



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104203977 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201280069905. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 11. 30

C07K 16/18 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

(30) 优先权数据

12158974. 1 2012. 03. 12 EP

61/598968 2012. 02. 15 US

61/672799 2012. 07. 18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 08. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/074093 2012. 11. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/120554 EN 2013. 08. 22

(71) 申请人 诺和诺德 A/S (股份有限公司)

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 V. W. 斯坦尼科 C. B. 里德 J. 奎珀

X. 唐 M. 海佩 S. A. 乔斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李慧惠 梁谋

权利要求书3页 说明书40页

序列表44页 附图18页

(54) 发明名称

结合肽聚糖识别蛋白 1 的抗体

(57) 摘要

本文所公开的是用于鉴定 TREM-1 的配体和抗体或其片段的方法,其能够修饰 TREM-1 的配体的功能。使用此方法可以鉴定和选择降低或阻断 TREM-1 活化的抗体。结合 TREM-1 的配体并降低 TREM-1 活性的抗体可以适合用作药物。

1. 抗体或其片段,其能够特异性结合 PGLYRP1 并降低 PGLYRP1 介导的 TREM-1 活性。
2. 根据权利要求 1 的抗体或其片段,其能够特异性结合 SEQ ID NO: 37 (**II型 1.0 PGLYRP1**)和 / 或 SEQ ID NO: 38 (**II型 1.0 PGLYRP1**)。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项的抗体,其能够与抗体 1F10、抗体 1F36 (mAb 0182)、抗体 1F95、抗体 1F105 (mAb 0184)、抗体 2F5 和 / 或抗体 2F7 竞争结合 PGLYRP1。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项的抗体,其重链包含:对应 SEQ ID NO: 15 的氨基酸残基 31 至 35 (**SYWMN**)的 CDRH1 序列,其中所述氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 15 的氨基酸 50 至 66 (**MIHPDSETRLNQKFKD**)的 CDRH2 序列,其中所述氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 15 的氨基酸残基 98 至 108 (**DYSDYDGFAY**)的 CDRH3 序列,其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。
5. 根据权利要求 1-3 中任一项的抗体,其重链包含:对应 SEQ ID NO: 19 的氨基酸残基 31 至 35 (**DYNMY**)的 CDRH1 序列,其中所述氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 19 的氨基酸 50 至 66 (**YIDPYNGDTSYNQKFKG**)的 CDRH2 序列,其中所述氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 19 的氨基酸残基 99 至 109 (**GDYGNPFYLDY**)的 CDRH3 序列,其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。
6. 根据权利要求 1-3 中任一项的抗体,其重链包含:对应 SEQ ID NO: 23 的氨基酸残基 31 至 35 (**DTYIH**)的 CDRH1 序列,其中所述氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或 SEQ ID NO: 23 的氨基酸 50 至 66 (**RIDPANDDTKYDPNFQG**)的 CDRH2 序列,其中所述氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或 SEQ ID NO: 23 的氨基酸残基 99 至 108 (**SDNSDSWFAY**)的 CDRH3 序列,其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。
7. 根据权利要求 1-3 中任一项的抗体,其重链包含:对应 SEQ ID NO: 27 的氨基酸残基 31 至 35 (**DYNMH**)的 CDRH1 序列,其中所述氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 27 的氨基酸 50 至 66 (**YVDPYDGGTSSNQKFKG**)的 CDRH2 序列,其中所述氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 27 的氨基酸残基 99 至 106 (**EVPIYFDY**)的 CDRH3 序列,其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。
8. 根据权利要求 1-3 中任一项的抗体,其重链包含:对应 SEQ ID NO: 31 的氨基酸残基 31 至 35 (**DYYMY**)的 CDRH1 序列,其中这些氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 31 的氨基酸 50 至 66 (**AISDDSTYTYPPDSVKG**)的 CDRH2 序列,其中这些氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 31 的氨基酸残基 99 至 109 (**GGYGPLYAMDY**)的 CDRH3 序列,其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。
9. 根据权利要求 1-3 中任一项的抗体,其重链包含:对应 SEQ ID NO: 35 的氨基酸残基

31 至 35 (NYVMH) 的 CDRH1 序列, 其中这些氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 35 的氨基酸 50 至 66 (WINPFNDGTNYNENFKN) 的 CDRH2 序列, 其中这些氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 35 的氨基酸残基 99 至 109 (SGFITTIEDY) 的 CDRH3 序列, 其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

10. 根据权利要求 4-9 中任一项的抗体, 其轻链包含: 对应 SEQ ID NO: 16 的氨基酸残基 24 至 34 (RASQSIDYLH) 的 CDRL1 序列, 其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以用不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 16 的氨基酸残基 51 至 56 (ASQIS) 的 CDRL2 序列, 其中所述氨基酸残基的一个或两个可以用不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 16 的氨基酸残基 89 至 97 (QNGHSFPLT) 的 CDRL3 序列, 其中所述氨基酸残基的一个或两个可以用不同的氨基酸取代。

11. 根据权利要求 4-9 中任一项的抗体, 其轻链包含: 对应 SEQ ID NO: 20 的氨基酸残基 24 至 33 (SVSSSVNYMY) 的 CDRL1 序列, 其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以用不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 20 的氨基酸残基 49 至 55 (DTSKLPS) 的 CDRL2 序列, 其中所述氨基酸残基的一个或两个可以用不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 20 的氨基酸残基 88 至 96 (QQWTSNPPT) 的 CDRL3 序列, 其中所述氨基酸残基的一个或两个可以用不同的氨基酸取代。

12. 根据权利要求 4-9 中任一项的抗体, 其轻链包含: 对应 SEQ ID NO: 24 的氨基酸残基 24 至 33 (SVSSSVNFMN) 的 CDRL1 序列, 其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以用不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 24 的氨基酸残基 49 至 55 (DTSKLAP) 的 CDRL2 序列, 其中所述氨基酸残基的一个或两个可以用不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 24 的氨基酸残基 88 至 96 (HQWSSYSLT) 的 CDRL3 序列, 其中所述氨基酸残基的一个或两个可以用不同的氨基酸取代。

13. 根据权利要求 4-9 中任一项的抗体, 其进一步包含: 对应 SEQ ID NO: 28 的氨基酸残基 24 至 33 (VASSSVTYMY) 的 CDRL1 序列, 其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以用不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 28 的氨基酸残基 49 至 54 (THPLAS) 的 CDRL2 序列, 其中所述氨基酸残基的一个或两个可以用不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 28 的氨基酸残基 87 至 95 (PHWNTNPPT) 的 CDRL3 序列, 其中所述氨基酸残基的一个或两个可以用不同的氨基酸取代。

14. 根据权利要求 4-9 中任一项的抗体, 其进一步包含: 对应 SEQ ID NO: 32 的氨基酸残基 24 至 35 (TASSSVSSSYLH) 的 CDRL1 序列, 其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以用不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 32 的氨基酸残基 51-57 (STSNLAS) 的 CDRL2 序列, 其中这些氨基酸残基的一个或两个可以用不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 32 的氨基酸残基 90-98 (HQYHRSPFT) 的 CDRL3 序列, 其中这些氨基酸残基的一个或两个可以用不同的氨基酸取代。

15. 根据权利要求 4-9 中任一项的抗体, 其进一步包含: 对应 SEQ ID NO: 36 的氨基酸

残基 24 至 34 (KASESVGSFVS) 的 CDRL1 序列, 其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以用不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 36 的氨基酸残基 50 至 56 (GASNRYT) 的 CDRL2 序列, 其中这些氨基酸残基的一个或两个可以用不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 36 的氨基酸残基 89 至 96 (GQYYTHPT) 的 CDRL3 序列, 其中这些氨基酸残基的一个或两个可以用不同的氨基酸取代。

16. 根据权利要求 1-15 中任一项的抗体, 其用作药物。

结合肽聚糖识别蛋白 1 的抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及免疫学领域。更具体地,本发明涉及用于鉴定能够刺激髓样细胞上表达的触发受体(TREM-1)的配体的方法,以及结合 TREM-1 的配体的抗体。这些抗体能够调节髓样细胞活化和因此调节免疫应答。

[0002] 背景

肽聚糖识别蛋白 1 (另外称为 PGLYRP1、PGRP-S、TNFSF3L、PGRP、TAG7 和 PGRPS) 在嗜中性粒细胞中表达并在它们活化后释放。PGLYRP1 在患病组织中高度丰富,并且已显示在通过先天免疫系统的细菌感染的清除中起重要作用。PGLYRP 蛋白家族(PGLYRP1、PGLYRP2、PGLYRP3、PGLYRP4) 均与细菌肽聚糖(PGN) 相互作用,但在蛋白的 PGN 结合位点中有重要区别。PGLYRP1 具有附加的沟,假定其构成未知效应物或信号传导蛋白的结合位点(J. Mol. Biol. 347:683-691 (2005))。PGLYRP1 是高度保守的、196 个氨基酸长度的蛋白,由信号肽和肽聚糖结合域组成。

[0003] 为了理解并由此操纵此蛋白在各种感染性和炎性疾病中的功能,鉴定由 PGLYRP1 介导的信号传导机制是重要的。

[0004] TREM-1 在免疫调节中同样地具有充分描述的效果,但是迄今为止,尚未了解导致 TREM-1 介导的免疫功能的机制。TREM-1 是在髓样细胞,如单核细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞上表达的受体。其是由 234 个氨基酸组成的跨膜蛋白,包括单个细胞外免疫球蛋白结构域和短的胞质尾。TREM-1 不具有明显的信号传导基序,但是,当被活化时,形成二聚体/多聚体,并通过与含 ITAM 的信号接头蛋白 DAP12 相关联介导信号传导。下游信号传导可包括 Syk 和 Zap70 的磷酸化。下游信号传导可包括 NFAT、ELK、NK- κ B 转录因子的活化。当 TREM-1 被活化时,其触发促炎性细胞因子,如 TNF- α (TNF- α)、IL-8 和单核细胞趋化蛋白-1 从髓样细胞中的释放。

[0005] TREM-1 在患有败血症、类风湿关节炎(RA) 和炎性肠病(IBD) 的患者中上调,并且越来越多的证据支持该理论认为 TREM-1 有助于炎性疾病的发生和进展。TREM-1 信号传导的阻断已进一步在 RA 和 IBD 的体内小鼠模型中显示具有治疗活性。

[0006] TREM-1 活化的作用方式仍然很难以捉摸,因为活化 TREM-1 的配体不是本领域中已知的。因此,在本领域中,存在对鉴定 TREM-1 的配体的手段的需求。在本领域中对于鉴定能够降低、阻断、或者干扰 TREM-1 与其配体的相互作用分子(如抗体) 的方法存在需求。在本领域中对于能够结合 TREM-1 的配体,并从而降低、阻断,或干扰 TREM-1 被其配体的刺激的分子,如抗体存在需求。在本领域中对于能够结合 TREM-1 的配体的分子,如抗体存在需求。在本领域中对于能够结合 TREM-1 的配体并从而阻断 TREM-1 的活化和信号传导的分子,如抗体存在需求。在本领域中对于能够结合 TREM-1 的配体,并从而降低或阻断从表达 TREM-1 的髓样细胞的细胞因子释放的分子,如抗体存在需求。

[0007] 本文所公开的是用于鉴定 TREM-1 的配体以及能够结合 TREM-1 的配体的分子如抗体的方法和测定法。本文描述的是,能够影响 TREM-1 活化的抗体。因此,本文所公开的抗体适于用作药物。结合 TREM-1 的配体,并且降低或阻断 TREM-1 与其配体相互作用的抗体

对于患有慢性炎性疾病如类风湿性关节炎、银屑病关节炎和炎症性肠疾病的个体的生活质量可以具有实质性的影响。

[0008] 概述

本发明涉及用于鉴定 TREM-1 的配体和结合 TREM-1 的配体的分子如抗体(本文中鉴定为 PGLYRP1)的方法。本发明还涉及可通过本发明的方法鉴定 PGLYRP1 抗体。因此,本发明涉及 PGLYRP1 抗体,其能够通过 PGLYRP1 修饰 TREM-1 的活化,诸如能够通过 PGLYRP1 降低 TREM-1 活性(信号传导和 / 或活化)的 PGLYRP1 抗体。降低 TREM-1 的活性的抗体可用于炎症治疗。

[0009] 用于鉴定 TREM-1 的配体的方法,其包括:(a)培养表达 TREM-1、TREM-1 的信号传导蛋白和报道基因构建体的细胞,所述报道基因构建体被所述信号蛋白活化;(b)当它与细胞、化合物或流体,例如生物流体或组织接触时(其触发 TREM-1 的活化),对所述表达 TREM-1 的细胞的活性进行检测,优选定量;(c)使(b)的培养物与 TREM-1 活化组分接触;(d)分离结合 TREM-1 的组分以及(e)表征所分离的组分。TREM-1 的配体,通过本发明鉴定为 PGLYRP1,可用于修饰 TREM-1 的活性。

[0010] 用于鉴定特异性结合 PGLYRP1 并且修饰 TREM-1 介导的细胞活性的分子的方法,其包括:(a)根据实施方案 1-18 中任一项培养细胞;(b)当它与 PGLYRP1 和任选地,多聚化试剂如 PGN 接触时,对表达 TREM-1 的所述细胞的活性进行检测,优选定量;(c)将(b)的培养物与特异性结合 PGLYRP1 的分子接触;并且(d)检测,优选定量表达 TREM-1 的所述细胞的活性小于或大于如(b)中测量的它的活性。

[0011] 用于鉴定修饰 TREM-1 介导的细胞活性的 PGLYRP1 抗体的方法,其包括:(a)培养表达 TREM-1、TREM-1 的信号传导蛋白和由所述信号传导蛋白活化的报道基因构建体的细胞;(b)当它与 PGLYRP1 和任选地,组合多聚化试剂如 PGN 接触时,对表达 TREM-1 的所述细胞的活性进行检测,优选定量;(c)将(b)的培养物与结合 PGLYRP1 的抗体接触;并且(d)检测,优选定量表达 TREM-1 的所述细胞的活性小于或大于如(b)中测量的它的活性。

[0012] 鉴定降低 TREM-1 介导的细胞活性的 PGLYRP1 抗体的一种方法,其包括:(a)培养细胞,例如表达 TREM-1、信号传导蛋白例如 DAP12 和报道基因例如荧光素酶或 β -半乳糖苷酶的 T 细胞;(b)将所述细胞与活化的嗜中性粒细胞和任选地,组合多聚化试剂例如 PGN 一起孵育;(c)检测,优选定量所述细胞的发光;(d)将所述细胞和活化的嗜中性粒细胞的培养物与 PGLYRP1 抗体接触;以及(e)检测,优选定量所述细胞的发光少于(c)中测量的活性。

[0013] 附图简述

图 1 显示嗜中性粒细胞活化 BWZ-TREM-1 报道基因细胞系。BWZ 报道基因细胞系表达人 TREM-1 并介导 NFAT-连接的 β -半乳糖苷酶报道基因的活化,其可以使用来自 Promega, Denmark 的 Beta-Glo 测定系统试剂盒通过发光定量。该图显示当在含有 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 和 GM-CSF 或 Toll 样受体(TLR)活化“混合物(cocktails)”(TLRL 和 TLR2 混合物, tlr1-kit2hm, Invivogen, Sigma-Aldrich, Denmark)的细胞因子混合物的存在下,以及这些活化混合物的分开的组分的存在下与嗜中性粒细胞一起培养时,报道基因细胞系的活化。

[0014] 图 2 显示用 TREM-1 四聚体重组蛋白的 PGN 刺激的嗜中性粒细胞的流式细胞染色。

对照蛋白不结合(图 2A),而 TREM-1 四聚体(SEQ ID NO: 2)结合 PGN-活化的嗜中性粒细胞的亚群(图 2B),并且这可以被另一种 TREM-1 蛋白竞争(图 2D),但不被对照蛋白竞争(图 2C),证实了相互作用的特异性。

[0015] 图 3:用 TREM-1 通过免疫沉淀(IP)/质谱(MS)鉴定 PGLYRP1。可溶性 TREM-Fc 与 PGN-活化的嗜中性粒细胞一起孵育,交联,免疫沉淀,随后进行清洗,胰蛋白酶消化和质谱。TREM-1 结合蛋白的免疫沉淀得到 3 个特异性蛋白,73 个蛋白与对照蛋白重叠,并且 72 个被对照蛋白单独沉淀(背景)。表显示了 TREM-1 特异性免疫沉淀和后续质谱的结果。

[0016] 图 4 显示可溶性 TREM-1 结合 PGLYRP1。通过用 TREM-1 在表达重组 PGLYRP1 的 HEK293 转染子上流式细胞染色(图 4A)和通过 PGLYRP1 和 TREM-1 四聚体(SEQ ID NO: 2)之间的相互作用的 Biacore 和 ForteBio 分析显示。在存在或不存在 10 μ g/ml 的可溶性大肠杆菌肽聚糖(PGN)的情况下可溶性人 PGLYRP1 结合固定化人 TREM-1 (图 4B)。PGN 本身也结合固定化的人 PGLYRP1(图 4C),并且在 PGLYRP1 表面暴露于和被 PGN 结合之前和之后,可溶性人 TREM-1 结合固定化的 PGLYRP1 (图 4D)。

[0017] 图 5 显示 TREM-1 报道基因细胞系被重组 PGLYRP1 活化。TREM-1 报道基因细胞系用重组 PGLYRP1 (目录号 2590-PG-050 R&D Systems Minneapolis MN, USA)的刺激,以及内部(in-house)生成的 PGLYRP1(SEQ ID NO: 1)在 PGN 的存在下导致剂量依赖性的应答(图 5A)。此 PGLYRP1 诱导的应答可以被 TREM-1-Fc 融合蛋白特异性阻断(图 5B)验证了 TREM-1 特异性信号。

[0018] 图 6 显示单克隆抗-PGLYRP1 抗体可以阻断在报道基因测定中用 PGN-活化的嗜中性粒细胞刺激的 TREM-1 应答。抗体杂交瘤克隆上清液的实例在多个板中筛选它们阻断活化信号的能力。少数抗体(那些在虚线下的抗体,例如 F10、F95)能够阻断此信号。黑点表示每个板中的同种型对照(图 6A)。图 6B 显示来自另一个融合体的测试引起 2 个额外的阻断 PGLYRP1 抗体 M-hPGRPS-2F5 和 -2F7。商购可得的抗-PGLYRP1 mAb 的测试显示它们不能阻断此信号,即使在高剂量,而多克隆的商购可得的 PGLYRP1 pAb (AF2590, R&D Systems Minneapolis MN, USA)可以。图 6C 显示来自 Thermo Scientific 的商购可得的抗 PGLYRP1 mAb 188C424(Thermo Scientific, Waltham MA, USA)与同种型对照(MAB002)和多克隆抗 PGLYRP1 pAb (AF2590)的比较。图 6D 显示商购可得的抗 PGLYRP1 mAb 4H230(US Biological, Salem MA, USA)与同种型对照(MAB002)和多克隆抗 PGLYRP1 pAb (AF2590)的比较。图 6E 显示商购可得的抗 PGLYRP1 mAb 9A319(US Biological, Salem MA, USA)与同种型对照(MAB002)和多克隆抗 PGLYRP1 pAb (AF2590)的比较,图 6F 显示商购可得的抗 PGLYRP1 mAb 6D653(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA)与同种型对照(MAB002)和多克隆抗 PGLYRP1 pAb (AF2590)的比较。对于 SC 6D653 mAb 所见的活性轻微下降似乎由于含叠氮化物的制剂,因为用 1 μ g/ml 板结合的抗 TREM-1 mAb 触发 TREM-1 的 PGLYRP1 独立的信号显示相同的现象(图 6G)。

[0019] 图 7 显示在人 RA 滑液中存在的 TREM-1 配体能够刺激 TREM-1。

[0020] 图 7 显示板结合的对抗抗 TREM-1 mAb (R&D MAB1278, Minneapolis, MN, USA)刺激 TREM-1 (星号)并且已向其中添加 PGN 的 RA 滑液(SF)样品显示 hTREM-1 配体活性,其可以被 PGLYRP1 多克隆抗体(AF2590)中和,表明 TREM-1 活性是 PGLYRP1 依赖性的。

[0021] 图 8 显示 II 型 PGLYRP1 构建体的总体结构。IC 表示细胞内结构域, TM 是跨膜结

构域 – 其两者源自 MDL-1 蛋白序列,组合 hPGLYRP1 的 EC (细胞外) 结构域。

[0022] 序列简述

SEQ ID NO: 1 表示成熟、全长 hPGLYRP1 肽序列的氨基酸序列。

[0023] SEQ ID NO: 2 表示包含下列元件的重组蛋白序列:人 TREM-1 ECD、接头肽、人 TREM-1 ECD、具有 7 个不同于野生型的突变 (L15A、L16E、G18A、A111S、P112S、D137E、L139M) 的人同种异型 IgG1 Fc。

[0024] SEQ ID NO: 3 表示具有 5 个不同于野生型的突变:L15A、L16E、G18A、A111S、P112S 的人同种异型 IgG1 Fc。

[0025] SEQ ID NO: 4 表示从 N 至 C 末端包含下列元件的重组蛋白序列:6xHIS 标签、两个拷贝的链霉抗生物素蛋白结合蛋白结构域(SBP)、GS 接头、软骨寡聚蛋白 C 末端(COMP)、GS 接头、hDCIR-ECD。

[0026] SEQ ID NO: 5 表示包含下列元件的重组蛋白序列:hTREM-1-ECD、GS 接头、软骨寡聚蛋白 C 末端(COMP)、GS 接头、两个拷贝的链霉抗生物素蛋白结合蛋白结构域(SBP)、6xHIS 标签。

[0027] SEQ ID NO: 6 表示从 N 至 C 末端的顺序包含下列元件的重组蛋白序列:人 CD83 ECD、G4Sx3 接头肽、人 CD83 ECD、人同种异型 IgG1 Fc 突变体。

[0028] SEQ ID NO:7 表示具有 C 末端 GPI 信号序列的全长人 PGLYRP1 编码 cDNA 序列。经由 EcoRI 和 XhoI 限制性位点将此序列克隆入 pcDNA3.1zeo(+) (Invitrogen: V860-20, Carlsbad, CA, USA)。

[0029] SEQ ID NO: 8 表示成熟全长 hTREM-1 ECD (aa. 21-200)。

[0030] SEQ ID NO:9 表示被 G4Sx3 接头分开的 CD33 前导肽串联 hTREM-1 细胞外结构域的 cDNA。合成 cDNA 具有 5' EcoRI 限制性位点、GCCACC Kozak 序列 CD33 前导序列随后是人 TREM-1 的细胞外结构域(aa17-200),具有相互间隔的 KpnI 限制性位点和重复 3 次的甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸间隔序列(G4Sx3)随后是人 TREM-1 的细胞外结构域的额外拷贝(aa17-200)和 ApaI 位点以允许克隆。

[0031] SEQ ID NO:10 表示五聚体 hTREM-COMP-SBP38x2-6HIS。EcoRI 位点和 Kozak 是 ORF 的 5' 并且 BamHI 位点是 ORF 的 3'。

[0032] SEQ ID NO:11 表示用 EcoRI 和 ApaI 克隆入 pJSV002-hFc6mut 载体的 hCD83 四聚体。EcoRI 位点和 Kozak 是 ORF 的 5' 并且 ApaI 位点是 ORF 的 3'。

[0033] SEQ ID NO:12 表示五聚体 6HIS-SBP38x2-COMP-hDCIR。EcoRI 位点和 Kozak 是 ORF 的 5' 并且 BamHI 是 ORF 的 3'。

[0034] SEQ ID NO:13 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F36, mAb 0182) 的可变重链的核酸序列。

[0035] SEQ ID NO:14 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F36, mAb 0182) 的可变轻链的核酸序列。

[0036] SEQ ID NO:15 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F36, mAb 0182) 的可变重链的氨基酸序列。

[0037] SEQ ID NO:16 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F36, mAb 0182) 的可变轻链的氨基酸序列。

- [0038] SEQ ID NO:17 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F10) 的可变重链的核酸序列。
- [0039] SEQ ID NO:18 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F10) 的可变轻链的核酸序列。
- [0040] SEQ ID NO:19 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F10) 的可变重链的氨基酸序列。
- [0041] SEQ ID NO:20 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F10) 的可变轻链的氨基酸序列。
- [0042] SEQ ID NO:21 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F105, mAb 0184) 的可变重链的核酸序列。
- [0043] SEQ ID NO:22 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F105, mAb 0184) 的可变轻链的核酸序列。
- [0044] SEQ ID NO:23 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F105, mAb 0184) 的可变重链的氨基酸序列。
- [0045] SEQ ID NO:24 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F105, mAb 0184) 的可变轻链的氨基酸序列。
- [0046] SEQ ID NO:25 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F95) 的可变重链的核酸序列。
- [0047] SEQ ID NO:26 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F95) 的可变轻链的核酸序列。
- [0048] SEQ ID NO:27 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F95) 的可变重链的氨基酸序列。
- [0049] SEQ ID NO:28 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (1F95) 的可变轻链的氨基酸序列。
- [0050] SEQ ID NO:29 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (2F5) 的可变重链的核酸序列。
- [0051] SEQ ID NO:30 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (2F5) 的可变轻链的核酸序列。
- [0052] SEQ ID NO:31 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (2F5) 的可变重链的氨基酸序列。
- [0053] SEQ ID NO:32 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (2F5) 的可变轻链的氨基酸序列。
- [0054] SEQ ID NO:33 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (2F7) 的可变重链的核酸序列。
- [0055] SEQ ID NO:34 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (2F7) 的可变轻链的核酸序列。
- [0056] SEQ ID NO:35 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (2F7) 的可变重链的氨基酸序列。
- [0057] SEQ ID NO:36 表示单克隆 PGLYRP1 抗体 (2F7) 的可变轻链的氨基酸序列。
- [0058] SEQ ID NO:37 表示 II 型 1.0 PGLYRP1 的氨基酸序列。
- [0059] SEQ ID NO:38 表示 II 型 2.0 PGLYRP1 的氨基酸序列。
- [0060] SEQ ID NO:39 表示表位标签的氨基酸序列。
- [0061] SEQ ID NO:40 表示全长人 PGLYRP2 的氨基酸序列。
- [0062] SEQ ID NO:41 表示全长人 PGLYRP3 的氨基酸序列。
- [0063] SEQ ID NO:42 表示全长人 PGLYRP4 的氨基酸序列。
- [0064] SEQ ID NO:43 表示 hCD33-hTREM-1 ECD(aa17-200)-Fc6mut 的核酸序列。
- [0065] SEQ ID NO:44 表示 hCD33-hTREM-1 ECD(aa17-200)-Fc6mut 的氨基酸序列。
- [0066] SEQ ID NO:45 表示 hCD33-hTremL1 ECD(aa16-162)-Fc6mut 的核酸序列。
- [0067] SEQ ID NO:46 表示 hCD33-hTremL1 ECD(aa16-162)-Fc6mut 的氨基酸序列。
- [0068] SEQ ID NO:47 表示 hCD33-hTremL2 ECD(aa19-268)-Fc6mut 的核酸序列。
- [0069] SEQ ID NO:48 表示 hCD33-hTremL2 ECD(aa19-268)-Fc6mut 的氨基酸序列。
- [0070] SEQ ID NO:49 表示 hCD33-hTREM2-Fc6mut 二聚体的核酸序列。
- [0071] SEQ ID NO:50 表示 hCD33-hTREM2-Fc6mut 二聚体的氨基酸序列。
- [0072] SEQ ID NO:51 表示引物的核酸序列。

[0073] SEQ ID NO:52 表示引物的核酸序列。

[0074] SEQ ID NO:53 表示 hCD33 的氨基酸序列。

[0075] 描述

本发明涉及用于鉴定分子例如抗体的方法,所述分子能够特异性结合 TREM-1 的信号传导配偶体(本文鉴定为 PGLYRP1),并影响 PGLYRP1 与其信号传导配偶体 TREM-1 的结合。PGLYRP1 可以用于修饰 TREM-1 的活性。因此,本发明涉及影响由 PGLYRP1 介导的炎症应答的分子,例如抗体。已经产生并鉴定了能够结合 PGLYRP1 并影响 TREM-1 活化和信号传导的抗体。

[0076] 用于鉴定 TREM-1 的配体和用于鉴定能够特异性结合 PGLYRP1 并降低或阻断 TREM-1 的 PGLYRP1 活化的分子例如抗体的方法或测定法可以如下产生:

第一细胞或第一细胞的群体用编码 TREM-1 或其片段、信号传导蛋白和报道基因构建体的基因转染。该细胞可以是造血来源的,诸如髓样细胞,其可以是 T 细胞,或者其可以是能够被转染和表达这些分子任何其它的细胞类型。信号传导蛋白可以是无论直接或间接地能够从 TREM-1 向报道基因构建体发送或传送信号的任何蛋白,并且可以包括 DAP10、DAP12、TCR ζ 、FC γ RIII、Fc 受体,或能够从 TREM-1 向报道基因构建体发送或传送信号的任何其它蛋白。可选地,所述信号传导蛋白可以是 TREM-1/ 信号传导嵌合分子。所述报道基因构建体包含转录因子和报道基因,其依次编码产生可检测的信号例如可定量的信号的报道蛋白。所述转录因子可以是 NFAT 或 NF κ B 或本领域已知的任何其它合适的转录因子。报道基因可以编码 β -半乳糖苷酶、荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、氯霉素转移酶或能够产生可检测的信号的任何其它报道蛋白。可以用于此生物测定的一个合适的细胞系是 BWZ. 36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ T- 细胞(本文也鉴定为“BWZ/hTREM-1 报道基因细胞”),在实施例中详细描述其产生。当被活化时,BWZ/hTREM-1 报道基因细胞产生 β -半乳糖苷酶,其产生可以使用本领域已知的设备或试剂盒,例如 Beta Glow™ (Promega E4720, Madison, WI, USA) 进行测量。

[0077] 可以通过与 PGLYRP1 和任选地,多聚化试剂一起孵育活化第一细胞或第一细胞的群体。任选的多聚化试剂作为 PGLYRP1 的支架,并且可以是肽聚糖(PGN)、嗜中性粒细胞的细胞外陷阱(neutrophil extracellular traps, NETs)、透明质酸(hyaluronic acid)、蛋白聚糖结构(如多功能蛋白聚糖(versican)、聚集蛋白聚糖、核心蛋白聚糖或纤维蛋白),或能够多聚化或呈递 PGLYRP1 的任何其它天然存在的基质结构或分子。所述第一细胞可以通过与一种或多种在其表面或细胞内表达 PGLYRP1 的第二细胞一起孵育被活化。细胞内表达的实例可以是 PGLYRP1 在分泌颗粒中的储存。所述第二细胞可以因此是表达或转染有编码 PGLYRP1 的基因和在其表面表达 PGLYRP1 的任何细胞(或细胞群体)。该第二细胞可以是原核或真核细胞,例如哺乳动物细胞,例如 CHO 细胞、BHK 细胞或 HEK 细胞。所述第二细胞还可以是活化的嗜中性粒细胞。嗜中性粒细胞可以从个体的全血或组织中获得,并大量(in bulk)或作为纯化的嗜中性粒细胞使用。模拟嗜中性粒细胞的细菌活化的任何试剂,例如来自细菌细胞壁的肽聚糖(PGN),例如 PGN-SA、PGN-EB、PGN-EC、PGN-BS (InVivogen, tlr1-pgnsa, SanDiego, CA) 可以用于活化嗜中性粒细胞。

[0078] 然后检测并优选测量第一细胞或第一细胞的群体的活性。

[0079] 第一细胞和一种或多种表达 PGLYRP1 的第二细胞的培养物和 / 或第一细胞与

PGLYRP1 孵育的培养物,以及任选地,多聚化试剂例如 PGN,与已产生的针对 PGLYRP1 的抗体接触。检测并优选测量第一细胞或第一细胞的群体的活性。

[0080] 以此方式,可以鉴定能够结合 TREM-1 的配体 PGLYRP1 和影响 PGLYRP1 与 TREM-1 相互作用的抗体。导致第一细胞的活性增加的 PGLYRP1 抗体增强 PGLYRP1 与 TREM-1 的相互作用并且在本文鉴定为“刺激性 PGLYRP1 抗体”。导致第一细胞的活性降低的 PGLYRP1 抗体降低、干扰或阻断 PGLYRP1 与 TREM-1 的相互作用并且在本文鉴定为“抑制性 PGLYRP1 抗体”。抑制性 PGLYRP1 抗体降低或阻断 TREM-1 活化和信号传导。

[0081] 因此,本发明涉及表征 PGLYRP1 抗体功能的方法。能够特异性结合 PGLYRP1 并具有对 TREM-1 活化和下游信号传导的任何影响的抗体在本文中称为“功能性 PGLYRP1 抗体”。因此,术语“功能性 PGLYRP1 抗体”意在涵盖刺激性 PGLYRP1 抗体和抑制性 PGLYRP1 抗体。

[0082] 此外,本发明涉及能够特异性结合 PGLYRP1 和降低、干扰或阻断其与 TREM-1 的相互作用,从而降低 TREM-1 活化和下游信号传导的抗体。本发明的抗体可以具有免疫调节功能,降低表达 TREM-1 的髓样细胞的细胞因子产生。例如,本发明的抗体可以降低或阻止 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 、MIP-1 β 、MCP-1、IL-8 和 / 或 GM-CSF 从髓样细胞例如巨噬细胞和 / 或嗜中性粒细胞和 / 或患病组织例如滑膜组织中髓样细胞的释放。本发明的抗体可以能够下调嗜中性粒细胞应答。

[0083] 根据本发明的 PGLYRP1 抗体可以通过直接或间接影响 TREM-1 的一种机制或几种不同机制的组合降低或阻断 TREM-1 活化。本发明的抗体可以阻止 PGLYRP1 产生与 TREM-1 的功能复合物。

[0084] 本发明的抗体可以通过降低或阻断 TREM-1 活化和下游信号传导阻断 PGLYRP1 功能。

[0085] 本发明还涉及可通过本文公开的方法之外的其它手段鉴定的抑制性 PGLYRP1 抗体。

[0086] 本发明的抗体可以能够结合人 PGLYRP1 和来自人之外的物种的 PGLYRP1。如本文所用术语“PGLYRP1”从而涵盖 PGLYRP1 的任何天然存在形式,其可以衍生自任何合适的生物,例如无脊椎动物物种或脊椎动物物种。如本文所述使用的 PGLYRP1 可以是脊椎动物 PGLYRP1,例如哺乳动物 PGLYRP1,例如来自灵长类(例如人、黑猩猩、食蟹猴或恒河猴)的 PGLYRP1;啮齿动物(例如小鼠或大鼠),兔形目动物(如兔),或偶蹄动物(如牛、绵羊、猪或骆驼)等等。优选地,PGLYRP1 是人 PGLYRP1 (SEQ ID NO: 1)。PGLYRP1 可以是 PGLYRP1 的成熟形式,例如在合适的细胞内已经经历翻译后加工的 PGLYRP1 蛋白。这样的成熟 PGLYRP1 蛋白可以例如是糖基化的。PGLYRP1 可以是全长 PGLYRP1 蛋白。PGLYRP1 可以是剪接变体。

[0087] 本发明的抗体还可以能够特异性结合 PGLYRP1 的变体,例如 SEQ ID NO: 37 (II 型 1.0 PGLYRP1) 和 / 或 SEQ ID NO: 38 (II 型 1.0 PGLYRP1)。

[0088] 本发明的抗体可以能够影响,例如抑制 / 降低 / 阻断人 TREM-1 和来自人以外的另一物种的 TREM-1 的活性(信号传导和 / 或活化)。如本文所用术语“TREM-1”从而涵盖 TREM-1 的任何天然存在形式,其可以衍生自任何合适的生物。例如,如本文所述使用的 TREM-1 可以是脊椎动物 TREM-1,例如哺乳动物 TREM-1,例如来自灵长类(例如人、黑猩猩、食蟹猴或恒河猴)的 TREM-1;啮齿动物(例如小鼠或大鼠),兔形目动物(如兔),或偶蹄动物(如牛、绵羊、猪或骆驼)等等。优选地,所述 TREM-1 是人 TREM-1。TREM-1 可以是 TREM-1 的成熟形

式,例如在合适的细胞内已经经历翻译后加工的 TREM-1 蛋白。这样的成熟 TREM-1 蛋白可以例如是糖基化的。TREM-1 可以是全长 TREM-1 蛋白。TREM-1 可以是剪接变体。

[0089] 本文术语“抗体”指衍生自种系免疫球蛋白序列的蛋白,其能够特异性结合 PGLYRP1 或其部分。所述术语包括任何同种型(即, IgA、IgE、IgG、IgM 和 / 或 IgY)的全长抗体和任何单链或其片段。特异性结合 PGLYRP1 或其部分的抗体,可以排他性结合 PGLYRP1 或其部分,或其可以结合有限数目的同源性抗原或其部分。

[0090] 本发明的抗体可以是单克隆抗体,在这个意义上,它们可以直接或间接地衍生自 B 淋巴细胞的单一克隆。本发明的抗体可以是单克隆抗体,前提是其不是 188C424 (Thermo Scientific)、4H230 或 9A319 (US Biological) 或克隆 6D653 (Santa Cruz Biotechnology)。

[0091] 本发明的抗体可以是分离的。术语“分离的抗体”指已从其天然环境的另一种 / 其它一种或多种组分中分离和 / 或回收,和 / 或从其天然环境中组分的混合物纯化的抗体。

[0092] 抗体可以在原核细胞、真核细胞或衍生自细胞提取物的无细胞系统中重组表达。所述原核细胞可以是大肠杆菌。所述真核细胞可以是酵母、昆虫或哺乳动物细胞,例如衍生自下列生物的细胞:灵长类(例如人、黑猩猩、食蟹猴或恒河猴)、啮齿动物(例如小鼠或大鼠)、兔形目动物(如兔)或偶蹄动物(如牛、绵羊、猪或骆驼)。合适的哺乳动物细胞系包括但不限于 HEK293 细胞、CHO 细胞和 HELA 细胞。PGLYRP1 抗体还可以通过本领域技术人员已知的其它方法产生,例如噬菌体展示或酵母展示。本发明的抗体可以在体内通过用 PGLYRP1、表达 PGLYRP1 的细胞或两者的组合免疫合适的哺乳动物产生。

[0093] 可以使用例如实施例描述的方法产生、筛选和纯化 PGLYRP1 抗体。简而言之,任何合适的小鼠,包括 PGLYRP1 敲除(KO)小鼠或 TREM-1 KO 小鼠都可以用 PGLYRP1、表达 PGLYRP1 的细胞或两者的组合进行免疫。可以使用直接 ELISA 或 FMAT 进行杂交瘤上清液的初筛并且可以使用流式细胞术来进行复筛。可以随后筛选结合例如全长 PGLYRP1 的阳性杂交瘤上清液以及纯化的抗体。然后可以测试阳性杂交瘤上清液或纯化的抗体其降低或阻断 TREM-1 携带细胞的 PGLYRP1 刺激的能力。本发明的方法可以用于此目的。

[0094] 本发明的全长抗体可以包含至少四条多肽链:即通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链。一个具有特定药物兴趣的免疫球蛋白亚类是 IgG 家族,其可以细分为同种型 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。IgG 分子由通过两个或更多个二硫键相互连接的两条重链和各自通过二硫键连接到重链的两条轻链构成。重链可以包含重链可变区(VH)和至多三个重链恒定(CH)区:CH1、CH2 和 CH3。轻链可以包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)。VH 和 VL 区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布更保守的称为框架区(FR)的区域。VH 和 VL 区通常由三个 CDR 和四个 FR 构成,以下列顺序从氨基端向羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的高变区形成能够与抗原(PGLYRP1)相互作用的[结合]结构域,而抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白对宿主组织或因子的结合,包括但不限于免疫系统的各种细胞(效应细胞)、Fc 受体和经典补系统的第一组分(C1q)。

[0095] 抗原结合片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、F(ab)S、Fv(通常为抗体的单个臂的 VL 和 VH 结构域)、单链 Fv(scFv;参见例如 Bird 等, Science 1988; 242:42S-426;和 Huston 等 PNAS 1988;85:5879-5883)、dsFv、Fd(通常为 VH 和 CH1 结构域)以及 dAb(通常为 VH 结构域)片段;VH、VL、VhH 和 V-NAR 结构域;包含单个 VH 和单

个 VL 链的单价分子;微型抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体和 κ 抗体(kappa bodies)(参见,例如 I11 等 Protein Eng 1997;10:949-57);骆驼 IgG;IgNAR;以及一个或多个分离的 CDR 或功能互补位,其中分离的 CDR 或抗原结合残基或多肽可以结合或连接在一起,以便形成功能抗体片段。抗体片段的各种类型已描述于或综述于,例如 Holliger 和 Hudson, Nat Biotechnol 2005;2S:1126-1136;W02005040219 和公开的美国专利申请 20050238646 和 20020161201。

[0096] 在本发明的背景下抗体的某些抗原结合片段可以是合适的,因为其已经显示,可以通过全长抗体的片段实现所述抗体的抗原结合功能。术语抗体的“抗原结合片段”指抗体的一个或多个片段,其保留特异性结合如本文所述的抗原例如人 PGLYRP1 或来自另一物种的 PGLYRP1 的能力。抗原结合片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、F(ab)S、Fv(通常为抗体的单个臂的 VL 和 VH 结构域)、单链 Fv(scFv;参见例如 Bird 等, Science 1988;242:42S-426;和 Huston 等 PNAS 1988;85:5879-5883)、dsFv、Fd(通常为 VH 和 CHI 结构域)以及 dAb(通常为 VH 结构域)片段;VH、VL、VhH 和 V-NAR 结构域;包含单个 VH 和单个 VL 链的单价分子;微型抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体和 κ 抗体(kappa bodies)(参见,例如 I11 等 Protein Eng 1997;10:949-57);骆驼 IgG;IgNAR;以及一个或多个分离的 CDR 或功能互补位,其中分离的 CDR 或抗原结合残基或多肽可以结合或连接在一起,以便形成功能抗体片段。抗体片段的各种类型已描述于或综述于,例如 Holliger 和 Hudson, Nat Biotechnol 2005;2S:1126-1136;W02005040219 和公开的美国专利申请 20050238646 和 20020161201。这些抗体片段可以使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且可以以与完整抗体相同的方式筛选该片段的效用。

[0097] 本发明的抗体可以是人抗体或人源化的抗体。如本文所用术语“人抗体”意在包括具有可变区的抗体,其中至少框架区的一部分和/或至少 CDR 区的一部分衍生自人种系免疫球蛋白序列。(例如,人抗体可以具有可变区,其中框架区和 CDR 区均衍生自人种系免疫球蛋白序列)。此外,如果抗体包含恒定区,则该恒定区也衍生自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过随机或位点特异性诱变体外引入的突变或通过体细胞突变体内引入的突变)。

[0098] 这样的人抗体可以是人单克隆抗体。这样的人单克隆抗体可以通过杂交瘤产生,其包括融合无限增殖化细胞的从具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因非人动物,例如转基因小鼠获得的 B 细胞。

[0099] 可以从建立在人种系序列的选择上,进一步用天然和合成序列多样性进行多样化的序列文库中分离人抗体。

[0100] 可以通过人淋巴细胞的体外免疫随后是用 EB 病毒进行淋巴细胞转化来制备人抗体。

[0101] 术语“人抗体衍生物”指人抗体的任何修饰形式,例如抗体和另一试剂或另一抗体的缀合物。

[0102] 如本文所用术语“人源化抗体”指包含衍生自非人免疫球蛋白的一种或多种序列(CDR 区)的人/非人嵌合抗体。因此,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中至少来自受体高变区的残基被来自非人物种的高变区(供体抗体)的残基取代,所述非人物种例如来自小鼠、大鼠、兔或具有所期望的特异性、亲和力和能力的非人灵长类动物。在一些情况

下,人免疫球蛋白的FR残基被相应的非人残基取代。这样的修饰的实例是一个或多个所谓回复突变的引入。

[0103] 此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体的性能。通常,人源化抗体将包含至少一个——通常两个——可变结构域,其中所有或基本上所有CDR区对应非人免疫球蛋白的那些,并且其中所有或基本上所有的FR残基是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体可以任选地还包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。

[0104] 术语“人源化抗体衍生物”指人源化抗体的任何修饰形式,例如抗体和另一试剂或另一抗体的缀合物。

[0105] 如本文所用术语“嵌合抗体”指其轻链和重链基因已从源自不同物种的免疫球蛋白可变和恒定区基因进行构建(通常通过遗传工程化)的抗体。例如,来自小鼠单克隆抗体的基因的可变区段可以连接到人恒定区段。

[0106] 抗体的可结晶区片段(“Fc区”/“Fc结构域”)是抗体的N末端区域,其包含恒定CH2和CH3结构域。Fc结构域可以与称为Fc受体的细胞表面受体以及补体系统的一些蛋白相互作用。Fc区使抗体能够与免疫系统相互作用。在本发明的一个方面,抗体可以被工程化以在Fc区内包括修饰,通常改变一种或多种其功能特性,例如血清半衰期、补体结合、Fc-受体结合、蛋白稳定性和/或抗原依赖性细胞毒性、或其缺乏,等等。此外,本发明的抗体可以被化学修饰(例如,一种或多种化学基团可以连接到抗体)或被修饰以改变其糖基化,仍然为了改变抗体的一种或多种功能特性。优选地,修饰的Fc结构域包含一种或多种,并且可能所有下列突变,其将分别导致对某些Fc受体的亲和力下降(L234A、L235E和G237A)和C1q介导的补体结合降低(A330S和P331S)(残基编号根据EU索引)。

[0107] 本发明的抗体的同种型可以是IgG,例如IgG1,例如IgG2,例如IgG4。如果需要,抗体的种类可以被已知技术“转换”。例如,最初作为IgM分子产生的抗体可以类别转换为IgG抗体。类别转换技术也可以用于将一种IgG亚类转换为另一种,例如,从IgG1到IgG2或IgG4;从IgG2到IgG1或IgG4;或从IgG4到IgG1或IgG2。还可以通过组合来自不同IgG亚类的区域进行抗体的工程化以产生恒定区嵌合分子。

[0108] 在一个实施方案中,修饰CH1的铰链区使得铰链区中半胱氨酸残基的数目被改变,例如增加或降低。此方法例如在美国专利号5,677,425中由Bodmer等进一步描述。

[0109] 可以进一步修饰恒定区以稳定抗体,例如以降低二价抗体分成两个单价VH-VL片段的风险。例如,在IgG4恒定区,可以突变残基S241成脯氨酸(P)残基以允许在铰链处完全的二硫键形成(参见,例如Angal等, Mol Immunol. 199S ;30:105-8)。

[0110] 抗体或其片段还可以根据它们的互补决定区(CDR)进行限定。当用于本文时,术语“互补决定区”或“高变区”指涉及抗原结合的氨基酸残基位于其中的抗体区域。所述CDR通常由轻链可变结构域中氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变结构域中31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)构成;(Kabat等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)和/或来自“高变环”的那些残基(轻链可变结构域中残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3),以及重链可变结构域中26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Chothia和Lesk, J. Mol. Biol

1987;196:901-917) 构成。通常,此区域中氨基酸残基通过上文 Kabat 等中所述方法进行编号。短语例如“Kabat 位置”、“Kabat 残基”和“根据 Kabat”本文指此编号系统用于重链可变结构域或轻链可变结构域。使用 Kabat 编号系统,肽的实际线性氨基酸序列可包含对应可变结构域的框架(FR)或 CDR 的缩短或插入的更少或额外的氨基酸。例如,重链可变结构域可以包括在 CDR H2 的残基 52 后的氨基酸插入(根据 Kabat,残基 52a、52b 和 52c)和在重链 FR 残基 82 之后插入的残基(例如,根据 Kabat,残基 82a、82b 和 82c 等)。对于给定的抗体,残基的 Kabat 编号可以通过在抗体序列的同源性区域与“标准”Kabat 编号的序列的比对来确定。

[0111] 如本文所定义的术语“框架区”或“FR”残基指不在 CDR 内的那些 VH 或 VL 氨基酸残基。

[0112] 本发明的抗体可以包含来自一种或多种本文公开的特异性抗体的 CDR 区,例如来自 SEQ ID NO: 15、16、19、20、23、24、27、28、31、32、35 或 36 内的 CDR 区。

[0113] 1F36 抗体具有如 SEQ ID NO: 15 所示的重链和如 SEQ ID NO: 16 所示的轻链。本发明的抗体可以包含此可变重链序列和 / 或此可变轻链序列。所述 1F36 抗体具有 SEQ ID NO: 15 的氨基酸 31 至 35、50 至 66 和 98 至 108 和 SEQ ID NO: 16 的氨基酸 24 至 34、51 至 56 和 89 至 97 所示的 CDR 序列。本发明的抗体可以包含 1、2、3、4、5 或所有 6 个这些 CDR 序列。

[0114] 根据本发明的抗体可以包含:对应 SEQ ID NO: 15 的氨基酸残基 31 至 35(SYWMN)的 CDRH1 序列,其中这些氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 15 的氨基酸 50 至 66 (MIHPDSETRLNQKFKD)的 CDRH2 序列,其中这些氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 15 的氨基酸残基 98 至 108 (DYSYDGFAY)的 CDRH3 序列,其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0115] 根据本发明的抗体可以包含:对应 SEQ ID NO: 16 的氨基酸残基 24 至 34 (RASQSISDYLH)的 CDRL1 序列,其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 16 的氨基酸残基 51 至 56 (ASQSIS)的 CDRL2 序列,其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 16 的氨基酸残基 89 至 97 (QNGHSFPLT)的 CDRL3 序列,其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代。

[0116] 1F10 抗体具有如 SEQ ID NO:19 所示的重链和如 SEQ ID NO:20 所示的轻链。本发明的抗体可以包含此可变重链序列和 / 或此可变轻链序列。所述 1F10 抗体具有 SEQ ID NO: 19 的氨基酸 31 至 35、50 至 66 和 99 至 109 和 SEQ ID NO: 20 的氨基酸 24 至 33、49 至 55 和 88 至 96 所示的 CDR 序列。本发明的抗体可以包含 1、2、3、4、5 或所有 6 个这些 CDR 序列。

[0117] 根据本发明的抗体可以包含:对应 SEQ ID NO: 19 的氨基酸残基 31 至 35(DYNMY)的 CDRH1 序列,其中这些氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 19 的氨基酸 50 至 66 (YIDPYNGDTSYNQKFKG)的 CDRH2 序列,其中这些氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 19 的氨基酸残基 99 至 109 (GDYGNPFYLDY)的 CDRH3 序列,其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的

氨基酸取代。

[0118] 根据本发明的抗体可以包含对应 SEQ ID NO: 20 的氨基酸残基 24 至 33 (SVSSSVNYMY) 的 CDRL1 序列, 其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 20 的氨基酸残基 49 至 55 (DTSKLPS) 的 CDRL2 序列, 其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 20 的氨基酸残基 88 至 96 (QQWTSNPPT) 的 CDRL3 序列, 其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代。

[0119] 1F105 抗体具有如 SEQ ID NO: 23 所示的重链和如 SEQ ID NO: 24 所示的轻链。本发明的抗体可以包含此可变重链序列和 / 或此可变轻链序列。所述 1F105 抗体具有 SEQ ID NO: 23 的氨基酸 31 至 35、50 至 66 和 99 至 108 和 SEQ ID NO: 24 的氨基酸 24 至 33、49 至 55 和 88 至 96 所示的 CDR 序列。本发明的抗体可以包含 1、2、3、4、5 或所有 6 个这些 CDR 序列。

[0120] 根据本发明的抗体可以包含: 对应 SEQ ID NO: 23 的氨基酸残基 31 至 35 (DTYIH) 的 CDRH1 序列, 其中这些氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 23 的氨基酸 50 至 66 (RIDPANDDTKYDPNFQG) 的 CDRH2 序列, 其中这些氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 23 的氨基酸残基 99 至 108 (SDNSDSWFAY) 的 CDRH3 序列, 其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0121] 根据本发明的抗体可以包含: 对应 SEQ ID NO: 24 的氨基酸残基 24 至 33 (SVSSSVNFMN) 的 CDRL1 序列, 其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 24 的氨基酸残基 49 至 55 (DTSKLAP) 的 CDRL2 序列, 其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 24 的氨基酸残基 88 至 96 (HQWSSYSLT) 的 CDRL3 序列, 其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代。

[0122] 1F95 抗体具有如 SEQ ID NO: 27 所示的重链和如 SEQ ID NO: 28 所示的轻链。本发明的抗体可以包含此可变重链序列和 / 或此可变轻链序列。所述 1F95 抗体具有 SEQ ID NO: 27 的氨基酸 31 至 35、50 至 66 和 99 至 106 和 SEQ ID NO: 28 的氨基酸 24 至 33、49 至 54 和 87 至 95 所示的 CDR 序列。本发明的抗体可以包含 1、2、3、4、5 或所有 6 个这些 CDR 序列。

[0123] 根据本发明的抗体可以包含: 对应 SEQ ID NO: 27 的氨基酸残基 31 至 35 (DYNMH) 的 CDRH1 序列, 其中这些氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 27 的氨基酸 50 至 66 (YVDPYDGGTSSNQKFKG) 的 CDRH2 序列, 其中这些氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 27 的氨基酸残基 99 至 106 (EVPYYFDY) 的 CDRH3 序列, 其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0124] 根据本发明的抗体可以包含: 对应 SEQ ID NO: 28 的氨基酸残基 24 至 33 (VASSSVTYMY) 的 CDRL1 序列, 其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 28 的氨基酸残基 49 至 54 (THPLAS) 的 CDRL2 序列, 其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 28 的氨

氨基酸残基 87 至 95 (PHWNTNPPT) 的 CDRL3 序列, 其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代。

[0125] 2F5 抗体具有如 SEQ ID NO: 31 所示的重链和如 SEQ ID NO: 32 所示的轻链。本发明的抗体可以包含此可变重链序列和 / 或此可变轻链序列。所述 2F5 抗体具有 SEQ ID NO: 31 的氨基酸 35 至 31、50 至 66 和 99 至 109 和 SEQ ID NO: 32 的氨基酸 24 至 33、49 至 55 和 88 至 96 所示的 CDR 序列。本发明的抗体可以包含 1、2、3、4、5 或所有 6 个这些 CDR 序列。

[0126] 根据本发明的抗体可以包含: 对应 SEQ ID NO: 31 的氨基酸残基 31 至 35(DYYMY) 的 CDRH1 序列, 其中这些氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 31 的氨基酸 50 至 66 (AISDDSTYTYYPDSVKG) 的 CDRH2 序列, 其中这些氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 31 的氨基酸残基 99 至 109 (GGYGNYAMDY) 的 CDRH3 序列, 其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0127] 根据本发明的抗体可以包含: 对应 SEQ ID NO: 32 的氨基酸残基 24 至 35 (TASSSVSSSYLH) 的 CDRL1 序列, 其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 32 的氨基酸残基 51 至 57 (STSNLAS) 的 CDRL2 序列, 其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 32 的氨基酸残基 90 至 98 (HQYHRSPFT) 的 CDRL3 序列, 其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代。

[0128] 2F7 抗体具有如 SEQ ID NO: 35 所示的重链和如 SEQ ID NO: 36 所示的轻链。本发明的抗体可以包含此可变重链序列和 / 或此可变轻链序列。所述 2F5 抗体具有 SEQ ID NO: 35 的氨基酸 31 至 35、50 至 66 和 99 至 109 和 SEQ ID NO: 36 的氨基酸 24 至 34、50 至 56 和 89 至 96 所示的 CDR 序列。本发明的抗体可以包含 1、2、3、4、5 或所有 6 个这些 CDR 序列。

[0129] 根据本发明的抗体可以包含: 对应 SEQ ID NO: 35 的氨基酸残基 31 至 35(NYVMH) 的 CDRH1 序列, 其中这些氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 35 的氨基酸 50 至 66 (WINPFNDGTNYNENFKN) 的 CDRH2 序列, 其中这些氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 35 的氨基酸残基 99 至 109 (SGFITTIEDY) 的 CDRH3 序列, 其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0130] 根据本发明的抗体可以包含: 对应 SEQ ID NO: 36 的氨基酸残基 24 至 34 (KASESVGSFVS) 的 CDRL1 序列, 其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 36 的氨基酸残基 50 至 56 (GASNRYT) 的 CDRL2 序列, 其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代; 和 / 或对应 SEQ ID NO: 36 的氨基酸残基 89 至 96 (GQYYTHPT) 的 CDRL3 序列, 其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代。

[0131] 术语“抗原”(Ag)指用于免疫具有免疫能力的脊椎动物以产生识别 Ag 的抗体 (Ab) 的分子实体。本文中, Ag 更广泛地定义并且通常意在包括被 Ab 特异性识别的目标分子, 从而包括在免疫方法或用于生成 Ab 的其它方法如噬菌体展示中使用的分子的片段或模拟

物。

[0132] 如本文所用术语“表位”在“抗原结合多肽”例如抗体(Ab),与其相应抗原(Ag)之间的分子相互作用的背景下进行定义。通常,“表位”指 Ab 特异性结合到的 Ag 上的面积或区域,即与 Ab 物理接触的面积或区域。可以使用各种标准(例如,2-6 Å 的距离截止值,例如 3 Å,例如 4 Å,例如 5 Å;或溶剂可及性)对于 Ab 和 Ag 分子中的原子定义物理接触。蛋白表位可以包含 Ag 中结合 Ab 直接参与的氨基酸残基(也称为表位的免疫显性成分)和不直接参与结合的其它氨基酸残基,例如被 Ab 有效封闭的 Ag 的氨基酸残基,即在 Ab 的“溶剂排除表面”和 / 或“足迹”内的氨基酸残基。

[0133] 本文术语表位包含特异性结合 PGLYRP1 抗体的 PGLYRP1 的任何特定区域中两种类型的结合区域。PGLYRP1 可以包含许多不同表位,其可以包括但不限于构象表位(其由成熟 PGLYRP1 构象中位置彼此接近的一个或多个非邻接氨基酸组成),和翻译后表位(其整体或部分由共价连接 PGLYRP1 的分子结构,例如碳水化合物基团组成)。PGLYRP1 还可以包含线性表位。

[0134] 对于给定抗体(Ab) / 抗原(Ag) 对的表位可以使用多种实验性的和计算的表位作图方法在不同的细节层次上进行描述和表征。所述实验性方法包括诱变、X 射线晶体学、核磁共振(NMR)光谱、氢氘交换质谱(HX-MS)和各种竞争结合的方法;这是本领域已知的方法。由于每个方法依赖于独特的原理,所以表位的描述与确定其的方法密切相关。因此,取决于所采用的表位作图的方法,对于给定的 Ab/Ag 对的表位可以不同地描述。

[0135] 在其最详细的水平上,用于 Ag 和 Ab 之间的相互作用的表位可以通过限定 Ag-Ab 相互作用中存在的原子接触的空间坐标,以及关于它们对结合热力学的相对贡献的信息来描述。在更不详细的水平上,该表位可以通过限定 Ag 和 Ab 之间的原子接触的空间坐标来表征。在甚至更不详细的水平上,表位可以通过氨基酸残基表征,所述氨基酸残基包括由特定标准所定义的氨基酸残基,诸如 Ab:Ag 复合物中原子之间的距离或溶剂可及性。在进一步更不详细的水平上,表位可以通过功能,例如通过竞争结合其它 Ab 来表征。该表位也可以更一般地定义为包括这样的氨基酸残基,其被另一种氨基酸的取代将改变 Ab 和 Ag 之间的相互作用的特征。

[0136] 在由 Ab 如 Fab 片段与其 Ag 之间的复合物的空间坐标限定的 X 射线衍生的晶体结构的背景下,术语表位在本文中,除非另有说明或根据上下文矛盾,明确限定为 PGLYRP1 残基,其特征在于距离 Ab 中的重原子(即,非氢原子),例如 2-6 Å,例如 3 Å,例如 4 Å,例如 5 Å 内具有重原子。

[0137] 根据表位的描述和定义取决于所使用的表位作图方法在不同细节水平获得的事实,可以得出,对于相同 Ag 上的不同 Ab 的表位的比较可以类似地在不同的细节水平上进行。

[0138] 在氨基酸水平描述的表位,例如根据 X 射线结构确定,如果它们包含同一组氨基酸残基,则认为是相同的。如果至少一个氨基酸被多个表位共有,则认为表位是重叠的。如果没有氨基酸残基被多个表位共有,则认为表位是分开的(独特的)。

[0139] 术语“互补位”的定义通过反转角度(reversing the perspective)衍生自“表位”的上述定义。因此,术语“互补位”指 Ab 上的 Ag 特异性结合的面积或区域,即 Ab 用其与 Ag 进行物理接触。

[0140] 在由 Ab 如 Fab 片段与其 Ag 之间的复合物的空间坐标限定的 X 射线衍生的晶体结构的背景下, 术语互补位在本文中, 除非另有说明或根据上下文矛盾, 明确限定为 Ag 残基, 其特征在于距离 PGLYRP1 中的重原子(即, 非氢原子) 4 Å 内具有重原子。

[0141] 对于给定抗体(Ab) / 抗原(Ag) 对的表位和互补位可以通过常规方法鉴定。例如, 表位的通常定位可以通过评价抗体结合不同片段或变体 PGLYRP1 多肽的能力来确定。PGLYRP1 内与抗体接触的特定氨基酸(表位) 和抗体内与 PGLYRP1 接触的特定氨基酸(互补位) 也可以使用常规方法确定。例如, 可以组合抗体和目标分子, 并且可以结晶 Ab :Ag 复合物。可以确定复合物的晶体结构并用于鉴定抗体和其目标之间的相互作用的特异性位点。

[0142] 结合相同抗原的抗体可以关于它们同时结合它们共同的抗原的能力进行表征, 并且可以进行“竞争性结合”/ “框并”(binning)。在本上下文中, 术语“框并”指对结合相同抗原的抗体分组的方法。抗体的“框并”可以基于两种抗体对它们共同的抗原的竞争性结合, 在基于标准技术例如表面等离子共振(SPR)、ELISA 或流式细胞术的测定中。

[0143] 抗体的“框(bin)”使用参考抗体进行限定。如果第二抗体不能与参考抗体同时结合抗原, 则所述第二抗体被认为属于与参考抗体相同的“框”。在此情况下, 参考抗体和第二抗体竞争性结合抗原的相同部分并且共同称为(coined) “竞争性抗体”。如果第二抗体能够与参考抗体同时结合抗原, 则所述第二抗体被认为属于分开的“框”。在此情况下, 参考抗体和第二抗体不竞争性结合抗原的相同部分并且共同称为“非竞争性抗体”。

[0144] 抗体“框并”不提供关于表位的直接信息。竞争抗体, 即属于相同“框”的抗体, 可以具有相同的表位、重叠的表位或甚至分开的表位。后者是这样的情况, 即结合抗原上其表位的参考抗体是否占据了第二抗体接触抗原上其表位所需的空间(“空间位阻”)。非竞争性抗体通常具有分开的表位。

[0145] 根据本发明的抗体可以能够与 1F10 竞争结合 PGLYRP1。根据本发明的抗体可以能够与 1F36/mAb 0182 竞争结合 PGLYRP1。根据本发明的抗体可以能够与 1F95 竞争结合 PGLYRP1。根据本发明的抗体可以能够与 1F105/mAb 0184 竞争结合 PGLYRP1。根据本发明的抗体可以能够与 2F5 竞争结合 PGLYRP1。根据本发明的抗体可以能够与 2F7 竞争结合 PGLYRP1。因此, 根据本发明的抗体可以属于与这些抗体的任何一种或多种相同的框。

[0146] 本文术语“结合亲和力”指两个分子, 例如抗体, 或其片段, 和抗原之间非共价相互作用的强度的测量。术语“结合亲和力”用于描述单价相互作用(内在活性)。

[0147] 两个分子, 例如抗体或其片段和抗原之间通过单价相互作用的结合亲和力可以通过确定平衡解离常数(K_D) 来定量。接下来, K_D 可以通过测量复合物形成和解离的动力学来确定, 例如通过 SPR 法。单价复合物的结合和解离相应的速率常数分别称作结合速率常数 k_a (或 k_{on}) 和解离速率常数 k_d (或 k_{off})。 K_D 通过公式 $K_D = k_d / k_a$ 与 k_a 和 k_d 相关。

[0148] 按照上述定义, 与不同分子相互作用相关的结合亲和力, 例如不同抗体对于给定抗原的结合亲和力的比较, 可以通过比较单个抗体 / 抗原复合物的 K_D 值进行比较。

[0149] 本发明的 PGLYRP1 抗体对于其目标(PGLYRP1) 可以具有 $1 \times 10^{-6} M$ 或更低, $1 \times 10^{-7} M$ 或更低, $1 \times 10^{-8} M$ 或更低, 或 $1 \times 10^{-9} M$ 或更低, 或 $1 \times 10^{-10} M$ 或更低, $1 \times 10^{-11} M$ 或更低, $1 \times 10^{-12} M$ 或更低或 $1 \times 10^{-13} M$ 或更低的 K_D 。

[0150] 根据本发明的抗体可以能够与另一分子, 例如天然存在的配体或受体或另一种抗体竞争结合 PGLYRP1。因此, 根据本发明的抗体可以能够结合 PGLYRP1, 具有比也能够结合

PGLYRP1 的另一分子更高的亲和力。抗体与天然配体 / 受体竞争结合抗原的能力可以通过确定和比较目的相互作用的 K_D 值和非目的相互作用的 K_D 值来评估,所述目的相互作用例如抗体和抗原之间的特异性相互作用。

[0151] 本文术语“结合特异性”指分子例如抗体或其片段与单个专属抗原,或与有限数目的高度同源性抗原(或表位)的相互作用。能够特异性结合 PGLYRP1 的抗体不能结合不相似的分子。根据本发明的抗体可以不能结合 PGLYRP 家族成员,例如 PGLYRP2、PGLYRP3 和 PGLYRP4。根据本发明的抗体可以不能结合人 PGLYRP 家族成员,例如人 PGLYRP2、人 PGLYRP3 和人 PGLYRP4。

[0152] 相互作用的特异性和平衡结合常数的值可以通过熟知的方法直接确定。评价配体(例如抗体)结合它们的目标的能力的标准测定法是本领域已知的,并且包括,例如 ELISA、蛋白质印迹、RIA 和流式细胞术分析。抗体的结合动力学和结合亲和力也可以通过本领域已知的标准测定,例如 SPR 来评价。

[0153] 可以进行竞争性结合测定,其中抗体对目标的结合与该目标的另一配体(例如另一抗体)对目标的结合进行比较。

[0154] 在另一方面,本发明提供了包含本发明的分子,例如本文所述 PGLYRP1 抗体、多核苷酸、载体和细胞的组合物和制剂。例如,本发明提供了与药学上可接受的载体一起配制的包含一种或多种本发明的 PGLYRP1 抗体的药物组合物。

[0155] 因此,本发明的一个目标是提供包含这样的 PGLYRP1 抗体的药物制剂,所述抗体以 0.25 mg/ml 至 250 mg/ml 的浓度存在,并且其中所述制剂具有 2.0 至 10.0 的 pH。所述制剂可以进一步包含一种或多种缓冲系统、防腐剂、张力剂、螯合剂、稳定剂或表面活性剂,以及它们的各种组合。防腐剂、等渗剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂在药物组合物中的用途是本领域技术人员熟知的。可以参考 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995。

[0156] 在一个实施方案中,所述药物制剂是含水制剂。该制剂通常是溶液或悬浮液,但是还可以包括胶体、分散液、乳状液和多相材料。术语“含水制剂”定义为包含至少 50%w/w 水的制剂。类似地,术语“水溶液”定义为包含至少 50%w/w 水的溶液,并且术语“水悬浮液”定义为包含至少 50%w/w 水的悬浮液。

[0157] 在另一实施方案中,所述药物制剂是冻干的制剂,在使用前医师或患者向其中添加溶剂和 / 或稀释剂。

[0158] 在进一步的方面,所述药物制剂包含这样的抗体的水溶液,和缓冲液,其中所述抗体以 1mg/ml 或以上的浓度存在,并且其中所述制剂具有约 2.0 至约 10.0 的 pH。

[0159] 本发明的 PGLYRP1 抗体和包括这样的抗体的药物组合物可用于炎性疾病的治疗,例如下列炎性疾病:炎性肠病(IBD)、克罗恩病(CD)、溃疡性结肠炎(UC)、肠易激综合征、类风湿关节炎(RA)、银屑病、银屑病关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、I 型糖尿病、格雷夫斯氏病、多发性硬化(MS)、自身免疫性心肌炎、川崎病、冠状动脉疾病、慢性阻塞性肺疾病、间质性肺疾病、自身免疫性甲状腺炎、硬皮病、系统性硬化症、骨关节炎、特应性皮炎、白癜风、移植物抗宿主病、Sjogrens 综合征、自身免疫性肾炎、Goodpasture 综合征、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、过敏症、哮喘和急性或慢性炎症导致的其它自身免疫性疾病。本发明的 PGLYRP1 抗体和包含这些抗体的药物组合物可以用于心血管疾病、中风、缺血再灌

注损伤、肺炎、败血病和癌症的治疗。

[0160] 本发明的 PGLYRP1 抗体适合在患有炎性肠病的个体的治疗中使用。炎性肠病 (IBD) 是可影响从口腔到肛门的胃肠道任何部分,引起多种症状的疾病。IBD 主要引起腹痛、腹泻(可能带血)、呕吐或体重下降,但也可能引起胃肠道外的并发症如皮疹、关节炎、眼的炎症、疲劳和注意力不集中。患有 IBD 的患者可以分成两大类,患有溃疡性结肠炎(UC)的那些和患有克罗恩病(CD)的那些。虽然 CD 通常涉及回肠和结肠,其可以影响肠中的任何区域,但往往是不连续的(疾病的集中区域散布到整个肠),UC 总是涉及直肠(结肠),并且更连续。在 CD 中,炎症是透壁的,导致脓肿、瘘和狭窄,而在 UC 中,炎症通常局限于粘膜。对于克罗恩病没有已知的药物或手术治疗,而一些患有 UC 的患者可以通过手术移除结肠治愈。治疗选择限于控制症状、维持缓解和预防复发。炎性肠病在临床的效力可以测量为对于 CD 的克罗恩病活动指数(CDAI)评分的降低,其是基于实验室测试和生活质量问卷的评分量表。在动物模型中,效力主要通过体重增加,并且还通过疾病活动指数(DAI)的增加来测量,所述疾病活动指数是大便稠度、体重和血便的组合。

[0161] 本发明的 PGLYRP1 抗体适合在患有类风湿关节炎的个体的治疗中使用。类风湿关节炎(RA)是全身性疾病,其影响几乎身体的所有部分(如果不是全部),并且是关节炎的最常见形式之一。其特征在于关节的炎症应答,其导致疼痛、僵硬、发热、发红和肿胀。这种炎症是炎症细胞侵入关节的结果,并且这些炎性细胞释放的酶可以消化骨和软骨。结果是,这种炎症除其他生理效应之外还可以导致严重的骨和软骨损伤和关节退化和重度疼痛。所涉及的关节可能会失去它的形状和取向,导致疼痛和运动丧失。

[0162] 本领域已知有几种动物模型用于类风湿性关节炎。例如,在胶原诱导的关节炎(CIA)模型中,小鼠发生类似于人类类风湿性关节炎的炎性关节炎。由于 CIA 与 RA 共有类似的免疫学和病理学特征,这使得其成为合适的模型用于筛选潜在的人抗炎化合物。此模型中的效力通过关节肿胀降低来测量。RA 在临床中的效力通过降低患者中症状的能力测量,其作为关节肿胀、红细胞沉降率、C-反应蛋白水平和血清因子如抗瓜氨酸化蛋白抗体的水平的组合进行测量。

[0163] 本发明的 PGLYRP1 抗体适合在患有银屑病的个体的治疗中使用。银屑病是可造成相当大的不适感的 T 细胞介导的皮肤的炎性病症。它是这样的疾病,对于其目前还没有治愈方法,并影响所有年龄的人。虽然患有轻度银屑病的个体往往可以用外用制剂控制他们的疾病,但全世界一百多万患者需要紫外线照射治疗或全身性免疫抑制治疗。不幸的是,紫外线辐射的不便和风险以及很多疗法的毒性限制了其长期使用。另外,患者通常具有银屑病复发,并在某些情况下,停止免疫抑制治疗后不久就反弹。最近开发的基于 CD4⁺ T 细胞转移的银屑病模型模拟人银屑病的很多方面,并且因此可以用于鉴定适合在银屑病的治疗中使用的化合物(Davenport 等, Internat. Immunopharmacol 2: 653-672, 2002)。此模型的效力使用评分系统通过皮肤病理学的降低进行测量。同样,患者中的效力通过皮肤病理学降低进行测量。

[0164] 本发明的 PGLYRP1 抗体适合在患有银屑病关节炎的个体的治疗中使用。银屑病关节炎(PA)是一种发生在银屑病患者的亚群中的炎性关节炎。在这些患者中,皮肤病理学/症状伴有关节肿胀,类似于类风湿性关节炎中见到的那些。其特征在于具有起鳞(scaling)的皮肤炎症的斑片状、隆起、红色区域。银屑病经常影响肘部和膝盖的顶端、头皮、肚脐和生

殖器区域周围或肛门。大约 10% 的患有银屑病的患者也发生他们的关节相关的炎症。

[0165] 如本文所用的术语“治疗”，指有需要的任何人或其它动物对象的医学治疗。所述对象预计由医生或兽医医生进行体检，其已给予暂定的或明确的诊断，其将表明，使用所述治疗有益于所述人或其它动物对象的健康。根据许多因素，如对象的健康现状，所述治疗的时机和目的可以从一个个体到另一个进行变化。因此，所述治疗可以是预防性的、姑息性的、针对症状性的和 / 或治疗性的。

[0166] 在本发明中，预防性的、姑息性的、针对症状性的和 / 或治疗性的治疗可以代表本发明的单独的方面。

[0167] 本发明的抗体可被胃肠外施用，如静脉内，如肌内，如皮下。可选地，本发明的抗体可以通过非肠胃外途径施用，如口服或局部施用。本发明的抗体可被预防性施用。本发明的抗体可以治疗性施用(按需)。

[0168] 示例性实施方案

1. 细胞，其表达 TREM-1、TREM-1 的信号传导蛋白和被所述信号传导蛋白活化的报道基因构建体。

[0169] 2. 根据实施方案 1 的细胞，其中所述细胞是造血来源的。

[0170] 3. 根据实施方案 2 的细胞，其中所述细胞是髓样细胞。

[0171] 4. 根据实施方案 2 的细胞，其中所述细胞是 T 细胞。

[0172] 5. 根据实施方案 1-4 任一项的细胞，其中所述信号传导蛋白是 DAP10。

[0173] 6. 根据实施方案 1-4 任一项的细胞，其中所述信号传导蛋白是 DAP12。

[0174] 7. 根据实施方案 1-4 任一项的细胞，其中所述信号传导蛋白是 TCR ζ 。

[0175] 8. 根据实施方案 1-4 任一项的细胞，其中所述信号传导蛋白是 Fc γ RIII。

[0176] 9. 根据实施方案 1-4 任一项的细胞，其中所述信号传导蛋白是 Fc 受体。

[0177] 10. 根据实施方案 1-9 任一项的细胞，其中所述报道基因构建体包含转录因子和报道基因。

[0178] 11. 根据实施方案 10 的细胞，其中所述转录因子是 NFAT。

[0179] 12. 根据实施方案 11 的细胞，其中所述转录因子是 NFkB。

[0180] 13. 根据实施方案 10-12 任一项的细胞，其中所述报道基因编码 β -半乳糖苷酶。

[0181] 14. 根据实施方案 10-12 任一项的细胞，其中所述报道基因编码荧光素酶。

[0182] 15. 根据实施方案 10-12 任一项的细胞，其中所述报道基因编码绿色荧光蛋白(GFP)。

[0183] 16. 根据实施方案 10-12 任一项的细胞，其中所述报道基因编码氯霉素转移酶。

[0184] 17. 根据实施方案 1-4、6、10-11 和 13 任一项的细胞，其是 BWZ.36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ T-细胞。

[0185] 18. 刺激根据实施方案 1-17 任一项的细胞的方法，其包括使所述细胞与 PGLYRP1 接触。

[0186] 19. 刺激根据实施方案 1-17 任一项的细胞的方法，其包括使所述细胞与 PGLYRP1 和 PGN 接触。

[0187] 20. 根据实施方案 18-19 任一项的方法，其中所述 PGLYRP1 由细胞表达。

[0188] 21. 根据实施方案 20 的方法，其中表达 PGLYRP1 的细胞是原核细胞。

- [0189] 22. 根据实施方案 20 的方法,其中表达 PGLYRP1 的细胞是真核细胞。
- [0190] 23. 根据实施方案 22 的方法,其中表达 PGLYRP1 的细胞是哺乳动物细胞。
- [0191] 24. 根据实施方案 23 的方法,其中表达 PGLYRP1 的细胞是活化的嗜中性粒细胞。
- [0192] 25. 根据实施方案 23 的方法,其中表达 PGLYRP1 的细胞是 HEK 细胞。
- [0193] 26. 鉴定 TREM-1 配体的方法,其包括:(a)培养根据实施方案 1-18 任一项的细胞;(b)当它与细胞、流体例如生物流体或组织接触时(其触发 TREM-1 的活化),对所述表达 TREM-1 的细胞的活性进行检测,优选定量;(c)使(b)的培养物与 TREM-1 蛋白接触;(d)分离结合 TREM-1 的组分以及(e)表征所分离的组分。
- [0194] 27. 鉴定特异性结合 PGLYRP1 并且修饰 TREM-1 介导的细胞活性的分子的方法,其包括:(a)根据实施方案 1-18 中任一项培养细胞;(b)当它与 PGLYRP1 和任选地,多聚化试剂如 PGN 接触时,对表达 TREM-1 的所述细胞的活性进行检测,优选定量;(c)将(b)的培养物与特异性结合 PGLYRP1 的分子接触;和(d)检测,优选定量表达 TREM-1 的所述细胞的活性小于或大于如(b)中测量的它的活性。
- [0195] 28. 鉴定修饰 TREM-1 介导的细胞活性的 PGLYRP1 抗体或其片段的方法,其包括:(a)根据实施方案 1-18 中任一项培养细胞;(b)当它与 PGLYRP1 和任选地,多聚化试剂如 PGN 接触时,对表达 TREM-1 的所述细胞的活性进行检测,优选定量;(c)将(b)的培养物与结合 PGLYRP1 的抗体接触;和(d)检测,优选定量表达 TREM-1 的所述细胞的活性小于或大于如(b)中测量的它的活性。
- [0196] 29. 根据实施方案 27 的方法,其中所述 PGLYRP1 抗体或其片段降低 TREM-1 介导的细胞活性,并且其中所述第一细胞在(d)中测量时的活性低于其在(b)中测量时的活性。
- [0197] 30. 根据实施方案 27 的方法,其中所述 PGLYRP1 抗体或其片段增加 TREM-1 介导的细胞活性,并且其中所述第一细胞在(d)中测量时的活性多于其在(b)中测量时的活性。
- [0198] 31. PGLYRP1 抗体或其片段,其通过根据实施方案 28-30 任一项的方法鉴定。
- [0199] 32. PGLYRP1 抗体或其片段,其能够特异性结合 PGLYRP1 并降低 PGLYRP1 介导的 TREM-1 活性。
- [0200] 33. 根据实施方案 31-32 任一项的抗体或其片段,其能够降低从表达 TREM-1 的细胞中一种或多种细胞因子的释放。
- [0201] 34. 根据实施方案 31-33 任一项的抗体或其片段,其是单克隆抗体。
- [0202] 35. 根据实施方案 31-34 任一项的抗体或其片段,其是人源化抗体。
- [0203] 36. 根据实施方案 31-34 任一项的抗体或其片段,其是人抗体。
- [0204] 37. 根据实施方案 31-34 任一项的抗体或其片段,其是嵌合抗体。
- [0205] 38. 根据实施方案 31-37 任一项的抗体,其中所述抗体的同种型是 IgG。
- [0206] 39. 根据实施方案 38 的抗体,其中所述同种型是 IgG1、IgG2 或 IgG4。
- [0207] 40. 根据实施方案 37 的抗体,其中所述抗体的同种型是 IgG1。
- [0208] 41. 根据实施方案 37 的抗体,其中所述抗体的同种型是 IgG4。
- [0209] 42. 根据实施方案 31-41 任一项的抗体或其片段,其能够与抗体 1F10 竞争结合 PGLYRP1。
- [0210] 43. 根据实施方案 31-41 任一项的抗体或其片段,其能够与抗体 1F36/mAb 0182 竞争结合 PGLYRP1。

[0211] 44. 根据实施方案 31-41 任一项的抗体或其片段,其能够与抗体 1F95 竞争结合 PGLYRP1。

[0212] 45. 根据实施方案 31-41 任一项的抗体,其能够与抗体 1F105/mAb 0184 竞争结合 PGLYRP1。

[0213] 46. 根据实施方案 31-41 任一项的抗体,其能够与抗体 2F5 竞争结合 PGLYRP1。

[0214] 47. 根据实施方案 31-41 任一项的抗体,其能够与抗体 2F7 竞争结合 PGLYRP1。

[0215] 48. 根据实施方案 31-47 任一项的抗体或其片段,其能够特异性结合 SEQ ID NO: 37 (II 型 1.0 PGLYRP1) 和 / 或 SEQ ID NO: 38 (II 型 2.0 PGLYRP1)。

[0216] 49. 根据实施方案 31-48 任一项的抗体或其片段,当使用表面等离子共振测量时,其对于其目标具有 1×10^{-6} M 或更低, 1×10^{-7} M 或更低, 1×10^{-8} M 或更低, 或 1×10^{-9} M 或更低, 或 1×10^{-10} M 或更低, 1×10^{-11} M 或更低, 1×10^{-12} M 或更低或 1×10^{-13} M 或更低的 K_D 。

[0217] 50. 根据实施方案 31-49 任一项的抗体,其重链包含:对应 SEQ ID NO: 15 的氨基酸残基 31 至 35 (SYWMN) 的 CDRH1 序列,其中所述氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 15 的氨基酸 50 至 66 (MIHPDSETRLNQKFKD) 的 CDRH2 序列,其中所述氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 15 的氨基酸残基 98 至 108 (DYSYDGFAY) 的 CDRH3 序列,其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0218] 51. 根据实施方案 31-49 任一项的抗体,其重链包含:对应 SEQ ID NO: 19 的氨基酸残基 31 至 35 (DYNMY) 的 CDRH1 序列,其中所述氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 19 的氨基酸 50 至 66 (YIDPYNGDTSYNQKFKG) 的 CDRH2 序列,其中所述氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 19 的氨基酸残基 99 至 109 (GDYGNPFYLDY) 的 CDRH3 序列,其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0219] 52. 根据实施方案 31-49 任一项的抗体,其重链包含:对应 SEQ ID NO: 23 的氨基酸残基 31 至 35 (DTYIH) 的 CDRH1 序列,其中所述氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 23 的氨基酸 50 至 66 (RIDPANDDTKYDPNFQG) 的 CDRH2 序列,其中所述氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 23 的氨基酸残基 99 至 108 (SDNSDSWFAY) 的 CDRH3 序列,其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0220] 53. 根据实施方案 31-49 任一项的抗体,其重链包含:对应 SEQ ID NO: 27 的氨基酸残基 31 至 35 (DYNMH) 的 CDRH1 序列,其中所述氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 27 的氨基酸 50 至 66 (YVDPYDGGTSSNQKFKG) 的 CDRH2 序列,其中所述氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 27 的氨基酸残基 99 至 106 (EVPYYFDY) 的 CDRH3 序列,其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0221] 54. 根据实施方案 31-49 任一项的抗体,其重链包含:对应 SEQ ID NO: 31 的氨基酸残基 31 至 35 (DYMY) 的 CDRH1 序列,其中这些氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代;和 / 或对应 SEQ ID NO: 31 的氨基酸 50 至 66 (AISDDSTYTYYPDSVKG) 的 CDRH2 序

列,其中这些氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代;和/或对应 SEQ ID NO: 31 的氨基酸残基 99 至 109 (GGYGPLYAMDY) 的 CDRH3 序列,其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0222] 55. 根据实施方案 31-49 任一项的抗体,其重链包含:对应 SEQ ID NO: 35 的氨基酸残基 31 至 35 (NYVMH) 的 CDRH1 序列,其中这些氨基酸残基之一可以被不同的氨基酸残基取代;和/或对应 SEQ ID NO: 35 的氨基酸残基 50 至 66 (WINPFNDGTNYNENFKN) 的 CDRH2 序列,其中这些氨基酸的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代;和/或对应 SEQ ID NO: 35 的氨基酸残基 99 至 109 (SGFITTLLIEDY) 的 CDRH3 序列,其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代。

[0223] 56. 根据实施方案 50-55 任一项的抗体,其轻链包含:对应 SEQ ID NO: 16 的氨基酸残基 24 至 34 (RASQSIDYLYH) 的 CDRL1 序列,其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代;和/或对应 SEQ ID NO: 16 的氨基酸残基 51 至 56 (ASQSIDY) 的 CDRL2 序列,其中所述氨基酸的一个或两个可以被不同的氨基酸取代;和/或对应 SEQ ID NO: 16 的氨基酸残基 89 至 97 (QNGHSFPLT) 的 CDRL3 序列,其中所述氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代。

[0224] 57. 根据实施方案 50-55 任一项的抗体,其轻链包含:对应 SEQ ID NO: 20 的氨基酸残基 24 至 33 (SVSSSVNYMY) 的 CDRL1 序列,其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代;和/或对应 SEQ ID NO: 20 的氨基酸残基 49 至 55 (DTSKLPS) 的 CDRL2 序列,其中所述氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代;和/或对应 SEQ ID NO: 20 的氨基酸残基 88 至 96 (QQWTSNPPT) 的 CDRL3 序列,其中所述氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代。

[0225] 58. 根据实施方案 50-55 任一项的抗体,其轻链包含:对应 SEQ ID NO: 24 的氨基酸残基 24 至 33 (SVSSSVNFMN) 的 CDRL1 序列,其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代;和/或对应 SEQ ID NO: 24 的氨基酸残基 49 至 55 (DTSKLAP) 的 CDRL2 序列,其中所述氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代;和/或对应 SEQ ID NO: 24 的氨基酸残基 88 至 96 (HQWSSYSLT) 的 CDRL3 序列,其中所述氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代。

[0226] 59. 根据实施方案 50-55 任一项的抗体,其轻链包含:对应 SEQ ID NO: 28 的氨基酸残基 24 至 33 (VASSSVTYMY) 的 CDRL1 序列,其中所述氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸残基取代;和/或对应 SEQ ID NO: 28 的氨基酸残基 49 至 54 (THPLAS) 的 CDRL2 序列,其中所述氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代;和/或对应 SEQ ID NO: 28 的氨基酸残基 87 至 95 (PHWNTNPPT) 的 CDRL3 序列,其中所述氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代。

[0227] 60. 根据实施方案 50-55 任一项的抗体,其轻链包含:对应 SEQ ID NO: 32 的氨基酸残基 24 至 35 (TASSSVSSSYLYH) 的 CDRL1 序列,其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代;和/或对应 SEQ ID NO: 32 的氨基酸残基 51 至 57 (STSNLAS) 的 CDRL2 序列,其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代;和/或对应 SEQ ID NO: 32 的氨基酸残基 90 至 98 (HQYHRSPFT) 的 CDRL3 序列,其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代。

[0228] 61. 根据实施方案 50-55 任一项的抗体,其轻链包含:对应 SEQ ID NO: 36 的氨基酸残基 24 至 34 (KASESVGSFVS)的 CDRL1 序列,其中这些氨基酸残基的一个、两个或三个可以被不同的氨基酸取代;和/或对应 SEQ ID NO: 36 的氨基酸残基 50 至 56 (GASNRYT)的 CDRL2 序列,其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代;和/或对应 SEQ ID NO: 36 的氨基酸残基 89 至 96 (GQYYTHPT)的 CDRL3 序列,其中这些氨基酸残基的一个或两个可以被不同的氨基酸取代。

[0229] 62. 根据实施方案 31-61 任一项的抗体,其用作药物。

[0230] 63. 根据实施方案 31-62 任一项的抗体,其用于治疗炎性疾病。

[0231] 64. 抗体,其能够特异性结合 PGLYRP1 并降低 PGLYRP1 介导的 TREM-1 活性,所述抗体用作药物。

[0232] 65. 抗体,其能够特异性结合 PGLYRP1 并降低 PGLYRP1 介导的 TREM-1 活性,所述抗体用于治疗炎性疾病。

[0233] 66. 根据实施方案 62-65 任一项的用途,其中所述炎性疾病是自身免疫性疾病。

[0234] 67. 根据实施方案 66 的用途,其中所述自身免疫性疾病是类风湿关节炎(RA)。

[0235] 68. 根据实施方案 66 的用途,其中所述自身免疫性疾病是炎性肠病(IBD)和/或溃疡性结肠炎。

[0236] 69. 根据实施方案 66 的用途,其中所述自身免疫性疾病是银屑病关节炎(PA)。

[0237] 70. 实施方案 62 或 64 在心血管疾病、中风、缺血再灌注损伤、败血症和/或癌症治疗中的用途。

[0238] 本发明进一步通过下列实施例阐明,其不应理解为进一步的限制。本申请中引用的所有附图和所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容明确地通过引用并入本文。

实施例

[0239] 实施例 1:BWZ. 36 人 TREM-1:DAP12 稳定细胞系的生成

BWZ. 36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ 细胞系(本文也称为“BWZ/hTREM-1 报道基因细胞”)衍生自 BW5147 T 细胞(小家鼠(*Mus musculus*)胸腺淋巴瘤细胞系,ATCC TIB-47, LGC Standards, Middlessex, UK)并包含由 NFAT 启动子元件的四个拷贝调控的 LacZ 报道基因构建体(参见 Karttunen, J. & Shastri, N. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3972-3976 和 Fiering, S., Northrop, J. P., Nolan, G. P., Matilla, P., Crabtree, G. R. & Herzenberg, L. A. (1990) Genes Dev. 4, 1823-1834)。将使用 TREM-1 cDNA (Gene Bank 参考 ID: NM_018643.2, Sino Biological Inc., Beijing, China))作为模板和寡聚物 5' TAGTAGGGATCCGCTGGTGCACAGGAAGG (SEQ ID NO: 51) 和

5' TAGTAGGCGGCCGCTTCGTGGGCCTAGGGTAC (SEQ ID NO: 52) 作为引物,克隆入 pIRESHyg 载体 GenBank 登录号 U89672 (目录号 6061-1, Clontech Laboratories, CA, USA) 的 TREM/DAP12/pMX-IRES 载体(从 SmaI 位点至 BamHI 位点编码 786 bp 的 TREM-1),转染入 PLAT-E 包装细胞系(由华盛顿大学的 W. Yokoyama 提供;或者目录号 RV-101, Cell Biolabs Inc, Bio-Mediator KY, Vantaa, Finland),其使用 Superfect 转染试剂(目录号 301305, Qiagen Nordic, Denmark)。包含 TREM/DAP12/pMX-IRES 病毒颗粒的 PLAT-E 上清液用于如下感染 BWZ. 36 细胞: 2×10^5 个 BWZ. 36 细胞在 6 孔板中培养,并且培养基用 1.5ml

包含病毒颗粒 + 8 mg/ml 聚凝胺的上清液替换。6-8 小时后,将 1.5 ml 正常培养基添加到板中并且将细胞孵育额外 24 小时。稳定表达 TREM-1 的 BWZ. 36 细胞系用抗 TREM-1 单克隆抗体(克隆 21C7; Bouchon 等, 2000, J. Immunol vol. 164 第 4991-4995 页)染色,并通过细胞分选分离。

[0240] 实施例 2:用于鉴定表达 TREM-1 的配体的细胞的生物测定的建立

如实施例 1 所述,通过用 hTREM-1 和 DAP12 转染 NFAT-lacZ 携带细胞系 BWZ. 36 (Sanderson S, Int. Immun. 1994) 生成 TREM-1 报道基因细胞系。此 BWZ. 36/hTREM-1:DAP12:NFAT-LacZ 细胞系(本文也称为 BWZ/hTREM-1 报道基因细胞)对 TREM-1 的抗体介导的交联是高度敏感的,当用 1-10 μ g/ml 板结合的可商购的抗 TREM-1 抗体刺激时,相比同种型对照,给出 NFAT- 驱动的 LacZ 产生的约 40 倍的诱导。在报道基因细胞中 NFAT- 驱动的 LacZ 产生可以使用基于发光的试剂盒 Beta Glow™ (Promega E4720, Madison, WI) 进行测定。板用同种型对照或 aTREM-1 MAB1278 (在 PBS 中浓度 3 μ g/ml, 100 μ l/ 孔) (R&D Systems, Minneapolis, USA) 在 4°C 包被 16 小时或在 37°C, 5 % CO₂ 包被 2 小时,并且通过添加 10ml 维尔烯 (Versene)(目录号 #15040, Gibco, Carlsbad CA, USA) 使 BWZ/hTREM-1 报道基因细胞脱离,以 400g 离心 5 分钟,并在 PBS 和培养基(RPMI-1640 w/o 酚红;目录号 11835, Gibco, Carlsbad CA, USA)中清洗,然后添加到包被的板中(1×10^6 细胞 /ml, 4×10^4 细胞 / 孔)到总体积 100 μ l 并在 37°C, 5 % CO₂ 孵育过夜(16-20 小时)。

[0241] 这些 TREM-1 反应性细胞用于鉴定表达 TREM-1 配体的细胞。一种这样的细胞被证明是来自全血的嗜中性粒细胞。通过 Ficoll 和葡聚糖沉降纯化健康供体的嗜中性粒细胞,并用 PGN (Invivogen, tlrl-pgnsa, San Diego, CA, USA)刺激过夜。简而言之,以 1:3 的报道基因细胞:嗜中性粒细胞的比例将 BWZ/hTREM-1 报道基因细胞添加到活化的嗜中性粒细胞培养物中。在聚-D-赖氨酸包被的 Black 细胞培养板(# 356640, 来自 BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 中运行此测定。TREM-1 活化在培养 24 小时后使用 BetaGlo 试剂(E4720, 来自 Promega, Madison, WI, USA) 读出并且使用来自 Perkin Elmer 的 TopCount 发光计数器测量发光。

[0242] 体外刺激的嗜中性粒细胞具有能够诱导 TREM-1 信号传导的配体,并且来自健康供体的全血的嗜中性粒细胞通过葡聚糖沉降纯化,并用多种试剂刺激过夜。能刺激来自嗜中性粒细胞的 TREM-1 应答信号的唯一试剂是 PGN-SA (Invivogen, tlrl-pgnsa, San Diego, CA, USA), 其模拟细胞的细菌活化。这些活化的嗜中性粒细胞然后通过共培养细胞用来刺激 BWZ/hTREM-1 报道基因细胞系。简而言之,以 1:3 的报道基因细胞:嗜中性粒细胞的比例将 BWZ/hTREM-1 报道基因细胞添加到活化的嗜中性粒细胞培养物中。在聚-D-赖氨酸包被的黑细胞培养板(目录号 356640 BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 中运行此测定。TREM-1 活化在培养 24 小时后使用 BetaGlo 试剂(目录号 E4720, Promega, Madison, WI, USA) 读出并且使用(来自 Perkin Elmer, Waltham MA, USA) 的 TopCount 发光计数器测量发光。如图 1 所示,在与 PGN 刺激的嗜中性粒细胞共培养的 BWZ/hTREM-1 细胞中观察到报道基因活性的显著诱导。此诱导高度依赖嗜中性粒细胞活化。对于静息嗜中性粒细胞没有看到应答(柱 2 嗜中性粒细胞)。类似地,当不存在嗜中性粒细胞的情况下用 TLRL 混合物中 PGN-SA 刺激 BWZ/hTREM-1 报道基因细胞时(柱 1-TLRL) 没有看到应答,证明应答不仅仅是 PGN 对 BWZ/hTREM-1 细胞的直接作用。用细胞因子混合物活化嗜中性粒细胞(柱 3+4 嗜

中性粒细胞 + 细胞因子) 也不提供正确的 TREM-1 活化信号。

[0243] 实施例 3 : 可溶性 TREM-1 对 PGN 活化的嗜中性粒细胞的结合

PGN- 刺激的嗜中性粒细胞能够诱导 TREM-1 活化, 表明在 PGN 刺激的嗜中性粒细胞培养物中存在 TREM-1 刺激因子。为了证实嗜中性粒细胞上 TREM-1 相互作用蛋白的存在, 将 PGN- 刺激的嗜中性粒细胞用重组 TREM-1 四聚体蛋白染色并通过流式细胞术分析。简而言之, 从获自 Astarte Biologics (Redmond, WA, USA) 的人全血中经由 Ficoll- 葡聚糖沉降法分离粒细胞。在 50ml 管中用 3 份 Ficoll 和 4 份血液的比例, 使血液在 FicollPaque (17-0840-03, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 梯度上分层, 然后在 400xg 在 22°C 不间断 (without brake) 离心 30 分钟。中间的 PBMC 带轻轻吸去。吸取浓缩的 RBC 上分层的粒细胞, 并转移到 50ml 聚丙烯管。粒细胞和污染的 RBC 用 1xPBS 稀释到 40ml 并随后添加 10ml PBS 溶液中的 4% DEXTRAN 500 (Sigma, 31392, St Louis, MO, USA)。通过轻轻颠倒混合后, 管在 22°C 放置 20-30 分钟。然后将富含粒细胞的上清液转移到新管并在 250xg 在 22°C 离心 5 分钟; 吸取上清液并丢弃。用渗透压裂解去除污染的 RBC, 简而言之, 将细胞沉淀重悬在 7.5ml 的 0.2% NaCl 中; 轻轻混合 55-60 秒, 并且添加 17.5ml 的 1.2% NaCl 溶液。然后用 PBS 使体积达到 50ml, 并在 250xg 离心 5 分钟, 将沉淀重悬在 7.5ml 的 0.2% NaCl 中以第二次重复裂解。最终的粒细胞沉淀重悬在 RPMI/10% FBS 中。

[0244] 分离的粒细胞以 3.8×10^6 /ml 的密度在 RPMI/10%FBS + $10 \mu\text{g/ml}$ PGN-SA (Invivogentrl-pgnsa, San Diego, CA, USA) 中培养 7 天。通过离心沉淀细胞并重悬在 PBS/2% FBS 用于染色。然后在存在或不存在 $2 \mu\text{g/ml}$ 探针, 具有或不具有 $100 \mu\text{g/ml}$ (50X) 的特异性的或不相关的竞争蛋白的情况下, 以 100,000/孔的密度将重悬的粒细胞铺板在 96 孔板 (圆底) 中。在 $50 \mu\text{l}$ /孔体积中将细胞在 4°C 与探针 / 竞争蛋白孵育 1 小时。在孵育结束时, 添加 $150 \mu\text{l}$ /孔 PBS/2%FBS 并沉淀细胞。沉淀的细胞重悬在 $50 \mu\text{l}$ /孔的山羊抗 hFc F(ab')₂/PE 缀合物 (Jackson ImmunoResearch 109-116-098, West Grove, PA, USA) 中并在 4°C 孵育 30 分钟。添加 $150 \mu\text{l}$ /孔 PBS/2%FBS 并沉淀细胞。沉淀的细胞进一步在 $200 \mu\text{l}$ /孔 PBS/2%FBS 中洗涤并沉淀。然后将洗涤的细胞重悬在 $100 \mu\text{l}$ /孔固定剂 (1:1 PBS: Cytofix. 554655, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 中并在室温孵育 5 分钟。向固定的细胞添加 $100 \mu\text{l}$ /孔 PBS/2%FBS, 并然后沉淀细胞。染色 / 固定的细胞然后重悬在 $100 \mu\text{l}$ /孔 PBS/2%FBS 用于在 LSR II 流式细胞仪上进行流式细胞术分析。(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)。

探针组:

Fc mut	5.36 mg/ml	SEQ ID NO: 3
hTREM-1tet/Fc mut	1.07 mg/ml	SEQ ID NO: 2

hTREM-1 tet/Fc mut 的竞争蛋白:

50X DCIR COMP	0.3 mg/ml	SEQ ID NO: 4
50X TREM COMP	1.14 mg/ml	SEQ ID NO: 5

[0245] 从流式细胞数据创建直方图。来自山羊抗 hFc/PE 缀合物的背景荧光在每个直方图中显示为背景并指定为“PE”。在每个直方图上绘制相同的标志物以指定结合第二山羊抗 hFc/PE 缀合抗体的细胞的百分比。阴性对照 Fcmut 蛋白显示 2% 阳性结合细胞, 其与单独用

山羊抗 hFc/PE 缀合物看到的背景荧光相同(图 2A)。当细胞用 2 μ g/ml hTREM-1/ 四聚体染色时,它们为 39% 阳性(图 2B)。当在 100 μ g/ml DCIR COMP 蛋白的背景下完成 TREM-1 四聚体结合时,细胞为 41% 阳性,证实 DCIR COMP 不竞争结合 TREM-1 四聚体(图 2C)。当在 100 μ g/ml TREM-1 COMP 蛋白存在的情况下完成 TREM-1 四聚体结合时,细胞为 10% 阳性,显示 TREM-1 COMP 蛋白的确与 TREM-1 四聚体竞争结合细胞(图 2D)。

[0246] 实施例 4:作为嗜中性粒细胞表达的 TREM-1 配体的 PGLYRP1 的鉴定

通过使用免疫沉淀偶联质谱(IP-MS)将 PGLYRP1 鉴定为 TREM-1 配体。可溶性 TREM-1 四聚体用作亲和“诱饵”分子以鉴定配体。简而言之,TREM-1-四聚体-Fc (SEQ ID NO:2) 和分开的 CD83-Fc (SEQ ID NO:5) 各自以 100 μ g/ml 的终浓度与 270 百万个通过如上述的葡聚糖沉降纯化的人嗜中性粒细胞在 1 mL PBS 中在 4°C 一起孵育 90 分钟并温和摇动。沉淀后,细胞重悬在 1mL PBS 缓冲液中,其包含交联剂 3,3'-二硫代双[磺酸琥珀酰亚胺丙酸酯](DTSSP)(Thermo Scientific:21578, Rockford, IL, USA),以 2 mM 的浓度并在室温孵育 30 分钟。细胞用 1mL PBS 洗涤 3X,随后在 1 mL RIPA 缓冲液(Thermo Scientific, 89901, Rockford, IL, USA)中裂解。裂解物以 15,000 X g 在 4°C 离心 10 分钟以去除不溶的材料。使用蛋白 A Mag Sepharose™ 珠(GE Healthcare Life Sciences, 28-9670-56, Piscataway, NJ, USA)从上清液中将交联到偶联探针的 Fc 的嗜中性粒细胞蛋白免疫沉淀。简而言之,50 μ L 珠首先用 200 μ L PBS 洗涤,然后重悬在 1mL 细胞裂解物中,在 4°C 孵育 60 分钟,磁力捕获并随后用 200 μ L RIPA 缓冲液洗涤 2 次,然后用 200 μ L PBS 洗涤 3 次。从最终的磁力捕获物去除 PBS 后,使用 200 μ L 包含 8M 尿素、100 mM Tris (pH8.0) 和 15mM TCEP (Thermo Scientific, 77720, Rockford, IL, USA) 的缓冲液从磁性珠上洗脱蛋白,并在室温孵育 30 分钟,捕获珠并将上清液转移到 Microcon Ultracel YM-30 过滤器(Millipore, 42410, Billerica, MA, USA)。样品在 14,000 x g, 20°C 离心 30-60 分钟,直至滤膜顶部上没有液体保留。然后用 100 μ L 8M 尿素中的 50mM IAA (碘乙酰胺)在室温下黑暗中将保留的蛋白烷基化 30 分钟。过滤器用 100 μ L 50mM NH_4HCO_3 洗涤 2 次并然后转移到新的收集管中。添加在 60 μ L 50 mM NH_4HCO_3 中的 1 μ g 胰蛋白酶(目录号 V5111, Promega, Madison WI, USA)然后在 37°C 孵育过夜。通过在 14,000 xg 离心 30 分钟收集胰蛋白酶消化物,随后用 50 μ L 50 mM NH_4HCO_3 洗涤过滤器。通过 LC/MS/MS 使用 LTQ-Orbitrap-XL 质谱仪(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)分析 10 μ L 消化物。针对 IPI 人数据库(v3.81)使用 SEQUEST-Sorcerer 引擎(4.0.4 样式(build)) (SageN, Milpitas, CA, USA) 搜索数据,并且然后用 Scaffold 3 (Proteome Software, Portland, OR, USA) 后处理以用 1% 的错误发现率过滤蛋白 ID。阴性对照扣除后,发现 PGLYRP1 是与 hTREM-1 四聚体特异性结合的高可信度蛋白。在嗜中性粒细胞中的免疫沉淀显示在 148 个鉴定的蛋白中,72 个蛋白通过对照构建体(CD83)单独免疫沉淀,73 个蛋白对于 TREM-1 和 CD83 是相同的,而只有三个是 TREM-1 特异性的(图 3)。该实验后来使用来自不同的供体的嗜中性粒细胞进行了重复并且 PGLYRP1 再次被鉴定为特异性与 hTREM-1 相互作用。

[0247] 实施例 5:从 HEK293 6E 表达的人 PGLYRP1 的纯化

通过将人 CD33 信号肽序列(SEQ ID NO: 53)与人成熟 PGLYRP1 编码序列(SEQ ID NO: 1)融合构建重组蛋白序列。所获得的开放阅读框克隆入 pcDNA3.1/Zeo(+) 载体(Life Technologies, Carlsbad CA, USA) CMV 启动子后。然后用 293fectin™ (Life

Technologies, Carlsbad CA, USA) 按照供货商的方案将所述 pcDNA3.1-hPGLYRP1 构建体转染入 HEK293 6E 细胞。转染后 5 天, 包含分泌的人 PGLYRP1 的培养上清液通过离心 (15,000 rpmX 20 min, 4°C) 收获, 并且然后通过用 0.22 μ m 硝酸纤维素膜过滤澄清。然后将澄清的上清液首先稀释 10 倍到 20mM 柠檬酸钠 pH5.0 中, 并且然后应用到 Hitrap SP HP 5 ml 柱 (17-1151-01 GE Healthcare, Uppsala, Sweden), 然后用 5 倍柱体积的 20 mM 柠檬酸钠 pH5.0 洗涤。然后用 20 mM 柠檬酸钠 pH 5.0、1 M NaCl 的 0-100% 线性梯度以 30 倍柱体积洗脱结合的人 PGLYRP1。分开合并包含人 PGLYRP1 的二聚体和单体形式的级分并通过 Amicon ultra 15 离心单元 (UFC800324 3,000 kDa MWC0, Millipore, Hellerup, Denmark) 浓缩到少于 4ml。二聚体和单体合并物进一步精加工并且通过 Hiload 26/60 Superdex 75 318ml 柱 (17-1070-01 GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 缓冲液交换到磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。离心后, 通过用 NANODROP UV 分光光度计测量 280nm 吸光度来确定最终蛋白浓度。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 评价蛋白纯度。

[0248] 实施例 6: 大肠杆菌表达的人 PGLYRP1 的重折叠和纯化

人 PGLYRP1 作为包含体在大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞中表达。通过离心收获细菌, 重悬在 50mM Tris-HCl pH8.0, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100 中并通过离心破碎。不溶沉淀用 50 mM Tris, pH 8.0, 1% TritonX-100, 2 M 尿素洗涤三次并用 50mM Tris pH8.0 洗涤一次, 然后溶解在 50 mM Tris-HCl, 6M 盐酸胍, pH7.4, 1 mM DTT 中 (终蛋白浓度 20mg/ml)。对于体外折叠, 溶解的人 PGLYRP1 包涵体稀释在 50 mM Tris, pH 8.0, 2mM EDTA, 5 mM 半胱胺, 0.5 mM 胱胺, 0.4 M 精氨酸中 (终蛋白浓度 1mg/ml)。在 4°C 过夜后, 通过离心 / 过滤使折叠混合物澄清, 并且然后稀释 12 倍到 10mM MES pH3.5 中以降低电导率和 pH (最终 pH 约 5.8, 电导率约 6mS/cm)。然后将稀释的折叠混合物应用到 Hitrap SP HP 5ml 柱 (17-1151-01 GE Healthcare, Uppsala, Sweden), 然后用 5 倍柱体积的 50 mM MES pH5.8 洗涤。然后用 50 mM MES pH 5.8, 1 M NaCl 的 0-60% 线性梯度以 20 倍柱体积洗脱结合的人 PGLYRP1。合并包含重折叠的人 PGLYRP1 的级分并通过 Amicon ultra 15 离心单元 (UFC800324 3,000 kDa MWC0, Millipore, Hellerup, Denmark) 浓缩到少于 4ml。然后使用 Hiload 26/60 Superdex 75 318ml 柱 ((17-1070-01 GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 精加工并将蛋白缓冲液交换到磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。大部分重折叠的人 PGLYRP1 蛋白以单体形式。离心后, 通过用 NANODROP UV 分光光度计测量 280nm 吸光度来确定最终蛋白浓度。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 评价蛋白纯度。

[0249] 实施例 7: 小鼠免疫和 mAb 的鉴定

使用纯化的人 PGLYRP1 免疫小鼠以产生抗体。简而言之, 小鼠免疫 3 次, 每次免疫用 20 μ g 重组 PGLYRP1。第一次免疫使用完全福氏佐剂 (目录号 3018, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) 皮下进行。随后的两次免疫使用不完全福氏佐剂 (目录号 3016, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) 腹膜内进行。最后一次免疫后 10 天, 脸颊抽血并在直接 ELISA 中针对 PGLYRP1 测试血清。

[0250] 实施例 8: 可溶性 TREM-1 与 PGLYRP1 的结合

验证新的蛋白 - 蛋白相互作用的一个常规方法是通过使用重组试剂重建相互作用。为此, 表达具有信号传导糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 结构的翻译后添加的 C 末端表位的重组人

PGLYRP1。包含末端 GPI 结构的蛋白靶向在质膜上展示。此通常应用的技术允许其它可溶性蛋白被展示并通过流式细胞技术测试结合。在图 4a 中, HEK-2936E 细胞用 pCDNA 3.1/zeo(+) hPGLYRP1-GPI (SEQ ID NO: 7) 转染, 3 μ g DNA 稀释入 100 μ l 的 Optimem (目录号 31985062, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)。将 4 μ l 的 293fectin (目录号 51-0031, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 添加到 100 μ l 的 Optimem (目录号 31985062, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 并在 22°C 孵育 5 分钟。合并 DNA/Optimem 混合物和 293fectin/Optimem 混合物并在室温下孵育额外 20 分钟。HEK-2936E 细胞在 Freestyle 培养基 (目录号 12338, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 中以 1e6/ml 稀释到 3 ml 并铺板在 6 孔皿中 (目录号 35-3046, Biosciences San Jose, CA, USA) 并且然后将 DNA/293fectin 混合物逐滴添加到细胞。细胞在 37°C 摇动孵育 48 小时。1 μ g/ml 的人 TREM-1-G4Sx3-TREM-1/Fc6mut (SEQ ID NO: 2) 稀释到 PBS/2%FBS 中并且将 50 μ l 探针添加到圆底 96 孔板 (目录号 3799, Costar, Lowell, MA, USA) 中的 80,000 个转染的 HEK293-6E 细胞中。细胞在 4°C 孵育 1 小时, 随后用 200 μ l PBS/2%FBS 洗涤 2 次。添加 50 μ l 1 μ g/ml PE 山羊抗人 Fc (目录号 109-116-098, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), 并孵育额外 1 小时随后用 PBS/2%FBS 洗涤 2 次。细胞在 1:1 PBS 稀释的 BDCytofix (目录号 554655, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 中固定 5 分钟, 并且孵育 5 分钟随后用 200 μ l PBS/2%FBS 洗涤。细胞重悬在 100 μ l PBS/2%FBS 中然后在 FACS LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA) 上分析。此实验的结果显示在图 4a 中, 其中未染色的细胞通过黑实线显示 (G03)。模拟转染细胞的 TREM-1-G4Sx3-TREM-1/Fc6mut 染色显示为虚线, 并且显示相对未染色的细胞无结合。最终, 用人 PGLYRP1-GPI 转染的细胞强力结合 TREM-1-G4Sx3-TREM-1/Fc6mut, 其用点线显示。结合的定量表示为平均荧光强度, MFI。

[0251] 除了流式细胞术, 通常还通过测量表面等离子共振 (SPR) 评价蛋白-蛋白相互作用。使用 BiacoreT200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 设备分析人 TREM-1 和人 PGLYRP1 之间并且还有人 PGLYRP1 和超声的可溶性大肠杆菌肽聚糖 (目录号 tlr1-kssp gn, Invivogen, San Diego, CA, USA) 之间的相互作用。所有测定以 20-30 μ L/ 分钟的流速在 1X HBS-P 运行缓冲液 (目录号 BR-1006-71, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 中在 25°C 进行。

[0252] 在图 4B 中, 按照制造商推荐的方法将 4641.1 RU 的人 TREM-1 四聚体 (SEQ ID NO: 2) 胺偶联到 Biacore CM5 芯片 (目录号 BR-1005-30, BR-1000-50, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)。在存在或不存在 10 μ g/mL 可溶性大肠杆菌肽聚糖 (目录号 tlr1-kssp gn, Invivogen, San Diego, CA, USA) 的情况下, 将 PGLYRP1 (目录号 2590-PG, R&D Systems, Minneapolis, USA) 在 1X HBS-P 运行缓冲液 (目录号 BR-1006-71, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 中稀释到 150 nM, 并注射经过 TREM-1 表面。数据相对活化的和封闭的 (用乙醇胺) 参考表面进行参考扣除。尽管在存在和不存在 PGN 的情况下, PGLYRP1 均结合 TREM-1, 但当 PGLYRP1 被 PGN 交联时, 似乎存在显著的亲和力效应。

[0253] 在图 4C 中, 将 274.8 RU 的 PGLYRP1 二聚体 (SEQ ID NO: 1) 胺偶联到 Biacore CM5 芯片 (目录号 BR-1005-30, BR-1000-50, GE Healthcare, Piscataway, NJ)。可溶性大肠杆菌肽聚糖 (目录号 tlr1-kssp gn, Invivogen, San Diego, CA, USA) 在 1X HBS-P

运行缓冲液中（目录号 BR-1006-71, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA）稀释到 10 μ g/mL, 并注射经过 PGLYRP1 表面。数据相对活化的和封闭的（用乙醇胺）参考表面进行参考扣除。

[0254] 在图 4D 中, 使用与图 4C 相同的芯片 (274.8 RU 的 PGLYRP1 二聚体, (SEQ ID NO: 1)。将 TREM-1 二聚体 (SEQ ID NO: 8) 在 1X HBS-P 运行缓冲液中 (BR-1006-71, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 稀释到 150nM, 并且在重复注射肽聚糖 (图 4B 中描述) 之前和之后注射。数据相对活化的和封闭的（用乙醇胺）参考表面进行参考扣除, 并且也扣除缓冲液空白注射的信号。TREM-1 显示清楚地结合固定化的 PGLYRP1。可溶性 TREM-1 二聚体类似地结合单独的固定化的 PGLYRP1 或结合已加载 PGN 的 PGLYRP1。表面固定化的 TREM-1 受体被可溶性 PGLYRP1 和 PGN 的总体结合由对被来自高度交联的 PGLYRP1 的亲合力效应增强的 PGLYRP1:TREM-1 复合物的适度亲和力组成。

[0255] 实施例 9 : TREM-1- 应答被重组 PGLYRP1 的活化

为了测试是否重组 PGLYRP1 可以活化 TREM-1 应答, 将 BWZ/ hTREM-1 报道基因细胞系接种到黑 96 孔板并在存在或不存在的 10 μ g/mL PGN 的情况下用重组人 PGLYRP1 (目录号 2590-PG-050, R&D Systems: Minneapolis, MN) 刺激。TREM-1 活化在培养 24 小时后使用 BetaGlo 试剂 (目录号 E4720, Promega, Madison, WI, USA) 读出并且使用来自 Perkin Elmer 的 TopCount 发光计数器测量发光。如图 5a 所示, TREM-1 报道基因细胞系用 PGLYRP1 刺激在存在 PGN 的情况下诱导剂量依赖性的 TREM-1 的活化。测试了几种不同的 PGN, 包括 PGN-EC (来自大肠杆菌)、PGN-SA (来自金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)) 和 PGN-BS (来自枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)) (Invivogen, San Diego, CA, USA), 并且均能够促进 PGLYRP1 诱导的 TREM-1 应答。

[0256] 重组 PGLYRP1 诱导的应答可以通过添加重组 TREM-1-Fc- 融合蛋白 (SEQ ID NO: 2) 抑制 (图 5b), 或通过添加多克隆抗 PGLYRP1 抗体 (目录号 AF-2590, R&D Systems: Minneapolis, MN, USA) 抑制, 证实 PGLYRP1 是 TREM-1 配体并且可溶性 TREM-1 和抗 PGLYRP1 潜在地可用作 TREM-1 拮抗剂。

[0257] 实施例 10 : 来自 PGLYRP1 刺激的 M1 巨噬细胞的 TNF- α 释放

单核细胞分化成 M1 巨噬细胞并用 PGLYRP1 复合物刺激, 导致在两个不同的供体中的 TNF- α 释放。

[0258] 本领域技术人员将认识到建立冷冻库收集来自多个供体的原代细胞从而提供方便的实验重复的价值。如下从外周血单核细胞产生体外衍生的巨噬细胞。使用 Rosette Sep 试剂盒 (目录号 15068 Stem Cell Technologies, Vancouver BC, Canada) 按照制造商的指导从获自 Research Blood Components (Brighton, MA, USA) 的外周血 “leukopak” 分离负富集的单核细胞。分离的单核细胞悬浮在 50e6 细胞 /ml 的 10% DMSO/FBS 等分试样中并逐渐冷却到 -80 $^{\circ}$ C。为了产生巨噬细胞, 在 37 $^{\circ}$ C 水浴中快速融化一瓶或多瓶冻存小瓶的单核细胞, 用具有 10% FBS (目录号 03-600-511, Thermo Fisher, Waltham MA, USA) 的生长培养基 RPMI 1640 (目录号 72400-047, Life Technologies, Carlsbad CA, USA) 稀释到 10ml 并在 250g 离心 5 分钟。细胞在补充 50 ng/ml 人 MCSF (目录号 PHC9501, Life Technologies, Carlsbad CA, USA) 的生长培养基中悬浮至 2e6 个细胞 /ml, 置入组织培养物处理的佩特里式 (petri style) 组织培养板并放入加湿的培养箱, 设置维持 5% CO₂, 2% O₂

的“低氧”气氛。在培养的第三天,将细胞饲喂添加等体积的补充有 50 ng/ml 人 MCSF 生长培养基。培养 6 天后,所述单核细胞已分化成 M0 巨噬细胞。通过将培养基换成补充有 50 ng/ml 人 IFN γ (目录号, PHC4031, Life Technologies, Carlsbad CA, USA) (对于 M1 巨噬细胞)或 40 ng/ml 人 IL-4 (目录号 PHC0045, Life Technologies, Carlsbad CA, USA) (对于 M2 巨噬细胞)的生长培养基并放回培养箱额外 22 小时,使 M0 细胞进一步分化。在第 7 天,巨噬细胞合适地分化用于生物测定中。简而言之,通过用 1x PBS 随后是 PBS 中的 5mM EDTA 洗涤,将巨噬细胞从培养板回收。然后将板放回 37°C 30 分钟,并且将细胞使用 10ml 注射器和 22G 针头从板上“强力洗下 (power washed)”。然后将细胞稀释到生长培养基中,在 250g 离心 5 分钟,之后将细胞沉淀悬浮到 1e6/ml 的终浓度。

[0259] 如上制备的巨噬细胞用在生物测定中,其中通过 ELISA 在条件培养基中测量应答于用 TREM-1 配体刺激细胞产生的细胞因子例如 TNF- α 。进一步利用这样的生物测定来测量通过 TREM-1 特异性抗体的 TREM-1 配体刺激的阻断。在生长培养基中以 4X 浓度制备 TREM 配体或阴性对照,并且将 50 微升 / 孔添加到 96 孔微量滴定板中。TREM-1 配体的终浓度由 7.5ng/ml 重组人 PGLYRP1(如实施例 5 所述生成)和 3 μ g/ml PGN-BS (目录号, tlr1-pgnbs, Invivogen, San Diego CA, USA) 组成。如上述在加湿低氧条件下培养细胞 22 小时,之后收集条件培养基并且按照制造商的指导(目录号 DY210, R&D Systems, Minneapolis MN, USA)通过 ELISA 测量 TNF- α 水平。

	供体1		供体2	
	TNF- α , pg/ml		TNF- α , pg/ml	
<u>M1 巨噬细胞与:</u>	<u>Avg</u>	<u>SD</u>	<u>Avg</u>	<u>SD</u>
无添加	0	0	22	1
0.4 μ g/ml PGN-BS	357	153	764	139
2.0 μ g/ml PGN-BS	3086	151	5792	226
5 μ g/ml PGLYRP1 + 0.4 μ g/ml PGN-BS	7502	384	7819	945
5 μ g/ml PGLYRP1 + 2 μ g/ml PGN-BS	31440	1030	40418	1633

[0260] 此实施例表明 TREM-1 配体 PGLYRP1 能够进一步增加从来自两个不同供体的巨噬细胞中的 TNF- α 释放。

[0261] 实施例 11 :在用 PGLYRP1 刺激后从 RA 患者滑膜组织细胞的细胞因子释放。

[0262] 在全膝盖替换过程中从 RA 患者获得滑膜组织样品。经由 4mg/ml 胶原酶 (目录号 11088793001, Roche, Mannheim, Germany) 和 0.1mg/ml DNase (目录号 11284932001, Roche, Mannheim, Germany) 通过在 37°C 消化 1 小时分离滑膜组织细胞的单悬浮液 (Single suspension)。

[0263] 以 1x10⁵/孔在培养基 RPMI (目录号 R0883, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) +10% FCS (目录号 S0115, BioChrom AG, Grand Island, NY 14072, USA)

中的滑膜组织细胞用 4ug/ml PGLYRP1 和 1ug/ml PGN-ECNDi (目录号 tlrl-kipgn, Invivogen, San Diego, CA 92121, USA) 刺激。孵育 24 小时后,收获细胞上清液,并且通过 ELISA (TNF- α (目录号 DY210, R&D Systems, Minneapolis, MN55413 USA)、IL-1 β (目录号 88-7010-88, eBioscience, San Diego CA USA)、GM-CSF (目录号 88-7339-88, eBioscience, San Diego CA USA) 或 Flowcytomix (TNF- α 、IL-1 β 、MIP-1 β 、MCP-1、IL-6 和 IL-8 (目录号 BMS, eBioscience, San Diego CA USA) 测量细胞因子。用 TREM-1 配体刺激后,从滑膜组织分泌细胞因子。

细胞因子 (pg/ml)	PGN	PGN+PGLYRP1
TNF α	623.69	1444.59
IL-1 β	2419.42	3772.74
GM-CSF	181.91	615.91
MIP-1 β	2457.955	4394.725
MCP-1	273.055	471.26
IL-6	2056.94	4189.355
IL-8	2574.56	5509.195

[0264] 此实施例显示来自类风湿关节炎患者的滑膜组织的细胞将通过分泌很多细胞因子对通过 TREM-1 配体 PGLYRP1 的刺激应答。

[0265] 实施例 12 :抑制 TREM-1 活化的抗 PGLYRP1 mAb 的鉴定

为了鉴定可以阻断 TREM-1 应答的单克隆抗 PGLYRP1 mAb,用重组人 PGLYRP1 免疫 wtbalb/c 小鼠。通过 PGLYRP1 蛋白上的直接 ELISA 进行初级筛选,并且随后在 BWZ/hTREM-1 报道基因细胞测定中测试所有 PGLYRP1 特异性杂交瘤上清液,以鉴定能够抑制如实施例 1 下所述的由 PGN 刺激的嗜中性粒细胞诱导的 TREM-1 活化的单克隆抗 PGLYRP1 抗体。如下运行生物测定:在存在 75 ng/ml PGLYRP1 (SEQ ID NO: 1) 与 2.5 μ g/ml PGN-ECndi (目录号 tlrl-kipgn, Invivogen San Diego, CA, USA) 的情况下,40,000 hTREM-1/BWZ. 36 细胞/孔铺板在透明底的黑 96 孔板,以提供次最大 (sub-maximal) 阳性信号,或可替代地在存在次最大水平 (1 μ g/ml) 的塑料吸附的抗 TREM-1 单克隆抗体 (目录号 MAB1278 R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 的情况下,以提供阳性信号。将测试抗体滴定入从 10 μ g/ml 开始,5 个连续的 2 倍稀释的测定。所述测定在 37°C 孵育过夜,并根据 Beta Glo 方案,用 Beta Glo (目录号 E4740, Promega Madison, WI, USA) 显色,并记录发光。数据绘图显示 Beta Glo 相对发光单位相对测试抗体浓度。在各个测试板上运行非中和性阴性对照 mIgG1 (目录号 MAB002, R&D Systems Minneapolis, MN, USA) 和中和性阳性对照多克隆山羊抗 hPGLYRP1 抗体 (目录号 AF2590, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)。如图 6a 中所示,F10、F14、F29、F36、F38、F77、F95 和 F105 鉴定为能够阻断 TREM-1 对 PGLYRP1 的应答。图 6B 显示其它 PGLYRP1 抗体杂交瘤上清液能够阻断 TREM-1 依赖性信号。M-hPGRPS-2F5 (SEQ ID NOs: 31-32 和 -2F7 (SEQ ID NOs: 35-36) 是非常有效的阻断剂。相反,在相同的测定方案中可商购获得的单克隆抗 PGLYRP1 抗体和抗 PGLYRP1 山羊多克隆阳性对照 (目录

号 AF2590, R&D Systems Minneapolis, MN, USA) 的测试显示这些都不能阻断 TREM-1 活化(图 6C)。所测试的抗 PGLYRP1 抗体包括:来自 Thermo Scientific 的 188C424(6D)、来自 US Biological 的 4H230 和 9A319 Mabs (图 6D、6E);所有均不能阻断 TREM-1 生物测定的 PGLYRP1 刺激。发现来自 Santa Cruz Biotechnology 的克隆 6D653(图 6F 和 6G) 非特异性地阻断测定,基于如下观察, Mab 阻断 PGLYRP1 (6F) 和抗 TREM-1 刺激 (6G),而阳性对照抗 PGLYRP1 多克隆 Ab 仅阻断 PGLYRP1 介导的活化。此非特异性阻断可能由于叠氮化物对生物测定的毒性。

[0266] 总之,已经鉴定 PGLYRP1 单克隆抗体不仅结合 PGLYRP1 也中和其 TREM-1 信号传导活性。相对于鉴定 PGLYRP1 抗体的常规方法,用于鉴定这些分子的方法提供了独特的优势,这通过商购抗体不能中和 PGLYRP1 来证实。

[0267] 实施例 13 :PGLYRP1 抗体阻断 TREM-1 特异性信号

对 PGLYRP1 杂交瘤克隆进行测序并且重组表达为 hIgG 抗体。这两个 mAb 0182 (来自 1F36) (SEQ ID 15 和 16) 和 mAb 0184 (来自 1F105) (SEQ ID 23 和 24) 在如实施例 13 所述的 BWZ/hTREM-1 报道基因细胞测定中重新测试。这些抗 PGLYRP1 抗体以剂量依赖性方式阻断 BWZ/hTREM-1 报道基因细胞测定中的 TREM-1 应答。

	BWZ.36/hTREM-1 应答, Beta Glo RLU					
抗体	同种型		182		184	
ug/ml	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD
0	74636	10004	74636	10004	74636	10004
0,16	70289	13018	81858	3336	60738	5449
0,31	68555	5585	73382	650	59830	2837
0,63	68105	11547	73831	7818	51198	397
1,25	71797	8545	63280	1663	46447	708
2,5	69207	5004	51675	1270	42062	1953
5	76951	901	33641	842	36194	1461
10	83930	8962	20655	1080	25239	407
20	74555	511	11852	464	21333	115
40	72296	8228	7696	306	15693	1861

[0268] 此实施例显示,与图 6C-G 中所示的可商购获得的针对 PGLYRP1 的抗体相反,本文公开的 PGLYRP1 抗体在 BWZ/hTREM-1 报道基因细胞测定中能够阻断 TREM-1 特异性信号。

[0269] 实施例 14 :来自 PGLYRP1 刺激的 M2 巨噬细胞的 TNF- α 释放

单核细胞分化成 M2 巨噬细胞并用 PGLYRP1 复合物刺激。针对 PGLYRP1 的抗体 (10 μ g/ml) mAb -0182 和 -0184 能够降低 TNF- α 释放。M2 巨噬细胞如实施例 10 中所述分化。在生长培养基中以 4X 浓度制备待测试的抗体,并添加 50 微升/孔。开始生物测定的最终步骤是添加 100 微升/孔的如上述制备的 M2 巨噬细胞。测试 PGLYRP1 单克隆抗体 (mAb 0182 和

mAb 0184) 对 M2 巨噬细胞的中和活性。在下列条件下测试重复(除非另有说明)测试孔:无添加的刺激,仅 7.5 ng/ml PGLYRP1,仅 3 μ g/ml PGN-BS (目录号 t1rl-pgnbs, Invivogen San Diego, CA, USA) (重复六次),PGLYRP1 与 PGN-BS (重复六次)和在存在 PGLYRP1 抗体或 hIgG4 同种型对照抗体的情况下的 PGLYRP1 与 PGN-BS,所述 PGLYRP1 抗体或 hIgG4 同种型对照抗体在 40 μ g/ml 和 0.31 μ g/ml 之间的浓度以 2 倍稀释滴定。

M2 巨噬细胞与:	供体1 TNF-α, pg/ml		供体2 TNF-α, pg/ml	
	Avg	SD	Avg	SD
无添加	108	42	68	16
PGLYRP1	167	98	89	33
PGN	424	105	635	156
PGLYRP1+PGN	1660	198	2168	210
PGLYRP1+PGN+ 同种型	1726	182	2483	251
PGLYRP1+PGN+mAb 0182	1322	173	2014	107
PGLYRP1+PGN+mAb 0184	1207	168	1948	173

[0270] 此实施例表明 TREM-1 配体 PGLYRP1 能够进一步增加从来自两个不同供体的 M2 巨噬细胞的 TNF- α 释放,并且本文公开的抗体能够降低该 TNF- α 释放。因此,这些 PGLYRP1 抗体潜在地可用作 TREM-1 拮抗剂。

[0271] 实施例 15 :TREM-1 和 PGLYRP1 相关分子之间的结合相互作用的调查证实特异性。

[0272] 已鉴定了在存在 PGN 的情况下, TREM-1 能够结合 PGLYRP1 并活化 TREM-1,我们开始确定 TREM-1 是否可以结合其它 PGLYRP 家族成员。通过在 N 末端添加衍生自 II 型受体 MDL-1 的细胞内(IC)和跨膜结构域(TM)将 PGLYRP1 人工锚定在细胞膜中。后一个构建体称为 II 型 PGLYRP1(图 9a)。在 II 型 1.0(SEQ ID NO: 37)中,天然 MDL-1 受体 TM 的带电荷的氨基酸被保留,并且此蛋白的有效表达取决于 DAP12 的共表达。在 II 型 2.0 PGLYRP1 构建体(SEQ ID NO: 38)中,带电荷的 TM 残基已用中性氨基酸取代(赖氨酸到亮氨酸),使蛋白能够独立于例如 DAP12 表达,并且添加 DYKDDDDK (SEQ ID NO: 39) 表位标签。全长 hPGLYRP2 (SEQ ID NO: 40)、hPGLYRP3 (SEQ ID NO: 41) 和 hPGLYRP4 (SEQ ID NO: 42)],cDNAs 合成膜锚定的蛋白,使用如上文用于 PGLYRP1 的 II 型 2.0 MDL1 N 末端的 N 末端融合。cDNA 亚克隆到修饰的 pTT5 表达质粒载体中(Zhang J 等 Protein Expression and Purification, Vol. 65, Issue 1, May 2009, pp 77-8),并且如实施例 8 中所述与空载体阴性对照(模拟物)一起转染入 HEK293-6E 细胞。对于下列探针的表面和细胞内结合,通过流式细胞术分析细胞:山羊抗-人 PGLYRP1 (PGRPS) (目录号 AF2590, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA);Mab 抗-人 PGLYRP2 (PGRP-L) (目录号 MAB0755, Abnova, Walnut, CA, USA);Mab 抗-人 PGLYRP3 (PGRP-1a) (目录号 MAB0068, Abnova, Walnut, CA, USA);Mab 抗-人 PGLYRP3 (PGRP-1a) (目录号 ab13901, Abcam, Cambridge MA, USA);兔抗-人 PGLYRP3 (PGRP-1a) (目录号 18082-1-AP, Protein Tech, Chicago IL, USA);山羊

抗-人 PGLYRP4-生物素 (PGRP-1b) (目录号 BAF3018, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA);山羊抗-小鼠 PGLYRP1 (PGRPS) (目录号 AF2696, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA);huTREM-1.Fc 二聚体 (C0099);huTREML1.Fc 二聚体 (C0246);huTREML2.Fc 二聚体 (C0247);huTREM2.Fc 二聚体 (C0248)。结合方案如下进行,使用 cytofix/perm 缓冲液 (目录号 51.2090KZ, BD Biosciences, San Jose CA, USA) 用于细胞内染色或 2% FBS/PBS 用于表面染色:在 22℃将细胞沉淀用 200 μ l cytofix/perm 缓冲液重悬在 96 孔圆底板 (开始于:160,000 个细胞/孔) 15 分钟,用 200 μ l 1x PermWash 缓冲液 (在 DiH₂O 中稀释 10x) 洗涤两次,用 50 μ l 在 1x PermWash 缓冲液中稀释到 5 μ g/ml 的探针染色,在 4℃孵育 1 小时,然后用 200 μ l 1x PermWash 缓冲液洗涤细胞,添加在 50 μ l 1x PermWash 缓冲液中的第二探针,细胞在 4℃孵育 30 分钟,用 200 μ l 1x PermWash 缓冲液洗涤两次,沉淀重悬在 50 μ l 1:1 PBS 稀释的 CytoFix (BD:554655, San Jose, CA) 中,在 22℃孵育 5 分钟,添加 150 μ l PBS/2%FBS,在 300g 离心 5 分钟,用 200 μ l PBS/2%FBS 洗涤一次并重悬在 100 μ l PBS/2%FBS 中。使用 FACS 在 LSRII (BD, San Jose CA, USA) 上分析结合。

[0273] 如下表总结, TREM-1 探针排他性结合 hPGLYRP1 并且没有检测到结合 PGLYRP2、PGLYRP3 或 PGLYRP4 的 hTREM 家族成员。

	模拟物	II型 PGLYRP1	II型 PGLYRP2	II型 PGLYRP3	II型 PGLYRP4	II型 PGLYRP 3+4	II型 muPGLYRP1
抗 huPGLYRP1 (R&D, AF2590)	-	++++	-	-	++	+	++++
抗 huPGLYRP2 (Abnova, MAB07755)	-	-	++++	-	-	-	n/d
抗 huPGLYRP3 (Abnova, MAB0068)	-	-	-	-	-	-	n/d
抗 huPGLYRP3 (Abcam, ab13901)	-	-	-	-	-	-	n/d
抗 huPGLYRP3	-	-	-	-	-	-	n/d

(Proteintech, 18082-1-AP)							
抗 huPGLYRP4 (R&D, BAF3018)	-	++++	-	-	++++	++++	n/d
抗 muPGLYRP1 (R&D, AF2696)	-	++++	n/d	n/d	n/d	n/d	++++
huTrem1.Fc (C0099)	-	++++	-	-	-	-	-
huTremL1.Fc (C0246)	-	-	-	-	-	-	-
huTremL2.Fc (C0247)	-	-	-	-	-	-	n/d
huTrem2.Fc (C0248)	-	-	-	-	-	-	n/d

[0274] 人膜锚定的 PGLYRP1、PGLYRP2、PGLYRP3 和 PGLYRP4 在 HEK293 中瞬时表达并用内部和商购可溶性受体两者以及抗体探测,以鉴定家族成员之间新的相互作用。结合评分表示为“n/d”、“-”、“+”或“++++”。评分是探针染色相对阴性对照染色的平均荧光强度(MFI)的比例;“-”等于<1的比例,“++++”表示>30的评分并且“++”表示约10-15,“+”表示2-5,具有统计学显著性差异($p < 0.05$)。本领域技术人员可以将这些评分分别表征为阴性、明亮(bright)或暗淡(dim)。

[0275] TRME-1 仅结合 PGLYRP1,并且不结合其它 PGLYRP 成员,反之亦然:PGLYRP1 仅与 TREM-1 相互作用,并且不与其它 TREM 成员相互作用。

[0276] 实施例 16:TREM-1 配体存在于 RA 滑液样品中。

[0277] 类风湿关节炎特征在于掌指(MCP)关节炎,其中活化的粒细胞发挥显著作用。通过 ELISA 测定并在 BWZ/hTREM-1 报道基因细胞测定中测试从 9 名 RA 患者的 MCP 关节中抽取的滑液中的 PGLYRP1。按照制造商的指导(Promega, Madison WI, USA),将商购来源的滑液(Asterand, Detroit MI, USA)解冻,旋涡振荡并系列稀释在 ELISA 缓冲液中,并在 PGLYRP1 测定运行。9 名患者中的 4 名显示升高的 PGLYRP1 水平:

RA SF 供体	PGLYRP1, ng/ml	
	Avg	SD
1	14	5
2	8	1
3	213	44
4	229	58
5	135	49
6	47	4
7	39	13
8	116	33
9	32	1

[0278] 随后在如实施例 2 中所述的 BWZ 报道基因测定中测定 RA 滑液样品的 TREM 配体活性。简而言之,将滑液解冻,旋涡振荡并系列稀释,在添加多克隆 PGLYRP1 抗体(目录号 AF2590, Promega, Madison WI, USA)或阴性对照多克隆的 $\pm 10 \mu\text{g/ml}$ PGNECndi (Invivogen, San Diego, CA, USA) 中重复测定。塑料粘附的单克隆 TREM-1 和同种型抗体(R&D Systems, Minneapolis MN, USA) 分别充当阳性和阴性对照。图 8 显示来自类风湿关节炎患者的滑液如何能够以 PGLYRP1 依赖性方式触发 BWZ/hTREM-1 报道基因测定的实例。

[0279] 实施例 17 :在 PGLYRP1 :TREM 1 相互作用的鉴定和表征中可用的哺乳动物表达载体的组装

A.) pJSV002 hTREM-1-G4Sx3-hTREM-1/Fc6mut (SEQ ID NO: 9) 的构建

通过消除包含可变和恒定 1(CH1)结构域的人 IgG1 的前 215 个氨基酸并在铰链、恒定 2 和恒定 3 结构域中进行下列氨基酸取代来建立人 IgG1 的 Fc 受体结合缺陷版本(version): (E216G、C220S、L234A、L235E、G237A、A330S、P331S)。该构建体被命名为 Fc6mut,因为进行了 6 个突变以调节对 Fc 受体的结合,而掺入第 7 个突变(E216G)以创建 Apa I 限制克隆位点。将这些突变置入 pJSV002 (修改的 pTT5, Zhang J 等 Protein Expression and Purification, Vol. 65, Issue 1, May 2009, pp 77-8)允许将 Fc6mut 的 5' 的受体胞外结构域作为 EcoRI/Apa I 片段克隆。合成 cDNA,其具有 5' EcoRI 限制性位点、GCCACC Kozak 序列 CD33 前导序列随后是人 TREM-1 的细胞外结构域(aa17-200),具有相互间隔的 KpnI 限制性位点和重复 3 次的甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸间隔序列(G4Sx3)随后是人 TREM-1 的细胞外结构域的额外拷贝(aa17-200)和 ApaI 位点以允许克隆 Fc6mut 的上游。用 EcoRI 和 ApaI 切割此合成的 DNA 并连接入也已经用 EcoRI/ApaI 消化制备的 pJSV002 Fc6mut。将此连接物电穿孔入 DH10B 大肠杆菌并涂布到氨苄青霉素琼脂板上。单个克隆在 2ml LB+ 氨苄青霉素培养物中生长过夜,并且微量制备,随后用 EcoRI/ApaI 限制筛选以发现具有适当的 1219 碱基对插入片段的克隆。对正确的克隆测序,并且选择正确的克隆之一(#519)用

于通过大量制备 (big prep) 制备额外的 DNA。

[0280] B.) *hTREM-1-COMP-SBP38x2-6His* (SEQ ID NO: 10) 的构建

为了产生五聚体 TREM ECD 分子,在 pJSV002 表达载体中创建了 C 末端表位标签。编码软骨寡聚蛋白 (COMP) 的 3' 端的合成 cDNA 融合到两个拷贝的链霉抗生物素蛋白结合蛋白结构域 (SBP) 随后是 C 末端 6xHis 结构域,置入 pJSV002 使得受体的细胞外结构域可以作为 EcoRI/KpnI 片段被克隆作为此片段的 5'。随后合成 hTREMcDNA,其包含 EcoRI 限制位点,随后是 GCCACC Kozak 序列和具有 C 末端 KpnI 位点的人 TREM-1 的细胞外结构域。将此 EcoRI/KpnI 片段连接入上述 pJSV002 COMP-SBP38x2-6His 载体。将此连接物电穿孔入 DH10B 大肠杆菌 (Life Technologies, Carlsbad CA, USA) 并涂布到氨苄青霉素琼脂板上。单个克隆在 2ml LB+ 氨苄青霉素培养物中生长过夜,并且微量制备,随后用 EcoRI/KpnI 限制筛选以发现具有适当的 616bp 插入片段的克隆。对正确的克隆测序,并且选择正确的克隆之一 #525 用于通过大量制备来制备额外的 DNA。所述全长 cDNA 列举为 SEQ ID NO: 10。

[0281] C.) *pJSV002 hCD83-G4Sx3-hCD83/Fc6mut* (SEQ ID NO: 11) 的构建

当针对广泛的细胞系进行测试时,hCD83 四聚体先前已通过 FACS 分析证明具有具有低结合,并且因此成为实施例 3 中列举的 IPMS 实验的优良的阴性对照。为了产生此分子,合成 cDNA,其具有 5' EcoRI 限制性位点、GCCACC Kozak 序列、CD33 前导序列随后是人 CD83 的细胞外结构域,具有相互间隔的 KpnI 限制性位点和重复 3 次的甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸间隔序列 (G4Sx3) 随后是人 CD83 的细胞外结构域的额外拷贝。然后将此 cDNA 克隆到先前所述的 pJSV002 表达载体中 hFc6mut 的上游。所获得的成熟蛋白列举为 SEQ ID NO: 6,并且 EcoRI 和 ApaI 之间串联 CD83 细胞外结构域 cDNA 序列显示为 SEQ ID NO: 11。

[0282] D.) *pJSV002 NCOMP-hDCIR* (SEQ ID NO: 12) 的构建

作为实施例 5 中使用的 hTREM-1-COMP 五聚体的阴性对照,使用 hDCIR-COMP。用下列元件产生基于 pJSV002 的表达质粒:6xHIS 标签随后是融合到软骨寡聚蛋白 (COMP) 的 3' 端的链霉抗生物素蛋白结合蛋白结构域 (SBP) 的两个拷贝,使得 2 型受体的细胞外结构域可以克隆此片段的 3' 为 BglIII/BamHI 片段,并且表达为五聚体可溶性受体。从合成的 cDNA 模板扩增 PCR 片段,以生成分别在 5' 和 3' 端具有 BglIII 和 BamHI 端的 DNA 片段。用 BglIII 和 BamHI 限制酶切割此片段,然后进行条带纯化。所获得的片段连接入先前已用 BglIII 和 BamHI 切割的 pJSV002 NCOMP。将此连接物电穿孔入 DH10B 大肠杆菌并涂布到氨苄青霉素选择琼脂上。挑取克隆,微量制备并用 EcoRI 和 BamHI 筛选并且对具有适当的 1.137kB 插入片段的克隆进行测序。编码包括 NCOMP-SBP 和 DCIR 序列的全长开放阅读框的 cDNA 指定为 SEQ ID NO: 12,并且编码先前提及的成熟肽序列的 cDNA 指定为 SEQ ID NO: 4。

[0283] E.) *pNNC649-hTREM-1-hFc6mut* 二聚体的构建

实施例 14 中使用 TREM-1-Fc 二聚体以证实对 PGLYRP1 的结合并测试对其它 PGLYRP 家族成员的结合。利用基于 pTT5 的质粒 (Zhang J 等, Protein Expression and Purification, Vol. 65, Issue 1, May 2009, pp. 77-8) pNNC649 以允许受体胞外结构域框架内和 Fc6mut 的 5' 的克隆。为了表达 hTREM-1-Fc6mut,合成 cDNA,其具有 5' EcoRI 限制性位点、GCCACC Kozak 序列和 hCD33 前导序列,随后是人 TREM-1 的细胞外结构域 (aa17-200),随后是 KpnI 位点。使用本领域技术人员熟悉的限制酶和 DNA 连接酶技术将此 cDNA 克隆入 pNNC549。编码包括 CD33 前导肽、hTREM-1 ECD 和 Fc6mut 序列的全长开放阅

读框的 cDNA 指定为 SEQ ID NO: 43, 并且编码成熟肽序列的 cDNA 指定为 SEQ ID NO: 44。

[0284] F.) *pNNC649-hTREML1-Fc6mut* 二聚体的构建

产生合成 cDNA, 其具有 5' EcoRI 限制位点、GCCACC Kozak 序列和 hCD33 前导序列, 随后是人 TREML1 的细胞外结构域(aa16-162), 随后是 Kpn1 位点。使用本领域技术人员熟悉的限制酶和 DNA 连接酶技术将此 cDNA 克隆入先前所述的 pNNC549 载体。编码包括 CD33 前导肽、hTREML1 ECD 和 Fc6mut 序列的全长开放阅读框的 cDNA 指定为 SEQ ID NO: 45, 并且编码成熟肽序列的 cDNA 指定为 SEQ ID NO: 46。

[0285] G.) *pNNC649-hTREML2-Fc6mut* 二聚体的构建

产生具有 5' EcoRI 限制位点、GCCACC Kozak 序列和 hCD33 前导序列, 随后是人 TREML2 的细胞外结构域(aa19-268), 随后是 Kpn1 位点的合成 cDNA。使用本领域技术人员熟悉的限制酶和 DNA 连接酶技术将此 cDNA 克隆入先前所述的 pNNC549 的载体。编码包括 CD33 前导肽、hTREML2 ECD 和 Fc6mut 序列的全长开放阅读框的 cDNA 指定为 SEQ ID NO: 47, 并且编码成熟肽序列的 cDNA 指定为 SEQ ID NO: 48。

[0286] H.) *pNNC649-hTREM2-Fc6mut* 二聚体的构建

产生具有 5' EcoRI 限制位点、GCCACC Kozak 序列和 hCD33 前导序列, 随后是人 TREM2 的细胞外结构域(aa19-174), 随后是 Kpn1 位点的合成 cDNA。使用本领域技术人员熟悉的限制酶和 DNA 连接酶技术将此 cDNA 克隆入先前所述的 pNNC549 的载体。编码包括 CD33 前导肽, hTREM2 ECD 和 Fc6mut 序列的全长开放阅读框的 cDNA 指定为 SEQ ID NO: 49, 并且编码成熟肽序列的 cDNA 指定为 SEQ ID NO: 50。

[0287] 实施例 18: 多聚化的 PGLYRP1 活化 TREM-1

通过结合分析和 IP/MS 蛋白质组学鉴定 TREM-1 的反结构(counter-structure)或配体。随后通过特异性阻断验证配体 PGLYRP1 (或 PGRP-S) 的身份。

[0288] 有意思的是, 尽管可以证明可溶性 PGLYRP1 结合 TREM-1, 但是 TREM-1 被 PGLYRP1 的活化需要支架试剂例如嗜中性粒细胞细胞外陷阱(NETs)或 PGN 的同时存在。

[0289] 为了测试是否 PGLYRP1 的这种可替代的和多聚化形式可以结合和/或活化 TREM-1, 设计并表达了细胞相关联的 PGLYRP1 蛋白。测试了两种概念上不同 PGLYRP1 构建体。在一个中, 将 GPI 锚定序列基序添加到 PGLYRP1 的 C 末端。在另一个中, 通过在 N 末端添加衍生自 II 型受体 MDL-1 的细胞内(IC)和跨膜结构域(TM)将 PGLYRP1 人工锚定在细胞膜中。后一个构建体称为 II 型 PGLYRP1 (图 9a)。在 II 型 1.0 (SEQ ID NO: 37)中, 天然 MDL-1 受体 TM 的带电荷的氨基酸被保留, 并且此蛋白的有效表达取决于 DAP12 的共表达。在 II 型 2.0 PGLYRP1 构建体 (SEQ ID NO: 38) 中, 带电荷的 TM 残基已用中性氨基酸取代(赖氨酸到亮氨酸), 使蛋白能够独立于例如 DAP12 表达。在 HEK293 6E 细胞中瞬时表达编码这些构建体的 cDNA, 在转染后第二天收获细胞并分析它们刺激报道基因细胞系 BWZ/hTREM1 的能力。II 型 PGLYRP1 转染子与 BWZ/hTREM1 报道基因细胞在不存在 PGN 的情况下共孵育。18 小时后使用 BetaGlo 试剂(目录号 E4720, Promega, Madison WI, USA)读出 TREM-1 活化。表达 II 型 PGLYRP1 的转染子在不存在 PGN 的情况下诱导 TREM-1 的活化, 达到比用空表达载体转染的对照细胞看到的高 24 倍的水平。相反, 经由 PGLYRP1 的 C 末端固定化的 GPI 锚定的 PGLYRP1 不介导任何 TREM-1 活化。膜结合和固定化的 PGLYRP1 蛋白在细胞表面的表达通过流式细胞术使用多克隆抗 PGLYRP1 抗体(AF2590)确定。两个蛋白 II

型 PGLYRP1 和 GPI-PGLYRP1 均证明的确是细胞表面表达的。

构建体	倍数活性
C-GPI PGLYRP1	2.0 ± 0.4 (n=3)
II型 1.0 PGLYRP1	24 ± 3.3 (n=3)

[0290] 上表显示经由 C 末端 GPI 锚结合到细胞膜表面的 PGLYRP1 在诱导 TREM-1 活性中不如经由 N 末端部分结合细胞膜的 II 型 PGLYRP1 蛋白有效。这表明能够刺激 TREM-1 的游离 C 末端 PGLYRP1 部分的重要性。

[0291] 进一步证明 II 型 PGLYRP1 活化被抗 PGLYRP1 抗体特异性抑制。因此添加高浓度 (1 μg/100 μl 测定体积) 的多克隆 (目录号 AF2590, R&D Systems, Minneapolis MN, USA) PGLYRP1 抗体能够完全抑制此 PGLYRP1 诱导的活性。

条件	活性
II型 1.0 PGLYRP1	100%
II型 1.0 PGLYRP1 + IsoAb	98%
II型 1.0 PGLYRP1 + AF2590	9.7%

[0292] 恰好在 PGLYRP1 的 C 末端结构域的序列似乎对于活化 TREM-1 受体的能力是关键的。作为共同特征共有在 PGLYRP1 的最远 C 末端的修饰的几个构建体因此已被发现不介导 TREM-1/BWZ 报道基因活性的活化,而相反在 N 末端已修饰的相应的构建体的确展示活性。

构建体	活性
PGLYRP1 天然	+++
PGLYRP1 N-Flag	+++
PGLYRP1 C-Flag	-
PGLYRP1 N-Fc	+++
PGLYRP1 C-Fc	(+)
II型 1.0 PGLYRP1	+++
PGLYRP1 C-GPI	(+)

[0293] 这表明能够刺激 TREM-1 的游离 C 末端 PGLYRP1 部分的重要性。

[0294] 解释及生物学观点

在存在 PGN 的情况下使用天然 PGLYRP1 配体或可替代地使用新的 PGLYRP1 变体(已证明其克服了对 PGN 的需要)活化 TREM-1 受体的能力,清楚地证明 PGN 不是 TREM-1 活化的绝对的辅因子需要。各种分子 PGLYRP1 形式(其证明赋予 PGN 非依赖性的 TREM-1 活化)的共同特征似乎是高密度的形式,导致假说即当充当天然配体的辅因子时,PGN 的主要作用是提供支架用于多聚化。在体内,这样的支架可以通过嗜中性粒细胞细胞外陷阱(NETs)提供 (Blood 2005, 106: 2551-58) 或其它天然存在的基质结构,例如透明质酸 (hyaloronic

acid)、蛋白聚糖结构(如多功能蛋白聚糖、聚集蛋白聚糖、核心蛋白聚糖或纤维蛋白)提供,所有这些都可能多聚化或以其它方式呈现 PGLYRP1。

[0295] 这些发现表明 PGLYRP1 的 C 末端部分的修饰降低 TREM-1 活化,其从而表明用试剂,例如针对 PGLYRP1 的 C 末端部分的抗体封闭 PGLYRP1 的 C 末端部分,将降低 TREM-1 相互作用并从而降低 TREM-1 刺激。

[0296] 实施例 19:II 型 PGLYRP1 能够诱导来自类风湿关节炎患者的滑膜组织细胞中 TNF- α 释放。

[0297] 在全膝盖替换过程中从 RA 患者获得滑膜组织样品。经由 4mg/ml 胶原酶(目录号 11088793001, Roche, Mannheim, Germany)和 0.1mg/ml DNase(目录号 11284932001, Roche, Mannheim, Germany)通过在 37°C 消化 1 小时分离滑膜组织细胞的单悬浮液。滑膜组织细胞(1×10^5 /孔在培养基 RPMI(目录号 22400105, Life Technologies, Carlsbad CA, USA) +10 % FCS(目录号 S0115, BioChrom AG, Berlin, Germany)中)与多个剂量的用 II 型 PGLYRP1 瞬时转染的 HEK 细胞在低氧条件下共培养。孵育 24 小时后,收获细胞上清液,并且通过 TNF- α ELISA(目录号 DY210, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)测量细胞因子。

II 型 PGLYRP1 (HEK 转染的)/对照 HEK	TNF- α (pg/ml) 释放					
	1×10^5	3×10^4	1×10^4	3×10^3	1×10^3	0
IgG4+ II 型	121.17	114.08	95.02	54.56	57.87	33.47
IgG4+ 对照	55.65	63.73	57.99	33.78	36.40	36.32

[0298] 此实施例显示 TREM-1 配体可以以剂量依赖性的方式诱导来自类风湿关节炎患者的滑膜组织细胞的 TNF- α 。

[0299] 实施例 20:PGLYRP1 抗体阻断嗜中性粒细胞中 TREM-1 介导的信号并降低 IL-8 释放

已经证明嗜中性粒细胞可以释放 PGLYRP1 并且嗜中性粒细胞还表达 TREM-1 受体,我们测试了是否嗜中性粒细胞衍生的 PGLYRP1 可以以自分泌的方式刺激嗜中性粒细胞。用 PGN-SA(目录号 tlr1-pgnsa, Invivogen, San Diego CA, USA)刺激分离的嗜中性粒细胞,并且测量释放进入培养基的 IL-8。PGLYRP1 抗体 mAb 0184 能够降低 PGN-SA-诱导的 IL-8 释放。如实施例 3 所述从人健康供体全血分离嗜中性粒细胞并重悬在 RPMI/10% FBS 中。以 1.5×10^6 个细胞/ml 铺细胞,并且在下列条件下测试三次重复的测试孔:无添加的刺激,仅 $10 \mu\text{g/ml}$ PGN-SA,或 $10 \mu\text{g/ml}$ PGN-SA(在存在 $4 \mu\text{g/ml}$ 的 PGLYRP1 抗体或 hIgG4 同种型对照抗体的情况下)。样品在 37°C, 5% CO_2 培养箱中培养 24 小时。然后收获上清液并使用 Bioplex Pro Human Cytokine IL-8 套装(目录号 171-B5008M, BioRad, Hercules CA, USA)分析 IL-8。

用以下刺激嗜中性粒细胞	IL-8, pg/ml	
	Avg	SD
无添加	52	3
PGN-SA	1158	341
PGN-SA + 同种型对照	1195	144
PGN-SA + mAb 0184	449	50

[0300] 此实施例表明从通过用细菌衍生的 PGN-SA 刺激诱导的嗜中性粒细胞的 IL-8 释放可以被抗 -PGLYRP1 抗体减少。TREM-1 配体 PGLYRP1 因此是嗜中性粒细胞的自分泌刺激物，并且本文所公开的 PGLYRP1 抗体潜在地可用于下调嗜中性粒细胞应答。

[0301] 尽管本文已阐释并描述了本发明的某些特征，但是很多修饰、替换、变化和等价形式对于本领域普通技术人员是显而易见的。因此，应当理解，所附的实施方案意在涵盖所有这些修饰和变化，落入本发明的真实精神内。

[0001]

序列表

<110> Novo Nordisk A/S

<120> 结合肽聚糖识别蛋白1的抗体

<130> 8498

<160> 53

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> I

<211> 175

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> I

Gln Glu Thr Glu Asp Pro Ala Cys Cys Ser Pro Ile Val Pro Arg Asn
1 5 10 15

Glu Trp Lys Ala Leu Ala Ser Glu Cys Ala Gln His Leu Ser Leu Pro
20 25 30

Leu Arg Tyr Val Val Val Ser His Thr Ala Gly Ser Ser Cys Asn Thr
35 40 45

Pro Ala Ser Cys Gln Gln Gln Ala Arg Asn Val Gln His Tyr His Met
50 55 60

Lys Thr Leu Gly Trp Cys Asp Val Gly Tyr Asn Phe Leu Ile Gly Glu
65 70 75 80

Asp Gly Leu Val Tyr Glu Gly Arg Gly Trp Asn Phe Thr Gly Ala His
85 90 95

Ser Gly His Leu Trp Asn Pro Met Ser Ile Gly Ile Ser Phe Met Gly
100 105 110

Asn Tyr Met Asp Arg Val Pro Thr Pro Gln Ala Ile Arg Ala Ala Gln
115 120 125

Gly Leu Leu Ala Cys Gly Val Ala Gln Gly Ala Leu Arg Ser Asn Tyr
130 135 140

Val Leu Lys Gly His Arg Asp Val Gln Arg Thr Leu Ser Pro Gly Asn
145 150 155 160

Gln Leu Tyr His Leu Ile Gln Asn Trp Pro His Tyr Arg Ser Pro
165 170 175

<210> 2

<211> 617

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> TREM ECD+Fc6mut

<400> 2

Glu Leu Arg Ala Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys
1 5 10 15

[0002]

Glu Gly Gln Thr Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe
 20 25 30
 Ala Ser Ser Gln Lys Ala Trp Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro
 35 40 45
 Lys Thr Leu Ala Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val
 50 55 60
 Gln Val Gly Arg Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu
 65 70 75 80
 Arg Val Arg Met Val Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln
 85 90 95
 Cys Val Ile Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg
 100 105 110
 Ile Arg Leu Val Val Thr Lys Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn
 115 120 125
 Glu Asn Ser Thr Gln Asn Val Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys
 130 135 140
 Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro
 145 150 155 160
 Pro Lys Ser Thr Ala Asp Val Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu
 165 170 175
 Thr Asn Val Thr Asp Ile Ile Arg Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 180 185 190
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Arg Ala Ala Thr Lys
 195 200 205
 Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys Glu Gly Gln Thr Leu Asp Val
 210 215 220
 Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe Ala Ser Ser Gln Lys Ala Trp
 225 230 235 240
 Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro Lys Thr Leu Ala Cys Thr Glu
 245 250 255
 Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val Gln Val Gly Arg Ile Ile Leu
 260 265 270
 Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu Arg Val Arg Met Val Asn Leu
 275 280 285
 Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln Cys Val Ile Tyr Gln Pro Pro
 290 295 300
 Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg Ile Arg Leu Val Val Thr Lys
 305 310 315 320

[0003]

Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn Glu Asn Ser Thr Gln Asn Val
 325 330 335
 Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Thr
 340 345 350
 Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro Pro Lys Ser Thr Ala Asp Val
 355 360 365
 Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu Thr Asn Val Thr Asp Ile Ile
 370 375 380
 Arg Gly Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 385 390 395 400
 Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 405 410 415
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 420 425 430
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 435 440 445
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 450 455 460
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 465 470 475 480
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 485 490 495
 Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 500 505 510
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 515 520 525
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 530 535 540
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 545 550 555 560
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 565 570 575
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 580 585 590
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 595 600 605
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 610 615

[0004]

<210> 3
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> Fc5mut

 <400> 3
 Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu
 1 5 10 15
 Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 20 25 30
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 35 40 45
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 50 55 60
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 65 70 75 80
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 85 90 95
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser
 100 105 110
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 115 120 125
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 130 135 140
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 145 150 155 160
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 165 170 175
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 180 185 190
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 195 200 205
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 210 215 220
 Ser Pro Gly Lys
 225

 <210> 4
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> 人工的

[0005]

<220>

<223> 用于五聚体的hDCIR ECD COMP

<400> 4

His His His His His His Glu Asp Leu Tyr Phe Gln Ser Met Asp Glu
1 5 10 15

Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly Leu Ala Gly
20 25 30

Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro Gln Gly Gln
35 40 45

Arg Glu Pro Gly Ser Gly Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly
50 55 60

Gly His Val Val Glu Gly Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala
65 70 75 80

Arg Leu Glu His His Pro Gln Gly Gln Arg Glu Pro Gly Gly Gly Ser
85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Asp Leu Ala Pro Gln Met Leu
100 105 110

Arg Glu Leu Gln Glu Thr Asn Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu
115 120 125

Leu Arg Gln Gln Val Lys Glu Ile Thr Phe Leu Lys Asn Thr Val Met
130 135 140

Glu Cys Asp Ala Cys Gly Met Gln Pro Ala Arg Thr Pro Gly Leu Ser
145 150 155 160

Val Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Glu Val
165 170 175

Leu Phe Gln Gly Pro Arg Ser Ile Ala Phe Val Ile Phe Phe Gln Lys
180 185 190

Tyr Ser Gln Leu Leu Glu Lys Lys Thr Thr Lys Glu Leu Val His Thr
195 200 205

Thr Leu Glu Cys Val Lys Lys Asn Met Pro Val Glu Glu Thr Ala Trp
210 215 220

Ser Cys Cys Pro Lys Asn Trp Lys Ser Phe Ser Ser Asn Cys Tyr Phe
225 230 235 240

Ile Ser Thr Glu Ser Ala Ser Trp Gln Asp Ser Glu Lys Asp Cys Ala
245 250 255

Arg Met Glu Ala His Leu Leu Val Ile Asn Thr Gln Glu Glu Gln Asp
260 265 270

Phe Ile Phe Gln Asn Leu Gln Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Val Gly Leu
275 280 285

[0006]

Ser Asp Pro Glu Gly Gln Arg His Trp Gln Trp Val Asp Gln Thr Pro
 290 295 300
 Tyr Asn Glu Ser Ser Thr Phe Trp His Pro Arg Glu Pro Ser Asp Pro
 305 310 315 320
 Asn Glu Arg Cys Val Val Leu Asn Phe Arg Lys Ser Pro Lys Arg Trp
 325 330 335
 Gly Trp Asn Asp Val Asn Cys Leu Gly Pro Gln Arg Ser Val Cys Glu
 340 345 350
 Met Met Lys Ile His Leu
 355
 <210> 5
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 用于五聚体的hTREM-1 ECD COMP
 <400> 5
 Glu Leu Arg Ala Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys
 1 5 10 15
 Glu Gly Gln Thr Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe
 20 25 30
 Ala Ser Ser Gln Lys Ala Trp Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro
 35 40 45
 Lys Thr Leu Ala Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val
 50 55 60
 Gln Val Gly Arg Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu
 65 70 75 80
 Arg Val Arg Met Val Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln
 85 90 95
 Cys Val Ile Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg
 100 105 110
 Ile Arg Leu Val Val Thr Lys Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn
 115 120 125
 Glu Asn Ser Thr Gln Asn Val Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys
 130 135 140
 Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro
 145 150 155 160
 Pro Lys Ser Thr Ala Asp Val Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu
 165 170 175
 Thr Asn Val Thr Asp Ile Ile Arg Gly Thr Leu Glu Val Leu Phe Gln

[0007]

180	185	190
Gly Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Asp 195 200 205		
Leu Ala Pro Gln Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu Thr Asn Ala Ala Leu 210 215 220		
Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val Lys Glu Ile Thr Phe 225 230 235 240		
Leu Lys Asn Thr Val Met Glu Cys Asp Ala Cys Gly Met Gln Pro Ala 245 250 255		
Arg Thr Pro Gly Leu Ser Val Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly 260 265 270		
Gly Gly Ser Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val 275 280 285		
Val Glu Gly Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu 290 295 300		
His His Pro Gln Gly Gln Arg Glu Pro Gly Ser Gly Met Asp Glu Lys 305 310 315 320		
Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly Leu Ala Gly Glu 325 330 335		
Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro Gln Gly Gln Arg 340 345 350		
Glu Pro Glu Asp Leu Tyr Phe Gln Ser His His His His His His 355 360 365		
<210> 6 <211> 505 <212> PRT <213> 人工的 <220> <223> hCD83 ECD Fc <400> 6		
Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys 1 5 10 15		
Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys 20 25 30		
Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His 35 40 45		
Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp 50 55 60		
Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser 65 70 75 80		

[0008]

Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln
 85 90 95
 Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala
 100 105 110
 Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Gly Thr Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Pro
 130 135 140
 Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys Thr Ala
 145 150 155 160
 Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys Leu Leu
 165 170 175
 Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His Leu Arg
 180 185 190
 Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp Ala Pro
 195 200 205
 Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser Cys Asn
 210 215 220
 Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln Arg Asn
 225 230 235 240
 Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala Gln Arg
 245 250 255
 Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Gly Ala Leu Ala Gly
 260 265 270
 Thr Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 275 280 285
 Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 290 295 300
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 305 310 315 320
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 325 330 335
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 340 345 350
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 355 360 365
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 370 375 380

[0009]

Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
385 390 395 400

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
405 410 415

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
420 425 430

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
435 440 445

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
450 455 460

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
465 470 475 480

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
485 490 495

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

<210> 7
<211> 684
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> hPGYRP1-GPI

<400> 7
gaattcgcca ccatgtcccg ccgtcttatg ctgcttgcc tggctctccc cagcctcctt 60
cgactcggag cggtcagga gacagaagac cggcctgct gcagcccat agtccccgg 120
aacgagtga aggccttggc atcagagtgc gccagcacc tgagcctgcc cttacgtat 180
gtggtggtat cgcacacggc gggcagcagc tgcaacacc ccgcctcgtg ccagcagcag 240
gccccgaatg tgcagcacta ccacatgaag acactgggct ggtgcgacgt gggctacaac 300
ttctgattg gagaagacgg gctcgtatac gagggcctg gctggaactt cacgggtgcc 360
cactcaggtc acttatgaa cccatgtcc attggcata gcttcattgg caactacatg 420
gatcgggtgc ccacacccca ggccatccgg gcagccagg gtctactggc ctgcgggtgtg 480
gctcaggag ccctgaggtc caactatgig ctcaaaggac accgggatgt gcagcgtaca 540
ctctctccag gcaaccagct ctaccacctc atccagaatt ggcacaccta ccgtccccc 600
tctcctcga caactacgac cacaactacg accctacttc tctgtctact tetgtctcta 660
cttctgtccc tactttgact cgag 684

<210> 8
<211> 180
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys Glu Gly Gln Thr
1 5 10 15

[0010]

Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe Ala Ser Ser Gln
 20 25 30
 Lys Ala Trp Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro Lys Thr Leu Ala
 35 40 45
 Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val Gln Val Gly Arg
 50 55 60
 Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu Arg Val Arg Met
 65 70 75 80
 Val Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln Cys Val Ile Tyr
 85 90 95
 Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg Ile Arg Leu Val
 100 105 110
 Val Thr Lys Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn Glu Asn Ser Thr
 115 120 125
 Gln Asn Val Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys Ala Leu Cys Pro
 130 135 140
 Leu Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro Pro Lys Ser Thr
 145 150 155 160
 Ala Asp Val Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu Thr Asn Val Thr
 165 170 175
 Asp Ile Ile Arg
 180
 <210> 9
 <211> 1221
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> hTREM ECD x2
 <400> 9
 gaattcgcaa ctatgcctct gctgctgctg ctgcctctgc tgtgggctgg cgcactggct 60
 gaactgaggg ccgctaccaa actgaccgaa gaaaagtacg agctgaaaga agggcagacc 120
 ctggacgtga agtgcgatta tacactggaa aagttcgcaa gctccagaa agcctggcag 180
 atcattagag acggagagat gcccaagact ctggcttgta ccgaacgccc ttcaaaaaac 240
 agccacccag tgcaggtcgg ccgaatcatt ctggaggact accacgatca tgggctgctg 300
 egggtgagaa tggtaaatct gcaggtggag gactccggcc tgtaccagtg cgtcatctat 360
 cagcccccta aggaaccaca tatgctgttc gataggattc gcciggtggt cactaaaggc 420
 ttttctggga cccccggaag taacgagaac agcaccaga acgtgtacaa gatccaccc 480
 accacaacta aggccctgtg cccctgtat acatctcttc gaaccgtgac acaggccctt 540
 ccaaagagta ccgctgacgt gagcacacc gattccgaga ttaacctgac aaatgtgact 600
 gacatcatta ggggtaccgg aggaggagga tccgaggag gaggaagcgg aggcggggga 660

[0011]

```

tcggaactgc gcgccgctac caagctgaca gaggaaaaat atgagctgaa agaaggccag      720
actctggacg tgaatatgca ttataccctg gagaagtttg cttctagtca gaaagcatgg      780
cagatcattc gcgatgggga gatgcctaag acactggcct gtactgaacg gccctccaaa      840
aacctcacc ctgtgcaggc cggaagaatc attciggaag actatcacga tcatggcctg      900
ctgcgagtgc ggatggtgaa tctgcaggtc gaggacagtg gactgtatca atgcgtcacc      960
tatcaacccc ctaaggaacc tcatatgctg ttcatagaa tttagctggg ggtcacaaaa     1020
ggcttttagc ggactccagg atctaacgag aatagtactc agaactgtga caaaattcct     1080
cctactacca ccaaggccct gtgccactg tatacaagcc caggaactgt gaccacagga     1140
cctccaaaga goactgcaga tgtgagcact ccagatagcg aaatcaacct gaccaatgtg     1200
acagatattt ttagggggcc c                                     1221

```

<210> 10
 <211> 1170
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> hTREM COMP

```

<400> 10
gaattcgcaa ctatgctctt gctgctgctg ctgcctctgc tgtgggctgg cgcactggtt      60
gaactgaggg ccgctaccaa actgaccgaa gaaaagtacg agctgaaaga agggcagacc     120
ctggacgtga agtgcgatta tacactggaa aagtctgcaa gctccagaa agcctggcag     180
atcattagag acggagagat gcccaagact ctggtctgta ccgaacgccc ttcaaaaaac     240
agccaccacg tgcaggctcg cgaatcatt ctggaggact accacgatca tgggctgctg     300
cgggttgagaa tggatcaatc gcaggctggg gactccggcc tgtaccagtg cgtcatctat     360
cagcccccct aggaaccaca tatgctgttc gataggattc gcctgggtgg cactaaaggc     420
ttttctggga ccccgggaag taacgagaac agcaeccaga acgtgtacaa gatccacccc     480
accacaacta aggcctgtg cccctgtat acatctcttc gaaccgtgac acagcccccct     540
ccaaagagta ccgctgacgt gacacacccc gattccgaga ttaacctgac aaatgtgact     600
gacatcatta ggggtacctt ggaggtgctg ttccagggac caggaggagg aagcggagga     660
ggcagcggcg ggggatctgg ggacctggcc cctcagatgc tgaggagact gcaggaaacc     720
aacgccgctc tgcaggatgt gcgggagctg ctgagacagc aggtgaagga aatcacattt     780
ctgaaaaata ctgtgatgga gtgcgacgct tgtggaatgc agccagctag gacacctgga     840
ctgagcgtgg gaggaggaag tggaggagga tcaggaggag gaagcatgga tgagaagacc     900
acaggatgga gaggaggaca cgtggtggaa ggactggctg gagagctgga acagctgagg     960
gctagactgg agcaccatcc acagggacag agggagccag ggltccggaat ggacgaaaaa    1020
actaccgat ggaggggagg acacgtggtg gagggcctgg ccggcgaaact ggagcagctg    1080
agagctcgcc tggaaacaca tctcagggc cagagagagc cagaggacct gtacttccag    1140
tctcaccatc accatcacca ttaaggatcc                                     1170

```

<210> 11
 <211> 867
 <212> DNA
 <213> 人工的

[0012]

<220>

<223> 用于四聚体的hCD83

<400> 11

```

gaattcgcca ccattccctet gctgctgctg ctgccactgc tgtgggctgg cgtcttggt      60
accccagagg tgaagggtgc ttgctccgaa gacgtggatc tgccctgtac agccccctgg      120
gaccctcagg tgcataacac cgtgagctgg gtgaaactgc tggaggcgcg ggaggaaagg      180
atggagacac cacaggaaga ccacctgaga gggcagcact atcatcagaa ggggcagaac      240
ggatctttcg atgtcccaa tgaacggctt tacagtctga aaatcagaaa caccacaagg      300
tgcaattccg gcacatatag gtgtactctg caggaccctg atggacagcg caacctgagc      360
ggcaaagtga tcctgcgggt gacagctgc ccagctcaga gaaaggagga aacttttaag      420
aagtaccggg ccgagggtac cggaggcggg ggatccggag gaggaggaag cggaggagga      480
ggatccactc ctgaagtga ggtggcttgc agtgaagacg tggatctgcc ctgtaccgcc      540
ccctgggata ctcaggtgcc atacacagtg tcttgggtga agctgctgga gggaggcgag      600
gaacggatgg agaccctca ggaagacat ctgagaggcc agcattacca tcagaagggc      660
cagaacgggt cattcgatgc cccaaatgaa aggccttaca gctgaaaaat ccgaacact      720
acctcttgca atagtggaa ctataggtgt aactgcagg accccgatgg gcagcgcaat      780
ctgtccggca aagtatcct gagggtgact ggtgtctctg ctgagcgcaa agaggaaacc      840
tttaagaaat atagggecga ggggccc      867

```

<210> 12

<211> 1143

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> hDCIR COMP

<400> 12

```

gaattcgcca ccattccaact gctgctgctg ctgccaactgc tgtgggctgg agctctggct      60
caaccatcac atcaccatga ggacctgtac ttccagteca tggatgaaaa gaccacagga      120
tggaggggag gacacgtggt ggagggactg gctggagagc tggaaacagct gagggctaga      180
ctggaaacac atcctcaggg ccagagggag ccagggtctg gaatggacga aaaaactacc      240
ggctggagag gcggccatgt cgtcgaagc ctggccggcg aactggagca gctgagagct      300
aggctggagc accatccaca gggacagagg gaacctggag gaggcagcgg aggaggctcc      360
ggaggaggct ctggcgacct ggcccacag atgctgagag agctgcagga aaccaacgcc      420
gctctgcagg atgtcgggga gctgctgaga cagcaggtga aggaaatcac attcctgaaa      480
aatactgtga tggagtgca tgcctgtgga atgcagccag ctaggacacc tggactgagc      540
gaggaggag gcagtgagg aggcacagga ggaggcagcc tggaggtgct gtttcagggc      600
cccagatcta ttgcttttgt cattttcttt caaaaatatt ctgagcttct tgaaaaaaag      660
actacaaaag agctggttca tacaacattg gagtgtgtga aaaaaaatat gccctggaa      720
gagacagcct ggagctgttg cccaaagaat tggaaatcat ttagttccaa ctgctacttt      780
atttctactg aatcagcatc ttggcaagac agtgagaagg actgtgctag aatggaggt      840
caactgctgg tgataaacac tcaagaagag caggatttca tcttcagaa tetgcaagaa      900
gaatctgctt attttgtggg gctctcagat ccagaaggtc agcgacattg gcaatgggt      960

```

[0013]

gatacagacac catacaatga aagttccaca ttctggcatic cacgtgagcc cagtgatecc 1020
aatgagcgct gcgttgtgct aaattttcgt aaatcaccca aaagatgggg ctggaatgat 1080
gttaattgtc ttggtctctca aaggtcagtt tgtgagatga tgaagatcca cttatgagga 1140
tcc 1143

<210> 13
<211> 426
<212> DNA
<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 13
aagcttgccg ccaccatgcc tetgtgtgtg ctgtgtgctc tgctgtgggc cggggctctg 60
gctcaggfcc agctgcagca gcttggggcc gaactggfcc gaccaggggc atctgtgaaa 120
ctgagttgca agggctctgg atacagtttc acctcatatt ggatgaactg ggteaaacag 180
cgaccaggac agggactgga gtggatcgcc atgattcacc ctagecactc cgaacaaga 240
ctgaatcaga agtttaaaga caagctacc ctgacagtgg ataagagctc ctctacagca 300
tacctgcage tgagttcacc cactagcgag gactccgccc ttactattg tgctagggat 360
tactctgact atgatgggtt cgccatttgg ggacagggca ctctggtgac cgtcagcgct 420
gctagc 426

<210> 14
<211> 390
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 14
aagcttgccg ccaccatgcc tetgtgtgtg ctgtgtgctc tgctgtgggc tggggctctg 60
gtgatattg tgatgactca gtcacccgct acctgtccg tgacaaccagg ggaccgggtg 120
agcctgtcct gcagagcttc tcagagtaic tcagattacc tgcactggta tcagcagaag 180
tctcatgaga gteccaggct gctgatcaag tacgccagcc agtecatctc tggeattcct 240
tcccggttca gtggtcagg gageggatcc gactttactc tgtctatcaa cagcgtcgag 300
ccagaagatg tgggagtcta ctattgtcag aatggccaca gcttccccct gacctttggc 360
accgggacaa agctggaact gaaacgtacg 390

<210> 15
<211> 446
<212> PRT
<213> 小家鼠

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

[0014]

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Ser Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

[0015]

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 16
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 16
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

[0016]

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 17
<211> 429
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 17
aagcttgccg ccaccatgcc tctgtctgtg ctgtgtcctc tgctgtgggc eggagccctg 60
gccgaatcc agctgcagca gtcaggacct gaactggtga aaccgggggc ctcagtgaag 120
gtcagctgca tggcttcagt gtacagcttc accgactaca acatgtattg ggtaaacag 180
tccccgggga agtctctgga gtggatcgga tacatigacc cttataacgg cgatacatcc 240
tataatcaga agttcaagg caaggcaact ctgacctggg acaagagctc caacacagcc 300
tttatgcacc tgaattccct gacttctgaa gatagtgctg tctactattg tatcagagga 360
gactacggca atcccttita cctggattat tggggccagg ggaccacact gacctgtct 420
agtgctagc 429

<210> 18
<211> 387
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 18
aagcttgccg ccaccatgcc cctgtgtgtg ctgtgtcctc tgctgtgggc cggcgccactg 60
gtcagattg tctgtattca gtctccgccg atcgtgtccg ctcccccctgg ggagaagggtg 120
accatgacat gcagcgtgag ctctctgtc aactacatgt attggtacca gcagaagagc 180
ggaacatccc ccaaacggtg gatctatgac acttctaaac tgccaagtgg agtcccagca 240
agattcagcg gatccggatc tggaaactagt tactcactga ccattagttc aatggagggc 300
gaagatgccg ctacatacta ttgtcagcag tggacatcta acccccctac ttttgccagc 360
gggaccaatc tggaaatcaa gcgtacg 387

<210> 19
<211> 447
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 19

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Met Ala Ser Val Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser Arg Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

[0017]

65	70	75	80
Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ile Arg Gly Asp Tyr Gly Asn Pro Phe Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln	100	105	110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val	115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala	130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser	145	150	155
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val	165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro	180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys	195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro	210	215	220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val	225	230	235
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu	260	265	270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile	325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	340	345	350
Pro Ser Glu Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			

[0018]

370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
	405	410 415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
	420	425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
	435	440 445
<210> 20		
<211> 213		
<212> PRT		
<213> 小家鼠		
<400> 20		
Gln Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Ala Ile Val Ser Ala Ser Pro Gly		
1	5	10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met		
	20	25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr		
	35	40 45
Asp Thr Ser Lys Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser		
	50	55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu		
65	70	75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr		
	85	90 95
Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro		
	100	105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr		
	115	120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
	130	135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
145	150	155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser		
	165	170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
	180	185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe		
	195	200 205

[0019]

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 21
<211> 426
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 21
aagcttgccg ccaccatgcc cctgctgctg ctgctgectc tgctgtgggc cggagccctg 60
gccgaagtcc agctgcagca gtctggcgct gagtttgtga agccaggggc aagcgtgaag 120
ctgtccctgca ccgcctctgg attcaacatc aaagacacat acattcactg ggtcaatcag 180
cggcccgagc agggactgga atggatcggc agaattgacc ccgccaacga cgatactaag 240
tacgatccta attttcaggg caaagctacc atcacatccg aactagctc caacaccgca 300
tatgtgcagc tgtctagtct gacaagcgag gatactgccc tctactattg tgcttcaagc 360
gacaattccg attcittggtt cgcctattgg ggccagggga cactggtgag tgtctcagct 420
gctagc 426

<210> 22
<211> 387
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 22
aagcttgccg ccaccatgcc cctgctgctg ctgctgectc tgctgtgggc tggagccctg 60
gccagattg tctgactca gtcccccgt attatgtccg cttcaccagg ggagaaggcg 120
accatcacat gcagtgtag ctcctcigt cacttcatga attggtacca gcagaagctg 180
ggaagtccac ccaaactgtg gatctacgac accageaaac tggcaccagg agtccttgea 240
cggtttccag gaagcggatc cggaacttct tacagtctga ccacagctc catggagaca 300
gaagatgccg ctctctactt cgtcaccag tggcttagtt attctctgac atttggcgct 360
gggactaagc tggaaactgaa acgtacg 387

<210> 23
<211> 446
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 23

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

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

Tyr Ile His Trp Val Asn Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0020]

Val Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Ser Asp Asn Ser Asp Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Ser Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

[0021]

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 24
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 24
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Asn Phe Met
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Thr Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Ser Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

[0022]

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 25
<211> 420
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 25
aagcttgccg ccaccatgcc tctgctgctg ctgctgacctc tgcgtgtgggc cggggctctg 60
gceagatttc agctgcagca gctcggacct gacctgggtga aaccgggcac ctctgtgaaa 120
gtcagttgca agctttctgg gtacagtctc acagactata acatgcaactg ggtgaaacag 180
tctcatggga agagcctgga gtggatcgga tacgtcgacc cttatgatgg cgggactagc 240
tccaatcaga agttcaaagg caaggcaact ctgacctggg ataaatctag ttcaacagcc 300
tttatgcacc tgaagtcact gactagcgag gactccgccg tgtactattg tgctcgggaa 360
gtccctact attttgatta ctggggacag ggcaccacac tgacagttag ctcgcgtage 420

<210> 26
<211> 384
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 26
aagcttgccg ccaccatgcc cctgctgctg ctgctgcccc tgcgtgtgggc cggagctctg 60
gctcagattg tgctgactca gtccctagt attatgtccg cctcccttgg cgagaagggt 120
accatgacat gctgctccag ctctctctg acatacatgt attggiacca gcagaaaagc 180
ggaacctccc cacaggacgg ctctcatgaca caccacttgg caagcggagt ccagacagg 240
tttateggag gaggatctgg cacaagttaa tcactgacta ttagtaacat ggaggecgaa 300
gatgcegcta ctactattg tccccattgg aacactaatc cccctacatt cggtctctggg 360
accaagctgg aaatcaatcg taac 384

<210> 27
<211> 444
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 27
Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Val Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Thr Ser Ser Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80
Met His Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0023]

Ala Arg Glu Val Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr	100	105	110
Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu	115	120	125
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys	130	135	140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser	145	150	155
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser	165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser	180	185	190
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn	195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro	210	215	220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe	225	230	235
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe	260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	275	280	285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	290	295	300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	305	310	315
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	325	330	335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln	340	345	350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	355	360	365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	370	375	380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	385	390	395
			400

[0024]

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440
 <210> 28
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 28
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Val Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Gln Asp Gly Phe Met
 35 40 45
 Thr His Pro Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ile Gly Gly Gly
 50 55 60
 Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Met Glu Ala Glu Asp
 65 70 75 80
 Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Pro His Trp Asn Thr Asn Pro Pro Thr Phe
 85 90 95
 Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 100 105 110
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 115 120 125
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 130 135 140
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 145 150 155 160
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
 165 170 175
 Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
 180 185 190
 Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 195 200 205
 Arg Gly Glu Cys
 210

[0025]

<210>	29	
<211>	360	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	29	
gaagtgcagc	tgggtggagtc	tggtggagtc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaaactc 60
tcctgtgcag	ccctctggatt	ctctttcagt gactattaca tgtattgggt tegccagact 120
ccggaanaaga	ggctggagtg	ggctgcagcc attagtgaig atagtactta cacctactaf 180
ccagacagtg	tgaaggggctg	attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtac 240
ctgcaaatga	gcagctctgaa	gtctgaggac acagccaigt attactgtgc aagagggggg 300
tatggttaacc	tctatgetat	ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctectca 360
<210>	30	
<211>	327	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	30	
caaattgttc	tcacccagtc	tccagcaatc atgtctgcat ctctaggga acgggtcacc 60
atgacctgca	ctgccagctc	aagtgttaagt tccagtiact tgcactggta ccagcagaag 120
ccaggatcct	ccccaaaact	ctggatttat agcacaacca accctggcttc tggagtccca 180
gtctgcttca	gtggcagtg	gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag 240
gctgaagatg	ctgccactta	ttactgccac cagtatcacc gtteccattt caggttcggc 300
tcggggacaa	agttggaaat	aaaacgg 327
<210>	31	
<211>	120	
<212>	PRT	
<213>	小家鼠	
<400>	31	
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Tyr		
20 25 30		
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val		
35 40 45		
Ala Ala Ile Ser Asp Asp Ser Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val		
50 55 60		
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr		
65 70 75 80		
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
100 105 110		
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
115 120		

[0026]

<210> 32
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 32

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 33
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 33

gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag gtggtaaagc ctgggacttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tgcactgggt gaggcagaag 120
 cctgggcagg gccttgaatg ggittgatgg attaatccct tcaatgatgg tacaaattat 180
 aatgagaact tcaaaaacaa ggccacactg acttcagaca aatctccag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagatccggt 300
 tttattacta cacttataga agactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctectca 360

<210> 34
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 34

aacattgtga tgaaccaatc tcccaaatac atgtccatgt cagtaggaga gaggtcacc 60
 ttgaccigca aggccagtga gagtgtgga agttttgtat cctgglatca acagaaagca 120
 gaccagtctc ctacctact gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgcaagagat ttcactetga ccateagtag tgtgcagget 240
 aaagaccttg cagaatatta ctgtggacag tattacacc atcccacgtt cgtgtctggg 300
 accaagetgg agctgaaacg g 321

<210> 35
 <211> 120

[0027]

<212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 35
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60
 Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Leu Ile Glu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 36
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 36
 Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Met Ser Met Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Ser Val Gly Ser Phe
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Asp Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ala Arg Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Lys Asp Leu Ala Glu Tyr Tyr Cys Gly Gln Tyr Tyr Thr His Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105
 <210> 37
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0028]

<220>
 <223> II型 1.0 PGLYRP1
 <400> 37
 Met Asn Trp His Met Ile Ile Ser Gly Leu Ile Val Val Val Leu Lys
 1 5 10 15
 Val Val Gly Met Thr Leu Phe Leu Leu Gln Glu Thr Glu Asp Pro Ala
 20 25 30
 Cys Cys Ser Pro Ile Val Pro Arg Asn Glu Trp Lys Ala Leu Ala Ser
 35 40 45
 Glu Cys Ala Gln His Leu Ser Leu Pro Leu Arg Tyr Val Val Val Ser
 50 55 60
 His Thr Ala Gly Ser Ser Cys Asn Thr Pro Ala Ser Cys Gln Gln Gln
 65 70 75 80
 Ala Arg Asn Val Gln His Tyr His Met Lys Thr Leu Gly Trp Cys Asp
 85 90 95
 Val Gly Tyr Asn Phe Leu Ile Gly Glu Asp Gly Leu Val Tyr Glu Gly
 100 105 110
 Arg Gly Trp Asn Phe Thr Gly Ala His Ser Gly His Leu Trp Asn Pro
 115 120 125
 Met Ser Ile Gly Ile Ser Phe Met Gly Asn Tyr Met Asp Arg Val Pro
 130 135 140
 Thr Pro Gln Ala Ile Arg Ala Ala Gln Gly Leu Leu Ala Cys Gly Val
 145 150 155 160
 Ala Gln Gly Ala Leu Arg Ser Asn Tyr Val Leu Lys Gly His Arg Asp
 165 170 175
 Val Gln Arg Thr Leu Ser Pro Gly Asn Gln Leu Tyr His Leu Ile Gln
 180 185 190
 Asn Trp Pro His Tyr Arg Ser Pro
 195 200
 <210> 38
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> II型 2.0 PGLYRP1
 <400> 38
 Met Asn Trp His Met Ile Ile Ser Gly Leu Ile Val Val Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Val Gly Met Thr Leu Phe Leu Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 20 25 30

[0029]

Lys Gly Ser Gln Glu Thr Glu Asp Pro Ala Cys Cys Ser Pro Ile Val
 35 40 45
 Pro Arg Asn Glu Trp Lys Ala Leu Ala Ser Glu Cys Ala Gln His Leu
 50 55 60
 Ser Leu Pro Leu Arg Tyr Val Val Val Ser His Thr Ala Gly Ser Ser
 65 70 75 80
 Cys Asn Thr Pro Ala Ser Cys Gln Gln Gln Ala Arg Asn Val Gln His
 85 90 95
 Tyr His Met Lys Thr Leu Gly Trp Cys Asp Val Gly Tyr Asn Phe Leu
 100 105 110
 Ile Gly Glu Asp Gly Leu Val Tyr Glu Gly Arg Gly Trp Asn Phe Thr
 115 120 125
 Gly Ala His Ser Gly His Leu Trp Asn Pro Met Ser Ile Gly Ile Ser
 130 135 140
 Phe Met Gly Asn Tyr Met Asp Arg Val Pro Thr Pro Gln Ala Ile Arg
 145 150 155 160
 Ala Ala Gln Gly Leu Leu Ala Cys Gly Val Ala Gln Gly Ala Leu Arg
 165 170 175
 Ser Asn Tyr Val Leu Lys Gly His Arg Asp Val Gln Arg Thr Leu Ser
 180 185 190
 Pro Gly Asn Gln Leu Tyr His Leu Ile Gln Asn Trp Pro His Tyr Arg
 195 200 205
 Ser Pro
 210
 <210> 39
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 表位标签
 <400> 39
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5
 <210> 40
 <211> 589
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 40
 Met Asn Trp His Met Ile Ile Ser Gly Leu Ile Val Val Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Val Gly Met Thr Leu Phe Leu Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 20 25 30

[0030]

Asp Lys Ser Leu Pro Leu Leu Met Asp Ser Val Ile Gln Ala Leu Ala	35	40	45
Glu Leu Glu Gln Lys Val Pro Ala Ala Lys Thr Arg His Thr Ala Ser	50	55	60
Ala Trp Leu Met Ser Ala Pro Asn Ser Gly Pro His Asn Arg Leu Tyr	65	70	75
His Phe Leu Leu Gly Ala Trp Ser Leu Asn Ala Thr Glu Leu Asp Pro	85	90	95
Cys Pro Leu Ser Pro Glu Leu Leu Gly Leu Thr Lys Glu Val Ala Arg	100	105	110
His Asp Val Arg Glu Gly Lys Glu Tyr Gly Val Val Leu Ala Pro Asp	115	120	125
Gly Ser Thr Val Ala Val Glu Pro Leu Leu Ala Gly Leu Glu Ala Gly	130	135	140
Leu Gln Gly Arg Arg Val Ile Asn Leu Pro Leu Asp Ser Met Ala Ala	145	150	155
Pro Trp Glu Thr Gly Asp Thr Phe Pro Asp Val Val Ala Ile Ala Pro	165	170	175
Asp Val Arg Ala Thr Ser Ser Pro Gly Leu Arg Asp Gly Ser Pro Asp	180	185	190
Val Thr Thr Ala Asp Ile Gly Ala Asn Thr Pro Asp Ala Thr Lys Gly	195	200	205
Cys Pro Asp Val Gln Ala Ser Leu Pro Asp Ala Lys Ala Lys Ser Pro	210	215	220
Pro Thr Met Val Asp Ser Leu Leu Ala Val Thr Leu Ala Gly Asn Leu	225	230	235
Gly Leu Thr Phe Leu Arg Gly Ser Gln Thr Gln Ser His Pro Asp Leu	245	250	255
Gly Thr Glu Gly Cys Trp Asp Gln Leu Ser Ala Pro Arg Thr Phe Thr	260	265	270
Leu Leu Asp Pro Lys Ala Ser Leu Leu Thr Met Ala Phe Leu Asn Gly	275	280	285
Ala Leu Asp Gly Val Ile Leu Gly Asp Tyr Leu Ser Arg Thr Pro Glu	290	295	300
Pro Arg Pro Ser Leu Ser His Leu Leu Ser Gln Tyr Tyr Gly Ala Gly	305	310	315
Val Ala Arg Asp Pro Gly Phe Arg Ser Asn Phe Arg Arg Gln Asn Gly	325	330	335

[0031]

Ala Ala Leu Thr Ser Ala Ser Ile Leu Ala Gln Gln Val Trp Gly Thr
 340 345 350
 Leu Val Leu Leu Gln Arg Leu Glu Pro Val His Leu Gln Leu Gln Cys
 355 360 365
 Met Ser Gln Glu Gln Leu Ala Gln Val Ala Ala Asn Ala Thr Lys Glu
 370 375 380
 Phe Thr Glu Ala Phe Leu Gly Cys Pro Ala Ile His Pro Arg Cys Arg
 385 390 395 400
 Trp Gly Ala Ala Pro Tyr Arg Gly Arg Pro Lys Leu Leu Gln Leu Pro
 405 410 415
 Leu Gly Phe Leu Tyr Val His His Thr Tyr Val Pro Ala Pro Pro Cys
 420 425 430
 Thr Asp Phe Thr Arg Cys Ala Ala Asn Met Arg Ser Met Gln Arg Tyr
 435 440 445
 His Gln Asp Thr Gln Gly Trp Gly Asp Ile Gly Tyr Ser Phe Val Val
 450 455 460
 Gly Ser Asp Gly Tyr Val Tyr Glu Gly Arg Gly Trp His Trp Val Gly
 465 470 475 480
 Ala His Thr Leu Gly His Asn Ser Arg Gly Phe Gly Val Ala Ile Val
 485 490 495
 Gly Asn Tyr Thr Ala Ala Leu Pro Thr Glu Ala Ala Leu Arg Thr Val
 500 505 510
 Arg Asp Thr Leu Pro Ser Cys Ala Val Arg Ala Gly Leu Leu Arg Pro
 515 520 525
 Asp Tyr Ala Leu Leu Gly His Arg Gln Leu Val Arg Thr Asp Cys Pro
 530 535 540
 Gly Asp Ala Leu Phe Asp Leu Leu Arg Thr Trp Pro His Phe Thr Ala
 545 550 555 560
 Thr Val Lys Pro Arg Pro Ala Arg Ser Val Ser Lys Arg Ser Arg Arg
 565 570 575
 Glu Pro Pro Pro Arg Thr Leu Pro Ala Thr Asp Leu Gln
 580 585
 <210> 41
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 41
 Met Asn Trp His Met Ile Ile Ser Gly Leu Ile Val Val Val Leu Leu
 1 5 10 15

[0032]

Val Val Gly Met Thr Leu Phe Leu Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 20 25 30
 Asp Lys Trp Asp Thr Pro Thr Ile Val Ser Arg Lys Glu Trp Gly Ala
 35 40 45
 Arg Pro Leu Ala Cys Arg Ala Leu Leu Thr Leu Pro Val Ala Tyr Ile
 50 55 60
 Ile Thr Gln Leu Pro Gly Met Gln Cys Gln Gln Gln Ser Val Cys Ser
 65 70 75 80
 Gln Met Leu Arg Gly Leu Gln Ser His Ser Val Tyr Thr Ile Gly Trp
 85 90 95
 Cys Asp Val Ala Tyr Asn Phe Leu Val Gly Asp Asp Gly Arg Val Tyr
 100 105 110
 Glu Gly Val Gly Trp Asn Ile Gln Gly Leu His Thr Gln Gly Tyr Asn
 115 120 125
 Asn Ile Ser Leu Gly Ile Ala Phe Phe Gly Asn Lys Ile Gly Ser Ser
 130 135 140
 Pro Ser Pro Ala Ala Leu Ser Ala Ala Glu Gly Leu Ile Ser Tyr Ala
 145 150 155 160
 Ile Gln Lys Gly His Leu Ser Pro Arg Tyr Ile Gln Pro Leu Leu Leu
 165 170 175
 Lys Glu Glu Thr Cys Leu Asp Pro Gln His Pro Val Met Pro Arg Lys
 180 185 190
 Val Cys Pro Asn Ile Ile Lys Arg Ser Ala Trp Glu Ala Arg Glu Thr
 195 200 205
 His Cys Pro Lys Met Asn Leu Pro Ala Lys Tyr Val Ile Ile Ile His
 210 215 220
 Thr Ala Gly Thr Ser Cys Thr Val Ser Thr Asp Cys Gln Thr Val Val
 225 230 235 240
 Arg Asn Ile Gln Ser Phe His Met Asp Thr Arg Asn Phe Cys Asp Ile
 245 250 255
 Gly Tyr His Phe Leu Val Gly Gln Asp Gly Val Tyr Glu Gly Val Gly
 260 265 270
 Trp His Ile Gln Gly Ser His Thr Tyr Gly Phe Asn Asp Ile Ala Leu
 275 280 285
 Gly Ile Ala Phe Ile Gly Tyr Phe Val Glu Lys Pro Pro Asn Ala Ala
 290 295 300
 Ala Leu Glu Ala Ala Gln Asp Leu Ile Gln Cys Ala Val Val Glu Gly
 305 310 315 320

[0033]

Tyr Leu Thr Pro Asn Tyr Leu Leu Met Gly His Ser Asp Val Asn Ile
 325 330 335
 Leu Ser Pro Gly Gln Ala Leu Tyr Asn Ile Ile Ser Thr Trp Pro His
 340 345 350
 Phe Lys His
 355
 <210> 42
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 42
 Met Asn Trp His Met Ile Ile Ser Gly Leu Ile Val Val Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Val Gly Met Thr Leu Phe Leu Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 20 25 30
 Asp Lys Asp Ser Ser Trp Asn Lys Thr Gln Ala Lys Gln Val Ser Glu
 35 40 45
 Gly Leu Gln Tyr Leu Phe Glu Asn Ile Ser Gln Leu Thr Glu Lys Gly
 50 55 60
 Leu Pro Thr Asp Val Ser Thr Thr Val Ser Arg Lys Ala Trp Gly Ala
 65 70 75 80
 Glu Ala Val Gly Cys Ser Ile Gln Leu Thr Thr Pro Val Asn Val Leu
 85 90 95
 Val Ile His His Val Pro Gly Leu Glu Cys His Asp Gln Thr Val Cys
 100 105 110
 Ser Gln Arg Leu Arg Glu Leu Gln Ala His His Val His Asn Asn Ser
 115 120 125
 Gly Cys Asp Val Ala Tyr Asn Phe Leu Val Gly Asp Asp Gly Arg Val
 130 135 140
 Tyr Glu Gly Val Gly Trp Asn Ile Gln Gly Val His Thr Gln Gly Tyr
 145 150 155 160
 Asn Asn Ile Ser Leu Gly Phe Ala Phe Phe Gly Thr Lys Lys Gly His
 165 170 175
 Ser Pro Ser Pro Ala Ala Leu Ser Ala Met Glu Asn Leu Ile Thr Tyr
 180 185 190
 Ala Val Gln Lys Gly His Leu Ser Ser Ser Tyr Val Gln Pro Leu Leu
 195 200 205
 Gly Lys Gly Glu Asn Cys Leu Ala Pro Arg Gln Lys Thr Ser Leu Lys
 210 215 220
 Lys Ala Cys Pro Gly Val Val Pro Arg Ser Val Trp Gly Ala Arg Glu

[0034]

225	230	235	240
Thr His Cys Pro Arg Met Thr Leu Pro Ala Lys Tyr Gly Ile Ile Ile			
245	250	255	
His Thr Ala Gly Arg Thr Cys Asn Ile Ser Asp Glu Cys Arg Leu Leu			
260	265	270	
Val Arg Asp Ile Gln Ser Phe Tyr Ile Asp Arg Leu Lys Ser Cys Asp			
275	280	285	
Ile Gly Tyr Asn Phe Leu Val Gly Gln Asp Gly Ala Ile Tyr Glu Gly			
290	295	300	
Val Gly Trp Asn Val Gln Gly Ser Ser Thr Pro Gly Tyr Asp Asp Ile			
305	310	315	320
Ala Leu Gly Ile Thr Phe Met Gly Thr Phe Thr Gly Ile Pro Pro Asn			
325	330	335	
Ala Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gln Asp Leu Ile Gln Cys Ala Met Val			
340	345	350	
Lys Gly Tyr Leu Thr Pro Asn Tyr Leu Leu Val Gly His Ser Asp Val			
355	360	365	
Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly Gln Ala Leu Tyr Asn Ile Ile Ser Thr			
370	375	380	
Trp Pro His Phe Lys His			
385	390		

<210> 43
 <211> 1317
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> huCD33-huTrem1 ECD(aa17-200)-Fc6mut

<400> 43	
gaattcgcaa ctatgcctct gctgctgctg ctgcctctgc tgtgggctgg cgcactggct	60
gaactgaggg ccgctaccaa actgaccgaa gaaaagtacg agctgaaaga agggcagacc	120
ctggacgtga agtgcgatta tacactggaa aagttcgcaa gctcccagaa agcctggcag	180
atcattagag acggagagat gcccaagact ctggettgtg ccgaacgccc ttcaaaaaac	240
agccaccag tgcaggtcgg ccgaatcatt ctggaggact accacgata tgggctgctg	300
cgggtgagaa tggtaaatct gcaggtggag gactccggcc tgtaccagtg cgtaatctat	360
cagcccccta aggaaccaca tatgctgttc gataggattc gectggtggt cactaaaggc	420
tittctggga cccccgaag taacgagaac agcaccaga acgtgtacaa gateccacce	480
accacaacta aggecctgtg cccctgttat acatctctc gaacegtgac acaggccctt	540
ccaaagagta ccgctgacgt gagcacacc gatlcgaga ttaacctgac aaatgtgact	600
gacatcatta ggggtaccga gcccaaatct tetgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	660
ccagcacctg aagccgaggg ggcacagtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac	720

[0035]

```

accctcatga tctcccgga cctgagggtc acatgcgtgg tggtagacgt gagccacgaa      780
gaccttgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcggtg aggtgcataa tgccaagaca      840
aagccgctgg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcttg      900
caccaggact ggtggaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaaaca agccctccca      960
tcttccatcg agaaaacct ctcctaaagg aaaggcgagc cccgagaacc acaggtgtac     1020
acctgcctcc catcccgga ggagatgacc aagaaccagg tcagctgac ctgcttggtc     1080
aaagcttct atccagcga catcgcggtg gaggggaga gcaatggga gccggagaac     1140
aactacaaga ccacgctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctatagcaag     1200
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat     1260
gaggctctgc acaaccaata cagcagaag agcctctccc tgtccccggg taatatga     1317

```

```

<210> 44
<211> 434
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> huCD33-huTremI ECD(aa17-200)-Fc6mut

<400> 44

```

```

Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
1           5           10          15

```

```

Glu Leu Arg Ala Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys
20          25          30

```

```

Glu Gly Gln Thr Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe
35          40          45

```

```

Ala Ser Ser Gln Lys Ala Trp Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro
50          55          60

```

```

Lys Thr Leu Ala Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val
65          70          75          80

```

```

Gln Val Gly Arg Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu
85          90          95

```

```

Arg Val Arg Met Val Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln
100         105         110

```

```

Cys Val Ile Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg
115         120         125

```

```

Ile Arg Leu Val Val Thr Lys Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn
130         135         140

```

```

Glu Asn Ser Thr Gln Asn Val Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys
145         150         155         160

```

```

Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro
165         170         175

```

```

Pro Lys Ser Thr Ala Asp Val Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu

```

[0036]

180	185	190
Thr Asn Val Thr Asp Ile Ile 195	Arg Gly Thr Glu Pro Lys Ser Ser Asp 200	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala 210	215	220
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile 225	230	235 240
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu 245	250	255
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His 260	265	270
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg 275	280	285
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 290	295	300
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu 305	310	315 320
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr 325	330	335
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu 340	345	350
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp 355	360	365
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val 370	375	380
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp 385	390	395 400
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His 405	410	415
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro 420	425	430
Gly Lys		

<210> 45

<211> 1206

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> huCD33-huTrem1.1 FCD(aa16-162)-Fc6mut

<400> 45

[0037]


```

gaattcgcca ccatgacctt getgtgtgtg ctgaccttgc tgtgggtgtg cgcactgget      60
caggcatag ttggcagcct cctgagggtg ctgcaggcac ccgtgggaag ctccattctg      120
gtgcagtgcc actacaggct ccaggatgtc aaagctcaga aggtgtggtg ccggttcttg      180
ccggagggtt gccagccctt ggtgtcttca gctgtggatc gcagagctcc agcgggcagg      240
cgtacgtttc tcacagacct ggggtggggc ctgctgcagg tggaaatggt taccttgcag      300
gaagaggatg ctggcgagta tggctgcatg gtggatgggg ccagggggcc ccagattttg      360
cacagagtc tctgaacat acgtccccc gaggaagaag aagagaccca taagattggc      420
agtctggtcg agaacgcat ctcagacctt gcaggcagtg ccaacctttt ggaaccacgc      480
caggatgaga agagcatccc cggtaccgag cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatgc      540
ccaccgtgcc cagcactga agccgagggg gcaccgtcag tcttctctt cccccaaaa      600
cccagagaca cctcatgat ctcccgagc cctgaggta catgcgtggt ggtggacgtg      660
agccacgaag acctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat      720
gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc      780
accgtcttgc accaggactg gctgaatgga aaggagtaca agtgaaggt ctccaacaaa      840
gccctcccat cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca      900
cagggtgaca ccctgcccc atcccgagg gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc      960
tgcttggtca aaggttctc tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag      1020
ccggagaaca actacaagac cagcctctcc gtgctggact ccgacgctc ctcttctctc      1080
tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtccc      1140
gtgatgcatt aggtcttgc caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtccccgggt      1200
aatga                                          1206

```

<210> 46
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> huCD33-huTremL1 ECD(aal6-162)-Fc6mut

<400> 46

Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Gln Gly Ile Val Gly Ser Leu Pro Glu Val Leu Gln Ala Pro Val Gly
 20 25 30

Ser Ser Ile Leu Val Gln Cys His Tyr Arg Leu Gln Asp Val Lys Ala
 35 40 45

Gln Lys Val Trp Cys Arg Phe Leu Pro Glu Gly Cys Gln Pro Leu Val
 50 55 60

Ser Ser Ala Val Asp Arg Arg Ala Pro Ala Gly Arg Arg Thr Phe Leu
 65 70 75 80

Thr Asp Leu Gly Gly Gly Leu Leu Gln Val Glu Met Val Thr Leu Gln
 85 90 95

[0038]

Glu Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Gly Cys Met Val Asp Gly Ala Arg Gly
 100 105 110
 Pro Gln Ile Leu His Arg Val Ser Leu Asn Ile Leu Pro Pro Glu Glu
 115 120 125
 Glu Glu Glu Thr His Lys Ile Gly Ser Leu Ala Glu Asn Ala Phe Ser
 130 135 140
 Asp Pro Ala Gly Ser Ala Asn Pro Leu Glu Pro Ser Gln Asp Glu Lys
 145 150 155 160
 Ser Ile Pro Gly Thr Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 165 170 175
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
 180 185 190
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 195 200 205
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 210 215 220
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 225 230 235 240
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 245 250 255
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 260 265 270
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 275 280 285
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 290 295 300
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 305 310 315 320
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 325 330 335
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 340 345 350
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 355 360 365
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 370 375 380
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390 395

[0039]

<210> 47
 <211> 1515
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> huCD33-huTremL2 ECD(aa19-268)-Fc6mut

<400> 47
 gaattegeca ccatgacctt getgtgtgt ctgcctctgc tgtgggctgg cgcactgget 60
 ggcccctctg ctgacagtgt atacacaaaa gtgaggtctc ttgaaggga gactctgtct 120
 gtgcagtgtc cctataagg ctacaaaaac cgcgtggagg gcaaggttt gtgcaaatc 180
 aggaagaaga agtgtagacc tggctttgcc cgagtciggg tgaagggcc ccgtacttg 240
 ctgcaggacg atgcccaggc caagggtgc aacatcacca tggtagccct caagctccag 300
 gactcaggcc gatactgtgt catgcgcaac acctctggga tctgtacct cttgatgggc 360
 ttccagctgg atgtgtctcc agctccccaa actgagagga acattctctt caccatctg 420
 gacaacatcc tcaagagtgg aactgtcaca actggccaag cccctacct aggcctgat 480
 gcccctttta ccaetgggtg gatgtgttc acccaggac tcatcactt gcctaggctc 540
 ttagectcca ccagacctgc ctccaagaca ggctacagct tcatgtctac cagcaccacc 600
 agccaggggc ccaggaggac catggggtcc cagacagtga ccgcgtctcc cagcaatgcc 660
 agggactcct ctgtggccc agaattccat tccactaagt ctggggacct cagcaccaga 720
 tcgccacca cagggtctg cctcaccagc agatctctcc tcaacagact acctccatg 780
 cctccatca ggcaccagga tgtttactcc ggtaccgagc ccaatcttc tgacaaaaat 840
 cacacatgcc caecgtgccc agcacctgaa gccgaggggg caccgtcagt ctctctctc 900
 ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgate tcccggacce ctgaggtcac atgcgtggtg 960
 gtggaegiga gccacgaaga cctgagggtc aagtccaact ggtacgtgga cgcggtggag 1020
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgggggag gacagctaca acagcacgta ccgtgtggtc 1080
 agcgtcctca ccgtctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggct 1140
 tccaacaaag cctctccatc ctccatcgag aaacctctt ccaagccaa agggcagccc 1200
 cgagaaccac aggtgtacac cctgcccaca tccgggagg agatgacaa gaaccaggtc 1260
 agcctgacct gccgtgtcaa aggtttctat ccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1320
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgctcccg tctgtgactc cgacggtccc 1380
 ttcttctct atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcagg gaacgtcttc 1440
 teatgtccg tgatgcatga ggtcttgcac aaccaetaca cgcagaagag cctctccctg 1500
 tccccgggta aatga 1515

<210> 48
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> huCD33-huTremL2 ECD(aa19-268)-Fc6mut

<400> 48

Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
 1 5 10 15

[0040]

Gly Pro Ser Ala Asp Ser Val Tyr Thr Lys Val Arg Leu Leu Glu Gly
 20 25 30
 Glu Thr Leu Ser Val Gln Cys Ser Tyr Lys Gly Tyr Lys Asn Arg Val
 35 40 45
 Glu Gly Lys Val Trp Cys Lys Ile Arg Lys Lys Lys Cys Glu Pro Gly
 50 55 60
 Phe Ala Arg Val Trp Val Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Leu Gln Asp Asp
 65 70 75 80
 Ala Gln Ala Lys Val Val Asn Ile Thr Met Val Ala Leu Lys Leu Gln
 85 90 95
 Asp Ser Gly Arg Tyr Trp Cys Met Arg Asn Thr Ser Gly Ile Leu Tyr
 100 105 110
 Pro Leu Met Gly Phe Gln Leu Asp Val Ser Pro Ala Pro Gln Thr Glu
 115 120 125
 Arg Asn Ile Pro Phe Thr His Leu Asp Asn Ile Leu Lys Ser Gly Thr
 130 135 140
 Val Thr Thr Gly Gln Ala Pro Thr Ser Gly Pro Asp Ala Pro Phe Thr
 145 150 155 160
 Thr Gly Val Met Val Phe Thr Pro Gly Leu Ile Thr Leu Pro Arg Leu
 165 170 175
 Leu Ala Ser Thr Arg Pro Ala Ser Lys Thr Gly Tyr Ser Phe Thr Ala
 180 185 190
 Thr Ser Thr Thr Ser Gln Gly Pro Arg Arg Thr Met Gly Ser Gln Thr
 195 200 205
 Val Thr Ala Ser Pro Ser Asn Ala Arg Asp Ser Ser Ala Gly Pro Glu
 210 215 220
 Ser Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Leu Ser Thr Arg Ser Pro Thr Thr
 225 230 235 240
 Gly Leu Cys Leu Thr Ser Arg Ser Leu Leu Asn Arg Leu Pro Ser Met
 245 250 255
 Pro Ser Ile Arg His Gln Asp Val Tyr Ser Gly Thr Glu Pro Lys Ser
 260 265 270
 Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu
 275 280 285
 Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 290 295 300
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 305 310 315 320

[0041]

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 325 330 335
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 340 345 350
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 355 360 365
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser
 370 375 380
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 385 390 395 400
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495
 Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 49
 <211> 1233
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> huCD33-huTrem2 ECD(aa19-174)-Fc6mut

<400> 49
 gaattcgcca ccatgcctct gtgcgctg ctgcctctgc tgtgggctgg cgcactggct 60
 cacaacacca cagtgttcca gggcgtggcg ggccagtcgc tgcaggtgct ttgccctat 120
 gactccatga agcactgggg gaggcgcaag gcttggtgcc gccagctggg agagaagggc 180
 ccatgccagc gtgtggtcag caccgacaa ttgtggctgc tgccttctct gaggaggtgg 240
 aatgggagca cagccatcac agacgatacc ctgggtggca ctctcaccat tacgtgcgg 300
 aatctacaa cccatgatgc gggctctctac cagtgccaga gccctcaagg cagtgaggt 360
 gacacctca ggaaggctct ggtggaggtg ctggcagacc ccttgatca cgggatgct 420
 ggagatctct ggttccccgg ggagtctgag agcttcgagg atgcccattg ggagcacagc 480
 atctccagga gctcttggga aggagaaatc ccttctccac ccatttcggg taccgagccc 540

[0042]

```

aaatcttctg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaagc cgagggggca      600
ccgtcagttc tccctctccc cccaaaaacc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt      660
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gtccaactgg      720
tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgggggagga gcagtacaac      780
agcacgtacc gtgtgtcagc cgtctcacc gtctgcacc aggaatgget gaatggcaag      840
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccatctt ccatcgagaa aaccatctcc      900
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag      960
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     1020
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccctgt     1080
ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gacgaggtgg     1140
cagcagggga acgtctctc atgtccctgt atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg     1200
cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa tga                                     1233

```

<210> 50
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> huCD33-huTrem2 ECD(aa19-174)-Fc6mut

<400> 50

```

Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
1           5           10          15

```

```

His Asn Thr Thr Val Phe Gln Gly Val Ala Gly Gln Ser Leu Gln Val
          20          25          30

```

```

Ser Cys Pro Tyr Asp Ser Met Lys His Trp Gly Arg Arg Lys Ala Trp
          35          40          45

```

```

Cys Arg Gln Leu Gly Glu Lys Gly Pro Cys Gln Arg Val Val Ser Thr
          50          55          60

```

```

His Asn Leu Trp Leu Leu Ser Phe Leu Arg Arg Trp Asn Gly Ser Thr
          65          70          75          80

```

```

Ala Ile Thr Asp Asp Thr Leu Gly Gly Thr Leu Thr Ile Thr Leu Arg
          85          90          95

```

```

Asn Leu Gln Pro His Asp Ala Gly Leu Tyr Gln Cys Gln Ser Leu His
          100          105          110

```

```

Gly Ser Glu Ala Asp Thr Leu Arg Lys Val Leu Val Glu Val Leu Ala
          115          120          125

```

```

Asp Pro Leu Asp His Arg Asp Ala Gly Asp Leu Trp Phe Pro Gly Glu
          130          135          140

```

```

Ser Glu Ser Phe Glu Asp Ala His Val Glu His Ser Ile Ser Arg Ser
          145          150          155          160

```

```

Leu Leu Glu Gly Glu Ile Pro Phe Pro Pro Thr Ser Gly Thr Glu Pro

```

[0043]

165	170	175
Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu 180 185 190		
Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp 195 200 205		
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp 210 215 220		
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly 225 230 235 240		
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn 245 250 255		
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp 260 265 270		
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro 275 280 285		
Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu 290 295 300		
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn 305 310 315 320		
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 325 330 335		
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr 340 345 350		
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys 355 360 365		
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys 370 375 380		
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu 385 390 395 400		
Ser Leu Ser Pro Gly Lys 405		
<210> 51		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 引物		
<400> 51		
tagtagggat ccgctggtgc acaggaagg		

29

[0044]

<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 52
tagtaggcgg ccgcttcgtg ggcctagggt ac 32

<210> 53
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53

Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
1 5 10 15

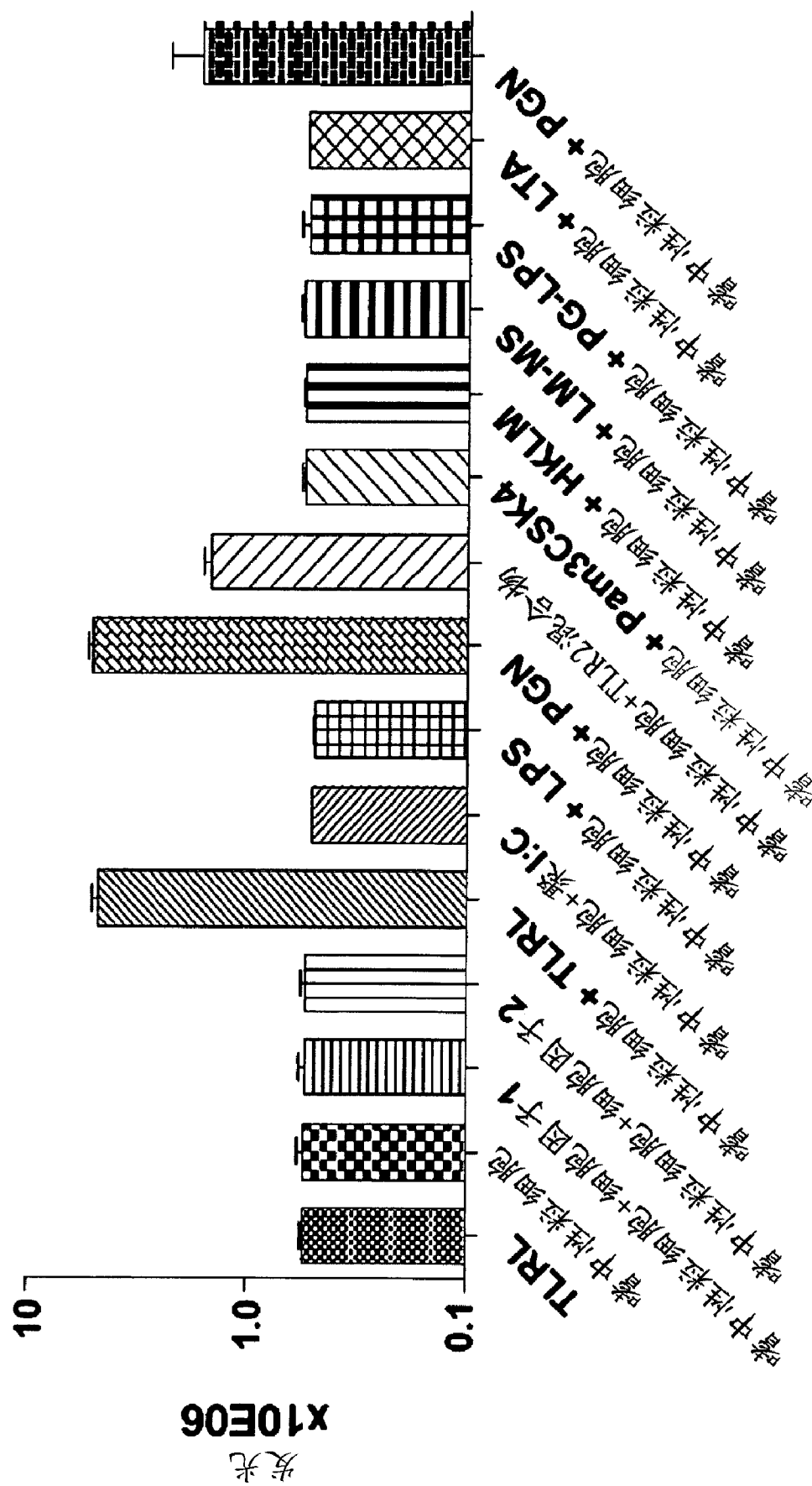
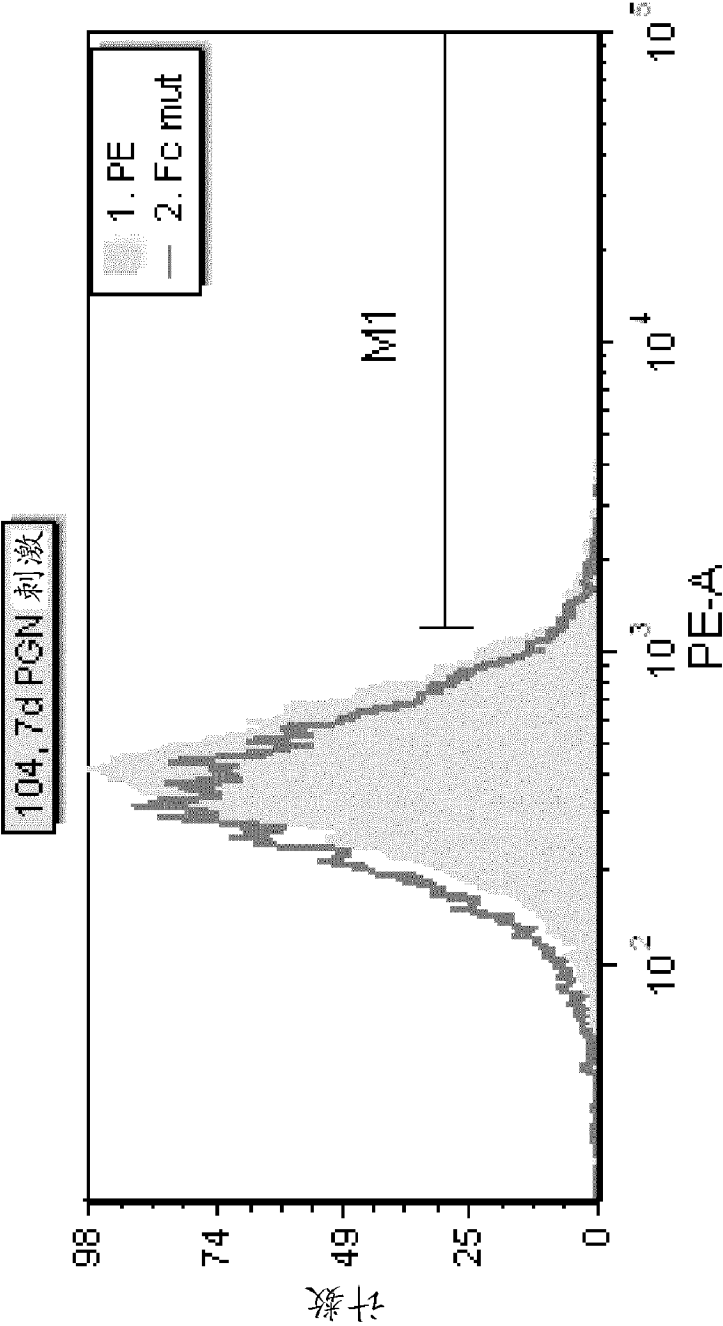
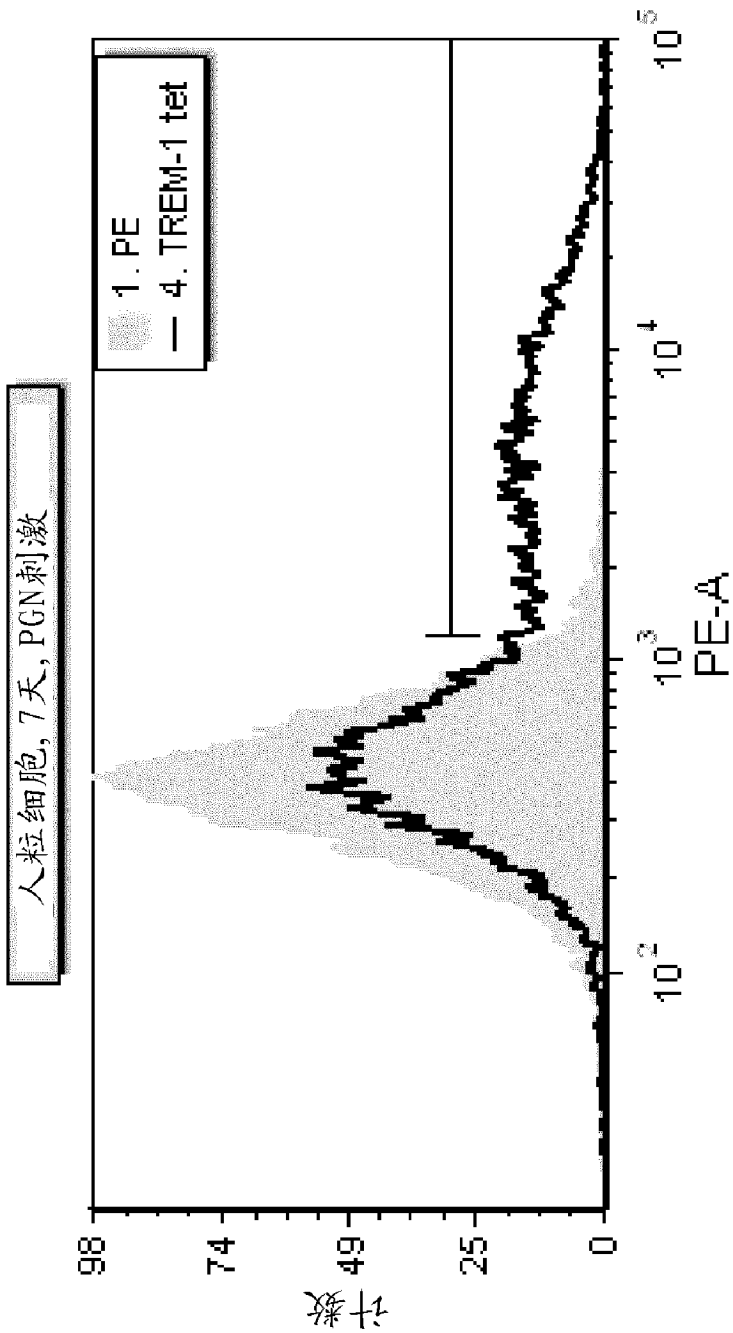


图 1



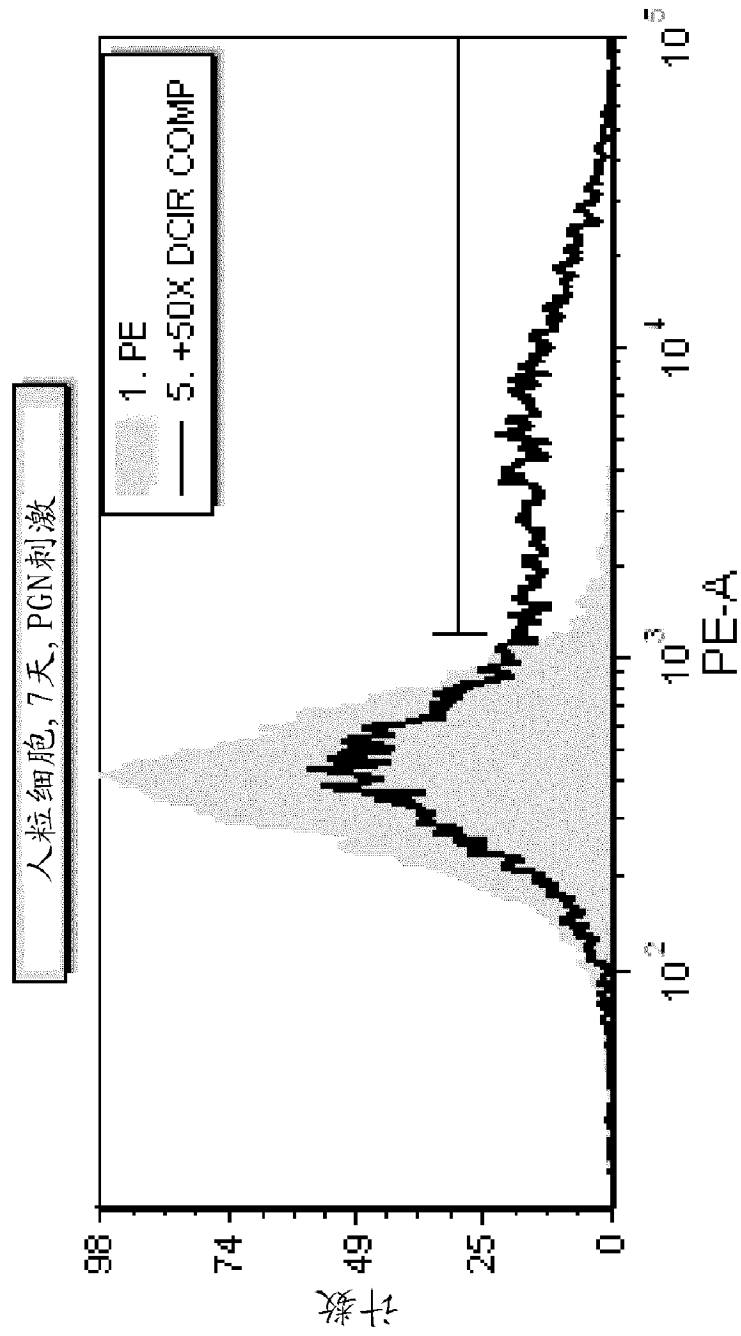
直方图 #	门控 细胞 的%
1	2
2	2

图 2A



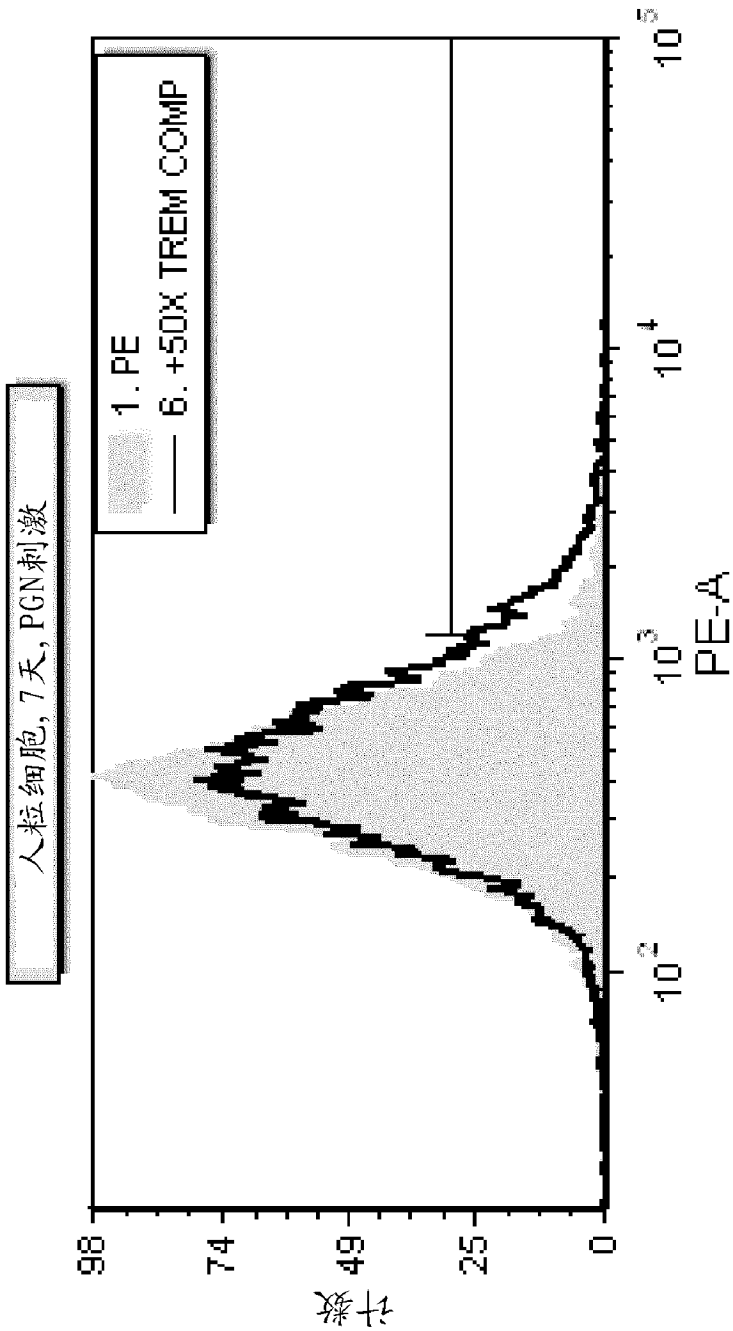
直方图 #	门控 细胞的 %
1	2
2	39

图 2B



直方图 #	门控 细胞 的%
1	2
2	41

图 2C

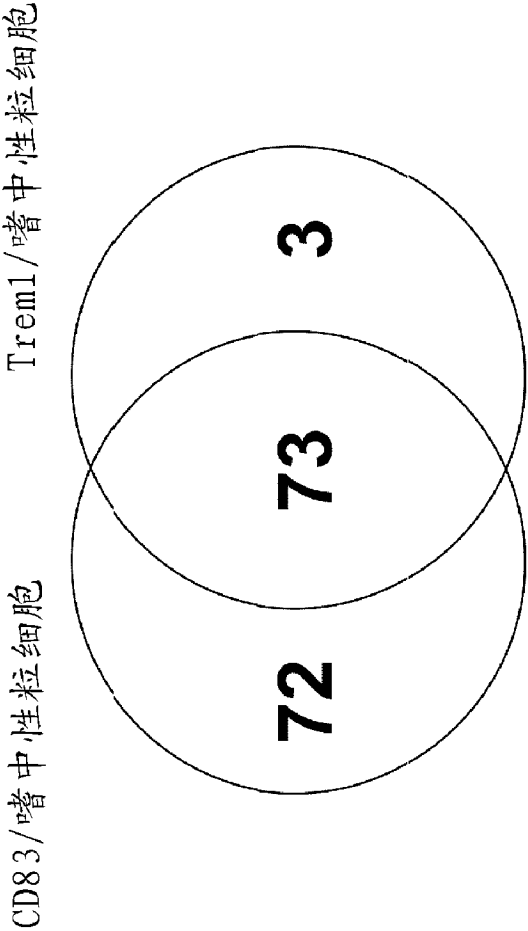


直方图 #	门控 细胞 的%
1	2
2	10

图 2D

鉴定的蛋白	基因符号	登录号
在髓样细胞1上表达的触发受体的同工型1	Trem1	IPI00427321
肽聚糖识别蛋白1	PGLYRP1	IPI00021085
酪氨酸-蛋白磷酸酶非受体类型6的同工型3	PTPN6	IPI00183046

图 3



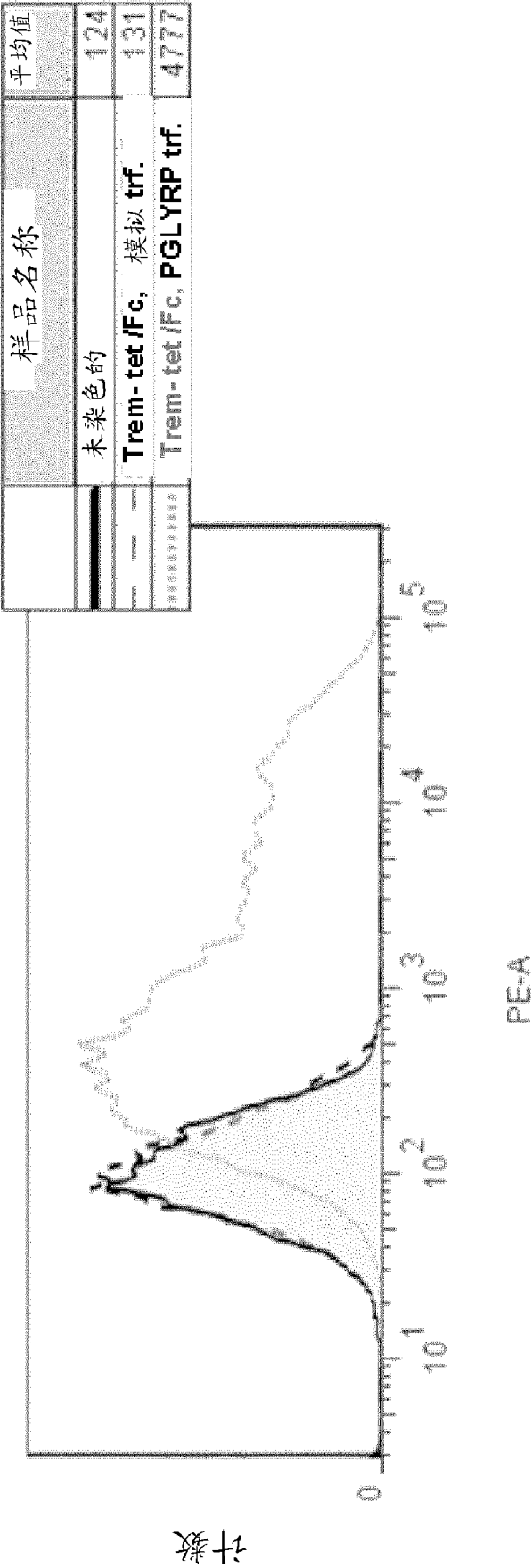


图 4A

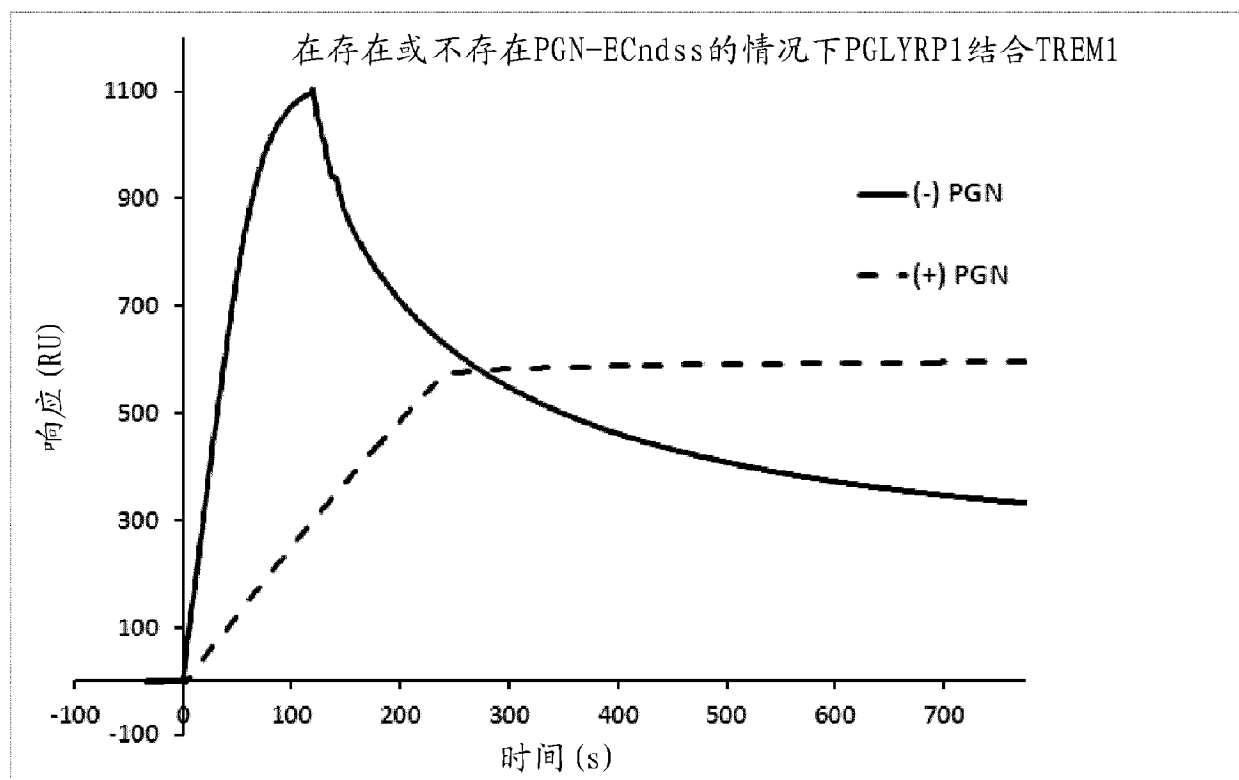


图 4B

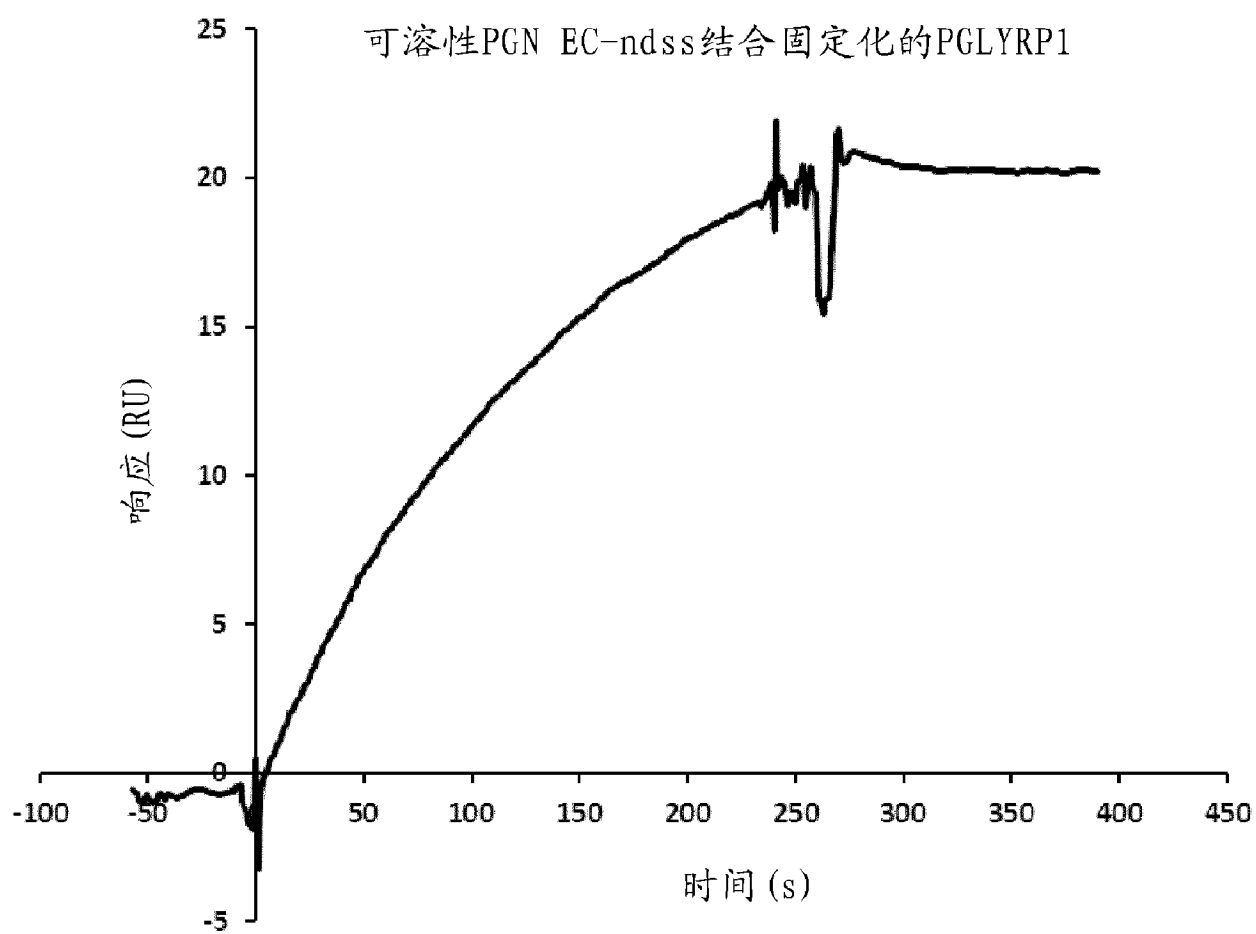


图 4C

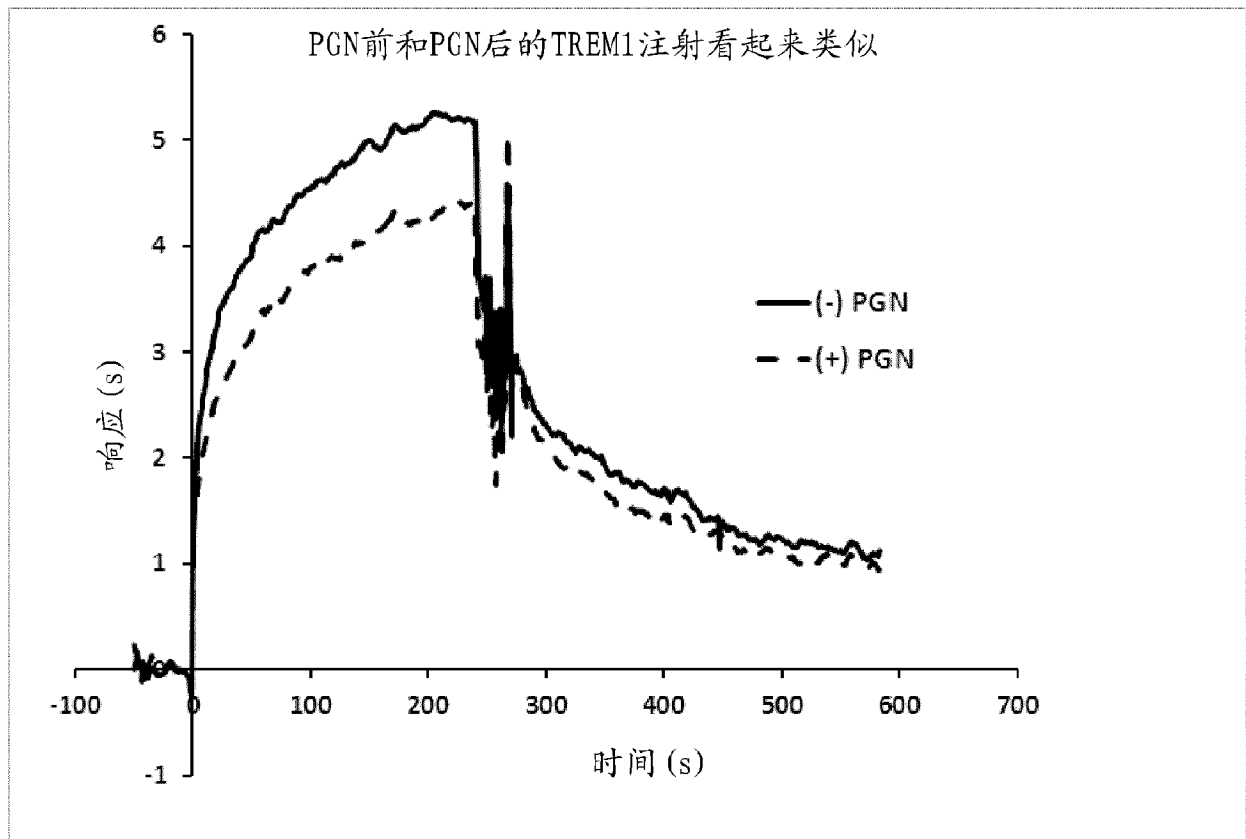


图 4D

hTREM-1/BWZ.36 报道基因测定 hPGLYRP1 滴定 + PGN ECndi

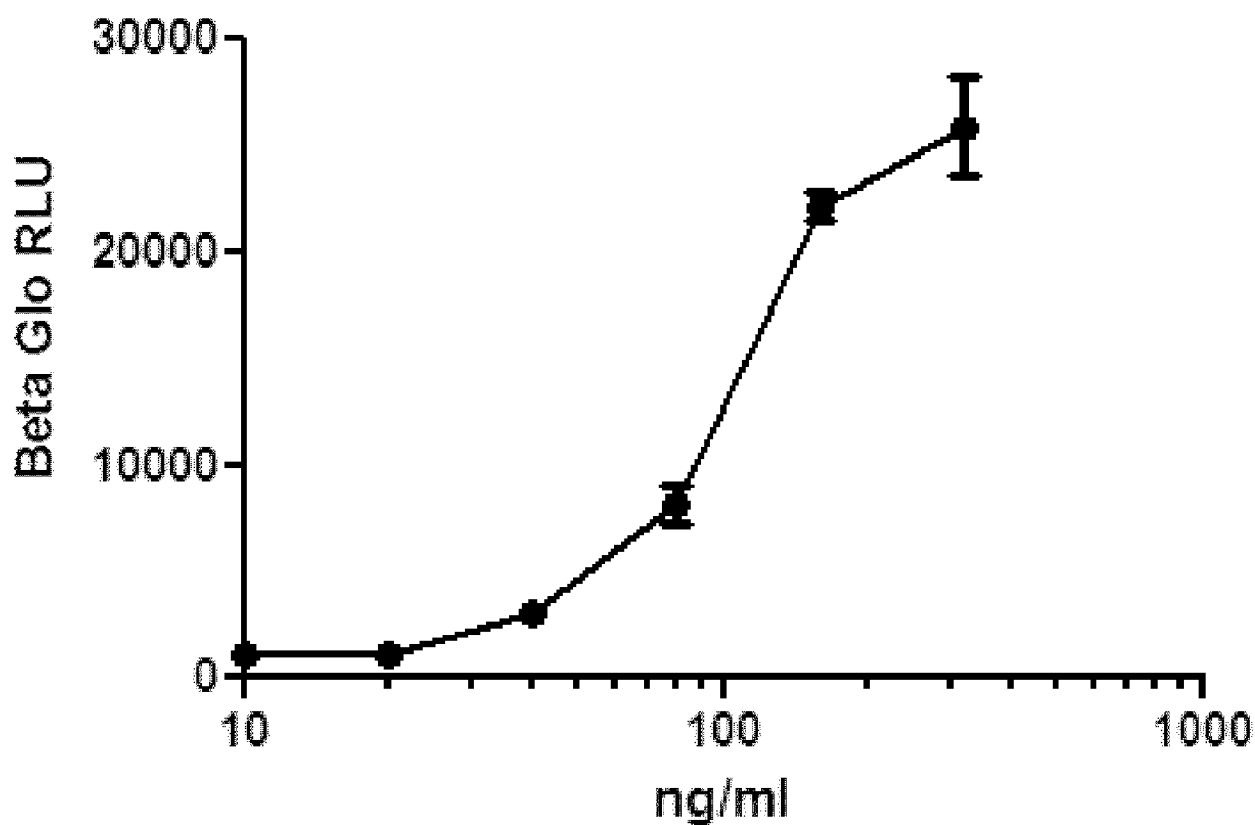


图 5A

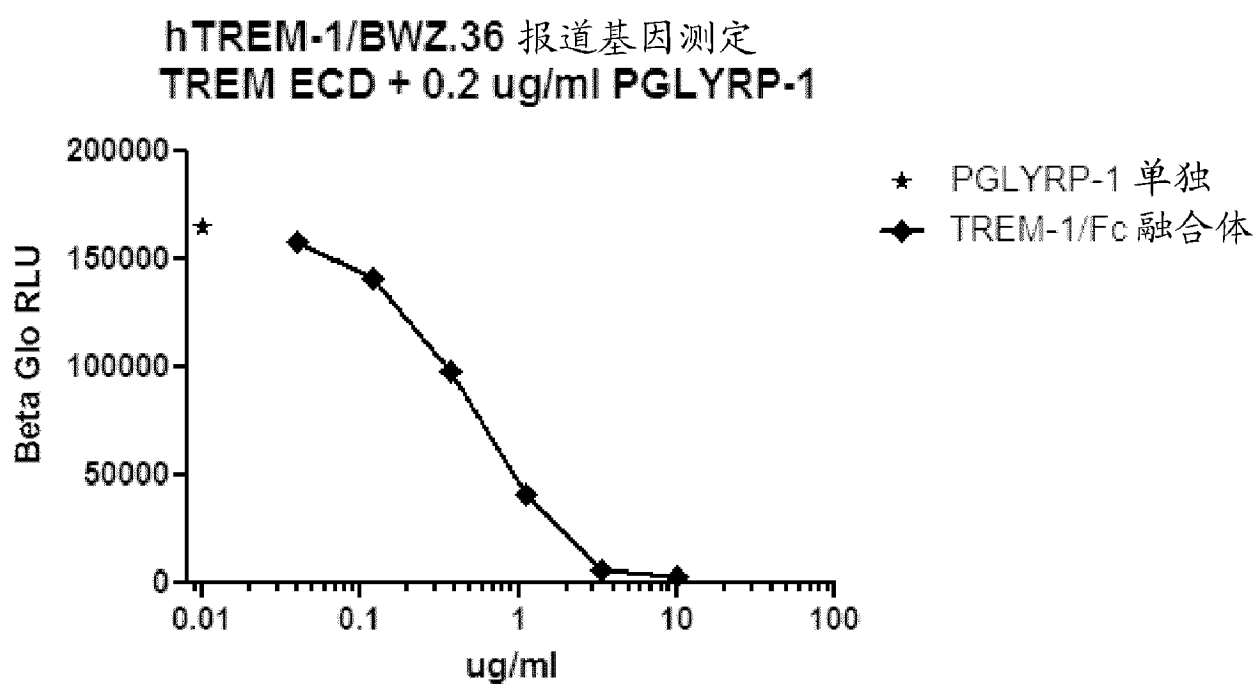


图 5B

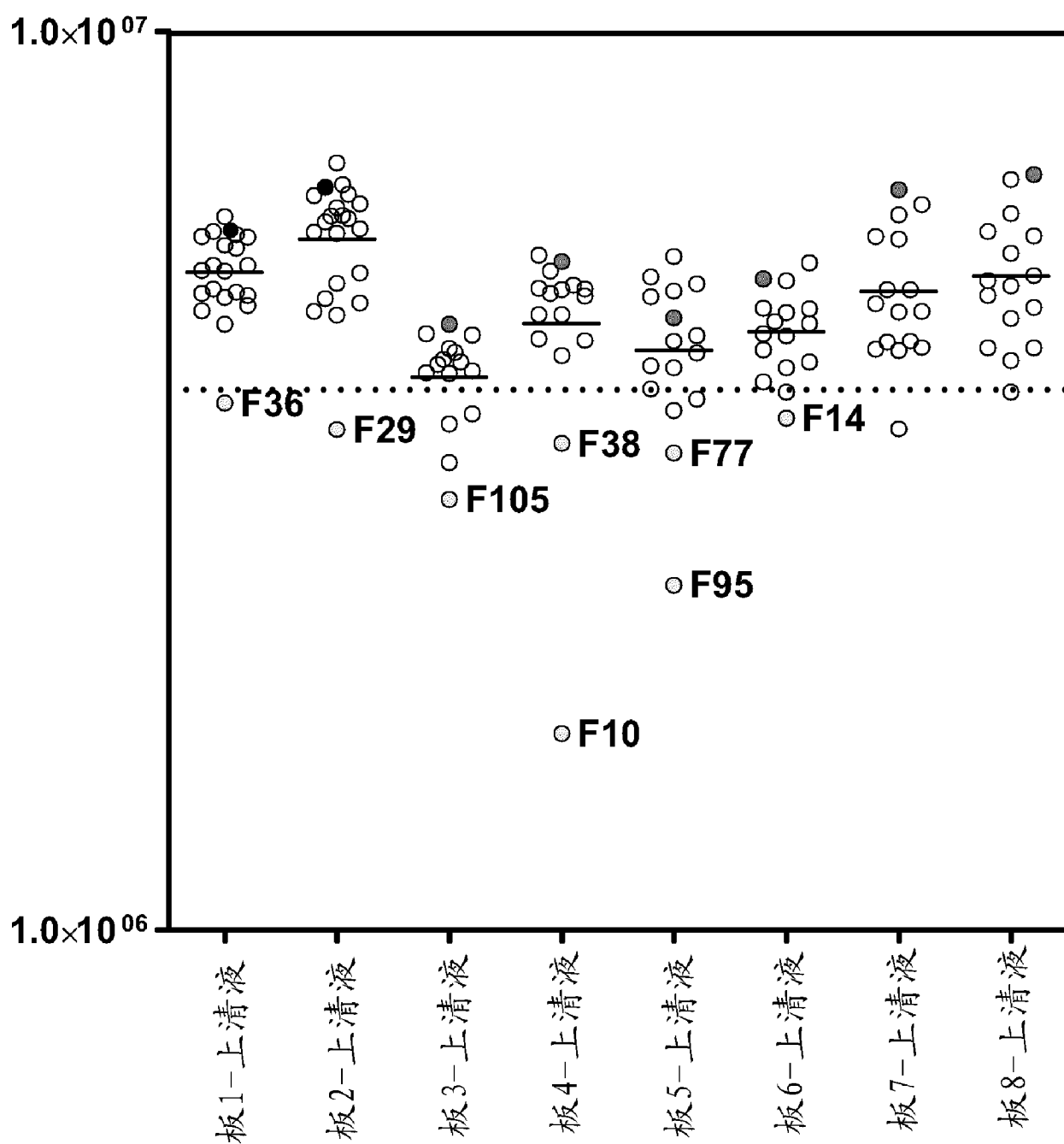


图 6A

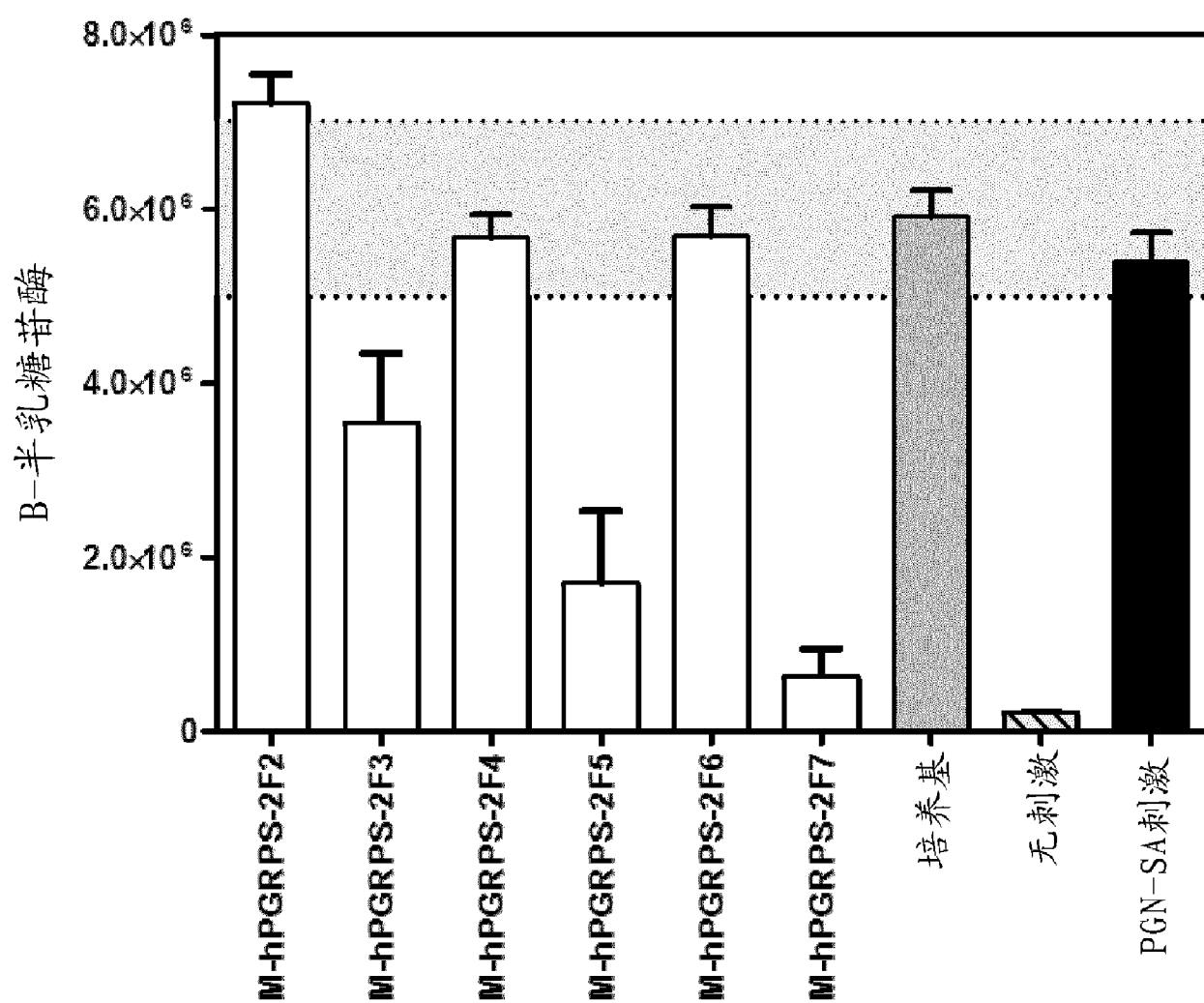


图 6B

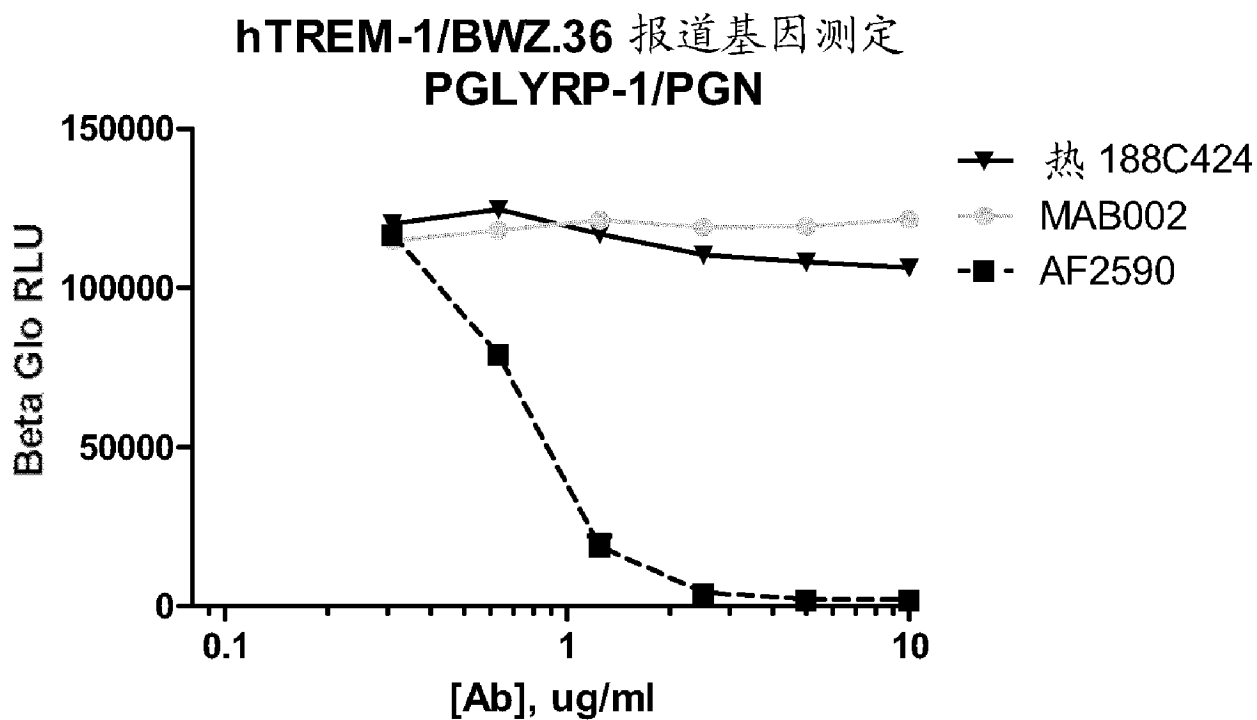


图 6C

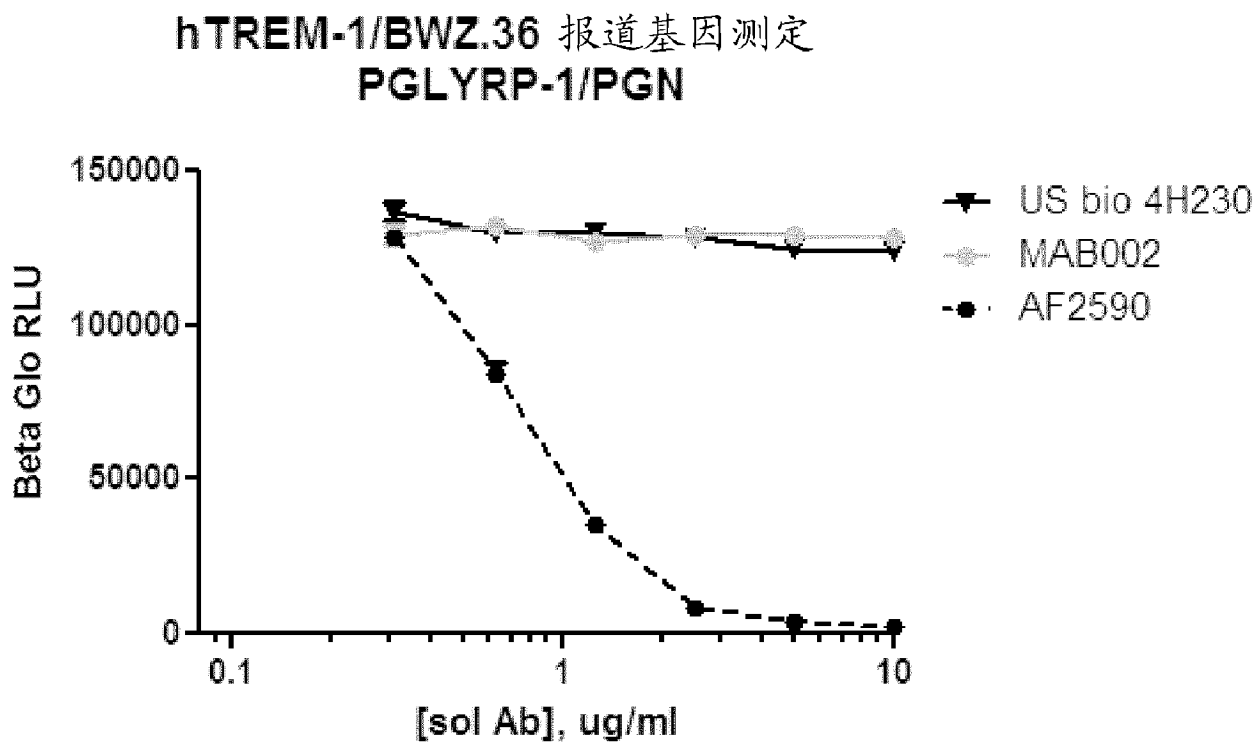


图 6D

hTREM-1/BWZ.36 报道基因测定
PGLYRP-1/PGN

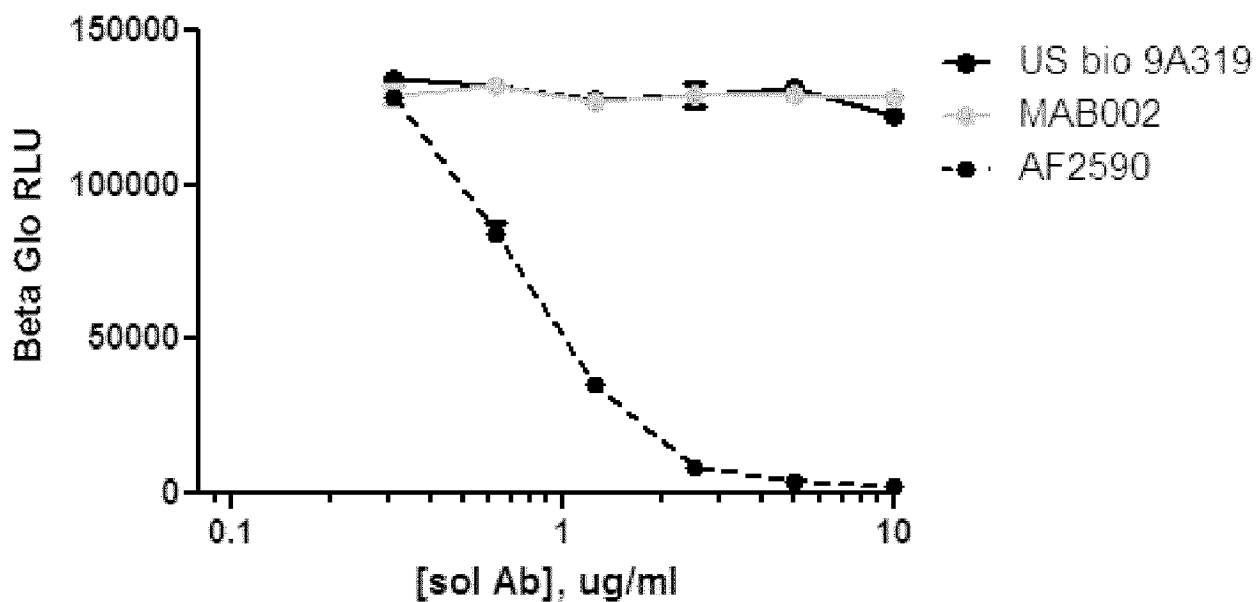


图 6E

hTREM-1/BWZ.36 报道基因测定
pglyrp-1/pgn

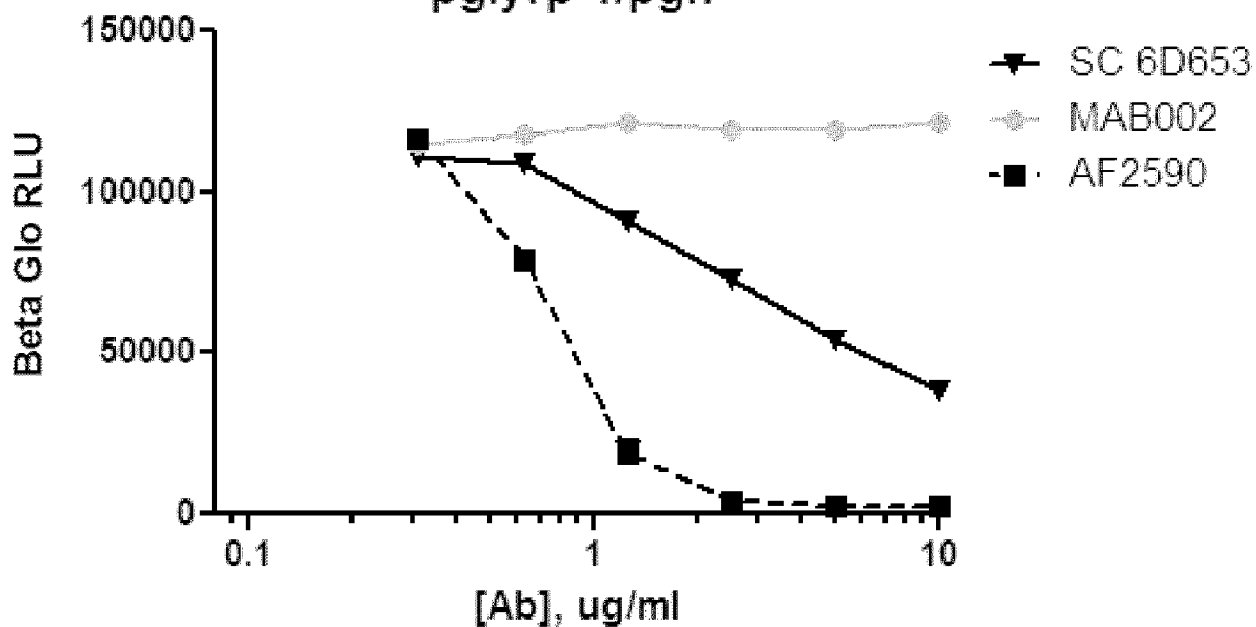


图 6F

hTREM-1/BWZ.36 报道基因测定 1 ug/ml 铺板的抗 TREM-1 Mab

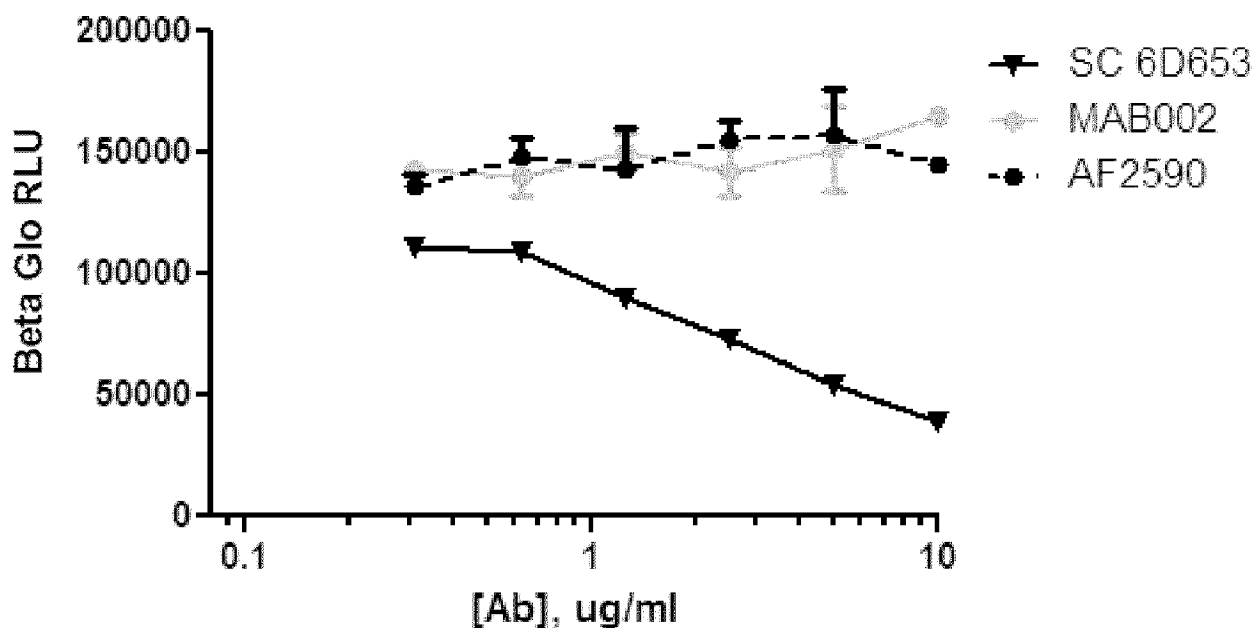


图 6G

hTREM-1/BWZ.36 RA滑液

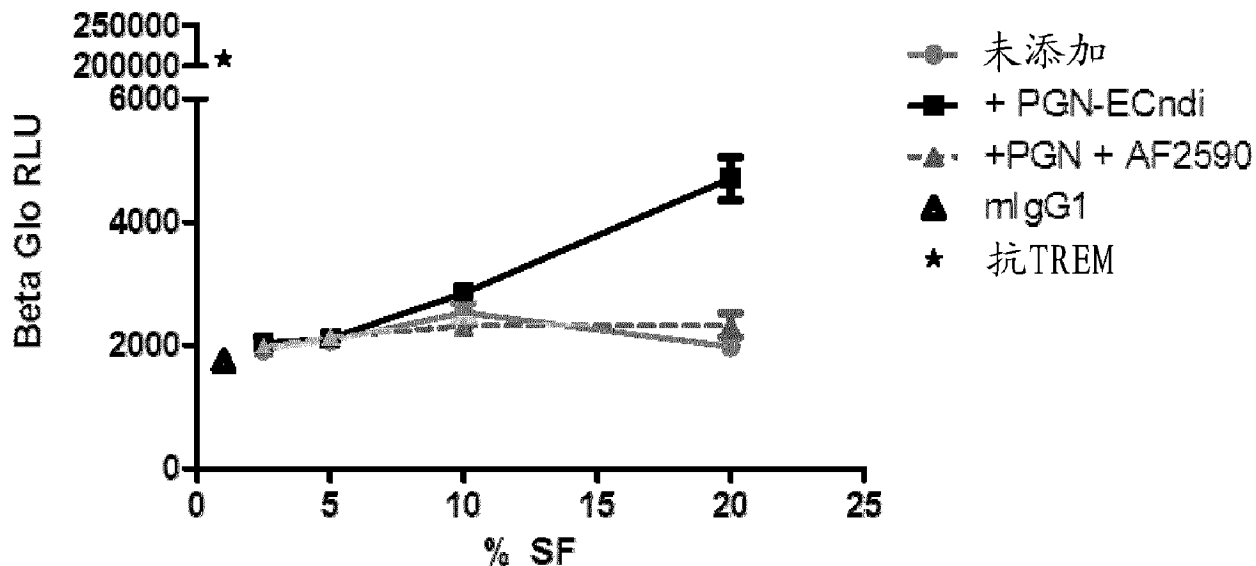


图 7

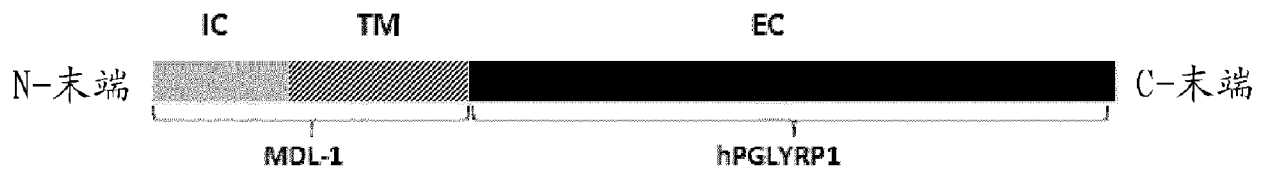


图 8