

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01802049.6

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 4 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 100482688C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 29/00 (2006.01)

[22] 申请日 2001.5.15 [21] 申请号 01802049.6

[30] 优先权

[32] 2000.5.18 [33] JP [31] 147116/00

[32] 2001.3.30 [33] JP [31] 99508/01

[86] 国际申请 PCT/JP2001/004035 2001.5.15

[87] 国际公布 WO2001/087981 日 2001.11.22

[85] 进入国家阶段日期 2002.3.15

[73] 专利权人 日本烟草产业株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 辻 孝 手塚克成 堀伸明

[56] 参考文献

EP0984023A 2000.3.8

WO9915553A 1999.4.1

AILIM/ICOS: A novel lymphocyte adhesion molecule. . Tamatani Takuya, et al. International Immunology, Vol. 12 No. 1. 2000

审查员 苏 林

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 黄益芬

权利要求书 9 页 说明书 140 页 附图 78 页

[54] 发明名称

抗协同刺激信号转导分子 AILIM 的人单克隆抗体及其药物用途

[57] 摘要

本发明涉及用 AILIM 分子作为抗原对用遗传工程技术得到的产生人抗体的转基因小鼠进行免疫, 结果得到能结合 AILIM 并且能控制各种与 AILIM - 介导的协同刺激信号(第二信号)转导相关的生物反应(例如细胞增殖, 细胞因子产生, 免疫胞解, 细胞死亡, ADCC 的诱导等)的各种人单克隆抗体。此外, 本发明公开了所述人单克隆抗体对于治疗和预防与 AILIM - 介导的协同刺激信号转导相关的各种疾病是有效的, 其能抑制这些疾病的发生和/或发展。

1.结合人 AILIM 的人单克隆抗体或其一部分,其中所述人单克隆抗体重链可变区具有由下列(a)到(f)中任一项定义的氨基酸序列:

(a) SEQ ID NO: 28 的 20-117 位氨基酸的氨基酸序列,

(b) SEQ ID NO: 28 的 20-117 位氨基酸的氨基酸序列,其中有最多 10 个氨基酸被缺失或取代,或已添加最多 10 个氨基酸,

(c) SEQ ID NO: 32 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列,

(d) SEQ ID NO: 32 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列,其中有最多 10 个氨基酸被缺失或取代,或已添加最多 10 个氨基酸,

(e) SEQ ID NO: 36 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列,或

(f) SEQ ID NO: 36 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列,其中有最多 10 个氨基酸被缺失或取代,或已添加最多 10 个氨基酸

条件是,当重链可变区具有上述(b),(d)或(f)的氨基酸序列时,所述抗体包含以下(i)-(iii)所述的任一种性质:

(i)阻止混合淋巴细胞反应的活性;

(ii)诱导信号传递从而诱导从 AILIM 表达细胞产生干扰素 γ 的活性;或

(iii)诱导对 AILIM 表达细胞的抗体依赖性细胞毒作用的活性,其中所述单克隆抗体的部分是 F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv (抗体的可变区片段)、sFv、dsFV (二硫键稳定型 Fv)或者 dAb (单一结构域抗体)。

2.结合人 AILIM 的人单克隆抗体或其一部分,其中所述人单克隆抗体的重链多肽具有由下列(a)到(f)中任一项定义的氨基酸序列:

(a) SEQ ID NO: 28 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列,

(b) SEQ ID NO: 28 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列,其中有最多 10 个氨基酸被缺失或取代,或已添加最多 10 个氨基酸,

(c) SEQ ID NO: 32 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列,

(d) SEQ ID NO: 32 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列,其中有最多 10 个氨基酸被缺失或取代,或已添加最多 10 个氨基酸,

(e) SEQ ID NO: 36 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列,或

(f) SEQ ID NO: 36 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列,其中有最多 10 个氨基酸被缺失或取代,或已添加最多 10 个氨基酸

条件是,当重链可变区具有上述(b),(d)或(f)的氨基酸序列时,所述抗体包含以下(i)-(iii)所述的任一种性质:

- (i)阻止混合淋巴细胞反应的活性;
- (ii)诱导信号传递从而诱导从 AILIM 表达细胞产生干扰素 γ 的活性;或
- (iii)诱导对 AILIM 表达细胞的抗体依赖性细胞毒作用的活性,其中所述单克隆抗体的部分是 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv (抗体的可变区片段)、 sFv 、 $dsFv$ (二硫键稳定型 Fv)或者 dAb (单一结构域抗体)。

3. 结合人 AILIM 的人单克隆抗体或其一部分,其中所述人单克隆抗体的轻链可变区具有由下列(a)到(f)中任一项定义的氨基酸序列:

- (a) SEQ ID NO: 30 的 23-116 位氨基酸的氨基酸序列,
- (b) SEQ ID NO: 30 的 23-116 位氨基酸的氨基酸序列,其中有最多 10 个氨基酸被缺失或取代,或已添加最多 10 个氨基酸,
- (c) SEQ ID NO: 34 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列,
- (d) SEQ ID NO: 34 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列,其中有最多 10 个氨基酸被缺失或取代,或已添加最多 10 个氨基酸,
- (e) SEQ ID NO: 38 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列,或
- (f) SEQ ID NO: 38 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列,其中有最多 10 个氨基酸被缺失或取代,或已添加最多 10 个氨基酸

条件是,当轻链可变区具有上述(b),(d)或(f)的氨基酸序列时,所述抗体包含以下(i)-(iii)所述的任一种性质:

- (i)阻止混合淋巴细胞反应的活性;
- (ii)诱导信号传递从而诱导从 AILIM 表达细胞产生干扰素 γ 的活性;或
- (iii)诱导对 AILIM 表达细胞的抗体依赖性细胞毒作用的活性,其中所述单克隆抗体的部分是 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv (抗体的可变区片段)、 sFv 、 $dsFv$ (二硫键稳定型 Fv)或者 dAb (单一结构域抗体)。

4. 结合人 AILIM 的人单克隆抗体或其一部分,其中所述人单克隆抗体的轻链多肽具有由下列(a)到(f)中任一项定义的氨基酸序列:

- (a) SEQ ID NO: 30 的 23-236 位氨基酸的氨基酸序列,
- (b) SEQ ID NO: 30 的 23-236 位氨基酸的氨基酸序列,其中有最多 10 个氨基酸被缺失或取代,或已添加最多 10 个氨基酸,
- (c) SEQ ID NO: 34 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列,

(d) SEQ ID NO: 34 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列, 其中有最多 10 个氨基酸被缺失或取代, 或已添加最多 10 个氨基酸,

(e) SEQ ID NO: 38 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列, 或

(f) SEQ ID NO: 38 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列, 其中有最多 10 个氨基酸被缺失或取代, 或已添加最多 10 个氨基酸

条件是, 当轻链可变区具有上述(b), (d)或(f)的氨基酸序列时, 所述抗体包含以下(i)-(iii)所述的任一种性质:

(i)阻止混合淋巴细胞反应的活性;

(ii)诱导信号传递从而诱导从 AILIM 表达细胞产生干扰素 γ 的活性; 或

(iii)诱导对 AILIM 表达细胞的抗体依赖性细胞毒作用的活性, 其中所述单克隆抗体的部分是 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv (抗体的可变区片段)、 sFv 、 $dsFv$ (二硫键稳定型 Fv) 或者 dAb (单一结构域抗体)。

5. 结合人 AILIM 的人单克隆抗体, 其具有下列(a)和(b)的特征:

(a) 所述抗体的重链可变区包含下述(I)或(II)

(I) SEQ ID NO: 28 的 20-117 位氨基酸的氨基酸序列, 或

(II) SEQ ID NO: 28 的 20-117 位氨基酸的氨基酸序列, 且其中最多 10 个氨基酸残基缺失或被取代, 或者其中添加了最多 10 个氨基酸残基; 和

(b) 所述抗体的轻链可变区包含下述(I)或(II)

(I) SEQ ID NO: 30 的 23-116 位氨基酸的氨基酸序列, 或

(II) SEQ ID NO: 30 的 23-116 位氨基酸的氨基酸序列, 且其中最多 10 个氨基酸残基缺失或被取代, 或者其中添加了最多 10 个氨基酸残基;

条件是, 当重链可变区是上述(a)之(II)或轻链可变区是上述(b)之(II)时, 所述抗体包含以下(i)-(iii)所述的任一种性质:

(i)阻止混合淋巴细胞反应的活性;

(ii)诱导信号传递从而诱导从 AILIM 表达细胞产生干扰素 γ 的活性; 或

(iii)诱导对 AILIM 表达细胞的抗体依赖性细胞毒作用的活性。

6. 结合人 AILIM 的人单克隆抗体, 其具有下列(a)和(b)的特征:

(a) 所述抗体的重链多肽包含下述(I)或(II)

(I) SEQ ID NO: 28 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列, 或

(II) SEQ ID NO: 28 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列, 且其中最多 10 个氨基酸残基缺失或被取代, 或者其中添加了最多 10 个氨基酸残基; 和

(b) 所述抗体的轻链多肽包含下述(I)或(II)

(I) SEQ ID NO: 30 的 23-236 位氨基酸的氨基酸序列, 或

(II) SEQ ID NO: 30 的 23-236 位氨基酸的氨基酸序列, 且其中最多 10 个氨基酸残基缺失或被取代, 或者其中添加了最多 10 个氨基酸残基;

条件是, 当重链可变区是上述(a)之(II)或轻链可变区是上述(b)之(II)时, 所述抗体包含以下(i)-(iii)所述的任一种性质:

(i)阻止混合淋巴细胞反应的活性;

(ii)诱导信号传递从而诱导从 AILIM 表达细胞产生干扰素 γ 的活性; 或

(iii)诱导对 AILIM 表达细胞的抗体依赖性细胞毒作用的活性。

7. 结合人 AILIM 的人单克隆抗体, 其具有下列(a)和(b)的特征:

(a) 所述抗体的重链可变区包含下述(I)或(II)

(I) SEQ ID NO: 32 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列, 或

(II) SEQ ID NO: 32 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列, 且其中最多 10 个氨基酸残基缺失或被取代, 或者其中添加了最多 10 个氨基酸残基; 和

(b) 所述抗体的轻链可变区包含下述(I)或(II)

(I) SEQ ID NO: 34 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列, 或

(II) SEQ ID NO: 34 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列, 且其中最多 10 个氨基酸残基缺失或被取代, 或者其中添加了最多 10 个氨基酸残基;

条件是, 当重链可变区是上述(a)之(II)或轻链可变区是上述(b)之(II)时, 所述抗体包含以下(i)-(iii)所述的任一种性质:

(i)阻止混合淋巴细胞反应的活性;

(ii)诱导信号传递从而诱导从 AILIM 表达细胞产生干扰素 γ 的活性; 或

(iii)诱导对 AILIM 表达细胞的抗体依赖性细胞毒作用的活性。

8. 结合人 AILIM 的人单克隆抗体, 其具有下列(a)和(b)的特征:

(a) 所述抗体的重链多肽包含下述(I)或(II)

(I) SEQ ID NO: 32 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列, 或

(II) SEQ ID NO: 32 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列, 且其中最多 10 个氨基酸残基缺失或被取代, 或者其中添加了最多 10 个氨基酸残基; 和

(b) 所述抗体的轻链多肽包含下述(I)或(II)

(I) SEQ ID NO: 34 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列, 或

(II) SEQ ID NO: 34 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列, 且其中最多

10 个氨基酸残基缺失或被取代, 或者其中添加了最多 10 个氨基酸残基;

条件是, 当重链可变区是上述(a)之(II)或轻链可变区是上述(b)之(II)时, 所述抗体包含以下(i)-(iii)所述的任一种性质:

- (i)阻止混合淋巴细胞反应的活性;
- (ii)诱导信号传递从而诱导从 AILIM 表达细胞产生干扰素 γ 的活性; 或
- (iii)诱导对 AILIM 表达细胞的抗体依赖性细胞毒作用的活性。

9. 结合人 AILIM 的人单克隆抗体, 其具有下列(a)和(b)的特征:

(a) 所述抗体的重链可变区包含下述(I)或(II)

(I) SEQ ID NO: 36 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列, 或

(II) SEQ ID NO: 36 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列, 且其中最多 10 个氨基酸残基缺失或被取代, 或者其中添加了最多 10 个氨基酸残基; 和

(b) 所述抗体的轻链可变区包含下述(I)或(II)

(I) SEQ ID NO: 38 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列, 或

(II) SEQ ID NO: 38 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列, 且其中最多 10 个氨基酸残基缺失或被取代, 或者其中添加了最多 10 个氨基酸残基;

条件是, 当重链可变区是上述(a)之(II)或轻链可变区是上述(b)之(II)时, 所述抗体包含以下(i)-(iii)所述的任一种性质:

- (i)阻止混合淋巴细胞反应的活性;
- (ii)诱导信号传递从而诱导从 AILIM 表达细胞产生干扰素 γ 的活性; 或
- (iii)诱导对 AILIM 表达细胞的抗体依赖性细胞毒作用的活性。

10. 结合人 AILIM 的人单克隆抗体, 其具有下列(a)和(b)的特征:

(a) 所述抗体的重链多肽包含下述(I)或(II)

(I) SEQ ID NO: 36 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列, 或

(II) SEQ ID NO: 36 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列, 且其中最多 10 个氨基酸残基缺失或被取代, 或者其中添加了最多 10 个氨基酸残基; 和

(b) 所述抗体的轻链多肽包含下述(I)或(II)

(I) SEQ ID NO: 38 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列, 或

(II) SEQ ID NO: 38 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列, 且其中最多 10 个氨基酸残基缺失或被取代, 或者其中添加了最多 10 个氨基酸残基;

条件是, 当重链可变区是上述(a)之(II)或轻链可变区是上述(b)之(II)时, 所述抗体包含以下(i)-(iii)所述的任一种性质:

- (i)阻止混合淋巴细胞反应的活性;
- (ii)诱导信号传递从而诱导从 AILIM 表达细胞产生干扰素 γ 的活性; 或
- (iii)诱导对 AILIM 表达细胞的抗体依赖性细胞毒作用的活性。

11. 编码权利要求 1 所述人单克隆抗体的重链可变区多肽的 DNA, 所述重链可变区多肽选自下列(a)到(c)中的任一项:

- (a) SEQ ID NO: 28 的 20-117 位氨基酸的氨基酸序列,
- (b) SEQ ID NO: 32 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列, 和
- (c) SEQ ID NO: 36 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列。

12. 编码权利要求 3 所述人单克隆抗体的轻链可变区多肽的 DNA, 所述轻链可变区多肽选自下列(a)到(c)中的任一项:

- (a) SEQ ID NO: 30 的 23-116 位氨基酸的氨基酸序列
- (b) SEQ ID NO: 34 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列, 和
- (c) SEQ ID NO: 38 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列。

13. 编码权利要求 2 所述人单克隆抗体的重链可变区多肽的 DNA, 所述重链可变区多肽选自下列(a)到(c)中的任一项:

- (a) SEQ ID NO: 28 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列,
- (b) SEQ ID NO: 32 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列, 和
- (c) SEQ ID NO: 36 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列。

14. 编码权利要求 4 所述人单克隆抗体的轻链可变区多肽的 DNA, 所述轻链可变区多肽选自下列(a)到(c)中的任一项:

- (a) SEQ ID NO: 30 的 23-236 位氨基酸的氨基酸序列,
- (b) SEQ ID NO: 34 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列, 和
- (c) SEQ ID NO: 38 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列。

15. 权利要求 11 的 DNA, 其选自下列(a)到(f)中的任一项:

- (a) SEQ ID NO: 27 的 126-419 位核苷酸的核苷酸序列,
- (b) SEQ ID NO: 29 的 105-386 位核苷酸的核苷酸序列,
- (c) SEQ ID NO: 31 的 151-441 位核苷酸的核苷酸序列,
- (d) SEQ ID NO: 33 的 88-375 位核苷酸的核苷酸序列,
- (e) SEQ ID NO: 35 的 153-443 位核苷酸的核苷酸序列,
- (f) SEQ ID NO: 37 的 93-380 位核苷酸的核苷酸序列。

16. 权利要求 12 的 DNA, 其选自下列(a)到(f)中的任一项:

- (a) SEQ ID NO: 27 的 69-1481 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (b) SEQ ID NO: 29 的 39-749 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (c) SEQ ID NO: 31 的 94-1506 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (d) SEQ ID NO: 33 的 28-738 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (e) SEQ ID NO: 35 的 96-1508 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (f) SEQ ID NO: 37 的 33-743 位核苷酸的核苷酸序列。
17. 含有权利要求 11 到 16 任一项的 DNA 的载体。
18. 权利要求 17 的载体, 其包含下列(a)到(c)任一项的 DNA:
- (a) SEQ ID NO: 27 的 126-419 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (b) SEQ ID NO: 31 的 151-441 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (c) SEQ ID NO: 35 的 153-443 位核苷酸的核苷酸序列。
19. 权利要求 17 的载体, 其包含下列(a)到(c)任一项的 DNA:
- (a) SEQ ID NO: 27 的 69-1481 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (b) SEQ ID NO: 31 的 94-1506 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (c) SEQ ID NO: 35 的 96-1508 位核苷酸的核苷酸序列。
20. 权利要求 17 的载体, 其包含下列(a)到(c)任一项的 DNA:
- (a) SEQ ID NO: 29 的 105-386 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (b) SEQ ID NO: 33 的 88-375 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (c) SEQ ID NO: 37 的 93-380 位核苷酸的核苷酸序列。
21. 权利要求 17 的载体, 其包含下列(a)到(c)任一项的 DNA:
- (a) SEQ ID NO: 29 的 39-749 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (b) SEQ ID NO: 33 的 28-738 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (c) SEQ ID NO: 37 的 33-743 位核苷酸的核苷酸序列。
22. 权利要求 17 的载体, 其包含下列(a)和(b)的 DNA:
- (a) SEQ ID NO: 27 的 126-419 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (b) SEQ ID NO: 29 的 105-386 位核苷酸的核苷酸序列。
23. 权利要求 17 的载体, 其包含下列(a)和(b)的 DNA:
- (a) SEQ ID NO: 27 的 69-1481 位核苷酸的核苷酸序列,
 - (b) SEQ ID NO: 29 的 39-749 位核苷酸的核苷酸序列。
24. 权利要求 17 的载体, 其包含下列(a)和(b)的 DNA:
- (a) SEQ ID NO: 31 的 151-441 位核苷酸的核苷酸序列,

- (b) SEQ ID NO: 33 的 88-375 位核苷酸的核苷酸序列。
25. 权利要求 17 的载体, 其包含下列(a)和(b)的 DNA:
- (a) SEQ ID NO: 31 的 94-1506 位核苷酸的核苷酸序列,
- (b) SEQ ID NO: 33 的 28-738 位核苷酸的核苷酸序列。
26. 权利要求 17 的载体, 其包含下列(a)和(b)的 DNA:
- (a) SEQ ID NO: 35 的 153-443 位核苷酸的核苷酸序列,
- (b) SEQ ID NO: 37 的 93-380 位核苷酸的核苷酸序列。
27. 权利要求 17 的载体, 其包含下列(a)和(b)的 DNA:
- (a) SEQ ID NO: 35 的 96-1508 位核苷酸的核苷酸序列,
- (b) SEQ ID NO: 37 的 33-743 位核苷酸的核苷酸序列。
28. 生产权利要求 1 到 10 任一项的人单克隆抗体的细胞。
29. 权利要求 28 的细胞, 其中所述细胞是将得自能产生所述人单克隆抗体的哺乳动物的 B 细胞与得自哺乳动物的骨髓瘤细胞融合而得的融合细胞。
30. 通过权利要求 17-27 之一的载体而转化的基因重组宿主。
31. 权利要求 30 的基因重组宿主, 其中所述宿主是哺乳动物细胞。
32. 权利要求 30 的基因重组宿主, 其中所述宿主是哺乳动物受精卵。
33. 权利要求 30 或 31 的基因重组宿主产生的结合人 AILIM 的人单克隆抗体或其一部分, 其中所述单克隆抗体的部分是 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv (抗体的可变区片段)、 sFv 、 $dsFv$ (二硫键稳定型 Fv) 或者 dAb (单一结构域抗体)。
34. 包含权利要求 1-10 之一的人单克隆抗体和可药用载体的药用组合物。
35. 包含权利要求 33 的人单克隆抗体或其一部分和可药用载体的药用组合物。
36. 权利要求 1-10 之一的人单克隆抗体或其一部分制备用于抑制由 AILIM 介导的信号转导进入细胞的药物的用途。
37. 权利要求 1-10 之一的人单克隆抗体或其一部分制备用于阻止 AILIM 表达细胞增殖的药物的用途。
38. 权利要求 1-10 之一的人单克隆抗体或其一部分制备用于阻止从 AILIM 表达细胞产生细胞因子的药物的用途。

39. 权利要求 1-10 之一的人单克隆抗体或其一部分制备用于阻止，治疗或预防迟发型变态反应的药物的用途。

抗协同刺激信号转导分子 AILIM 的 人单克隆抗体及其药物用途

技术领域

本发明涉及结合 AILIM(激活诱导型淋巴细胞免疫刺激分子, 也称之为 ICOS(诱导型协同刺激物))的人抗体; 结合 AILIM 或其一部分的人单克隆抗体; 编码所述人单克隆抗体或其一部分的 DNA, 或所述 DNA 的一部分; 产生所述人单克隆抗体或其一部分的细胞(包括基因重组细胞); 由所述基因重组细胞产生的人单克隆抗体或其一部分; 含有所述人单克隆抗体或其一部分的药物组合物; 治疗与迟发型过敏反应相关的疾病的含有抗 AILIM 抗体的药物组合物; 鉴定, 定量测定或分析结合 AILIM 或 AILIM 配体的物质的方法; 和用于所述方法的试剂盒。

背景技术

哺乳动物活体具有排斥侵入该活体的病原性微生物(病毒, 细菌, 寄生虫等)或异物(下文中这两者被称为“抗原”)的免疫应答系统。其中之一被称为先天性免疫应答系统, 另一个是获得性免疫应答系统。前者的排斥机理包括吞噬细胞(包括多形核白细胞, 单核细胞, 巨噬细胞等)的吞噬作用, 自然杀伤(NK)细胞的进攻, 和补体对抗原的非特异性识别例如调理作用。后者, 获得性免疫应答系统, 是通过淋巴细胞(主要是 T 细胞和 B 细胞)的排斥机理, 所述淋巴细胞获得对抗原的特异性(即激活的淋巴细胞)。获得抗原特异性的 B 细胞通过产生对该抗原特异性的抗体进攻存在于这些细胞外部的抗原。获得抗原特异性的 T 细胞(即激活的 T 细胞)分为辅助 T 细胞和细胞毒性 T 细胞(细胞毒性淋巴细胞, CTL)。辅助 T 细胞调节 B 细胞的分化和抗体的产生, 并且与巨噬细胞共同作用破坏抗原。后者, CTL 自身进攻病毒感染细胞等(实验药物(Experimental Medicine):增刊, “Bio Science Term Library, Immunity(生物科学术语文库, 免疫)”, Yodosha, pp. 14-17(1995))。

T细胞的抗原特异性的获得(即T细胞的激活)是通过T细胞对抗原呈递细胞(APC)例如巨噬细胞, B细胞或树突细胞呈递的抗原的识别开始的。抗原呈递细胞处理所掺入的抗原并且通过将他们与主要组织相容性复合体(MHC)结合来呈递这些处理过的抗原。通过细胞膜表面上存在的T细胞受体(TcR)和CD3抗原之间的复合体(TcR/CD3复合体)识别抗原呈递细胞呈递的处理过的抗原, T细胞接受激活细胞的第一信号(或获得特异性)。

但是, TcR/CD3复合体-介导的第一信号单独不能充分地激活T细胞并且导致无应答性或克隆无反应性, 这样这些细胞此后不能与接受的任何刺激反应。白细胞介素2(IL-2)的自分泌对于T细胞被激活, T细胞分化成抗原特异性T细胞克隆, 和T细胞增殖是必需的。在克隆无反应性中, T细胞由于没有产生IL-2等物质且没有细胞分裂而失活。即, IL-2等细胞因子的产生伴随的T细胞的激活需要通过TcR/CD3复合体的第一信号之后的第二信号。此第二信号被称为协同刺激信号。

T细胞接受该第二信号并且通过T细胞表面上除TcR/CD3复合体之外的分子与抗原呈递细胞上除MHC之外的分子相互作用(细胞粘附)而将其传递到细胞中。该第二信号避免了细胞无反应性(克隆无反应性)并且激活这些细胞。

尽管还没有对抗原呈递细胞和淋巴细胞例如T细胞之间的第二信号传递的一部分机理的详细解释, 但是迄今为止的研究表明第二信号传递的一个重要因素是主要在T细胞和胸腺细胞上表达的细胞表面分子CD28(也称为Tp44, T44或9.3抗原)与在抗原呈递细胞(巨噬细胞, 单核细胞, 树突细胞等)上表达的细胞表面分子CD80(也称为B7-1, B7, BB1, 或B7/BB1)以及与抗原呈递细胞上的细胞表面分子CD86(也称为B7-2或B70)的相互作用(即, 通过这些细胞之间的结合发生的细胞粘附)。此外, 通过实验解释了认为其表达依据第二信号而加强的细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)与CD80(B7-1)和CD86(B7-2)的相互作用(即, 通过这些细胞之间的结合发生的细胞粘附)在通过第二信号调节T细胞激活时起着重要作用。换句话说, 通过第二信号的传递而调节T细胞激活至少涉及CD28和CD80/CD86之间的相互作用, 据认为是依据该相互作用的CTLA-4表达的增强, 和CTLA-4与CD80/CD86之间的相互作用。

已知CD28是传递激活T细胞和避免无反应性所需的第二信号(协同刺

激信号)的协同刺激物分子。通过该分子结合抗原呈递细胞上的 CD80(B7-1)和 CD86(B7-2)协同刺激物分子(通过这些分子之间的结合而发生细胞粘附)所传递的第二信号稳定 Th1-型细胞因子的 mRNA, 并且接着促进 T 细胞产生大量 Th1-型细胞因子例如 IL-2, IFN γ 和 TNF α 。TcR/CD3 传递的第一信号诱导 CTLA-4 的表达, 并且 CD28 和 CD80 之间的结合传递的第二信号还将该表达增强。证明 CTLA-4 接受这些信号来抑制 T 细胞功能, 这与 CD28 传递的第二信号对 T 细胞的激活作用相反。

人 CD28 和 CTLA-4 分别是分子量分别是 44Kd 和 41-43Kd 的 I 型糖蛋白。这两者都具有免疫球蛋白样区, 属于免疫球蛋白超家族, 并且具有作为细胞粘附分子的功能和作为信号传递分子的功能。

人 CD28 通过二硫键形成异二聚体, 而 CTLA-4 以单体存在。CD28 和 CTLA-4 基因两者都定位于人染色体上“2q33”和小鼠染色体上“1C”, 都由四个(4)外显子组成。人 CD28 和 CTLA-4 分别由 220 和 223 个氨基酸组成, 包括前导序列, 并且它们之间的氨基酸同源性是 20-30%。

CD28 和 CTLA-4 在人和小鼠中的配体是 CD80(B7-1)和 CD86(B7-2)。CTLA-4 对两种配体的亲和性是 CD28 对两种配体的亲和性的约 20 倍。已经阐明了动物物种间保守的氨基酸序列结构“MYPPPY(Met-Tyr-Pro-Pro-Pro-Tyr)”对于 CD28 和 CTLA-4 与 CD80(B7-1)的结合是重要的。还报道过, 当 CD28 被刺激时, PI3 激酶(磷酸肌醇 3 激酶, PI3K)与 CD28 的部分序列“YMN(Met-Tyr-Met-Asn-Met)”中的磷酸化酪氨酸残基结合, 并且 CD28 在通过该“YxxM”结构的胞内信号传递中起着重要的作用。此外, 报道过 CTLA-4 在其胞质区中还具有“YxxM”代表的序列, 即“YVKM(Tyr-Val-Lys-Met)”, 并且在受刺激后 SYP 与该序列结合。

CD28 在胸腺细胞和外周血 T 细胞中特异表达, CTLA-4 在激活的 T 细胞中特异表达(细胞工程(Cell Engineering):增刊, “Handbook of Adhesion Molecule(粘附分子手册)”, Shujunsha, 93-102 页(1994); 同上 120-136 页; 实验药物(Experimental Medicine):增刊, “生物科学术语文库, 免疫”, Yodosha, pp. 94-98(1995); 实验药物(Experimental Medicine):增刊, “生物科学术语文库, 胞内信号传导”, Yodosha, pp. 58-59(1995); Nihon Rinsho, 55 卷, No. 6, pp. 215-220(1997))。

在 T 细胞功能的调节(T 细胞功能的激活和抑制)中, 多个分子例如协同

刺激物分子(CD28, CD80(B7-1), CD86(B7-2)等)和与它们一同作用的CTLA-4之间的相互作用的重要性被认识到了,这引起了人们对这些分子和疾病之间的关系以及通过调节这些分子的功能来治疗疾病的注意。

如上所述,尽管活体激活对活体(自身)来说是外物的抗原的获得性免疫应答系统,但是其也具有免疫耐受性,这样就不表现出针对其自身成分(自身抗原)的免疫应答。如果由于某些原因破坏了免疫耐受性,则发生对自身抗原的免疫应答,通过上述相同机理诱导自身抗原-反应性T细胞进入免疫异常状态,从而引发各种自身免疫疾病。

换句话说,因为当活体免疫系统正常时,正常组织中未受刺激的抗原呈递细胞(APC)不表达协同刺激分子,即使存在与自身抗原反应的自身抗原-反应T细胞,T细胞仍处于无应答状态而保持免疫耐受性。有人提出,免疫异常状态下,协同刺激分子异常过度的持续表达,更多的自身抗原-反应T细胞被激活,从而引起自身免疫疾病。

最近基于这样的观点,有人尝试通过调节协同刺激信号的传递,例如上述CD28/CTLA-4和CD80/CD86之间的信号传递,来治疗各种自身免疫疾病。

这些尝试的结果还没有详细阐明协同刺激分子与相关分子之间的相互作用激活T细胞的机理。该机理中可能涉及其它未知分子。

最近,鉴定出了一种新的类似上述“CD28”和“CTLA-4”的协同刺激分子,认为其实现对淋巴细胞例如T细胞的激活所必需的第二信号(协同刺激信号)的转导,并且实施与所述激活的淋巴细胞例如激活的T细胞的信号相伴的功能调节。该分子已经被指定为AILIM(激活诱导型淋巴细胞免疫调制分子)(在人体,小鼠和大鼠体内:国际免疫学(Int. Immunol.)12卷, No. 1, p. 51-55, 2000),也称作ICOS(可诱导型共同刺激物)(人体内:自然(Nature), 397卷, No. 6716, p. 263-266, 1999)。

另一方面,最近已经鉴定了称为B7h, B7RP-1, GL50或LICOS的新的分子,它们是与该协同刺激传递分子AILIM(ICOS)相互作用的配体(AILIM配体)(自然(Nature), 402卷, No. 6763, p. 827-832, 1999; 天然药物(Nature Medicine), 5卷, No. 12, p. 1365-1369, 1999; 免疫学杂志(J. Immunology), 164卷, p. 1653-1657, 2000; 当今生物学(Curr. Biol.), 10卷, No. 6, p. 333-336, 2000)。

将这两类新的分子,即 AILIM(ICOS)和 B7RP-1(B7h, GL50, LICOS)鉴定为上述淋巴细胞例如 T 细胞的激活以及激活的 T 细胞的功能控制所必需的协同刺激信号的信号转导途径表明,除了已知的第一和第二信号途径,即 CD28 和 CD80(B7-1)/CD86(B7-2)之间的以及 CTLA4 和 CD80(B7-1)/CD86(B7-2)之间的转导途径之外,还存在通过 AILIM(ICOS)和 B7RP-1(B7h, GL50, LICOS)之间相互作用而转导信号的新的第三途径。

有关这些新分子的生物学功能,通过所述分子传导第三协同刺激信号而对淋巴细胞例如 T 细胞的功能控制,以及新的信号转导和疾病之间的关系的研究正在进展之中(免疫学杂志(J. Immunol.), 166(1), 1 页, 2001; 免疫学杂志(J. Immunol.), 165(9), 5035 页, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun., 276(1), 335 页, 2000; 免疫学(Immunity), 13(1), 95 页, 2000; 实验药理学杂志(J. Exp. Med.), 192(1), 53 页, 2000; 欧洲免疫学杂志(Eur. J. Immunol.), 30(4), 1040 页, 2000; WO01/15732)。

发明内容

具体地说,本发明的目的是公开被认为类似于“CD28”和“CTLA-4”的新分子 AILIM,作为传递淋巴细胞例如 T 细胞的激活所必需的第二信号(协同刺激信号)并且通过与该信号一起作用来控制激活的淋巴细胞例如激活的 T 细胞的功能的生物学功能;公开 AILIM 的表达与疾病之间的关系;以及提供根据 AILIM 的表达方式能抑制各种疾病的发展的方法和药物或通过使用所述医药方法(例如单克隆抗体和低分子量化合物等药物)控制 AILIM 的生物功能来治疗所述疾病的方法和药物。

为了实现上述目的,本发明人主动继续研究抗哺乳动物 AILIM(特别是人 AILIM)的人抗体(特别是人单克隆抗体),结果通过用 AILIM(具体地是表达人 AILIM 的细胞的细胞膜级分)对应用基因重组技术制备的转基因小鼠进行免疫以产生人抗体,在世界上第一次成功地制备了结合人 AILIM 的各种单克隆抗体,特别是能调节人 AILIM 介导的信号转导的那些与人 AILIM 结合型单克隆抗体。

因为本发明的抗体(特别是单克隆抗体)是从人体得到的,所以它们根本会在宿主中由于抗人的免疫原性, HAMA(人抗小鼠抗原性)而诱导任何严重

的免疫排斥,所述免疫原性是使用含有从非人哺乳动物例如小鼠得到的抗体的抗体药物进行治疗时的一个大问题(副作用),因此本发明大大提高了抗体作为药物的价值。

因此,本发明的结合哺乳动物 AILIM(特别是人 AILIM)的人抗体(特别是人单克隆抗体)和含有所述人抗体(特别是人单克隆抗体)的药物组合物可用作不诱导宿主中 HAMA 所致免疫排斥而控制各种生理反应的药物,所述生理反应相关于 AILIM 介导协同刺激信号向 AILIM-表达细胞的转导(例如 AILIM-表达细胞的增殖, AILIM-表达细胞的细胞因子产生, AILIM-表达细胞的免疫胞解或凋亡,诱导对 AILIM-表达细胞的抗体-依赖性细胞毒性的活性,等等),和/或所述抗体和组合物可用作抑制和预防各种与所述 AILIM 介导之信号转导相关的疾病的症状发生和/或发展的药物,以及可用作治疗或预防所述疾病的药物。

具体地说,本发明的药物组合物能控制(抑制或刺激)AILIM-表达细胞的增殖或 AILIM-表达细胞产生细胞因子(例如 γ 干扰素或白细胞介素-4等),从而能够抑制各种病理症状和治疗或预防与 AILIM 介导的信号转导相关的生理现象引起的各种疾病。

应用本发明的药物组合物能抑制,预防和/或治疗例如,各种疾病(例如,类风湿性关节炎,多发性硬化,自身免疫性甲状腺炎,过敏性接触性皮炎,慢性炎性皮肤病例如扁平苔藓,系统性红斑狼疮,胰岛素依赖性糖尿病,牛皮癣等等),这些疾病分为自身免疫疾病或过敏性疾病(特别是细胞免疫引起的自身免疫疾病和迟发型过敏反应);关节病(例如类风湿性关节炎(RA)和骨关节炎(OA)),炎症(例如肝炎);移植物抗宿主反应(GVH 反应);移植物抗宿主病(GVHD);伴随组织(例如皮肤,角膜,骨等组织)或器官(肝脏,心脏,肺,肾,胰脏等)移植(同种移植或异种移植)的免疫排斥;外来抗原或自身抗原引发的免疫应答(例如抗所述抗原的抗体的产生,细胞增殖,细胞因子的产生);以及可能由异常肠免疫引起的疾病(具体是炎性肠疾病(特别是结肠(clone)病和溃疡性结肠炎)和食物过敏反应)。

此外,在抑制/治疗上述组织和器官的移植伴随的免疫排斥的领域,通过将本发明的药物组合物与已知在这类移植治疗中用于抑制免疫排斥的药物联合应用,可能会加强已知免疫抑制剂对移植排斥作用的抑制效果。

此外,本发明的药物组合物能够用于治疗或预防任何能用各种啮齿化

合物消炎的炎症。

本发明的药物组合物能够用于炎症疾病，例如各种关节炎伴随的炎症(例如，类风湿性关节炎，骨关节炎)，肺炎，肝炎(包括病毒性肝炎)，传染病伴随的炎症，炎性结肠病，小肠性肠炎，肾炎(肾小球肾炎伴随的炎症，肾纤维化)，胃炎，脉管炎，胰腺炎，腹膜炎，支气管炎，心肌炎，脑炎，局部缺血后再灌注损伤(心肌缺血再灌注损伤)中的炎症，组织和器官移植之后免疫排斥所致炎症，烧伤，各种皮肤炎症(牛皮癣，过敏接触性皮炎，作为慢性炎症皮肤病的扁平苔藓)，多器官衰竭中的炎症，PTCA 或 PTCR 术后炎症，和动脉硬化伴随的炎症，和自身免疫性甲状腺炎。

此外，通过应用是本发明一个方面用于鉴定结合 AILIM 或 AILIM 配体的物质的方法，使得有可能筛选具有通过结合 AILIM 或 AILIM 配体来调节它们的相互作用所介导的信号转导来治疗各种疾病的潜在活性的药物(化学合成化合物或抗体)。

具体地说，本发明是下面(1)至(108)描述的本发明。

- (1) 结合 AILIM 的人抗体。
- (2) (1)的人抗体，其中所述 AILIM 从人体得到。
- (3) 结合 AILIM 或其一部分的人单克隆抗体。
- (4) (3)的人单克隆抗体或其一部分，其中所述 AILIM 从人体得到。
- (5) (3)或(4)的人单克隆抗体或其一部分，其中所述人单克隆抗体具有抑制通过 AILIM 介导的信号转导到细胞中的活性。
- (6) (5)的人单克隆抗体或其一部分，其中所述抑制信号转导的活性是下面的(a)或(b):
 - (a) 抑制 AILIM-表达细胞增殖的活性，或
 - (b) 抑制细胞因子从 AILIM-表达细胞产生的活性。
- (7)(6)的人单克隆抗体或其一部分，其中所述细胞因子是 Th1-型或 Th2-型 T 细胞产生的细胞因子之一。
- (8)(7)的人单克隆抗体或其一部分，其中所述细胞因子是 γ 干扰素或白细胞介素-4。
- (9) (5)的人单克隆抗体或其一部分，其中所述人单克隆抗体具有阻止混合淋巴细胞反应的活性。
- (10) (3)或(4)的人单克隆抗体或其一部分，其中所述人单克隆抗体具有

诱导通过 AILIM 介导的信号转导到细胞中的活性。

(11) (10)的人单克隆抗体或其一部分,其中所述诱导信号转导的活性是下面的(a)或(b):

(a) 诱导 AILIM-表达细胞增殖的活性,或

(b) 诱导细胞因子从 AILIM-表达细胞产生的活性。

(12)(11)的人单克隆抗体或其一部分,其中所述细胞因子是 Th1-型或 Th2-型 T 细胞产生的细胞因子之一。

(13)(12)的人单克隆抗体或其一部分,其中所述细胞因子是 γ 干扰素或白细胞介素-4。

(14) (3)或(4)的人单克隆抗体或其一部分,其中所述人单克隆抗体具有诱导对 AILIM-表达细胞的抗体-依赖性细胞毒活性,和/或 AILIM-表达细胞的免疫胞解或凋亡的活性。

(15) (3)或(4)的人单克隆抗体或其一部分,其中所述单克隆抗体和 AILIM 之间的结合速度常数(k_a)是 1.0×10^3 (1/M. 秒)或更大。

(16) (15)的人单克隆抗体或其一部分,其中所述结合速度常数(k_a)是 1.0×10^4 (1/M. 秒)或更大。

(17) (16)的人单克隆抗体或其一部分,其中所述结合速度常数(k_a)是 1.0×10^5 (1/M. 秒)或更大。

(18) (3)或(4)的人单克隆抗体或其一部分,其中所述单克隆抗体和 AILIM 之间的解离速度常数(k_d)是 1.0×10^{-3} (1/秒)或更小。

(19) (18)的人单克隆抗体或其一部分,其中所述解离速度常数(k_d)是 1.0×10^{-4} (1/秒)或更小。

(20) (19)的人单克隆抗体或其一部分,其中所述解离速度常数(k_d)是 1.0×10^{-5} (1/秒)或更小。

(21) (3)或(4)的人单克隆抗体或其一部分,其中所述单克隆抗体和 AILIM 之间的解离常数(K_d)是 1.0×10^{-6} (M)或更小。

(22) (21)的人单克隆抗体或其一部分,其中所述解离常数(K_d)是 1.0×10^{-7} (M)或更小。

(23) (22)的人单克隆抗体或其一部分,其中所述解离常数(K_d)是 1.0×10^{-8} (M)或更小。

(24) (23)的人单克隆抗体或其一部分,其中所述解离常数(K_d)是 1.0×10^{-9} (M)或更小。

$0 \times 10^{-9}(\text{M})$ 或更小。

(25)(4)的人单克隆抗体或其一部分，其中编码所述人单克隆抗体的重链可变区的V区DNA是从人免疫球蛋白重链V基因片段1-02或3-13衍生的。

(26)(4)的人单克隆抗体或其一部分，其中编码所述人单克隆抗体的轻链可变区的V区DNA是从人免疫球蛋白轻链V基因片段L5或A27衍生的。

(27)(25)或(26)的人单克隆抗体或其一部分，其中编码所述人单克隆抗体的重链可变区的V区DNA是从人免疫球蛋白重链V基因片段1-02或3-13衍生的，并且其中编码所述人单克隆抗体的轻链可变区的V区DNA是从人免疫球蛋白轻链V基因片段L5或A27衍生的。

(28)(27)的人单克隆抗体或其一部分，其中编码所述人单克隆抗体的重链可变区的V区DNA是从人免疫球蛋白重链V基因片段1-02衍生的，并且其中编码所述人单克隆抗体的轻链可变区的V区DNA是从人免疫球蛋白轻链V基因片段L5衍生的。

(29)(27)的人单克隆抗体或其一部分，其中编码所述人单克隆抗体的重链可变区的V区DNA是从人免疫球蛋白重链V基因片段3-13衍生的，并且其中编码所述人单克隆抗体的轻链可变区的V区DNA是从人免疫球蛋白轻链V基因片段A27衍生的。

(30)(4)的人单克隆抗体或其一部分，其中所述人单克隆抗体的重链可变区具有下面(a)至(f)任一项中定义的氨基酸序列：

(a) 包括 SEQ ID NO:28 的 20-117 位氨基酸的氨基酸序列，

(b) 包括其中一个或多个氨基酸残基被缺失或取代的或向其中插入或添加一个或多个氨基酸残基的 SEQ ID NO:28 的 20-117 位氨基酸的氨基酸序列，

(c) 包括 SEQ ID NO:32 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列，

(d) 包括其中一个或多个氨基酸残基被缺失或取代的或向其中插入或添加一个或多个氨基酸残基的 SEQ ID NO:32 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列，

(e) 包括 SEQ ID NO:36 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列，

(f) 包括其中一个或多个氨基酸残基被缺失或取代的或向其中插入或添加一个或多个氨基酸残基的 SEQ ID NO:36 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序

列。

(31) (4)的人单克隆抗体或其一部分，其中所述人单克隆抗体的重链多肽具有下面(a)至(f)任一项中定义的氨基酸序列：

(a) 包括 SEQ ID NO:28 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列，

(b) 包括其中一个或多个氨基酸残基被缺失或取代的或向其中插入或添加一个或多个氨基酸残基的 SEQ ID NO:28 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列，

(c) 包括 SEQ ID NO:32 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列，

(d) 包括其中一个或多个氨基酸残基被缺失或取代的或向其中插入或添加一个或多个氨基酸残基的 SEQ ID NO:32 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列，

(e) 包括 SEQ ID NO:36 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列，

(f) 包括其中一个或多个氨基酸残基被缺失或取代的或向其中插入或添加一个或多个氨基酸残基的 SEQ ID NO:36 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列。

(32) (4)的人单克隆抗体或其一部分，其中所述人单克隆抗体的轻链可变区具有下面(a)至(f)任一项中定义的氨基酸序列：

(a) 包括 SEQ ID NO:30 的 23-116 位氨基酸的氨基酸序列，

(b) 包括其中一个或多个氨基酸残基被缺失或取代的或向其中插入或添加一个或多个氨基酸残基的 SEQ ID NO:30 的 23-116 位氨基酸的氨基酸序列，

(c) 包括 SEQ ID NO:34 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列，

(d) 包括其中一个或多个氨基酸残基被缺失或取代的或向其中插入或添加一个或多个氨基酸残基的 SEQ ID NO:34 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列，

(e) 包括 SEQ ID NO:38 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列，

(f) 包括其中一个或多个氨基酸残基被缺失或取代的或向其中插入或添加一个或多个氨基酸残基的 SEQ ID NO:38 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列。

(33) (4)的人单克隆抗体或其一部分，其中所述人单克隆抗体的轻链多肽具有下面(a)至(f)任一项中定义的氨基酸序列：

- (a) 包括 SEQ ID NO:30 的 23-236 位氨基酸的氨基酸序列,
- (b) 包括其中一个或多个氨基酸残基被缺失或取代的或向其中插入或添加一个或多个氨基酸残基的 SEQ ID NO:30 的 23-236 位氨基酸的氨基酸序列,
- (c) 包括 SEQ ID NO:34 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列,
- (d) 包括其中一个或多个氨基酸残基被缺失或取代的或向其中插入或添加一个或多个氨基酸残基的 SEQ ID NO:34 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列,
- (e) 包括 SEQ ID NO:38 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列, 或
- (f) 包括其中一个或多个氨基酸残基被缺失或取代的或向其中插入或添加一个或多个氨基酸残基的 SEQ ID NO:38 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列。

(34) (4)的人单克隆抗体或其一部分, 其中所述人单克隆抗体具有下面的特征(a)和(b):

- (a) 重链可变区具有包括 SEQ ID NO:28 的 20-117 位氨基酸的氨基酸序列的氨基酸序列, 和
- (b) 轻链可变区具有包括 SEQ ID NO:30 的 23-116 位氨基酸的氨基酸序列的氨基酸序列。

(35) (4)的人单克隆抗体或其一部分, 其中所述人单克隆抗体具有下面的特征(a)和(b):

- (a) 重链多肽具有 SEQ ID NO:28 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列的氨基酸序列, 和
- (b) 轻链多肽具有 SEQ ID NO:30 的 23-236 位氨基酸的氨基酸序列的氨基酸序列。

(36) (4)的人单克隆抗体或其一部分, 其中所述人单克隆抗体具有下面的特征(a)和(b):

- (a)重链可变区具有包括 SEQ ID NO:32 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列的氨基酸序列, 和
- (b)轻链可变区具有包括 SEQ ID NO:34 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列的氨基酸序列。

(37) (4)的人单克隆抗体或其一部分, 其中所述人单克隆抗体具有下面

的特征(a)和(b):

(a)重链多肽具有包括 SEQ ID NO:32 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列的氨基酸序列, 和

(b)轻链多肽具有包括 SEQ ID NO:34 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列的氨基酸序列。

(38) (4)的人单克隆抗体或其一部分, 其中所述人单克隆抗体具有下面的特征(a)和(b):

(a)重链可变区具有包括 SEQ ID NO:36 的 20-116 位氨基酸的氨基酸序列的氨基酸序列, 和

(b)轻链可变区具有包括 SEQ ID NO:38 的 21-116 位氨基酸的氨基酸序列的氨基酸序列。

(39) (4)的人单克隆抗体或其一部分, 其中所述人单克隆抗体具有下面的特征(a)和(b):

(a)重链多肽具有包括 SEQ ID NO:36 的 20-470 位氨基酸的氨基酸序列的氨基酸序列, 和

(b)轻链多肽具有包括 SEQ ID NO:38 的 21-236 位氨基酸的氨基酸序列的氨基酸序列。

(40) (3)-(29)任一项的人单克隆抗体或其一部分, 其中所述人单克隆抗体是从能产生人抗体的转基因非人哺乳动物产生的单克隆抗体。

(41) (40)的人单克隆抗体或其一部分, 其中所述人单克隆抗体是通过用 AILIM-表达细胞, 从所述细胞衍生的膜级分, 构成 AILIM 的完整分子或其一部分, 或编码 AILIM 或其一部分的基因对能够产生人抗体的转基因非人哺乳动物进行免疫而获得的。

(42) (40)或(41)的人单克隆抗体或其一部分, 其中所述转基因非人哺乳动物是转基因小鼠。

(43)编码选自下面(a)-(f)的多肽的 DNA 或其一部分:

(a) 包括 SEQ ID NO:28 的氨基酸 20-117 的氨基酸序列的多肽,

(b) 包括 SEQ ID NO:30 的氨基酸 23-116 的氨基酸序列的多肽,

(c) 包括 SEQ ID NO:32 的氨基酸 20-116 的氨基酸序列的多肽,

(d) 包括 SEQ ID NO:34 的氨基酸 21-116 的氨基酸序列的多肽,

(e) 包括 SEQ ID NO:36 的氨基酸 20-116 的氨基酸序列的多肽,

- (f) 包括 SEQ ID NO:38 的氨基酸 21-116 的氨基酸序列的多肽。
- (44) 编码选自下面(a)-(f)的多肽的 DNA 或其一部分:
- (a) 包括 SEQ ID NO:28 的氨基酸 20-470 的氨基酸序列的多肽,
- (b) 包括 SEQ ID NO:30 的氨基酸 23-236 的氨基酸序列的多肽,
- (c) 包括 SEQ ID NO:32 的氨基酸 20-470 的氨基酸序列的多肽,
- (d) 包括 SEQ ID NO:34 的氨基酸 21-236 的氨基酸序列的多肽,
- (e) 包括 SEQ ID NO:36 的氨基酸 20-470 的氨基酸序列的多肽,
- (f) 包括 SEQ ID NO:38 的氨基酸 21-236 的氨基酸序列的多肽。
- (45)选自下面(a)-(f)的 DNA 或其一部分:
- (a) 包括 SEQ ID NO:27 的核苷酸 126-419 的核苷酸序列的 DNA,
- (b) 包括 SEQ ID NO:29 的核苷酸 105-386 的核苷酸序列的 DNA,
- (c) 包括 SEQ ID NO:31 的核苷酸 151-441 的核苷酸序列的 DNA,
- (d) 包括 SEQ ID NO:33 的核苷酸 88-375 的核苷酸序列的 DNA,
- (e) 包括 SEQ ID NO:35 的核苷酸 153-443 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (f) 包括 SEQ ID NO:37 的核苷酸 93-380 的核苷酸序列的 DNA。
- (46) 选自下面(a)-(f)的 DNA 或其一部分:
- (a) 包括 SEQ ID NO:27 的核苷酸 69-1481 的核苷酸序列的 DNA,
- (b) 包括 SEQ ID NO:29 的核苷酸 39-749 的核苷酸序列的 DNA,
- (c) 包括 SEQ ID NO:31 的核苷酸 94-1506 的核苷酸序列的 DNA,
- (d) 包括 SEQ ID NO:33 的核苷酸 28-738 的核苷酸序列的 DNA,
- (e) 包括 SEQ ID NO:35 的核苷酸 96-1508 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (f) 包括 SEQ ID NO:37 的核苷酸 33-743 的核苷酸序列的 DNA。
- (47)包含(43)-(46) 任一项的 DNA 的载体。
- (48)包含下面(a)-(c)任一项的 DNA 的(47)的载体:
- (a) 包括 SEQ ID NO:27 的核苷酸 126-419 的核苷酸序列的 DNA,
- (b) 包括 SEQ ID NO:31 的核苷酸 151-441 的核苷酸序列的 DNA, 或
- (c) 包括 SEQ ID NO:35 的核苷酸 153-443 的核苷酸序列的 DNA。
- (49)包含下面(a)-(c)任一项的 DNA 的(47)的载体:
- (a) 包括 SEQ ID NO:27 的核苷酸 69-1481 的核苷酸序列的 DNA,
- (b) 包括 SEQ ID NO:31 的核苷酸 94-1506 的核苷酸序列的 DNA, 或
- (c) 包括 SEQ ID NO:35 的核苷酸 96-1508 的核苷酸序列的 DNA。

(50)包含下面(a)-(c)任一项的 DNA 的(47)的载体:

- (a) 包括 SEQ ID NO:29 的核苷酸 105-386 的核苷酸序列的 DNA,
- (b) 包括 SEQ ID NO:33 的核苷酸 88-375 的核苷酸序列的 DNA, 或
- (c) 包括 SEQ ID NO:37 的核苷酸 93-380 的核苷酸序列的 DNA。

(51)包含下面(a)-(c)任一项的 DNA 的(47)的载体:

- (a) 包括 SEQ ID NO:29 的核苷酸 39-749 的核苷酸序列的 DNA,
- (b) 包括 SEQ ID NO:33 的核苷酸 28-738 的核苷酸序列的 DNA, 或
- (c) 包括 SEQ ID NO:37 的核苷酸 33-743 的核苷酸序列的 DNA。

(52)包含下面(a)和(b)的 DNA 的(47)的载体:

- (a) 包括 SEQ ID NO:27 的核苷酸 126-419 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:29 的核苷酸 105-386 的核苷酸序列的 DNA。

(53)包含下面(a)和(b)的 DNA 的(47)的载体:

- (a) 包括 SEQ ID NO:27 的核苷酸 69-1481 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:29 的核苷酸 39-749 的核苷酸序列的 DNA。

(54)包含下面(a)和(b)的 DNA 的(47)的载体:

- (a) 包括 SEQ ID NO:31 的核苷酸 151-441 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:33 的核苷酸 88-357 的核苷酸序列的 DNA。

(55)包含下面(a)和(b)的 DNA 的(47)的载体:

- (a) 包括 SEQ ID NO:31 的核苷酸 94-1506 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:33 的核苷酸 28-738 的核苷酸序列的 DNA。

(56)包含下面(a)和(b)的 DNA 的(47)的载体:

- (a) 包括 SEQ ID NO:35 的核苷酸 153-443 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:37 的核苷酸 93-380 的核苷酸序列的 DNA。

(57)包含下面(a)和(b)的 DNA 的(47)的载体:

- (a) 包括 SEQ ID NO:35 的核苷酸 96-1508 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:37 的核苷酸 33-743 的核苷酸序列的 DNA。

(58)产生(3)-(42)任一项的人单克隆抗体的细胞。

(59)(58)的细胞, 其中所述细胞是通过融合来自能产生所述人单克隆抗体的哺乳动物的 B 细胞和来自哺乳动物的骨髓瘤细胞而获得的融合细胞。

(60)通过转移下面(a)中描述的 DNA 或包含所述 DNA 的载体, 下面(b)中描述的 DNA 或包含所述 DNA 的载体, 或下面(a)和(b)中描述的两个 DNA

或包含所述两个 DNA 的载体而转化的基因重组宿主:

- (a) 编码结合人 AILIM 的单克隆抗体的重链多肽或其一部分的 DNA;
- 或
- (b) 编码结合人 AILIM 的单克隆抗体的轻链多肽或其一部分的 DNA。
- (61)(60)的基因重组宿主, 其中所述单克隆抗体是人单克隆抗体。
- (62)(60)或(61)的基因重组宿主, 其中所述宿主是哺乳动物细胞。
- (63)(60)或(61)的基因重组宿主, 其中所述宿主是哺乳动物受精卵。
- (64)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中所述重链多肽选自下面(a)-(c)的重链多肽之一:

- (a) 包括 SEQ ID NO:28 的氨基酸 20-117 的氨基酸序列的重链多肽,
 - (b) 包括 SEQ ID NO:32 的氨基酸 20-116 的氨基酸序列的重链多肽, 和
 - (c) 包括 SEQ ID NO:36 的氨基酸 20-116 的氨基酸序列的重链多肽。
- (65)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中所述重链多肽选自下面(a)-(c)的重链多肽之一:

- (a) 包括 SEQ ID NO:28 的氨基酸 20-470 的氨基酸序列的重链多肽,
 - (b) 包括 SEQ ID NO:32 的氨基酸 20-470 的氨基酸序列的重链多肽, 和
 - (c) 包括 SEQ ID NO:36 的氨基酸 20-470 的氨基酸序列的重链多肽。
- (66)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中所述轻链多肽选自下面(a)-(c)的轻链多肽之一:

- (a) 包括 SEQ ID NO:30 的氨基酸 23-116 的氨基酸序列的轻链多肽,
 - (b) 包括 SEQ ID NO:34 的氨基酸 21-116 的氨基酸序列的轻链多肽, 和
 - (c) 包括 SEQ ID NO:38 的氨基酸 21-116 的氨基酸序列的轻链多肽。
- (67)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中所述轻链多肽选自下面(a)-(c)的轻链多肽之一:

- (a) 包括 SEQ ID NO:30 的氨基酸 23-236 的氨基酸序列的轻链多肽,
 - (b) 包括 SEQ ID NO:34 的氨基酸 21-236 的氨基酸序列的轻链多肽, 和
 - (c) 包括 SEQ ID NO:38 的氨基酸 21-236 的氨基酸序列的轻链多肽。
- (68)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中所述重链和轻链多肽分别是下面(a)和(b)中定义的那些:

- (a) 包括 SEQ ID NO:28 的氨基酸 20-117 的氨基酸序列的重链多肽, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:30 的氨基酸 23-116 的氨基酸序列的轻链多肽。

(69)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中所述重链和轻链多肽分别是下面(a)和(b)中定义的那些:

- (a) 包括 SEQ ID NO:28 的氨基酸 20-470 的氨基酸序列的重链多肽, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:30 的氨基酸 23-236 的氨基酸序列的轻链多肽。

(70)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中所述重链和轻链多肽分别是下面(a)和(b)中定义的那些:

- (a) 包括 SEQ ID NO:32 的氨基酸 20-116 的氨基酸序列的重链多肽, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:34 的氨基酸 21-116 的氨基酸序列的轻链多肽。

(71)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中所述重链和轻链多肽分别是下面(a)和(b)中定义的那些:

- (a) 包括 SEQ ID NO:32 的氨基酸 20-470 的氨基酸序列的重链多肽, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:34 的氨基酸 21-236 的氨基酸序列的轻链多肽。

(72)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中所述重链和轻链多肽分别是下面(a)和(b)中定义的那些:

- (a) 包括 SEQ ID NO:36 的氨基酸 20-116 的氨基酸序列的重链多肽, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:38 的氨基酸 21-116 的氨基酸序列的轻链多肽。

(73)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中所述重链和轻链多肽分别是下面(a)和(b)中定义的那些:

- (a) 包括 SEQ ID NO:36 的氨基酸 20-470 的氨基酸序列的重链多肽, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:38 的氨基酸 21-236 的氨基酸序列的轻链多肽。

(74)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中编码所述重链多肽的 DNA 是下面(a)-(c)任一项中定义的 DNA:

- (a) 包括 SEQ ID NO:27 的核苷酸 126-419 的核苷酸序列的 DNA,
- (b) 包括 SEQ ID NO:31 的核苷酸 151-441 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (c) 包括 SEQ ID NO:35 的核苷酸 153-443 的核苷酸序列的 DNA。

(75)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中编码所述重链多肽的 DNA 是下面(a)-(c)任一项中定义的 DNA:

- (a) 包括 SEQ ID NO:27 的核苷酸 69-1481 的核苷酸序列的 DNA,
- (b) 包括 SEQ ID NO:31 的核苷酸 94-1506 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (c) 包括 SEQ ID NO:35 的核苷酸 96-1508 的核苷酸序列的 DNA。

(76)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中编码所述轻链多肽的 DNA

是下面(a)-(c)任一项中定义的 DNA:

- (a) 包括 SEQ ID NO:29 的核苷酸 105-386 的核苷酸序列的 DNA,
- (b) 包括 SEQ ID NO:33 的核苷酸 88-375 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (c) 包括 SEQ ID NO:37 的核苷酸 93-380 的核苷酸序列的 DNA。

(77)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中编码所述轻链多肽的 DNA 是下面(a)-(c)任一项中定义的 DNA:

- (a) 包括 SEQ ID NO:29 的核苷酸 39-749 的核苷酸序列的 DNA,
- (b) 包括 SEQ ID NO:33 的核苷酸 28-738 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (c) 包括 SEQ ID NO:37 的核苷酸 33-743 的核苷酸序列的 DNA。

(78)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中编码所述重链多肽的 DNA 是下面(a)中描述的 DNA, 编码所述轻链多肽的 DNA 是下面(b)中描述的 DNA:

- (a) 包括 SEQ ID NO:27 的核苷酸 126-419 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:29 的核苷酸 105-386 的核苷酸序列的 DNA。

(79)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中编码所述重链多肽的 DNA 是下面(a)中描述的 DNA, 编码所述轻链多肽的 DNA 是下面(b)中描述的 DNA:

- (a) 包括 SEQ ID NO:27 的核苷酸 69-1481 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:29 的核苷酸 39-749 的核苷酸序列的 DNA。

(80)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中编码所述重链多肽的 DNA 是下面(a)中描述的 DNA, 编码所述轻链多肽的 DNA 是下面(b)中描述的 DNA:

- (a) 包括 SEQ ID NO:31 的核苷酸 151-441 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:33 的核苷酸 88-375 的核苷酸序列的 DNA。

(81)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中编码所述重链多肽的 DNA 是下面(a)中描述的 DNA, 编码所述轻链多肽的 DNA 是下面(b)中描述的 DNA:

- (a) 包括 SEQ ID NO:31 的核苷酸 94-1506 的核苷酸序列的 DNA, 和
- (b) 包括 SEQ ID NO:33 的核苷酸 28-738 的核苷酸序列的 DNA。

(82)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中编码所述重链多肽的 DNA 是下面(a)中描述的 DNA, 编码所述轻链多肽的 DNA 是下面(b)中描述的

DNA:

(a) 包括 SEQ ID NO:35 的核苷酸 153-443 的核苷酸序列的 DNA, 和

(b) 包括 SEQ ID NO:37 的核苷酸 93-380 的核苷酸序列的 DNA。

(83)(60)-(63)任一项的基因重组宿主, 其中编码所述重链多肽的 DNA 是下面(a)中描述的 DNA, 编码所述轻链多肽的 DNA 是下面(b)中描述的 DNA:

(a) 包括 SEQ ID NO:35 的核苷酸 96-1508 的核苷酸序列的 DNA, 和

(b) 包括 SEQ ID NO:37 的核苷酸 33-743 的核苷酸序列的 DNA。

(84)(60)-(62)任一项, 或(64)-(83)任一项的基因重组宿主(前提是排除所述宿主是受精卵的情况)产生的人单克隆抗体或其一部分。

(85)含有(1)或(2)的人抗体和可药用载体的药物组合物。

(86)含有(3)-(42)任一项的人单克隆抗体或其一部分和可药用载体的药物组合物。

(87)含有(84)的人单克隆抗体或其一部分和可药用载体的药物组合物。

(88)(85)-(87)任一项的药物组合物, 其中所述药物组合物用来抑制 AILIM 介导的转导到细胞中的信号转导。

(89)(85)-(87)任一项的药物组合物, 其中所述药物组合物用来预防 AILIM-表达细胞的增殖。

(90)(85)-(87)任一项的药物组合物, 其中所述药物组合物用来预防 AILIM-表达细胞产生细胞因子。

(91)(85)-(87)任一项的药物组合物, 其中所述药物组合物用来诱导 AILIM 介导的转导到细胞中的信号转导。

(92)(85)-(87)任一项的药物组合物, 其中所述药物组合物用来诱导 AILIM-表达细胞的增殖。

(93)(85)-(87)任一项的药物组合物, 其中所述药物组合物用来诱导 AILIM-表达细胞产生细胞因子。

(94)(85)-(87)任一项的药物组合物, 其中所述药物组合物用来诱导针对 AILIM-表达细胞的抗体-依赖性细胞毒活性, 和/或针对 AILIM-表达细胞的免疫胞解或凋亡。

(95)用来阻止, 治疗或预防迟发型过敏的药物组合物, 含有在调节 AILIM 介导的信号转导中有活性的物质, 和可药用载体。

(96)(95)的药物组合物, 其中所述物质是一种蛋白物质。

(97)(96)的药物组合物, 其中所述蛋白物质选自下面的物质:

- (a) 结合 AILIM 的抗体或其一部分;
- (b) 包括 AILIM 胞外区的全部或部分的多肽;
- (c) 包括 AILIM 胞外区的全部或部分, 以及免疫球蛋白重链恒定区的全部或部分的融合多肽; 和
- (d) 结合 AILIM 的多肽。

(98)(97)的药物组合物, 其中所述结合 AILIM 的抗体是(1)或(2)的人抗体。

(99) (97)的药物组合物, 其中所述结合 AILIM 的抗体是(3)-(42)任一项的人单克隆抗体。

(100) (97)的药物组合物, 其中所述抗 AILIM 的抗体是(84)的人单克隆抗体。

(101) (95)的药物组合物, 其中所述物质是非蛋白物质。

(102) (101)的药物组合物, 其中所述非蛋白物质是 DNA, RNA, 或一种化学合成的化合物。

(103)一种鉴定结合 AILIM 或 AILIM 配体的物质的方法, 包括下面的步骤:

- (a) 制备不溶性载体, AILIM 的全部胞外区或其一部分都固定在上面;
- (b) 制备包括用发出可检测信号的标记材料标记的 AILIM 配体的全部胞外区或其一部分的多肽;
- (c) 使步骤(a)中的不溶性载体与步骤(b)中的多肽反应;
- (d) 使步骤(a)的不溶性载体, 步骤(b)的多肽, 以及所述物质以任何顺序相互反应;
- (e) 分别检测步骤(c)中制备的复合体中包含的所述标记材料发出的信号, 和步骤(d)中制备的复合体中包含的所述标记材料发出的信号; 和
- (f) 比较步骤(e)中检测到的各个信号的大小。

(104)一种鉴定结合 AILIM 或 AILIM 配体的物质的方法, 包括下面的步骤:

- (a) 制备不溶性载体, AILIM 的全部胞外区或其一部分都固定在上面;
- (b) 制备包括用发出可检测信号的标记材料标记的 AILIM 的全部胞外

区或其一部分的多肽;

(c) 使步骤(a)中的不溶性载体与步骤(b)中的多肽反应;

(d) 使步骤(a)的不溶性载体, 步骤(b)的多肽, 以及所述物质以任何顺序相互反应;

(e) 分别检测步骤(c)中制备的复合体中包含的所述标记材料发出的信号, 和步骤(d)中制备的复合体中包含的所述标记材料发出的信号; 和

(f) 比较步骤(e)中检测到的各个信号的大小。

(105)(103)或(104)的方法, 其中所述包括 AILIM 的全部胞外区或其一部分的多肽是一种包括 AILIM 的全部胞外区或其一部分, 和免疫球蛋白重链的全部恒定区或其一部分的融合多肽。

(106)(103)或(104)的方法, 其中所述包括 AILIM 配体的全部胞外区或其一部分的多肽是一种包括 AILIM 配体的全部胞外区或其一部分, 和免疫球蛋白重链的全部恒定区或其一部分的融合多肽。

(107)(103)-(106)任一项的方法, 其中所述 AILIM 是人 AILIM。

(108) (103)-(107)任一项的方法, 其中所述 AILIM 配体是人 AILIM 配体。

下面通过定义本发明的术语详细描述本发明。

本文中“哺乳动物”指人, 牛, 山羊, 兔, 小鼠, 大鼠, 仓鼠和豚鼠; 优选指人, 兔, 大鼠, 仓鼠或小鼠并且特别优选指人, 大鼠, 仓鼠或小鼠。

这里使用的术语“除人以外的哺乳动物”和“非人哺乳动物”彼此是同义词, 指上文定义的人之外的所有哺乳动物。

这里使用的术语“氨基酸”指自然界存在的每一种氨基酸, 优选根据下面给出的三字母缩写或单字母缩写描述的那些氨基酸:

甘氨酸(Gly/G), 丙氨酸(Ala/A), 缬氨酸(Val/V), 亮氨酸(Leu/L), 异亮氨酸(Ile/L), 丝氨酸(Ser/S), 苏氨酸(Thr/T), 天冬氨酸(Asp/D), 谷氨酸(Glu/E), 天冬酰胺(Asn/N), 谷氨酰胺(Gln/Q), 赖氨酸(Lys/K), 精氨酸(Arg/R), 半胱氨酸(Cys/C), 蛋氨酸(Met/M), 苯丙氨酸(Phe/F), 酪氨酸(Tyr/Y), 色氨酸(Trp/W), 组氨酸(His/H), 脯氨酸(Pro/P)。

这里使用的术语“AILIM”是激活诱导型淋巴细胞免疫调制分子的缩写, 指具有先前报告中已经描述的结构和功能的哺乳动物细胞表面分子, 更优选地, 特别是来自人的 AILIM(例如, 国际免疫学(International Immunology), 12 卷, No. 1, p. 51-55; 基因库登记号:BAA82129(人),

BAA82128(大鼠), BAA82127(大鼠变种), 和 BAA82126(小鼠))。

或, 此 AILIM 也被称为 ICOS(待审公开的日本专利申请(JP-A) 平 11-29599, 国际专利申请 WO98/38216), 这些缩写指相同的分子。

这里使用的“AILIM 配体”指与所述协同刺激分子 AILIM (ICOS)相互作用, 并被称为 B7h, B7RP-1, GL50 或 LICOS 的细胞表面分子(自然(Nature), 402 卷, No. 6763, p. 827-832, 1999; 天然药物(Nature Medicine), 5 卷, No. 12, p. 1365-1369, 1999; 免疫学杂志(J. Immunology), 164 卷, p. 1653-1657, 2000; 当今生物学(Curr. Biol.), 10 卷, No. 6, p. 333-336, 2000)。

此外, 这里使用的“AILIM”也包括与参考文献中描述的各种哺乳动物的 AILIM, 特别优选人 AILIM, 具有基本上相同的氨基酸序列的多肽。此外, 与已经报道过的大鼠 AILIM 变体(基因库登记号 BAA82127)相似的人 AILIM 变体也包括在本发明的“AILIM”之内。

这里使用的“AILIM 配体”也具有上述相似意义。

这里 “具有基本上相同的氨基酸序列的多肽”指下文所述变体多肽。

即, 只要这些变体多肽具有基本上等价于天然型 AILIM(特别优选来自人的 AILIM)的生物学性质, 则它们就是本发明的多肽。如具有天然型 AILIM 的氨基酸序列, 且其中多个氨基酸残基, 优选 1-10 个氨基酸残基, 最优选 1-5 个氨基酸残基被缺失和/或修饰, 或已向其中添加多个氨基酸残基, 优选 1-10 个氨基酸残基, 最优选 1-5 个氨基酸残基的那些变体。

此外, 它们可以是分子中具有所述多个氨基酸取代, 缺失, 修饰和添加的变体多肽。

本发明中的“AILIM 配体”也具有上述相似意义。

除了基因重组技术之外, 通过适当地使用本技术领域公知的方法例如化学合成方法, 细胞培养方法等, 或这些的改进方法, 能够制备本发明中的 AILIM(特别是人 AILIM)和 AILIM 配体(特别是人 AILIM 配体)。

根据常规方法(实验药物:增刊, “遗传工程手册”(1992); 等等)实现氨基酸的这些取代, 缺失, 或插入。

用来制备上述突变多肽的方法的例子是合成寡核苷酸定点诱变(缺口双链法), 用亚硝酸盐或亚硫酸盐处理随机导入点突变的点诱变法, 利用 Bal31 酶等制备缺失突变体的方法, 盒式诱变, 接头分区方法, 错掺方法, 错配引物方法, DNA 片段合成方法等等。

例如可以如下进行合成寡核苷酸定点诱变(缺口双链方法)。将要诱变的区克隆到具有琥珀突变的 M13 噬菌体载体中来制备单链噬菌体 DNA。通过限制酶处理将没有琥珀突变的 M13 载体的 RF DNA 线性化之后,将 DNA 与上述单链噬菌体 DNA 混合,变性,退火,从而形成“缺口双链 DNA”。其中导入了突变的合成寡核苷酸与该缺口双链 DNA 杂交,并且通过 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶进行的反应制备闭合环双链 DNA。用该 DNA 转染错配修复活性有缺陷的大肠杆菌 mutS 细胞。用成熟噬菌体感染没有抑制活性的大肠杆菌细胞,只筛选出没有琥珀突变的噬菌体。

用亚硝酸盐导入点突变的方法应用例如下文所述原理。如果用亚硝酸盐处理 DNA,碱基经脱氨基作用将腺嘌呤变为次黄嘌呤,胞嘧啶变为尿嘧啶,鸟嘌呤变为黄嘌呤。如果将脱氨基化 DNA 导入细胞,则“A: T”和“G: C”分别被“G: C”和“A: T”置换,因为在 DNA 复制中,次黄嘌呤,尿嘧啶和黄嘌呤分别与胞嘧啶,腺嘌呤和胸腺嘧啶形成碱基对。实际上,用亚硝酸盐处理过的单链 DNA 片段与“缺口双链 DNA”杂交,然后通过与合成寡核苷酸定点诱变(缺口双链方法)相同的方法操作来分离突变株。

另外,“AILIM”在这里也包括所述 AILIM 的“一部分”。这里,“一部分”指包括上面定义的 AILIM 氨基酸序列的任何部分序列的多肽。

优选地,所述部分指上面定义的 AILIM(特别优选人 AILIM)的胞外区或其任何部分。

本发明中的“AILIM 配体”也具有上述相似意义。

所述 AILIM 的“部分”(优选 AILIM 的胞外区或其任何部分)可根据下述本领域公知方法或其改良法,经基因重组技术或化学合成,或使用蛋白水解酶适当裂解从细胞培养分离的 AILIM(特别优选人 AILIM)等等而制备。

通过上述相似方法也可以制备“AILIM 配体的部分”。

本发明的“人抗体”是结合上面定义的 AILIM 或其一部分(特别优选来自人的 AILIM 或其一部分)的人抗体。具体地说,它指来自人的多克隆抗体(人多克隆抗体,人抗血清)或来自人的单克隆抗体(人单克隆抗体)。

本发明的“人单克隆抗体”是结合上面定义的 AILIM 或其一部分(特别优选来自人的 AILIM 或其一部分)的人单克隆抗体。

更具体地说,包括重链(H-链)的可变区和恒定区,和轻链(L-链)的可变

区和恒定区的所有区都由编码所述人免疫球蛋白的基因衍生的人免疫球蛋白组成。L-链举例来说是人κ链或人λ链。

本发明的结合 AILIM(特别优选来自人的 AILIM)或其一部分的人单克隆抗体是具有上述(5)-(42)或(84)任一项中定义的特征的人单克隆抗体。

更具体地说,包括具有实施例和附图中描述的各种特征和工业实用性的各种人单克隆抗体。

本发明的人单克隆抗体的优选实施方案是上述(5)-(42)或(84)任一项中定义的结合 AILIM 或其一部分的人单克隆抗体。

最优选的实施方案是上述(30)或(39)中描述的结合人 AILIM 的人单克隆抗体。

通过用下述任何免疫原(抗原)免疫下面的产生人抗体的转基因非人哺乳动物能够制备本发明的“人单克隆抗体”。

(a) 在细胞表面表达上述 AILIM(特别优选来自人的 AILIM)的天然细胞或人工建立的细胞系;

(b) 利用基因重组技术制备的使之在细胞表面表达上面定义的 AILIM(特别优选来自人的 AILIM)的基因重组细胞;

(c) 通过将上述(a)或(b)中的细胞溶解而获得的细胞溶胞产物,或从所述细胞溶胞产物纯化的 AILIM(特别优选来自人的 AILIM)的多肽片段;

(d) 利用基因重组技术制备的以可溶性多肽形式表达上述 AILIM(特别优选来自人的 AILIM)的一部分(特别优选胞外区或其任何优选的肽)的基因重组细胞;

(e) 通过培养上述(d)中基因重组细胞获得的培养上清液或从该培养上清液纯化的 AILIM(特别优选来自人的 AILIM)的胞外区多肽(可溶性 AILIM); 或

(f) 化学合成的 AILIM(特别优选来自人的 AILIM)的一部分(特别优选胞外区或其任何优选的肽)。

此外,通过培养“基因重组宿主”[这里,所述宿主是除了受精卵之外的真核细胞(优选哺乳动物细胞,例如 CHO,淋巴细胞,和骨髓瘤细胞)],从培养上清液也可以获得本发明的单克隆抗体,其中所述宿主可以应用基因重组技术将编码本发明人单克隆抗体的各重链和轻链的 cDNA(优选包含所述 cDNA 的载体)转化宿主来制备,其产生基因重组型人单克隆抗体。

具体地说，通过培养本发明的上述(60)-(62)或(64)-(80)任一项中描述的基因重组宿主能够获得本发明的单克隆抗体(这里，所述宿主是除了受精卵之外的真核细胞(优选哺乳动物细胞，例如 CHO, 淋巴细胞, 和骨髓瘤细胞))。

另外，本发明的人单克隆抗体可以是具有属于 IgG(IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4), IgM, IgA(IgA1 和 IgA2), IgD 或 IgE 的任何同种型的人单克隆抗体。优选地，所述单克隆抗体属于 IgG(IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4)，更优选 IgG1, IgG2 或 IgG4。

根据已知的常用方法，用上述(a)-(f)中任一种免疫原(抗原)免疫能产生人抗体的转基因非人哺乳动物例如下述能产生人抗体的转基因小鼠，能够制备本发明的人单克隆抗体。

即，例如，根据情况要求用与弗氏佐剂混合的所述抗原免疫能产生人抗体的所述转基因非人哺乳动物。从所述免疫动物采集血清可以获得多克隆抗体。使从所述免疫动物分离的所述抗体产生细胞与不能产生自身抗体的骨髓瘤细胞制备融合细胞(杂交瘤)，并且克隆所述杂交瘤，从而筛选产生对用来免疫所述哺乳动物的抗原具有特异亲和力的多克隆抗体的克隆，最终制备单克隆抗体。

更具体地说，如下所述制备单克隆抗体。即，通过皮内，肌内，静脉内，足垫中，或腹膜内将上面(a)-(c)中提到的任何免疫原注射一次至几次，或将所述免疫原移植到所述哺乳动物体内，来免疫所述产生人抗体的转基因非人哺乳动物(特别优选“产生人抗体的转基因小鼠”)。通常，第一次接种之后，每隔 1-14 天对每只小鼠接种一至四次。在最后一次接种的约 1-5 天后从这样免疫过的哺乳动物获得产生抗体的细胞。接种的次数和时间间隔可以适当根据，例如，使用的免疫原的特性而安排。

通过 Kohler 和 Milstein 的方法(自然(Nature), 256 卷, p. 495-497(1975))或其改良法可以制备分泌人单克隆抗体的杂交瘤。也就是说，从根据上述免疫的产生人抗体的转基因非人哺乳动物获得脾，淋巴结，骨髓或扁桃体(优选脾)，使其中含有的产生抗体的细胞与优选从哺乳动物例如小鼠，大鼠，豚鼠，仓鼠，兔或人，更优选小鼠，大鼠或人获得的没有产生自身抗体能力的骨髓瘤融合，来制备杂交瘤。

例如，来自小鼠的骨髓瘤 P3/X63-AG8. 653(ATCC No. CRL-1580), P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1), P3/X63-Ag8. U1(P3U1), SP2/0-Ag14(Sp2/0, Sp2),

NSO, PAI, F0, 或 BW5147, 来自大鼠的骨髓瘤 210RCY3-Ag. 2.3., 或来自人的骨髓瘤 U-266AR1, GM1500-6TG-A1-2, UC729-6, CEM-AGR, D1R11 或 CEM-T15 可以作为用于细胞融合的骨髓瘤。

通过, 例如, 在微量滴定板中培养细胞和通过测定有杂交瘤生长的孔中的培养上清液对用于上述接种的免疫原的反应性, 可以筛选产生单克隆抗体的细胞(例如, 杂交瘤), 所用方法如酶免疫方法分析例如放射免疫分析(RIA)和酶联免疫-溶剂试验(ELISA)。

通过体外或体内, 例如在小鼠, 大鼠, 豚鼠, 仓鼠或兔, 优选小鼠或大鼠, 更优选小鼠的腹水中培养杂交瘤, 并且从所得培养上清液或哺乳动物的腹水分离抗体, 能够从杂交瘤产生单克隆抗体。

通过下面的方法能够大规模制备本发明的单克隆抗体:

(1) 从所述杂交瘤分别克隆出编码所述单克隆抗体的重链和轻链的相应基因(cDNA 等);

(2) 将分别编码重链和轻链的克隆基因插入不同载体或单个载体中, 以制备表达载体;

(3) 将所述表达载体转移到目标非人哺乳动物(例如山羊)的受精卵中;

(4) 将转移有所述基因的所述受精卵移植到代孕母体的子宫中获得嵌合非人动物;

(5) 通过进一步使所述嵌合山羊与另一个非人哺乳动物交配, 产生转基因非人哺乳动物(牛, 山羊, 绵羊或猪), 其中编码重链和轻链的基因已分别插入到内源基因中; 和

(6) 从所述转基因非人哺乳动物的奶中大规模获得从所述人单克隆抗体基因衍生的单克隆抗体(Nikkei Science, 1997 年 4 月, p. 78-84)。

根据, 例如, 要培养的细胞的性质, 研究目的, 和培养方法的各种条件, 通过应用公知的营养培养基或从已知用于培养, 维持和贮存杂交瘤的基础培养基衍生的任何营养培养基, 能够进行产单克隆抗体的细胞的体外培养, 来在培养上清液中产生单克隆抗体。

基础培养基的例子是低钙浓度培养基, 例如 Ham'F12 培养基, MCDB153 培养基, 或低钙浓度 MEM 培养基, 和高钙浓度培养基, 例如 MCDB104 培养基, MEM 培养基, D-MEM 培养基, RPMI1640 培养基, ASF104 培养基, 或 RD 培养基。基础培养基可以根据目的含有, 例如, 血清, 激素,

细胞因子, 和/或各种无机或有机物。

通过饱和硫酸铵沉淀, 优球蛋白沉淀方法, 己酸方法, 辛酸方法, 离子交换层析(DEAE 或 DE52), 使用抗免疫球蛋白柱或蛋白 A 柱的亲层析, 可以从上述培养上清液或腹水中分离和纯化单克隆抗体。

本发明的人单克隆抗体包括由重链和/或轻链组成的人单克隆抗体, 其中每条链的氨基酸序列中有一个或多个氨基酸残基缺失, 被取代或添加。

这里, “多个氨基酸残基”指多个氨基酸, 特别是 1-10 个氨基酸残基, 优选 1-5 个氨基酸残基。

通过部分改变编码本发明的人单克隆抗体的氨基酸序列的碱基序列, 可以向所述氨基酸序列引入如上所述部分修饰(缺失, 取代, 插入或添加)。所述对碱基序列的部分改变可通过标准方法使用已知的定点诱变技术(美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81 卷, p. 5662-5666, 1984)导入。

根据公开的文献可以制备“转基因的产生人抗体的非人哺乳动物”, 特别是产生人抗体的转基因小鼠, 其是一个优选的实施方案(自然遗传(Nature Genetics), 7 卷, p. 13-21, 1994; 自然遗传(Nature Genetics), 15 卷, p. 146-156, 1997; 国际公开号平 4-504365 的公开的日文译本; 国际公开号平 7-509137 的公开的日文译本; Nikkei Science, 1995 年 6 月, p. 40-50; 国际专利公开号 WO94/25585; 自然(Nature), 368 卷, p. 856-859, 1994; 和国际公开号平 6-500233 的公开的日文译本等等)。

具体地说, 例如, 应用由下面过程组成的技术, 能够制备所述产生人抗体的转基因小鼠:

(1) 制备基因敲除小鼠, 其内源免疫球蛋白重链基因已功能性失活, 方法是通过同源重组用抗药性标记基因(例如新霉素耐药基因)取代小鼠内源免疫球蛋白 κ 重链的基因座位的至少一部分;

(2) 制备基因敲除小鼠, 其内源免疫球蛋白轻链基因(特别是 κ 链基因)已功能性失活, 方法是通过同源重组用抗药性标记基因(例如新霉素耐药基因)取代小鼠内源免疫球蛋白轻链的基因座位的至少一部分;

(3) 制备转基因小鼠, 其中已通过诸如能携带大基因的酵母人工染色体(YAC)等载体将人免疫球蛋白重链基因座位的所需区整合到小鼠染色体中;

(4) 制备转基因小鼠, 其中已通过诸如能携带大基因的酵母人工染色体

(YAC)等载体将人免疫球蛋白轻链基因座位(特别是 κ 链基因)的所需区整合到小鼠染色体中; 和

(5) 制备转基因小鼠, 其内源免疫球蛋白重链和轻链基因座位都功能性失活, 并且已将人免疫球蛋白重链和轻链基因座位的所需区整合到其染色体中, 方法是使上述(1)至(4)的基因敲除小鼠和转基因小鼠以任意顺序交配。

上述基因敲除小鼠可如下制备: 通过同源重组, 用外源标记基因(例如新霉素耐药基因)取代小鼠内源免疫球蛋白基因座位的适当区, 以失活所述基因座位, 从而避免重排。利用所述同源重组进行的失活可以使用例如称之为阳性阴性选择(PNS)的方法(Nikkei Science, 1994年5月, p. 52-62)。

通过在J-或C-区的一部分(例如, $C\mu$ 区)中导入损伤, 可以实现免疫球蛋白重链基因座位的功能失活。通过在J-或C-区的一部分中导入损伤, 或在跨越了J-和C-区的一个区中导入损伤, 可以实现免疫球蛋白轻链(例如 κ 链)的功能失活。

根据通常用于产生转基因动物的方法(例如, 参见“动物细胞实验最新手册(Newest Manual of Animal Cell Experiment)”, LIC出版社, 第7章, p. 361-408(1990)), 能够制备转基因小鼠。具体地说, 应用原生质球融合技术, 将例如来自正常小鼠胚胎的HPRT-阴性(次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因缺陷)ES细胞(胚胎干细胞)与包含插入了编码所述人免疫球蛋白重链基因座位或轻链基因座位或其一部分的基因和HPRT基因的YAC载体的酵母融合。通过HAT筛选方法筛选其小鼠内源基因与所述外源基因整合的ES细胞。然后, 将筛选到的ES细胞显微注射到从另一个正常小鼠获得的受精卵(胚胎)中(美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77卷, p. 7380-7384, 1980; 美国专利 No. 4873191)。将该胚胎移植到作为代孕母体的另一只正常小鼠的子宫中。然后, 从代孕母体小鼠生出嵌合的转基因小鼠。通过使该嵌合的转基因小鼠与正常小鼠交配, 得到异基因转基因小鼠。根据Mendel法则, 通过使该异基因转基因小鼠彼此交配, 得到同基因转基因小鼠。

本发明中使用的“单克隆抗体的部分”指本发明上述人单克隆抗体的一部分, 具体地说, 包括 $F(ab')_2$, Fab' , Fab , Fv (抗体的可变区片段), sFv , $dsFv$ (二硫键稳定型 Fv), 或 dAb (单一结构域抗体)(Exp. Opin. Ther. Patents, 6卷, No. 5, p. 441-456(1996))。

“F(ab')₂”和“Fab'”可通过用蛋白酶例如胃蛋白酶和木瓜蛋白酶处理免疫球蛋白(单克隆抗体)来制备,它们表示通过在两条H链之间的绞链区中接近二硫键处消化免疫球蛋白产生的抗体片段。例如,木瓜蛋白酶裂解IgG两条H链之间的绞链区中二硫键的上游,产生两个同源抗体片段,其中由V_L(L链可变区)和C_L(L链恒定区)组成的L链,和由V_H(H链可变区)和C_Hγ1(H链的恒定区中的γ1区)组成的H链片段通过二硫键在它们的C末端区连接。这两个同源抗体片段都称为Fab'。胃蛋白酶也裂解IgG两条H链之间绞链区中二硫键的下游,产生比由上述两个Fab'在绞链区连接形成的片段稍微大一些的抗体片段。该抗体片段称为F(ab')₂。

“结合速度常数(ka)”表示根据抗体抗原反应动力学计算的所述单克隆抗体与靶抗原的结合强度(程度)。“解离速度常数(kd)”表示所述单克隆抗体与靶抗原解离的强度(程度)。“解离常数(Kd)”是通过将所述“解离速度常数(kd)”除以“结合速度常数(ka)”得到的值。这些常数用来代表所述单克隆抗体对抗原的亲和力及它们中和抗原的活性。

所述常数可以根据各种方法来分析,并可使用商售分析试剂盒Biacore X (Amersham Pharmacia)或类似的试剂盒,根据试剂盒所附的说明和实验方法,容易地分析所述常数。使用所述试剂盒得到的ka, kd和Kd分别以1/M.秒, 1/秒和M(摩尔)单位表示。ka值越高表明所测单克隆抗体的抗原结合活性越强, Kd值越小表明抗体的抗原中和活性越强。

本发明的人单克隆抗体包括那些具有下面(1)-(3)所示ka, kd和Kd值的人单克隆抗体:

(1) 以 1.0×10^4 (1/M. 秒)或更大, 优选 1.0×10^5 (1/M. 秒)或更大的结合速度常数(ka)结合人AILIM或其一部分的人单克隆抗体。

(2) 以 1.0×10^{-4} (1/秒)或更小, 优选 1.0×10^{-5} (1/秒)或更小的解离速度常数(kd)结合人AILIM或其一部分的人单克隆抗体。

(3) 具有对人AILIM或其一部分的反应性, 解离常数(Kd)是 1.0×10^{-7} (M)或更小, 优选 1.0×10^{-8} (M)或更小, 更优选 1.0×10^{-9} (M)或更小的人单克隆抗体。

在该情况下, 预期上述ka, kd和Kd各个值随着在测定时不同的条件而稍有波动, 有误差范围, 但是一般情况下特定指数没有波动。

本发明的“产生单克隆抗体的细胞”或产生人单克隆抗体的基因重组

的“基因重组宿主”(这里,所述宿主是除受精卵以外的细胞)指产生上述本发明人单克隆抗体的任何细胞。

具体地说,例如,它包括下面(1)-(3)任一项中描述的细胞,但是不局限于它们:

(1) 通过用上面定义的免疫原(抗原)免疫上述产生人抗体的转基因非人哺乳动物并且从所述接受免疫的动物收集细胞而获得的产生人单克隆抗体的 B 细胞。

(2) 通过使这样获得的产生人单克隆抗体的 B 细胞与来自哺乳动物的骨髓瘤细胞融合得到的上述融合细胞(杂交瘤)。

(3) 通过用编码从所述产生人单克隆抗体的 B 细胞或产生人单克隆抗体的融合细胞(杂交瘤)分离的所述人单克隆抗体的基因(编码重链的基因或编码轻链的基因,或两者)转化除所述 B 细胞和杂交瘤以外的细胞(例如 CHO(中国仓鼠卵巢)细胞, BHK(仓鼠胚肾)细胞,淋巴细胞例如骨髓瘤),获得的产生人单克隆抗体的基因重组细胞。

这里,(3)中提到的产生人单克隆抗体的基因重组细胞即指产生由上述(1)中 B 细胞或上述(2)中杂交瘤产生的人单克隆抗体的基因重组体的基因重组细胞。

本发明的“基因重组宿主”中的“宿主”除了上述各种哺乳动物细胞之外,包括任何非人哺乳动物(山羊,猪,绵羊,牛,等)的受精卵。通过将本发明编码抗人 AILIM 的任何单克隆抗体(优选人单克隆抗体)的基因(编码重链的基因或编码轻链的基因,或两者)转移到该受精卵中,能够获得本发明的基因重组受精卵。该基因重组受精卵被能制备能大规模从奶中生产蛋白质的转基因动物(Nikkei Science, 1997 年 4 月, p. 78-84)。

本发明包括的“物质”,具体地说“在调节 AILIM 介导的信号转导方面有活性的物质”,更具体地说“在抑制 AILIM-表达细胞的增殖方面,或在抑制 AILIM-表达细胞产生细胞因子的方面有活性的物质”指自然界存在的天然物质,或人工制备的任意物质。

与“结合 AILIM 的物质”和“结合 AILIM 配体的物质”相关的“物质”在这里也指自然界存在的任何天然物质,或人工制备的任意物质。

这里,“AILIM 介导的信号转导”指导致 AILIM-表达细胞的任意表型变化(细胞增殖,细胞的激活,细胞的失活,凋亡,和/或从 AILIM-表达细

胞产生任意细胞因子的能力改变)的经由 AILIM 的信号转导。

“物质”可以主要分类为“蛋白质物质”和“非蛋白质物质”。

“蛋白质物质”的例子是下面的多肽, 抗体(多克隆抗体, 单克隆抗体, 或单克隆抗体的一部分, 并且特别优选上述人抗体)。

当所述物质是一种抗体时, 所述物质优选是一种单克隆抗体。当所述物质是一种单克隆抗体时, 所述物质不仅包括来自非人哺乳动物的单克隆抗体, 还包括重组嵌合单克隆抗体, 重组人源化单克隆抗体和人单克隆抗体。

这里, “重组嵌合单克隆抗体”是一种通过基因工程制备的单克隆抗体, 具体地指一种嵌合抗体例如小鼠/人嵌合单克隆抗体, 其可变区来自非人哺乳动物(小鼠, 大鼠, 仓鼠等)的免疫球蛋白, 其恒定区来自人免疫球蛋白。

本发明的“人源化单克隆抗体(CDR-移植型抗体)”是一种通过基因工程制备的单克隆抗体, 具体地指其中高变区中互补决定区的部分或全部来自非人哺乳动物(小鼠, 大鼠, 仓鼠等)单克隆抗体高变区的互补决定区, 可变区的框架区来自人免疫球蛋白可变区的框架区, 恒定区来自人免疫球蛋白恒定区的人源化单克隆抗体。

高变区的互补决定区存在于抗体可变区的高变区中, 并且指直接结合并互补于抗原的三个区(互补决定区残基, CDR1, CDR2, 和 CDR3)。可变区的框架区指位于这三个互补决定区的上游, 下游或之间的四个比较保守的区(框架区, FR1, FR2, FR3, 和 FR4)。

换句话说, 人源化单克隆抗体指其中除了来自非人哺乳动物单克隆抗体高变区的互补决定区的部分或全部之外所有的区被它们相应的来自人免疫球蛋白的区置换的单克隆抗体。

来自人免疫球蛋白的恒定区具有各种同种型例如 IgG(IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4), IgM, IgA, IgD 和 IgE 中固有的氨基酸序列。本发明的人源化单克隆抗体的恒定区可以是来自属于任何同种型的人免疫球蛋白。优选地, 其是人 IgG 的恒定区。对来自人免疫球蛋白恒定区的框架区没有特别限定。

当本发明的物质是一种多肽时, 所述物质包括下面的多肽, 其片段(寡肽), 融合多肽, 其化学修饰的多肽。寡肽的例子是包括 5-30 个, 优选 5-20

个氨基酸的肽。化学修饰可以根据不同目的设计,例如,体内给药的情况下提高血液半衰期,或口服的情况下在消化道中增强对降解作用的耐受性或促进消化道吸收。

下面是多肽的例子:

- (1) 包括 AILIM 的胞外区的全部或部分的多肽;
- (2) 包括 AILIM 的胞外区的全部或部分以及免疫球蛋白重链恒定区的全部或部分的融合多肽;或
- (3) 结合 AILIM 的多肽。

“非蛋白质”的例子是 DNA, RNA, 和化学合成的化合物。

这里,“DNA”指根据编码上述 AILIM(优选人 AILIM)的 DNA(包括 cDNA 和基因组 DNA)的核苷酸序列设计的可用作反义 DNA 药物的“包括所述 DNA 或其化学修饰型 DNA 的部分核苷酸序列的 DNA”。具体地说,所述反义 DNA 能通过与编码 AILIM 的 DNA 或 RNA 杂交,抑制编码 AILIM 的 DNA 转录为 mRNA,或抑制该 mRNA 翻译为蛋白质。

“部分核苷酸序列”在这里指包括任意区中任意个核苷酸的部分核苷酸序列。所述部分核苷酸序列由 5-100 个连续的核苷酸,优选 5-70 个连续的核苷酸,更优选 5-50 个连续的核苷酸,更优选 5-30 个连续的核苷酸组成。

当 DNA 被用作反义 DNA 药物时,可以部分化学修饰该 DNA 序列以延长给药后该 DNA 的血液半衰期(稳定性),以提高该 DNA 的胞质膜渗透性,或提高口服给药时该 DNA 在消化器官中的抗降解性或促进吸收。化学修饰包括对磷酸酯键,核糖,核苷酸碱基,糖部分,寡核苷酸 DNA 结构中的 3'末端和/或 5'末端的修饰。

磷酸酯键的修饰包括,例如,将一个或多个磷酸酯键转化为磷酸二酯键(D-寡),硫代磷酸酯键,二硫代磷酸酯键(S-寡),磷酸甲酯(MP-寡),氨基磷酸酯键,非磷酸酯键或硫代磷酸甲酯键,或它们的组合。核糖的修饰包括例如转化为 2'-氟代核糖或 2'-O-甲基核糖。核苷酸碱基的修饰包括例如转化为 5-丙炔基尿嘧啶或 2-氨基腺嘌呤。

这里,“RNA”指根据编码上述 AILIM(优选人 AILIM)的 RNA 的核苷酸序列设计的用作反义 RNA 药物的“包括所述 RNA 或其化学修饰型 RNA 的部分核苷酸序列的 RNA”。所述反义 RNA 能通过与编码 AILIM 的 DNA 或 RNA 杂交,抑制编码 AILIM 的 DNA 转录为 mRNA,或抑制 mRNA 翻

译为蛋白质。

“部分核苷酸序列”在这里指包括任意区中任意个核苷酸的部分核苷酸序列。所述部分核苷酸序列由 5-100 个连续的核苷酸，优选 5-70 个连续的核苷酸，更优选 5-50 个连续的核苷酸，更优选 5-30 个连续的核苷酸组成。

可对反义 RNA 的序列进行部分化学修饰，以延长给药后该 RNA 的血液半衰期(稳定性)，提高该 RNA 的胞质膜渗透性，或提高口服时 RNA 在消化器官中的抗降解性或促进吸收。化学修饰的例子是适用于上述反义 DNA 的化学修饰。

“化学合成的化合物”的例子是除了上述 DNA，RNA 和蛋白质物质之外的具有约 100 至约 1000 分子量的任何化合物，优选具有约 100 至约 800 分子量，更优选约 100 至约 600 分子量的任何化合物。

包括在上文“物质”的定义中的“多肽”指构成 AILIM(优选人 AILIM)的多肽链的部分(片段)，优选构成 AILIM 的多肽的胞外区的全部或部分(可以任选地在该区的 N-端和/或 C-端加上 1-5 个氨基酸)。

本发明中涉及的 AILIM 是包括 1 或 2 个多肽链的穿透细胞膜的跨膜分子。

这里，“跨膜蛋白”指通过一次或几次穿透该膜的脂双层的疏水肽区与膜连接的蛋白质，并且其结构整体由三个主要的区组成，它们是胞外区，跨膜区和胞质区，正如在很多受体或细胞表面分子中见到的一样。这样一种跨膜蛋白与具有相同或不同氨基酸序列的另一条链构成单体，同型二聚体，异二聚体或寡聚体形式的受体或细胞表面分子。

这里，“胞外区”指上述跨膜蛋白的完整结构中存在于膜外的部分结构(部分区)的全部或部分。换句话说，指跨膜蛋白中除了插入膜中的区(跨膜区)和紧接跨膜区而存在于胞质中的区(胞质区)之外的区的全部或部分。

包括在上述“蛋白质物质”中的“融合多肽”指包括构成 AILIM(优选人 AILIM)的多肽的胞外区的全部或部分，和“免疫球蛋白重链(Ig，优选人 Ig)恒定区的全部和部分”的融合多肽。优选地，所述融合多肽是包括 AILIM 的胞外区和人 IgG 重链恒定区的一部分的融合多肽，特别优选地是 AILIM 的胞外区与人 IgG 重链中包括绞链区，CH2 区和 CH3 区的区(Fc)的融合多肽。IgG 优选 IgG1，AILIM 优选人，小鼠或大鼠的 AILIM(优选人的)。

这里使用的“人免疫球蛋白(Ig)重链的恒定区的全部或部分”指如上所

述来自人的免疫球蛋白重链(H链)的恒定区或Fc区,或其一部分。免疫球蛋白可以是属于任何类和任何亚类的免疫球蛋白。具体地说,免疫球蛋白的例子是IgG(IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4), IgM, IgA(IgA1 和 IgA2), IgD 或 IgE。优选地,免疫球蛋白是IgG(IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4), 或 IgM。本发明特别优选的免疫球蛋白的例子是属于来自人的 IgG(IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4)的那些。

免疫球蛋白具有Y-形结构单元,其中四条链由两条同源轻链(L链)和两条同源重链(H链)组成并且通过二硫键(S-S键)连接。轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。

重链恒定区由具有各类(IgG, IgM, IgA, IgD 和 IgE)和各亚类(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 和 IgA2)固有的氨基酸序列的一些区组成。

IgG(IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4)的重链由V_H, CH1区, 绞链区, CH2区和CH3区以此顺序自N末端构成。

类似地, IgG1的重链由V_H, C_{γ1}1区, 绞链区, C_{γ1}2区和C_{γ1}3区以此顺序自N末端构成。IgG2的重链由V_H, C_{γ2}1区, 绞链区, C_{γ2}2区和C_{γ2}3区以此顺序自N末端构成。IgG3的重链由V_H, C_{γ3}1区, 绞链区, C_{γ3}2区和C_{γ3}3区以此顺序自N末端构成。IgG4的重链由V_H, C_{γ4}1区, 绞链区, C_{γ4}2区和C_{γ4}3区以此顺序自N末端构成。

IgA的重链由V_H, C_α1区, 绞链区, C_α2区和C_α3区以此顺序自N末端构成。

类似地, IgA1的重链由V_H, C_{α1}1区, 绞链区, C_{α1}2区和C_{α1}3区以此顺序自N末端构成。IgA2的重链由V_H, C_{α2}1区, 绞链区, C_{α2}2区和C_{α2}3区以此顺序自N末端构成。

IgD的重链由V_H, C_δ1区, 绞链区, C_δ2区和C_δ3区以此顺序自N末端构成。

IgM的重链由V_H, C_μ1区, C_μ2区和C_μ3区, 和C_μ4以此顺序自N末端构成, 没有IgG, IgA和IgD中见到的绞链区。

IgE的重链由V_H, C_ε1区, C_ε2区和C_ε3区, 和C_ε4以此顺序自N末端构成, 没有IgG, IgA和IgD中见到的绞链区。

如果, 例如, 用木瓜蛋白酶处理IgG, 在绞链区中连接两条重链的二硫键以外偏N-末端处裂解产生两个同源Fab, 其中由V_H和CH1组成的重链

片段通过二硫键与一条轻链连接,还产生一个Fc,其中由绞链区,CH2区和CH3区组成的两条同源重链片段通过二硫键连接(参见 Immunology Illustrated, 原第2版, Nankodo, p. 65-75(1992); 和最新药物科学焦点(免疫系统识别机理)(Focus of Newest Medical Science ‘Recognition Mechanism of Immune System’), Nankodo, p. 4-7(1991)等等)。

即,上文提到的“免疫球蛋白重链的恒定区的一部分”指免疫球蛋白重链恒定区中具有如上所述结构特征的部分,优选地,是没有C1区或Fc区的恒定区。具体地说,其例子是由来自IgG, IgA, 和IgD的绞链区, C2区和C3区组成的区,和由来自IgM和IgE的C2区, C3区和C4区组成的区。其特别优选的例子是来自人IgG1的Fc区。

上述融合多肽具有下面的优点,即通过利用蛋白质A与免疫球蛋白片段特异性结合的性质经亲和柱层析可以非常容易地纯化融合多肽,因为本发明的融合多肽具有免疫球蛋白例如上述IgG的恒定区的一部分(Fc)作为融合配对物。此外,由于抗各种免疫球蛋白的Fc的各种抗体是可获得的,因此可用抗Fc抗体容易地进行融合多肽的免疫测定。

上文“物质”的定义中包括的“多肽”包括“结合AILIM的多肽”。

“结合AILIM的多肽”的具体例子是构成已知的作为与AILIM相互作用的配体的B7h, B7RP-1, GL50或称为LICOS分子的多肽的全部或部分(自然(Nature), 402卷, No. 6763, p. 827-832, 1999; 天然药物(Nature Medicine), 5卷, No. 12, p. 1365-1369, 1999; 免疫学杂志(J. Immunology), 164卷, p. 1653-1657, 2000; 当今生物学(Curr. Biol.), 10卷, No. 6, p. 333-336, 2000)。

优选地,所述多肽是包括上述配体(B7h, B7RP-1, GL50)胞外区的全部或部分的多肽,或包括该多肽和免疫球蛋白重链(优选人免疫球蛋白)恒定区的全部或部分的融合多肽。这里,术语“胞外区”和“免疫球蛋白重链的恒定区”具有和上面相同的意义。

上述多肽,多肽的部分(片段)和融合多肽不仅可以通过下面提到的重组DNA技术制备,而且还可以通过本领域公知的方法例如化学合成方法和细胞培养方法或其改进的方法来制备。

本发明的“抗体”可以是上文定义的抗哺乳动物AILIM(特别优选人AILIM)的多克隆抗体(抗血清)或单克隆抗体,优选是单克隆抗体。

具体地,所述抗体是具有通过结合 AILIM 而抑制 AILIM-表达细胞增殖或通过结合 AILIM 而抑制 AILIM-表达细胞产生干扰素 γ 或白细胞介素 4 的活性的抗体。

这里“迟发型过敏反应”是细胞免疫介导的(特别是 Th1-型 T 细胞介导的)过敏反应,即,被抗原(记忆 T 细胞记忆的抗原)致敏的 T 细胞介导的过敏反应,并且指任何过敏反应,它是当抗原致敏的活体生物再次接触该相同抗原时,约 24-48 小时表现过敏反应,并伴随所述记忆 T 细胞引起的炎症。

该迟发型过敏反应包括针对传染性致病抗原例如来自结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的结核菌素的过敏反应,针对少量蛋白的瞬时 Jones-Mote 迟发型过敏反应,对化学品例如苦基氯或植物毒素例如天然漆的接触型过敏反应,或在异源移植中见到的对移植物的移植排斥相关的过敏反应。

“药物组合物”这里指含有结合 AILIM(优选人 AILIM)或其一部分的抗体(优选人抗体),或单克隆抗体(优选人单克隆抗体)或其一部分作为有效成分并含有“可药用载体”而作为药物使用的组合物。

“可药用载体”包括赋形剂,稀释剂,膨胀剂,分解剂,稳定剂,防腐剂,缓冲剂,乳化剂,芳香剂,着色剂,甜味剂,增粘剂,矫味剂,增溶剂或其它添加剂。

使用一种或多种这样的载体,能够将药物组合物配制成片剂,丸剂,粉末剂,颗粒剂,注射剂,溶液,胶囊,糖锭,酏剂,悬浮液,乳液或糖浆。

药物组合物可以口服或肠胃外给药。肠胃外给药的其它形式包括常规方法制备的含有一种或多种活性成分的外用溶液,直肠施用的栓剂,和阴道栓。

剂量根据患者的年龄,性别,体重和症状,治疗效果,给药途径,治疗周期,或药物组合物中含有的活性成分的类型(上述多肽或抗体)而不同。通常,对成人,可以以 10 微克至 1000 毫克(或 10 微克至 500 毫克)/每次给药的剂量施用药物组合物。根据各种条件,小于上述剂量的剂量在某些情况下可能是足够的,而大于上述剂量的剂量在另外情况下可能是必需的。

特别地,通过将抗体溶解于或悬浮于无毒的可药用载体例如生理盐水或市售注射用蒸馏水中,将浓度调节为 0.1 微克抗体/毫升载体至 10 毫克抗

体/毫升载体,可以制备注射剂。

可以以1微克至100毫克/千克体重,优选50微克至50毫克/千克体重的剂量一天一次或多次对需要治疗的患者施用这样制备的注射液。给药途径的例子是药学可接受的给药途径,例如静脉注射,皮下注射,皮内注射,肌肉注射,或腹膜内注射,优选静脉内注射。

也可以将注射液制备到不含水的稀释液(例如丙二醇,聚乙二醇,植物油例如橄榄油,醇例如乙醇),悬浮剂或乳剂中。

通过用细菌不能穿透的除菌滤膜过滤,通过与杀菌剂混合或通过辐射,可将注射剂灭菌。还可将注射剂制备成使用时制备的形式。即,将其冻干成无菌固体组合物,并且在使用前可以溶解于注射用无菌蒸馏水或另一种溶剂中。

含有本发明的人抗体的药物组合物可作为药物制剂用于控制与AILIM-介导的向AILIM-表达细胞转导协同刺激信号(第二信号)相关的各种生物反应(例如AILIM表达细胞的增殖,AILIM表达细胞产生细胞因子,AILIM细胞表达的免疫胞解或死亡(凋亡)或其它)而不诱发HAMA(人抗小鼠抗体)所致宿主免疫排斥作用,和/或用于通过阻抑和抑制与AILIM-介导的信号转导相关的疾病的发生和/或进展来治疗或预防各种疾病。

术语“免疫胞解”这里指下面的一种生物现象。

通过抗体(特别是细胞-溶解抗体)以及通过与杀伤细胞结合能够诱导细胞的裂解(胞解)。细胞-溶解抗体是一种细胞毒活性抗体,其特别具有对细胞例如免疫细胞,组织细胞或精子的溶解活性。当该抗体结合细胞-表面抗原时,其引起对细胞的细胞毒作用或在补体的存在下诱导细胞溶解。

补体作用与抗体对细胞-表面抗原的特异性结合联合诱导免疫胞解。与表面抗原结合的抗体激活C1补体(C1)。接着,通过与C2-C9补体(C2-C9)的一系列补体-固定反应形成细胞损伤位点,然后从细胞释放细胞内含物从而溶解细胞。

术语“抗体-依赖性细胞介导的细胞毒活性”这里指一种生物作用,也缩写为“ADCC”,并且是效应细胞例如淋巴细胞,巨噬细胞或多形核白细胞对靶细胞的细胞毒作用,其需要的不仅是效应细胞和靶细胞,而且还有参与诱导细胞毒作用的抗体。

术语“混合淋巴细胞反应”这里指缩写为“MLR”的生物现象。该反

应也称为混合的白细胞反应。

将来自不同个体的异源白细胞或淋巴细胞相互混合并且培养几天,从而使细胞形成母细胞并且在细胞中合成 DNA(即细胞增殖)。该反应被称为 MLR(异源 MLR)。

通过抑制任一淋巴细胞的增殖可以分析 DNA 合成(细胞增殖)。通过辐射或丝裂霉素处理可以完成抑制。通过测定其它淋巴细胞中合成的 DNA 量可以进行分析。

通过测定用放射性同位素例如掺入到细胞核中的氘标记的胸腺嘧啶核苷可以分析合成的 DNA 的量。

根据通常使用的方法,用从编码 AILIM 的 mRNA 克隆出 cDNA 的方法;分离基因组 DNA 并剪接它们的方法;以 cDNA 序列或 mRNA 序列作为模板经 PCR 制备 DNA 的方法;或化学合成 DNA 的方法,能够获得本发明的编码 AILIM(特别优选人 AILIM)的 DNA。

用上述相同的方法还能够获得根据本发明的编码 AILIM 配体的 DNA。

通过用合适的限制酶酶切(消化)包括编码这样制备的 AILIM 的 DNA 的 DNA 能够制备根据本发明的编码 AILIM(特别优选人 AILIM)的 DNA,如果需要,通过使用合适的 DNA 聚合酶等使所得 DNA 片段与接头 DNA 或标记相连。用相同的方法还能够制备编码 AILIM 配体的 DNA。

下面将给出一个从 mRNA 克隆出编码 AILIM(特别优选人 AILIM;下面称该蛋白质为目的蛋白)的 cDNA 的例示方法。

用相同的方法还能够克隆编码 AILIM 配体的 DNA。

首先,从表达和产生目的蛋白的组织 and 细胞制备编码目的蛋白的信使 RNA。通过已知方法,例如硫氰酸胍方法(Chirgwin, J. M. 等,生物化学(Biochemistry), 18 卷, p. 5294, 1979), 热酚方法,或 AGPC 方法,从分离的总 RNA 可以制备 mRNA,并且对其进行亲和层析(使用寡-dT 纤维素或聚尿苷酸 Sepharose)。

然后,使用所得 mRNA 作为模板,合成 cDNA,例如,通过公知的使用逆转录酶的方法,例如 Okayama 等的方法(分子细胞生物学(Mol. Cell. Biol), 2 卷, p. 161(1982); 出处同上, 3 卷, p. 280(1983))或 Hoffman 等的方法(基因(Gene), 25 卷, p. 263(1983)), 并且转化为双链 cDNA。通过用包含该 cDNA 的质粒载体,噬菌体载体或粘粒载体转化大肠杆菌或通过体外

包装之后转染大肠杆菌而制备 cDNA 文库。

本发明中使用的质粒载体没有限制，只要它们能在宿主中维持并复制。也可以使用能在宿主中复制的任何噬菌体载体。通常使用的克隆载体的例子是 pUC19, λ gt10, λ gt11, 等等。当该载体被应用于下述免疫筛选时，优选使用包含能在宿主中表达编码本发明多肽的基因的启动子的载体。

通过，例如 Maniatis 等的方法(分子克隆，实验手册，第二版，冷泉港实验室，p. 1. 53, 1989)将 cDNA 插入质粒中。通过，例如 Hyunh 等的方法(DNA 克隆，操作指南，vol. 1, p. 49, 1985)将 cDNA 插入噬菌体载体中。通过使用市售克隆试剂盒(例如，购自 Takara Shuzo 的产品)简单地进行这些方法。将这样获得的重组质粒或噬菌体载体导入合适的宿主细胞例如原核细胞(例如大肠杆菌:XL1Blue MRF', DH5 α , HB101, MC1061/P3, 等)中。

将质粒导入宿主的方法有分子克隆，实验手册(第二版，冷泉港实验室，p. 1. 74, (1989))中描述的氯化钙方法，氯化钙/氯化铷法，和电穿孔方法。通过例如其中噬菌体 DNA 在体外包装后被导入培养宿主中的方法将噬菌体载体导入宿主细胞。用市售体外包装试剂盒(例如购自 Stratagene 或 Amersham 的产品)能容易进行体外包装。

通过组合通用的 cDNA 筛选方法能够从根据上述方法制备的 cDNA 文库分离编码本发明多肽的 cDNA。

例如，通过已知的菌落杂交方法(Crunstein 等，美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)72 卷，p. 3961(1975))或噬菌斑杂交方法(分子克隆，实验手册，第二版，冷泉港实验室，p. 2. 108, 1989)，使用 ^{32}P -标记的化学合成的相应于本发明多肽之氨基酸序列的寡核苷酸作为探针能够筛选包含目标 cDNA 的克隆。或通过用合成的 PCR 引物经 PCR 扩增所述区能够筛选包含编码本发明多肽中特定区的 DNA 片断的克隆。

当利用以 cDNA 表达载体(例如 λ ZAPII 噬菌体载体)制备的 cDNA 文库时，通过使用抗本发明多肽的抗体经抗原-抗体反应能够筛选所需克隆。当筛选很多克隆时优选使用应用了 PCR 方法的筛选方法。

通过 Maxam-Gilbert 方法(Maxam 等，美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 74, p. 560(1977))或使用噬菌体 M13 的双脱氧核苷酸合成链终止方法(Sanger 等，美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 74, p. 5463-5467(1977))，能够测定这样获得的 DNA 的核苷酸序列。通

过用限制酶等酶切如上所述获得的克隆能够获得编码本发明多肽的基因的全部或部分。

通过下面的方法能够从如上所述得自表达本发明多肽的细胞的基因组 DNA 分离编码本发明多肽的 DNA。

这些细胞优选通过 SDS 或蛋白酶 K 溶解并且通过酚反复萃取将 DNA 脱蛋白。优选用核糖核酸酶消化 RNA。用合适的限制酶对所得 DNA 进行部分消化,获得的 DNA 片段用合适的噬菌体或粘粒扩增以产生文库。含所需序列的克隆通过例如用放射性标记的 DNA 探针检测,编码本发明多肽的基因的全部或部分通过用限制酶等切割这些克隆而获得。

根据常规方法(“用于基因扩增的 PCR 技术-基础和新技术”KYORITSU SHUPPAN, 1992, 等)通过使用已知的编码目的蛋白的 mRNA 或 cDNA 作为模板能经 PCR 制备编码目的蛋白的 DNA。

以编码目的蛋白的核苷酸序列为基础通过常规方法也可以化学合成编码目的蛋白的 DNA。

根据包含常用基因重组技术的常规方法,使用合适的限制酶经上述方法切割编码 AILIM 的 DNA(cDNA 或含有内含子的基因组 DNA)以给出编码 AILIM 的 DNA 片段,然后根据需要,用合适的 DNA 酶等将所得 DNA 片段与接头 DNA 或标记相连,可以制备作为重组蛋白的本发明的 AILIM(特别优选人 AILIM)或其一部分(优选胞外区)。

用相同的方法能制备 AILIM 配体(特别优选人 AILIM 配体)或其一部分(优选胞外区)。

下面详细说明一个具体的例子。即,将上述制备的 DNA 插入载体(下面将详细说明)中,得到表达载体。然后使用该表达载体来转化如下所述宿主细胞以获得转化体。培养该转化体并允许在培养上清液中产生目的蛋白。利用柱层析等能容易地纯化培养上清液中的目的蛋白。

对产生重组 AILIM(或其胞外区)的表达载体的类型没有特别限制,只要该载体在各种宿主例如原核细胞和/或真核细胞中能自我复制并维持或自动产生即可。这样的表达载体包括质粒载体和噬菌体载体(克隆载体:实验手册, Elsevier, 纽约, 1985)。

通过常规方法将编码 AILIM(或其胞外区)的 DNA 与本领域可获得的用于重组的载体(质粒 DNA 和噬菌体 DNA)相连,能够容易制备表达载体。使

用的用于重组的载体的具体例子是得自大肠杆菌的质粒例如 pBR322, pBR325, pUC12, pUC13, 和 pUC19, 得自酵母的质粒例如 pSH19 和 pSH15, 得自枯草芽孢杆菌的质粒, 例如 pUB110, pTP5 和 pC194。噬菌体的例子是细菌噬菌体例如 λ 噬菌体, 和动物或昆虫病毒(pVL1393, Invitrogen)例如逆转录病毒, 痘苗病毒, 和核形多角体病毒。

当要在宿主细胞中表达编码本发明的 AILIM(特别优选人 AILIM)或其可溶性胞外区的 DNA 从而在宿主表面上表达 AILIM, 或要产生 AILIM(特别优选人 AILIM)的可溶性胞外区时, 可使用质粒载体。对这样的质粒载体没有特别限制, 只要载体能表达编码 AILIM(特别优选人 AILIM)或其可溶性胞外区的基因并且在各种宿主细胞例如原核细胞和/或真核细胞中产生编码蛋白即可。例如, 这样的质粒包括 pMAL C2, pcDNA3.1(-), pEF-BOS(核酸研究(Nucleic Acid Research), Vol. 18, p. 5322, 1990; 等), pME18S(“基因工程手册”, 实验药物(Experimental Medicine), 增刊, 1992; 等), 等。

当使用细菌特别是大肠杆菌作为宿主时, 表达载体一般至少由启动子-操纵子区, 起始密码子, 编码目的蛋白的 DNA, 终止密码子, 终止子区和复制子组成。

当使用酵母, 动物细胞或昆虫细胞作为宿主时, 表达载体优选至少由启动子, 起始密码子, 编码本发明的 AILIM(特别优选人 AILIM)或其胞外区的 DNA, 和终止密码子组成。也可以包括编码信号肽的 DNA, 增强子序列, 编码本发明 AILIM 的基因的 5'-和 3'-非翻译区, 剪接连接区, 聚腺苷酸化位点, 选择标记区和复制子。如果需要, 表达载体还可以包含通常使用的用于基因扩增(标记)的基因。

在细菌中表达本发明的 AILIM(特别优选人 AILIM)或其胞外区的启动子-操纵子区包括启动子, 操纵子和 Shine-Dalgarno(SD)序列(例如 AAGG)。例如, 当宿主是埃希氏菌时, 其优选包括 Trp 启动子, lac 启动子, recA 启动子, λ PL 启动子, lpp 启动子, tac 启动子等等。

在酵母中表达本发明的 AILIM(特别优选人 AILIM)或其胞外区的启动子的例子是 PH05 启动子, PGK 启动子, GAP 启动子, ADH 启动子等等。当宿主是芽孢杆菌时, 其例子是 SL01 启动子, SP02 启动子, penP 启动子等等。

当宿主是真核细胞例如哺乳动物细胞时, 其例子是 SV40-衍生的启动

子, 逆转录病毒启动子, 热休克启动子等等。当然, 启动子不局限于上面的例子。另外, 使用增强子对于表达是有效的。

优选的起始密码子是例如甲硫氨酸密码子(ATG)。

通常使用的终止密码子(例如, TAG, TGA, TAA 等)可作为终止密码子的例子。

使用常用的天然或合成终止子作为终止子区。

复制子指能在宿主细胞中复制整个 DNA 序列的 DNA, 包括天然质粒, 人工修饰的质粒(从天然质粒制备的 DNA 片段), 合成质粒等等。优选的质粒的例子是用于大肠杆菌的 pBR322 或其人工衍生物(通过用合适的限制酶处理 pBR322 获得的 DNA 片段), 用于酵母的酵母 2 μ 质粒或酵母染色体 DNA, 用于哺乳动物细胞的 pRSVneo ATCC37198, pSV2dhfr ATCC37145, pdBPV-MMTneo ATCC37224, pSV2neo ATCC37149, pSV2bsr 等等。

也可以使用本领域通常使用的增强子序列, 聚腺苷酸化位点和剪接连接区, 例如从 SV40 衍生的那些。

可以根据常规方法使用通常使用的选择标记。其例子是针对抗生素的抗药性基因, 例如四环素, 氨苄青霉素或卡那霉素抗药性基因, 和胸苷激酶基因。

用于基因扩增的基因的例子是二氢叶酸还原酶(DHFR)基因, 胸苷激酶基因, 新霉素抗药性基因, 谷氨酰胺合酶基因, 腺苷脱氨酶基因, 鸟氨酸脱羧酶基因, 潮霉素-B-磷酸转移酶基因, 天冬氨酸转氨甲酰酶基因等等。

通过将至少上面提到的启动子, 起始密码子, 编码本发明蛋白的 DNA, 终止密码子和终止子区与合适的复制子依次环状连接, 能够制备本发明的表达载体。如果需要, 可通过常规方法例如用限制酶消化或用 T4 DNA 连接酶连接而使用合适的 DNA 片段(例如接头, 用其它限制酶产生的限制性酶切位点)。

通过将上述表达载体导入宿主细胞中能制备本发明的转化体。

本发明中使用的宿主细胞没有限制, 只要与上述表达载体相容并且能够被转化。其例子是本发明技术领域通常使用的各种细胞例如天然细胞或人工建立的重组细胞(例如细菌(埃希氏菌属或芽孢杆菌属), 酵母(糖酵母属, 毕赤氏酵母属等), 动物细胞或昆虫细胞)。

优选使用大肠杆菌或动物细胞。具体的例子是大肠杆菌(DH5 α ,

DH10B, TB1, HB101, XL-2Blue, 等), 来自小鼠的细胞(COP, L, C127, Sp2/0, NS-1, NIH3T3, 等), 来自大鼠的细胞, 来自仓鼠的细胞(BHK, CHO, 等), 来自猴的细胞(COS1, COS3, COS7, CV1, Velo 等), 和来自人的细胞(Hela, 二倍体成纤维细胞衍生的细胞, 骨髓瘤细胞, Namalwa 等)。

通过已知方法能将表达载体导入(转化/转导至)宿主细胞中。

根据例如下面的方法能进行转化:当宿主是细菌(大肠杆菌, 枯草芽孢杆菌等)时, Cohen 等的方法(美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69 卷, p. 2110(1972)), 原生质体方法(分子基因遗传学(Mol. Gen. Genet.), 168 卷, p. 111(1979)), 或感受态方法(分子生物学杂志(J. Mol. Biol.), 56 卷, p. 209(1971)); 当宿主是啤酒糖酵母时, Hinnen 等的方法(美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75 卷, p.1927(1978)), 或锂方法(J. Bacteriol. 153 卷, p. 163(1983)); 当宿主是动物细胞时, Graham 的方法(病毒学(Virology), 52 卷, p. 456(1973)); 当宿主是昆虫细胞时, Summers 等的方法(分子细胞生物学(Mol. Cell. Biol.), 3 卷, pp. 2156-2165(1983))。

通过在营养培养基中培养包含上述制备的表达载体的转化体(下文中该术语包括转导体)能够产生本发明 AILIM(特别优选人 AILIM)的胞外区。用相同方法能产生 AILIM 配体。

营养培养基优选包括宿主细胞(转化体)生长必需的碳源, 无机氮源, 或有机氮源。碳源的例子是葡萄糖, 葡聚糖, 可溶性淀粉和蔗糖, 无机或有机氮源的例子是铵盐, 硝酸盐, 氨基酸, 玉米浆, 蛋白胨, 酪蛋白水解物, 肉提取物, 大豆饼和马铃薯提取物。如果需要, 它们可以含有其它营养物(例如无机盐(例如氯化钙, 磷酸二氢钠和氯化镁), 维生素, 抗生素(例如四环素, 新霉素, 氨苄青霉素, 卡那霉素等))。

通过本领域公知的方法进行培养。适当选择培养条件例如温度, 培养基的 pH, 和培养时间, 使得超量产生本发明的蛋白质。

下面详细说明根据宿主细胞使用的具体培养基和培养条件。

当宿主是细菌, 放线菌, 酵母, 丝状真菌时, 包括上述营养源的液体培养基是合适的。优选使用 pH5-8 的培养基。

当宿主是大肠杆菌时, 优选的培养基的例子是 LB 培养基, M9 培养基(Miller 等, 实验分子遗传学(Exp. Mol. Genet.), 冷泉港实验室, p. 431(1972)), YT 培养基等。使用这些培养基, 通常在 14°C - 43°C 下培养约 3-24 小时,

如果需要, 通气并搅拌。

当宿主是芽孢杆菌时, 通常在 30℃ - 40℃ 下培养约 16-96 小时, 如果需要, 通气并搅拌。

当宿主是酵母时, 培养基的例子是 Burlholder 基本培养基(Bostian, 美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77 卷, p. 4505, 1980)。pH 优选为 5-8。通常在 20℃ - 35℃ 下培养约 14-144 小时, 如果需要, 通气并搅拌。

当宿主是动物细胞时, 培养基的例子是含有 5-20% 胎牛血清的 MEM 培养基(科学(Science), 122 卷, p. 501(1952)), DMEM 培养基(病毒学(Virology), 8 卷, p. 396(1959)), RPMI1640 培养基(美国药物学会杂志(J. Am. Med. Assoc.), 199 卷, p. 519(1967)), 199 培养基(Proc. Soc. Exp. Biol. Med. , 73 卷, p. 1(1950)), HamF12 培养基等。培养基的 pH 优选是约 6-8。通常在约 30℃ - 40℃ 下培养约 15-72 小时, 如果需要, 通气并搅拌。

当宿主是昆虫细胞时, 培养基的例子是含有胎牛血清的 Grace's 培养基(美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 82 卷, p. 8404, 1985)。其 pH 优选是约 5-8。通常在约 20℃ - 40℃ 下培养约 15-100 小时, 如果需要, 通气并搅拌。

通过培养上述转化的细胞(特别是动物细胞或大肠杆菌)并且使之分泌蛋白质到培养上清液中, 能产生本发明的 AILIM(特别优选人 AILIM)的胞外区(可溶性 AILIM)。即, 通过例如将所得培养物过滤或离心可获得培养物滤液(上清液), 并且通过常用于纯化和分离天然或合成蛋白的方法从培养物滤液纯化和分离本发明的多肽或多肽片段。

分离和纯化方法的例子是利用特异性亲和力的方法, 例如亲和层析, 利用溶解度的方法, 例如盐析和溶剂沉淀方法, 利用分子量差异的方法, 例如透析, 超滤, 凝胶过滤和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 利用电荷的方法, 例如离子交换层析和羧基磷灰石层析, 利用疏水性差异的方法, 例如反相高效液相色谱, 和利用等电点差异的方法, 例如等电聚焦。

当培养的转化体的周质或胞质中存在目的蛋白时, 首先通过常规方法例如过滤或离心收集真菌菌体或细胞并且悬浮于合适的缓冲液中。通过例如超声溶解, 溶菌酶, 和冻融等方法破坏细胞的细胞壁和/或细胞膜之后, 通过例如离心或过滤的方法获得含有本发明多肽的膜级分。这样的膜级分

用去污剂例如 Triton-X100 溶解获得粗提取物。最后,通过如上述常规方法从该粗提取物分离并纯化所述多肽或多肽片段。

在本发明中,术语“不溶性载体”指用来通过物理吸附或化学连接将多肽固定于其上的载体。例如,所述载体可以是(1)平板,试管,管,或具有内部空间的类似物,小珠,球,滤膜,膜,或由水不溶性材料包括塑料例如聚苯乙烯树脂,聚碳酸酯树脂,有机硅树脂或尼龙树脂,或玻璃制成的物件,和(2)亲和层析中使用的不溶性载体,例如纤维素载体,琼脂糖载体,聚丙烯酰胺载体,葡聚糖树脂,聚苯乙烯载体,聚乙烯醇载体,聚氨基酸载体,多孔硅树脂载体等。

本发明的“能给出可检测信号的标记物质”包括,例如,酶,荧光材料,发光材料,生物素,抗生物素蛋白或放射性同位素,更具体地说,酶例如过氧化物酶(例如辣根过氧化物酶),碱性磷酸酶, β -D-半乳糖苷酶,葡萄糖氧化酶,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,乙醇脱氢酶,苹果酸脱氢酶,青霉素酶,过氧化氢酶,脱-葡萄糖氧化酶,脲酶,萤光素酶,乙酰胆碱酯酶等;荧光材料例如异硫氰酸荧光素,藻胆蛋白,稀土金属螯合剂,丹磺酰氯,异硫氰酸四甲基罗丹明等;放射性同位素例如 ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I 等;生物素,抗生物素蛋白和发光材料。

其中,放射性同位素或荧光材料甚至单独使用时都能给出可检测信号。另一方面,当单独使用时,酶,发光材料,生物素或抗生物素蛋白不提供可检测信号,但是当使其与一种或多种物质反应时,其能提供可检测信号。例如,当标记是一种酶时,检测时必需有至少一种底物。根据用于测定酶活性的方法的类型(比色法,荧光检查,利用生物发光或化学发光的方法等)可以使用不同类型的底物。例如,当标记是过氧化物酶时,可以使用过氧化氢作为底物。或,当标记是生物素时,通常使用抗生物素蛋白或酶-修饰的抗生物素蛋白,但是不局限于此。根据需要,可按所使用的底物的类型使用各种发光物质。

本发明中可以使用任何上述标记。但是,考虑到检测或测试的灵敏度以及操作的方便,优选的标记是酶,例如过氧化物酶或生物素。

根据本发明的“用于鉴定能结合 AILIM 或 AILIM 配体的物质的方法”建立在免疫测定的原理上。

具体地说,可以利用“免疫测定”(第三版,编著, Eiji Ishikawa 等,

Igakushoin, 1987)中描述的各种方法的原理。

优选利用的原理有固相-一抗体方法, 液相两抗体方法, 固相两抗体方法, 夹心方法和一锅法(one-pot), 如描述于审查公开的日本专利申请(JP-B)平 2-39747。此外, 利用抗原-抗体反应的测定方法有 EMIT 法(酶放大免疫测定技术), 酶通道免疫分析, 酶调节剂介导的酶免疫分析(EMMIA), 酶抑制剂免疫分析, 免疫酶计量(immunoenzymometric)测定, 酶增强的免疫分析和近侧键合的免疫分析定。

在本发明中, 根据目的可以适当选择所述免疫分析原理的任何一个。但是, 要考虑程序的方便和/或经济利益, 特别是临床通用性, 优选利用夹心方法, 一锅法, 或固相一抗体方法, 更优选夹心方法或一锅法。特别优选的是利用有很多孔的多孔微量滴定板例如 96 孔微滴培养板的夹心法, 或利用固定有多肽的小珠并使用经酶例如过氧化物酶或经生物素标记的配对物的一锅法。

附图简述

图 1 给出利用流式细胞仪通过细胞 ELISA 分析的抗-人 IgG 抗体, 抗-人 Igκ抗体, 和抗-人 IgFc 抗体对人抗-人 AILIM 单克隆抗体的各自反应性。

(a)-(l)组分别给出了下述测定的各自结果。

(a) 组:在不存在一抗的情况下向已经平铺了野生型 HPB-ALL 细胞的微量培养板加入作为二抗的生物素-标记的抗-人 IgG 抗体的测定结果。

(b) 组:在不存在一抗的情况下向已经平铺了野生型 HPB-ALL 细胞的微量培养板加入作为二抗的生物素-标记的抗-人 Igκ抗体的测定结果。

(c) 组:在不存在一抗的情况下向已经平铺了野生型 HPB-ALL 细胞的微量培养板加入作为二抗的生物素-标记的抗-人 IgFc 抗体的测定结果。

(d) 组:人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab-136 用作一抗并且生物素-标记的抗-人 IgG 抗体用作二抗的测定结果。

(e) 组:人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab-136 用作一抗并且生物素-标记的抗-人 Igκ抗体用作二抗的测定结果。

(f) 组:人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab-136 用作一抗并且生物素-标记的抗-人 IgFc 抗体用作二抗的测定结果。

(g) 组:人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab-138 用作一抗并且生物素-标记的抗-人 IgG 抗体用作二抗的测定结果。

(h) 组:人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab-138 用作一抗并且生物素-标记的抗-人 Igk 抗体用作二抗的测定结果。

(i) 组:人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab-138 用作一抗并且生物素-标记的抗-人 IgFc 抗体用作二抗的测定结果。

(j) 组:人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab-139 用作一抗并且生物素-标记的抗-人 IgG 抗体用作二抗的测定结果。

(k) 组:人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab-139 用作一抗并且生物素-标记的抗-人 Igk 抗体用作二抗的测定结果。

(l) 组:人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab-139 用作一抗并且生物素-标记的抗-人 IgFc 抗体用作二抗的测定结果。

各组中带有空心符号的曲线对应于用人抗-KLH 单克隆抗体作为对照抗体的测定结果。

图 2 给出用抗-人 IgG 抗体经夹心 ELISA 测定的人 IgG 单克隆抗体(标准品)的标准曲线。

纵轴指示荧光强度,横轴指示标准品的浓度。

图 3 给出各种小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体对人 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞或野生型 CHO 细胞的结合活性。

纵轴指示作为与重组细胞的结合活性指数的荧光强度,横轴指示加入的抗体的浓度。

该图中术语“CHO”指对野生型 CHO 细胞的结合测定的结果,“人”指对人 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞的结合测定的结果。

图 4 给出各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体或作为阴性对照的人抗-KLH 单克隆抗体对人 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞或野生型 CHO 细胞的结合活性。

纵轴指示作为与重组细胞的结合活性指数的荧光强度,横轴指示加入的抗体的浓度。

该图中术语“CHO”指对野生型 CHO 细胞的结合测定结果,“人”指对人 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞的结合测定结果。

图 5 给出各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体对人 AILIM-过表达型重组

CHO 细胞或野生型 CHO 细胞的结合活性。

纵轴指示作为与重组细胞的结合活性指数的荧光强度，横轴指示加入的抗体的浓度。

该图中术语“CHO”指对野生型 CHO 细胞的结合测定结果，“人”指对人 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞的结合测定结果。

图 6 给出各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体对人 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞或野生型 CHO 细胞的结合活性。

纵轴指示作为与重组细胞的结合活性指数的荧光强度，横轴指示加入的抗体的浓度。

该图中术语“CHO”指对野生型 CHO 细胞的结合测定结果，“人”指对人 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞的结合测定结果。

图 7 给出大鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体对小鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞或野生型 CHO 细胞的结合活性。

纵轴指示作为与重组细胞的结合活性指数的荧光强度，横轴指示加入的抗体的浓度。

该图中术语“CHO”指对野生型 CHO 细胞的结合测定结果，“小鼠”指对小鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞的结合测定结果。

图 8 给出各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体或作为阴性对照的人抗-KLG 单克隆抗体对小鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞或野生型 CHO 细胞的结合活性。

纵轴指示作为与重组细胞的结合活性指数的荧光强度，横轴指示加入的抗体的浓度。

该图中术语“CHO”指对野生型 CHO 细胞的结合测定结果，“小鼠”指对小鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞的结合测定结果。

图 9 给出各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体对小鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞或野生型 CHO 细胞的结合活性。

纵轴指示作为与重组细胞的结合活性指数的荧光强度，横轴指示加入的抗体的浓度。

该图中术语“CHO”指对野生型 CHO 细胞的结合测定结果，“小鼠”指对小鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞的结合测定结果。

图 10 给出各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体对小鼠 AILIM-过表达型重组

CHO 细胞或野生型 CHO 细胞的结合活性。

纵轴指示作为与重组细胞的结合活性指数的荧光强度，横轴指示加入的抗体的浓度。

该图中术语“CHO”指对野生型 CHO 细胞的结合测定结果，“小鼠”指对小鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞的结合测定结果。

图 11 给出各种小鼠抗-大鼠 AILIM 单克隆抗体对大鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞或野生型 CHO 细胞的结合活性。

纵轴指示作为与重组细胞的结合活性指数的荧光强度，横轴指示加入的抗体的浓度。

该图中术语“CHO”指对野生型 CHO 细胞的结合测定结果，“大鼠”指对大鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞的结合测定结果。

图 12 给出各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体或作为阴性对照的人抗-KLG 单克隆抗体对大鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞或野生型 CHO 细胞的结合活性。

纵轴指示作为与重组细胞的结合活性指数的荧光强度，横轴指示加入的抗体的浓度。

该图中术语“CHO”指对野生型 CHO 细胞的结合测定结果，“大鼠”指对大鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞的结合测定结果。

图 13 给出各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体对大鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞或野生型 CHO 细胞的结合活性。

纵轴指示作为与重组细胞的结合活性指数的荧光强度，横轴指示加入的抗体的浓度。

该图中术语“CHO”指对野生型 CHO 细胞的结合测定结果，“大鼠”指对大鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞的结合测定结果。

图 14 给出各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体对大鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞或野生型 CHO 细胞的结合活性。

纵轴指示作为与重组细胞的结合活性指数的荧光强度，横轴指示加入的抗体的浓度。

该图中术语“CHO”指对野生型 CHO 细胞的结合测定结果，“大鼠”指对大鼠 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞的结合测定结果。

图 15 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体一

起包被的微量培养板分析各种小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时, 正常健康“供者 A”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

图 16 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时, 正常健康“供者 A”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

图 17 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时, 正常健康“供者 B”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中, “JHC1”指其中抗-人 CETP 单克隆抗体用作阴性对照代替小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

图 18 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时, 正常健康“供者 B”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中, “抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

图 19 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时, 正常健康“供者 B”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中, “抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

图 20 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体一

起包被的微量培养板分析各种小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时, 正常健康“供者 C”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中, “JHC1”指其中抗-人 CETP 单克隆抗体用作阴性对照代替小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

图 21 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时, 正常健康“供者 C”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中, “抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下:

“124”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab124。

“126”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab126。

“127”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab127。

图 22 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时, 正常健康“供者 C”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中, “抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下:

“128”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab128。

“135”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab135。

“136”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

图 23 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时, 正常健康“供者 C”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下:

“137”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab137。

“138”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab138。

“139”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab139。

图 24 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时,正常健康“供者 C”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下:

“140”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab140。

“141”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab141。

图 25 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时,正常健康“供者 D”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“JHC1”指其中抗人 CETP 单克隆抗体用作阴性对照代替小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

图 26 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时,正常健康“供者 D”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替

人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下：

“124”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab124。

“126”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab126。

“127”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab127。

图 27 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时，正常健康“供者 D”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量，横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中，“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下：

“128”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab128。

“135”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab135。

“136”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

图 28 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时，正常健康“供者 D”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量，横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中，“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下：

“137”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab137。

“138”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab138。

“139”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab139。

图 29 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时，正常健康“供者 D”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量，横轴指示人

抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下:

“140”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab140。

“141”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab141。

图 30 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时,正常健康“供者 E”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“JHC1”指其中抗人 CETP 单克隆抗体用作阴性对照代替小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

图 31 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时,正常健康“供者 E”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下:

“124”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab124。

“126”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab126。

“127”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab127。

图 32 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时,正常健康“供者 E”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下:

“128”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab128。

“135”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab135。

“136”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

图 33 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时, 正常健康“供者 E”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中, “抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下:

“137”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab137。

“138”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab138。

“139”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab139。

图 34 给出用抗-人 CD3 单克隆抗体和人抗-人 AILIM 单克隆抗体一起包被的微量培养板分析各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时, 正常健康“供者 E”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中, “抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下:

“140”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab140。

“141”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab141。

图 35 给出当单独向用抗-人 CD3 单克隆抗体包被的微量培养板加入小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体(于液相中)的溶液时, 对各种小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性的测定中正常健康“供者 D”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“JHC1”指其中抗人 CETP 单克隆抗体用作阴性对照代替小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

图 36 给出当单独向用抗-人 CD3 单克隆抗体包被的微量培养板加入人抗-人 AILIM 单克隆抗体(于液相中)的溶液时,对各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性的测定中正常健康“供者 D”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下:

“124”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab124。

“125”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab125。

“126”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab126。

图 37 给出当单独向用抗-人 CD3 单克隆抗体包被的微量培养板加入人抗-人 AILIM 单克隆抗体(于液相中)的溶液时,对各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性的测定中正常健康“供者 D”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下:

“128”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab128。

“135”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab135。

“136”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

图 38 给出当单独向用抗-人 CD3 单克隆抗体包被的微量培养板加入人抗-人 AILIM 单克隆抗体(于液相中)的溶液时,对各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性的测定中正常健康“供者 D”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示人

抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中，“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下：

“137”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab137。

“138”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab138。

“139”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab139。

图 39 给出当单独向用抗-人 CD3 单克隆抗体包被的微量培养板加入人抗-人 AILIM 单克隆抗体(于液相中)的溶液时，对各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性的测定中正常健康“供者 D”的 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷的细胞掺入的量，横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中，“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下：

“140”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab140。

“141”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab141。

图 40 给出在用小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体和抗-人 CD3 单克隆抗体一起包被的微量培养板中培养的来自正常健康“供者 B”的 T 细胞的培养上清液中产生的 IFN- γ 的量。

纵轴指示 IFN- γ 的浓度，横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中，“JHC1”指其中抗-人 CETP 单克隆抗体用作阴性对照代替小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

图 41 给出在用人抗-人 AILIM 单克隆抗体和抗-人 CD3 单克隆抗体一起包被的微量培养板中培养的来自正常健康“供者 B”的 T 细胞的培养上清液中产生的 IFN- γ 的量。

纵轴指示 IFN- γ 的浓度，横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中，“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替

人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

图 42 给出在用人抗-人 AILIM 单克隆抗体和抗-人 CD3 单克隆抗体一起包被的微量培养板中培养的来自正常健康“供者 B”的 T 细胞的培养上清液中产生的 IFN- γ 的量。

纵轴指示 IFN- γ 的浓度，横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中，“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

图 43 给出在用小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体和抗-人 CD3 单克隆抗体一起包被的微量培养板中培养的来自正常健康“供者 C”的 T 细胞的培养上清液中产生的 IFN- γ 的量。

纵轴指示 IFN- γ 的浓度，横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中，“JHC1”指其中抗-人 CETP 单克隆抗体用作阴性对照代替小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

图 44 给出在用人抗-人 AILIM 单克隆抗体和抗-人 CD3 单克隆抗体一起包被的微量培养板中培养的来自正常健康“供者 C”的 T 细胞的培养上清液中产生的 IFN- γ 的量。

纵轴指示 IFN- γ 的浓度，横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中，“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下：

“124”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab124。

“125”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab125。

“126”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab126。

图 45 给出在用人抗-人 AILIM 单克隆抗体和抗-人 CD3 单克隆抗体一起包被的微量培养板中培养的来自正常健康“供者 C”的 T 细胞的培养上清液中产生的 IFN- γ 的量。

纵轴指示 IFN- γ 的浓度，横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下:

“128”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab128。

“135”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab135。

“136”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

图 46 给出在用人抗-人 AILIM 单克隆抗体和抗-人 CD3 单克隆抗体一起包被的微量培养板中培养的来自正常健康“供者 C”的 T 细胞的培养上清液中产生的 IFN- γ 的量。

纵轴指示 IFN- γ 的浓度,横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下:

“137”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab137。

“138”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab138。

“139”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab139。

图 47 给出在用人抗-人 AILIM 单克隆抗体和抗-人 CD3 单克隆抗体一起包被的微量培养板中培养的来自正常健康“供者 C”的 T 细胞的培养上清液中产生的 IFN- γ 的量。

纵轴指示 IFN- γ 的浓度,横轴指示小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

其它注释如下:

“140”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab140。

“141”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab141。

图 48 给出在通过混合淋巴细胞反应(MLR)检验 T 细胞增殖的试验中,各种试验样品在正常健康“供者 A”的 T 细胞与正常健康“供者 D”的 PBMC 共同培养的情况下对 T 细胞增殖的抑制作用。

纵轴是能指示细胞增殖程度的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入量,横轴指示试验样品的浓

度。

附图中的各说明如下。

“CD80 + 86”：抗-CD80 抗体和抗-CD86 抗体的混合物

“mIgG1”：抗-人 CD34/IgG1 小鼠单克隆抗体

“CTLA4-Ig”：人 CTLA4-IgFc 嵌合分子

“SA12”：抗-人 AILIM 小鼠单克隆抗体。

图 49 给出在通过混合淋巴细胞反应(MLR)检验 T 细胞增殖的试验中，各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体在正常健康“供者 A”的 T 细胞与正常健康“供者 D”的 PBMC 共培养的情况下对 T 细胞增殖的抑制作用。

纵轴为指示细胞增殖程度的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入量，横轴指示试验样品的浓度。

其它注释如下：

“抗-KLH”：作为阴性对照的人抗-KLH 单克隆抗体。

“JMab-124”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab124。

“126”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab126。

“127”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab127。

“128”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab128。

“135”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab135。

“136”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

“137”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab137。

图 50 给出在通过混合淋巴细胞反应(MLR)检验 T 细胞增殖的试验中，各种试验样品在正常健康“供者 D”的 T 细胞与正常健康“供者 B”的 PBMC 共培养的情况下对 T 细胞增殖的抑制作用。

纵轴为指示细胞增殖程度的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入量，横轴指示试验样品的浓度。

附图中的各说明如下。

“CD80 + 86”：抗-CD80 抗体和抗-CD86 抗体的混合物

“mIgG1”：抗-人 CD34/IgG1 小鼠单克隆抗体

“CTLA4-Ig”：人 CTLA4-IgFc 嵌合分子

“SA12”：抗-人 AILIM 小鼠单克隆抗体。

图 51 给出在通过混合淋巴细胞反应(MLR)检验 T 细胞增殖的试验中，

各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体在正常健康“供者 D”的 T 细胞与正常健康“供者 B”的 PBMC 共培养的情况下对 T 细胞增殖的抑制作用。

纵轴为指示细胞增殖程度的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入量，横轴指示试验样品的浓度。

其它注释如下：

“抗-KLH”：作为阴性对照的人抗-KLH 单克隆抗体。

“JMab-124”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab124。

“126”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab126。

“127”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab127。

“128”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab128。

“135”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab135。

“136”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

“137”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab137。

图 52 给出在通过混合淋巴细胞反应(MLR)检验 T 细胞增殖的试验中，各种试验样品在正常健康“供者 C”的 T 细胞与正常健康“供者 A”的 PBMC 共培养的情况下对 T 细胞增殖的抑制作用。

纵轴为指示细胞增殖程度的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入量，横轴指示试验样品的浓度。

附图中的各说明如下。

“CD80 + 86”：抗-CD80 抗体和抗-CD86 抗体的混合物

“mIgG1”：抗-人 CD34/IgG1 小鼠单克隆抗体

“CTLA4-Ig”：人 CTLA4-IgFc 嵌合分子

“SA12”：抗-人 AILIM 小鼠单克隆抗体。

图 53 给出在通过混合淋巴细胞反应(MLR)检验 T 细胞增殖的试验中，各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体在正常健康“供者 C”的 T 细胞与正常健康“供者 A”的 PBMC 共培养的情况下对 T 细胞增殖的抑制作用。

纵轴为指示细胞增殖程度的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入量，横轴指示试验样品的浓度。

其它注释如下：

“抗-KLH”：作为阴性对照的人抗-KLH 单克隆抗体。

“JMab-124”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab124。

“126”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab126。

“127”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab127。

“128”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab128。

“135”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab135。

“136”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

“137”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab137。

图 54 给出在通过混合淋巴细胞反应(MLR)检验 T 细胞增殖的试验中，各种试验样品在正常健康“供者 E”的 T 细胞与正常健康“供者 G”的 PBMC 共培养的情况下对 T 细胞增殖的抑制作用。

纵轴为指示细胞增殖程度的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入量，横轴指示试验样品的浓度。

附图中的各说明如下。

“对照 mIgG”：抗-人 CD34/IgG1 小鼠单克隆抗体

“CD80 + 86Ab”：抗-CD80 抗体和抗-CD86 抗体的混合物

“SA12”：抗-人 AILIM 小鼠单克隆抗体

“CTLA4-Ig”：人 CTLA4-IgFc 嵌合分子。

图 55 给出在通过混合淋巴细胞反应(MLR)检验 T 细胞增殖的试验中，各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体在正常健康“供者 E”的 T 细胞与正常健康“供者 G”的 PBMC 共培养的情况下对 T 细胞增殖的抑制作用。

纵轴为指示细胞增殖程度的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入量，横轴指示试验样品的浓度。

其它注释如下：

“抗-KLH”：作为阴性对照的人抗-KLH 单克隆抗体。

“JMab-136”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

“138”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab138。

“139”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab139。

“140”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab140。

“141”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab141。

图 56 给出在通过混合淋巴细胞反应(MLR)检验 T 细胞增殖的试验中，各种试验样品在正常健康“供者 F”的 T 细胞与正常健康“供者 E”的 PBMC 共培养的情况下对 T 细胞增殖的抑制作用。

纵轴为指示细胞增殖程度的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入量,横轴指示试验样品的浓度。

附图中的各说明如下。

“对照 mIgG”: 抗-人 CD34/IgG1 小鼠单克隆抗体

“CD80 + 86Ab”: 抗-CD80 抗体和抗-CD86 抗体的混合物

“SA12”: 抗-人 AILIM 小鼠单克隆抗体

“CTLA4-Ig”: 人 CTLA4-IgFc 嵌合分子。

图 57 给出在通过混合淋巴细胞反应(MLR)检验 T 细胞增殖的试验中,各种试验样品在正常健康“供者 F”的 T 细胞与正常健康“供者 E”的 PBMC 共培养的情况下对 T 细胞增殖的抑制作用。

纵轴为指示细胞增殖程度的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入量,横轴指示试验样品的浓度。

附图中各说明如下:

“抗-KLH”:作为阴性对照的人抗-KLH 单克隆抗体。

“JMab-136”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

“138”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab138。

“139”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab139。

“140”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab140。

“141”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab141。

图 58 给出在通过混合淋巴细胞反应(MLR)检验 T 细胞增殖的试验中,各种试验样品在正常健康“供者 G”的 T 细胞与正常健康“供者 F”的 PBMC 共培养的情况下对 T 细胞增殖的抑制作用。

纵轴为指示细胞增殖程度的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入量,横轴指示试验样品的浓度。

附图中的各说明如下。

“对照 mIgG”: 抗-人 CD34/IgG1 小鼠单克隆抗体

“CD80 + 86Ab”: 抗-CD80 抗体和抗-CD86 抗体的混合物

“SA12”: 抗-人 AILIM 小鼠单克隆抗体

“CTLA4-Ig”: 人 CTLA4-IgFc 嵌合分子。

图 59 给出在通过混合淋巴细胞反应(MLR)检验 T 细胞增殖的试验中,各种试验样品在正常健康“供者 G”的 T 细胞与正常健康“供者 F”的 PBMC

共培养的情况下对 T 细胞增殖的抑制作用。

纵轴为指示细胞增殖程度的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入量，横轴指示试验样品的浓度。

附图中各说明如下：

“抗-KLH”：作为阴性对照的人抗-KLH 单克隆抗体。

“JMab-136”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

“138”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab138。

“139”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab139。

“140”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab140。

“141”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab141。

图 60 给出在使用混合淋巴细胞反应(MLR)的测试中，各种对照试验物质对 T 细胞增殖的抑制作用。来自正常健康“供者 A”的 T 细胞与来自正常健康“供者 D”的已在人 CTLA4-Ig 嵌合分子存在下预培养的 PBMC 共同培养。

纵轴为指示细胞增殖程度的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞量，横轴指示试验物质的浓度。

附图中的各说明如下。

“CD80 + 86”：抗-CD80 抗体和抗-CD86 抗体的混合物

“mIgG1”：抗-人 CD34/IgG1 小鼠单克隆抗体

“SA12”：抗-人 AILIM 小鼠单克隆抗体。

图 61 给出在使用混合淋巴细胞反应(MLR)的测试中，各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体对 T 细胞增殖的抑制作用。来自正常健康“供者 A”的 T 细胞与来自正常健康“供者 D”的已在人 CTLA4-Ig 嵌合分子存在下预培养的 PBMC 共同培养。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量，横轴指示试验物质的浓度。

其它注释如下：

“抗-KLH”：作为阴性对照的人抗-KLH 单克隆抗体。

“JMab-124”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab124。

“126”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab126。

“127”：人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab127。

“128”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab128。

“135”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab135。

“136”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

“137”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab137。

图 62 给出在使用混合淋巴细胞反应(MLR)的测试中, 各种对照试验物质对 T 细胞增殖的抑制作用。来自正常健康“供者 D”的 T 细胞与来自正常健康“供者 B”的已在人 CTLA4-Ig 嵌合分子存在下预培养的 PBMC 共同培养。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示试验物质的浓度。

附图中的各说明如下。

“CD80 + 86”: 抗-CD80 抗体和抗-CD86 抗体的混合物

“mIgG1”: 抗-人 CD34/IgG1 小鼠单克隆抗体

“SA12”: 抗-人 AILIM 小鼠单克隆抗体。

图 63 给出在使用混合淋巴细胞反应(MLR)的测试中, 各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体对 T 细胞增殖的抑制作用。来自正常健康“供者 D”的 T 细胞与来自正常健康“供者 B”的已在人 CTLA4-Ig 嵌合分子存在下预培养的 PBMC 共同培养。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示试验物质的浓度。

其它注释如下:

“抗-KLH”: 作为阴性对照的人抗-KLH 单克隆抗体。

“JMab-124”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab124。

“126”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab126。

“127”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab127。

“128”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab128。

“135”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab135。

“136”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

“137”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab137。

图 64 给出在使用混合淋巴细胞反应(MLR)的测试中, 各种对照试验物质对 T 细胞增殖的抑制作用。来自正常健康“供者 C”的 T 细胞与来自正

常健康“供者 A”的已在人 CTLA4-Ig 嵌合分子存在下预培养的 PBMC 共同培养。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示试验物质的浓度。

附图中的各说明如下。

“CD80 + 86”: 抗-CD80 抗体和抗-CD86 抗体的混合物

“mIgG1”: 抗-人 CD34/IgG1 小鼠单克隆抗体

“SA12”: 抗-人 AILIM 小鼠单克隆抗体。

图 65 给出在使用混合淋巴细胞反应(MLR)的测试中,各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体对 T 细胞增殖的抑制作用。来自正常健康“供者 C”的 T 细胞与来自正常健康“供者 A”的已在人 CTLA4-Ig 嵌合分子存在下预培养的 PBMC 共同培养。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示试验物质的浓度。

其它注释如下:

“抗-KLH”:作为阴性对照的人抗-KLH 单克隆抗体。

“JMab-124”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab124。

“126”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab126。

“127”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab127。

“128”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab128。

“135”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab135。

“136”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

“137”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab137。

图 66 给出在使用混合淋巴细胞反应(MLR)的测试中,各种对照试验物质对 T 细胞增殖的抑制作用。来自正常健康“供者 E”的 T 细胞与来自正常健康“供者 G”的已在人 CTLA4-Ig 嵌合分子存在下预培养的 PBMC 共同培养。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示试验物质的浓度。

附图中的各说明如下。

“对照 mIgG”: 抗-人 CD34/IgG1 小鼠单克隆抗体

“CD80 + 86Ab”: 抗-CD80 抗体和抗-CD86 抗体的混合物

“SA12”: 抗-人 AILIM 小鼠单克隆抗体。

图 67 给出在使用混合淋巴细胞反应(MLR)的测试中, 各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体对 T 细胞增殖的抑制作用。来自正常健康“供者 E”的 T 细胞与来自正常健康“供者 G”的已在人 CTLA4-Ig 嵌合分子存在下预培养的 PBMC 共同培养。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示试验物质的浓度。

其它注释如下:

“抗-KLH”: 作为阴性对照的人抗-KLH 单克隆抗体。

“JMab-136”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

“138”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab138。

“139”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab139。

“140”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab140。

“141”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab141。

图 68 给出在使用混合淋巴细胞反应(MLR)的测试中, 各种对照试验物质对 T 细胞增殖的抑制作用。来自正常健康“供者 G”的 T 细胞与来自正常健康“供者 F”的已在人 CTLA4-Ig 嵌合分子存在下预培养的 PBMC 共同培养。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示试验物质的浓度。

附图中的各说明如下。

“对照 mIgG”: 抗-人 CD34/IgG1 小鼠单克隆抗体

“CD80 + 86Ab”: 抗-CD80 抗体和抗-CD86 抗体的混合物

“SA12”: 抗-人 AILIM 小鼠单克隆抗体。

图 69 给出在使用混合淋巴细胞反应(MLR)的测试中, 各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体对 T 细胞增殖的抑制作用。来自正常健康“供者 G”的 T 细胞与来自正常健康“供者 F”的已在人 CTLA4-Ig 嵌合分子存在下预培养的 PBMC 共同培养。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量, 横轴指示试验物质的浓度。

其它注释如下:

“抗-KLH”:作为阴性对照的人抗-KLH 单克隆抗体。

“JMab-136”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136。

“138”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab138。

“139”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab139。

“140”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab140。

“141”: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab141。

图 70 给出野生型 CHO 细胞用作靶细胞情况下,各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体和对照抗体的 ADCC-诱导活性。

纵轴指示抗体的 ADCC-诱导活性引起的细胞毒性率,横轴指示抗体的浓度。

图 71 给出人 AILIM-过表达型重组 CHO 细胞用作靶细胞情况下,各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体和对照抗体的 ADCC-诱导活性。

纵轴指示抗体的 ADCC-诱导活性导致的细胞损伤率,横轴指示抗体的浓度。

图 72 给出抗-AILIM 抗体对迟发型过敏反应的抑制作用。

纵轴指示作为迟发型过敏反应发生指数的红斑大小,横轴指示给予动物受试者的试验样品的类型。

图 73 给出用人抗-人 AILIM 单克隆抗体和抗-人 CD3 单克隆抗体一起包被的微量培养板测定各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体转导协同刺激信号的活性时,猴 T 细胞的增殖活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示人抗-人 AILIM 单克隆抗体的浓度。

在该图中,“抗-KLH”指其中人抗-KLH 单克隆抗体用作阴性对照代替人抗-人 AILIM 单克隆抗体的测试结果。

图 74 给出阴性对照抗体对可溶性 AILIM 配体(hB7h-IgFc)与各种浓度的可溶性 AILIM(AILIM- IgFc)之间的结合的抑制活性。

纵轴指示作为抑制活性指数的吸收度,横轴指示可溶性 AILIM 的浓度。

图 75 给出抗 AILIM 抗体对可溶性 AILIM 配体(hB7h-IgFc)与各种浓度的可溶性 AILIM(AILIM- IgFc)之间的结合的抑制活性。

纵轴指示作为抑制活性指数的吸收度,横轴指示可溶性 AILIM 的浓度。

图 76 给出各种浓度的抗 AILIM 抗体对可溶性 AILIM 配体(hB7h-IgFc)与可溶性 AILIM(AILIM- IgFc)之间的结合的抑制活性。

纵轴指示作为抑制活性指数的吸收度,横轴指示可溶性 AILIM 的浓度。

图 77 给出用可溶性人 AILIM 配体(hB7h-IgFc)和抗-人 CD3 单克隆抗体一起包被的微量培养板测定转导协同刺激信号的活性时,各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体对人 T 细胞增殖的抑制活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示抗体的浓度。

图 78 给出用可溶性人 AILIM 配体(hB7h-IgFc)和抗-人 CD3 单克隆抗体一起包被的微量培养板测定转导协同刺激信号的活性时,各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体对猴 T 细胞增殖的抑制活性。

纵轴指示作为细胞增殖程度指数的 $[^3\text{H}]$ 腺苷掺入细胞的量,横轴指示抗体的浓度。

实施本发明的最佳方式

下面参考实施例对本发明进行详细说明,但是这不应视为限制。

实施例 1: 免疫原的制备

<1-1>制备表达人 AILIM 的重组细胞

依照在早期公开(JP-A No.Hei 11-29599 和 WO98/38216),以及本发明人之一,Tezuka 的早期报告(Int. Immunology, Vol.12, No.1, p.51-55, 2000)中所述方法制备过表达人 AILIM 的两种重组细胞(CHO 细胞和 HPB-ALL 细胞)。具体地,此方法如下:

将含有编码人 AILIM 的全长 ORF 的 cDNA(GenBank 登记号: AB023135(cDNA); BAA82129(氨基酸))插入到载体 pEF-neo 中。然后用 Gene Pulser (BioRad)经常用的电穿孔法(960 μF , 320V)将上述所得重组表达载体引入中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)和人胸腺瘤细胞系 HPB-ALL 细胞中。每种细胞培养在含遗传霉素(0.8mg/ml; Gibco BRL)和 10% FCS 的 RPMI1640 培养基中以挑选抗药性的转化细胞。

<1-2>选择过表达人 AILIM 的重组 HPB-ALL 细胞

将在上述<1-1>中所选的抗药性 HPB-ALL 细胞培养液离心得到细胞沉

淀。将本发明人早期建立并报导(JP-A 11-29599(实施例 12)和 WO98/38216(实施例 12))的称为“SA12”的小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体(小鼠抗-人 JTT-1 抗原单克隆抗体)加入到细胞沉淀中(浓度:以 $100\mu\text{l}/10^5$ 细胞的比例加入经 EDTA-BSA/PBS 稀释的抗体溶液($10\mu\text{g}/\text{ml}$))。所得混合物 4°C 下保温 30 分钟。用上述 EDTA-BSA/PBS($200\mu\text{l}$)洗细胞两次,然后再加入用藻红蛋白标记的链霉抗生物素(SA-PE; $100\mu\text{l}$ 500 倍稀释液)。将所得混合物 4°C 下保温 30 分钟。保温后,用 EDTA-BSA/PBS 洗细胞 3 次,制备细胞悬浮液。

用流式细胞仪 FACSsort(Beckton-Dichinson)分析细胞悬浮液中不同细胞的人 AILIM 表达水平,以挑选出过表达人 AILIM 的重组 HPB-ALL 细胞。在含有 10% FCS 和 G418($1\text{mg}/\text{ml}$)的 RPMI1640 培养基中培养所选细胞到铺满。

<1-3>对过表达人 AILIM 的重组 CHO 细胞的筛选

将在上述<1-1>中所选的抗药性 CHO 细胞培养液离心得到细胞沉淀。将上述已用 FITC 标记的小鼠抗人 AILIM 单克隆抗体 SA12 加入到每种细胞沉淀中(用 EDTA-BSA/PBS 稀释的抗体溶液($100\mu\text{g}/\text{ml}$))。将所得混合物 4°C 下保温 30 分钟。用上述 EDTA-BSA/PBS 清洗细胞,向细胞沉淀中加入 EDTA-BSA/PBS($500\mu\text{l}$)制备细胞悬浮液。

用流式细胞仪 FACSsort(Beckton-Dichinson)分析细胞悬浮液中不同细胞的人 AILIM 表达水平,以挑选出过表达人 AILIM 的重组 HPB-ALL 细胞。在含有 10% FCS 和 G418($1\text{mg}/\text{ml}$)的 RPMI1640 培养基中培养所选细胞到铺满。

<1-4>从过表达人 AILIM 的 HPB-ALL 细胞制备免疫原

将上述<1-2>中所得过表达人 AILIM 的 HPB-ALL 细胞离心。用磷酸缓冲液(PBS; Nikken Seibutsu)清洗回收的细胞沉淀 4 次,然后重悬于含蛋白酶抑制剂的缓冲液(含有 25mM HEPES($\text{pH}7.4$), 10mM MgCl_2 , 0.25M 蔗糖,和蛋白酶抑制剂($10\text{U}/\text{ml}$ 抑蛋白酶肽, $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 胃蛋白酶抑制剂, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 亮抑蛋白酶肽,和 $0.35\text{mg}/\text{ml}$ PMSF))。在 Potter 型匀浆器中处理细胞悬浮液,并低速离心(4°C 下 $1,500\text{rpm}$ 10 分钟)。然后将所得上清超速离心($100,000\text{g}$ 4°C 下 1 小时)。回收沉淀的膜级分,并悬浮在磷酸缓冲液中(调整膜级分浓度使 1ml PBS 包含得自 1×10^7 个细胞的膜级分)。 -80°C 下保存该悬浮液。包含

细胞膜级分的悬浮液用作抗原(免疫原)以制备本发明的人抗体,下面有对此的记述。

<1-5>从过表达人 AILIM 的 CHO 细胞制备免疫原

将上述<1-3>中所得过表达人 AILIM 的 CHO 细胞用刮刀分散并离心。回收的细胞沉淀用磷酸缓冲液(PBS; Nikken Seibutsu)清洗 4 次,然后重悬于含蛋白酶抑制剂的缓冲液(含有 25mM HEPES(pH7.4), 10mM $MgCl_2$, 0.25M 蔗糖,和蛋白酶抑制剂(10U/ml 抑蛋白酶肽, 2 μ g/ml 胃蛋白酶抑制剂, 50 μ g/ml 亮抑蛋白酶肽, 和 0.35mg/ml PMSF))。在 Potter 型匀浆器中处理细胞悬浮液,并低速离心(4℃下 1,500rpm 10 分钟)。然后所得上清液超速离心(100,000g 4℃下 1 小时)。回收沉淀的膜级分,并悬浮在磷酸缓冲液中(调整膜级分浓度使 1ml PBS 包含得自 1×10^7 个细胞的膜级分)。-80℃下保存悬浮液。包含细胞膜级分的悬浮液用作抗原(免疫原)制备本发明的人抗体,下面有对此的记述。

实施例 2: 制备能产生人抗-人 AILIM 单克隆抗体的杂交瘤

在本实施例中,依照“实验医学(增刊),细胞技术手册”(T.Kuroki 等编, Yodosha, pp.66-74, 1992)和“单克隆抗体实验手册”(T.Ando 等, Kodansha, 1991)所述典型方法进行单克隆抗体的制备。

实施例 1 中制备自过表达人 AILIM 的重组细胞的细胞膜级分用作人 AILIM 的免疫原。

进行免疫的动物是通过上述方法(Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997; 公开的国际申请日语翻译件 Hei 4-504365; 公开的国际申请日语翻译件 Hei 7-509137; Nikki Science, 6 月, pp.40-50, 1995; 等)产生的生产人抗体的转基因小鼠。

采用多孔微量培养板进行细胞培养。

<2-1>免疫和杂交瘤的制备

对上述产生人抗体的转基因小鼠给予上述<1-4>中(得自 HPB-ALL)或<1-5>中(得自 CHO)制备的免疫原(100 μ l/小鼠/给药)。将免疫原与 wit 弗氏完全佐剂(ICN/CAPPEL)一起注射进足垫作为初次免疫(0 天)。

初次免疫后,以一周的间隔继续在足垫注射任一种免疫原作为第二次和/或第三次免疫。以同样方式进行末次注射,两天后,如下制备淋巴细胞。

末次免疫的两天后,从各自免疫的转基因小鼠的(腹股沟下和膝下)淋巴结和脾制备淋巴细胞。将淋巴细胞和小鼠骨髓瘤细胞 P3/X63-AG8.653(ATCC 编号 CRL-1580)以 5: 1 的比例混合,加入聚乙二醇 1500 (Boehringer Mannheim)作为融合剂。然后,用 10 倍体积的无血清基础培养基 EX-CELL301(JRH Bioscience)稀释混合物。混合的细胞随后用基础培养基清洗,然后悬浮在 HAT 培养基(1L 基础培养基中含 13.61mg 次黄嘌呤, 176 μ g 氨基蝶呤, 和 3.88mg 胸苷)中。将细胞铺于 96 孔微量培养板上,培养 10-14 天完成细胞融合。细胞融合产生许多杂交瘤。

<2-2>筛选产生人单克隆抗体的杂交瘤

上述<2-1>中制备的几种杂交瘤采用下述的细胞 ELISA 方法进行筛选,以挑选出生产抗人 AILIM 人单克隆抗体的杂交瘤。

分别将上述过表达人 AILIM 的重组 HPB-ALL 细胞和重组 CHO 细胞铺板在 ELISA 96 孔微量培养板的每一孔中(1×10^5 个细胞/孔)。37℃下保温 2 天。

随后,弃去每孔的上清,加入每种杂交瘤培养液的上清样品(50 μ l/孔),保温混合物 1 小时。反应结束后,弃去混合的样品液,每孔用含有 1% BSA (Sigma)的 PBS 清洗 3 次。

随后,在每孔加入过氧化物酶偶联的山羊抗-人免疫球蛋白(Fc)抗体(每孔 50 μ l 2000 倍稀释液; American Corex; 1% BSA/PBS)以检测杂交瘤上清中的人免疫球蛋白(人单克隆抗体)重链。混合物室温下保温 1 小时。

另一方面,在每孔加入过氧化物酶偶联的山羊抗-人免疫球蛋白 κ 链抗体(每孔 50 μ l 2000 倍稀释液)以检测杂交瘤上清中的人免疫球蛋白(人单克隆抗体)轻链。混合物室温下保温 15 分钟。

从微量培养板的每孔除去抗-人 IgFc 抗体或抗-人 Ig κ 抗体,然后用含有 1% BSA 的 PBS 清洗微量培养板的每孔 3 次。每孔中加入四甲基苯胺(3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB), 100 μ l/孔, BIO-RAD), 所得混合物室温下保温 15 分钟。

随后,每孔中加入 1N H₂SO₄(50 μ l/孔)以终止反应。采用微量培养板读取仪(3550 型微量培养板读取仪, BIO-RAD)在 450nm 波长测定吸收值以监控反应。

以上述同样的方法进行对照 ELISA 实验,使用下列选项:

- (1)野生型 HPB-ALL 细胞, 替代表达人 AILIM 的重组 HPB-ALL 细胞;
 - (2)野生型 CHO 细胞, 替代表达人 AILIM 的重组 CHO 细胞;
 - (3)抗人 AILIM 小鼠单克隆抗体(SA12 或 SG430; JP-A11-29599(实施例 12)和 WO98/38216(实施例 12))替代杂交瘤上清;
 - (4)抗 KLH(匙孔血蓝蛋白, PIERCE)的人单克隆抗体, 替代杂交瘤上清。
- 通过用 KLH(匙孔血蓝蛋白, PIERCE)免疫上述生产人抗体的转基因小鼠, 以与<2-1>同样的方法制备人抗-KLH 单克隆抗体。
- 通过所述筛选挑选能生产与人 AILIM 结合的人单克隆抗体的许多杂交瘤。

<2-3>杂交瘤的初次克隆

通过下列试验从<2-2>所挑选的产生抗人 AILIM 的人单克隆抗体的多种杂交瘤(亲本细胞系)建立多类杂交瘤单克隆。

将上述<2-2>中所选的杂交瘤分别铺板在 24 孔微量培养板上。通过滴度确定每孔中的杂交瘤细胞数。随后, 将 10 % 胎牛血清(FCS; Trace Bioscience PTY), 1 % 青霉素/链霉素(Sigma), 1 % HT Supplement(Gibco BRL)和 2.5 % T-STIM Culture Supplement (Collaborative Biomedical Products)加入含 4.0mM L-谷氨酰胺和脂类的 EX-CELL301 培养基(JRH Bioscience)。用如此改变的培养基将杂交瘤稀释到 1×10^4 细胞/ml, 将细胞悬浮在每孔中。

将每孔的细胞悬浮液(300 μ l 或 600 μ l)与改变的培养基(150ml 或 300ml)充分混合, 然后在多个 96 孔板的每孔加入 200 μ l 细胞悬浮液, 使每孔含有 4 个杂交瘤细胞。将上述改变的培养基(50ml 或 100ml)新鲜加入到剩下的已充分混合的细胞悬浮液中, 然后将所得的细胞悬浮液加入到其它新制备的多个 96 孔微量培养板的每孔中, 使每孔含有两个杂交瘤细胞。

继续培养 1 到 2 周。培养后, 在许多孔中发现了得自单个杂交瘤的单菌落。

采用如上<2-2>所述细胞 ELISA 方法, 证实在含菌落的每孔的培养上清中产生了抗人 AILIM 的人单克隆抗体。

<2-4>杂交瘤的再次克隆

将如上<2-3>所述所得不同杂交瘤克隆的每一克隆亚克隆(再次克隆), 方法如上<2-3>所述。

96 孔微量培养板中每孔的细胞密度在本实验中调整为 1 个细胞/孔。

筛选产生了许多生产抗人 AILIM 的人单克隆抗体的杂交瘤单克隆。这些克隆部分如下:

(克隆名称)

AIF34 (JMab124), AIF182 (JMab-126), AIF348 (JMab-127), AIF620 (JMab-128), AIF1052 (JMab-135), AIH5D3 (JMab-136), AIH386 (JMab-137), AII289 (JMab-138), AII394 (JMab-139), AII488 (JMab-140), AIJ40 (JMab-141),

以上名称在本发明全文中使用,即在包含本实施例的下述所有实施例中,包含本实施例所得分析结果的图表中使用。

实施例 3: 分析单克隆抗体的性质

<3-1>重链和轻链的分析

通过使用下述 ELISA 和流式细胞术证实,如上<2-4>中所述克隆的每一杂交瘤克隆产生的抗人 AILIM 单克隆抗体确实是人单克隆抗体。

将实施例 1 中制备的过表达人 AILIM 的重组 HPB-ALL 细胞铺板在微量培养板的每一 V 形孔中(3×10^4 个细胞/孔)。在含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中 37°C 下培养细胞。

培养完成后,将板离心(1800rpm, 2 分钟)以沉淀细胞,然后弃去所得上清。随后,将如上<2-4>所述克隆的每一杂交瘤培养液的上清样品(50 μ l/孔),或作为对照抗体的小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体 SA12(2 μ g/50 μ l)或备选地人抗-KLH 单克隆抗体(50 μ l/孔)加入到每孔中。使该混合物在冰箱中反应 30 分钟。反应后,弃去样品液,用磷酸缓冲液(含 5mM EDTA 的 0.5% BSA-PBS)清洗每孔。

随后,将下列第二抗体的任一加入到每孔中(用上述磷酸缓冲液稀释 1000 倍,加入量为 50 μ l/孔)使细胞悬浮。悬浮液在冰箱中反应 30 分钟。

(第二抗体)

生物素标记的抗-人 IgG 抗体(Zymed);

生物素标记的抗-人 IgG 抗体(Protos);

生物素标记的抗-人 IgFc 抗体(EY Laboratories); 或

生物素标记的抗-人 Igk 抗体(Vector)。

反应后,弃去第二抗体并用上述磷酸缓冲液清洗板上每一孔。随后,将藻红蛋白标记的链霉抗生物素(链霉抗生物素-PE; Pharmingen; 用上述磷酸缓冲液稀释 500 倍,加入量为 50 μ l/孔)加入到每孔中。混合物在冰箱中反

应 30 分钟。反应后,用上述磷酸缓冲液清洗每孔。然后,将上述磷酸缓冲液加入到每孔中(200 μ l/孔)使细胞悬浮。

分析确定每一杂交瘤克隆的培养上清中的抗-人 AILIM 单克隆抗体对每孔中过表达人 AILIM 的 HPB-ALL 细胞的反应性。

使用下列项以与上述相同的方法进行对比实验:

- (1)野生型 HPB-ALL 细胞,替代表达人 AILIM 的重组 HPB-ALL 细胞;
- (2)抗 KLH(匙孔血蓝蛋白, PIERCE)人单克隆抗体,替代杂交瘤上清。

以如上<2-1>所述相同方法,通过用 KLH(匙孔血蓝蛋白, PIERCE)免疫上述生产人抗体的转基因小鼠制备人抗-KLH 单克隆抗体。

基于这些实验结果,上述<2-4>中所有杂交瘤克隆都被证实为由人-源重链和人源 κ 轻链组成的单克隆抗体。

图 1 显示了这些结果的一个例子,它包括对杂交瘤克隆 AIH5D3(JMab-136), AII289(JMab-138), AII394(JMab-139)的分析结果。

<3-2>人单克隆抗体的同种型分型

鉴定在<2-4>中克隆并在<3-1>中分析的杂交瘤产生的每一种人抗-人 AILIM 单克隆抗体的同种型。采用人单克隆抗体同种型分型试剂盒(American Qualex)依照试剂盒所附的实验方法进行鉴定。

所有的人抗-人 AILIM 单克隆抗体都鉴定为 IgG2/ κ 。

实施例 4: 抗人 AILIM 的人单克隆抗体(人抗-人 AILIM 单克隆抗体)的大规模制备及其纯化

<4-1>方法 1

将已在上述<2-4>中制备的产生人抗-人 AILIM 单克隆抗体的每一杂交瘤克隆的细胞加入到组织培养瓶(50ml, FALCON)中,在含有 10% 极低(Ultra Low)牛 IgG FBS (GIBCO-BRL)的 ASF104 培养基(Ajinomoto)中 37 $^{\circ}$ C 下于 5% CO₂ 中培养至铺满。

随后,将全部培养液转移到新的组织培养摇瓶(750ml, FALCON)中,将细胞培养在含有 10% 极低牛 IgG FBS (GIBCO-BRL)的 ASF104 培养基(Ajinomoto)中 37 $^{\circ}$ C 下于 5% CO₂ 中培养至铺满。

培养 10-20 天后,回收每一杂交瘤的培养上清并转移到 50-ml 聚丙烯圆锥管(FALCON)中。将试管在 500g 下离心 5 分钟。

随后,将所得离心上清用除菌过滤组件(NALGEN)过滤,回收滤液。

以 3ml/min 的流速将滤液上柱到已用磷酸缓冲液(30ml)预平衡的 HiTrap 蛋白 G 柱(HiTrap 亲和柱蛋白 G; Amersham Pharmacia)。

随后,用磷酸缓冲液(20ml)洗柱,目的抗体用 100mM 柠檬酸盐缓冲液(pH2.0)以约 1ml/min 的低流速洗脱。随后,滤液用 750mM Tris-HCl 溶液(pH9.0)中和,经滤膜(Millipore)过滤除去白色沉淀。所得滤液对磷酸缓冲液透析(过夜),并经滤膜(Millipore)过滤。这样从每一杂交瘤细胞系得到纯化的抗-AILIM 人单克隆抗体。

用分光光度计测定 A_{280} 的吸光度以确定蛋白浓度($1 A_{280}=1.41\text{mg/ml}$)。

<4-2>方法 2

将<2-4>中制备的每一杂交瘤克隆的细胞置于含有 10% 极低牛 IgG FBS (GIBCO-BRL)的 ASF104 培养基(Ajinomoto)中(每种为 $1-2 \times 10^6$ 个细胞/ml),铺板并培养在 Integra Cell Line 1000 (INTEGRA CL1000, INTEGRA BIOSCIENCE)中。培养 7-10 天后,当细胞密度达到 1×10^8 个/ml 时,回收每一杂交瘤培养液的上清。

以 3ml/min 的流速将每一培养上清液上柱到已用磷酸缓冲液(30ml)预平衡的 HiTrap 蛋白 G 柱(HiTrap 亲和柱蛋白 G; Amersham Pharmacia)。

随后,用磷酸缓冲液(20ml)洗柱,抗体用 100mM 柠檬酸盐缓冲液(pH2.0)以约 1ml/min 的低流速洗脱。随后,滤液用 750mM Tris-HCl 溶液(pH9.0)中和,经滤膜(Millipore)过滤除去白色沉淀。所得滤液对磷酸缓冲液透析(过夜),并经滤膜(Millipore)过滤。这样从每一杂交瘤细胞系得到纯化的抗-AILIM 人单克隆抗体。

实施例 5: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体对人 AILIM 的反应性,以及其对小鼠 AILIM 和大鼠 AILIM 的交叉反应性

采用细胞 ELISA 方法分析上述各种纯化的人抗-人 AILIM 单克隆抗体对人 AILIM 的反应性,以及对小鼠 AILIM 和大鼠 AILIM 的交叉反应性。

<5-1>建立可测定 IgG 抗体浓度的 ELISA 系统并制备标准曲线

上述所有纯化的人抗-人 AILIM 单克隆抗体都是 IgG(IgG2)抗体,可建立 ELISA 系统以确定 IgG 抗体的浓度。

在 96 孔 ELISA 微量培养板(Nunc)的每孔加入山羊抗-人 IgG(Fc)抗体(PBS 中 $1.2\mu\text{g/ml}$; $100\mu\text{l/孔}$; Organon Teknika)。将培养板室温下保温 2 小时,使抗-IgG(Fc)抗体吸附到微量培养板上。随后,弃去上清,用含 0.05%

吐温 20 的磷酸缓冲液(PBS)洗板 3 次。向每孔中加入封闭试剂(含 0.5 % 牛血清白蛋白(BSA)和 0.1 % 吐温 20 的 PBS)(200 μ l/孔),将板室温下保温 2 小时以封闭板上的抗-IgG(Fc)抗体-游离位点。然后,弃去封闭试剂,用 PBS 清洗每孔 2 次。

向培养板的不同孔中加入各种浓度(0-100ng/ml)的用作标准抗体的人源 IgG2 抗体(50 μ l/孔; TheBindingSite),将板室温下保温 2 小时。弃去多余的标准抗体溶液,用含 0.05 % 吐温 20 的磷酸缓冲液洗每孔 3 次。

随后,向每孔加入过氧化物酶偶联的山羊抗-人 IgG/ κ 抗体(4000 倍稀释, 100 μ l/孔, Protos),将板室温下保温 1 小时。

弃去上清,用含 0.05 % 吐温 20 的磷酸缓冲液洗微量培养板 3 次。向每孔加入含有底物的缓冲液(组成:邻苯二胺(OPD; 20mg)/柠檬酸-磷酸缓冲液(pH5.0, 50ml)/30 % 过氧化氢水溶液(15 μ l))(100 μ l/孔),将板室温下保温约 7 分钟。

随后,向每孔中加入 2M 硫酸(50 μ l/孔)终止反应。基于微量培养板读取仪 490nm 波长测定的吸光度结果绘制标定曲线(图 2)。

单独以培养基或 BSA 溶液为实验物质以如上相同的方法进行对比实验。

<5-2>各种纯化的人抗-人 AILIM 单克隆抗体对人 AILIM 的反应性以及
对小鼠 AILIM 和大鼠 AILIM 的交叉反应性的分析

<5-2-1>试剂的制备

如下制备在此细胞 ELISA 中所用的试剂:

<5-2-1-1>过表达小鼠 AILIM 的重组 CHO 细胞的制备

用<1-1>和<1-3>中所述方法制备并得到过表达小鼠 AILIM 的重组 CHO 细胞。

将含有小鼠 AILIM 全长 ORF 的 cDNA(GenBank 登记号: AB023132 (cDNA); BAA82126(氨基酸))插入到载体 pEF-neo 中,然后将所得重组表达载体采用 Gene Pulser(BioRad)通过常用的电穿孔方法(960 μ F, 320V)引入中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)。将细胞培养在含遗传霉素(0.8mg/ml; Gibco BRL)和 10 % FCS 的 RPMI1640 培养基中以挑选抗药性的转化细胞,这样就得到了过表达小鼠 AILIM 的重组 CHO 细胞。

<5-2-1-2>过表达大鼠 AILIM 的重组 CHO 细胞的制备

用<1-1>和<1-3>中所述方法制备并得到过表达大鼠 AILIM 的重组 CHO 细胞。

将含有大鼠 AILIM 全长 ORF 的 cDNA(GenBank 登记号: AB023134 (cDNA); BAA82128(氨基酸))插入到载体 pEF-neo 中,然后将所得重组表达载体采用 Gene Pulser(BioRad)通过常用的电穿孔方法(960 μ F, 320V)引入中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)。将细胞培养在含遗传霉素(0.8mg/ml; Gibco BRL)和 10%FCS 的 RPMI1640 培养基中以挑选抗药性的转化细胞,这样就得到了过表达大鼠 AILIM 的重组 CHO 细胞。

<5-2-1-3>抗小鼠 AILIM 单克隆抗体的制备

将如上<5-2-1-1>中制备的过表达小鼠 AILIM 的重组 CHO 细胞匀浆,进行超速离心(100000g)。回收所得含细胞膜级分的沉淀并将其悬于 PBS 中。将所得细胞膜级分同弗氏完全佐剂一起注射进入 Wistar 大鼠足垫进行初次免疫(第 0 天)。在初次免疫后第 7 天, 14 天, 28 天,进一步对大鼠足垫给予细胞膜级分抗原。末次免疫的 2 天后收集它们的淋巴结细胞。

将所述淋巴结细胞和小鼠骨髓瘤细胞 PAI (JCR No.B0113; Res. Disclosure, Vol.217, p.155, 1982)以 5: 1 的比例组合。采用聚乙二醇 4000 (Boehringer Mannheim)作融合剂将所述细胞相互融合,以制备生产单克隆抗体的杂交瘤。将杂交瘤培养在含 HAT, 10%胎牛血清和氨基蝶呤的 ASF104 培养基(Ajinomoto)中以便筛选。

通过将培养上清与上述表达小鼠 AILIM 的 CHO 细胞反应,然后采用 EPICS-ELITE 流式细胞仪测定 FITC 标记型抗-大鼠 IgG(Cappel)染色的细胞的荧光强度,以此测定每一杂交瘤的培养上清中的大鼠单克隆抗体对小鼠 AILIM 的反应性。筛选得到多个杂交瘤,它们可以生产具有对小鼠 AILIM 的反应性的单克隆抗体。

在这些杂交瘤中,有一杂交瘤细胞系命名为“B10.5.”。将此杂交瘤的细胞腹膜内注射(10^6 - 10^7 个细胞/0.5ml/小鼠)给 ICR nu/nu 小鼠(雌性, 7 到 8 周龄)。注射 10 到 20 天后,依照常规方法于麻醉下通过剖腹术从每只小鼠收集腹水。从腹水大规模制备大鼠抗-小鼠 AILIM 单克隆抗体 B10.5(IgG1)。

<5-2-2>抗体对人,小鼠和大鼠 AILIM 的反应性

基于上述<5-1>中的 ELISA 和标准曲线确定以下 ELISA 中所用人抗-人 AILIM 单克隆抗体和对照抗体的浓度。

实施例 1 中制备的过表达人 AILIM 的重组 CHO 细胞, 上述<5-2-1-1>中制备的过表达小鼠 AILIM 的重组 CHO 细胞, 以及上述<5-2-1-2>中所述过表达大鼠 AILIM 的重组 CHO 细胞分别铺板在 96 孔 ELISA 微量培养板的孔中(7×10^3 个细胞/孔), 37°C 下培养至铺满。

随后, 弃去上清, 向每孔加入如上制备的纯化的任一种人抗-人 AILIM 单克隆抗体或对照抗体(抗体浓度: 用含 1% BSA 的 PBS 将 200 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 的抗体稀释 3 倍, 3^2 倍, 3^3 倍, 3^4 倍, 3^5 倍, 3^6 倍, 3^7 倍, 3^8 倍, 3^9 倍, 3^{10} 倍, 3^{11} 倍, 3^{12} 倍), 加入量为 50 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 将板在室温下反应 2 小时。弃去单克隆抗液体, 用含 1% BSA(Sigma)的磷酸缓冲液洗孔 3 次。

随后, 每孔加入辣根过氧化物酶偶联的抗-人 IgG(Fc)抗体(稀释 1000 倍, 50 $\mu\text{l}/\text{孔}$; American Qualex), 将板室温下保温 1 小时。

弃去多余的标记抗液体, 用含 1% BSA(Sigma)的磷酸缓冲液洗板 3 次。向每孔加入含底物的缓冲液(组成: 邻苯二胺(OPD; 20mg)/柠檬酸-磷酸缓冲液(pH5.0, 50ml)/过氧化氢的 30% 水溶液(15 μl))(100 $\mu\text{l}/\text{孔}$), 将板室温下保温约 7 分钟。

随后, 向孔中加入 2M 硫酸(50 $\mu\text{l}/\text{孔}$)以终止反应。使用微量培养板读取仪(Bio-Rad)于 490nm 波长下测定吸光度。

采用下列对照抗体, 按照上述同样的方法进行对照 ELISA 检测, 以评价上述抗体:

(1)抗人 AILIM 的小鼠单克隆抗体 SA12 或 SG430(JP-A 11-29599(实施例 12)和 WO98/38216(实施例 12));

(2)抗小鼠 AILIM 的大鼠单克隆抗体 B10.5(如<5-2-1-3>所述);

(3)抗大鼠 AILIM 的小鼠单克隆抗体 JTT2(由 1996 年 10 月 11 日以国际保藏号 FERM BP-5708 保藏在根据布达佩斯条约的微生物国际保藏单位, 通商产业省工业技术院国立生命科学和人体技术研究所); JP-A11-29599(实施例 1 和 2)和 WO98/38216(实施例 1 和 2))。

(4)如上制备的抗 KLH(钥孔血蓝素, PIERCE)人单克隆抗体, 而非杂交瘤上清。

采用下列野生型 CHO 细胞, 而非表达 AILIM 的重组 CHO 细胞, 按照上述同样的方法进行 ELISA 对照实验。

结果示于图 3 到 14 中。

基于结果, 计算 50%有效浓度(ED50: ng/ml)作为每种人抗-人 AILIM 单克隆抗体对人 AILIM(过表达人 AILIM 的重组 CHO 细胞), 小鼠 AILIM(过表达小鼠 AILIM 的重组 CHO 细胞), 大鼠 AILIM(过表达大鼠 AILIM 的重组 CHO 细胞)的反应性的指标。计算所得结果列于下:

(A)过表达人 AILIM 的 CHO 的 ED50 值

AIF34 (JMab-124) : 5.3 ng/ml
AIF182 (JMab-126) : 3.6ng/ml
AIF348 (JMab-127) : 9.1 ng/ml
AIF620 (JMab-128) : 10.1 ng/ml
AIF1052 (JMab-135) : 2.0 ng/ml
AIH5D3 (JMab-136) : 7.5 ng/ml
AIH386 (JMab-137) : 9.6 ng/ml
AII289 (JMab-138) : 10.5 ng/ml
AII394 (JMab-139) : 10.6 ng/ml
AII488 (JMab-140) : 11.0 ng/ml
AIJ40 (JMab-141) : 3.7 ng/ml
SA 12: 1.8 ng/ml
SG430: 1.2 ng/ml

(B) 过表达小鼠 AILIM 的 CHO 的 ED50 值

AIF34 (JMab-124) : 42 ng/ml
AIF348 (JMab-127) : 81 ng/ml
AIF620 (JMab-128) : 100 ng/ml
AII289 (JMab-138) : 53 ng/ml
AII394 (JMab-139) : 60 ng/ml
AII488 (JMab-140) : 70 ng/ml

(C) 过表达大鼠 AILIM 的 CHO 的 ED50 值

AIF34 (JMab-124) : 45 ng/ml
AIF348 (JMab-127) : 62 ng/ml
AIF620 (JMab-128) : 97 ng/ml
AII289 (JMab-138) : 57 ng/ml
AII394 (JMab-139) : 90 ng/ml

AII488 (JMab-140) : 90 ng/ml

结果表明本发明的人抗-人 AILIM 单克隆抗体表现出对人 AILIM 的极高的特异性。

此外,还显示6种类型的人抗-人 AILIM 单克隆抗体(如上(B)和(C)所示)对小鼠 AILIM 和大鼠 AILIM 都有反应性(结合能力,交叉反应性)。

实施例 6: 测定人抗-人 AILIM 单克隆抗体对抗原(人 AILIM)的亲合力和中和活性

采用市售试剂盒 Biacore X(Amersham Pharmacia)测定如上制备的每种纯化的人抗-人 AILIM 单克隆抗体与人 AILIM 之间反应的结合速度常数(k_a),解离速度常数(k_d)和解离常数(K_d)。

<6-1>制备固定在传感器芯片上的抗原

试剂盒中固定在传感器芯片上的抗原以重组嵌合抗原的形式(下文中称为“人 AILIM-IgFc”)制备,其由人 AILIM 的胞外区和人 IgG1 的恒定区(Fc)组成。

将本发明人之一,Tezuka 的早期文献(JP-A 11-29599(实施例 16(2)) and WO98/38216(实施例 16(2))所述方法所得的抗原进一步纯化可制备人 AILIM-IgFc。

将生产人 AILIM-IgFc 的重组细胞的培养上清以流速 3ml/min 上样到已用磷酸缓冲液预平衡的 HiTrap 蛋白 G 柱(HiTrap 亲和柱蛋白 G; Amersham Pharmacia),以将培养上清中的人 AILIM-IgFc 吸附到柱上。

随后,用磷酸缓冲液(20ml)洗柱,然后用 100mM 柠檬酸缓冲液(pH2.0)以约 1ml/min 的流速洗脱人 AILIM-IgFc。随后,洗脱液用 750mM Tris-HCl(pH9.0)中和,再对磷酸缓冲液透析(过夜)。然后,将透析过的溶液经滤膜(Millipore)过滤。这样就得到了纯化的抗-人 AILIM-IgFc。

采用分光光度计测定 A280 吸收度来确定蛋白浓度($1A_{280}=1\text{mg/ml}$)。人 AILIM-IgFc 的浓度经测定为 0.28mg/ml。

依照上述同样的方法制备由大鼠 AILIM 胞外区和人 IgG1 恒定区(Fc)组成的纯化嵌合蛋白(大鼠 AILIM-IgFc; JP-A 11-29599(实施例 16(2)) and WO98/38216(实施例 16(2))。所得大鼠 AILIM-IgFc 的浓度经测定为 0.45mg/ml。

<6-2>亲合力和中和活性的测定

除下述的在传感器芯片上固定抗原(人 AILIM-IgFc)的步骤外, 其它实验步骤都基于市售检测试剂盒 Biacore X(Amersham-Pharmacia)所附的指导手册和实验方法。

使 HPS 缓冲液(含 0.01M HEPES, 0.15M NaCl, 3mM EDTA 和 0.005 % 去污剂 P20, (pH7.0))流过试剂盒所附 Flow Cell-1, 流速 5 μ l/min。随后, 加入含 0.005 M NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)和 0.2M EDC(N-乙基-N'-(二甲基氨基)碳二亚胺)的溶液(15 μ l)以活化包被在传感器芯片表面的 CM 的羧基。

随后, 加入 23 μ l 人 AILIM-IgFc 溶液(10 μ g/ml; 溶于 10mM 乙酸钠缓冲液(pH5.0))中以将人 AILIM-IgFc 固定在传感器芯片上。随后, 加入 35 μ l 1M 盐酸乙醇胺以封闭未反应的活化羧基。通过 2 次固定化处理固定的人 AILIM-IgFc 的量分别为 2444RU(共振单位)和 2213RU。RU 对应每单位面积的质量; 1RU = 1pg/mm²。

Flow Cell-2, 是一个参比流槽, 以如上同样的方式在没有人 AILIM-IgFc 的情况下进行包被处理。

使磷酸缓冲液以 20 μ l/min 的流速流过所述流槽(传感器芯片), 向其中加入上面实施例中制备的每一种纯化的人抗-人 AILIM 单克隆抗体(10-50 μ g/ml, 60 μ l)。

测定的标准条件是: 结合阶段 3 分钟, 解离阶段 10 分钟。按时间进程监控每种抗体结合抗原和与抗原分离的量以得到传感图(sensorgram)。通过使 PBS 以 20 μ l/min 的流速流过传感器芯片而实现抗原与抗体的解离。

基于所得传感图数据, 通过试剂盒所附分析软件(BIAevaluation 3.0)计算结合速度常数(k_a), 解离速度常数(k_d)和解离常数(K_d ; $K_d=k_d/k_a$)。

以与上述同样的方法分析上述实施例制备的小鼠单克隆抗体 SA12 和 SG430 对人 AILIM 的亲力和中和活性。

所得各数值列于下。

< 克隆名称 >	< k_a (1/M.Sec)>	< k_d [1/Sec]>	< K_d (M) >
AIF 34 (JMab-124)	1.6×10^4	1.0×10^{-4}	6.3×10^{-9}
AIF182 (JMab-126)	3.2×10^4	2.8×10^{-5}	8.8×10^{-10}
AIF348 (JMab-127)	1.9×10^4	6.4×10^{-5}	3.4×10^{-9}
AIF620 (JMab-128)	1.1×10^4	1.1×10^{-4}	1.0×10^{-8}
AIF1052 (JMab-135)	1.6×10^4	6.3×10^{-5}	3.9×10^{-9}
AIH5D3 (JMab-136)	2.8×10^4	4.9×10^{-6}	1.8×10^{-10}

AIH386 (JMab-137)	1.2×10^5	3.1×10^{-4}	2.6×10^{-9}
AIH289 (JMab-138)	3.7×10^4	4.2×10^{-5}	1.1×10^{-9}
AIH394 (JMab-139)	3.1×10^4	2.4×10^{-5}	7.7×10^{-10}
AIH488 (JMab-140)	2.3×10^4	3.5×10^{-5}	1.5×10^{-9}
AIJ 40 (JMab-141)	1.9×10^4	1.9×10^{-5}	1.0×10^{-9}
SA 12	7.8×10^3	7.9×10^{-5}	1.0×10^{-8}
SG430	2.2×10^4	1.5×10^{-4}	6.8×10^{-9}

结果显示所有人抗-人 AILIM 单克隆抗体和抗-人 AILIM 小鼠单克隆抗体都表现出对人 AILIM 具有明显很高的亲和力和中和活性。

实施例 7: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体向人 T 细胞中转导协同刺激信号的活性

对本发明的人抗-人 AILIM 单克隆抗体是否具有控制(增强和/或抑制)人 T 细胞应答(生产细胞因子如 IFN- γ 和 IL-4, 细胞增殖等)的能力, 即所述抗体是否表现出对 AILIM 介导的协同刺激信号的细胞转导具有调控活性进行了分析。基于人 T 细胞产生的细胞因子(IFN- γ 和 IL-4)的量和人 T 细胞增殖的程度作为指标进行分析。

<7-1>抗体的稀释

用磷酸缓冲液(PBS)稀释抗-人 CD3 单克隆抗体 OKT3(ATCC CRL-8001)使终浓度为 8 μ g/ml。

如上制备的每一种人抗-人 AILIM 单克隆抗体都用 PBS 稀释到最终浓度为 40 μ g/ml。抗体溶液进一步用 PBS 稀释以制备各种浓度的抗体(40 μ g/ml-0.0049 μ g/ml)。

<7-2>用抗体包被微量培养板

用(1)抗-人 CD3 单克隆抗体 OKT3(8 μ g/ml; 每孔 25 μ l)和任一种人抗-人 AILIM 单克隆抗体(40 μ g/ml-0.0049 μ g/ml; 每孔 25 μ l), 或单独用(2)抗-人 CD3 单克隆抗体 OKT3(8 μ g/ml; 每孔 25 μ l)包被 96 孔微量培养板的每孔。将板 37 $^{\circ}$ C 下保温 2 小时。随后, 弃去抗体液, 每孔用 PBS 洗 3 次。然后, 将含 10%FCS 的 RPMI 1640 培养基加入到每孔中(100 μ l/孔), 37 $^{\circ}$ C 下将板保温 1 小时。这样, 板上不同的孔被上述(1)或(2)所述抗体包被。

依照同样的方法进行对照实验, 所用板分别用下列单克隆抗体, 而非人抗-人 AILIM 单克隆抗体作对照抗体进行包被。

(1)抗人 AILIM 的小鼠单克隆抗体 SA12 或 SG430(JP-A 11-29599(实施

例 12))和 WO98/38216(实施例 12));

(2)小鼠抗-人 CETP 单克隆抗体 JHC1(也称为 JMab109; JP-A 9-20800);
和

(3)人抗-KLH 单克隆抗体(也称为 JMab23; 上述实施例)。

在下述分析中使用抗体包被的微量培养板。

<7-3>人 T 细胞悬浮液的制备

从每一正常健康人采集外周血(5 人; 供者 A, B, C, D 和 E)。采用 LymphoPrep (Nycomed)通过密度-梯度离心制备含单核细胞的级分。使用 Pan-T 细胞分离试剂盒(Miltenyi)和磁性分选仪(Magnetic Sorter)按说明书从人单核细胞级分分离人 T 细胞。采用血细胞计数器计数 T 细胞。将人 T 细胞悬浮在含 10 % FCS 的 RPMI1640 培养基中制备人 T 细胞悬浮液(1×10^6 个细胞/ml)。

<7-4>细胞培养

(1)用抗-人 CD3 抗体和抗-人 AILIM 抗体包被的微量培养板进行的培养
向用上述抗体包被的微量培养板的每孔加入人 T 细胞悬浮液(供者 A, B, C, D 和 E; 100 μ l/孔; 1×10^5 个细胞/孔), 将板在 CO₂ 培养箱中于 37 °C 下保温 3 天。

培养后, 取所得培养液上清的等分试样(50 μ l)保藏于-20 °C, 并在后面所述分析中使用(IFN γ 分析)。在采集了培养液上清的等分样品后, 使用不同的微量培养板进行下列分析:

(2)单独使用抗-人 CD3 抗体包被的微量培养板进行的培养

人 T 细胞悬浮液(供者 D; 100 μ l/孔; 1×10^5 个细胞/孔)加入到用上述抗体包被的微量培养板的每孔中, 然后将任一种人抗-人 AILIM 单克隆抗体加入其中(25 μ l 40 μ g/ml-0.0049 μ g/ml 的抗体)。将板在 CO₂ 培养箱中于 37 °C 下保温 3 天。

<7-5>测定 T 细胞的增殖活性

保温后, 向各板的每孔加入甲基 [³H] 胸苷 (0.5 μ Ci/ 孔; Amersham-Pharmacia), 将各板在 CO₂ 培养箱中于 37 °C 下保温 6 小时。然后, 用细胞收集器将细胞捕获在 GF/C 滤膜(Packard)上。随后, 将滤膜 40 °C 下干燥 3 小时或更长时间, 然后向其中加入 Microscinti 0(20 μ l/孔; Packard)。用 β -计数器(TOP COUNT)测定滤膜捕获的细胞中掺入的 ³H 放射性来分析培养

后 T 细胞增殖的程度。

结果显示于图 15 到 39。

此分析结果显示当用抗-人 AILIM 单克隆抗体(人单克隆抗体或小鼠单克隆抗体)与抗-人 CD3 抗体一起包被微量培养板时, 人 T 细胞根据细胞浓度显著增殖。此外, 在各个供者中细胞增殖的程度有所不同。

在另一方面, 当单独用抗-人 CD3 抗体包被各板并在细胞培养期间在溶液(液相)中使用抗-人 AILIM 单克隆抗体(人单克隆抗体或小鼠单克隆抗体)时人 T 细胞没有显著生长。

<7-6>T 细胞培养上清中 IFN γ 的定量

对<7-4>(1)中所述 T 细胞(供者 B 和 C)的各自培养物, 通过市售人 IFN γ ELISA 试剂盒(Amersham-Pharmacia; Endogen)测定培养上清中 IFN γ 的量。

结果显示于图 40 到 47。

此分析结果显示 IFN γ 的生产随抗-人 AILIM 单克隆抗体(人单克隆抗体或小鼠单克隆抗体)的浓度显著提高。

实施例 8: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体对混合淋巴细胞反应(MLR)的调节活性

通过分析对与异源混合淋巴细胞反应(异源 MLR)相关的 T 细胞增殖的控制活性(即, 细胞中 DNA 的合成)作为指标, 检测本发明的人抗-人 AILIM 单克隆抗体是否能够控制(增强和/或抑制)T 细胞应答(生产细胞因子如 IFN- γ 和 IL-4, 细胞增殖等), 即对 AILIM 介导的协同刺激信号向细胞内的转导进行调节的能力。

<8-1>人 PBMC 和 T 细胞的制备

从正常健康人(7 人; 供者 A, B, C, D, E, F, G)采集外周血(200ml), 分散在微管(50ml; Falcon)中的 Lymphoprep (15ml; Nycomed)层上。离心(1600rpm 10 分钟), 回收中间层。用磷酸缓冲液将回收的细胞稀释两倍或更多, 然后离心(1800rpm, 10 分钟)。这样, 制备得到 PBMC(外周血单核细胞; 2×10^8 - 5×10^8 个细胞)。采用血细胞计数器测定细胞数。取 MLR 分析中所用细胞的等分试样($1.08 \times 10^8/9$ 个微量培养板)并冰上保存。其它细胞用于下述 T 细胞的分离。

PanT 分离试剂盒(Miltenyi Biotech)用于从 PBMC 分离 T 细胞。依照试

剂盒所附手册,将剩余的 PBMC 加入到试剂盒所附的溶液中,保温所述溶液。随后,用含 5mM EDTA 和 0.5% BSA 的 PBS 洗涤细胞,然后重悬于 PBS 中。随后,将细胞悬浮液上样至已用 PBS 溶胀的阳性选择柱 VS+(Miltenyi Biotech),回收未吸附的级分。此外,将 PBS 上样至该柱,回收洗液。再同样处理一次。混合回收的溶液得到 T 细胞级分。T 细胞级分离心后,将细胞重悬在 PBS 中。使用血细胞计数器测定细胞数。所述细胞用于下列检测。

<8-2>混合淋巴细胞反应(MLR)

如上所述,已知 CD28 与 CD80 (B7-1) / CD86 (B7-2)之间以及 CTLA4 与 CD80 (B7-1) / CD86 (B7-2)之间的两个信号传递途径(已进行过详细分析)是淋巴细胞如 T 细胞等活化所必需的协同刺激信号传递途径。

即,通过两个已知途径中的任一个的信号转导可诱导 T 细胞应答混合淋巴细胞反应(MLR)而增殖。

这样,通过使用下述底物,本发明的实验可分析(1)通过阻断 CTLA4-介导的信号传递途径而对 MLR 的抑制;(2)通过阻断 CD80(B7-1)/CD86(B7-2)-介导的信号传递途径而对 MLR 的抑制;(3)通过同时阻断 CTLA4-介导的信号传递途径和 CD80(B7-1)/CD86(B7-2)-介导的信号传递途径而对 MLR 的抑制;(4)通过阻断与 AILIM 相关的第三信号传递途径而对 MLR 的抑制;(5)通过同时阻断 CTLA4-介导途径和 AILIM 介导途径而对 MLR 的抑制。

采用下列实验底物。

- (1) 人抗-人 AILIM 单克隆抗体(如上述实施例制备);
- (2) 小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体 SA12(与上述实施例相同);
- (3) 人抗-KLH 单克隆抗体(阴性对照;与上述实施例相同);
- (4) 小鼠 IgG 抗体(抗-人 CD34; 阴性对照; Immunotech);
- (5) 抗-人 CD80 单克隆抗体(Pharmingen)和抗-人 CD86 单克隆抗体(Pharmingen);
- (6) 人 CTLA4-IgFc 嵌合分子(Ancell)。

采用从<8-1>所述供者制备的 PBMC 和 T 细胞对下述组合进行混合淋巴细胞反应(MLR):

- (i) T 细胞(供者 A)/PBMC(供者 D)
- (ii) T 细胞(供者 D)/PBMC(供者 B)

(iii) T 细胞(供者 C)/PBMC(供者 A)

(iv) T 细胞(供者 E)/PBMC(供者 G)

(v) T 细胞(供者 F)/PBMC(供者 E)

(vi) T 细胞(供者 G)/PBMC(供者 F)

如下调整实验中所用 PBMC 和 T 细胞的浓度。

将 PBMC 悬于 PBS 中, 然后转移到培养皿(60mm)。用辐射仪(Hitachi MEDICO)对细胞进行 X-射线照射。回收细胞, 离心然后加入到含 10 % FCS 的 PRMI1640 培养基中。调整细胞数量为 2×10^5 个/50 μ l。

所得每个供者的 T 细胞也加入到含 10 % FCS 的 PRMI1640 培养基中, 调整细胞数量为 1×10^5 个/50 μ l。

<8-2-1>用人抗-人 AILIM 单克隆抗体抑制 MLR

向具有 U-形孔的 96 孔微量培养板的每孔加入含 10 % FCS 的 PRMI1640 培养基。用含 10 % FCS 的 PRMI1640 培养基稀释人抗-人 AILIM 单克隆抗体溶液或小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体 SA12 溶液以制备具有多种抗体浓度的溶液。将稀释的抗体溶液加入孔中(最终浓度: 0, 0.31, 1.25, 5 和 20 μ g/ml)。随后, 将 T 细胞加入孔中(50 μ l)。37 $^{\circ}$ C 下 CO₂ 培养箱(NAPCO)中将板保温 1 小时。反应完成后, 孔中加入另一供者的 PBMC(50 μ l)以引发 MLR。

当使用非人抗-人 AILIM 单克隆抗体的抗体(如上(3)-(6)所述)作为实验物质进行 MLR 时, 使 PBMC 与该实验物质一起保温后, 再与另一供者的 T 细胞反应。

在培养的第 5 天, 向每孔中加入用含 10 % FCS 的 PRMI1640 培养基稀释的氚标记的胸苷(³H-胸苷; 20 μ l; 1 μ Ci/孔)。继续培养 1 天。培养完成后, 用细胞收集器(Packard)收获细胞。用 β -计数器(TOP COUNT; Packard)测定细胞中掺入的 ³H 放射性来分析培养后 T 细胞的增殖速度。

结果显示于图 48 到 59。

<8-2-2>在 CTLA4-介导的信号传递途径已预先阻断的 MLR 系统中, 用人抗-人 AILIM 单克隆抗体抑制 MLR

向具有 U-形孔的 96 孔微量培养板的每孔加入含 10 % FCS 的 PRMI1640 培养基。用含 10 % FCS 的 PRMI1640 培养基稀释人抗-人 AILIM 单克隆抗体溶液或小鼠抗-人 AILIM 单克隆抗体 SA12 溶液以制备具有多种抗体浓度的溶液。将稀释的抗体溶液加入孔中(最终浓度: 0, 0.31, 1.25, 5 和 20 μ g/ml)。

随后, 将 T 细胞加入孔中(50 μ l)。37 $^{\circ}$ C 下 CO₂ 培养箱(NAPCO)中将板保温 1 小时。

除培养 T 细胞外, 另一供者的 PBMC(在含 10% FCS 的 PRMI1640 培养基中)在添加了人 CTLA4-IgFc 后单独培养。37 $^{\circ}$ C 下 CO₂ 培养箱(NAPCO)中培养 1 小时。在 MLR 开始时 CTLA4-IgFc 浓度调整到 20 μ l/ml。

随后, 向上述 T 细胞培养液中加入 PBMC(50 μ l)以引发 MLR。

当使用非人抗-人 AILIM 单克隆抗体的抗体(如上(3)-(5)所述)作为实验物质进行 MLR 时, 使 PBMC(已在 CTLA4-IgFc 存在下培养)与所述实验物质一起保温后, 再与另一供者的 T 细胞反应。

在培养的第 5 天, 向每孔中加入用含 10% FCS 的 PRMI1640 培养基稀释的氚标记的胸苷(³H-胸苷; 20 μ l; 1 μ Ci/孔)。继续培养 1 天。培养完成后, 用细胞收集器(Packard)收获细胞。用 β -计数器(TOP COUNT; Packard)测定细胞中掺入的 ³H 放射性来分析培养后 T 细胞的增殖速度。

结果显示于图 60 到 69。

得自上述两个实验的实验结果总结如下:

(1) CTLA4-IgFc 阻断 CTLA-4 介导的信号转导, 并因此抑制了异源 MLR-诱导的 T 细胞增殖。

(2) 抗-CD80 抗体和抗-CD86 抗体抑制 CD80/CD86(CTLA4 和 CD28 的配体)介导的信号转导, 这样就抑制了异源 MLR-诱导的 T 细胞增殖。

(3) 抗人 AILIM 的单克隆抗体, 如 CTLA4-IgFc, 抗-CD80 抗体和抗-CD86 抗体以抗体浓度依赖性方式显著抑制异源 MLR-诱导的与 AILIM-介导的信号转导有关的 T 细胞增殖。

也就是说, 这些结果显示除已知由 CTLA4/CD80/Cd86 介导的和 CD28/CD80/CD86 介导的途径外, 由 AILIM 及其配体介导的第三途径作为 T 细胞活化必需的协同刺激信号传递途径而存在, 还显示 AILIM-介导的信号传递途径被抗 AILIM 抗体抑制。

此外, 出现了这样的可能性: AILIM-介导的途径对信号转导的作用与 CTLA4/CD80/Cd86 介导的途径和 CD28/CD80/CD86 介导的途径相当。

实施例 9: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒活性(ADCC)

由抗体引起的生物活性包括对抗体依赖性细胞介导的细胞毒活性

(ADCC)的诱导。ADCC 是除效应细胞和靶细胞外,还需要抗体来诱导由效应细胞,如淋巴细胞,巨噬细胞或多形核白细胞诱发的对靶细胞的破坏的一种细胞毒作用。

如下分析了本发明的抗-人 AILIM 单克隆抗体诱导 ADCC 的活性:

^{51}Cr (0.1mCi/ 10^6 个细胞; Amersham-Pharmacia)加入到上述实施例中制备的过表达人 AILIM 的重组 HPB-ALL 细胞培养中,将混合物 37°C 下保温 2 小时。用 RPMI1640 培养基洗涤细胞 8 次。所得同位素标记的细胞用作靶细胞。

采用该同位素标记的野生型人 HPB-ALL 细胞作为对照细胞依照上述同样的方法进行对照实验。

通过使用 Lymphosepar I(IBM),从正常健康人体的外周血分离 PBMC 级分。所得人 PBMC 用作效应细胞。

将靶细胞铺板在具有 U-形孔的 96 孔微量培养板(Nunc)的每孔上(1×10^4 个细胞/孔; $25\mu\text{l}$ /孔)。随后,向各孔加入用含 5% FBS 的 RPMI1640 培养基($0.0001\text{--}1.0\mu\text{g}/\text{ml}$; $25\mu\text{l}$ /孔),或只用所述培养基($25\mu\text{l}$ /孔)或用 1% Nonidet P-40 ($25\mu\text{l}$ /孔; 具有细胞裂解活性的去污剂)稀释的不同浓度的人抗-人 AILIM 单克隆抗体,然后室温下将板保温 20 分钟。

使用抗-人 CD3 单克隆抗体 OKT3(ATCC CRL-8001)作为阳性对照抗体替代抗-人 AILIM 抗体以上述同样的方法进行培养。

随后,各孔加入效应细胞(E/T 比 = 50; 1×10^5 个细胞/孔; $50\mu\text{l}$ /孔), 37°C 下将板在 CO_2 培养箱中保温 16 小时。

培养后,将样品离心(4°C 下 1500rpm 10 分钟)。回收所得上清。通过 γ -计数器测定离心所得上清中的放射性。所述放射性代表由于 ADCC 造成的细胞膜损害而使 ^{51}Cr 从细胞中释放到培养液中的量。

假设只采用培养基的情况下观察到的放射性对应于 0% 细胞膜损害(0),采用 Nonidet 的情况下所测放射性对应于 100% 细胞膜损害(0),测定由抗-AILIM 抗体或抗-CD3 抗体诱导的 ADCC 造成的细胞膜损害的百分比。

实验结果列于图 70 和 71。

实验结果表明,本发明的人抗-人 AILIM 单克隆抗体表现出浓度依赖性 ADCC 诱导活性。

实施例 10: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体的基因和氨基酸序列的测定及

其分析

如下所述测定了上述实施例中制备的各种人抗-人 AILIM 单克隆抗体的重链以及轻链的 cDNA 序列。还对这些基因的结构特点进行了分析。

采用 Quick Prep mRNA 纯化试剂盒(Amersham Pharmacia), 从如上述实施例制备的产生人抗-人 AILIM 单克隆抗体的各杂交瘤(克隆: AIH5D3 (JMab-136), AII289 (JMab-138), AII394 (JMab-139))提取并纯化 PolyA⁺RNA。

将杂交瘤细胞悬浮于细胞裂解缓冲液(Lysis Buffer)中, 通过使用注射器使其裂解而将其溶解。将 Oligo(dT)树脂加入到该已解的物质中, 轻微振荡混合物。随后, 冲洗 Oligo(dT)树脂, 然后用 Elution Buffer 洗脱 PolyA⁺RNA。洗脱下来的 PolyA⁺RNA 用乙醇沉淀, 再溶解在 Tris-EDTA 缓冲液中。在 260nm 波长测定吸光度确定 PolyA⁺RNA 浓度。

采用市售 cDNA 合成试剂盒(GIBCOBRL)依照 M-MLV 逆转录酶方法, 以 PolyA⁺RNA 作模板, 合成的寡 DNA NotI-T(SEQ ID NO:1)作引物合成双链 cDNA。

具体地, 在含有纯化自杂交瘤的 PolyA⁺RNA 作模板(约 5μg), 引物(400pmol)和 M-MLV 逆转录酶的溶液(约 50μl)中, 37℃下 1 小时合成单链 cDNA。随后, 向反应液(4μl)中加入 dNTP, DNA 聚合酶 I, RNaseH, DNA 连接酶, 缓冲液和蒸馏水, 使混合物 16℃下保温 2 小时以合成双链 cDNA。用酚/氯仿提取所述双链 cDNA, 然后用乙醇沉淀。

随后, 向含有所述双链 cDNA 的 TE 缓冲液(50μl)中加入 EcoRI 接头 DNA(约 300pmole)和 DNA 连接酶(Ligation High; 33μl; TOYOBO), 将混合物 16℃下保温约 80 分钟以用接头 DNA 连接所述 cDNA。所用接头 DNA 是由已经常规方法 5'-磷酸化并相互退火的寡 DNA(20adp; SEQ ID NO: 2)和寡 DNA(24adp; SEQ ID NO: 3)组成的双链 DNA。

用酚/氯仿提取 DNA 连接体, 然后用乙醇沉淀。随后, 用市售限制酶 NotI (TOYOBO)消化该 DNA 反应物, 然后与市售 ATP 溶液(GIBCO BRL)和 T4 激酶(TOYOBO)37℃一起保温 30 分钟以使其 5'末端磷酸化。

所得 DNA 用乙醇沉淀, 然后经聚丙烯酰胺凝胶电泳分级分离。切下含约 500 到 2000bp 的 DNA 片段。用 UV 灯在照相设备中目视观察用溴乙啶染色的 DNA, 进行切胶。

切下的胶打碎然后悬浮在 TE 缓冲液中。离心悬浮液, 回收所得上清。

在市售 DNA 连接酶(Ligation High; TOYOBO)存在下,将回收的 DNA 与市售 λ 噬菌体载体 λ EXcell (0.25 μ g; Amersham Pharmacia)连接(16℃下 30 分钟)。然后,采用市售 λ 噬菌体包装试剂盒 Gigapack III Gold (STRATAGENE)将 DNA 连接体包装进入 λ 噬菌体,所得噬菌体颗粒感染大肠杆菌 NM522 宿主以制备 cDNA 文库。所有操作依照试剂盒所附实验方法进行。

随后,如下通过噬菌斑杂交方法筛选 cDNA 文库(Maniatis 等,“分子克隆:实验室手册”,冷泉港实验室,冷泉港,纽约):

cDNA 文库(1×10^4 噬菌斑)铺板在琼脂平板上,采用 Hybond-N 尼龙膜 (Amersham Pharmacia)制备其影印滤膜。按照噬菌斑杂交方法采用 γ 32 P-ATP 标记的探针在杂交缓冲液中对这些影印滤膜进行杂交处理。对抗体轻链所用的探针是 HIGLC(SEQ ID NO: 4),对抗体重链所用的探针是 NHCc2(SEQ ID NO: 5)。从得自初次筛选和二次筛选的阳性克隆进行单个噬菌斑分离。

通过采用单一 PCR 引物和 Taq PCR 试剂盒(TAKARA),以每一阳性克隆的噬菌体悬浮液作模板 DNA 经 PCR 扩增抗体的每一重链和轻链。抗体轻链所用引物对是 Exclle(SEQ ID NO: 6)和 ck117(SEQ ID NO: 7),抗体重链所用引物对是 Exclle(SEQ ID NO: 6)和 NHCc2(SEQ ID NO: 5)。依照常见方法采用琼脂糖凝胶电泳对所得 PCR 产物分级分离。切下对应于重链和轻链的含约 600bp DNA 的胶段。采用 DNA 测序仪(373A; PE-Applied Biosystems),ABI PRISM 测序软件(PE-Applied Biosystems)和 ABI PRISM 自动装配仪(PE-Applied Biosystems)分析从胶中纯化的 DNA 的核苷酸序列。证实每一阳性克隆的 DNA 具有足够长度的核苷酸序列。

用来自每一阳性克隆的噬菌斑的 λ 噬菌体感染大肠杆菌 NP66 以便体内切割目的质粒 DNA,将所得丝状噬菌体铺板在含氨苄青霉素的平板上以得到菌落。随后,采用常用方法从菌落回收并纯化质粒 DNA,用所述质粒转化大肠杆菌 JM109。随后,将转化细胞铺板在含氨苄青霉素的营养琼脂平板上以形成菌落。

随后,将得自每一菌落的细菌在含氨苄青霉素的 LB 培养基中的悬浮液转移到液体营养培养基,37℃下培养 24 小时。从培养液中收获细菌,采用质粒纯化试剂盒(Quiagen)纯化所述质粒 DNA。每一质粒 DNA 用限制酶 EcoRI/NotI 消化以证实载体 DNA 和插入的 DNA(重链 cDNA 或轻链 cDNA)的存在。

采用 DNA 测序仪(377A; PE-AppliedBiosystems), ABI PRISM 测序软件 (PE-Applied Biosystems) 和 ABI PRISM 自动装配仪 (PE-Applied Biosystems), 通过常用方法测定已插入每种纯化质粒的、编码抗体重链和轻链的每种 cDNA 的核苷酸序列。

用于序列测定的引物如下:

<用于测定重链 cDNA 的引物>

M13R 引物(SEQ ID NO: 8; STRATAGENE), ExcellE(SEQ ID NO: 6), 136H(SEQ ID NO: 9), 138/9H(SEQ ID NO: 10), AILIMHCL(SEQ ID NO: 11), HCc1(SEQ ID NO: 12), HCc2(SEQ ID NO: 5), HCc7(SEQ ID NO: 13), HCc8(SEQ ID NO: 14), HCc3(SEQ ID NO: 15), HCc4(SEQ ID NO: 16), HCc6(SEQ ID NO: 17), HIGHC(SEQ ID NO: 18), HCc9(SEQ ID NO: 19), HCc5(SEQ ID NO: 20)和 polyA(SEQ ID NO: 21).

<用于测定轻链 cDNA 的引物>

M13R 引物(SEQ ID NO: 8; STRATAGENE), ExcellE(SEQ ID NO: 6), AILIMLC1(SEQ ID NO: 22), AILIMLC2(SEQ ID NO: 23), LCc1(SEQ ID NO: 24), ck117(SEQ ID NO: 7), HIGHC(SEQ ID NO: 4), LCc2(SEQ ID NO: 25), HIK(SEQ ID NO: 26)和 polyA(SEQ ID NO: 21).

下列所列序列包括编码抗人 AILIM 的人单克隆抗体(由上述每一杂交瘤产生)重链和轻链的 cDNA 序列, 以及由 cDNA 序列导出的氨基酸序列。

克隆 AIH5D3(JMab-136)

<重链>

DNA 序列: SEQ ID NO: 27(信号序列: 核苷酸编号 69 到 125, V 区: 核苷酸编号 126 到 419)

氨基酸序列: SEQ ID NO: 28(包含信号序列: 氨基酸编号 1 到 19, 可变区: 氨基酸编号 20 到 118)

<轻链>

DNA 序列: SEQ ID NO: 29(信号序列: 核苷酸编号 39 到 104, V 区: 核苷酸编号 105 到 386)

氨基酸序列: SEQ ID NO: 30(包含信号序列: 氨基酸编号 1 到 22, 可变区: 氨基酸编号 23 到 116)

克隆 AII289(JMab-138)

<重链>

DNA 序列: SEQ ID NO: 31(信号序列: 核苷酸编号 94 到 150, V 区: 核苷酸编号 151 到 441)

氨基酸序列: SEQ ID NO: 32(包含信号序列: 氨基酸编号 1 到 19, 可变区: 氨基酸编号 20 到 116)

<轻链>

DNA 序列: SEQ ID NO: 33(信号序列: 核苷酸编号 28 到 87, V 区: 核苷酸编号 88 到 375)

氨基酸序列: SEQ ID NO: 34(包含信号序列: 氨基酸编号 1 到 20, 可变区: 氨基酸编号 21 到 116)

克隆 AII394(JMab-139)

<重链>

DNA 序列: SEQ ID NO: 35(信号序列: 核苷酸编号 96 到 152, V 区: 核苷酸编号 153 到 443)

氨基酸序列: SEQ ID NO: 36(包含信号序列: 氨基酸编号 1 到 19, 可变区: 氨基酸编号 20 到 116)

<轻链>

DNA 序列: SEQ ID NO: 37(信号序列: 核苷酸编号 33 到 92, V 区: 核苷酸编号 93 到 380)

氨基酸序列: SEQ ID NO: 38(包含信号序列: 氨基酸编号 1 到 20, 可变区: 氨基酸编号 21 到 116)

用基因序列分析软件在由 Tomlinson 等(Immunol. Today, Vol.16, No.5, p.237-242, 1995)构建的人免疫球蛋白可变区基因的 V BASE 序列库中检索在此测定的每一 DNA 序列。

结果表明: 上述人单克隆抗体的重链和轻链的 V-区基因分别由下列片段构成。

<重链 V-区基因>

克隆 AIH5D3(JMab-136): 1-02

克隆 AII289(JMab-138): 3-13

克隆 AII394(JMab-139): 3-13

<轻链 V-区基因>

克隆 AIH5D3(JMab-136): L5

克隆 AII289(JMab-138): A27

克隆 AII394(JMab-139): A27

实施例 11: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体对迟发型超敏反应(DTH)的抑制作用

免疫应答系统的功能是消除对生命体有害的抗原(致病性微生物如病毒, 细菌, 寄生虫, 异物等), 它可以广义地分为先天性免疫和获得性免疫。

前者是基于非特异性识别的排除作用系统, 包括吞噬细胞(多形核白细胞, 单核细胞, 巨噬细胞等)的吞噬作用, 自然杀伤细胞(NK)的攻击, 和补体的抗原调理作用等。

后者, 获得性免疫应答, 是获得了抗原特异性(活化)的淋巴细胞(主要是 T 细胞和 B 细胞)实施的排除作用系统。

此外, 获得性免疫应答可广义地分为细胞免疫和体液免疫。

与依赖于抗体的体液免疫不同, 细胞免疫通常是以 T 细胞对作为标靶的抗原的直接作用为表现的免疫应答。已知细胞免疫涉及对病毒或肿瘤的免疫应答, 组织或器官移植后诱发的免疫应答, 对某些药物的超敏反应, 和某些自身免疫疾病。

细胞免疫最典型的现象是公知的结核菌素过敏(基本上与结核菌素超敏反应同义)。结核菌素过敏是结核杆菌感染引发的迟发型过敏。该过敏源于结核杆菌感染并且可通过对活体皮内注射结核杆菌培养上清中的结核菌素蛋白引起免疫应答而诱发。

迟发型过敏是抗原致敏的 T 细胞(能记忆抗原的记忆 T 细胞)介导的过敏性。这种过敏称为“迟发型”是因为被抗原致敏的活体再次与所述抗原接触时, 需要 24 到 48 小时才表达出对记忆 T 细胞诱导的炎症的过敏性应答。

结核菌素过敏现象是一种有代表性的迟发型过敏, 通常被用于“结核菌素试验”中以诊断在动物体内是否已经建立了对结核杆菌感染的过敏性。具体地, 如下进行该试验: 对动物皮内注射纯化的结核菌素(纯蛋白衍生物; PPD; 普通诊断使用 0.1ml 的浓度为 0.05 μ g /0.1ml(2.5TU)的所述衍生物), 它是纯化自结核杆菌培养物的结核菌素蛋白; 注射的 48 小时后测定注射点皮肤红斑的主轴; 根据所测主轴长可诊断结核杆菌感染的存在。如果红斑

的主轴短于 4mm, 则受试体是阴性的; 如果该主轴在 4-9mm 的范围内, 则受试者为假阳性; 如果主轴为 10mm 或更长则受试体是阳性的。

与细胞免疫相关的迟发型过敏包括, 例如, 少量蛋白或类似物瞬时诱发的 Jones-Mote 型超敏反应, 对某些药物如苦基氯或植物毒素如日本漆的接触过敏, 或与移植排斥(如异源移植)相关的过敏, 以及上述对感染性病原体的抗原的过敏, 如由上述结核杆菌引起的结核菌素过敏。

此试验中, 利用上述结核菌素试验评价抗-AILIM 抗体对迟发型超敏反应(迟发型过敏)的抑制作用。所述试验如下进行:

将已用 BCG(卡介苗)(一种减毒的牛型结核杆菌活菌)致敏的每一只恒河猴(cynomolgus monkeys)(雄性, 体重: 6.0-8.5kg, Environmental Biological Life Science Research Center Inc.; 每组 3 只)用盐酸氯胺酮麻醉(10mg/kg, 肌肉内注射), 在其胸部的每一注射点(每只 6 个注射点)皮内注射 0.1ml 下列的任一试验样品。样品注射点间距离是 3cm 或更长。

(1) 人抗-人 AILIM 单克隆抗体(JMab-136; 0.2mg; 每个注射点 10 μ g)和结核菌素(4 μ g /1ml 生理盐水)的 1: 1 混合溶液;

(2) 人抗-人 AILIM 单克隆抗体(JMab-136; 2mg; 每个注射点 100 μ g)和结核菌素(4 μ g /1ml 生理盐水)的 1: 1 混合溶液;

(3) 磷酸盐缓冲液(PBS(-))作对照;

(4) 市售甾类消炎剂, 强的松龙(0.2mg; 每个注射点 10 μ g) 和结核菌素(4 μ g /1ml 生理盐水)的 1: 1 混合溶液作为阳性对照;

(5) 人抗-KLH 单克隆抗体(实施例<2-2>; 0.2mg; 每个注射点 10 μ g)和结核菌素(4 μ g /1ml 生理盐水)的 1: 1 混合溶液作为阴性对照;

每个样品注射 24 小时后, 测量每个注射点红斑的长轴和短轴, 确定红斑面积。

所得结果示于图 72。

所得结果表明与对照组和阴性对照组相比, 迟发型过敏引起的红斑在接受了抗-AILIM 抗体注射的组别中受到了显著抑制。此抑制作用与作为阳性对照的甾类消炎药的作用相当。

实施例 12: 分析在移植物抗宿主疾病(GVHD)病人的各种组织中 AILIM 的表达

采用常规方法分析病人活组织检查所得多种组织中 AILIM 的表达, 所

述病人是移植了来自供者的异源移植物的受者，并在移植后经临床诊断患有急性或慢性移植物抗宿主疾病(GVHD)。用 HE 和如上述实施例中制备的人抗-人 AILIM 单克隆抗体(JMab-36)将组织染色。

使用采自急性 GVHD 病人(28 例)各种组织的 33 个样品以及慢性 GVHD 病人(5 例)的 5 个样品进行分析。

结果如下：AILIM-阳性反应可见于 29 个皮肤样品中的 15 个；3 个胃组织样品中的 1 个；1 个结肠组织样品中的 1 个，上述所有样品全部得自急性 GVHD 病人。AILIM-阳性反应可见于 3 个皮肤样品中的 1 个；2 个结肠组织样品中的 2 个；这些样品全部得自慢性 GVHD 病人。此外，在 13 个观察到显著淋巴细胞浸润的样品中有 10 个发现 AILIM-阳性反应。

实施例 13：人抗-人 AILIM 单克隆抗体将协同刺激信号转导至猴 T 细胞中的活性

实施例 7 中进行的试验表明本发明的人抗-人 AILIM 单克隆抗体通过控制人 T 细胞应答，具体是控制 AILIM 介导的协同刺激信号向细胞内的转导而促进人 T 细胞增殖。在此试验中，如实施例 7 相同的方式分析了人单克隆抗体是否表现出促进猴 T 细胞增殖的活性。

<13-1>抗体的稀释

用磷酸缓冲液(PBS)稀释抗-人 CD3 单克隆抗体 SP34(BD-Pharmingen)，使最终浓度为 1 μ g /ml。

用 PBS 稀释如上制备的人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136 至终浓度 40 μ g /ml。再进一步用 PBS 稀释抗体溶液以制备多种浓度的抗体(40 μ g /ml-0.064 μ g /ml)。

<13-2>用抗体包被微量培养板

96 孔微量培养板的每一孔用抗人 CD3 单克隆抗体 SP34 (1 μ g /ml；每孔 25 μ l)和人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136 (40 μ g /ml-0.064 μ g /ml；每孔 25 μ l)包被。将板 37 $^{\circ}$ C 下保温 2 小时。随后，弃去抗体溶液，每孔用 PBS 洗 3 遍。洗后，向每孔加入含 10% FCS 的 RPMI1640 培养基(100 μ l /孔)，将板 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时。从而用上述抗体包被了板的各孔。

以相同的方法进行对照试验，板上包被的对照抗体是人抗-KLH 单克隆抗体(JMab23；参见前面的实施例)，而非人抗-人 AILIM 单克隆抗体。

在下面的试验中使用用所述抗体包被的微量培养板。

<13-3>猴 T 细胞悬浮液的制备

从恒河猴采集外周血,采用 NycoPrep1.077A(Nycomed)通过密度梯度离心分离单核细胞。依照实验手册,使用抗-人 CD4 抗体 M-T477(BD-Pharmingen),抗-人 CD8 抗体 RPA-T8(BD-Pharmingen),抗-小鼠 IgG 微珠(Miltenyi)和磁性分选仪从恒河猴单核细胞分离猴 T 细胞。采用血球计数器测定 T 细胞数。将猴 T 细胞悬在含 10% FCS 的 RPMI1640 培养基中。这样就制备得到了猴 T 细胞悬浮液(1×10^6 个细胞/ml)。

<13-4>细胞培养

(1)用抗-人 CD3 抗体和抗-人 AILIM 抗体包被的微量培养板进行培养
将猿猴(Simian)T 细胞悬浮液加入到用上述抗体包被的微量培养板的每孔,将板置于 CO₂ 培养箱中 37℃ 下保温 2 天。

培养完成后,各板进行下列试验:

<13-5>T 细胞增殖活性的测定

向保温后的每孔加入甲基[³H]胸苷(0.5μCi/孔, Amersham Pharmacia),将板置于 CO₂ 培养箱中 37℃ 下保温 6 小时。保温后,用细胞收集器将细胞捕获在 GF/C 滤膜(Packard)上。随后,将滤膜 40℃ 下干燥 3 小时或更长时间,然后向其中加入 Microscinti 0(20μl/孔; Packard)。用β-计数器(TOP COUNT)测定滤膜上捕获的细胞中所掺入的 ³H 放射性来分析培养后 T 细胞增殖的程度。

结果显示于图 73。

本试验结果表明当用抗-人 AILIM 单克隆抗体(人单克隆抗体或小鼠单克隆抗体)与抗-人 CD3 抗体一起包被微量培养板时,随着所述细胞浓度的增加猿猴 T 细胞显著增殖。

该结果也提示,本发明的人抗-人 AILIM 单克隆抗体可与猴 AILIM 结合,且具有调节猴 AILIM 功能的活性。

实施例 14: 建立用于鉴定和定量能与 AILIM 或 AILIM 配体结合的物质

建立一种 ELISA(酶联免疫溶剂检测)方法以鉴定或定量能与 AILIM (ICOS)或 AILIM 配体(B7h/B7RP1/GL50/LICOS)结合的物质。

下文详述的方法的原理是基于通过 ELISA 估计的所述物质对可溶性 AILIM (hAILIM-IgFc)和可溶性人 AILIM 配体(hB7h-IgFc)间结合的抑制程

度。

<14-1>样品

使用下列样品:

(1)链霉抗生素-HRP(Southern Biotechnology Associates, Inc.);

(2)可溶性人 AILIM 配体(人 B7h 的胞外区与人 IgG1 的恒定区之间的融合蛋白);

所述蛋白由下述<14-2>的方法制备;

(3)生物素标记的可溶性 AILIM-IgFc;

依照本发明人之一的 Tezuka 的较早文献(JP-A 11-29599(实施例 16(2)) 和 WO 98/38216(实施例 16(2)))所述同样的方法所得抗原可通过进一步纯化而制备 AILIM-IgFc;

(4)人抗-人 AILIM 单克隆抗体(JMab-136; 如上所述);

(5)人抗-KLH 单克隆抗体(阴性对照抗体; JMab-23; 如上所述);

(6)磷酸盐缓冲液(PBS(-); Nikken Seibutsu);

(7)RPMI1640 培养基(Nikken Seibutsu);

(8)胎牛血清(FCS; JRH-Bioscience);

(9)30%牛血清白蛋白(BSA; Sigma);

(10)吐温 20(BioRad);

(11)TMB⁺底物色素原(Dako)。

<14-2>可溶性人 AILIM 配体(人 B7h 的胞外区与人 IgG1 的恒定区的融合蛋白(hB7h-IgFc))的制备

依照上述实施例所述同样的方式从得自人外周血的单核细胞制备总 RNA。以所得总 RNA(5μg)为模板并使用 Preamplification System 用于第一链 cDNA 的合成(GIBCO-BRL)的 Superscript 预扩增系统合成 cDNA。

然后, 设计并合成 5'引物(5'-GAGGTCTCCGCCCTCGAGATGCGGCTGGGCAGTCC-3', SEQ ID NO: 39), 其末端具有 XhoI 限制性位点, 3'引物(5'-CACAGGACAGCCAGGGGATCCCACGTGGCCGCG-3', SEQ ID NO: 40), 其末端具有 BamHI 限制性位点, 通过 PCR 扩增编码人 AILIM 配体(hB7h)胞外区的 cDNA。使用所述 cDNA 为模板并用所述引物经 PCR 制备 DNA, 所述 DNA 包含编码人 B7h 胞外区的 cDNA 且在其不同末端具有 XhoI 和 BamHI 位点。所得 PCR 产物用 XhoI 和 BamHI 消化, 通过琼脂糖

凝胶电泳分级以分离得到预计编码目的胞外区的相当于约 720bp cDNA 片段的区带。将分离的 cDNA 片段亚克隆进入预先用 XhoI 和 BamHI 消化的质粒 pBluescript II SK(+)(Stratagene)。采用自动荧光 DNA 测序仪(Applied Biosystems)通过序列分析证实所述 cDNA 片段包含编码人 B7h 胞外区的部分。

另一方面,通过用 XbaI 和 BamHI 消化质粒(参见,细胞, Vol.61, p.1303-1313, 1990; Dr.Seed 等制备,马塞诸塞州总医院)来制备 BamHI-XbaI DNA 片段形式(约 1.3kb)的编码作为融合配对物的人 IgG1 的 Fc 的 DNA。所述片段包含编码人 IgG1, C γ 12 和 C γ 13 的铰链区的外显子。

将如上制备的编码人 B7h(hB7h)胞外区的 XhoI-BamHI 片段和包含编码人 IgG1 的 Fc(缩写为“IgFc”)的外显子的 BamHI-XbaI 片段亚克隆进入预先用 XhoI 和 XbaI 消化的质粒 pBluescript II SK(+)(Stratagene)。

随后,用 XhoI 和 XbaI 消化所述质粒以制备约 1.8kb 的 DNA 片段,其包含人 B7h 与人 IgFc 胞外区的融合 DNA。通过使用 T4 DNA 连接酶,将此融合 DNA 片段插入到表达载体 pME18S(Medical Immunology, Vol.20, No.1, p.27-32, 1990, 和“基因工程手册,” Experimental Medicine, supplement, Yodosha, pp.101-107, 1992)的 XhoI 和 XbaI 位点之间,以构建质粒 pHB7h-IgFc。

在含 10%胎牛血清和氨苄青霉素的 DMEM 培养基中培养单层 COS7 细胞(ATCC CRL-1651)至亚铺满,用质粒 pHB7h-IgFc 通过电穿孔转化所述细胞以产生转化细胞。

将转化细胞在无血清 ASF104 培养基中培养 72 小时以表达 hB7h-IgFc。

采用蛋白 G Sepharose 亲和柱(Amersham Pharmacia)如下纯化 HB7h-IgFc:

将上述培养上清离心得到上清。将所得上清上样到已用结合缓冲液预平衡的蛋白 G Sepharose 亲和柱。随后,用结合缓冲液洗柱,用洗脱缓冲液进行洗脱。回收洗脱液,然后对磷酸盐缓冲液透析。将外部透析缓冲液更换 2 或更多次。这样就得到了纯化的 hB7h-IgFc。

<14-3>抗体和可溶性人 AILIM (hAILIM-IgFc)的稀释及其反应

抗-人 AILIM 单克隆抗体(JMab-136)和作为阴性对照抗体的人抗-KLH 单克隆抗体(JMab-23)原液系列稀释为 11 个水平,将每一样品(200 μ l)与 200 μ l

含 10 % FCS 的 RPMI1640 培养基充分混合。如此制备好各种浓度的抗体溶液。向所制备的各种浓度的溶液中加入生物素标记的 hAILIM-IgFc(2 μ l/管; 终浓度 1 μ g/ml)。将所得溶液充分混合并在室温下保温 30 分钟。

<14-4>抗-AILIM 单克隆抗体抑制 hAILIM-IgFc 与 hB7h-IgFc 结合的活性的检测

向 96 孔微量培养板的每孔加入 hB7h-IgFc (50 μ l/孔(800ng/孔))。将板密封并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时。从每孔移去溶液, 用 PBS (120 μ l)清洗每孔 3 次。随后, 将含 0.5 % BSA 的 PBS(100 μ l/孔)加入到每孔中以封闭未反应的点。将板密封并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时。保温后, 除去溶液, 用 PBS(120 μ l)清洗每孔 3 次。随后将<14-3>中制备的每一样品加入孔中(50 μ l/孔)。将板密封并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时。弃去溶液, 用 37 $^{\circ}$ C 下预热的含 10 % FCS 的 RPMI1640 培养基(120 μ l)清洗每孔 3 次。随后, 向每孔加入含 3.7 % 福尔马林的 PBS(100 μ l/孔), 将板冰上保温 5 分钟。将每孔的溶液弃去, 用 0.1 % 吐温 20 洗孔 3 次(120 μ l)。随后, 向每孔加入链霉抗生物素-HRP(50 μ l/孔)。将板密封并在室温下保温 30 分钟。将每孔的溶液弃去, 用含 0.1 % 吐温 20 的 PBS 洗孔 3 次(120 μ l)。随后, 向每孔加入 TMB⁺底物色素原(50 μ l/孔)。将板室温下保温 20 分钟。随后, 向每孔加入 2N 硫酸(50 μ l/孔)以终止反应。采用 THERMO max (Molecular Devices)在 450nm 波长测定每孔的吸光度。

结果示于图 74 到 76。

结果显示抗-AILIM 单克隆抗体具有以剂量依赖方式抑制 hAILIM-IgFc 与 hB7h-IgFc 结合的活性。

相应地, 本实施例指出一种由本发明方法阐明的检测系统可用于筛选和鉴定能与 AILIM 或 AILIM 配体结合的物质(例如, 抗体或合成的低分子量化合物)。

实施例 15: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体对与 AILIM-AILIM 配体介导的协同刺激信号转导相关的人 T 细胞增殖进行抑制的活性

通过测定人抗-人 AILIM 单克隆抗体对人 T 细胞与 AILIM 配体(B7h/B7RP1/GL50/LICOS)相接触而诱发的细胞增殖的抑制效应, 分析本发明的抗-人 AILIM 单克隆抗体是否具有调节人 T 细胞表面 AILIM 所介导的信号转导的活性。

<15-1>抗体的稀释

用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释抗-人 CD3 单克隆抗体 OKT3(ATCC CRL-8001)到终浓度为 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

用 PBS 稀释如上制备的可溶性人 AILIM 配体(hB7h-IgFc)到终浓度为 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 。抗体溶液用 PBS 进一步稀释以得到多种浓度的抗体($40\mu\text{g}/\text{ml}$ - $0.064\mu\text{g}/\text{ml}$)。

<15-2>用抗体包被微量培养板

用(1)抗-人CD3单克隆抗体OKT3($8\mu\text{g}/\text{ml}$; 每孔 $25\mu\text{l}$)和 hB7h-IgFc($40\mu\text{g}/\text{ml}$ - $0.064\mu\text{g}/\text{ml}$; 每孔 $25\mu\text{l}$)包被 96 孔微量培养板的每一孔。将板 37°C 下保温 2 小时。随后弃去抗体溶液, 每孔用 PBS 洗 3 次。清洗后, 向每孔加入含 10% FCS 的 RPMI1640 培养基($100\mu\text{l}/\text{孔}$), 将板 37°C 下保温 1 小时。使板的各孔都被包被。

<15-3>人 T 细胞悬浮液的制备

从正常健康人体采集外周血, 采用 LymphoPrep(Nycomed)通过密度梯度离心对单核细胞分级。使用 Pan-T 细胞分离试剂盒(Miltenyi)和磁性分选仪, 按说明书从人单核细胞分离人 T 细胞。采用血球计数器测定 T 细胞数。将人 T 细胞悬浮在添加了人抗-人 AILIM 单克隆抗体 Jmab136 ($20\mu\text{g}/\text{ml}$)的含 10% FCS 的 RPMI1640 培养基中。将制备好的人 T 细胞悬浮液(1×10^6 个细胞/ ml)室温下保温 30 分钟。

用人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMAb23($20\mu\text{g}/\text{ml}$)作为阴性对照抗体。

<15-4>细胞培养

依照上述同样的方式, 向已用抗-人 CD3 抗体和 hB7h-IgFc 包被的微量培养板的每孔加入人 T 细胞悬浮液($100\mu\text{l}/\text{孔}$; 1×10^5 个细胞/ 孔), 将板置于 CO_2 培养箱中 37°C 下保温 3 天。

<15-5>T 细胞增殖活性的测定

保温后, 向各板的每孔加入甲基 ^3H 胸苷 ($0.5\mu\text{Ci}/\text{孔}$; Amersham-Pharmacia), 将各板在 CO_2 培养箱中于 37°C 下保温 6 小时。然后, 用细胞收集器将细胞捕获在 GF/C 滤膜(Packard)上。随后, 将滤膜 40°C 下干燥 3 小时或更长时间, 然后向其中加入 Microscinti 0($20\mu\text{l}/\text{孔}$; Packard)。用 β -计数器(TOP COUNT)测定滤膜上捕获的细胞中掺入的 ^3H 放射性来分析培养后 T 细胞增殖的程度。

结果显示于图 77。

此分析结果显示人T细胞生长显著依赖于人B7h-IgFc浓度(在使用阴性对照抗体的检测中)。此外,人抗-人 AILIM 单克隆抗体显著抑制人 T 细胞的增殖。

实施例 16: 人抗-人 AILIM 单克隆抗体对与 AILIM-AILIM 配体介导的协同刺激信号转导相关的猴 T 细胞增殖的抑制活性

以猴 T 细胞取代人 T 细胞如上实施例 15 所述进行同样的实验。

<16-1>抗体的稀释及其它

用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释抗-人 CD3 单克隆抗体 SP34(BD-Pharmacia)到终浓度为 1 μ g/ml。

用 PBS 稀释如上制备的人 B7h-IgFc 到终浓度为 40 μ g/ml。用 PBS 进一步稀释抗体溶液以得到多种浓度的抗体(40 μ g/ml-0.064 μ g/ml)。

<16-2>用抗体包被微量培养板

用(1)抗-人 CD3 单克隆抗体 SP34(BD-Pharimingen)(1 μ g/ml; 每孔 25 μ l)和人 B7h-IgFc(40 μ g/ml-0.064 μ g/ml; 每孔 25 μ l)包被 96 孔微量培养板的每一孔。将板 37 $^{\circ}$ C 下保温 2 小时。随后弃去抗体溶液,每孔用 PBS 洗 3 次。清洗后,向每孔加入含 10% FCS 的 RPMI1640 培养基(100 μ l/孔),将板 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时。使板的各孔都被包被。

<16-3>猴 T 细胞悬浮液的制备

从恒河猴采集外周血。采用 NycoPrep1.077A(Nycomed)通过密度梯度离心制备含单核细胞的级分。使用抗-人 CD4 抗体 M-T477 (BD-Pharimingen),抗-人 CD8 抗体 RPA-T8 (BD-Pharimingen),抗-小鼠 IgG 微珠(Miltenyi)和磁性分拣仪,按说明书从恒河猴单核细胞分离猴 T 细胞。采用血球计数器测定 T 细胞数。将猴 T 细胞悬浮在含人抗-人 AILIM 单克隆抗体 JMab136(20 μ g/ml)和 10% FCS 的 RPMI1640 培养基中以制备猴 T 细胞悬浮液(1×10^6 个细胞/ml)。将所述悬浮液室温下保温 30 分钟。

将人抗-KLH 单克隆抗体 JMab23(20 μ g/ml)用作阴性对照抗体。

<16-4>细胞培养

依照上述同样的方式,向已用抗-人 CD3 抗体和 hB7h-IgFc 包被的微量培养板的每孔加入猴 T 细胞悬浮液(100 μ l/孔; 1×10^5 个细胞/孔),将板置于 CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 下保温 3 天。

<16-5>T 细胞增殖活性的测定

培养后，向各板的每孔加入甲基³H]胸苷(0.5 μ Ci/孔；Amersham-Pharmacia)，将各板在CO₂培养箱中于37℃下保温6小时。然后，用细胞收集器将细胞捕获在GF/C滤膜(Packard)上。随后，将滤膜40℃下干燥3小时或更长时间，然后向其中加入Microscinti 0(20 μ l/孔；Packard)。用 β -计数器(TOP COUNT)测定滤膜上捕获的细胞中掺入的³H放射性来分析培养后T细胞增殖的程度。

结果显示于图78。

此分析结果显示猴T细胞生长显著依赖于人B7h-IgFc浓度(在使用阴性对照抗体的检测中)。此外，抗-人AILIM单克隆抗体显著抑制猴T细胞增殖。

工业应用

本发明的能与人AILIM结合的单克隆抗体是人源的，因此这些抗体不会由于对人的抗原性，即宿主中的HAMA(人抗小鼠抗原性)，诱发严重的免疫排斥反应，所述HAMA在包含非-人哺乳动物来源的抗体，如小鼠源抗体的抗体治疗制剂中已经是一个严重的治疗性问题(副作用)。因此本发明的抗体就具有作为抗体药物的巨大价值。

所以本发明抗AILIM(具体地是人AILIM)的人单克隆抗体和含有所述人单克隆抗体的药物制剂根本不会诱发HAMA引起的宿主免疫排斥反应；所以能作为治疗剂用于控制与AILIM介导的共信号(第二信号)转导到AILIM表达细胞有关的多种生物反应(如，AILIM表达细胞的增殖，由AILIM表达细胞产生的细胞因子，引起AILIM表达细胞的免疫性细胞溶解或细胞死亡(凋亡)，诱导对AILIM表达细胞的抗体依赖性损害)；和/或用于治疗或预防与AILIM介导的信号转导有关的多种疾病，控制和抑制这些疾病的发生和/或发展。

具体地，通过提供包含本发明的人抗-人AILIM单克隆抗体或其一部分作为活性成分的药物制剂，可能抑制或治疗和预防多种疾病(如，类风湿性关节炎，多发性硬化，自身免疫性甲状腺炎，过敏性接触性皮炎，慢性炎性疾病扁平苔癣，系统性红斑狼疮，胰岛素依赖型糖尿病，牛皮癣等)，这些疾病可分类为自身免疫病或过敏性疾病(具体地，由于细胞免疫引起的自身免疫病和迟发型过敏)；关节病(例如类风湿性关节炎(RA)，骨关节炎(OA))，炎症(如肝炎)；移植物抗宿主反应(GVH反应)；移植物抗宿主疾病

(GVHD); 与组织(如皮肤, 角膜和骨)或器官(肝, 心, 肺, 肾, 胰脏等)移植(同种移植或异种移植)有关的免疫排斥反应; 对外来抗原或自身抗原的免疫应答(例如抗所述抗原的抗体的生产, 细胞增殖, 细胞因子的生产等); 可能由肠免疫异常(具体地, 炎性肠疾病(特别是 Crohn's 病和溃疡性结肠炎))引起的疾病; 食物过敏反应等。

本发明的药物组合物使得有可能治疗或预防某些采用甾族药物作消炎药的炎症, 例如, 与各种关节炎性皮疹相关的炎症(类风湿性关节炎, 骨关节炎等), 肺炎, 肝炎(包括病毒性肝炎), 与传染性疾病相关的炎症, 炎性肠疾病, 肠炎, 肾炎(肾小球肾炎, 与肾纤维化相关的炎症, 胃炎, 脉管炎, 胰腺炎, 腹膜炎, 支气管炎, 心肌炎, 脑炎, 与局部缺血-再灌注液损伤相关的炎症(心肌缺血-再灌注损伤等)), 与组织或器官移植后的免疫排斥反应有关的炎症, 烫伤, 各种皮肤炎症(牛皮癣, 过敏性接触性皮炎, 慢性炎性皮肤病扁平苔癣), 与多器官衰竭有关的炎症, PTCA 或 PTCR 手术后炎症, 与动脉粥样硬化症有关的炎症, 自身免疫甲状腺炎等。

此外, 在上述抑制和治疗与组织或器官移植相关的免疫排斥反应方面, 本发明的药物组合物可与已知用于抑制移植治疗中的免疫排斥反应的免疫抑制剂联合使用, 从而可提高已知药物对移植排斥的抑制效应。

而且, 通过使用本发明的用于鉴定能与 AILIM 或 AILIM 配体结合的物质方法, 有可能通过与 AILIM 或 AILIM 配体的结合来控制与 AILIM 和 AILIM 配体间作用有关的信号转导, 这样就可以筛选和选择具有治疗上述各种疾病的潜在活性的药物制剂(合成的化学化合物和抗体)。

序列表说明文字

SEQ ID NO: 1

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, NotI-T。

SEQ ID NO: 2

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的接头序列, 20adp。

SEQ ID NO: 3

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的接头序列, 24adp。

SEQ ID NO: 4

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, HIGLC。

SEQ ID NO: 5

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, NHCc2。

SEQ ID NO: 6

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, ExcellE。

SEQ ID NO: 7

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, ck117。

SEQ ID NO: 8

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, M13R。

SEQ ID NO: 9

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, 136H。

SEQ ID NO: 10

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, 138/9H。

SEQ ID NO: 11

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, AILIMHC1。

SEQ ID NO: 12

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, HCc1。

SEQ ID NO: 13

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, HCc7。

SEQ ID NO: 14

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, HCc8。

SEQ ID NO: 15

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, HCc3。

SEQ ID NO: 16

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, HCc4。

SEQ ID NO: 17

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, HCc6。

SEQ ID NO: 18

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, HIGHC。

SEQ ID NO: 19

其它信息: 人工序列的描述: 人工合成的引物序列, HCc9。

SEQ ID NO: 20

其它信息：人工序列的描述：人工合成的引物序列，HCc5。

SEQ ID NO: 21

其它信息：人工序列的描述：人工合成的引物序列，polyA。

SEQ ID NO: 22

其它信息：人工序列的描述：人工合成的引物序列，AILIMLC1。

SEQ ID NO: 23

其它信息：人工序列的描述：人工合成的引物序列，AILIMLC2。

SEQ ID NO: 24

其它信息：人工序列的描述：人工合成的引物序列，LCc1。

SEQ ID NO: 25

其它信息：人工序列的描述：人工合成的引物序列，LCc2。

SEQ ID NO: 26

其它信息：人工序列的描述：人工合成的引物序列，HIK。

SEQ ID NO: 39

其它信息：人工序列的描述：人工合成的引物序列

SEQ ID NO: 40

其它信息：人工序列的描述：人工合成的引物序列

序列表

<110> 日本烟草产业株式会社(Japan Tobacco, Inc.)

<120> 抗协同刺激信号转导分子 AILIM 的人单克隆抗体及其药物用途

<130> J1-A0101Y1P

<140>

<141>

<150> JP P2000-147116

<151> 2000-05-18

<150> JP P2001-99508

<151> 2001-03-30

<160> 40

<170> PatentIn 2.1 版

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 NotI-T

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(45)

<400> 1

aactggaagc ttcagcggcc gcagagatTT tttttttttt ttttt

45

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的接头序列, 20adp

<400> 2

cgtggtgtca tggcactgcg

20

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的接头序列, 24adp

<400> 3

aattcgctgt gccatgacac cacg

24

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 HIGLC

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(23)

<400> 4

gtctgctttg ctcagcgtca ggg

23

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 NHCc2

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(21)

<400> 5
caccggttcg gggaagtagt c 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 ExcellE

<220>
<221> primer_bind
<222> (1).. (21)

<400> 6
ggtgacacta tagaatacag g 21

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 ck117

<220>
<221> primer_bind
<222> (1).. (25)

<400> 7
gcaggcacac aacagaggca gttcc 25

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 M13R

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<400> 8

cacaggaaac agctatgacc

20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 136H

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(21)

<400> 9

cctggacaag ggcttgagtg g

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 138/9H

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(21)

<400> 10

acaggaaaag gtctggagtg g

21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 AILIMHC1

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(21)

<400> 11

acagtaatac acggccgtgt c

21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 HCc1

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(21)

<400> 12

gactacttcc ccgaaccggt g

21

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 HCc7

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(22)

<400> 13

gtggcaggac cgtcagtctt cc

22

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 HcC8

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<400> 14

aagaggaaga ctgacggtcc tgcc

24

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 HcC3

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(23)

<400> 15

ccgttgtgca ccaggactgg ctg

23

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 HcC4

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(23)

<400> 16
tgcacttgta ctccttgccg ttc 23

<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 HCc6

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(23)

<400> 17
cagccggaga acaactacaa gac 23

<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 HIGHC

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(22)

<400> 18
tcttgtagtt gttctccggc tg 22

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 HCc9

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(22)

<400> 19

tacttcccag gcacccagca tg

22

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 Hc5

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(23)

<400> 20

atgctgggtg cctgggaagt atg

23

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 polyA

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(21)

<400> 21

tcaaactatc ggccttgctg g

21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 AILIMLC1

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(21)

<400> 22

tagcctggta tcagcagaaa c

21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 AILIMLC2

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(21)

<400> 23

gtttctgctg ataccaggct a

21

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 LCc1

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(22)

<400> 24

gcaccatctg tcttcatttt cc

22

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 LCc2

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(21)

<400> 25

caaagagctt caacagggga g

21

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 HIK

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<400> 26

aggetggaac tgaggagcag

20

<210> 27

<211> 1616

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1)..(68)

<220>

<221> CDS

<222> (69).. (1481)

<220>

<221> 3' UTR

<222> (1482).. (1616)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (69).. (125)

<400> 27

gaattcgag tgccatgaca ccacgcatct gtcctctaga gaatcccctg agagctccgt 60

tcctcacc atg gac tgg acc tgg agg atc etc ttc ttg gtg gca gca gcc 110

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala

1

5

10

aca gga gcc cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg 158

Thr Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

15

20

25

30

aag aag cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac 206

Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

35

40

45

acc ttc acc ggc tac tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa 254

Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln

50

55

60

ggg ctt gag tgg atg gga tgg atc aac cct cac agt ggt ggc aca aac 302

Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr Asn

65

70

75

tat gca cag aag ttt cag ggc agg gtc acc atg acc agg gac acg tcc 350

Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser

80

85

90

atc agc aca gcc tac atg gag ctg agc agg ctg aga tcc gac gac acg 398

Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr

95

100

105

110

gcc gtg tat tac tgt gcg agg acg tat tac tat gat agt agt ggt tat 446

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr

115

120

125

tac cat gat gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc	494
Tyr His Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val	
130 135 140	
tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc	542
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys	
145 150 155	
tcc agg agc acc tcc gag agc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag	590
Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys	
160 165 170	
gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gct ctg	638
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu	
175 180 185 190	
acc agc ggc gtg cac acc ttc cca gct gtc cta cag tcc tca gga ctc	686
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu	
195 200 205	
tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc aac ttc ggc acc	734
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr	
210 215 220	
cag acc tac acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg	782
Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val	
225 230 235	
gac aag aca gtt gag cgc aaa tgt tgt gtc gag tgc cca ccg tgc cca	830
Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	
240 245 250	
gca cca cct gtg gca gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	878
Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
255 260 265 270	
aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg	926
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
275 280 285	
gtg gac gtg agc cac gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg	974
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val	
290 295 300	

gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag cca cgg gag gag cag	1022
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
305 310 315	
ttc aac agc acg ttc cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtt gtg cac cag	1070
Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln	
320 325 330	
gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc	1118
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly	
335 340 345 350	
ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa acc aaa ggg cag ccc	1166
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro	
355 360 365	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc	1214
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr	
370 375 380	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc	1262
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
385 390 395	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	1310
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
400 405 410	
aag acc aca cct ccc atg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac	1358
Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
415 420 425 430	
agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	1406
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
435 440 445	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	1454
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
450 455 460	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga gtgccacggc cggcaagccc	1501
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
465 470	

ccgctcccca ggctctcggg gtcgctgag gatgcttggc acgtaccccg tgtacatact 1561

tcccaggcac ccagcatgga aataaagcac ccagcgtgc cctggaaaaa aaaaa 1616

<210> 28

<211> 470

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 28

```

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

```

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 29

<211> 974

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1)..(38)

<220>

<221> CDS

<222> (39)..(749)

<220>

<221> 3' UTR

<222> (750).. (974)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (39).. (104)

<400> 29

gaattcgacgag tgccatgaca ccacggtcag gacacagc atg gac atg agg gtc ccc 56

Met Asp Met Arg Val Pro

1

5

gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg ttc cca ggt tcc aga tgc 104

Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro Gly Ser Arg Cys

10

15

20

gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc gtg tct gca tct gta gga 152

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

25

30

35

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agg ttg 200

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Leu

40

45

50

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc 248

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

55

60

65

70

tat gtt gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 296

Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

75

80

85

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 344

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

90

95

100

gaa gat ttt gca act tac tat tgt caa cag gct aac agt ttc ccg tgg 392

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp

105

110

115

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cga act gtg gct gca 440

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

120

125

130

cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga 488
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 135 140 145 150

act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc 536
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 155 160 165

aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag 584
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 170 175 180

gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc 632
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 185 190 195

agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac 680
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 200 205 210

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc 728
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 215 220 225 230

ttc aac agg gga gag tgt tag agggagaagt gccccacct gctcctcagt 779
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 235

tccagcctga cccctccca tcctttggcc tctgaccctt tttccacagg ggacctaccc 839

ctattgcggt cctccagctc atctttcacc tcacccccct cctcctcctt ggctttaatt 899

atgctaattgt tggaggagaa tgaataaata aagtgaatct ttgcaaaaaa aaaaaaaaaa 959

aatctctgcg gccgc 974

<210> 30

<211> 236

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 30

```

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

```

<210> 31

<211> 1708

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1).. (93)

<220>

<221> CDS

<222> (94)..(1506)

<220>

<221> 3' UTR

<222> (1507)..(1708)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (94)..(150)

<400> 31

gaattgcgag taccatgaca ccacgggagc cccagccttg ggattcccaa gtgtttgtaa 60

tcagtgatca ggactgagca cacaggactc acc atg gag ttg ggg ctg agc tgg 114

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp

1

5

gtt ttc ctt gtt gct ata tta gaa ggt gtc cag tgt gag gtg cag ctg 162

Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu

10

15

20

gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc 210

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu

25

30

35

tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tac gac atg cac tgg 258

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met His Trp

40

45

50

55

gtc cgc caa gct aca gga aaa ggt ctg gag tgg gtc tca gct att ggt 306

Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Gly

60

65

70

act gct ggt gac aca tac tat cca ggc tcc gtg aag ggc cga ttc acc 354

Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr

75

80

85

atc tcc aga gaa aat gcc aag aac tcc ttg tat ctt caa atg aac agc 402

Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser

90

95

100

ctg aga gcc ggg gac acg gct gtg tat tac tgt gta aga gat aat agg 450

Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Asn Arg

105

110

115

```

aag gtg acc cac gag cac tac tac tac tac ggt atg gac gtc tgg ggc 498
Lys Val Thr His Glu His Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
120          125          130          135

caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg 546
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
          140          145          150

gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg agc acc tcc gag agc aca gcg 594
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
          155          160          165

gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg 642
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
          170          175          180

tcg tgg aac tca ggc gct ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc cca gct 690
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
          185          190          195

gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg 738
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
200          205          210          215

ccc tcc agc aac ttc ggc acc cag acc tac acc tgc aac gta gat cac 786
Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
          220          225          230

aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aca gtt gag cgc aaa tgt tgt 834
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
          235          240          245

gtc gag tgc cca ccg tgc cca gca cca cct gtg gca gga ccg tca gtc 882
Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
          250          255          260

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc 930
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
          265          270          275

cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac ccc gag 978
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
280          285          290          295

```

gtc cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag	1026
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	
300 305 310	
aca aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc acg ttc cgt gtg gtc agc	1074
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser	
315 320 325	
gtc ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag	1122
Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	
330 335 340	
tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc	1170
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile	
345 350 355	
tcc aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc	1218
Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	
360 365 370 375	
cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg	1266
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	
380 385 390	
gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat	1314
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	
395 400 405	
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg ctg gac tcc	1362
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser	
410 415 420	
gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg	1410
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	
425 430 435	
tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg	1458
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	
440 445 450 455	
cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	1506
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
460 465 470	

```

gtgccacggc cggcaagccc ccgctcccca ggctctcggg gtcgcgtgag gatgcttggc 1566

acgtaccccc tgtacatact tcccaggcac ccagcatgga aataaagcac ccagcgctgc 1626

cctgggcccc tgcnaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1686

aaaaaaaaat ctctgcggcc gc 1708

```

<210> 32

<211> 470

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 32

```

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

```

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 33

<211> 948

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1)..(27)

<220>

<221> CDS

<222> (28).. (738)

<220>

<221> 3' UTR

<222> (739).. (948)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (28).. (87)

<400> 33

gaattgcag tgccatgaca ccacgcc atg gaa acc cca gcg cag ctt ctc ttc 54

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe

1

5

ctc ctg cta ctc tgg ctc cca gat acc acc gga gaa att gtg ttg acg 102

Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr

10

15

20

25

cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc 150

Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu

30

35

40

tcc tgc agg gcc agt cag aat att aga agc agc tac tta gcc tgg tac 198

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr

45

50

55

cag cag aaa cct ggc cag gct ccc ggg ctc ctc atc tat ggt gca tcc 246

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Gly Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser

60

65

70

agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg 294

Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

75

80

85

aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag cct gaa gat ttt gca 342

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala

90

95

100

105

gtg tat tac tgt cag cag ttt ggt agc tca cct atg tgc agt ttt ggc 390

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Ser Ser Pro Met Cys Ser Phe Gly

110

115

120

cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc 438
 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 125 130 135

ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct 486
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 140 145 150

gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag 534
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 155 160 165

tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc 582
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 170 175 180 185

aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg 630
 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 190 195 200

acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa 678
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 205 210 215

gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg 726
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 220 225 230

gga gag tgt tag agggagaant gccccacct gctcctcagt tccagcctga 778
 Gly Glu Cys
 235

ccccctccca tcctttggcc tctgaccctt ttccacagg ggacctaccc ctattgcggt 838

cctccagctc atctttcacc tcacccccct cctcctcctt ggctttaatt atgctaattg 898

tggaggagaa tgaataaata aagtgaatct ttgcacctgt gaaaaaaaaa 948

<210> 34

<211> 236

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 34

```

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

```

<210> 35

<211> 1673

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1)..(95)

<220>

<221> CDS

<222> (96).. (1508)

<220>

<221> 3' UTR

<222> (1509).. (1673)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (96).. (152)

<400> 35

gaattcgcag tgccatgaca ccacggtgga gccccagcct tgggattccc aagtgtttgt 60

attcagtgat caggactgaa cacacaggac tcacc atg gag ttg ggg ctg agc 113

Met Glu Leu Gly Leu Ser

1

5

tgg gtt ttc ctt gtt gct ata tta gaa ggt gtc cag tgt gag gtg cag 161

Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly Val Gln Cys Glu Val Gln

10

15

20

ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga 209

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg

25

30

35

ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tac gac atg cac 257

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met His

40

45

50

tgg gtc cgc caa gct aca gga aaa ggt ctg gag tgg gtc tca gct att 305

Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile

55

60

65

70

ggc act gct ggt gac aca tac tat cca ggc tcc gtg aag ggc cga ttc 353

Gly Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe

75

80

85

acc atc tcc aga gaa aat gcc aag aac tcc ttg tat ctt caa atg aac 401

Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn

90

95

100

agc ctg aga gcc ggg gac acg gct gtg tat tac tgt gta aga gat aag 449

Ser	Leu	Arg	Ala	Gly	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	Asp	Lys	
	105						110					115				
agg	acg	gtg	acc	cac	gag	cac	tac	tac	tac	tac	ggt	atg	gac	gtc	tgg	497
Arg	Thr	Val	Thr	His	Glu	His	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	
	120						125					130				
ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gcc	tcc	acc	aag	ggc	cca	545
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	
	135						140					145			150	
tcg	gtc	ttc	ccc	ctg	gcg	ccc	tgc	tcc	agg	agc	acc	tcc	gag	agc	aca	593
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	
					155				160					165		
gcg	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acc	641
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
			170					175						180		
gtg	tcg	tgg	aac	tca	ggc	gct	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	ttc	cca	689
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
	185						190					195				
gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg	gtg	acc	737
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
	200						205					210				
gtg	ccc	tcc	agc	aac	ttc	ggc	acc	cag	acc	tac	acc	tgc	aac	gta	gat	785
Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	
	215						220					225			230	
cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aca	gtt	gag	cgc	aaa	tgt	833
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	
					235					240				245		
tgt	gtc	gag	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cca	cct	gtg	gca	gga	ccg	tca	881
Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	
				250					255				260			
gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	929
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
	265							270					275			
acc	cct	gag	gtc	acg	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	ccc	977

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	
280	285 290
gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc	1025
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
295	300 305 310
aag aca aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc acg ttc cgt gtg gtc	1073
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val	
	315 320 325
agc gtc ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac	1121
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
	330 335 340
aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc	1169
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	
	345 350 355
atc tcc aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg	1217
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
	360 365 370
ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc	1265
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
375	380 385 390
ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc	1313
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
	395 400 405
aat ggg cag cgg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg ctg gac	1361
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp	
	410 415 420
tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc	1409
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	
	425 430 435
agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct	1457
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
440	445 450
ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa	1505

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 455 460 465 470

tga gtgccacggc cggcaagccc ccgctcccca ggctctcggg gtcgcgtgag 1558

gatgcttggc acgtaccccg tgtacatact tcccaggcac ccagcatgga aataaagcac 1618

ccagcgctgc cctgggcccc tgcgaaaaaa aaaaaaaaaa aatctctgcg gccgc 1673

<210> 36

<211> 470

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 36

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

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 37

<211> 970

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1)..(32)

<220>

<221> CDS

<222> (33).. (743)

<220>

<221> 3' UTR

<222> (744).. (970)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (33).. (92)

<400> 37

```

gaattcgcag tgccatgaca ccacggggaa cc atg gaa acc cca gcg cag ctt    53
                               Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu
                               1               5

```

```

ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca gat acc acc gga gaa att gtg    101
Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val
      10               15               20

```

```

ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg gaa aga gcc    149
Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
      25               30               35

```

```

acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt att agc agc agc tcc tta gcc    197
Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Ser Leu Ala
      40               45               50               55

```

```

tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc ggg ctc ctc atc ttt ggt    245
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Gly Leu Leu Ile Phe Gly
      60               65               70

```

```

gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt ggc agt ggg    293
Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
      75               80               85

```

```

tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag cct gaa gat    341
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp
      90               95               100

```

```

ttt gca gtg tat tac tgt cag cag ttt ggt agc tca cct atg tgc agt    389
Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Ser Ser Pro Met Cys Ser
      105               110               115

```

```

ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cga act gtg gct gca cca 437
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
120                125                130                135

tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act 485
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
                140                145                150

gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa 533
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
                155                160                165

gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag 581
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
                170                175                180

agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc 629
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
                185                190                195

acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc 677
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
200                205                210                215

tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc 725
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
                220                225                230

aac agg gga gag tgt tag agggagaagt gccccacct gtcctcagt 773
Asn Arg Gly Glu Cys
                235

tccagcctga cccctcccca tcctttggcc ttgaccctt ttccacagg ggacctacc 833

ctattgcggt cctccagctc atctttcacc tcacccccct cctcctcctt ggctttaatt 893

atgctaattg ttgaggagaa tgaataaata aagtgaatct ttgcaaaaaa aaaaaaaaaa 953

aaaatctctg cggccgc 970

```

<210> 38

<211> 236

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 38

```

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

```

<210> 39

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(35)

<400> 39

gaggtctccg ccctcgagat gcggctgggc agtcc 35

<210> 40

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<400> 40

cacaggacag ccaggggatc ccacgtggcc gcg 33

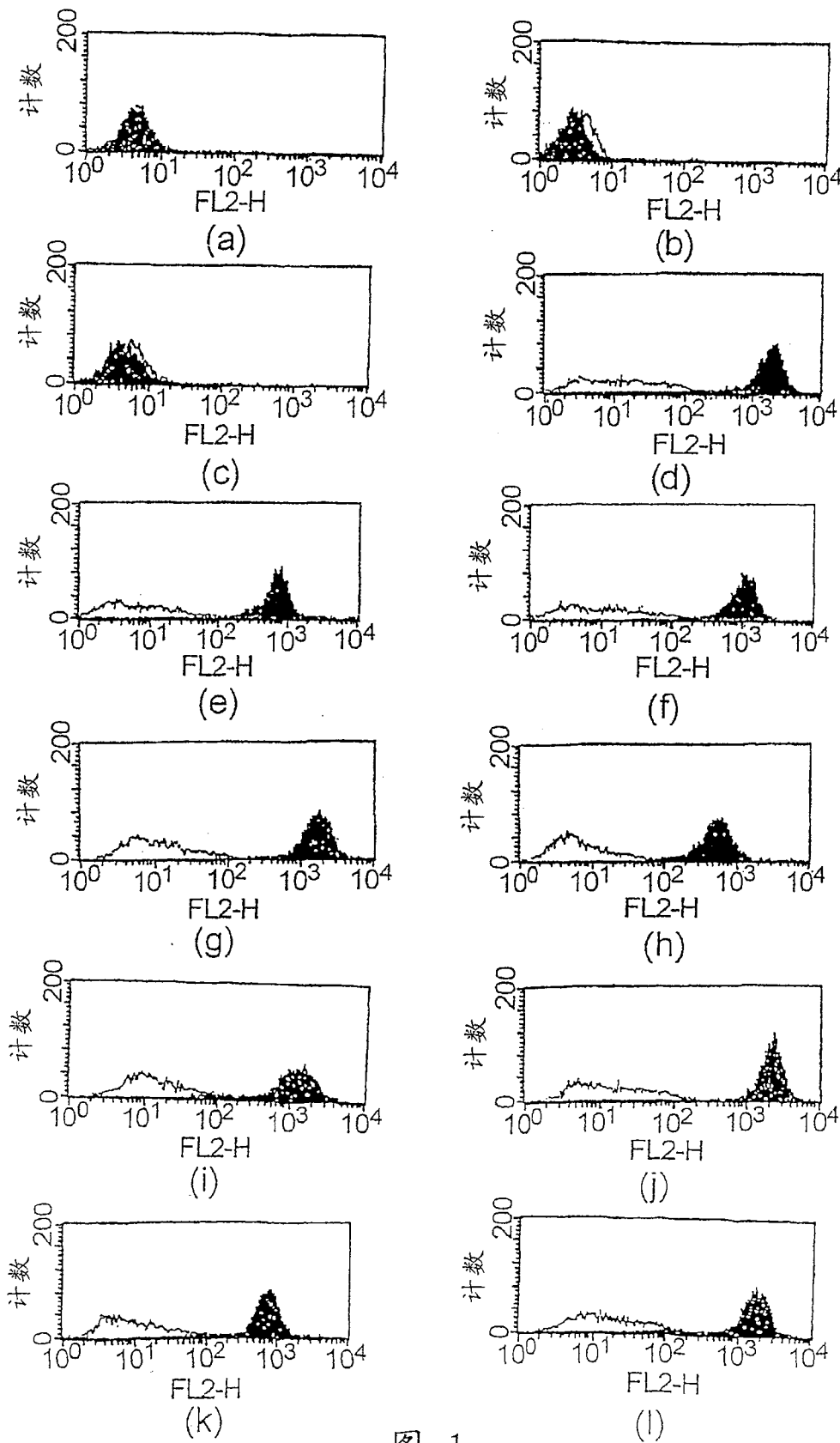


图 1

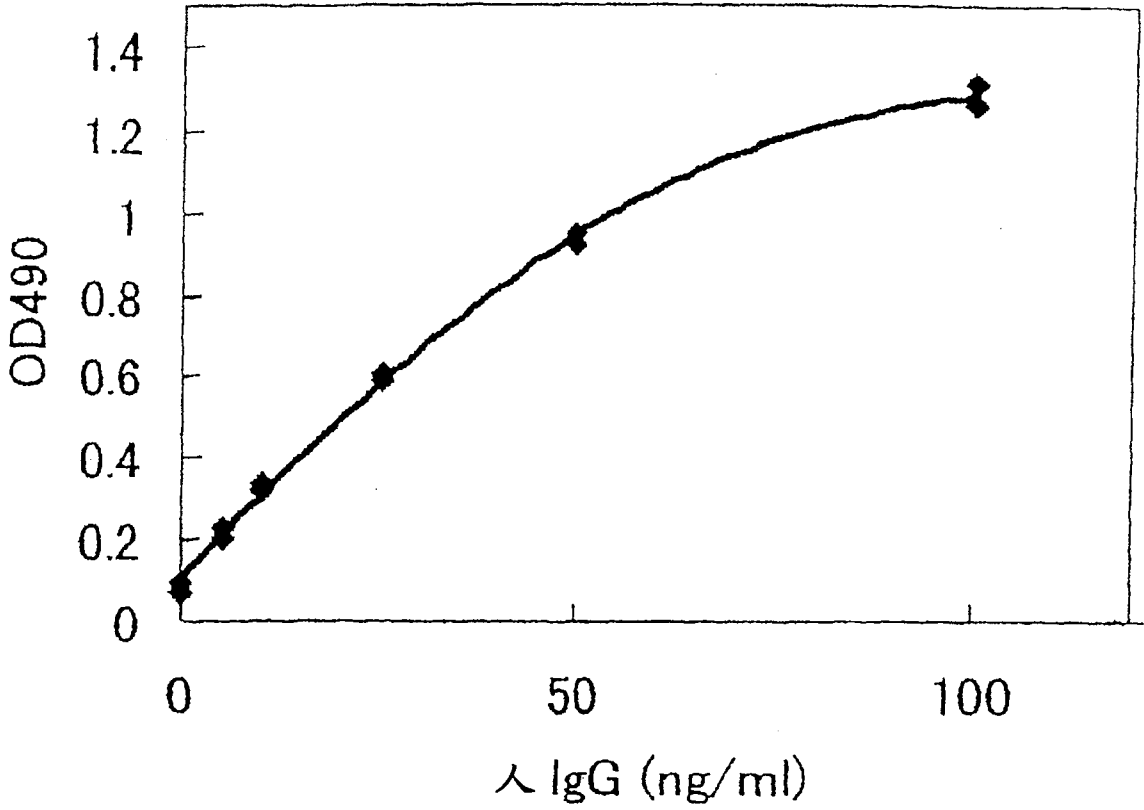


图 2

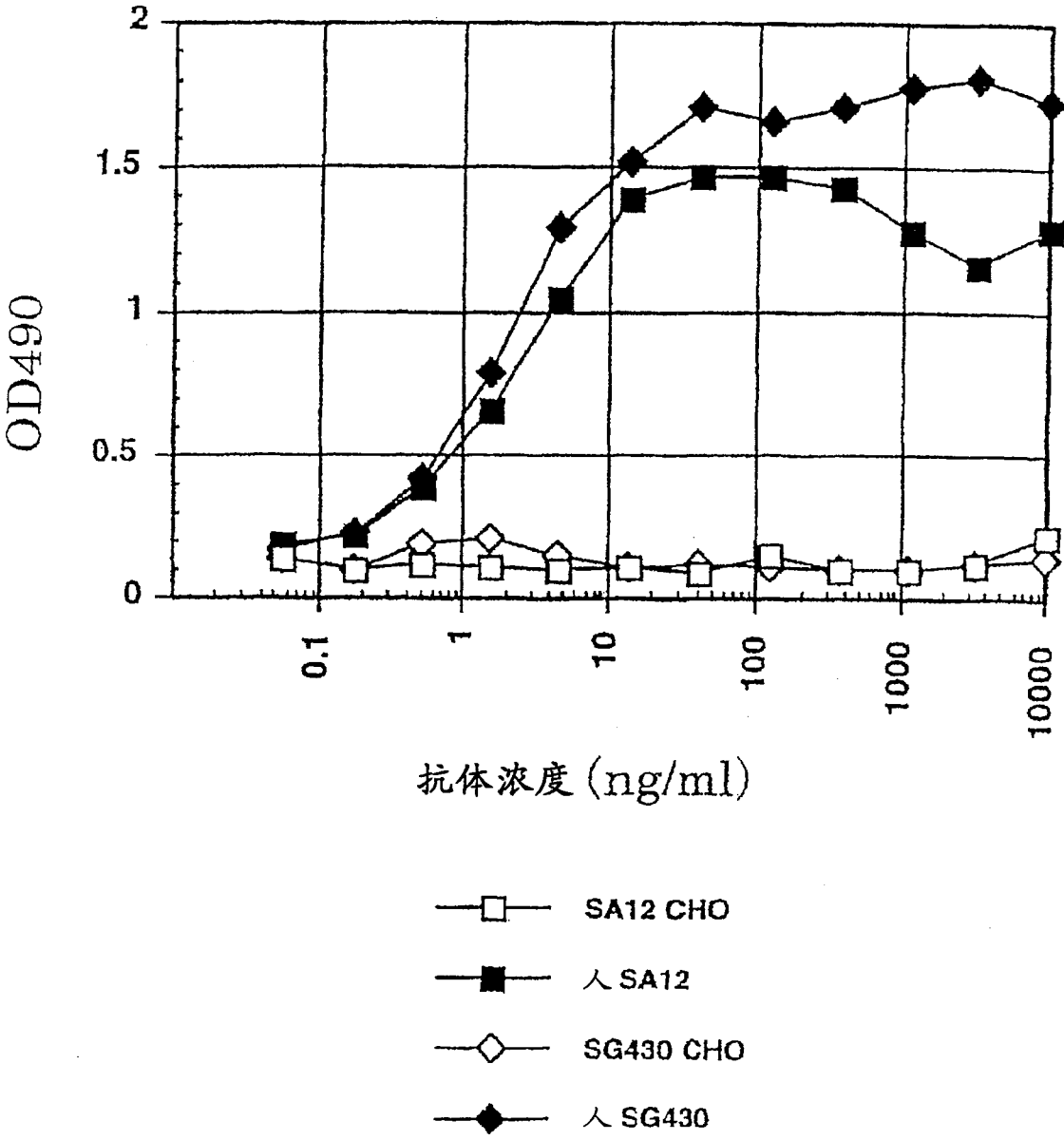
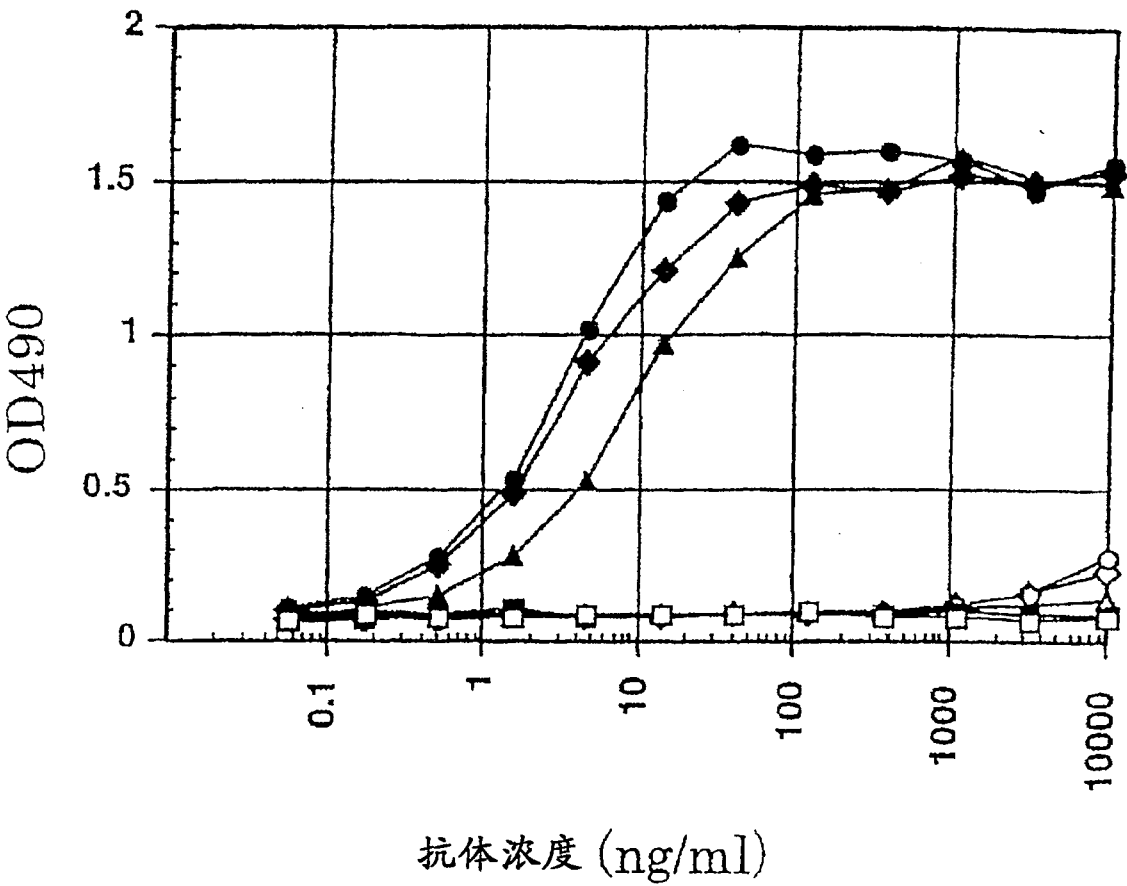


图 3



- KLH CHO
- 人 KLH
- JMAb124 CHO
- 人 JMAb124
- ◇— JMAb126 CHO
- ◆— 人 JMAb126
- △— JMAb127 CHO
- ▲— 人 JMAb127

图 4

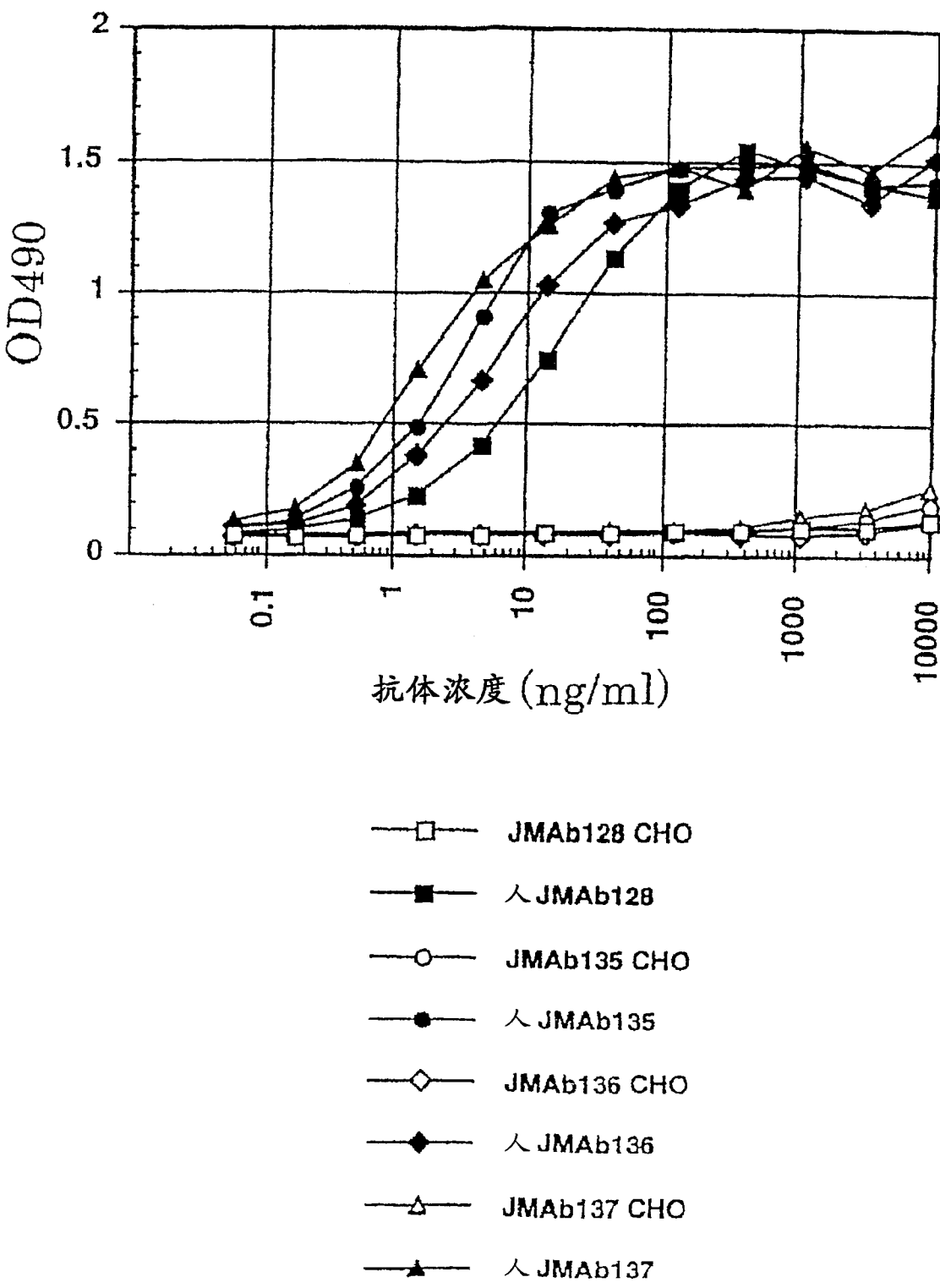
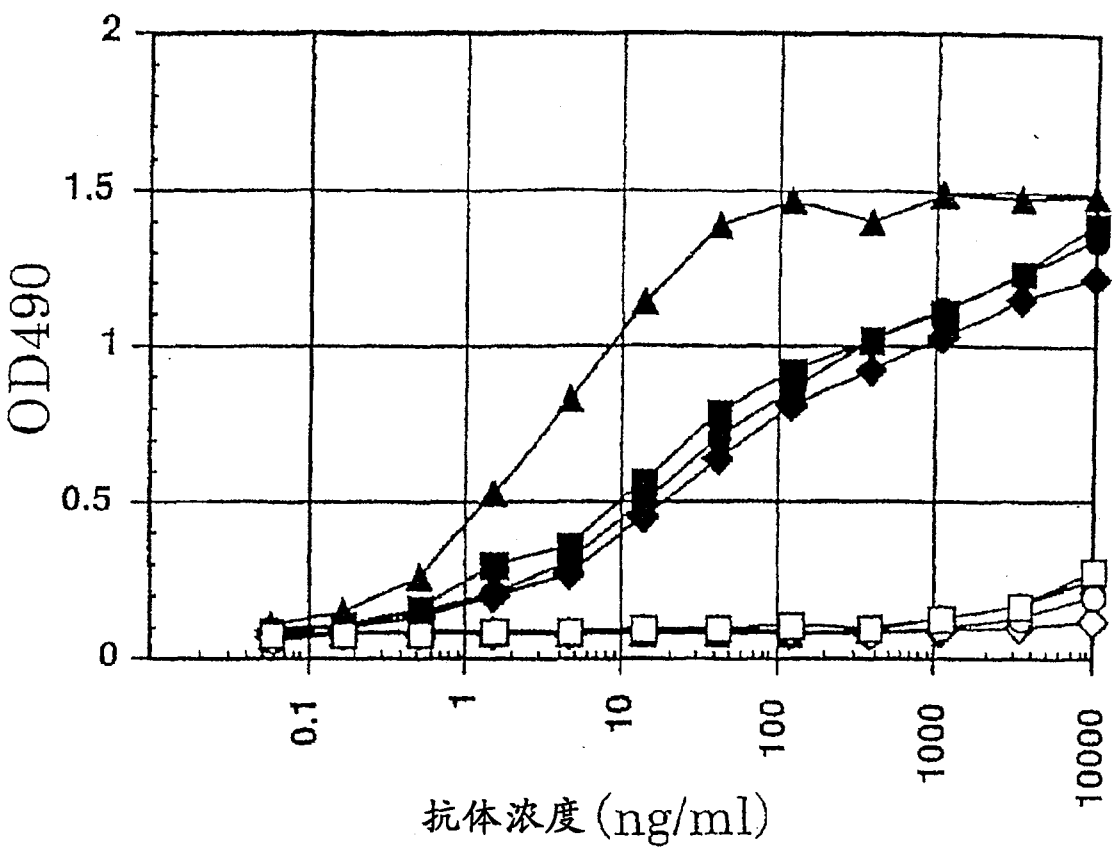


图 5



- JMAb138 CHO
- 人 JMAb138
- JMAb139 CHO
- 人 JMAb139
- ◇— JMAb140 CHO
- ◆— 人 JMAb140
- △— JMAb141 CHO
- ▲— 人 JMAb141

图 6

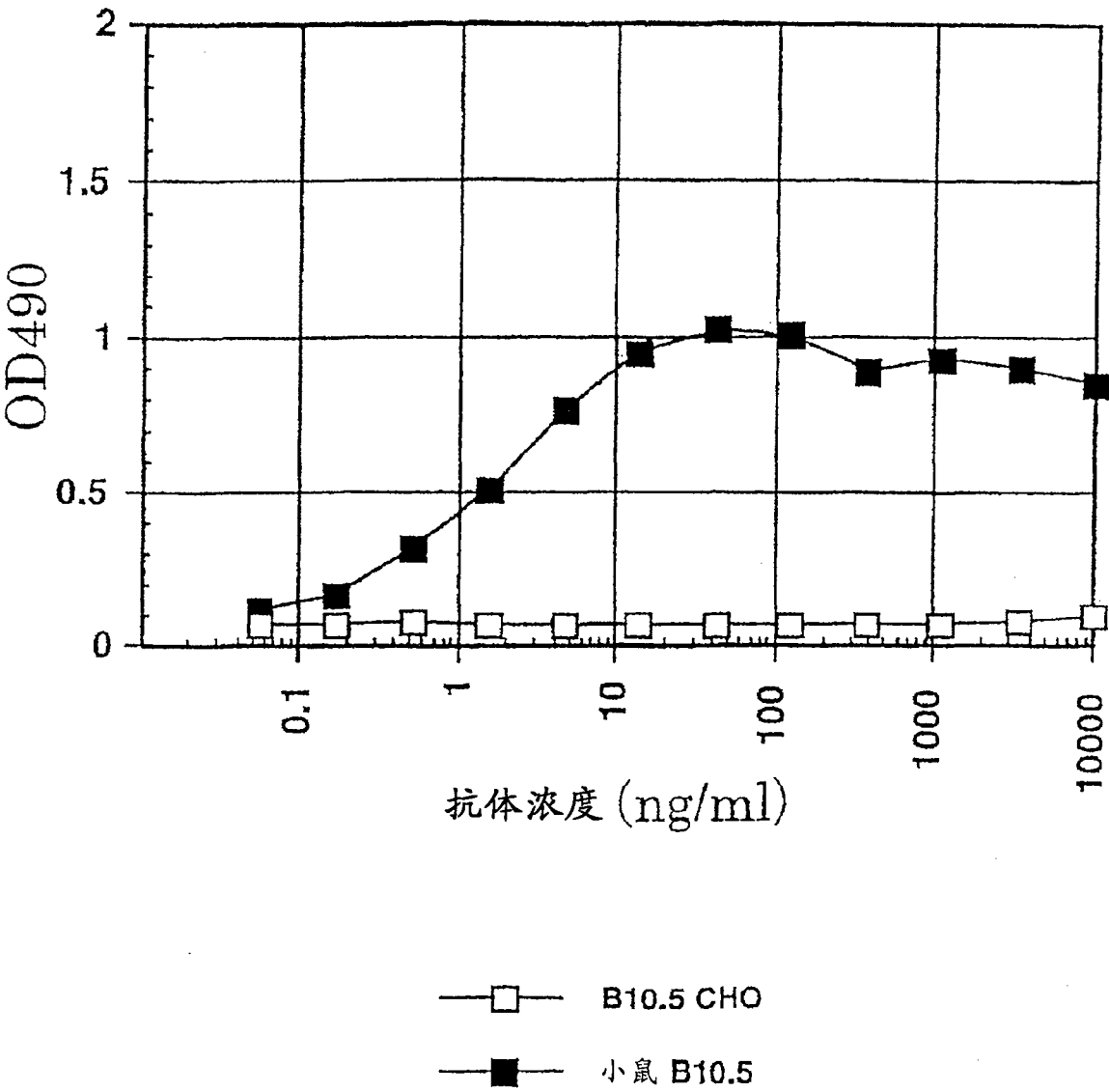
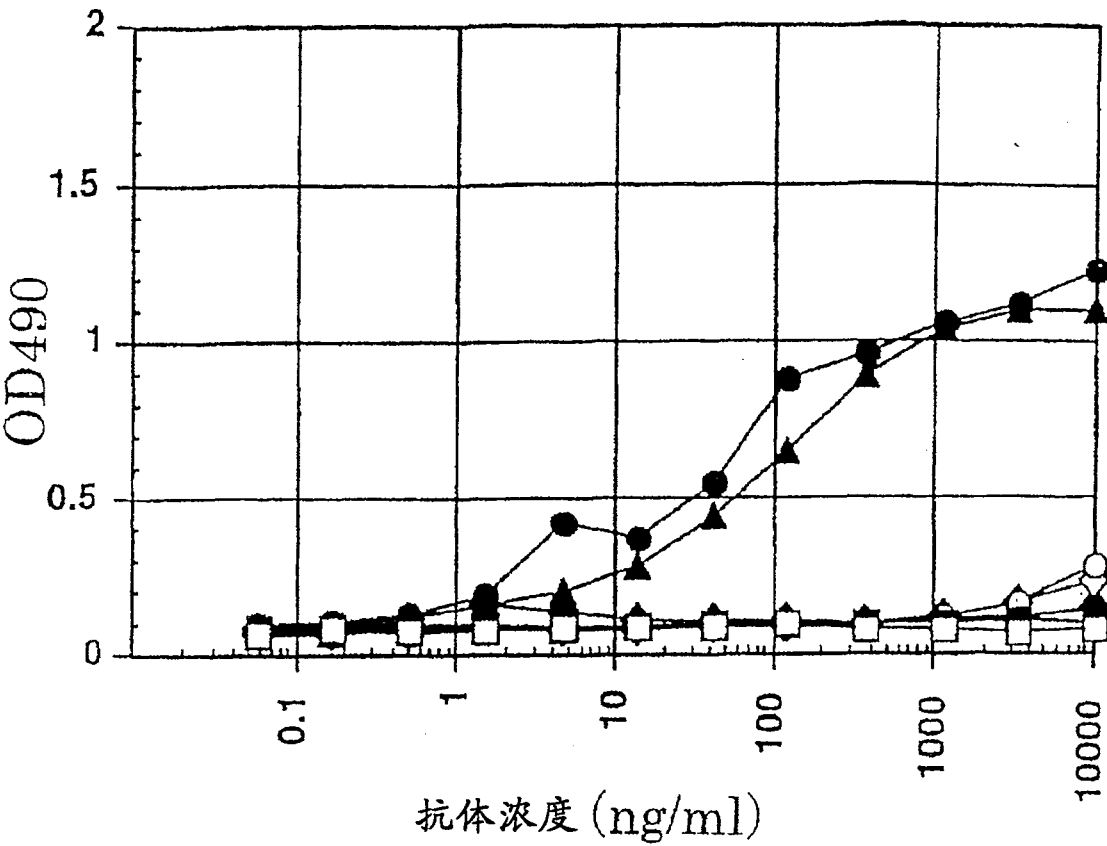


图 7



- KLH CHO
- 小鼠 KLH
- JMAB124 CHO
- 小鼠 JMAB124
- ◇— JMAB126 CHO
- ◆— 小鼠 JMAB126
- △— JMAB127 CHO
- ▲— 小鼠 JMAB127

图 8

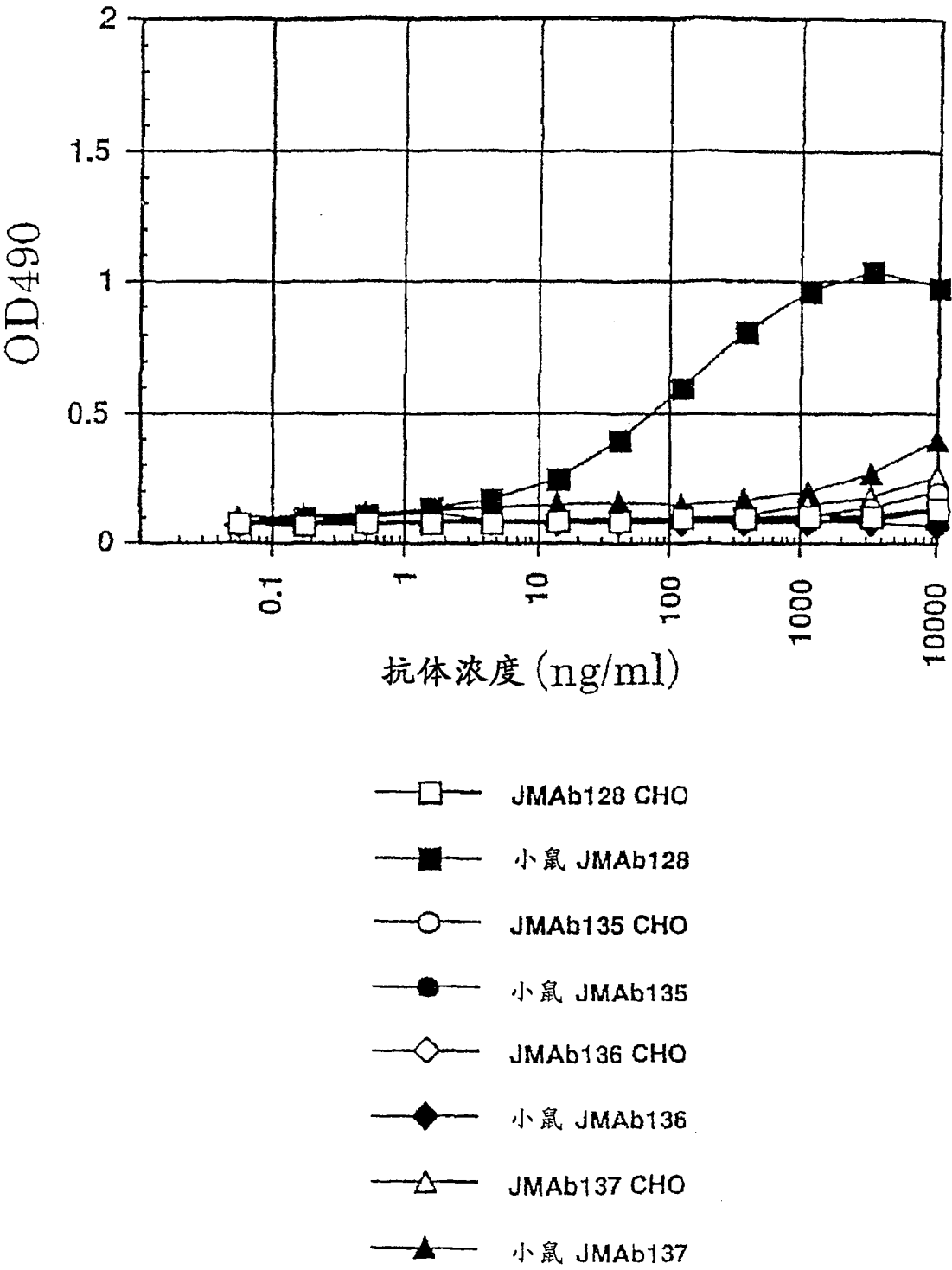


图 9

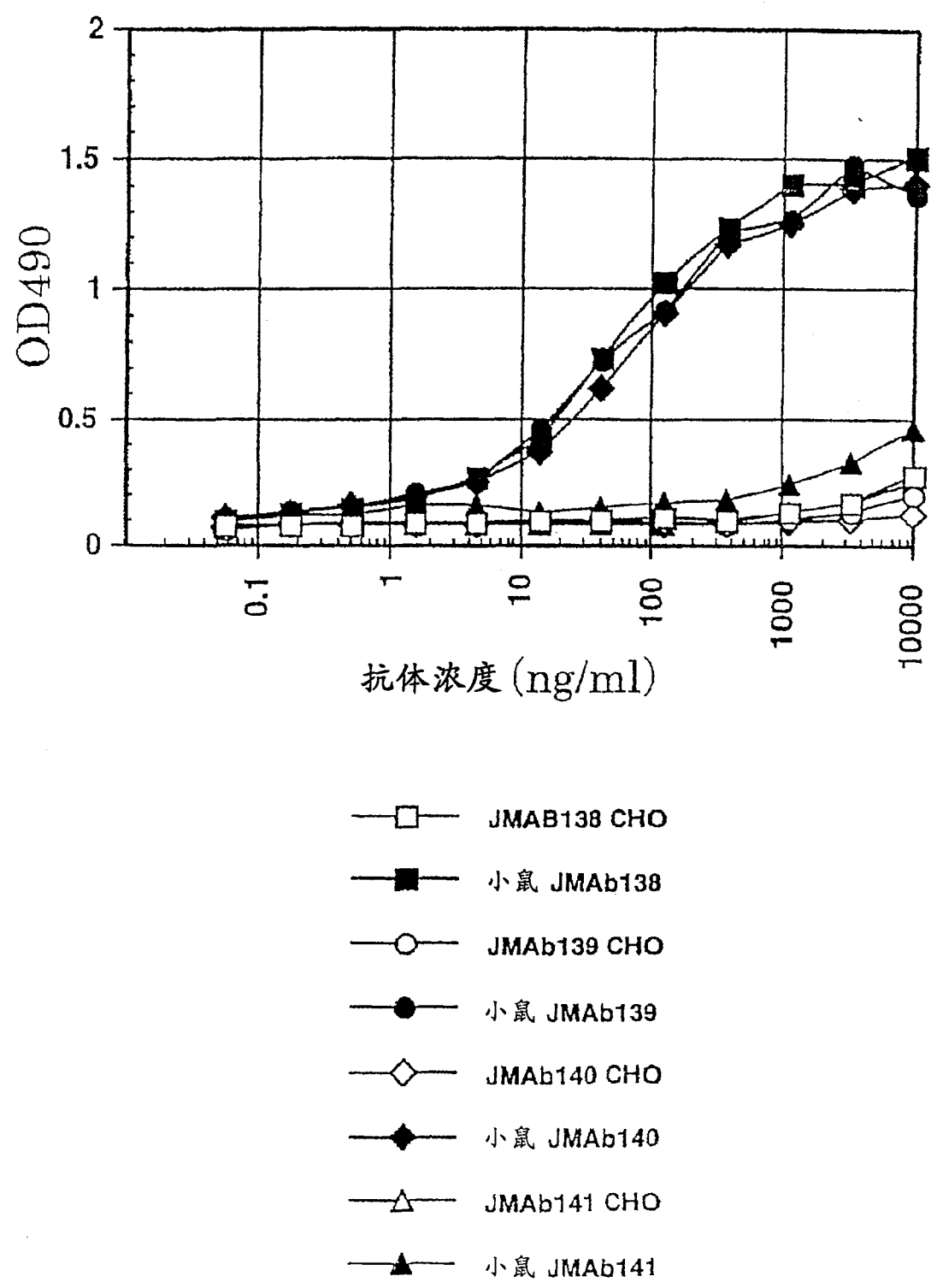


图 10

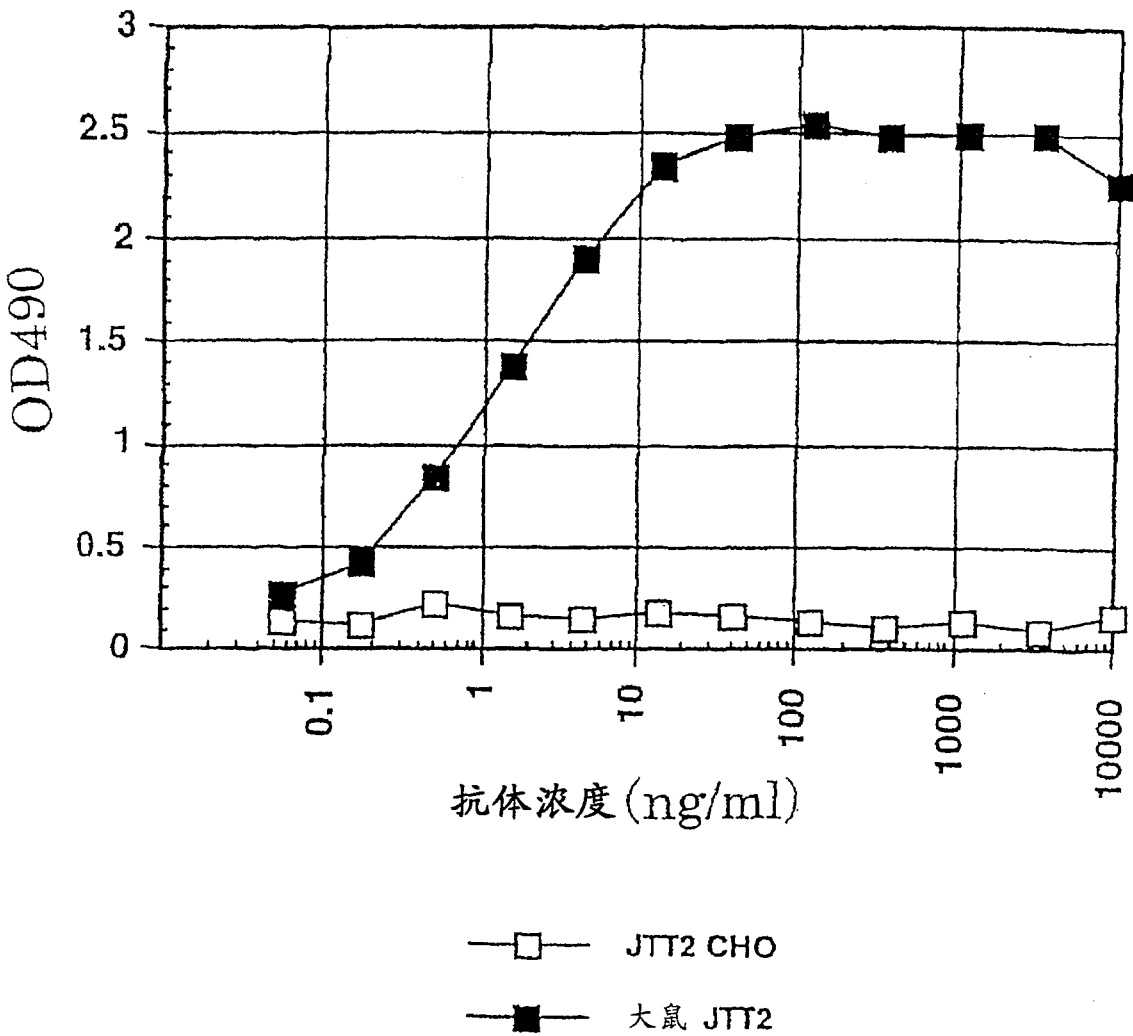


图 11

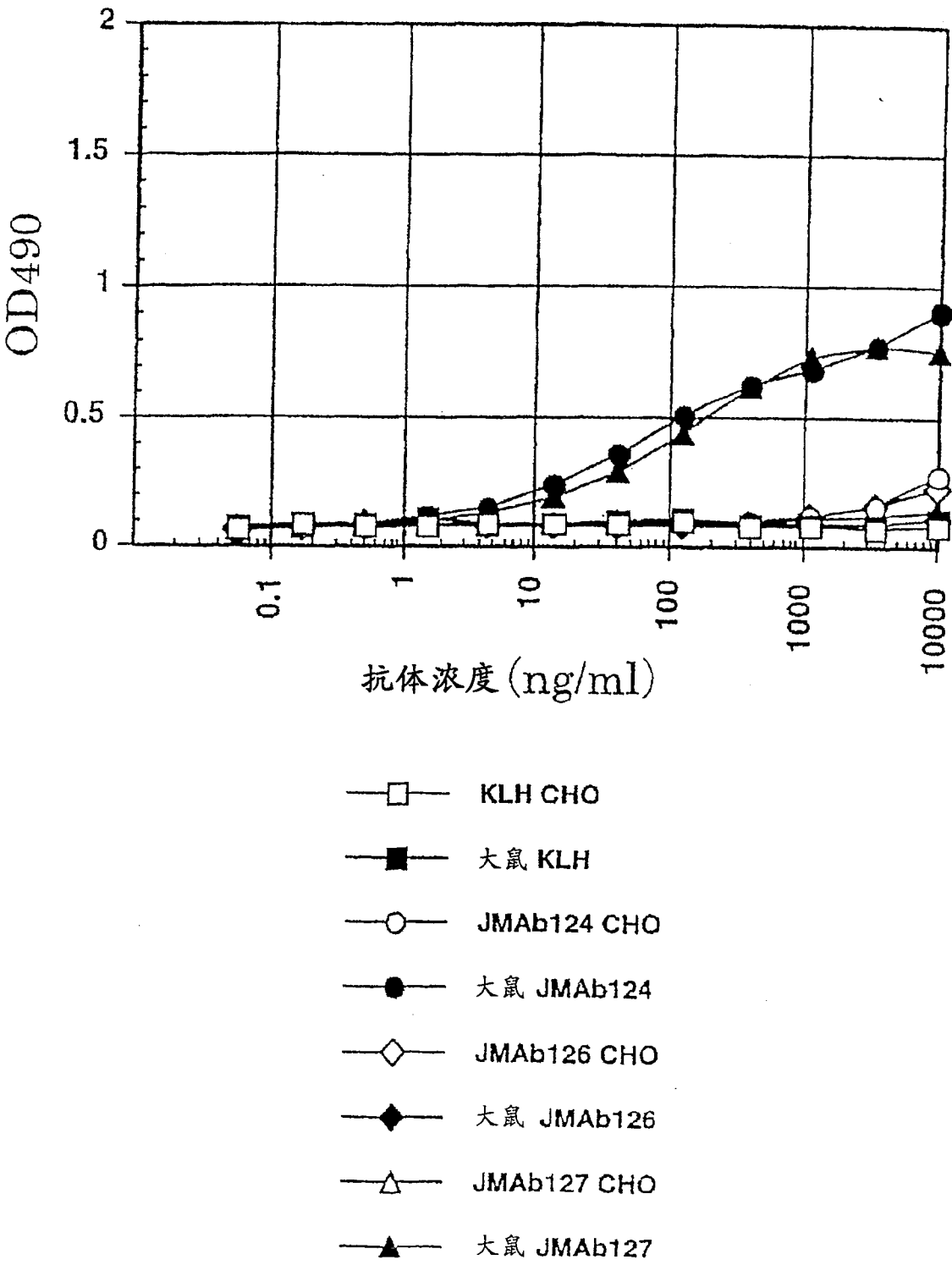


图 12

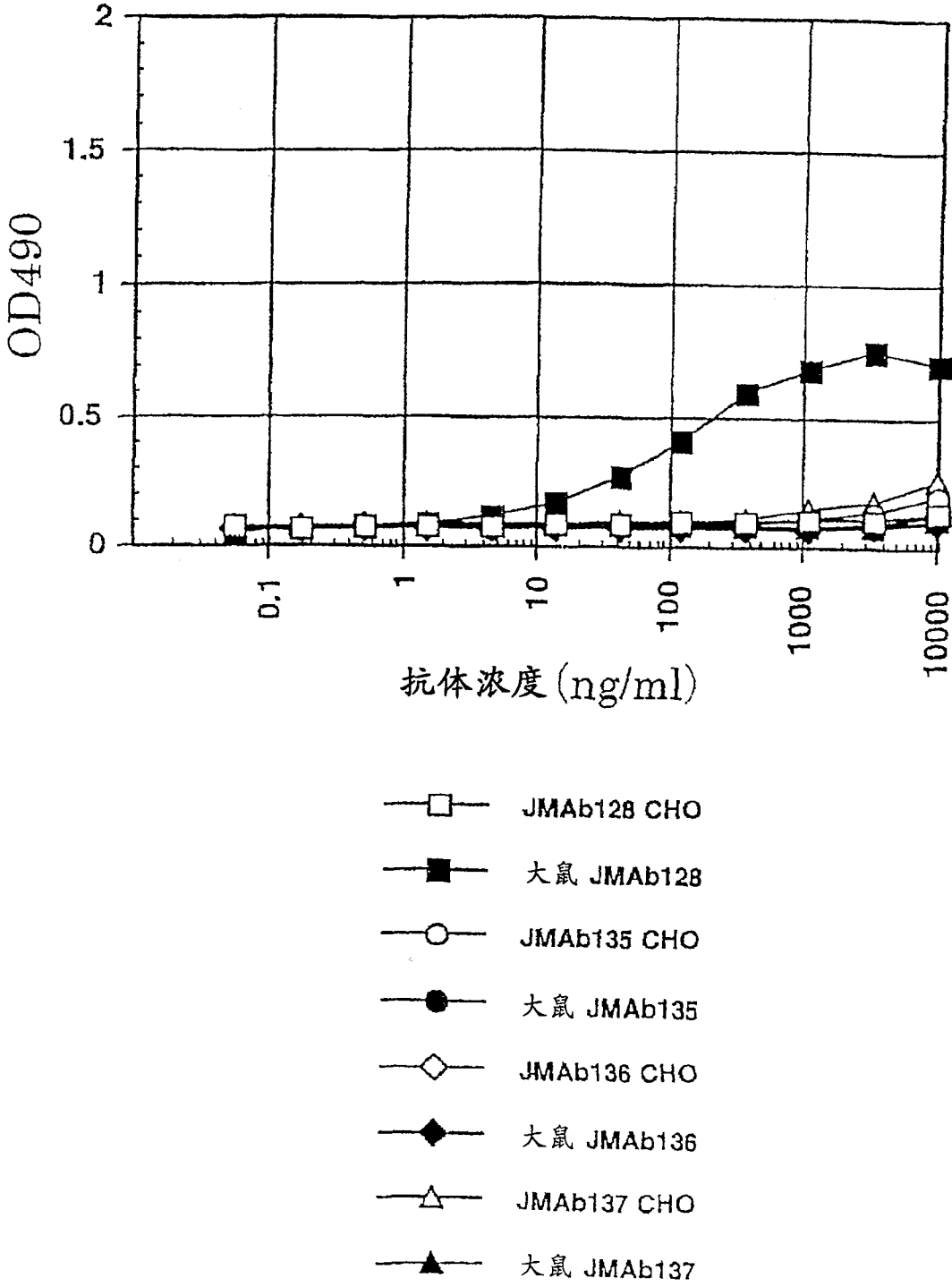


图 13

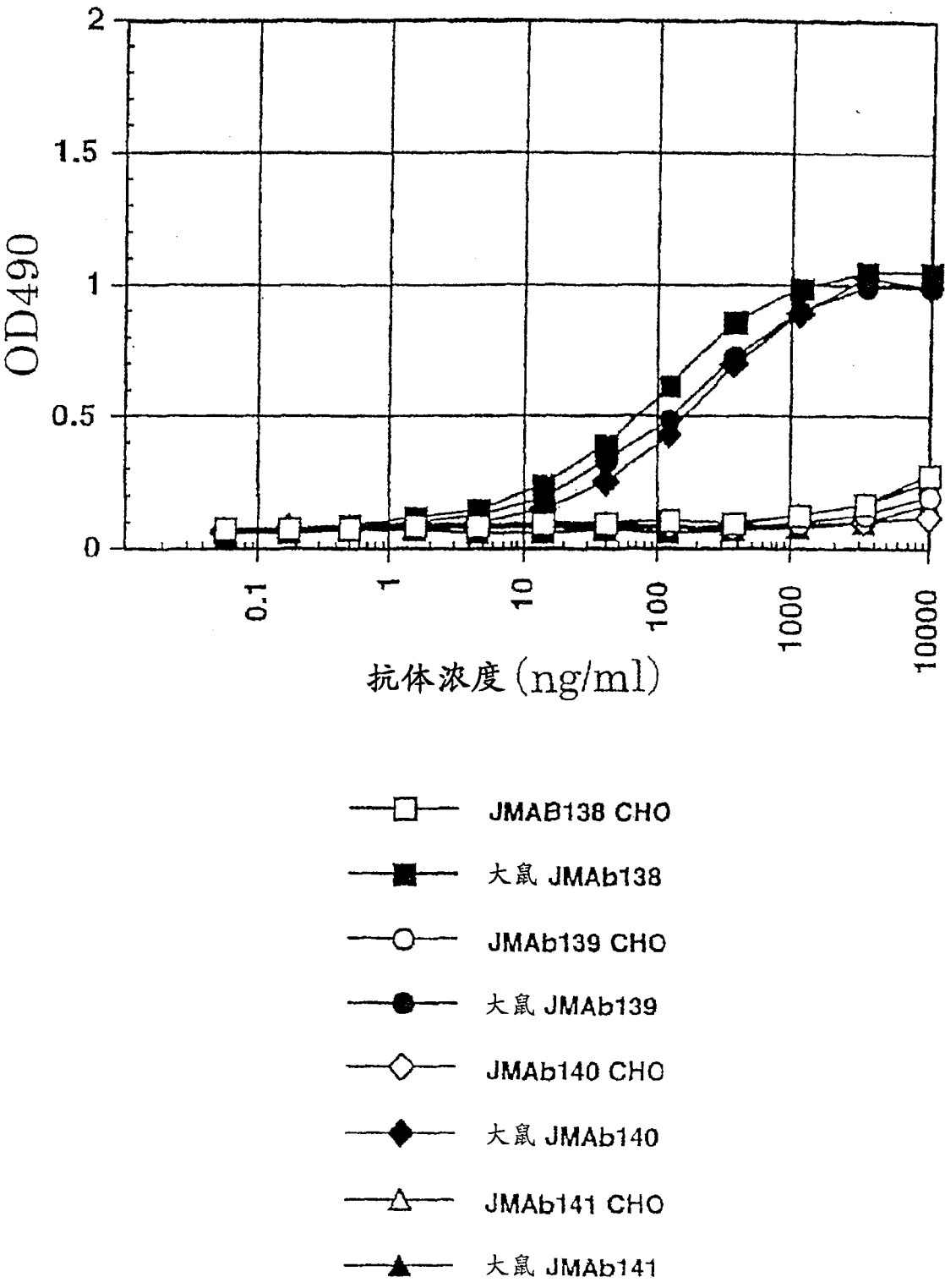


图 14

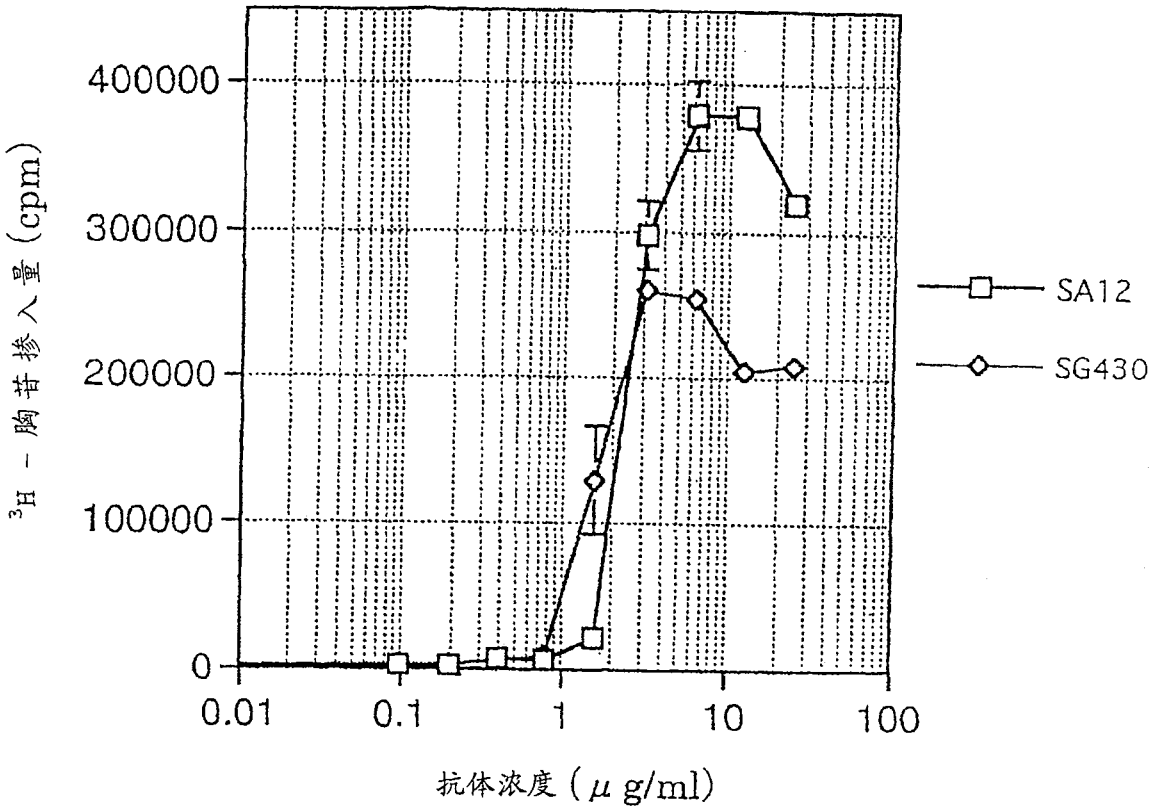


图 15

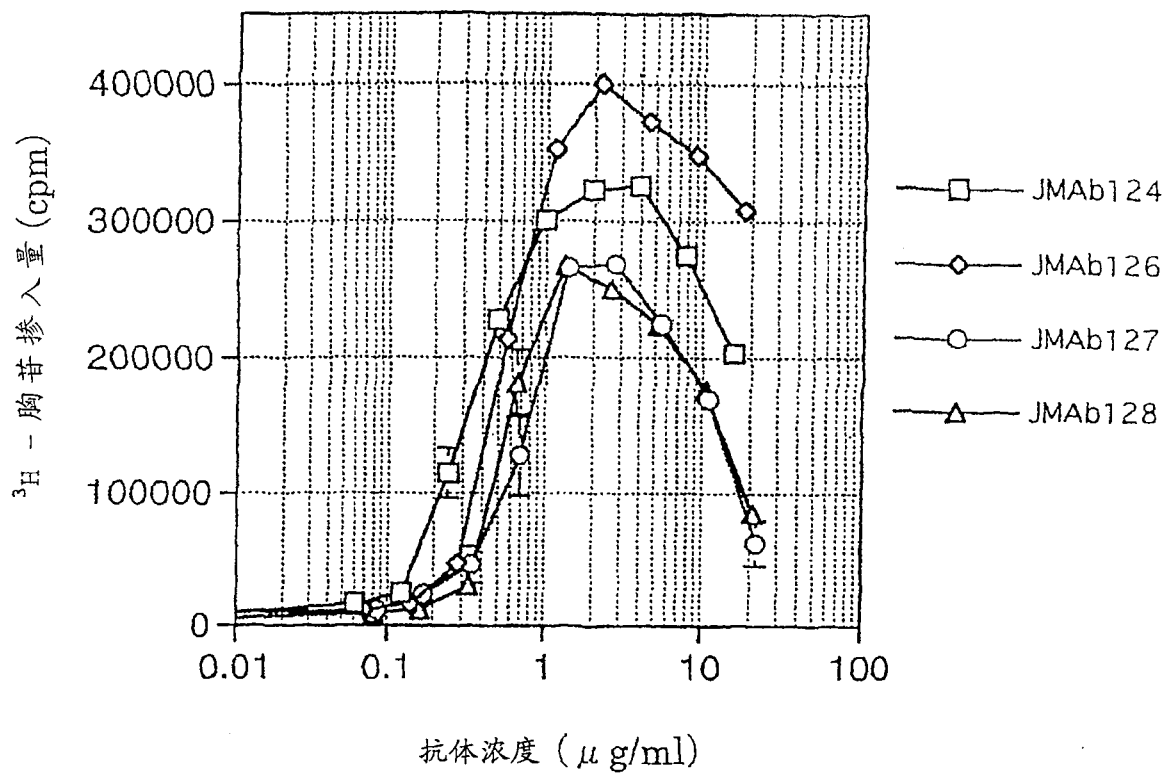


图 16

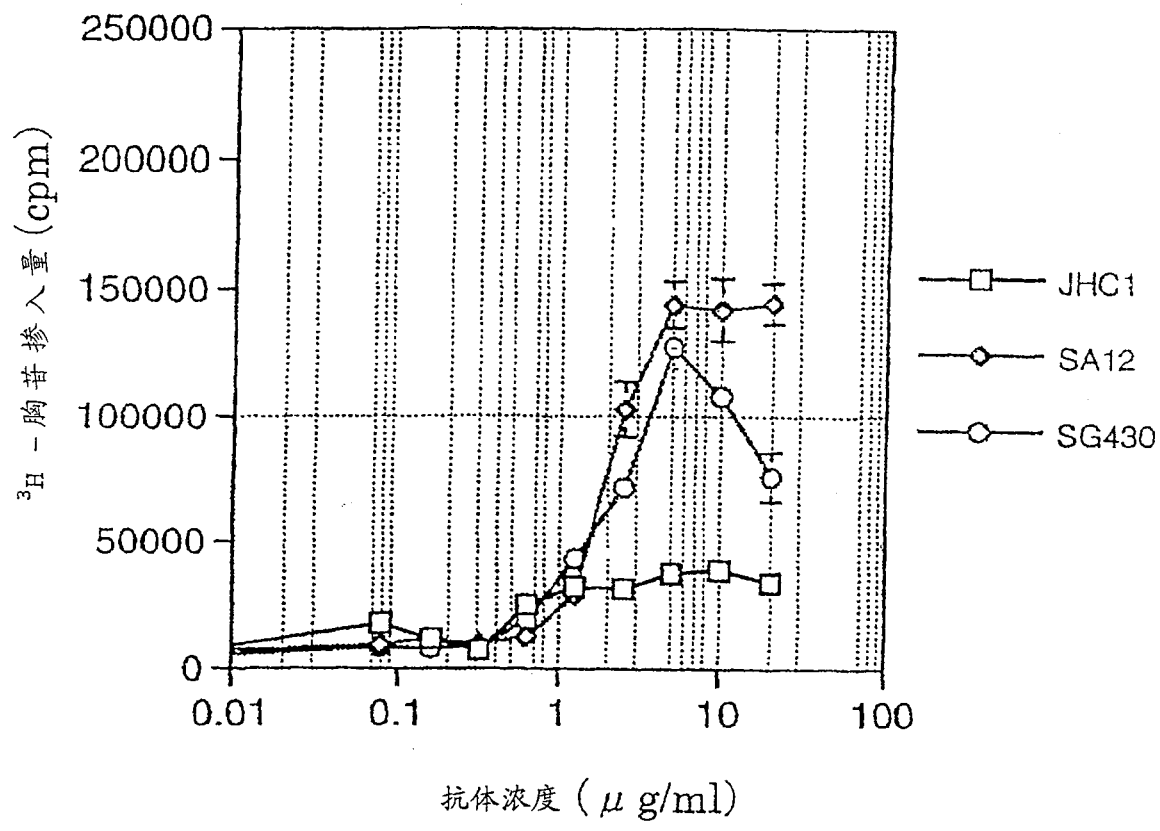


图 17

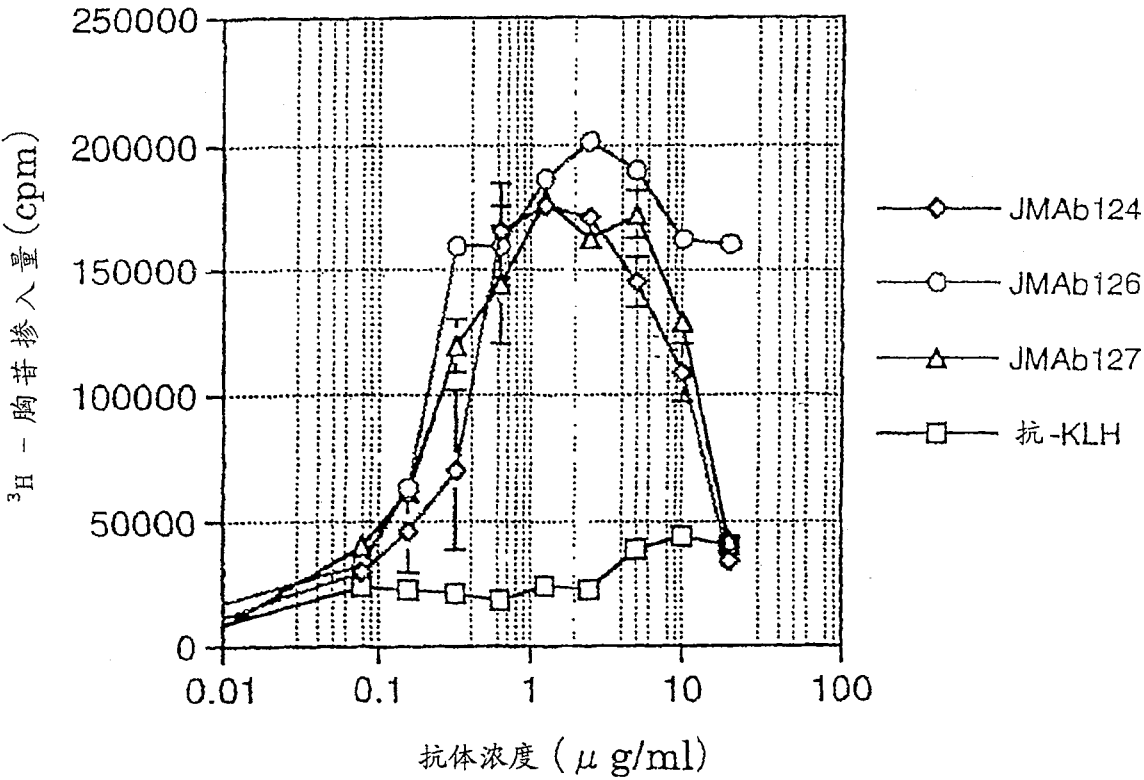


图 18

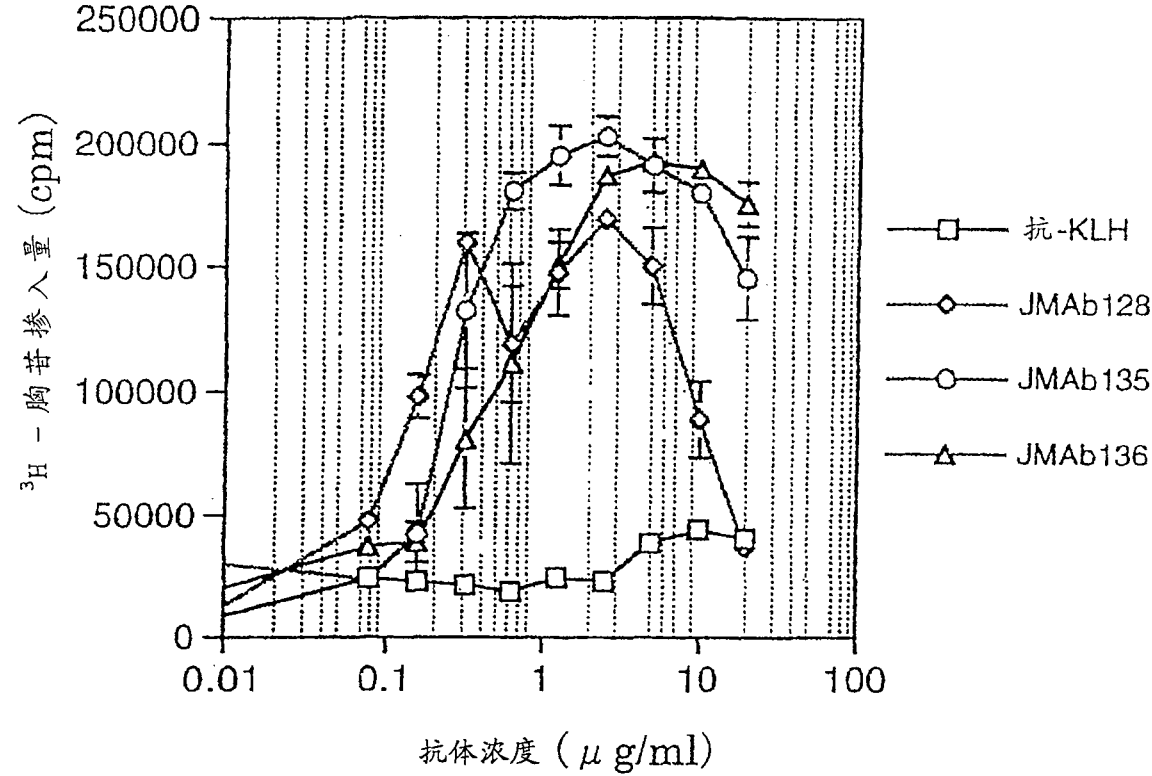


图 19

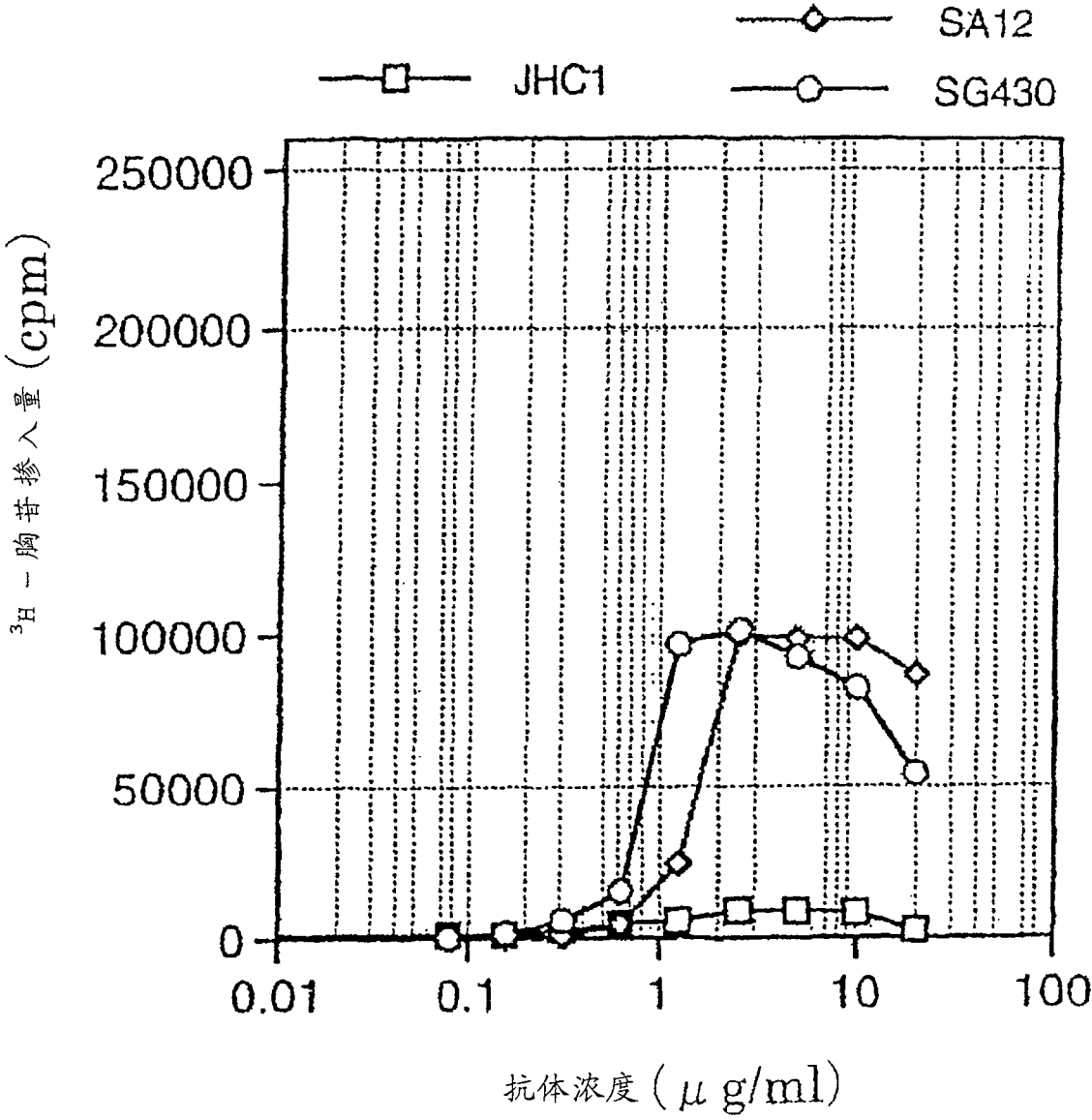


图 20

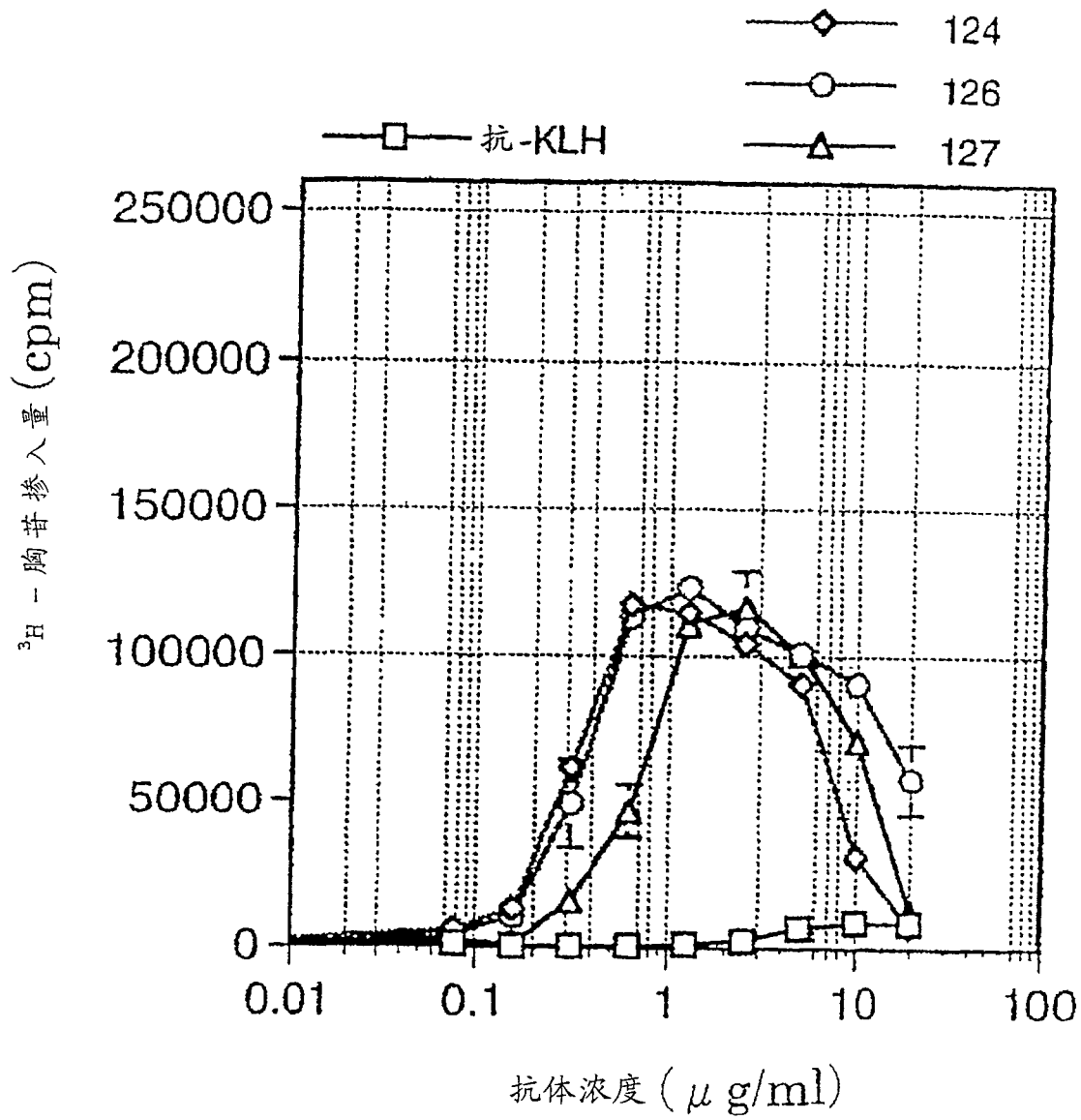


图 21

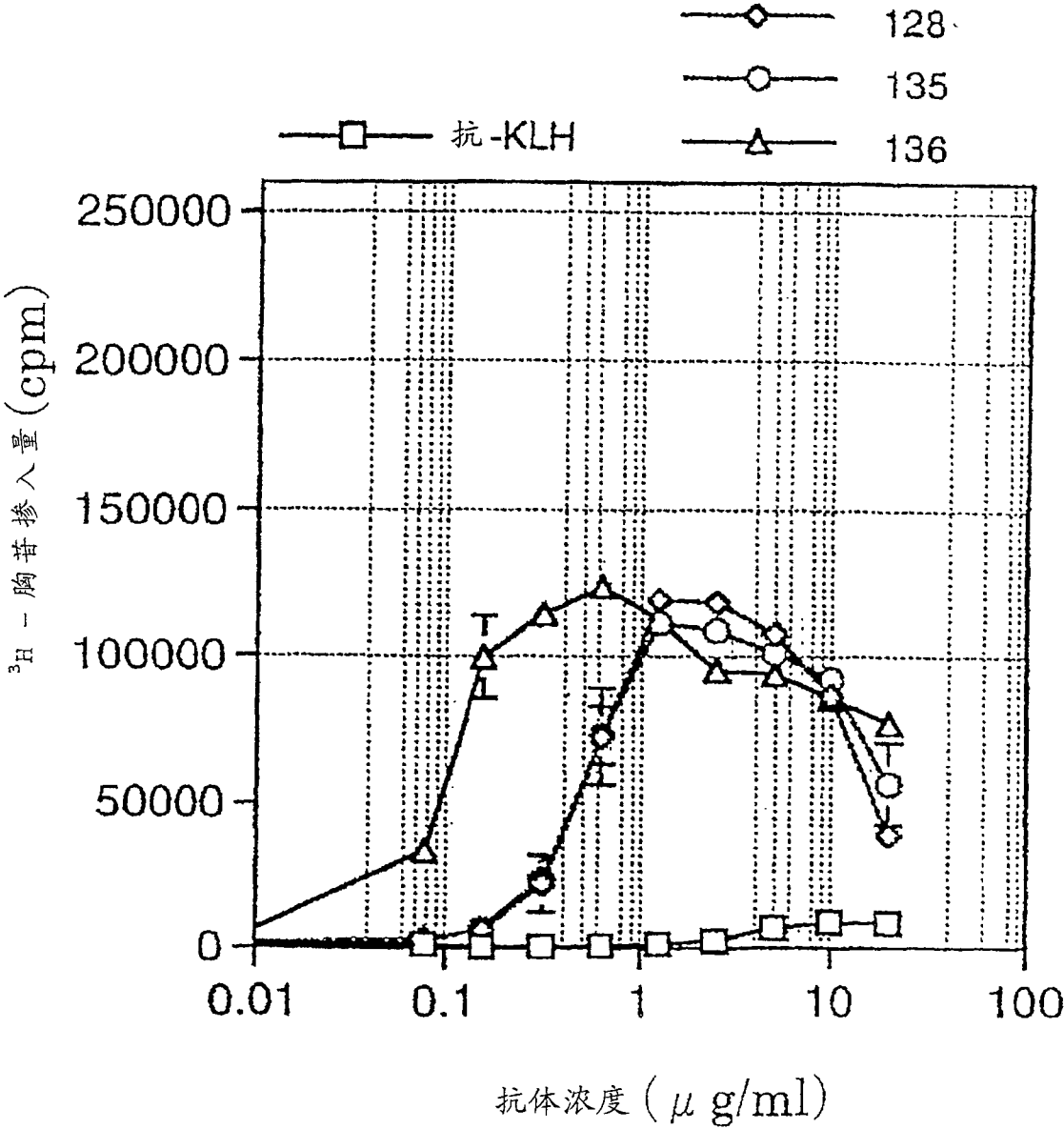


图 22

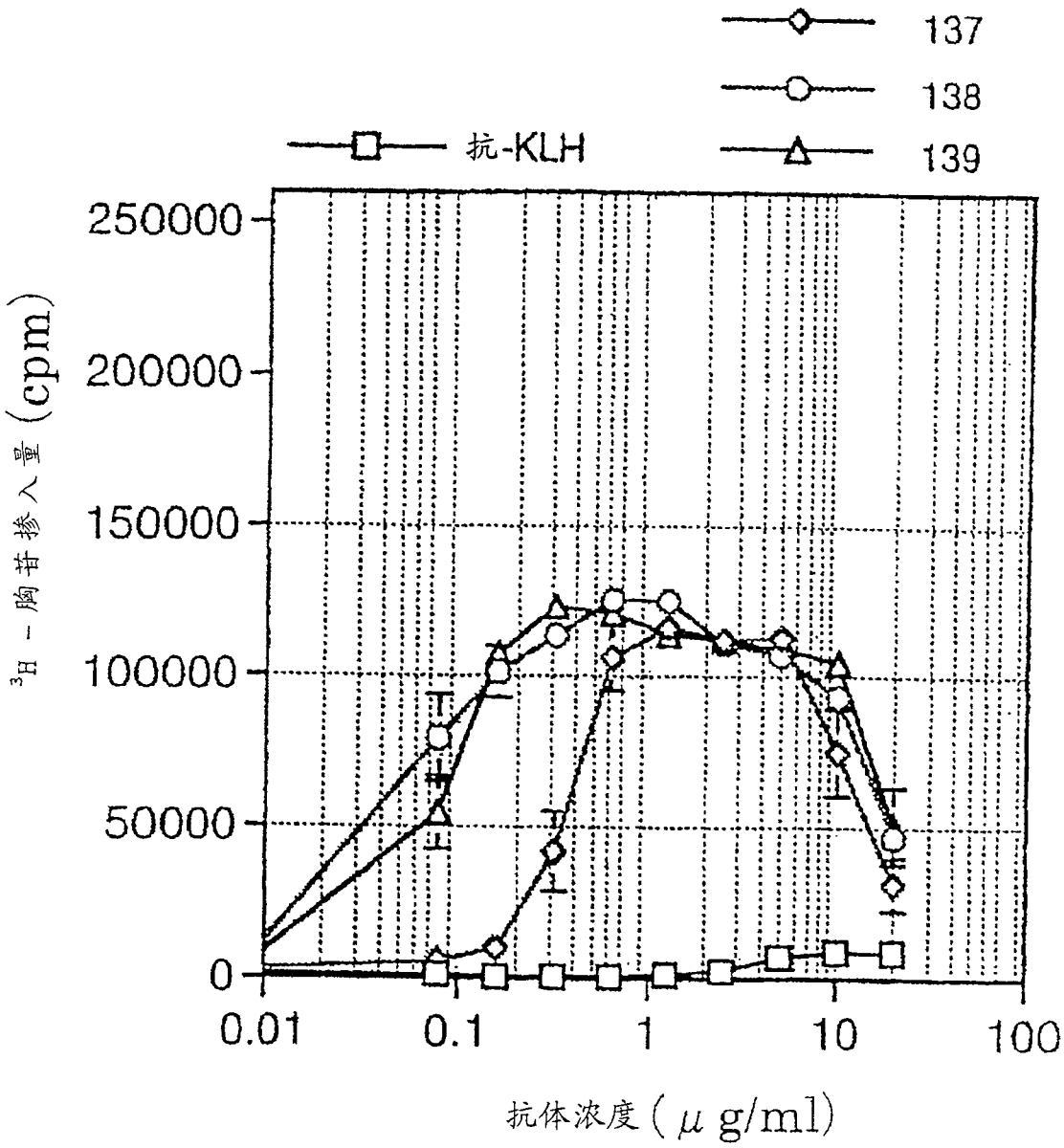


图 23

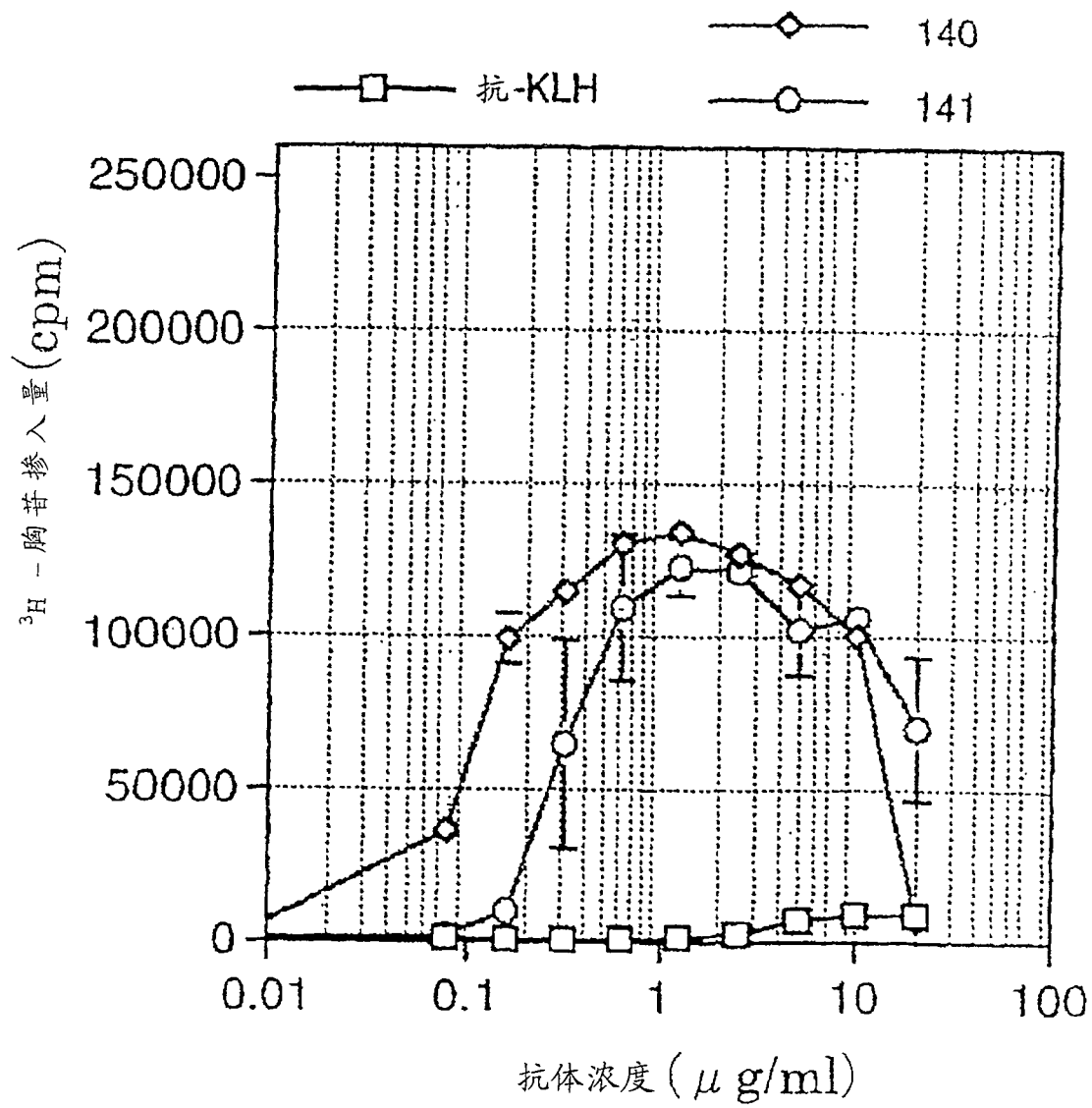


图 24

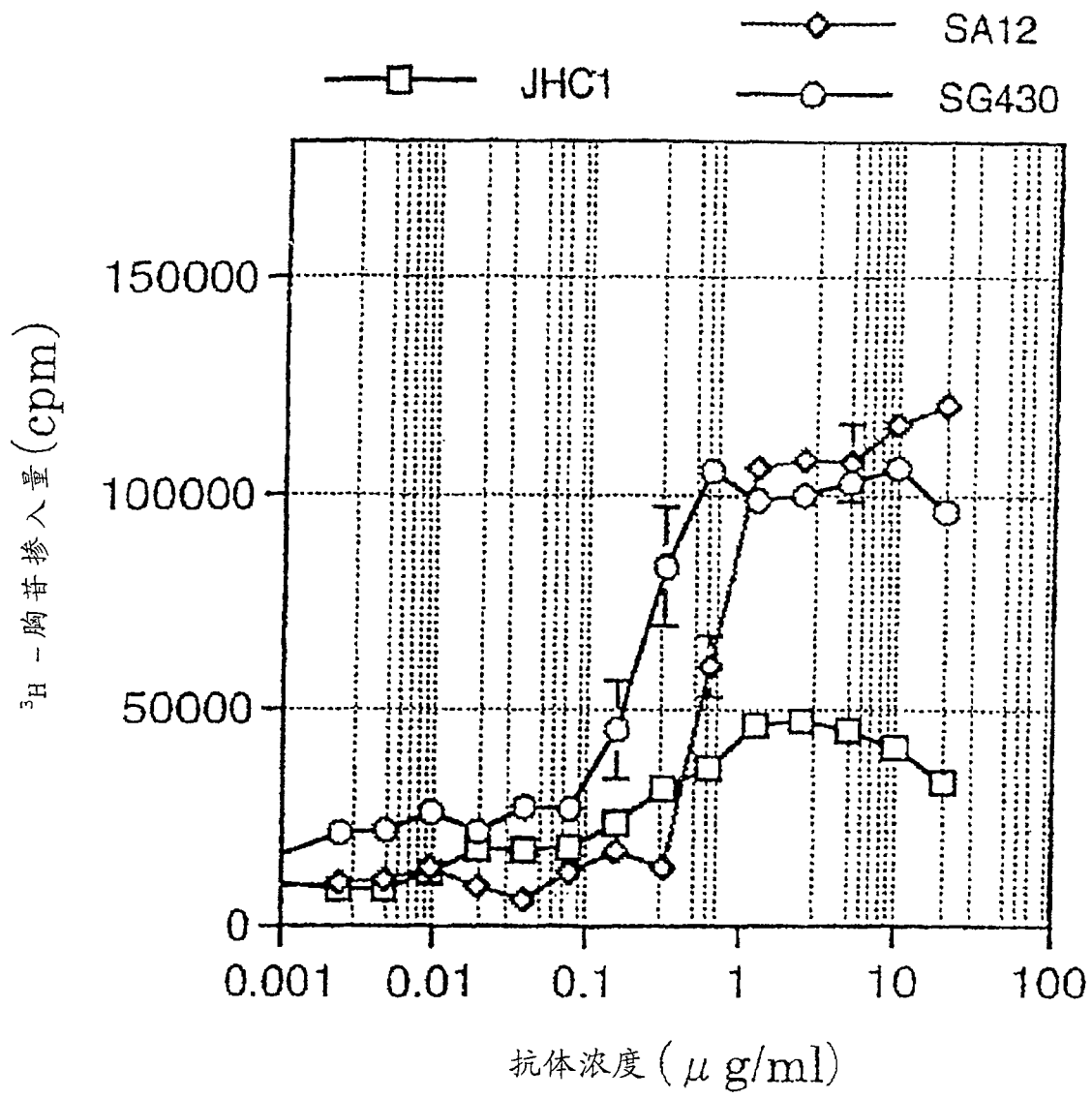


图 25

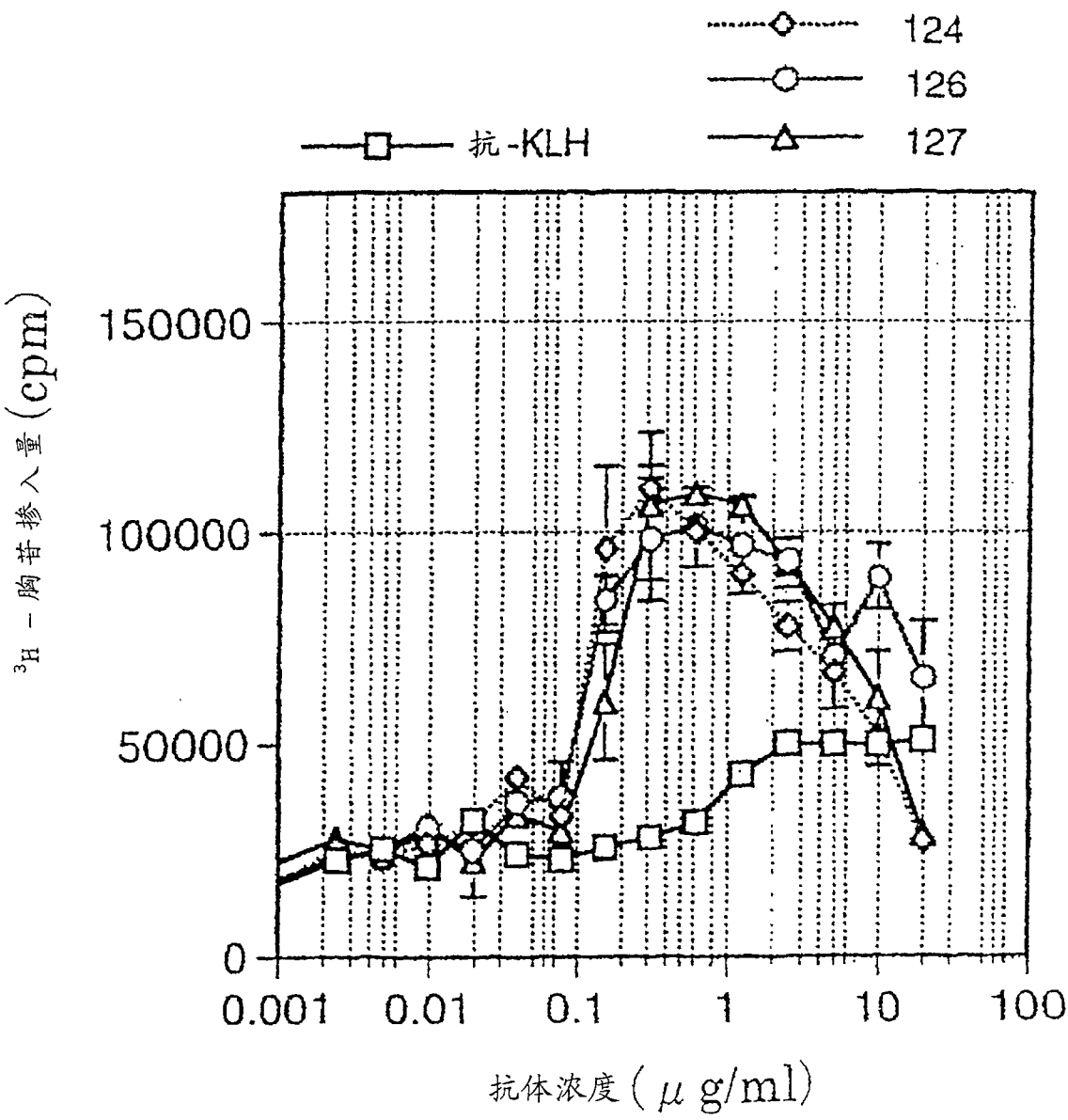


图 26

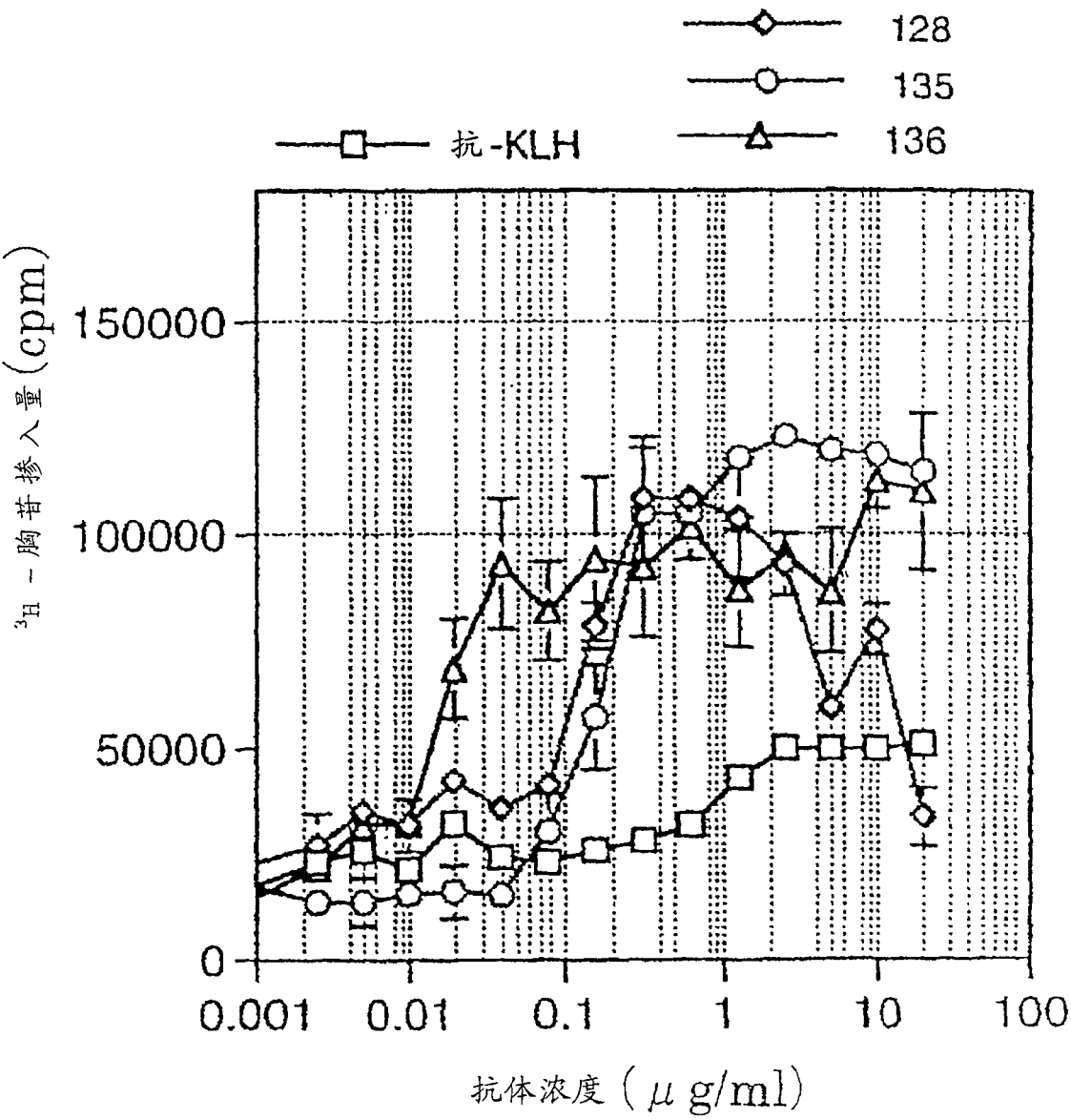


图 27

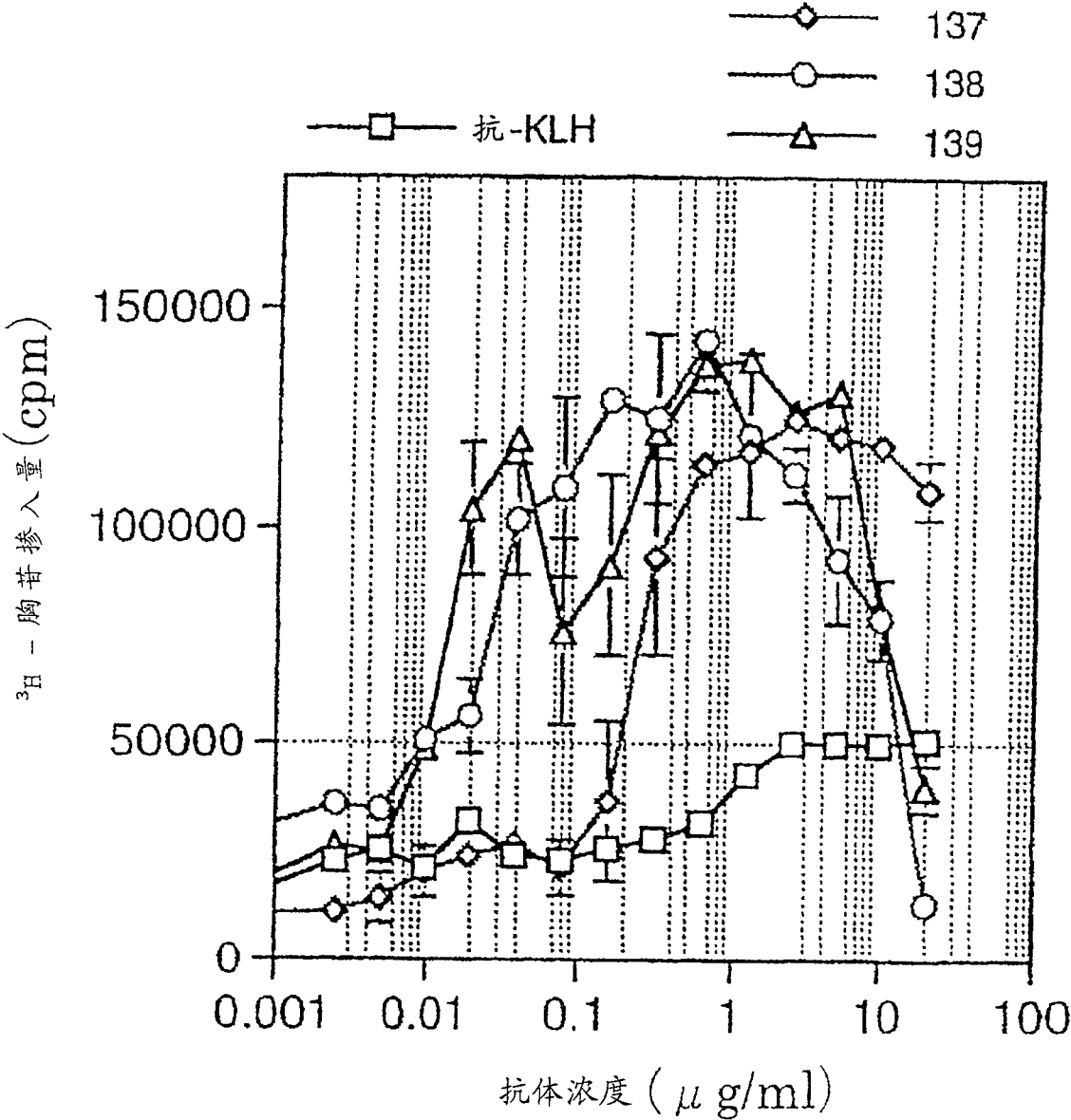


图 28

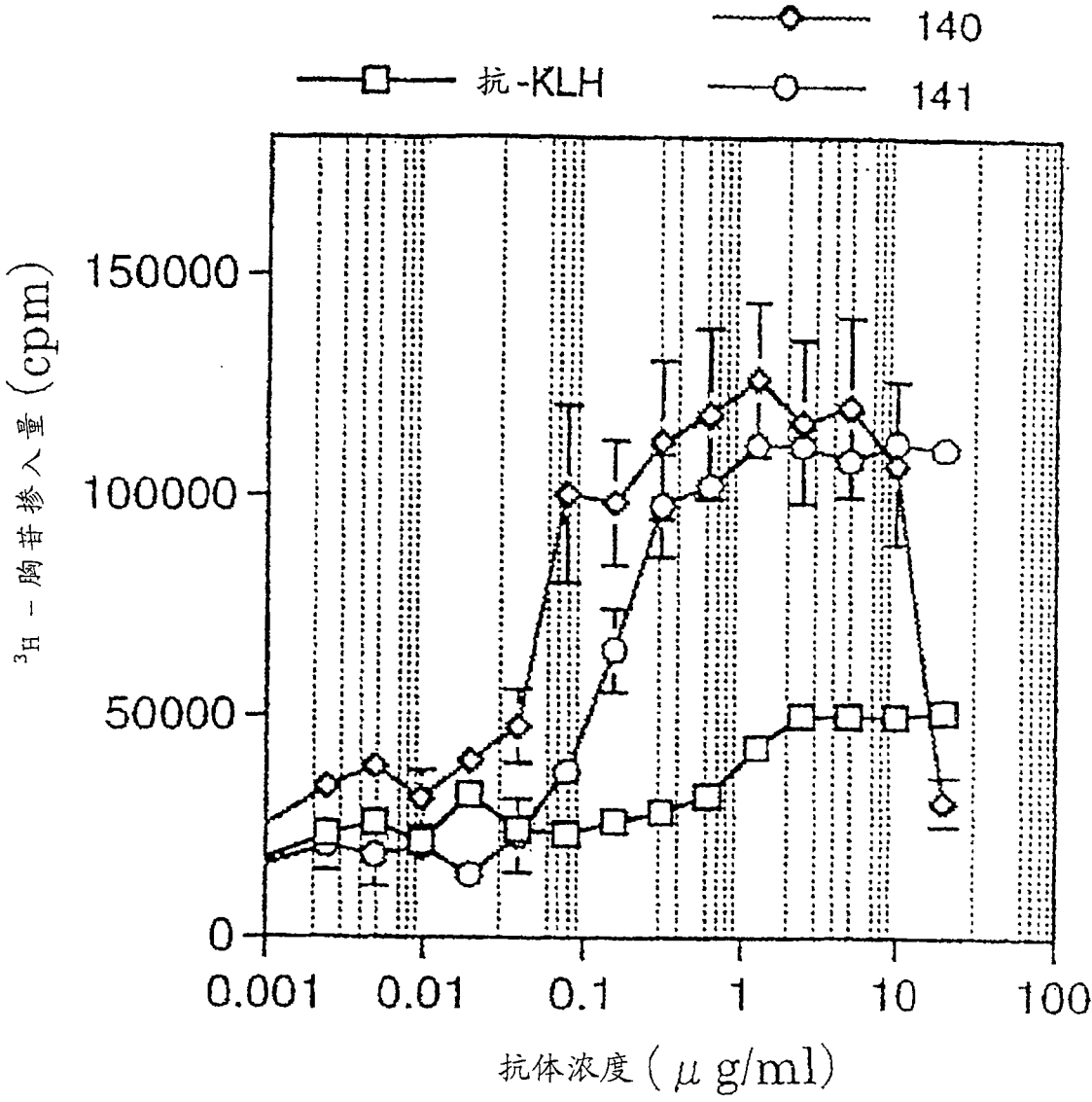


图 29

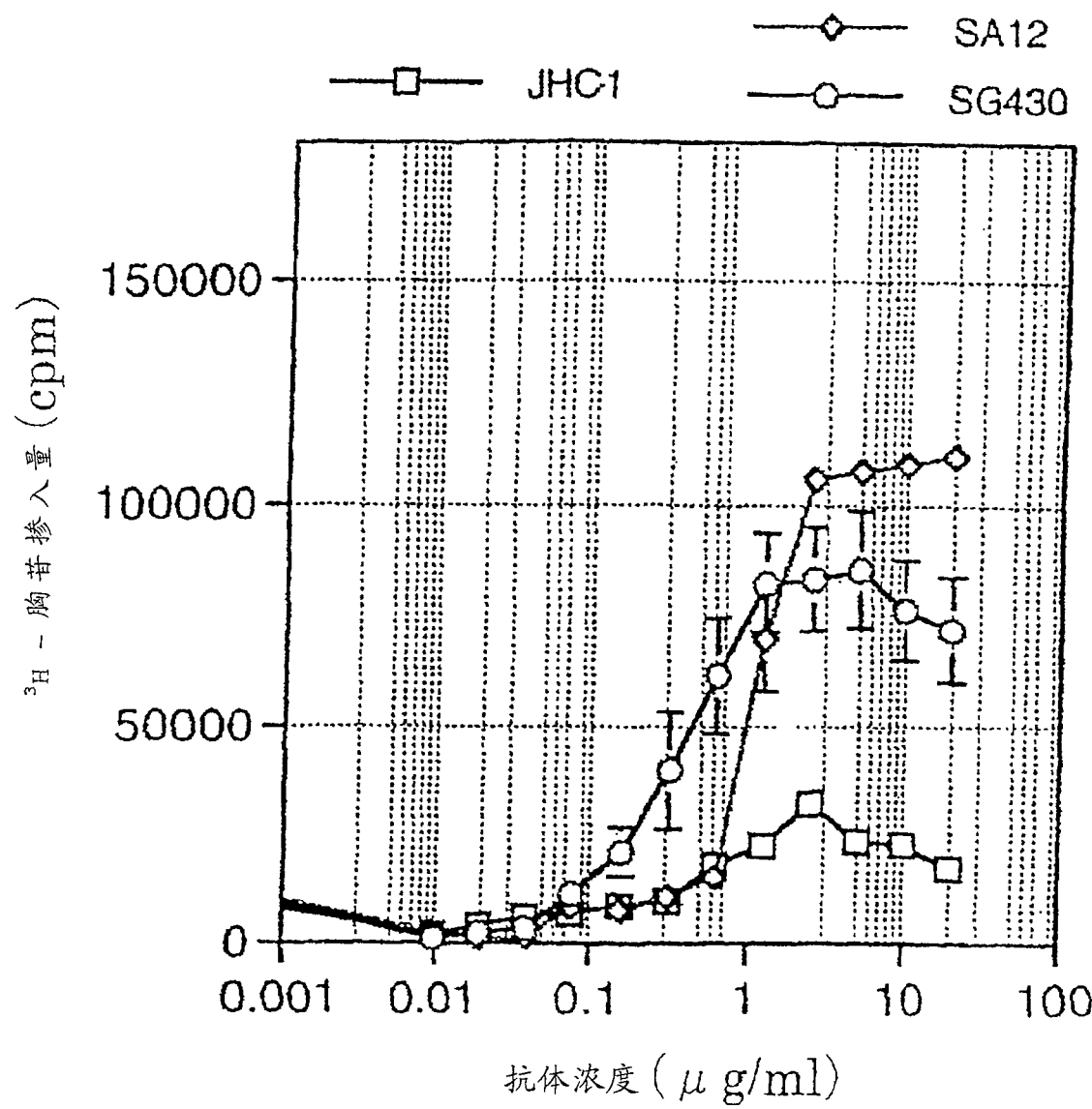


图 30

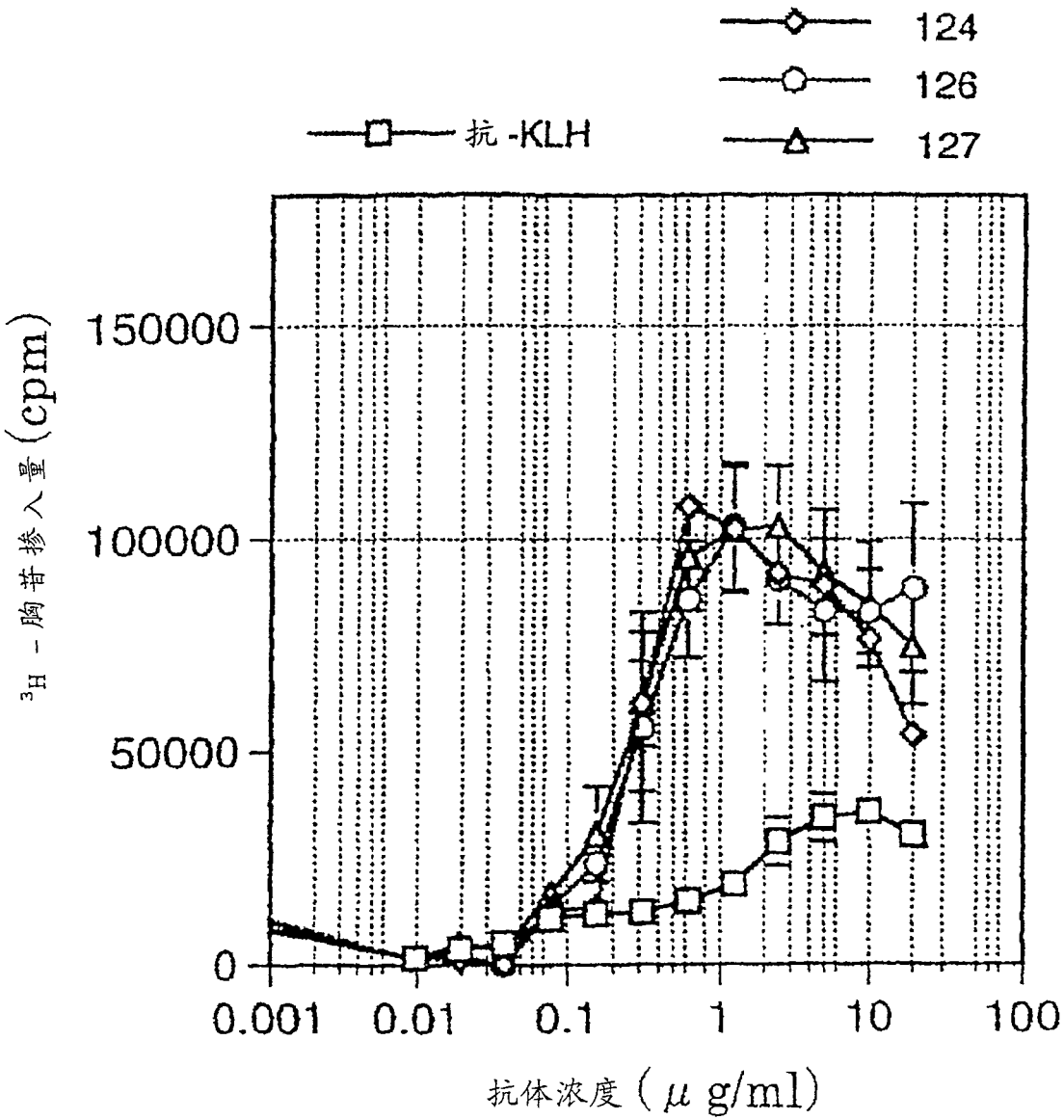


图 31

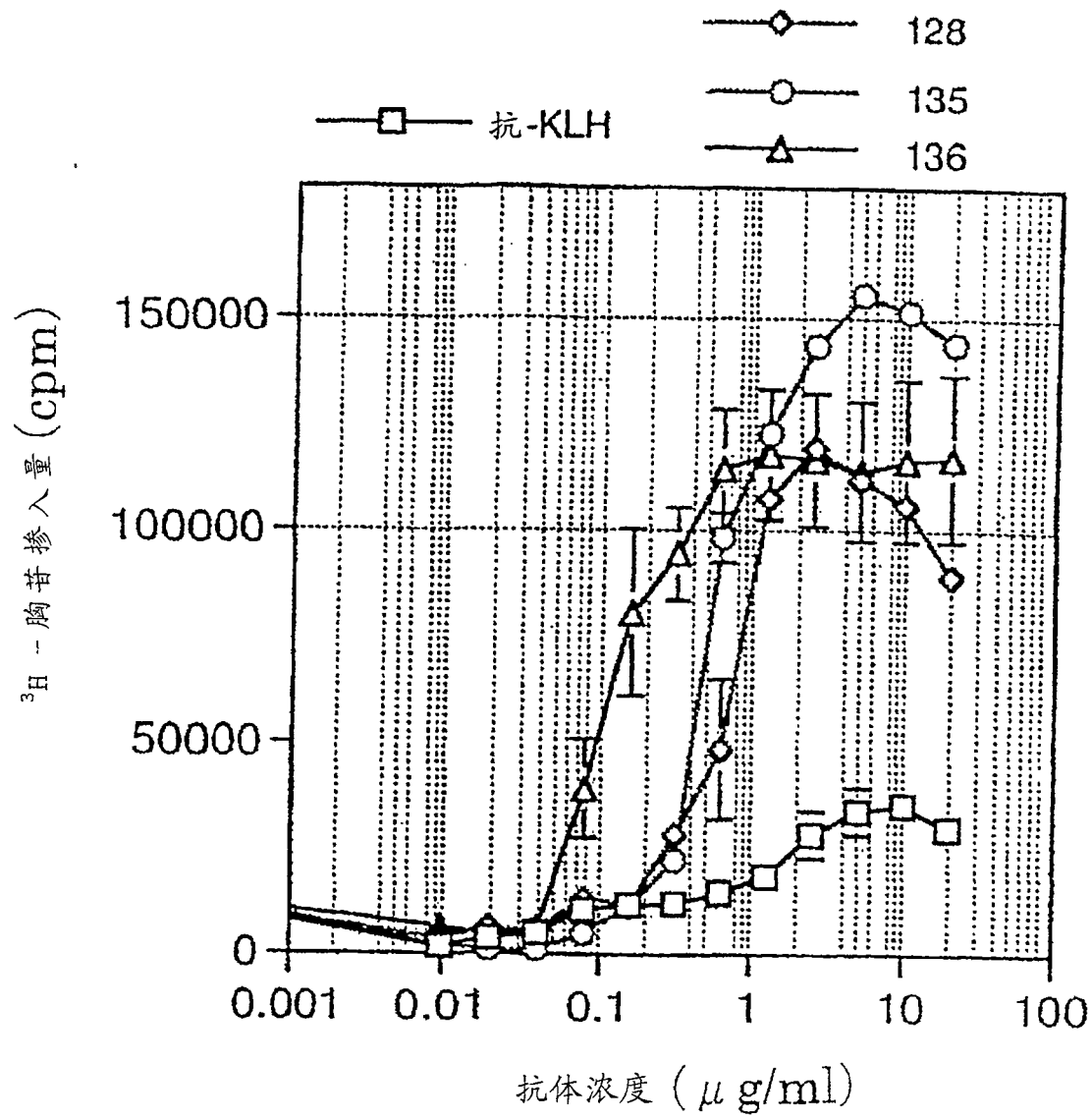


图 32

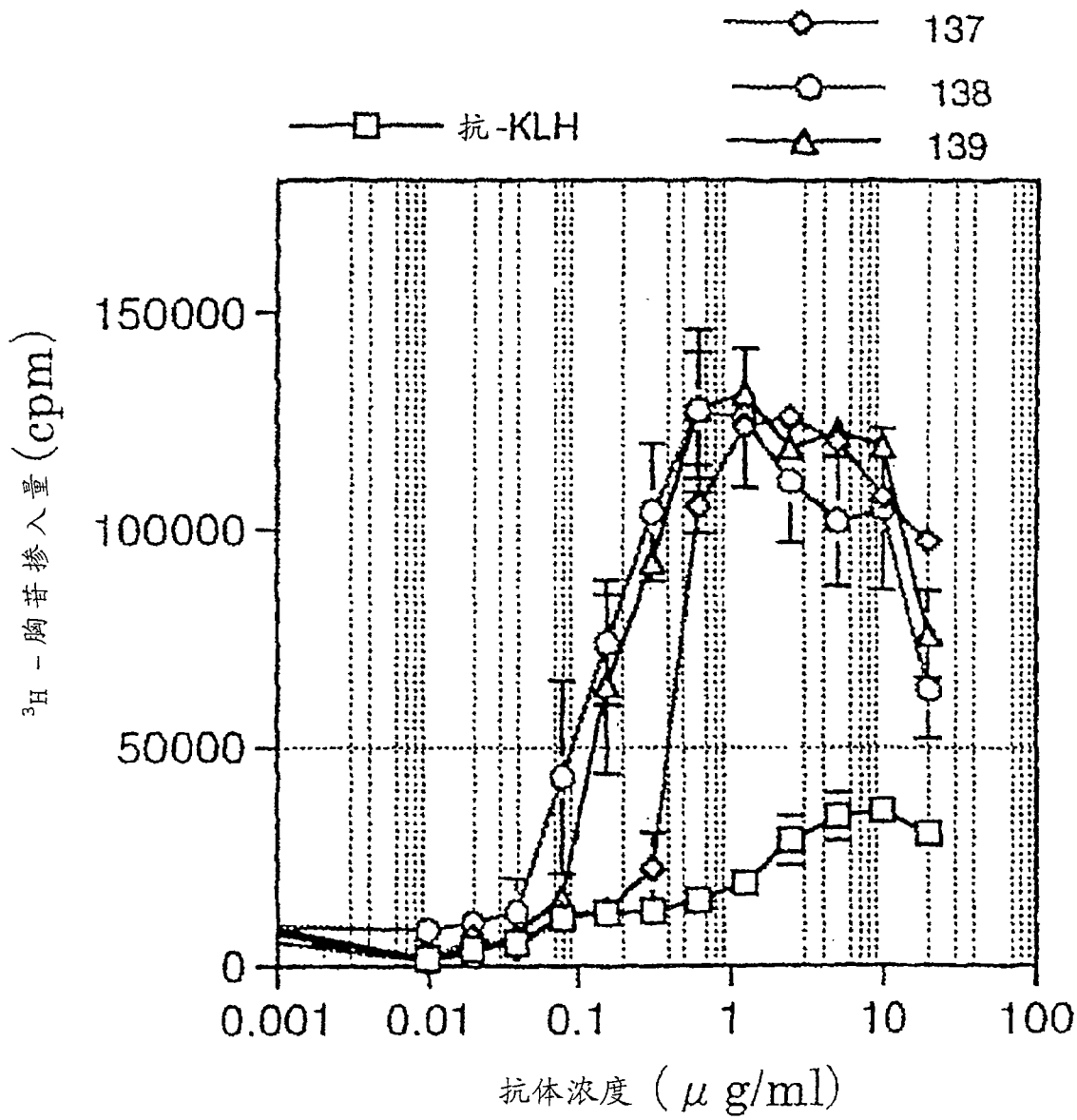


图 33

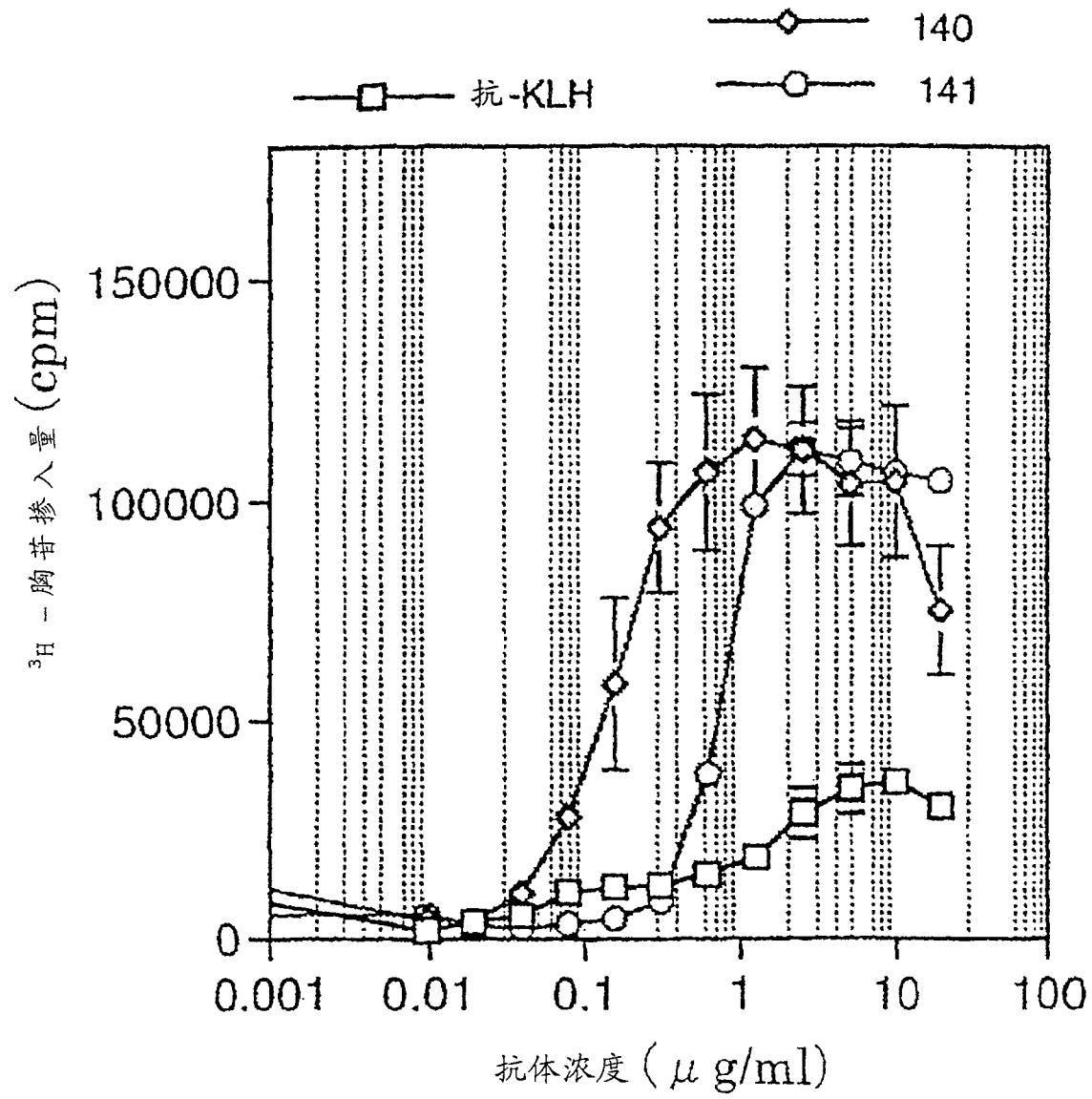


图 34

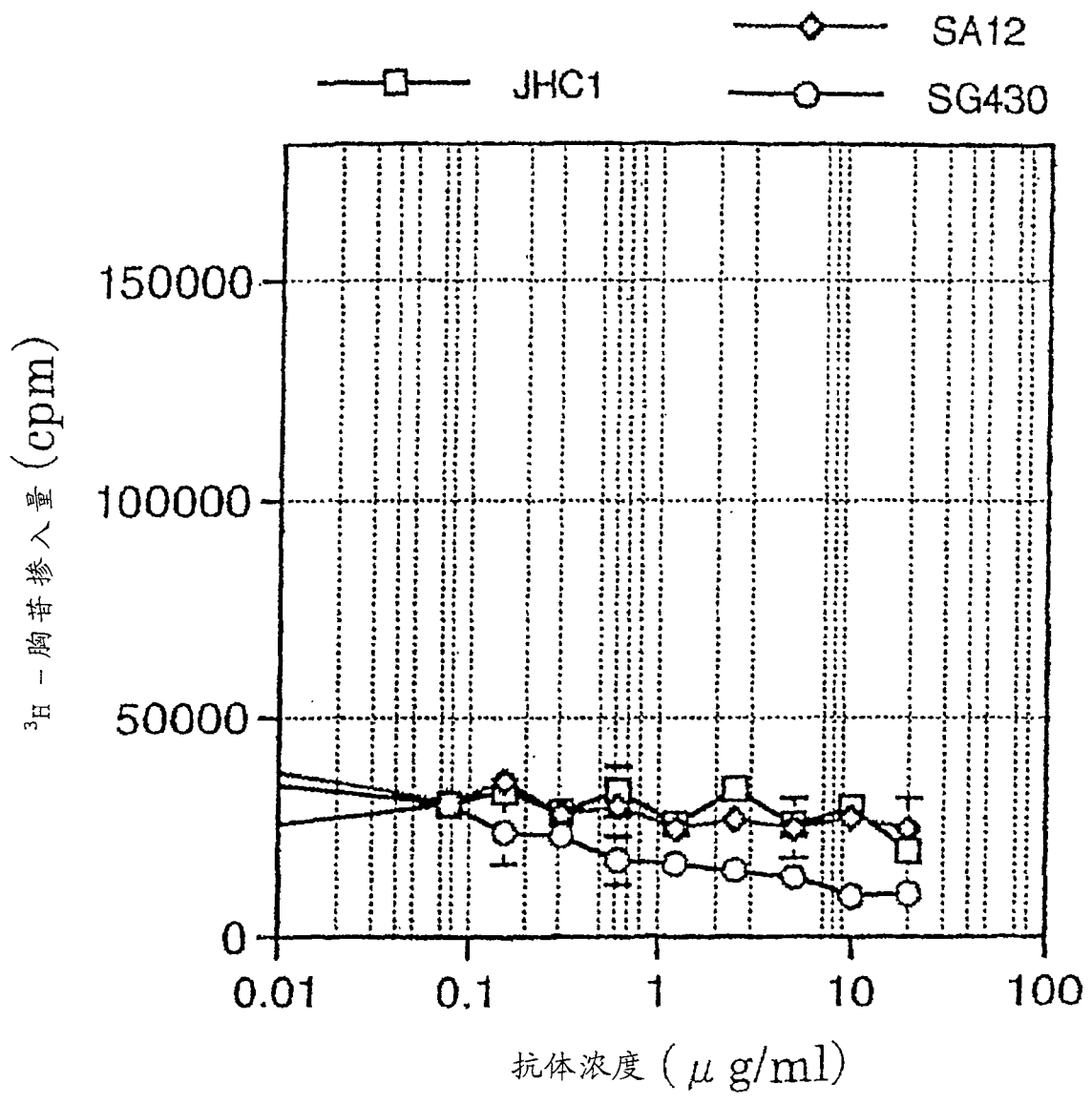


图 35

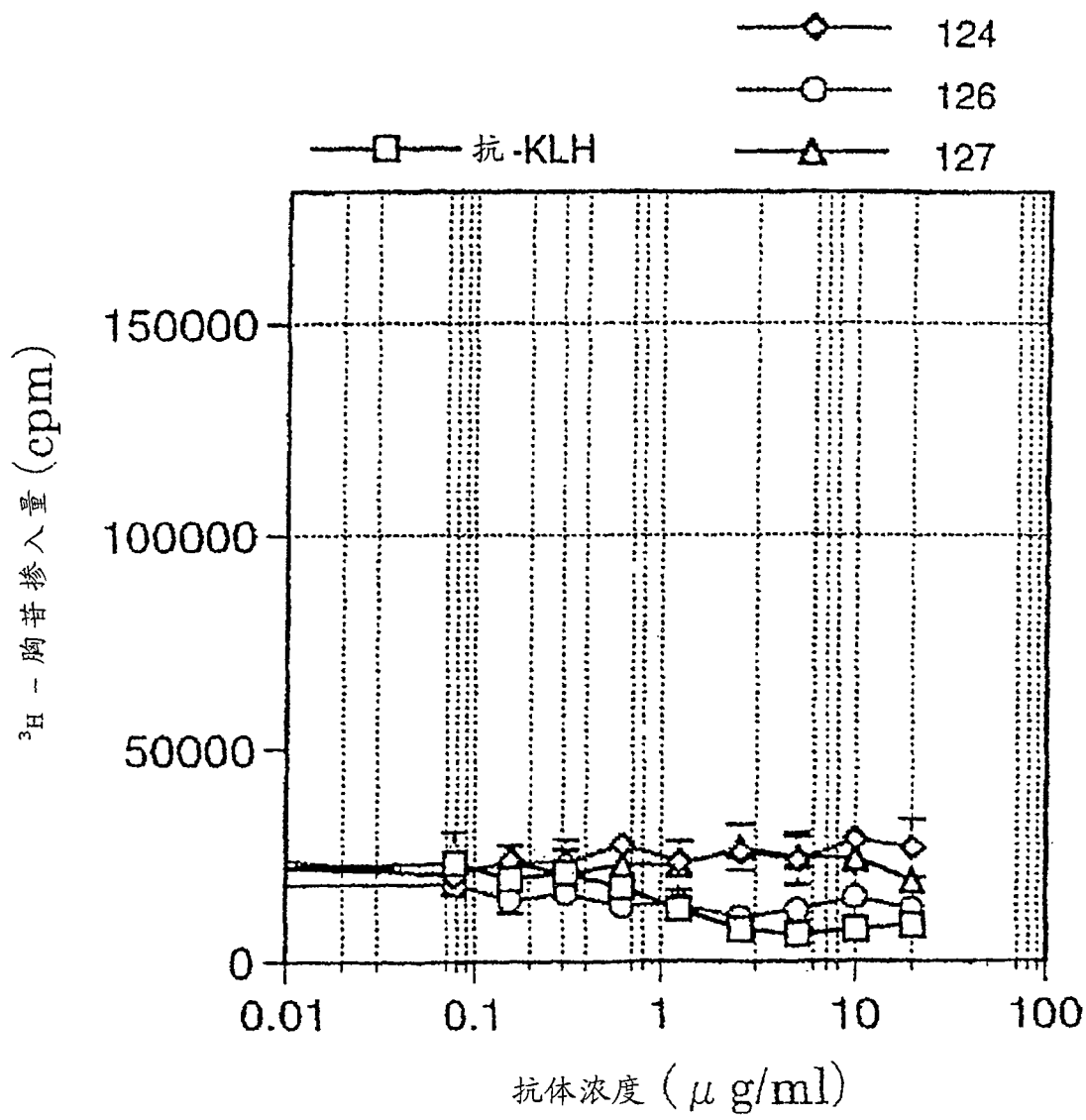


图 36

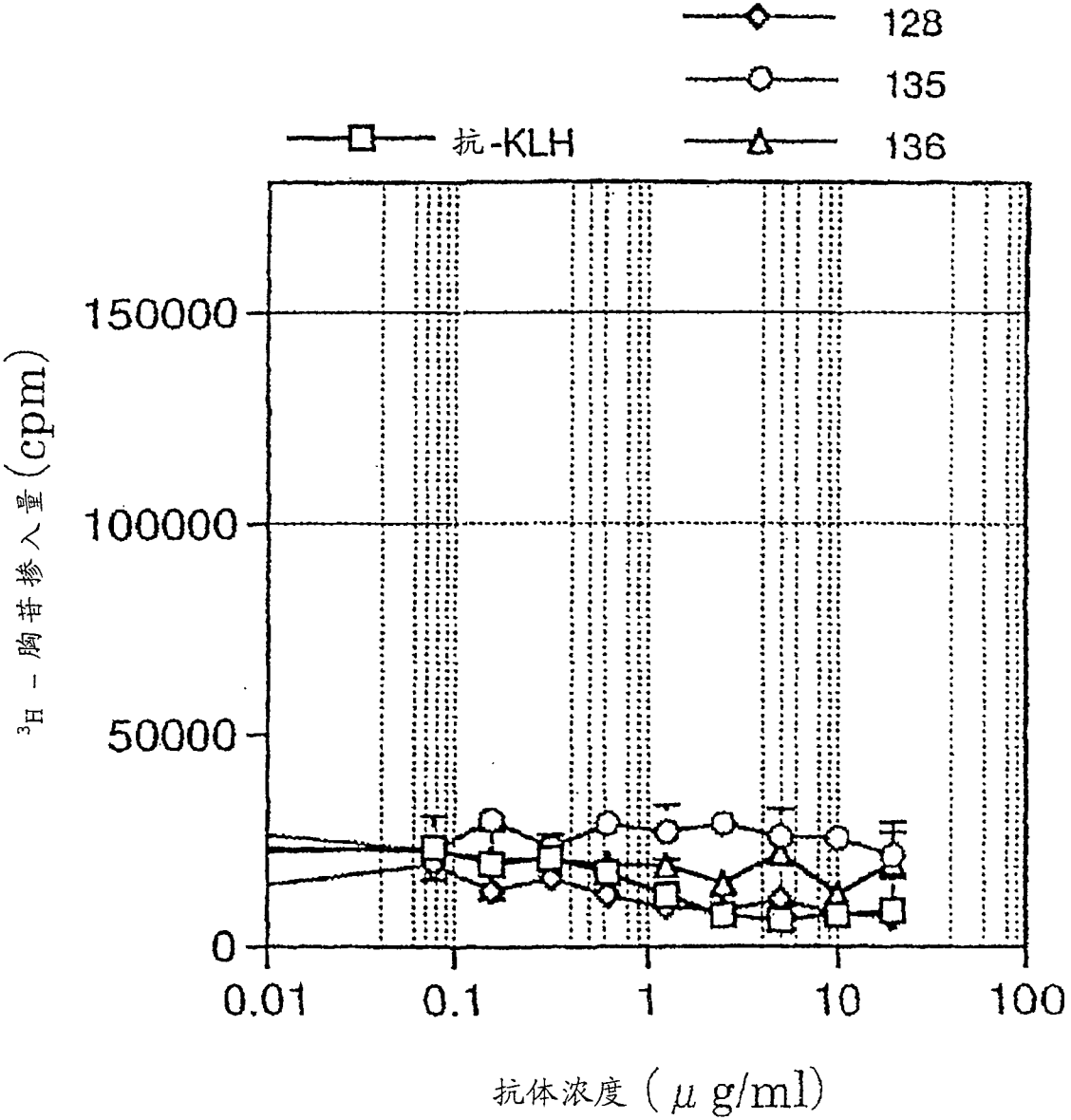


图 37

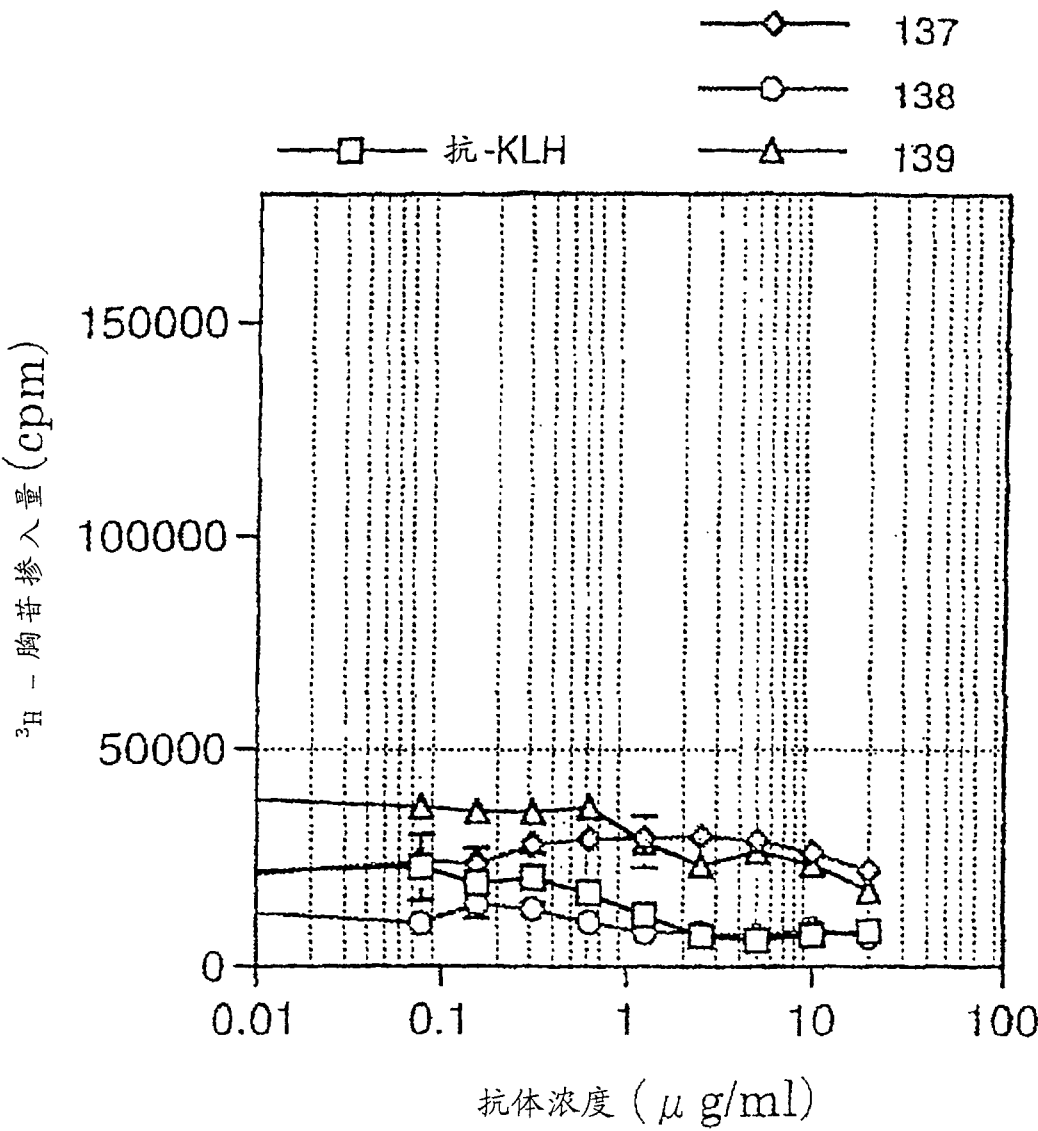


图 38

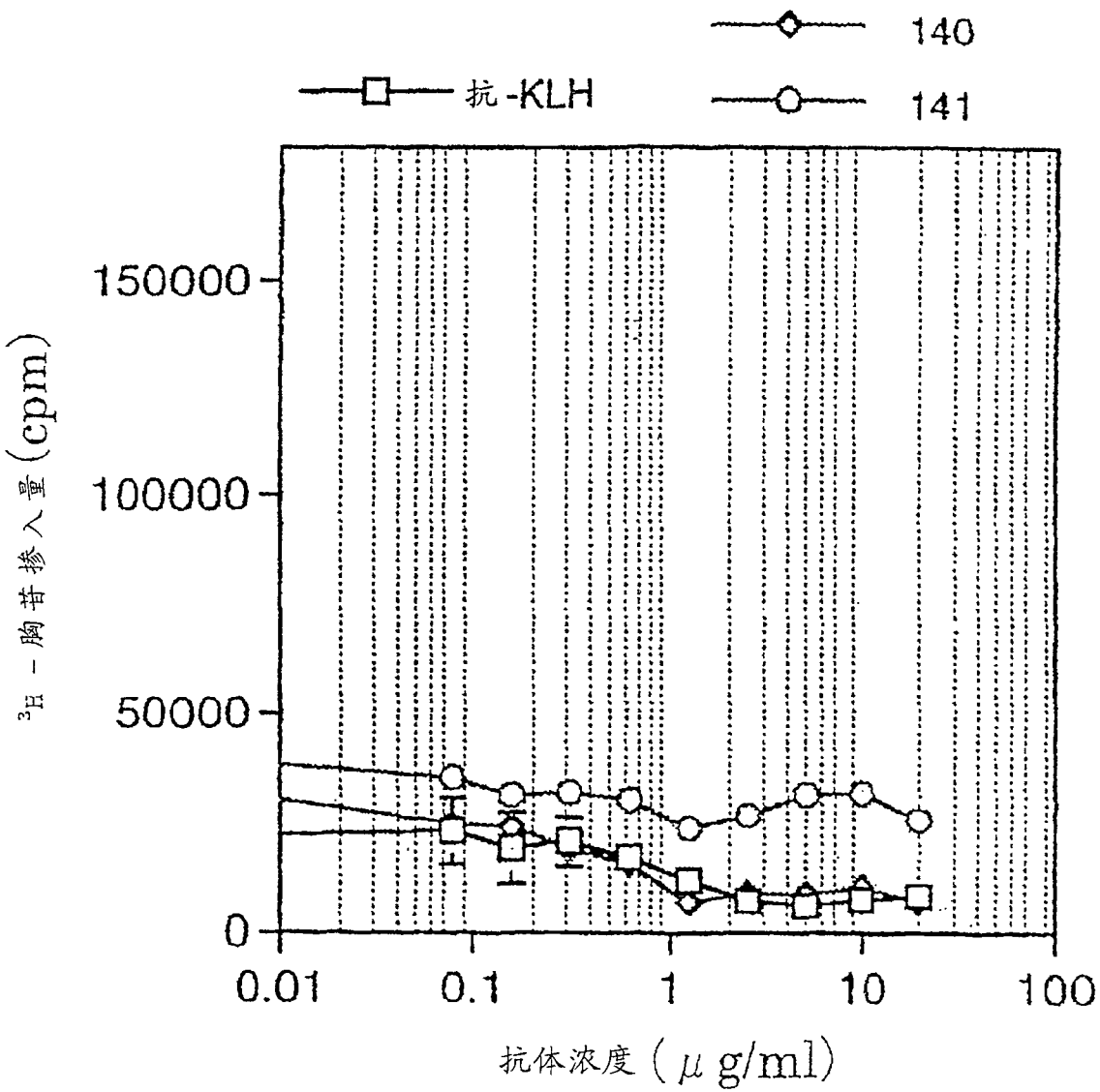


图 39

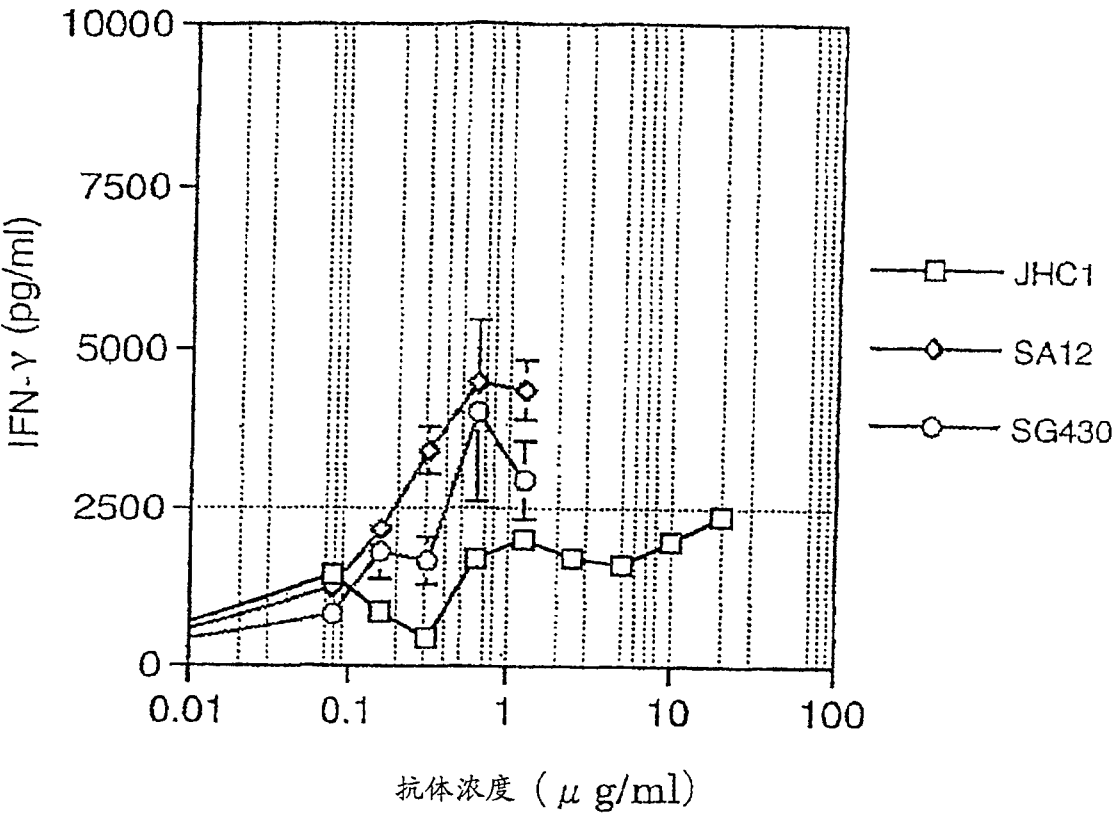


图 40

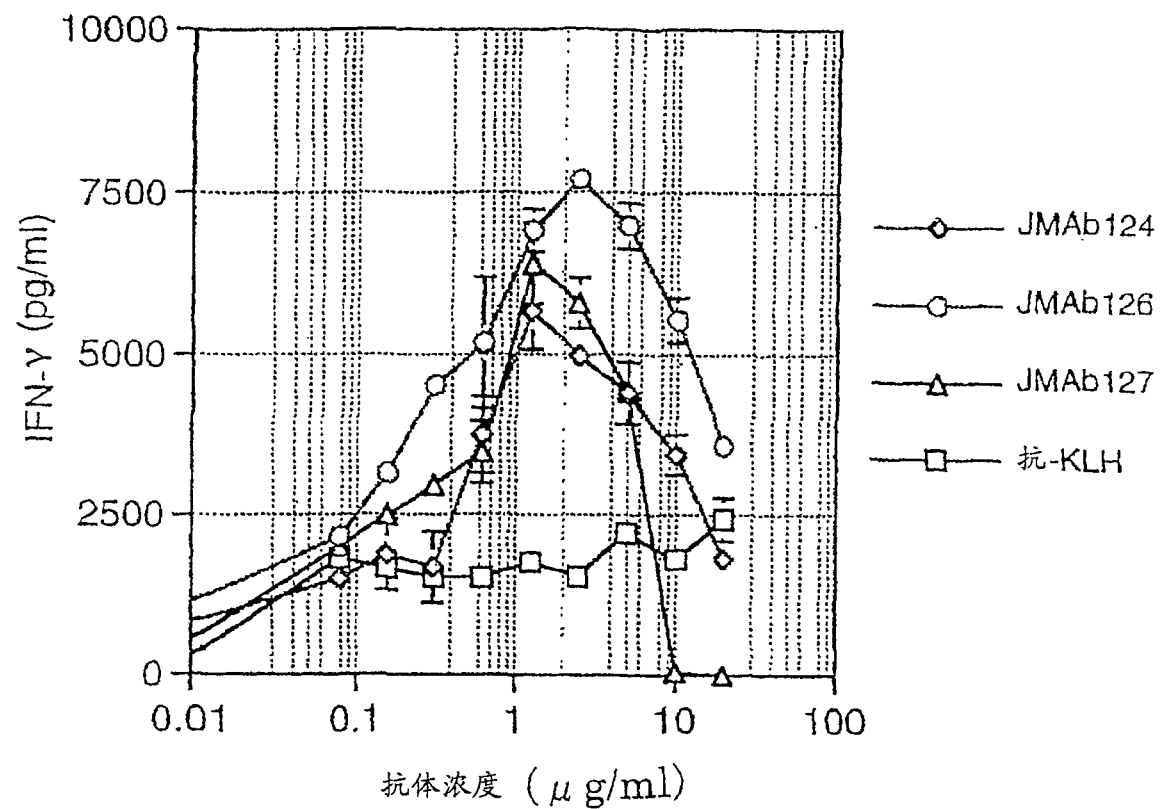


图 41

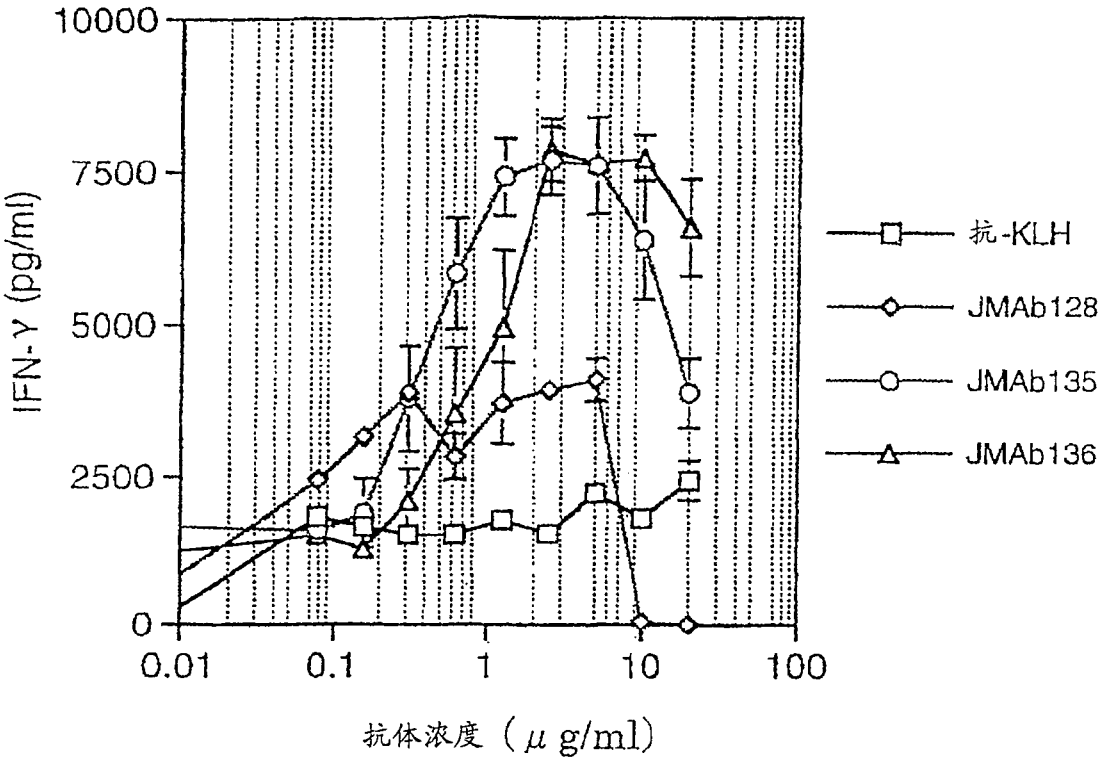


图 42

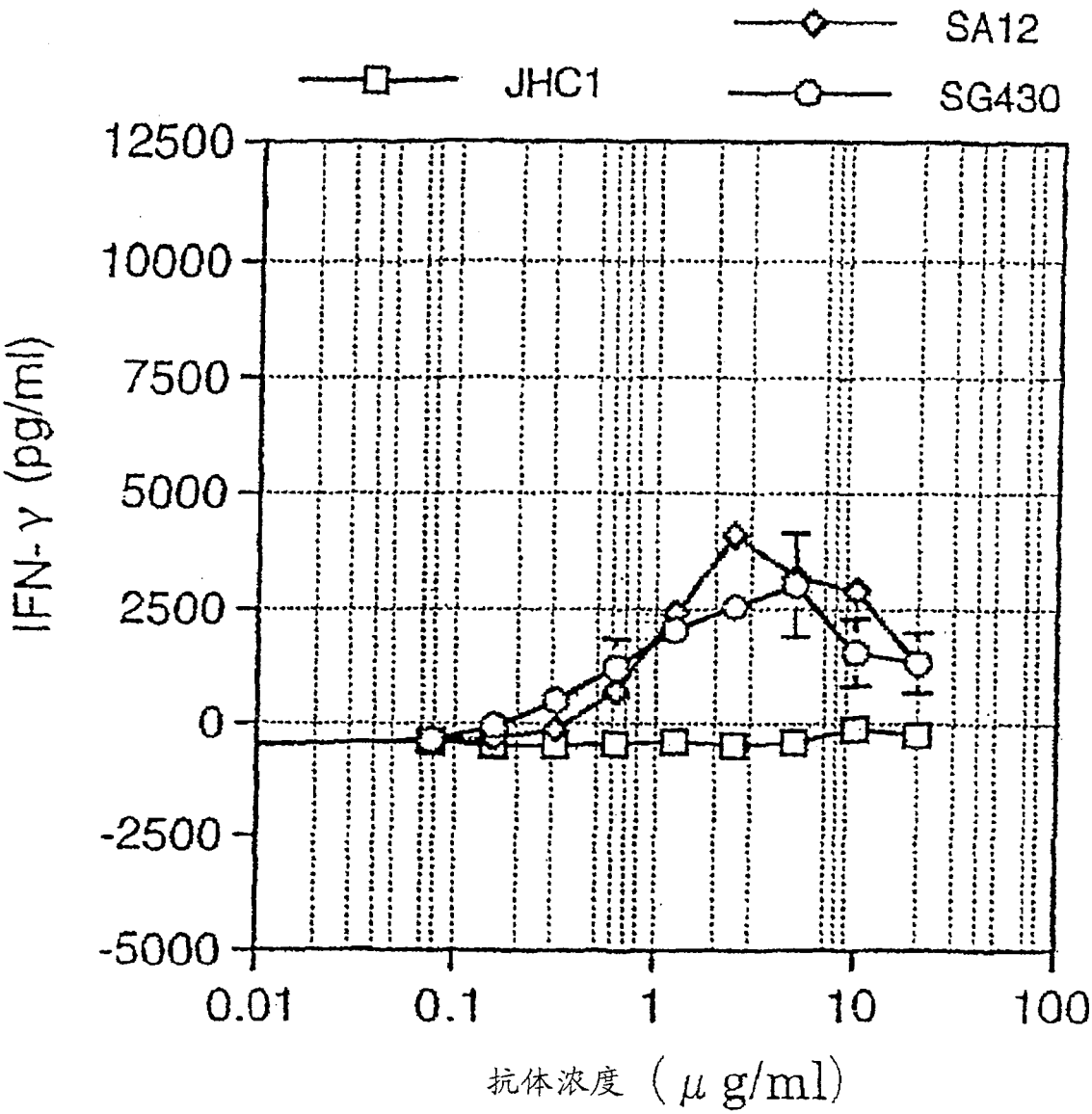


图 43

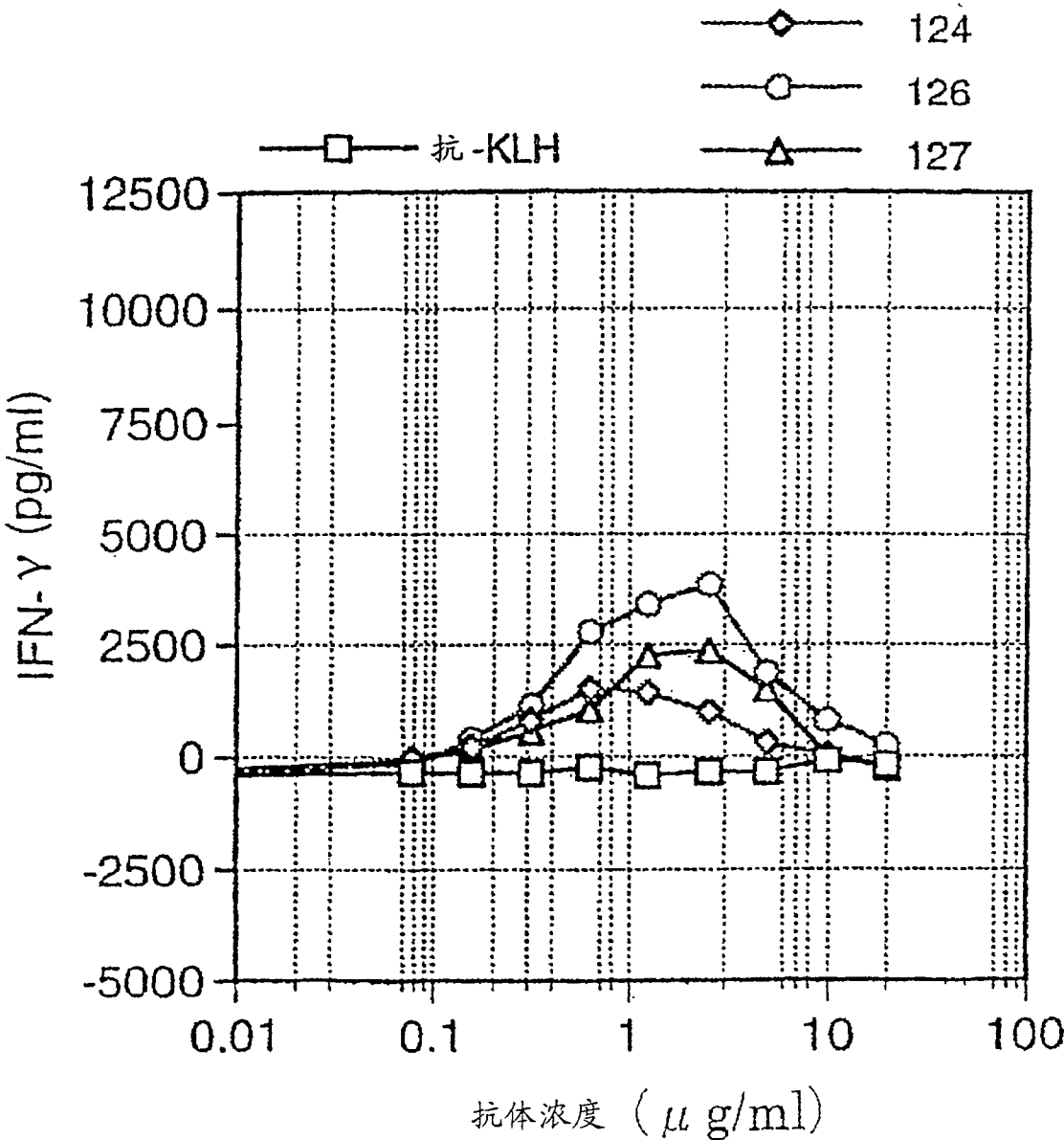


图 44

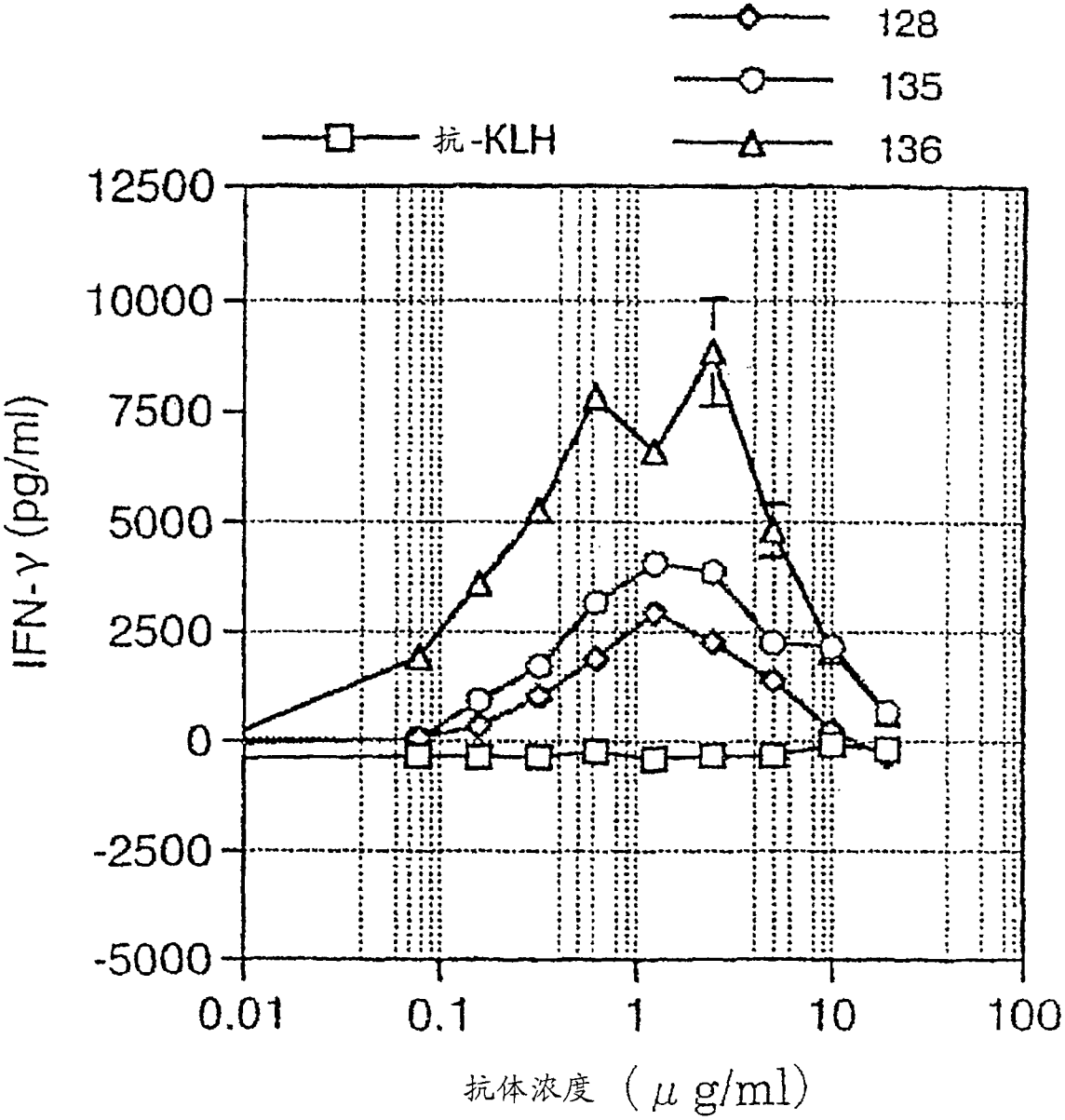


图 45

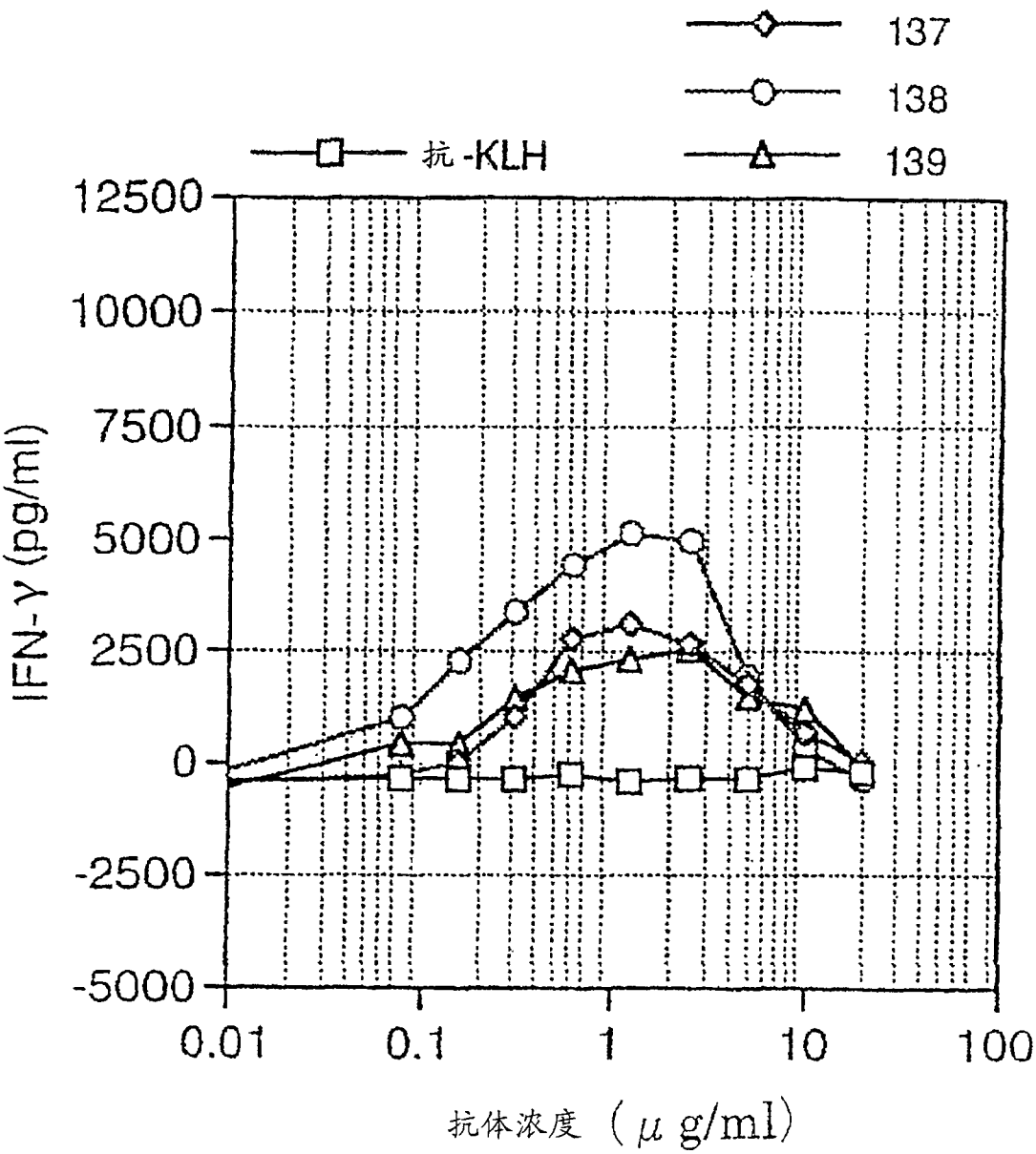


图 46

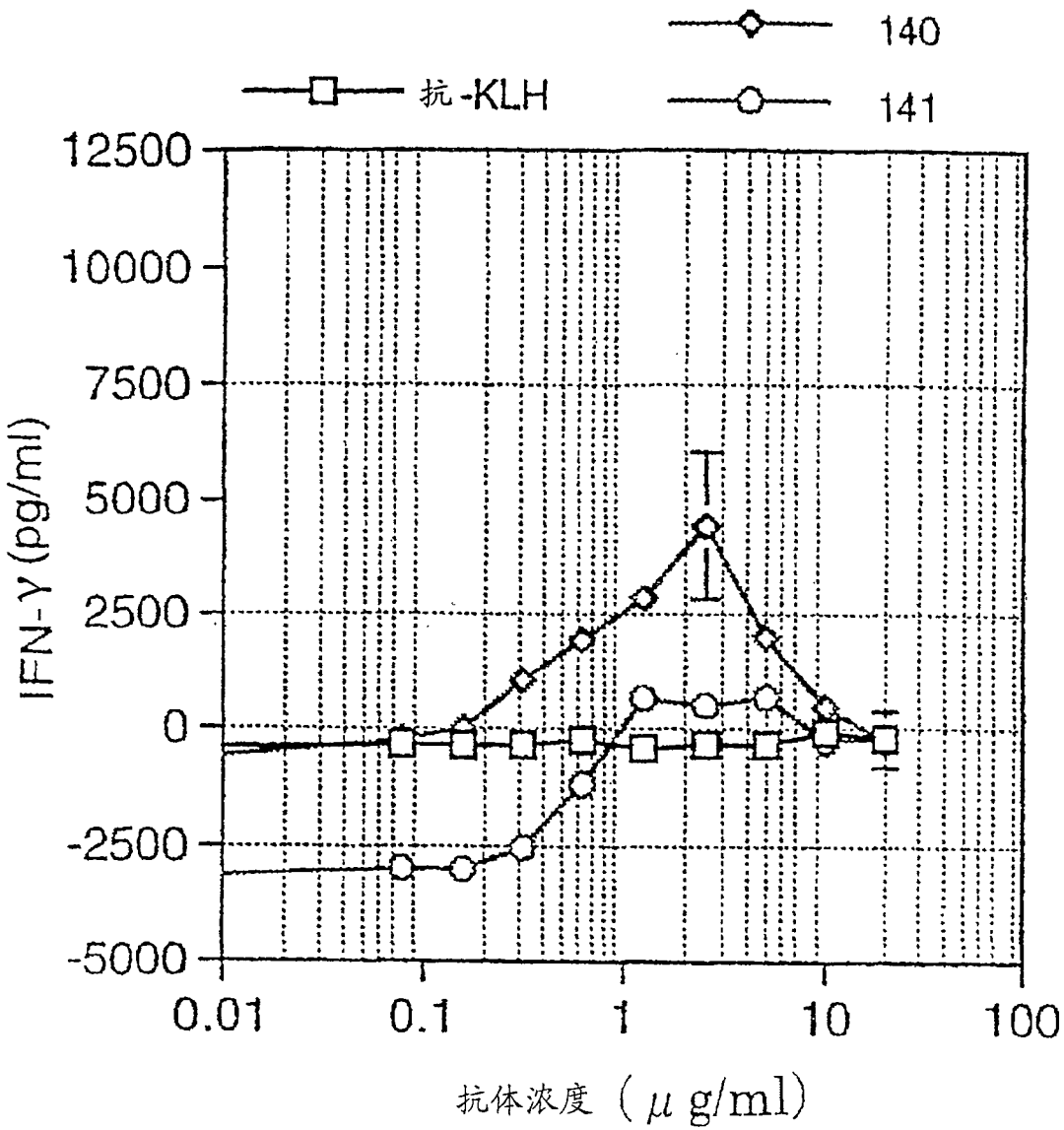


图 47

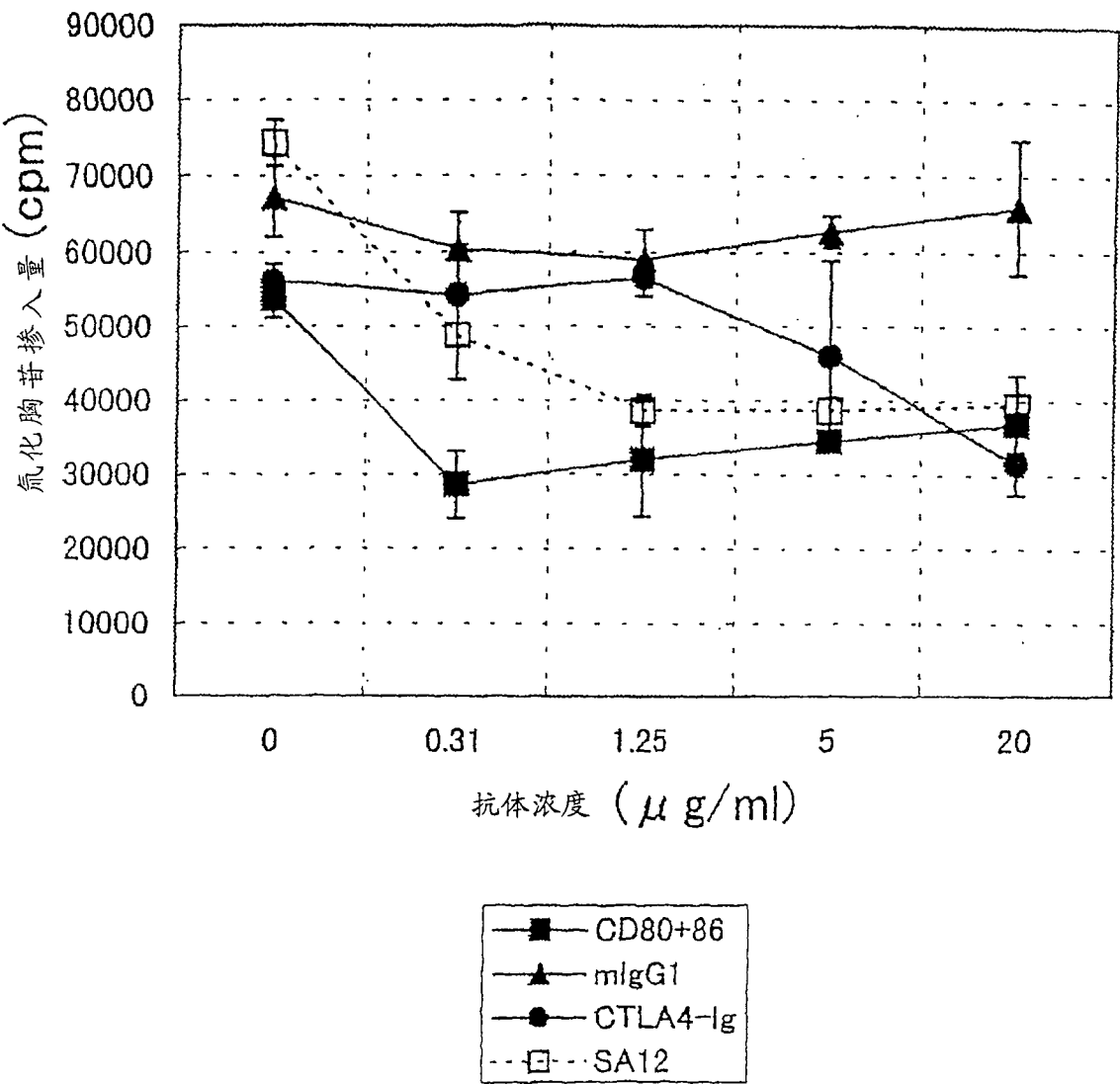


图 48

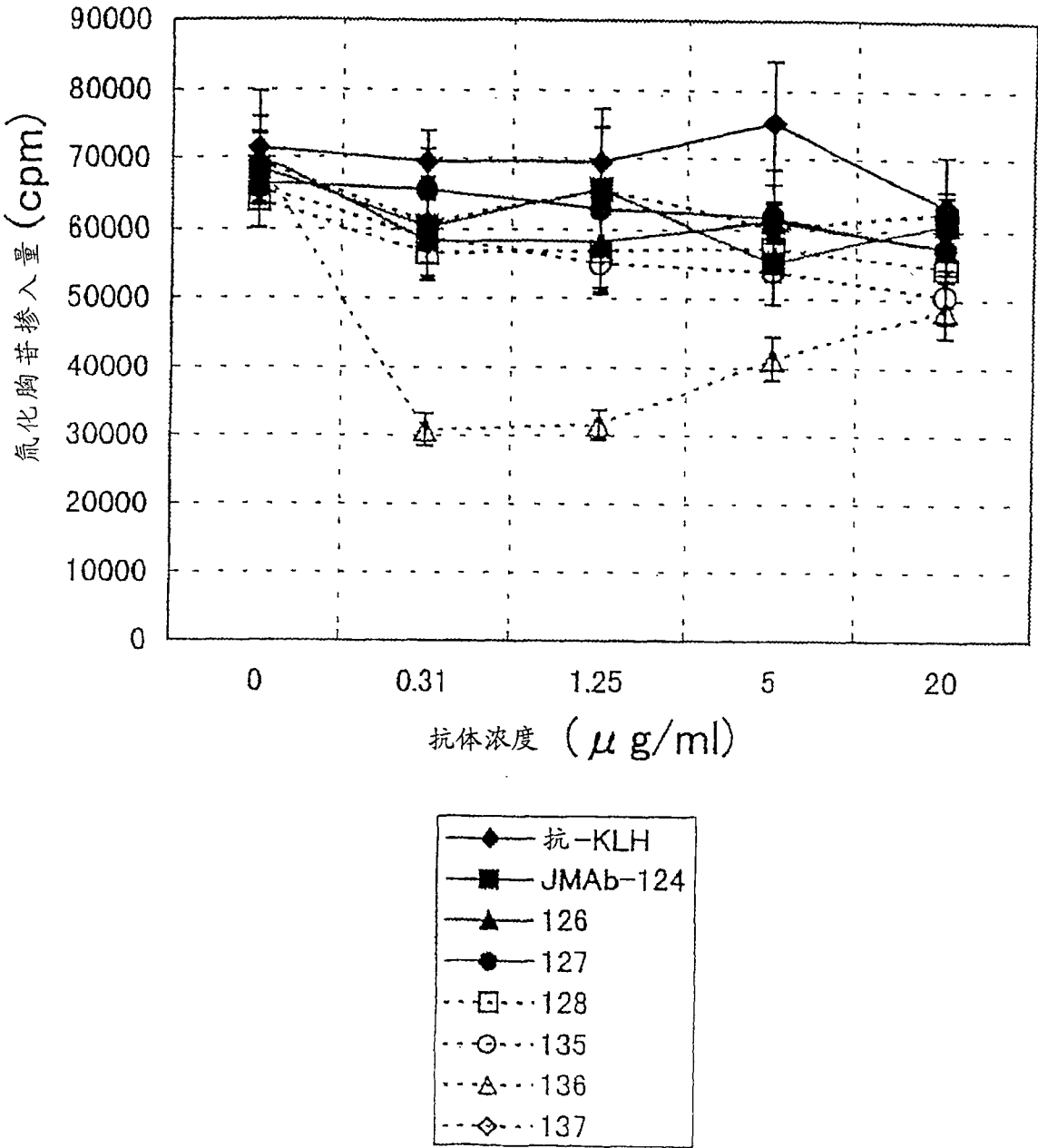


图 49

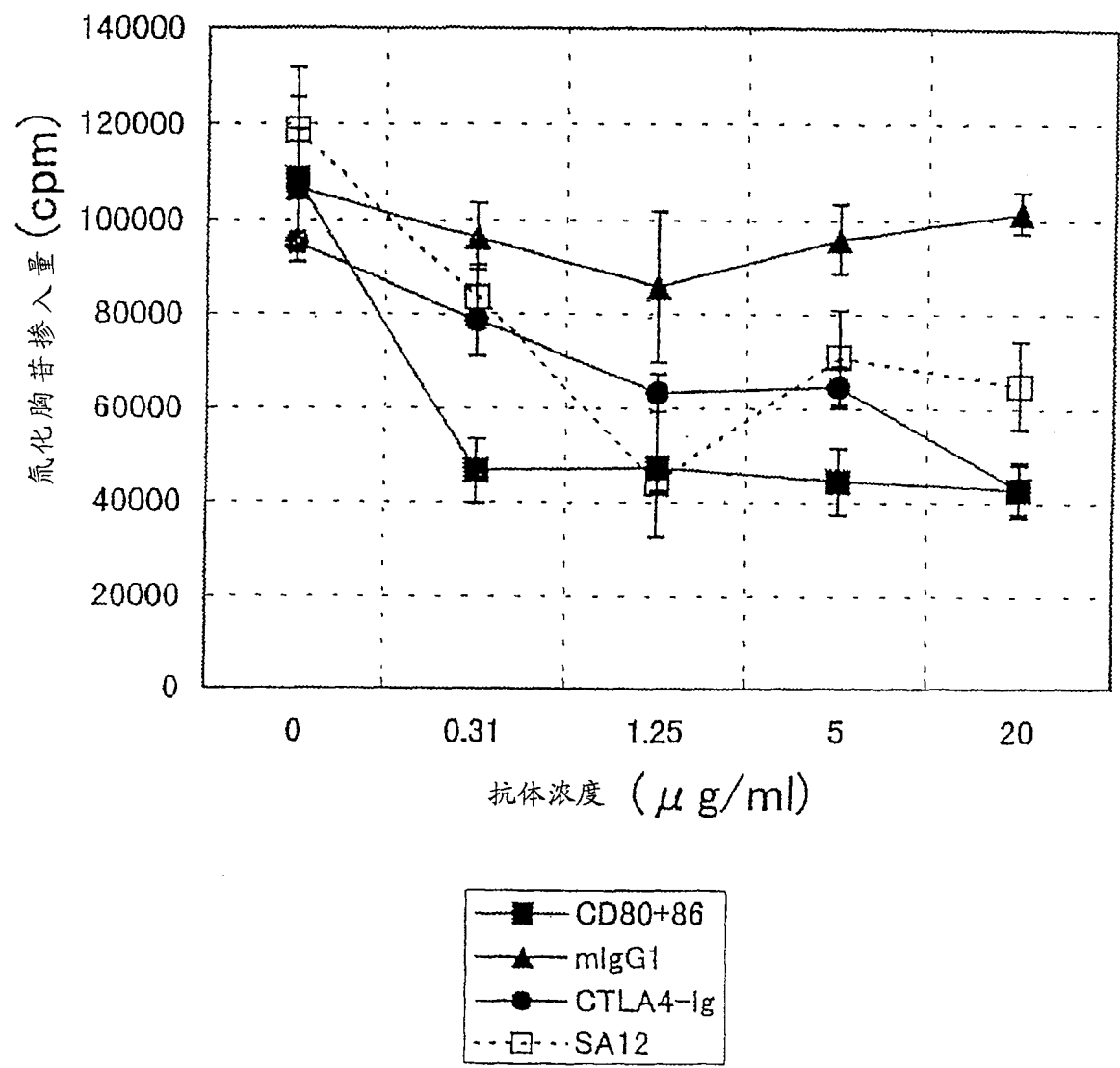


图 50

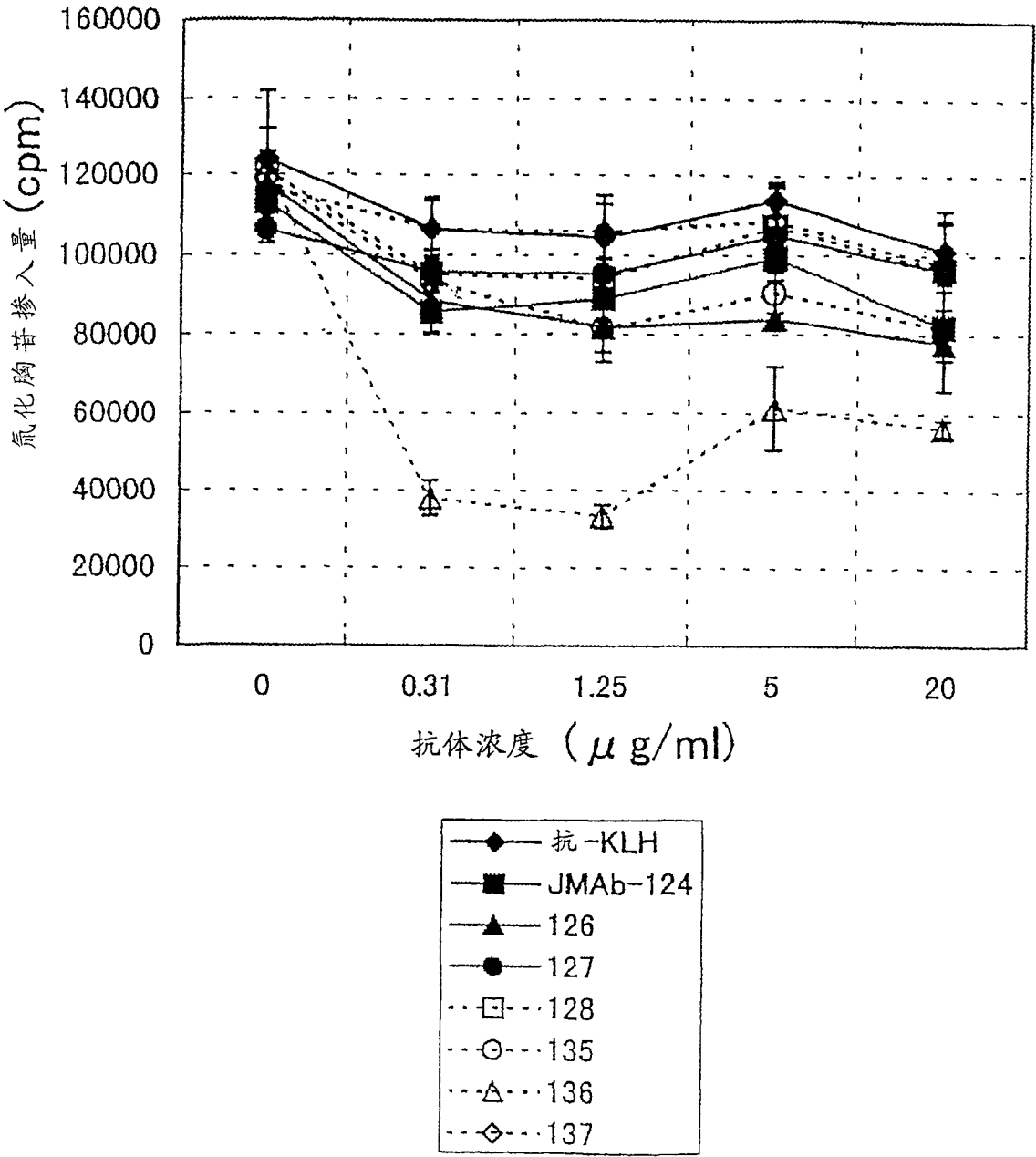


图 51

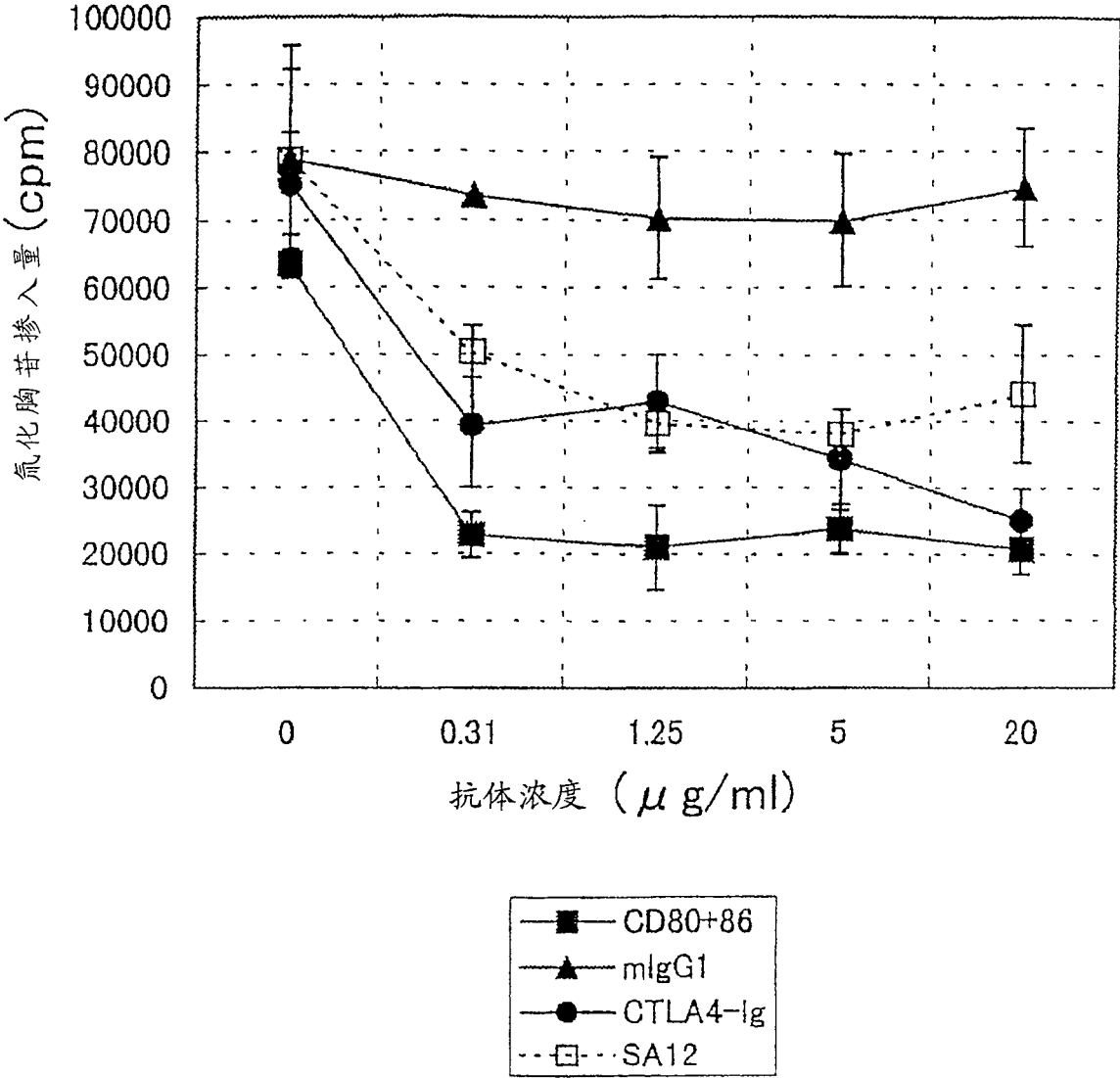


图 52

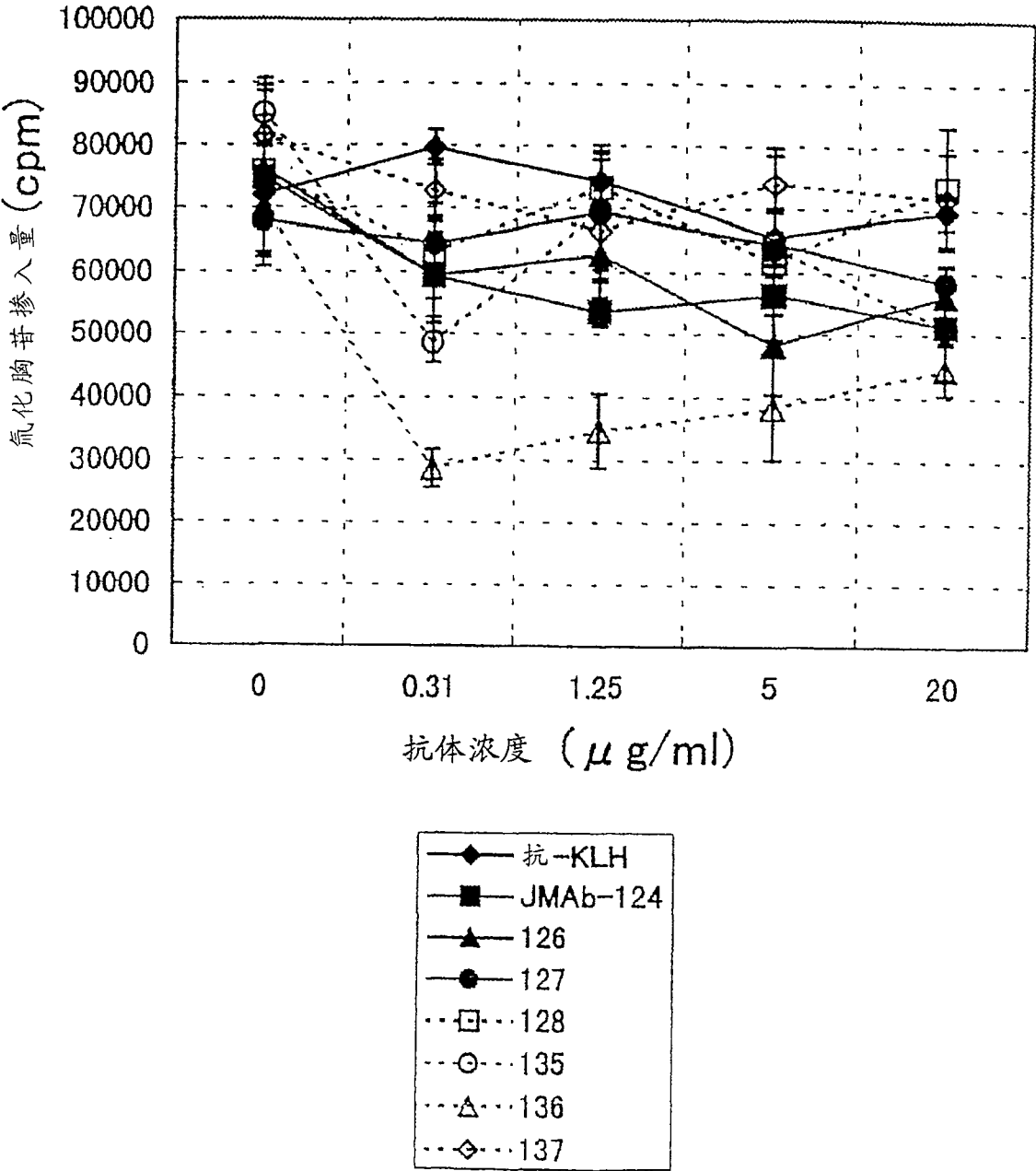


图 53

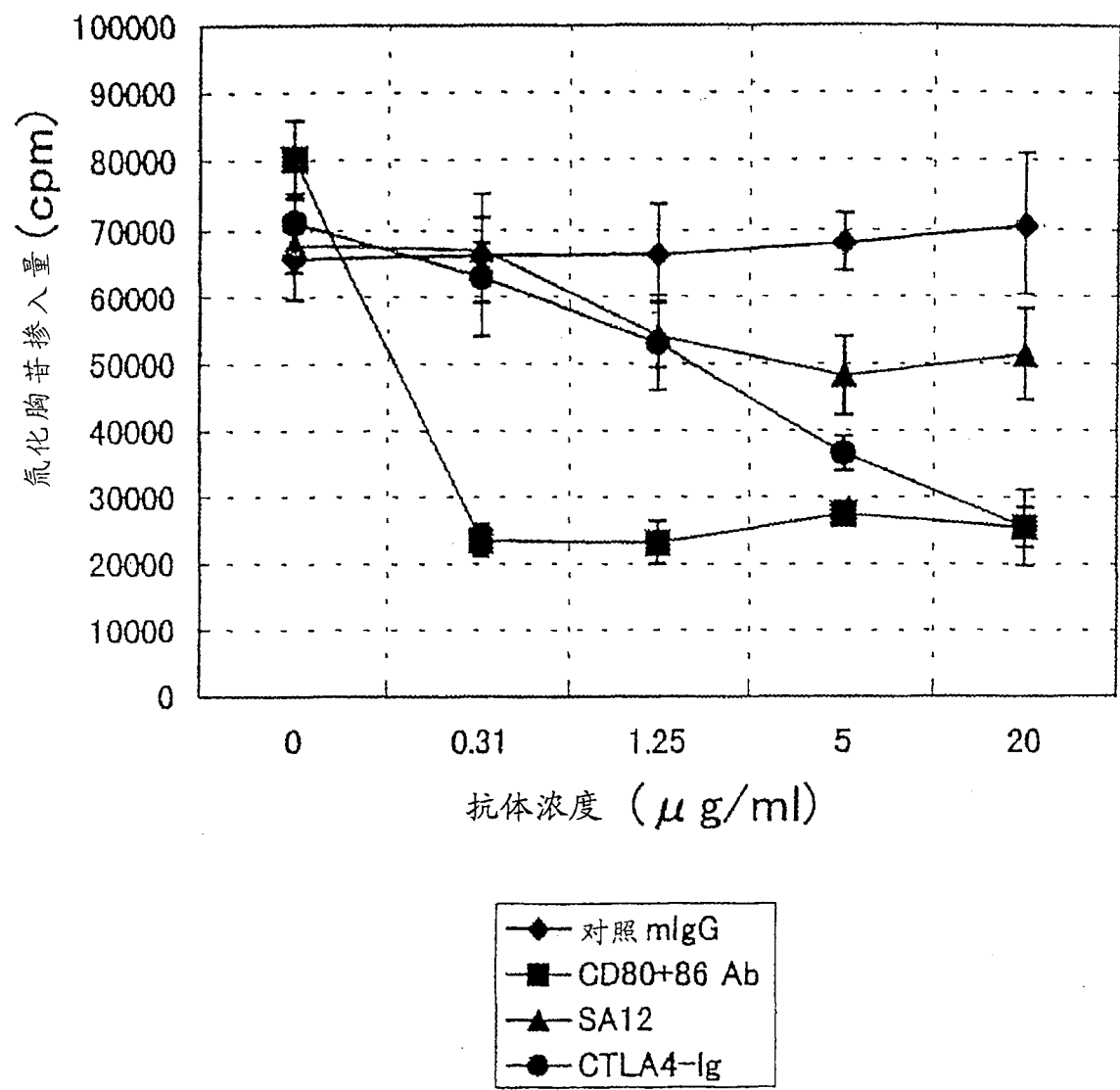


图 54

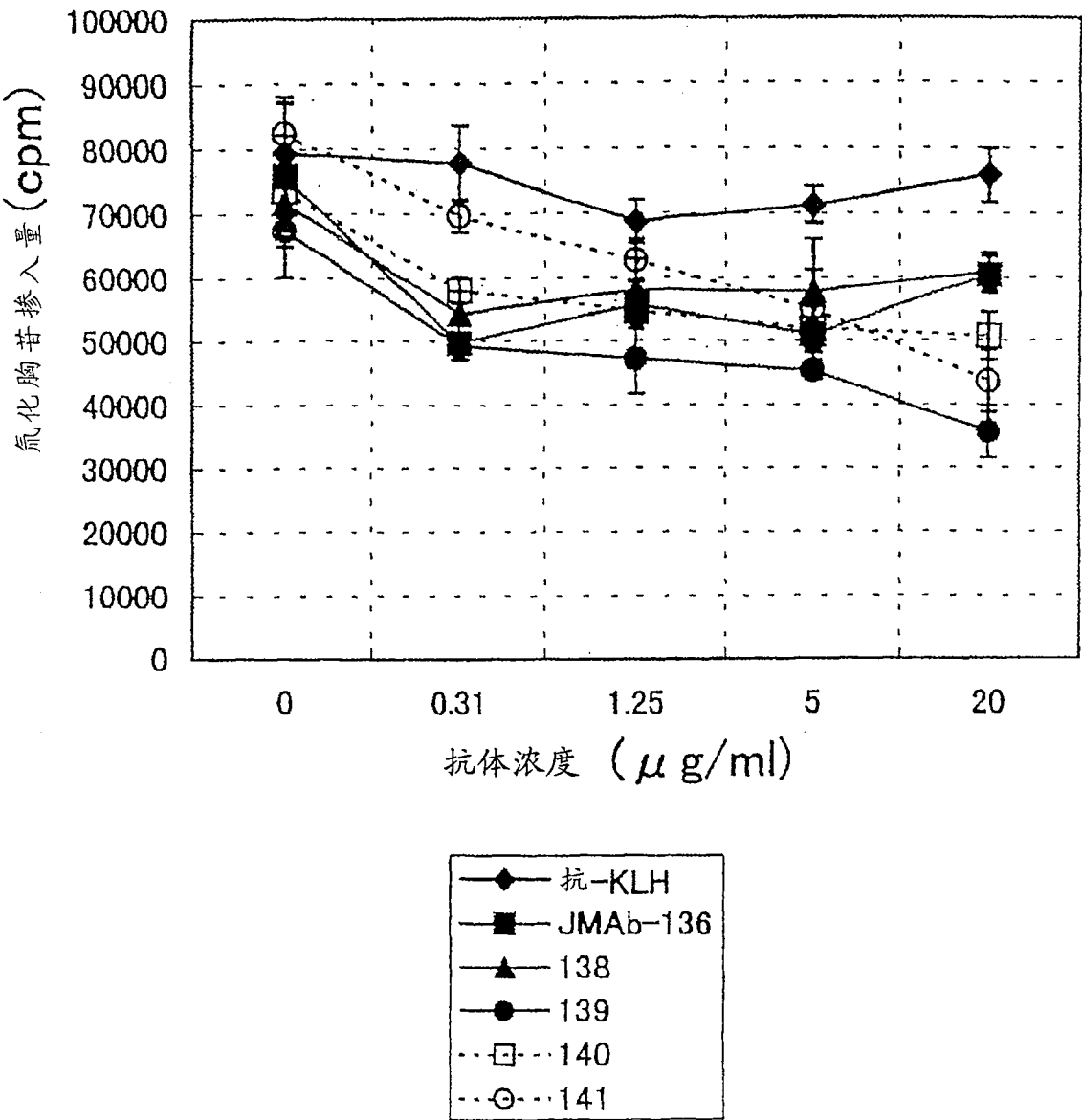


图 55

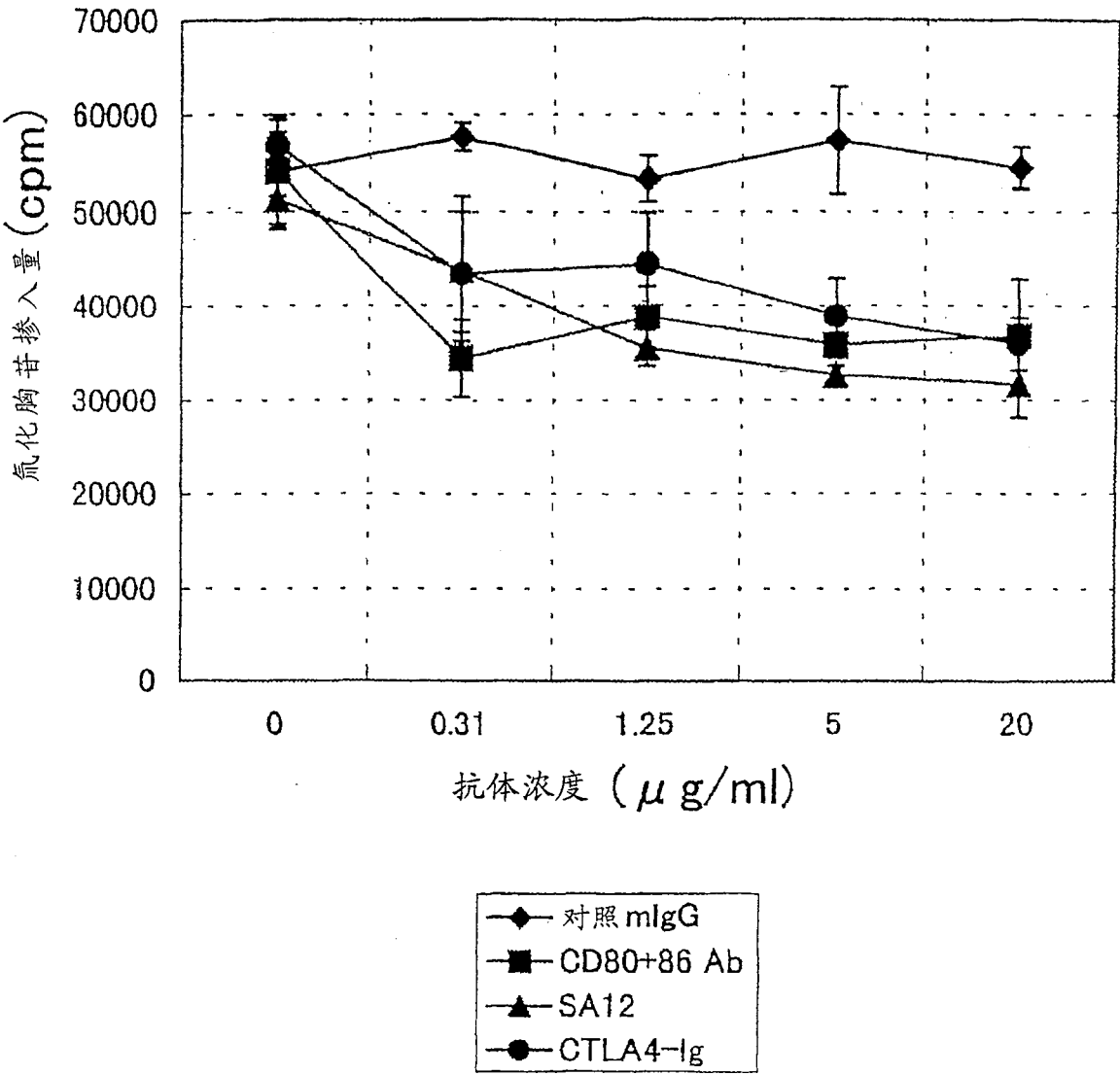


图 56

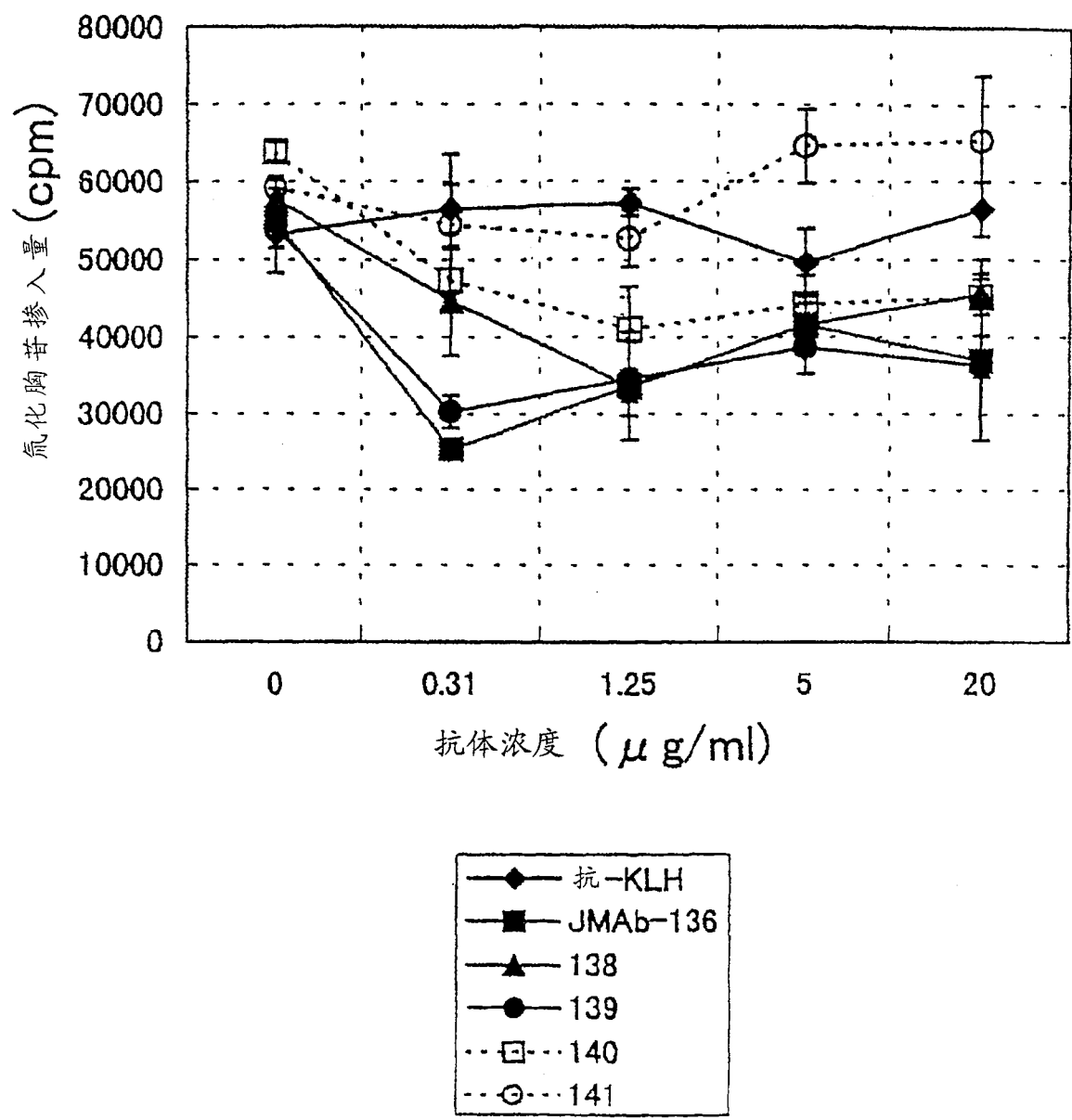


图 57

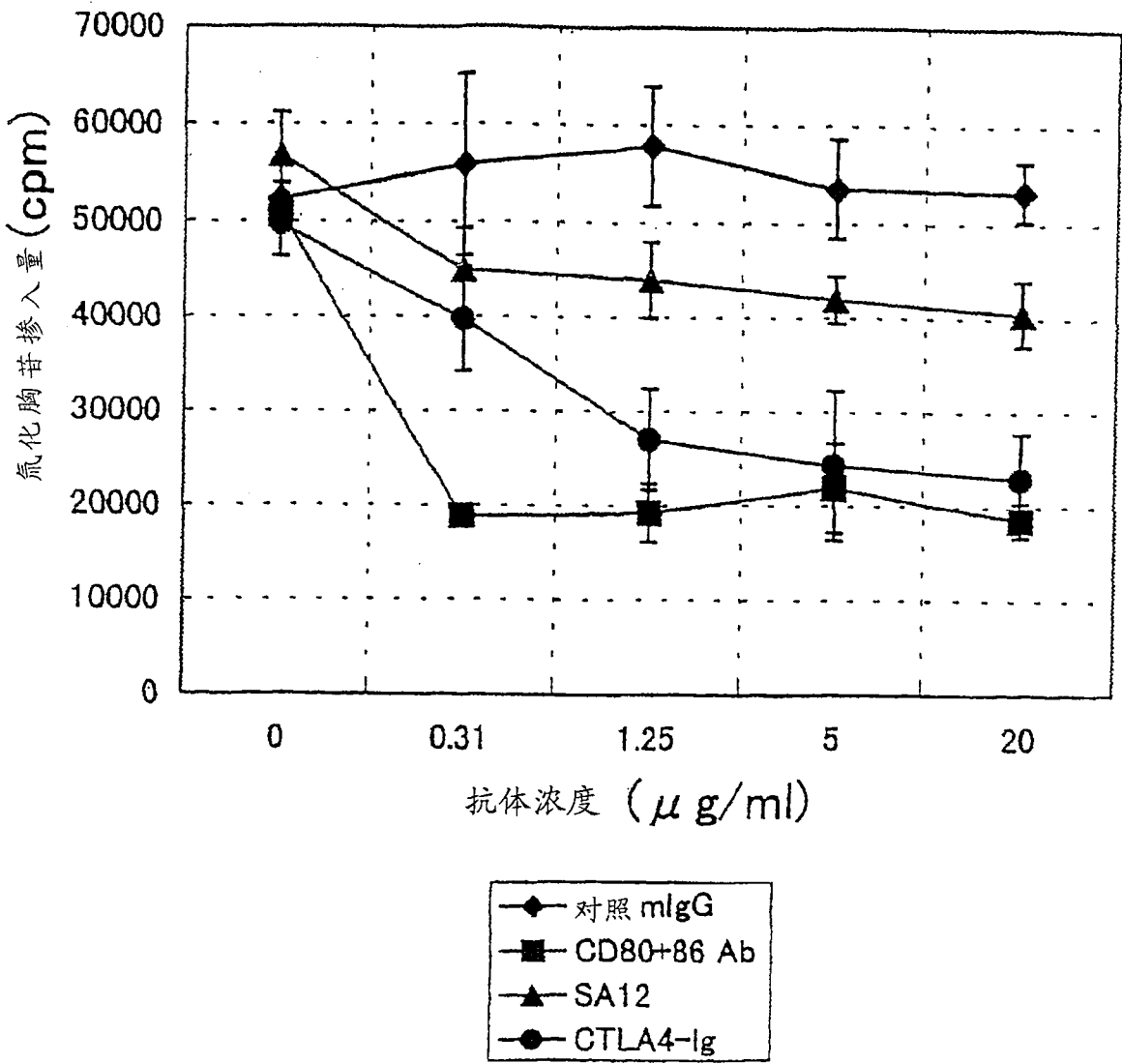


图 58

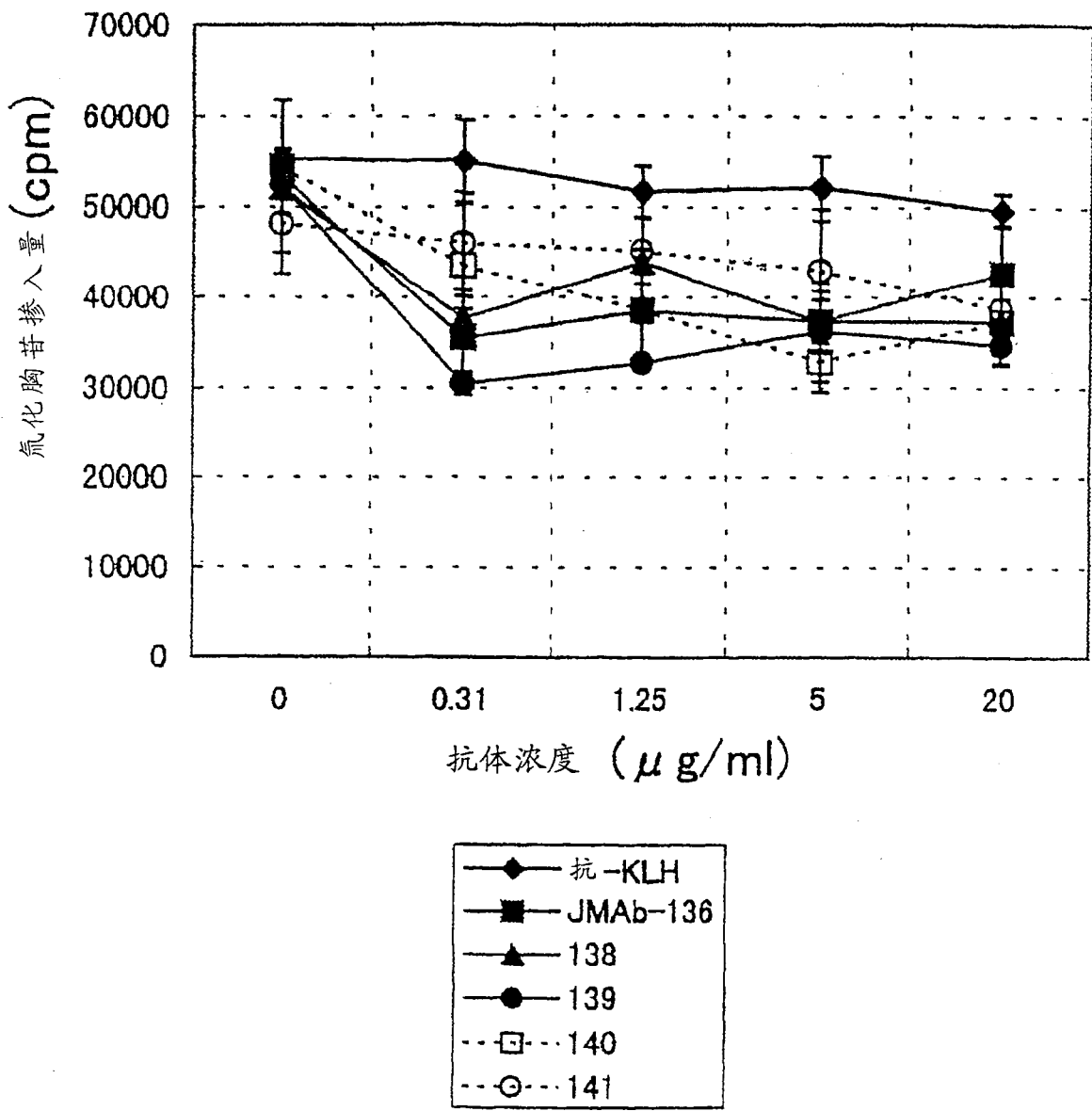


图 59

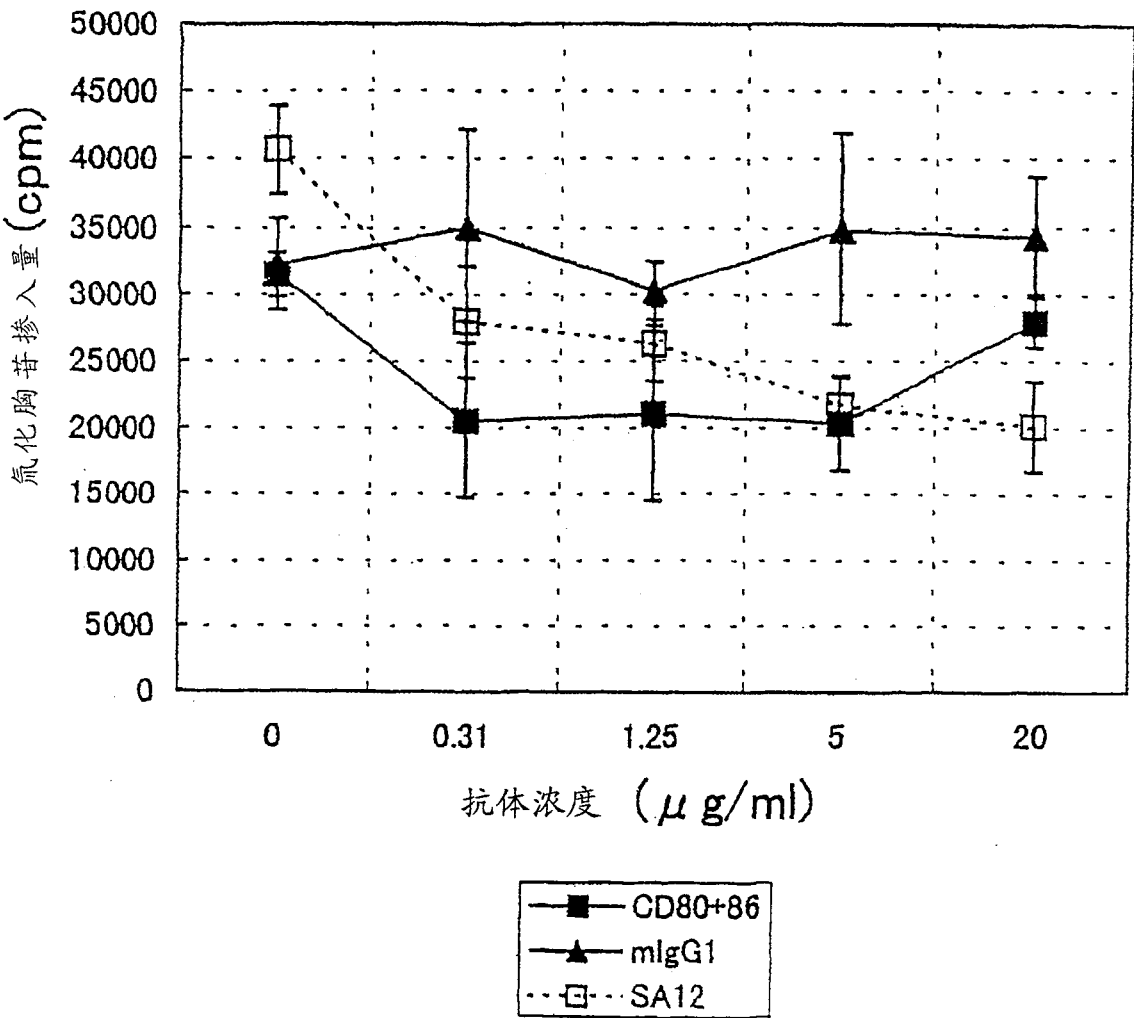


图 60

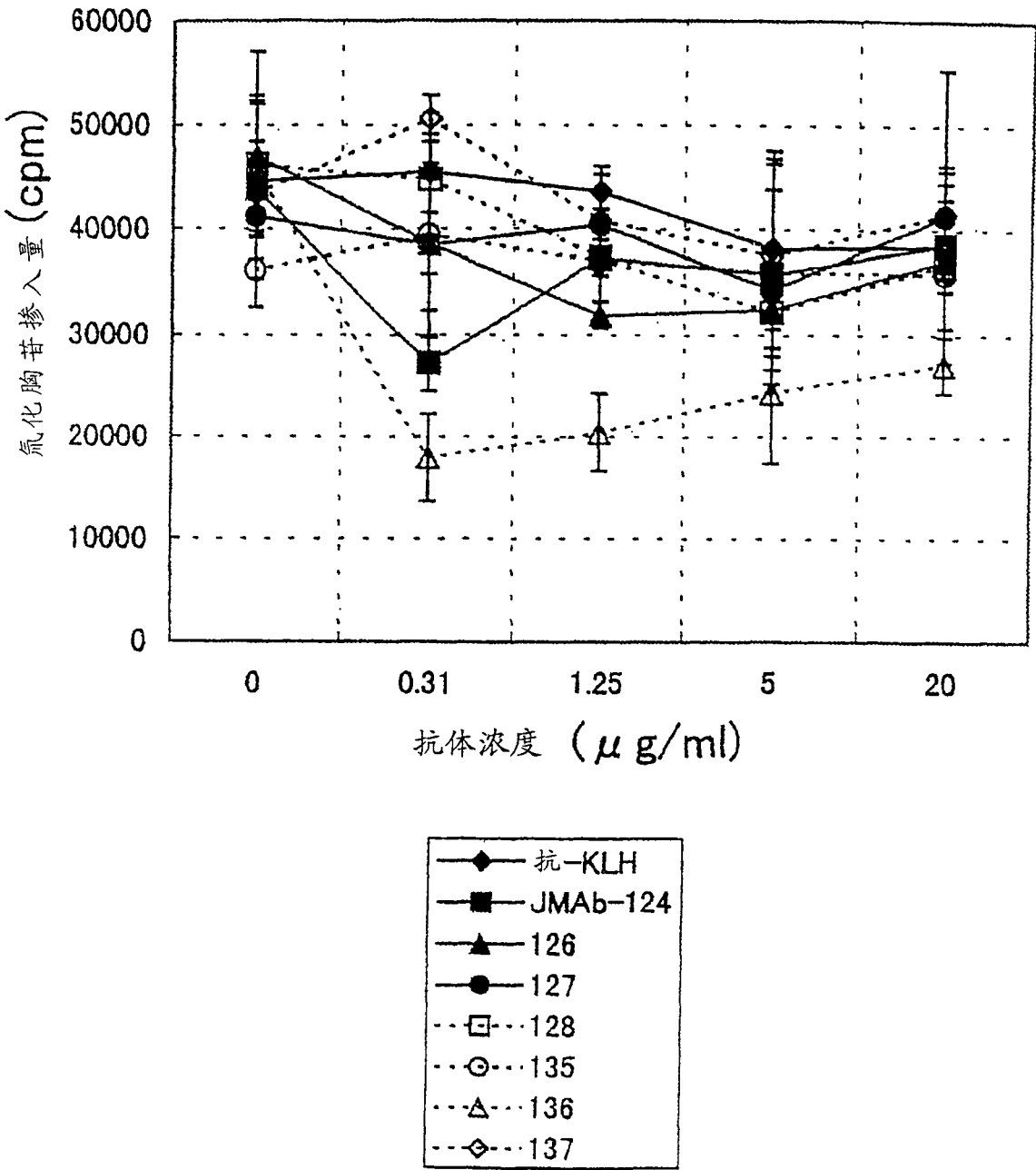


图 61

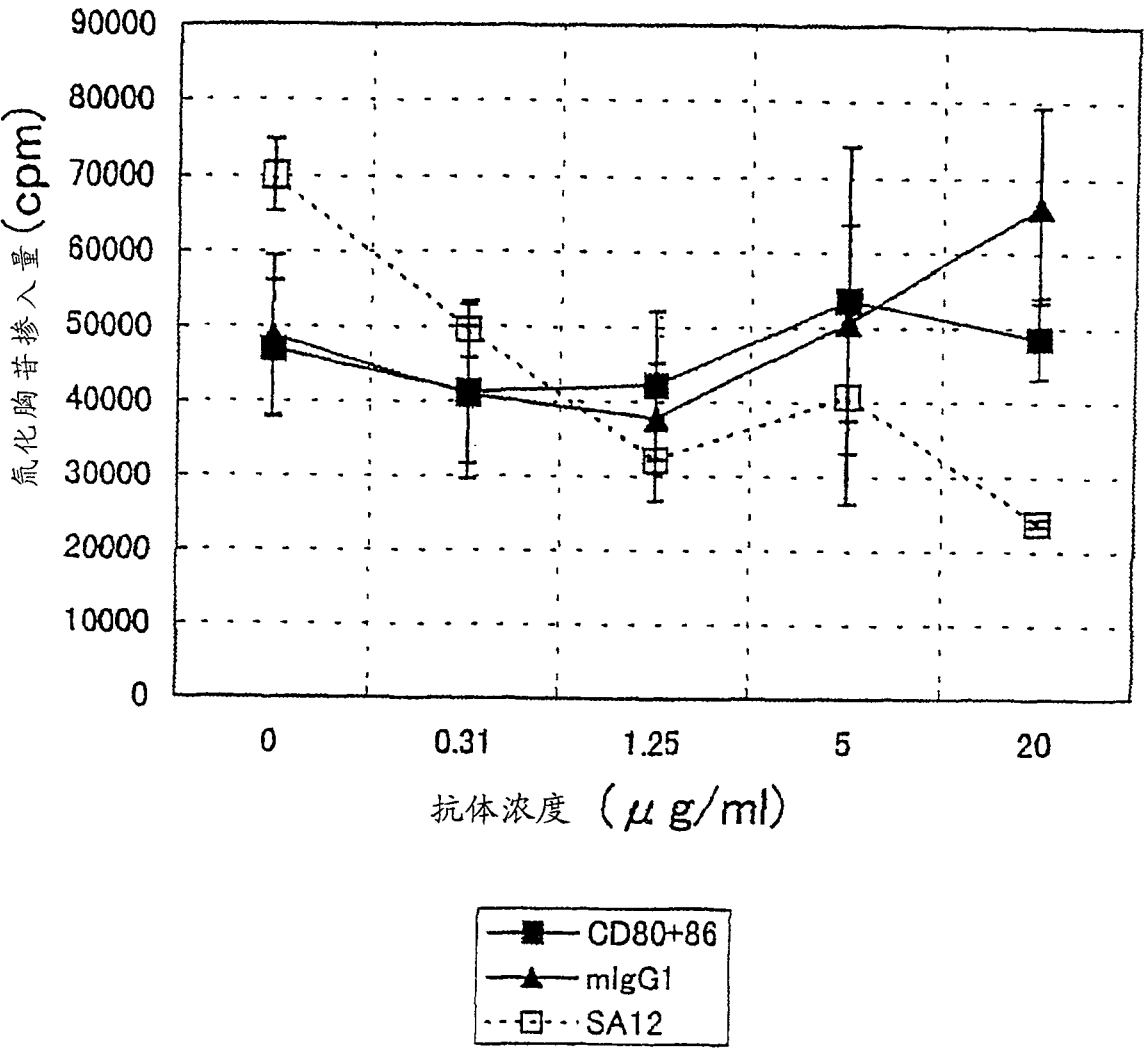


图 62

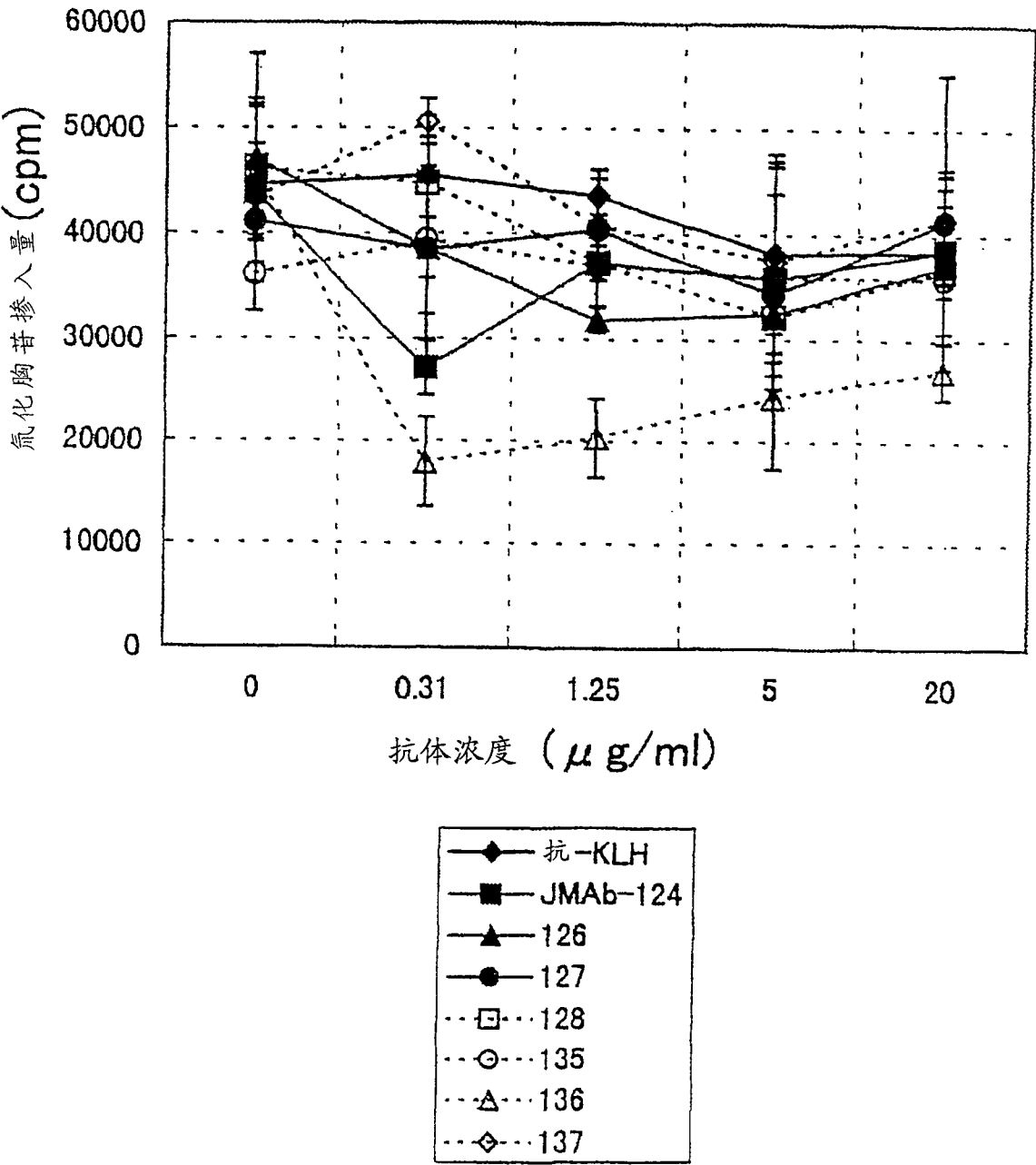


图 63

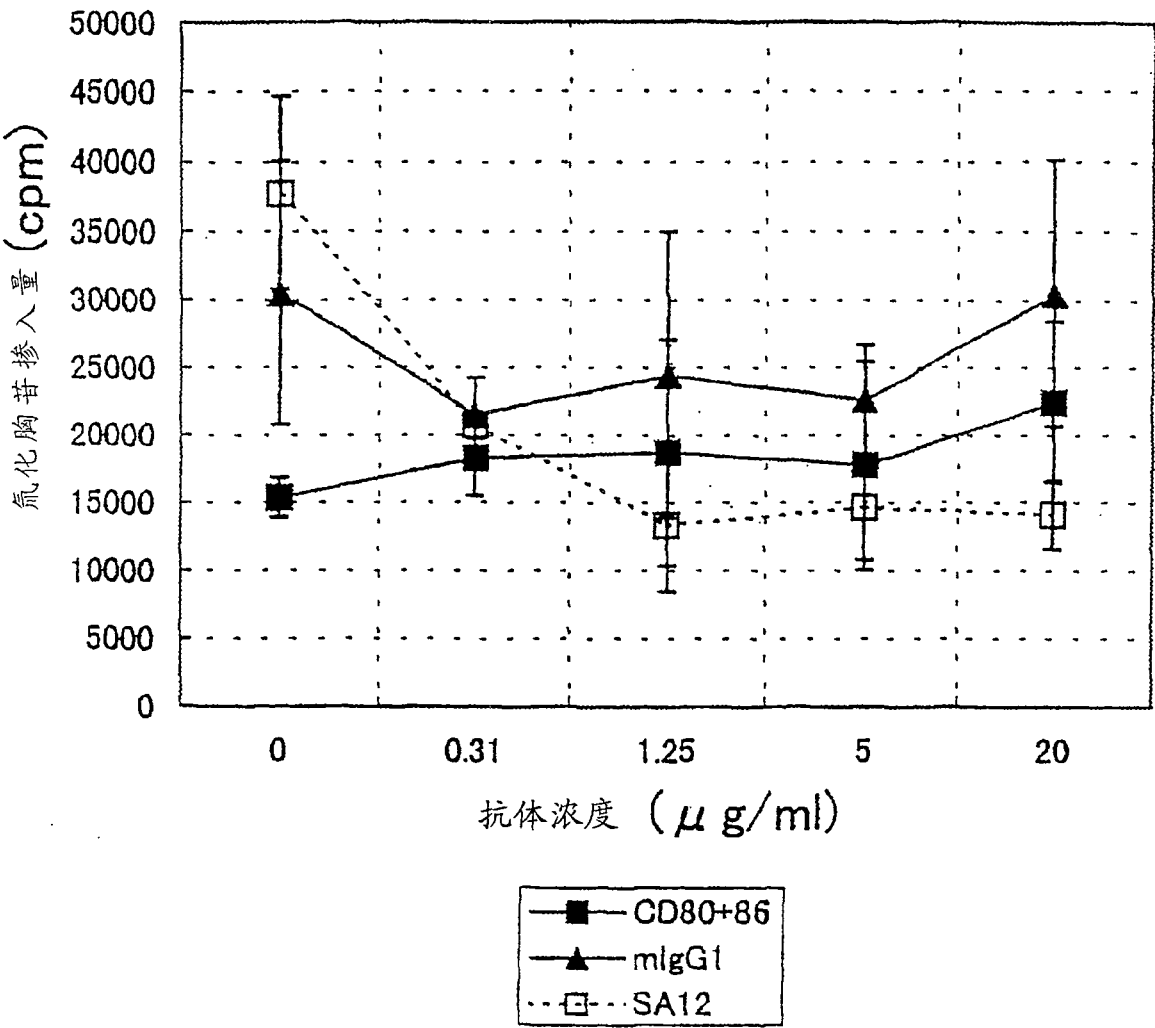


图 64

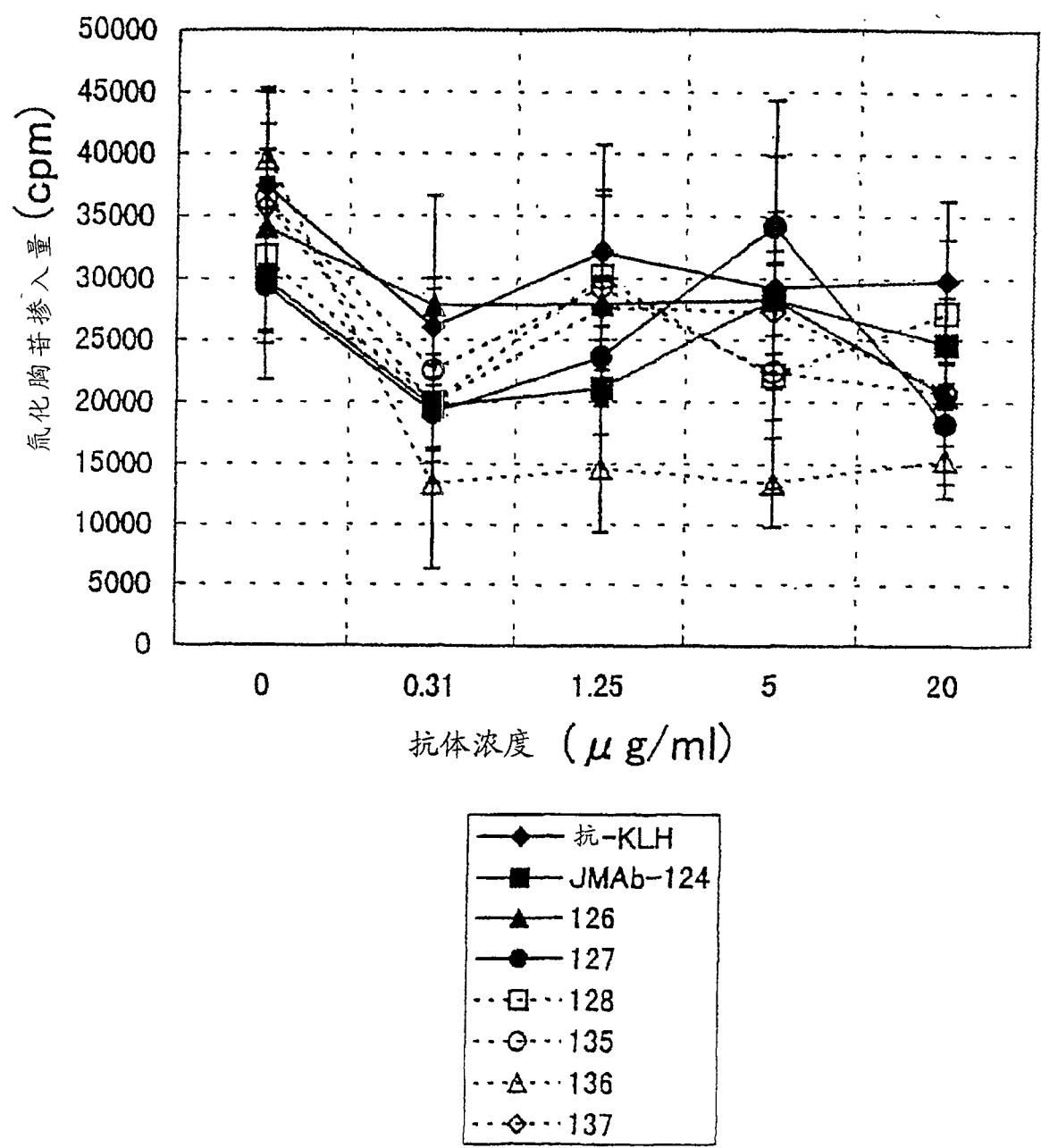


图 65

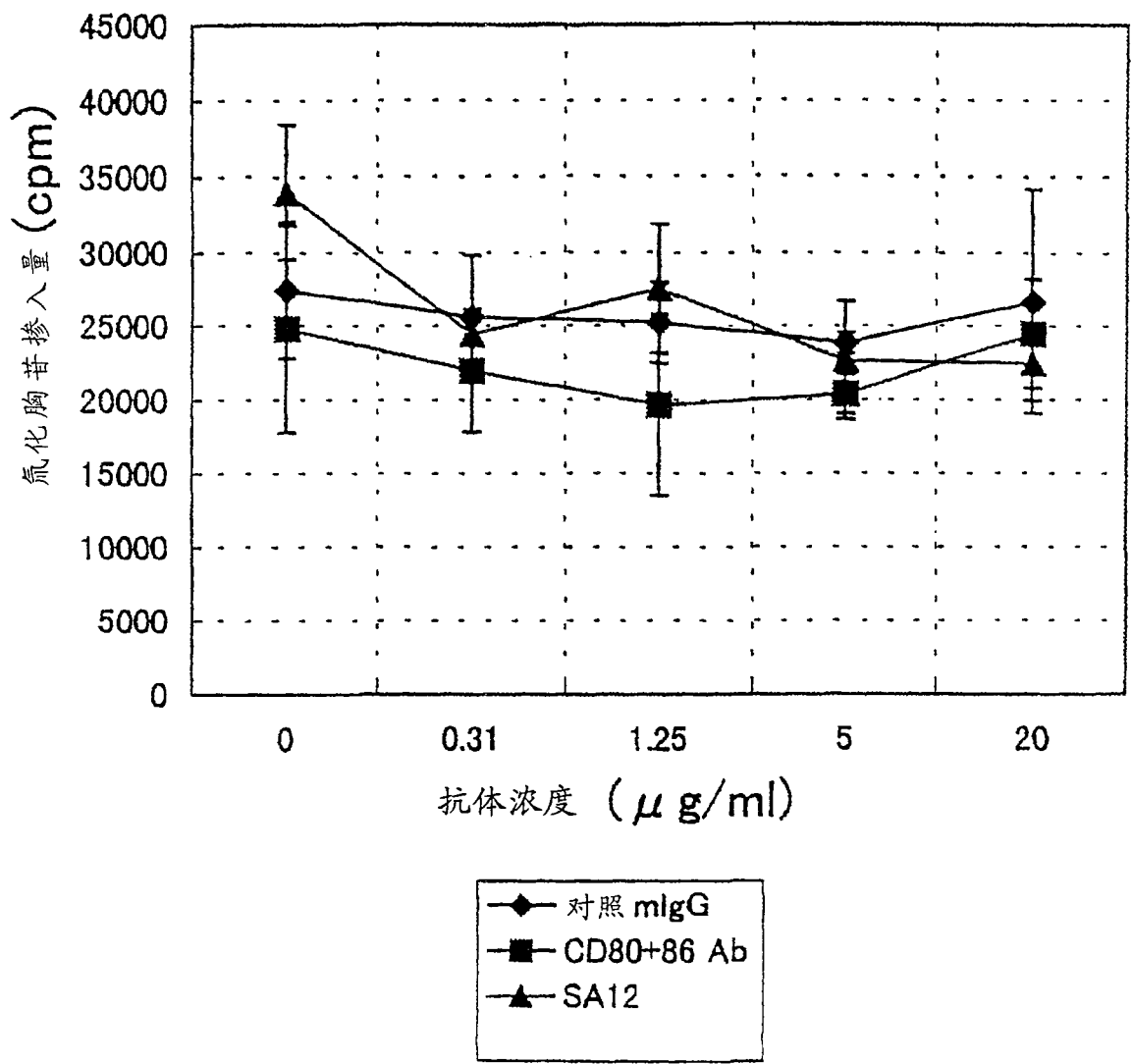


图 66

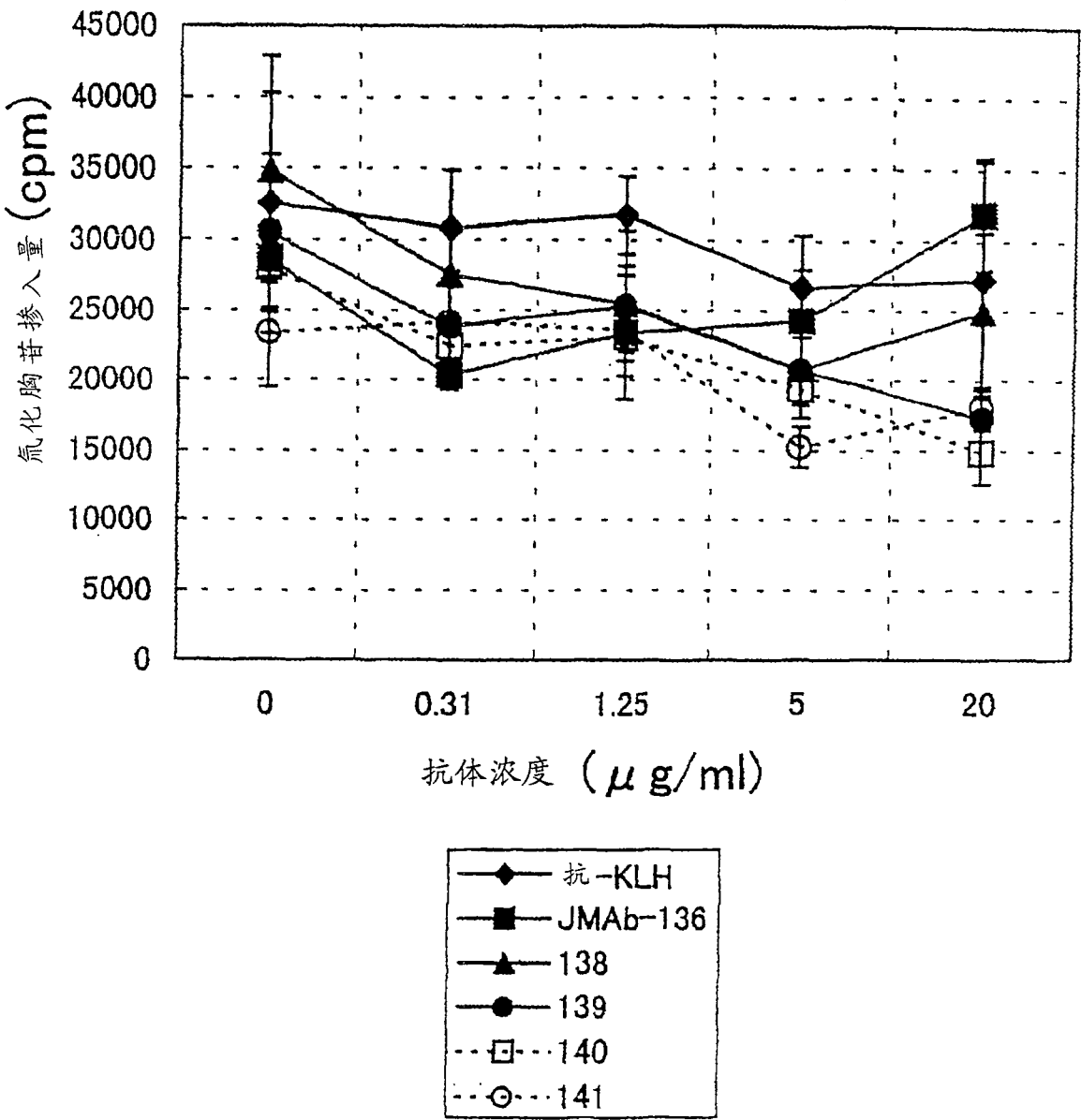


图 67

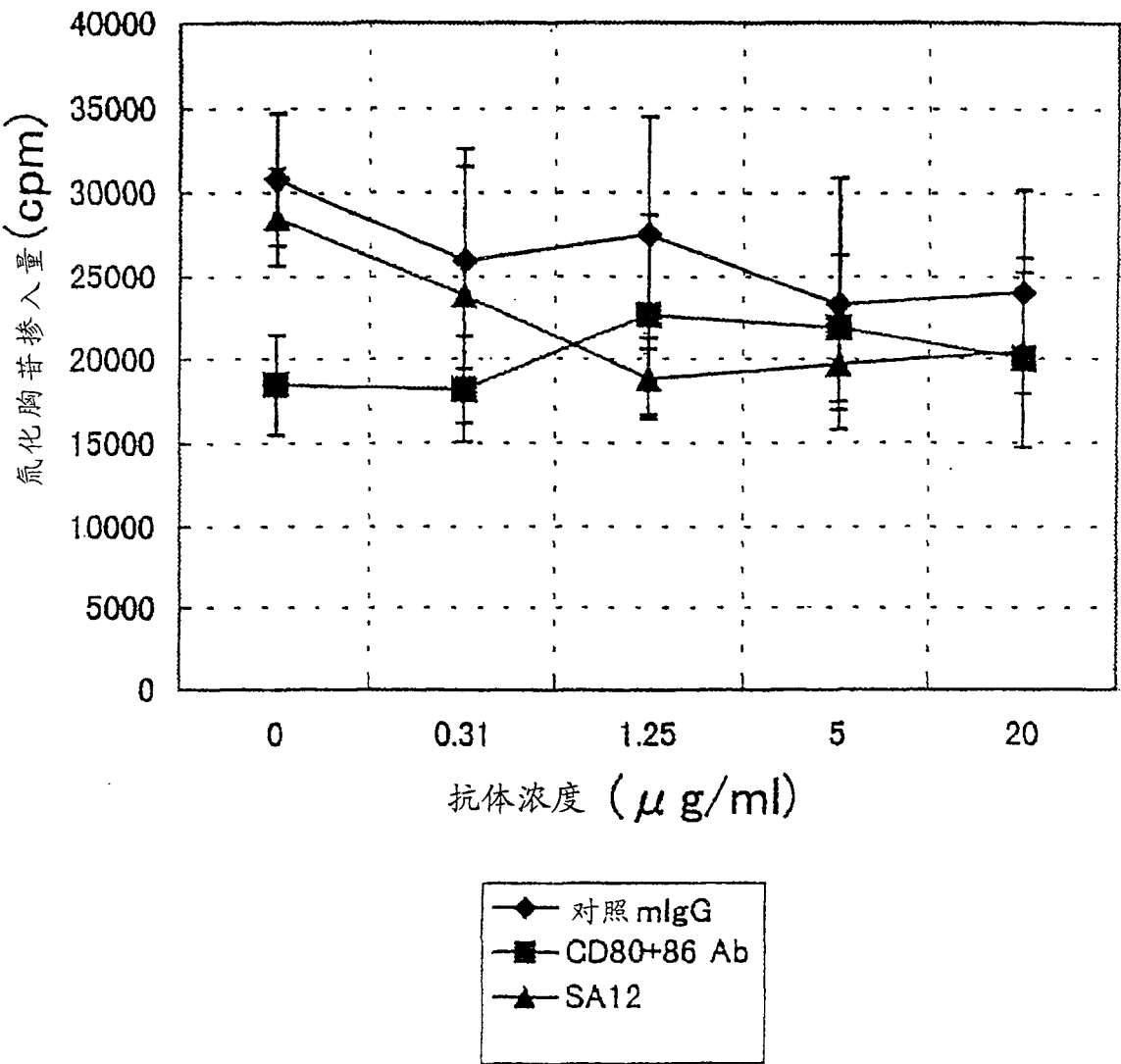


图 68

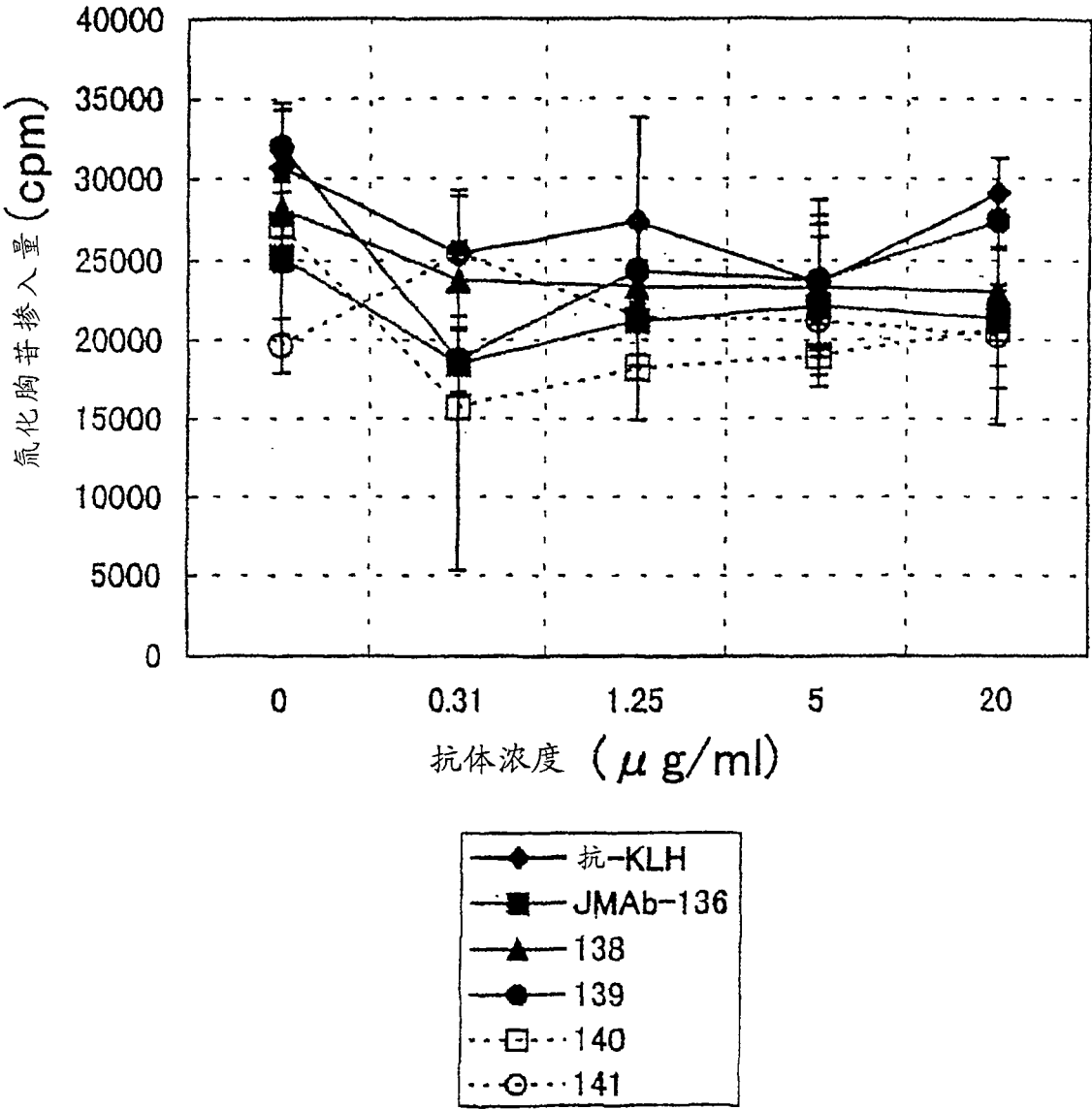


图 69

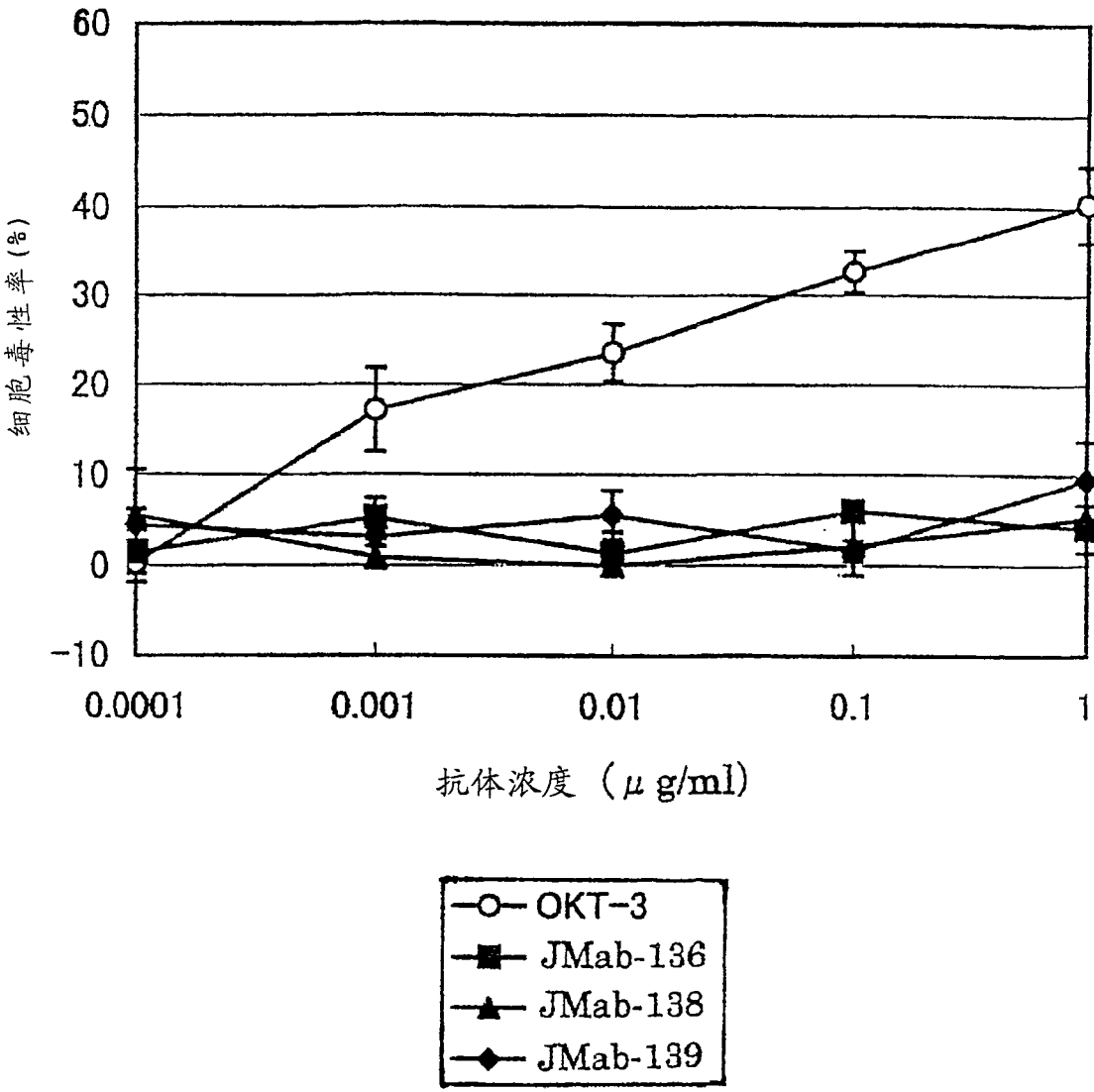


图 70

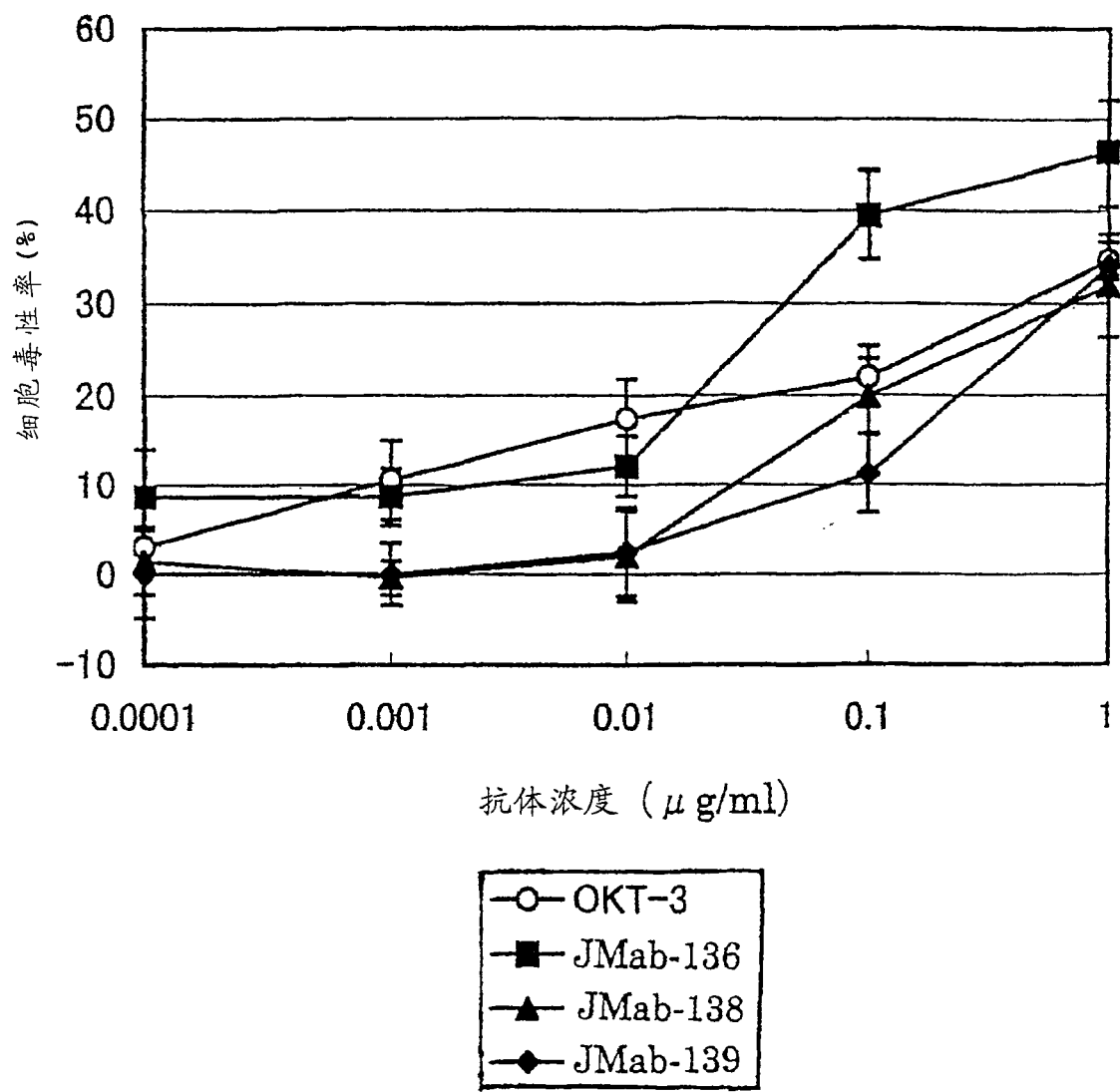


图 71

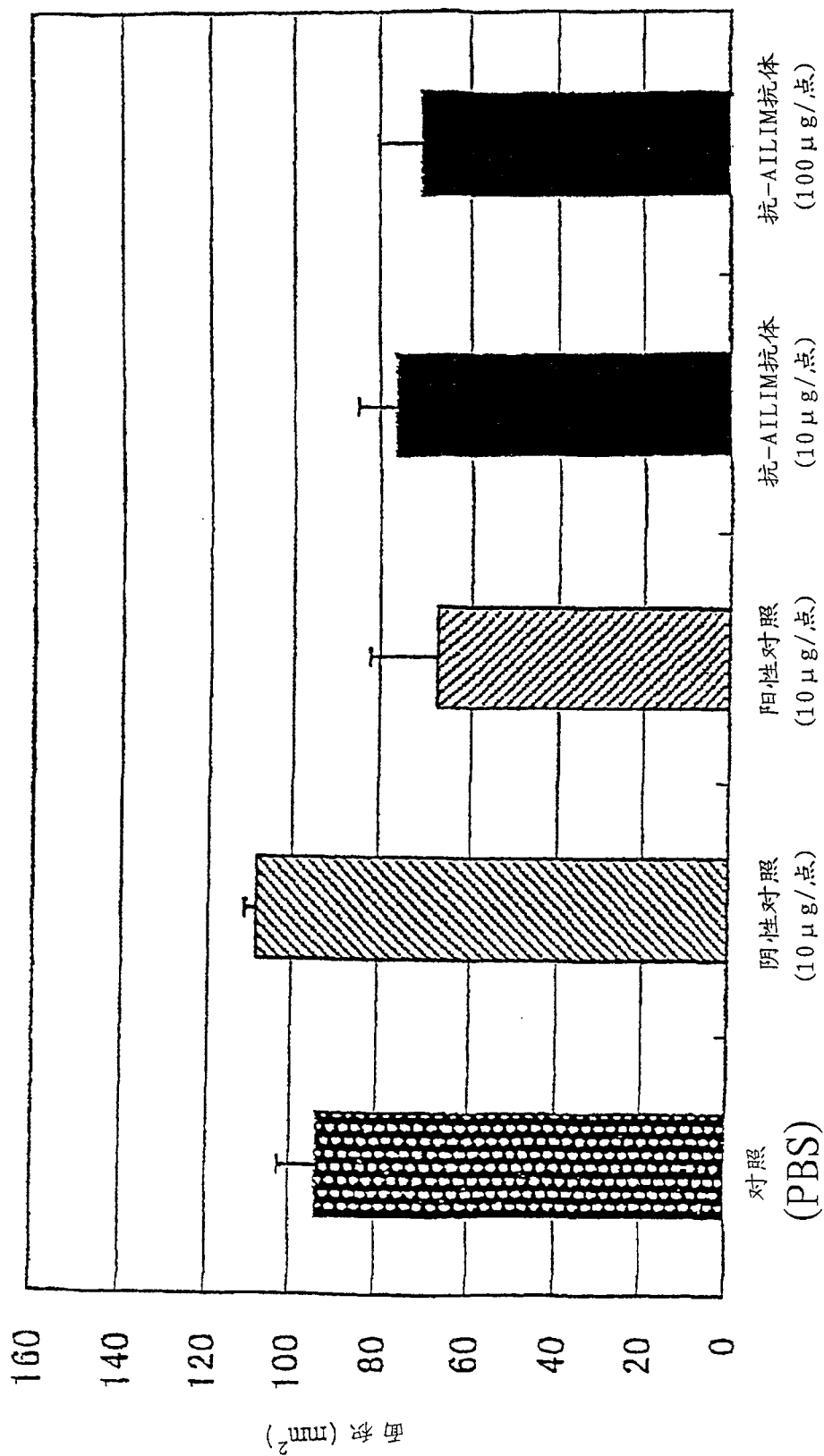


图 72

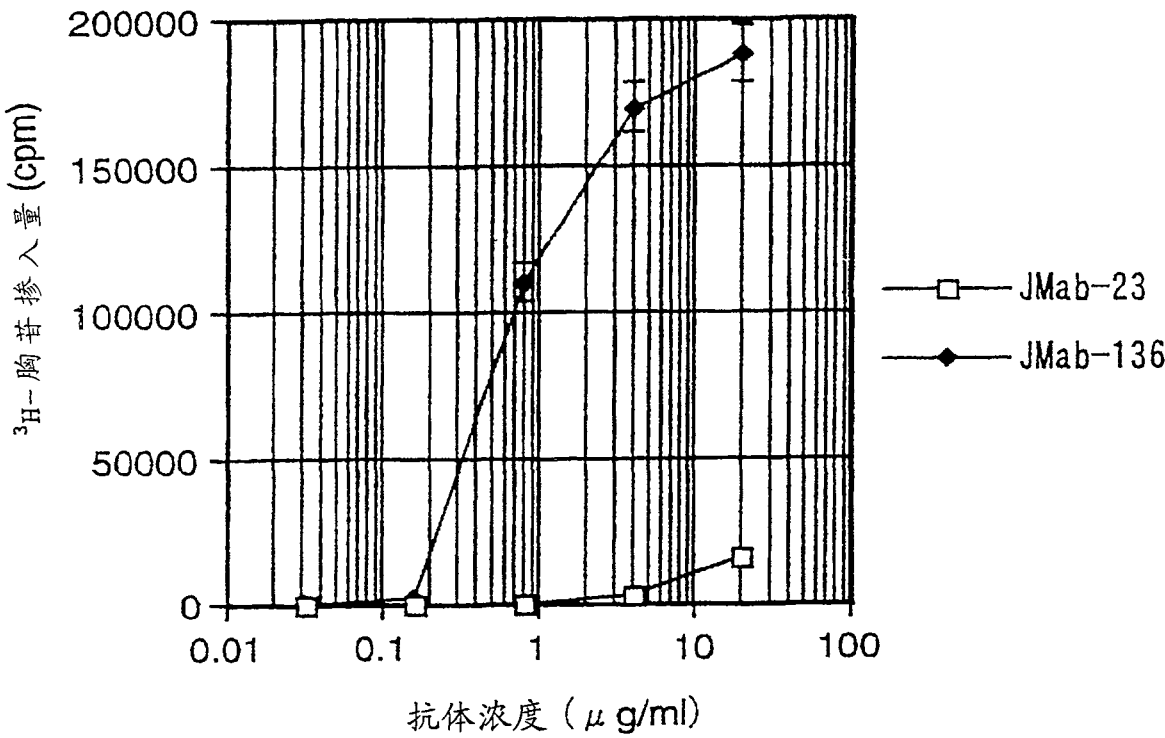


图 73

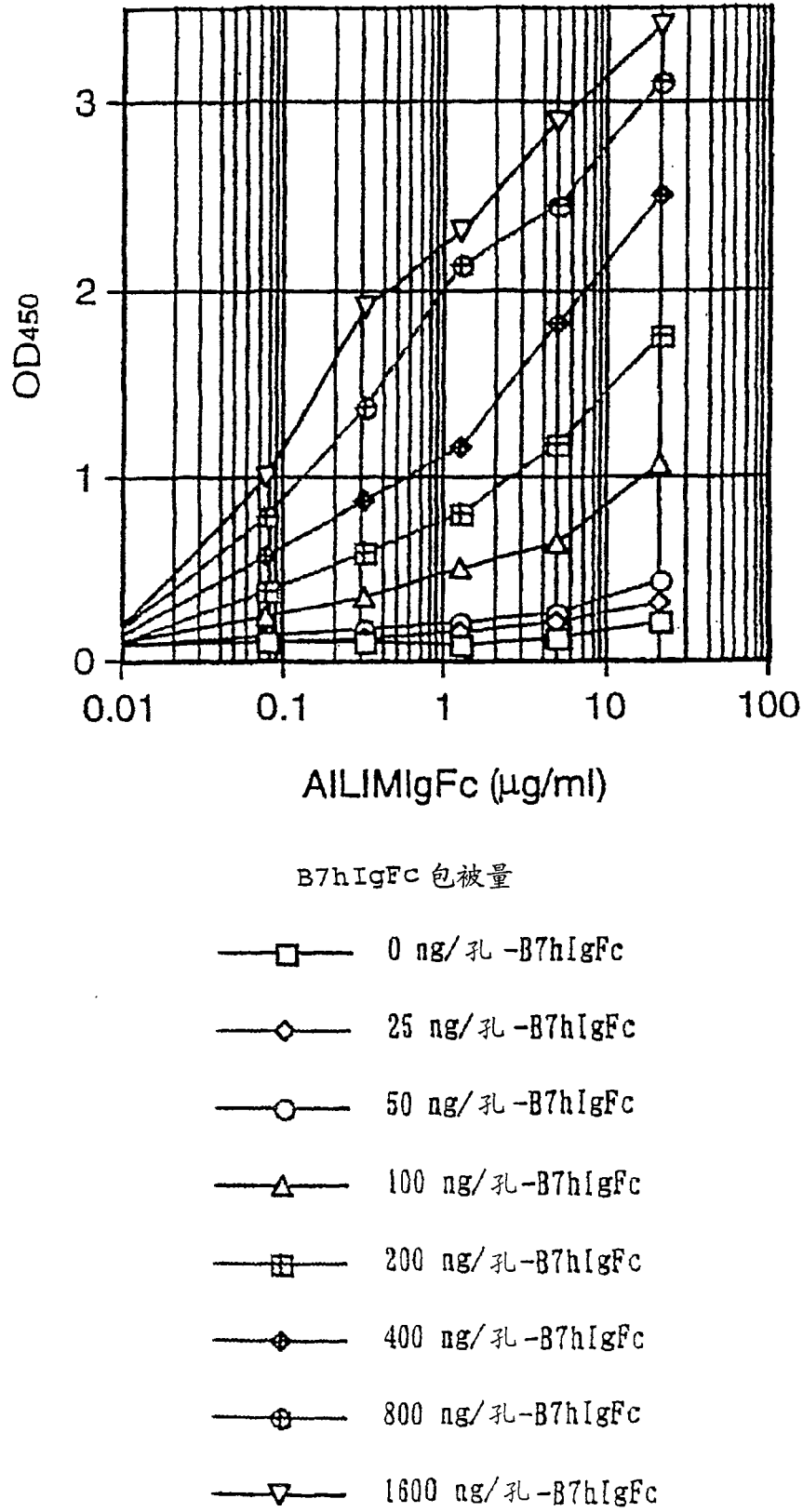


图 74

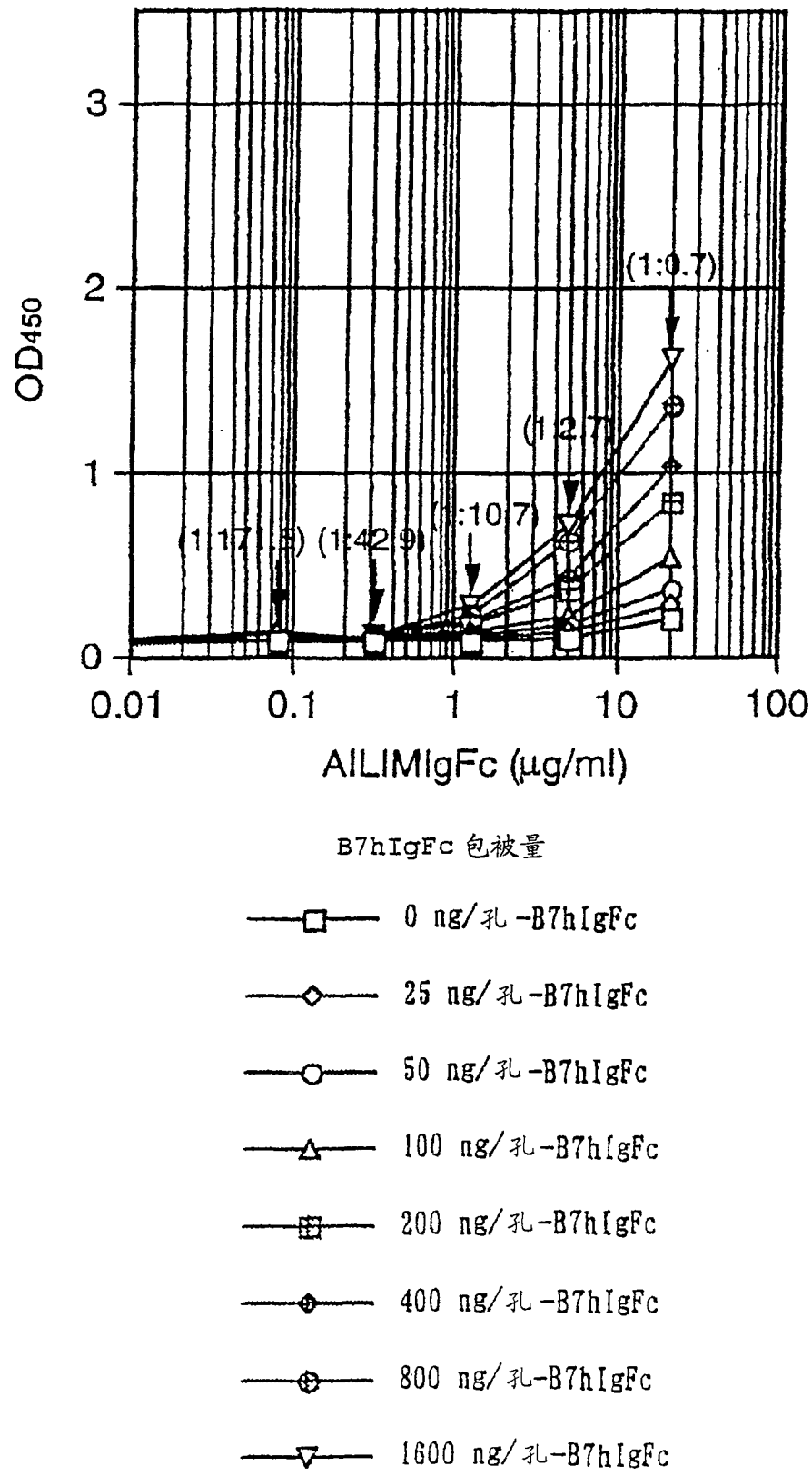


图 75

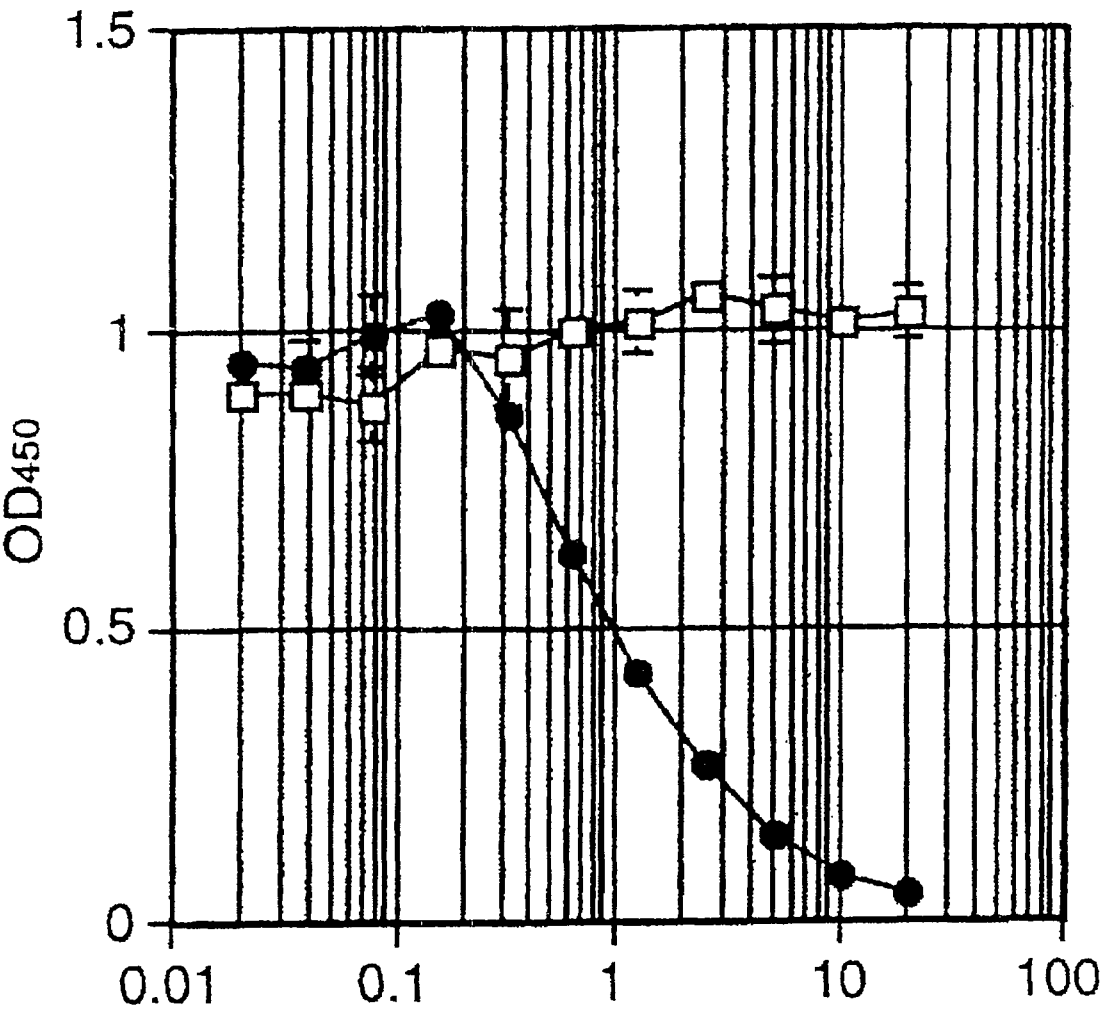


图 76

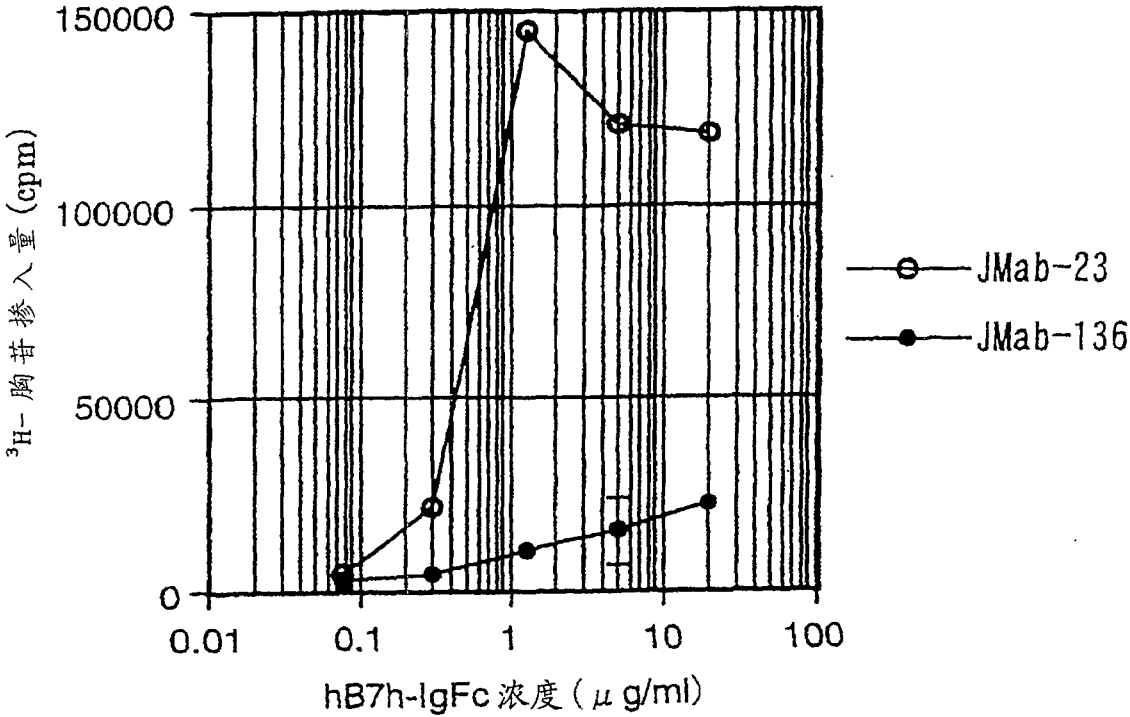


图 77

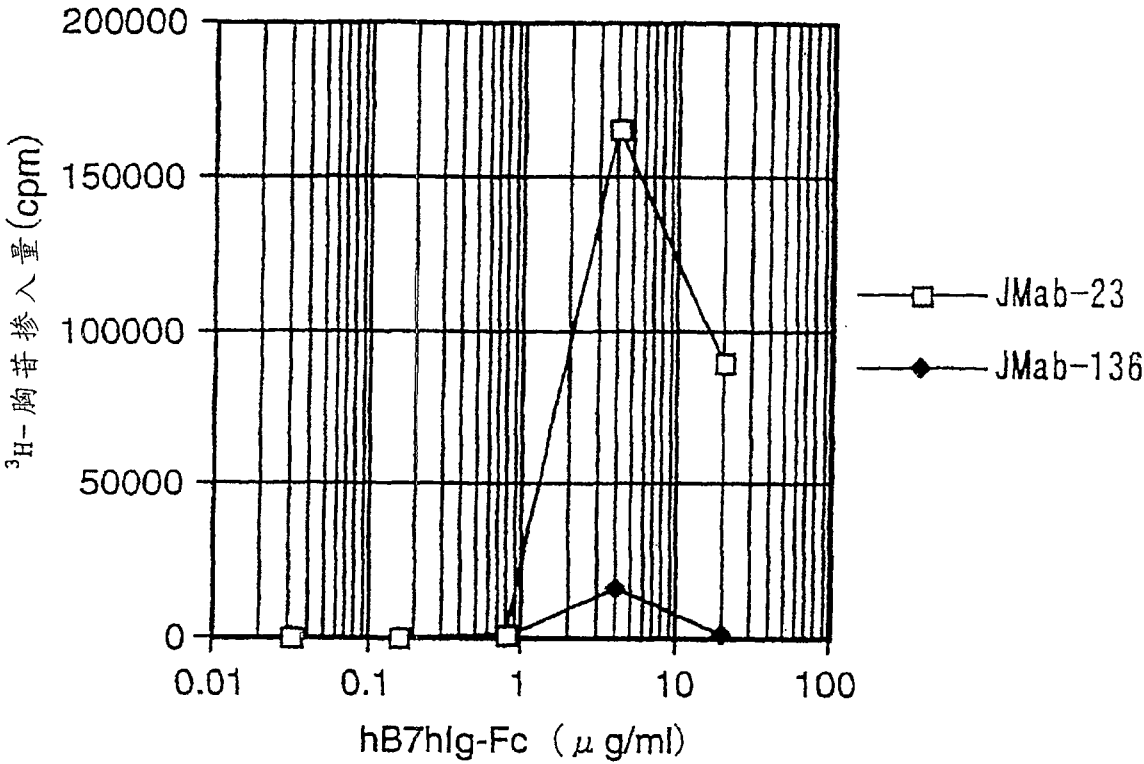


图 78