



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102239180 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 31

(21) 申请号 200980136307. 1

(22) 申请日 2009. 08. 17

(30) 优先权数据

61/189, 357 2008. 08. 18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 03. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/004711 2009. 08. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/021697 EN 2010. 02. 25

(83) 生物保藏信息

PTA-6979 2005. 09. 16

PTA-6980 2005. 09. 16

PTA-6981 2005. 09. 16

PTA-7341 2006. 01. 31

PTA-7342 2006. 01. 31

(73) 专利权人 辉瑞大药厂

地址 美国纽约州

专利权人 安进弗里蒙特公司

(72) 发明人 R·P·格拉杜 B·T·凯勒

小川慎志 A·拉吉帕尔

L·A·苔拉斯卡 S·S·贝洛斯基

L·L·格林 M·梁

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

C07K 14/715 (2006. 01)

C12N 5/12 (2006. 01)

A61P 25/00 (2006. 01)

A61P 37/00 (2006. 01)

A61P 31/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2003165988 A1, 2003. 09. 04, 全文.

W0 03066830 A2, 2003. 08. 14, 全文.

Nils Lonberg. "Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms". 《Current opinion in immunology》. 2008, 第 20 卷 (第 4 期), 第 450-459 页.

Ki Hoon Han et al., "Role of the first extracellular loop in the functional activation of CCR2". 《The Journal of Biological Chemistry》. 1999, 第 274 卷 (第 45 期), 第 32055-32062 页.

审查员 刘贺

权利要求书1页 说明书55页

序列表89页 附图22页

(54) 发明名称

抗 CCR2 抗体

(57) 摘要

提供了特异性结合 CCR2 特别是人 CCR2 和可用于抑制 CCR2 的抗体 (包括人抗体) 和其抗原结合部分。抗 CCR2 抗体包括结合 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环的抗体。还提供了人抗 CCR2 抗体和其抗原结合部分。提供了分离的来源于人抗 CCR2 抗体的重链和轻链免疫球蛋白和编码此类免疫球蛋白的核酸分子。提供了制备人抗 CCR2 抗体或抗原结合部分的方法、包含此类抗体或抗原结合部分的组合物、使用抗体和抗原结合部分的方法和

用于诊断和治疗的组合物。还提供了使用编码重链和 / 或轻链免疫球蛋白分子的核酸分子的基因治疗方法, 所述免疫球蛋白分子包含人抗 CCR2 抗体或其抗原结合部分。

1. 特异性结合人 CCR2 的分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:SEQ ID NO:84 中所示的 V_H CDR1,SEQ ID NO:85 中所示的 V_H CDR2,SEQ ID NO:86 中所示的 V_H CDR3,SEQ ID NO:102 中所示的 V_L CDR1,SEQ ID NO:103 中所示的 V_L CDR2 和 SEQ ID NO:104 中所示的 V_L CDR3,其中所述抗原结合部分选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、单链 Fv、嵌合抗体和双抗体。

2. 权利要求 1 的分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含 SEQ ID NO:83 的重链可变 (V_H) 结构域氨基酸序列。

3. 权利要求 1 的分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含轻链可变 (V_L) 结构域氨基酸序列,所述轻链可变结构域氨基酸序列选自 SEQ ID NO:101 和 SEQ ID NO:113。

4. 权利要求 1 的分离的人单克隆抗体或抗原结合部分,其进一步包含:来自由 ATCC 登录号为 PTA-6980 的杂交瘤产生的单克隆抗体的重链的 CDR1、CDR2 和 CDR3;和来自由 ATCC 登录号为 PTA-6980 的杂交瘤产生的单克隆抗体的轻链的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

5. 权利要求 1 的分离的人单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体的重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:82,轻链的氨基酸序列为 SEQ ID NO:100。

6. 权利要求 1 的分离的人单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述重链氨基酸序列是 SEQ ID NO:116 并且所述轻链氨基酸序列是 SEQ ID NO:112。

7. 权利要求 1 的分离的人单克隆抗体或抗原结合部分,其还包含重链恒定结构域。

8. 权利要求 7 的分离的人单克隆抗体或抗原结合部分,其还包含轻链恒定结构域。

9. 包含权利要求 1 的抗体或抗原结合部分及药学可接受的载体的药物组合物。

10. 产生权利要求 1 的抗体或抗原结合部分的分离的细胞系。

11. 包含编码权利要求 1 的抗体或抗原结合部分的核苷酸序列的分离的核酸分子。

12. 包含权利要求 11 的核酸分子的载体,其中所述载体任选地包含可操作地连接至所述核酸分子的表达控制序列。

13. 权利要求 1 的抗体或抗原结合部分用于制造药剂的用途,所述药剂用于治疗、预防或减轻有此需要的受试者的 CCR2 介导的病症的症状。

14. 权利要求 13 的用途,其中所述受试者患有选自炎性病症、变应性病症、自身免疫病症、移植排斥病症、动脉粥样硬化、肥胖症、HIV 感染、神经性疼痛、血管狭窄、血管再狭窄、多发性硬化、纤维化病况、年龄相关性黄斑变性和癌症的一种或多种病症或病况。

15. 权利要求 14 的用途,其中所述纤维化病况是肝纤维化。

16. 权利要求 15 的用途,其中所述肝纤维化是丙型肝炎病毒感染、乙型肝炎病毒感染、酒精性脂肪性肝炎或非酒精性脂肪性肝炎的结果。

17. 权利要求 14 的用途,其中所述炎性病症是葡萄膜炎或角膜感染。

抗 CCR2 抗体

[0001] 交叉参考相关专利和专利申请

[0002] 本申请要求 2008 年 8 月 18 日提交的美国临时专利申请案 61/189,357 (其以其全文通过引用合并入本文) 的权益。

[0003] 联合研究协议

[0004] 本文中的公开内容和权利要求由在 Pfizer Inc. 与 Abgenix Inc. 之间的联合研究协议的范围内进行的活动产生,所述协议在产生所请求保护的发明的日期当天或之前有效。

[0005] 背景

[0006] 白细胞浸润入炎症部位据信受称为趋化因子的 8-10kD 蛋白调控。此类趋化因子根据其 N 末端半胱氨酸残基的间隔分成 4 类,命名为 CC、CXC、XC 和 CX3C。趋化因子可介导一系列对白细胞的促炎效应,例如触发趋化作用、脱粒、脂质介体 (mediator) 的合成以及整联蛋白激活 (Oppenheim, J. J. 等人, Annu. Rev. Immunol., 9 :617-648(1991) ;Baggiolini, M., 等人, Adv. Immunol., 55 :97-179(1994) ;Miller, M. D. 和 Krangel, M. S., Crit. Rev. Immunol., 12 :17-46(1992))。

[0007] 一种趋化因子,单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1) (也称为 CCL2) 作用于单核细胞、淋巴细胞和树突细胞,以诱导趋化作用、颗粒释放、呼吸爆发和细胞因子释放。研究已表明, MCP-1 牵涉疾病例如类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、肉芽肿病、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、肥胖症 / 糖尿病、神经性疼痛、癌症和多发性硬化的病理 (Koch, J. Clin. Invest. 90 :772-79(1992) ;Hosaka 等人, Clin. Exp. Immunol. 97 :451-457(1994) ;Schwartz 等人, Am. J. Cardiol. 71(6) :9B-14B(1993) ;Schimmer 等人, J. Immunol. 160 :1466-1471(1998) ;Flory 等人, Lab. Invest. 69 :396-404(1993) ;Gong 等人, J. Exp. Med. 186 :131-137(1997) ;Salcedo 等人 Blood 96(1) 34-40(2000) ;Bracke 等人, Inflammation & Allergy-Drug Targets 6 :75-79(2007) ;Chung Current Drug Targets-Inflammation & Allergy 4 :619-625(2005)。

[0008] CCR2 是七跨膜域 (seven-transmembrane domain) G 蛋白偶联趋化受体,其结合 MCP-1 以及其他趋化因子包括 CCL8 (MCP-2)、CCL7 (MCP-3) 和 CCL13 (MCP-4) (Charo, I. F., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :2752-2756(1994) ;Myers, S. J., 等人, J. Biol. Chem. 270 :5786-5792(1995) ;Gong 等人, J. Biol. Chem. 272 :11682-11685(1997) ;Garcia-Zepeda 等人, J. Immunol. 157 :5613-5626(1996))。CCR2 也称为 CMKBR2 和 CKR2。已克隆了相异在于其 C 末端的 CCR2 的两个可选择的剪接形式 CCR2A 和 CCR2B (Wong 等人 (1997) J. Biol. Chem. 272 :1038-1045)。在信号转导研究中,CCR2A 和 CCR2B 都介导激动剂依赖性钙动员和腺苷酸环化酶抑制。CCR2 在单核细胞、T 细胞和树突细胞上表达,并且与由内皮细胞、单核细胞和滑膜成纤维细胞分泌的趋化因子相互作用。

[0009] 已使用 CCR2 敲除小鼠探测了 CCR2 的生物学作用 (Boring 等人, J. Clin. Invest. 100(10) :2552-61(1997) ;Boring 等人, Nature 394(6696) :894-7(1998) ;De Paolo 等人, J. Immunol. 171(7) :3560-7(2003) ;Gaupp 等人, Am. J. Pathol. 162(1) :

139-50(2003))。CCR2^{-/-}小鼠在迟发型超敏反应和 Th1 型细胞因子的产生中具有显著缺陷,并且通常较不易于发生实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)。除了调节免疫应答外,CCR2 还是 HIV 的共受体(Connor 等人, J. Exp. Med. 185 :621-628(1997) ;Frade 等人, J Clin Invest. 100(3) :497-502(1997))。

[0010] 由于 MCP-1 和其受体 CCR2 参与不期望的免疫应答,因此 CCR2 拮抗剂可以是很前景的治疗剂。然而,已描述的 CCR2 拮抗剂很少(参见 Ogilvie 等人, Blood 97(7) : 1920-4(2001))。因此,存在对新型和改进的组合物的需要,所述组合物可结合 CCR2 并且阻断其配体介导的 CCR2 信号转导。

[0011] 概述

[0012] 提供了特异性结合 CCR2 特别是人 CCR2 并且可用作 CCR2 拮抗剂的分离的抗体或其抗原结合部分,以及包含所述抗体或部分的组合物。包括了在除了 CCR2 的 N 末端部分或第 3 环外的表位上结合 CCR2 的抗体或抗原结合部分。此类抗体可结合 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环。

[0013] 提供了组合物,所述组合物包含 (i) 所述抗 CCR2 抗体的重链和 / 或轻链、其可变结构域或其抗原结合部分,或编码它们的核酸分子 ;和 (ii) 药学可接受的载体。组合物还可包含另一种成分例如治疗剂或诊断剂。

[0014] 还提供了诊断和治疗方法。类似地,提供了用于制备治疗炎性和非炎性病症的药剂的抗 CCR2 抗体和其部分。

[0015] 提供了包含所述核酸分子的载体和宿主细胞以及重组产生由所述核酸分子编码的多肽的方法。还提供了产生抗 CCR2 抗体或其抗原结合部分的分离的细胞系。

[0016] 附图概述

[0017] 图 1A、1B 和 1C 是显示 CCR2 抗体与细胞的结合(如通过 FACS 分析测定的)的图。图 1A 是举例说明与 KLH 对照抗体相比较 AF-488 (ALEXA **FLUOR**® 488, Invitrogen) 缀合的 CCR2 抗体 4. 40A68G S230P 与人全血单核细胞的结合(如通过 FACS 分析测定的)的图。图 1B 是举例说明 AF-488 缀合的 CCR2 抗体 4. 40A68G S230P 与表达人 CCR2 的 300-19 细胞的结合(如通过 FACS 分析测定的)的图。图 1C 是举例说明不同浓度的 4. 40A68GS230P 抗体与 CCR2 转染的 300-19 细胞的结合(如使用抗人 PE 检测的)的图。

[0018] 图 2 举例说明在饱和结合测定中 4. 40A68G S230P 抗体与 CCR2 转染的 300-19 细胞的剂量相关结合。

[0019] 图 3 举例说明 4. 40A68G S230P 抗体抑制 THP-1 细胞响应 CCR2 配体 MCP-1 (而非响应 CCR1/CCR5 配体 MIP-1a) 的趋化作用的能力。

[0020] 图 4 举例说明 4. 40A68G S230P 抗体抑制原代人单核细胞响应 MCP-1 的趋化作用的能力。

[0021] 图 5 显示用于表达 CCR1/CCR2 嵌合体的逆转录病毒载体的质粒图谱。

[0022] 图 6A 和 6B 举例说明 4. 40A68G S230P 抗体与表达嵌合受体的 300-19 细胞的结合,所述嵌合受体只由 CCR2 的细胞外第 1 和第 2 环以及 CCR1 的 N 末端和第 3 环组成。图 6C 描述了 4. 40A68G S230P 与嵌合受体转染的 300-19 细胞的饱和结合测定,如通过 FACS 分析测定的。

[0023] 图 7 显示 4. 40A68G S230P 抗体与如下细胞的饱和结合分析(3 小时饱和曲线) :

(A) 300-19 对照细胞 ; (B) 表达全长 CCR2 的转染的 300-19 细胞 ; (C) 表达 flag- 标记的 (M1) MRRR 嵌合体 [经 flag 标记以确保受体表达的 CCR2 (M) 的 N 末端和 CCR1 (R) 的环区域] 的转染的 300-19 细胞 ; (D) 表达 flag- 标记的 (M1) RRRM 嵌合体 [经 flag 标记以确保受体表达的 CCR1 (R) 的 N 末端和第 1 及第 2 环以及 CCR2 (M) 的第 3 环] 的转染的 300-19 细胞 ; 和 (E) 表达 flag- 标记的 (M1) RMMR 嵌合体 [经 flag 标记以确保受体表达的 CCR1 (R) 的 N 末端和第 3 环以及 CCR2 (M) 的第 1 和第 2 环] 的转染的 300-19 细胞。

[0024] 图 8 显示如捕获 ELISA 中评估的 4. 40A68G S230P 抗体与 CCR2 的第 2 环或第 3 环肽区域的结合。

[0025] 图 9 显示两个图, 其举例说明用 AF-488 缀合的 4. 40. 3A68G S230P 抗体 (图框 A) 或用抗 CCR5 抗体 (图框 B) 对表达重组 CCR5 的 300-19 细胞的 FACS 免疫染色。

[0026] 图 10 举例说明了 4. 40A68G S230P 抗体对 MCP-1 诱导的活性的抑制, 如通过对 CCR2 转染的 300-19 细胞的钙动员评估的。

[0027] 图 11 显示了 4. 40A68G S230P 抗体对 MCP-3 诱导的 CCR2 转染的 300-19 细胞的趋化作用的抑制。

[0028] 图 12 举例说明了 4. 40A68G S230P 抗体对全血中响应 MCP-1 的人单核细胞肌动蛋白多聚化的抑制。

[0029] 图 13 举例说明 4. 40A68G S230P 抗体在雌食蟹猴中对全血中响应 MCP-1 的单核细胞肌动蛋白多聚化的抑制。

[0030] 图 14 显示 4. 40A68G S230P 抗体对 hHSC 细胞系 LI90 中胶原 1mRNA 合成的剂量依赖性抑制。

[0031] 图 15 显示 4. 40A68G S230P 抗体对在 10nM MCP-1 下的人全血中的 pERK 磷酸化的剂量依赖性抑制。

[0032] 图 16 显示在单次 ConA 注射后 24 小时, 4. 40A68G S230P 抗体降低人 CCR2 敲入 (knock-in) 小鼠中血浆丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 的活性。

[0033] 图 17A-17D 显示重链和轻链可变区的种系氨基酸序列与分别地 4. 22. 3、4. 40. 2、4. 39. 3 和 4. 9. 2 抗体重链和轻链可变区 (对于 4. 22. 3、4. 40. 2、4. 39. 3 和 4. 9. 2 抗体只显示错配) 相比较的比对。CDR 以下划线标示并且用井号 (#) 标示错配缺口。

[0034] 详述

[0035] 定义和一般技术

[0036] 除非在本文中另外定义, 否则本文中使用的科学和技术术语具有本领域技术人员通常理解的意义。此外, 除非上下文要求, 否则单数术语将包括复数并且复数术语将包括单数。本文中提及的全部公开案和其他参考资料以其全文通过引用合并入本文。通常, 本文中描述的与细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学、蛋白质和核酸化学以及杂交相关的术语和技术是本领域内熟知的和常用的术语和技术。在矛盾的情况下, 以本说明书 (包括定义) 为准。

[0037] 除非另外指出, 否则通常按照本领域内熟知的以及各种一般和更具体的参考文献 (其在整个本说明书中引用和论述) 中描述的常规方法进行方法和技术。参见, 例如, Sambrook 等人, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) ; Ausubel 等人, Current Protocols

in Molecular Biology, Greene Publishing Associates(1992); 和 Harlow 和 Lane, Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1990), 其全部通过引用合并入本文。按照制造商的说明书进行酶促反应和纯化技术, 如在本领域内通常使用的或如本文描述的。本文中描述的与分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学相关的术语以及实验室方法和技术是本领域内熟知和常用的术语以及实验室方法和技术。将标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。

[0038] 除非另外指出, 否则下列术语将理解为具有下列意义:

[0039] 术语“多肽”包括天然或人工蛋白质、蛋白质片段以及蛋白质序列的多肽类似物。多肽可以是单体或多聚体的。

[0040] 术语“分离的蛋白质”、“分离的多肽”或“分离的抗体”是指根据其来源或衍生的来源, (1) 不与在天然状态下与其相伴的天然结合的组分结合; (2) 不含来自相同物种的其他蛋白质; (3) 由来自不同物种的细胞表达; 或 (4) 非天然发生的蛋白质、多肽或抗体。因此, 例如通过化学方法合成或在与其所天然源自的细胞不同的细胞系统中合成的多肽将是与其天然结合的组分相“分离的”。还可使用本领域内熟知的蛋白质纯化技术通过分离使得蛋白质大体上不含天然结合的组分。

[0041] 分离的抗体的实例包括已使用 CCR2 或其部分亲和纯化的抗 CCR2 抗体、通过杂交瘤或其他细胞系体外合成的抗 CCR2 抗体以及从转基因小鼠产生的人抗 CCR2 抗体。

[0042] 当至少约 60 至 75% 的样品展示单一类别的多肽时, 蛋白质或多肽是“大体上纯的”、“大体上均一的”或“大体上纯化的”。多肽或蛋白质可以是单体或多聚体。大体上纯的多肽或蛋白质通常可占蛋白质样品的约 50%、60%、70%、80% 或 90% W/W, 更通常地约 95%, 和纯度可以高于 99%。蛋白质的纯度或均一性可通过本领域内熟知的许多方法来显示, 例如进行蛋白质样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后在用本领域内熟知的染料对凝胶染色后显现单个多肽条带。为了某些目的, 可通过使用 HPLC 或本领域内熟知的用于纯化的其他方法提供更高的分辨率。

[0043] 本文中使用的术语“抗体类似物”是指包含与氨基酸序列的部分 具有大体上的同一性的区段并且具有至少一个下列性质的抗体: (1) 在适当的结合条件下特异性结合 CCR2, (2) 抑制 CCR2 的至少一个生物活性的能力。通常, 抗体类似物包含相对于天然序列的保守氨基酸置换 (或插入或缺失)。类似物通常为至少 20 或 25 个氨基酸长, 至少 50、60、70、80、90、100、150 或 200 个氨基酸长或更长, 并且通常可与抗体的全长重链或轻链一样长。一些例子包括与种系氨基酸序列相比具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 个置换的抗体类似物。

[0044] 在某些情况下, 对抗 CCR2 抗体或其抗原结合部分的氨基酸置换是这样的氨基酸置换, 其: (1) 减少对蛋白水解的易感性, (2) 减少对氧化的易感性, (3) 改变形成蛋白质复合物的结合亲和力, (4) 添加或除去糖基化位点和 (5) 提供或改进此类类似物的其他物理化学或功能性质但仍然保持对 CCR2 的特异性结合。类似物可包括除了正常发生的肽序列外的序列的各种突变蛋白。例如, 可在多肽的一部分 (该部分在形成分子间接触的结构域外部) 的正常发生的序列中产生单个或多个氨基酸置换, 例如保守氨基酸置换。保守氨基酸置换不应当显著地改变亲本序列的结构特征; 例如, 替代氨基酸不应当改变组

成在亲本序列中存在的免疫球蛋白结合结构域的反向平行 β -折叠片,或破坏表征亲本序列的其他类型的二级结构。一般地,甘氨酸和脯氨酸不应该用于反向平行 β -折叠片。本领域公认的多肽二级和三级结构的实例描述于 *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden 和 J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); 以及 Thornton 等人, *Nature* 354:105 (1991) (通过引用合并入本文) 中。

[0045] 当在本文中提及“抗体”时,其通常被理解为还可使用其抗原结合部分。抗原结合部分与完整抗体竞争特异性结合。通常参见, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N. Y. (1989)) (以其全文通过引用合并入本文,用于所有目的)。可通过重组 DNA 技术 或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗原结合部分。在一些情况下,抗原结合部分包括 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb 和互补决定区 (CDR) 片段、单链抗体 (例如, scFv)、嵌合抗体、双抗体 (diabody) 和包含足以赋予多肽特异性抗原结合的抗体的至少一部分的多肽。

[0046] 从 N 端至 C 端,抗体的成熟轻链和重链可变结构域都包含区域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。本文中氨基酸至各结构域的分配依照 Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 和 1991)), 或 Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); 或 Chothia 等人 *Nature* 342:878-883 (1989) 中的定义。

[0047] 如本文中所使用的,以编号提及的抗体与从相同编号的杂交瘤获得的单克隆抗体相同。例如,单克隆抗体 4.40 是与从杂交瘤 4.40 或其亚克隆获得的抗体相同的抗体。连续的亚克隆称为例如 4.40.1、4.40.2 和 4.40.3,并且具有大体上相同的序列和功能性。

[0048] 如本文中所使用的, Fd 片段意指由 V_H 和 C_H1 结构域组成的抗体片段; Fv 片段由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成; 以及 dAb 片段 (Ward 等人, *Nature* 341:544-546 (1989)) 由 V_H 结构域组成。

[0049] 在一些情况下,抗体是单链抗体 (例如, scFv), 其中 V_L 和 V_H 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的合成连接体配对形成单价分子。(参见,例如, Bird 等人, *Science* 242:423-426 (1988) 和 Huston 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988))。在一些情况下,抗体是双抗体,即,是双价抗体,其中 V_H 和 V_L 结构域在单个多肽链上表达,但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位。(参见,例如, Holliger P. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), 和 Poljak R. J. 等人, *Structure* 2:1121-1123 (1994))。在一些情况下,来自本文中的抗体的一个或多个 CDR 可被共价地或非共价地整合入分子以使其成为特异性结合 CCR2 的免疫粘附素。在此类情况下,可将 CDR 整合为更大的多肽链的部分,可将其共价连接至另一条多肽链,或可将其非共价地整合。在具有一个或多个结合部位的情况下,结合部位可彼此相同或可以不同。

[0050] 如本文中所使用的,术语“人抗体”意指其中可变和恒定结构域序列是人序列的任何抗体。该术语包括具有来源于人基因的序列 (其已被改变以例如减少可能的免疫原性、增加亲和力、消除可能引起不期望的折叠的半胱氨酸等) 的抗体。该术语还包括在非人细胞中重组产生的此类抗体,所述非人细胞可能赋予与人细胞赋予的典型糖基化形式不同的

糖基化。可以以许多方法如本文中描述的方法制备此类抗体。

[0051] 本文中使用的术语“嵌合抗体”意指包含来自两个或更多个不同的抗体的区域的抗体。在一种情况下,嵌合抗体的一个或多个 CDR 来源于人 CCR2 抗体。在另一种情况下,所有 CDR 来源于人 CCR2 抗体。在另一情况下,在嵌合抗体中组合来自多于一个人 CCR2 抗体的 CDR。例如,嵌合抗体可包含来自第一人抗 CCR2 抗体的轻链的 CDR1、来自第二人抗 CCR2 抗体的轻链的 CDR2 和来自第三人抗 CCR2 抗体的轻链的 CDR3,并且来自重链的 CDR 可来源于一个或多个其他抗 CCR2 抗体。此外,构架区可来源于从其获得一个或多个 CDR 的抗 CCR2 抗体之一或来源于一个或多个不同的人抗体。

[0052] 在一些情况下,嵌合抗体是人源化的抗 CCR2 抗体。人源化的抗 CCR2 抗体包含一个或多个构架区的氨基酸序列和 / 或来自一个或多个个人抗 CCR2 抗体的恒定区的至少一部分的氨基酸序列和来源于非人抗 CCR2 抗体的 CDR。

[0053] 抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物可由本领域技术人员按照本说明书的教导容易地制备。片段或类似物的优选氨基和羧基末端存在于功能性结构域的边界附近。

[0054] 本文中使用的术语“表面等离子体共振”是指允许通过检测生物传感器基质内蛋白质浓度的改变(例如使用 BIACORE™ 系统 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N. J.)) 来分析实时生物特异性相互作用的光学现象。关于进一步描述,参见 Jonsson U. 等人, *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26(1993); Jonsson U. 等人, *Biotechniques* 11:620-627(1991); Jonsson B. 等人, *J. Mol. Recognit.* 8:125-131(1995); 和 Johnsson B. 等人, *Anal. Biochem.* 198:268-277(1991)。

[0055] 术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。当解离常数 $\leq 1\text{mM}$, $\leq 100\text{nM}$ 或 $\leq 10\text{nM}$ 时,抗体被认为特异性结合抗原。在某些情况下, K_D 为 1pM 至 500pM 。在其他情况下, K_D 为 500pM 至 $1\text{ }\mu\text{M}$, $1\text{ }\mu\text{M}$ 至 100nM 或 100mM 至 10nM 。

[0056] 术语“表位”包括能够特异性结合免疫球蛋白或 T 细胞受体或与分子相互作用的任何蛋白质决定簇(determinant)。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。表位可以是“线性的”或“构象的”。在线性表位中,蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中,相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。一旦确定抗原上的期望的表位,就可例如使用本说明书中描述的技术产生抗该表位的抗体。可选择地,在发现过程中,抗体的产生和表征可阐明关于期望的表位的信息。根据该信息,则可能就与相同表位的结合竞争性筛选抗体。实现这一点的方法是进行竞争和交叉竞争研究以发现彼此竞争或交叉竞争与 CCR2 结合的抗体,例如竞争与抗原的结合的抗体。基于它们的交叉竞争“划分(bin)ing)”抗体的高通量方法描述于国际专利申请 WO 03/48731 中。

[0057] 如本文中所使用的,20 种常规氨基酸和其缩写遵从常规用法。参见 *Immunology-A Synthesis* (第 2 版, E. S. Golub 和 D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), 其通过引用合并入本文。

[0058] 术语“多核苷酸”,如本文中所指,表示长度为至少 10 个碱基的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或任一类型的核苷酸的修饰形式)的多聚体形式。该术语包括单链和双链形式。

[0059] 术语“分离的多核苷酸”，如本文中所使用的，意指基因组、cDNA 或合成来源的多核苷酸或其的一些组合，根据其来源，“分离的多核苷酸”(1) 不与和“分离的多核苷酸”一起被天然发现的多核苷酸的全部或部分结合，(2) 可操作地连接至与其非天然连接的多核苷酸，或 (3) 不作为更大的序列的一部分天然发生。

[0060] 术语“天然发生的核苷酸”，如本文中所使用的，包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。术语“修饰的核苷酸”，如本文中所使用的，包括例如具有修饰的或取代的糖基的核苷酸等。本文中提及的术语“寡核苷酸连接”包括寡核苷酸连接例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯 (phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯 (phosphorodiselenoate)、phosphoroanilothioate、phosphoraniladate、氨基磷酸酯 (phosphoroamidate) 等。参见，例如 LaPlanche 等人，Nucl. Acids Res. 14 :9081(1986) ;Stec 等人，J. Am. Chem. Soc. 106 :6077(1984) ;Stein 等人，Nucl. Acids Res. 16 :3209(1988) ;Zon 等人，Anti-Cancer Drug Design 6 :539(1991) ;Zon 等人，Oligonucleotides and Analogues : A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England(1991)) ;美国专利 5, 151, 510 ;Uhlmann 和 Peyman, Chemical Reviews 90 : 543(1990)，其公开内容通过引用合并入本文。需要时，寡核苷酸可包括用于检测的标记物。

[0061] “可操作地连接的”序列包括与目的基因邻近的表达控制序列和以反式或在远距离起作用以控制目的基因的表达控制序列。术语“表达控制序列”，如本文中所使用的，意指进行与它们连接的编码序列的表达和加工所必需的多核苷酸序列。表达控制序列包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列；有效的 RNA 加工信号例如剪接和多腺苷酸化信号；稳定细胞质 mRNA 的序列；提高翻译效率的序列（即，Kozak 共有序列）；增强蛋白质稳定性的序列；和当需要时，增强蛋白质分泌的序列。此类控制序列的性质视宿主生物而不同；在原核生物中，此类控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列；在真核生物中，一般而言，此类控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”意欲包括，在最低程度上，其存在是表达和加工所必需的所有元件，并且还可包括其存在是有利的另外的元件，例如前导序列和融合伴侣序列。

[0062] 术语“载体”，如本文中所使用的，是指能够转运已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一些情况下，载体是质粒，即，可将另外的 DNA 区段连接至其中的环状双链 DNA 片段。在一些情况下，载体是病毒载体，其中可将另外的 DNA 区段连接入病毒基因组。在一些情况下，载体能够在已向其中引入了它们的宿主细胞中自主复制（例如，具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）。在其他情况下，载体（例如，非附加型哺乳动物载体）可在引入宿主细胞后被整合入宿主细胞的基因组，从而可随宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够指导与它们可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”（或简称“表达载体”）。

[0063] 术语“重组宿主细胞”（或简称“宿主细胞”），如本文中所使用的，是指已向其中引入了重组表达载体的细胞。应当理解，“重组宿主细胞”和“宿主细胞”不仅指特定受试细胞而且还指这样的细胞的后代。因为某些修饰可由于突变或环境影响而在连续世代中发生，因此，这样的后代可能实际上与亲本细胞并不完全一致，但其仍然包括在本文中使用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0064] 术语“百分比序列同一性”，在核苷酸序列的背景中，是指当就最大相应性对齐时，

两个序列中相同的残基。存在许多本领域内已知的可用于测量核苷酸序列同一性的不同算法。例如,可使用 FASTA、Gap 或 Bestfit(其为 Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin 中的程序)比较多核苷酸序列。FASTA,其包括例如程序 FASTA2 和 FASTA3,提供质询序列与搜索序列之间最佳重叠的区域的比对和百分比序列同一性 (Pearson, Methods Enzymol. 183 :63-98(1990) ;Pearson, Methods Mol. Biol. 132 :185-219(2000) ;Pearson, Methods Enzymol. 266 :227-258(1996) ;Pearson, J. Mol. Biol. 276 :71-84(1998) ;通过引用合并入本文)。除非另外指出,否则使用特定程序或算法的缺省参数。例如,可使用 FASTA 和其缺省参数 (6 的字长和用于评分矩阵的 NOPAM 因子) 或使用 GCG Version 6.1(通过引用合并入本文) 中提供的 Gap 和其缺省参数来测定核苷酸序列之间的百分比序列同一性。

[0065] 除非另外指出,否则核苷酸序列包括其互补序列。因此,具有特定序列的核酸应当理解为包括具有其互补序列的其互补链。

[0066] 如本文中使用的,术语“百分比序列同一性”与“百分比序列同源性”可互换使用。

[0067] 术语“大体上的相似性”或“大体上的序列相似性”,当指核酸或其片段时,是指当通过适当的核苷酸插入或缺失与另一个核酸(或其互补链)最佳对齐时,在至少约 85%、至少约 90%和至少约 95%、96%、97%、98%或 99%的核苷酸碱基中存在核苷酸序列同一性,如通过任何熟知的序列同一性算法例如 FASTA、BLAST 或 Gap(如上论述的)测量的。

[0068] 当用于多肽时,术语“大体上的同一性”,是指两个肽序列,当例如使用程序 GAP 或 BESTFIT,利用程序提供的缺省缺口权重,进行最佳对齐时,共有至少 70%、75%或 80%的序列同一性,至少 90%或 95%的序列同一性,和至少 97%、98%或 99%的序列同一性。在某些情况下,不相同的残基位点相异在于保守氨基酸置换。“保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有拥有相似化学性质(例如,电荷或疏水性)的侧链 R 基团的另一个氨基酸残基置换的置换。一般地,保守氨基酸置换将基本上不改变蛋白质的功能性质。在其中两个或更多个氨基酸序列彼此相异在于保守置换的情况下,可上调百分比序列同一性以就置换的保守性质进行修正。用于进行该调整的方法对于本领域技术人员来说是熟知的。参见例如 Pearson, Methods Mol. Biol. 243 :307-31(1994)。具有拥有相似化学性质的侧链的氨基酸组的实例包括 1) 脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2) 脂肪族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3) 含酰胺侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4) 芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5) 碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6) 酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸;和 7) 含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。保守氨基酸置换组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0069] 可选择地,保守置换是在 Gonnet 等人, Science 256 :1443-45(1992)(通过引用合并入本文)中公开的 PAM250 对数似然矩阵(PAM250log-likelihood matrix)中具有正值的任何变化。“中度保守的”置换是在 PAM250 对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0070] 通常使用序列分析软件测量多肽的序列同一性。蛋白质分析软件使用分配给不同置换、缺失和其他修饰(包括保守氨基酸置换)的相似性的量度来匹配序列。例如,GCG 包括程序例如“Gap”和“Bestfit”,所述程序(使用由程序指定的缺省参数)可用于测定密切相关的多肽(例如来自不同生物物种的同源多肽)之间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的

序列同源性或序列同一性。参见,例如,GCG Version 6.1(University of Wisconsin,WI)。还可使用缺省或推荐的参数利用 FASTA 比较多肽序列,参见 GCG Version 6.1。FASTA(例如,FASTA2 和 FASTA3) 提供质询序列与搜索序列之间最佳重叠的区域的比对和百分比序列同一性(Pearson, Methods Enzymol. 183 :63-98(1990) ;Pearson, Methods Mol. Biol. 132 :185-219(2000))。当将序列与含有大量来自不同生物的序列的数据库相比较时,另一个优选算法是计算机程序 BLAST,特别地 blastp 或 tblastn(使用程序提供的缺省参数)。参见,例如,Altschul 等人,J. Mol. Biol. 215 :403-410(1990) ;Altschul 等人,Nucleic Acids Res. 25 :3389-402(1997)。

[0071] CCR2 是七跨膜域蛋白,并且因此其具有 6 个环。从细胞外 N 末端开始计数,环 1、3 和 5 是细胞内环,而环 2、4 和 6 是细胞外环。CCR2 的第 1、第 2 和第 3 细胞外环分别指环 2、4 和 6。

[0072] 在整个本说明书和权利要求书中,术语“包括”或变型例如“包含”或“含有”将被理解为意指包括所述整体(integer)或整体的组且不排除任何其他整体或整体的组。

[0073] 人抗 CCR2 抗体和其特征

[0074] 在一些情况下,提供了人抗 CCR2 抗体。在一些情况下,通过免疫非人转基因动物例如啮齿类动物(其基因组包含人免疫球蛋白基因以便所述转基因动物产生人抗体)来产生人抗 CCR2 抗体。在一些情况下,抗 CCR2 抗体和抗原结合部分包括但不限于这样的抗体或抗原结合部分,其(i)结合 CCR2 的第 1 或第 2 细胞外环或两者;(ii)不结合 CCR2 的 N 末端或第 3 细胞外环或两者;或(iii)(i)和(ii)两者。在另一种情况下,提供了结合包含 SEQ ID NO:128 或 SEQ ID NO:129 的氨基酸序列的多肽的人抗 CCR2 抗体。在另一种情况下,人抗 CCR2 抗体结合包含与 SEQ ID NO:128 或 SEQ ID NO:129 具有 80,85,90,95,96,97,98 或 99% 的同一性的氨基酸序列的多肽。在另一种情况下,抗 CCR2 抗体和抗原结合部分包括但不限于结合 CCR2 的第 3 细胞外环的抗体或抗原结合部分。

[0075] 基于序列同源性将 V_H 、 V_K 、 V_λ 基因分类入家族。如果它们在超过 80% 的位置上共有相同的核苷酸序列,则两种 V_H 、 V_K 或 V_λ 基因属于相同家族。抗 CCR2 抗体可包含人 κ 轻链(V_K)或人 λ 轻链(V_λ)或从其衍生的氨基酸序列。在一些包含 λ 轻链的情况下,轻链可变结构域(V_L)利用人 $V_\lambda 1$ 、 $V_\lambda 2$ 、 $V_\lambda 3$ 、 $V_\lambda 4$ 、 $V_\lambda 5$ 、 $V_\lambda 6$ 、 $V_\lambda 7$ 、 $V_\lambda 8$ 、 $V_\lambda 9$ 或 $V_\lambda 10$ 家族基因(Williams S. C. 等人 J. Mol. Bio. 264 :220-232, (1996))。

[0076] 在一些包含 κ 轻链的情况下,轻链可变结构域(V_L)利用人 $V_K I$ 、 $V_K II$ 、 $V_K III$ 、 $V_K IV$ 、 $V_K V$ 或 $V_K VI$ 家族基因(Cox J. P. L. 等人, Eur. J. Immunol 24 :827-836, (1994)),优选 $V_K I$ 、 $V_K II$ 、 $V_K IV$ 或 $V_K VI$ 家族基因,优选 $V_K I$ 或 $V_K VI$ 家族基因。在一些情况下,轻链种系序列选自人 V_K 序列,包括但不限于, A1、A10、A11、A14、A17、A18、A19、A2、A20、A23、A26、A27、A3、A30、A5、A7、B2、B3、L1、L10、L11、L12、L14、L15、L16、L18、L19、L2、L20、L22、L23、L24、L25、L4/18a、L5、L6、L8、L9、O1、O11、O12、O14、O18、O2、O4 和 O8。在某些情况下,该轻链人种系基因选自 V1-11、V1-13、V1-16、V1-17、V1-18、V1-19、V1-2、V1-20、V1-22、V1-3、V1-4、V1-5、V1-7、V1-9、V2-1、V2-11、V2-13、V2-14、V2-15、V2-17、V2-19、V2-6、V2-7、V2-8、V3-2、V3-3、V3-4、V4-1、V4-2、V4-3、V4-4、V4-6、V 5-1、V5-2、V5-4 和 V5-6。在某些情况下,轻链利用人 $V_K I$ O12、 $V_K II$ A1、 $V_K IV$ B3 或 $V_K VI$ A26 种系基因。

[0077] 抗 CCR2 抗体可包含利用人 $V_H 1$ 、 $V_H 2$ 、 $V_H 3$ 、 $V_H 4$ 、 $V_H 5$ 、 $V_H 6$ 或 $V_H 7$ 家族基因的重链可变结

构域 (V_H)。在特定的实例中,该重链人种系基因选自 VH1-18、VH1-2、VH1-24、VH1-3、VH1-45、VH1-46、VH1-58、VH1-69、VH1-8、VH2-26、VH2-5、VH2-70、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-16、VH3-20、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-33、VH3-35、VH3-38、VH3-43、VH3-48、VH3-49、VH3-53、VH3-64、VH3-66、VH3-7、VH3-72、VH3-73、VH3-74、VH3-9、VH4-28、VH4-31、VH4-34、VH4-39、VH4-4、VH4-59、VH4-61、VH5-51、VH6-1 和 VH7-81。在某些情况下,重链利用人 V_H I 1-46 或 V_H III 3-30 基因。

[0078] 在特定的情况下,轻链可变区和 / 或重链可变区包含构架区或至少部分的构架区 (例如,包含 2 或 3 亚区,例如 FR2 和 FR3)。在某些情况下,至少 FRL1、FRL2、FRL3 或 FRL4 是完全人的。在其他实例中,至少 FRH1、FRH2、FRH3 或 FRH4 是完全人的。在一些情况下,至少 FRL1、FRL2、FRL3 或 FRL4 是种系序列 (例如,人种系) 或包含特定构架的人共有序列 (可容易地在本文中描述的已知的人 Ig 序列的来源中获得)。在其他实例中,至少 FRH1、FRH2、FRH 3 或 FRH4 是种系序列 (例如,人种系) 或包含特定构架的人共有序列。

[0079] 在一些情况下,CCR2 抗体的 V_L 相对于人基因的种系氨基酸序列包含一个或多个氨基酸置换、缺失和 / 或插入。在一些情况下,抗 CCR2 抗体的 V_L 相对于种系氨基酸序列包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸置换。在一些情况下,一个或多个此类置换、缺失和 / 或插入位于轻链的 CDR 中。在一些情况下,相对于种系的氨基酸置换、缺失和 / 或插入在一个或多个与抗体 4.40、4.9、4.22、4.39 或 4.40A68GS230P 的任一个或多个 V_L 中相对于种系的置换、缺失和 / 或插入相同的位点上。例如,抗 CCR2 抗体的 V_L 可包含一个或多个在抗体 4.40 的 V_L 中发现的与种系相比较的氨基酸置换、缺失和 / 或插入。在一些情况下,氨基酸变化位于一个或多个相同的位点上,但牵涉与种系相比较不同的置换、缺失和 / 或插入。在一些情况下,置换可代表此类位置上相对于参照抗体中的氨基酸的保守氨基酸置换。例如,如果此类抗体之一中的特定位置相对于种系被置换并且是谷氨酸,那么在该位点上可用天冬氨酸置换。类似地,如果与种系相比较氨基酸置换是丝氨酸,那么可在该位置上用苏氨酸保守置换丝氨酸。

[0080] 在一些情况下,人抗 CCR2 抗体的轻链包含抗体 4.40 (SEQ ID NO:101); 4.9 (SEQ ID NO:29); 4.22 (SEQ ID NO:65); 4.39 (SEQ ID NO:194) 或 4.40 A68G S230P (SEQ ID NO:113) 的可变结构域 (V_L) 氨基酸序列;或具有直至 1,2,3,4,5,6,7,8,9 或 10 个保守氨基酸置换和 / 或总共直至 3 个非保守氨基酸置换的所述氨基酸序列。在一些情况下,轻链可包含 CDR1、CDR2 和 CDR3,其分别独立地选自抗体 4.40、4.9、4.22、4.39 或 4.40A68G S230P 的轻链的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3,或各自具有少于 4 个或少于 3 个保守氨基酸置换和 / 或总共 3 个或更少的非保守氨基酸置换的 CDR。在一些情况下,抗 CCR2 抗体的轻链包含轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3,其各自独立地选自单克隆抗体 4.40 (SEQ ID NO:100)、4.9 (SEQ ID NO:28)、4.22 (SEQ ID NO:64)、4.39 (SEQ ID NO:193) 或 4.40A68G S230P (SEQ ID NO:112) 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区。在一些情况下,抗 CCR2 抗体的轻链包含抗体 (其包含选自 4.40 (SEQ ID NO:101)、4.9 (SEQ ID NO:29)、4.22 (SEQ ID NO:65)、4.39 (SEQ ID NO:194) 或 4.40A68G S230P (SEQ ID NO:113) 的抗体的 V_L 区的氨基酸序列) 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3,或各自具有少于 4 个或少于 3 个保守氨基酸置换和 / 或总共 3 个或更少的非保守氨基酸置换的所述 CDR。某些抗体的 CDR 的序列标志符列于表 8 中。

[0081] 关于重链,在一些情况下,可变结构域 (V_H) 利用人 V_H 3-30 或 V_H 1-46 基因序列。在

一些情况下,抗 CCR2 抗体的 V_H 序列相对于种系氨基酸序列包含一个或多个氨基酸置换、缺失和 / 或插入 (添加)。在一些情况下,重链的可变结构域相对于种系氨基酸序列包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 个置换、缺失和 / 或插入。在一些情况下,与种系氨基酸序列相比较,置换是非保守置换。在一些情况下,置换、缺失和 / 或插入位于重链的 CDR 中。在一些情况下,在一个或多个与抗体 4.40、4.22、4.39 或 4.9 的任何一个或多个 V_H 中相对于种系的突变相同的位点上产生氨基酸置换、缺失和 / 或插入。在其他情况下,氨基酸置换、缺失和 / 或插入位于一个或多个相同的位点上,但牵涉与参照抗体中的不同的置换、缺失和 / 或插入。在一些情况下,抗体包含具有 SEQ ID NO :202 或 SEQ ID NO :203 的氨基酸序列的重链 CDR3。

[0082] 在一些情况下,重链包含抗体 4.40 (SEQ ID NO :83)、4.22 (SEQ ID NO :47)、4.9 (SEQ ID NO :11)、4.39 (SEQ ID NO :176) 的 V_H 氨基酸序列;或具有直至 1、2、3、4、6、8 或 10 个保守氨基酸置换和 / 或总共直至 3 个非保守氨基酸置换的所述 V_H 氨基酸序列。在一些情况下,重链包含任一上述抗体的从 CDR1 开始至 CDR3 结束的氨基酸序列。

[0083] 在一些情况下,重链包含抗体 4.40、4.22、4.39 或 4.9 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR 3,或各自具有少于 8 个、少于 6 个、少于 4 个或少于 3 个保守氨基酸置换和 / 或总共 3 个或更少的非保守氨基酸置换的所述 CDR。

[0084] 在一些情况下,重链 CDR 独立地选自抗体 4.40、4.22、4.39 或 4.9 的 CDR。在另一种情况下,重链包含独立地选自从 4.40 (SEQ ID NO :83)、4.22 (SEQ ID NO :47)、4.39 (SEQ ID NO :176) 或 4.9 (SEQ ID NO :11) 中选择的一个或多个 V_H 区的 CDR。在另一种情况下,抗体包含上文中公开的轻链和上文中公开的重链。在另外的情况下,轻链 CDR 和重链 CDR 来自相同的抗体。

[0085] 可产生的一种类型的氨基酸置换是改变抗体中的一个或多个半胱氨酸,所述半胱氨酸可与另一个残基例如但不限于丙氨酸或丝氨酸化学反应。在一种情况下,存在非典范 (canonical) 半胱氨酸的置换。可在抗体的可变结构域的 CDR 或构架区中或恒定结构域中产生置换。在一些情况下,半胱氨酸是典范的。

[0086] 可产生的另一种类型的氨基酸置换是改变抗体中任何潜在的蛋白质水解位点。此类位点可发生在抗体的可变结构域的 CDR 或构架区中或恒定结构域中。半胱氨酸残基的置换和蛋白质水解位点的去除可减少抗体产物中任何异质性的风险,从而增加其同质性。另一种类型的氨基酸置换是通过改变天冬酰胺和甘氨酸中的一个或两个来消除形成潜在的脱酰胺位点的天冬酰胺 - 甘氨酸对。在一些情况下,将氨基酸置换用于插入或去除糖基化位点。在一些情况下,可通过蛋白质水解或基因工程去除抗 CCR2 抗体的重链的 C 末端赖氨酸。在多种情况下,抗 CCR2 抗体的重链和轻链可任选地包括信号序列。

[0087] 在一个方面,抗体由杂交瘤产生。

[0088] 表 1 列出了示例性抗体的编码重链和轻链的全长和包含可变结构域的部分的核酸以及相应的推导的氨基酸序列的序列标识符 (SEQ ID NO)。

[0089] 表 1

[0090]

人抗 CCR2 抗体								
单克隆抗体	序列标识符 (SEQ ID NO:)							
	包含可变结构域的部分				全长			
	重链 (V _H)		轻链 (V _L)		重链		轻链	
	蛋白质	DNA	蛋白质	DNA	蛋白质	DNA	蛋白质	DNA
4. 40. 2	83	74	101	92	82	73	100	91
4. 40. 2 A68G S230P	83	74	113	110	116	115	112	109
4. 9. 2	11	2	29	20	10	1	28	19
4. 22. 3	47	38	65	56	46	37	64	55
4. 39. 3	176	167	194	185	175	166	193	184

[0091] 还提供了某些上述人抗 CCR2 抗体的包含一个或多个氨基酸置换的重链和 / 或轻链变体。为了命名变体, 第一个字母是天然发生的抗体链的氨基酸的单字母符号, 数字表示氨基酸的位置 (其中位置 1 是 N 末端氨基酸), 第二个字母是变异氨基酸的单字母符号。在一些情况下, 提供了重链变体。一个这样的重链变体是减少半单体 (half-monomer) 的形成的铰链区稳定性突变 (Angal, S. 等人 Molecular Immunology 30:105-108(1993))。4. 40 抗体重链变体的一个这样的铰链稳定性突变用脯氨酸置换了 SEQ ID NO:82 的位点 230 上的丝氨酸。编码 S230P 变体的 DNA 序列具有始于 SEQ ID NO:115 的位点 688 的 CCA 密码子。

[0092] 还提供了单克隆抗体 4. 40 的变异轻链。A68G 是由 SEQ ID NO:113 所示的 4. 40 轻链变体, 其中残基 68 是甘氨酸残基。在 DNA 序列中, A68G4. 40 变体由 SEQ ID NO:109 编码, 其中始于位点 252 的密码子是 GGG。

[0093] 在其他情况下, 可产生包含氨基酸变异的组合的抗体。变异的组合的实例是抗 CCR2 抗体 4. 40A68G S230P, 其在 4. 40 抗体的背景中包含轻链置换 A68G 和重链置换 S230P。包括了 4. 40 的变异重链和变异轻链的其他组合。

[0094] 在一种情况下, 抗 CCR2 抗体是 4. 40、4. 22、4. 39、4. 40A68G S230P 或 4. 9。在另外的情况下, 包括了含有与任何上文所列的人抗 CCR2 抗体的可变结构域氨基酸序列具有超过 80%、超过 85%、超过 90%、超过 95%、超过 96%、超过 97%、超过 98% 或超过 99% 的序列同一性的可变结构域氨基酸序列的抗体。

[0095] 抗 CCR2 抗体的种类和亚类

[0096] 抗 CCR2 抗体的种类和亚类可通过本领域已知的任何方法来确定。一般地, 可使用特异于特定抗体种类和亚类的抗体来确定抗体的种类和亚类。此类抗体是可商购获得的。可以通过 ELISA 或 Western 印迹以及其他技术来确定种类和亚类。可选择地, 可通过下列来确定种类和亚类: 测定抗体的轻链和 / 或重链的恒定结构域的全部或部分的序列, 将它们的氨基酸序列与不同种类和亚类的免疫球蛋白的已知的氨基酸序列相比较, 然后确定抗体的种类和亚类。

[0097] 在一些情况下, 抗 CCR2 抗体是单克隆抗体。抗 CCR2 抗体可以是 IgG、IgM、IgE、IgA 或 IgD 分子。在一种情况下, 抗 CCR2 抗体是属于例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚类

的 IgG。在另一种情况下,抗 CCR2 抗体是 IgG4。在另一种情况下,抗体是 IgG4 同种异型(isoallotype)(Ellison J. 和 Hood L., PNAS 79:1984-1988(1982); & Brusco A. 等人, Eur J. Immunogenetics 25:349-355(1998))。

[0098] 抗 CCR2 抗体对 CCR2 的结合亲和力

[0099] 在一些情况下,抗 CCR2 抗体以高亲和力结合 CCR2。

[0100] 在一些情况下,抗 CCR2 抗体以高亲和力结合 CCR2 的第 1 细胞外环,结合 CCR2 的第 2 细胞外环或结合由第 1 和第 2 细胞外环形成的表位。

[0101] 在相关的情况下,抗 CCR2 抗体结合由 SEQ ID NO:128 或 SEQ ID NO:129 中所示的氨基酸序列组成的多肽。

[0102] 在一些情况下,抗 CCR2 抗体不结合 CCR2 的第 3 细胞外环或 CCR2 的 N 末端结构域。

[0103] 在另一种情况下,抗 CCR2 抗体不结合由 SEQ ID NO:127 或 SEQ ID NO:130 中所示的序列组成的肽。在另一种情况下,抗 CCR2 抗体以约 2×10^{-7} M 或更低的 K_D ,以约 2×10^{-8} M 或更低的 K_D ,以约 2×10^{-9} M 或更低的 K_D ,以约 1×10^{-9} M 或更低的 K_D ,以约 9×10^{-10} M 或更低的 K_D ,以约 8×10^{-10} M 或更低的 K_D ,以约 7×10^{-10} M 或更低的 K_D ,以约 6×10^{-10} M 或更低的 K_D ,以约 5×10^{-10} M 或更低的 K_D ,以约 4×10^{-10} M 或更低的 K_D ,以约 3×10^{-10} M 或更低的 K_D ,以约 2×10^{-10} M 或更低的 K_D 结合 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环。在某些情况下,抗体以大体上与选自 4.40、4.9、4.22、4.39 或 4.40A68G S230P 的抗体相同的 K_D 结合 CCR2 或结合 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环。在另一种情况下,抗体以大体上与抗体(所述抗体包含具有于 SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:176 或 SEQ ID NO:47 中发现的 V_H 区的氨基酸序列的重链可变结构域)相同的 K_D 结合 CCR2 或结合 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环。在另一种情况下,抗体以大体上与抗体(所述抗体包含具有于 SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:194 或 SEQ ID NO:65 中发现的 V_L 区的氨基酸序列的轻链可变结构域的 CDR 或包含具有于 SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:176 或 SEQ ID NO:47 中发现的 V_H 区的氨基酸序列的重链可变结构域的 CDR) 相同的 K_D 结合 CCR2。

[0104] 在一些情况下,抗 CCR2 抗体可具有低解离速率常数(k_{off})。在一些情况下,抗 CCR2 抗体可以以 $1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ 或更低的 k_{off} 、 $5.0 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或更低的 k_{off} 或 $2 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或更低的 k_{off} 结合 CCR2,或更优选结合 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环。在一些情况下, k_{off} 可以与本文中描述的抗体包括选自 4.40、4.9、4.22、4.39 和 4.40A68G S230P 的抗体大体上相同。在一些情况下,抗体可以以与抗体(所述抗体包含选自 4.40、4.9 和 4.40A68G S230P 的抗体的重链的 CDR 或轻链的 CDR) 大体上相同的 k_{off} 结合 CCR2 或结合 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环。在一些情况下,抗体可以以与抗体(所述抗体包含(i)具有在 SEQ ID NO:83 或 SEQ ID NO:11 中发现的 V_H 区的氨基酸序列的重链可变结构域;(ii)具有在 SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:29 中发现的 V_L 区的氨基酸序列的轻链可变结构域,或(iii)(i)和(ii))大体上相同的 k_{off} 结合 CCR2 或结合 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环。在另一种情况下,抗体可以以与抗体(所述抗体包含具有在 SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:113 或 SEQ ID NO:29 中发现的 V_L 区的氨基酸序列的轻链可变结构域的 CDR;和具有 SEQ ID NO:83 或 SEQ ID NO:11 中发现的 V_H 区的氨基酸序列的重链可变结构域的 CDR) 大体上相同的 k_{off} 结合 CCR2 或结合 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环。

[0105] 抗 CCR2 抗体对 CCR2 的结合亲和力和解离速率可使用本领域已知的方法来测定。

结合亲和力可使用 ELISA、RIA、流式细胞术和表面等离子体共振术例如 BIACORE™ 来测量。解离速率可使用表面等离子体共振术来测量。可通过使用本领域已知的方法来确定抗体是否具有与抗 CCR2 抗体大体上相同的 K_D 。实施例 5 例举了用于测定抗 CCR2 单克隆抗体的亲和力和常数的方法。

[0106] 被抗 CCR2 抗体识别的 CCR2 表位的鉴定

[0107] 提供了人抗 CCR2 单克隆抗体,所述单克隆抗体结合 CCR2 并且可与下列抗体竞争或交叉竞争和 / 或结合与下列抗体相同的表位:(a) 选自 4.40、4.9、4.22、4.39 和 4.40A68G S230P 的抗体;(b) 包含具有 SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:176 或 SEQ ID NO:47 中发现的可变结构域的氨基酸序列的重链可变结构域的抗体,(c) 包含具有 SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:194 或 SEQ ID NO:65 中发现的可变结构域的氨基酸序列的轻链可变结构域的抗体,或 (d) 包含 (b) 中定义的重链可变结构域和 (c) 中定义的轻链可变结构域的抗体。如果两个抗体彼此相互竞争对 CCR2 的结合,则认为它们交叉竞争。

[0108] 可通过使用本领域已知的方法来确定抗体是否与本文中提供的抗 CCR2 抗体结合相同的表位、竞争或交叉竞争结合。在一种情况下,让本文中提供的抗 CCR2 抗体在饱和条件下结合 CCR2,然后测量受试抗体结合 CCR2 的能力。如果受试抗体能够与提供的抗 CCR2 抗体同时结合 CCR2,那么受试抗体结合与抗 CCR2 抗体不同的表位。然而,如果受试抗体不能同时结合 CCR2,那么受试抗体结合相同的表位、重叠的表位或与本文中提供的人抗 CCR2 抗体所结合的表位十分靠近的表位。为了确定受试抗体是否与参照抗体交叉竞争,进行交换 (reversing) 抗体顺序的实验,即,让测试抗体结合 CCR2,然后测量本文中提供的抗 CCR2 抗体结合 CCR2 的能力。此类实验可使用 ELISA、RIA、BIACORE™ 或流式细胞术 (FACS) 来进行。

[0109] 抗 CCR2 抗体对 CCR2 活性的抑制

[0110] 在一些情况下,提供了抑制 CCR2-介导的信号转导的抗 CCR2 抗体。在其他情况下,提供了抑制 MCP-1、MCP-2、MCP-3 和 / 或 MCP-4 介导的通过 CCR2 的信号转导的抗 CCR2 抗体。在其他情况下,提供了抑制 MCP-1、MCP-2、MCP-3 和 / 或 MCP-4 与 CCR2 的结合的抗 CCR2 抗体。在一种情况下,CCR2 是人 CCR2。在一些情况下,CCR2 是人 CCR2A、CCR2B 或两者。在其他情况下,抗 CCR2 抗体是人抗体。

[0111] 可在配体结合测定例如 ELISA、RIA 或相关测定和基于细胞的测定例如表达 CCR2 的细胞的趋化作用测定中测量抗 CCR2 抗体的 IC_{50} 。在多种情况下,抗体或其抗原结合部分以不超过 $5 \mu g/ml$ 、不超过 $1 \mu g/ml$ 、不超过 $0.5 \mu g/ml$ 或不超过 $0.20 \mu g/ml$ 的 IC_{50} 抑制 MCP-1 与 CCR2 之间的配体结合,如通过 ELISA 测定所测量的。

[0112] 在另一种情况下,提供了在 CCR2 配体例如 MCP-1 (CCL2)、MCP-2、MCP-3 和 / 或 MCP-4 存在的情况下减少 CCR2 的激活的抗 CCR2 抗体。在一种情况下,抗 CCR2 抗体可抑制 CCR2 配体诱导的 (i) G-蛋白激活, (ii) 腺苷酸环化酶激活, (iii) 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 激活, (iv) 胞质钙动员, (v) ERK 磷酸化, (vi) 趋化作用或 (vii) 肌动蛋白多聚化。可通过测定用放射性标记的 GTP 标记的细胞中 G-蛋白的 GTP/GDP 比率,通过测量 GTPγS 掺入,通过使用钙生色团测量胞质钙流或通过测量细胞中 MAPK 的磷酸化状态来确定在 MCP-1 存在的情况下抗 CCR2 抗体是否可阻止、抑制或减少 CCR2 的激活。在例如 Gabrilin

等人, *Biochem Biophys Res Commun.* 327(2):533-40(2005) 和 Jimenez-Sainz 等人, *Mol Pharmacol.* 64(3):773-82(2003) 中描述了用于检测 CCR2 激活和 / 或 MCP-1 与 CCR2 的结合的测定。

[0113] 在一种情况下,可使用趋化作用测定确定 CCR2 激活的水平。在一些情况下,使用趋化作用测定测量的 IC_{50} 不超过 $5 \mu g/ml$, 不超过 $1 \mu g/ml$, 不超过 $0.5 \mu g/ml$ 或不超过 $0.20 \mu g/ml$ 。实施例 10 例举了通过监控钙动员测量抗 CCR2 抗体对 CCR2 的抑制的一种类型的测定。

[0114] 在另一个方面,将细胞与抗体接触可导致细胞表面 CCR2 的表达在与抗体一起温育后下调。在一些情况下,温育可以是短时期(例如,4 小时)或更长的时期(例如,24 小时)。可使用 Western 印迹、ELISA 或 FACS 分析来测量细胞表面 CCR2 表达的下调。在特定的情况下,将细胞与抗体接触可导致细胞表面 CCR2 的表达至少 6% 的减少,至少 10% 的减少,至少 20% 的减少,至少 30% 的减少或至少 50% 的减少,如通过 Western 印迹或 ELISA 测量的。

[0115] 在另一个方面,抗体减少 MCP-1 诱导的 pERK 磷酸化。可使用 Western 印迹、ELISA 或 FACS 分析测量 MCP-1 诱导的 pERK 磷酸化的下调。在特定的情况下,抗体产生 MCP-1 诱导的 pERK 磷酸化的至少 6% 的减少,至少 10% 的减少,至少 20% 的减少,至少 30% 的减少或至少 50% 的减少,如通过 FACS 分析测量的。

[0116] 利用抗 CCR2 抗体体内抑制趋化作用

[0117] 根据一些情况,提供了体内抑制免疫细胞的趋化作用的抗 CCR2 抗体。其趋化作用被抑制的免疫细胞包括外周血单核细胞、THP 细胞、单核细胞、记忆 T 淋巴细胞、树突细胞、嗜碱性粒细胞、天然杀伤细胞和过继转移的 CCR2+ 细胞 (adoptively transferred CCR2+cell)。在一个情况下,抗 CCR2 抗体抑制免疫细胞响应 MCP-1、MCP-2、MCP-3 和 MCP-4 中的一种或多种的趋化作用。在一种情况下,趋化因子是 MCP-1。在另一种情况下,趋化因子是 MCP-3。抗 CCR2 抗体可抑制至炎症或损伤的位置的趋化作用。

[0118] 根据一些情况,还提供了抑制非免疫细胞的趋化作用的抗 CCR2 抗体,所述细胞包括但不限于成纤维细胞样滑膜细胞 (FLS) (参见 Garcia-Vicuna 等人, *Arthritis Rheum.* 50(12):3866-77(2004))、成体神经干细胞 (参见 Widera 等人, *Eur J Cell Biol.* 83(8):381-7(2004)) 和人胎儿星形细胞 (参见 Andjelkovic 等人, *J Neurosci Res.* 70(2):219-31(2002))。

[0119] 在一种情况下,与未处理的动物中的细胞的趋化作用相比较,抗体抑制细胞趋化作用。在另一种情况下,抗 CCR2 抗体减少趋化作用至少 30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100%。在一种情况下,在用抗体开始处理动物后至少 1 小时测量趋化作用的抑制。在另一种情况下,在用抗体开始处理动物后至少 7 天测量趋化作用的抑制。在另一种情况下,抗 CCR2 抗体导致至少 10% 至 100% 的趋化作用抑制。

[0120] 物种和分子选择性

[0121] 在另一个方面中,抗 CCR2 抗体显示物种和分子选择性。在一些情况下,抗 CCR2 抗体结合人和食蟹猴 CCR2。抗 CCR2 抗体可结合另外的非人灵长类动物的 CCR2。在一些情况下,抗 CCR2 抗体不结合小鼠或大鼠 CCR2。按照本说明书的教导,可使用本领域熟知的方法

测定抗 CCR2 抗体的物种选择性。例如,可使用 Western 印迹、流式细胞术、ELISA、免疫沉淀或 RIA 测定物种选择性。在一种情况下,可使用流式细胞术测定物种选择性。在另一种情况下,可通过使用来自该物种的细胞评估抗体抑制 MCP-1 功能响应的能力来测定物种特异性。这可包括趋化作用、肌动蛋白多聚化、钙动员等。

[0122] 在另一种情况下,抗 CCR2 抗体对于由 SEQ ID NO :126 (人 CCR2B) 中所示的氨基酸序列组成的多肽具有优于对由 SEQ ID NO :131 (人 CCR5) 所示的氨基酸序列组成的多肽的选择性。在另一种情况下,抗 CCR2 抗体对于 CCR2 具有优于 CCR5 至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 25 倍、至少 50 倍或至少 100 倍的选择性。在另一种情况下,人抗 CCR2 抗体结合包含与 SEQ ID NO :126 具有 80,85,90,95,96,97,98 或 99% 的同一性的氨基酸序列的多肽。

[0123] 在另一种情况下,抗 CCR2 抗体对于由 SEQ ID NO :125 (人 CCR2A) 中所示的氨基酸序列组成的多肽可具有优于由 SEQ ID NO :131 (人 CCR5) 中所示的氨基酸序列组成的多肽至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 25 倍、至少 50 倍或至少 100 倍的选择性。在另一种情况下,人抗 CCR2 抗体结合包含与 SEQ ID NO :125 具有 80、85、90、95、96、97、98 或 99% 的同一性的氨基酸序列的多肽。

[0124] 可按照本说明书的教导,使用本领域熟知的方法测定抗 CCR2 抗体对 CCR2 的选择性。例如,可使用 Western 印迹、流式细胞术、ELISA、免疫沉淀或 RIA 和 / 或功能性测定例如趋化作用、钙动员或肌动蛋白多聚化来测定选择性。

[0125] 产生抗体和抗体产生性细胞系的方法

[0126] 免疫

[0127] 在一些情况下,通过用 CCR2 抗原免疫在其基因组中包含一些或全部人免疫球蛋白重链和轻链基因座的非人转基因动物来产生人抗体。在一种情况下,非人动物是 XENOMOUSE™ 动物。(Amgen Fremont, Inc. (formerly Abgenix, Inc.), Fremont, CA)。

[0128] XENOMOUSE™ 小鼠是包含大片段的人免疫球蛋白重链和轻链基因座并且在小鼠抗体产生中具有缺陷的基因工程改造的小鼠品系。参见,例如,Green 等人, Nature Genetics 7:13-21 (1994) 和美国专利 5,916,771,5,939,598,5,985,615,5,998,209,6,075,181,6,091,001,6,114,598,6,130,364,6,162,963 和 6,150,584。也参见 WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560 和 WO 00/037504。

[0129] 在另一个方面,提供了通过用 CCR2 抗原免疫包含人免疫球蛋白基因座的非人转基因动物来从非人、非小鼠动物产生抗 CCR2 抗体的方法。可使用上述文献中描述的方法产生此类动物。可如美国专利 5,994,619 (其通过引用合并入本文) 中所述改进这些文献中公开的方法。美国专利 5,994,619 描述了产生新型培养的内细胞团 (CICM) 细胞和细胞系 (来源于猪和牛) 和已向其中引入了异源 DNA 的转基因 CICM 细胞的方法。可将 CICM 转基因细胞用于产生克隆的转基因胚胎、胎儿和后代。' 619 专利还描述了产生能够将异源 DNA 传递至其后代的转基因动物的方法。在优选情况下,非人动物是哺乳动物,特别是大鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马。

[0130] XENOMOUSE™ 小鼠产生完全人抗体的成体样人库 (repertoire) 和产生抗原特异性人抗体。在一些情况下, XENOMOUSE™ 小鼠通过引入人重链基因座和 κ 轻链基因座的种

系结构片段 (configuration fragment) 而包含约 80% 的人抗体 V 基因库。在其他情况下, XENOMOUSE™ 小鼠还包含约全部人 λ 轻链基因座。参见 Mendez 等人, Nature Genetics 15 : 146-156 (1997), Green 和 Jakobovits, J. Exp. Med. 188 :483-495 (1998), 和 W0 98/24893, 其公开内容通过引用合并入本文。

[0131] 在另一种情况下, 使用从修饰的胚胎干 (ES) 细胞直接立即产生遗传上改变的小鼠的 VELOCIMOUSE™ 技术 (Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, NY.) 来产生抗体 (Poueymirou W. T., 等人, Nature Biotechnology 25 :91-99 (2007))。

[0132] 在一些情况下, 包含人免疫球蛋白基因的非人动物是具有人免疫球蛋白“微小基因座 (minilocus)”的动物。在微小基因座方法中, 通过包含来自 Ig 基因座的单独基因来模拟外源 Ig 基因座。因此, 将一个或多个 V_H 基因、一个或多个 D_H 基因、一个或多个 J_H 基因、 μ 恒定结构域和第二恒定结构域 (优选 γ 恒定结构域) 形成用于插入动物的构建体。该方法, 特别地, 描述于美国专利 5, 545, 807, 5, 545, 806, 5, 569, 825, 5, 625, 126, 5, 633, 425, 5, 661, 016, 5, 770, 429, 5, 789, 650, 5, 814, 318, 5, 591, 669, 5, 612, 205, 5, 721, 367, 5, 789, 215 和 5, 643, 763 (通过引用合并入本文) 中。

[0133] 在另一个方面, 提供了用于产生人源化抗 CCR2 抗体的方法。在一些情况下, 如本文中描述的, 在允许抗体产生的条件下用 CCR2 抗原免疫非人动物。从动物分离抗体产生性细胞, 并且分离编码目的抗 CCR2 抗体的重链和轻链的核酸。然后使用本领域技术人员已知的和下面进一步描述的技术对这些核酸进行工程改造, 以减少非人序列的量, 即人源化抗体以减小在人中的免疫应答。

[0134] 在一些情况下, CCR2 抗原是分离的和 / 或纯化的 CCR2。在一种情况下, CCR2 抗原是人 CCR2。在一些情况下, CCR2 抗原是 CCR2 的片段。在一些情况下, CCR2 片段是 CCR2 的细胞外环、N 末端结构域或 C 末端。在某些情况下, CCR2 片段包含 CCR2 的第 1 或第 2 细胞外环。在其他情况下, CCR2 片段包含 SEQ ID NO :128 或 SEQ ID NO :129 中所示的氨基酸序列。

[0135] 在其他情况下, CCR2 片段不包含 CCR2 的第 3 细胞外环或 N 末端结构域。

[0136] 在其他情况下, CCR2 片段不包含 SEQ ID NO :127 或 SEQ ID NO :130 中所示的氨基酸序列。在一些情况下, CCR2 片段包含 CCR2 的至少一个表位。在其他情况下, CCR2 抗原是在其表面上表达或过表达 CCR2 或其免疫原性片段的细胞。在一些情况下, CCR2 抗原是 CCR2 融合蛋白。在一些情况下, CCR2 是合成的肽免疫原。

[0137] 可利用本领域已知的任何方法免疫动物。参见, 例如, Harlow 和 Lane, Antibodies :A Laboratory Manual, New York :Cold Spring Harbor Press, 1990。用于免疫非人动物例如小鼠、大鼠、绵羊、山羊、猪、牛或马的方法在本领域内是熟知的。参见, 例如, Harlow 和 Lane, 同上以及美国专利 5, 994, 619。在一种情况下, 将 CCR2 抗体与佐剂一起施用以刺激免疫应答。示例性佐剂包括完全或不完全弗氏佐剂、RIBI (胞壁酰二肽) 或 ISCOM (免疫刺激复合物)。此类佐剂可通过将多肽隔离在局部沉积物中来保护多肽免受快速分散, 或它们可包含刺激宿主分泌对于巨噬细胞和免疫系统的其他组分具有趋化作用的因子的物质。如果将要施用多肽, 那么免疫接种安排将包括在数周内展开的两次或更多次的多肽的施用。实施例 1 例举了用于在 XENOMOUSE™ 小鼠中产生抗 CCR2 单克隆抗体的方法。

[0138] 抗体和抗体产生性细胞系的产生

[0139] 在用 CCR2 抗原免疫动物后,可从动物获得抗体和 / 或抗体产生性细胞。在一些情况下,通过采血或杀死动物从动物获得含有抗 CCR2 抗体的血清。可使用血清(如其从动物获得的),可从血清获得免疫球蛋白级分,或可从血清纯化抗 CCR2 抗体。

[0140] 在一些情况下,从分离自经免疫的动物的细胞制备产生抗体的永生化细胞系。在免疫后,杀死动物,然后通过本领域内已知的任何方法使外周血,淋巴结和 / 或脾 B 细胞永生化。永生化细胞的方法包括但不限于,用癌基因转染它们,用致癌病毒感染它们和在选永生生化细胞的条件下培养它们,将它们经历致癌或突变化合物,将它们与永生化细胞例如骨髓瘤细胞融合,以及使肿瘤抑制基因失活。参见,例如,Harlow 和 Lane,同上。如果使用与骨髓瘤细胞的融合,那么骨髓瘤细胞优选不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌型细胞系)。使用 CCR2 或其部分或表达 CCR2 的细胞筛选永生生化细胞。在一种情况下,CCR2 部分(i) 包含 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环;(ii) 包含 SEQ ID NO:128 和 / 或 SEQ ID NO:129 中所示的氨基酸序列;(iii) 不包含 CCR2 的第 3 细胞外环和 / 或 N 末端结构域;(iv) 不包含 SEQ ID NO:127 和 / 或 SEQ ID NO:130 中所示的氨基酸序列;或(v) 其组合。在一种情况下,使用酶联免疫测定(ELISA)或放射性免疫测定来进行初步筛选。在 WO 00/37504(通过引用合并入本文)中提供了 ELISA 筛选的实例。

[0141] 选择、克隆产生抗 CCR2 抗体的细胞例如杂交瘤并且就期望的特征(包括旺盛的生长、高抗体产量和期望的抗体特征)对其进行进一步筛选,如下文中进一步论述的。可在同基因动物(syngeneic animal)中,在缺乏免疫系统的动物例如裸小鼠中体内扩增或在细胞培养物中体外扩增杂交瘤。选择、克隆和扩增杂交瘤的方法对于本领域技术人员来说是熟知的。

[0142] 在一个方面,免疫的动物是表达人免疫球蛋白基因的非人动物,并且将脾 B 细胞融合至来自与该非人动物相同物种的骨髓瘤细胞系。在示例性情况下,免疫的动物是 XENOMOUSE™ 小鼠,并且骨髓瘤细胞系是非分泌型小鼠骨髓瘤。在一种情况下,骨髓瘤细胞系是 P3-X63-Ag8.653(美国典型培养物保藏中心)。参见,例如实施例 1。

[0143] 通过测试由细胞产生的抗体是否结合包含 CCR2 的第 1 或第 2 细胞外环的氨基酸序列的肽来筛选永生化的抗体产生性细胞,以鉴定抗 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环的抗体。可选择地或组合地,可就与嵌合趋化因子受体的结合测试由细胞产生的抗体,所述受体主要具有另一种趋化因子受体的序列和 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环的序列。参见实施例 8,其例举了嵌合体用于对抗 CCR2 抗体进行表位作图的用途。在互补的情况下,可就与嵌合趋化因子受体的结合测试由细胞产生的已知结合 CCR2 的抗体,所述受体主要具有 CCR2 的序列但缺乏 CCR2 的野生型第 1 和 / 或第 2 细胞外环,例如,具有来自另一种细胞因子受体的第 1 和 / 或第 2 细胞外环或在此类细胞外环的一个或两个中包含突变。

[0144] 在另一个方面,提供了产生人抗 CCR2 抗体的细胞和细胞系(包括杂交瘤)。在一种情况下,由细胞、细胞系或杂交瘤产生的人抗 CCR2 抗体是 CCR2 的拮抗剂。在另一种情况下,人抗 CCR2 抗体(i) 结合 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环;(ii) 结合 SEQ ID NO:128 和 / 或 SEQ ID NO:129 中所示的氨基酸序列;(iii) 不结合 CCR2 的第 3 细胞外环和 / 或 N 末端结构域;(iv) 不结合 SEQ ID NO:127 和 / 或 SEQ ID NO:130 中所示的氨基酸序列;或(v) 其组合。在另一种情况下,由细胞、细胞系或杂交瘤产生的人抗 CCR2 抗体不以高亲和力

结合第 3 细胞外环,不以高亲和力结合 CCR2 的 N 末端结构域或不以高亲和力结合任一者。

[0145] 在另一个方面,用 CCR2 免疫转基因动物,从免疫的转基因动物分离原代细胞例如脾或外周血细胞,并鉴定产生特异于期望的抗原的抗体的单个细胞。例如,分离来自每一个单个细胞的多腺苷酸化 mRNA,使用与变区序列退火的有义引物(例如识别大部分或全部人重链和轻链可变区基因的 FR1 区的简并引物)和与恒定区或铰链(J)区序列退火的反义引物进行逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)。然后克隆重链和轻链可变结构域的 cDNA,将其在任何适当的宿主细胞例如骨髓瘤细胞中表达为具有各自的免疫球蛋白恒定区例如重链和 κ 或 λ 恒定结构域的嵌合抗体。参 Babcook, J. S. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7843-48(1996),其通过引用合并入本文。然后可如本文中所述鉴定和分离抗 CCR2 抗体。

[0146] 在另一个方面,可使用噬菌体展示技术提供包含对于 CCR2 具有不同的亲和力的抗体的库的文库。可将原代 B 细胞直接用作 DNA 的来源。将获自 B 细胞(其例如来源于脾)的 cDNA 的混合物用于制备表达文库,例如,转染入大肠杆菌(*E. coli*.)的噬菌体展示文库。就对 CCR2 的免疫反应性测试所得的细胞。Griffiths 等人, *EMBO J.* 13:3245-3260(1994); Nissim 等人, *ibid*, pp. 692-698 和 Griffiths 等人, *ibid*, 12:725-734(通过引用合并入本文)描述了用于从此类文库鉴定高亲和力人抗体的技术。最终,鉴定来自文库的克隆,其对于抗原产生期望量级的结合亲和力,回收编码负责这样的结合的产物的 DNA,并操作其以进行标准重组表达。还可使用之前操作的核苷酸序列构建噬菌体展示文库,并且以相似的方式进行筛选。一般地,独立地提供编码重链和轻链的 cDNA,或将其连接以形成用于在噬菌体文库中产生的 Fv 类似物。

[0147] 然后就具有对于 CCR2 的最高亲和力的抗体筛选噬菌体文库,并从适当的克隆回收遗传物质。更多轮次的筛选可增加分离的原始抗体的亲和力。

[0148] 产生抗体的核酸、载体、宿主细胞和重组方法

[0149] 核酸

[0150] 还包括编码抗 CCR2 抗体或其抗原结合部分的核酸分子。在一些情况下,不同核酸分子编码抗 CCR2 免疫球蛋白的重链和轻链。在其他情况下,相同核酸分子编码抗 CCR2 免疫球蛋白的重链和轻链。在一种情况下,核酸编码 CCR2 抗体或其抗原结合部分。

[0151] 在一些情况下,编码轻链的可变结构域(V_L)的核酸分子包含人 $V_{\kappa 1}$, $V_{\kappa 2}$, $V_{\kappa 3}$, $V_{\kappa 4}$, $V_{\kappa 5}$ 或 $V_{\kappa 6}$ 基因家族区段和具有或不具有相对于种系的突变的 $J_{\kappa 1}$, $J_{\kappa 2}$, $J_{\kappa 4}$ 或 $J_{\kappa 5}$ 基因区段。

[0152] 在一些情况下,编码轻链的核酸分子编码相对于种系氨基酸序列包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个置换的氨基酸序列。在一些情况下,核酸分子包含核苷酸序列,所述核苷酸序列编码与种系 V_{κ} 和 J_{κ} 序列相比较包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸置换和/或 1、2 或 3 个非保守置换的 V_L 氨基酸序列。置换可存在于 CDR、构架区中或恒定结构域中。

[0153] 在一些情况下,核酸分子编码与种系序列相比较包含一个或多个变异的 V_L 氨基酸序列,所述变异与抗体 4.40、4.9、4.22、4.39 或 4.40A68GS230P 之一的 V_L 中发现的变异相同。在一些情况下,核酸编码 V_L 氨基酸序列,所述氨基酸序列在与本文提供的 CCR2 抗体中相对于种系的突变相同的一个或多个位置上包含突变,但包含不同的置换(在一些情况下,与提供的抗体中的置换相比较,保守置换)。

[0154] 在一些情况下,与在抗体 4.40、4.9、4.22、4.39 或 4.40A68G S230P 之一的 V_L 中发现的种系序列相比较,核酸分子编码至少 3 个氨基酸置换。

[0155] 在一些情况下,核酸分子包含编码单克隆抗体 4.40 (SEQ ID NO:101)、4.9 (SEQ ID NO:29)、4.22 (SEQ ID NO:65)、4.39 (SEQ ID NO:194) 或 4.40A68G S230P (SEQ ID NO:113) 的 V_L 氨基酸序列或其变体或部分的核苷酸序列。在一些情况下,核酸编码包含上述抗体之一的轻链 CDR 的氨基酸序列。在一些情况下,所述部分是包含 CDR1-CDR3 的连续部分。

[0156] 在一些情况下,核酸分子编码与抗体 4.40、4.9、4.22、4.39 或 4.40A68G S230P 的任一个 V_L 区的 V_L 氨基酸序列或 SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:194 或 SEQ ID NO:65 的任一个的 V_L 区的氨基酸序列至少 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 或 99% 同一的 V_L 氨基酸序列。核酸分子包括编码 SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:65 中发现的 V_L 区的核酸。

[0157] 在另一种情况下,核酸分子编码选自 4.40、4.9、4.22、4.39 或 4.40A68G S230P 的抗体的全长轻链,或包含 SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:193 或 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的轻链,或包含突变例如本文中公开的突变的所述轻链序列。

[0158] 在另一种情况下,核酸分子编码重链的可变结构域 (V_H),其包含人 3-30 或 1-46 V_H 基因序列或来源于其的序列。在不同的情况下,核酸分子利用人 3-30 V_H 基因序列、人 D1-7 基因序列和人 J_H 3B 基因序列;人 1-46 V_H 基因序列、人 D1-7 基因序列和人 J_H 3B 基因序列;或来源于人基因的序列。

[0159] 在一些情况下,核酸分子编码与人 V、D 或 J 基因的种系氨基酸序列相比较包含 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 或 18 个突变的氨基酸序列。在一些情况下,所述突变存在于 V_H 区中。在一些情况下,所述突变存在于 CDR 中。

[0160] 在一些情况下,核酸分子编码与种系序列相比较包含一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列,所述突变与在单克隆抗体 4.40、4.22、4.39 或 4.9 的 V_H 中发现的氨基酸突变相同。在一些情况下,与种系序列相比较,核酸编码至少 3 个氨基酸突变,所述突变与上述单克隆抗体之一中发现的至少 3 个氨基酸突变相同。

[0161] 在一些情况下,核酸分子包含核苷酸序列,所述核苷酸序列编码选自 4.40 (SEQ ID NO:83)、4.22 (SEQ ID NO:47)、4.39 (SEQ ID NO:176) 或 4.9 (SEQ ID NO:11) 的单克隆抗体的 V_H 氨基酸序列的至少一部分、其变体或具有保守氨基酸置换和 / 或总共 3 个或更少的非保守氨基酸置换的所述序列。在不同情况下,序列编码一个或多个 CDR、CDR3 区、全部 3 个 CDR、包括 CDR1-CDR3 的连续部分或整个 V_H 区 (具有或不具有信号序列)。

[0162] 在一些情况下,核酸分子包含核苷酸序列,所述核苷酸序列编码 SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:175 或 SEQ ID NO:116 之一的氨基酸序列或具有信号序列的所述序列。在一些优选情况下,核酸分子包含 SEQ ID NO:73 或 SEQ ID NO:115 的核苷酸序列的至少一部分或具有信号序列的所述序列。在一些情况下,所述部分编码 V_H 区 (具有或不具有信号序列)、CDR3 区、全部 3 个 CDR 或包括 CDR1-CDR3 的连续区域。

[0163] 在一些情况下,核酸分子编码与抗体 4.40、4.9、4.22、4.39 或 4.40A68G S230P 的任一 V_H 区的 V_H 氨基酸序列或 SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:176 或 SEQ ID NO:11 的任一个的 V_H 区的氨基酸序列至少 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 或 99%

同一的 V_H 氨基酸序列。还包括编码 4.40 (SEQ ID NO:83)、4.22 (SEQ ID NO:47)、4.39 (SEQ ID NO:176) 或 4.9 (SEQ ID NO:11) 或其 V_H 区的氨基酸序列的核酸,或具有 SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:167、SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的核酸或编码其 V_H 区的核酸。

[0164] 在另一种情况下,核酸编码选自 4.40、4.22、4.9、4.39 或 4.40A68GS230P 的抗体的全长重链或具有 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:175 或 SEQ ID NO:116 的氨基酸序列的重链(具有或不具有信号序列)或包含突变(例如本文中论述的变异之一)的重链。此外,核酸可包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:166 或 SEQ ID NO:115 的核苷酸序列或编码包含突变(例如本文中论述的变异之一)的重链的核酸分子。

[0165] 编码抗 CCR2 抗体的重链或轻链或其部分的核酸分子可从产生这样的抗体的任何来源分离。在不同的情况下,从 B 细胞(分离自用 CCR2 免疫的动物)或从来源于表达抗 CCR2 抗体的这样的 B 细胞的永生细胞分离核酸分子。分离编码抗体的 mRNA 的方法在本领域内是熟知的。参见,例如, Sambrook 等人。可将 mRNA 用于产生用于聚合酶链式反应(PCR)或抗体基因的 cDNA 克隆的 cDNA。在一种情况下,从杂交瘤分离核酸分子,所述杂交瘤将来自非人转基因动物的人免疫球蛋白产生性细胞作为其融合伴侣之一。在其他情况下,从 XENOMOUSE™ 动物分离人免疫球蛋白产生性细胞。在另一种情况下,人免疫球蛋白产生性细胞来自本文中所述的非人、非小鼠转基因动物。在另一种情况下,从非人、非转基因动物分离核酸。从非人、非转基因动物分离的核酸分子可用于例如人源化的抗体。

[0166] 在一些情况下,编码抗 CCR2 抗体的重链的核酸包含与来自任何来源的编码重链恒定结构域的核苷酸序列符合读框地连接的编码 V_H 结构域的核苷酸序列。类似地,编码抗 CCR2 抗体的轻链的核酸分子可包含与来自任何来源的编码轻链恒定结构域的核苷酸序列符合读框地连接的编码 V_L 结构域的核苷酸序列。

[0167] 在另外的方面中,将编码重(V_H)和/或轻(V_L)链的可变结构域的核酸分子“转换”成长抗体基因。在一种情况下,通过将编码 V_H 或 V_L 结构域的核酸分子分别插入已编码重链恒定(C_H)或轻链恒定(C_L)结构域的表达载体(以便将 V_H 区段可操作地连接至载体内的 C_H 区段,和/或将 V_L 区段可操作地连接至载体内的 C_L 区段)来将所述核酸分子转换成全长抗体基因。在另一种情况下,通过使用标准分子生物学技术将编码 V_H 和/或 V_L 结构域的核酸分子连接例如连接至编码 C_H 和/或 C_L 结构域的核酸分子来将编码 V_H 和/或 V_L 结构域的核酸分子转换成全长抗体基因。人重链和轻链免疫球蛋白恒定结构域基因的核苷酸序列在本领域是已知的。参见例如, Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, NIH Publ. No. 91-3242, 1991。然后可从已将编码全长重链和/或轻链的核酸分子引入其中的细胞表达所述核酸分子,并且分离抗 CCR2 抗体。

[0168] 可将核酸分子用于重组表达抗 CCR2 抗体。核酸分子还可用于产生嵌合抗体、双特异性抗体、单链抗体、免疫粘附素、双抗体、突变的抗体和抗体衍生物,如下文中进一步描述的。如果核酸分子来源于非人、非转基因动物,那么核酸分子可用于抗体人源化,如本文中所描述的。

[0169] 在一些情况下,提供了编码全长重链或全长轻链的核酸,其中编码恒定区氨基酸序列的核苷酸序列与种系人恒定区序列相比较包含一个或多个突变。例如,核酸可编码通过添加或去除糖基化位点或编码提高抗体的稳定性或半衰期的置换来改善抗体的性质的

氨基酸置换。核酸还可包含“沉默”突变以添加或去除限制性酶位点,例如以促进核酸至特定表达载体内的克隆。

[0170] 载体

[0171] 提供了包含核酸分子的载体,所述核酸分子编码抗 CCR2 抗体的重链和 / 或轻链或其抗原结合部分。还提供了包含编码融合蛋白、修饰的抗体、抗体片段和其探针的核酸分子的载体。

[0172] 在一些情况下,将如本文所述获得的编码部分或全长轻链和 / 或重链的 DNA 插入表达载体,以便将基因可操作地连接至需要的表达控制序列例如转录和翻译控制序列,从而表达抗 CCR2 抗体或抗原结合部分。表达载体包括质粒、逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒(AAV)、植物病毒例如花椰菜花叶病毒、烟草花叶病毒、粘粒、YAC 和 EBV 衍生附加体等。在一些情况下,将抗体基因连接入载体以便载体内的转录和翻译控制序列能够发挥它们期望的调控抗体基因的转录和翻译的功能。选择表达载体和表达控制序列以与使用的表达宿主细胞相容。可将抗体轻链基因和抗体重链基因插入分开的载体或插入相同的表达载体。利用标准方法(例如,抗体基因片段与载体上的互补限制性位点的连接,或者如果不存在限制性位点则平端连接)将抗体基因插入表达载体。

[0173] 方便的载体是这样的载体,其编码功能上完整的人 C_H 或 C_L 免疫球蛋白序列,具有适当的经工程改造的限制性位点以便任何 V_H 或 V_L 序列可插入和表达,如本文所述的。在此类载体中,剪接通常在插入的 J 区中的剪接供体位点与人 C 结构域之前的剪接受体位点之间发生,也可在存在于人 C_H 外显子中的剪接区域上发生。多腺苷酸化和转录终止在编码区下游的天然染色体位点上发生。重组表达载体还可编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可将抗体链基因克隆入载体以便信号肽符合读框地连接至免疫球蛋白链的氨基端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽)。

[0174] 除了抗体链基因外,重组表达载体具有控制抗体链基因在宿主细胞中的表达的调控序列。本领域技术人员理解,表达载体的设计(包括调控序列的选择)可取决于这样的因素例如待转化的宿主细胞的选择、期望的蛋白质表达水平等。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调控序列包括在哺乳动物细胞中指导高水平的蛋白质表达的病毒元件,例如来源于逆转录病毒 LTR、巨细胞病毒(CMV)(例如 CMV 启动子 / 增强子),猿猴病毒 40(SV40)(例如 SV40 启动子 / 增强子)、腺病毒(例如,腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))、多瘤和强哺乳动物启动子例如天然免疫球蛋白和肌动蛋白启动子的启动子和 / 或增强子。关于病毒调控元件和其序列的进一步描述,参见例如,美国专利 5,168,062、美国专利 4,510,245 和美国专利 4,968,615。用于在植物中表达抗体(包括启动子和载体的描述)以及植物的转化的方法,在本领域内是已知的。参见,例如,美国专利 6,517,529,其通过引用合并入本文。在细菌细胞或真菌细胞例如酵母细胞中表达多肽的方法在本领域内也是熟知的。

[0175] 除了抗体链基因和调控序列外,重组表达载体可携带另外的序列,例如调控载体在宿主细胞中的复制的序列(例如,复制起点)和选择标记基因。选择标记基因帮助选择已向其中引入了载体的宿主细胞(参见例如,美国专利 4,399,216、4,634,665 和 5,179,017,其通过引用合并入本文)。例如,通常选择标记基因为向其中引入了载体的宿主细胞提供对药物例如 G418、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性。优选的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于使用甲氨蝶呤选择 / 扩增的 dhfr- 宿主细胞)、neo 基因(用于 G418 选

择)和谷氨酸合成酶(GS)基因。

[0176] 非杂交瘤宿主细胞和重组产生蛋白质的方法

[0177] 编码抗 CCR2 抗体的核酸分子和包含此类核酸分子的载体可用于转染适当的哺乳动物、植物、细菌、昆虫或酵母宿主细胞。可以通过将多核苷酸引入宿主细胞的任何已知的方法来进行转化。用于将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法在本领域内是熟知的并且包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、多核苷酸在脂质体中的封装和 DNA 至细胞核内的直接显微注射。此外,可利用病毒载体将核酸分子引入哺乳动物细胞。转化细胞的方法在本领域内是熟知的。参见,例如,美国专利 4,399,216、4,912,040、4,740,461 和 4,959,455(其通过引用合并入本文)。转化植物细胞的方法在本领域内是熟知的,包括,例如农杆菌(*Agrobacterium*)介导的转化、基因枪转化(biolistic transformation)、直接注射、电穿孔和病毒转化。用于转化细菌、昆虫细胞和酵母细胞的方法在本领域内也是熟知的。

[0178] 可获得作为用于表达的宿主的哺乳动物细胞系在本领域内是熟知的,其包括许多可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的永生化的细胞系。特别地,此类细胞包括例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0 细胞、NS0 细胞、SP2 细胞、HEK-293T 细胞、NIH-3T3 细胞、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(例如, Hep G2)、A549 细胞和许多其他细胞系。通过确定哪些细胞系具有高表达水平来选择特别优选的细胞系。可使用的其他细胞系是昆虫细胞系例如 Sf9 或 Sf21 细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞时,通过培养宿主细胞并进行足以允许抗体在宿主细胞中表达或允许抗体分泌入培养宿主细胞的培养基中的时间来产生抗体。可使用标准蛋白质纯化方法来从培养基回收抗体。植物宿主细胞包括例如烟草、拟南芥、浮萍、玉米、小麦、马铃薯等。细菌宿主细胞包括大肠杆菌(*E. coli*)和链霉菌属(*Streptomyces*)的种。酵母宿主细胞包括粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。

[0179] 此外,可使用许多已知的技术来增强抗体从产生性细胞系的表达。例如,谷氨酰胺合成酶基因表达系统(GS 系统)是用于在某些条件下增强表达的常用方法。在与欧洲专利 216846、256055、323997 和 338841 相关的全部或部分中论述了 GS 系统。

[0180] 由不同细胞系或在转基因动物中表达的抗体可能具有彼此不同的糖基化。然而,由本文中提供的核酸分子编码的或包含本文中提供的氨基酸序列的所有抗体都是本公开内容的部分,无论抗体的糖基化如何。

[0181] 转基因动物和植物

[0182] 还可通过产生就目的免疫球蛋白重链和轻链序列进行转基因并且以可回收的形式从其产生抗体的哺乳动物或植物来转基因地产生抗 CCR2 抗体。关于哺乳动物中的转基因产生,可在山羊、牛或其他哺乳动物的奶中产生并且回收抗 CCR2 抗体。参见,例如,美国专利 5,827,690、5,756,687、5,750,172 和 5,741,957(通过引用合并入本文)。在一些情况下,如本文中描述的,用 CCR2 或其免疫原性部分免疫包含人免疫球蛋白基因座的非人转基因动物。在例如美国专利 6,046,037 和 5,959,177(通过引用合并入本文)中描述了用于在植物中产生抗体的方法。

[0183] 在一些情况下,通过利用标准转基因技术将一个或多个编码抗 CCR2 抗体的核酸

分子引入动物或植物来产生非人转基因动物或植物。参见 Hogan 和美国专利 6,417,429, 同上。用于产生转基因动物的转基因细胞可以是胚胎干细胞或体细胞或受精卵。转基因非人生物可以是嵌合的、非嵌合的杂合子和非嵌合的纯合子。参见,例如, Hogan 等人, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* 第 2 版, Cold Spring Harbor Press(1999); Jackson 等人, *Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press(2000); 和 Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press(1999), 其全部通过引用合并入本文。在一些情况下,转基因非人动物具有被编码目的重链和 / 或轻链的靶向构建体靶向的破坏和置换。在一种情况下,转基因动物包含和表达编码重链和轻链的核酸分子,所述重链和轻链特异性结合 CCR2,和优选 (i) 结合 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环;(ii) 不结合 CCR2 的 N 末端或第 3 细胞外环或两者;或 (iii) (i) 和 (ii) 两者。在一种情况下,转基因动物包含和表达编码特异性结合人 CCR2 的重链和轻链的核酸分子。在一些情况下,转基因动物包含编码修饰的抗体例如单链抗体、嵌合抗体或人源化抗体的核酸分子。可在任何转基因动物中产生抗 CCR2 抗体。在一种情况下,非人动物是小鼠、大鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马。非人转基因动物在血液、奶、尿、唾液、眼泪、粘液和其他体液中表达所述编码的多肽。

[0184] 噬菌体展示文库

[0185] 提供了用于产生抗 CCR2 抗体或其抗原结合部分的方法,其包括步骤:在噬菌体上合成抗体文库,用 CCR2 或其部分筛选文库,分离结合 CCR2 的噬菌体,以及从噬菌体获得抗体。例如,用于制备抗体文库(其用于噬菌体展示技术)的一个方法包括步骤:用 CCR2 或其抗原性部分免疫包含人免疫球蛋白基因座的非人动物以产生免疫应答,从免疫的动物提取抗体产生性细胞;从提取的细胞分离编码抗体的重链和轻链的 RNA,逆转录 RNA 以产生 cDNA,使用引物扩增 cDNA,然后将 cDNA 插入噬菌体展示载体以便在噬菌体上表达抗体。可用该方法获得重组抗 CCR2 抗体。

[0186] 可通过筛选重组组合抗体文库来分离重组抗 CCR2 人抗体。文库可以是使用从分离自 B 细胞的 mRNA 制备的人 V_L 和 V_H cDNA 产生的 scFv 噬菌体展示文库。用于制备和筛选此类文库的方法在本领域内是已知的。用于产生噬菌体展示文库的试剂盒是可商购获得的(例如,Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catalog no. 27-9400-01; 和 Stratagene SurfZAP™ 噬菌体展示试剂盒, catalog no. 240612)。还存在可用于产生和筛选抗体展示文库的其他方法和试剂(参见,例如,美国专利 5,223,409;PCT 公开案 WO 92/18619、WO91/17271、WO 92/20791、WO 92/15679、WO 93/01288、WO 92/01047、WO 92/09690;Fuchs 等人, *Bio/Technology* 9:1370-1372(1991);Hay 等人, *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85(1992);Huse 等人, *Science* 246:1275-1281(1989);McCafferty 等人, *Nature* 348:552-554(1990);Griffiths 等人, *EMBO J.* 12:725-734(1993);Hawkins 等人, *J. Mol. Biol.* 226:889-896(1992);Clackson 等人, *Nature* 352:624-628(1991);Gram 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580(1992);Garrod 等人, *Bio/Technology* 9:1373-1377(1991);Hoogenboom 等人, *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137(1991);和 Barbas 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982(1991),其全部通过引用合并入本文。

[0187] 在一种情况下,为了分离和产生具有期望的特征的人抗 CCR2 抗体,首先使用 PCT 公开案 WO 93/06213(其通过引用合并入本文)中描述的表位印迹法将本文中描述的人抗

CCR2 抗体用于选择具有对 CCR2 的相似结合活性的人重链和轻链序列。用于该方法的抗体文库可以是如 PCT 公开案 WO 92/01047, McCafferty 等人, Nature 348 :552-554 (1990) ; 和 Griffiths 等人, EMBO J. 12 :725-734 (1993) (其全部通过引用合并入本文) 中所述制备和筛选的 scFv 文库。可使用人 CCR2 作为抗原来筛选 scFv 抗体文库。

[0188] 在选择了初始的人 V_L 和 V_H 结构域后, 进行“混合和匹配 (mix and match)”实验, 其中就 CCR2 结合筛选初始选择的 V_L 和 V_H 区段的不同配对以选择优选的 V_L/V_H 配对组合。此外, 为了进一步提高抗体的质量, 可在与体内体细胞突变过程 (其在天然免疫应答过程中负责抗体的亲和力成熟) 相似的过程中, 随机突变优选的 V_L/V_H 对的 V_L 和 V_H 区段 (优选在 V_H 和 / 或 V_L 的 CDR3 区域内)。可通过使用分别与 V_H CDR3 或 V_L CDR3 互补的 PCR 引物扩增 V_H 和 V_L 结构域来完成该体外亲和力成熟, 所述引物已在某些位点上用 4 种核苷酸碱基的随机混合物进行“掺杂”以便所得的 PCR 产物编码已将随机突变引入 V_H 和 / 或 V_L CDR3 区域的 V_H 和 V_L 区段。可就对 CCR2 的结合再筛选这些随机突变的 V_H 和 V_L 区段。

[0189] 在从重组免疫球蛋白展示文库筛选和分离抗 CCR2 抗体后, 可从展示包装 (例如, 从噬菌体基因组) 回收编码所选择的抗体的核酸, 然后通过标准重组 DNA 技术将其亚克隆入其他表达载体。需要时, 还可操纵核酸以产生其他抗体形式, 如本文中所描述的。为了表达通过筛选组合文库而分离的重组人抗体, 如本文中所描述的, 将编码抗体的 DNA 克隆入重组表达载体并且引入哺乳动物宿主细胞。

[0190] 种类转换 (Class switching)

[0191] 另一个方面提供了将抗 CCR2 抗体的种类或亚类转换成另一个种类或亚类的方法。在一些情况下, 使用本领域熟知的方法分离编码 V_L 或 V_H 的核酸分子, 其不包含编码 C_L 或 C_H 的序列。然后将核酸分子可操作地连接至编码来自期望的免疫球蛋白种类或亚类的 C_L 或 C_H 的核苷酸序列。这可使用包含 C_L 或 C_H 链的载体或核酸分子来实现, 如本文中所描述的。例如, 可将本来是 IgM 的抗 CCR2 抗体种类转换成 IgG。此外, 种类转换可用于将一个 IgG 亚类转换成另一个亚类, 例如将 IgG1 或 IgG2 转换成 IgG4。用于产生抗体 (其包括期望的同种型) 的另一个方法包括步骤: 分离编码抗 CCR2 抗体的重链的核酸和编码抗 CCR2 抗体的轻链的核酸, 分离编码 V_H 区的序列, 将 V_H 序列连接至编码期望的同种型的重链恒定结构域的序列, 在细胞中表达轻链基因和重链构建体, 然后收集具有期望的同种型的抗 CCR2 抗体。

[0192] 去免疫化的抗体

[0193] 在另一个方面, 可使用例如 PCT 公开案 W098/52976 和 W000/34317 (其通过引用合并入本文) 中描述的技术将抗体去免疫化以减小其免疫原性。

[0194] 突变的抗体

[0195] 在另一个方面中, 可将核酸分子、载体和宿主细胞用于产生突变的抗 CCR2 抗体。可在重链和 / 或轻链的可变结构域中突变抗体例如以改变抗体的结合性质。例如, 可在一个或多个 CDR 中产生突变以增加或减少抗体对 CCR2 的 K_D , 增加或减少 k_{off} , 或改变抗体的结合特异性。定点诱变中的技术在本领域内是熟知的。参见, 例如, Sambrook 等人和 Ausubel 等人, 同上。在另一种情况下, 可在氨基酸残基 (其在单克隆抗体 4.40、4.9、4.22、4.39 或 4.40A68G S230P 中与种系相比较已知被改变) 上产生一个或多个突变。可在可变结构域的 CDR 或构架区中或恒定结构域中产生突变。在一种情况下, 在可变结构域中产生突变。在一

些情况下,在氨基酸残基(其在选自 SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:194 或 SEQ ID NO:113 的氨基酸序列的可变结构域的 CDR 或构架区中与种系相比较已知被改变)上产生一个或多个突变。

[0196] 在另一个方面中,突变构架区以便所得的构架区具有相应种系基因的氨基酸序列。可在构架区或恒定结构域中产生突变以增加抗 CCR2 抗体的半衰期。参见,例如,PCT 公开案 WO 00/09560,通过引用合并入本文。还可在构架区或恒定结构域中产生突变以改变或减少抗体的免疫原性,为与另一个分子的共价或非共价结合提供位点,添加或删除一个或多个糖基化位点或改变这样的性质例如补体结合、FcR 结合和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。单个抗体可在可变结构域的任何个或多个 CDR 或构架区中或在恒定结构域中具有突变。

[0197] 在一些情况下,与突变前的抗 CCR2 抗体相比较,突变的抗 CCR2 抗体的 V_H 或 V_L 结构域中存在 1 至 8 个(包括其间的任何数量)的氨基酸突变。在任何上述抗体中,突变可存在于一个或多个 CDR 中。此外,任一突变可以是保守氨基酸置换。在一些情况下,在恒定结构域中存在不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸变化。

[0198] 修饰的抗体

[0199] 在另一个方面中,可产生包含连接至另一种多肽的抗 CCR2 抗体的全部或部分的融合抗体或免疫粘附素。在一种情况下,只将抗 CCR2 抗体的可变结构域连接至多肽。在另一种情况下,将抗 CCR2 抗体的 V_H 结构域连接至第一多肽,同时以使 V_H 和 V_L 结构域可彼此相互作用以形成抗原结合位点的方式将抗 CCR2 抗体的 V_L 结构域连接至与第一多肽结合的第二多肽。在另一种情况下,通过连接体将 V_H 结构域与 V_L 结构域分开以便 V_H 和 V_L 结构域可彼此相互作用(参见下文,单链抗体)。然后将 V_H -连接体- V_L 抗体连接至目的多肽。融合抗体可用于指导多肽至表达 CCR2 的细胞或组织。多肽可以是治疗剂例如毒素、趋化因子或其他调控蛋白,或可以是诊断剂,例如可容易地显现的酶例如辣根过氧化物酶。此外,可产生其中两个(或更多个)单链抗体彼此连接的融合蛋白。如果想要在单条多肽链上产生双价或多价抗体或如果想要产生双特异性抗体,这是非常有用的。

[0200] 为了产生单链抗体(scFv),将编码 V_H 和编码 V_L 的 DNA 片段可操作地连接至编码柔性连接体(例如编码氨基酸序列 $(Gly_4-Ser)_3$)的另一个片段,以便 V_H 和 V_L 序列可表达为连续单链蛋白,且 V_L 和 V_H 结构域通过柔性连接体连接。参见例如,Bird 等人 Science 242:423-426(1988);Huston 等人 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883(1988);McCafferty 等人, Nature 348:552-554(1990)。如果只使用单个 V_H 和 V_L ,则单链抗体可以是单价的,如果使用两个 V_H 和 V_L ,则其可以是二价的,或如果使用 2 个以上的 V_H 和 V_L ,则其可以是多价的。可产生特异性结合 CCR2 和另一个分子的双特异性或多价抗体。

[0201] 在另一个方面中,可使用编码抗 CCR2 抗体的核酸分子制备其他修饰的抗体。例如,可按照本说明书的教导使用标准分子生物学技术制备“Kappa bodies”(Ill 等人, Protein Eng. 10:949-57(1997))、“微小抗体”(Martin 等, EMBO J. 13:5303-9(1994))、“双抗体”(Holliger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993))或“Janusins”(Traunecker 等, EMBO J. 10:3655-3659(1991) 和 Traunecker 等, Int. J. Cancer(Suppl.)7:51-52(1992))。

[0202] 可利用许多方法（包括杂交瘤的融合或 Fab' 片段的连接）产生双特异性抗体或抗原结合片段。参见，例如，Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79 : 315-321 (1990), Kostelny 等人, J. Immunol. 148 :1547-1553 (1992)。此外，可将双特异性抗体形成“双抗体”或“Janusins”。在一些情况下，双特异性抗体结合 CCR2 的两个不同表位。在一些情况下，双特异性抗体具有来自单克隆抗体 4.40、4.9 或 4.40 A68G S230P 的第一重链和第一轻链以及另外的抗体的重链和轻链。在一些情况下，另外的轻链和重链也来自上文鉴定的单克隆抗体之一，但与第一重链和轻链不同。

[0203] 在一些情况下，使用来自本文中提供的人抗 CCR2 单克隆抗体的一个或多个可变结构域或 CDR 来制备本文中描述的修饰的抗体。

[0204] 衍生的和标记的抗体

[0205] 可衍生抗 CCR2 抗体或抗原结合部分或将其连接至另一个分子（例如，另一个肽或蛋白质）。一般地，衍生抗体或其部分以使 CCR2 结合不受衍生或标记不利地影响。因此，抗体和抗体部分旨在包括本文中描述的人抗 CCR2 抗体的原封不动（intact）的形式和修饰的形式。例如，可将抗体或抗体部分功能性地连接（通过化学偶联、基因融合、非共价结合等）至一个或多个其他分子实体，例如另一个抗体（例如，双特异性抗体或双抗体）、检测试剂、细胞毒性剂、药剂和 / 或可介导抗体或抗体部分与另一个分子的结合的蛋白质或肽（例如链霉抗生物素蛋白核心区或多组氨酸标签）。

[0206] 通过交联两种或更多种抗体（相同类型或不同类型的，例如，以产生双特异性抗体）来产生一种类型的衍生抗体。合适的交联剂包括具有被适当的间隔子分隔的两个不同的反应性基团的异双功能的（例如，m-马来酰亚胺基苯甲酰基 -N-羟基琥珀酰亚胺酯）或同双功能的（例如，二琥珀酰亚胺基辛二酸酯）交联剂。此类交联剂可从 Pierce Chemical Company, Rockford, IL 获得。

[0207] 另一种类型的衍生抗体是标记抗体。可用其衍生抗体或抗原结合部分的有用的检测试剂包括荧光化合物，包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白、5-二甲胺基-1-萘磺酰氯、镧系元素磷光体等。抗体还可用于检测的酶标记，所述酶例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等。当用可检测的酶标记抗体时，通过加入另外的试剂（酶可用其产生可辨别的反应产物）来检测酶。例如，当提供试剂辣根过氧化物酶时，过氧化氢和二氨基联苯胺的加入导致可检测的有色反应产物。还可用于生物素标记抗体，并通过间接测量抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白的结合来对其进行检测。还可用于预先确定的被第二报道分子识别的多肽表位（例如，亮氨酸拉链对序列，二抗的结合部分，金属结合结构域、表位标签）标记抗体。在一些情况下，通过不同长度的间隔臂连接标记以减小潜在的空间位阻。

[0208] 还可用于放射性标记的氨基酸标记抗 CCR2 抗体。放射性标记可用于诊断和治疗目的。例如，放射性标记可用于通过 X 射线或其他诊断技术检测表达 CCR2 的肿瘤。此外，还可在治疗上将放射性标记用作癌细胞或肿瘤的毒素。用于多肽的标记物的实例包括但不限于下列放射性同位素或放射性核素—— ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 和 ^{131}I 。

[0209] 还可用于化学基团例如聚乙二醇（PEG）、甲基或乙基或碳水化合物基团衍生抗 CCR2 抗体。此类基团可用于改进抗体的生物学特征，例如用于增加血清半衰期或增加组织结合。

[0210] 在一些情况下，可用顺磁性、放射性或荧光离子或部分（其在成像后可检测）标记

抗 CCR2 抗体。

[0211] 在一些情况下,顺磁性离子是铬 (III), 锰 (II), 铁 (III), 铁 (II), 钴 (II), 镍 (II), 铜 (II), 钼 (III), 钆 (III), 铈 (III), 钷 (III), 钆 (II), 铽 (III), 镱 (III), 铊 (III) 或铊 (III)。在其他情况下,放射性离子是碘 123, 铪 99, 铟 111, 铪 188, 铪 186, 铜 67, 碘 131, 钷 90, 碘 125, 碲 211 和镓 67。在其他情况下,用 X 射线显象剂例如镧 (III), 金 (III)、铅 (II) 和铋 (III) 标记抗 CCR2 抗体。

[0212] 药物组合物和试剂盒

[0213] 提供了包含具有拮抗剂性质的人抗 CCR2 抗体的组合物。此类组合物 可用于治疗其中 CCR2 具有作用的病症,包括但不限于肝纤维化、肾纤维化、肺纤维化、银屑病、炎症病症、变应性病症、自身免疫疾病、移植排斥病症、动脉粥样硬化、肥胖症、HIV 感染、神经性疼痛、与缺血关联的炎症、狭窄和再狭窄、癌症、脓毒症、硬皮病和糖尿病。在一些情况下,治疗是对由丙型肝炎病毒 (HCV)、乙型肝炎病毒 (HBV)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 和 / 或酒精诱导的脂肪性肝炎 (ASH) 的介导的肝纤维化的治疗。在一些情况下,受试者需要减少白细胞至组织例如为炎症应答的位置的组织内的浸润。在一些情况下,治疗的受试者是人。在其他情况下,受试者是兽医的受试者。需要减少炎症或减少白细胞浸润的组织的实例包括但不限于结缔组织、软骨、肝、肺、肾、神经组织包括脑、脊髓和周围神经组织、心脏、血管、食管、胃、小肠、大肠、结肠、前列腺、胰腺、泌尿道、卵巢、乳房、子宫、睾丸、阴茎、骨、肌肉、甲状腺、肾上腺、垂体、脂肪组织、骨髓、血液、胸腺、脾、淋巴结、皮肤、眼、耳或鼻。在一种情况下,组织是具有粘膜表面的组织。

[0214] 如本文中所使用的,“药学可接受的载体”是指生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。药学可接受的载体的一些实例例如是水、盐溶液、磷酸缓冲盐溶液、葡萄糖、甘油、乙醇等以及其组合。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇例如甘露醇、山梨醇或氯化钠。药学可接受的物质的另外的实例是湿润剂或少量辅助物质例如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其增加抗体的贮存期限或功效。

[0215] 组合物可以以多种形式存在,例如液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液 (例如,可注射和可输注溶液)、分散体或悬浮液、片剂、丸剂、粉剂、脂质体和栓剂。形式取决于期望的施用模式和治疗应用。典型的组合物以可注射或可输注溶液的形式存在,例如与用于人的被动免疫的组合物相似的组合物。优选的施用模式是胃肠外的 (例如,静脉内、皮下、腹膜内、肌内)。在一种情况下,通过静脉内输注或注射施用抗体。在另一种情况下,通过肌内或皮下注射施用抗体。

[0216] 治疗组合物在制造和贮存条件下必须是无菌且稳定的。可将组合 物配制为溶液、微乳剂、分散体、脂质体或适合于高药物浓度的其他有序结构。可通过将抗 CCR2 抗体以需要的量与上面列举的成分之一或组合 (需要时) 一起掺入适当的溶剂中,然后进行过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。通常,通过将活性化合物掺入包含基本分散介质和来自上文列举的成分的需要的其他成分的无菌媒介物来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉剂的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分加上来自之前其灭菌过滤的溶液的任何另外想要的成分的粉剂。可以例如通过使用包衣例如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持需要的颗粒大小,和通过使用表面活性剂来维持溶液的适当流动

性。可注射组合物的延长的吸收可通过在组合物中包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸盐和明胶来产生。

[0217] 可通过许多本领域内已知的方法施用抗体,虽然对于许多治疗应用,优选的施用途径/模式是皮下、肌内或静脉内输注。如本领域技术人员所理解的,施用的途径和/或模式可根据期望的结果而改变。其他施用模式包括腹膜内、支气管内、经粘膜(transmucosal)、脊柱内、滑膜内、主动脉内、鼻内、经眼、经耳、局部和口腔以及肿瘤内施用。

[0218] 在某些情况下,可使用载体制备抗体组合物的活性化合物,所述载体将保护抗体免于快速释放,例如控释制剂,包括埋植剂、透皮贴剂和微型胶囊递送系统。可使用生物可降解的生物相容性聚合物,例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、多正酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的许多方法已被授予专利或是本领域技术人员熟知的。参见,例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems(J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978)。

[0219] 还可将另外的活性化合物掺入组合物。在某些情况下,将抑制性抗 CCR2 抗体与一种或多种另外的治疗剂、诊断剂或预防剂共配制和/或共施用。治疗剂包括但不限于,具有不同的精细特异性的抗 CCR2 抗体、结合其他靶的抗体、光敏剂、雄激素、雌激素、非类固醇抗炎剂、抗高血压剂、镇痛剂、抗抑郁药、抗生素、抗癌剂、麻醉剂、止吐药、抗感染剂、避孕药、抗糖尿病剂、类固醇、抗过敏剂、化学治疗剂、抗偏头痛剂、戒烟药 (agents for smoking cessation)、抗病毒剂、免疫抑制剂、溶血栓剂、降胆固醇剂和抗肥胖剂 (anti-obesity agent)。

[0220] 治疗剂还包括抑制 CCR2 的肽类似物、结合 MCP-1、MCP-2、MCP-3 或 MCP-4 并且阻止它们与 CCR2 结合的抗体或其他分子和抑制 CCR2 表达的试剂。在一种情况下,抑制 CCR2 表达的另外的试剂包括能够与 CCR2mRNA 杂交的反义核酸例如发夹 RNA 或 siRNA。能够通过 RNA 干扰抑制基因功能的序列特异性核酸在本领域内是熟知的。此类联合治疗可能需要更低剂量的抑制性抗 CCR2 抗体以及共施用的试剂,从而避免与各种单一治疗相关的可能的毒性或并发症。

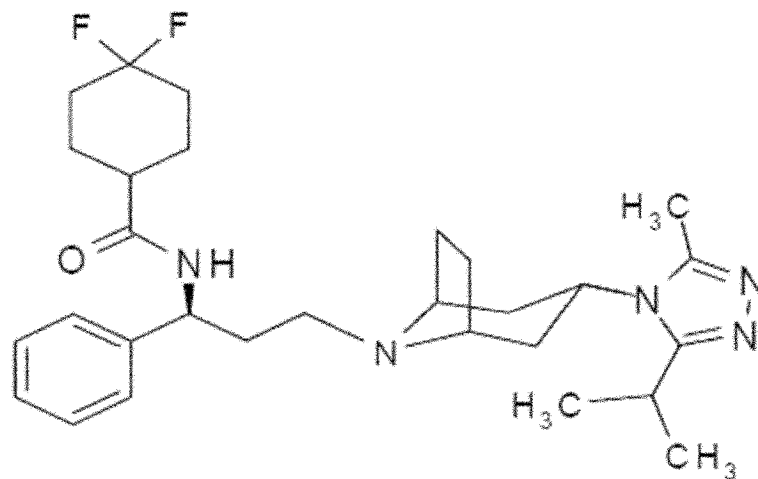
[0221] 在某些特定的情况下,与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和/或共施用的治疗剂是抗微生物剂。抗微生物剂包括抗生素(例如,抗细菌剂)、抗病毒剂、抗真菌剂和抗原生动物剂。抗微生物剂的非限定性实例是磺胺类、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑、喹诺酮类、青霉素和头孢菌素。

[0222] 在某些特定的情况下,与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和/或共施用的治疗剂是趋化因子拮抗剂、CCR2 拮抗剂、MCP-1 拮抗剂或 CCR5 拮抗剂。CCR2 拮抗剂或 MCP-1 拮抗剂包括但不限于:抗 MCP-1 抗体(美国专利 7,202,343、US2005/0025768、US2006/0039913、US2006/0246069 和 US2004/004/0047860);四氢吡喃基环戊基苯甲酰胺化合物(US2006/0116421);heterarylpyrrolidine 化合物(US2005/0250781);哌啶基环戊基芳基苯甲酰胺化合物(US2006/0173013);环胺化合物(美国专利 6,140,349 和美国专利 6,476,054);环戊基化合物(US2002/0049222 和美国专利 6,545,023);四氢吡喃基环戊基四氢吡啶并吡啶化合物(US2004/0167156,美国专利 6,812,234 和美国专利 7,230,008);氨基环戊基融合的杂三环酰胺化合物(US2007/0004714);哌啶基- α -氨基

酰胺化合物 (US2005/0250814) ;取代的吡唑化合物 (W006/88813) ;四氢吡喃基环戊基杂环酰胺化合物 (US2006/0178363) ;7 和 8 员杂环环戊基苯甲酰胺化合物 (US2006/0183731) ;苯并噁嗪基 - 酰胺基环戊基 - 杂环化合物 (US2006/0069088) ;3- 氨基环戊烷羧酰胺化合物 (US2007/0149532) ;含 氮杂环化合物 (US2007/0155713) ;三唑基苯基 benzenesulfonylamide 化合物 (W008/10934) ;取代的吡咯啉衍生物 (US2004/0186140) ;取代的苯甲酰胺和取代的氨基甲酸苯酯衍生物 (美国专利 7, 087, 604) ;取代的环烷基胺化合物 (US2005/0054626) ;取代的二环烷基胺化合物 (US2005/0227960) ;吡咯烷酮和吡咯烷 - 硫酮化合物 (US2003/0149081, 美国专利 6, 727, 275 和美国专利 6, 936, 633) ;巯基咪唑化合物 (US2007/0244138) ;取代的二哌啶化合物 (US2007/0197590) ;苯氨基取代的季盐化合物 (US2006/0293379) ;二环和桥接氮杂环 (US2006/0074121) ;3- 氨基环戊烷羧酰胺化合物 (US2006/0020133) ;3-(4- 杂芳基环己基氨基) - 环戊烷羧酰胺化合物 (US2005/0267146) ;三唑并化合物 (美国专利 6, 492, 364) ;杂芳基磺酰胺化合物 (US2006/0173019) ;芳基磺胺 (美国专利 6, 939, 885) ;双 - 芳基磺胺 (美国专利 7, 227, 035 和 US2004/0167113) ;取代的苯甲酰胺化合物 (美国专利 6, 821, 964) ;取代的地西洋化合物 (US2007/0249589) ;三氮杂螺 [5. 5] 十一烷衍生物 (US2005/267114) ;取代的哌啶羧酰胺化合物 (US2003/0114443 和 US6, 562, 978) ;苯并氮杂卓 (benzazepine) 衍生物 (US2004/0235822 和美国专利 7, 262, 185) ;

[0223] 在选择的情况下, 与 CCR2 抗体共配制或共施用的趋化因子拮抗剂是 SELZENTRY™ (Maraviroc), 其在化学上可描述为 4,4- 二氟 -N-{(1S)-3-[exo-3-(3- 异丙基 -5- 甲基 -4H-1,2,4- 三唑 -4- 基) -8- 氮杂双环 [3. 2. 1] 辛 -8- 基] -1- 苯丙基} 环己烷羧酰胺 :

[0224]



[0225] 在某些特定的情况下, 与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和 / 或共施用的 治疗剂是 CB-1 受体拮抗剂。如本文中所使用的, 术语 " CB-1 受体 " 是指 G 蛋白偶联 1 型大麻素受体。术语 " 拮抗剂 " 包括完全拮抗剂和部分拮抗剂以及反激动剂。CB-1 受体拮抗剂对于 CB-1 受体可具有选择性。" CB-1 受体选择性 " 意指该化合物不具有或几乎不具有拮抗大麻素 -2 受体 (CB-2) 的活性。CB-1 拮抗剂对于 CB-1 受体的选择性可以是对于 CB-2 受体的选择性的至少约 10 倍。例如, 用于拮抗 CB-1 受体的抑制性浓度 (IC₅₀) 是用于拮抗 CB-2 受体的 IC₅₀ 的约 1/10 或更低。适当的 CB-1 受体拮抗剂包括公开于下列中的化合物 : 美国

专利 5,462,960 ;5,596,106 ;5,624,941 ;5,747,524 ;6,017,919 ;6,028,084 ;6,432,984 ;6,476,060 ;6,479,479 ;6,518,264 和 6,566,356 ;美国专利公开案 2003/0114495 ;2004/0077650 ;2004/0092520 ;2004/0122074 ;2004/0157838 ;2004/0157839 ;2004/0214837 ;2004/0214838 ;2004/0214855 ;2004/0214856 ;2004/0058820 ;2004/0235926 ;2004/0259887 ;2005/0080087 ;2005/0026983 和 2005/0101592 ;PCT 专利公开案 W003/075660 ;W0 02/076949 ;W0 01/029007 ;W0 04/048317 ;W0 04/058145 ;W0 04/029204 ;W0 04/012671 ;W0 03/087037 ;W0 03/086288 ;W003/082191 ;W0 03/082190 ;W0 03/063781 ;W0 04/012671 ;W0 04/013120 ;W0 05/020988 ;W0 05/039550 ;W0 05/044785 ;W0 05/044822 和 W005/049615 ;2004 年 12 月 6 日提交的 PCT 专利申请系列案 PCT/IB2004/004050 ;2004 年 12 月 6 日提交的 PCT/IB2004/004017 ;2004 年 12 月 6 日提交的 PCT/IB2004/004023 ;和 2004 年 12 月 6 日提交的 PCT/IB2004/004019 ;和 2003 年 11 月 21 日提交的美国临时申请案 60/523937 ;2003 年 12 月 16 日提交的 60/529908 ;2003 年 12 月 16 日提交的 60/529909 ;2003 年 12 月 16 日提交的 60/529910 ;2003 年 12 月 16 日提交的 60/530012 ;和 2004 年 4 月 21 日提交的 60/564648。所有上述专利和专利申请通过引用合并入本文。用于本方法的优选 CB-1 受体拮抗剂包括 :利莫那班 (SR141716A, 在商标名 Acomplia™ 下也是已知的), 可从 Sanofi-Synthelabo 获得或可如美国专利 5,624,941 中所述制备 ;N-(哌啶 -1- 基)-1-(2,4- 二氯苯基)-5-(4- 碘苯基)-4- 甲基 -1H- 吡唑 -3- 羧酰胺 (AM251), 可从 Tocris™, Ellisville, MO 获得 ;可如美国专利 6,645,985 中所述制备的 [5-(4- 溴苯基)-1-(2,4- 二氯 - 苯基)-4- 乙基 -N-(1- 哌啶基)-1H- 吡唑 -3- 羧酰胺] (SR147778) ;可如 PCT 专利公开案 W0 03/075660 中所述制备的 N-(哌啶 -1- 基)-4,5- 二苯基 -1- 甲基咪唑 -2- 羧酰胺, N-(哌啶 -1- 基)-4-(2,4- 二氯苯基)-5-(4- 氯苯基)-1- 甲基咪唑 -2- 羧酰胺, N-(哌啶 -1- 基)-4,5- 二 -(4- 甲苯基)-1- 甲基咪唑 -2- 羧酰胺, N- 环己基 -4,5- 二 -(4- 甲苯基)-1- 甲基咪唑 -2- 羧酰胺, N-(环己基)-4-(2,4- 二氯苯基)-5-(4- 氯苯基)-1- 甲基咪唑 -2- 羧酰胺和 N-(苯基)-4-(2,4- 二氯苯基)-5-(4- 氯苯基)-1- 甲基咪唑 -2- 羧酰胺 ;可如美国专利公开案 2004/0092520 中所述制备的 1-[9-(4- 氯 - 苯基)-8-(2- 氯 - 苯基)-9H- 嘌呤 -6- 基]-4- 乙氨基 - 哌啶 -4- 羧酸的盐酸盐、甲磺酸盐和苯磺酸盐 ;可如美国专利公开案 2004/0157839 中所述制备的 1-[7-(2- 氯 - 苯基)-8-(4- 氯 - 苯基)-2- 甲基 - 吡唑并 [1,5-a] [1,3,5] 三嗪 -4- 基]-3- 乙氨基 - 吡啶 -3- 羧酸酰胺和 1-[7-(2- 氯 - 苯基)-8-(4- 氯 - 苯基)-2- 甲基 - 吡唑并 [1,5-a] [1,3,5] 三嗪 -4- 基]-3- 甲氨基 - 吡啶 -3- 羧酸酰胺 ;可如美国专利公开案 2004/0214855 中所述制备的 3-(4- 氯 - 苯基)-2-(2- 氯 - 苯基)-6-(2,2- 二氟 - 丙基)-2,4,5,6- 四氢 - 吡唑并 [3,4-c] 吡啶 -7- 酮、2-(2- 氯 - 苯基)-3-(4- 乙基 - 苯基)-5-(2,2,2- 三氟 - 乙基)-4,5- 二氢 -2H- 吡咯并 [3,4-c] 吡唑 -6- 酮和 2-(2- 氯 - 苯基)-3-(4- 异丙基 - 苯基)-5-(2,2,2- 三氟 - 乙基)-4,5- 二氢 -2H- 吡咯并 [3,4-c] 吡唑 -6- 酮 ;可如美国专利公开案 2005/0101592 中所述制备的 3-(4- 氯 - 苯基)-2-(2- 氯 - 苯基)-7-(2,2- 二氟 - 丙基)-6,7- 二氢 -2H,5H-4- 氧杂 -1,2,7- 三氮杂 - 萘 -8- 酮 ;可如美国专利公开案 2004/0214838 中所述制备的 2-(2- 氯 - 苯基)-6-(2,2,2- 三氟 - 乙基)-3-(4- 三氟甲基 - 苯基)-2,6- 二氢 - 吡唑并 [4,3-d] 嘧啶 -7- 酮 ;可如 PCT 专利公开案 W0 02/076949 中所述制备的 (S)-4- 氯 -N- {[3-(4- 氯 - 苯基)-4- 苯基 -4,5- 二氢 - 吡

唑-1-基]-甲氨基-亚甲基}-苯磺酰胺 (SLV-319) 和 (S)-N-[[3-(4-氯-苯基)-4-苯基-4,5-二氢-吡唑-1-基]-甲氨基-亚甲基]-4-三氟甲基-苯磺酰胺 (SLV-326); 可如美国专利 6,432,984 中所述制备的 N-哌啶-5-(4-溴苯基)-1-(2,4-二氯苯基)-4-乙基吡唑-3-羧酰胺; 可如美国专利 6,518,264 中所述制备的 1-[双-(4-氯-苯基)-甲基]-3-[(3,5-二氟-苯基)-甲烷磺酰基-亚甲基]-吡丁啶; 可如 PCT 专利公开案 WO 04/048317 中所述制备的 2-(5-(三氟甲基)吡啶-2-基氧基)-N-(4-(4-氯苯基)-3-(3-氰基苯基)丁烷-2-基)-2-甲基丙酰胺; 可如美国专利 5,747,524 中所述制备的 4-{[6-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-1-苯并呋喃-3-基]羰基}苯基氰 (LY-320135); 可如 WO 04/013120 中所述制备的 1-[2-(2,4-二氯苯基)-2-(4-氟苯基)-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-磺酰基]-哌啶; 和可如 WO 04/012671 中所述制备的 [3-氨基-5-(4-氯苯基)-6-(2,4-二氯苯基)-氟[2,3-b]吡啶-2-基]-苯基-甲酮。

[0226] 在某些特定的情况下,与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和/或共施用的治疗剂是血管生成因子(angiogenic factor)。血管生成因子包括但不限于碱性成纤维细胞生长因子、酸性成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子、血管生成素(angiogenin)、转化生长因子 α 和 β 肿瘤坏死因子、血管形成素(angiopoietin)、血小板源性生长因子、胎盘生长因子、肝细胞生长因子和增殖蛋白(proliferin)。

[0227] 在某些特定的情况下,与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和/或共施用的治疗剂是溶血栓剂。溶血栓剂包括但不限于,尿激酶纤溶酶原激活物、尿激酶、链激酶、 α 2-纤溶酶抑制剂的抑制剂和纤溶酶原激活物抑制剂-1 的抑制剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、螺内酯、组织纤溶酶原激活物(tPA)、白介素 1 β 转化酶的抑制剂、抗凝血酶 III 等。

[0228] 在某些特定的情况下,与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和/或共施用的治疗剂是抗肥胖剂。抗肥胖剂包括但不限于,apo-B/MTP 抑制剂、11 β -羟基类固醇脱氢酶-1 抑制剂、肽 YY₃₋₃₆ 或其类似物、MCR-4 激动剂、CCK-A 激动剂、单胺重摄取抑制剂、拟交感神经剂、 β 3 肾上腺素能受体激动剂、多巴胺激动剂、促黑素细胞(melanocyte-stimulating)激素受体类似物、5-HT_{2c} 受体激动剂、黑色素聚集激素拮抗剂、瘦素、瘦素类似物、瘦素受体激动剂、甘丙肽拮抗剂、脂肪酶抑制剂、铃蟾肽激动剂、神经肽 Y 受体拮抗剂、拟甲状腺素药(thyromimetic agent)、脱氢表雄甾酮或其类似物、糖皮质激素受体拮抗剂、食欲素(orexin)受体拮抗剂、高血糖素样肽 1 受体激动剂、睫状神经营养因子、人刺鼠相关蛋白(agouti-related protein)拮抗剂、饥饿激素(ghrelin)受体拮抗剂、组胺 3 受体拮抗剂或反激动剂(inverse agonist) 和神经介素 U(neuromedin U) 受体激动剂。

[0229] 在某些特定的情况下,与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和/或共施用的治疗剂是抑制中性粒细胞和/或单核细胞至血管损伤位置的募集和/或附着的试剂。此类治疗剂可以例如抑制通过其介导细胞粘附、趋化作用和/或归巢(homing)的细胞表面分子的活性(例如,结合活性、信号转导活性)。例如,可将细胞粘附分子(例如,整联蛋白(例如, β 1、 β 2、 β 3、 β 4、 β 5、 β 6、 β 7、 β 8 整联蛋白),选择蛋白(例如,E-选择蛋白,P-选择蛋白,L-选择蛋白),钙粘蛋白(例如,E-,P-,N-钙粘蛋白)和免疫球蛋白超家族粘附分子(例如,LFA-2、LFA-3、CD44))的拮抗剂和细胞因子受体的拮抗剂(例如,趋化因子受体功能的拮抗剂)与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和/或共施用。此外,还可将结合细胞因子或趋化因子或细胞粘附分子的配体并且抑制配体与中性粒细胞和/或单核细胞上表达的受体的结

合的试剂与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和 / 或共施用。

[0230] 在某些特定的情况下,与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和 / 或共施用的治疗剂是心脏病治疗剂。意欲用于治疗心脏病的示例性治疗剂包括但不限于,生长因子、血管生成剂 (angiogenic agent)、钙通道阻断剂、抗高血压剂、变力剂 (inotropic agent)、抗动脉粥样硬化剂、抗凝血剂、 β -阻断剂、抗心律失常剂 (anti-arrhythmia agent)、强心苷类、抗炎剂、抗生素、抗病毒剂、抗真菌剂和抑制原生动感染物的试剂和抗肿瘤剂。

[0231] 在某些特定的情况下,与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和 / 或共施用的心脏病治疗剂是钙通道阻断剂。钙通道阻断剂包括但不限于,二氢吡啶类例如硝苯地平、尼卡地平、尼莫地平等;苯并噻氮卓类例如地尔硫卓 (diltiazem);苯烷基胺例如维拉帕米;二芳基氨基丙胺醚类例如苻普地尔;和苯并咪唑取代的四氢化萘 (benzimidole-substituted tetraline) 例如米贝拉地尔。

[0232] 在某些特定的情况下,与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和 / 或共施用的心脏病治疗剂是抗高血压剂。抗高血压剂包括但不限于,利尿剂,包括噻嗪类例如氢氯噻嗪、呋塞米、螺内酯、氨苯喋啶和阿米洛利;抗肾上腺素能剂,包括可乐定、胍那苄、胍法辛、甲基多巴、曲美芬、利舍平、胍乙啶、胍那决尔、酚妥拉明、酚苄明、哌唑嗪、特拉唑嗪、多沙唑嗪、普萘洛尔 (propranolol)、美托洛尔 (metoprolol)、纳多洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、倍他洛尔、卡替洛尔、吲哚洛尔、醋丁洛尔、拉贝洛尔;血管扩张剂,包括肼苯哒嗪 (hydralazine)、米诺地尔、二氮嗪、硝普钠;和血管紧张素转化酶抑制剂,包括卡托普利、贝那普利、依那普利、依那普利拉、福辛普利、赖诺普利、喹那普利、雷米普利;血管紧张素受体拮抗剂例如氯沙坦;和钙通道拮抗剂,包括硝苯地平 (nifedine)、氨氯地平、非洛地平 XL、isadipine、尼卡地平、苯并噻氮卓类 (例如,地尔硫卓) 和苯烷基胺 (例如维拉帕米)。

[0233] 在某些特定的情况下,与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和 / 或共施用的心脏病治疗剂是抗凝血剂。抗凝血剂包括但不限于肝素、华法林、水蛭素、蟬抗凝血肽、低分子量肝素例如依诺肝素、达肝素和阿地肝素 (ardeparin)、噻氯匹定、达那肝素、阿加曲班、阿昔单抗和替罗非班。

[0234] 在某些特定的情况下,与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和 / 或共施用的心脏病治疗剂是抗心律失常剂。抗心律失常剂包括但不限于,钠通道阻断剂 (例如,利多卡因、普鲁卡因胺、恩卡尼、氟卡尼等)、 β 肾上腺素能阻断剂 (例如,普萘洛尔)、动作电位持续时间的延长剂 (例如,胺碘酮) 和钙通道阻断剂 (例如,维拉帕米、地尔硫卓、氯化镍等)。心脏抑制药 (例如,利多卡因)、心脏兴奋剂 (例如,异丙肾上腺素、多巴胺、去甲肾上腺素等) 和多种心脏病药物的组合 (例如,治疗心房颤动的地高辛 / 奎尼丁) 的递送也是有益的。

[0235] 在某些特定的情况下,与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和 / 或共施用的心脏病治疗剂是用于治疗充血性心力衰竭的试剂。用于治疗充血性心力衰竭的试剂包括但不限于,强心苷、变力剂、细胞外袢利尿剂、噻嗪类利尿剂、保钾利尿剂、血管紧张素转化酶抑制剂、血管紧张素受体拮抗剂、硝基血管扩张剂、磷酸二酯酶抑制剂、直接血管扩张剂 (direct vasodilator)、 α 1- 肾上腺素能受体拮抗剂、钙通道阻断剂和拟交感神经剂。

[0236] 在某些特定的情况下,与抑制性抗 CCR2 抗体共配制和 / 或共施用的心脏病治疗剂是适合用于治疗心肌病的试剂,例如但不限于多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素和去氧肾上腺素。

[0237] 还包括用于在哺乳动物中抑制病毒感染特别是 HIV 感染的组合物,其包含一定量的抗体和一定量的抗病毒剂,其中抗 CCR2 抗体和抗病毒剂的量一起在抑制病毒复制、新细胞的病毒感染或病毒载量中是有效的。许多抗病毒剂目前在本领域内是已知的,包括核苷类似物(例如,AZT、3TC 和 ddI),蛋白酶抑制剂和趋化因子受体拮抗剂可抑制 HIV 感染但不抑制病毒感染。

[0238] 在另一个方面中,可将抗 CCR2 抗体或其片段与其他治疗剂例如抗炎药物或分子一起共施用至患有炎症病症例如关节炎,动脉粥样硬化或多发性硬化的患者。在一个方面中,提供了用于治疗哺乳动物的炎症病症的方法,其包括给所述哺乳动物施用治疗有效量的与抗炎剂组合的化合物。抗炎剂包括但不限于,任何已知的非类固醇抗炎剂例如水杨酸衍生物(阿司匹林)、对氨基苯酚衍生物(对乙酰氨基酚)、吲哚和茚乙酸(吲哚美辛)、杂芳基乙酸(酮咯酸)、芳基丙酸(布洛芬)、邻氨基苯甲酸(甲芬那酸)、烯醇酸(昔康类)和链烷酮(alkanone)(萘丁美酮),和任何已知的类固醇抗炎剂,其包括皮质类固醇和具有生物学活性的合成的类似物(在其相关糖皮质类固醇(代谢的)和盐皮质激素(调节电解质的)活性方面)。在另一种情况下,将抗 CCR2 抗体与非类固醇抗炎药例如阿司匹林(Bayer,Bufferin)、布洛芬(Motrin,Advil)、萘普生钠(Aleve)、酮洛芬(Orudis KT)、吲哚美辛(Indocin)、依托度酸(Lodine)、双氯芬酸钠(Voltaren)、罗非考昔(Vioxx)、塞来考昔(Celebrex)、萘丁美酮(Relafen)组合或与类固醇例如泼尼松、泼尼松龙、地塞米松、倍氯米松、布地奈德、氟替卡松或曲安西龙组合施用。

[0239] 此外,用于治疗炎症的其他药物包括但不限于,拮抗剂例如所有组胺和缓激肽受体拮抗剂、白三烯和前列腺素受体拮抗剂以及血小板活化因子受体拮抗剂。在另一种情况下,将抗体或联合治疗与放射疗法、化学疗法、光动力疗法、手术或其他免疫疗法即靶向免疫系统的疗法一起施用。在另一种情况下,将抗体与另一种抗体一起施用。例如,可将抗 CCR2 抗体与已知抑制炎症的抗体或其他试剂例如抑制 α -4 整联蛋白(US2004/0009169)或 IL-8 受体(US2004/0037830)的抗体或试剂一起施用。可与抗 CCR2 抗体共施用的另外的抗体描述于美国专利 6,696,550;6,406,865;6,352,832 和 6,084,075(其内容通过引用合并入本文)中。

[0240] 组合物可包含“治疗有效量”或“预防有效量”的抗体或抗原结合部分。“治疗有效量”是指在剂量上和在所需的一段时间内有效地实现期望的治疗结果的量。治疗有效量的抗体或抗体部分可根据因素例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体或抗体部分在个体中引发期望的应答的能力而变化。治疗有效量也是其中抗体或抗体部分的任何毒性或有害效应被治疗有益效应超越的剂量。“预防有效量”是指在剂量上和在所需的一段时间内有效地实现期望的预防结果的量。通常,因为预防性剂量在疾病之前或在其早期用于受试者,因此预防有效量可低于治疗有效量。

[0241] 可调整剂量方案以提供最佳的期望应答(例如,治疗性或预防性应答)。例如,可施用单次团注,可在一段时间内施用几个分开的剂量或可根据治疗情况的紧迫性而相应地减少或增加剂量。以剂量单位形式配制胃肠外组合物对于施用的容易性和剂量的一致性是有利的。剂量单位形式,如本文中所使用的,是指用于待治疗的哺乳动物受试者的适合作为单元剂量的物理上分开的单位;各单位包含预先确定量的活性化合物,所述量经计算与需要的药物载体一起产生期望的治疗效果。剂量单位形式的规格(specification)受制

于和直接取决于 (a) 抗 CCR2 抗体或其部分的独特特征和要获得的具体治疗或预防效果, 以及 (b) 配制用于治疗个体的敏感性的此类抗体的领域中固有的限制。

[0242] 抗体或抗体部分的治疗有效量或预防有效量的示例性非限定性范围是 0.025 至 50mg/kg, 0.1 至 50mg/kg, 0.1-25, 0.1 至 10 或 0.1 至 3mg/kg。在一种情况下, 将抗体以无菌水溶液形式的制剂施用, 所述无菌水溶液具有范围在约 5.0 至约 6.5 之间的 pH 并且含有约 1mg/ml 至约 200mg/ml 的抗体, 约 1mM 至约 100mM 的组氨酸缓冲剂, 约 0.01mg/ml 至约 10mg/ml 聚山梨酯 80 或聚山梨酯 20, 约 100mM 至约 400mM 的选自但不限于海藻糖或蔗糖的非还原性糖, 约 0.01mM 至约 1.0mM 的 EDTA 二钠二水合物, 以及除了螯合剂外, 任选地包含药学可接受的抗氧化剂。适当的抗氧化剂包括但不限于甲硫氨酸、硫代硫酸钠、过氧化氢酶和铂。例如, 组合物可以包含浓度范围在 1mM 至大约 100mM 之间, 特别地为约 27mM 的甲硫氨酸。在一些情况下, 制剂在 20mM 柠檬酸钠, pH 5.5, 140mM NaCl 和 0.2mg/ml 聚山梨酯 80 的缓冲液中包含 5mg/ml 的抗体。要指出的是, 剂量值可随待缓解的病况的类型和严重程度而变化。还应理解, 对于任何特定的受试者, 应当随时间根据个体需要以及施用或指导组合物的施用的人的专业判断来调整特定剂量方案, 并且本文中所示的剂量范围只是示例性的并且无意限定所请求保护的组合物的范围或施用。

[0243] 另一个方面提供了包含抗 CCR2 抗体或抗原结合部分或含有这样的抗体或抗原结合片段的组合物的试剂盒。除了抗体或组合物以外, 试剂盒还可包括诊断剂或治疗剂。试剂盒还可包括用于诊断或治疗方法的说明书以及包装材料, 例如但不限于冰、干冰、STYROFOAM™、泡沫材料、塑料、塞璐玢、收缩包装、泡沫包装、卡纸板和淀粉花生 (starch peanut)。在一种情况下, 试剂盒包括抗体或包含抗体的组合物以及可用于本文中描述的方法的诊断剂。在另一种情况下, 试剂盒包括抗体或包含抗体的组合物以及一种或多种可用于本文中描述的方法的治疗剂。

[0244] 提供了用于抑制哺乳动物的癌症的组合物和试剂盒, 其包含一定量的抗体和一定量的化学治疗剂, 其中化合物、盐、溶剂合物或前体药物的量以及化学治疗剂的量一起在抑制异常细胞生长中是有效的。许多化学治疗剂目前在本领域内是已知的。在一些情况下, 化学治疗剂选自有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢物、嵌入抗生素、趋化因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物应答调节剂、抗激素例如抗雄激素和抗血管生成剂 (anti-angiogenesis agent)。

[0245] 使用的诊断方法

[0246] 在另一个方面中, 提供了诊断方法。抗 CCR2 抗体可用于体内或体外检测生物样品中的 CCR2。在一种情况下, 提供了用于在有此需要的受试者中诊断表达 CCR2 的细胞的存在或定位的方法, 其包括步骤: 将抗体注射入受试者, 通过定位抗体结合的地方来确定 CCR2 在受试者中的表达, 将受试者中的表达与正常参照受试者或标准的表达相比较, 以及诊断细胞的存在或定位。抗 CCR2 抗体还可用作炎症和 / 或免疫细胞 (例如单核细胞) 至组织内的浸润的标志物。

[0247] 抗 CCR2 抗体可用于常规免疫测定, 包括但不限于, ELISA、RIA、流式细胞术、组织免疫组织化学、Western 印迹或免疫沉淀。抗 CCR2 抗体可用于检测来自人的 CCR2。在另一种情况下, 抗 CCR2 抗体可用于检测来自食蟹猴或猕猴的 CCR2。在另一种情况下, 抗 CCR2 抗体可用于检测来自啮齿类动物例如小鼠和大鼠的 CCR2。

[0248] 还提供了用于检测生物样品中的 CCR2 的方法,其包括将生物样品与抗 CCR2 抗体接触,然后检测结合的抗体。在一种情况下,用可检测的标记物直接标记抗 CCR2 抗体。在另一种情况下,不标记抗 CCR2 抗体(一抗),而是标记可结合抗 CCR2 抗体的二抗或其他分子。如本领域技术人员所熟知的,选择能够特异性结合特定类别和种类的一抗的二抗。例如,如果抗 CCR2 抗体是人 IgG,则二抗可以是抗人 IgG。可结合抗体的其他分子包括但不限于,蛋白 A 和蛋白 G,其两者都可例如从 Pierce Chemical Co 商购获得。

[0249] 已在上文中公开了用于抗体或二抗的合适的标记物,其包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料和放射性材料。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺;以及合适的放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0250] 在其他情况下,可使用用可检测物质标记的 CCR2 标准和未标记的抗 CCR2 抗体通过竞争性免疫测定来测定生物样品中的 CCR2。在该测定中,将生物样品、标记的 CCR2 标准和抗 CCR2 抗体组合,然后测定结合至未标记的抗体的经标记的 CCR2 标准的量。生物样品中 CCR2 的量与结合至抗 CCR2 抗体的经标记的 CCR2 标准的量成反比。

[0251] 可将上文中公开的免疫测定用于许多目的。例如,可将抗 CCR2 抗体用于检测培养的细胞中的 CCR2。在一种情况下,将抗 CCR2 抗体用于测定已用不同化合物处理的细胞的表面上的 CCR2 的量。该方法可用于鉴定调控 CCR2 蛋白水平的化合物。根据该方法,用受试化合物处理一个细胞样品一段时间,同时让另一个样品不接受处理。如果要测量总 CCR2 的表达,则裂解细胞,使用本文中描述的免疫测定之一来测量总 CCR2 的表达。将经处理的细胞与未经处理的细胞中的总 CCR2 表达相比较以测定受试化合物的作用。

[0252] 用于测量总 CCR2 表达的优选免疫测定是流式细胞术或免疫组织化学。如果要测量细胞表面 CCR2 表达,则不裂解细胞,使用本文中描述的免疫测定之一测量 CCR2 的细胞表面水平。用于测定 CCR2 的细胞表面水平的优选免疫测定包括步骤:用可检测的标记物例如生物素或 ^{125}I 标记细胞表面蛋白,用抗 CCR2 抗体免疫沉淀 CCR2,然后检测标记的 CCR2。

[0253] 用于确定 CCR2 的定位例如细胞表面水平的另一个免疫测定是使用免疫组织化学。用于检测 CCR2 的细胞表面水平的免疫测定包括:结合用适当的荧光团例如荧光素或藻红蛋白标记的抗 CCR2 抗体,然后使用流式细胞术检测一抗。在另一个情况中,不标记抗 CCR2 抗体,而标记可结合抗 CCR2 抗体的二抗或其他分子。方法例如 ELISA、RIA、流式细胞术、Western 印迹、免疫组织化学、膜蛋白质的细胞表面标记以及免疫沉淀在本领域内都是熟知的。参见,例如,Harlow 和 Lane,同上。此外,为了就 CCR2 的激活或抑制检测大量化合物,可将免疫测定按比例放大以进行高通量筛选。

[0254] 抗 CCR2 抗体还可用于测定组织中或来源于组织的细胞中 CCR2 的水平。在一些情况下,组织是患病组织。在一些情况下,组织是活检组织。在本方法的一些情况下,从患者切取组织或其活检组织。然后组织或活检组织可用于免疫测定中以通过上述方法来测定例如总 CCR2 表达、CCR2 的细胞表面水平或 CCR2 的定位。此类方法可用于确定组织是否表达高水平的 CCR2,高水平的 CCR2 可表示组织是用抗 CCR2 抗体进行治疗的靶。

[0255] 还可将抗体用于体内鉴定表达 CCR2 的组织 and 器官。在一些情况下,抗 CCR2 抗体

用于鉴定表达 CCR2 的细胞。

[0256] 该方法包括步骤：将可检测地标记的抗 CCR2 抗体或包含其的组合物施用给需要这样的诊断测试的患者，然后使患者经历成像分析以确定表达 CCR2 的组织的位置。成像分析在医学领域内是熟知的，其包括但不限于 x 射线分析、磁共振成像 (MRI) 或，计算机 x 射线断层摄影 (computed tomography, CT)。可用适合于体内成像的任何试剂例如造影剂例如钨（其可用于 x 射线分析）或磁性造影剂例如钆螯合剂（其可用于 MRI 或 CT）来标记抗体。其他标记试剂包括但不限于放射性同位素例如 ⁹⁹Tc。在另一种情况下，不标记抗 CCR2 抗体，而可通过施用可检测的并且可结合抗 CCR2 抗体的二抗或其他分子来进行成像。在另一种情况下，从患者获得活检组织以确定目的组织是否表达 CCR2。

[0257] 在一些情况下，可检测地标记的抗 CCR2 包含荧光团。在某些情况下，荧光团选自近红外荧光染料、二硝基苯基、荧光素和其衍生物、罗丹明、罗丹明的衍生物、藻红蛋白、藻青蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛和荧光胺、TEXAS RED™、RHODAMINE GREEN™、OREGON GREEN™、CASCADE BLUE™、藻红蛋白、CY3™、CY5™、CY2™、CY7™、香豆素、红外线 40、MR 200、IRD 40、ALEXA FLUOR™、四甲基罗丹明、PACIFICBLUE™、SYBR™ 和 BODIPY™。在另一种情况下，荧光团包括下列化合物之一（在括号中以 nm 标示它们的最大发射）：CY2™(506)、GFP(RedShifted)(507)、YO-PRO®-1(509)、YOYO®-1(509)、钙黄绿素(517)、FITC(518)、FLUORX®(519)、ALEXA®(520)、罗丹明 110(520)、5-FAM(522)、OREGON GREEN® 500(522)、OREGON GREEN® 488(524)、RIBOGREEN®(525)、RHODAMINE GREEN®(527)、罗丹明 123(529)、MAGNESIUM GREEN®(531)、CALCIUM GREEN®(533)、TO-PRO®-1(533)、TOTO®-1(533)、JOE(548)、BODIPY® 530/550(550)、DiI(565)、BODIPY®(568)、BODIPY® 558/568(568)、BODIPY® 564/570(570)、CY3®(570)、ALEXA® 546(570)、TRITC(572)、MAGNESIUM ORANGE®(575)、藻红蛋白 R&B(575)、罗丹明鬼笔环肽(575)、CALCIUM ORANGE®(576)、派洛宁 Y(580)、罗丹明 B(580)、TAMRA(582)、RHODAMINE RED®(590)、CY3.5®(596)、ROX(608)、CALCIUM CRIMSON™(615)、ALEXA® 594(615)、TEXAS RED™(615)、Nile Red(628)、YO-PRO®-3(631)、YOYO®-3(631)、R-藻青蛋白(642)、C-藻青蛋白(648)、TO-PRO®-3(660)、TOTO®-3(660)、DiD DiIC(5)(665)、CY5™(670)、Thiadicarbocyanine(671) 和 Cy5.5™(694)。

[0258] 使用的治疗方法

[0259] 在另一个方面中，提供了通过给有此需要的患者施用抗 CCR2 抗体来抑制 CCR2 活性的方法。可治疗性使用本文中描述的任何类型的抗体。在不同的情况下，抗 CCR2 抗体是人抗体、嵌合抗体或人源化抗体。在一些情况下，抗体或其抗原结合部分结合 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环。抗体或其抗原结合部分优选不结合 CCR2 的第 3 细胞外环或 N 末端结构域。

[0260] 在另一种情况下，CCR2 是人的并且患者是人患者。可选择地，患者可以是表达 CCR2（抗 CCR2 抗体与其交叉反应）的哺乳动物。为了兽医目的或作为人疾病的动物模型，可将抗体施用给表达 CCR2（抗体与其交叉反应）的非人哺乳动物。此类动物模型可用于评估抗体的治疗功效。

[0261] 在一个方面，提供了通过给受试者施用治疗有效量的抗 CCR2 抗体治疗、帮助治

疗、预防或帮助预防受试者的 CCR2- 介导的病症的方法。如本文中所使用的,术语“CCR2 介导的病症”旨在包括这样的疾病和其他病症,其中已显示高水平的 CCR2 表达或活性在患有病症的受试者中的存在是或怀疑是造成病症的病理生理异常的原因或促成病症恶化的因素。此类病症可以例如通过下列得到证明:患有病症的受试者的受影响的细胞或组织中细胞表面上的 CCR2 水平增加,或细胞类型例如嗜碱性粒细胞、单核细胞或淋巴细胞中 CCR2 介导的活性增加(其促成病症的病理或促成病症的恶化),或 CCR2 配体例如 MCP-1 的水平在炎性部位增加。可以例如使用抗 CCR2 抗体检测 CCR2 表达的增加。可通过 G- 蛋白激活的增加、F- 肌动蛋白多聚化或表达 CCR2 的细胞的增加的趋势作用(例如响应 MCP-1 或其他 CCR2 配体的趋化作用)来检测 CCR2 活性的增加。

[0262] 在一个方面中,CCR2 介导的病症的特征在于纤维化。术语“纤维化”,如本文中所使用的,是指特征在于响应组织损伤的纤维变性材料(例如,细胞外基质)的过度沉积和代谢的病理状况。在许多情况下,纤维化代表这样的正常修复过程(即,伤口愈合),其由于慢性或过度组织损伤而出错,从而导致成纤维细胞或星形细胞活化和增殖以及胶原积累。纤维化病况包括,与血管疾病例如心脏病、脑病和外周血管病以及所有主要组织和器官系统例如眼、皮肤、肾、肺、肠和肝相关的纤维增生性病症(Wynn, *Nature Reviews* 4: 583-594 (2004); Batailler, R 和 Brenner, D., *J. Clin. Invest.* 115:209-218 (2005))。其他来源是化学治疗药物、辐射诱发的纤维化以及损伤和烧伤。虽然纤维化病况包括一大类病理状况,但据信对于大多数此类病况,导致纤维变性组织积累的一般机制具有许多共同的元素。通常病况响应炎性细胞的流入而被起始,然后被浸润细胞(例如,巨噬细胞、T 细胞)与组织内的驻留细胞(resident cell)(例如,星形细胞、成肌纤维细胞、枯否细胞)之间的细胞因子信号转导途径保持。例如,已显示 MCP-1 在肺的几种疾病中起着重要作用(Rose CE Jr, Sung SS, Fu SM. *Microcirculation* 10:273-288 (2003))并且 CCR2 缺陷小鼠被保护而免于发生肺纤维化(Moore BB, 等人 *Protection from Pulmonary Fibrosis in the Absence of CCR2 Signaling*. *J. Immunol.* 167:4368-4377 (2001)),这表明该受体在肺中的至关重要的作用。类似地,周细胞是参与硬皮病的发展的至关重要的纤维发生细胞类型并且已显示 PDGF 受体酪氨酸激酶抑制剂(RTKI)减缓周细胞的增殖并且抑制患有该进行性疾病的患者的皮肤损伤。在肾中,白细胞浸润在介导慢性肾病中的肾小管间质性炎症和纤维化中起主要作用。Vielhauer 和同事已确定,在梗阻性肾病的小鼠模型中,CCR2 和 CCR5 在积累的巨噬细胞和 CD³⁺ 淋巴细胞上的表达与组织损伤的位置上的进行性纤维化相关(Vielhauer V, 等人 *J. Am. Soc. Nephrol.* 12:1173-1187 (2001))。

[0263] 如本文中所使用的,也将术语“纤维化”与“成纤维细胞积累和胶原沉积”同义地使用。成纤维细胞是结缔组织细胞,其分散在整个躯体的结缔组织中。成纤维细胞分泌含有 I 型和 / 或 III 型胶原的非刚性细胞外基质。响应对组织的损伤,附近的成纤维细胞或星形细胞迁移入伤口、增殖并且产生大量的胶原细胞外基质。胶原是富含甘氨酸和脯氨酸的纤维状蛋白,其为细胞外基质和结缔组织、软骨和骨的主要成分。胶原分子是称为 α 链的三链螺旋结构,其在绳状螺旋中彼此相互缠绕。胶原以几种形式或类型存在;其中, I 型(最常见的),发现于皮肤、腱和骨中;以及 III 型发现于皮肤、血管和内部器官中。示例性纤维化病况包括但不限于,与纤维化相关的肺病,例如,特发性肺纤维化、辐射诱发的纤维化、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、硬皮病、博来霉素诱发的肺纤维化、慢性哮喘,硅肺,石棉诱发的

肺纤维化、急性肺损伤和急性呼吸窘迫（包括细菌性肺炎诱发的，创伤诱发的，病毒性肺炎诱发的，呼吸机诱发的，非肺性（non-pulmonary）脓毒症诱发的和吸入（aspiration）诱发的）；与损伤 / 纤维化（肾纤维化）相关的慢性肾病，例如，狼疮、糖尿病、硬皮病、肾小球肾炎、局灶节段性肾小球硬化、IgA 肾病、高血压、同种异体移植、狼疮和 Alport；肠纤维化，例如，硬皮病和辐射诱发的肠纤维化；肝纤维化，例如，肝硬化，酒精诱发的肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎（NASH），胆管损伤，原发性胆汁性肝硬化，感染或病毒诱发的肝纤维化（例如慢性 HCV 感染）和自身免疫性肝炎；头颈纤维化，例如，辐射诱发的；角膜瘢痕形成，例如，LASIX™、角膜移植和小梁切除术（trabeculectomy）；肥厚性瘢痕形成和疤痕疙瘩，例如，烧伤诱发的和手术诱发的；和其他纤维化疾病，例如，肉瘤样病、硬皮病、脊髓损伤 / 纤维化、骨髓纤维化、血管再狭窄、动脉粥样硬化、韦格纳氏肉芽肿（Wegener's granulomatosis）、混合性结缔组织病和佩罗尼氏病（Peyronie's disease）。

[0264] 在一个方面，CCR2 介导的病症的特征在于病理炎症（pathological inflammation）。术语“病理炎症”，如本文中所使用的，意指与病症关联的不适当的和 / 或慢性炎症，所述病症包括但不限于哮喘、动脉粥样硬化、AIDS 痴呆、糖尿病、炎性肠病、类风湿性关节炎、移植排斥、移植物抗宿主病、多发性硬化（特别是抑制进一步脱髓鞘）、肿瘤、肿瘤转移、肾炎、特应性皮炎、银屑病、心肌缺血和慢性前列腺炎、肥胖症、代谢综合征。此类炎症的特征在于加强的炎性细胞包括浸润白细胞的响应。随着时间流逝，这样的病理炎症通常导致对具有不适当炎症的区域中的组织的损害。因此，提供了治疗患有病理炎症的受试者的方法，包括给受试者施用治疗有效量的结合并且抑制 CCR2 的抗体或其抗原结合部分。

[0265] 抗体或其抗原结合片段还可用于治疗其中牵涉趋化因子包括 MCP-1、MCP-2、MCP-3 和 MCP-4 的结合对 CCR2 的激活的病症。

[0266] 拮抗性抗 CCR2 抗体或其抗原结合片段（例如，4.40 和 / 或 4.9 或其抗原结合片段）可用于治疗炎性或变应性疾病和病症，包括变应性呼吸疾病例如哮喘、变应性鼻炎、超敏性肺疾病、超敏性肺炎、间质性肺疾病（ILD）（例如，特发性肺纤维化，或与类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、系统性硬化、干燥综合征（Sjogren's syndrome）、多肌炎或皮肌炎关联的 ILD）、慢性阻塞性肺疾病、过敏反应或超敏反应、药物变态反应（例如，对青霉素、头孢菌素）、昆虫叮咬变态反应、炎性肠病例如克罗恩病和溃疡性结肠炎、脊柱关节病、硬皮病、银屑病和炎性皮肤病例如皮炎、湿疹、特应性皮炎、变应性接触性皮炎、荨麻疹、血管炎（例如，坏死性、皮肤性和超敏性血管炎）。

[0267] 拮抗性抗 CCR2 抗体或其抗原结合片段（例如，4.40 和 / 或 4.9 或其抗原结合片段）可用于治疗自身免疫性疾病。自身免疫性疾病的实例包括但不限于，阿狄森氏病（Addison's Disease）、溶血性贫血、抗磷脂综合征、类风湿性关节炎、皮炎、变应性脑脊髓炎、肾小球肾炎、古德帕斯彻综合征（Goodpasture's Syndrome）、格雷夫斯病（Graves' Disease）、多发性硬化、重症肌无力、神经炎、眼炎、大疱性类天疱疮、天疱疮、多内分泌腺病、紫癜、赖特氏病（Reiter's Disease）、僵人综合征、自身免疫性甲状腺炎、系统性红斑狼疮、自身免疫性肺炎、格林 - 巴利综合征（Guillain-Barre Syndrome）、胰岛素依赖型糖尿病和自身免疫性炎性眼疾病。

[0268] 在某些情况下，用拮抗性抗 CCR2 抗体治疗的自身免疫性疾病是类风湿性关节炎

(RA)。TH1 病症 RA 是在高加索人中具有约 1% 的发病率的常见人自身免疫性疾病 (Harris, B. J. 等人, 1997, In Textbook of Rheumatology 898-932), 其目前影响二百五十万美国人。RA 的特征在于滑膜关节的慢性炎症和活化的 T 细胞、巨噬细胞和浆细胞的浸润, 从而导致关节软骨的渐进性破坏。其是最严重的关节疾病形式。

[0269] 在另一个方面中, 用拮抗性抗 CCR2 抗体治疗的自身免疫性疾病是多发性硬化 (MS)。MS, 也是 TH1 病症, 是最常见的中枢神经系统 (CNS) 脱髓鞘病, 其影响北美的 350,000 (0.1%) 个个体和全世界的 110 万个体。通常, MS 被认为是部分由促炎 CD4T (Th1) 细胞和单核细胞介导的自身免疫性疾病, 所述细胞识别与在抗原 (Ag) 呈递细胞 (APC) 上表达的 MHC II 类分子结合的特定髓磷脂多肽。

[0270] 拮抗性抗 CCR2 抗体或其抗原结合片段 (例如, 4.40 和 / 或 4.9 或其抗原结合片段) 还可用于治疗人 I 型或胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM), 特征在于朗格汉斯胰岛中 β 细胞的自身免疫性破坏的疾病。 β 细胞的耗竭导致不能调节血液中的葡萄糖水平。在人中, 在糖尿病的发作之前存在长的症状前时期 (presymptomatic period)。在该时期, 胰腺 β 细胞的功能逐渐丧失。疾病的发展与抗胰岛素、谷氨酸脱羧酶和酪氨酸磷酸酯酶 IA2 (IA2) 的自身抗体的存在有关。

[0271] 拮抗性抗 CCR2 抗体或其抗原结合片段 (例如, 4.40 和 / 或 4.9 或其抗原结合片段) 还可用于治疗神经性疼痛。已显示缺乏 CCR2 的小鼠具有减轻的神经性疼痛 (Abbadie 等人, Proc Natl Acad Sci U S A. 100 (13): 7947-52 (2003))。如本文中所使用的, 术语“神经性疼痛”意指由对神经的损伤而引起的疼痛。神经性疼痛与伤害性疼痛 (其是由牵涉小的皮神经或肌肉或结缔组织中的小神经的急性组织损伤而引起的疼痛) 不同。牵涉感受伤害的机制的疼痛在持续时间上通常限定于组织修复的时期并且通常可利用可获得的镇痛剂或阿片样物质缓解, 如 Myers, Regional Anesthesia 20: 173-184 (1995) 中描述的。神经性疼痛通常是持久的或慢性的, 并且通常在初始急性组织损伤后数天或数月发生。神经性疼痛可包括持久的自发性疼痛以及异常性疼痛 (其是对通常非疼痛的刺激疼痛响应)。神经性疼痛还可由痛觉过敏 (其中存在对通常是轻微的疼痛刺激例如针刺的加重的响应) 表征。

[0272] 拮抗性抗 CCR2 抗体可用于缓解由周围神经、背根神经节、脊髓、脑干、丘脑或皮层的病症而引起的神经性疼痛。所述方法可用于缓解神经性疼痛而无论疼痛的病因学。例如, 所述方法可用于缓解由周围神经病症例如神经瘤; 神经压迫; 神经压碾 (nerve crush)、神经牵张 (nerve stretch) 或不完全神经切断; 单神经病或多神经病而引起的神经性疼痛。所述方法还可用于缓解由病症例如背根神经节压迫; 脊髓的炎症; 脊髓的挫伤、肿瘤或部分切除 (hemisection); 脑干、丘脑或皮层的肿瘤; 或对脑干、丘脑或皮层的创伤而引起的神经性疼痛。

[0273] 拮抗性抗 CCR2 抗体或其抗原结合片段 (例如, 4.40 和 / 或 4.9 或其功能性片段) 还可用于治疗动脉粥样硬化。动脉粥样硬化斑块在数十年内发展并且牵涉炎性细胞浸润、平滑肌细胞增殖、细胞外基质的积累、纤维帽形成和血管生成。(Bayes-Genis 等人 Circ. Res. 86: 125-130 (2000))。趋化作用参与动脉粥样硬化的早期发展。细胞群体向血管壁的内部部分迁移并且引起新内膜, 这导致动脉粥样硬化斑块的形成。例如, 单核细胞趋化作用由单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 诱导, 所述蛋白在损伤的动脉壁中在动脉粥样硬化发展

的早期表达。(Furukawa 等人 *Circ. Res.* 84 :306-314(1999) ;Han 等人 *J. Lipid Res.* 40 :1053(1999))。来自 CCR2^{-/-} 小鼠但非来自 CCR2^{+/+} 小鼠的骨髓至 ApoE3-Leiden 小鼠(对饮食诱导的动脉粥样硬化易感的小鼠品系)的移植减少了动脉粥样硬化形成,这表明经由 CCR2 的 MCP-1 信号转导促成动脉粥样硬化(Guo 等人(2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* ;23(3) :447-53)。因此,可给受试者施用 CCR2 拮抗性抗体,特别是结合 CCR2 的第 1 和 / 或第 2 细胞外环的拮抗性抗体,以减少动脉粥样硬化的发病率、治疗或帮助治疗动脉粥样硬化。

[0274] 拮抗性抗 CCR2 抗体或其抗原结合片段(例如,4.40 和 / 或 4.9 或其抗原结合片段)还可用于治疗肥胖症。在肥胖症中,已显示脂肪组织包含大量单核细胞。此类单核细胞可促成脂肪沉积或通常与通常称为代谢综合征的肥胖症关联的各种后遗症的发展。代谢综合征包括这样的改变如糖尿病的发展。

[0275] 拮抗性抗 CCR2 抗体或其抗原结合片段(例如,4.40 和 / 或 4.9 或其抗原结合片段)还可用于治疗脉管系统特别是动脉例如冠状动脉的狭窄或再狭窄,例如由血管介入(例如,手术性、治疗性或机械性介入)以及新内膜增生引起的狭窄或再狭窄。例如,通常引起血管腔开口狭窄的再狭窄可因血管损伤而引起,所述血管损伤包括但不限于由下列引起的血管损伤:血管移植操作、血管成形术,包括通过气囊进行的血管成形术、动脉粥样硬化斑块切除术、激光或其他适当的方法(例如经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA))、支架放置(例如,机械或生物学血管内支架置入)、血管旁路操作(vascular bypass procedure)或其组合以及用于治疗狭窄或闭塞的血管的其他方法。

[0276] 拮抗性抗 CCR2 抗体或其抗原结合片段(例如,4.40 和 / 或 4.9 或其抗原结合片段)还可用于治疗移植排斥(例如,在移植中),包括同种异体移植排斥或移植物抗宿主病和器官移植相关动脉硬化。

[0277] 作为 CCR2 的拮抗剂的抗体和其抗原结合片段可用作治疗 HIV 感染的治疗剂。HIV-1 和 HIV-2 是人获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的病原体。AIDS 部分因 CD4⁺T 淋巴细胞在 HIV 感染的个体中耗竭而引起。HIV-1 主要感染 T 淋巴细胞、单核细胞 / 巨噬细胞、树突细胞和在中枢神经系统中,小胶质细胞。所有此类细胞都表达 CD4 糖蛋白,其用作 HIV-1 和 HIV-2 的受体。HIV 至靶细胞内的有效进入依赖于病毒外部包膜糖蛋白 gp120 与氨基端 CD4 结构域的结合。

[0278] 此外,已显示 CCR2 充当 HIV-1 的共受体(Frade 等人(1997) *J Clin Invest.* ;100(3) :497-502)。在病毒结合后,HIV-1 包膜糖蛋白介导病毒和宿主细胞膜的融合,从而完成进入过程。由被感染的细胞表面上表达的 HIV-1 包膜糖蛋白指导的膜融合导致细胞间融合,从而导致合胞体。

[0279] 作为 CCR2 的拮抗剂的抗体和其抗原结合片段可用作治疗多种眼科病症包括年龄相关性黄斑变性(AMD)、葡萄膜炎和角膜感染的治疗剂。

[0280] 年龄相关性黄斑变性(AMD)

[0281] 已显示 CCR2 在脉络膜新血管生成(CNV)的发展中的巨噬细胞的募集(其在年龄相关性黄斑变性患者以及血管样条纹、高度近视、眼组织胞浆菌病患者中观察到)中起着重要作用(Tsutsumi, C. 等人 *Journal of Leukocyte Biology* 74 :25-32,2003)。

[0282] 葡萄膜炎

[0283] 已在患有急性特发性前葡萄膜炎 (Yeo, TK, 等人 Cytokine 35 :29-352006) 和特发性免疫介导的后段葡萄膜炎 (Ahad, MA, 等人 MolVis 13 :388-3962007) 的患者中证明了 CCR2 的单核苷酸多态性与其配体 (MCP-1) 之间的相关性。

[0284] 角膜感染 (细菌性) :

[0285] 已显示 CCL2 在角膜感染期间在多形核中性粒细胞 (PMN) 募集的调控中起着重要作用 (Xue, M. L, 等人 Immunology and Cell Biology 85 :525-5312007)。虽然 PMN 是在角膜中消除细菌和促进伤口愈合所必需的, 但此类细胞的持久存在可导致慢性炎症性疾病。

[0286] 作为 CCR2 的拮抗剂的抗体和其抗原结合片段可用作治疗剂用于治疗多种实体瘤和癌症, 包括慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、多发性骨髓瘤、恶性骨髓瘤、何杰金氏病以及前列腺、膀胱、乳腺、宫颈、结肠、肺、肝或胃实体瘤和癌症。

[0287] 前列腺癌

[0288] 已显示 MCP-1 用作前列腺癌生长和浸润的旁分泌和自分泌因子 (Lu, Y. 等人 The Prostate 66 :1311-1318, 2006) 并且已显示 CCR2 的表达与前列腺癌进展相关 (Lu, Y. 等人 Journal of cellular biochemistry 101 :676-685, 2007)。已显示中和性抗 MCP-1 抗体的全身性递送诱导小鼠中前列腺癌肿瘤的消退 (Loberg, R. D., Cancer Res 67 : 9417-94242007)。

[0289] 乳腺癌

[0290] 肿瘤相关巨噬细胞据认为在肿瘤免疫监督和发展中起着至关重要的作用, 并且淋巴细胞的活化和募集受趋化因子包括 MCP-1 调节。已在乳腺癌中显示对于 CCR2 多态性的显著相关性 (Zafiropoulos, A., N. 等人 Journal of medical genetics 41 :e592009)。还已显示 CCL2/CCR2 途径在骨髓样抑制细胞至癌症包括乳腺癌、卵巢癌和胃癌的募集 (这促进肿瘤进展、血管生成和 vasculoangiogenesis) 中起着中枢作用 (Huang, B., 等人 Cancer letters 252 :86-92, 2007)。

[0291] 黑色素瘤

[0292] 还已显示 MCP-1 功能的阻断在小鼠中抑制肿瘤相关巨噬细胞的募集并且阻止肿瘤血管生成和恶性黑色素瘤的生长 (Koga, M. 等人 Biochemical and biophysical research communications 365 :279-284, 2008)。

[0293] 肝癌

[0294] 已显示 CCR2 的阻断减少了肝星形细胞 (基质金属蛋白酶 2 的主要来源, 其在肝肿瘤形成过程中促进了新血管形成) 的运输 (Yang, X. 等人 International journal of cancer 118 :335-345, 2006)。

[0295] 宫颈癌

[0296] 已显示 CCR2 在巨噬细胞募集 (其在来自鳞状表皮内病损的宫颈癌的发展中导致肿瘤血管生成) 中起着重要作用 (Coelho, A., 等人 Gynecologic oncology 96 :760-764, 2005 ; Coelho, A., 等人 Gynecologic and obstetric investigation 64 :208-212, 2007)。

[0297] 卵巢癌

[0298] 已显示 CCL2/CCR2 途径在骨髓样抑制细胞至癌症包括乳腺癌、卵巢癌和胃癌的募集 (这促进了肿瘤进展、血管生成和 vasculoangiogenesis) 中起着中枢作用 (Huang, B., 等人 Cancer letters 252 :86-92, 2007)。

[0299] 可施用抗体一次或多次。可以以每天 4 次至每 6 个月或更长时间 1 次施用抗体。施用可以按计划进行,例如每天 3 次,每天 2 次,每天 1 次,每 2 天 1 次,每 3 天 1 次,每周 1 次,每 2 周 1 次,每个月 1 次,每 2 个月 1 次,每 3 个月 1 次和每 6 个月 1 次。还可通过微型泵(minipump)连续施用抗体。可通过粘膜、口腔、鼻内、吸入、静脉内、皮下、肌内、胃肠外、瘤内或局部途径施用抗体。可局部或全身性施用抗体。

[0300] 可施用抗体 1 次,至少 2 次或进行至少一段时间直至病况得到治疗、缓解或治愈。通常将抗体作为本文中描述的藥物组合物的一部分来施用。抗体的剂量通常在 0.1 至 100mg/kg、0.5 至 50mg/kg、1 至 20mg/kg 或 1 至 10mg/kg 的范围内。抗体的血清浓度可通过本领域已知的任何方法来测量。

[0301] 下列实施例仅用于举例说明并且不被解释为以任何方式限定范围。

[0302] 实施例 1

[0303] 产生抗 CCR2 抗体的杂交瘤的产生

[0304] 在 小 鼠 后 足 垫 中 利 用 用 CCR2B(Genbank MN000648, SEQ ID NO:204) 转 染 的 300-19 细 胞 (10^7 个 细 胞 / 剂 量 / 小 鼠, 于 TITERMAX™ Gold Adjuvant, Sigma, Catalog#T2684, lot#K1599 中 ; 制 备 50/50 体 积) 免 疫 产 生 人 IgG2 和 IgG4 抗 体 的 8 至 10 周 龄 XENOMOUSE™ 小 鼠。小鼠在 3 至 8 周的时间内接受 5 至 9 次在 Aluminium Phosphate Gel Adjuvant(Catalog#1452-250, batch#8937, HCI Biosector(5ul/ 小 鼠 / 加 强)) 和 qCpG(IMMUNEASY™ Mouse Adjuvant)(Catalog#303101 ;lot#11551249 ;Qiagen(15ul/ 小 鼠 / 加 强)) 中 的 加 强 注 射。在融合前 4 天,给小鼠提供于 PBS 中的最后的注射。收集经免疫的小鼠的脾和淋巴结淋巴细胞,将其与非分泌型骨髓瘤 P3-X63-Ag8.653 细胞系融合。将融合的细胞经历如之前所述的 HAT 选择 (Galfre 和 Milstein, Methods Enzymol. 73:3-46(1981))。回收全部分泌 CCR2- 特异性人抗体的一组杂交瘤。就与 CCR2 的结合鉴定许多抗体,如通过 FACS 分析评估的。选择杂交瘤用于进一步研究,其中一些杂交瘤列于表 6 中。

[0305] 根据布达佩斯条约的条款,将示于表 2 中的杂交瘤保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801University Blvd., Manassas, VA20110-2209。杂交瘤已被赋予下列登录号:

[0306] 表 2

[0307]

抗体	小鼠杂交瘤细胞系名称	株系名称	ATCC 名称	保藏日期
4.9.3	PF11-4.9.3	LN 15923	PTA-6979	2005 年 9 月 16 日
4.22.3	PF11-4.22.3	LN 15924	PTA-6981	2005 年 9 月 16 日
4.40.3	PF11-4.40.3	LN 15925	PTA-6980	2005 年 9 月 16 日
7.123.1	PF11-7.123.1	LN 15931	PTA-7341	2006 年 1 月 31 日
8.19.1.1	PF11-8.19.1.1	LN 15932	PTA-7342	2006 年 1 月 31 日

[0308] 实施例 2

[0309] 抗 CCR2 抗体的测序

[0310] 为了分析产生的抗体的结构,从产生抗 CCR2 单克隆抗体的杂交瘤克隆编码包含重链和轻链可变结构域的片段的核酸。克隆 CCR2 抗体的轻链和重链并进行序列验证,如下文用 4.40.2 抗体进行举例说明的:

[0311] 使用 RNEASY™ MINI KIT(Qiagen) 分离 Poly(A)⁺mRNA,使用 ADVANTAGERT-for-PCR 试剂盒(BD Biosciences),利用 oligo(dT) 引物从 mRNA 合成 cDNA。使用表 3 中所列的引物扩增克隆 4.40.2 的 oligo(dT) 引发的 cDNA。使用 PFUULTRA HIGH-FIDELITY Polymerase(Stratagene) 和 PTC-200DNA Engine(MJ Research),利用如下的循环进行扩增:在 95℃ 下进行 2 分钟;25X(在 95℃ 下进行 20 秒,在 55℃ 下进行 30 秒,在 72℃ 下进行 30 秒);在 72℃ 下进行 10 分钟。将 PCR 扩增子克隆入重链和轻链表达载体。然后使用标准方案将载体转化入 MAX EFFICIENCY DH5 α 化学感受态细胞(Invitrogen)。使用 Grills16th BDTv3.1/dGTP 化学药品(Applied Biosystems Inc) 和 3730xl DNA Analyzer(Applied Biosystems Inc) 验证克隆的序列。根据抗体的核苷酸序列和预测的氨基酸序列,鉴定每一个抗体链的基因利用(gene usage)。使用 MACVECTOR™ 和 GENEWORKS™ 软件程序(Oxford Molecular Group,Campbell,CA,USA) 进行与“V Base sequence directory”(MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK;Tomlinson,等人, J. Mol. Biol.,227, 776-798(1992);Hum. Mol. Genet.,3,853-860(1994);EMBO J.,14,4628-4638(1995)) 的比对。

[0312] 表 3:设计用于扩增 4.40.2 的可变结构域引物(5' 至 3')

[0313]

CCR2_440_VH_G2_F	VH3.30	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG (SEQ ID NO:147)
CCR2_440_VH_G2_R	JH3b	GAAGAGACGGTGACCATTGTCCCTT (SEQ ID NO:148)
CCR2_440_VL_K_F	A26	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGAC (SEQ ID NO:149)
CCR2_440_VL_K_R	JK4	GTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTC (SEQ ID NO:150)

[0314] 表 4 显示了选择的杂交瘤抗体克隆的基因利用。

[0315] 表 4:重链和轻链的基因利用

[0316]

克隆	重链种系			κ 轻链种系	
	V _H	D _H	J _H	V _κ	J _κ
4.9.3	VH3-30	D1-7	JH3B	O12	JK2
4.22.3	VH1-46	D1-7	JH3B	A1	JK5
4.39.3	VH1-46	D1-7	JH3B	B3	JK1
4.40.3	VH3-30	D1-7	JH3B	A26	JK4

[0317] 在 IgG4 小鼠中产生杂交瘤克隆,并且一旦获得序列,将可变结构域克隆入 IgG1、IgG2 和 IgG4 形式的表达载体以进行比较。

[0318] 实施例 3

[0319] 抗 CCR2 抗体的诱变

[0320] 轻链可变区中至种系序列的恢复

[0321] 如下通过定点诱变将 CCR24. 40. 2 的轻链中位置 68 上的丙氨酸残基 恢复至种系残基甘氨酸。使用表 5 中的引物进行氨基酸残基 68 的密码子中的点突变。使用 QUIKCHANGE™ II Site-Directed Mutagenesis 试剂盒 (Stratagene), 利用标准方案进行定点诱变, 所述方案包括对循环的下列改动: 在 96℃ 进行 2 分钟; 16X (在 96℃ 下进行 50 秒, 在 68℃ 下进行 10 秒); 在 68℃ 下进行 10 分钟。将经诱变的载体转化入 XL1-Blue 超级感受态细胞 (supercompetent cell)。为了证实诱变是成功的, 使用 Grills16th BDtv3.1/dGTP 化学药品 (Applied Biosystems Inc.) 和 3730xl DNAAnalyzer (Applied Biosystems Inc.) 测定克隆的序列。

[0322] 表 5: 诱变引物 (5' 至 3')

[0323]

CCR2_440_VK_G68A_F	GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACC (SEQ ID NO:151)
CCR2_440_VK_G68A_R	GGTGAAATCTGTCCAGATCCACTGCC (SEQ ID NO:152)

[0324] * 改变的核苷酸以粗体和下划线标示。

[0325] 所得的抗体称为 4. 40A68G (SEQ ID NO:112), 其在轻链可变区的位置 68 处具有甘氨酸。

[0326] 具有铰链稳定性突变的 IgG4 重链恒定区的产生

[0327] 从 pCON-G4(pro) (Lonza, Basel, Switzerland) 衍生的 IgG4 表达载体分离 IgG4 重链恒定区, 所述恒定区在 IgG4L309 同种异型 (Brusco A. 等人, Eur J. Immunogenetics 15: 349-355 (1998)) 的背景中在氨基酸 230 处具有从种系丝氨酸至脯氨酸的铰链区稳定性突变 (Angal, S. 等人 Molecular Immunology 30:105-108 (1993))。

[0328] 使用下列扩增引物, 通过 PCR 诱变将沉默突变 (Lys, AAG → AAA) 引入 pCON-G4(pro) 载体的 G4CH1 外显子的第 11 个核苷酸残基, 以除去 ApaI 识别位点, 从而促进亚克隆:

[0329] G4_Forward

[0330] ttatgctgggcccagctctgtccacacccgcggtcacatggcaccacctctcttgcaGCTTCCACCAAA
GGCCCATCCGTCTTCCCC (SEQ ID NO:153)

[0331] (杂交碱基以大写字母标示 (CH1 的残基 #11 的突变以粗体标示); 非杂交碱基以小写字母标示)

[0332] G4_Reverse:

[0333] tcatattctctagaTCATTTACCCAGAGACAGGGAGAGG (SEQ ID NO:154)

[0334] (杂交碱基以大写字母标示。具有 XbaI 位点的非杂交碱基以小写字母标示)

[0335] 使用 Expand Hi-Fi Polymerase (Roche) 和 PTC-200 DNA ENGINE™ (MJ Research), 利用如下热循环进行扩增: 在 95℃ 下进行 3 分钟; 22X (在 95℃ 下进行 20 秒, 在 58℃ 下进行 30 秒, 在 72℃ 下进行 2 分 10 秒); 在 72℃ 下进行 10 分钟。

[0336] 使用下列引物通过 PCR 诱变在 pCON-G4(pro) 载体的 G4CH1 外显子的核苷酸残基 209 处引入另一个沉默突变 (Thr, ACC → ACA) 以除去 BstEII 位点, 从而便于使用该酶将可变区亚克隆入表达载体:

[0337] G4delBst_F

[0338] CAGCGTGGTGACAGTGCCTCCAGCAG (SEQ ID NO: 155)

[0339] G4delBst_R

[0340] CTGCTGGAGGGCACTGTCACCACGCTG (SEQ ID NO: 156).

[0341] 使用 QUIKCHANGE™ Site-Directed Mutagenesis 试剂盒 (Stratagene) 和 PTC-200 DNA Engine (MJ Research), 利用如下热循环来进行扩增: 在 96℃ 下进行 1 分钟; 14X (在 96℃ 下进行 50 秒, 在 68℃ 下进行 15 分钟 48 秒); 在 72℃ 下进行 10 分钟。

[0342] 然后将称为 S230P 的包含铰链区突变和 2 个沉默突变的所得的 IgG4 恒定区作为 ApaI/XbaI 片段亚克隆入 DHFR 抗体表达载体的 ApaI/XbaI 位点。然后将 4.40.2 抗体的重链可变区克隆入包含 G4S230P 恒定区的表达载体, 从而产生全长重链构建体。具有轻链可变区 A68G 种系置换和重链铰链区 S230P 置换的 4.40 衍生的抗体被称为 4.40 A68G S230P, 其具有 SEQ ID NO: 112 的轻链氨基酸序列和 SEQ ID NO: 116 的重链氨基酸序列。

[0343] 收集来自用表达载体转染的细胞的上清液, 利用标准蛋白 A 亲和层析进行纯化以分离重组免疫球蛋白。然后利用 SDS-PAGE、光散射和分光光度法来表征此类蛋白质。

[0344] 实施例 4

[0345] 体外结合

[0346] 图 1 显示 AF-488 缀合的抗体 4.40A68G S230P 与全血中的人单核细胞 (图 1A)、与 CCR2- 转染的 300-19 细胞 (图 1B) 的体外结合以及不同浓度的 4.40A68G S230P 抗体与 CCR2- 转染的 300-19 的细胞的结合 (如使用抗人 PE 检测的) (图 1C)。简而言之, 使用含有 2% 的热灭活的胎牛血清和 0.002% 的叠氮化钠的 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, 用测试抗体对 100ul 体积中的 1 百万个细胞进行染色。15 分钟后, 加入第二检测抗体。30 分钟后, 在缓冲液中洗涤细胞, 将其重悬浮于 500ul 中, 并在 FACS CALIBUR 上就染色对其进行评估。评估总共 10,000 个事件/管。将每一个抗体浓度的平均通道荧光强度评估为染色量级的指标。

[0347] 实施例 5

[0348] 抗 CCR2 单克隆抗体的亲和常数 (K_D) 的测定

[0349] 为了评估抗体对于 CCR2 的 K_D , 在 3 小时的测定中利用 FACS 评估抗体与表达 CCR2 的 300-19 细胞的结合。简而言之, 使用含有 2% 的热灭活的胎牛血清、0.002% 叠氮化钠和 0.005mg/ml 细胞松弛素 B (Sigma 6762) 的 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 缓冲液, 用测试抗体对 100ul 体积中的 1 百万个细胞进行染色。15 分钟后, 加入第二检测抗体 R-藻红蛋白缀合的亲和纯化 F(ab') 片段驴抗人 IgG H+L (Jackson 709-116-149)。将管在室温下轻轻振荡 3 小时。在缓冲液中洗涤 2 次后, 将细胞重悬浮于 500ul 缓冲液中并且在 FACS CALIBUR™ 上进行评估。评估总共 10,000 个事件/管。将每一个抗体浓度的平均通

道荧光强度评估为染色量级的指标。此类结合研究显示, 4. 40A68G S230P 抗体以 0. 085ug/mL (0. 58nM) 的 K_D 结合转染的细胞上的人 CCR2 (图 2)。当在表达具有 CCR2 的第 1 和第 2 细胞外环的 CCR2/CCR5 嵌合受体的细胞上评估饱和结合时 (参见实施例 7), 如图 6C 中所示, 获得相似的浓度曲线和 K_D ($K_D = 0. 023\text{ug/mL}$ (0. 16nM))。

[0350] 实施例 6

[0351] MCP-1 诱导的趋化作用的抑制

[0352] 就其抑制 THP-1 单核细胞 (ATCC#TIB 202) 响应 CCR2 配体 MCP-1 (CCL2) 的趋化作用的能力评估人抗 CCR2 抗体。如之前所述 (参见 GladueRP 等人, J Biol Chem 278: 40473-40480 (2003)), 在购自 NeuroProbe, Inc. (Gaithersburg, MD) 的 96 孔趋化小室中进行趋化作用。简而言之, 将 CCL2 稀释于含有 0. 1% BSA 的 RPMI 1640 培养基 (Roswell Park Memorial Institute) 中, 然后加入至小室的底部小孔。将具有 5 μm 孔的滤膜 (Neuroprobe) 置于小室的上下孔之间。然后在不同浓度的测试抗体存在或不存在的条件下向顶部小室中加入 THP-1 细胞 (8×10^5)。将装置在 37°C 下于 5% CO_2 潮湿培养箱中温育 3 小时。在温育期后, 从上部小室除去非迁移细胞, 擦净滤膜的顶部。然后向上部小孔中加入 2mM 冷 EDTA, 将趋化小室于 4°C 下温育 20 分钟。然后除去 EDTA, 以 800xg 离心 96 孔微量滴定板 10 分钟。然后取走滤膜, 弃去培养基, 向板中加入 0. 2% FDA。然后于 37°C 下温育板 1. 5 小时, 直至显现黄色。通过在微量滴定板读取器上读取 490nm 处的颜色强度来定量迁移细胞的数量。如表 6 中所显示的, 鉴定到抑制 THP1 趋化作用至不同程度的几种抗体。

[0353] 表 6 :MCP-1 诱导的 THP-1 趋化作用的抑制

[0354]

抗体克隆	IC50 (ug/ml)
4. 40. 3	0. 137
4. 22. 3	0. 138
4. 39. 3	0. 139
4. 9. 2	0. 198
4. 6. 3	0. 400
4. 48. 3	0. 491
4. 41. 1	0. 521
4. 3. 1	0. 618
4. 52. 1	0. 641
4. 59. 2	1. 020
4. 24. 3	2. 264

[0355] 类似地, 抗体 4. 40A68G S230P 抑制 THP-1 单核细胞响应 MCP-1 (而非 CCR1/CCR5 配体 MIP-1) 的趋化作用 ($\text{IC}_{50} = 0. 148\text{ug/ml}$), 如图 3 中所显示的。

[0356] 原代单核细胞的趋化作用

[0357] 将肝素化的人全血在 ACCUSPIN HISTOPAQUE 1077 管 (Sigma; St. Louis, MO) 上分层, 然后进行离心。收集单核细胞级分并用 PBS 洗涤 3 次, 用水裂解红细胞 (RBC), 将细胞以 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 重悬浮于含有 0. 1% BSA (Sigma) 和 10mM HEPES (Gibco) 的 RPMI (Gibco; Grand Isle, NY) 中。将 KLH 对照或抗体稀释物加入至 0. 25nM MCP-1 (Peprotech; Rocky Hill, NJ) 并且将 30ul 置于 48 孔 Boyden 小室 (Neuroprobe; Gaithersburg, MD) 的底部; 阴性对照是单独的培养基。将 5um 无 PVP 滤膜 (Neuroprobe) 置于其上方并且密封小室。将分离的单核细胞与 KLH 对照或抗体稀释物一起在室温下温育 30 分钟。然后向上部小孔中加入 50ul。

将小室在 37℃ 下于 5% CO₂ 潮湿培养箱中温育 90 分钟。温育后,将细胞从上部小孔中吸出,擦静滤膜顶部,风干,用 DIFF-QUIK™ (Dade-Behring ;Newark, DE) 染色,然后计数 6 个视野中迁移细胞的数量。抗体 4.40 A68G S230P 对原代分离的人单核细胞响应 MCP-1 的趋化作用的抑制示于图 4 中。

[0358] 此外,如用 4.40 抗体例证的,针对 CCR1/CCR5 配体 MIP-1a,未观察到对 THP-1 细胞的抑制(图 3)。

[0359] 实施例 7

[0360] CCR2/CCR1 嵌合体的构建

[0361] 就与 CCR2 嵌合体的结合测试抑制 MCP-1 诱导的趋化作用的抗体以定位其表位。这通过评估抗体与 300-19 细胞的结合来实现,所述细胞表达由用 CCR1 的部分进行的 CCR2 的细胞外环(第 1、第 2 和 / 或第 3) 和 N 末端置换(M = CCR2, R = CCR1) 组成的不同受体嵌合体。

[0362] 嵌合受体 MRRR 的构建

[0363] 使用来自 Stratagene 的 **QUIKCHANGE®** Site-Directed mutagenesis 试剂盒和用于突变野生型人 CCR1 中的第一 ApaI 限制性酶位点的下列诱变引物构建 MRRR 嵌合受体(CCR2(M) 的 N 末端、CCR1(R) 的第 1、第 2 和第 3 细胞外环),使用下列引物将其克隆入表达载体 pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 至 BamHI 位点:

[0364] 有义引物 40A:

[0365] CGAGAGGGCCTTTGGGATCCAACTGCTGCC (SEQ ID NO :132)

[0366] 反义引物 40B:

[0367] GGCAGCAGTTGGATCCCAAAGGCCCTCTCG (SEQ ID NO :133)

[0368] 由 J. David Gladstone Institutes 的 Israel Charo 提供克隆入 pCMV-1 衍生的表达载体 (Pharmacia ;Piscataway, NJ) 的包含 FLAG 标记的 MMRR 嵌合体 (CCR2 的 N 末端和第 1 细胞外环、CCR1 的第 2 和第 3 细胞外环) 的嵌合受体。MMRR 嵌合体(该作者称为“2211”)的构建描述于 Montecarlo F. S. 等人 (Methods in Enzymology 228 :70-84(1997)) 中。使用下列诱变引物将嵌合体中的第一 ApaI 位点突变成 BamHI 位点:

[0369] 有义引物 41A:

[0370] GCAAATTGGGATCCAACTCCTGCC (SEQ ID NO :134)

[0371] 反义引物 41B:

[0372] GGCAGGAGTTGGATCCCAATTTGC (SEQ ID NO :135).

[0373] 使用 NdeI 和 BamHI 切割每一个所得的突变的克隆。凝胶分离包含来自 CCR1/pcDNA3BamHI 突变体的载体的片段和只包含来自突变的 MMRR/pCMV1 质粒的 CCR2N 末端的 632 个碱基对的 NdeI/BamHI 片段,将其连接在一起,产生 MRRR/pcDNA3 嵌合体。

[0374] 使用下列诱变引物将 MRRR 嵌合体中的 BamHI 位点突变回 ApaI 位点:

[0375] 有义引物 41C:

[0376] GCAAATTGGGGCCCAACTGCTGCC (SEQ ID NO :136)

[0377] 反义引物 41D:

[0378] GGCAGCAGTTGGGCCCCAATTTGC (SEQ ID NO :137).

[0379] 使用与载体的 FLAG 标记区域同源的有义引物 66C (SEQ ID NO :138) 和与 CCR1 的

3' 末端同源并且包含 HindIII 位点的反义引物 66D (SEQ ID NO :139) PCR 扩增完整的 MRRR 片段。

[0380] 有义引物 66C

[0381] CTCTTGTGCCAGGGTGTGGTCTCCGA (SEQ ID NO :138)

[0382] 反义引物 66D

[0383] GATCGAAGCTTTCAGAACCCAGCAGAGAGTTCATG (SEQ ID NO :139)

[0384] 然后将该片段亚克隆入 pMIG (Van Parijs, L. 等人, Immunity 11 : 281-188 (1999)) 衍生的逆转录病毒构建体的 Pf1MI 和 HindIII 位点 (图 5), 从而取代了插入的基因 (小鼠 / 人嵌合体), 所述插入的基因之前是 FLAG 标记, 之后是 SalI 位点并且已除去内部核糖体进入位点 - 增强型绿色荧光蛋白位点 (IRESE GFP)。

[0385] 嵌合受体 RRRM 和 RMMR 的构建

[0386] 使用两步骤 PCR 法制备 RRRM (CCR1 的 N 末端、第 1 和第 2 细胞外环, 和 CCR2 的第 3 细胞外环) 和 RMMR (CCR1 的 N 末端和第 3 细胞外环, 和 CCR2 的第 2 和第 3 细胞外环) 嵌合受体。

[0387] 对于 RRRM 嵌合体, 首先使用下列引物 PCR 扩增人野生型 CCR2 的第 3 环:

[0388] 有义嵌合引物 89A:

[0389] GACTATACTTATTTCTGTTTTTCATTGTCATTCTCTGAACACC (SEQ ID NO :140)

[0390] 反义引物 81B:

[0391] CGCCAAGCTTCATTATAAAACAGCCGAGA (SEQ ID NO :141).

[0392] 将野生型人 CCR2 克隆入逆转录病毒衍生的表达载体 pMIG 作为模板。使用下列引物 PCR 扩增 N 末端区域至第二细胞外环:

[0393] 有义引物 89C:

[0394] ACGCGTCGACGAAACTCCAAACACCACAGAG (SEQ ID NO :142)

[0395] 反义嵌合引物 89B:

[0396] GTTCAGGAGAATGACAATGAAAACAGAAATAAGTATAGTC (SEQ ID NO :143),

[0397] 并且将野生型 CCR1 克隆入表达载体 pcDNA3 作为模板。

[0398] 凝胶纯化这些片段, 将其组合, 并使用 5' 和 3' 末端引物: 89C (SEQ ID NO :142) 和 81B (SEQ ID NO :141) 将其 PCR 扩增在一起。将所得的片段连接入逆转录病毒载体 (包含 N 末端 FLAG 标记并且已除去 IRESE GFP 的 pMIG) 的 SalI/HindIII 位点。

[0399] 嵌合受体 RMMR 的构建

[0400] 使用克隆入表达载体 pcDNA3 的野生型 CCR1 作为模板和下列引物 PCR 扩增 CCR1 的第 3 细胞外环至细胞质尾部:

[0401] 有义嵌合引物 85A:

[0402] TCATTCTCTGAACACCTTCCAAGACTTCCTGTTACCCCA (SEQ ID NO :144)

[0403] 反义引物 78D:

[0404] GCCAAGCTTCCAGTGTGATGGATATCTGA (SEQ ID NO :145),

[0405] 所述引物与野生型 CCR1/pcDNA3 质粒中插入物的载体 3' 的区域杂交。

[0406] 使用获自 J. David Gladstone Institutes 的 Israel Charo 的 FLAG 标记的 RMMM/pcDNA3 质粒作为模板 PCR 扩增包含 CCR1 的 N 末端和包含 CCR2 的第 1 和第 2 细胞外环的区

域的第二片段。RMMM 嵌合构建体（该作者称为“2111”）的构建描述于 Montecclaro, F. S. 等人 (Methods in Enzymology 228 :70-84(1997)) 中。使用的引物是与 FLAG 标记杂交的有义引物 66C (SEQ ID NO :138) 和反义嵌合引物 85B :

[0407] TGGGTGAACAGGAAGTCTTGGAAGGTGTTTCAGGAGAATGA (SEQ ID NO :146).

[0408] 凝胶纯化这两个片段, 将其组合, 使用 5' 和 3' 末端引物 :66C (SEQ ID NO :138) 和 78D (SEQ ID NO :144) 将其 PCR 扩增在一起。用 Pf 1MI 和 HindIII 消化该终片段, 然后将其连接入含有 N- 末端 FLAG 标记并且除去了 IRESE GFP 的 pMIG 逆转录病毒载体。

[0409] 嵌合体表达

[0410] 从每一个嵌合构建体产生逆转录病毒并且将其用于转导 300-19 细胞。使用抗 FLAG 表位的抗体 M1 (Sigma ;St. Louis, MO, catalog#F3040) 通过 FACS 分析测定表达。

[0411] 实施例 8

[0412] 表位作图

[0413] 使用 FACS 分析评估抗体与 CCR2/CCR1 嵌合受体的结合。用 FLAG 在 N 末端标记所有受体, 并且还用抗 FLAG 抗体 M1 进行染色, 以便可确认受体的表达。图 6A 和 B 举例说明了使用 M1 抗体对 N 末端上的 FLAG 的 FACS 染色 (图 6A), 与 4.40 的染色相比较 (图 6B)。图 6C 举例说明了 4.40A68G S230P 抗体对 RMMR 嵌合体转染的 300-19 细胞的饱和结合曲线。4.40A68G S230P 抗体与未用 CCR2 转染的 300-19 细胞的饱和结合在高至 10ug/mL 的浓度上未显示结合 (图 7A), 然而用全长人 CCR2 转染的 300-19 细胞在高于 0.01ug/mL 的浓度上展示剂量依赖性结合 (图 7B)。此外, 4.40A68G S230P 抗体与只表达 CCR2 的 N 末端和 CCR1 的 3 个环区域 (MRRR) (图 7C) 或只表达 CCR2 的第 3 细胞外环与 CCR1 的 N 末端及第 1 和第 2 环区域 (RRRM) 的嵌合受体的饱和结合在高至 10ug/mL 的浓度上未展示任何显著结合 (图 7D)。相反地, 4.40A68G S230P 抗体与表达 CCR1 的 N 末端和第 3 环区域以及 CCR2 的第 1 和第 2 环区域的嵌合受体 (RMMR) 的饱和结合在高于 0.001ug/mL 的浓度上显示显著的剂量依赖性结合 (图 7E)。通过评估 M1 抗体 (Sigma#F3040) 对 N 末端上的 FLAG 的染色来确认所有此类受体转染子上的受体表达。

[0414] 表 7 :表位作图

[0415]

克隆	全长 CCR2 (MMMM)	CCR2 的 N 末端 (MRRR)	CCR2 的第 1、 第 2 和第 3 环 (RMMM)	CCR2 的 第 1 和第 2 环 (RMMR)	趋化作用 IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	表位
4. 40. 2	+	-	+	+	0. 130	第 1/第 2 环
4. 9. 2	+	-	+	+	0. 198	第 1/第 2 环
4. 52. 3	+	+	-		0. 642	N-末端
4. 22. 3	+	-	+	-	0. 137	第 3 环
4. 6. 3	+	+	+		0. 400	复合的*
4. 48. 3	+	+	+		0. 491	复合的
4. 3. 1	+	+	+		0. 618	复合的
4. 59. 2	+	+	+		1. 020	复合的
4. 41. 1	+	-	-		0. 521	复合的
4. 24. 3	+	-	-		2. 264	复合的
4. 39. 3	+	-	-	-	0. 139	复合的

[0416] * 复合的=结合野生型但不结合嵌合体

[0417] 肽 ELISA

[0418] 此外,还使用肽 ELISA 评估表位与 CCR2 的第一和 / 或第二环的结合。用 PBS/0.05 % Tween20 洗涤 Reacti-Bind NEUTRAVIDIN™ 包被的 HighBinding Capacity ELISA 板 (Pierce ;Rockford, IL) 3 次,然后用 100ul/ 孔的 6ug/ml 生物素化的 CCR2 环 2 (SEQ ID NO :129) 或环 3 (SEQ ID NO :130) 肽 (AnaSpec ;San Jose, CA) 进行包被。将板温育 1 小时,然后洗涤 3 次。然后以系列稀释向板中加入于 PBS/0.1 % BSA/0.05 % Tween20 中稀释的 CCR2 拮抗性抗体 4. 40. 3A68G S230P 或其他一抗并温育 1 小时,对于其他对照亦如此。将板洗涤 3 次,以 1 : 5000 的稀释度向所有孔中加入 100ul/ 孔的 HRP- 小鼠抗人 IgG4 二抗 (Zymed ;So. San Francisco, CA),温育 1 小时。清洗板 3 次,向所有孔中加入 TMB 底物,温育约 30 分钟。用 2M H_2SO_4 终止颜色反应,在板读取器上测量 450nm 处的吸光度读数 (图 8)。鉴定到结合受体的第二细胞外环肽并且不结合第三环的抗体,包括抗体 4. 9 和 4. 40。

[0419] 实施例 9

[0420] 结合选择性

[0421] 通过与密切相关的趋化因子受体 CCR5 的结合的不存在 (如图 9 中所示) 和通过对由 CCR5/CCR1 配体 MIP-1a 诱导的趋化作用的抑制的缺乏 (图 3) 来确认 4. 40A68G S230P 抗体对人 CCR2 的选择性。抗 CCR5 抗体 (PharMingen, catalog#555992) 结合表达 CCR5 的细胞 (图 9b), 而 CCR2 抗体 4. 40. 3A68G S230P 未显示与此类相同细胞的结合 (图 9a)。为了进行此类研究,将经工程改造以表达 CCR5 的 300. 19 细胞与 CCR2 选择性抗体 4. 40A68G S230P 或 CCR5 选择性抗体一起温育 30 分钟。然后在 FACS 缓冲液 (0.02 % 叠氮化钠、2 % 的在 PBS 中的热灭活的胎牛血清) 中洗涤细胞,并使用标准方法,利用流式细胞仪就细胞表面表达进行分析。

[0422] 实施例 10

[0423] 钙动员

[0424] 为了确定抗体 4.40 是否充当针对 CCR2 的功能性拮抗剂并且不具有任何显著的激动剂性质,如之前所述 (Gladue RP 等人, J Biol Chem 278:40473-40480 (2003)) 测试 4.40.3 对 CCR2 转染的 300-19 细胞的钙动员的效应。将 CCR2 转染的 300-19 细胞离心,然后以 2×10^6 个细胞/ml 重悬浮于 PTI 缓冲液 (含有 10mM Hepes (Gibco) 和 4.0mM CaCl_2 (Sigma; St. Louis, MO) 的 HBSS (Gibco, Grand Island, NY)) 中。用 2ul indo-1AM (Molecular Probes; Eugene, OR) /ml (2uM 的终浓度) 装载细胞,在 37°C 下温育 25 分钟。然后用 PTI 缓冲液洗涤细胞 2 次,并以 1×10^7 /ml 重悬浮。将几个浓度的抗体或适当的对照加入细胞并且在室温下温育 30 分钟。向 1mm² 的比色杯 (Sarstedt; Germany) 中加入 1.8ml 预温热的 PTI 缓冲液和 200ul 细胞悬浮液。激发细胞,使用来自 Photon Technology Corporation International (PTI; Lawrenceville, NJ) 的设备测量荧光。使机器暂停,加入 20ul 100nM MCP-1 (Peprotech; Rocky Hill, NJ)。在响应后,按该顺序加入下列试剂以释放和螯合总钙: 20ul 18% Triton X-100; 20ul 3M Tris pH 8.5; 20ul 0.5M EGTA pH 8.5 (全部来自 Sigma)。抗体 4.40 以剂量反应方式抑制 MCP-1 诱导钙动员的能力 (图 10)。使用 4.40A68G S230P 抗体获得相似的结果。

[0425] 实施例 11

[0426] 朝向 CCL2 和 CCL7 的趋化作用的抑制

[0427] 为了确定 4.40A68G S230P 抗体对趋化作用的抑制是否是特异于 MCP-1 的或其是否也可用于其他 CCR2 配体,将 THP-1 细胞朝向 MCP-1 (CCL2) 的趋化作用与朝向 CCL3 (MIP-1a) 的趋化作用相比较,如图 3 中显示的。此外,在抗体 4.40A68G S230P 存在的情况下,还使用与实施例 6 中所述的相似的趋化作用测定评估 CCR2 转染的 300-19 细胞朝向另一个 CCR2 配体 CCL7 (MCP-3) 的迁移。虽然 4.40A68G S230P 抗体抑制朝向两种已知的 CCR2 配体 CCL2 (图 3) 和 CCL7 (图 11) 的趋化作用,但图 3 显示其不阻断朝向 CCR1/CCR5 配体 CCL3 (MIP-1a) 的趋化作用。

[0428] 实施例 12

[0429] 单核细胞中的肌动蛋白多聚化

[0430] 人全血肌动蛋白的多聚化

[0431] 如图 12 中所示,还就其抑制人全血中肌动蛋白的多聚化的能力测试单克隆抗体 4.40A68G S230P。将血液收集在 EDTA 真空采血管 (VWR; Boston, MA) 中,然后将其与抗体的稀释物或 KLH 对照一起在室温下温育 30 分钟。向 48 孔 Corning 板 (VWR) 中加入缓冲液对照或 10 μ l 100nM MCP-1 (Peprotech; Rocky Hill, NJ)。然后加入 100 μ l 血液同时轻轻混合,温育 40 秒,之后用 0.8ml 终止/裂解试剂 (10% 的 FACS 裂解溶液 (Becton Dickinson; San Jose, CA)、20% 的 16% 多聚甲醛 (Electron Microscopy Sciences; Ft. Washington, PA) 和 70% 的 H_2O) 终止反应。将板在室温下温育 10 分钟,离心,然后将细胞转移至 96 孔圆底聚丙烯板中,用 PBS 洗涤 2 次。每孔加入 100 μ l PBS。然后加入 50 μ l 染色剂 (10% 的在 10X HBSS 中的 5mg/ml 溶血卵磷脂 (Sigma), 80% 的 16% 多聚甲醛和 10% 的 6.6uM NBD 类鬼笔环肽 (Molecular Probes; Eugene, OR))。在室温下于黑暗中将细胞染色 1 小时。温育后,用含有 2% 胎牛血清 (Hyclone, Logan UT) 的 PBS 洗涤细胞 2 次,在对单核细胞门控的 FACSCAN (Becton Dickinson) 上定量荧光。如图 12 中所显示的,抗体 4.40A68GS230P 以 0.168ug/ml 的 IC_{50} 抑制肌动蛋白多聚化。

[0432] 食蟹猴全血肌动蛋白多聚化

[0433] 将血液收集在 EDTA 真空采血管 (VWR ;Boston, MA) 中,然后将其与抗体的稀释物或同种型对照一起在室温下温育 30 分钟。在该时间内,向 48 孔 Corning 板 (VWR) 中加入 10ul 100nM MCP-1 (Peprotech ;Rocky Hill, NJ ;终浓度 10nM) 或缓冲液对照 (无 Ca^{+2} 或 Mg^{+2} 但具有 0.2% BSA (Sigma ;St. Louis, MO) 的 HBSS (Gibco ;Grand Island, NY))。然后加入 100ul 血液并轻轻混合,温育 40 秒。用 0.8ml 终止 / 裂解试剂 (10% 的 FACS 裂解溶液 (Becton Dickinson ;San Jose, CA), 20% 的 16% 多聚甲醛 (Electron Microscopy Sciences ;Ft. Washington, PA) 和 70% 的 H_2O) 终止反应。将板温育 10 分钟,离心,用 PBS 洗涤 2 次。然后用染色剂 (10% 的在 10X HBSS 中的 5mg/ml 溶血卵磷脂 (Sigma), 80% 的 16% 多聚甲醛和 10% 的 6.6uM NBD 类鬼笔环肽 (Molecular Probes ;Eugene, OR)) 在室温下于黑暗中将细胞染色 1 小时。温育后,用含有 2% 胎牛血清 (Hyclone, Logan UT) 的 PBS 洗涤细胞 2 次,在对激活的单核细胞门控的 FACSCAN (Becton Dickinson) 上定量荧光。如图 13 中所示,抗体 4.40A68GS230P 以 0.49ug/ml 的 IC_{50} 抑制食蟹猴的全血肌动蛋白多聚化。

[0434] 实施例 13**[0435] 胶原 I mRNA 的定量测定**

[0436] 将人肝星形细胞系 LI-90 (JCRB Cellbank, Japan) 在 37℃ 下于 5% CO_2 潮湿的培养箱中培养在装有 DME 培养基 (补充有 10% 的灭活的 FBS, 100U/ml 青霉素 / 100ug/ml 链霉素和 2mM L-Gln (Invitrogen)) 的培养瓶中。将细胞以 20,000 个细胞 / 孔在 96 孔组织培养板中培养 3 天,用 1000nM MCP-1 (PeproTech) 和不同浓度的 4.40A68G S230P 在 37℃ 下处理 48 小时。除去培养基,通过加入 100ul QUANTIGENE™ Expression 试剂盒 (Panomics) 提供的裂解缓冲液来裂解细胞。按照制造商的说明书进行分支 DNA 测定。简而言之,将总 RNA 样品装载在含有杂交缓冲液和 50fmol/ul 的 Col1A1/GAPDH 探针组的 96 孔微量滴定板上。通过在 46℃ 下温育 60 分钟将捕获的 mRNA 与包含碱性磷酸酶分子的分支 DNA 分子杂交。在与化学发光底物于 46℃ 下进一步温育 30 分钟后,使用发光计 (ARV0sx, Perkin Elmer ; Massachusetts, USA) 定量发光。计算 Col1A1 对 GAPDH 的发光比率,利用 Prism 4.0 软件分析数据以测定 IC_{50} 值 (GraphPad)。如图 14 中所显示的,4.40A68G S230P 以 0.89 $\mu\text{g/mL}$ (6.2nM) 的 IC_{50} 值抑制由 MCP-1 诱导的 LI90 细胞中的胶原 IAI mRNA 的合成。

[0437] 实施例 14**[0438] pERK 磷酸化**

[0439] 从健康志愿者新鲜分离人全血。FACS 分析显示,在加入 MCP-1 后 6 分钟在 CD14+ 单核细胞中存在高水平的细胞外信号调节激酶的磷酸化 (pERK)。4.40A68G S230P 以剂量依赖性方式抑制全血中 MCP-1 诱导的 pERK 磷酸化 (图 15)。在用 MCP-1 离体刺激后,单核细胞中的 pERK 磷酸化可用作机制生物标志物,从而便于 PK/PD 和转化药理学 (translational pharmacology)。在全血测定中获得的 4.40A68G S230P 抗体的 IC_{50} 和 IC_{90} 值分别是 0.44 $\mu\text{g/mL}$ (2.9nM) 和 0.89 $\mu\text{g/mL}$ (6.1nM)。

[0440] 实施例 15**[0441] 鼠急性肝炎模型**

[0442] 还使用肝炎的急性小鼠 ConA 模型检查 4.40A68G S230P 抗体的功效。为了进行该研究,使用其中已用人 CCR2 替代了小鼠 CCR2 的转基因小鼠,因为 4.40A68G S230P 抗体不

识别啮齿类动物 CCR2。给动物单次腹膜内注射 0.1、0.3 或 1.0mg/kg 的在盐水中的 mAb。给单独的组施用 I gG₄ 同种型对照抗体。30 分钟后,通过 i. v. 尾静脉注射给予动物 0.1mL 的 15mg/kg 的在无热原的盐水中的 ConA。给对照组施用无 ConA 的盐水。24 小时后,获得血液样品,分析血浆肝酶。如图 16 中所示,ALT 和 AST 在对照抗体组中显著升高,值接近 25,000U/L。相反地,用 0.5 和 1.0mg/kg 4.40A68G S230P 处理的小鼠显示其血浆肝酶分别显著降低约 50%和 80%。

[0443] 实施例 17

[0444] 动物疾病模型中的治疗效果

[0445] 炎症

[0446] 使用炎症的体内哺乳动物模型测试人抗 CCR2 抗体或其抗原结合片段(包括 4.40 和 4.9 抗体)的治疗效果。在将趋化因子例如 MCP-1 和与哺乳动物 CCR2 反应的抗体或其片段例如 4.40 抗体皮内注射入适当的动物例如兔、小鼠、大鼠、豚鼠或猕猴后,监控白细胞浸润(参见例如, VanDamme, J. 等人, J. Exp. Med. 176 :59-65(1992) ;Zachariae, C. O. C. 等人, J. Exp. Med. 171 :2177-2182(1990) ;Jose, P. J. 等人, J. Exp. Med. 179 :881-887(1994))。就白细胞(例如,嗜酸性粒细胞和粒细胞)的浸润在组织学上评估皮肤活组织检查样品。预期与对照动物相比较,拮抗性抗 CCR2 抗体将减少白细胞的浸润。

[0447] 多发性硬化

[0448] 使用多发性硬化的体内哺乳动物模型测试抗体或其片段(包括 4.40 和 4.9 抗体)的治疗效果。实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)是用作多发性硬化(MS)的动物模型的中枢神经系统(CNS)的 T 细胞介导的炎症性疾病(参见 Steinman L, Neuron 24 :511-514(1999))。在用致脑炎的 MOG₃₅₋₅₅ 肽免疫后(p. i.)的第 0 天和第 7 天,通过皮下(s. c.)注射(两个位置,背侧面)总共 600 μg 的致脑炎的 MOG₃₅₋₅₅(其在含有 70 μg 结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)H37Ra(Difco)的不完全弗氏佐剂(IFA;Difco, Detroit, MI)中乳化),使 C57/J129 和 / 或 C57BL/6 小鼠对活性 EAE 敏感。在免疫后第 0 天和第 2 天,每一只小鼠还经尾静脉静脉内(i. v.)接受 500ng 百日咳毒素(PTX;List Biological Laboratories, Campbell, CA)。一些动物还接受增加剂量的抗 CCR2 拮抗性抗体例如 4.40 抗体。每天就临床体征估量动物并按照下列等级进行评估:0 级,无异常;1 级,虚弱的尾;2 级,无力的尾和后肢的虚弱;3 级,后肢轻瘫;4 级,四肢麻痹;和 5 级,垂死或死亡。

[0449] 此外,对来自视神经、大脑、小脑和脊髓的戊二醛/钨酸固定的组织样品进行光学显微镜研究。使组织样品脱水并且包埋在环氧树脂中,从所述树脂切取 1-μm 切片,用甲苯胺蓝染色。如之前所述(Cannella 等人, Proc Natl Acad Sci USA 95 :10100-10105(1998)),按照 0 至 5 的等级给炎症、脱髓鞘、Wallerian 变性(WD)和髓鞘再生评分。预期用抗 CCR2 拮抗性抗体处理的小鼠与对照动物相比较将展示减轻的临床异常、炎症、脱髓鞘和 WD 的体征。还预期此类减轻将以剂量依赖性的方式发生。

[0450] 神经性疼痛

[0451] 使用神经性疼痛的体内哺乳动物模型测试抗体或其片段(包括 4.40 和 4.9 抗体)的治疗效果。将 C57BL 小鼠分成两组。每日常尾静脉注射给实验组施用抗 CCR2 拮抗性抗体例如 4.40 抗体,而不给第二组施用抗体。在治疗起始后在下列测定中每隔一定时间测试

两个组：

[0452] 跳台实验 (Rota-rod)。开始时,将小鼠在跳台 (以 10rpm 的速度) 上训练 3 分钟。为了进行测试,将速度设置为 10rpm,进行 60 秒,然后加速至 600rpm。记录小鼠在加速开始后跌落所花的时间。

[0453] 热板法。使小鼠习惯温度设置在 45℃ 的热板装置 2 分钟。然后,将小鼠置于热板上,随后将温度改变至 52.5℃ 和 55.5℃ (截断值设置为 30 秒) 各一次,然后改变至 58.5℃ (截断值设置为 20 秒)。记录当小鼠舔其足或跳跃时的时间。

[0454] 福尔马林试验。在测试前 4 天中,每一天使小鼠在测试平台上习惯 2 小时。在研究的当天,将小鼠放置在测试平台上 1 小时,然后在左足的跖面 (plantar surface) 中施用 10 μ l 2% 福尔马林。以 5 分钟的间隔记录 2 分钟的时间内小鼠花在舔或抬起被注射的足的时间,进行 50 分钟。

[0455] 热和机械刺激。通过测量对辐射热刺激的缩足反应时间来评估热敏感性 (Hargreaves 等人, Pain 32:77-88(1988))。通过使用上上下下的范式 (up-and-down paradigm) 用标刻度的弗莱丝 (von Frey filament) 测定机械敏感性 (Chaplan 等人, J. Neurosci. Methods 53,55-63(1994))。

[0456] 神经损伤。用氯胺酮 (50mg/kg, i. m.) 和美托咪啶 (1mg/kg, i. m.) 的混合物麻醉小鼠。紧在髌骨下方平行于坐骨神经产生切口。暴露神经并且从神经上除去任何附着组织。围绕坐骨神经直径的 1/3 至 1/2 用 6-0 丝缝线紧密结扎。用缝合线闭合肌肉,用创伤夹 (wound clip) 闭合伤口。在神经损伤之前和在之后达到 15 天,测试小鼠对机械刺激的反应。

[0457] 预期用抗 CCR2 拮抗性抗体处理的小鼠与对照小鼠相比较将展示减小的神经性疼痛体征。

[0458] 表 8 :CDR 序列 (SEQ ID NO :)

[0459]

抗体	V _H CDR1	V _H CDR2	V _H CDR3	V _L CDR1	B _L CDR2	V _L CDR3
4. 9	12	13	14	30	31	32
4. 22	48	49	50	66	67	68
4. 40	84	85	86	102	103	104
4. 39	177	178	179	195	196	197

[0001]

序列表

<110> Pfizer Inc

<120> CCR2 抗体

<130> PC032985

<160> 203

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1350

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtgggccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
tctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccaggt	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt caaacatatg atggaagaaa taaatactat	180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa aacgttgat	240
ctgcaaatga acagactgag agctgaggac acggtgtgt attattgtgc gagagatcag	300
gcgtactgga agtactttga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcacgcgc	360
tcttcagctt ccaccaaggc cccatccgtc tccccctgg cgcctgctc caggagcacc	420
tccgagagca cagccgccct gggtgcctg gtcaaggact acttcccga accggtgacg	480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggctgcaca ccttcccgc tgctctacag	540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg	600
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt	660
gagtccaaat atgggtcccc atgcccatac tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca	720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctccc gaccctgag	780
gtcacgtgcg tggagggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac	840
gtggatggcg tggagggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc	900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacgcgc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag	960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtctctca tcgagaaaac catctccaaa	1020
gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacacctgc ccccatccca ggaggagatg	1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggt tctaccccag cgacatcgcc	1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1200

[0002]

gactccgacg gctccttctt cctctacage aggetaaccg tggacaagag caggtggcag	1260
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggetc tgcacaacca ctacacacag	1320
aagagcctct cctgtctctt gggtaaata	1350

<210> 2
<211> 366
<212> DNA
<213> 智人

<400> 2 caggtgcage tgggtggagtc tgggggagge gtggtccage ctgggaggte cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccagget	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt caaacatatg atggaagaaa taaatactat	180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa aacgttgtat	240
ctgcaaatac acagactgag agctgaggac acggctgtgt attattgtgc gagagatcag	300
gcgtactgga agtactttga tgettttgat atctggggcc aagggaacaat ggtcaccgtc	360
tcttca	366

<210> 3
<211> 15
<212> DNA
<213> 智人

<400> 3 agttatggca tgcac	15
-----------------------------	----

<210> 4
<211> 51
<212> DNA
<213> 智人

<400> 4 gttcaaacat atgatggaag aaataaatac tatgcagact ccgtgaaggg c	51
---	----

<210> 5
<211> 39
<212> DNA
<213> 智人

<400> 5 gatcaggcgt actggaagta ctttgatgct tttgatata	39
---	----

<210> 6
<211> 90
<212> DNA

[0003]

<213> 智人

<400> 6

cagggtgcage tgggtggagtc tggggggagge gtgggtccage ctgggaggtc cctgagactc 60

tectgtgcag cctctggatt caccttcagt 90

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> 智人

<400> 7

tgggtccgcc aggtccagg caaggggctg gagtgggtgg ca 42

<210> 8

<211> 96

<212> DNA

<213> 智人

<400> 8

cgattacca tctccagaga caattccaag aaaacgttgt atctgcaaat gaacagactg 60

agagctgagg acacggctgt gtattattgt gcgaga 96

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> 智人

<400> 9

tggggccaag ggacaatggc caccgtctct tea 33

<210> 10

<211> 449

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Gln Thr Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

[0004]

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

[0005]

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys

<210> 11
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

[0006]

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Gln Thr Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Ala Tyr Trp Lys Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Val Gln Thr Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 14
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

[0007]

Asp Gln Ala Tyr Trp Lys Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 19
<211> 645

[0008]

<212> DNA
<213> 智人

<400> 19
gacatccaga tgaccacgac tccatcctcc ctgtctacat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtc gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacaatt ccccgatcag ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat ctcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gctgctgaa gaacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggcg gataacgccc tccaatcggg taactccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcactaca gctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtag 645

<210> 20
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 20
gacatccaga tgaccacgac tccatcctcc ctgtctacat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtc gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacaatt ccccgatcag ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 21
<211> 33
<212> DNA
<213> 智人

<400> 21
cgggcaagtc agagcattag cagctattta aat 33

<210> 22
<211> 21
<212> DNA

[0009]

<213>	智人	
<400>	22	
	getgcatcca gtttgcaaag t	21
<210>	23	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	23	
	caacagagtt acaattcccc glgcagt	27
<210>	24	
<211>	69	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	24	
	gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctacat ctgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgc	69
<210>	25	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	25	
	tggtatcagc agaaaccagg gaaagccct aagctcctga tctat	45
<210>	26	
<211>	96	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	26	
	gggtcccat caaggttcag tggcagtgga tctgggacag atttcaactct caccatcagc	60
	agttctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgt	96
<210>	27	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	27	
	tttggccagg ggaccaagct ggagatcaaa	30
<210>	28	
<211>	214	
<212>	PRT	

[0010]

<213> 智人

<400> 28

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Ser Pro Cys
85 90 95

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Lys Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

[0011]

<210> 29
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Ser Pro Cys
85 90 95

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

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

[0012]

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

Gln Gln Ser Tyr Asn Ser Pro Cys Ser
1 5

<210> 33
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 35
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

[0013]

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggetgag	gtgaagaagc	ctggggccctc	agtgaaggtt	60
tcttgcgaagg	catctggata	caccttcacc	agctactata	tgcactggat	acgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagt	gatgggaatg	atcaacccta	gtggtggtag	cacaacctac	180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcaccttg	accaggggaca	cgtccacgag	cacagtctac	240
atggacctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtat	attactgtgc	gagagagaga	300
tggtataagt	ggaacttcga	tgtttttgat	atctggggcc	aaggggacaat	ggtcaccgtc	360
tcttcagctt	ccaccaaggg	cccatccgtc	tccccctgg	cgcctgtctc	caggagcacc	420
tccgagagca	cagccgcctt	gggctgcctg	gtcaaggact	acttccccga	accggtgacg	480
gtgtctgtga	actcaggegc	cctgaccagc	ggcgtgcaca	ccttcccggc	tgtcttacag	540
tcttcaggac	tctactccct	cagcagcgtg	glgaccgtgc	cctccagcag	cttgggcacg	600
aagacctaca	cctgcaacgt	agatcacaag	cccagcaaca	ccaaggttga	caagagagtt	660
gagtcacaaat	atggctcccc	atgcccatca	tgcccagcac	ctgagttcct	ggggggacca	720
tcagtcttcc	tgttcccccc	aaaacccaag	gacactctca	tgatctcccg	gacccctgag	780
gtcacgtgcg	tgggtggtga	cgtgagccag	gaagaccccg	aggtccagtt	caactggtac	840
gtggatggcg	tggaggtgca	taatgccaa	acaaagccgc	gggaggagca	gttcaacagc	900
acgtaccgtg	tggtcagcgt	cctcaccgtc	ctgcaccagg	actggctgaa	cggcaaggag	960
tacaagtgca	aggtctccaa	caaaggcctc	ccgtctctca	tgcagaaaac	catctccaaa	1020
gccaaagggc	agccccgaga	gccacaggtg	tacacctgtc	ccccatccca	ggaggagatg	1080
accaagaacc	aggtcagcct	gacctgcctg	gtcaaagget	tctaccccag	cgacatcgcc	1140
gtggagtggg	agagcaatgg	gcagccggag	aacaactaca	agaccacgcc	tcccgtgctg	1200
gactccgaag	gctccttctt	cctctacagc	aggetaaccg	tggacaagag	caggtggcag	1260
gaggggaaatg	tcttctcatg	ctccgtgatg	catgaggctc	tgcacaacca	ctacacacag	1320
aagagcctct	cctgtctctt	gggtaaatga				1350

<210>	38	
<211>	366	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	38	
cagggtgcagc	tgggtgcagtc	tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcttgcgaagg	catctggata	caccttcacc agctactata tgcactggat acgacaggcc 120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggaatg atcaacccta gtggtggttag cacaacctac 180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcaccttg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
atggacctga	gcagcctgag	atctgaggac acggccgtat attactgtgc gagagagaga 300
tgggtataagt	ggaacttcga	tgtttttgat atctggggcc aaggggacaat ggtcacccgc 360
tcttca		366
<210>	39	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	39	
agctactata	tgcac	15
<210>	40	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	40	
atgatcaacc	ctagtgtgtg	tagcacaacc tacgcacaga agttccaggg c 51
<210>	41	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	41	
gagagatggt	ataagtggaa	cttcgatggt tttgatata 39
<210>	42	
<211>	90	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	42	
cagggtgcagc	tgggtgcagtc	tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcttgcgaagg	catctggata	caccttcacc 90

[0015]

<210>	43	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	43	
	tggatacgac aggccctgg acaaggcctt gaggatgg ga	42
<210>	44	
<211>	96	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	44	
	agatcacct tgaccagga cagtcacg agcacagtet acatggacct gacagcctg	60
	agatctgagg acacggcctt atattactgt gcgaga	96
<210>	45	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	45	
	tggggccaag ggacaatggt caccgtctct tca	33
<210>	46	
<211>	449	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	46	
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
	1 5 10 15	
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
	20 25 30	
	Tyr Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
	35 40 45	
	Gly Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe	
	50 55 60	
	Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr	
	65 70 75 80	

[0016]

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

[0017]

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys

<210> 47

<211> 122

<212> PRT

<213> 智人

<400> 47

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

[0018]

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48

Ser Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49

Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 50
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50

Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Val Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 51
<211> 30

[0019]

<212> PRT
<213> 智人

<400> 51

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 52
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 53
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53

Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Asp
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 55
<211> 648
<212> DNA
<213> 智人

<400> 55

gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaca gccgacctcc 60

[0020]

atctcctgca ggtctagtc aagcccgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg	120
cttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggttcc taactgggac	180
gctggggtec cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
agcagggtgg aggcctgagga tgttgggttt tattacactg gccgatcgat caccgtcgge	300
caaggacac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtactcc	480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg	540
acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
ggcctgagct cgccctcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag	648

<210> 56
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 56	
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgccgtca ccttggaca gccggcctcc	60
atctcctgca ggtctagtc aagcccgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg	120
cttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggttcc taactgggac	180
gctggggtec cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
agcagggtgg aggcctgagga tgttgggttt tattacactg gccgatcgat caccgtcgge	300
caaggacac gactggagat taaa	324

<210> 57
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 57	
aggtctagtc aaagcccggt atacagtgat ggaaacacct acttgaat	48

<210> 58
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 58	
aaggtttcta actgggacgc t	21

[0021]

<210>	59	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	59	
actggccgat cgatcacc		18
<210>	60	
<211>	69	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	60	
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgccegtca ccttggaca gccggcctcc		60
atctcctgc		69
<210>	61	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	61	
tggcttcagc agaggccagg ccaatctcca aggcgcctaa ttat		45
<210>	62	
<211>	93	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	62	
gggtgccag acagattcag cggcagtggg tcaggcactg atttcacact gaaaatcagc		60
agggtggagg ctgaggatgt tgggttttat tac		93
<210>	63	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	63	
gtcgccaag ggacacgact ggagattaaa		30
<210>	64	
<211>	215	
<212>	PRT	
<213>	智人	
<400>	64	
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly		
1 5 10 15		

[0022]

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Pro Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp Ala Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Arg Ser
85 90 95

Ile Thr Val Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 65
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

[0023]

<400> 65

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Pro Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp Ala Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Phe Tyr Tyr Thr Gly Arg Ser
85 90 95

Ile Thr Val Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 66

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 66

Arg Ser Ser Gln Ser Pro Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 67

Lys Val Ser Asn Trp Asp Ala
1 5

<210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

[0024]

<400> 68

Thr Gly Arg Ser Ile Thr
1 5

<210> 69

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人

<400> 69

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 70

Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 71

<211> 31

<212> PRT

<213> 智人

<400> 71

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Phe Tyr Tyr
20 25 30

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 72

Val Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
1 5 10

[0025]

<210>	73					
<211>	1350					
<212>	DNA					
<213>	智人					
<400>	73					
caggtgcagc	tggtaggagtc	tgaggaggagc	gtggtagcagc	ctggaggagtc	cctgagactc	60
tctgtgcag	cctctggact	caccttcagt	agctatggca	tgcactgggt	cggccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atattatatg	atggaaagaa	taaatactat	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agctgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatcag	300
ggctactgga	cctactttga	tgtttttgat	atctggggcc	aagggaacaat	ggtcaccgtc	360
tcttcagctt	ccaccaaggg	cccatccgtc	tccccctgg	cggcctgctc	caggagcacc	420
tccgagagca	cagccgccct	gggtgcctg	gtcaaggact	acttcccga	accggtgacg	480
gtgtcgtgga	actcaggcgc	cctgaccagc	ggcgtgcaca	ccttcccggc	tgtcctacag	540
tcctcaggac	tctactccct	cagcagcgtg	gtgaccgtgc	cctccagcag	cttgggcacg	600
aagacctaca	cctgcaacgt	agatcacaa	cccagcaaca	ccaagggtgga	caagagagtt	660
gagtccaaat	atgggtccccc	atgcccatca	tgccagcac	ctgagtctct	ggggggacca	720
tcagtcctcc	tgccccccc	aaaaccaag	gacactctca	tgaletccc	gacccctgag	780
gtcacgtgcg	tggtaggtgga	cgtgagccag	gaagaccccg	aggctcagtt	caactggtac	840
gtggatggcg	tggaggtgca	taatgccaag	acaaagccgc	gggaggagca	gttcaacagc	900
acgtaccgtg	tggtcagcgt	cctcacccgc	ctgcaccagg	actggctgaa	cggcaaggag	960
tacaagtgca	aggtctccaa	caaaggccct	cgtctctcca	tcgagaaaac	catctccaaa	1020
gccaaagggc	agccccgaga	gccacagggt	tacacctgc	ccccatccca	ggaggagatg	1080
accaagaacc	aggtcagcct	gacctgcctg	gtcaaaggct	tctaccccag	cgacatcgcc	1140
gtggagtggg	agagcaatgg	gcagccggag	aacaactaca	agaccacgcc	tcccgtgctg	1200
gactccgacg	gtctcttctt	cctctacagc	aggctaaccg	tggacaagag	cagggtggcag	1260
gaggggaatg	tcttctcatg	ctccgtgatg	catgaggctc	tgcacaacca	ctacacacag	1320
aagagcctct	cctgtctctt	gggtaaatga				1350

<210> 74
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> 智人

[0026]

<400> 74
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagge gtggtccage ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggact caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtl atattalatg atggaaagaa taaataclal 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatac acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcag 300
 gcgtactgga cctactttga tgettttgat atctggggcc aagggaacaat ggtcacccgc 360
 tcttca 366

<210> 75
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 75
 agctatggca tgcac 15

<210> 76
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 76
 gttatattat atgatggaaa gaataaatac tatgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 77
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 77
 gatcaggcgt actggaccta ctttgatgct ttgatatac 39

<210> 78
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 78
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagge gtggtccage ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggact caccttcagt 90

<210> 79
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 智人

[0027]

<400> 79	
tgggtccgcc aggtccagg caaggggctg gagtgggtgg ca	42
<210> 80	
<211> 96	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 80	
cgattcacca tetccagaga caattccaag aacacgctgt atctgcaaat gaacagcctg	60
agagctgagg acacggctgt gtattactgt gcgaga	96
<210> 81	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 81	
tggggccaag ggacaatggt caccgtctct tca	33
<210> 82	
<211> 449	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 82	
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ala Val Ile Leu Tyr Asp Gly Lys Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
Ala Arg Asp Gln Ala Tyr Trp Thr Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp	
100 105 110	

[0028]

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

[0029]

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys

<210> 83
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 83

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Leu Tyr Asp Gly Lys Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0030]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Ala Tyr Trp Thr Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 84
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 84

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 85

Val Ile Leu Tyr Asp Gly Lys Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 86
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 86

Asp Gln Ala Tyr Trp Thr Tyr Phe Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 87
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 87

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

[0031]

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Leu	Thr	Phe	Ser
			20					25					30

<210> 88
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 88

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala
1			5					10					

<210> 89
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 89

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
1			5					10						15	

Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 90
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 90

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1			5					10		

<210> 91
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 91

gaaattgtgc	tgactcagtc	tccagacttt	cagtctgtga	ctccaaagga	gaaagtcacc	60
atcacctgcc	gggccagtc	gagcattgg	agtagcttac	actggtaacca	gcagaaacca	120
gatcagtctc	caaagctct	catcaagtat	gcttcccagt	ccttctcagg	ggteccctcg	180
aggttcagtg	gcagtggatc	tgcgacagat	ttcaccctca	ccatcaatag	cctggaagct	240

[0032]

gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtagtagtt taccgctcac ttteggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg getgcacat ctgttctcat cttecegeca	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taactttctat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgecc tccaateggg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
ctgagctcgc cctgcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag	645

<210> 92
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 92 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc	60
atcacctgcc gggccagtc gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca	120
gacagctctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggteccctcg	180
aggttcagtg gcagtggatc tgcgacagat ttcacctca ccatcaatag cctggaagct	240
gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtagtagtt taccgctcac ttteggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 93
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 93 egggccagtc agagcattgg tagtagetta cac	33
--	----

<210> 94
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 94 tatgttccc agtcttctc a	21
-----------------------------------	----

<210> 95
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 95

[0033]

catcagagta gtagtttacc gctcact	27
<210> 96	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 96	
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc	60
atcacctgc	69
<210> 97	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 97	
tggtaccagc agaaaccaga tcagtctcca aagctectca tcaag	45
<210> 98	
<211> 96	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 98	
ggggtcccct cgaggttcag tggcagtgga tctgcgacag atttcaccct caccatcaat	60
agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat tactgt	96
<210> 99	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 99	
ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa	30
<210> 100	
<211> 214	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 100	
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys	
1 5 10 15	
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser	
20 25 30	

[0034]

Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50				55					60				
Ser	Gly	Ser	Ala	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Ala
65					70					75				80	
Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Leu
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
			100					105					110		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
		115					120					125			
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
	130					135					140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
			180					185					190		
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
		195					200					205			
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
		210													
<210>	101														
<211>	107														
<212>	PRT														
<213>	智人														
<400>	101														
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Phe	Gln	Ser	Val	Thr	Pro	Lys
1				5					10					15	

[0035]

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 102
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 102

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
1 5 10

<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 103

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 104

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

[0036]

<210> 105
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 105

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 106
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 106

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys
1 5 10 15

<210> 107
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 107

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 108
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 108

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 109
<211> 645
<212> DNA
<213> 智人

<400> 109

[0037]

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc	60
atcacctgcc gggccagtc gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca	120
gatcagtctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtccctcgc	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcacctca ccatcaatag cctggaagct	240
gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtagtagtt tacgctcac ttctggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat ctcccccca	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taactttat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag	645

<210> 110
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 110	
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc	60
atcacctgcc gggccagtc gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca	120
gatcagtctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtccctcgc	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcacctca ccatcaatag cctggaagct	240
gaagatgctg caacgtatta ctgtcatcag agtagtagtt tacgctcac ttctggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 111
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 111	
gggggtccct cgaggttcag tggcagtgga tctgggacag atttcacct caccatcaat	60
agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat tactgt	96

<210> 112
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 智人

[0038]

<400> 112

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

[0039]

<210> 113
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 113

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 114
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 114

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 115
<211> 1350
<212> DNA
<213> 智人

<400> 115

cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60

[0040]

tcctgtgcag cctctggaact caccttcagt agctatggca tgcactgggt cegccagget	120
ccaggaagg ggcctggagt ggtggaagtt atattatatg atggaaagaa taaatactat	180
gcagactccg tgaaggcccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcag	300
gcgtactgga cctactttga tgcttttgat atctggggcc aagggaacaat ggteaccgtc	360
tcttcagett ccaccaaggg cccatccgtc tccccctgg cgcctgtctc caggagcacc	420
tccgagagca cagccgccct gggtgcctg gteaaggact acttccccga accggtgacg	480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggctgcaca ccttccggc tgctctacag	540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg	600
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaagggtga caagagagtt	660
gagtcacaat atggtccccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca	720
tcagtcttcc tgttccccc aaaaccaag gacactctca tgatctccg gaccctgag	780
gtcacgtgcg tgggtggtga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac	840
glggatggcg tggagglgca taalgccaag acaaagccgc gggaggagca gltcaacagc	900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggtgaa cggcaaggag	960
tacaagtga aggtctccaa caaaggcctc cgtctctcca tcgagaaaac catctccaaa	1020
gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacacctgc ccccatcca ggaggagatg	1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctacccag cgacatcgcc	1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgctgtg	1200
gactccgaag gctccttctt cctctacagc aggetaaccg tggacaagag caggtggcag	1260
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgagctc tgcacaacca ctacacacag	1320
aagagcctct cctgtctct gggtaaatga	1350

<210> 116
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 116

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

[0041]

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

[0042]

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys

<210> 117
<211> 389
<212> PRT
<213> 智人

<400> 117

[0043]

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

[0044]

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

<210> 118
 <211> 1167
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 118	
atggacagca aaggttcgtc gcagaaaggg tcccgcctgc tcttgetget ggtggtgtca	60
aatctactct tgtgccaggg tgtggtctcc gattacaaag atgatgatga tgtcgacgaa	120
actccaaaca ccacagagga ctatgacacg accacagagt ttgactatgg ggatgcaact	180
cctgtccaga aggtgaacga gagggccttt ggggcccac tectgcctcc gctctactcg	240
ctgggtgttca tctttggttt tgtgggcaac atgctggteg tctcatctt aataaactgc	300

[0045]

Val Asn Glu Arg Ala Phe Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser
65 70 75 80

102

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

[0047]

305	310	315	320
Thr Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys Ile Asn Pro			
	325	330	335
Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe Arg Arg Tyr Leu Ser Val			
	340	345	350
Phe Phe Arg Lys His Ile Thr Lys Arg Phe Cys Lys Gln Cys Pro Val			
	355	360	365
Phe Tyr Arg Glu Thr Val Asp Gly Val Thr Ser Thr Asn Thr Pro Ser			
	370	375	380
Thr Gly Glu Gln Glu Val Ser Ala Gly Leu			
385	390		

<210> 120
 <211> 1182
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 120
 atggacagca aaggttegte gcagaaaggg tcccgeetgc tcttgetget ggtggtgtca 60
 aatctactct tgtgccaggg tgtggtctcc gattacaaag atgatgatga tgtcgacgaa 120
 actccaaaca ccacagagga ctatgacacg accacagagt ttgactatgg ggatgcaact 180
 ccgtgccaga aggtgaacga gagggccttt ggggcccac tctgtccccc tctgtactcc 240
 ttggtatttg tcattggcct gggttgaaac atcctggtgg tcttggctct tgtgcaatac 300
 aagaggctaa aaaacatgac cagcatctac ctctgaacc tggccatttc tgacctgctc 360
 ttctgttca cgttccctt ctggatcgac tacaagttga aggatgactg ggtttttggt 420
 gatgccatgt gtaagatcct ctctgggttt tattacacag gcttgtacag cgagatcttt 480
 ttcatcatec tgcctgacgat tgacaggtac ctggccatcg tccacgccgt gtttgccttg 540
 cgggcacgga ccgtcacttt tgggtgcate accagcatca tcatttgggc cctggccate 600
 ttggttcca tgccaggett ataatttcc aagacccaat gggaattcac tcaccacacc 660
 tgcagccttc actttcctca cgaaagccta cgagagtgga agctgtttca ggctctgaaa 720
 ctgaacctct ttgggctggt attgcctttg ttggtcatga tcacttgeta cacagggatt 780
 ataaagattc tgetaagaag accaaatgag aagaaatcca aagctgtccg ttgattttt 840
 gtcateatga tcattttttt tctcttttgg acccctaca atttgactat acttatttct 900

[0048]

gttttcagg aattcttcgg cctgagtaac tgtgaaagca ccagtcaact ggaccaagec 960
acgcaggtga cagagactct tgggatgact cactgctgca tcaatcccat catctatgcc 1020
ttcgttgggg agaagttcag aaggtatctc tcggtgttct tccgaaagca catcaccaag 1080
cgcttctgca aacaatgtcc agttttctac agggagacag tggatggagt gacttcaaca 1140
aacacgcett ccaactgggga gcaggaagtc tcggtgtggt ta 1182

<210> 121
<211> 390
<212> PRT
<213> 智人

<400> 121

Met Asp Ser Lys Gly Ser Ser Gln Lys Gly Ser Arg Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Val Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys Gln Gly Val Val Ser Asp Tyr
20 25 30

Lys Asp Asp Asp Asp Val Asp Glu Thr Pro Asn Thr Thr Glu Asp Tyr
35 40 45

Asp Thr Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Gly Asp Ala Thr Pro Cys Gln Lys
50 55 60

Val Asn Glu Arg Ala Phe Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser
65 70 75 80

Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn Met Leu Val Val Leu Ile
85 90 95

Leu Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys Cys Leu Thr Asp Ile Tyr Leu Leu
100 105 110

Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Ile Thr Leu Pro Leu Trp
115 120 125

Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ala Met Cys Lys
130 135 140

Leu Phe Thr Gly Leu Tyr His Ile Gly Tyr Phe Gly Gly Ile Phe Phe
145 150 155 160

[0049]

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

[0050]

385

390

<210> 122

<211> 1170

<212> DNA

<213> 智人

<400> 122

```

atggacagca aaggttcgtc gcagaaaggg tcccgcctgc tctgctgct ggtgggtgtca      60
aatctactct tgtgccaggg tgtggtctcc gattacaaag atgatgatga tgtcgacgaa      120
actccaaaca ccacagagga ctatgacacg accacagagt ttgactatgg ggatgcaact      180
ccgtgccaga aggtgaacga gagggccttt ggggcccac tctgcctcc gctctactcg      240
ctgggtgttc tctttggttt tgtgggcaac atgctggctg tctcatctt aataaactgc      300
aaaaagctga agtgettgac tgacatttac ctgctcaacc tgcccatctc tgatctgctt      360
tttcttatta ctctccatt gtgggtctac tctgctgcaa atgagtgggt ctttgggaat      420
gcaatgtgca aattattcac agggtgttat cacatcggtt attttgccg aatcttcttc      480
atcactctcc tgacaatcga tagatactg gctattgtcc atgctgtgtt tgetttaaaa      540
gccaggacgg tcacctttgg ggtggtgaca agtgtgatca cctggttggg ggetgtgttt      600
gcttctgtcc caggaatcat ctttactaaa tgccagaaag aagattctgt ttatgtctgt      660
ggcccttatt ttccacgagg atggaataat ttccacaca taatgaggaa cttttgggg      720
ctggctctgc cgtgctcat catggctatc tgctactcgg gaatcctgaa aacctgctt      780
cgggtgtcga acgagaagaa gaggcatagg gcagtgaag tcactttcac catcatgatt      840
gtttactttc tcttctggac tccctataac attgtcatte tctgaacac cttccaggaa      900
ttcttcggcc tgagtaactg tgaaagcacc agtcaactgg accaagccac gcaggtgaca      960
gagactcttg ggatgactca ctgctgcac aatcccatca tctatgcctt cgttggggag      1020
aagttcagaa ggtatctctc ggtgttcttc cgaaagcaca tcaccaagcg cttctgcaaa      1080
caatgtccag tttctacag ggagacagtg gatggagtga cttcaacaaa cagccttcc      1140
actggggagc aggaagtctc ggetggttta      1170

```

<210> 123

<211> 400

<212> PRT

<213> 智人

<400> 123

Met Asp Ser Lys Gly Ser Ser Gln Lys Gly Ser Arg Leu Leu Leu Leu

[0051]

1	5	10	15
Leu Val Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys Gln Gly Val Val Ser Asp Tyr	20	25	30
Lys Asp Asp Asp Asp Val Asp Leu Ser Thr Ser Arg Ser Arg Phe Ile	35	40	45
Arg Asn Thr Asn Glu Ser Gly Glu Glu Val Thr Thr Phe Phe Asp Tyr	50	55	60
Asp Tyr Gly Ala Pro Cys His Lys Phe Asp Val Lys Gln Ile Gly Ala	65	70	75
Gln Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val	85	90	95
Gly Asn Met Leu Val Val Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys	100	105	110
Cys Leu Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu	115	120	125
Phe Leu Ile Thr Leu Pro Leu Trp Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp	130	135	140
Val Phe Gly Asn Ala Met Cys Lys Leu Phe Thr Gly Leu Tyr His Ile	145	150	155
Gly Tyr Phe Gly Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg	165	170	175
Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg Ala Arg Thr Val	180	185	190
Thr Phe Gly Val Ile Thr Ser Ile Ile Ile Trp Ala Leu Ala Ile Leu	195	200	205
Ala Ser Met Pro Gly Leu Tyr Phe Ser Lys Thr Gln Trp Glu Phe Thr	210	215	220
His His Thr Cys Ser Leu His Phe Pro His Glu Ser Leu Arg Glu Trp	225	230	235
			240

[0052]

Lys	Leu	Phe	Gln	Ala	Leu	Lys	Leu	Asn	Leu	Phe	Gly	Leu	Val	Leu	Pro	
				245				250					255			
Leu	Leu	Val	Met	Ile	Ile	Cys	Tyr	Thr	Gly	Ile	Ile	Lys	Ile	Leu	Leu	
			260					265					270			
Arg	Arg	Pro	Asn	Glu	Lys	Lys	Ser	Lys	Ala	Val	Arg	Leu	Ile	Phe	Val	
		275					280					285				
Ile	Met	Ile	Ile	Phe	Phe	Leu	Phe	Trp	Thr	Pro	Tyr	Asn	Leu	Thr	Ile	
	290					295					300					
Leu	Ile	Ser	Val	Phe	Gln	Asp	Phe	Leu	Phe	Thr	His	Glu	Cys	Glu	Gln	
305				310						315					320	
Ser	Arg	His	Leu	Asp	Leu	Ala	Val	Gln	Val	Thr	Glu	Val	Ile	Ala	Tyr	
			325					330						335		
Thr	His	Cys	Cys	Val	Asn	Pro	Val	Ile	Tyr	Ala	Phe	Val	Gly	Glu	Arg	
		340						345					350			
Phe	Arg	Lys	Tyr	Leu	Arg	Gln	Leu	Phe	His	Arg	Arg	Val	Ala	Val	His	
	355					360						365				
Leu	Val	Lys	Trp	Leu	Pro	Phe	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Leu	Glu	Arg	Val	
	370					375					380					
Ser	Ser	Thr	Ser	Pro	Ser	Thr	Gly	Glu	His	Glu	Leu	Ser	Ala	Gly	Phe	
385				390				395						400		

<210> 124
 <211> 1200
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 124
 atggacagca aaggttcgtc gcagaaaggg tccgcctgc tectgctgct ggtggtgtca 60
 aatctactct tgtgccaggg tgtggtctcc gattacaaag atgatgatga tgtegcacctg 120
 tccacatctc gttctcgggt taccagaaat accaaccaga gcggtgaaga agtcaccacc 180
 ttttttgatt atgattacgg tgetccctgt cataaatttg acgtgaagca aattggggcc 240
 caactcctgc ctcgcctcta ctcgtgggtg ttcattcttg gttttgtggg caacatgctg 300
 gtgctctca tettaataaa ctgcaaaaag ctgaagtget tgaetgacat ttacctctc 360

[0053]

aacctggcca tctctgatct gctttttctt attactctcc cattgtgggc tcactctgct 420
 gcaaatgagt gggctcttgg gaatgcaatg tgcaaattat tcacagggct gtatcacatc 480
 gggtattttg gcggaatctt ttctcatcct ctgctgacga ttgacaggta cctggccatc 540
 gtccacgcgc tgtttgcctt gcgggcacgg accgtcactt ttggtgtcat caccagcatc 600
 atcatttggg ccttggccat cttggcttcc atgccagget tatacttttc caagacccaa 660
 tgggaattca ctcaccacac ctgcagcctt cactttcttc acgaaagcct acgagagtgg 720
 aagctgtttc aggtcttgaa actgaacctc ttgggctgg tattgccttt gttggtcatg 780
 atcatctgct acacagggat tataaagatt ctgctaagac gaccaaata gaagaaatcc 840
 aaagctgtcc gtttgatttt tgtcatcatg atcatctttt ttctcttttg gacccctac 900
 aatttgacta tacttatttc tgttttccaa gacttctgt tcacccatga gtgtgagcag 960
 agcagacatt tggacctggc tgtgcaagtg acggaggtga tcgctacac gcactgtctg 1020
 gtcaaccacg tgatctacgc cttcgttggg gagaggttcc ggaagtacct gcggcagttg 1080
 ttccacagge gtgtggctgt gcacctggtt aaatggctcc ccttctcttc cgtggacagg 1140
 ctggagaggg tcagctccac atctccctcc acaggggagc atgaactctc tgcctgggtc 1200

<210> 125

<211> 374

<212> PRT

<213> 智人

<400> 125

Met Leu Ser Thr Ser Arg Ser Arg Phe Ile Arg Asn Thr Asn Glu Ser
1 5 10 15

Gly Glu Glu Val Thr Thr Phe Phe Asp Tyr Asp Tyr Gly Ala Pro Cys
20 25 30

His Lys Phe Asp Val Lys Gln Ile Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu
35 40 45

Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn Met Leu Val Val
50 55 60

Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys Cys Leu Thr Asp Ile Tyr
65 70 75 80

Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Ile Thr Leu Pro

[0054]

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

[0055]

Gly Cys Arg Ile Ala Pro Leu Gln Lys Pro Val Cys Gly Gly Pro Gly
 325 330 335

Val Arg Pro Gly Lys Asn Val Lys Val Thr Thr Gln Gly Leu Leu Asp
 340 345 350

Gly Arg Gly Lys Gly Lys Ser Ile Gly Arg Ala Pro Glu Ala Ser Leu
 355 360 365

Gln Asp Lys Glu Gly Ala
 370

<210> 126
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 126

Met Leu Ser Thr Ser Arg Ser Arg Phe Ile Arg Asn Thr Asn Glu Ser
 1 5 10 15

Gly Glu Glu Val Thr Thr Phe Phe Asp Tyr Asp Tyr Gly Ala Pro Cys
 20 25 30

His Lys Phe Asp Val Lys Gln Ile Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu
 35 40 45

Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn Met Leu Val Val
 50 55 60

Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys Cys Leu Thr Asp Ile Tyr
 65 70 75 80

Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Ile Thr Leu Pro
 85 90 95

Leu Trp Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ala Met
 100 105 110

Cys Lys Leu Phe Thr Gly Leu Tyr His Ile Gly Tyr Phe Gly Gly Ile
 115 120 125

Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His
 130 135 140

[0056]

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

[0057]

<210> 127
<211> 42
<212> PRT
<213> 智人

<400> 127

Met Leu Ser Thr Ser Arg Ser Arg Phe Ile Arg Asn Thr Asn Glu Ser
1 5 10 15

Gly Glu Glu Val Thr Thr Phe Phe Asp Tyr Asp Tyr Gly Ala Pro Cys
20 25 30

His Lys Phe Asp Val Lys Gln Ile Gly Ala
35 40

<210> 128
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 128

Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ala Met Cys Lys
1 5 10

<210> 129
<211> 28
<212> PRT
<213> 智人

<400> 129

Thr Lys Cys Gln Lys Glu Asp Ser Val Tyr Val Cys Gly Pro Tyr Phe
1 5 10 15

Pro Arg Gly Trp Asn Asn Phe His Thr Ile Met Arg
20 25

<210> 130
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 130

Gln Glu Phe Phe Gly Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp
1 5 10 15

Gln

[0058]

<210> 131
<211> 352
<212> PRT
<213> 智人

<400> 131

Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr
1 5 10 15

Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu
20 25 30

Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn
35 40 45

Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met
50 55 60

Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu
65 70 75 80

Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe
85 90 95

Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe
100 105 110

Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu
115 120 125

Ala Val Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe
130 135 140

Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser
145 150 155 160

Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr
165 170 175

Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn
180 185 190

Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu

[0059]

195	200	205
Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys 210	215	220
Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile 225	230	235 240
Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu 245	250	255
Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser 260	265	270
Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr 275	280	285
His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe 290	295	300
Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe 305	310	315 320
Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser 325	330	335
Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu 340	345	350

<210> 132
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人

<400> 132
cgagagggcc tttgggatcc aactgctgcc

30

<210> 133
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人

<400> 133
ggcagcagtt ggatcccaaa ggccctctcg

30

<210> 134

[0060]

<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	134	
	gcaaattggg atccaactcc tgcc	24
<210>	135	
<400>	135	
	000	
<210>	136	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	136	
	gcaaattggg gcccaactgc tgcc	24
<210>	137	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	137	
	ggcagcagtt gggecccaat ttgc	24
<210>	138	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	138	
	ctcttgtgcc aggggtgtgt ctccga	26
<210>	139	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	139	
	gatcgaagct ttcagaaccc agcagagagt tcatg	35
<210>	140	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	140	
	gactatactt atttctgttt tcattgtcat tctectgaac acc	43

[0061]

<210>	141	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	141	
	cgccaagctt cattataaac cagccgaga	29
<210>	142	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	142	
	acgcgtcgac gaaactccaa acaccacaga g	31
<210>	143	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	143	
	gttcaggaga atgacaatga aaacagaaat aagtatagtc	40
<210>	144	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	144	
	cattctcctg aacaccttcc aagacttcct gttcaccea	39
<210>	145	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	145	
	gccaagcttc cagtgtgatg gatatctga	29
<210>	146	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	146	
	tgggtgaaca ggaagtcttg gaagtggtc aggagaatga	40
<210>	147	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	智人	

[0062]

<400> 147 caggtgcagc tggaggagtc tgg	23
<210> 148 <211> 25 <212> DNA <213> 智人	
<400> 148 gaagagacgg tgaccattgt ccctt	25
<210> 149 <211> 27 <212> DNA <213> 智人	
<400> 149 gaaattgtgc tgactcagtc tccagac	27
<210> 150 <211> 24 <212> DNA <213> 智人	
<400> 150 gtttgatctc caccttggtc cctc	24
<210> 151 <211> 27 <212> DNA <213> 智人	
<400> 151 ggcagtggat ctgggacaga tttcacc	27
<210> 152 <211> 27 <212> DNA <213> 智人	
<400> 152 ggtgaaatct gtcccagatc cactgcc	27
<210> 153 <211> 88 <212> DNA <213> 智人	
<400> 153 ttatgetggg cccagctctg tcccacaccg cggtcacatg gcaccacctc tcttcagct	60

[0063]

tccaccaaag gcccatecgt cttecccc	88
<210> 154	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 154	
tcatattctc tagatcattt acccagagac agggagagg	39
<210> 155	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 155	
cagcgtgggtg acagtgcctt ccagcag	27
<210> 156	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 156	
ctgctggagg gcactgtcac cacgetg	27
<210> 157	
<211> 12754	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 157	
ccccacctgt aggtttggca agctagctta agtaacgcca ttttgcaagg catggaaaat	60
acataactga gaatagagaa gttcagatca aggttaggaa ggggtggaca tccaaaccgt	120
tcgategaat tcattgcggt aaaacgttcc gtacctttta tgtattgact ettatctctt	180
caagtetagt tccaatectt cagagagaca gcagaatatg ggccaaacag gatatctgtg	240
gtaagcagtt cctgeccccg ctcagggcca agaacagatg gtccccagat gcggtcccgc	300
gtctctctgt cgtcttatac ccggtttgtc ctatagacac cattcgtaa ggacggggcc	360
gagtccegggt tcttgtctac caggggtcta cgcagggcg cctcagcagt ttctagagaa	420
ccatcagatg ttccagggt gccccaagga cctgaaaatg accctgtgcc ttatttgaac	480
taaccaatca gttcgtctt ggagtcgtca aagatctctt ggtagtctac aaaggtecca	540
cggggttcct ggaactttac tgggacacgg aataaacttg attggttagt caagcgaaga	600
cgttctgtt cgcgcgttc tgetccccga getcaataaa agageccaca acccctcact	660

[0064]

cggcgcgcca gtcctccgat agactgcgtc gcccggttac gcgaagacaa gcgcgcgaag	720
acgaggggct cgagttatatt tctcggtgt tggggagtga gccgcgcgt caggaggeta	780
tctgacgcag cgggcccattg ccccccccc cccgtattcc caataaagcc tcttctgtt	840
tgcacccgaa tcgtggactc gctgacctt gggagggtct cctcagattg attgactgcc	900
gggggggggg gggcataagg gttatttcgg agaacgacaa acgtaggctt agcacctgag	960
cgactaggaa cctcccaga ggagctaac taactgacgg caccctgggg gtctttcatt	1020
tggaggttcc accgagattt ggagaccctt gcctagggac caccgacccc cccgcggga	1080
ggtaagctgg ccagcggctg gtggagcccc cagaaagtaa acctccaagg tggctctaaa	1140
cctctgggga cggatccctg gtggtgggg gggcgccct ccattcgacc ggtcgccagc	1200
tttctgtct gtctctgtct ttgtcgtgt ttgtgccgc atctaattgt tgcgcctgcg	1260
tctgtactag ttagctaact agctctgtat ctggcggacc aaagcacaga cagagacaga	1320
aacacgcaca aacacggccg tagattacaa acgcggacgc agacatgac aatcgattga	1380
tcgagacata gaccgcctgg cgtggtggaa ctgacgagtt ctgaacaccc ggccgcaacc	1440
ctgggagacg tcccagggac tttgggggccc gtttttgtgg cccgacctga ggaagggagt	1500
gcaccacctt gactgctcaa gacttgtggg ccggcgttgg gacctctgc agggctccctg	1560
aaacccccgg caaaaacacc gggctggact ccttcccctc cgalgtggaa tccgaccccg	1620
tcaggatatg tggttctggt aggagacgag aacctaaaac agttcccgc tccgtctgaa	1680
tttttgcctt cggtttggaa gctacacctt aggtcggggc agtctatac accaagacca	1740
tcctctgctc ttggattttg tcaaggcgg aggcagactt aaaaacgaaa gccaaacctt	1800
ccgaagccgc gcgtcttgct tgcctcagcg ctgcagcacc gttctgtgtt gtctctgtct	1860
gactgtgttt ctgtatttct ctgaaaatta gggccagact ggtctcggc cgcagaacag	1920
acgacgtcgc gacgtcgtag caagacacaa cagagacaga ctgacacaaa gacataaaca	1980
gacttttaat cccggtctga gttaccactc ccttaagttt gaccttaggt cactggaaag	2040
atgtcgagcg gatcgtcac aaccagtcgg tagatgtcaa gaagagacgt tgggttacct	2100
caatggtgag ggaattcaaa ctggaatcca gtgaccttc tacagctcgc ctagecagtg	2160
ttggtcagcc atctacagtt cttctctgca acccaatgga tctgctctgc agaattggcca	2220
acctttaacg tcggatggcc gcgagacggc acctttaacc gagacctcat caccaggtt	2280
aagatcaagg tcttttcacc agacgagacg tcttaaccgt tggaaattgc agcctaccg	2340
cgtctgcgcg tggaaattgg ctctggagta gtgggtccaa ttctagttcc agaaaagtgg	2400

[0065]

tggeccgcacat ggacacccag accaggtccc ctacatcgtg acctgggaag cetttgcttt	2460
tgacccccct cctgggtca agcccttgt acaccetaag accggcgta cctgtgggtc	2520
tggtccaggg gatgtagcac tggacccttc ggaaccgaaa actgggggga gggaccagc	2580
tcgggaaaca tgtgggattc cctccgctc ctcttctcc atccgcccc tctctcccc	2640
ttgaacctcc tcgttcgacc ccgcctcgat cctccctta tccagccctc actccttctc	2700
ggaggcggag gagaaggagg taggcggggc agagaggggg aacttgagg agcaagctgg	2760
ggcggagcta ggagggaat aggtcgggag tgaggaagag taggcgcga gatctctga	2820
ggttaaactt aagctatgga cagcaaaggc tcgtgcaga aagggtccc cctgctcctg	2880
ctgctgggtg tgtaaatct atccgggt ctagagagct ccaatttgaa ttcgatacct	2940
gtcgtttcca agcagcgtct ttcccagggc ggacgaggac gacgaccacc acagtttaga	3000
actcttgtgc cagggtgtgg tctccgatta caaagatgat gatgatagcg ctgaagacaa	3060
taatatgtta cctcagttca tccacggcat actatcaaca tgagaacacg gtcccacacc	3120
agaggctaata gtttctacta ctactatcgc gacttctgtt attatacaat ggagteaagt	3180
aggtgccgta tgatagttgt tctcattctc tatttacacg aagtatcaa gagcttgatg	3240
aaggggccac cacaccgtat gactacgatg atggtgagcc ttgtcataaa accagtgtga	3300
agaglaagag alaaatgtgc ttcatagggt ctcgaactac ttccccggtg gtgtggcata	3360
ctgatgctac taccactcgg aacagtattt tggtcacact agcaaattgg agcttggatc	3420
ctgcctccgc tctactcgtt ggtgttcac tttggttttg tgggcaacat gctggtcgtc	3480
ctcatcttaa taaactgcaa tcgtttaacc tcgaacctag gacggaggcg agatgagcga	3540
ccacaagtag aaacaaaac acccgttgta cgaccagcag gagtagaatt atttgacgtt	3600
aaagctgaag tgettgaactg acatttacct gctcaacctg gccatctctg atctgetttt	3660
tcttattact cteccattgt gggtcactc tgetgcaaat ttctgacttc acgaactgac	3720
tgtaaatgga cgagttggac cggtagagac tagacgaaaa agaataatga gagggtacaa	3780
cccagtgag acgacgttta gagtgggtct ttgggaatgc aatgtgcaa ttattcacag	3840
ggtgtatca catcggttat ttggcgga tcttcttcat cctctcctg acaatcgata	3900
ctcaccacaga aacccttacg ttacacgttt aataagtgtc ccgacatagt gtagccaata	3960
aaacegcctt agaagaagta gtaggaggac tgtagctat gatacctggc tattgtccat	4020
gctgtgtttg ctttaaaagc caggacggtc acctttgggg tggtgacaag tgtgatcacc	4080
tggttggtgg ctgtgtttgc ctatggaccg ataacaggta cgacacaaac gaaattttcg	4140

[0066]

gtcctgccag tggaaacccc accaetgttc acactagtgg accaaccacc gacacaaacg	4200
ttctgtccca ggaatcatct ttactaaatg ccagaaagaa gattctgttt atgtctgtgg	4260
cccttatttt ccacgaggat ggaataatth ccacacaata aagacagggt ccttagtaga	4320
aatgatttac ggtcttttct ctaagacaaa tacagacacc gggaataaaa ggtgctccta	4380
ccttattaaa ggtgtgttat atgaggaaca ttttggggct ggtcctgccg ctgctcatca	4440
tggctcatctg ctactcggga atcctgaaaa ccctgcttcg gtgtcgaaac gagaagaaga	4500
tactccttgt aaaaccccca ccaggacggc gacgagtagt accagtagac gatgagccct	4560
taggactttt gggacgaagc cacagctttg ctctctctct ggcatagggc agtgagagtc	4620
atcttcacca tcatgattgt ttactttctc ttctggactc cctataatat tgtcattctc	4680
ctgaacacct tccaggaatt ccgtatcccg tcaactcag tagaagtgg agtactaaca	4740
aatgaaagag aagacctgag ggatattata acagtaagag gacttgtgga aggtccttaa	4800
cttcggcctg agtaactgtg aaagcaccag tcaactggac caagccacgc aggtgacaga	4860
gactcttggg atgactcact gctgcatcaa tccatcctc gaagccggac tcattgacac	4920
tttcgtggtc agttgacctg gtccgggtcg tccactgtct ctgagaacct tactgagtga	4980
cgaagtagtt agggtagtag tatgccttcg ttggggagaa gttcagaagg tatctctcgg	5040
tgttcttccg aaagcacatc accaagegct tctgcaaaac atgcccagtt ttctacaggg	5100
atacggaaac aacctctct caagtcttc atagagagcc acaagaagc tttcgtgtag	5160
tggttcgcga agacgtttgt tacaggtaaa aagatgtccc agacagtgga tggagtgact	5220
tcaacaaaca cgccttcac tggggagcag gaagtctcgg ctggtttata atgactcgag	5280
ctctctagag ggcccgtttg tctgtcacct acctcactga agttgtttgt gcggaagggtg	5340
acctctgctc cttcagagcc gaccaaatat tactgagctc gagagatctc ccgggcaaac	5400
acctgcagcc aagcttatcg ataaaaataa agattttatt tagtctccag aaaaaggggg	5460
gaatgaaaga cccacactgt aggtttggca agctagctta tggacgtcgg ttcgaaatgc	5520
tattttatth tctaaaataa atcagaggtc tttttccccc cttactttct ggggtggaca	5580
tccaaaccgt tcatcgaaat agtaacgcca ttttgcaagg catggaaaat acataactga	5640
gaatagagaa gttcagatca aggttaggaa cagagagaca gcagaatatg ggccaaacag	5700
tcattgcggg aaaacgttcc gtacctttta tgtattgact cttatctctt caagtctagt	5760
tccaatcctt gtctctctgt cgtcttatac ccggtttgtc gatctctgtg gtaagcagtt	5820
cctgccccgg ctcagggcca agaacagatg gtccccagat gcggctccgc cctcagcagt	5880

[0067]

ttctagagaa ccatcagatg ctatagacac cattcgtcaa ggacggggcc gagtcccggg	5940
tcttgtctac caggggtcta cggcagggeg ggagtcgtca aagatctctt ggtagtctac	6000
tttccagggt gcccacagga cctgaaaatg accctgtgcc ttatttgaac taaccaatca	6060
gttcgcttct cgttctgtt cgcgcgttc tgctccccga aaaggtccca cggggttctt	6120
ggacttttac tgggacacgg aataaacttg attggtagt caagcgaaga gcgaagacaa	6180
gcgcgcgaag acgaggggct gctcaataaa agagcccaca accctcact cggcgcgcca	6240
gtctccgat agactgcgtc gcccggtac cgtgtatcc aataaacctt cttgcagttg	6300
cagattattt tctcgggtgt tggggagtga gccgcgggt caggaggcta tctgacgcag	6360
cgggcccatt ggcacatagg ttatttggga gaacgtcaac catccgactt gtggtctcgc	6420
tgttcttgg gaggtctcc tctgagtgt tgactaccgc tcagcggggg tcttctatgg	6480
gtaacagttt cttgaagttg gtaggtgaa caccagagcg acaaggaacc ctcccagagg	6540
agactcacta actgatgggc agtcgcccc agaaagtacc cattgtcaaa gaacttcaac	6600
gagaacaaca ttctgagggt aggagtcgaa tattaagtaa tctgactca attagccact	6660
gttttgaate cacatactcc aatactctg aaatagttca ctcttggtt aagactccca	6720
tcctcagctt ataattcatt aggaactgagt taatcgggtg caaaacttag gtgtatgagg	6780
ttatgaggac ttatcaagl ttatggacag cgcagaaaga gctggggaga attgtgaaat	6840
tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagt taaagcctgg	6900
aatacctgtc gcgtctttct cgcacctct taacacttta acaataggcg agtgtaagg	6960
tgtgttgat gctcgccct cgtatttcac atttcggacc ggtgcctaat gaggtagcta	7020
actcacatta attgcgttc gctcactgcc cgtttccag tcgggaaacc tgcgtgccca	7080
gctgcattaa tgaatcgcc ccacggatta ctactcgat tgagtgtaat taacgaacg	7140
cagtgacgg gcgaaaggtc agccctttgg acagcacggc cgacgtaatt acttagccg	7200
aacgcgcggg gagaggcgtt ttgcgtattt ggcgtcttc cgttctctg ctactgact	7260
cgtgcgtc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc ttgcgcgcc ctctccgcca	7320
aacgcataac ccgcgagaag gcgaaggagc gaggactga gcgacgcgag ccagcaagcc	7380
gacgccgtc gccatagtcg tcaactcaaag gcgtaatac ggttatccac agaactcagg	7440
gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag	7500
agtgagtttc cgcattatg ccaatagggt tctagtcctt ctattgcgtc cttcttgta	7560
cactgtttt ccggtcgtt tccgtcctt ggcatttttc gccgcgttgc tggcgttttt	7620

[0068]

cctagagctc cgcceccctg acgagcatca caaaaatcga cgtcaagtc agaggtggcg	7680
aaacecgaca ggactataaa cggcgcaacg accgcaaaaa ggtatccgag gcggggggac	7740
tgtctgtagt gtttttagct gcgagttcag tctccaccgc tttgggctgt cctgatattt	7800
gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc	7860
ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ctatggtcg caaaggggga	7920
ccttcgaggg agcacgcgag aggacaaggc tgggacggcg aatggcctat ggacagcgcg	7980
aaagagggaa gcccttcgca ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg	8040
gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc	8100
cccgaaaaga gtatcgagtgc cgacatccat agagtcaagc cacatccagc aagcgaggtt	8160
cgacccgaca cacgtgcttg gggggcaagt cgggctggcg tgcgccttat ccggtaaacta	8220
tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa	8280
caggattagc agagcgaggt acgcggaata ggccattgat agcagaactc aggttgggcc	8340
attctgtgct gaatageggt gaccgtcgtc ggtgaccatt gtcctaactg tctcgctcca	8400
atgtaggcgg tgetacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga	8460
cagtatttgg tatctgcgct ctgtcgaagc cagttacett tacatccgcc acgatgtctc	8520
aagaacttca ccaccgall gatgccgatg tgalcttccct gtcataaacc atagacgcga	8580
gacgacttcg gtcaatggaa cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc	8640
accgctggta gcggtggttt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga	8700
gcctttttct caaccatcga gaactagccc gtttgtttgg tggcgaccat cggcaccaaa	8760
aaaacaaacg ttcgtcgtct aatgcgcgtc ttttttccct tctcaagaag atcctttgat	8820
cttttctacg gggctcgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggteat	8880
gagattatca aaaaggatct agagttcttc taggaaacta gaaaagatgc ccagactgc	8940
gagtcacett gcttttgagt gcaatccct aaaaccagta ctctaatagt ttttcctaga	9000
tcacctagat ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt	9060
aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgagge agtggatcta ggaaaattta	9120
atttttactt caaaatttag ttagatttca tatatactca tttgaaccag actgtcaatg	9180
gttaegaatt agtcaactcg acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt	9240
gcctgaactc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggecccgat	9300
tggatagagt cgetagacag ataaagcaag taggtatcaa cggactgagg ggcagcacat	9360

[0069]

ctattgatgc tatgccctcc cgaatggtag accgggggtca gctgcaatga taccgcgaga	9420
cccacgetca ccggetccag atttatecag aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg	9480
cagaagtggc cctgcaactt cgacgttact atggcgctct ggggtcgagt ggccgaggtc	9540
taaatagtcg ttatttggtc ggtcggcctt cccggctcgc gtcttcacca ggacgttgaa	9600
tatccgcctc catccagtct attaatgttt gccgggaagc tagagtaagt agttcccgag	9660
ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat ataggcggag gtaggtcaga	9720
taattaacaa cgcccttcg atctcattca tcaageggtc aattatcaaa cgcgttgcaa	9780
caacggtaac gatgtccgta cgtgggtgca cgtcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc	9840
tccggttccc aacgateaag gcgagttaca tgatecccca tgttgtgcaa aaaagcggtt	9900
gcaccacagt gcgagcagca aaccataccg aagtaagtcg aggccaaggg ttgctagttc	9960
cgtcfaatgt actagggggc acaacacgtt ttttcgcaa agctccttcg gtcctccgat	10020
cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa	10080
ttctcttact gtcatgccat tcgaggaagc caggaggcta gcaacagtct tcattcaacc	10140
ggcgtcacia tagtgagtac caataccgtc gtgacgtatt aagagaatga cagtacggta	10200
ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtga	10260
tgcggcgacc gagttgctct tgcggggcgt caatacggga ggcatctac gaaaagacac	10320
tgaccactca tgagttggtt cagtaagact cttatcacat acgcgcgtgg ctcaacgaga	10380
acgggcccga gttatgccct taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc	10440
attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt	10500
attatggcgc ggtgtatcgt cttgaaattt tcacgagtag taaccttttg caagaagccc	10560
cgtttttgag agttcctaga atggcgacaa ctctaggtea tcgatgtaac ccactcgtgc	10620
acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg	10680
aaggcaaaat gccgcaaaaa agctacattg ggtgagcacg tgggttgact agaagtcgta	10740
gaaaatgaaa gtggtcgcaa agaccactc gtttttgccc ttccgtttta cggcgttttt	10800
agggataaag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact ctctcttttt caatattatt	10860
gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat tcccttattc ccgctgtgcc	10920
tttacaactt atgagtatga gaaggaaaaa gttataataa cttegtaaat agtcccaata	10980
acagagtact cgcctatgta atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg	11040
cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtetaagaaa ccattattat catgacatta	11100

[0070]

taaacttaca taaatctttt tatttgttta tccccaagge gcgtgtaaag gggettttca	11160
eggtggactg cagattcttt ggtaataata gtactgtaat acctataaaa ataggcgtat	11220
cacgaggecc tttegtctcg cgcgtttcgg tgatgacggg gaaaacctct gacacatgca	11280
gctcccggag acggtcacag tggatatattt tatccgcata gtgctcgggg aaagcagagc	11340
gcgcaaagcc actactgcca cttttggaga ctgtgtacgt cgagggcctc tgccagtgtc	11400
cttgtctgta ageggatgcc gggagcagac aageccgtca gggecgctca gggggtgttg	11460
gcgggtgtcg gggctggctt aactatgcgg catcagagca gaacagacat tcgcctacgg	11520
ccctcgtctg ttccggcagt cccgcgcagt cgcaccacac cgccacagc cccgaccgaa	11580
ttgatacgcc gtagtctcgt gattgtactg agagtgcacc atatgcgggtg tgaataaccg	11640
cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac aggcgcatt cgccattcag gctgcgcaac	11700
ctaacaatgac tctcacgtgg tatacgccac actttatgga gtgtctacgc attcctcttt	11760
tatggcgtag tccgcggtaa gcggtaaagtc cgacgcgttg tgttggaag ggcgatcggt	11820
gcgggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag	11880
ttggglaacg ccagggtttt acaacccttc ccgctagcca cgcccgaga agcgataatg	11940
cggtcgaccg ctttccctt acacgacgtt ccgctaattc aaccattgc ggtcccaaaa	12000
cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcgc aaggaaatgg gcatgcaagg agatggcgcc	12060
caacagtcgc ccggccacgg ggctgcccac catacccacg gggtcagtgc tgcaacattt	12120
tgtgcgcggt ttcctacca cgtacgttcc tctaccgcgg gttgtcaggg ggcgggtgcc	12180
ccggacgggt gtatgggtgc ccgaaacaag cgctcatgag ccggaagtgg cgagcccgat	12240
cttccctac cgtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg gcgcgggtga	12300
ggctttgttc gcgagtactc gggtctcacc gctcgggcta gaaggggtag ccaactacagc	12360
cgctatatcc gcggtcgttg gcgtggacac cgcggccact tgccggccac gatgcgtccg	12420
gcgtagaggc gattagtcca atttgttaaa gacaggatat cagtgggtcca ggctctagtt	12480
ttgactcaac aatatcacca acggccgggtg ctacgcagge cgcattctcg ctaatcaggt	12540
taacaatttt ctgtcctata gtcaccaggt ccgagatcaa aactgagttg ttatagtggg	12600
gctgaagcct atagagtacg agccatagat aaaataaaag attttattta gtctccagaa	12660
aaagggggga tgaaagacga ctccggatat ctcatgctcg gtatctattt tattttctaa	12720
aataaatcag aggtcttttt cccctact ttct	12754

<210> 158

[0071]

<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<400> 158

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Asn Trp Asn Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 159
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 159

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp Ser Gly Val Pro

[0072]

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr His Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 160

<211> 118

<212> PRT

<213> 智人

<400> 160

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 161

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

[0073]

<400> 161

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Phe	Gln	Ser	Val	Thr	Pro	Lys
1				5					10					15	

Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Ser	Ser
			20					25					30		

Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Ala
65					70					75					80

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

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105		

<210> 162

<211> 117

<212> PRT

<213> 智人

<400> 162

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Tyr	Gly
			20					25					30		

Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala
		35					40					45			

Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
	50					55					60				

Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
65					70					75					80

[0074]

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 163
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 163

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 164
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 164

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

[0075]

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 165
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 165

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

[0076]

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 166

<211> 1350

<212> DNA

<213> 智人

<400> 166

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt	60
tcctgcaagg catctggata caccctcacc agctactata tacattgggt ggcacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagt gatgggaatg atcaatccta gtggtggctg cacaagctac	180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac	240
atggacctga gcagcctgag atctgaggac acggcctgtt ttactgtgc gagagagaga	300
tgggtataagt ggaacttcga tgcctttgat atctggggcc aagggaacaat ggtcaccgtc	360
tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc tccccctgg cgcctgtct caggagcacc	420
tccgagagca cagccgcct gggtgcctg gteaaggact actccccga accggtgacg	480
glgtcglgga actcaggegc cctgaccagc ggcgtgcaca cctccccgc tgcctacag	540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg	600
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt	660
gagtcctaat atggtccccc atgcccata tgcacagcac ctgagttcct ggggggacca	720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gacctctgag	780
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac	840
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc	900
acgtaccgtg tggteagcgt cctcacgcgc ctgcaccagg actggctgaa cggaaggag	960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc cgtctctcca tcagaaaaac catctccaaa	1020
gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacacctgc cccatccca ggaggagatg	1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctacccag cgacatcgcc	1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tccctgtctg	1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggetaacg tggacaagag caggtggcag	1260
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggtc tgcacaacca ctacacacag	1320

[0077]

aagagcctct cctgtctctt gggtaaata	1350
<210> 167	
<211> 366	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 167	
caggtgcagc tgggtgcagc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt	60
tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tacattgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg atcaatccta gtggtggctg cacaagctac	180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaaca cgtccacgag cacagtctac	240
atggacctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt ttactgtgc gagagagaga	300
tggtataagt ggaacttcga tgcttttgat atctggggcc aagggaacaat ggteaccgtc	360
tcctca	366
<210> 168	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 168	
agctactata tacat	15
<210> 169	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 169	
atgatcaatc ctagtgtgtg tcgcacaagc tacgcacaga agttccaggc c	51
<210> 170	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 170	
gagagatggg ataagtggaa cttegatgct ttgatatac	39
<210> 171	
<211> 90	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 171	

[0078]

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggetgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt	60
tectgcaagg catctggata caccttcacc	90
<210> 172	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 172	
tgggtgcgac aggcccttg acaagggtt gattggatgg ga	42
<210> 173	
<211> 96	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 173	
agatcacca tgaccagga cactccacg agcacagtct acatggacct gacgacctg	60
agatctgagg acacggcgt gttttactgt gcgaga	96
<210> 174	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 174	
tggggccaag ggacaatggt caccgtctcc tea	33
<210> 175	
<211> 449	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 175	
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
Gly Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe	
50 55 60	
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr	

[0079]

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

[0080]

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys

<210> 176
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 176

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

[0081]

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 177
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 177

Ser Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 178
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 178

Met Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 179
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 179

Glu Arg Trp Tyr Lys Trp Asn Phe Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

[0082]

<210> 180
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 180

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

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
		20						25					30

<210> 181
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 181

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly
1			5						10				

<210> 182
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 182

Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr	Met	Asp
1			5						10					15	

Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Phe	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 183
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 183

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1			5						10	

<210> 184
<211> 663
<212> DNA
<213> 智人

[0083]

<400> 184
 gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tgglaaccaac agaaaccagg acagccctct aagctgtctca ttactgggc atctacacgg 180
 gaatccggggg tccctgaccg attcagtggc agegggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc agcaggetga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttacagtact 300
 cctcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac gaactgtgga tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgtgaaga acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgcctc 480
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
 ctcagcagca cctgacgct gagcaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgcgc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660
 tag 663

<210> 185
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 185
 gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tggtaaccaac agaaaccagg acagccctct aagctgtctca ttactgggc atctacacgg 180
 gaatccggggg tccctgaccg attcagtggc agegggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc agcaggetga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttacagtact 300
 cctcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

<210> 186
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 186
 aagtcagcc agagtggttt atacagctcc aacaataaga actacttagc t 51

<210> 187
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 智人

[0084]

<400> 187	
tgggcatcta cacgggaatc c	21
<210> 188	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 188	
cagcaatatt acagtactcc tcggacg	27
<210> 189	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 189	
gacatcgtga tgaccacagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc	60
atcaactgc	69
<210> 190	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 190	
tggtaccaac agaaaccagg acagctcct aagctgetca ttac	45
<210> 191	
<211> 96	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 191	
ggggtccctg accgattcag tggcagcggg tctgggacag atttactct caccatcage	60
agccagcagg ctgaagatgt ggcagtttat tactgt	96
<210> 192	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 192	
ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa	30
<210> 193	
<211> 220	
<212> PRT	
<213> 智人	

[0085]

<400> 193

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Gln Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

[0086]

<210> 194
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 194

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

Ile Ser Ser Gln Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 195
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 195

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 196
 <211> 7
 <212> PRT

[0087]

<213> 智人

<400> 196

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 197

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 197

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 198

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人

<400> 198

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 199

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 199

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 200

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 200

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Gln Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

[0088]

<210> 201
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 201

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 202
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> X = E 或 D

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (2).. (2)
<223> X = Q, N, R, K 或 H

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (3).. (3)
<223> X = A, G, W 或 Y

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (5).. (5)
<223> X = W, Y, K, R 或 H

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (6).. (6)
<223> X = K, R, H, W, Y, T 或 S

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> X = Y, W, N 或 Q

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (10).. (10)
<223> X = A, G 或 V

<400> 202

Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Phe Asp Ile
1 5 10

[0089]

<210> 203
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X = D 或 E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X = Q 或 R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X = A 或 W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X = W 或 K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X = W 或 K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X = Y 或 N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X = A 或 V

<400> 203

Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Phe Asp Ile
1 5 10

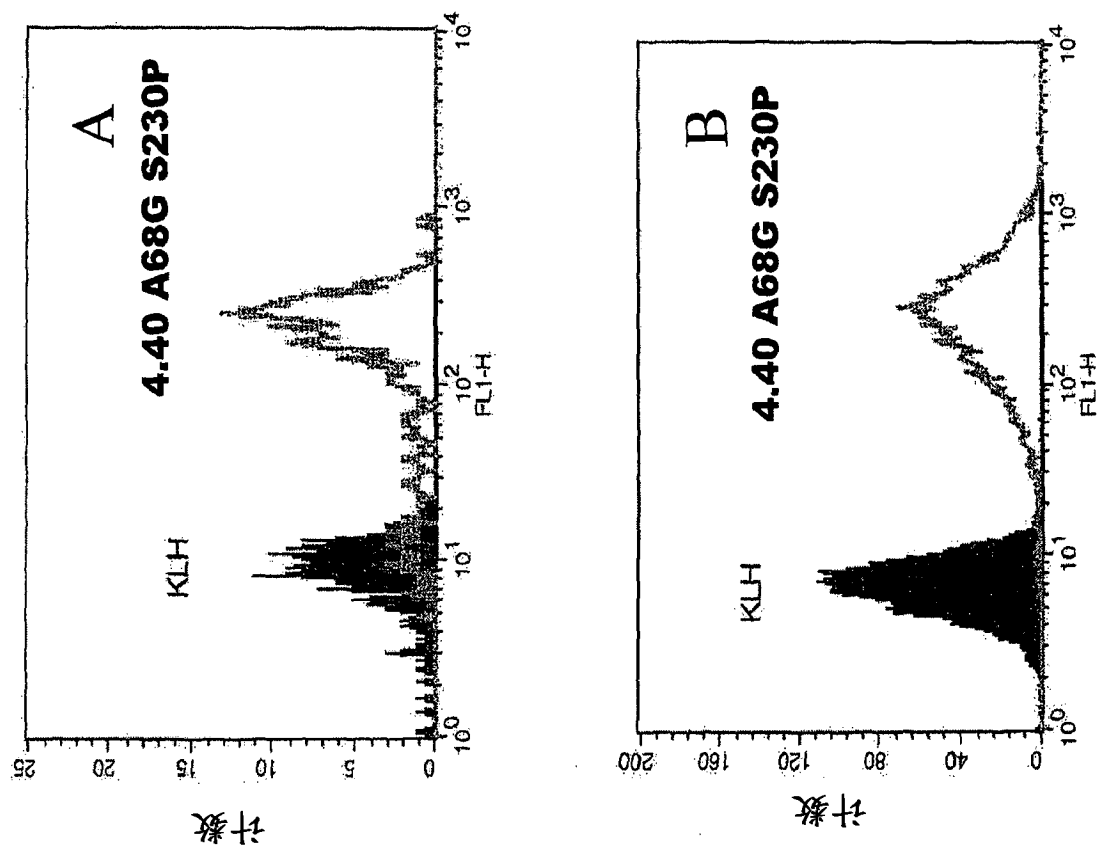


图 1

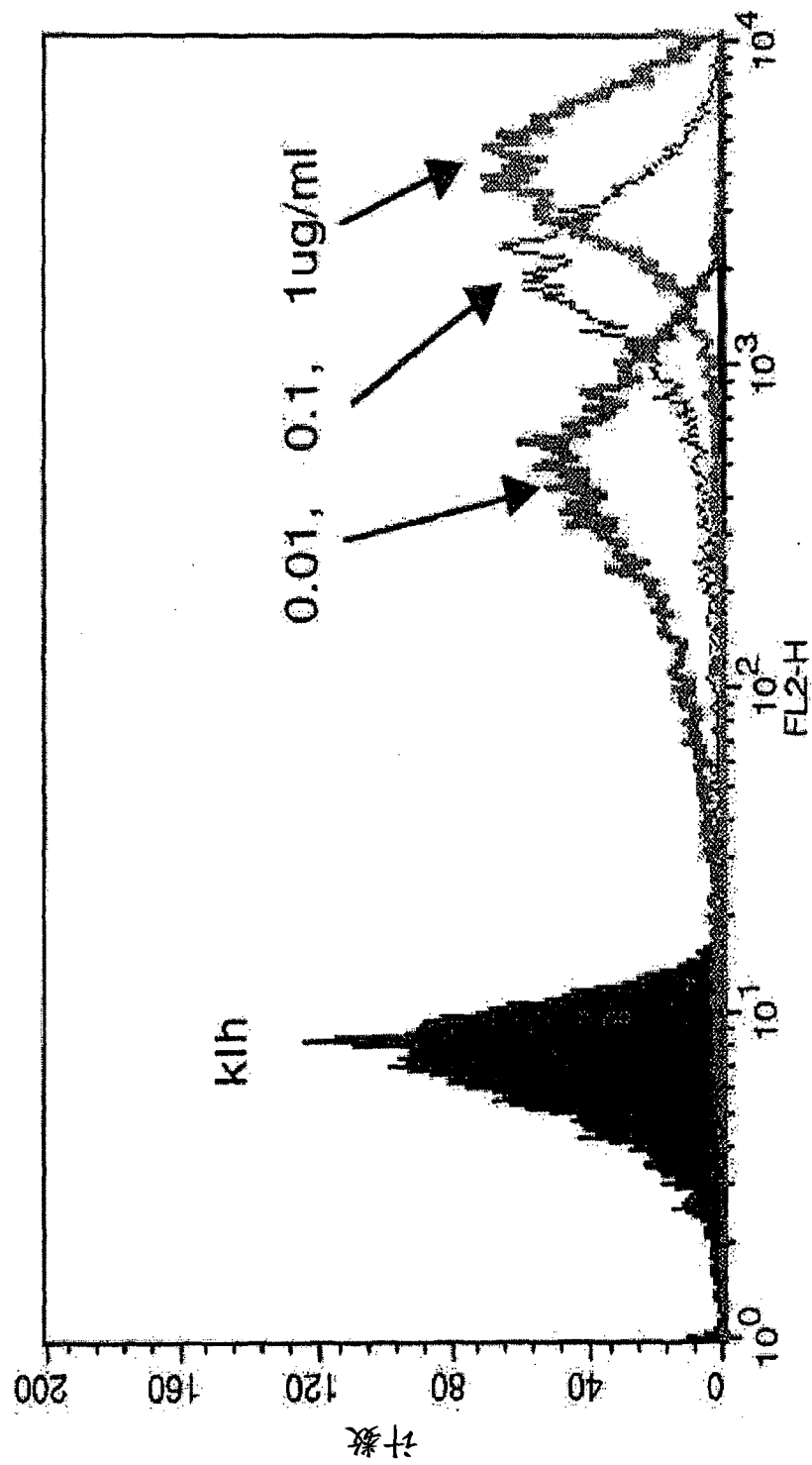


图 1C

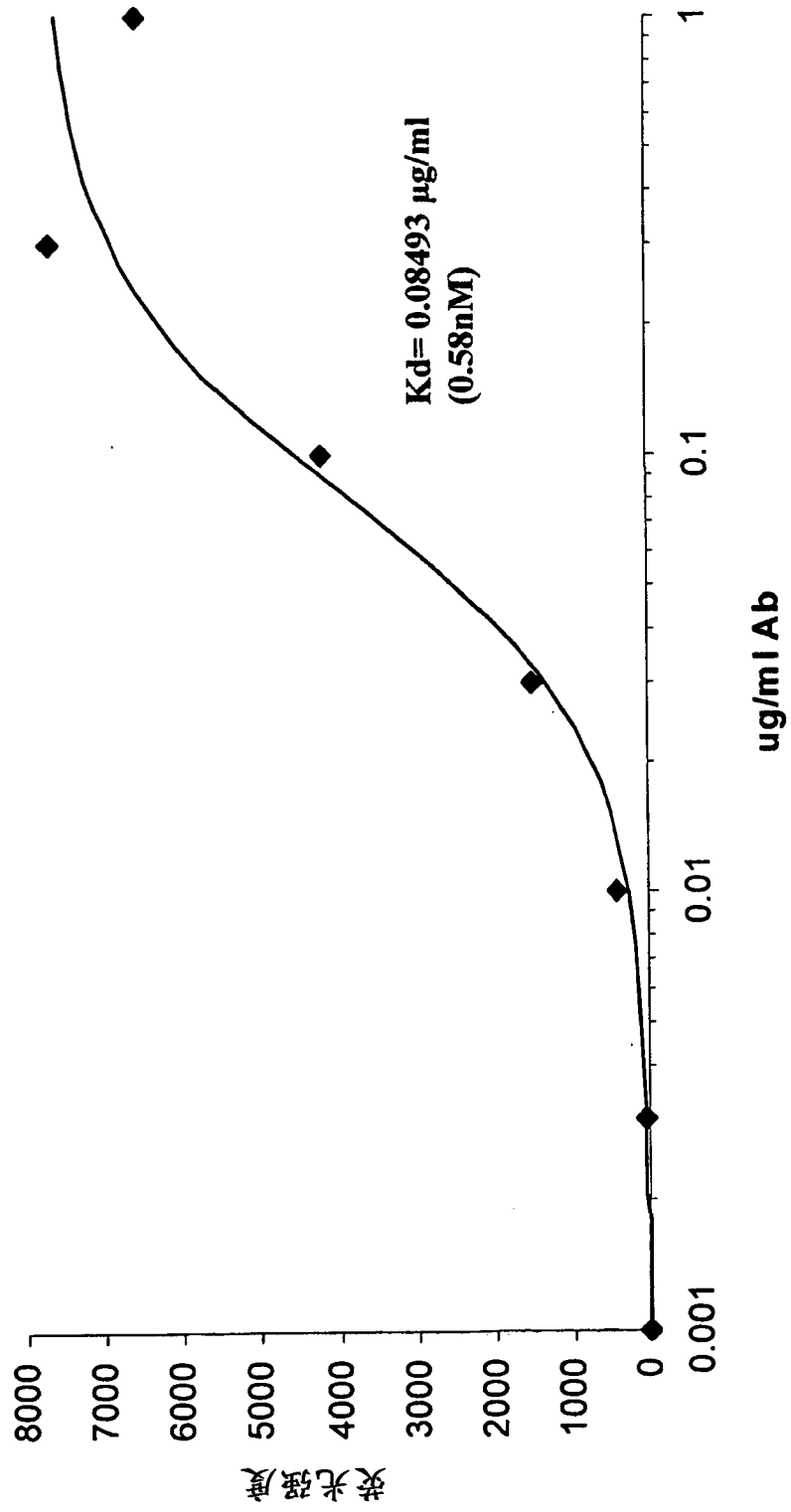


图 2

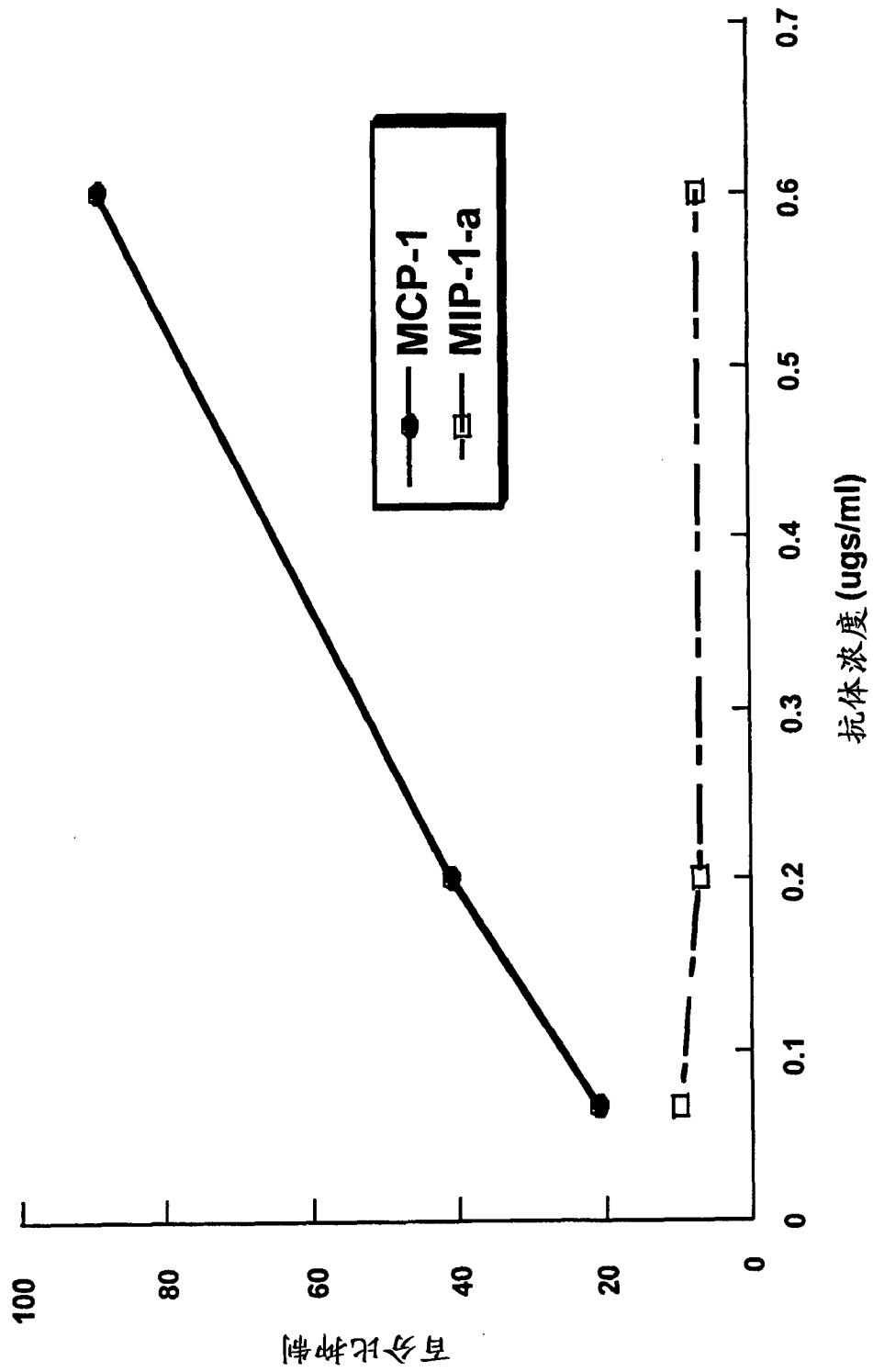


图 3

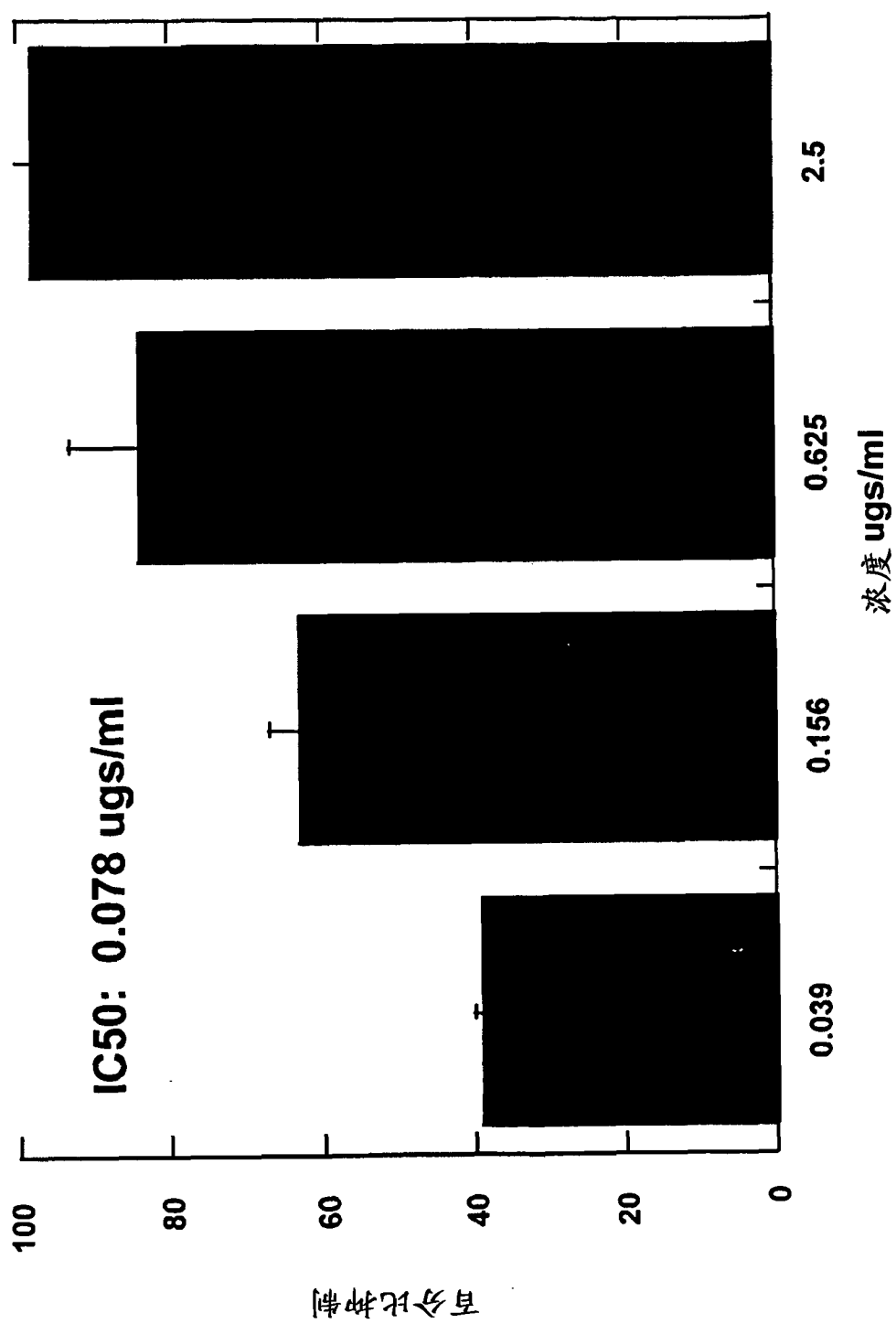


图 4

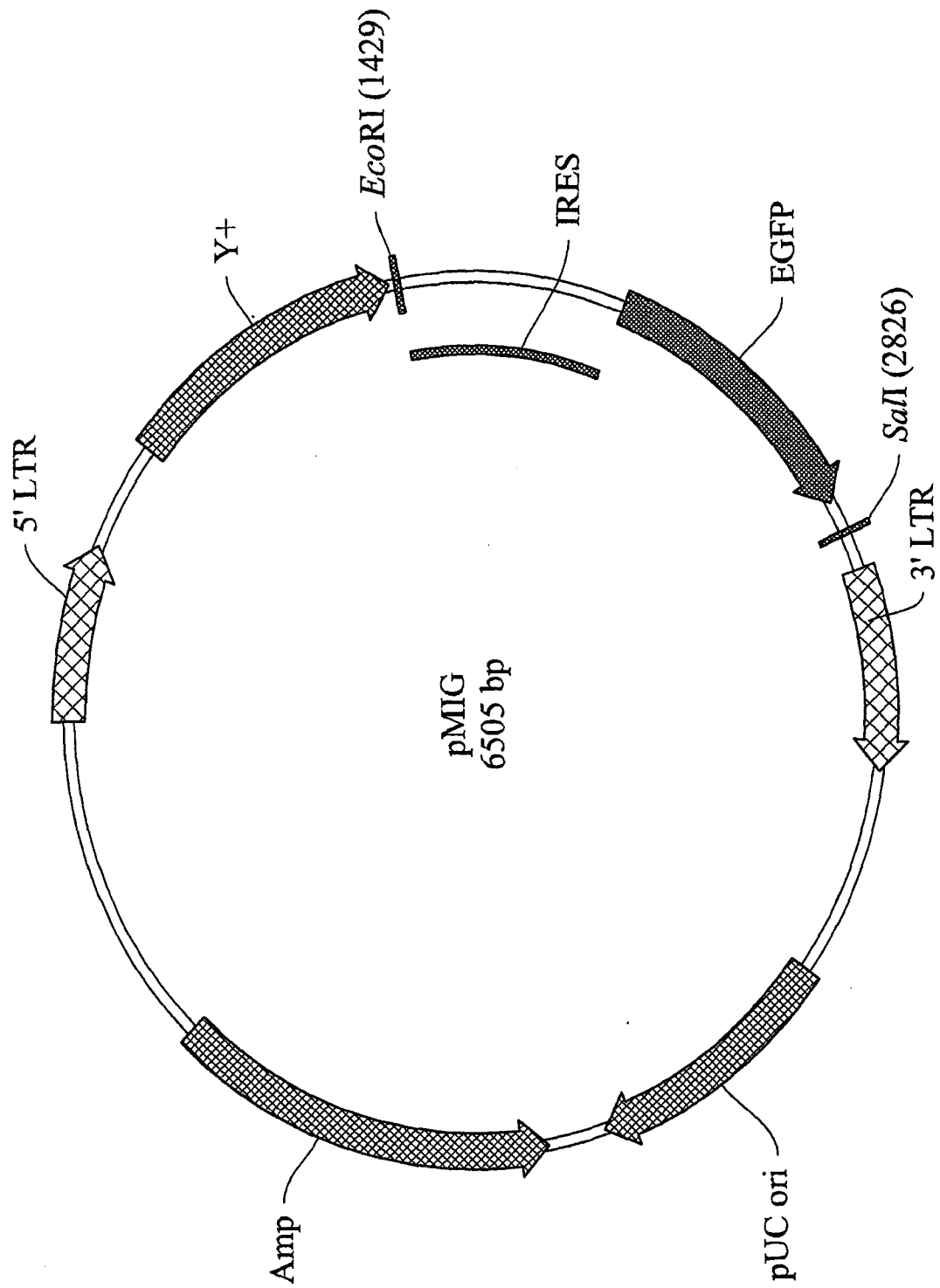


图 5

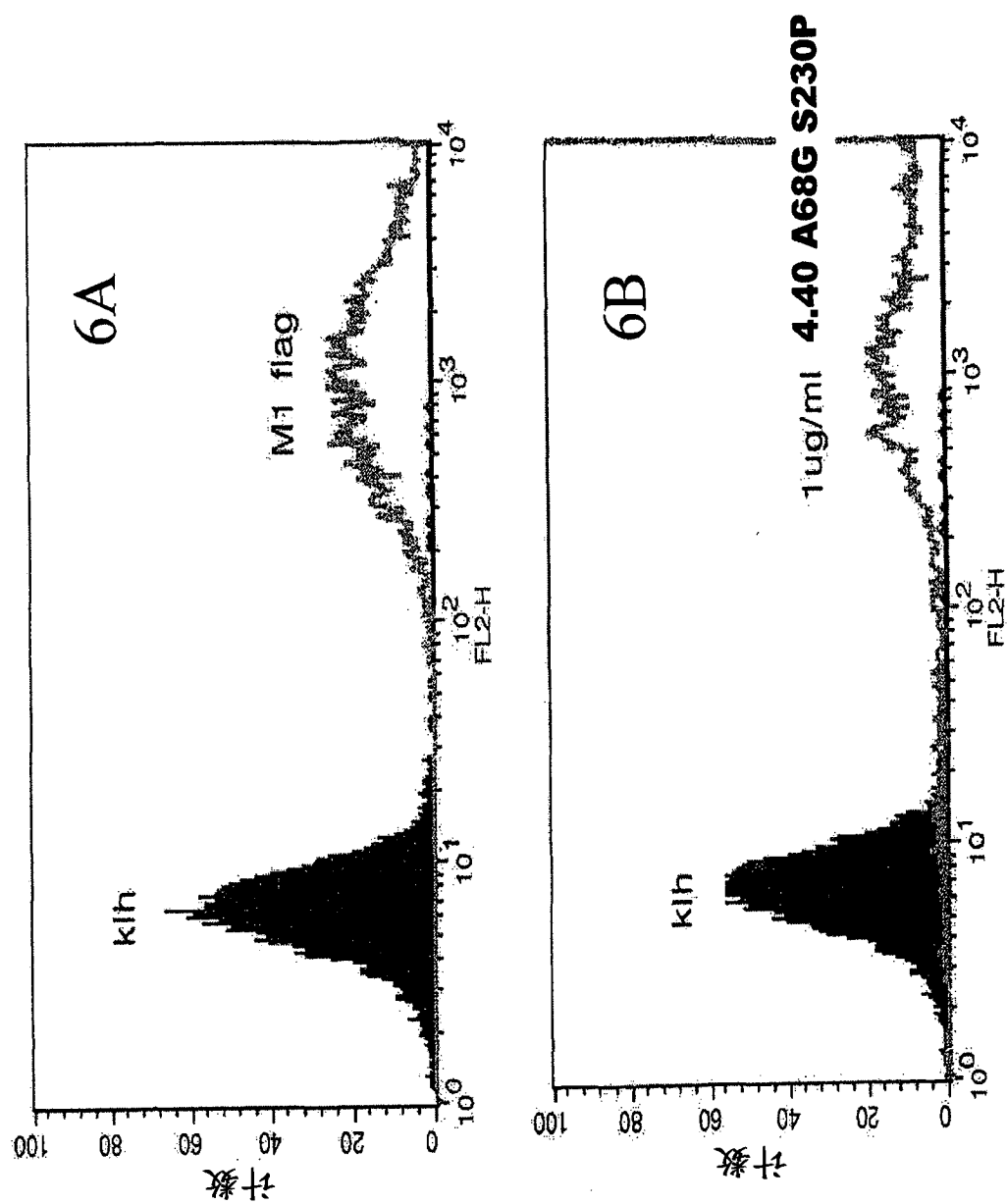


图 6A6B

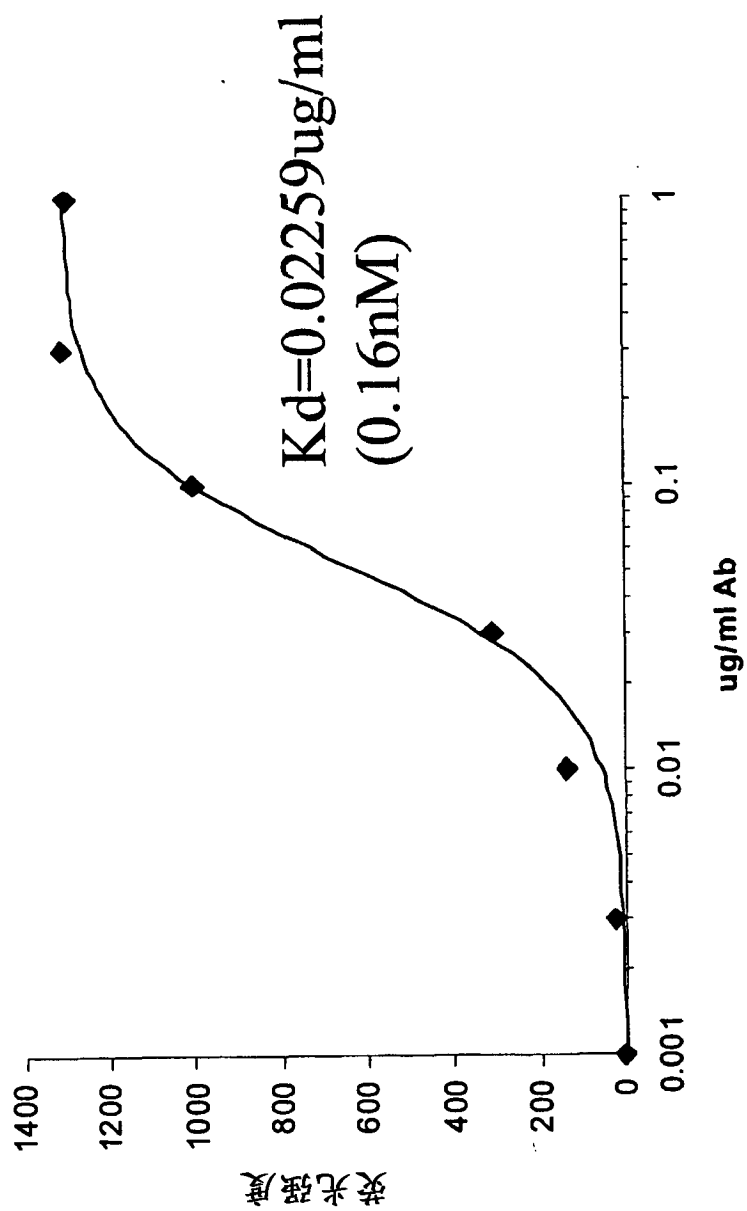


图 6C

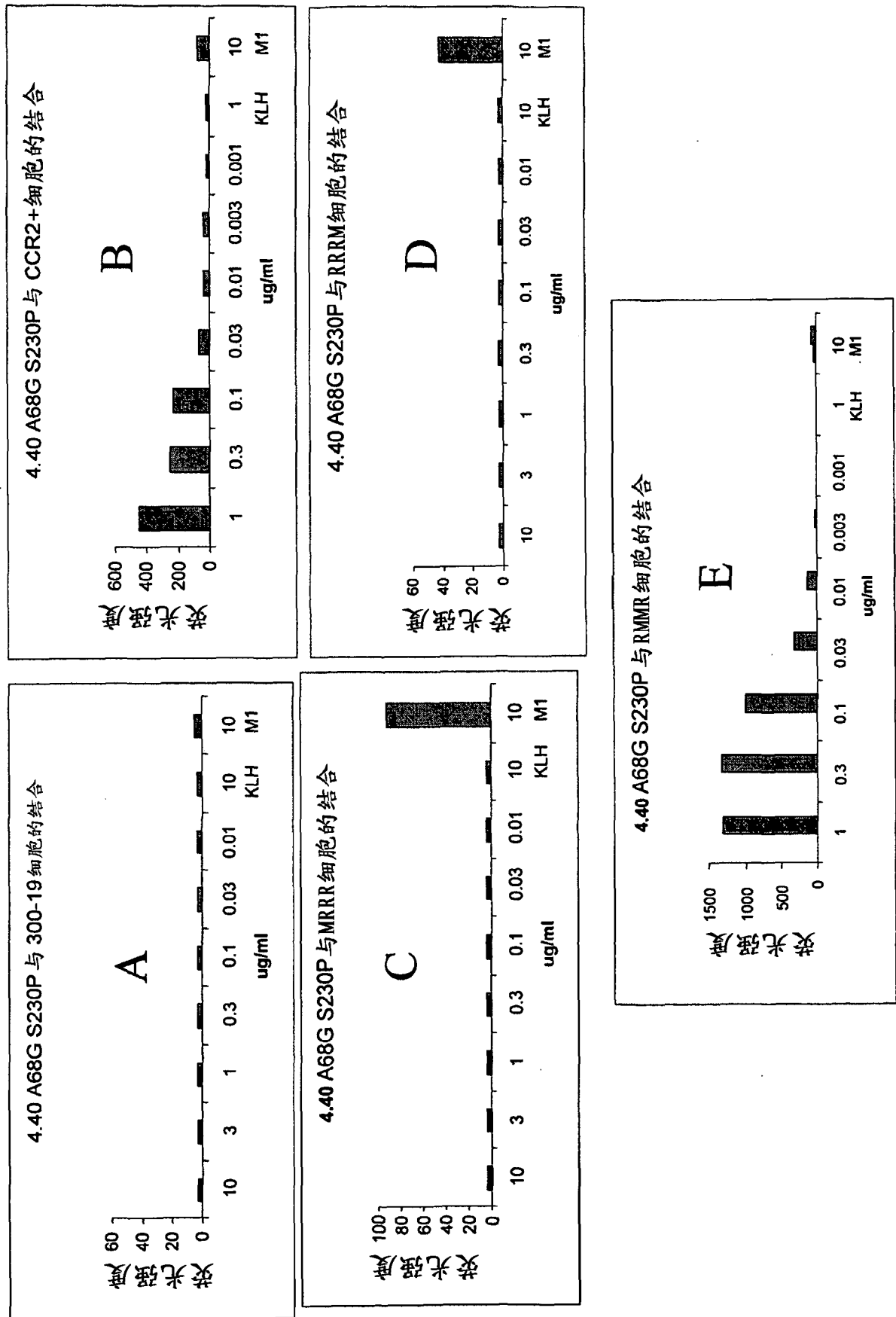


图 7

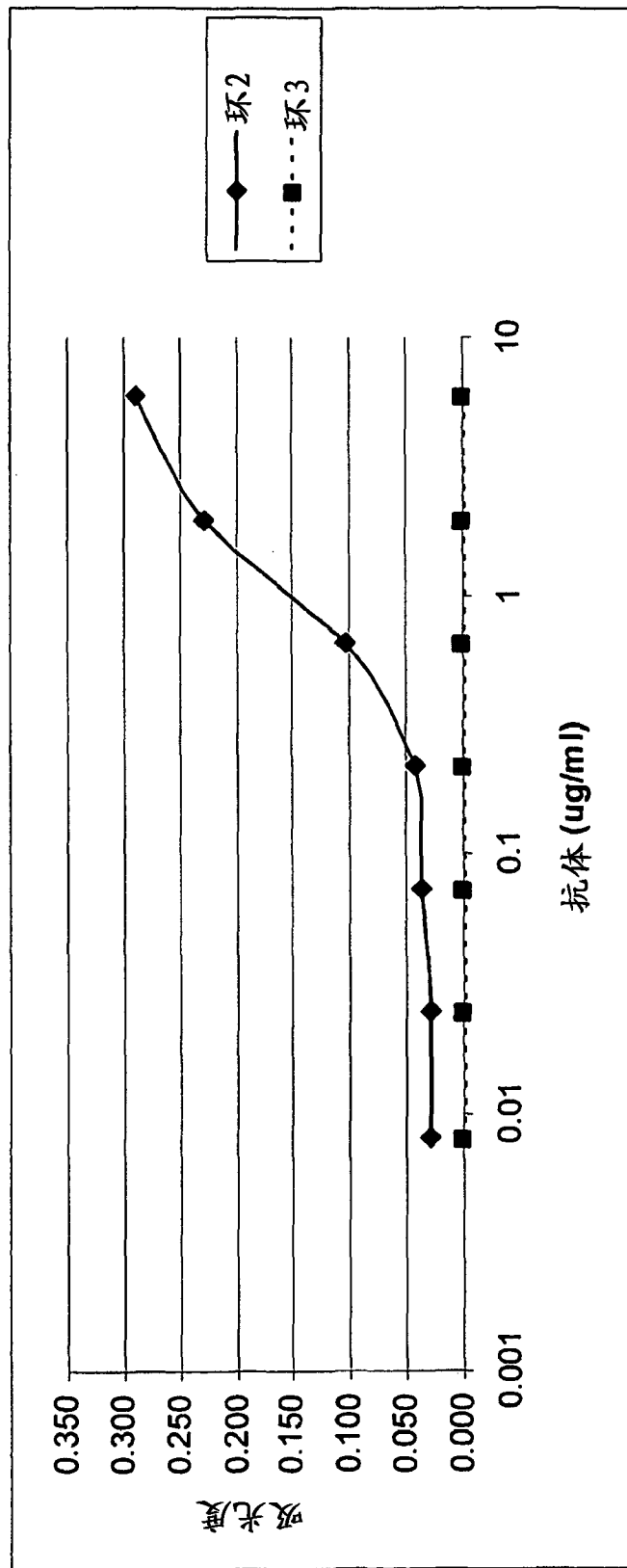


图 8

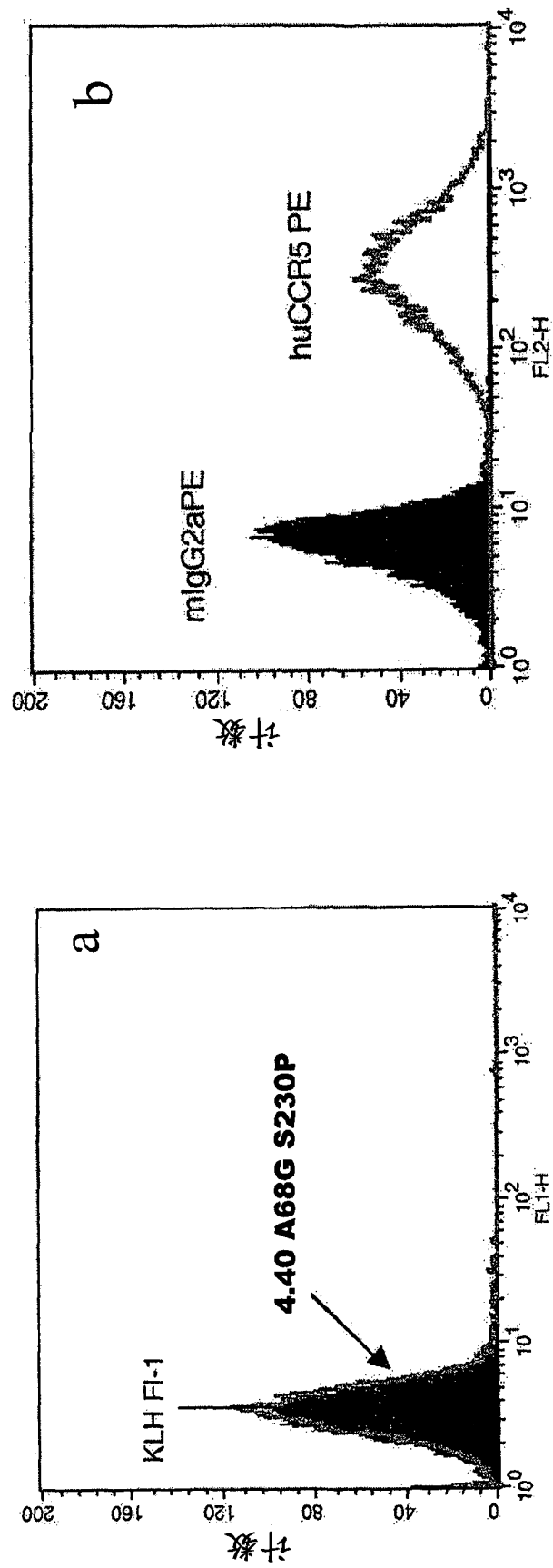


图 9

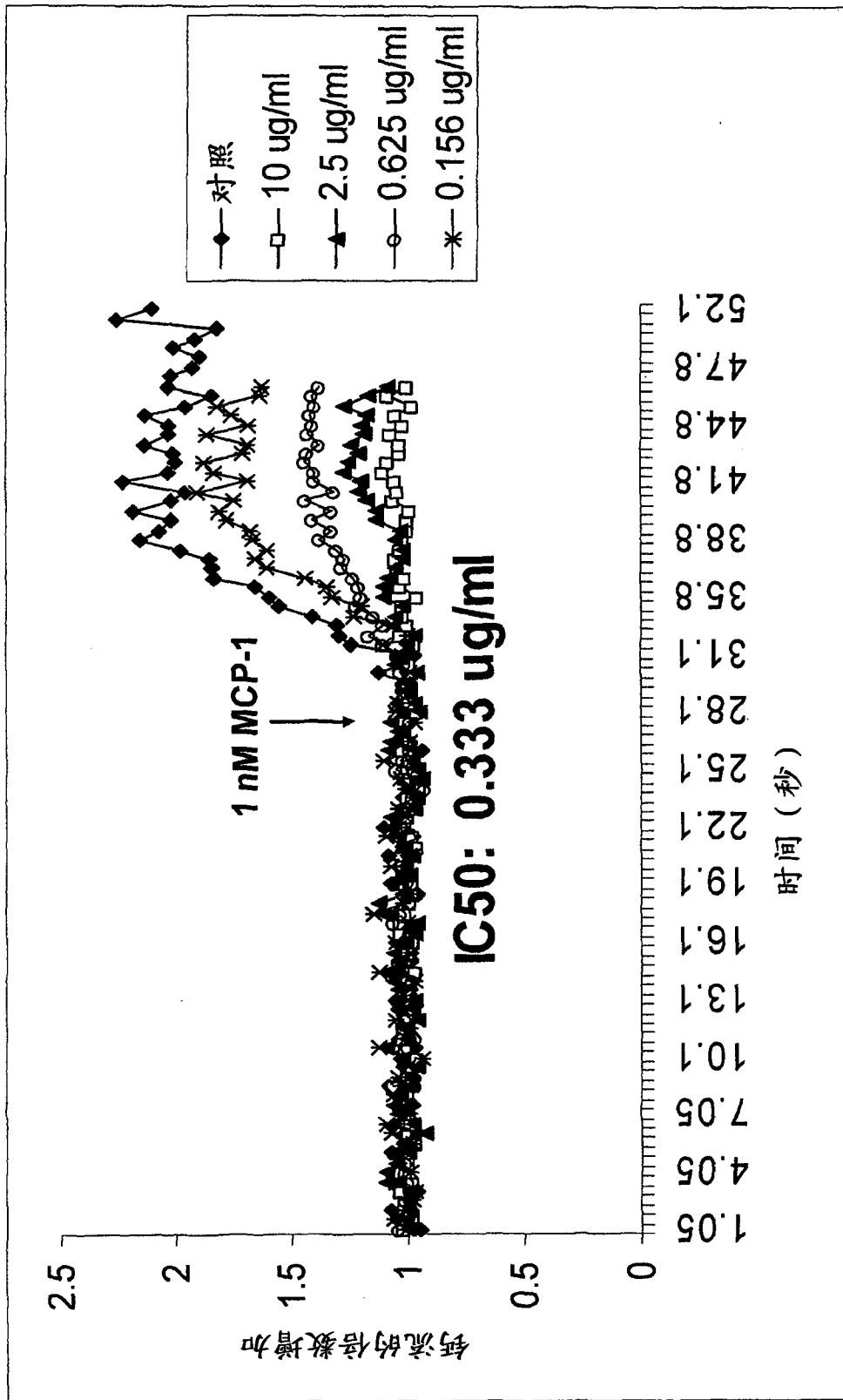


图 10

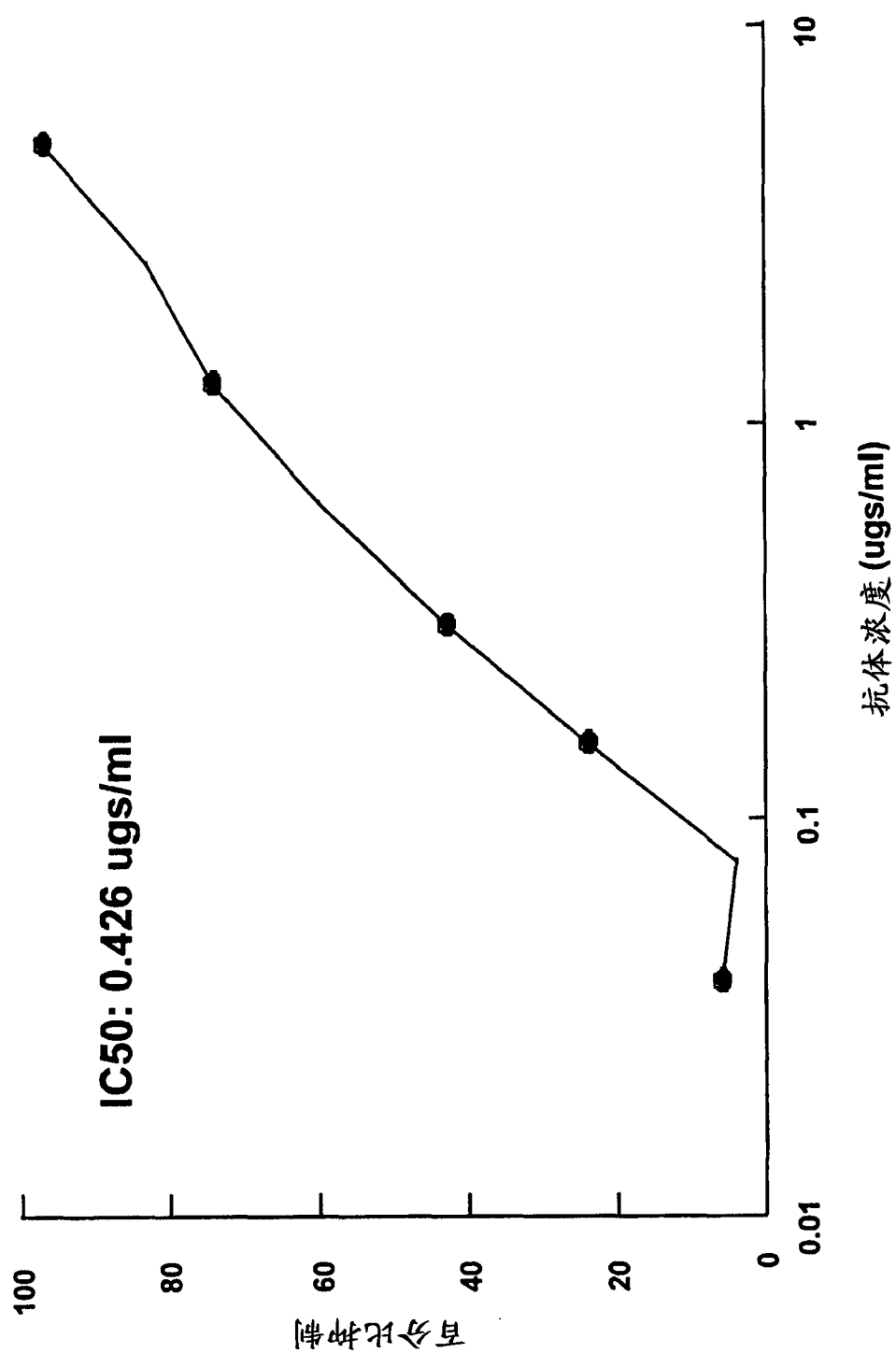


图 11

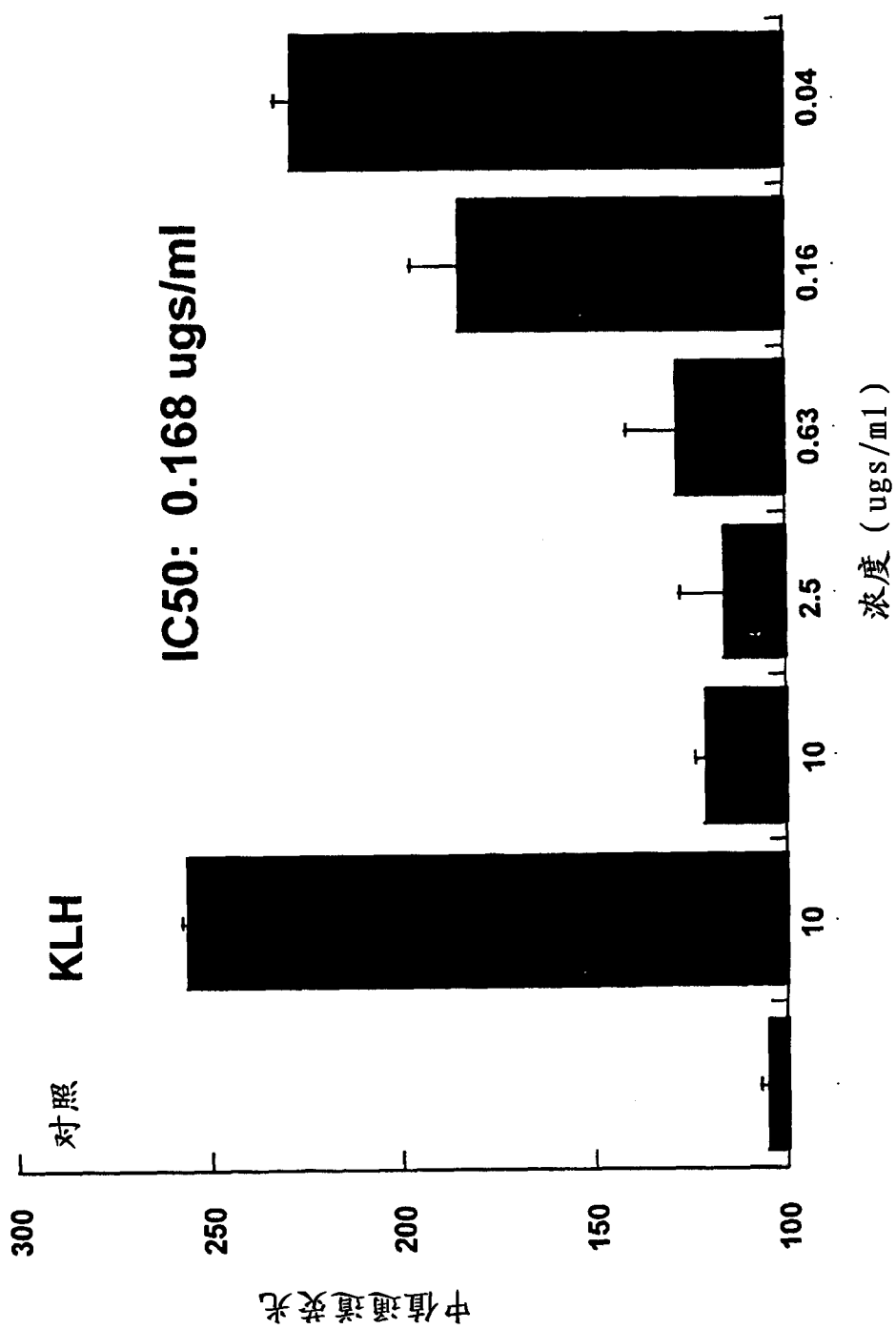


图 12

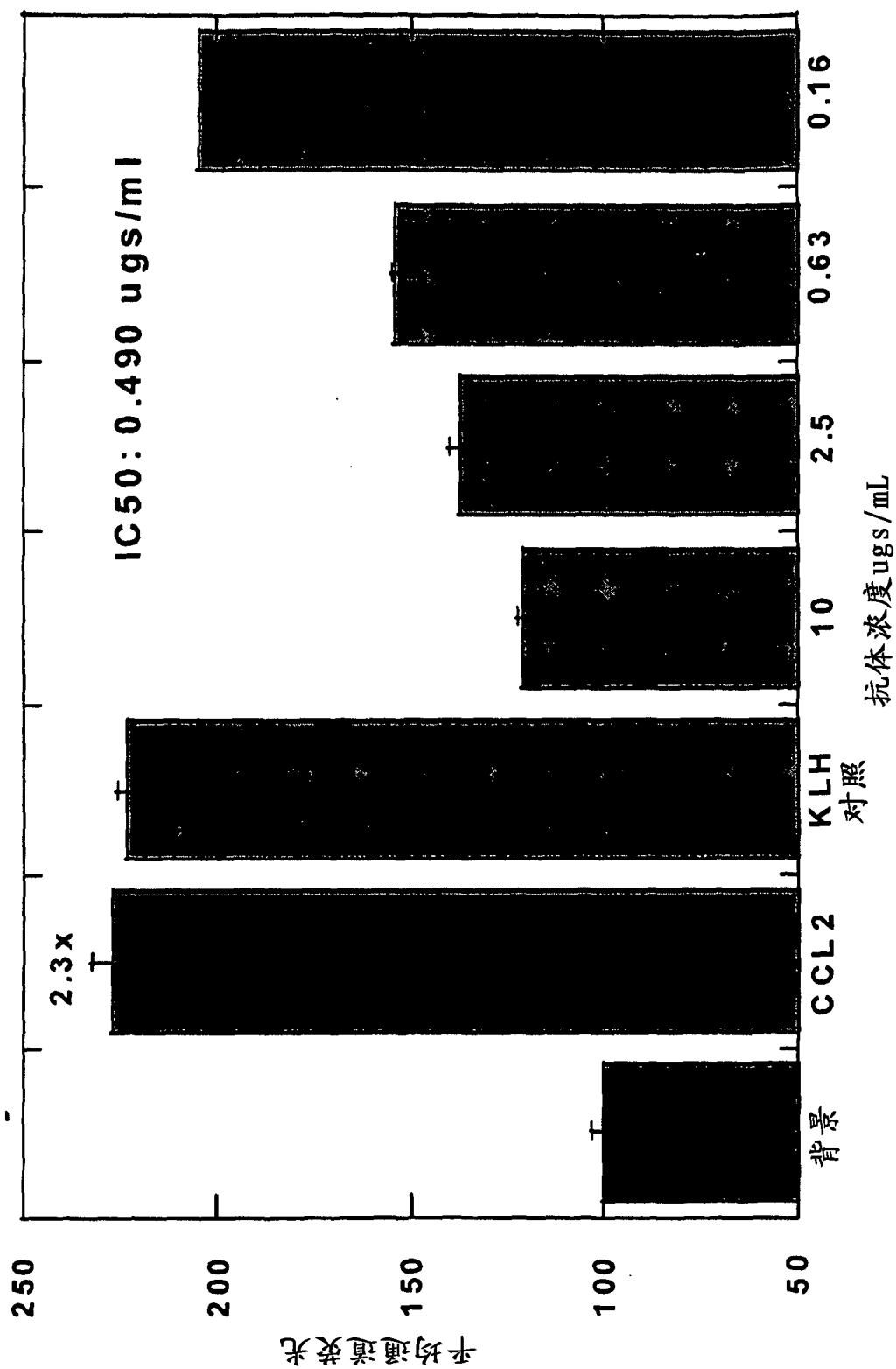


图 13

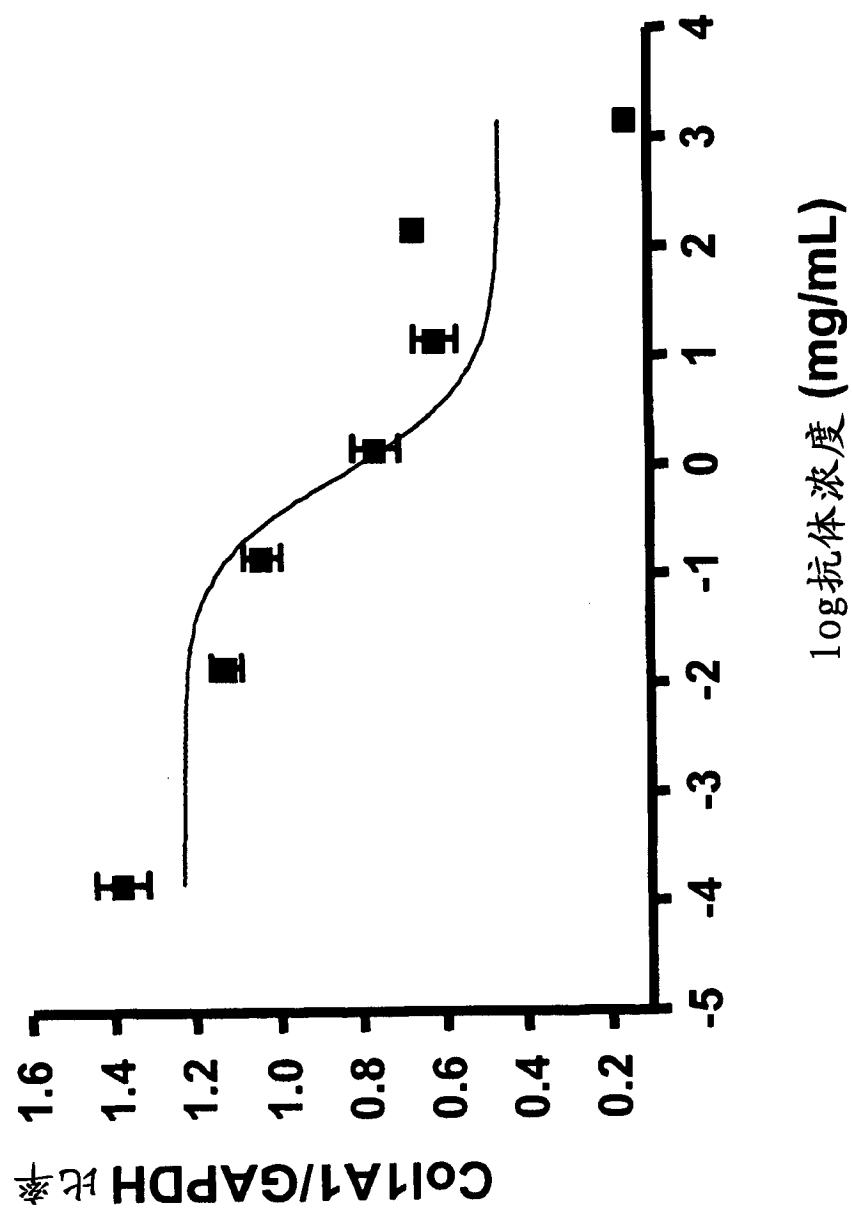


图 14

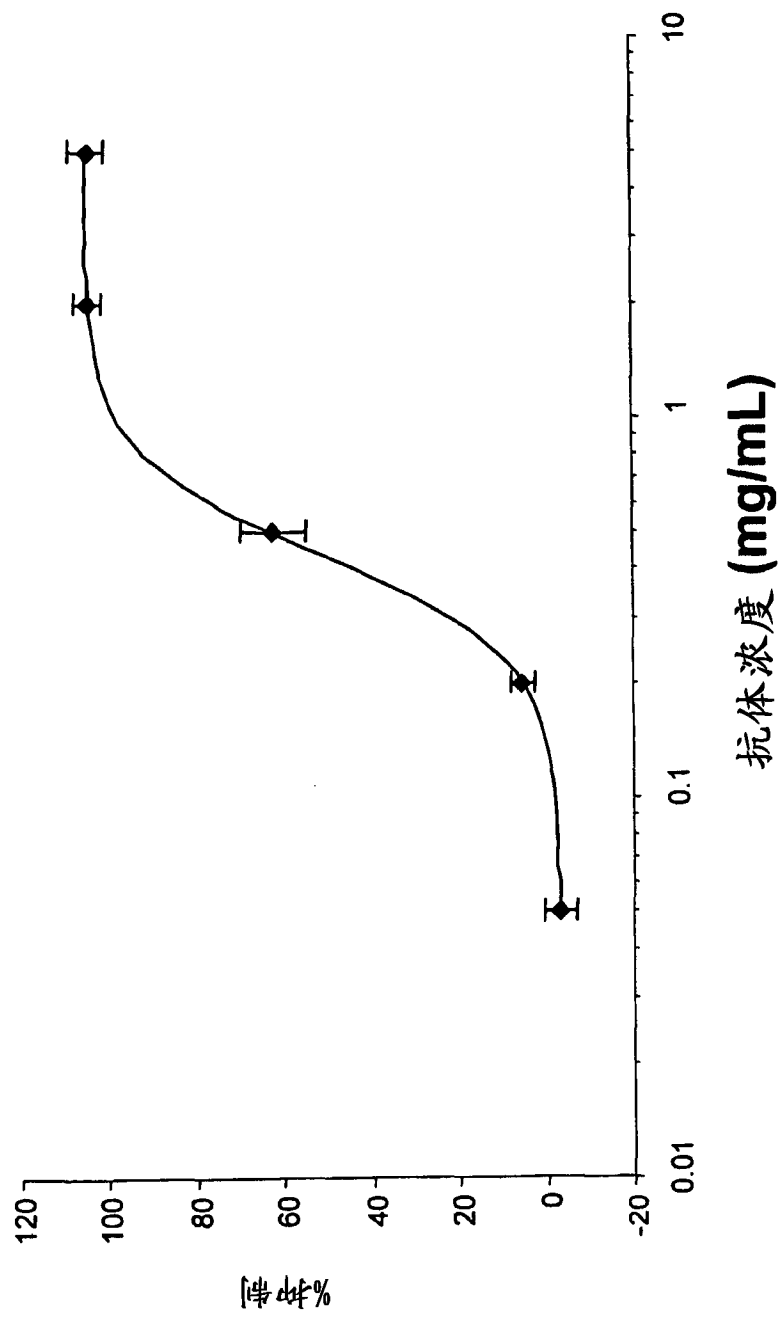


图 15

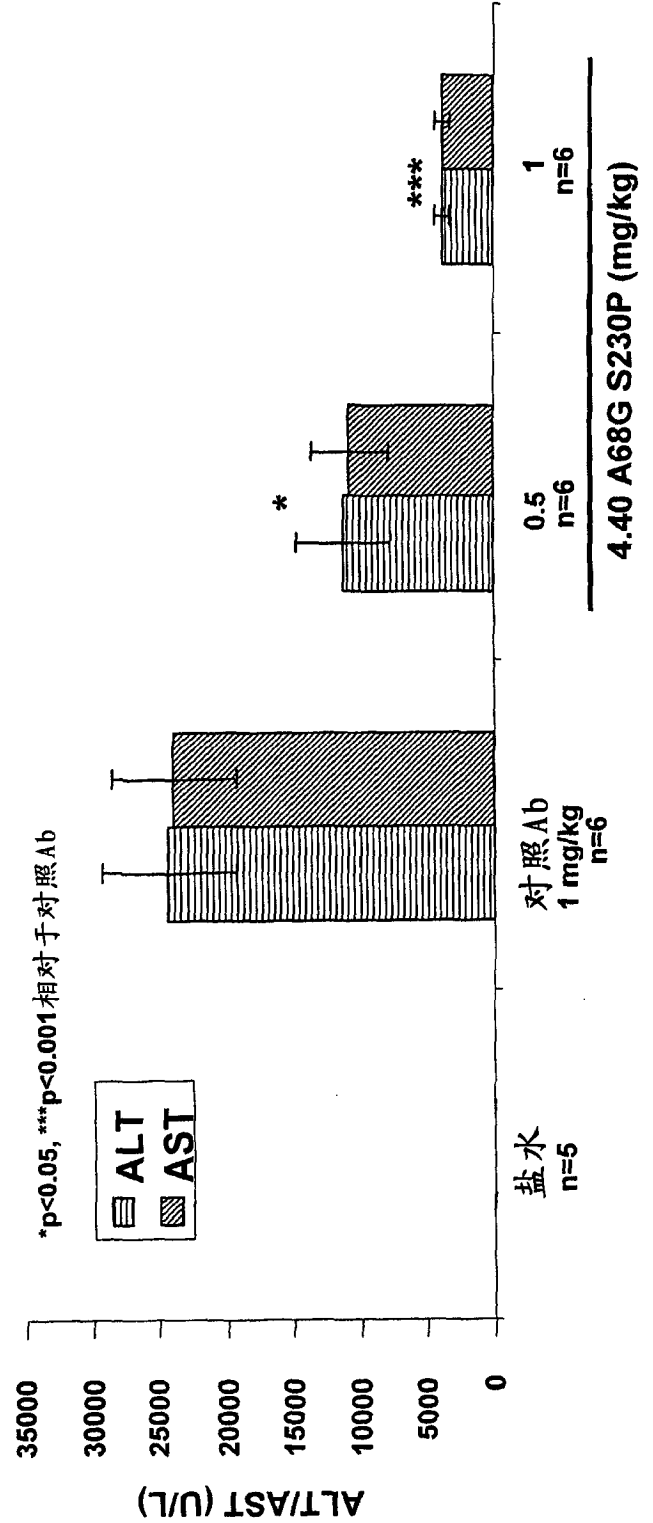


图 16

V_H	
种系	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQG</u>
4.22.3	-----I-----M-----T-----
种系	<u>RVTMTRDTSTVYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCARE#YNWNY#AFDIWGQGTMTVSS</u> SEQ ID NO:158
4.22.3	---L-----D-----RW-K--FDV-----
V_L	
种系	<u>DVVMTQSPPLSLPVTILGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLLIYKVSNWDS</u>
4.22.3	-----P-----L-----A
种系	<u>GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQGTHWPITFGQGT</u> <u>RL</u> <u>EIK</u> SEQ ID NO:159
4.22.3	-----F---##-GRS--V-----

图 17a

V _H	
种系	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG</u>
4.40.2	-----L-----L-----K-----
种系	<u>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR##YNWNY##AFDIWGQGTMTVSS</u> SEQ ID NO:160
4.40.2	-----DQAYWT-FD-----
V _L	
种系	<u>EIVLTQSPDFQSVPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFS</u>
4.40.2	-----
种系	<u>GVPSRFGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLPLTFGGGTKVEIK</u> SEQ ID NO:161
4.40.2	-----A-----

图 17b

V_H	
种系	<u>QVQLVESGGGVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG</u>
4.9.2	-----GT-----R-----
种系	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR##YNWNY## <u>AFDIWGQGTMTVSS</u> SEQ ID NO:162
4.9.2	-----K-----R-----DQAY-K-FD-----
V_L	
种系	<u>DIQMTQSPSSLASVGDRTTTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYAASSLQS</u>
4.9.2	-----T-----
种系	GVPSTRFSGSGTDFTLTISSLPEDFATYVCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK SEQ ID NO:163
4.9.2	-----NS-CS-----

图 17c

V_H	
种系	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSSGGSTSYAQKFQG</u>
4.39.3	-----I-----M-----P-----
种系	<u>RVTMTRDTSTSTVMESSLRSED</u> <u>TAVYYCAR##YNWNY#AFDIWGQGTMTVSS</u> SEQ ID NO:164
4.39.3	-----D-----F-----ERW-K--FD-----
V_L	
种系	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES</u>
4.39.3	-----
种系	<u>GVPDRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYCCQQYYSTPWT</u> <u>FGQGTKVEIK</u> SEQ ID NO:165
4.39.3	-----Q-----R-----

图 17d