



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1961003 B

(45) 授权公告日 2013.03.27

(21) 申请号 200580017613.5

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2005.03.31

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/558,290 2004.03.31 US

US 20030064069 A1, 2003.04.03, 第 8 页
0098, 0104 段.

US 2003125251 A1, 2003.07.03, 全文.

US 5821337 A, 1998.10.13, 全文.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2006.11.30

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2005/010994 2005.03.31

审查员 孙婷婷

(87) PCT 申请的公布数据

W02005/097832 EN 2005.10.20

(73) 专利权人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 卡米利亚·W·亚当斯

纳波莱昂内·费拉拉

埃伦·菲尔瓦罗夫 毛维光

伦纳德·G·普雷斯塔

马克斯·L·特加达

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 巫肖南 封新琴

(51) Int. Cl.

C07K 16/22 (2006.01)

权利要求书 5 页 说明书 55 页

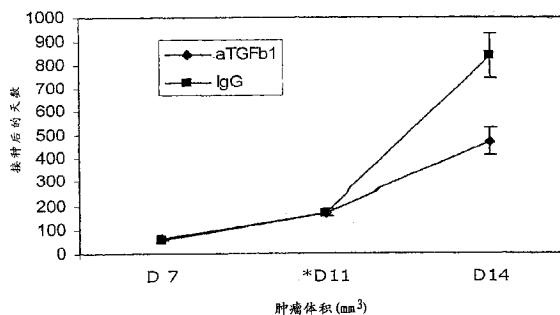
序列表 40 页 附图 35 页

(54) 发明名称

人源化抗 TGF-β 抗体

(57) 摘要

本发明提供了人源化抗 TGF-β 抗体及其制备和使用方法,包括用于治疗 TGF-β 病症,例如癌症的方法。还提供了为各种用途设计的含有所述人源化抗体的产品。



1. 结合 TGF- β 的包含重链可变区 (V_H) 的人源化抗体, 其

(i) 包含轻链可变区 (V_L) 互补决定区 (CDR) 残基 RASQSVLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO : 18) 作为 CDR-L1 ; WASTRES (SEQ ID NO : 19) 作为 CDR-L2 ; 和 HQYLSSDT (SEQ ID NO : 20) 作为 CDR-L3, 且包含重链可变区 (V_H) 互补决定区 (CDR) 残基 GYAFTNYLIE (SEQ ID NO : 21) 作为 CDR-H1 ; VNNPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO : 22) 作为 CDR-H2 ; 和 SGGFYFDY (SEQ ID NO : 23) 作为 CDR-H3, 或

(ii) 包含轻链可变区 (V_L) 互补决定区 (CDR) 残基 RASQSVLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO : 18) 作为 CDR-L1 ; WASTRES (SEQ ID NO : 19) 作为 CDR-L2 ; 和 HQYLSSDT (SEQ ID NO : 20) 作为 CDR-L3, 且包含重链可变区 (V_H) 互补决定区 (CDR) 残基 GYAFTNYLIE (SEQ ID NO : 21) 作为 CDR-H1 ; VINPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO : 43) 作为 CDR-H2 ; 和 SGGFYFDY (SEQ ID NO : 23) 作为 CDR-H3, 或

(iii) 包含轻链可变区 (V_L) 互补决定区 (CDR) 残基 RASQSVLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO : 18) 作为 CDR-L1 ; YASSLQS (SEQ ID NO : 8) 作为 CDR-L2 ; 和 HQYLSSDT (SEQ ID NO : 20) 作为 CDR-L3, 且包含重链可变区 (V_H) 互补决定区 (CDR) 残基 GYAFTNYLIE (SEQ ID NO : 21) 作为 CDR-H1 ; VNNPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO : 22) 作为 CDR-H2 ; 和 SGGFYFDY (SEQ ID NO : 23) 作为 CDR-H3, 或

(vi) 包含轻链可变区 (V_L) 互补决定区 (CDR) 残基 RASQGISSYLA (SEQ ID NO : 7) 作为 CDR-L1 ; YASSLQS (SEQ ID NO : 8) 作为 CDR-L2 ; 和 HQYLSSDT (SEQ ID NO : 20) 作为 CDR-L3, 且包含重链可变区 (V_H) 互补决定区 (CDR) 残基 GYAFTNYLIE (SEQ ID NO : 21) 作为 CDR-H1 ; VNNPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO : 22) 作为 CDR-H2 ; 和 SGGFYFDY (SEQ ID NO : 23) 作为 CDR-H3, 或

(v) 包含轻链可变区 (V_L) 互补决定区 (CDR) 残基 RASQGISSYLA (SEQ ID NO : 7) 作为 CDR-L1 ; YASSLQS (SEQ ID NO : 8) 作为 CDR-L2 ; 和 HQYLSSDT (SEQ ID NO : 20) 作为 CDR-L3, 且包含重链可变区 (V_H) 互补决定区 (CDR) 残基 GYAFTNYLIE (SEQ ID NO : 21) 作为 CDR-H1 ; VINPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO : 43) 作为 CDR-H2 ; 和 SGGFYFDY (SEQ ID NO : 23) 作为 CDR-H3,

所述重链可变区 (V_H) 包含掺入人 V_H 结构域的非人高变区残基, 所述可变区在选自 48、49、68、70、72、74 和 79 的位置上包含 SEQ ID NO : 6 中的构架区 (FR) 取代, 其中

在 (i) 的情况中, (1) 在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸, 在 68 位上苯丙氨酸改变成丙氨酸, 且在 72 位上精氨酸改变成丙氨酸 ; (2) 在 48 位上缬氨酸改变成异亮氨酸, 在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸, 且在 72 位上精氨酸改变成丙氨酸 ; (3) 在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸, 在 70 位上异亮氨酸改变成亮氨酸, 且在 72 位上精氨酸改变成丙氨酸 ; (4) 在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸, 在 70 位上异亮氨酸改变成亮氨酸, 在 72 位上精氨酸改变成丙氨酸, 且在 74 位上天冬酰胺改变成赖氨酸 ; (5) 在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸, 在 72 位上精氨酸改变成丙氨酸, 且在 74 位上天冬酰胺改变成赖氨酸 ; 或 (6) 在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸, 在 72 位上精氨酸改变成丙氨酸, 且在 79 位上亮氨酸改变成丙氨酸, 或

在 (ii)-(v) 的情况中, 在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸, 在 68 位上苯丙氨酸改变成丙氨酸, 且在 72 位上精氨酸改变成丙氨酸。

2. 权利要求 1 所述的人源化抗体, 其中在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸, 在 68 位上苯

丙氨酸改变成丙氨酸,且在72位上精氨酸改变成丙氨酸,且其中所述人源化抗体包含轻链可变区(V_L)互补决定区(CDR)残基RASQSVLYSSNQKNYLA(SEQ ID NO:18)作为CDR-L1;WASTRES(SEQID NO:19)作为CDR-L2;和HQYLSSDT(SEQ ID NO:20)作为CDR-L3,且包含重链可变区(V_H)互补决定区(CDR)残基GYAFTNYLIE(SEQ ID NO:21)作为CDR-H1;VNNPGSGGSNYNEKFKG(SEQ ID NO:22)作为CDR-H2;和SGGFYFDY(SEQ ID NO:23)作为CDR-H3。

3. 权利要求1所述的人源化抗体,其中在48位上缬氨酸改变成异亮氨酸,在49位上丙氨酸改变成甘氨酸,且在72位上精氨酸改变成丙氨酸,且其中所述人源化抗体包含轻链可变区(V_L)互补决定区(CDR)残基RASQSVLYSSNQKNYLA(SEQ ID NO:18)作为CDR-L1;WASTRES(SEQID NO:19)作为CDR-L2;和HQYLSSDT(SEQ ID NO:20)作为CDR-L3,且包含重链可变区(V_H)互补决定区(CDR)残基GYAFTNYLIE(SEQ ID NO:21)作为CDR-H1;VNNPGSGGSNYNEKFKG(SEQ ID NO:22)作为CDR-H2;和SGGFYFDY(SEQ ID NO:23)作为CDR-H3。

4. 权利要求1所述的人源化抗体,其中在49位上丙氨酸改变成甘氨酸,在70位上异亮氨酸改变成亮氨酸,且在72位上精氨酸改变成丙氨酸,且其中所述人源化抗体包含轻链可变区(V_L)互补决定区(CDR)残基RASQSVLYSSNQKNYLA(SEQ ID NO:18)作为CDR-L1;WASTRES(SEQID NO:19)作为CDR-L2;和HQYLSSDT(SEQ ID NO:20)作为CDR-L3,且包含重链可变区(V_H)互补决定区(CDR)残基GYAFTNYLIE(SEQ ID NO:21)作为CDR-H1;VNNPGSGGSNYNEKFKG(SEQ ID NO:22)作为CDR-H2;和SGGFYFDY(SEQ ID NO:23)作为CDR-H3。

5. 权利要求4所述的人源化抗体,其中在74位上天冬酰胺改变成赖氨酸。

6. 权利要求1所述的人源化抗体,其中在49位上丙氨酸改变成甘氨酸,在72位上精氨酸改变成丙氨酸,且在74位上天冬酰胺改变成赖氨酸,且其中所述人源化抗体包含轻链可变区(V_L)互补决定区(CDR)残基RASQSVLYSSNQKNYLA(SEQ ID NO:18)作为CDR-L1;WASTRES(SEQID NO:19)作为CDR-L2;和HQYLSSDT(SEQ ID NO:20)作为CDR-L3,且包含重链可变区(V_H)互补决定区(CDR)残基GYAFTNYLIE(SEQ ID NO:21)作为CDR-H1;VNNPGSGGSNYNEKFKG(SEQ ID NO:22)作为CDR-H2;和SGGFYFDY(SEQ ID NO:23)作为CDR-H3。

7. 权利要求1所述的人源化抗体,其中在49位上丙氨酸改变成甘氨酸,在72位上精氨酸改变成丙氨酸,且在79位上亮氨酸改变成丙氨酸,且其中所述人源化抗体包含轻链可变区(V_L)互补决定区(CDR)残基RASQSVLYSSNQKNYLA(SEQ ID NO:18)作为CDR-L1;WASTRES(SEQID NO:19)作为CDR-L2;和HQYLSSDT(SEQ ID NO:20)作为CDR-L3,且包含重链可变区(V_H)互补决定区(CDR)残基GYAFTNYLIE(SEQ ID NO:21)作为CDR-H1;VNNPGSGGSNYNEKFKG(SEQ ID NO:22)作为CDR-H2;和SGGFYFDY(SEQ ID NO:23)作为CDR-H3。

8. 权利要求1所述的人源化抗体,其中在49位上丙氨酸改变成甘氨酸,在68位上苯丙氨酸改变成丙氨酸,且在72位上精氨酸改变成丙氨酸,且其中所述人源化抗体包含轻链可变区(V_L)互补决定区(CDR)残基RASQSVLYSSNQKNYLA(SEQ ID NO:18)作为CDR-L1;WASTRES(SEQID NO:19)作为CDR-L2;和HQYLSSDT(SEQ ID NO:20)作为CDR-L3,且

包含重链可变区 (V_H) 互补决定区 (CDR) 残基 GYAFTNYLIE (SEQ ID NO :21) 作为 CDR-H1 ; VINPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO :43) 作为 CDR-H2 ; 和 SGGFYFDY (SEQ ID NO :23) 作为 CDR-H3。

9. 权利要求 1 所述的人源化抗体, 其中在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸, 在 68 位上苯丙氨酸改变成丙氨酸, 且在 72 位上精氨酸改变成丙氨酸, 且其中所述人源化抗体包含轻链可变区 (V_L) 互补决定区 (CDR) 残基 RASQSVLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO :18) 作为 CDR-L1 ; YASSLQS (SEQ ID NO :8) 作为 CDR-L2 ; 和 HQYLSSDT (SEQ ID NO :20) 作为 CDR-L3, 且包含重链可变区 (V_H) 互补决定区 (CDR) 残基 GYAFTNYLIE (SEQ ID NO :21) 作为 CDR-H1 ; VNNPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO :22) 作为 CDR-H2 ; 和 SGGFYFDY (SEQ ID NO :23) 作为 CDR-H3。

10. 权利要求 1 所述的人源化抗体, 其中在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸, 在 68 位上苯丙氨酸改变成丙氨酸, 且在 72 位上精氨酸改变成丙氨酸, 且其中所述人源化抗体包含轻链可变区 (V_L) 互补决定区 (CDR) 残基 RASQGISSYLA (SEQ ID NO :7) 作为 CDR-L1 ; YASSLQS (SEQ ID NO :8) 作为 CDR-L2 ; 和 HQYLSSDT (SEQ ID NO :20) 作为 CDR-L3, 且包含重链可变区 (V_H) 互补决定区 (CDR) 残基 GYAFTNYLIE (SEQ ID NO :21) 作为 CDR-H1 ; VNNPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO :22) 作为 CDR-H2 ; 和 SGGFYFDY (SEQ ID NO :23) 作为 CDR-H3。

11. 权利要求 1 所述的人源化抗体, 其中在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸, 在 68 位上苯丙氨酸改变成丙氨酸, 且在 72 位上精氨酸改变成丙氨酸, 且其中所述人源化抗体包含轻链可变区 (V_L) 互补决定区 (CDR) 残基 RASQGISSYLA (SEQ ID NO :7) 作为 CDR-L1 ; YASSLQS (SEQ ID NO :8) 作为 CDR-L2 ; 和 HQYLSSDT (SEQ ID NO :20) 作为 CDR-L3, 且包含重链可变区 (V_H) 互补决定区 (CDR) 残基 GYAFTNYLIE (SEQ ID NO :21) 作为 CDR-H1 ; VINPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO :43) 作为 CDR-H2 ; 和 SGGFYFDY (SEQ ID NO :23) 作为 CDR-H3。

12. 权利要求 1 或 2 所述的人源化抗体, 包含 SEQ ID NO :3 中的 VL 结构域氨基酸序列。

13. 权利要求 1、2 和 12 任一项所述的人源化抗体, 包含 SEQ ID NO :4 中的 V_H 结构域氨基酸序列。

14. 权利要求 1-13 任一项所述的人源化抗体, 为完整 IgG1 抗体。

15. 权利要求 1-13 任一项所述的人源化抗体, 为选自下组的抗体片段: Fab, Fab', F(ab')₂ 和 scFv。

16. 权利要求 15 所述的人源化抗体, 为 Fab 片段。

17. 权利要求 1-16 任一项所述的人源化抗体, 未与胞毒剂偶联。

18. 权利要求 1-16 任一项所述的人源化抗体, 已与胞毒剂偶联。

19. 组合物, 包含权利要求 1-18 任一项所述的人源化抗体和载体。

20. 分离的核酸, 编码权利要求 1-18 任一项所述的人源化抗体。

21. 载体, 包含权利要求 20 所述的核酸。

22. 宿主细胞, 包含权利要求 20 所述的核酸。

23. 生产人源化抗体的方法, 包括培养权利要求 22 所述的宿主细胞, 以便表达所述核酸并产生所述抗体。

24. 权利要求 23 所述的方法, 还包括从所述宿主细胞培养物回收所述抗体。

25. 权利要求 24 所述的方法, 其中从宿主细胞培养基中回收所述抗体。

26. 权利要求 23-25 任一项所述的方法,其中在培养前用包含编码重链可变区的核酸的载体和包含编码轻链可变区的核酸的载体共转染所述宿主细胞。

27. 用于检测身体样品中的 TGF- β 的方法,包括使权利要求 1-18 任一项所述的人源化抗体接触所述身体样品并测定是否发生抗体与 TGF- β 的结合。

28. 用于治疗 TGF- β 病症的产品,包括装有所述人源化抗体的容器和指导使用者用有效量的该抗体治疗哺乳动物中的 TGF- β 病症的说明书,其中所述 TGF- β 病症为癌症,其中所述癌症为结肠癌、结肠直肠癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌或恶性黑色素瘤。

29. 权利要求 28 所述的产品,额外包括装有所述人源化抗体以外的治疗剂的容器,其中所述说明书指导使用者使用所述抗体联合有效量的所述治疗剂治疗所述病症,所述治疗剂为结合血管内皮生长因子的抗体。

30. 权利要求 29 所述的产品,其中所述结合血管内皮生长因子的抗体为 AVASTIN。

31. 权利要求 28-30 任一项所述的产品,其中所述哺乳动物为人。

32. 权利要求 1-18 任一项所述的人源化抗体在制备治疗哺乳动物 TGF- β 病症的药物中的用途,其中所述病症为癌症,其中所述癌症为结肠癌、结肠直肠癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌或恶性黑色素瘤。

33. 权利要求 32 所述的用途,其中所述哺乳动物为灵长类。

34. 权利要求 32 或 33 所述的用途,其中所述哺乳动物为人。

35. 权利要求 32-34 任一项所述的用途,其中所述药物还包括有效量的所述人源化抗体以外的治疗剂,所述治疗剂为结合血管内皮生长因子的抗体。

36. 权利要求 35 所述的用途,其中所述结合血管内皮生长因子的抗体为 AVASTIN。

37. 权利要求 35 所述的用途,其中所述结合血管内皮生长因子的抗体为完整抗体。

38. 权利要求 35 所述的用途,其中所述结合血管内皮生长因子的抗体为选自下组的抗体片段:Fab, Fab', F(ab')₂ 和 scFv。

39. 权利要求 38 所述的用途,其中所述抗体片段为 Fab 片段。

40. 权利要求 35-39 任一项所述的用途,其中所述结合血管内皮生长因子的抗体已与胞毒剂偶联。

41. 权利要求 35-39 任一项所述的用途,其中所述结合血管内皮生长因子的抗体未与胞毒剂偶联。

42. 权利要求 1-18 任一项的人源化抗体和结合血管内皮生长因子的抗体在制备治疗哺乳动物癌症的药物中的用途,其中所述癌症为结肠癌、结肠直肠癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌或恶性黑色素瘤。

43. 权利要求 42 所述的用途,其中所述哺乳动物为人。

44. 权利要求 42 或 43 所述的用途,其中所述结合血管内皮生长因子的抗体为 AVASTIN。

45. 权利要求 42-44 任一项所述的用途,其中所述 TGF- β 抗体结合 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 中的任一种或多种。

46. 权利要求 42-45 任一项所述的用途,其中所述抗体结合 TGF- β 1。

47. 权利要求 42-46 任一项所述的用途,其中所述抗体结合 TGF- β 1 和 TGF- β 2。

48. 权利要求 1-18 任一项所述的人源化抗体在制备用于检测身体样品中的 TGF- β 的药物中的用途,所述检测包括使所述人源化抗体接触所述身体样品并测定是否发生抗体与 TGF- β 的结合。

人源化抗 TGF- β 抗体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2004 年 3 月 31 日提交的美国临时申请 60/558,290 的优先权,在 35 U. S. C. § 119 下本申请要求该美国临时申请的优先权,将其内容引入本文作为参考。

发明领域

[0003] 本发明涉及人源化抗 TGF- β 抗体及其制备方法和使用它们治疗 TGF- β 相关病症的方法。例如,所述抗体可用于免疫亲和纯化、免疫测定、体内成像、放射性受体测定和需要拮抗 TGF- β 活性,特别是 TGF- β 1 活性的治疗。

[0004] 发明背景

[0005] 转化生长因子- β (TGF- β) 为最初因其将正常成纤维细胞转化成能不依赖锚泊生长的细胞的能力而命名的多功能细胞因子。主要由造血细胞和肿瘤细胞产生的 TGF- β 可调节,即刺激或抑制来源于各种正常和肿瘤组织的细胞的生长和分化 (Sporn 等, Science, 233 :532(1986)), 并刺激各种基质成分的形成和加工 (elaboration)。关于 TGF- β 及其作用的一般性综述参见 Sporn 等, J. Cell Biol., 105 :1039-1045(1987) 及 Sporn 和 Roberts, Nature, 332 :217-219(1988)。

[0006] 已知它们涉及许多增殖性和非增殖性细胞过程,诸如细胞增殖和分化、胚胎发育、胞外基质形成、骨发育、创伤愈合、血细胞生成及免疫和炎症应答。Pircher 等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 136 :30-37(1986); Wakefield 等, Growth Factors, 1 :203-218(1989); Roberts 和 Sporn, pp 419-472 in Handbook of Experimental Pharmacology M. B. Sporn 和 A. B. Roberts 编, Springer, Heidelberg, 1990; Massague 等, Annual Rev. Cell Biol., 6 :597-646(1990); Singer 和 Clark, New Eng. J. Med., 341 :738-745(1999)。此外, TGF- β 用于治疗 and 预防肠粘膜疾病。WO 2001/24813。

[0007] 从免疫学观点来看特别令人关注的是 TGF- β 的有效免疫抑制活性,包括淋巴因子激活的杀伤细胞 (LAK) 和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 抑制 (Ranges 等, J. Exp. Med., 166 :991(1987); Espevik 等, J. Immunol., 140 :2312(1988); Grimm 等, Cancer Immunol. Immunother., 27 :53(1988); Kasid 等, J. Immunol., 141 :690(1988); Mule 等, Cancer Immunol. Immunother., 26 :95(1988)、抑制的 B 细胞淋巴细胞生成和 κ 轻链表达 (Lee 等, J. Exp. Med., 166 :1290(1987))、血细胞生成的负调节 (Hino 等, Br. J. Haematol., 70 :143(1988); Sing 等, Blood, 72 :1504(1988))、肿瘤细胞上 HLA-DR 表达的下调 (Czarniecki 等, J. Immunol., 140 :4217(1988); Zuber 等, Eur. J. Immunol., 18 :1623(1988))、及响应 B 细胞生长因子的抗原活化 B 淋巴细胞增殖的抑制 (Petit-Koskas 等, Eur. J. Immunol., 18 :111(1988))。许多人肿瘤 (deMartin 等, EMBO J., 6 :3673(1987); Kuppner 等, Int. J. Cancer, 42 :562(1988)) 和许多肿瘤细胞系 (Derynck 等, Cancer Res., 47 :707(1987); Roberts 等, Br. J. Cancer, 57 :594(1988)) 产生 TGF- β 的观察结果提示了那些肿瘤避免正常免疫监视的可能机制。这种负免疫调节与某些转化细胞系失去以自分泌方式响应 TGF- β 的能力 (Wakefield 等, J. Cell Biol., 105 :965(1987); McMahon 等, Cancer

Res., 46 :4665 (1986)) 和 TGF- β 刺激基质形成并减少对肿瘤的免疫监视的观察结果结合,提示了瘤性失调和增殖的有吸引力的模型 (Roberts 等, Br. J. Cancer, 同上)。

[0008] 此外,美国专利 5,824,297 和 5,262,319 披露了通过对正常细胞施用 TGF- β , 诸如 TGF- β 3 抑制其细胞毒性中毒的方法。

[0009] 目前鉴定的 TGF- β 至少存在 5 种形式:TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 和 TGF- β 5。已知用于从不同物种,诸如人、小鼠、绿猴、猪、牛、鸡和蛙及从不同身体来源,诸如骨、血小板或胎盘纯化该 TGF- β 家族,用于在重组细胞培养物中产生它,及用于测定其活性的合适方法。例如参见 Derynck 等, Nature, 316 :701-705 (1985); 1986 年 12 月 10 日公布的欧洲专利公开号 200,341、1986 年 1 月 22 日公布的 169,016、1988 年 5 月 25 日公布的 268,561 和 1988 年 5 月 18 日公布的 267,463; 美国专利 4,774,322; Cheifetz 等, Cell, 48 :409-415 (1987); Jakowlew 等, Molecular Endocrin., 2 :747-755 (1988); Dijke 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.), 85 :4715-4719 (1988); Derynck 等, J. Biol. Chem., 261 :4377-4379 (1986); Sharples 等, DNA, 6 :239-244 (1987); Derynck 等, Nucl. Acids. Res., 15 :3188-3189 (1987); Derynck 等, Nucl. Acids. Res., 15 :3187 (1987); Derynck 等, EMBO J., 7 :3737-3743 (1988); Seyedin 等, J. Biol. Chem., 261 :5693-5695 (1986); Madisen 等, DNA, 7 :1-8 (1988); 和 Hanks 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.), 85 :79-82 (1988), 明确将这些出版物的全部内容引入作为参考。

[0010] TGF- β 1 的活化形式为通过 390 个氨基酸的前体的羧基末端 112 个氨基酸二聚化形成的同二聚体 (Derynck 等, Nature, 同上)。TGF- β 2 具有 414 个氨基酸的前体形式,且还从羧基末端 112 个氨基酸加工成同二聚体,与 TGF- β 1 活性形式共享约 70% 同源性 (Marquardt 等, J. Biol. Chem., 262 :12127 (1987))。已从猪血小板 (Seyedin 等, J. Biol. Chem., 262 :1946-1949 (1987)) 和人成胶质细胞瘤细胞 (Wrann 等, EMBO J., 6 :1633 (1987)) 纯化得到 TGF- β 2 并已克隆重组人 TGF- β 2 (deMartin 等, 同上)。已克隆重组 TGF- β 1 (Derynck 等, Nature, 同上) 并在中国仓鼠卵巢细胞中表达 (Gentry 等, Mol. Cell. Biol., 7 :3418-3427 (1987))。关于目前分别公认为 TGF- β 1 和 2 的 CIF-A 和 CIF-B 参见美国专利 4,774,322、4,843,063 和 4,848,063。Ellingsworth 等, J. Biol. Chem., 261 :12362-12367 (1986)。尽管在两种形式 (TGF- β 1 和 TGF- β 2) 的前 36 个氨基酸残基中存在 14 个氨基酸差异,但是它们的生物学活性相似。Cheifetz 等, Cell, 48 :409-415 (1987); Seyedin 等, J. Biol. Chem., 262 :同上。

[0011] TGF- β 的最新发现形式 TGF- β 3、TGF- β 4 和 TGF- β 5 是通过筛选 cDNA 文库鉴定到的。这三种推定的蛋白质没有一种已从天然来源分离到,不过 RNA 印迹证实了相应 mRNA 的表达。已经克隆了人和猪 TGF- β 3 并描述为同二聚体且在中国仓鼠卵巢细胞中得到表达 (Derynck 等, EMBO J., 7 :3737-3743 (1988); ten Dijke 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 :4715 (1988); 美国专利 4,886,747)。另外,有关 TGF- β 3 蛋白质及其抗体参见 WO 1992/00318。TGF- β 1 不同于 TGF- β 2 的方面在于 27 个主要保守改变,而不同于 TGF- β 3 的方面在于 22 个主要保守改变。已经将这些差异与 3D 结构联系起来。Schlunegger 和 Grutter, Nature, 358 :430-434 (1992)。

[0012] TGF- β 4 和 TGF- β 5 分别克隆自鸡软骨细胞 cDNA 文库 (Jakowlew 等, Molec. Endocrinol., 2 :1186-1195 (1988)) 和蛙卵母细胞 cDNA 文库。可以使用衍生自另一种类

型 TGF- β 的一种或多种序列的探针筛选蛙卵母细胞 cDNA 文库。在鸡胚软骨细胞中可检测到 TGF- β 4 mRNA, 但远不如在发育中的胚胎或鸡胚成纤维细胞中的 TGF- β 3 mRNA 丰富。TGF- β 5 mRNA 在超出神经胚态 (neurula state) 的蛙胚胎和非洲蟾蜍属 (Xenopus) 蝌蚪 (XTC) 细胞中表达。

[0013] 美国专利 5,061,786、5,268,455 和 5,801,231 描述了 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 的重组生产。另外, 有关用于治疗激素响应性癌和产生抗体的 TGF- β 2 参见美国专利 5,120,535。如美国专利 4,931,548 和 5,304,541 中所述, 已经鉴定了称作 TGF- β 1.2 的 TGF- β 1 和 TGF- β 2 的异二聚体并演示了其用途, 后者披露了其抗体。1989 年 7 月 20 日提交的 WO 1990/00900 披露了用同二聚体 TGF- β 1 和 - β 2 和异二聚体 TGF- β 1.2 治疗炎症病症。美国专利 5,462,925 披露了 TGF- β 2 和 TGF- β 3 的异二聚体。美国专利 5,780,436 披露了 TGF- β 的小肽模拟物。

[0014] TGF- β 活性水平升高涉及许多病理情况, 包括但不限于如下情况: (i) 创伤愈合过程中的纤维化、瘢痕形成和粘连; (ii) 肺、肝和肾的纤维变性疾病; (iii) 动脉粥样硬化和动脉硬化; (iv) 某些类型的癌症, 包括前列腺癌、消化系统的神经内分泌瘤、宫颈癌、胶质细胞瘤和胃癌; (v) 血管病、血管病变、肾病; (vi) 全身性硬化症; (vii) 病毒感染, 诸如丙型肝炎和 HIV; 及 (viii) 免疫和炎症病症及缺陷, 诸如类风湿性关节炎。TGF- β 调节免疫和炎症应答包括: (i) 抑制所有 T 细胞亚群的增殖; (ii) 对 B 淋巴细胞增殖和功能的抑制作用; (iii) 对天然杀伤细胞活性和 T 细胞应答的下调; (iv) 对免疫细胞细胞因子产生的调节; (v) 对巨噬细胞功能的调节; 及 (vi) 白细胞募集和活化。

[0015] 特别就癌症而言, 已知 TGF- β 家族的成员具有许多与肿瘤发生 (包括血管发生) 和转移相关的生物学活性。TGF- β 抑制许多细胞类型的增殖, 包括毛细血管内皮细胞和平滑肌细胞。TGF- β 下调整联蛋白表达 (涉及内皮细胞迁移的 $\alpha 1 \beta 1$ 、 $\alpha 2 \beta 1$ 和 $\alpha v \beta 3$)。整联蛋白涉及所有细胞的迁移, 包括转移细胞。TGF- β 下调血管发生和转移所需的基质金属蛋白酶表达。TGF- β 诱导纤溶酶原激活物抑制剂, 它抑制血管发生和转移所需的蛋白酶级联。TGF- β 诱导正常细胞以便抑制转化细胞。例如参见 Yingling 等, *Nature Reviews*, 3(12):1011-1022 (2004), 它披露了 TGF- β 的失调涉及多种疾病, 包括癌症和纤维化的发病机理, 并为评价 TGF- β 信号传导抑制剂作为癌症治疗剂、生物标志物 / 诊断剂、研发中的小分子抑制剂的结构、及应用其研发的靶向药物研发模型提供了基本原理。癌症的早期检测是非常重要的 (Ruth 等, *Nature Reviews Cancer*, 3:243-252 (2003)), 且正在研究癌症转移的发病机理。Fidler, *Nature Reviews Cancer*, 3:453-458 (2003)。

[0016] TGF- β 已经通过调节内皮细胞增殖、迁移、胞外基质 (ECM) 代谢和黏着分子表达而表现为血管发生的主要调节物。它是正常乳腺上皮细胞和许多乳腺癌细胞系的有效生长抑制剂。TGF- β 看起来以前后关系 (contextual) 的方式在乳腺癌的肿瘤生成中发挥多效性作用, 即它通过直接抑制血管发生和肿瘤细胞生长在早期阶段抑制肿瘤发生。然而, 晚期肿瘤过度产生 TGF- β 可能通过间接刺激血管发生和免疫抑制而加速疾病发展。细胞膜抗原 CD105 (内皮糖蛋白) 结合 TGF β 1 和 TGF β 3 且优先在生血管的血管内皮细胞中表达。HUVEC 中 CD105 水平的下降在有 TGF- β 1 存在下在体外导致血管发生抑制和大量细胞死亡。CD105 裸鼠在子宫内死于脉管系统受损, 这表明了 CD105 在血管发育中的关键作用。Li 等, *Microsc. Res. Tech.*, 52:437-449 (2001)。在 TGF- β I 型受体缺陷型小鼠中观察到异常血

管发生,但造血能力完整。Larsson 等, EMBO J., 20(7):1663-1673(2001)。此外, TGF- β II 型受体缺陷导致卵黄囊血细胞生成和血管发生缺陷。Oshima 等, Developmental Biology, 179(1):297-302(1996)。此外,在 TGF- β III 型受体缺陷型胚胎中观察到心和肝缺陷以及转化生长因子 β 2 敏感性下降。Stenvers 等, Mol. Cell. Biol., 23(12):4371-4385(2003)。此外,小鼠 TGF- β 1 基因的靶向破坏导致多病灶炎性疾病。Shull 等, Nature, 359(6397):693-699(1992)。发现 TGF- β 1 裸鼠中的早期发作多病灶炎症为淋巴细胞介导的。Diebold 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 92(26):12215-12219(1995)。

[0017] TGF- β 最重要的非增殖性功能在于促进胞外基质的形成。尽管这主要通过胶原和纤连蛋白两者转录增加来实现,但是抑制蛋白酶降解基质也有助于其稳定性。胞外基质的降解因蛋白酶自身分泌下降和蛋白酶抑制剂水平同时升高而受到抑制。

[0018] WO 1984/001106 描述了 TGF- β 1 及其用于促进细胞增殖和组织修复、创伤愈合和外伤治疗的应用。美国专利 4,806,523 披露了 TGF- β 1 和 TGF- β 2 均具有抗炎活性且为促分裂原刺激的 T 细胞增殖和 B 细胞活化的抑制剂。还报导了 TGF- β 位于血细胞生成和淋巴细胞生成中心,且由此 TGF- β 可用于治疗与血细胞生成或淋巴细胞生成机能障碍或机能不良相关的适应征。

[0019] 已经证实 TGF- β 2 为人眼神经视网膜、视网膜色素上皮-脉络膜和玻璃体中 TGF- β 的主要同种型 (Pfeffer 等, Exp. Eye Res., 59:323-333(1994)),且在来自进行内障摘出术及人造晶状体植入的人眼样本中的房水中发现。Jampel 等, Current Eye Research, 9:963-969(1990)。未转化的人视网膜色素上皮细胞主要分泌 TGF- β 2。Kvanta, Ophthalmic Res., 26:361-367(1994)。

[0020] 有可能可用针对 TGF- β 的抗体治疗的其它疾病包括成人呼吸窘迫综合征、肝硬化、后壁心肌梗死 (post-myocardial infarction)、血管成形术后再狭窄、瘢痕疙瘩和硬皮病。骨质疏松症中 TGF- β 2 表达水平的升高 (Erlenbacher 等 J. Cell Biol., 132:195-210(1996)) 意味着它是有可能可用针对 TGF- β 2 的抗体治疗的疾病。

[0021] 由于许多严重病理情况涉及 TGF- β , 所以相当关注 TGF- β 抑制剂的研发。TGF- β 抑制剂的许多建议涉及抗体。

[0022] 分离对相同物种的 TGF- β 具有特异性的抗体片段是一项高要求的任务。动物一般不产生针对自身抗原的抗体,这种现象称作耐受 (Nossal, Science, 245:147-153(1989))。一般来说,用自身抗原接种不会产生循环抗体。因此,难以生成对人自身抗原的人抗体。此外,对人接种还存在伦理问题。就生成对 TGF- β 具有特异性的非人抗体而言,存在许多问题。TGF- β 为免疫抑制性分子,且在人与小鼠 TGF- β 分子之间还存在强序列保守性。小鼠与人 TGF- β 1 的区别仅在于一个氨基酸残基,即隐蔽残基处丙氨酸(人)-丝氨酸(小鼠)的改变。Derynck 等, J. Biol. Chem., 261:4377-4379(1986)。小鼠与人 TGF- β 2 的区别仅在于三个残基,即残基 59(T 小鼠;S 人);残基 60(K 小鼠;R 人)和残基 94(N 小鼠;K 人)。这使得难以在小鼠中生成针对人 TGF- β 的抗体。此外,生成的任何抗体可能仅针对有限的一组表位。

[0023] 如美国专利 6,143,559 所述,已经通过免疫鸡并使 B 细胞永生产生了针对 TGF- β 的单克隆抗体,用于例如疾病的诊断和被动治疗。

[0024] 已经在兔 (Danielpour 等, Growth Factors, 2:61-71(1989); Roberts 等,

Growth Factors, 3:277-286 (1990))、鸡 (R&D Systems, Minneapolis) 和火鸡 (Danielpour 等, J. Cell Physiol., 138:79-86 (1989); Danielpour 和 Sporn, J. Cell Biochem., 13B:84 (1989)) 中生成了结合人 TGF- β 1 和人 TGF- β 2, 针对中和性和非中和性表位的多克隆抗体。

[0025] 还将代表部分或完整 TGF- β 序列的肽用作在兔中生成中和性多克隆抗血清的免疫原。Ellingsworth 等, J. Biol. Chem., 261:12362 (1986); Ellingsworth 等, Cell. Immunol., 114:41 (1988); Border 等, Nature, 346:371-374 (1990); Flanders, Biochemistry, 27:739-746 (1988); Flanders 等, Growth Factors, 3:45-52 (1990); Flanders 等, Development, 113:183-191 (1991)。此外, 对分离针对 TGF- β 的小鼠单克隆抗体存在有限的报导。在用牛 TGF- β 2 (等同于人 TGF- β 2) 免疫接种后, 分离了三种对 TGF- β 2 具有特异性的非中和性单克隆抗体和一种对 TGF- β 1 和 TGF- β 2 具有特异性的中和性抗体。Dasch 等, J. Immunol., 142:1536-1541 (1989)。在另一篇报导中, 在用人 TGF- β 1 免疫接种后, 分离了对 TGF- β 1 具有特异性或与 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 发生交叉反应的中和性抗体。Lucas 等, J. Immunol., 145:1415-1422 (1990)。已经证实对人和猪 TGF- β (Keski-Oja 等, Cancer Res., 47:6451-6458 (1987)) 和对猪 TGF- β 2 (Rosa 等, Science, 239:783-785 (1988)) 的多克隆抗血清分别中和 TGF- β 1 和 TGF- β 2 的生物学活性。Roberts 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:4167-4171 (1986) 描述了兔抗 TGF- β 血清。此外, 已经使用兔抗血清建立了针对 TGF- β 1 的 RIA, 从而可以对血小板聚集过程中释放的蛋白质进行定量。Assoian 和 Sporn, J. Cell Biol., 102:12178-1223 (1986)。

[0026] 结合 TGF- β 2 和 TGF- β 3 两种同种型的中和性小鼠单克隆抗体可从 Genzyme Diagnostics 购得。针对人 TGF- β 1 的小鼠单克隆抗体可从 R&D Systems 购得。这种抗体在中和试验中仅微弱中和 TGF- β 1。还从用包含 48-60 位氨基酸 (与 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 反应的抗体) 和 86-101 位氨基酸 (对 TGF- β 1 具有特异性的抗体) 的人 TGF- β 1 肽免疫的小鼠中产生了中和性小鼠单克隆抗体。Hoefer 和 Anderer, Cancer Immunol. Immunother., 41:302-308 (1995)。

[0027] 噬菌体抗体技术 (WO 1992/01047; WO 1993/19172; WO 1992/20791; WO 1993/06213; 和 WO 1993/11236) 提供了直接分离针对人 TGF- β 的人抗体的能力。已经描述了从噬菌体上展示的抗体片段全集分离抗自身抗体。Griffiths 等, EMBO J., 12:725-734 (1993); Nissim 等, EMBO J., 13:692-698 (1994); Griffiths 等, 13:3245-3260 (1994); Barbas 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:10003-10007 (1993); 和 WO 1993/11236。此外, Tempest 等, Immunotechnology, 2:306 (1996) 描述了衍生自噬菌体展示文库, 对人 TGF- β 具有特异性的人抗体。

[0028] WO 1997/13844 披露了对人 TGF- β 1 具有特异性的人抗体和对人 TGF- β 2 具有特异性的人抗体的分离。它描述了含有 31G9 VH 结构域和该结构域变体的抗体, 更具体地说是包括 31G9 VH 结构域及 CS37 VL 和该结构域的变体的抗体 CS37, 包括如下抗体: (i) 在 ELISA 中与 CS37 竞争性结合 TGF- β 1; (ii) 相对于 TGF- β 3 而言, 优先结合 TGF- β 1; 及 (iii) 中和 TGF- β 1。

[0029] 美国专利 6,492,497 基于涉及 CS37, 但在结合和中和 TGF- β 1 方面具有令人意外有利特性的抗体的鉴定。它们不结合或中和 TGF- β 2 或 TGF- β 3。这些抗体的表位位于

TGF- β 1 的 C-末端区(残基 83-112)且包含由 TGF- β 1 的残基 92-98 组成的环,也称作指 2(finger 2),即已经鉴定为与 TGF- β 的受体发生相互作用的区。

[0030] 1995 年 7 月 26 日公布的 JP 95068278 B2 披露了对人 TGF- β 1 具有高度特异性且可用于肿瘤诊断和亲和层析的单克隆抗体。

[0031] WO 1991/19513 披露了 TGF- β 及其拮抗剂在调节血压及分别在治疗高血压和低血压中的应用。

[0032] WO 1991/15223 披露了可以与特异性结合 TGF- β 1 的火鸡抗 TGF- β 抗体一起温育的纯化的突发性呼吸抑制因子。该抗体完全中和 TGF- β 1 对活化巨噬细胞的活性,但对突发性呼吸抑制因子对巨噬细胞的活性没有影响。

[0033] WO 1991/04748 和 WO 1993/10808 披露了通过接触 ECM 产生活性抑制剂,诸如抗 TGF- β 抗体在诊断和治疗纤维变性疾病,诸如肾小球肾炎中抑制 TGF- β 活性和胞外基质蓄积。还披露了针对来自 TGF- β 的线性肽的抗体和产生所述抗体的细胞。

[0034] 美国专利 5,888,705 披露了诱导成人胰腺细胞增殖或其分化的方法,通过使这类细胞的原代培养物接触单独的肝细胞生长因子或联合抗 TGF- β 抗体来进行。

[0035] WO 2001/66140 披露了 TGF- β 激动剂,诸如抗体在治疗或预防肾功能丧失中的应用。

[0036] WO 2000/40227 披露了使用抑制 TGF- β 的试剂,诸如抗体治疗与过量胞外基质蓄积相关的疾患的方法。

[0037] Miyajima 等,Kidney International,58:2301-2313(2000) 披露了 TGF- β 的抗体在单侧输尿管梗阻中改善管的凋亡。

[0038] Ziyadeh 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,97(14):8015-8020(2000) 披露了在 db/db 糖尿病小鼠中通过单克隆抗 TGF- β 抗体治疗长期预防肾机能不全、过度基质基因表达和肾小球系膜基质膨胀。

[0039] Han 和 Ziyadeh,Peritoneal dialysis international,19 Suppl 2:S234-237(1999) 披露了在实验性糖尿病肾病中使用中和性抗 TGF- β 抗体的有利治疗效果。发现 TGF- β 为高血糖和糖尿病性肾病中的关键介质。Sharma 和 Ziyadeh,Diabetes,44(10):1139-46(1995)。Border 等,Diabetes Metab. Rev.,12/4:309-339(1996) 披露了 TGF- β 在糖尿病性肾病中的应用。

[0040] 美国专利 5,662,904 描述了用于治疗伤口以抑制瘢痕组织形成的组合物。例示性的这类组合物含有生长因子中和性抗体,诸如对 TGF- β 1、TGF- β 2 和 PDGF 的抗体。

[0041] 美国专利 5,972,335 披露了用于促进纤维变性病症的创伤愈合,包含至少两种抗体的组合物,其中第一抗体对 TGF- β 1 上的单一表位具有特异性,而第二抗体对 TGF- β 2 上的单一表位具有特异性。

[0042] 美国专利 5,958,411 披露了通过施用中和性抗 TGF- β 抗体治疗 CNS 病理的方法。

[0043] 美国专利 5,616,561 描述了使用 TGF- β 拮抗剂,诸如抗体治疗放射导致的组织损伤的方法。

[0044] 美国专利 6,500,920 披露了 10-25 个氨基酸,包括 TGF- β 2 的 49-58 位氨基酸的肽,该肽能够抑制 TGF- β 与细胞上 TGF- β 受体的特异性结合。

[0045] 美国专利申请 2002/0176858 和美国专利 5,693,607 ;6,419,928 ;6,090,383 ;

5, 783, 185 ; 5, 772, 998 ; 和 5, 571, 714 以及 EP 489, 062 ; 557, 418 ; 和 669, 833 以及 WO 1992/08480 ; 1994/09815 ; 和 1994/18991 披露了对 TGF- β 的单克隆抗体, 包括中和 TGF- β 1 和 TGF- β 2 活性的单克隆抗体及其在治疗存在 TGF- β 过量产生的适应征 (例如急性肝损伤、间质性肺纤维化、肝硬化、慢性肝纤维化和纤维变性皮肤病, 诸如硬皮病) 和在诊断或治疗恶性肿瘤 (例如肉瘤和黑素瘤) 和转移癌中的治疗性应用。

[0046] WO 1992/00330 和美国专利 5, 262, 319 披露了用于治疗与 TGF- β 3 相关的病症, 例如骨质疏松症、AIDS、癌症等的新抗体。这类抗体结合人 TGF- β 3 且表现出不与 TGF- β 1 和 β 2 发生交叉反应。

[0047] 美国专利 6, 509, 318 披露了发现抑制 TGF- β 活性的小肽家族, 用于诸如创伤愈合过程中的瘢痕组织抑制。

[0048] WO 2000/13705 披露了能抑制 TGF- β 对受损前 (pre-damaged) 神经元的生物学活性的化合物 (例如抗体) 用于治疗大脑功能障碍, 例如脑缺血的应用。

[0049] WO 2000/54804 披露了识别 TGF- β 的所有三种同种型, 能抑制 TGF- β 对受损前神经元的生物学活性, 可用于治疗大脑功能障碍的单克隆抗体。这类抗体用于在鸡胚中在睫状神经节 (CG) 和背根神经节 (DRG) 以及脊柱运动神经元的个体发育细胞死亡的主要阶段中中和内源 TGF- β 。

[0050] WO 2000/34788 披露了使用对血管发生因子或受体具有特异性的抗体, 诸如对 TGF- β 3 具有特异性的抗体诊断和预测他莫昔芬敏感性或他莫昔芬耐受性乳腺癌发生的可能性。

[0051] EP 945464 B1 披露了人 TGF- β 的特异性结合成员, 即包含对人 TGF- β 特异的人抗体-抗原结合结构域的特异性结合成员, 与 TGF- β 3 相比它们优先特异性结合同种型 TGF- β 2 和 TGF- β 1 或两者。可以分离特异性结合成员并将其用于治疗疾病, 特别是纤维变性疾病和免疫 / 炎性疾病。

[0052] 已经证实针对 TGF- β 的抗体有效治疗肾小球肾炎 (Border 等, Diabetes Metab. Rev., 同上); 神经瘢痕形成 (Logan 等, Eur. J. Neurosci., 6 : 355-363 (1994) ; WO 1993/19783) ; 皮肤瘢痕形成 (Shah 等, Lancet, 339 : 213-214 (1992) ; Shah 等, J. Cell Science, 107 : 1137-1157 (1994) ; Shah 等, J. Cell Science, 985-1002 (1995) ; WO 1992/17206) ; 肺纤维化 (Giri 等, Thorax, 48 : 959-966 (1993)) ; 动脉损伤 (Wolf 等, J. Clin. Invest., 93 : 1172-1178 (1994)) ; 和类风湿性关节炎 (Wahl 等, J. Exp. Medicine, 177 : 225-230 (1993))。还提示 TGF- β 3 在皮肤瘢痕形成中以拮抗方式对 TGF- β 1 和 TGF- β 2 起作用 (Shah 等, 1995, 同上)。

[0053] Arteaga 等, J. Clin. Invest., 92 : 2569-2576 (1993) 披露了抗 TGF- β 抗体抑制乳腺癌细胞致肿瘤性且提高小鼠脾天然杀伤细胞活性。

[0054] WO 1993/19769 披露了用于创伤愈合和治疗纤维变性病症的抗纤维变性剂, 包括抗 TGF- β 。

[0055] EP 853, 661 B1 描述了抗 TGF- β 2 的特异序列。

[0056] 针对 TGF- β 的抗体已经表现出治疗功效前景的其它应用包括针对 TGF- β 的抗体用于治疗涉及眼纤维化的眼病, 包括增殖性视网膜病 (Pena 等, Invest. Ophthalmology. Vis. Sci., 35 : 2804-2808 (1994))、预防白内障 (WO 1995/13827)、视网膜剥离和青光眼后引

流术 (post glaucoma drainagesurgery) (Khaw 等, *Eye*, **8**:188-195(1994)) 的应用。Connor 等, *J. Clin. Invest.*, **83**:1661-1666(1989) 证实, 与患有不复杂的视网膜剥离但未发生眼纤维化的患者相比, 在来自患有与增殖性视网膜病相关的眼内纤维化的患者的玻璃体抽吸物中存在水平高得多的 TGF- β 2, 而且可以用针对 TGF- β 2 的抗体中和此 TGF- β 2 的生物学活性。

[0057] 针对 TGF- β 的抗体用于治疗疾病的应用已经成为纤维变性疾病 (WO1991/04748); 巨噬细胞缺乏疾病 (WO 1993/14782); 巨噬细胞病原体感染 (WO1993/17708; 美国专利 5, 730, 976); 和血管病症 (WO 1993/21945) 的专利申请的主题。

[0058] WO 2000/43499 描述了经过 TGF- β 抗体处理, 能够在体外或离体存活 14 天并加速体内造血系统恢复 (repopulation) 的干细胞组合物。

[0059] 2000 年 10 月 4 日的 *Scrup* 2580 p14 报导了 Cambridge Antibody Technology (CAT) 和 Genzyme 正在联合工作以便研发针对 TGF- β 的人单克隆抗体。CAT 拥有两种完全人的 TGF- β 抗体 CAT-152 和 CAT-192, 而 Genzyme 拥有 1D11, 即中和 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 且被评价为弥漫性硬化病的可能治疗剂的鼠全特异性单克隆抗体。CAT 的目的在于使用其噬菌体展示技术研发 1D11 的人类似物。还考虑到了抗 TGF- β 治疗的几种其它临床适应征, 包括: 眼科适应征; 术后瘢痕形成; 主要器官的纤维化, 诸如肺、肾和肝; 和某些癌症, 以及通过抑制 TGF- β 2 生长治疗恶性脑瘤。CAT-152 (抗 TGF- β 2) 处于在进行青光眼手术的患者中预防术后瘢痕形成的 II 期试验中, 而 CAT-192 (抗 TGF- β 1) 已经完成了 I 期试验。另外, 参见“Trends in antibody Research: The Monoclonal Elite” by Tim Searle, *Bioventure-View* 1510 p14, October 1, 2000。

[0060] WO 1995/19987 披露了使用抗 TGF- β 抗体对 TGF- β 定量的方法。WO2000/00641 描述了使用含有 TGF- β 响应性表达载体的真核细胞测定样品中的活性 TGF- β 的新试验。该试验包括测定样品中 TGF- β 同种型的水平的一个步骤, 其中将冷冻切片与抗 TGF- β 同种型中和性抗体一起温育。例如, 1992 年 7 月 7 日公布的 JP 2126157 和 JP 92041307 B 描述了使用 TGF- β 抗体的 TGF- β 免疫测定。

[0061] Darland 和 D' Amore, *J. Clin. Invest.*, **103**:157-158(1999) 披露了血管发育从存活因子缺失导致凋亡的生长因子依赖性阶段开始进行。通过包埋壁细胞 (mural cell)、TGF- β 局部活化和基底膜产生标记血管稳定化。它提出了几个有关成人血管中生长因子, 包括 VEGF 和 TGF- β 作用的几个问题。Benjamin 等, *J. Clin. Invest.*, **103**:159-165(1999) 披露了 VEGF 停药后已形成人肿瘤中未成熟血管的选择性消融。

[0062] 下列参考文献和本领域的其它参考文献描述了制备嵌合和人源化抗体的方法, 例如有关针对人表皮生长因子受体的完全人的单克隆抗体的美国专利 6, 235, 883; 有关小鼠-人嵌合抗体的 EP 184187; 有关使用噬菌体技术以重组方式制备抗体的方法的 EP 844, 306; 有关制备带有非人供体和受体框架的 CDR 嫁接抗体, 优选人源化抗体的美国专利 5, 859, 205; EP 120, 694; EP125, 023; EP 171, 496; EP 173, 494; EP 239, 400; WO 1989/07452; WO1990/07861; 和有关人源化技术的 WO 1986/01533; 有关超人源化抗体的美国申请 2003/0039649; 有关对人 TNF- α 具有特异性的人源化抗体的美国申请 2003/0039645; 有关重组抗体及其生产的 EP 239, 400; 有关人源化抗体的 WO1991/09967; 有关抗体产生的 WO 1992/01047; 有关制备人源化抗体的方法的 WO 1992/22653; 有关

多价抗原结合蛋白的 WO 1993/11161 ;有关多价抗原结合蛋白的 WO 1994/13804 ;有关针对 TGF- β 的特异性结合成员的 WO2000/66631 ;和 Henry " Special Delivery : Alternative methods for delivering drugs improve performance, convenience, and patient compliance. " C & EN, p. 49-65(2000)。另外,参见美国专利 6,140,471 和 5,969,108 和 5,872,215 和 5,871,907 和 5,858,657 和 5,837,242 和 5,733,743 ;EP 1,024,191 ;EP 774,511 ;WO 1997/13844 ;EP 656,941 和 605,522 和 WO 1994/13804 ;EP 589,877 ;EP585,287 ;WO 1993/19172 ;EP 540,586 ;WO 1993/06213 ;WO 1992/20791 ;WO 1992/01787 ;和 WO 1992/01047。此外,WO 2004/065417 披露了对抗体和抗原结合片段的各种改变以便提高产量。另外,参见 US 20050049403。

[0063] 对控制 TGF- β 分子以便预防其在疾病诸如上文所述中的有害作用存在需求。还存在提供特异性结合 TGF- β 并中和 TGF- β 活性以便作为 TGF- β 拮抗剂起作用的高亲和力单克隆抗体的需求。瘤细胞的 TGF- β 调节的明显缺失与免疫功能抑制和 TGF- β 诱导的基质形成结合,使得 TGF- β 拮抗剂的潜在干预作为癌症疗法的有吸引力的选择。此外,TGF- β 抗体可用于诊断试验和免疫亲和纯化。

[0064] 发明概述

[0065] 在第一个方面中,本发明提供了结合 TGF- β , 包含重链可变区 (V_H) 的人源化抗体,所述重链可变区 (V_H) 包含掺入人 V_H 结构域的非人高变区残基,所述可变区在选自 48、49、68、70、72、74 和 79 的位置上包含 SEQ ID NO :6 中的构架区 (FR) 取代,其中所述位置使用了 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 中描述的编号系统。该抗体包括完整 IgG1 抗体或抗体片段, 诸如 Fab。

[0066] 优选的是,所述人源化抗体包含在 49、68 和 72 位上的 FR 取代,其中更优选的是,在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸,在 68 位上苯丙氨酸改变成丙氨酸,且在 72 位上精氨酸改变成丙氨酸。

[0067] 在另一个优选的实施方案中,所述人源化抗体包含在 48、49 和 72 位上的 FR 取代,其中更优选的是,在 48 位上缬氨酸改变成异亮氨酸,在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸,且在 72 位上的精氨酸改变成丙氨酸。

[0068] 同样优选的是,所述人源化抗体包含在 49、70 和 72 位上的 FR 取代,其中更优选的是,在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸,在 70 位上异亮氨酸改变成亮氨酸,且在 72 位上精氨酸改变成丙氨酸。在另一个方面中,在 74 位上有额外的 FR 取代,更优选的是,其中在 74 位上天冬酰胺改变成赖氨酸。

[0069] 在另一个优选的实施方案中,所述人源化抗体包含在 49、72 和 74 位上的 FR 取代,其中更优选的是,在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸,在 72 位上精氨酸改变成丙氨酸,且在 74 位上天冬酰胺改变成赖氨酸。

[0070] 在另一个优选的实施方案中,所述人源化抗体包含在 49、72 和 79 位上的 FR 取代,其中更优选的是,在 49 位上丙氨酸改变成甘氨酸,在 72 位上精氨酸改变成丙氨酸,且在 79 位上亮氨酸改变成丙氨酸。

[0071] 在另一个优选的实施方案中,上述任何抗体包含轻链可变区 (V_L) 互补决定区 (CDR) 残基 RASQSVLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO :18) ;WASTRES (SEQ ID NO :19) ; 和

HQYLSSDT(SEQ ID NO:20);或包含 V_L 结构域 CDR 残基,其中第一 CDR(CDR L1) 恢复成人种系 κ 基因座 L8/L9 的序列:RASQGISSYLA(SEQ ID NO:7) 和 / 或第二 CDR(CDR L2) 恢复成人种系 κ 基因座 L8/L9/L14/L15 的序列:YASSLQS(SEQ ID NO:8)。在另一个优选的实施方案中,上述任何抗体包括 V_H 结构域互补决定区(CDR) 残基 GYAFTNYLIE(SEQ ID NO:21);VNNPGSGGSNYNEKFKG(SEQ ID NO:22) 或 VINPGSGGSNYNEKFKG(SEQ ID NO:43);和 SGGFYFDY(SEQ ID NO:23)。

[0072] 此外,本发明提供了上述任何已与胞毒剂偶联或未与之偶联的抗体。此外,本发明提供了包含这类抗体和载体的组合物。

[0073] 在另一个实施方案中,本发明提供了编码所述人源化抗体的分离的核酸、包含这类核酸的载体和包含这类核酸的宿主细胞。

[0074] 另外,本发明提供了生产人源化抗体的方法,包括培养含有编码所述抗体的核酸的宿主细胞,以便表达所述核酸和产生所述抗体,且优选从宿主细胞培养物回收,更优选从宿主细胞培养基回收。此外,可以用包含编码重链可变区的核酸的载体和包含编码轻链可变区的核酸的载体共转染宿主细胞。

[0075] 在另一个实施方案中,本发明提供了治疗哺乳动物,优选灵长类且更优选人中 TGF- β 病症的方法,包括对所述哺乳动物施用有效量的所述人源化抗体。该方法还可包括对所述哺乳动物施用有效量的所述人源化抗体以外的治疗剂,诸如化疗药、抗血管生成剂、胞毒剂或细胞因子。

[0076] 在另一个实施方案中,本发明提供了检测身体样品中的 TGF- β 的方法,包括使所述人源化抗体接触所述身体样品并测定是否发生抗体与 TGF- β 的结合。

[0077] 本发明还提供了产品,包括装有所述人源化抗体的容器和指导使用者用该抗体治疗哺乳动物,优选人中 TGF- β 病症的说明书。该产品还可以包括装有所述人源化抗体以外的治疗剂的容器,其中所述说明书指导使用者用所述抗体联合所述试剂治疗所述病症。

[0078] 在另一个实施方案中,本发明提供了治疗哺乳动物中癌症的方法,包括对该哺乳动物施用有效量的 TGF- β 抗体和结合血管内皮生长因子的抗体。优选的是,所述哺乳动物为人。在另一个实施方案中,所述 TGF- β 抗体结合 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 中的一种或多种。在另一个实施方案中,所述抗体结合 TGF- β 1 或 TGF- β 1 和 TGF- β 2 两者。

[0079] 附图简述

[0080] 图 1A 和 1B 描绘了鼠单克隆抗体 2G7 的轻链可变区 (V_L) (图 1A) 和重链可变区 (V_H) (图 1B) (分别为 SEQ ID NO:1 和 2);人源化 huxTGFB 型式 (V5H.V5L) 的 V_L 和 V_H 结构域 (分别为 SEQ ID NO:3 和 4);及人 V_L 和 V_H 共有框架 (hum κ 1,轻链 κ 亚型 I;humIII,重链亚型 III) (分别为 SEQ ID NO:5 和 6) 的氨基酸序列对比。星号鉴定了人源化 huxTGFB 与鼠单克隆抗体 2G7 之间或人源化 huxTGFB 与人共有框架区之间的差异。为了比较,给互补决定区(CDR) 加下划线,而实际人种系序列的 CDR 位于共有框架区下 (SEQ IDNO:7-10)。

[0081] 图 2 显示了编码各个 CDR 区 (SEQ ID NO:18-24) 的 DNA 序列 (SEQ IDNO:11-17)。

[0082] 图 3 显示了 709.1andH.IgG1(SEQ ID NO:25)、H2NI.V5L(SEQ ID NO:26)、V11H.V11L(SEQ ID NO:27)、V5H.V5L(SEQ ID NO:28)、chimL.chimH(SEQ ID NO:29) 和 V5H.g1L2(SEQ ID NO:30) 的氨基酸序列。

[0083] 图 4 显示了不含和含有信号序列,编码图 3 序列的核酸序列 (SEQ ID NO:31-42)。

[0084] 图 5 显示了 2G7IgG 变体人源化抗体与 TGF- β 的结合曲线。

[0085] 图 6 显示了如实施例 2 中所述用于表达免疫球蛋白轻链的质粒 pDR1 的序列 (SEQ ID NO :44 ;5391bp)。pDR1 含有编码无关抗体,即人源化抗 CD3 抗体的轻链的序列 (Shalaby 等, *J. Exp. Med.*, 175 :217-225 (1992)), 用粗体和下划线表示其起始和终止密码子。

[0086] 图 7 显示了如实施例 2 中所述用于表达免疫球蛋白重链的质粒 pDR2 的序列 (SEQ ID NO :45 ;6135bp)。PDR2 含有编码无关抗体,即人源化抗 CD3 抗体的重链的序列 (Shalaby 等, 同上), 用粗体和下划线表示其起始和终止密码子。

[0087] 图 8 显示了 2G7 种系回复体 (germ-line revertant) 人源化抗体与 TGF- β 的结合曲线。

[0088] 图 9 显示了 TGF- β 1 抗体 2G7 和几种人源化 TGF- β 变体抗体的小鼠肾小球系膜细胞增殖试验的阻断结果。

[0089] 图 10A-10C 分别显示了三种针对 TGF- β 的人源化抗体 (H2NI. V5L、H2NI. g1L2 和 V5H. g1L2) 和 2G7 鼠抗体在 3T3 成纤维细胞增殖试验中对三种不同浓度 TGF- β 3 的中和作用。

[0090] 图 11A-11C 分别显示了图 10 所示四种抗体在 3T3 成纤维细胞增殖试验中对三种不同浓度 TGF- β 2 的中和作用。

[0091] 图 12A-12C 分别显示了图 10 所示四种抗体在 3T3 成纤维细胞增殖试验中对三种不同浓度 TGF- β 1 的中和作用。

[0092] 图 13A-13C 分别显示了图 10 所示四种抗体在 3T3 成纤维细胞增殖试验中对 2ng/ml TGF β 1、 β 2 和 β 3 的中和作用。

[0093] 图 14A-14D 显示了人源化抗体 H2NI. V5L (图 14A)、人源化抗体 H2NI. g1L2 (图 14B)、2G7 鼠抗体 (图 14C) 和人源化抗体 V5H. g1L2 (图 14D) 在 3T3 成纤维细胞增殖试验中对三种 TGF- β 同种型的中和作用。

[0094] 图 1 5A 和 1 5B 显示了使用正常和肿瘤上皮细胞进行的 TGF- β 产生和抑制的 ELISA 结果。图 15A 显示了使用正常上皮细胞 (EpC) (C57) 和肿瘤 EpC (4T1 模型) 进行的体外 TGF- β 1 产生。图 15B 显示了抗 TGF- β 抗体 2G7 在体内对肿瘤 EpC 中的血清 TGF- β 1 水平的作用及 IgG 对照抗体 (同种型匹配的 IgG, 其为抗豚草 (anti-ragweed) 抗体) 在体内对正常和肿瘤 EpC 中的血清 TGF- β 1 水平的作用。这种相同的 IgG 对照用于其余的图, 而在图 28 中可使用相同或不同的 IgG 对照。

[0095] 图 16A 和 16B 显示了抗 TGF- β 抗体 2G7 与 IgG 对照相比对继发性肺肿瘤的作用。图 16A 显示了就 IgG 对照抗体和 TGF- β 抗体 2G7 而言受侵害肺叶等级和数目的组织学评分, 而图 16B 显示了对相同对照和 TGF- β 抗体 2G7 而言按克和体重百分比计的组织重量。

[0096] 图 17 显示了抗 TGF- β 抗体 2G7 与 IgG 对照相比对使用 uCT 根据肿瘤体积和肿瘤数量进行的肺肿瘤定量的作用。

[0097] 图 18A 和 18B 显示了抗 TGF- β 抗体 2G7 和化疗 4T1 乳腺癌模型中与 IgG 对照相比的作用。图 18A 显示了肿瘤体积作为给细胞注射 IgG 和盐水对照、IgG 和多西他赛 (docetaxel) (**TAXOTERE®** 泰索帝) 对照、及抗 TGF- β 2G7 和多西他赛 (**TAXOTERE®** 泰索帝) 后的时间的函数。图 18B 显示了就两种对照 (IgG 与和与 **TAXOTERE®** 多西他赛) 及抗 TGF- β 加多西他赛 (**TAXOTERE®**) 而言脑、肺、脾和

肿瘤的组织重量。

[0098] 图 19 显示了不带肿瘤的小鼠（正常）中或用对照 IgG（对照）或抗 TGF- β (2G7) 处理的带有 4T1 乳腺肿瘤的小鼠中的血浆 VEGF 水平 (pg/ml)。

[0099] 图 20A 和 20B 显示了 TGF- β 抗体 2G7 在不同乳腺癌模型 PymT 中的作用。图 20A 显示了就 TGF- β 抗体和 IgG 对照而言肿瘤体积作为肿瘤生长的天数的函数，而图 20B 显示了对 TGF- β 抗体和 IgG 对照而言的肿瘤重量。

[0100] 图 21A 和 21B 显示了小鼠黑素瘤模型 B16 和 TGF- β 抗体 2G7 与 IgG 对照相比的作用。图 21A 显示了就对照和 TGF- β 抗体而言具有表面和病理性肺肿瘤的小鼠 (mice with lung tumors for surface and pathology) 的百分比，而图 21B 显示了就对照和 TGF- β 抗体而言表面 (surface)、清除的 (cleared) 和 CT 的肺肿瘤数量。

[0101] 图 22 显示了 TGF- β 抗体 2G7 与 IgG 对照相比在接种后 14 天内对 B16 肿瘤生长（体积）的作用。

[0102] 图 23 显示了 TGF- β 抗体 2G7 与 IgG 对照相比对 B16 (E6) 可见肺转移计数的作用。

[0103] 图 24 显示了 TGF- β 抗体 2G7 与 IgG 对照相比在接种后 17 天内对 B16 肿瘤生长（体积）的作用。

[0104] 图 25 显示了 TGF- β 抗体 2G7 与 IgG 对照相比对 B16 原发性肿瘤重量的作用。

[0105] 图 26 显示了 TGF- β 抗体 2G7 与 IgG 对照相比对 B16 (E7) 可见肺转移计数的作用。

[0106] 图 27 显示了 TGF- β 抗体 2G7、鼠单克隆抗 VEGF 抗体 A461 和这两种抗体的组合与 IgG 对照相比对人肺细胞 Calu-6 小鼠异种移植物在直达第 42 天的一段时间里的作用。在第 2 天开始使用各种试剂的治疗。

[0107] 图 28 显示了就三类抗体治疗和 IgG 对照而言图 27 中 Calu-6 实验的最终肿瘤重量。

[0108] 优选实施方案的详细描述

[0109] I. 定义

[0110] 术语“TGF- β ”和“转化生长因子- β ”在本文中可互换使用，指上文所述具有来自人的任何 TGF- β 的全长天然氨基酸序列的分子家族，包括潜在形式及前体和成熟 TGF- β （“潜在 TGF- β ”）的结合 (associated) 或未结合 (unassociated) 复合物。本文所涉及的这类 TGF- β 应理解为指目前鉴定形式中的任一种，包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 和 TGF- β 5 及其潜在型式以及将来鉴定的人 TGF- β 种类，包括衍生自任何已知 TGF- β 的序列且与该序列至少约 75%，优选至少约 80%，更优选至少约 85%，仍更优选至少约 90%，且甚至更优选至少约 95% 同源的多肽。具体的术语“TGF- β 1”、“TGF- β 2”和“TGF- β 3”以及“TGF- β 4”和“TGF- β 5”指文献中定义的 TGF- β ，例如 Derynck 等，*Nature*，同上；Seyedin 等，*J. Biol. Chem.*，262，同上；及 deMartin 等，同上。术语“TGF- β ”指编码人 TGF- β 的基因。优选的 TGF- β 为天然序列人 TGF- β 。

[0111] 将 TGF- β 家族的成员定义为那些在分子的成熟部分中带有 9 个半胱氨酸残基，在成熟区与其它已知 TGF- β 序列共享至少 65% 同源性，且可竞争相同受体的成员。此外，它们看起来均编码为较大前体，这些前体在 N-末端附近共享高度同源区并在随后可通过加

工除去的前体的部分中表现出三个半胱氨酸残基的保守性。此外, TGF- β 看起来含有带有 4 个或 5 个氨基酸的加工位点。

[0112] “天然序列”多肽为具有与来源于天然的多肽(例如 TGF- β 1)相同的氨基酸序列的多肽。这类天然序列多肽可分离自天然或可通过重组或合成方式产生。因此,天然序列多肽可具有天然存在的人多肽、鼠多肽或来自任何其它哺乳动物物种的多肽的氨基酸序列

[0113] 术语“氨基酸序列变体”指具有在一定程度上不同于天然序列多肽的氨基酸序列的多肽。一般来说,氨基酸序列变体与和该变体相比的天然序列多肽或其部分具有至少约 70% 的同源性,并且优选它们与这类天然序列多肽或部分至少约 80%,更优选至少约 90%,且仍更优选至少约 95% 同源。氨基酸序列变体在天然氨基酸序列内的某些位置上具有取代、删除和 / 或插入。

[0114] 将“同源性”定义为氨基酸序列变体中在达到最大同源性百分比而对序列进行对比并根据需要导入缺口后相同残基的百分比。用于进行对比的方法和计算机程序为本领域众所周知。一种这类计算机程序为 Genentech, Inc. 创造的“Align 2”,它在 1991 年 12 月 10 日由美国版权局 (United States Copyright Office, Washington, DC 20559) 与用户文档一起归档。

[0115] 本文中术语“抗体”使用其最广泛的含义,具体覆盖完整单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(如双特异性抗体)、和抗体片段,只要它们显示所需生物学活性。

[0116] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指由基本上同质的抗体群获得的抗体,即构成群体的各个抗体相同,除了可能的天然存在的突变外,它们通常以极少量存在。单克隆抗体是高度特异的,即针对单一抗原位点。另外,与包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制品不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性以外,单克隆抗体的优越性体现在可以合成它们而不受其它抗体的污染。修饰语“单克隆”指示抗体由基本上同质的抗体群获得的特征,并不解释为需要通过任何特定方法来生产抗体。例如,依照本发明使用的单克隆抗体可通过最初由 Kohler 等, *Nature*, 256 :495 (1975) 描述的杂交瘤法来制备,或者可通过重组 DNA 法来制备(见例如美国专利 4,816,567)。“单克隆抗体”还可使用 Clackson 等, *Nature*, 352 :624-628 (1991) 和 Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222 :581-597 (1991) 中描述的技术由噬菌体抗体库分离。

[0117] 本文中的单克隆抗体明确包括“嵌合”抗体,其中重链和 / 或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及这类抗体的片段,只要它们显示所需生物学活性(美国专利 4,816,567;及 Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 :6851-6855 (1984))。本文中感兴趣的嵌合抗体包括包含衍生自非人灵长类动物(如旧大陆猴类 (Old World Monkey)、猿等)的可变区抗原结合序列及人恒定区序列的“灵长类化 (primatized)”抗体。

[0118] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选包含其抗原结合或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0119] “完整”抗体为包含抗原结合可变区以及轻链恒定区 (C_L) 和重链恒定区 C_H1、C_H2 和

C_H3 的抗体。恒定区可以为天然序列恒定区（例如人天然序列恒定区）或其氨基酸序列变体。优选的是，完整抗体具有一种或多种效应子功能。

[0120] 抗体的“效应子功能”指那些归因于抗体 Fc 区（天然序列 Fc 区或 Fc 区的氨基酸序列变体）的生物学活性。抗体效应子功能的实例包括 C1q 结合；补体依赖性细胞毒性；Fc 受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)；吞噬作用；细胞表面受体（例如 B 细胞受体；BCR）的下调等。

[0121] 根据其重链恒定区的氨基酸序列，可将完整抗体归入不同的“类别”。完整抗体有五种主要的类别：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，其中有些可进一步分为“亚类”（同种型），如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。将与不同抗体类别对应的重链恒定区分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的。

[0122] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指由细胞介导的反应，其中表达 Fc 受体 (FcR) 的非特异性细胞毒性细胞（如天然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞）识别靶细胞上的结合抗体，随后促使靶细胞溶解。介导 ADCC 的初级细胞 NK 细胞只表达 Fc γ RIII，而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。Ravetch 和 Kinet, Annu. Rev. Immunol., **9**:457-92 (1991) 中第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。为了评估目的分子的 ADCC 活性，可进行体外 ADCC 测定法，诸如美国专利 5,500,362 或 5,821,337 中所描述的。可用于这类测定法的效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。或者/另外，可在体内评估目的分子的 ADCC 活性，例如在动物模型中，诸如 Clynes 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **95**:652-656 (1998) 中所公开的。

[0123] “人效应细胞”指表达一种或多种 FcR 并行行使效应子功能的白细胞。优选的是，该细胞至少表达 Fc γ RIII 并执行 ADCC 效应子功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单核细胞 (PBMC)、天然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞；优选 PBMC 和 NK 细胞。效应细胞可分离自其天然来源，例如本文所述血液或 PBMC。

[0124] 术语“Fc 受体”或“FcR”用于描述与抗体 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是天然序列人 FcR。而且，优选的 FcR 是与 IgG 抗体结合的 FcR (γ 受体)，包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体，包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA (“激活受体”) 和 Fc γ RIIB (“抑制受体”)，它们具有相似的氨基酸序列，区别主要在于它们的胞质域。激活受体 Fc γ RIIA 在其胞质域中包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM)。抑制受体 Fc γ RIIB 在其胞质域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM)。(见综述 Daëron, Annu. Rev. Immunol. **15**:203-234 (1997))。FcR 的综述见 Ravetch 和 Kinet, Annu. Rev. Immunol., **9**:457-492 (1991)；Capel 等, Immunomethods, **4**:25-34 (1994)；和 de Haas 等, J. Lab. Clin. Med., **126**:330-41 (1995)。本文中术语“FcR”涵盖其它 FcR，包括未来将会鉴定的 FcR。该术语还包括新生儿受体 FcRn，它负责将母体的 IgG 转移给胎儿 (Guyer 等, J. Immunol., **117**:587 (1976) 和 Kim 等, J. Immunol., **24**:249 (1994))。

[0125] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指在存在补体的情况下分子溶解靶细胞的能力。补体激活途径是由补体系统第一组分 (C1q) 结合与关联抗原复合的分子（如抗体）起始的。为了评估补体激活，可进行 CDC 测定法，例如 Gazzano-Santoro 等, J. Immunol. Methods, **202**:163 (1996) 中所描述的。

[0126] “天然抗体”通常是由两条相同的轻链 (L) 和两条相同的重链 (H) 构成的分子量约

150,000 道尔顿的异型四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链中有所变化。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫桥。每条重链在一端具有一个可变区 (V_H),接着是多个恒定区。每条轻链在一端具有一个可变区 (V_L),而另一端是一个恒定区。轻链的恒定区与重链的第一个恒定区排列在一起,而轻链的可变区与重链的可变区排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成了界面。

[0127] 术语“可变”指可变区中的某些部分在不同抗体的序列中差异广泛且用于每种特定抗体针对其特定抗原的结合和特异性的实情。然而,变异性并非均匀分布于抗体的整个可变区。它集中于轻链和重链可变区中称作高变区的三个区段。可变区中更加高度保守的部分称作构架区 (FR)。天然重链和轻链的可变区都包含四个 FR,它们大多采取 β -折叠构象,通过形成环状连接而且在某些情况中形成部分 β -折叠结构的三个高变区连接。每条链中的高变区通过 FR 非常接近地保持在一起,并与其它链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成(见 Kabat 等,同上)。恒定区不直接涉及抗体与抗原的结合,但显示出多种效应子功能,诸如抗体依赖性细胞细胞毒性 (ADCC) 中抗体的参与。

[0128] 术语“高变区”在用于本文时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(如轻链可变区中的残基 24-34(L1)、50-56(L2) 和 89-97(L3) 以及重链可变区中的 31-35(H1)、50-65(H2) 和 95-102(H3);Kabat 等,同上)和/或来自“高变环”的残基(如轻链可变区中的残基 26-32(L1)、50-52(L2) 和 91-96(L3) 以及重链可变区中的 26-32(H1)、53-55(H2) 和 96-101(H3);Chothia 和 Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196 :901-917(1987))。“构架区”或“FR”残基指本文定义的高变区残基以外的可变区残基。

[0129] 用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称作“Fab”片段,各自具有一个抗原结合位点,和一个残余“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个 $F(ab')_2$ 片段,它具有两个抗原结合位点,并且还能够交联抗原。

[0130] “Fv”是包含完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。这个区域由紧密、非共价结合的一个重链和一个轻链可变区的二聚体组成。正是在这种构造中,各个可变区的三个高变区相互作用而在 V_H - V_L 二聚体表面确定了一个抗原结合位点。六个高变区共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变区(或只包含对抗原特异的三个高变区的半个 Fv)也具有识别和结合抗原的能力,尽管亲和力低于完整结合位点。

[0131] Fab 片段还包含轻链的恒定区和重链的第一恒定区 (CH1)。Fab' 片段因在重链 CH1 结构域的羧基末端增加了少数残基而与 Fab 片段有所不同,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。本文中 Fab'-SH 是其中恒定区的半胱氨酸残基携带至少一个游离硫醇基的 Fab' 的称谓。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为成对 Fab' 片段生成的,在 Fab' 片段之间具有铰链半胱氨酸。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0132] 来自任何脊椎动物物种的抗体的“轻链”,根据其恒定区的氨基酸序列,可归入两种截然不同类型中的一种,称作 κ 和 λ 。

[0133] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域,其中这些结构域存在于一条多肽链上。优选的是,该 Fv 多肽在 V_H 和 V_L 结构域之间还包含多肽接头,使得 scFv 形成抗原结合所需的结构。关于 scFv 的综述参见 Plückthun, *The Pharmacology of*

Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg 和 Moore 编, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994)。WO 1993/16185 ;美国专利 5, 571, 894 ;和美国专利 5, 587, 458 描述了抗 TGF- β 抗体 scFv 片段。

[0134] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小型抗体片段,该片段在同一条多肽链(V_H-V_L)中包含相连的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对,迫使结构域与另一条链的互补结构域配对,并产生两个抗原结合位点。双抗体更完整的描述于例如 EP 404, 097 ;WO 1993/11161 ;和 Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90** :6444-6448(1993)。

[0135] 非人(如啮齿类)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上,人源化抗体指人免疫球蛋白(受体抗体)中的高变区残基用具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中,将人免疫球蛋白的构架区(FR)残基用相应的非人残基替换。而且,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。通常,人源化抗体将包含基本上不少于至少一个、通常两个下述可变区,其中所有或基本上所有的高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且所有或基本上所有的 FR 是人免疫球蛋白序列的 FR。任选的是,人源化抗体还将包含至少部分的免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones 等, *Nature*, **321** :522-525(1986) ;Riechmann 等, *Nature*, **332** :323-329(1988) ;和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, **2** :593-596(1992)。

[0136] “分离的”抗体指由其天然环境的成分鉴别和分离和 / 或回收的抗体。其天然环境的污染成分指将会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将抗体纯化至(1)根据 Lowry 法的测定,抗体重量超过 95%,最优选重量超过 99%,(2)足以通过使用转杯式蛋白质测序仪获得至少 15 个残基的 N-末端或内部氨基酸序列的程度,或(3)通过使用考马斯蓝或优选银染的还原或非还原条件下的 SDS-PAGE 达到同质。既然抗体的天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而,通常,分离的抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0137] “结合”目的抗原,如 TGF- β 抗原的抗体指能够以足够亲和力结合抗原的抗体,以便该抗体可用作靶向表达该抗原的细胞的治疗剂。如果抗体是结合 TGF- β 的抗体,那么它通常优先结合 TGF- β ,而非 TGF- β 超家族的其他成员,并且可以是不与这类家族的其他蛋白质,诸如 BMP、激活蛋白等发生显著交叉反应的抗体。在这类实施方案中,根据荧光活化细胞分选(FACS)分析或放射免疫沉淀(RIA)的测定,抗体与这些非 TGF- β 蛋白质结合的程度将低于 10%。

[0138] 具有指定抗体,诸如命名为 2G7 的单克隆抗体的“生物学特性”的抗体指具有所述抗体的一种或多种生物学特性的抗体,它与其它抗体的区别在于它结合相同抗原(如 TGF- β)。例如,具有 2G7 的生物学特性的抗体可阻断 TGF- β 的活化和 / 或结合与 2G7 所结合的不同 TGF- β 胞外域表位。

[0139] 除非另有说明,表述“单克隆抗体 2G7”指具有下文实施例中鼠 2G7 抗体的抗原结合残基或衍生自下文实施例中鼠 2G7 抗体的抗体。例如,单克隆抗体 2G7 可以是鼠单克隆

抗体 2G7 或其变体,诸如具有鼠单克隆抗体 2G7 的抗原结合氨基酸残基的人源化抗体 2G7。下文实施例 2 中提供了人源化 2G7 抗体的实例。除非另有说明,表述“rhuMAb 2G7”在用于本文时指分别包含轻链可变区 (V_L) 和重链可变区 (V_H) 序列 SEQ ID NO :1 和 2 并融合有人轻链和重链 IgG1 (非 A 同种异型) 恒定区序列的抗体,任选由中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞表达。

[0140] “生长抑制剂”在用于本文时指在体外和 / 或在体内抑制细胞,尤其是表达 TGF- β 的癌细胞生长的化合物或组合物。因此,生长抑制剂可以是显著降低 S 期表达 TGF- β 的细胞百分比的试剂。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期行进 (处于 S 期以外的位置) 的试剂,诸如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的试剂。经典的 M 期阻断剂包括长春花生物碱类 (长春新碱和长春碱)、紫杉烷类、和拓扑异构酶 II 抑制剂诸如多柔比星、表柔比星、柔红霉素、依托泊苷和博来霉素。那些阻滞 G1 的试剂也溢出进入 S 期停滞,例如 DNA 烷化剂诸如他莫昔芬、泼尼松、达卡巴嗪、双氯乙基甲胺、顺铂、甲氨喋呤、5-氟尿嘧啶和 ara-C。其它信息可参见 Mendelsohn 和 Israel 编的《The Molecular Basis of Cancer》中, Murakami 等著的第 1 章,题为“Cell cycleregulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”, W B Saunders, Philadelphia, 1995, 尤其是第 13 页。

[0141] “生长抑制性”抗体的实例为那些结合 TGF- β 并抑制过表达 TGF- β 的癌细胞生长的抗体。优选的生长抑制性抗 TGF- β 抗体在约 0.5-30 μ g/ml 抗体浓度抑制细胞培养物中 SK-BR-3 乳腺肿瘤细胞生长超过 20%, 优选超过 50% (如约 50% - 约 100%), 其中在 SK-BR-3 细胞与抗体接触后 6 天测定生长抑制 (参见 1997 年 10 月 14 日发布的美国专利 5,677,171)。该专利更详细的描述了 SK-BR-3 细胞生长抑制试验。

[0142] “诱导细胞死亡”的抗体为使可存活细胞变为不可存活的抗体。细胞一般为表达 TGF- β 受体的细胞,尤其是细胞过表达 TGF- β 受体的情况。优选的是,该细胞是癌细胞,例如乳房、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰腺或膀胱细胞。在体外,该细胞可以是 SK-BR-3、BT474、Calu3、MDA-MB-453、MDA-MB-361 或 SKOV3 细胞。可以在没有补体和免疫效应细胞存在下测定体外细胞死亡以便区分抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 诱导的细胞死亡。因此,可以使用热灭活血清 (即在无补体存在下) 和没有免疫效应细胞存在下对细胞死亡进行测定。为了测定抗体是否能够诱导细胞死亡,可以与未处理的细胞相比评价根据碘化丙啶 (PI)、锥虫蓝 (参见 Moore 等, *Cytotechnology*, 17 :1-11 (1995)) 或 7AAD 摄取评价的膜完整性丧失。优选的诱导细胞死亡的抗体为那些在 BT474 细胞中进行的 PI 摄取试验中诱导 PI 摄取的抗体 (参见下文)。

[0143] “诱导凋亡”的抗体指根据膜联蛋白 V 结合、DNA 片段化、细胞收缩、内质网膨胀、细胞破裂和 / 或膜囊 (称作凋亡小体) 形成的测定,诱导程序性细胞死亡的抗体。细胞通常为过表达 TGF- β 受体的细胞。优选的是,该细胞为肿瘤细胞,例如乳房、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰腺或膀胱细胞。在体外,该细胞可以是 SK-BR-3、BT474、Calu 3 细胞、MDA-MB-453、MDA-MB-361 或 SKOV3 细胞。可利用各种方法评价与凋亡相关的细胞活动。例如,可通过膜联蛋白结合测定磷脂酰丝氨酸 (PS) 易位;可通过 DNA 成梯状评价 DNA 片段化;且可根据亚二倍体细胞的任何增加评价随同 DNA 片段化一起的核 / 染色质凝聚。优选的是,诱导凋亡的抗体为在使用 BT474 细胞进行的膜联蛋白结合试验中导致对膜联蛋白的结合的诱导为未处理细胞的约 2-50 倍,优选约 5-50 倍,且最优选约 10-50 倍的

抗体（参见下文）。有时，促凋亡（pro-apoptotic）抗体为进一步阻断 TGF- β 结合的抗体（如 2G7 抗体）；即该抗体与 TGF- β 抗体共有一种生物学特性。在其它情况中，该抗体为不显著阻断 TGF- β 的抗体。此外，该抗体可以为在诱导凋亡的同时不诱导 S 期细胞百分比明显下降的抗体（例如与对照相比仅诱导这些细胞的百分比降低约 0-10% 的抗体）。

[0144] “表位 2G7”为 TGF- β 胞外域中抗体 2G7(ATCC HB10240) 所结合的区域。为了筛选结合 2G7 表位的抗体，可进行常规交叉阻断试验，诸如 Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane(1988) 中所述。

[0145] “TGF- β 抗体”指结合 TGF- β 的任何同种型，优选结合 TGF- β 1、TGF- β 2 或 TGF- β 3 或其任意组合，更优选至少结合 TGF- β 1 或至少结合 TGF- β 2 且 最优选 TGF- β 1 或 TGF- β 1 及 TGF- β 2 的抗体。任选的是，抗体可至少结合 TGF- β 3。

[0146] “治疗”指治疗性处理和预防性措施二者。需要治疗的人包括已经具有病症的人以及要预防病症的人。因此，本文中待治疗的哺乳动物可能诊断为患有疾病或可能有患病的倾向或容易患病。

[0147] 用于治疗目的的“哺乳动物”指归入哺乳动物的任何动物，包括人、家畜和农畜、及动物园、运动、或宠物动物，诸如犬、马、猫、牛等。优选的是，哺乳动物是灵长类，诸如例如猴、猿或人，且最优选人。

[0148] “TGF- β 病症”或“TGF- β 相关病症”指将得益于使用抗 TGF- β 抗体治疗的任何病症、疾病或疾患。这包括慢性和急性病症或疾病，包括那些使哺乳动物倾向于所讨论病症的病理学状况。本文中待治疗的病症包括特征在于胞外基质蓄积的疾病；因循环 TGF- β 或局部位置上活化的 TGF- β 导致的疾病；因内源 TGF- β 产生所致免疫系统抑制引起的疾患；因严重损伤、烧伤和疾病诸如病毒或细菌感染导致的急性免疫缺陷；因 TGF- β 产生或过度产生导致的多器官系统性疾病；和产生 TGF- β 的肿瘤。非限制性具体实例包括：神经元、神经胶质、星形胶质细胞、下丘脑和其它腺、巨噬细胞、上皮、基质和囊胚腔病症；纤维化；瘢痕形成；组织损伤，诸如放射导致的组织损伤；和创伤愈合过程中的粘连；纤维变性皮肤病，诸如硬皮病、CNS 病理性瘢痕组织、皮肤瘢痕形成、瘢痕瘤和神经瘢痕形成；腹膜腔、肺、肝和肾的纤维变性疾病，诸如慢性肝纤维化、急性肝损伤、间质性肺和肾纤维化、及肝硬化；囊性纤维化；血管病症，例如心脏纤维化、动脉损伤，诸如动脉粥样硬化和动脉硬化；良性和恶性肿瘤；某些不受 TGF- β 抑制的白血病；和恶性肿瘤（例如肉瘤、癌瘤和黑素瘤），包括前列腺、纤维变性、卵巢、恶性黑素瘤、乳房、肺、结肠、直肠、结肠直肠或宫颈癌和转移癌，以及消化系统的神经内分泌肿瘤和成胶质细胞瘤；血管病；血管病变；肾病；系统性硬化病；感染，诸如巨噬细胞病原体感染；和病毒感染，诸如丙型肝炎和 HIV；免疫、血管发生和炎性病症和缺陷，诸如类风湿性关节炎；眼病，尤其是那些涉及眼纤维化的疾病，包括增殖性视网膜病、视网膜剥离和青光眼后引流术，诸如人眼神经视网膜、视网膜色素上皮-脉络膜和玻璃体，和白内障；骨质疏松症；成人呼吸窘迫综合征；后壁心肌梗死；血管成形术后再狭窄；肾小球性肾炎；糖尿病相关疾患，诸如高血糖、糖尿病、糖尿病性肾病、糖尿病性肾病变、糖尿病性神经病或视网膜病、和巨噬细胞缺乏疾病。

[0149] 优选的是，所述病症为纤维化、动脉损伤、感染、类风湿性关节炎、糖尿病或糖尿病性疾患、或恶性肿瘤，诸如表达 TGF- β 的癌症，更优选其中特征在于 TGF- β 过度活化的癌症。这类癌症可过表达 TGF- β ，或者特征并不在于过表达 TGF- β 。

[0150] 术语“有效量”指有效治疗哺乳动物中的疾病或病症的药物的用量。就癌症而言，药物的治疗有效量可减少癌细胞数目；减小肿瘤大小；抑制（即在一定程度上减缓且优选终止）癌细胞浸润入周围器官；抑制（即在一定程度上减缓且优选终止）肿瘤转移；在一定程度上抑制肿瘤生长；和/或在一定程度上缓解与癌症相关的症状中的一种或多种。就药物可预防存在的癌细胞生长和/或杀伤它们的程度而言，它可以是抑制细胞的和/或毒害细胞的。就癌症疗法而言，可通过例如评估时间对疾病进展（TTP）和/或测定响应率（RR）来测量功效。

[0151] 术语“癌症”和“癌性”指或描述一般特征在于细胞生长失调的哺乳动物中的生理情况。癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。这类癌症的更多具体实例包括鳞状细胞癌（如上皮鳞状细胞癌）；肺癌，包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌；腹膜癌；肝细胞癌；胃（gastric）或胃（stomach）癌，包括胃肠癌；胰腺癌；成胶质细胞瘤；宫颈癌；卵巢癌；肝癌；膀胱癌；肝细胞瘤；乳腺癌；结肠癌；直肠癌；结肠直肠癌；子宫内膜或子宫癌；唾液腺癌；肾脏或肾癌；前列腺癌；外阴癌；甲状腺癌；肝癌；肛门癌；阴茎癌；以及头颈癌。

[0152] “表达 TGF- β 的癌症”指如下癌症，它在其细胞表面上产生足够水平的 TGF- β ，以便抗 TGF- β 抗体可以与之结合并对癌症具有治疗作用。

[0153] “特征在于 TGF- β 受体过度活化”的癌症指如下癌症，其中癌细胞中 TGF- β 受体活化的程度显著超过了该受体在相同组织类型的非癌性细胞中的活化水平。这类过度活化可以因 TGF- β 受体过表达所致和/或超过可用于活化癌细胞中 TGF- β 受体的 TGF- β 配体正常水平。这类过度活化可导致癌细胞的恶性状态和/或癌细胞的恶性状态可导致这类过度活化。在有些实施方案中，对癌症进行诊断或预后试验以便测定是否发生导致这类 TGF- β 受体过度活化的 TGF- β 受体扩增和/或过表达。或者/另外，可以对癌症进行诊断或预后试验以便测定癌症中是否发生归因于所述受体过度活化的 TGF- β 配体扩增和/或过表达。在这类癌症的亚类中，所述受体的过度活化可以因自分泌刺激途径所致。

[0154] 在“自分泌”刺激途径中，自体刺激通过产生 TGF- β 配体及其关连 TGF- β 受体的癌细胞而发生。例如，癌症可表达或过表达 TGF- β 受体且还表达或过表达 TGF- β 配体（如 TGF- β 1）。

[0155] “过表达”TGF- β 受体的癌症为在其细胞表面上具有显著高于相同组织类型的非癌性细胞的 TGF- β 受体水平的癌症。这类过表达可以因基因扩增或转录或翻译增加所致。可以通过评估存在于细胞表面上的 TGF- β 蛋白质的水平增加在诊断或预后试验中测定 TGF- β 受体过表达（例如通过免疫组织化学测定法；IHC）。或者/另外，可通过例如下列方法测定细胞中编码 TGF- β 的核酸的水平：荧光原位杂交（FISH；参见 1998 年 10 月公布的 WO1998/45479）；DNA 印迹或聚合酶链反应（PCR）技术，诸如实时定量 PCR（RT-PCR）。还可通过测量生物学流体，诸如血清中的脱落抗原（如 TGF- β 胞外域）来研究 TGF- β 受体过表达（参见例如 1990 年 6 月 12 日发布的美国专利 4,933,294；1991 年 4 月 18 日公布的 WO 1991/05264；1995 年 3 月 28 日发布的美国专利 5,401,638；和 Sias 等，*J. Immunol. Methods*, 132:73-80 (1990)）。除上述试验外，本领域熟练技术人员可利用各种体内试验。例如，可以在患者体内使细胞接触任选用可检测标记物，例如放射性同位素标记的抗体，并且可通过例如外部扫描放射性或通过分析取自先前接触过抗体的患者的活检组织来评估

患者体内抗体与细胞的结合。

[0156] 相反,“特征并不在于 TGF- β 受体过表达”的癌症为如下癌症,在诊断试验中,它不表达高于相同组织类型的非癌性细胞的正常水平的 TGF- β 受体。

[0157] “过表达”TGF- β 配体的癌症为与相同组织类型的非癌性细胞相比产生显著更高水平的该配体的癌症。这类过表达可以因基因扩增或转录或翻译增加所致。可以通过评估该配体(或编码它的核酸)在患者体内的水平,例如在肿瘤活检组织中的水平或通过各种诊断试验,诸如 IHC、FISH、DNA 印迹、PCR 或上文所述体内试验在诊断上测定 TGF- β 配体的过表达。

[0158] “非激素依赖性”癌症为如下癌症,其中其增殖不依赖于结合癌症中的细胞所表达的受体的激素的存在。这类癌症在给予降低肿瘤内或附近的激素浓度的药物或手术策略时不发生临床退化。非激素依赖性癌症的实例包括不依赖雄激素的前列腺癌、不依赖雌激素的乳腺癌、子宫内膜癌和卵巢癌。这类癌症可作为激素依赖性肿瘤开始并在抗激素疗法后从激素敏感性阶段发展至激素难治的肿瘤。

[0159] 术语“胞毒剂”在用于本文时指抑制或阻止细胞功能和/或促使细胞破坏的物质。该术语意欲包括放射性同位素(如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³² 和 Lu 的放射性同位素)、和毒素诸如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素,包括其片段和/或变体。

[0160] “化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂,诸如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide)(**CYTOXAN®**);烷基磺酸酯,诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类(aziridines),诸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines),包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);氮芥(nitrogen mustards),诸如氯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、异磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、松龙苯芥(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥;硝基脲类(nitrosoureas),诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);抗生素类,诸如阿克拉霉素、放线菌素、氨基霉素、氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素 C、加利车霉素、carabycin、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素 D、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、依达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培来霉素(peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲霉素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁

(zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin) ;抗代谢物, 诸如甲氨喋呤和 5- 氟尿嘧啶 (5-FU) ; 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨喋呤、蝶酰三谷氨酸 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate) ;嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6- 巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤 ;嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6- 氮尿苷、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、多西氟尿啶 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 ;雄激素类, 诸如卡鲁睾酮 (calusterone)、羟甲雄酮丙酸酯、表硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone) ;抗肾上腺类, 诸如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、曼托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane) ;叶酸补充剂, 诸如亚叶酸 ;醋葡内酯 ;醛磷酰胺糖苷 (aldophosphamideglycoside) ;氨基酮戊酸 (aminolevulinic acid) ;氨苯吡啶 (amsacrine) ;bestrabucil ;比生群 (bisantrene) ;依达曲沙 (edatraxate) ;defofamine ;地美可辛 (demecolcine) ;地吡醌 (diaziquone) ;依洛尼塞 (elfornithine) ;醋酸羟吡唑啉 (elliptinium acetate) ;依托格鲁 (etoglucid) ;硝酸镓 ;羟脲 ;香菇多糖 (lentinan) ;氯尼达明 (lonidamine) ;米托胍脘 (mitoguazone) ;米托蒽醌 (mitoxantrone) ;莫哌达醇 (mopidamol) ;二胺硝吡啶 (nitracrine) ;喷司他丁 (pentostatin) ;蛋氨酸芥 (phenamet) ;吡柔比星 (pirarubicin) ;鬼臼酸 (podophyllinic acid) ;2- 乙基酰肼 ;丙卡巴肼 (procarbazine) ; **PSK®** 云芝多糖 (krestin) ;雷佐生 (razoxane) ;西索菲兰 (sizofiran) ;锗螺胺 (spirogermanium) ;细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid) ;三亚胺醌 (triaziquone) ;2,2', 2'' - 三氯三乙胺 ;乌拉坦 (urethan) ;长春地辛 (vindesine) ;达卡巴嗪 (dacarbazine) ;甘露醇氮芥 (mannomustine) ;二溴甘露醇 (mitobronitol) ;二溴卫矛醇 (mitolactol) ;哌泊溴烷 (pipobroman) ;gacytosine ;阿糖胞苷 (“Ara-C”) ;环磷酰胺 ;塞替哌 (thiotepa) ;紫杉烷类 (taxanes) (或类紫杉醇类 (taxoids)), 如紫杉醇 (paclitaxel) (**TAXOL®**, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) 和多西他塞 (doxetaxel) (**TAXOTERE®**, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France) ;苯丁酸氮芥 ;吉西他滨 (gemcitabine) ;6- 巯基嘌呤 ;巯基嘌呤 ;甲氨喋呤 ;铂类似物, 诸如顺铂和卡铂 ;长春碱 (vinblastine) ;铂 ;依托泊苷 (etoposide) (VP-16) ;异磷酰胺 ;丝裂霉素 C ;米托蒽醌 ;长春新碱 (vincristine) ;长春 瑞宾 (vinorelbine) ;诺维本 (navelbine) ;诺安托 (novantrone) ;替尼泊甙 (teniposide) ;柔红霉素 ;氨基蝶呤 ;希罗达 (xeloda) ;伊拜膦酸盐 (ibandronate) ;CPT-11 ;拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000 ;二氟甲基鸟氨酸 (DMFO) ;视黄酸 ;esperamicin ;卡培他滨 (capecitabine) ;以及上述任何物质的制药学可接受的盐、酸或衍生物。

[0161] 该定义还包括承担调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂, 诸如抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂 (SERM), 包括例如他莫昔芬 (tamoxifen) (包括 **NOLVADEX®** 他莫昔芬)、雷洛昔芬 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4- 羟基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、那洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和 **FARESTON®** 托瑞米芬 (toremifene) ;抑制调节肾上腺中雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂, 诸如例如 4(5)- 咪唑、氨鲁米特 (aminoglutethimide)、**MEGASE®** 醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate)、**AROMASIN®** 依西美坦 (exemestane)、福美司坦 (formestane)、法倔唑 (fadrozole)、**RIVISOR®** 伏罗

唑 (vorozole)、**FEMARA®** 来曲唑 (letrozole) 和 **ARIMIDEX®** 阿纳托唑 (anastrozole); 及抗雄激素类, 诸如氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide)、比卡米特 (bicalutamide)、亮丙瑞林 (leuprolide) 和戈舍瑞林 (goserelin); 以及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3- 二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是抑制牵涉粘着细胞增殖的信号途经中的基因表达的反义寡核苷酸, 诸如例如 PKC- α 、Ralf 和 H-Ras; 疫苗, 诸如基因疗法疫苗, 例如 **ALLOVECTIN®** 疫苗、**LEUVECTIN®** 疫苗和 **VAXID®** 疫苗; **PROLEUKIN®**rIL-2; **LURTOTECAN®** 拓扑异构酶 1 抑制剂; **ABARELIX®**rmRH; 及上述任何物质的制药学可接受的盐、酸或衍生物。

[0162] 在用于本文时, 术语“EGFR 靶向药物”指结合 EGFR 且任选抑制 EGFR 活化的治疗剂。这类试剂的实例包括结合 EGFR 的抗体和小分子。结合 EGFR 的抗体实例包括: MAb 579 (ATCC CRL HB 8506)、MAb 455 (ATCC CRLHB8507)、MAb 225 (ATCC CRL 8508)、MAb 528 (ATCC CRL 8509) (参见美国专利 4,943,533, Mendelsohn 等) 及其变体, 诸如嵌合 225 (C225) 和整形人 225 (H225) (参见 WO 1996/40210, Imclone Systems Inc.); 结合 II 型突变体 EGFR 的抗体 (美国专利 5,212,290); 如美国专利 5,891,996 中所述的结合 EGFR 的人源化和嵌合抗体; 和结合 EGFR 的人抗体 (参见 WO 1998/50433, Abgenix)。抗 EGFR 抗体可以与胞毒剂偶联, 由此产生免疫偶联物 (参见例如 EP 659,439, Merck Patent GmbH)。结合 EGFR 的小分子的实例包括 ZD1839 (Astra Zeneca)、CP-358774 (OSI/Pfizer) 和 AG1478。

[0163] “非人源化抗体的治疗剂”指有效治疗 TGF- β 病症的非本文抗体的任何试剂, 包括下列那些类型。

[0164] “抗血管发生剂”指在一定程度上阻断或干扰血管发育的化合物。抗血管发生因子可以是例如结合涉及促进血管发生的生长因子或生长因子受体的小分子或抗体。实例包括血管内皮生长因子 (VEGF) 的拮抗剂, 诸如特异性结合 VEGF 的抗体, 如 **AVASTIN®**。“结合 VEGF 的抗体”包括嵌合、人和人源化抗体以及片段, 还包括阻断或中和 VEGF 或阻断 VEGF 结合一种或多种 VEGF 受体, 优选这两类受体的抗体。

[0165] 表述“哺乳动物中的免疫功能调节剂”指调节哺乳动物免疫功能的细胞因子和生长因子, 包括白介素、肿瘤坏死因子、淋巴毒素、表皮生长因子、血小板衍生生长因子、TGF- α 、巨噬细胞移动抑制因子、巨噬细胞活化因子、成纤维细胞生长因子、巨噬细胞活化因子、干扰素和集落刺激因子。这些调节剂可以衍生自天然来源, 由白细胞形成, 如果合适通过化学方法合成, 或通过重组方式制备。优选 IL-1、IL-2、IL-6 和 IFN- β 。

[0166] 术语“细胞因子”指由一种细胞群释放的、作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。这类细胞因子的例子是淋巴因子、单核因子、和传统的多肽激素。细胞因子包括生长激素, 诸如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素; 甲状旁腺素; 甲状腺素; 胰岛素; 胰岛素原; 松弛素; 松弛素原; 糖蛋白激素类, 诸如促卵泡激素 (FSH)、促甲状腺激素 (TSH) 和促黄体 (生成) 激素 (LH); 肝生长因子; 成纤维细胞生长因子; 促乳素; 胎盘催乳素; 肿瘤坏死因子- α 和 - β ; Mullerian 氏抑制性物质 (mullerian-inhibiting substance); 小鼠促性腺激素相关肽; 抑制素; 激活素 (activin); 血管内皮生长因子; 整合蛋白; 血小板生成素 (TPO); 神经生长因子, 诸如 NGF- β ; 血小板生长因子; 胰岛素样生长因子-I 和 -II; 促红细胞生成素 (EPO); 骨诱导因子 (osteoinductive factor); 干扰素, 诸如干扰素- α 、- β 和 - γ ; 集落刺激因子 (CSF), 诸如巨噬细胞 CSF (M-CSF)、粒细胞-巨

噬细胞 CSF (GM-CSF)、和粒细胞 CSF (G-CSF) ;白介素 (IL), 诸如 IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12 ; 肿瘤坏死因子, 诸如 TNF- α 或 TNF- β ;及其它多肽因子, 包括 LIF 和 kit 配体 (KL)。在用于本文时, 术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列细胞因子的生物学活性等效物。

[0167] 术语“前体药物”在用于本申请时指与母药 (parent drug) 相比对肿瘤细胞的细胞毒性较小并能够酶促活化或转变为更具活性母药形式的前体或衍生物形式药用活性物质。参见如 Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy”, Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) 和 Stella 等, “Prodrugs :A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery”, Directed Drug Delivery, Borchardt 等编, pp. 247-267, Humana Press (1985)。本发明的前体药物包括但不限于含磷酸盐 (酯) 前体药物、含硫代磷酸盐 (酯) 前体药物、含硫酸盐 (酯) 前体药物、含肽前体药物、D-氨基酸修饰前体药物、糖基化前体药物、含 β -内酰胺前体药物、含任选取代苯氧基乙酰胺的前体药或含任选取代苯乙酰胺的前体药物、可转化为更具活性而无细胞毒性的药物的 5-氟胞嘧啶和其它 5-氟尿苷前体药物。可衍生为本发明使用的前体药物形式的胞毒性药物的例子包括但不限于上文描述的那些化疗剂。

[0168] “脂质体”为由各种类型脂质、磷脂和 / 或表面活性剂构成的, 可用于给哺乳动物递药 (诸如本文披露的抗 TGF- β 抗体和任选的化疗剂) 的小囊泡。与生物膜的脂质排列相似, 脂质体的成分通常排列成双层形式。

[0169] 术语“包装插页”用于指通常包括在治疗产品的商品包装中的说明书, 它们包含有关涉及这类治疗产品应用的适应征、用途、剂量、给药、禁忌症和 / 或警告的信息。

[0170] “心脏保护剂”为与对患者给药, 诸如蒽环类抗生素和 / 或抗 TGF- β 抗体相关的预防或减轻心肌机能障碍 (即心肌病和 / 或充血性心力衰竭) 的化合物或组合物。例如, 心脏保护剂可阻断或减轻自由基介导的心脏中毒作用和 / 或预防或减轻氧化应激损伤。本定义涵盖的心脏保护剂的实例包括: 铁螯合剂右雷佐生 (dexrazoxane) (ICRF-187) (Seifert 等, The Annals of Pharmacotherapy, 28 :1063-1072 (1994)) ;降脂药和 / 或抗氧化剂, 诸如普罗布考 (probucol) (Singal 等, J. Mol. Cell Cardiol., 27 :1055-1063 (1995)) ;氨磷汀 (amifostine) (氨基硫醇 2-[(3-氨基丙基) 氨基] 乙硫醇 - 二氢磷酸酯, 也称作 WR-2721 及其脱磷酸化细胞摄取形式, 称作 WR-1065) 和 S-3-(3-甲氨基丙氨基) 丙基硫代磷酸 (WR-151327), 参见 Green 等, Cancer Research, 54 :738-741 (1994) ;地高辛 (digoxin) (Bristow, M. R. In :Bristow MR 编, Drug-Induced Heart Disease (New York :Elsevier 191-215 (1980)) ; β -阻断剂, 诸如美托洛尔 (metoprolol) (Hjalmarson 等, Drugs, 47 : Suppl 4 :31-9 (1994) ;和 Shaddy 等, Am. Heart J., 129 :197-199 (1995)) ;维生素 E ;抗坏血酸 (维生素 C) ;自由基清除剂, 诸如石竹酸 (oleanolic acid)、乌索酸和 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) ;自旋捕获化合物, 诸如 α -苯基-叔丁基硝酮 (PBN) (Paracchini 等, Anticancer Res., 13 :1607-1612 (1993)) ;硒基有机化合物, 诸如 P251 (Elbesen) ;等。

[0171] “分离的”核酸分子为从一般与编码抗体的核酸的天然来源相关的至少一种污染性核酸分子鉴别和分离的核酸分子。分离的核酸分子不同于天然发现的形式或背景。分离的核酸分子由此不同于它在天然细胞中存在时的核酸分子。不过, 分离的核酸分子包括一般表达抗体的细胞中包含的核酸分子, 其中, 例如该核酸分子位于不同于在天然细胞中的

染色体位置上。

[0172] 表述“控制序列”指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的 DNA 序列。例如,适于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵子序列、和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号、和增强子。

[0173] 当一种核酸与另一种核酸序列处于功能性相互关系中时,则它们是“可操作连接的”。例如,若前序列或分泌前导序列的 DNA 表达成参与多肽分泌的前蛋白,则它与多肽的 DNA 可操作连接;若启动子或增强子影响编码序列的转录,则它与编码序列可操作连接;或者,若核糖体结合位点的位置促进翻译,则它与编码序列可操作连接。通常,“可操作连接”指 DNA 序列邻近相连,且在分泌前导序列的情况中指邻近且以读码状态相连。然而,增强子不必邻近。连接可以通过在方便的限制性位点处的连接反应来完成。如果没有这些位点,那么使用与常规实践一致的合成寡核苷酸接头或接头。

[0174] 在用于本文时,表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,且所有这类命名均包括后代。因此,措词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试者细胞和由它们衍生的培养物,不管转移次数。还可以理解,所有的后代在 DNA 内含物上可以不完全相同,这是因有意或无意突变所致。包括与所筛选的原始转化细胞具有相同功能或生物学活性的突变体后代。如果指定了不同的命名,那么显然可以从上下文中得知。

[0175] 在用于本文时,“身体样品”指含有或可能含有待检测 TGF- β 的任何液体或生物学样品。样品包括:流体,诸如人或动物体液,例如血液、血清、尿液、羊水、组织提取物、脑脊液等。样品可能需要专门的处理,诸如在分析前提取,这取决于其中包含的成分趋向于不稳定、聚集或受到储存容器吸附的倾向。

[0176] II. 人源化抗 TGF- β 抗体的生产

[0177] 本领域已经描述了用于将非人抗体人源化的方法。优选的是,人源化抗体具有从非人来源引入的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称为“输入”残基,它们通常取自“输入”可变区。人源化可本质上遵循 Winter 及其同事的方法进行 (Jones 等, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann 等, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen 等, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), 通过用高变区序列替换人抗体的相应序列。因此,这类“人源化”抗体是嵌合抗体 (美国专利 4,816,567), 其中基本上少于整个人可变区来自非人物种的相应序列替换。在实践中,人源化抗体通常是其中一些高变区残基和可能的一些 FR 残基来自啮齿类抗体中类似位点的残基替换的人抗体。

[0178] 2003 年 1 月 23 日出版的美国专利公开号 2003/0017534 描述了用于制备人源化抗体的另一种方法,其中由转基因非人动物产生人源化抗体和抗体制品。对非人动物进行遗传改造以便含有一个或多个个人源化免疫球蛋白基因座,它们能够在转基因非人动物中进行基因重排和基因转变以便产生多样化人源化免疫球蛋白。

[0179] 用于制备人源化抗体的人可变区的选择,包括轻链和重链,对于降低抗原性非常重要。根据所谓的“最适 (best-fit)”方法,用啮齿类抗体可变区序列对已知的人可变区序列的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类最接近的人序列作为人源化抗体的人框架区 (FR) (Sims 等, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia 等, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987))。另一种方法使用由特定轻链或重链亚群的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架区。同一框架可用于几种不同的人源化抗体 (Carter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

89:4285(1992);Presta 等, *J. Immunol.*, 151:2623(1993))。

[0180] 更为重要的是,抗体在人源化后保持对抗原的高亲和力以及其它有利的生物学特性。为了实现这一目的,依照一种优选的方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。通常可获得三维免疫球蛋白模型,且为本领域熟练技术人员所熟悉。还可获得图解和显示选择的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。检查这些显示图像能够分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可从受体和输入序列中选出 FR 残基并进行组合,从而获得所需抗体特征,诸如对靶抗原的亲和力提高。通常,高变区残基直接且最实质的涉及对抗原结合的影响。

[0181] 下文的实施例 2 描述了结合 TGF- β 的例示性人源化抗 TGF- β 抗体的生产。本文的人源化抗体包含掺入人重链可变区的非人高变区残基,且在选自 48、49、68、70、72、74 和 79 的位置上还包含框架区 (FR) 取代,其中使用了 Kabat 等,文献同上中描述的可变区编号系统。在一个实施方案中,人源化抗体包含在 48、49、68、70、72、74 和 79 位中两个或多个位置上的 FR 取代;而在其它实施方案中,人源化抗体包含在这类位置中的三个或四个位置上的 FR 取代。在优选的实施方案中,抗体包含在 49、68 和 72 位、或 48、49 和 72 位、或 49、70 和 72 位、或 49、70、72 和 74、或 49、72 和 74 位、或 49、72 和 79 位上的 FR 取代。优选存在较少而非较多框架取代以便将免疫原性降至最低,但功效也是一个很重要的考虑因素。实际取代的氨基酸优选为那些保守以便不改变免疫原性或功效的氨基酸。48 位上缬氨酸优选改变成异亮氨酸,49 位上丙氨酸优选改变成甘氨酸,68 位上苯丙氨酸优选改变成丙氨酸,70 位上苯丙氨酸优选改变成丙氨酸,72 位上精氨酸优选改变成丙氨酸,74 位上天冬酰胺优选改变成赖氨酸,而 79 位上亮氨酸优选改变成丙氨酸。

[0182] 本文关注的例示性人源化抗体包含重链可变区互补决定残基 GYAFTNYLIE (SEQ ID NO:21);VNNPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO:22) 或 VINPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO:43);和 / 或 SGGFYFDY (SEQ ID NO:23),任选包含那些 CDR 残基的氨基酸修饰,例如其中这些修饰基本上维持或改善抗体的亲和力。例如,所关注的抗体变体可以在上述重链可变区 CDR 序列中带有约 1 个 - 约 7 个或约 5 个氨基酸取代。可以通过例如下文所述的亲和力成熟来制备这类抗体变体。优选的是,残基为 GYAFTNYLIE (SEQ ID NO:21);VNNPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO:22) 或 VINPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO:43);和 / 或 SGGFYFDY (SEQ ID NO:23) 中的两种或更多,最优选所有三种。最优选的人源化抗体包含 SEQ ID NO:4 中的重链可变区氨基酸序列或带有 GYAFTNYLIE (SEQ ID NO:21);VINPGSGGSNYNEKFKG (SEQ ID NO:43);和 SGGFYFDY (SEQ ID NO:23) 的氨基酸序列。

[0183] 人源化抗体可包含轻链可变区互补决定残基 RASQSVLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO:18) 或 RASQGISSYLA (SEQ ID NO:7);WASTRES (SEQ ID NO:19) 或 YASSLQS (SEQ ID NO:8);和 / 或 HQYLSSDT (SEQ ID NO:20),例如在上述段落中的那些重链可变区 CDR 残基以外还包括所述轻链可变区互补决定残基。这类人源化抗体任选包含上述 CDR 残基的氨基酸修饰,例如其中这些修饰基本上维持或改善抗体的亲和力。例如,所关注的抗体变体可以在上述轻链可变区 CDR 序列中带有约 1 个 - 约 7 个或约 5 个氨基酸取代。可以通过例如下文所述的亲和力成熟来制备这类抗体变体。优选的是,残基为 RASQSVLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO:18);WASTRES (SEQ ID NO:19);和 / 或 HQYLSSDT (SEQ ID NO:20) 中的两种或更多,最优选所有

三种。最优选的人源化抗体包含 SEQ ID NO :3 中的轻链可变区氨基酸序列。

[0184] 本申请还关注结合 TGF- β 的亲合力成熟抗体。亲本抗体可以是人抗体或人源化抗体,例如分别包含轻链和 / 或重链可变区序列 SEQ ID NO :3 和 4 的抗体 (即型式 (version)5)。亲合力成熟抗体优选以优于鼠 2G7 或变体 5 的亲合力结合 TGF- β (例如根据使用 TGF- β 胞外域 (ECD) 的 ELISA 的评估,亲合力提高了例如约 2 倍或约 4 倍 - 约 100 倍或约 1000 倍)。

[0185] 关注人源化抗体或亲合力成熟抗体的多种形式。例如,人源化抗体或亲合力成熟抗体可以为抗体片段,诸如 Fab, 任选偶联一种或多种胞毒剂以便生成免疫偶联物。或者,人源化抗体或亲合力成熟抗体可以为完整抗体,诸如完整 IgG1 抗体。

[0186] 已经开发了用于生成人源化抗体的抗体片段的多种技术。传统上,通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段 (参见例如 Morimoto 等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24 :107-117 (1992); 和 Brennan 等, Science, 229 :81 (1985))。然而,现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。

[0187] 双特异性抗体指对至少两种不同表位具有结合特异性的抗体。例示性的双特异性抗体可结合 TGF- β 蛋白质的两种不同表位。其它这类抗体可将 TGF- β 结合位点与 HER-2、EGFR、ErbB、ErbB3 和 / 或 ErbB4 的结合位点组合起来。或者,抗 TGF- β 臂可与结合白细胞上引发分子诸如 T 细胞受体分子 (如 CD2 或 CD3) 或 IgG 的 Fc 受体 (Fc γ R), 诸如 Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ RIII (CD16) 的臂组合起来,使得细胞防御机制集中于表达 TGF- β 的细胞。双特异性抗体还可用于将胞毒剂定位于表达 TGF- β 的细胞。这些抗体拥有 TGF- β 结合臂及结合胞毒剂 (例如肥皂草毒蛋白、抗干扰素 - α 、长春花生物碱、蓖麻毒素 A 链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原) 的臂。可将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段 (如 F(ab')₂ 双特异性抗体)。

[0188] WO 1996/16673 中描述了双特异性抗 TGF- β / 抗 Fc γ RIII 抗体,而美国专利 5,837,234 中披露了双特异性抗 TGF- β / 抗 Fc γ RI 抗体。WO 1998/02463 中显示了双特异性抗 TGF- β / Fc α 抗体。美国专利 5,821,337 中教导了双特异性抗 TGF- β / 抗 CD3 抗体。

[0189] 用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的常规生成是基于两种免疫球蛋白重链 - 轻链对的共表达,其中两种链具有不同的特异性 (Millstein 等, Nature, 305 :537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤 (四源杂交瘤 quadromas) 生成 10 种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化非常麻烦,且产量低。WO 93/08829 和 Traunecker 等, EMBO J., 10 :3655-3659 (1991) 公开了类似的方法。

[0190] 根据一种不同的方法,将具有所需结合特异性 (抗体 - 抗原结合位点) 的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。融合优选使用包含至少部分铰链、CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定区。优选的是,在至少一种融合物中具有包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区 (CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物及,如果需要,免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体,并共转染到合适的宿主生物体中。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供最佳产量的实施方案中,这为调整三种多肽链的相互比例提供了很大的灵活性。然而,在至少两种多肽链以相同比率表达导致高产量时或在该比率没有特别意义时,有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一表达载体。

[0191] 在本方法的一个优选实施方案中,双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链,和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半双特异性分子中的存在提供了分离的便利途径,因此发现这种不对称结构促进所需双特异性复合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法公开于 W094/04690。关于制备双特异性抗体的其它细节参见例如 Suresh 等, *Methods in Enzymology*, 121:210(1986)。

[0192] 根据美国专利 5,731,168 中描述的另一种方法,可改造抗体分子对之间的界面,将从重组细胞培养物中回收的异型二聚体的百分比最大化。优选的界面包含至少部分 C_H3 抗体恒定区。在该方法中,将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换。通过用较小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生针对大侧链的相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了相对于其它不想要的终产物诸如同型二聚体提高异型二聚体产量的机制。

[0193] 双特异性抗体包括交联或“异源偶联”抗体。例如,异源偶联物中的一种抗体可与亲合素偶联,另一种抗体与生物素偶联。例如,这类抗体建议用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利 4,676,980),及用于治疗 HIV 感染(WO 1991/00360、WO 1992/200373 和 EP 03089)。可使用任何便利的交联方法来制备异源偶联抗体。合适的交联剂是本领域所熟知的,且连同许多交联技术一起公开于美国专利 4,676,980。

[0194] 文献中还描述了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如,可使用化学键合制备双特异性抗体。Brennan 等, *Science*, 229:81(1985) 描述了通过蛋白水解切割完整抗体生成 F(ab')₂ 片段的方法。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况中还原,以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的 Fab' 片段转化为硫代硝基苯甲酸酯(TNB) 衍生物。然后将 Fab' -TNB 衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成 Fab' -硫醇,并与等摩尔量的另一种 Fab' -TNB 衍生物混合,形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作酶的选择性固定化试剂。

[0195] 近来的进展推动了从大肠杆菌直接回收 Fab' -SH 片段,可对其进行化学偶联而形成双特异性抗体。Shalaby 等, *J. Exp. Med.*, 175:217-225(1992) 描述了完全人源化双特异性抗体 F(ab')₂ 分子的生成。各 Fab' 片段分别从大肠杆菌分泌并进行体外定向化学偶联而形成双特异性抗体。由此形成的双特异性抗体能够结合过表达 TGF-β 受体的细胞和正常人 T 细胞,以及引发人细胞毒性淋巴细胞对人乳腺肿瘤靶的溶解活性。

[0196] 还描述了从重组细胞培养物直接制备和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已使用亮氨酸拉链生产出双特异性抗体。Kostelny 等, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553(1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同型二聚体在铰链区还原,形成单体,然后重新氧化,形成抗体异型二聚体。该方法还可用于生产抗体同型二聚体。由 Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993) 描述的“双抗体”技术提供了制备双特异性抗体片段的替换机制。该片段包含通过接头相连的重链可变区(V_H) 和轻链可变区(V_L),该接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此,迫使一个片段上的 V_H 和 V_L 结构域不得与另一个片段上的互补 V_L 和 V_H 结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链 Fv(sFv) 二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见 Gruber 等, *J. Immunol.*, 152:

5368(1994)。

[0197] 关注具有超过两个效价的抗体。例如,可制备三特异性抗体。Tutt 等, *J. Immunol.*, 147:60(1991)。

[0198] 可以通过评价例如抗体中和、拮抗或抑制 TGF- β 活性的能力,例如基本上防止不需要的生长抑制、免疫抑制、形成基质(基质成分包括炎性细胞、内皮细胞和成纤维细胞)或成熟 TGF- β 的不依赖锚地的生长促进活性中的至少一种来评价它的生长抑制作用,正如文献中所定义的。抗体由此能够阻断肿瘤和抑制淋巴样细胞(T 细胞)产生的所有内源 TGF- β 的活性。测量这类中和的一种方式是通过貂肺成纤维细胞细胞系,如 Mv-3D9 的 ^3H -胸苷摄取抑制,其中随着抗体的浓度升高, TGF- β 的活性稳定下降,或是线性的或是非线性的。貂肺细胞系对 TGF- β 的生长抑制作用非常敏感且这是相对易于进行的试验。一般来说,通过下列步骤进行该试验:在 37°C 和 5% CO_2 中将细胞与 TGF- β 和抗体混合物在含有 2mM 谷氨酰胺和 5% 胎牛血清的极限必需培养基中一起温育 18-24 小时,然后用在 20 μl 中的 1 μCi ^3H -胸苷脉冲,并在 37°C 温育 4 小时后收集。优选的是,抗体将能够将 TGF- β 产生的细胞增殖抑制到大于单克隆抗体 2G7 的程度。另一种评价抗体的生长抑制作用的方式在于测试它是否在下文实施例所述的小鼠肾小球系膜细胞增殖试验中抑制 TGF- β 。本文的抗体还可以常规方式用于受体结合或放射性受体测定,如通过下列步骤进行:将放射性标记的 TGF- β (例如放射性碘化的 rhTGF- β 1) 和抗体的混合物与含有 TGF- β 受体的细胞(例如貂肺成纤维细胞,诸如 Mv1Lu 细胞系,作为 ATCC No. CCL-64 购自 ATCC) 一起温育,并测定抗体是否阻断经标记 TGF- β 结合受体。

[0199] 为了选择诱导细胞死亡的抗体,可与对照组相比评价例如 PI、锥虫蓝或 7AAD 摄取显示的膜完整性丧失。优选的试验为使用 BT474 细胞进行的 PI 摄取试验。按照该试验,在补充了 10% 热灭活的 FBS(Hyclone) 和 2mM L-谷氨酰胺的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(D-MEM):Ham's F-12(50:50) 中培养 BT474 细胞(可以从 American Type Culture Collection(Manassas, VA) 获得)。(因此,该试验在没有补体和免疫效应细胞存在下进行。)将 BT474 细胞以 3×10^6 /平皿的密度接种在 100 \times 20mm 平皿上并使其贴壁过夜。然后除去培养基并更换单独的新鲜培养基或含有 10 $\mu\text{g/ml}$ 合适单克隆抗体的培养基。将细胞温育 3 天。在每次处理后,用磷酸盐缓冲盐水(PBS) 洗涤单层并通过胰蛋白酶消化分离。然后在 4°C 以 1200rpm 将细胞离心 5 分钟并将沉淀重悬于 3ml 冰冷的 Ca^{2+} 结合缓冲液(10mM HEPES, pH7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl_2) 并等分入 35mm 盖有滤网的 12 \times 75 管(1ml/管, 3 支管/处理组) 以便除去细胞团。管随后接受 PI(10 $\mu\text{g/ml}$)。可以使用 FACSCAN™ 流式细胞仪和 FACSCONVERT™ CellQuest 软件(Becton Dickinson) 分析样品。可以将那些根据 PI 摄取的测定诱导统计学显著水平的细胞死亡的抗体选作诱导细胞死亡的抗体。

[0200] 为了选择诱导凋亡的抗体,可利用使用 BT474 细胞进行的膜联蛋白结合试验。培养 BT474 细胞并如上述段落中所述将其接种到平皿上。然后除去培养基并更换单独的新鲜培养基或含有 10 $\mu\text{g/ml}$ 单克隆抗体的培养基。在 3 天温育期后,用 PBS 洗涤单层并通过胰蛋白酶消化分离。然后离心细胞,重悬于 3ml 冰冷的 Ca^{2+} 结合缓冲液中并如上所述等分入管以便进行细胞死亡试验。管随后接受经标记的膜联蛋白(如膜联蛋白 V-FTIC)(1 $\mu\text{g/ml}$)。可以使用 FACSCAN™ 流式细胞仪和 FACSCONVERT™ CellQuest 软件(Becton Dickinson) 分析样品。可以将那些与对照组相比诱导统计学显著水平的膜联蛋白结合的抗体选作诱导凋亡

的抗体。

[0201] 除膜联蛋白结合试验外,还可利用使用 BT474 细胞进行的 DNA 染色试验。为了进行该试验,将已经如上述两段中所述用目的抗体处理过的 BT474 细胞与 $9\mu\text{g/ml}$ HOECHST 33342TM 荧光探针在 37°C 一起温育 2 小时,然后在 EPICS ELITETM 流式细胞仪 (Coulter Corporation) 上使用 MODFIT LTTM 软件 (Verity Software House) 分析。可以使用该试验将诱导凋亡细胞百分比改变 2 倍或更多 (且优选 3 倍或更多) 于未处理细胞 (可高达 100% 凋亡细胞) 的抗体选作促凋亡抗体。

[0202] 为了筛选结合 TGF- β 上目的抗体所结合的表位的抗体,可以进行常规交叉阻断试验,诸如 Antibody, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane (1988) 中所述。或者 / 另外,可以通过本领域公知的方法进行表位作图。

[0203] 本发明还涉及免疫偶联物,它们包括偶联有胞毒剂,诸如化疗剂、毒素 (例如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物来源的酶活毒素,包括其片段和 / 或变体) 或放射性同位素 (即放射性偶联物) 的抗体。

[0204] 上文已经描述了可用于生成这类免疫偶联物的化疗剂。本文还关注抗体与一种或多种小分子毒素,诸如加利车霉素、美登素 (美国专利 5, 208, 020)、单端孢菌素和 CC1065 抗癌药的偶联物。

[0205] 在本发明的一个优选实施方案中,将抗体与一个和多个美登素分子偶联 (如每个抗体分子偶联约 1 个至约 10 个美登素分子)。例如可将美登素转化为 May-SS-Me,后者可还原为 May-SH3 并与经修饰抗体反应 (Chari 等, Cancer Research, 52:127-131 (1992)) 产生美登素生物碱-抗体偶联物。

[0206] 关注的另一种免疫偶联物包含偶联有一个或多个加利车霉素分子的抗 TGF- β 抗体。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度产生双链 DNA 断裂。可使用的加利车霉素的结构类似物包括但不限于 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙酰基- γ_1^I 、PSAG 和 θ_1^I (Hinman 等, Cancer Research, 53:3336-3342 (1993) 和 Lode 等, Cancer Research, 58:2925-2928 (1998))。还可参见美国专利 5, 714, 586 ;5, 712, 374 ;5, 264, 586 ;和 5, 773, 001, 明确引入本文作为参考。

[0207] 可使用的酶活毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链 (来自铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*)、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 (abrin) A 链、蒴莲根毒素 (modeccin) A 链、 α -帚曲毒素 (alpha-sarcin)、油桐 (*Aleurites fordii*) 蛋白质、香石竹毒蛋白 (dianthinprotein)、美洲商陆 (*Phytolaca Americana*) 蛋白质 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制物、麻疯树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (crotonin)、肥皂草 (*Saponaire officinalis*) 抑制物、白树毒素 (gelonin)、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (neomycin) 和单端孢菌毒素类 (tricothecenes)。参见例如 1993 年 10 月 28 日出版的 WO 1993/21232。

[0208] 本发明还关注与具有核酸水解活性的化合物 (如核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶诸如脱氧核糖核酸酶 ;DNA 酶) 偶联的抗体。

[0209] 有多种放射性同位素可用于生成放射性偶联抗 TGF- β 抗体。例子包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 和 Lu 的放射性同位素。

[0210] 可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和胞毒剂的偶联物,诸如 3-(2-吡啶基二巯基)丙酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPDP)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己胺-1-羧酸琥珀酰亚胺酯、亚氨基硫烷 (iminothiolane) (IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(诸如盐酸二甲基己二酰亚胺酯、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对重氮苯甲酰基)乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可如 Vitetta 等, *Science*, 238:1098(1987) 中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳 14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 WO 1994/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒性药物的“可切割接头”。例如,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、二甲基接头、或含二硫化物接头 (Chari 等, *Cancer Research*, 52:127-131(1992))。

[0211] 或者,可通过例如重组技术或肽合成法来制备包含抗 TGF- β 抗体和胞毒剂的融合蛋白。

[0212] 在另一个实施方案中,可以将抗体与“受体”(诸如链霉亲和素)偶联,用于肿瘤的预定位,其中对患者给予抗体-受体偶联物,随后使用清除剂从循环中除去未结合的偶联物,然后给予与胞毒剂(如放射性核苷酸)偶联的“配体”(例如亲和素)。

[0213] 通过将抗体与前体药物活化酶偶联,后者将前体药物(如肽基化疗剂,参见 WO 1981/01145)转化为活性抗癌药,还可将抗体用于 ADEPT。参见例如 WO 1988/07378 和美国专利 4,975,278。

[0214] 可用于 ADEPT 的免疫偶联物中的酶成分包括能够以这样一种方式作用于前体药物从而将其转化为更具有活性的细胞毒性形式的任何酶。

[0215] 可用于本发明方法的酶包括但不限于可将含磷酸盐/酯的前体药物转化为游离药物的碱性磷酸酶;可将含硫酸盐/酯的前体药物转化为游离药物的芳基硫酸酯酶;可将无毒 5-氟胞嘧啶转化为抗癌药物 5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶;可将含肽的前体药物转化为游离药物的蛋白酶,诸如沙雷氏菌属蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(诸如组织蛋白酶 B 和 L);可转化含 D-氨基酸取代的前体药物的 D-丙氨酰羧肽酶;可将糖基化前体药物转化为游离药物的碳水化合物切割酶类,诸如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸酶;可将 β -内酰胺衍生的药物转化为游离药物的 β -内酰胺酶;及可在其氨基氮处分别用苯氧乙酰基或苯乙酰基衍生的药物转化为游离药物的青霉素酰胺酶,诸如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。或者,可使用具有酶活性的抗体,本领域也称作“抗体酶”,将本发明的前体药物转化为游离的活性药物(参见如 Massey, *Nature*, 328:457-458(1987))。可如本文所述制备抗体-抗体酶偶联物,用于将抗体酶投递至肿瘤细胞群。

[0216] 可通过本领域众所周知的技术将可用于本发明的酶与抗 TGF- β 抗体共价结合,诸如使用上文讨论的异双功能交联剂。或者,可使用本领域众所周知的重组 DNA 技术构建包含与合适酶的至少功能活性部分连接的本发明抗体的至少抗原结合区的融合蛋白(参见如 Neuberger 等, *Nature*, 312:604-608(1984))。

[0217] 本文关注抗体的其它修饰。例如,可将抗体与多种非蛋白质聚合物中的一种连接,如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯、或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。例如,还可将抗体包裹

在通过凝聚技术或界面聚合（例如分别用羟甲基纤维素或明胶-微囊和聚（甲基甲基丙烯酸酯）微囊）制备的微囊中、胶体药物递送系统（例如脂质体、清蛋白微球体、纳米颗粒和纳米胶囊）或粗滴乳状液中。Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Oslo, A. 编 (1980) 中披露了这类技术。

[0218] 本文公开的抗 TGF- β 抗体还可配制成脂质体。可通过本领域已知的方法制备包含抗体的脂质体, 诸如 Epstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); 美国专利 4,485,045 和 4,544,545; 和 1997 年 10 月 23 日公布的 WO 1997/38731 中所述。美国专利 5,013,556 中公开了具有延长的循环时间的脂质体。

[0219] 特别有用的脂质体可用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生化磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的脂质组合物通过反相蒸发法生成。将脂质体挤过具有设定孔径的滤器, 产生具有所需直径的脂质体。可如 Martin 等, J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982) 中所述, 将本发明抗体的 Fab' 片段经二硫化物交换反应与脂质体偶联。任选在脂质体中包含化疗剂。参见 Gabizon 等, J. National Cancer Inst., 81(19):1484 (1989)。

[0220] III. 载体、宿主细胞和重组方法

[0221] 本发明还提供了编码人源化抗 TGF- β 抗体的分离的核酸、包含所述核酸的载体和宿主细胞以及用于生产所述抗体的重组技术。

[0222] 为了重组生产抗体, 分离编码它的核酸, 并将其插入可复制载体, 用于进一步克隆 (DNA 扩增) 或表达。可以使用常规流程容易的分离编码单克隆抗体的 DNA 并测序 (如使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异结合的寡核苷酸探针)。可以获得许多载体。载体构件通常包括但不限于下列一种或多种: 信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0223] (i) 信号序列构件

[0224] 不仅可以直接重组生产本发明的抗 TGF- β 抗体, 而且可以作为与异源多肽的融合多肽, 所述异源多肽优选在成熟蛋白质或多肽的 N-末端处带有特异性切割位点的信号序列或其它多肽。优选受到宿主细胞识别并加工 (即受到信号肽酶切割) 的异源信号序列。就无法识别和加工天然抗 TGF- β 抗体信号序列的原核宿主细胞而言, 用例如选自碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp 或热稳定肠毒素 II 前导序列的原核信号序列取代所述信号序列。为了酵母分泌, 可以用例如酵母转化酶前导序列、 α -因子前导序列 (包括糖酵母属和克鲁维氏酵母属 α -因子前导序列)、酸性磷酸酯酶前导序列、白色假丝酵母葡萄糖淀粉酶前导序列或 WO 1990/13646 中所述的信号取代天然信号序列。在哺乳动物细胞表达中, 可以利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列, 例如单纯疱疹 gD 信号。

[0225] 将这类前体区的 DNA 连接到编码抗 TGF- β 抗体的 DNA 的读码框中。

[0226] (ii) 复制起点构件

[0227] 表达和克隆两种载体都含有能够使载体在一种或多种选择的宿主细胞中复制的核酸序列。一般来说, 在克隆载体中, 这种序列为能够使载体不依赖于宿主染色体 DNA 复制的序列, 包括复制起点或自主复制序列。众所周知多种细菌、酵母和病毒的这类序列。来自质粒 pBR322 的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌, 2 μ 质粒起点适合于酵母, 而各种病毒起点 (SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV) 可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。通

常,哺乳动物表达载体不需要复制起点构件(SV40 起点通常可能只因含有早期启动子才使用)。

[0228] (iii) 选择基因构件

[0229] 表达和克隆载体可以含有选择基因,也称为选择标记。典型的选择基因编码如下蛋白质:(a) 赋予抗生素或其它毒素抗性,如氨基青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素;(b) 补足营养缺陷;或(c) 提供不能由复合培养基获得的关键营养物,例如编码芽孢杆菌 D- 丙氨酸消旋酶的基因。

[0230] 选择方案的一个实例利用药物来阻滞宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞生成赋予药物抗性的蛋白质,因而幸免于选择方案。这些显性选择的实例使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0231] 适于哺乳动物细胞的选择标记的另一个实例是能够鉴定有能力摄取编码抗 TGF- β 抗体之核酸的细胞的选择标记,诸如 DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白 I 和 II 优选灵长类金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0232] 竞争性拮抗剂,的培养基中进行培养来鉴定经 DHFR 选择基因转化的细胞。在采用野生型 DHFR 时,合适的宿主细胞是 DHFR 活性缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

[0233] 或者,可以通过在含有针对选择标记的选择剂诸如氨基糖苷抗生素如卡那霉素、新霉素或 G418 的培养基中培养细胞来选择经编码抗 TGF- β 抗体、野生型 DHFR 蛋白质、和另一种选择标记诸如氨基糖苷 3' - 磷酸转移酶(APH) 的 DNA 序列转化或共转化的宿主细胞(特别是含有内源 DHFR 的野生型宿主)。参阅美国专利 4,965,199。

[0234] 适用于酵母的选择标记为存在于酵母质粒 YRp7 中的 trp1 基因(Stinchcomb 等, *Nature*, 282 :39(1979))。trp1 基因为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株,例如 ATCC No. 44076 或 PEP4-1 提供了选择标记。Jones, *Genetics*, 85 :12(1977)。酵母宿主细胞基因组中存在 trp1 损害随之提供了用于通过在不存在色氨酸下生长来检测转化的有效环境。类似地,用带有 Leu2 基因的公知质粒补足 Leu2- 缺陷型酵母菌株(ATCC 20,622 或 38,626)。

[0235] 此外,衍生自 1.6 μ m 环状质粒 pKD1 的载体可用于转化克鲁维氏酵母属酵母。或者,报导了用于在乳酸克鲁维氏酵母中大规模生产重组小牛凝乳酶的表达系统。Van den Berg, *Bio/Technology*, 8 :135(1990)。还披露了适用于通过克鲁维氏酵母属的工业菌株分泌成熟重组人血清清蛋白的稳定多拷贝表达载体。Fleer 等, *Bio/Technology*, 9 :968-975(1991)。

[0236] (iv) 启动子构件

[0237] 表达和克隆载体通常含有受到宿主生物体识别的启动子,且与编码抗 TGF- β 抗体的核酸可操作连接。适用于原核宿主的启动子包括 PhoA 启动子、 β -内酰胺酶启动子和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统、和杂合启动子诸如 tac 启动子。然而,其它已知的细菌启动子也是合适的。用于细菌系统的启动子还含有与编码抗 TGF- β 抗体的 DNA 可操作连接的 Shine-Dalgarno(S. D.) 序列。

[0238] 已知真核细胞的启动子序列。事实上,所有真核基因都具有富含 AT 区,位于起始转录的位点上游约 25 至 30 个碱基处。在许多基因的转录起点上游 70 至 80 个碱基处发现的另一种序列是 CNCAAT(SEQ ID NO :46) 区,其中 N 可以是任何核苷酸。在大多数真核基因

的 3' 端是 AATAAA (SEQ IDNO :47) 序列,它可能是向编码序列的 3' 端添加聚腺苷酸尾的信号。所有这

[0239] 适用于酵母宿主的启动子序列的实例包括 3-磷酸甘油酸酯激酶或其它糖酵解酶的启动子,诸如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸酯变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶。

[0240] 作为具有由生长条件控制转录的额外优点的诱导型启动子的其它酵母启动子是醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和负载麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适用于酵母表达的载体和启动子进一步描述于 EP 73,657 中。酵母增强子也可以有利地与酵母启动子联用。

[0241] 在哺乳动物宿主细胞中由载体转录抗 TGF- β 抗体受到例如由病毒(诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒诸如腺病毒 2、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、细胞巨化病毒、逆转录病毒、乙肝病毒和最优选的猿猴病毒 40 (SV40)) 基因组、异源哺乳动物启动子(如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子)、和热休克启动子获得的启动子的控制,倘若这类启动子与宿主细胞系统相容的话。

[0242] 方便的以 SV40 限制性片段的形式获得 SV40 病毒的早期和晚期启动子,该片段还含有 SV40 病毒复制起点。方便的以 HindIII E 限制性片段的形式获得人细胞巨化病毒的立即早期启动子。美国专利 4,419,446 中公开了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达 DNA 的系统。美国专利 4,601,978 中描述了该系统的一种修改。关于在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下表达人 β -干扰素 cDNA 还可参阅 Reyes 等, *Nature*, 297 :598-601 (1982)。或者,可以使用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

[0243] (v) 增强子元件构件

[0244] 常常通过在载体中插入增强子序列来提高高等真核细胞对编码本发明抗 TGF- β 抗体的 DNA 的转录。已知来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、 α -胎蛋白和胰岛素)的许多增强子序列。然而,通常使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括 SV40 复制起点晚期一侧的增强子 (bp100-270)、细胞巨化病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期一侧的增强子、和腺病毒增强子。关于激活真核启动子的增强元件还可参阅 Yaniv, *Nature*, 297 :17-18 (1982)。增强子可以剪接到载体中,位于编码抗 TGF- β 抗体的序列的 5' 或 3' 位置,但是优选位于启动子的 5' 位点。

[0245] (vi) 转录终止构件

[0246] 用于真核宿主细胞(例如酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物体的有核细胞)的表达载体还将含有终止转录和稳定 mRNA 所必需的序列。这类序列通常可以由真核或病毒 DNA 或 cDNA 非翻译区的 5' 端和偶尔的 3' 端获得。这些区域含有在编码抗 TGF- β 抗体的 mRNA 的非翻译部分中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止构件是牛生长激素聚腺苷酸化区。参阅 WO 1994/11026 及其中公开的表达载体。

[0247] (vii) 宿主细胞的选择和转化

[0248] 适于克隆或表达本文载体中的 DNA 的宿主细胞是上文描述的原核生物、酵母或高等真核细胞。适于此目的的原核生物包括真细菌,诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生

物体,例如肠杆菌科,诸如埃希氏菌属 (*Escherichia*) 如大肠埃希氏菌 (*E. coli*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、变形菌属 (*Proteus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 如粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*)、和志贺氏菌属 (*Shigella*),以及芽孢杆菌属 (*Bacilli*) 诸如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) (如 1989 年 4 月 12 日出版的 DD 266,710 中公开的地衣芽孢杆菌 41P)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 诸如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)、和链霉菌属 (*Streptomyces*)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294(ATCC 31,446),尽管其它菌株诸如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776(ATCC31,537)、和大肠杆菌 W3110(ATCC 27,325) 也是合适的。这些实例只是例示而非限制。

[0249] 除了原核生物以外,真核微生物,诸如丝状真菌或酵母也是编码抗 TGF- β 抗体的载体的合适克隆或表达宿主。酿酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或常用的面包酵母是最常用的低等真核宿主微生物。然而,可获得许多其它属、种、和菌株且可用于本发明,诸如粟酒裂殖糖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主诸如如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、*K. waltii* (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*)、和马克思克鲁维酵母 (*K. marxianus*);亚罗酵母属 (*Yarrowia*) (EP 402,226);巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070);假丝酵母属 (*Candida*);瑞氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234);粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*);许旺酵母属 (*Schwanniomyces*) 诸如许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*);和丝状真菌诸如如脉孢菌属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*)、和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主诸如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*)。

[0250] 适用于表达糖基化抗 TGF- β 抗体的宿主细胞衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株和变体及相应的允许昆虫宿主细胞,它们来自诸如草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (毛虫)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (蚊子)、白纹伊蚊 *Aedes albopictus* (蚊子)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (果蝇)、和家蚕 *Bombyx mori* 等宿主。公众可获得多种病毒株用于转染,如苜蓿尺蠖 *Autographa californica* NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 株,而且这类病毒可依照本发明用作本文的病毒,特别是用于转染草地夜蛾细胞。

[0251] 还可利用棉、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄、和烟草的植物细胞培养物作为宿主。

[0252] 然而,最大的兴趣在于脊椎动物细胞,而且培养(组织培养)中脊椎动物细胞的繁殖已经成为常规流程。有用哺乳动物宿主细胞系的实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651);人胚肾系 (293 或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的 293 细胞, Graham 等, *J. Gen. Virol.*, 36:59(1977));幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216(1980), 包括 DG44 (Urlaub 等, *Som. Cell and Mol. Gen.*, 12:555-566(1986)) 和 DP12 细胞系);小鼠塞托

利细胞 (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251(1980));猴肾细胞 (CV1, ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34);牛鼠 (buffalo rat) 肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75);人肝细胞 (Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL 51);TRI 细胞 (Mather 等, *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 383:44-68(1982));MRC5 细胞;FS4 细胞;和人肝癌系 (Hep G2)。

[0253] 为了生产抗 TGF- β 抗体,用上文所述表达或克隆载体转化宿主细胞,并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当改动的常规营养培养基中进行培养。

[0254] (viii) 宿主细胞的培养

[0255] 可以在多种培养基中培养用于生产本发明抗 TGF- β 抗体的宿主细胞。商品化培养基诸如 Ham 氏 F10(Sigma)、极限必需培养基 (MEM, Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、和 Dulbecco 氏改良的 Eagle 氏培养基 (DMEM, Sigma) 适于培养宿主细胞。另外,可以使用下列文献中描述的任何培养基作为宿主细胞的培养基:Ham 等, *Meth. Enz.*, 58:44(1979);Barnes 等, *Anal. Biochem.*, 102:255(1980);美国专利 4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655;5,122,469;WO 1990/03430;WO 1987/00195;或美国专利再审查号 (U. S. Patent Re.) 30,985。任何这些培养基可以根据需要补充激素和/或其它生长因子(诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐(诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂(诸如 HEPES)、核苷酸(诸如腺苷和胸苷)、抗生素(诸如 GENTAMYCINTM 药物)、微量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以以适当浓度包含本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。培养条件诸如温度、pH 等即为表达而选择的宿主细胞先前所用的,这对于普通技术人员而言是显然的。

[0256] (ix) 抗 TGF- β 抗体的纯化

[0257] 在使用重组技术时,可以在细胞内或在周质空间中生成抗体,或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体,那么作为第一步,通过例如离心或超滤清除宿主细胞或裂解片段的微粒碎片。Carter 等, *Bio/Technology*, 10:163-167(1992) 描述了用于分离分泌到大肠杆菌周质空间的抗体的流程。简单的说,在存在乙酸钠 (pH 3.5)、EDTA 和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 下使细胞糊在约 30 分钟内融化。可以通过离心除去细胞碎片。如果将抗体分泌到培养基中,那么通常首先使用商品化蛋白质浓缩滤器,例如 AMICONTM 或 MILLIPORE PELLICONTM 超滤单元浓缩来自这类表达系统的上清液。在任何上述步骤中,可以包括蛋白酶抑制剂诸如苯甲基磺酰氟 (PMSF) 来抑制蛋白水解,而且可以包括抗生素来防止外来污染物的生长。

[0258] 可以使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析(优选的纯化技术是亲和层析)来纯化由细胞制备的抗体组合物。蛋白 A 作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人 γ 1、 γ 2 或 γ 4 重链的抗体 (Lindmark 等, *J. Immunol. Meth.*, 62:1-13(1983))。蛋白 G 推荐用于所有小鼠同种型和人 γ 3 (Guss 等, *EMBO J.*, 5:1567-1575(1986))。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖,但是可以使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯能够获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。对于包含 C_H3 结构域的抗体而

言,可使用 BAKERBOND ABX™ 树脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) 进行纯化。根据待回收的抗体,也可使用其它蛋白质纯化技术诸如离子交换柱上的分馏、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅土上的层析、肝素 SEPHAROSE™ 上的层析、阴离子或阳离子交换树脂 (诸如聚天冬氨酸柱) 上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀。

[0259] 在任何初步纯化步骤之后,可以将包含目的抗体和污染物的混合物进行低 pH 疏水相互作用层析,使用 pH 约 2.5-4.5 的洗脱缓冲液,优选在低盐浓度 (如约 0-0.25M 盐) 进行。

[0260] IV. 药用制剂

[0261] 制备依照本发明使用的抗体的治疗用制剂,即将具有所需纯化程度的抗体与任选的制药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编 (1980)), 以冻干制剂或水溶液的形式贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,还包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂 (诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化乙烷双胺;苯扎氯铵、苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量 (少于约 10 个残基) 多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如 EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐相反离子,诸如钠;金属复合物 (如 Zn-蛋白质复合物);和 / 或非离子表面活性剂,诸如 TW/EEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。优选的冻干抗 TGF- β 抗体制剂描述在 WO 1997/04801 中,明确引入本文作为参考。

[0262] 本文中的制剂还可包含所治疗具体适应症所需的超过一种活性化合物,优选那些活性互补且彼此没有不利影响的化合物。例如,可能还希望在制剂中提供结合 HER-2、EGFR、TGF- β (例如结合 TGF- β 上不同表位的抗体)、ErbB3、ErbB4 或血管内皮生长因子 (VEGF) 抗原的抗体。或者 / 另外,组合物还可包含化疗剂、胞毒剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂、TGF- β 靶向药物、抗血管发生剂和 / 或心脏保护剂。这类分子适合于以有效用于指定目的的量组合存在。

[0263] 活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如分别用羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚 (甲基丙烯酸甲酯) 微胶囊,在胶状药物传递系统 (例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊) 或粗滴乳状液中。这类技术公开于 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编 (1980)。

[0264] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质,该基质以定型产品的形式存在,如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶 (例如聚 (2-羟乙基-甲基丙烯酸酯) 或聚 (乙烯醇))、聚交酯 (美国专利 3,773,919)、L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ -乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯共聚物、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRON DEPOT™ (由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球体) 及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0265] 用于体内给药的制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[0266] V. 使用抗 TGF- β 抗体的治疗

[0267] 本发明关注的是抗 TGF- β 抗体可用于治疗多种疾病或病症。例示性的疾患或病症包括：良性或恶性肿瘤；白血病和淋巴样恶性肿瘤；和其它病症，诸如神经元、神经胶质、星形胶质细胞、下丘脑、腺、巨噬细胞、上皮、基质、囊胚腔、炎性、血管发生和免疫病症。

[0268] 一般来说，待治疗的病症为 TGF- β 病症，最优选癌症。本文中待治疗的癌症实例包括但不限于癌、母细胞瘤和肉瘤，和某些白血病或淋巴样恶性肿瘤。这类癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌（例如上皮鳞状细胞癌）；肺癌，包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌；腹膜癌；肝细胞癌；胃 (gastric) 或胃 (stomach) 癌，包括胃肠癌；胰腺癌；成胶质细胞瘤；宫颈癌；卵巢癌；肝癌；膀胱癌；肝细胞瘤；乳腺癌；结肠癌；直肠癌；结肠直肠癌；子宫内膜或子宫癌；唾液腺癌；肾脏或肾癌；前列腺癌；外阴癌；甲状腺癌；肝癌；肛门癌；阴茎癌；以及头颈癌。

[0269] 在一个实施方案中，癌症为表达（且可以是过表达）TGF- β 受体的癌症。可表达 / 过表达 TGF- β 受体的癌症的实例包括鳞状细胞癌（例如上皮鳞状细胞癌）；肺癌，包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌；腹膜癌；肝细胞癌；胃 (gastric) 或胃 (stomach) 癌，包括胃肠癌；胰腺癌；成胶质细胞瘤；宫颈癌；卵巢癌；肝癌；膀胱癌；肝细胞瘤；乳腺癌；结肠癌；直肠癌；结肠直肠癌；子宫内膜或子宫癌；唾液腺癌；肾脏或肾癌；前列腺癌；外阴癌；甲状腺癌；肝癌；肛门癌；阴茎癌；以及头颈癌。然而，用本文的抗体治疗的癌症可以为任何癌症，不仅仅是那些表达或过表达 TGF- β 受体的癌症。

[0270] 如果本文中待治疗的癌症可以为特征在于 TGF- β 受体过度活化的癌症，那么这类过度活化可归因于 TGF- β 受体的过表达或产生增加。在本发明的一个实施方案中，将进行诊断或预后试验以便确定患者的癌的特征是否在于 TGF- β 受体过度活化。例如，可测定癌中的 TGF- β 基因扩增和 / 或 TGF- β 受体过表达。本领域中可利用多种试验用于测定这类扩增 / 过表达，例如免疫组织化学 (IHC)、FISH、DNA 印迹或 PCR 技术。

[0271] 此外，可使用体内诊断试验，例如通过给予结合待检测分子并用可检测标记物（如放射性同位素）进行标记的分子（诸如抗体），并且从外部扫描患者以便对标记定位来评价 TGF- β 受体过表达或扩增。

[0272] 可用于测定本文中的人源化抗体是否在体内和体外试验中提高 TNF- α 的肿瘤缓解活性的试验如下所述：

[0273] A. 细胞毒性试验流程

[0274] L-929 试验系统为便利的体外试验，它能够快速测定本文抗体的活性，任选结合合适的免疫功能调节剂。它与 Carswell 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:3666 (1975) 中描述的体内肿瘤坏死试验的相关度目前尚不了解；然而，当具体使用鼠肿瘤细胞时，预计相关度较高。蛋白质肿瘤坏死因子 (TNF- α) 和淋巴毒素 (TNF- β) 在本试验中产生活性。该试验在概念上与使用鼠 L-M 细胞和亚甲蓝染色的美国专利 4, 457, 916 中所披露的相似。然而，已经证实 L-929 试验与人肿瘤细胞系细胞毒性相关（就衍生自 HL-60 细胞的 TNF- α 而言）。

[0275] 在本文的 L-929 试验系统中，在微量滴定板上将 L-929 细胞制成单层过夜。将最佳样品通过平板稀释 2 倍，进行 UV 照射，然后加入到准备好的细胞单层上。然后使各孔中的培养基接触 1 μ g/ml 放线菌素 D。将平板在 37°C 温育 18 小时并在显微镜下通过目测给平板评分。对各孔给出表示孔中细胞死亡程度的 25、50、75 或 100% 的标记。将 1 个单位的

TNF 活性定义为杀伤 50% 发生时稀释度的倒数。

[0276] B. 体内试验

[0277] 还可以通过抗 TGF- β 抗体杀伤或抑制肿瘤生长和防止带有肿瘤的动物死亡的能力来测试制剂的活性。给 Balb/c 小鼠皮下注射不同类型的肿瘤细胞以便生成局限化肿瘤。肿瘤细胞系包括作为来自腹水的细胞悬浮液获得的 MethA 小鼠纤维肉瘤和作为 1mm³ 细胞团给予的人乳腺癌 MCF-7。

[0278] 为了进行本试验,用 26 号针头给雌性 Balb/c 小鼠 (19-22g) 皮下注射在 0.1ml 培养基中含有 5×10^5 个纤维肉瘤细胞的悬浮液或 MCF-7 团。(由 8 日龄腹水通过细胞计数并用不含血清的培养基稀释来制备纤维肉瘤悬浮液。)9-10 天后,当肿瘤变得可触及时,对每只小鼠静脉内注射 1 μ g TNF- α , 并且如果需要,在随后几天中重复给予 TNF- α 。通过测定肿瘤体积和根据存活率评价结果。通过给每只小鼠分开依次注射 1 μ g TNF- α 和每只小鼠 10mg/kg 抗体 4A11 重复进行测试。比较测试抗体与这些试剂的活性。

[0279] 如果待治疗的癌症为不依赖激素的癌症,那么可以使用例如如上所述的任何多种可利用的试验评价激素(如雄激素)和/或其关连受体在肿瘤中的表达。或者/另外,因为患者不再对抗雄激素疗法有响应,可将患者诊断为患有不依赖激素的癌症。

[0280] 在某些实施方案中,对患者施用包含与胞毒剂偶联的抗 TGF- β 抗体的免疫偶联物。优选的是,免疫偶联物和/或它所结合的 TGF- β 蛋白质受到细胞内摄,导致免疫偶联物在杀伤它所结合的癌细胞中的治疗功效增加。在一个优选的实施方案中,胞毒剂靶向或干扰癌细胞中的核酸。这类胞毒剂的实例包括美登木素生物碱、加利车霉素、核糖核酸酶和 DNA 内切核酸酶。

[0281] 按照下列已知方法对人类患者施用抗 TGF- β 抗体或免疫偶联物,诸如静脉内施药,例如作为推注或通过在一时间段期限内连续输注;肌内;腹膜内;脑脊髓内;皮下;关节内;滑膜内;鞘内;口服;局部;或吸入途径。优选抗体的静脉内、腹膜内或皮下施药,特别优选皮下或腹膜内途径。优选的施药方案包括每周约 2-3 次,这取决于待治疗的特定哺乳动物、抗体的类型和本领域技术人员众所周知的其它因素。然而,口服施药方案在本文中具有可操作性。

[0282] 可以将其它治疗方案与抗 TGF- β 抗体的施用联合。联合施药包括使用分开的制剂或单一药物制剂的共同施药,和按照任一次序依次施药,其中优选存在一段时间所有两种(或多种)活性剂同时发挥其生物学活性。

[0283] 在一个优选的实施方案中,用两种不同的抗 TGF- β 抗体治疗患者。

[0284] 可能还需要将一种或多种抗 TGF- β 抗体的施用与针对另一种肿瘤相关抗原的抗体的施用联合。例如,在这种情况下中的另一种抗体可结合下列抗原,诸如 HER-2、EGFR、ErbB3、ErbB4、血管内皮生长因子(VEGF)或 B 细胞表面标志或抗原(可以用与之结合的拮抗剂靶向的在 B 细胞表面上表达的抗原),诸如例如 CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85 和 CD86 白血病表面标志(其描述参见 The Leukocyte Antibody Facts Book,第 2 版,1997,Barclay 等编,Academic Press,Harcourt Brace & Co.,New York)。其它 B 细胞表面标志包括 RP105、FcRH2、B 细胞 CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、Bt_{ig}、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、

BCMA 和 239287。特别关注的 B 细胞表面标志与哺乳动物的其它非 B 细胞组织相比优先在 B 细胞上表达,且可在前体 B 细胞和成熟 B 细胞上表达。本文优选的 B 细胞表面标志为 CD20 和 CD22。在另一个方面中, TGF- β 抗体可以与起抑制血管发生作用的抗血管发生剂联合。实例为 VEGF 拮抗剂,诸如抗体,例如 AVASTIN™。

[0285] 在一个实施方案中,本发明的治疗包括联合施用抗 TGF- β 抗体(一种或多种)与一种或多种哺乳动物免疫功能调节剂,诸如细胞因子,以及化疗剂或生长抑制剂,包括共同施用不同化疗剂的混合物。优选的化疗剂包括紫杉烷类(诸如紫杉醇和多西他赛)和/或蒽环类抗生素。可以按照制造商的说明或如本领域技术人员根据经验的决定使用这类化疗剂的制剂和给药方案。这类化疗的制剂和给药方案还描述在 Chemotherapy Service, M. C. Perry 编, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992) 中。

[0286] 可以将抗体与抗激素化合物,例如抗雌激素化合物,诸如他莫昔芬或芳香酶抑制剂,诸如阿那曲唑;抗孕酮,诸如奥那司酮(参见 EP 616 812);或抗雄激素,诸如氟他胺以这类分子的已知剂量联合。在待治疗的癌症为不依赖激素的癌症,患者先前可能进行过抗激素疗法,和在癌症变成不依赖激素时,可对患者施用抗 TGF- β 抗体(和任选的本文所述其它试剂)。

[0287] 有时,还对患者共同施用心脏保护剂(以预防或减轻与疗法相关的心肌机能障碍)或一种或多种细胞因子可能是有益的。还可以共同施用胞毒剂。除上述治疗方案外,可以对患者实施手术切除癌细胞和/或放疗。

[0288] 还可将本文的抗 TGF- β 抗体与诸如上述定义部分中讨论的那些 EGFR 靶向药物联合,从而产生互补的且可能是协同的治疗作用。

[0289] 任何上述共同施用的试剂的合适剂量就是目前所使用的且可以因所述试剂与抗 TGF- β 抗体的联合作用而降低。

[0290] 为了预防或治疗疾病,合适的抗体剂量将取决于如上所述的待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和过程、施用抗体是为了预防还是为了治疗的目的、先前的疗法、患者的临床病史和对抗体的反应、以及主治医师的判断。合适的是对患者一次性或在一系列治疗中施用抗体。根据疾病的类型和严重程度,约 1 μ g/kg-15mg/kg(例如 0.1-20mg/kg)的抗体为对患者施药的起始候选剂量,无论是例如一次或多次分开的施药,还是连续输注。典型的日剂量可以在约 1 μ g/kg-100mg/kg 或更多的范围内,这取决于上述因素。根据状况,为了在几天或更长时间内反复施药,治疗可以持续至发生所需的疾病症状抑制。

[0291] 抗体的优选剂量将在约 0.05mg/kg-约 10mg/kg 的范围内。因此,可以对患者施用约 0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg 或 10mg/kg(或其任意组合)中的一种或多种剂量。可以间歇施用这类剂量,例如每周或每三周一次(例如使得患者接受约 2-约 20,如约 6 个剂量的抗 TGF- β 抗体)。可以施用起始的较高负荷剂量,随后是一种或多种较低剂量。例示性的给药方案包括施用约 4mg/kg 起始负荷剂量的抗 TGF- β 抗体,随后是约 2mg/kg 的每周维持剂量。然而,可以使用其它剂量方案。该疗法的进程易于通过常规技术和试验监测。

[0292] 或者,合适的依次或与放疗--辐射或导入放射性物质--诸如 UICC(Ed.), Klinische Onkologie, Springer-Verlag(1982) 中提及的那些联合施用抗体。

[0293] 除对受试者施用抗体蛋白质外,本申请关注通过基因疗法来施用抗体。表述“施用治疗有效量的抗体”涵盖编码抗体的核酸的这类施药。参见例如 1996 年 3 月 14 日出版的

WO 1996/07321,它关注通过基因疗法来生成胞内抗体。

[0294] 有两种主要方法使核酸(任选包含在载体中)进入患者的细胞,即体内和回体(ex vivo)。对于体内投递,通常在需要抗体的部位将核酸直接注射到患者体内。对于回体治疗,采集患者的细胞,将核酸导入这些分离的细胞,并将经过修饰的细胞或是直接给予患者,或是例如装入多孔膜内并植入患者体内(参见如美国专利 4,892,538 和 5,283,187)。有多种技术可用于将核酸导入活细胞。这些技术根据是将核酸转移至目的宿主的体外培养细胞还是体内细胞而有所变化。适于在体外将核酸转移到哺乳动物细胞中的技术包括使用脂质体、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE-右旋糖苷、磷酸钙沉淀法等。常用于回体投递基因的载体是逆转录病毒。

[0295] 目前优选的体内核酸转移技术包括用病毒载体(诸如腺病毒、I型单纯疱疹病毒或腺伴随病毒)和基于脂质的系统(可用于脂质介导的基因转移的脂质有例如 DOTMA、DOPE 和 DC-Chol)进行的转染。在有些情况中,希望与靶向靶细胞的试剂一起提供核酸源,诸如对细胞表面膜蛋白或靶细胞特异的抗体、靶细胞上受体的配体等。在采用脂质体时,与胞吞作用相关细胞表面膜蛋白结合的蛋白质可用于靶向和/或促进摄入,例如对特定细胞类型具有向性的衣壳蛋白或其片段、在循环中进行内在化的蛋白质的抗体、和靶向细胞内定位和增加细胞内半衰期的蛋白质。例如 Wu 等, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432(1987) 和 Wagner 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3410-3414(1990) 中描述了受体介导的胞吞技术。关于目前已知的基因标记和基因疗法方案的综述参见 Anderson 等, *Science*, 256:808-813(1992)。还可参见 WO 1993/25673 及其引用的参考文献。

[0296] 在一个具体的实施方案中,通过对哺乳动物施用有效量的 TGF- β 抗体和结合 VEGF 的抗体,任选与任何其它本文所述的合适试剂一起治疗哺乳动物,优选人的癌症,诸如肺癌、黑素瘤、乳腺癌、肾癌、结肠直肠癌、胰腺癌或前列腺癌。优选的是, TGF- β 抗体为单克隆抗体,更优选的是它结合如下任何一种或多种: TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3,且仍更优选结合至少 TGF- β 1,或是 TGF- β 1 和 TGF- β 2 两者,且最优选如本文所述的人源化抗体。在另一个实施方案中,结合 VEGF 的抗体为单克隆抗体,且更优选的是它阻断或中和 VEGF 和/或阻断 VEGF 结合其两类受体之一或两者。

[0297] VI. 产品

[0298] 在本发明的另一个实施方案中,提供了装有可用于治疗上文所述病症的物质的产品。该产品包含一种容器及该容器上或与该容器相关的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小管、注射器等。所述容器可以用各种材料诸如玻璃或塑料制成。该容器装有有效治疗疾患的组合物,且可具有无菌存取口(例如该容器可以是具有皮下注射针头可刺穿的塞子的静脉内溶液包或小管)。所述组合物中的至少一种活性剂是本文中的人源化抗 TGF- β 抗体。所述标签或包装插页表明该组合物用于治疗选定的疾患,诸如癌症。在一个实施方案中,该标签或包装插页表明包含抗体的组合物可用于治疗 TGF- β 病症,例如治疗表达 TGF- β 受体的癌症。此外,该标签或包装插页可表明待治疗的患者为患有特征在于 TGF- β 受体过度活化的癌症的患者。该标签或包装插页还可以表明组合物可用于治疗癌症,其中癌症的特征不在于 TGF- β 受体的过表达。在其它实施方案中,包装插页可表明抗体或组合物可用于治疗乳腺癌(例如转移性乳腺癌);不依赖激素的癌症;前列腺癌(例如不依赖雄激素的前列腺癌);肺癌(例如非小细胞肺癌);结肠、直肠或结肠直肠癌;或本文

披露的任何其它疾病或病症。

[0299] 此外,所述产品可以包括:(a)其中装有组合物的第一容器,其中所述组合物包含本文的人源化抗体;和(b)其中装有组合物的第二容器,其中所述组合物包含人源化抗体以外的治疗剂。本发明该实施方案的产品还可包括表明所述第一和第二组合物可联合用于治疗 TGF- β 病症,诸如癌症的包装插页。这类治疗剂可以为上述部分中所述的任何辅助疗法(例如化疗剂、抗血管发生剂、抗激素化合物、心脏保护剂和/或哺乳动物免疫功能调节剂,包括细胞因子)。或者/另外,所述产品还可包括第二(或第三)容器,其中装有制药学可接受的缓冲剂,诸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、Ringer 氏溶液和右旋糖溶液。它还可包括商业和使用者观点来看所需的其它物质,包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0300] VII. 抗 TGF- β 抗体的非治疗性用途

[0301] 本发明的抗体(例如人源化抗 TGF- β 抗体)还具有非治疗性应用。

[0302] 例如,该抗体可以用作亲和纯化试剂。在这种方法中,使用本领域众所周知的方法将抗体固定在固相,诸如 SEPHADEX™ 树脂或滤纸上。使固定化抗体接触含有待纯化 TGF- β 蛋白质(或其片段)的样品,并在此后用合适的溶剂洗涤支持物,所述溶剂将基本上除去样品中固定化抗体所结合的 TGF- β 蛋白质以外的所有物质。最后用另一种合适的溶剂洗涤支持物,诸如将使 TGF- β 蛋白质从抗体中释放的甘氨酸缓冲液 pH 5.0。

[0303] 抗 TGF- β 抗体还可以用于 TGF- β 蛋白质的诊断试验,例如检测其在具体细胞、组织或血清中的表达。

[0304] 就诊断应用而言,一般用可检测部分标记抗体。可利用的许多标记物一般可以分成如下几类:

[0305] (a) 放射性同位素,诸如 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I 。例如,可以使用 Current Protocols in Immunology, 第 1 和 2 卷, Coligen 等编, Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. (1991) 中描述的技术用放射性同位素标记抗体,并可以使用闪烁计数测定放射性。

[0306] (b) 荧光标记物,诸如可以利用稀土元素螯合物(钆螯合物)或荧光素及其衍生物、若丹明及其衍生物、丹酰、丽丝胺、藻红蛋白和德克萨斯红。例如,可以使用 Current Protocols in Immunology, 同上中披露的技术使荧光标记物与抗体偶联。可以使用荧光计对荧光进行定量。

[0307] (c) 各种酶-底物标记物是可以利用的且美国专利 4,275,149 中提供了有关它们中的一些的综述。所述酶一般催化可以使用各种技术测定的显色底物的化学改变。例如,酶可以催化可通过分光光度法测定的底物中的颜色改变。或者,酶可以改变底物的荧光或化学发光。用于对荧光改变进行定量的技术如上所述。化学发光底物通过化学反应以电子的方式被激发且然后可以发射可测定(例如使用化学发光计)或给荧光受体提供能量的光。酶标记物的实例包括萤光素酶(例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶;美国专利 4,737,456)、萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮类、苹果酸脱氢酶、尿素酶、过氧化物酶诸如辣根过氧化物酶(HRPO)、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳酸过氧化物酶、微过氧化物酶等。用于使酶与抗体偶联的技术描述在 O' Sullivan 等, "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for

use in EnzymeImmunoassay”, Methods in Enzym. (Ed., J.Langone & H.Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166(1981) 中。

[0308] 酶-底物组合的实例包括例如：

[0309] (i) 辣根过氧化物酶 (HRPO) 与作为底物的过氧化氢, 其中过氧化物酶氧化染料前体 (例如邻苯二胺 (OPD) 或 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺盐酸盐 (TMB))；

[0310] (ii) 碱性磷酸酶 (AP) 与作为显色底物的对磷酸硝基苯酯；和

[0311] (iii) β -D-半乳糖苷酶 (β -D-Gal) 与显色底物 (例如对硝基苯基- β -D-半乳糖苷) 或荧光底物 4-甲基伞形基- β -D-半乳糖苷。

[0312] 本领域技术人员可以利用许多其它酶-底物组合。有关它们的一般性综述参见美国专利 4,275,149 和 4,318,980。

[0313] 有时,将标记物间接与抗体偶联。本领域技术人员了解实现这一目的的各种技术。例如,可以将抗体与生物素偶联,并且可以将上述三大类标记物中的任意种与亲合素偶联,或反之亦然。生物素选择性结合亲合素,并且标记物由此以这种间接方式与抗体偶联。或者,为了实现标记物与抗体的间接偶联,将抗体与小半抗原 (例如地高辛) 偶联并将上文所述不同类型的标记物之一与抗半抗原抗体 (例如抗地高辛抗体) 偶联。由此,可以实现标记物与抗体的间接偶联。

[0314] 在本发明的另一个实施方案中,抗 TGF- β 抗体不需标记且可以使用结合 TGF- β 抗体的经标记抗体检测其存在。

[0315] 本发明的抗体可以用于任何已知测定方法,诸如竞争性结合测定、直接和间接夹心式测定、和免疫沉淀测定法。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987)。

[0316] 就免疫组织化学而言,例如,肿瘤样品可以是新鲜的或冷冻的或可以包埋在石蜡中并用防腐剂,诸如福尔马林固定。

[0317] 抗体还可以用于体内诊断试验。一般来说,用放射性核素 (诸如 ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 或 ^{35}S) 标记抗体,因而例如可以使用免疫闪烁描记法 (immunoscintigraphy) 对肿瘤定位。

[0318] 为便利起见,可以在试剂盒中提供本发明的抗体,即预定量的试剂与用于进行诊断试验的说明书的包装组合。如果用酶标记抗体,那么试剂盒将包括酶所需的底物和辅因子 (例如提供可检测发色团或荧光团的底物前体)。此外,可以包括其它添加剂,诸如稳定剂、缓冲剂 (例如封闭缓冲剂或裂解缓冲剂) 等。各种试剂的相对量可以广泛改变以便提供实质性优化试验灵敏度的试剂在溶液中的浓度。具体而言,可以将这些试剂作为干粉提供,通常为冻干的,它们包括在溶解时提供具有合适浓度的试剂溶液的赋形剂。

[0319] 本文的抗体还用于体内成像,其中将经标记抗体给予宿主,优选血流,并检测宿主中经标记抗体的存在和定位。这种成像技术适用于赘生物的分级和治疗。适合用在宿主体内可检测到的任意部分标记的抗体,包括通过例如核磁共振或本领域公知的其它方式可检测的非放射性指示剂。然而,优选的是,该标记物为放射性标记物,包括碘,例如 ^{125}I 和 ^{131}I ；硒；双功能螯合剂；铜,例如 ^{67}Cu ；锝,例如 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ；和铼,例如 ^{186}Re 和 ^{188}Re 。通过任意方式,包括金属螯合化合物或乳酸过氧化物酶或用于碘化的 iodogen (非水溶性碘化试剂) 技术使放射性同位素与蛋白质偶联。

[0320] 鼠单克隆抗体 2G7 于 1989 年 9 月 28 日以编号 HB10240 保藏于 American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC); 而鼠单克隆抗体 4A11 于 1989 年 9 月 28 日以编号 ATCC HB10241 保藏。

[0321] 通过下列非限制性实施例例示本发明的更多详情。明确将本说明书中所有引证文献的公开内容引入本文作为参考。

[0322] 实施例

[0323] 实施例 1: 单克隆抗体 2G7 和 4A11 的生产和鉴定

[0324] A. 试验流程

[0325] I. ELISA 测定

[0326] 将 96 孔聚苯乙烯试验平板用 100 μ l / 孔 pH 9.6 碳酸盐缓冲液中的 1 μ g/ml 纯化 TGF- β 1 在 4 $^{\circ}$ C 包被 18 小时。将经过包被的平板用 PBS 中的 0.5% 牛血清清蛋白 (BSA) (称作 BPBS) 在 22 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时, 用 PBS 中的 0.05% TWEEN20TM 表面活性剂 (称作 PBST) 洗涤, 并与 100 μ l 杂交瘤上清液一起在 22 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。用 PBST 洗涤平板并用偶联有过氧化物酶的山羊抗小鼠 IgG (Tago, Burlingame, CA) 检测结合的抗体。用 PBST 洗涤平板并以 100 μ l / 孔加入邻苯二胺二盐酸盐底物。15 分钟后终止反应并用 UVMAXTM 读板仪 (Molecular Devices, Palo Alto, CA) 读取 492nm 处光密度。

[0327] II. rTGF- β 1 的碘化

[0328] 使用 CHLORAMINE TTM 正-氯-对甲苯磺酰胺钠盐通过改良的流程碘化纯化的 TGF- β 1 (Greenwood 等, *Biochem. J.*, 89:114 (1963))。简单的说, 以 2 分钟温育为间隔, 三次添加 20 μ l 0.1mg/ml CHLORAMINE TTM 正-氯-对甲苯磺酰胺钠盐, 在冰上用 1mCi Na¹²⁵I 标记 10 μ g 纯化的 rTGF- β 1。依次添加 20 μ l 150mM N-乙酰酪氨酸、1M 碘化钾、随后是 200 μ l 8M 脲终止反应。通过使用 C18 柱和三氟乙酸 / 乙腈梯度的 HPLC 将碘化的 rTGF- β 1 与游离的 Na¹²⁵I 分开, 并合并含有主峰的级分, 储存在 -70 $^{\circ}$ C (比活 112 μ Ci/ μ g)。

[0329] III. 抗原俘获放射性免疫测定

[0330] 将 IMMULONTM 2" REMOVAWELL" TM 微量滴定条 (Dynatech, Chantilly, VA) 用 pH9.6 碳酸盐缓冲液中的 5 μ g/ml 羊抗小鼠 IgG (Boehringer Mannheim) 在 4 $^{\circ}$ C 包被 18 小时。用 PBST 洗涤孔, 用含有 0.1% 明胶的 PBS (称作 PBSG) 封闭, 用 PBST 洗涤, 并与杂交瘤上清液一起在 22 $^{\circ}$ C 温育 4 小时。用 PBST 洗涤孔, 并以 100 μ l 含 0.1% 明胶的 PBST 加入约 75,000 CPM / 孔 ¹²⁵I-rTGF- β 1, 且在 22 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。用 PBST 洗涤平板, 并在 GAMMA MASTERTM 计数器 (LKB, Sweden) 对结合的 ¹²⁵I-rTGF- β 1 定量。

[0331] IV. ¹²⁵I-rTGF- β 的免疫沉淀

[0332] 还根据抗 TGF- β 单克隆抗体免疫沉淀 ¹²⁵I-rTGF- β 1 或猪血小板衍生 ¹²⁵I-TGF- β 2 (R & D Systems, Minneapolis, MN; 比活 103.4 μ Ci/ μ g) 的能力, 评价了它们的特异性。将 2 μ g 纯化的单克隆抗体与 5×10^4 CPM ¹²⁵I-rTGF- β 1 或 ¹²⁵I-TGF- β 2 一起在 22 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。用包被了兔抗小鼠 IgG (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) 的蛋白质 A-SEPHAROSETM 琼脂糖 (Repligen, Cambridge, MA) 沉淀免疫复合物, 随后用 PBST 洗涤 3 次。用还原样品缓冲液使该复合物与蛋白质 A-SEPHAROSETM 琼脂糖解离, 电泳入 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE), 并进行放射自显影。

[0333] V. TGF- β 单克隆抗体的亲和力测定

[0334] 使用 Mariani 等, *J. Immunol. Methods*, **71**:43(1984) 描述的固相放射性免疫测定流程,测定 TGF- β 特异性单克隆抗体的亲和力。简单的说,将纯化的抗 TGF- β 单克隆抗体在 4°C 在 pH9.6 碳酸盐缓冲液中以 18 小时包被到微量滴定条上。如上所述洗涤并封闭孔。将 40,000CPM/孔 ^{125}I -rTGF- β 1 或猪 ^{125}I -TGF- β 2 (R&D Systems) 在 50 μ l PBSG 中加到范围为 2500-9.7ng/孔的未标记 rTGF- β 1 或猪 TGF- β 2 在 50 μ l PBSG 中的 2 倍连续稀释液中。将所得混合液在 4°C 温育 18 小时。如上所述将孔洗涤并计数,通过 Scatchard 分析 (Munson 和 Pollard, *Anal. Biochem.*, **107**:220(1980)) 测定亲和常数,得到与 Antoni 和 Mariani, *J. Immunol. Meth.*, **83**:61(1985) 中的非线性回归分析相似的结果。

[0335] VI. 从腹水中纯化单克隆抗体

[0336] 通过有限稀释克隆在上述试验中为阳性的分泌抗体的亲本杂交瘤培养物,并在用 PRISTANE™ 引物致敏的 Balb/c 小鼠的腹水中培养 (Potter 等, *JNCI*, **49**:305(1972))。使用确立的流程在蛋白质 A-SEPHAROSE™ 琼脂糖上从腹水中纯化单克隆抗体并用 0.1M 乙酸, 0.5M NaCl, pH2.4 洗脱 (Goding, *J. Immunol. Methods*, **20**:241(1978)), 在 PBS 中无菌储存在 4°C。

[0337] VII. 单克隆抗体在体外中和 TGF- β 比活

[0338] 体外 TGF- β 试验使用貂肺成纤维细胞细胞系 Mv-3D9 (亚克隆自 Mv1Lu, 作为 ATCC No. CCL-64 获自 American Type Culture Collection, Manassas, VA)。简单的说,将纯化的抗 TGF- β 单克隆抗体和对照与终浓度为 1000-2000pg/ml 的 rTGF- β 1、天然猪 TGF- β 2 (R&D Systems) 或 rTGF- β 3 (Derynck 等, *Nature*, 同上) 一起在 4°C 温育 18 小时。将 50 μ l 这些混合液加到 96 孔微量滴定板上,随后以 50 μ l 含有 2mM 谷氨酰胺和 5% 胎牛血清的极限必需培养基加入 1×10^4 Mv-3D9 细胞并在 37°C 和 5% CO₂ 温育 18-24 小时。将孔用 20 μ l 中的 1 μ Ci ^3H -胸苷脉冲并在 37°C 温育 4 小时后收集且用闪烁计数器计数。将 TGF- β 标准品各稀释度的 ^3H -胸苷摄取抑制百分比用于计算以 pg/ml 计的阴性对照单克隆抗体和 TGF- β 特异性单克隆抗体处理的样品的 TGF- β 活性。

[0339] VIII. 单克隆抗体的同种型分型

[0340] 使用 PANDEX™ 荧光筛选机技术进行 TGF- β 1 反应性单克隆抗体的同种型分型。将大鼠抗小鼠 IgG 抗血清包被的聚苯乙烯颗粒用于结合分配到 PANDEX™ 96 孔试验板中的培养物上清液中的单克隆抗体。洗涤平板并加入 FITC 偶联的大鼠单克隆抗小鼠同种型特异性试剂 (Becton Dickinson Monoclonal Center)。通过 PANDEX™ 荧光筛选机技术对结合的荧光定量。

[0341] IX. 表位分析

[0342] 通过 Nakane 和 Kawaoi, *J. Histochem. Cytochem.*, **22**:1084(1974) 描述的方法使纯化的抗 rTGF- β 1 单克隆抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联。将 rTGF- β 1 包被的平板与 PBS 中的 50 μ g/ml 纯化的抗 rTGF- β 1 或阴性对照一起在 22°C 温育 2 小时。然后向平板中加入抗 rTGF- β 单克隆抗体-HRP 偶联物的预定稀释液并在 22°C 温育 1 小时。洗涤平板并加入底物且如上所述对反应性定量。将异源抗 rTGF- β 1 单克隆抗体的阻断百分比与自体阳性阻断对照进行比较。

[0343] X. 免疫印迹分析

[0344] 使用非还原样品缓冲液将 1 μ g/泳道 rTGF- β 1 电泳入 12% SDS-PAGE 以便测得各

种单克隆抗体与 rTGF- β 1 二聚体形式的反应性。将肽转印迹到硝酸纤维素纸上并用合适的偶联了 HRP 的单克隆抗体探测。使用不溶性底物 4-氯-1-萘酚 (Kirkegaard 和 Perry, Gathersburg, MD) 使结合的抗体显现。15 分钟后通过用蒸馏水彻底洗涤终止反应,将免疫印迹干燥并照相。

[0345] B. 抗 TGF- β 1 和抗 TGF- β 2 特异性单克隆抗体的生产

[0346] 在初次免疫接种方案中,用各种免疫原制品、剂量和方案并使用完全和不完全弗氏佐剂通过皮下和腹膜内途径给 Balb/c 小鼠免疫接种 rTGF- β 1 (如 Derynck 等, *Nature*, 同上所述生产和纯化)。将免疫接种方案持续达 11 周。几只小鼠产生可测量的响应,但抗 rTGF- β 1 滴度低,处死其中 2 只小鼠并将其脾用于融合。从 1152 个亲本培养物中仅检测到 84 份阳性抗 TGF- β 上清液。克隆这些杂交瘤中的 10 个并产生无法用于试验研发或纯化的低亲和力单克隆抗体。

[0347] 作为备选策略,在第 0、3、7、10 和 14 天给一组 10 只 Balb/c 雌性小鼠 (Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, MA) 的后足垫注射 100 μ IDETOX™ 佐剂 (RIBI ImmunoChem Res. Inc., Hamilton, MT) 中的 5 μ g/剂纯化的 TGF- β 1。在第 17 天处死动物,取出其引流腹股沟和腠淋巴结,并用不锈钢筛网将淋巴细胞与结节基质解离。合并来自所有 10 只小鼠的淋巴细胞悬浮液并通过建立的流程 (Oi 和 Herzenberg, *Selected Methods in Cellular Immunology*, B. Mishel 和 S. Schiigi 编 (W. J. Freeman Co., San Francisco, CA, 1980), p. 351) 使用 50% 聚乙二醇 4000 与小鼠骨髓瘤系 X63-Ag8.653 (Kearney 等, *J. Immunol.*, 123:1548 (1979)) 融合。将融合细胞以 2×10^5 细胞/孔的密度分配到 96 孔微量滴定板总计 1344 个孔中,随后在融合后第 1 天进行 HAT 选择 (Littlefield, J. W., *Science*, 145:709 (1964))。

[0348] 在 ELISA 试验中 1190 个孔与固定化重组 TGF- β 1 起反应。这些培养物中的 18 个在扩增后保持稳定并将细胞系冷藏保存。将这些亲本培养物同种型分型并检测其俘获 125 I-rTGF- β 1 和在体外中和 TGF- β 1 活性的能力。在检测 rTGF- β 1 中和且随后同种型分型的 18 个亲本培养物中,2 个是 IgG1 κ 同种型;其余的是 IgG2b κ 同种型。仅发现属于 IgG1 亚类的单克隆抗体在体外表现出 rTGF- β 1 抑制 (中和) 活性。选择分泌高亲和力抗 TGF- β 单克隆抗体的三种稳定杂交瘤。下文进一步描述了这些抗体的鉴定。

[0349] C. 放射性碘化的 TGF- β 的免疫沉淀

[0350] 进行免疫沉淀实验以便测定三种单克隆抗体识别和沉淀溶液中的 TGF- β 1 的能力。放射自显影照片显示抗 TGF- β 单克隆抗体 2G7、4A11 和 12H5 免疫沉淀了等量的 125 I-rTGF- β 1, 而对照单克隆抗体 6G12 为阴性。免疫沉淀带具有约 14.5kD 的表观分子量。使用竞争性抑制试验来测定 TGF- β 1 与每种单克隆抗体之间相互作用的亲和力。单克隆抗体 2G7 和 4A11 具有等同较高的亲和力,为 1.2×10^8 升/摩尔。

[0351] 还进行免疫沉淀实验以便测定选择的单克隆抗体识别和沉淀溶液中的 TGF- β 2 的能力。放射自显影照片显示与 rTGF- β 1 相反,仅抗体 2G7 将 125 I-TGF- β 2 免疫沉淀至任何可测量的程度。将 4A11 和 12H5 与阴性对照比较,揭示出很少的特异性沉淀。这些结果令人意外的方面在于交叉阻断实验揭示出 4A11 和 2G7 能够抑制彼此与人 rTGF- β 1 的结合。参见表 1。

[0352] 表 1

[0353]

结合性单克隆抗体	Mab 与 TGF- β 1 阻断性单克隆抗体的交叉阻断百分比			
	2G7	4A11	12H5	456*
2G7	100	74	32	1.9
4A11	96	100	19	1.5
12H5	28	12	100	3.4

[0354] *Mab 456 为与 CD4 起反应的对照抗体。

[0355] 总之,这些数据表明由这两种单克隆抗体识别的表位是不同的,但或是紧密相邻或是在一定距离上以某种方式影响彼此结合。从免疫沉淀和交叉阻断实验来看,12H5 表现为不同的表位,尽管观察到一些阻断作用。这一结论也得到了下文中和数据的支持。

[0356] D. 使用 rTGF- β 1 的免疫印迹分析

[0357] 由于 TGF- β 的活性形式为同型二聚体,所以进行免疫印迹以便测定单克隆抗体是否识别该形式。抗体 2G7、4A11 和 12H5 均以间接免疫印迹方式与 TGF- β 1 二聚体(未还原的)形式起反应。2G7 产生了远强于 4A11 或 12H5 的带。正如在免疫沉淀实验中,对照抗体 6G12 为阴性。在使用这些单克隆抗体的 HRP 偶联物的直接蛋白质印迹中也观察到这种反应性模式。

[0358] 概括的说,在使用完全和不完全弗氏佐剂在 Balb/c 和 C3H 小鼠中进行多种免疫接种程序和给药方案试图破坏对 rTGF- β 1 的耐受多次失败后,进行了采用足垫免疫接种与引流淋巴结融合相结合的方案。一般来说,发现该程序可用于产生对这些弱免疫原具有很高亲和力的快速响应,这与使用弗氏佐剂中纯化的牛骨衍生 TGF- β 2 作为免疫原在 Balb/c 小鼠中产生 TGF- β 1 和 TGF- β 2 中和性单克隆抗体的 Dasch 等,文献同上的经历相反。

[0359] 所有三种单克隆抗体在免疫印迹、ELISA、交叉阻断和免疫沉淀试验中结合 rTGF- β 1。抗 rTGF- β 抗体中的两种在体外中和 rTGF- β 1 活性,而两种中仅有一种在貂肺成纤维细胞细胞试验中中和 TGF- β 2 和 TGF- β 3 二者的活性。TGF- β 1 中和性抗体还在放射性受体试验中阻断放射性碘化的 rTGF- β 1 结合,表明 rTGF- β 1 活性的体外中和可能是因受体阻断所致。

[0360] 实施例 2 :人源化 2G7 抗体

[0361] 首先将鼠单克隆抗体 2G7 的可变区克隆到能够产生小鼠/人嵌合 Fab 片段的载体中。使用 STRAGENTM RNA 提取试剂盒,按照制造商的方案从杂交瘤细胞中分离总 RNA。通过 RT-PCR 扩增可变区,凝胶纯化,并如先前所述插入基于 pUC119,含有人 κ 恒定区和人 C_H1 结构域的质粒的衍生物(Carter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **89**:4285(1992) 和美国专利 5,821,337)。将所得质粒转化到大肠杆菌菌株 16C9 中以便表达 Fab 片段。如先前所述培养培养物,诱导蛋白质表达,并纯化 Fab 片段(Werther 等, *J. Immunol.*, **157**:4986-4995(1996); Presta 等, *Cancer Research*, **57**:4593-4599(1997))。

[0362] 1990/14357 中所述生产)在 4°C 包被过夜,然后用 ELISA 稀释液(0.5% BSA, 0.05% POLYSORBATETM 20 非离子型表面活性剂, PBS)在室温封闭 1 小时。将样品在 ELISA 稀释液中的连续稀释液在平板上温育 2 小时。洗涤后,用生物素化鼠抗人 κ 抗体(ICN 634771)检测结合的 Fab 片段,随后是链霉抗生物素偶联的辣根过氧化物酶(Sigma),并使用 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)作为底物。读取 450nm 处的吸光度。CDR 交换 Fab 的结合与嵌合 Fab 片段的结合相比显著

下降。

[0363] 为了恢复人源化 Fab 的结合,使用来自 CDR 交换的 DNA 作为模板构建突变体。使用计算机生成的模型设计这些突变以便在改变可能影响 CDR 构象或抗体-抗原界面的位置上将人框架区残基改变成其鼠对应物。表 2 显示了突变体。(注意所有氨基酸编号均按照 Kabat 等,文献同上中的表述)。有关序列参见图 1-4。

[0364] 表 2

[0365] 人源化 2G7FR 突变的设计

[0366]

突变体编号	与人抗 TGF- β 共有序列 (SEQ ID NO :6) 相比的构架区 (FR) 取代
型式 3	ArgH72Ala
型式 4	ArgH72Ala, AlaH49Gly,
型式 5	ArgH72Ala, AlaH49Gly, PheH68Ala
型式 6	ArgH72Ala, AlaH49Gly, LeuH79Ala
型式 709	ArgH72Ala, AlaH49Gly, ValH48Ile
型式 710	ArgH72Ala, AlaH49Gly, IleH70Leu
型式 11	ArgH72Ala, AlaH49Gly, AsnH74Lys
型式 712	ArgH72Ala, AlaH49Gly, IleH70Leu, AsnH74Lys

[0367] 型式 3 和 4 用作获得带有稍后编号的人源化 Fab 型式的中间体。具有改变 AlaH49Gly、PheH68Ala 和 ArgH72Ala 的型式 5 表现出具有恢复至原始嵌合 2G7Fab 片段的结合,正如型式 709 和 11(图 5)。预计型式 710 和 712 具有与嵌合片段类似的结合,但型式 712 具有额外的框架突变,这因免疫原性增加的可能性而可能是不想要的。可以修饰额外的 FR 或 CDR 残基,诸如 L3、L24、L54 和 / 或 H35(例如如下取代:GlnL3Met, ArgL24Lys, ArgL54Leu, GluH35Ser)。对提高稳定性而言可能想要的取代为亮氨酸或异亮氨酸取代甲硫氨酸以减少氧化,或 CDR 中的天冬酰胺改变成其它残基以减少脱酰胺的可能性。或者 / 另外,人源化抗体可以进行亲和力成熟(参见上文)以便进一步改善或改进其亲和力和 / 或其它生物学活性。

[0368] 通过将嵌合 2G7Fab 以及人源化 Fab 型式 5、709 和 11 的 VL 和 VH 结构域亚克隆到先前描述的 pRK 载体中以便哺乳动物细胞表达来构建用于表达全长 IgG 的质粒(Gorman 等, DNA Prot. Eng. Tech., 2 :3-10(1990))。简单的说,用 EcoRV 和 B1pI 消化各 Fab 构建体以便切下 VL 片段,将其克隆到质粒 pDR1 的 EcoRV/B1pI 位点中(参见图 6)以表达完整轻链(VL-CL 结构域)。另外,用 PvuII 和 ApaI 消化各 Fab 构建体以便切下 VH 片段,将其克隆到质粒 pDR2 的 PvuII/ApaI 位点中(参见图 7)以表达完整重链(VH-CH1-CH2-CH3 结构域)。

[0369] 就各 IgG 变体而言,通过将表达轻链的质粒和表达重链的质粒共转染到经腺病毒转化的人胚肾细胞系 293 中进行瞬时转染(Graham 等, J. Gen. Virol., 36 :59-74(1977))。简单的说,在转染前的当天分离 293 细胞并分配到平板中含血清的培养基中。在第二天,由轻链和重链的双链 DNA 与 pADVANTAGE™ 载体 DNA(Promega, Madison, WI)一起制备磷酸钙沉淀并逐滴加到平板中。使细胞在 37°C 温育过夜,然后用 PBS 洗涤并在不含血清的培养基中培养 4 天,此时收集条件培养基。使用蛋白质 A-SEPHAROSECL-4B™ 琼脂糖从培养物上清液中纯化抗体,然后进行缓冲液交换成 10mM 琥珀酸钠、140mM NaCl, pH 6.0,并使用 CENTRICON-10™ 微量浓缩器(Amicon)浓缩。通过测定 280nm 处的吸光度或通过定量氨基

酸分析测定蛋白质浓度。

[0370] 对 hu2G7 型式 5IgG 进行额外的修饰以便阐明哪些 CDR 促进结合,哪些 CDR 可以恢复至人种系 κ 基因座序列而不会丧失活性,或用于稳定抗体。它们如表 3 中所示命名,并给出了型式 5 与这些型式之间的氨基酸差别。

[0371] 表 3

[0372] 人源化 2G7CDR 突变的设计

[0373]

突变体编号	与人抗 TGF- β 型式 5 相比的 CDR 取代
式 5(V5H.V5L)	
H2N1.V5L	与型式 5 相同,但 CDR H2 中的 Asn51 改变成 Ile
V5H.g1L2	与型式 5 相同,但 CDRL2 恢复至人种系 κ 基因座 L8/L9/L14/L15 的序列:YASSLQS(SEQ ID NO:8)
V 5 H .g1L1g1L2	与型式 5 相同,但 CDR L1 恢复至人种系 κ 基因座 L8/L9 的序列: RASQGISSYLA(SEQ ID NO:7) 且 CDR L2 恢复至人种系 κ 基因座 L8/L9/L14/L15 的序列:YASSLQS(SEQ ID NO:8)
H 2 N 1 .g1L1g1L2	与型式 5 相同,但 CDR L1 恢复至人种系 κ 基因座 L8/L9 的序列: RASQGISSYLA(SEQ ID NO:7) 且 CDR L2 恢复至人种系 κ 基因座 L8/L9/L14/L15 的序列:YASSLQS(SEQ ID NO:8),且 CDR H2 中的 Asn51 改变成 Ile

[0374] 用于 CDR L1 的种系序列的名称为 L8/L9,如 Cox 等,Eur. J. Immunol., 24:827-836(1994) 中的图 4 和 Schable 和 Zachau,Biol.Chem.Hoppe-Seyler,374:1001-1022(1993) 中的图 2e 所示。就 CDR L2 而言,种系序列称作 L8/L9/L14/L15(参见 Cox 等,同上,和 Schable 和 Zachau,同上)。

[0375] 在所有 CDR 中恢复至人种系 (g1) κ 基因座的序列,但仅上述种系回复体表现出结合(参见图 8)。从该图可以看到,CDR L2 恢复至人种系 κ 基因座序列的 V5H.g1L2 仍然像 V5H.V5L 一样结合 TGF- β 。两种型式 V5H.g1L1g1L2 和 H2N1.g1L1g1L2 以及 H2N1.V5L 不像所述嵌合体那样结合。

[0376] 使用小鼠肾小球系膜细胞增殖试验来测试对照抗体和几种人源化抗体(V5H.V5L、V5H.g1L2、H2N1.V5L、V5H.g1L1g1L2 和 H2N1.g1L1g1L2)。方案如下:

[0377] 第 1 天:将小鼠肾小球系膜细胞分配到 96 孔板的培养基中(Dulbecco 氏改良的 Eagle 氏培养基与补充了 14mM HEPES 缓冲液的 Ham 氏 F12 培养基 95% - 胎牛血清 5% 的 3:1 混合液)并培养过夜。

[0378] 第 2 天:在不含血清的培养基中稀释三种不同浓度(100ng、10ng 和 1ng)的 TGF- β 和 5 种不同类型的人源化 TGF 抗体(20 μ g/ml)并加到细胞中。将小鼠 TGF 抗体用作对照(2G7)。

[0379] 第 4 天:温育 48 小时后,将 20 μ l 反应缓冲液(CELLTITER 96 AQUEOUS ONE SOLUTION REAGENT™ 缓冲液(Promega Inc. 产品目录编号 G3580))加到平板各孔中并温育 2 小时。测定 490nm 处的吸光度(OD)。

[0380] H2N1.V5L(20 μ g/ml)完全阻断由 1ng/ml 水平的 TGF- β 诱导的细胞抑制,这与使用嵌合小鼠对照获得的结果相同(参见图 9)。型式 5(V5H.V5L)也与对照相似的阻断细胞抑制。

[0381] 为了测试各种人源化抗体与 2G7 相比在中和各种 TGF- β 方面的活性,将来自分解的 Swiss 小鼠胚胎的成纤维细胞的 3T3 细胞系在体外用三种 TGF- β 之一刺激,然后测量其增殖作为活性。结果如图 10-14 所示。这些图表明人源化抗体 H2N1.V5L 在阻断活性方面完全优于对照 2G7 抗体。测试的另外的人源化抗体 H2N1.g1L2(CDR L2 恢复至人种系 κ 基因座序列)和 V5H.g1L2(CDR L2 恢复至人种系 κ 基因座序列)表现出相差无几的抑制活

性,其中就所有 TGF- β 1-- β 3 而言,V5H. g1L2 的有效性最低。

[0382] 概括的说,人源化抗体 V5H. V5L、V5H. g1L2、H2NI. V5L、H2NI. g1L2

[0383] 实施例 3 :复发性或顽固性前列腺癌的疗法

[0384] 本文的抗体为针对 TGF- β 的全长人源化单克隆抗体(在 CHO 细胞中产生)。指示它作为单一试剂用于治疗激素顽固性(不依赖雄激素的)前列腺癌患者。功效的主要终点包括在作为单一试剂使用时与最佳有效护理(米托蒽醌/泼尼松)相比的总存活和安全性。次要功效终点(secondary efficacy endpoint)包括:时间-疾病进展、响应率、生活质量、疼痛和/或响应期限。每周或每三周一次分别以 2 或 4mg/kg 经静脉内(IV)施用抗体,直到疾病进展。抗体作为多剂量液体制剂提供(以 20mg/mL 或更高浓度填充 20mL)。

[0385] 还指示抗体与化疗联合用于治疗激素顽固性(不依赖雄激素的)前列腺癌患者。功效的主要终点包括与化疗相比的总存活和安全性。次要功效终点包括:时间-疾病进展、响应率、生活质量、疼痛和/或响应期限。每周或每三周一次分别以 2 或 4mg/kg 经静脉内(IV)施用抗体,直到疾病进展。抗体作为多剂量液体制剂提供(以 20mg/mL 或更高浓度填充 20mL)。

[0386] 可以与人源化抗 TGF- β 抗体联合用于治疗前列腺癌(例如不依赖雄激素的前列腺癌)的药物的实例包括:法尼基转移酶抑制剂;抗血管发生剂(例如抗 VEGF 抗体);EGFR 靶向药物(例如 C225 或 ZD1839); **HERCEPTIN®**抗 HER-2 抗体,或诱导凋亡的抗 ErbB 抗体,诸如 7C2 或 7F3,包括其人源化或亲和力成熟变体;2C4 或人源化 2C4;另一种抗 TGF- β 抗体(例如单克隆 TGF- β 抗体);细胞因子(例如 IL-2、IL-12、G-CSF 或 GM-CSF);抗雄激素(诸如氟他胺或醋酸环丙孕酮);亮丙瑞林;苏拉明;化疗剂,诸如长春碱、雌莫司汀、米托蒽醌、利阿唑(视黄酸代谢阻断剂)、环磷酰胺、蒽环类抗生素诸如多柔比星、紫杉烷(例如紫杉醇或多西他赛)或甲氨蝶呤,或任意上述组合,诸如长春碱/雌莫司汀或环磷酰胺/多柔比星/甲氨蝶呤;泼尼松;氢化可的松;或其组合。可以施用这些各种药物的标准剂量,例如 40mg/m²/周多西他赛(**TAXOTERE®**泰索帝);6(AUC)卡铂;和 200mg/m²紫杉醇(**TAXOL®**泰素)。

[0387] 由于 TGF- β 涉及前列腺癌(Shah 等,Cancer Research,62:7135-7138(2002)),所以可以在前列腺癌模型(例如 TRAMP 转基因小鼠以及植入的 PC-3 细胞)中测试抗体,预计会成功。

[0388] 实施例 4 :乳腺癌疗法

[0389] 指示本文的抗体作为单一试剂用于治疗乳腺癌患者,尤其是但不限于转移患者。功效的主要终点包括响应率和安全性。次要功效终点包括:总存活、时间-疾病进展、生活质量和/或响应期限。每周或每三周一次分别以 2 或 4mg/kg 经静脉内(IV)施用本文的人源化抗体,直到疾病进展。抗体作为多剂量液体制剂提供(以 20mg/mL 或更高浓度填充 20mL)。

[0390] 还指示本文的人源化抗体与化疗联合用于治疗乳腺癌患者。功效的主要终点包括与单独的化疗相比的总存活和安全性。次要功效终点包括:时间-疾病进展、响应率、生活质量和/或响应期限。每周或每三周一次分别以 2 或 4mg/kg 经静脉内(IV)施用人源化抗体,直到疾病进展。抗体作为多剂量液体制剂提供(以 20mg/mL 或更高浓度填充 20mL)。

[0391] 可以与本文的人源化抗 TGF- β 抗体联合用于治疗乳腺癌(例如特征并不在于 TGF- β 过表达的转移性乳腺癌)的药物的实例包括:化疗剂,诸如蒽环类抗生素(例如多柔比星)、环磷酰胺、紫杉烷(例如紫杉醇或多西他赛)、诺维本、希罗达、丝裂霉素 C、铂化合物、奥沙利铂、吉西他滨或其中两种或多种的组合,诸如多柔比星/环磷酰胺;

HERCEPTIN®抗 HER-2 抗体或诱导凋亡的抗 ErbB 抗体,诸如 7C2 或 7F3,包括其人源化或亲和力和成熟变体;2C4 或人源化 2C4;另一种抗 TGF- β 抗体(例如单克隆 TGF- β 抗体);抗雌激素(例如他莫昔芬);芳香酶抑制剂(例如阿那曲唑);法尼基转移酶抑制剂;抗血管发生剂(例如抗 VEGF 抗体);EGFR 靶向药物(例如 C225 或 ZD1839);细胞因子(例如 IL-2、IL-12、G-CSF 或 GM-CSF);或上述组合。可以使用这类额外药物的标准剂量。

[0392] 另外,指示本文的人源化抗体与 **HERCEPTIN®**抗 HER-2 抗体或 rhuMAb2C4 联合用于治疗乳腺癌患者,尤其是那些患有转移的患者。功效的主要终点包括响应率和安全性。次要功效终点包括:时间-疾病进展、与单独的 **HERCEPTIN®**抗 HER-2 抗体或 rhuMAb 2C4 相比的总存活、生活质量和/或响应期限。每周或每三周一次分别以 2 或 4mg/kg 经静脉内(IV)施用 rhuMAb 2C4,直到疾病进展。抗体 rhuMAb 2C4 作为多剂量液体制剂提供(以 20mg/mL 或更高浓度填充 20mL)。**HERCEPTIN®**抗 HER-2 抗体作为 4mg/kg 的起始负荷剂量 IV 施用,随后每周施用 2mg/kg 的维持剂量。**HERCEPTIN®**抗 HER-2 抗体作为冻干粉提供。每支小瓶的 **HERCEPTIN®**抗 HER-2 抗体含有 440mg **HERCEPTIN®**抗 HER-2 抗体、9.9mg L-组氨酸 HCl、6.4mg L-组氨酸、400mg α - α -海藻糖二水合物和 1.8mg POLYSORBATE 20™ 表面活性剂。用 20mL 含有 1.1% 苯醇作为防腐剂的抑菌注射用水(BWFI)重新溶解,得到 21mL 含有 21mg/mL **HERCEPTIN®**抗 HER-2 抗体, pH 约 6.0 的多剂量溶液。

[0393] 在来自乳腺癌的自发性小鼠乳腺肿瘤模型的 4T1 上皮细胞中使用鼠抗体 2G7,将细胞(1.5×10^5)注入小鼠乳房脂肪(第 0 天)。在该模型中,在第一周时出现可触及的原发性肿瘤;在第 2 周时在肺中出现继发性转移,在第 3 周时在肝中出现,而在第 4 和 5 周之间在骨中出现。在第 5 周时采集组织。将 2G7 抗体和两种对照 IgG 抗体以 25mg/kg 3x/周经腹膜内注入小鼠,并通过 R&D Systems 的商品化 ELISA 在组织培养基(或用于体内研究的血液)中测量 4T1 细胞的血清 TGF- β 产生。

[0394] 图 15A 显示了通过体外 ELISA 测量的 4T1 细胞和作为对照的正常小鼠上皮细胞 C57 的 TGF- β 产生。图 15B 显示了与用对照(Con)抗体(同种型匹配的 IgG,为抗豚草抗体)治疗的没有肿瘤的小鼠(-Con)相比和与用对照抗体治疗的带有肿瘤的小鼠(+Con)相比 2G7 抗体在带有肿瘤的小鼠(+抗 TGF β)中对 4T1 细胞的血清 TGF- β 产生的体内作用。这些结果证实在体外 4T1 上皮肿瘤细胞产生的 TGF- β 多于对照 C57 上皮细胞(图 15A),且本文的 2G7 抗体与用对照抗体治疗的带有肿瘤的小鼠相比减少了循环中游离 TGF- β 的量(图 15B)。

[0395] 在使用抗 TGF- β 抗体 2G7 治疗的小鼠中游离 TGF- β 的血清水平下降,这与抗 TGF- β 抗体可改变体内 TGF- β 利用度的先前结果一致(Wojtowicz-Praga 等, *Immunother Emphasis Tumor Immunol.*, 19(3):169-75(1996). Erratum: *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.*, 19(5):386(1996), Verma UM(改成 Verma UN))。此外,本文使用的抗体(2G7)不干扰 ELISA 试验,正如与载体(vehicle)相比,将 2G7 以 1:10、1:100 和 1:1000 稀释度添加到对照血浆中不影响 ELISA 读数的事实所证明的。Ziyadeh 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:8015-20(2000)。

[0396] 图 16A 和图 16B 分别显示了依照图 15 的描述给予小鼠抗豚草 IgG 对照和抗 TGF- β 2G7,由用于图 15 的肿瘤细胞模型产生的继发性肺肿瘤的组织学评分和组织重量,

表明抗 TGF- β 与对照相比降低了等级,减少了受侵害肺叶的数目,减少了按克计的组织重量和占体重百分比的肺重量。通过回体计算机断层摄影扫描检测继发性肺肿瘤。

[0397] 图 17 显示了用 uCT 对上述小鼠模型肺肿瘤的体积和数量进行定量,表明依照图 15 的描述给予小鼠 2G7 和对照(即经腹膜内 25mg/kg 每周 3 次),抗 TGF- β 2G7 显示的肿瘤体积低于 IgG 对照。

[0398] 图 18A 显示了上述小鼠模型中的肿瘤体积作为经腹膜内 25mg/kg 每周 3 次 IgG 对照加盐水或紫杉醇;和经腹膜内 25mg/kg 每周 3 次抗 TGF- β 2G7 加紫杉醇的细胞注射后以天计的时间的函数,表明后者在减小肿瘤体积方面最为有效。图 18B 显示了抗 TGF- β 抗体 2G7 加化疗对组织重量-肺、脾和肿瘤的减少超过 IgG/ 盐水对照和 IgG/ 化疗对照二者。

[0399] 此外,2G7 抗体在该小鼠模型中与 IgG 对照相比降低了血管内皮生长因子(VEGF)的全身水平。图 19 显示了在没有肿瘤(正常)的小鼠中或在用对照 IgG(对照)或抗 TGF- β 2G7(aTGF-b)治疗(就对照和抗 TGF- β 而言,25kg/kg 每周 3 次经腹膜内)的带有 4T1 乳腺肿瘤的小鼠中的血浆 VEGF 水平(pg/ml)。各点代表各个小鼠。棒形图表示组的平均值。

[0400] 概括的说,在来源于 Balb C 小鼠自发性乳腺肿瘤的上皮细胞(4T1)注入同基因小鼠乳房脂肪垫的乳腺癌模型中,发现 2G7 抗体降低游离 TGF- β 1 的循环水平和全身 VEGF 水平,并与对照组相比具有小但显著的减少原发性肿瘤生长的短暂能力。使用 2G7 的早期治疗减少了继发性肺肿瘤。

[0401] 此外,使用与对肺相同的扫描发现,使用 2G7 抗体的早期治疗战胜了该模型中发生的大部分乳腺肿瘤诱导的骨组织破坏。参见表 4。在该表中,小梁数目指小梁(骨延伸入髓腔的小骨针)的数目,而小梁厚度(thickness)指这些小梁的平均厚度。这两个参数表示骨的量,并使用微型计算机断层摄影和算法测定它们以便对各种骨参数定量(表 4)。

[0402] 表 4

[0403] 骨再生的测量

[0404]

	小梁 数目	小梁 厚度	骨体积 (BV)/ 总体积	骨表面 /BV	矿物质 密度
2G7, 没有原发性肿瘤	-2.8%	未评价	-4.8%	未评价	未评价
带有原发性肿瘤	-7.2%	-22.5%	-28.3%	+28.6%	-15.9%
2G7, 带有原发性肿瘤	+6.5%	+7.2%	+14.3%	-6.6%	+6.3%

[0405] 注意：百分比指的是：

[0406] 1) 对“2G7, 没有原发性肿瘤”和“带有原发性肿瘤”样品而言, 与正常小鼠 (即无肿瘤) 相比。

[0407] 2) 对“2G7, 带有原发性肿瘤”样品而言, 与使用 IgG 对照抗体治疗的带有肿瘤的小鼠相比。

[0408] 还如 Maglione 等, “Transgenic Polyoma middle-T mice model premalignant mammary disease” *Cancer Res.*, 61(22):8298-305(2001) 和 Lin 等, “Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human disease”, *Am J Pathol.*, 163(5):2113-26(2003) 中所述在乳腺癌模型 (PymT) 中测试抗体 2G7。同样给予两种抗体 (IgG 对照 (抗豚草抗体) 和抗 TGF- β 2G7): 经腹膜内给予 25mg/kg 每周 3 次。图 20A 显示了抗 TGF- β 2G7 与 IgG 对照相比对肿瘤体积的作用, 作为 PymT 模型中肿瘤生长天数的函数, 表明 2G7 抗体与 IgG 对照相比随时间减小肿瘤体积。图 20B 显示了与 IgG 对照相比使用 TGF- β 抗体 2G7 减小肿瘤重量。还发现与 Her2 肿瘤相比在 PyMT 肿瘤中 VEGF 水平降低。

[0409] 根据这些数据, 预计本文的 2G7 抗体人源化型式将在肿瘤生长和转移方面起到与 2G7 相似的作用。

[0410] 不同于 4T1 上皮细胞, Her+ 上皮细胞在体外不合成高水平的 TGF- β , 在体外生长受到 TGF- β 抑制 (Siegel 等, “Transforming growth factor betasignaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(14):8430-5(2003)), 且在体内生长不受抗 TGF- β 治疗的抑制。此外, 与 IgG 对照相比, 当给予抗 TGF- β 抗体 2G7 时, 在该模型中 VEGF 水平升高。

[0411] 对三种乳腺肿瘤模型 (4T1、PyMt 和 Her2) 的基底膜 (胶原 IV)、上皮细胞 (CD31) 或称作周细胞的血管支持细胞 (SMA 或 NG2) 染色, 揭示出这些模型系统在这三种成分方面的差异。不受任何一种理论的约束, 这些成分可用于预测肿瘤对抗 TGF- β 治疗的敏感性。

[0412] 考虑到提出的 TGF- β 在癌症中作用的双功能本质, 通过诊断来确定患者如何 / 是否将做出响应可以证实 TGF- β 抑制策略用于治疗癌症的应用中是有用的。例如, 确定指定患者的癌细胞是否保持对 TGF- β 生长抑制作用的敏感性是重要的。

[0413] 不受任何一种理论的约束, 下面是选择对抗 TGF- β 治疗最可能做出响应的患者 / 肿瘤的潜在诊断标记的列表, 有但不限于：

[0414] 1) 三种 TGF- β 同种型 TGF- β 1、-2 和 / 或 -3 中一种或多种的表达, 尤其是那些表达水平较高的, 特别关注 TGF- β 1。

[0415] a. 这将覆盖许多不同类型的癌症, 包括但不限于乳房、胰腺、前列腺、肾、肺和皮肤 (黑素瘤)。发现 TGF- β 1 在这些肿瘤类型中与相同组织类型的匹配正常组织样品相比具有显著过表达。

[0416] b. Her2 阴性乳腺癌而非 Her2 阳性乳腺癌, 因为前者对抗体治疗的响应可能更好, 正如 TGF- β 1 表达较高所表明的。在这方面, 发现 TGF- β 1 在这些肿瘤类型中与相同组织

类型的匹配正常组织样品相比具有显著过表达。

[0417] 2) 作为 #1 的推论, 肿瘤细胞产生, 不管 TGF- β 是否也在基质 / 环境中产生。

[0418] 3) TGF- β 受体中一种或多种, 尤其是但不限于 TGF- β 1 RI 或 TGF- β RII (类型 IIR) 的突变和表达降低。

[0419] 4) TGF- β 信号传导途径中的分子的突变或水平或定位的改变, 包括但不限于: SMAD/ 磷酸 SMAD、c-myc、CDC25A、p15INK4B、p21WAF1/CiP1 和 p27KIP1。

[0420] 5) 已知影响 TGF- β 活性的其它信号传导途径的改变, 包括但不限于: FoxG1、Jagged/Notch、CDK2 和 CDK4, 尤其是 Her2/neu、雌激素受体水平、Ras 活性、磷脂酰肌醇 3- 激酶 (PI3K)、AKT 和 MAPK 活性, 以及 p53 状态。

[0421] 除上述确定待治疗肿瘤的标记外, 还可使用几种标记来评价 (肿瘤内和 / 或周围) 治疗前后患者中抗 TGF- β 抗体的生物学活性, 包括但不限于:

[0422] 1) 肿瘤中或循环中的 TGF- β 水平 (如图 15B 和显示在肿瘤异种移植植物 Colo205 和 Calu6 肿瘤、HPAC 肿瘤和人导管乳腺癌肿瘤样品的染色组织切片中 TGF- β 1 蛋白质表达的免疫组织化学 (IHC) 数据所示)。

[0423] 2) 肿瘤中或循环中的 VEGF 水平 (如图 19 和显示与对照相比提供 2G7 后 Her2 阳性模型中 VEGF 水平升高的数据所示)。

[0424] 3) 肿瘤中和 / 或周围细胞中, 诸如血液单核细胞 (BMC) 中 TGF- β 信号传导途径中的分子, 诸如 SMAD/ 磷酸 SMAD 的水平。

[0425] 4) 免疫细胞功能, 尤其是 NK、T 细胞和巨噬细胞活性的指示剂。

[0426] 实施例 5: 肺癌疗法

[0427] 指示本文的人源化抗体作为单一试剂用于治疗 IIIb 或 IV 期非小细胞肺癌 (NSCLC)。功效的主要终点包括响应率和安全性。次要功效终点包括: 总存活、时间 - 疾病进展、生活质量和 / 或响应期限。每周或每三周一次分别以 2 或 4mg/kg 经静脉内 (IV) 施用人源化抗体, 直到疾病进展。抗体作为多剂量液体制剂提供 (以 20mg/mL 或更高浓度填充 20mL)。

[0428] 还指示人源化抗体与化疗联合用于治疗转移性非小细胞肺癌患者。功效的主要终点包括与标准疗法相比的总存活和安全性。次要功效终点包括: 时间 - 疾病进展、响应率、生活质量和 / 或响应期限。每周或每三周一次分别以 2 或 4mg/kg 经静脉内 (IV) 施用人源化抗体, 直到疾病进展。抗体作为多剂量液体制剂提供 (以 20mg/mL 或更高浓度填充 20mL)。

[0429] 可以与本文抗体联合用于治疗肺癌的额外药物的实例包括: 化疗剂, 诸如卡铂、紫杉烷 (例如紫杉醇或多西他赛)、吉西他滨、诺维本、顺铂、奥沙利铂或其任意组合, 诸如卡铂 / 多西他赛; **HERCEPTIN®** 抗 HER-2 抗体或诱导凋亡的抗 ErbB 抗体, 诸如 7C2 或 7F3, 包括其人源化或亲和力成熟变体; 2C4 或人源化 2C4; 另一种抗 TGF- β 抗体 (例如单克隆 TGF- β 抗体); 法尼基转移酶抑制剂; 抗血管发生剂 (例如抗 VEGF 抗体); EGFR 靶向药物 (例如 C225 或 ZD1839); 细胞因子 (例如 IL-2、IL-12、G-CSF 或 GM-CSF); 或上述的组合。

[0430] 实施例 6: 结肠直肠癌疗法

[0431] 指示本文的人源化抗体作为单一试剂用于治疗转移性结肠直肠癌。功效的主要终点包括响应率和安全性。次要功效终点包括: 总存活、时间 - 疾病进展、生活质量和 / 或

响应期限。每周或每三周一次分别以 2 或 4mg/kg 经静脉内 (IV) 施用人源化抗体,直到疾病进展。抗体作为多剂量液体制剂提供 (以 20mg/mL 或更高浓度填充 20mL)。

[0432] 还指示人源化抗体与化疗联合用于治疗转移性结肠直肠癌患者。功效的主要终点包括与标准疗法相比的总存活和安全性。次要功效终点包括:时间-疾病进展、响应率、生活质量和 / 或响应期限。每周或每三周一次分别以 2 或 4mg/kg 经静脉内 (IV) 施用人源化抗体,直到疾病进展。抗体作为多剂量液体制剂提供 (以 20mg/mL 或更高浓度填充 20mL)。

[0433] 可以与结合 TGF- β 的人源化抗体联合用于治疗结肠直肠癌的化疗剂的实例包括 5-氟尿嘧啶 (5-FU)、亚叶酸钙 (leucovorin, LV)、CPT-11、左旋咪唑或其中任意两种或多种的组合,例如 5-FU/LV/CPT-11。可以给予这类化疗剂的标准剂量。可以与抗 TGF- β 抗体联合用于治疗结肠直肠癌的其它药物包括:法尼基转移酶抑制剂;抗血管发生药 (例如抗 VEGF 抗体);EGFR 靶向药物 (例如 C225 或 ZD1839);细胞因子 (例如 IL-2、IL-12、G-CSF 或 GM-CSF); **HERCEPTIN®** 抗 HER-2 抗体或诱导凋亡的抗 ErbB 抗体,诸如 7C2 或 7F3, 包括其人源化或亲和力成熟变体;2C4 或人源化 2C4;另一种抗 TGF- β 抗体 (例如单克隆 TGF- β 抗体);或上述的组合。

[0434] 考虑到 TGF- β 在结肠癌中可能的作用,可以在结肠癌模型 (例如 HT29 和 HCT116) 中测试抗体且预计起作用。

[0435] 实施例 7:黑素瘤疗法

[0436] 本实施例中使用单克隆抗体 2G7 的结果提示本文的人源化抗体可用于治疗恶性黑素瘤。在黑素瘤动物模型中测试鼠抗 TGF- β 1 抗体 2G7。具体而言,在皮下注射了小鼠黑素瘤细胞 (B16F10 或 B16B16) 的同基因 C57black6 小鼠中,使用抗 TGF- β (2G7) 以 25mg/kg 每种 3 次经腹膜内治疗与使用同种型匹配的 IgG 对照 (抗豚草抗体) (以 25mg/kg 每种 3 次经腹膜内) 治疗相比减小原发性肿瘤的大小 (图 22、24 和 25)。在这种 B16 模型中,就肿瘤的每种定量方法而言,即表面计数 ("表面")、组织学检查 ("病理学")、使组织透明后 ("清除的 (cleared)") 或通过使用微型计算机的断层摄影术 ("CT") 对所有可见肿瘤的定量,抗 TGF- β 2G7 治疗与对照相比还降低了带有肺肿瘤的小鼠百分比 (即肺肿瘤发病率) (图 21A) 和肺肿瘤数目 (图 21B)。还参见图 23 和 26。

[0437] 发现 Calu-6 (人非小细胞肺癌) 肿瘤细胞 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA) 在体外产生 TGF- β 。Calu-6 CM 细胞在体外诱导 VEGF 和 SMA 在成纤维细胞中表达,这种作用受到使用鼠抗 TGF- β 2G7 抗体的治疗的抑制。不受任何一种理论的约束,这些结果提示 TGF- β 可能涉及肿瘤环境中基质细胞的活化。在裸鼠中进行这些细胞的异种移植 (参见例如 Gourdeau 等, *Mol Cancer Ther.*, 3: 1375-1384 (2004)) 并在用上述 B16 实验中所使用的对照 IgG2b 抗体 (以 25mg/kg 每种 3 次经腹膜内) 及抗 VEGF 抗体 (A461) (以 5mg/kg 每种 3 次经腹膜内)、鼠抗 TGF- β 抗体 2G7 (以 25mg/kg 每种 3 次经腹膜内), 和 2G7 与 A461 的组合 (如上所述给药) 治疗后测试肿瘤体积。分别显示于图 27 和 28 的肿瘤体积和肿瘤重量结果表明 2G7 与抗 VEGF 抗体的组合为最优的疗法,随后是 2G7 抗体。结果证实两种抗体 (抗 TGF- β 和抗 VEGF) 彼此具有相加和 / 或协同作用。

[0438] 基于这些数据,预计本文的人源化抗体还将减轻涉及恶性黑素瘤的原发性和继发性肿瘤。具体而言,可以在鼠抗体 2G7 证实了功效的两种模型中测试人源化抗体 H2NI. V5L:

[0439] 1) 将小鼠黑素瘤细胞 (B16) 注入同基因小鼠 ;和

[0440] 2) Calu-6 (人 NSCLC) 肿瘤细胞在裸鼠中作为异种移植物。

[0441] 在 B16 模型中, 将细胞经皮下植入小鼠。在这两种模型中, 在可触及的肿瘤出现时, 开始使用各种抗 TGF- β 抗体, 包括 H2NI. V5L (25mg/kg 每种 3 次) 或对照抗体 (25mg/kg 每种 3 次) 的治疗。每周 2-3 次测量肿瘤。

[0442] 在测试任何抗体前, 确定了 H2NI. V5L 抑制 TGF- β 诱导的成纤维细胞 (NIH3T3) 细胞生长的能力。

[0443] 如果 H2NI. V5L 的小鼠 Fc 部分并非在小鼠中的活性所需要的, 那么预计 H2NI. V5L 在小鼠中具有与原始小鼠单克隆 2G7 相同或更好的活性。如果抗体的小鼠 Fc 部分为在小鼠中的活性所需要的, 那么预计 H2NI. V5L 在小鼠研究中的有效性不如原始小鼠单克隆 2G7。然而, 预计 H2NI. V5L (和本文中要求的其它人源化抗体) 在人体中保持有效性, 因为人 Fc 在其中将具有活性。

[0444] 实施例 8 :2G7 抗体在正常和荷瘤小鼠中的药动学

[0445] 此处的目的在于评价鼠抗 TGF- β 2G7 在正常小鼠中与在荷瘤小鼠中相比的药动学 (PK) 特性。

[0446] 研究设计:

[0447] 动物模型为带有 4T1 细胞诱导的乳腺肿瘤的 Balb/c 小鼠。在 4 组中给药为单一 43mg/kg 剂量:

[0448] • 1 组 :非荷瘤小鼠 IV

[0449] • 2 组 :荷瘤小鼠 IV

[0450] • 3 组 :荷瘤小鼠 IP

[0451] • 4 组 :荷瘤小鼠 SC

[0452] N = 3 只小鼠 / 组 / 时间点。每只小鼠取血 3 次。

[0453] 在 5、15、30、60 分钟 ;3、6、24 小时 ;3、7、10、14、21 天 采集血清用于鼠抗 TGF- β ELISA。

[0454] 结果:

[0455] 结果表明鼠抗 TGF- β 的消除特征表现为在荷瘤小鼠中快于正常小鼠。此外, 按照 IP 和 SC 施药途径的抗体生物利用度大于 95%。在荷瘤小鼠中的半衰期为 2-3 天。

[0456] 因此, 2G7 抗体的 PK 特性看起来是可接受的。在正常小鼠中, 抗体的半衰期为 4 天, 它处于对其它抗体和融合蛋白在正常小鼠中观察到的范围内。在荷瘤小鼠中, 抗体清除快约 2 倍, 这不大可能是该剂量水平的因素 (factor)。生物利用度大于 95% 表明 IP 或 SC 施药是合适的治疗途径。2-3 天的半衰期支持每周 2-3 次的给药方案。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 健泰科生物技术公司 (Genentech, Inc.)
- [0003] <120> 人源化抗 TGF- β 抗体
- [0004] <130>P1954R1PCT
- [0005] <140>PCT/US2005/010994
- [0006] <141>2005-03-31
- [0007] <150>US 60/558, 290
- [0008] <151>2004-03-31
- [0009] <160>47
- [0010] <210>1
- [0011] <211>116
- [0012] <212>PRT
- [0013] <213> 小鼠 (Mus musculus)
- [0014] <400>1
- [0015] Asp Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala
- [0016] 1 5 10 15
- [0017] Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu
- [0018] 20 25 30
- [0019] Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
- [0020] 35 40 45
- [0021] Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
- [0022] 50 55 60
- [0023] Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
- [0024] 65 70 75
- [0025] Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala
- [0026] 80 85 90
- [0027] Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gly
- [0028] 95 100 105
- [0029] Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
- [0030] 110 115
- [0031] <210>2
- [0032] <211>124
- [0033] <212>PRT
- [0034] <213> 小鼠
- [0035] <220>
- [0036] <221> 不确定
- [0037] <222>3,5
- [0038] <223> 未知氨基酸

[0039]	<400>2		
[0040]	Gln Val Xaa Leu Xaa Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly		
[0041]	1	5	10 15
[0042]	Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr		
[0043]		20	25 30
[0044]	Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu		
[0045]		35	40 45
[0046]	Glu Trp Ile Gly Val Asn Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr		
[0047]		50	55 60
[0048]	Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser		
[0049]		65	70 75
[0050]	Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp		
[0051]		80	85 90
[0052]	Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp		
[0053]		95	100 105
[0054]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Gln Ser Pro Ser Pro Gln Pro Lys		
[0055]		110	115 120
[0056]	Arg Arg Ala His		
[0057]	<210>3		
[0058]	<211>116		
[0059]	<212>PRT		
[0060]	<213> 人工序列		
[0061]	<220>		
[0062]	<223> 此序列是人工合成的		
[0063]	<400>3		
[0064]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val		
[0065]	1	5	10 15
[0066]	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu		
[0067]		20	25 30
[0068]	Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys		
[0069]		35	40 45
[0070]	Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg		
[0071]		50	55 60
[0072]	Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr		
[0073]		65	70 75
[0074]	Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala		
[0075]		80	85 90
[0076]	Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gln		
[0077]		95	100 105

[0078]	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala		
[0079]		110	115
[0080]	<210>4		
[0081]	<211>124		
[0082]	<212>PRT		
[0083]	<213> 人工序列		
[0084]	<220>		
[0085]	<223> 此序列是人工合成的		
[0086]	<400>4		
[0087]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
[0088]	1	5	10 15
[0089]	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr		
[0090]		20	25 30
[0091]	Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
[0092]		35	40 45
[0093]	Glu Trp Val Gly Val Asn Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr		
[0094]		50	55 60
[0095]	Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser		
[0096]		65	70 75
[0097]	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp		
[0098]		80	85 90
[0099]	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp		
[0100]		95	100 105
[0101]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr		
[0102]		110	115 120
[0103]	Lys Gly Pro Ser		
[0104]	<210>5		
[0105]	<211>109		
[0106]	<212>PRT		
[0107]	<213> 人工序列		
[0108]	<220>		
[0109]	<223> 此序列是人工合成的		
[0110]	<400>5		
[0111]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val		
[0112]	1	5	10 15
[0113]	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser		
[0114]		20	25 30
[0115]	Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys		
[0116]		35	40 45

[0117]	Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
[0118]	50 55 60
[0119]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
[0120]	65 70 75
[0121]	Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
[0122]	80 85 90
[0123]	Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
[0124]	95 100 105
[0125]	Ile Lys Arg Thr
[0126]	<210>6
[0127]	<211>117
[0128]	<212>PRT
[0129]	<213>人工序列
[0130]	<220>
[0131]	<223>此序列是人工合成的
[0132]	<220>
[0133]	<221>不确定
[0134]	<222>102
[0135]	<223>未知氨基酸
[0136]	<400>6
[0137]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
[0138]	1 5 10 15
[0139]	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
[0140]	20 25 30
[0141]	Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[0142]	35 40 45
[0143]	Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
[0144]	50 55 60
[0145]	Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
[0146]	65 70 75
[0147]	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
[0148]	80 85 90
[0149]	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Gly Xaa Ser Phe Asp
[0150]	95 100 105
[0151]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0152]	110 115
[0153]	<210>7
[0154]	<211>11
[0155]	<212>PRT

- [0156] <213> 人工序列
[0157] <220>
[0158] <223> 此序列是人工合成的
[0159] <400>7
[0160] Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
[0161] 1 5 10
[0162] <210>8
[0163] <211>7
[0164] <212>PRT
[0165] <213> 人工序列
[0166] <220>
[0167] <223> 此序列是人工合成的
[0168] <400>8
[0169] Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
[0170] 1 5
[0171] <210>9
[0172] <211>9
[0173] <212>PRT
[0174] <213> 人工序列
[0175] <220>
[0176] <223> 此序列是人工合成的
[0177] <400>9
[0178] Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
[0179] 1 5
[0180] <210>10
[0181] <211>10
[0182] <212>PRT
[0183] <213> 人工序列
[0184] <220>
[0185] <223> 此序列是人工合成的
[0186] <400>10
[0187] Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His
[0188] 1 5 10
[0189] <210>11
[0190] <211>51
[0191] <212>DNA
[0192] <213> 人工序列
[0193] <220>
[0194] <223> 此序列是人工合成的

- [0195] <400>11
[0196] agagccagtc agagcgtgct gtatagtctg aatcagaaga actacctggc 50
[0197] c 51
[0198] <210>12
[0199] <211>21
[0200] <212>DNA
[0201] <213> 人工序列
[0202] <220>
[0203] <223> 此序列是人工合成的
[0204] <400>12
[0205] tgggctagta ctcgcgagtc t 21
[0206] <210>13
[0207] <211>24
[0208] <212>DNA
[0209] <213> 人工序列
[0210] <220>
[0211] <223> 此序列是人工合成的
[0212] <400>13
[0213] caccagtatc tgagctctga caca 24
[0214] <210>14
[0215] <211>30
[0216] <212>DNA
[0217] <213> 人工序列
[0218] <220>
[0219] <223> 此序列是人工合成的
[0220] <400>14
[0221] ggctacgcat tcaccaacta tctgatcgag 30
[0222] <210>15
[0223] <211>51
[0224] <212>DNA
[0225] <213> 人工序列
[0226] <220>
[0227] <223> 此序列是人工合成的
[0228] <400>15
[0229] gttacaate ctggatccgg aggctccaac tataacgaga agttcaaggg 50
[0230] g 51
[0231] <210>16
[0232] <211>24
[0233] <212>DNA

- [0234] <213> 人工序列
- [0235] <220>
- [0236] <223> 此序列是人工合成的
- [0237] <400>16
- [0238] tccggaggct tctacttcga ctac 24
- [0239] <210>17
- [0240] <211>51
- [0241] <212>DNA
- [0242] <213> 小鼠
- [0243] <400>17
- [0244] aagtccagtc aaagtgtttt atacagttca aatcagaaga actacttggc 50
- [0245] c 51
- [0246] <210>18
- [0247] <211>17
- [0248] <212>PRT
- [0249] <213> 人工序列
- [0250] <220>
- [0251] <223> 此序列是人工合成的
- [0252] <400>18
- [0253] Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr
- [0254] 1 5 10 15
- [0255] Leu Ala
- [0256] <210>19
- [0257] <211>7
- [0258] <212>PRT
- [0259] <213> 人工序列
- [0260] <220>
- [0261] <223> 此序列是人工合成的
- [0262] <400>19
- [0263] Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
- [0264] 1 5
- [0265] <210>20
- [0266] <211>8
- [0267] <212>PRT
- [0268] <213> 人工序列
- [0269] <220>
- [0270] <223> 此序列是人工合成的
- [0271] <400>20
- [0272] His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr

[0273]	1	5	
[0274]	<210>21		
[0275]	<211>10		
[0276]	<212>PRT		
[0277]	<213> 人工序列		
[0278]	<220>		
[0279]	<223> 此序列是人工合成的		
[0280]	<400>21		
[0281]	Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu		
[0282]	1	5	10
[0283]	<210>22		
[0284]	<211>17		
[0285]	<212>PRT		
[0286]	<213> 人工序列		
[0287]	<220>		
[0288]	<223> 此序列是人工合成的		
[0289]	<400>22		
[0290]	Val Asn Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe		
[0291]	1	5	10 15
[0292]	Lys Gly		
[0293]	<210>23		
[0294]	<211>8		
[0295]	<212>PRT		
[0296]	<213> 人工序列		
[0297]	<220>		
[0298]	<223> 此序列是人工合成的		
[0299]	<400>23		
[0300]	Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr		
[0301]	1	5	
[0302]	<210>24		
[0303]	<211>17		
[0304]	<212>PRT		
[0305]	<213> 小鼠		
[0306]	<400>24		
[0307]	Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr		
[0308]	1	5	10 15
[0309]	Leu Ala		
[0310]	<210>25		
[0311]	<211>667		

[0312]	<212>	PRT	
[0313]	<213>	人工序列	
[0314]	<220>		
[0315]	<223>	此序列是人工合成的	
[0316]	<220>		
[0317]	<221>	不确定	
[0318]	<222>	220	
[0319]	<223>	未知氨基酸	
[0320]	<400>	25	
[0321]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val		
[0322]	1	5	10 15
[0323]	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu		
[0324]		20	25 30
[0325]	Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys		
[0326]		35	40 45
[0327]	Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg		
[0328]		50	55 60
[0329]	Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr		
[0330]		65	70 75
[0331]	Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala		
[0332]		80	85 90
[0333]	Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gln		
[0334]		95	100 105
[0335]	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val		
[0336]		110	115 120
[0337]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala		
[0338]		125	130 135
[0339]	Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
[0340]		140	145 150
[0341]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
[0342]		155	160 165
[0343]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
[0344]		170	175 180
[0345]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
[0346]		185	190 195
[0347]	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val		
[0348]		200	205 210
[0349]	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Xaa Glu Val Gln Leu Val		
[0350]		215	220 225

[0351]	Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu		
[0352]		230	235 240
[0353]	Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu		
[0354]		245	250 255
[0355]	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val		
[0356]		260	265 270
[0357]	Asn Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys		
[0358]		275	280 285
[0359]	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0360]		290	295 300
[0361]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
[0362]		305	310 315
[0363]	Cys Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0364]		320	325 330
[0365]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
[0366]		335	340 345
[0367]	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
[0368]		350	355 360
[0369]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
[0370]		365	370 375
[0371]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
[0372]		380	385 390
[0373]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
[0374]		395	400 405
[0375]	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		
[0376]		410	415 420
[0377]	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
[0378]		425	430 435
[0379]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
[0380]		440	445 450
[0381]	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
[0382]		455	460 465
[0383]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
[0384]		470	475 480
[0385]	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
[0386]		485	490 495
[0387]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
[0388]		500	505 510
[0389]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		

[0390]		515	520	525
[0391]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
[0392]		530	535	540
[0393]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
[0394]		545	550	555
[0395]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
[0396]		560	565	570
[0397]	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
[0398]		575	580	585
[0399]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
[0400]		590	595	600
[0401]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
[0402]		605	610	615
[0403]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu			
[0404]		620	625	630
[0405]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys			
[0406]		635	640	645
[0407]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
[0408]		650	655	660
[0409]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[0410]		665		
[0411]	<210>26			
[0412]	<211>695			
[0413]	<212>PRT			
[0414]	<213> 人工序列			
[0415]	<220>			
[0416]	<223> 此序列是人工合成的			
[0417]	<220>			
[0418]	<221> 不确定			
[0419]	<222>220,668,673			
[0420]	<223> 未知氨基酸			
[0421]	<400>26			
[0422]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val			
[0423]	1	5	10	15
[0424]	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu			
[0425]		20	25	30
[0426]	Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys			
[0427]		35	40	45
[0428]	Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg			

[0429]		50	55	60
[0430]	Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr			
[0431]		65	70	75
[0432]	Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala			
[0433]		80	85	90
[0434]	Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gln			
[0435]		95	100	105
[0436]	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val			
[0437]		110	115	120
[0438]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala			
[0439]		125	130	135
[0440]	Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys			
[0441]		140	145	150
[0442]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
[0443]		155	160	165
[0444]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu			
[0445]		170	175	180
[0446]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys			
[0447]		185	190	195
[0448]	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val			
[0449]		200	205	210
[0450]	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Xaa Glu Val Gln Leu Val			
[0451]		215	220	225
[0452]	Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu			
[0453]		230	235	240
[0454]	Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu			
[0455]		245	250	255
[0456]	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Val			
[0457]		260	265	270
[0458]	Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys			
[0459]		275	280	285
[0460]	Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[0461]		290	295	300
[0462]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
[0463]		305	310	315
[0464]	Cys Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
[0465]		320	325	330
[0466]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
[0467]		335	340	345

[0468]	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
[0469]	350 355 360
[0470]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[0471]	365 370 375
[0472]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
[0473]	380 385 390
[0474]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
[0475]	395 400 405
[0476]	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
[0477]	410 415 420
[0478]	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
[0479]	425 430 435
[0480]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
[0481]	440 445 450
[0482]	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
[0483]	455 460 465
[0484]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
[0485]	470 475 480
[0486]	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
[0487]	485 490 495
[0488]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
[0489]	500 505 510
[0490]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
[0491]	515 520 525
[0492]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
[0493]	530 535 540
[0494]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[0495]	545 550 555
[0496]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[0497]	560 565 570
[0498]	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
[0499]	575 580 585
[0500]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[0501]	590 595 600
[0502]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[0503]	605 610 615
[0504]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
[0505]	620 625 630
[0506]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

[0507]		635		640		645
[0508]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser					
[0509]		650		655		660
[0510]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Xaa Val Arg Arg Pro Xaa Ser Arg					
[0511]		665		670		675
[0512]	Pro Ala Glu Ala Trp Pro Pro Trp Pro Asn Leu Phe Ile Ala Ala					
[0513]		680		685		690
[0514]	Tyr Asn Gly Tyr Lys					
[0515]		695				
[0516]	<210>27					
[0517]	<211>666					
[0518]	<212>PRT					
[0519]	<213>人工序列					
[0520]	<220>					
[0521]	<223>此序列是人工合成的					
[0522]	<400>27					
[0523]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val					
[0524]	1	5		10		15
[0525]	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu					
[0526]		20		25		30
[0527]	Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys					
[0528]		35		40		45
[0529]	Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg					
[0530]		50		55		60
[0531]	Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr					
[0532]		65		70		75
[0533]	Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala					
[0534]		80		85		90
[0535]	Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gln					
[0536]		95		100		105
[0537]	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val					
[0538]		110		115		120
[0539]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala					
[0540]		125		130		135
[0541]	Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys					
[0542]		140		145		150
[0543]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln					
[0544]		155		160		165
[0545]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu					

[0546]		170	175	180
[0547]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys			
[0548]		185	190	195
[0549]	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val			
[0550]		200	205	210
[0551]	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Glu Val Gln Leu Val Glu			
[0552]		215	220	225
[0553]	Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser			
[0554]		230	235	240
[0555]	Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp			
[0556]		245	250	255
[0557]	Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Asn			
[0558]		260	265	270
[0559]	Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly			
[0560]		275	280	285
[0561]	Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu			
[0562]		290	295	300
[0563]	Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0564]		305	310	315
[0565]	Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
[0566]		320	325	330
[0567]	Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
[0568]		335	340	345
[0569]	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
[0570]		350	355	360
[0571]	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
[0572]		365	370	375
[0573]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
[0574]		380	385	390
[0575]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val			
[0576]		395	400	405
[0577]	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn			
[0578]		410	415	420
[0579]	Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu			
[0580]		425	430	435
[0581]	Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
[0582]		440	445	450
[0583]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
[0584]		455	460	465

[0585]	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
[0586]		470	475 480
[0587]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn		
[0588]		485	490 495
[0589]	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
[0590]		500	505 510
[0591]	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
[0592]		515	520 525
[0593]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
[0594]		530	535 540
[0595]	Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
[0596]		545	550 555
[0597]	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
[0598]		560	565 570
[0599]	Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
[0600]		575	580 585
[0601]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
[0602]		590	595 600
[0603]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[0604]		605	610 615
[0605]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
[0606]		620	625 630
[0607]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
[0608]		635	640 645
[0609]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
[0610]		650	655 660
[0611]	Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0612]		665	
[0613]	<210>28		
[0614]	<211>667		
[0615]	<212>PRT		
[0616]	<213> 人工序列		
[0617]	<220>		
[0618]	<223> 此序列是人工合成的		
[0619]	<220>		
[0620]	<221> 不确定		
[0621]	<222>220		
[0622]	<223> 未知氨基酸		
[0623]	<400>28		

[0624]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
[0625]	1 5 10 15
[0626]	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu
[0627]	20 25 30
[0628]	Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
[0629]	35 40 45
[0630]	Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
[0631]	50 55 60
[0632]	Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
[0633]	65 70 75
[0634]	Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
[0635]	80 85 90
[0636]	Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gln
[0637]	95 100 105
[0638]	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
[0639]	110 115 120
[0640]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
[0641]	125 130 135
[0642]	Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
[0643]	140 145 150
[0644]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[0645]	155 160 165
[0646]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
[0647]	170 175 180
[0648]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
[0649]	185 190 195
[0650]	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
[0651]	200 205 210
[0652]	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Xaa Glu Val Gln Leu Val
[0653]	215 220 225
[0654]	Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
[0655]	230 235 240
[0656]	Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu
[0657]	245 250 255
[0658]	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Val
[0659]	260 265 270
[0660]	Asn Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[0661]	275 280 285
[0662]	Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0663]		290		295		300
[0664]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr					
[0665]		305		310		315
[0666]	Cys Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly					
[0667]		320		325		330
[0668]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val					
[0669]		335		340		345
[0670]	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala					
[0671]		350		355		360
[0672]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr					
[0673]		365		370		375
[0674]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe					
[0675]		380		385		390
[0676]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val					
[0677]		395		400		405
[0678]	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys					
[0679]		410		415		420
[0680]	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val					
[0681]		425		430		435
[0682]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro					
[0683]		440		445		450
[0684]	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro					
[0685]		455		460		465
[0686]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr					
[0687]		470		475		480
[0688]	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe					
[0689]		485		490		495
[0690]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys					
[0691]		500		505		510
[0692]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val					
[0693]		515		520		525
[0694]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys					
[0695]		530		535		540
[0696]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr					
[0697]		545		550		555
[0698]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr					
[0699]		560		565		570
[0700]	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu					
[0701]		575		580		585

[0702]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[0703]	590 595 600
[0704]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[0705]	605 610 615
[0706]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
[0707]	620 625 630
[0708]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
[0709]	635 640 645
[0710]	Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[0711]	650 655 660
[0712]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0713]	665
[0714]	<210>29
[0715]	<211>667
[0716]	<212>PRT
[0717]	<213> 人工序列
[0718]	<220>
[0719]	<223> 此序列是人工合成的
[0720]	<220>
[0721]	<221> 不确定
[0722]	<222>220
[0723]	<223> 未知氨基酸
[0724]	<400>29
[0725]	Asp Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala
[0726]	1 5 10 15
[0727]	Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu
[0728]	20 25 30
[0729]	Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
[0730]	35 40 45
[0731]	Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
[0732]	50 55 60
[0733]	Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
[0734]	65 70 75
[0735]	Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala
[0736]	80 85 90
[0737]	Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gly
[0738]	95 100 105
[0739]	Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
[0740]	110 115 120

[0741]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala		
[0742]		125	130
[0743]	Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
[0744]		140	145
[0745]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
[0746]		155	160
[0747]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
[0748]		170	175
[0749]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
[0750]		185	190
[0751]	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val		
[0752]		200	205
[0753]	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Xaa Glu Val Gln Leu Gln		
[0754]		215	220
[0755]	Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Val		
[0756]		230	235
[0757]	Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu		
[0758]		245	250
[0759]	Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val		
[0760]		260	265
[0761]	Asn Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys		
[0762]		275	280
[0763]	Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0764]		290	295
[0765]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe		
[0766]		305	310
[0767]	Cys Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0768]		320	325
[0769]	Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Gly Pro Ser Val		
[0770]		335	340
[0771]	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
[0772]		350	355
[0773]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
[0774]		365	370
[0775]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
[0776]		380	385
[0777]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
[0778]		395	400
[0779]	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		

[0780]		410		415		420
[0781]	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val					
[0782]		425		430		435
[0783]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro					
[0784]		440		445		450
[0785]	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro					
[0786]		455		460		465
[0787]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr					
[0788]		470		475		480
[0789]	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe					
[0790]		485		490		495
[0791]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys					
[0792]		500		505		510
[0793]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val					
[0794]		515		520		525
[0795]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys					
[0796]		530		535		540
[0797]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr					
[0798]		545		550		555
[0799]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr					
[0800]		560		565		570
[0801]	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu					
[0802]		575		580		585
[0803]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu					
[0804]		590		595		600
[0805]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro					
[0806]		605		610		615
[0807]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu					
[0808]		620		625		630
[0809]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys					
[0810]		635		640		645
[0811]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser					
[0812]		650		655		660
[0813]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
[0814]		665				
[0815]	<210>30					
[0816]	<211>667					
[0817]	<212>PRT					
[0818]	<213>人工序列					

[0819]	<220>		
[0820]	<223>	此序列是人工合成的	
[0821]	<220>		
[0822]	<221>	不确定	
[0823]	<222>	220	
[0824]	<223>	未知氨基酸	
[0825]	<400>	30	
[0826]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val		
[0827]	1	5	10 15
[0828]	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Leu		
[0829]		20	25 30
[0830]	Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys		
[0831]		35	40 45
[0832]	Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu		
[0833]		50	55 60
[0834]	Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr		
[0835]		65	70 75
[0836]	Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala		
[0837]		80	85 90
[0838]	Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Asp Thr Phe Gly Gln		
[0839]		95	100 105
[0840]	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val		
[0841]		110	115 120
[0842]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala		
[0843]		125	130 135
[0844]	Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
[0845]		140	145 150
[0846]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
[0847]		155	160 165
[0848]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
[0849]		170	175 180
[0850]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
[0851]		185	190 195
[0852]	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val		
[0853]		200	205 210
[0854]	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Xaa Glu Val Gln Leu Val		
[0855]		215	220 225
[0856]	Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu		
[0857]		230	235 240

[0858]	Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu		
[0859]		245	250 255
[0860]	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Val		
[0861]		260	265 270
[0862]	Asn Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys		
[0863]		275	280 285
[0864]	Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0865]		290	295 300
[0866]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
[0867]		305	310 315
[0868]	Cys Ala Arg Ser Gly Gly Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0869]		320	325 330
[0870]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
[0871]		335	340 345
[0872]	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
[0873]		350	355 360
[0874]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
[0875]		365	370 375
[0876]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
[0877]		380	385 390
[0878]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
[0879]		395	400 405
[0880]	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		
[0881]		410	415 420
[0882]	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
[0883]		425	430 435
[0884]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
[0885]		440	445 450
[0886]	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
[0887]		455	460 465
[0888]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
[0889]		470	475 480
[0890]	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
[0891]		485	490 495
[0892]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
[0893]		500	505 510
[0894]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
[0895]		515	520 525
[0896]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		

[0897]	530	535	540
[0898]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
[0899]	545	550	555
[0900]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
[0901]	560	565	570
[0902]	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
[0903]	575	580	585
[0904]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0905]	590	595	600
[0906]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
[0907]	605	610	615
[0908]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0909]	620	625	630
[0910]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
[0911]	635	640	645
[0912]	Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
[0913]	650	655	660
[0914]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0915]	665		
[0916]	<210>31		
[0917]	<211>1341		
[0918]	<212>DNA		
[0919]	<213>人工序列		
[0920]	<220>		
[0921]	<223>此序列是人工合成的		
[0922]	<400>31		
[0923]	gaagttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc	50	
[0924]	actccgtttg tctgtgcag cttctggcta cgcattcacc aactatctga	100	
[0925]	tcgagtgggt ccgtcaggcc ccgggtaagg gcctcgagtg gatcgggtgta	150	
[0926]	aacaatcctg gatccggagg ctccaactat aacgagaagt tcaagggccg	200	
[0927]	tttcaactata agtgcagaca attcgaaaaa cacattatac ctgcagatga	250	
[0928]	acagcctgcg tgctgaggac actgccgtct attattgtgc tcgatccgga	300	
[0929]	ggctttact tgcactactg gggtaagga accctgggtca ccgtctcctc	350	
[0930]	agcctccacc aagggcccat cggctttccc cctggcaccc tcctccaaga	400	
[0931]	gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc	450	
[0932]	cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt	500	
[0933]	gcacaccttc cggctgtcc tacagtcctc aggactctac tcctcagca	550	
[0934]	gcgtgggtgac tgtgccctct agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc	600	
[0935]	aacgtgaate acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc	650	

[0936]	caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgcca gcacctgaac	700
[0937]	tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc	750
[0938]	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag	800
[0939]	ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg	850
[0940]	tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	900
[0941]	cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa	950
[0942]	ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga	1000
[0943]	aaaccatctc caaagccaaa ggcagccccc gagaaccaca ggtgtacacc	1050
[0944]	ctgccccat cccgggaaga gatgaccaag aaccaggctc gcctgacctg	1100
[0945]	cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca	1150
[0946]	atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc	1200
[0947]	gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggctg	1250
[0948]	gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca	1300
[0949]	accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa	a 1341
[0950]	<210>32	
[0951]	<211>1398	
[0952]	<212>DNA	
[0953]	<213> 人工序列	
[0954]	<220>	
[0955]	<223> 此序列是人工合成的	
[0956]	<400>32	
[0957]	atgggatggt catgtatcat ctttttctca gtagcaactg caactggagt	50
[0958]	acattcagaa gttcagctgg tggagtctgg cgggtggcctg gtgcagccag	100
[0959]	ggggctcact ccgtttgtcc tgtgcagctt ctggctacgc attcaccaac	150
[0960]	tatctgatcg agtgggtccg tcaggccccg ggtaagggcc tcgagtggat	200
[0961]	cgggtgtaaac aatcctggat ccggaggctc caactataac gagaagttca	250
[0962]	agggccgttt cactataagt gcagacaatt cgaaaaacac attataacctg	300
[0963]	cagatgaaca gcctgcgtgc tgaggacact gccgtctatt attgtgctcg	350
[0964]	atccggaggc ttctacttcg actactgggg tcaaggaacc ctggtcaccg	400
[0965]	tctctcagc ctccaccaag ggcccacgg tcttccccct ggcaccctcc	450
[0966]	tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga	500
[0967]	ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca	550
[0968]	gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	600
[0969]	ctcagcagcg tggtagctgt gccctctagc agcttgggca cccagacctc	650
[0970]	catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaaag	700
[0971]	ttgagcccaa atcttctgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca	750
[0972]	cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa	800
[0973]	ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg	850
[0974]	acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	900

[0975]	gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag	950
[0976]	cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga	1000
[0977]	atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc	1050
[0978]	atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt	1100
[0979]	gtacaccctg cccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc	1150
[0980]	tgacctgctt ggtcaaagge ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg	1200
[0981]	gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct	1250
[0982]	ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga	1300
[0983]	gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct	1350
[0984]	ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa	1398
[0985]	<210>33	
[0986]	<211>1341	
[0987]	<212>DNA	
[0988]	<213> 人工序列	
[0989]	<220>	
[0990]	<223> 此序列是人工合成的	
[0991]	<400>33	
[0992]	gaagttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc	50
[0993]	actccgtttg tctgtgcag cttctggcta cgcattcacc aactatctga	100
[0994]	tcgagtgggt cegtcaggcc cgggtaagg gcctcgagtg ggttgggtgtt	150
[0995]	atcaatcctg gatccggagg ctccaactat aacgagaagt tcaaggggcg	200
[0996]	cgccactate agtgcagaca attcgaaaa cacattatac ctgcagatga	250
[0997]	acagcctgcg tgctgaggac actgcccgtct attattgtgc tcgatccgga	300
[0998]	ggcttctact tcgactactg gggtaagga accctggtea ccgtctcctc	350
[0999]	agcctccacc aagggcccat cggctctccc cctggcaccc tctccaaga	400
[1000]	gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctggtaa ggactacttc	450
[1001]	cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt	500
[1002]	gcacaccttc cggctgtcc tacagtcctc aggactctac tccctcagca	550
[1003]	gcgtggtgac tgtgccctct agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc	600
[1004]	aacgtgaate acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc	650
[1005]	caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaac	700
[1006]	tcttgggggg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc	750
[1007]	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag	800
[1008]	ccacgaagac cctgaggtea agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg	850
[1009]	tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	900
[1010]	cgggtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa	950
[1011]	ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga	1000
[1012]	aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	1050
[1013]	ctgcccccat cccgggaaga gatgaccaag aaccaggtea gcctgacctg	1100

[1014]	cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca	1150
[1015]	atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	1200
[1016]	gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg	1250
[1017]	gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca	1300
[1018]	accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a	1341
[1019]	<210>34	
[1020]	<211>1400	
[1021]	<212>DNA	
[1022]	<213> 人工序列	
[1023]	<220>	
[1024]	<223> 此序列是人工合成的	
[1025]	<400>34	
[1026]	atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt	50
[1027]	acattcagaa gttcagctgg tggagtctgg cgggtggcctg gtgcagccag	100
[1028]	ggggctcact cegtttgtcc tgtgcagctt ctggctacgc attcaccaac	150
[1029]	tatctgatcg agtgggtccg tcaggccccg ggtaagggcc tcgagtgggt	200
[1030]	tggtgttate aatcctggat ccggaggctc caactataac gagaagttca	250
[1031]	aggggcgcgc cactatcagt gcagacaatt cgaaaaacac attataacctg	300
[1032]	cagatgaaca gcctgcgtgc tgaggacact gccgtctatt attgtgctcg	350
[1033]	atccggagge ttctacttcg actactgggg tcaaggaacc ctggtcaccg	400
[1034]	tctctcagc ctccaccaag ggcccacgg tcttccccct ggcaccctcc	450
[1035]	tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga	500
[1036]	ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcagge gccctgacca	550
[1037]	gcggcgtgca caccttcccc gctgtctctac agtcctcagg actctactcc	600
[1038]	ctcagcagcg tgggtactgt gccctctagc agcttgggca cccagacct	650
[1039]	catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag	700
[1040]	ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca	750
[1041]	cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa	800
[1042]	ggacaccctc atgatctccc ggacccttga ggtcacatgc gtgggtgggtg	850
[1043]	acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	900
[1044]	gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag	950
[1045]	cacgtaccgg gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga	1000
[1046]	atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc	1050
[1047]	atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt	1100
[1048]	gtacaccctg ccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc	1150
[1049]	tgacctgect ggtcaaagge ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg	1200
[1050]	gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct	1250
[1051]	ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga	1300
[1052]	gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggt	1350

[1053]	ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaagt	1400
[1054]	<210>35	
[1055]	<211>1341	
[1056]	<212>DNA	
[1057]	<213> 人工序列	
[1058]	<220>	
[1059]	<223> 此序列是人工合成的	
[1060]	<400>35	
[1061]	gaagttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc	50
[1062]	actccgtttg tcctgtgcag cttctggcta cgcatcacc aactatctga	100
[1063]	tcgagtgggt ccgtcaggcc ccgggtaagg gcctcgagtg gatcgggtgta	150
[1064]	aacaatcctg gatccggagg ctccaactat aacgagaagt tcaagggcg	200
[1065]	cgccactatc agtgcagaca attcgaaaa cacattatac ctgcagatga	250
[1066]	acagcctgcg tgctgaggac actgccgtct attattgtgc tcgatccgga	300
[1067]	ggcttctact tcgactactg gggtaagga accctggtea ccgtctcctc	350
[1068]	agcctccacc aagggccat cggctctccc cctggcaccc tcctccaaga	400
[1069]	gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctggtaa ggactacttc	450
[1070]	cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt	500
[1071]	gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac tccctcagca	550
[1072]	gcgtggtgac tgtgccctct agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc	600
[1073]	aacgtgaate acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc	650
[1074]	caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgcca gcacctgaac	700
[1075]	tcctgggggg accgtcagtc ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc	750
[1076]	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgctggtgg tggacgtgag	800
[1077]	ccacgaagac cctgaggtea agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg	850
[1078]	tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	900
[1079]	cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa	950
[1080]	ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga	1000
[1081]	aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	1050
[1082]	ctgccccat cccgggaaga gatgaccaag aaccaggtea gcctgacctg	1100
[1083]	cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca	1150
[1084]	atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	1200
[1085]	gacggtcctc tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg	1250
[1086]	gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca	1300
[1087]	accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a	1341
[1088]	<210>36	
[1089]	<211>1398	
[1090]	<212>DNA	
[1091]	<213> 人工序列	

- [1092] <220>
- [1093] <223> 此序列是人工合成的
- [1094] <400>36
- [1095] atgggatggt catgtatcat cttttttcta gtagcaactg caactggagt 50
- [1096] acattcagaa gttcagctgg tggagtctgg cgggtggcctg gtgcagccag 100
- [1097] ggggctcact cegtttgtcc tgtgcagctt ctggctacgc attcaccaac 150
- [1098] tatctgatcg agtgggtccg tcaggccccg ggtaagggcc tcgagtggat 200
- [1099] cgggtgtaaac aatcctggat ccggaggctc caactataac gagaagtca 250
- [1100] aggggcgcgc cactatcagt gcagacaatt cgaaaaacac attataacctg 300
- [1101] cagatgaaca gcctgcgtgc tgaggacact gccgtctatt attgtgctcg 350
- [1102] atccggaggc ttctacttcg actactgggg tcaaggaacc ctggtcaccg 400
- [1103] tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 450
- [1104] tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga 500
- [1105] ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca 550
- [1106] gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
- [1107] ctcagcagcg tgggtgactgt gccctctagc agcttgggca cccagacct 650
- [1108] catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag 700
- [1109] ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 750
- [1110] cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa 800
- [1111] ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgggtg 850
- [1112] acgtgagcca cgaagaccct gaggtaagt tcaactggta cgtggacggc 900
- [1113] gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag 950
- [1114] cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga 1000
- [1115] atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc 1050
- [1116] atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt 1100
- [1117] gtacaccctg ccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggctcagcc 1150
- [1118] tgacctgcct ggtcaaagge ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
- [1119] gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct 1250
- [1120] ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga 1300
- [1121] gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1350
- [1122] ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 1398
- [1123] <210>37
- [1124] <211>1341
- [1125] <212>DNA
- [1126] <213> 人工序列
- [1127] <220>
- [1128] <223> 此序列是人工合成的
- [1129] <400>37
- [1130] gaagttcage tgggtgagtc tggcgggtggc ctgggtgcagc cagggggctc 50

[1131]	actcggtttg tectgtgcag ettetggcta cgcattcacc aactatctga	100
[1132]	tcgagtgggt cegtcaggcc ceggtaagg gcctcgagtg ggttgggtgtt	150
[1133]	aacaatcctg gatccggagg ctccaactat aacgagaagt tcaaggggcg	200
[1134]	cgccactatc agtgcagaca attcgaaaa cacattatac ctgcagatga	250
[1135]	acagcctgcg tgctgaggac actgccgtct attattgtgc tcgatccgga	300
[1136]	ggcttctact tegactactg gggteaagga accctgggtca ccgtctcctc	350
[1137]	agcctccacc aagggeccat cggttctccc cctggcaccc tcctccaaga	400
[1138]	gcacctctgg gggcacagcg gccctgggtc gcctgggtcaa ggactacttc	450
[1139]	cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca ggccgacctga ccagcggcgt	500
[1140]	gcacaccttc cgggtgtcc tacagtcctc aggactctac tcctcagca	550
[1141]	gcgtgggtgac tgtgccctct agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc	600
[1142]	aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc	650
[1143]	caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaac	700
[1144]	tcctgggggg accgtcagtc ttctctctcc ccccaaaacc caaggacacc	750
[1145]	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag	800
[1146]	ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg	850
[1147]	tgcataatgc caagacaaag ccgcccggagg agcagtacaa cagcacgtac	900
[1148]	cgtgtgggtca gcgtctctac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa	950
[1149]	ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga	1000
[1150]	aaacctctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	1050
[1151]	ctgccccat cccgggaaga gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg	1100
[1152]	cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca	1150
[1153]	atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	1200
[1154]	gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg	1250
[1155]	gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag ggtctgcaca	1300
[1156]	accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a	1341
[1157]	<210>38	
[1158]	<211>1398	
[1159]	<212>DNA	
[1160]	<213> 人工序列	
[1161]	<220>	
[1162]	<223> 此序列是人工合成的	
[1163]	<400>38	
[1164]	atgggatggt catgtatcat ctttttctca gtagcaactg caactggagt	50
[1165]	acattcagaa gttcagctgg tggagtctgg cgggtggcctg gtgcagccag	100
[1166]	ggggctcact ccgtttgtcc tgtgcagctt ctggctacgc attcaccac	150
[1167]	tatctgatcg agtgggtccg tcaggccccg ggtaagggcc tcgagtgggt	200
[1168]	tggtgttaac aatcctggat ccggaggctc caactataac gagaagttca	250
[1169]	aggggcgcgc cactatcagt gcagacaatt cgaaaaacac attataacctg	300

[1170]	cagatgaaca gcctgcgtgc tgaggacact gccgtctatt attgtgctcg	350
[1171]	atccggagge ttctactteg actactgggg tcaaggaacc ctggtcaccg	400
[1172]	tctcctcage ctccaccaag ggcccacgg tcttccccct ggcaccctcc	450
[1173]	tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga	500
[1174]	ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgt gaactcagge gccctgacca	550
[1175]	gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	600
[1176]	ctcagcagcg tgggtactgt gccctctage agcttgggca cccagaccta	650
[1177]	catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag	700
[1178]	ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca	750
[1179]	cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa	800
[1180]	ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgggtgg	850
[1181]	acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	900
[1182]	gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag	950
[1183]	cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga	1000
[1184]	atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc	1050
[1185]	atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt	1100
[1186]	gtacaccctg ccccatccc gggagagat gaccaagaac caggtcagcc	1150
[1187]	tgacctgctt ggtcaaagge ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg	1200
[1188]	gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct	1250
[1189]	ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga	1300
[1190]	gcaggtggca gcaggggaaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgagggt	1350
[1191]	ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa	1398
[1192]	<210>39	
[1193]	<211>657	
[1194]	<212>DNA	
[1195]	<213> 人工序列	
[1196]	<220>	
[1197]	<223> 此序列是人工合成的	
[1198]	<400>39	
[1199]	gatatecaga tgaccagtc cccgagctcc ctgtccgcct ctgtgggcca	50
[1200]	tagggtcacc atcacctgca gagccagtca gagcgtgctg tatagttcga	100
[1201]	atcagaagaa ctacctggcc tggatatcaac agaaaccagg aaaagctccg	150
[1202]	aaactactga ttactgggc tagtactcgc gactctggag tcccttctcg	200
[1203]	cttctctgga tccggttctg ggacggattt cactctgacc atcagcagtc	250
[1204]	tgcagccaga agacttcgca acttattact gtcaccagta tctgagctct	300
[1205]	gacacatttg gacagggtag caaggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc	350
[1206]	accatctgct ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa	400
[1207]	ctgcttctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa	450
[1208]	gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa tccggtaact cccaggagag	500

- [1209] tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcaccc 550
- [1210] tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
- [1211] gtcacccate agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg 650
- [1212] agagtgt 657
- [1213] <210>40
- [1214] <211>714
- [1215] <212>DNA
- [1216] <213> 人工序列
- [1217] <220>
- [1218] <223> 此序列是人工合成的
- [1219] <400>40
- [1220] atgggatggt catgtatcat cttttttcta gtagcaactg caactggagt 50
- [1221] acattcagat atccagatga cccagtcgcc gagctccctg tccgcctctg 100
- [1222] tgggcgatag ggtcacate acctgcagag ccagtcagag cgtgctgtat 150
- [1223] agttcgaate agaagaacta cctggcctgg tatcaacaga aaccaggaaa 200
- [1224] agctccgaaa ctactgattt actgggctag tactcgcgag tctggagtcc 250
- [1225] cttctcgctt ctctggatcc ggttctggga cggatttcac tctgaccate 300
- [1226] agcagtctgc agccagaaga cttecgcaact tattactgtc accagtatct 350
- [1227] gagctctgac acatttggac agggtagcaa ggtggagatc aaacgaactg 400
- [1228] tggctgcacc atctgtcttc atcttccgc catctgatga gcagttgaaa 450
- [1229] tctggaactg cttctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga 500
- [1230] ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc 550
- [1231] aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
- [1232] agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc 650
- [1233] ctgcgaagtc accatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca 700
- [1234] acaggggaga gtgt 714
- [1235] <210>41
- [1236] <211>657
- [1237] <212>DNA
- [1238] <213> 人工序列
- [1239] <220>
- [1240] <223> 此序列是人工合成的
- [1241] <400>41
- [1242] gatatecaga tgaccagtc cccgagctcc ctgtccgcct ctgtgggcca 50
- [1243] tagggtcacc atcacctgca gagccagtca gagcgtgctg tatagtctga 100
- [1244] atcagaagaa ctacctggcc tggatatcaac agaaaccagg aaaagctccg 150
- [1245] aaactactga ttactatgc tagcagtctc cagtctggag tcccttctcg 200
- [1246] cttctctgga tccggttctg ggacggattt cactctgacc atcagcagtc 250
- [1247] tgcagccaga agacttcgca acttattact gtcaccagta tctgagctct 300

[1248]	gacacatttg gacagggtac caaggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc	350
[1249]	accatctgtc ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa	400
[1250]	ctgcttctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa	450
[1251]	gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa tgggtaact cccaggagag	500
[1252]	tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcaccc	550
[1253]	tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa	600
[1254]	gtcaccatec agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg	650
[1255]	agagtgt	657
[1256]	<210>42	
[1257]	<211>714	
[1258]	<212>DNA	
[1259]	<213> 人工序列	
[1260]	<220>	
[1261]	<223> 此序列是人工合成的	
[1262]	<400>42	
[1263]	atgggatggt catgtatcat cttttttcta gtagcaactg caactggagt	50
[1264]	acattcagat atccagatga cccagtcgcc gagctccctg tccgcctctg	100
[1265]	tgggcgatag ggtcaccate acctgcagag ccagtcagag cgtgctgtat	150
[1266]	agttcgaate agaagaacta cctggcctgg tatcaacaga aaccaggaaa	200
[1267]	agctccgaaa ctactgattt actatgctag cagtctccag tctggagtcc	250
[1268]	cttctcgctt ctctggatcc ggttctggga cggatttcac tctgaccate	300
[1269]	agcagtctgc agccagaaga cttecgcaact tattactgtc accagtatct	350
[1270]	gagctctgac acatttggac agggtagcaa ggtggagatc aaacgaactg	400
[1271]	tggctgcacc atctgtcttc atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa	450
[1272]	tctggaactg cttctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga	500
[1273]	ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc	550
[1274]	aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	600
[1275]	agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc	650
[1276]	ctgcgaagtc accatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca	700
[1277]	acaggggaga gtgt	714
[1278]	<210>43	
[1279]	<211>17	
[1280]	<212>PRT	
[1281]	<213> 人工序列	
[1282]	<220>	
[1283]	<223> 此序列是人工合成的	
[1284]	<400>43	
[1285]	Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	
[1286]	1 5 10 15	

[1287]	Lys Gly	
[1288]	<210>44	
[1289]	<211>5391	
[1290]	<212>DNA	
[1291]	<213> 人工序列	
[1292]	<220>	
[1293]	<223> 此序列是人工合成的	
[1294]	<400>44	
[1295]	ttcagactcg cccgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat	50
[1296]	tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac	100
[1297]	ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg	150
[1298]	acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca	200
[1299]	ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac	250
[1300]	atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg	300
[1301]	aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc	350
[1302]	tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atggtgatgc	400
[1303]	ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga	450
[1304]	tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca	500
[1305]	aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc	550
[1306]	aaatggggcgg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctcgt	600
[1307]	ttagtgaacc gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct	650
[1308]	ccatagaaga caccgggacc gatccagcct ccgcgcccgga gaacgggtgca	700
[1309]	ttggaacgcg gattccccgt gccaaagatg acgtaagtac cgcctataga	750
[1310]	gtctatagge ccacccccct ggcttcgtta gaacgcggct acaattaata	800
[1311]	cataacctta tgtatcatac acatacgatt taggtgacac tatagaataa	850
[1312]	catccacttt gcctttctct ccacaggtgt ccactcccag gtccaactgc	900
[1313]	acctcggttc tategattga attccacat gggatgggtca tgtatcatcc	950
[1314]	tttttctagt agcaactgca actggagtac attcagatat ccagatgacc	1000
[1315]	cagtccccga gctcccctgtc cgctctgtg ggcataggg tcaccatcac	1050
[1316]	ctgccgtgcc agtcaggaca tccgtaatta tttgaactgg tatcaacaga	1100
[1317]	aaccaggaaa agctccgaaa ctactgattt actatactc ccgctggag	1150
[1318]	tctggagtcc cttctcgctt ctctggttct ggttctggga cggattacac	1200
[1319]	tctgaccate agtagtctgc aaccggagga cttcgcaact tattactgtc	1250
[1320]	agcaaggtaa tactctgccg tggacgttcg gacagggcac caaggtggag	1300
[1321]	atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc ttcacttcc cgccatctga	1350
[1322]	tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact	1400
[1323]	tctateccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa	1450
[1324]	tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac	1500
[1325]	ctacagcctc agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac	1550

[1326]	acaaagtcta	cgcctgcgaa	gtcaccate	agggcctgag	ctcggcccgtc	1600
[1327]	acaaagagct	tcaacagggg	agagtgttaa	gcttggccgc	catggcccaa	1650
[1328]	cttgtttatt	gcagcttata	atggttacaa	ataaagcaat	agcatcacia	1700
[1329]	atttcacaaa	taaagcattt	ttttactgc	attctagttg	tggtttgctc	1750
[1330]	aaactcatca	atgtatctta	tcatgtctgg	atcgatcggg	aattaattcg	1800
[1331]	gcgcagcacc	atggcctgaa	ataacctctg	aaagaggaac	ttggttaggt	1850
[1332]	accttctgag	gcggaaagaa	ccagctgtgg	aatgtgtgtc	agttaggggtg	1900
[1333]	tggaaagtcc	ccaggctccc	cagcaggcag	aagtatgcaa	agcatgcatc	1950
[1334]	tcaattagtc	agcaaccagg	tgtggaaagt	ccccaggctc	cccagcaggc	2000
[1335]	agaagtatgc	aaagcatgca	tctcaattag	tcagcaacca	tagtcccgcc	2050
[1336]	cctaactccg	cccatcccgc	ccctaactcc	gcccagttcc	gcccattctc	2100
[1337]	cgccccatgg	ctgactaatt	ttttttat	atgcagaggc	cgaggccgcc	2150
[1338]	tcggcctctg	agctattcca	gaagtagtga	ggaggctttt	ttggaggcct	2200
[1339]	aggcttttgc	aaaaagctgt	taacagcttg	gacttgcccg	tcgttttaca	2250
[1340]	acgtcgtgac	tgggaaaacc	ctggcgttac	ccaacttaat	cgcttgcag	2300
[1341]	cacatcccc	cttcgccagc	tggcgtaata	gcgaagaggc	ccgcaccgat	2350
[1342]	cgcccttccc	aacagttgcg	tagcctgaat	ggcgaatggc	gcctgatgcg	2400
[1343]	gtattttctc	cttacgcate	tgtgcggtat	ttcacaccgc	atacgtcaaa	2450
[1344]	gcaaccatag	tacgcgcct	gtagcggcgc	attaagcgcg	gcgggtgtgg	2500
[1345]	tggttacgcg	cagcgtgacc	gctacacttg	ccagcgcct	agcggcccgt	2550
[1346]	cctttcgctt	tcttcccttc	ctttctcgcc	acgttcgccg	gctttccccg	2600
[1347]	tcaagctcta	aategggggc	tccttttagg	gttccgattt	agtgttttac	2650
[1348]	ggcacctega	ccccaaaaa	cttgatttgg	gtgatggttc	acgtagtggg	2700
[1349]	ccatcgccct	gatagacggt	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtccacgtt	2750
[1350]	ctttaatagt	ggactcttgt	tccaaactgg	aacaacactc	aaccctatct	2800
[1351]	cgggctattc	ttttgattta	taagggattt	tgccgatttc	ggcctattgg	2850
[1352]	ttaaaaaatg	agctgattta	acaaaaattt	aacgcgaatt	ttaacaaaaat	2900
[1353]	attaacgttt	acaattttat	ggtgcactct	cagtacaatc	tgctctgatg	2950
[1354]	ccgcatagtt	aagccaactc	cgctatcgct	acgtgactgg	gtcatggctg	3000
[1355]	cgccccgaca	cccgccaca	cccgtgacg	cgccctgacg	ggcttgtctg	3050
[1356]	ctcccggcat	ccgcttacag	acaagctgtg	accgtctccg	ggagctgcat	3100
[1357]	gtgtcagagg	ttttaccgt	catcaccgaa	acgcgcgagg	cagtattctt	3150
[1358]	gaagacgaaa	gggcctcgtg	atacgcctat	ttttataggt	taatgtcatg	3200
[1359]	ataataatgg	tttcttagac	gtcaggtggc	acttttcggg	gaaatgtgcg	3250
[1360]	cggaaccct	atgtgtttat	ttttctaaat	acattcaaat	atgtatccgc	3300
[1361]	tcatgagaca	ataaccctga	taaagtcttc	aataatattg	aaaaaggaag	3350
[1362]	agtatgagta	ttcaacattt	ccgtgtcgcc	cttattccct	tttttgcggc	3400
[1363]	attttgcctt	cctgtttttg	ctcaccgaga	aacgctgggtg	aaagtaaaaag	3450
[1364]	atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtg	gttacatcga	actggatctc	3500

[1365]	aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat	3550
[1366]	gatgagcact tttaaagtte tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtgatg	3600
[1367]	acgccgggca agagcaactc ggtegccgca tacactattc tcagaatgac	3650
[1368]	ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac	3700
[1369]	agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacctgcgg	3750
[1370]	ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt	3800
[1371]	ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaccgga	3850
[1372]	gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgccagcag	3900
[1373]	caatggcaac aacgttgccg aaactattaa ctggcgaact acttactcta	3950
[1374]	gcttcccggc aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg	4000
[1375]	accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat	4050
[1376]	ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc actggggcca	4100
[1377]	gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc	4150
[1378]	aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga	4200
[1379]	ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt	4250
[1380]	gatttaaaac ttcattttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt	4300
[1381]	tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag	4350
[1382]	cgtcagacce cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt	4400
[1383]	ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcgg	4450
[1384]	ggtttgtttg cggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggttaactg	4500
[1385]	gcttcagcag agcgcagata ccaataactg tccttctagt gtagccgtag	4550
[1386]	ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgtct	4600
[1387]	gctaatectg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta	4650
[1388]	ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc	4700
[1389]	tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac	4750
[1390]	cgaactgaga tacctacagc gtgagcattg agaaagcgcc acgcttccc	4800
[1391]	aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga	4850
[1392]	gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtc	4900
[1393]	tgtegggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt	4950
[1394]	caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg	5000
[1395]	ttcctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcgttate	5050
[1396]	ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataacc	5100
[1397]	ctcggccgag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg	5150
[1398]	gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcggt ggccgattca	5200
[1399]	ttaatccage tggcacgaca ggtttcccga ctggaaagcg ggcagtgagc	5250
[1400]	gcaacgcaat taatgtgagt tacctcactc attaggcacc ccaggcttta	5300
[1401]	cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca	5350
[1402]	atttcacaca ggaaacagct atgacatga ttacgaatta a	5391
[1403]	<210>45	

[1404]	<211>6135	
[1405]	<212>DNA	
[1406]	<213>人工序列	
[1407]	<223>此序列是人工合成的	
[1408]	<400>45	
[1409]	attcgagctc gcccgacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa	50
[1410]	ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa	100
[1411]	cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt	150
[1412]	gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	200
[1413]	attgacgtca atgggtggag tattttacggg aaactgcca cttggcagta	250
[1414]	catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg	300
[1415]	taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc	350
[1416]	ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg	400
[1417]	cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	450
[1418]	atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	500
[1419]	aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg	550
[1420]	caaatgggcg gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctcg	600
[1421]	tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc	650
[1422]	tccatagaag acaccgggac cgatccagcc tccgcgcccg ggaacgggtgc	700
[1423]	attggaacgc ggattccccg tgccaagagt gacgtaagta ccgctatag	750
[1424]	agtctatagg cccaccccct tggcttcggt agaacgcggc tacaattaat	800
[1425]	acataacctt atgtatcata cacatacgat ttaggtgaca ctatagaata	850
[1426]	acatccactt tgcctttctc tccacaggtg tccactccca ggtccaactg	900
[1427]	cacctcggtt ctatcgattg aattccacca tgggatggtc atgtatcatc	950
[1428]	ctttttctag tagcaactgc aactggagta cattcagaag ttcagctggt	1000
[1429]	ggagtctggc ggtggcctgg tgcagccagg gggctcactc cgtttgcct	1050
[1430]	gtgcagcttc tggctactcc tttaccggct acactatgaa ctgggtgcgt	1100
[1431]	caggccccag gtaagggcct ggaatgggtt gcactgatta atccttataa	1150
[1432]	aggtgttact acctatgccg atagegtcaa gggccgtttc actataagcg	1200
[1433]	tagataaate caaaaacaca gcctacctgc aaatgaacag cctgcgtgct	1250
[1434]	gaggacactg ccgtctatta ttgtgctaga agcggatact acggcgatag	1300
[1435]	cgactggtat tttgacgtct ggggtcaagg aaccctggtc accgtctcct	1350
[1436]	cgccctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctccctcaag	1400
[1437]	agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcctgggtca aggactactt	1450
[1438]	ccccgaaccg gtgacgggtg cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg	1500
[1439]	tgcacacett cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcage	1550
[1440]	agegtggtga ctgtgccctc tagcagcttg ggcaccaga cctacatctg	1600
[1441]	caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc	1650
[1442]	ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa	1700

[1443]	ctcctggggg	gaccgtcagt	cttctctctt	ccccaaaac	ccaaggacac	1750
[1444]	cctcatgate	tcccggacce	ctgaggteac	atgcgtggtg	gtggacgtga	1800
[1445]	gccacgaaga	ccctgaggte	aagtccaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	1850
[1446]	gtgcataatg	ccaagacaaa	gccgcgggag	gagcagtaca	acagcacgta	1900
[1447]	ccgtgtggte	agcgtcctca	ccgtcctgca	ccaggactgg	ctgaatggca	1950
[1448]	aggagtacaa	gtgcaaggte	tccaacaaag	ccctcccagc	ccccatcgag	2000
[1449]	aaaaccatct	ccaaagccaa	agggcagccc	cgagaaccac	agggtgtacac	2050
[1450]	cctgccccca	tcccgggaag	agatgaccaa	gaaccaggte	agcctgacct	2100
[1451]	gcctggtcaa	aggcttctat	cccagcgaca	tcgccgtgga	gtgggagagc	2150
[1452]	aatgggcagc	cggagaacaa	ctacaagacc	acgcctcccg	tgctggactc	2200
[1453]	cgacggctcc	ttcttctctt	acagcaagct	caccgtggac	aagagcaggt	2250
[1454]	ggcagcaggg	gaacgtcttc	tcatgtctccg	tgatgcatga	ggctctgcac	2300
[1455]	aaccactaca	cgcagaagag	cctctccctg	tctccgggta	aatgagtgcg	2350
[1456]	acggccctag	agtcgacctg	cagaagcttg	gccgccatgg	cccaacttgt	2400
[1457]	ttattgcagc	ttataatggt	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	2450
[1458]	acaaataaag	catttttttc	actgcattct	agttgtggtt	tgtccaaact	2500
[1459]	catcaatgta	tcttatcatg	tctggatcga	tcgggaatta	attcggcgca	2550
[1460]	gcaccatggc	ctgaaataac	ctctgaaaga	ggaacttggt	taggtacctt	2600
[1461]	ctgaggcgga	aagaaccatc	tgtggaatgt	gtgtcagtta	gggtgtggaa	2650
[1462]	agtcccagc	ctcccagca	ggcagaagta	tgcaaagcat	gcattctcaat	2700
[1463]	tagtcagcaa	ccaggtgtgg	aaagtcccca	ggctcccagc	caggcagaag	2750
[1464]	tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	aaccatagtc	ccgcccctaa	2800
[1465]	ctccgccc	ctccgccc	actccgccc	gttccgccc	ttctccgccc	2850
[1466]	catggctgac	taattttttt	tatttatgca	gaggccgagg	ccgctcggc	2900
[1467]	ctctgagcta	ttccagaagt	agtgaggagg	cttttttggg	ggcctaggct	2950
[1468]	tttgcaaaaa	gctgttaaca	gcttggcact	ggccgtcgtt	ttacaacgtc	3000
[1469]	gtgactggga	aaaccctggc	gttaccaca	ttaatgcct	tgcagcacat	3050
[1470]	cccccttcg	ccagttggcg	taatagcgaa	gaggcccgca	ccgatcgccc	3100
[1471]	ttcccacag	ttgcgtagcc	tgaatggcga	atggcgctg	atgcggtatt	3150
[1472]	ttctcttac	gcatctgtgc	ggtatttcac	accgcatacg	tcaaagcaac	3200
[1473]	catagtacgc	gccctgtagc	ggcgcattaa	gcgcggcggg	tgtggtggtt	3250
[1474]	acgcgcagcg	tgaccgctac	acttgccagc	gccctagcgc	ccgctccttt	3300
[1475]	cgttttcttc	ccttctcttc	tcgccacgtt	cgccggcttt	ccccgtcaag	3350
[1476]	ctctaaatcg	ggggctccct	ttagggttcc	gatttagtgc	tttacggcac	3400
[1477]	ctcgacceca	aaaaacttga	tttgggtgat	ggttcacgta	gtgggccatc	3450
[1478]	gccctgatag	acggtttttc	gccctttgac	gttggagtcc	acgttcttta	3500
[1479]	atagtggact	cttgttccaa	actggaacaa	cactcaaccc	tatctcgggc	3550
[1480]	tattcttttg	atttataagg	gattttgccg	atttcggcct	attggttaaa	3600
[1481]	aaatgagctg	atttaacaaa	aatttaacgc	gaattttaac	aaaatattaa	3650

[1482]	cgtttacaat	tttatgggtgc	actetecagta	caatctgctc	tgatgccgca	3700
[1483]	tagttaagcc	aactcecgta	tegtacgtg	actgggtcat	ggctgcgccc	3750
[1484]	cgacacccgc	caacacccgc	tgacgcgccc	tgacgggctt	gtctgctccc	3800
[1485]	ggcatccgct	tacagacaag	ctgtgaccgt	ctccgggagc	tgcatgtgtc	3850
[1486]	agaggttttc	accgtcatca	ccgaaacgcg	cgaggcagta	ttcttgaaga	3900
[1487]	cgaaagggcc	tegtgatacg	cctatTTTTA	taggttaatg	tcatgataat	3950
[1488]	aatggtttct	tagacgtcag	gtggcacttt	tcggggaaat	gtgcgcggaa	4000
[1489]	cccctatttg	tttatTTTTc	taaatacatt	caaatatgta	tccgctcatg	4050
[1490]	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	4100
[1491]	gagtattcaa	catttccgtg	tegcccttat	tccctTTTTt	gcggcatttt	4150
[1492]	gccttcctgt	ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	4200
[1493]	gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	4250
[1494]	cggtaagatc	cttgagagtt	ttcgccccga	agaacgtttt	ccaatgatga	4300
[1495]	gcacttttaa	agttctgcta	tgtggcgcg	tattatcccc	tgatgacgcc	4350
[1496]	gggcaagagc	aactcggteg	ccgcatacac	tattctcaga	atgacttgg	4400
[1497]	tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	4450
[1498]	gagaattatg	cagtgtctgc	ataacatga	gtgataacac	tgcgccaac	4500
[1499]	ttacttctga	caacgatcgg	aggaccgaag	gagctaaccg	cttttttgca	4550
[1500]	caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccttga	tcgttgggaa	ccggagctga	4600
[1501]	atgaagccat	accaaacgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	agcagcaatg	4650
[1502]	gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	4700
[1503]	ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	4750
[1504]	ttctgcgctc	ggcccttccg	gctggctgg	ttattgctga	taaactctgga	4800
[1505]	gccggtgagc	gtgggtctcg	cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	4850
[1506]	taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	gacggggagt	caggcaacta	4900
[1507]	tggatgaacg	aaatagacag	atcgtgaga	taggtgcctc	actgattaag	4950
[1508]	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	5000
[1509]	aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	5050
[1510]	atctcatgac	caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	5100
[1511]	gaccccgtag	aaaagatcaa	aggatcttct	tgagatcctt	tttttctgcg	5150
[1512]	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	caaaaaaac	accgctacca	gcggtggttt	5200
[1513]	gtttgccgga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaaggt	aactggcttc	5250
[1514]	agcagagcgc	agataccaaa	tactgtcctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	5300
[1515]	ccaccacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	tacatacctc	gctctgctaa	5350
[1516]	tctgtttacc	agtggctgct	gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttaccggg	5400
[1517]	ttggactcaa	gacgatagtt	accggataag	gcgcagcgg	cgggctgaac	5450
[1518]	ggggggttcg	tgcacacagc	ccagcttgg	gcgaacgacc	tacaccgaac	5500
[1519]	tgagatacct	acagcgtgag	cattgagaaa	gcgccacgct	tcccgaagg	5550
[1520]	agaaagcgcg	acaggtatcc	ggtaagcggc	agggtcggaa	caggagagcg	5600

- [1521] cacgaggag cttccaggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg 5650
[1522] ggtttcgcca cctctgactt gagegtgat ttttgtgatg ctcgtcagg 5700
[1523] gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gggcctttt tacggttcct 5750
[1524] ggccttttgc tggecttttg ctcacatggt ctttcctgcg ttatcccctg 5800
[1525] attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc 5850
[1526] cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 5900
[1527] gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat 5950
[1528] ccaactggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac 6000
[1529] gcaattaatg tgagttacct cactcattag gcaccccagg ctttacctt 6050
[1530] tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc 6100
[1531] acacaggaaa cagctatgac catgattacg aatta 6135
[1532] <210>46
[1533] <211>6
[1534] <212>DNA
[1535] <213> 人工序列
[1536] <220>
[1537] <223> 此序列是人工合成的
[1538] <220>
[1539] <221> 不确定
[1540] <222>2
[1541] <223> 未知碱基
[1542] <400>46
[1543] cncaat 6
[1544] <210>47
[1545] <211>6
[1546] <212>DNA
[1547] <213> 人工序列
[1548] <220>
[1549] <223> 此序列是人工合成的
[1550] <400>47
[1551] aataaa 6

可变轻链

	10	20	30	40
			CDR-L1	
2G7	D IMMTQSPSSLA VSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNOKNYLAWYQQKPGQS			
	*	* * * *	* * * *	* *
huxTGFB	D IQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQSVLYSSNOKNYLAWYQQKPGKA			

hukI	D IQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQSVLYSSNOKNYLAWYQQKPGKA			
huCDR			RASQGIS-----SYLA	
	50	60	70	80
		CDR-L2		
2G7	PKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYC			
		* *	* * * *	
huxTGFB	PKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC			
	* *			
hukI	PKLLIYAASSLESGVPSRFTGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC			
huCDR	YASSLQS			
	90	100		
		CDR-L3		
2G7	HOYL-SSDTFGGGTKVEIKRTVA			
		* *		
huxTGFB	HOYL-SSDTFGQGTKVEIKRTVA			
	* *	*****		
hukI	QQYNSLPWTFGQGTKVEIKRT			
huCDR	QQYNSYPYT			

图 1A

可变重链

	10	20	30	40			
			CDR-H1				
2G7	<u>QVxLxQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKORPGQGLEWIG</u>						
	* * * * * * * * * * * * * * * *						
huxTGFB	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYAFTNYLIEWVRAQPGKGLEWVG</u>						
	* * * * * * * * * * * * * * *						
huIII	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA</u>						
huCDR	GFTFSSYAMH						
	50	a	60	70	80	abc	90
			CDR-H2				
2G7	<u>VNNPGSGGSNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR</u>						
	* * * * * * * * * * * * * * *						
huxTGFB	<u>VNNPGSGGSNYNEKFKGRATISADNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u>						
	* * * * * * * * * * * * * * *						
huIII	<u>VISGDGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u>						
	100	110					
		CDR-H3					
2G7H	<u>SGGFYFDYWGQGTQSPSPQPKRAH</u>						
	* * * * * * * * * * * * * * *						
huxTGFB	<u>SGGFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPS</u>						
	* * * *						
huIII	<u>GRGxSFDYWGQGLVTVSS</u>						

图 1B

人源化 (V5) 2G7 CDRs

CDR L1 [RASQSVLYSSNQKNYLA]

5'-
AGAGCCAGTCAGAGCGTGCTGTATAGTTCTGAATCAGAAGAACTACCTGGCC-3'

CDR L2 [WASTRES]

5'-TGGGCTAGTACTCGCGAGTCT-3'

CDR L3 [HQYL-SSDT]

5'-CACCAGTATCTGAGCTCTGACACA-3'

CDR H1 [GYAFTNYLIE]

5'-GGCTACGCATTCACCAACTATCTGATCGAG-3'

CDR H2 [VNNPGSGGSNYNEKFKG]

5'-GTTAACAATCCTGGATCCGGAGGCTCCAACCTATAACGAGAAGTTCAAGGGG-
3'

CDR H3 [SGGFYFDY]

5'-TCCGGAGGCTTCTACTTCGACTAC-3'

就鼠源前体而言, CDR与人源化型式相同, 除了如下的L1:

CDR L1 [KSSQSVLYSSNQKNYLA]

5' AAGTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAAGAACTACTTGGCC-3'

图 2

```

::::::::::::::::::
p1.xTGFb.709.LandH.IgG1.RK
::::::::::::::::::
< Mon Apr 2 11:49:24 2001
< /tmp_mnt/home/oz/vqa/Mac/adamscom/ss.xTGFb.709.IgG1.LandH.RK (2676
bases)

```

```

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPKAPKLLIYWASTR
ESGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYLSSDTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEGCOEVQLVESGGGLVQPGGSLRL
SCAASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLEWIGVNNPGSGGSNYNEKFKGRFTISADNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARSGGFYFDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
KVSINAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

```

<666个残基, 1终止; 分子量: 72869. 74

```

::::::::::::::::::
p1.xTGFb.H2-N1.V5L.RK.theo
::::::::::::::::::
< Tue May 22 20:20:57 2001
< /tmp_mnt/home/oz/vqa/Mac/adamscom/ss.xTGFb.H2-N1.V5L.RK.theo (2518
bases)

```

```

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPKAPKLLIYWASTR
ESGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYLSSDTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEGCOEVQLVESGGGLVQPGGSLRL
SCAASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLEWGVINPGSGGSNYNEKFKGRATISADNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARSGGFYFDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
KVSINAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKOVRRPOSRAEAWPPWPNLFIAAYNGYK

```

<692个残基, 3终止; 分子量: 75854. 20

```

::::::::::::::::::
p1.xTGFb.V11.LandH.IgG1.RK
::::::::::::::::::
< Fri Mar 30 11:33:04 2001
< /tmp_mnt/home/oz/vqa/Mac/adamscom/ss.xTGFb.V11.LandH.IgG1.RK (2639
bases)

```

```

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPKAPKLLIYWASTR
ESGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYLSSDTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEGCOEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS
CAASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLEWIGVNNPGSGGSNYNEKFKGRATISADNSKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCARSGGFYFDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
KVSINAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL
LSLSPGK

```

<666个残基, 0终止; 分子量: 72775. 63

图 3


```

>xTGFb_709_重链_Ig_nosig [1341个碱基]
GAAGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTT
TCCTGTGCAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTATCTGATCGAGTGGTCCGTCAGGCC
CCGGGTAAGGGCCCTCGAGTGGATCGGTGTAAACAATCCTGGATCCGGAGGCTCCAAC
AACGAGAAGTTCAGGGCCGCTTCACTATAAGTGCAGACAATCGAAAAACACATTATAC
CTGCAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGATCCGGA
GGCTTCTACTTCGACTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG
GCCCTGGGCTGCCTGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACTCA
GGCGCCCTGACAGCAGCGGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGTGACTGTGCCCTTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
GACAAAACCTCACACA TGCCACCGTGCACCACTGAACTCCTGGGGGACCCGTCAGTC
TTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACA
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
CGTGTGGTCAACCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
TGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA
GGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCTTCCCGGAGAGATGACCAAG
AACAGTTCAGCCTGACCTGTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCC
GACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC
CTCTCCCTGTCTCCGGTAAA
>xTGFb_709_重链_Ig_sig [1398个碱基]
ATGGGATGGTCACTATCATCTCTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTAGAA
GTTTCAGTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCC
TGTGCAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTATCTGATCGAGTGGTCCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCCTCGAGTGGATCGGTGTAAACAATCCTGGATCCGGAGGCTCCAACATAAC
GAGAAGTTCAGGGCCGTTTCACTATAAGTGCAGACAATCGAAAAACACATTATACCTG
CAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGATCCGAGGC
TTCTACTTCGACTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG
GGCCCATCGGTCTTCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAATCAGGC
GCCCAGCCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTGA CTGTGCCCTTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC
AAAATCACACATGC CCACCGTGCACCACTGAACTCCTGGGGGACCCGTCAGTCTTCT
CTCTTCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC
GTGGTGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAGCGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAAGCCTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTCAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG
CAGCCCGGAGAACCA CAGGTGTACACCTTCCCGGAGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAAGCCTGACC TGCCGTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGTAAA
>xTGFb_H2-NI_重链_Ig_nosig [1341个碱基]
GAAGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTT
TCCTGTGCAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTATCTGATCGAGTGGTCCGTCAGGCC
CCGGGTAAGGGCCCTCGAGTGGGTGGTGTATCAATCCTGGATCCGGAGGCTCCAAC
AACGAGAAGTTCAGGGCCGCTTCACTATAAGTGCAGACAATCGAAAAACACATTATAC
CTGCAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGATCCGGA
GGCTTCTACTTCGACTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG
GCCCTGGGCTGCCTGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACTCA
GGCGCCCTGACAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGTGACTGTGCCCTTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
GACAAAACCTCACACA TGCCACCGTGCACCACTGAACTCCTGGGGGACCCGTCAGTC
TTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACA
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
CCGGTGTGACCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG

```

图 4

```

TGCAAGGTCTCCAAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAG
AACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCCAACCACTACACGCAGAAGAGC
CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
>>TGFB H2-NI 重链 Ig_sig [1400 个碱基]
ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTTCAGAA
GTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTG CAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCC
TGTGCAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTAT CTGATCGAGTGGGTCCGTCCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTCGAGTGGGTGGTGTATCAAT CCTGGATCCGGAGGCTCCAACATAAC
GAGAAGTTCAAGGGCGCGCCACTATCAGTGCAGCA GACAAATCGAAAAACACATTATACCTG
CAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGCCGTCTATTTATTGTGCTCGATCCGGAGGC
TTCTACTTCGACTACTGGGGTCAAGGAACCTGGT CACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAG
GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA CCGGTGACGGTGTCTGTGGAACACTAGGC
GCCCTGACCAGCGGTGCACACCTTCCCGGTGTCTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTGTCTGTCCTCTAGCAGCTT TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
GTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGAC
AAAACATCACATGCCACCGTGCACAGCCTGAACT CCGGGGGGACCCGTCACTTCTTC
CTCTTCCCCCAAACCCAGGACACCCCTCATGATCT CCGGGACCCCTGAGGTACATGTC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGG GAGGAGCAGTACAAACAGCAGTACCGG
GTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGACCAGGACTGGGT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCCAG AAAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCC C CATCCGGGAAGAGATGACCAAGAAC
CAGGTACGCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCAGCAGCATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG A CACCGCTCCCGTGTGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGC A CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAATG
>>TGFB V11 重链 Ig_nosig [1341 个碱基]
GAAGTTGAGTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGT GCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTG
TCTGTGACAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTA TCTGATCGAGTGGGTCCGTCCAGGCC
CCGGTAAAGGCCTCGAGTGGATCGGTGTAAACA AATCCTGGATCCGGAGGCTCCAACAT
AACCAGAAAGTTCAAGGGCGCGCCACTATCAGTG CAGACAATTCGAAAAACACATTATAC
CTCAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGC CCGTCTATTATTGTGCTCGATCCGGA
GGCTTCTACTTTCGACTACTGGGGTCAAGGAAC CTTGGTACCGTCTCCTCAGCCTCCACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGG AACCAGGTGACGGTGTCTGTGGAAC
GGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGG C TGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGTACTGTGCCCTTAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAAGCCAGCAACCAAGGTGGA CAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGT
GACAAAATCACACATGCCACCGTGCACACCTGGA ACTCCTGGGGGACCCGTGAGTCT
TTCCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
TGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC T GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG C GGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTAC
CGTGTGTGTCAGCGTCTCACCGTCTGACCAGGA C TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
TSCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC T GCCCATCCCGGAAGAGATGACCAAG
AACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA CAAGACCAGCCTCCCGTGTCTGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT C TGCAACCACTACACGCAGAAGAGC
CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
>>TGFB V11 重链 Ig_sig [1398 个碱基]
ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTCTAGTAG CAACTGCAACTGGAGTACATTTCAGAA
GTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGT GCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCC
TGTGCAGCTTCTGGTACGCATTACCAACTATC TGATCGAGTGGGTCCGTCCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTCGAGTGGATCGGTGTAAACAAT C TGGATCCGGAGGCTCCAACATAAC
GAGAAGTTCAAGGGCGCGCCACTATCAGTGCAG A CAATTCGAAAAACACATTATACCTG
CAGATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACTGCCG TCTATTATTGTGCTCGATCCGGAGGC
TTCTACTTCGACTACTGGGGTCAAGGAACCC TGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAG
GGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCA AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAAC CCGGTGACGGTGTCTGTGGAACACTAGGC

```

图4(续)

```

GCCCTGACCAGCGGGCGTGCACACCTTCCCCTGTCTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTACTGTGCCCTCTAGCA.GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
GTGAATCACAAGCCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC
AAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCAC CTGAACCTCTGGGGGACCGTCACTTTC
CTCTTCCCCAAAACCCAGGACACCCCTCA TGATCTCCCGGACCCTGAGGTCAACATGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCTTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAAGCTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCA.TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCATCCCGGAAGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAATAAAGACCAGCCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
GGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAA
>xTGFb V5 重链 Ig nosig [1341 个碱基]
GAAGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCC.TGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTG
TCCTGTGCAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTATCTGATCGAGTGGGTCCGTCCAGGCC
CCGGTAAAGGGCCCTCGAGTGGTGGTGTAAACAATCCTGGATCCGGAGGCTCCAACATAT
AACGAGAAGTTCAAGGGGCGGCCACTATCA GTGCAGACAATTGAAAAACACATTATAC
CTGCAGATGAACAGCCTGCCGTCTGAGGACA CTGCCGTCTATTATTGTGCTCGATCCGGA
GGCTTCTACTTCACTACTGGGTCAAGGAA.CCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACC
AAGGGCCCATCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCG
CCCTTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCA
GGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGA CTGTGCCCTTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
GACAAAACCTCACACATGCCACCCCTGCCAG CACTGAACTCTGGGGGACCGTCACTC
TTCTCTTCCCCAAAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTCAAC
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGAC
GGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
CGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
TGCAAGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCA.TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC.TGCCCCATCCCGGAAGAGATGACCAAG
AACCAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAATAAAGACCAGCCCTCCCGTGTGGACTCC
GACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC
CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
>xTGFb V5 重链 Ig sig [1398 个碱基]
ATGGGATGGTCAATGATCATCTTTTCTAGTAGCACTGCAACTGGAGTACATTCAGAA
GTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCC
TGTGCAGCTTCTGGCTACGCATTACCAACTATCTGATCGAGTGGTCCGTCCAGCCCCG
GGTAAAGGGCCCTCGAGTGGTGGTGTAAACAATCTGGATCCGGAGGCTCCAACATAAC
GAGAAGTTCAAGGGGCGGCCACTATCAGTGCAGACAATTGAAAAACACATTTATACCTG
CAGATGAACAGCCTGCCGTGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGATCCGGAGGC
TTCTACTTCACTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG
GGCCCATCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTC.CAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGGTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA.ACCGGTGAAGGTGTCTGGAACTCAGGC
GCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTGA CTGTGCCCTTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA.CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC
AAAACCTCACACATGCCACCCGTCGCCAGCACC.TGAACTCTGGGGGACCGTCACTTTC
CTCTTCCCCAAAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAACATGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCTGA.GGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAAGCTCTCACCCTCTGCACCAGGA.CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCCAT.CGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC.TGCC CCCATCCCGGAAGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT.CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAATAAAGACCAGCCCTCCCGTGTGGACTCCGAC
GGCTCTTCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAA

```

图 4(续)

```

>xTGFb V5 轻链_nosig [657 个碱基]
GATATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACC
ATCACCCTGCAGAGCCAGTCCAGAGCGTGTGTATAGTTCGAATCAGAAGAATACTGGCC
TGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAACTACTGATTTACTGGGCTAGTACTCGC
GAGTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGA TCCGGTTCTGGGACGGATTTCACTCTGACC
ATCAGCAGTCTGCAGCCAGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCAACCAGTATCTGAGCTCT
GACACATTTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCT
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTTCTGTTGTGTGCCTG
CTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAA GTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAA
TCGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
AGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
>xTGFb V5 轻链_sig [714 个碱基]
ATGGGATGGTCAATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGAT
ATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATC
ACCTGCAGAGCCAGTCCAGAGCGTGTGTATAGTTCGAATCAGAAGAATACTGGCCCTGG
TATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAA CTACTGATTTACTGGGCTAGTACTCGCGAG
TCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATCCGGTTCTGGGACGGATTTCACTCTGACCATC
AGCAGTCTGCAGCCAGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCAACCAGTATCTGAGCTCTGAC
ACATTTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAACCTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAACTG
GGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC
ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
>xTGFb g1L2 轻链_nosig [657 个碱基]
GATATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACC
ATCACCCTGCAGAGCCAGTCCAGAGCGTGTGTATAGTTCGAATCAGAAGAATACTGGCC
TGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAA AACTACTGATTTACTATGCTAGCAGTCTC
GAGTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGA TCCGGTTCTGGGACGGATTTCACTCTGACC
ATCAGCAGTCTGCAGCCAGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCAACCAGTATCTGAGCTCT
GACACATTTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCT
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTTCTGTTGTGTGCCTG
CTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAA GTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAA
TCGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
AGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
>xTGFb g1L2 轻链_sig [714 个碱基]
ATGGGATGGTCAATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGAT
ATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATC
ACCTGCAGAGCCAGTCCAGAGCGTGTGTATAGTTCGAATCAGAAGAATACTGGCCCTGG
TATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAA CTACTGATTTACTATGCTAGCAGTCTCCAG
TCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATCCGGTTCTGGGACGGATTTCACTCTGACCATC
AGCAGTCTGCAGCCAGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCAACCAGTATCTGAGCTCTGAC
ACATTTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAACCTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAACTG
GGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC
ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

```

图 4(续)

2G7 IgG 变体与 TGF β 的结合

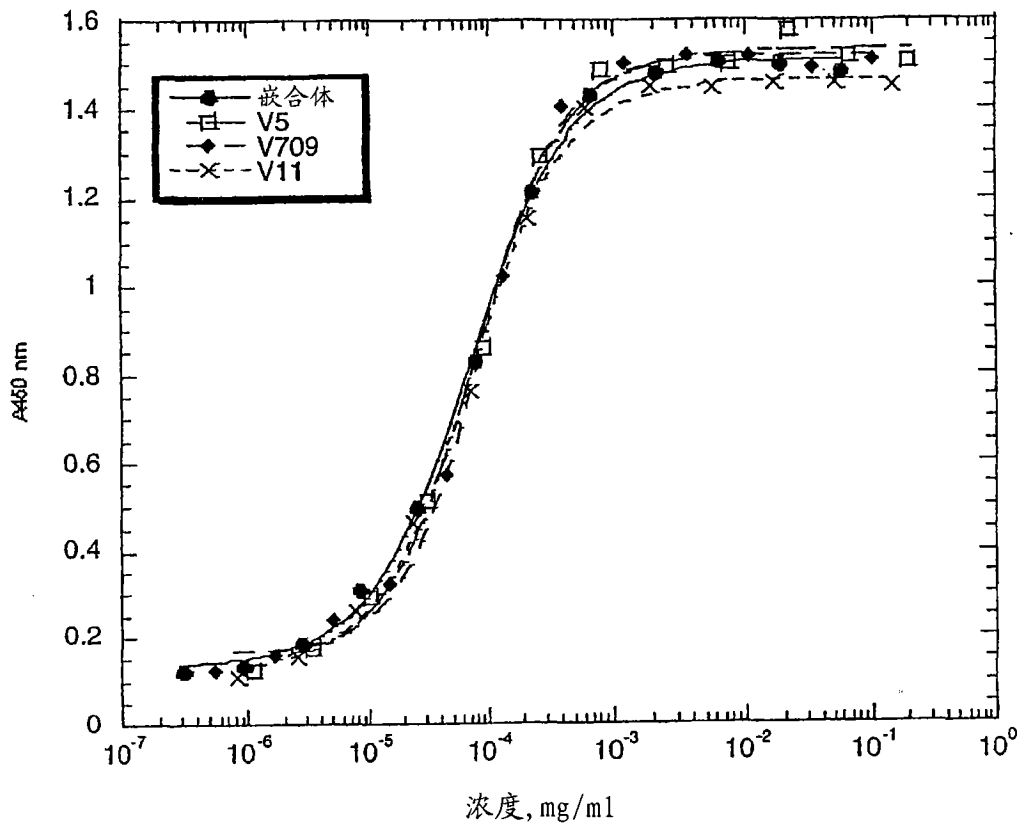


图 5

TTCGAGCTCGCCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAATCAATTACGGGGTCA
 TTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTC
 GGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
 ACCGCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCAC
 TTGGCAGTACATCAAGTGLATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATGACGTCAATGACGGT
 AAATGGCCCGCTGGCATTTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTTGGCAG
 TACATCTACGTATTAGTCACTCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTGGCAGTACATCAAT
 GGGCGTGGATAGCGGTTTACTCAACGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAAT
 GGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTCGTAACAACCTCCGCC
 CCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGT
 TTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGGACCTCCATAGAAGA
 CACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGCGGGGAACGGTGCATTGGAAACGGGATTCCCCGT
 GCCAAGAGTGCAGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACCCCTTGGCTTCGTTA
 GAACGCGGCTACATTAATACATAACCTTATGTATCATAACATAACGATTTAGGTGACAC
 TATAGAATAACATCCACTTTGCCCTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCAACTGC
 ACCTCGGTTCTATCGATTGAATCCACCAATGGGATGGTCAATGATCATCTTTCTAGT
 AGCAACTGCAACTGGAGTACATTGAGATATCCAGATGACCCAGTCCCGAGCTCCCTGTC
 CGCCTCTGTGGCGATAGGGTCCCATCCCTGCGGTCAGTCAAGACATCCGTAATTA
 TTTGAACTGGTATCAACAGAAACCGAAAGCTCCGAAACTACTGATTTACTATACCTC
 CCGCTGGAGTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGTTCTGGTTCGGGACGGATTACAC
 TCTGACCATCAGTASTCTGCAACCGGAGGACTTCGCAACTTATTACTGTCAAGGTAA
 ACCATCTGTCTTCTCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGT
 TGTGTCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTCACTGGAAAGGTGGATAA
 CGCCCTCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC
 CTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAAACACAAAGTCTA
 CGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGCTTCAACAGGGG
 AGAGTGTAAAGCTTGGCCGCAATGGCCCAACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAA
 ATAAAGCAATAGCATCAAAATTTCAAAATAAAGCATTTTTTCCTGCACTCTAGTTG
 TGGTTGTCCAAACTCATCAATGATCTTATCATGTCTGGATCGATCGGGAAATAATTG
 GCGCAGCACCATGGCTGAAATAACCTCTGAAAGAGGAACCTGGTCAAGGTACCTTCTGAG
 GCGGAAAGAACCAAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCC
 CAGCAGGCAGAAATGCAAGCATGCATCTCAATAGTCAGCAACAGGTTGAGGTTGGAAGT
 CCCAGGCTCCCAGCAGGCAAGATATGCAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA
 TAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCCGCCATTTCTC
 CGCCCAATGGCTGACTAATTTTTTTTATTATGACAGAGCCGAGGC CGCCTCGCCCTCTG
 AGCTATTCAGAAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTTCAAAAGCTGT
 TAACAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACTGCTGACTGGGAAACCCCTGGCGTAC
 CCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCCCGCTGGCGTAAAGCGAAGAGGC
 CCGCAGCATCGCCTTCCCAACAGTTGCGTAGCCTGAATGGGAAAGGCGCCTGATGGG
 GTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACGTCAAAGCAACCATAG
 TACGCGCCTGTAGCGGCGCATTAGCAGCGGCGGTGTGGTGTAAAGCGCAGCGTACC
 GCTACACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTCTCGCC
 ACGTTTGGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTT
 AGTGTCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTGATTTGGGTGATGTTTCAAGTAGTGGG
 CCATCGCCTGATAGACGGTTTTTCCGCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGT
 GGACTCTGTTCAAACTGGAACAACAACCTCAACCTATCTCGGCTATTCTTTTGAATTA
 TAAGGGATTTTCCGATTTCCGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAATAATTT
 AACCGAATTTTAAACAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGAATCTCAGTACAATC
 TGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAACCTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCAATGGCTG
 CGCCCGACACCCGCCAACCCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGCAT

图 6

CCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTACCGT
 CATCACCGAAACGCGCGAGGCAGTATTCTTGAAGAGGAAAGGGCCTCGTGATACGCCCTAT
 TTTTATAGGTTAATGTTCATGATAAATAATGGTTTTCTTAGACGTACAGGTGGCACTTTTCGGG
 GAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGC
 TCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAAGATATGAGTA
 TTCAACATTTCCGTGTCCGCCCTTATTCCTTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTG
 CTCACCCAGAAAACGCTGGTGAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGG
 GTTACATCGAAGCTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAAC
 GTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTGATG
 ACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACTACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGT
 ACTCACCGTGCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTG
 CTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAAAGATCGGAGGAC
 CGAAGGAGCTAACCGTTTTTTGCAACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTT
 GGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCAGCAG
 CAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGC
 AACAAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCC
 TTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTA
 TCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGTAAGCCCTCCCGTATCGTAAATATCTACACGACGG
 GGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGA
 TTAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAAC
 TTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAA
 TCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
 CTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAATAACCCCGC
 TACCAGCGGTGGTTGTTTCCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGT
 GCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCCCTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACC
 ACTTCAAGAACTCTGTAGCAACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTACCAAGTGG
 CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGG
 ATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAA
 CGACCTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCAAGCTTCCCG
 AAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGTCGGAAACAGGAGAGCGCACGA
 GGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCT
 GACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAATAACGCCA
 GCAACCGCCCTTTTTACGTTCTCGCCCTTTTGTGCTGGCCTTTGCTCACA.TGTTCTTTC
 CTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCG
 CTCGCCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAAGAGCGCC
 CAATACGCAACCGCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATCCAGCTGGCACGACA
 GGTTCGCCACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTEAGTTACCTCACTC
 ATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGA
 GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTA

图6(续)

ATTTCGAGCTCGCCCGACATTGATTATTGACTAGTATTTAATAGTATCAATTACGGGGTC
 ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCC
 TGGCTGACCCGCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCATATAATGACGTATGTTCCCATAGT
 AACGCCAATAGGGACTTTCCTTTGACGTCATAGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCA
 CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCATATGACGG
 TAAATTGGCCCGCTGGCATTATGCCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA
 GTACATCTACGTTATGATCATCGCTATTACCATGCTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAA
 TGGCGGTGGATAGCGGTTTGGACTCACGGGGATTTCAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAA
 TGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAAACAACCTCCGC
 CCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCG
 TTTAGTGAACCGTCAAGTCCGCTGGAGACGCCATCCACCGCTGTTTGGACTCCATAGAAG
 ACACCCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGCCGGGACCGGTGCATTGGAAACCGCGGATTCGCCG
 TGCCAAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACCCCTTGGCTTCGTT
 AGAAACCGCGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACA
 CTATAGAATAACATCCACTTTGCCCTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAACTG
 CACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCACCATGGGATGGTCAATGTATCATCCTTTTTCTAG
 TAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGAAGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGG
 TGCAGCCAGGGGGCTCACTCGTTTGTCTCTGTCAGCTTCTGGCTACTCCTTTACCGGCT
 ACACATATGAACCTGGTGCCTCAGGCCCCAGGTAAGGGCCTGGAAATGGGTGCACTGATTA
 ATCCTTATAAAGGTGTTACTACTATGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCG
 TAGATAAATCCAAAACACAGCCTACCTGCAATGAACAGCCTCGGTGCTGAGGACACTG
 CCGTCTATATTGTGCTAGAAGCGGATACTACGGCGATAGCGAGTGGTATTTTGACGTCT
 GGGTCAAGGAACCTGGTCAACGCTCTCTCGGCCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCCTCC
 CCCTGGCACCCCTCCCAAGAGCACCTCTGGGGCAACGCGCCCTGGGCTGCTGTCAC
 AGGACTACTTCCCGAAACCGGTGACGCTGTCTGGAACCTCAGGCGCCTGACCAGCGCG
 TGCAACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
 CTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAGGCCA
 GCAACACCAAGGTGGAACAAGAAAGTTGAGCCCAAACTCTGTGACAAAACCTCACATGCC
 CACCGTGGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCACTCTCTCTCTCCCCCAAAA
 CCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
 CCAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACTGACCTGTGGTCAAGCGTCTCA
 CCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG
 CCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACAC
 AGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACAGGTCAAGCTGACCT
 GCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAAATGGGCAGC
 CGGAGAACAACCTACAAGACCGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTCTCTCTCT
 ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
 TGATGCAAGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTA
 AATGAGTGCAGCGGCCCTAGAGTGCACCTGCAAGCTTGGCCCGCATGGCCCAACTTGT
 TTATTGACGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCAAAATAAAG
 CATTTTTTCACTGCATCTAGTTGTGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATG
 TCTGGATCGATCGGGAATTAATTCGGCGCAGCACCATGGCCTGAAATAACCTCTGAAAGA
 GGAACTTGGTTAGGTACTTCTGAGGCGAAAGAACCATCTGTGGAAATGTGTGTGATTA
 GGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCGAGCAGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAAT
 TAGTCAGCAACAGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGC
 ATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAATCTCCGCCCATCCCGCCCTA
 ACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTTATTTATGCA
 GAGCCCGAGGCGCCTCGCCTCTGAGCTATCCAGAAGTGTGAGGAGGCTTTTTTTGGA
 GGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTGTTAACAGCTTGGCACTGGCCGTGTTTTTACACGTC
 GTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCG

图 7

CCAGTTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTCCGTAGCC
TGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTAGGCATCTGTGCGGTATTTCAC
ACCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGGGGGCATTAGCGCGGCGGG
TGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTT
CGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCCGGCTTCCCGTCAAGCTCIAAATCG
GGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTGA
TTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTCGCCCTTTGAC
GTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCC
TATCTCGGGCTATTCTTTTGAATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTGGCCTATGGTTTAAA
AAATGAGCTGATTTAAACAAAATTTAAACGGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAAT
TTTATGGTGCACCTCTCAGTACAACTGTCTGTATGCCGATAGTTAAGCCAACCTCCGCTA
TCGCTACGTGACTGGTCAATGGCTGCGCCCCGACACCCGCAACACCCGCTGACGGCCC
TGACGGGCTGTGTCGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGCTTCCGGGAGC
TGCATGTGTGAGAGTTTTCACCGCTATCAACCGAAGCGCGGAGGCAGTATTTCTGAAGA
CGAAAGGGCCTCGTGTACGCTTATTTTATAGGTTAATGTCAAGATAATAATGGTTCTT
TAGACGTGAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTATTATTTTC
TAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAA
TATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCACAACTTCCGTGTGCCCTTATTCCCTTTT
GGGGCATTTTGCCTTCCGTGTGTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCT
GAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC
CTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCGCTCA
TGTGGCGGGTATTATCCCGTGTGACGCGCGGCAAGAGCAACTCGGTCCGCGCTA.CAC
TATTCTCAGAAATGACTTGGTGTAGTACTCACAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGC
ATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGAATAACACTGCGGCCAAC
TTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCACAAACATGCGG
GATCATGTAACCTCGCTGTATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAACGAC
GAGCGTGAACCAACGATGCCAGCAGCAATGGCAAACAAGCTTGGCGAAACTATTAACCTGGC
GABCTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAA.GTT
GCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGA
GCCGGTGAAGCGTGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCACTATGGATGAACGAAATAGA.CAG
ATCGTGAAGATAGTGCCTCACTGATTAAGCAITGGTAAGTGTGAGACCAAGTTTAC.TCA
TATATACTTTAGATGATTTAAAACCTTCAATTTTAAATTAAGGATCTAGGTGAAGATC
CTTTTGAATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA
GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAATCCCTTTTTCGCGGTAATCTGC
TGCTTGCAAAACAAAACCAACCGCTACAGCGGTGGTTTGGTTTCCCGGATCAAGAGCTA
CCAACCTTTTTCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTGTCTCTT
CTAGTGTAGCCGCTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTGTGAGCACCGCTACATAGCTC
GCTCTGCTAATCCTGTACCAGTGGCTGTGCGCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGG
TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTTCG
TGCAACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACTACACCGAATGAGATACCTACAGCGTGAG
CATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGACAGGTATCCGGTAAGCGGC
AGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCGCTGGTATCTTTAT
AGTCTGTCCGGTTTCCGCCACTCTGACTTGGCGTCAATTTTGTGATGCTGTCAAGGG
GGCGGAGCCTATGGAAAACCGCACCAACCGGCTTTTACGGTCTTGGCCTTTTTCG
TGGCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATT
ACCGCTTTGAGTGAAGTACCGCTCGCCGACCGCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA
GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAACCGCTCTCCCGCGGTTGGCCG
ATTCATTAATCCAACCTGGCAGCAGAGTTTCCCGACTGGAAGCGGCAAGTGAAGCGAAC
GCAATTAATGTGAGTTACCTCACTCATTAGGCACCCCGGCTTTACACTTTATGCTTCCG
GCTCGTATGTTGTGGAAATGTGAGCGGATAACAATTTCAACAGGAACAGCTATGAC
CATGATTACGAATTA

图 7(续)

2G7 种系回复体与 TGF β 的结合

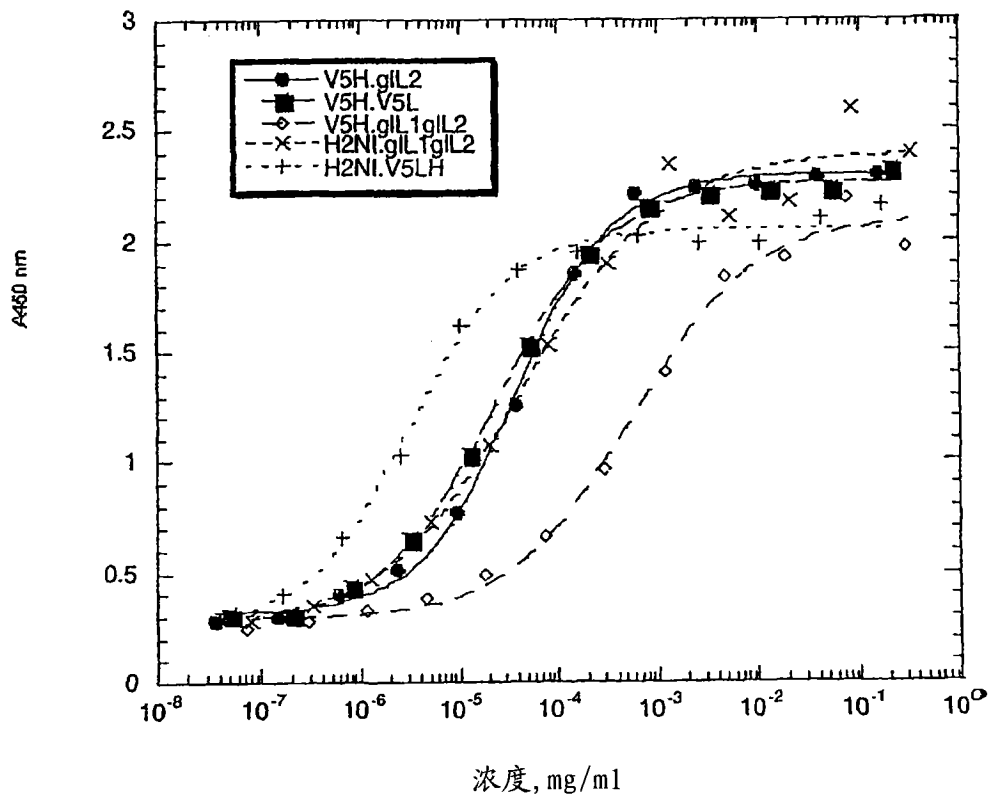


图 8

用TGF和人源化TGF抗体治疗的小鼠肾小球系膜细胞增殖试验

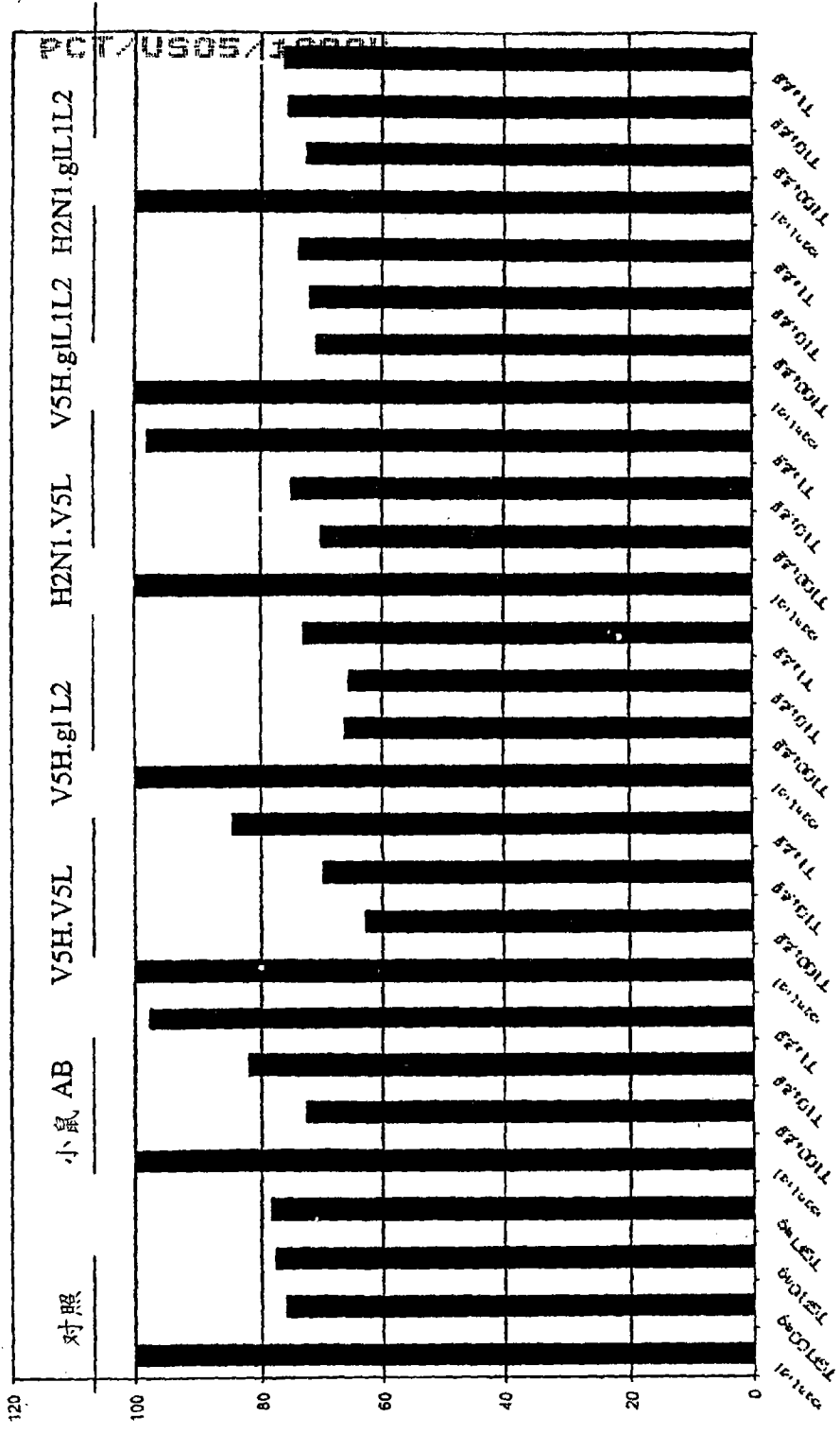


图 9

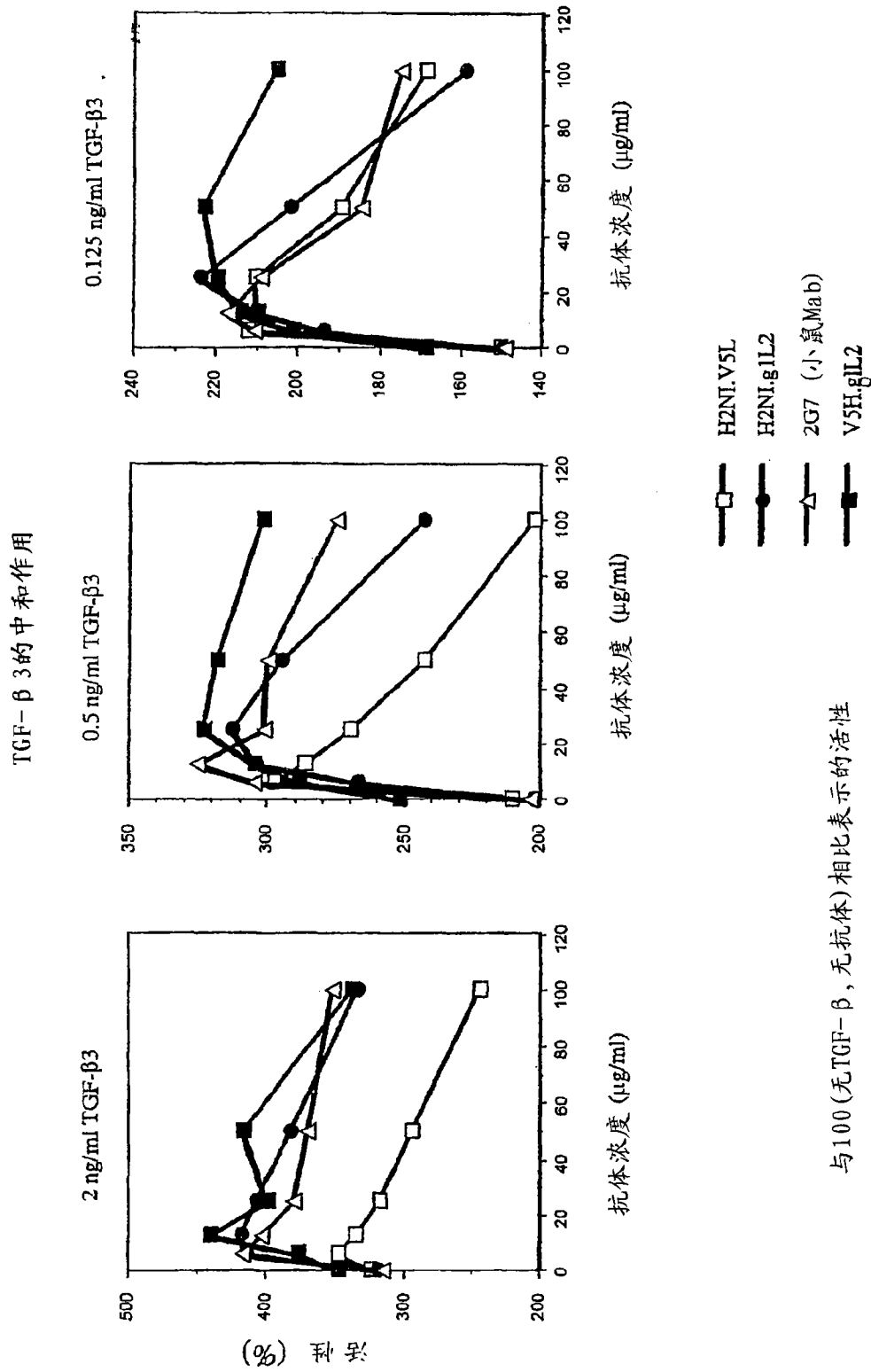


图 10A

图 10B

图 10C

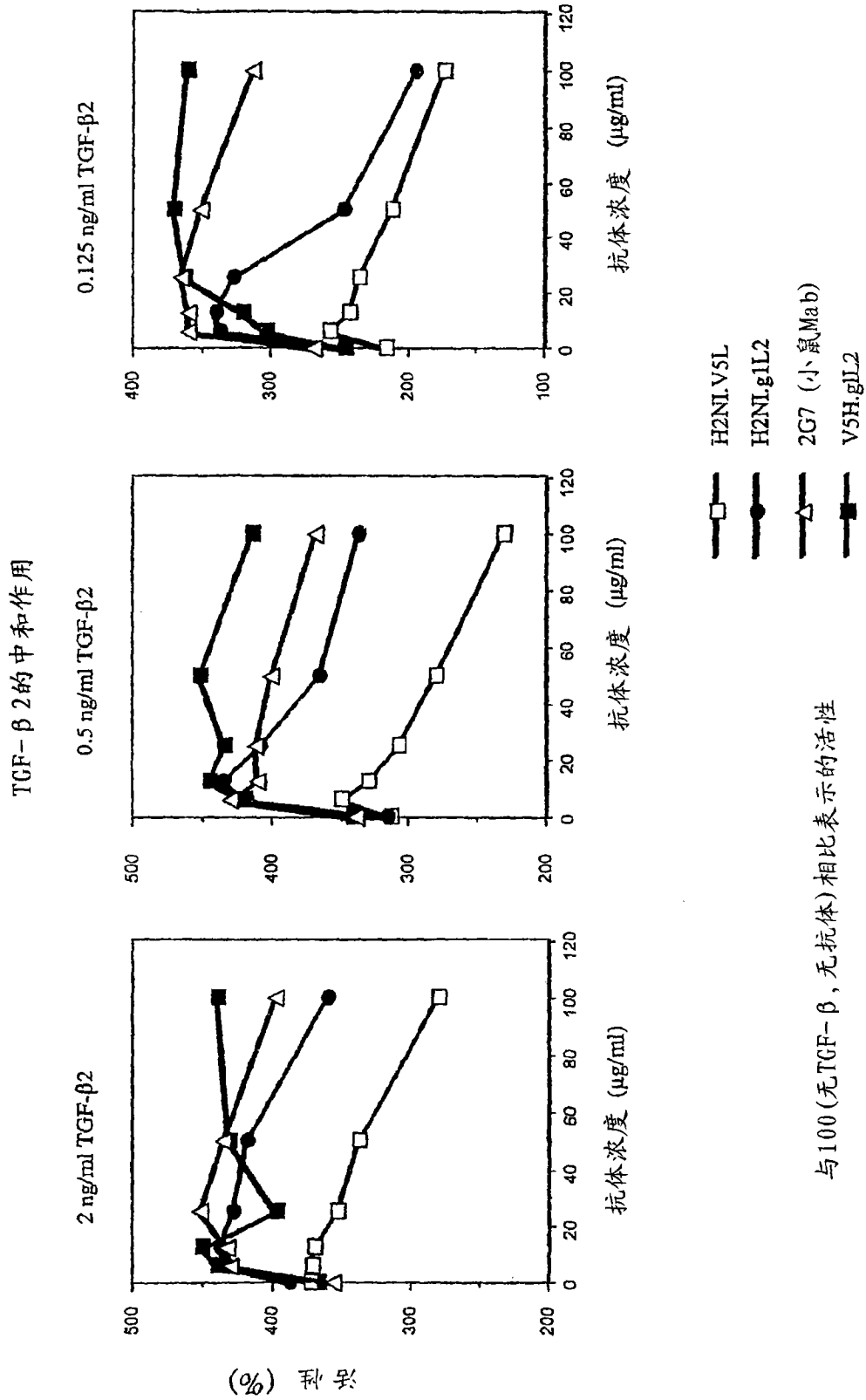
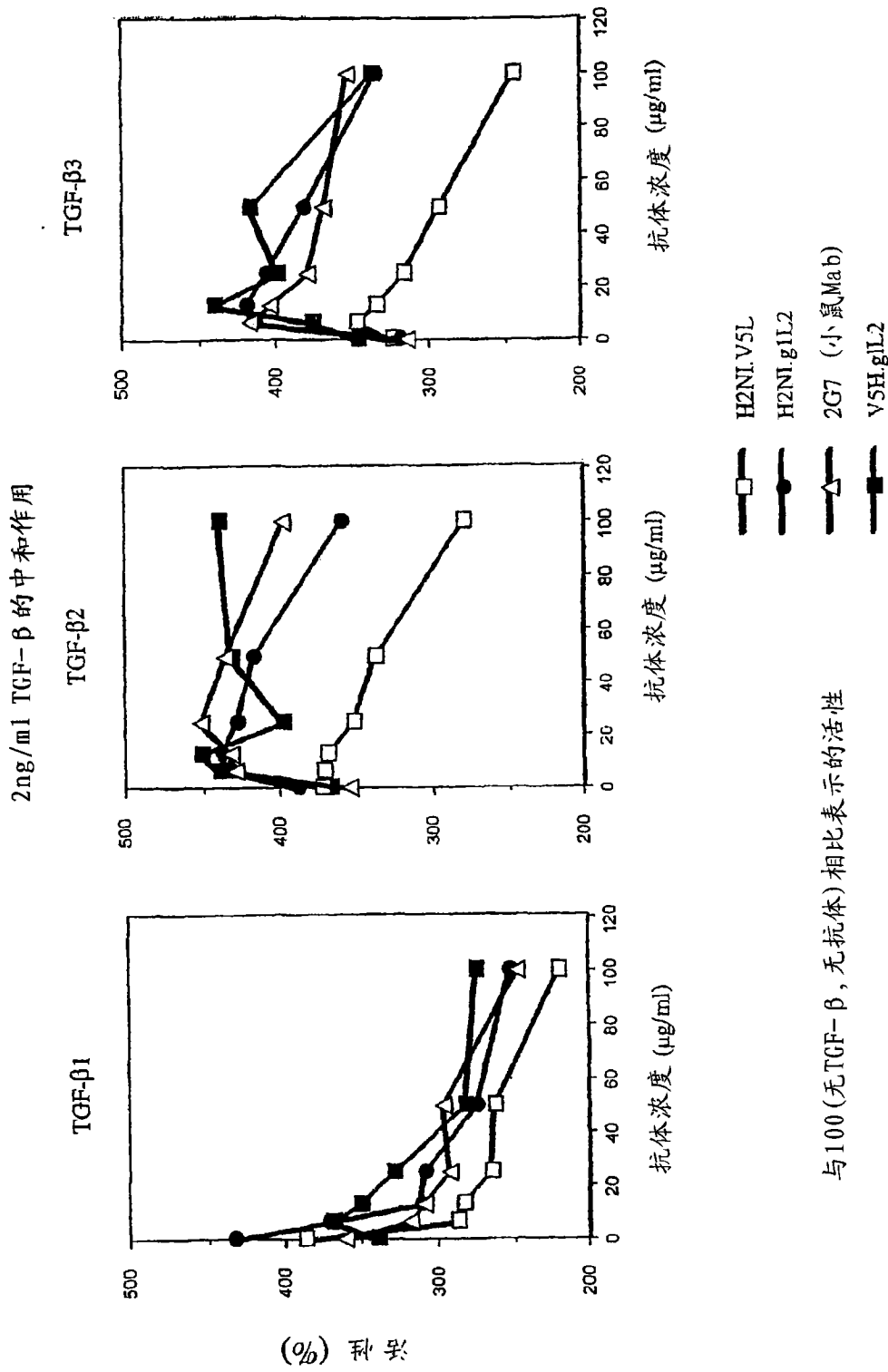


图 11A

图 11B

图 11C



不同抗体对三种TGF-β同种型的中和作用

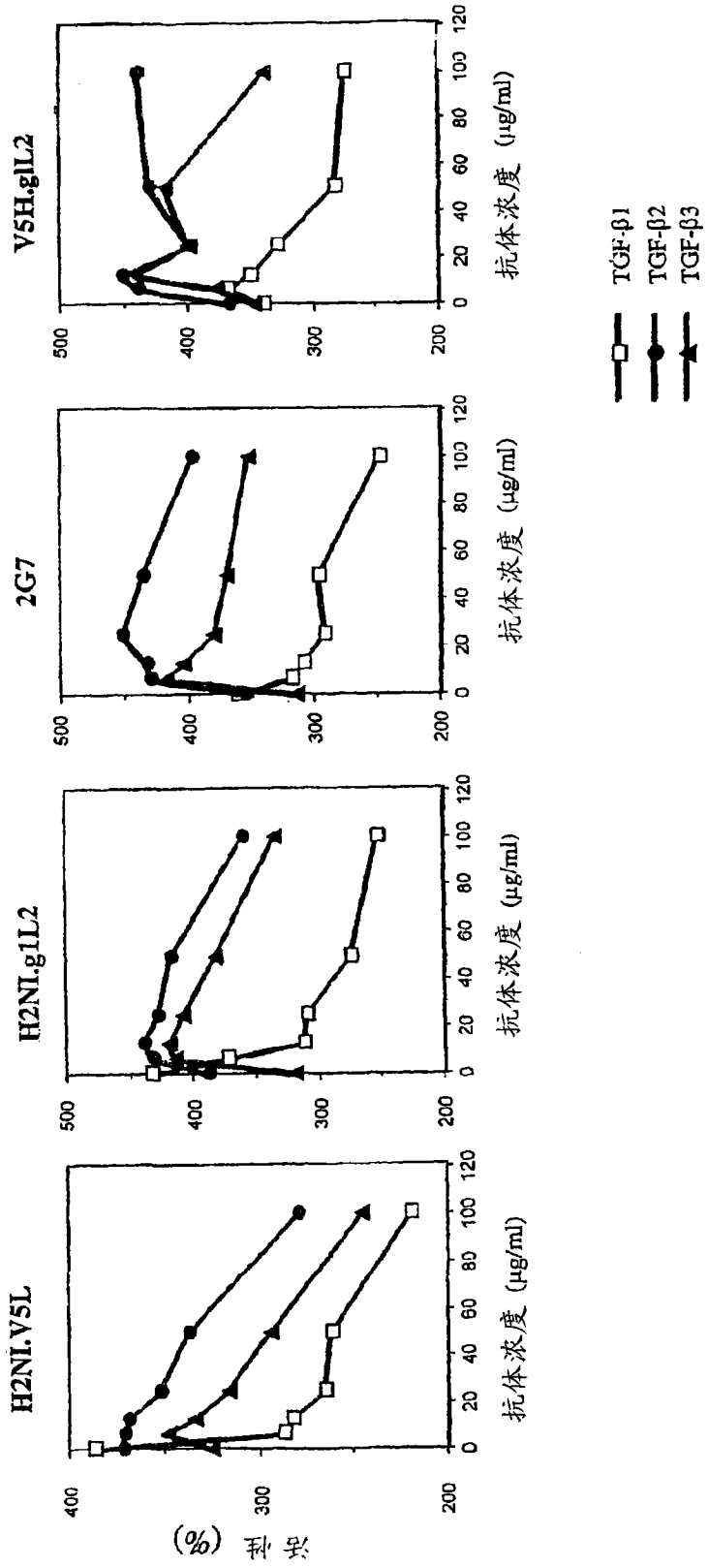


图 14A

图 14B

图 14C

图 14D

4T1细胞的TGF-β 产生 (ELISA)

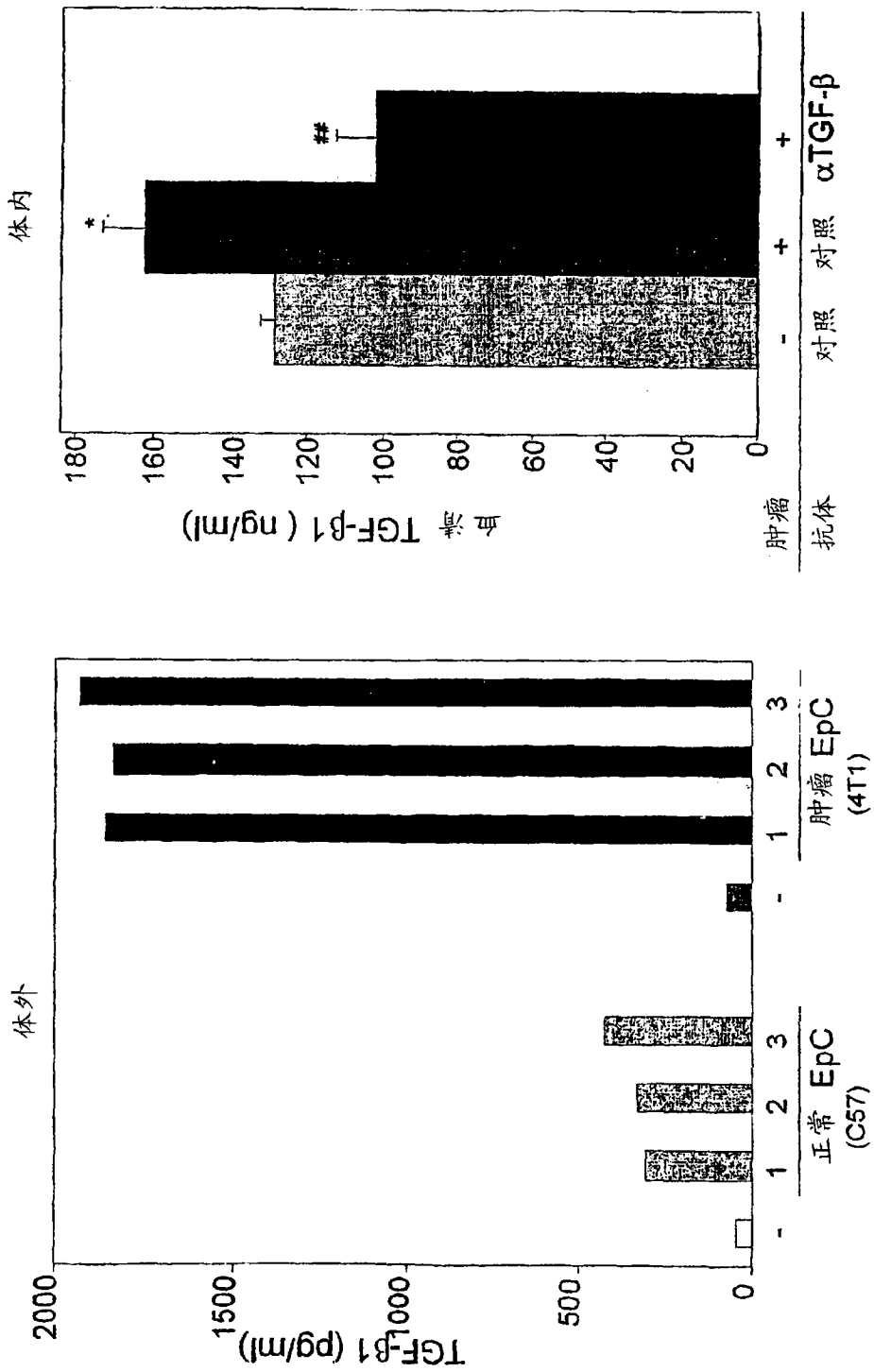


图 15B

图 15A

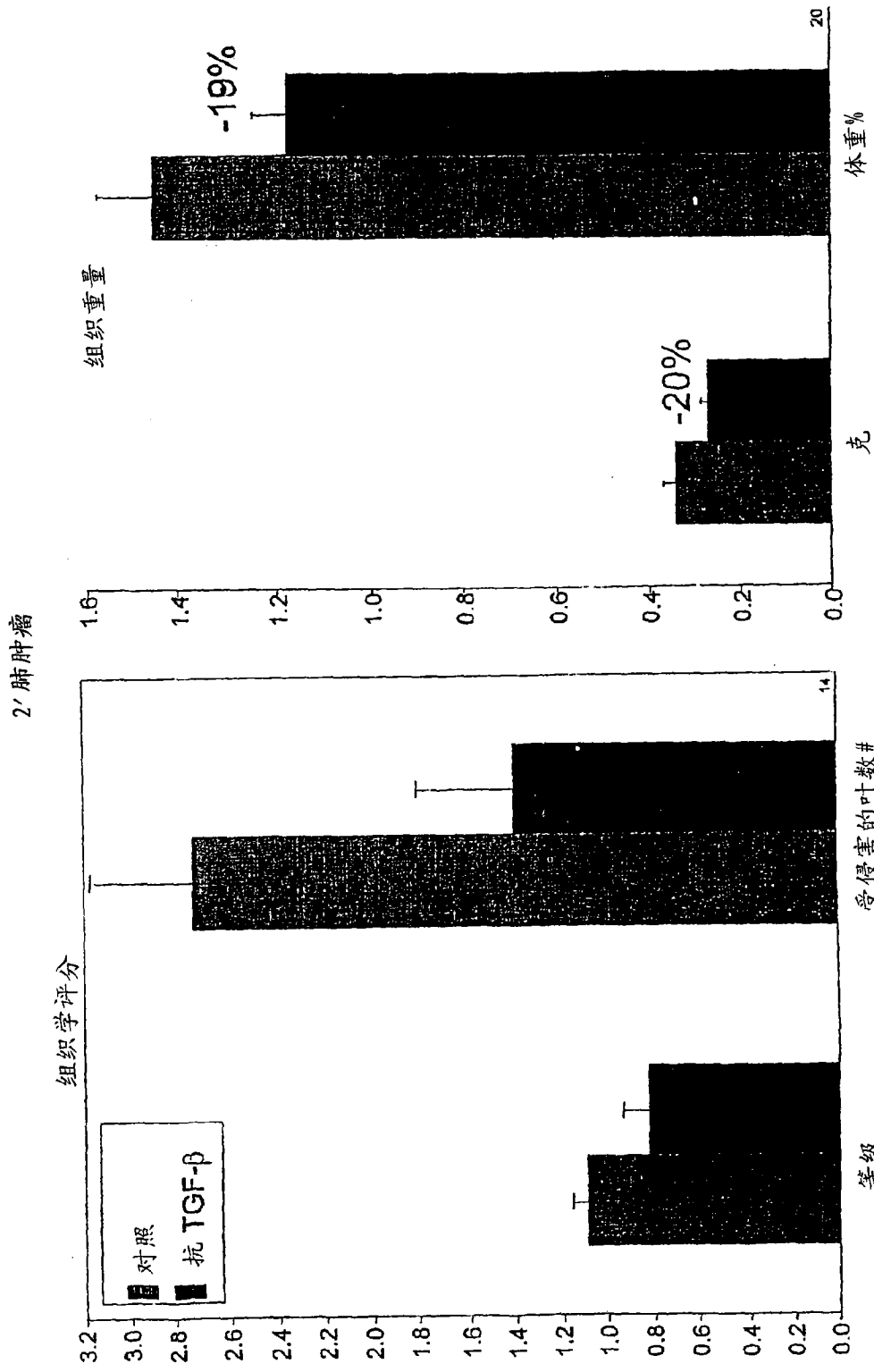


图 16B

图 16A

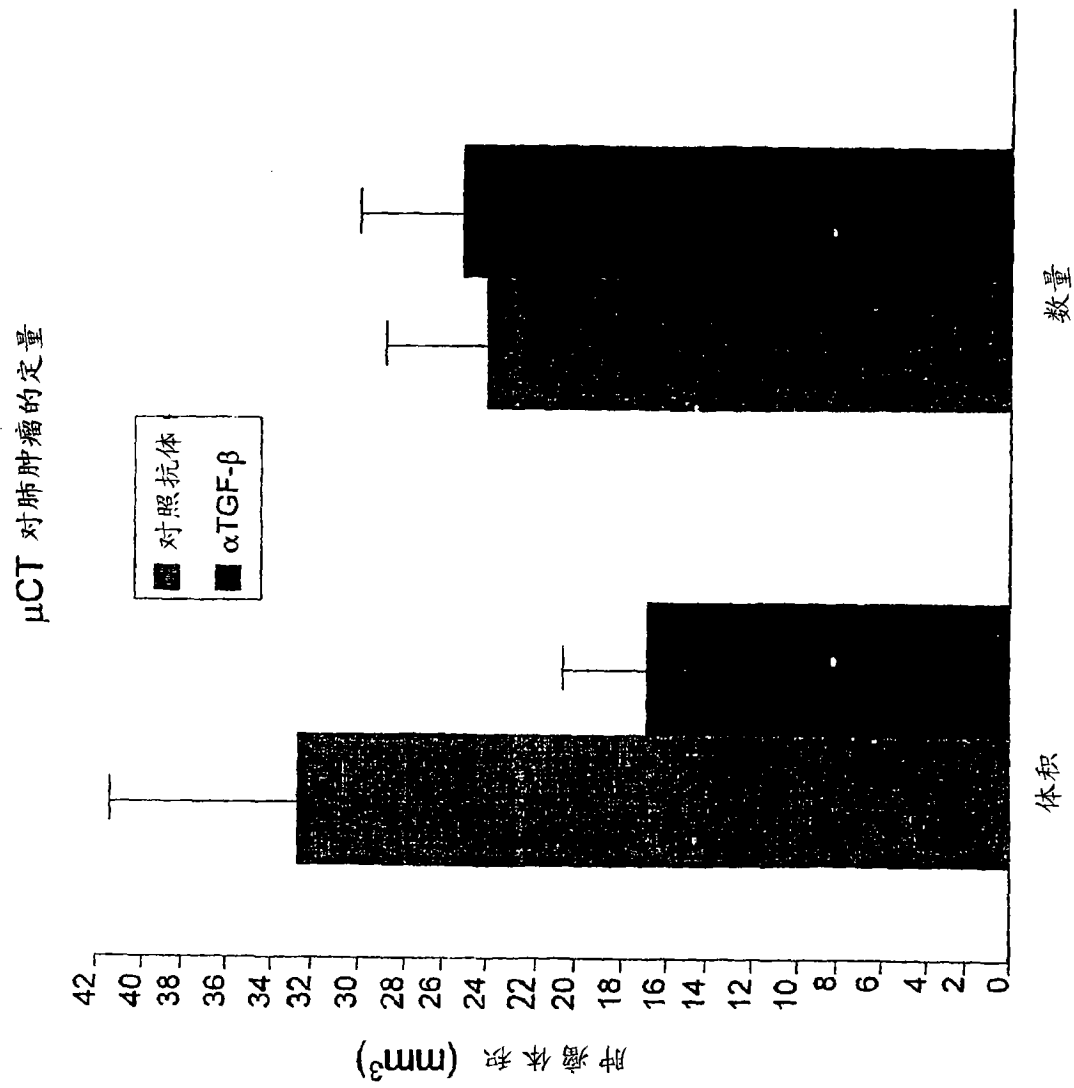


图 17

抗 TGF- β + 化疗 (4T1)

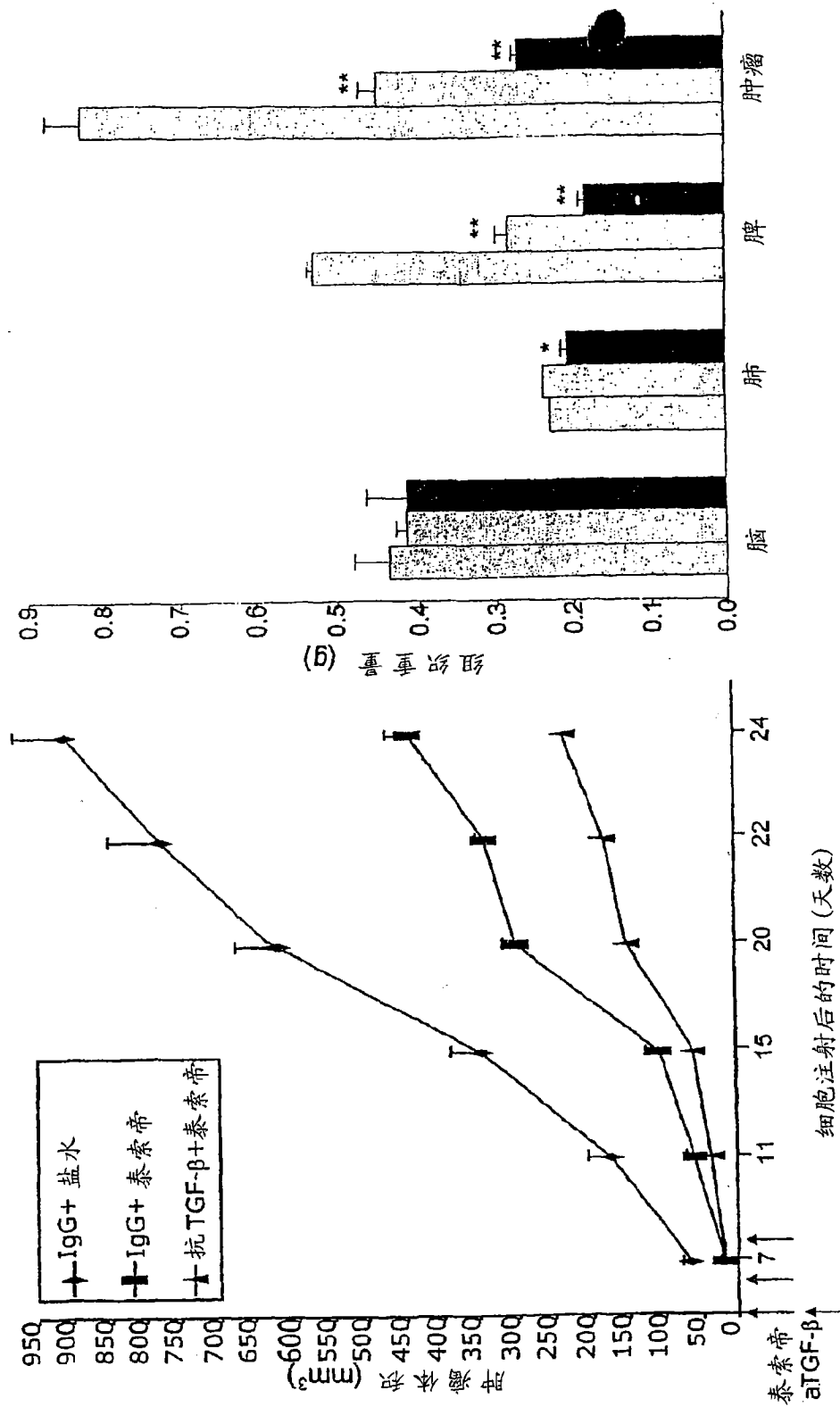


图 18B

图 18A

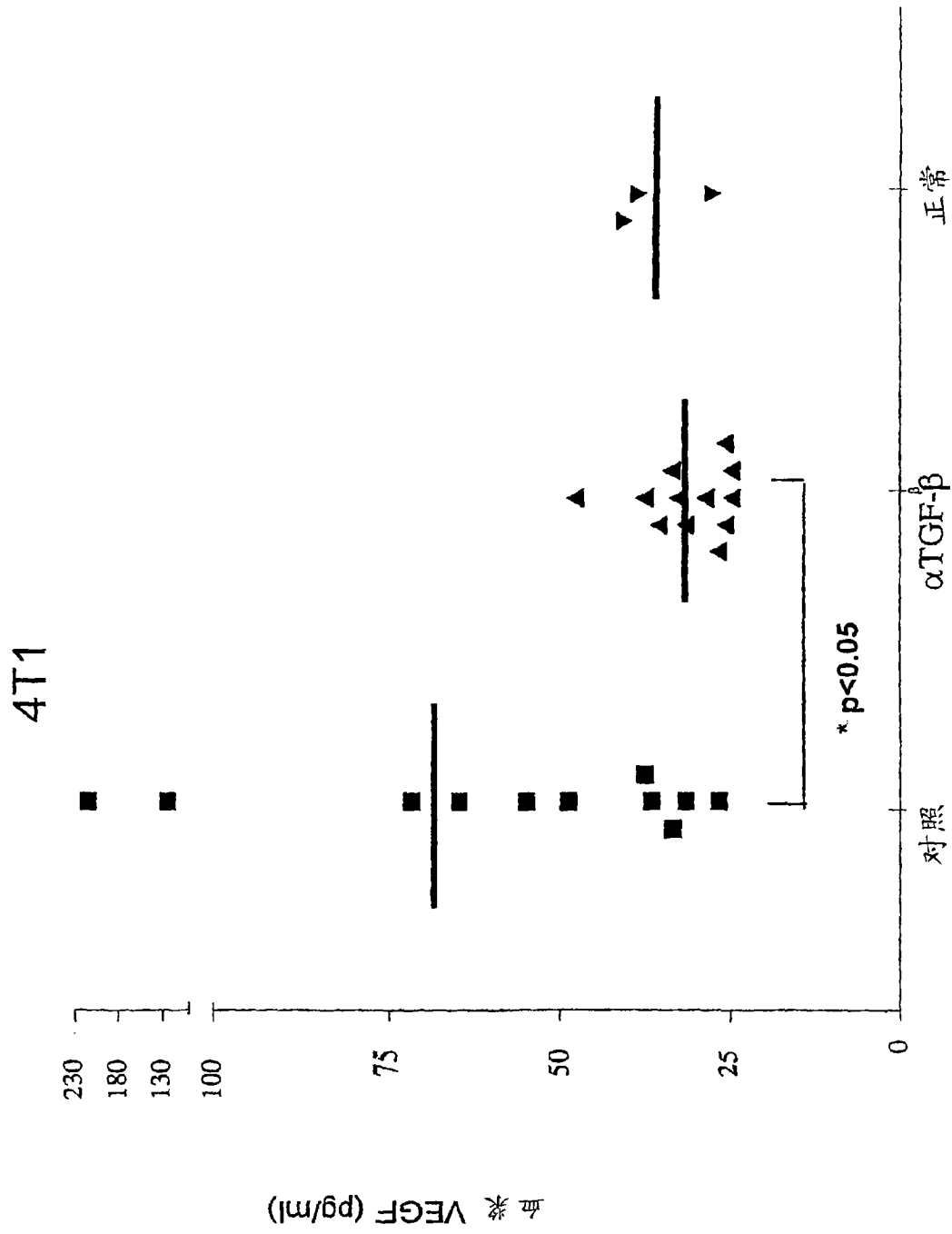


图 19

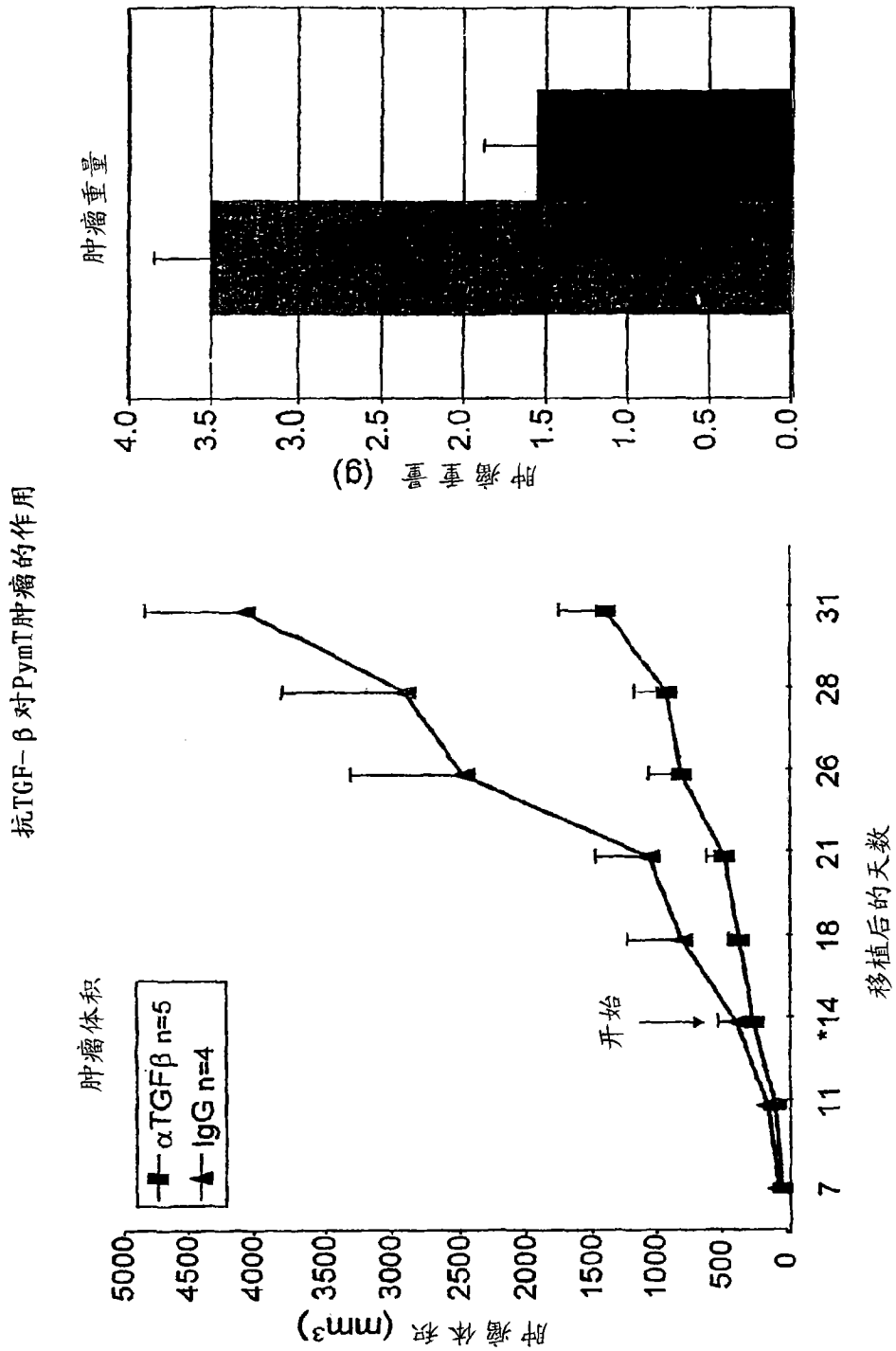


图 20B

图 20A

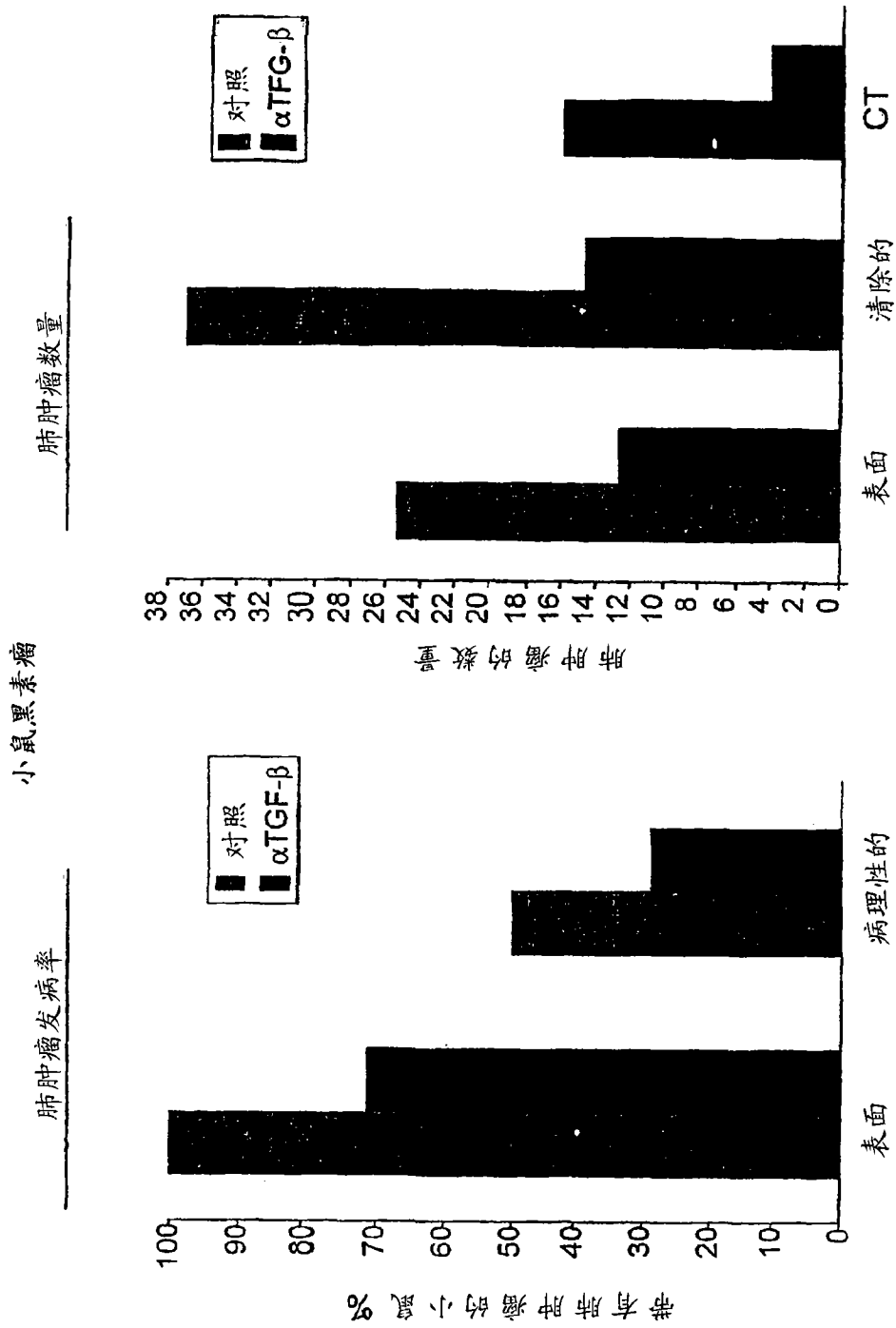


图 21B

图 21A

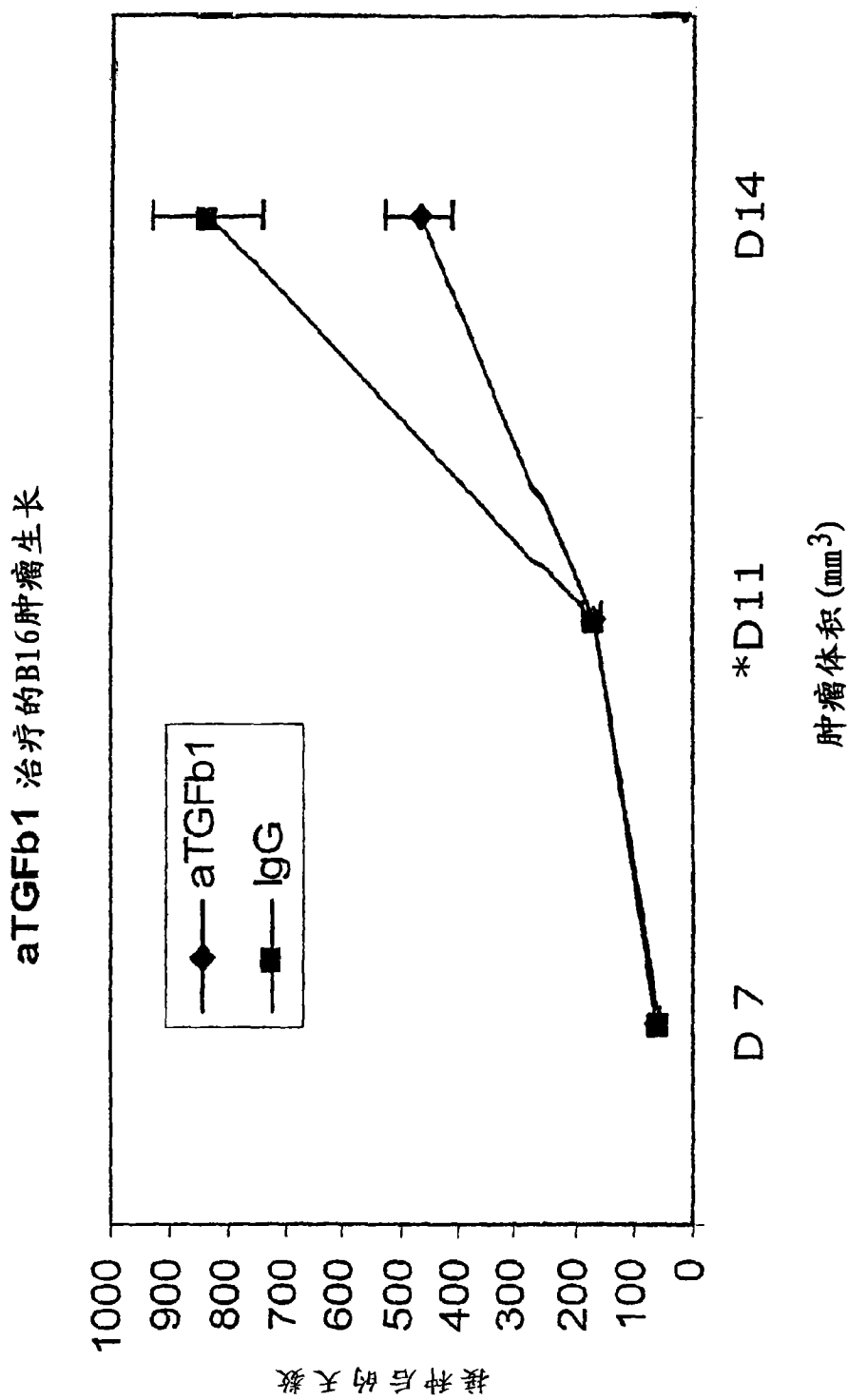


图 22

在晚期抗-TGFb1 治疗中的E6可见肺转移(粗计数)

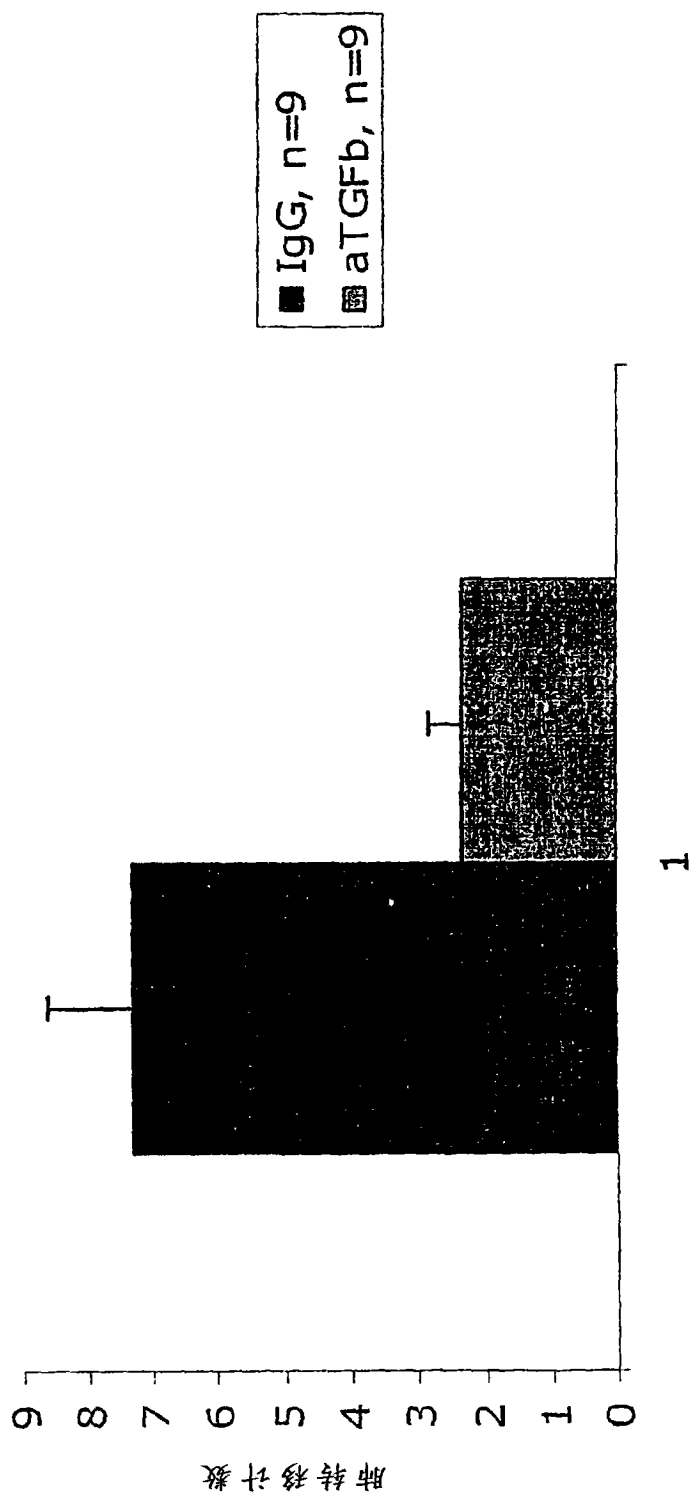


图 23

B16实验7: aTGFb1治疗的B16肿瘤生长

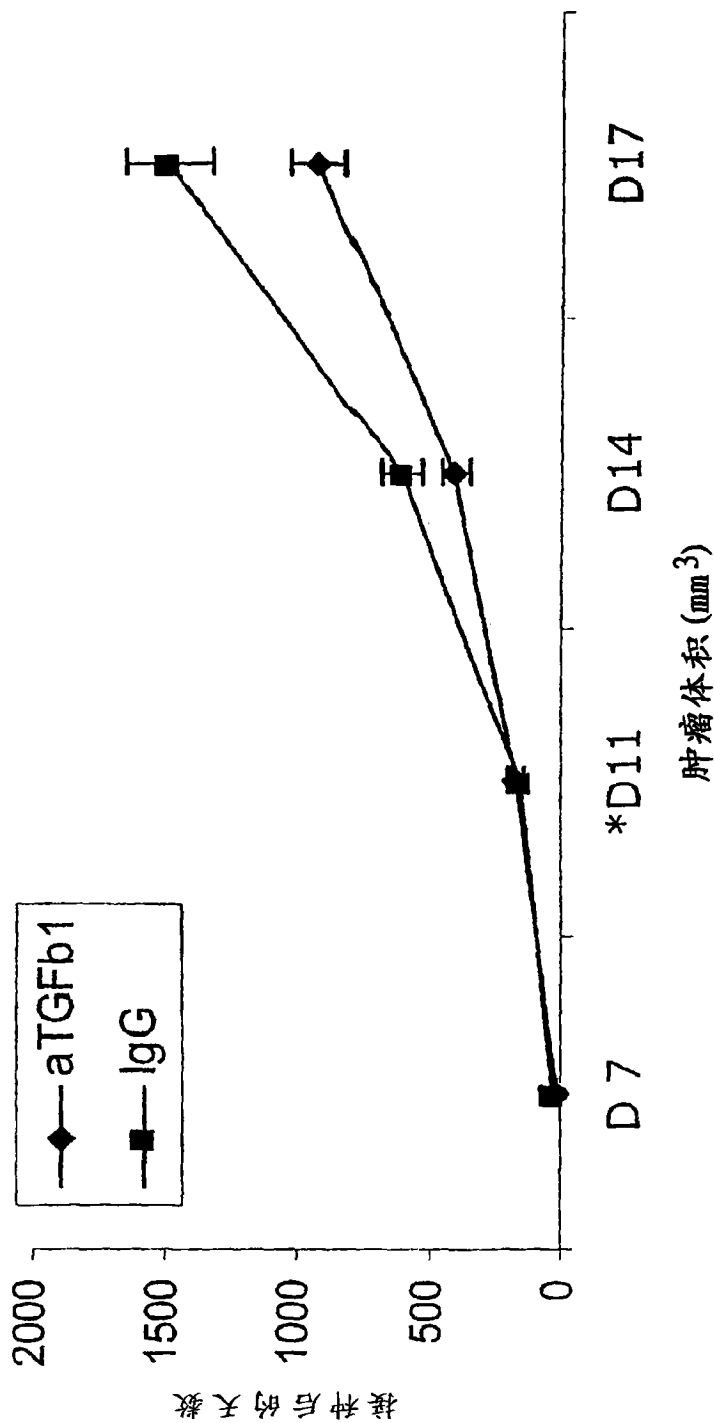


图 24

B16实验7: 原发性肿瘤重量

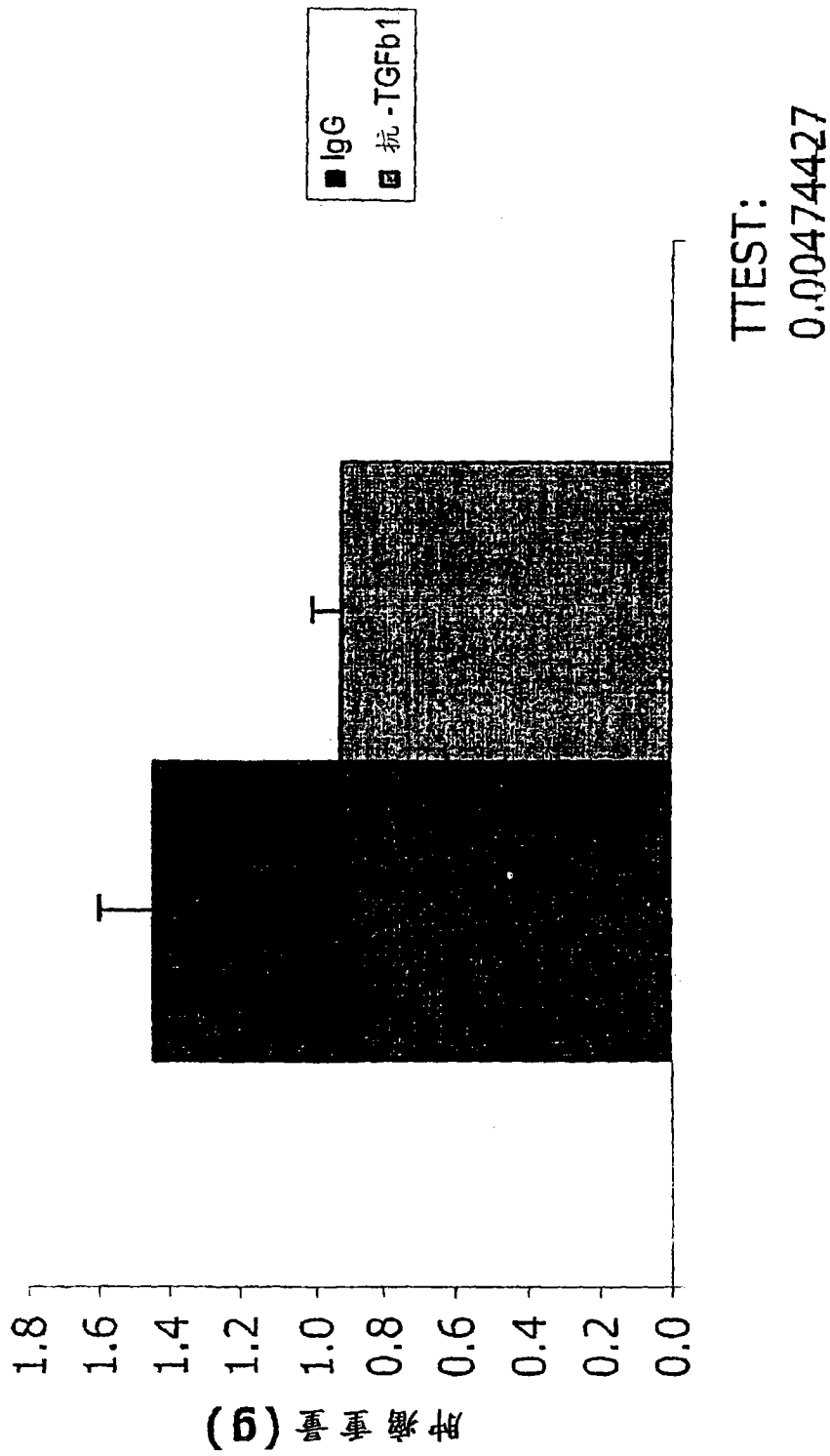


图 25

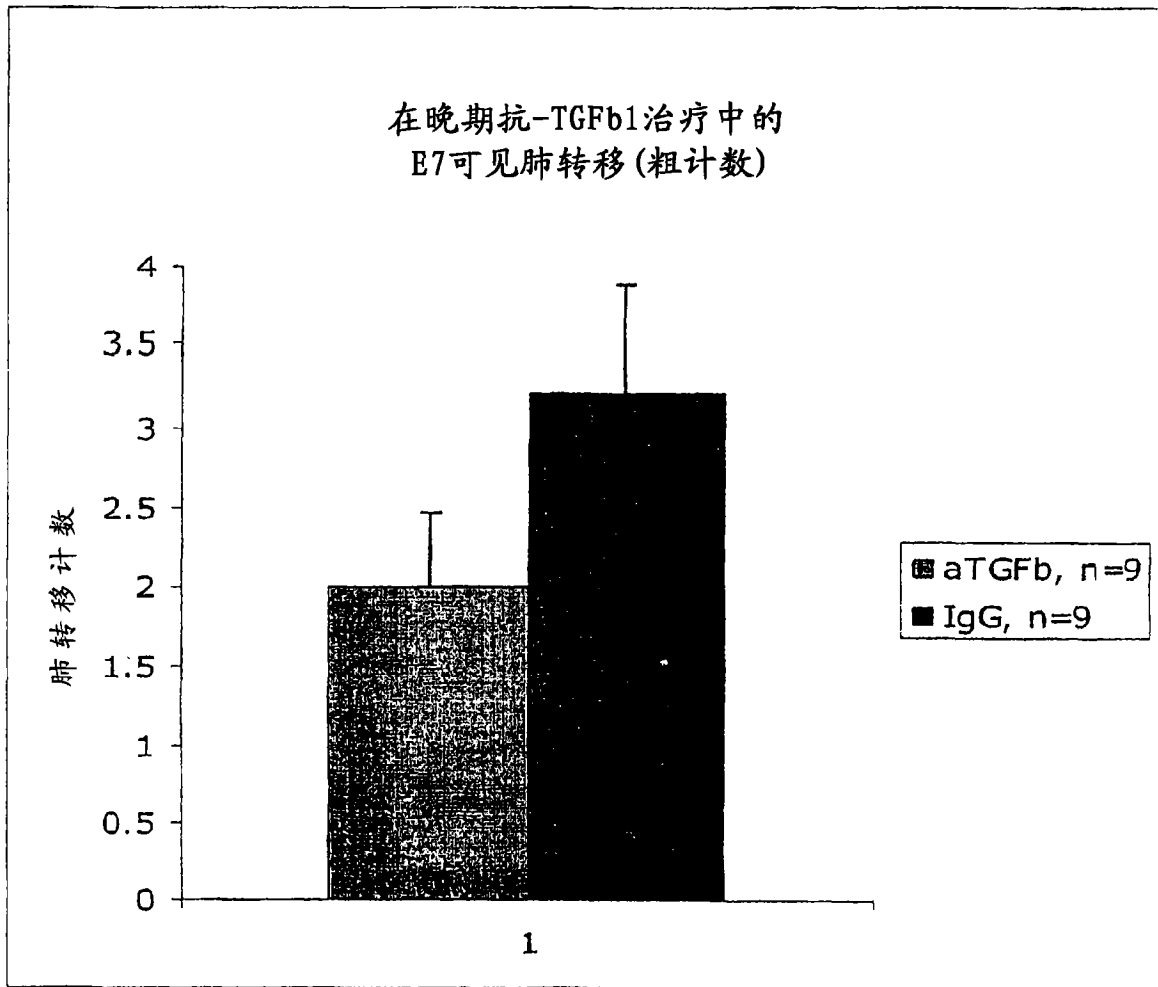


图 26

Calu-6 实验

—●— IGG 对照
—■— A4.6.1
—△— 2G7
—○— 2G7+A.4.6.1

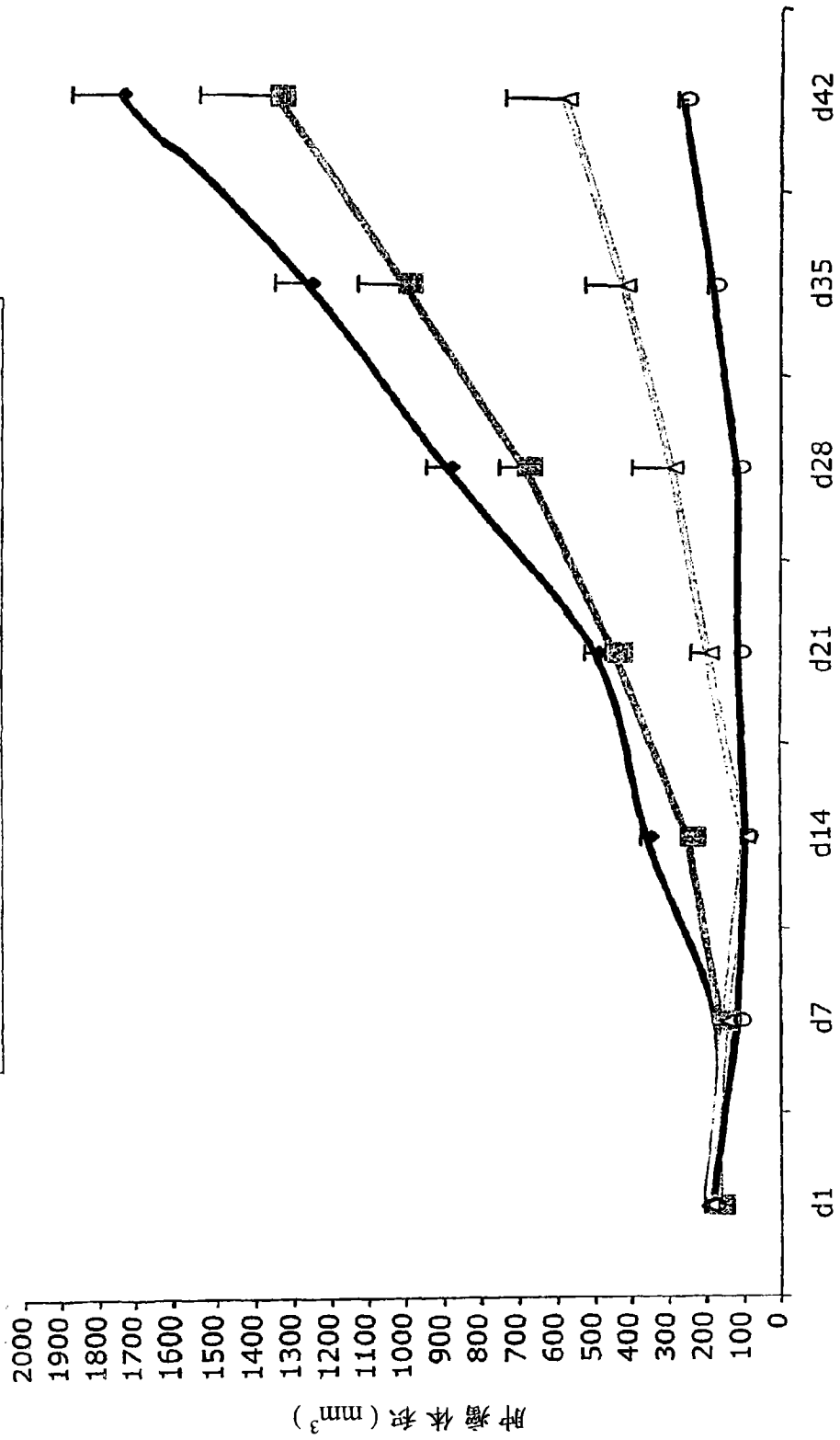


图 27

Calu-6 最终肿瘤重量

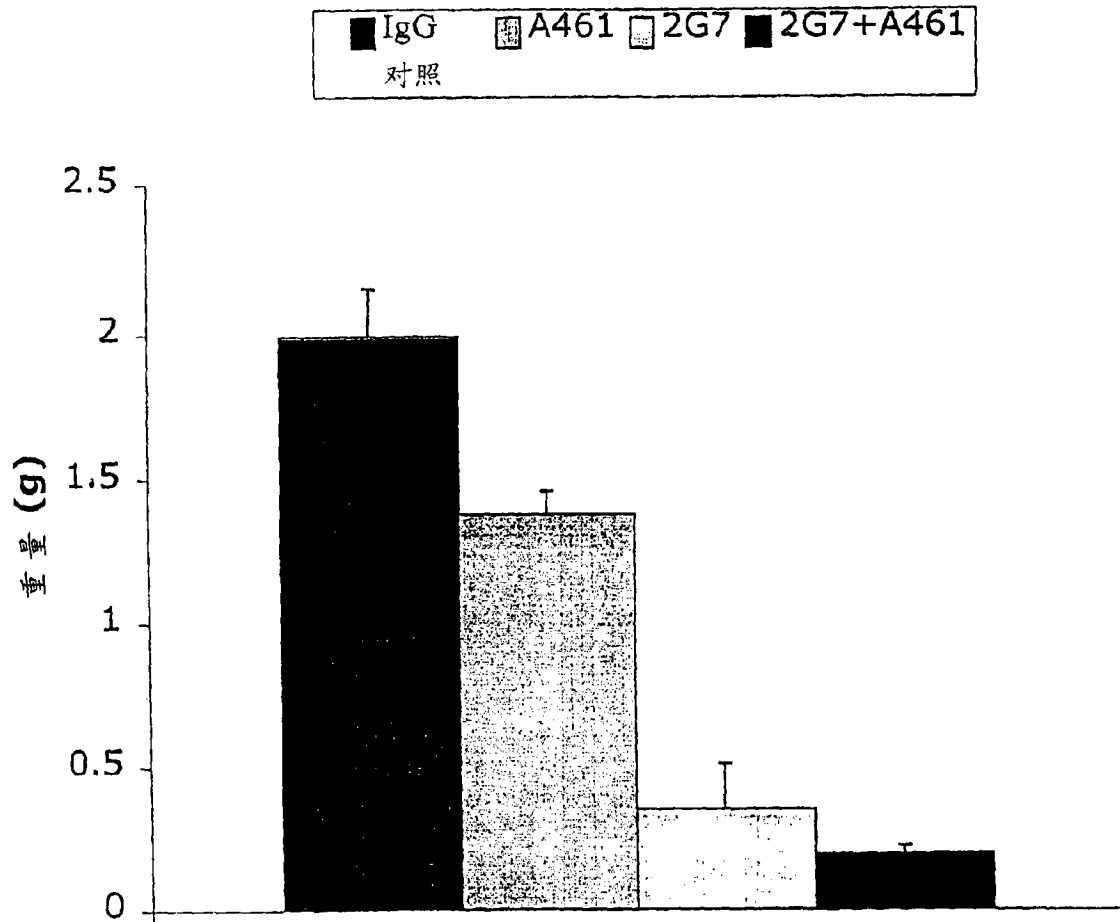


图 28