

[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 200910009932.1

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 1 月 20 日

[11] 公开号 CN 101628939A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 11/02 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 13/10 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 19/04 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

[22] 申请日 2003.9.5

[21] 申请号 200910009932.1

分案原申请号 03824846.8

[30] 优先权

[32] 2002. 9. 6 [33] US [31] 60/408719

[71] 申请人 安姆根有限公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 米德列斯公司

[72] 发明人 B·瓦纳姆 C·韦兹纳 A·维特

X·钱 F·马丁 H·黄

G·埃利奥特

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭文洁 付 磊

权利要求书 15 页 说明书 156 页 附图 27 页

[54] 发明名称

治疗性人抗 - IL - 1R1 单克隆抗体

[57] 摘要

本发明涉及治疗性人抗 - IL - 1R1 单克隆抗体。描述了与白介素 - 1 受体型 1 (IL - 1R1) 相互作用的抗体。还描述了通过施用药学有效量的针对 IL - 1R1 的抗体治疗 IL - 1 介导的疾病的方法。另外还描述了使用针对 IL - 1R1 的抗体检测样品中 IL - 1R1 的量的方法。

1. 特异结合白介素-1受体型 1(IL-1R1)的分离的人抗体,其含有重链和轻链,其中重链包含含有如在 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 14、或 SEQ ID NO: 16 任一个中提出的氨基酸序列的重链可变区,或者其抗原结合片段或具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

2. 特异结合白介素-1受体型 1(IL-1R1)的分离的人抗体,其含有重链和轻链,其中轻链包含含有如在 SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 18 任一个中提出的氨基酸序列的轻链可变区,或者其抗原结合片段或具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

3. 特异结合白介素-1受体型 1(IL-1R1)的分离的人抗体,其含有重链和轻链,其中重链含有如在 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、或 SEQ ID NO: 36 任一个中提出的氨基酸序列,或者其抗原结合片段或具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

4. 特异结合白介素-1受体型 1(IL-1R1)的分离的人抗体,其含有重链和轻链,其中轻链含有如在 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40 任一个中提出的氨基酸序列,或者其抗原结合片段或具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

5. 特异结合白介素-1受体型 1(IL-1R1)的分离的人抗体,其中抗体含有:

a) 重链,该重链具有含有 SEQ ID NO:10 中提出的氨基酸序列的重链可变区、其抗原结合片段,或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段;和轻链,该轻链具有含有 SEQ ID NO:12 中提出的氨基酸序列的轻链可变区、其抗原结合片段,或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段;

b) 重链,该重链具有含有 SEQ ID NO:14 中提出的氨基酸序列的重链可变区、其抗原结合片段,或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段;和轻链,该轻链具有含有 SEQ ID NO:12 中提出的氨基酸序列的轻链可变区、其抗原结合片段,或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段;或

c) 重链,该重链具有含有 SEQ ID NO:16 中提出的氨基酸序列

的重链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段；和轻链，该轻链具有含有 SEQ ID NO:18 中提出的氨基酸序列的轻链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

6. 权利要求 5 的抗体，其中重链含有具有 SEQ ID NO:10 中提出的氨基酸序列的重链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段，并且轻链含有具有 SEQ ID NO:12 中提出的氨基酸序列的轻链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

7. 权利要求 6 的抗体，其中重链可变区含有与 SEQ ID NO: 10 中提出的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，并且其中轻链可变区含有与 SEQ ID NO: 12 中提出的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

8. 权利要求 5 的抗体，其中重链含有具有 SEQ ID NO:14 中提出的氨基酸序列的重链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段，并且轻链含有具有 SEQ ID NO:12 中提出的氨基酸序列的轻链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

9. 权利要求 8 的抗体，其中重链可变区含有与 SEQ ID NO: 14 中提出的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，并且其中轻链可变区含有与 SEQ ID NO: 12 中提出的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

10. 权利要求 5 的抗体，其中重链含有具有 SEQ ID NO:16 中提出的氨基酸序列的重链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段，并且轻链含有具有 SEQ ID NO:18 中提出的氨基酸序列的轻链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

11. 权利要求 10 的抗体，其中重链可变区含有与 SEQ ID NO: 16 中提出的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，并且其中轻链可变区含有与 SEQ ID NO: 18 中提出的氨基酸序列具有至

少 90%序列同一性的氨基酸序列,并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

12. 特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)的分离的人抗体, 其中抗体含有:

a) 含有如 SEQ ID NO: 38 中提出的氨基酸序列的轻链、其抗原结合片段或具有免疫学功能的免疫球蛋白片段; 和

b) 含有如 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28 或 SEQ ID NO: 30 中提出的氨基酸序列的重链、其抗原结合片段或具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

13. 权利要求 12 的抗体, 其中重链含有具有 SEQ ID NO:20 中提出的氨基酸序列的重链可变区、其抗原结合片段, 或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段, 并且轻链含有具有 SEQ ID NO:38 中提出的氨基酸序列的轻链可变区、其抗原结合片段, 或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

14. 权利要求 13 的抗体, 其中重链可变区含有与 SEQ ID NO: 20 中提出的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列, 并且其中轻链可变区含有与 SEQ ID NO: 38 中提出的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列, 并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

15. 权利要求 12 的抗体, 其中重链含有具有 SEQ ID NO:22 中提出的氨基酸序列的重链可变区、其抗原结合片段, 或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段, 并且轻链含有具有 SEQ ID NO:38 中提出的氨基酸序列的轻链可变区、其抗原结合片段, 或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

16. 权利要求 15 的抗体, 其中重链可变区含有与 SEQ ID NO: 22 中提出的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列, 并且其中轻链可变区含有与 SEQ ID NO: 38 中提出的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列, 并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

17. 权利要求 12 的抗体, 其中重链含有具有 SEQ ID NO:24 中提出的氨基酸序列的重链可变区、其抗原结合片段, 或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段, 并且轻链含有具有 SEQ ID NO:38 中提出

的氨基酸序列的轻链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

18. 权利要求 17 的抗体，其中重链可变区含有与 SEQ ID NO: 24 中提出的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，并且其中轻链可变区含有与 SEQ ID NO: 38 中提出的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

19. 权利要求 12 的抗体，其中重链含有具有 SEQ ID NO:26 中提出的氨基酸序列的重链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段，并且轻链含有具有 SEQ ID NO:38 中提出的氨基酸序列的轻链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

20. 权利要求 19 的抗体，其中重链可变区含有与 SEQ ID NO: 26 中提出的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，并且其中轻链可变区含有与 SEQ ID NO: 38 中提出的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

21. 权利要求 12 的抗体，其中重链含有具有 SEQ ID NO:28 中提出的氨基酸序列的重链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段，并且轻链含有具有 SEQ ID NO:38 中提出的氨基酸序列的轻链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

22. 权利要求 21 的抗体，其中重链可变区含有与 SEQ ID NO: 28 中提出的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，并且其中轻链可变区含有与 SEQ ID NO: 38 中提出的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

23. 权利要求 12 的抗体，其中重链含有具有 SEQ ID NO:30 中提出的氨基酸序列的重链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段，并且轻链含有具有 SEQ ID NO:38 中提出的氨基酸序列的轻链可变区、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

24. 权利要求 23 的抗体, 其中重链可变区含有与 SEQ ID NO: 30 中提出的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列, 并且其中轻链可变区含有与 SEQ ID NO: 38 中提出的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列, 并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

25. 特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1) 的分离的人抗体, 其中抗体含有:

a) 含有如 SEQ ID NO: 40 中提出的氨基酸序列的轻链、其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段; 和

b) 含有如 SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34 或 SEQ ID NO: 36 中提出的氨基酸序列的重链、其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

26. 权利要求 25 的抗体, 其中重链含有具有 SEQ ID NO: 32 中提出的氨基酸序列的重链可变区、其抗原结合片段, 或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段, 并且轻链含有具有 SEQ ID NO: 40 中提出的氨基酸序列的轻链可变区、其抗原结合片段, 或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

27. 权利要求 26 的抗体, 其中重链可变区含有与 SEQ ID NO: 32 中提出的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列, 并且其中轻链可变区含有与 SEQ ID NO: 40 中提出的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列, 并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

28. 权利要求 25 的抗体, 其中重链含有 SEQ ID NO: 34 中提出的氨基酸序列、其抗原结合片段, 或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段, 并且轻链含有 SEQ ID NO: 40 中提出的氨基酸序列、其抗原结合片段, 或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

29. 权利要求 28 的抗体, 其中重链可变区含有与 SEQ ID NO: 34 中提出的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列, 并且其中轻链可变区含有与 SEQ ID NO: 40 中提出的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列, 并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

30. 权利要求 25 的抗体, 其中重链含有 SEQ ID NO: 36 中提出

的氨基酸序列、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段，并且轻链含有 SEQ ID NO:40 中提出的氨基酸序列、其抗原结合片段，或者其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

31. 权利要求 30 的抗体，其中重链可变区含有与 SEQ ID NO: 36 中提出的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，并且其中轻链可变区含有与 SEQ ID NO: 40 中提出的氨基酸序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

32. 权利要求 1、2、3、4、5、12 或 25 的抗体，其中重链和轻链通过柔性接头连接形成单链抗体。

33. 权利要求 32 的抗体，其是单链 Fv 抗体。

34. 权利要求 1、2、3、4、5、12 或 25 的抗体，其是 Fab 抗体片段。

35. 权利要求 1、2、3、4、5、12 或 25 的抗体，其是 Fab' 抗体片段。

36. 权利要求 1、2、3、4、5、12 或 25 的抗体，其是 (Fab')₂ 抗体片段。

37. 权利要求 1、2、3、4、5、12 或 25 的抗体，其中该抗体是完全人抗体。

38. 权利要求 1、2、3、4、5、12 或 25 的抗体，其中该抗体抑制 IL-1 与其受体的结合。

39. 治疗患者中 IL-1 介导的疾病的方法，该方法包括对患者施用药学有效量的权利要求 38 的抗体。

40. 药物组合物，其含有药学上可接受的载体和治疗有效量的权利要求 38 的抗体。

41. 治疗患者中 IL-1 介导的疾病的方法，该方法包括对患者施用权利要求 40 的药物组合物。

42. 含有可变区和恒定区的重链，其中可变区含有 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 14、或 SEQ ID NO: 16 中任一个提出的氨基酸序列，或者其抗原结合片段或具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

43. 含有如在 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、

SEQ ID NO: 34、或 SEQ ID NO: 36 任一个中提出的氨基酸序列的重链，或者其抗原结合片段或具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

44. 含有可变区和恒定区的轻链，其中可变区含有 SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 18 任一个中提出的氨基酸序列，或者其抗原结合片段或具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

45. 含有如在 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40 任一个中提出的氨基酸序列的轻链，或者其抗原结合片段或具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

46. 分离的人抗体，其含有：

a) 人重链框架区、人重链 CDR1 区、人重链 CDR2 区、和人重链 CDR3 区，其中人重链 CDR3 区具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68 或 SEQ ID NO: 69；和

b) 人轻链框架区、人轻链 CDR1 区、人轻链 CDR2 区、和人轻链 CDR3 区，其中人轻链 CDR3 区具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 74 或 SEQ ID NO: 75；

其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

47. 权利要求 46 的分离的人抗体，其中人重链 CDR2 区具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65 或 SEQ ID NO: 66 并且人轻链 CDR2 区具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 72 或 SEQ ID NO: 73。

48. 权利要求 46 的分离的人抗体，其中人重链 CDR1 区具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62 或 SEQ ID NO: 63 并且人轻链 CDR1 区具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 70 或 SEQ ID NO: 71。

49. 含有人重链 CDR1 区的分离的人抗体，其中重链 CDR1 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62 或 SEQ ID NO: 63，并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

50. 含有人重链 CDR2 区的分离的人抗体，其中重链 CDR2 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65 或 SEQ ID NO: 66，并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

51. 含有人重链 CDR3 区的分离的人抗体，其中重链 CDR3 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68 或 SEQ ID NO: 69，并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

52. 含有人轻链 CDR1 区的分离的人抗体，其中轻链 CDR1 具有

氨基酸序列 SEQ ID NO: 70 或 SEQ ID NO: 71, 并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

53. 含有人重链 CDR2 区的分离的人抗体, 其中重链 CDR2 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 72 或 SEQ ID NO: 73, 并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

54. 含有人重链 CDR3 区的分离的人抗体, 其中重链 CDR3 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 74 或 SEQ ID NO: 75, 并且其中该抗体特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

55. 特异结合 SEQ ID NO:76 的多肽的分离的人抗体。

56. 权利要求 55 的抗体, 其中该抗体特异结合 IL1-R1 的表位 4。

57. 权利要求 5、12 或 25 的抗体, 其是 IgG2 抗体。

58. 权利要求 5、12 或 25 的抗体, 其特异结合 SEQ ID NO:76 的多肽。

59. 权利要求 5、12 或 25 的抗体, 其特异结合 IL1-R1 的表位 4。

60. 对所选抗原进行表位作图的方法, 该方法包括:

a) 产生一组融合蛋白, 其中每种融合蛋白含有(i)抗生物素蛋白和(ii)抗原的片段;

b) 筛选与所述抗原的一种或多种特异结合配偶体结合的融合蛋白组;

c) 在含有生物素的介质上分离融合蛋白, 其中抗生物素蛋白结合生物素; 和

d) 分析被特异结合配偶体结合的融合蛋白以确定所述特异结合配偶体在该抗原上的结合位点。

61. 权利要求 60 的方法, 其中特异结合配偶体是抗体。

62. 分离的抗体, 其含有:

a) 人重链框架区、人重链 CDR1 区、人重链 CDR2 区、和人重链 CDR3 区, 其中所述的 CDR1 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 61 或 SEQ ID NO: 62; 所述的 CDR2 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 64 或 SEQ ID NO: 65; 所述的 CDR3 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 67 或 SEQ ID NO: 68; 和

b) 人轻链框架区、人轻链 CDR1 区、人轻链 CDR2 区、和人轻链 CDR3 区, 其中所述的 CDR1 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 70;

所述的 CDR2 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 72; 所述的 CDR3 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 74;

其中该抗体结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)。

63. 特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)的分离的抗体, 其含有重链和轻链, 其中所述的重链包含含有 SEQ ID NO: 82 的可变区, 或者其抗原结合片段, 其中, 所述的抗原结合片段包含至少 SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 65, 和 SEQ ID NO: 68。

64. 特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)的分离的抗体, 其含有重链和轻链, 其中所述的轻链包含含有 SEQ ID NO: 83 的可变区, 或者其抗原结合片段, 其中, 所述的抗原结合片段包含至少 SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, 和 SEQ ID NO: 74。

65. 特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)的分离的抗体, 其中, 所述的抗体包含含有 SEQ ID NO: 82 的重链可变区, 或者其抗原结合片段, 其中, 所述的抗原结合片段包含至少 SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 65, 和 SEQ ID NO: 68; 以及包含含有 SEQ ID NO: 83 的氨基酸序列的轻链可变区, 或者其抗原结合片段, 其中, 所述的抗原结合片段包含至少 SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, 和 SEQ ID NO: 74。

66. 特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)的分离的抗体, 其含有重链和轻链, 其中所述的重链包含含有 SEQ ID NO: 82 的可变区。

67. 特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)的分离的抗体, 其含有重链和轻链, 其中所述的轻链包含含有 SEQ ID NO: 83 的可变区。

68. 特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)的分离的抗体, 其中, 所述的抗体包含含有 SEQ ID NO: 82 的重链可变区, 以及含有 SEQ ID NO: 83 的轻链可变区。

69. 特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)的分离的抗体, 其含有重链和轻链, 其中所述的重链包含含有 SEQ ID NO: 84 的可变区, 或者其抗原结合片段, 其中, 所述的抗原结合片段包含至少 SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 64, 和 SEQ ID NO: 67。

70. 特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)的分离的抗体, 其中, 所述的抗体包含含有 SEQ ID NO: 84 的重链可变区, 或者其抗原结合片段, 其中, 所述的抗原结合片段包含至少 SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 64, 和 SEQ ID NO: 67, 以及含有 SEQ ID NO: 83 的氨基酸序列

的轻链可变区,或者其抗原结合片段,其中,所述的抗原结合片段包含至少 SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, 和 SEQ ID NO: 74。

71. 特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)的分离的抗体,其含有重链和轻链,其中所述的重链包含含有 SEQ ID NO: 84 的可变区。

72. 特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1)的分离的抗体,所述的抗体包含含有 SEQ ID NO: 84 的重链可变区,以及含有 SEQ ID NO: 83 的轻链可变区。

73. 权利要求 62-72 中任一项所述的抗体,其中所述的重链和轻链通过柔性接头连接形成单链抗体。

74. 权利要求 73 的抗体,其是单链 Fv 抗体。

75. 权利要求 62-72 中任一项所述的抗体,其是 Fab 抗体片段。

76. 权利要求 62-72 中任一项所述的抗体,其是 Fab'抗体片段。

77. 权利要求 62-72 中任一项所述的抗体,其是(Fab')₂ 抗体片段。

78. 权利要求 62-72 中任一项所述的抗体,其中该抗体是完全人抗体。

79. 权利要求 62-72 中任一项所述的抗体,其中该抗体抑制 IL-1 与其受体的结合。

80. 权利要求 62-72 中任一项所述的抗体,其是 IgG2 抗体。

81. 权利要求 62-72 中任一项所述的抗体,其与 SEQ ID NO: 76 的氨基酸序列特异结合。

82. 权利要求 62-72 中任一项所述的抗体,其中所述的抗体与 IL-1R1 的氨基酸序列的部分特异结合,其中所述与抗体特异性结合的氨基酸序列的部分包含氨基酸序列 YSV。

83. 包含可药用载体,赋形剂或稀释剂,以及权利要求 62-72 中任一项所述的抗体的组合物。

84. 包含可药用载体,赋形剂或稀释剂,以及治疗有效量的权利要求 62-72 中任一项所述的抗体的组合物。

85. 抗体在制备用于治疗或预防 IL-1 介导的疾病、病症或失调的药物中的用途,其中,所述的抗体包含权利要求 62-72 中任一项所述的氨基酸序列。

86. 权利要求 85 所述的用途,其中,IL-1 介导的疾病、病症或失调选自:肺病、哮喘、慢性阻塞性肺病、肺泡蛋白质沉积、博来霉

素诱导的肺病变、肺纤维样变性、自发性肺纤维样变性、放射诱导的肺纤维样变性、膀胱纤维样变性、肺中的胶原积累、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、支气管肺发育不良 (BPD)、选自肺气肿和慢性支气管炎的慢性阻塞性肺病、慢性纤维样变性肺病、石棉肺、煤炭工人的尘肺、硅肺、bronchiolitis organizing pneumonia、肺肉样瘤病、过敏性鼻炎、接触性皮炎、特应性皮炎、糖尿病、炎症肠病、类风湿性关节炎和哮喘。

87. 分离的核酸分子, 其包含

(a) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, 或 SEQ ID NO: 89 的核苷酸序列, 或其组合、片段或变体;

(b) 编码 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, 或 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列或其白介素-1 受体型 1(IL-1R1)结合片段的核苷酸序列, 或其组合;

(c) 与(a) 或(b) 的核苷酸序列的互补序列在至少中等严格条件下杂交的核苷酸序列, 其中, 所编码的多肽具有白介素-1 受体型 1(IL-1R1)结合活性; 或

(d)与(a)-(c) 中任一项的核苷酸序列互补的核苷酸序列。

88. 权利要求 87 所述的分离的核酸分子, 其中, 所述的核酸分子包含 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, 或 SEQ ID NO: 89 的片段, 或其组合, 其中, 所述的片段编码包含至少

抗体轻链或重链可变区的人白介素-1 受体型 1(IL-1R1)结合片段的氨基酸序列。

89. 分离的核酸分子, 其包含

(a) 编码 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, 或 SEQ ID NO: 89 的核苷酸序列的等位变体、剪接变体的核苷酸序列, 或其组合、片段或变体;

(b) 编码氨基酸序列或其人白介素-1 受体型 1(IL-1R1)结合片段的核苷酸序列, 或其组合, 其与 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, 或 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列具有至少约 90% 同一性;

(c) 与(a) 或(b) 的核苷酸序列的互补序列在至少中等严格条件下杂交的核苷酸序列, 其中, 所编码的多肽具有白介素-1 受体型 1(IL-1R1)结合活性; 或

(d) 与(a)-(c) 中任一项的核苷酸序列互补的核苷酸序列。

90. 分离的核酸分子, 其包含

(a) 编码 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, 或 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列的核苷酸序列, 或其组合, 其中所述的氨基酸序列包含至少一个保守的氨基酸取代, 其中, 所述的氨基酸序列结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1);

(b) 编码 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ

ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, 或 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列的核苷酸序列, 或其组合, 其中所述的氨基酸序列包含至少一个氨基酸插入, 其中, 所述的氨基酸序列结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1);

(c) 编码 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, 或 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列的核苷酸序列, 或其组合, 其中所述的氨基酸序列包含至少一个氨基酸缺失, 其中, 所述的氨基酸序列结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1);

(d) 编码 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, 或 SEQ ID NO: 84 的氨基酸序列的核苷酸序列, 或其组合, 其中所述的氨基酸序列包含 N-末端或 C-末端截短或两者, 其中, 所述的氨基酸序列结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1);

(e) 包含至少约 16 个核苷酸的片段的(a)-(d) 中任一项的核苷酸序列

(f) 与(a) -(e)中任一项的核苷酸序列的互补序列在至少中等严格条件下杂交的核苷酸序列, 其中, 所编码的多肽具有白介素-1 受体型 1(IL-1R1)结合活性; 或

(g)与(a)-(f) 中任一项的核苷酸序列互补的核苷酸序列。

91. 权利要求 87-90 中任一项所述的分离的核酸分子, 其中所述的核酸分子编码抗体, 其是人源化抗体。

92. 权利要求 87-90 中任一项所述的分离的核酸分子, 其中所述

的核酸分子编码抗体，其是完全人抗体。

93. 包含权利要求 87-90 中任一项所述的核酸分子的载体。

94. 包含权利要求 93 所述载体的分离的宿主细胞。

95. 权利要求 94 的宿主细胞，其是真核细胞。

96. 权利要求 94 的宿主细胞，其是原核细胞。

97. 包含权利要求 93 所述载体的细胞系。

98. 制备抗体或其抗原结合片段的方法，其包括在适宜的条件下培养权利要求 94-96 中任一项所述的宿主细胞以表达所述的抗体或其抗原结合片段，可选择地，从所述培养物中分离所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体或其抗原结合片段具有白介素-1 受体型 1(IL-1R1)结合活性。

99. 权利要求 98 的方法制备的抗体或其抗原结合片段。

100. 权利要求 98 所述的方法，其中，所述的核酸分子包含不同于天然的抗体或其抗原结合片段的启动子 DNA 的启动子 DNA，其与编码所述抗体或其抗原结合片段的核酸序列可操作地连接。

101. 确定化合物是否抑制白介素-1 受体型 1(IL-1R1)结合活性或 IL-1R1 合成的方法，其包含将权利要求 94-96 的细胞暴露于所述的化合物，测定细胞中结合的 IL-1R1 的量。

102. 有效量的权利要求 99 的抗体在制备用于治疗或预防 IL-1 介导的疾病、病症或失调的药物中的用途。

103. 权利要求 102 所述的用途，其中，IL-1 介导的疾病、病症或失调选自：肺病、哮喘、慢性阻塞性肺病、肺泡蛋白质沉积、博来霉素诱导的肺病变、肺纤维样变性、自发性肺纤维样变性、放射诱导的肺纤维样变性、膀胱纤维样变性、肺中的胶原积累、急性呼吸窘迫综合症 (ARDS)、支气管肺发育不良 (BPD)、选自肺气肿和慢性支气管炎的慢性阻塞性肺病、慢性纤维样变性肺病、石棉肺、煤炭工人的尘肺、硅肺、bronchioliterans organizing pneumonia、肺肉样瘤病、过敏性鼻炎、接触性皮炎、特应性皮炎、糖尿病、炎性肠病、类风湿性关节炎和哮喘。

104. 包含可药用载体，赋形剂或稀释剂，以及权利要求 99 所述的抗体的组合物。

105. 包含可药用载体，赋形剂或稀释剂，以及治疗有效量的权

利要求 99 所述的抗体的组合物。

治疗性人抗-IL-1R1 单克隆抗体

本申请是申请日为 2003 年 9 月 5 日, 申请号为 03824846.8 的、发明名称和本发明相同的发明专利申请的分案申请。

本发明涉及并要求 2002 年 9 月 6 日提交的美国临时申请序号 60/408,719 的优先权, 其公开在此次被并入作为参考。

发明领域

本发明涉及结合白介素-1 受体型 1 (IL-1R1) 蛋白的抗体。还提供了用于治疗 IL-1 介导的疾病, 如类风湿性关节炎、骨关节炎和其他炎性病症的组合物, 特别是药物组合物和方法。

发明背景

抗体开发

炎症是身体对机械损伤、感染或抗原刺激导致的损伤的应答。炎症反应通常出现病理性地表达。当炎症以夸张方式表达, 被不适当地刺激或者有害剂被除去后仍然持续时, 出现这些病症。

炎症应答由细胞因子介导。目前发现的最有效的炎症细胞因子之一是白介素-1 (IL-1)。IL-1 信号增加导致与一些疾病有关的持续炎症, 并且认为 IL-1 是许多疾病和医学病症的关键介导剂。该细胞因子主要(尽管不是专门地)由巨噬细胞/单核细胞谱系的细胞产生并且可以以两种形式产生: IL-1 alpha (IL-1 α) 和 IL-1 beta (IL-1 β)。

IL-1 通过与异二聚体受体复合体相互作用刺激细胞应答, 该异二聚体受体复合体由两种跨膜蛋白: IL-1 受体型 1 (IL-1R1) 和 IL-1 受体辅助蛋白 (IL-1RAcP) 组成。IL-1 首先结合 IL-1R1; 然后 IL-1RAcP 被募集到该复合体 (Greenfeder 等人, 1995, J. Biol.Chem. 270: 13757-13765; Yoon 和 Dinarello, 1998, J. Immunology 160: 3170-3179; Cullinan 等人, 1998, J Immunology 161: 5614-5620), 接着是信号转导, 从而诱导细胞应答。

基于细胞的结合研究表明 IL-1RAcP 通过延缓配体离开速度来稳定 IL-1R 信号复合体 (Wesche 等人, 1998, FEBS Letters 429: 303-306)。尽管已经完全表征了 IL-1 和 IL-1R 的相互作用, 但

是 IL-1RAcP 与配体-结合的受体之间的相互作用仍然没有被较好地限定。因为 IL-1RAcP 与单独的 IL-1 或者 IL-1R1 都没有显著亲和性,但是与其复合体却有高亲和性,因此推断通过 IL-1/IL-1R 结合事件产生了 IL-1RAcP 的新的结合位点,该结合事件甚至包括 IL-1 残基的贡献(Ettorre 等人, 1997, *Eur. Cytokine Netw.* 8: 161-171)。另一种分子——IL-1 受体拮抗剂(IL-1ra)与 IL-1 α 和 IL-1 β 竞争受体结合但是不能募集 IL-1RAcP, 导致一种被占据但是无信号的受体。IL-1 活性还可以被 II 型 IL-1R 均衡, II 型 IL-1R 是一种引诱受体,其结合配体但是由于截断的细胞内结构域而不参与信号化。IL-1ra 和 II 型 IL-1R 降低 IL-1 介导的炎症事件的严重性和持续时间(Wesche 等人, 1998, *FEBS Letters* 429: 303-306; Dripps 等人, 1991, *J. Biol. Chem.* 266: 10331- 10336; Dripps 等人, 1991, *J. Biol. Chem.* 266: 20331-20335)。

可以从能够特异防止 IL-1 的细胞受体活化的任一种蛋白质产生白介素-1 抑制剂, 该活化的防止可以来自许多机理。这些机理包括下调 IL-1 产生、结合游离的 IL-1、干扰 IL-1 结合 IL-1R、干扰 IL-1R-IL-1RAcP 复合体的形成或者干扰 IL-1 与其受体结合后 IL-1 信号化的调节。IL-1 抑制剂的类别包括:

- 白介素-1 受体拮抗剂如 IL-1ra, 如下面描述的;

- 抗-IL-1R 单克隆抗体(例如, 如在公布的欧洲专利申请号 EP 623674 中公开的, 其公开在此处被并入作为参考);

- IL-1 结合蛋白, 如可溶性 IL-1 受体(例如, 如在美国专利号 5,492, 888; 5,488, 032、5,464, 937、5,319, 071 和 5,180, 812 中公开的, 它们的公开在此处被并入作为参考);

- 抗-IL-1 单克隆抗体(例如, 如在国际专利申请公布号 WO 9501997、WO 9402627、WO 9006371、美国专利号 4,935, 343、EP 364778、EP 267611 和 EP 220063 中公开的, 它们的公开在此处被并入作为参考);

- IL-1 受体辅助蛋白和其抗体(例如, 如在国际专利申请公布号 WO 96/23067 和 WO 99/37773 中公开的, 它们的公开在此处被并入作为参考); 和

- 白介素-1 β 转换酶抑制剂(ICE)或半胱天冬酶 I(例如, 如在国

际专利申请公布号 WO 99/46248、WO99/47545 和 WO 99/47154 中公开的，它们的公开在此处被并入作为参考)；它们可用于抑制 IL-1 β 产生和分泌；

- 白介素-1 β 蛋白酶抑制剂；和

- 其他化合物和蛋白质，它们阻断 IL-1 的体内合成或胞外释放。

示例性 IL-1 抑制剂在下面的参考文献中公开：美国专利号 5,747,444、5,359,032、5,608,035、5,843,905、5,359,032、5,866,576、5,869,660、5,869,315、5,872,095、5,955,480、和 5,965,564、国际专利申请公布号 WO98/21957、WO96/09323、WO91/17184、WO96/40907、WO98/32733、WO98/42325、WO98/44940、WO98/47892、WO98/56377、WO99/03837、WO99/06426、WO99/06042、WO91/17249、WO98/32733、WO98/17661、WO97/08174、WO95/34326、WO99/36426、和 WO99/36415、欧洲专利申请公布号 EP534978 和 EP89479、和法国专利申请号 FR 2762514。所有上述参考文献的公开在此处被并入作为参考。

白介素-1 受体拮抗剂 (IL-1ra) 是作为白介素-1 的天然抑制剂的一种人体蛋白并且是 IL-1 家族的一员，IL-1 家族包括 IL-1 α 和 IL-1 β 。优选的受体拮抗剂 (包括 IL-1ra 和其变体与衍生物)，以及其产生和使用方法在美国专利号 5,075,222、国际专利申请公布号 WO 91/08285、WO 91/17184、WO92/16221、WO93/21946、WO 94/06457、WO 94/21275、WO 94/21235、DE 4219626、WO 94/20517、WO 96/22793、WO97/28828、和 WO99/36541、澳大利亚专利申请号 AU9173636，和法国专利申请号 FR2706772 中公开，它们的公开在此处被并入作为参考。蛋白质包括 IL-1 受体拮抗剂的糖基化和非糖基化形式。

特别地，在美国专利号 5,075,222 ('222 专利) 中公开和描述了 IL-1ra 的 3 个有用的形式及其变体。IL-1ra α 通过 SDS-PAGE 被表征为一种 22-23 kD 的分子，等电点约为 4.8，在 Tris 缓冲液 (pH 7.6) 中约 52 mM NaCl 处从 Mono Q FPLC 中洗脱出来。IL-1ra β 被表征为 22-23 kD 蛋白，在 48 mM NaCl 处从 Mono Q 柱洗脱出来。IL-1ra α 和 IL-1ra β 都被糖基化。IL-1rax 被表征为 20 kD 蛋白，在 48 mM NaCl 处从 Mono Q 柱被洗脱出来，并且未被糖基化。'222 专利还公开了分离负责编码该抑制剂的基因、在适宜的载体和细胞类型中克隆该基

因,并表达该基因以产生抑制剂的方法。尽管该方法有效,但是 IL-1ra 的半衰期相对较短。在当前使用中, IL-1ra 被每天施用一次。具有相当长的半寿期的 IL-1 受体拮抗剂对于本领域是有益的。

通过抑制 IL-1 结合 IL-1 受体而防止 IL-1 信号化对于治疗 IL-1 介导的疾病是一种有吸引力的治疗方法。本领域中需要 IL-1 信号途径的临床上有有效的抑制剂,该抑制剂可以改善 IL-1 介导的疾病的作用并且适于被递送到人类患者中。阻碍 IL-1 信号化的人抗体对实现该需求尤其有利并且将提供比当前可利用的治疗更长的半寿期。

发明概述

本发明提供了结合白介素-1 受体型 1 (IL-1R1) 的单克隆抗体。优选地,该抗体通过与 IL-1 β 和 IL-1 α 竞争结合 IL-1R1 而抑制 IL-1 信号化。本发明还提供了杂交瘤细胞系,其产生,并且最优选地,向细胞培养基分泌本发明的单克隆抗体。本发明的抗体成功地阻断人细胞中的 IL-1 信号化并从而可用于治疗患有 IL-1 介导的疾病的患者。本发明还提供了融合蛋白,其含有抗体 Fc 区的序列和选自 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 38、和 SEQ ID NO: 40 的一种或多种序列。可以使用如,例如,WO 00/24782 中描述的方法制备这些分子,WO 00/24782 在此处被并入作为参考。这些分子可以例如,在哺乳动物细胞(例如,中国仓鼠卵巢细胞)或者细菌细胞(例如,大肠杆菌细胞)中表达。

在某些方面,本发明提供了抗体,优选单克隆抗体,最优选人抗体,它们含有重链和轻链,其中重链含有如在 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 任一个中提出的氨基酸序列,或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

本发明还提供了抗体,优选单克隆抗体,最优选人抗体,其含有重链和轻链,其中轻链含有如在 SEQ ID NO: 4 中提出的氨基酸序列,或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

在某些方面,本发明的抗体含有重链和轻链,其中重链的可变区含有如在 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 14、或 SEQ ID NO: 16 任一

个中提出的氨基酸序列,或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。在其他方面,轻链可变区含有如在 SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 18 任一个中提出的氨基酸序列,或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。在另外的方面,重链含有如在 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、或 SEQ ID NO: 36 任一个中提出的氨基酸序列,或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。在其他方面,轻链含有如在 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40 任一个中提出的氨基酸序列,或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。这些抗体链可用于制备特异结合 IL-1R1 的抗体,还可以用于制备双特异抗体,其中所得分子结合 IL-1R1 和/或另一种靶分子(例如, TNF 或 TNF 受体)。

本发明还提供了特异结合 IL-1R1 的抗体,其中重链包含含有 SEQ ID NO: 10 中提出的氨基酸序列的重链可变区,或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段,轻链包含含有 SEQ ID NO: 12 中提出的氨基酸序列的轻链可变区,或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

在某些方面,本发明还提供了含有重链和轻链的抗体,其中重链含有第一可变区,并且其中第一可变区含有与 SEQ ID NO: 10 中提出的氨基酸序列具有至少 90%,更优选至少 95%,最优选约 99%的同一性的序列,其中轻链含有第二可变区,其中第二可变区含有与 SEQ ID NO: 12 中提出的氨基酸序列具有至少 90%,更优选至少 95%,最优选约 99%的同一性的序列,其中该抗体与 IL-1R1 相互作用。

本发明还提供了特异结合 IL-1R1 的抗体,其中重链包含含有如 SEQ ID NO: 14 中提出的氨基酸序列的重链可变区,或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段,轻链包含含有如 SEQ ID NO: 12 中提出的氨基酸序列的轻链可变区,或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

在某些方面,本发明提供了含有重链和轻链的抗体,其中重链含有第一可变区,并且其中第一可变区含有与 SEQ ID NO: 14 中提出的氨基酸序列具有至少 90%,更优选至少 95%,最优选约 99%的同一性

的序列，并且其中轻链含有第二可变区，其中第二可变区含有与 SEQ ID NO: 12 中提出的氨基酸序列具有至少 90%，更优选至少 95%，最优选约 99% 的同一性的序列，其中该抗体与 IL-1R1 相互作用。

本发明还提供了特异结合 IL-1R1 的抗体，其中重链包含含有如 SEQ ID NO: 16 中提出的氨基酸序列的重链可变区，或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段，并且轻链包含含有如 SEQ ID NO: 18 中提出的氨基酸序列的轻链可变区，或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

在某些方面，本发明提供了含有重链和轻链的抗体，其中重链含有第一可变区，并且其中第一可变区含有与 SEQ ID NO: 16 中提出的氨基酸序列具有至少 90%，更优选至少 95%，最优选约 99% 的同一性的序列，并且其中轻链含有第二可变区，其中第二可变区含有与 SEQ ID NO: 18 中提出的氨基酸序列具有至少 90%，更优选至少 95%，最优选约 99% 的同一性的序列，其中该抗体与 IL-1R1 相互作用。

本发明还提供了特异结合 IL-1R1 的抗体，其中重链含有如 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、或 SEQ ID NO: 30 中提出的氨基酸序列，或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段，并且轻链含有如 SEQ ID NO: 38 中提出的氨基酸序列，或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

本发明还提供了特异结合 IL-1R1 的抗体，其中重链含有如 SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、或 SEQ ID NO: 36 中提出的氨基酸序列，或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段，并且轻链含有如 SEQ ID NO: 40 中提出的氨基酸序列，或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

本发明还提供了所有前述的实施方案，它们是单链抗体、单链 Fv 抗体、Fab 抗体、Fab' 抗体和 (Fab')₂ 抗体。

在具体方面，本发明提供了含有如 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40 任一个中提出的氨基酸序列的轻链，或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

此外，本发明提供了含有如 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、

SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34 或 SEQ ID NO: 36 任一个中提出的氨基酸序列的重链,或者其抗原结合片段或其具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

本发明还涉及分离的人抗体,其特异结合 IL-1R1,其中该抗体含有:(a)人重链框架区、人重链 CDR1 区、人重链 CDR2 区,和人重链 CDR3 区;和(b)人轻链框架区、人轻链 CDR1 区、人轻链 CDR2 区,和人轻链 CDR3 区。在某些方面,人重链 CDR1 区可以是如图 10 中所示的 26F5、27F2 或 15C4 的重链 CDR1 区,人轻链 CDR1 区可以是如图 11 中所示的 26F5、27F2 或 15C4 的轻链 CDR1 区。在其他方面,人重链 CDR2 区可以是如图 10 中所示的 26F5、27F2 或 15C4 的重链 CDR2 区,人轻链 CDR2 区可以是如图 11 中所示的 26F5、27F2 或 15C4 的轻链 CDR2 区。在其他方面,人重链 CDR3 区可以是如图 10 中所示的 26F5、27F2 或 15C4 的重链 CDR3 区,人轻链 CDR3 区可以是如图 11 中所示的 26F5、27F2 或 15C4 的轻链 CDR3 区。

此外,本发明提供了分离的人抗体,其特异结合白介素-1 受体 1 型(IL-1R1),该抗体含有:人重链 CDR1 区,其中重链 CDR1 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62 或 SEQ ID NO: 63;人重链 CDR2 区,其中重链 CDR2 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65 或 SEQ ID NO: 66;和/或人重链 CDR3 区,其中重链 CDR3 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68 或 SEQ ID NO: 69。

本发明还提供了分离的人抗体,其特异结合白介素-1 受体型 1(IL-1R1),该抗体含有:人轻链 CDR1 区,其中轻链 CDR1 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 70 或 SEQ ID NO: 71;人轻链 CDR2 区,其中轻链 CDR2 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 72 或 SEQ ID NO: 73;和/或人轻链 CDR3 区,其中轻链 CDR3 具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 74 或 SEQ ID NO: 75。

在一些实施方案中,本发明的抗体结合 IL-1R1 的第三个结构域,该结构域在图 17 中显示。优选地,本发明抗体的表位由氨基酸序列 YSV 组成,其在此处被称为表位 4 并且在图 24 中显示。本发明还涉及融合蛋白和能够结合表位 4 的其他分子(与上述抗体在此处统称为“特异结合配偶体”),如使用如,例如,W000/24782 中描述的方法可以制备的分子,该文献在此处并入作为参考。可以在例如,哺乳动

物细胞(例如,中国仓鼠卵巢细胞)或细菌细胞(例如,大肠杆菌细胞)中表达这些分子。

此外,本发明提供了所选抗原的表位作图方法。一方面,本发明包括步骤:(a)产生一组融合蛋白,其中每种融合蛋白含有(i)抗生物素蛋白和(ii)抗原的片段;(b)筛选与所述抗原的一种或多种特异结合配偶体结合的融合蛋白组;(c)在含有生物素的介质上分离融合蛋白,其中抗生物素蛋白结合生物素;和(d)分析被特异结合配偶体结合的融合蛋白以确定该特异结合配偶体在该抗原上的结合位点。在具体方面,特异结合配偶体是抗体。

在另外实施方案中,本发明提供了治疗 IL-1 介导的疾病、病症或失调的方法,该方法包括对需要该治疗的个体施用药学有效量的一种或多种本发明的单克隆抗体或者其抗原结合或具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。

本发明还提供了检测生物样品中 IL-1R1 的水平的方法,该方法包括将样品与本发明的单克隆抗体或者其抗原结合片段接触。本发明的抗-IL-1R 抗体可用于任一公知的测定方法,如竞争结合测定法、直接和间接三明治测定法、免疫沉淀测定法和酶联免疫吸附测定法(ELISA)(见, Sola, 1987, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, 147-158 页, CRC Press, Inc.)中,以检测和定量 IL-1R。抗体可结合 IL-1R, 其亲和力适于所用的测定方法。

从下面的一些优选的实施方案的更详细描述和权利要求,本发明的特别优选的实施方案将变得显而易见。

附图简述

图 1A-1B 描绘编码人抗-IL-1R1 抗体重链 IgG1 恒定区的 cDNA 序列(SEQ ID NO: 1)(图 1A)和人抗-IL-1R1 抗体重链 IgG1 恒定区的氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)(图 1B)。

图 2A-2B 描绘编码人抗-IL-1R1 抗体 κ 链恒定区的 cDNA 序列(SEQ ID NO: 3)(图 2A)和人抗-IL-1R1 抗体 κ 链恒定区的氨基酸序列(SEQ ID NO: 4)(图 2B)。

图 3A-3B 描绘编码人抗-IL-1R1 抗体重链 IgG2 恒定区的 cDNA 序列(SEQ ID NO: 5)(图 3A)和人抗-IL-1R1 抗体重链 IgG2 恒定区的氨基酸序列(SEQ ID NO: 6)(图 3B)。

图 4A-4B 描绘编码人抗-IL-1R1 抗体重链 IgG4 恒定区的 cDNA 序列 (SEQ ID NO: 7) (图 4A) 和人抗-IL-1R1 抗体重链 IgG4 恒定区的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 8) (图 4B)。

图 5A-5B 描绘编码 26F5 抗-IL-1R1 抗体重链可变区的 cDNA 序列 (SEQ ID NO: 9) (图 5A) 和 26F5 抗-IL-1R1 抗体重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 10) (图 5B)。

图 6A-6B 描绘编码 26F5 抗-IL-1R1 抗体 κ 链可变区的 cDNA 序列 (SEQ ID NO: 11) (图 6A) 和 26F5 抗-IL-1R1 抗体 κ 链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 12) (图 6B)。

图 7A-7B 描绘编码 27F2 抗-IL-1R1 抗体重链可变区的 cDNA 序列 (SEQ ID NO: 13) (图 7A) 和 27F2 抗-IL-1R1 抗体重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 14) (图 7B)。

图 8A-8B 描绘编码 15C4 抗-IL-1R1 抗体重链可变区的 cDNA 序列 (SEQ ID NO: 15) (图 8A) 和 15C4 抗-IL-1R1 抗体重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 16) (图 8B)。

图 9A-9B 描绘编码 15C4 抗-IL-1R1 抗体 κ 链可变区的 cDNA 序列 (SEQ ID NO: 17) (图 9A) 和 15C4 抗-IL-1R1 抗体 κ 链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 18) (图 9B)。

图 10 显示了命名为 15C4 (SEQ ID NO: 80)、27F2 (SEQ ID NO: 82) 和 26F5 (SEQ ID NO: 84) 的抗-IL-1R1 抗体的重链的氨基酸序列比对。互补决定区 (CDRs) 被下划线标出。26F5 的 CDR1 被指定为 SEQ ID NO: 61; 27F2 的 CDR1 被指定为 SEQ ID NO: 62; 15C4 的 CDR1 被指定为 SEQ ID NO: 63。26F5 的 CDR2 被指定为 SEQ ID NO: 64; 27F2 的 CDR2 被指定为 SEQ ID NO: 65; 15C4 的 CDR2 被指定为 SEQ ID NO: 66。26F5 的 CDR3 被指定为 SEQ ID NO: 67; 27F2 的 CDR3 被指定为 SEQ ID NO: 68; 15C4 的 CDR3 被指定为 SEQ ID NO: 69。

图 11 显示了命名为 15C4 (SEQ ID NO: 81)、27F2 (SEQ ID NO: 83) 和 26F5 (SEQ ID NO: 83) 的抗-IL-1R1- γ 抗体的轻链的氨基酸序列比对。26F5/27F2 的 CDR1 被指定为 SEQ ID NO: 70; 15C4 的 CDR1 被指定为 SEQ ID NO: 71。26F5/27F2 的 CDR2 被指定为 SEQ ID NO: 72; 15C4 的 CDR2 被指定为 SEQ ID NO: 73。26F5/27F2 的 CDR3 被指定为 SEQ ID NO: 74; 15C4 的 CDR3 被指定为 SEQ ID NO: 75。

图 12 图解了抗-IL-1R1 抗体对 IL-1R/IL-1 β /IL-1RacP 复合体形成的抑制作用。

图 13 图解了如此处描述并且被命名为 15C4 的抗-IL-1R1 单克隆抗体对 IL-1R/IL-1 α /IL-1RacP 复合体形成的抑制作用。

图 14 表示抗-IL-1R1 抗体与 IgG 对照相比，阻断 IL-1 β 结合而不显著干扰 IL-1ra 结合。

图 15A 显示与 IL-1ra 相比在此处鉴定被命名为 15C4、26F5 和 27F2 的抗-IL-1R1 抗体抑制原代人软骨细胞中 IL-6 的产生。

图 15B 显示与 10H7 和 24E12 代表的单克隆抗体类相比，IL-1ra 和单克隆抗体 15C4 和 27F2 抑制原代人软骨细胞中 IL-6 的产生。

图 16 显示与 IL-1ra 相比被命名为 15C4、26F5 和 27F2 的抗-IL-1R1 单克隆抗体抑制人全血中 IL-6 的产生。

图 17 描绘了人氨基酸 (SEQ ID NO: 76) 和核苷酸 (SEQ ID NO: 77) 和大鼠核苷酸 (SEQ ID NO: 78) 和氨基酸 (SEQ ID NO: 79) 第三个结构域 IL-1R1 序列。人序列上编号的横条指出 15 个不同的突变位点，它们用于构建 15 种不同的突变蛋白。通过突变导入的大鼠残基在大鼠核酸序列下列出。

图 18 显示了蛋白质印迹分析，证明 IL-1R1 突变体的抗-IL-1R1 单克隆抗体识别。

图 19 表示 (I) IL-1 信号途径的活化，其以 IL-1 β 与 IL-1R1 的结合和 IL-1RacP 的募集开始，和三类抗-IL-1R1 抗体：(II) 第三结构域表位 IL-1 阻断剂，(III) 第三结构域表位 RacP 阻断剂，和 (IV) 第一/第二个结构域表位 IL-1 阻断剂。

图 20 描绘了具有如此处描述的突变 10 的 15C4 和 27F2 的晶体结构。灰色残基表示 15C4 和 27F2 表位。

图 21 描绘了胞外 IL-1R1 的第三个结构域中的 15C4 表位。

图 22 描绘了胞外 IL-1R1 的第三个结构域中的 24E12 表位。

图 23 描绘了本发明的抗生物素蛋白-人 IL-1R1-FLAG 嵌合蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 59)。

图 24 描绘了抗生物素蛋白-猕猴 IL-1R1-FLAG 嵌合蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 60)。重组鸡抗生物素蛋白 (斜体) 通过 6 个氨基酸组成的连接体连接到猕猴 IL-1R1 的成熟胞外结构域 (下划线标出，C-

末端 FLAG 标记为粗体)。单独或者组合导入猕猴序列的人 IL-1R1 的四个氨基酸在猕猴序列下用粗体表示。表位 4 用粗体、斜体和下划线表示。

图 25A 显示了结合 IL-1R1 的抗-人 IL1-R1 抗体(抗-huIL1-R1)的蛋白质印迹分析。*指示以 5 μ g/mL 使用的抗体,而剩余的抗体以 1 μ g/mL 使用。

图 25B 显示了一式两份的蛋白质印迹实验的光密度分析概况。

图 26 表示复合的基于珠子的结合测定法中抗 huIL1R1 抗体与抗生物素蛋白 IL-1R1-FLAG 蛋白的结合。

一些优选实施方案的详细描述

此处所用的章节标题仅用于组织的目的,不应被理解为限制所描述的主题。该申请中引用的所有参考文献在此次为了任何目的被特别地并入作为参考。

定义

如果天然发生的或者实验诱导的疾病或者医学病症与体液或者组织中 IL-1 的水平升高有关或者如果从身体得到的细胞或者组织在培养中产生水平升高的 IL-1,那么疾病或者医学病症被认为是“白介素-1(IL-1)介导的疾病”。IL-1 的升高的水平可以包括,例如,超过在具体细胞或组织中正常发现的水平的水平,或者可以是在通常不表达 IL-1 的细胞或组织中可检测的 IL-1 水平。在许多情况中,IL-1 介导的疾病也被下面的额外的两个条件识别:通过使用 IL-1 或者 IL-1 的表达的上调可以在动物中通过实验模拟的与疾病或医学病症相关的病理发现;和(2)用抑制 IL-1 作用的试剂处理可以抑制或者消除在该疾病或者医学病症的实验动物模型中诱导的病理。在多数 IL-1 介导的疾病中,三个条件中的至少两个被满足,在许多 IL-1 介导的疾病中,所有三个条件都被满足。

急性和慢性 IL-1-介导的疾病的非排他性列表包括但不限于下面的:急性胰腺炎、amyelolaterosclerosis (ALS)、阿尔茨海默氏病、恶病质/厌食,包括 AIDS-诱导的恶病质;哮喘和其他肺病、动脉粥样硬化、自身免疫血管炎、慢性疲劳综合症、梭状芽孢杆菌相关的疾病,包括梭状芽孢杆菌相关的腹泻;冠状病症和适应症,包括充血性心力衰竭、冠状再狭窄、心肌梗塞、心肌功能异常(例如,与脓毒相

关), 和冠状动脉旁路移植; 癌, 如多发性骨髓瘤和骨髓性(例如, AML 或 CML) 和其他白血病, 以及肿瘤转移、糖尿病(例如, 依赖胰岛素的糖尿病)、子宫内膜异位症、发热、fibromyalgia、肾小球性肾炎、移植物抗宿主病/移植排斥、出血性休克、感觉过敏、炎性肠病、关节的炎性病症, 包括骨关节炎、牛皮癣关节炎和类风湿性关节炎; 炎性眼病, 如可能与例如角膜移植有关的炎性眼病; 局部缺血, 包括脑局部缺血(例如, 由于创伤导致的脑损伤、癫痫、出血或中风, 它们的每一种都可以导致神经退化); 川崎病; 学习损伤; 肺病(例如, ARDS); 多发性硬化; 肌病(例如, 肌蛋白代谢, 特别是脓毒症中); 神经毒性(例如, HIV 诱导的); 骨质疏松; 疼痛, 包括癌相关的疼痛; 帕金森病、牙周病、pre-term labor、牛皮癣、再灌注损伤、脓毒性休克、放射治疗的副作用、颞颥关节病、睡眠障碍、葡萄膜炎; 或者损伤、扭伤、软骨损伤、外伤、矫形手术、感染或其他疾病过程导致的炎症。下面描述了治疗这些急性和慢性 IL-1 介导的疾病以及其他 IL-1-介导的病症和疾病的本发明方法。

可以用常规技术制备重组 DNA、进行寡核苷酸合成, 和实施组织培养和转化(例如, 电穿孔、转染或脂转染)。可以根据生产商的说明书或者如本领域中通常完成的或者如本文中描述的实施酶反应和纯化技术。可以根据本领域中熟知的常规方法或者如本说明书中引用和讨论的各种一般性和更具体的参考文献中描述的实施前面的技术和方法。见, 例如, Sambrook 等人, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 其在此处为了任一目的被并入作为参考。除非提供具体定义, 此处描述的与分析化学、合成有机化学, 和医学和药物化学有关的术语和实验方法是本领域中熟知的并且通常用于本领域。标准技术可用于化学合成、化学分析、药物制备、制剂和递送, 和患者的治疗。

如按照本公开所用的, 下面的术语, 除非特别说明, 将被理解为具有下面的意思:

术语“分离的多核苷酸”指主题多核苷酸, (1) 不与其他多核苷酸的所有或一部分结合(共价或非共价), 该主题多核苷酸在天然中与这些其他多核苷酸结合, (2) 与一种分子结合, 该主题多核苷酸在天

然中不与该分子结合，或者(3)天然不与任何其他多核苷酸结合。这种分离的多核苷酸可以是基因组 DNA、cDNA、mRNA 或合成的其他 RNA，或者它们的组合。

术语“分离的蛋白”在此处指主题蛋白(1)没有至少一些其他蛋白，这些蛋白通常被发现与主题蛋白在一起，(2)基本上无来自相同来源，例如，来自相同物种的其他蛋白，(3)被不同物种的细胞表达，(4)已经与至少 50%的多核苷酸、脂质、糖类或自然界中与主题物质在一起的其他物质分开，(5)不与天然状态下通常与“分离的蛋白”结合的蛋白质的部分结合(共价或非共价相互作用)，(6)可操作地与一种多肽结合(通过共价或非共价相互作用)，自然中主题蛋白通常不与该多肽结合，或者(7)不在自然中发生。基因组 DNA、cDNA、mRNA 或者合成来源的其他 RNA，或者它们的任一组合可以编码这种分离的蛋白。优选地，该分离的蛋白基本上不含有在其天然环境中发现的蛋白质或多肽或者其他污染物，这些蛋白质或多肽或者其他污染物将干扰该分离的蛋白质的治疗、诊断、预防、研究或其他的用途。

术语“多肽”或者“蛋白质”指一条或多条氨基酸链，其中每条链含有通过肽键共价连接的氨基酸，并且其中所述多肽或蛋白质可以包含非共价地和/或通过肽键共价连接的多条链，这些链具有天然蛋白的序列，即，通过天然发生的和特异非重组细胞，或者基因工程化的或者重组细胞产生蛋白质，并且包括具有天然蛋白质的氨基酸序列的分子，或者通过天然序列的一个或多个氨基酸的缺失、加入和/或置换得到的分子。术语“多肽”和“蛋白质”特别包括抗-IL1-R1 抗体，或者抗-ILR-1R1 抗体的一个或多个氨基酸的缺失、加入和/或置换得到的序列。从而，“多肽”或“蛋白质”可以包括一条(称为“单体”)或多条(称为“多体”)氨基酸链。

术语“多肽片段”指多肽，其可以是单体或多体的，该多肽具有天然发生的或重组产生的多肽的氨基末端缺失、羧基末端缺失，和/或内部缺失或置换。在一些实施方案中，多肽片段可含有至少 5 到约 500 个氨基酸长的氨基酸链。将明白在一些实施方案中，片段长为至少 5、6、8、10、14、20、50、70、100、110、150、200、250、300、350、400、或 450 个氨基酸。特别有用的多肽片段包括功能结构域，包括结合结构域。对于抗-IL1-R1 抗体，有用的片段包括，但不限于：

CDR 区，特别是重或轻链的 CDR3 区；重或轻链的可变结构域；抗体链的一部分或者其仅仅包括两个 CDR 的可变区；等等。

如此处所用的术语“具有免疫学功能的免疫球蛋白片段”指至少含有免疫球蛋白重链和轻链的可变结构域的多肽片段。本发明的有免疫学功能的免疫球蛋白片段能够结合配体，防止配体与其受体的结合，中断配体结合其受体导致的生物学应答，或者它们的任一组合。优选地，本发明的具有免疫学功能的免疫球蛋白片段特异结合 IL-1R1。

术语“天然发生的”和“天然的”指用此术语的生物学材料(分子、序列、蛋白质复合体、细胞，等)可以在自然界中发现并且没有受到人的操作。例如，存在于可从天然来源分离并且没有被人有意地修饰的生物(包括病毒)中的多肽或者多核苷酸序列是天然发生的。同样，术语“非天然发生的”或者“非-天然的”指未在自然界中发现或者被人进行结构修饰或者合成的材料。

术语“可操作地连接”指该术语所指的组分处于一种关系中，该关系允许这些组分在适宜的条件下发挥它们的内在功能。例如，指控制序列“可操作地连接”到蛋白质编码序列，指控制序列连接到该蛋白质编码序列，从而在与控制序列的转录活性相容的条件下实现蛋白质编码序列的表达。

术语“控制序列”指主题多核苷酸序列可以影响其所连接的编码序列的表达和加工。这些控制序列的性质可取决于宿主生物。在具体实施方案中，原核生物的控制序列可以包括启动子、核糖体结合位点，和转录终止序列。在其他具体实施方案中，真核生物的控制序列可包括启动子，其含有转录因子的一个或多个识别位点、转录增强子序列，和转录终止序列。在特定实施方案中，“控制序列”可包括引导序列和/或融合配偶体序列。

术语“多核苷酸”指长至少 10 个碱基的单链或双链核酸聚合物。在一些实施方案中，含有核苷酸的多核苷酸可以是核糖核苷酸或者脱氧核糖核苷酸或者任一类型的核苷酸的修饰形式。所述修饰包括碱基修饰如溴尿苷和次黄苷衍生物，核糖衍生物如 2', 3'-二脱氧核糖，和核苷酸间键修饰如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、phosphoroanilothioate、phosphoraniladate 和

phosphoroamidate。该术语 DNA 的单链和双链形式。

术语“寡核苷酸”指含有长 200 个或更少碱基的多核苷酸。在优选的实施方案中，寡核苷酸长为 10 到 60 个碱基。在更优选的实施方案中，寡核苷酸长为 12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 到 40 个碱基。寡核苷酸可以是单链或双链的，例如，用于构建突变基因。本发明的寡核苷酸可以是有义或反义寡核苷酸。

术语“天然发生的寡核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。术语“修饰的核苷酸”包括具有修饰的或取代的糖基或者修饰的或取代的碱基的核苷酸。术语“寡核苷酸键”包括如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、phosphoroanilothioate、phosphoraniladate 和 phosphoroamidate 等的键。见，例如，LaPlanche 等人 (1986), Nucl. Acids Res 14: 9081 ; Stec 等人 (1984), J. Am. Chem. Soc. 106: 6077; Stein 等人 (1988), Nucl. Acids Res. 16: 3209 ; Zon 等人 (1991), Anti-Cancer Drug Design 6: 539; Zon 等人 (1991), Oligonucleotides and Analogues : A Practical Approach, 87-108 页 (F. Eckstein, 编者), Oxford University Press, Oxford England; Stec 等人, 美国专利号 5,151, 510; Uhlmann 和 Peyman (1990), Chemical Reviews 90: 543, 这些文献的公开在此为了任何目的被并入作为参考。本发明的寡核苷酸可以含有标记，包括放射标记、荧光标记、半抗原或抗原性标记，以用于检测测定法。

术语“载体”指用于将编码信息转移到宿主细胞的任一种分子(例如，核酸、质粒、或病毒)。

术语“表达载体”或“表达构建体”指适于转化宿主细胞的载体并且该载体含有核酸序列，该核酸序列指导和/或控制(与宿主细胞联合)可操作地连接到该核酸序列的一个或多个异源编码区的表达。表达载体可包括，但不限于，一些序列，该序列影响或控制与其可操作地连接的编码区的转录、翻译和 RNA 剪接(如果存在内含子)。

术语“宿主细胞”指已经或者能够用核酸序列转化并从而表达所选的目标基因的细胞。该术语包括亲本细胞的后代，无论该后代与原来的亲本细胞在形态或基因组成上是否相同，只要后代存在所选基因即可。

术语“转导”指通常通过噬菌体将基因从一个细菌转移到另一细

菌。“转导”还指通过逆转录病毒的真核细胞序列的获得和转移。

术语“转染”指外来或外源 DNA 被细胞摄入，当该外源 DNA 已经被导入细胞膜内时，该细胞已经被“转染”。许多转染技术是本领域熟知的并且在本文中公开。见例如，Graham 等人，1973, *Virology* 52: 456; Sambrook 等人，2001, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Id. ; Davis 等人，1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; 和 Chu 等人，1981, *Gene* 13 : 197。这些技术可用于将一种或多种外源 DNA 部分导入适宜的宿主细胞。

术语“转化”指细胞遗传特征的变化，当其被修饰而含有新 DNA 时，该细胞已经被转化。例如，当通过转染、转导或其他技术使细胞从其天然状态被遗传修饰时，该细胞被转化。转染或转导后，转化 DNA 可以通过物理整合到细胞的染色体与细胞的 DNA 重组，或者可以作为附加体元件暂时保留而不被复制，或者可以作为质粒独立地复制。当转化 DNA 随着细胞的分离而复制时，认为细胞已经被“稳定转化”。

术语“抗原”指能够被选择性结合剂，如抗体结合，并且还能够用于动物中以产生能够结合该抗原的一个表位的抗体的分子或者分子的一部分。一个抗原可以具有一个或多个表位。

术语“表位”包括任一决定簇，优选多肽决定簇，其能够特异结合免疫球蛋白或 T-细胞受体。在一些实施方案中，表位决定簇包括分子的化学活性表面基团，如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基，并且，在一些实施方案中，可以具有特定三维结构特征，和/或特定电荷特征。表位是被抗体结合的抗原的一个区域。在一些实施方案中，当抗体优先识别蛋白质和/或大分子的复杂混合物中其靶标抗原时，可以说该抗体特异结合抗原。在优选的实施方案中，当解离常数小于或等于约 10 nM，更优选地，当解离常数小于或等于约 100 pM 时，最优选地，当解离常数小于或等于约 10 pM 时，可以说该抗体特异结合抗原。

术语“同一性”指两个或多个多肽分子或者两个或多个核酸分子序列之间的关系，该关系通过比较它们的序列确定。在本领域中，“同一性”还指核酸分子或者多肽序列相关性的程度，这可以通过两个或多个核苷酸或两个或多个氨基酸的序列之间的匹配来确定。“同一

性”测量两个或多个序列的较小者之间相同匹配的百分数，用特定数学模型或计算机程序(即，“算法”)处理缺口比对(如果存在)。

术语“相似性”关于相关的概念用于本领域中；然而，与“同一性”相比，“相似性”指对相关性的—种量度，其包括相同匹配和保守置换匹配。如果两个多肽序列有，例如，10/20个相同氨基酸，并且剩余的都是非-保守置换，那么同一性和相似性百分数将都是50%。如果在相同实例中，还有5个位置有保守置换，那么同源性百分数仍然为50%，但是相似性百分数将是75%(15/20)。因此，对于有保守置换的情况，两个多肽之间的相似性百分数将高于那两个多肽之间的同一性百分数。

可以通过公知的方法容易地计算有关核酸和多肽的同一性和相似性。这些方法包括，但不限于，《计算分子生物学》(Lesk, A. M., 编者), 1988, Oxford University Press, New York; 《生物计算：信息学和基因组计划》(Smith, D. W., ed.), 1993, Academic Press, New York; 《序列数据的计算机分析》，第一部，(Griffin, A. M., 和 Griffin, H. G., 编者), 1994, Humana Press, New Jersey; von Heinje, G., 《分子生物学中的序列分析》，1987, Academic Press; 《序列分析引物》(Gribskov, M. and Devereux, J., 编者), 1991, M. Stockton Press, New York; Carillo 等人, 1988, SIAM J. Applied Math. 48: 1073; 和 Durbin 等人, 1998, 生物序列分析, Cambridge University Press。

确定同一性的优选方法被设计用以得到所检查的序列之间的最大匹配。确定同一性的方法在公开的可得到的计算机程序中描述。确定两个序列之间同一性的优选计算机程序方法包括，但不限于，GCG 程序包，包括 GAP (Devereux 等人, 1984, Nucl. Acid. Res. 12: 387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)、BLASTP、BLASTN 和 FASTA (Altschul 等人, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410)。BLASTX 程序可以公开地从国际生物技术信息中心 (NCBI) 和其他来源 (BLAST 手册, Altschul 等, NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul 等人, 1990, 如前) 得到。熟知的 Smith Waterman 算法也可用于确定同一性。

用于比对两个氨基酸序列的一些比对方案可导致这两个序列的

仅仅短的区域匹配,并且该小的比对区域可能具有非常高的序列同一性,即使这两个全长序列之间没有明显的关系。因此,在一些实施方案中,所选择的比对方法(GAP程序)将导致一种比对,其横跨靶标多肽的至少50个相邻氨基酸。

例如,使用计算机算法GAP(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI),比对两个多肽以得到它们的各自氨基酸的最佳匹配(“匹配的跨度”,如该算法所确定的),从而确定这两个多肽的序列同一性百分比。在一些实施方案中,缺口开口罚分(其被计算为三倍平均对角线,其中“平均对角线”是所用的比较矩阵的对角线平均值;“对角线”是具体比较矩阵分配给每个完全氨基酸匹配的得分或数字)和缺口延伸罚分(其通常是缺口开口罚分的十分之一),以及比较矩阵如PAM250或BLOSUM 62与算法结合使用。在一些实施方案中,算法也使用标准比较矩阵(对于PAM250比较矩阵,见Dayhoff等人,1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5: 345-352; 对于BLOSUM 62比较矩阵,见Henikoff等人,1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 10915-10919)。

在一些实施方案中,多肽序列比较的参数包括下面的:

算法: Needleman等人(1970), J. Mol. Biol. 48: 443-453;

比较矩阵: Henikoff等人(1992)(如前)的BLOSUM 62;

缺口罚分: 12

缺口长度罚分: 4

相似性阈值: 0

GAP程序可以使用上面的参数。在一些实施方案中,上述参数是使用GAP算法比较多肽的默认参数(对于末端缺口无罚分)。

术语“天然发生的”用于氨基酸,指20种常见氨基酸。见Immunology--A Synthesis, 第二版, (E. S. Golub和D. R. Gren, 编者), Sinauer Associates: Sunderland, MA (1991), 其在此处为了任何目的被并入作为参考。

多肽类似物通常用于制药工业作为非肽药物,其具有类似于模板肽的性质。这些非-肽化合物类型被称为“肽模拟物”。见Fauchere (1986), Adv. Drug Res. 15: 29; Veber & Freidinger, 1985, TINS 392页; 和Evans等人(1987), J. Med. Chem. 30: 1229, 这些文献在

此处为了任何目的被并入作为参考。通常通过计算机分子建模来开发这些化合物。结构类似于用于治疗的多肽的肽模拟物可用于产生类似的治疗或预防效果。通常，肽模拟物结构上类似于范例肽或者多肽(即，具有生化性质或药理学活性的肽或多肽)，如人抗体，但是具有一个或多个肽连接，其任选通过本领域中熟知的方法用选自 $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (顺式和反式)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 、和 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 的连接代替。在一些实施方案中，可以将共有序列的一个或多个氨基酸用相同类型的D-氨基酸(例如，D-赖氨酸置换L-赖氨酸)进行系统的置换以产生更稳定的肽。此外，通过本领域中公知的方法(Rizo & Gierasch, 1992, Ann. Rev. Biochem. 61: 387, 此处为了任何目的并入作为参考)；例如，通过加入能够形成分子内二硫键以环化该肽的内部半胱氨酸残基，可以产生含有共有序列或者基本上相同的共有序列变异的约束肽。

“抗体”或“抗体肽”指完整抗体，或者其结合片段，该结合片段与完整抗体竞争特异结合，抗体或抗体肽包括嵌合抗体、人源化抗体、完全人的抗体和双特异抗体。在一些实施方案中，通过重组DNA技术产生结合片段。在额外的实施方案中，通过完整抗体的酶或化学切割产生结合片段。结合片段包括，但不限于，Fab、Fab'、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、Fv、和单链抗体。

术语“重链”包括全长重链和其片段，该片段具有足够的可变区序列而赋予对IL-1R1的特异性。全长重链包括可变区结构域、 V_H 和三个恒定区结构域： C_H1 、 C_H2 和 C_H3 。 V_H 结构域在多肽的氨基末端， C_H3 结构域在羧基末端。

术语“轻链”包括全长轻链和其片段，该片段具有足够的可变区序列而赋予对IL-1R1的特异性。全长轻链包括可变区结构域、 V_L 和恒定区结构域 C_L 。类似重链，轻链的可变区结构域在多肽的氨基末端。

“Fab片段”由一条轻链和一条重链的 C_H1 和可变区组成。Fab分子的重链不能与另一重链分子形成二硫键。

“Fab'片段”含有一条轻链和一条重链，该重链还含有 C_H1 和 C_H2 结构域之间的恒定区，从而两条重链之间可以形成链间二硫键而形成 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 分子。

“ $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段”含有两条轻链和两条重链，重链含有 C_H1 和 C_H2

结构域之间的恒定区的一部分，从而两条重链之间形成链间二硫键。

“Fv 区”含有来自重链和轻链的可变区，但是缺少恒定区。

“单链抗体”是 Fv 分子，其中重链和轻链可变区通过柔性连接体连接形成一条多肽链，该多肽链形成抗原-结合区。在国际专利申请 W088/01649 和美国专利号 4,946,778 和 5,260,203 中详细讨论了单链抗体，这些文献在此为了任何目的被并入作为参考。

在一些实施方案中，“二价抗体”而不是“多特异的”或“多功能的”抗体被理解为含有具有相同抗原特异性的结合位点。

“双特异的”或“双功能的”抗体是具有两个不同重/轻链对和两个不同结合位点的杂交体抗体。可通过各种方法产生双特异抗体，这些方法包括，但不限于，杂交瘤的融合或 Fab' 片段的连接。见，例如，Songsivilai & Lachmann (1990), Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321; Kostelny 等人 (1992), J. Immunol. 148: 1547-1553。

在评估根据本发明的抗体结合和特异性时，当抗体过量使受体结合到反受体的数量减少至少约 20%、40%、60%、80%、85%，或更多（如在体外竞争结合测定法中测量）时，抗体“基本上”抑制配体对受体的结合。

术语“试剂”指化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子，或者生物材料的提取物。

术语“标记”或“标记的”指可检测标记物的掺入，例如，通过掺入放射标记的氨基酸或者将生物素部分附着到多肽，该生物素部分可以通过标记的抗生物素蛋白检测（例如，链霉抗生物素蛋白，其优选含有可检测标记如荧光标记物、化学发光标记物或可以被光学或者比色方法检测的酶活性）。在一些实施方案中，标记也可以是治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域中熟知的并且可有利地用于此处公开的方法中。多肽标记的实例包括，但不限于下面的：放射性同位素或放射性核素（例如， ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、荧光标记（例如，异硫氰酸荧光素 (FITC)、罗丹明或镧系磷光素）、酶标记（例如，辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶）、化学发光标记、半抗原标记如生物素基，和被第二报道分子识别的预定的多肽表位（例如，亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标记）。在一些实施方案中，标

记通过各种长度的间隔臂(如 $(\text{CH}_2)_n$ ，其中 $n < \text{约 } 20$)附着以降低潜在的立体位阻。

术语“生物样品”包括，但不限于，来自活物或者以前的活物得到的物质的任一数量。这些活物包括，但不限于，人、小鼠、猴、大鼠、兔，和其他动物。这些物质包括，但不限于，血液、血清、尿、细胞、器官、组织、骨、骨髓、淋巴、淋巴结、滑液组织、软骨细胞、滑液巨噬细胞、内皮细胞、血管组织(特别是发炎的血管组织)，和皮肤。术语“药学试剂”和“药物”指当正确施用于患者时能够诱导所希望的治疗效果的化学化合物或组合物。

术语“患者”包括人和动物受试者。

除非上下文特别需要，单数术语将包括复数，复数术语将包括单数。

氨基酸

20 种天然发生的氨基酸和它们的缩写按照常规用法。见 Immunology--A Synthesis, 第二版, (E. S. Golub 和 D. R. Gren, 编者), Sinauer Associates: Sunderland, MA (1991), 其为了任何目的在此处被并入作为参考。这 20 种常规氨基酸的立体异构体(例如, D-氨基酸)、非天然氨基酸如 α -、 α -二取代的氨基酸、N-烷基氨基酸, 和其他非常规氨基酸也可以是本发明多肽的适宜组分。非常规氨基酸的实例包括: 4-羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰基赖氨酸、O-磷丝氨酸、N-乙酰基丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、6-N-甲基精氨酸, 和其他类似氨基酸和亚氨基酸(例如, 4-羟基脯氨酸)。按照标准用法和常规, 在此处所用的多肽符号中, 左手方向是氨基末端方向, 右手方向是羧基末端。

类似地, 除非特别指出, 单链多核苷酸序列的左手末端是 5'末端; 双链多核苷酸序列的左手方向被称为 5'方向。新 RNA 转录物的 5'到 3'方向加入被称为转录方向; DNA 链上具有和 RNA 转录物相同的序列并且在该 RNA 转录物的 5'末端的 5'的序列区被称为“上游序列”; DNA 链上具有和 RNA 转录物相同的序列并且在该 RNA 转录物的 3'末端的 3'的序列区被称为“下游序列”。

天然发生的氨基酸残基可以基于通常的侧链性质分成下面的类

别:

- 1) 疏水的: 正亮氨酸(Nor 或 Nle)、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- 2) 中性亲水的: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- 3) 酸性: Asp、Glu;
- 4) 碱性: His、Lys、Arg;
- 5) 影响链取向的残基: Gly、Pro; 和
- 6) 芳香族的: Trp、Tyr、Phe.

保守氨基酸置换可包括这些类别之一的一个成员与相同类别的另一成员置换。保守氨基酸置换可包括非天然发生的氨基酸残基, 其通常被化学肽合成而不是生物体系中的合成掺入。这些包括肽模拟物和氨基酸部分的其他颠倒或倒转的形式。

非保守氨基酸置换可包括这些类别之一的一个成员与另一类别的一个成员置换。这些置换的残基可被, 例如, 导入到与非人抗体同源的人抗体的区域, 或者导入该分子的非同源区。

根据一些实施方案, 在进行这些改变时, 可以考虑氨基酸的亲水指数。基于每个氨基酸的疏水性和电荷特征对其分配亲水指数。它们是: 异亮氨酸(+4.5)、缬氨酸(+4.2)、亮氨酸(+3.8)、苯丙氨酸(+2.8)、半胱氨酸/胱氨酸(+2.5)、甲硫氨酸(+1.9)、丙氨酸(+1.8)、甘氨酸(-0.4)、苏氨酸(-0.7)、丝氨酸(-0.8)、色氨酸(-0.9)、酪氨酸(-1.3)、脯氨酸(-1.6)、组氨酸(-3.2)、谷氨酸(-3.5)、谷氨酰胺(-3.5)、天冬氨酸(-3.5)、天冬酰胺(-3.5)、赖氨酸(-3.9)、和精氨酸(-4.5)。

亲水氨基酸指数在赋予蛋白质的相互作用生物功能中的重要性是本领域中理解的(见, 例如, Kyte 等人, 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131)。公知一些氨基酸可被具有类似亲水指数或得分的其他氨基酸置换并且仍然保持类似的生物学活性。在基于亲水指数进行改变时, 在一些实施方案中, 包括氨基酸的亲水指数为 ± 2 以内的氨基酸置换。在一些实施方案中, 包括氨基酸的亲水指数为 ± 1 以内的氨基酸置换, 在一些实施方案中, 包括氨基酸的亲水指数为 ± 0.5 以内的氨基酸置换。

在本领域中还理解可以基于亲水性有效进行像氨基酸的置换, 特别当如此产生的生物学功能蛋白质或肽旨在用于如此处所公开的免疫学实施方案中时。在一些实施方案中, 蛋白质的最大局部平均亲水

性(受到其邻近氨基酸的亲水性的控制)与其免疫原性和抗原性,即,与该蛋白质的生物学性质相关。

下面的亲水性值被分配给这些氨基酸残基:精氨酸(+3.0)、赖氨酸(+3.0)、天冬氨酸(+3.0 $\pm$ 1)、谷氨酸(+3.0 $\pm$ 1)、丝氨酸(+0.3)、天冬氨酸(+0.2)、谷氨酰胺(+0.2)、甘氨酸(0)、苏氨酸(-0.4)、脯氨酸(-0.5 $\pm$ 1)、丙氨酸(-0.5)、组氨酸(-0.5)、半胱氨酸(-1.0)、甲硫氨酸(-1.3)、缬氨酸(-1.5)、亮氨酸(-1.8)、异亮氨酸(-1.8)、酪氨酸(-2.3)、苯丙氨酸(-2.5)和色氨酸(-3.4)。在基于相似的亲水性值进行改变时,在一些实施方案中,包括氨基酸的亲水性值为 ± 2 以内的氨基酸置换。在一些实施方案中,包括氨基酸的亲水性值为 ± 1 以内的氨基酸置换,在一些实施方案中,包括氨基酸的亲水性值为 ± 0.5 以内的氨基酸置换。可以基于亲水性从原来的最初的氨基酸序列鉴定表位。这些区域也称为“表位核心区”。

示例性氨基酸置换在表1中给出。

表1

氨基酸置换

原来的残基	示意性置换	优选置换
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸	Leu
Leu	正亮氨酸, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1, 4-二氨基-丁酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 正亮氨酸	Leu

技术人员使用熟知的技术将能够确定如此处提出的多肽的适宜的变体。在一些实施方案中，本领域技术人员可以鉴定分子的适宜区域，可以改变认为对活性不重要的靶标区域而不破坏分子的活性。在其他实施方案中，技术人员可以鉴定分子的一些残基和部分，这些残基和部分在相似的多肽中是保守的。在其他实施方案中，甚至对于生物学活性或对于结构重要的区域也可以进行保守氨基酸置换而不破坏生物学活性或者对多肽结构造成不利影响。

此外，技术人员可以回顾结构-功能研究，这些研究鉴定相似的多肽中对于活性或结构重要的残基。鉴于这种比较，技术人员可以预测一种蛋白中相应于另一相似蛋白中对活性或结构重要的氨基酸残基的氨基酸残基的重要性。技术人员可以选择对这种被预测重要的氨基酸残基进行化学上相似的氨基酸置换。

技术人员还可关于类似多肽中的结构分析三维结构和氨基酸序

列。考虑到该信息,技术人员可以关于三维结构预测抗体的氨基酸残基的排列。在一些实施方案中,技术人员可以选择不对预测位于蛋白质表面上的氨基酸残基进行根本的改变,因为这些残基可能参与与其他分子的重要的相互作用。此外,技术人员可以产生试验变体,其含有每个所希望的氨基酸残基处的一个氨基酸置换。然后可以使用本领域中技术人员公知的活性测定法筛选这些变体。这些变体可用于收集关于适宜变体的信息。例如,如果发现特定氨基酸残基的改变导致被破坏的、不希望地降低的,或者不适宜的活性,那么可以避免具有这种改变的变体。换句话说,基于从这些常规实验收集的信息,本领域技术人员可以容易地确定一些氨基酸,其中进一步置换应该被单独地或者与其他突变一起被避免。

许多科学出版物已经致力于二级结构的预测。见 Moulton, 1996, *Curr. Opin. Biotech.* 7: 422-427; Chou 等人, 1974, *Biochemistry* 13: 222-245 ; Chou 等人, 1974, *Biochemistry* 113: 211-222 ; Chou 等人, 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47: 45-148; Chou 等人, 1979, *Ann. Rev. Biochem.* 47: 251-276; 和 Chou 等人, 1979, *Biophys. J.* 26: 367-384。此外,当前可利用计算机程序辅助预测二级结构。预测二级结构的一种方法是基于同源性建模。例如,序列同源性大于 30%,或者相似性大于 40%的两种多肽或蛋白质通常具有相似的结构拓扑。蛋白质结构数据库(PDB)的最近的扩大已经增强了二级结构,包括多肽或蛋白质结构中的潜在折叠数目的可预测性。见, Holm 等人, 1999, *Nucl. Acid. Res.* 27: 244-247。已经提出(Brenner 等人, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 369-376)在给定多肽或蛋白质中有有限数目的折叠,并且一旦解决结构的临界数目,结构预测将变得十分准确。

预测二级结构的额外的方法包括“穿线(threading)”(Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 377-87; Sippl 等人, 1996, *Structure* 4: 15-19)、“概况分析”(Bowie 等人, 1991, *Science* 253: 164-170; Gribskov 等人, 1990, *Meth. Enzym.* 183: 146-159 ; Gribskov 等人, 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84: 4355-4358)和“进化连接”(见 Holm, 1999, 如前; 和 Brenner, 1997, 如前)。

在一些实施方案中,抗体变体包括糖基化变体,其中与亲本多肽

的氨基酸序列相比，糖基化位点的数目和/或类型已经被改变。在一些实施方案中，蛋白质变体含有比天然蛋白或多或少的 N-连接的糖基化位点。N-连接的糖基化位点的特征是序列：Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr，其中被指定为 X 的氨基酸残基可以是除了脯氨酸之外的任一氨基酸残基。产生该序列的氨基酸残基替换为 N-连接的糖链的加入提供了潜在的新位点。备选地，除去该序列的置换将除去已有的 N-连接的糖链。还提供了 N-连接的糖链的重排，其中一个或多个 N-连接的糖基化位点(典型为天然发生的)被除去并产生一个或多个新的 N-连接的位点。额外优选的抗体变体包括半胱氨酸变体，其中与亲本氨基酸序列相比，一个或多个半胱氨酸残基被缺失或者被另一氨基酸(例如丝氨酸)置换。当例如，分离不可溶的包含体之后抗体必须被再折叠成生物活性构象时，可以使用半胱氨酸变体。半胱氨酸变体通常比天然蛋白具有更少的半胱氨酸残基，并且通常具有偶数半胱氨酸残基以最小化未配对半胱氨酸残基导致的相互作用。

根据一些实施方案，氨基酸残基替换为：(1)减小对蛋白质酶解的敏感性，(2)减小对氧化的敏感性，(3)改变对形成蛋白质复合体的结合亲和性，(4)改变结合亲和性，和/或(5)赋予或改变这些多肽上其他生理生化或功能性质的置换。根据一些实施方案，可以在天然发生的序列(在一些实施方案中，在形成分子间接触的结构域之外的多肽部分中)中进行单个或多个氨基酸置换(在一些实施方案中，保守氨基酸置换)。在优选实施方案中，保守氨基酸置换通常不实质性地改变亲本序列的结构特征(例如，置换氨基酸应该不倾向于断开亲本序列中发生的螺旋，或者破坏表征亲本序列的其他类型的二级结构)。在 *Proteins, Structures and Molecular Principles*, (Creighton, 编者), 1984, W. H. Freeman and Company, New York; *Introduction to Protein Structure* (C. Branden 和 J. Tooze, 编者), 1991, Garland Publishing, New York, N. Y.; 和 Thornton 等人 (1991), *Nature* 354: 105 中描述了本领域公知的多肽二级结构和三级结构的实例。

抗体的制备

天然发生的抗体结构单位通常含有四聚体。每种该四聚体通常由两对相同的多肽链组成，每一对具有一条完全长度的“轻”链(通常

分子量为约 25 kDa) 和一条完全长度的“重”链(通常分子量为约 50-70 kDa)。每条链的氨基末端部分通常包括约 100 到 110 个或更多氨基酸的可变区, 其通常负责抗原识别。每条链的羧基末端部分通常限定了负责效应物功能的恒定区。人轻链通常被分为 κ 和 λ 轻链。重链通常分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 、或 ϵ , 并且分别限定抗体的同种型为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。IgG 具有几种亚类, 包括, 但不限于, IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。IgM 的亚类包括, 但不限于, IgM1 和 IgM2。IgA 被类似的细分成亚类, 其包括, 但不限于, IgA1 和 IgA2。在全长轻链和重链中, 典型地, 约 12 或更多氨基酸的“J”区连接可变区和恒定区, 重链也包括约 10 个或更多氨基酸的“D”区。见, 例如, *Fundamental Immunology*, 第 7 章, 第二版, (Paul, W., 等人), 1989, Raven Press, N. Y. (为了所有目的被完整并入作为参考)。每个轻链/重链对的可变区的组合形成了抗原结合位点。

每个重链和轻链的可变区通常表现出相同的一般结构, 其含有四个相对保守的框架区(FR), 该框架区被三个高度区连接, 该高度区称为互补决定区或 CDRs。来自每一对的两条链的 CDRs 被框架区排列, 该排列使得能够结合特定表位。从 N-末端到 C-末端, 轻链和重链可变区通常都含有结构域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。通常按照 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 和 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)、Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, 或 Chothia 等人, 1989, *Nature* 342: 878-883) 的定义将氨基酸分配给每个结构域。

随着单克隆抗体的开发, 抗体成为有用和有趣的药物剂。使用通过连续培养细胞系产生抗体分子的任一方法产生单克隆抗体。制备单克隆抗体的适宜方法的实例包括 Kohler 等人(1975, *Nature* 256: 495-497) 的杂交瘤方法和人 B-细胞杂交瘤方法(Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133: 3001; 和 Brodeur 等人, 1987, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, (Marcel Dekker, Inc., New York), 51-63 页)。

可以修饰单克隆抗体以用作治疗剂。一个实例是“嵌合”抗体, 其中重链和/或轻链的一部分与来自特定物种或属于特定抗体类别或

亚类的抗体中相应序列相同或同源，而链的剩余部分与来自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中相应序列相同或同源。其他实例是这些抗体的片段，只要这些片段表现出所希望的生物学活性。见，美国专利号 4,816,567；和 Morrison 等人(1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855。相关发展是“CDR-嫁接的”抗体，其中抗体含有来自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的一个或多个互补确定区(CDRs)，而抗体链的剩余部分来自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中相应序列相同或同源。

另一发展是“人源化”抗体。人源化非人抗体的方法是本领域中熟知的(见美国专利号 5,585,089, 和 5,693,762)。通常，通过非-人动物产生人源化抗体，然后将通常来自该抗体的非-抗原识别部分的一些氨基酸残基修饰以与相应同种型的人抗体中的所述残基同源。可以使用例如，本领域中描述的方法 (Jones 等人, 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann 等人, 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen 等人, 1988, Science 239: 1534-1536)，通过将啮齿类可变区的至少一部分置换成人抗体的相应部分实施人源化。

更近并且更有希望的是开发人抗体而不用将抗原暴露于人(“完全人抗体”)。使用能够产生人抗体的所有组成成分而不产生内源小鼠免疫球蛋白的转基因动物(例如，小鼠)，通过用抗原(通常具有至少 7 个相邻氨基酸)(任选缀合到载体)免疫产生这些抗体。见例如，Jakobovits 等人, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551-2555; Jakobovits 等人, 1993, Nature 362: 255-258; 和 Bruggermann 等人, 1993, Year in Immunol. 7: 33。在这些方法的一个实施例中，通过将编码小鼠免疫球蛋白重链和轻链的内源小鼠免疫球蛋白基因座无能化，并将编码人重链和轻链蛋白的基因座插入小鼠的基因组产生转基因小鼠。部分修饰的动物没有完全修饰，将这些部分修饰的动物杂交得到具有所有所希望的免疫系统修饰的动物。当施用免疫原时，这些转基因动物产生对具有人(而不是鼠)氨基酸序列的那些抗原免疫特异的抗体，包括可变区。见 PCT 公布号 W096/33735 和 W094/02602，这些文献被并入作为参考。其他方法在美国专利号 5,545,807、PCT 公布号 W091/10741、W090/04036、和 EP 546073B1 和 EP 546073A1 中描述，这些文献被并入作为参考。也可以通过在宿

主细胞中表达重组 DNA 或者在如此处描述的杂交瘤细胞中表达产生人抗体。

也可以从噬菌体展示文库(如在 Hoogenboom 等人, 1991, J. Mol. Biol. 227: 381 ; 和 Marks 等人, 1991, J. Mol. Biol. 222: 581 中公开)产生完全人抗体。这些方法通过将抗体的所有组成组分展示在丝状噬菌体的表面上, 然后通过噬菌体对所选抗原的结合选择噬菌体来模拟免疫选择。一种该技术在 PCT 公布号 W099/10494 中描述, 其被并入作为参考, 该文献描述了使用这种方法分离 MPL-和 msK-受体的高亲和性和功能激动抗体。

一旦确定了编码这些抗体的核苷酸序列, 也可以通过重组方法产生嵌合抗体、CDR-嫁接的抗体、人源化抗体和完全的人抗体。使用本领域中公知的材料和方法将编码抗体的核酸导入宿主细胞并表达。

本发明提供了针对人 IL-1R1 的一种或多种完全人单克隆抗体。优选地, 这些抗体结合 IL-1R1 的第三个结构域。在优选的实施方案中, 本发明提供了编码重链和轻链免疫球蛋白分子, 特别是相应于其可变区的序列的核苷酸序列和含有重链和轻链免疫球蛋白分子, 特别是相应于其可变区的序列的氨基酸序列。在优选的实施方案中, 提供了相应于互补决定区(CDRs), 特别是 CDR1 到 CDR3 的序列。在另外的优选实施方案中, 本发明提供了杂交瘤细胞系, 其表达这些免疫球蛋白分子和从中产生的单克隆抗体, 最优选地, 纯化的针对人 IL-1R1 的人单克隆抗体。

克隆和在酵母人工染色体(YACs)中重构 Mb 大小的人基因座并将酵母人工染色体导入小鼠种系提供了一种有利的方法以阐明非常大或者初步作图的基因座的功能组分以及产生人类疾病的有用模型。此外, 使用这些技术将小鼠基因座用它们的人等价物置换对于发育期间人基因产物的表达和调节、它们与其他系统的交流, 和它们与疾病诱导和发展的关系提供了独特的理解。

这种策略的一个重要的实际应用是小鼠体液免疫系统的“人源化”。将人免疫球蛋白(Ig)基因座导入小鼠中, 其中内源 Ig 基因已经被失活, 该导入为研究抗体的潜在的程序化表达和装配以及它们在 B-细胞发育中的角色提供了机会。此外, 这种策略为产生完全人单克隆抗体(Mabs), 特别用作治疗剂的完全人单克隆抗体提供了来源。预

期完全人抗体使小鼠或小鼠来源的 Mabs 的内在免疫原性和变应原性应答最小,从而增加治疗应用中所施用的抗体的效能和安全性。完全人抗体可用于治疗慢性和复发性人疾病,如骨关节炎、类风湿性关节炎,和其他炎症,其治疗需要反复的抗体施用。

本领域技术人员可以用人 Ig 基因座大片段工程化小鼠抗体产生缺陷的小鼠品系从而这些小鼠产生人抗体而不产生小鼠抗体。大的人 Ig 片段可以保存大可变基因多样性以及抗体产生和表达的正确调节。利用抗体多样化和选择以及对人蛋白免疫耐受的缺乏的小鼠机器,这些小鼠品系中再生的人抗体所有组成组分产生针对任一目标抗原,包括人抗原的高亲和性抗体。使用杂交瘤技术,可以产生和选择具有所希望的特异性的抗原-特异的人 MAb。

在一些实施方案中,技术人员可以使用来自不同于人的物种的恒定区以及这些小鼠中的人可变区以产生嵌合抗体。用全长 IL-1R1、IL-1R1 的可溶形式,或者其片段免疫这些动物可以产生本发明的抗体。见,例如,国际专利申请公布号 WO 93/12227。

本发明的抗-IL-1R1 抗体的轻链和重链可变区的 CDRs 可以嫁接到相同或另一物种的框架区(FRs)。在一些实施方案中,抗-IL-1R1 抗体的轻链和重链可变区的 CDRs 可以嫁接到共有人 FRs。为了产生共有人 FRs,对来自几种人重链或轻链氨基酸序列的 FRs 进行比对以鉴定共有氨基酸序列。抗-IL-1R1 抗体的重链或轻链的 FRs 可以被来自不同重链或轻链的 FRs 代替。抗-IL-1R1 抗体的重链和轻链的 FRs 中的稀有氨基酸通常不被置换,然而剩下的 FR 氨基酸可被置换。稀有氨基酸是特定氨基酸,在 FR 中它们所处的位置中不通常发现这些氨基酸。本发明的抗-IL-1R1 抗体的嫁接的可变区可以与不同于抗 IL-1R1 抗体的恒定区一起使用。备选地,嫁接的可变区是单链 Fv 抗体的部分。CDR 嫁接在例如,美国专利号 6,180,370、5,693,762、5,693,761、5,585,089、和 5,530,101 中描述,它们在此处为了任何目的被并入作为参考。

在一些实施方案中,本发明提供了抗 IL1-R1 抗体,其含有具有 SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、或 SEQ ID NO: 63 的氨基酸序列的人重链 CDR1 区;具有 SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、或 SEQ ID NO: 66 的氨基酸序列的人重链 CDR2 区;和/或具有 SEQ ID NO: 67、

SEQ ID NO: 68、或 SEQ ID NO: 69 的氨基酸序列的人重链 CDR3 区。

在另一实施方案中，本发明提供了抗-IL1-R1 抗体，其含有具有 SEQ ID NO: 70 或 SEQ ID NO: 71 的氨基酸序列的人轻链 CDR1 区；具有 SEQ ID NO: 72 或 SEQ ID NO: 73 的氨基酸序列的人轻链 CDR2 区；和/或具有 SEQ ID NO: 74 或 SEQ ID NO: 75 的氨基酸序列的人轻链 CDR3 区。

优选使用转基因小鼠制备本发明的抗体，该转基因小鼠具有插入小鼠的抗体产生细胞中的人抗体-产生基因座的实质性部分，并且该小鼠被进一步工程化而在产生内源的鼠抗体方面有缺陷。这些小鼠能够产生人免疫球蛋白分子和抗体并且不产生鼠免疫球蛋白分子和抗体或者所产生的量充分减少。用于实现该结果的技术在本说明书中公开的专利、申请和参考文献中公开。在优选的实施方案中，技术人员可以使用如国际专利申请公布号 W0 98/24893 中公开的方法，该专利申请为了任何目的被并入作为参考。还见 Mendez 等人，1997, *Nature Genetics* 15:146-156，该文献为了任何目的被并入作为参考。

可通过各种技术产生本发明的单克隆抗体 (MAbs)，这些技术包括常规单克隆抗体方法学，例如，Kohler 和 Milstein, 1975, *Nature* 256: 495 的标准体细胞杂交技术。尽管原则上优选体细胞杂交方法，但是也可使用产生单克隆抗体的其他技术，例如，B-淋巴细胞的病毒或癌基因转化。

在优选的实施方案中，可以使用称为“HuMab”小鼠的小鼠产生针对 IL-1R1 的人单克隆抗体，该小鼠含有人免疫球蛋白基因微基因座，该微基因座编码未重排的人重链 (μ 和 γ) 和 κ 轻链免疫球蛋白序列，以及靶定突变，该突变失活内源的 μ 和 κ 链基因座。Lonberg 等人，1994, *Nature* 368: 856-859。因此，小鼠表现出小鼠 IgM 或 κ 表达减少和免疫应答的降低，所导入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变以产生高亲和性的人 IgG κ 单克隆抗体。Lonberg 等人，如前；Lonberg 和 Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93；Harding 和 Lonberg, 1995, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764: 536-546。HuMab 小鼠的制备在 Taylor 等人，1992, *Nucleic Acids Res.* 20: 6287-6295；Chen 等人，1993, *International Immunology* 5: 647-656；Tuailon 等人，1994, *J. Immunol.* 152: 2912-2920；

Lonberg 等人, 1994, Nature 368: 856-859 ; Lonberg, 1994, Handbook of Exp. Pharmacology 113: 49-101 ; Taylor 等人, 1994, International Immunology : 579-591; Lonberg & Huszar, 1995, -Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 ; Harding & Lonberg, 1995, Ann. N. Y. Acad. Sci 764: 536-546; Fishwild 等人, 1996, Nature Biotechnology 14: 845-851 中详细描述, 所有它们的内容在此处被完整并入作为参考。还见美国专利号 Lonberg 和 Kay 的 5,545, 806、5,569, 825、5,625, 126、5,633, 425、5,789, 650、5,877, 397、5,661, 016、5,814, 318、5,874, 299、和 5,770, 429; 以及 Surani 等人的美国专利号 5,545, 807; 1993 年公布的国际专利申请公布号 WO 93/1227; 1992 年 12 月 23 日公布的 WO 92/22646; 和 1992 年 3 月 19 日公布的 WO 92/03918, 所有这些文献的公开被完整并入作为参考。备选地, 在下面的实施例中描述的 HCo7 和 HCo12 转基因小鼠品系被用于产生人抗-IL-1R1 抗体。

备选地, 如下产生 IL-1R1 特异的全人单克隆抗体。用目标 IL-1R1-相关的抗原免疫含有人免疫球蛋白基因的转基因小鼠。从表达抗体的小鼠得到淋巴细胞(如 B-细胞)。这些回收的细胞与骨髓-型细胞系融合以制备无限增殖的杂交瘤细胞系, 并且筛选和选择这些杂交瘤细胞系以鉴定产生目标抗原特异的抗体的杂交瘤细胞系。在一些实施方案中, 提供了产生 IL-1R1 特异的抗体的杂交瘤细胞系。

在优选的实施方案中, 通过杂交瘤系产生本发明的抗体。在这些实施方案中, 本发明的抗体结合 IL-1R1, 它们之间的解离常数(K_d)约为 4 pM 到 100 pM。在本发明的一些实施方案中, 抗体结合 IL-1R1, K_d 小于约 20 pM。在其他实施方案中, 本发明的抗体结合 IL-1R1 的第三个结构域。在图 17 中显示了人和大鼠 IL1-R1 的第三个结构域的核苷酸和氨基酸序列。

在优选的实施方案中, 本发明的抗体是 IgG1、IgG2 或 IgG4 同种型抗体, 最优选 IgG2 同种型。在本发明的优选实施方案中, 抗体含有人 κ 轻链和人 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链。在具体实施方案中, 抗体的可变区连接到不同于 IgG1、IgG2 或 IgG4 同种型的恒定区的恒定区。在一些实施方案中, 本发明的抗体已经被克隆以在哺乳动物细胞中表达。

在一些实施方案中,对抗 IL-1R1 抗体的重链和轻链的保守氨基酸置换(和编码核苷酸的相应修饰)产生的抗 IL-1R1 抗体将具有类似于抗 IL-1R1 抗体的功能和化学特征。相比,通过选择重链和轻链的氨基酸序列中的置换可以实现抗-IL-1R1 抗体的功能和/或化学特征的实质的修饰,这些置换在它们对保持(a)置换的区域中分子主链的结构,例如,作为折叠或螺旋构象,(b)靶标位点处分子的电荷或疏水性,或(c)侧链的体积的效果方面显著不同。

例如,“保守性氨基酸置换”可包括用非天然残基置换天然氨基酸残基,从而对该位置上氨基酸残基的极性 or 电荷影响很小或没有影响。此外,多肽中的任一天然残基也可以用丙氨酸置换,如以前关于“丙氨酸扫描诱变”所描述的(Wells, 1991, Methods Enzymol. 202: 390 (编者 J. J. Langone), Academic Press, London)。

本领域技术人员在希望时可以确定所希望的氨基酸置换(保守的或非保守的)。在一些实施方案中,氨基酸置换可用于鉴定抗-IL-1R1 抗体的重要残基,或者增加或降低此处描述的抗-IL-1R1 抗体的亲和性。

在备选实施方案中,本发明的抗体可以在不同于杂交瘤细胞系的细胞系中表达。在这些实施方案中,编码特定抗体的序列可用于转化适宜的哺乳动物宿主细胞。根据这些实施方案,可以利用将多核苷酸导入宿主细胞的任一公知的方法实现转化,该方法包括,例如,将多核苷酸包装在病毒(或者病毒载体)中并用该病毒(或载体)转导宿主细胞,或者通过本领域中公知的转染方法。这些方法由美国专利号 4,399,216、4,912,040、4,740,461 和 4,959,455(所有都为了任何目的在此处被并入作为参考)例证。通常,所用的转化方法取决于所要转化的宿主。将异源多核苷酸导入哺乳动物细胞的方法是本领域中熟知的并且包括,但不限于,葡聚糖-介导的转染、磷酸钙沉淀、1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物(polybrene)介导的转染、原生质体融合、电穿孔、多核苷酸在脂质体中的包被、和 DNA 微注射到细胞核中。

根据本发明的一些实施方案,使用标准连接技术将本发明的 IL-1R1 抗体的重链恒定区、重链可变区、轻链恒定区,或轻链可变区的氨基酸序列的核酸分子插入适宜的表达载体中。在优选的实施方案

案中, IL-1R1 重链或轻链恒定区附加到适宜的可变区的 C-末端并被连接到表达载体。所选的载体通常在所用的具体宿主细胞中是有功能的(即, 载体与宿主细胞机器相容从而可以发生基因的扩增和/或基因的表达)。对于表达载体综述, 见 Goeddel (编者), 1990, Meth. Enzymol. 卷 185, Academic Press. N. Y.

通常, 用于任一种宿主细胞的表达载体将含有用于质粒维持和外源核苷酸序列的克隆和表达的序列。这些统称为“侧翼序列”的序列在一些实施方案中将通常包括一种或多种下面的核苷酸序列: 启动子、一种或多种增强子序列、复制原点、转录终止序列、含有供体和受体剪接位点的完整内含子序列、编码多肽分泌的引导序列的序列、核糖体结合位点、聚腺苷酸序列、用于插入编码所要表达的多肽的核酸的多接头区, 和可选择的标记物元件。下面讨论这些序列的每一种。

任选地, 载体可含有“标记”编码序列, 即位于 IL-1R1 多肽编码序列的 5'或 3'末端的寡核苷酸分子; 该寡核苷酸序列编码聚 His (如六聚 His), 或者另一“标记”, 如 FLAG、HA (流感病毒血凝素), 或者 myc, 通过商业途径可得到这些标记的抗体。该标记在多肽表达时通常被融合到该多肽, 并且可作为亲和纯化或者从宿主细胞检测 IL-1R1 抗体的方式。可以例如, 通使用针对标记的抗体作为亲和基质通过柱层析实现亲和层析。任选地, 可通过各种方法如使用一些用于切割的肽酶从纯化的 IL-1R1 多肽除去标记,

侧翼序列可以是同源的(例如, 来自与宿主细胞相同的物种和/或品系)、异源的(例如, 来自不同于宿主细胞种类或品系的物种)、杂交的(例如, 来自一种以上来源的侧翼序列的组合)、合成的或天然的。同样地, 侧翼序列的来源可以是任一种原核或真核生物, 任一种脊椎动物或无脊椎动物生物, 或者任一种植物, 只要侧翼序列在宿主细胞机器中是有功能的并且可被宿主细胞机器活化。

可通过本领域中熟知的方法之一得到用于本发明的载体的侧翼序列。通常, 用于此处的侧翼序列将事先已经通过作图和/或通过限制性内切酶消化鉴定并从而可以使用适宜的限制性内切酶从适当的组织来源分离。在一些情况中, 可以知道侧翼序列的全部核苷酸序列。这里, 可以用此处描述关于核酸合成或克隆的方法合成侧翼序列。

当知道了侧翼序列的所有或仅一部分时, 可以使用聚合酶链式反

应(PCR)和/或通过使用适宜的探针如寡核苷酸和/或来自相同或另一物种的侧翼序列片段筛选基因组文库得到该侧翼序列。当侧翼序列是未知的时候,可以从更大的DNA分离含有侧翼序列的DNA片段,该更大的DNA可能含有,例如,编码序列或者甚至另一个或几个基因。可通过限制性内切酶消化产生适当的DNA片段,然后使用琼脂糖凝胶纯化、Qiagen®柱层析(Chatsworth, CA),或者技术人员公知的其他方法实现分离。实现该目的的适宜酶的选择对本领域普通技术人员是显而易见的。

复制原点通常是通过商业途径购买的那些原核表达载体的一部分,并且该原点有助于载体在宿主细胞中的扩增。如果所选载体不含有复制原点,可以基于公知的序列化学合成复制原点,并将其连接到载体。例如,来自质粒pBR322(New England Biolabs, Beverly, MA)的复制原点适于大多数革兰氏阴性细菌,并且各种病毒原点(例如,SV40、多形瘤、腺病毒、疱疹性口腔炎病毒(VSV),或者乳头瘤病毒如HPV或BPV)可用于哺乳动物细胞中克隆载体。通常,哺乳动物表达载体不需要复制原点组分(例如,通常需要SV40原点仅仅是因为其也还含有病毒早启动子)。

转录终止序列通常位于多肽编码区末端的3'并且用于终止转录。通常,原核细胞中的转录终止序列是富含G-C的片段,接着是聚-T序列。尽管可以从文库容易地克隆该序列或者甚至作为载体的一部分通过商业途径购买,但是也可以使用核酸合成的方法(如本文中所描述的)容易地合成该序列。

选择性标记基因编码宿主细胞在选择性培养基上存活和生长所必需的蛋白。典型的选择标记基因编码的蛋白(a)赋予原核宿主细胞对抗体或其他毒素,例如氨苄西林、四环素,或者卡那霉素抗性;(b)细胞的互补营养缺陷型缺陷;或(c)提供从复杂或已知成分培养基不能得到的关键营养。优选的可选择标记是卡那霉素抗性基因、氨苄西林抗性基因,和四环素抗性基因。新霉素抗性基因也可以用于原核和真核宿主细胞的选择。

其他可选择基因也可用于扩增将要表达的基因。扩增是一种过程,其中更需要用于产生对生长或细胞存活关键的蛋白质的基因通常在重组细胞的连续世代的染色体中串联重复。哺乳动物的适宜的选择

性标记的实例包括二氢叶酸还原酶(DHFR)和无启动子的胸苷激酶。哺乳动物细胞转化体被置于选择压力下,其中转化体通过载体中存在的选择性标记唯一地幸存。通过将所转化的细胞培养在培养基中选择剂浓度不断增加的条件下来加强选择压力,从而导致选择性基因和编码另一种基因的DNA,如含有IL-1R1多肽的载体都扩增。结果,从扩增的DNA合成量不断增加的多肽如IL-1R1多肽。

核糖体-结合位点通常是mRNA的翻译起始所必须的并且其特征是SD序列(原核生物)或Kozak序列(真核生物)。该元件通常位于启动子的3'和所要表达的多肽的编码区的5'。

在一些情况中,如当在真核宿主细胞表达系统中希望糖基化时,可以操作各种前序列或者原序列以提高糖基化或产率。例如,可以改变特定信号肽的肽酶切割位点,或者加入原序列,其也影响糖基化。最后的蛋白质产物可以具有-1位(相对于成熟蛋白的第一个氨基酸)的一个或多个与表达关联的额外的氨基酸,所述氨基酸可能没有被完全除去。例如,最终蛋白质产物可以具有在肽酶切割位点发现的一个或多个氨基酸残基,其附着到氨基末端。备选地,如果酶在成熟多肽的这些区域内切割,那么使用一些酶切割位点可导致所希望的多肽的稍微截短的形式。

本发明的表达和克隆载体将通常含有启动子,其被宿主生物识别并可操作地连接到编码抗IL-1R1抗体的分子。启动子是位于结构基因的起始密码子的上游(例如,5')的未翻译序列(通常约100到1000bp),其控制结构基因的转录。启动子通常分成两种类别之一:可诱导的启动子和组成性启动子。可诱导的启动子应答培养条件中的某种变化,如营养物的存在或缺乏,或者温度的改变,而启动处于它们控制下的DNA的转录水平增加。另一方面,组成性启动子,启动连续的基因产物产生;即,对基因表达几乎没有或者没有控制。熟知许多启动子,它们被各种潜在的宿主细胞识别。通过限制酶消化从源DNA除去启动子序列并将所希望的启动子序列插入载体,可以将适宜的启动子可操作地连接到编码含有本发明的抗IL-1R1抗体的重链或轻链的DNA。

用于酵母宿主的适宜的启动子也是本领域中公知的。酵母增强子可有利地与酵母启动子一起使用。用于哺乳动物宿主细胞的适宜的启

动子是熟知的并且包括,但不限于,从病毒如多形瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、鸟肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和最优选地猿病毒 40(SV40)的基因组得到的启动子。其他适宜的哺乳动物启动子包括异源哺乳动物启动子,例如,热休克启动子和肌动蛋白启动子。

另外的目标启动子包括,但不限于: SV40 早启动子区(Bernoist 和 Chambon, 1981, *Nature* 290: 304-10); CMV 启动子; 包含在劳氏肉瘤病毒的 3'长末端重复的启动子(Yamamoto 等人, 1980, *Cell* 22: 787-97); 疱疹胸苷激酶启动子(Wagner 等人, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1444-45); 金属硫蛋白基因的调节序列(Brinster 等人, 1982, *Nature* 296: 39-42); 原核生物表达载体如 β -内酰胺酶启动子(Villa-Kamaroff 等人, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3727-31); 或者 tac 启动子(DeBoer 等人, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25)。还作为目标的是下面的动物转录控制区, 其表现出组织特异性并且已经用于转基因动物: 在胰腺腺泡细胞中有活性的弹性蛋白酶 I 基因控制区(Swift 等人, 1984, *Cell* 38: 639-46; Ornitz 等人, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7: 425-515); 在胰腺 β 细胞中有活性的胰岛素基因控制区(Hanahan, 1985, *Nature* 315: 115-22); 在淋巴细胞中有活性的免疫球蛋白基因控制区(Grosschedl 等人, 1984, *Cell* 38: 647-58; Adames 等人, 1985, *Nature* 318: 533-38; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7: 1436-44); 在睾丸、乳腺、淋巴和肥大细胞中有活性的小鼠乳腺肿瘤病毒控制区(Leder 等人, 1986, *Cell* 45: 485-95); 在肝脏中有活性的白蛋白基因控制区(Pinkert 等人, 1987, *Genes and Devel.* 1: 268-76); 在肝脏中有活性的 α -feto-蛋白基因控制区(Krumlauf 等人, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5: 1639-48; Hammer 等人, 1987, *Science* 235: 53-58); 在肝脏中有活性的 α 1-抗胰蛋白酶基因控制区(Kelsey 等人, 1987, *Genes and Devel.* 1: 161-71); 在骨髓细胞中有活性的 β -珠蛋白基因控制区(Mogam 等人, 1985, *Nature* 315: 338-40; Kollias et al., 1986, *Cell* 46: 89-94); 在脑中的少突胶质细胞中有活性的髓磷脂碱性蛋白基因控制区(Readhead 等

人, 1987, *Cell* 48 : 703-12); 在骨骼肌中有活性的肌球蛋白轻链-2 基因控制区 (Sani, 1985, *Nature* 314: 283-86); 和在下丘脑中有活性的促性腺释放激素基因控制区 (Mason 等人, 1986, *Science* 234: 1372-78)。

增强子序列可插入到载体以增强高级真核生物对编码本发明的抗 IL-1R1 抗体的轻链或重链的 DNA 的转录。增强子是 DNA 的顺式作用元件, 通常长约 10-300bp, 作用于启动子以增加转录。增强子是相对独立于方向和位置的。已经在转录单位的 5' 和 3' 发现了增强子。公知可以从哺乳动物基因 (例如, 珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、 α -feto-蛋白和胰岛素) 得到一些增强子序列。然而, 通常使用来自病毒的增强子。本领域中公知的 SV40 增强子、巨细胞病毒早启动子增强子、多形瘤增强子和腺病毒增强子是真核细胞启动子活化的示例性增强元件。尽管增强子可以在核酸分子的 5' 或 3' 位置剪接到载体中, 但是其通常位于启动子的 5' 位。

可以从起始载体如通过商业途径可得到的载体构建本发明的表达载体。这些载体可以含有或不含有所有希望的侧翼序列。当一种或多种此处描述的侧翼序列不存在于该载体时, 可以单独地得到这些侧翼序列并将它们连接到载体。得到每种侧翼序列的方法是本领域技术人员熟知的。

已经构建载体并且编码抗-IL-1R1 抗体的轻链或重链或者轻链和重链的核酸分子已经被插入到载体的适当位点后, 所完成的载体可被插入到适宜的宿主细胞以扩增和/或多肽表达。可以通过熟知的方法将抗-IL-1R1 抗体的表达载体转化到所选的宿主细胞, 该方法包括转染、感染、磷酸钙共沉淀、电穿孔、微注射、脂转染、DEAE-葡聚糖介导的转染, 或者其他公知的技术。所选的方法将部分是所用的宿主细胞类型的函数。这些方法和其他适宜的方法是技术人员熟知的, 并且在例如, Sambrook 等人, (如前) 中提出。

宿主细胞当在适宜的条件下培养时合成抗-IL-1R1 抗体, 随后从培养基 (如果宿主细胞将抗体分泌到培养基) 或者直接从产生抗体的宿主细胞 (如果其不被分泌) 回收抗 IL-1R1 抗体。适宜的宿主细胞的选择将取决于各种因素, 如所希望的表达水平、所希望的或者活性所必要的多肽修饰 (如糖基化或磷酸化) 和折叠成生物活性分子的容易

性。

可以得到的作为表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域中熟知的并且包括,但不限于,可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)得到的许多无限增殖的细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如, Hep G2), 和许多其他细胞系。在一些实施方案中,可以通过确定哪些细胞系具有高表达水平并产生具有组成性 IL-1R1 结合性质的抗体来选择细胞系。在另一实施方案中,可以从来自不产生自身抗体但是能够产生并分泌异源抗体的 B 细胞谱系选择细胞系(例如, 小鼠骨髓瘤细胞系 NS0 和 SP2/0)。

本发明的抗体可用于检测生物样品中的 IL-1R1 和鉴定产生 IL-1R1 蛋白的细胞或组织。所述抗体结合 IL-1R1 并阻断与其他结合化合物的相互作用, 该抗体具有治疗性用途, 用以调节 IL-1 介导的疾病。在优选的实施方案中, 针对 IL-1R1 的抗体可以阻断 IL-1R1 与 IL-1 β 或 IL-1 α 的结合, 从而导致 IL-1 信号转导级联的破坏。

特异结合 IL-1R1 的本发明抗体可用于治疗 IL-1 介导的疾病, 如下面所讨论的。所述抗体可用于结合测定法中检测 IL-1R1 结合以及它们抑制 IL-1R1 与 IL-1 β 和 IL-1R 辅助蛋白(IL-1RAcP)或与 IL-1 α 和 IL-1RAcP 形成复合物的能力。

在一些实施方案中, 本发明提供了治疗与 IL-1 介导的炎症反应或者 IL-1 介导的免疫调节反应有关的医学失调。本发明的方法包括将本发明的抗-IL1R1 抗体施用于受到 IL-1 介导的炎症或免疫调节疾病折磨的个体。如此处所用的, 术语“病”、“疾病”、“医学病症”或“异常病症”可以与术语“医学失调”互换使用。

在具体实施方案中, 本发明的方法包括对患者施用本发明的抗 IL-1R1 抗体, 从而防止 IL-1 与其细胞表面受体(IL-1R1)的结合。

为了治疗特征为 IL-1 的异常或过量表达或者 IL-1 信号异常或过量的医学失调, 将含有本发明的 IL-1R1 型 I 抗体施用于患者, 所施用的量和持续的时间足够引起反映该失调的严重性的至少一种指标的持续改善。如果患者在相隔 1 到 4 周的至少两个场合表现出改善, 那么认为该改善是“持续的”。改善的程度可基于病征或症状确定, 并且也可以使用用于患者的调查表, 如生命质量调查表。

可以评估反映患者疾病的程度的各种指标以确定治疗的量和时间是否足够。在使用第一剂抗体之前通过检查患者确定所选的一种或多种指标的基线值。优选地，在第一剂施用前约 60 天内进行基线检查。如果 IL-1R 抗体被用于治疗急性症状，如，例如，治疗外伤性损伤（外伤性膝损伤、中风、头损伤，等），那么在损伤或事件发生后从实际出发尽快施用第一剂。

通过抗体剂量的反复施用引起改善，直到患者表现出所选一种或多种指标高于基线的改善。在治疗慢性病症时，通过在至少 1 个月或更长，例如，1、2、或 3 个月或更长或者无限地期间内反复施用该药物得到改善的程度。对于治疗急性病症，1 到 6 周，或者甚至一剂通常就足够了。

尽管根据一种或多种指标，治疗后患者的疾病程度似乎改善了，但是可以无限地在相同水平上或者以更低的剂量或频率继续治疗。一旦治疗已经减小或停止，如果症状以后再次出现，其可能恢复到最初的水平。

任何一种有效施用途径都可用于治疗性施用抗体。可以通过关节内、静脉内、肌内、病灶内、腹膜内、颅内、吸入或者通过大丸剂皮下注射或者通过连续灌输注射抗体。例如，肺部疾病可包括鼻内和吸入方法。其他适宜的施用方法包括植入物的缓释、气溶胶吸入、滴眼液、口服制剂，包括丸剂、糖浆剂、锭剂或咀嚼树胶，和局部制剂如洗剂、凝胶剂、喷雾剂、软膏剂或其他适宜的技术。当治疗与肺部失调有关的疾病时，通过吸入施用尤其有利。

在本发明的一个实施方案中，本发明的抗-IL-1R1 抗体可以每月一次施用。在另一实施方案中，每两周一次或每周一次施用抗体以治疗此处公开的各种医学失调。在再一个实施方案中，每周施用抗体至少两次，在另一实施方案中，每天施用抗体至少一次。成年患者是 18 岁或以上的人。如果注射，那么每个成人剂量的有效量为 $1\text{--}200\text{mg}/\text{m}^2$ 或 $1\text{--}40\text{mg}/\text{m}^2$ 或约 $5\text{--}25\text{ mg}/\text{m}^2$ 。备选地，可以施用 flat 剂量，其量为 $2\text{--}400\text{ mg}/\text{剂}$ 、 $2\text{--}100\text{ mg}/\text{剂}$ 或约 $10\text{--}80\text{mg}/\text{剂}$ 。如果剂量将以每周施用 1 次以上，那么示例性剂量范围和前面描述的剂量范围相同或更低。在本发明的一个实施方案中，通过将含有 IL-1 受体抗体的注射可接受的制剂以 $80\text{--}100\text{ mg}/\text{剂}$ 施用，或者备选地含有 80

mg/剂的制剂治疗下述各种适应症。剂量被反复施用。如果使用不同于注射的施用途，那么根据标准医学惯例适当调节剂量。例如，如果施用途是吸入，那么给药可以是每周1到7次，剂量范围为10 mg/剂到50 mg/剂。

在优选的实施方案中，本发明还提供了药物组合物，其含有治疗有效量的一种或多种本发明抗体以及药学上可接受的稀释剂、载体、溶解剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。优选地，可接受的制剂物质在所用的剂量和浓度下对接受者是无毒的。在优选的实施方案中，提供了含有治疗有效量的抗-IL-1R1抗体的药物组合物。

在一些实施方案中，药物组合物可含有用于改变、保持或保存例如，pH、摩尔渗透压浓度、粘度、透明度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速度、组合物的吸收或渗透的制剂物质。在这些实施方案中，适宜的制剂物质包括，但不限于，氨基酸(如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、精氨酸或赖氨酸)、抗微生物剂、抗氧化剂(如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠)、缓冲剂(如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸)、膨胀剂(如甘露醇或甘氨酸)、螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA))、络合剂(如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精)、填充剂、单糖、二糖、和其他糖类(如葡萄糖、甘露糖或糊精)、蛋白质(如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白)、着色剂、增味剂和稀释剂、乳化剂、亲水性聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮)、低分子量多肽、盐形成反离子(如钠)、防腐剂和(如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、双氯苯双胍己烷、山梨酸或过氧化氢)、溶剂(如甘油、丙二醇或聚乙二醇)、糖醇(如甘露醇或山梨醇)、悬浮剂、表面活性剂或增湿剂(如 pluronics、PEG、聚山梨糖酯、聚山梨醇酯如聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80、triton、trimethamine、卵磷脂、胆固醇、tyloxapal)、稳定增强剂(如蔗糖或山梨醇)、张力增强剂(如碱金属卤化物，优选氯化钠或钾、甘露醇、山梨醇)、递送载体、稀释剂、赋形剂和/或药学佐剂。见，Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版，(A. R. Gennaro，编者)，1990，Mack Publishing Company。

在一些实施方案中，本领域技术人员根据例如，所希望的施用途

径、递送方式和所希望的剂量确定最佳药物组合物。见，例如，Remington's Pharmaceutical Sciences, 如前。在一些实施方案中，这些组合物可影响本发明抗体的物理状态、稳定性、体内释放速度和体内清除速度。

在一些实施方案中，药物组合物中的最初载体在性质上可以是水性或非水性的。例如，适宜的载体可以是注射用水、生理盐水或人工脑脊液，可能补充用于肠胃外施用的组合物中常用的其他物质。中性缓冲盐水或者与血清白蛋白混合的盐水是进一步的示例性载体。在优选的实施方案中，药物组合物含有 pH 约 7.0-8.5 的 Tris 缓冲液、pH 约 4.0-5.5 的乙酸缓冲液，并且可以还包括山梨醇或适宜的替代物。在本发明的一些实施方案中，通过将所选的具有所希望的纯度的组合物与任选的配制剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 如前) 以冻干饼或者水性溶液的形式混合可以制备用于保存的抗 IL-1R1 抗体组合物。此外，在一些实施方案中，可以用适宜的赋形剂如蔗糖将抗 IL-1R1 抗体产物制备成冻干物。

可以选择本发明的药物组合物用于肠胃外递送。可以选择该组合物用于吸入或通过消化道递送，如口服。这些药学上可接受的组合物的制备是本领域内的技术。

制剂组分存在的浓度优选为施用位点可接受的。在一些实施方案中，用缓冲剂保持组合物在生理 pH 或者稍低的 pH，典型地为约 5 到约 8 的 pH 范围。

当预期肠胃外施用，用于本发明的治疗性组合物可以以无致热原、肠胃外可接受的水性溶液的形式提供，该水性溶液含有药学上可接受的载体中的所希望的抗 IL-1R1 抗体。用于肠胃外注射的尤其适宜的载体是无菌蒸馏水，其中抗 IL-1R1 抗体被制备成无菌、等渗溶液，适当保存。在一些实施方案中，该制剂可包括所希望的分子与一种试剂，如微球体、生物可侵蚀的微粒、聚合的化合物 (如聚乳酸或聚乙醇酸) 珠子或脂质体的制剂，该试剂可以使通过 depot 注射递送的药物缓释或控释。在一些实施方案中，也可以使用透明质酸，其具有促进循环中持续时间的作用。在一些实施方案中，可施用可移植的药物递送装置导入所希望的抗体分子。

可以制备用于吸入的本发明的药物组合物。在这些实施方案中，

抗 IL-1R1 抗体被制备成用于吸入的干粉。在优选的实施方案中，抗 IL-1R1 抗体吸入溶液也可以与推进剂配制用于气溶胶递送。在一些实施方案中，溶液可被雾化。在国际专利公布号 W094/20069 中还描述了肺部施用和制备方法，该专利被并入作为参考，其描述了化学修饰的蛋白的肺部递送。

还预期制剂可以口服施用。以这种方式施用的抗-IL-1R1 抗体可以与或不与用于固体剂型如片剂或胶囊剂的配制中通常使用的载体配制。在一些实施方案中，可以设计胶囊剂在胃肠道的某一点释放制剂的活性部分，在该点生物利用度最大并且前-系统性降解最小。还可以包括额外的试剂以促进抗-IL-R1 抗体的吸收。也可以利用稀释剂、增味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、悬浮剂、片剂崩解剂，和结合剂。

优选提供本发明的药物组合物含有与适于片剂生产的无毒赋形剂混合的有效量的一种或多种抗-IL-1R1 抗体。将片剂溶于无菌水，或者另一种适宜的载体中，可以以单位-剂量形式制备溶液。适宜的赋形剂包括，但不限于，惰性稀释剂，如碳酸钙、碳酸钠或碳酸氢钠、乳糖，或磷酸钙；或者结合剂，如淀粉、明胶、或阿拉伯树胶；或者润滑剂如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。

另外的药物组合物对于本领域技术人员将是显然的，包括含有缓慢-或受控的递送制剂的抗-IL-1R1 抗体的制剂。制备各种其他缓慢-或受控的递送方式的技术，如脂质体载体、生物-易侵蚀的微粒或者有孔珠和 depot 注射液，是本领域技术人员公知的。见，例如，国际专利公布号 W093/15722，其被并入参考文献，该专利描述了用于递送药物组合物的有孔聚合微粒的控制。缓释制剂可包括成形的物品形式的半透性聚合物基质，例如，膜剂或微胶囊剂。缓释基质可包括聚酯、水凝胶、聚交酯(如在美国专利号 3,773,919 和欧洲专利公布号 EP 058481 中公开的)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman 等人, 1983, Biopolymers 22: 547-556)、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer 等人, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 和 Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105)、乙烯-乙酸乙烯共聚物(EVA)(Langer, 如前)、或聚-D(-)-3-羟基丁酸(欧洲专利申请公布号 EP133,988)。缓释组合物也可以包括脂质体，其可通过本领域中公知

的若干方法之一制备。见，例如，Eppstein 等人，1985，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688-3692；欧洲专利申请公布号 EP 036,676、EP 088,046 和 EP 143,949。

体内施用的药物组合物通常以无菌制剂提供。可通过无菌滤膜过滤实现除菌。当组合物被冻干时，可以在冻干和重构之前或之后用该方法除菌。用于肠胃外施用的组合物可以以冻干的形式保存或在溶液中保存。肠胃外组合物通常置于具有无菌入口的容器中，例如，静脉内溶液包或者具有塞子的小瓶，该塞子可被皮下注射针头穿透。

一旦已经配制了药物组合物，其可以作为溶液、悬浮液、凝胶剂、乳剂、固体，或者作为脱水或冻干的粉末保存在无菌小瓶中。这些制剂可以以直接使用的形式保存或者以施用前重构的形式（例如，冻干的）保存。

本发明还提供了产生单剂量施用形式的试剂盒。本发明的试剂盒可以每个含有具有干燥蛋白的第一容器和具有水性制剂的第二容器。在本发明的一些实施方案中，提供了含有一个或多个室的预装注射器（例如，液体注射器或 lyosyringes）的试剂盒。

所用的含有抗-IL-1R1 抗体的药物组合物的有效量将取决于例如，治疗背景和目标。本领域技术人员将明白治疗的适宜剂量水平将部分根据所递送的分子、所用的抗 IL-IL-1R1 抗体的适应症、施用途径和患者的大小（体重、体表面积或器官大小）和/或状况（年龄和一般健康）而变。在一些实施方案中，临床医生可以确定剂量和更改施用途径以得到最佳治疗效果。典型剂量可以为约 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 到约 100 mg/kg 或者以上，这取决于上述因素。在优选的实施方案中，剂量可以为约 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 到约 100 mg/kg；更优选地，约 1 $\mu\text{g/kg}$ 到约 100 mg/kg；甚至更优选 5 $\mu\text{g/kg}$ 到约 100 mg/kg。

给药频率将取决于所用的制剂中特定抗 IL-1R1 抗体的药物动力学参数。通常，临床医生施用该组合物直到剂量达到实现所希望的效果的剂量。因此，组合物可以作为单剂施用，或者作为两个或多个剂量（可以含有或不含有相同量的所希望的分子）随时间施用，或者作为连续灌注液通过植入装置或导管施用。适宜剂量的其他完善可由本领域普通技术人员常规地进行并且在他们常规实施的任务的范围内。可通过使用适宜的剂量-应答数据确定合适的剂量。

药物组合物的施用途径是按照公知的方法,例如,经口,通过静脉内注射、腹膜内、脑内(实质内)、脑室内、肌内、眼内、动脉内、门脉内,或病灶内途径,通过缓释系统或者通过植入装置。在一些实施方案中,可通过大丸注射或通过连续灌注,或通过植入装置施用组合物。

也可以通过膜、海绵或其他适宜的材料植入局部施用该组合物,在这些材料上已经吸附或包被所希望的分子。在一些实施方案中,当使用植入装置时,该装置可植入适宜的组织或器官,或者可通过扩散、定时释放的大丸剂,或者连续施用递送所希望的分子。

还希望体外使用根据本发明的抗-IL-1R1 抗体药物组合物。在这些实例中,从患者除去的细胞、组织或器官被暴露于抗-IL-1R1 抗体药物组合物,之后这些细胞、组织和/或器官被随后植入该患者体内。

具体地,,通过植入使用如此处描述的方法基因工程化而表达和分泌多肽的一些细胞递送抗 IL-1R1 抗体。在一些实施方案中,这些细胞可以是动物或人细胞,并且可以是自体的、异体的或异种的。在一些实施方案中,细胞可被永生。在其他实施方案中,为了减少免疫应答的机会,可以将细胞胶囊化以避免周围组织的浸润。在其他实施方案中,胶囊化材料典型地为生物相容的、半透性聚合物壳或膜,其允许蛋白质产物的释放但是防止患者的免疫系统或者来自周围组织的其他有害因子对细胞的破坏。

在一些实施方案中,本发明还包括将本发明的抗 IL-1R1 抗体或者药物组合物与施用于同一患者的一种或多种其他药物同时施用,根据适于该药物的使用方案使用每种药物。这包括预处理、同时治疗、顺次治疗或交替方案。这些药物的实例包括,但不限于,抗病毒剂、抗生素、镇痛剂、皮质类固醇、炎症细胞因子的拮抗剂、疾病-修饰性抗风湿病药物(DMARDs)和非类固醇消炎剂。

在其他实施方案中,本发明的抗 IL-1R1 抗体或药物组合物可以与其他细胞因子抑制剂组合施用,这些抑制剂包括拮抗,例如,RANKL、TGF β 、IFN γ 、IL-6 或 IL-8 和 TNF,尤其 TNF α 的抑制剂。本发明的抗体与 IL-6 组合可用于治疗和预防抽搐的复发,这些抽搐包括 GABA_A 受体拮抗诱导的抽搐、与 EEG 猝发相关的抽搐和癫痫状态期间发生的运动边缘系统抽搐。本发明的抗体与 INF γ 抑制剂组合可用于

治疗自发性肺纤维样变性和膀胱纤维样变性。与 IL-1 受体抗体和 RANKL 抑制剂,例如,RANKL 抗体组合可用于预防各种情况的骨破坏,包括但不限于各种风湿性失调、骨质疏松、多发性骨髓瘤或导致骨退化的其他恶性肿瘤,或者针对防止向骨转移的抗肿瘤治疗,或者与假体磨损碎片或与牙周炎相关的骨破坏。此外,本发明的抗体可以与 IL-17 抑制剂如 IL-17 受体的可溶形式(如 IL-17R:Fc)或者与 IL-17 抗体或 IL-17R 抗体、IL-18 结合蛋白、IL-19 受体的可溶形式,和 IL-18 抗体、针对 IL-18 受体的抗体或者针对 CD30-配体或针对 CD4 的抗体组合施用。

本发明还包括使用本发明的抗 IL-1R1 抗体或药物组合物与 TNF 抑制剂,优选 TNFR:Fc (ENBREL[®])和上述细胞因子或细胞因子抑制剂(它们是组合治疗中的活性剂)的任一组合组合治疗此处公开的医学失调的方法。例如,根据本发明,组合治疗方法可用于治疗类风湿性关节炎、中风、哮喘、牛皮癣等。

此处描述的抗 IL-1R1 抗体或药物组合物可以有效治疗的病症包括肺病如哮喘、慢性阻塞性肺病、肺泡蛋白质沉积、博来霉素诱导的肺病变和纤维样变性、放射诱导的肺纤维样变性、膀胱纤维样变性、肺中的胶原积累、和 ARDS,所有这些都可以用针对 IL-1R 的抗体和 IL-4 抑制剂和/或 IL-13 抑制剂,例如抑制 IL-13 和 IL-4 活性的 IL-4R 抗体组合治疗。本发明公开的抗体和药物组合物也可用于治疗支气管肺发育不良 (BPD)、慢性阻塞性肺病(例如,肺气肿和慢性支气管炎),和早产儿的慢性纤维样变性肺病。此外,本发明的化合物、组合物和组合治疗可用于治疗职业性肺疾病,包括石棉肺、煤炭工人的尘肺、硅肺或与长期暴露于细小颗粒有关的类似病症。在本发明的其他方面,所公开的化合物、组合物和组合治疗用于治疗 bronchiolitis、organizing pneumonia、肺纤维样变性,包括自发的肺纤维样变性和放射诱导的肺纤维样变性、肺肉样瘤病;和变态反应,包括过敏性鼻炎、接触性皮炎、特应性皮炎和哮喘。

这些组合物还可用于治疗各种皮肤失调的患者,这些皮肤失调包括但不限于疱疹性皮炎(Dühring 氏病)、特应性皮炎、接触性皮炎、风疹(包括慢性自发性风疹),和自身免疫水疱病,包括寻常天疱疮和大疱性类天疱疮。可以用 IL-1R 抗体和 IL-4 和/或 IL-13 抑制剂组合

治疗的其他疾病包括 myasthenia gravis、肉样瘤病，包括肺肉样瘤病、硬皮病、反应性关节炎、IgE 过多综合症、多发性硬化和自发性嗜酸性粒细胞过多综合症。该组合物还可用于治疗对药物的变态反应和作为变态反应免疫治疗的佐剂。

此处描述的 IL-1 受体抗体和药物组合物用于治疗原生动疾病，包括疟疾和血吸虫病，和治疗麻风的结节性红斑、细菌或病毒性脑膜炎、结核病，包括肺结核；细菌或病毒感染继发性肺炎和感染性单核细胞增多症。

单独用此处公开的药物组合物或抗 IL-1R1 抗体或者与其他细胞因子抑制剂组合可以治疗和/或防止心血管失调。可以治疗的心血管失调包括主动脉动脉瘤；包括腹部主动脉动脉瘤、急性冠状动脉综合症、动脉炎；血管阻塞，包括脑动脉阻塞；冠状动脉旁路手术并发症；局部缺血/再灌注损伤；心脏病，包括动脉粥样硬化性心脏病、心肌炎，包括慢性自身免疫心肌炎和病毒性心肌炎；心力衰竭，包括慢性心力衰竭、充血性心力衰竭、心力衰竭的恶病体质；心肌梗塞、心脏手术或颈动脉气囊血管成形术后的再狭窄和/或动脉粥样硬化；沉默性心肌局部缺血、左心室泵功能障碍、左心室辅助装置的移植后并发症、Raynaud 氏现象、血栓性静脉炎、血管炎，包括川崎血管炎；静脉闭塞病、巨细胞动脉炎、Wegener 氏肉芽肿病、心肺旁路手术后精神错乱，和 Schoenlein-Henoch 紫癜。

在一些实施方案中，本发明的抗 IL-1R1 抗体和药物组合物也可用于治疗慢性疼痛病症，如慢性骨盆痛，包括慢性前列腺炎/骨盆痛综合症，和疱疹后痛。

本发明的抗 IL-1R1 抗体和药物组合物也可用于治疗内分泌系统失调，包括青少年发作糖尿病（包括自身免疫糖尿病和胰岛素依赖的糖尿病）和成年发作糖尿病（包括非胰岛素依赖的和肥胖-介导的糖尿病）。这些治疗包括与糖尿病相关的继发性病症，如糖尿病性肥胖、糖尿病患者中肾移植排斥、肥胖-介导的胰岛素抗性，和肾衰竭，其自身可以与蛋白尿和高血压有关。用这些化合物也可以治疗其他内分泌失调，包括多囊卵巢病、X-连锁的脑白质肾上腺萎缩症、甲状腺功能不足和甲状腺炎，包括 Hashimoto 氏甲状腺炎（即，自身免疫甲状腺炎）、甲状腺细胞功能异常，包括甲状腺机能异常综合症。

本发明的抗 IL-1R1 抗体或药物组合物单独或与其他治疗剂组合可以治疗或预防胃肠道系统的病症。这些病症包括腹腔病、Crohn 氏病；溃疡性结肠炎；自发性胃轻瘫；胰腺炎，包括慢性胰腺炎；急性胰腺炎、炎性肠病和溃疡，包括胃溃疡和十二指肠溃疡。

用此处描述的抗 IL-1R1 抗体或药物组合物也可以治疗或预防泌尿生殖系统的失调。这些失调包括肾小球性肾炎，包括自身免疫肾小球性肾炎、暴露于毒素导致的肾小球性肾炎或者溶血性链球菌或其他感染剂感染的继发性肾小球性肾炎。本发明的化合物、组合物和组合治疗还可以治疗的是尿毒症综合症及其临床并发症(例如，肾衰竭、贫血和肥大性心肌病)，包括与暴露于毒素、药物或其他原因相关的尿毒症综合症。本发明的抗体可以治疗或预防胆囊壁炎症导致吸收功能变化引起的并发症。这些并发症包括胆石病(胆结石)和胆总管石病(胆道结石)和胆石病和胆总管石病的复发。本发明的化合物、组合物和组合疗法可治疗的其他病症是血液透析并发症；前列腺病症，包括良性前列腺增生、非细菌性前列腺炎和慢性前列腺炎；和血液透析并发症。

此处还提供了使用本发明的抗 IL-1R1 抗体、组合物和组合治疗治疗各种血液和肿瘤疾病的方法。例如，抗 IL-1R1 抗体，单独地或者与上述其他细胞因子抑制剂或其他活性剂组合，可用于治疗各种形式的癌症，包括急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、EB 病毒阳性鼻咽癌、神经胶质瘤、结肠癌、胃癌、前列腺癌、肾细胞癌、宫颈癌和卵巢癌，肺癌(SCLC 和 NSCLC)，包括癌相关的恶病体质、疲劳、乏力、恶病体质和血钙过多的副肿瘤性综合症。实体瘤，包括肉瘤、骨肉瘤，和癌，如腺癌(例如，乳腺癌)和鳞状细胞癌也是可以治疗的。其他可治疗的癌包括 esophageal 癌、胃癌、胆囊癌、白血病，包括急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓白血病，慢性或急性成淋巴细胞白血病和毛细胞白血病。用主题化合物、组合物和组合治疗也可以治疗其他具有侵染转移潜力的恶性肿瘤，包括多发性骨髓瘤。

此外，所公开的抗-IL-1R1 抗体可用于治疗贫血和血样失调，包括慢性自发性中性粒细胞减少、慢性病贫血、再生障碍性贫血，包括 Fanconi 氏再生障碍性贫血；自发性血小板减少性紫癜(ITP)、血栓性血小板减少性紫癜、myelodysplastic 综合症(包括顽固性贫血、

环状成高铁红细胞顽固性贫血、过量原始细胞顽固性贫血、转化的过量原始细胞顽固性贫血); 骨髓纤维化/骨髓外化生; 和镰刀形细胞 vasocclusive crisis。

本发明的抗-IL-1R1 抗体也可以治疗各种淋巴增殖性失调, 包括自身免疫淋巴增殖综合症(ALPS)、慢性成淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、慢性淋巴白血病、外周 T-细胞淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、套(mantle)细胞淋巴瘤、滤泡细胞淋巴瘤、非洲淋巴瘤、EB 病毒阳性 T-细胞淋巴瘤、组织细胞淋巴瘤、Hodgkin 氏病、扩散侵袭性淋巴瘤、急性淋巴白血病、T γ 淋巴增殖病、皮肤 B 细胞淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤(例如, 阿利贝尔氏病)和 Sézary 综合症。

本发明的抗体可以治疗遗传病症如 Gaucher 氏病、Huntington 病、线性 IgA 病, 和肌营养不良。

通过所公开的 IL-1 受体抗体或者药物组合物可以治疗或预防的其他病症包括头或脊髓损伤导致的病症, 包括头部创伤导致的硬膜下血肿。关于该治疗, 所描述的组合物和组合适于预防颅侧神经损伤和防止和治疗颈源性头痛。所描述的组合物和组合还适宜治疗与脑辐射相关的神经学上的副作用。

本发明的抗 IL-1R1 抗体和药物组合物还用于治疗肝脏病症如肝炎, 包括急性酒精肝炎、急性药物诱导的或病毒性肝炎、甲肝、乙肝和丙肝、硬化性胆管炎、肝窦状隙上皮, 和未知原因导致的肝炎。

本发明的抗 IL-1R1 抗体或药物组合物可以治疗与听力损失和与异常 IL-1 表达有关的失调。这些失调包括耳蜗神经相关的听力损失, 认为其由自身免疫过程导致, 即, 自身免疫神经损失。本发明的抗 IL-1R1 抗体或药物组合物还可以治疗或预防 Meniere 氏综合症和胆脂瘤、通常与听力损失有关的中耳失调。

此处描述的抗体还可以治疗骨和关节的非-关节炎性失调。这些失调包括导致骨损失的破骨细胞失调, 如但不限于骨质疏松, 包括绝经后骨质疏松、骨关节炎、导致牙齿松动或脱落的牙周炎, 和关节替换后的假肢松动(通常与对磨损碎片的炎症反应有关)。该后一病症也称为“矫形植入骨质溶解”。本发明的化合物、组合物和组合治疗可以治疗的另一病症是暂时性下颌骨关节功能障碍(TMJ)。

本发明的抗 IL-1R1 抗体或者药物组合物还可用于治疗风湿性失

调,包括成年人和青少年类风湿性关节炎;硬皮病、系统性红斑狼疮、痛风、骨关节炎、风湿性多肌痛、血清阴性脊椎关节病,包括关节强直性脊椎柱炎,和 Reiter 氏病,牛皮癣关节炎和慢性 Lyme 关节炎。本发明的抗体还可用于治疗随意肌和其他肌肉的炎症,包括皮肌炎、包含体肌炎、多肌炎,和淋巴管平滑肌瘤病。

本发明抗体和药物组合物的另一用途是治疗和/或预防原发性淀粉样变和继发性淀粉样变,其是各种病症的特征,这些病症包括阿尔茨海默氏病、继发反应性淀粉样变; Down 氏综合症; 和透析-相关的淀粉样变。本发明的抗体或药物组合物还可以治疗遗传性周期性发热综合症,包括家族性地中海发热、免疫球蛋白 D 过多和周期性发热综合症与 TNF-受体相关的周期性综合症 (TRAPS)。

在其他实施方案中,本发明的抗体或药物组合物可用于治疗皮肤或粘膜相关的失调。这些失调包括皮肤棘状松解病,包括 Darier 氏病、毛囊角化和寻常天疱疮。可用本发明的抗体治疗的额外的皮肤失调包括粉刺、酒糟鼻、斑秃、口疮性口炎、大疱性类天疱疮、烧伤、湿疹、红斑,包括多形性红斑和大疱性多形性红斑 (Stevens-Johnson 综合症)、炎性皮肤病、扁平苔癣、线性 IgA 大疱病 (儿童的慢性大疱性皮炎)、皮肤弹性丧失、粘膜表面溃疡,包括胃溃疡,嗜中性粒细胞皮炎 (Sweet 氏综合症)、皮肌炎、德佛札氏病、牛皮癣、坏疽性脓皮病、多中心网状内皮系统组织细胞瘤病和毒性表皮坏死溶解。本发明的治疗和组合治疗可以治疗的其他皮肤相关的病症包括疱疹性皮炎。

本发明的抗体或药物组合物可以治疗的额外的失调包括宿主抗移植物病,和实体器官移植,如心脏、肝脏、皮肤、肾脏、肺 (肺移植气道闭塞) 或其他移植,包括骨髓抑制导致的并发症。

所公开的抗-IL-1R1 抗体或药物组合物也可以治疗或预防眼失调,其包括视网膜剥离,和炎性眼病,包括与吸烟和黄斑变性有关的炎性眼病。

如此处描述的抗体或药物组合物可用于治疗影响女性生殖系统的失调。实例包括,但不限于,多移植衰竭 (multiple implant failure) / 不育、胎儿流产综合症或 IV 胚胎流产 (自发性流产); 惊厥前怀孕或惊厥; 子宫内膜异位、慢性宫颈炎、和早产。

此外, 本发明的抗体或药物组合物可用于治疗和/或预防坐骨神经痛、老化症状、严重药物反应(例如, IL-2 毒性或博来霉素诱导的肺病和纤维化), 或者在心脏或其他手术中同种异型红细胞输血之前、之间或之后抑制炎症反应, 或者用于治疗四肢或关节的外伤性损伤, 如外伤性膝损伤。用所公开的抗 IL-1R1 抗体或药物组合物可以治疗的各种其他医学病症包括: 多发性硬化、Behcet 氏综合症、Sjogren 氏综合症、自身免疫溶血性贫血、 β 地中海贫血、肌萎缩性侧索硬化(Lou Gehrig 氏病)、帕金森氏病、和不明原因的腱鞘炎, 以及与遗传缺陷相关的各种自身免疫失调或疾病, 包括 x-连锁的智力迟钝。

此外, 本发明的抗 IL-1R1 抗体或药物组合物可用于治疗中枢神经系统(CNS)损伤, 包括中枢神经系统中炎症刺激过程中神经毒性神经递质释放的影响, 和抑制或防止中枢神经系统损伤部位胶质疤痕的形成。关于癫痫和抽搐的治疗, 本发明的抗 IL-1R1 抗体或药物组合物可用于减小复发性抽搐的严重性和次数, 并减小抽搐的有害作用的严重性, 减少神经元损失、神经元退化和与抽搐相关的神经胶质增生。

本发明的抗体或药物组合物的额外用途包括, 但不限于, 治疗临界疾病多发性神经病和肌病(critical illness polyneuropathy and myopathy)(CIPNM)急性多发性神经病、神经性食欲缺乏、Bell 氏麻痹、慢性疲劳综合症、可遗传的痴呆, 包括 Creutzfeld-Jacob 病; 脱髓鞘神经病、Guillain-Barre 综合症、脊椎间盘病、海湾战争综合症、慢性炎性脱髓鞘多发性神经病、重症肌无力、沉默脑局部缺血、睡眠失调, 包括发作性睡病和睡眠呼吸暂停; 慢性神经元退化; 和中风, 包括脑缺血病。本发明抗体的额外用途是厌食和/或厌食性病症、腹膜炎、内毒素性血症和脓毒性休克、肉芽瘤形成、热中风、Churg-Strauss 综合症、急性感染后的慢性炎症如结核和麻风病、系统性硬化和肥大性瘢痕形成。

在其他实施方案中, 可以构建含有本发明的 IL-1R1 抗体之一的氨基酸序列的抗生物素蛋白融合蛋白用于各种目的。使用例如, 哺乳动物表达载体可以产生抗生物素蛋白融合蛋白, 该载体含有编码与用于插入特异靶基因融合配偶体的多克隆位点邻接的重组鸡抗生物素蛋白的 cDNA 序列。该载体可以包括抗生物素蛋白序列与其内源信号

序列，从而能够分泌不天然含有信号序列的不连续的融合基因配偶体。载体表达的融合蛋白具有融合配偶体的 N-末端部分的抗生物素蛋白标记。如此处描述的融合策略能够分泌通常在细胞内表达的蛋白，如信号转导基因或核激素受体。

备选地，可以使用编码没有内源信号序列的抗生物素蛋白，其可导致融合蛋白配偶体的 C-末端被标记。C-末端抗生物素蛋白融合也容许基于融合配偶体的内源信号序列的蛋白质分泌。可应用这种策略纠正蛋白质加工和折叠或者确定被提议的信号序列的有效性。此外，载体可以含有编码氨基酸序列的短核苷酸序列，该氨基酸序列可作为抗生物素蛋白和融合配偶体序列之间的特异酶切割底物。这种酶-可切割的序列允许为了纯化或蛋白质释放目的将融合配偶体与抗生物素蛋白分开。

本发明的抗生物素融合蛋白可用于，例如，抗体筛选、功能表征（确定抗体作为激动剂或拮抗剂、中和剂等适用性）、表位作图，或免疫策略。靶蛋白的抗生物素融合也可以用于药物动力学、效能或其他标准测定法形式中，设计这些测定法是为了检验样品或临床患者样品是否在血液、尿或其他组织样品中存在治疗性抗体。可以将抗生物素蛋白融合蛋白配偶体制备为全长或截断的序列、特异分离的结构域，或者作为与来自其他物种的融合配偶体的其他同系物的嵌合序列。

可以使用如此处描述的和本领域中公知的将基因导入细胞的任何一种标准方法来表达抗生物素蛋白融合蛋白。可通过在脂质，如 Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) 溶液中用抗生物素蛋白融合构建体转染细胞在例如 293 或 CHO 细胞中表达蛋白。

可收集条件培养基和/或表达融合蛋白的细胞的细胞裂解物并将其应用于测定基质，如生物素-包被的聚苯乙烯珠或生物素-包被的 ELISA 板。可以在允许融合蛋白最佳表达的时间点收集条件培养基和/或细胞裂解物。该时间点可以由本领域技术人员通过实验去定，但是通常为转染后约 48 小时。也可以分析融合蛋白在细胞膜或细胞内的表达和结合已知的配体、受体或抗体的功能性。

可以通过利用生物素-抗生物素蛋白相互作用的任一公知的或者以前表征的方法分析本发明的抗生物素蛋白融合蛋白。这些方法包

括,但不限于,流式细胞术和荧光成像/显微术。例如,可将培养基中或细胞裂解物中的抗生物素蛋白融合应用于生物素-包被的珠子并用荧光标记的抗-抗生物素蛋白抗体染色以指示表达水平。而且,在多比色测定法形式中可以应用识别特定融合蛋白配偶体的荧光抗体。此外,在竞争性测定法中可以将对融合蛋白配偶体特异的未标记的抗体与荧光标记的抗体同时应用。

在一些实施方案中,本发明提供了使用抗生物素蛋白融合蛋白进行表位作图的方法。下面提供了关于抗 IL-1R1 抗体的表位作图的本发明的表位作图方法的一个实例。然而,本领域技术人员将认识到这些方法可容易地应用于任一抗体的表位作图并且不限于抗-IL-1R1 抗体。例如,编码鸡抗生物素蛋白的 cDNA(具有内源信号序列)可以与编码融合到 3'末端 FLAG-标记序列的目标蛋白(即被确定表位所希望的抗体识别的蛋白)的 cDNA 的 5'末端连接。可以用常规分子技术将 FLAG-标记的融合基因装配在表达载体中。可用常规技术产生一组突变的抗生物素-FLAG 标记的蛋白,其中一些氨基酸已经被置换(例如,用来自另一动物物种的相应氨基酸残基置换)。可以在宿主细胞中表达突变的和野生型蛋白并使用,例如,蛋白质印迹分析或者如此处描述的基于珠子的结合测定法检测野生型或突变蛋白与目标抗体的结合。从而,通过确定突变蛋白中的哪些置换破坏了目标抗体的结合来限定表位。

实施例

提供了下面的实施例,包括所实施的实验和得到的结果,这些仅用于阐明性目的,不应被理解为限制本发明。

实施例 1

产生针对白介素-1 受体型 1(IL-1R1)的人单克隆抗体
转基因 HuMab 小鼠

使用转基因小鼠 HCo7 品系制备针对 IL-1 受体型 1(IL-1R1)的完全人单克隆抗体,该转基因小鼠 HCo7 品系表达人抗体基因。在这些小鼠品系的每一种中,已经如 Chen 等人(1993, EMBO J. 12: 811-820)描述的将内源小鼠 κ 轻链纯合地破坏,并且已经如国际专利申请公布号 W001/09187(并入参考文献)的实施例 1 中描述的将内源小鼠重链基因纯合地破坏。这些小鼠品系的每一个携带如 Fishwild 等人(1996,

Nature Biotechnology 14: 845-851) 中描述的人 κ 轻链转基因 KCo5。HCo7 品系携带如美国专利号 5,545,806、5,625,825、和 5,545,807 (并入参考文献) 中描述的 HCo7 人重链转基因。HCo7 品系在此处被称为 HuMab 小鼠。

HuMab 免疫

为产生针对 IL-1R1 的完全人单克隆抗体。用来自昆虫或哺乳动物细胞 (例如, CHO 细胞) 的纯化的重组 IL-1R1 作为抗原免疫 HuMab 小鼠。HuMab 小鼠的一般免疫方案在 Lonberg 等人 (1994, Nature 368: 856-859; Fishwild 等人, 如前; 和国际专利申请号 W098/24884 中描述, 这些文献的每一篇的教导都被并入作为参考。当第一次灌输抗原时小鼠为 6-16 周龄。IL-1R1 抗原的纯化的重组制剂 (25-50 μ g) (例如, 从被转染的表达 IL-1R1 的昆虫或哺乳动物细胞纯化) 用于腹膜内 (IP) 或皮下 (Sc) 免疫 HuMab 小鼠。

使用完全弗氏佐剂中的抗原并注射两次实现 HuMab 转基因小鼠的免疫, 然后用不完全弗氏佐剂中的抗原腹膜内免疫 2-4 周 (高达共 11 次免疫)。数打小鼠被每种抗原免疫。用 IL-1R1 免疫 HCo7 品系的共 149 只小鼠。通过眶后取血监视免疫应答。

为了选择结合 IL-1R1 的抗体的 HuMab 小鼠, 如 Fishwild 等人 (如前) 描述的通过 ELISA 检验免疫小鼠的血清。简言之, 将从昆虫或哺乳动物细胞纯化的重组 IL-1R1 溶于 PBS 中, 浓度为 1-2 μ g/mL, 将该溶液以 50 μ L/孔包被微量滴定板并在 4°C 过夜孵育, 然后将微量滴定板用 200 μ L/孔 PBS/Tween (0.05%) 中的 5% 鸡血清封闭。向每孔加入来自 IL-1R1 免疫的小鼠的血清稀释液并在室温孵育 1-2 小时。将板用 PBS/Tween 洗涤并用缀合辣根过氧化物酶 (HRP) 的山羊-抗-人 IgG Fc-特异的多克隆试剂在室温下孵育 1 小时。将板用 PBS/Tween 洗涤并用缀合辣根过氧化物酶 (HRP) 的山羊-抗-人 IgG Fc-特异的多克隆试剂在室温下孵育 1 小时。洗涤后, 将板用 ABTS 底物显色 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, 目录号 A-1888, 0.22 mg/mL) 并通过分光光度计在 415-495 nm 下分析 OD。用具有抗-IL-1R1 人免疫球蛋白的足够效价的小鼠产生如下描述的单克隆抗体。

产生针对 IL-1R1 的人单克隆抗体的杂交瘤的制备

通过静脉内注射抗原强化来制备用于单克隆抗体产生的小鼠, 强

化后两天处死小鼠，之后除去脾脏。从 HuMab 小鼠分离小鼠脾细胞并通过标准方案用 PEG 将其与小鼠骨髓瘤细胞系融合。通常，对每种抗原实施 20-30 个融合。

简言之，用 50%PEG (Sigma) 将来自免疫小鼠的脾脏淋巴细胞的单一细胞悬浮液与 P3X63-Ag8.653 非分泌性小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC, 记录号 CRL 1580) 或者 SP2/0 非分泌性小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC, CRL1581) 数目的 1/4 融合。将细胞以约 1×10^5 个/孔平铺在平底微量滴定板中，然后在含有 10%胎牛血清、10%P388D1- (ATCC 记录号 CRL TIB-63) 条件培养基、DMEM (Mediatech, 目录号 CRL 10013, 具有高葡萄糖、L-谷氨酰胺和丙酮酸钠) 中的 3-5%origen (IGEN) 加 5 mM HEPES、0.055 mM 2-巯基乙醇，50 mg/mL 庆大霉素和 $1 \times$ HAT (Sigma, 目录号 CRLP-7185) 的选择性培养基中孵育约 2 周。1-2 周后，将细胞培养在以 HT 代替 HAT 的培养基中。

对所得杂交瘤筛选抗原-特异抗体的产生。通过 ELISA 对每个孔筛选人-抗-IL-1R1 单克隆 IgG 抗体。一旦发生大范围的杂交瘤生长，通常在 10-14 天后监视培养基。将分泌抗体的杂交瘤再次涂板，再次筛选，如果对人 IgG 仍然阳性，那么通过有限稀释将抗 IL-1R1 单克隆抗体亚克隆至少 2 次。体外培养稳定的亚克隆以在组织培养基中产生少量抗体用于鉴定。

选择结合 IL-1R1 的人单克隆抗体

如上述的 ELISA 测定法被用于筛选与 IL-1R1 免疫原表现出阳性反应性的杂交瘤。对分泌高亲和性结合 IL-1R1 的单克隆抗体的杂交瘤亚克隆并进一步鉴定。为每种杂交瘤选择一个保留亲本细胞反应性 (通过 ELISA 确定) 的克隆以制备 5-10 个小瓶细胞库，将其保存在液氮中。

如此处公开的实施同种型-特异的 ELISA 以确定产生的单克隆抗体的同种型。在这些实验中，将微量滴定板孔用 50 μ L 溶液/孔包被，该溶液为溶于 PBS 中的 1 μ g/ml 小鼠抗-人 κ 轻链，并将板在 4℃ 过夜孵育。用 5%鸡血清封闭后，将板与每种受试单克隆抗体的上清液和纯化的同种型对照反应。将板在室温下孵育 1-2 小时。然后将孔与人 IgG1、IgG2 或 IgG4-特异的辣根过氧化物酶-缀合的山羊-抗人多克隆抗血清反应并将板显色并如下描述的进行分析。

通过 ELISA 检测从杂交瘤上清液纯化的表现出对 IL-1R1 的显著结合的单克隆抗体,用体外结合测定法和基于人软骨细胞和全血细胞的测定法试验这些单克隆抗体的生物学活性。表现出最佳活性的抗体被指定为 15C4、26F5、27F2、24E12、和 10H7。对抗体实施初步表位分选实验。将 ELISA 板用人 sIL-1R1(1+2+3 结构域)、截断的人 sIL-1R1(1+2 结构域)、大鼠 sIL-1R1、人 sIL-1R 型 II 和卵白蛋白(负对照)包被。用缀合辣根过氧化物酶的抗-人 Fc 抗体(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)检测抗体结合。结果概述于表 2。表 2 中的勾号(√)代表结合的阳性结果;“×”代表阴性结果。抗体 15C4、26F5、27F2 和 24E12 仅结合具有所有三个胞外结构域的 IL-1R1 蛋白,表明每一种抗体的表位都落在第三个结构域内。抗体 10H7 结合全长胞外结构域 IL-1R1 和仅有结构域 1 和 2 的截断的蛋白,表明该抗体的表位位于结构域 1 或 2 内。所试验的抗体都没有与人 II 型受体或大鼠 IL-1R1 的交叉反应性。

表2

抗体	OA (阴性对照)	Hu sIL-1R1 (1+2+3 结构域)	Hu sIL-1R1 (1+2 结构域)	Hu sIL-1RII (1+2+3 结构域)	大鼠 sIL-1R1 (1+2+3 结构域)
15C4	X	√	X	X	X
26F5	X	√	X	X	X
27F2	X	√	X	X	X
24E12	X	√	X	X	X
10H7	X	√	√	X	X

实施例 2

通过抗 IL-1R1 抗体体外抑制 IL-1 受体型 1 复合体形成

在测定法中用重组蛋白体外评估抗体抑制 IL-1 信号化所需的胞外结合事件的能力,在该测定法中,IL-1 对 IL-1R 的结合导致形成 IL-1RAcP 的高亲和性结合位点。如下测量 IL-1RAcP 与 IL-1-结合的 IL-1R 的结合(称为“复合体形成”)。在结合测定法中,不存在(对照)或存在抗体时,在微量滴定板中孵育重组蛋白。将对照值与存在

浓度为 10 fM 到 1 μ M 的抗体时所得值比较得到 IC_{50} 值。简言之，如下实施测定法。将生物素化 IL-1R1 和链霉抗生物素蛋白-包被的珠子 (Dynal, Dynabeads M-28) 分散在微量滴定板中。然后将抗体的宽范围浓度的连续稀释液加入适宜的孔中。IL-1 β 或 IL-1 α 以 1 nM 浓度加入，用钉标记的 IL1RacP (根据 IGEN 方案用 NHS-Tag (IGEN) 制备) 以 5 nM 的终浓度加入。室温下孵育 1 小时后，用 ORIGENTM 1.5 或 M8 仪器 (IGEN International Inc.) 分析结合反应。通过与 IL-1R1 结合珠子相关的电化学发光信号确定 IL-1RacP 对 IL-1 结合的 IL-1R1 的结合。IL-1 或 IL-1RacP 结合的抗体竞争导致的信号减弱被计算为最大结合 (无竞争) 的 ECL 信号的百分比。

用 PRISMTM 软件建立这些结合测定法中每种抗体的抑制应答曲线并得到 IC_{50} 。通过图 12 中的图描绘 IL-1 β 诱导的结合事件的抑制结果。在下面的表 3 中显示了抑制复合体形成的 IC_{50} 。抗体 15C4、26F5、27F2 和 24E12 强烈抑制复合体形成。这些抗体都是 IL-1R1 第三结构域结合剂，如上述。抗体 10H7 属于一类抗体，其结合缺少第三结构域的 IL-1R 的构建体。10H7 是比第三结构域结合剂稍弱的 IL-1 驱动的 IL-1RacP 结合的抑制剂。将通过本发明的抗体产生的复合体形成抑制与 IL-1ra 抑制比较。第三结构域结合剂抑制复合体形成的能力与 IL-1ra 类似或稍强。

图 13 描绘了抗体 15C4 抑制 IL-1R1/IL-1 α /RacP 复合体形成的能力。IL-1R1/IL-1 α /RacP 复合体形成的 IC_{50} 是 43 pM。

表3

	人抗-IL-1R1					rIL-1ra
	15C4	26F5	27F2	24E12	10H7	
IC50	96 pM	160 pM	333 pM	348 pM	5.3 nM	535 pM
95%置信范围	71 pM 到 129 pM	118 pM 到 219 pM	214 pM 到 517 pM	223 pM 到 542 pM	3.6 nM 到 7.5 nM	414 pM 到 743 pM

实施例 3 抗-IL-1R1 抗体抑制 IL-1 β 和 IL-1ra 对受体的结合

用重组蛋白在测定法中评估抗-IL-1R1 抗体抑制 IL-1 β 或 IL-1ra 与 IL-1R1 结合的能力。反应混合物含有 0.1 mg/mL Dynabeads M-280 链霉抗生物素蛋白 (Dynal) 和 1 nM 生物素化 IL-1R1。加入浓度为 320 nM 到 0.3 nM 的抗体。钉标记的 IL-1 β (5 nM) 或 IL-1ra (1 nM)

的加入启动结合,该结合在室温下进行 1h。如上使用 ORIGEN™ 1.5 或 M8 仪器 (IGEN International Inc.) 测量反应混合物。竞争被计算为最大结合 (无竞争) 的 ECL 信号的百分数。抗体 15C4、26F5 和 27F2 是最强的抗体,它们阻断配体 (IL-1 β) 与受体的结合,但是与 IgG 对照相比不显著干扰 IL-1ra 的结合。相比,抗体 24E12 结合受体但是不阻断 IL-1 β 或 IL-1ra 与受体的结合。从而,抗体 24E12 代表与 15C4、26F5 和 27F2 所代表的类别不同的独特类别的第三结构域结合剂。抗体 10H7 抑制 IL-1 β 和 IL-1ra 与受体的结合。结果在图 14 中总结。

实施例 4

软骨细胞和人全血测定法

将原代人软骨细胞 (Cell Applications Inc., San Diego, CA) 以 10,000 个细胞/孔的密度接种在 96-孔板中,孔中含有含 1%FBS 和 1%Pen Strep (GIBCO) 的 DMEM 培养基。让细胞过夜恢复,然后在 20 分钟内加入浓度为 10nM 到 0.1 pM 的抗-IL1-R1 抗体。加入 IL-1 β 至浓度为 1 pM ($\sim$ EC₅₀) 并在 37℃ 孵育 16 小时后收获培养上清液。使用 ELISA (Pierce-Endogen, Rockford, IL, Cat# EH2IL-65) 根据生产商的使用说明书测量上清液中的 IL-6 水平。使用 PRISM 软件为基于细胞的测定法中本发明的每种抗体建立抑制应答曲线并得到 IC₅₀ 值。与 IL-1ra 相比,抗体 15C4、26F5 和 27F2 是 IL-1 信号化的强烈抑制剂 (图 15A)。抗体 24E12 和 10H7 明显比 15C4 和 27F2 弱 (图 15B)。在表 4A 和 4B 中显示了人软骨细胞对 IL-1 β 诱导的 IL-6 产生的抑制的 IC₅₀ 值 (分别相应于图 15A 和 15B)。

将抗 IL-1R1 单克隆抗体 15C4、26F5 和 27F2 与人全血细胞预孵育 40-60 分钟,该全血细胞从正常志愿者收集并溶于肝素钠真空容器 (vacutainers) 中。如下实施测定法:将 100 μ l 新鲜分离的血液等分到 96 孔板的孔中。向含有 10% 人 AB 血清的 RPMI 培养基加入 50 μ l 抗体。然后以 30 pM (EC₅₀) 的浓度加入 IL-1 β 。18 小时后收获培养上清液,并使用 ELISA 测量上清液中的 IL-6 水平。作为对照,将 IL-1ra 与全血预孵育 40-60 分钟,并如上测量 IL-6 的产生。三种抗-IL-1R1 抗体封闭 IL-1 活性的有效性与 IL-1ra 的相当 (图 16)。在表 5 中显示了人全血中 IL-1 诱导的 IL-6 产生的抑制的 IC₅₀ 值。

表4A

	人抗-IL-1R1抗体			rIL-1ra
	15C4	27F2	26F5	
IC50	16 pM	32 pM	26 pM	32 pM
95%置信范围	15 pM到18 pM	21 pM到49 pM	19 pM到36 pM	22 pM到46 pM

表4B

	人抗-IL-1R1抗体				rIL-1ra
	15C4	27F2	10H7	24E12	
IC50	7 pM	28 pM	7.5 pM	NA	20 pM
95%置信范围	5.8 pM到7.9 pM	22 pM到35 pM	5.6 nM到10 nM	NA	17 pM到23 pM

表5

供体	分析参数	15C4	26F5	27F2	IL-1ra
1047	IC50	126 pM	410 pM	249 pM	241 pM
	95%置信范围	47 pM到339 pM	213 pM到790 pM	88 pM到703 pM	124 pM到471 pM
1319	IC50	111 pM	174 pM	579 pM	381 pM
	95%置信范围	59 pM到208 pM	60 pM到501 pM	249 pM到1.3 nM	167 pM到875 pM
复合的	IC50	126 pM	372 pM	387 pM	264 pM
(合并的数据)	95%置信范围	62 pM到255 pM	187 pM到739 pM	202 pM到748 pM	134 pM到517 pM

实施例5 诱变和表位作图

使用 IL-1R1 的定点诱变 (Altered Sites In Vitro Mutagenesis System, Promega, Madison WI) 制备一组突变的蛋白 (“突变蛋白”), 其中大鼠氨基酸残基被相应的人序列置换。构建了 15 种不同的突变质粒 (见图 17 中编号的横条)。编码这些置换蛋白和亲本 IL-1R1 的质粒被瞬时转染到 CHO 细胞中。产生假转染子作为阴性对照。用 Centriprep 10 浓缩柱 (Amicon) 将来自这些细胞的条件培养基 (CM) 浓缩约 20 倍。通过 SDS-PAGE 和蛋白质印迹评估突变蛋白的表达。13 种突变蛋白的表达水平允许评价抗体结合。将蛋白质加到凝胶、电泳并转移到膜。将膜在溶于 PBS 和 0.1 % Tween-20 的 1% 奶封闭然后在室温下用溶于 PBS 和 0.1 % Tween-20 的 0.5 μ g/mL 抗 IL-1R 抗体 15C4、27F2、或 24E12 孵育 1 小时。洗涤后, 将膜用山羊抗-人 IgG-Fc-HRP 孵育。使用化学发光 (ECL) 底物 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)

检测信号。对抗体结合关键的人特异序列被鉴定为当用大鼠序列置换时 ECL 信号减弱或消除的那些序列。与 24E12 相比, 15C4 对突变体 1、2、4 和 10 的识别被削弱(图 18, 顶栏)。类似地, 27F2 对 1、2 和 4 的识别被削弱(图 18, 中间栏)。24E12 对突变体 12、13、14 和 15 没有显著结合(图 18, 底部栏)。

对人抗-IL-1R1 抗体的分离和表征已经鉴定了三种不同类的竞争性抗体(图 19)。IL-1 生物活性的最强烈的抑制剂(如通过基于细胞的生物测定阐明的)为结合 IL-1R1 的第三结构域并且防止 IL-1- β 解离的那些抗体。用一组第三结构域突变蛋白质实施表位作图实验, 该实验表明这类抗体(包括 15C4、27F2 和 26F5)具有重叠但是不相同的构象表位。图 20 和 21 在 IL-1ra 结合的 IL-1 受体的带状图(Schreuder 等人, 1997, *Nature* 386 : 194-200). 中阐明了 IL-1 受体的第三结构域上 15C4 表位的位置, 定义最强的抗体类结合的 IL-1 受体残基以灰色图解。这些抗体已经表现了优良的效价, 从而这些表位限定了优良类别抗体的结合位点。15C4 和 27F2 结合位点是重叠但不是相同的, 如通过上述 IL-1R1 中 15 种不同位点的突变分析所确定的。位点在图 17 中描绘为蛋白质序列上带编号的横条。相互作用的关键位点似乎在位点 1(LSDIA; SEQ ID NO: 41)、2(VIDE; SEQ ID NO: 42)、4(YSV)和 10(TCFA; SEQ ID NO: 43)的突变内。15C4 和 27F2 结合位点包含在位点 1 和 2 内, 因为在任一位点内用人残基置换大鼠残基都消除了结合。27F2 与 15C4 的不同之处在于在位点 4 完全消除其结合, 而 15C4 结合被减弱而不是完全除去。突变 10 也减弱 15C4 结合, 但是 27F2 与该位点没有明显的相互作用。晶体结构的检查揭示这些残基限定第三结构域的一面, 该面指向被结合的配体所占据的空间(图 20 和 21)(Vigers 等人, 1997, *Nature* 386: 190-194)。

所鉴定的第二类抗体的代表是 10H7, 这类抗体不需要第三结构域用于结合, 并且不像优选的类, 抑制 IL-1ra 结合。该类在生物测定中有活性, 但是比优选的类别弱。

相比在生物测定中优选类别的抗体强烈抑制 IL-1, 24E12 在生物测定中是无效抑制剂。抗体 24E12 抑制 IL-1RAcP 与 IL-1-结合的 IL-1R 的结合。这类抗体的表位(通过突变体 12、13、14 和 15 限定)与 IL-1R1 的跨膜结构域接近, 并且位于与 IL-1 和 IL-1ra 结合不直

接相关的区域内(图 22)。

实施例 6 克隆抗 IL-1R1 抗体的重链和轻链

抗-IL-1R1 15C4 MAb 轻链的克隆

将三种杂交瘤表达的结合 α IL-1R1 的单克隆抗体 15C4、27F2 和 26F5 的轻链克隆到哺乳动物细胞表达载体 pDSR α 19 中(见国际专利申请公布号 W0 90/14363, 其在此处为了任何目的被并入作为参考)。在此处清楚地描述了编码 15C4 κ 轻链的质粒的构建; 用类似方法实施其他轻链种类的克隆。用 TRIzol®试剂(Invitrogen)制备 α IL-1R1 杂交瘤 15C4 总 RNA, 然后制备第一条链 cDNA, 用聚合酶链式反应(PCR)扩增方法从该第一条链 cDNA 得到 α IL-1R1 κ 轻链可变区。用 GeneRacer™ 试剂盒(Invitrogen), 使用具有延伸接合体(adaptor)的随机引物(5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNNNT-3'; SEQ ID NO: 44)和 5'RACE(cDNA 末端的快速扩增)合成第一条链 cDNA。对于全部轻链, 正向引物是 GeneRacer™ 嵌套引物(5' GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAGTA-3'; SEQ ID NO: 45) 并且反向引物是 5'-GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG-3' (SEQ ID NO: 46)。将 RACE 产物克隆到 pCR4-TOPO (Invitrogen)中并确定 DNA 序列。15C4 κ 链共有 DNA 序列用于设计进行全长抗体链 PCR 扩增的引物。5' κ PCR 引物编码信号序列的氨基末端、XbaI 限制酶位点, 和优化的 Kozak 序列(5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GTC GCC ATC ACA ACT CAT TGGG-3'; SEQ ID NO: 47)。3'引物编码羧基末端和终止密码子, 以及 SalI 限制性位点(5'-CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCTC-3'; SEQ ID NO: 48)。

5' α IL-1R1 15C4 kappa primer (SEQ ID NO: 47):

5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GTC GCC ATC ACA ACT

XbaI Kozak M S P S Q L

CAT TGG G -3'

I G (SEQ ID NO: 49)

3' α IL-1R1 15C4 kappa primer (SEQ ID NO: 48):

5'- CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C -3'

SalI * C E G R N F S (SEQ ID NO: 50)

用 pCR4: 15C4 κ 克隆并使用 5'和 3' α IL-1R1 15C4 κ 引物通过 PCR 扩增克隆得到全长 α IL-1R1 15C4 κ 链克隆。PCR 反应产生了 733 个碱基对的产物, 其编码 α IL-1R1 15C4 κ 链的 233 个氨基酸残基(包括 19 个氨基酸的 κ 链信号序列)。用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(Qiagen Cat. No. 28104)纯化 PCR 产物, 将其用 XbaI 和 SalI 切割、凝胶分离并用 QIAquick 凝胶提取试剂盒(Qiagen Cat. No. 28704)纯化。该 PCR 片段含有完整 α IL-1R1 15C4 κ 链, 将该 PCR 片段连接到哺乳动物表达载体 pDSR α 19 中。对 15C4 κ 链表达克隆进行 DNA 测序以确定该克隆编码 15C4 杂交瘤中鉴定的相同肽。最终表达载体 pDSR α 19: 15C4 κ 为 5468 个碱基对并含有表 6 中描述的 7 个功能区。

表6

质粒碱基对编号:

2 到 881	牛垂体糖蛋白激素的 α -亚单位 (α -FSH) 的转录终止/聚腺苷酸化信号 (Goodwin等人, 1983, Nucleic Acids Res. 11: 6873-82 ; Genbank记录号X00004)
882 到 2027	含有内源小鼠DHFR启动子、cDNA编码序列, 和DHFR转录终止/聚腺苷酸化信号的小鼠二氢叶酸还原酶(DHFR)小基因 (Gasser等人, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 6522-6 ; Nunberg 等人, 1980, Cell 19: 355-64 ; Setzer等人, 1982, J. Biol. Chem. 257: 5143-7; McGrogan 等人, 1985, J. Biol. Chem. 260: 2307-14)
2031 到 3947	含有氨苄西林抗性标记基因和大肠杆菌中质粒的复制原点的pBR322序列 (Genbank记录号J01749)
3949 到 4292	SV40早启动子、增强子和复制原点 (Takebe等人, 1988, Mol. Cell Biol. 8: 466-72, Genbank记录号J02400)
4299 到 4565	来自HTLV-1 LTR结构域的翻译增强子元件 (Seiki等人, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 3618-22, Genbank记录号J02029)
4574 到 4730	来自SV40 16S、19S剪接供体/受体信号的内含子 (Okayama和Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3: 280-9, Genbank记录号J02400)
4755 到 5468	XbaI和SalI位点之间的15C4 κ 轻链cDNA

构建 pDSR19 : hIgG1C_H

构建 pDSR α 19: 大鼠可变区/人恒定区 IgG1 (rVh/hCh1) Mab 表达质粒, 构建过程是将具有 XbaI 和 BsmBI 末端的大鼠抗体可变区 PCR 产物、人 IgG1 恒定区 (C_H1、铰链、C_H2 和 C_H3 结构域) 和具有 XbaI 和

Sa1I末端的线性化 pDSRa19 连接, 其中人 IgG1 恒定区是通过将线性质粒 pDSR α 19: hIgG1 C_H (HindIII 和 BsmBI 末端) 的 BsmBI 和 Sa1I 片段用 Sa1I 切割并凝胶分离得到 (见共有的和共同待决的 2002 年 4 月 5 日提交的美国临时专利申请号 60/370, 407, “作为选择性 OPGL 途径抑制剂的人抗-OPGL 中和抗体”, 将其并入参考文献)。最终表达载体 pDSR α 19: 大鼠可变区/人恒定区 IgG1 (rVh/hCh1) 为 6158 个碱基对并且含有表 7 中描述的 7 个功能区。

表7

质粒碱基对编号:

2 到 881	牛垂体糖蛋白激素的 α -亚单位 (α -FSH) 的转录终止/聚腺苷酸化信号 (Goodwin 等人, 1983, Nucleic Acids Res. 11: 6873-82 ; Genbank 记录号 X00004)
882 到 2027	含有内源小鼠 DHFR 启动子、cDNA 编码序列, 和 DHFR 转录终止/聚腺苷酸化信号的小鼠二氢叶酸还原酶 (DHFR) 小基因 (Gasser 等人, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 6522-6 ; Nunberg 等人, 1980, Cell 19: 355-64 ; Setzer 等人, 1982, J. Biol. Chem. 257: 5143-7; McGrogan 等人, 1985, J. Biol. Chem. 260: 2307-14)
2031 到 3947	含有氨苄西林抗性标记基因和大肠杆菌中质粒的复制原点的 pBR322 序列 (Genbank 记录号 J01749)
3949 到 4292	SV40 早启动子、增强子和复制原点 (Takebe 等人, 1988, Mol. Cell Biol. 8: 466-72, Genbank 记录号 J02400)
4299 到 4565	来自 HTLV-1 LTR 结构域的翻译增强子元件 (Seiki 等人, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 3618-22, Genbank 记录号 J02029)
4574 到 4730	来自 SV40 16S、19S 剪接供体/受体信号的内含子 (Okayama 和 Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3: 280-9, Genbank 记录号 J02400)
4755 到 6158	XbaI 和 Sa1I 位点之间的 rVh/hCh1 重链 cDNA。该重链片段序列在下面显示 (SEQ ID NO: 51), 限制性位点序列用下划线标出: <u>XbaI</u> <u>TCTAG</u> ACCACCATGG ACATCAGGCT CAGCTTAGTT TTCCTTGTC TTTTCATAAA AGGTGTCCAG TGTGAGGTAG AACTGGTGGA GTCTGGGGGC GGCTTAGTAC AACCTGGAAG GTCCATGACA CTCTCCTGTG CAGCCTCGGG ATTCACTTTC AGAACCTATG GCATGGCCTG GGTCCGCCAG GCCCAACGA AGGGTCTGGA GTGGGTCTCA

	TCAATTACTG CTAGTGGTGG TACCACCTAC TATCGAGACT CCGTGAAGGG CCGCTTCACT ATTTTATAGG ATAATGCAAA AAGTACCCTA TACCTGCAGA TGGACAGTCC GAGGTCTGAG GACACGGCCA CTTATTCTG TACATCAATT <i>BsmBI</i> TCGGAATACT GGGGCCACGG AGTCATGGTC ACCGTCCTTA GTGCCTCCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCC GAACCG GTGACGGTGT CGTGGA ACTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC CCAAATCTTG TGACAAA ACT CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCCTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA <i>SalI</i> AATGATAAGT CGAC
--	--

用限制酶 *XbaI* 和 *BsmBI* 消化 pDSR19: 大鼠可变区/人恒定区 IgG1 质粒除去大鼠可变区并用 QIAquick 凝胶提取试剂盒纯化制备线性质粒 pDSR α 19: hIgG1C_H。线性质粒 pDSR α 19: hIgG1C_H 含有 1 kbp 人 IgG1 恒定区结构域, 该质粒被用于接受从杂交瘤得到的 α IL-1R 抗体可变区。

克隆抗-IL1-R1 15C4 MAb 重链

将十种杂交瘤表达的结合 α IL-1R1 的单克隆抗体 15C4、27F2 和 26F5 的重链克隆到哺乳动物细胞表达载体 pDSR α 19 中。已经清楚地描述了编码 15C4 重链的质粒的构建; 用类似方法实施其他重链种类的克隆。用 TRIzol® 试剂从 α IL-1R1 杂交瘤 15C4 制备总 RNA, 然后制备第一条链 cDNA, 用 PCR 扩增方法从该第一条链 cDNA 得到 α IL-1R1 15C4 重链可变区。用 GeneRacer™ 试剂盒, 使用具有延伸接合体的随机引物 (5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNNNT-3'; SEQ ID NO: 44) 和 5'RACE (cDNA 末端的快速扩增) 合成第一条链 cDNA。对于部分长度重链, 正向引物是 GeneRacer™ 嵌套引物 (5' GGA CAC TGA CAT

GGA CTG AAG GAGTA-3' ; SEQ ID NO: 45) 并且反向引物是 5'-TGA GGA CGC TGA CCA CAC G-3' (SEQ ID NO 52.)。将 RACE 产物克隆到 pCR4-TOPO 中并确定 DNA 序列。15C4 重链可变区共有 DNA 序列用于设计重链可变区 PCR 扩增的引物。5'重链 PCR 引物编码信号序列的氨基末端、XbaI 限制酶位点, 和优化的 Kozak 序列 (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGG GTC AAC CGC CAT CCT CG-3' ; SEQ ID NO: 53)。3'引物编码可变区的羧基末端, 包括天然发生的有义链 BsmBI 位点 (5'-GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTTCC-3' ; SEQ ID NO: 54)。

5'αIL-1R1 15C4 重链引物 (SEQ ID NO: 53):

5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC C ATG GGG TCA ACC GCC

XbaI Kozak M G S T A

ATC CTCG -3'

I L (SEQ ID NO: 55)

3'αIL-1R1 15C4 重链引物 (SEQ ID NO: 54):

5'- GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTT CC-3'

T S A S S V T V L T G (SEQ ID NO: 56)

BsmBI

抗-IL1-R1 IgG1 重链表达克隆的构建

用 pCR4: 15C4 重链克隆并使用 5'和 3' α IL-1R1 15C4 重链引物通过 PCR 扩增得到全长 α IL-1R1 15C4 重链克隆。PCR 反应产生了 442 个碱基对的产物, 其编码 α IL-1R1 15C4 重链可变区的 137 个氨基酸残基(包括 19 个氨基酸的重链信号序列)。用 QIAquick PCR 纯化试剂盒纯化 PCR 产物, 将其用 XbaI 和 BsmBI 切割、凝胶分离并用 QIAquick 凝胶提取试剂盒纯化。将含有完整 α IL-1R1 15C4 重链可变区的连接到哺乳动物表达载体 pDSR α 19: hIgG1C_H 中。对 15C4 重链 IgG1 表达克隆进行 DNA 测序以确定该克隆编码和在 15C4 杂交瘤中鉴定的相同的重链可变区肽。最终表达载体 pDSR α 19: 15C4 IgG1 重链为 6173 个碱基对并含有表 8 中描述的 7 个功能区。

表8

质粒碱基对编号:

2 到 881	牛垂体糖蛋白激素的 α -亚单位(α -FSH)的转录终止/聚腺苷酸化信号 (Goodwin等人, 1983, Nucleic Acids Res. 11: 6873-82 ; Genbank记录号X00004)
882 到 2027	含有内源小鼠DHFR启动子、cDNA编码序列, 和DHFR转录终止/聚腺苷酸化信号的小鼠二氢叶酸还原酶(DHFR)小基因(Gasser等人, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 6522-6 ; Nunberg 等人, 1980, Cell 19: 355-64 ; Setzer等人, 1982, J. Biol. Chem. 257: 5143-7; McGrogan 等人, 1985, J. Biol. Chem. 260: 2307-14)
2031 到 3947	含有氨苄西林抗性标记基因和大肠杆菌中质粒的复制原点的pBR322序列 (Genbank记录号J01749)
3949 到 4292	SV40早启动子、增强子和复制原点(Takebe等人, 1988, Mol. Cell Biol. 8: 466-72, Genbank记录号J02400)
4299 到 4565	来自HTLV-1 LTR结构域的翻译增强子元件(Seiki等人, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 3618-22, Genbank记录号J02029)
4574 到 4730	来自SV40 16S、19S剪接供体/受体信号的内含子(Okayama和Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3: 280-9, Genbank记录号J02400)
4755 到 6173	XbaI和SalI位点之间的15C4重链IgG1 cDNA

构建 pDSR19 : hIgG2C_H

构建 pDSR α 19: 人可变区/人恒定区 IgG2 (hVh/hCh2) Mab 表达质粒, 构建过程是将具有 XbaI 和 BsmBI 末端的人抗体可变区 PCR 产物、人 IgG2 恒定区 (C_{H1}、铰链、C_{H2} 和 C_{H3} 结构域) 的具有 BsmBI 和 SalI 末端的 PCR 产物和具有 XbaI 和 SalI 末端的线性化 pDSRa19 连接。最终表达载体 pDSR α 19: 人可变区/人恒定区 IgG1 (hVh/hCh2) (见共有的和共同待决的 2002 年 4 月 5 日提交的美国临时专利申请号 60/370,407, “作为选择性 OPGL 途径抑制剂的人抗-OPGL 中和抗体”, 将其并入参考文献) 为 6164 个碱基对并且含有表 9 中描述的 7 个功能区。

表9

质粒碱基对编号:

2 到 881	牛垂体糖蛋白激素的 α -亚单位(α -FSH)的转录终止/聚腺苷酸化信号 (Goodwin等人, 1983, Nucleic Acids Res. 11: 6873-82 ; Genbank记录号X00004)
882 到 2027	含有内源小鼠DHFR启动子、cDNA编码序列, 和DHFR转录终止/聚腺苷酸化 信号的小鼠二氢叶酸还原酶(DHFR)小基因(Gasser等人, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 6522-6 ; Nunberg等人, 1980, Cell 19: 355-64 ; Setzer等人, 1982, J. Biol. Chem. 257: 5143-7; McGrogan等人, 1985, J. Biol. Chem. 260: 2307-14)
2031 到 3947	含有氨苄西林抗性标记基因和大肠杆菌中质粒的复制原点的pBR322序列 (Genbank记录号J01749)
3949 到 4292	SV40早启动子、增强子和复制原点(Takebe等人, 1988, Mol. Cell Biol. 8: 466-72, Genbank记录号J02400)
4299 到 4565	来自HTLV-1 LTR结构域的翻译增强子元件(Seiki等人, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 3618-22, Genbank记录号J02029)
4574 到 4730	来自SV40 16S、19S剪接供体/受体信号的内含子(Okayama和Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3: 280-9, Genbank记录号J02400)
4755 到 6164	XbaI和SalI位点之间的hVh/hCh2重链cDNA。该重链片段序列在下面显示 (SEQ ID NO: 57), 限制性位点序列用下划线标出: <i>XbaI</i>

	<u>TCTAGA</u> CCACCATGGA CATGAGGGTC CCCGCTCAGC TCCTGGGGCT CCTGCTATTG TGGTTGAGAG GTGCCAGATG TGAGGTCCAG CTGGTGCAGTCTGGGGGAGG CTGGGTACAT CCTGGGGGGT CCCTGAGACT CTCCTGTGCAGGCTCTGGAT TCACCTTCAG TGGCCATGCT TTGCACTGGG TTCGCCAGGCTCCAGGAAAA GGTCTGGAGT GGGTATCAGG TATTGGTACT CATGGTGGGACATACTATGC AGACTCCGTG AAGGGCCGAT TCACCATCTC CAGAGACAATGCCAAGAACT CCTTGTCTTCT TCAAATGAAC AGCCTGAGCG CCGAGGACATGGCTGTGTAT TACTGTACAA GAAGAAACTG <i>BsmBI</i> GGGACAATTT GACTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACC <u>GTCTCTAGTG</u> CCTCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAATCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCCTACAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAACTTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCAACCGTGCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCGTGGTGGTGA CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCAC GGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTT GTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTCCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACCTCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG <i>Sall</i> AAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAATGA <u>TAAGTCGAC</u>
--	--

用限制酶 XbaI 和 BsmBI 消化 pDSR19: 人可变区/人恒定区 IgG2 质粒除去人可变区并用 QIAquick 凝胶提取试剂盒纯化制备线性质粒 pDSR α 19: hIgG2C_H。线性质粒 pDSR α 19: hIgG2C_H 含有 1 kbp 人 IgG2 恒定区结构域, 该质粒被用于接受从杂交瘤得到的 α IL-1R 抗体可变区。

抗-IL1-R1 IgG2 重链表达克隆的构建

如上面描述的, 将 α IL-1R1 15C4 重链可变区片段连接到哺乳动物表达载体 pDSR α 19: hIgG2C_H 中。对 15C4 重链 IgG2 表达克隆进行 DNA 测序以确定该克隆编码与在 15C4 杂交瘤中鉴定的相同的重链可变区肽。最终表达载体 pDSR α 19: 15C4 IgG2 重链为 6161 个碱基对并含有表 10 中描述的 7 个功能区。

表10

质粒碱基对编号:

2 到 881	牛垂体糖蛋白激素的 α -亚单位(α -FSH)的转录终止/聚腺苷酸化信号 (Goodwin等人, 1983, Nucleic Acids Res. 11: 6873-82 ; Genbank记录号X00004)
882 到 2027	含有内源小鼠DHFR启动子、cDNA编码序列, 和DHFR转录终止/聚腺苷酸化信号的小鼠二氢叶酸还原酶(DHFR)小基因 (Gasser等人, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 6522-6 ; Nunberg 等人, 1980, Cell 19: 355-64 ; Setzer等人, 1982, J. Biol. Chem. 257: 5143-7; McGrogan等人, 1985, J. Biol. Chem. 260: 2307-14)
2031 到 3947	含有氨苄西林抗性标记基因和大肠杆菌中质粒的复制原点的pBR322序列 (Genbank记录号J01749)
3949 到 4292	SV40早启动子、增强子和复制原点 (Takebe等人, 1988, Mol. Cell Biol. 8: 466-72, Genbank记录号J02400)
4299 到 4565	来自HTLV-1 LTR结构域的翻译增强子元件 (Seiki等人, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 3618-22, Genbank记录号J02029)
4574 到 4730	来自SV40 16S、19S剪接供体/受体信号的内含子 (Okayama和Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3: 280-9, Genbank记录号J02400)
4755 到 6161	XbaI和SalI位点之间的15C4重链IgG2 cDNA

构建 pDSR19 : hIgG4C_H

构建 pDSR α 19: 人可变区/人恒定区 IgG4 (hVh/hCh4) Mab 表达质粒, 构建过程是将具有 XbaI 和 BsmBI 末端的人抗体可变区 PCR 产物、用 BsmBI 和 SalI 消化并凝胶分离的人 IgG4 恒定区 (C_{H1}、铰链、C_{H2} 和 C_{H3} 结构域) 片段和具有 XbaI 和 SalI 末端的线性化 pDSRa19 连接。最终表达载体 pDSR α 19: 人可变区/人恒定区 IgG4 (hVh/hCh4) (见共有的和共同待决的 2002 年 4 月 5 日提交的美国临时专利申请号 60/370,407, “作为选择性 OPGL 途径抑制剂的人抗-OPGL 中和抗体”, 将其并入参考文献) 为 6167 个碱基对并且含有表 11 中描述的 7 个功能区。

表11

质粒碱基对编号:

2 到 881	牛垂体糖蛋白激素的 α -亚单位(α -FSH)的转录终止/聚腺苷酸化信号 (Goodwin等人, 1983, Nucleic Acids Res. 11: 6873-82 ; Genbank记录号X00004)
882 到 2027	含有内源小鼠DHFR启动子、cDNA编码序列, 和DHFR转录终止/聚腺苷酸化信号的小鼠二氢叶酸还原酶(DHFR)小基因 (Gasser等人, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 6522-6 ; Nunberg 等人, 1980, Cell 19: 355-64 ; Setzer等人, 1982, J. Biol. Chem. 257: 5143-7; McGrogan等人, 1985, J. Biol. Chem. 260: 2307-14)
2031 到 3947	含有氨苄西林抗性标记基因和大肠杆菌中质粒的复制原点的pBR322序列 (Genbank记录号J01749)
3949 到 4292	SV40早启动子、增强子和复制原点 (Takebe等人, 1988, Mol. Cell Biol. 8: 466-72, Genbank记录号J02400)
4299 到 4565	来自HTLV-1 LTR结构域的翻译增强子元件 (Seiki等人, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 3618-22, Genbank记录号J02029)
4574 到 4730	来自SV40 16S、19S剪接供体/受体信号的内含子 (Okayama和Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3: 280-9, Genbank记录号J02400)
4755 到 6167	XbaI和SalI位点之间的hVh/hCh4重链cDNA。该重链片段的序列在下面显示 (SEQ ID NO: 58), 限制性位点序列用下划线标出: XbaI TCTAGACCACCAT GGACATGAGG GTCCCCGCTC AGCTCCTGGG GCTCCTGCTA TTGTGGTTGA GAGGTGCCAG ATGTGAGGTC CAGCTGGTGCACTCTGGGGG AGGCTTGGTA CATCCTGGGG GGTCCCTGAG ACTCTCCTGTGCAGGCTCTG GATTACCTT CAGTGGCCAT GCTTTGCACT GGGTTCCGAGGCTCCAGGA AAAGGTCTGG AGTGGGTATC AGGTATTGGT ACTCATGGTGGGACATACTA TGCAGACTCC GTGAAGGGCC GATTACCAT CTCCAGAGACAATGCCAAGA ACTCCTTGTT TCTCAAATG AACAGCCTGA GCGCCGAGGACATGGCTGTG TATTACTGTA CAAGAAGAAA CTGGGGACAA TTTGACTACTGGGGCCAGGG BsmBI AACCCTGGTC ACCGTCTCTA GTGCCAGCAC CAAGGGGCCATCCGTCTTCC

	CCCTGGCGCC CTGCTCCAGG AGCACCTCCG AGAGCACAGCCGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGTCTGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTCTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACGAAGA CCTACACCTG CAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGAGT CCAAATATGG TCCCCCATGCCATCATGCC CAGCACCTGA GTTCCTGGGG GGACCATCAG TCTTCCTGTTCCCCCAAAA CCCAAGGACA CTCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCACGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCAGGAAG ACCCCGAGGT CCAGTTCAACTGGTACGTGG ATGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAAGGCCTCCCGT CCTCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAGCCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCAGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAGGCTAACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGGAGG GGAATGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC SalI ACACAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGATAAG TCGAC
--	--

用限制酶 XbaI 和 BsmBI 消化 pDSR19: 人可变区/人恒定区 IgG4 质粒除去人可变区并用 QIAquick 凝胶提取试剂盒纯化制备线性质粒 pDSR α 19: hIgG4C_H。线性质粒 pDSR α 19: hIgG4C_H 含有 1 kbp 人 IgG4 恒定区结构域, 该质粒被用于接受从杂交瘤得到的 α IL-1R 抗体可变区。

抗-IL1-R1 IgG4 重链表达克隆的构建

如上面描述的, 将 α IL-1R1 15C4 重链可变区片段连接到哺乳动物表达载体 pDSR α 19: hIgG4C_H 中。对 15C4 重链 IgG4 表达克隆进行 DNA 测序以确定该克隆编码与在 15C4 杂交瘤中鉴定的相同的重链可变区肽。最终表达载体 pDSR α 19: 15C4 IgG4 重链为 6164 个碱基对并含有表 12 中描述的 7 个功能区。

表12

质粒碱基对编号:

2 到 881	牛垂体糖蛋白激素的 α -亚单位(α -FSH)的转录终止/聚腺苷酸化信号 (Goodwin等人, 1983, Nucleic Acids Res. 11: 6873-82 ; Genbank记录号X00004)
882 到 2027	含有内源小鼠DHFR启动子、cDNA编码序列, 和DHFR转录终止/聚腺苷酸化 信号的小鼠二氢叶酸还原酶(DHFR)小基因(Gasser等人, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 6522-6 ; Nunberg 等人, 1980, Cell 19: 355-64 ; Setzer等人, 1982, J. Biol. Chem. 257: 5143-7; McGrogan等人, 1985, J. Biol. Chem. 260: 2307-14)
2031 到 3947	含有氨苄西林抗性标记基因和大肠杆菌中质粒的复制原点的pBR322序列 (Genbank记录号J01749)
3949 到 4292	SV40早启动子、增强子和复制原点(Takebe等人, 1988, Mol. Cell Biol. 8: 466-72, Genbank记录号J02400)
4299 到 4565	来自HTLV-1 LTR结构域的翻译增强子元件(Seiki等人, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 3618-22, Genbank记录号J02029)
4574 到 4730	来自SV40 16S、19S剪接供体/受体信号的内含子(Okayama和Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3: 280-9, Genbank记录号J02400)
4755 到 6164	XbaI和SalI位点之间的15C4重链IgG4 cDNA

实施例 7 在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中表达抗-IL-1R1 抗体

如美国专利号 6,210,924(并入参考文献)所描述的在中国仓鼠卵巢细胞,特别在 CHO AM-1/D 中产生重组抗-IL-1R1 抗体。简言之,将编码抗-IL-1R1 抗体的完整重链和轻链的 DNA 序列克隆到表达载体中。用能够表达适宜的抗 IL-1R1 抗体的完整重链的表达载体和表达该抗体的完整轻链的表达载体共转染 CHO AM-1/D 细胞。例如,为了产生 26F5 抗体,用能够表达含有如 SEQ ID NO: 38 中提出的氨基酸序列的完整轻链的载体和能够表达含有如 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 24 中提出的氨基酸序列的完整重链的载体共转染细胞。为了产生 27F2 抗体,用能够表达含有如 SEQ ID NO: 38 中提出的氨基酸序列的完整轻链的载体和能够表达含有如 SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28 或 SEQ ID NO: 30 中提出的氨基酸序列的完整重链的载体共转染细胞。为了产生 15C4 抗体,用能够表达含有如 SEQ ID NO: 40 中提出的氨基酸序列的完整轻链的载体和能够表达含有如 SEQ ID

NO: 32、SEQ ID NO: 34 或 SEQ ID NO: 36 中提出的氨基酸序列的完整重链的载体共转染细胞。表 13 概述了各种 IL-1R1 抗体的完整重链和完整轻链。名称 “.../IgG-” 描述具体抗体的恒定区序列。

表13

抗体	重链可变区 + 重链恒定区	完整重链
26F5/IgG1 (核苷酸)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 19
26F5/IgG1 (氨基酸)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 20
26F5/IgG2 (核苷酸)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 21
26F5/IgG2 (氨基酸)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 22
26F5/IgG4 (核苷酸)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 23
26F5/IgG4 (氨基酸)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 24
27F2/IgG1 (核苷酸)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 25
27F2/IgG1 (氨基酸)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 26
27F2/IgG2 (核苷酸)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 27
27F2/IgG2 (氨基酸)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 28
27F2/IgG4 (核苷酸)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 29
27F2/IgG4 (氨基酸)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 30
15C4/IgG1 (核苷酸)	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 31
15C4/IgG1 (氨基酸)	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 32
15C4/IgG2 (核苷酸)	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 33
15C4/IgG2 (氨基酸)	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 34
15C4/IgG4 (核苷酸)	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 35
15C4/IgG4 (氨基酸)	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 36
抗体	轻链可变区 + 轻链恒定区	完整轻链
26F5/27F2 (核苷酸)	SEQ ID NO: 11 + SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 37
26F5/27F2 (氨基酸)	SEQ ID NO: 12 + SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 38
15C4 (核苷酸)	SEQ ID NO: 17 + SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 39
15C4 (氨基酸)	SEQ ID NO: 18 + SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 40

用表达载体共转染二氢叶酸还原酶缺陷型 (DHFR⁻) CHO AM-1/D 细

胞实现抗-IL-1R1 抗体的稳定表达。用标准技术(磷酸钙共沉淀)和 DHFR 选择实施转染。分离转染的菌落并使其在 24 孔板中生长到汇合。检验转染细胞所产生的抗体的适当折叠和中和活性。选择过量产生适当折叠的 IgG1、IgG2 和 IgG4 同型的抗 IL-1R1 抗体的克隆并如下描述的纯化抗体。

实施例 8 抗 IL-1R1 抗体的产生

通过 CHO 细胞的克隆系中表达产生抗 IL-1R1 抗体。对于每个产生试验,将来自单个小瓶的细胞在无血清的细胞培养基中解冻。细胞最初生长在 T 型烧瓶中,并通过一系列旋转烧瓶连续放大直到产生足够接种物接种 20 L 生物反应器。生长 5-10 天后,将培养物用于接种 300 L 生物反应器。再生长 5-10 天后,培养物用于接种 2000L 生物反应器。用补料分批培养基在 2000L 生物反应器中实施生产,其中加入含有浓缩培养基组分的营养料以维持细胞生长和培养物生活力。生产持续约 2 周,在该期间内抗-IL-R1 抗体被细胞组成性地产生并分泌到细胞培养基中。

生产反应器被控制在固定 pH、温度和溶解氧水平:通过二氧化碳气体和碳酸钠加入控制 pH;通过空气、氮气和氧气流控制溶解氧。

在生产末,将细胞培养液加到盘式离心机(disk stack centrifuge)并使培养上清液与细胞分离。将浓缩物通过深度过滤器然后通过 0.2 μm 滤器进一步澄清。然后通过切向流超滤浓缩澄清的条件培养基。该条件培养基被浓缩 15-30 倍。然后将所得浓缩的条件培养基纯化或者冰冻后用于以后的纯化。

实施例 9

用抗生物素蛋白-融合蛋白进行表位作图

为了产生抗生物素蛋白-融合蛋白,将编码鸡抗生物素蛋白的 cDNA(具有内源信号序列)与编码在 3'端融合 FLAG-标记序列的人或猕猴 IL-1R1 的成熟胞外结构域的 cDNAs 的 5'末端连接。用常规分子技术将 FLAG-标记的融合基因装配在 pALTERMAX 载体中。抗生物素蛋白-人 IL-1R1 融合蛋白的氨基酸序列在图 23 中显示(SEQ ID NO: 59)。抗生物素蛋白-猕猴 IL-1R1 融合蛋白的氨基酸序列在图 24 中显示(SEQ ID NO: 60)。用改变的位点 II 哺乳动物体外诱变系统(Altered Sites II Mammalian In Vitro Mutagenesis System) (Promega Corp.)

产生一组突变的抗生物素蛋白-cynoIL-1R1-FLAG 蛋白, 其中人氨基酸被相应猕猴残基置换。突变在图 24 中阐明。

用 Cytofectine 转染试剂(Bio-Rad Laboratories, Inc.)将编码抗生物素蛋白-cynoIL-1R 突变体和野生型蛋白以及抗生物素蛋白-huIL-1R1-FLAG 蛋白的质粒瞬时转染到 293T 细胞中。假转染子用作阴性对照。通过蛋白质印迹和基于珠子的结合测定法, 使用从被转染的细胞收获的条件培养基(CM)分析这些蛋白与抗-huIL-1R1 单克隆抗体(MAb)的结合。

对于蛋白质印迹分析, 将 CM 以 1: 3 在非还原性 SDS 样品缓冲液中稀释, 煮沸 5-10 分钟并加到 10%Tris-甘氨酸凝胶中。SDS-PAGE 和蛋白质转移后, 将膜用 PBS/0.1% Tween-20 (PBST) 中的 3% BSA/1% 卵清蛋白封闭并用抗-huIL-1R1 Mab 染色。以 1: 15,000 在 PBST 中稀释的山羊抗-人 IgG-Fc-HRP 抗体(Pierce Chemical Co.)用于次级检测。抗-FLAG 检测用于对蛋白质加样标准化。用 FluorChem 8000 数字成像系统(Alpha Innotech Corp.)实施图像捕捉和光密度分析。将抗-huIL-1R1 MAb 的信号强度对抗-FLAG 抗体的值标准化以解决蛋白质加样中的差异。抗体结合表达为对抗生物素蛋白-人 IL-1R1-FLAG 的结合百分数。

图 25A 中显示了蛋白质印迹的结果。图 25B 显示了一式两份蛋白质印迹试验的光密度分析。对抗体结合关键的人残基是当置换成 cyno-IL-1R1 时恢复信号的那些人残基。通常, 突变 1 和 2(图 24 中阐明)单独或者组合可以恢复对许多抗体(15C4/IgG2、5B8、1C2、24H2、16E9、26E4 和 20G1)的结合而突变 10.1 和 10.2 却不能。这些抗体都不结合野生型 cynoIL-1R1。两种抗体(27F2 和 19C8)总是结合所有突变蛋白以及野生型 cynoIL-1R1。这表明表位 4(cynoIL-1R 的残基 Y279-V281)是这些抗体的优势表位, 其中表位 4 在大鼠/人共生同源蛋白中鉴定并且在猕猴 IL-1R1 中没有改变。表位 4 在图 24 所示氨基酸序列中被粗体化、斜体化和下划线化。

在多重基于珠子的结合测定中, 将 CM 与生物素-包被的荧光珠孵育以捕获抗生物素蛋白融合蛋白, 每种融合蛋白一套珠子(Beadlyte Multi-Biotin 10plex Bead 试剂盒; Upstate Biotechnologies)。洗涤珠子并将其在 PBST 中合并并等分到 96-孔滤器底板(Millipore

Corp.) 的孔中。以 $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ 加入抗体 (抗-huIL-1R1 MAbs 或抗-FLAG-MAb) 并孵育 1 小时。再次洗涤珠子并用藻红蛋白-缀合的抗-小鼠 IgG 抗体和抗-人 IgG (Fab')₂ 的混合物检测抗体结合。孵育 1 小时后, 洗涤珠子并将其重悬在 PBST 中。用 Luminex100 (Luminex Corp) 测量平均荧光强度 (MFI)。用 MFI 值标准化抗-FLAG MAb 结合数据以解决蛋白质加样中的差异。抗体结合表达为结合抗生物素蛋白-huIL-1R1-FLAG 的百分数 (图 26)。抗-IL-1R1 抗体与用人残基突变的抗生物素蛋白-cynoIL1R1-FLAG 蛋白以及野生型猕猴和人 IL-1R1 蛋白的结合模式与图 25 中所示的免疫印迹分析一致。

应该理解前面的公开着重于本发明的一些特定实施方案并且它们的所有修饰或备选等价方案都在所附权利要求书中提出的本发明的精神和范围之内。

序列表

<110> Varnum, Brian
 Witte, Alison
 Vezina, Chris
 Wong, Lu Min
 Qian, Xueming

<120> 治疗性人抗-IL-1R1 单克隆抗体

<130> 01-1554

<160> 89

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
 <211> 990
 <212> DNA
 <213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 1
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcggtg cacaccttcc cggtgttcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540

```

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag    600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc    660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag    720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc    780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg    840
ctggactccg acggtctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg    900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg    960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa                                990

```

<210> 2
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1           5           10          15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35          40          45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65          70          75          80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85          90          95

```

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

330

<210> 3
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 3
 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgcat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 5

<211> 978

<212> DNA

<213> 智人

<400> 5

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60

agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120

tggaactcag gcgtctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtctctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 240

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300

aaatgttgtg tcgagtgcgc accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360

ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggacacgtgc 420

gtgggtggtg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480

gtggaggtgc ataatgcca gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540

gtggtcagcg tcctaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600

aaggtctcca acaaaggcct ccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg 660

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatgc cgtggagtgg 780

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 840

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
 tccctgtctc cgggtaaa 978

<210> 6
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 7

<211> 981

<212> DNA

<213> 智人

<400> 7

```

gccagcacca aggggccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc      240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc      300
aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc      360

ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg      420
tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat      480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac      540
cgtgttgtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag      600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag      720
aaccaggcca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag      780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc      840
gacggctcct tcttctctta cagcaggcta accgtgraca agagcagggt gcaggagggg      900
aatgttttct catgtccgt gakgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc      960
ctctccctgt ctctgggtaa a                                              981

```

<210> 8
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 8

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

225	230	235	240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
245	250	255	
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
260	265	270	
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
275	280	285	
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser			
290	295	300	
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
305	310	315	320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
325			

<210> 9
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 9
 atggagtttg ggctgagctg ggtcttcttc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca 240
 cactccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcccagagac cgaggacacg gctgtgtatt actgtgag agcacggtct 360
 ttgcactggc tattatttga gttctggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctagt 417

<210> 10

<211> 139
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 11
 <211> 384
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 11

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtagca acagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgct cactttcggc 360
ggagggacca aggtggagat caaa 384

```

<210> 12
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 12

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1           5           10           15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
          20           25           30

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

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65           70           75           80

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
          100          105          110

```

Asn Trp Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 13
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 13
 atggagtttg ggctgagctg ggttttcttc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagtgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggtcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca 240
 ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggacgatat 360
 tttgactggg tattatttga gtattggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctagt 417

<210> 14
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 14

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

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

Glu Trp Val Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 15

<211> 411

<212> DNA

<213> 智人

<400> 15

atgggggtcaa cgcctcctc cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60

gtgcagctga tgcagtctgg agcagagggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc 120

tgttaagggtt ctggatacag cttttccttc cactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc 180

gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc catcctgggtg cctctgatac cagatacagc 240

ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaact ccaacagcgc cacctacctg 300

cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt tctgtgag acaaaggga 360

ctcgactact ttgactactg gggccaggga accctgggtc ccgtctctag t 411

<210> 16

<211> 137

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

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

Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

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

Glu Trp Met Gly Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65 70 75 80

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn Ser
85 90 95

Ala Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 17

<211> 378

<212> DNA

<213> 智人

<400> 17

atgtcgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggtgaa 60

attgtgctga ctcagtctcc agactttcag tctgtgactc caaaggagaa agtcaccatc 120

```

acctgccggg ccagtcagag cattgtagt agcttacact ggtaccagca gaaaccagat    180
cagtctccaa agctcctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg    240
ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc accctcacca tcaatagcct ggaagctgaa    300
gatgctgcag cgtattactg tcatcagagt agtagtttac ctctcacttt cggcggaggg    360

accaaggtgg agatcaaa                                                    378

```

<210> 18
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 18

```

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1              5              10              15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val
              20              25              30

Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
              35              40              45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys
              50              55              60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg
65              70              75              80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
              85              90              95

Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser
              100             105             110

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

```

115	120	125
<210> 19		
<211> 1407		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 19		
atggagtttg ggctgagctg ggtcttcttc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag	60	
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc	120	
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca	180	
ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca	240	
cactccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	300	
caaatgaaca gcccagagac cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agcacggtct	360	
ttcgactggc tattatttga gttctggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctagtgcc	420	
tccaccaagg gccatcgggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	480	
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	540	
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga	600	
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	660	
atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaa	720	
tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcacagcac ctgaactcct ggggggaccg	780	
tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag	840	
gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac	900	
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	960	
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	1020	

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa 1080

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1140

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccggtgctg 1260

gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320

cagggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1407

<210> 20
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 20

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Pro Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 21

<211> 1395

<212> DNA

<213> 智人

<400> 21

atggagtttg ggctgagctg ggtcttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca 240

cactccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcccagagac cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agcacggtct 360
 ttcgactggc tattatttga gttctggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctagtgcc 420
 tccaccaagg gcccacgggt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccttcagca acttcggcac ccagacctac 660
 acctgcaacg tagatcaca gcccagcaac accaagggtgg acaagacagt tgagcgcaaa 720
 tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc 780
 ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 840
 gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagtcca actggtacgt ggacggcgtg 900
 gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 960
 gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 1020
 gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1080
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1260
 tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gacgtcttcc 1380
 ctgtctccgg gtaaa 1395

<210> 22

<211> 465

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
145 150 155 160

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

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

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

Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
210 215 220

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

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
245 250 255

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

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

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys
 465

<210> 23
 <211> 1398
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 23
 atggagtttg ggctgagctg ggtcttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca 240
 cactccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gcccagagac cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agcacggtct 360
 ttcgactggc tattatttga gttctggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctagtgcc 420
 agcaccaagg ggccatccgt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
 acagccgccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac gaagacctac 660
 acctgcaacg tagatcaciaa gcccagcaac accaaggtgg acaagagagt tgagtccaaa 720
 tatgggtccc catgcccac atgccagca cctgagttcc tggggggacc atcagtcttc 780
 ctgttcccc caaaaccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 840
 gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 900

```

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt    960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc    1020
aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg    1080
cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac    1140
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg    1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac    1260
ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtgracaaga gcaggtggca ggaggggaat    1320
gtctttctcat gctccgtgak gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc    1380
tccctgtctc tgggtaaa                                1398

```

<210> 24
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 24

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
145 150 155 160

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

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

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

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

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

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
245 250 255

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

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

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

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

305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
340 345 350

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
465

<210> 25

<211> 1407

<212> DNA

<213> 智人

<400> 25

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagtgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca	180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca	240
ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggacgatat	360
tttgactgggt tattatttga gtattggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctagtgcc	420
tccaccaagg gcccatcgggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	480
acagcggccc tgggtgcctt ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg	540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccttcagca gcttgggcac ccagacctac	660
atctgcaacg tgaatcaciaa gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa	720
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	780
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag	840
gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac	900
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	960
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	1020
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa	1080
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg	1140
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc	1200
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgcc tcccgctgctg	1260
gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	1320
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1380
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa	1407

<210> 26
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 26

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

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

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

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

Glu Trp Val Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala
 65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

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

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

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

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

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

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 27

<211> 1395

<212> DNA

<213> 智人

<400> 27

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagtgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca 240

ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggacgatat 360

tttgactggt tattatttga gtattggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctagtgcc 420

tccaccaagg gccatcggt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540

aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca acttcggcac ccagacctac 660

acctgcaacg tagatcaciaa gccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa 720

```

tggtgtgtcg agtggccacc gtggccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc 780
ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg 840
gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 900
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 960
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 1020
gtctccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1140
gtcagcctga cctgccttgt caaaggettc taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1260
tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa ggcctctcc 1380
ctgtctccgg gtaaa 1395

```

<210> 28
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 28

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

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

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

Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

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

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys
465

<210> 29
<211> 1398
<212> DNA
<213> 智人

<400> 29

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc	120
tgtgcagtgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca	180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca	240
ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggacgatat	360
tttgactggt tattatttga gtattggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctagtgcc	420
agcaccaagg ggccatccgt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc	480
acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg	540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga	600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccttcagca gcttgggcac gaagacctac	660
acctgcaacg tagatcacia gcccgcaac accaagggtg acaagagagt tgagtccaaa	720
tatgggtcccc catgcccata atgcccagca cctgagttcc tggggggacc atcagtcttc	780
ctgttcccc caaaaccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc	840
gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc	900
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt	960
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	1020
aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg	1080
cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac	1140
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatgc cgtggagtgg	1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac	1260
ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtgracaaga gcagggtggca ggaggggaat	1320

gtcttctcat gctccgtgak gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 1380

tcctgtctc tgggtaaa 1398

<210> 30

<211> 466

<212> PRT

<213> 智人

<400> 30

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

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

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

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

Glu Trp Val Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
145 150 155 160

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

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

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

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

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

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
245 250 255

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

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

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
340 345 350

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

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

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

385	390	395	400
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
	405	410	415
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp			
	420	425	430
Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	435	440	445
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu			
	450	455	460
Gly Lys			
465			

<210> 31
 <211> 1401
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 31
 atgggggtcaa cgcceatcct cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60
 gtgcagctga tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc 120
 tgtaagggtt ctggatacag cttttccttc cactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc 180
 gggaaggcc tggagtggat ggggatcatc catcctgggtg cctctgatac cagatacagc 240
 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaact ccaacagcgc cacctacctg 300
 cagtggagca gcctgaaggc ctcgacacc gccatgtatt tctgtgag acaaaggga 360
 ctcgactact ttgactactg gggccaggga accctggta ccgtctctag tgcctccacc 420
 aagggcccat cggctcttccc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc ccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca 540
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgttcc tacagtctc aggactctac 600

```

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
tgcggtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg tctggactcc 1260
gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
aacgtcttct catgtcccg gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
ctctccctgt ctccgggtaa a 1401

```

<210> 32
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 32

```

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
1           5           10          15
Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20          25          30

```

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

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

Glu Trp Met Gly Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65 70 75 80

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn Ser
85 90 95

Ala Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

260	265	270
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
275	280	285
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
290	295	300
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
305	310	315
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
325	330	335
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
340	345	350
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
355	360	365
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
370	375	380
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
385	390	395
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
405	410	415
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
420	425	430
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
435	440	445
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
450	455	460
Pro Gly Lys		
465		
<210> 33		
<211> 1389		
<212> DNA		

<213> 智人

<400> 33

atggggtcaa cgcgccatcct cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag	60
gtgcagctga tgcagtctgg agcagagggtg aaaaagcccc gggagtctct gaagatctcc	120
tgtaagggtt ctggatacag cttttccttc cactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc	180
gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc catcctgggt cctctgatac cagatacagc	240
ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaact ccaacagcgc cacctacctg	300
cagtggagca gcctgaaggc ctcggacacc gccatgtatt tctgtgcgag acaaaggga	360
ctcgactact ttgactactg gggccaggga accctggta ccgtctctag tgcctccacc	420
aagggcccat cggtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg	480
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca	540
ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtcctc aggactctac	600
tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc	660
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt	720
gtcgagtgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc	780
ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggacccctg aggtcacgtg cgtggtggtg	840
gacgtgagcc acgaagacct cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg	900
cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc	960
gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc	1020
aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga	1080
gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc	1140

```

ctgacctgcc tgggtcaaagg ctctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctccttc 1260
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
tgctccgtga tgcattgagc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380
ccgggtaaa 1389

```

<210> 34
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 34

```

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

Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          20          25          30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
          35          40          45

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

Glu Trp Met Gly Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65          70          75          80

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn Ser
          85          90          95

Ala Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
          100         105         110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
          115         120         125

```

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
145 150 155 160

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

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

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

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
210 215 220

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
245 250 255

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

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

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

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

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

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

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

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

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

<210> 35

<211> 1392

<212> DNA

<213> 智人

<400> 35

atgggggtcaa cgcgccatcct cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60

gtgcagctga tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc 120

tgttaagggtt ctggatacag cttttccttc cactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc 180

gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc catcctggtg cctctgatac cagatacagc 240

ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaact ccaacagcgc cacctacctg 300

cagtggagca gcctgaaggc ctggacacc gccatgtatt tctgtgcgag acaaagggaa 360

ctcgactact ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctctag tgccagcacc 420

aaggggccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctcca gagcacagcc 480

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540

```

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgttcc tacagtcttc aggactctac    600
tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc    660
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gatttgagtc caaatatggt    720
cccccatgcc catcatgccc agcacctgag ttcttggggg gaccatcagt cttcctgttc    780
cccccaaac ccaaggacac tctcatgata tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg    840
gtggacgtga gccaggaaga ccccagggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag    900
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc    960
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc   1020
tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc   1080
cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc   1140
agcctgacct gcctggtcaa aggtttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc   1200
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc   1260
ttcttcctct acagcaggct aaccgtgrac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc   1320
tcatgctccg tgakgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg   1380
tctctgggta aa                                                              1392

```

<210> 36

<211> 464

<212> PRT

<213> 智人

<400> 36

```

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

```

Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

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

Glu Trp Met Gly Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
 65 70 75 80

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn Ser
 85 90 95

Ala Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 145 150 155 160

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

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser

245	250	255
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
260	265	270
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
275	280	285
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
290	295	300
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
305	310	315
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
325	330	335
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
340	345	350
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
355	360	365
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
370	375	380
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
385	390	395
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
405	410	415
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
420	425	430
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
435	440	445
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
450	455	460

<210> 37

<211> 705

<212> DNA

<213> 智人

<400> 37

```

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga      60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      120
ctctcctgca gggccagtea gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct      180
ggccaggetc ccaggtcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc      240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct      300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgct cactttcggc      360
ggagggacca aggtggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg      420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc      480
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc      540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg      600
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag      660
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtt                        705

```

<210> 38

<211> 235

<212> PRT

<213> 智人

<400> 38

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1           5           10          15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20          25          30

```

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

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

<210> 39

<211> 699

<212> DNA

<213> 智人

<400> 39

```

atgtcgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggtgaa    60
attgtgctga ctgagtctcc agactttcag tctgtgactc caaaggagaa agtcaccatc    120
acctgccggg ccagtcagag cattggtagt agcttacct ggtaccagca gaaaccagat    180
cagtctccaa agtcctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg    240
ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc accctacca tcaatagcct ggaagctgaa    300
gatgctgcag cgtattactg tcatcagagt agtagtttac ctctcacttt cggcggaggg    360
accaaggtgg agatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcattct cccgccatct    420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgcgaataa cttctatccc    480
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag    540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg    600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg    660
agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt                                699

```

<210> 40

<211> 233

<212> PRT

<213> 智人

<400> 40

```

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1           5           10          15
Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val
          20           25           30

```

Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys
50 55 60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
85 90 95

Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser
100 105 110

Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 41

Leu Ser Asp Ile Ala

1 5

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 42

Val Ile Asp Glu

1

<210> 43

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 43

Thr Cys Phe Ala

1

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的寡核苷酸引物

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(23)

<223> n is a, c, t, 或 g

<400> 44

ggccg gatag gcctccannn nnnt

24

<210> 45

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的寡核苷酸引物

<400> 45

ggacactgac atggactgaa ggagta

26

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的寡核苷酸引物

<400> 46

ggacactgac atggactgaa ggagta

26

<210> 47

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的寡核苷酸引物

<400> 47

cagcagaagc ttctagacca ccatgtcgcc atcacaactc attggg

46

<210> 48

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的寡核苷酸引物

<400> 48

cttgtcgact caacactctc ccctgttgaa gctc

34

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> amino acid sequence encoded by 5' anti-IL-1R1 15C4 kappa primer

<400> 49

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly

1

5

<210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>

<223> 3' 抗-IL-1R1 15C4 κ 引物编码的氨基酸序列

<400> 50

Cys Glu Gly Arg Asn Phe Ser
 1 5

<210> 51
 <211> 1409
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 51
 tctagaccac catggacatc aggctcagct tagttttcct tgccttttc ataaaagggtg 60
 tccagtgtga ggtagaactg gtggagtctg ggggcggctt agtacaacct ggaagggtcca 120
 tgacactctc ctgtgcagcc tcgggattca ctttcagaac ctatggcatg gcctgggtcc 180
 gccaggcccc aacgaagggt ctggagtggg tctcatcaat tactgctagt ggtggtacca 240
 cctactatcg agactccgtg aagggccgct tcactatttt tagggataat gcaaaaagta 300
 ccctatacct gcagatggac agtccgaggt ctgaggacac ggccacttat ttctgtacat 360
 caatttcgga atactggggc cacggagtca tggtcaccgt ctctagtgcc tccaccaagg 420
 gcccatcggt cttccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc acagcgcccc 480
 tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg 540
 ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga ctctactccc 600

```

tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg    660
tgaatcaciaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa tcttgtgaca    720
aaactcacac atgcccaccg tggccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc    780
tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctcccg gaccttgag gtcacatgcg    840
tggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg    900
tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg    960
tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca   1020
aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc   1080
agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc   1140
aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatccag cgacatgcc gtggagtggg   1200
agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccagcc tcccgctgtg gactccgacg   1260
gtccttcttt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg   1320
tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct   1380
ccctgtctcc gggtaaatga taagtcgac                                     1409

```

<210> 52

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的寡核苷酸引物

<400> 52

tgaggacgct gaccacacg

19

<210> 53
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的寡核苷酸引物

<400> 53
cagcagaagc ttctagacca ccatggggtc aaccgccatc ctcg 44

<210> 54
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的寡核苷酸引物

<400> 54
gtggaggcac tagagacggt gaccagggtt cc 32

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 5' 抗-IL-1R1 15C4 重链引物编码的氨基酸序列

<400> 55

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu

1 5

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 3' 抗-IL-1R1 15C4 重链引物编码的氨基酸序列

<400> 56

Thr Ser Ala Ser Ser Val Thr Val Leu Thr Gly

1 5 10

<210> 57

<211> 1415

<212> DNA

<213> 智人

<400> 57

tctagaccac catggacatg agggtecccg ctcagctcct ggggctcctg ctattgtggt 60

tgagaggtgc cagatgtgag gtccagctgg tgcagtctgg gggaggttg gtacatcctg 120

gggggtccct gagactctcc tgtgcaggct ctggattcac cttcagtggc catgctttgc 180

actgggttcg ccaggtcca ggaaaagtc tggagtgggt atcaggtatt ggtactcatg 240

gtgggacata ctatgcagac tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca 300

agaactcctt gtttcttcaa atgaacagcc tgagcgccga ggacatggct gtgtattact 360

gtacaagaag aaactgggga caatttgact actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct 420

ctagtgcctc caccaagggc ccatcggctt tccccctggc gccctgctcc aggagcacct 480

ccgagagcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg 540

tgctcgtggaa ctcaggcgct ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt	600
cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcaac ttcggcaccc	660
agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg	720
agcgcaaatg ttgtgtcgag tgcccacgt gccagcacc acctgtggca ggaccgtcag	780
tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctccggacc cctgaggtca	840
cgtgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagtgg	900
acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt	960
tccgtgtggt cagcgtcctc accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca	1020
agtgcaaggt ctccaacaaa ggctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca	1080
aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca	1140
agaaccaggt cagcctgacc tgcttgtca aaggcttcta cccagcgac atcgccgtgg	1200
agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact	1260
ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg	1320
ggaacgtctt ctcatgtcc gtgatgatg aggtcttga caaccactac acgcagaaga	1380
gcctctccct gtctccgggt aatgataag tcgac	1415

<210> 58
 <211> 1418
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 58
 tctagaccac catggacatg aggtccccg ctcagctcct ggggtcctg ctattgtggt 60
 tgagaggtgc cagatgtgag gtccagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg 120
 gggggtccct gagactctcc tgtgcaggct ctggattcac cttcagtggc catgctttgc 180

actgggttcg ccaggtcca ggaaaaggtc tggagtgggt atcaggtatt ggtactcatg	240
gtgggacata ctatgcagac tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca	300
agaactcctt gtttcttcaa atgaacagcc tgagcgccga ggacatggct gtgtattact	360
gtacaagaag aaactgggga caatttgact actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct	420
ctagtgccag caccaagggg ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct	480
ccgagagcac agccgccctg ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg	540
tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggct gtcctacagt	600
cctcaggact ctactccctc agcagcgctg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacga	660
agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg	720
agtccaaata tgggtcccca tgcccatcat gcccagcacc tgagttcctg gggggaccat	780
cagtcttcct gttccccca aaaccaagg acactctcat gatctcccg acccctgagg	840
tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccagg aagacccga ggtccagttc aactggtacg	900
tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccg cgaggagcag ttcaacagca	960
cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt	1020
acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag	1080
ccaaagggca gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag gaggagatga	1140
ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg	1200
tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg	1260
actccgacgg ctccttcttc ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg	1320
aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga	1380
agagcctctc cctgtctctg ggtaaatgat aagtcgac	1418

<210> 59
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 59

Met Val His Ala Thr Ser Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Val Ala Pro Gly Leu Ser Ala Arg Lys Cys Ser Leu Thr Gly
 20 25 30

Lys Trp Thr Asn Asp Leu Gly Ser Asn Met Thr Ile Gly Ala Val Asn
 35 40 45

Ser Lys Gly Glu Phe Thr Gly Thr Tyr Thr Thr Ala Val Thr Ala Thr
 50 55 60

Ser Asn Glu Ile Lys Glu Ser Pro Leu His Gly Thr Gln Asn Thr Ile
 65 70 75 80

Asn Lys Arg Thr Gln Pro Thr Phe Gly Phe Thr Val Asn Trp Lys Phe
 85 90 95

Ser Glu Ser Thr Thr Val Phe Thr Gly Gln Cys Phe Ile Asp Arg Asn
 100 105 110

Gly Lys Glu Val Leu Lys Thr Met Trp Leu Leu Arg Ser Ser Val Asn
 115 120 125

Asp Ile Gly Asp Asp Trp Lys Ala Thr Arg Val Gly Ile Asn Ile Phe
 130 135 140

Thr Arg Leu Arg Thr Gln Lys Glu Gln Leu Leu Ala Ser Leu Leu Glu
 145 150 155 160

Ala Asp Lys Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val Ser Ser
 165 170 175

Ala Asn Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn Glu His
 180 185 190

Lys Gly Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Val Ser
195 200 205

Thr Glu Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys Leu Trp Phe
210 215 220

Val Pro Ala Met Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val Val Arg
225 230 235 240

Asn Ser Ser Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Ser Ala Lys Phe Val Glu
245 250 255

Asn Glu Pro Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Gln Ala Ile Phe Lys Gln Lys
260 265 270

Leu Pro Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met Glu Phe
275 280 285

Phe Lys Asn Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Gln Trp Tyr Lys Asp
290 295 300

Cys Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys Asp
305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn Tyr Thr
325 330 335

Cys His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr Arg
340 345 350

Val Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg Pro Val
355 360 365

Ile Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Met Glu Val Asp Leu Gly Ser Gln
370 375 380

Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Ile Ala Tyr
385 390 395 400

Trp Lys Trp Asn Gly Ser Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val Leu Gly
405 410 415

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

420 425 430
 Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe Tyr Lys
 435 440 445
 His Pro Phe Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp Ala Ala
 450 455 460
 Tyr Ile Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Asn Phe Gln Lys Asp Tyr Lys
 465 470 475 480
 Asp Asp Asp Asp Lys
 485

<210> 60
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>

<223> 抗生物素-猕猴 IL-1R1-FLAG 嵌合蛋白

<400> 60

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

Ser Glu Ser Thr Thr Val Phe Thr Gly Gln Cys Phe Ile Asp Arg Asn
100 105 110

Gly Lys Glu Val Leu Lys Thr Met Trp Leu Leu Arg Ser Ser Val Asn
115 120 125

Asp Ile Gly Asp Asp Trp Lys Ala Thr Arg Val Gly Ile Asn Ile Phe
130 135 140

Thr Arg Leu Arg Thr Gln Lys Glu Gln Leu Leu Ala Ser Leu Leu Glu
145 150 155 160

Ala Asp Lys Cys Asn Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val Ser Ser
165 170 175

Ala Asn Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn Glu Tyr
180 185 190

Lys Gly Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Asn Asp Ser Lys Thr Pro Ile Ser
195 200 205

Thr Glu Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Lys Lys Leu Trp Phe
210 215 220

Val Pro Ala Lys Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val Val Arg
225 230 235 240

Asn Ser Ser Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Thr Ala Lys Phe Val Glu
245 250 255

Asn Glu Pro Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Glu Ala Ile Phe Lys Gln Arg
260 265 270

Leu Pro Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met Glu Phe
275 280 285

Phe Lys Asp Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Leu Trp Tyr Lys Asp
290 295 300

Cys Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys Asp
305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn Tyr Thr
325 330 335

Cys His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr Arg
340 345 350

Val Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg Pro Val
355 360 365

Ile Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Ile Glu Val Asp Leu Gly Ser Gln
370 375 380

Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Thr Ala Tyr
385 390 395 400

Trp Lys Trp Asn Gly Ser Phe Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val Leu Gly
405 410 415

Glu Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg Ser Thr
420 425 430

Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Thr Glu Ser Arg Phe Tyr Lys
435 440 445

His Pro Phe Thr Cys Leu Ala Arg Asn Thr His Gly Met Asp Ala Ala
450 455 460

Tyr Val Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Lys Phe Gln Lys Asp Tyr Lys
465 470 475 480

Asp Asp Asp Asp Lys
485

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 61

Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 62
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 62

Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 63

Phe His Trp Ile Ala
1 5

<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 64

Gly Ile Trp Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr His Ala His Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 65

Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala Gly Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 66

Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 67

Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe
1 5 10

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 68

Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr
1 5 10

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 69

Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 70

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 71

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

<210> 72

<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 72

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

<210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 74

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr
1 5 10

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 75

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 76
<211> 111
<212> PRT
<213> 智人

<400> 76

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

Ser Gln Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Ile
20 25 30

Ala Tyr Trp Lys Trp Asn Gly Ser Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val
35 40 45

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

Ser Thr Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe
65 70 75 80

Tyr Lys His Pro Phe Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp
85 90 95

Ala Ala Tyr Ile Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Asn Phe Gln Lys
100 105 110

<210> 77
<211> 350
<212> DNA
<213> 智人

<400> 77

cctgtgattg tgagcccagc taatgagaca atggaagtag acttgggata ccagatacaa 60

ttgatctgta atgtcaccgg ccagttgagt gacattgctt actggaagtg gaatgggtca 120

gtaattgatg aagatgaccc agtgctaggg gaagactatt acagtgtgga aaatcctgca 180
 aacaaaagaa ggagtaccct catcacagtg cttaatatat cggaaattga aagtagattt 240
 tataaacatc catttacctg ttttgccaag aatacacatg gtatagatgc agcatatata 300
 cagttaatat atccagtcac taatttccag aagcacatga ttggtatatg 350

<210> 78
 <211> 350
 <212> DNA
 <213> 大鼠 (Rattus sp.)

<400> 78
 cctgtgatta tgagcccacg gaatgagacg atggaagctg acccaggatc cagatacaa 60
 ctgatctgca acgtcacggg ccagttcacc gaccttgtct actggaagtg gaatgggtcg 120
 gaaattgaat gggacgatcc aatcctagcc gaagactatc agtttttgga acacccttca 180
 gccaaaagaa agtacactct cattacaaca cttaacgttt cagaggtcaa aagccagttt 240
 tatcgctatc cgttcactcg cttcgtaag aacactcata ttctggagac tgcacacgta 300
 cggttagtat acccagttcc tgacttcaag aattacctca tcgggggctt 350

<210> 79
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 大鼠

<400> 79

Pro Val Ile Met Ser Pro Arg Asn Glu Thr Met Glu Ala Asp Pro Gly
 1 5 10 15

Ser Thr Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Phe Thr Asp Leu

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 81
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 81

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

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

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

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

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

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

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

<210> 82

<211> 120

<212> PRT

<213> 智人

<400> 82

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

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

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

Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala Gly Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 83

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人

<400> 83

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

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

<210> 84

<211> 120

<212> PRT

<213> 智人

<400> 84

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 85

<211> 354

<212> DNA

<213> 智人

<400> 85

gaggtgcagc tgatgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60

tcctgtaagg gttctggata cagcttttcc ttccactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120

ccccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atccatcctg gtgcctctga taccagatac 180

agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca actccaacag cgccacctac 240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt atttctgtgc gagacaaagg 300

gaactcgact actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc tagt 354

<210> 86

<211> 321

<212> DNA

<213> 智人

<400> 86

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

atcacctgcc gggccagtc gagcattggt agtagcttac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtcctc caaagctcct catcaagtat gcttcccagt ccttctcagg ggtcccctcg 180

aggttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg cagcgtatta ctgtcatcag agtagtagtt tacctctcac ttctggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 87

<211> 360

<212> DNA

<213> 智人

<400> 87

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag tgtctggatt caccttcagt aactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggaatg atggagaaaa taaacaccat 180

gcaggctccg tgaggggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggacga 300

tattttgact gggtattatt tgagtattgg ggccaggga ccctgggtcac cgtctctagt 360

<210> 88

<211> 324

<212> DNA

<213> 智人

<400> 88

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgct cactttcggc 300

ggagggacca aggtggagat caaa 324

<210> 89

<211> 360

<212> DNA

<213> 智人

<400> 89

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagc aactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaggc atttggaatg atggaattaa taaataccat 180

gcacactccg tgaggggccc attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcccagag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagcacgg 300

tccttcgact ggctattatt tgagttctgg ggccaggga ccctggtcac cgtctctagt 360

重链IgG1恒定区

gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcaccct	cctccaagag	cacctctggg	60
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacgggtgtcg	120
tggaaactcag	gcgccttgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtcctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	caccagacc	240
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagaa	agttgagccc	300
aaatcttggt	acaaaactca	cacatgcccc	ccgtgcccag	cacctgaact	cctgggggga	360
ccgtcagttc	tcctcttccc	cccaaaaccc	aaggacaccc	tcattgatctc	ccggaccctc	420
gaggtcacat	gcgtgggtgg	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	480
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgcgggagga	gcagtacaac	540
agcacgtacc	gtgtggtcag	cgtcctcacc	gtcctgcacc	aggactgggt	gaatggcaag	600
gagtacaagt	gcaaggtctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	660
aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	gtgtacaccc	tgcccccatc	ccgggatgag	720
ctgaccaaga	accagggtcag	cctgacctgc	ctgggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	780
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccgtg	840
ctggactccg	acggctcctt	cttcctctat	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	900
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	960
cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa				990

图1A

ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKKVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPPELLGG	120
PSVFLFPPKP	KDTLMISRT	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	180
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE	240
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	300
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK				330

图1B

κ 链恒定区

cgaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcac	ttcccgccat	ctgatgagca	gttgaaatct	60
ggaactgcct	ctgttggtgtg	cctgctgaat	aacttctatc	ccagagagggc	caaagtacag	120
tggaaggtgg	ataacgccct	ccaatcgggt	aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	180
agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	accctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	240
aaacacaaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaaag	300
agcttcaaca	ggggagagtg	t				321

图 2A

RTVAAPSVFI	FPPSDEQLKS	GTASVVCLLN	NFYPREAKVQ	WKVDNALQSG	NSQESVTEQD	60
SKDSTYSLSS	TLTLSKADYE	KHKVYACEVT	HQGLSSPVTK	SFNRGEC		107

图 2B

重链IgG2恒定区

gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcgccct	gctccaggag	cacctccgag	60
agcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacgggtgtcg	120
tggaaactcag	gcgctctgac	cagcggcggtg	cacaccttcc	cagctgtcct	acagtcctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccttcca	gcaacttcgg	cacccagacc	240
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagac	agttgagcgc	300
aaatgttgtg	tcgagtgtcc	accgtgtcca	gcaccacctg	tggcaggacc	gtcagtcttc	360
ctcttcccc	caaaacccaa	ggacaccctc	atgatctccc	ggaccctga	ggtcacgtgc	420
gtgggtggtg	acgtgagcca	cgaagacccc	gaggtccagt	tcaactggta	cgtggacggc	480
gtggaggtgc	ataatgccaa	gacaaagcca	cgggaggagc	agttcaacag	cacgttccgt	540
gtggtcagcg	tcctcaccgt	tgtgcaccag	gactgggtga	acggcaagga	gtacaagtgc	600
aaggtctcca	acaaaggcct	cccagcccc	atcgagaaaa	ccatctccaa	aaccaaaggg	660
cagccccgag	aaccacaggt	gtacaccctg	cccccatccc	gggaggagat	gaccaagaac	720
caggtcagcc	tgacctgcct	ggtcaaaggc	ttctaccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	780
gagagcaatg	ggcagccgga	gaacaactac	aagaccacac	ctcccatgct	ggactccgac	840
ggctccttct	tcctctacag	caagctcacc	gtggacaaga	gcaggtggca	gcaggggaac	900
gtcttctcat	gctccgtgat	gcatgaggct	ctgcacaacc	actacacgca	gaagagcctc	960
tcctgtctc	cgggtaaa					978

图 3A

ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSNFQTQT	YTCNVDHKPS	NTKVDKTVR	KCCVECPPCP	APPVAGPSVF	120
LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVVDVSHEDP	EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTFR	180
VVSVLTVVHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKGLPAP	IEKTISKTKG	QPREPQVYTL	PPSREEMTKN	240
QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTTPMLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	300
VFSCSVMEHA	LHNHYTQKSL	SLSPGK				326

图 3B

重链IgG4恒定区

gccagcacca	agggggccatc	cgtcttcccc	ctggcgccct	gctccaggag	cacctccgag	60
agcacagccg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacgggtgtcg	120
tggaactcag	gcgccctgac	cagcggcgctg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtccctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	cacgaagacc	240
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagtcc	300
aaatatggtc	ccccatgccc	atcatgcccc	gcacctgagt	tcctgggggg	accatcagtc	360
ttcctgttcc	ccccaaaacc	caaggacact	ctcatgatct	cccggacccc	tgaggtcacg	420
tgcgtgggtg	tggacgtgag	ccaggaagac	cccaggttcc	agttcaactg	gtacgtggat	480
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	cgcggggagg	agcagttcaa	cagcacgtac	540
cgtgtgggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	600
tgcaaggtct	ccaacaaaag	cctcccgtcc	tccatcgaga	aaaccatctc	caaagccaaa	660
gggcagcccc	gagagccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccaggagga	gatgaccaag	720
aaccaggtca	gcctgacctg	cctgggtcaaa	ggcttctacc	ccagcgacat	cgccgtggag	780
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgcctcccgt	gctggactcc	840
gacggctcct	tcttctctta	cagcaggcta	accgtgraca	agagcagggtg	gcaggagggg	900
aatgtcttct	catgctccgt	gakgcatgag	gctctgcaca	accactacac	acagaagagc	960
ctctccctgt	ctctgggtaa	a				981

图 4A

ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTKT	YTCNVDHKPS	NTKVDKRVES	KYGPPCPSCP	APEFEGGPSV	120
FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	180
RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	240
NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTPPVLDL	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	300
NVFSCSVME	ALHNHYTQKS	LSLSLGK				327

图 4B

26F5重链

atggagtttg	ggctgagctg	ggtcttcctc	gttgotcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagcgt	ctggattcac	cttcagcaac	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggetcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcaggcatt	tggaatgatg	gaattaataa	ataccatgca	240
cactccgtga	ggggccgatt	caccatctoc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcccgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	agcacggtct	360
ttcgactggc	tattatttga	gttctggggc	caggggaacc	tggtcacctg	ctctagt	417

图 5A

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQGRSLRLS	CAASGFTFSN	YGMHWVRQAP	60
GKGLEWVAGI	WNDGINKYHA	HSVRGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSPRAEDT	AVYYCARARS	120
FDWLLFEFWG	QGTLVTVSS					139

图 5B

26F5 κ 链

atggaagccc	cagctcagct	tctcttcctc	ctgctactct	ggctcccaga	taccaccgga	60
gaaattgtgt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	120
ctctcctgca	gggccagtca	gagtgttagc	agctacttag	cctggtacca	acagaaacct	180
ggccaggctc	ccaggctcct	catctatgat	gcatccaaca	gggccactgg	catcccagcc	240
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagac	ttcactctca	ccatcagcag	cctagagcct	300
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcagcag	cgtagcaact	ggcctccgct	cactttcggc	360
ggagggacca	aggaggagat	caaaa				384

图6A

MEAPAQLLFL	LLLWLPTTG	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	60
GQAPRLLIYD	ASNRTGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTISLEP	EDFAVYVCQQ	RSNWPPLTFG	120
GGTKVEIK						128

图6B

27F2重链

atggagtttg	ggctgagctg	ggttttcctc	gttgctcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggagggcgtg	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagtgt	ctggattcac	cttcagtaac	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcagctata	tggaatgatg	gagaaaataa	acaccatgca	240
ggctccgtga	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcctgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	aggacgatat	360
tttgactggg	tattatttga	gtattggggc	caggggaacc	tggtcacccg	ctctagt	417

图7A

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQPGRSLRLS	CAVSGFTFSN	YGMHWVRQAP	60
GKGLEWVAAI	WNDGENKHHA	GSVRGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDT	AVYYCARGRY	120
FDWLLFEYWG	QGTLLTVSS					139

图7B

15C4重链

atgggggtcaa	ccgccatcct	cgccctcctc	ctggctgttc	tccaaggagt	ctgtgccgag	60
gtgcagctga	tgcagtctgg	agcagagggtg	aaaaagcccg	gggagtctct	gaagatctcc	120
tgtaaggggt	ctggatacag	cttttccttc	cactggatcg	cctgggtgcg	ccagatgccc	180
gggaaaggcc	tggagtggat	ggggatcatc	catcctgggtg	cctctgatac	cagatacagc	240
ccgtccttcc	aaggccaggt	caccatctca	gccgacaact	ccaacagcgc	cacctacctg	300
cagtggagca	gcctgaaggc	ctcggacacc	gccatgtatt	tctgtgcgag	acaaagggaa	360
ctcgactact	ttgactactg	gggccaggga	accctggtca	ccgtctctag	t	411

图8A

MGSTAILALL	LAVLQGVCAE	VQLMQSGAEV	.KKPGESLKIS	CKGSGYSFSF	HWIAWVROMP	60
GKGLEWMGII	HPGASDTRYs	PSFQQQVTIS	ADNSNSATYL	QWSSLKASDT	AMYFCARQRE	120
LDYFDYWGQG	TLVTVSS					137

图8B

15C4 κ 链

atgtcgccat	cacaactcat	tgggtttctg	ctgctctggg	ttccagcctc	caggggtgaa	60
attgtgctga	ctcagtctcc	agactttcag	tctgtgactc	caaaggagaa	agtcaccatc	120
acctgccggg	ccagtcagag	cattggtagt	agcttacact	ggtaccagca	gaaaccagat	180
cagtctccaa	agtcctcat	caagtatgct	tcccagtcct	tctcaggggt	cccctcgagg	240
ttcagtgga	gtggatctgg	gacagatttc	accctcacca	tcaatagcct	ggaagctgaa	300
gatgctgcag	cgtattactg	tcatcagagt	agtagtttac	ctctcacttt	cggcggaggg	360
accaaggtgg	agatcaaa					378

图9A

MSPSQLIGFL	LLWVPASRGE	IVLTQSPDFQ	SVTPKEKVTI	TCRASQSIGS	SLHWYQQKPD	60
QSPKLLIKYA	SQSFSGVPSR	FSGSGSGTDF	TLTINSLEAE	DAAAYYCHQS	SSLPLTFGGG	120
TKVEIK						126

图9B

				CDR1		CDR2
26F5	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL	SCAASGFTFS	<u>NYGMEHWVRQA</u>	PGKGLEWVAG	<u>IWNDGINKYH</u>
27F2	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL	SCAVSGFTFS	<u>NYGMEHWVRQA</u>	PGKGLEWVAA	<u>IWNDGENKHH</u>
15C4	EVQLMQSGAE	VKKPGESLKI	SCKGSGYSFS	<u>FEWIAWVRQM</u>	PGKGLEWMGI	<u>IHPGASDTRY</u>
				CDR3		
26F5	<u>AHSVRGRFTI</u>	SRDNSKNTLY	LQMNSPRAED	TAVYYCARAR	<u>SFDWLLFEFW</u>	GQGTTLTVSS
27F2	<u>AGSVRGRFTI</u>	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGR	<u>YFDWLLFEYW</u>	GQGTTLTVSS
15C4	<u>SPSFQGVVTI</u>	SADNSNSATY	LQWSSLKASD	TAMYFCARQR	<u>ELDYFDYWGQ</u>	GTLTVTVSS

图 10

	CDR1			
26F5/27F2	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP
15C4	EIVLTQSPDF	QSVTPKEKVT	ITCRASQSIG	SSLHWYQQKP
	CDR2		CDR3	
26F5/27F2	ASNRA	TGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTISSELP
15C4	ASQSF	SGVPS	RFSGSGSGTD	FTLTINSLEA
26F5/27F2	GGTKVEIK			
15C4	GTKVEIK			

图 11

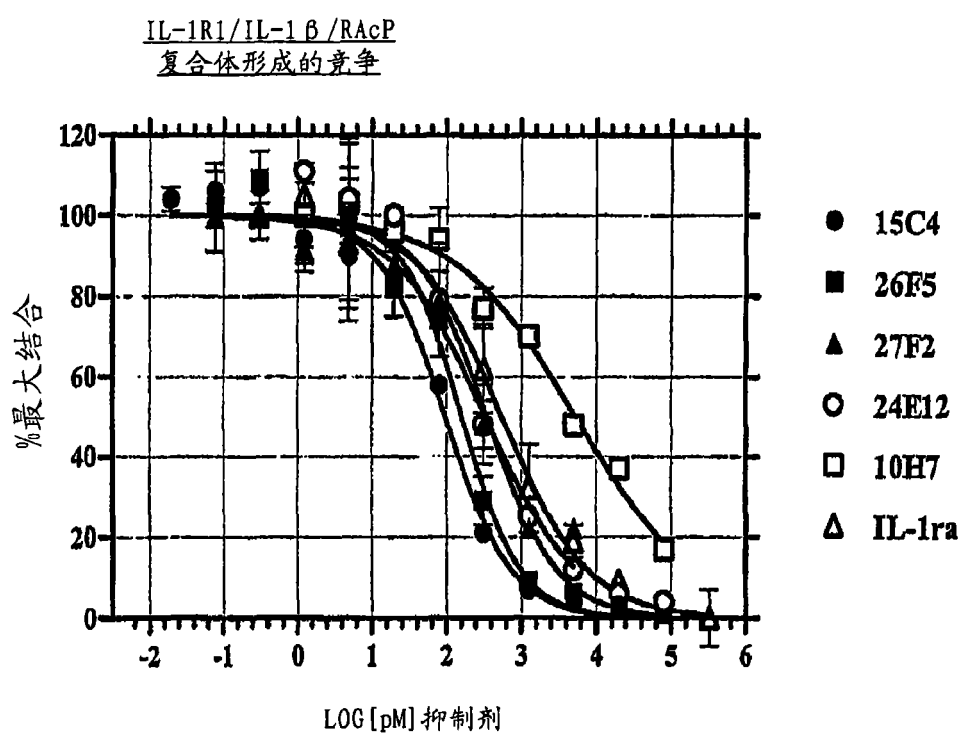


图 12

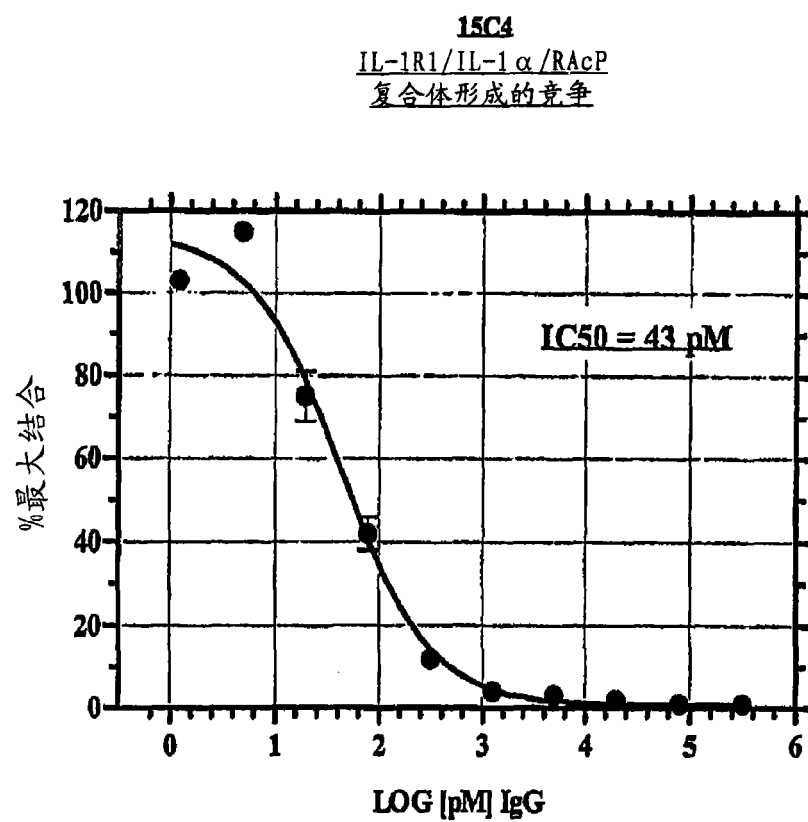


图 13

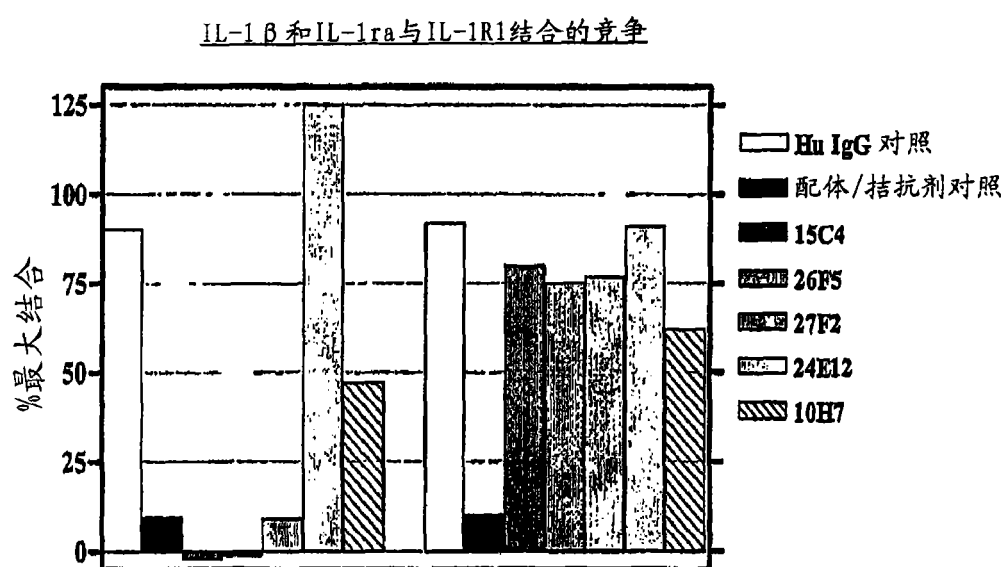


图 14

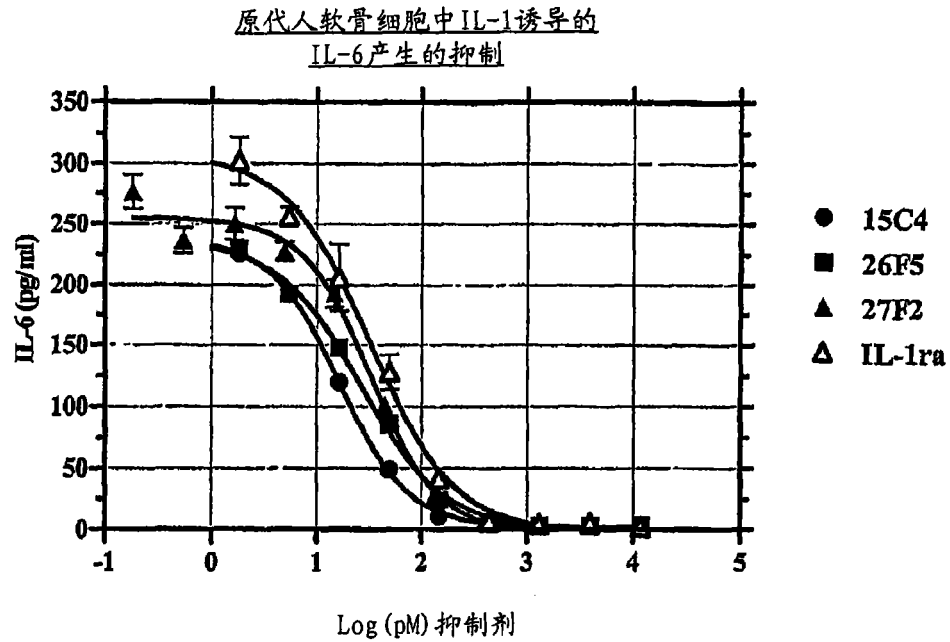


图 15A

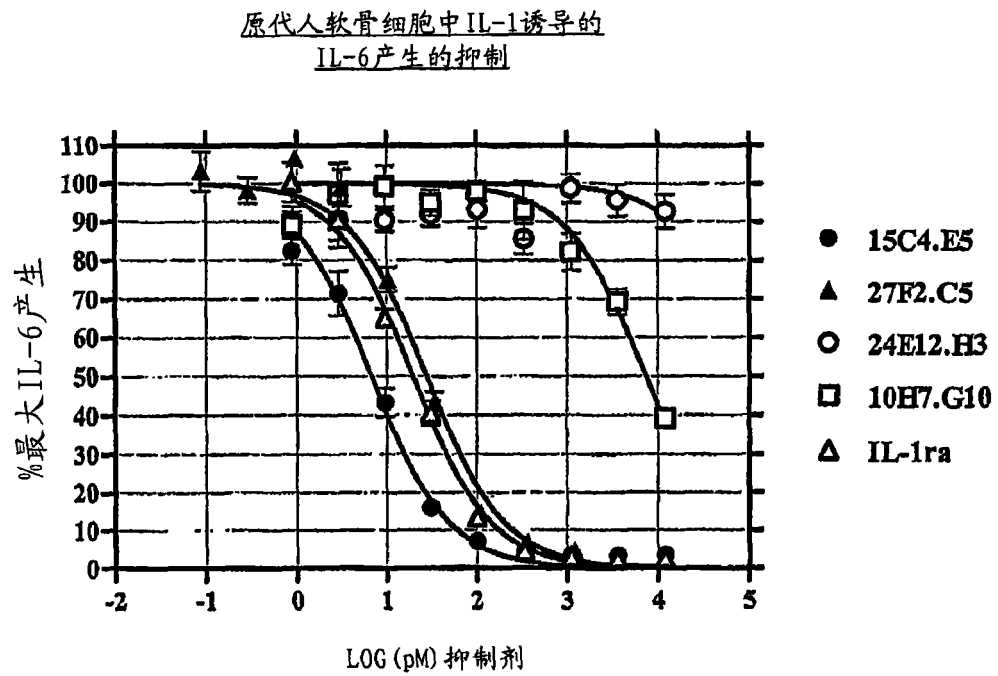


图 15B

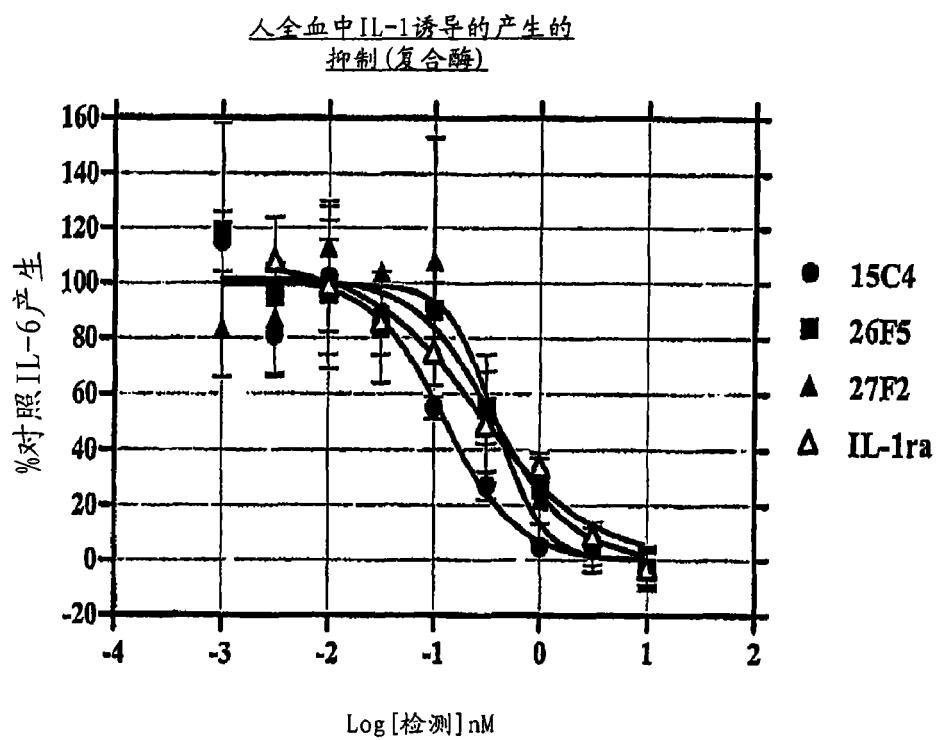


图 16

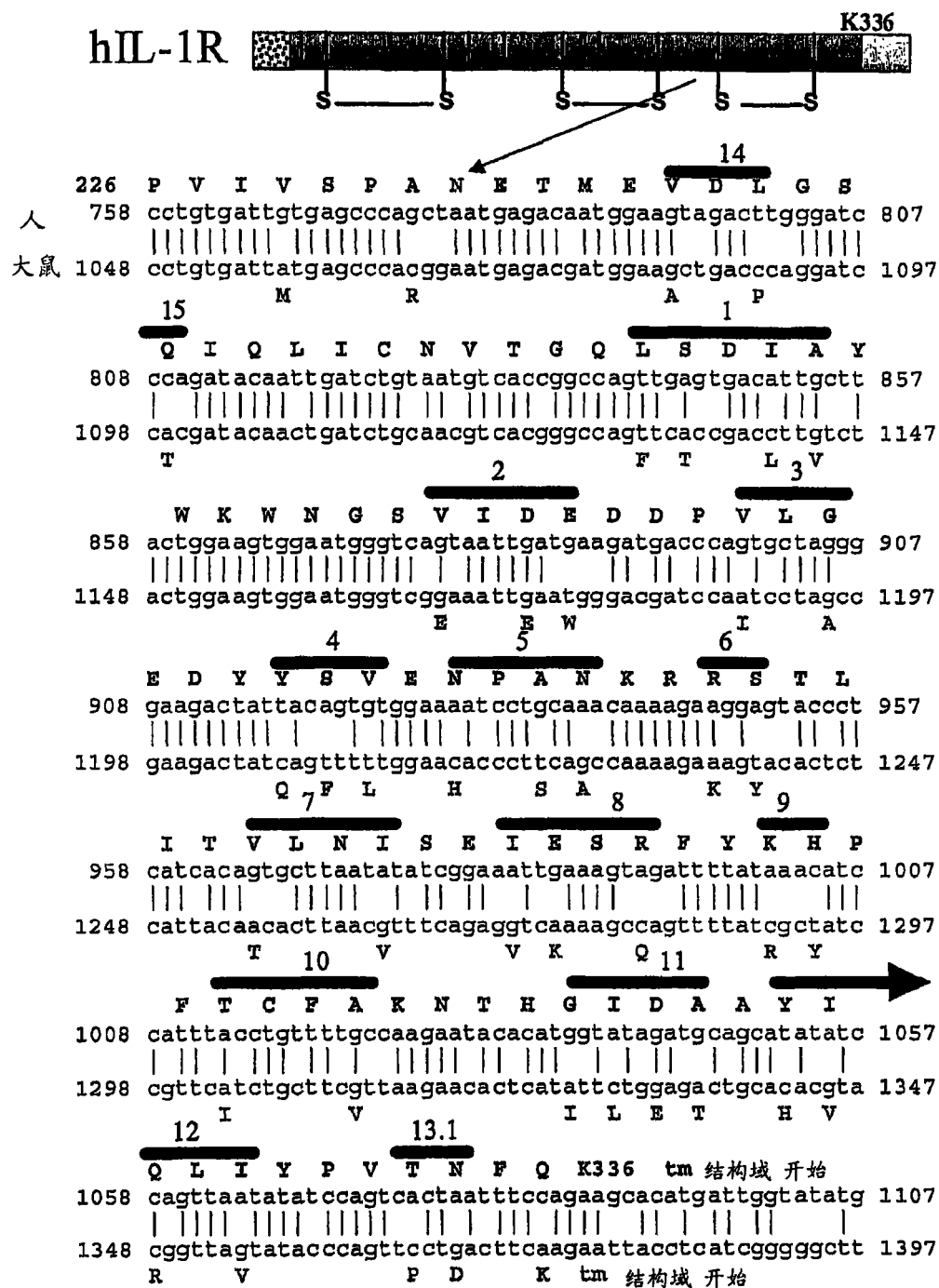


图 17

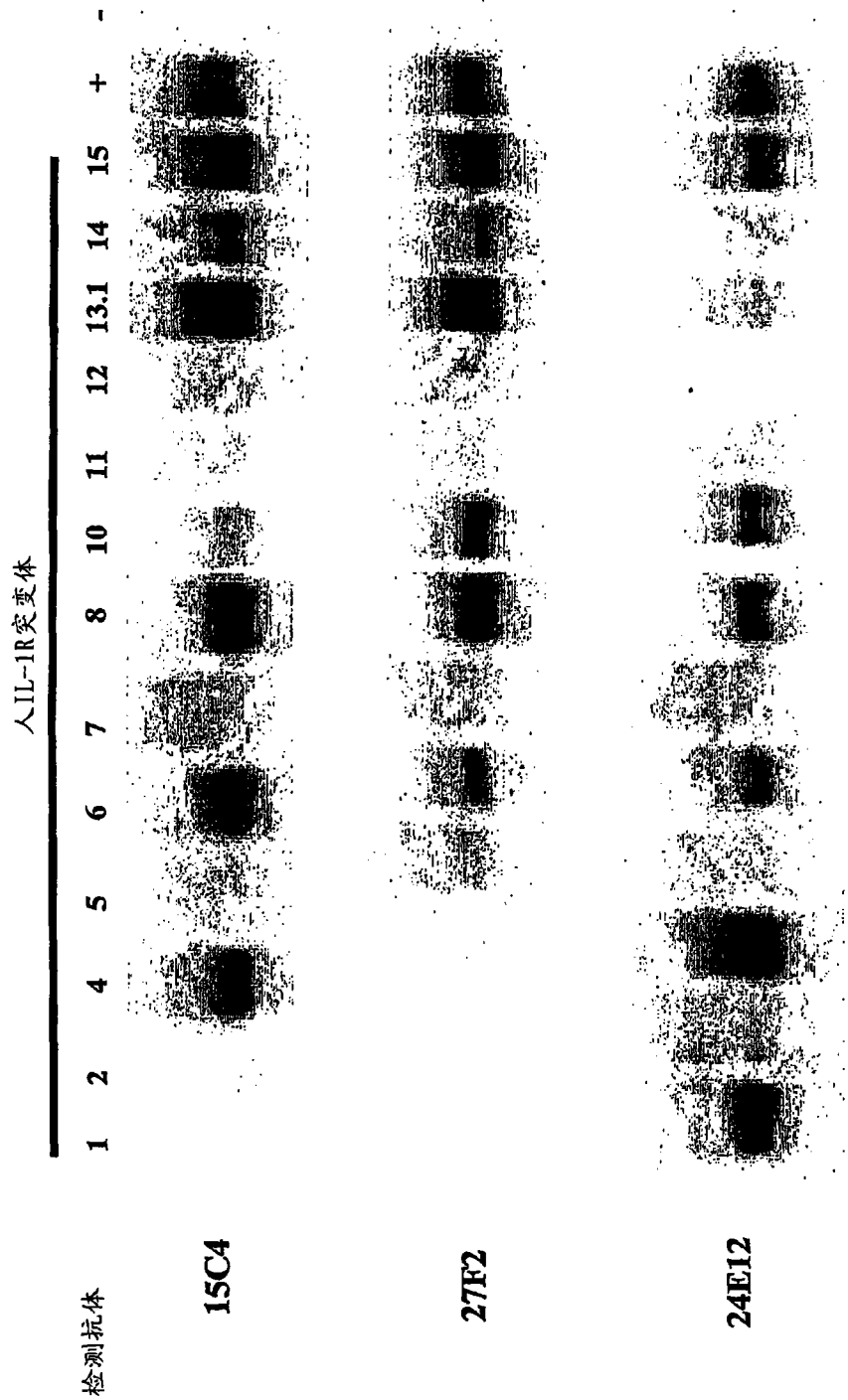


图 18

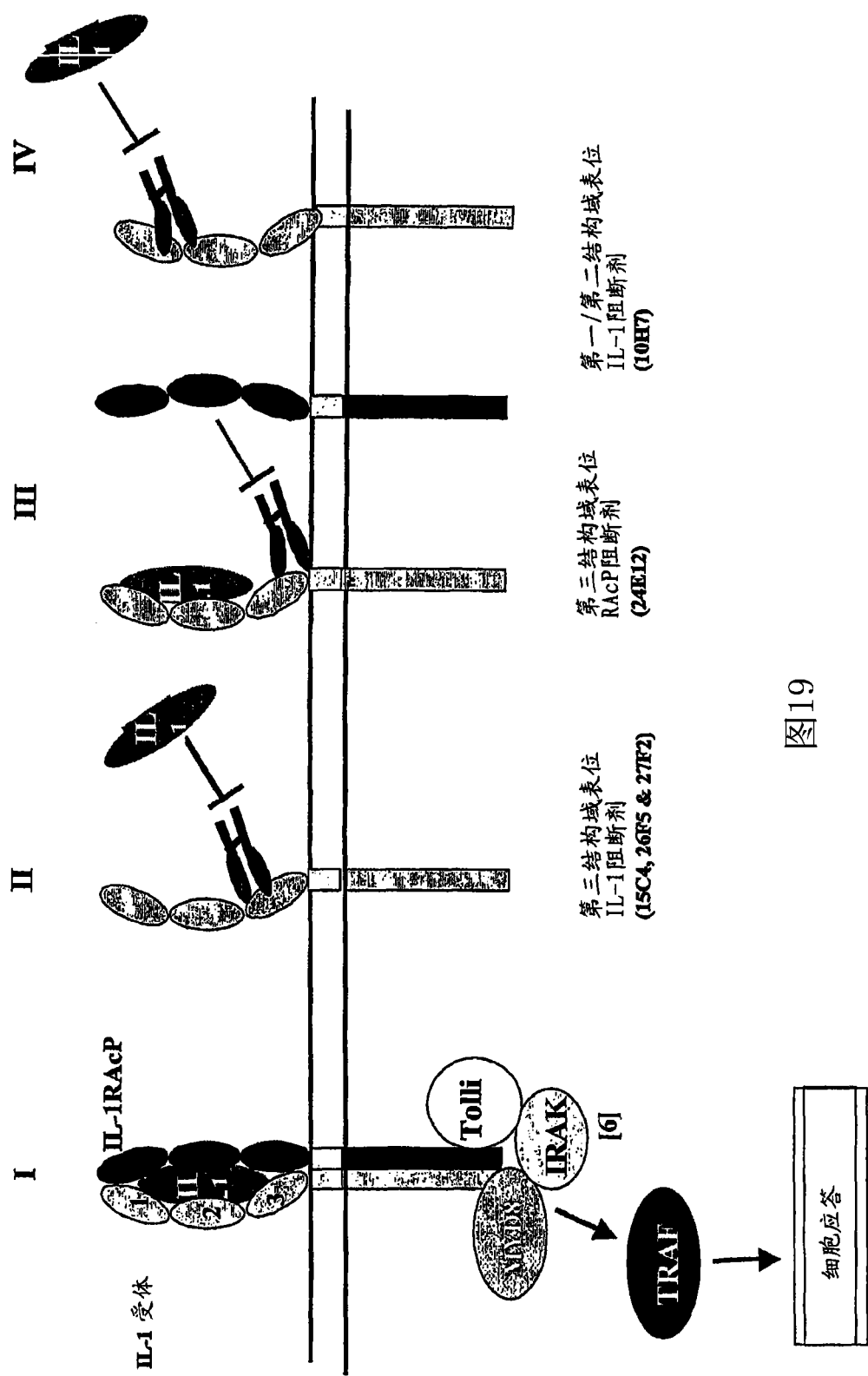


图19



图 20

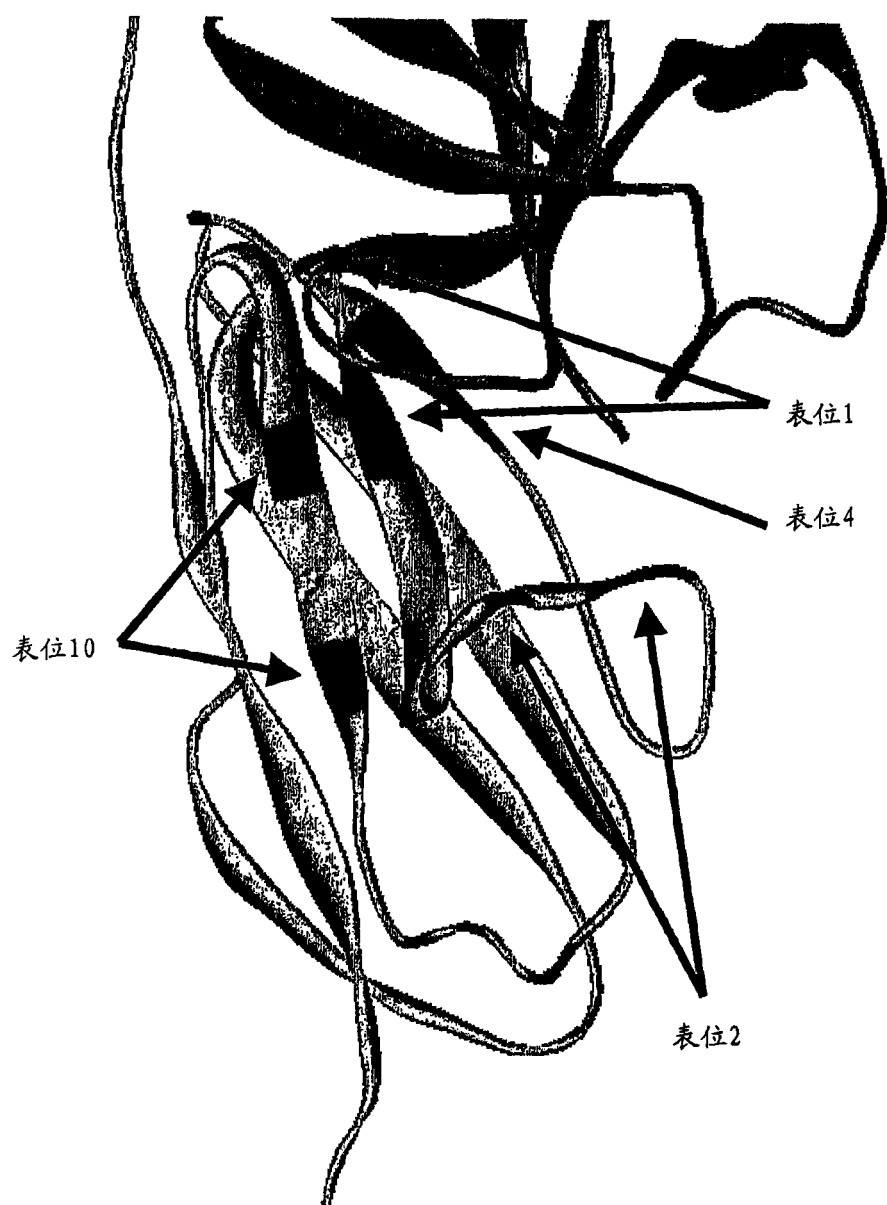


图 21

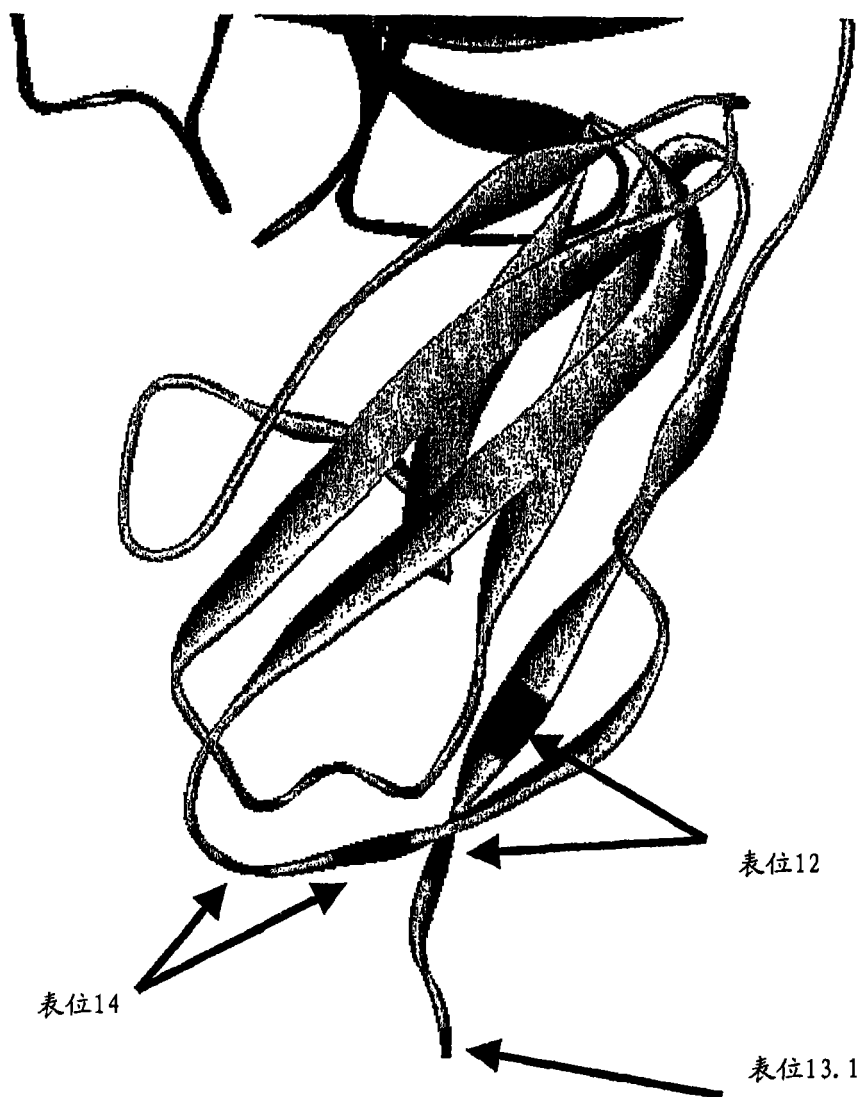


图 22

MVHATSPILL LLLLSLALVA PGLSARKCSL TGKWTNDLGS NMTIGAVNSK GEFTGTYTTA 60
VTATSNEIKB SPLHGTQNTI NKRTQPTFGF TVNWKFESEST TVFTGQCFID RKGKEVLKTM 120
WLLRSSVNDI GDDWKATRVG INIFTRLRTQ KEQLLASLLE ADKCKEREK IILVSSANEI 180
DVRPCPLNPN EHKGTITWYK DDSKTPVSTE QASRIHQHKE KLNFPVAMVE DSGHYICVVR 240
NSSYCLRIKI SAKFVENEPN LCYNAQAIFK QKLPVAGDGG LVCPYMEFFK NENNELPKLQ 300
WYKCKPILL DNIHFSGVKD RLIVMNVAEK HRGNYTCHAS YTYLGKQYPI TRVIEFITLE 360
ENKPTRPVIV SPANETMEVD LGSQIQILCN VTGQLSDIAY WKWNGSVIDE DDPVLGEDYY 420
SVENPANKRR STLITVLNIS EIESRFYKHP FTCFAKNTHG IDAAAYIQLIY PVTNFAQDYK 480
DDDDK 485

图 23

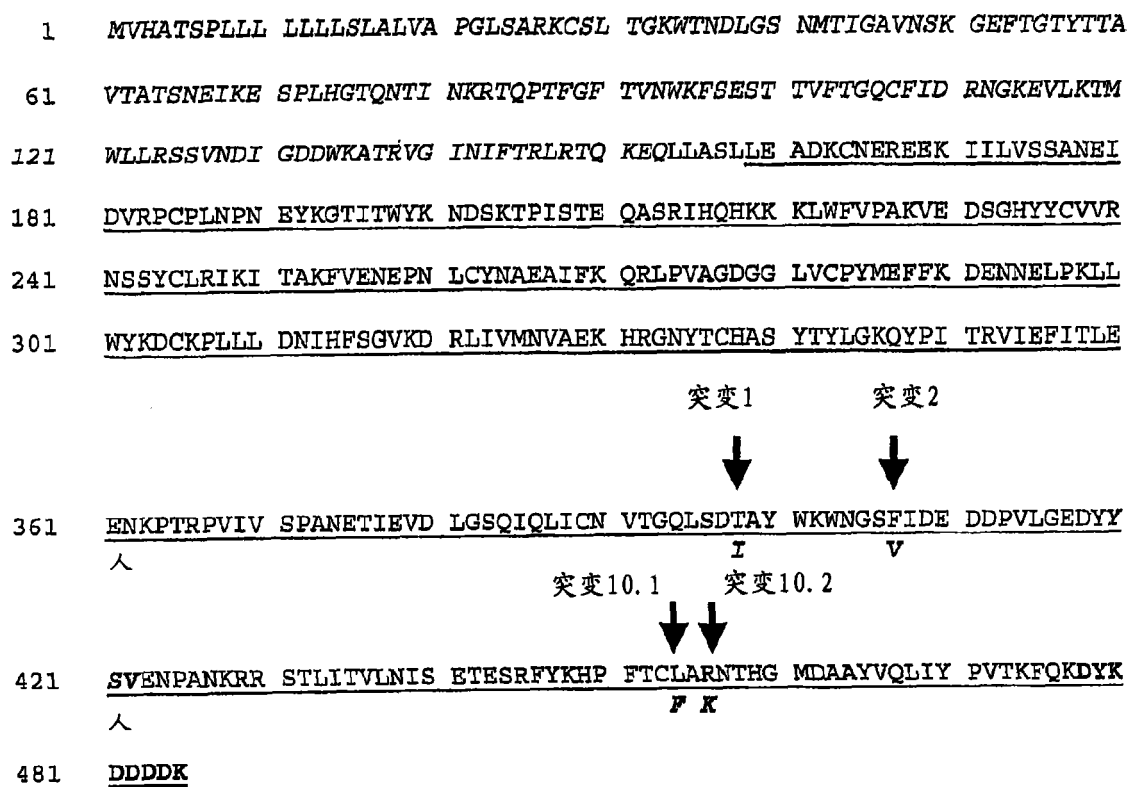


图 24

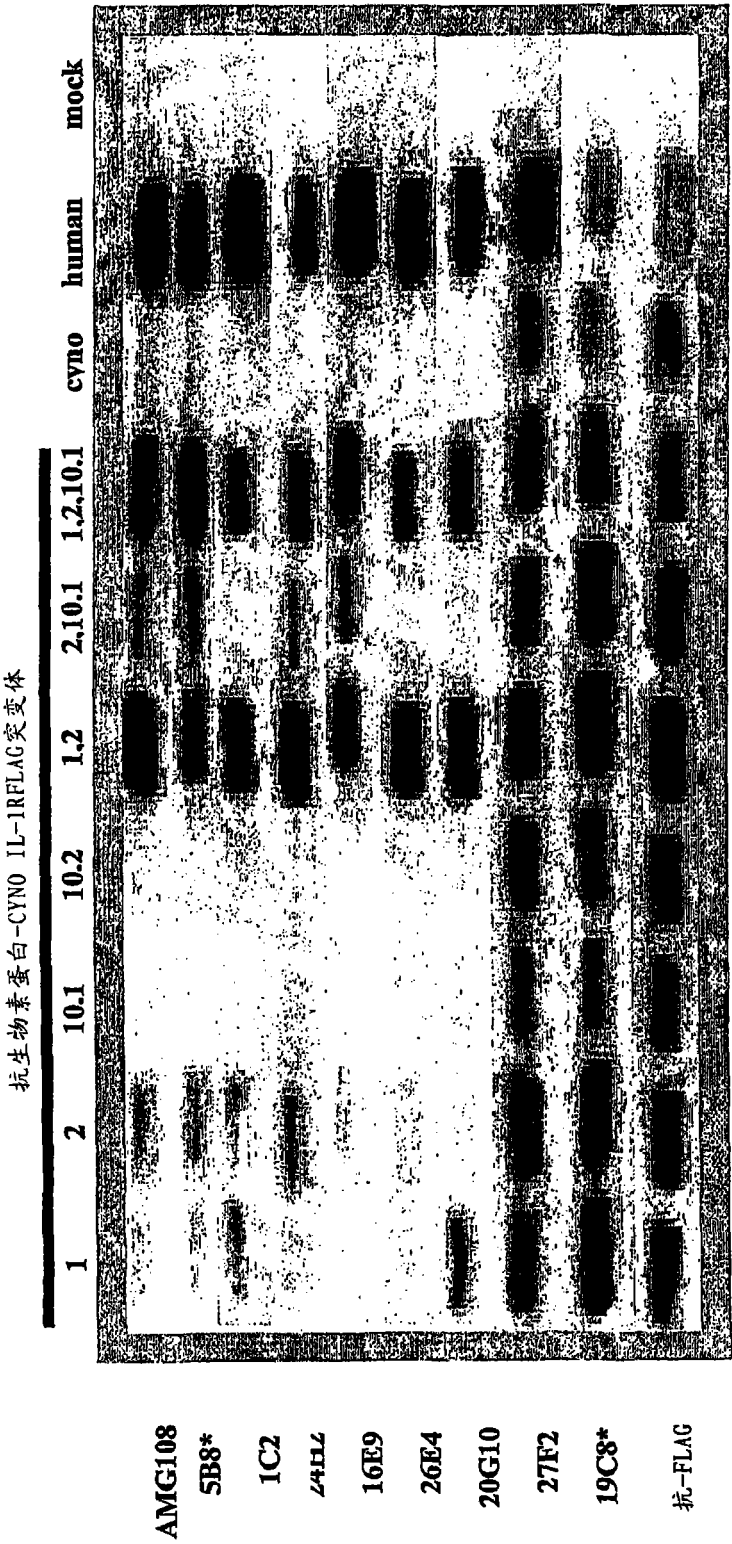


图 25A

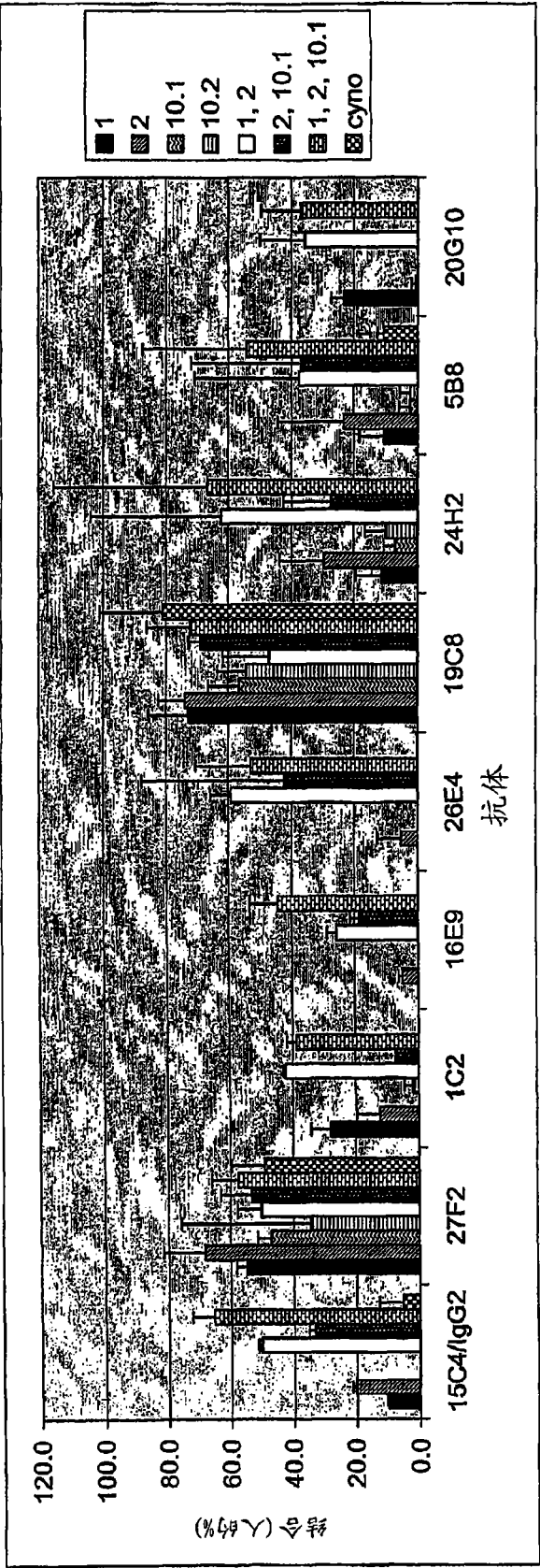


图 25B

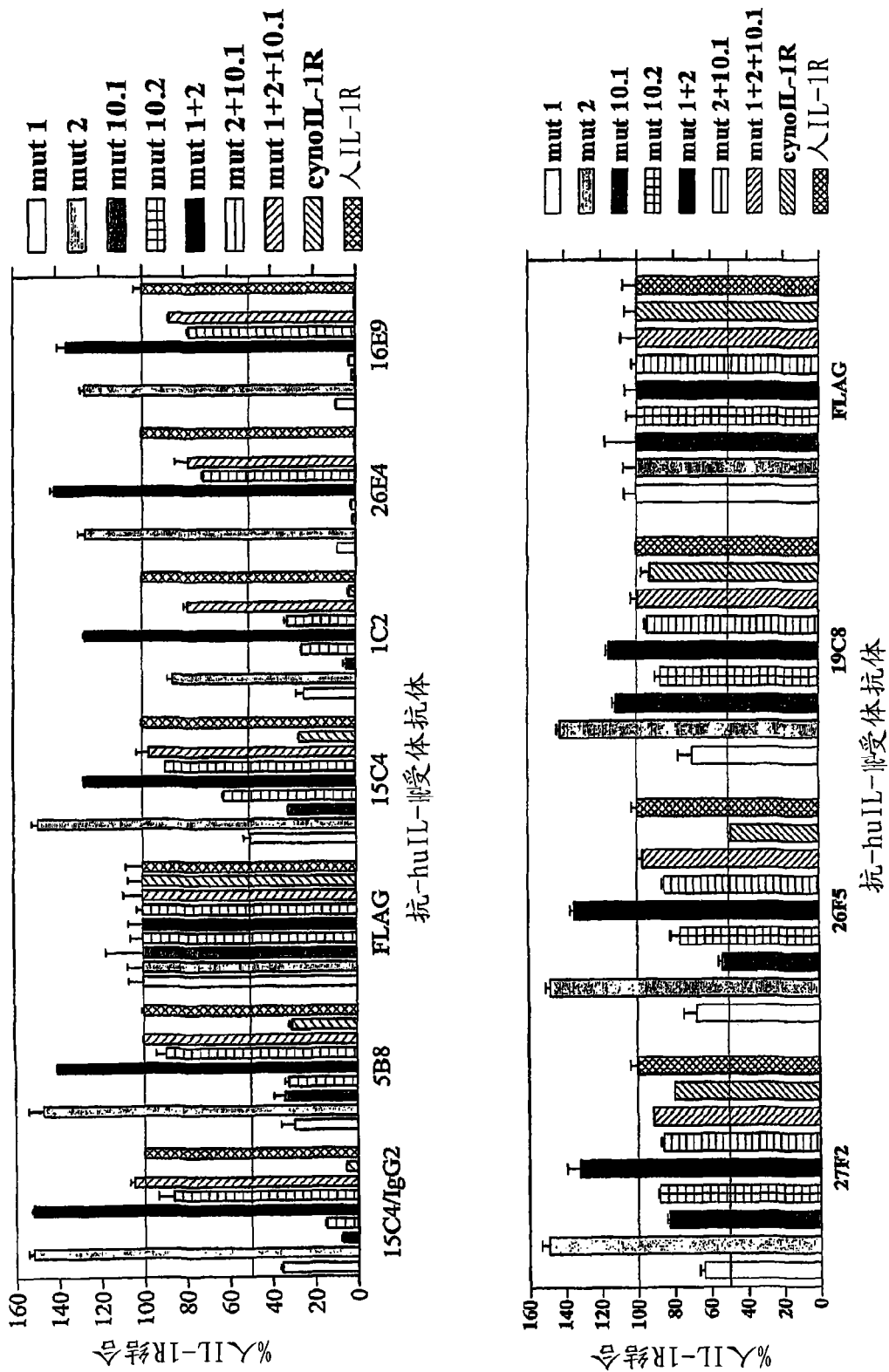


图 26

专利名称(译)	治疗性人抗 - IL - 1R1单克隆抗体		
公开(公告)号	CN101628939A	公开(公告)日	2010-01-20
申请号	CN200910009932.1	申请日	2003-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司 米德列斯公司		
申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司 米德列斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司 米德列斯公司		
[标]发明人	B瓦纳姆 C韦兹纳 A维特 X钱 F马丁 H黄 G埃利奥特		
发明人	B·瓦纳姆 C·韦兹纳 A·维特 X·钱 F·马丁 H·黄 G·埃利奥特		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/13 C12N15/63 C12N1/00 C12N5/10 C12P21/08 A61K39/395 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/10 A61P17/00 A61P3/10 A61P1/00 A61P19/04 G01N33/53 C12Q1/02		
CPC分类号	C07K16/2866 C07K2317/565 C07K2317/21 C07K2316/96 A61K2039/505 C07K2317/56 C07K16/24 A61P1/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/12 A61P1/14 A61P1/18 A61P3/02 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/10 A61P13/12 A61P15/00 A61P15/06 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/02 A61P23/02 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/04 A61P25/06 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/20 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 C07K2317/76 A61K39/39533		
代理人(译)	郭文洁 付磊		
优先权	60/408719 2002-09-06 US		
其他公开文献	CN101628939B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及治疗性人抗 - IL - 1R1单克隆抗体。描述了与白介素 - 1受体型1(IL - 1R1)相互作用的抗体。还描述了通过施用药学有效量的针对IL - 1R1的抗体治疗IL - 1介导的疾病的方法。另外还描述了使用针对IL - 1R1的抗体检测样品中IL - 1R1的量的方法。

重链IgG1恒定区

```

gctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg cctgggctg cctgggcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag ggcacctgac cagcggcggtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
aaatcttggt acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagtet tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcctgatctc ccggaacctc 420
gaggtcacat gctgggtggt ggacgtgagc cagcaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gctgggagt gcataatgcc aagacaaagc cggggaggga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacg gtctgcacc aggaactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 660
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacccc tgcccccac cgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgaacctg ctgggcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gocgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

```