



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102014958 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 13

(21) 申请号 200980115521. 9

A61P 29/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 04. 28

C07K 16/28 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C07K 16/24 (2006. 01)

61/125, 880 2008. 04. 29 US

A01K 67/027 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 10. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/055129 2009. 04. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02009/133103 EN 2009. 11. 05

(71) 申请人 米克罗麦特股份公司

地址 德国慕尼黑

(72) 发明人 克里斯蒂娜·普莱特-齐贝克

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理

有限公司 11112

代理人 丁业平 张天舒

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

权利要求书 5 页 说明书 29 页 序列表 42 页
附图 6 页

(54) 发明名称

用于治疗 GM-CSF 和 IL-17 抑制剂

(57) 摘要

本发明涉及一种在患有炎症疾病的个体中治疗炎症疾病的方法, 所述方法包含对所述个体施予一种中和 GM-CSF 的化合物和一种中和 IL-17 的化合物。

1. 一种在患有炎症疾病的个体中治疗炎症疾病的方法，所述方法包括对所述个体施予：

- (a) 一种中和 GM-CSF 的化合物；以及
- (b) 一种中和 IL-17 的化合物。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中：

- (1) 在施予所述中和 IL-17 的化合物之前施予所述中和 GM-CSF 的化合物；
- (2) 在施予所述中和 IL-17 的化合物之后施予所述中和 GM-CSF 的化合物；或
- (3) 同时施予所述中和 GM-CSF 的化合物和所述特异性结合并且中和 IL-17 的化合物。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述个体为人或非人类灵长类动物。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述中和 GM-CSF 的化合物选自由多肽、模拟肽、核酸或小分子组成的组。

5. 如权利要求 4 所述的方法，其中所述多肽是结合 GM-CSF 或 GM-CSF 受体的抗体或其功能片段。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其中所述抗体为人类单克隆抗体或其功能片段。

7. 如权利要求 5 所述的方法，其中所述抗体或其功能片段结合至 GM-CSF 的表位，优选至 GM-CSF 的不连续表位，所述表位优选包含氨基酸第 23-27 位 (RLLN) 和 / 或氨基酸第 65-77 位 (GLR/QGSLTKLKGPL)。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其中所述不连续表位进一步包括：

- (a) 氨基酸第 28-31 位 (LSRD)；
- (b) 氨基酸第 32-33 位 (TA) 和 / 或
- (c) 氨基酸第 21-22 位 (EA)。

9. 如权利要求 6 所述的方法，其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其重链可变区包含 CDR3，其中该 CDR3 包含这样的氨基酸序列，该氨基酸序列选自由 SEQ ID NOs：1-13 和 56 中任一所示的氨基酸序列组成的组。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中任意一个所述的重链可变区 CDR3 序列与 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列和 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列一起存在于重链可变区。

11. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区中包含 CDR1、CDR2 和 CDR3，其中该 CDR1 包含 SEQ ID NO：16 所示氨基酸序列，该 CDR2 包含 SEQ ID NO：17 所示氨基酸序列，并且该 CDR3 包含 SEQ ID NO：18 所示氨基酸序列。

12. 如权利要求 11 所述的方法，其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区进一步包含如 SEQ ID NOs：19、54 和 55 中任一所示的氨基酸序列。

13. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其重链可变区包含如 SEQ ID NOs：20-33、52 和 53 中任一所示的氨基酸序列。

14. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区包含 CDR1、CDR2 和 CDR3，其中该 CDR1 包含如 SEQ ID NO：16 所示的氨基酸序列，该 CDR2 具有如 SEQ ID NO：17 所示的氨基酸序列，该 CDR3 具有如 SEQ ID NO：18 所示

的氨基酸序列；并且在其重链可变区包含 CDR1 区、CDR2 区和 CDR3，其中该 CDR1 区包含如 SEQ ID NO：14 所示的氨基酸序列，该 CDR2 区具有如 SEQ ID NO：15 所示的氨基酸序列，该 CDR3 具有如 SEQ ID NOs：1-13 和 56 中任一所示的氨基酸序列。

15. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述人类单克隆抗体或其功能片段包含如 SEQ ID NO：34 中所示的轻链氨基酸序列，并且包含选自如 SEQ ID NOs：35-48 中任一所示的重链氨基酸序列。

16. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述人类单克隆抗体或其功能片段包含与如 SEQ ID NOs：1-48 和 52-56 中任一所示的氨基酸序列各自有至少 70% 同源性的氨基酸序列。

17. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述中和 IL-17 的化合物选自由多肽、模拟肽、核酸或小分子组成的组。

18. 如权利要求 17 所述的方法，其中所述多肽为结合 IL-17 或 IL-17 受体的抗体或其功能片段。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其中所述抗体和其功能片段分别是人类单克隆抗体和其功能片段。

20. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述炎性疾病选自由类风湿性关节炎 (RA) (包括对用 TNF- α 中和剂治疗有抗药性的 RA)、哮喘、多发性硬化症 (MS)、慢性阻碍性肺病 (COPD)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、特发性肺纤维化 (IPF)、炎性肠道疾病 (IBD)、克罗恩氏病、葡萄膜炎、黄斑变性、结肠炎、银屑病、沃勒变性、抗磷脂抗体综合征 (APS)、急性冠脉综合征、再狭窄、动脉粥样硬化、复发性多发软骨炎 (RP)、急性或慢性肝炎、失败的整形外科植入、血管球性肾炎、狼疮和自身免疫性疾病组成的组。

21. 一种在患有肿瘤性疾病的个体中治疗肿瘤性疾病的方法，其中所述方法包括对所述个体施予：

(a) 一种中和 GM-CSF 的化合物；和

(b) 一种中和 IL-17 的化合物。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其中：

(a) 在施予所述中和 IL-17 的化合物之前施予所述中和 GM-CSF 的化合物；

(b) 在施予所述中和 IL-17 的化合物之后施予所述中和 GM-CSF 的化合物；或

(c) 同时施予所述中和 GM-CSF 的化合物和所述中和 IL-17 的化合物。

23. 如权利要求 21 所述的方法，其中所述个体为人或非人类灵长类动物。

24. 如权利要求 21 所述的方法，其中所述中和 GM-CSF 的化合物选自由多肽、模拟肽、核酸或小分子组成的组。

25. 如权利要求 24 所述的方法，其中所述多肽是结合 GM-CSF 或 GM-CSF 受体的抗体或其功能片段。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其中所述抗体和其功能片段分别为人类单克隆抗体和其功能片段。

27. 如权利要求 25 所述的方法，其中所述抗体或其功能片段结合至 GM-CSF 的表位，优选至 GM-CSF 的不连续表位，所述表位优选包含氨基酸第 23-27 位 (RRLLN) 和/或氨基酸第 65-77 位 (GLR/QGSLTKLKGPL)。

28. 如权利要求 27 所述的方法，其中所述不连续表位进一步包含：

- (a) 氨基酸第 28-31 位 (LSRD) ;
- (b) 氨基酸第 32-33 位 (TA) 和 / 或
- (c) 氨基酸第 21-22 位 (EA)。

29. 如权利要求 26 所述的方法, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其重链可变区包含 CDR3, 其中该 CDR3 包含这样的氨基酸序列, 该氨基酸序列选自 SEQ ID NOs : 1-13 和 56 中任一所示的氨基酸序列组成的组。

30. 如权利要求 29 所述的方法, 其中任意一个所述的重链可变区 CDR3 序列与 SEQ ID NO : 14 所示的重链可变区 CDR1 序列和 SEQ ID NO : 15 所示的重链可变区 CDR2 序列一起存在于重链可变区。

31. 如权利要求 29 所述的方法, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区中包含 CDR1、CDR2 和 CDR3, 其中该 CDR1 包含 SEQ ID NO : 16 所示氨基酸序列, 该 CDR2 包含 SEQ ID NO : 17 所示氨基酸序列, 并且该 CDR3 包含 SEQ ID NO : 18 所示氨基酸序列。

32. 如权利要求 31 所述的方法, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区进一步包含如 SEQ ID NOs : 19、54 和 55 中任一所示的氨基酸序列。

33. 如权利要求 29 所述的方法, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其重链可变区包含如 SEQ ID NOs : 20-33、52 和 53 中任一所示的氨基酸序列。

34. 如权利要求 29 所述的方法, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区包含 CDR1、CDR2 和 CDR3, 其中该 CDR1 包含如 SEQ ID NO : 16 所示的氨基酸序列, 该 CDR2 具有如 SEQ ID NO : 17 所示的氨基酸序列, 该 CDR3 具有如 SEQ ID NO : 18 所示的氨基酸序列; 并且在其重链可变区包含 CDR1 区、CDR2 区和 CDR3, 其中该 CDR1 区包含如 SEQ ID NO : 14 所示的氨基酸序列, 该 CDR2 区具有如 SEQ ID NO : 15 所示的氨基酸序列, 该 CDR3 具有如 SEQ ID NOs : 1-13 和 56 中任一所示的氨基酸序列。

35. 如权利要求 29 所述的方法, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的轻链氨基酸序列, 并且包含选自如 SEQ ID NOs : 35-48 中任一所示的重链氨基酸序列。

36. 如权利要求 29 所述的方法, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段包含与如 SEQ ID NOs : 1-48 和 52-56 中任一所示的氨基酸序列各自有至少 70% 同源性的氨基酸序列。

37. 如权利要求 21 所述的方法, 其中所述中和 IL-17 的化合物选自由多肽、模拟肽、核酸或小分子组成的组。

38. 如权利要求 37 所述的方法, 其中所述多肽为结合 IL-17 或 IL-17 受体的抗体或其功能片段。

39. 如权利要求 38 所述的方法, 其中所述抗体是人类单克隆抗体或其功能片段。

40. 如权利要求 21 所述的方法, 其中所述肿瘤性疾病为癌症。

41. 如权利要求 40 所述的方法, 其中所述癌症为白血病、多发性骨髓瘤、胃癌或皮肤癌。

42. 一种药物组合物, 该组合物包含:

- (a) 一种中和 GM-CSF 的化合物; 和
- (b) 一种中和 IL-17 的化合物。

43. 如权利要求 42 所述的药物组合物，其中所述中和 GM-CSF 的化合物选自多肽、模拟肽、核酸分子或小分子组成的组。

44. 如权利要求 43 所述的药物组合物，其中所述多肽是结合 GM-CSF 或 GM-CSF 受体的抗体或其功能片段。

45. 如权利要求 44 所述的药物组合物，其中所述抗体为人类单克隆抗体或其功能片段。

46. 如权利要求 44 或 45 所述的药物组合物，其中所述抗体或其功能片段结合至包含氨基酸第 23-27 位 (RRLN) 和 / 或氨基酸第 65-77 位 (GLR/QGSLTKLKGPL) 的 GM-CSF 的表位，该表位优选为 GM-CSF 的不连续表位。

47. 如权利要求 46 所述的药物组合物，其中所述不连续表位进一步包括：

(a) 氨基酸第 28-31 位 (LSRD)；

(b) 氨基酸第 32-33 位 (TA) 和 / 或

(c) 氨基酸第 21-22 位 (EA)。

48. 如权利要求 44 所述的药物组合物，其中所述抗体或其功能片段在其重链可变区包含 CDR3，其中该 CDR3 包含这样的氨基酸序列，该氨基酸序列选自 SEQ ID NOs：1-13 和 56 中任一所示的氨基酸序列组成的组。

49. 如权利要求 48 所述的药物组合物，其中任意一个所述的重链可变区 CDR3 序列与 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列和 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列一起存在于重链可变区。

50. 如权利要求 48 所述的药物组合物，其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区中包含 CDR1、CDR2 和 CDR3，其中该 CDR1 包含 SEQ ID NO：16 所示氨基酸序列，该 CDR2 包含 SEQ ID NO：17 所示氨基酸序列，并且该 CDR3 包含 SEQ ID NO：18 所示氨基酸序列。

51. 如权利要求 50 所述的药物组合物，其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区进一步包含如 SEQ ID NOs：19、54 和 55 中任一所示的氨基酸序列。

52. 如权利要求 48 所述的药物组合物，其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其重链可变区包含如 SEQ ID NOs：20-33、52、和 53 中任一所示的氨基酸序列。

53. 如权利要求 48 所述的药物组合物，其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区包含 CDR1、CDR2 和 CDR3，其中该 CDR1 包含如 SEQ ID NO：16 所示的氨基酸序列，该 CDR2 具有如 SEQ ID NO：17 所示的氨基酸序列，该 CDR3 具有如 SEQ ID NO：18 所示的氨基酸序列；并且在其重链可变区包含 CDR1 区、CDR2 区和 CDR3，其中该 CDR1 区包含如 SEQ ID NO：14 所示的氨基酸序列，该 CDR2 区具有如 SEQ ID NO：15 所示的氨基酸序列，该 CDR3 具有如 SEQ ID NOs：1-13 或 56 中任一所示的氨基酸序列。

54. 如权利要求 48 所述的药物组合物，其中所述人类单克隆抗体或其功能片段包含如 SEQ ID NO：34 中所示的轻链氨基酸序列，并且包含选自如 SEQ ID NOs：35-48 中任一所示的重链氨基酸序列。

55. 如权利要求 48 所述的药物组合物，其中所述人类单克隆抗体或其功能片段包含与如 SEQ ID NOs：1-48 和 52-56 中任一所示的氨基酸序列各自有至少 70% 同源性的氨基酸

序列。

56. 如权利要求 42 所述的药物组合物，其中所述中和 IL-17 的化合物选自由多肽、模拟肽、核酸分子或小分子组成的组。

57. 如权利要求 56 所述的药物组合物，其中所述多肽为结合 IL-17 或 IL-17 受体的抗体或其功能片段。

58. 如权利要求 57 所述的药物组合物，其中所述抗体 f 是人类单克隆抗体或其功能片段。

59. 如权利要求 42 所述的药物组合物，其中所述组合物用于治疗炎性疾病。

60. 如权利要求 59 所述的药物组合物，其中所述炎性疾病选自由类风湿性关节炎 (RA) (包括对用 TNF- α 中和剂治疗有抗药性的 RA)、哮喘、多发性硬化症 (MS)、慢性阻碍性肺病 (COPD)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、特发性肺纤维化 (IPF)、炎症肠道疾病 (IBD)、克罗恩氏病、葡萄膜炎、黄斑变性、结肠炎、银屑病、沃勒变性、抗磷脂抗体综合征 (APS)、急性冠脉综合征、再狭窄、动脉粥样硬化、复发性多发软骨炎 (RP)、急性或慢性肝炎、失败的整形外科植入、血管球性肾炎、狼疮和自身免疫性疾病组成的组。

61. 如权利要求 42 所述的药物组合物，其中所述组合物用于治疗肿瘤性疾病。

62. 如权利要求 61 所述的药物组合物，其中所述肿瘤性疾病为癌症。

63. 如权利要求 62 所述的药物组合物，其中所述癌症为白血病、多发性骨髓瘤、胃癌或皮肤癌。

用于治疗 GM-CSF 和 IL-17 抑制剂

[0001] 本发明涉及炎症性疾病的治疗。本发明的另一方面涉及肿瘤性疾病（如癌症）的治疗。本发明的另一方面涉及一种用于治疗炎性和 / 或肿瘤性疾病的药物组合物。根据本申请提交地的法律，本发明同样可能涉及两种特殊物质在制备用于治疗上述疾病的药物中的用途。

[0002] 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)，最初被确定作为一种造血细胞生长因子，最近被表明为一种在炎症和自身免疫中的重要细胞因子。在包括过敏和银屑病患者、关节炎和哮喘患者中的各种炎症部位中检测到高水平的 GM-CSF mRNA 或蛋白质。

[0003] 在过去的几年来，许多体内研究表明，通过中和抗体阻断 GM-CSF 能够在一系列炎症模型中（包括在关节炎实验性自身免疫性脑炎、银屑病和肺部疾病模型中）预防甚至治愈促炎性疾病。GM-CSF 通过刺激成熟中性粒细胞和巨噬细胞的增殖和活化，在先天免疫中起着重要的作用。另外，已证明 GM-CSF 通过体外调节树突细胞的分化和成熟在抗原呈递反应中的关键作用。已有报导 GM-CSF 在体内通过人类外周血单核细胞 (PBMC)、T 细胞和抗原呈递细胞 (APC) 优先诱导 I 型促炎性细胞因子。

[0004] 白介素 17 (IL-17) 是一类获得性免疫系统细胞因子家族，目前主要由六个成员组成，从 IL-17A 到 IL-17F。据描述，IL-17 与 IL-17 受体结合，IL-17 受体家族目前包含五个成员，IL-17RA 到 IL-17RE，它们相互之间共享相当大的序列同源性。IL-17 受体家族成员是 I 型跨膜蛋白。目前人们一般认可 IL-17 受体在所有免疫系统细胞中大量表达，并且对含 IL-17A、IL-17F 和 IL-17D 的不同细胞类型进行刺激可以诱导其它细胞因子如 IL-1 β 、TNF α 和 IL-6 和趋化因子 IL-8 和 MIP-1 α 的表达。与其受体相反，IL-17 主要由近来发现的 Th17 细胞产生，并且其表达经常与感染和自身免疫相关。

[0005] 类风湿性关节炎 (RA) 是一种慢性的、炎性和系统性自身免疫疾病。尽管 RA 的病因和发病机制仍然不完全清楚，这种疾病被表征为是侵袭性滑膜增生（血管翳形成）和炎症（滑膜炎），这导致渐进性关节软骨和骨骼的破坏。RA 是由属于先天性和获得性免疫系统中的许多细胞类型和因子之间的复杂相互作用导致的。例如，已报导在 RA 病人中观察到不同细胞因子表达的普遍提高，如 IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-13、IFN γ 、G-CSF、GM-CSF、MCP-1 和 MIP-1 β 与对照组相比有高得多的表达水平。此外，已经确认 IL-1、TNF α 和 IL-18 是 RA 中刺激 T 细胞的重要炎性因子。已发表报导提出了一种在 RA 中 GM-CSF 的致病作用的假说。支持该假说的证据如下：(i) GM-CSF 是在 RA 病人的滑膜中产生，并且可以在病人的滑液中检测到该细胞因子表达水平的增加；(ii) 在胶原诱导的关节炎小鼠模型 (CIA) 中，使用中和抗 GM-CSF 单克隆抗体 (mAb) 可以降低疾病的严重程度；(iii) GM-CSF 缺陷小鼠对于胶原和 mBSA 诱导疾病的敏感性降低；(iv) 在 CIA 小鼠中注射重组 GM-CSF 可以使疾病恶化；(v) 化疗后接受 GM-CSF 的 RA 患者表现出显示关节炎严重程度的潮红。

[0006] 除了上述已鉴定的不同细胞因子，IL-17 也显示与 RA 病理学相关，因为 IL-17 在 RA 滑膜和滑液中表达水平提高，并且在实验模型中，IL-17 的阻断可以减轻关节炎中的炎症和破坏。另外，IL-17 基因缺陷小鼠表现出胶原诱导关节炎的抑制，并且当将

IL-17^{-/-}小鼠与 IL-1Ra^{-/-}小鼠交配时, IL-17^{-/-}小鼠完全缺乏在 IL-1 受体拮抗剂缺陷 Balb/c 小鼠中通常看到的多关节炎自发启动。 还已报导在 小鼠体内试验中, IL-17 加上 TNF α 的局部共同刺激可以通过影响中性粒细胞的招募和生存, 导致中性粒细胞在呼吸道中的 GM-CSF 依赖性聚集。

[0007] 已在小鼠中使用的用于研究人的类 RA 疾病的模型之一为链球菌细胞壁 (SCW) 关节炎。 在所述模型中, 向小鼠的一个膝关节中通过关节内 (i.a.) 注射细菌细胞壁片段可以同时诱导急性疾病和慢性复发性关节炎。 通过向幼龄小鼠的膝关节中一次注射 SCW 片段, 可以获得先天免疫起主要致病作用的急性关节炎。 通过重复关节内注射 SCW 片段, 可以建立慢性复发性关节炎模型, 其中获得性免疫系统中的介质逐渐取代了先天免疫反应的最初优势。 胶原诱导的关节炎 (CIA) 是另一种广泛接受的关节炎模型, 其基于对抗软骨胶原 II 型 (CII) 的 T 细胞和抗体介导的自身免疫活性。 该小鼠模型与人 RA 具有一些临床、组织病理和免疫原性上共同的特点, 其主要特征为在滑液炎症之后有严重的软骨及骨组织的破坏。 本发明人在 TNF α 无关的慢性 SCW 炎症模型和 TNF α 依赖的 CIA 模型中探索了中和 GM-CSF 的治疗效果。 另外, 他们也研究了通过抑制 GM-CSF 和 IL-17 通路阻断先天性和获得性免疫系统的影响。 这是通过在 IL-17 受体基因缺陷小鼠 (IL-17R-KO 小鼠) 中中和 GM-CSF, 或是通过使用中和 GM-CSF 和 IL-17 的化合物进行联合治疗来执行的。 发明人意外观察到, 通过联合阻断 GM-CSF 和 IL-17 通路, 两种炎性疾病均能以高效方式治疗。 在 CIA 模型中, 联合施予 GM-CSF 抑制化合物和 IL-17 抑制化合物可以极大降低胶原诱导的关节炎的临床评分, 而单独施予给药 GM-CSF 抑制化合物或 IL-17 抑制化合物不能显著减轻关节炎的严重程度。 此外, 详细的组织学分析表明, 对关节炎症和软骨及骨破坏的联合治疗有着协同效应。 因此, 对两条通路的联合阻断可以导致对炎症和关节破坏的高效保护。 这些结果特别让人意外, 这是因为直到最近还假设 GM-CSF 处于 IL-17 的下游 (参见文献 Kawaguchi M.et al., J.Allergy Clin. Immunol.114(2004), 444-450 ; Starnes T.et al., The Journal of Immunology 169(2002), 642-646 ; Laan M.et al., Eur.Respir.J.21(2003), 387-393)。 因此, 人们尚未预期到结合了中和 GM-CSF 和 IL-17 的化合物的治疗会有额外或协同的效果。 本申请首次表明了体内联合阻断 IL-17 和 GM-CSF 的有益效果。 本申请所示数据强烈支持这样一个观点, 抗 GM-CSF 和抗 IL-17 的联合治疗不只在 RA 中同时还在其它自身免疫和炎性疾病 (如下文所述定义) 情况中有非常重大的治疗效果。

[0008] 因此, 本发明所述的药物方法和手段特别针对关节炎的治疗, 但也可能用于其它炎性疾病, 包括多发性硬化症、银屑病和肺部炎症如哮喘和慢性阻塞性肺病 (COPD)。

[0009] 定义

[0010] 本文所用术语“个体”指的是动物。 术语“动物”包括但不限于哺乳动物, 如实验性动物 (啮齿动物, 如大鼠、豚鼠、仓鼠或小鼠; 非人类灵长类动物, 如食蟹猴或猕猴)、家畜或宠物 (如狗或猫)、农场或农业动物 (如牛、绵羊、山羊和猪)、和/或人。 优选地, 所述动物为人或非人类灵长类动物。

[0011] 本文所用术语“GM-CSF”代指人 (智人 (Homo sapiens)) 或非人类灵长类动物的 GM-CSF (如文献中定义), 并且包括其变体 (同系物)。 本术语也包括人和非人类灵

长类动物的 GM-CSF 受体及其变体（同系物）。特别优选的非人类灵长类 GM-CSF 或非人类灵长类 GM-CSF 受体的变体（同系物）包括长臂猿（*nomascus concolor*，也称为西黑冠长臂猿）和猕猴属家族（如恒河猴（*Macaca mulatta*）和食蟹猴（*Macaca fascicularis*）的 GM-CSF 受体及其变体（同系物）。

[0012] 本文所用术语“结合 GM-CSF 或 GM-CSF 受体的抗体”或其功能片段，包括具有结合动物 GM-CSF 或 GM-CSF 受体能力的任何抗体或抗体片段。特别地，它包括在人类和至少一种上述猴子物种中表现出交叉反应性（在结合 GM-CSF 或 GM-CSF 受体方面）的任何抗体或其功能片段。例如，所述抗体或其功能片段能够结合（和中和）人类 GM-CSF 和食蟹猴（*Macaca fascicularis*）GM-CSF。这对于要向人类个体治疗性施予抗体分子是尤其有益的，这是因为这种抗体通常在进行行政审批前必须经过大量试验，其中某些早期试验涉及非人动物物种。进行这些试验时，一般希望用与人遗传上高度相似的非人物种（如，非人类灵长类如食蟹猴），这是因为由此获得的结果一般将高度预示出将相同分子向人给药时可预期的相应结果。可是，这种基于动物试验的预测能力至少部分取决于分子的相似性，并且如果由于物种交叉反应性可将相同的治疗分子向人和动物给药，其预测能力就非常高。相应地，如果抗体分子对人和其它物种中的相同抗原能交叉反应，就可以使用在人和其它物种（例如上述猴物种中的一种）中相同的抗体分子进行试验。这增加了试验本身的效率以及这些试验对这些抗体在人（从治疗角度最终兴趣所在的物种）中行为的预测能力。

[0013] 本文所用术语“结合 GM-CSF 或 GM-CSF 受体的抗体”还包括具有这种结合能力的 GM-CSF 或 GM-CSF 受体的单克隆抗体或其功能片段。

[0014] 本发明第一个方面涉及一种在患有炎症疾病的个体中治疗炎症性疾病的方法，所述方法包含施予中和 GM-CSF 的化合物（简述为 GM-CSF 抑制化合物）和中和 IL-17 的化合物（简述为 IL-17 抑制化合物）。根据技术人员公知的参数，所述化合物可为一种组合物的部分，或者它们可为分开的药物。

[0015] 所述方法的优选实施方案如下：

[0016] (a) 一种方法，其中在施予中和 IL-17 的化合物之前或之后对个体施予中和 GM-CSF 的化合物，或者同时施予两种化合物；

[0017] (b) 根据本发明的第一个方面或 (a) 所述的方法，其中所述治疗个体为上述定义的动物；

[0018] (c) 根据本发明的第一个方面或 (a) 或 (b) 的方法，其中 GM-CSF 中和化合物为多肽、模拟肽、核酸或小分子；

[0019] (d) 根据 (c) 所述的方法，其中所述多肽为结合 GM-CSF 或 GM-CSF 受体的抗体或其功能片段；优选地，所述抗体为单克隆抗体或其功能片段；

[0020] (e) 根据 (d) 所述的方法，其中所述抗体为人类单克隆抗体或其功能片段；

[0021] (f) 根据 (d) 或 (e) 所述的方法，其中所述抗体或其功能片段结合于人类和非人类灵长类动物 GM-CSF 的表位。所述表位优选为人类和非人类灵长类动物 GM-CSF 的不连续表位，所述表位优选为包含氨基酸第 23-27 位 (RRLLN) 和 / 或氨基酸第 65-77 位 (GLR/QGSLTKLKGPL)。第 65-77 位氨基酸序列段中第 67 位的变异性反映出在作为一方面的人和长臂猿 GM-CSF (其中第 67 位为 R) 与作为另一方面的猕猴科猴子（例如食蟹

猴和恒河猴)GM-CSF(其中第67位为Q)之间GM-CSF的这个位置的异质性;

[0022] (g) 根据(f)所述的方法,其中所述不连续表位进一步包含氨基酸第28-31位(LSRD),氨基酸第32-33位(TA)和/或氨基酸第21-22位(EA);

[0023] (h) 根据(e)、(f)和(g)中任一所述的方法,其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其重链可变区包含CDR3,其中CDR3包含SEQ ID NOs: 1-13或56所示氨基酸序列中的任一个;

[0024] (i) 根据(h)所述的方法,其中所述重链可变区CDR3序列中的任一个与SEQ ID NO: 14所示重链可变区CDR1序列和SEQ ID NO: 15所示重链可变区CDR2序列一起存在于重链可变区;

[0025] (j) 根据(h)或(i)所述的方法,其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区中包含CDR1、CDR2和CDR3,其中CDR1包含SEQ ID NO: 16所示氨基酸序列,CDR2包含SEQ ID NO: 17所示氨基酸序列,CDR3包含SEQ ID NO: 18所示氨基酸序列;

[0026] (k) 根据(j)所述的方法,其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区进一步包含如SEQ ID NOs: 19、54和55中任一所示的氨基酸序列;

[0027] (l) 根据(h)或(i)所述的方法,其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其重链可变区包含如SEQ ID NOs: 20-33、52和53中任一所示的氨基酸序列;

[0028] (m) 根据(h)到(l)任一所述的方法,其中人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区包含CDR1、CDR2和CDR3,其中CDR1包含如SEQ ID NO: 16所示的氨基酸序列,CDR2具有如SEQ ID NO: 17所示的氨基酸序列,CDR3具有如SEQ ID NO: 18所示的氨基酸序列;并且在其重链可变区包含CDR1区、CDR2区和CDR3,其中CDR1区包含如SEQ ID NO: 14所示的氨基酸序列,CDR2区具有如SEQ ID NO: 15所示的氨基酸序列,CDR3具有如SEQ ID NOs: 1-13或56中任一所示的氨基酸序列;

[0029] (n) 根据(h)到(m)任一所述的方法,其中所述人类单克隆抗体或其功能片段包含如SEQ ID NO: 34所示的轻链氨基酸序列,以及如SEQ ID NOs: 35-48中任一所示的重链氨基酸序列;

[0030] (o) 根据(h)到(n)任一所述的方法,其中所述人类单克隆抗体或其功能片段包含与如SEQ ID NOs: 1-48和/或52-56中任一所示的氨基酸序列有至少70%同源性的氨基酸序列。同源性可通过标准序列比对程序(如Vector NTI(InforMaxTM, Maryland, 美国))来确定。该程序在一个氨基酸一个氨基酸的基础上比较被比对的序列,并能设置各种水平的比较严谨度(如等同氨基酸、保守氨基酸替换等)。作为本文中所用的术语,如果所论及的两个氨基酸中的每一个都属于相同的化学组别,即酸性、非极性、不带电荷的极性和碱性,则它们被认为是互相的“保守替换”。例如而不限于,两个属于非极性氨基酸组的不同氨基酸被认为是互相的“保守替换”,即使这两个氨基酸不相同,而一个是非极性氨基酸另一个是碱性氨基酸,则不会被认为是“保守替换”。Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts和Walter的“Molecular Biology of the Cell”(第4版(2002))的第3.1节把氨基酸分成四个主要的组:酸性、非极性、不带电荷的极性和碱性。该分组方式可用于在本发明中确定特定氨基酸是否是另一个所论及的氨基酸的保守替换;

[0031] (p) 根据本发明的第一个方面或 (a) 到 (o) 中任一所述的方法, 其中所述中和 IL-17 的化合物为多肽、模拟肽、核酸或小分子;

[0032] (q) 根据 (p) 所述的方法, 其中所述多肽为可以结合 IL-17 或 IL-17 受体的抗体或其功能片段, 优选地, 所述抗体为单克隆抗体或其功能片段。

[0033] (r) 根据 (q) 所述的方法, 其中所述抗体为人类单克隆抗体或其功能片段; 以及

[0034] (s) 根据本发明的第一个方面或 (a) 到 (r) 中任一所述的方法, 其中炎症疾病为类风湿性关节炎 (RA) (包含对 TNF- α 中和剂治疗有抗药性的 RA)、哮喘、多发性硬化症 (MS)、慢性阻碍性肺病 (COPD)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、特发性肺纤维化 (IPF)、炎症肠道疾病 (IBD)、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、葡萄膜炎、黄斑变性、结肠炎、银屑病、沃勒变性、抗磷脂抗体综合征 (APS)、急性冠脉综合征、再狭窄 (restenosis)、动脉粥样硬化、复发性多发软骨炎 (RP)、急性或慢性肝炎、失败的整形外科植入、血管球性肾炎、狼疮或其它自身免疫性疾病。

[0035] 本发明第二个方面涉及一种在患有肿瘤性疾病的个体中治疗肿瘤性疾病的方法, 所述方法包括施予一种中和 GM-CSF 的化合物和一种中和 IL-17 的化合物。根据技术人员公知的参数, 所述化合物可为一种组合物的部分, 或者它们可为分开的药物。

[0036] 根据第二个方面, 所述方法的优选实施方案如下:

[0037] (a) 一种方法, 其中在施予中和 IL-17 的化合物之前或之后对个体施予所述中和 GM-CSF 的化合物, 或一种方法, 其中同时给药两种化合物;

[0038] (b) 根据本发明的第二个方面或 (a) 所述的方法, 其中所述治疗个体为上述定义动物; 优选地, 所述个体为人类或非人类灵长类动物;

[0039] (c) 根据本发明的第二个方面或 (a) 或 (b) 的方法, 其中中和 GM-CSF 的化合物为多肽、模拟肽、核酸或小分子;

[0040] (d) 根据 (c) 所述的方法, 其中所述多肽为结合 GM-CSF 或 GM-CSF 受体的抗体或其功能片段, 优选地, 所述抗体为单克隆抗体或其功能片段;

[0041] (e) 根据 (d) 所述的方法, 其中所述抗体为人类单克隆抗体或其功能片段;

[0042] (f) 根据 (d) 或 (e) 所述的方法, 其中所述抗体或其功能片段结合于人类和非人类灵长类动物 GM-CSF 的表位。所述表位优选为人类和非人类灵长类动物 GM-CSF 的不连续表位, 所述表位优选包含氨基酸第 23-27 位 (RLLN) 和 / 或氨基酸第 65-77 位 (GLR/QGSLTKLKGPL);

[0043] (g) 根据 (f) 所述的方法, 其中所述不连续表位进一步包含氨基酸第 28-31 位 (LSRD)、氨基酸第 32-33 位 (TA) 和 / 或氨基酸第 21-22 位 (EA);

[0044] (h) 根据 (e)、(f) 和 (g) 中任一所述的方法, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其重链可变区包含 CDR3, 其中 CDR3 包含 SEQ ID NOs: 1-13 和 56 所示氨基酸序列中的任一个;

[0045] (i) 根据 (h) 所述的方法, 其中所述重链可变区 CDR3 序列中的任一个与 SEQ ID NO: 14 所示重链可变区 CDR1 序列和 SEQ ID NO: 15 所示重链可变区 CDR2 序列一起存在于重链可变区;

[0046] (j) 根据 (h) 或 (i) 所述的方法, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区中包含 CDR1、CDR2 和 CDR3, 其中 CDR1 包含 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序

列, CDR2 包含 SEQ ID NO : 17 所示氨基酸序列, CDR3 包含 SEQ ID NO : 18 所示氨基酸序列;

[0047] (k) 根据 (j) 所述的方法, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区进一步包含如 SEQ ID NOs : 19、54 和 55 中任一所示的氨基酸序列;

[0048] (l) 根据 (h) 或 (i) 所述的方法, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其重链可变区包含如 SEQ ID NOs : 20-33、52 和 53 中任一所示的氨基酸序列;

[0049] (m) 根据 (h) 到 (l) 任一所述的方法, 其中人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区包含 CDR1、CDR2 和 CDR3, 其中 CDR1 包含如 SEQ ID NO : 16 所示的氨基酸序列, CDR2 具有如 SEQ ID NO : 17 所示的氨基酸序列, CDR3 具有如 SEQ ID NO : 18 所示的氨基酸序列; 并且在其重链可变区包含 CDR1 区、CDR2 区和 CDR3, 其中 CDR1 区包含如 SEQ ID NO : 14 所示的氨基酸序列, CDR2 区具有如 SEQ ID NO : 15 所示的氨基酸序列, CDR3 具有如 SEQ ID NOs : 1-13 或 56 中任一所示的氨基酸序列;

[0050] (n) 根据 (h) 到 (m) 任一所述的方法, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段包含如 SEQ ID NO : 34 所示的轻链氨基酸序列, 以及如 SEQ ID NOs : 35-48 中任一所示的重链氨基酸序列;

[0051] (o) 根据 (h) 到 (n) 任一所述的方法, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段包含分别与如 SEQ ID NOs : 1-48 和 / 或 52-56 中任一所示的氨基酸序列有至少 70% 同源性的氨基酸序列。此处定义的同源性与所述本发明的第一个方面的实施方案 (o) 相同;

[0052] (p) 根据本发明的第二个方面或 (a) 到 (o) 中任一所述的方法, 其中所述中和 IL-17 的化合物为多肽、模拟肽、核酸或小分子;

[0053] (q) 根据 (p) 所述的方法, 其中所述多肽为可以结合 IL-17 或 IL-17 受体的抗体或其功能片段, 优选地, 所述抗体为单克隆抗体或其功能片段。

[0054] (r) 根据 (q) 所述的方法, 其中所述抗体为人类单克隆抗体或其功能片段; 和

[0055] (s) 根据本发明的第二个方面或 (a) 到 (r) 任一所述的方法, 其中所述肿瘤性疾病为癌症; 以及

[0056] (t) 根据 (s) 所述的方法, 其中所述癌症为白血病、多发性骨髓瘤、胃癌或皮肤癌。

[0057] 本发明的第三个方面为一种用于人类医学和 / 或兽医学的药品组合物, 特别是用于在上述定义的人类和 / 或动物中治疗炎症性疾病或肿瘤性疾病的药品组合物。所述组合物包含一种 GM-CSF 中和化合物 (简述为 GM-CSF 抑制化合物) 和一种 IL-17 中和化合物 (简述为 IL-17 抑制化合物)。根据本发明的第三个方面, 所述组合物的优选实施方案如下:

[0058] (a) 一种组合物, 其中所述 GM-CSF 抑制化合物为多肽、模拟肽、核酸或小分子;

[0059] (b) 根据 (a) 所述的组合物, 其中所述多肽为结合 GM-CSF 或 GM-CSF 受体的抗体或其功能片段; 优选地, 所述抗体为单克隆抗体或其功能片段;

[0060] (c) 根据 (b) 所述的组合物, 其中所述抗体或其功能片段为人类单克隆抗体或其功能片段;

[0061] (d) 根据 (b) 或 (c) 所述的组合物, 其中所述抗体或其功能片段结合于人类和非

人类灵长类动物 GM-CSF 的表位。所述表位优选为人类和非人类灵长类动物 GM-CSF 的不连续表位,所述表位优选为包含氨基酸第 23-27 位 (RRLN) 和 / 或氨基酸第 65-77 位 (GLR/QGSLTKLKGPL)。

[0062] (e) 根据 (d) 所述的组合物,其中所述不连续表位进一步包含氨基酸第 28-31 位 (LSRD),氨基酸第 32-33 位 (TA) 和 / 或氨基酸第 21-22 位 (EA);

[0063] (f) 根据 (c)、(d) 和 (e) 中任一所述的组合物,其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其重链可变区包含 CDR3,其中 CDR3 包含 SEQ ID NOs: 1-13 和 56 所示氨基酸序列中的任一个;

[0064] (g) 根据 (f) 所述的组合物,其中所述重链可变区 CDR3 序列中的任一个与 SEQ ID NO: 14 所示重链可变区 CDR1 序列和 SEQ ID NO: 15 所示重链可变区 CDR2 序列一起存在于重链可变区;

[0065] (h) 根据 (f) 或 (g) 所述的组合物,其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区中包含 CDR1、CDR2 和 CDR3,其中 CDR1 包含 SEQ ID NO: 16 所示氨基酸序列,CDR2 包含 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列,CDR3 包含 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列;

[0066] (i) 根据 (h) 所述的组合物,其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区进一步包含如 SEQ ID NOs: 19、54 和 55 中任一所示的氨基酸序列;

[0067] (j) 根据 (f) 或 (g) 所述的组合物,其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其重链可变区包含如 SEQ ID NOs: 20-33、52 和 53 中任一所示的氨基酸序列;

[0068] (k) 根据 (f) 到 (j) 任一所述的组合物,其中人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区包含 CDR1、CDR2 和 CDR3,其中 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列,CDR2 具有如 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列,CDR3 具有如 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列;并且在其重链可变区包含 CDR1 区、CDR2 区和 CDR3,其中 CDR1 区包含如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列,CDR2 区具有如 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列,CDR3 具有如 SEQ ID NOs: 1-13 或 56 中任一所示的氨基酸序列;

[0069] (l) 根据 (f) 到 (k) 任一所述的组合物,其中所述人类单克隆抗体或其功能片段包含如 SEQ ID NO: 34 所示的轻链氨基酸序列,以及如 SEQ ID NOs: 35-48 中任一所示的重链氨基酸序列;

[0070] (m) 根据 (f) 到 (l) 任一所述的组合物,其中所述人类单克隆抗体或其功能片段包含分别与如 SEQ ID NOs: 1-48 和 / 或 52-56 中任一所示的氨基酸序列有至少 70% 同源性的氨基酸序列,此处定义的同源性与前述本发明的第一个方面的实施方案 (o) 相同;

[0071] (n) 根据 (a) 到 (m) 中任一所述的组合物,其中所述 IL-17 抑制化合物为多肽、模拟肽、核酸或小分子;

[0072] (o) 根据 (n) 所述的组合物,其中所述多肽为结合 IL-17 或 IL-17 受体的抗体或其功能片段,优选地,所述抗体为单克隆抗体或其功能片段;

[0073] (p) 根据 (o) 所述的组合物,其中所述抗体或其功能片段分别为人类单克隆抗体或其功能片段;

[0074] (q) 根据 (a) 到 (p) 中任一所述的组合物,其中所述组合物用于治疗炎症性疾病和 / 或肿瘤性疾病,特别地,其中所述炎症性疾病为类风湿性关节炎 (RA) (包含对 TNF- α 中

和剂治疗有抗药性的 RA)、哮喘、多发性硬化症 (MS)、慢性阻碍性肺病 (COPD)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、特发性肺纤维化 (IPF)、炎性肠道疾病 (IBD)、克罗恩氏病、葡萄膜炎、黄斑变性、结肠炎、银屑病、沃勒变性、抗磷脂抗体综合征 (APS)、急性冠脉综合征、再狭窄、动脉粥样硬化、复发性多发软骨炎 (RP)、急性或慢性肝炎、失败的整形外科植入、血管球性肾炎、狼疮或自身免疫性疾病；并且 / 或者所述肿瘤性疾病为癌症例如白血病、多发性骨髓瘤、胃癌或皮肤癌。

[0075] 根据本申请提交地的法律，本发明的第四个方面可为 GM-CSF 抑制化合物和 IL-17 抑制化合物在制备治疗如上进一步说明的炎性疾病和肿瘤性疾病的药物中的联合用途。因此，在本发明第四个方面的优选实施方案中，可以配制包含 GM-CSF 抑制化合物和 IL-17 抑制化合物的药物，该药物用于如下给药方式：

[0076] (1) 首先施予 GM-CSF 抑制化合物，然后施予 IL-17 抑制化合物；(2) 首先施予 IL-17 抑制化合物，然后施予 GM-CSF 抑制化合物；以及 (3) 同时施予 GM-CSF 抑制化合物和 IL-17 抑制化合物。因此，根据技术人员公知的参数，所述化合物可为一种组合物的部分，或者它们可为分开的药物。

[0077] 可选地，本发明的第五个方面可以为用于治疗上述任何疾病的 GM-CSF 和 IL-17 抑制化合物。再一次说明，所述化合物的给药方式可以为以任何顺序一个接一个地给药或者可以为同时给药。同样，根据技术人员公知的参数，所述化合物可为一种组合物的部分，或者它们可为分开的药物。

[0078] 对于使用 GM-CSF 和 IL-17 抑制化合物制备药物的情况，和对于用于治疗任意所述疾病的 GM-CSF 和 IL-17 抑制化合物的情况，优选的实施方案如下：

[0079] (a) 所述接受治疗的个体如上定义；

[0080] (b) 所述 GM-CSF 抑制化合物为多肽、模拟肽、核酸或小分子；

[0081] (c) 根据 (b) 所述的多肽为结合 GM-CSF 或 GM-CSF 受体的抗体或其功能片段；优选地，所述抗体为单克隆抗体或其功能片段；

[0082] (d) 如 (c) 定义的所述抗体或其功能片段为人类单克隆抗体或其功能片段；

[0083] (e) 所述抗体或其功能片段结合于人和非人类灵长类动物 GM-CSF 的表位。所述表位优选为人和非人类灵长类动物 GM-CSF 的不连续表位，所述表位优选为包含氨基酸第 23-27 位 (RRLLN) 和 / 或氨基酸第 65-77 位 (GLR/QGSLTKLKGPL)。

[0084] (f) 所述不连续表位进一步包含氨基酸第 28-31 位 (LSRD)、氨基酸第 32-33 位 (TA) 和 / 或氨基酸第 21-22 位 (EA)；

[0085] (g) 根据 (d)、(e) 和 (f) 中任一所述的人类单克隆抗体或其功能片段在其重链可变区包含 CDR3，其中 CDR3 包含 SEQ ID NOs：1-13 和 56 所示氨基酸序列中的任一个；

[0086] (h) 实施方案 (g)，其中所述重链可变区 CDR3 序列中的任一个与 SEQ ID NO：14 所示重链可变区 CDR1 序列和 SEQ ID NO：15 所示重链可变区 CDR2 序列一起存在于重链可变区；

[0087] (i) 实施方案 (g) 或 (h)，其中所述人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区中包含 CDR1、CDR2 和 CDR3，其中 CDR1 包含 SEQ ID NO：16 所示氨基酸序列，CDR2 包含 SEQ ID NO：17 所示氨基酸序列，CDR3 包含 SEQ ID NO：18 所示氨基酸序列；

[0088] (j) 根据 (i) 所述的人类单克隆抗体或其功能片段, 在其轻链可变区进一步包含如 SEQ ID NOs : 19、54 和 55 中任一所示的氨基酸序列;

[0089] (k) 根据实施方案 (h) 或 (g) 所述的人类单克隆抗体或其功能片段, 在其重链可变区包含如 SEQ ID NOs : 20-33、52 和 53 中任一所示的氨基酸序列;

[0090] (l) 实施方案 (g) 到 (k) 中的任一个, 其中人类单克隆抗体或其功能片段在其轻链可变区包含 CDR1、CDR2 和 CDR3, 其中 CDR1 包含如 SEQ ID NO : 16 所示的氨基酸序列, CDR2 具有如 SEQ ID NO : 17 所示的氨基酸序列, CDR3 具有如 SEQ ID NO : 18 所示的氨基酸序列; 并且在其重链可变区包含 CDR1 区、CDR2 区和 CDR3, 其中 CDR1 区包含如 SEQ ID NO : 14 所示的氨基酸序列, CDR2 区具有如 SEQ ID NO : 15 所示的氨基酸序列, CDR3 具有如 SEQ ID NOs : 1-13 或 56 中任一所示的氨基酸序列;

[0091] (m) 实施方案 (g) 到 (l) 中的任一个, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段包含如 SEQ ID NO : 34 所示的轻链氨基酸序列, 以及如 SEQ ID NOs : 35-48 中任一所示的重链氨基酸序列;

[0092] (n) 实施方案 (g) 到 (m) 中的任一个, 其中所述人类单克隆抗体或其功能片段包含分别与如 SEQ ID NOs : 1-48 和 / 或 52-56 中任一所示的氨基酸序列有至少 70 % 同源性的氨基酸序列。 同源性可通过标准序列比对程序 (如 Vector NTI(InforMax™, Maryland, 美国)) 来确定。 该程序在一个氨基酸一个氨基酸的基础上比较被比对的序列, 并能设置各种水平的比较严谨度 (如等同氨基酸、保守氨基酸替换等)。 作为本文中所用的术语, 如果所论及的两个氨基酸中的每一个都属于相同的化学组别, 即酸性、非极性、不带电荷的极性和碱性, 则它们被认为是互相的 “保守替换”。 例如而不限于, 两个属于非极性氨基酸组的不同氨基酸被认为是互相的 “保守替换”, 即使这两个氨基酸不相同, 而一个是非极性氨基酸另一个是碱性氨基酸, 则不会被认为是 “保守替换”。 Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts 和 Walter 的 “Molecular Biology of the Cell” (第 4 版 (2002)) 的第 3.1 节把氨基酸分成四个主要的组: 酸性、非极性、不带电荷的极性和碱性。 该分组方式可用于在本发明中确定特定氨基酸是否是另一个所论及的氨基酸的保守替换;

[0093] (o) 实施方案 (a) 到 (n) 中的任一个, 其中所述 IL-17 抑制化合物为多肽、模拟肽、核酸或小分子;

[0094] (p) 根据 (o) 所述的多肽为结合 IL-17 或 IL-17 受体的抗体或其功能片段, 优选地, 所述抗体为单克隆抗体或其功能片段;

[0095] (q) 根据 (p) 所述的抗体或其功能片段为人类单克隆抗体或其功能片段; 以及

[0096] (r) 所述炎性疾病为类风湿性关节炎 (RA) (包含对 TNF- α 中和剂治疗有抗药性的 RA)、哮喘、多发性硬化症 (MS)、慢性阻碍性肺病 (COPD)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、特发性肺纤维化 (IPF)、炎性肠道疾病 (IBD)、克罗恩氏病、葡萄膜炎、黄斑变性、结肠炎、银屑病、沃勒变性、抗磷脂抗体综合征 (APS)、急性冠脉综合征、再狭窄、动脉粥样硬化、复发性多发软骨炎 (RP)、急性或慢性肝炎、失败的整形外科植入、血管球性肾炎、狼疮或自身免疫性疾病; 和 / 或所述肿瘤性疾病为癌症, 例如白血病、多发性骨髓瘤、胃癌或皮肤癌。

[0097] 如前所述, 本文所用术语 “IL-17”, 是指一类获得性免疫系统细胞因子家族,

由 IL-17A 到 IL-17F 六个成员组成。该术语的定义还包含异二聚体,如已被报导例如通过 CD4⁺T 细胞生理表达的 IL-17A/IL-17F。特别优选的根据本发明被中和的 IL-17 家族成员包含 IL-17A、IL-17F 和 IL-17D。更优选地,IL-17A 和 IL-17F 的效应根据本发明被中和。由于优选由 IL-17A、IL-17F 和 IL-17D 组成的组,所以也优选中和/抑制 IL-17 受体亚组(IL-17R)的信号,如 IL-17RA、IL-17RB 和 IL-17RC 信号,更优选 IL-17RA 和 IL-17RC 的信号。

[0098] 本文所用术语“特异结合”或相关表述,如“特异性结合”、“特异地结合”、“特异结合物”等,指 GM-CSF/IL-17 抑制化合物以及优选人类单克隆抗体或其功能片段(如上定义)区分出 GM-CSF/IL-17 和任何数量的其它不同于 GM-CSF/IL-17 的潜在抗原的能力如此之高,从多种作为潜在结合配偶体的不同抗原的集合中,仅结合或仅显著结合 GM-CSF/IL-17。在本发明的范围内,“显著”结合 GM-CSF/IL-17,是指在从作为潜在结合配偶体的同样可接触的多种不同抗原的汇聚物中,比任何其它不同于 GM-CSF/IL-17 的抗原高至少 10 倍、优选 50 倍、最优选 100 倍或更高频率(在动力学意义上)地结合 GM-CSF/IL-17。这些动力学测量可在 Biacore 设备上进行。

[0099] 本文中所述的“中和作用”、“中和剂”、“中和”和其语法上相关的变体指部分或完全减弱 GM-CSF/IL-17 的一种或多种生物学效应。该 GM-CSF/IL-17 的一种或多种生物学效应的部分或完全减弱可由修饰、阻断和/或消除 GM-CSF/IL-17 介导的过程例如信号传导(例如在细胞内信号传递、细胞增殖或释放可溶性物质、上调或下调细胞内基因活化所显示的)而造成,例如导致除了 GM-CSF 之外的配体的表面受体的表达。所属领域技术人员能理解的是,存在多种模式来确定试剂(例如所论及的抗体或其功能片段)是否能被划分为中和剂。例如,这一般可通过如下标准体外测试来实现:在第一个增殖试验中,将其增殖程度已知取决于 GM-CSF 活性的细胞系和一系列含各种浓度的 GM-CSF 一起孵育,孵育后测定细胞系的增殖程度。通过这种测量,确定出能使细胞达到半最大增殖程度的 GM-CSF 浓度。然后进行第二个增殖实验,其在每一系列样品中利用第一个增殖实验中所用的相同数量的细胞、以上确定的 GM-CSF 浓度、以及此次使用各种浓度的怀疑是 GM-CSF 中和剂的抗体或其功能片段。再测量细胞增殖以确定足以导致半最大生长抑制的抗体或其功能片段的浓度。如果得到的生长抑制对抗体(或其功能片段)浓度的图是乙状的(sigmoidal),使得随着抗体(或其功能片段)浓度增加而降低细胞增殖,则在一定程度上导致抗体依赖性生长抑制,即以某种程度中和了 GM-CSF 活性。在这种情况下,抗体或其功能片段可被认为是本发明范围内的“中和剂”。其增殖程度已知取决于 GM-CSF 活性的细胞系的一个例子是 TF-1 细胞系,其如文献 Kitamura, T 等(1989).J Cell Physiol 140, 323-34 所述。

[0100] 如所属领域普通技术人员所理解的,细胞增殖的程度不是确立 GM-CSF 中和能力的唯一参数。例如,测定其分泌水平依赖于 GM-CSF 的信号传递分子(如细胞因子)的水平,可用于鉴定可疑的 GM-CSF 中和剂(GM-CSF 抑制化合物)。用于确定 IL-17 抑制化合物的中和效应的相应细胞实验设定是所属领域技术人员所公知的。

[0101] 可用于确定所论及的抗体或其功能片段是否是 GM-CSF 活性的中和剂的细胞系的其它实例包括 AML-193(参见文献 Lange, B. 等(1987).Blood 70, 192-9)、GF-D8(参见文献 Rambaldi, A. 等(1993).Blood 81, 1376-83)、GM/SO(参见文献 Oez, S. 等

(1990).*Experimental Hematology* 18, 1108-11)、MO7E(参见文献Avanzi, G.C.等(1990).*Journal of Cellular Physiology* 145, 458-64)、TALL-103(参见文献Valtieri, M.等(1987).*Journal of Immunology* 138, 4042-50)、UT-7(参见文献Komatsu, N.等(1991).*Cancer Research* 51, 341-8)。可用于确定所论及的化合物(例如抗体或其功能片段)是否是IL-17活性的中和剂的基于细胞系/细胞的分析的实例包括IL-17蛋白质的BEAS-2B体外分析(BEAS-2B, 人类支气管上皮细胞(ATCC, CRL-9609))或成纤维细胞的标准IL-6释放分析(参见文献Yao等, 1995, *Journal of Immunology*, 155, 5483-5486)。

[0102] 应当理解, 在含有GM-CSF和IL-17的受体的细胞之外或细胞之内, 根据本发明的GM-CSF和IL-17的抑制作用/中和作用都能够分别发生。因此, 通过化合物产生的GM-CSF和IL-17的抑制作用/中和作用既可以为抑制或阻止GM-CSF或IL-17与其特异性受体结合的作用, 也可以为抑制这些细胞因子与其受体结合所诱导的细胞内信号的作用。细胞内作用的IL-17信号的抑制剂/中和剂的实例包括阻断细胞内信号通路的化合物, 包括JAK/STAT、MAPK p38、NF-kappaB或JNK抑制剂。

[0103] 如上定义, GM-CSF或IL-17的抑制剂可以选自多肽、模拟肽、核酸和小分子组成的组。

[0104] 本文所用术语“多肽”描述一组由多于30个氨基酸组成的分子。根据本发明, 所述多肽的组包含由一个或多个多肽组成的“蛋白质”。术语“多肽”还描述蛋白质片段, 只要这些片段由多于30个氨基酸组成。在本领域众所周知, 多肽可能形成多聚体, 如二聚体、三聚体和更高寡聚体, 即由多于一个多肽分子组成。这样的多聚体也包括在术语“多肽”的定义中。形成这种二聚物、三聚物等的多肽分子可为相同的或不同的。于是, 这种多聚物的相应的更高级结构, 被命名为同或异二聚物, 同或异三聚物等。异多聚物的一个实例为一种由两个相同轻链和两个相同重链组成的天然形式的抗体分子。术语“多肽”和“蛋白”还指自然或非自然修饰的多肽/蛋白质, 其中所述修饰可例如通过转录后修饰(如糖基化、乙酰化、磷酸化等)产生。这种修饰是本领域公知的。

[0105] 术语“小分子”指的是一组分子量少于1000D、并且优选为300-700D的药物化合物。相应的小分子可以源于至少部分随机的肽文库。本发明适用的小分子文库是本领域所公知的, 并且/或是可以从经销商购买的。

[0106] 术语“核酸”在本发明范围中定义为由磷酸、糖、嘌呤和嘧啶碱基的多个重复单元构成的大分子。这些分子的实施方案包括DNA、RNA和PNA。在本发明范围中, 核酸的一个特别优选的实施方案为适体(aptamer)。适体为这样的DNA或RNA分子, 其选自基于与其它分子结合能力的随机库。所选择的适体可以结合核酸、蛋白质、有机小分子、甚至整个有机体。

[0107] 术语“模拟肽”指的是一种设计用来模拟肽的小蛋白样链。这种分子是为了改变分子的特性, 通过修饰现有肽而人工获得的。例如, 修饰亲本现存肽以改变该分子的稳定性或生物学活性。这些修饰包含改变骨架和加入非天然氨基酸。

[0108] 术语“GM-CSF受体”是指GM-CSF的生理细胞表面受体, 在本领域中是指CD116和常见bata(βc)亚基形成的异二聚体。术语“IL-17受体”指的是IL-17不同亚型的生理细胞表面受体的家族。目前所述家族尤其包含以下亚型: IL-17RA、IL-17RB、IL-17RC、IL-17RD和IL-17RE。

[0109] 中和用肽链的一个优选的实施方案为抗体（或其功能片段），更优选为人类抗体（或其功能片段）。生产抗体的技术在本领域为公知的且已在例如文献 Harlow 和 Lane "Antibodies, A Laboratory Manual"，Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 以及文献 Harlow and Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 中描述。术语“抗体”包含不同种类（如 IgA、IgG、IgM、IgD 和 IgE）和亚类（如 IgG1、IgG2 等）的免疫球蛋白 (Ig)。本发明所述抗体定义也包含抗体的衍生物，所述抗体衍生物包括对所述分子的修饰，如糖基化、乙酰化、磷酸化、法尼基化 (farnesylation)、羟基化、甲基化或酯化。

[0110] 非人类或人类抗体或其功能片段（具有 GM-CSF 和 IL-17 特异性）优选是单克隆的。制备单克隆的人抗体尤其困难。与用永生化的细胞系融合鼠 B 细胞相反，融合人 B 细胞和永生化的细胞系是不可行的。因此，人单克隆抗体是克服抗体技术领域中现存的公认的技术障碍的结果。抗体的单克隆性质使其尤其适于用作治疗剂，这是因为该抗体将作为单一、均一的分子种类而存在，其可以被很好地表征并重复制备并纯化。这些因素产生的产物，其生物活性可被高精度地预测出，如果要使该分子被管理部门批准可以向人给药治疗，则这是非常重要的。

[0111] 特别优选地，单克隆抗体（或其相应功能片段）是人抗体（或其相应功能片段）。为了使抗体试剂能对人给药治疗，抗体为人源的是非常有利的。在对人患者给药后，人抗体或其功能片段将最可能不引发患者免疫系统的强免疫原性应答，即不会被识别为“外来的”非人蛋白。这指不产生宿主（即患者）抗体来抗该治疗性抗体，否则宿主抗体就会阻断治疗性抗体的活性和/或加速患者身体清除治疗性抗体，由此阻止其发挥所希望的治疗效应。

[0112] 本文中所用的术语“人”抗体应被理解为指具有特异性的抗体或其功能片段，其包括包含于人的种系抗体群内的一种或多种氨基酸序列。因此为了在本文中定义，抗体或其片段可被认为是人的，条件是由这样的一种或多种人的种系氨基酸序列组成，即，条件是所论及的抗体或其功能片段的一种或多种氨基酸序列与表达的一种或多种人的种系氨基酸序列一致。抗体或其功能片段也可以看成是人的，条件是它由如下序列组成：所述序列与其最接近的人的种系序列的差别不超过由于体细胞超突变印记所带来的差别。另外，许多非人哺乳动物（例如啮齿动物，如小鼠和大鼠）抗体包含 VH CDR3 氨基酸序列，其预计也存在于表达的人抗体群中。可被预计存在于表达的人的所有组成成分 (repertoire) 中的人或非人源的一个或多个任何这种序列也可被认为是符合本发明目的的“人”的。

[0113] 根据本发明的一个优选的实施方式，被用于药学目的的人类单克隆抗体或其功能片段在人和至少一种猴物种之间显示出交叉反应性。优选所有其它（非抗体或非抗体来源的）GM-CSF 和/或 IL-17 的中和/抑制化合物具有同样的物种间交叉反应性。由于该抗体通常将在行政审批前必须经历大量试验，其中某些早期试验涉及非人动物物种，因此这种交叉反应抗体非常有用。为了进行这些测试，一般希望用与人遗传上高度相似的非人物种，这是因为由此获得的结果一般将高度预示出将相同分子向人给药时所预期的相应结果。可是，这种基于动物试验的预测能力至少部分取决于分子的相似性，当由于物种交叉反应性而可将相同的治疗分子向人和动物模型给药时，其预测能力是非常高

的。如在本发明的实施方案中，当抗体分子与人和另一种很相关的物种中的相同抗原交叉反应时，可以使用该相同抗体分子在人以及该很相关的物种（如上述猴物种）中进行试验。这增加了测试本身的效率以及这些试验对这些抗体在人（从治疗角度最终兴趣所在的物种）中行为的所能达到的预测能力。在使用不是抗体（或不是抗体衍生）的中和/抑制化合物的可供选用的其它实施方案中也是这样的。

[0114] 根据本发明的另一个具体实施方式，人单克隆抗体可以是 IgG 抗体。IgG 不仅包含负责高度区别性地识别和结合抗原的可变抗体区，而且还包含通常在内源产生的抗体中出现的重和轻抗体多肽链的恒定区，在某些情况下，甚至在一个或多个位点上带有碳水化合物修饰。这样的糖基化一般是 IgG 型的标志，而且这些恒定区的部分组成了完整抗体的所谓 Fc 区，已知其能在体内引发出各种效应器功能。另外，Fc 区介导 IgG 与 Fc 受体的结合，由此延长体内半衰期并辅助 IgG 向 Fc 受体增加的地方——例如发炎组织归巢。有益的是，IgG 抗体是 IgG1 抗体或 IgG4 抗体，这些是优选的形式，这是因为它们的体内作用机制被特别好地理解并表征了。尤其对于 IgG1 抗体是这样。

[0115] 根据本发明的另一个具体实施方式，人单克隆抗体的功能性片段可以是 scFv、单结构域抗体、Fv、VHH 抗体、双抗体、串联的双抗体、Fab、Fab' 或 F(ab)2。这些形式通常可被分成两个亚型，即由单多肽链组成的那些，和包含至少 2 条多肽链的那些。前一亚型的成员包括 scFv（包含一个 VH 区和一个 VL 区，它们通过多肽接头连接成单多肽链）；单结构域抗体（包含单个抗体可变区），如 VHH 抗体（包含单 VH 区）。后一亚型的成员包括 Fv（包含一个 VH 区和一个 VL 区，形成分开的多肽链，非共价地相互连接）；双抗体（包含 2 条非共价连接的多肽链，其中每一条包含 2 个抗体可变区——通常每条多肽链有一个 VH 和一个 VL——这两条多肽链以头对尾构型排列而形成二价抗体分子）；串联的双抗体（双特异性单链 Fv 抗体，其包含具有两种不同特异性的 4 个共价相连的免疫球蛋白可变 VH 和 VL 区，形成上述双抗体两倍大的同二聚体）；Fab（包含作为一条多肽链的完整的抗体轻链（其自身包含了 VL 区和完整的轻链恒定区），以及作为另一条多肽链的一部分抗体重链（其包含完整的 VH 区和部分重链恒定区），所述 2 条多肽链通过链内二硫键而在分子间相连）；Fab'（如同以上 Fab，除了具有包含在抗体重链上的另外的还原二硫键）和 F(ab)2（包含 2 个 Fab' 分子，每个 Fab' 分子与另一个 Fab' 分子通过链间二硫键相连）。一般而言，上文所述类型的功能性抗体片段给设计，例如需要在特定紧急情况下临时治疗给药的抗体的药物动力学性质带来了很大的灵活性。例如，可期望减小给药抗体的大小，从而在治疗已知很少有血管分布的组织（例如，关节）时增加组织穿透程度。在某些情况下，也可期望增加治疗性抗体被清除出身体的速率，所述速率一般通过减少给药抗体大小来加速。只要抗体片段能维持特异性结合亲本抗体表位/靶标的特性，即，只要能分别特异性结合 GM-CSF 或 IL-17，这个抗体片段就定义为本发明范围内的功能性抗体片段。

[0116] 根据本发明的另一个具体实施方式，所述人单克隆抗体或其功能片段可以呈现为单价单特异性的；多价单特异性的，尤其是二价单特异性的；或是多价多特异性的，尤其是二价双特异性的形式。一般而言，多价单特异性的、尤其是二价单特异性的抗体（如上述完整的人 IgG）可带来治疗优势，即通过这种抗体起到的中和作用能够被抗体亲抗原性 (avidity) 作用（即相同的抗体结合至多个相同抗原（此处指 GM-CSF/IL-17）分子）

增强。本发明的抗体片段的几种单价单特异性形式如上所述（例如，scFv、Fv、VHH 或单结构域抗体）。多价多特异性的、尤其是二价双特异性形式的人单克隆抗 GM-CSF/IL-17 抗体，可包括完整的 IgG，其中一个结合臂结合非人类灵长类动物的 GM-CSF/IL-17，而另一个结合臂结合于不同于 GM-CSF/IL-17 的另一抗原。其它多价多特异性的、尤其是双价双特异性形式，优选为人单链双特异性抗体，即包含 2 个上述 scFv 实体的重组人抗体构建体，通过本领域通常已知的小的插入性多肽间隔区连成一个连续的多肽链（例如参见 WO 99/54440，其涉及抗 CD19x 抗 CD3 双特异性单链抗体）。在本文中，双特异性单链抗体的范围内所涵盖的双特异性单链抗体的一个 scFv 部分将特异结合如上所提及的 GM-CSF/IL-17，而该双特异性单链抗体的另一个 scFv 部分将结合另一个确定具有治疗利益的抗原。优选的另一方式是，如上所述双特异性单链抗体将特异性结合 GM-CSF，而该双特异性单链抗体的另一个 scFv 部分将结合 IL-17。

[0117] 根据本发明的另一个具体实施方式，抑制性人类单克隆抗体或其功能片段可以是衍生化的，例如用有机聚合物，例如用一个或多个聚乙二醇（“PEG”）和 / 或聚乙烯吡咯烷酮（“PVP”）分子进行衍生化。本领域已知，这种衍生化有益于调节抗体或其功能片段的药效学性质。尤其优选的是衍生化为 PEG-马来酰亚胺的 PEG 分子，其能以位点特异性方式通过半胱氨酸的巯基来与抗体或其功能片段缀合。在这些中，尤其优选的是 20kD 和 / 或 40kD 的 PEG-马来酰亚胺，其可以是支链或直链的形式。尤其有益的是增加较小的人抗 GM-CSF/IL-17 抗体片段（如 scFv 片段）的有效分子量，其通过将后者与一个或多个 PEG 分子（尤其是 PEG-马来亚酰胺）偶联而获得。

[0118] 本文中所用的人和灵长类 GM-CSF 的编号指成熟的 GM-CSF 的，即不带有其 17 个氨基酸信号序列的 GM-CSF（上述人和灵长类物种的成熟的 GM-CSF 的总长度都是 127 个氨基酸）。人 GM-CSF (SEQ ID NO : 57) 和长臂猿 GM-CSF (SEQ ID NO : 58) 的序列如下：

[0119] APARSPSPST QPWEHVNAIQ EARLLNLSR DTAAEMNETV

[0120] EVISEMFDLQ EPTCLQTRLE LYKQGLRGSL TKLKGPLTMM

[0121] ASHYKQHCPP TPETSCATQI ITFESFKENL KDFLLVIPFD

[0122] CWEPVQE

[0123] 某些猕猴科成员（例如恒河猴 (SEQ ID NO : 59) 和食蟹猴 (SEQ ID NO : 60)）的 GM-CSF 序列如下：

[0124] APARSPSPGT QPWEHVNAIQ EARLLNLSR DTAAEMNKTIV

[0125] EVVSEMFDLQ EPSCLQTRLE LYKQGLQGSL TKLKGPLTMM

[0126] ASHYKQHCPP TPETSCATQI ITFQSFKENL KDFLLVIPFD

[0127] CWEPVQE

[0128] 上述本发明的人单克隆抗体（或其功能片段）所结合的最小表位（更好是不连续表位）在以上 GM-CSF 序列中用粗体字表示。本文中所用的术语“不连续表位”应被理解为是给定多肽链（本文中的成熟的人和灵长类 GM-CSF）中至少 2 个不相邻的氨基酸序列段，其同时并特异地与抗体结合。根据该定义，这种同时的特异的结合是针对线型 GM-CSF 多肽的。在本文中，可以设想成熟的 GM-CSF 多肽形成了延伸的环，在环的一个区域中上面粗体字所指示的 2 个序列排成排，例如或多或少互相平行和彼此

接近。在该状态下，它们特异并同时与本发明的抗体片段结合。根据该定义，以上所示的成熟 GM-CSF 的 2 个序列段的同时特异结合也可以采取抗体与构象表位结合的形式。在本文中，成熟的 GM-CSF 已经形成了其通常在体内所形成的三级构象。在该三级构象中，成熟的 GM-CSF 多肽链以如下方式折叠：使以上所示的 2 条序列段处于空间相邻的位置，例如在成熟、折叠的 GM-CSF 的特定区域的外表面，然后他们在此通过其在周围多肽序列环境内的三维构象被识别。

[0129] 优选的人单克隆抗 GM-CSF 抗体或其功能片段包含：如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列，如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列和如 SEQ ID NO：1 所示的重链可变区 CDR3 序列；或是包含：如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列，如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列和如 SEQ ID NO：2 所示的重链可变区 CDR3 序列；或是包含：如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列，如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列和如 SEQ ID NO：3 所示的重链可变区 CDR3 序列；或是包含：如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列，如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列和如 SEQ ID NO：4 所示的重链可变区 CDR3 序列；或是包含：如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列，如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列和如 SEQ ID NO：5 所示的重链可变区 CDR3 序列；或是包含：如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列，如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列和如 SEQ ID NO：6 所示的重链可变区 CDR3 序列；或是包含：如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列，如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列和如 SEQ ID NO：7 所示的重链可变区 CDR3 序列；或是包含：如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列，如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列和如 SEQ ID NO：8 所示的重链可变区 CDR3 序列；或是包含：如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列，如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列和如 SEQ ID NO：9 所示的重链可变区 CDR3 序列；或是包含：如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列，如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列和如 SEQ ID NO：10 所示的重链可变区 CDR3 序列；或是包含：如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列，如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列和如 SEQ ID NO：11 所示的重链可变区 CDR3 序列；或是包含：如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列，如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列和如 SEQ ID NO：12 所示的重链可变区 CDR3 序列；或是包含：如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列，如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列和如 SEQ ID NO：13 所示的重链可变区 CDR3 序列；或是包含：如 SEQ ID NO：14 所示的重链可变区 CDR1 序列，如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区 CDR2 序列和如 SEQ ID NO：56 所示的重链可变区 CDR3 序列。

[0130] 更优选的是，以上 14 种 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的组合的任一种存在于这样的人单克隆抗体或其功能片段中，其中该人单克隆抗体或其功能片段进一步在其轻链可变区中包含 CDR1、CDR2 和 CDR3，其中 CDR1 包含 SEQ ID NO：16 所示氨基酸序列，CDR2 包含 SEQ ID NO：17 所示氨基酸序列，CDR3 包含 SEQ ID NO：18 所示氨基酸序列。

[0131] 根据另一个具体实施方式，抑制性人单克隆抗 GM-CSF 抗体或其功能片段在其

[illegible]

[0132] 根据另一个具体实施方式，抑制性人单克隆抗 GM-CSF 抗体或其功能片段在其轻链可变区包含如 SEQ ID NO：54 中所示的氨基酸序列。优选的是：这样的人单克隆抗体或其功能片段，其轻链可变区包含如 SEQ ID NO：54 中所示的氨基酸序列，重链可变区包含如 SEQ ID NO：20 中所示的氨基酸序列；或这样的人单克隆抗体或其功能片段，其轻链可变区包含如 SEQ ID NO：54 中所示的氨基酸序列，重链可变区包含如 SEQ ID NO：21 中所示的氨基酸序列；或这样的人单克隆抗体或其功能片段，其轻链可变区包含如 SEQ ID NO：54 中所示的氨基酸序列，重链可变区包含如 SEQ ID NO：22 中所示的氨基酸序列；或这样的人单克隆抗体或其功能片段，其轻链可变区包含如 SEQ ID NO：54 中所示的氨基酸序列，重链可变区包含如 SEQ ID NO：23 中所示的氨基酸序列；或

ID NO : 55 中所示的氨基酸序列, 重链可变区包含如 SEQ ID NO : 28 中所示的氨基酸序列; 或这样的人单克隆抗体或其功能片段, 其轻链可变区包含如 SEQ ID NO : 55 中所示的氨基酸序列, 重链可变区包含如 SEQ ID NO : 29 中所示的氨基酸序列; 或这样的人单克隆抗体或其功能片段, 其轻链可变区包含如 SEQ ID NO : 55 中所示的氨基酸序列, 重链可变区包含如 SEQ ID NO : 30 中所示的氨基酸序列; 或这样的人单克隆抗体或其功能片段, 其轻链可变区包含如 SEQ ID NO : 55 中所示的氨基酸序列, 重链可变区包含如 SEQ ID NO : 31 中所示的氨基酸序列; 或这样的人单克隆抗体或其功能片段, 其轻链可变区包含如 SEQ ID NO : 55 中所示的氨基酸序列, 重链可变区包含如 SEQ ID NO : 32 中所示的氨基酸序列; 或这样的人单克隆抗体或其功能片段, 其轻链可变区包含如 SEQ ID NO : 55 中所示的氨基酸序列, 重链可变区包含如 SEQ ID NO : 33 中所示的氨基酸序列; 或这样的人单克隆抗体或其功能片段, 其轻链可变区包含如 SEQ ID NO : 55 中所示的氨基酸序列, 重链可变区包含如 SEQ ID NO : 52 中所示的氨基酸序列; 或这样的人单克隆抗体或其功能片段, 其轻链可变区包含如 SEQ ID NO : 55 中所示的氨基酸序列, 重链可变区包含如 SEQ ID NO : 53 中所示的氨基酸序列。

[0134] 一种优选的抑制性人单克隆抗 GM-CSF 抗体或其功能片段, 在其轻链可变区包含 CDR1 区、CDR2 区和 CDR3, 其中 CDR1 区包含 SEQ ID NO : 16 所示氨基酸序列, CDR2 区具有 SEQ ID NO : 17 所示氨基酸序列, CDR3 具有 SEQ ID NO : 18 所示氨基酸序列; 并且在其重链可变区包含 CDR1 区、CDR2 区和 CDR3, 其中 CDR1 区包含如 SEQ ID NO : 14 所示的氨基酸序列, CDR2 区具有如 SEQ ID NO : 15 所示的氨基酸序列, CDR3 具有如 SEQ ID NOs : 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 56 中任一所示的氨基酸序列。

[0135] 根据另一个具体实施方式, 所述抗体在其轻链中包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的氨基酸序列, 在其重链中包含如 SEQ ID NO : 35 中所示的氨基酸序列; 或在其轻链中包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的氨基酸序列, 在其重链中包含如 SEQ ID NO : 36 中所示的氨基酸序列; 或在其轻链中包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的氨基酸序列, 在其重链中包含如 SEQ ID NO : 37 中所示的氨基酸序列; 或在其轻链中包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的氨基酸序列, 在其重链中包含如 SEQ ID NO : 38 中所示的氨基酸序列; 或在其轻链中包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的氨基酸序列, 在其重链中包含如 SEQ ID NO : 39 中所示的氨基酸序列; 或在其轻链中包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的氨基酸序列, 在其重链中包含如 SEQ ID NO : 40 中所示的氨基酸序列; 或在其轻链中包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的氨基酸序列, 在其重链中包含如 SEQ ID NO : 41 中所示的氨基酸序列; 或在其轻链中包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的氨基酸序列, 在其重链中包含如 SEQ ID NO : 42 中所示的氨基酸序列; 或在其轻链中包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的氨基酸序列, 在其重链中包含如 SEQ ID NO : 43 中所示的氨基酸序列; 或在其轻链中包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的氨基酸序列, 在其重链中包含如 SEQ ID NO : 44 中所示的氨基酸序列; 或在其轻链中包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的氨基酸序列, 在其重链中包含如 SEQ ID NO : 45 中所示的氨基酸序列; 或在其轻链中包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的氨基酸序列, 在其重链中包含如 SEQ ID NO : 46 中所示的氨基酸序列; 或在其轻链中包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的氨基酸序列, 在其重链中包含如 SEQ ID NO : 47 中所示的氨基酸序列; 或在

其轻链中包含如 SEQ ID NO : 34 中所示的氨基酸序列, 在其重链中包含如 SEQ ID NO : 48 中所示的氨基酸序列。

[0136] 以上优选的具体实施方式提供了人单克隆抗体分子和 / 或其功能片段, 其作为非人类灵长类和人类 GM-CSF 活性的中和剂特别有利。根据这些特别优选的具体实施方式的人单克隆抗体或其功能片段非常有利是由于以下几个原因。

[0137] 首先, 它们高度特异地识别非人类灵长类和人类 GM-CSF, 也就是说从非人类灵长类 GM-CSF 与其它非人类灵长类集落刺激因子 (例如非人类灵长类 G-CSF 和 M-CSF) 的混合物中, 根据这些特别优选的具体实施方式的结合分子能高度区分出灵长类 GM-CSF, 而在相同环境中不识别其它集落刺激因子。这也同样适用于人类 GM-CSF。这是指, 这些具体实施方式所述的人单克隆抗体或其功能片段, 在向人给药时, 将被预见到只能特异结合并中和所期望的靶, 而并不结合与中和其它不期望的靶。最终, 这导致了关于体内作用的治疗模式的高度可预测性。

[0138] 第二, 这些特别优选的具体实施方式的结合物以非常高的亲和力结合非人类灵长类和人类 GM-CSF。对于该类分子所观察到的 K_D 值从约 $4 \times 10^{-9} M$ 低至约 $0.04 \times 10^{-9} M$, 后者相当于约 40pM。由于在含水介质中该分子的动力学结合速率极大地受扩散控制, 因此不能提高到超出在生理条件下局部扩散条件所能达到的速率, 因此低的 K_D 值主要由动力学解离速率 (k_{off}) 造成, k_{off} 对于亲和力最高的抗体结合物来说约为 $10^{-5} s^{-1}$ 。这是指, 一旦作为一方的本发明这些具体实施方式所述的人单克隆抗体或其功能片段与作为另一方的 GM-CSF 之间形成复合物, 就不能容易地、或至少不能迅速地分离。对于要作为生物活性中和剂的结合分子来说, 这些特点是高度有益的, 这是因为所希望的中和效果通常将只能在其生物活性要被中和的分子 (此处指非人类灵长类和人类 GM-CSF) 仍旧被中和结合分子结合时才能持续。因此, 仍保持长时间结合其所要结合的靶的中和分子将继续中和相当长的一段时间。

[0139] 人单克隆抗体或其功能片段与非人类灵长类和人类 GM-CSF 的高度结合亲和力具有额外的优势。通常, 抗体或其功能片段将以大小依赖性的形式从患者血流中被清除出, 方式是排出并清除较小的分子, 然后是较大的。由于两种多肽 (抗体或抗体片段与所结合的 GM-CSF) 的复合物明显大于抗体本身, 因此上述低 k_{off} 使得治疗性中和剂比它不结合 GM-CSF 的情况更慢地从患者身体中被排出并清除。因此, 中和活性的幅度与其体内持续时间都增加了。

[0140] 根据上述具体实施方式的结合物所确定的中和活性出人意料地高。如将在下文中更具体地描述的那样, 可利用 TF-1 生长抑制分析进行体外测量 GM-CSF 中和活性 (Kitamura, T. 等 (1989) J Cell Physiol 140, 323-34)。测定 IC_{50} 值作为中和潜力的指标, IC_{50} 表示本发明这些具体实施方式所述的人单克隆抗体或其功能片段引发半最大 TF-1 细胞增殖抑制作用所需的浓度。对于上述的人单克隆抗 GM-CSF 抗体或其功能片段, 所确定的 IC_{50} 值约为 $3 \times 10^{-10} M$, 或约为 0.3nM。因此, 本发明这些具体实施方式所述的结合分子是很强有力的非人类灵长类和人类 GM-CSF 活性的中和剂。

[0141] 然后, 总之, 人单克隆抗 GM-CSF 抗体或其功能片段显示出对所希望的抗原的高度区分能力, 非常牢固地结合该抗原并持续长时间, 并在它所结合的长时间内显示出高度有效的中和活性。同时, 长时间保持结合物 - 抗原复合物能减缓该结合物从身体中

被清除，由此延长所希望的体内治疗效果的持续时间。

[0142] 对中和 / 抑制性的单克隆抗 IL-17 抗体，上述讨论也适用。

[0143] 根据本发明，所述术语“药物组合物”涉及向患者（优选人患者）给药的组合物。优选地，所述药物组合物包含载体、稳定剂和 / 或赋形剂的适合制剂。在优选的具体实施方式中，药物组合物包含用于非肠道、透皮、内腔内、动脉内、膜内和 / 或鼻内给药或直接注射入组织的组合物。尤其关注的是，所述药物组合物通过输注或注射向患者给药。合适的组合物的给药方法可通过不同方式实施，如静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或皮内给药。本发明的药物组合物可进一步包括药学上可接受的载体。合适的药物载体的例子是本领域公知的，包括磷酸盐缓冲盐溶液、水、乳剂（如油 / 水乳剂）、各类保湿剂、无菌溶液、脂质体等。包含这些载体的组合物可通过传统公知方法配制。这些药物组合物可以合适的剂量向患者给药。剂量方案可由参与的医生和临床因素来确定。如在医学领域所公知的那样，对于任一患者的剂量取决于许多因素，包括患者的身材、体表面积、年龄、将要施予的特定化合物、性别、给药时间和途径、综合健康情况、以及同时给药的其它药物。非肠道给药的制剂包括无菌水溶液或非水溶液、混悬液、和乳剂。非水性溶剂的例子有丙二醇、聚乙二醇、植物油（如橄榄油）、和可注射的有机酯（如油酸乙酯）。水性载体包括水、醇 / 含水溶液、乳剂或混悬液，包括盐水和缓冲介质。非肠道载体包括氯化钠溶液、葡萄糖林格氏液（Ringer's dextrose）、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液（lactated Ringer's）、或非挥发油。静脉内载体包括流体和营养物补充剂、电解质补充剂（如基于葡萄糖林格氏液的那些）等。也可含有防腐剂和其添加剂，例如，抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。另外，本发明的药物组合物可包含蛋白质载体，像诸如，血清白蛋白或免疫球蛋白，优选是人源的。可设想的是，除了如本发明所述，本发明的药物组合物还可包含其它生物活性剂，这取决于药物组合物所需的用途。该试剂可以是作用于胃肠系统的药物、起细胞抑制剂（cytostatica）作用的药物、防止高尿酸血症（hyperurikemia）的药物、抑制免疫反应的药物（如皮质类固醇）、调节炎症反应的药物、作用于循环系统的药物和 / 或诸如细胞因子的本领域已知的试剂。

[0144] 本文中所定义的药物组合物的生物学活性可以通过如 WO99/54440 中的细胞毒性分析来测定（如下述实施例中所述），或通过如文献 Schlereth 等（Cancer Immunol. Immunother.20 (2005), 1-12）的方法测定。此处所用“效能”（efficacy）或“体内效能”是指通过本发明药物组合物治疗后的反应，使用如标准化 NCI 反应标准。使用本发明药物组合物治疗达到成功或体内效能是指所述药物组合物达到其预期使用目的的效果，即组合物起到预期作用的能力，即，病理细胞如肿瘤细胞的清除。体内效能可以通过对各种疾病实体建立标准方法进行监测，其中标准方法包括但不限于白细胞计数、差异、荧光激活细胞分选、骨髓穿刺。另外，也可以使用各种疾病特异性临床化学参数和其它已建立的标准方法。此外，也可以使用计算机断层扫描、X 射线、核磁共振成像（如用于基于国家癌症研究所标准的反应评估）、正电子发射断层扫描、白细胞计、差异、荧光激活细胞分选、骨髓穿刺、淋巴结活组织检查 / 组织学以及各种淋巴特性临床化学参数（如乳酸脱氢酶）和其它已建立的标准方法。

[0145] 发展药物（如本发明所述药物组合物）的另一个挑战是其药代动力学性质的可测

调控。为此，建立了所述候选药物的药代动力学特征，即影响特定药物治疗给定病情的能力的药代动力学参数的特征。影响药物治疗某种疾病实体的能力的药物药代动力学参数包括但不限于：半衰期、分布容积、肝脏首过效应和血清结合度。上述提到的任一参数可影响给定药物制剂的效能。

[0146] “半衰期”指的是通过生物学过程（如代谢、排泄等）清除 50% 所给药物所需的时间。

[0147] “肝脏首过代谢”，指的是药物首度接触肝脏（即第一次经过肝脏）而被代谢的倾向。

[0148] “分布容积”是指药物经过整个机体各个部分（如细胞内和细胞外空间、组织和器官等）的滞留度，以及所述药物在这些部分中的分布。

[0149] “血清结合度”指的是药物与血清蛋白质（如白蛋白）互相作用并结合的倾向，其中血清蛋白质导致药物生物活性的降低或损失。

[0150] 药代动力学参数还包括生物利用度、滞后时间 ($T_{\text{滞后}}$)、 $T_{\text{最大}}$ 、吸收速率、更多发病和 / 或对于所给药物给定剂量的峰值浓度 ($C_{\text{最大}}$)。

[0151] “生物利用度”指药物在血液腔室中的数量。

[0152] “滞后时间”指的是从施予药物到该药物在血液或血浆中的检测和可测性之间的时间耽搁。

[0153] “ $T_{\text{最大}}$ ”是指药物到达最大血药浓度所需的时间，“ $C_{\text{最大}}$ ”指给定药物获得的最大血药浓度。所有参数均影响达到药物发挥其生物学效应所要求的血液或组织浓度所经历的时间。

[0154] 此处所用术语“毒性”是指表现为副作用或严重副作用的药物毒性效应。这些副作用事件可以指给药后大体上缺乏的对药物的耐受性和 / 或给药后缺乏的对药物的局部耐受性。毒性也包含药物导致的致畸或致癌作用。

[0155] 此处所用术语“安全性”、“体内安全性”或“耐受性”指的是在刚给药之后（局部耐受性）以及使用药物较长时间后，所述给药没有引发严重的副作用。“安全性”、“体内安全性”或“耐受性”可以通过在治疗和随访阶段定期评估。测量包含临床评估（如器官表现）和实验室异常的筛查。可以进行临床评估并比较与根据 NCI-CTC 和 / 或 MeDRA 标准记录或编码的正常结果的偏离。器官表现可包括诸如过敏 / 免疫学、血 / 骨髓穿刺、心律失常、凝血等等之类的标准，如在 Common Terminology Criteria for adverse events v3.0 (CTCAE) 中设定的。可以测试的实验室参数包括例如血液学研究、临床化学、凝血概况和尿液分析，以及其它体液（如血清、血浆、淋巴或脊髓液）、酒精之类的检测。因此安全性可以通过如身体检查、成像技术（如超声波、X 射线、CT 扫描、磁共振成像 (MRI)）、其它使用技术设备的测量（如心电图）、生命体征、通过测量实验室参数和记录副作用来评估。此处所用术语“有效且无毒剂量”是指此处定义的双特异性单链抗体的耐受剂量，其高到足以引起清除病理细胞、消除肿瘤、肿瘤缩小或稳定疾病，而没有或基本上没有大的毒性作用。这种有效且无毒剂量可通过例如本领域所述的剂量递增研究来确定，并且其应低于诱发严重副作用（剂量限制性毒性，DLT）的剂量。

[0156] 本申请包括一些附图，描述如下：

[0157] 图 1：GM-CSF 中和用 mAb（单克隆抗体）22E9(A)、IL-17 中和用 mAb

1400.24.17(B) 和 TNF α 拮抗剂依那西普 (etanercept) (C) 对慢性 SCW 炎症中膝关节肿胀的治疗效果。关节炎的诱导如方法部分中所述。通过在 14、17、21 和 24 天腹腔注射 300 μ g 剂量治疗。用摄入膝盖的 ^{99m}Tc 来测量炎症,并以右(关节炎膝盖)/左(PBS 对照膝盖)(R/L)比率表示。比率 > 1.10 则认为关节肿胀。组间使用曼-惠特尼 U 检验 (Mann-Whitney U-test) ($*0.05 > p > 0.01$; $**0.01 > p > 0.001$) 进行比较,每组 $n = 7$ 。

[0158] 图 2: GM-CSF 中和用 mAb(22E9mAb), IL-17 中和用 mAb(1400.24.17) 和 TNF α 拮抗剂依那西普对滑膜中炎性细胞的涌入 (A) 和软骨破坏 (B) 的治疗效果。诱导和治疗疾病方法参见方法部分。将小鼠在第 28 天处以安乐死,并制备其组织学切片并进行视觉评分。各组与对照组的对比使用曼-惠特尼 U 检验, $n = 7$ 。

[0159] 图 3: 来自患有慢性 SCW 关节炎小鼠的典型膝关节显微照片,其中小鼠使用 GM-CSF 中和用 mAb(22E9) (A)、IL-17 中和用 mAb(1400.24.17) (B)、TNF α 拮抗剂依那西普 (C) 和对照 mAb(D) 进行治疗。在初始诱导 SCW 关节炎后第 28 天,制作切片并用番红 O/ 快绿染色。P = 髌骨, F = 股骨, C = 软骨。注意 (A) 和 (B) 中软骨完整保存,而 (C) 和 (D) 中软骨蛋白聚糖缺失和侵蚀。原始放大倍数为 $200\times$ 。

[0160] 图 4: 局部 IL-1 β (A) 和 KC(Gro α 等价物) (B) 的水平,其通过在初次诱导 SCW 关节炎后 21 天建立的髌骨 1 小时培养物的上清液中的 Luminex 珠测量。其处理如图 1 说明所述。

[0161] 图 5: 使用对照抗体和抗 GM-CSF 抗体来治疗野生型 (WT) 和 IL-17R 缺陷型小鼠的慢性 SCW 诱导的关节炎。(A) 野生型 (WT) 和 IL-17R $^{-/-}$ 小鼠的关节肿胀。如前所示,在 WT 小鼠中对照抗体治疗和抗 GM-CSF 抗体治疗的小鼠的关节肿胀在第 22、23 和 28 天有非常明显的差别。(B) 第 28 天的关节炎和软骨蛋白聚糖 (PG) 破坏。(C) 用对照抗体治疗的 WT 小鼠的髌骨和股骨的软骨层的软骨破坏 (侵蚀和软骨细胞死亡) (D) 对 IL-17R $^{-/-}$ 小鼠施予抗 GM-CSF 抗体后软骨损失减轻。(E) 用对照抗体治疗的小鼠的髌骨和股骨的软骨层有软骨 PG 缺失。(F) 对 IL-17R $^{-/-}$ 小鼠施予抗 GM-CSF 抗体后有软骨 PG 缺失。细节见图 3。数据以平均值 $\pm$ SD 表示,每组至少 6 只小鼠。重复实验一次并获得类似结果。与使用对照抗体治疗的 WT 对照小鼠对比, $*P < 0.01$, 与使用抗 GM-CSF 抗体治疗的 IL-17R $^{-/-}$ 小鼠对比, $**P < 0.01$, 使用曼-惠特尼 U 检验。

[0162] 图 6: 治疗 10 天后,胶原诱导关节炎小鼠的宏观评分。关节炎第一个症状出现 (对应图 6 中的第 1 天) 时,静脉注射治疗小鼠 (也为图 6 中的第 1 天) 使用 (i) 单次给予抗 IL17 单克隆抗体: 只有 mAb421 1.5mg/kg, (ii) 只给予抗 GM-CSF 单克隆抗体: 22E9 3mg/kg, 或 (iii) 联合给予 mAb421 1.5mg/kg 和 22E9 3mg/kg。将使用 mAb421 阻断 IL-17 与使用 22E9 中和 GM-CSF 相结合,极大的降低了胶原诱导的关节炎的临床评分,而单独使用 mAb421 或 22E9 均不能明显减轻疾病严重程度。腹腔注射地塞米松 (2mg/kg, 阳性对照) 2-3 天后,小鼠关节炎症状消失。IgG2A 抗体 (同型对照) 作为阴性对照。结果为平均值 + 标准误 (SEM) ($n = 9-10$ 只小鼠 / 组)。与 IgG2A 同型阴性对照治疗的小鼠对比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, 通过单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Dunnett 的多重比较试验确定。

[0163] 图 7 单次施予 22E9 3mg/kg (A)、mAb421 1.5mg/kg (B)、22E9 3mg/kg 和 mAb 421 1.5mg/kg 的组合 (C)、或同型对照 (D) 10 天后的典型的关节切片。关节在 4% 福尔

马林中固定、脱钙、切片并用苏木素 / 伊红染色。施予大鼠 IgG2a (图 7D) 的同型对照小鼠表现出被标记的关节炎伴有滑膜中大量细胞浸润 (*), 以及被标记的关节破坏伴有软骨和骨组织侵蚀 (↑)。虽然严重程度有轻微减轻, 但施予 3mg/kg 22E9 (图 7A) 或 1.5mg/kg mAb 421 (图 7B) 的小鼠也表现出严重的炎症和关节破坏; 而单次施予 3mg/kg 22E9 和 1.5mg/kg mAb421 的联合治疗, 则表现出非常显著减轻的炎症 (*) (图 7C), 并且良好地保存了带有接近正常软骨表面的关节完整性 (↑) (图 7C)。

[0164] 下面的详细试验将使本领域技术人员能彻底理解本发明的要旨。

[0165] 实验动物

[0166] 雄性 C57B1/6 小鼠购自 Charles River 公司 (位于 Sulzfeld, Germany)。IL-17R 缺陷小鼠由 Amgen 公司 (位于 Seattle, WA, USA) 的 J.Peschon 友好提供。上述小鼠养在顶部具有过滤器的笼子里, 水和食物无限制提供。使用的小鼠约为 10-12 周大小。所有动物处理均经过机构伦理委员会批准。

[0167] 制备 SCW 和诱导 SCW 关节炎

[0168] 在托 - 休二氏培养基 (Todd-Hewitt broth) 中过夜培养化脓链球菌 T12 (*Streptococcus pyogenes* T12)。使用文献 van den Broek et al., *Am J Pathol* 133(1), 139-149 (1988) 中描述的方法制备细胞壁。各实验都使用 10000×g 离心后的上清。该制备物包含 11% 胞壁酸。将含有 25 μg SCW (鼠李糖成分) 的 6 μl 磷酸盐缓冲液 (PBS), 经关节 (i.a.) 注射到幼鼠的右膝关节以诱导单侧关节炎 (如文献 Joosten et al., *Ann Rheum Dis* 59(3), 196-205 (2000) 中所述)。为了产生慢性链球菌细胞壁 (SCW) 诱导的关节炎, 分别在第 0、7、14 和 21 天进行右侧关节注射。重复的注射会引发慢性关节炎。对照组中, 左膝关节注射 PBS。

[0169] 试剂和治疗方法

[0170] 使用大鼠 mAb 22E9 (MM500CS, Perbio Science 公司 (位于 Bonn, Germany)) 中和 GM-CSF。使用依那西普 (Enbrel®; Wyeth Pharma 公司 (位于 Münster, Germany)) 阻断 TNF α。一些研究已经报导在不同小鼠模型 (包括 CIA) 中人类可溶性 TNF 受体 Fc 融合蛋白的有效性。使用大鼠 IgG2a 同型对照品 (BLD-400516-bulk, Biozol Diagnostica 公司 (位于 Eching, Germany)) 和 Humira® (Abbott, Wiesbaden-Delkenheim 公司 (位于 Germany)) 作为同型对照。使用大鼠抗鼠 IL-1 β mAb1400.24.17 (MM425, Perbio Science 公司 (位于 Bonn, Germany)) 中和 IL-1 β。所有治疗通过腹腔 (i.p.) 注射 300 μg 的剂量给药, 并且给予 4 次: i) 在第三次反应 (第 14 天) 前 2 小时, ii) 在第 17 天, iii) 在第四次反应 (第 21 天) 前 2 小时和 iv) 最初疾病诱导后第 24 天。

[0171] 关节肿胀的测量

[0172] SCW 关节炎中关节肿胀使用文献 Kruijsen et al., *Agents Actions* 11(6-7), 640-2 (1981) 中所述 ^{99m}Tc 摄取方法定量测定。该验证方法通过用外部 gamma 射线计算由于局部血流增加和组织肿胀导致的炎症位点处的放射性同位素的累积。肿胀严重性由右膝关节 (炎性组) 和左膝关节 (对照组) 的 ^{99m}Tc 摄取的比值来表示。所有超过 1.10 的值即被认为是关节肿胀。

[0173] 细胞因子和趋化因子测定

[0174] 一些细胞因子和趋化因子 (包括 IL-1 β、IL-6、TNF α、RANTES、KC 和

MIP-1 α) 的表达水平是在髌骨冲洗物中测定的。将髌骨及周围滑液组织从炎性膝关节中分离,并在室温条件下在含有 0.1% BSA 的 RPMI 1640 培养基中培养 1 小时,如之前文献 Joosten et al., J Immunol 165(11), 6553-8(2000) 所述。然后,将获得的上清以 1000 $\times$ g 的速率离心 5 分钟。使用 Luminex 多分析物技术来确定细胞因子和趋化因子的水平。我们使用的是 BioRad 公司(位于 Munich, Germany)的 BioPlex 系统并结合多重细胞因子和趋化因子试剂盒。

[0175] 组织学分析

[0176] 第 28 天,使用颈椎脱臼法处死小鼠。取出整个膝关节并固定在 4% 的福尔马林中放置 7 天,然后在 5% 的蚁酸中脱钙,石蜡包埋处理。组织切片(7 μ m)用苏木素/伊红(H/E)或番红 O/快绿(SO)染色。在髌骨/股骨区域中相隔 140 μ m 的 5 个半连续区域上对膝关节中组织病理学的改变进行评分。通过两个不同的观察者使用以下参数对连续编码的玻片进行评分。在 H/E 染色玻片中,浸润滑液衬里的细胞数量评分为 0-3。在 SO 染色玻片中,软骨破坏评分范围为 0-3。

[0177] 统计学分析

[0178] 实验组间差异使用曼-惠特尼 U 检验和 GraphPad Prism 4 软件进行检测。显著性读数分组如下: * = 0.05 > p > 0.01; ** = 0.01 > p > 0.001; 并且 *** = p < 0.001。

[0179] 下述实施例将同样使技术人员能彻底的理解本发明的要旨。

[0180] 实施例 1:

[0181] 系统性对 GM-CSF 的中和作用减轻慢性 SCW 模型中的关节肿胀

[0182] 在 C57B1/6 小鼠 SCW 关节炎的慢性期,对给予生物中和剂 GM-CSF(mAb 22E9)、TNF α (依那西普)或 IL-1 β (mAb 1400.24.17)治疗关节肿胀的效果,通过在第 15、16、22、23 和 28 天摄入膝关节的 ^{99m}Tc 的差异摄取进行研究。结果用注射关节炎 SCW 的膝关节和注射 PBS 对照组的膝关节的 ^{99m}Tc 摄取比值表达。

[0183] 系统施予 GM-CSF 中和抗体在第 16、22、23 和 28 天高效并显著地减轻了关节肿胀,其相应 p 值分别为 0.018、0.004、0.004 和 0.002(图 1A)。IL- β 中和剂也可以减轻关节肿胀,尽管只在第 22 天(p = 0.011)和第 23 天(p = 0.001)观测到与对照组相比膝关节的 ^{99m}Tc 摄取比值的显著减少(图 1B)。与预期相同,依那西普阻断 TNF α ,可以中和人和鼠 TNF α ,在慢性 SCW 模型中对关节肿胀没有效果(图 1C)。相反,依那西普之前显示对该疾病模型的急性期是有活性的。因此,慢性 SCW 关节炎中,对 GM-CSF 的中和作用看来比对 IL-1 β 的中和作用更有效,其效果一直持续到第 28 天,即最后一次施予抗体后第 4 天。第二个独立研究证实了对 GM-CSF 的中和作用对慢性 SCW 模型中减轻关节肿胀的效能。

[0184] 实施例 2:

[0185] 对 GM-CSF 的中和作用减轻炎性细胞涌入滑膜和软骨破坏

[0186] 在第 28 天终止实验后,制备不同组小鼠关节的组织病理学切片。炎性细胞涌入滑膜的度和软骨组织损伤评价分别通过两个观察者对匿名的 H/E 和 SO 染色的组织切片来独立评分。

[0187] 所有三种治疗,用 mAb 22E9 中和 GM-CSF,用 mAb1400.24.17 中和 IL-1 β 和用依那西普阻断 TNF α ,在显著减轻炎性细胞涌入滑膜方面都是有效的(图 2A)。尽管

阻断 TNF α 有显著性效果,但看来弱于 GM-CSF 或 IL-1 β 的中和作用,与对照相比 p 值分别为 0.042、0.004、和 0.001。此外,尽管在依那西普治疗的小鼠中,炎性细胞涌入膝关节有所减轻,其软骨组织并没有完整保存(图 2B)。与之相反,对 GM-CSF 的中和作用显著地保护软骨组织免受损伤($p = 0.02$; mAb22E9 对比同型对照 mAb)(图 2B)。如前所述,IL-1 β 中和作用可以有效保护软骨组织免受损伤($p = 0.004$, 抗 IL-1 β 对比对照组;图 2B)。

[0188] 不同治疗对软骨组织完整性的影响如图 3 所示,其中显示了三种治疗中,每组选择一个典型的小鼠的关节进行番红 O/ 快绿染色后的显微照片。在 mAb 22E9 治疗的小鼠中观测到健康的软骨着色和完好保存的组织(图 3A),这体现了对 GM-CSF 的中和作用对保护软骨完整性的效果。与之相反,在接受同型对照抗体的小鼠中(图 3D),其软骨表现出破坏性侵蚀和蛋白聚糖(关节软骨一个主要的成分)损失所致的染色强度降低。相似地,在依那西普治疗小鼠中看到蛋白聚糖的损失和软骨损失增加(图 3C)。这之前在关节炎的慢性 SCW 模型中显示 TNF α 无关性的研究是一致的。因此,在本研究中通过抗体中和 IL-1 β 对软骨有着显著性的保护作用(图 3B)。

[0189] 实施例 3 :

[0190] 对 GM-CSF 的中和作用降低膝关节中 IL-1 β 和 KC 的产生

[0191] 为了更好的理解 GM-CSF 的保护性作用,和它与 IL-1 β 的相互关系,我们研究了膝关节洗脱液中各种细胞因子和趋化因子的浓度。因为在之前的实验中重复发现未受影响的对照组膝盖(左)中的水平低于检测限,我们只对关节炎膝盖(右)进行了分析。

[0192] 与在接受同型对照抗体治疗的小鼠膝关节中检测的水平相比,使用 mAb 22E9 中和 GM-CSF 可显著的减少局部的 IL-1 β ($p = 0.042$; 22E9- 治疗对比对照组)(图 4)。而使用依那西普阻断 TNF α 则对关节中 IL-1 β 的水平没有影响(图 4)。并且如我们所预料的,在接受 mAb 中和 IL-1 β 的小鼠中,IL-1 β 的水平接近基线。所有三种治疗都导致了关节炎膝关节中趋化因子 KC(鼠 GRO- α)的表达显著性降低(22E9 对比对照组 $p = 0.0047$; 依那西普对比对照组 $p = 0.0007$; 抗 IL-1 β 抗体对比对照组 $p = 0.007$)。所研究的任何治疗都没有影响 IL-6 和 RANTES 的局部水平(数据未显示)。IL-2、TNF α 和 GM-CSF 的水平低于分析检测限,即小于 10pg/ml。

[0193] 实施例 4 :

[0194] IL-17 信号缺乏时,对 GM-CSF 的中和作用可以增强对软骨破坏的保护作用

[0195] 中和 GM-CSF 能减轻关节肿胀并保护软骨免受损伤,其效能与中和 IL-1 β 所观察到的相似。其后,我们使用抗 GM-CSF mAb 在 IL-17R 缺陷小鼠的慢性 SCW 关节炎中进行了相似的研究。IL-17R 缺陷在慢性 SCW 关节炎中导致潜伏性关节肿胀和软骨破坏(图 5A)。关节炎模型中,GM-CSF 和 IL-17 信号作为联合靶标可以导致对关节肿胀的强的增大的抑制(图 5A)。尽管抗 GM-CSF 治疗和 IL-17R 缺陷都导致细胞涌入减少,联合靶标不能使关节炎有显著减轻(图 5B)。然而有趣的是,在使用抗 GM-CSF 治疗的 IL-17R 缺陷小鼠中,蛋白聚糖的消耗和软骨组织损伤(软骨细胞死亡和侵蚀)显著地减轻了(图 5B-E)。上述实验结果表明了抗 GM-CSF 对软骨组织的保护作用可以通过 T 细胞细胞因子 IL-17 的额外靶向而增强。

[0196] 实施例 5 :

[0197] 慢性复发性 SCW 的关节炎小鼠模型的特征为如人类慢性 RA 晚期时典型的严重关节破坏。与在 CIA 小鼠模型和急性 SCW 关节炎模型中观察到的相反, 当 IL-1 β 开始作为主要致病因素 (72) 时, TNF α 中和作用在控制慢性 SCW 关节炎中不再有效。我们的研究证实了在慢性 SCW 关节炎的软骨破坏中 TNF α 的无关性和 IL-1 β 的关键作用。

[0198] 第一次在该特殊模型中研究了 GM-CSF 阻断, 并发现当在疾病慢性阶段腹腔注射 300 μ g 抗体时, 其在 SCW 注射的膝盖中对关节肿胀和软骨破坏中的深远的抑制作用。这说明, 在小鼠中施予一定剂量的抗 GM-CSF 抗体 (该剂量相当于在人体中约 1mg/kg 的抗体剂量 (在异速生长改正之后)), 足以纠正关节炎膝关节中 GM-CSF 的水平。慢性关节炎模型中对 GM-CSF 的中和作用的治疗效能是有着非常重大的意义的。抗 GM-CSF 比抗 IL-1 β 能更有效的控制关节肿胀, 而 TNF α 阻断是无效的。由于 TNF α 的中和作用对炎性细胞的涌入和 KC 趋化因子的水平有一定影响, 因此异常的 TNF α 的产生也许仍然在慢性 SCW 关节炎中有一定效果。然而, 对比于其它关节炎小鼠模型, 与该疾病的急性阶段相反, TNF α 控制该慢性疾病的作用减小。在软骨保护中, 抗 GM-CSF 和抗 IL-1 β 治疗都非常有效。GM-CSF 和 IL-1 作用之间的互相依赖性已在其它关节炎模型中被报导。在这个 IL-1 诱导关节炎并在其后注射 mBSA 的模型中, GM-CSF 表现出占优势的致病作用。GM-CSF KO 小鼠中的 GM-CSF 缺乏, 或在野生型动物中的对 GM-CSF 的中和作用, 都可以显著地减轻关节炎。然而, 在慢性 SCW 关节炎中, GM-CSF 看起来处于 IL-1 β 的上游, 因为对 GM-CSF 的中和在关节炎关节中减少 IL-1 β 水平。通过活化的巨噬细胞和其它 GM-CSF 刺激的免疫细胞来降低 IL-1 β 的产生, 也可能解释为什么抗 GM-CSF 的治疗在我们的模型中对软骨有保护作用。在急性 SCW 的模型中, 我们也发现, 抗 GM-CSF 的抗体能抑制 IL-1 β 水平, 而 TNF α 阻断剂依那西普则不能。在 RA 的 CIA 小鼠模型中, GM-CSF 的阻断可以显著减少 IL-1 β 和 TNF α 的表达。

[0199] 虽然通过转录因子 NF- κ B 及其它的活化使得前炎性细胞因子 (如 TNF α 和 IL-1 β) 在不同免疫细胞中急性诱导 GM-CSF 的表达, 但细胞因子的层次在炎症后期似乎翻转, 其中 GM-CSF 接管控制 TNF α 和 IL-1 β 的产生, 也许还接管控制其它细胞因子和趋化因子。在抑制关节炎组织中 TNF α 和 IL-1 β 的同时, 对 GM-CSF 的阻断也有可能降低依赖于 GM-CSF 的免疫细胞 (如粒细胞、中性粒细胞和巨噬细胞) 的活性和存活率。可以想到 GM-CSF 不仅直接诱导 IL-1 β 和 TNF α 表达, 而且可以导致协同的抗凋亡作用和对先天免疫系统中多重细胞的持续性激活作用, 因而间接地增加 IL-1 β 和 TNF α 的产生。对细胞周期和存活的影响已经在 mBSA 关节炎模型中展示, 其中体内对 GM-CSF 的中和作用导致关节炎关节中整体细胞性和周期细胞数的显著减少。

[0200] 实施例 6 :

[0201] 除了在野生型动物的慢性 SCW 关节炎过程中阻断 GM-CSF, 我们还在 IL-17R 缺陷小鼠中进行了实验。IL-17 由 Th17 细胞产生, 其中 Th17 细胞能同时产生 TNF α 和 GM-CSF。在 TNF α 存在时, IL-17 可以诱使滑膜细胞产生 GM-CSF, 暗示 IL-17 在 GM-CSF 上游起作用。另外, 用 LPS 刺激经 GM-CSF 治疗的骨髓细胞, 可以产生 IL-23, 其为可产生 IL-17 的 Th17 细胞的重要存活因子。在本发明之前, 尚未研究体内外中对 IL-17 和 GM-CSF 的联合阻断。本发明人的本研究首先显示出, 相对于阻断单独通路, 同时阻断 IL-17 和 GM-CSF 信号通路能更好地抑制关节肿胀和增加对软骨破坏的保护。

这种对软骨的强作用也许可以通过在 IL-17 和 (GM-CSF 诱导的) IL-1 β 之间的协同作用来解释, 因为这两种细胞因子之前表现出对通过 RA 病人的滑膜产生细胞因子的过程和 in 骨关节炎软骨中产生 PGE2 和 NO 的过程具有协同作用。本发明的研究和之前的研究都强烈支持这一观点, 即对 GM-CSF 的中和作用可能在人类 RA 患者中和在对 TNF α 阻断不再有反应或从一开始就没有反应的患者中具有治疗潜力。另外, 本发明展示抗 GM-CSF 和抗 IL-17 的联合治疗在 RA 和其它自身免疫和炎症性疾病中均有非常深远的治疗效果。

[0202] 实施例 7 :

[0203] 胶原诱导的关节炎 (CIA) 是一种被广泛接受的基于对抗软骨胶原 II 型 (CII) 的 T 细胞和抗体介导的自身免疫反应性的关节炎小鼠模型。所述模型与人 RA 有一些共同的临床、组织病理学和免疫性特征, 其主要特征为滑膜炎, 伴随有严重的软骨和骨组织侵蚀。此处所述本研究的目标是在 CIA 小鼠模型系统中评估联合施予 GM-CSF 中和化合物和 IL-17 中和化合物的治疗效能。特别地, 在 CIA 发作后, 研究对小鼠施予 (i) 单独的抗 IL-17 单克隆抗体 (mAb 421)、(ii) 单独的抗 GM-CSF 单克隆抗体 (mAb 22E9)、和 (iii) 联合的两种抗体的治疗效果, 并与阴性对照 (IgG2A) 和阳性对照 (地塞米松) 比较。抗 IL-17 抗体 mAb421 购自 R&D Systems 公司, mAb 22E9 购自 Perbio Science 公司。大鼠 IgG2a 同型对照抗体来自 Biolegend 公司。所有抗体在 -80 $^{\circ}$ C 储存。地塞米松来自 Centrafarm 公司, 并于室温储存。所有化合物用无菌 PBS 稀释给药。

[0204] 对上述化合物对 CIA 小鼠的治疗效果设计了 7 周的研究。第 0 天, 在将雄性 DBA/1J 小鼠用异氟烷麻醉后, 在其尾巴根部注射 100 μ g 的牛 CII 使其产生免疫反应。第 21 天, 将上述小鼠腹腔内加压注射 100 μ g 溶于磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 的 CII, 之后几天内, 关节炎就会产生。将处于 0.05M 乙酸中的浓度为 2mg/ml 的牛 II 型胶原 (CII) 用相同体积的弗氏完全佐剂 (2mg/ml 的结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 株 H37Ra) 进行乳化。出现关节炎的初步症状 (得分大于等于 0.25) 时, 将小鼠顺序分配到如下所列出的不同的实验组, 并进行另外 10 天的观察研究。

[0205] 当指头和爪子其它部分有明显的红色和 / 或肿胀改变时, 小鼠即被认为是患有关节炎。每个爪子的关节炎通过视觉评分, 如文献 R.Smeets 等, Arthritis Rheum 2003 所述, 每个爪子评分范围为 0-2, 每个动物最高评分为 8 (4 个有关节炎症状的爪子, 每个最高评分为 2) : 0 为没有炎症, 1 为轻度炎症, 1.5 为显著炎症, 2 为严重炎症。从第 21 天到第 45 天, 由对实验组别不知情的独立的观察者每周进行三次评分。

[0206] 关节炎症状产生时, 使用单独剂量的抗体进行给药。每周三次 (周一、周三和周五) 进行剂量为 2mg/kg 的地塞米松腹腔注射。到第 35 天仍没有表现出任何关节炎症状的小鼠被认为是无反应者, 并从进一步的实验分析中去除。

[0207] 根据之前的实验结果, 研究中药剂量设定为 1.5mg/kg mAb421。对于抗 GM-CSF 抗体 22E9, 剂量设定为 3mg/kg。本研究使用这些剂量来评估在胶原诱导的关节炎期间对 IL-17 和 GM-CSF 的联合阻断的效果。地塞米松作为阳性对照, 大鼠 IgG2a 抗体作为阴性对照。此外, 本研究包括以下实验组: 采用抗 IL-17 (mAb421) 治疗、采用抗 GM-CSF (22E9) 治疗、以及采用它们联合给药治疗, 其中均使用上述剂量给药。

[0208] 实验组 :

[0209] mAb421 1.5mg/kg + 大鼠 IgG2a 3mg/kg (共 4.5mg/kg)

[0210] 22E9 3mg/kg+ 大鼠 IgG2a 1.5mg/kg

[0211] mAb421 1.5mg/kg+22E9 3mg/kg

[0212] 大鼠 IgG2a 15mg/kg

[0213] 地塞米松 2mg/kg

[0214] 如图 6 所示, 使用 mAb421 中和 IL-17 与使用 22E9 中和 GM-CSF 的联合, 极为显著地减轻胶原诱导的关节炎的临床评分。与之相反, 单独采用 mAb421 或 22E9 的治疗没有显著降低疾病的严重性。腹腔注射地塞米松 (2mg/kg, 阳性对照) 2 到 3 天后, 关节炎症状消失。IgG2A 抗体治疗的小鼠 (阴性对照) 表现出明显的关节炎严重性的进展。

[0215] 组织病理学分析前爪和后爪 (左和右, 4 例样品 / 每只小鼠)。将爪子放在 4% 福尔马林溶液中固定。在用 EDTA 或标准脱钙溶液脱钙 3 天后, 将爪子包被在石蜡中 (paraplast®), 用 H&E 染色, 并通过光学显微镜评估。组织病理学评估只限于爪子的指关节 (跗骨 / 腕骨和手指)。

[0216] 组织病理学评估显示, 较低的四肢关节 (腕 / 跗, 手指) 有亚急性到慢性的关节炎。关节炎的特点是滑膜变厚 (滑膜增生)、关节内渗出物和主要在关节囊中的显著的混合细胞浸润。在所述情况中, 炎症细胞反应也出现在结缔组织和肌腱。此外, 在更多的慢性情况中, 对由纤维组织和占大部分的单核细胞组成的典型肉芽组织进行了观察。对指关节软骨的侵蚀变化也进行了观察。在大多数情况下, 超过一个关节受到了影响 (多关节炎)。图 7 所示为单独施予 22E9 3mg/kg (A)、单独施予 mAb421 1.5mg/kg (B)、联合施予 22E9 3mg/kg 和 mAb 421 1.5mg/kg (C)、或施予同型对照 15mg/kg (D) 10 天后典型的关节切片图。将关节固定于 4% 福尔马林, 脱钙, 切片并用苏木 / 曙红染色。接受同型对照治疗的小鼠 (图 7D) 显示出在滑膜中有显著的关节炎并伴有大量细胞浸润, 以及软骨关节破坏和骨侵蚀。虽然严重程度稍轻, 接受 3mg/kg 22E9 (图 7A) 或 1.5mg/kg mAb 421 (图 7B) 的小鼠也表现出严重的炎症和关节破坏, 而接受单次施予 22E9 3mg/kg 和 mAb421 1.5mg/kg 联合治疗的小鼠显示出显著减轻的炎症, 关节的完整性也得到了较好的保存, 并伴随有其表面接近正常的软骨表面 (图 7C)。因此, 患有关节炎的大部分病例是出现在阴性对照组 (大鼠 IgG2a) 的。经过 2 到 3 天地塞米松 (阳性对照) 给药后, 没有检测到关节炎。比较阴性对照与在 CIA 小鼠中单独给予 mAb421 或 mAb22E9、或联合给药, 关于关节炎的发生和严重程度的最好的结果出现在 mAb421 与 mAb22E9 的联合给药组。

[0217] 结论:

[0218] 本发明中发明人探索了对 GM-CSF 的中和作用在两种不同关节炎动物模型系统中的治疗效能, 即 (i) 不依赖于 TNF α 的慢性 SCW 关节炎动物模型和 (ii) 依赖于 TNF α 的 CIA 模型。另外, 他们研究了通过抑制 GM-CSF 和 IL-17 途径来阻断先天性免疫和获得性免疫的效果。该实验通过在基因缺乏 IL-17 受体的小鼠 (IL-17R-KO 小鼠) 中中和 GM-CSF 实现, 或是使用中和 GM-CSF 和 IL-17 的单克隆抗体联合治疗实现。发明人意外发现, 通过联合阻断 GM-CSF 和 IL-17 途径, 两种类型的炎性疾病均可以一种高效的方式治疗。在 CIA 模型中, 抑制 GM-CSF 的化合物和抑制 IL-17 的化合物的联合给药可以显著地降低胶原诱导关节炎的临床评分, 而单独给予抑制 GM-CSF 的化合物或抑制 IL-17 的化合物则不能显著减轻关节炎的严重程度。另外, 详细的组织病理学分析

显示了联合治疗对关节炎症以及对软骨和骨的破坏产生的有益效果。因此，联合阻断两条通路可以高效保护机体免于炎症和关节破坏。直到最近，人们仍然假定 GM-CSF 处在 IL-17 的下游（参见文献 Kawaguchi M. 等，J.Allergy Clin.Immunol.114(2004)，444-450；Starnes T.et al.，The Journal of Immunology 169(2002)，642-646；Laan M.et al.，Eur. Respir.J.21(2003)，387-393），因而这些结果非常令人惊讶。因此，人们并不能预料到对两条通路的联合阻断会有额外的或协同的效应。本发明申请首先证实了体内对 IL-17 和 GM-CSF 的联合阻断的有益效果。相对于阻断单独通路，对 IL-17 和 GM-CSF 通路的同时阻断，能更好地抑制关节肿胀和增加对软骨破坏的保护。本文所示实验数据提出这样一个强有力的观点，联合抗 GM-CSF 和抗 IL-17 的治疗，不止对 RA 有非常深远的治疗效果，并且对其它如上定义的自身免疫和炎症疾病也有非常深远的治疗效果。

[0001]

序列表

<110> 米克罗麦特股份公司 (Micromet AG)

<120> 用于治疗GM-CSF和IL-17抑制剂

<130> VI-101423-59:58

<160> 60

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H3 7A-701

<400> 1

Ser	Gly	Leu	Ile	Ala	Asn	His	Met	Thr	Pro
1				5					10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H3 7B1-502

<400> 2

Thr	Thr	Leu	Ile	Ser	Val	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H3 L38-A1

<400> 3

Ser	Gly	Leu	Ile	Phe	Asp	Tyr	Trp	Leu	Asp
1				5					10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H3 L38-A12

<400> 4

Ser	Gly	Leu	Ile	Ile	Asp	Ala	Leu	Ser	Pro
1				5					10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0002]

<223> CDR-H3 L38-G7

<400> 5

Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H3 L39-D11

<400> 6

Ser Gly Leu Leu Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H3 E1-37-E7

<400> 7

Ser Gly Leu Ile Asn Leu Gly Met His Pro
1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H3 M1_3-82

<400> 8

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp
1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H3 Ln4p-23

<400> 9

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser
1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR-H3 Ln4p-28

<400> 10

Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr
1 5 10

[0003]

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR-H3 Ln4p-50

<400> 11

Ser Thr His Phe Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR-H3 Ln4p-65

<400> 12

Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn
1 5 10

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR-H3 Ln4p-90

<400> 13

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro
1 5 10

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR-H1 7B1-502

<400> 14

Asp Tyr Leu Leu His
1 5

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR-H2 7B1-502

<400> 15

Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 16

[0004]

<211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR-L1 5-306

<400> 16

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

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR-L2 5-306

<400> 17

Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR-L3 5-306

<400> 18

Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VL 5-306* L-version

<400> 19

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0005]

[0006]

	85	90	95
Thr Arg Thr	Thr Leu Ile Ser Val	Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
	100	105	110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	22		
<211>	119		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	VH with CDR-H3 = 3077*		
<400>	22		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe			
	50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Thr Arg Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	23		
<211>	119		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	VH with CDR-H3 = L38-A1		
<400>	23		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe			

[0007]

50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Tyr Trp Leu Asp Trp Gly Gln Gly 100 105 110		
Thr Met Val Thr Val Ser Ser 115		
<210> 24 <211> 119 <212> PRT <213> 人工序列		
<220> <223> VH with CDR-H3 = L38-A12		
<400> 24		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr 20 25 30		
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60		
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
Ala Arg Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro Trp Gly Gln Gly 100 105 110		
Thr Met Val Thr Val Ser Ser 115		
<210> 25 <211> 119 <212> PRT <213> 人工序列		
<220> <223> VH with CDR-H3 = L38-G7		
<400> 25		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr		

[0008]

	20	25	30
	Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
	Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60		
	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		
	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Thr Arg Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly 100 105 110		
	Thr Met Val Thr Val Ser Ser 115		
<210>	26		
<211>	119		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	VH with CDR-H3 = L39-D11		
<400>	26		
	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15		
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr 20 25 30		
	Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
	Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60		
	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		
	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Thr Arg Ser Gly Leu Leu Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly 100 105 110		
	Thr Met Val Thr Val Ser Ser 115		
<210>	27		
<211>	119		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	VH with CDR-H3 = E1-37-E7		

[0009]

<400> 27

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Asn Leu Gly Met His Pro Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH with CDR-H3 = M1_3-82

<400> 28

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

[0010]

<210> 29
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VH with CDR-H3 = Ln4p-23

<400> 29

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 30
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VH with CDR-H3 = Ln4p-28

<400> 30

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

[0011]

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH with CDR-H3 = Ln4p-50

<400> 31

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Thr Arg Ser Thr His Phe Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH with CDR-H3 = Ln4p-65

<400> 32

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

[0012]

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH with CDR-H3 = Ln4p-90

<400> 33

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Light Chain 5-306* L-version

<400> 34

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

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

[0013]

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 35
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Heavy Chain with CDR-H3 = 7B1-502*
 <400> 35
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

[0014]

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg 85	Leu Arg Ser Asp 90	Asp Thr Ala Val Tyr 95	Tyr Cys
Thr Arg Thr Thr 100	Leu Ile Ser Val 105	Tyr Phe Asp Tyr Trp 110	Gly Gln Gly
Thr Met Val Thr 115	Val Ser Ser Ala 120	Ser Thr Lys Gly 125	Pro Ser Val Phe
Pro Leu Ala Pro 130	Ser Ser Lys Ser 135	Thr Ser Gly Gly 140	Thr Ala Ala Leu
Gly Cys Leu Val 145	Lys Asp Tyr Phe 150	Pro Glu Pro Val 155	Thr Val Ser Trp 160
Asn Ser Gly Ala 165	Leu Thr Ser Gly 170	Val His Thr Phe 175	Pro Ala Val Leu
Gln Ser Ser Gly 180	Leu Tyr Ser Leu 185	Ser Ser Val Val 190	Thr Val Pro Ser
Ser Ser Leu Gly 195	Thr Gln Thr Tyr 200	Ile Cys Asn Val 205	Asn His Lys Pro
Ser Asn Thr Lys 210	Val Asp Lys Lys 215	Val Glu Pro Lys 220	Ser Cys Asp Lys
Thr His Thr Cys 225	Pro Pro Cys Pro 230	Ala Pro Glu Leu 235	Leu Gly Gly Pro 240
Ser Val Phe Leu 245	Phe Pro Pro Lys 250	Pro Lys Asp Thr 255	Leu Met Ile Ser
Arg Thr Pro Glu 260	Val Thr Cys Val 265	Val Val Asp Val 270	Ser His Glu Asp
Pro Glu Val Lys 275	Phe Asn Trp Tyr 280	Val Asp Gly Val 285	Glu Val His Asn
Ala Lys Thr Lys 290	Pro Arg Glu Glu 295	Gln Tyr Asn Ser 300	Thr Tyr Arg Val
Val Ser Val Leu 305	Thr Val Leu His 310	Gln Asp Trp Leu 315	Asn Gly Lys Glu 320
Tyr Lys Cys Lys 325	Val Ser Asn Lys 330	Ala Leu Pro Ala 335	Pro Ile Glu Lys
Thr Ile Ser Lys 340	Ala Lys Gly Gln 345	Pro Arg Glu Pro 350	Gln Val Tyr Thr
Leu Pro Pro Ser 355	Arg Asp Glu Leu 360	Thr Lys Asn Gln 365	Val Ser Leu Thr
Cys Leu Val Lys 370	Gly Phe Tyr Pro 375	Ser Asp Ile Ala 380	Val Glu Trp Glu

[0015]

370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu 385 390 395 400		
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys 405 410 415		
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu 420 425 430		
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 435 440 445		
Lys		
<210> 36		
<211> 449		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Heavy Chain with CDR-H3 =7A-701*		
<400> 36		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr 20 25 30		
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60		
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
Thr Arg Ser Gly Leu Ile Ala Asn His Met Thr Pro Trp Gly Gln Gly 100 105 110		
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe 115 120 125		
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu 130 135 140		
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp 145 150 155 160		
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu 165 170 175		

[0016]

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 <210> 37
 <211> 449
 <212> PRT

[0017]

<213> 人工序列

<220>

<223> Heavy Chain with CDR-H3 = L38-A1*

<400> 37

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Tyr Trp Leu Asp Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

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

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

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

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

[0018]

275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val 290 295 300		
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu 305 310 315 320		
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys 325 330 335		
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr 340 345 350		
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr 355 360 365		
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu 370 375 380		
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu 385 390 395 400		
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys 405 410 415		
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu 420 425 430		
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 435 440 445		
Lys		
<210> 38		
<211> 449		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Heavy Chain with CDR-H3 = L38-A12*		
<400> 38		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr 20 25 30		
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60		
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		

[0019]

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

[0020]

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 <210> 39
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Heavy Chain with CDR-H3 = L38-G7*
 <400> 39
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

[0021]

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

Lys

<210> 40
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0022]

<220>
 <223> Heavy Chain with CDR-H3 = L39-D11*
 <400> 40
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Gly Leu Leu Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

[0023]

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 <210> 41
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Heavy Chain with CDR-H3 = E1-37-E7*
 <400> 41
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0024]

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

[0025]

385	390	395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys	405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	435	440	445
Lys			
<210> 42			
<211> 449			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> Heavy Chain with CDR-H3 = M1_3-82*			
<400> 42			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr	20	25	30
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp Trp Gly Gln Gly	100	105	110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe	115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu	130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp	145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu	165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser	180	185	190

[0026]

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 <210> 43
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Heavy Chain with CDR-H3 = Ln4p-23*

[0027]

<400> 43

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

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

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

[0028]

290	295	300
Val Ser Val Leu Thr 305	Val Leu His Gln Asp 310	Trp Leu Asn Gly Lys Glu 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val 325	Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys 330 335	
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr 340 345 350		
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu 355	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr 360 365	
Cys Leu Val Lys Gly Phe 370	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu 375 380	
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu 385 390 395 400		
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys 405 410 415		
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu 420 425 430		
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 435 440 445		
Lys		
<210> 44		
<211> 449		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Heavy Chain with CDR-H3 = Ln4p-28*		
<400> 44		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr 20 25 30		
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60		
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		

[0029]

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

[0030]

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 <210> 45
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Heavy Chain with CDR-H3 = Ln4p-50*
 <400> 45
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Thr His Phe Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

[0031]

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

Lys

<210> 46
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Heavy Chain with CDR-H3 = Ln4p-65*
 <400> 46

[0032]

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr	
20 25 30	
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
50 55 60	
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
Ala Arg Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn Trp Gly Gln Gly	
100 105 110	
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe	
115 120 125	
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu	
130 135 140	
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp	
145 150 155 160	
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu	
165 170 175	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser	
180 185 190	
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro	
195 200 205	
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys	
210 215 220	
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro	
225 230 235 240	
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser	
245 250 255	
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp	
260 265 270	
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn	
275 280 285	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val	
290 295 300	

[0033]

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 <210> 47
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Heavy Chain with CDR-H3 = Ln4p-90*
 <400> 47
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro Trp Gly Gln Gly

[0034]

100	105	110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe 115 120 125		
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu 130 135 140		
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp 145 150 155 160		
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu 165 170 175		
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser 180 185 190		
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro 195 200 205		
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys 210 215 220		
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro 225 230 235 240		
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser 245 250 255		
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp 260 265 270		
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn 275 280 285		
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val 290 295 300		
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu 305 310 315 320		
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys 325 330 335		
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr 340 345 350		
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr 355 360 365		
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu 370 375 380		
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu 385 390 395 400		
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		

[0035]

405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu 420 425 430		
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 435 440 445		
Lys		
<210> 48		
<211> 449		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Heavy Chain with CDR-H3 = 3077*		
<400> 48		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr 20 25 30		
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60		
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
Thr Arg Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly 100 105 110		
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe 115 120 125		
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu 130 135 140		
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp 145 150 155 160		
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu 165 170 175		
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser 180 185 190		
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro 195 200 205		

[0036]

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 <210> 49
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 人 (human) GM-CSF
 <400> 49
 Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
 1 5 10 15

[0037]

Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr
 20 25 30
 Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp
 35 40 45
 Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
 50 55 60
 Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
 65 70 75 80
 Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
 100 105 110
 Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 115 120 125

<210> 50
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 猕猴 (macaca) GM-CSF
 <400> 50

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Gly Thr Gln Pro Trp Glu His Val
 1 5 10 15
 Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr
 20 25 30
 Ala Ala Glu Met Asn Lys Thr Val Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp
 35 40 45
 Leu Gln Glu Pro Ser Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
 50 55 60
 Gly Leu Gln Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
 65 70 75 80
 Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Gln Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
 100 105 110
 Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 115 120 125

<210> 51
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 长臂猿 (gibbon) GM-CSF
 <400> 51

Ala Pro Ser Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
 1 5 10 15

[0038]

Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr
 20 25 30
 Ala Ala Glu Ile Asn Glu Thr Val Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp
 35 40 45
 Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
 50 55 60
 Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
 65 70 75 80
 Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gln Ile Ile Ile Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
 100 105 110
 Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Gly
 115 120 125
 <210> 52
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VH with CDR-H3 7B1-502
 <400> 52
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Thr Thr Leu Ile Ser Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 53
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0039]

<220>
 <223> VH with CDR-H3 3077
 <400> 53
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 54
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VL 5-306
 <400> 54
 Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

[0040]

<210> 55
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> VL 5-306* V-version

 <400> 55
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR-H3 3077

 <400> 56

Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 57
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 57
 Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
 1 5 10 15
 Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr
 20 25 30
 Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp
 35 40 45
 Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
 50 55 60
 Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met

[0041]

65	70	75	80
Ala Ser His Tyr	Lys Gln His Cys	Pro Pro Thr Pro Glu Thr	Ser Cys
	85	90	95
Ala Thr Gln Ile	Ile Thr Phe Glu	Ser Phe Lys Glu Asn	Leu Lys Asp
	100	105	110
Phe Leu Leu Val	Ile Pro Phe Asp	Cys Trp Glu Pro Val	Gln Glu
	115	120	125
<210>	58		
<211>	127		
<212>	PRT		
<213>	长臂猿 (Hylobates sp.)		
<400>	58		
Ala Pro Ala Arg	Ser Pro Ser Pro	Ser Thr Gln Pro Trp	Glu His Val
1	5	10	15
Asn Ala Ile Gln	Glu Ala Arg Arg	Leu Leu Asn Leu Ser	Arg Asp Thr
	20	25	30
Ala Ala Glu Met	Asn Glu Thr Val	Glu Val Ile Ser	Glu Met Phe Asp
	35	40	45
Leu Gln Glu Pro	Thr Cys Leu Gln Thr	Arg Leu Glu Leu Tyr	Lys Gln
	50	55	60
Gly Leu Arg Gly	Ser Leu Thr Lys	Leu Lys Gly Pro	Leu Thr Met Met
65	70	75	80
Ala Ser His Tyr	Lys Gln His Cys	Pro Pro Thr Pro Glu Thr	Ser Cys
	85	90	95
Ala Thr Gln Ile	Ile Thr Phe Glu	Ser Phe Lys Glu Asn	Leu Lys Asp
	100	105	110
Phe Leu Leu Val	Ile Pro Phe Asp	Cys Trp Glu Pro Val	Gln Glu
	115	120	125
<210>	59		
<211>	127		
<212>	PRT		
<213>	恒河猴 (Macaca mulatta)		
<400>	59		
Ala Pro Ala Arg	Ser Pro Ser Pro	Gly Thr Gln Pro Trp	Glu His Val
1	5	10	15
Asn Ala Ile Gln	Glu Ala Arg Arg	Leu Leu Asn Leu Ser	Arg Asp Thr
	20	25	30
Ala Ala Glu Met	Asn Lys Thr Val	Glu Val Val Ser	Glu Met Phe Asp
	35	40	45
Leu Gln Glu Pro	Ser Cys Leu Gln Thr	Arg Leu Glu Leu Tyr	Lys Gln
	50	55	60

[0042]

Gly Leu Gln Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
 65 70 75 80

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

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Gln Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
 100 105 110

Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 115 120 125

<210> 60
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴 (Macaca fascicularis)
 <400> 60

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Gly Thr Gln Pro Trp Glu His Val
 1 5 10 15

Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr
 20 25 30

Ala Ala Glu Met Asn Lys Thr Val Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp
 35 40 45

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

Gly Leu Gln Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
 65 70 75 80

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

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Gln Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
 100 105 110

Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 115 120 125

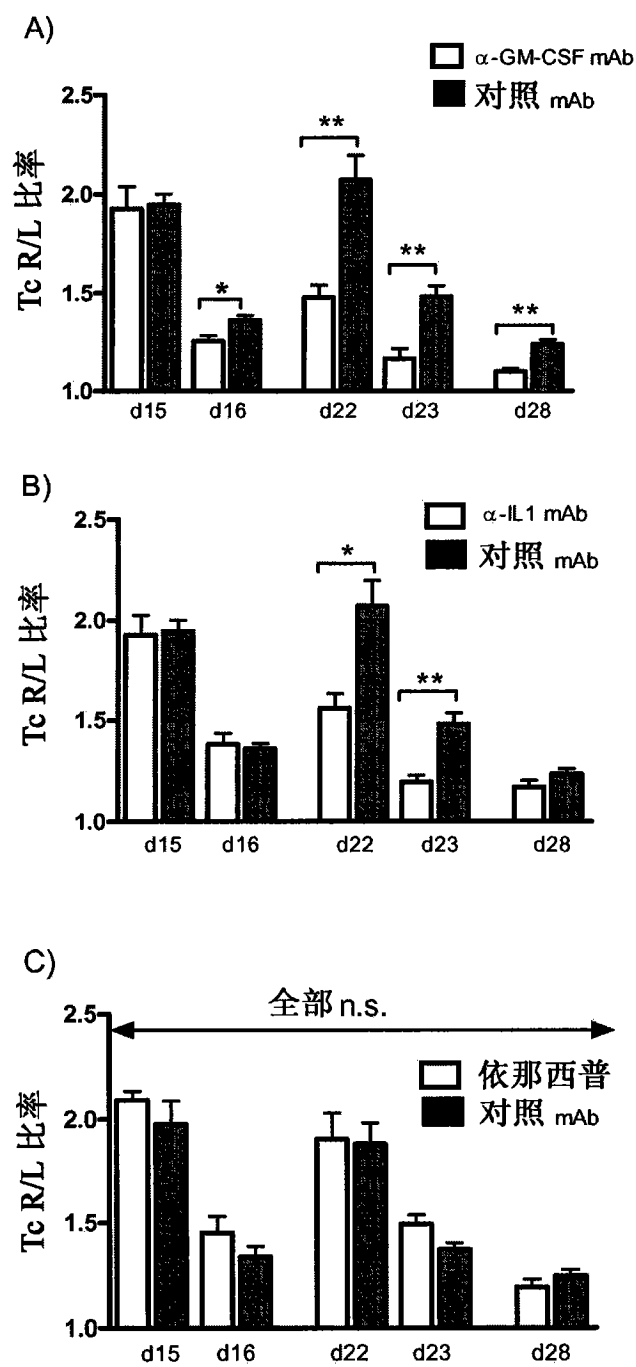


图 1

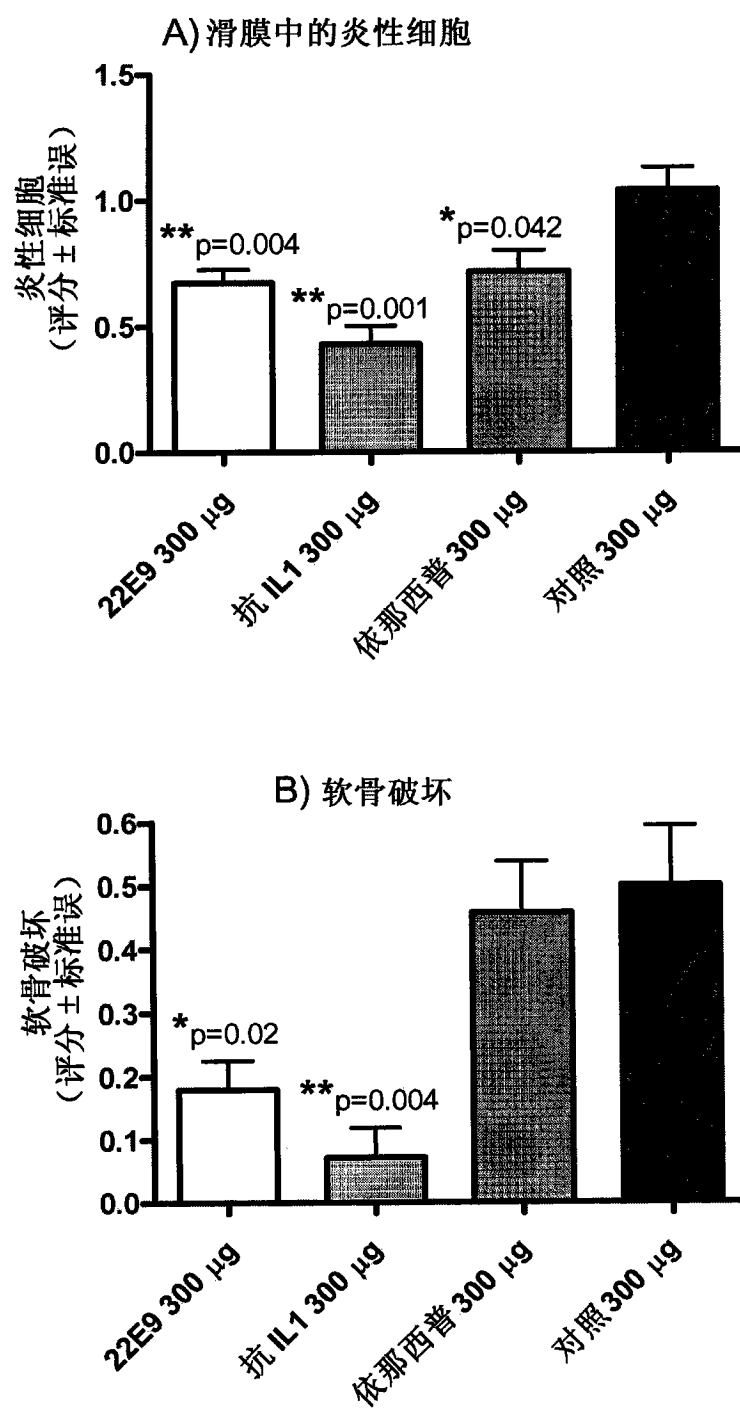


图 2

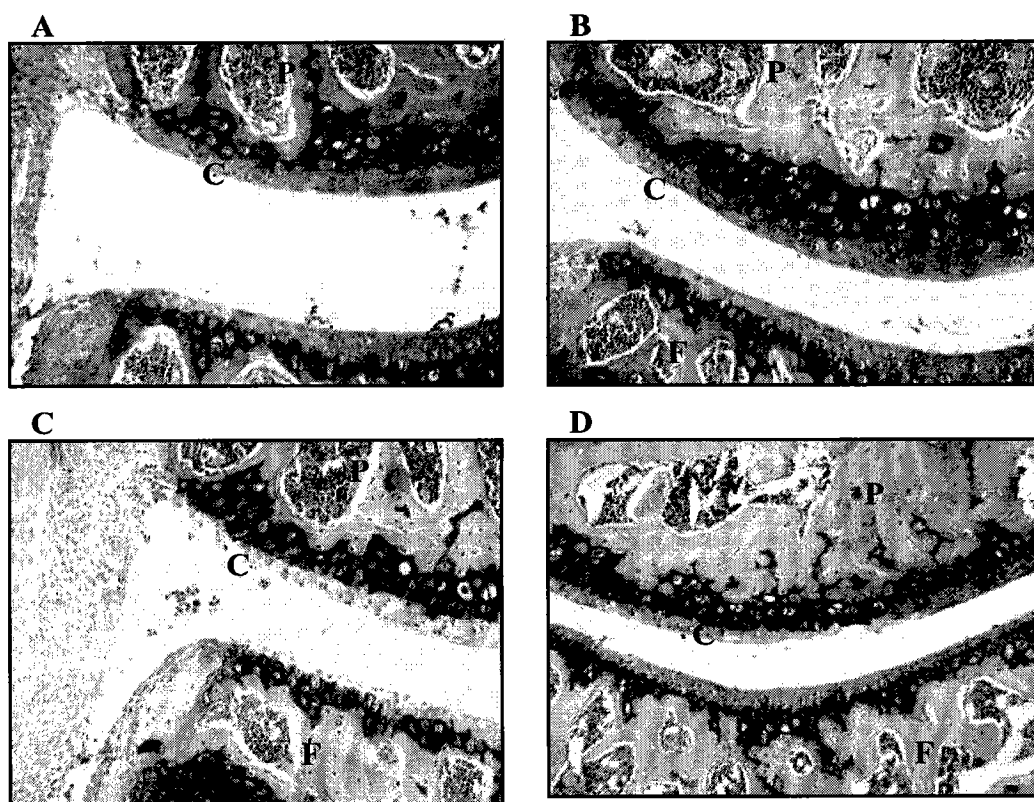


图 3

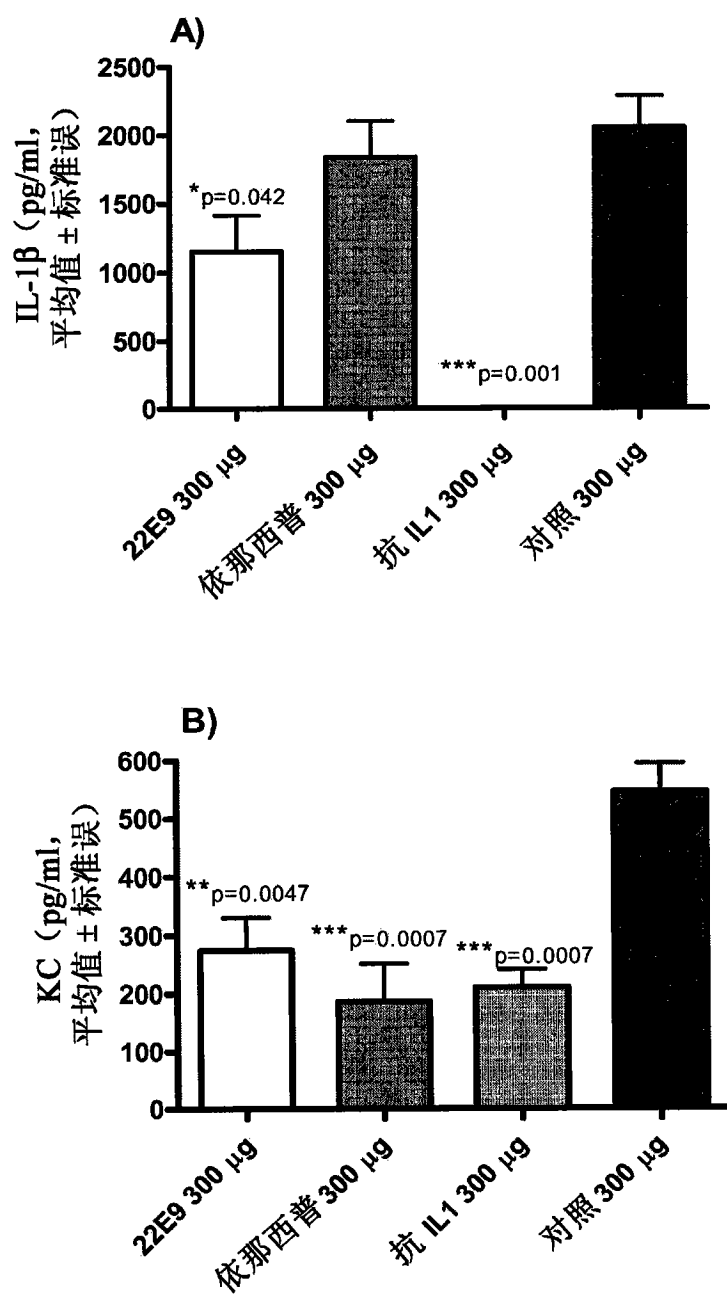


图 4

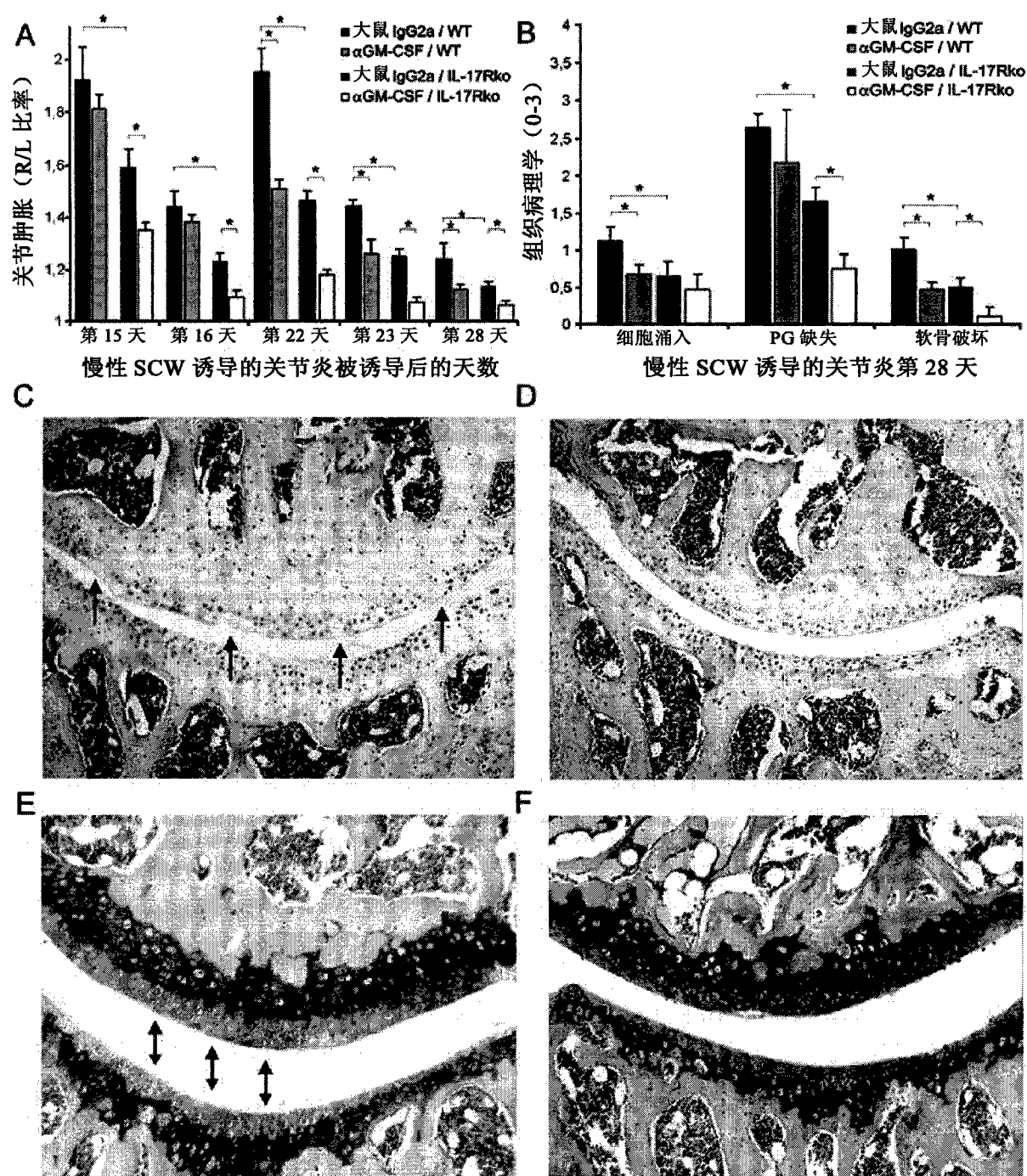


图 5

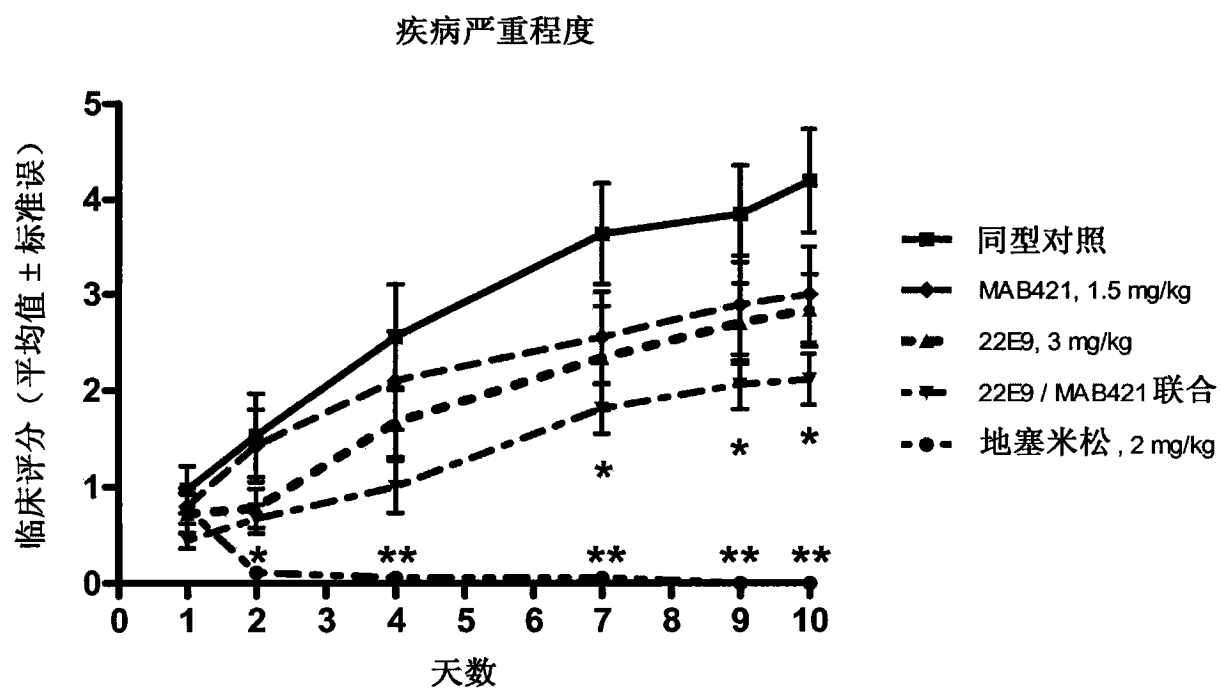


图 6

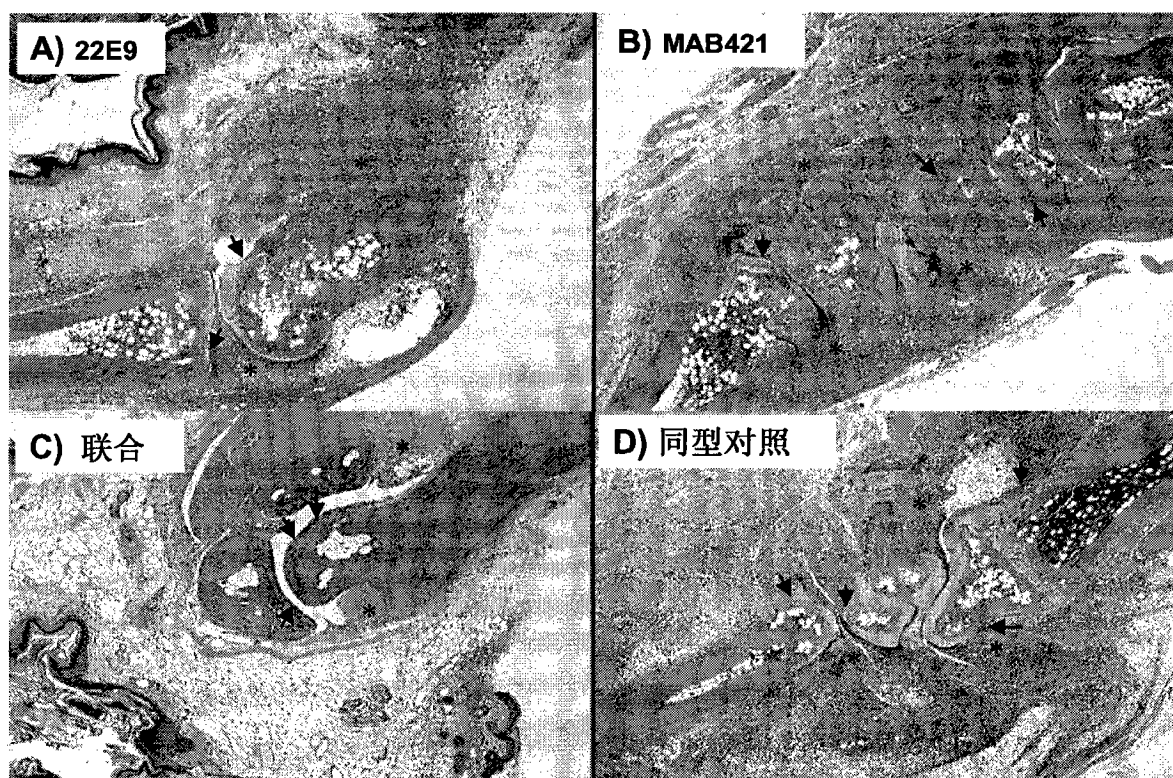


图 7