



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102112154 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 30

(21) 申请号 200980125033. 6

C12N 5/16 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 06. 01

C07K 16/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

审查员 黄利

61/057, 586 2008. 05. 30 US

61/121, 391 2008. 12. 10 US

61/178, 350 2009. 05. 14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 12. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/003355 2009. 06. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02009/148575 EN 2009. 12. 10

(73) 专利权人 埃克斯生物科技公司

地址 加拿大温哥华

(72) 发明人 J·西马德

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 申基成 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书14页

序列表20页

(54) 发明名称

白细胞介素-1 α 抗体及使用方法

(57) 摘要

完全人单克隆抗体, 其包含 (i) 抗原结合可变区, 所述抗原结合可变区表现出对 IL-1 α 的非常高的结合亲和力; 和 (ii) 恒定区, 所述恒定区对于通过 C1q 结合而活化补体系统和与几种不同的 Fc 受体结合都有效。

1. 一种与人 IL-1 α 特异性结合的纯化的人 IgG1 单克隆抗体,所述单克隆抗体包含与轻链共价连接的重链,其中所述重链包含 SEQ ID NO :9 的氨基酸序列并且所述轻链包含 SEQ ID NO :11 的氨基酸序列。

2. 一组分离的核酸,所述分离的核酸包含编码与 IL-1 α 特异性结合的人 IgG1 单克隆抗体的重链的第一核酸以及编码与人 IL-1 α 特异性结合的人 IgG1 单克隆抗体的轻链的第二核酸,其中所述第一核酸编码 SEQ ID NO :9 的氨基酸序列并且所述第二核酸编码 SEQ ID NO :11 的氨基酸序列。

3. 如权利要求 2 所述的一组分离的核酸,其中所述第一核酸包含 SEQ ID NO :10 的核苷酸序列并且所述第二核酸包含 SEQ ID NO :12 的核苷酸序列。

4. 如权利要求 2 所述的一组分离的核酸,其中所述一组分离的核酸被包含在至少一种表达载体内。

5. 如权利要求 3 所述的一组分离的核酸,其中所述一组分离的核酸被包含在至少一种表达载体内。

6. 如权利要求 4 所述的一组分离的核酸,其中所述一组分离的核酸被包含在分离的宿主细胞中。

7. 如权利要求 6 所述的一组分离的核酸,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

白细胞介素-1 α 抗体及使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求分别于 2008 年 5 月 30 日、2008 年 12 月 10 日和 2009 年 5 月 14 日提交的美国临时专利申请系列第 61/057,586 号、第 61/121,391 号和第 61/178,350 号的优先权。

[0003] 关于联邦政府赞助的研究的声明

[0004] 不适用。

[0005] 发明领域

[0006] 本发明总的来说涉及免疫学、炎症、癌症、血管病症和医学领域。更具体地,本发明涉及特异性结合白细胞介素-1 α (IL-1 α) 的抗体 (Ab) 以及使用这种抗体治疗、预防或检测与异常的 IL-1 α 表达相关的病理的方法。

[0007] 背景

[0008] IL-1 α 是促炎细胞因子,它在大量不同活性中发挥重要作用,所述大量不同活性包括炎症、免疫应答、肿瘤转移和血细胞生成。针对 IL-1 α 的 IgG 自身抗体天然地存在于普通人群中并被认为有益于诸如动脉粥样硬化等疾病。

[0009] 概述

[0010] 本发明基于完全人单克隆抗体 (mAb) 的开发,所述完全人单克隆抗体包含 (i) 抗原结合可变区,所述抗原结合可变区表现出对于人 IL-1 α 的非常高的结合亲和力,和 (ii) 恒定区,所述恒定区对于通过 C1q 结合而活化补体系统以及对于与几种不同的 Fc 受体结合都有效。本文描述的 IL-1 α 特异性的 mAb 通过用人 IgG1 mAb 的恒定区取代人 IgG4 mAb 的恒定区而制得,所述人 IgG4 mAb 具有对人 IL-1 α 特异性的可变区。

[0011] 因此,本发明的特征是与 IL-1 α 特异性结合的纯化的人 IgG1 mAb,所述 mAb 包含与轻链共价连接的重链。所述重链可包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列并且所述轻链可包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。

[0012] 一组分离的核酸也在本发明之中,这组分离的核酸包含编码与 IL-1 α 特异性结合的人 IgG1 mAb 的重链的第一核酸,以及编码与人 IL-1 α 特异性结合的人 IgG1 mAb 的轻链的第二核酸。所述第一核酸可以编码 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列且所述第二核酸可以编码 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。所述第一核酸可包含 SEQ ID NO:10 核苷酸序列且所述第二核酸可包含 SEQ ID NO:12 的核苷酸序列。

[0013] 在另一方面,本发明的特征是一种表达载体,该表达载体包含编码 SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列的核酸。

[0014] 本发明的另一个特征是包含一组分离的核酸的分离的宿主细胞 (例如,哺乳动物细胞,诸如 CHO 细胞),这组分离的核酸包含编码与 IL-1 α 特异性结合的人 IgG1 mAb 的重链的第一核酸,以及编码与人 IL-1 α 特异性结合的人 IgG1 mAb 的轻链的第二核酸。所述重链可包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列并且轻链可包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。

[0015] 本发明的特征还是杀伤表达 IL-1 α 的细胞的方法。该方法可包括使所述细胞接触与人 IL-1 α 特异性结合的纯化的人 IgG1 mAb 的步骤。

[0016] 抑制人细胞穿过基膜基质迁移的方法也在本发明之中。该方法可包括将与人 IL-1 α 特异性结合的纯化的 mAb 添加到包括基膜基质和人细胞的混合物中的步骤。

[0017] 还在本发明中的是抑制 IL-1 α 诱导的在人内皮细胞表面上的 ICAM-1 和 / 或 E- 选择素的表达增加的方法。该方法可以包括将与人 IL-1 α 特异性结合的纯化的 mAb 添加到包含内皮细胞和 IL-1 α 的混合物中的步骤。

[0018] 另外, 本发明包括在人受治疗者中示踪炎症的方法, 所述人受治疗者之前经受了下列步骤: 首次从受治疗者获得外周血单核细胞的第一样品; 用与人 IL-1 α 特异性结合的纯化的 mAb 接触所述第一样品; 以及确定所述第一样品中与所述单克隆 Ab 结合的细胞的百分比。该方法可包括下列步骤: (a) 再次从该受治疗者获得外周血单核细胞的第二样品; (b) 使所述第二样品接触与人 IL-1 α 特异性结合的纯化的 mAb; (c) 确定所述第二样品中与所述单克隆 Ab 结合的细胞的百分比; 以及 (d) 将所述第一样品中结合所述 mAb 的细胞的百分比与所述第二样品中结合所述单克隆 Ab 的细胞的百分比相比较。

[0019] 在上述的方法中, 纯化的 mAb 可以是包含与轻链共价连接的重链的人 IgG1 mAb, 例如, 其中所述重链包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列且所述轻链包含 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列。

[0020] 本发明中的另一种方法的特征是下列步骤: (a) 使用滤器富集从人受治疗者获得的生物样品, 所述滤器根据分子量将分子分为包含与 IL-1 α 复合的完整 IgG 的第一级分和包含小于 100Kda 的分子的第二级分; 以及 (b) 对所述第一级分中的 IL-1 α 的量进行定量。

[0021] 本发明中的又一种方法的特征是下列步骤: (a) 使用滤器富集从人受治疗者获得的血浆样品, 所述滤器根据分子量将分子分为包含与 IL-1 α 复合的完整 IgG 的第一级分和包含小于 100Kda 的分子的第二级分; (b) 在允许所述第一级分中的 IgG 与固定在基质上的抗人 IgG Ab 特异性结合的条件下, 将所述第一级分添加到含有固定的抗人 IgG Ab 的所述基质中; (c) 洗涤所述基质以去除所述第一级分中未与所述固定的抗人 IgG Ab 特异性结合的材料; (d) 在允许特异性结合人 IL-1 α 的 Ab 与结合于所述基质的任何人 IL-1 α 特异性结合的条件下, 使在步骤 (c) 中洗涤的基质接触与人 IL-1 α 特异性结合的 Ab; (e) 洗涤所述基质以去除与未结合于基质的人 IL-1 α 特异性结合的任何抗体; 以及 (f) 对与步骤 (e) 之后仍结合于所述基质的人 IL-1 α 特异性结合的抗体的量进行定量。

[0022] 除非另外定义, 否则本文使用的所有技术术语具有如本发明所属领域的普通技术人员所通常理解的相同含义。通常理解的生物术语的定义可见于: Rieger 等人, Glossary of Genetics: Classical and Molecular (遗传学词汇: 经典遗传学和分子遗传学), 第 5 版, Springer-Verlag: New York, 1991; 和 Lewin, Genes V (基因 V), Oxford University Press: New York, 1994。

[0023] 如本文所使用的术语“特异性结合”, 当涉及多肽 (包括 Ab) 或受体时, 指的是决定在异质蛋白群体和其它生物群体中的蛋白或多肽或受体的存在的结合反应。因此, 在指定的条件下 (例如, 就 Ab 而言在免疫测定条件下), 指明的配体或 Ab 与其特定的“靶”结合且不以显著的量与样品中存在的其它蛋白结合或与机体中该配体或 Ab 可能发生接触的其它蛋白结合。通常, 与第二分子“特异性结合”的第一分子对所述第二分子具有大于约 10^5 (例如, 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 和 10^{12} 或更多) 升 / 摩尔的平衡亲和力常数。

[0024] 当涉及蛋白分子例如 Ab 时, “纯化的”意思是与天然地伴随这种分子的组分分离

的。通常,当 Ab 或蛋白是按重量计至少约 10% (例如,9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.9% 和 100%)、不含非抗体蛋白或与其天然缔合的其它天然存在的有机分子时,Ab 或蛋白是纯化的。纯度可通过任何适当的方法测定,例如柱层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳或 HPLC 分析。化学合成的蛋白或在其天然存在的细胞类型之外的细胞类型中产生的其它重组蛋白是“纯化的”。

[0025] 虽然类似于或等同于本文描述的那些方法和材料的方法和材料可用于本发明的实践或测试中,但是在下文描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物通过引用整体并入。在矛盾的情况下,以包括定义的本说明书为标准。另外,下文讨论的具体实施方案仅是示例性的并且不旨在是限制性的。

[0026] 详述

[0027] 本发明涵盖与完全人 mAb 相关的组合物和方法,所述完全人 mAb 包含:(i) 抗原结合可变区,所述抗原结合可变区表现出对 IL-1 α 的非常高的结合亲和力;和(ii) 恒定区,所述恒定区对于通过 C1q 结合而活化补体系统以及对于与几种不同的 Fc 受体结合都有效。下文描述的优选的实施方案显示这些组合物和方法的改编。尽管如此,由这些实施方案的描述,基于下文提供的描述可做出和/或实践本发明的其它方面。

[0028] 本文描述了包含常规免疫学技术和分子生物技术的方法。免疫学方法(例如,用于检测和定位抗原-抗体复合物的测定、免疫沉淀、免疫印迹及类似方法)通常是本领域已知的并在下述方法学专著中描述,诸如:Current Protocols in Immunology(现代免疫学实验技术),Coligan 等人,编辑,John Wiley & Sons, New York。在下述专著中详细描述了分子生物技术,诸如:Molecular Cloning:A Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册),第二版,第 1-3 卷,Sambrook 等人编辑,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, N.Y.,2001;和 Current Protocols in Molecular Biology(现代分子生物学实验技术),Ausubel 等人编辑,Green Publishing and Wiley-Interscience, New York。在 Handbook of Therapeutic Abs(治疗性抗体手册),Dubel, S. 编辑,Wiley-VCH, 2007 中描述了抗体方法。细胞培养技术通常是本领域已知的并在下述方法学专著中详述:诸如 R Ian Freshney、Wiley-Liss、Hoboken, N.J. 的 Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique(动物细胞的培养:基础技术手册),第四版,2000;和 Maureen A Harrison 和 Ian F Rae 的 General Techniques of Cell Culture(细胞培养的一般技术),Cambridge University Press, Cambridge, UK,1994。蛋白纯化的方法在 Guide to Protein Purification:Methods in Enzymology(蛋白纯化指南:酶学中的方法),第 182 卷,Deutscher M P 编辑,Academic Press, San Diego, Calif.,1990 中讨论。

[0029] 在一个方面,本发明的特征为完全人 mAb,其包含(i) 抗原结合可变区,所述抗原结合可变区表现出对人 IL-1 α 的非常高的结合亲和力,和(ii) 恒定区,所述恒定区对于通过 C1q 的结合而活化补体系统以及对于与几种不同的 Fc 受体的结合都有效。人 Ab 优选地是 IgG1。Ab 的 K_a 优选地是至少 $1 \times 10^9 M^{-1}$ 或更高(例如,高于 $9 \times 10^{10} M^{-1}$ 、 $8 \times 10^{10} M^{-1}$ 、 $7 \times 10^{10} M^{-1}$ 、 $6 \times 10^{10} M^{-1}$ 、 $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、 $4 \times 10^{10} M^{-1}$ 、 $3 \times 10^{10} M^{-1}$ 、 $2 \times 10^{10} M^{-1}$ 或 $1 \times 10^{10} M^{-1}$)。

[0030] 因为人类中天然地存在表达对人 IL-1 α 特异的 Ig 的 B 淋巴细胞,所以用于培育 mAb 的一种目前优选的方法是首先从受治疗者中分离这种 B 淋巴细胞,并之后将该 B 淋巴细胞永生化以便它能在培养中连续复制。可用一种或多种人 IL-1 α 抗原免疫缺乏大量天

然存在的表达对人 IL-1 α 特异的 Ig 的 B 淋巴细胞的受治疗者以增加这种 B 淋巴细胞的数量。通过使人 Ab 分泌细胞（例如，人浆细胞）永生化来制备人 mAb。参见，例如，美国专利第 4,634,664 号。

[0031] 在示例性的方法中，对一个或多个（例如：5、10、25、50、100、1000 或更多个）人受治疗者（即，之前未施用人 IL-1 α 疫苗的受治疗者）筛选他们的血液中这种人 IL-1 α 特异性的 Ab 的存在。表达期望的 Ab 的那些受治疗者之后可被用作 B 淋巴细胞供体。在一个可能的方法中，从拥有表达人 IL-1 α 特异性的 Ab 的 B 淋巴细胞的人供体中获得外周血。之后从血液样品中分离这种 B 淋巴细胞，例如，通过细胞分选（例如，荧光激活的细胞分选“FACS”或磁珠细胞分选）以选择表达人 IL-1 α 特异性的 Ig 的 B 淋巴细胞。之后可以根据已知的技术通过病毒转化（例如，使用 EBV）或通过诸如人骨髓瘤的另一种永生化细胞融合而将这些细胞永生化。之后可以通过有限稀释法分离该群体内表达对人 IL-1 α 特异的 Ig 的 B 淋巴细胞（例如，选择微量滴定板孔中对人 IL-1 α 特异的 Ig 呈阳性的细胞并传代培养，并重复上述步骤直至能够分离期望的克隆株系）。参见，例如 Goding, *Monoclonal Abs: Principles and Practice* (单克隆抗体：原理和实践)，第 59-103 页，Academic Press, 1986。这些表达对人 IL-1 α 具有至少纳摩尔或皮摩尔结合亲和力的 Ig 的克隆细胞系是优选的。可以通过常规的 Ig 纯化程序诸如盐析 (salt cut)、尺寸排阻、离子交换分离和亲和层析从培养基或体液中（诸如腹水）纯化这些克隆细胞系分泌的 mAb。

[0032] 虽然永生化的 B 淋巴细胞可用于体外培养以直接产生 mAb，在某些情形下使用异源表达系统来产生 mAb 可能是期望的。参见，例如，在美国专利申请第 11/754,899 号中描述的方法。例如，可以将编码对人 IL-1 α 特异的 mAb 的基因克隆并引入表达载体中（例如，基于质粒的表达载体）以在异源的宿主细胞（例如：CHO 细胞、COS 细胞、骨髓瘤细胞和大肠杆菌细胞）中表达。因为 Ig 包括 H₂L₂ 构型的重链 (H) 和轻链 (L)，所以可在不同的载体中分别分离和表达编码重链和轻链各自的基因。

[0033] 虽然通常不优选，但是嵌合的 mAb（例如，“人源化的”mAb）可用于本发明，嵌合的 mAb 是具有来源于不同动物物种的不同部分的抗原结合分子（例如，小鼠 Ig 的可变区与人 Ig 的恒定区融合）。这样的嵌合的 Ab 可以通过本领域已知的方法制备。E. G., Morrison 等人, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 81:6851, 1984; Neuberger 等人, *Nature*, 312:604, 1984; Takeda 等人, *Nature*, 314:452, 1984。类似地，可以用本领域已知的方法将 Ab 人源化。例如，具有期望的结合特异性的单克隆 Ab 可以是商业上人源化的或如在美国专利第 5,693,762 号、第 5,530,101 号或第 5,585,089 号中描述的。

[0034] 可通过下列已知方法使本文描述的 mAb 亲和力成熟以增强或者另外改变它们的结合特异性：诸如 VH 和 VL 结构域改组 (Marks 等人 *Bio/Technology* 10:779-783, 1992)、高变区 (HVR) 和 / 或框架残基的随机诱变 (Barbas 等人, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813, 1994; Schier 等人, *Gene* 169:147-155, 1995; Yelton 等人, *J. Immunol.* 155:1994-2004, 1995; Jackson 等人, *J. Immunol.* 154(7):3310-9, 1995; 和 Hawkins 等人, *J. Mol. Biol.* 226:889-896, 1992)。Ab 的氨基酸序列变体可通过将合适的改变引入至编码该 Ab 的核苷酸序列中来制备。另外，可改变对编码 mAb 的核酸序列的修饰（例如，不改变 mAb 的氨基酸序列）以增强在某种表达系统中 mAb 的产生（例如，给定的表达系统的内含子消除和 / 或密码子优化）。本文描述的 mAb 也可通过与另一种蛋白（例如，另一种 mAb）或

非蛋白分子结合而被修饰。例如, mAb 可与水溶性聚合物结合, 诸如: 聚乙二醇或碳纳米管(参见, 例如 Kam 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605, 2005)。参见, 美国专利申请第 11/754, 899 号。

[0035] 优选地, 为保证可以将高效价的人 IL-1 α - 特异性 mAb 以最小的副作用施用给受治疗者, 本发明的 mAb 组合物按重量计至少为 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9% 或更高百分比的纯度(不包含任何赋形剂)。本发明的 mAb 组合物可仅包含单一类型的 mAb(例如, 从单一克隆的 B 淋巴细胞系中产生的 mAb) 或可包含两种或更多种(例如, 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多) 不同类型的 mAb 的混合物。除人 IL-1 α mAb 之外, 本发明的 Ab 组合物也可包含与除人 IL-1 α 之外的抗原特异性结合的其它 mAb。

[0036] 为修饰或增强它们的功能, 人 IL-1 α mAb 可与另一种分子诸如细胞毒素或可检测的标记结合。人 IL-1 α 特异性 mAb 可与一种或多种细胞毒素结合以更有效地杀伤表达 IL-1 α 的细胞。本发明中使用的细胞毒素可以是能够与人 IL-1 α 特异性的 mAb 结合的任何细胞毒性剂(例如, 接触细胞后能杀伤细胞的分子)。细胞毒素的实例包括但不限于: 放射性核素(如 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{201}Tl 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{57}Cu 、 ^{213}Bi 和 ^{211}At)、结合的放射性核素和化疗剂。细胞毒素的其他实例包括但不限于: 抗代谢物(如 5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲氨蝶呤(MTX)、氟达拉滨等); 抗微管剂(如长春新碱、长春碱、秋水仙碱、紫杉烷类(诸如紫杉醇和多西他赛)等); 烷化剂(如环磷酰胺、美法仑、亚硝脲氮芥(BCNU)等); 铂剂(如顺铂(也称为 cDDP)、卡铂、奥沙利铂、JM-216、CI-973 等); 蒽环类(如, 多柔比星、柔红霉素等); 抗生素剂(如丝裂霉素-C); 拓扑异构酶抑制剂(如依托泊苷、替尼泊苷和喜树碱); 或其他细胞毒性剂诸如蓖麻毒素、白喉毒素(DT)、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒蛋白、皂草毒蛋白、商陆病毒蛋白、溴化乙锭、糖皮质激素、炭疽毒素及其它。参见, 例如美国专利申请第 5, 932, 188 号。

[0037] 人 IL-1 α 特异性的 mAb 也可以与可检测的标记结合。本发明中有用的可检测标记包括: 生物素或抗生蛋白链菌素、磁珠、荧光染料(例如异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白及类似物)、放射性标记(如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{111}In 、 ^{97}Ru 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 或 ^{72}As)、不透射线物质诸如用于放射成像的金属、用于磁共振成像的顺磁剂、酶(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和通常在 ELISA 中使用的其它酶)以及显色标记诸如胶体金或有色玻璃珠或塑料(如, 聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等)珠。检测这种标记的方法是本领域技术人员熟知的。因此, 例如, 放射性标记可使用摄影胶片或闪烁计数器检测。也可使用荧光标志物并可以通过使用光探测器检测发射照度来检测。酶标记通常通过将底物提供给酶并检测由酶对底物的作用而产生的反应产物来检测, 且显色标记通过简单地将有色的标记显像而检测。

[0038] 本发明也涵盖编码对人 IL-1 α 特异的完全人 mAb 的核酸分子。虽然同一核酸分子可编码人 IL-1 α 特异性的 mAb 的重链和轻链二者, 但是也可使用两种不同的核酸分子, 一种编码重链且另一种编码轻链。本文呈现了对人 IL-1 α 特异的三种 IgG1 mAb 的氨基酸序列。参见 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9 和 11。本文也描述了编码这些氨基酸序列的示例性核酸分子。参见 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10 和 12。也可使用编码本发明中的两种描述的 IgG1 mAb

或其它 mAb 的氨基酸序列的任何其它合适的核酸。

[0039] 为产生 mAb, 可以将本发明的核酸分子以如下方向并入表达载体中: 其中该核酸分子与诸如转录控制序列和翻译控制序列等表达控制序列可操作地连接。表达载体的实例包括来源于质粒的载体和来源于病毒诸如腺病毒、腺相关病毒和反转录病毒的载体。编码轻链和重链的核酸分子可并入单一载体或不同载体中。本发明的载体还可包括调节序列诸如启动子和 / 或增强子 (参见美国专利第 5, 168, 062 号、美国专利第 4, 510, 245 号和美国专利第 4, 968, 615 号)、选择性标记或编码亲和标签的序列 (以有利于纯化) 或可检测标记。

[0040] 为产生 mAb, 可以将本发明的载体引入至合适的宿主细胞中, 例如诸如细菌等原核细胞或优选真核细胞, 诸如哺乳动物宿主细胞、植物宿主细胞或酵母宿主细胞。用于将异源的多核苷酸引入至宿主细胞中的方法的实例包括使用病毒载体、电穿孔、多核苷酸在脂质体中的包封、右旋糖酐介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、农杆菌介导的转化、基因枪转化和将 DNA 直接微注射入细胞核中。哺乳动物细胞系目前优选地用于从载体中表达 mAb。哺乳动物宿主细胞的实例包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞 (如, DG44 CHO 细胞系)、HeLa 细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞、非洲绿猴肾细胞 (COS)、人肝细胞癌细胞 (如 Hep G2)、NS0 细胞、SP2 细胞、HEK-293T 细胞、293 Freestyle 细胞和 NIH-3T3 细胞。本发明的 mAb 还可在转基因动物或转基因植物中表达。参见, 例如美国专利第 5, 827, 690 号; 第 5, 756, 687 号; 第 5, 750, 172 号; 第 5, 741, 957 号; 第 6, 046, 037 号和第 5, 959, 177 号。

[0041] 本发明提供通过使细胞与人 IL-1 α 特异性的 mAb 接触并检测与所述细胞结合的 mAb 来检测样品中表达人 IL-1 α 的细胞的方法。本发明还提供通过使细胞与人 IL-1 α 特异性的 mAb 接触来杀伤表达人 IL-1 α 的细胞的方法。这种杀伤可通过补体介导的杀伤、Ab 依赖性细胞介导的细胞毒性或 Ab 介导的细胞毒素的递送实现。本文描述的 Ab 还显示可用于其它方法。例如, MABp1 已降低 IL-1 α 诱导的 ICAM1 和 E- 选择素在内皮细胞上的表达。MABp1 还显示用于检测和定量生物样品中的 IL-1 α 的免疫测定。

实施例

[0042] 实施例 1- 抗 -hIL-1 α IgG1 和 κ 链的克隆

[0043] 使用美国专利第 5, 959, 085 号提供的氨基酸序列信息对可变区重链 (V-HC) 序列和可变区轻链 (V-LC) 序列进行基因合成。PCR 扩增 V-HC 以引入 ATG 起始密码子上游的 HindIII/ClaI 位点和 3' 末端的 NheI 位点。PCR 扩增人种系 IgG1 恒定区 (包括外显子和内含子) 以将编码前两个氨基酸 Ala-Ser 的两个 5' 三联体修饰为 NheI 位点, 并在 3' 末端引入 BamHI 位点。人种系 IgG1 恒定区氨基酸序列除 K171Q 和 V261L 互换之外, 与 Swiss-Prot 条目 P01857 一致。使用 NheI 位点连接 V-HC 序列和恒定区 IgG1-HC 序列, 并使用 HindIII 位点和 BamHI 位点将其克隆至 pcDNA3 中。

[0044] > hIL-1 α -IgG1-HC

[0045] MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCTASGFTFSMFGVHWVRQAPGKGLEWVAA
VSYDGSNKYYAESVKGRFTISRDN SKNIFLQMDSLRLDTAVYYCARGRPKVVIPAPLAHWGQGT LVTFSSTK
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSTLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPELPGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

NWYVDGVEVHNAQTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIALEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO :1)

[0046] > hIL-1a-IgG1-HC

[0047] atggagttcgggctgagttgggtgttcctgggtggctctgctgcggggcgtgcagtgccaggtgcagctgtggagagtggggggtggcgtgggtgcagcctggccgggtctctgcgcctgtcttgactgcctccggttttaccttttcctatgtttgggtgtgcactgggtgcgccaggctcccggcaagggaactgggaatgggtggccgccgtgagttacgacgggtccaacaaatattacgctgagagcgtgaaaggcagattcaccatcagcagagataattccaagaatattctgttcctgcagatggacagctctgagactggaggacactgctgtgtactactgcgctcgtggacgccctaaggtggatccccgccttcctggcacattggggccagggaactctgggtgaccttttctagcgttagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcacctcctccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggtgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgtgtgacgggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtccacaccttcccggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtagtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacactacatctgcaacgtgaatcacagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgcccagcactgaactcctggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgacccttgaggtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactgggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccagacaaagccgcgaggagcagtacaacagcagctaccgtgtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccggtatgagctgaccaaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccctggagtgaggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacgggtccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccttaagtccgggaaaataa (SEQ ID NO :2)

[0048] PCR 扩增 V-LC 以引入 ATG 起始密码子上游的 HindIII/ClaI 位点和 3' 末端的 BsiWI 位点。PCR 扩增人恒定区 κ -LC 序列,以引入编码额外的 Arg 和第一个氨基酸 Thr 的 5' BsiWI 位点和位于 3' 末端的 BamHI 位点。人恒定区 κ -LC 氨基酸序列与 Swiss-Prot 条目 P01834 一致。使用 BsiWI 位点连接 V-HC 序列和恒定区 κ -LC 序列,并使用 HindIII 位点和 BamHI 位点将其克隆至 pcDNA3 中。

[0049] > hIL-1a-K-LC

[0050] MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYEASNLETGVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTSSFLSFSGGGTKVEHRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO :3]

[0051] > hIL-1a-K-LC

[0052] atggacatgcgcgtgccccgccagctgctggggctgctgctgctgtggttccttgatctaggtgcgacattcagatgaccagtcccccagctcagtgctcagcctccgtgggcgacagagtgcacaaacacctgccgcgcctctcagggaatctctagttggctggcctggtaccagcagaagcctggaaaggcccccaagctgctgatctatgaagcctccacctggagaccggcgtgccctctcgcttcagcggctcaggtcaggcagtgatcttactctgaccatcagctccctgcagccagaggatttcgctacttactactgccagcagacctcttcttctctgctgtccttcgggggaggcacaaggt

ggagcaccgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttccccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcct
ctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcg
ggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgag
caaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagttcacgggtgacaaaga
gcttcaacaggggagagtgttag [SEQ ID NO :4]

[0053] 实施例 2-NATHMAB-hIL-1a IgG1 和 κ 链的产生

[0054] 对编码 NATHMAB-hIL-1a/IgG1 重链的完整序列进行基因合成。V-HC 序列与在美国专利第 5,959,085 号中描述的氨基酸序列一致。人恒定区 IgG1-HC 序列与 Swiss-Prot 条目 P01857 一致。对核苷酸序列进行密码子优化以在 CHO 细胞中表达。将 Kozac 序列 (gccacc) 添加至起始 ATG 的上游。

[0055] > NATHMAB-hIL-1A-IGG1-HC

[0056] MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLSCTASGFTFSMFGVHWVRQAPGKGLEWVA
AVSYDGSNKYYAESVKGRFTISRDN SKNIFLQMDSLRLED TAVYYCARGRPKVVIPAPLAHWGQGLVTFSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK [SEQ ID NO :5]

[0057] > NATHMAB-hIL-1A-IGG1-HC

[0058] gccaccatggagtttggctctgtcctgggtgttcttgggtggctctgctgaggggggtgcagtgccaggtc
cagctggtggagtctggtgggggagtggtgcagcctgggagatctctgcggctgtcttgcactgcctctggtttcac
tttctctatgtttggtgtgcattgggtcaggcaagcaccaggcaaaggactcgagtgggtcgcagctgtgagctatg
acgggtctaacaaatattacgctgagctctgtcaagggtaggtttaccatcagccgggataattccaaaaatattcctg
ttcctgcaaatggactctctgaggctggaagatactgcagcttactattgtgcaagggggaggccaaaggtggtgat
ccccgctccccctgcctcactggggacagggaacctgggtgactttcagctctgctagcaccaaggggcctagcgtgt
tccattggctccttctccaaatctacttctggaggcaccgcccctgggatgtctcgtgaaagattattttctc
gagcccggtcacctgagctggaacagcgccctgactagcggcgtgcacaccttccccgcagtgctgcaatctag
cgggctgtactccctgagctctgtcgtgaccgtgccctccagcagcctcggaactcagacctacatctgcaatgtca
atcataaacctctaataccaagtcgataagaaggtcgaacctaaatcttgcgataaaaccatacctgccccct
tgcccagcacccgaactgctgggcgggtccctctgtgtttctgttccccccaaacccaaagataacctgatgatctc
taggacccccgaggtcacttgtgtcgtggtggatgtgtccacgaagatccagaagtc aaattcaactggtatgtgg
acgggggtcgaagtgcacaacgcaaagaccaagcctagggagggaacagtataatagcacatatagggtggtcagcgtc
ctgaccgtcctgcatcaggactggctgaatggcaaagaatataagtgtaaagtgtccaacaaggccctgccagcccc
aatcgaaaagacaatctctaaagccaaggggcaaccccggaacctcaggtctatacactgccaccctctcgggatg
aactgaccaagaatcaggtgagcctgacatgtcttgtgaagggtttttatccctccgacattgccgtggagtgaggag
agcaatggacaaccagaaaataactacaaaaccacacccccctgtgctggactccgatggttcttcttctctactc
taagctgacagtggataagtctaggtggcagcagggaatgtgttctcctgctctgtgat gcacgaggcactgcac
aatcattatacacaaaagttctgtctctgtctccaggaaagtaa [SEQ ID NO :6]

[0059] 对编码 NATHMAB-hIL-1a/ κ 轻链的完整序列进行基因合成。V-LC 序列与在美国

专利第 5,959,085 号中描述的氨基酸序列一致。人恒定区 κ -LC 序列与 Swiss-Prot 条目 P01834 一致。对核苷酸序列进行密码子优化以在 CHO 细胞中表达。将 Kozac 序列 (gccacc) 添加至 ATG 的上游。

[0060] > NATHMAB-hIL-1A-K-LC

[0061] MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLL
IYEASNLETGVPSRFSGSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQTSSFLLSFGGGTKVEHTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC[SEQ ID NO:7]

[0062] NATHMAB-hIL-1A-K-LC

[0063] gccaccatggacatgcgcgttcctgccagctcctcggactgctgctgctttggttcccaggctcccg
tgtgatattcagatgacacagctctccctcctccgtatctgcatccgtggcgacagggtcacaatcactttagggc
cagccaggggatctctagttggctcgcagtggtaccaacaaaagccaggttaaggctccgaaactgctcatattacgaag
ctagtaacctcgaaacaggcgtgccaaagccggttagcggctccggttccggttctgacttcaccctcactatttcc
tccttgaacctgaggattttgccacatattactgtcagcaaaacttcttcttttctgctctcctttggtgggggaac
taaggtggagcacacagtgccgccccccagcgtctttatcttcccccaagcgatgaacagctgaagtcagggaccg
ccagcgtggtctgcctgctcaataatttttaccctcgcgaggctaaggtccaatggaaagtgataacgcctccag
agcggtaactctcaggagctctgtcacagagcaagacagcaaggatagcacctattccctctccagcacctgacact
gtctaaggccgactacgagaaacacaaagtgtacgcttgtgaggtgactcaccagggactgagtagccctgtgacaa
aatctttcaataggggagaatgctga [SEQ ID NO:8]

[0064] 实施例 3-NATHMAB-IL-1-a (IgG1/ κ 亚型) 的表达

[0065] 使用瞬时转染法表达和纯化 NATHMAB-IL-1 α 。细胞培养上清液或蛋白 G 亲和纯化的 Ab 进一步经受如下文所描述的分析。在含有 10% FCS 的 DMEM 中培养人胚胎肾 (HEK) 293T 细胞,并根据厂家的方案使用 jetPEI 试剂 (Polylplus) 瞬时转染。在转染之前 24h 将细胞接种在 10cm 皿中 (每个 10cm 皿 3×10^6 个细胞) 以在转染时间点达到约 50% 的密度。使用每皿 5 μ g 的 pcDNA3- 抗-hIL-1 α -IgG1-HC 和 2 倍摩尔过量的 pcDNA3- 抗-hIL-1 α - κ 进行转染。在回收之后,将培养基换为含有 2% FCS 的 DMEM (每皿 10ml) 并收集 Ab 持续 5 至 6 天。收集上清液,过滤,将 pH 调至 7.5-8,并储存在 4°C 直到进一步的使用。

[0066] 将部分上清液 (250ml) 与蛋白 G 琼脂糖 (GE Healthcare) 在旋转轮上在 4°C 下孵育 3 小时。之后,将蛋白 G 琼脂糖加样于重力流柱中并用 PBS 洗涤。使用在 100 μ l Tris (pH 8) 中的 100mM 甘氨酸/150mM NaCl 将 Ab 洗脱在 1ml 的级分中,随后用含有 10% 甘油的 PBS 透析。使用 BCA 蛋白检测试剂盒 (Pierce) 测量各级分的总蛋白浓度。通过 SDS-PAGE 确认重链和轻链的正确大小和组装的天然 Ab 的正确大小。

[0067] 使用 125 I-hIL-1 α 在放射免疫测定 (RIA) 中测试含有 NATHMAB-hIL-1 α 纯化的 Ab 的上清液和生产者 HEK 293T 细胞的 Triton X-100 细胞裂解物的抗原结合。通过对蛋白 G 的吸收来测定结合。洗脱物中所有样品都以最高的活性与 125 I-hIL-1 α 结合。使用 0.012% 的浓度 (在 RIA 中的半数最高活性) 的纯化的 NATHMAB-hIL-1 α 与 125 I-hIL-1 α 的结合测量亲和系数。在这些条件下 NATHMAB-hIL-1 α 的 K_a 是 $3.03 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ 。反演计算揭示了在纯化的洗脱物中约 30 μ g/ml 的活性抗-hIL-1 α -IgG 的估计浓度。

[0068] 使用鼠 EL4-6.1 亚系在生物测定中测试 NATHMAB-hIL-1 α 的中和活性,所述

鼠 EL4-6.1 亚系当用鼠 IL-1 α 或人 IL-1 α 处理时产生高水平的 IL-2 (Zubler 等人, J. Immunol. 134 :3662-3668, 1985)。将标示浓度的 NATHMAB-hIL-1 α (洗脱物) 与多种浓度的重组 hIL-1 α (eBioscience) 以 100 μ l / 孔的终体积在 96- 孔培养板 (平底的) 中在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟。每点以一式三份且在培养基中 (DMEM, 5% FCS) 实施。将 100 μ l 在含有 0.2 μ g/ml 离子霉素 (ionomycin) 的培养基中的 EL4-6.1 细胞 (5×10^5 细胞 /ml) 的悬浮液添加至各孔中。在 37 $^{\circ}$ C 下 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 小时之后, 收获无细胞的上清液并使用商购获得的 ELISA (R&D Systems) 测定其 IL-2 浓度。结果显示 NATHMAB-IL-1 α 有效地中和 hIL-1 α 诱导的 EL-4 细胞的 IL-2 分泌。

[0069] 为测试膜结合的 hIL-1 α 的中和, 使用如上文所描述的相同的基于 EL-4 细胞的测定, 但具有下述修改。用不同数量的活化的人单核细胞孵育不同浓度的 NATHMAB-hIL-1 α (洗脱物)。对于单核细胞制备, 使用 Ficoll-Paque 离心从暗黄覆盖层中分离 PBMC。允许单核细胞在塑料皿上 RPMI 中于 37 $^{\circ}$ C 附着 1.5 小时。洗掉未附着的淋巴细胞以产生几乎纯的单核细胞培养物。将单核细胞在 37 $^{\circ}$ C 下在 5% CO₂ 培养箱中在含有 Gln、Pyr 和 10% FCS 的 RPMI 中与 LPS (1 μ g/ml) 一起培养 24 小时。用 PBS/2mM EDTA 使细胞脱离, 小心地从板上将细胞刮下, 并转移至 Falcon 管中。用 PBS 洗涤细胞两次, 将细胞重悬在 PBS/1% PFA 中并在 20 $^{\circ}$ C 固定 10 分钟。用甘氨酸缓冲液 (150mM 甘氨酸, 75mM NaCl, pH 7.4) 然后用培养基洗涤细胞并计数。结果显示 NATHMAB-hIL-1 α 有效地中和由膜结合的 hIL-1 α 诱导的 EL-4 细胞的 IL-2 分泌。在类似于上文所描述的实验中, 测试了 NATHMAB-hIL-1 α 对鼠 IL-1 α 的中和。用重组的人 (h) IL-1 α 或鼠 (m) IL-1 α (eBioscience) 孵育标示量的 NATHMAB-hIL-1 α 上清液。含有 Ab 的上清液中和人 IL-1 α , 而不中和鼠 IL-1 α 。

[0070] 实施例 4-Ab 介导的癌细胞的杀伤

[0071] 在 37 $^{\circ}$ C 下和 5% CO₂ 中将用标准 Ficoll Paque 制剂从暗黄覆盖层中分离的人外周血单核细胞 (PBMC) 在 RPMI-1640CM 或者含有 rhIL-2 (30ng/ml, ebioscience) 的 RPMI-1640-CM 中孵育过夜, 并将其用作效应细胞 (E)。将 THP1 细胞用作靶 (T)。在 96- 孔板中以每点一式三份进行测定。在用不同浓度的 MABp1 孵育 1×10^4 个靶 15 分钟之后, 按 25 : 1 和 50 : 1 的 ET 比将效应细胞加入至 1×10^4 个靶中并孵育另外 4 小时。将 75 μ l 的测定体积转移至新的 96- 孔板中, 并根据厂家的方案使用 LDH 细胞毒性检测试剂盒 (Roche) 测定细胞毒性。% 特异性裂解 = (平均的实验释放 - 无抗体的平均自发释放) $\times$ 100 / (平均的由靶最大释放 - 平均的由靶自发释放)。A. 使用未处理的 PBMC 作为效应细胞。B. 使用 rhIL-2- 处理的 PBMC 作为效应细胞。在两种情形下, 增加 MABp1 的浓度 (从 1.25 μ g/ml 至 20 μ g/ml) 在两种 ET 比之下都导致靶细胞杀伤增加 (达约 90%)。

[0072] 实施例 5- 人抗 -IL1 α 特异性 mAb 序列

[0073] 如上文所述合成并表达编码对人 IL1 α 特异的另一种人抗 -hIL-1 α IgG₁/ κ 轻链的完整序列 (MABp1)。在编码重链和轻链的核酸中, 将 Kozac 序列 (gccacc) 添加至起始 ATG 的上游。

[0074] 重链

[0075] MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLSCTASGFTFSMFGVHWVRQAPGKGLEWVAA
VSYDGSNKYYAESVKGRFTISRDN SKNIFLQMDSLRLDTAVYYCARGRPKVVIPAPLAHWGQGTLVTFSSASTKG

PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMH
EALHNYHTQKSLSLSPGK[SEQ ID NO :9]

[0076] gccacatggagtttggctctgtcctgggtgttcttgggtggctctgctgaggggggtgcagtgccaggtc
cagctggtggagctctggtgggggagtggtgcagcctgggagatctctgcggctgtcttgcactgcctctggtttcac
tttctctatgtttggtgtgcattgggtcaggcaagcaccaggcaaaggactcgagtgggtcgcagctgtgagctatg
acgggtctaacaatatattacgtgagctctgtcaagggtaggtttaccatcagccgggataattccaaaaatatcctg
ttcctgcaaatggactctctgaggttggaagatactgcagctctactattgtgcaagggggaggccaaaggtggtgat
ccccgtccccctgcctcactggggacagggaacctgggtgactttcagctctgctagcaccaagggccctagcgtgt
tccattgggtccttctccaaatctacttctggaggcaccgccgcctgggatgtctctgtgaaagattattttctt
gagcccgtcaccgtgagctggaacagcggcgccctgactagcggcgtgcacacctttcccgagctgctgcaatctag
cgggctgtactccctgagctctgtcgtgaccgtgccctccagcagcctcggaactcagacctacatctgcaatgtca
atcataaacctctataaccaagtcgataagagggtcgaaacctaaatcttgcgataaaaccataacctgccccct
tgcccagcacccgaactgctgggcgggtccctctgtgtttctgttcccccccaaacccaaagataacctgatgat ct
ctaggacccccgaggtcacttgtgtcgtggtggatgtgtccacgaagatccagaagtcaaattcaactggtatgtg
gacggggtcgaagtgcacaacgcaaagaccaagcctagggagggaacagtataatagcacatatagggtggtcagcgt
cctgaccgtcctgcctcaggactggctgaatggcaaagaatataagtgtaaagtgtccaacaaggccctgccagccc
caatcgaaaagacaatctctaaagccaaggggcaaccccggaacctcaggtctatacactgccaccctctcgggag
gaaatgaccaagaatcaggtgagcctgacatgtcttgtgaagggtttttatccctccgacattgccgtggagtggga
gagcaatggacaaccagaaaaaataactacaaaaccacacccccctgtgctggactccgatggttcccttcttctctact
ctaagctgacagtggataagtcctaggtggcagcaggggaatgtgttctctctgctctgtgatgcagaggcactgcac
aatcattatacacaaaagtcctctgtctctgtctccaggaaagtaa [SEQ ID NO :10]

[0077] 轻链

[0078] MDMRVPAQLLGLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLL
IYEASNLETGVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTSSFLLSFGGGTKVEHKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEHKVKYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC[SEQ ID NO :11]

[0079] gccacatggacatgcgcgttccctgccagctcctcggactgctgctgctttggttcccaggtcctccgg
tgtgatattcagatgacacagctctccctcctccgtatctgcctcctggggcgacagggtcaccaatcacttgtagggc
cagccaggggatctctagttggctcgcctggtaccaacaaaagccaggttaaggctccgaaactgctcattttacgaag
ctagtaacctcgaaacaggcgtgccaaagcgggttttagcggctccgggttccggttctgacttcacctcactatttcc
tccctgcaacctgaggattttgccacataattactgtcagcaaaacttcttcttttctgctctcctttggtggaggaa
taagggtggagcacaaagcgacagttgtgtctcctagcgtctttatcttccctccaagcgatgaacagctgaagtcag
ggaccgccagcgtggtctgcctgtcctaataatttttaccctcgcgaggctaaggtccaatggaaagtgataacgcc
ctccagagcggtaactctcaggagctctgtcacagagcaagacagcaaggatagcactattccctctccagcacct
gacactgtctaagggcgactacgagaaacacaaagtgtacgcttgtgaggtgactcaccagggtgagtagccctg
tgacaaaatctttcaataggggagaatgctga[SEQ ID NO :12]

[0080] 实施例 6-MABp1 结合亲和力

[0081] 在 BIAcore 2000 仪器 (GE Health Sciences) 上使用表面等离子共振 (SPR) 检测纯化的 MABp1 的结合亲和力。使用人 Ab 捕获试剂盒和胺偶联试剂盒 (GE Health Sciences) 将小鼠抗人 IgG (Fc) 单克隆 Ab 共价地固定在 CM5 传感器芯片的流动池上。通常达到 8000-14000RU 的固定水平。在小鼠抗 - 人 IgG (Fc) 捕获 Ab 固定之后, 用 HBS-EP 运行缓冲液 (GE Health Sciences) 运行三次起始循环并用 MABp1 运行二次起始循环以稳定 CM5 表面并去除任何未共价结合的 Ab。为了分析, 将 MABp1 Ab 稀释到 HBS-EP 运行缓冲液中至 $1 \mu\text{g/mL}$ 的终浓度并将其以 700RU 固定到 CM5 传感器芯片的一个流动池上。在 100nM 至 0.05nM 的检测范围内将无载体的人 IL-1A 细胞因子 (eBioscience, #34-8019) 系列稀释在 HBS-EP 运行缓冲液中。流速为 $30 \mu\text{l/min}$ 。持续 15 分钟记录每个细胞因子稀释物的解离数据。在每次循环之后, 用 $30 \mu\text{l/min}$ 的流速单次注射 3M MgCl_2 持续 25 秒以再生 CM5 表面。使用 BiaEvaluation 软件和 Langmuir 结合模型拟合数据。测得 MABp1 的 K_D 为小于 $2.0 \times 10^{-10}\text{M}$ 。

[0082] 实施例 7-MABp1 抑制肿瘤细胞对基膜基质的侵袭

[0083] 将基质胶 (BD) (一种基膜基质) 在 4°C 下融化过夜并在无血清的冷细胞培养基中稀释 (从 5mg/ml 至 1mg/ml)。将 $100 \mu\text{l}$ 稀释的基质胶置于 24-孔 transwell (Costar) 的上室中并将 transwell 在 37°C 下孵育至少 4 至 5 小时以凝胶化。用胰蛋白酶 / EDTA 从组织培养瓶中收获肿瘤细胞 (MDA-MB-231 和 THP-1)、用培养基洗涤并以 1×10^6 细胞 / ml 的密度重悬在含有 1% FBS 的培养基中。用温的无血清培养基轻轻地洗涤凝胶化的基质胶, 并将 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬浮液添加至每孔中。用 $600 \mu\text{l}$ 培养基填充 transwell 的下室, 并将板在 37°C 下孵育 12 至 24 小时。用棉拭子轻轻地将来侵袭基质胶的细胞从每个 transwell 的顶部擦去。之后将 transwell 从 24-孔板中移出并在用 70% 乙醇或甲醇固定侵袭的细胞之后用结晶紫染色。在光学显微镜下对侵袭的细胞计数。在 MABp1 存在下, 侵袭基质胶的细胞的百分比被显著地抑制。

[0084] 实施例 8-MABp1 阻断内皮细胞中 ICAM1 表达的增加

[0085] 将人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) (BD Biosciences) 以在 1mL 补充了低血清生长补充物的 M-200 培养基 (Invitrogen) 中以 5×10^5 个 / 孔接种至 24-孔板中。允许细胞沉降 3-4 小时。吸出培养基并将新鲜的 1mL M-200 添加到每孔中。以 $4.26 \mu\text{g/mL}$ 直接添加 MABp1 至细胞中, 在室温下共孵育 15 分钟, 并之后添加重组人 IL-1 α (rhIL1A, eBioscience) 至 40pg/mL 的终浓度。阳性对照孔仅接受 IL-1 α 的添加。使用不存在 IL-1 α 或不存在 MABp1 的 HUVEC 细胞作为阴性对照。在 37°C 、5% CO_2 下孵育 17-20 小时之后, 通过使用 CellStripper 试剂 (Cellgro Mediatech) 无酶处理 20 分钟使细胞从板上浮起, 并之后使用标准的流式细胞术方案立即测定 CD54 (ICAM-1) 的表达。染色缓冲液包含补充了 2% 热灭活的胎牛血清的 Dulbecco PBS。参照厂家的说明书, 在室温下于黑暗中使用 PE- 结合的小鼠抗人 CD54 (ICAM-1) mAb (eBioscience, HA58 克隆) 或 PE- 结合的小鼠 IgG1k 同种型对照 (eBioscience, #12-4714) 以 100 微升染色体积将 HUVEC 细胞染色 20 分钟。随后用染色缓冲液进行两次洗涤并之后在 FACSCalibur 流式细胞仪 (BD Biosciences) 上获得样品。在几次独立的实验 ($n = 5$) 中, HUVEC 细胞表面上的由 rhIL1A 诱导的 ICAM-1 粘附分子的上调被 MABp1 中和至未被刺激的 HUVEC 细胞所显示的基线水平。

[0086] 实施例 9-MABp1 阻断内皮细胞中 E- 选择素的表达的增加

[0087] 类似于 MABp1 对 ICAM-1 诱导的作用,还观察到了 MABp1- 介导的 HUVEC 细胞上 CD62E (E- 选择素) 诱导的中和。这个作用在当 HUVEC 细胞不是被可溶性的 rhIL-1a 刺激而是被通过糖基磷脂酰肌醇锚定在 DG44CHO 细胞 (GPI-IL1A 细胞) 表面的膜 IL-1a 刺激时是最明显的。在本实验中,将在 6- 孔板中的 HUVEC 细胞的汇合培养物与 5×10^6 GPI-IL1A DG44 细胞在单独的 M-200 培养基中共培养过夜、或在 $10 \mu\text{g/mL}$ MABp1 的存在下共培养过夜、或在 $10 \mu\text{g/mL}$ D5 同种型对照 Ab 的存在下共培养过夜。在 17-20 小时之后,用 Dulbecco PBS 彻底洗涤 HUVEC 单层并之后用 CellStripper 试剂 (Cellgro Mediatech) 无酶处理 20 分钟使 HUVEC 单层浮起,并且之后使用标准的流式细胞术方案立即测定 CD62E (E- 选择素) 的表达。染色缓冲液包含补充了 2% 热灭活的胎牛血清的 Dulbecco PBS。参照厂家的说明书,在室温下于黑暗中使用 PE- 结合的小鼠抗人 CD62E mAb (eBioscience, P2H3 克隆) 或 PE- 结合的小鼠 IgG1k 同种型对照 (eBioscience, P3 克隆) 在 100 微升的染色体积中将 HUVEC 细胞染色 20 分钟。随后用染色缓冲液进行两次洗涤并之后在 FACSCalibur 流式细胞仪 (BD Biosciences) 上获得样品。由膜 GPI-IL-1a 诱导的 HUVEC 细胞表面上的 E 选择素的表达上调被 MABp1 中和至由未被刺激的 HUVEC 细胞所显示的基线水平。

[0088] 实施例 10-MABp1 效价 (rhIL1A 的中和) 的 MRC-5 生物测定

[0089] 来源于人胎儿肺成纤维细胞的 MRC-5 细胞系获自 ATCC 保藏中心 (CCL-171)。通过测量 IL-1A 诱导的 IL-6 从 MRC-5 细胞中的释放测定 MABp1 的 IL-1 中和效价。将在 100 微升 DMEM 完全培养基中的 MRC-5 细胞按 5×10^3 每孔接种在 96- 孔板中。 37°C 下在加湿的 5% CO_2 培养箱中培养细胞过夜。随后将汇合的 MRC-5 细胞与单独的 20pg/mL 的重组人 IL-1A (rhIL1A, eBioscience) 培养另外 24 小时或者在递增浓度的 MABp1 存在下与 20pg/mL 的重组人 IL-1A (rhIL1A, eBioscience) 培养另外 24 小时。阴性对照细胞不用 rhIL1A 刺激。24 小时之后,收集上清液并用来自 eBioscience 的 IL-6ELISA 试剂盒测定 IL-6 释放。 IC_{50} 或抑制最大 IL-6 释放的 50% 所需的 MABp1 浓度在 $0.001 \mu\text{g/mL}$ - $0.01 \mu\text{g/mL}$ 的范围中。

[0090] 实施例 11-MABp1 鉴定 IL-1a+ 细胞

[0091] 将一百微升肝素钠抗凝的全血等分到聚苯乙烯 FACS 管中。将样品与 1mg 人 IgG (蛋白 A 纯化的) 加上 2ml 阻断 Fc 受体的热灭活的胎牛血清一起在室温下孵育 15 分钟。之后添加一抗至下列样品中: 1mg Alexa-488 标记的 MABp1、1mg FITC- 标记的单克隆抗膜人 IL1AAb (FAB200F, R&D Systems)、或者 1mg 鼠同种型对照 (IC002F, R&D Systems)。将一抗与样品在室温下黑暗中孵育 30 分钟。之后在室温下将样品红细胞裂解 (BD Biosciences PharmLyse 溶液) 15 分钟,以 $300 \times g$ 离心 5 分钟,并吸出。用 1mL 含有 2% 热灭活的胎牛血清的 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 将样品团粒洗涤三次。将样品重悬在 0.3mL HBSS+2% FBS 中并在 FACSCalibur 流式细胞仪上获得数据并使用 CellQuest 软件分析数据。使用 MABp1 的人 PBMC 的流式细胞术分析显示仅 0.2% 的 PBMC 是 IL-1 α 阳性的。

[0092] 实施例 12- 用于检测和示踪感染及炎症的 MABp1

[0093] 使用 MABp1 的人 PBMC 的流式细胞术分析 (如在实施例 11 中的) 显示与正常对照相比在具有亚临床感染的受治疗者中 IL-1 α 阳性的 PBMC 的百分比增加了 3.6 倍。类似地,在具有发炎的智齿的受治疗者中,IL-1 α 阳性的 PBMC 的百分比也增加。在智齿去除之后 14 至 45 天,观察到 IL-1 α PBMC 的数量大量降低。

[0094] 实施例 13- 用于检测和 / 或定量 IL-1 α 的免疫测定

[0095] 通常,人受治疗者的血浆中存在非常低水平的 IL-1 α 。由于这些水平常常超出常规免疫测定的检测阈,所以开发了具有提高的灵敏度的 ELISA。在该 ELISA 中,可以在允许 Ab 与样品中的 IL-1 α 结合的条件下,将外源的抗-IL-1 α Ab(如, MABp1)添加至被测试的生物样品(如人血浆)中。因为观察到在人血浆样品中几乎所有的 IL-1 α 都已经与内源抗-IL-1 α Ab 结合存在,所以后一步骤通常可以省略。之后将具有 IL-1 α -Ab 复合物的样品施加到具有约 100kDa 的分子量截留的滤器(Amicon 离心装置)中,来将 IL-1 α -Ab 复合物与样品中小于分子量截留的分子分离。在一个实验中,这引起 50 倍的浓缩。之后将处理的样品(及其稀释物)加至用抗-人 IgG 捕获 Ab(2 μ g/ml 小鼠抗人 IgG, Fc-特异性的, Southern Biotech 产品编号 9042-01)包被的微量滴定板的孔中。在允许结合样品中的 IL-1 α -Ab 复合物的时间之后,洗涤各孔以去除未结合的材料。之后将标记的抗-人 IL-1 α 二抗加至孔中(0.2 μ g/ml 生物素结合的单克隆小鼠抗-人 IL-1AAb, CRM6 克隆, eBioscience 目录号 13-7017)。在允许结合孔中的 IL-1 α 的时间之后,洗涤板,并将各孔中的标记的抗-人 IL-1 α 的量定量作为被测试的样品中的 IL-1 α 的浓度的指示。

[0096] 其它实施方案

[0097] 应理解虽然已经结合本发明的详述描述了本发明,但是上述描述旨在阐述且不限制由所附的权利要求书的范围所限定的本发明的范围。其它方面、优点及修改都在下述的权利要求书的范围内。

[0001]

序列表

<110> 埃克斯生物科技公司
J·西马德

<120> 白细胞介素-1 α 抗体及使用方法

<130> 5407-0024

<150> US 61/057,586

<151> 2008-05-30

<150> US 61/121,391

<151> 2008-12-10

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 471

<212> PRT

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 1

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Met Phe Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

[0002]

Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Ile Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro Leu
115 120 125

Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

[0003]

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Leu Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

[0004]

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 2

<211> 1416

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

atggagttcg ggctgagttg ggtgttcctg gtggctctgc tgcggggcgt gcagtgccag	60
gtgcagctgg tggagagtgg gggtagcgtg gtgcagcctg gccggtctct gcgcctgtct	120
tgcactgcct ccggttttac cttttctatg tttggtgtgc actgggtgcg ccaggctccc	180
ggcaaggac tggaatgggt ggccgccgtg agttacgacg ggtccaaca atattacgt	240
gagagcgtga aaggcagatt caccatcagc agagataatt ccaagaatat tctgttcctg	300
cagatggaca gtctgagact ggaggacact gctgtgtact actgcgctcg tggacgcct	360
aagtggtca tccccgccc cctggcacat tggggccagg gaactctggt gacctttct	420
agcgctagca ccaagggcc atcggtcttc ccctggcac ctcctccaa gacacctct	480
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg	540
tcgtggaact caggcgcct gaccagcggc gtccacacct tcccggtgt cctacgtcc	600
tcaggactct actcctcag cagcgtagt accgtgcct ccagcagctt gggcaccag	660
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag	720

[0005]

```

cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg      780
ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc      840
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac      900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gcccagacaa agccgcggga ggagcagtac      960
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc     1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc     1080
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat     1140
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgccctgtca aaggcttcta tcccagcgac     1200
atcgccctgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc     1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaage tcaccgtgga caagagcagg     1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac     1380
acgcagaaga gcctctcctt aagtccggga aaataa                                1416

```

<210> 3

<211> 235

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly 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

```

[0006]

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser 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

Thr Ser Ser Phe Leu Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu His
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

[0007]

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 4

<211> 708

<212> DNA

<213> 智人

<400> 4

```
atggacatgc gcgtgcccgcc ccagctgctg gggctgctgc tgcgtgggtt ccctggatct      60
agggtgcgaca ttcatgatgac ccagtccccc agctcagtgt cagcctccgt gggcgacaga      120
gtgacaatca cctgcccgcc ctctcaggga atctctagtt ggctggcctg gtaccagcag      180
aagcctggaa agggccccaa gctgctgata tatgaagcct ccaacctgga gaccggcgtg      240
ccctctcgtc tcagcggctc aggcctcaggc agtgatttta ctctgacct cagctccctg      300
cagccagagg atttcgtac ttactactgc cagcagacct ctctcttct getgtccttc      360
gggggaggca caaagggtga gcaccgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg      420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc      480
tatcccagag agggcaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc      540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagacct acagcctcag cagcaccctg      600
acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag      660
ggcctgagtt caccggtgac aaagagcttc aacaggggag agtggttag      708
```

<210> 5

<211> 471

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

[0008]

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Met Phe Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Ile Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro Leu
115 120 125

Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

[0009]

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

[0010]

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 6

<211> 1422

<212> DNA

<213> 智人

<400> 6

gccaccatgg agtttgggtct gtcctgggtg ttcttggtgg ctctgctgag ggggggtgcag 60

tgccagggtcc agctgggtgga gtctgggtggg ggagtgggtgc agcctgggag atctctgcgg 120

ctgtcttgca ctgcctctgg tttcactttc tctatgtttg gtgtgcattg ggtagcaggcaa 180

gcaccaggca aaggactcga gtgggtcgca gctgtgagct atgacgggtc taacaaatat 240

[0011]

tacgctgagt ctgtcaaggg taggtttacc atcagccggg ataattccaa aaatatcctg	300
ttcctgcaaa tggactctct gaggetggaa gatactgcag tctactattg tgcaaggggg	360
aggccaaagg tggatgcc cgctccctc gctcactggg gacagggaac cctggtgact	420
ttcagctctg ctagcaccaa gggccctage gtgttcccat tggtccttc ctccaaatct	480
acttctggag gcaccgccg cctgggatgt ctgctgaaag attattttcc tgagcccgctc	540
accgtgagct ggaacagcgg cgccctgact agcggcgctgc acacctttcc cgcagtgtg	600
caatctagcg ggtgtactc cctgagctct gtctgaccg tgccctccag cagcctcgga	660
actcagacct acatctgcaa tgtcaatcat aaacctctta ataccaaagt cgataagaag	720
gtcgaaaccta aatcttgca taaaaccat acctgcccc ctgcccagc acccgaactg	780
ctggcggtc cctctgtgtt tctgttcccc cccaaacca aagataacct gatgatctct	840
aggacccccg aggtcacttg tgtcgtggtg gatgtgtccc acgaagatcc agaagtcaaa	900
ttcaactggt atgtggacgg ggtcgaagtg cacaacgcaa agaccaagcc tagggaggaa	960
cagtataata gcacatatag ggtggtcagc gtctgaccg tcctgcatca ggactggctg	1020
aatggcaaag aatataagt taaagtgtcc aacaaggccc tgccagcccc aatcgaaaag	1080
acaatctcta aagccaaggg gcaaccccg gaacctcagg tctatacact gccaccctct	1140
cgggatgaac tgaccaagaa tcaggtgagc ctgacatgtc ttgtgaaggg tttttatccc	1200
tccgacattg ccgtggagtg ggagagcaat ggacaaccag aaaataacta caaaaccaca	1260
ccccctgtgc tggactcega tggttccttc ttctctact ctaagctgac agtggataag	1320
tctaggtggc agcaggggaa tgtgttctcc tgctctgtga tgcacgaggc actgcacaat	1380
cattatacac aaaagtctct gtctctgtct ccaggaaagt aa	1422

<210> 7

<211> 234

<212> PRT

[0012]

<213> 智人

<400> 7

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 Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser 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

Thr Ser Ser Phe Leu Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu His
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

[0013]

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 8

<211> 711

<212> DNA

<213> 智人

<400> 8

gccaccatgg acatgcgcgt tctgcccag ctccctcgac tgctgctgct ttggttccca 60

ggctcccgggt gtgatattca gatgacacag tctccctcct ccgtatctgc atccgtgggc 120

gacagggtca caatcacttg tagggccagc caggggatct ctagttggct cgcatggtac 180

caacaaaagc caggaagc tccgaaactg ctcatctacg aagctagtaa cctcgaaaca 240

ggcgtgccaa gccggttttag cggctccgggt tccggttctg acttcaccct cactatttcc 300

tccctgcaac ctgaggattt tgccacatat tactgtcagc aaacttcttc ttttctgctc 360

tcctttggtg ggggaactaa ggtggagcac acagtggccg ccccagcgt ctttatcttc 420

cccccaagcg atgaacagct gaagtcaggg accgccagcg tggtctgcct gctcaataat 480

ttttaccctc gcgaggctaa ggtccaatgg aaagtggata acgccctcca gagcggtaac 540

[0014]

tctcaggagt ctgtcacaga gcaagacagc aaggatagca cctattccct ctccagcacc 600
ctgacactgt ctaaggccga ctacgagaaa cacaaagtgt acgcttgtga ggtgactcac 660
cagggactga gtagccctgt gacaaaatct ttcaataggg gagaatgctg a 711

<210> 9

<211> 471

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Met Phe Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Ile Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro Leu
115 120 125

[0015]

Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

[0016]

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

[0017]

<210>	10	
<211>	1422	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	10	
gccaccatgg agtttggctct gtctgggtg ttcttgggtg ctctgtgag gggggtgcag	60	
tgccaggtcc agctgggtga gtctgggtgg ggagtgggtc agcctgggag atctctgcgg	120	
ctgtcttgca ctgcctctgg ttctactttc tctatgtttg gtgtgcattg ggtcaggcaa	180	
gcaccaggca aaggactcga gtgggtcgca gctgtgagct atgacgggtc taacaaatat	240	
tacgtgagt ctgtcaagg taggtttacc atcagccggg ataattcaa aaatatcctg	300	
ttcctgcaaa tggactctct gaggttgaa gatactgcag tctactattg tgcaaggggg	360	
aggccaaagg tggatgctcc cgctccctc gctcactggg gacagggaac cctgggtgact	420	
ttcagctctg ctagcaccaa gggccctagc gtgttcccat tggtccttc ctccaaatct	480	
acttctggag gcaccgccgc cctgggatgt ctctgaaag attattttcc tgagcccgctc	540	
accgtgagct ggaacagcgg cgccctgact agcggcgtgc acacctttcc cgcagtgtctg	600	
caatctagcg ggctgtactc cctgagctct gtcgtgaccg tgccctccag cagcctcgga	660	
actcagacct acatctgcaa tgtcaatcat aaacctcta ataccaaagt cgataagagg	720	
gtcgaacct aatcttgca taaaacctat acctgcccc cttgcccagc acccgaactg	780	
ctgggcgggtc cctctgtgtt tctgttcccc cccaaacca aagataccct gatgatctct	840	
aggacccccg aggtcacttg tgtcgtgggt gatgtgtccc acgaagatcc agaagtcaaa	900	
ttcaactggg atgtggacgg ggtcgaagtg cacaacgcaa agaccaagcc tagggaggaa	960	
cagtataata gcacatatag ggtggtcagc gtctgaccg tctgcatca ggactggctg	1020	
aatggcaaag aatataagt taaagtgtcc aacaaggccc tgccagcccc aatcgaaaag	1080	

[0018]

acaatctcta aagccaaggg gcaaccccg gaaacctcagg tctatacact gccaccctct 1140
cgggaggaaa tgaccaagaa tcagggtgagc ctgacatgtc ttgtgaaggg tttttatccc 1200
tccgacattg ccgtggagtg ggagagcaat ggacaaccag aaaataacta caaaaccaca 1260
ccccctgtgc tggactccga tggttccttc ttctctact ctaagctgac agtggataag 1320
tctaggtggc agcaggggaa tgtgttctcc tgctctgtga tgcacgaggc actgcacaat 1380
cattatacac aaaagtctct gtctctgtct ccaggaaagt aa 1422

<210> 11
<211> 236
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

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 Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

[0019]

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Thr Ser Ser Phe Leu Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu His
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> 12

<211> 717

<212> DNA

<213> 智人

<400> 12

gccaccatgg acatgcgcgt tctgcccag ctcctcggac tgctgctgct ttggttccca

60

[0020]

ggctcccggg	gtgatattca	gatgacacag	tctccctcct	ccgtatctgc	atccgtgggc	120
gacaggggtca	caatcacttg	tagggccagc	caggggatct	ctagttggct	cgcatgggtac	180
caacaaaagc	caggtaaggc	tccgaaactg	ctcatttacg	aagctagtaa	cctcgaaaca	240
ggcgtgccaa	gccggtttag	cggtccggg	tccggttctg	acttcaccct	cactatttcc	300
tccctgcaac	ctgaggattt	tgccacatat	tactgtcagc	aaacttcttc	ttttctgctc	360
tcctttgggtg	gaggaactaa	ggtggagcac	aagcggacag	ttgctgctcc	tagcgtcttt	420
atcttccctc	caagcgatga	acagctgaag	tcagggaccg	ccagcgtggt	ctgcctgctc	480
aataattttt	accctcgca	ggctaaggtc	caatggaaag	tgataacgc	cctccagagc	540
ggtaactctc	aggagtctgt	cacagagcaa	gacagcaagg	atagcaccta	ttccctctcc	600
agcaccctga	cactgtctaa	ggccgactac	gagaaacaca	aagtgtacgc	ttgtgaggtg	660
actcaccagg	gactgagtag	ccctgtgaca	aaatctttca	ataggggaga	atgctga	717