcacac	cagcacatcc	tttttttttgc	tttttttttgc	tttttttttgc	4740

[0017]

cacggacaca tttctgccta gaaaacagct tcttactgct cttacatgtg atggcatatc	4800
ttacactaaa agaatattat tggggaaaa actacaagtg ctgtacatat gctgagaaac	4860
tgcagagcat aatacgcc accaaaaat cttttgaaa atcatttcca gacaaccctt	4920
tactttctgt gtagttttt attttttaaa aaaaaaaaggtt taaacagaa gcacatgaca	4980
tatgaaagcc tgcaggactg gtcgtttt tggattctt tccacgtggg acttgtccac	5040
aagaataaaa gtagtgggtt taaagagtt aagtacata ttatttctt cacttaagg	5100
atttatgca aagttttct ttagagaaat gacaatgtt atatgtttt atgaattaaac	5160
agtctgttct ccagagatc agagacattt taaataaaga caatgaatca tgaccgaaag	5220
gatgtggct cattttgtt acccacatc acgttcattt tgcataagg gacacccttc	5280
tcttggtcac tagagtcac accttggaca caccttgcac tgcctctgg tggcccttg	5340
ggcaattatg tcttccttgg aaaaatcatg titatccctt cttttccaaa cccagaccgc	5400
atttcttcac ccagggcatg gtaataaccc cagcttgcata tccttttagc agcctcccc	5460
ccatgtggc ttccaaatg ctgttctcat tgtatcactc ccctgtcaa aagccttca	5520
tagctcccc ttgcggagga tcaagtgca gttccatc tgcatacgga ggccttctc	5580
gcttgactcc cacccccc tccacaagg ttctactga ctccaaatgg tcatgcagat	5640
ccctgttcc ttagtttgc accacactt agacccccc ataactaactt cttttctt	5700
aggattcaca ttacttgtca tctttcccc taaccttcca gagatgttcc aatctccat	5760
gatcccttc tccctgtgagg ttccagcccc tttgtctac accactactt tggttctaa	5820
ttctgtttt catttgacag tcattcatgg aggaccagcc tggccaaatgc ctgcttagt	5880
ctggcataga caacacaaag ccaactacaa tccaggacca gtcacaggaa aacttcatc	5940
tcttgcgaaat gtggatttgc tgcctctgg ttagaaatgtt aagatgttca aaagtggcc	6000
agcccttc accticctca aactgttgc tcccaagggt gtcttaatag tgctggatgc	6060
tagctgatgtt agcatcttca gatgaagagt aaccctaaag ttactttca gttggccctaa	6120
ggtgggatgg tcaactggaa agctttaat taagtccagg ctaccctggg ggaacccacc	6180
ccacacaaaga aagctggatgg cccttctgtt gacttgcac tttactacc aataacccac	6240
tttgaattaaat catcatcattt aagtttgc ttagtgttgc tgggttgc tggccgttcc	6300
cttcctggg ctccagggcc cggaggaggcc tcagtgagcc ctgcagaaaa atccatgc	6360
catgagtgc tcagggccca gaataatgaga gcaggttagga aacagagaca tttccatcc	6420
ctgagaggca gtgcggtcca gtgggtgggg acacgggctc tgggtcagggt ttgtgttgc	6480
tgtttgttgc ttgtggagaca gactgttgc tttatggccca ggctggagggt cagtgca	6540
acttcggctt actgeaactt ctgccttccc ggatgttgc tttatggccca ctcagccctc	6600
cagatgttgc gggatttgc acacttttgc tttatggccca tttatggccca tttatggccca	6660
agagacgggg tttacccatg ttggccaggc tagtctcgaa ctcttgcactt caagtgtatc	6720
gcctgcctcg gcctccaaa gtgttggat tacaggcgtg agccaccaca cccagcccca	6780
ggttgggtt tgaatcttgc gagacttgc cacaagggg tttatggccca tttatggccca	6840
catacttggg ctcaatgc tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	6900
acatggccaa taaccaggc acacttttgc tttatggccca tttatggccca tttatggccca	6960
agtaatttgc tctgtgggg ggttggggg tagtgggttgc gttttttttt aaaaatgggg	7020
tgttgttgc agattttca ggttggggg ggggttgc gttttttttt aaaaatgggg	7080
caaagacttc aagtttgc tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	7140
taccggatcc ttgcatgttca gttttttttt tttatggccca tttatggccca tttatggccca	7200
aaaccttagg tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	7260
cccattacca cggggggaa aaaaatggggg tagtgggttgc gttttttttt aaaaatgggg	7320
tttatggaaa gttttttttt tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	7380
gaacaaacaa cagacccatgg tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	7440
ttcttgggggtt acagccatgg tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	7500
gggatggaaat gaaatggggg tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	7560
tctctcacac acacacacac acacacacac acgttgcata gttttttttt aaaaatgggg	7620
gttacaaatca gggccatctt acacacacac acgttgcata gttttttttt aaaaatgggg	7680
ggaccccaaaa attttttttt tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	7740
ctcagctatt gggcgtttt gttttttttt tttatggccca tttatggccca tttatggccca	7800
aggcaggggg atatttgc tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	7860
tcgttttacac ctgttgcata tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	7920
gaccaatctt gggcgtttt tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	7980
gctgttgcata tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8040
gagggttgcata tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8100
acaaaatattt gttttttttt tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8160
acaggagaat ggtttttttt tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8220
ccctccatcc ctgttgcata tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8280
actgttgcata tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8340
cagccatcc tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8400
aaatgttgcata tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8460
gagagactaa attttttttt tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8520
atgcccattt tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8580
agttttttttt tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8640
gagatggaaat gttttttttt tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8700
ttgttgcata tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8760
aaggagagggtt tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8820
gactgttgcata tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8880
ggagccatcc tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	8940
ataaacattt tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	9000
agttttttttt tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	9060
ggagccatcc tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	9120
ggagccatcc tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	9180
ataaacattt tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	9240
agcatatata tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca tttatggccca	9300

[0018]

c	9301
<210> 19 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 19 ccggagctgg agaacaacaa g	21
<210> 20 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 20 gcactggccg gagcacacc	19
<210> 21 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 21 aggccaacct cgagaagatg acc	23
<210> 22 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 22 gaagtccagg gcgacgtgc a	21
<210> 23 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 23 aagcttggta ccatgcagct cccac	25
<210> 24 <211> 50 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 24 aagcttctac ttgtcatcgt cgtccttgta gtcgttaggcgt ttctccagct	50
<210> 25 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	

[0019]

<400> 25 gcactggccg gagcacacc	19
<210> 26 <211> 39 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 26 gtcgtcggat ccatgggtg gcaggcggtc aagaatgtat	39
<210> 27 <211> 57 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 27 gtcgtaaagc ttctacttgt catcgccctt gtagtcgtag gctttctcca gtcggc	57
<210> 28 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 28 gacttggatc ccaggggtgg caggcggtc	29
<210> 29 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 29 agcataagct tcttagtaggc gttctccag	29
<210> 30 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 30 gacttggatc cgaaggaaaa aagaaaagg	29
<210> 31 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 31 agcataagct ttatccaa atcgatgg	29
<210> 32 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	

[0020]

<400> 32 actacgagct cggcccccacc acccatcaac aag	33
<210> 33 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 33 acttagaagg tttcagtcct cagccccctc ttcc	34
<210> 34 <211> 66 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 34 aatctggatc cataacttcg tatagcatac attatacgaa gttatctgca ggattcgagg gccctt	60 66
<210> 35 <211> 82 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 35 aatctgaatt ccacccgtgt taatcaaata acttcgtata atgtatgcta tacgaagttt tagatctaga gtcagcttca ga	60 82
<210> 36 <211> 62 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 36 attttaggtga cactatagaa ctgcggcgc tgaagcttaa ccacatgggt gctcacaacc at	60 62
<210> 37 <211> 54 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 37 aacgacggcc agtgaatccg taatcatggt catgctgccg ggtggaggag ggca	54
<210> 38 <211> 31 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 用于PCR的引物	
<400> 38 attaccacccg gtgacaccccg cttcctgaca g	31
<210> 39 <211> 61 <212> DNA	

[0021]

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于PCR的引物

<400> 39

attacttaat taaacatggc gcgcataatg gccggccctt aattgcggcg catcgtaat
t

60

61

<210> 40

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于PCR的引物

<400> 40

attacggccg gcccgaagg aattcaagat ctga

34

<210> 41

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于PCR的引物

<400> 41

attacggcgc gcccctcaca ggccgcaccc agct

34

<210> 42

<211> 184

<212> PRT

<213> 智人

<400> 42

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

<210> 43

<211> 267

<212> PRT

<213> 智人

<400> 43

Met	His	Leu	Leu	Leu	Phe	Gln	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Gly	Lys
1					5				10			15			
Thr	Thr	Arg	His	Gln	Asp	Gly	Arg	Gln	Asn	Gln	Ser	Ser	Leu	Ser	Pro
						20		25			30				
Val	Leu	Leu	Pro	Arg	Asn	Gln	Arg	Glu	Leu	Pro	Thr	Gly	Asn	His	Glu
						35		40			45				
Glu	Ala	Glu	Glu	Lys	Pro	Asp	Leu	Phe	Val	Ala	Val	Pro	His	Leu	Val

[0022]

50 55 60
 Ala Thr Ser Pro Ala Gly Glu Gly Gln Arg Gln Arg Glu Lys Met Leu
 65 70 75 80
 Ser Arg Phe Gly Arg Phe Trp Lys Lys Pro Glu Arg Glu Met His Pro
 85 90 95
 Ser Arg Asp Ser Asp Ser Glu Pro Phe Pro Pro Gly Thr Gln Ser Leu
 100 105 110
 Ile Gln Pro Ile Asp Gly Met Lys Met Glu Lys Ser Pro Leu Arg Glu
 115 120 125
 Glu Ala Lys Lys Phe Trp His His Phe Met Phe Arg Lys Thr Pro Ala
 130 135 140
 Ser Gln Gly Val Ile Leu Pro Ile Lys Ser His Glu Val His Trp Glu
 145 150 155 160
 Thr Cys Arg Thr Val Pro Phe Ser Gln Thr Ile Thr His Glu Gly Cys
 165 170 175
 Glu Lys Val Val Gln Asn Asn Leu Cys Phe Gly Lys Cys Gly Ser
 180 185 190
 Val His Phe Pro Gly Ala Ala Gln His Ser His Thr Ser Cys Ser His
 195 200 205
 Cys Leu Pro Ala Lys Phe Thr Thr Met His Leu Pro Leu Asn Cys Thr
 210 215 220
 Glu Leu Ser Ser Val Ile Lys Val Val Met Leu Val Glu Glu Cys Gln
 225 230 235 240
 Cys Lys Val Lys Thr Glu His Glu Asp Gly His Ile Leu His Ala Gly
 245 250 255
 Ser Gln Asp Ser Phe Ile Pro Gly Val Ser Ala
 260 265

<210> 44
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 44
 Met Leu Arg Val Leu Val Gly Ala Val Leu Pro Ala Met Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Pro Pro Pro Ile Asn Lys Leu Ala Leu Phe Pro Asp Lys Ser Ala
 20 25 30
 Trp Cys Glu Ala Lys Asn Ile Thr Gln Ile Val Gly His Ser Gly Cys
 35 40 45
 Glu Ala Lys Ser Ile Gln Asn Arg Ala Cys Leu Gly Gln Cys Phe Ser
 50 55 60
 Tyr Ser Val Pro Asn Thr Phe Pro Gln Ser Thr Glu Ser Leu Val His
 65 70 75 80
 Cys Asp Ser Cys Met Pro Ala Gln Ser Met Trp Glu Ile Val Thr Leu
 85 90 95
 Glu Cys Pro Gly His Glu Glu Val Pro Arg Val Asp Lys Leu Val Glu
 100 105 110
 Lys Ile Leu His Cys Ser Cys Gln Ala Cys Gly Lys Glu Pro Ser His
 115 120 125
 Glu Gly Leu Ser Val Tyr Val Gln Gly Glu Asp Gly Pro Gly Ser Gln
 130 135 140
 Pro Gly Thr His Pro His Pro His Pro His Pro Gly Gly Gln
 145 150 155 160
 Thr Pro Glu Pro Glu Asp Pro Pro Gly Ala Pro His Thr Glu Glu Glu
 165 170 175
 Gly Ala Glu Asp
 180

<210> 45
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(639)

<400> 45
 atg cag ctc cca ctg gcc ctg tgt ctc gtc tgc ctg ctg gta cac aca 48
 Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr
 1 5 10 15

gcc ttc cgt gta gtg gag ggc cag ggg tgg cag gcg ttc aag aat gat 96
 Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
 20 25 30

gcc acg gaa atc atc ccc gag ctc gga gag tac ccc gag cct cca ccg Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro 35 40 45	144
gag ctg gag aac aac aag acc atg aac cgg gcg gag aac gga ggg cgg Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg 50 55 60	192
cct ccc cac cac ccc ttt gag acc aaa gac gtg tcc gag tac agc tgc Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys 65 70 75 80	240
cgc gag ctg cac ttc acc cgc tac gtg acc gat ggg cgg tgc cgc agc Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser 85 90 95	288
gcc aag ccg gtc acc gag ctg gtg tgc tcc ggc cag tgc ggc ccg gcg Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala 100 105 110	336
cgc ctg ctg ccc aac gcc atc ggc cgc ggc aag tgg tgg cga cct agt Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser 115 120 125	384
ggg ccc gac ttc cgc tgc atc ccc gac cgc tac cgc gcg cag cgc gtg Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val 130 135 140	432
cag ctg ctg tgt ccc ggt ggt gag ggc cgc cgc cgc aag gtg cgc Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg 145 150 155 160	480
ctg gtg gcc tcg tgc aag tgc aag cgc ctc acc cgc ttc cac aac cag Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln 165 170 175	528
tcg gag ctc aag gac ttc ggg acc gag gcc gct cgg ccg cag aag ggc Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly 180 185 190	576
cgg aag ccg cgg ccc cgc gcc cgg agc gcc aaa gcc aac cag gcc gag Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu 195 200 205	624
ctg gag aac gcc tac tag Leu Glu Asn Ala Tyr 210	642
<210> 46	
<211> 190	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 46	
Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu 1 5 10 15	
Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr 20 25 30	
Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg Pro Pro His His Pro Phe Glu 35 40 45	
Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys Arg Glu Leu His Phe Thr Arg 50 55 60	
Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu 65 70 75 80	
Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile 85 90 95	
Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile 100 105 110	
Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly 115 120 125	
Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys 130 135 140	
Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly 145 150 155 160	
Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala	

[0024]

Arg Ser Ala Lys	165	Ala Asn Gln Ala Glu	170	Leu Glu Asn Ala Tyr	175
	180		185		190

<210> 47
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu	1	5	10	15
Leu Gly Glu Tyr		20		

<210> 48
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro Glu	1	5	10	15
Leu Glu Asn Asn		20		

<210> 49
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

Pro Glu Pro Pro Pro Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala	1	5	10	15
Glu Asn Gly Gly		20		

<210> 50
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg Pro Pro His His Pro	1	5	10	15
Phe Glu Thr Lys		20		

<210> 51
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人

Arg Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser	1	5	10	15
---	---	---	----	----

<210> 52
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的人SOST肽片段

Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu	1	5	10	15
Leu Gly Glu Tyr Cys		20		

[0025]

<210> 53
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的人SOST肽片段

<400> 53
 Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro Glu
 1 5 10 15
 Leu Glu Asn Asn Cys
 20

<210> 54
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的人SOST肽片段

<400> 54
 Pro Glu Pro Pro Pro Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala
 1 5 10 15
 Glu Asn Gly Gly Cys
 20

<210> 55
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的人SOST肽片段

<400> 55
 Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg Pro Pro His His Pro
 1 5 10 15
 Phe Glu Thr Lys Cys
 20

<210> 56
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的人SOST肽片段

<400> 56
 Arg Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser
 1 5 10 15
 Cys

<210> 57
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 大鼠

<400> 57
 Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp Ala Thr Glu Ile Ile Pro Gly
 1 5 10 15
 Leu Arg Glu Tyr Pro Glu Pro Pro
 20

<210> 58
 <211> 20

[0026]

<212> PRT
<213> Rattus morvegicus

<400> 58
Pro Glu Pro Pro Gln Glu Leu Glu Asn Asn Gln Thr Met Asn Arg Ala
1 5 10 15
Glu Asn Gly Gly
20

<210> 59
<211> 20
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 59
Glu Asn Gly Gly Arg Pro Pro His His Pro Tyr Asp Thr Lys Asp Val
1 5 10 15
Ser Glu Tyr Ser
20

<210> 60
<211> 20
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 60
Thr Glu Ile Ile Pro Gly Leu Arg Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Gln Glu
1 5 10 15
Leu Glu Asn Asn
20

<210> 61
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 添加了额外半胱氨酸的大鼠SOST肽片段

<400> 61
Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp Ala Thr Glu Ile Ile Pro Gly
1 5 10 15
Leu Arg Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Cys
20 25

<210> 62
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 添加了额外半胱氨酸的大鼠SOST肽片段

<400> 62
Pro Glu Pro Pro Gln Glu Leu Glu Asn Asn Gln Thr Met Asn Arg Ala
1 5 10 15
Glu Asn Gly Gly Cys
20

<210> 63
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 添加了额外半胱氨酸的大鼠SOST肽片段

<400> 63
Glu Asn Gly Gly Arg Pro Pro His His Pro Tyr Asp Thr Lys Asp Val
1 5 10 15
Ser Glu Tyr Ser Cys

[0027]

20

<210> 64
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的大鼠SOST肽片段

<400> 64
 Thr Glu Ile Ile Pro Gly Leu Arg Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Gln Glu
 1 5 10 15
 Leu Glu Asn Asn Cys
 20

<210> 65
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> 大鼠

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

<210> 66
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 66
 Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val Gln Leu Leu Cys Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Glu Ala Pro
 20

<210> 67
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 67
 Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg
 1 5 10 15
 Leu Val Ala Ser
 20

<210> 68
 <211> 21

[0028]

<212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的人SOST肽片段

<400> 68
 Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val Gln Leu Leu Cys Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Glu Ala Pro Cys
 20

<210> 69
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的人SOST肽片段

<400> 69
 Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg
 1 5 10 15
 Leu Val Ala Ser Cys
 20

<210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 大鼠

<400> 70
 Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val Gln Leu Leu Cys Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly

<210> 71
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 大鼠

<400> 71
 Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ser Arg Lys Val Arg Leu Val Ala Ser
 1 5 10 15

<210> 72
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的大鼠SOST肽片段

<400> 72
 Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val Gln Leu Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Cys

<210> 73
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的大鼠SOST肽片段

<400> 73
 Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ser Arg Lys Val Arg Leu Val Ala Ser
 1 5 10 15

[0029]

Cys

<210> 74
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 74
 Cys Gly Pro Ala Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp
 1 5 10 15
 Trp Arg Pro Ser
 20

<210> 75
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 75
 Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser Gly Pro Asp Phe Arg Cys
 1 5 10 15

<210> 76
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 大鼠

<400> 76
 Pro Asn Ala Ile Gly Arg Val Lys Trp Trp Arg Pro Asn Gly Pro Asp
 1 5 10 15
 Phe Arg

<210> 77
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的大鼠SOST肽片段

<400> 77
 Pro Asn Ala Ile Gly Arg Val Lys Trp Trp Arg Pro Asn Gly Pro Asp
 1 5 10 15
 Phe Arg Cys

<210> 78
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 78
 Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly
 1 5 10 15
 Thr Glu Ala Ala
 20

<210> 79
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 79
 Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly Arg
 1 5 10 15
 Lys Pro Arg Pro
 20

[0030]

<210> 80
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 80
 Arg Pro Gln Lys Gly Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys
 1 5 10 15
 Ala Asn Gln Ala
 20

<210> 81
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 81
 Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu Leu Glu Asn Ala Tyr
 1 5 10 15

<210> 82
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的人SOST肽片段

<400> 82
 Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly
 1 5 10 15
 Thr Glu Ala Ala Cys
 20

<210> 83
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的人SOST肽片段

<400> 83
 Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly Arg
 1 5 10 15
 Lys Pro Arg Pro Cys
 20

<210> 84
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的人SOST肽片段

<400> 84
 Arg Pro Gln Lys Gly Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys
 1 5 10 15
 Ala Asn Gln Ala Cys
 20

<210> 85
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的人SOST肽片段

[0031]

<400> 85
 Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu Leu Glu Asn Ala Tyr
 1 5 10 15
 Cys

<210> 86
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 大鼠

<400> 86
 Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly
 1 5 10 15
 Pro Glu Thr Ala Arg Pro Gln
 20

<210> 87
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 大鼠

<400> 87
 Lys Gly Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln
 1 5 10 15
 Ala Glu Leu Glu Asn Ala Tyr
 20

<210> 88
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 大鼠

<400> 88
 Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu Thr Ala Arg Pro Gln Lys Gly
 1 5 10 15
 Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg
 20

<210> 89
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的大鼠SOST肽片段

<400> 89
 Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly
 1 5 10 15
 Pro Glu Thr Ala Arg Pro Gln Cys
 20

<210> 90
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 添加了额外半胱氨酸的大鼠SOST肽片段

<400> 90
 Lys Gly Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln
 1 5 10 15
 Ala Glu Leu Glu Asn Ala Tyr Cys
 20

<210> 91
 <211> 25
 <212> PRT

[0032]

<213> 人工序列

<220>

<223> 添加了额外半胱氨酸的大鼠SOST肽片段

<400> 91

Ser	Glu	Leu	Lys	Asp	Phe	Gly	Pro	Glu	Thr	Ala	Arg	Pro	Gln	Lys	Gly
1				5				10					15		
Arg	Lys	Pro	Arg	Pro	Arg	Ala	Arg	Cys							
				20				25							

<210> 92

<211> 56

<212> PRT

<213> 智人

<400> 92

Gln	Gly	Trp	Gln	Ala	Phe	Lys	Asn	Asp	Ala	Thr	Glu	Ile	Ile	Pro	Glu
1						5			10				15		
Leu	Gly	Glu	Tyr	Pro	Glu	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Glu	Asn	Asn	Lys	Thr
						20			25			30			
Met	Asn	Arg	Ala	Glu	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Pro	His	His	Pro	Phe	Glu
	35				40						45				
Thr	Lys	Asp	Val	Ser	Glu	Tyr	Ser								
	50				55										

<210> 93

<211> 56

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 93

Gln	Gly	Trp	Gln	Ala	Phe	Lys	Asn	Asp	Ala	Thr	Glu	Ile	Ile	Pro	Gly
1						5			10				15		
Leu	Arg	Glu	Tyr	Pro	Glu	Pro	Pro	Gln	Glu	Leu	Glu	Asn	Asn	Gln	Thr
						20			25			30			
Met	Asn	Arg	Ala	Glu	Asn	Gly	Gly	Arg	Pro	Pro	His	His	Pro	Tyr	Asp
	35				40						45				
Thr	Lys	Asp	Val	Ser	Glu	Tyr	Ser								
	50				55										

<210> 94

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 94

Cys	Ile	Pro	Asp	Arg	Tyr	Arg	Ala	Gln	Arg	Val	Gln	Leu	Leu	Cys	Pro
1						5			10				15		
Gly	Gly	Ala	Pro	Arg	Ala	Arg	Lys	Val	Arg	Leu	Val	Ala	Ser	Cys	
	20				25						30				

<210> 95

<211> 32

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 95

Cys	Ile	Pro	Asp	Arg	Tyr	Arg	Ala	Gln	Arg	Val	Gln	Leu	Leu	Cys	Pro
1						5			10				15		
Gly	Gly	Ala	Ala	Pro	Arg	Ser	Arg	Lys	Val	Arg	Leu	Val	Ala	Ser	Cys
	20				25						30				

<210> 96

<211> 44

<212> PRT

<213> 智人

<400> 96

Leu	Thr	Arg	Phe	His	Asn	Gln	Ser	Glu	Leu	Lys	Asp	Phe	Gly	Thr	Glu
1					5			10				15			

[0033]

Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser
 20 25 30
 Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu Leu Glu Asn Ala Tyr
 35 40

<210> 97
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> 大鼠

<400> 97
 Leu Thr Arg Phe His Asn Gln Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Pro Gln Lys Gly Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Gly
 20 25 30
 Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu Leu Glu Asn Ala Tyr
 35 40

<210> 98
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 98
 Cys Gly Pro Ala Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp
 1 5 10 15
 Trp Arg Pro Ser Gly Pro Asp Phe Arg Cys
 20 25

<210> 99
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 大鼠

<400> 99
 Cys Gly Pro Ala Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Val Lys Trp
 1 5 10 15
 Trp Arg Pro Asn Gly Pro Asp Phe Arg Cys
 20 25

<210> 100
 <211> 570
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 100
 cagggttgcg aggcttcaa gaatgtgcc acggaaatca tcccgagct cggagagta 60
 cccgagccctc caccggact ggagaacaac aagaccatga accggcgga gaacggagg 120
 cggcctcccc accacccctt tgagacaaa gacgtgtccg agtacagctg cccgagctg 180
 cacttcaccc gctacgtgac cgatggccg tgccgcagcg ccaagccgtt caccgagctg 240
 gtgtgctcg gccagtgcgg cccggcgcc ctgctccca acgcacatcg cccgcggcaag 300
 tggtgccgac ctatgggcc cgacttccgc tgcattcccg accgcatacg cgcgcagcgc 360
 gtgcagctgc tggtcccg tggtaggcgc ccgcgcgcgc gcaagggtgcg cctggtgcc 420
 tcgtcaagt gcaagcgcct caccgcgtt cacaaccagt cggagctcaa ggacttcgg 480
 accggccgcg ctggccgcga gaaggccgcg aagccgcggc cccgcggccg gagegcacaa 540
 gccaaccagg cggacttggaa gaacgcctac 570

<210> 101
 <211> 570
 <212> DNA
 <213> 大鼠

<400> 101
 cagggttgcg aaggcttcaa gaatgtgcc acagaaatca tcccgggact cagagagta 60
 ccagagccctc ctcaggaact agagaacaac cagaccatga accggccga gaacggagg 120
 agacccccc accatccca tgcacacaaa gacgtgtccg agtacagctg cccgagctg 180
 cactacaccc gcttcgtgac cgacggccg tgccgcagtg ccaagccgtt caccgagttg 240
 gtgtgctcg gccagtgcgg ccccgcgccg ctgctccca acgcacatcg gcgcgtgaag 300
 tggtgccgac cgaacggacc cgacttccgc tgcattcccg atgcatacg cgcgcagcgg 360
 gtgcagctgc tggtcccg cggcgccgcg ccgcgcgtcgc gcaagggtgcg tctggtgcc 420
 tcgtcaagt gcaagcgcct caccgcgtt cacaaccagt cggagctcaa ggacttcgg 480
 cctgagaccg cggccgcga gaagggtgcg aagccgcggc cccgcggccg gggagccaaa 540

[0034]

gccaaccagg cgagctggaa gaacgcctac

570

<210> 102
 <211> 532
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 102
 Met Thr Gln Leu Tyr Ile Tyr Ile Arg Leu Leu Gly Ala Tyr Leu Phe
 1 5 10 15
 Ile Ile Ser Arg Val Gln Gly Gln Asn Leu Asp Ser Met Leu His Gly
 20 25 30
 Thr Gly Met Lys Ser Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ser Glu Asn Gly Val
 35 40 45
 Thr Leu Ala Pro Glu Asp Thr Leu Pro Phe Leu Lys Cys Tyr Cys Ser
 50 55 60
 Gly His Cys Pro Asp Asp Ala Ile Asn Asn Thr Cys Ile Thr Asn Gly
 65 70 75 80
 His Cys Phe Ala Ile Ile Glu Glu Asp Asp Gln Gly Glu Thr Thr Leu
 85 90 95
 Ala Ser Gly Cys Met Lys Tyr Glu Gly Ser Asp Phe Gln Cys Lys Asp
 100 105 110
 Ser Pro Lys Ala Gln Leu Arg Arg Thr Ile Glu Cys Cys Arg Thr Asn
 115 120 125
 Leu Cys Asn Gln Tyr Leu Gln Pro Thr Leu Pro Pro Val Val Ile Gly
 130 135 140
 Pro Phe Phe Asp Gly Ser Ile Arg Trp Leu Val Leu Leu Ile Ser Met
 145 150 155 160
 Ala Val Cys Ile Ile Ala Met Ile Ile Phe Ser Ser Cys Phe Cys Tyr
 165 170 175
 Lys His Tyr Cys Lys Ser Ile Ser Ser Arg Arg Arg Tyr Asn Arg Asp
 180 185 190
 Leu Glu Gln Asp Glu Ala Phe Ile Pro Val Gly Glu Ser Leu Lys Asp
 195 200 205
 Leu Ile Asp Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Leu
 210 215 220
 Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Arg Gln Val
 225 230 235 240
 Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg Gly Glu
 245 250 255
 Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Ala Ser Trp Phe
 260 265 270
 Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His Glu Asn Ile
 275 280 285
 Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly Ser Trp Thr Gln
 290 295 300
 Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
 305 310 315 320
 Leu Lys Cys Ala Thr Leu Asp Thr Arg Ala Leu Leu Lys Leu Ala Tyr
 325 330 335
 Ser Ala Ala Cys Gly Leu Cys His Leu His Thr Glu Ile Tyr Gly Thr
 340 345 350
 Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn Ile
 355 360 365
 Leu Ile Lys Lys Asn Gly Ser Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
 370 375 380
 Val Lys Phe Asn Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Val Pro Leu Asn Thr
 385 390 395 400
 Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Ser
 405 410 415
 Leu Asn Lys Asn His Phe Gln Pro Tyr Ile Met Ala Asp Ile Tyr Ser
 420 425 430
 Phe Gly Leu Ile Ile Trp Glu Met Ala Arg Arg Cys Ile Thr Gly Gly
 435 440 445
 Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asn Met Val Pro Ser Asp
 450 455 460
 Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Val Val Cys Val Lys Arg Leu Arg
 465 470 475 480
 Pro Ile Val Ser Asn Arg Trp Asn Ser Asp Glu Cys Leu Arg Ala Val
 485 490 495
 Leu Lys Leu Met Ser Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser Arg Leu
 500 505 510
 Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Val Glu Ser Gln
 515 520 525
 Asp Val Lys Ile

[0035]

530

<210> 103
 <211> 502
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 103
 Met Leu Leu Arg Ser Ala Gly Lys Leu Asn Val Gly Thr Lys Lys Glu
 1 5 10 15
 Asp Gly Glu Ser Thr Ala Pro Thr Pro Arg Pro Lys Val Leu Arg Cys
 20 25 30
 Lys Cys His His Cys Pro Glu Asp Ser Val Asn Asn Ile Cys Ser
 35 40 45
 Thr Asp Gly Tyr Cys Phe Thr Met Ile Glu Glu Asp Asp Ser Gly Leu
 50 55 60
 Pro Val Val Thr Ser Gly Cys Leu Gly Leu Glu Gly Ser Asp Phe Gln
 65 70 75 80
 Cys Arg Asp Thr Pro Ile Pro His Gln Arg Arg Ser Ile Glu Cys Cys
 85 90 95
 Thr Glu Arg Asn Glu Cys Asn Lys Asp Leu His Pro Thr Leu Pro Pro
 100 105 110
 Leu Lys Asn Arg Asp Phe Val Asp Gly Pro Ile His His Arg Ala Leu
 115 120 125
 Leu Ile Ser Val Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Val Leu Ile Ile Leu
 130 135 140
 Phe Cys Tyr Phe Arg Tyr Lys Arg Gln Glu Thr Arg Pro Arg Tyr Ser
 145 150 155 160
 Ile Gly Leu Glu Gln Asp Glu Thr Tyr Ile Pro Pro Gly Glu Ser Leu
 165 170 175
 Arg Asp Leu Ile Glu Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu
 180 185 190
 Pro Leu Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Lys
 195 200 205
 Gln Ile Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg
 210 215 220
 Gly Glu Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser
 225 230 235 240
 Trp Phe Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His Glu
 245 250 255
 Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly Ser Trp
 260 265 270
 Thr Gln Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly Ser Leu Tyr
 275 280 285
 Asp Tyr Leu Lys Ser Thr Thr Leu Asp Ala Lys Ser Met Leu Lys Leu
 290 295 300
 Ala Tyr Ser Ser Val Ser Gly Leu Cys His Leu His Thr Glu Ile Phe
 305 310 315 320
 Ser Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys
 325 330 335
 Asn Ile Leu Val Lys Lys Asn Gly Thr Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly
 340 345 350
 Leu Ala Val Lys Phe Ile Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Ile Pro Pro
 355 360 365
 Asn Thr Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Pro Pro Glu Val Leu Asp
 370 375 380
 Glu Ser Leu Asn Arg Asn His Phe Gln Ser Tyr Ile Met Ala Asp Met
 385 390 395 400
 Tyr Ser Phe Gly Leu Ile Leu Trp Glu Val Ala Arg Arg Cys Val Ser
 405 410 415
 Gly Gly Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr His Asp Leu Val Pro
 420 425 430
 Ser Asp Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Ile Val Cys Ile Lys Lys
 435 440 445
 Leu Arg Pro Ser Phe Pro Asn Arg Trp Ser Ser Asp Glu Cys Leu Arg
 450 455 460
 Gln Met Gly Lys Leu Met Thr Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser
 465 470 475 480
 Arg Leu Thr Ala Leu Arg Val Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Ser Glu
 485 490 495
 Ser Gln Asp Ile Lys Leu
 500

<210> 104

[0036]

<211> 502
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 104
 Met Leu Leu Arg Ser Ala Gly Lys Leu Asn Val Gly Thr Lys Lys Glu
 1 5 10 15
 Asp Gly Glu Ser Thr Ala Pro Thr Pro Arg Pro Lys Val Leu Arg Cys
 20 25 30
 Lys Cys His His Cys Pro Glu Asp Ser Val Asn Asn Ile Cys Ser
 35 40 45
 Thr Asp Gly Tyr Cys Phe Thr Met Ile Glu Glu Asp Asp Ser Gly Leu
 50 55 60
 Pro Val Val Thr Ser Gly Cys Leu Gly Leu Glu Gly Ser Asp Phe Gln
 65 70 75 80
 Cys Arg Asp Thr Pro Ile Pro His Gln Arg Arg Ser Ile Glu Cys Cys
 85 90 95
 Thr Glu Arg Asn Glu Cys Asn Lys Asp Leu His Pro Thr Leu Pro Pro
 100 105 110
 Leu Lys Asn Arg Asp Phe Val Asp Gly Pro Ile His His Arg Ala Leu
 115 120 125
 Leu Ile Ser Val Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Val Leu Ile Ile Leu
 130 135 140
 Phe Cys Tyr Phe Arg Tyr Lys Arg Gln Glu Thr Arg Pro Arg Tyr Ser
 145 150 155 160
 Ile Gly Leu Glu Gln Asp Glu Thr Tyr Ile Pro Pro Gly Glu Ser Leu
 165 170 175
 Arg Asp Leu Ile Glu Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu
 180 185 190
 Pro Leu Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Lys
 195 200 205
 Gln Ile Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg
 210 215 220
 Gly Glu Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser
 225 230 235 240
 Trp Phe Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His Glu
 245 250 255
 Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly Ser Trp
 260 265 270
 Thr Gln Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly Ser Leu Tyr
 275 280 285
 Asp Tyr Leu Lys Ser Thr Thr Leu Asp Ala Lys Ser Met Leu Lys Leu
 290 295 300
 Ala Tyr Ser Ser Val Ser Gly Leu Cys His Leu His Thr Glu Ile Phe
 305 310 315 320
 Ser Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys
 325 330 335
 Asn Ile Leu Val Lys Lys Asn Gly Thr Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly
 340 345 350
 Leu Ala Val Lys Phe Ile Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Ile Pro Pro
 355 360 365
 Asn Thr Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Pro Pro Glu Val Leu Asp
 370 375 380
 Glu Ser Leu Asn Arg Asn His Phe Gln Ser Tyr Ile Met Ala Asp Met
 385 390 395 400
 Tyr Ser Phe Gly Leu Ile Leu Trp Glu Val Ala Arg Arg Cys Val Ser
 405 410 415
 Gly Gly Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr His Asp Leu Val Pro
 420 425 430
 Ser Asp Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Ile Val Cys Ile Lys Lys
 435 440 445
 Leu Arg Pro Ser Phe Pro Asn Arg Trp Ser Ser Asp Glu Cys Leu Arg
 450 455 460
 Gln Met Gly Lys Leu Met Thr Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser
 465 470 475 480
 Arg Leu Thr Ala Leu Arg Val Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Ser Glu
 485 490 495
 Ser Gln Asp Ile Lys Leu
 500

<210> 105
 <211> 532
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 105
 Met Thr Gln Leu Tyr Thr Tyr Ile Arg Leu Leu Gly Ala Cys Leu Phe
 1 5 10 15
 Ile Ile Ser His Val Gln Gly Gln Asn Leu Asp Ser Met Leu His Gly
 20 25 30
 Thr Gly Met Lys Ser Asp Val Asp Gln Lys Lys Pro Glu Asn Gly Val
 35 40 45
 Thr Leu Ala Pro Glu Asp Thr Leu Pro Phe Leu Lys Cys Tyr Cys Ser
 50 55 60
 Gly His Cys Pro Asp Asp Ala Ile Asn Asn Thr Cys Ile Thr Asn Gly
 65 70 75 80
 His Cys Phe Ala Ile Ile Glu Glu Asp Asp Gln Gly Glu Thr Thr Leu
 85 90 95
 Thr Ser Gly Cys Met Lys Tyr Glu Gly Ser Asp Phe Gln Cys Lys Asp
 100 105 110
 Ser Pro Lys Ala Gln Leu Arg Arg Thr Ile Glu Cys Cys Arg Thr Asn
 115 120 125
 Leu Cys Asn Gln Tyr Leu Gln Pro Thr Leu Pro Pro Val Val Ile Gly
 130 135 140
 Pro Phe Phe Asp Gly Ser Val Arg Trp Leu Ala Val Leu Ile Ser Met
 145 150 155 160
 Ala Val Cys Ile Val Ala Met Ile Val Phe Ser Ser Cys Phe Cys Tyr
 165 170 175
 Lys His Tyr Cys Lys Ser Ile Ser Ser Arg Gly Arg Tyr Asn Arg Asp
 180 185 190
 Leu Glu Gln Asp Glu Ala Phe Ile Pro Val Gly Glu Ser Leu Lys Asp
 195 200 205
 Leu Ile Asp Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Leu
 210 215 220
 Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Arg Gln Val
 225 230 235 240
 Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg Gly Glu
 245 250 255
 Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser Trp Phe
 260 265 270
 Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His Glu Asn Ile
 275 280 285
 Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly Ser Trp Thr Gln
 290 295 300
 Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
 305 310 315 320
 Leu Lys Cys Ala Thr Leu Asp Thr Arg Ala Leu Leu Lys Leu Ala Tyr
 325 330 335
 Ser Ala Ala Cys Gly Leu Cys His Leu His Thr Glu Ile Tyr Gly Thr
 340 345 350
 Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn Ile
 355 360 365
 Leu Ile Lys Lys Asn Gly Ser Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
 370 375 380
 Val Lys Phe Asn Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Ile Pro Leu Asn Thr
 385 390 395 400
 Arg Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Ser
 405 410 415
 Leu Ser Lys Asn His Phe Gln Pro Tyr Ile Met Ala Asp Ile Tyr Ser
 420 425 430
 Phe Gly Leu Ile Ile Trp Glu Met Ala Arg Arg Cys Ile Thr Gly Gly
 435 440 445
 Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asn Met Val Pro Ser Asp
 450 455 460
 Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Val Val Cys Val Lys Arg Leu Arg
 465 470 475 480
 Pro Ile Val Ser Asn Arg Trp Asn Ser Asp Glu Cys Leu Arg Ala Val
 485 490 495
 Leu Lys Leu Met Ser Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser Arg Leu
 500 505 510
 Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Val Glu Ser Gln
 515 520 525
 Asp Val Lys Ile
 530

<210> 106

<211> 532

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 106
 Met Thr Gln Leu Tyr Thr Tyr Ile Arg Leu Leu Gly Ala Cys Leu Phe
 1 5 10 15
 Ile Ile Ser His Val Gln Gly Gln Asn Leu Asp Ser Met Leu His Gly
 20 25 30
 Thr Gly Met Lys Ser Asp Val Asp Gln Lys Pro Glu Asn Gly Val
 35 40 45
 Thr Leu Ala Pro Glu Asp Thr Leu Pro Phe Leu Lys Cys Tyr Cys Ser
 50 55 60
 Gly His Cys Pro Asp Asp Ala Ile Asn Asn Thr Cys Ile Thr Asn Gly
 65 70 75 80
 His Cys Phe Ala Ile Ile Glu Glu Asp Asp Gln Gly Glu Thr Thr Leu
 85 90 95
 Thr Ser Gly Cys Met Lys Tyr Glu Gly Ser Asp Phe Gln Cys Lys Asp
 100 105 110
 Ser Pro Lys Ala Gln Leu Arg Arg Thr Ile Glu Cys Cys Arg Thr Asn
 115 120 125
 Leu Cys Asn Gln Tyr Leu Gln Pro Thr Leu Pro Pro Val Val Ile Gly
 130 135 140
 Pro Phe Phe Asp Gly Ser Val Arg Trp Leu Ala Val Leu Ile Ser Met
 145 150 155 160
 Ala Val Cys Ile Val Ala Met Ile Val Phe Ser Ser Cys Phe Cys Tyr
 165 170 175
 Lys His Tyr Cys Lys Ser Ile Ser Ser Arg Gly Arg Tyr Asn Arg Asp
 180 185 190
 Leu Glu Gln Asp Glu Ala Phe Ile Pro Val Gly Glu Ser Leu Lys Asp
 195 200 205
 Leu Ile Asp Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Leu
 210 215 220
 Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Arg Gln Val
 225 230 235 240
 Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg Gly Glu
 245 250 255
 Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser Trp Phe
 260 265 270
 Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His Glu Asn Ile
 275 280 285
 Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly Ser Trp Thr Gln
 290 295 300
 Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
 305 310 315 320
 Leu Lys Cys Ala Thr Leu Asp Thr Arg Ala Leu Leu Lys Leu Ala Tyr
 325 330 335
 Ser Ala Ala Cys Gly Leu Cys His Leu His Thr Glu Ile Tyr Gly Thr
 340 345 350
 Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn Ile
 355 360 365
 Leu Ile Lys Lys Asn Gly Ser Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
 370 375 380
 Val Lys Phe Asn Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Ile Pro Leu Asn Thr
 385 390 395 400
 Arg Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Ser
 405 410 415
 Leu Ser Lys Asn His Phe Gln Pro Tyr Ile Met Ala Asp Ile Tyr Ser
 420 425 430
 Phe Gly Leu Ile Ile Trp Glu Met Ala Arg Arg Cys Ile Thr Gly Gly
 435 440 445
 Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asn Met Val Pro Ser Asp
 450 455 460
 Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Val Val Cys Val Lys Arg Leu Arg
 465 470 475 480
 Pro Ile Val Ser Asn Arg Trp Asn Ser Asp Glu Cys Leu Arg Ala Val
 485 490 495
 Leu Lys Leu Met Ser Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser Arg Leu
 500 505 510
 Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Val Glu Ser Gln
 515 520 525
 Asp Val Lys Ile
 530

<210> 107

<211> 532

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 107
 Met Thr Gln Leu Tyr Thr Tyr Ile Arg Leu Leu Gly Ala Cys Leu Phe
 1 5 10 15
 Ile Ile Ser His Val Gln Gly Gln Asn Leu Asp Ser Met Leu His Gly
 20 25 30
 Thr Gly Met Lys Ser Asp Val Asp Gln Lys Lys Pro Glu Asn Gly Val
 35 40 45
 Thr Leu Ala Pro Glu Asp Thr Leu Pro Phe Leu Lys Cys Tyr Cys Ser
 50 55 60
 Gly His Cys Pro Asp Asp Ala Ile Asn Asn Thr Cys Ile Thr Asn Gly
 65 70 75 80
 His Cys Phe Ala Ile Ile Glu Glu Asp Asp Gln Gly Glu Thr Thr Leu
 85 90 95
 Thr Ser Gly Cys Met Lys Tyr Glu Gly Ser Asp Phe Gln Cys Lys Asp
 100 105 110
 Ser Pro Lys Ala Gln Leu Arg Arg Thr Ile Glu Cys Cys Arg Thr Asn
 115 120 125
 Leu Cys Asn Gln Tyr Leu Gln Pro Thr Leu Pro Pro Val Val Ile Gly
 130 135 140
 Pro Phe Phe Asp Gly Ser Val Arg Trp Leu Ala Val Leu Ile Ser Met
 145 150 155 160
 Ala Val Cys Ile Val Ala Met Ile Val Phe Ser Ser Cys Phe Cys Tyr
 165 170 175
 Lys His Tyr Cys Lys Ser Ile Ser Ser Arg Gly Arg Tyr Asn Arg Asp
 180 185 190
 Leu Glu Gln Asp Glu Ala Phe Ile Pro Val Gly Glu Ser Leu Lys Asp
 195 200 205
 Leu Ile Asp Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Leu
 210 215 220
 Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Arg Gln Val
 225 230 235 240
 Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg Gly Glu
 245 250 255
 Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser Trp Phe
 260 265 270
 Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His Glu Asn Ile
 275 280 285
 Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly Ser Trp Thr Gln
 290 295 300
 Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
 305 310 315 320
 Leu Lys Cys Ala Thr Leu Asp Thr Arg Ala Leu Leu Lys Leu Ala Tyr
 325 330 335
 Ser Ala Ala Cys Gly Leu Cys His Leu His Thr Glu Ile Tyr Gly Thr
 340 345 350
 Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn Ile
 355 360 365
 Leu Ile Lys Lys Asn Gly Ser Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
 370 375 380
 Val Lys Phe Asn Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Ile Pro Leu Asn Thr
 385 390 395 400
 Arg Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Ser
 405 410 415
 Leu Ser Lys Asn His Phe Gln Pro Tyr Ile Met Ala Asp Ile Tyr Ser
 420 425 430
 Phe Gly Leu Ile Ile Trp Glu Met Ala Arg Arg Cys Ile Thr Gly Gly
 435 440 445
 Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asn Met Val Pro Ser Asp
 450 455 460
 Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Val Val Cys Val Lys Arg Leu Arg
 465 470 475 480
 Pro Ile Val Ser Asn Arg Trp Asn Ser Asp Glu Cys Leu Arg Ala Val
 485 490 495
 Leu Lys Leu Met Ser Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser Arg Leu
 500 505 510
 Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Val Glu Ser Gln
 515 520 525
 Asp Val Lys Ile
 530

<210> 108

<211> 502

<212> PRT

<213> 智人

<400> 108
Met Leu Leu Arg Ser Ala Gly Lys Leu Asn Val Gly Thr Lys Lys Glu
1 5 10 15
Asp Gly Glu Ser Thr Ala Pro Thr Pro Arg Pro Lys Val Leu Arg Cys
20 25 30
Lys Cys His His Cys Pro Glu Asp Ser Val Asn Ile Cys Ser
35 40 45
Thr Asp Gly Tyr Cys Phe Thr Met Ile Glu Glu Asp Asp Ser Gly Leu
50 55 60
Pro Val Val Thr Ser Gly Cys Leu Gly Leu Gly Ser Asp Phe Gln
65 70 75 80
Cys Arg Asp Thr Pro Ile Pro His Gln Arg Arg Ser Ile Glu Cys Cys
85 90 95
Thr Glu Arg Asn Glu Cys Asn Lys Asp Leu His Pro Thr Leu Pro Pro
100 105 110
Leu Lys Asn Arg Asp Phe Val Asp Gly Pro Ile His His Arg Ala Leu
115 120 125
Leu Ile Ser Val Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ile Ile Leu
130 135 140
Phe Cys Tyr Phe Arg Tyr Lys Arg Gln Glu Thr Arg Pro Arg Tyr Ser
145 150 155 160
Ile Gly Leu Glu Gln Asp Glu Thr Tyr Ile Pro Pro Gly Glu Ser Leu
165 170 175
Arg Asp Leu Ile Glu Gln Ser Gln Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu
180 185 190
Pro Leu Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Lys
195 200 205
Gln Ile Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg
210 215 220
Gly Glu Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser
225 230 235 240
Trp Phe Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His Glu
245 250 255
Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly Ser Trp
260 265 270
Thr Gln Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly Ser Leu Tyr
275 280 285
Asp Tyr Leu Lys Ser Thr Thr Leu Asp Ala Lys Ser Met Leu Lys Leu
290 295 300
Ala Tyr Ser Ser Val Ser Gly Leu Cys His Leu His Thr Glu Ile Phe
305 310 315 320
Ser Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys
325 330 335
Asn Ile Leu Val Lys Asn Gly Thr Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly
340 345 350
Leu Ala Val Lys Phe Ile Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Ile Pro Pro
355 360 365
Asn Thr Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Pro Pro Glu Val Leu Asp
370 375 380
Glu Ser Leu Asn Arg Asn His Phe Gln Ser Tyr Ile Met Ala Asp Met
385 390 395 400
Tyr Ser Phe Gly Leu Ile Leu Trp Glu Val Ala Arg Arg Cys Val Ser
405 410 415
Gly Gly Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr His Asp Leu Val Pro
420 425 430
Ser Asp Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Ile Val Cys Ile Lys Lys
435 440 445
Leu Arg Pro Ser Phe Pro Asn Arg Trp Ser Ser Asp Glu Cys Leu Arg
450 455 460
Gln Met Gly Lys Leu Met Thr Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser
465 470 475 480
Arg Leu Thr Ala Leu Arg Val Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Ser Glu
485 490 495
Ser Gln Asp Ile Lys Leu
500

<210> 109
<211> 502
<212> PRT
<213> 智人

<400> 109
Met Leu Leu Arg Ser Ala Gly Lys Leu Asn Val Gly Thr Lys Lys Glu
1 5 10 15
Asp Gly Glu Ser Thr Ala Pro Thr Pro Arg Pro Lys Val Leu Arg Cys

	20	25	30
Lys Cys His His His Cys Pro Glu Asp Ser Val Asn Asn Ile Cys Ser			
35	40	45	
Thr Asp Gly Tyr Cys Phe Thr Met Ile Glu Glu Asp Asp Ser Gly Leu			
50	55	60	
Pro Val Val Thr Ser Gly Cys Leu Gly Leu Glu Gly Ser Asp Phe Gln			
65	70	75	80
Cys Arg Asp Thr Pro Ile Pro His Gln Arg Arg Ser Ile Glu Cys Cys			
85	90	95	
Thr Glu Arg Asn Glu Cys Asn Lys Asp Leu His Pro Thr Leu Pro Pro			
100	105	110	
Leu Lys Asn Arg Asp Phe Val Asp Gly Pro Ile His His Arg Ala Leu			
115	120	125	
Leu Ile Ser Val Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Val Leu Ile Ile Leu			
130	135	140	
Phe Cys Tyr Phe Arg Tyr Lys Arg Gln Glu Thr Arg Pro Arg Tyr Ser			
145	150	155	160
Ile Gly Leu Glu Gln Asp Glu Thr Tyr Ile Pro Pro Gly Glu Ser Leu			
165	170	175	
Arg Asp Leu Ile Glu Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu			
180	185	190	
Pro Leu Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Lys			
195	200	205	
Gln Ile Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg			
210	215	220	
Gly Glu Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser			
225	230	235	240
Trp Phe Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His Glu			
245	250	255	
Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly Ser Trp			
260	265	270	
Thr Gln Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly Ser Leu Tyr			
275	280	285	
Asp Tyr Leu Lys Ser Thr Thr Leu Asp Ala Lys Ser Met Leu Lys Leu			
290	295	300	
Ala Tyr Ser Ser Val Ser Gly Leu Cys His Leu His Thr Glu Ile Phe			
305	310	315	320
Ser Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys			
325	330	335	
Asn Ile Leu Val Lys Lys Asn Gly Thr Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly			
340	345	350	
Leu Ala Val Phe Ile Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Ile Pro Pro			
355	360	365	
Asn Thr Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Pro Pro Glu Val Leu Asp			
370	375	380	
Glu Ser Leu Asn Arg Asn His Phe Gln Ser Tyr Ile Met Ala Asp Met			
385	390	395	400
Tyr Ser Phe Gly Leu Ile Leu Trp Glu Val Ala Arg Arg Cys Val Ser			
405	410	415	
Gly Gly Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr His Asp Leu Val Pro			
420	425	430	
Ser Asp Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Ile Val Cys Ile Lys Lys			
435	440	445	
Leu Arg Pro Ser Phe Pro Asn Arg Trp Ser Ser Asp Glu Cys Leu Arg			
450	455	460	
Gln Met Gly Lys Leu Met Thr Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser			
465	470	475	480
Arg Leu Thr Ala Leu Arg Val Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Ser Glu			
485	490	495	
Ser Gln Asp Ile Lys Leu			
500			

<210> 110
<211> 532
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 110
Met Thr Gln Leu Tyr Thr Tyr Ile Arg Leu Leu Gly Ala Cys Leu Phe
1 5 10 15
Ile Ile Ser His Val Gln Gly Gln Asn Leu Asp Ser Met Leu His Gly
20 25 30
Thr Gly Met Lys Ser Asp Val Asp Gln Lys Lys Pro Glu Asn Gly Val
35 40 45
Thr Leu Ala Pro Glu Asp Thr Leu Pro Phe Leu Lys Cys Tyr Cys Ser

50 55 60
 Gly His Cys Pro Asp Asp Ala Ile Asn Asn Thr Cys Ile Thr Asn Gly
 65 70 75 80
 His Cys Phe Ala Ile Ile Glu Glu Asp Asp Gln Gly Glu Thr Thr Leu
 85 90 95
 Thr Ser Gly Cys Met Lys Tyr Glu Gly Ser Asp Phe Gln Cys Lys Asp
 100 105 110
 Ser Pro Lys Ala Gln Leu Arg Arg Thr Ile Glu Cys Cys Arg Thr Asn
 115 120 125
 Leu Cys Asn Gln Tyr Leu Gln Pro Thr Leu Pro Pro Val Val Ile Gly
 130 135 140
 Pro Phe Phe Asp Gly Ser Val Arg Trp Leu Ala Val Leu Ile Ser Met
 145 150 155 160
 Ala Val Cys Ile Val Ala Met Ile Val Phe Ser Ser Cys Phe Cys Tyr
 165 170 175
 Lys His Tyr Cys Lys Ser Ile Ser Ser Arg Gly Arg Tyr Asn Arg Asp
 180 185 190
 Leu Glu Gln Asp Glu Ala Phe Ile Pro Val Gly Glu Ser Leu Lys Asp
 195 200 205
 Leu Ile Asp Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Leu
 210 215 220
 Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Arg Gln Val
 225 230 235 240
 Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg Gly Glu
 245 250 255
 Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser Trp Phe
 260 265 270
 Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His Glu Asn Ile
 275 280 285
 Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly Ser Trp Thr Gln
 290 295 300
 Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
 305 310 315 320
 Leu Lys Cys Ala Thr Leu Asp Thr Arg Ala Leu Leu Lys Leu Ala Tyr
 325 330 335
 Ser Ala Ala Cys Gly Leu Cys His Leu His Thr Glu Ile Tyr Gly Thr
 340 345 350
 Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn Ile
 355 360 365
 Leu Ile Lys Lys Asn Gly Ser Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
 370 375 380
 Val Lys Phe Asn Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Ile Pro Leu Asn Thr
 385 390 395 400
 Arg Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Ser
 405 410 415
 Leu Ser Lys Asn His Phe Gln Pro Tyr Ile Met Ala Asp Ile Tyr Ser
 420 425 430
 Phe Gly Leu Ile Ile Trp Glu Met Ala Arg Arg Cys Ile Thr Gly Gly
 435 440 445
 Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asn Met Val Pro Ser Asp
 450 455 460
 Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Val Val Cys Val Lys Arg Leu Arg
 465 470 475 480
 Pro Ile Val Ser Asn Arg Trp Asn Ser Asp Glu Cys Leu Arg Ala Val
 485 490 495
 Leu Lys Leu Met Ser Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser Arg Leu
 500 505 510
 Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Val Glu Ser Gln
 515 520 525
 Asp Val Lys Ile
 530

<210> 111

<211> 530

<212> PRT

<213> 智人

<400> 111

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

50	55	60
Thr Cys Tyr Gly Leu Trp Glu Lys Ser Lys Gly Asp Ile Asn Leu Val	70	75
65	85	90
Lys Gln Gly Cys Trp Ser His Ile Gly Asp Pro Gln Glu Cys His Tyr	95	
Glu Glu Cys Val Val Thr Thr Pro Pro Ser Ile Gln Asn Gly Thr	100	105
Tyr Arg Phe Cys Cys Cys Ser Thr Asp Leu Cys Asn Val Asn Phe Thr	110	
115	120	125
Glu Asn Phe Pro Pro Pro Asp Thr Thr Pro Leu Ser Pro Pro His Ser	130	135
140		
Phe Asn Arg Asp Glu Thr Ile Ile Ala Leu Ala Ser Val Ser Val	145	150
155		160
Leu Ala Val Leu Ile Val Ala Leu Cys Phe Gly Tyr Arg Met Leu Thr	165	170
175		
Gly Asp Arg Lys Gln Gly Leu His Ser Met Asn Met Met Glu Ala-Ala	180	185
190		
Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asp Leu Asp Asn Leu Lys Leu Leu Glu Leu	195	200
205		
Ile Gly Arg Gly Arg Tyr Gly Ala Val Tyr Lys Gly Ser Leu Asp Glu	210	215
220		
Arg Pro Val Ala Val Lys Val Phe Ser Phe Ala Asn Arg Gln Asn Phe	225	230
235		240
Ile Asn Glu Lys Asn Ile Tyr Arg Val Pro Leu Met Glu His Asp Asn	245	250
255		
Ile Ala Arg Phe Ile Val Gly Asp Glu Arg Val Thr Ala Asp Gly Arg	260	265
270		
Met Glu Tyr Leu Leu Val Met Glu Tyr Tyr Pro Asn Gly Ser Leu Cys	275	280
285		
Lys Tyr Leu Ser Leu His Thr Ser Asp Trp Val Ser Ser Cys Arg Leu	290	295
300		
Ala His Ser Val Thr Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His Thr Glu Leu Pro	305	310
320		
Arg Gly Asp His Tyr Lys Pro Ala Ile Ser His Arg Asp Leu Asn Ser	325	330
335		
Arg Asn Val Leu Val Lys Asn Asp Gly Thr Cys Val Ile Ser Asp Phe	340	345
350		
Gly Leu Ser Met Arg Leu Thr Gly Asn Arg Leu Val Arg Pro Gly Glu	355	360
365		
Glu Asp Asn Ala Ala Ile Ser Glu Val Gly Thr Ile Arg Tyr Met Ala	370	375
380		
Pro Glu Val Leu Glu Gly Ala Val Asn Leu Arg Asp Cys Glu Ser Ala	385	390
400		
Leu Lys Gln Val Asp Met Tyr Ala Leu Gly Leu Ile Tyr Trp Glu Ile	405	410
415		
Phe Met Arg Cys Thr Asp Leu Phe Pro Gly Glu Ser Val Pro Glu Tyr	420	425
430		
Gln Met Ala Phe Gln Thr Glu Val Gly Asn His Pro Thr Phe Glu Asp	435	440
445		
Met Gln Val Leu Val Ser Arg Glu Lys Gln Arg Pro Lys Phe Pro Glu	450	455
460		
Ala Trp Lys Glu Asn Ser Leu Ala Val Arg Ser Leu Lys Glu Thr Ile	465	470
480		
Glu Asp Cys Trp Asp Gln Asp Ala Glu Ala Arg Leu Thr Ala Gln Cys	485	490
495		
Ala Glu Glu Arg Met Ala Glu Leu Met Met Ile Trp Glu Arg Asn Lys	500	505
510		
Ser Val Ser Pro Thr Val Asn Pro Met Ser Thr Ala Met Gln Asn Glu	515	520
525		
Arg Arg	530	

<210> 112

<211> 530

<212> PRT

<213> 智人

<400> 112

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

50	55	60
Thr Cys Tyr Gly Leu Trp Glu Lys Ser Lys Gly Asp Ile Asn Leu Val	70	75
65		80
Lys Gln Gly Cys Trp Ser His Ile Gly Asp Pro Gln Glu Cys His Tyr	85	90
		95
Glu Glu Cys Val Val Thr Thr Pro Pro Ser Ile Gln Asn Gly Thr	100	105
		110
Tyr Arg Phe Cys Cys Cys Ser Thr Asp Leu Cys Asn Val Asn Phe Thr	115	120
		125
Glu Asn Phe Pro Pro Pro Asp Thr Thr Pro Leu Ser Pro Pro His Ser	130	135
		140
Phe Asn Arg Asp Glu Thr Ile Ile Ala Leu Ala Ser Val Ser Val	145	150
		155
Leu Ala Val Leu Ile Val Ala Leu Cys Phe Gly Tyr Arg Met Leu Thr	165	170
		175
Gly Asp Arg Lys Gln Gly Leu His Ser Met Asn Met Met Glu Ala Ala	180	185
		190
Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asp Leu Asp Asn Leu Lys Leu Leu Glu Leu	195	200
		205
Ile Gly Arg Gly Arg Tyr Gly Ala Val Tyr Lys Gly Ser Leu Asp Glu	210	215
		220
Arg Pro Val Ala Val Lys Val Phe Ser Phe Ala Asn Arg Gln Asn Phe	225	230
		235
Ile Asn Glu Lys Asn Ile Tyr Arg Val Pro Leu Met Glu His Asp Asn	245	250
		255
Ile Ala Arg Phe Ile Val Gly Asp Glu Arg Val Thr Ala Asp Gly Arg	260	265
		270
Met Glu Tyr Leu Leu Val Met Glu Tyr Tyr Pro Asn Gly Ser Leu Cys	275	280
		285
Lys Tyr Leu Ser Leu His Thr Ser Asp Trp Val Ser Ser Cys Arg Leu	290	295
		300
Ala His Ser Val Thr Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His Thr Glu Leu Pro	305	310
		315
Arg Gly Asp His Tyr Lys Pro Ala Ile Ser His Arg Asp Leu Asn Ser	325	330
		335
Arg Asn Val Leu Val Lys Asn Asp Gly Thr Cys Val Ile Ser Asp Phe	340	345
		350
Gly Leu Ser Met Arg Leu Thr Gly Asn Arg Leu Val Arg Pro Gly Glu	355	360
		365
Glu Asp Asn Ala Ala Ile Ser Glu Val Gly Thr Ile Arg Tyr Met Ala	370	375
		380
Pro Glu Val Leu Glu Gly Ala Val Asn Leu Arg Asp Cys Glu Ser Ala	385	390
		395
Leu Lys Gln Val Asp Met Tyr Ala Leu Gly Leu Ile Tyr Trp Glu Ile	405	410
		415
Phe Met Arg Cys Thr Asp Leu Phe Pro Gly Glu Ser Val Pro Glu Tyr	420	425
		430
Gln Met Ala Phe Gln Thr Glu Val Gly Asn His Pro Thr Phe Glu Asp	435	440
		445
Met Gln Val Leu Val Ser Arg Glu Lys Gln Arg Pro Lys Phe Pro Glu	450	455
		460
Ala Trp Lys Glu Asn Ser Leu Ala Val Arg Ser Leu Lys Glu Thr Ile	465	470
		475
Glu Asp Cys Trp Asp Gln Asp Ala Glu Ala Arg Leu Thr Ala Gln Cys	485	490
		495
Ala Glu Glu Arg Met Ala Glu Leu Met Met Ile Trp Glu Arg Asn Lys	500	505
		510
Ser Val Ser Pro Thr Val Asn Pro Met Ser Thr Ala Met Gln Asn Glu	515	520
		525
Arg Arg		
	530	

<210> 113
 <211> 1038
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 113
 Met Thr Ser Ser Leu Gln Arg Pro Trp Arg Val Pro Trp Leu Pro Trp
 1 5 10 15
 Thr Ile Leu Leu Val Ser Thr Ala Ala Ala Ser Gln Asn Gln Glu Arg
 20 25 30
 Leu Cys Ala Phe Lys Asp Pro Tyr Gln Gln Asp Leu Gly Ile Gly Glu
 35 40 45
 Ser Arg Ile Ser His Glu Asn Gly Thr Ile Leu Cys Ser Lys Gly Ser

50	55	60
Thr Cys Tyr Gly Leu Trp Glu Lys Ser Lys	Gly Asp Ile Asn Leu Val	
65 70	75	80
Lys Gln Gly Cys Trp Ser His Ile Gly Asp Pro Gln Glu Cys His Tyr		
85 90	95	
Glu Glu Cys Val Val Thr Thr Pro Pro Ser Ile Gln Asn Gly Thr		
100 105	110	
Tyr Arg Phe Cys Cys Cys Ser Thr Asp Leu Cys Asn Val Asn Phe Thr		
115 120	125	
Glu Asn Phe Pro Pro Pro Asp Thr Thr Pro Leu Ser Pro Pro His Ser		
130 135	140	
Phe Asn Arg Asp Glu Thr Ile Ile Ala Leu Ala Ser Val Ser Val		
145 150	155	160
Leu Ala Val Leu Ile Val Ala Leu Cys Phe Gly Tyr Arg Met Leu Thr		
165 170	175	
Gly Asp Arg Lys Gln Gly Leu His Ser Met Asn Met Met Glu Ala Ala		
180 185	190	
Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asp Leu Asp Asn Leu Lys Leu Leu Glu Leu		
195 200	205	
Ile Gly Arg Gly Arg Tyr Gly Ala Val Tyr Lys Gly Ser Leu Asp Glu		
210 215	220	
Arg Pro Val Ala Val Lys Val Phe Ser Phe Ala Asn Arg Gln Asn Phe		
225 230	235	240
Ile Asn Glu Lys Asn Ile Tyr Arg Val Pro Leu Met Glu His Asp Asn		
245 250	255	
Ile Ala Arg Phe Ile Val Gly Asp Glu Arg Val Thr Ala Asp Gly Arg		
260 265	270	
Met Glu Tyr Leu Leu Val Met Glu Tyr Tyr Pro Asn Gly Ser Leu Cys		
275 280	285	
Lys Tyr Leu Ser Leu His Thr Ser Asp Trp Val Ser Ser Cys Arg Leu		
290 295	300	
Ala His Ser Val Thr Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His Thr Glu Leu Pro		
305 310	315	320
Arg Gly Asp His Tyr Lys Pro Ala Ile Ser His Arg Asp Leu Asn Ser		
325 330	335	
Arg Asn Val Leu Val Lys Asn Asp Gly Thr Cys Val Ile Ser Asp Phe		
340 345	350	
Gly Leu Ser Met Arg Leu Thr Gly Asn Arg Leu Val Arg Pro Gly Glu		
355 360	365	
Glu Asp Asn Ala Ala Ile Ser Glu Val Gly Thr Ile Arg Tyr Met Ala		
370 375	380	
Pro Glu Val Leu Glu Gly Ala Val Asn Leu Arg Asp Cys Glu Ser Ala		
385 390	395	400
Leu Lys Gln Val Asp Met Tyr Ala Leu Gly Leu Ile Tyr Trp Glu Ile		
405 410	415	
Phe Met Arg Cys Thr Asp Leu Phe Pro Gly Glu Ser Val Pro Glu Tyr		
420 425	430	
Gln Met Ala Phe Gln Thr Glu Val Gly Asn His Pro Thr Phe Glu Asp		
435 440	445	
Met Gln Val Leu Val Ser Arg Glu Lys Gln Arg Pro Lys Phe Pro Glu		
450 455	460	
Ala Trp Lys Glu Asn Ser Leu Ala Val Arg Ser Leu Lys Glu Thr Ile		
465 470	475	480
Glu Asp Cys Trp Asp Gln Asp Ala Glu Ala Arg Leu Thr Ala Gln Cys		
485 490	495	
Ala Glu Glu Arg Met Ala Glu Leu Met Met Ile Trp Glu Arg Asn Lys		
500 505	510	
Ser Val Ser Pro Thr Val Asn Pro Met Ser Thr Ala Met Gln Asn Glu		
515 520	525	
Arg Asn Leu Ser His Asn Arg Arg Val Pro Lys Ile Gly Pro Tyr Pro		
530 535	540	
Asp Tyr Ser Ser Ser Tyr Ile Glu Asp Ser Ile His His Thr Asp		
545 550	555	560
Ser Ile Val Lys Asn Ile Ser Ser Glu His Ser Met Ser Ser Thr Pro		
565 570	575	
Leu Thr Ile Gly Glu Lys Asn Arg Asn Ser Ile Asn Tyr Glu Arg Gln		
580 585	590	
Gln Ala Gln Ala Arg Ile Pro Ser Pro Glu Thr Ser Val Thr Ser Leu		
595 600	605	
Ser Thr Asn Thr Thr Thr Asn Thr Thr Gly Leu Thr Pro Ser Thr		
610 615	620	
Gly Met Thr Thr Ile Ser Glu Met Pro Tyr Pro Asp Glu Thr Asn Leu		
625 630	635	640
His Thr Thr Asn Val Ala Gln Ser Ile Gly Pro Thr Pro Val Cys Leu		
645 650	655	
Gln Leu Thr Glu Glu Asp Leu Glu Thr Asn Lys Leu Asp Pro Lys Glu		

660	665	670
Val Asp Lys Asn Leu Lys Glu Ser Ser Asp Glu Asn Leu Met Glu His		
675	680	685
Ser Leu Lys Gln Phe Ser Gly Pro Asp Pro Leu Ser Ser Thr Ser Ser		
690	695	700
Ser Leu Leu Tyr Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Ala Thr Gly Gln		
705	710	715
Gln Asp Phe Thr Gln Thr Ala Asn Gly Gln Ala Cys Leu Ile Pro Asp		
725	730	735
Val Leu Pro Thr Gln Ile Tyr Pro Leu Pro Lys Gln Gln Asn Leu Pro		
740	745	750
Lys Arg Pro Thr Ser Leu Pro Leu Asn Thr Lys Asn Ser Thr Lys Glu		
755	760	765
Pro Arg Leu Lys Phe Gly Ser Lys His Ser Asn Leu Lys Gln Val		
770	775	780
Glu Thr Gly Val Ala Lys Met Asn Thr Ile Asn Ala Ala Glu Pro His		
785	790	795
Val Val Thr Val Thr Met Asn Gly Val Ala Gly Arg Asn His Ser Val		
805	810	815
Asn Ser His Ala Ala Thr Thr Gln Tyr Ala Asn Gly Thr Val Leu Ser		
820	825	830
Gly Gln Thr Thr Asn Ile Val Thr His Arg Ala Gln Glu Met Leu Gln		
835	840	845
Asn Gln Phe Ile Gly Glu Asp Thr Arg Leu Asn Ile Asn Ser Ser Pro		
850	855	860
Asp Glu His Glu Pro Leu Leu Arg Arg Glu Gln Gln Ala Gly His Asp		
865	870	875
Glu Gly Val Leu Asp Arg Leu Val Asp Arg Arg Glu Arg Pro Leu Glu		
885	890	895
Gly Gly Arg Thr Asn Ser Asn Asn Asn Ser Asn Pro Cys Ser Glu		
900	905	910
Gln Asp Val Leu Ala Gln Gly Val Pro Ser Thr Ala Ala Asp Pro Gly		
915	920	925
Pro Ser Lys Pro Arg Arg Ala Gln Arg Pro Asn Ser Leu Asp Leu Ser		
930	935	940
Ala Thr Asn Val Leu Asp Gly Ser Ser Ile Gln Ile Gly Glu Ser Thr		
945	950	955
Gln Asp Gly Lys Ser Gly Ser Gly Glu Lys Ile Lys Lys Arg Val Lys		
965	970	975
Thr Pro Tyr Ser Leu Lys Arg Trp Arg Pro Ser Thr Trp Val Ile Ser		
980	985	990
Thr Glu Ser Leu Asp Cys Glu Val Asn Asn Gly Ser Asn Arg Ala		
995	1000	1005
Val His Ser Lys Ser Ser Thr Ala Val Tyr Leu Ala Glu Gly Gly Thr		
1010	1015	1020
Ala Thr Thr Met Val Ser Lys Asp Ile Gly Met Asn Cys Leu		
1025	1030	1035

<210> 114

<211> 1038

<212> PRT

<213> 智人

<400> 114

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

165	170	175
Gly Asp Arg Lys Gin Gly Leu His Ser Met Asn Met Met	Glu Ala Ala	
180	185	190
Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asp Leu Asn Leu Lys Leu	Glu Leu	
195	200	205
Ile Gly Arg Gly Arg Tyr Gly Ala Val Tyr Lys Gly Ser	Leu Asp Glu	
210	215	220
Arg Pro Val Ala Val Lys Val Phe Ser Phe Ala Asn Arg	Gln Asn Phe	
225	230	235
Ile Asn Glu Lys Asn Ile Tyr Arg Val Pro Leu Met Glu	His Asp Asn	
245	250	255
Ile Ala Arg Phe Ile Val Gly Asp Glu Arg Val Thr Ala	Asp Gly Arg	
260	265	270
Met Glu Tyr Leu Leu Val Met Glu Tyr Tyr Pro Asn	Gly Ser Leu Cys	
275	280	285
Lys Tyr Leu Ser Leu His Thr Ser Asp Trp Val Ser Ser	Cys Arg Leu	
290	295	300
Ala His Ser Val Thr Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His Thr	Glu Leu Pro	
305	310	315
Arg Gly Asp His Tyr Lys Pro Ala Ile Ser His Arg Asp	Leu Asn Ser	
325	330	335
Arg Asn Val Leu Val Lys Asn Asp Gly Thr Cys Val Ile	Ser Asp Phe	
340	345	350
Gly Leu Ser Met Arg Leu Thr Gly Asn Arg Leu Val Arg	Pro Gly Glu	
355	360	365
Glu Asp Asn Ala Ala Ile Ser Glu Val Gly Thr Ile Arg	Tyr Met Ala	
370	375	380
Pro Glu Val Leu Glu Gly Ala Val Asn Leu Arg Asp Cys	Glu Ser Ala	
385	390	395
Leu Lys Gln Val Asp Met Tyr Ala Leu Gly Leu Ile Tyr	Trp Glu Ile	
405	410	415
Phe Met Arg Cys Thr Asp Leu Phe Pro Gly Glu Ser Val	Pro Glu Tyr	
420	425	430
Gln Met Ala Phe Gln Thr Glu Val Gly Asn His Pro	Thr Phe Glu Asp	
435	440	445
Met Gln Val Leu Val Ser Arg Glu Lys Gln Arg Pro	Lys Phe Pro Glu	
450	455	460
Ala Trp Lys Glu Asn Ser Leu Ala Val Arg Ser Leu	Lys Glu Thr Ile	
465	470	475
Glu Asp Cys Trp Asp Gln Asp Ala Glu Ala Arg Leu	Thr Ala Gln Cys	
485	490	495
Ala Glu Glu Arg Met Ala Glu Leu Met Met Ile Trp Glu	Arg Asn Lys	
500	505	510
Ser Val Ser Pro Thr Val Asn Pro Met Ser Thr Ala Met	Gln Asn Glu	
515	520	525
Arg Asn Leu Ser His Asn Arg Arg Val Pro Lys Ile	Gly Pro Tyr Pro	
530	535	540
Asp Tyr Ser Ser Ser Tyr Ile Glu Asp Ser Ile His His	Thr Asp	
545	550	555
Ser Ile Val Lys Asn Ile Ser Ser Glu His Ser Met Ser	Ser Thr Pro	
565	570	575
Leu Thr Ile Gly Glu Lys Asn Arg Asn Ser Ile Asn	Tyr Glu Arg Gln	
580	585	590
Gln Ala Gln Ala Arg Ile Pro Ser Pro Glu Thr Ser	Val Thr Ser Leu	
595	600	605
Ser Thr Asn Thr Thr Thr Asn Thr Thr Gly Leu Thr	Pro Ser Thr	
610	615	620
Gly Met Thr Thr Ile Ser Glu Met Pro Tyr Pro Asp	Glu Thr Asn Leu	
625	630	635
His Thr Thr Asn Val Ala Gln Ser Ile Gly Pro Thr	Pro Val Cys Leu	
645	650	655
Gln Leu Thr Glu Glu Asp Leu Glu Thr Asn Lys Leu	Asp Pro Lys Glu	
660	665	670
Val Asp Lys Asn Leu Lys Glu Ser Ser Asp Glu Asn	Leu Met Glu His	
675	680	685
Ser Leu Lys Gln Phe Ser Gly Pro Asp Pro Leu Ser	Ser Thr Ser Ser	
690	695	700
Ser Leu Leu Tyr Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu	Ala Thr Gly Gln	
705	710	715
Gln Asp Phe Thr Gln Thr Ala Asn Gly Gln Ala Cys	Leu Ile Pro Asp	
725	730	735
Val Leu Pro Thr Gln Ile Tyr Pro Leu Pro Lys Gln	Gln Asn Leu Pro	
740	745	750
Lys Arg Pro Thr Ser Leu Pro Leu Asn Thr Lys Asn	Ser Thr Lys Glu	
755	760	765
Pro Arg Leu Lys Phe Gly Ser Lys His Lys Ser Asn	Leu Lys Gln Val	

770	775	780
Glu	Thr	Gly Val Ala Lys Met Asn Thr Ile Asn Ala Ala Glu Pro His
785	790	795 800
Val	Val	Thr Val Thr Met Asn Gly Val Ala Gly Arg Asn His Ser Val
		805 810 815
Asn	Ser	His Ala Ala Thr Thr Gln Tyr Ala Asn Arg Thr Val Leu Ser
		820 825 830
Gly	Gln	Thr Thr Asn Ile Val Thr His Arg Ala Gln Glu Met Leu Gln
		835 840 845
Asn	Gln	Phe Ile Gly Glu Asp Thr Arg Leu Asn Ile Asn Ser Ser Pro
		850 855 860
Asp	Glu	His Glu Pro Leu Leu Arg Arg Glu Gln Gln Ala Gly His Asp
		865 870 875 880
Glu	Gly	Val Leu Asp Arg Leu Val Asp Arg Glu Arg Pro Leu Glu
		885 890 895
Gly	Gly	Arg Thr Asn Ser Asn Asn Asn Ser Asn Pro Cys Ser Glu
		900 905 910
Gln	Asp	Val Leu Ala Gln Gly Val Pro Ser Thr Ala Ala Asp Pro Gly
		915 920 925
Pro	Ser	Lys Pro Arg Arg Ala Gln Arg Pro Asn Ser Leu Asp Leu Ser
		930 935 940
Ala	Thr	Asn Val Leu Asp Gly Ser Ser Ile Gln Ile Gly Glu Ser Thr
		945 950 955 960
Gln	Asp	Gly Lys Ser Gly Ser Gly Glu Lys Ile Lys Lys Arg Val Lys
		965 970 975
Thr	Pro	Tyr Ser Leu Lys Arg Trp Arg Pro Ser Thr Trp Val Ile Ser
		980 985 990
Thr	Glu	Ser Leu Asp Cys Glu Val Asn Asn Asn Gly Ser Asn Arg Ala
		995 1000 1005
Val	His	Ser Lys Ser Ser Thr Ala Val Tyr Leu Ala Glu Gly Gly Thr
		1010 1015 1020
Ala	Thr	Thr Met Val Ser Lys Asp Ile Gly Met Asn Cys Leu
		1025 1030 1035

<210> 115

<211> 1038

<212> PRT

<213> 智人

<400> 115

Met	Thr	Ser	Ser	Leu	Gln	Arg	Pro	Trp	Arg	Val	Pro	Trp	Leu	Pro	Trp
1				5				10				15			
Thr	Ile	Leu	Leu	Val	Ser	Thr	Ala	Ala	Ala	Ser	Gln	Asn	Gln	Glu	Arg
				20				25				30			
Leu	Cys	Ala	Phe	Lys	Asp	Pro	Tyr	Gln	Gln	Asp	Leu	Gly	Ile	Gly	Glu
				35				40				45			
Ser	Arg	Ile	Ser	His	Glu	Asn	Gly	Thr	Ile	Leu	Cys	Ser	Lys	Gly	Ser
				50				55				60			
Thr	Cys	Tyr	Gly	Leu	Trp	Glu	Lys	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Asn	Leu	Val
				65				70				75			80
Lys	Gln	Gly	Cys	Trp	Ser	His	Ile	Gly	Asp	Pro	Gln	Glu	Cys	His	Tyr
				85				90				95			
Glu	Glu	Cys	Val	Val	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Ile	Gln	Asn	Gly	Thr	
				100				105				110			
Tyr	Arg	Phe	Cys	Cys	Ser	Thr	Asp	Leu	Cys	Asn	Val	Asn	Phe	Thr	
				115				120				125			
Glu	Asn	Phe	Pro	Pro	Pro	Asp	Thr	Thr	Pro	Leu	Ser	Pro	Pro	His	Ser
				130				135				140			
Phe	Asn	Arg	Asp	Glu	Thr	Ile	Ile	Ile	Ala	Leu	Ala	Ser	Val		
				145				150				155			160
Leu	Ala	Val	Leu	Ile	Val	Ala	Leu	Cys	Phe	Gly	Tyr	Arg	Met	Leu	Thr
				165				170				175			
Gly	Asp	Arg	Lys	Gln	Gly	Leu	His	Ser	Met	Asn	Met	Met	Glu	Ala	Ala
				180				185				190			
Ala	Ser	Glu	Pro	Ser	Leu	Asp	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys	Leu	Glu	Leu	
				195				200				205			
Ile	Gly	Arg	Gly	Arg	Tyr	Gly	Ala	Val	Tyr	Lys	Gly	Ser	Leu	Asp	Glu
				210				215				220			
Arg	Pro	Val	Ala	Val	Lys	Val	Phe	Ser	Phe	Ala	Asn	Arg	Gln	Asn	Phe
				225				230				235			240
Ile	Asn	Glu	Lys	Asn	Ile	Tyr	Arg	Val	Pro	Leu	Met	Glu	His	Asp	Asn
				245				250				255			
Ile	Ala	Arg	Phe	Ile	Val	Gly	Asp	Glu	Arg	Val	Thr	Ala	Asp	Gly	Arg
				260				265				270			
Met	Glu	Tyr	Leu	Leu	Val	Met	Glu	Tyr	Tyr	Pro	Asn	Gly	Ser	Leu	Cys

275	280	285
Lys Tyr Leu Ser Leu His Thr Ser Asp Trp Val Ser Ser Cys Arg Leu		
290	295	300
Ala His Ser Val Thr Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His Thr Glu Leu Pro		
305	310	315
Arg Gly Asp His Tyr Lys Pro Ala Ile Ser His Arg Asp Leu Asn Ser		
325	330	335
Arg Asn Val Leu Val Lys Asn Asp Gly Thr Cys Val Ile Ser Asp Phe		
340	345	350
Gly Leu Ser Met Arg Leu Thr Gly Asn Arg Leu Val Arg Pro Gly Glu		
355	360	365
Glu Asp Asn Ala Ala Ile Ser Glu Val Gly Thr Ile Arg Tyr Met Ala		
370	375	380
Pro Glu Val Leu Glu Gly Ala Val Asn Leu Arg Asp Cys Glu Ser Ala		
385	390	395
Leu Lys Gln Val Asp Met Tyr Ala Leu Gly Leu Ile Tyr Trp Glu Ile		
405	410	415
Phe Met Arg Cys Thr Asp Leu Phe Pro Gly Glu Ser Val Pro Glu Tyr		
420	425	430
Gln Met Ala Phe Gln Thr Glu Val Gly Asn His Pro Thr Phe Glu Asp		
435	440	445
Met Gln Val Leu Val Ser Arg Glu Lys Gln Arg Pro Lys Phe Pro Glu		
450	455	460
Ala Trp Lys Glu Asn Ser Leu Ala Val Arg Ser Leu Lys Glu Thr Ile		
465	470	475
Glu Asp Cys Trp Asp Gln Asp Ala Glu Ala Arg Leu Thr Ala Gln Cys		
485	490	495
Ala Glu Glu Arg Met Ala Glu Leu Met Met Ile Trp Glu Arg Asn Lys		
500	505	510
Ser Val Ser Pro Thr Val Asn Pro Met Ser Thr Ala Met Gln Asn Glu		
515	520	525
Arg Asn Leu Ser His Asn Arg Arg Val Pro Lys Ile Gly Pro Tyr Pro		
530	535	540
Asp Tyr Ser Ser Ser Tyr Ile Glu Asp Ser Ile His His Thr Asp		
545	550	555
Ser Ile Val Lys Asn Ile Ser Ser Glu His Ser Met Ser Ser Thr Pro		
565	570	575
Leu Thr Ile Gly Glu Lys Asn Arg Asn Ser Ile Asn Tyr Glu Arg Gln		
580	585	590
Gln Ala Gln Ala Arg Ile Pro Ser Pro Glu Thr Ser Val Thr Ser Leu		
595	600	605
Ser Thr Asn Thr Thr Thr Asn Thr Thr Gly Leu Thr Pro Ser Thr		
610	615	620
Gly Met Thr Thr Ile Ser Glu Met Pro Tyr Pro Asp Glu Thr Asn Leu		
625	630	635
His Thr Thr Asn Val Ala Gln Ser Ile Gly Pro Thr Pro Val Cys Leu		
645	650	655
Gln Leu Thr Glu Glu Asp Leu Glu Thr Asn Lys Leu Asp Pro Lys Glu		
660	665	670
Val Asp Lys Asn Leu Lys Glu Ser Ser Asp Glu Asn Leu Met Glu His		
675	680	685
Ser Leu Lys Gln Phe Ser Gly Pro Asp Pro Leu Ser Ser Thr Ser Ser		
690	695	700
Ser Leu Leu Tyr Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Ala Thr Gly Gln		
705	710	715
Gln Asp Phe Thr Gln Thr Ala Asn Gly Gln Ala Cys Leu Ile Pro Asp		
725	730	735
Val Leu Pro Thr Gln Ile Tyr Pro Leu Pro Lys Gln Gln Asn Leu Pro		
740	745	750
Lys Arg Pro Thr Ser Leu Pro Leu Asn Thr Lys Asn Ser Thr Lys Glu		
755	760	765
Pro Arg Leu Lys Phe Gly Ser Lys His Lys Ser Asn Leu Lys Gln Val		
770	775	780
Glu Thr Gly Val Ala Lys Met Asn Thr Ile Asn Ala Ala Glu Pro His		
785	790	795
Val Val Thr Val Thr Met Asn Gly Val Ala Gly Arg Asn His Ser Val		
805	810	815
Asn Ser His Ala Ala Thr Thr Gln Tyr Ala Asn Arg Thr Val Leu Ser		
820	825	830
Gly Gln Thr Asn Ile Val Thr His Arg Ala Gln Glu Met Leu Gln		
835	840	845
Asn Gln Phe Ile Gly Glu Asp Thr Arg Leu Asn Ile Asn Ser Ser Pro		
850	855	860
Asp Glu His Glu Pro Leu Leu Arg Arg Glu Gln Gln Ala Gly His Asp		
865	870	875
Glu Gly Val Leu Asp Arg Leu Val Asp Arg Arg Glu Arg Pro Leu Glu		

[0050]

[0051]

```

<210> 117
<211> 1575
<212> DNA
<213> 智人

<400> 117
gcaaacttcc ttgataacat gctttgcga agtgcaggaa aattaaatgt gggcaccaag 60
aaagaggatg gtgagagtac agccccccacc ccccgccaa aggcttcgc ttgttaaatgc 120
caccacccat gtcccgagaaga ctcatgtcaac aatatttgc aacagacgg atattgttc 180
acgatgtatg aagaggatgt ctcgggttg cctgttgtca ctctgggttg ctcaggacta 240
gaaggcttag attttcgtg tcgggacact cccatcttc atcaaagaag atcaattgaa 300
tgcgtcacaag aaaggaaacga atgtataaaa gacctacacc ctacactgcc tccattgaaa 360
aacagagatt ttgitgtatgg acctatacac cacagggtt tacttataatc tgitgactgtc 420
tgttagtttgc tcttggctt tatcatatata ttgttact tccggataaa aagacaagaaa 480
accaggaccc gatacagcat tgggttagaa caggatgaaa cttagatccc tcttggagaa 540
tccctgagag acttaattgt gcagtctcg agctcaggaa gtggatcagg ctcctctcg 600
ctggtccaaagg ggactatagc taagcagatt catgtgtga aacagattgg aaaaggctgc 660
tatggggaaat ttggatggg aaagtggcgt ggcggaaaagg tagctgtgaa agtgttctc 720
accacagagg aagccagctg gttcaagagag acagaaaatat atcagacagt gitgtatggg 780
catgaaaatctt tttgggtt catgtgtca gataatcaaagg ggacagggtc ctggaccagg 840
ttgttacctaacttacagacta tcatgaaaat gttttccctt atgattatctt gaagttccacc 900
atcttagacgactaaatcaatcat gctgaatgtt gcctactttt ctgtcagtgg ctatgtcat 960
ttacacacag aatatttttag tactcaaggc aaaccagcaa ttggccatcg agatctgaaa 1020
agtaaaaaacat ttctgggtgaa gaaaaatggaa acttgcgttta ttgtgcacctt gggcttggct 1080
gtttaaaatttt ttagtgcatac aaatgttgggtt gacataccac cttaacactcg agttggcacc 1140
aaacgcgtata tgcctccaga agtgttggac gagatgttgc acagaaatcat ctgcctcg 1200
tacatcatgtt ctgacatgtt tagttttgc ctcatctttt gggatgttgc taggatgtt 1260
gtatcaggagg gtatagttgtt gaaataccag ctgcattttt atgacatgtt gcccaggatgc 1320
ccctttttatgg aggacatgtt gggatgttgc tgcatcaaga agttacgcctt ctcatccca 1380
aaccgggttggaa gcaatgttgc ttgttgcattt gatgttggaa aactcatgttgc agaaatgttgc 1440
gtccatcaatctt ctgcatcaatgtt gctgacatgtt ctgcgggttta agaaaacact tgcctttttatgg 1500
tcagatgttccctt aggacatgttacttgcatgtt gggatgttgc tgcacatgtt ctgcaggaaatgg 1560
ccacacatgttgc ttgttgcattt gatgttggaa aactcatgttgc agaaatgttgc 1575

```

<210> 119

[0052]

<211> 3167
<212> DNA
<213> Rattus sp.

<210> 120
<211> 3167
<212> DNA
<213> 大鼠

```

<400> 120
gaatttcatga gatggaaaca taggtcaaaag ctgtttggag aaatttggAAC tacagttta 60
tctagccaca tctctgagaaa gctctgaagaa agcagcaggT gaaaagtcatTT gtcaagtgtat 120
tttgcTTCTC tgaatggaaa cctcgTCAG taaggccgtT tactcgatg aaacacggcagg 180
accgataatc aaggTggccc ggacaggacaa cgtggcaatt ggacaatgac tacatatac 240
acttacatca gattatcggg agcctgttgc ttcatcattt ctcatgttca aggccgaaat 300
cttagatgtt tgctccatgg tactggatg aatacagacg tggaccagaa gaagccggaa 360
aatggagtgtt cgTTtagcacc agaggacacc ttacccTTCT taaaatgttca ttgctcagg 420
cactgcCCCAg atgacgttat taataaacaca tgcataacta atgcgcattt ctTtgccatt 480
atagaagaag atgtatcagg agaaacacag ttAAacttCTG gggtatgaa gtatgtaaacgg 540
tctgtatTTCTC aatgcAAGGA ttccaaaaaa gcccggactac gcggacaaat tttttttgtt 600
cgggaccaatt tggcaacca atatTTGCG cctacactgc cccctgtcgt tataggcccc 660

```

[0053]

〈210〉 121
〈211〉 3003
〈212〉 DNA
〈213〉 大鼠

[0054]

acgtttgaga	atcaagaaga	cgcicgc当地	gatgggtt当地	tccaggatg	taaagattt	1680
acaaaacagt	ttgagaaaga	attttagactg	caagaaaattc	accggaggaa	gggtggagtt	1740
agcatggact	aggatgtcgg	cttgggttcc	agactcttc	ctcacatct	tcacaggctg	1800
ctaagactaa	acttcaggg	ctctcgacaa	tgcagggtt	gagcttcaga	cataggactt	1860
cagacatgt	gttcttgcg	tatggacage	tttttttaa	atgtggcc	ttgtatgcctt	1920
ttttttttt	atgaatttca	tcaagactcc	aatctgtata	agaagttctt	ggtaaaactc	1980
tggttactca	ctatccgtc	cataaaagtgg	tgctttctgt	gaaagccctt	agggaaaattag	2040
tgagctcagc	agagatggag	aaaggcataat	ttgcctctta	cagagaaaat	atctgtctgt	2100
gttctgtcic	tgtaaacacgc	ctggactatg	atctctttgg	gatgtctcct	ggttgtatgt	2160
ggtctctgata	tgcatcattcag	actttcttc	ctggcatggg	tttacaagac		2220
aagaatgtga	agggtgcaca	ggacggattt	tgtggccagt	gtttaataat	tgcataatct	2280
atgcgacatt	cgcacatctc	ataaaaagcc	tctacttgc	aactgaagta	acttctctac	2340
caacttttat	tttagcataa	tagttgtaaa	ggccaaaacta	tgataaaagt	gtccatagac	2400
tgcgaactgtt	ttccctccag	caccattttt	ttttcccttt	ggtaattttt	tttgttat	2460
aattccctct	atcccagaatt	ggcgctcact	gtcttigaaacc	atactttigaa	agaaaatgcct	2520
cttcctggag	tctgccttac	tgcatctgtat	caccatgtgc	atacctctga	tc当地atctcg	2580
gagtctttgt	tctcggiatc	tctttaaaaag	ggaaaatgttgc	tatcatgttgc	atgtgtcttgc	2640
tattttcaaa	atcttcata	ccittatct	agccatttttt	acccatatac	tcattctgtat	2700
caaagactgt	cactcggtct	cacggctgtat	cctcagtgga	aatgattttaa	agiagagctg	2760
tgtacgaattt	tcagaatttca	tgatattaaa	aacttcacac	taacacttta	ctaagatatt	2820
gtctctat	ttttatgagg	atgtcagctg	attttcaatg	actataaaatg	tatcttagct	2880
atcttcataat	tttgcataat	ggttttataa	tttctggcc	ctaaatgttgc	aagacaaaaga	2940
ggcagaagta	cccagtcata	cacatttaca	ctgtacatttta	ttaataaaaa	aatatgttat	3000
ttt						3003

<210> 122
<211> 2063
<212> DNA
<213> 智人

```
<210> 123
<211> 1964
<212> DNA
<213> 智人

<400> 123
atttcttttcc ttggcccttc tgattcttgg ctggcccagg gatgacttcc tcgctgcagc 60
ggccctggcg ggtggccctgg ctaccatggta ccatcttgct ggtcagcaact ggccgtgcctt 120
cgccaaatcta agaacgcgtta tgcgttta aagatccgtta tcagcaagac ctggggatag 180
```

[0055]

tgtggagat	aatctctcat	aaaaatggga	caatattatg	ctcgaaagg	tgccactgt	240
atggcctt	ggagaatca	aaagggaca	taaatcttg	aaaacaagg	tgttgtc	300
acattggaga	tccccaaag	tgtcaat	aagaatgtgt	agttaactacc	actctccct	360
caattcaga	tggaaacat	cgtttctgt	gtttagcac	agatttatgt	aatgtcaact	420
ttactggaga	ttttccat	cctgacaa	caccatcag	tccaccat	tccatiaacc	480
gagatggagac	aataatcat	gttggcat	cagtcgtt	attagcttt	ttgtatgtt	540
ccttatgtt	tggatacaga	atgttgcac	gagaccgtaa	acaaggctt	cacagtatg	600
acatgtatgg	ggcagcagca	tccgaacc	ctctgtat	agataatctg	aaactgttgg	660
agctgtatgg	ccgaggcgt	tatggacag	tataaaagg	ccttggat	gagcgtccag	720
ttgctgtaa	agtgtttcc	tttgaaacc	gtcagattt	tatcaacaa	agaacattt	780
acagagtgc	tttgcgtt	catgacaa	ttgcccgt	tatgttgg	gtatgagag	840
tcactcgaga	tggacgcgt	gaatatttgc	ttgtgtatgg	gtatatatcc	aatggatctt	900
tatgcaagta	tttgcgtt	cacacaagt	actggtaag	cttggccgt	tttgcgtt	960
ctgttactag	aggactgtt	tatcttca	cagaaitacc	acgaggagat	cattataaac	1020
ctgcaattt	ccatcgagat	ttaaaacgca	gaaatgtct	agtggaaaaat	gttggaaacct	1080
gtgttattt	tgacttttgc	ctgtccat	ggctgactgg	aaatagactg	gtgcgcgg	1140
gggaggaga	taatgcgcg	ataaggcagg	ttggccat	cataatgtat	ggcaggaaag	1200
tgcttagaa	agctgtgtt	ttgaggact	gtgaatcgc	tttggaaacaa	gttagacatgt	1260
atgtcttgg	actaatctt	ttggagat	ttatgagat	tacagac	cttgcggg	1320
aatccgtacc	agagtaccat	atggctt	agacagagg	tggaaaccat	ccacttttgc	1380
aggatgtgc	ggtictctgt	tcttagggaa	aaacagagg	caagtccca	gaaggcttgg	1440
aagaaaaat	cctggcgt	aggtcact	aggagacaat	cgaagactgt	ttggccagg	1500
atgcaggac	tcggcttact	gcacatgt	ctggggaaag	gttggctgaa	tttgcgtt	1560
tttggggaa	aaacaaatct	gtgagccaa	cagtcaat	aatgtctact	gtatgcaga	1620
atgaacgt	gtgagtca	acaagatgg	aaatcaggat	cagggtggaaa	gtcaagaaaa	1680
cgtgtgaaa	ctccctattt	tcttaaagg	ttggccccc	ccactgtgg	cattctccact	1740
gaatctgcgt	actgtgtt	caacaataat	ggcgtatca	ggcgttca	ttccaaatcc	1800
ageactgt	tttacatgc	agaaggaggc	actgttacaa	ccatgggttgc	taaaatgtt	1860
tttggatgt	gtctgttgc	tttttttt	ctatggagt	gaaatatttt	tttgcgtt	1920
ttaaacatgc	agaagatgtt	taaaaataaa	aaaaaaaatgt	cttt		1964

[0056]

gttgcacagt	caattggcc	aaccctgtc	tgcttacagc	tgacagaaga	agacttggaa	2400
accaacaage	tagacccaaa	agaagtgtat	aagaaccta	aggaaagctc	tgatgagaat	2460
ctcatggagc	actctctta	acagttcagt	ggcccagacc	cactgagcag	tactagtct	2520
agcttgcgtt	acccactat	aaaactgtca	gtagaagccaa	ctggacacga	ggacttcaca	2580
cagactgcaa	atggccaage	atgtttgatt	cctgtatgtc	tgcttactaa	gactatctt	2640
ctccccaaacg	agcagaacct	tcccaagaga	cctactatgtt	tgcttggaa	cacaaaaaaal	2700
tcaacaaaag	agccccggct	aaaatttggc	agcaagcaca	aatcaaactt	gaaacaagtc	2760
gaaacttggag	ttgccaagat	gaatacataatc	aatgcagcag	aacctcatgt	ggtgacagtc	2820
accatgtatg	gtgtggcagg	tagaaaaaccac	agtgttaact	cccatgtcgc	cacaacccaa	2880
atgtccatgt	ggacagactt	atctggccaa	acaaccaaca	tagtgacaca	tagggcccaa	2940
gaaatgttgc	agaatcagtat	tatttgttag	gacacccggc	tgaatattaa	ttccaggctt	3000
gatgagcatg	agcctttact	gagacgagag	caacaagctg	gccatgatga	aggtgttctg	3060
gatcgcttgg	tgacaggagg	ggaacggcca	ctagaagggt	gccaactaa	ttcaataaac	3120
aacaacacga	atccatgttgc	agaacaaagat	gttcttgcac	agggtgttcc	aagcacacga	3180
gcagatcgttgc	ggccatcaaaa	gcccggaaaga	gcacagggc	ctaatttcgt	gatgtttca	3240
gccacaaaatgt	tcttggatgg	cagcgtata	catagatgttgc	agtcacacaa	agatggccaaa	3300
tccaggatcg	gtgaaaagat	caagaaacgt	gtgaaaactc	cctatitctt	taagcgggtgg	3360
cggcccttcca	cctgggtcat	ctccactgaa	tcgtggact	gtgaagtcaa	caataatggc	3420
agtaacacgg	cagttcattt	caaattccacgc	actgtgttt	accttgcaga	aggaggcact	3480
gctacacaatcg	tggtgtctaa	agatataatgg	atgaatgtc	tgtgaaatgt	tttcaagcc	3540
ttggagtgttgc	atttttttgc	catttttttttt	aacatgcaga	agatgtttaa	aaataaaaaaa	3600
aaaactgtctt	t					3611

〈210〉 125

〈211〉 3871

<212> DNA

〈213〉 智人

〈400〉 125

[0057]

cacagtgtta actcccatgc tgccacaacc caatatgcca ataggacagt actatctggc 2880
 caaacaacca acatagtgac acatagggcc caagaaatgt tgcagaatca gtttatttgg 2940
 gaggcacccc ggetgaatat taattccagt cctgtatggc atgagccitt actgagacga 3000
 gagcaacaag ctggccatga tgaagggtt ctggatcgcc ttgtggacag gagggaacgg 3060
 ccactagaag gtggccgaac taattccaat aacaacaaca gcaatccatg ttcaaaatcc 3120
 gatgttttg cacagggtgt tccaagcaca gcagcagatc ctggccatc aaagccccaga 3180
 agagcacaga ggcctaattc tctggatctt tcagccacaa atgtccttggg tggcagcagt 3240
 atacagatag gtgagtcaac acaagatggc aaatcaggat caggtgaaaa gatcaagaaa 3300
 cgtgtgaaaa ctcccttattc tcttaagcgg tggcgcctt ccacctgggt catctccact 3360
 gaatcgtgg actgtgaatg caacaataat ggcagtaaca gggcgttca ttccaaatcc 3420
 agcactgtg tttaccttc agaaggaggc actgtacaa ccatggtgtc taaagatata 3480
 ggaatgact gtctgtgaaa tttttcaag cctatggagt gaaattattt tttgcattat 3540
 ttaaacatgc agaagatgtt taccggcgg ggtgacagga gagagcgtca gcgccaaact 3600
 gtggaggat gggctcgaaa tgccagactg ggctggccgc atggccttc cctgagccct 3660
 gattttgtt agggaaagcag tatgggtgca gtcccttcctt aggccctccctt ctgggttccc 3720
 ccgatccat cccacctt caggggtgac cagcctacc tcttcctttagt cctggagggt 3780
 agggcaggct gaggcaacga gtgggagggtt caaacaagag tgggcttggag ccaaggaaa 3840
 atagagatga tgtaatttctt ttccggattt c 3871

<210> 126

<211> 88

<212> PRT

<213> 智人

<400> 126

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

<210> 127

<211> 82

<212> PRT

<213> 智人

<400> 127

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

<210> 128

<211> 82

<212> PRT

<213> 智人

<400> 128

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

<210> 129
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 129
 Cys Ile Pro Thr Glu Tyr Thr Met His Ile Glu Arg Arg Glu Cys Ala
 1 5 10 15
 Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Met Thr
 20 25 30
 Arg Asp Ile Asn Gly Lys Leu Phe Leu Pro Lys Tyr Ala Leu Ser Gln
 35 40 45
 Asp Val Cys Thr Tyr Arg Asp Phe Ile Tyr Arg Thr Val Glu Ile Pro
 50 55 60
 Gly Cys Pro Leu His Val Ala Pro Tyr Phe Ser Tyr Pro Val Ala Leu
 65 70 75 80
 Ser Cys Lys Cys

<210> 130
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 130
 Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys
 1 5 10 15
 Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala
 20 25 30
 Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys
 35 40 45
 Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His
 50 55 60
 Cys Thr Asn Gly Ser Val Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu
 65 70 75 80
 Cys Lys Cys

<210> 131
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 131
 Cys Ser Thr Val Pro Val Thr Thr Glu Val Ser Tyr Ala Gly Cys Thr
 1 5 10 15
 Lys Thr Val Leu Met Asn His Cys Ser Gly Ser Cys Gly Thr Phe Val
 20 25 30
 Met Tyr Ser Ala Lys Ala Gln Ala Leu Asp His Ser Cys Ser Cys Cys
 35 40 45
 Lys Glu Glu Lys Thr Ser Gln Arg Glu Val Val Leu Ser Cys Pro Asn
 50 55 60
 Gly Gly Ser Leu Thr His Thr Tyr Thr His Ile Glu Ser Cys Gln Cys
 65 70 75 80

<210> 132
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 132
 Cys Arg Thr Val Pro Phe Ser Gln Thr Ile Thr His Glu Gly Cys Glu
 1 5 10 15
 Lys Val Val Val Gln Asn Asn Leu Cys Phe Gly Lys Cys Gly Ser Val
 20 25 30
 His Phe Pro Gly Ala Ala Gln His Ser His Thr Ser Cys Ser His Cys
 35 40 45
 Leu Pro Ala Lys Phe Thr Thr Met His Leu Pro Leu Asn Cys Thr Glu
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Ile Lys Val Val Met Leu Val Glu Glu Cys Gln Cys

65	70	75	80
<210> 133 <211> 85 <212> PRT <213> 智人			
<400> 133 Cys Lys Thr Gln Pro Leu Lys Gln Thr Ile His Glu Glu Gly Cys Asn 1 5 10 15 Ser Arg Thr Ile Ile Asn Arg Phe Cys Tyr Gly Gln Cys Asn Ser Phe 20 25 30 Tyr Ile Pro Arg His Ile Arg Lys Glu Glu Gly Ser Phe Gln Ser Cys 35 40 45 Ser Phe Cys Lys Pro Lys Lys Phe Thr Thr Met Met Val Thr Leu Asn 50 55 60 Cys Pro Glu Leu Gln Pro Pro Thr Lys Lys Lys Arg Val Thr Arg Val 65 70 75 80 Lys Gln Cys Arg Cys 85			
<210> 134 <211> 86 <212> PRT <213> 智人			
<400> 134 Cys Glu Ala Lys Asn Ile Thr Gln Ile Val Gly His Ser Gly Cys Glu 1 5 10 15 Ala Lys Ser Ile Gln Asn Arg Ala Cys Leu Gly Gln Cys Phe Ser Tyr 20 25 30 Ser Val Pro Asn Thr Phe Pro Gln Ser Thr Glu Ser Leu Val His Cys 35 40 45 Asp Ser Cys Met Pro Ala Gln Ser Met Trp Glu Ile Val Thr Leu Glu 50 55 60 Cys Pro Gly His Glu Glu Val Pro Arg Val Asp Lys Leu Val Glu Lys 65 70 75 80 Ile Leu His Cys Ser Cys 85			
<210> 135 <211> 70 <212> PRT <213> Homo sapies			
<400> 135 Cys Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro Ile Lys Phe Glu Leu Ser 1 5 10 15 Gly Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys 20 25 30 Thr Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Leu Pro Val 35 40 45 Glu Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met Lys Lys Asn Met Met Phe 50 55 60 Ile Lys Thr Cys Ala Cys 65 70			
<210> 136 <211> 70 <212> PRT <213> 智人			
<400> 136 Cys Leu Arg Thr Lys Lys Ser Leu Lys Ala Ile His Leu Gln Phe Lys 1 5 10 15 Asn Cys Thr Ser Leu His Thr Tyr Lys Pro Arg Phe Cys Gly Val Cys 20 25 30 Ser Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Asn Thr Lys Thr Ile Gln Ala 35 40 45 Glu Phe Gln Cys Ser Pro Gly Gln Ile Val Lys Lys Pro Val Met Val 50 55 60 Ile Gly Thr Cys Thr Cys			

[0060]

65

70

<210> 137
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 137
 Cys Ser Lys Thr Lys Lys Ser Pro Glu Pro Val Arg Phe Thr Tyr Ala
 1 5 10 15
 Gly Cys Leu Ser Val Lys Lys Tyr Arg Pro Lys Tyr Cys Gly Ser Cys
 20 25 30
 Val Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro Gln Leu Thr Arg Thr Val Lys Met
 35 40 45
 Arg Phe Arg Cys Glu Asp Gly Glu Thr Phe Ser Lys Asn Val Met Met
 50 55 60
 Ile Gln Ser Cys Lys Cys
 65 70

<210> 138
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 138
 Gln His Tyr Leu His Ile Arg Pro Ala Pro Ser Asp Asn Leu Pro Leu
 1 5 10 15
 Val Asp Leu Ile Glu His Pro Asp Pro Ile Phe Asp Pro Lys Glu Lys
 20 25 30
 Asp Leu Asn Glu Thr Leu Leu Arg Ser Leu Leu Gly Gly His Tyr Asp
 35 40 45
 Pro Gly Phe Met Ala Thr Ser Pro Pro Glu Asp Arg Pro Gly Gly Gly
 50 55 60
 Gly Gly Ala Ala Gly Gly Ala Glu Asp Leu Ala Glu Leu Asp Gln Leu
 65 70 75 80
 Leu Arg Gln Arg Pro Ser Gly Ala Met Pro Ser Glu Ile Lys Gly Leu
 85 90 95
 Glu Phe Ser Glu Gly Leu Ala Gln Gly Lys Lys Gln Arg Leu Ser Lys
 100 105 110
 Lys Leu Arg Arg Lys Leu Gln Met Trp Leu Trp Ser Gln Thr Phe Cys
 115 120 125
 Pro Val Leu Tyr Ala Trp Asn Asp Leu Gly Ser Arg Phe Trp Pro Arg
 130 135 140
 Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Phe Ser Lys Arg Ser Cys Ser Val Pro
 145 150 155 160
 Glu Gly Met Val Cys Lys Pro Ser Lys Ser Val His Leu Thr Val Leu
 165 170 175
 Arg Trp Arg Cys Gln Arg Arg Gly Gly Gln Arg Cys Gly Trp Ile Pro
 180 185 190
 Ile Gln Tyr Pro Ile Ile Ser Glu Cys Lys Cys Ser Cys
 195 200 205

<210> 139
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

<400> 139
 Gln His Tyr Leu His Ile Arg Pro Ala Pro Ser Asp Asn Leu Pro Leu
 1 5 10 15
 Val Asp Leu Ile Glu His Pro Asp Pro Ile Phe Asp Pro Lys Glu Lys
 20 25 30
 Asp Leu Asn Glu Thr Leu Leu Arg Ser Leu Met Gly Gly His Phe Asp
 35 40 45
 Pro Asn Phe Met Ala Met Ser Leu Pro Glu Asp Arg Leu Gly Val Asp
 50 55 60
 Asp Leu Ala Glu Leu Asp Leu Leu Arg Gln Arg Pro Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Met Pro Gly Glu Ile Lys Gly Leu Glu Phe Tyr Asp Gly Leu Gln Pro
 85 90 95
 Gly Lys Lys His Arg Leu Ser Lys Lys Leu Arg Arg Lys Leu Gln Met
 100 105 110
 Trp Leu Trp Ser Gln Thr Phe Cys Pro Val Leu Tyr Thr Trp Asn Asp

[0061]

115 120 125
 Leu Gly Ser Arg Phe Trp Pro Arg Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Tyr
 130 135 140
 Ser Lys Arg Ser Cys Ser Val Pro Glu Gly Met Val Cys Lys Pro Ala
 145 150 155 160
 Lys Ser Val His Leu Thr Ile Leu Arg Trp Arg Cys Gln Arg Arg Gly
 165 170 175
 Gly Gln Arg Cys Thr Trp Ile Pro Ile Gln Tyr Pro Ile Ile Ala Glu
 180 185 190
 Cys Lys Cys Ser Cys
 195

<210> 140
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Xenopus laevis
 <400> 140
 Gln His Tyr Leu His Ile Arg Pro Ala Pro Ser Glu Asn Leu Pro Leu
 1 5 10 15
 Val Asp Leu Ile Glu His Pro Asp Pro Ile Tyr Asp Pro Lys Glu Lys
 20 25 30
 Asp Leu Asn Glu Thr Leu Leu Arg Thr Leu Met Val Gly His Phe Asp
 35 40 45
 Pro Asn Phe Met Ala Thr Ile Leu Pro Glu Glu Arg Leu Gly Val Glu
 50 55 60
 Asp Leu Gly Glu Leu Asp Leu Leu Arg Gln Lys Pro Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Met Pro Ala Glu Ile Lys Gly Leu Glu Phe Tyr Glu Gly Leu Gln Ser
 85 90 95
 Lys Lys His Arg Leu Ser Lys Lys Leu Arg Arg Lys Leu Gln Met Trp
 100 105 110
 Leu Trp Ser Gln Thr Phe Cys Pro Val Leu Tyr Thr Trp Asn Asp Leu
 115 120 125
 Gly Thr Arg Phe Trp Pro Arg Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Tyr Ser
 130 135 140
 Lys Arg Ser Cys Ser Val Pro Glu Gly Met Val Cys Lys Ala Ala Lys
 145 150 155 160
 Ser Met His Leu Thr Ile Leu Arg Trp Arg Cys Gln Arg Arg Val Gln
 165 170 175
 Gln Lys Cys Ala Trp Ile Thr Ile Gln Tyr Pro Val Ile Ser Glu Cys
 180 185 190
 Lys Cys Ser Cys
 195

<210> 141
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Takifugu rubripes
 <400> 141
 Gln Pro Tyr Tyr Leu Leu Arg Pro Ile Pro Ser Asp Ser Leu Pro Ile
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Lys Glu Asp Pro Gly Pro Val Phe Asp Pro Lys Glu Arg
 20 25 30
 Asp Leu Asn Glu Thr Glu Leu Lys Ser Val Leu Gly Asp Phe Asp Ser
 35 40 45
 Arg Phe Leu Ser Val Leu Pro Pro Ala Glu Asp Gly His Ala Gly Asn
 50 55 60
 Asp Glu Leu Asp Asp Phe Asp Ala Gln Arg Trp Gly Gly Ala Leu Pro
 65 70 75 80
 Lys Glu Ile Arg Ala Val Asp Phe Asp Ala Pro Gln Leu Gly Lys Lys
 85 90 95
 His Lys Pro Ser Lys Lys Leu Lys Arg Arg Leu Gln Gln Trp Leu Trp
 100 105 110
 Ala Tyr Ser Phe Cys Pro Leu Ala His Ala Trp Thr Asp Leu Gly Ser
 115 120 125
 Arg Phe Trp Pro Arg Phe Val Arg Ala Gly Ser Cys Leu Ser Lys Arg
 130 135 140
 Ser Cys Ser Val Pro Glu Gly Met Thr Cys Lys Pro Ala Thr Ser Thr
 145 150 155 160
 His Leu Thr Ile Leu Arg Trp Arg Cys Val Gln Arg Lys Val Gly Leu
 165 170 175
 Lys Cys Ala Trp Ile Pro Met Gln Tyr Pro Val Ile Thr Asp Cys Lys

	180	185	190
Cys Ser Cys			
195			
<210> 142			
<211> 196			
<212> PRT			
<213> Danio rerio			
<400> 142			
Gln His Tyr Tyr Leu Leu Arg Pro Ile Pro Ser Asp Ser Leu Pro Ile			
1 5 10 15			
Val Glu Leu Lys Glu Asp Pro Asp Pro Val Leu Asp Pro Lys Glu Arg			
20 25 30			
Asp Leu Asn Glu Thr Glu Leu Arg Ala Ile Leu Gly Ser His Phe Glu			
35 40 45			
Gln Asn Phe Met Ser Ile Asn Pro Pro Glu Asp Lys His Ala Gly Gln			
50 55 60			
Asp Glu Leu Asn Glu Ser Glu Leu Met Lys Gln Arg Pro Asn Gly Ile			
65 70 75 80			
Met Pro Lys Glu Ile Lys Ala Met Glu Phe Asp Ile Gln His Gly Lys			
85 90 95			
Lys His Lys Pro Ser Lys Lys Leu Arg Arg Arg Leu Gln Leu Trp Leu			
100 105 110			
Trp Ser Tyr Thr Phe Cys Pro Val Val His Thr Trp Gln Asp Leu Gly			
115 120 125			
Asn Arg Phe Trp Pro Arg Tyr Leu Lys Val Gly Ser Cys Tyr Asn Lys			
130 135 140			
Arg Ser Cys Ser Val Pro Glu Gly Met Val Cys Lys Pro Pro Lys Ser			
145 150 155 160			
Ser His Leu Thr Val Leu Arg Trp Arg Cys Val Gln Arg Lys Gly Gly			
165 170 175			
Leu Lys Cys Ala Trp Ile Pro Val Gln Tyr Pro Val Ile Ser Glu Cys			
180 185 190			
Lys Cys Ser Cys			
195			
<210> 143			
<211> 188			
<212> PRT			
<213> 鼠			
<400> 143			
Gln Gly Trp Gln Ala Phe Arg Asn Asp Ala Thr Glu Val Ile Pro Gly			
1 5 10 15			
Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Glu Asn Asn Gln Thr Met Asn			
20 25 30			
Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg Pro Pro His His Pro Tyr Asp Ala Lys			
35 40 45			
Gly Val Ser Glu Tyr Ser Cys Arg Glu Leu His Tyr Thr Arg Phe Leu			
50 55 60			
Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys			
65 70 75 80			
Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg			
85 90 95			
Val Lys Trp Trp Arg Pro Asn Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp			
100 105 110			
Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala			
115 120 125			
Pro Arg Ser Arg Lys Val Arg Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg			
130 135 140			
Leu Thr Arg Phe His Asn Gln Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Pro Glu			
145 150 155 160			
Thr Ala Arg Pro Gln Lys Gly Arg Lys Pro Arg Pro Gly Ala Arg Gly			
165 170 175			
Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu Leu Glu Asn Ala Tyr			
180 185			

共同半胱氨酸主链

1				50
human-gremlin.pro	_____	_____	_____	_____
human-cerberus.pro	MHLLLFOLLV	LLPLGKTTTRH	QDGRQNQSSL	SPVLLPRNQR
human-dan.pro	_____	_____	_____	ELPTGNHEEA
human-beer.pro	_____	_____	_____	_____
51				100
human-gremlin.pro	_____	_____	H SRTAYTVGAI	LLLGTILLPA
human-cerberus.pro	EKPDLFVAV	PHLVAT.SPA	GEGOROREKM	LSRFGRFWIKK
human-dan.pro	_____	_____	PEREMHPSRD	_____
human-beer.pro	_____	_____	_____	MQLPLA LCLVCLLVLHT
101				150
human-gremlin.pro	AI.PPPDKAQ	HNDSEQTQSP	QOPGSRNRRGR	GIGRGTAMPQ
human-cerberus.pro	SDSEPPPPGT	QSLIQPID.G	NKMEKSPLNE	EEVKFVHIFPM
human-dan.pro	_____	_____	_____	FRKTPASQGV
human-beer.pro	AFRVVEGQGW	QAFKNDATEI	IPELGEYPEP	PPELEMKTH NRAENGGRP
151	↓	↓	↓	200
human-gremlin.pro	LHYTERKYLK	RDWICKTOPLK	QTIEHEEGONS	RTIIINRF.CY
human-cerberus.pro	ILPIKSHEVH	NETCRTVYFS	QTITHEGCEK	VVVQNNL.CF
human-dan.pro	INKLALFPDK	SANKEAKNIT	QIVGHSGCCEA	KSIQHRA.CL
human-beer.pro	HHPFETKDV	EYSCRELHFT	RYVTDGPQRS	AKPVTELVC
201	↓	↓	↓	250
human-gremlin.pro	HIRKEEGSFQ	SCSF...	CXP KKFTTMWVTL	NCPELOPPTK K.KRVTRVKQ
human-cerberus.pro	..GAQHSHT	SCSH...	AKFTTMHLPL	NCTELSSVIK V...VMLVEE
human-dan.pro	TFPQSTIESLV	HCDS...	CMP AQSMHEIVTL	ECPGHEEVPR VDKLVEKILH
human-beer.pro	NAIGHGKWAR	PSGPDRICIP	DYRAQRVQL	LCPGGEAPRA RKVRVLVAS..
251				300
human-gremlin.pro	CRC.ISIDLD	_____	_____	_____
human-cerberus.pro	CQCKVKTEHE	DGHILHAGSQ	DSFIPGVSA	_____
human-dan.pro	CSCQACGKEP	SHEGLSVYVQ	GEDGPGSQPG	THPHPHPHPH PGGQTPEPED
human-beer.pro	CKCKRLTRFH	NQSELKDFGT	EAARPQKGRK	PRPRARSAKA NOAELENAY-
301	314			
human-gremlin.pro	_____	_____	_____	_____
human-cerberus.pro	_____	_____	_____	_____
human-dan.pro	PPGAPHTEEE	GAED	_____	_____
human-beer.pro	_____	_____	_____	_____

图 1

由RT-PCR显示的人Beer基因表达

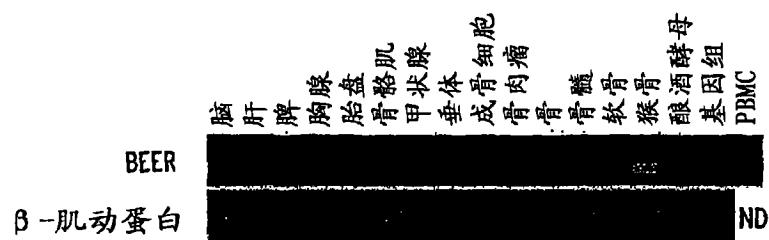


图 2

小鼠胚胎切片的RNA原位杂交

图 3A
图 3B

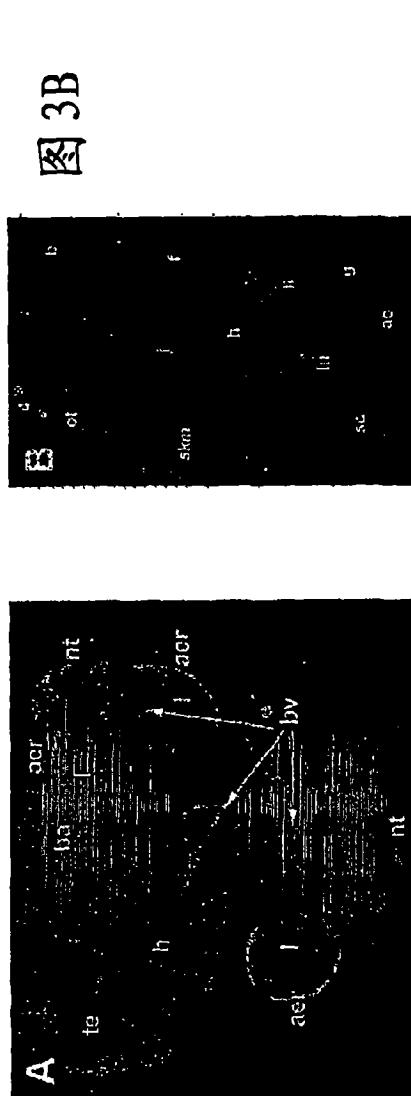
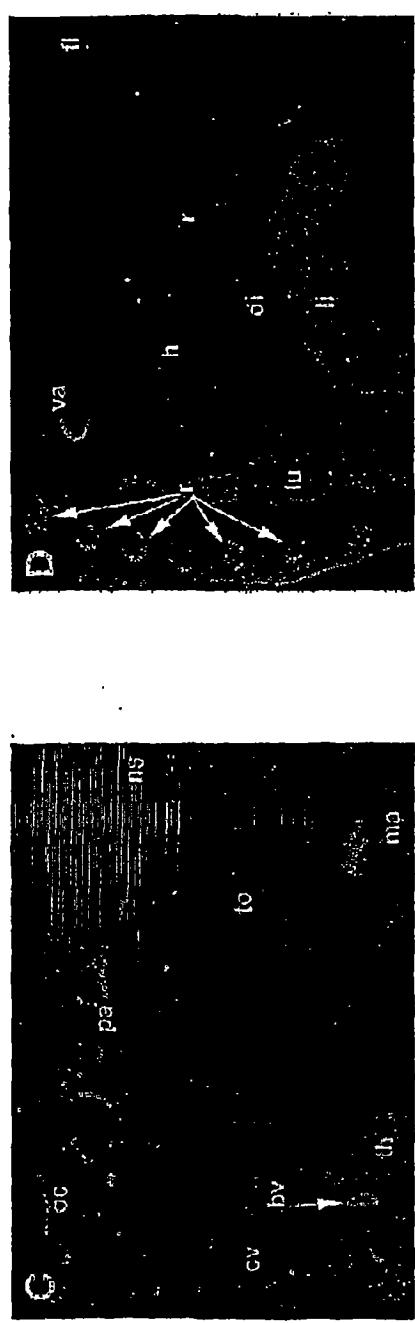


图 3D
图 3C



抗体选择性

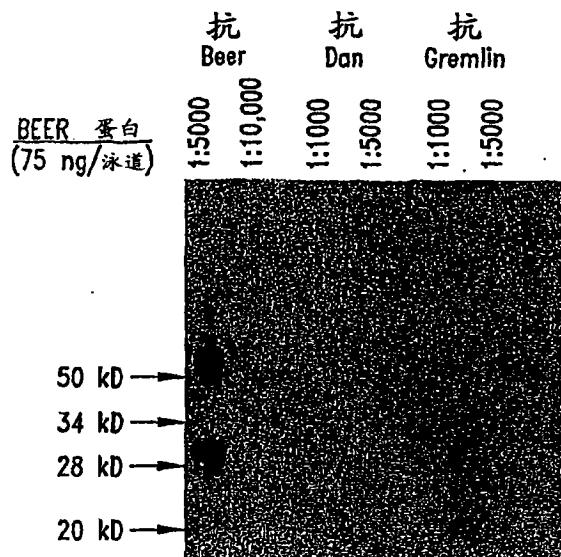


图 4A

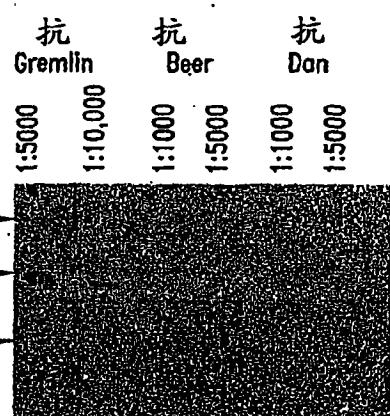


图 4B

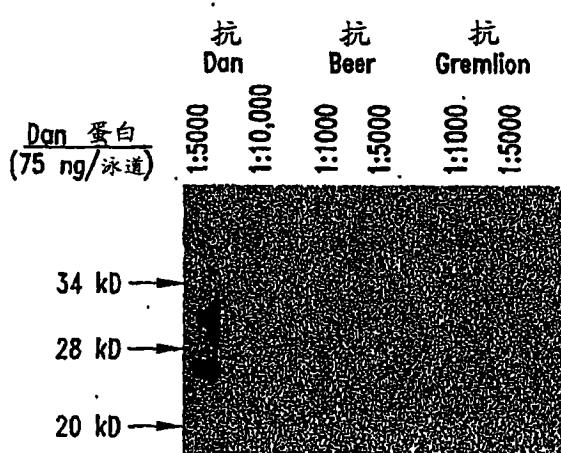


图 4C

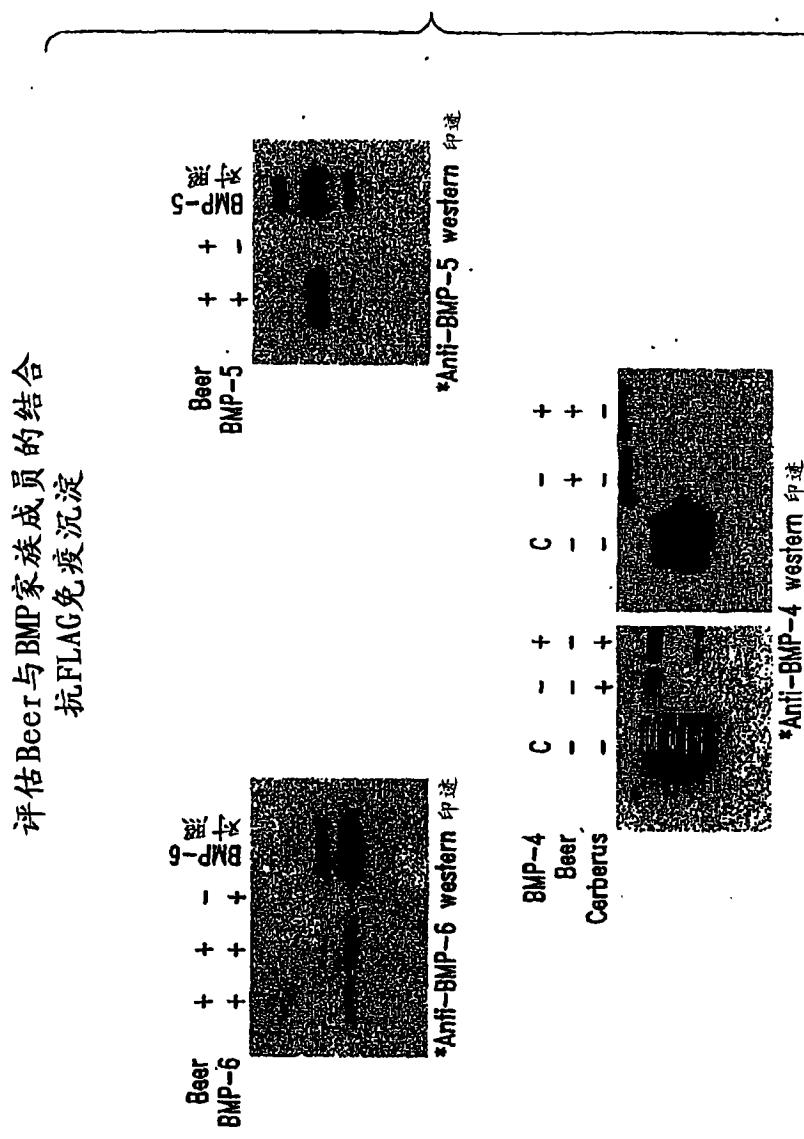
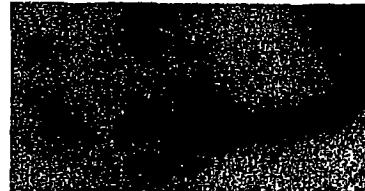


图 5

BMP-5/Beer 解离常数表征

.75 1.5 7.5 15 30 60 120 nM BMP-5

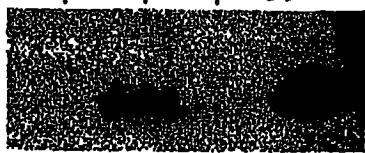


*Anti-FLAG 免疫沉淀

*Anti-BMP-5 western 印迹

BMP-5/Beer结合的离子性破坏

NaCl(mM)	500	150	150	5	BMP-5 western
Beer	+	+	-	-	对照
BMP-5	+	+	+	+	对照



*Anti-FLAG 免疫沉淀

*Anti-BMP-5 western 印迹

图 6

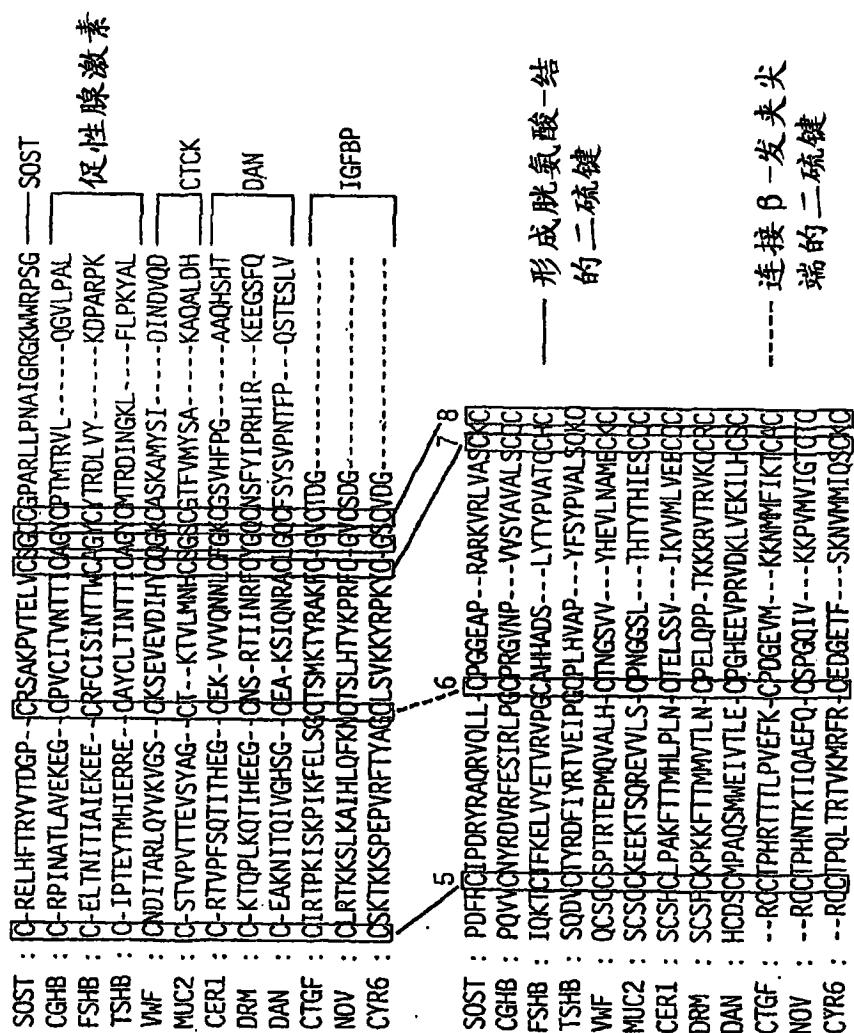


图 7



图 8

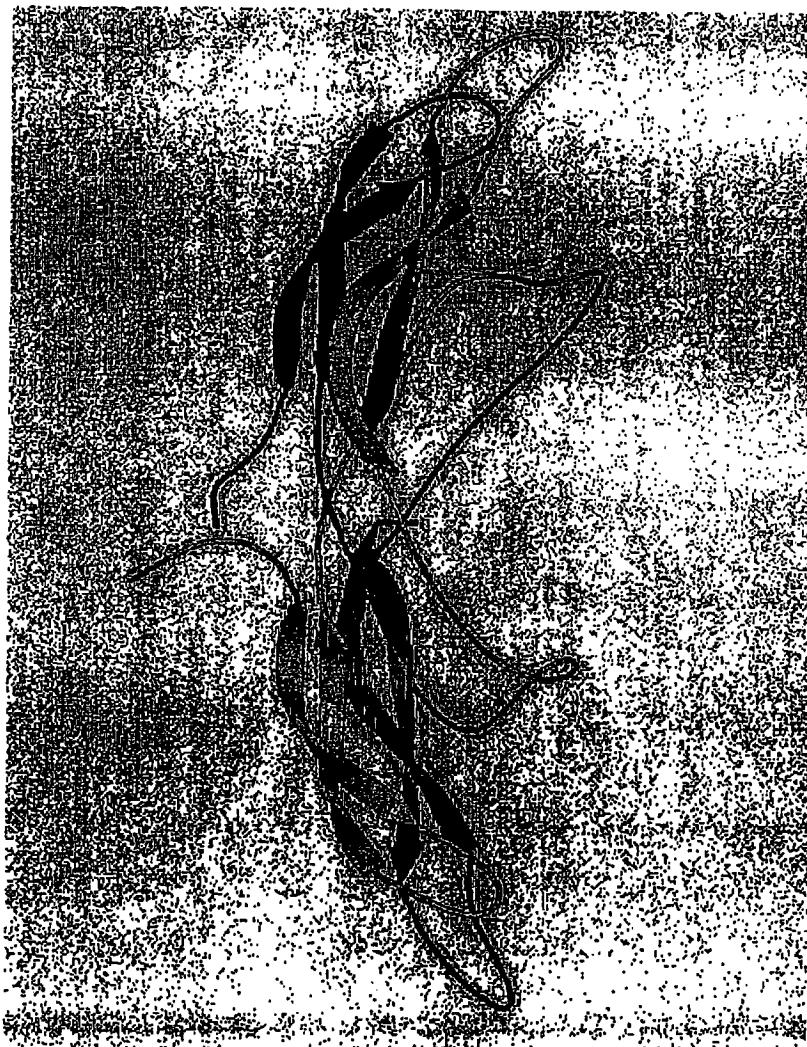


图 9

20	40	60
NOGG_HUMAN : Q-YLHIRPA--FSDNLPV-VOLIE-PDPIFDPKEKOLNETILRSLLGGHNYDPGFMATSPP-EDRPG :	62	
NOGG_CHICK : Q-YLHIRPA--FSDNLPV-VOLIE-PDPIFDPKEKOLNETILRSLLGGHNFDPNFMAMSLP-EDRLG :	62	
NOGG_XENLA : Q-YLHIRPA--FSENLPV-VOLIE-PDPIYDPEKOLNETILRSLLMGSHFDPNFMATLILP-EERLG :	62	
NOGG_FUGRU : QPYVLLRPV--PSDSLPIVELKEPDPVDFPDKEROLNETEIKSVLIG-DFDSRFISVLPPAEDGHA :	62	
NOGG_ZEBRA : Q-YVLLRPV--PSDSLPIVELKEPDPVDFPDKEROLNETEIRAILGSHEQNFMISINPP-EDKHA :	62	
SOST_HUMAN : QGMDA-FKNDATEIIIP-ELGENPEP---PPEIENNMTMRAENGGRP-PHPFETKDV----- :	52	
SOST_RAT : QGMDA-FKNDATEIIIP-GLREMPPEP---PDEIENNMTMRAENGGRP-PHPYDTKDV----- :	52	
SOST_MOUSE : QGMDA-FRNDAEVIP-QLGENPEP---PPEI-NNOTMRAENGGRP-PHPYDAKDV----- :	50	

80	100	120
NOGG_HUMAN : GGGGAAGGAEDIAELDOLLRORPSGAMPSEIKGLEFSEGLAQGKKORLSKKLRRKLQMLVISOTF :	127	
NOGG_CHICK : -----VDDLAELDILLRORPSGAMPGEIKGLEFYDGLOPGKKHRLSKKLRRKLQMLVISOTF :	119	
NOGG_XENLA : -----VEDLGELDILLROKPSGAMPAEIKGLEFYEGLQS-KKHLSSKKLRRKLQMLVISOTF :	118	
NOGG_FUGRU : G-----NDELDDFD-AQR-WGGALPKEIRAVDF-DAPQLGKKHKPSKKLKRRLQQMLWAYSF :	116	
NOGG_ZEBRA : G-----QDELNESE-LMKORPNGLMPKEIKAMEF-DIQ-HGKKHKPSKKLRRRLQMLHSYTF :	117	
SOST_HUMAN : -----SEYS :	56	
SOST_RAT : -----SEYS :	56	
SOST_MOUSE : -----SEYS :	54	

140	160	180
NOGG_HUMAN : ICPIVLYTFLNDLGSRFWIFRMVKVGSCFSKRSCSVPEGI-----VCKPSKGVHL :	173	
NOGG_CHICK : ICPIVLYTFLNDLGSRFWIFRMVKVGSCFSKRSCSVPEGI-----VCKPSKGVHL :	165	
NOGG_XENLA : ICPIVLYTFLNDLGSRFWIFRMVKVGSCFSKRSCSVPEGI-----VCKAAKSMHL :	164	
NOGG_FUGRU : ICPLAHAFLNDLGSRFWIFRMVKVGSCFSKRSCSVPEGI-----TCKPATSTHL :	162	
NOGG_ZEBRA : ICPIVLYTFLNDLGSRFWIFRMVKVGSCFSKRSCSVPEGI-----VCKPKKSSHL :	163	
SOST_HUMAN : CRELHYTRVFTDGP CRSAKPMTTELVC\$-GCGPARILPNAIGRGKQWRPSGPDFRCIIPDRYRAQ :	119	
SOST_RAT : CRELHYTRVFTDGP CRSAKPMTTELVC\$-GCGPARILPNAIGRVKQWRPNGPDFRCIIPDRYRAQ :	119	
SOST_MOUSE : CRELHYTRVFTDGP CRSAKPMTTELVC\$-GCGPARILPNAIGRVKQWRPNGPDFRCIIPDRYRAQ :	117	

图 10A

200	220	240	260
NOGG_HUMAN : TIVLRWRCQ-RPGGGORCGWIPQYVIISEKDOSC----- :	205		
NOGG_CHICK : TIVLRWRCQ-RPGGGORCTWIPQYVIIAEKDOSC----- :	197		
NOGG_XENLA : TIVLRWRCQ-RRVQOKCQAIITIYQVIVISEKDOSC----- :	196		
NOGG_FUGRU : TIVLRWRCQORKVKEIKCAWIPMQYVITIDKDOSC----- :	195		
NOGG_ZEBRA : TIVLRWRCQORKGGGLXCAWIPQYVIVISEKDOSC----- :	196		
SOST_HUMAN : RVIQLLICP-GGI-BAPRKARVRLVASOKCKRLTRFHNIQSELKDFGTEARPQKGRKPRPRARS :	178		
SOST_RAT : RVIQLLICP-GGI-AAPRSRKVRLVASOKCKRLTRFHNIQSELKDFGPETARPQKGRKPRPRARG :	178		
SOST_MOUSE : RVIQLLICP-GGI-AAPRSRKVRLVASOKCKRLTRFHNIQSELKDFGPETARPQKGRKPRPGARG :	176		

NOGG_HUMAN : ----- :	-
NOGG_CHICK : ----- :	-
NOGG_XENLA : ----- :	-
NOGG_FUGRU : ----- :	-
NOGG_ZEBRA : ----- :	-
SOST_HUMAN : AKANQAELENAY :	190
SOST_RAT : AKANQAELENAY :	190
SOST_MOUSE : AKANQAELENAY :	188

图 10B



图 11

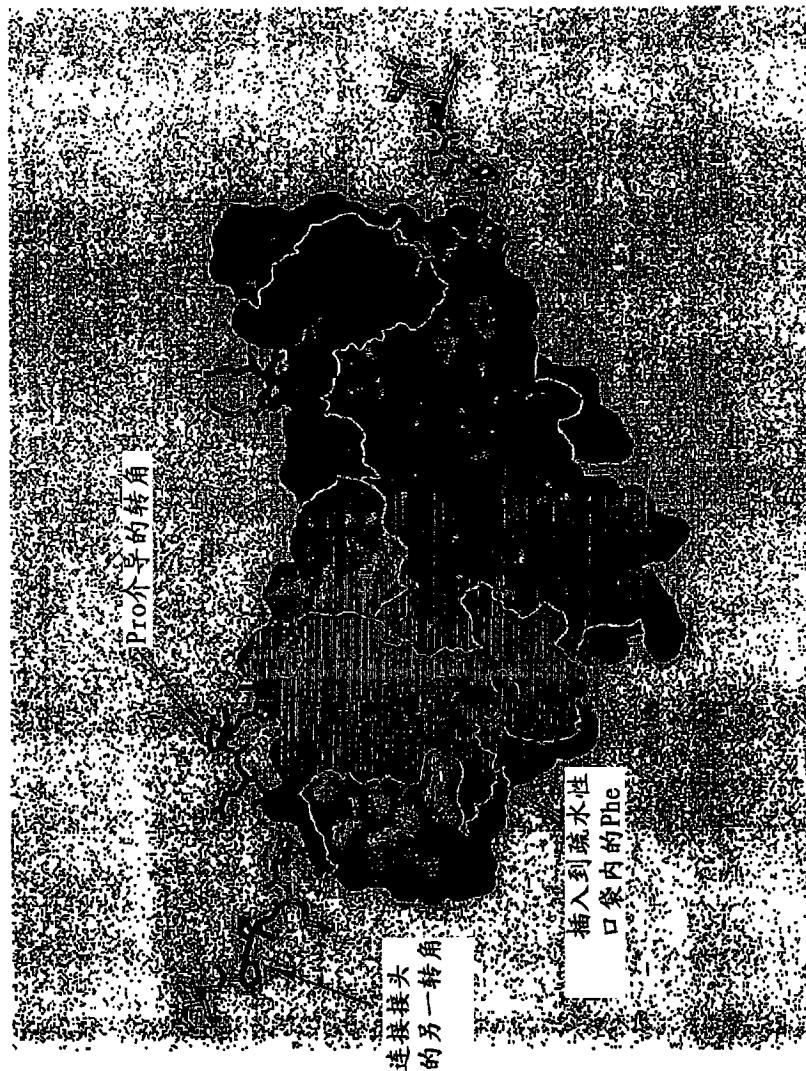


图 12