

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680053131.X

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月4日

[11] 公开号 CN 101379089A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[22] 申请日 2006.12.20

[21] 申请号 200680053131.X

[30] 优先权

[32] 2005.12.20 [33] JP [31] 366465/2005

[86] 国际申请 PCT/JP2006/325391 2006.12.20

[87] 国际公布 WO2007/072866 日 2007.6.28

[85] 进入国家阶段日期 2008.8.20

[71] 申请人 SBI 生物技术有限公司

地址 日本东京都

[72] 发明人 鸭川由美子 赵民权 新井直子

石田晃司

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 封新琴 巫肖南

权利要求书 4 页 说明书 58 页 序列表 51 页

附图 15 页

[54] 发明名称

抗 ILT7 抗体

[57] 摘要

能够结合 IPC 的抗体是通过利用动物细胞来获得的, 在该细胞中与 ILT7 结合的细胞膜蛋白是作为免疫原共表达的。本发明的抗体具有高特异性, 使得该抗体能够从免疫学上将 ILT7 与其他 ILT 家族分子区分开来。本发明的抗 ILT-7 的抗体能够结合 IPC 并抑制其活性。通过本发明的抗 ILT-7 的抗体可以抑制 IPC 的活性, 并且可以治疗或预防干扰素相关疾病。在 IFN α 存在的情况下, ILT7 在 IPC 中的表达仍可维持。因此, 在 IFN α 生成量增加的多种自身免疫病病人体内, 可以预期抗 ILT-7 的抗体对于 IPC 活性的抑制作用。

1. 能够结合人 ILT7 的胞外域的单克隆抗体, 或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段。

2. 根据权利要求 1 的单克隆抗体或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段, 其中, 所述单克隆抗体能够结合人干扰素生成细胞。

3. 保藏号为 FERM BP-10704 的杂交瘤 ILT7#11 或保藏号为 FERM BP-10705 的杂交瘤 ILT7#17 产生的单克隆抗体, 或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段。

4. 根据权利要求 1 的单克隆抗体或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段, 其中, 所述单克隆抗体在重链可变区和轻链可变区中含有如下 i) 至 iii)任意一项的氨基酸序列作为 CDR1、CDR2 和 CDR3:

i) 重链可变区的 CDR1: SDYAWN(SEQ ID NO: 58);

重链可变区的 CDR2: YISYSGSTSYNPSLKSR(SEQ ID NO: 59); 和

重链可变区的 CDR3: SPPYYAMDY(SEQ ID NO: 60);

轻链可变区的 CDR1: KASQDVGTA(AVA)(SEQ ID NO: 61);

轻链可变区的 CDR2: WASTRHT(SEQ ID NO: 62); 和

轻链可变区的: CDR3 QQYSSYPLT(SEQ ID NO: 63);

ii) 重链可变区的 CDR1: SYWIH(SEQ ID NO: 64);

重链可变区的 CDR2: RIYPGTGSTYYNEKFKG(SEQ ID NO: 65);

和

重链可变区的 CDR3: YPTYDWYFDV(SEQ ID NO: 66);

轻链可变区的 CDR1: RASQ(S)ISNYLH(SEQ ID NO: 67);

轻链可变区的 CDR2: YASQ(S)IS(SEQ ID NO: 68);

轻链可变区的 CDR3: QQSNSWPLT(SEQ ID NO: 69);

iii) 重链可变区的 CDR1: SDYAWN(SEQ ID NO: 70);

重链可变区的 CDR2: YISYSGSTSYNPSLKSR(SEQ ID NO: 71);

重链可变区的 CDR3: ALPLPWFAY(SEQ ID NO: 72);

轻链可变区的 CDR1: KASQDVGTA(AVA)(SEQ ID NO: 73);

轻链可变区的 CDR2: WASTRHT(SEQ ID NO: 74); 和

轻链可变区的 CDR3: QQYSSYPYT(SEQ ID NO: 75).

5. 根据权利要求 1 的单克隆抗体或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段, 其中, 所述单克隆抗体含有选自如下(a)至(c)的组合中的任意一项的氨基酸序列的成熟序列作为重链可变区和轻链可变区:

a)SEQ ID NO: 39 的重链可变区和 SEQ ID NO: 41 的轻链可变区;

b)SEQ ID NO: 43 的重链可变区和 SEQ ID NO: 45 的轻链可变区; 以及

c)SEQ ID NO: 47 的重链可变区和 SEQ ID NO: 49 的轻链可变区。

6. 编码权利要求 4 或 5 的单克隆抗体或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段的多核苷酸。

7. 含有编码权利要求 4 或 5 的单克隆抗体或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段的多核苷酸的载体。

8. 以可表达的方式携带权利要求 7 的载体的转化细胞。

9. 制备权利要求 4 或 5 的单克隆抗体或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段的方法, 该方法包括如下步骤: 培养权利要求 8 的转化细胞, 从培养物中回收单克隆抗体或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段。

10. 产生权利要求 1 或 2 的单克隆抗体的杂交瘤。

11. 保藏号为 FERM BP-10704 的杂交瘤 ILT7#11 或者保藏号为 FERM BP-10705 的杂交瘤 ILT7#17。

12. 制备单克隆抗体的方法, 该方法包括以下步骤: 培养权利要求 11 的杂交瘤, 从培养物中收集单克隆抗体。

13. 制备单克隆抗体产生细胞的方法, 其中, 所述单克隆抗体能够结合人 ILT7 的胞外域, 该方法包括以下步骤:

(1)给免疫动物施用细胞, 所述细胞表达含有人 ILT7 胞外域的外源蛋白和与人 ILT7 结合的外源分子; 以及

(2)从所述免疫动物的抗体生成细胞中选择下述抗体生成细胞, 所述抗体生成细胞产生能够结合人 ILT7 的抗体。

14. 根据权利要求 13 的方法, 其中与人 ILT7 结合的分子是细胞膜蛋白。

15. 根据权利要求 14 的方法, 其中所述细胞膜蛋白是 Fc 受体 γ 链。

16. 根据权利要求 15 的方法, 其中表达人 ILT7 和与人 ILT7 结合的分子的细胞是以可表达的方式携带以下的(a)和(b)的细胞:

(a)编码含有人 ILT7 胞外域的氨基酸序列的外源多核苷酸; 以及

(b)编码 Fc 受体 γ 链的外源多核苷酸。

17. 根据权利要求 16 的方法，其中所述细胞是动物细胞。

18. 根据权利要求 17 的方法，其中所述细胞是人源细胞。

19. 根据权利要求 18 的方法，其中所述人源细胞是 293T 细胞。

20. 根据权利要求 13 的方法，该方法还包括克隆化按照权利要求 13 的方法所获得的抗体生成细胞的步骤。

21. 制备能够结合人 ILT7 胞外域的单克隆抗体的方法，该方法包括如下步骤：培养按照权利要求 8 的方法获得的抗体生成细胞，从培养物中收集单克隆抗体。

22. 能够识别人 ILT7 的单克隆抗体或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段，所述单克隆抗体或片段能够通过以下的步骤获得：

(1)给免疫动物施用细胞，所述细胞外源性表达含有人 ILT7 胞外域的蛋白和与人 ILT7 结合的分子；

(2)从所述免疫动物的抗体生成细胞中选择下述抗体生成细胞，所述抗体生成细胞产生能够结合人 ILT7 的抗体；以及

(3)培养从步骤(2)中选择出来的抗体生成细胞，从培养物中回收能够识别人 ILT7 的抗体。

23. 用于制备能够结合人 ILT7 胞外域的抗体的免疫原，该免疫原包括下述动物细胞或者其细胞膜成分，所述细胞以可外源性表达的方式携带(a)编码含有人 ILT7 胞外域的氨基酸序列的多核苷酸和(b)编码 Fc 受体 γ 链的多核苷酸。

24. 根据权利要求 23 的免疫原，其中，所述动物细胞是人源细胞。

25. 检测干扰素生成细胞的方法，该方法包括以下步骤：

使能够结合人 ILT7 胞外域的单克隆抗体或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段与受试细胞接触；以及

检测与细胞结合了的单克隆抗体或含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段。

26. 用于检测干扰素生成细胞的检测试剂，该检测试剂包含能够结合人 ILT7 胞外域的单克隆抗体或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段。

27. 抑制干扰素生成细胞的活性的方法，该方法包括使以下任意成分与干扰素生成细胞接触的步骤：

(a) 能够结合人 ILT7 并且抑制干扰素生成细胞活性的单克隆抗体或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段；以及

(b) 免疫球蛋白或含有该免疫球蛋白的抗原结合区的片段，在所述免疫球蛋白中导入了(a)的单克隆抗体的互补决定区。

28. 抑制活体中干扰素生成细胞的活性的方法，该方法包括给活体施用以下任意成分的步骤：

(a) 能够结合人 ILT7 并且抑制干扰素生成细胞活性的单克隆抗体或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段；

(b) 免疫球蛋白或含有该免疫球蛋白的抗原结合区的片段，在所述免疫球蛋白中导入了(a)的单克隆抗体的互补决定区；以及

(c) 编码(a)或(b)所述成分的多核苷酸。

29. 根据权利要求 27 或 28 的方法，其中，所述干扰素生成细胞的活性是干扰素生成活性，或者干扰素生成细胞的存活，或者二者皆有。

30. 干扰素生成细胞活性抑制剂，其包含下述的任意成分作为活性成分：

(a)能够结合人 ILT7 并且抑制干扰素生成细胞活性的单克隆抗体或者含有该单克隆抗体的抗原结合区的片段；

(b)免疫球蛋白或含有该免疫球蛋白的抗原结合区的片段，在所述免疫球蛋白中导入了(a)的单克隆抗体的互补决定区；以及

(c)编码(a)或(b)所述成分的多核苷酸。

31. 根据权利要求 30 的干扰素生成细胞活性抑制剂，其中，所述干扰素生成细胞的活性是干扰素生成活性，或者干扰素生成细胞的存活，或者二者皆有。

抗 ILT7 抗体

技术领域

本发明涉及能够结合人 ILT7 的抗体。

背景技术

干扰素 α (IFN α : 在下文中“干扰素”以缩写 IFN 代表)以及干扰素 β (IFN β)作为 1 型 IFN 为人们所知, 该类型 IFN 具有抗病毒活性或者抗肿瘤活性。另一方面, 已经有研究表明 IFN α 涉及自身免疫病。例如, 已经报道过在以下的自身免疫病的病人体内有 IFN α 的异常产生。已经有研究提示可以通过中和 IFN α 来减轻自身免疫病的症状。

系统性红斑狼疮(Shiozawa et al., *Arthr. & Rheum.* 35, 412, 1992)

慢性风湿(Hopkins et al., *Clin. Exp. Immunol.* 73, 88, 1988)

已经有报道在给药重组的 IFN α 2 或 IFN 之后自身免疫病的症状出现或者恶化的例子(Wada et al., *Am. J. Gastroenterol.* 90, 136, 1995; Perez et al., *Am. J. Hematol.* 49, 365, 1995; Wilson LE et al, *Semin Arthritis. Rheum.* 32, 163-173, 2002.).

进一步地, 还有研究提示 IFN α 能够诱导树突细胞(dendritic cell)的分化。树突细胞也是一种抗原呈递细胞。因此, 认为树突细胞的分化诱导包括自身免疫病的重要的机制。已经有研究表明在 IFN α 诱导树突细胞分化和系统性红斑狼疮的发作之间有很深的联系(Blanco et al., *Science*, 16: 294, 1540-1543, 2001)。因此, 已经有研究指出 IFN α 与抗肿瘤活性以及自身免疫病密切相关。而且, IFN α 与银屑病的发作有密切的关系(Nestle FO et al., *J. Exp. Med.* 202, 135-143, 2005)。

将当病毒感染时能够产生大量 1 型 IFN 的细胞鉴定为干扰素生成细胞(Interferon Producing cell, IPC)。很少有 IPC 在血液中出现。研究者认为在外周血淋巴细胞中仅有 1%或者更少的 IPC。然而, IPC 具有很高的产生 IFN 的能力。IPC 产生 IFN 的能力能够达到, 例如, 3000pg/毫升/ 10^4 细胞。也就是说, 可以说虽然只有很少的细胞, 但是在病毒感染时血液中产生的大部分的 IFN α 或 IFN β 是由 IPC 产生的。

另一方面, IPC 是未分化的淋巴样树突细胞, 该细胞被认为是树突细胞的前体细胞。IPC 可能指的是类浆树突细胞(Plasmacytoid dendritic cell)。在病毒的刺激下 IPC 会分化成树突细胞并且诱导 T 细胞产生 IFN γ 或 IL-10。IPC 也可以在 IL-3 的刺激下分化成树突细胞。在 IL-3 的刺激下所分化的树突细胞会诱导 T 细胞产生 Th2 细胞因子(IL-4, IL-5 和 IL-10)。因此, IPC 具有在不同的刺激下分化成不同树突细胞的性质。

相应地, IPC 具有两种类型: IFN 产生细胞和树突细胞的前体细胞。在免疫系统中两种细胞都起重要的作用。换言之, IPC 是在多个方面支持免疫系统的重要细胞。

非专利文献 1: Shiozawa et al., Arthr. & Rheum. 35, 412, 1992

非专利文献 2: Hopkins et al., Clin. Exp. Immunol. 73, 88, 1988

非专利文献 3: Wada et al., Am. J. Gastroenterol. 90, 136, 1995

非专利文献 4: Perez et al., Am. J. Hematol. 49, 365, 1995

非专利文献 5: Bianco et al., Science, 16: 294, 1540-1543, 2001

非专利文献 6: Ju et al., Gene. 2004 Apr 28; 331: 159-64.

非专利文献 7: Colonna M et al., Seminars in Immunology 12: 121-127, 2000.

非专利文献 8: Nakajima H. et al., J. Immunology 162: 5-8. 1999

非专利文献 9: Wilson LE et al, Semin Arthritis. Rheum. 32, 163-173, 2002

非专利文献 10: Nestle FO et al., J. Exp. Med. 202, 135-143, 2005

专利文献 1: WO03/12061(U.S. Patent Published Application No. 2003-148316)

发明内容

[本发明所要解决的问题]

本发明的目的是提供能结合免疫球蛋白样转录物 7 (Immunoglobulin-Like transcript-7, ILT7) 的抗体, 并且检测, 鉴定或者分离 IPC。本发明的另一个目的是调节 IPC 的活性。

为了调节诸如 IFN 这样的体液因子的活性, 给药能够识别该因子的抗体是有效的。例如, 已经实现了通过针对白介素(IL)-1 或者 IL-4 的抗体来治疗自身免疫病的尝试(Guler et al., Arthritis Rheum., 44. S307, 2001)。进一步地, 设想中和抗体可以和干扰素一样作为种自身免疫病的治疗制剂来起

作用(Stewart, TA. Cytokine Growth Factor Rev. 14; 139-154, 2003)。可以预言与上述相同的方法对于由 IPC 所产生的 IFN 同样有效。然而, 这样的方法是基于在产生体液因子之后抑制该因子的效力。如果可以直接地控制所需体液因子的产生, 就可以得到更明显的疗效。

已经报道过能够识别人 IPC 的抗体。例如, 抗 BDCA-2 单克隆抗体是人 IPC-特异的单克隆抗体(Dzionic A. et al. J. Immunol. 165: 6037-6046, 2000)。研究者发现抗 BDCA-2 单克隆抗体能够有效地抑制人 IPC 产生 IFN(J. Exp. Med. 194: 1823-1834, 2001)。而且, 还报道过能够识别小鼠中干扰素生成细胞的单克隆抗体能够抑制干扰素的产生(Blood 2004 Jun 1; 103/11: 4201-4206.Epub 2003 Dec)。已经有报道称针对小鼠类浆树突细胞的单克隆抗体会造成树突细胞数目的减少(J. Immunol. 2003, 171: 6466-6477)。

相似地, 如果能够提供识别人 IPC、并且调节其活性的抗体, 那么会非常有用。例如, 本发明的发明者已经显示了能够识别 Ly49Q 的抗体会特异地结合小鼠的 IPC。然而, 针对 Ly49Q 的抗体不会干扰小鼠 IPC 的活性(Blood, 1 April 2005, Vol. 105, No. 7, 和 pp. 2787-2792.; WO2004/13325)。另一方面, 已知 ILT7 是一种特异表达在类浆树突细胞中的分子(Ju XS et al. and Gene. 2004 Apr 28; 331: 159-64.; WO03/12061)。然而, 还没有获得过任何针对 ILT7 的抗体。因此, 抗体对于 IPC 的作用仍然未知。

ILT7 是一种含有免疫球蛋白样基序的膜蛋白。已经有报道称该分子是在骨髓系统或者淋巴系统的细胞中表达的分子之一(Colonna M et al., Seminars in Immunology 12: 121-127, 2000)。一类具有类似于 ILT7 结构的分子被指定为 ILT 家族。ILT 家族也与杀伤细胞抑制受体(killer cell inhibitory receptor, KIR)的结构、功能相近。ILT7 与 ILT 家族其它分子一样具有 4 个 C-型免疫球蛋白样结构域。研究者认为 ILT7 像 ILT1、ILT1 样蛋白、ILT8 和 LIR6a 等一样将活化的信号送入到细胞内。已经确认了, 在血系统细胞中有属于 ILT 家族的分子的表达(Young et al., Immunogenetics 53: 270-278, 2001; "The KIR Gene Cluster. "Carrington, Mary and Norman, Paul. Bethesda(MD): National Library of Medicine(US), NCBI; 2003)。

于是, 通过减除杂交法检测到了 ILT7 在类浆树突细胞(Plasmacytoid dendritic cell, PDC)中的高表达以及在单核细胞衍生的树突细胞(monocyte-derived dendritic cell, MDDC)中的低表达。ILT2 和 ILT3 不仅在

PDC 中有表达, 而且在从 MDDC 或 CD34 阳性细胞中获得的 DC 中也有表达。然而, 由于 ILT7 的 mRNA 在 PDC 中特异地表达, 所以发现了可以使用该 mRNA 作为 PDC 的标记。另外, 当时已经发现了, 通过 CpG 的刺激可以降低 ILT7 的表达(Ju XS et al. Gene. 2004 Apr 28; 331: 159-64.; WO03/12061)。

本发明的发明者通过研究人 IPC 确认了: 在 IPC 中 ILT7 的表达特异性地亢进。于是, 本发明的发明者尝试了制备 ILT7 抗体, 并且阐述其作用。例如, 诸如 ILT2 和 ILT3 这样的构成 ILT 家族的分子, 特别是在其胞外域的氨基酸序列上具有高保守性(图 9)。这些 ILT 家族分子分别在不同的血细胞中展示特有的表达谱。因此, 获得能够从免疫学上区分 ILT7 与其他的 ILT 家族分子的抗体是非常重要的。然而, 实际上, 由于下述的障碍, 制备以 ILT7 为免疫原特异性结合人 IPC 的抗体是困难的。

通常, 将通过基因重组技术制备的蛋白用作免疫原, 以便获得能够识别从活体组织中得到的微量蛋白的抗体。本发明的发明者以人 ILT7 的 cDNA 序列、以及根据该碱基序列翻译而成的氨基酸序列的信息(GenBank Accession No. NM_012276)为基础设法表达了人 ILT7。然而, 在常规条件, 不能作为重组体表达人 ILT7。

为了获得蛋白的抗体, 也经常尝试使用天然蛋白的部分氨基酸序列作为免疫原。然而, 由于在 ILT 家族中其氨基酸序列同源性极高, 所以对于人 ILT7 几乎没有氨基酸序列是特异的。而且, 为了使抗体能够识别细胞表面的分子, 选择位于细胞表面的区域是必要的, 其中该区域是由能够作为抗原表位被抗体识别的部分组成的。因此, 研究者已经认识到利用氨基酸序列片段作为免疫原来制备特异针对 ILT7 的抗体是不现实的。

本发明的发明者明确了在这种条件下可以通过利用特异的免疫原获得能够结合 IPC 的抗体。更进一步地, 本发明的发明者发现: 以这种方法获得的抗体能够特异地识别人 IPC 并且进一步地具有调节其活性的作用, 因此成功的完成了本发明。就是说, 本发明涉及下述的抗 ILT-7 抗体、其制备方法及其应用。

[本发明的效果]

本发明提供了可以用于制备能够识别人 ILT7 的抗体的免疫原以及利用该免疫原制备抗人 ILT-7 抗体的方法。ILT7 是属于 ILT 家族的一种膜蛋白。

具体地，ILT 家族的胞外区的氨基酸序列是高度保守的。因此，想要通过常规的免疫方法来制备能够区分 ILT 家族成员的抗体是非常困难的。本发明的发明者显示了可以很方便地利用动物细胞来获得能够识别人 ILT7 的抗体，其中该动物细胞共表达了 ILT7 与细胞膜蛋白。通过本发明的方法获得的抗 ILT-7 抗体具有高特异性，该抗体能够区分人 IPC 与其他表达 ILT 家族成员的细胞。

在优选应用实例中，本发明所提供的抗人 ILT-7 抗体能够结合人 IPC。另外，本发明的抗体特异地识别人 IPC。因此，该抗体可用于检测和分离 IPC。IPC 是产生大部分 1 型干扰素的细胞。因此，在诊断和研究诸如自身免疫病这样的与 IPC 相关的疾病时，检测和分离 IPC 是很重要的。具体地，按照本发明的发明者的发现，IPC 中 ILT7 的表达不因 $IFN\alpha$ 的存在而降低。在患有自身免疫病的病人体内， $IFN\alpha$ 的表达经常被促进。这意味着可以使用本发明的抗 ILT-7 的抗体来检测和分离患有自身免疫病的病人的 IPC，在该病人体内 $IFN\alpha$ 的表达受到了促进。

在优选应用实例中，本发明提供的抗 ILT-7 抗体具有调节人 IPC 的活性的作用。因此，可以使用本发明的抗 ILT-7 抗体来抑制 IPC 的活性。如前所述，在 $IFN\alpha$ 存在的情况下，IPC 中 ILT7 的表达不会减少。因此，如果利用本发明的抗体对 IPC 的活性的抑制，那么可以预期该抗体对于患有自身免疫病的病人具有治疗效果，其中在该病人体内 $IFN\alpha$ 的表达被促进了。

少量的 IPC 就可以产生大量的 IFN。需要与 IFN 分子一样多的抗体来中和 IFN。然而，在本发明中直接抑制了生成细胞的活化。因此，可以预期与利用抗 IFN 抗体中和 IFN 相比，即使使用少量的抗体也能获得强效的 IFN 抑制作用。此外，在持续产生 IFN 的情况中，可以预言通过 IFN 抗体来进行中和是暂时的抑制。在本发明中，由于抑制了 IPC 的活性，可以预期对 IFN 的产生的抑制作用可以在很长的时间内有效。

附图说明

图 1a 是通过 RT-PCR 方法检测 ILT7 基因的 mRNA 的表达的照片。该图是对人免疫细胞中 ILT7 基因的 mRNA 的表达的分析结果。

图 1b 是利用定量 PCR 方法检测和比较多种人组织和细胞中 ILT7 基因的 mRNA 的表达的图表。横轴显示的是所检测的组织和细胞，纵轴显示的是

ILT7 的表达水平，其中 ILT7 的表达水平按照 GAPDH 的表达水平进行了标准化。

图 2 是显示 ILT7 蛋白结构的图表。其中图 2(a)显示的是 ILT7 蛋白的氨基酸序列，并且进一步在图中显示了推定的分泌信号序列以及跨膜区；图 2(b)显示了由构建的表达载体所编码的 ILT7 蛋白的简图。

图 3 是一张图片，该图片显示了将 ILT7 表达载体和 FcR γ 表达载体导入到细胞内、并且利用 FCM 检测 ILT7 分子在细胞表面的表达的结果。横轴表示利用抗 FLAG 抗体检测的荧光强度，即带有 FLAG 标签 ILT7 分子在细胞表面的表达强度，同时纵轴表示细胞数目。

图 4 是一张照片，该照片显示的是利用免疫沉淀和 Western 印迹方法分析的、在导入了 ILT7 表达载体和 FcR γ 表达载体的细胞中的分子结合。左边的图表显示了在利用抗 myc 抗体对 FcR γ 分子进行了免疫沉淀之后，利用抗 FLAG 抗体对 ILT7 分子进行印迹的结果的图片（上方的图片）、以及利用抗 myc 抗体对 FcR γ 分子进行印迹的结果的图片（下方的图片）。相似地，右边的图片显示的是在利用抗 FLAG 的抗体对 FcR γ 分子进行免疫沉淀之后，利用抗 FLAG 抗体（上方的图片）和抗 myc 抗体（下方的图片）进行印迹的结果的图片。

图 5 是显示了通过将 ILT7 表达载体和 FcR γ 表达载体导入到细胞内、并利用 N 糖苷酶处理来检测 ILT7 分子糖基化的照片。左侧的照片显示的是没有利用 N 糖苷酶处理 ILT7 时 ILT7 的大小，右侧的照片显示的是利用 N 糖苷酶处理 ILT7 后 ILT7 的大小。

图 6a 是利用 FCM 分析来检测所产生的抗 ILT7 单克隆抗体的反应性的图片。(a)显示的是抗 ILT-7 抗体与 BDCA-2 阳性 IPC 结合的结果，该结果是利用人外周血淋巴细胞以及利用抗 ILT-7 抗体和抗 BDCA-2 抗体进行双染色来分析的。纵轴显示的是与 BDCA-2 抗体的反应性，横轴显示的是每种制备各种抗 ILT7 抗体的反应性。

图 6b 是显示了利用 FCM 分析检测制备的抗 ILT7 单克隆抗体的反应性的图片。(b)显示了抗 ILT-7 抗体与 ILT7 分子结合能力的检测结果，其中该检测是利用导入了 ILT7 和 FcR γ 表达载体的 293T 细胞进行的。纵轴显示的是抗 FLAG 抗体的反应性，即带有 FLAG 标签的 ILT7 分子的表达强度，横轴显示的是各抗 ILT7 抗体的反应性。

图 7 是一张图片，该图片显示了通过 FCM 分析检测制备的抗 ILT7 单克隆抗体中的两个克隆对于人外周血淋巴细胞的反应性。左侧的三个图片显示的是#11 的结果，右侧的三个图片显示的是#17 的结果。在左侧图表中，带有 ILT7 标记的每个轴表示的是 ILT7#11 的反应性。相似地，在右侧图表中，带有 ILT7 标记的每个轴表示的是 ILT7#17 的反应性。

图 8 是制备的抗 ILT7 单克隆抗体 ILT7#11 和 ILT7#17 与人淋巴细胞的结合能力的检测结果和与抗 BDCA-2 抗体的相应结合能力的比较结果。纵轴显示的是抗 CD123 抗体的反应性，横轴显示的是每种抗体的反应性。就是说，每种抗体结合 CD123 阳性细胞的一部分。该图显示了当利用 CpG 和 IFN α 刺激淋巴细胞时分析反应性得到的结果。

图 9a 是显示了与 ILT7 分子具有高同源性的家族分子的氨基酸序列的图片。主要显示每个胞外区的氨基酸序列的比对；图 9b 是图 9a 的续图；图 9c 是图 9b 的续图。

图 10 是制备的抗 ILT7 单克隆抗体 ILT7#11、ILT7#17 针对 ILT1 分子、ILT2 分子和 ILT3 分子的反应性的检测结果，该检测是利用导入了该三种分子的表达载体的细胞进行的。上方的图片显示的是对反应性的结果的再确定，该反应性是针对共表达具有 FLAG 标记的 ILT7 分子和 FcR γ 的细胞的。下方的图片显示的是针对导入了 ILT1、ILT2、ILT3 以及 FcR γ 的细胞的反应性的结果(左侧图片：ILT7#11，右侧图片：ILT7#17)。横轴显示的是每种抗 ILT-7 抗体的反应性。

图 11 是显示了制备的抗 ILT7 单克隆抗体 ILT7#11 和 ILT7#17 对于人淋巴细胞的干扰素产生活性的作用的图片。在该图片中，横轴显示的是当利用流感病毒刺激人淋巴细胞时培养上清中 IFN α 的浓度，纵轴显示的是处理的抗体。术语“无感染”是指没有用流感病毒刺激的细胞的结果。

图 12 是显示了制备的抗 ILT7 单克隆抗体 ILT7#37、ILT7#28 和 ILT7#33 的 CDC 活性的图片。使用从任何杂交瘤中获得的抗 ILT7 单克隆抗体，当抗体浓度为 0.1 μ g/毫升或更高时，均显示了 80% 或更高的 CDC 活性。在除了抗 ILT7 单克隆抗体之外的抗体的例子中，没有观察到针对目标细胞的 CDC 活性。

图 13 是显示了制备的抗 ILT7 单克隆抗体 ILT7#17、ILT7#26、ILT7#37、ILT7#28 和 ILT7#33 在目标细胞中的内化(internalization)的图片。APC 的荧

光强度是在孵育之前出现在细胞表面的 ILT7-抗 ILT-7 抗体免疫复合物的量的指示剂，并且无论 ILT7-抗 ILT-7 抗体免疫复合物是在目标细胞表面还是在孵育之后整合到细胞里都可以检测到该复合物。另一方面，FITC 的荧光强度是在孵育之后仍然存在于细胞表面的 ILT7-抗 ILT-7 抗体免疫复合物的量的指示剂。就是说，内化会降低 FITC 的荧光强度。

发明的具体实施方式

已经有报道人 ILT7(免疫球蛋白样转录本 7)是在类浆树突细胞中特异表达的分子(Gene. 2004 Apr 28; 331: 159-64.; WO03/12061)。或者，已知可以使用人 ILT7 作为预测淋巴瘤的预测指示剂(WO2005/24043)。然而，还没有找到制备能够识别人 ILT7 的抗体的方法。

人 ILT7 由在 SEQ ID NO: 2 中显示的 499 个氨基酸残基构成，并且该蛋白是在结构上具有 4 个免疫球蛋白样结构域和一个跨膜区(445-466; 在 SEQ ID NO: 2 中显示的从 429 到 450)的 1 型跨膜蛋白。在包括 N 末端的 444 个氨基酸残基中，16 个氨基酸残基(在 SEQ ID NO: 2 中显示的从 -15 到 -1)构成信号序列，从 17 位到 444 位氨基酸残基(在 SEQ ID NO: 2 中显示的从 1 到 428)构成的胞外域。另一方面，C 末端区是胞内区。人 ILT7 的大部分是胞外域，由 33 个氨基酸残基组成胞内结构域(从 467 到 499; 在 SEQ ID NO: 2 中显示的从 451 到 483)。目前还没有预测与信号作用相关的基序出现在胞内域中。人 ILT7 的全长氨基酸序列在 SEQ ID NO: 2 中显示，并且编码该氨基酸序列的 cDNA 碱基序列在 SEQ ID NO: 1 中显示。此处，如 SEQ ID NO: 1 中显示的成熟肽的编码区(72)..(1520)不包含终止和起始密码子(終始コドン)。就是说，在 SEQ ID NO: 1 中的包含终止和起始密码子的蛋白编码序列是从 24 到 1523。

可以认为配体信号是通过人 ILT7 与信号转导分子的结合传导到细胞的。例如，大部分 Fc 受体的 γ 链存在于细胞中。另外，胞内域含有参与信号作用的免疫受体的以酪氨酸为基础的激活基序(ITAM)。ITAM 是氨基酸序列部分，该氨基酸序列部分在与诸如 Fc 受体这样的免疫受体相关的转接子分子中常见。诸如 YxxL(SEQ ID NO: 76)这样的酪氨酸磷酸化靶点的基序是包含在 ITAM 中的并且该信号是通过磷酸化传导的。已知的在胞内域含有 ITAM 的信号转导分子的例子除了 Fc 受体的 γ 链还包括 CD3 ζ 和 DAP12。

目前还没有找到能够结合人 ILT7 的配体。

本发明的发明者通过基因表达分析确认了 ILT7 在人 IPC 的特异表达。本发明的发明者认为如果可以获得能够在免疫学上从其他的免疫分子中区分人 ILT7 的抗体，那么可以将该抗体用于针对 IPC 的研究中。然而，包括 ILT7 在内的 ILT 家族中存在很多分子具有相似的结构。诸如 ILT1，ILT2，ILT3，ILT4，ILT5，ILT6 或 LIR-8 这样的分子含有高同源性的氨基酸序列，特别是在其胞外域中。因此，本发明的发明者认为利用含有组成胞外域的部分氨基酸序列作为免疫原很难获得能够区分这些分子的抗体。于是，本发明的发明者利用表达人 ILT7 的细胞作为免疫原来设法制备了针对人 ILT7 的抗体。

然而，使用常规的表达载体不能够导致人 ILT7 的 cDNA 在动物细胞中的表达。已经有报道具有与 ILT7 非常相似的结构 ILT1 分子与 Fc 受体的 γ 链相关。就是说，当将诸如 RBL(大鼠噬碱细胞性白血病)细胞和 P815(小鼠肥大细胞瘤)细胞这样的表达 Fc 受体的 γ 链的细胞作为宿主细胞时，可以观察到 ILT1 在细胞表面的表达。然而，如果强迫 ILT1 在 293 这样原本不表达 Fc 受体的 γ 链的细胞中表达，那么不能观察到该蛋白在细胞表面的表达。另一方面，研究表明当 ILT1 与 Fc 受体的 γ 链共表达时可以确认 ILT1 在细胞表面的表达(Nakajima H. et al., J. Immunology 162: 5-8.1999)。然而，还没有用于制备 ILT7 抗体的免疫原的信息。

例如，在该报道中，将导入了 ILT1 基因的 RBL 细胞作为免疫原来制备 ILT1 抗体。本发明的发明者设法利用与上述相同的方式使用导入了 ILT7 基因的 RBL 细胞制备了 ILT7 抗体。然而，即使 ILT7 被迫在 RBL 细胞(P815)中表达，也没有观察到 ILT7 在细胞表面的表达，因此不能将该细胞用作抗原。

本发明的发明者为了获得能够识别人 ILT7 的抗体进行了专门的研究。因此，本发明的发明者发现了可以使用指定的转化细胞作为免疫原来制备所需抗体，并完成了本发明。就是说，本发明涉及能结合人 ILT7 胞外域的单克隆抗体，并且涉及含有其抗原结合区的片段。

在本发明中，将人 ILT7 定义为：在人 IPC 中表达的天然分子或者在免疫学上与人 IPC 中表达的 ILT7 等价的分子。在本发明中，可以通过例如以下方法确认抗体与人 ILT7 的结合。

- 基于与人细胞的反应性的确认:

根据本发明的发明者的发现, 在人 IPC 中观察到了人 ILT7 的特异表达。最初, 是将人 ILT7 作为在类浆树突细胞中观察到有表达的基因而分离的 (Blood. 2002 100; 3295-3303, Gene. 2004 Apr 28; 331: 159-64.)。另外, 还已知可以将其用作类浆树突细胞的标记(WO03/12061)。假设类浆树突细胞和 IPC 是基本相同的细胞种群或者其大部分是相同的。因此在这些报道与本发明的发明者的发现之间没有矛盾。

考虑到人 ILT7 这样的表达谱, 首先, 本发明中能够结合人 ILT 的抗体的一个重要性质是与 IPC 或者类浆树突细胞的, 至少部分亚类(サブセット)的结合活性。可以使用各个细胞种群的特异的细胞表面标记来确定某细胞是 IPC 还是类浆树突细胞。例如, 可以通过利用能结合细胞表面标记的抗体和需要检测结合活性的抗体进行的双染色来确认该待测抗体与目标细胞的结合。就是说, 本发明中的 IPC 包含例如表达 BDCA2 的细胞。

- 基于与表达人 ILT7 基因的转化细胞的反应性的确认:

本发明的发明者发现当人 ILT7 基因的表达是在一定条件下进行的时候, 可以重构在人 IPC 中表达的 ILT7 的免疫学性质。因此, 也可以基于抗体针对人为导入了编码 ILT7 的基因的细胞的反应性来确认针对人 ILT7 的反应性。也就是, 本发明涉及单克隆抗体或者含有该抗体的抗原结合区的片段, 其中该抗体含有具有胞外域的氨基酸序列并且能够结合与信号转导分子共表达的分子。此处, 该胞外域包括与在 SEQ ID NO: 2 中显示的氨基酸序列的 N 末端第 17 到第 444 位(在 SEQ ID NO: 2 中从 1 到 428)相应的氨基酸序列。

例如, 表达在人 IPC 中的 ILT7 的免疫学性质可以在共转染了两种载体的细胞中维持, 其中该两种载体分别为含有编码人 ILT7 的 DNA 的表达载体和含有编码信号转导分子的 DNA 的表达载体。因此, 在本发明中, 优选将共表达人 ILT7 和信号转导分子的转化细胞用作确认本发明中的抗体与人 ILT7 胞外域的亲和性的细胞。在本发明中, 当利用转化细胞来确认抗体的反应性时, 需要利用没有被转化的细胞作为对照。此外, 利用只表达信号转导分子的相同宿主细胞作为对照, 来确认没有检测到抗体的结合能力也是很重要的。

在本发明中, 可以将能够诱导人 ILT7 在细胞表面表达的分子作为共表

达的信号转导分子来使用。本发明中的信号转导分子也可以被定义为：在表达 ILT7 的细胞中，能够将天然人 ILT7 的免疫学性质赋予 ILT7 分子的至少胞外域分子。此处，天然人 ILT7 的免疫学性质是指能够被能结合人 IPC 的抗体所识别。

具体地，优选地使用 Fc 受体的 γ 链或者 DAP12 作为信号转导分子。在本发明中，特别优选 Fc 受体的 γ 链作为信号转导分子。Fc 受体的 γ 链是由 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列构成的分子。信号转导分子也可以是片段，只要共表达的人 ILT7 定位在细胞表面。只要共表达的人 ILT7 定位在细胞表面，可以在如 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列上进行突变或者增加。也就是说，本发明提供制备细胞的方法，该细胞能够制备能结合人 ILT7 胞外域的单克隆抗体，该方法包括以下步骤：

(1)给免疫动物施用细胞，其中，该细胞外源表达含有人 ILT7 的胞外域的蛋白和含有如 SEQ ID NO: 16 中所述的氨基酸序列的分子；和

(2)从免疫动物的抗体生成细胞中选择产生能够结合人 ILT7 的抗体的抗体生成细胞。

随后，作为在本发明中能够结合人 ILT7 的抗体，优选地使用能与细胞种群交叉反应的抗体，已知在该细胞种群中没有观察到除了 ILT7 以外的 ILT 家族其他成员的表达。具体地，作为在本发明中能够结合人 ILT7 的抗体，优选地使用能与指定细胞种群结合的抗体，其中该细胞种群已知没有观察到除了 ILT7 以外的 ILT 家族其他成员的表达，并且该观察是在与确认对于 IPC 的结合的条件相同的条件下进行的。如已经描述的，例如，ILT2 和 ILT3 不仅在 PDC 中有表达，而且在从 MDDC 或者 CD34 阳性细胞中所获得的 DC 中也有表达(Gene. 2004 Apr 28; 331: 159-64.)。另一方面，由于 IPC 分化成树突细胞，所以不能检测到 ILT7 的表达。因此，在可以确认对于 IPC 的结合的条件下，不能检测到与从 MDDC 或者 CD34 阳性细胞中获得的 DC 结合的抗体也包括在本发明的能够结合人 ILT7 的抗体中。

已经报道过下述其他 ILT 家族分子的表达图式(“The KIR Gene Cluster” Carrington, Mary and Norman, Paul. Bethesda(MD): National Library of Medicine(US), NCBI; 2003, Gene. 2004 Apr 28; 331: 159-64.)。因此，能结合人 IPC 或者 PDC、并且不能确认与下述细胞结合的抗体也包括在具有针对 ILT7 的特异性的抗体中：

ILT1; 骨髓系细胞(单核细胞、单核细胞来源 DC、巨噬细胞);

ILT2; PDC、B 细胞、CD34 阳性细胞、来源于 CD34 阳性细胞的 DC 以及来源于单核细胞的 DC;

ILT3; PDC 和 DC;

ILT5; 单核细胞, 来源于 CD34 阳性细胞的 DC 和来源于单核细胞的 DC; 以及

ILT8; 单核细胞系。

就是说, 本发明中能够结合人 ILT7 的胞外域的单克隆抗体优选地包含具有以下免疫学性质的单克隆抗体:

a) 结合人 IPC 的单克隆抗体;

b) 该单克隆抗体在与 IPC 结合的条件下, 能够确认不与从含有单核细胞、巨噬细胞、B 细胞、CD34 阳性细胞和由这些细胞衍生出的树突细胞的组中选择出来的一种或多种细胞的结合。

特别是, 作为本发明的单克隆抗体, 优选的是在与 IPC 结合的条件下, 不能确认与单核细胞、巨噬细胞、B 细胞、CD34 阳性细胞和由这些细胞衍生出的树突细胞结合的抗体。

或者, 在本发明中能够结合人 ILT7 胞外域的单克隆抗体优选地包括具有以下免疫学性质的单克隆抗体:

c) 能够结合共转染了两种表达载体的转化细胞的单克隆抗体, 其中这两种表达载体分别为具有编码人 ILT7 的 DNA 的表达载体和具有编码信号转导分子的 DNA 的表达载体;

d) 在与 c) 中所描述的与共转染细胞结合的条件下, 可以不能确认与转化之前的宿主细胞结合; 或者

本发明的单克隆抗体包括具有以下免疫学性质的单克隆抗体:

e) 在与 c) 中所描述的与共转染细胞结合的条件下, 不能确认与仅表达信号转导分子的宿主细胞结合。

在本发明中, 可以通过使用被迫表达每种其他 ILT 家族分子的细胞来确认抗 ILT7 的单克隆抗体与 ILT 家族的其他分子没有交叉反应的事实。也就是说, 为了强迫表达, 将编码每种 ILT 家族分子的氨基酸序列的 cDNA 导入到合适的宿主细胞中。向获得的宿主细胞中加入需要验证交叉反应的抗 ILT7 的单克隆抗体。然后, 可以确认如果抗体与细胞的结合, 那么该抗

体能够从免疫学上将 ILT7 与其他的 ILT 家族分子区分开来, 其中在该细胞中没有观察到除了 ILT7 以外的 ILT 家族分子的表达。例如, 在下述的例子中, 确认了通过本发明的方法获得的抗 ILT7 的单克隆抗体与 ILT1, ILT2 和 ILT3 没有交叉反应的事实。因此, 本发明中的单克隆抗体的优选的应用实例是能够结合 ILT7 的单克隆抗体, 并且在相同条件下不能检测到该单克隆抗体与 ILT1, ILT2 和 ILT3 的结合。

具体地 ILT2 和 ILT3 是已经证明在 IPC 中有表达的基因(Ju et al. Gene 331, 159-164, 2004)。然而, 根据 IPC 的分化水平或者一定条件, 这些分子各自对于每种细胞可能显示出固有表达谱, 其中一定条件是诸如用病毒或者其他细胞因子刺激。使用能够在免疫学上将这些 ILT 家族分子与 ILT7 区分开来的抗体, 可以特异的测定 ILT7 表达的变化。

可以基于例如流式细胞技术的原理来确认需要确认结合能力的单克隆抗体对于各种类型细胞的结合。为了基于流式细胞技术的原理来确认抗体的反应性, 用可以产生可检测的信号分子或者原子团来预先标记抗体是很方便的。通常使用荧光或者发光标记。基于流式细胞技术的原理可以使用荧光活化细胞分检器(FACS)来分析荧光标记抗体与细胞的结合。使用 FACS 可以有效地确认多种抗体与细胞的结合。

具体的, 例如以前已经发现能够鉴定 IPC 的抗体 A 和需要分析其与 IPC 结合性质的抗体 B 与含有 IPC 的细胞群同时反应。抗体 A 和抗体 B 预先标记了能够互相区分这些抗体的荧光信号。在相同的细胞群中检测到两种信号的例子中, 可以确认这些抗体与相同的细胞群结合。换言之, 抗体 A 和 B 具有相同的结合性质。在抗体结合到不同的细胞群的例子中, 很明显两种抗体具有不同的结合性质。

本发明中的优选单克隆抗体包含由杂交瘤 ILT7#11 或 ILT7#17 产生的单克隆抗体。已经于 2005 年 10 月 21 日在独立行政法人国立产业技术综合研究所专利微生物保藏中心保藏了杂交瘤 ILT7#11 和杂交瘤 ILT7#17, 保藏号为 FERM BP-10704 和 FERM BP-10705。

具体保藏事项如下:

(a)保藏机构名称和地址

名称: 独立行政法人国立产业技术综合研究所专利微生物保藏中心

地址: AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan(zip code

305-8566)

(b) 保藏日期: 2005 年 10 月 21 日

(c) 保藏号: FERM BP-10704(杂交瘤 ILT7#11)

(c) 保藏号: FERM BP-10705(杂交瘤 ILT7#17)

本发明的单克隆抗体也可以是其含有其抗原结合区的片段。例如, 可以将酶消化 IgG 所得的含有其抗原结合区的抗体片段用作本发明中的抗体。具体的, 可以通过用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化来获得诸如 Fab 和 F(ab')₂ 这样的抗体片段。已经众所周知可以将这些抗体片段用作具有抗原亲合性的抗体分子。或者, 也可以使用通过基因重组构建的抗体, 只要能够维持良好的抗原结合活性即可。通过基因重组构建的抗体的例子包括嵌合抗体、CDR 移植抗体、单链 Fv、双体(diabodies)、线性抗体以及由抗体片段形成的多特异性抗体。已经众所周知可以通过使用单克隆抗体或者能够产生该抗体的抗体生成细胞来获得这些抗体。

可以使用一定的转化细胞作为免疫原来获得本发明的单克隆抗体。就是说, 本发明涉及制备细胞的方法, 其中该细胞产生能结合人 ILT7 胞外域的单克隆抗体, 该方法包括以下步骤:

(1)给免疫动物施用细胞, 其中该细胞能表达含有人 ILT7 胞外域的外源蛋白和与人 ILT7 结合的外源分子; 以及

(2)从免疫动物的抗体生成细胞中选择产生能够结合人 ILT7 的抗体的抗体生成细胞。

培养如此获得的抗体生成细胞或者永生化的抗体生成细胞, 并且从该培养物中回收所需的单克隆抗体。关于永生化的抗体生成细胞的方法, 很多方法是已知的。

在制备本发明的单克隆抗体的方法中, 可以使用的分子的例子包括细胞膜蛋白, 其中所述分子用于制备可以作为免疫原的转化细胞、并能与人 ILT7 结合。其中, 本发明优选的细胞膜蛋白是定位在细胞膜上的信号转导分子。“信号转导分子”是指在细胞膜上与在胞外域具有受体结构的蛋白质结合、将配体结合到受体的刺激转导到细胞内的分子。信号转导分子的例子包括 Fc 受体 γ 链, DAP12 以及诸如此类的分子。例如, 在本发明中优选使用的细胞膜蛋白是 Fc 受体 γ 链。人 DAP12 和 Fc 受体 γ 链的氨基酸序列以及编码该氨基酸序列的 cDNA 碱基序列是广为人知的。人 Fc 受体 γ 链的碱基

序列以及由该碱基序列编码的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 15 和 16 所示。

在本发明中, 用作免疫原的转化细胞可以通过制备例如具有下述(a)和(b)的细胞来获得:

- (a) 编码含有人 ILT7 胞外域的氨基酸序列的外源多核苷酸; 以及
- (b) 编码 Fc 受体的 γ 链的外源多核苷酸。

在本发明中, 外源多核苷酸指被人为导入到宿主细胞中的多核苷酸。当使用人细胞作为宿主细胞时, 人基因被导入到人细胞中。在该组合中, 人为导入的多核苷酸是外源多核苷酸。因此, 外源多核苷酸的表达包括人 ILT7 或人 Fc 受体 γ 链的异位表达(異所生の発現)。

此处, “人 ILT7 的胞外域”指 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列中、相当于其胞外域的第 17 位到第 444 位的氨基酸序列(在 SEQ ID NO: 2 中显示的从 1 到 428)。在本发明中, 作为含有人 ILT7 胞外域的氨基酸序列, 优选的是例如: , 从 N 末端侧开始按照下述顺序含有各区域的氨基酸序列:

[信号序列+胞外域+跨膜区+胞内区]

或者, 本发明中人 ILT7 胞外域的氨基酸序列也包括如下所述的部分缺失胞内区的氨基酸序列。

[信号序列+胞外域+跨膜区+胞内区的一部分]

此外, 本发明中人 ILT7 胞外域的氨基酸序列也包括如下所述的缺失胞内区的结构。

[信号序列+胞外域+跨膜区]

在上述结构中, 除了胞外域以外的区域可以从 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列中选择出来的氨基酸序列, 或者可以是与这些区域具有同源性的其他氨基酸序列的组合。例如, 组成信号序列、跨膜区和胞内区的氨基酸序列可以是除了 ILT7 以外的 ILT 家族分子的氨基酸序列。或者, 可以是与除了人以外的其它物种的 ILT 家族的氨基酸序列的组合。此外, 组成除了胞外域以外的区域的氨基酸序列中, 可以包括在保持每个区域的功能的范围内的突变。或者, 可以将其他的区域插入到任意区域之间。例如, 可以将诸如 FLAG 这样的表位标签插入到信号序列和胞外域之间。具体地, 在翻译成蛋白质之后、转移到细胞膜表面的过程中会通过加工去掉信号序列。因此, 可以将任何诱导翻译后的蛋白通过细胞膜的氨基酸序列用作信号序列。更具体地, 优选地将人 ILT7 的氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)作为含

有人 ILT7 胞外域的氨基酸序列来使用。

因此，在本发明中可以将编码含有上述结构[信号序列+胞外域+跨膜区+胞内区]的氨基酸序列的任意碱基序列作为(a)中描述的外源多核苷酸中的多核苷酸使用。例如，SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列是由 SEQ ID NO: 1 中所述的碱基序列编码的。

在本发明中，为了获得可以用作免疫原的转化细胞，可表达的带有上述的(a)和(b)多核苷酸的表达载体可以被导入到合适的宿主细胞中。可以在一个载体或者不同载体上带有(a)和(b)的多核苷酸。当不同的载体上带有不同的多核苷酸时，利用两种载体共转染宿主细胞。

本发明中，优选的宿主细胞包括哺乳动物细胞。宿主细胞的具体例子包括人、猴子、小鼠或者大鼠来源的细胞。特别优选的宿主细胞是来源于人的细胞。例如，本发明中来源于人的宿主细胞优选使用 293T 细胞。可以从 ATCC CRL-11268 获得 293T 细胞。另外，也可以将来源于免疫动物的细胞用作宿主细胞。当将来源于免疫动物的细胞用作免疫原时，对于宿主细胞的免疫反应很少。因为这样的理由，可以有效地获得针对外源表达的 ILT7 的胞外域的抗体。因此，例如当将小鼠用作免疫动物时，也可以将来源于小鼠的细胞用作宿主细胞。

可以通过可在宿主细胞中诱导表达的载体将上述多核苷酸导入到细胞内。可以使用可在哺乳动物细胞中诱导表达的市售载体。可以将诸如 pCMV-Script(R)载体、pSG5 载体(由 Stratagene 生产)、pcDNA3.1(由 Invitrogen 生产)这样的表达载体用于本发明。

如果需要，可以将如此获得的转化细胞和诸如佐剂这样的附加成分一起施用于免疫动物。可以使用的佐剂的例子包括弗氏完全佐剂，等等。在使用小鼠作为免疫动物的例子中，可以施用的转化细胞的数目在 10^4 到 10^9 的范围之内，更具体的是 10^4 到 10^6 个细胞。通常，多倍剂量给药是每隔一段时间间隔就给药一次免疫原，直到抗体滴度升高。例如，在短期免疫的例子中，每隔 2 到 4 天就施用一次转化细胞，更具体的是每隔 3 天。在施用两或三次后，可以回收抗体生成细胞。或者，可以每周施用一次并且在施用五或六次之后回收抗体生成细胞。

在本发明中，对回收的抗体生成细胞进行克隆化来得到单克隆抗体。为了克隆化，优选将抗体生成细胞永生。例如，可以使用以杂交瘤法为

代表的细胞融合法、或者利用 EB 病毒(EBV)的转化作为使抗体生成细胞永生化的方法

作为抗体生成细胞，一个细胞可以产生一种抗体。因此，建立来源于一个细胞的细胞种群(即克隆化)，就可以获得单克隆抗体。杂交瘤方法是指使抗体生成细胞与合适的细胞系融合、永生化的方法。永生化的方法。可以利用诸如有限稀释法这样的技术来克隆化永生化的抗体生成细胞。已知有很多的细胞系可以用于杂交瘤方法。这些细胞系在淋巴细胞的永生化的方面表现良好，并且具有所需的用于选择融合细胞的多种遗传标记。此外，当需要获得抗体生成细胞时，也可以使用缺乏抗体产生能力的细胞系。

例如，在小鼠或大鼠细胞融合方法中，广泛使用小鼠骨髓瘤 P3x63Ag8.653(ATCC CRL-1580)和 P3x63Ag8U.1(ATCC CRL-1597)作为细胞系。通常，杂交瘤是通过同种细胞的融合来制备的，然而也可以通过亲缘关系较近的异种的异质杂交瘤来获得单克隆抗体。

细胞融合的具体方案已经广为人知。就是说，将免疫动物的抗体生成细胞与合适的融合伴侣进行混合来进行细胞融合。可用的抗体生成细胞的例子包括脾细胞，从淋巴结收集到的淋巴细胞以及外周血 B 细胞。作为融合伴侣，可以使用前述的各种细胞系。可以使用聚乙二醇方法和电融合方法来进行细胞融合。

此后，以融合细胞的选择标记为基础，选择成功融合的细胞。例如，当使用 HAT 敏感细胞系进行细胞融合时，选择在 HAT 培养基中生长的细胞作为成功融合的细胞。此外，已经确认了由选择出来的细胞产生的抗体具有所需的反应性。

基于抗体反应性对每一种杂交瘤进行筛选。就是说，可以通过上述的方法来选择能够结合人 ILT7 的杂交瘤产生的抗体。优选地，先对选择出来的杂交瘤进行亚克隆然后对所需抗体进行最终的确认，将经过确认的抗体选择出来作为本发明的杂交瘤产生的单克隆抗体。

具体的，可以基于针对人细胞的反应性或者针对表达人 ILT7 基因的转化细胞的反应性来选择所需的杂交瘤。可以基于免疫分析的原理来检测能够结合细胞的抗体。例如，可以使用将细胞作为抗原进行的 ELISA 来检测所需抗体。具体的，向固定有作为免疫原的或转化细胞的支撑物中加入杂交瘤的培养上清。在该例子中培养上清液中含有所需抗体，固定在支撑物

上的细胞会募集抗体。然后，从培养上清中分离固定相，如果需要，对其进行清洗。其后，可以检测募集在固定相上的抗体。可以使用能够识别抗体的抗体来检测抗体。例如，可以通过抗小鼠免疫球蛋白抗体来检测小鼠抗体。如果标记了能够识别抗体的抗体，那么可以很容易进行这种检测。可用的标记的例子包括酶，荧光染料，发光染料以及诸如此类的。

另一方面，可以使用微粒和微孔板的内壁作为固定细胞的支撑物。可以通过物理吸附作用将细胞固定在由塑料制成的微粒或者容器的表面。固定细胞可用的支撑物的例子包括聚苯乙烯制成的珠子和反应器。

在杂交瘤的选择中，有时可以预测：产生了针对用作免疫原的转化细胞的宿主细胞的、而不是针对 ILT7 的抗体。例如，在实施例展示的，在以人细胞为免疫原并且以小鼠作为免疫动物的例子中，可以预计人细胞是作为外源物质被识别从而产生了与之结合的抗体。在本发明中，希望获得能够识别人 ILT7 的抗体。因此，没有必要获得能够识别除了人 ILT7 以外其他人细胞抗原的抗体。在筛选中，为了去除能够产生这样的抗体的杂交瘤，可以在确认抗体反应性之前对非所需的抗体进行吸收。

可以通过与推测存在的抗体结合的抗原来吸收非所需抗体。具体的，例如，可以通过不能检测到人 ILT7 表达的细胞来吸收能够识别除了人 ILT7 以外其他人细胞抗原的抗体。在本发明中，优选地使用作为免疫原的宿主细胞来作为吸收非所需抗体的抗原。或者，可以使用不表达人 ILT7 的胞外域而表达与 ILT7 结合的分子的宿主细胞作为吸收抗体的抗原。

作为已经确认了其抗原结合活性的单克隆抗体，如果需要，可以确认其对于 IPC 活性的实际影响。可以通过诸如以下所述的方法来确认其对于 IPC 的影响。

作为本发明的单克隆抗体，培养产生单克隆抗体的杂交瘤并且从得到的培养物中回收本发明的单克隆抗体。可以在体内或体外培养该杂交瘤。在体外的例子中，可以通过诸如 RPMI1640 之类的已知培养基来培养该杂交瘤。该杂交瘤分泌的免疫球蛋白会在培养物上清中累积。因此，如果需要，可以通过收集并且纯化培养物上清来获得本发明的单克隆抗体。不在培养基中加入血清，会使对于免疫球蛋白的纯化更容易。然而，出于使该杂交瘤快速扩增以及增加抗体产量的目的，可以在培养基中添加 10% 的胎牛血清。

也可以在体内培养该杂交瘤。具体的，可以通过将该杂交瘤接种到裸鼠的腹腔内的方法来实现腹膜内培养。单克隆抗体会在腹水内累积。因此，如果按照需要来获得并纯化腹水就可以制备所需的单克隆抗体。依照预期的用途可以对获得的单克隆抗体进行合适的修饰或处理。

可以通过从杂交瘤中获得编码抗体的抗原结合区的 cDNA 并将其插入到合适的表达载体中来表达本发明的单克隆抗体。获得编码抗体可变区的 cDNA 并在合适的宿主细胞中表达该 cDNA 的技术是已知的。另外，通过将含有抗原结合区的可变区与恒定区连接起来以便获得嵌合抗体的方法也是已知的。

发明中优选的单克隆抗体包括由杂交瘤#11(保藏号: FERM BP-10704)、杂交瘤#17(保藏号: FERM BP-10705)或杂交瘤#37所产生的单克隆抗体。组成这些单克隆抗体的可变区的氨基酸序列以及编码该氨基酸序列的 cDNA 碱基序列如下所示。因此，例如，本发明中优选的是通过将 these 可变区与其他免疫球蛋白的恒定区连接起来形成的嵌合抗体。在序列列表中描述的氨基酸序列中，从第 1 位到 C 末端的氨基酸序列组成了成熟的蛋白。就是说，对于每种氨基酸序列来说从第 1 位到 C 末端的连续的氨基酸序列是每种氨基酸序列的成熟序列。另一方面，由从 N 末端到-1 的数值表示的氨基酸序列是信号序列。

	重链可变区	轻链可变区
#11	SEQ ID NO: 38 (碱基序列)	SEQ ID NO: 40 (碱基序列)
	SEQ ID NO: 39 (氨基酸序列)	SEQ ID NO: 41 (氨基酸序列)
#17	SEQ ID NO: 42 (碱基序列)	SEQ ID NO: 44 (碱基序列)
	SEQ ID NO: 43 (氨基酸序列)	SEQ ID NO: 45 (氨基酸序列)
#3	SEQ ID NO: 46 (碱基序列)	SEQ ID NO: 48 (碱基序列)
7	SEQ ID NO: 47 (氨基酸序列)	SEQ ID NO: 49 (氨基酸序列)

例如, 通过将这些可变区基因分别地连接到人 IgG1 重链恒定区和人 Igk 轻链恒定区来制备小鼠(可变区)-人(恒定区)嵌合抗体。这样嵌合抗体的氨基酸序列和编码该抗体的碱基序列分别如下所述。用这些序列表示的嵌合抗体显示了本发明的抗 ILT7 单克隆抗体的构建物的优选实施方案。在以下嵌合抗体的氨基酸序列中, 从 N 末端到-1 的氨基酸序列对应信号序列, 并且从 1 到 C 末端的氨基酸序列对应成熟蛋白。就是说, 含有重链和轻链的嵌合抗体在本发明中是优选的, 其中该嵌合抗体含有每种氨基酸序列的从 1 到 C 末端的氨基酸序列。

	重链	轻链
#1	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 52
1	(碱基序列)	(碱基序列)
	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 53
	(氨基酸序列)	(氨基酸序列)
#1	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 56
7	(碱基序列)	(碱基序列)
	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 57
	(氨基酸序列)	(氨基酸序列)

此外, 也可以将单克隆抗体的抗原结合活性移植到其他的免疫球蛋白上。免疫球蛋白的可变区含有互补性决定区(CDR)和框架区。每种免疫球蛋白抗原结合性是由 CDR 决定的, 并且框架维持了抗原结合区的结构。CDR 的氨基酸序列具有极其丰富的多样性, 然而框架部分的氨基酸序列是高度保守的。已知通过将组成 CDR 的氨基酸序列整合到其他免疫球蛋白分子的框架区的方法可以对抗原结合活性进行移植。已经确立了通过这样的过程将不同免疫球蛋白的抗原结合性移植到人免疫球蛋白的方法。本发明中, “抗原结合区”可以包含被移植到框架区的 CDR。因此, 指定单克隆抗体的“包含抗原结合区的片段”包括含有可变区的人免疫球蛋白的片段, 其中该单克隆抗体的 CDR 被移植到该可变区上。例如, 上述的可变区的氨基酸序列分别含有以下的氨基酸序列(SEQ ID NO)作为 CDR。

	CDR1	CDR2	CDR3
#11 重链	SDYAWN(58)	YISYSGSTSYNPSLKSR(59)	SPPYYAMDY(60)
#11 轻链	KASQDVGTA(61)	WASTRHT(62)	QQYSSYPLT(63)

#17 重链	SYWIH(64)	RIYPGTGSTYYNEKFKG(65)	YPTYDWYFDV(66)
#17 轻链	RASQISNYLH(67)	YASQIS(68)	QQSNSWPLT(69)
#37 重链	SDYAWN(70)	YISYSGSTSYNPSLKSR(71)	ALPLPWFAY(72)
#37 轻链	KASQDVGTAVA(73)	WASTRHT(74)	QQYSSYPYT(75)

基于编码上述氨基酸序列的碱基序列以及编码人免疫球蛋白的框架(FR)的碱基序列的信息,可以设计引物并且可以扩增 cDNA,其中该 cDNA 的碱基序列是通过将该两种碱基序列连接起来形成的。对于每种框架的操作是重复的,并且可以构建将小鼠的 CDR1、CDR2 和 CDR3 连接到人 FR 上所形成的可变区。此外,当将编码人免疫球蛋白的恒定区的碱基序列按照需要连接起来的时候,可以获得具有该恒定区的人化抗体。

作为含有上述可变区的嵌合抗体或者移植了由 CDR 组成的可变区的人化抗体,本发明的抗体优选地含有具有来源于 IgG 或 IgM 的恒定区的抗体。本发明的发明者确认了针对 ILT7 的单克隆抗体显示了针对 ILT7 表达细胞的 CDC 作用。因此,具有来源于 IgG 或 IgM 的恒定区的抗体由于其 CDC 作用显示出针对 ILT7 表达细胞的细胞毒性。可以使用这样的抗体来抑制诸如 IPC 这样的 ILT7 表达细胞的数目。

可以通过使用编码能够识别 ILT7 的嵌合抗体或者人化抗体的多核苷酸、并利用基因工程来制备本发明所提供的能够识别 ILT7 的嵌合抗体或者人化抗体。例如,可以将以下 SEQ ID NO 所述的碱基序列的多核苷酸和编码氨基酸序列的多核苷酸作为编码可变区#11 或#17 的多核苷酸来使用,其中该氨基酸序列是组成每种氨基酸序列的成熟蛋白的。对于每一种氨基酸序列的从 1 到 C 末端的连续的氨基酸序列对应一种成熟蛋白。在每种成熟蛋白作为分离蛋白表达的例子中,优选的是将分泌信号置于每种氨基酸序列的 N 末端。例如,当这样的蛋白在动物细胞表达时,在这些 SEQ ID NO 所显示的氨基酸序列中可以将从 N 末端到-1 的氨基酸序列作为信号序列来使用。或者,通过使用能够保证免疫球蛋白分泌的任意信号序列,这些可变区可以作为成熟蛋白被分泌。

#11 SEQ ID NO: 50(碱基序列) SEQ ID NO: 52(碱基序列)

#17 SEQ ID NO: 54(碱基序列) SEQ ID NO: 56(碱基序列)

在如上所述的相同的方法中,对于编码人化抗体的多核苷酸,可以通过使用编码具有信号序列的蛋白的碱基序列来制备表达人化抗体的多核苷

酸，其中该信号序列是被加到蛋白的 N 末端的。当重链和轻链是由不同的载体携带的时候，将两种载体共转染到相同的宿主细胞中。用由每种载体表达的重链和轻链来构建具有两条链的免疫球蛋白。或者也可以在同一载体上带有编码重链的多核苷酸和编码轻链的多核苷酸。转化了带有两种多核苷酸的载体的宿主细胞可以表达重链和轻链并且可以制备具有两种链的免疫球蛋白。

使用能够表达抗体基因的宿主载体系统，可以将这些多核苷酸表达为抗体。此外，在通过将重链可变区和轻链可变区连接起来的方法将其表达为单一蛋白分子的例子中，可以将信号序列置于蛋白分子的 N 末端。这样的抗体分子的已知的例子包括 scFv 分子，在该 scFv 分子中通过连接子将重链可变区与轻链可变区连接起来。

本发明的单克隆抗体包含每种如此制备的单克隆抗体。换言之，本发明中的单克隆抗体包括由免疫球蛋白组成的单克隆抗体，该免疫球蛋白含有由多核苷酸所编码的抗原结合区，该多核苷酸是由编码上述单克隆抗体的抗原结合区的 cDNA 衍生来的。

如前所述，可以使用 ILT1 基因强制表达的 RBL 细胞作为获得 ILT1 抗体的免疫原。然而，不能够确认 ILT7 在 RBL 细胞(P815)表面的表达，因此不能将其作为免疫原。本发明的发明者发现了可以通过将人 ILT7 与其他与人 ILT7 结合的细胞膜蛋白共表达来诱导人 ILT7 在细胞表面的表达。于是，本发明的发明者发现了可以通过利用转化细胞作为免疫原来获得能结合人 IPC 的抗体并完成了本发明，其中该转化细胞的表达是通过上述方法诱导的。

就是说，本发明提供能够用于制备能结合人 ILT7 胞外域的抗体的免疫原，并且包含动物细胞或其细胞膜成分，在该动物细胞中携带以下的多核苷酸用于外源表达，其中该多核苷酸包括(a)编码含有人 ILT7 的胞外域的氨基酸序列的多核苷酸；以及(b)编码 Fc 受体的 γ 链的多核苷酸。

自从 1998 发现了人 ILT7 的结构以来已经过了六年或者更长的时间了。然而，仍然没有获得能够特异地识别 ILT7 的抗体。通过使用本发明的免疫原首次提供了能够识别人 ILT7 的抗体。就是说，本发明提供了能够识别人 ILT7 的抗体，该抗体是通过以下的步骤获得的：

(1)对免疫动物施用细胞，该细胞能够外源表达含有人 ILT7 胞外域的蛋

白和与人 ILT7 结合的分子;

(2)从免疫动物的抗体生成细胞中选择能够产生能够结合人 ILT7 的抗体的抗体生成细胞; 并且

(3)培养步骤(2)中选择出来的抗体生成细胞, 并且从培养物中回收能够识别人 ILT7 的抗体。

已经发现人 ILT7 在人 IPC 中有特异性的表达。本发明的发明者利用 SAGE 对基因表达进行了分析, 也确认了人 ILT7 在人 IPC 中的特异表达。然而, 在以前的报道中, 基于 mRNA 对两个例子中的 ILT7 的表达水平进行了分析。由于不能提供能够检测人 ILT7 的抗体, 所以没有按照惯例来分析蛋白的表达状态。通过提供本发明的能结合人 ILT7 胞外域的抗体实现了对于人 ILT7 蛋白的分析。

本发明的发明者实际上确认了能够结合到基于本发明的人 ILT7 的胞外域的单克隆抗体能够特异的检测人 IPC。就是说, 本发明涉及检测干扰素生成细胞的方法, 该方法包括以下步骤: 向受试细胞中加入能结合人 ILT7 胞外域的单克隆抗体或者含有其抗原结合区的片段; 并且检测结合到细胞上的单克隆抗体或者含有其抗原结合区的片段。

通过对于基于本发明的人 ILT7 的检测可以确定特定细胞是否是 IPC。就是说, 本发明提供了利用人 ILT7 作为指示剂来鉴定 IPC 的方法。或者, 通过分离检测到人 ILT7 的细胞可以分离人 IPC, 其中检测人 ILT7 的方法是基于本发明的。就是说, 本发明提供了利用人 ILT7 作为指示剂来分离 IPC 的方法。

基于通过人 ILT7 抗体进行的分析, 确认了 ILT7 在 IPC 中的表达水平降低了, 其中该 IPC 的分化是由 CpG 诱导的。就是说, 通过利用 ILT7 作为指示剂可以特异的检测在其分化被诱导之前的 IPC。换言之, 本发明的单克隆抗体可以特别的用于在 IPC 分化成树突细胞之前检测该细胞。可以将此处所使用的术语“分化之前的 IPC”定义为具有产生干扰素能力的细胞群。

在本发明中, 可以预先标记能够结合人 ILT7 胞外域的单克隆抗体或者含有其抗原结合区域的片段。例如, 通过标记发光染料或者荧光染料可以很容易的检测抗体。更具体的, 将制备的荧光染料标记的抗体加入到可能含有 IPC 的细胞群中然后通过利用荧光染料作为指示剂来检测本发明的抗体结合的细胞。进一步地, 可以通过分离检测到荧光染料的细胞来分

离 IPC。基于 FACS 的原理可以很容易的进行一系列的步骤。

或者，可以预先将本发明的抗体结合到诸如磁性颗粒这样的固相支持物上。结合到固定相支持物上的抗体会识别人 ILT7 然后 IPC 被捕获到固定相支持物上。因此，可以对 IPC 进行检测和分离。

基于本发明可以提供对于检测 IPC 的方法必需的抗体作为检测 IPC 的试剂。就是说，本发明提供用于检测干扰素生成细胞的试剂，该试剂含有能够结合人 ILT7 的胞外域的单克隆抗体或含有其抗原结合区的片段。除了将该检测本发明的 IPC 的试剂用作抗体以外还可以将其与正对照或负对照组合使用。例如，可以将表达人 ILT7 的胞外域并且被用作免疫原的转化细胞以及从人体内获得的 IPC 用作正对照。通常，从外周血中只能获得很少的人 IPC。因此，特别优选的在本发明的试剂中使用转化细胞作为正对照。另一方面，可以使用任意不能表达人 ILT7 的细胞作为负对照。

就是说，本发明提供检测人 IPC 的试剂盒，该试剂盒包括：

(a)能够结合人 ILT7 胞外域的单克隆抗体或者含有其抗原结合区域的片段；以及

(b)表达外源蛋白和外源分子的细胞，该外源蛋白含有人 ILT7 的胞外域，该外源分子能与人 ILT7 结合。

本发明的发明者分析了能结合人 ILT7 胞外域的抗体对于 IPC 的作用。因此，可以确认能够结合人 ILT7 胞外域的抗体抑制 IPC 的活性。就是说，本发明涉及抑制干扰素生成细胞活性的方法，该方法包括向干扰素生成细胞中加入以下任意成分的步骤：

(a)能够结合人 ILT7 并且抑制干扰素生成细胞活性的单克隆抗体、或者含有其抗原结合区的片段；以及

(b)移植了(a)所述的单克隆抗体的互补性决定区的免疫球蛋白、或者其含有抗原结合区的片段。

或者，本发明涉及抑制活体组织中的干扰素生成细胞活性的方法，该方法包括向活体组织中加入以下任意成分的步骤：

(a)能够结合人 ILT7 并且抑制干扰素生成细胞活性的单克隆抗体、或者其含有抗原结合区的片段；

(b)含有移植了(a)所述的单克隆抗体的互补性决定区的免疫球蛋白、或者其含有抗原结合区的片段；以及

(c)编码(a)或(b)所述成分的多核苷酸。

此处，“干扰素生成细胞(Interferon Producing cell, IPC)”是指具有产生 IFN 能力的、并且在细胞表面表达 ILT7 的细胞。在下文中，除非特别提及，“IPC”不仅包括树突细胞的前体细胞还包括具有产生 IFN 并且在细胞表面表达 ILT7 的能力的细胞。鉴定此类 IPC 的方法已经广为人知。可以利用一些细胞表面标记作为指示剂来区分 IPC 和其他血细胞。具体的，人 IPC 的细胞表面标记物谱如下所述(Shortman, K. and Liu, YJ. Nature Reviews 2: 151-161, 2002)。近年来，特定的报道建议将 BDCA-2 阳性的细胞定义为 IPC(Dzionic, A. et al. J. Immunol. 165: 6037-6046, 2000.)。

[人 IPC 细胞表面抗原谱]

CD4 阳性, CD123 阳性,

谱系(CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56)阴性以及 CD11c 阴性

因此，也可以说 IPC 是具有这些已知标记的表达谱并且具有产生 IFN 能力的细胞。此外，甚至即使细胞是一群具有这些已知标记的表达图式不同的表达谱的细胞，只要活体组织中的细胞具有产生 IFN 能力，该细胞就也包括在 IPC 中。此外，人 IPC 的共同特征如下：

[细胞的形态特征]

-与浆细胞相似

-具有平滑细胞表面的圆细胞

-核相对大

[细胞的功能特征]

-在病毒感染过程中，在短时间内会产生大量的 1 型干扰素。

-在病毒感染之后分化成树突细胞。

“抑制 IPC 的活性”是指对于至少一项 IPC 功能的抑制。IPC 的功能的例子包括产生 IFN 以及细胞存活。也可以将细胞存活说成是细胞数目。因此，在抑制这两个功能中的一项或者两项的例子中，可以说抑制了 IPC 的活性。已经发现由 IPC 产生的 1 型 IFN 能够导致多种疾病。因此，对 IPC 的数目和 IFN 的产生的抑制可以用于这些疾病的内科治疗方法。

例如，已经指出了多种自身免疫病的病理状态与 IFN α 之间的关系。大部分 IFN α 是由 IPC 产生的。因此，可以通过抑制 IFN α 的产生来缓解由 IFN α 导致的病理状态。此处，“抑制由 IPC 产生的 IFN”是指抑制至少一种 IPC 产

生的 IFN 的产生。本发明中优选的 IFN 是 1 型 IFN。其中 IFN α 是重要的。

就是说，本发明涉及抑制 IFN 产生的抑制剂，该抑制剂包括作为活性成分的能够结合 ILT7 胞外域的抗体。或者，本发明提供能够抑制 IFN 的产生的方法，该方法包括给药能够结合 ILT7 胞外域的抗体的步骤。此外，本发明涉及能够结合 ILT7 胞外域的抗体在生产用于抑制 IFN 产生的药用成分用途。

在 IPC 之中包含以少量细胞产生大量的 IFN 的细胞。例如，通过病毒或诸如此类的条件来刺激树突细胞的前体细胞，该细胞会产生活体中所产生的大部分 IFN 中。对于能够产生很多 IFN 的 IPC 的数目的抑制能够抑制 IFN 的产生。因此，通过抑制 IPC 的数目可以减轻由 IFN α 所引起的病理状态。已经确认了在本发明优选的实施方案中，抗 ILT7 的单克隆抗体会结合到 ILT7 表达细胞上，然后通过互补依赖细胞毒性(CDC)发挥了细胞毒性的作用。CDC 作用是抗体药物的一种重要的机理。由于本发明的抗 ILT7 的单克隆抗体的 CDC 作用，该抗体也具有针对诸如 IPC 此类的 ILT7 表达细胞的潜在细胞毒性。就是说，对于抗 ILT7 的单克隆抗体，除了在优选的实施方案中的对于 IFN 产生的抑制的机理以外，可以预期通过针对 IPC 的细胞毒性来获得对于 IFN 的产生的抑制作用。

可以通过基于前述的方法来获得本发明所使用的能够识别人 ILT7 的胞外域的抗体。本发明中的抗体可以是任意级别的。抗体来源的物种也没有特殊限制。此外，可以将含有抗体的抗原结合区的片段用作抗体。例如，可以将通过酶解 IgG 所获得的含有其抗原结合区的抗体片段用作本发明中的抗体。具体的，可以通过利用木瓜蛋白酶或者胃蛋白酶来进行酶解以获得诸如 Fab 和 F(ab')₂ 这样的抗体片段。已经广为人知可以将这些抗体片段用作具有抗体亲和力的抗体分子。或者，只要能够维持良好的抗原结合活性，也可以使用通过遗传重组技术构建的抗体。通过遗传重组构建的抗体的例子包括嵌合抗体、CDR 移植抗体单链 Fv、双体、线性抗体以及由抗体片段组成的多特异性抗体。已知通过利用单克隆抗体可以获得这些抗体。

在本发明中，如果需要可以对抗体进行修饰。按照本发明，能够识别人 ILT7 的胞外域的抗体具有对 IPC 的活性的抑制作用。就是说，可以预期抗体本身具有针对 IPC 的细胞毒性。展示了潜在的效应子活性的抗体的亚类是已知的。或者，通过使用细胞毒试剂来修饰抗体可以进一步的增强其

对 IPC 活性的抑制效果。细胞毒试剂的例子如下所述。

毒素：假单胞菌内毒素(PE)、白喉毒素、蓖麻毒素

放射性同位素： Tc^{99m} 、 Sr^{89} 、 I^{131} 、 Y^{90}

抗肿瘤试剂：加利利霉素，丝裂霉素，紫杉醇

可以通过双功能试剂将由蛋白组成的毒素连接到抗体或其片段上。或者，将编码毒素的基因连接到编码抗体的基因上，也可以获得两条基因的融合蛋白。将抗体与同位素连接起来的方法也是已知的。例如，利用螯化试剂将放射性同位素标记到抗体上的方法是已知的。此外，可以利用糖链或者双功能试剂将抗肿瘤试剂连接到抗体上。

本发明的发明者已经确认了一种现象，该现象是结合到表达在细胞表面的 ILT7 上的单克隆抗体会在结合之后整合到细胞之内（内化作用）。因此，可以通过向 ILT7 表达细胞中加入连接了本发明的细胞毒试剂的抗体来把该细胞毒试剂转运到细胞内。就是说，本发明提供了 ILT7 表达细胞的活性抑制剂，该抑制剂包括连接了作为活性成分的细胞毒试剂的抗 ILT7 的单克隆抗体。或者，本发明涉及抗 ILT7 的单克隆抗体在生产 ILT7 表达细胞的活性抑制剂中的用途，该抗体上连接了细胞毒试剂。此外，本发明提供抑制 ILT7 表达细胞活性的方法，该方法包括给药连接了细胞毒试剂的抗 ILT7 的单克隆抗体的步骤。

在本发明中，也可以将人为改变过结构的抗体作为活性成分来使用。例如，为了提高抗体的细胞毒性和稳定性而对其进行修饰的方法是已知的。具体的，对其重链的糖链进行了修饰的免疫球蛋白是已知的(Shinkawa, T. et al. *J. Biol. Chem.* 278: 3466-3473. 2003.)。通过修饰糖链增强了免疫球蛋白的抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)的活性。或者，修饰了 Fc 区的氨基酸序列的免疫球蛋白也是已知的。就是说，通过人为增加免疫球蛋白对于 Fc 受体的结合活性增强了 ADCC 的活性(Shield, RL. et al. *J. Biol. Chem.* 276; 6591-6604, 2001.)。

已经发现这种现象：结合到 Fc 受体的 IgG 会立即整合到细胞内。然后 IgG 结合到表达在内涵体内的 Fc 受体上，并且会被再次释放到血液中。具有针对 Fc 受体高结合活性的 IgG 在整合到细胞内之后，具有更多的机会被释放到血液中。因此，延长了 IgG 在血液中的维持时间(Hinton, PR. et al. *J Biol Chem.* 279: 6213-6216. 2004)。除此之外，有报道称对于 Fc 区氨基酸

序列的修饰可以引起互补依赖的细胞毒性(CDC)的活性的改变。可以将这些改良的抗体作为本发明中的抗体使用。

向 IPC 中加入能够结合人 ILT7 胞外域的抗体, 可以抑制 IPC 的活性。因此, 可以将这些抗体用作抑制 IPC 的活性的抑制剂或者用于抑制 IPC 的活性的方法。就是说, 本发明提供了 IPC 的活性抑制剂, 该抑制剂包括从由(a)到(c)组成的组中选择出来的至少一种成分, 该成分作为活性成分使用的。或者, 本发明涉及抑制 IPC 的活性的方法, 该方法包括给药从由以下的(a)到(c)组成的组中选择出来的至少一种成分的步骤。此外, 本发明涉及从由以下的(a)到(c)组成的组中选择出来的至少一种成分的用于制备 IPC 活性抑制剂的用途:

(a)能够结合人 ILT7 的单克隆抗体、或者含有其抗原结合区的片段;

(b)移植了(a)中描述的抗体的互补性决定区的免疫球蛋白、或其含有抗原结合区的片段; 以及

(c)编码(a)或(b)描述的成分的多核苷酸。

在本发明中, 可以将能够识别人 ILT7 的胞外域的单克隆抗体用作能够抑制 IPC 活性的单克隆抗体。在本发明中, 可以使用一种或多种单克隆抗体。例如, 在本发明中可以混合使用一种或多种能够识别人 ILT7 的胞外域的单克隆抗体。

可以通过下述的方法确认抗体对 IPC 的 IFN 产生活性的抑制作用。用病毒刺激 IPC 会产生大量的 IFN。在利用病毒刺激 IPC 之前, 之后或者同时, 向 IPC 中加入抗体。将得到的每种 IPC 的产生 IFN 的能力与相应的没有加入抗体的每种对照的能力进行比较。通过测定 IPC 的培养上清中含有的 IFN α 或 IFN β 来评估生成 IFN 的能力。作为比较的结果, 当加入了抗体的组的上清中的 IFN 的量明显降低的时候可以确认所测试的抗体具有抑制 IFN 生成能力的作用。测定 IFN 的方法是已知的。在活体中 IPC 生成大多数 IFN。因此, 可以通过抑制 IPC 的生成 IFN 的能力来调节活体中的 IFN 的生成状态。

在本发明中, IPC 的活性包括维持 IPC 的数目。因此, 本发明中对于 IPC 的活性的抑制包括抑制 IPC 的数目。当确认了在抗体存在时 IPC 的数目受到了抑制, 可以发现抗体在抑制 IPC 的活性。当测量 IFN 的生成时, 可以使用来源于相同的动物品种的无活性的免疫球蛋白作为测定抗体活性的比

较对照组。可以通过细胞计数来在数量上比较 IPC 的数目。可以通过 FACS 或者显微镜来计算细胞的数目。

此外，有报道称由于病毒感染或此类的刺激，IPC 可以分化成 Th2 也被称作树突细胞 2(DC2)。如果可以抑制由于病毒刺激 IPC 所产生的 IFN，那么也可以抑制其分化成 Th2。因此，可以预期能够抑制 IFN 的产生的本发明的单克隆抗体，对于多种过敏疾病可能也具有治疗的作用。

当向与获得抗体的组织种类不同的宿主中加入能够识别人 ILT7 的胞外域的抗体时，需要将抗体加工成不会被宿主识别成外源成分的形态。例如，通过将抗体加工成以下的分子的方法使得免疫球蛋白不会很容易的被识别成外源物质。下述的对免疫球蛋白加工的技术是已知的。(含有抗原结合区的片段缺乏恒定区。(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, Academic Press Limited. 1995; Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)

-含有单克隆抗体的抗原结合区和宿主的免疫球蛋白的恒定区的嵌合抗体("Gene Expression Experiment Manual", Isao Ishida, Tamie Ando, eds., Kodansha, 1994)

-CDR 替代抗体，在该抗体中用单克隆抗体的互补决定区 (CDR) 替换宿主的免疫球蛋白的 CDR("Gene Expression Experiment Manual", Isao Ishida, Tamie Ando, eds., Kodansha, 1994)

或者，当使用非人动物时，可以通过将人抗体基因整合到作为免疫动物的非人动物中的方法来获得人抗体。例如，已经将具有人抗体基因的转基因小鼠作为免疫动物付诸实际应用来制备人抗体(Ishida et al., Cloning and Stem Cells, 4: 85-95, 2002)。可以通过使用此类动物以及上游的免疫原来获得能够识别 ILT7 的人抗体。优选的是对人给药人抗体。

或者，可以通过噬菌体展示方法来获得人免疫球蛋白的可变区基因(McCafferty J. et al., Nature 348: 552-554, 1990; Kretzschmar T et. al., Curr Opin Biotechnol. 2002 Dec; 13(6): 598-602.)。在噬菌体展示方法中，将编码人免疫球蛋白可变区的基因整合到噬菌体基因中。也可以通过使用多种免疫球蛋白基因作为调整来制备噬菌体库。噬菌体会将可变区作为组成噬菌体的蛋白的融合蛋白来表达。由噬菌体表达在噬菌体表面的可变区保持了与抗原的结合活性。考虑到从噬菌体库中筛选表达了具有所需结合活性

的可变区的噬菌体，因此，选择出能够结合抗原或者表达抗原的细胞的噬菌体。此外，如此筛选得到的噬菌体颗粒保持了编码具有所需结合活性的可变区的基因。就是说，在噬菌体展示方法中，可以使用可变区的结合活性作为指示剂来获得编码具有所需结合活性的可变区的基因。

在本发明中的 IPC 的活性抑制剂中或者抑制 IPC 的活性的方法中，可以将能够识别人 ILT7 的胞外域的抗体或者至少含有抗体的抗原结合区域的抗体片段作为蛋白或多核苷酸编码的蛋白进行给药。在多核苷酸的给药中，需要使用载体来表达所需蛋白，在该载体中将编码所需蛋白的多核苷酸置于合适的启动子的调控之下。也可以将增强子和终止子插入到载体中。带有组成免疫球蛋白的重链和轻链的基因以及能够表达免疫球蛋白分子的基因的载体是已知的。

可以通过将能够表达免疫球蛋白的载体导入到细胞中来给药。在对活体组织的给药中，对于可以通过对活体组织给药来感染细胞的载体可以直接给药。先从活体组织中分离出淋巴细胞，然后将载体导入到能够被重新注射回活体组织的淋巴细胞中(回体法)。

在基于本发明 IPC 的活性抑制剂中或者抑制 IPC 的活性的方法中，对于活体组织给药单克隆抗体的量来说通常给药免疫球蛋白的范围为每公斤体重 0.5 mg 到 100 mg，例如，每公斤体重 1 mg 到 50 mg，优选的是每公斤体重 2 mg 到 10 mg。对于活体组织给药抗体的间隔可以进行适当的调整，以便在治疗的过程中能够维持活体组织中免疫球蛋白的有效浓度。具体的，例如，给药抗体的间隔可以是 1 到 2 周。给药途径是可选的。本领域技术人员可以适当地选择在治疗中有效地给药途径。其具体的例子包括口服给药或者非经肠道给药。抗体可以进行全身给药或者局部给药，例如，通过静脉注射，肌肉注射，腹腔内注射，皮下注射或者此类方法。本发明中非经肠道给药的合适的剂型包括注射液剂，栓剂以及喷剂。当向细胞中加入抗体时，向培养基中加入免疫球蛋白，加入的浓度的范围通常为 1 μ g/毫升，优选的是 10 μ g/毫升，更优选的是 50 μ g/毫升，再进一步优选的是 0.5mg/毫升。

在本发明中的 IPC 的活性抑制剂中或者抑制 IPC 的活性的方法中，可以通过可选的方法对活体组织进行单克隆抗体的给药。通常，是将单克隆抗体与药学上可接受的支持物进行混合。如果需要，可以将单克隆抗体与

诸如稠化剂、稳定剂、防腐剂以及增溶剂此类的添加试剂混合。这样的支持物或者添加试剂的例子包括乳糖、柠檬酸、硬脂酸、硬脂酸镁、蔗糖，淀粉、滑石粉、凝胶、琼脂、植物油以及乙二醇。术语“药学上可接受”是指各个政府的管理机构所认可的或者列在各个国家药典上的或者被用于动物，哺乳动物以及更具体的人的药典所普遍公认的。也可以通过单剂量或多剂量的冻干粉末或者药片的形式提供本发明的 IPC 的活性抑制剂。此外，可以将冻干粉末或者药片与使用注射用无菌水，生理盐水溶液或者缓冲溶液联合使用以便在给药之前将合成物溶解成所需的浓度。

此外，当以能够表达免疫球蛋白的载体的形式进行单克隆抗体的给药的时候，共转染具有重链和轻链的质粒，每种质粒的给药范围为 0.1 到 10mg，例如，1 到 5mg 每公斤体重。为了将质粒导入到细胞内，所使用的载体的浓度为 1 到 $5\mu\text{g}/10^6$ 细胞。下文中将结合实施例来具体描述本发明。

此处所引用的所有文献其全部内容已以参考方式并入本文。

实施例

实施例 1

A. 对 ILT7 表达的分析

A-1) 利用 SAGE 库进行分析

通过 SAGETM (Serial Analysis of Gene Expression; 基因表达连续分析) 方法将基因在人单核细胞，IPC 以及 HSV 处理过的 IPC 中的表达进行比较和分析。分析的方法如下。利用细胞分选仪从人外周血中分离了作为 CD14 阳性细胞的单核细胞，并且分离了作为 BDCA-4 阳性细胞的 IPC。此外，在存在单纯疱疹病毒(HSV)的情况下将 IPC 培养了 12 小时，制备了分化的 IPC。利用 I-SAGETM 试剂盒 (Invitrogen 生产) 从各种细胞中获得了 RNA，然后制备了 SAGE 库。利用 SAGE 分析软件 (由 Invitrogen 生产) 分析了获得的大约 100,000 个标签的碱基序列的数据。其结果，发现了已知基因 ILT7 (Gen Bank Acc#NM_012276)，对于该基因，单核细胞/IPC/IPC+HSV 的得分是 0/16/0，即，该基因显示 IPC 特异性表达。ILT7 是由 SEQ ID NO: 1 中显示的碱基序列所编码的、具有免疫球蛋白样结构域的膜蛋白 (图 2(a))。已经报道了 ILT7 的 mRNA 在 IPC 中的表达 (Blood 100, 3295-3303(2002))。

A-2) RT-PCR

更加详细的考察了 ILT7 在血细胞中的表达。利用细胞分选仪从人外周血中分离了每种细胞。从每种分离的细胞群中分离了 RNA，以该 RNA 为模板合成了 cDNA。利用所得的 cDNA 按照通常的方法进行了定量 PCR，并且分析了 ILT7 的 mRNA 的表达水平。所使用的 PCR 条件以及引物的碱基序列如下：

正向引物：5' CTC CAA CCC CTA CCT GCT GTC 3'(SEQ ID NO: 3)

反向引物：5' TTC CCA AGG CTC CAC CAC TCT 3'(SEQ ID NO: 4)

94°C 3 分钟，1 个循环

[94°C 30 秒， 58°C 30 秒， 72°C 1 分钟]，25 个循环

72°C 6 分钟，1 个循环

当对单核细胞、IPC、HSV 刺激过的 IPC、CD19 阳性细胞(即 B 细胞)、CD3 阳性细胞(即 T 细胞)、用 PMA 刺激过的 T 细胞以及 CD56 阳性细胞(即 NK 细胞)进行考察时，发现了 ILT7 在 IPC 中的特异表达(图 1(a))。

A-3)定量 RT-PCR

此外，利用 ABI PRISM 7000(由 Applied Biosystem 生产)进行定量 PCR，检测了在其他组织和器官中的表达。作为 cDNA 模板(cDNA パネル)，使用了 BD™ MTC 多组织 cDNA 模板(MTC multiple tissue cDNA panel; Human I; Cat.No.636742, Human immune; Cat.No.636748, Human blood fractions; Cat.No.636750; 均由 Becton Dickinson 制造)以及与上述 2)相同的血细胞来源的 cDNA。

所使用的引物的碱基序列如下：

ILT7 的正向引物：5' C CT CAA TCC AGC ACA AAA GAA GT 3'(SEQ ID NO: 5)

ILT7 的反向引物：5' CGG ATG AGA TTC TCC ACT GTG TAA 3'(SEQ ID NO: 6)

GAPDH 的正向引物：5' CCA CCC ATG GCA AAT TCC 3'(SEQ ID NO: 7)

GAPDH 的反向引物：5' TGG GAT TTC CAT TGA TGA CAA G 3'(SEQ ID NO: 8)

利用 ABI PRISM 7000(由 Applied Biosystem 生产)和 SYBR green PCR 预混合试剂盒(由相同公司生产)进行了 PCR。利用 Sequence Detection System

Software(由相同公司生产)进行了分析。

反应条件如下:

第 1 步: 50°C 2 分钟, 1 个循环

第 2 步: 95°C 10 分钟, 1 个循环

第 3 步: (95°C 15 秒, 60°C 1 分钟), 40 个循环

通过将 ILT7 基因针对磷酸-3-甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因进行标准化, 比较了 ILT7 基因在每种组织中的表达, 其中已知该磷酸-3-甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因的表达是稳定的。其结果, 观察到了 ILT7 在除了淋巴组织以外的其他器官中没有表达, 其特异地在 IPC 中表达。

B. ILT7 和 FcR γ 表达载体的制备

此后, 为了表达 ILT7 蛋白进行了基因的克隆和表达载体的制备。

B-1) ILT7 基因的克隆

从 IPC 中抽提多聚(A)⁺RNA, 所述 IPC 是从人外周血分离的, 并利用寡聚 dT 引物和 Super Script Choice System for cDNA Synthesis kit 合成了 cDNA。在合成的 cDNA 上连接了 EcoRI 接头, 然后将该 cDNA 连接到了用 EcoRI 酶切之后的 pME18S 载体上, 其结果是制备了人 IPC cDNA 库。

利用制备的 cDNA 库作为模板, 利用具有以下碱基序列的引物通过 PCR 的方法扩增了 ILT7 基因。在 PCR 反应中使用了 1 活力单位的 KOD Plus DNA 聚合酶(由 TOYOBO CO., LTD 制造)。反应条件为: 94°C 2 分钟, 1 个循环; 然后, [94°C 15 秒, 55°C 30 秒, 68°C 2 分钟], 25 个循环。

正向引物: 5' CAG GGC CAG GAG GAG GAG ATG 3'(SEQ ID NO: 9)

反向引物: 5' TCA GCA GAC ACT TCC CCA ACT 3'(SEQ ID NO: 10)

利用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳对扩增出的约 2kb 的 ILT7cDNA 片段进行了分离和回收, 然后利用 Zero Blunt TOPO PCR 克隆试剂盒(由 Invitrogen 生产)将该片段克隆到了 pCR4Blunt-TOPO 质粒载体(由 Invitrogen 生产)中。对获得的基因的碱基序列进行了分析, 确认获得了在 SEQ ID NO: 1 中显示的目的 ILT7 基因。

B-2)具有 FLAG 标签的 ILT7 表达载体的制备

分别构建了如下表达质粒, 所述表达质粒表达在 ILT7 的 N 末端或 C 末端融合了 FLAG 标签所形成的蛋白。ILT7 融合了标签, 通过检测该标签可以确认 ILT7 蛋白的表达。利用 1)中得到的 ILT7 基因作为模板, 并且使用

具有下述碱基序列的引物,通过PCR的方法扩增了目的序列。在PCR反应中使用了1活力单位的KOD Plus DNA聚合酶(由TOYOBO CO.,LTD制造)。反应条件为:94℃2分钟,1个循环;然后,[94℃15秒,55℃30秒,68℃2分钟],25个循环。

对于N-FLAG ILT7

正向引物(SEQ ID NO: 11): 5' CCG ctc gag ATG ACC CTC ATT CTC ACA AGC CTG CTC TTC TTT GGG CTG AGC CTG GGC [GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG] CCC AGG ACC CGG GTG CAG GCA GAA 3'

反向引物(SEQ ID NO: 12): 5' C TAG act agt TCA GAT CTG TTC CCA AGG CTC 3'

对于C-FLAGILT7

正向引物(SEQ ID NO: 13): 5' CCG ctc gag ATG ACC CTC ATT CTC ACA AGC 3'

反向引物(SEQ ID NO: 14): 5' C TAG act agt TCA [CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC] GAT CTG TTC CCA AGG CTC 3'

在上述的碱基序列中,在括号中的具有下划线的部分显示的是编码FLAG标签的碱基序列,并且每组小写字母显示的是限制性内切酶XhoI或SpeI的酶切位点。用XhoI和SpeI酶切了PCR扩增出的DNA片段,然后利用凝胶电泳分离了该片段。回收了约2kb的DNA片段,然后将该片段连接到了按照上述相同方法用XhoI和SpeI酶切过的pME18X载体之中。这样,分别构建了能够表达目的蛋白的两种质粒,即pME18X-N-FLAG ILT7和pME18 X-C-FLAG ILT7。

B-3)对FcR γ 基因的克隆

FcR γ 蛋白被认为是能够与ILT7蛋白结合的蛋白。该分子是具有在SEQ ID NO: 15和16中显示的碱基序列和氨基酸序列的基因(Genbank Acc#NM_004106, J. Biol. Chem. 265, 6448-6452(1990))。该分子是组成Fc ϵ RI(高亲和性IgE受体)的分子(γ 链)。虽然也将其命名为Fc ϵ RI γ ,但这里将该分子称为FcR γ 。在这方面,已知该分子也是Fc γ R或Fc α R的组成分子。通过以下显示的PCR方法克隆了该基因,制备了表达载体。

利用1)中制备的人IPC cDNA库作为模板,并且利用具有以下碱基序列的引物,通过PCR方法扩增了FcR γ 基因。在PCR反应中使用了1活力单

位的 KOD Plus DNA 聚合酶(由 TOYOBO CO., LTD 制造)。反应条件为: 94°C 2 分钟, 1 个循环; 然后, [94°C 15 秒, 55°C 30 秒, 68°C 1 分钟], 25 个循环。

正向引物: 5' CCC AAG ATG ATT CCA GCA GTG 3'(SEQ ID NO: 17)

反向引物: 5' GGA AGA ACC AGA AGC CAA AGA 3'(SEQ ID NO: 18)

利用 2%琼脂糖凝胶对扩增得到的约 0.3kb 的 FcR γ DNA 片段进行了分离和回收, 然后利用 Zero Blunt TOPO PCR 克隆试剂盒(由 Invitrogen 生产)将该片段克隆到了 pCR4Blunt-TOPO 质粒载体(由 Invitrogen 生产)中。对所获得的该基因的碱基序列进行了分析, 确认已经克隆了 SEQ ID NO: 15 中所示的目的 FcR γ 基因。

B-4)具有 Myc 标签的 FcR γ 表达载体的制备

构建了能够表达 C 末端连接了 Myc 标签的蛋白的表达质粒, 以确认 FcR γ 蛋白的表达。利用上述 3)中制备的 FcR γ 基因作为模板, 并且利用具有以下碱基序列的引物进行 PCR, 扩增了目的序列。在 PCR 反应中使用了 1 活力单位的 KOD Plus DNA 聚合酶(由 TOYOBO CO., LTD 制造)。。反应条件为: 94°C 2 分钟, 1 个循环; [94°C 15 秒, 55°C 30 秒, 68°C 1 分钟], 25 个循环。

正向引物(SEQ ID NO: 19): 5' CCG ctc gag ATG ATT CCA GCA GTG GTC TTG 3'

反向引物(SEQ ID NO: 20): 5' CTA Gac tag tCT A[CA GAT CCT CTT CAG AGA TGA GTT TCT GCT C]CT GTG GTG GTT TCT CAT G 3'

在上述的碱基序列中,在括号中的具有下划线的部分显示的是编码 Myc 标签的碱基序列, 并且每组小写字母显示的是限制性内切酶 XhoI 或 SpeI 的酶切位点。用 XhoI 和 SpeI 酶切了 PCR 扩增出的 DNA 片段, 然后利用凝胶电泳分离了该片段。回收了大约 0.3 kb 的 DNA 片段, 然后将该片段连接到了按照上述相同方法用 XhoI 和 SpeI 酶切过的 pME18X 载体之中。这样, 构建了能够表达所需蛋白的质粒, 即 pME18X-Myc-FcR γ 。

C. ILT7 在动物细胞中的表达

利用上述制备的表达载体检测了 ILT7 在动物细胞中的表达。

C-1) 在 293T 细胞中的表达

使用 Effectene Transfection Kit(由 Qiagen 制造)将以下五种组合的 DNA

导入到 293T 细胞(7×10^5 个细胞)中。导入两天之后,进行了流式细胞技术分析(FCM 分析)。

- (1) pME18X-N-FLAG ILT7 2 μg
- (2) pME18X-C-FLAG ILT7 2 μg
- (3) pME18X-N-FLAG ILT7 1 μg + pME18X-Myc-FcR γ 1 μg
- (4) pME18X-C-FLAG ILT7 1 μg + pME18X-Myc-FcR γ 1 μg
- (5) pME18X-Myc-FcR γ 2 μg

按照如以下实施例 2 中 A-4 所述的相同的方法进行了 FCM 分析。使用连接了 Cy3 的抗 FLAG 抗体(由 Sigma 生产)进行了反应,并且使用 FACScan(由 Becton Dickinson 制造)进行了分析。其结果,明确了:当单独反应时,仅有少量 ILT7 在细胞表面表达;然而,当与 FcR γ 共存的时候,ILT7 在细胞外强表达(图 3)。而且,已知小鼠的 FcR γ 与人的 FcR γ 具有高度的同源性,但当使用内源性表达小鼠 FcR γ 的 p815 细胞(小鼠肥大细胞瘤)作为宿主时,没有观察到 ILT7 的表达。

C-2)通过免疫沉淀反应和 Western 印迹的方法进行分析

按照以下的方法确认了在细胞表面上 ILT7 是与 FcR γ 共同表达的。对以上述(1)~(5)的组合的形式共表达两种基因的 293T 细胞,在免疫沉淀反应后,使用各种抗体进行了分析。

像上述 1)那样,将 DNA 导入了 293T 细胞(7×10^5 个细胞),两天后回收了 293T 细胞。用裂解缓冲液(0.5% Triton, 150mM NaCl)溶解了细胞组分,然后将该溶液冰浴了 20 分钟。其后,使用针头(27G)进行了数次吹吸,然后 15Krpm 离心了 20 分钟。向 200 μg 得到的裂解产物中加入了抗 myc 抗体(2 μg , 由 Santa cruz 生物技术生产)或抗 FLAG 抗体(2 μg , 由 Sigma 生产),然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转搅拌了 4 小时。然后,向其中加入了 Protein A/G Sepharose 4 Fast Flow mix(由 Amersham bioscience 生产),在 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转搅拌了 1 小时。然后,利用具有以下的成分的裂解缓冲液洗涤了所得的沉淀成分 3 次。

裂解缓冲液:

- 0.5% TritonX-100,
- 50 mM HEPES(pH 7.6),
- 150 mM NaCl,
- 1 mM EDTA,

10% 甘油,
1 mM DTT,
2 mM PMSF,
1 $\mu\text{g}/\text{毫升}$ 抑肽酶,
1 $\mu\text{g}/\text{毫升}$ 亮抑肽酶,
1 $\mu\text{g}/\text{毫升}$ 胃酶抑制剂 A,
0.1 $\mu\text{g}/\text{毫升}$ 糜蛋白酶抑制剂,
1 mM Na_3VO_4 ,
0.1 mM β -甘油磷酸酯

向洗涤过的沉淀加入 SDS-PAGE 样品缓冲液, 煮沸 5 分钟并且离心, 然后利用 10% SDS 凝胶进行了电泳。在电泳之后, 按照常规的方法将样品从胶上转移到了 PVDF 膜上(Immobilon-p-转移膜: 由 Millipore 生产)。利用抗 FLAG 抗体和抗 myc 抗体进行印迹实验。由于在每个免疫沉淀组分中观察到了其存在, 所以确认了 ILT7 与 FcR γ 二者在 293T 细胞中是结合存在的(图 4)。

C-3)糖链的分析

由于在 Western 分析中观察到了几条 ILT7 的带, 所以考察了 ILT7 被糖基化了的可能性。利用抗 FLAG 抗体按照在 1)和 2)中所描述的方法对 200 μg 的 293T 细胞裂解物进行了免疫沉淀反应, 其中该 293T 细胞表达 N-FLAG ILT7 和 Myc-FcR γ 。此后, 用 60 μL 具有以下组分的 N-糖苷酶缓冲液重悬了沉淀, 并且向两个管中各分装了 30 μL 。

N-糖苷酶缓冲液:

10 mM EDTA,
0.2% SDS,
0.5% TritonX100,

含有 1% 2-巯基乙醇的 PBS(磷酸盐缓冲液)

然后向一个管子中加入 3 μL 的 N 糖苷酶(#1365177, 由 Roche 生产)3 个活力单位, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应了 15 小时。并且, 向其中加入了 7 μL 上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 分钟, 然后用 10%SDS 凝胶进行了电泳。电泳之后, 将胶转移到 PVDF 膜上, 加入 4)中所描述的抗 ILT7 多克隆抗体 1 μg , 并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应了一夜。用 TBS-T 缓冲液洗涤, 并且与 100, 000 倍稀释的 HRP 标记的抗兔抗

体(由 Jackson 制造)在室温的条件下进行了反应。然后利用 ECL Western Blotting Detection System(由 Amersham bioscience 生产)进行了显色。结果是,通过 N 糖苷酶处理之后表观分子量下降了。因此,认为 ILT7 上带有糖链(图 5)。

C-4)抗 ILT7 多克隆抗体的制备

按照如下方法制备了在 3)中使用的抗 ILT7 多克隆抗体。化学合成了对应于 ILT7 的 C 末端的 23 个氨基酸的肽(CSQEANSRKDNAPFRVVEPWEQI; SEQ ID NO: 21), 并且用作为载体的 KLH 蛋白结合了该肽, 作为免疫原。利用混合了弗氏完全佐剂的免疫原, 对兔子进行了皮内免疫。在总共六次免疫之后(每周进行一次), 确认了血清中抗体滴度的增加并且收集了全血。然后, 利用相同序列的肽亲和柱对一部分血清进行了亲和纯化, 作为抗 ILT7 多克隆抗体。

实施例 2

A. 抗 ILT7 单克隆抗体的制备

A-1)免疫原的制备

按照如下描述的方法将基因导入到 293T 细胞中, 通过该方法制备了免疫原。向扑满 100mm/Collagen Coated Dish(培养涂铺盘)(IWAKI)的整个底部的 3mL 的 opti-MEM(GIBCO)中, 加入 46.4 μ g 转基因(pME18X-C-FLAGILT7 23.2 μ g 以及 pME18X-Myc-FcR γ 23.2 μ g), 并且进行混合。此后, 将转基因溶液放在一边, 用 3mL 的 opti-MEM 稀释 58 μ L 的 Lipofectamine(商品名)2000(Invitrogen), 室温下放置 5 分钟, 通过这样的步骤制备了 Lipofectamine 溶液。此后, 向含有转基因溶液的培养皿中加入 Lipofectamine 溶液并进行了混合。在室温下放置了 20 分钟, 利用含有 10%FBS(胎牛血清)的 DMEM 培养基(SIGMA)将的 293T-细胞稀释成 1×10^6 个细胞 / mL 的细胞溶液, 然后向该培养皿中轻柔地加入了该细胞溶液 10 mL。37 $^{\circ}$ C 下, 在 CO₂ 培养箱中静置培养 48 小时, 然后通过移液管回收了细胞, 作为免疫原用转染子(トランスフェクタント)。

A-2)杂交瘤的制备

在进行细胞免疫前一天, 对四只 Balb/c 雌性小鼠(四周大)的双脚脚底各注射了 50 μ L 乳剂进行免疫, 该乳剂是通过将 200 μ L PBS 与 200 μ L 佐剂(完全佐剂 FREUND)(RM606-1, 由 Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.生产)混合制

备的。在此后一天,将 2×10^7 个细胞悬浮在 400 μL 的 PBS 中,各利用 50 μL 进行了免疫。此后,每隔三天进行了第二次和第三次免疫。在第三次免疫三天以后,按如下方法进行了细胞融合。

从免疫小鼠的双脚淋巴结中收集了细胞。将其与培养在含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基(SIGMA)中的小鼠骨髓瘤细胞 P3-X63-Ag8-U1 混合,使得从淋巴结和骨髓瘤获得的细胞的比例为 2: 1~10: 1,然后通过离心分离回收了细胞。向所得的细胞组份中加入了用等量 RPMI1640 培养基稀释过的 G4000(MERCK),进行了细胞融合。在洗涤细胞之后,用含有添加物(supplement)的 160 mL 的 15% FBS-HAT 培养基重悬,然后将该混合物以 200 μL /孔接种到了 16 个 96 孔板中。三天之后更换了培养基。观察到克隆形成一到两周之后,进行了初步筛选。

A-3)通过 Cell ELISA 的方法筛选杂交瘤

通过以下的 Cell ELISA 对产生目标抗体的杂交瘤进行了筛选。以 1×10^7 个细胞每个 96 孔板的浓度使用按照在 1)中制备的细胞,利用 0.5% BSA/2 mM EDTA/PBS 溶液重悬,然后以 100 μL /孔的量分装到 Cell ELISA 用培养板(NUNC 249570 96V NW PS)中。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 2,000 rpm 的速度进行了 2 分钟的离心,然后弃去了上清。以 50 μL /孔的量加入了取样过的上清,室温下反应了 30 分钟。进行了两次洗涤操作,其中该洗涤操作如下进行:向每孔中加入 0.5% BSA/2 mM-EDTA/PBS,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 2,000 rpm 的速度离心 2 分钟,然后弃去上清。洗涤之后向每孔中加入了 50 μL 的 10,000 倍稀释的过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(IM0819; Beckman coulter),并反应了 30 分钟。使用 0.5% BSA/2 mM-EDTA/PBS 进行了 3 次洗涤操作,然后加入显色溶液,测定 OD450nm-620nm,选择呈阳性反应的孔。

A-4)利用流式细胞技术(FCM)分析考察抗体反应性

利用流式细胞技术(FCM)分析的方法分析了杂交瘤培养上清。用 0.5% BSA/2 mM EDTA/PBS 重悬了上述 1)中制备的细胞,然后以每个样品 1×10^5 的量收集到离心管中,此后加入每种培养上清 40 μL ,并且在室温下反应 30 分钟。进行了两次洗涤操作,该洗涤操作如下:向每管中加入 1 ml 0.5% BSA/2 mM-EDTA/PBS,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 1,200 rpm 的速度离心 3 分钟,然后弃去上清。洗涤之后向每孔中加入了 40 μL 的 100 倍稀释的 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(IM0819; Beckman coulter),在室温下反应了 30 分钟。进行

了两次使用 0.5% BSA/2 mM-EDTA/PBS 的洗涤操作, 然后利用流式细胞仪 FC500(Beckman coulter)进行了分析。选择了产生抗体的杂交瘤, 其中该抗体不与宿主细胞产生反应, 而特异地与导入了基因的细胞产生反应。利用极限稀释法克隆化了选择出来的杂交瘤, 并且获得了产生单克隆抗体的杂交瘤#11 和#17。

B. 抗 ILT-7 的抗体反应性的考察

在 293T 细胞中, 按照实施例 1 中的 C-1)所描述的相同的方法对 N 末端连接了 FLAG 标签的 ILT7 和 FcR γ 分子进行了共表达。然后, 利用 FACScan(Becton Dickinson)通过 FCM 分析确认了实施例 2 中所获得的抗体的反应性。其结果, 确认了由 A 中获得的杂交瘤#11 和#17 产生的抗体均对于导入了 ILT7 基因并表达 ILT7 的细胞有反应(图 6(b))。

此外, 利用聚蔗糖从人外周血中分离了淋巴细胞, 然后利用制备的抗 ILT-7 抗体和 PE 标记的抗 BDCA-2 抗体(Miltenyi)对其进行了双染色。然后, 考察了该抗体对于淋巴细胞的反应性。其结果, 检测到了由杂交瘤#11 和#17 所产生的单克隆抗体对于 BDCA-2 阳性细胞的结合。就是说, 确认了两种抗体都识别人 IPC 上表达的 ILT7 分子(图 6(a))。将该单克隆抗体分别命名为抗 ILT-7 抗体#11 和抗 ILT-7 抗体#17。还进行了更详细的分析。

利用制备的抗 ILT-7 抗体, 抗谱系 1 抗体(抗 CD3, CD14, CD16, CD19, CD56 抗体; Becton Dickinson), 抗 CD123 抗体(Becton Dickinson)以及抗 BDCA-2 抗体(Miltenyi)对人外周血淋巴细胞进行了多重染色分析。对于 ILT7 抗体阳性的组分, 谱系标记物(Lineage Marker)是阴性的, CD123 是阳性的并且 BDCA-2 是阳性的。从这些结果中, 确认了 ILT7#11 和 ILT7#17 仅对 IPC 进行了染色(图 7)。

此外, 当利用 CpG 或者 IFN α 对外周血淋巴细胞刺激了 24 小时的时候, 利用 FCM 分析对多种分子的表达进行了检测。将 CpGODN2216 用作诱导 IPC 产生 IFN 的 CpGA, 并且将 CpGODN2006 用作促进树突细胞成熟的 CpGB(Moseman et al. J. Immunology. 173, 4433-4442, 2004)。对谱系标记物阴性组分设置了标准, 当分析抗 BDCA-2 抗体和抗 ILT-7 抗体针对 CD123 阳性细胞群的反应性的时候, 在 CpG 刺激 24 小时之后, ILT7 阳性组分基本上消失了。另一方面, 对于 BDCA-2, 一部分细胞在 CpG 刺激 24 小时之后仍显示阳性(图 8)。认为在 CpG 刺激之后 IPC 立即分化成不同的细胞, 这

表明可以将本发明的抗 ILT-7 抗体用作 IPC 的阶段特异性抗体。此外，可以确认：在 IFN α 存在时，外周血淋巴细胞中的 IPC 不会分化，存活率高，但此时在 IPC 上维持了 ILT7 的表达，在血清中的 IFN 可能处于高水平的自身免疫病中，IPC 上的 ILT7 是稳定存在的。

C. 对抗 ILT-7 抗体特异性的考察

ILT7 属于 ILT/LIR 家族，并且该家族有许多分子具有高同源性，特别是在胞外区具有高同源性(图 9)。已经报道过在 IPC 中有诸如 ILT2 和 ILT3 的 mRNA 的表达(Ju et al. Gene 331, 159-164, 2004)。因此，利用转基因细胞确认了该类分子的反应性。

C-1)ILT1 分子的克隆以及表达载体的制备

利用寡聚 dT 引物和 SuperScript Choice System cDNA 合成试剂盒，以从人扁桃体得到的 RNA 为模板合成了 cDNA。在合成的 cDNA 上连接了 NotI 接头，然后将其连接到了用 NotI 酶切之后的 pME18S 载体上，其结果是制备了人扁桃体 cDNA 库。

利用所得的 cDNA 库作为模板，并且使用具有下述碱基序列的引物，通过 PCR 的方法扩增了 C 末端连接了 FLAG 标签的 ILT1 基因。在 PCR 反应中使用了 1 活力单位的 KOD Plus DNA 聚合酶(由 TOYOBO CO., LTD 制造)。反应条件为：94 $^{\circ}$ C 2 分钟，1 个循环；然后，[94 $^{\circ}$ C 15 秒，55 $^{\circ}$ C 30 秒，68 $^{\circ}$ C 2 分钟]，25 个循环。

正向引物(SEQ ID NO: 22): 5' CCG ctc gag ATG ACC CCC ATC CTC ACG GTC C 3'

反向引物(SEQ ID NO: 23): 5' CTA Gac tag tTC A[CT TAT CGT CGT CAT CCT TGT AAT C]CC TCC CGG CTG CAT CTT G 3'

在上述的引物序列中，在括号中的具有下划线的部分显示的是编码 FLAG 标签的碱基序列，并且每组小写字母显示的是限制性内切酶 XhoI 或 SpeI 的酶切位点。用 XhoI 和 SpeI 酶切了 PCR 扩增出的 DNA 片段，然后利用凝胶电泳分离了该片段。回收了约 2kb 的 DNA 片段，然后将该片段连接到了按照上述相同方法用 XhoI 和 SpeI 酶切过的 pME18X 载体之中。这样，构建了能够表达目的融合蛋白的质粒，即 pME18X-C-FLAGILT1。其碱基序列和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 和 25 所示。

C-2) 表达细胞的制备以及抗体反应性的考察

对于 ILT2(SEQ ID NO: 26)以及 ILT3(SEQ ID NO: 28), 使用了将两种基因分别克隆到 pcDNA4.1(由 Invitrogen 生产)的 XbaI、XhoI 位点所制备的表达载体。使用与 C-1)中所描述的相同的方法向 293T 细胞(7×10^5 个细胞)中导入了以下的 DNA 组合。导入两天之后, 进行了流式细胞技术分析(FCM 分析), 分析了抗 ILT7 抗体。

(1) pME18X-N-FLAG ILT7 1 μ g + pME18X-Myc-FcR γ 1 μ g

(2) pME18X-C-FLAG ILT1 0.5 μ g + pME18X-Myc-FcR γ 0.5 μ g + pcDNA4.1-ILT2 0.5 μ g + pcDNA4.1-ILT3 0.5 μ g

其结果, 任何抗体对于表达了 ILT1 等的细胞都没有反应。因为这样的原因, 证明了该抗 ILT7 抗体特异地识别 IPC 上的 ILT7 分子(图 10)。

实施例 3

抗 ILT-7 抗体对产人 IFN 能力的影响

将人外周血淋巴细胞以 2×10^5 个细胞/孔的量接种到 96 孔板中, 然后在 37°C 与各种抗体进行了反应, 各种抗体的量均为 5 μ g/mL。培养 1 小时之后, 向其中加入了流感病毒 PR8。培养 24 小时之后, 利用 ELISA 试剂盒(Bender Med System)测定了培养上清中的 IFN α 。其结果, 通过加入抗 ILT-7 抗体抑制了 IFN 的产生(图 11)。也就是, 明确了本发明的抗 ILT-7 抗体对 IPC 的产 IFN 活性有影响。

实施例 4

抗 ILT-7 抗体的 CDC 活性

A. 抗 ILT7 的单克隆抗体的制备

按照实施例 2 中 A-1)~A-4)所描述的相同的方法获得了产生单克隆抗体的克隆。按照实施例 2 中 B 所描述的相同的方法测定了反应性, 并且按照实施例 2 中 C 所描述的相同的方法测定了特异性。其结果, 获得了产生反应性和特异性良好的抗 ILT7 单克隆抗体的杂交瘤#37, #28 以及#33。利用由这三种杂交瘤所产生的抗 ILT7 单克隆抗体按照下述方法测定了 CDC 活性。

B. CDC 活性的确定

B-1) 在前一天, 利用 Effectene Transfection Reagent(由 QLAGEN 生产)将以下的 DNA 导入到了 CHO-k1 细胞中, 所述 CHO-k1 细胞是以每盘 6×10^5 个细胞的数量接种在 6cm ϕ 盘上的, 然后利用 800 μ g/毫升的 Zeocin(由

Invitrogen 生产)选择了抗性株。

导入的 DNA: pcDNA3.1-C-FLAG ILT7 1 μg + pME18X-Myc FcR γ 2 μg

此后, 利用细胞分选仪(BD FACSAria, 由 Becton Dickinson 制造)获得了大量表达 ILT7 的细胞系。通过 FCM 分析确认了所选择的细胞系大量表达 ILT7。除了将 BD FACSCaliber(由 BD 生产)用于 FCM 以外, 按照实施例 2 中 A-4)中所描述的相同的方法实施了 FCM 分析操作。分别使用了以下的抗体作为第一抗体和第二抗体。

第一抗体: 5 μg /毫升小鼠抗 ILT-7 抗体(#37),

第二抗体: R 藻红蛋白(R-PE)连接的山羊抗小鼠免疫球蛋白特异性多克隆抗体(BD 公司)

B-2)目标细胞与抗 ILT7 抗体的反应

利用 5 mM EDTA/PBS 溶液回收了 B-1)中获得的目标细胞(ILT7-CHO 细胞), 然后利用含有以下成分的 CDC 培养基重悬了该细胞而获得 4×10^5 个细胞/毫升的浓度。将该重悬液按 50 μl /孔浓度分装到 V 形底 96 孔板中。

CDC 培养基:

RPMI1640

0.1% BSA

100 活力单位/毫升青霉素

100 μg /毫升链霉素

10 mM HEPES(pH 7.6)

2 mM L-谷氨酰胺

向每个孔中加入了 50 μl 用 CDC 培养基制备的抗 ILT-7 抗体溶液, 并且进行了混匀以使最终的抗体浓度为 0.1 μg /毫升, 0.5 μg /毫升, 1 μg /毫升以及 5 μg /毫升。此外, 向其中加入了 50 μl 含有具有以下成分的含补体的 CDC 培养基, 并且进行了混合以使补体的终浓度为 6%, 然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养了 2 小时。

含补体的 CDC 培养基:

1 ml 幼兔的补体(Catalog No.: CL3441, 由 CEDARLANE 生产)

CDC 培养基(同上)

然后, 将悬浮液进行了离心(离心条件: 250 G 离心 4 分钟)并且回收了上清, 在回收的时候注意不要带入细胞的污染。利用常规的方法测定了上

清中的 LDH，将该结果确定为“由补体活性引起的目标细胞渗漏出的 LDH 的量(实验样本)”。

为了确定 CDC 的活性也测定了以下的参数。

-目标细胞自发的 LDH 的释放(Target Cell Spontaneous LDH Release): 仅培养了与样品相同体积的目标细胞并对其进行了制备。

-目标细胞最大的 LDH 释放(Target Cell Maximum LDH Release): 仅培养了与样品相同体积的目标细胞，然后在回收上清液之前 60 分钟，向其中加入了试剂盒里包含的 TritonX-100 溶液以使最终浓度为 0.8%，这样对其进行了制备。

-体积修正对照(Volume Correction Control): 向与样品具有相同体积的培养基中加入了与制备目标细胞最大的 LDH 释放时所加入的相同的量的 TritonX-100，这样对其进行了制备。

-培养基的本底(Culture Medium Background): 制备了与样品具有相同的体积的培养基，以及，向培养基中加入了含补体的 CDC 培养基使之与样品具有相同体积而成的溶液。

如下进行了修正：从目标最大以及目标自发的吸收中减去了与样品具有相同体积的培养基的吸收，从实验样品的吸收中减去了向培养基中加入了含补体的 CDC 培养基使之与样品具有相同体积而成的溶液的吸收。

通过以下的等式计算了 CDC 活性。结果在表 1 和图 12 中显示。在使用了从任何杂交瘤中获得的抗 ILT7 单克隆抗体的例子中，当抗体浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{毫升}$ 或者更高时，显示出 80% 或者更多的 CDC 活性。

$$\text{CDC 活性} = [(\text{实验样品} - \text{目标自发}) / (\text{目标最大} - \text{体积对照} - \text{目标自发})] \times 100$$

[表 1]

	抗体浓度 ($\mu\text{g}/\text{毫升}$)	细胞伤害性 (平均值)	细胞伤害性 (标准偏差)
#37	0.1	14.78	3.16
	0.5	85.5	0.60
	1	86.13	2.93
	5	90.26	1.87
#28	0.1	18.52	0.60
	0.5	80.97	1.62
	1	83.64	1.99
	5	88.17	3.32
#33	0.1	4.42	1.58
	0.5	82.16	3.35
	1	85.39	2.78
	5	86.18	1.71
小鼠 IgG2a	0.1	1.53	0.60
	0.5	1.47	2.50
	1	3.68	2.90
	5	3.06	1.72
无抗体	0	2.10	0.49

比较例 1

除了将抗 ILT7 抗体替换成小鼠 IgG2a 以外，其他完全按照实施例 4 的 B 和 C 中所描述的相同的方法进行操作。其结果与实施例 4 一起显示在表 5 和图 12 中。在除了抗 ILT7 单克隆抗体以外的其他抗体中没有观察到针对目标细胞的 CDC 活性。

实施例 5

抗 ILT-7 抗体在目标细胞上的内化

A. 抗 ILT7 单克隆抗体

使用了以下的抗 ILT7 单克隆抗体。抗 ILT7 单克隆抗体：#17，#26，#37，#28 以及#33

B. 内化的观察

B-1)目标细胞系(ILT7-CHO 细胞系)的制备

按照实施例 4 的 B-1 中所描述的相同的方法制备了目标细胞系(ILT7-CHO 细胞系)。

B-2)目标细胞与抗 ILT-7 抗体的反应

用含有以下成分的冰预冷的(T(-) + 10% FBS)缓冲液重悬了回收的 ILT7-CHO 细胞，重悬后的浓度为 1×10^6 个细胞/毫升，回收细胞时使用的是 5 mM EDTA/PBS 溶液。

T(-)培养基:

RPMI1640

100 活力单位/毫升青霉素

100 μ g/毫升链霉素

10 mM HEPES(pH 7.6)

2 mM L-谷氨酰胺(Glutamin)

1 mM 丙酮酸钠

50 μ M 2-巯基乙醇

10%热灭活的胎牛血清

将 1 毫升上述的悬浮液放入 15 毫升离心管中，进行离心(离心条件：在 4°C 以 1200 rpm 的速度离心 5 分钟)，然后弃去了上清。向细胞沉淀中加入了 200 μ L 抗 ILT7 单克隆抗体悬液(10 μ g/毫升)，然后对其进行了混合，并且在 4°C 孵育 30 分钟，此后利用冰预冷的 T(-)培养基洗涤两次(所使用的培养基的量：每次洗涤用 10 毫升，离心条件：在 4°C 以 1200 rpm 的速度离心 5 分钟)。

B-3)对存在于目标细胞表面的 ILT7-抗 ILT-7 抗体免疫复合物的修饰

随后，利用第二抗体对存在于细胞表面的 ILT7-抗 ILT-7 抗体免疫复合物进行了修饰，使得能够通过荧光进行检测。具体方法如下所述。向 B-2)中获得的细胞沉淀中加入了含有 APC-标记的山羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体(目录号：550826BD，由 Biosciences 生产)的冰预冷的 T(-)培养基，然后在 4°C 避光孵育 20 分钟，此后用冰预冷的 T(-)培养基洗涤两次(所使用的培养基

的量: 每次洗涤用 10 毫升, 离心条件: 在 4°C 以 1200 rpm 的速度离心 5 分钟)。然后向其中加入了冰预冷的 T(-)培养基, 作为浓度为 1×10^6 个细胞/毫升的悬液。

B-4) 通过在 37°C 孵育来诱导内化

将按照 B-3 中获得的悬液平均分到两个管子里(即管(a)和(b))。将管(a)和(b)分别在 37°C 和 4°C 避光孵育了 60 分钟。在孵育之后, 向其中加入了 1% FBS/PBS(冰预冷的)来终止内化。对其进行了离心(离心条件: 在 4°C 以 1200 rpm 的速度离心 5 分钟), 然后弃去了上清, 接着利用 1% 的 FBS/PBS(冰预冷的)洗涤两次(溶液的量: 每次洗涤用 10 毫升, 离心条件: 在 4°C 以 1200 rpm 的速度离心 5 分钟)。

B-6) 对在孵育之后仍存在于目标细胞表面的 ILT7-抗 ILT-7 抗体免疫复合物的修饰

利用第三抗体对孵育之后仍保留在细胞表面的 ILT7-抗 ILT-7 抗体免疫复合物进行修饰, 使得能够通过荧光来检测。具体方法如下所述。向 B-4) 中获得的细胞沉淀中加入了 20 μ L 含有第三抗体(FITC 标记的驴抗山羊 IgG 抗体(目录号: sc-2024, 由 Santa cruz 生物技术生产))的悬浮液, 然后在 4°C 避光孵育 15 分钟。然后用 1% 的 FBS/PBS(溶液的量: 每次洗涤用 10 毫升, 离心条件: 在 4°C 以 1200 rpm 的速度离心 5 分钟)对所得的溶液进行了洗涤。

B-5) 对目标细胞中存在的抗 ILT-7 的抗体的分析

随后, 向 B-5)中获得的细胞沉淀中加入了 150 μ L 的 1% FBS/PBS, 然后将其重悬并收集到 1.2 毫升的微量滴定管中, 对其进行 FCM 分析。在分析中, 分 FITC 和 APC 分析了每种细胞的平均荧光强度(MPI)。进一步, 按照以下的等式计算了荧光强度比(%)。

荧光强度比(%)=(37°C 孵育了 60 分钟的细胞的平均荧光强度/4°C 孵育了 60 分钟的细胞的平均荧光强度) \times 100

该结果在表 2, 表 3 和图 13 中显示。

[表 2]

	FITC			APC		
	平均荧光强度		荧光强度比 (%)	平均荧光强度		荧光强度比 (%)
	孵育的温度 (°C)			孵育的温度 (°C)		
	4	37	4	37		
#17	35.7	15.9	44.5	1384	1320	95.4
#26	29.8	16.5	55.4	884	816	96.7
#37	51.0	28.5	55.9	2194	2155	98.2
#28	40.6	19.3	47.5	1746	1709	97.9
#33	47.7	22.6	47.4	1882	1845	98.0
IgG2a	3.7	4.2	116.2	3	3.64	121.3

[表 3]

	第一抗体的种类	荧光强度比(%)	
		APC	FITC
实施例 5	抗 ILT7 抗体#17	95.4	44.5
	抗 ILT7 抗体#26	96.7	55.4
	抗 ILT7 抗体#37	98.2	55.9
	抗 ILT7 抗体#28	97.9	47.5
	抗 ILT7 抗体#33	98.0	47.4
比较例 2	小鼠 IgG2a	121.3	116.2

FITC 的荧光强度是在孵育之后仍保留在细胞表面的 ILT7-抗 ILT-7 抗体免疫复合物的量的指示剂。与在 4°C 孵育的细胞相比较，在 37°C 孵育 60 分钟的细胞的 FITC 的平均荧光强度降低到了大约 50%。

另一方面，APC 的荧光强度是在孵育之前存在于细胞表面的 ILT7-抗 ILT-7 抗体免疫复合物的量的指示剂。在孵育之后，无论 ILT7-抗 ILT-7 抗

体免疫复合物是存在于细胞表面还是整合到细胞内，都能够检测到该复合物。在实施例 5 中，在 37℃ 孵育的例子与在 4℃ 孵育的例子相比，孵育之后的 APC 荧光强度是相等的。该结果表明：无论在两种温度中任何一种温度中孵育，ILT7-抗 ILT-7 抗体免疫复合物均存在于目标细胞的任何部位。如上所述，可知通过 37℃ 孵育，抗 ILT7 单克隆抗体引起了 ILT7 的内化。

比较例 2

除了将抗 ILT7 抗体替换成小鼠 IgG2a 以外，其他完全按照实施例 5 中所描述的相同的方法进行操作。其结果实施例 5 一起显示在表 2，表 3 以及图 13 中。在使用小鼠 IgG2a 的例子中没有观察到 FITC 的荧光强度的任何变化，因此可知小鼠 IgG2a 没有引起 ILT7 的内化。

实施例 6

关于小鼠抗人 ILT7 单克隆抗体的结构

[可变区的序列]

A. 编码小鼠抗 ILT-7 抗体可变区的 cDNA 的克隆

A-1) 关于产生小鼠抗 ILT7 抗体的杂交瘤

使用了以下的杂交瘤作为产生小鼠抗 ILT7 抗体的杂交瘤。

-杂交瘤 #11(保藏号: FERM BP-10704)

-杂交瘤 #17(保藏号: FERM BP-10705)

A-2) 总 RNA 的分离

利用市售试剂盒“RNeasy Mini Kit”(目录号: 74106, 由 Qiagen 制造)按照试剂盒中所附的说明, 从 A-1)中所述的杂交瘤中抽提了总 RNA。均是从 1×10^7 个杂交瘤细胞中获得了大约 200 μg 的总 RNA。

A-3) 对于编码小鼠重链可变区的 cDNA 的扩增和片段化

以 5 μg 的 A-2 中分离的总 RNA 作为模板, 并利用 5'RACE 的方法扩增了编码小鼠重链可变区的 cDNA。对于扩增, 使用了市售试剂盒“5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA ENDS, Version 2.0 Kit”(目录号: 18374-058, 由 Invitrogen 生产)。其具体描述如下。首先, 利用反转录酶以 A-2 中分离的总 RNA 作为模板合成了 cDNA 的第一条链。此时, 所使用的反义引物(GSP1)的碱基序列如表 4 所示。

[表 4]

用于扩增小鼠重链可变区编码基因的引物

所用的杂交瘤	引物名称	SEQ ID NO	序列(5'→3')
#11	Mu IgG3VH5RACE -GSP1	30	CCATAGTTCCATTTTACAGTTACC (24-mer)
	Mu IgG3VH5RACE -GSP2	31	GGGACCAAGGGATAGACAGA (20-mer)
#17	Mu IgG2aVH5RA CE-GSP1	32	TCCAGAGTTCCAGGTCAAGGTCAC (24-mer)
	Mu IgG2aVH5RA CE-GSP2	33	GCCAGTGGATAGACCGATGG (20-mer)

此后，利用 RNaseH 降解了总 RNA，并且利用低熔点琼脂糖法(1.5%)纯化了保持单链形式的 cDNA 的第一链。此外，利用末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)将 dC(即核苷酸同聚物)连接到 cDNA 的第一条链的 3' 末端。利用锚定引物(SEQ ID NO: 34)以及如表 4 中所示的反向引物(GSP2)通过 PCR 的方法扩增了 cDNA，其中该锚定引物在 3' 末端具有与 dC(锚定序列)互补的核苷酸多聚物。此外，将所获得的 PCR 产物用作模板，利用 AUAP 引物(SEQ ID NO: 35)以及如表 4 中所示的反向引物通过巢式 PCR 的方法扩增了 cDNA。此外，通过低熔点琼脂糖法(1.5%)的方法纯化了该 PCR 产物。

用于 5'RACE(SEQ ID NO: 34)的锚定引物

5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3'(36 个寡核苷酸)

用于 5'RACE 的 AUAP 引物(SEQ ID NO: 35)

5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'(20 个寡核苷酸)

A-4)编码小鼠轻链可变区的 cDNA 的扩增和片段化

以 A-2)中分离的总 RNA 作为模板，并利用 A-3)中所述的相同的方法扩增了编码小鼠轻链可变区的 cDNA。此时，所使用的引物的碱基序列如表 5 所示。利用低熔点琼脂糖法(1.5%)纯化了所得的 PCR 产物。

[表 5]

用于扩增小鼠轻链可变区编码基因的引物

所用的杂交瘤	引物名称	SEQ ID NO	序列(5'→3')
#11、#17	Mu IgVL5RACE -GSP1	36	TTCAGTGGCCATCAATCTTCCACTT (24-mer)
	Mu IgVL5RACE -GSP2	37	GATGGATACAGTTGGTGCAGC (21-mer)

A-5)对 cDNA 碱基序列的确认以及 CDR 区的确定

利用市售试剂盒“Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit”(目录号: 1325137, 由 Invitrogen 生产)按照试剂盒中所附的说明, 将 A-3)中获得的重链可变区以及 A-4)中获得的轻链可变区的 cDNA 片段克隆到 pCR4Blunt-TOPO 载体中, 然后将所得的载体导入到大肠杆菌感受态细胞中, 获得了大肠杆菌转化株。从上述的转化株中获得了上述的质粒, 然后利用自动 DNA 测序仪“PCR-based ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer”(由 Applied Biosystems 生产)确认了质粒中的 cDNA 碱基序列。通过排除从无活性 RNA 获得的转录子获得了正确的序列, 其中该无活性 RNA 是由于在互补性决定区(此后称为“CDR 区”)周围的移码以及无意义突变造成的。此外, 将该质粒中所包含的 cDNA 碱基序列的同源性 with Kabat 数据库进行了比较, 并且确定了各个可变区中 CDR 区和可变区的序列。

同样, 对于实施例 4 中制备的杂交瘤#37, 按照利用杂交瘤#17 的实施例 6 中 A-1)~A-5)所描述的程序确定了可变区中 CDR 区和可变区的序列。在以下的 SEQ ID NO 中显示的是由每种杂交瘤产生的抗 ILT7 单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区的 cDNA 的碱基序列以及由该序列编码的氨基酸序列。

	重链可变区	轻链可变区
#11	SEQ ID NO: 38 (碱基序列)	SEQ ID NO: 40 (碱基序列)

	SEQ ID NO: 39 (氨基酸序列)	SEQ ID NO: 41 (氨基酸序列)
#17	SEQ ID NO: 42 (碱基序列)	SEQ ID NO: 44 (碱基序列)
	SEQ ID NO: 43 (氨基酸序列)	SEQ ID NO: 45 (氨基酸序列)
#37	SEQ ID NO: 46 (碱基序列)	SEQ ID NO: 48 (碱基序列)
	SEQ ID NO: 47 (氨基酸序列)	SEQ ID NO: 49 (氨基酸序列)

[恒定区同种型(アイソタイプ)の確認]

对于杂交瘤培养上清, 使用市售小鼠单克隆抗体分型试剂盒(目录号: MMT1, 由 Serotec Product 生产)确认了制备的单克隆抗体的恒定区的同种型。小鼠抗人 ILT-7 抗体#11 的重链恒定区是 Igy3, 而轻链恒定区是 Igk。此外, 小鼠抗人 ILT-7 抗体#17 的重链恒定区和小鼠抗人 ILT-7 抗体#37 的重链恒定区都是 Igy2a, 并且其轻链恒定区都是 Igk。

实施例 7

嵌合抗体的制备

A. 编码人 IgG 恒定区的 cDNA 的克隆

从人 IPC 的 cDNA 库选择了人 IgG1 的重链恒定区以及人 Igk 的轻链恒定区。然后, 利用市售试剂盒“Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit”(目录号: 1325137, 由 Invitrogen 生产)按照试剂盒中所附的说明将选出的区域克隆到 pCR4 Blunt-TOPO 载体中, 然后将所得的载体导入到大肠杆菌感受态细胞中, 获得了大肠杆菌转化株。从上述的转化株中获得了上述的质粒, 然后利用自动 DNA 测序仪“PCR-based ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer”(由 Applied Biosystems 生产)确认了质粒中的 cDNA 的碱基序列。

B. 可变区与恒定区的连接和克隆

分别使用了 A 中获得的重链恒定区的编码 cDNA 以及实施例 6 的 A-5 中获得的重链可变区的编码 cDNA。两种 DNA 具有 DNA 的碱基序列重叠的区域。因此, 利用该区域使用重叠延伸方法获得了双链 DNA。详细方法

如下。

C-1)制备编码嵌合 ILT7 抗体的重链的 cDNA

利用限制性内切酶 NotI 和 XbaI 消化了 A-5)中获得的“具有编码#11 和 #17 重链可变区的 cDNA 的质粒”，然后利用琼脂糖凝胶方法(1.5%)对其进行了纯化。利用具有以下成分的 TE 缓冲液溶解了所得的产物，制备了浓度为 100 pmol/ μ L 的编码重链可变区的 cDNA 片段的溶液。

TE 缓冲液:

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

pH 7.5~8.0

此外，按照上述相同的方法处理了 B 中获得的“具有编码重链恒定区的 cDNA 的质粒”了制备浓度为 100 pmol/ μ L 的溶液。随后，将两种溶液进行了混合，然后通过最初将混合液在 70 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟，然后在 37 $^{\circ}$ C 放置 5 分钟来使二者的重合区杂交。其后，通过 PCR 的方法扩增了 cDNA，并且利用限制性内切酶 NotI 和 XbaI 对所得的 cDNA 进行了消化，然后利用低熔点琼脂糖凝胶方法(1.5%)对其进行了纯化。

C-2)制备编码嵌合 ILT7 抗体的轻链的 cDNA

分别使用了 A 中获得的轻链恒定区的编码 cDNA 以及实施例 6 的 A-5 中获得的轻链可变区的编码 cDNA。使用这些 cDNA 按照 C-1)中所描述的相同的方法获得了编码嵌合 ILT7 抗体的轻链的 cDNA。

C-3)克隆化

使用 NotI 和 XbaI 作为克隆位点将 C-1)中获得的 cDNA 克隆到质粒载体 pcDNA3.1-Zeocin(由 Invitrogen 生产)中，制备了嵌合 ILT7 抗体重链表达载体。此外，使用 NotI 和 XbaI 作为克隆位点将 C-2)中获得的 cDNA 克隆到质粒载体 pcDNA3.1-hygromycin(由 Invitrogen 生产)中，制备了嵌合 ILT7 抗体轻链表达载体。

表 6 中显示的是每种载体的名称。

[表 6]

质粒载体的名称

	嵌合 ILT7 抗体重链 表达用	嵌合 ILT7 抗体轻链 表达用
#11	pcDNA-#11VH	pcDNA-#11VL
#17	pcDNA-#17VH	pcDNA-#17VL

D.嵌合 ILT7 抗体的表达

D-1)瞬时转染

利用 effectine transfection kit(目录号: 301427, 由 Qiagen 制造)将 1 μ g 的嵌合 ILT7 抗体重链表达载体和 1 μ g 的嵌合 ILT7 抗体轻链表达载体共转染了 293T 细胞, 其中两种载体是在 C-3)中制备的。此后, 使用含有以下成分的加入了 2% Low IgG FBS 的 DMEM 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C 进行了培养。

加入了 2% Low IgG FBS 的 DMEM 培养基:

DMEM 培养基(目录号: D5796, 由 Sigma 生产)

2% Low IgG FBS(目录号: SH30151.03, HyClone 产)

2 mM L-谷氨酰胺(Glutamin)

100 U/毫升青霉素

100 μ g/毫升链霉素

pH 7.2~pH 7.4

在导入了载体之后, 培养 96 小时, 收集了培养上清。然后, 通过离心去除了细胞碎片, 获得了粗制的抗体溶液。

D-2)稳定转染

利用 effectine transfection kit(目录号: 301427, 由 Qiagen 制造)将 1 μ g 的嵌合 ILT7 抗体的重链表达载体和 1 μ g 的嵌合 ILT7 抗体的轻链表达载体共转染了 YB2/0 细胞(该细胞来自于大鼠骨髓瘤, ATCC#CRL-1622), 其中两种载体是 C-3)中制备的。在所使用的质粒载体中, 重链表达载体的标记是 Zeocin 抗性, 而轻链表达载体的标记是潮霉素抗性。因此, 导入了两种载体的细胞能够在同时加入了 Zeocin 和潮霉素的培养基中生长。然后, 利用加入了 Zeocin 和潮霉素的 RPMI 培养基培养该细胞并且选择了抗性株。

加入了 Zeocin-潮霉素的 RPMI 培养基:

RPMI1640 培养基(目录号: R8758, 由 Sigma 生产)

10% FBS

0.01 M HEPES(N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸钠)

1 mM 丙酮酸钠

2 mM L-谷氨酰胺

100 U/毫升青霉素

100 μ g/毫升链霉素

55 μ M 2-巯基乙醇

0.5 mg/毫升 Zeocin

0.5 mg/毫升潮霉素

pH 7.2~pH 7.4

在此操作三天以后, 通过 ELISA 方法确定了培养上清中的抗体产量。

选择了具有高抗体表达水平以及细胞明显增加的 ILT7 嵌合抗体生成细胞系。此外, 通过细胞分选的方法进行单克隆化, 获得了以下的细胞系。

#11 ILT7 嵌合抗体生成细胞系: #11-5 细胞系和#11-16 细胞系

#17 ILT7 嵌合抗体生成细胞系: #17-24 细胞系

将上述的细胞系(#11-5 细胞系, #11-16 细胞系和#17-24 细胞系)分别在具有以下成分的加入了 5% FBS 的 RPMI 培养基中培养。将孵育温度和孵育时间分别设置为 37°C 和 96 小时。

加入了 5% FBS 的 RPMI 培养基:

RPMI1640 培养基(目录号: R8758, 由 Sigma 生产)

5% FBS

0.01 M HEPES

1 mM 丙酮酸钠

2 mM L-谷氨酰胺

100 U/毫升青霉素

100 μ g/毫升链霉素

55 μ M 2-巯基乙醇

pH 7.2~pH 7.4

收集了培养上清并且通过离心去除了细胞碎片以便, 获得了粗制的抗

体溶液。

E. 抗体的纯化

通过蛋白 A 亲和柱(rProtein A Sepharose FF, 目录号: 17-1279-01, 由 Amersham Pharmacia 生产)纯化了 D-1 和 D-2 中获得的每种粗制抗体溶液。纯化条件如下。使用具有如下成分的 PBS(-)缓冲液作为吸附缓冲液, 以及 0.1M 柠檬酸钠缓冲液(pH3)作为洗脱缓冲液, 按照附带的说明书进行了亲和纯化。向洗脱组分中加入了 1M Tris-HCl(pH 8.0)将 pH 调节至大约 7.2。对于调整好 pH 的抗体溶液, 使用透析膜将其交换成 PBS(-), 得到了纯化的抗 ILT7 嵌合抗体。关于纯化抗体的浓度, 测定了在 280nm 处的吸收值, 并且以 1.38 OD 为 1mg/毫升进行了换算。表 7 中总结了所获得的嵌合 ILT7 抗体、其可变区基因的来源杂交瘤以及宿主细胞之间的关系。

PBS(-)缓冲液:

0.2 g/L 磷酸二氢钾

0.2 g/L 氯化钾

8 g/L 氯化钠

1.15g/L 无水磷酸氢二钠

[表 7]

制备的嵌合抗体

制备的嵌合抗体的名称	使用的杂交瘤	转染形式	导入的细胞
#11 ILT7 嵌合抗体	#11	瞬时	293T
#17 ILT7 嵌合抗体	#17		
#11-5 ILT7 嵌合抗体	#11	稳定	YB2/0
#11-16 ILT7 嵌合抗体	#11		
#11-24 ILT7 嵌合抗体	#17		

制备的嵌合抗体的重链和轻链的氨基酸序列以及 cDNA 碱基序列分别如下所示。在每种氨基酸序列中，从氨基酸序列 N 末端到-1 是信号序列的氨基酸序列，从氨基酸序列的 1 到 C 末端是成熟蛋白的氨基酸序列。就是说，组成这些嵌合抗体的重链和轻链是由以下每种氨基酸序列的从 1 到 C 末端的氨基酸序列所组成的。

	重链	轻链
#11	SEQ ID NO: 50 (碱基序列)	SEQ ID NO: 52 (碱基序列)
	SEQ ID NO: 51 (氨基酸序列)	SEQ ID NO: 53 (氨基酸序列)
#17	SEQ ID NO: 54 (碱基序列)	SEQ ID NO: 56 (碱基序列)
	SEQ ID NO: 55 (氨基酸序列)	SEQ ID NO: 57 (氨基酸序列)

工业实用性

本发明提供了可用于制造特异性识别人 ILT7 的抗体的免疫原，以及利用该免疫原生产抗 ILT-7 抗体的方法。本发明的特异识别人 ILT7 的抗体能够在 ILT 家族存在的情况下特异地识别 ILT7。因此，可以使用本发明的抗体来测定和分离人 ILT7。例如，也可以使用本发明的抗体来分析 ILT7 的定位。已经认识到 ILT7 是与 IPC 或树突细胞的分化和功能密切相关的分子。因此，可以使用能够识别 ILT7 并且具有高特异性的抗体来分析 IPC 或树突细胞的功能。IPC 样的(具有表达 BDCA-2 的特性)癌细胞是已知的(Chaper of L et al. Eur. J. Immunol. 34; 418-426, 2004, Maeda T et al., Int. J. Hematol. 81; 148-154, 2005)。对于在这些细胞中 ILT7 的表达的确认可能会使得对癌症的诊断和治疗成功。

在自身免疫病的例子中，例如，已经有人指出由 IPC 产生的 IFN α 与银屑病的发展之间有很深的关系，其中的银屑病是一种皮肤病(Nestle FO et al., J. Exp. Med. 202, 135-143, 2005)。因此，可以通过鉴定银屑病病人皮肤组织中的 IPC 来测定银屑病的程度，即在活检标本中使用抗 ILT-7 的抗体。

已知 HIV 感染的病人的 AIDS 的发展是与 IPC 的数目相关的。也就是，在还没有显示出症状的病人中观察到了很多的 IPC 并且在发病时观察到了 IPC 的减少(Soumells V. et al., Blood 98; 906-912, 2001)。因此，可以有效地对诸如 HIV 的病毒的感染的预后进行预测。

例如，ILT7 是在人源 IPC 中特异表达的分子。因此，可以使用本发明的抗 ILT-7 的抗体来检测，鉴定或者分离 IPC。IPC 是产生大多数 1 型干扰素的细胞。因此，在诊断和研究与 1 型干扰素相关的疾病时对该分子的检测，鉴定或者分离是重要的指标。可能已经展示了诸如多种自身免疫病以及感染这样的在病理状态形成的过程中牵涉到干扰素的疾病。

另外，本发明的抗 ILT-7 的抗体对 IPC 的活性具有抑制作用。所以，可以使用本发明的抗 ILT-7 的抗体来抑制 IPC 的活性。此外，可以通过抑制 IPC 的活性来治疗涉及 1 型干扰素的疾病。具体的，本发明的抗 ILT-7 的抗体可以用于多种自身免疫病以及感染这样的在病理状态形成的过程中涉及到干扰素的疾病。特殊地由于该抗 ILT-7 的抗体具有高特异性，该抗体可以有效地去除 IPC。

<110> SBI 生物技术有限公司 (SBI BIOTECH CO., LTD.)

<120> 抗 ILT7 抗体

<130> G2-A0501P

<150> JP 2005-366465

<151> 2005-12-20

<160> 76

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1577

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<221> CDS

<222> (24).. (1520)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (24).. (71)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (72).. (1520)

<400> 1

cagggccagg aggaggagat gcc atg acc ctc att ctc aca agc ctg ctc ttc 53
Met Thr Leu Ile Leu Thr Ser Leu Leu Phe
-15 -10

ttt ggg ctg agc ctg ggc ccc agg acc cgg gtg cag gca gaa aac cta 101
Phe Gly Leu Ser Leu Gly Pro Arg Thr Arg Val Gln Ala Glu Asn Leu
-5 -1 1 5 10

ccc aaa ccc atc ctg tgg gcc gag cca ggt ccc gtg atc acc tgg cat 149
Pro Lys Pro Ile Leu Trp Ala Glu Pro Gly Pro Val Ile Thr Trp His
15 20 25

aac ccc gtg acc atc tgg tgt cag ggc acc ctg gag gcc cag ggg tac 197
Asn Pro Val Thr Ile Trp Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Gln Gly Tyr
30 35 40

cgt ctg gat aaa gag gga aac tca atg tcg agg cac ata tta aaa aca 245
Arg Leu Asp Lys Glu Gly Asn Ser Met Ser Arg His Ile Leu Lys Thr
45 50 55

ctg gag tct gaa aac aag gtc aaa ctc tcc atc cca tcc atg atg tgg 293
Leu Glu Ser Glu Asn Lys Val Lys Leu Ser Ile Pro Ser Met Met Trp
60 65 70

gaa cat gca ggg cga tat cac tgt tac tat cag agc cct gca ggc tgg 341
Glu His Ala Gly Arg Tyr His Cys Tyr Tyr Gln Ser Pro Ala Gly Trp
75 80 85 90

tca gag ccc agc gac ccc ctg gag ctg gtg gtg aca gcc tac agc aga 389
Ser Glu Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Ala Tyr Ser Arg
95 100 105

ccc acc ctg tcc gca ctg cca agc cct gtg gtg acc tca gga gtg aac Pro Thr Leu Ser Ala Leu Pro Ser Pro Val Val Thr Ser Gly Val Asn 110 115 120	437
gtg acc ctc cgg tgt gcc tca cgg ctg gga ctg ggc agg ttc act ctg Val Thr Leu Arg Cys Ala Ser Arg Leu Gly Leu Gly Arg Phe Thr Leu 125 130 135	485
att gag gaa gga gac cac agg ctc tcc tgg acc ctg aac tca cac caa Ile Glu Glu Gly Asp His Arg Leu Ser Trp Thr Leu Asn Ser His Gln 140 145 150	533
cac aac cat gga aag ttc cag gcc ctg ttc ccc atg ggc ccc ctg acc His Asn His Gly Lys Phe Gln Ala Leu Phe Pro Met Gly Pro Leu Thr 155 160 165 170	581
ttc agc aac agg ggt aca ttc aga tgc tac ggc tat gaa aac aac acc Phe Ser Asn Arg Gly Thr Phe Arg Cys Tyr Gly Tyr Glu Asn Asn Thr 175 180 185	629
cca tac gtg tgg tgg gaa ccc agt gac ccc ctg cag cta ctg gtg tca Pro Tyr Val Trp Ser Glu Pro Ser Asp Pro Leu Gln Leu Leu Val Ser 190 195 200	677
ggc gtg tct agg aag ccc tcc ctc ctg acc ctg cag ggc cct gtc gtg Gly Val Ser Arg Lys Pro Ser Leu Leu Thr Leu Gln Gly Pro Val Val 205 210 215	725
acc ccc gga gag aat ctg acc ctc cag tgt ggc tct gat gtc ggc tac Thr Pro Gly Glu Asn Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Val Gly Tyr 220 225 230	773
atc aga tac act ctg tac aag gag ggg gcc gat ggc ctc ccc cag cgc Ile Arg Tyr Thr Leu Tyr Lys Glu Gly Ala Asp Gly Leu Pro Gln Arg 235 240 245 250	821
cct ggc cgg cag ccc cag gct ggg ctc tcc cag gcc aac ttc acc ctg Pro Gly Arg Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu 255 260 265	869
agc cct gtg agc cgc tcc tac ggg ggc cag tac aga tgc tac ggc gca Ser Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala 270 275 280	917
cac aac gtc tcc tcc gag tgg tgg gcc ccc agt gac ccc ctg gac atc His Asn Val Ser Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile 285 290 295	965
ctg atc gca gga cag atc tct gac aga ccc tcc ctc tca gtg cag ccg Leu Ile Ala Gly Gln Ile Ser Asp Arg Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro 300 305 310	1013
ggc ccc acg gtg acc tca gga gag aag gtg acc ctg ctg tgt cag tca Gly Pro Thr Val Thr Ser Gly Glu Lys Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser 315 320 325 330	1061
tgg gac ccg atg ttc act ttc ctt ctg acc aag gag ggg gca gcc cat Trp Asp Pro Met Phe Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala His 335 340 345	1109
ccc ccg ttg cgt ctg aga tca atg tac gga gct cat aag tac cag gct Pro Pro Leu Arg Leu Arg Ser Met Tyr Gly Ala His Lys Tyr Gln Ala 350 355 360	1157
gaa ttc ccc atg agt cct gtg acc tca gcc cac gcg ggg acc tac agg	1205

Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg
 365 370 375
 tgc tac ggc tca cgc agc tcc aac ccc tac ctg ctg tct cac ccc agt 1253
 Cys Tyr Gly Ser Arg Ser Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser
 380 385 390
 gag ccc ctg gag ctc gtg gtc tca gga gca act gag acc ctc aat cca 1301
 Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Gly Ala Thr Glu Thr Leu Asn Pro
 395 400 405 410
 gca caa aag aag tca gat tcc aag act gcc cca cac ctc cag gat tac 1349
 Ala Gln Lys Lys Ser Asp Ser Lys Thr Ala Pro His Leu Gln Asp Tyr
 415 420 425
 aca gtg gag aat ctc atc cgc atg ggt gtg gct ggc ttg gtc ctg ctg 1397
 Thr Val Glu Asn Leu Ile Arg Met Gly Val Ala Gly Leu Val Leu Leu
 430 435 440
 ttc ctc ggg att ctg tta ttt gag gct cag cac agc cag aga agc ccc 1445
 Phe Leu Gly Ile Leu Leu Phe Glu Ala Gln His Ser Gln Arg Ser Pro
 445 450 455
 cca agg tgc agc cag gag gca aac agc aga aag gac aat gca ccc ttc 1493
 Pro Arg Cys Ser Gln Glu Ala Asn Ser Arg Lys Asp Asn Ala Pro Phe
 460 465 470
 aga gtg gtg gag cct tgg gaa cag atc tgatgatctg aggaggttct 1540
 Arg Val Val Glu Pro Trp Glu Gln Ile
 475 480
 ggaagactgg ggcagcagtt ggggaagtgt ctgctga 1577

<210> 2
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 2

Met Thr Leu Ile Leu Thr Ser Leu Leu Phe Phe Gly Leu Ser Leu Gly
 -15 -10 -5 -1

Pro Arg Thr Arg Val Gln Ala Glu Asn Leu Pro Lys Pro Ile Leu Trp
 1 5 10 15

Ala Glu Pro Gly Pro Val Ile Thr Trp His Asn Pro Val Thr Ile Trp
 20 25 30

Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Gln Gly Tyr Arg Leu Asp Lys Glu Gly
 35 40 45

Asn Ser Met Ser Arg His Ile Leu Lys Thr Leu Glu Ser Glu Asn Lys
 50 55 60

Val Lys Leu Ser Ile Pro Ser Met Met Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr
 65 70 75 80

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

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工合成的引物序列	
<400> 5	
cctcaatcca gcacaaaaga agt	23
<210> 6	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工合成的引物序列	
<400> 6	
cggatgagat tctccactgt gtaa	24
<210> 7	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工合成的引物序列	
<400> 7	
ccacccatgg caaattcc	18
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工合成的引物序列	
<400> 8	
tgggatttcc attgatgaca ag	22
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工合成的引物序列	
<400> 9	
cagggccagg aggaggagat g	21
<210> 10	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 人工合成的引物序列	

<400> 10 tcagcagaca cttccccaac t	21
<210> 11 <211> 105 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 人工合成的引物序列	
<400> 11 ccgctcgaga tgaccctcat tctcacaagc ctgctcttct ttgggctgag cctgggcat	60
tacaaggatg acgacgataa gcccaaggacc cgggtgcagg cagaa	105
<210> 12 <211> 31 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 人工合成的引物序列	
<400> 12 ctagactagt tcagatctgt tcccaaggct c	31
<210> 13 <211> 30 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 人工合成的引物序列	
<400> 13 ccgctcgaga tgaccctcat tctcacaagc	30
<210> 14 <211> 55 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 人工合成的引物序列	
<400> 14 ctagactagt tcacttatcg tcgtcatcct tgtaatcgat ctgttcccaa ggctc	55
<210> 15 <211> 313 <212> DNA <213> 人类	
<220> <221> CDS <222> (7)..(267)	
<400> 15	

cccaag atg att cca gca gtg gtc ttg ctc tta ctc ctt ttg gtt gaa 48
 Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu
 1 5 10
 caa gca gcg gcc ctg gga gag cct cag ctc tgc tat atc ctg gat gcc 96
 Gln Ala Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala
 15 20 25 30
 atc ctg ttt ctg tat gga att gtc ctc acc ctc ctc tac tgt cga ctg 144
 Ile Leu Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu
 35 40 45
 aag atc caa gtg cga aag gca gct ata acc agc tat gag aaa tca gat 192
 Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp
 50 55 60
 ggt gtt tac acg ggc ctg agc acc agg aac cag gag act tac gag act 240
 Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr
 65 70 75
 ctg aag cat gag aaa cca cca cag tag ctttagaata gatgcggtca 287
 Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln
 80 85
 tattcttctt tggcttctgg ttcttc 313

<210> 16

<211> 86

<212> PRT

<213> 人类

<400> 16

Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala
1 5 10 15

Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu
20 25 30

Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile
35 40 45

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

Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys
65 70 75 80

His Glu Lys Pro Pro Gln
85

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 17
cccaagatga ttccagcagt g 21

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的引物序列

<400> 18
ggaagaacca gaagccaaag a 21

<210> 19
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的引物序列

<400> 19
ccgctcgaga tgattccagc agtggctctg 30

<210> 20
<211> 61
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的引物序列

<400> 20
ctagactagt ctacagatcc tcttcagaga tgagtttctg ctccctgtggt ggtttctcat 60

g 61

<210> 21
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 21

Cys Ser Gln Glu Ala Asn Ser Arg Lys Asp Asn Ala Pro Phe Arg Val
1 5 10 15

Val Glu Pro Trp Glu Gln Ile
20

<210> 22
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 22

ccgctcgaga tgaccccat cctcacggtc c

31

<210> 23

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 23

ctagactagt tcacttatcg tcgtcatcct tgtaatccct cccggctgca tcttg

55

<210> 24

<211> 1425

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1425)

<400> 24

atg acc ccc atc ctc acg gtc ctg atc tgt ctc ggg ctg agt ctg ggc
Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15

48

ccc agg acc cac gtg cag gca ggg cac ctc ccc aag ccc acc ctc tgg
Pro Arg Thr His Val Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp
20 25 30

96

gct gag cca ggc tct gtg atc atc cag gga agt cct gtg acc ctc agg
Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ile Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg
35 40 45

144

tgt cag ggg agc ctt cag gct gag gag tac cat cta tat agg gaa aac
Cys Gln Gly Ser Leu Gln Ala Glu Glu Tyr His Leu Tyr Arg Glu Asn
50 55 60

192

aaa tca gca tcc tgg gtt aga cgg ata caa gag cct ggg aag aat ggc
Lys Ser Ala Ser Trp Val Arg Arg Ile Gln Glu Pro Gly Lys Asn Gly
65 70 75 80

240

cag ttc ccc atc cca tcc atc acc tgg gaa cac gca ggg cgg tat cac
Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr His
85 90 95

288

tgt cag tac tac agc cac aat cac tca tca gag tac agt gac ccc ctg
Cys Gln Tyr Tyr Ser His Asn His Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Leu
100 105 110

336

gag ctg gtg gtg aca gga gcc tac agc aaa ccc acc ctc tca gct ctg
Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala Leu
115 120 125

384

ccc agc cct gtg gtg acc tta gga ggg aac gtg acc ctc cag tgt gtc
Pro Ser Pro Val Val Thr Leu Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln Cys Val
130 135 140

432

tca cag gtg gca ttt gac ggc ttc att ctg tgt aag gaa gga gaa gat Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Asp 145 150 155 160	480
gaa cac cca caa cgc ctg aac tcc cat tcc cat gcc cgt ggg tgg tcc Glu His Pro Gln Arg Leu Asn Ser His Ser His Ala Arg Gly Trp Ser 165 170 175	528
tgg gcc atc ttc tcc gtg ggc ccc gtg agc ccg agt cgc agg tgg tcg Trp Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg Trp Ser 180 185 190	576
tac agg tgc tat gct tat gac tcg aac tct ccc tat gtg tgg tct cta Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Leu 195 200 205	624
ccc agt gat ctc ctg gag ctc ctg gtc cca ggt gtt tct aag aag cca Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro 210 215 220	672
tca ctc tca gtg cag cca ggt cct atg gtg gcc cct ggg gag agc ctg Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Met Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu 225 230 235 240	720
acc ctc cag tgt gtc tct gat gtc ggc tac gac aga ttt gtt ctg tat Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr 245 250 255	768
aag gag gga gaa cgt gac ttc ctc cag cgc cct ggt tgg cag ccc cag Lys Glu Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Trp Gln Pro Gln 260 265 270	816
gct ggg ctc tcc cag gcc aac ttc acc ctg ggc cct gtg agc ccc tcc Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Pro Ser 275 280 285	864
cac ggg ggc cag tac aga tgc tac agt gca cac aac ctc tcc tcc gag His Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Ser Ala His Asn Leu Ser Ser Glu 290 295 300	912
tgg tcg gcc ccc agt gac ccc ctg gac atc ctg atc aca gga cag ttc Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Phe 305 310 315 320	960
tat gac aga ccc tct ctc tcg gtg cag ccg gtc ccc aca gta gcc cca Tyr Asp Arg Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Val Pro Thr Val Ala Pro 325 330 335	1008
gga aag aac gtg acc ctg ctg tgt cag tca cgg ggg cag ttc cac act Gly Lys Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Arg Gly Gln Phe His Thr 340 345 350	1056
ttc ctt ctg acc aag gag ggg gca ggc cat ccc cca ctg cat ctg aga Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Gly His Pro Pro Leu His Leu Arg 355 360 365	1104
tca gag cac caa gct cag cag aac cag gct gaa ttc cgc atg ggt cct Ser Glu His Gln Ala Gln Gln Asn Gln Ala Glu Phe Arg Met Gly Pro 370 375 380	1152
gtg acc tca gcc cac gtg ggg acc tac aga tgc tac agc tca ctc agc Val Thr Ser Ala His Val Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Ser Leu Ser 385 390 395 400	1200

tcc aac ccc tac ctg ctg tct ctc ccc agt gac ccc ctg gag ctc gtg Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser Leu Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val 405 410 415	1248
gtc tca gca tcc cta ggc caa cac ccc cag gat tac aca gtg gag aat Val Ser Ala Ser Leu Gly Gln His Pro Gln Asp Tyr Thr Val Glu Asn 420 425 430	1296
ctc atc cgc atg ggt gtg gct ggc ttg gtc ctg gtg gtc ctc ggg att Leu Ile Arg Met Gly Val Ala Gly Leu Val Leu Val Val Leu Gly Ile 435 440 445	1344
ctg cta ttt gag gct cag cac agc cag aga agc cta caa gat gca gcc Leu Leu Phe Glu Ala Gln His Ser Gln Arg Ser Leu Gln Asp Ala Ala 450 455 460	1392
ggg agg gat tac aag gat gac gac gat aag tga Gly Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys 465 470	1425
<210> 25 <211> 474 <212> PRT <213> 人类	
<400> 25	
Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly 1 5 10 15	
Pro Arg Thr His Val Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp 20 25 30	
Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ile Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg 35 40 45	
Cys Gln Gly Ser Leu Gln Ala Glu Glu Tyr His Leu Tyr Arg Glu Asn 50 55 60	
Lys Ser Ala Ser Trp Val Arg Arg Ile Gln Glu Pro Gly Lys Asn Gly 65 70 75 80	
Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr His 85 90 95	
Cys Gln Tyr Tyr Ser His Asn His Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Leu 100 105 110	
Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala Leu 115 120 125	
Pro Ser Pro Val Val Thr Leu Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln Cys Val 130 135 140	
Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Asp	

145		150		155		160
Glu His Pro Gln Arg Leu Asn Ser His Ser His Ala Arg Gly Trp Ser		165		170		175
Trp Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg Trp Ser		180		185		190
Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Leu		195		200		205
Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro		210		215		220
Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Met Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu		225		230		240
Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr		245		250		255
Lys Glu Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Trp Gln Pro Gln		260		265		270
Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Pro Ser		275		280		285
His Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Ser Ala His Asn Leu Ser Ser Glu		290		295		300
Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Phe		305		310		315
Tyr Asp Arg Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Val Pro Thr Val Ala Pro		325		330		335
Gly Lys Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Arg Gly Gln Phe His Thr		340		345		350
Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Gly His Pro Pro Leu His Leu Arg		355		360		365
Ser Glu His Gln Ala Gln Gln Asn Gln Ala Glu Phe Arg Met Gly Pro		370		375		380
Val Thr Ser Ala His Val Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Ser Leu Ser		385		390		395
Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser Leu Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val		405		410		415

Val Ser Ala Ser Leu Gly Gln His Pro Gln Asp Tyr Thr Val Glu Asn
420 425 430

Leu Ile Arg Met Gly Val Ala Gly Leu Val Leu Val Val Leu Gly Ile
435 440 445

Leu Leu Phe Glu Ala Gln His Ser Gln Arg Ser Leu Gln Asp Ala Ala
450 455 460

Gly Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
465 470

<210> 26

<211> 1953

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1953)

<400> 26

atg acc ccc atc ctc acg gtc ctg atc tgt ctc ggg ctg agt ctg ggc 48
Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15

ccc cgg acc cac gtg cag gca ggg cac ctc ccc aag ccc acc ctc tgg 96
Pro Arg Thr His Val Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp
20 25 30

gct gaa cca ggc tct gtg atc acc cag ggg agt cct gtg acc ctc agg 144
Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg
35 40 45

tgt cag ggg ggc cag gag acc cag gag tac cgt cta tat aga gaa aag 192
Cys Gln Gly Gly Gln Glu Thr Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys
50 55 60

aaa aca gca ccc tgg att aca cgg atc cca cag gag ctt gtg aag aag 240
Lys Thr Ala Pro Trp Ile Thr Arg Ile Pro Gln Glu Leu Val Lys Lys
65 70 75 80

ggc cag ttc ccc atc cca tcc atc acc tgg gaa cat gca ggg cgg tat 288
Gly Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr
85 90 95

cgc tgt tac tat ggt agc gac act gca ggc cgc tca gag agc agt gac 336
Arg Cys Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Ala Gly Arg Ser Glu Ser Ser Asp
100 105 110

ccc ctg gag ctg gtg gtg aca gga gcc tac atc aaa ccc acc ctc tca 384
Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ile Lys Pro Thr Leu Ser
115 120 125

gcc cag ccc agc ccc gtg gtg aac tca gga ggg aat gta acc ctc cag 432
Ala Gln Pro Ser Pro Val Val Asn Ser Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln
130 135 140

tgt gac tca cag gtg gca ttt gat ggc ttc att ctg tgt aag gaa gga 480

Cys 145	Asp	Ser	Gln	Val	Ala 150	Phe	Asp	Gly	Phe	Ile 155	Leu	Cys	Lys	Glu	Gly 160		
gaa Glu	gat Asp	gaa Glu	cac His	cca Pro	caa Gln	tgc Cys	ctg Leu	aac Asn	tcc Ser	cag Gln	ccc Pro	cat His	gcc Ala	cgt Arg	ggg Gly	528	
tcg Ser	tcc Ser	cgc Arg	gcc Ala	atc Ile	ttc Phe	tcc Ser	gtg Val	ggc Gly	ccc Pro	gtg Val	agc Ser	ccg Pro	agt Ser	cgc Arg	agg Arg	576	
tgg Trp	tgg Trp	tac Tyr	agg Arg	tgc Cys	tat Tyr	gct Ala	tat Tyr	gac Asp	tcg Ser	aac Asn	tct Ser	ccc Pro	tat Tyr	gag Glu	tgg Trp	624	
tct Ser	cta Leu	ccc Pro	agt Ser	gat Asp	ctc Leu	ctg Leu	gag Glu	ctc Leu	ctg Leu	gtc Val	cta Leu	ggt Gly	ggt Val	tct Ser	aag Lys	672	
aag Lys	cca Pro	tca Ser	ctc Leu	tca Ser	gtg Val	cag Gln	cca Pro	ggt Gly	cct Pro	atc Ile	gtg Val	gcc Ala	cct Pro	gag Glu	gag Glu	720	
acc Thr	ctg Leu	act Thr	ctg Leu	cag Gln	tgt Cys	ggc Gly	tct Ser	gat Asp	gct Ala	ggc Gly	tac Tyr	aac Asn	aga Arg	ttt Phe	ggt Val	768	
ctg Leu	tat Tyr	aag Lys	gac Asp	ggg Gly	gaa Glu	cgt Arg	gac Asp	ttc Phe	ctt Leu	cag Gln	ctc Leu	gct Ala	ggc Gly	gca Ala	cag Gln	816	
ccc Pro	cag Gln	gct Ala	ggg Gly	ctc Leu	tcc Ser	cag Gln	gcc Ala	aac Asn	ttc Phe	acc Thr	ctg Leu	ggc Gly	cct Pro	gtg Val	agc Ser	864	
cgc Arg	tcc Ser	tac Tyr	ggg Gly	ggc Gly	cag Gln	tac Tyr	aga Arg	tgc Cys	tac Tyr	ggt Gly	gca Ala	cac His	aac Asn	ctc Leu	tcc Ser	912	
tcc Ser	gag Glu	tgg Trp	tcg Ser	gcc Ala	ccc Pro	agc Ser	gac Asp	ccc Pro	ctg Leu	gac Asp	atc Ile	ctg Leu	atc Ile	gca Ala	gga Gly	960	
cag Gln	ttc Phe	tat Tyr	gac Asp	aga Arg	gtc Val	tcc Ser	ctc Leu	tcg Ser	gtg Val	cag Gln	ccg Pro	ggc Gly	ccc Pro	acg Thr	gtg Val	1008	
gcc Ala	tca Ser	gga Gly	gag Glu	aac Asn	gtg Val	acc Thr	ctg Leu	ctg Leu	tgt Cys	cag Gln	tca Ser	cag Gln	gga Gly	tgg Trp	atg Met	1056	
caa Gln	act Thr	ttc Phe	ctt Leu	ctg Leu	acc Thr	aag Lys	gag Glu	ggg Gly	gca Ala	gct Ala	gat Asp	gac Asp	cca Pro	tgg Trp	cgt Arg	1104	
cta Leu	aga Arg	tca Ser	acg Thr	tac Tyr	caa Gln	tct Ser	caa Gln	aaa Lys	tac Tyr	cag Gln	gct Ala	gaa Glu	ttc Phe	ccc Pro	atg Met	1152	
ggt Gly	cct Pro	gtg Val	acc Thr	tca Ser	gcc Ala	cat His	gcg Ala	ggg Gly	acc Thr	tac Tyr	agg Arg	tgc Cys	tac Tyr	ggc Gly	tca Ser	1200	
cag Gln	agc Ser	tcc Ser	aaa Lys	ccc Pro	tac Tyr	ctg Leu	ctg Leu	act Thr	cac His	ccc Pro	agt Ser	gac Asp	ccc Pro	ctg Leu	gag Glu	1248	

ctc gtc gtc tca gga cgc tct ggg ggc ccc agc tcc ccg aca aca ggc Leu Val Val Ser Gly Pro Ser Gly Gly Pro Ser Ser Pro Thr Thr Gly 420 425 430	1296
ccc acc tcc aca tct ggc cct gag gac cag ccc ctc acc ccc acc ggg Pro Thr Ser Thr Ser Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly 435 440 445	1344
tcg gat ccc cag agt ggt ctg gga agg cac ctg ggg gtt gtg atc ggc Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly 450 455 460	1392
atc ttg gtg gcc gtc atc cta ctg ctc ctc ctc ctc ctc ctc ttc Ile Leu Val Ala Val Ile Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe 465 470 475 480	1440
ctc atc ctc cga cat cga cgt cag ggc aaa cac tgg aca tcg acc cag Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln 485 490 495	1488
aga aag gct gat ttc caa cat cct gca ggg gct gtg ggg cca gag ccc Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro 500 505 510	1536
aca gac aga ggc ctg cag tgg agg tcc agc cca gct gcc gat gcc cag Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln 515 520 525	1584
gaa gaa aac ctc tat gct gcc gtg aag cac aca cag cct gag gat ggg Glu Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys His Thr Gln Pro Glu Asp Gly 530 535 540	1632
gtg gag atg gac act cgg agc cca cac gat gaa gac ccc cag gca gtg Val Glu Met Asp Thr Arg Ser Pro His Asp Glu Asp Pro Gln Ala Val 545 550 555 560	1680
acg tat gcc gag gtg aaa cac tcc aga cct agg aga gaa atg gcc tct Thr Tyr Ala Glu Val Lys His Ser Arg Pro Arg Arg Glu Met Ala Ser 565 570 575	1728
cct cct tcc cca ctg tct ggg gaa ttc ctg gac aca aag gac aga cag Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg Gln 580 585 590	1776
gcg gaa gag gac agg cag atg gac act gag gct gct gca tct gaa gcc Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ala Ser Glu Ala 595 600 605	1824
ccc cag gat gtg acc tac gcc cag ctg cac agc ttg acc ctt aga cgg Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg 610 615 620	1872
aag gca act gag cct cct cca tcc cag gaa ggg ccc tct cca gct gtg Lys Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Pro Ser Pro Ala Val 625 630 635 640	1920
ccc agc atc tac gcc act ctg gcc atc cac tag Pro Ser Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His 645 650	1953

<210> 27

<211> 650

<212> PRT

<213> 人类

<400> 27

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

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

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

Cys Gln Gly Gly Gln Glu Thr Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys
50 55 60

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

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

Arg Cys Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Ala Gly Arg Ser Glu Ser Ser Asp
100 105 110

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

Ala Gln Pro Ser Pro Val Val Asn Ser Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln
130 135 140

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

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

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

Trp Trp Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Glu Trp
195 200 205

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

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

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

Leu Tyr Lys Asp Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Leu Ala Gly Ala Gln
 260 265 270

Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser
 275 280 285

Arg Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser
 290 295 300

Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Ala Gly
 305 310 315 320

Gln Phe Tyr Asp Arg Val Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val
 325 330 335

Ala Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Gln Gly Trp Met
 340 345 350

Gln Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Trp Arg
 355 360 365

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

Gly Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser
 385 390 395 400

Gln Ser Ser Lys Pro Tyr Leu Leu Thr His Pro Ser Asp Pro Leu Glu
 405 410 415

Leu Val Val Ser Gly Pro Ser Gly Gly Pro Ser Ser Pro Thr Thr Gly
 420 425 430

Pro Thr Ser Thr Ser Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly
 435 440 445

Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly
 450 455 460

Ile Leu Val Ala Val Ile Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe
 465 470 475 480

Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln
 485 490 495

Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro

	500		505		510										
Thr	Asp	Arg	Gly	Leu	Gln	Trp	Arg	Ser	Ser	Pro	Ala	Ala	Asp	Ala	Gln
	515						520					525			
Glu	Glu	Asn	Leu	Tyr	Ala	Ala	Val	Lys	His	Thr	Gln	Pro	Glu	Asp	Gly
	530					535					540				
Val	Glu	Met	Asp	Thr	Arg	Ser	Pro	His	Asp	Glu	Asp	Pro	Gln	Ala	Val
545					550					555					560
Thr	Tyr	Ala	Glu	Val	Lys	His	Ser	Arg	Pro	Arg	Arg	Glu	Met	Ala	Ser
				565					570					575	
Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Ser	Gly	Glu	Phe	Leu	Asp	Thr	Lys	Asp	Arg	Gln
			580					585					590		
Ala	Glu	Glu	Asp	Arg	Gln	Met	Asp	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Glu	Ala
		595					600					605			
Pro	Gln	Asp	Val	Thr	Tyr	Ala	Gln	Leu	His	Ser	Leu	Thr	Leu	Arg	Arg
	610					615					620				
Lys	Ala	Thr	Glu	Pro	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Val
625					630					635					640
Pro	Ser	Ile	Tyr	Ala	Thr	Leu	Ala	Ile	His						
				645					650						

<210> 28

<211> 1347

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1347)

<400> 28

atg	atc	ccc	acc	ttc	acg	gct	ctg	ctc	tgc	ctc	ggg	ctg	agt	ctg	ggc	48
Met	Ile	Pro	Thr	Phe	Thr	Ala	Leu	Leu	Cys	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Gly	
1			5					10					15			

ccc	agg	acc	gac	atg	cag	gca	ggg	ccc	ctc	ccc	aaa	ccc	acc	ctc	tgg	96
Pro	Arg	Thr	Asp	Met	Gln	Ala	Gly	Pro	Leu	Pro	Lys	Pro	Thr	Leu	Trp	
			20				25						30			

gct	gag	cca	ggc	tct	gtg	atc	agc	tgg	ggg	aac	tct	gtg	acc	atc	tgg	144
Ala	Glu	Pro	Gly	Ser	Val	Ile	Ser	Trp	Gly	Asn	Ser	Val	Thr	Ile	Trp	
		35					40				45					

tgt	cag	ggg	acc	ctg	gag	gct	cgg	gag	tac	cgt	ctg	gat	aaa	gag	gaa	192
Cys	Gln	Gly	Thr	Leu	Glu	Ala	Arg	Glu	Tyr	Arg	Leu	Asp	Lys	Glu	Glu	
	50					55					60					

agc cca gca ccc tgg gac aga cag aac cca ctg gag ccc aag aac aag Ser Pro Ala Pro Trp Asp Arg Gln Asn Pro Leu Glu Pro Lys Asn Lys 65 70 75 80	240
gcc aga ttc tcc atc cca tcc atg aca gag gac tat gca ggg aga tac Ala Arg Phe Ser Ile Pro Ser Met Thr Glu Asp Tyr Ala Gly Arg Tyr 85 90 95	288
cgc tgt tac tat cgc agc cct gta ggc tgg tca cag ccc agt gac ccc Arg Cys Tyr Tyr Arg Ser Pro Val Gly Trp Ser Gln Pro Ser Asp Pro 100 105 110	336
ctg gag ctg gtg atg aca gga gcc tac agt aaa ccc acc ctt tca gcc Leu Glu Leu Val Met Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala 115 120 125	384
ctg ccg agt cct ctt gtg acc tca gga aag agc gtg acc ctg ctg tgt Leu Pro Ser Pro Leu Val Thr Ser Gly Lys Ser Val Thr Leu Leu Cys 130 135 140	432
cag tca cgg agc cca atg gac act ttc ctt ctg atc aag gag cgg gca Gln Ser Arg Ser Pro Met Asp Thr Phe Leu Leu Ile Lys Glu Arg Ala 145 150 155 160	480
gcc cat ccc cta ctg cat ctg aga tca gag cac gga gct cag cag cac Ala His Pro Leu Leu His Leu Arg Ser Glu His Gly Ala Gln Gln His 165 170 175	528
cag gct gaa ttc ccc atg agt cct gtg acc tca gtg cac ggg ggg acc Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Val His Gly Gly Thr 180 185 190	576
tac agg tgc ttc agc tca cac ggc ttc tcc cac tac ctg ctg tca cac Tyr Arg Cys Phe Ser Ser His Gly Phe Ser His Tyr Leu Leu Ser His 195 200 205	624
ccc agt gac ccc ctg gag ctc ata gtc tca gga tcc ttg gag ggt ccc Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Ile Val Ser Gly Ser Leu Glu Gly Pro 210 215 220	672
agg ccc tca ccc aca agg tcc gtc tca aca gct gca ggc cct gag gac Arg Pro Ser Pro Thr Arg Ser Val Ser Thr Ala Ala Gly Pro Glu Asp 225 230 235 240	720
cag ccc ctc atg cct aca ggg tca gtc ccc cac agt ggt ctg aga agg Gln Pro Leu Met Pro Thr Gly Ser Val Pro His Ser Gly Leu Arg Arg 245 250 255	768
cac tgg gag gta ctg atc ggg gtc ttg gtg gtc tcc atc ctg ctt ctc His Trp Glu Val Leu Ile Gly Val Leu Val Val Ser Ile Leu Leu Leu 260 265 270	816
tcc ctc ctc ctc ttc ctc ctc ctc caa cac tgg cgt cag gga aaa cac Ser Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Gln His Trp Arg Gln Gly Lys His 275 280 285	864
agg aca ttg gcc cag aga cag gct gat ttc caa cgt cct cca ggg gct Arg Thr Leu Ala Gln Arg Gln Ala Asp Phe Gln Arg Pro Pro Gly Ala 290 295 300	912
gcc gag cca gag ccc aag gac ggg ggc cta cag agg agg tcc agc cca Ala Glu Pro Glu Pro Lys Asp Gly Gly Leu Gln Arg Arg Ser Ser Pro 305 310 315 320	960
gct gct gac gtc cag gga gaa aac ttc tgt gct gcc gtg aag aac aca	1008

Ala Ala Asp Val Gln Gly Glu Asn Phe Cys Ala Ala Val Lys Asn Thr	
325 330 335	
cag cct gag gac ggg gtg gaa atg gac act cgg cag agc cca cac gat	1056
Gln Pro Glu Asp Gly Val Glu Met Asp Thr Arg Gln Ser Pro His Asp	
340 345 350	
gaa gac ccc cag gca gtg acg tat gcc aag gtg aaa cac tcc aga cct	1104
Glu Asp Pro Gln Ala Val Thr Tyr Ala Lys Val Lys His Ser Arg Pro	
355 360 365	
agg aga gaa atg gcc tct cct ccc tcc cca ctg tct ggg gaa ttc ctg	1152
Arg Arg Glu Met Ala Ser Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu	
370 375 380	
gac aca aag gac aga cag gca gaa gag gac aga cag atg gac act gag	1200
Asp Thr Lys Asp Arg Gln Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu	
385 390 395 400	
gct gct gca tct gaa gcc ccc cag gat gtg acc tac gcc cgg ctg cac	1248
Ala Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Arg Leu His	
405 410 415	
agc ttt acc ctc aga cag aag gca act gag cct cct cca tcc cag gaa	1296
Ser Phe Thr Leu Arg Gln Lys Ala Thr Glu Pro Pro Ser Gln Glu	
420 425 430	
ggg gcc tct cca gct gag ccc agt gtc tat gcc act ctg gcc atc cac	1344
Gly Ala Ser Pro Ala Glu Pro Ser Val Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His	
435 440 445	
taa	1347
<210> 29	
<211> 448	
<212> PRT	
<213> 人类	
<400> 29	
Met Ile Pro Thr Phe Thr Ala Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
Pro Arg Thr Asp Met Gln Ala Gly Pro Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp	
20 25 30	
Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ser Trp Gly Asn Ser Val Thr Ile Trp	
35 40 45	
Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Arg Glu Tyr Arg Leu Asp Lys Glu Glu	
50 55 60	
Ser Pro Ala Pro Trp Asp Arg Gln Asn Pro Leu Glu Pro Lys Asn Lys	
65 70 75 80	
Ala Arg Phe Ser Ile Pro Ser Met Thr Glu Asp Tyr Ala Gly Arg Tyr	
85 90 95	

Arg Cys Tyr Tyr Arg Ser Pro Val Gly Trp Ser Gln Pro Ser Asp Pro
 100 105 110

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

Leu Pro Ser Pro Leu Val Thr Ser Gly Lys Ser Val Thr Leu Leu Cys
 130 135 140

Gln Ser Arg Ser Pro Met Asp Thr Phe Leu Leu Ile Lys Glu Arg Ala
 145 150 155 160

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

Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Val His Gly Gly Thr
 180 185 190

Tyr Arg Cys Phe Ser Ser His Gly Phe Ser His Tyr Leu Leu Ser His
 195 200 205

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

Arg Pro Ser Pro Thr Arg Ser Val Ser Thr Ala Ala Gly Pro Glu Asp
 225 230 235 240

Gln Pro Leu Met Pro Thr Gly Ser Val Pro His Ser Gly Leu Arg Arg
 245 250 255

His Trp Glu Val Leu Ile Gly Val Leu Val Val Ser Ile Leu Leu Leu
 260 265 270

Ser Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Gln His Trp Arg Gln Gly Lys His
 275 280 285

Arg Thr Leu Ala Gln Arg Gln Ala Asp Phe Gln Arg Pro Pro Gly Ala
 290 295 300

Ala Glu Pro Glu Pro Lys Asp Gly Gly Leu Gln Arg Arg Ser Ser Pro
 305 310 315 320

Ala Ala Asp Val Gln Gly Glu Asn Phe Cys Ala Ala Val Lys Asn Thr
 325 330 335

Gln Pro Glu Asp Gly Val Glu Met Asp Thr Arg Gln Ser Pro His Asp
 340 345 350

Glu Asp Pro Gln Ala Val Thr Tyr Ala Lys Val Lys His Ser Arg Pro

355	360	365
Arg Arg Glu Met Ala Ser Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu 370		380
Asp Thr Lys Asp Arg Gln Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu 385	390	395 400
Ala Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Arg Leu His 405		410 415
Ser Phe Thr Leu Arg Gln Lys Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu 420	425	430
Gly Ala Ser Pro Ala Glu Pro Ser Val Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His 435	440	445

<210> 30
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工合成的引物序列

<400> 30
 ccatagttcc attttacagt tacc

24

<210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工合成的引物序列

<400> 31
 gggaccaagg gatagacaga

20

<210> 32
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工合成的引物序列

<400> 32
 tccagagttc caggtaagg tcac

24

<210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>

<223>	人工合成的引物序列	
<400>	33	
	gccagtggat agaccgatgg	20
<210>	34	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	人工合成的引物序列	
<220>		
<221>	modified_base	
<222>	(24)..(25)	
<223>	I	
<220>		
<221>	modified_base	
<222>	(29)..(30)	
<223>	I	
<220>		
<221>	modified_base	
<222>	(34)..(35)	
<223>	I	
<400>	34	
	ggccacgcgt cgactagtac gggnnngggnn gggnnng	36
<210>	35	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	人工合成的引物序列	
<400>	35	
	ggccacgcgt cgactagtac	20
<210>	36	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	人工合成的引物序列	
<400>	36	
	ttcactgccca tcaatcttcc actt	24
<210>	37	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	人工合成的引物序列	

<400> 37
 gatggataca gttggtgcag c 21

<210> 38
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(408)

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(54)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (55)..(408)

<400> 38
 atg aga gtg ctg att ctt ttg tgg ctg ttc aca gcc ttt cct ggt atc 48
 Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile
 -15 -10 -5

ctg tct gat gtg cag ctt cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct 96
 Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 -1 1 5 10

tct cag tct ctg tcc ctc acc tgc act gtc act ggc tac tca atc acc 144
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 15 20 25 30

agt gat tat gcc tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg 192
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
 35 40 45

gag tgg atg ggc tac ata agc tac agt ggt agc act agc tac aac cca 240
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
 50 55 60

tct ctc aaa agt cga atc tct atc act cga gac aca tcc aag aac cag 288
 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 65 70 75

ttc ttc ctg cag ttg aat tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat 336
 Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 80 85 90

tac tgt gca aga tct ccc cct tac tat gct atg gac tac tgg ggt caa 384
 Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105 110

gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 408
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 39
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 39

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile
 -15 -10 -5

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 -1 1 5 10

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 15 20 25 30

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

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
 50 55 60

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 65 70 75

Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 80 85 90

Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 40

<211> 381

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (381)

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1).. (60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61).. (381)

<400> 40

atg gag aca cat tct cag gtc ttt gta tac atg ttg ctg tgg ttg tct 48
 Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
 -20 -15 -10 -5

ggt gtt gaa gga gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc 96
 Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
 -1 1 5 10

aca tca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat 144
 Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 15 20 25

gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct 192
 Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 30 35 40

aaa cta ctg att tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat 240
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
 45 50 55 60

cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc 288
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75

aat gtg cag tct gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat agc 336
 Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser
 80 85 90

agc tat cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 381
 Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 95 100 105

<210> 41
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 41

Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
 -20 -15 -10 -5

Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
 -1 1 5 10

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 15 20 25

Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 30 35 40

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
 45 50 55 60

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

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser
 80 85 90

Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 95 100 105

<210> 42
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(414)

<220>
 <221> sig-peptide
 <222> (1)..(57)

<220>
 <221> mat-peptide
 <222> (55)..(414)

<400> 42
 atg gga tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48
 Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 -15 -10 -5

gtc cac tgc cag gtc cag ctg aag cag tct gga gct gag ctg gtg agg 96
 Val His Cys Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 -1 1 5 10

cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag act tct gga tac atc ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe
 15 20 25 30

acc agc tac tgg att cac tgg gta aaa cag agg tct gga cag ggc ctt 192
 Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu
 35 40 45

gag tgg att gca agg att tat cct gga act ggt agt act tac tac aat 240
 Glu Trp Ile Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn
 50 55 60

gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc 288
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 65 70 75

act gcc tac atg cag ctc agc agc ctg aaa tct gag gac tct gct gtc 336
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Val
 80 85 90

tat ttc tgt gca aga tac cct acc tac gac tgg tac ttc gat gtc tgg 384
 Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 95 100 105 110

ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 414
 Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 43

Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 -15 -10 -5

Val His Cys Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 -1 1 5 10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe
 15 20 25

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45

Glu Trp Ile Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn
 50 55 60

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 65 70 75

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Val
 80 85 90

Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 95 100 105

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 44
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (381)

<220>
 <221> sig-peptide
 <222> (1).. (60)

<220>
 <221> mat-peptide
 <222> (61).. (381)

<400> 44
 atg gtt ttc aca cct cag att ctt gga ctt atg ctt ttc tgg att tca 48
 Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser
 -20 -15 -10 -5

gcc tcc aga ggt gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg tct 96
 Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 -1 1 5 10

gtg act cca gga gat aga gtc agt ctt tcc tgc agg gcc agt caa agt 144
 Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 15 20 25

att agc aac tac cta cac tgg tat caa caa aaa tca cat gag tct cca 192
 Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro
 30 35 40

agg ctt ctc atc aag tat gct tcc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc 240
 Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
 45 50 55 60

agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc act ctc agt atc aac 288
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
 65 70 75

agt gtg gag act gaa gat ttt gga atg tat ttc tgt caa cag agt aac 336
 Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn
 80 85 90

agc tgg ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 381
 Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 95 100 105

<210> 45

<211> 127

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 45

Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser
 -20 -15 -10 -5

Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 -1 1 5 10

Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 15 20 25

Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro
 30 35 40

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
 45 50 55 60

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

Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn
 80 85 90

Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 95 100 105

<210> 46

<211> 408

<212> DNA

<213> 小鼠

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
15 20 25 30

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

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
50 55 60

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
65 70 75

Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Pro Leu Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
95 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 48
<211> 381
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(381)

<220>
<221> sig-peptide
<222> (1)..(60)

<220>
<221> mat-peptide
<222> (61)..(381)

<400> 48
atg gag aca cat tct cag gtc ttt gta tac atg ttg ctg tgg ttg tct 48
Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
-20 -15 -10 -5

ggt gtt gaa gga gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc 96
Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
-1 1 5 10

aca tca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat 144
Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
15 20 25

gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct 192
Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
30 35 40

aaa cta ctg att tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat 240

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
 45 50 55 60
 cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc 288
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75
 aat gtg cag tct gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat agc 336
 Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser
 80 85 90
 agc tat cct tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 381
 Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 95 100 105

<210> 49
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 49

Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
 -20 -15 -10 -5

Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
 -1 1 5 10

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 15 20 25

Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 30 35 40

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
 45 50 55 60

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

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser
 80 85 90

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 95 100 105

<210> 50
 <211> 1401
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工合成的核苷酸序列

<220>

<221> CDS
 <222> (1).. (1398)

<220>
 <221> sig-peptide
 <222> (1).. (54)

<220>
 <221> mat-peptide
 <222> (55).. (1398)

<400> 50
 atg aga gtg ctg att ctt ttg tgg ctg ttc aca gcc ttt cct ggt atc 48
 Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile
 -15 -10 -5

ctg tct gat gtg cag ctt cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct 96
 Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 -1 1 5 10

tct cag tct ctg tcc ctc acc tgc act gtc act ggc tac tca atc acc 144
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 15 20 25 30

agt gat tat gcc tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg 192
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
 35 40 45

gag tgg atg ggc tac ata agc tac agt ggt agc act agc tac aac cca 240
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
 50 55 60

tct ctc aaa agt cga atc tct atc act cga gac aca tcc aag aac cag 288
 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 65 70 75

ttc ttc ctg cag ttg aat tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat 336
 Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 80 85 90

tac tgt gca aga tct ccc cct tac tat gct atg gac tac tgg ggt caa 384
 Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105 110

gga acc tca gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc 432
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc 480
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg 528
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155

tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc 576
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 160 165 170

cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc 624
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 175 180 185 190

tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag 672

Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys		
				195					200					205			
ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	gtt	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	720	
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp		
			210					215					220				
aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	ggg	gga	768	
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly		
		225					230					235					
ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	816	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile		
	240					245					250						
tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	864	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu		
255				260				265							270		
gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	912	
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		
			275					280						285			
aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	960	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg		
			290				295						300				
gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	1008	
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		
		305					310					315					
gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	1056	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu		
	320					325					330						
aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	1104	
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr		
335				340					345						350		
acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	1152	
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu		
				355					360					365			
acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	1200	
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp		
			370					375					380				
gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	1248	
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val		
		385					390					395					
ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	1296	
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp		
	400					405					410						
aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	1344	
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His		
415				420					425						430		
gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	1392	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro		
				435					440					445			
ggt	aaa	tga														1401	
Gly	Lys																

<210> 51
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 51

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile
 -15 -10 -5

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 -1 1 5 10

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 15 20 25 30

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

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro
 50 55 60

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 65 70 75

Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 80 85 90

Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105 110

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

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

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

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 160 165 170

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 175 180 185 190

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

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

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

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
240 245 250

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
255 260 265 270

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

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

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
320 325 330

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
335 340 345 350

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

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

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
400 405 410

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
415 420 425 430

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

Gly Lys

<210> 52
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工合成的核苷酸序列

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(702)

<220>
 <221> sig-peptide
 <222> (1)..(60)

<220>
 <221> mat-peptide
 <222> (61)..(702)

<400> 52

atg gag aca cat tct cag gtc ttt gta tac atg ttg ctg tgg ttg tct	48
Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser	
-20 -15 -10 -5	
ggt gtt gaa gga gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc	96
Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser	
-1 1 5 10	
aca tca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat	144
Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp	
15 20 25	
gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct	192
Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro	
30 35 40	
aaa cta ctg att tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat	240
Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp	
45 50 55 60	
cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc	288
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	
aat gtg cag tct gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat agc	336
Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser	
80 85 90	
agc tat cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cga	384
Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg	
95 100 105	
act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag	432
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln	
110 115 120	
ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat	480
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr	
125 130 135 140	

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
125 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
160 165 170

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
175 180 185

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
190 195 200

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
205 210

<210> 54
<211> 1407
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1404)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(57)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (55)..(1404)

<400> 54
atg gga tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48
Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
-15 -10 -5

gtc cac tgc cag gtc cag ctg aag cag tct gga gct gag ctg gtc agg 96
Val His Cys Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
-1 1 5 10

cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag act tct gga tac atc ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe
15 20 25 30

acc agc tac tgg att cac tgg gta aaa cag agg tct gga cag ggc ctt 192
Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu
35 40 45

gag tgg att gca agg att tat cct gga act ggt agt act tac tac aat 240

Glu Trp Ile Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn 50 55 60	
gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser 65 70 75	288
act gcc tac atg cag ctc agc agc ctg aaa tct gag gac tct gct gtc Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Val 80 85 90	336
tat ttc tgt gca aga tac cct acc tac gac tgg tac ttc gat gtc tgg Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp 95 100 105 110	384
ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115 120 125	432
tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr 130 135 140	480
gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr 145 150 155	528
gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro 160 165 170	576
gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 175 180 185 190	624
gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195 200 205	672
cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser 210 215 220	720
tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu 225 230 235	768
ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 240 245 250	816
atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 255 260 265 270	864
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275 280 285	912
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 290 295 300	960
tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 1008	1008

305	310	315	
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro 320 325 330			1056
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 335 340 345 350			1104
gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 355 360 365			1152
agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 370 375 380			1200
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 385 390 395			1248
ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 400 405 410			1296
gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 415 420 425 430			1344
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 435 440 445			1392
tct ccg ggt aaa tga Ser Pro Gly Lys 450			1407
<210> 55			
<211> 468			
<212> PRT			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 55			
Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly -15 -10 -5			
Val His Cys Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg -1 1 5 10			
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe 15 20 25			
Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu 30 35 40 45			

Glu Trp Ile Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn
 50 55 60

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 65 70 75

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Val
 80 85 90

Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 95 100 105

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 110 115 120 125

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 160 165 170

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 175 180 185

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 190 195 200 205

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 240 245 250

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 255 260 265

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 270 275 280 285

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

gcc tcc aga ggt gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg tct 96
 Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 -1 1 5 10

gtg act cca gga gat aga gtc agt ctt tcc tgc agg gcc agt caa agt 144
 Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 15 20 25

att agc aac tac cta cac tgg tat caa caa aaa tca cat gag tct cca 192
 Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro
 30 35 40

agg ctt ctc atc aag tat gct tcc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc 240
 Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
 45 50 55 60

agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc act ctc agt atc aac 288
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
 65 70 75

agt gtg gag act gaa gat ttt gga atg tat ttc tgt caa cag agt aac 336
 Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn
 80 85 90

agc tgg ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cga 384
 Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 95 100 105

act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag 432
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 110 115 120

ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat 480
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 125 130 135 140

ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg 528
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155

ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc 576
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 160 165 170

tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa 624
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 175 180 185

cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc 672
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 190 195 200

gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgc tag 705
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 205 210

<210> 57
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 57

Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser
 -20 -15 -10 -5

Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 -1 1 5 10

Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 15 20 25

Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro
 30 35 40

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
 45 50 55 60

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

Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn
 80 85 90

Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 95 100 105

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 110 115 120

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 125 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 160 165 170

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 175 180 185

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 190 195 200

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 205 210

<210> 58

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(6)

<223> CDR

<400> 58

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> CDR

<400> 59

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

Arg

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDR

<400> 60

Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> CDR

<400> 61

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (7)
<223> CDR

<400> 62

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (9)
<223> CDR

<400> 63

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (5)
<223> CDR

<400> 64

Ser Tyr Trp Ile His
1 5

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (17)
<223> CDR

<400> 65

Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> CDR

<400> 66

Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> CDR

<400> 67

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

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDR

<400> 68

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (9)
 <223> CDR

<400> 69

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 70
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (6)
 <223> CDR

<400> 70

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5

<210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (17)
 <223> CDR

<400> 71

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

Arg

<210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (9)
 <223> CDR

<400> 72

Ala Leu Pro Leu Pro Trp Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 73
 <211> 11

<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> CDR

<400> 73

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDR

<400> 74

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDR

<400> 75

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 76
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<220>
<221> misc-feature
<222> (2)..(3)
<223> Xaa 可以是任何天然氨基酸

<400> 76

Tyr Xaa Xaa Leu
1

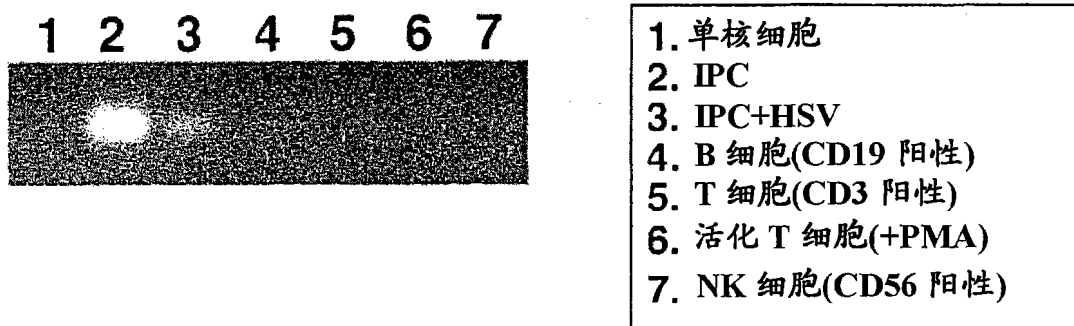


图 1a

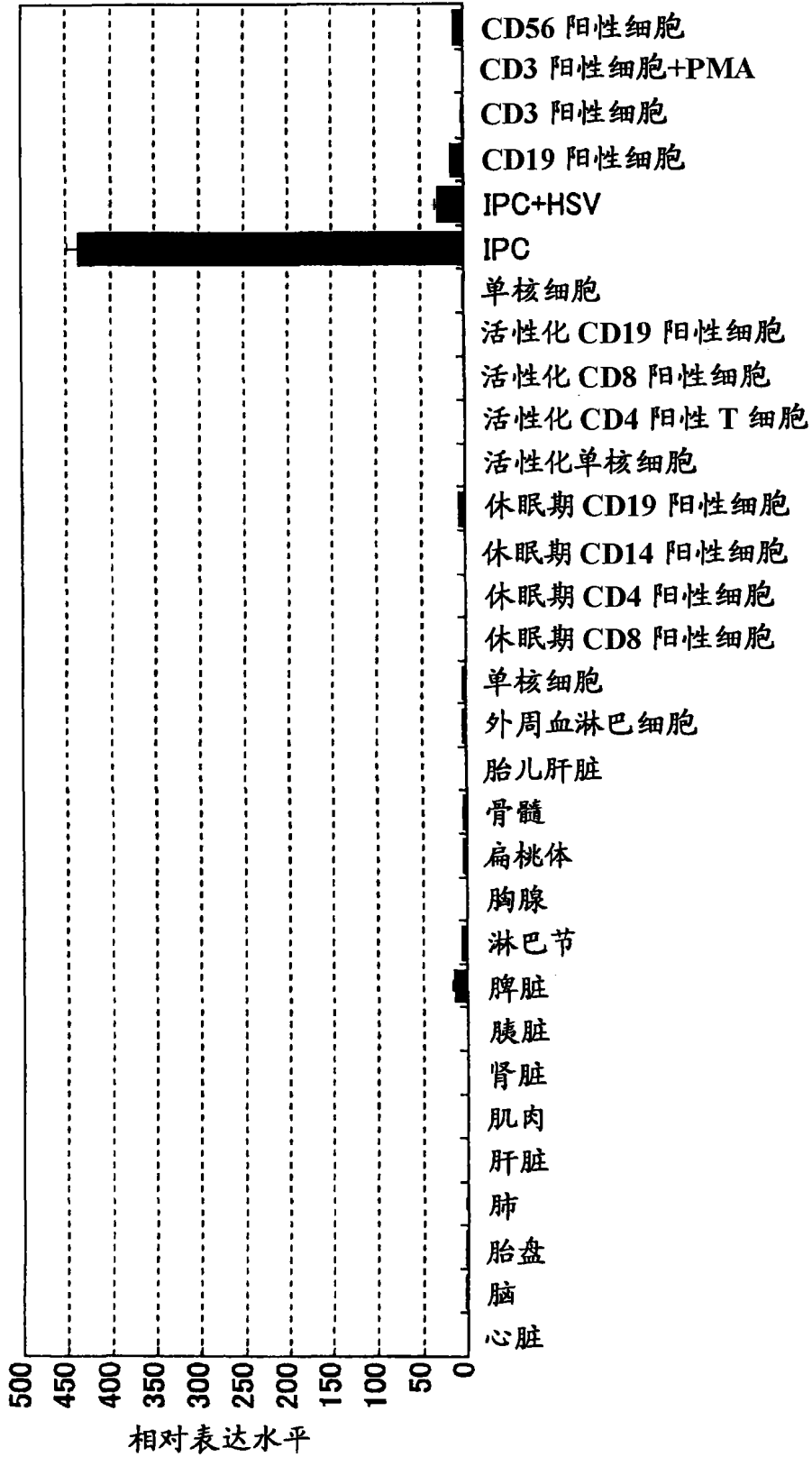


图 1b

(a) 信号序列

MTLILTSLLFFGLSLGPRTRVQAENLPKPILWAEPGPI TWHNPVT IWCQGTLEAQQYRL
 DKEGNSMSRHI LKLESENKVKLSIPSMWHEHAGRYHCYYQSPAGWSEPSDPLELVVTAY
 SRPTLSALPSPVVTSGVNVTLRCASRLGLGRFTLIEEGDHRLSWTLNSHQHNHGKFKQALF
 PMGPLTFSNRGTFRCYGYENNTPYVWSEPSDPLQLLVSGVSRKPSLLTLQGPVVTGGENL
 TLQCGSDVGYIRYTLYKEGADGLPQRPRGRPQAGLSQANFTLSPVSRSYGGQYRCYGAHN
 VSSEWSAPSDPLDIL IAGQISDRPSLSVQPGPTVTSGEKVTLLCQSWDPMFTFLLTKEGA
 AHPPLRLRSMYGAHKYQAEFPMPSPVTSAHAGTYRCYGRSSNPYLLSHPSEPLELVVSGA
 TETLNPAQKKS~~DKTAPHLQD~~YTVENLIRMGVAGLVLLFLGILLFE**AQHSQRSPPRCSQE**
 ANSRKDNAPFRVVEPWEQI (SEQ ID NO:2) 跨膜区(TM)

(b)

N-FLAG ILT7(57KDa)



C-FLAG ILT7(57KDa)



图 2

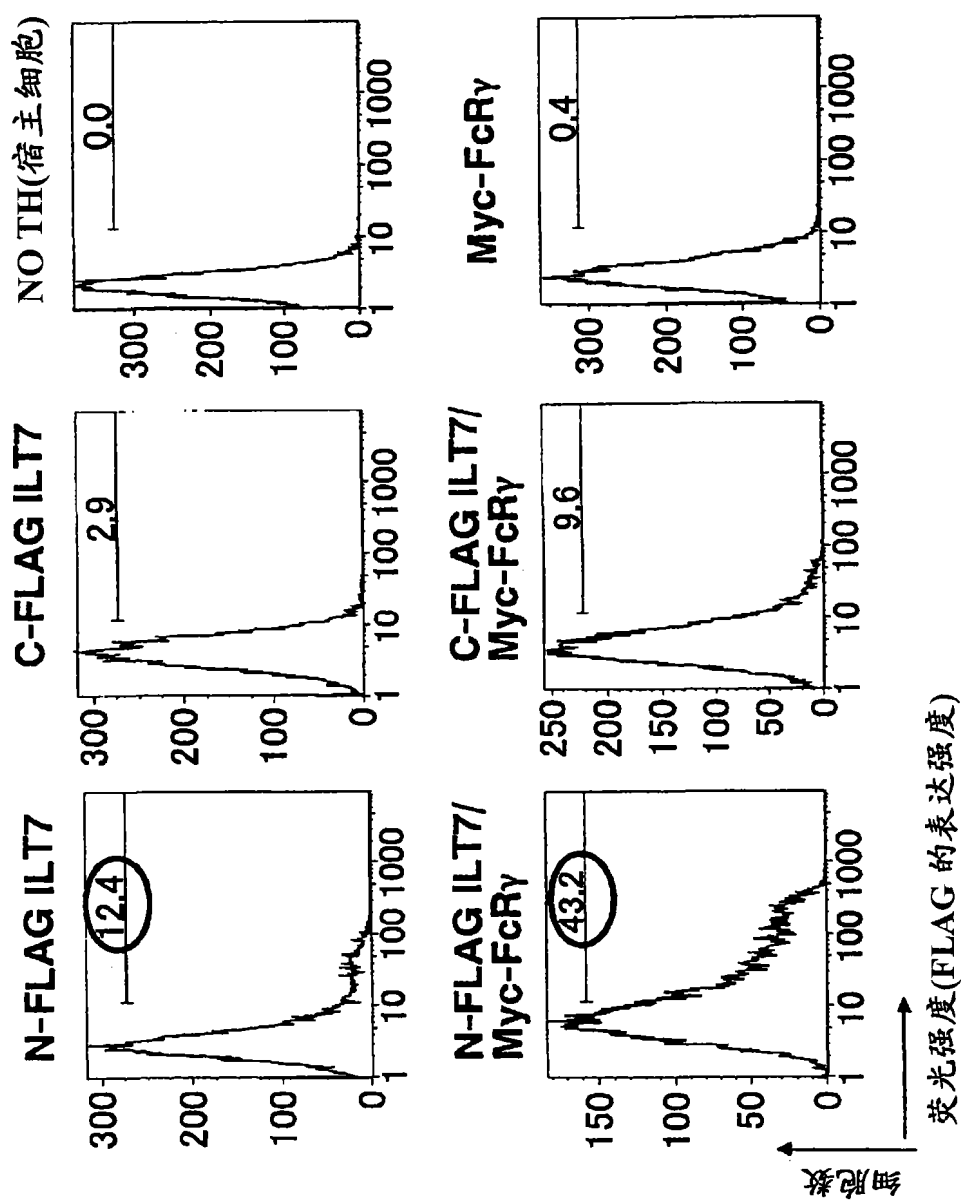
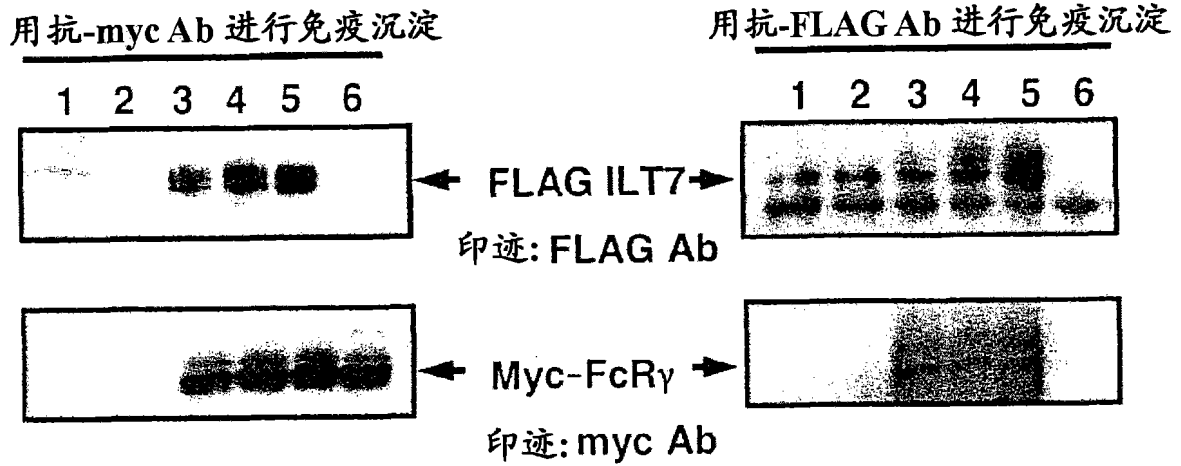


图 3



- 导入到细胞中的基因
1. N-FLAG ILT7
 2. C-FLAG ILT7
 3. N-FLAG ILT7 + Myc-FcR γ
 4. N-FLAG ILT7 + Myc-FcR γ
 5. C-FLAG ILT7 + Myc-FcR γ
 6. Myc-FcR γ

图 4

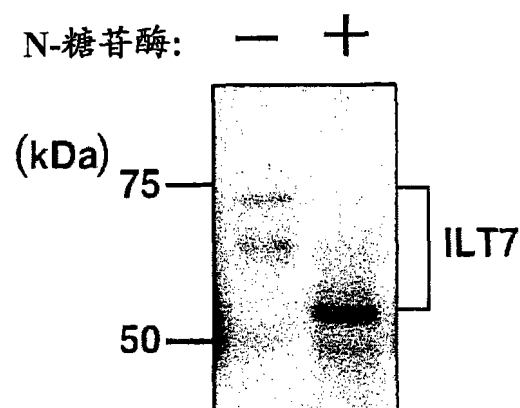


图 5

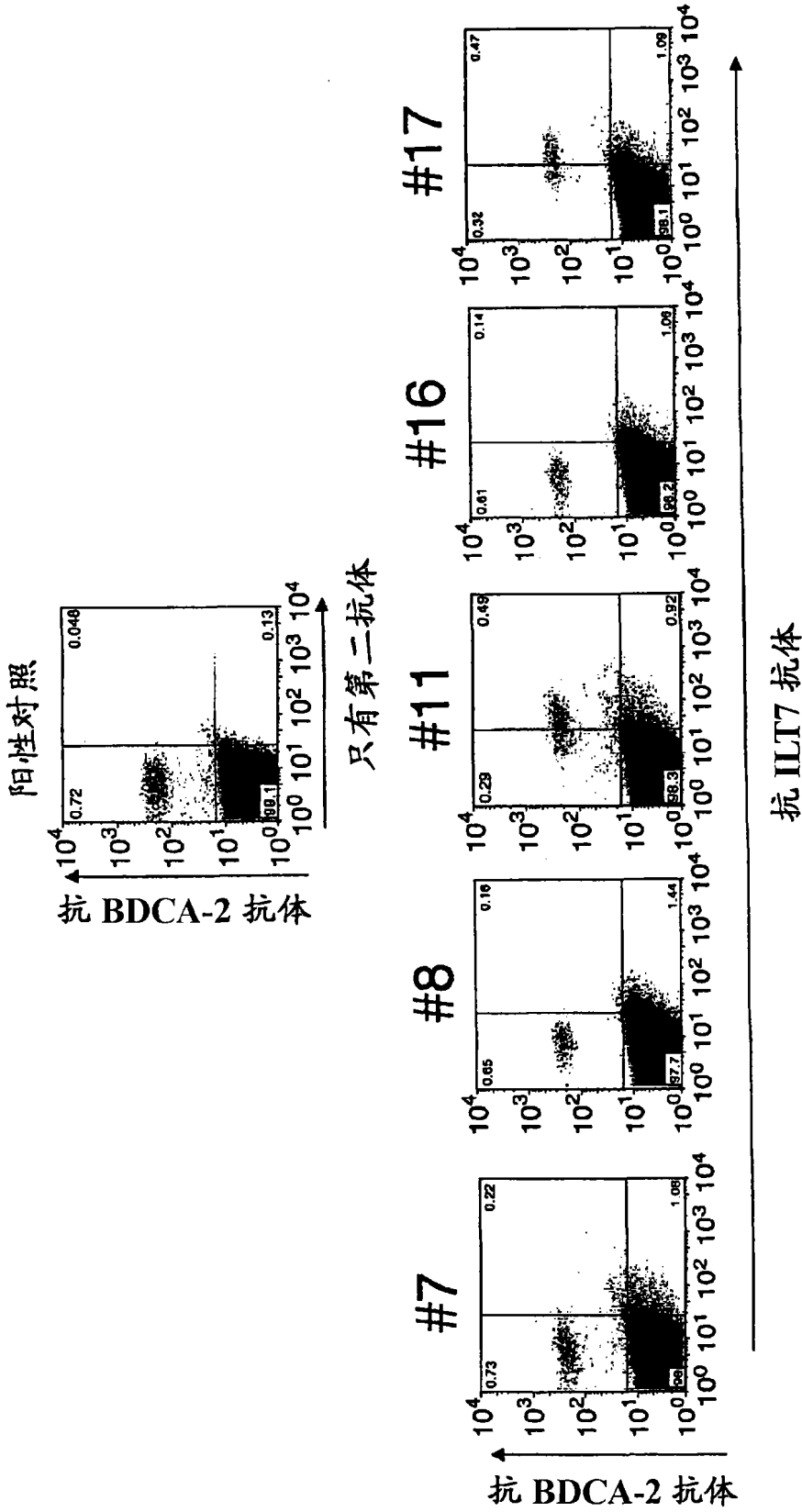


图 6a

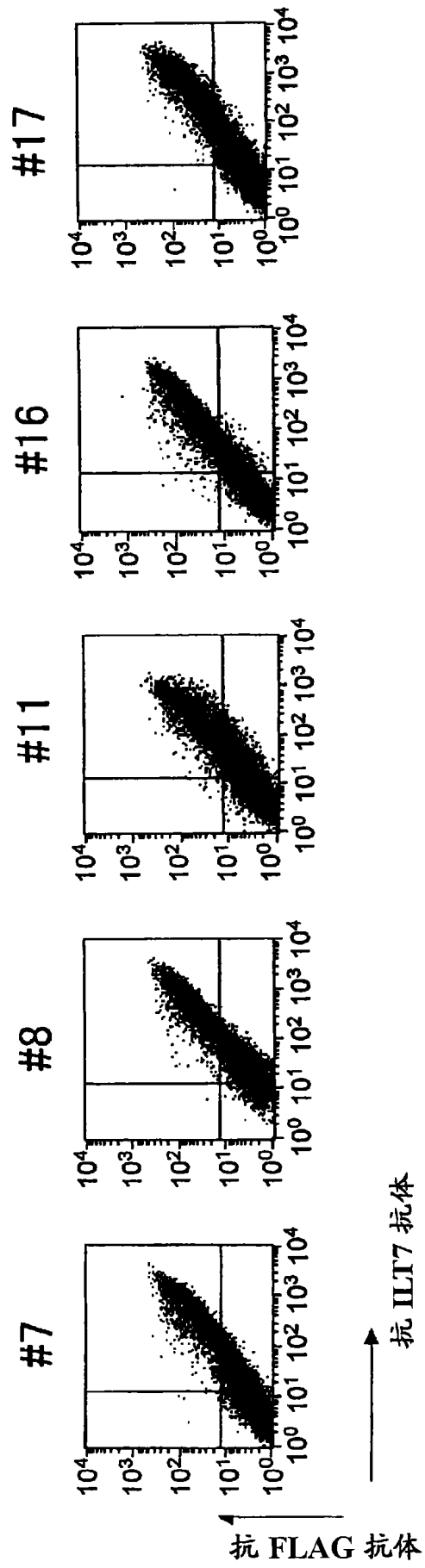


图 6b

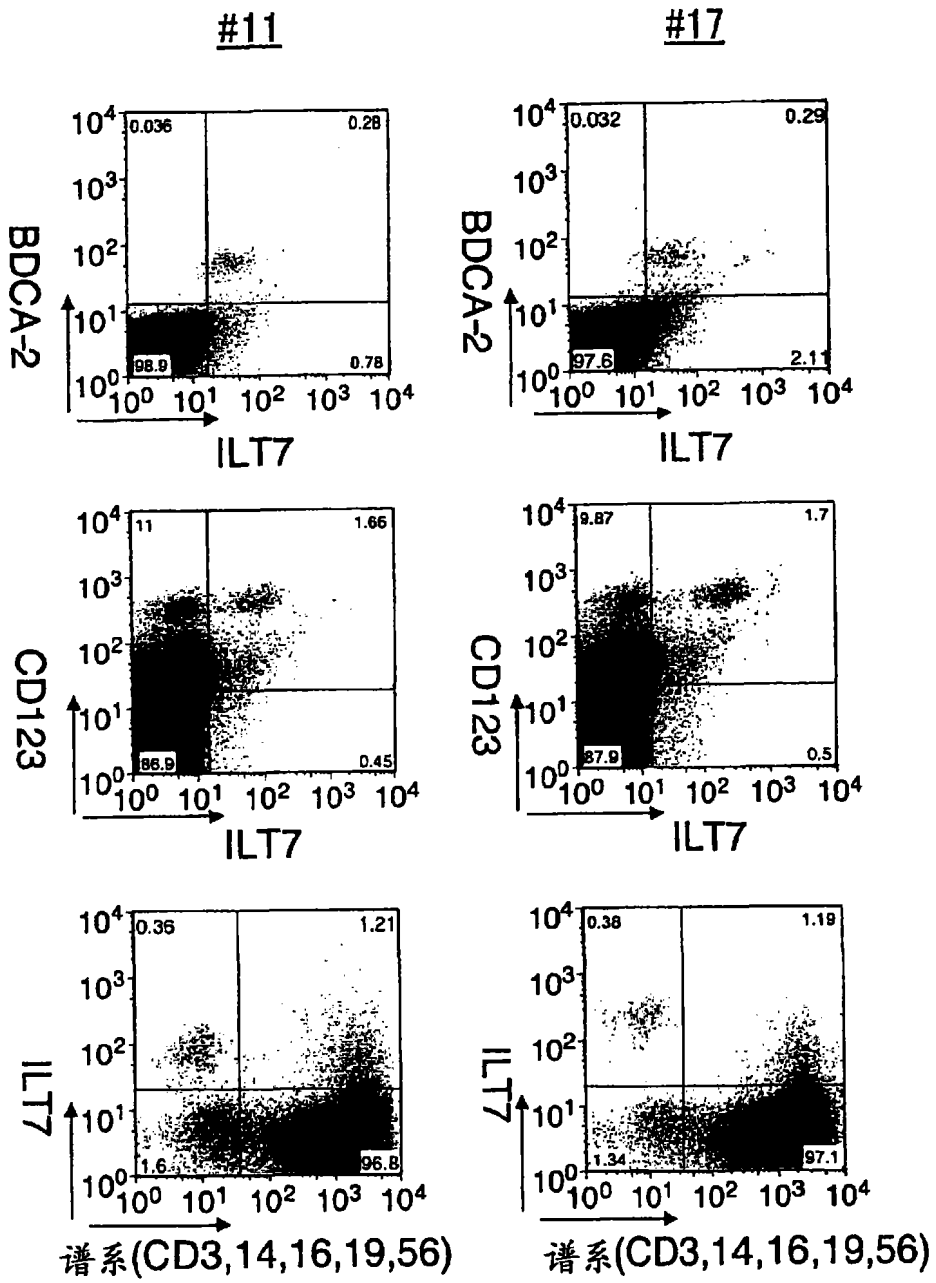


图 7

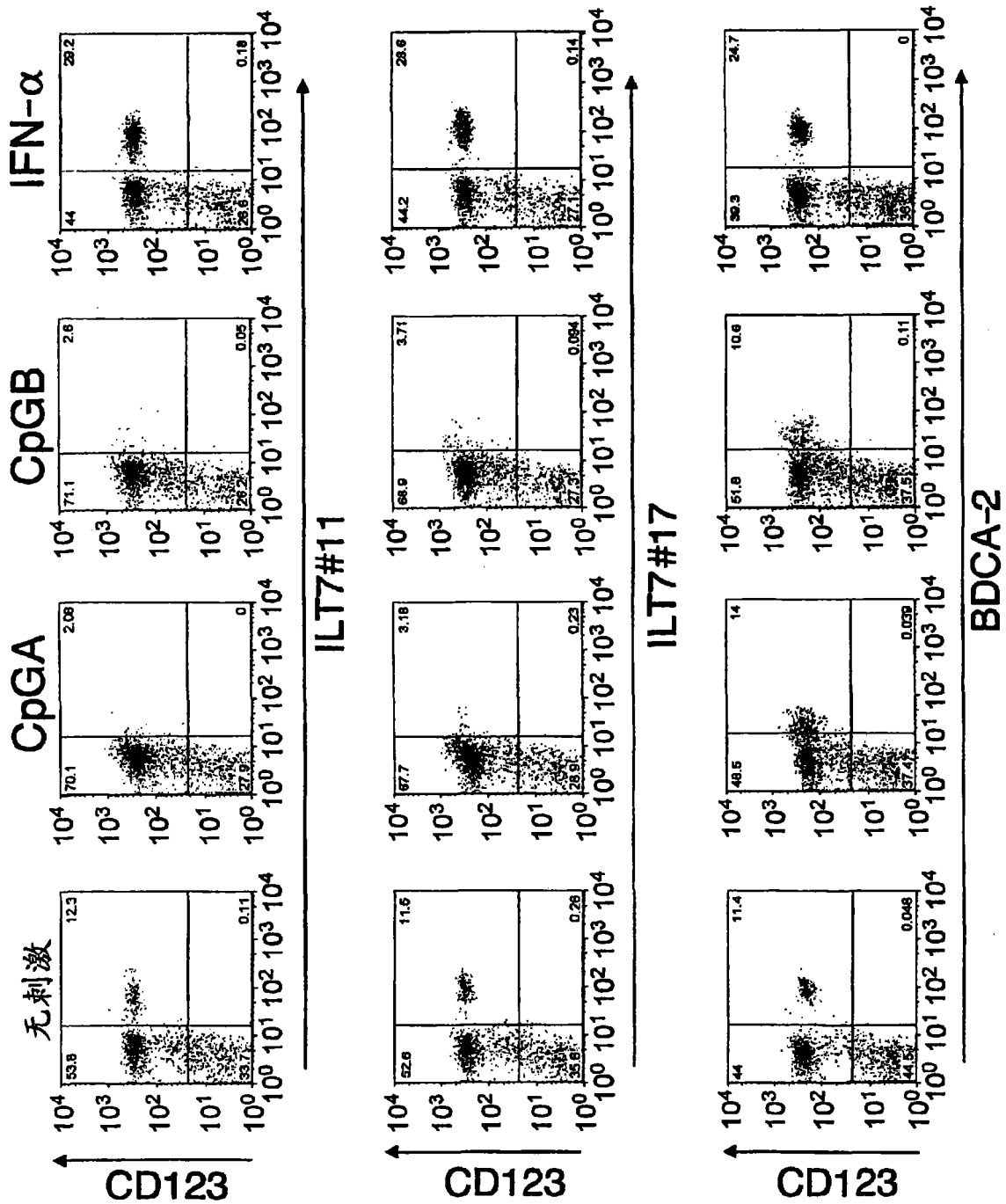


图 8

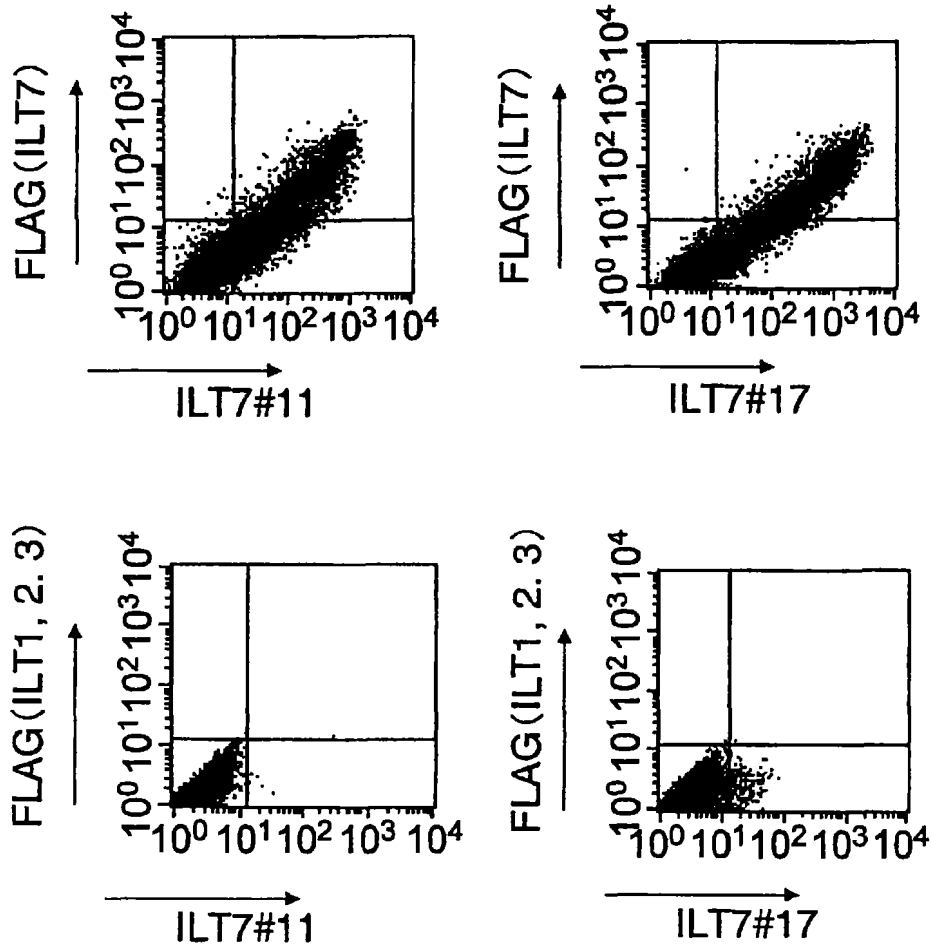


图 10

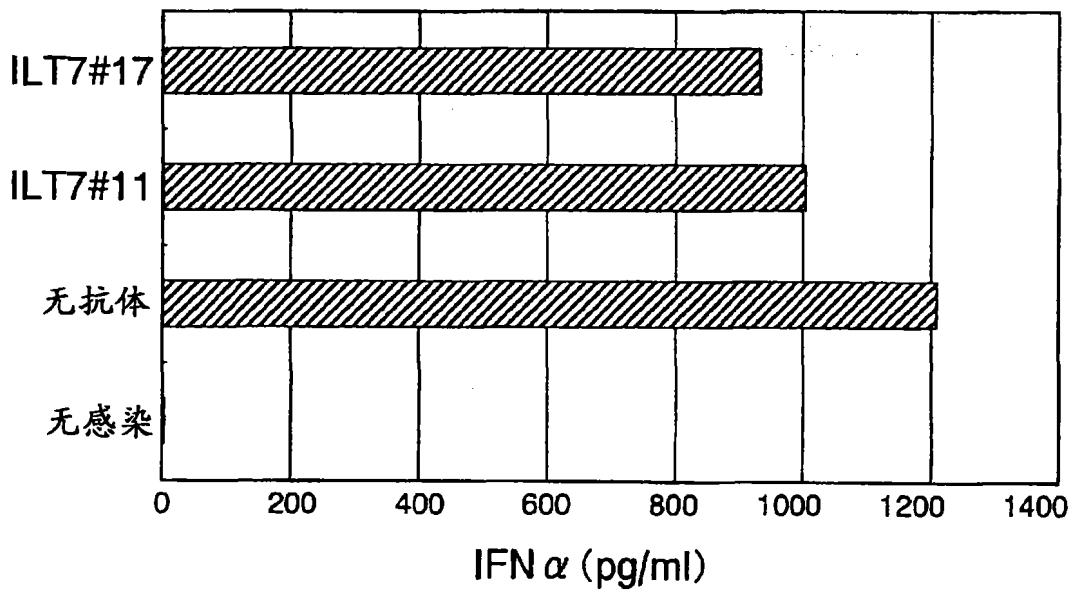


图 11

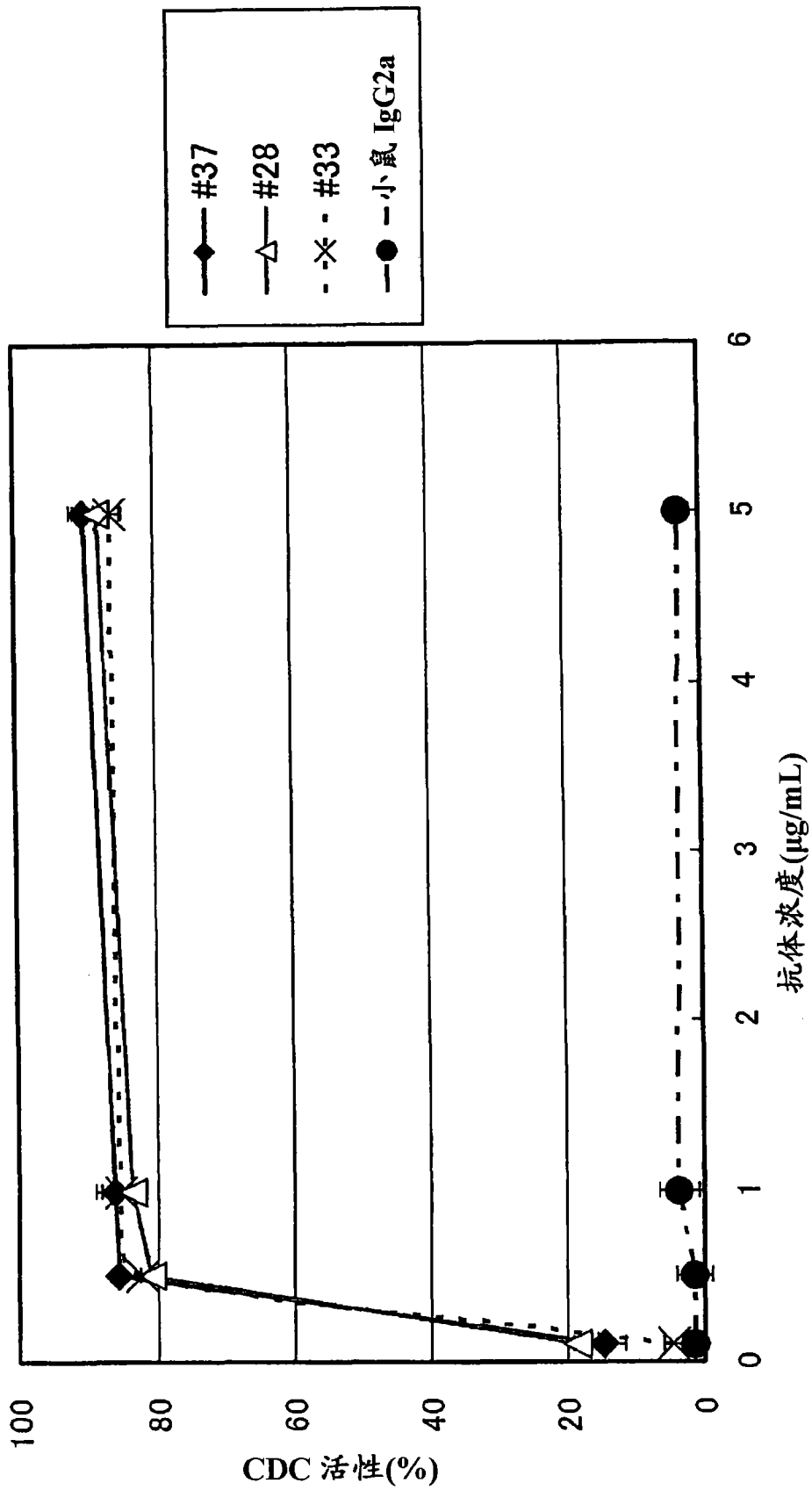


图 12

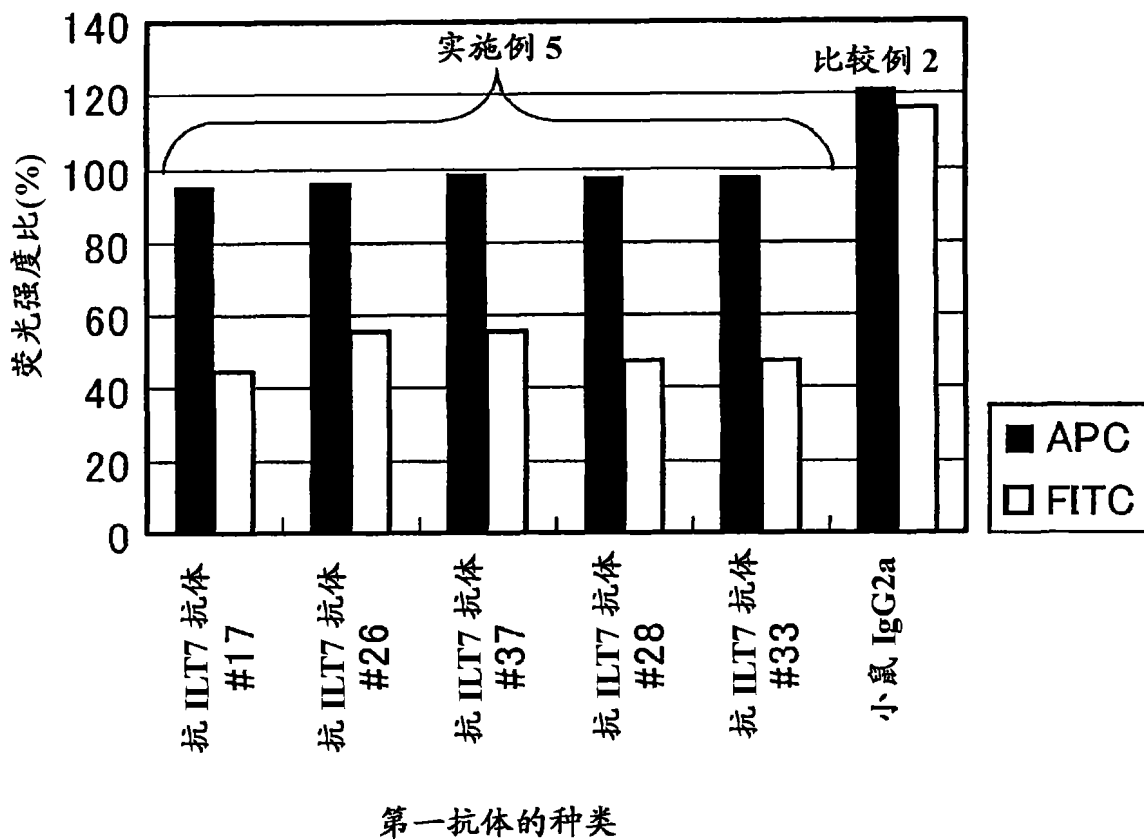


图 13

专利名称(译)	抗ILT7抗体		
公开(公告)号	CN101379089A	公开(公告)日	2009-03-04
申请号	CN200680053131.X	申请日	2006-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	SBI生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	SBI生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	SBI生物技术有限公司		
[标]发明人	鸭川由美子 赵民权 新井直子 石田晃司		
发明人	鸭川由美子 赵民权 新井直子 石田晃司		
IPC分类号	C07K16/28 A61P43/00 A61P17/06 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 A61K39/395 A61K48/00 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/2803 G01N33/577 C07K2317/34 A61K2039/545 C07K2317/77 C07K16/28 C07K2317/734 G01N33/6866 A61K2039/505 G01N33/566 C07K2317/24 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 C07K2317/56 G01N33/56972 G01N2333/555 G01N2333/705 C12N5/00 C12N2510/02		
优先权	2005366465 2005-12-20 JP		
其他公开文献	CN101379089B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

能够结合IPC的抗体是通过利用动物细胞来获得的，在该细胞中与ILT7结合的细胞膜蛋白是作为免疫原共表达的。本发明的抗体具有高特异性，使得该抗体能够从免疫学上将ILT7与其他ILT家族分子区分开来。本发明的抗ILT - 7的抗体能够结合IPC并抑制其活性。通过本发明的抗ILT - 7的抗体可以抑制IPC的活性，并且可以治疗或预防干扰素相关疾病。在IFN α 存在的情况下，ILT7在IPC中的表达仍可维持。因此，在IFN α 生成量增加的多种自身免疫病人体内，可以预期抗ILT - 7的抗体对于IPC活性的抑制作用。

	抗体浓度 (μ g/毫升)	细胞伤害性 (平均值)	细胞伤害性 (标准偏差)
#37	0.1	14.78	3.16
	0.5	85.5	0.60
	1	86.13	2.93
	5	90.26	1.87
#28	0.1	18.52	0.60
	0.5	80.97	1.62
	1	83.64	1.99
	5	88.17	3.32
#33	0.1	4.42	1.58
	0.5	82.16	3.35
	1	85.39	2.78
	5	86.18	1.71
小鼠 IgG2a	0.1	1.53	0.60
	0.5	1.47	2.50
	1	3.68	2.90
	5	3.06	1.72
无抗体	0	2.10	0.49