



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102089327 A

(43) 申请公布日 2011.06.08

(21) 申请号 200980126524.2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009.05.13

C07K 16/28 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006.01)

61/052,949 2008.05.13 US

A61P 25/28 (2006.01)

12/208, 883 2008. 09. 11 US

12/316,130 2008.12.09 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.01.07

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2009/043757 2009.05.13

(87) PCT 申请的公布数据

W02009/140361 EN 2009.11.19

(71) 申请人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 贾斯文德·阿塔瓦尔

马克·特西尔-拉维格尼 吴雁

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张红春

权利要求书 2 页 说明书 29 页

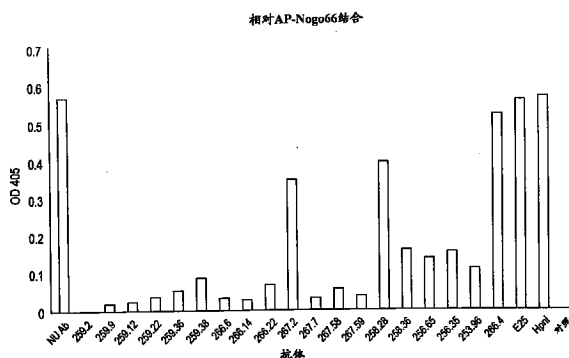
序列表 16 页 附图 22 页

(54) 发明名称

抗 PirB 抗体

(57) 摘要

本发明一般涉及神经发育和神经学病症。本发明具体关注髓磷脂相关抑制系统的新调控剂的鉴定及如此鉴定的拮抗剂的各种用途。



1. 一种分离的抗 PirB/LILRB 抗体,其与选自下组的抗体结合人 PirB(LILRB) 上相同的表位:YW259.2、YW259.9 和 YW259.12。
2. 一种分离的抗 PirB/LILRB 抗体,其与选自下组的抗体竞争对人 PirB(LILRB) 的结合:YW259.2、YW259.9 和 YW259.12。
3. 一种分离的抗 PirB/LILRB 抗体,其包含来自选自下组的重链的一个、两个、或三个高变区序列:YW259.2 重链 (SEQ ID NO:4 或 11)、YW259.9 重链 (SEQ ID NO:5 或 12)、和 YW259.12 重链 (SEQ ID NO:6 或 13)。
4. 权利要求 3 的抗体,其中该抗体包含 YW259.2 抗体重链 (SEQ ID NO:4 或 11) 的所有高变区序列。
5. 权利要求 3 的抗体,其中该抗体包含 YW259.9 抗体重链 (SEQ ID NO:5 或 12) 的所有高变区序列。
6. 权利要求 3 的抗体,其中该抗体包含 YW259.12 抗体重链 (SEQ ID NO:6 或 13) 的所有高变区序列。
7. 权利要求 3-6 任一项的抗体,其进一步包含轻链。
8. 权利要求 7 的抗体,其中所述轻链包含多肽序列 SEQ ID NO:15 的一个、两个或三个高变序列。
9. 权利要求 7 的抗体,其中所述轻链包含多肽序列 SEQ ID NO:7 或 15 的所有高变区序列。
10. 权利要求 3 的抗体,选自下组:抗体 YW259.2、YW259.9、和 YW259.12。
11. 一种分离的抗 PirB/LILRB 抗体,其中该抗体的全长 IgG 形式以 5nM 或更好的结合亲和力特异性结合人 PirB(LILRB)。
12. 一种分离的抗 PirB/LILRB 抗体,其中该抗体的全长 IgG 形式以 1nM 或更好的结合亲和力特异性结合人 PirB(LILRB)。
13. 权利要求 1-12 任一项的抗体,其促进轴突再生。
14. 权利要求 1-12 任一项的抗体,其促进 CNS 神经元再生。
15. 权利要求 1-12 任一项的抗体,其至少部分挽救 Nogo66 和髓磷脂所致的神经突向外生长的抑制。
16. 权利要求 1-12 任一项的抗体,其中该抗体是单克隆抗体。
17. 权利要求 1-12 任一项的抗体,其中该抗体选自下组:嵌合抗体、人源化抗体、亲和力成熟的抗体、人抗体、和双特异性抗体。
18. 权利要求 1-12 任一项的抗体,其中该抗体是抗体片段。
19. 权利要求 1-12 任一项的抗体,其中该抗体是免疫偶联物。
20. 一种多核苷酸,其编码权利要求 1-12 任一项的抗体或其重链或轻链。
21. 一种载体,其包含权利要求 20 的多核苷酸。
22. 权利要求 21 的载体,其中该载体是表达载体。
23. 一种宿主细胞,其包含权利要求 21 的载体。
24. 权利要求 23 的宿主细胞,其中该宿主细胞是原核的。
25. 权利要求 23 的宿主细胞,其中该宿主细胞是真核的。
26. 权利要求 25 的宿主细胞,其中该宿主细胞是哺乳动物的。

27. 一种用于制备抗 PirB/LILRB 抗体的方法,所述方法包括 (a) 在合适的宿主细胞中表达权利要求 22 的载体,并 (b) 回收该抗体。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述宿主细胞是原核的。

29. 权利要求 27 的方法,其中所述宿主细胞是真核的。

30. 一种组合物,其包含权利要求 1-12 任一项的抗 PirB/LILRB 抗体和药学可接受赋形剂。

31. 权利要求 30 的组合物,其中该组合物进一步包含第二药物,其中所述抗 PirB/LILRB 抗体是第一药物。

32. 权利要求 31 的组合物,其中所述第二药物是 NgR 抑制剂。

33. 权利要求 32 的组合物,其中所述 NgR 抑制剂是抗 NgR 抗体。

34. 一种试剂盒,其包含权利要求 1-12 任一项的抗 PirB/LILRB 抗体。

35. 一种用于促进轴突再生的方法,包括对有所需要的受试者施用有效量的权利要求 1-12 任一项的抗 PirB/LILRB 抗体。

36. 权利要求 35 的方法,其中所述受试者是人患者。

37. 权利要求 36 的方法,其中神经元的存活得到增强。

38. 权利要求 36 的方法,其中神经元的向外长出得到诱导。

39. 一种治疗神经变性疾病的方法,包括对有所需要的受试者施用有效量的权利要求 1-12 任一项的抗 PirB/LILRB 抗体。

40. 权利要求 39 的方法,其中所述神经变性疾病特征为对中枢神经系统的物理损伤。

41. 权利要求 40 的方法,其中所述神经变性疾病是与中风有关的脑损伤。

42. 权利要求 39 的方法,其中所述神经变性疾病选自下组:三叉神经痛,舌咽神经痛,贝尔氏麻痹,重症肌无力,肌营养不良,肌萎缩侧索硬化 (ALS),多发性硬化 (MS),进行性肌萎缩,进行性延髓遗传性肌萎缩,身体损伤 (例如烧伤、伤口) 或疾病状态 (诸如糖尿病、肾功能障碍) 或由用于治疗癌症和 AIDS 的化疗剂的毒性作用引起的周围神经损伤,椎间盘成疝、破裂和脱出综合征,颈椎病,丛病症,胸廓出口破坏综合征,周围神经病诸如那些由铅、氨基苯酚、蟑螂引起的,卟啉病,格巴二氏综合征,阿尔茨海默氏病,亨廷顿氏病,和帕金森氏病。

43. 一种抗独特型抗体,其特异性结合权利要求 1-12 任一项的抗 PirB/LILRB 抗体。

抗 PirB 抗体

发明领域

[0001] 一般而言,本发明涉及神经发育和神经学病症。具体而言,本发明特别涉及髓磷脂相关抑制系统的新调控剂的鉴定及如此鉴定的调控剂的各种用途。

[0002] 发明背景

[0003] 髓磷脂和髓磷脂相关蛋白

[0004] 已知成年哺乳动物 CNS 神经元的轴突在损伤后再生的能力非常有限,而周围神经系统 (PNS) 中的轴突再生迅速。已知 CNS 神经元的有限再生能力部分地由于 CNS 轴突的内在特性,但也是由于不允许的环境。虽然 CNS 髓磷脂不是神经突向外长出的抑制信号的唯一来源,但是它含有众多积极阻断轴突生长的抑制分子,因此构成再生的一个重大障碍。已经鉴定了三种这样的髓磷脂相关蛋白 (MAP):Nogo(也称为 NogoA)是具有两个跨膜结构域的 Reticulon 蛋白质家族成员;髓磷脂相关糖蛋白 (MAG) 是 Ig 超家族的跨膜蛋白;和 OMgp 是具有糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚的富含亮氨酸的重复 (LRR) 蛋白。Chen 等, Nature 403:434-39(2000);GrandPre 等, Nature 417:439-444(2000);Prinjha 等, Nature 403:383-384(2000);McKerracher 等, Neuron 13:805-11(1994);Wang 等, Nature 417:941-4(2002);Kottis 等, J. Neurochem 82:1566-9(2002)。Nogo66 是 NogoA 的一部分,被描述为一种 66 个氨基酸的胞外多肽,其见于 Nogo 的所有三种同等型中。

[0005] 尽管结构差异,但是所有三种抑制性蛋白质(包括 Nogo66)已经显示出结合相同的 GPI 锚定受体,称为 Nogo 受体 (NgR;也称为 Nogo 受体 -1 或 NgR1),而且已提出 NgR 可能是介导 Nogo、MAG 和 OMgp 的抑制作用所需的。Fournier 等, Nature 409:341-346(2001)。还鉴定了两种 NgR1 同系物 (NgR2 和 NgR3)。US 2005/0048520 A1(Strittmatter 等),公布于 2005 年 3 月 3 日。考虑到 NgR 是一种 GPI 锚定的细胞表面蛋白,它不太可能是直接的信号转导体 (Zheng 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:1205-1210(2005))。另有人提出神经营养因子受体 p75^{NTR} 是 NgR 的一种共同受体,并且在受体复合物中提供信号转导模块 (Wang 等, Nature 420:74-78(2002);Wong 等, Nat. Neurosci. 5:1302-1308(2002))。

[0006] PirB 及人直向同系物

[0007] I 类主要组织相容性复合物 (MHC) 最初鉴定为一个编码对免疫系统有重要作用的分子家族的区域。新近的证据指出了 I 类 MHC 分子在发育和成年 CNS 中具有别的功能。Boulanger 和 Shatz, Nature Rev Neurosci. 5:521-531(2004);US 2003/0170690 (Shatz 和 Syken), 公布于 2003 年 9 月 11 日。发现许多 I 类 MHC 成员及其结合配偶在 CNS 神经元中表达。新近的遗传和分子研究集中在 CNS I 类 MHC 的生理学功能,而且初始结果提示 I 类 MHC 分子可能涉及活性依赖性突触可塑性,即现有突触连接的强度应答因神经元活性而增强或减弱,接着是对回路的长期结构改变的过程。此外,也已在遗传上将 I 类 MHC 编码区与极其多种具有神经学症状的病症关联,而且认为 I 类 MHC 分子的异常功能引起正常脑发育和可塑性的破坏。

[0008] 免疫背景中已知的 I 类 MHC 受体之一是 PirB,即由 Kubagawa 等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 94:5261-6(1997) 首先记载的一种鼠多肽。小鼠 PirB 具有数种人直向同

系物,它们是白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B(LILRB) 的成员,也称为“免疫球蛋白样转录物”(ILT)。人直向同系物与鼠序列具有显著同源性,同源性由高到低的次序如下:LILRB3/ILT5, LILRB1/ILT2, LILRB5/ILT3, LILRB2/ILT4,而且正如 PirB 一样,都是抑制性受体。LILRB3/ILT5(NP_006855) 和 LILRB1/ILT2(NP_006660) 最初记载于 Samaridis 和 Colonna, Eur. J. Immunol. 27(3):660-665(1997)。LILRB5/ILT3(NP_006831) 由 Borges 等, J. Immunol. 159(11):5192-5196(1997) 鉴定。LILRB2/ILT4(也称为 MIR10) 是由 Colonna 等, J. Exp. Med. 186:1809-18(1997) 鉴定的。PirB 及其人直向同系物显示出极大程度的结构可变性。各种可变剪接形式的序列可以自 EMBL/GenBank 获得,包括例如人 ILT4 cDNA 的以下登录号:ILT4-c11AF009634;ILT4-c117 AF11566;ILT4-c126 AF11565。如上所述,PirB/LILRB 多肽是 I 类 MHC(MHCI) 抑制性受体,而且已知它们在调控免疫细胞激活中的作用(Kubagawa 等,见上文;Hayami 等, J. Biol. Chem. 272:7320(1997);Takai 等, Immunology 115:433(2005);Takai 等, Immunol. Rev. 181:215(2001);Nakamura 等, Nat. Immunol. 5:623(2004);Liang 等, Eur. J. Immunol. 32:2418(2002))。

[0009] Syken 等 (Science 313:1795-800(2006)) 的新近研究报告了 PirB 在遍及大脑的神经元子集中表达。在缺乏功能性 PirB 的突变型小鼠中,皮质眼优势(cortical ocular dominance, OD) 可塑性在所有年龄显著增强,提示 PirB 在约束视皮层中的活性依赖性可塑性(activity-dependent plasticity) 中的功能。

[0010] 发明概述

[0011] 使用功能阻断性抗 PirB 抗体干扰 PirB 活性有助于挽救 Nogo66 和髓磷脂所致的神经突向外生长(neurite outgrowth) 的抑制,而且同时阻断 PirB 和 NgR 活性导致近乎完全解除髓磷脂抑制。

[0012] 一方面,本发明关注一种分离的抗 PirB/LILRB 抗体,其与选自下组的抗体结合人 PirB(LILRB) 上基本上相同的表位:YW259.2、YW259.9 和 YW259.12。

[0013] 另一方面,本发明关注一种分离的抗 PirB/LILRB 抗体,其与选自下组的抗体竞争对人 PirB(LILRB) 的结合:YW259.2、YW259.9 和 YW259.12。

[0014] 又一方面,本发明关注一种分离的抗 PirB/LILRB 抗体,其包含来自选自下组的重链的一个、两个、或三个高变区序列:YW259.2 重链(SEQ ID NO:4 或 11)、YW259.9 重链(SEQ ID NO:5 或 12)、和 YW259.12 重链(SEQ ID NO:6 或 13)。

[0015] 在一个实施方案中,该抗体包含 YW259.2 抗体重链(SEQ ID NO:4 或 11) 的所有高变区序列。

[0016] 在另一个实施方案中,该抗体包含 YW259.9 抗体重链(SEQ ID NO:5 或 12) 的所有高变区序列。

[0017] 在又一个实施方案中,该抗体包含 YW259.12 抗体重链(SEQ ID NO:6 或 13) 的所有高变区序列。

[0018] 在一个进一步的实施方案中,该抗体包含轻链。

[0019] 在一个又进一步的实施方案中,该抗体包含来自多肽序列 SEQ ID NO:7 的轻链的一个、两个或三个高变区序列。

[0020] 在又一个实施方案中,该抗体包含含有多肽序列 SEQ ID NO:7 或 15 的轻链的所有高变区序列。

[0021] 在一个具体的实施方案中,该抗体包含重链和轻链二者,其中所述重链包含来自选自下组的重链的一个、两个、或三个高变区序列:YW259.2 重链 (SEQ ID NO:4 或 11)、YW259.9 重链 (SEQ ID NO:5 或 12)、和 YW259.12 重链 (SEQ ID NO:6 或 13),和 / 或所述轻链包含来自多肽序列 SEQ ID NO:7 或 15 的轻链的一个、两个或三个高变区序列。

[0022] 在一个进一步的实施方案中,该抗体选自下组:抗体 YW259.2、YW259.9、和 YW259.12。

[0023] 又一方面,本发明关注一种分离的抗 PirB 抗体,其中该抗体的全长 IgG 形式以 5nM 或更好或者 1nM 或更好的结合亲和力特异性结合人 PirB。

[0024] 在一个实施方案中,该抗体促进轴突再生,诸如 CNS 神经元再生。

[0025] 在另一个实施方案中,该抗体至少部分挽救 Nogo66 和髓磷脂所致的神经突向外生长的抑制。

[0026] 在所有方面,该抗体优选是单克隆抗体,其可以是例如嵌合抗体、人源化抗体、亲和力成熟的抗体、人抗体、或双特异性抗体,抗体片段或免疫偶联物。

[0027] 又一方面,本发明关注编码本文抗 PirB/LILRB 抗体的多核苷酸。

[0028] 其它方面,本发明关注包含编码本文抗体的多核苷酸(包括一条或多条抗体链的编码序列)的载体和宿主细胞。该宿主细胞包括原核、真核和哺乳动物宿主。

[0029] 又一方面,本发明关注一种用于制备抗 PirB/LILRB 抗体的方法,包括 (a) 在合适的宿主细胞中表达包含编码该抗体的核酸的载体,并 (b) 回收该抗体。

[0030] 还有一方面,本发明关注一种组合物,其包含本文抗 PirB/LILRB 抗体和药学可接受赋形剂。任选的是,该组合物包含第二药物,其中所述抗 PirB/LILRB 抗体是第一药物。所述第二药物可以是例如 NgR 抑制剂,诸如抗 NgR 抗体。

[0031] 在一个不同的方面,本发明关注一种试剂盒,其包含本文抗 PirB/LILRB 抗体。

[0032] 另一方面,本发明关注一种用于促进轴突再生的方法,包括对有所需要的受试者施用有效量的本文抗 PirB/LILRB 抗体。优选的是,所述受试者是人患者。

[0033] 在多个实施方案中,本文治疗方法增强神经元的存活和 / 或诱导神经元的向外长出。

[0034] 又一方面,本发明关注一种治疗神经变性疾病 (neurodegenerative disease) 的方法,包括对有所需要的受试者施用有效量的本文抗 PirB/LILRB 抗体。所述神经变性疾病特征可以例如对中枢神经系统的物理损伤 (physical damage to the central nervous system),而且包括但不限于与中风有关的脑损伤。

[0035] 在一个具体的实施方案中,所述神经变性疾病选自下组:三叉神经痛 (trigeminal neuralgia),舌咽神经痛 (glossopharyngeal neuralgia),贝尔氏麻痹 (Bell's Palsy),重症肌无力 (myasthenia gravis),肌营养不良 (muscular dystrophy),肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS),多发性硬化 (multiple sclerosis, MS),进行性肌萎缩 (progressive muscular atrophy),进行性延髓遗传性肌萎缩 (progressive bulbar inherited muscular atrophy),身体损伤(例如烧伤、伤口)或疾病状态(诸如糖尿病、肾功能障碍)或由用于治疗癌症和 AIDS 的化疗剂的毒性作用引起的周围神经损伤,椎间盘成疝、破裂和脱出综合征 (herniated, ruptured or prolapsed intervertebral disk syndromes),颈椎病 (cervical spondylosis),丛病症

(plexus disorders), 胸廓出口破坏综合征 (thoracic outlet destruction syndromes), 周围神经病诸如那些由铅、氨苯砒 (dapsone)、蜱螨引起的 (peripheral neuropathies such as those caused by lead, dapsone, ticks), 卟啉病 (prophyria), 格巴二氏综合征 (Gullain-Barre syndrome), 阿尔茨海默氏病 (Alzheimer' s disease), 亨廷顿氏病 (Huntington' s Disease), 和帕金森氏病 (Parkinson' s disease)。

[0036] 本发明还关注一种抗独特型抗体, 其特异性结合本文抗 PirB 抗体。

[0037] 附图简述

[0038] 图 1A 和 1B 显示小鼠 PirB 序列 (SEQ ID NO :1) 和人 LILRB2 序列 (SEQ IDNO :2)。

[0039] 图 2A 和 2B。阻断 PirB 逆转 AP-Nogo66 或髓磷脂上的 CGN 向外长出抑制。将解离的小鼠 P7CGN 在 PDL/ 层粘连蛋白 (对照)、AP-Nogo66、或髓磷脂上涂板以测试这些底物所致抑制。(A) 代表性显微照片, (B) 测量来自一项代表性实验的平均神经突长度 ($\pm$ SE) 的图。培养在 PDL/ 层粘连蛋白、AP-Nogo66、或髓磷脂上生长的神经元, 有或无针对 PirB 的功能阻断性抗体 (aPB1 ;50 μ g/ml)。aPB1 显著降低任一底物所致抑制 (* $p < 0.01$;比例尺, 50 μ m)。

[0040] 图 3A-3D。阻断 PirB 逆转 AP-Nogo66 或髓磷脂上的 CGN 向外长出抑制。将解离的小鼠 P7CGN 在 PDL/ 层粘连蛋白 (对照)、AP-Nogo66、或髓磷脂上涂板以测试这些底物所致抑制。代表性显微照片显示于图 3A 和 3C, 而测量来自一项代表性实验的平均神经突长度 ($\pm$ SE) 的图显示于图 3B 和 3D。培养在 PDL/ 层粘连蛋白、AP-Nogo66、或髓磷脂上生长的神经元, 有或无针对 PirB 的功能阻断性抗体 (aPB1 ;50 μ g/ml)。aPB1 显著降低任一底物所致抑制 (* $p < 0.01$;比例尺, 50 μ m)。

[0041] 图 4A 和 4B。PirB 和 NgR 二者是髓磷脂抑制剂介导生长锥塌陷 (growthcone collapse) 所需要的。将出生后 DRG 轴突的生长锥用单独的培养基 (对照)、髓磷脂 (3 μ g/ml)、或 AP-Nogo66 (100nM) 处理 30 分钟以刺激塌陷, 并用罗丹明 - 鬼笔环肽染色以显现生长锥。(A) 代表性显微照片, (B) 测量来自累积实验的百分比生长锥塌陷 ($\pm$ SEM) 的图。NgR 的遗传丢失或抗 PirB 处理所致 PirB 抑制任一足以单独阻止髓磷脂或 AP-Nogo66 的生长锥塌陷活性。对两种途径的抑制也完全阻断塌陷 (比例尺, 50 μ m)。

[0042] 图 5A-5D。阻断 PirB 部分解除 DRG 神经元中的和底物 MAG 上的神经突向外长出抑制。代表性显微照片显示于图 5A 和 5C ;显示来自一项代表性实验的平均神经突长度 ($\pm$ SE) 的图显示于图 5B 和 5D。(A) 和 (B) 将解离的 P10DRG 神经元在 PDL/ 层粘连蛋白、AP-Nogo66、或髓磷脂上涂板, 有或无抗 PirB。aPB1 对 AP-Nogo66 和髓磷脂的抑制作用有显著降低。(C) 和 (D) 将解离的 P7CGN 培养物在 PDL/ 层粘连蛋白或 MAG-Fc 上涂板, 有或无 aPB1。针对 PirB 的抗体降低 MAG-Fc 所致神经突向外长出抑制。(* $p < 0.01$;比例尺, A、B 为 200 μ m ;C 为 50 μ m)。

[0043] 图 6。抗 PirB 抗体 YW259.2 重链的 DNA 序列 (SEQ ID NO :8)。

[0044] 图 7。抗 PirB 抗体 YW259.9 重链的 DNA 序列 (SEQ ID NO :9)。

[0045] 图 8。抗 PirB 抗体 YW259.12 重链的 DNA 序列 (SEQ ID NO :3)。

[0046] 图 9。抗 PirB 抗体 YW259.2 重链的蛋白质序列 (SEQ ID NO :4)。

[0047] 图 10。抗 PirB 抗体 YW259.9 重链的蛋白质序列 (SEQ ID NO :5)。

[0048] 图 11。抗 PirB 抗体 YW259.12 重链的蛋白质序列 (SEQ ID NO :6)。

[0049] 图 12。所有 YW259 抗体的轻链蛋白质序列 (SEQ ID NO :7)。

[0050] 图 13。抗 PirB 抗体 YW259.2(IgG) 抑制带 His 标签的小鼠 PirB 的活性的能力。

[0051] 图 14。抗 PirB 抗体 YW259.9(IgG) 抑制带 His 标签的小鼠 PirB 的活性的能力。

[0052] 图 15。抗 PirB 抗体 YW259.12(IgG) 抑制带 His 标签的小鼠 PirB 的活性的能力。

[0053] 图 16。一组抗 PirB 抗体的相对 AP-Nogo66 结合, 包括 YW259.2、YW259.9、和 YW259.12。

[0054] 图 17A-17C。抗 PirB 抗体 YW259.2(SEQ ID NO :11)、YW259.9(SEQ ID NO :12) 和 YW259.12(SEQ ID NO :13) 的重链序列比对。随同依照 Kabat、Chothia 和接触 CDR H 域的 CDR H 域, 框示了 CDR H1、CDR H2 和 CDR H3 序列。Hum III 披露为 SEQ ID NO :10。

[0055] 图 18A-18C。抗 PirB 抗体 YW259.2(SEQ ID NO :15)、YW259.9(SEQ ID NO :15) 和 YW259.12(SEQ ID NO :15)、及 Hu κ I(SEQ ID NO :14) 的轻链序列比对。随同依照 Kabat、Chothia 和接触 CDR L 域的 CDR L 域, 框示了 CDR L1、CDR L2 和 CDR L3 序列。Hum III 披露为 SEQ ID NO :10。

[0056] 图 19。C1QTNF5(CTRP5 ;NP_05646) 抑制背根神经节神经元的神经突向外长出, 而且此抑制在 PirB 被 PirB 功能阻断性抗体 YW259.2 阻断时降低。

[0057] 发明详述

[0058] 定义

[0059] 术语“成对免疫球蛋白样受体 B”和“PirB”在本文中可互换使用, 指图 1 所示天然序列的、841 个氨基酸的小鼠抑制性蛋白质 (SEQ ID NO :1) (NP_035225), 及其在大鼠和其它非人哺乳动物中的天然序列同源物, 包括所有天然存在的变体, 诸如可变剪接的等位变体和同等型, 及其可溶形式。进一步的详情参见 Kubagawa et al., Proc Natl Acad Sci USA 94, 5261 (1997)。

[0060] 术语“LILRB”、“ILT”和“MIR”在本文中可互换使用, 指人“白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B”的所有成员, 包括所有天然存在的变体, 诸如可变剪接的等位变体和同等型, 及其可溶形式。LILR 受体的这个 B 型亚家族内的各个成员以首字母缩写后面的数字命名, 诸如例如 LILRB3/ILT5、LILRB1/ILT2、LILRB5/ILT3、和 ILIRB2/ILT4, 除非另有说明, 当提及任何成员个体时也包括提及所有天然存在的变体, 诸如可变剪接的等位变体和同等型, 及其可溶形式。如此, 例如, “LILRB2”、“LIR2”和“MIR10”在本文中可互换使用, 是指 SEQ ID NO :2 所示的 598 个氨基酸的多肽 (图 1) (NP_005865), 以及其天然存在的变体, 诸如可变剪接的等位变体和同等型, 及其可溶形式。进一步的详情参见 Martin et al., Trends Immunol. 23, 81 (2002)。

[0061] 术语“PirB/LILRB”在本文中用于共同地指相应的小鼠和人蛋白及在其它非人哺乳动物中的天然序列同源物, 包括所有天然存在的变体, 诸如可变剪接的等位变体和同等型, 及其可溶形式。

[0062] 术语“髓磷脂相关蛋白”以最广义使用, 包括抑制神经元再生的 CNS 髓磷脂中存在的所有蛋白质, 包括 Nogo、MAG 和 OMgp。

[0063] “分离的”, 在用于描述本文中所公开的各种蛋白质时, 意指已经鉴定且从其天然环境的成分中分离和 / 或回收的蛋白质。蛋白质的天然环境的污染性成分指通常会干扰其诊断或治疗用途的物质, 可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优

选的实施方案中,将蛋白质纯化至(1)足以通过使用转杯式测序仪获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度,或(2)使用考马斯蓝或优选银染色的非还原性或还原性条件下进行SDS-PAGE,达到同质,或(3)根据质谱或肽作图技术,达到同质。由于所讨论蛋白质的天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的蛋白质包括重组细胞内的原位蛋白质。然而,分离的蛋白质通常通过至少一个纯化步骤来制备。

[0064] “分离的”核酸分子指已经鉴定且与所讨论核酸的天然来源中通常与之关联的至少一种污染性核酸分子分开的核酸分子。分离的核酸分子不同于在自然界中发现它时的形式或背景。分离的核酸分子因此与存在于天然细胞中时的核酸分子有区别。然而,分离的核酸分子包括通常表达此类核酸的细胞中所包含的核酸分子,例如当所述核酸分子在所述细胞中的染色体定位不同于它在天然细胞中的染色体定位时。

[0065] 在用于本文时,术语“PirB/LILRB拮抗剂”用于指能够阻断、中和、抑制、消除、降低或干扰PirB/LILRB活性的药剂。特别地,PirB/LILRB拮抗剂干扰髓磷脂相关抑制活性,由此增强神经突向外长出(neurite outgrowth)、和/或促进神经元生长、修复和/或再生。在一个优选的实施方案中,PirB/LILRB拮抗剂通过结合PirB/LILRB来抑制PirB/LILRB对Nogo66和/或MAG和/或OMgp的结合。PirB/LILRB拮抗剂包括例如针对PirB/LILRB的抗体及其抗原结合片段,PirB/LILRB、Nogo 66、MAG或OMgp的能够隔绝(sequestering)PirB/LILRB与Nogo 66之间、或PirB/LILRB与MAG之间、或PirB/LILRB与OMgp之间的结合的截短或可溶片段,及PirB/LILRB相关抑制途径的小分子抑制物。PirB/LILRB拮抗剂还包括能够抑制或降低PirB/LILRB mRNA表达的短干扰RNA(siRNA)分子。

[0066] 一种优选的PirB/LILRB拮抗剂是抗PirB/LILRB抗体。

[0067] 术语“抗体”在本文中以最广义使用,特别包括完整抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)、及抗体片段,只要它们展现出期望的生物学活性。

[0068] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体中获得的抗体,即构成群体的各个抗体相同,除了可能以极小量存在的可能的天然存在突变外。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原性位点。此外,与包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。在它们的特异性以外,单克隆抗体的优势在于它们可以在不受其它抗体污染的情况下合成。修饰语“单克隆”指示抗体从基本上同质的抗体群获得的特征,不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如,在本发明中使用的单克隆抗体可以通过首次由Kohler等,Nature, 256:495(1975)记载的杂交瘤方法来制备,或者可以通过重组DNA方法来制备(参见例如美国专利No. 4,816,567)。“单克隆抗体”也可以使用例如Clackson等,Nature, 352: 624-628(1991)及Marks等,J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)中记载的技术从噬菌体抗体库中分离。

[0069] 抗体特别地包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性(美国专利No. 4,816,567;和Morrison等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。本文中感兴趣的嵌合抗体包括包含衍生自非人灵长

类动物（例如旧大陆猴类（Old World Monkey）、猿等）的可变域抗原结合序列和人恒定区序列的灵长类抗体。

[0070] “抗体片段”包含完整抗体的一部分，优选包含抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段；双抗体；线性抗体；单链抗体分子；及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0071] “完整”抗体指包含抗原结合可变区以及轻链恒定域（C_L）和重链恒定域 C_H1、C_H2 和 C_H3 的抗体。恒定域可以是天然序列恒定域（例如人天然序列恒定域）或其氨基酸序列变体。优选的是，完整抗体具有一项或多项效应器功能。

[0072] 非人（例如啮齿类）抗体的“人源化”形式指包含衍生自非人免疫球蛋白的最短序列的嵌合抗体。在极大程度上，人源化抗体指人免疫球蛋白（受体抗体）中的高变区残基用具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种（供体抗体）诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中，将人免疫球蛋白的框架区（FR）残基用相应的非人残基替换。此外，人源化抗体可包含在受体抗体中或在供体抗体中没有找到的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。一般而言，人源化抗体将包含至少一个、通常两个基本上整个如下的可变域（Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab₂、Fv），其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环，且所有或基本上所有 FR 是人免疫球蛋白序列的 FR。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区（Fc），通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones 等，Nature 321:522-525(1986)；Riechmann 等，Nature 332:323-329(1988)；和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。

[0073] 术语“高变区”在用于本文时指抗体可变域中在序列方面高度变化和 / 或形成结构确定的环的区域。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基（即轻链可变域中的残基 24-34、50-56 和 89-97 及重链可变域中的残基 31-35、50-65 和 95-102；Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)）和 / 或那些来自“高变环”的残基（即轻链可变域中的残基 26-32、50-52 和 91-96 及重链可变域中的残基 26-32、53-55 和 96-101；Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917(1987)）。在这两种情况中，可变域残基依照 Kabat 等（见上文）的方式编号，下文将更详细地讨论。“框架”或“FR”残基指可变域中除本文中所定义的高变区残基之外的那些残基。

[0074] “亲本抗体”或“野生型”抗体指包含如下氨基酸序列的抗体，所述氨基酸序列与本文所公开的抗体变体相比缺少一处或多处氨基酸序列改变。如此，亲本抗体一般具有至少一个如下高变区，所述高变区在氨基酸序列方面与本文所公开的抗体变体的相应高变区的氨基酸序列不同。亲本多肽可包含天然序列（即天然存在的）抗体（包括天然存在的等位变体）或具有天然存在序列的预先存在的氨基酸序列修饰（诸如插入、删除和 / 或其它改变）的抗体。贯穿本公开内容，“野生型”、“WT”、“wt”、和“亲本”抗体可互换使用。

[0075] 在用于本文时，“抗体变体”或“变体抗体”指具有如下氨基酸序列的抗体，所述氨基酸序列与亲本抗体的氨基酸序列不同。优选的是，抗体变体包含具有在自然界中未发现的氨基酸序列的重链可变域或轻链可变域。此类变体必然地与亲本抗体具有低于 100% 的序列同一性或相似性。在一个优选的实施方案中，抗体变体会具有如下的氨基酸序列，所述氨基酸序列与亲本抗体的重链或轻链可变域的氨基酸序列具有约 75% 至低于 100%，更优

选约 80% 至低于 100%，更优选约 85% 至低于 100%，更优选约 90% 至低于 100%，和最优选约 95% 至低于 100% 的氨基酸序列同一性或相似性。抗体变体一般是在其一个或多个高变区中或附近包含一处或多处氨基酸改变的抗体。

[0076] “氨基酸改变”指预定的氨基酸序列的氨基酸序列中的变化。例示性的改变包括插入、替代和删除。“氨基酸替代”指预定氨基酸序列中的现有氨基酸残基用另一种不同氨基酸残基置换。

[0077] “置换”氨基酸残基指置换或替代氨基酸序列中另一个氨基酸残基的氨基酸残基。置换残基可以是天然存在的或非天然存在的氨基酸残基。

[0078] “氨基酸插入”指将一个或多个氨基酸残基导入预定氨基酸序列中。氨基酸插入可包含“肽插入”，在这种情况下将包含两个或多个通过肽键相连接的氨基酸残基的肽导入预定的氨基酸序列中。若氨基酸插入牵涉肽的插入，则所插入的肽可通过随机诱变来生成，使得它具有自然界中不存在的氨基酸序列。“高变区附近的”氨基酸改变指在高变区的 N 末端和 / 或 C 末端导入或替代一个或多个氨基酸残基，使得至少一个所插入或置换的氨基酸残基与所讨论高变区的 N 端或 C 端氨基酸残基形成肽键。

[0079] “天然存在的氨基酸残基”指由遗传密码编码的氨基酸残基，一般选自：丙氨酸 (Ala)；精氨酸 (Arg)；天冬酰胺 (Asn)；天冬氨酸 (Asp)；半胱氨酸 (Cys)；谷氨酰胺 (Gln)；谷氨酸 (Glu)；甘氨酸 (Gly)；组氨酸 (His)；异亮氨酸 (Ile)；亮氨酸 (Leu)；赖氨酸 (Lys)；甲硫氨酸 (Met)；苯丙氨酸 (Phe)；脯氨酸 (Pro)；丝氨酸 (Ser)；苏氨酸 (Thr)；色氨酸 (Trp)；酪氨酸 (Tyr)；和缬氨酸 (Val)。

[0080] “非天然存在的氨基酸残基”在本文中指上文所列天然存在氨基酸残基以外的，能够在多肽链中与邻近氨基酸残基共价结合的氨基酸残基。非天然存在氨基酸残基的例子包括正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸和其它氨基酸残基类似物，诸如那些 Ellman 等，Meth. Enzym. 202 :301-336 (1991) 中所记载的。为了生成此类非天然存在氨基酸残基，可使用 Noren 等，Science 244 :182 (1989) 和 Ellman 等（见上文）的操作程序。简而言之，这些操作程序包括用非天然存在氨基酸残基化学活化阻抑型 tRNA，接着体外转录并翻译 RNA。

[0081] 贯穿本公开内容，提到了来自 Kabat, E. A. 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) 和 (1991) 的编号系统。在这些概要中，Kabat 列出了每种亚类的抗体的许多氨基酸序列，而且列出了该亚类中每个残基位置的最常见的氨基酸。Kabat 使用一种方法给所列序列中的每个氨基酸指派残基编号，而且这种用于指派残基编号的方法已经成为该领域的标准。本说明书遵循 Kabat 编号方案。为了本发明的目的，为了给未包括在 Kabat 概要中的候选抗体氨基酸序列指派残基编号，遵循下列步骤。一般而言，将候选序列与 Kabat 中的任何免疫球蛋白序列或任何共有序列比对。比对可以手工进行，或者使用普遍接受的计算机程序由计算机进行；此类程序的一个例子是 Align 2 程序。可通过使用与大多数 Fab 序列共同的一些氨基酸残基来推动比对。例如，轻链和重链各自典型地具有两个具有相同残基编号的半胱氨酸；在 V_L 结构域中，这两个半胱氨酸典型地位于残基编号 23 和 88 处，而在 V_H 结构域中，这两个半胱氨酸残基典型地编号为 22 和 92。框架残基一般而非总是具有大致相同的残基数目，然而，CDR 会在大小 (size) 方面有所变化。例如，在来自候选序列的 CDR 比与之比对的 Kabat 序列中的 CDR 长的情况中，通常给残基编号添加后缀以指明额外残基的插入（见

例如图 1B 中的残基 100abc)。对于例如候选序列与 Kabat 序列在残基 34 和 36 处比对但在这两个残基之间没有残基以与残基 35 比对的,就不将编号 35 指派给残基。

[0082] 在用于本文时,具有“高亲和力”的抗体指具有纳摩尔 (nM) 范围中的或更好的 K_D 或解离常数的抗体。“纳摩尔范围”中的或更好的 K_D 可以表示为 XnM,其中 X 是小于约 10 的数。

[0083] “亲和力成熟的”抗体指在抗体的一个或多个 CDR 中具有一处或多处改变、导致该抗体对抗原的亲和力与没有这些改变的亲本抗体相比有所改进的抗体。在一个实施方案,亲和力成熟的抗体具有纳摩尔或甚至皮摩尔量级的对靶抗原的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知规程来生成。Markset al.,*Bio/Technology* 10:779-783(1992) 记载了通过 VH 和 VL 结构域改组进行的亲和力成熟。以下文献记载了 CDR 和 / 或框架残基的随机诱变:Barbas et al.,*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813(1994);Schier et al.,*Gene* 169:147-155(1995);Yelton et al.,*J. Immunol.* 155:1994-2004(1995);Jackson et al.,*J. Immunol.* 154(7):3310-9(1995);及 Hawkins et al.,*J. Mol. Biol.* 226:889-896(1992)。

[0084] 抗体的“功能性抗原结合位点”指能够结合靶抗原的位点。抗原结合位点的抗原结合亲和力不必像衍生该抗原结合位点的亲本抗体那样强,但是结合抗原的能力必须是使用已知用于评估抗体对抗原结合的多种方法之任一可测量到的。

[0085] 具有指定抗体的“生物学特征”的抗体指拥有该指定抗体区别于其它结合相同抗原的抗体的一项或多项生物学特征的抗体。

[0086] 为了筛选能结合抗原上感兴趣抗体所结合的表位的抗体,可以实施常规交叉阻断测定法,诸如 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988) 中所记载的。

[0087] 术语“丝状噬菌体”指能够在其表面上展示异源多肽的病毒颗粒,而且包括但不限于 f1、fd、Pf1、和 M13。丝状噬菌体可包含选择标志,诸如四环素(例如“fd-tet”)。多种丝状噬菌体展示系统对于本领域技术人员是众所周知的(参见例如 Zacher 等,*Gene*, 9:127-140(1980);Smith 等,*Science*, 228:1315-1317(1985);及 Parmley 和 Smith,*Gene*, 73:305-318(1988))。

[0088] 术语“淘选”用于指鉴定和分离携带如下化合物(诸如抗体)的噬菌体的多轮筛选过程,所述化合物对靶物具有高亲和力和特异性。

[0089] 术语“短干扰 RNA(siRNA)”指干扰基因表达的双链小 RNA。siRNA 是 RNA 干扰(双链 RNA 沉默同源基因的过程)的媒介物。siRNA 典型地由两条长约 15-25 个核苷酸、形成双链体(其可包括单链突出端)的单链 RNA 构成。酶复合物(例如聚合酶)对双链 RNA 的加工导致切割双链 RNA 以生成 siRNA。RNA 干扰(RNAi)沉默复合物使用 siRNA 的反义链来引导 mRNA 切割,由此促进 mRNA 降解。为了使用 siRNA 来沉默特定基因,例如在哺乳动物细胞中,选择碱基配对区来避免与无关 mRNA 的偶然互补。本领域已经鉴定了 RNAi 沉默复合物诸如 Fire 等,*Nature*, 391:806-811(1998) 及 McManus 等,*Nat. Rev. Genet.*, 3(10):737-47(2002)。

[0090] 术语“干扰 RNA(RNAi)”在本文中用于指导致特定 mRNA 的催化性降解,如此可用于抑制 / 降低特定基因表达的双链 RNA。

[0091] 术语“多态性”在本文中用于指基因或其一部分(例如等位变体)具有一种以上

形式。基因中具有至少两种不同形式的那部分称为该基因的“多态性区域”。位于基因多态性区域的特定遗传序列为“等位基因”。多态性区域可以是在不同等位基因中不同的单个核苷酸,或者可以长数个核苷酸。

[0092] 在用于本文时,术语“病症”一般指任何会受益于 PirB/LILRB2 拮抗剂诸如抗 PirB 抗体处理的疾患,包括神经系统中预期会受益于轴突再生疗法和 / 或突触可塑性 (synaptic plasticity) 改善的任何疾患。本文中待治疗的病症的非限制性例子包括但不限于受益于增强神经突向外长出、促进神经元生长、修复或再生的疾病和疾患,包括神经学病症,诸如物理损伤的神经和神经退行性疾病。此类病症明确包括对中枢神经系统的物理损伤 (例如脊髓损伤和头部外伤); 与中风有关的脑损伤; 和与神经变性有关的神经学病症,诸如例如三叉神经痛、舌咽神经痛、贝耳氏 (Bell) 麻痹、重症肌无力、肌肉营养不良、肌萎缩侧索硬化 (ALS)、进行性肌萎缩、进行性延髓遗传性肌萎缩、多发性硬化 (MS)、椎间盘成疝、破裂和脱出综合征、颈椎病、丛病症、胸廓出口破坏综合征、由身体损伤或疾病状态 (诸如糖尿病) 引起的周围神经损伤、周围神经病诸如那些由铅、氨苯砞 (dapsone)、蜱螨引起的、卟啉病、格巴二氏 (Gullain-Barre) 综合征、阿耳茨海默氏 (Alzheimer) 病、亨廷顿氏 (Huntington) 病、或帕金森氏 (Parkinson) 病。

[0093] 术语“处理”、“治疗”和“疗法”在用于本文时指治疗性处理、预防性处理、和防范性处理。连续治疗或施用指以至少每天一次为基础、期间没有中断一天或多天的处理。间歇治疗或施用或者间歇方式的治疗或施用指本质上并非连续而是循环的处理。

[0094] 术语“预防神经变性”在用于本文时包括 (1) 在最近诊断为患有神经退行性疾病或有风险发生新的神经退行性疾病的患者中抑制或预防神经变性的能力,和 (2) 在早就患有神经退行性疾病或具有神经退行性疾病的症状的患者中抑制或预防进一步神经变性的能力。

[0095] 术语“哺乳动物”在用于本文时指归入哺乳类的任何哺乳动物,包括人、高等非人灵长类、啮齿类、家畜和牲畜诸如牛、马、犬和猫。在本发明的一个优选实施方案中,哺乳动物指人。

[0096] 与一种或多种其它治疗剂“联合”施用包括同时 (共同) 施用和任何次序的顺序施用。

[0097] “有效量”指足以实现有益的或期望的治疗 (包括预防) 结果的量。可以在一次或多次施用中施用有效量。

[0098] 在用于本文时,表述“细胞”、“细胞系”、和“细胞培养物”可互换使用,而且所有这类名称都包括后代。如此,词语“转化子 / 转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞及由其衍生的培养物,不管转移的次数。还应理解,由于有意的或无意的突变,所有后代可能在 DNA 内容上不是精确相同的。术语“后代”指初始转化的细胞或细胞系之后每一代的任何和所有后裔。在最初转化细胞中筛选的具有相同功能或生物学活性的突变后代包括在内。若想做出不同的命名,上下文会有清楚的表述。

[0099] 关于本文中所鉴定的序列的“百分比 (%) 氨基酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分,候选序列中与参考序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。可以以本领域技术范围内的多种方式进行序列对比以测定百分比氨基酸序列同一性。本领域技术

人员可决定测量序列对比的适宜参数,包括指派对所比较的全长序列获得最大对比所需的算法。为了本发明,可使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 来获得百分比氨基酸同一性值,ALIGN-2 程序由 Genentech 公司编写,其源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局(US Copyright Office,Washington,DC,20559),并以美国版权注册号 TXU510087 注册。公众可通过 Genentech 公司(South San Francisco, California)得到 ALIGN-2 程序。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定且不变。

[0100] 杂交反应的“严格性”容易为本领域普通技术人员所确定,并且通常取决于探针长度、洗涤温度和盐浓度凭经验计算。一般而言,较长的探针需要较高的温度用于正确的退火,而较短的探针则需要较低的温度。当互补链存在于低于它们解链温度的环境中时,杂交通常取决于变性 DNA 重新退火的能力。探针和能杂交的序列之间的期望同一性程度越高,就可使用越高的相对温度。作为结果,推出,更高的相对温度趋向于使反应条件更加严格,而更低的温度则更不严格。对于杂交反应的严格性的补充细节及解释参见 Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995)。

[0101] 如本文中所定义的,“高严格条件”定义为如下的那些:(1) 对于洗涤使用低离子强度和高温;0.015M 氯化钠/0.0015M 柠檬酸钠/0.1%十二烷基硫酸钠,50℃;(2) 在杂交期间使用变性剂;50% (v/v) 甲酰胺及 0.1%牛血清清蛋白/0.1% Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮/具有 750mM 氯化钠,75mM 柠檬酸钠的 50mM 磷酸钠缓冲液 pH 6.5,42℃,或(3) 使用 50%甲酰胺,5x SSC(0.75M NaCl,0.075M 柠檬酸钠),50mM 磷酸钠(pH6.8),0.1%焦磷酸钠,5xDenhardt 氏溶液,超声处理的鲑精 DNA(50 μg/ml),0.1% SDS 和 10%硫酸右旋糖苷,42℃,在 42℃于 0.2x SSC(氯化钠/柠檬酸钠)和 50%甲酰胺中洗涤,然后在 55℃由含有 EDTA 的 0.1x SSC 组成的高严格洗涤。

[0102] “中等严格条件”可规定为如 Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 所描述的,而且包括在含:20%甲酰胺、5x SSC(150mM NaCl,15mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠(pH7.6)、5x Denhardt 氏溶液、10%硫酸右旋糖苷和 20mg/ml 变性的剪切的鲑精 DNA 的溶液中于 37℃温育过夜,然后于约 37-50℃在 1x SSC 中洗涤滤膜。本领域熟练技术人员应当认识到如何根据适应诸如探针长度等因素的需要来调节温度、离子强度等。

[0103] 术语“调控序列”指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的 DNA 序列。例如,适于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵基因序列、和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号、和增强子。

[0104] 若一段核酸与另一段核酸序列处于功能性相互关系中,则它是“可操作连接的”。例如,若前序列(presequence)或分泌前导(secretory leader)的 DNA 表达成参与多肽分泌的前蛋白质(preprotein),则它与该多肽的 DNA 可操作连接;若启动子或增强子影响编码序列的转录,则它与该序列可操作连接;或者,若核糖体结合位点的设置促进翻译,则它与编码序列可操作连接。一般而言,“可操作连接的”意味着相连的 DNA 序列是相邻的,而且在分泌前导的情况中意味着相邻且处于阅读状态。然而,增强子不必相邻。连接可以通过在方便的限制性位点处的连接来实现。若没有此类位点,则依照常规实践使用合成的寡核苷酸衔接头或接头。

[0105] “小分子”在本文中定义为分子量小于约 1000 道尔顿,优选小于约 500 道尔顿。

[0106] B. 抗 PirB/LILRB 抗体的生成

[0107] 通过本领域已知方法来生成本发明的抗 PirB 抗体,包括重组 DNA 技术的技术。

[0108] i) 抗原制备

[0109] 可溶性抗原或其片段(任选偶联有其它分子的)可作为免疫原用于生成抗体。对于跨膜分子,诸如受体,它们的片段(例如受体的胞外结构域)可用作免疫原。或者,表达跨膜分子的细胞可用作免疫原。此类细胞可衍生自天然来源(例如癌细胞系),或者可以是经重组技术转化而表达跨膜分子的细胞。对于制备抗体有用的其它抗原及其形式对于本领域技术人员会是显而易见的。

[0110] (ii) 多克隆抗体

[0111] 多克隆抗体优选在动物中生成,通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂。使用双功能或衍生化试剂,例如马来酰亚氨基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (其中 R 和 R_1 是不同的烃基),将相关抗原与在待免疫物种中有免疫原性的蛋白质偶联可能是有用的,例如匙孔虫凝集素蛋白、血清清蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

[0112] 通过将例如 100 μg 或 5 μg 蛋白质或偶联物(分别用于兔或小鼠)与 3 倍体积的弗氏完全佐剂混和并将该溶液皮内注射于多个部位,将动物针对抗原、免疫原性偶联物或衍生物进行免疫。1 个月后,通过多个部位的皮下注射,用弗氏完全佐剂中初始量 1/5-1/10 的肽或偶联物对动物进行加强免疫。7-14 天后,采集动物的血液并测定血清的抗体滴度。对动物进行加强免疫直到滴度达到平台(plateau)。优选的是,将动物用相同抗原但与不同蛋白质和/或通过不同交联剂偶联得到的偶联物进行加强免疫。偶联物还可在重组细胞培养中作为蛋白质融合物来制备。同样,适当使用凝聚剂诸如明矾来增强免疫应答。

[0113] (iii) 单克隆抗体

[0114] 单克隆抗体可以使用最初由 Kohler 等, Nature, 256:495(1975) 记载的杂交瘤方法来生成,或者可以通过 DNA 重组方法(美国专利 No. 4,816,567)来生成。在杂交瘤方法中,如上所述免疫小鼠或其它适宜的宿主动物,诸如仓鼠或猕猴,以引发生成或能够生成如下抗体的淋巴细胞,所述抗体将特异性结合用于免疫的蛋白质。或者,可以在体外免疫淋巴细胞。然后使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。

[0115] 将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养,所述培养基优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质。例如,若亲本骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT 或 HPRT),则用于杂交瘤的培养基典型的将含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷(HAT 培养基),这些物质阻止 HGPRT 缺陷细胞生长。

[0116] 优选的骨髓瘤细胞是那些高效融合、支持所选择的抗体生产细胞稳定且高水平地生成抗体、且对培养基诸如 HAT 培养基敏感的骨髓瘤细胞。其中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系,诸如那些自可从索尔克研究所细胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA)获得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤和可从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA)

获得的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。人骨髓瘤和小鼠 - 人异源骨髓瘤细胞系也可用于生成单克隆抗体 (Kozbor, J. Immunol., 133 :3001(1984) ;Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。

[0117] 可对杂交瘤细胞正在其中生长的培养基测定针对抗原的单克隆抗体的生成。优选的是,通过免疫沉淀或通过体外结合测定法,诸如放射性免疫测定法 (RIA) 或酶联免疫吸附测定法 (ELISA),测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。

[0118] 在鉴定出生成具有期望特异性、亲和力和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后,所述克隆就可通过有限稀释操作程序进行亚克隆,并通过标准方法进行培养 (Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。适于这一目的的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外,杂交瘤细胞可在动物中作为腹水瘤进行体内培养。

[0119] 可通过常规免疫球蛋白纯化操作程序,诸如例如蛋白 A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析、或亲和层析,将由亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水或血清适当分开。

[0120] 编码单克隆抗体的 DNA 易于使用常规操作程序分离和测序 (例如通过使用能够特异性结合编码单克隆抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞是此类 DNA 的优选来源。一旦分离,就可将 DNA 置于表达载体中,然后将该表达载体转染到不另外生成免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞中,诸如大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。抗体的重组生产在下文中有更详细描述。

[0121] 在另一个实施方案中,可从使用 McCafferty 等, Nature, 348 :552-554 (1990) 中记载的技术构建的噬菌体抗体库中分离抗体或抗体片段。

[0122] Clackson 等, Nature, 352 :624-628 (1991) 及 Marks 等, J. Mol. Biol., 222 :581-597 (1991) 分别记载了使用噬菌体文库进行的鼠和人抗体的分离。后续出版物记载了通过链改组生成高亲和力 (nM 范围) 的人抗体 (Marks 等, Bio/Technology 10 :779-783 (1992)), 以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略 (Waterhouse 等, Nuc. Acids Res. 21 :2265-2266 (1993))。如此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代方法。

[0123] 也可以修饰 DNA, 例如通过用人重链和轻链恒定域的编码序列替代同源鼠序列 (美国专利 No. 4, 816, 567 ;Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 :6851 (1984)), 或通过将免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列共价连接。典型地,用此类非免疫球蛋白多肽替代抗体的恒定域,或者用它们替代抗体的一个抗原结合位点的可变域,以产生嵌合二价抗体,它包含对一种抗原具有特异性的一个抗原结合位点对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点。

[0124] (iv) 人源化抗体和人抗体

[0125] 人源化抗体具有一个或多个导入其中的来自非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基,它们通常取自“输入”可变域。人源化可基本上遵循 Winter 及其同事的方法进行 (Jones 等, Nature, 321 :522-525 (1986) ;Riechmann 等, Nature, 332 :

323-327(1988);Verhoeyen 等, Science, 239 :1534-1536(1988)),即用啮齿类 CDR 或 CDR 序列替代人抗体的相应序列。因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利 4,816,567),其中基本上小于整个人可变域的区域用来自非人物种的相应序列替代。在实践中,人源化抗体通常是其中一些 CDR 残基以及可能一些 FR 残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替代的人抗体。

[0126] 用于制备人源化抗体的人可变域的选择,包括轻链和重链,对于降低抗原性非常重要。依照所谓的“最适”(best-fit)法,用啮齿类抗体的可变域序列对已知的人可变域序列的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类序列最接近的人序列作为人源化抗体的人框架(FR)(Sims 等, J. Immunol., 151 :2296(1993);Chothia 等, J. Mol. Biol., 196 :901(1987))。另一种方法使用由特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架。同一框架可被用于数种不同的人源化抗体(Carter 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :4285(1992);Presta 等, J. Immunol., 151 :2623(1993))。

[0127] 更为重要的是,抗体在人源化后保持对抗原的高亲和力及其它有利的生物学特性。为了实现这一目的,依照一种优选的方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的,且为本领域技术人员所熟悉。还可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。检查这些显示图像能够分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可从受体和输入序列中选出 FR 残基并进行组合,从而获得期望抗体特征,诸如对靶抗原的亲和力提高。通常,CDR 残基直接且最实质的涉及对抗原结合的影响。

[0128] 或者,现在有可能生成在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫时生成抗体完整全集的转基因动物(例如小鼠)。例如,已经描述了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合删除导致内源抗体生成的完全抑制。在此类种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在抗原攻击时生成抗体。参见例如 Jakobovits 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551(1993);Jakobovits 等, Nature, 362 :255-258(1993);Bruggermann 等, Year in Immuno., 7 :33(1993);及 Duchosal 等, Nature, 355 :258(1992)。还可从噬菌体展示库衍生人抗体(Hoogenboom 等, J. Mol. Biol., 227 :381(1991);Marks 等, J. Mol. Biol., 222 :581-597(1991);Vaughan 等, Nature Biotech., 14 :309(1996))。下文进一步描述了自抗体噬菌体展示文库生成抗体。

[0129] (v) 抗体片段

[0130] 已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上,通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段(参见例如 Morimoto 等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24 :107-117(1992);及 Brennan 等, Science, 229 :81(1985))。然而,现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。例如,可以从上文讨论的噬菌体抗体库分离抗体片段。或者,可直接从大肠杆菌回收 Fab'-SH 片段并化学偶联以形成 F(ab')₂ 片段(Carter 等, Bio/Technology 10 :163-167(1992))。在另一个实施方案中,如下文实施例所述,使用亮氨酸拉链 GCN4 促进 F(ab')₂ 分子的装配来形成 F(ab')₂。依照另一种方法,可直接从重组宿主细胞培养物分离 F(ab')₂ 片段。用于生成抗体片段的其它技术对熟练从业人员将是显而易见的。在其它实施方案中,所选抗体是单链 Fv 片段(scFv)。参见 WO 93/16185。

[0131] (vi) 多特异性抗体

[0132] 多特异性抗体具有对至少两种不同表位的结合特异性,其中所述表位通常来自不同抗原。尽管此类分子通常只会结合两种不同表位(即双特异性抗体,BsAb),但是此表述在用于本文时涵盖具有额外特异性的抗体,诸如三特异性抗体。BsAb 的例子包括那些一个臂针对 PirB/LILRB2 而另一个臂针对 Nogo 或 MAG 或 OMgp 的抗体。BsAb 的另一个例子包括那些一个臂针对 PirB/LILRB2 而另一个臂针对 NgR 的抗体

[0133] 用于构建双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生产基于两对免疫球蛋白重链-轻链的共表达,其中两种链具有不同的特异性(Millstein 等, *Nature*, 305 :537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma))生成 10 种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行正确分子的纯化,这相当麻烦且产物产量低。类似的操作程序披露于 W0 93/08829 及 Traunecker 等, *EMBO J.*, 10 :3655-3659 (1991)。

[0134] 依照一种不同的方法,将具有期望结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变量与免疫球蛋白恒定域序列融合。优选的是,与包含至少部分铰链、CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定域进行融合。优选在至少一种融合物中存在包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物和,在需要时,免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体中,并共转染到合适的宿主生物体中。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供所期望的最佳产量的实施方案中,这为调整三种多肽片段的相互比例提供了很大的灵活性。然而,在至少两种多肽链以相同比例表达导致高产量时或在该比例没有特别意义时,有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入到一个表达载体中。

[0135] 在该方法的一个优选实施方案中,双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链,和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半双特异性分子中存在提供了便利的分离途径,因此发现这种不对称结构便于将期望的双特异性复合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法披露于 W094/04690。关于生成双特异性抗体的进一步详情参见例如 Suresh 等, *Methods in Enzymology*, 121 :210 (1986)。

[0136] 依照 W096/27011 中记载的另一种方法,可改造一对抗体分子间的界面,以将从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比最大化。优选的界面包含抗体恒定域的至少部分 CH3 结构域。在该方法中,将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换。通过将大氨基酸侧链用较小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换,在第二抗体分子的界面上产生与大侧链相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了较之其它不想要的终产物诸如同二聚体提高异二聚体产量的机制。

[0137] 双特异性抗体包括交联的或“异源偶联的”抗体。例如,可以将异源偶联物中的一种抗体与亲合素偶联,而将另一种抗体与生物素偶联。此类抗体已经建议用于例如将免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利 No. 4,676,980)和用于治疗 HIV 感染(W0 91/00360, W0 92/200373)。异源偶联抗体可以使用任何方便的交联方法来制备。合适的交联剂连同许多交联技术是本领域众所周知的,而且披露于美国专利 No. 4,676,980。

[0138] 文献中还记载了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如,可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan 等, *Science*, 229 :81 (1985) 记载了通过蛋白水解切割完整抗

体以生成 $F(ab')_2$ 片段的操作程序。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下还原,以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的 Fab' 片段转变为硫代硝基苯甲酸酯 (TNB) 衍生物。然后将 $Fab' - TNB$ 衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成 $Fab' -$ 硫醇,并与等摩尔量的另一种 $Fab' - TNB$ 衍生物混合,以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作选择性固定酶的试剂。

[0139] 也可以从大肠杆菌直接回收 $Fab' - SH$ 片段,而且可以将这些片段化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby 等, *J. Exp. Med.*, 175 :217-225 (1992) 记载了完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的生成。由大肠杆菌分别分泌每种 Fab' 片段,并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。

[0140] 还记载了从重组细胞培养物直接生成和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体。Kostelny 等, *J. Immunol.*, 148 (5) : 1547-1553 (1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原以形成单体,然后重新氧化以形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 : 6444-6448 (1993) 记载的“双抗体”技术提供了构建双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的重链可变域 (VH) 和轻链可变域 (VL),所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此,迫使一个片段上的 VH 和 VL 结构域与另一个片段上的互补 VL 和 VH 结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链 Fv (sFv) 二聚体构建双特异性抗体片段的另一种策略。参见 Gruber 等, *J. Immunol.*, 152 :5368 (1994)。

[0141] 设想了具有超过两个效价的抗体。例如,可制备三特异性抗体。Tutt 等, *J. Immunol.*, 147 :60 (1991)。

[0142] (vii) 效应器功能工程改造

[0143] 可能希望在效应器功能方面修饰本发明的抗体,从而增强抗体的效力。例如,可向 Fc 区中引入半胱氨酸残基,从而使得在该区中形成链间二硫键。如此生成的同二聚体抗体可具有改善的内在化能力和 / 或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)。参见 Caron 等, *J. Exp. Med.*, 176 :1191-1195 (1992) 和 Shopes, B., *J. Immunol.*, 148 :2918-2922 (1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体还可使用异双功能交联剂来制备,如 Wolff 等, *Cancer Research*, 53 :2560-2565 (1993) 中记载。或者,抗体可改造成具有双重 Fc 区,由此可具有增强的补体溶解和 ADCC 能力。参见 Stevenson 等, *Anti-Cancer Drug Design*, 3 :219-230 (1989)。

[0144] (viii) 抗体 - 补救受体结合表位融合物

[0145] 在本发明的某些实施方案中,可能希望使用抗体片段,而非完整抗体,来例如提高肿瘤穿透。在这种情况下,可能希望修饰抗体片段以延长其血清半衰期。这可通过例如将补救受体结合表位掺入抗体片段中来实现 (例如通过抗体片段中适宜区域的突变或通过将该表位掺入肽标签中然后将该肽标签融合至抗体片段的任一末端或中部,例如通过 DNA 或肽合来实现)。

[0146] 补救受体结合表位优选构成这样一个区域,其中将来自 Fc 结构域的一个或两个环的任何一个或多个氨基酸残基转移至抗体片段的类似位置。甚至更优选的是,转移来自 Fc 结构域的一个或两个环的三个或更多残基。仍更优选的是,表位取自 Fc 区 (例如 IgG

的)的CH2结构域并转移至抗体的CH1、CH3、或VH区,或超过一个此类区域。或者,表位取自Fc区的CH2结构域并转移至抗体片段的CL区或VL区或二者。

[0147] (ix) 抗体的其它共价修饰

[0148] 抗体的共价修饰包括在本发明的范围内。如果适用,它们可通过化学合成或者通过酶促或化学切割抗体来生成。抗体的其它类型共价修饰如下引入分子,即通过使抗体的目标氨基酸残基与能够与选定侧链或N-末端或C-末端的残基反应的有机衍生化试剂起反应。共价修饰的例子记载于美国专利 No. 5, 534, 615,明确引入本文作为参考。一类优选的抗体共价修饰包括将抗体连接至多种非蛋白质性质聚合物之一,例如聚乙二醇、聚丙二醇、或聚氧化烯,以美国专利 No. 4, 640, 835 ;4, 496, 689 ;4, 301, 144 ;4, 670, 417 ;4, 791, 192 ;或 4, 179, 337 所列方式。

[0149] (x) 从合成的抗体噬菌体文库中产生抗体

[0150] 在一个优选的实施方案中,本发明提供利用独特的噬菌体展示法来产生和挑选新的抗体的方法。该方法包括基于单个框架模板产生合成抗体噬菌体文库,设计可变域内的足够的多样性,展示具有多样化可变域的多肽,选择对靶抗原具有高亲和力的候选抗体,和分离所选的抗体。噬菌体展示方法的详情可在例如 2003 年 12 月 11 日公开的 W003/102157 中找到,将其完整公开内容明确引入本文作为参考。

[0151] 在一个方面,本发明中所用的抗体文库可通过突变抗体可变域的至少一个 CDR 中溶剂可及的和 / 或高度多变的位置来产生。一些或全部 CDR 可用本文提供的方法来突变。在一些实施方案中,优选突变CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 中的位置以形成单个文库或突变CDRL3 和 CDRH3 中的位置以形成单个文库或突变CDRL3 和 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 中的位置以形成单个文库,由此产生多样的抗体文库。

[0152] 例如,可产生这样的抗体可变域文库,其在 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 中溶剂可及的和 / 或高度多变的位置上有突变。产生的另一种文库在 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 中有突变。这些文库也可互相结合使用以产生具有期望亲和力的结合物。例如,在一轮或多轮选择对靶抗原结合的重链文库后,在其它轮次的选择中可将轻链文库替换入重链结合物群中以提高结合物的亲和力。

[0153] 文库优选通过用重链序列可变区 CDRH3 区中的变异氨基酸替代原始氨基酸来产生。所得文库可包含多种抗体序列,其中序列多样性主要位于重链序列的 CDRH3 区中。

[0154] 在一个方面,文库在人源化抗体 4D5 序列、或人源化抗体 4D5 序列的框架氨基酸序列的背景中产生。文库优选通过用 DVK 密码子集编码的氨基酸至少替代重链残基 95-100a 来产生,其中 DVK 密码子集用于编码这些位置中每个位置的变异氨基酸集。可用于产生这些替代的寡核苷酸子集的例子包括序列 (DVK)₇。在一些实施方案中,文库通过用 DVK 和 NNK 两个密码子集编码的氨基酸至少替代残基 95-100a 来产生。可用于产生这些替代的寡核苷酸子集的例子包括序列 (DVK)₆(NNK)。在另一个实施方案中,文库通过用 DVK 和 NNK 两个密码子集编码的氨基酸替代残基 95-100a 来产生。可用于产生这些替代的寡核苷酸子集的例子包括序列 (DVK)₅(NNK)。可用于产生这些替代的寡核苷酸子集的另一个例子包括序列 (NNK)₆。根据本文所述标准,本领域技术人员可确定合适寡核苷酸序列的其它例子。

[0155] 在另一个实施方案中,利用不同的 CDRH3 设计来分离高亲和力结合物和分离针对各种表位的结合物。该文库中产生的 CDRH3 的长度范围是 11 至 13 个氨基酸,尽管也可产

生不同于此的长度。通过用 NNK、DVK 和 NVK 密码子集也可拓展 H3 的多样性,以及在 N 和 / 或 C- 末端处的更有限的多样性。

[0156] CDRH1 和 CDRH2 中也可产生多样性。CDR-H1 和 H2 多样性的设计遵循目标为模拟所述带有如下修饰的天然抗体全集的策略,所述修饰使多样性较前述设计更紧密地与天然多样性相匹配。

[0157] 对于 CDRH3 中的多样性,可分别构建具有不同长度的 H3 的多个文库,然后组合起来以选择针对靶抗原的结合物。可合并多个文库并用前述和本文下述的固体支持物选择和溶液分选法来选择。可采用多种选择策略。例如,一种变化涉及在结合至固相的靶物上选择,然后分选可能在融合多肽上存在的标签(例如抗 gD 标签),然后再一次在结合至固相的靶物上分选。或者,文库可首先在结合至固体表面的靶物上选择,然后用靶抗原浓度逐渐降低的溶液相结合来分选所洗脱的结合物。利用不同分选方法的组合来最低限度地只选择高度表达的序列并选择许多不同的高亲和力克隆。

[0158] 针对靶抗原的高亲和力结合物可由文库分离。H1/H2 区中的有限多样性可降低简并性约 10^4 至 10^5 倍,而允许更大的 H3 多样性提供了更多高亲和力结合物。利用在 CDRH3 中具有不同类型多样性的文库(例如利用 DVK 或 NVT)可分离能与靶抗原的不同表位结合的结合物。

[0159] 对于从如上所述合并的文库中分离的结合物,已经发现可通过提供轻链中的有限多样性来进一步提高亲和力。在该实施方案中,轻链多样性如下产生,在 CDRL1 中:第 28 位氨基酸由 RDT 编码;第 29 位氨基酸由 RKT 编码;第 30 位氨基酸由 RVW 编码;第 31 位氨基酸由 ANW 编码;第 32 位氨基酸由 THT 编码;任选的,第 33 位氨基酸由 CTG 编码;在 CDRL2 中:第 50 位氨基酸由 KBG 编码;第 53 位氨基酸由 AVC 编码;任选的,第 55 位氨基酸由 GMA 编码;在 CDRL3 中:第 91 位氨基酸由 TMT 或 SRT 或这两者编码;第 92 位氨基酸由 DMC 编码;第 93 位氨基酸由 RVT 编码;第 94 位氨基酸由 NHT 编码;和第 96 位氨基酸由 TWT 或 YKG 或这两者编码。

[0160] 在另一个实施方案中,产生在 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 的区域中具有多样性的一个或多个文库。在该实施方案中,用各种长度的 H3 区并主要用密码子集 XYZ 和 NNK 或 NNS 来产生 CDRH3 中的多样性。可用各寡核苷酸形成文库并合并,或者可合并寡核苷酸来形成文库子集。该实施方案的文库可针对结合至固体的靶物进行分选。分离自多次分选的克隆可利用 ELISA 测定法来筛选特异性和亲和力。对于特异性,克隆可以针对期望靶抗原以及其它非靶抗原进行筛选。然后,在溶液结合竞争 ELISA 测定法或点竞争测定法中对那些针对靶抗原的结合物筛选亲和力。可以用如上所述制备的 XYZ 密码子集从文库中分离高亲和力结合物。可方便地在细胞培养中以高产率将这些结合物制备成抗体或抗原结合片段。

[0161] 在一些实施方案中,可能希望产生在 CDRH3 区长度方面具有更大多样性的文库。例如,可能希望产生 CDRH3 区的长度范围为约 7 至 19 个氨基酸的文库。

[0162] 由这些实施方案中的文库分离的高亲和力结合物可方便地在细菌和真核细胞培养中以高产率产生。可设计载体以方便地去除如下序列诸如 gD 标签、病毒外壳蛋白成分序列,和 / 或增加恒定区序列来高产率地产生全长抗体或抗原结合片段。

[0163] 可以将 CDRH3 中有突变的文库与包含不同型式的其它 CDR(例如 CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1 和 / 或 CDRH2) 的文库组合。因此,例如,在一个实施方案中,将 CDRH3 文库与

CDRL3 文库组合,所述 CDRL3 文库用预先确定的密码子集在第 28、29、30、31、和 / 或 32 位有变异氨基酸的人源化 4D5 抗体序列的背景中产生。在另一个实施方案中,可将 CDRH3 有突变的文库与包含变异 CDRH1 和 / 或 CDRH2 重链可变域的文库组合。在一个实施方案中,CDRH1 文库用第 28、30、31、32 和 33 位有变异氨基酸的人源化抗体 4D5 序列产生。CDRH2 文库可用预先确定的密码子集以及第 50、52、53、54、56 和 58 位有变异氨基酸的人源化抗体 4D5 序列来产生。

[0164] (xi) 抗体突变体

[0165] 可进一步修饰噬菌体文库产生的新抗体以产生抗体突变体,所述抗体突变体具有比亲本抗体改善了的物理、化学和 / 或生物学性质。当所用的测定法是生物学活性测定法时,优选抗体突变体在所选测定法中的生物学活性比亲本抗体在该测定法中的生物学活性好至少约 10 倍,优选好至少约 20 倍,更优选好至少约 50 倍,有时好至少约 100 倍或 200 倍。例如,优选抗 PirB/LILRB 抗体突变体针对 PirB/LILRB 的结合亲和力比亲本抗体的结合亲和力强至少约 10 倍,优选强至少约 20 倍,更优选强至少约 50 倍,有时强至少约 100 倍或 200 倍。

[0166] 为了产生抗体突变体,在亲本抗体的一个或多个高变区中导入一处或多处氨基酸改变(例如替代)。或者 / 另外,可将框架区残基的一处或多处改变(例如替代)导入亲本抗体,这些改变导致抗体突变体针对来自第二哺乳动物物种的抗原的结合亲和力有所改善。要修饰的框架区残基的实例包括那些直接非共价结合抗原的残基(Amit 等(1986)Science 233 :747-753);相互作用于 / 影响 CDR 构象的残基(Chothia 等(1987)J. Mol. Biol. 196 :901-917);和 / 或参与 V_L - V_H 界面的(EP 239 400B1)残基。在某些实施方案中,一个或多个这类框架区残基的修饰导致抗体针对来自第二哺乳动物物种的抗原的结合亲和力有所增强。例如,在本发明的该实施方案中,可改变约 1 个至约 5 个框架残基。有时,这可足以产生适用于临床前试验中的抗体突变体,甚至其中没有高变区残基被改变。可是通常,抗体突变体将包含别的高变区改变。

[0167] 被改变的高变区残基可以是随机变化的,尤其是在亲本抗体的起始结合亲和力之处,使得这类随机产生的抗体突变体可方便地被筛选出来。

[0168] 可用于生成此类抗体突变体的一种方法称作“丙氨酸扫描诱变”(Cunningham 和 Wells(1989)Science 244 :1081-1085)。这里,一个或多个高变区残基用丙氨酸或多丙氨酸残基替代,以影响氨基酸与来自第二哺乳动物物种的抗原的相互作用。然后通过在对替代位点引入更多或其它的突变,推敲那些对替代表现出功能敏感性的高变区残基。如此,虽然引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的,但是突变本身的性质不需要预先决定。如本文所述对如此生成的丙氨酸突变体筛选它们的生物学活性。

[0169] 通常,从保守替代诸如下文显示在标题“优选替代”下的那些开始。如果此类替代导致生物学活性(例如结合亲和力)的改变,那么引入下表中称为“例示替代”的或如下文中关于氨基酸种类的进一步描述的更实质性改变,并筛选产物。

[0170] 优选替代:

[0171]

原始残基	例示替代	优选替代
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	leu
Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	leu

[0172]

[0173] 对抗体生物学特性的甚至更实质性修饰通过选择在保持以下方面的效果上显著不同的替代来完成：(a) 替代区域的多肽主链的结构，例如作为折叠片或螺旋构象，(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性，或 (c) 侧链的体积。基于共同的侧链特性，将天然存在残基如下分组：

[0174] (1) 疏水性的：正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile；

[0175] (2) 中性、亲水性的：cys、ser、thr、asn、gln；

[0176] (3) 酸性的：asp、glu；

[0177] (4) 碱性的：his、lys、arg；

[0178] (5) 影响链取向的残基：gly、pro；及

[0179] (6) 芳香族的：trp、tyr、phe。

[0180] 非保守替代将需要用这些类别之一的一个成员替换另一个类别的。

[0181] 在另一个实施方案中,利用噬菌体展示(见上文),对为修饰而选择的位点进行亲和力和成熟。

[0182] 编码氨基酸序列突变体的核酸分子由本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于,寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR 诱变、和盒式诱变。这些方法制备的突变或非突变型式的亲本抗体。制备突变体的优选方法是定点诱变(参见例如 Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :488)。

[0183] 在某些实施方案中,抗体突变体仅有单个高变区残基被替代。在其它实施方案中,亲本抗体的两个或更多个高变区残基被替代,例如约 2 个至约 10 个高变区替代。

[0184] 通常,生物学特性得到改善的抗体突变体所具有的氨基酸序列与亲本抗体重链或轻链可变域的氨基酸序列有至少 75%,更优选至少 80%,更优选至少 85%,更优选至少 90%,和最优选至少 95%的氨基酸序列同一性或相似性。关于此序列的同一性或相似性在本文中定义为在比对序列并在必要时引入缺口以获得最大百分比序列同一性后,候选序列中与亲本抗体残基相同(即相同残基)或相似(即来自同一组具有共同侧链特性的氨基酸残基,见上文)的氨基酸残基的百分比。N-末端、C-末端、或内部的延伸、删除、或插入可变域以外的抗体序列都不应视为影响序列同一性或相似性。

[0185] 产生抗体突变体后,测定该分子相对于亲本抗体的生物学活性。如上所示,这可包括测定抗体的结合亲和力和/或其它生物学活性。在本发明的一个优选实施方案中,制备一组抗体突变体并筛选针对抗原或其片段的结合亲和力。任选将该初始筛选中选出的一个或多个抗体突变体进行一种或多种其它生物学活性测定法以确证结合亲和力增强的抗体突变体是真正有用的,例如可用于临床前研究。

[0186] 这样选出的抗体突变体可进一步修饰,修饰时常取决于抗体的预期用途。此类修饰可包括进一步改变氨基酸序列,融合异源多肽和/或共价修饰,诸如下文所详述的那些。对于氨基酸序列改变,示例性的修饰在上文有详述。例如,任何不参与保持抗体突变体正确构象的半胱氨酸残基也可被替代,一般替代为丝氨酸,用以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反地,可向抗体中加入半胱氨酸键以改善其稳定性(特别是在抗体是抗体片段时,诸如 Fv 片段)。另一类氨基酸突变体具有改变的糖基化模式。这可通过删除抗体中发现的一个或多个碳水化合物模块和/或增加不存在于抗体中的一个或多个糖基化位点来实现。抗体糖基化通常是 N-连接的或 O-连接的。N-连接的指碳水化合物模块连接于天冬酰胺残基侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸,其中 X 是除了脯氨酸之外的任何氨基酸,是碳水化合物模块酶促连接于天冬酰胺侧链的识别序列。因此,多肽中存在这些三肽序列之任一产生潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指糖类 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖、或木糖之一连接于羟基氨基酸(最常见的是丝氨酸或苏氨酸,尽管也可用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸)。在抗体上增加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使之包含一个或多个上述的三肽序列来方便地实现(用于 N-连接的糖基化位点)。也可在原始抗体序列中(用于 O-连接的糖基化位点)通过添加、或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来产生改变。

[0187] (xii) 抗体的重组生产

[0188] 为了重组生产抗体,分离编码抗体的核酸,并插入可复制载体中,用于进一步克隆

(DNA 扩增) 或表达。编码单克隆抗体的 DNA 易于使用常操作程序分离和测序(例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。可以获得许多载体。载体构件通常包括但不限于下列一种或多种:信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列(例如如美国专利 No. 5, 534, 615 中所记载的, 明确引入本文作为参考)。

[0189] 适于克隆或表达本文载体中的 DNA 的宿主细胞是上文描述的原核生物、酵母或高等真核细胞。适于此目的的原核生物包括真细菌, 诸如革兰氏阴性生物体或革兰氏阳性生物体, 例如肠杆菌科, 诸如埃希氏菌属 (*Escherichia*) 例如大肠埃希氏菌或大肠杆菌 (*E. coli*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、变形菌属 (*Proteus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 例如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 例如粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、和志贺氏菌属 (*Shigella*)、以及芽孢杆菌属 (*Bacilli*) 诸如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) (例如 1989 年 4 月 12 日公布的 DD 266, 710 中披露的地衣芽孢杆菌 41P)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 诸如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)、和链霉菌属 (*Streptomyces*)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294 (ATCC31, 446), 尽管其它菌株诸如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776 (ATCC 31, 537) 和大肠杆菌 W3110 (ATCC 27, 325) 也是合适的。这些例子是例示性的, 而不是限制性的。

[0190] 在原核生物以外, 真核微生物诸如丝状真菌或酵母也是编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。酿酒糖酵母或酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或常用的面包酵母是最常用的低等真核宿主微生物。然而, 通常可获得许多其它属、种和菌株且可用于本发明, 诸如粟酒裂殖糖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*); 克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主, 诸如例如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12, 424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16, 045)、威克克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24, 178)、*K. waltii* (ATCC 56, 500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilum*) (ATCC 36, 906)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 和马克思克鲁维酵母 (*K. marxianus*); 亚罗酵母属 (*Yarrowia*) (EP 402, 226); 巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183, 070); 假丝酵母属 (*Candida*); 瑞氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP 244, 234); 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*); 许旺酵母属 (*Schwanniomyces*), 诸如西方许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*); 和丝状真菌, 诸如例如脉孢菌属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*)、和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主诸如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*)。

[0191] 适于表达糖基化抗体的宿主细胞衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株和变体及相应的允许昆虫宿主细胞, 它们来自诸如草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 等宿主。公众可获得多种病毒株用于转染, 例如苜蓿尺蠖 (*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕 (*Bombyx mori*) NPV 的 Bm-5 株, 而且此类病毒可依照本发明用作本文中的病毒, 特别是用于转染草地夜蛾细胞。还可利用棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄和烟草的植物细胞培养物作为宿主。

[0192] 然而,脊椎动物细胞得到最多关注,而且培养(组织培养)繁殖脊椎动物细胞已经成为常规流程。有用哺乳动物宿主细胞系的例子是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7, ATCC CRL 1651);人胚肾系(293 或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的 293 细胞, Graham 等, J. Gen. Virol., 36:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216(1980));小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1, ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);牛鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳瘤(MMT 060562, ATCC CCL 51);TRI 细胞(Mather 等, Annals N. Y. Acad. Sci., 383:44-68(1982));MRC5 细胞;FS4 细胞;和人肝瘤系(Hep G2)。

[0193] 用上文所述用于生产抗体的表达或克隆载体转化宿主细胞,并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当更改的常规营养培养基中进行培养。

[0194] 可以在多种培养基中培养用于生产本发明抗体的宿主细胞。商品化培养基诸如 Ham 氏 F10(Sigma)、极限必需培养基(MEM, Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、和 Dulbecco 氏改良的 Eagle 氏培养基(DMEM, Sigma)适于培养宿主细胞。另外,可以使用下列文献中记载的任何培养基作为宿主细胞的培养基:Ham 等, Meth. Enz. 58:44(1979);Barnes 等, Anal. Biochem. 102:255(1980);美国专利 No. 4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655;或 5,122,469;W090/03430;W087/00195;或美国专利复审 30,985。任何这些培养基可以根据需要补充激素和/或其它生长因子(诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐(诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂(诸如 HEPES)、核苷酸(诸如腺苷和胸苷)、抗生素(诸如 GENTAMYCIN™)、痕量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以以本领域技术人员知道的适宜浓度包含任何其它必需补充物。培养条件,诸如温度、pH 等,就是先前为表达而选择用于宿主细胞的,这对于普通技术人员而言是显而易见的。

[0195] 在使用重组技术时,可以在细胞内、在周质空间中生成抗体,或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体,那么作为第一步,通过例如离心或超滤除去宿主细胞或裂解细胞的微粒碎片。如果将抗体分泌到培养基中,那么通常首先使用商品化蛋白质浓缩滤器,例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元,浓缩来自此类表达系统的上清液。在任何上述步骤中,可以包括蛋白酶抑制剂诸如 PMSF 来抑制蛋白水解,而且可以包括抗生素来防止外来污染物的生长。

[0196] 可以使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析来纯化由细胞制备的抗体组合物,优选的纯化技术是亲和层析。蛋白 A 作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人 γ 1、 γ 2 或 γ 4 重链的抗体(Lindmark 等, J. Immunol. Meth. 62:1-13(1983))。蛋白 G 推荐用于所有小鼠同种型和人 γ 3(Guss 等, EMBO J. 5:1567-1575(1986))。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖,但是可以使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯容许获得比琼脂糖所能获得的更快的流速和更短的加工时间。若抗体包含 C_H3 结构域,则可使用 Bakerbond ABX™ 树脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)进行纯化。根据待回收的

抗体,也可使用其它蛋白质纯化技术,诸如离子交换柱上的分级、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅土上的层析、肝素 SEPHAROSE™ 上的层析、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE、和硫酸铵沉淀。

[0197] C. 抗 PirB/LILRB 抗体的用途

[0198] 本发明的抗 PirB/LILRB 抗体可作为试剂用于增强神经细胞的存活或诱导神经细胞的向外长出。因此,它们可用于治疗神经系统的退行性病症(“神经退行性疾病”),包括例如对中枢神经系统(脊髓和脑)的物理损伤;与中风有关的脑损伤;和与神经退行性有关的神经学病症,诸如例如三叉神经痛、舌咽神经痛、贝耳氏(Bell)麻痹、重症肌无力、肌肉营养不良、肌萎缩侧索硬化(ALS)、多发性硬化(MS)、进行性肌萎缩、进行性延髓遗传性肌萎缩、由身体损伤(例如烧伤、伤口)或疾病状态(诸如糖尿病、肾功能障碍)或由用于治疗癌症和 AIDS 的化疗剂的毒性作用引起的周围神经损伤、椎间盘成疝、破裂和脱出综合征、颈椎病、丛病症、胸廓出口破坏综合征、周围神经病诸如那些由铅、氨苯矾(dapsone)、蜱螨引起的、卟啉病、格巴二氏(Gullain-Barre)综合征、阿耳茨海默氏(Alzheimer)病、亨廷顿氏(Huntington)病、或帕金森氏(Parkinson)病。

[0199] 本文中所鉴定的抗 PirB/LILRB 抗体还可用于在体外培养神经细胞的培养基的成分。

[0200] 最后,在用放射碘、酶、荧光团、自旋标记物等标记后,包含通过本文抗 PirB/LILRB 抗体的制备物可作为标准品用于竞争性结合测定法。

[0201] 本文抗 PirB/LILRB 抗体的治疗用配制剂制备成供存储的配制剂,即将具有期望纯度的所鉴定化合物(诸如抗体)与任选的生理学可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences,见上文)混合,制备成冻干饼或水溶液的形式。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(少于约 10 个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如 EDTA;糖醇,诸如甘露醇或山梨醇;成盐反荷离子,诸如钠;和/或非离子表面活性剂,诸如 Tween、聚醚(Pluronic)或 PEG。

[0202] 用于体内施用的抗 PirB/LILRB 抗体必须是无菌的。这可容易地通过在冻干和重建之前或之后使用无菌滤膜过滤来实现。

[0203] 治疗用组合物可置于具有无菌存取口的容器中,例如具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液的袋子或管形瓶。

[0204] 本发明的抗 PirB/LILRB 抗体可任选与神经营养因子(包括 NGF、NT-3、和/或 BDNF)组合或组合施用,而且与用于退行性神经病症的其它常规疗法一起使用。另外,本发明的抗 PirB/LILRB 抗体可有利地与阻断 Nogo-66、MAG 和/或 Mgp 结合 NgR 的 NgR 抑制剂诸如抗体、小分子或肽组合施用。

[0205] 施用路径依照已知方法,例如通过静脉内、腹膜内、大脑内、肌肉内、眼内、动脉内或病灶内路径的注射或输注,表面施用,或通过下文所述持续释放系统。

[0206] 对于大脑内使用,可以通过输注入 CNS 的液体池中来连续施用化合物,尽管推注也是可接受的。优选将化合物施用入脑室中或以其它方式导入 CNS 或脊髓液中。可使用连

续施用装置诸如泵,通过留置导管来实施施药,或者可通过植入(例如大脑内植入)持续释放装置来施用。更具体的说,可通过长期植入的插管来注射化合物,或者借助渗透微泵长期输注化合物。皮下泵可用于通过通向脑室的小管道来投递蛋白质。可将高度复杂的泵填埋到皮肤中,而且无需手术介入就可设定它们的投递速率。牵涉经由完全植入的药物投递系统进行连续脑室内输注或皮下泵装置的合适施用方案和投递系统的例子是那些用于给阿耳茨海默氏病患者和帕金森氏病动物模型施用多巴胺、多巴胺激动剂、和胆碱能激动剂的系统,记载于 Harbaugh, J. Neural Transm. Suppl., 24 :271 (1987); 及 DeYebenes 等, Mov. Disord., 2 :143 (1987)。

[0207] 持续释放制剂的合适例子包括定型产品形式的半透性聚合物基质,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质包括聚酯、水凝胶、聚交酯(美国专利 No. 3, 773, 919, EP 58, 481)、L-谷氨酸与 L-谷氨酸 γ 乙酯的共聚物(Sidman, 等, 1983, Biopolymers 22 :547)、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer 等, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15 :167; Langer, 1982, Chem. Tech. 12 :98)、乙烯-乙酸乙烯(Langer, 等, 同上)或聚-D-(-)-3-羟基丁酸(EP 133, 988A)。持续释放组合物还包括脂质体封装的化合物,其可通过本身已知的方法来制备(Epstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 82 :3688 (1985); Hwang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4030 (1980); 美国专利 No. 4, 485, 045 和 4, 544, 545; 及 EP 102, 324A)。一般而言,所述脂质体是小(约 200-800 埃)单层类型,其中脂质含量大于约 30mol. %胆固醇,并对所选的比例进行调整以实现最优疗法。

[0208] 活性化合物在治疗上采用的有效量取决于例如治疗目的、施用路径、和患者状况。因而,治疗学家有必要在需要时调整剂量和变更施用路径以获得最佳治疗效果。典型的日剂量的范围可以是约 1 μ g/kg 至高达 100mg/kg 或更高,这取决于上文所述因素。典型地,临床医师会施用活性化合物,直至达到修复、维持、和最好重建神经元功能的剂量。此疗法的进展易于通过常规测定法来监测。

[0209] 以下非限制性实施例例示了本发明的更多详情。

实施例

[0210] 实施例 1 :表达克隆 LILRB2

[0211] 为了鉴定抑制性髓磷脂蛋白的新受体,采取了表达克隆方法。作为诱饵,生成了将碱性磷酸酶(AP)融合至以下表征的髓磷脂抑制剂(使用人 cDNA)的 N 和 / 或 C 末端的构建物:Nogo66、NogoA 的另两个抑制性结构域(NiRΔD2 和 NiGΔ20)(Oertle T, J Neurosci. 2003, 23 (13) :5393-406)、MAG、和 OMgp。将这些构建物转染入 293 细胞以生成含有诱饵蛋白质的条件培养基(在 DMEM/2% FBS 中)。筛选中所使用的 cDNA 文库由 Origene 所产生的现成表达载体中的全长人 cDNA 克隆构成。将这些 cDNA 编译、排列、和合并。将大约 100 种 cDNA 的集合瞬时转染入 COS7 细胞中。

[0212] 具体而言,第 1 天,将 COS7 细胞以 85,000 个细胞 / 孔的密度分配入 12 孔板。第 2 天,使用基于脂质的转染试剂 FuGENE 6 (Roche) 每个孔转染 1mg 合并的 cDNA。第 4 天,实施筛选。简言之,自细胞取出培养基,并用 0.5ml 含有 AP-融合诱饵蛋白(20-50nM)的 293 细胞条件培养基更换。将细胞于室温温育 90 分钟。然后将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)清洗 3 次,用 4%低聚甲醛固定 7 分钟,在 HEPES 缓冲盐水(HBS)中清洗 3 次,并于 65°C 热灭

活 90 分钟以破坏内源 AP 活性。将细胞在 AP 缓冲液 (100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100mM Tris pH 9.5) 中清洗一次, 并在显色底物 (Western Blue, Promega) 中温育, 并在温育后 1 小时分析反应产物的存在, 并在温育过夜后再次分析。通过在膜表面上存在深蓝色沉淀来鉴定阳性细胞。进一步分拆阳性集合以通过后续数轮筛选来鉴定各个阳性克隆。

[0213] 自上述筛选鉴定出以下阳性命命中者。

[0214] MAG-AP 诱饵产生 4 个阳性命命中者。一个是先前表征的 Nogo 受体 (Fournier 等, Nature 409, 342-346 (2001))。这些命中者中两个是糖酵解加工酶, 而且认为不太可能是相关的。第四个注解为“来自克隆 643 (LOC57228) 的人类假定蛋白质, mRNA”。cDNA 的接近分析 (closer analysis) 揭示了与先前记载的蛋白质 SMAG 同源的可变 ORF。

[0215] AP-Nogo66 诱饵产生了 2 个阳性命命中。一个是先前表征的 Nogo 受体。另一个是“人类白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B (具有 TM 和 ITIM 结构域), 成员 2 (LILRB2), mRNA” (SEQ ID NO: 2)。此基因也因多种不同命名而为人所知, 包括 MIG10、ILT4、和 LIR2 (Kubagawa 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5261-6 (1997); Colonna 等, J. Exp. Med. 186: 1809-18 (1997))。

[0216] 实施例 2: PirB 功能阻断性抗体的制备和测试

[0217] PirB 功能阻断性抗体

[0218] 通过针对 PirB 胞外结构域淘选合成噬菌体抗体文库生成了针对 PirB 的抗体 (W. C. Liang 等, J. Mol. Biol. 366, 815 (2007))。然后在体外测试抗体克隆 (10 μ g/ml) 阻断 AP-Nogo66 (50nM) 结合表达 PirB 的 COS7 细胞的能力。多种 YW259 抗小鼠 PirB (抗 mPirB) 抗体的重链和轻链序列的核苷酸和氨基酸序列显示于图 6-16 及 17 和 18。图 17 和 18 还分别显示 YW259. 2、YW250. 9 和 YW259. 12 重链和轻链内的高变区序列。

[0219] 神经突向外长出测定法

[0220] 将用聚 D-赖氨酸 (Biocoat, BD) 预包被的 96 孔板用髓磷脂 (0.75 μ g/ml) 包被过夜或用 AP-Nogo66 或 MAG-Fc (150-300ng/点) 包被 2 小时, 然后用层粘连蛋白 (10 μ g/ml, 溶于 F-12 中) 处理 2 小时 (CGN 培养物) 或 4 小时 (DRG 培养物)。如先前 (B. Zheng 等, Proc Natl Acad Sci U S A 102, 1205 (2005)) 所述培养小鼠 P7 小脑神经元, 并以约 2×10^4 细胞/孔的浓度铺板。如先前 (Zheng 等, 2005, 见上文) 所述培养小鼠 P10 DRG 神经元, 并以约 5×10^3 细胞/孔的浓度铺板。将培养物于 37°C 以 5% CO₂ 培养 22 小时, 然后用 4% 低聚甲醛/10% 蔗糖固定, 并用抗 β III-微管蛋白 (TuJ1, Covance) 染色。对于每个实验, 所有条件在六个复制孔中实施, 由此测量最大神经突长度并确定六个孔之间的平均值。每个实验至少实施三次有相似结果。使用 Student 氏 t 检验确定 p 值。

[0221] 生长锥塌陷测定法

[0222] 分离 DRG 外植体, 即自 3 周龄小鼠解剖出 DRG 并将它们切出三分之一。然后将每个 DRG 外植体在各经 PDL (100 μ g/ml) 和层粘连蛋白 (10 μ g/ml) 包被的来自八孔板的孔中培养。涂板后 72 小时, 将外植体与 AP-Nogo66 (100nM) 或髓磷脂 (3 μ g/ml) 一起温育 30 分钟以刺激塌陷。将培养物用 4% 低聚甲醛/10% 蔗糖固定, 然后通过罗丹明-鬼笔环肽 (Molecular Probes) 染色来显现生长锥并对塌陷打分。通过对至少 3 个复制孔取平均来测定平均生长锥塌陷。

[0223] 结果

[0224] 为了解决 PirB 是否是 Nogo66 的功能性受体,我们聚焦于幼年 (P7) 小脑颗粒神经元 (cerebellar granule neurons, CGN), 其神经突向外长出在 AP-Nogo66 上生长时受到抑制 (K. C. Wang et al., Nature 420, 74 (2002))。成年 CGN 已经显示出表达 PirB (J. Syken et al., Science 313, 1795 (2006)), 而且我们发现幼年 CGN 也是这样, 如通过 RT-PCR、免疫组织化学和原位杂交所评估的 (数据未显示)。

[0225] 首先, 在体外测试了 PirB (PirB-His) 的可溶性胞外域干扰 AP-Nogo66 抑制的能力。如图 2A 所示, AP-Nogo66 抑制 P7CGN 的神经突向外长出至不处理对照水平的大约 66%。在此测定中包括 PirB-His 逆转 AP-Nogo66 抑制, 其中神经突向外长出基本上回到对照水平。这些结果与使用 NgR 胞外域来阻断 Nogo66 所致抑制所报告的结果相似 (B. Zeng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 1205 (2005); A. E. Fournier, et al., J. Neurosci. 22, 8876 (2000); Z. L. He et al., Neuron 38, 177 (2003)), 而且指示 PirB 能结合 Nogo66 的功能抑制性结构域, 但是没有解决 CGN 中的内源 PirB 是否介导 AP-Nogo66 所致抑制。

[0226] 因此, 针对 PirB 生成了能够干扰 PirB-Nogo66 相互作用的抗体 (抗 PirB)。针对 PirB 的细胞外结构域使用噬菌体展示平台 (W. C. Liang et al., J. Mol. Biol. 366, 815 (2007)), 对多个克隆筛选它们阻断 AP-Nogo66 结合 PirB 的能力。干扰 AP-Nogo66-PirB 结合最好的克隆 YW259.2 (下文称作 aPB1) 具有针对 PirB 的 5nM 的 Kd (见图 13-16)。

[0227] aPB1 对 CGN 的基线轴突生长没有影响。然而, aPB1 显著降低培养的 CGN 中 AP-Nogo66 或髓磷脂所致抑制 (图 2B), 在 AP-Nogo66 上将神经突向外长出自 41% 挽救至 59%, 而在髓磷脂上将神经突向外长出自 47% 挽救至 62%。使用 MAG 作为抑制性底物或者使用一种不同的细胞系 (背根神经节 (DRG) 神经元) 看到相似的结果 (图 5)。这些结果支持 PirB 是介导长期神经突向外长出抑制的功能性受体。

[0228] 为了验证此结果, 测试了细胞表面 PirB 的遗传清除是否也逆转 AP-Nogo66 或髓磷脂所致抑制, 即培养来自 PirBTM 小鼠的神经元, 该小鼠中消除了四个编码跨膜域和部分 PirB 胞内域的外显子 (J. Syken et al., Science 313, 1795 (2006))。将来自 PirBTM 小鼠或野生型 (WT) 同窝小鼠的 CGN 在对照底物、AP-Nogo66 或髓磷脂上培养。在对照底物 (PDL/层粘连蛋白) 上, PirBTM 神经元表现与 WT 神经元相似 (图 2C)。然而, 在 AP-Nogo66 或髓磷脂任一上, 来自 PirBTM 神经元的神经突向外长出受到的抑制比 WT 神经元显著要少。在 AP-Nogo66 上, 来自 WT 神经元的向外长出被抑制至对照水平的 50%, 而 PirBTM 神经元只被抑制至 66%。类似地, 在髓磷脂上, WT 神经元被抑制至对照水平的 52%, 而 PirBTM 神经元只被抑制至 70%。我们在髓磷脂和 AP-Nogo66 二者上再次看到相似的 PirBTM DRG 神经元抑制部分解除 (图 5)。这些发现指示 PirB 确实是 AP-Nogo66 和髓磷脂介导的神经突生长抑制的功能性受体。然而, PirB 活性的丢失没有完全挽救向外长出。

[0229] 由于先前将 NgR 描述为髓磷脂抑制剂的受体, 因此有可能的是 PirB 和 NgR 一起发挥功能来介导对神经突向外长出的抑制。为了解决这一点, 一起阻断 CGN 中的 PirB 和 NgR 二者功能, 即在抗 PirB 存在下培养来自 NgR 缺陷小鼠的神经元。如我们先前报告的 (B. Cheng et al., PNAS 2005, 见上文), NgR^{-/-}CGN 神经突向外长出受到 AP-Nogo66 或髓磷脂抑制的程度与 WT 神经元相同 (50% 和 49%; 图 3)。用 aPB1 抗体处理 NgR^{+/-} 神经元部分逆转 AP-Nogo66 或髓磷脂任一所致抑制, 如上文用 aPB1 处理 WT 神经元看到的。类似地, 用 aPB1 处理 NgR^{-/-} 神经元部分逆转 AP-Nogo66 所致抑制, 但是与用 aPB1 处理 NgR^{+/-} 神经元

或 WT 神经元所看到的相比没有提供进一步的挽救。相反,用 aPB1 处理 NgR^{-/-} 将髓磷脂上的神经突向外长出恢复至近乎对照水平。如此,似乎是 PirB(而非 NgR) 是 CGN 中 AP-Nogo66 所致底物抑制所需要的,但是只是部分地。此外, PirB 和 NgR 二者一起促成髓磷脂所致底物抑制。

[0230] 由于认为 NgR 是响应各种髓磷脂抑制剂的生长锥塌陷所需要的 (J. E. Kim et al., Neuron 44, 439 (2004), O. Chivatakarn et al., J. Neurosci. 27, 7117 (2007)), 因此有可能的是 PirB 也涉及这种更急性的应答。将来自 3 周龄小鼠背根神经节 (DRG)、经确认表达 PirB 的感觉神经元用于此实验。发现此培养系统中的生长锥具有较高的基线塌陷水平 (约 30%), 这在与 APNogo66 或髓磷脂一起温育时进一步升高 (图 4)。此塌陷在 NgR^{-/-} 神经元中大大消除。另外,用 aPB1 阻断 PirB 功能也足以逆转这些抑制剂所致生长锥塌陷。一起抑制 PirB 和 NgR 二者途径 (对来自 NgR^{-/-} 小鼠的神经元使用 aPB1 处理) 也完全逆转生长锥塌陷 (growth cone collapse), 但是此结果不提供信息,因任一单独处理在此测定法中给出完全挽救。

[0231] 在另一项实验中, C1QTNF5 抑制小脑颗粒神经元 (CGN) 的神经突向外长出, 而且此抑制被 PirB 功能阻断性抗体 YW259.2 逆转。该结果显示于图 19。

[0232] 总之, 这些结果支持 PirB 作为髓磷脂提取物 (更具体的说就是髓磷脂相关抑制剂 Nogo66 和 MAG) 所致神经突抑制的必需受体的新作用。确实, PirB 表现为比 NgR 更重要的底物抑制介导体, 因为单独消除 PirB 功能 (或是遗传地或是使用抗体) 部分解除髓磷脂提取物和髓磷脂抑制剂二者的生长抑制, 而单独遗传消除 NgR 不解除任何这些底物所致抑制。然而, NgR 表现为在介导髓磷脂提取物 (而非 Nogo66) 所致抑制中发挥辅助作用, 因为遗传消除 NgR 能提高抗 PirB 抗体对髓磷脂 (而非 Nogo66) 的抑制解除。我们的发现可能有助于解释 NgR 敲除小鼠中令人惊讶的不存在增强的 CST 再生 (J. E. Kim et al., 见上文, B. Zheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 1205 (2005)), 尽管在输注 NgR 胞外域的啮齿类动物中看到所报告的再生或出芽 (S. Li et al., J. Neurosci. 24, 10511 (2004))。如此, 在体内可能必须消除 PirB 和 NgR 二者来实现显著的再生。另外, 由于在 Nogo66 底物上, 遗传消除 NgR 没有进一步提高 PirB 消除的部分抑制解除效果, 因此有可能的是 Nogo66 有别的结合受体。

[0233] 虽然 PirB 表现为比 NgR 更重要的底物抑制受体, 但是单独灭活 PirB 或 NgR 任一足以阻断由添加髓磷脂抑制剂引起的急性生长锥塌陷。此观察结果提示塌陷是一种要求更多的过程, 需要 PirB 和 NgR 二者活性, 或是平行地或是一起地作用。在此背景中, 感兴趣的是 PirB 和 NgR 受体最近在限制视皮层中的突触连接的可塑性中显示出发挥相似作用: 在缺少任一受体的小鼠中, 关键发育期期间的眼闭合导致经睁开的眼过度增强连接 (J. Syken et al., 2006, 见上文, A. W. McGee et al., Science 309, 2222 (2005), 见上文)。负责两种受体在介导生长锥塌陷中的作用的机制也可能是它们在眼优势可塑性中的作用的共同性。

[0234] 成年轴突不能在损伤后再生是在对 CNS 的外伤性损伤后再次获得功能的一项主要障碍。推测再生潜力随突触可塑性的能力随年龄变得受到限制而下降, 试图限制过度或丰富的突触连接的发育。此推测得到了来自下述发现的支持, 即先前涉及在发育期间及在成年期中限制突触可塑性 (J. Syken et al., 2006, 见上文) 的 PirB 也是髓磷脂所致轴突抑制的介导体, 这又与下述发现类似, 即最初涉及轴突抑制的 NgR 类似地调节突触可塑性

(plasticity) (S.Li et al., J.Neurosci. 24,10511 (2004))。

[0235] 我们的发现还拓宽了潜在 PirB 配体的范围,其超出了 I 类 MHC 分子的范围,以包括神经元再生长抑制剂。相反,由于遗传删除已知的髓磷脂抑制剂 Nogo 或 MAG 只导致髓磷脂所致抑制的适度降低 – 暗示存在其它抑制剂 – 我们的发现提出了这种可能性,即正常情况下由少突胶质细胞以低水平表达的 MHCI 分子可能在损伤后上调并与中枢髓磷脂中的 Nogo 和 MAG 协作促成向外长出抑制。

[0236] PirB 响应髓磷脂抑制剂而发信号来抑制轴突生长的机制尚不清楚。然而,PirB 已经显示出拮抗整联蛋白受体的功能 (S.Pereira et al., J.Immunol. 173 :5757 (2004)),而且募集 SHP-1 和 SHP-2 磷酸酶二者;这些事件任一或二者能削弱正常神经突向外长出。使用本文抗 PirB 抗体或通过其它手段阻断 PirB 活性为刺激轴突再生的治疗性干预提供了一种重要的新靶。

[0237] 将贯穿本公开内容引用的所有参考文献完整引入本文作为参考。尽管已经参照所谓的具体实施方案描述了本发明,但是应当理解,本发明不限于此类实施方案。与之相反,本发明意图覆盖所附权利要求的精神和范围内所包括的各种修改形式和等同形式。

[0001]

序列表

<110> 健泰科生物技术公司 (GENENTECH, INC.)
Jasvinder Atwal
Marc Tessier-Lavigne
Yan Wu

<120> 抗 PirB 抗体

<130> GNE-0324PCT

<140> 未指定
<141> 内附

<150> 61/052,949
<151> 2008-05-13

<150> 12/316,130
<151> 2008-12-09

<150> 12/208,883
<151> 2008-09-11

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 841
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus sp.)

<400> 1
Met Ser Cys Thr Phe Thr Ala Leu Leu Arg Leu Gly Leu Thr Leu Ser
1 5 10 15

Leu Trp Ile Pro Val Leu Thr Gly Ser Leu Pro Lys Pro Ile Leu Arg
20 25 30

Val Gln Pro Asp Ser Val Val Ser Arg Trp Thr Lys Val Thr Phe Phe
35 40 45

Cys Glu Glu Thr Ile Gly Ala Asn Glu Tyr Arg Leu Tyr Lys Asp Gly
50 55 60

Lys Leu Tyr Lys Thr Val Thr Lys Asn Lys Gln Lys Pro Ala Asn Lys
65 70 75 80

Ala Glu Phe Ser Leu Ser Asn Val Asp Leu Arg Asn Ala Gly Gln Tyr
85 90 95

Arg Cys Ser Tyr Ser Thr Gln Tyr Lys Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Pro
100 105 110

Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Asp Tyr Trp Thr Pro Ser Leu Leu Ala
115 120 125

Gln Ala Ser Pro Val Val Thr Ser Gly Gly Tyr Val Thr Leu Gln Cys
130 135 140

Glu Ser Trp His Asn Asp His Lys Phe Ile Leu Thr Val Glu Gly Pro
145 150 155 160

Gln Lys Leu Ser Trp Thr Gln Asp Ser Gln Tyr Asn Tyr Ser Thr Arg
165 170 175

Lys Tyr His Ala Leu Phe Ser Val Gly Pro Val Thr Pro Asn Gln Arg
180 185 190

[0002]

Trp	Ile	Cys	Arg	Cys	Tyr	Ser	Tyr	Asp	Arg	Asn	Arg	Pro	Tyr	Val	Trp
		195					200					205			
Ser	Pro	Pro	Ser	Glu	Ser	Val	Glu	Leu	Leu	Val	Ser	Gly	Asn	Leu	Gln
	210					215					220				
Lys	Pro	Thr	Ile	Lys	Ala	Glu	Pro	Gly	Pro	Val	Ile	Ala	Ser	Lys	Arg
225					230					235					240
Ala	Met	Thr	Ile	Trp	Cys	Gln	Gly	Asn	Leu	Asp	Ala	Glu	Val	Tyr	Phe
				245					250					255	
Leu	His	Asn	Glu	Gly	Ser	Gln	Lys	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Thr	Leu	Gln
			260					265					270		
Gln	Pro	Gly	Asn	Lys	Gly	Lys	Phe	Phe	Ile	Pro	Ser	Met	Thr	Arg	Gln
		275					280					285			
His	Ala	Gly	Gln	Tyr	Arg	Cys	Tyr	Cys	Tyr	Gly	Ser	Ala	Gly	Trp	Ser
	290					295					300				
Gln	Pro	Ser	Asp	Thr	Leu	Glu	Leu	Val	Val	Thr	Gly	Ile	Tyr	Glu	His
305					310					315					320
Tyr	Lys	Pro	Arg	Leu	Ser	Val	Leu	Pro	Ser	Pro	Val	Val	Thr	Ala	Gly
				325					330					335	
Gly	Asn	Met	Thr	Leu	His	Cys	Ala	Ser	Asp	Phe	His	Tyr	Asp	Lys	Phe
			340					345					350		
Ile	Leu	Thr	Lys	Glu	Asp	Lys	Lys	Phe	Gly	Asn	Ser	Leu	Asp	Thr	Glu
		355					360					365			
His	Ile	Ser	Ser	Ser	Arg	Gln	Tyr	Arg	Ala	Leu	Phe	Ile	Ile	Gly	Pro
		370				375					380				
Thr	Thr	Pro	Thr	His	Thr	Gly	Thr	Phe	Arg	Cys	Tyr	Gly	Tyr	Phe	Lys
385					390					395					400
Asn	Ala	Pro	Gln	Leu	Trp	Ser	Val	Pro	Ser	Asp	Leu	Gln	Gln	Ile	Leu
				405					410					415	
Ile	Ser	Gly	Leu	Ser	Lys	Lys	Pro	Ser	Leu	Leu	Thr	His	Gln	Gly	His
			420					425					430		
Ile	Leu	Asp	Pro	Gly	Met	Thr	Leu	Thr	Leu	Gln	Cys	Tyr	Ser	Asp	Ile
		435					440					445			
Asn	Tyr	Asp	Arg	Phe	Ala	Leu	His	Lys	Val	Gly	Gly	Ala	Asp	Ile	Met
		450				455					460				
Gln	His	Ser	Ser	Gln	Gln	Thr	Asp	Thr	Gly	Phe	Ser	Val	Ala	Asn	Phe
465					470					475					480
Thr	Leu	Gly	Tyr	Val	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Gly	Gln	Tyr	Arg	Cys	Tyr
				485					490					495	
Gly	Ala	His	Asn	Leu	Ser	Ser	Glu	Trp	Ser	Ala	Ser	Ser	Glu	Pro	Leu
			500					505					510		

[0003]

Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Leu Pro Leu Thr Pro Ser Leu Ser Val
 515 520 525
 Lys Pro Asn His Thr Val His Ser Gly Glu Thr Val Ser Leu Leu Cys
 530 535 540
 Trp Ser Met Asp Ser Val Asp Thr Phe Ile Leu Ser Lys Glu Gly Ser
 545 550 555 560
 Ala Gln Gln Pro Leu Arg Leu Lys Ser Lys Ser His Asp Gln Gln Ser
 565 570 575
 Gln Ala Glu Phe Ser Met Ser Ala Val Thr Ser His Leu Ser Gly Thr
 580 585 590
 Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala Gln Asn Ser Ser Phe Tyr Leu Leu Ser Ser
 595 600 605
 Ala Ser Ala Pro Val Glu Leu Thr Val Ser Gly Pro Ile Glu Thr Ser
 610 615 620
 Thr Pro Pro Pro Thr Met Ser Met Pro Leu Gly Gly Leu His Met Tyr
 625 630 635 640
 Leu Lys Ala Leu Ile Gly Val Ser Val Ala Phe Ile Leu Phe Leu Phe
 645 650 655
 Ile Leu Ile Phe Ile Leu Leu Arg Arg Arg His Arg Gly Lys Phe Arg
 660 665 670
 Lys Asp Val Gln Lys Glu Lys Asp Leu Gln Leu Ser Ser Gly Ala Glu
 675 680 685
 Glu Pro Ile Thr Arg Lys Gly Glu Leu Gln Lys Arg Pro Asn Pro Ala
 690 695 700
 Ala Ala Thr Gln Glu Glu Ser Leu Tyr Ala Ser Val Glu Asp Met Gln
 705 710 715 720
 Thr Glu Asp Gly Val Glu Leu Asn Ser Trp Thr Pro Pro Glu Glu Asp
 725 730 735
 Pro Gln Gly Glu Thr Tyr Ala Gln Val Lys Pro Ser Arg Leu Arg Lys
 740 745 750
 Ala Gly His Val Ser Pro Ser Val Met Ser Arg Glu Gln Leu Asn Thr
 755 760 765
 Glu Tyr Glu Gln Ala Glu Glu Gly Gln Gly Ala Asn Asn Gln Ala Ala
 770 775 780
 Glu Ser Gly Glu Ser Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu Cys Ser Arg
 785 790 795 800
 Thr Leu Arg Gln Gly Ala Ala Ala Ser Pro Leu Ser Gln Ala Gly Glu
 805 810 815
 Ala Pro Glu Glu Pro Ser Val Tyr Ala Thr Leu Ala Ala Ala Arg Pro
 820 825 830

[0004]

Glu Ala Val Pro Lys Asp Val Glu Gln
 835 840

<210> 2
 <211> 598
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 2
 Met Thr Pro Ile Val Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Pro Arg Thr His Val Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp
 20 25 30

Ala Glu Pro Asp Ser Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Ser
 35 40 45

Cys Gln Gly Ser Leu Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys
 50 55 60

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

Gly Gln Phe His Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr
 85 90 95

Gly Cys Gln Tyr Tyr Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro
 100 105 110

Leu Val Leu Val Met Thr Gly Ala Tyr Pro Lys Pro Thr Leu Ser Ala
 115 120 125

Gln Pro Ser Pro Val Val Thr Ser Gly Gly Arg Val Thr Leu Gln Cys
 130 135 140

Glu Ser Gln Val Ala Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu
 145 150 155 160

Asp Glu His Pro Gln Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser
 165 170 175

Ser Arg Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp
 180 185 190

Ser His Arg Cys Tyr Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser
 195 200 205

Ser Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys
 210 215 220

Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Val Val Ala Pro Gly Glu Ser
 225 230 235 240

Leu Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu
 245 250 255

Tyr Lys Glu Gly Glu Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro
 260 265 270

Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg

[0005]

275	280	285
Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr 290	Arg Cys Tyr Gly Ala Tyr 295	Asn Leu Ser Ser 300
Glu Trp Ser Ala Pro Ser 305	Asp Pro Leu Asp Ile 310	Leu Ile Thr Gly Gln 315
Ile His Gly Thr Pro Phe Ile 325	Ser Val Gln Pro Gly Pro 330	Thr Val Ala 335
Ser Gly Glu Asn Val Thr 340	Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg 345	Gln Phe His 350
Thr Phe Leu Leu Thr Lys Ala 355	Gly Ala Ala Asp Ala 360	Pro Leu Arg Leu 365
Arg Ser Ile His Glu Tyr 370	Pro Lys Tyr Gln Ala 375	Glu Phe Pro Met Ser 380
Pro Val Thr Ser Ala His 385	Ala Gly Thr Tyr Arg 390	Cys Tyr Gly Ser Leu 395
Asn Ser Asp Pro Tyr 405	Leu Leu Ser His Pro 410	Ser Glu Pro Leu Glu Leu 415
Val Val Ser Gly Pro Ser 420	Met Gly Ser Ser 425	Pro Pro Pro Thr Gly Pro 430
Ile Ser Thr Pro Ala Gly 435	Pro Glu Asp Gln Pro 440	Leu Thr Pro Thr Gly 445
Ser Asp Pro Gln Ser 450	Gly Leu Gly Arg His 455	Leu Gly Val Val Ile Gly 460
Ile Leu Val Ala Val 465	Val Leu Leu Leu Leu 470	Leu Leu Leu Leu Phe 475
Leu Ile Leu Arg His 485	Arg Arg Gln Gly Lys 490	His Trp Thr Ser Thr Gln 495
Arg Lys Ala Asp 500	Phe Gln His Pro Ala 505	Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro 510
Thr Asp Arg Gly Leu 515	Gln Trp Arg Ser Ser 520	Pro Ala Ala Asp Ala Gln 525
Glu Glu Asn Leu Tyr 530	Ala Ala Val Lys Asp 535	Thr Gln Pro Glu Asp Gly 540
Val Glu Met Asp Thr 545	Arg Ala Ala Ala Ser 550	Glu Ala Pro Gln Asp Val 555
Thr Tyr Ala Gln Leu 565	His Ser Leu Thr Leu 570	Arg Arg Lys Ala Thr Glu 575
Pro Pro Pro Ser 580	Gln Glu Arg Glu Pro 585	Pro Ala Glu Pro Ser Ile Tyr 590
Ala Thr Leu Ala Ile His		

[0006]

595

<210> 3
 <211> 1419
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223>人工序列描述: 合成的多核苷酸

<400> 3
 atgggatggt catglatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagc gtacgctgag 60
 gticagctgg tggagctgg cggtagcctg gtgcagccag ggggtcact cggttgtcc 120
 tglgcagctt ctggcttcac cticactaat tctatatta gctgggtgag tcaggcccg 180
 ggtlaaggcc tgggaatggg tggtaggatt tctcctctg gcggttctac ttactatgcc 240
 gatagcgtca agggccgttt cactataagc gcagacacat ccaaaaacac agcctaccta 300
 caaatgaaca gcttaagagc tgaggacact gccgtctatt attgtgcaaa atcgggtctg 360
 gcgttcgtt actggggta aggaacctg gtaccgtct cctgggcct caccaagggc 420
 ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcact ctgggggac agcgccctg 480
 ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 540
 ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggt gtctacagt cctcaggact ctactccctc 600
 agcagcgtgg tgaactgtcc ctctagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaactg 660
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtg agcccaaatc ttgtgacaaa 720
 actcacacat gccaccgtg cccagcact gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc 780
 tccccccaa aacccaagga caccctcatg atctccgga cccctgaggt cacatgcgtg 840
 gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagtta actggtagct ggacggcgtg 900
 gagggtgata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg 960
 gtcacgttcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 1020
 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatccggg aagagatgac caagaaccag 1140
 gtacgcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
 tctctcttcc tctacagcaa gtccaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
 ctgtctccgg gtaaatgagt gcgacggccc tagagtcga 1419

<210> 4
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223>人工序列描述: 合成的多肽

<400> 4
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

[0007]

Ser Asn Ser Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Gly Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Ala Trp Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 210 215 220
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 225 230 235 240
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 275 280 285
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365

[0008]

```

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

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385                               390                               395                               400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405                               410                               415

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435                               440                               445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450                               455                               460

Lys
465

<210> 5
<211> 465
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列描述: 合成的多肽

<400> 5
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1                               5                               10                               15

Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20                               25                               30

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

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

Glu Trp Val Gly Gly Ile Asn Pro Thr Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala
65                               70                               75                               80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Val Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115                              120                              125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
130                              135                              140

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

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

```

[0009]

165	170	175
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu 180 185 190		
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser 195 200 205		
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro 210 215 220		
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys 225 230 235 240		
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro 245 250 255		
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser 260 265 270		
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp 275 280 285		
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn 290 295 300		
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val 305 310 315 320		
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu 325 330 335		
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys 340 345 350		
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr 355 360 365		
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr 370 375 380		
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu 385 390 395 400		
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu 405 410 415		
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys 420 425 430		
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu 435 440 445		
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 450 455 460		
Lys 465		

<210> 6

[0010]

<211> 465
 <212> PRT
 <213>人工序列

 <220>
 <223>人工序列描述: 合成的多肽

 <400> 6
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

 Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

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

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

 Glu Trp Val Gly Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

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

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

 Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Val Trp Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140

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

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

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

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

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

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

 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255

 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270

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

[0011]

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460
 Lys
 465
 <210> 7
 <211> 233
 <212> PRT
 <213>人工序列
 <220>
 <223>人工序列描述: 合成的多肽
 <400> 7
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 50 55 60
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 85 90 95

[0012]

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr
 100 105 110
 Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 8

<211> 1419

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列描述: 合成的多核苷酸

<400> 8

```

atgggaiggt caigtatcat ccttttcta gtagcaactg caactggagc gtacgctgag      60
gttcagctgg tggagtcagg cggtagcctg gtgcagccag ggggctcact cgtttgtcc      120
tgtgcagctt ctggcttcac cttcagtaat tcctatatta gctgggtgcg tcaggccccg      180
ggtaaggggc tggaatgggt tggtaggatt talccttctg gcggtaatat taactatgcc      240
gatagcgica agggccggtt cactataagc gcagacacat ccaaaaacac agcctaccta      300
caaatgaaca gcttaagagc tgaggacact gccgtctatt attgtgcaaa aagcgcttgg      360
cagttcgett actgggggca aggaacctg gtcacctgt cctcggcctc caccaagggc      420
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg      480
ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc      540
ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggt gtcctacagt ctcaggact ctactccctc      600
agcagcgtag tgaactgtcc ctctagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg      660
aatcacaagc ccagcaaac caaggtggac aagaaagtig agcccaaatc ttgtgacaaa      720
actcacacat gcccaccgtg ccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc      780
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg      840
gtggtaggag taggccaga agacctgag gtcaagttca actggtagct ggacggcggtg      900
gaggtgcata atgccaagac aaagccggg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg      960
gtcagcgctc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag      1020

```

[0013]

```

gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aagagatgac caagaaccag 1140
gtcagccctga cctgcccgtt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgaggag 1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
tcctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctcig cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
ctgtctccgg gtaaatgagt gcgacggccc tagagtcga 1419

```

<210> 9
 <211> 1419
 <212> DNA
 <213>人工序列

<220>
 <223>人工序列描述: 合成的多核苷酸

```

<400> 9
atgggatggc catgtatcat ctttttctta gtagcaacig caactggagc glacgtgag 50
gttcagctgg tggagtctgg cgggtggcctg gtgcagccag ggggctcact ccgtttgtcc 120
tgttcagctt ctggcttcac cticagtagt aactatatta gctgggtgcg tcaggccccg 180
ggttaaggcc tggaatgggt tgggtggatt aatcctactg gcggttatac tiactatgcc 240
catagcgtca agggccgttt cactataagc gcagacacat ccaaaaacac agcctaccta 300
caaaigaaca gcttaagagc tgaggacact gccgtctatt attgtgcaag aagcgtgtgg 360
gtgttcgatt actgggggca aggaaccctg gtcaccgtct cctcggccct caccaagggc 420
ccatcggtct tccccctggc accctctctc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 480
ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 540
ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggct gtcctacagt cctcaggact ctactcctc 600
agcagcgctg tgaactgtgc ctctagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 660
aatcacagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 720
actcacacat gccacccgtg ccagcacct gaactcctgg ggggacgctc agtcttctc 780
ttcccccaaa aaccaagga ccccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 840
gltgtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggctcgt ggacggcgtg 900
gaggtgcata atgccaagac aaagcccgcg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg 960
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag 1020
gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aagagatgac caagaaccag 1140
gtcagccctga cctgcccgtt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgaggag 1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
tcctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctcig cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
ctgtctccgg gtaaatgagt gcgacggccc tagagtcga 1419

```

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 10
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0014]

1	5	10	15
Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Ala Ala	Ser Gly Phe Thr Phe	Ser Ser Tyr
	20	25	30
Ala Met Ser	Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Val
	35	40	45
Ser Gly Ile	Ser Gly Asp Gly Gly	Ser Thr Tyr Tyr	Ala Asp Ser Val
	50	55	60
Lys Gly Arg	Phe Thr Ile Ser Ala	Asp Thr Ser Lys	Asn Thr Ala Tyr
	65	70	75
Leu Gln Met	Asn Ser Leu Arg Ala	Glu Asp Thr Ala	Val Tyr Tyr Cys
	85	90	95
Ala Arg Gly	Phe Asp Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr	
	100	105	

<210> 11
 <211> 110
 <212> PRT
 <213>人工序列

<220>
 <223>人工序列描述: 合成的多肽

<400> 11
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Tyr Ile Ser	Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Val
	35	40	45

Gly Gly Ile	Tyr Pro Ser Gly Gly	Asn Thr Asn Tyr	Ala Asp Ser Val
	50	55	60

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

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

Ala Lys Ser	Ala Trp Gln Phe Ala	Tyr Trp Gly Gln Gly	Thr
	100	105	110

<210> 12
 <211> 109
 <212> PRT
 <213>人工序列

<220>
 <223>人工序列描述: 合成的多肽

<400> 12
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

[0015]

Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Thr Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala His Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ser Val Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105

<210> 13
 <211> 110
 <212> PRT
 <213>人工序列

<220>
 <223>人工序列描述: 合成的多肽

<400> 13
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ser
 20 25 30
 Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Lys Ser Val Trp Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

<210> 14
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 14
 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 Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

[0016]

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 Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
85 90 95

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

<210> 15
<211> 108
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成的多肽

<400> 15
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 Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

PirB (小鼠)序列(SEQ ID NO: 1)

```

1  msctftallr  lgltlslwip  vltgslpkpi  lrvqpdsvvs  rwtkvtfce  etiganeyrl
61  ykdgklyktv  tknkqkpank  aefslsnvdl  rnagqyrtsy  stqykssgys  dplvlvvtgd
121 ywtpsllaqa  spvvtsggyv  tlqcesshnd  hkfiltvegp  qklswtqdsq  ynystrkyna
181 lfsvgpvtpn  qrwicrcysy  drnrpyvwsp  psesvellvs  gnlqkptika  epgpviaskr
241 amtiwcqgnl  daevyflhne  gsqktqstqt  lqqpgnkgkf  fipsmtrqna  qqyrcycygs
301 agwsqpsdtl  elvvtgiyeh  ykprlsvlps  pvvtaggnmt  lhcasdfhyd  kfiltkedkk
361 fgnsldtehi  sssrqyralf  iigpttptht  gtfrcygyfk  napqlwsvps  dlqqilisgl
421 skkpsllthq  ghildpgmtl  tlqcysdiny  drfalhkvvg  adimqhssqq  tdtgfsvanf
481 tlgyvssstg  ggyrcygahn  lssewsasse  pldilitgql  pltpslsvkp  nhtvhsgetv
541 sllcwsmds  dtfilskegs  aqqplrlksk  shdqqsqae  smsavtshls  gtyrcygaqn
601 ssfyllssas  spveltvsqp  ietstppptm  smplgglhmy  lkalgvsva  filflfilif
661 illrrrrhrgk  frkdqvkekd  lqlssgaeep  itrkgelqkr  pnpaaatqee  slyasvedmq
721 tedgvelnsw  tpeedpqge  tyaqvkpsrl  rkaghvpspv  msreqlntey  eqaeegqgan
781 nqaageseg  dvtyaqlcsr  tlrqgaasp  lsqageapee  psvyatlaaa  rpeavpkdve
841 q

```

图 1A

LILRB2 (人)序列(SEQ ID NO: 2)

```

1  mtpivtvlic  lglslgprth  vqtgtipkpt  lwaepdsvit  qgspvtlscq  gsleageyrl
61  yrekksaswi  trirpelvkn  qqfhipsitw  ehtgrygcqy  ysarwsels  dplvlvmtga
121 ypkptlsaqp  spvvtsggrv  tlqcesqvaf  ggfilckege  dehpqclnsq  phargssrai
181 fsvgpvspnr  rwsrvcygyd  lnsyvwssp  sdlllellvp  vskkpslsq  pgpvvapgcs
241 ltlqcvsdv  ydrfvlykeg  erdlrqlpgr  qpqaglsqan  ftlqpvsrsy  ggyrcygay
301 nlssewsaps  dpldilitgq  ihgtpfisvq  pgptvasgen  vtllcqswrq  fhtfltkag
361 aadaplrlrs  iheykyqae  fpmspvtsah  agtyrcygs  nsdpyllshp  sepelvvsg
421 psmgsspppt  gpistpagpe  dqpltpgds  pqsglgrhl  vvigilvav  lllllllllf
481 lilrrrrhrgk  hwtstqrkad  fqhpagavgp  eptdrqlwr  ssaaadaqee  nlyavkdtq
541 pedgvemdr  aaaseapqdv  tyaqhlstl  rrkateppps  qereppaeps  iyatlaih

```

图 1B

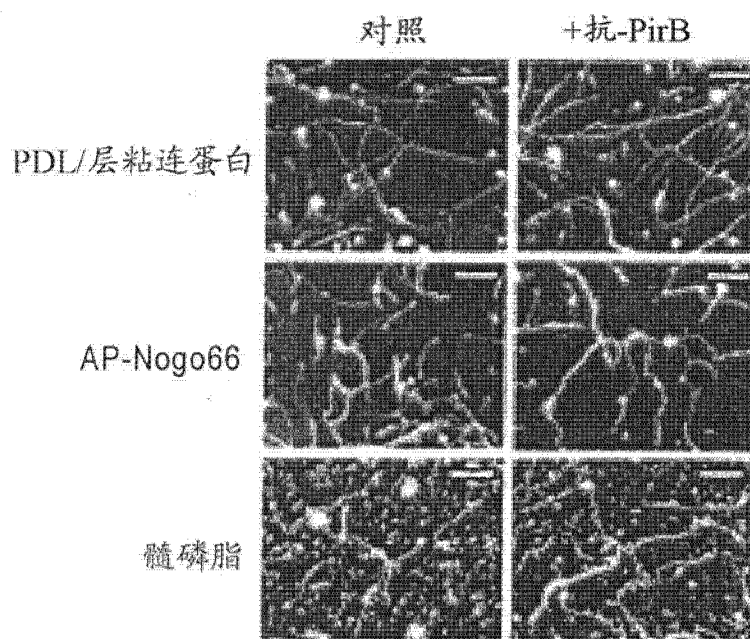


图 2A

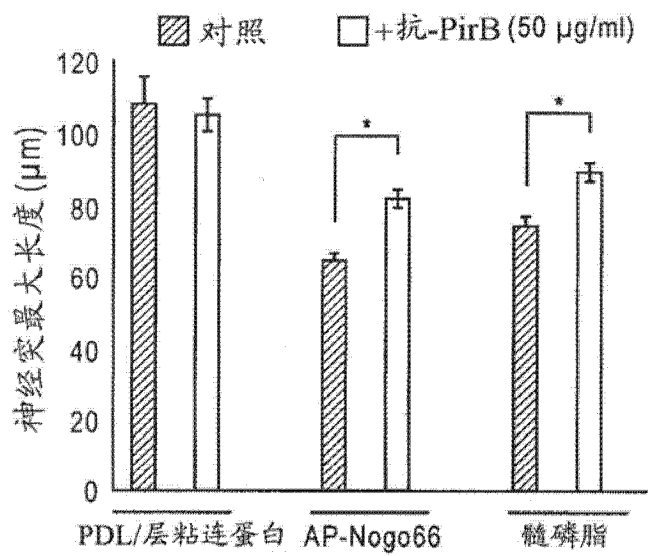


图 2B

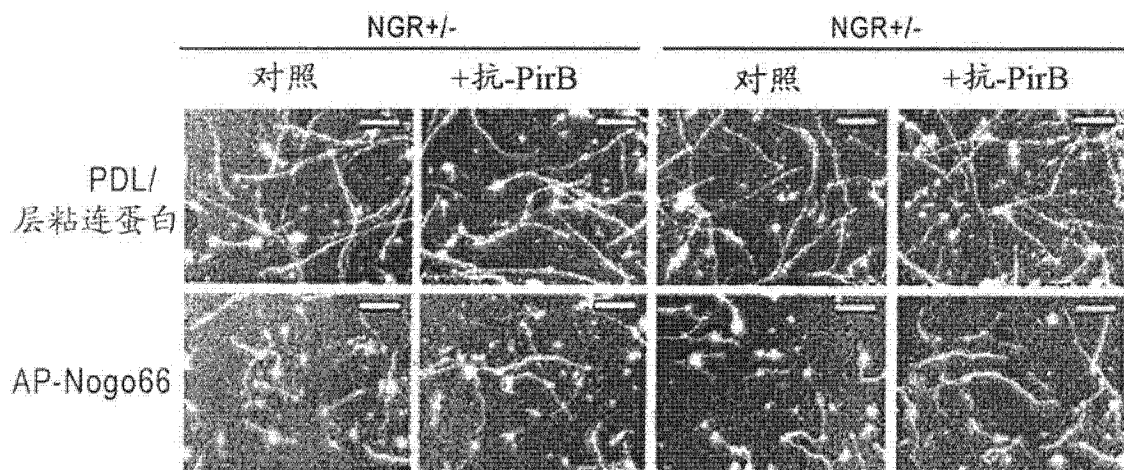


图 3A

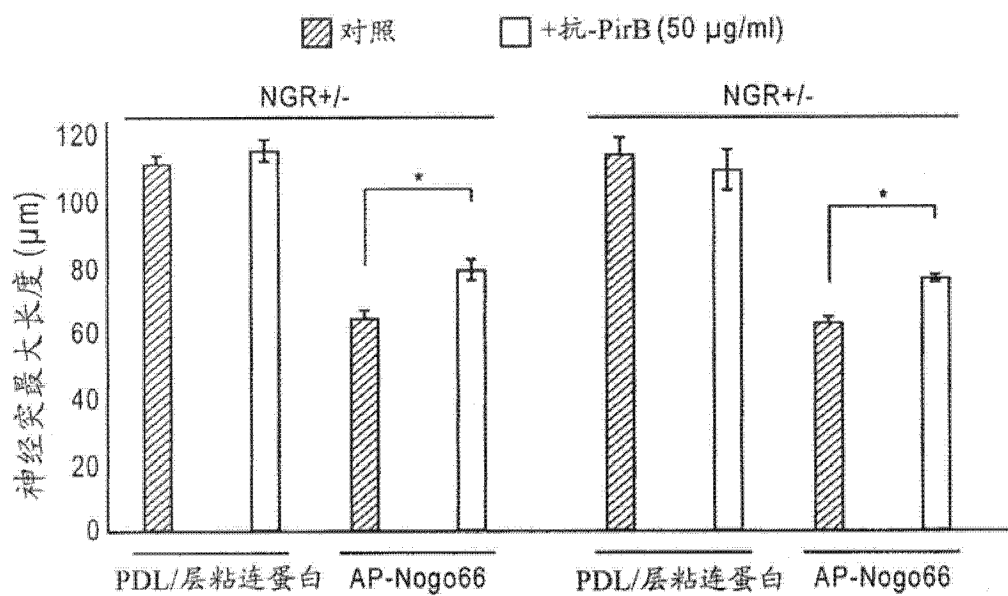


图 3B

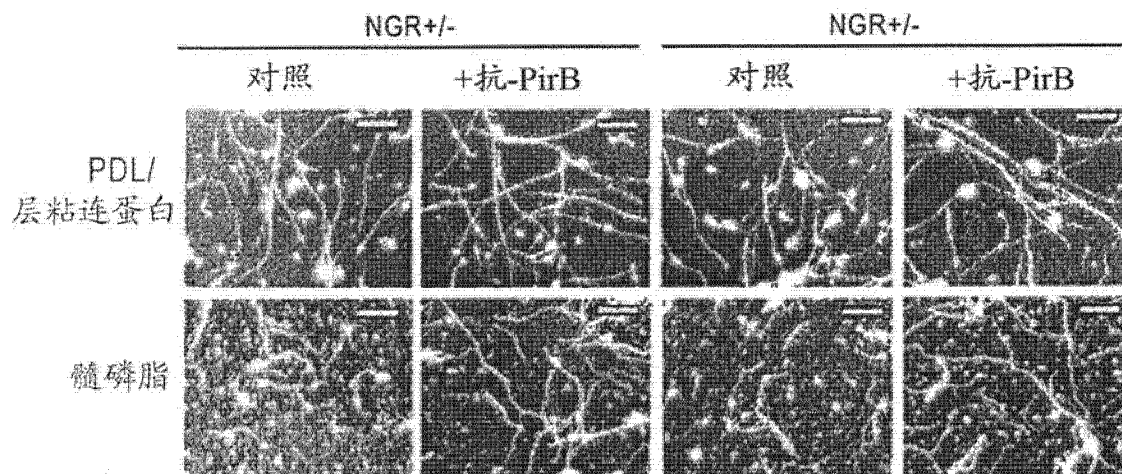


图 3C

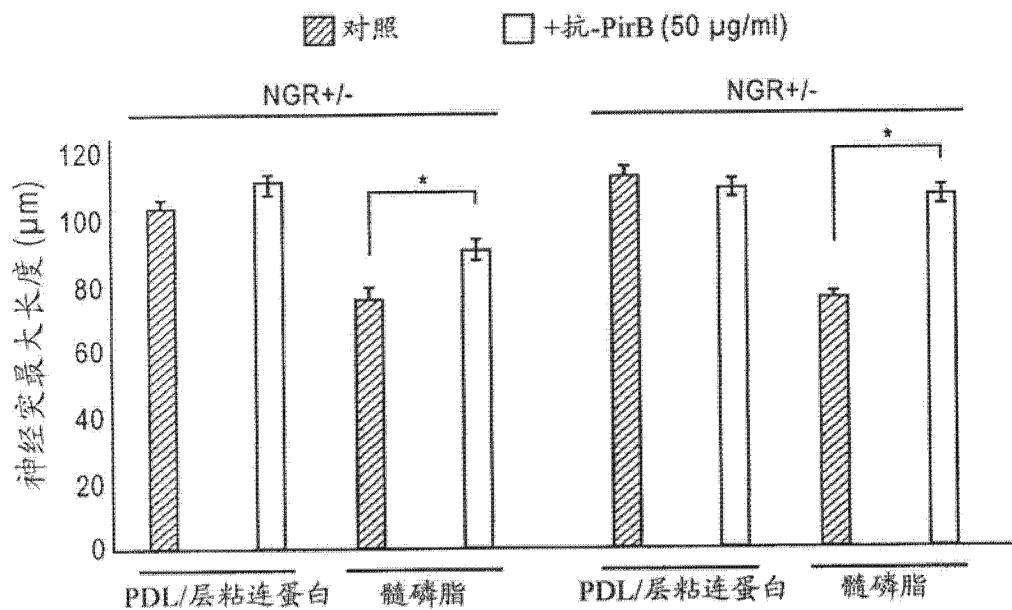


图 3D

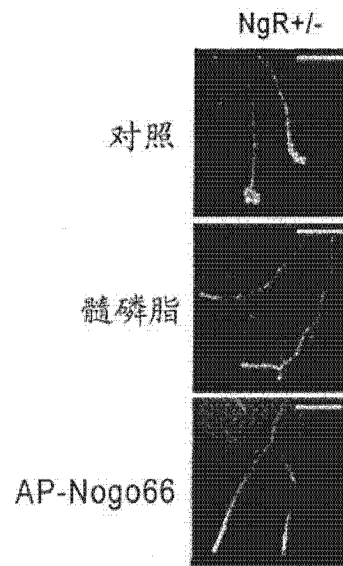


图 4A

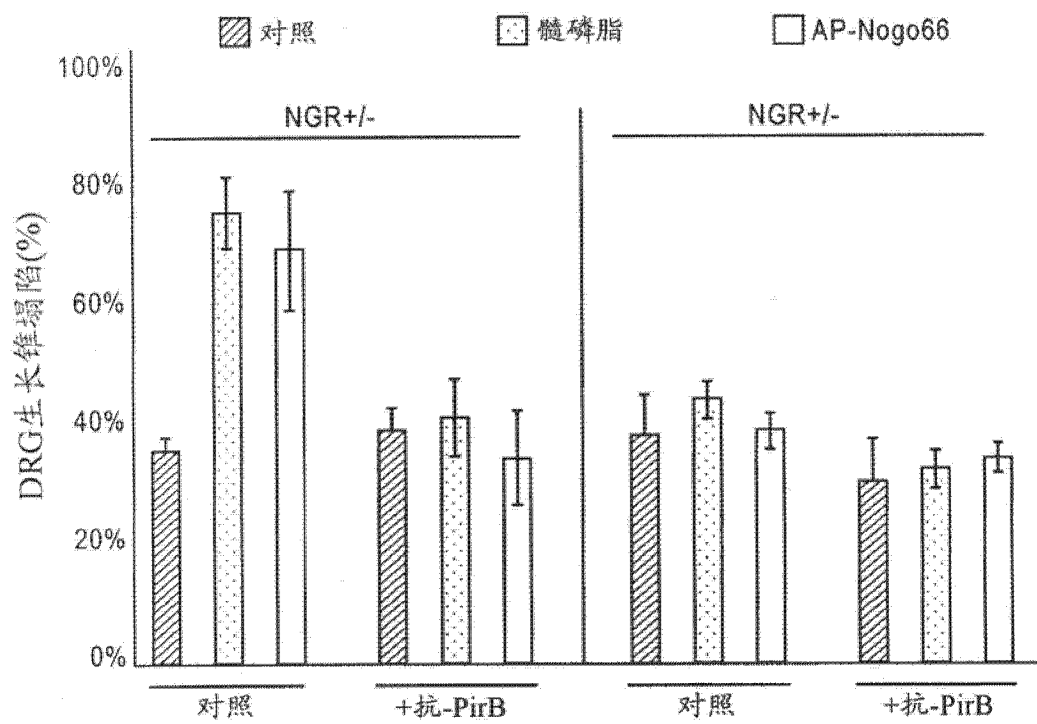


图 4B

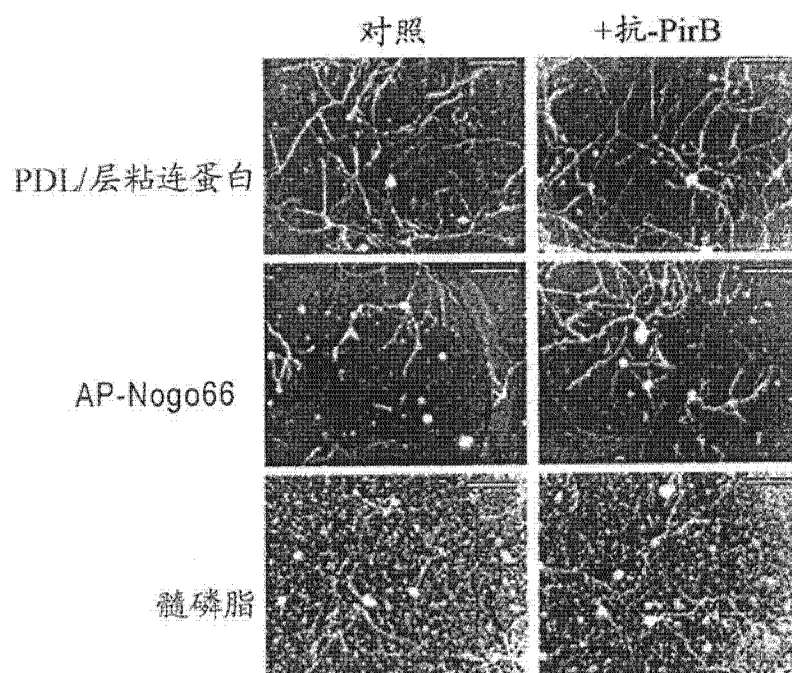


图 5A

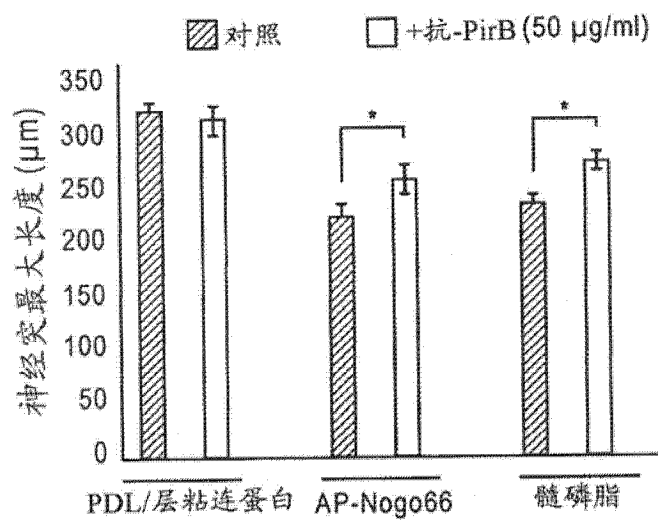


图 5B

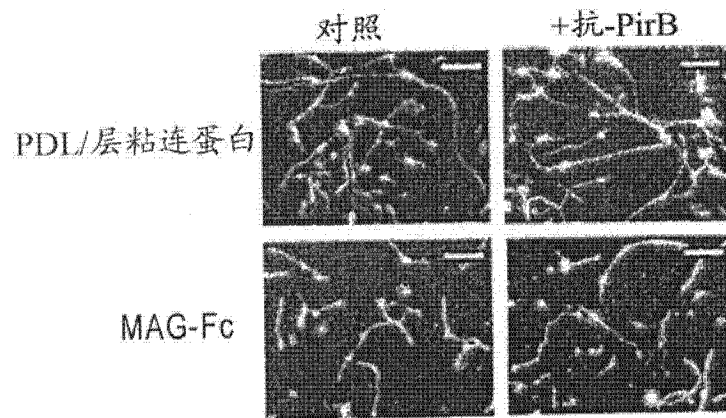


图 5C

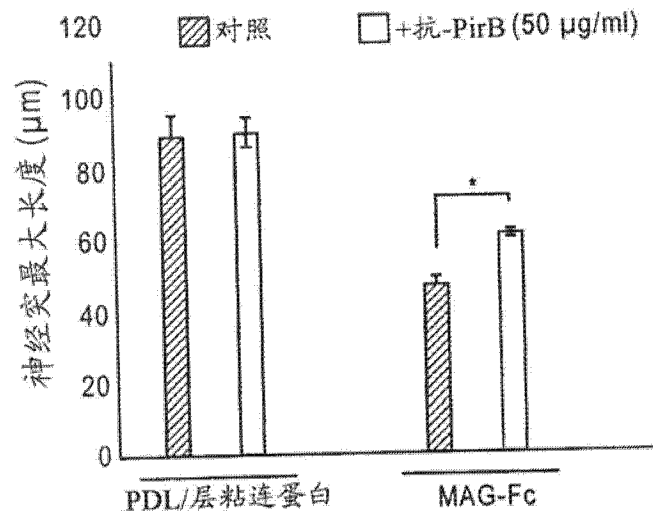


图 5D

YW259.2 DNA:

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGCGT
ACGCTGAGGTTTACGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGG
GGCTCACTCCGTTTGTCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCTTCAGTAATTCCT
ATATTAGCTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGT
GGGATTTATCCTTCTGGCGGTAATACTAACTATGCCGATAGCGTCAAGGGC
CGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGA
ACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAAAAGCGCCT
GGCAGTTCGCTTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCGGCCT
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGACACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC
CTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT
GACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA
TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
TGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
GACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCACCACCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC
GGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCCTAGAGTCGA

图 6

YW259.9 DNA:

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGCGT
ACGCTGAGGTTTACGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGG
GGCTCACTCCGTTTGTCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCTTCAGTAGTAACT
ATATTAGCTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGT
GGGATTAATCCTACTGGCGGTTATACTTACTATGCCCATAGCGTCAAGGGC
CGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGA
ACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAAGCGTGT
GGGTGTTTCGATTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCGGCCT
CCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC
CTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT
GACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA
TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
TGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC
GGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCCTAGAGTCGA

图 7

YW259.12 DNA:

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGCGT
ACGCTGAGGTTTACGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGG
GGCTCACTCCGTTTGTCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCTTCACTAATTCCT
ATATTAGCTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGT
GGGATTTCTCCTTCTGGCGGTTCTACTTACTATGCCGATAGCGTCAAGGGC
CGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGA
ACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAAATCGGTCTG
GGCGTTCGCTTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCGGCCTC
CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC
TGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC
CGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG
ACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACAGCACCTGAACTCCTGGGGGG
ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGC
TCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG
CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG
GAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC
CTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCCTAGAGTCGA

图 8

YW259.2蛋白质:

MGWSCILFLVATATGAYAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNSYIS
WVRQAPGKGLEWVGGIYPSGGNTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR
AEDTAVYYCAKSAWQFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 9

YW259.9蛋白质:

MGWSCIIILFLVATATGAYAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNYIS
WVRQAPGKGLEWVGGINPTGGYTYAHSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR
AEDTAVYYCARSVWVFDYWGQGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 10

YW259.12蛋白质:

MGWSCIIILFLVATATGAYAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNSYIS
WVRQAPGKGLEWVGGISPSGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR
AEDTAVYYCAKSVWAFAYWGQGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 11

蛋白质(所有的轻链)

MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW
YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ
QSYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

图 12

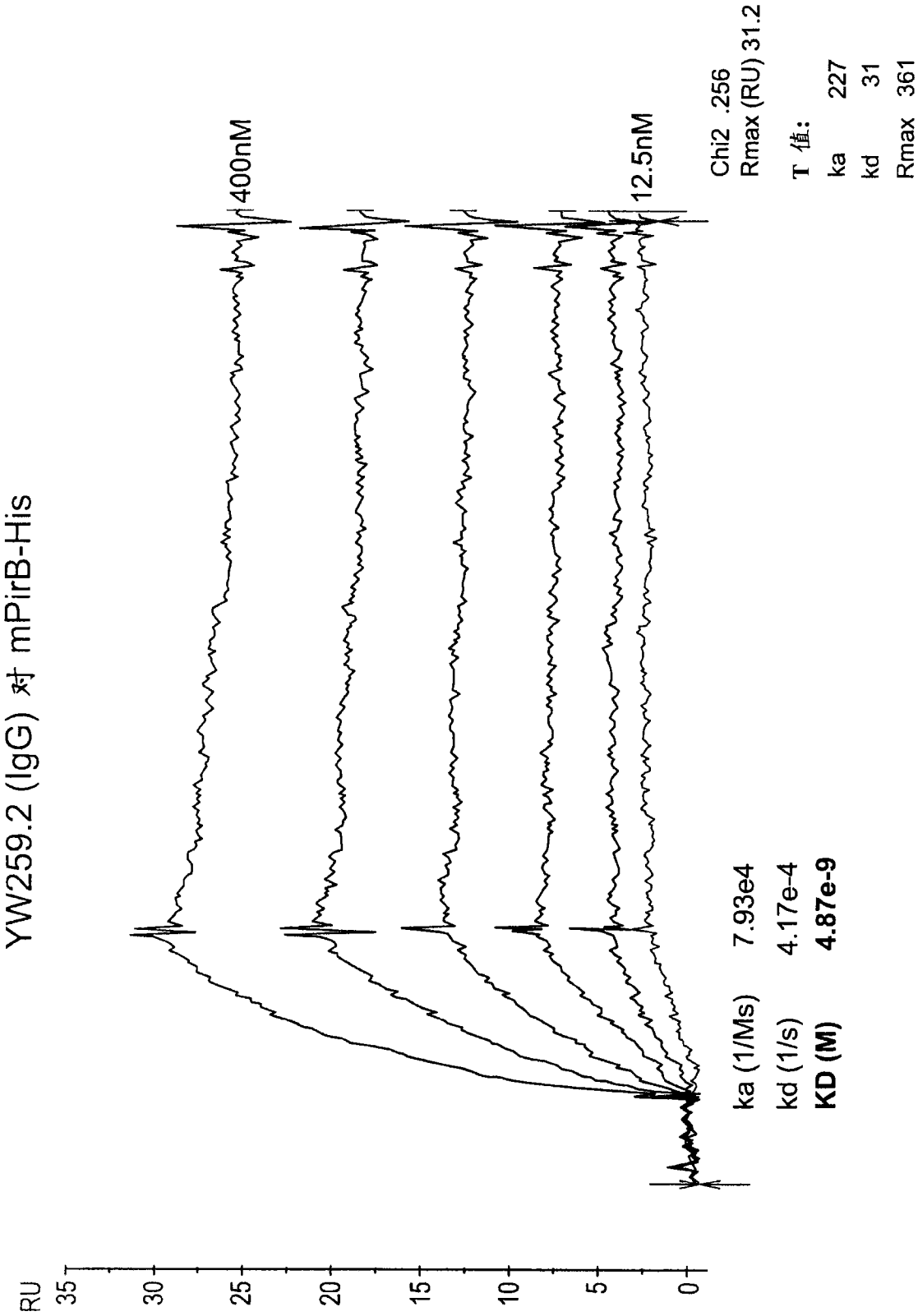


图 13

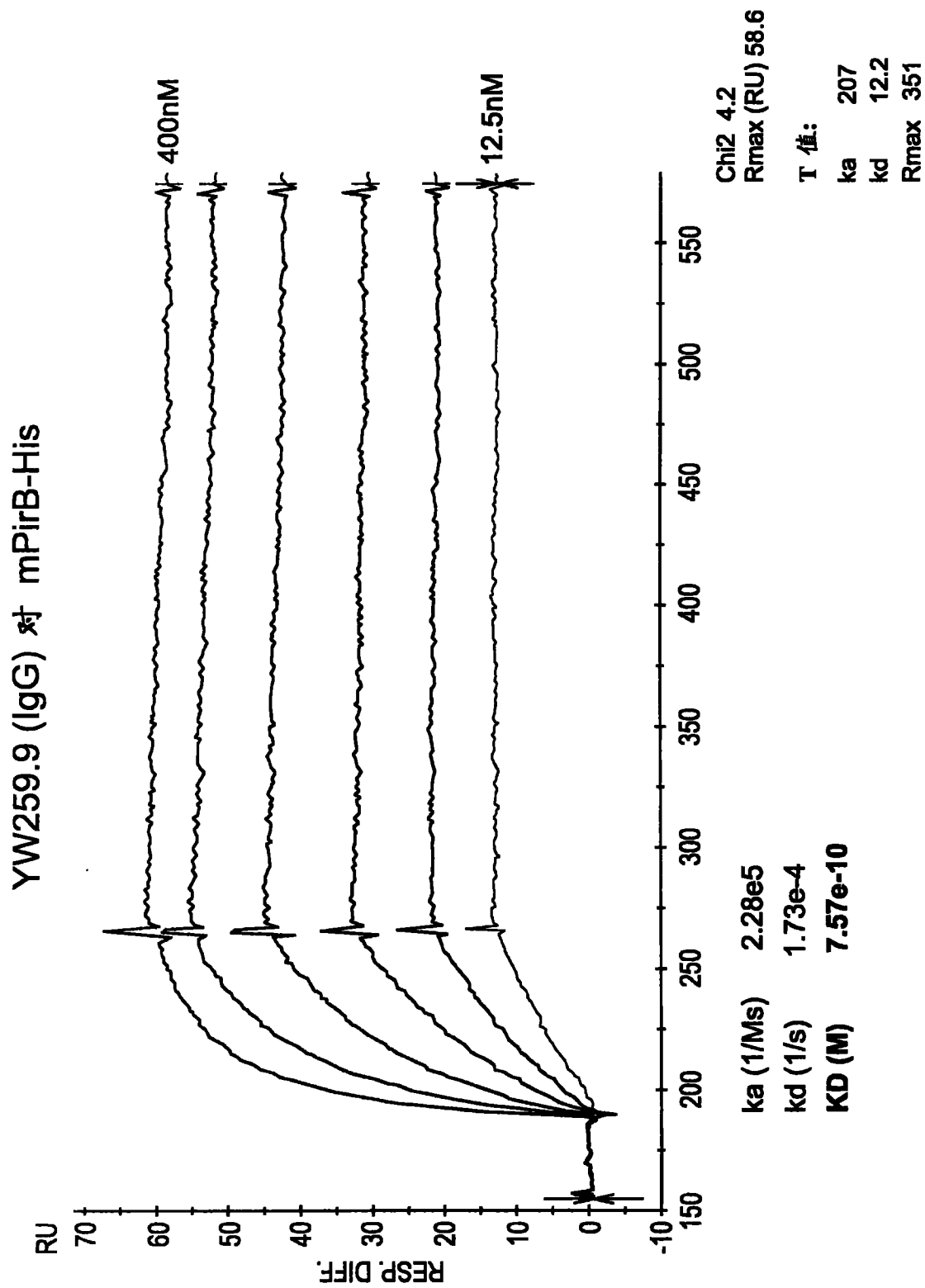


图 14

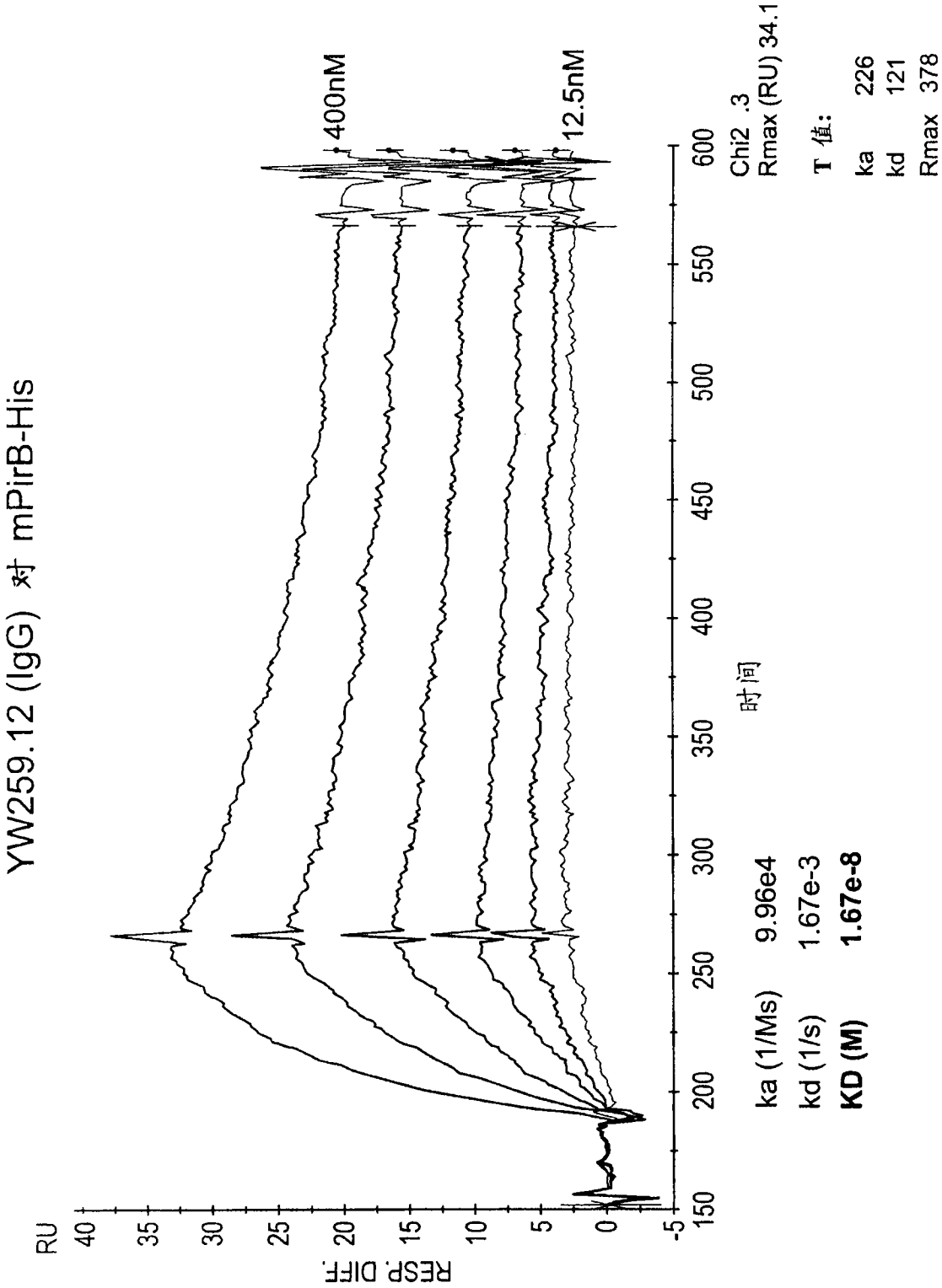


图 15

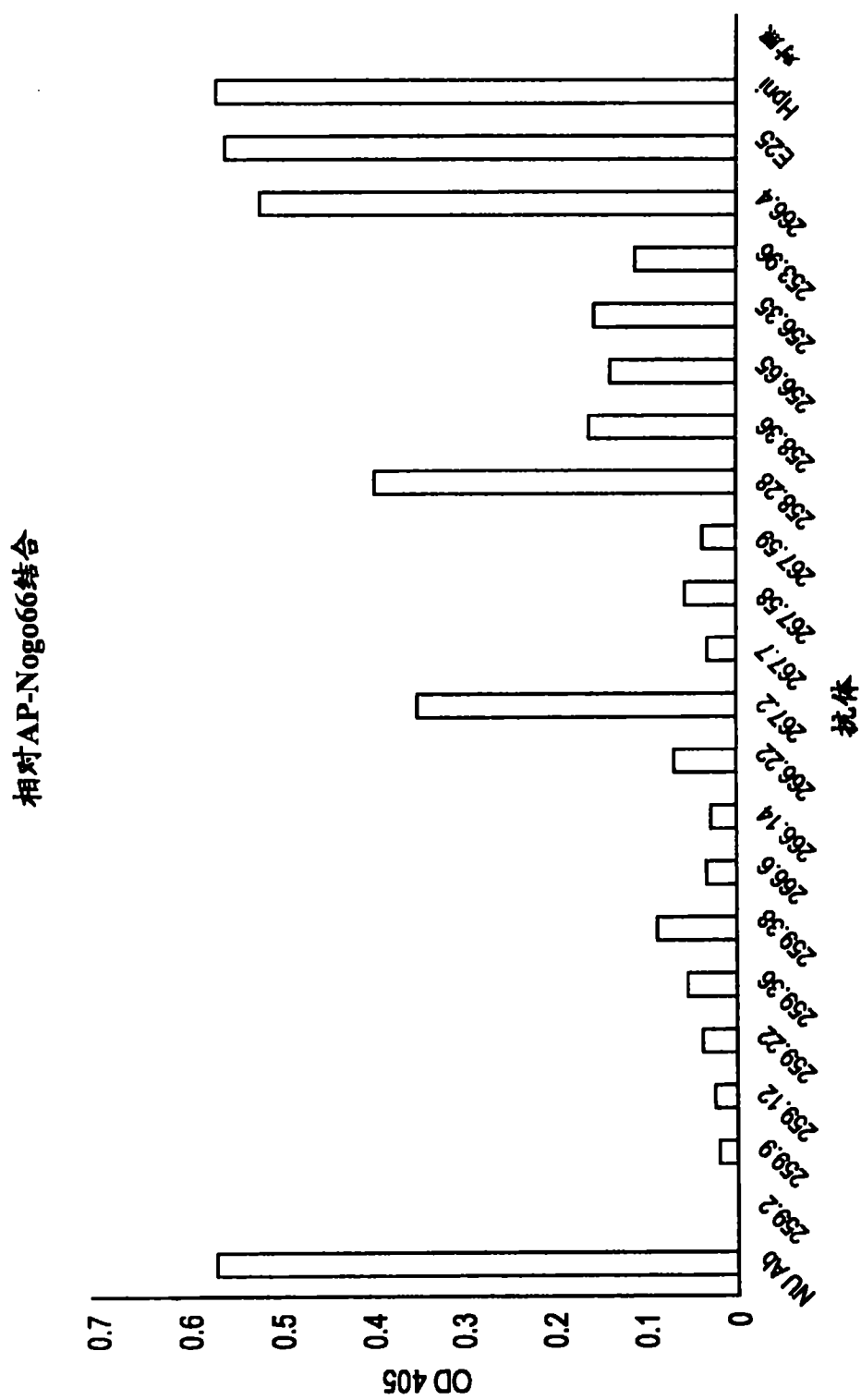


图 16

YW259/抗mPirB重链序列比对

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.9	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.12	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R

Kabat#	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39									
hum III	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q									
	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	S	Y	I	S	W	V	R	Q									
	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	N	Y	I	S	W	V	R	Q									
	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	T	N	S	Y	I	S	W	V	R	Q									
										Chothia - CDR H1										接触 - CDR H1									
										Kabat - CDR H1																			

图 17A

	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T
hum III	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T
YW259.2	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T
YW259.9	Y	A	H	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T
YW259.12	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T

65

YW259/抗mPirB重链序列比对

Kabat#	78	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93
hum III	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
YW259.2	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
YW259.9	A		L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
YW259.12	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A

Kabat#	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	101	102	103	104	105	106	107
	Kabat - CDR H3																				
	Chothia - CDR H3																				
	接触 - CDR H3																				
hum III	R	G				-	-	-	-	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T
YW259.2	K	S	A	W	Q									F	A	Y	W	G	Q	G	T
YW259.9	R	S	V	W	V									F	D	Y	W	G	Q	G	T
YW259.12	K	S	V	W	A									F	A	Y	W	G	Q	G	T

图 17C

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
huKI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T
YW259.2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T
YW259.9	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T
YW259.12	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T

Kabat#	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
	Kabat - CDR L1																					
	Chothia - CDR L1																					
												接触-CDRL1										

	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P
huKI	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P
YW259.2	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P
YW259.9	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P
YW259.12	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P

图 18A

		YW259/抗mPirB轻链序列比对																					
Kabat#		45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
		Kab - CDR L2																					
huKI		Chothia - CDR L2																					
		接触 - CDR L2																					
		K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G
YW259.2		K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G
YW259.9		K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G
YW259.12		K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G
Kabat#		67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	
		huKI																					
		S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	
YW259.2		S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	
YW259.9		S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	
YW259.12		S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	

图 18B

YW259/抗mPirB轻链序列比对

Kabat#	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
	Kabab - CDR L3																				
	Chothia - CDR L3																				
	接触 - CDR L3																				
huKl	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
YW259.2	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
YW259.9	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
YW259.12	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

图 18C

C1qTNF5抑制背根神经节(DRG)神经元的神经突向外长出,
而且此抑制在PirB被阻断时降低

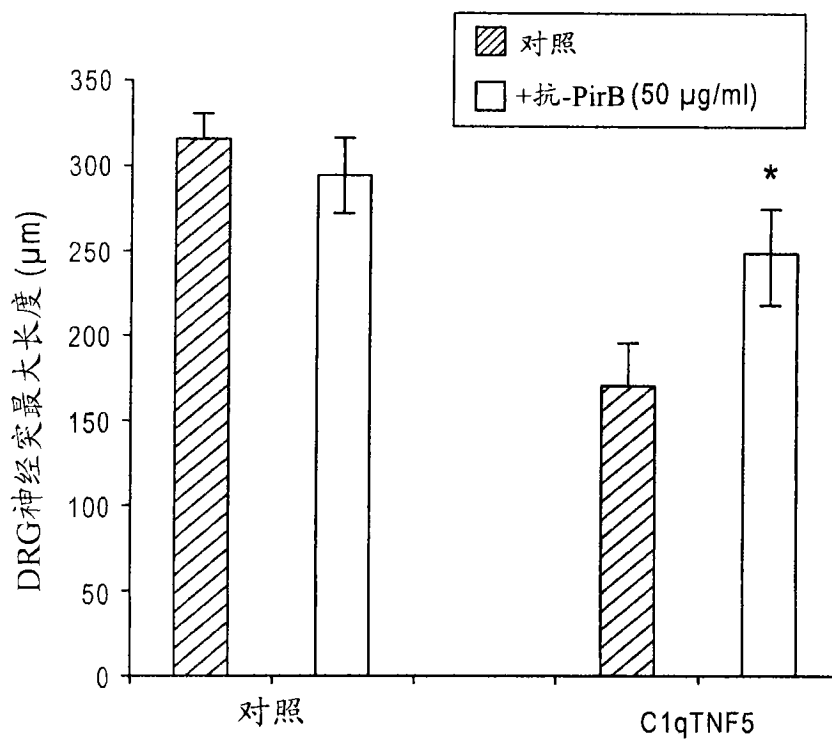


图 19