

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480039545.8

[51] Int. Cl.

C07K 14/495 (2006.01)
C12N 15/18 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

[43] 公开日 2007年1月24日

[11] 公开号 CN 1902221A

[22] 申请日 2004.12.21

[21] 申请号 200480039545.8

[30] 优先权

[32] 2003.12.31 [33] US [31] 60/533,719

[86] 国际申请 PCT/US2004/043125 2004.12.21

[87] 国际公布 WO2005/066204 英 2005.7.21

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.30

[71] 申请人 先灵-普劳有限公司

地址 瑞士卢塞恩

[72] 发明人 D·E·琼克 M·D·蔻克兰

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 程 淼 黄可峻

权利要求书 2 页 说明书 31 页 序列表 20 页
附图 2 页

[54] 发明名称

基于中和表位的生长增强疫苗

[57] 摘要

本发明提供了来自蛋白 GDF8 的新的、特异性的抗原肽。本发明还提供了包含所述新肽的融合蛋白、根据所述新肽和/或融合蛋白的免疫原和疫苗、特异性结合 GDF8 的所述新肽的抗体和采用根据本发明的疫苗或抗体治疗动物以调整 GDF8 活性的方法。

| 327 | 346 | 物种名称和 Genebank Nos. 对于每个引用的物种的完整名称GDF8 |
|---|-----|---|
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Anser platyrhynchos (鸭) AAL35275 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Anser anser (鹅) AAL35276 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Anser anser (鹅) AAR18246 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Doa isaurus (鸟) AAD9697 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Canis familiaris (狗) AAR14343 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Capra hircus (山羊) AAR12161 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Columba livia (鸽子) AAL35277 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Columba chinensis (岩鸽) AAL35278 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Danio rerio (斑马鱼) AAB88693 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Equus caballus (马) BA018046 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Gallus gallus (鸡) AAK18000 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Gallus gallus (鸡) AAR18244 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Homo sapiens (人) J05250 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | L. punctatus (鲈鱼) AAK84666 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Lepus capensis (野兔) AAN87890 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Mareca fasciata (绿头鸭) AAL17640 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Meleagris gallopavo (火鸡) AAB86692 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Morone chrysops (青斑) AAB86693 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Mus musculus (家鼠) AAC53167 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | O. mykiss (鲤鱼) AAK71707 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Ovis aries (绵羊) AAB86698 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Papilio homodryas (蝴蝶) AAB86698 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Rattus norvegicus (大鼠) AAB86691 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Salmo salar (鳟鱼) CAC18541 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Sparus aurata (锦鲤) AAL05943 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Sus scrofa (猪) AAC08035 |
| V H Q A N P R O S A G P C C T P T K M S | | Sus scrofa (猪) AAR18245 |

1. 一种由 50 个或更少的氨基酸残基组成的分离的肽,其包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基 327 到 346。
2. 权利要求 1 的分离的肽,其包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基 321 到 346。
3. 权利要求 2 的分离的肽,其包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基 320 到 350。
4. 权利要求 3 的分离的肽,其包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基 312 到残基 361。
5. 一种由 50 个或更少的氨基酸残基组成的分离的肽,其包含了包含氨基酸替换的 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基 327 到 346;
其中在氨基酸残基 327 到残基 346 之间有不超过五个的氨基酸替换; 和
其中所述肽特异性结合大鼠单克隆抗体 788。
6. 权利要求 5 的分离的肽,包含在选自残基 328、329、331、333 和 335、和它们的组合构成的组的位置上的氨基酸替换,其中
 - (a) 氨基酸残基 328 是 His、Leu 或 Asn;
 - (b) 氨基酸残基 329 是 Gln 或 Lys;
 - (c) 氨基酸残基 331 是 Asn 或 Ser;
 - (d) 氨基酸残基 333 是 Arg 或 Lys; 和/或
 - (e) 氨基酸残基 335 是 Ser、Pro 或 Thr。
7. 权利要求 6 的分离的肽,包含在前体 GDF8 的残基 327 到残基 346 之间的不超过一个的氨基酸替换,条件是所述肽特异性结合大鼠单克隆抗体 788。
8. 权利要求 1 的分离的肽,其包含抗 GDF8 抗体的特异性中和表位。
9. 权利要求 8 的分离的肽,其中所述抗体选自由大鼠抗 GDF8 单克隆抗体 788 和山羊抗 GDF8 多克隆抗血清的 IgG 部分构成的组。
10. 包含权利要求 1 的肽或所述肽的抗原性亚片段的融合蛋白。
11. 编码权利要求 10 的融合蛋白的核酸分子。
12. 编码权利要求 6 的肽的核酸分子。
13. 编码权利要求 1 的肽的核酸分子。

14. 权利要求 13 的核酸分子,其包含 SEQ ID NO: 2 的核苷酸 1112 到核苷酸 1171 的核酸序列。

15. 包含权利要求 13 的核酸分子的可复制克隆载体。

16. 包含权利要求 15 的可复制克隆载体的宿主细胞。

17. 权利要求 16 的宿主细胞,其被所述克隆载体转化。

18. 权利要求 16 的宿主细胞,其是真核细胞。

19. 生产 GDF8 肽的方法,包括培养权利要求 18 的宿主细胞,表达编码的肽和回收所述肽的步骤。

20. 包含权利要求 1 的肽的疫苗组合物。

21. 包含权利要求 10 的融合蛋白的疫苗组合物。

22. 权利要求 20 的疫苗组合物,进一步包含佐剂。

23. 在动物中引发抗 GDF8 免疫反应的方法,包括向所述动物施用有效量的权利要求 20 的疫苗组合物。

24. 从多种抗体或抗体片段中挑选抗 GDF8 抗体或抗体片段的筛选方法,包括使权利要求 1 的肽与包含一种或多种抗体或抗体片段的样品接触,和检测选择性地与所述肽结合的抗体或抗体片段。

25. 在动物中下调 GDF8 活性的方法,包括以在所述动物中有效下调 GDF8 活性的量和时间,向所述动物施用抗体或抗体片段,其中所述抗体特异性结合权利要求 1 的肽。

26. 在动物中下调 GDF8 活性的方法,包括用有效量的权利要求 20 的疫苗组合物免疫所述动物。

27. 在动物中下调 GDF8 活性的方法,包括用有效量的权利要求 21 的疫苗组合物免疫所述动物。

基于中和表位的生长增强疫苗

相关申请的交叉引用

本申请是非临时申请，根据 35 U.S.C. § 119 (e) 要求 2003 年 12 月 31 日提交的临时申请 U.S. Serial No. 60/533,719 的优先权，在此通过引用将其全部内容合并。

发明领域

本发明涉及蛋白生长分化因子 8，涉及生长分化因子 8 的抗原性肽片段，并涉及用以调整生长分化因子 8 的活性的免疫原、疫苗和治疗动物的方法。

发明背景

生长分化因子 8 是一种被分类为转化生长因子 - β (“TGF- β ”) 超家族的蛋白。一般地，TGF- β 超家族的蛋白最初被表达为前体 (a/k/a 激素原)，该前体在距前体蛋白 C-末端约 110-140 个氨基酸的一簇碱性残基处经历蛋白水解性裂解。在每种情况下，活性的、或成熟的 TGF- β 种类被认为是裂解的前体蛋白 C-末端区域的二硫化物连接的二聚体。

生长分化因子 8，在下文中称 GDF8，本领域中也称为 GDF-8 或 myostatin。已经从大范围的有机体克隆了编码 GDF8 的前体 (在下文中称“前体 GDF8”) 的基因。这些包括人和鼠的前体 GDF8 [Nestor *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:14938-43; 美国专利 No. 5,827,733, 在此通过引用将其全部内容合并]。还报道了的是，在人类骨骼肌中在 1 型和 2 型纤维中 GDF8 免疫反应性是可检测的。描述了检测 GDF8 的抗体和化验，例如，美国专利 No. 6,096,506。

进一步报道了，GDF8 在下调或抑制骨骼肌的生长和发育中起到作用，这是通过敲除 GDF8 的小鼠证实的 (McPherron *et al.*, 1997, *Nature* 387:83-90)。为此，已有一些先前的尝试，特别是在畜牧业方面，通过一些手段来调整动物中的 GDF8 活性，目标是下调 GDF8 活性来增强各种食用动物的生长和/或相对肌肉质量。

例如，美国专利 No. 6,399,312 描述了前体 GDF8 基因启动子和化验，建议是用该化验来鉴定该启动子的理论性抑制物。美国专利 No.

6,656,475 描述了通过用竞争 GDF8 受体的 GDF8 前结构域 (prodomain) 与细胞接触来抑制 GDF8 对细胞的影响的方法, 并报道了成熟 GDF8 的 C-末端可以变化。美国专利 No. 6,004,937 描述了使用 follistatin 作为 GDF8 的潜在拮抗物。这些方法在畜牧业或临床应用 (人类或者兽医学) 领域都没有产生任何实际应用。

其他人也尝试了采用抗体和疫苗技术来下调 GDF8 功能。例如, 美国专利 No. 6,369,201 [在此通过引用将其全部内容合并]描述了肽, 即, GDF8 蛋白的片段, 和用于引发抗 GDF8 抗体的疫苗。该专利还报道了在用某些所报道的 GDF8 肽片段免疫的啮齿动物中, 与对照相比, 有未指明程度的生长或体重增加。

也已经描述了 GDF8 的其他生理学作用。例如, 美国专利 No. 6,368,597 [在此通过引用将其全部内容合并]提示, 抑制 GDF8 功能对于治疗 II 型糖尿病是有用的, 例如, 通过向具有这种状况的患者施用抗 GDF8 抗体或抗 GDF8 疫苗。

尽管如此, 对于引发抗 GDF8 免疫反应的改进的抗原和免疫原, 以及对于能够高特异性结合 GDF8 的改进的 GDF8 抗体, 本领域中仍存在着长期的需求。

在此对任何参考文献的引用不应看作是认可这些参考文献作为本申请的“现有技术”。

发明概述

本发明通过提供包含 GDF8 特异性中和表位的 GDF8 肽 (例如, 50 个残基或更小的 GDF8 的肽片段) 来克服了本领域的这些和其他缺点。

在本发明的一个实施方式中, 提供的 GDF8 肽包括, 例如, 包含天然的人类前体 GDF8 (SEQ ID NO:1) 的约残基 312 到约残基 361 的分离的肽。优选的, 本发明的 GDF8 肽包含天然的人类前体 GDF8 的约残基 320 到约残基 350, 更优选的包含约残基 321 到约残基 346, 最优选的包含约残基 327 到约残基 346。以下说明例示的 GDF8 肽, 在下文中标记为 DJ5, 为了方便起见, 以单字母和三字母代码、连同基于 SEQ ID NO: 1 的前体 GDF8 的残基编号的形式表示。

DJ5 (SEQ ID NO: 8)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S |
| Val | His | Gln | Ala | Asn | Pro | Arg | Gly | Ser | Ala | Gly | Pro | Cys | Cys | Thr | Pro | Thr | Lys | Met | Ser |

在本发明的进一步的实施方式中，GDF8 肽任选的包括保守的单个氨基酸替换。仅是举例来说，这些可以在肽内的一到至少五个氨基酸位置。在特定的实施方式中，在例如 GDF8 的残基 327 到 346 之间，有至少一个保守性氨基酸替换。在另一个实施方式中，GDF8 肽包括在肽内的至多五个氨基酸位置上的保守性氨基酸替换。在再另一个实施方式中，在 GDF8 的残基 327 到 346 之间有两个保守性氨基酸替换。在又一个实施方式中，在 GDF8 的残基 327 到 346 之间有三个保守性氨基酸替换。在再另一个实施方式中，在 GDF8 的残基 327 到 346 之间有四个保守性氨基酸替换。

优选的，所述氨基酸残基替换处在相对天然的人类前体 GDF8 (SEQ ID NO: 1) 的一个或多个位置，所述位置由附图 2 的种间比对的氨基酸变异来标记。这些是在残基 328、329、331、333 和 335，以及它们的组合，其中，

- (a) 氨基酸残基 328 是 His、Leu 或 Asn;
- (b) 氨基酸残基 329 是 Gln 或 Lys;
- (c) 氨基酸残基 331 是 Asn 或 Ser;
- (d) 氨基酸残基 333 是 Arg 或 Lys; 和/或
- (e) 氨基酸残基 335 是 Ser、Pro 或 Thr。

优选的，这种修饰的 GDF8 肽包含抗 GDF8 抗体的特异性中和作用表位，因而维持了与抗 GDF8 抗体特异性结合的性质，其中该抗体是 mAb 788 和/或山羊抗 GDF8 多克隆抗血清的 IgG 部分，如下文中所例示的。

在本发明的再进一步的实施方式中，提供了编码上述 GDF8 肽的核酸分子，即多核苷酸。

优选的，所述核酸分子包括天然发生的人类前体 GDF8 基因的部分，从 (Genebank 登记号 NM_005259, 人类 GDF8 基因; SEQ ID NO: 2) 的约核苷酸 1112 到约核苷酸 1171。这个部分编码如上所述的肽

DJ5。注意到 **NM_005259** 数据包括了侧翼于实际编码区的大量序列。技术人员将要理解，**DJ5** 相应于 **GDF8** 激素原的实际编码区的核苷酸 979 - 1038。

还提供了包含所述核酸分子的可复制克隆载体，和原核或真核宿主细胞，一同提供了生产 **GDF8** 肽的方法，包括步骤：培养所述宿主细胞，表达所述编码的肽，和回收所述肽。技术人员还要理解的是，发明的 **GDF8** 肽也可以通过任何标准的、本领域已知的化学合成方法容易地产生。

在本发明的又进一步的实施方式中，还提供了包含发明的 **GDF8** 肽（或其融合蛋白）的疫苗组合物，例如，其优选的包括一种或多种佐剂和基于肽或蛋白的疫苗组合物的其他技术上标准的成分。还提供了在动物中引发抗 **GDF8** 免疫反应的方法，包括向所述动物施用有效量的所述疫苗组合物。

在另一个进一步的实施方式中，提供了从多种抗体或抗体片段中挑选抗 **GDF8** 抗体或抗体片段的筛选方法，包括使所述肽与一种或多种抗体或抗体片段接触，和检测与所述肽选择性结合的抗体或抗体片段。

在又一个方面，本发明提供了在动物中下调 **GDF8** 活性的方法。在一个这样的实施方式中，所述方法包括以在动物中有效下调 **GDF8** 活性的一定数量和时间，向动物施用抗体或抗体片段，其中所述抗体特异性结合所述肽，或通过用在此描述的疫苗组合物免疫所述动物。所述动物优选的是脊椎动物，更优选的是哺乳动物、禽类或鱼类。优选的，所述哺乳动物是驯养的动物（例如，用于畜牧业的动物，或作为选择，是陪伴动物），但任选的可以是需要这种 **GDF8** 下调作用的人类。

本发明还预期掺入了本发明的 **GDF8** 肽的融合蛋白。所述融合蛋白可以包括作为信号肽的结构域，用于增强所述 **GDF8** 融合蛋白的分泌或细胞表面表达，和/或用以允许使用选择性结合系统进行纯化。进一步的，预期所述融合蛋白将一种或多种 **GDF8** 肽连接在单个载体蛋白上，来增强所述 **GDF8** 肽结构域的免疫原性。在特定的实施方式中，本发明的融合蛋白包含由 50 个或更少的氨基酸残基组成的 **GDF8** 肽，所述氨基酸残基包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基 327 到 346。在这种

类型的相关实施方式中，所述融合蛋白包含 GDF8 肽的抗原性亚片段，例如，包含来自 DJ5 (SEQ ID NO:8) 的约 10 个连续氨基酸残基的 GDF8 肽。

附图的简要说明

附图 1 说明了在 GDF8 活性区（即，成熟 GDF8）中的重叠肽 DJ1 到 DJ7，所述 GDF8 活性区来自前体 GDF8 序列的残基 266 - 375。

附图 2 说明了人类 DJ5 肽序列（SEQ ID NO: 8）与相似的 20 残基肽进行比较的比对，所述相似的 20 残基肽位于所列其他动物物种的前体 GDF8 蛋白中。氨基酸残基位置 321 到 347 基于人类前体 GDF8。Genebank 登记号（通过引用合并在此）确定了这些物种的完全公开的蛋白序列。

比对的肽具有以下的 SEQ ID NOs。

| | |
|-----------------------------------|-----------------|
| Anas platyrhynchos (鸭) AAL35275 | (SEQ ID NO: 11) |
| Anser anser (鹅) AAL35276 | (SEQ ID NO: 12) |
| Anser anser (鹅) AAR18246 | (SEQ ID NO: 13) |
| Bos taurus (牛) AAB86687 | (SEQ ID NO: 14) |
| Canis familiaris (狗) AAR14343 | (SEQ ID NO: 15) |
| Capra hircus (山羊) AAR12161 | (SEQ ID NO: 16) |
| Columba livia (鸽子) AAL35277 | (SEQ ID NO: 17) |
| Coturnix chinensis (鹌鹑) AAL35278 | (SEQ ID NO: 18) |
| Danio rerio (斑马鱼) AAB86693 | (SEQ ID NO: 19) |
| Equus caballus (马) BAB16046 | (SEQ ID NO: 20) |
| Gallus gallus (鸡) AAK18000 | (SEQ ID NO: 21) |
| Gallus gallus (鸡) AAR18244 | (SEQ ID NO: 22) |
| Homo sapiens (人类) NP-005250 | (SEQ ID NO: 8) |
| I. punctatus (鲟鱼) AAK84666 | (SEQ ID NO: 23) |
| Lepus capensis (野兔) AAN87890 | (SEQ ID NO: 24) |
| Macaca fascicularis (猴) AAL17640 | (SEQ ID NO: 25) |
| Meleagris gallopavo (火鸡) AAB86692 | (SEQ ID NO: 26) |
| Morone chrysops (白鲈) AAK28707 | (SEQ ID NO: 27) |
| Mus musculus (家鼠) AAC53167 | (SEQ ID NO: 28) |
| O. mykiss (鲤鱼) AAK71707 | (SEQ ID NO: 29) |
| Ovis aries (绵羊) AAB86689 | (SEQ ID NO: 30) |
| Papio hamadryas (狒狒) AAB86686 | (SEQ ID NO: 31) |
| Rattus norvegicus (大鼠) AAB86691 | (SEQ ID NO: 32) |
| Salmo salar (鲑鱼) CAC19541 | (SEQ ID NO: 33) |
| Sparus aurata (海鲷) AAL05943 | (SEQ ID NO: 34) |
| Sus scrofa (猪) AAC08035 | (SEQ ID NO: 35) |
| Sus scrofa (猪) AAR18245 | (SEQ ID NO: 36) |

发明的详细说明

因此，本发明鉴定了 GDF8 结构域，其充当了多克隆抗 GDF8 山羊抗血清和其他某些特异性抗 GDF8 抗体的特异性中和表位。这些表位也用来提供 GDF8 蛋白的片段，其对于引发针对 GDF8 蛋白的活性和特异性免疫反应是有用的，例如，用于体外检测 GDF8 蛋白，和体内下调 GDF8 活性。这些片段在此一般称作 GDF8 肽或肽片段。这些 GDF8 肽的实用性包括用作在动物中引发抗 GDF8 免疫反应的免疫原，和用作 GDF8 相关的化验中的高特异性抗体结合靶标。

通过用抗 GDF8 抗血清与一组重叠的 GDF8 肽接触，并测定所述肽和所述抗血清 IgG 抗体之间的结合活性的程度，来鉴定出 GDF8 的特异性结合表位。从用前体 GDF8 蛋白免疫的山羊获得抗 GDF8 抗血清，所述前体 GDF8 蛋白具有根据表达和抗原性进行优化的结构。

为了更完整地理解本发明，给出以下定义。在说明书中为了方便起见使用单数的术语，决不意指这样进行限制。因而，例如，提及包含“多肽”的组合物包括了提及一种或多种这样的多肽。

如在此使用的，术语“大约”与术语“约”可互换地使用，表示某一值在指定值的百分之二十之内，即，含有“大约”50个氨基酸残基的肽可含有40到60个之间的氨基酸残基。

还需要理解的是，本发明不限于在此公开的特定的结构、处理步骤和材料，因为这些结构、处理步骤和材料可以有些改变。还需要理解的是，在此使用的专有名词仅用于描述特定实施方式的目的，不意味着限制，因为本发明的范围仅由附随的权利要求和其等同物限定。

如在此使用的，术语“多肽”与术语“蛋白”可互换地使用，表示包含通过肽键连接的两个或多个氨基酸的多聚体。优选的，在此除非另有说明，在大小或链长度方面，术语多肽不同于在此使用的术语“肽”，其中“肽”是指约50个或更少氨基酸的聚合体链，多肽或蛋白是指包含超过约五十个氨基酸的聚合体链。任选的，肽或多肽可以缺少某些由基因或由mRNA编码的氨基酸残基。例如，基因或mRNA分子可能编码多肽的N-末端的氨基酸残基序列（即，信号序列），其将从最终的蛋白裂解下来，因而不是最终的蛋白的一部分。

根据本发明的“GDF8肽”是来自GDF8蛋白的相对短的片段。甚至这种肽的亚片段也可以称为GDF8肽。尽管不打算限制根据本发明的GDF8肽的最大大小，优选的是，所述肽的最大大小是约50个残基，更优选的所述最大大小是约40个残基，再更优选的所述最大大小是约30个残基，再更优选的所述最大大小是约25个残基。更一般地，所述GDF8肽的大小在长度上优选的在约10到约50个氨基酸残基的范围内，更优选的约15到约30个氨基酸残基，特别地，是长度约20个氨基酸残基。作为本发明的其他GDF8肽的更小的亚片段的GDF8肽，例如，包含来自DJ5（SEQ ID NO: 8）的约10个连续氨基酸残基的GDF8肽，优选地包含来自更大GDF8肽的抗原性部分（例如，表位）。

在特定的实施方式中，GDF8肽包含肽结构域，所述肽结构域具有与天然发生的人类GDF8前体（SEQ ID NO: 1）的残基编号327-346（SEQ ID NO: 8）定义的肽约50%到100%同源性的同源性程度。在上述同源性中的改变优选的是保守性替换和/或保持了发明的抗原结构

的改变，所述抗原结构由某些特异性抗 GDF8 抗体特异性地识别。这些保守替换代表由种间同源性比较（例如，参见附图 2）显示的，保存了 GDF8 功能的残基替换，和/或代表在有相似的化学（例如，物理）和电学结构的氨基酸之间的残基替换，因而保存和/或优化了发明的 GDF8 肽的抗体结合特异性。这种保守性氨基酸替换的实例包括：用一个疏水残基例如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、或甲硫氨酸替换另一个；或用相等电荷的一个极性残基替换另一个，例如，精氨酸替换赖氨酸，谷氨酸替换天冬氨酸，或谷氨酰胺替换天冬酰胺。

特别地，根据本发明的 GDF8 肽还包括抗 GDF8 抗体的特异性中和表位，即，将与以下的实施例描述的 PGA 抗 GDF8 IgG 多克隆抗体特异性结合的，和/或与商业上可获得的大鼠单克隆抗体（“mAb”）Cat. No. MAB788（R & D Systems Inc., Minneapolis, MN）特异性结合的表位或抗原性结构域。

如在此使用的术语“纯化的”或“分离的”是指在减少或消除了不相关材料，即，污染物，包括天然材料的情况下分离的材料，所述材料从所述天然材料获得。例如，纯化的或分离的蛋白优选的不含可在细胞中与该蛋白一同找到的其他蛋白或核酸。纯化的材料可含有少于约 50%，优选的少于约 75%，最优选的少于约 90%的最初与之相结合的细胞成分。可以通过层析、凝胶电泳、免疫测定、组成分析、生物测定、和本领域已知的其他方法评估纯度。根据功能性的方面，根据本发明的分离的 GDF8 肽是与其他材料，包括前体 GDF8 蛋白和/或成熟 GDF8 蛋白充分分离的肽，从而能够引发特异于 GDF8 肽的免疫反应。

纯化方法是本领域公知的。例如，可以通过沉淀、层析、超速离心法和其他手段纯化核酸。可以通过各种方法，包括但不限于，制备性圆盘凝胶电泳、等电聚焦、HPLC、反相 HPLC、凝胶过滤、离子交换和分配层析、沉淀和盐析层析、萃取和逆流分布，来纯化蛋白和多肽以及肽。对于某些目的，优选的是在重组系统中生产多肽，其中蛋白含有便于纯化的额外序列，例如，但不限于，聚组氨酸序列或与抗体特异性结合的序列，例如 FLAG[®]和 GST。然后可以在适合的固相基质上通过层析从宿主细胞的粗溶胞产物中纯化多肽。做为选择，针对所述多肽产生的抗体或其结合片段可以用作纯化试剂。

术语“基本上纯”是指使用本领域已知的常规纯化技术可达到的最高纯度，意味着核酸、多肽、肽或其他材料不含来源于原始来源有机体或重组 DNA 表达系统的其他污染蛋白、核酸和其他生物物质。可以通过标准方法化验实际上的纯度，一般地超过至少约 75%、优选的至少约 90%、更优选的至少约 95%，最优选的至少约 99% 的纯度。可以在质量或摩尔基础上进行纯度评估。

“多核苷酸”或“核酸分子”是包含核苷酸的分子，包括但不限于，RNA、cDNA、基因组 DNA 和甚至是合成的 DNA 序列。还预期该术语涵盖包括任何本领域已知的 DNA 和 RNA 碱基类似物的核酸分子。

“载体”或“复制载体”是一种复制子，例如质粒、噬菌体或粘粒，另一个 DNA 片段可以连接或掺入其中，从而引起所述连接的片段的复制。该术语还包括复制子，所述复制子包括掺入的或连接的目标 DNA 片段。

可用于本发明的载体包括微生物质粒、病毒、噬菌体、可整合 DNA 片段和其他能促进核酸整合到宿主基因组中的运载体 (vehicle)。质粒是最常用的载体形式，但提供了等同功能并且是本领域已知的或成为已知的所有其他载体形式都适合于在此使用。参见，例如，Pouwels *et al.*, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985 和 *Supplements*, Elsevier, N. Y. 和 Rodriguez *et al.* (eds.), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, 1988, Butterworth, Boston, MA.

当 DNA 和载体的末端都包含相容的限制性位点时，将编码发明的 GDF8 肽的 DNA 插入到载体中很容易实现。如果这不能实现，有必要通过消化由限制性内切酶裂解产生的主干单链 DNA 突出来产生平末端，来修饰 DNA 和/或载体的末端，或通过用适合的 DNA 聚合酶填充单链末端来实现相同的结果。做为选择，例如，通过将核苷酸序列（接头）连接到末端上来产生期望的位点。这种接头可以包含定义期望的限制性位点的特定寡核苷酸序列。限制性位点也可以通过使用聚合酶链式反应 (PCR) 来产生。参见，例如，Saiki *et al.*, *Science* 239:487 (1988)。如果需要，也可以通过同聚物加尾来修饰裂解的载体和 DNA 片段。

用于本发明的重组表达载体一般是自我复制的 DNA 或 RNA 构建

体，其包含编码发明的 GDF8 肽之一的核酸，通常与适合的遗传控制元件可操作连接，所述遗传控制元件能调节相容的宿主细胞中所述核酸的表达。遗传控制元件可包括原核启动子系统或真核启动子表达控制系统，一般包括转录启动子、任选的操纵子以控制转录的开始，转录增强子以提高 mRNA 表达水平，编码适合的核糖体结合位点的序列，和终止转录和翻译的序列。表达载体也可含有复制起点，所述复制起点容许载体独立于宿主细胞进行复制。

编码发明的 GDF8 肽的核酸的表达可以在原核或真核细胞中以常规方法进行。

DNA “编码序列”或“编码”特定蛋白或肽的“序列”，是指一种 DNA 序列，当置于适合的调节元件的控制下时在体外或体内被转录和翻译为多肽。编码序列的边界由 5'-末端的起始密码子和 3'-末端的翻译终止密码子决定。编码序列可以包括，但不限于，原核序列、来自真核 mRNA 的 cDNA、来自真核（例如哺乳动物）DNA 的基因组 DNA 序列，和甚至是合成的 DNA 序列。转录终止序列通常位于编码序列的 3'。

如在此使用的，术语“融合蛋白”和“融合肽”可互换地使用，涵盖“嵌合蛋白和/或嵌合肽”和融合“内含蛋白/肽”。融合蛋白包含通过肽键与另一个蛋白的至少一部分连接的本发明的 GDF8 肽的至少一部分。例如，融合蛋白可以包含标记蛋白或肽，或有助本发明的 GDF8 肽的分离和/或纯化和/或抗原性的蛋白质或肽。GDF8 融合蛋白可包含通过肽键与 GDF8 多肽的至少一部分连接的非 GDF8 蛋白的至少一部分。在优选的实施方式中，GDF8 的一部分是功能性的，即，保持了它的抗原性。非 GDF8 序列可以是 GDF8 序列的氨基或羧基末端。

编码这种融合蛋白的重组 DNA 分子包含按阅读框与 GDF8 编码序列连接的编码非 GDF8 蛋白的至少一部分的序列，并可编码特异性蛋白酶，例如凝血酶或因子 Xa 的裂解位点，优选的位于或接近于 GDF8 序列和非 GDF8 序列之间的连接点。在特定的实施方式中，所述融合蛋白在 CHO 细胞中表达。通过使用特异于融合到 GDF8 肽的蛋白和/或标记的亲和层析柱，这种融合蛋白可用于分离本发明的 GDF8 肽。例如，然后通过使用蛋白水解酶和裂解位点，例如上文已经提及的，从融合蛋白上释放纯化的 GDF8 肽。

在一个这种实施方式中，可以制备嵌合的 GDF8 肽，例如谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 融合蛋白，麦芽糖结合蛋白 (MBP) 融合蛋白，或聚组氨酸标记的融合蛋白，用于在任何细胞中表达，或作为选择在无细胞系统中表达。例如，GST 结合与固相支持基质缀合的谷胱甘肽，MBP 结合麦芽糖基质，聚组氨酸与 Ni-螯合支持基质螯合。可以用合适的缓冲液将融合蛋白从特定基质洗脱下来，或通过用特异于裂解位点或如上所述的聚组氨酸的蛋白酶处理，所述裂解位点通常被工程化到 GDF8 肽与如下例示的融合配偶体 (例如，GST、BMP、FLAG®) 或上述多聚 His 之间。

如在此使用的“异源核苷酸序列”是指通过重组方法添加到本发明的核苷酸序列的核苷酸序列，来形成在自然中不会天然形成的核酸。这样的核酸可以编码融合 (例如，嵌合的) 蛋白。因而异源核苷酸序列可以编码含有调节和/或结构性质的肽和/或蛋白。在另一个这样的实施方式中，异源核苷酸序列可以编码一种蛋白或肽，在重组核酸表达之后，所述蛋白或肽作为检测由本发明的核苷酸序列编码的蛋白或肽的手段起作用。在再另一个实施方式中，异源核苷酸序列可以作为检测本发明的核苷酸序列的手段起作用。异源核苷酸序列可以包含非编码序列，所述非编码序列包括限制性位点、调节位点、启动子等等。

“宿主细胞”是短暂地或永久地含有外源核酸分子，或能够含有并表达外源核酸分子的细胞。当外源 DNA 被导入细胞膜内时，则细胞被这种外源 DNA “转化”。外源 DNA 可以或不整合 (共价连接) 到构成细胞的基因组的染色体 DNA 中。例如，在原核生物和酵母中，外源 DNA 可以被维持在游离的元件，例如质粒上。对于真核细胞，稳定转化的细胞是其中外源 DNA 已经整合到染色体中的细胞，从而外源 DNA 通过染色体复制被子代细胞继承。通过真核细胞建立细胞系或克隆的能力来证明这种稳定性，所述细胞系或克隆包括含外源 DNA 的子代细胞群体。

原核生物包括革兰氏阴性和阳性有机体，例如，*E. coli* 和 *B. subtilis*。高等真核生物包括从动物细胞建立的组织培养细胞系，是非哺乳动物来源的，例如，昆虫细胞和鸟类，和哺乳动物来源的，例如，人类、灵长类和啮齿动物。

原核的宿主-载体系统包括用于许多不同物种的各种载体。如在此使用的,一般地使用 *E. coli* 和它的载体来包括用于其他原核生物的同载体。用于扩增 DNA 的代表性载体是 pBR322 或它的许多衍生物。可用于表达 GDF8、和/或 GDF8 肽的载体包括但不限于,含有 lac 启动子 (pUC 系列); trp 启动子 (pBR322-trp); lpp 启动子 (pIN-系列); lambda-pP 或 pR 启动子 (pOTS); 或杂交启动子例如 ptac (pDR540) 的那些。参见 Brosius *et al.*, "Expression Vectors Employing Lambda-, trp-, lac-, and lpp-derived Promoters", in Rodriguez and Denhardt (eds.) *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, 1988, Butterworth, Boston, pp. 205-236。

酵母,以及高等真核组织培养细胞是重组生产发明的 GDF8 肽、和/或抗 GDF8 抗体和/或这些抗体的片断的优选的宿主。尽管可以使用任何高等真核组织培养细胞系,包括昆虫杆状病毒表达系统,哺乳动物细胞是优选的。这种细胞的转化或转染和增殖已经成为常规的程序。有用细胞系的实例包括 HeLa 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系、婴儿大鼠肾 (BRK) 细胞系、昆虫细胞系、鸟细胞系和猴 (COS) 细胞系。

用于这种细胞系的表达载体通常包括,例如,复制起点、启动子、翻译起始位点、RNA 剪接位点 (如果使用基因组 DNA)、多聚腺苷酸位点和转录终止位点。这些载体通常还含有选择基因或扩增基因。适合的表达载体可以是质粒、病毒或逆转录病毒,携带例如来自这种来源,如腺病毒、SV40、细小病毒、牛痘病毒或巨细胞病毒的启动子。适合的表达载体的代表性实例包括 pCR[®] 3.1、pCDNA1、pCD [Okayama *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 5:1136 (1985)]、pMC1 neo Poly-A [Thomas *et al.*, *Cell* 51:503 (1987)]、pUC19、pREP8、pSVSPORT 和其衍生物,和杆状病毒载体,例如 pAC 373 或 pAC 610。

一般使用的原核表达控制序列包括启动子,包括来源于 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统 [Chang *et al.*, *Nature*, 198:1056 (1977)]、色氨酸 (trp) 启动子系统 [Goeddel *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 8:4057 (1980)]、lambda P_L 启动子系统 [Shimatake *et al.*, *Nature*, 292:128 (1981)] 和 tac 启动子 [De Boer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 292:128 (1983)] 的那些。含有这种控制序列的许多表达载体是本领域已知的和商业上可获

得的。

“可操作连接”是指元件的排列，其中如此描述的成分被配置以进行它们的普通功能。因而，与编码序列可操作连接的控制元件能够影响编码序列的表达。所述控制元件不必是与编码序列连续的，只要它们起作用来指导编码序列的表达。因而，例如，非翻译但转录的插入序列可以位于启动子和编码序列之间，而启动子仍被认为是与编码序列“可操作连接的”。

本发明还包括与发明的 GDF8 肽特异性结合的多克隆和单克隆的 (mAb) 抗体。如在此使用的，术语“抗体”是指免疫球蛋白和/或其片段。天然发生的免疫球蛋白由一种或多种基本上由免疫球蛋白基因编码的多肽组成。公认的免疫球蛋白基因包括 kappa、lambda、 α 、gamma、delta、epsilon 和 mu 恒定区基因，以及无数的免疫球蛋白可变区基因。根据本发明的抗体还涵盖抗体片段，即，抗原结合片段，例如，Fv、Fab 和 F(ab')₂，工程化的单链结合蛋白（例如，Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 5879-5883 (1988) 和 Bird *et al.*, *Science*, 242, 423-426 (1988)，据此通过引用完全地合并在此），以及双功能杂交抗体（例如，Lanzavecchia *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 17, 105 (1987)）。[一般地，参见，Hood *et al.*, *Immunology*, Benjamin, N.Y., 2nd ed. (1984)，Harlow and Lane, *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 和 Hunkapiller and Hood, *Nature*, 323, 15-16 (1986)，它们的所有内容通过引用合并在此。]

例如，使用标准方法从用发明的 GDF8 肽免疫的动物产生的血清可以直接使用，或 IgG 部分可以使用标准方法从血清分离，例如血浆去除术或用 IgG 特异性吸附剂吸附层析，特异性吸附剂例如固定化的蛋白 A 或蛋白 G。做为选择，可以制备单克隆抗体，任选的，来自这种 mAbs 的抗原结合片段或重组结合蛋白。这种 MAbs 或其片段任选的可以通过本领域已知的方法进行人源化。

通过公知的技术来产生杂交瘤，所述杂交瘤产生选择性结合本发明的 GDF8 肽的 mAbs。通常，该过程包括永生细胞系与产生期望抗体的 B-淋巴细胞融合。做为选择，可以使用产生永生抗体生产细胞系的非融合技术，例如，病毒诱导的转化[Casali *et al.*, *Science* 234:476 (1986)]。永生细胞系通常是转化了的哺乳动物细胞，特别是啮齿动

物、牛和人类来源的骨髓瘤细胞。最经常地，为了方便和可用性起见，使用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。

从注射了抗原的哺乳动物获得抗体生产淋巴细胞的技术是公知的。一般地，如果采用的是人类来源的细胞，使用外周血淋巴细胞（PBL），或使用来自非人类哺乳动物来源的脾脏或淋巴结细胞。用重复剂量的纯化抗原注射宿主动物（人类细胞在体外致敏），在收获细胞用于与永生细胞系融合之前，允许动物产生期望的抗体生产细胞。融合的技术也是本领域公知的，一般地，包括将细胞与融合试剂，例如聚乙二醇混合。

通过标准程序选择杂交瘤，例如 HAT（次黄嘌呤 - 氨基蝶呤 - 胸腺嘧啶核苷）选择。使用标准的免疫测定，例如 Western 印迹、ELISA（酶联免疫吸附测定）、RIA（放射性免疫测定）等等，选择分泌期望的抗体的那些杂交瘤。使用标准的蛋白纯化技术从培养基回收抗体 [Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays* (Elsevier, Amsterdam, 1985)]。

可以获得许多参考文献来提供使用上述技术的指导 [Kohler *et al.*, *Hybridoma Techniques* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980); Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays* (Elsevier, Amsterdam, 1985); Campbell, *Monoclonal Antibody Technology* (Elsevier, Amsterdam, 1984); Hurrell, *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications* (CRC Press, Boca Raton, FL, 1982)]。也可以使用公知的噬菌体文库系统来产生单克隆抗体。参见，例如，Huse, *et al.*, *Science* 246:1275(1989); Ward, *et al.*, *Nature*, 341:544 (1989)。

可以使用如此产生的抗体，无论是多克隆的或单克隆的，例如，以通过公知方法与固相支持物结合的固定化形式，来通过免疫亲和层析纯化 GDF8 肽。

也可以使用针对 GDF8 肽的抗体，未标记的或通过标准方法标记的，作为进行免疫测定来检测或定量 GDF8 的基础。使用的特定标记将取决于免疫测定的种类。可以使用的标记物的实例包括，但不限于，放射性标记、例如 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{14}C ；荧光标记物，例如荧光素和其衍生物，罗丹明和其衍生物，丹磺酰和伞形酮；化学发光剂，例如荧

光素和 2,3-二氢酞嗪二酮(2,3 - dihydrophthalazinediones); 和酶, 例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、溶菌酶和葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢酶。

可以通过已知方法用这种标记物来标记抗体。例如, 可以使用偶联剂, 例如醛、碳二亚胺、二马来酰亚胺、imidates、琥珀酰亚胺、bisdiazotized benzadine 等等, 来标记带有荧光、化学发光或酶标记物的抗体。涉及的一般方法是本领域公知的, 在例如 *Immunoassay: A Practical Guide*, 1987, Chan (Ed.), Academic Press, Inc., Orlando, FL 中描述。例如, 可以对受体的纯化期间获得的部分进行这种免疫测定。

本发明的抗体也可以用于鉴定表达克隆系统中表达 GDF8 相关多肽的特定 cDNA 克隆。也可以使用特异于受体的配体结合位点的中和抗体作为拮抗物(抑制物)来阻断或下调 GDF8 功能。可以通过常规实验容易地鉴定这样的中和抗体, 如以下提供的实施例所例示的。

可以使用完全抗体分子, 或公知的抗原结合片段, 例如 Fab、Fc、F(ab)₂ 和 Fv 片段实现对 GDF8 活性的拮抗。这种片段的定义可以在上文的描述中, 或在 Klein, *Immunology* (John Wiley, New York, 1982); Parham, Chapter 14, in Weir, ed. *Immunochemistry*, 4th Ed. (Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 1986) 中找到。也已经描述了抗体片段的用途和产生, 例如: Fab 片段[Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays* (Elsevier, Amsterdam, 1985)], Fv 片段[Hochman *et al.*, *Biochemistry* 12:1130 (1973); Sharon *et al.*, *Biochemistry* 15:1591 (1976); Ehrlich *et al.*, 美国专利 No. 4,355,023]和抗体半分子(Auditore-Hargreaves, 美国专利 No. 4,470,925)。例如, 由 Moore 等(美国专利 No. 4,642,334)和由 Plückthun [*Bio/Technology* 9:545 (1991)], 已经进一步描述了根据已知的抗体重链和轻链可变区序列制造重组 Fv 片段的方法。做为选择, 它们可以通过标准方法化学地合成。

本发明还涵盖多克隆的和单克隆的抗独特型抗体, 其是使用上述抗体作为抗原产生的。这些抗体是有用的, 因为它们可能模拟了配体的结构。

肽合成

由于发明的 GDF8 肽, 例如下文中例示的 DJ5 肽是相对短的(例如, 优选的 50 个氨基酸残基或更少), 它们可以通过本领域已知的肽

合成方法来制备。使用固相、液相或肽缩合技术、或它们的任意组合的公知技术制备的合成肽或多肽可以包括天然的和非天然的氨基酸。用于肽合成的氨基酸可以是根据 Merrifield [*J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)] 的原始固相程序的标准保护、中和、偶联和洗涤方案的、标准的 Boc (N_{α} -氨基保护的 N_{α} -t-丁氧基羰基) 氨基酸树脂, 或是 Carpino 和 Han [*J. Org. Chem.*, 37:3403-3409 (1972)] 首先描述的碱不稳定 N_{α} -氨基保护的 9-芴基甲氧基羰基 (Fmoc) 氨基酸。Fmoc 和 Boc N_{α} -氨基保护的氨基酸都可以从 Fluka、Bachem、Advanced Chemtech、Sigma、Cambridge Research Biochemical、Bachem、或 Peninsula Labs 或本领域技术人员熟知的其他化学药品公司获得。此外, 本发明的方法也可以运用本领域技术人员熟知的其他 N_{α} -保护基团。固相肽合成可以通过本领域技术人员熟知的和在例如 Stewart and Young, **SOLID PHASE SYNTHESIS**, Second Edition, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984); Fields and Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* 35:161-214 (1990) 中提供的技术来实现, 或使用自动化合成仪, 例如由 ABS [Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 USA] 出售的自动化合成仪来实现。因而, 本发明的 GDF8 肽可以包含 D-氨基酸、D-和 L-氨基酸的组合、和各种“设计师”氨基酸 (例如, *beta*-甲基氨基酸、 C_{α} -甲基氨基酸, 和 N_{α} -甲基氨基酸, 等等), 来赋予特殊的性质。合成性氨基酸包括用于赖氨酸的鸟氨酸、用于苯丙氨酸的氟苯丙氨酸、和用于亮氨酸或异亮氨酸的正亮氨酸。另外, 通过在特定的偶联步骤指定特定的氨基酸, 可以产生 α 螺旋、 β 转角、 β 折叠、 γ 转角和环肽。

抗 GDF8 抗血清

本发明的方法包括针对多克隆抗 GDF8 抗血清筛选 GDF8 肽的过程。该过程鉴定了某些抗 GDF8 抗体以高度特异性方式结合的表位。通过用前体 GDF8 免疫动物获得抗 GDF8 抗血清。修饰前体 GDF8 基因以提供优化了表达和免疫原性的形式。例如, 优化 GDF8 激素原的天然 DNA 序列 (SEQ ID NO: 2) 用于在哺乳动物和病毒表达系统中表达。此外, 进行改变以避免病毒宿主停止机制的消极影响。一般地, 病毒宿主停止机制包括转录控制、RNA 稳定性 (剪接) 等等。这些改变使得核酸更不像宿主而更象病毒。

进一步的，优选的设计 DNA 序列尽可能地异于哺乳动物核酸序列。例如，使用酵母偏爱的密码子将前体 GDF8 的氨基酸序列反向翻译。检查产生的序列中保持了与人类 GDF8 核酸序列的同源性的密码子。可能时，用编码相同氨基酸的次最优的酵母密码子替换这些密码子。

产生的优化基因 (SEQ ID NO: 3) 可以在任何适合的宿主系统中表达，包括，例如，本领域已知的昆虫、哺乳动物、细菌、病毒和酵母表达系统。例如，昆虫细胞表达系统，如杆状病毒系统，是本领域公知的，由例如 Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) 描述了。用于杆状病毒/昆虫细胞表达系统的材料和方法是商业上可获得的，以试剂盒形式来自特别是 Invitrogen, San Diego Calif. (“MaxBac” 试剂盒)。类似地，细菌和哺乳动物细胞表达系统是本领域公知的，由例如 Sambrook 等描述了 (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL; DNA Cloning, Vols. I and II ; D. N. Glover ed.)。酵母表达系统也是本领域已知的，由例如 YEAST GENETIC ENGINEERING (Barr *et al.*, eds., 1989) Butterworths, London 描述了。许多其他这样的表达系统是本领域已知的，可以试剂盒的形式商业上获得。如在此例示的，修饰的前体 GDF8 基因 (SEQ ID NO: 3) 在 Flp - In™ CHO 表达系统 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中表达，在以下的实施例 1 中更详细地描述。

前体 GDF8 蛋白以及成熟 GDF8 蛋白的肽可以掺入任何蛋白或肽兼容性疫苗组合物。这种疫苗组合物是本领域公知的，包括，例如，生理学相容的缓冲液和盐水等等，以及佐剂，如在下文中更详细描述。使用包括前体 GDF8 蛋白的疫苗组合物来引发抗血清，用于筛选和鉴定抗 GDF8 抗体的特异性中和表位。

如在此例示的，由包含 SEQ ID NO: 3 的载体表达的纯化的前体 GDF8 蛋白，在包括乳化入弗氏完全佐剂 (CFA) 的 1g 前体 GDF8 蛋白的疫苗组合物中，注射到山羊体内。疫苗组合物优选的皮下地 (SC) 注射到山羊的皮肤之下。随后的强化免疫是优选的。这可以以适合的其他间隔用相同或降低剂量的蛋白施用，例如，在初次注射后以 2 - 5 周的间隔。

根据需要，从初次注射后约两周后开始，但优选的在更长的时间

之后开始，例如，三到十五周，或更长，从免疫的动物收集血清。然后通过常规的免疫球蛋白纯化步骤，例如蛋白 A - Sepharose、蛋白 G - 琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或用适合的配体亲和层析，优选地将收集的血清纯化和/或分级。如在此例示的，在蛋白 G 琼脂糖柱上将血清的 IgG 部分进一步分级。

然后可获得抗 GDF8 抗血清 IgG 部分，用于针对成熟 GDF8 的肽范围进行筛选，在下文中实施例 3 更详细地描述。

GDF8 结合表位

使适合的抗 GDF8 单克隆或多克隆抗体与 GDF8 蛋白接触，持续足够抗体选择性结合蛋白的时间。此后，GDF8 生物测定证实，抗体中和了基本上所有的 GDF8 蛋白活性。虽然为此目的可以采用任何 GDF8 生物测定，如下文的实施例 3 中例示的，根据 Thies 等，2001，(*Growth Factors* 18, 251) 的体外转录活性分析是优选的。

一般地，根据本发明作为抗原或结合表位有用的 GDF8 肽包括 GDF8 (SEQ ID NO: 1) 的约残基 312 到约残基 361。特别地，根据本发明的肽包括 GDF8 (SEQ ID NO: 1) 的约残基 320 到约残基 350。所述肽优选的包括 GDF8 (SEQ ID NO: 1) 的约残基 327 到约残基 346。

技术人员将理解，可以容易地修改发明的 GDF8 肽，来包括至少一个保守性氨基酸替换，在任何位置。优选的，这种肽特异性结合大鼠单克隆抗体 788，如下文例示的。这种保守性替换可以包括，例如，在残基 328、329 和 335 的改变，和它们的组合，其中氨基酸残基 328 是 His、Leu、Asn 或 Val；氨基酸残基 329 是 Lys 或 Leu；和氨基酸残基 335 是 Ser 或 Pro 或 Thr。如附图 2 所说明的，在物种之间，在 GDF8 蛋白序列内，前体 GDF8 残基 328、329 和 335 有不同，然而成熟的 GDF8 保持了功能。

附图 1 说明了在 GDF8 的前体蛋白的范围中，(形成成熟的蛋白的) GDF8 活性区的图谱。在 GDF8 活性区的图谱之上是七个重叠肽的位置。设计这些重叠肽来提供鉴定抗体结合表位或 GDF8 表位的靶点。标记为 DJ5 的肽是用例示的山羊抗 GDF8 抗血清的 IgG 部分筛选鉴定出的，是对于例示的抗血清的唯一重要的 GDF8 结合表位。这个肽具有相应于前体 GDF8 (SEQ ID NO: 1) 的残基 327 到残基 346 的序列

(SEQ ID NO: 8)。

GDF8 肽疫苗组合物

优选的将如上所述的 GDF8 肽配制成疫苗组合物。可以采用这些疫苗组合物来免疫动物，以引发高特异性抗 GDF8 免疫反应。免疫的结果将是在免疫的动物中下调 GDF8 的功能。这种疫苗组合物是本领域公知的，包括，例如，生理学相容的缓冲液、防腐剂 and 盐水等等，以及佐剂。

“佐剂”是非特异性提高针对特定抗原的免疫反应的试剂，因而降低了在任何给定疫苗中所需的抗原数量、和/或为产生针对目标抗原的充分免疫反应所需的注射次数。用于动物疫苗接种的适合的佐剂包括，但不限于，佐剂 65（含有花生油、二缩甘露醇一油酸酯和单硬脂酸铝）；弗氏完全或不完全佐剂；矿物质凝胶，例如氢氧化铝、磷酸铝和明矾；表面活性剂，例如十六烷基胺、十八胺、溶血卵磷脂、溴化二甲基双十八烷基铵、N,N-双十八烷基-N',N'-二(2-羟甲基)丙二胺、甲氧基十六烷基甘油和复合多元醇(pluronic polyols)；聚阴离子，例如吡喃、葡聚糖硫酸酯、poly IC、聚丙烯酸和卡波普；肽，例如胞壁酰二肽、二甲基甘氨酸和特夫素(tuftsins)；和油乳剂。也可以在掺入脂质体或其他微载体(microcarriers)中之后施用蛋白或肽。例如，由 P. Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, 3rd Edition, 1987, Elsevier, New York 系列地公开了关于佐剂和免疫测定的各个方面的信息，通过引用合并在此。

疫苗组合物包括足够数量的期望的免疫原，例如发明的 GDF8 肽，来引发免疫反应。相对于动物的质量而言，施用的数量可以从约 0.0001g/kg 到约 1.0g/kg。可以容易地采用任何适合的脊椎动物来获得多克隆的抗血清。优选的，动物是哺乳动物，包括但不限于，啮齿动物，例如小鼠、大鼠、兔，马，犬，猫，牛，羊，例如，山羊和绵羊，灵长类，例如，猴，巨猿和人类，等等。

通过任何标准的途径容易地施用疫苗组合物，包括静脉内、肌内、皮下、腹膜内、卵内（特别对于家禽）、和/或口服，对于鱼类物种，施用疫苗组合物或免疫原性组合物的方法包括上述的，以及将鱼类浸入包含抗原性浓度的肽的水中，当鱼类暂时与水分离时喷洒抗原性浓

度的肽，等等。技术人员将理解，优选的根据每种类型的接受者动物和给药途径适当地配制疫苗组合物。

合适的动物受试者可以包括那些野生的动物、家畜（例如，为了肉、奶、黄油、蛋、毛皮、皮革、羽毛和/或绒毛饲养的）、役畜、研究动物、陪伴动物，以及为/在动物园、野生栖息地和/或马戏团饲养的那些动物。在特定的实施方式中，动物是巨猿，例如大猩猩，或是人类。

在一个优选的实施方式中，所述动物是“食物生产”动物，免疫的结果是相对于未免疫的动物，在动物体重、特别是肌肉块上的增加。对于本发明的目的，术语“食物生产”动物应理解为包括所有为了人类和/或其他动物消费、或为了产生消费品例如蛋或奶而培育的动物。这种动物的非限制性列表包括禽类（例如，鸡、火鸡、鸭、鹅、鸵鸟），牛（例如，菜牛/犊牛、奶牛、种牛、水牛），猪（例如，肉猪或猪），羊（例如，山羊或绵羊），马类（例如，马）以及水族动物，包括贝类和鱼类，例如鳟鱼或鲑鱼，和其他用于人类消费而饲养或捕捞的物种。

对本发明来说，术语“鱼类”应理解为包括而限于鱼类的 *Teleosti* 类群，即，硬骨鱼。*Salmoniformes*（鲑）目（包括 *Salmonidae* 科）和 *Perciformes*（鲈形）目（包括 *Centrarchidae* 科）都包含在 *Teleosti* 类群中。

可能的鱼类接受者的实例包括 *Salmonidae* 科、*Serranidae* 科、*Sparidae* 科、*Cichlidae* 科、*Centrarchidae* 科、三横带髯鲷（three-Line Grunt, *Parapristipoma trilineatum*），和 Blue-Eyed Plecostomus (*Plecostomus spp*)。

Salmonidae (鲑科) 科

| 分类名 | 常用名 |
|-------------------------------|--------------------------------|
| <i>Coregonus clupeaformis</i> | Lake whitefish (欧白鲑) |
| <i>Coregonus hoyi</i> | Bloater (鲱鱼) |
| <i>Oncorhynchus keta</i> | Chum salmon (大麻哈鱼) |
| <i>Oncorhynchus gorbuscha</i> | Pink salmon (细鳞大麻哈鱼) |
| <i>Oncorhynchus kisutch</i> | Coho salmon (silver salmon) (银 |

| | |
|-------------------------------------|---|
| <i>Oncorhynchus masou</i> | 鲑 (银大麻哈鱼)) cherry salmon (masou salmon) (马 苏大麻哈鱼 (马苏鲑鱼)) |
| <i>Oncorhynchus nerka</i> | Sockeye salmon (红大麻哈鱼) |
| <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> | (chinook salmon) (大鳞大麻哈 鱼) |
| <i>Prosopium cylindraceum</i> | Round whitefish (柱白鲑) |
| <i>Oncorhynchus clarki</i> | Cutthroat trout (美洲鲑) |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Rainbow trout (虹鳟) |
| <i>Salmo salar</i> | Atlantic salmon (大西洋鲑) |
| <i>Salmo trutta</i> | Brown trout (褐鳟) |
| <i>Salmo trutta X S. fontinalis</i> | Tiger hybrid-trout (虎杂交鳟鱼) |
| <i>Salvelinus alpinus</i> | Arctic charr (北极嘉鱼) |
| <i>Salvelinus confluentus</i> | Bull trout (海鳟) |
| <i>Salvelinus fontinalis</i> | Brook trout (河鳟) |
| <i>Salvelinus leucomaenis</i> | Japanese charr (white spotted charr) (日本嘉鱼 (白斑嘉鱼)) |
| <i>Salvelinus malma</i> | Dolly varden (Miyabe charr) |
| <i>Salvelinus namaycush</i> | Lake trout (湖鳟) |
| <i>Thymallus thymallus</i> | Grayling (河鳟) |

Serranidae 科的某些成员

| 分类名 | 常用名 |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Centropristis ocyurus</i> | Bank sea bass (岸海鲈) |
| <i>Centropristis philadelphicus</i> | Rock sea bass (岩海鲈) |
| <i>Centropristis striata</i> | Black sea bass (黑海鲈) |
| <i>Diplectrum bivittatum</i> | Dwarf sandperch |
| <i>Diplectrum formosum</i> | Sand perch (黄尾石首鱼) |
| <i>Epinephelus flavolimbatus</i> | Yellowedge grouper (黄缘石斑 鱼) |
| <i>Epinephelus morio</i> | Red grouper (红石斑鱼) |
| <i>Serranus phoebe</i> | Tattler |

Serranus tortugarum

Chalk bass

Serranidae 科的某些成员

| 分类名 | 常用名 |
|------------------------------------|---------------------------|
| <i>Archosargus probatocephalus</i> | Sheepshead (红鲈) |
| <i>Archosargus rhomboidalis</i> | Sea bream (海鲷) |
| <i>Calamus penna</i> | Sheepshead porgy (羊头原鲷) |
| <i>Lagodon rhomboides</i> | Pinfish |
| <i>Pagrus Major</i> | Red Sea bream (红海鲷) |
| <i>Sparus aurata</i> | Gilthead Sea bream (金头海鲷) |
| <i>Stenotomus chrysops</i> | Scup (尖口鲷) |

Cichlidae 科的某些成员

| 分类名 | 常用名 |
|----------------------------------|------------------------------------|
| <i>Aequidens latifrons</i> | Blue acara |
| <i>Cichlisoma nigrofasciatum</i> | Congo cichlid (刚果丽鱼) |
| <i>Crenichichla sp.</i> | Pike cichlid (尖头丽鱼) |
| <i>Pterophyllum scalare</i> | Angel fish (神仙鱼) |
| <i>Tilapia mossambica</i> | Mozambique mouth breeder (莫桑比克口育鱼) |
| <i>Oreochromis sp.</i> | Tilapia |
| <i>Sarotherodon aurea</i> | Golden Tilapia |

Centrarchidae 科的某些成员

| 分类名 | 常用名 |
|--------------------------------|---|
| <i>Ambloplites rupestris</i> | Rock bass (岩鲈) |
| <i>Centrarchus macropterus</i> | Flier |
| <i>Elassoma evergladei</i> | Everglades pigmy sunfish (沼泽地矮小太阳鱼) |
| <i>Elassoma okefenokee</i> | Okefenokee pigmy sunfish (奥克弗诺基沼泽矮小太阳鱼) |

| | |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Elassoma zonatum</i> | Banded pigmy sunfish(条纹矮小太阳鱼) |
| <i>Enneacanthus gloriosus</i> | Bluespotted sunfish (蓝点太阳鱼) |
| <i>Enneacanthus obesus</i> | Banded sunfish (条纹太阳鱼) |
| <i>Lepomis auritus</i> | Redbreast sunfish (红胸太阳鱼) |
| <i>Lepomis cyanellus</i> | Green sunfish (蓝绿鳞鳃太阳鱼) |
| <i>Lepomis cyanellus X L. gibbous</i> | Green x pumpkinseed |
| <i>Lepomis gibbous</i> | Pumpkinseed |
| <i>Lepomis gulosus</i> | Warmouth |
| <i>Lepomis humilis</i> | Orange-spotted sunfish (橙点太阳鱼) |
| <i>Lepomis macrochirus</i> | Bluegill (大翻车鱼) |
| <i>Lepomis megalotis</i> | Longear sunfish (长耳太阳鱼) |
| <i>Micropterus coosae</i> | Shoal bass (滩鲈) |
| <i>Micropterus dolomieu</i> | Smallmouth bass (小嘴鲈) |
| <i>Micropterus punctulatus</i> | Spotted bass (斑鲈) |
| <i>Micropterus salmoides</i> | Largemouth bass (黑鲈) |
| <i>Pomoxis annularis</i> | White crappie (白色大鳃鲈鱼) |
| <i>Pomoxis nigromaculatus</i> | Black crappie (黑色大鳃鲈鱼) |

在进一步优选的实施方式中，动物是陪伴动物或人类，施用疫苗以提供长期的 GDF8 下调作用，用于任何对这种 GDF8 下调作用有反应的兽医学或医学目的。对本发明来说，术语“陪伴”动物应理解为包括所有动物—马类（马）、猫（猫科的）、狗（犬）、啮齿动物，（包括小鼠、大鼠、豚鼠），兔类，和禽类，例如鸽子、鸚鵡等等。

接受这种疫苗接种或抗体的鸟类可以与商业的或非商业的鸟类饲养有关。这包括，例如，*Anatidae*（鸭科），如天鹅，*Columbidae*（鸠鸽科），例如，鸽和原鸽，例如家鸽，*Phasianidae*（雉科），例如，鸚鵡和松鸡，*Thesienidae*，*Psittacines*，例如，长尾鸚鵡、金刚鸚鵡和鸚鵡，例如，由宠物或收藏市场饲养的，和 *Ratite*（平胸类鸟）科的成员。

在另一个优选的实施方式中，免疫任何上述的动物（优选的非人

类)来获得与发明的肽特异性结合的抗 GDF8 抗体,回收引发的抗体用于化验、和/或用于兽医或人类药物,例如,来提供 GDF8 的下调作用,用于对这种 GDF8 下调作用有反应的任何兽医学或医学目的。

参考以下非限制性实施例可以更好地理解本发明,所述实施例作为本发明的示范而提供。给出以下实施例是为了更完整地说明本发明的实施方式,决不能认为是限制本发明的宽广的范围。

实施例

实施例 1

材料&方法

A. 前体 GDF8 (GDF8 激素原) 的表达和纯化

优化前体 GDF8 或激素原的天然 DNA 序列 (SEQ ID NO: 2) 用于在哺乳动物和病毒表达系统中表达。为了避免病毒宿主停止(shutoff)机制的消极影响,设计 DNA 序列尽可能地异于哺乳动物核酸序列。为了实现这一点,使用酵母偏爱的密码子将 GDF8 激素原的氨基酸序列反向翻译。检查产生的序列中保持了与人类 GDF8 核酸序列的同源性的密码子。可能时,用编码相同氨基酸的次最优的酵母密码子替换这些密码子。商业上合成产生的核酸分子 (SEQ ID NO: 3),用于掺入适合的表达载体。

使用 Flp-In™ CHO 表达系统 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 来表达优化的 GDF8 激素原。简要地,通过将编码修饰的 GDF8 激素原的基因插入到质粒 pCMVtag4B (Stratagene, San Diego, CA.) 中来构建含有 C-末端 FLAG® (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) 表位融合物的 GDF8 激素原构建体。FLAG®融合标记便于在抗 FLAG®凝胶柱上分离 FLAG®融合蛋白。然后将含有修饰的 GDF8 激素原 - FLAG®基因的 PCR DNA 片段克隆到质粒表达载体 pcDNA5/FRT (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中。通过用含有 GDF8-FLAG®基因的 Flp-In™表达载体和 Flp 重组酶表达质粒 POG44 共转染 Flp-In™ CHO 细胞系,来实现表达 GDF8 激素原 - FLAG®融合蛋白的 Flp-In™ CHO 细胞系的产生。Flp 重组酶通过位点特异性 DNA 重组来介导 Flp-In 表达盒插入到基因组中的整合 FRT 位点。施用匀霉素 B 选择来获得表达和分泌含有 FLAG®表位的 GDF8 激素原的稳定细胞系。

使用标准技术将表达含有 FLAG®标记的 GDF8 激素原的稳定 CHO 细胞系在无血清培养基中进行悬浮培养。使用 WAVE 生物反应器系统 (WAVE Biotech LLC, Bridgewater, NJ) 产生含有分泌的 GDF8 激素原的条件培养基。通过使用抗 FLAG® M2 亲和性凝胶 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) 的亲和层析实现 FLAG®标记的 GDF8 激素原的纯化。

B. DJ5 特异性抗体纯化

通过亲和柱层析来纯化 DJ5 (SEQ ID NO: 8; 参见表 2, 下文) 特异性抗体部分。通过将 10 mg DJ5 合成肽偶联到 0.8 g 溴化氰激活的琼脂糖 4B (Sigma Genosys, Woodlands, TX) 来制备亲和柱。用 PBS 洗涤和平衡柱。将约 11 ml 山羊 IgG 部分 (10 mg/ml) 添加到亲和柱, 用 25 ml PBS 洗涤。收集 1.0 ml 的级分, 监视 280 nm 处的吸光率。用约 10 ml 的 0.2 M 甘氨酸 (pH 1.85) 洗脱结合的材料。收集 1.0 ml 的级分, 用 0.25 ml 0.5 M 磷酸钠、0.75 M NaCl pH 7.4 中和。针对约 25 μ l 等分量的未结合级分 1-10 和结合级分 25-35 分析对 DJ5 肽的 ELISA 反应性。发现未结合的级分对于 DJ5 反应性是阴性的。结合级分展现出对 DJ5 肽反应性的强峰值。将未结合级分 1-11 和结合级分 26-34 集中。浓缩集中的样品, 如下指示的用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 交换它们的缓冲液。通过 OD 280 法 (CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, 2.7.3, John Wiley & Sons, Inc.) 测定样品浓度。将未结合样品调节到 10 mg/ml, 将结合的样品调节到 1 mg/ml, 用于随后使用。

实施例 2

山羊抗 GDF8 多克隆 IgG 血清

通过以下方法从免疫的山羊获得山羊抗前体 GDF8 IgG。

A. 山羊的免疫

用纯化的重组 GDF8 激素原 (如实施例 1 的描述获得的, 如上) 免疫 Saanen (产奶) 山羊 (大约 2 岁雄性), 如下。将半毫克蛋白乳化在弗氏完全佐剂 (CFA) 中, 皮下 (SC) 注射到山羊的皮肤下。随后在三、六和十周 SC 施用的强化免疫含有乳化于弗氏不完全佐剂

(IFA) 中的 0.3mg 蛋白。用针筒和针从颈静脉收集血液，用真空瓶子和管采取血液。将血液收集在含抗凝剂的瓶中，在 2500RPM 离心 20 分钟除去红细胞。将血浆重钙化以产生血清。首次免疫 15 周后收集的血清样品用于进一步的分析。

B. 山羊多克隆 IgG 的收集和纯化

15 周后从山羊收集血清，从该血清中纯化 IgG 部分，如下。根据厂家的方案 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) 在蛋白 G 琼脂糖柱上纯化山羊血清的 IgG 部分。将洗脱的级分收集、浓缩、利用 Centriprep 离心过滤器 (Centriprep YM-10, Millipore Corporation, Billerica, MA) 与磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 进行缓冲液交换。通过 OD 280 法 (CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Id.) 测定样品浓度，调节到 10mg/ml。

实施例 3

山羊抗血清的表征

上述实施例 2 提供的山羊抗血清被称为 PGA。预期的是，PGA IgG 部分含有针对 GDF8 激素原分子上各种表位的抗体。通过体外转录活性分析来表征 PGA 抗血清，如下。用来定量测量 GDF8 生物中和作用的体外转录活性分析基本上是 Thies 等 (*Growth Factors* 18, 251 (2001)) 的。九十六孔组织培养处理的光度计 ViewPlate™ 分析平板 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA) 用 1.0×10^5 细胞/孔的 A204 横纹肌肉瘤细胞 (ATCC HTB-82) 接种，在 37℃、5% CO₂ 湿润的室中孵化。完全 A204 培养基由 McCoy's 5A 培养基、10% 胎牛血清、2% L-谷氨酰胺和 1% Penn/Strep 组成。在达到大于 80% 的汇合时，用质粒 pDPC4-荧光素酶和 HCMV IE-lacZ 的混合物使用 FUGENE 转染试剂的厂家 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) 推荐的方案瞬时地转染细胞，在 37℃、5% CO₂、湿润室中孵化 16 小时。质粒 pDPC4-荧光素酶含有 CAGA 盒的四个拷贝，所述 CAGA 盒来源于人类纤溶酶原激活物抑制物 (PAI-1)，其赋予 GDF8 对异源启动子报告构建体的反应性。

质粒 HCMV IE-lacZ 含有处在组成型人类巨细胞病毒即时早期启

动子控制下的 β -半乳糖苷酶基因。添加该基因作为对照来标准化转染效率。然后用 100ng/孔的 GDF8 蛋白 (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN) 处理细胞, 在 37°C、5% CO₂、湿润室中孵化额外的 16 小时。使用 Dual-Light Luciferase Assay (Tropix, Applied Biosystems, Foster City, CA) 定量处理的细胞中的荧光素酶和 β -半乳糖苷酶。

每个样品进行两份 (2 孔)。每个孔的信号计算为荧光素酶信号除以 β -半乳糖苷酶信号乘以 100。样品信号计算为两个孔的平均值。

为了测试抗体样品的生物中和作用活性, 在处理细胞之前用各种浓度的纯化 IgG 部分与 GDF8 蛋白孵化 (4°C 大约 16 小时)。抑制百分比计算为 $100 - (100 \times \text{样品信号}) / (\text{单有 GDF8 的信号} - \text{不添加 GDF8 的信号})$ 。体外转录活性分析的结果在表 1 中概述, 如下。

表 1
山羊血清 PGA 的 GDF8 中和滴度

| <u>样品 ($\mu\text{g IgG}$)</u> | <u>GDF8 活性的抑制 %</u> |
|--|---------------------|
| 山羊 - 正常 (250) | 0 |
| 山羊 - PGA (250) | 95 |
| 山羊 - PGA (125) | 86 |
| 山羊 - PGA (63) | 62 |
| 山羊 - PGA (31) | 22 |
| 山羊 - PGA (16) | 3 |

中和作用分析证实了, 收获的山羊血清的 IgG 部分含有能够中和该活性分析中使用的至少 95%GDF8 的抗体。

实施例 4

山羊多克隆抗体定义

GDF8 蛋白的特异性中和表位

为了确定中和免疫反应的特异性, 分析 PGA IgG 部分与一组七个重叠肽 (DJ1-7, 参见表 2 和附图 1) 的反应性, 所述重叠肽横跨活性 GDF8 蛋白的完整编码区。通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测定了山羊 PGA IgG 与每个单独的肽的反应性。基本上如 Protein Detector™

ELISA Kit HRP, ABTS System (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD) 中的描述进行 GDF8 肽 ELISA。在该分析中使用了以下的修改。合成肽 DJ1-7 (参见表 2, 下文) 在我们的指导下由 ProSci, Inc. (Poway, CA) 进行常规合成。用 500 ng 每孔的合成肽, 和 250 ng 每孔的纯化 GDF8 激素原包被平板。初级抗体是来自各种样品的 IgG 部分。次级抗体以 1:2000 的稀释度使用。对于山羊初级抗体样品, 次级抗体是抗山羊 IgG 的兔过氧化物酶标记的抗体。对于大鼠初级抗体样品, 次级抗体是抗大鼠 IgG 的山羊过氧化物酶标记的抗体。用 ELISA 平板读取器在 OD 405 nm 读取 15 分钟。ELISA 反应性计算为 OD 405 每分钟乘以 1000。

表 2

GDF8 活性区肽

| 名称 | 坐标 * | 氨基酸序列 | |
|-----|---------|----------------------|---------------|
| DJ1 | 267-286 | DFGLDCDEHSTESRCCRYPL | SEQ ID NO: 4 |
| DJ2 | 282-301 | CRYPLTVDFEAFGWDWIIAP | SEQ ID NO: 5 |
| DJ3 | 297-316 | WIIAPKRYKANYCSGCECFV | SEQ ID NO: 6 |
| DJ4 | 312-331 | ECEFVFLQKYPHTHLVHQAN | SEQ ID NO: 7 |
| DJ5 | 327-346 | VHQANPRGSAGPCCTPTKMS | SEQ ID NO: 8 |
| DJ6 | 342-361 | PTKMSPINMLYFNGKEQIIY | SEQ ID NO: 9 |
| DJ7 | 357-375 | EQIIYGKIPAMVVDRCGCS | SEQ ID NO: 10 |

* 相对于人类 GDF8 激素原 (Genebank 登记号 NP_005250)

表 3 概述了 ELISA 的结果, 如下。

表 3

PGA IgG (10 mg/ml) 对 GDF8 活性区肽的 ELISA 反应性

| 抗原 | OD 405 / 分钟 X 1000 | | |
|-----------|--------------------|------|------|
| | 1:20 | 1:40 | 1:80 |
| DJ1* | 23 | 10 | 1 |
| DJ2* | 3 | 0 | 0 |
| DJ3* | 0 | 10 | 0 |
| DJ4* | 3 | 0 | 0 |
| DJ5* | 121 | 37 | 27 |
| DJ6* | 3 | 0 | 0 |
| DJ7* | 10 | 1 | 0 |
| proGDF8** | 194 | 196 | 199 |

*肽, **激素原

PGA IgG 部分特异性地与纯化 GDF8 激素原和 DJ5 肽都反应。在 GDF8 活性区肽之中, IgG 部分特异性地和专一地与 DJ5 肽反应。这是强烈的指示, 该血清的中和能力是针对 DJ5 肽定义的表位的。为了确认这个假定, 纯化 PGA IgG 的 DJ5 特异性部分。通过如材料和方法中描述的亲和层析实现这一点。将 PGA 抗体分离成 DJ5 肽结合和不结合部分。分析两种部分对 GDF8 蛋白的中和作用活性。

表 4 中的结果显示, GDF8 中和能力的大部分在于特异性结合 DJ5 肽的抗体。这清楚地证明了, DJ5 肽定义了 GDF8 蛋白的中和表位。

表 4

DJ5 特异性抗体的 GDF8 中和作用活性

| 样品 ($\mu\text{g IgG}$) | GDF8 活性的抑制 % |
|--------------------------|--------------|
| 山羊 - 正常 (250) ** | 7 |
| DJ5 未结合的 IgG (250) | 26 |
| DJ5 结合的 IgG (25) | 90 |

** 从未免疫的山羊血清 (商业上购买的) 纯化的正常山羊 IgG 是阴性对照。

好奇地, 在初步实验中, 当用与钥孔血蓝素缀合的人类 DJ5 抗原注射两只兔子时, 没有获得中和 GDF8 抗体。可在附图 2 中看出, 相应于 DJ5 的氨基酸序列对于兔和人类 GDF8 是相同的, 而山羊 DJ5 的氨基酸序列是不同的。因此, 鉴于以上提供的对于山羊的数据, 兔的初步数据表明, 使用包含与宿主动物 GDF8 的相应区域/部分不同的氨基酸序列的 DJ5 抗原可能是有益的。因而, 在这种情况下, 重组人类 GDF8 激素原在山羊中诱导生物中和抗体的能力可能至少在某种程度上由于这一事实, 即使用的抗原包含了在 GDF8 的 DJ5 区域/部分中由单个氨基酸替换而不同于宿主序列的氨基酸序列 [参见, 附图 2 中的氨基酸残基 333]。更特别的, 如附图 2 所示, 人类序列中 Arg₃₃₃ 被山羊序列中的 Lys₃₃₃ 残基替代。这个单独的保守性氨基酸替换可能构成一种改变, 该改变对于引起蛋白“外源于”山羊免疫监视系统是足够显著的。

实施例 5

GDF8 中和大鼠 mAB 788 定义

GDF8 蛋白的特异性中和表位

报告了大鼠单克隆抗体 788 能中和小鼠 GDF8 生物活性 (R & D Systems Inc., Cat. No. MAB788, Minneapolis, MN)。为了确认这个结果, 我们分析了该单克隆抗体针对 GDF8 蛋白的中和活性。如上述实施例 2 描述的表征该抗体。这个分析的结果在表 5 中概述, 如下。

表 5

单克隆抗体 788 的 GDF8 中和作用滴度

| <u>样品 (μg IgG)</u> | <u>GDF8 活性的抑制 %</u> |
|-------------------------------------|---------------------|
| MAB - 788 (12.5) | 47 |
| MAB - 788 (6.3) | 17 |
| MAB - 788 (3.1) | 7 |
| MAB - 788 (1.8) | 0 |
| MAB - 788 (0.1) | 0 |

表 5 证实了这个抗体能够中和 GDF8 蛋白的活性。为了确定这个中和免疫反应的特异性, 分析大鼠单克隆抗体与一组七个重叠肽 (DJ1-7, 参见表 2 和附图 1) 的反应性, 这些重叠肽横跨活性 GDF8 蛋白的完整编码区。通过 ELISA 分析 (参见材料和方法) 测定了该单克隆抗体与每个单独的肽的反应性。

表 6

大鼠 MAB 788 (10 mg/ml) 对 GDF8 活性区肽的 ELISA 反应性

| <u>抗原</u> | <u>OD 405/分钟 \times 1000</u> | | |
|-----------|---|-------------|-------------|
| | <u>1:20</u> | <u>1:40</u> | <u>1:80</u> |
| DJ1* | 4 | 0 | 0 |
| DJ2* | 0 | 0 | 0 |
| DJ3* | 0 | 0 | 0 |
| DJ4* | 0 | 0 | 0 |
| DJ5* | 133 | 118 | 102 |
| DJ6* | 0 | 0 | 0 |
| DJ7* | 0 | 0 | 0 |
| proGDF8** | 132 | 127 | 132 |

*肽, **蛋白

大鼠单克隆抗体特异性地与纯化 GDF8 激素原和 DJ5 肽都反应。一般地，单克隆抗体具有对单个表位的单特异性。在 GDF8 活性区肽之中，这个单克隆抗体特异性地和专一地与 DJ5 肽反应。这个结果提供进一步的独立证据，DJ5 肽定义了 GDF8 蛋白的中和表位。

可以进行对本发明的许多修改和变化而不背离它的精神和范围，这对于本领域的技术人员是显而易见的。在此描述的特定实施方式仅通过举例的方式来提供，本发明仅由附随的权利要求的用语、以及这些权利要求所享有的等同物的完全范围来限定。在说明书中引用的许多参考文献，包括所公开的和/或因特网公开的核酸和多肽/蛋白序列的 Genbank 登记号，通过引用将其中公开的内容完全地合并。

<110> Schering-Plough Ltd.

Junker, David

Cochran, Mark D.

<120> 基于中和表位的生长增强疫苗

<130> AH 06148

<150> 60/533, 719

<151> 2003-12-31

<160> 36

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 375

<212> PRT

<213> 人类

<220>

<221> 肽

<222> (267).. (286)

<223> DJ1

<220>

<221> 肽

<222> (282).. (301)

<223> DJ2

<220>

<221> 肽

<222> (297).. (316)

<223> DJ3

<220>

<221> 肽

<222> (312).. (331)

<223> DJ4

<220>

<221> 肽
 <222> (327)..(346)
 <223> DJ5

<220>
 <221> 肽
 <222> (342)..(361)
 <223> DJ6

<220>
 <221> 肽
 <222> (357)..(375)
 <223> DJ7

<400> 1

Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile
 1 5 10 15

Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn
 20 25 30

Val Glu Lys Glu Gly Leu Cys Asn Ala Cys Thr Trp Arg Gln Asn Thr
 35 40 45

Lys Ser Ser Arg Ile Glu Ala Ile Lys Ile Gln Ile Leu Ser Lys Leu
 50 55 60

Arg Leu Glu Thr Ala Pro Asn Ile Ser Lys Asp Val Ile Arg Gln Leu
 65 70 75 80

Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Arg Glu Leu Ile Asp Gln Tyr Asp Val
 85 90 95

Gln Arg Asp Asp Ser Ser Asp Gly Ser Leu Glu Asp Asp Asp Tyr His
 100 105 110

Ala Thr Thr Glu Thr Ile Ile Thr Met Pro Thr Glu Ser Asp Phe Leu
115 120 125

Met Gln Val Asp Gly Lys Pro Lys Cys Cys Phe Phe Lys Phe Ser Ser
130 135 140

Lys Ile Gln Tyr Asn Lys Val Val Lys Ala Gln Leu Trp Ile Tyr Leu
145 150 155 160

Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu
165 170 175

Ile Lys Pro Met Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu
180 185 190

Lys Leu Asp Met Asn Pro Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val
195 200 205

Lys Thr Val Leu Gln Asn Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly
210 215 220

Ile Glu Ile Lys Ala Leu Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr
225 230 235 240

Phe Pro Gly Pro Gly Glu Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys
245 250 255

Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys
260 265 270

Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val
275 280 285

Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr
 290 295 300

Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys
 305 310 315 320

Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala
 325 330 335

Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr
 340 345 350

Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val
 355 360 365

Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 370 375

<210> 2
 <211> 2823
 <212> DNA
 <213> 人类

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (134)..(1261)
 <223> 编码前体 GDF8

<220>
 <221> 肽
 <222> (1112)..(1171)
 <223> 编码 DJ5

<400> 2
 agattcactg gtgtggcaag ttgtctctca gactgtacat gcattaaaat ttgcttggc 60
 attactcaaa agcaaaaagaa aagtaaaagg aagaacaag aacaagaaaa aagattatat 120

| | |
|--|------|
| tgattttaa atcatgcaaa aactgcaact ctgtgtttat atttacctgt ttatgetgat | 180 |
| tgttgctggt ccagtggatc taaatgagaa cagtgagcaa aaagaaaatg tggaaaaaga | 240 |
| gggctgtgt aatgcatgta cttggagaca aaacactaaa tcttcaagaa tagaagccat | 300 |
| taagatacaa atcctcagta aacttctctt gaaacagct cctaacaatca gcaaagatgt | 360 |
| tataagacaa cttttaccca aagctcctcc actccgggaa ctgattgac agtatgatgt | 420 |
| ccagagggat gacagcagcg atggtcttt ggaagatgac gattatcaag ctacaacgga | 480 |
| aacaatcatt accatgccta cagagtctga ttttctaata caagtggatg gaaaacccaa | 540 |
| atgttgettc tttaaattta gctctaaaat acaatacaat aaagtagtaa aggcccaact | 600 |
| atggatata ttgagaccgc tcgagactcc tacaacagtg tttgtgcaa tctgagact | 660 |
| catcaaact atgaaagac gtacaaggta tactggaatc cgatctctga aacttgacat | 720 |
| gaaccagge actggtattt ggcagagcat tgatgtgaag acagtgttgc aaaattggt | 780 |
| caaacaacet gaatccaact taggcattga aataaaagct ttagatgaga atggatcatga | 840 |
| tcttgetgta accttccag gaccaggaga agatgggctg aatccgttt tagaggtaa | 900 |
| ggtaacagac acaccaaaaa gatccagaag ggattttggt cttgactgtg atgagcactc | 960 |
| aacagaatca cgatgctgtc gttaccctct aactgtggat tttgaagctt ttgatggga | 1020 |
| ttggattatc gctcctaaaa gatataaggc caattactgc tctggagagt gtgaattgt | 1080 |
| atTTTTTaaa aaatatectc atactcatct ggtacaccaa gcaaacecca gaggttcagc | 1140 |
| aggccttgc tgtactccca caaagatgct tccaattaat atgctatatt ttaatggca | 1200 |
| agaacaaata atatatggga aaattccagc gatggtagta gaccgctgtg ggtgctcatg | 1260 |
| agatttatat taagcgttca taacttcta aaacatggaa ggTTTTTccc tcaacaattt | 1320 |
| tgaagctgtg aaattaagta ccacaggcta taggcctaga gtatgctaca gtcacttaag | 1380 |
| cataagctac agtatgtaaa ctaaaagggg gaatatatgc aatggttggc atttaacct | 1440 |

| | |
|---|------|
| ccaacaaat catacaagaa agttttatga tttccagagt ttttgagcta gaaggagatc | 1500 |
| aaattacatt tatgttecta tatattaaa catcgcgag gaaatgaaag cgattctcct | 1560 |
| tgagttctga tgaattaaag gagtatgctt taaagtctat ttctttaaag ttttgtttaa | 1620 |
| tatttacaga aaaatccaca tacagtattg gtaaaatgca ggattgttat ataccatcat | 1680 |
| togaatcadc cttaaacact tgaatttata ttgtatggta gtatacttgg taagataaaa | 1740 |
| ttccacaaaa atagggatgg tgcagcatat gcaatttcca ttcctattat aattgacaca | 1800 |
| gtacattaac aatccatgcc aacggtgcta atacgatagg ctgaatgtct gaggctacca | 1860 |
| ggtttatcac ataaaaaca ttcagtaaaa tagtaagttt ctcttttctt cagggcatt | 1920 |
| ttcctacacc tccaaatgag gaatggattt tctttaatgt aagaagaatc atttttctag | 1980 |
| aggttggett tcaattctgt agcatacttg gagaaactgc attatcttaa aaggcagtca | 2040 |
| aatggtgttt gtttttatca aatgtcaaa ataacatact tggagaagta tgtaattttg | 2100 |
| tctttgaaa attacaacac tgcctttgca aactgcagt ttttatggta aaataataga | 2160 |
| aatgatcgac tctatcaata ttgtataaaa agactgaaac aatgcattta tataatatgt | 2220 |
| atacaatatt gttttgtaaa taagtgtctc cttttttatt tactttggta tatttttaca | 2280 |
| ctaaggacat ttcaaattaa gtactaagge acaaagacat gtcatgcadc acagaaaagc | 2340 |
| aactacttat atttcagagc aaattagcag attaaatagt ggtcttaaaa ctccatatgt | 2400 |
| taatgattag atggttatat tacaatcatt ttatattttt ttacatgatt aacattcact | 2460 |
| tatggattca tgatggctgt ataaagtgaa ttgaaattt caatggttta ctgtcattgt | 2520 |
| gtttaaatct caacgttcca ttattttaat acttgcaaaa acattactaa gtataccaaa | 2580 |
| ataattgact ctattatctg aatgaagaa taaactgatg ctatctcaac aataactggt | 2640 |
| acttttattt tataatttga taatgaatat atttctgcat ttatttactt ctgttttgta | 2700 |
| aattgggatt ttgttaatca aatttattgt actatgacta aatgaaatta tttcttacet | 2760 |

ctaatttgta gaaacagtat aagttatatt aaagtgtttt cacatTTTTT tgaaagacaa 2820

aaa 2823

<210> 3

<211> 1164

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GDF8 激素原 FLAG 标签融合蛋白

<220>

<221> 信号肽

<222> (10)..(75)

<220>

<221> misc_feature

<222> (76)..(1131)

<223> 编码前体 GDF8

<220>

<221> 肽

<222> (985)..(1044)

<223> 编码 DJ5 肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (1132)..(1161)

<223> 编码 C-末端 FLAG 标签

<400> 3

atggatctac agaagttgca gttgtgtgtc tacatctatt tgttcatggt gatcgtcgcc 60

ggacctgttg acttgaacga aaattctgaa cagaaggaga acgttgagaa ggaaggtttg 120

tgcaacgctt gtacatggcg tcaaaataca aagtcctctc gtattgaagc tatcaagatt 180

caaattttgt ctaagttgag attggaaact gcccacaaata tttctaagga cgtcattcgt 240

caattgttgc caaaggcccc acctttgaga gaattgatcg accaatacga tgttcaaaga 300

gacgattcct ctgacggctt ccttgaagac gatgactacc atgccactac tgaactatt 360
atcactatgc caactgaate cgactttttg atgcagggtg atggtaagcc aaagtgctgt 420
ttttcaagt tctcttccaa gattcaatac aacaagggtg ttaaagctca attgtggatt 480
taccttcgtc cagttgaaac accaactact gtgtttgttc agattttgcg tttgattaag 540
ccaatgaagg atggaactag atacacaggt attagatcct tgaagttgga tatgaatcct 600
ggtacaggaa totggcaatc tatcgacggt aaaactgttc ttcaaaactg gttgaagcaa 660
ccagagtcta atttgggtat cgagattaag gccttgacg aaaacggaca tgacttggcc 720
gttacttttc ctggctctgg tgaagacggt ttgaacccat ttctggaagt taaggttact 780
gatactccta agcgttcag gagagacttc ggattggatt gtgatgaaca ttctactgag 840
tctagatggt gtagatatcc attgaccggt gatttcgagg ccttcggttg ggattggatc 900
attgcccaca agagatacaa agctaactat tgttccggtg aatgtgagtt cgttttcttg 960
cagaagtacc cacataccca tttggttcat caggctaate caagaggatc tgctgggtcca 1020
tgttgtacc caactaaaat gtcccctatc aacatgttgt acttcaacgg taaggagcag 1080
attatttacg gtaagatccc tgctatggtt gttgatagat gtggttggtc tctcgaggat 1140
tacaaggatg acgacgataa gtag 1164

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> 人类

<220>

<221> misc_feature

<223> DJ1

<400> 4

Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
 1 5 10 15

Arg Tyr Pro Leu
 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人类

<220>
 <221> misc_feature
 <223> DJ2

<400> 5

Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp
 1 5 10 15

Ile Ile Ala Pro
 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人类

<220>
 <221> misc_feature
 <223> DJ3

<400> 6

Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu
 1 5 10 15

Cys Glu Phe Val
20

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> 人类

<220>
<221> misc_feature
<223> DJ4

<400> 7

Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val
1 5 10 15

His Gln Ala Asn
20

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> 人类

<220>
<221> misc_feature
<223> DJ5

<400> 8

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
20

<210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人类

<220>
 <221> misc_feature
 <223> DJ6

<400> 9

Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu
 1 5 10 15

Gln Ile Ile Tyr
 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人类

<220>
 <221> misc_feature
 <223> DJ7

<400> 10

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Anas platyrhynchos

<400> 11

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Anser anser

<400> 12

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Anser anser

<400> 13

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

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 14

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 15

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> Capra hircus

<400> 16

Val His Gln Ala Asn Pro Lys Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> *Columba livia*

<400> 17

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> *Coturnix chinensis*

<400> 18

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 19

Val Asn Lys Ala Ser Pro Arg Gly Thr Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 20

<211> 20
 <212> PRT
 <213> Equus caballus

<400> 20

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

<400> 21

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Pro Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

<400> 22

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *I. punctatus*

<400> 23

Val Asn Lys Ala Ser Pro Arg Gly Thr Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Lepus capensis*

<400> 24

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 25
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 25

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 26
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Meleagris gallopavo*

<400> 26

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 27
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Morone chrysops*

<400> 27

Val Asn Lys Ala Asn Pro Arg Gly Thr Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 28

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 29
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *O. mykiss*

<400> 29

Val Asn Lys Ala Asn Pro Arg Gly Thr Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 30
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Ovis aries*

<400> 30

Val His Gln Ala Asn Pro Lys Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 31
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Papio hamadryas*

<400> 31

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser

20

<210> 32
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 32

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Salmo salar*

<400> 33

Val Asn Lys Ala Asn Pro Arg Gly Thr Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
 20

<210> 34
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Sparus aurata*

<400> 34

Val Asn Lys Ala Asn Pro Arg Gly Thr Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
 1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
20

<210> 35
<211> 20
<212> PRT
<213> *Sus scrofa*

<400> 35

Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro
1 5 10 15

Thr Lys Met Ser
20

<210> 36
<211> 20
<212> PRT
<213> *Sus scrofa*

<400> 36

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

Thr Lys Met Ser
20

动物物种和 Genebank Nos.
对于每个引用的物种的完整前体GDF8

相应于DJ5的GDF8肽
残基Nos. 根据前体GDF8

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------------------------------------|
| 327 | → | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Anas platyrhynchos (鸭) AAL35275 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Anser anser (鹅) AAL35276 |
| | | V | L | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Anser anser (鹅) AAR18246 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Bos taurus (牛) AAB86687 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Canis familiaris (狗) AAR14343 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Capra hircus (山羊) AAR12161 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Columba livia (鸽子) AAL35277 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Coturnix chinensis (鹌鹑) AAL35278 |
| | | V | N | K | A | N | P | R | G | T | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Danio rerio (斑马鱼) AAB86693 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Equus caballus (马) BAB16046 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | P | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Gallus gallus (鸡) AAK18000 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Gallus gallus (鸡) AAR18244 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Homo sapiens (人) NP_005250 |
| | | V | N | K | A | N | P | R | G | T | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | I. punctatus (鲟鱼) AAK84666 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Lepus capensis (野兔) AAN87890 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Macaca fascicularis (猴) AAL17640 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Meleagris gallopavo (火鸡) AAB86692 |
| | | V | N | K | A | N | P | R | G | T | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Morone chrysops (白鲈) AAK28707 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Mus musculus (家鼠) AAC53167 |
| | | V | N | K | A | N | P | R | G | T | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | O. mykiss (鲟鱼) AAK71707 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Ovis aries (绵羊) AAB86689 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Papio hamadryas (狒狒) AAB86686 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Rattus norvegicus (大鼠) AAB86691 |
| | | V | N | K | A | N | P | R | G | T | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Salmo salar (鲑鱼) CAC19541 |
| | | V | N | K | A | N | P | R | G | T | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Sparus aurata (海鲷) AAL05943 |
| | | V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Sus scrofa (猪) AAC08035 |
| | | V | L | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Sus scrofa (猪) AAR18245 |

图 2

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 基于中和表位的生长增强疫苗 | | |
| 公开(公告)号 | CN1902221A | 公开(公告)日 | 2007-01-24 |
| 申请号 | CN200480039545.8 | 申请日 | 2004-12-21 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 先灵-普劳有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 先灵-普劳有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 先灵-普劳有限公司 | | |
| [标]发明人 | DE琼克 MD蔻克兰 | | |
| 发明人 | D·E·琼克 M·D·蔻克兰 | | |
| IPC分类号 | C07K14/495 C12N15/18 A61K38/18 G01N33/53 C12N15/62 A61K38/00 A61K39/00 C07K14/475 | | |
| CPC分类号 | A61K38/00 A61K39/00 C07K14/475 A61P3/00 A61P21/00 A61P21/06 | | |
| 代理人(译) | 程淼 | | |
| 优先权 | 60/533719 2003-12-31 US | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明提供了来自蛋白GDF8的新的、特异性的抗原肽。本发明还提供了包含所述新肽的融合蛋白、根据所述新肽和/或融合蛋白的免疫原和疫苗、特异性结合GDF8的所述新肽的抗体和采用根据本发明的疫苗或抗体治疗动物以调整GDF8活性的方法。

| 327 | → | 相应于DJ5的GDF8肽 残基Nos. 根据前体GDF8 | → | 346 | 动物物种和 Genebank Nos. 对于每个引用的物种的完整前体GDF8 | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|---------------------------------|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------------------------------------|
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Anas platyrhynchos (鸭) AAL35275 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Anser anser (鹅) AAL35276 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Anser anser (鹅) AAR18246 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Bos taurus (牛) AAB86697 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Canis familiaris (狗) AAR14343 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Capra hircus (山羊) AAR12161 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Columba livia (鸽子) AAL35277 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Coturnix chinensis (鹌鹑) AAL35278 |
| V | N | K | A | S | P | R | G | T | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Danio rerio (斑马鱼) AAB86693 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Equus caballus (马) BAB16046 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Gallus gallus (鸡) AAK18000 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Gallus gallus (鸡) AAR18244 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Homo sapiens (人) NP_005250 |
| V | N | K | A | S | P | R | G | T | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | I. punctatus (鳊鱼) AAK84668 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Lepus capensis (野兔) AAN87890 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Macaca fascicularis (猴) AAL17640 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Meleagris gallopavo (火鸡) AAB86692 |
| V | N | K | A | S | P | R | G | T | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Morone chrysops (白鲈) ANK28707 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Mus musculus (家鼠) AAC53167 |
| V | N | K | A | S | P | R | G | T | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | O. mykiss (鲤鱼) AAK71707 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Ovis aries (绵羊) AAB86699 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Papio hamadryas (狒狒) AAB86696 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Rattus norvegicus (大鼠) AAB86691 |
| V | N | K | A | S | P | R | G | T | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Salmo salar (鲑鱼) CAC19541 |
| V | N | K | A | S | P | R | G | T | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Sparus aurata (海鲷) AAL05943 |
| V | H | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Sus scrofa (猪) AAC08035 |
| V | L | Q | A | N | P | R | G | S | A | G | P | C | C | T | P | T | K | M | S | Sus scrofa (猪) AAR18245 |