



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102040662 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 04

(21) 申请号 201010165730. 9 *C12N 5/10* (2006. 01)

(22) 申请日 2004. 03. 12 *C12N 5/20* (2006. 01)

(30) 优先权数据 *C12P 21/00* (2006. 01)
60/454, 336 2003. 03. 14 US *A61K 39/395* (2006. 01)
A61P 19/02 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据 *A61P 19/04* (2006. 01)
200480010518. 8 2004. 03. 12 *A61P 29/00* (2006. 01)
A61P 37/02 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息 *A61P 25/28* (2006. 01)
PTA-5031 2003. 03. 05 *A61P 19/08* (2006. 01)
PTA-5030 2003. 03. 05 *A61P 37/06* (2006. 01)

(71) 申请人 惠氏有限责任公司 *A61P 17/00* (2006. 01)
地址 美国新泽西 *A61P 17/06* (2006. 01)
申请人 医学免疫有限公司 *A61P 1/00* (2006. 01)

(72) 发明人 D·A·扬 M·J·惠特斯 *A61P 35/00* (2006. 01)
V·瓦尔格-阿彻 M·柯林斯 *G01N 33/53* (2006. 01)
A·J·威廉姆斯 J·维特克 *C12R 1/91* (2006. 01)

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006. 01)
C12N 15/13 (2006. 01)
C12N 15/63 (2006. 01)
C12N 1/21 (2006. 01)
C12N 1/19 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 34 页 序列表 59 页
附图 12 页

(54) 发明名称
抗人 IL-21 受体的抗体及其应用

(57) 摘要
本发明提供了特异性结合人白细胞介素-21受体 (IL-21R) 的人抗体和其抗原结合片段。所述抗体可作为 IL-21R 活性的拮抗剂, 因此在总体上调节免疫应答, 特别是那些由 IL-21R 介导的免疫应答。所述公开的组合物和方法可用于例如诊断、治疗和预防炎性疾病、自身免疫疾病、过敏、移植排斥、癌症和其它免疫系统疾病。

1. 分离的抗体,其包含与选自 SEQ ID NO :1, 2, 3, 19, 20, 21, 47, 48, 49, 65, 66, 67, 83, 84, 85, 101, 102, 103, 119, 120, 121, 137, 138 和 139 的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列,其中所述抗体选择性地与 IL-21 受体结合。

2. 分离的抗体,其由与选自 SEQ ID NO :10, 11, 12, 28, 29, 30, 56, 57, 58, 74, 75, 76, 92, 93, 94, 110, 111, 112, 128, 129, 130, 146, 147 和 148 的核苷酸序列具有至少 95% 同一性的核苷酸序列编码,其中所述抗体选择性地与 IL-21 受体结合。

3. 分离的抗体,其包含 V_H 结构域和 V_L 结构域,所述 V_H 结构域具有与选自 SEQ ID NO :1, 19, 47, 65, 83, 101, 119 和 137 的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列,所述 V_L 结构域具有与选自 SEQ ID NO :2, 20, 48, 66, 84, 102, 120 和 138 的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列,其中所述抗体选择性地与 IL-21 受体结合。

4. 分离的抗体,其包含含有一个或多个 CDR 的 V_H 结构域,所述 CDR 选自 SEQ ID NO :4, 5, 6, 22, 23, 24, 50, 51, 52, 68, 69, 70, 86, 87, 88, 104, 105, 106, 122, 123, 124, 140, 141 和 142 以及其保守氨基酸替代物,其中所述抗体选择性地与 IL-21 受体结合。

5. 分离的抗体,其包含含有一个或多个 CDR 的 V_L 结构域,所述 CDR 选自 SEQ ID NO :7, 8, 9, 25, 26, 27, 53, 54, 55, 71, 72, 73, 89, 90, 91, 107, 108, 109, 125, 126, 127, 143, 144 和 145 以及其保守氨基酸替代物,其中所述抗体选择性地与 IL-21 受体结合。

6. 分离的抗体,其与包含选自 SEQ ID NO :1, 2, 3, 19, 20, 21, 47, 48, 49, 65, 66, 67, 83, 84, 85, 101, 102, 103, 119, 120, 121, 137, 138 和 139 的氨基酸序列的抗体竞争结合 IL-21 受体。

7. 分离的抗体,其与包含选自 SEQ ID NO :1, 2, 3, 19, 20, 21, 47, 48, 49, 65, 66, 67, 83, 84, 85, 101, 102, 103, 119, 120, 121, 137, 138 和 139 的氨基酸序列的抗体结合 IL-21 受体上相同的抗原决定部位。

8. 权利要求 1, 2, 3, 4, 5, 6 或 7 的抗体,其中所述抗体选择性地结合到与包含 SEQ ID NO :43 所列至少 100 个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列上。

9. 权利要求 1, 2, 3, 4, 5, 6 或 7 的抗体,其中所述抗体选择性地结合人 IL-21 受体的细胞外结构域。

10. 权利要求 1, 2, 3, 4, 5, 6 或 7 的抗体,其中所述抗体抑制 IL-21 与 IL-21 受体的结合。

11. 权利要求 1, 2, 3, 4, 5, 6 或 7 的抗体,其中所述抗体是人抗体。

12. 权利要求 1, 2, 3, 4, 5, 6 或 7 的抗体,其中所述抗体是 IgG₁ 抗体。

13. 权利要求 12 的抗体,其中所述抗体是 IgG_{1λ} 和 IgG_{1κ}。

14. 由具有 ATCC 保藏号 PTA-5030 或 PTA-5031 的宿主细胞所表达的分离的抗体。

15. 包含权利要求 1, 2, 3, 4, 5, 6 或 7 的抗体的药物组合物。

16. 编码权利要求 1, 2, 3, 4, 5, 6 或 7 的抗体的分离的核酸。

17. 包含权利要求 16 的核酸的表达载体。

18. 用权利要求 17 的载体转化的宿主细胞。

19. 权利要求 18 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是细菌、哺乳动物细胞、酵母细胞、植物细胞或昆虫细胞。

20. 具有 ATCC 保藏号 PTA-5030 或 PTA-5031 的宿主细胞。

21. 生产与 IL-21 受体结合的抗体的方法,所述方法包括在允许所述抗体表达的条件下培养权利要求 20 的宿主细胞,并且从细胞培养物中分离所述抗体。

22. 产生选择性结合 IL-21 受体的抗体或抗原结合片段的方法,所述方法包括:

(a) 提供编码可变结构域的核酸的库集,所述可变结构域包括要被替代的 CDR1、2 或 3,或者缺少 CDR1,2,3 编码区域;

(b) 将所述库集与供体核酸组合,所述供体核酸编码基本上如 SEQ ID NO:4、5、6、7、8、9、22、23、24、25、26、27、50、51、52、53、54、55、68、69、70、71、72、73、86、87、88、89、90、91、104、105、106、107、108、109、122、123、124、125、126、127、140、141、142、143、144 或 145 中所列的氨基酸序列,这样所述供体核酸就插入到所述库集的 CDR1、2 或 3 中,如此提供了编码可变结构域的核酸的产物库集。

(c) 表达所述产物库集的核酸;

(d) 选择对于 IL-21 受体特异的抗原结合片段;

(e) 回收所述抗原结合片段或编码该抗原结合片段的核酸。

23. 由权利要求 22 的方法产生的抗体。

24. 权利要求 22 的方法,所述方法进一步包括种系转化的步骤。

25. 调节免疫应答的方法,所述方法包括用权利要求 1,2,3,4,5,6,7 或 23 的抗体与细胞接触,从而调节所述免疫应答。

26. 权利要求 25 的方法,其中所述细胞是白细胞或滑膜细胞。

27. 权利要求 26 的方法,其中所述白细胞是 T 细胞、B 细胞、NK 细胞或巨噬细胞。

28. 权利要求 25 的方法,其中所述免疫应答包括细胞增殖、细胞溶解活性、细胞因子分泌或趋化因子分泌。

29. 在受试者中治疗或预防免疫细胞相关疾病的方法,所述方法包括以足以抑制或减少受试者体内免疫细胞活性的剂量给受试者施用权利要求 1,2,3,4,5,6,7 或 23 的抗体,从而治疗或预防所述疾病。

30. 权利要求 29 的方法,其中所述免疫细胞相关疾病选自多发性硬化、类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、青少年类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣性关节炎、强直性脊柱炎、移植排斥、炎性肠病、牛皮癣和克罗恩疾病。

31. 权利要求 30 的方法,其中所述免疫细胞相关疾病选自类风湿性关节炎、炎性肠病、克罗恩病和牛皮癣。

32. 权利要求 29 的方法,所述方法进一步包括给受试者施用选自细胞因子抑制剂、生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂、细胞毒性剂和细胞抑制剂的其它治疗性试剂。

33. 权利要求 32 的方法,基中所述治疗性试剂选自 TNF 拮抗剂、IL-12 拮抗剂、IL-15 拮抗剂、IL-17 拮抗剂、IL-18 拮抗剂、IL-22 拮抗剂、T 细胞消耗性试剂、B 细胞消耗性试剂、甲氨蝶呤、来氟米特、雷帕霉素、或其类似物、Cox-2 抑制剂、cPLA2 抑制剂、NSAID 和 p38 抑制剂。

34. 在受试者中治疗或预防过度增殖性疾病的方法,所述方法包括以足以抑制或减少受试者体内 IL-21 和 / 或 IL-21 受体应答细胞过度增殖的量给受试者施用权利要求 1,2,3,4,5,6,7 或 23 的抗体,从而允许所述抗体治疗或预防所述疾病。

35. 权利要求 34 的方法,其中所述受试者是哺乳动物。
36. 权利要求 34 的方法,其中所述受试者是人。
37. 权利要求 29、30 或 33 的方法,其中所述抗体以选自 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $20\text{mg}/\text{kg}$ 、 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、 $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、 $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $1\text{mg}/\text{kg}$ 以及 $500\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $1\text{mg}/\text{kg}$ 的范围进行施用。
38. 包含权利要求 1,2,3,4,5,6,7 或 23 的抗体的诊断试剂盒。

抗人 IL-21 受体的抗体及其应用

[0001] 本申请是申请日为 2004 年 3 月 12 日, 优先权日为 2003 年 3 月 14 日, 申请号为 200480010518.8 的同名专利申请的分案申请。

[0002] 优选权信息

[0003] 本申请要求 2003 年 3 月 14 日提交的美国临时专利申请号 60/454,336 的优选权的利益。

技术领域

[0004] 本发明涉及抗体, 例如人抗体, 和其片段, 它们与白细胞介素 -21 (IL-21) 受体结合, 特别是与人 IL-21 受体结合, 以及涉及其在调节由 IL-21 受体介导的免疫应答中的用途。此处公开的抗体可用于诊断、预防和 / 或治疗免疫疾病, 例如自身免疫疾病。

[0005] 发明背景

[0006] 抗原引发免疫应答并且激活两个最大的淋巴细胞群体: T 细胞和 B 细胞。在遭遇抗原后, T 细胞增殖并且分化成效应细胞, 而 B 细胞增殖并且分化成抗体分泌浆细胞。淋巴细胞的增殖和分化由细胞外蛋白调控。其中一些蛋白称为细胞因子, 其是由淋巴细胞和其它细胞类型分泌的小蛋白 (< 30kDa)。

[0007] 白细胞介素 -21 (IL-21) 是最近发现的细胞因子, 其与 IL-2、IL-4 和 IL-5 紧密相关 (Parrish-Novak 等人 (2000) Nature 408 :57-63)。人 IL-21 具有大约 15kDa 的分子量, 由 131 个氨基酸组成, 并且与小鼠 IL-21 有着大约 57% 的同一性。IL-21 主要由被激活的 CD4+T 细胞产生。

[0008] IL-21 受体 (IL-21R) 是属于 I 类细胞因子受体家族的跨膜 IL-21 结合蛋白。人和小鼠的 IL-21R 都已在 W001/85792 中得以描述, 此处引用作为参考。预测的人 IL-21R 的大小大约为 529 个氨基酸。IL-21R 显示与 IL-2 受体 β 链和 IL-4 受体 α 链具有很高的序列同源性 (Ozaki 等人 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 :11439-11444)。人和小鼠 IL-21R 序列具有大约 62% 的同一性。在与配体结合时, IL-21R 与由 IL-2、IL-3、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13 和 IL-15 受体共享的共有 γ 细胞因子受体链 (γc) 结合 (Ozaki 等人 (2000) 同上; Asao 等人 (2001) J. Immunol. 167 :1-5)。

[0009] IL-21R 主要在淋巴组织例如 B 细胞、T 细胞和天然杀伤 (NK) 细胞中表达。IL-21R 的广泛淋巴分布暗示着 IL-21 可能在免疫调控中起作用。事实上, 体外研究已经显示出, IL-21 显著地调节 B 细胞、CD4+ 和 CD8+T 细胞以及 NK 细胞的功能 (Parrish-Novak 等人 (2000) 同上; Kasaiian, M. T. 等人 (2002) Immunity. 16 :559-569)。IL-21 和 IL-21R 还显示对调节巨噬细胞和滑膜细胞的活性具有重要作用。例如, IL-21 促进由抗 CD40 抗体刺激的 B 细胞增殖, 和抑制由抗 IgM 和 IL-4 刺激的 B 细胞增殖。IL-21 促进 T 细胞和人 NK 细胞的增殖和细胞溶解活性。IL-21 也介导由 T 细胞、NK 细胞、巨噬细胞和滑膜细胞分泌的细胞因子、趋化因子或其组合的表达。由于 B 细胞、T 细胞、NK 细胞、巨噬细胞和滑膜细胞对于 IL-21 的依赖性, 因此改变 IL-21 对 IL-21R 的结合可能会影响某些免疫应答。这样的操作提供了治疗免疫系统疾病的方法, 例如自身免疫疾病、炎性疾病、过敏、移植排斥、癌症、免

疫缺陷和其它疾病。

[0010] 发明简述

[0011] 本申请提供结合 IL-21 受体 (“IL-21R”), 特别是人 IL-21 受体的抗体, 所述抗体对 IL-21 受体具有很高的亲和力和特异性。在一个实施方案中, 抗体减少、抑制或拮抗 IL-21R 的活性。通过拮抗 IL-21R 的活性, 这类抗体可用来调节免疫应答或免疫细胞相关的疾病。在另一个实施方案中, 抗 IL-21R 抗体可作诊断使用或作为靶向抗体向表达 IL-21R 的细胞传递治疗性或细胞毒性试剂。因而, 本发明的抗 IL-21R 抗体在诊断和治疗免疫细胞相关的病理学症状 (例如, 与 T 细胞 (CD8+, CD4+T 细胞)、NK 细胞、B 细胞、巨噬细胞和巨核细胞中的至少一种的活性相关的病理学症状, 包括移植排斥和自身免疫疾病)。

[0012] 因此, 在一个方面, 本发明表征了与 IL-21R 特别是人 IL-21R 结合的分离的抗体。抗 IL-21R 抗体可具有至少一个下列特性: (1) 其是单克隆或单一的特异性抗体; (2) 其是人或在体外产生的抗体; (3) 其结合 IL-21R, 特别是结合人 IL-21R 的细胞外结构域, 并具有至少 $10^6 M^{-1}$ 的亲和常数 (K_a); 和 (4) 其如同 IgG 一样以 10nM 或更低的 IC_{50} 抑制 IL-21 与 IL-21R 的结合, 例如由实施例 9 中所描述的基于细胞的测定法所测量, 或其以 10nM 或更低的 IC_{50} 抑制抗体与 IL-21R 的结合, 例如由实施例 11 中所描述的抗原决定部位结合测定法所测量的。

[0013] 本发明抗体的非限制性说明性实施方案此处被称为 “MUF”、“MUF 种系”、“MU11”、“18G4”、“18A5”、“19F5”、“CP5G2” 和 “R18”。本发明的抗体可特异性地结合 IL-21R 的细胞外结构域, 例如 SEQ ID NO: 43 (人 IL-21R) 的大约 20 到 235 的氨基酸, 或与其有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的序列。在另一个实施方案中, 抗体特异性地结合 IL-21R 的片段, 例如与 SEQ ID NO: 43 所列氨基酸序列相邻的至少 10、20、50、75、100、150 或 200 个氨基酸的片段, 或与其有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的序列。在其他实施方案中, 抗体结合 IL-21R 的细胞外结构域并且竞争性地抑制 “MUF”、“MUF 种系”、“MU11”、“18G4”、“18A5”、“19F5”、“CP5G2” 或 “R18” 与其靶抗原决定部位的结合。在另外的实施方案中, 抗体结合 IL-21R 的细胞外结构域并且竞争性地抑制 IL-21 与 IL-21R 的结合。这种本发明抗体对于 IL-21 与其受体的结合的抑制可通过一个或多个此处提供的测定法进行测量。

[0014] 在一个实施方案中, 本发明的抗体包括 “MUF”、“MUF 种系”、“MU11”、“18G4”、“18A5”、“19F5”、“CP5G2” 或 “R18” 的 scFv 片段的 V_H 结构域、 V_L 结构域或其组合。例如, 抗体包括这样的 V_H 结构域和 / 或 V_L 结构域, 即所述结构域具有表 1A 和 1B 中所列氨基酸序列 (对于 V_H 为 SEQ ID NO: 1, 19, 47, 65, 83, 101, 119 或 137, 和对于 V_L 为 SEQ ID NO: 2, 20, 48, 66, 84, 102, 120 或 138), 或基本与其一致的序列 (例如, 与其具有至少大约 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的序列, 或与 SEQ ID NO: 1, 2, 19, 20, 47, 48, 65, 66, 83, 84, 101, 102, 119, 120, 137 或 138 相异不超过 1、2、5、10 或 15 个氨基酸残基的序列)。在另一个实施方案中, 抗体包括这样的 V_H 结构域和 / 或 V_L 结构域, 即所述结构域由下列核酸编码, 该核酸具有表 1A 和 1B 中所列核苷酸序列 (对于 V_H 为 SEQ ID NO: 10, 28, 56, 74, 92, 110, 128 或 146, 和对于 V_L 为 SEQ ID NO: 11, 29, 57, 75, 93, 111, 129 或 147), 或基本与其一致的序列 (例如, 与其具有至少大约 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的序列, 或与 SEQ ID NO: 10, 11, 28, 29, 56, 57, 74, 75, 92, 93, 110, 111, 128, 129, 146 或 147

相异不超过 3、6、15、30 或 45 个核苷酸的序列)。通常, scFv 片段上的 V_H 和 V_L 结构域通过连接体序列连接。

[0015] 在其他实施方案中, 所述抗体包括这样的 scFv 结构域, 即所述 scFv 结构域具有表 1A 和 1B 中所列氨基酸序列 (SEQ ID NO :3, 21, 49, 67, 85, 103, 121 或 139), 或基本与其一致的序列 (例如, 与其具有至少大约 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的序列, 或与 SEQ ID NO :3, 21, 49, 67, 85, 103, 121 或 139 相异不超过 1、2、5、10、15、20、30 或 35 个氨基酸残基的序列)。在另一个实施方案中, 所述抗体包括这样的 scFv 结构域, 即所述 scFv 结构域由下列核酸编码, 该核酸具有表 1A 和中所列核苷酸序列 1B (SEQ ID NO :12, 30, 58, 76, 94, 112, 130 或 148), 或基本与其一致的序列 (例如, 与其具有至少大约 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的序列, 或与 SEQ ID NO :12, 30, 58, 76, 94, 112, 130 或 148 相异不超过 3, 6, 15, 30, 45, 60, 90, 或 105 个核苷酸的序列)。在另外的实施方案中, 抗体包含至少一个这些 V_H 和 V_L 结构域的互补性决定区 (CDR)。例如, 所述抗体可包括 V_H 结构域的 1、2 或 3 个 CDR (即 H1、H2 和 H3), 所述 CDR 具有表 1A 和 1B 中所列氨基酸序列 (SEQ ID NO :4, 5, 6, 22, 23, 24, 50, 51, 52, 68, 69, 70, 86, 87, 88, 104, 105, 106, 122, 123, 124, 140, 141 或 142), 或基本与其同源的序列 (例如, 与其具有至少大约 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的序列)。在一些实施方案中, 基本上与 SEQ ID NO :4, 5, 6, 22, 23, 24, 50, 51, 52, 68, 69, 70, 86, 87, 88, 104, 105, 106, 122, 123, 124, 140, 141 或 142 中所列的 H1、H2 或 H3 氨基酸序列同源的序列包括一个或多个氨基酸替代, 例如一个或多个保守氨基酸替代。在另一个实施方案中, 所述抗体可包括 V_L 结构域的 1、2 或 3 个 CDR (即 L1、L2 和 L3), 所述 CDR 具有表 1A 和 1B 中所列氨基酸序列 (SEQ ID NO :7, 8, 9, 25, 26, 27, 53, 54, 55, 71, 72, 73, 89, 90, 91, 107, 108, 109, 125, 126, 127, 143, 144 或 145), 或基本与其一致的序列 (例如, 与其具有至少大约 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的序列)。在一些实施方案中, 基本上与 SEQ ID NO :7, 8, 9, 25, 26, 27, 53, 54, 55, 71, 72, 73, 89, 90, 91, 107, 108, 109, 125, 126, 127, 143, 144 或 145 所示的 L1、L2 和 L3 氨基酸序列同源的序列包括一个或多个氨基酸替代, 例如一个或多个保守氨基酸替代。

[0016] 在另外一个实施方案中, 抗体包括 MUF、MU11、MUF 种系、18G4、18A5、19F5、CP5G2 或 R18 的 V_H 结构域的 CDR, 所述 CDR 具有表 1A 和 1B 中所列氨基酸序列 (SEQ ID NO :6, 24, 52, 70, 88, 106, 124 或 142), 或基本与其一致的序列 (例如, 与其具有至少大约 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的序列), 所述基本与其一致的序列包括一个或多个氨基酸替代, 例如一个或多个保守氨基酸替代。根据本发明的抗体可包括包含单个 CDR 例如 H3, 或 H1、H2 和 H3 的任意组合的重链可变区。例如, 在一些实施方案中, 抗体可包含与 CDR2 (H2) 组合的 CDR (H3)。在其他实施方案中, 抗体可包含与 CDR1 (H1) 组合的 CDR3 (H3), 或 H1 和 H2 CDR 的组合。然而, 优选地, 抗体包括这样的重链可变区, 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO :6, 24, 52, 70, 88, 106, 124, 142 中任意一个所示的 CDR3 (H3) 和其具有氨基酸替代例如一个或多个保守氨基酸替代的序列, H3 可以是单独地存在或与 H1 和 H2 中一个或两个组合存在。

[0017] 类似地, 在一些实施方案中, 抗体包括 MUF、MU11、MUF 种系、18G4、18A5、19F5、CP5G2 或 R18 的 V_L 结构域的 CDR, 例如, 具有如表 1A 和 1B 中所列氨基酸序列 (SEQ ID NO :9, 27, 55, 73, 91, 109, 127 或 145), 或基本与其一致的序列 (例如, 与其具有至少大约 85%、

90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列)的 L3 CDR,所述基本与其一致的序列包括一个或多个氨基酸替代,例如一个或多个保守氨基酸替代。根据本发明的抗体可包括包含单个 CDR 例如 L3,或 L1、L2 和 L3 的任意组合的轻链可变区。例如,在一些实施方案中,抗体可包含与 L2 组合的 L3。在其它实施方案中,抗体可包含与 L1 组合的 L3。在另外一个实施方案中,抗体可包含与 L1 和 L2CDR 的组合。然而,优选地,抗体包括这样的轻链可变区,所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO :9,27,55,73,91,109,127,145 中任意一个所示的 L3 和其具有氨基酸替代例如一个或多个保守氨基酸替代的序列, L3 可以是单独地存在或与 L1 和 L2 中一个或两个组合存在。

[0018] 在一些实施方案中,本发明的抗体与包含与 SEQ ID NO :1,19,47,65,83,101,119 或 137 所示氨基酸序列具有至少 95%、96%、97%、98%、99%或超过 99%同一性的 V_H 结构域和与 SEQ ID NO :2,20,48,66,84,102,120 或 138 所示氨基酸序列具有至少 95%、96%、97%、98%、99%或超过 99%同一性的 V_L 结构域的抗体竞争结合 IL-21R。在某些实施方案中,抗体与含有包含至少一个重链 CDR 的重链可变区的抗体竞争结合 IL-21R,所述重链 CDR 选自 SEQ ID NO :6,24,52,70,88,106,124,142 和其中有氨基酸替代例如一个或多个保守氨基酸替代的序列。在某些实施方案中,根据本发明的抗体与含有包含至少一个轻链 CDR 的轻链可变区的抗体竞争结合 IL-21R 例如人 IL-2R,所述轻链 CDR 选自 SEQ ID NO :9,27,55,73,91,109,127,145 和其中有氨基酸替代例如一个或多个保守氨基酸替代的序列。与本发明的抗体竞争结合 IL-21R 例如人 IL-21R 的抗体可同时包含一个选自 SEQ ID NO :6,24,52,70,88,106,124 和 142 的重链 CDR 和一个选自 SEQ ID NO :9,27,55,73,91,109,127 和 145 的轻链 CDR。在一些实施方案中,根据本发明的抗体包括超过一个的重链 CDR 和 / 或一个或多个轻链可变区 CDR,所述重链 CDR 对于 MUF 选自 SEQ ID NO :4,5,6 ;对于 MU11 选自 SEQ ID NO :22,23,24 ;对于 18G4 选自 SEQ ID NO :50,51,52 ;对于 18A5 选自 SEQ ID NO :68,69,70 ;对于 MUF- 种系选自 SEQ ID NO :86,87,88 ;对于 19F 5 选自 SEQ ID NO :104,105,106 ;对于 CP5G2 选自 SEQ ID NO :122,123,124 ;和对于 R18 选自 SEQ ID NO :140,141,142,所述轻链可变区 CDR 对于 MUF 选自 SEQ ID NO :7,8,9 ;对于 MU11 选自 SEQ ID NO :25,26,27 ;对于 18G4 选自 SEQ ID NO :53,54,55 ;对于 18A5 选自 SEQ ID NO :71,72,73 ;对于 MUF- 种系选自 SEQ ID NO :89,90,91 ;对于 19F 5 选自 SEQ ID NO :107,108,109 ;对于 CP5G2 选自 SEQ ID NO :125,126,127 ;和对于 R18 选自 SEQ ID NO :143,144,145。

[0019] 在另外的实施方案中,根据本发明的抗体与 IL-21 例如人 L-21 竞争结合 IL-21R 例如人 IL-21R。

[0020] 本发明的抗体可以是全长(例如,包含至少一个完整的重链和至少一个完整的轻链),或可仅包含抗原结合片段(例如, Fab, F(ab')₂, Fv 或单链 Fv 片段(scFv))。抗体可包含选自 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因中的任一个的恒定区或其部分。例如,可使用各种同种型的重链恒定区,所述同种型包括: IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgM、IgA₁、IgA₂、IgD 和 IgE。所述轻链恒定区可选自 κ 或 λ 。抗体可以是 IgG,或其也可以是 IgG_{1 κ} 或 IgG_{1 λ} 。

[0021] 可将此处描述的抗 IL-21R 抗体进行衍生或连接到另一个功能性分子(例如另一个肽或蛋白质(例如, Fab 片段))上。例如,本发明的抗体可功能性地连接(例如通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其它方式)到至少一个其他分子实体上,除了其他以外,例如另一个抗体(例如,双特异性或多特异性抗体)、毒素、放射性同位素、细胞毒性剂或细

胞抑制剂。

[0022] 在另一个方面,本发明表征了含有至少一种抗 IL-2R 抗体和药物学可接受载体的药物组合物。所述药物组合物可进一步包含至少一种抗 IL-21R 抗体和至少一种治疗性试剂(例如,此处更详细描述了的细胞因子和生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂、细胞毒性剂、细胞抑制剂或其组合)的组合。抗 IL-21R 抗体和治疗性试剂的组合也在本发明范围内。本发明的组合物和组合可用于调节 IL-21 依赖性免疫细胞,例如 B 细胞、T 细胞、NK 细胞、巨噬细胞和滑膜细胞。

[0023] 在另一方面,本发明表征了治疗患有免疫细胞相关疾病的受试者的方法。所述方法包括给受试者施用剂量足以抑制免疫细胞的至少一种 IL-21R 活性的抗 IL-21R 抗体,从而治疗免疫细胞相关疾病。

[0024] 所述抗 IL-21R 抗体可单独或与此处描述的其他治疗性试剂组合施用给受试者。所述受试者可以是患有免疫细胞相关病理学症状(例如,与 T 细胞、NK 细胞、B 细胞、巨噬细胞和巨核细胞中的至少一种细胞的异常活性相关的病理学症状)的哺乳动物。所述受试者可以是人。例如,所述方法可用于治疗具有免疫细胞相关疾病例如移植排斥和自身免疫疾病的受试者。自身免疫疾病可包括糖尿病(I 型)、关节炎(包括类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣性关节炎和强直性脊柱炎)、多发性硬化、重症肌无力、脉管炎、全身性红斑狼疮、自身免疫性甲状腺炎、皮炎(包括特应性皮炎和湿疹性皮炎)、牛皮癣、硬皮病、哮喘、过敏、炎性肠病(IBM)和克罗恩病。使用本发明的抗 IL-21R 抗体治疗关节炎疾病(例如,选自类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣性关节炎和强直性脊柱炎中的至少一种的疾病)是本发明的一个实施方案。

[0025] 在另一方面,本发明提供了用于在体外检测样品中存在 IL-21R 的方法。样品可包括生物学样品例如血清、血浆、组织和活组织切片。本方法可用于诊断疾病,例如此处描述的免疫细胞相关疾病。所述方法包括:(1)将所述样品和对照样品与抗 IL-21R 抗体接触,和(2)检测抗 IL-21R 抗体和所述样品或对照样品之间的复合物的形成,其中相对于对照样品,在所述样品中复合物的形成在统计学上发生显著改变表示 IL-21R 存在于所述样品中。

[0026] 在另一方面,本发明提供了在体内检测 IL-21R 的存在的方法(例如,在受试者中的体内成像)。所述方法可用于诊断疾病,例如此处所描述的免疫细胞相关疾病。所述方法包括:(1)在允许所述抗体与 IL-21R 结合的条件下给受试者或对照受试者施用抗 IL-21R 抗体,和(2)检测所述抗体和 IL-21R 之间的复合物的形成,其中相对于对照例如对照受试者,在所述受试者中复合物的形成在统计学上发生显著改变表示存在 IL-21R。

[0027] 根据本发明的抗体可以直接或间接地用有助于检测结合或未结合的抗体的可检测物质进行标记。合适的可检测物质包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料和放射性材料。

[0028] 在另一方面,本发明提供了用于在体内将试剂例如治疗性或细胞毒性试剂递送或靶向表达 IL-21R 的细胞的方法。所述方法包括在允许所述抗体与 IL-21R 结合的条件下对受试者施用抗 IL-21R 抗体。可将所述抗体与第二治疗性部分例如毒素偶联。

[0029] 本公开内容提供了来自 MUF、MUF 种系、MU11、18G4、18A5、19F5、CP5G2 和 R18 的 V_H 和 V_L 结构域的核酸序列。也提供了包含至少一个来自 MUF、MUF 种系、MU11、18G4、18A5、19F5、CP5G2 和 R18 的 CDR 的核酸序列。本公开内容也提供了包含这类核酸的载体和宿主细胞。

[0030] 本公开内容进一步提供了产生新的 V_H 和 V_L 结构域以及功能性抗体的方法,所述功

能性抗体包含所有或部分这类来源于 MUF、MUF 种系、MU11、18G4、18A5、19F5、CP5G2 和 R18 的 V_H 或 V_L 结构域的结构域。

[0031] 本公开内容的另外方面部分将在描述中列出, 和部分可明显地从描述中看出或可从实施本发明中获知。提出本发明, 并且在权利要求中特别地加以指出, 和本公开内容不当被解释为限制所述权利要求的范围。下列详细描述包括本发明各种实施方案中的举例性的代表方案, 它们不是对所要求保护的发明的限制。附图与该描述一起构成了本说明书的一部分, 仅起举例说明实施方案的作用并不限制本发明。

[0032] 附图简述

[0033] 图 1A 描述了 ELISA 的结果, 其显示 MU11 特异性结合人 IL-21R。

[0034] 图 1B 描述了通过 FACS 进行分析而得到的结合测定法的结果, 其显示 MUF 和 MU11 都结合到人 IL-21R 的表面上。

[0035] 图 1C 描述了通过 FACS 进行分析而得到的结合测定法的结果, 其显示 MUF 与小鼠 B 细胞上的 IL-21R 结合。

[0036] 图 2 描述了 ELISA 的结果, 其显示 MUF 抑制人 IL-21 与人 IL-21R 的结合。

[0037] 图 3A 描述了细胞增殖测定法的结果, 其显示 MUF 的加入阻断了 IL-21 增加人 CD4+T 细胞的增殖的能力。

[0038] 图 3B 描述了细胞增殖测定法的结果, 其显示 MU11 阻断了 COS 细胞培养基中的 IL-21 增加小鼠 CD4+T 细胞的增殖的能力。

[0039] 图 3C 描述了细胞增殖测定法的结果, 其显示 MU11 以剂量依赖方式阻断了 COS 细胞培养基中的 IL-21 增加小鼠 CD8+T 细胞的增殖的能力。

[0040] 图 4 描述了细胞增殖测定法的结果, 其显示 MUF scFv 和 MUF IgG 均阻断了 IL-21 增加 Baf3Mu-1 细胞的增殖的能力, 所述 Baf3Mu-1 细胞表达 IL-21R。

[0041] 图 5A 描述了将 IL-21 加入到从关节炎患者中分离的人成纤维样滑膜细胞中而导致趋化因子 MCP-1 和 GRO 的分泌增加。

[0042] 图 5B 描述了将 IL-21 加入到从关节炎患者中分离的人成纤维样滑膜细胞中而导致趋化因子 1-309、TARC、Eotaxin、MDC、Lymph、SDF1B、IP-10、I-TAC、MG 和 MP3B 的分泌增加。

[0043] 图 5C 和 5D 描述了将 IL-21 加入到从关节炎患者中分离的人成纤维样滑膜细胞中而导致细胞因子 IFN- α 和 TNF- α (图 5C) 以及 IL-6 和 IL8 (图 5D) 的分泌增加。

[0044] 图 5E 显示了, 如通过对 CIA 指征的测量, IL-21 在关节炎小鼠模型中加重了胶原蛋白诱导的关节炎 (CIA)。

[0045] 图 6 显示了, 在移植排斥的体外模型即混合淋巴细胞反应中, IL-21 增加了 C57BL/6J 细胞的增殖。

[0046] 发明详述

[0047] 定义

[0048] 为了使本发明能更易理解, 首先定义一些术语。另外的定义在整个详述中提出。

[0049] “抗体”是指免疫球蛋白或其片段, 并且包括任何含有抗原结合位点的多肽。该术语不限于多克隆的、单克隆的、单特异性的、多特异性的、非特异性的、人源化的、人的、单链的、嵌合的、合成的、重组的、杂交的、突变的、移植的和体外产生的抗体。除非在之前冠以修

饰词“完整的”，所述术语“抗体”包括抗体片段例如 Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、dAb 和其它保留抗原结合功能的抗体片段。通常，这类片段包含抗原结合结构域。

[0050] 术语“抗原结合结构域”和“抗原结合片段”是指包含负责抗体与抗原之间特异性结合的氨基酸的抗体分子的部分。所述被抗体特异性识别和结合的抗原的部分称为“抗原决定部位”。抗原结合结构域可包含一个抗体轻链可变区 (V_L) 和一个抗体重链可变区 (V_H)；然而，其不必两者都包含。例如，Fd 片段具有 2 个 V_H 区并且通常保留一些完整的抗原结合结构域的抗原结合功能。抗体的抗原结合片段的例子包括 (1) Fab 片段，由 V_L、V_H、C_L 和 C_H1 结构域构成的单价片段；(2) F(ab')₂ 片段，包含两个在铰链区通过二硫键连接的 Fab 片段的二价片段；(3) 由两个 V_H 和 C_H1 结构域构成的 Fd 片段；(4) 由抗体的单个臂的 V_L 和 V_H 结构域构成的 Fv 片段；(5) dAb 片段 (Ward 等人, (1989) Nature 341 :544-546)，其由 V_H 结构域构成；和 (6) 分离的互补性决定区 (CDR)。此外，尽管 Fv 片段的两个结构域 V_L 和 V_H 由分开的基因编码，但它们可通过采用重组方法经合成的连接体连接起来，所述连接体能使它们成为单个的蛋白链，在该蛋白链中 V_L 和 V_H 区域配对形成单价分子（称为单链 Fv (scFv)；参见例如，Bird 等人 (1988) Science 242 :423-426；和 Huston 等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :5879-5883)。通过使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段，并且以和完整的抗体相同的方式筛选所述片段加以使用。

[0051] 术语“有效量”是指这样的剂量或数量，即其足以调节 IL-21R 活性以改善临床症状或获得想要的生物学效果，例如降低的 T 细胞和 / 或 B 细胞活性、自身免疫的抑制、移植排斥的抑制等。

[0052] 术语“人抗体”包括具有基本上对应于 Kabat 等人（参见 Kabat 等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) 描述的人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本发明的人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如，通过在体外的随机或定点诱变或体内体细胞突变引入的突变），例如在 CDR 中，并且特别是在 CDR3 中。所述人抗体可具有至少 1、2、3、4、5 或更多个被不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基替代的位置。

[0053] 术语“IL-21R 活性”是指至少一个由于 IL-21 结合细胞上的 IL-21R 而引发或中断的细胞过程。IL-21R 的活性包括下列中的至少一个，但不限于此：(1) 结合 IL-21（例如，人 IL-21）；(2) 与信号转导分子（例如， γ c 和 / 或 JAK-1）相联合；(3) 刺激 STAT 蛋白（例如，STAT5、STAT3 或其组合）的磷酸化；(4) 激活 STAT 蛋白；和 (5) 调节（例如，增加或减少）免疫细胞的增殖、分化、效应细胞功能、细胞溶解活性、细胞因子分泌、存活或其组合。免疫细胞可包括 CD8+ 和 CD4+T 细胞、NK 细胞、B 细胞、巨噬细胞和巨核细胞。IL-21R 活性可在体外例如通过使用实施例 8 和 9 中描述的 T 细胞增殖测定法进行测定。IL-21R 活性也可在体内例如通过实施例 12 中描述的免疫应答或疾病的进程计分法进行测定。

[0054] 短语“抑制”或“拮抗”IL-21R 活性和其同源词汇是指由于结合抗 IL-21R 抗体而减少、抑制或减弱 IL-21R 的至少一种活性，其中所述减少是相对于相同抗体不存在的情况下 IL-21R 的活性而言的。可如实施例 7、8、9 和 11 中所描述的方法测量所述活性。抑制或拮抗并不一定表示完全消除 IL-21R 多肽的生物学活性。活性减少可以为大约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或更多。

[0055] 术语“白细胞介素-21受体”或“IL-21R”是指I类细胞因子受体,也称为NILR(W001/85792;Parrish-Novak等人(2000)Nature408:57-63;Ozaki等人(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA97:11439-114444)。在配体结合时,IL-21R就与共有的 γ 细胞因子受体链(γc)(Asao等人(2001)J.Immunol.167:1-5)相互作用,并且引起STAT1和STAT3(Asao等人(2001)同上)或STAT5(Ozaki等人(2000)同上)的磷酸化。IL-21R显示出广泛的淋巴组织分布。术语“IL-21R”是指能与IL-21结合的受体(可以是哺乳动物的),并且具有至少一个下列特征:(1)天然发生的哺乳动物IL-21R多肽或其片段的氨基酸序列,例如SEQ ID NO:43(人)或SEQ ID NO:45(鼠科动物)或其片段所示的氨基酸序列;(2)与SEQ ID NO:43(人)或SEQ ID NO:45(鼠科动物)或其片段所示的氨基酸序列基本一致,例如具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;(3)由天然发生的哺乳动物IL-21R核苷酸序列或其片段(例如,SEQ ID NO:44(人)或SEQ ID NO:46(鼠科动物)或其片段)编码的氨基酸序列;(4)由与SEQ ID NO:44(人)或SEQ ID NO:46(鼠科动物)或其片段所示的核苷酸序列基本一致,例如具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列;(5)由与天然发生的IL-21R核苷酸序列或其片段例如SEQ ID NO:44(人)或SEQ IDNO:46(鼠科动物)或其片段简并的核苷酸序列编码的氨基酸序列;或(6)与前述核苷酸序列中的一个在严紧条件下,例如在高度严紧条件下杂交的核苷酸序列。IL-21R可结合到哺乳动物来源例如人或小鼠的IL-21上。(Parrish-Novak等人(2000)同上)。

[0056] 在此处使用时,“体外产生的抗体”是指全部或部分可变区(例如,至少一个CDR)产生于非免疫细胞选择(例如,体外噬菌体展示、蛋白质芯片或任何其他可以测试候选序列结合抗原的能力的方法)的抗体。该术语不包括通过在免疫细胞中基因组重排产生的序列。

[0057] 术语“分离的”是指基本上脱离其天然环境的分子。例如,分离的蛋白基本不含有来自其所来源的细胞或组织源的细胞材料或其他蛋白质。该术语也指这样的制剂,该制剂中分离的蛋白质的纯度足以用于药物组合物;或具有至少70-80%(w/w)的纯度;或具有至少80-90%(w/w)的纯度;或具有至少90-95%(w/w)的纯度;或具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%(w/w)的纯度。

[0058] 人IL-21R的核苷酸序列和预测的氨基酸序列分别显示于SEQ IDNO:44和SEQ ID NO:43中。人IL-21R氨基酸序列(SEQ ID NO:43)的分析揭示了下列结构特征:前导序列(SEQ ID NO:43的大约第1-19位氨基酸);WSXWS基元(SEQ ID NO:43的大约第213-217位氨基酸);跨膜结构域(SEQ ID NO:43的大约第236-252位氨基酸);细胞外结构域(SEQ ID NO:43的大约第1-235位氨基酸,和成熟的IL-21R序列的大约第20-235位氨基酸);和来自SEQ ID NO:43的大约第253-538位氨基酸的细胞内结构域。据信成熟的人IL-21R具有SEQ ID NO:43的第20-538位氨基酸的序列。

[0059] 术语“库集(repertoire)”是指全部或部分来源于编码免疫球蛋白的序列的核苷酸序列的遗传多样性集合。所述序列可以通过重链的V、D和J片段以及轻链的V和J片段在体内重排产生。作为另一种选择,所述序列可在响应例如体外刺激而发生重排的细胞中产生。可选择地,通过DNA拼接、核苷酸合成、诱变和其它方法(参见例如美国专利5,565,332)可获得所述序列的部分或全部。

[0060] 术语“特异性结合”、“选择性结合”和“选择性地结合”是指两个分子形成在生理学状况下相对稳定的复合物。选择性结合的特征在于高亲和力和低至中等的容量,这与通常具有低亲和力及中等至高容量的非特异性结合不同。通常,当亲和常数 K_a 高于 $10^6 M^{-1}$ 时,结合被认为是特异性的或选择性的。如果必要,通过改变结合条件可将非特异结合减小而基本上不影响选择性结合。通过使用常规技术,本领域技术人员可优化合适的结合条件,例如抗体浓度、溶液的离子强度、温度、结合时间、封闭剂浓度(例如血清白蛋白、乳酪蛋白)等。说明性的条件列于实施例 1-11 中,但本领域技术人员已知的其他条件也落在本发明的范围内。

[0061] 在此处使用时,术语“严紧”描述用于杂交和洗涤的条件。严紧条件对本领域技术人员来说是已知的,并且可在 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6. 3. 1-6. 3. 6 中查见。含水和无水的方法描述于该文献中并且二者都可使用。一个严紧杂交条件的例子是在大约 $45^\circ C$ 下于 6X 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 溶液中进行杂交,接着在 $50^\circ C$ 下用 0. 2X SSC、0. 1% SDS 洗涤至少一次。第二个严紧杂交条件的例子是在大约 $45^\circ C$ 下于 6X SSC 溶液中进行杂交,接着在 $55^\circ C$ 下用 0. 2X SSC、0. 1% SDS 洗涤至少一次。另一个严紧杂交条件的例子是在大约 $45^\circ C$ 下于 6X SSC 溶液中进行杂交,接着在 $60^\circ C$ 下用 0. 2X SSC、0. 1% SDS 洗涤至少一次。另外一个严紧杂交条件的例子是在大约 $45^\circ C$ 下于 6X SSC 溶液中进行杂交,接着在 $65^\circ C$ 下用 0. 2X SSC、0. 1% SDS 洗涤至少一次。高度严紧条件包括在 $65^\circ C$ 下于 0. 5M 磷酸钠、7% SDS 中杂交,接着在 $65^\circ C$ 下用 0. 2X SSC、1% SDS 洗涤至少一次。

[0062] 短语“基本如列出的”、“基本一致”或“基本同源”的意思是,相关的氨基酸或核苷酸序列(例如,CDR(s)、 V_H 或 V_L 结构域)与列出的序列相比基本一致或具有不显著的差异(通过保守氨基酸替代)。不显著的差异包括少量氨基酸变化,例如在特定区域的 5 个氨基酸序列上的 1 或 2 个替代。在抗体的情况下,第二个抗体具有相同的特异性,并且具有原抗体的至少 50% 的亲和力。

[0063] 与此处公开的序列基本一致或同源(例如,至少大约 85% 的序列同一性)的序列也是本申请的一部分。在一些实施方案中,序列同一性可达大约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高。可选择地,当所述核酸区段在选择杂交条件下(例如,高度严紧条件)与所述链的互补链杂交时,就认为存在基本同一性或同源性。所述核酸可以存在于整个细胞中、存在于细胞裂解物中或者以部分纯化或基本纯的形式存在。

[0064] 可通过标准的比对算法,例如由 Altschul 等人 ((1990) J. Mol. Biol., 215 : 403-410) 描述的 Basic Local Alignment Tool (BLAST); Needleman 等人 ((1970) J. Mol. Biol., 48 : 444-453) 的算法; 或 Meyers 等人 ((1988) Comput. Appl. Biosci., 4 : 11-17) 的算法来确定同一性百分数。一组参数可以是具有缺口罚分 (gap penalty) 为 12、缺口延伸罚分 (gap extend penalty) 为 4 和移码缺口罚分 (frameshift gap penalty) 为 5 的 Blosum 62 计分矩阵。两个氨基酸或核苷酸序列之间的同一性百分数可通过使用已整合入 ALIGN 程序 (2.0 版本) 中的计 E. Meyers 和 W. Miller ((1989) CABIOS, 4 : 11-17) 的算法,使用 PAM120 权重残基表 (weight residue table)、12 的缺口长度罚分 (gap length penalty) 和 4 的缺口罚分 (gap penalty) 来确定。

[0065] 术语“治疗性试剂”是治疗或辅助治疗医学疾病的物质。在此处使用时,治疗性试

剂是指当给具有抗 IL-21R 抗体的受试者施用,与单独施用治疗性试剂或抗 IL-21R 抗体相比提供更好的治疗效果的物质。这些治疗性试剂可包括但不限于以补充抗 IL-21R 抗体的 IL-21R 活性的方式调节免疫细胞或免疫应答的物质。此处描述了治疗性试剂的非限定性实例和用途。

[0066] 在此处使用时,抗 IL-21R 抗体的“治疗有效量”是指,当以单剂或多剂方式施用给受试者(例如病人)时,对于治疗、预防、医治、延缓疾病或复发性疾病的至少一个症状,减轻疾病或复发性疾病的至少一个症状的严重度,改善疾病或复发性疾病的至少一个症状,或延长受试者的存活时间至超过在缺少这种治疗的情况下所预期的存活时间有效的抗体数量。

[0067] 术语“治疗”是指治疗性或预防性措施。所述治疗可以是给患有医学疾病的受试者或最终可能会得病的人施用药物以预防、医治、延缓疾病或复发性疾病的一个或多个症状,减轻疾病或复发性疾病的一个或多个症状的严重度,或改善疾病或复发性疾病的一个或多个症状,或者延长受试者的存活时间至超过在缺少这种治疗的情况下所预期的存活时间。

[0068] 抗 IL-21R 抗体

[0069] 本公开内容提供了包含新的抗原结合片段的新颖抗 IL-21R 抗体。

[0070] 通常,通过采用例如常规的杂交瘤技术(Kohler 和 Milstein(1975)Nature, 256 : 495-499)、重组 DNA 方法(美国专利 4,816,567)或使用抗体文库的噬菌体展示(Clackson 等人(1991)Nature, 352 :624-628);Marks 等人(1991)J. Mol. Biol., 222 :581-597)来制备抗体。为查找另外的抗体生产技术,可参考“Antibodies :A Laboratory Manual”, Harlow 等人(编者), ColdSpring Harbor Laboratory, 1988。本发明不受限于任何特定的原料、生产方法或抗体的其它特殊的特征。

[0071] 完整的抗体是免疫球蛋白(Ig),其通常是由两条轻链(各为~25kDa)和 2 条重链(各为~50kDa)组成的四聚体糖基化蛋白。轻链分为两类同种型(λ 和 κ)而重链分为 5 类同种型(A、D、E、G 和 M)。一些重链同种型进一步分为同种型亚类,例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄。

[0072] 不同抗体的结构域和三维结构在本领域是已知的(Harlow 等人,同上)。简而言之,轻链由恒定结构域(C_L)和 N 末端可变结构域(V_L)构成。重链由三个或四个恒定结构域(C_H)、铰链区和 N 末端可变结构域(V_H)构成。紧邻 V_H 结构域 C_H 称为 C_H1。V_H 和 V_L 结构域包含 4 个称作构架(FR)区(FR1、FR2、FR3 和 FR4)的序列保守区域,所述区域为三个称作互补性决定区(CDR)的超可变序列区域形成支架。所述 CDR(CDR1、CDR2 和 CDR3)包含绝大部分特异性结合抗原的抗体氨基酸。重链 CDR 表示为 H1、H2 和 H3,而轻链 CDR 表示为 L1、L2 和 L3。

[0073] Fab 片段(抗原结合片段)由 V_H-C_H1 和 V_L-C_L 结构域通过恒定区之间的二硫键共价连接构成。Fv 片段较小,和由 V_H 和 V_L 结构域通过非共价连接构成。为克服非共价连接的结构域易于解离的趋势,可构建单链 Fv 片段(scFv)。所述 scFv 包含(1)将 V_H 的 C 末端连接到 V_L 的 N 末端,或(2)将 V_L 的 C 末端连接到 V_H 的 N 末端的柔性多肽。15 聚体(Gly₄Ser)₃ 肽可用作连接体,但其他连接体在本领域是已知的。

[0074] 通过使用编码可变区的多个种系基因和各种体细胞事件可产生抗体多样性。所述体细胞事件包括可变基因区段以及多样性(D)和连接(J)基因区段的重组以产生完整的 V_H

区域,和可变以及连接基因区段的重组以产生完整的 V_L 区域。CDR3(H3) 是在抗体序列内最大的分子多样性来源。例如, H3 可以短至 2 个氨基酸残基或大于 26 个氨基酸残基。最小的抗原结合片段是 Fv, 其由 V_H 和 V_L 结构域构成。

[0075] 具有与此处公开的 CDR 序列一致或相似的 CDR 序列的抗体和组合物不可能是独立产生的。在组装和体细胞突变后抗体基因的序列是高度变化的, 并且据估计这些变化的基因编码 10^{10} 个不同的抗体分子 (Immunoglobulin Genes, 第二版, Jonio 等人 (编者), Academic Press, San Diego, CA, 1995)。

[0076] 本公开内容提供了来源于人免疫球蛋白基因文库的新 CDR。具有 CDR 的结构通常是抗体的重链或轻链或其部分, 其中所述 CDR 位于天然产生的 CDR 区域。如 Kabat 等人的 “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, MD (1991) 中的描述, 可确定可变结构域的结构和位置。

[0077] 本发明的抗 IL-21R 抗体 (包括其 scFv 片段、 V_H 和 V_L 结构域和 CDR) 的说明性实施方案的 DNA 和氨基酸 (AA) 序列于序列列表中和列举于表 1A 和表 1B 中。将所述抗体的特殊实施方案确定为 MUF、MUF- 种系、MU11、18G4、18A5、19F5、CP5G2 和 R18。抗体的 V_H 和 V_L 结构域中的 CDR 位置列于表 2。

[0078] 表 1A : V_H 和 V_L 结构域、Fv 和 CDR 的 AA 和 DNA 序列

[0079]

区域	类型	MUF	MU11	18G4	18A5
V_H	AA	SEQ ID NO :1	SEQ ID NO :19	SEQ ID NO :47	SEQ ID NO :65
V_L	AA	SEQ ID NO :2	SEQ ID NO :20	SEQ ID NO :48	SEQ ID NO :66
scFv	AA	SEQ ID NO :3	SEQ ID NO :21	SEQ ID NO :49	SEQ ID NO :67
H1	AA	SEQ ID NO :4	SEQ ID NO :22	SEQ ID NO :50	SEQ ID NO :68
H2	AA	SEQ ID NO :5	SEQ ID NO :23	SEQ ID NO :51	SEQ ID NO :69
H3	AA	SEQ ID NO :6	SEQ ID NO :24	SEQ ID NO :52	SEQ ID NO :70
L1	AA	SEQ ID NO :7	SEQ ID NO :25	SEQ ID NO :53	SEQ ID NO :71
L2	AA	SEQ ID NO :8	SEQ ID NO :26	SEQ ID NO :54	SEQ ID NO :72
L3	AA	SEQ ID NO :9	SEQ ID NO :27	SEQ ID NO :55	SEQ ID NO :73
V_H	DNA	SEQ ID NO :10	SEQ ID NO :28	SEQ ID NO :56	SEQ ID NO :74

V _L	DNA	SEQ ID NO :11	SEQ ID NO :29	SEQ ID NO :57	SEQ ID NO :75
scF _v	DNA	SEQ ID NO :12	SEQ ID NO :30	SEQ ID NO :58	SEQ ID NO :76
H1	DNA	SEQ ID NO :13	SEQ ID NO :31	SEQ ID NO :59	SEQ ID NO :77
H2	DNA	SEQ ID NO :14	SEQ ID NO :32	SEQ ID NO :60	SEQ ID NO :78
H3	DNA	SEQ ID NO :15	SEQ ID NO :33	SEQ ID NO :61	SEQ ID NO :79
L1	DNA	SEQ ID NO :16	SEQ ID NO :34	SEQ ID NO :62	SEQ ID NO :80
L2	DNA	SEQ ID NO :17	SEQ ID NO :35	SEQ ID NO :63	SEQ ID NO :81
L3	DNA	SEQ ID NO :18	SEQ ID NO :36	SEQ ID NO :64	SEQ ID NO :82

[0080] 表 1B :V_H 和 V_L 结构域、F_v 和 CDR 的 AA 和 DNA 序列

[0081]

区域	类型	MUF 种系	19F5	CP5G2	R18
V _H	AA	SEQ ID NO :83	SEQ ID NO :101	SEQ ID NO :119	SEQ ID NO :137
V _L	AA	SEQ ID NO :84	SEQ ID NO :102	SEQ ID NO :120	SEQ ID NO :138
scF _v	AA	SEQ ID NO :85	SEQ ID NO :103	SEQ ID NO :121	SEQ ID NO :139
H1	AA	SEQ ID NO :86	SEQ ID NO :104	SEQ ID NO :122	SEQ ID NO :140
H2	AA	SEQ ID NO :87	SEQ ID NO :105	SEQ ID NO :123	SEQ ID NO :141
H3	AA	SEQ ID NO :88	SEQ ID NO :106	SEQ ID NO :124	SEQ ID NO :142
L1	AA	SEQ ID NO :89	SEQ ID NO :107	SEQ ID NO :125	SEQ ID NO :143
L2	AA	SEQ ID NO :90	SEQ ID NO :108	SEQ ID NO :126	SEQ ID NO :144
L3	AA	SEQ ID NO :91	SEQ ID NO :109	SEQ ID NO :127	SEQ ID NO :145
V _H	DNA	SEQ ID NO :92	SEQ ID NO :110	SEQ ID NO :128	SEQ ID NO :146
V _L	DNA	SEQ ID NO :93	SEQ ID NO :111	SEQ ID NO :129	SEQ ID NO :147

scF _v	DNA	SEQ ID NO :94	SEQ ID NO :112	SEQ ID NO :130	SEQ ID NO :148
H1	DNA	SEQ ID NO :95	SEQ ID NO :113	SEQ ID NO :131	SEQ ID NO :149
H2	DNA	SEQ ID NO :96	SEQ ID NO :114	SEQ ID NO :132	SEQ ID NO :150
H3	DNA	SEQ ID NO :97	SEQ ID NO :115	SEQ ID NO :133	SEQ ID NO :151
L1	DNA	SEQ ID NO :98	SEQ ID NO :116	SEQ ID NO :134	SEQ ID NO :152
L2	DNA	SEQ ID NO :99	SEQ ID NO :117	SEQ ID NO :135	SEQ ID NO :153
L3	DNA	SEQ ID NO :100	SEQ ID NO :118	SEQ ID NO :136	SEQ ID NO :154

[0082] 表 2 :AA 序列中 CDR 的位置

[0083]

CDR	MUF (SEQ ID NO :1)	MUF (SEQ ID NO :2)	MU11 (SEQ ID NO :21)	18G4 (SEQ ID NO :49)
H1	31-35		31-35	31-35
H2	50-66		50-66	50-66
H3	99-105		99-106	99-105
L1		23-33	156-166	156-166
L2		49-55	182-188	182-188
L3		88-100	221-229	221-231

[0084]

CDR	18A5 (SEQ ID NO :67)	19F5 (SEQ ID NO :103)	CP5G2 (SEQ ID NO :121)	R18 (SEQ ID NO :139)
H1	31-36	31-35	31-35	31-35
H2	51-66	50-66	50-66	50-66

H3	99-107	99-109	99-107	99-110
L1	158-168	160-170	158-168	161-171
L2	184-190	186-192	184-190	187-193
L3	223-234	225-236	223-234	226-236

[0085]

CDR	MUF 种系 (SEQ ID NO :85)
H1	31-35
H2	50-66
H3	99-105
L1	156-166
L2	182-188
L3	221-233

[0086] 本发明的抗 IL-21R 抗体可任选地包含抗体恒定区或其部分。例如,可将 V_L 结构域于其 C 末端处附着到轻链恒定结构域如 C_{κ} 或 C_{λ} 。类似地, V_H 结构域或其部分可附着到整个或部分重链上,如 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM 以及任何同种型亚类。恒定区在本领域是已知的(参见,例如,Kabat 等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, MD(1991))。

[0087] 在示例性实施方案中,MUF 包含人 $IgG_{1\lambda}$ 的重链和轻链恒定结构域,而 MU11 包含人 $IgG_{1\kappa}$ 的重链和轻链恒定结构域。在这些抗体中, V_H 结构域外的重链序列是一致的。所述 λ 轻链的 C 末端片段的 DNA 和氨基酸序列分别列于 SEQ ID NO :40 和 SEQ ID NO :39。所述 κ 链的 C 末端片段的 DNA 和氨基酸序列分别列于 SEQ ID NO :42 和 SEQ ID NO :41。 IgG_1 重链的 C 末端片段的 DNA 和氨基酸序列分别列于 SEQ ID NO :38 和 SEQ ID NO :37。

[0088] 某些实施方案包含来自 MUF、MUF- 种系、MU11、18G4、18A5、19F5、CP5G2 或 R18 的 Fv 片段的 V_H 结构域、 V_L 结构域或其组合。进一步的实施方案包含 1、2、3、4、5 或 6 个来自 V_H 和 V_L 结构域的互补性决定区 (CDR)。具有列于 SEQ ID NO :1、2、3、4、5、6、7、8、9、19、20、21、22、23、24、25、26、27、47、48、49、50、51、52、53、54、55、65、66、67、68、69、70、71、72、73、83、84、85、86、87、88、89、90、91、101、102、103、104、105、106、107、108、109、119、120、121、122、123、124、125、126、127、137、138、139、140、141、142、143、144 或 145 中的 CDR 序列的抗体包括在

本发明的范围内。例如,在一个实施方案中,抗体包含 MUF、MUF- 种系、MU11、18G4、18A5、19F5、CP5G2 或 R18 的 V_H 结构域的 CDR3(H3) 片段。

[0089] 在某些实施方案中, V_H 和 / 或 V_L 结构域可以进行种系转化 (germline), 即可使用常规的分子生物学技术对这些结构域的构架区 (FR) 进行突变以匹配由种系细胞产生的那些。在其他实施方案中, FR 序列保留着从共有种系序列中分出的状态。

[0090] 在一个实施方案中, 本发明提供了种系转化的 (germlined) MUF 的氨基酸和核酸序列。所述种系转化的 MUF 的 V_H 结构域的氨基酸序列描述于 SEQ ID NO :83 和 85。所述种系转化的 MUF 的 V_L 结构域的氨基酸序列描述于 SEQ ID NO :84 和 85。所述种系转化的 MUF 的 V_H 结构域的核酸序列描述于 SEQ ID NO :92 和 94, 而所述种系转化的 MUF 的 V_L 结构域的核酸序列描述于 SEQ ID NO :93 和 94。通过将氨基酸和核酸序列与 VBASE 数据库 (MRC Center for Protein Engineering, UK) 进行比对可确定 V_H 和 V_L 结构域的种系序列。在一些实施方案中, 按照与 VBASE 数据库中最匹配的序列对 scFv 的 FR 区域进行突变, 并且将 CDR 部分保持完整。

[0091] 在某些实施方案中, 本发明的抗体特异性地与人 IL-21R 的细胞外结构域中的抗原决定部位反应。所预测的细胞外结构域由 SEQIDNO :43 的从大约第 20 位氨基酸到大约第 235 位氨基酸的序列组成。在进一步实施方案中, 抗 IL-21R 抗体阻断 IL-21 与 IL-21R 的结合。在其他实施方案中, 抗 IL-21R 抗体特异性地与小鼠 IL-21R 的细胞外结构域中的抗原决定部位反应。鼠科动物 IL-21R 的细胞外结构域由 SEQIDNO :45 的从大约第 20 个氨基酸到大约第 236 个氨基酸的序列组成。小鼠 IL-21R 的细胞外结构域与人的对应物有大约 65% 的同一性。

[0092] 预期本发明的抗体可结合其他蛋白质, 例如包含所有或部分 IL-21R 细胞外结构域的重组蛋白。

[0093] 本领域技术人员会意识到, 所公开的抗体可用于检测、测量和 / 或抑制与 IL-21R 稍有不同的蛋白质。例如, 这些蛋白质可能是 IL-21R 的同源物。预期抗 IL-21R 抗体能结合含有与 SEQ ID NO :43 所列序列中的至少 100、80、60、40 或 20 个连续氨基酸的任一序列具有至少大约 60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的序列的蛋白质。

[0094] 除了序列同源性分析外, 还可进行抗原决定部位作图 (参见, 例如, Epitope Mapping Protocols, Morris (编者), Humana Press, 1996), 以及二级和三组结构分析以鉴定由目前公开的抗体和其与抗原形成的复合物推测的特异性 3D 结构。这类方法包括但不限于本抗体的 X 射线晶体学 (Engstrom (1974) Biochem. Exp. Biol., 11 :7-13) 和虚拟图象的计算机建模 (computer modeling of virtual representations) (Fletterick 等人 (1986) Computer Graphics and Molecular Modeling, Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

[0095] 本公开内容提供了获得抗 IL-21R 抗体的方法, 包括用改变的表 1A 和 1B 中的 V_H 和 / 或 V_L 序列产生抗体。这类抗体可由本领域技术人员通过使用本领域已知的技术进行衍生。例如, 可在 FR 和 / 或 CDR 区域中引入氨基酸替代、缺失或插入。通常对 FR 改变进行设计以提高抗体的稳定性和免疫原性, 而通常对 CDR 改变进行设计以增加抗体对其抗原的亲合力。通过改变 CDR 序列并测量抗体对其靶目标的亲和力可测试出增加亲和力的改变 (参

见Antibody Engineering,第二版,Oxford University Press,Borrebaeck(编者),1995)。

[0096] 具有与SEQ ID NO :1、2、3、4、5、6、7、8、9、19、20、21、22、23、24、25、26、27、47、48、49、50、51、52、53、54、55、65、66、67、68、69、70、71、72、73、83、84、85、86、87、88、89、90、91、101、102、103、104、105、106、107、108、109、119、120、121、122、123、124、125、126、127、137、138、139、140、141、142、143、144 或 145 所列序列无实质不同的 CDR 序列的抗体包括在本发明的范围内。通常,这包括用一个具有相似电荷、疏水性或立体化学特征的氨基酸来替代一个氨基酸。与 CDR 区域相反,只要替代不会不利地影响所述抗体的结合特性,在 FR 区域也可以发生更强烈的替代。替代也可用来对所述抗体进行种系转化或稳定抗原结合位点。

[0097] 保守修饰将产生具有与从中进行这类修饰的分子相似的功能和化学特征的分子。相反地,通过选择在氨基酸序列中的替代可实现对所述分子的功能和 / 或化学特征的本质性修饰,所述在氨基酸序列中的替代在其保持 (1) 替代区域中的分子主链的结构,例如折叠片或螺旋构象,(2) 分子在靶位点的电荷或疏水性,或 (3) 分子的大小的效果上显著不同。

[0098] 例如,“保守氨基酸替代”可能涉及用非天然的残基替代天然的氨基酸残基,这样对在该位点的氨基酸残基的极性 or 电荷影响很小或没有影响。此外,正如以前对于“丙氨酸扫描诱变 (alanine scanningmutagenesis)” (参见,例如,MacLennan 等人,1998, Acta Physiol. Scand. Suppl. 643 :55-67 ;Sasaki 等人,1998, Adv. Biophys. 35 :1-24) 曾描述的,多肽中的任何天然氨基酸也可用丙氨酸替代。

[0099] 所想要的氨基酸替代 (无论是保守还是非保守的) 可由本领域技术人员在想要进行这类替代的时候确定。例如,氨基酸替代可用来鉴定分子序列的重要残基,或者增加或减少此处描述的分子的亲和力。表 3 列出了示例性的氨基酸替代。

[0100] 表 3 :氨基酸替代

[0101]

初始残基	示例性取代	更保守的取代
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala

His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, 1,4 二氨基丁酸, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 正亮氨酸	Leu

[0102] 在某些实施方案中,保守氨基酸替代也包括非天然发生的氨基酸残基,所述氨基酸残基通常通过化学的肽合成而不是通过生物系统中的合成而被整合的。

[0103] 在一个实施方案中,用于制备变体 V_H 结构域的方法包括加入、缺失或替代公开的 V_H 结构域中的至少一个氨基酸,或将公开的 V_H 结构域与至少一个 V_L 结构域组合,并且测试变体 V_H 结构域结合 IL-21R 或调节 IL-21R 的活性的能力。

[0104] 用于制备变体 V_L 结构域类似方法包括加入、缺失或替代公开的 V_L 结构域中的至少一个氨基酸,或将公开的 V_L 结构域与至少一个 V_H 结构域组合,并且测试变体 V_L 结构域结合 IL-21R 或调节 IL-21R 活性的能力。

[0105] 公开内容的更进一步方面提供了制备结合 IL-21R 的抗原结合片段的方法。所述方法包括:

[0106] (a) 提供编码 V_H 结构域的核酸的起始库集,所述 V_H 结构域缺少一个或多个 CDR1、2、3,或者含有要被替代的 CDR1、2 或 3;

[0107] (b) 用编码基本上如此处列出的 V_H CDR1、2 或 3 的氨基酸序列的核酸插入或替代所述起始库集的 CDR1、2 或 3 区域,产生产物库集;

[0108] (c) 表达所述产物库集的核酸;

[0109] (d) 选择与 IL-21R 结合的特异性抗原结合片段;

[0110] (e) 回收所述特异性抗原结合片段或编码其的核酸。

[0111] 类似的方法为,其中用将本发明的 V_L CDR1、2或3与编码 V_L 结构域的核酸的库集进行组合,所述 V_L 结构域缺少CDR1、2或3或者含有要被替代的CDR1、2或3。

[0112] 通过使用重组DNA方法学,可将公开的CDR序列导入缺少相应CDR的 V_H 或 V_L 结构域的库集中(Marks等人(BioTechnology(1992)10:779-783)。例如,可用靠近可变结构域5'末端的引物和靠近第三个FR的引物产生缺少CDR3的可变结构域序列的库集。该库集可与公开的抗体的CDR3组合。使用类似的技术,用来自其它抗体的CDR序列的一部分可改组公开的CDR序列的一部分以提供结合IL-21R的抗原结合片段的库集。任一库集都可在宿主系统例如噬菌体展示(描述于W092/01047)中表达,因而可选择合适的结合IL-21R的抗原结合片段。

[0113] 进一步的可选择方案对公开的 V_H 或 V_L 序列使用随机诱变以产生仍能与IL-21R结合的变体 V_H 或 V_L 结构域。使用易错PCR的技术由Gram等人进行了描述(Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. (1992)89:3576-3580)。

[0114] 另一方法对公开的 V_H 或 V_L 序列使用定向诱变。该技术由Barbas等人(Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. (1992)91:3809-3813)和Schier等人(J. Mol. Biol. (1996)263:551-567)公开。

[0115] 可变结构域的一部分包含至少一个基本上如此处列出的CDR区域,并且可选地插入来自此处列出的 V_H 或 V_L 结构域的构架区。所述一部分可包括FR1的C末端半部分和/或FR4的N末端半部分。在可变结构域的N末端或C末端端的另外的残基可以与在天然产生的抗体中发现的残基不相同。例如,通过重组DNA技术的抗体构建通常由于使用连接体而引入N或C末端残基。一些连接体可用于将可变结构域连接到其它可变结构域(例如,diabodies)、恒定结构域或蛋白质标记上。

[0116] 尽管在实施例中说明的实施方案包含“匹配”的 V_H 和 V_L 结构域对,但本领域技术人员会认识到可选择实施方案可包含仅含有单个来自 V_H 或 V_L 结构域的CDR的抗原结合片段。任意一个单链特异性抗原结合结构域可用来筛选能够形成两结构域特异性抗原结合片段的互补结构域,所述两结构域特异性抗原结合片段能够例如与IL-2R结合。所述筛选可通过使用公开于W092/01047中的所谓等级双重组合方法(hierarchical dual combinatorial approach)的噬菌体展示筛选方法来完成。在该方法中,将含有H或L链克隆的单个菌落用于感染编码其它链(L或H)的克隆的完全文库,并且按照所描述的噬菌体展示技术来筛选所得的两链特异性抗原结合结构域。

[0117] 在一些可选择的实施方案中,通过化学交联或重组方法可将抗IL-21R抗体连接到蛋白质(例如,白蛋白)上。公开的抗体也可以以美国专利号4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192或4,179,337提出的方式连接到各种非蛋白质的聚合物上(例如,聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯)。例如,抗体可通过共价缀合到聚合物上而进行化学修饰,以增加其在血液循环中的半寿期。示例性的聚合物和附着方法显示于美国专利号4,766,106;4,179,337;4,495,285和4,609,546。

[0118] 可修饰公开的抗体以改变其糖基化;即,可以向抗体删除或添加至少一个糖部分。通过改变氨基酸序列以删除或建立糖基化共有位点(glycosylation consensus site)来实现糖基化位点的删除和添加,所述糖基化共有位点在本领域是众所周知的。另一个添加糖部分的方法是将糖苷以化学或酶促方式偶联到抗体的氨基酸残基上(参见W087/05330,

和 Aplin 等人 (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 22 :259-306)。也可以化学或酶促地实现糖部分的去除 (参见 Hakimuddin 等人 (1987) *Arch. Biochem. Biophys.*, 259 :52 ;Edge 等人 (1981) *Anal. Biochem.*, 118 :131 ;Thotakura 等人 (1987) *Meth. Enzymol.*, 138 :350)。

[0119] 用于改变抗体恒定区的方法在本领域是已知的。通过用不同的残基在抗体的恒定部分替代至少一个氨基酸残基可产生具有改变的功能 (例如,改变的对于细胞上的效应器配体如 FcR 或补体的 C1 成分的亲和力) 的抗体 (参见例如, EP388, 151A1, US5, 624, 821 和 US5, 648, 260, 所述所有文献的内容在此引用作为参考)。可以描述当应用于鼠科动物或其他物种抗体时会减少或清除类似功能的类似类型的改变。

[0120] 例如,可以改变抗体 (例如, IgG, 例如人 IgG) 的 Fc 区域对 FcR (例如, Fc γ R1) 或 C1q 的亲和力。通过用至少一个在其侧链具有合适官能度的残基替换至少一个特定残基, 或者通过引入带电荷的官能团 (例如, 谷氨酸或天冬氨酸) 或可能的芳香族非极性残基 (例如苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸或丙氨酸) 可改变亲和力 (参见例如, US5, 624, 821)。

[0121] 例如, 在 IgG 恒定区中用丙氨酸替代残基 297 (天冬酰胺) 显著地抑制了对效应细胞的募集, 而只是轻微地降低 (大约减弱 3 倍) 对 C1q 的亲和力 (参见例如, US5, 624, 821)。所述残基在重链中的编号就是 EU 索引的编号 (参见 Kabat 等人, 1991 同上)。该变化破坏了糖基化位点, 并且据信所述糖的存在对于 Fc 受体结合是必需的。据信, 在该位点破坏糖基化位点的任何其它替代均导致相似的裂解活性降低。其它氨酸替代, 例如, 还已知将残基 318 (Glu)、320 (Lys) 和 322 (Lys) 变成 Ala 会完全破坏 C1q 与 IgG 抗体的 Fc 区域结合 (参见例如, US5, 624, 821)。

[0122] 可产生具有减弱的与 Fc 受体的相互作用的经修饰的抗体。例如, 已证明在与人 Fc γ R1 受体结合的人 IgG3 中, 将 Leu235 变成 Glu 会破坏其与受体的相互作用。对于在抗体的铰链连接区域内的邻近或紧邻位点的突变 (例如, 用 Ala 替代残基 234、236 或 237) 也可用于影响抗体对 Fc γ R1 受体的抗体亲和力。在重链中残基的编号是基于 EU 索引 (参见 Kabat 等人, 1991 同上) 的。

[0123] 另外的用于改变抗体的裂解活性的方法, 例如通过改变 CH2 结构域 N 末端区域中的至少一个氨基酸, 描述于 Morgan 等人的 W094/29351 和 US5, 624, 821, 所有文献的内容在此引用作为参考。

[0124] 本发明的抗体可用可检测或功能性标记进行标记。这些标记包括放射性标记 (例如, ^{131}I 或 ^{99}Tc), 酶标记 (例如, 辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶), 和其它化学部分 (例如, 生物素)。

[0125] 本领域技术人员会意识到上述改变是无法穷举的, 根据本公开内容的教导, 许多其它改变对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0126] 核酸、克隆和表达系统

[0127] 所述公开内容提供了编码公开的抗体的分离的核酸。核酸可包括 DNA 或 RNA, 并且其可以是合成的 (完全或部分) 或重组的 (完全或部分)。此处列出的核酸序列的参考包括具有特定序列的 DNA 分子和包括具有用 U 替换 T 的特定序列的 RNA 分子。

[0128] 也提供了包含编码序列的核酸, 所述编码序列编码此处公开的 1、2 或 3 个 CDR、 V_H 结构域、 V_L 结构域或其组合, 或与其基本一致的序列 (例如, 与其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的序列, 或在严紧条件下能与所述公开的序列杂

交的序列)。

[0129] 在一个实施方案中,分离的核酸具有编码抗 IL-21R 抗体的重链和轻链可变区的核苷酸序列,所述抗 IL-21R 抗体具有至少一个选自 SEQ ID NO :4、5、6、7、8、9、22、23、24、25、26、27、50、51、52、53、54、55、68、69、70、71、72、73、86、87、88、89、90、91、104、105、106、107、108、109、122、123、124、125、126、127、140、141、142、143、144 和 145 的氨基酸序列的 CDR,或具有编码与此处描述的序列相异 1 或 2 个氨基酸的 CDR 的序列。在一些实施方案中,CDR 的氨基酸序列包括 SEQ ID NO :4、5、6、7、8、9、22、23、24、25、26、27、50、51、52、53、54、55、68、69、70、71、72、73、86、87、88、89、90、91、104、105、106、107、108、109、122、123、124、125、126、127、140、141、142、143、144 和 145 所列序列中一个或多个氨基酸的保守氨基酸替代。

[0130] 核酸可以只编码轻链或重链可变区,或也可以编码与相应的可变区有效地连接的抗体轻链或重链恒定区。在一个实施方案中,轻链可变区 (V_L) 连接到选自 κ 或 λ 恒定区的恒定区。轻链恒定区也可以是人 κ 或 λ 类型。在另一个实施方案中,重链可变区 (V_H) 连接到选自 IgG (例如, IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄)、IgM、IgA₁、IgA₂、IgD 和 IgE 的抗体同种型的重链恒定区。所述重链恒定区可以是 IgG (例如, IgG₁) 同种型。

[0131] 本发明的核酸组合物,通常在除了经修饰的限制性位点等之外的 (cDNA 或基因组 DNA 或其混合物的) 天然序列上,可根据标准技术进行突变以提供基因序列。对于编码序列,这些突变可以按想要的效果影响氨基酸序列。特别地,期望基本上与天然的 V、D、J、恒定区、转换区和其它此处描述的这类序列一致或源自这些序列的核苷酸序列 (其中“源自”表示序列与另一序列一致或从另一序列进行了修饰)。

[0132] 在一个实施方案中,核酸与所提供的序列的核酸不同 (例如,由于替代、插入或缺失而导致的不同) (例如,如下:至少一个但少于 10、20、30 或 40 个核苷酸不同;在受试者核酸中至少一个但低于 1%、5%、10% 或 20% 的核苷酸不同)。如果有必要进行该分析,应当将所述序列进行比对以求最大同源性。因缺失或插入或者错配而“成环的”序列被认为是差异所在。所述差异可以是在编码非必需残基的核苷酸上,或所述差异可以是保守替代。本公开内容也提供了以质粒、载体、转录或表达盒形式的核酸构建体,所述核酸包含至少一个此处所描述的核酸。

[0133] 本公开内容进一步提供了包含至少一个此处描述的核酸构建体的宿主细胞。也提供了制备由包含此处所述序列的核酸编码的蛋白质的方法。所述方法包括在适合条件下培养宿主细胞以使其表达来自所述核酸的蛋白质。在表达和产生后,用任何合适的技术可分离和 / 或纯化 V_H 或 V_L 结构域或者特异结合成员,然后进行适当应用。

[0134] 抗原结合片段、 V_H 和 / 或 V_L 结构域和编码核酸分子以及载体可以从其天然环境中,以基本纯的或均一的形式,或者在核酸的情况下以不含或基本不含除了编码具有所需功能的多肽的序列之外的起始核酸或基因的状态分离和 / 或纯化出来。

[0135] 用于在各种宿主细胞中克隆和表达多肽的系统在本领域是已知的。适合于生产抗体的细胞描述于例如 Fernandez 等人 (编者) (1999) 的 “Gene Expression Systems”, Academic Press 之中。简而言之,合适的宿主细胞包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母细胞或原核细胞例如大肠杆菌 (E. coli)。在本领域可获得的用于异源多肽表达的哺乳动物细胞包括淋巴细胞细胞系 (例如, NS0)、HEK293 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、COS 细胞、HeLa 细胞、幼年仓鼠肾细胞、卵母细胞和来自转基因动物的细胞例如乳腺上皮细胞。

在一个实施方案中, MUF 和 MU11 抗体在 HEK293 或 CHO 细胞中表达。在其他实施方案中, 编码本发明抗体的核酸被置于组织特异性启动子(例如, 乳腺特异性启动子)的控制之下, 并且在转基因动物中生产所述抗体。例如, 将抗体分泌到转基因动物例如转基因奶牛、猪、马、绵羊、山羊或啮齿动物的奶中。可以选择或构建合适的载体以含有合适的调控序列, 包括启动子序列、终止子序列、聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因和其它序列。载体也可含有质粒或病毒主链。详细内容可参阅 Sambrook 等人的“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)。许多已建立的应用于载体的技术, 包括 DNA 的操作、制备、诱变、测序和转染, 描述于“Current Protocols in Molecular Biology”, 第二版, Ausubel 等人(编者), John Wiley 和 Sons(1992)。

[0136] 本公开内容的进一方面提供了将核酸导入宿主细胞的方法。对于真核细胞, 合适的转染技术可包括磷酸钙、DEAE-Dextran、电穿孔、脂质体介导的转染, 和使用逆转录病毒或其它病毒例如痘苗病毒或杆状病毒进行的转导。对于细菌细胞, 合适的技术可包括氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体进行的转染。DNA 导入之后可施行选择方法(例如, 药物抗性)以筛选出含有所述核酸的细胞。

[0137] 生物保藏

[0138] 2003 年 3 月 5 日在美国组织培养物保藏所(American Tissue Culture Collection) (ATCC) 分别以保藏号 PTA-5031 和 PTA-5030 保藏了用含有 MUF 重链和轻链的载体转化的 CHO 细胞和用含有 MU11 重链和轻链的载体转化的 CHO 细胞。所述保藏所的地址是 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110, U. S. A。

[0139] 抗 IL-21R 抗体的用途

[0140] 作为 IL-21R 的拮抗剂的抗 IL-21R 抗体可用于调节至少一种 IL-21R 介导的免疫应答, 例如, T 细胞、B 细胞、NK 细胞、巨噬细胞或滑膜细胞的细胞增殖、细胞因子分泌、趋化因子分泌和细胞溶解活性中的一种或多种。因此, 本发明的抗体可用于抑制免疫或造血细胞(例如, 骨髓细胞、淋巴细胞或红细胞谱系细胞或者其前体细胞)的活性(例如, 增殖、分化和/或存活), 并因此可用于治疗各种免疫疾病和过度增殖性疾病。可治疗的免疫疾病的非限制性例子包括但不限于: 移植排斥、移植物抗宿主疾病、过敏(例如, 特应性过敏)和自身免疫疾病。自身免疫疾病可包括糖尿病、关节炎病症(包括类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣性关节炎和强直性脊柱炎)、脊柱关节病、多发性硬化、脑脊髓炎、重症肌无力、全身性红斑狼疮、皮肤红斑狼疮、自身免疫性甲状腺炎、皮炎(包括特应性皮炎和湿疹性皮炎)、牛皮癣、斯耶格伦综合征、IBD(包括克罗恩病和溃疡性结肠炎)、哮喘(包括内源性哮喘和过敏性哮喘)、硬皮病和脉管炎。

[0141] 多发性硬化是一种中枢神经系统疾病, 其特征在于髓鞘(将神经隔离且对于正常神经功能必需的脂肪物质)的炎症和缺失。用本发明的抗体和组合物可治疗由依赖 IL-21 的免疫应答所造成的炎症。在有关多发性硬化的实验性自身免疫脑炎(EAE)小鼠模型(Tuohy 等人(J. Immunol. (1988) 141:1126-1130), Sobel 等人(J. Immunol. (1984) 132:2393-2401), 和 Traugott(Cell Immunol. (1989) 119:114-129)中, 在 EAE 诱导前(立刻)用 MU11 注射剂处理小鼠可大大延缓所述疾病的发生。本发明的抗体可类似地用于治疗人中的多发性硬化。

[0142] 关节炎是一种特征在于关节处有炎症的疾病。类风湿性关节炎(RA)是最常见的

关节炎形式,涉及结缔组织和滑膜(沿关节排列的膜)的炎症。发炎的滑膜通常渗透入关节并且破坏关节软骨和骨。研究显示,用 IL-21 处理滑膜细胞和巨噬细胞会诱导这些细胞分泌与炎症相关的细胞因子和趋化因子。在有关类风湿性关节炎的胶原蛋白诱导的关节炎(CIA)小鼠模型(Courtenay 等人(Nature(1980)283:666-628)和Williams 等人(Immunol.(1995)84:433-439))中,在 CIA 诱导后(立刻)用 IL-21 处理小鼠会加重所述疾病。可用本发明的抗体治疗增加的炎性细胞因子和趋化因子分泌,并且更重要地是增加的由依赖 IL-21 的免疫应答造成的疾病。类似地,本发明的抗体和组合物可用于治疗人的 RA 或其它关节炎疾病。

[0143] 移植排斥是一种免疫学现象,其中来自供体的组织被宿主的免疫细胞特异性地“攻击”。主要的“攻击”细胞是 T 细胞,其 T 细胞受体认为供体的 MHC 分子是“外来的”。这种识别激活 T 细胞,所述 T 细胞增殖并且分泌最终破坏移植物的各种细胞因子和细胞溶解蛋白。当补充以 IL-21 时,在混合淋巴细胞反应(MLR)(移植排斥的体外测定法)中的 T 细胞将更强烈地增殖。MLR 和移植模型已由“Current Protocols in Immunology”,第二版,Coligan 等人(编者),John Wiley & Sons,1994;Kasaian 等人(Immunity(2002)16:559-569);Fulmer 等人(Am. J. Anat. (1963)113:273-285),和 Lenschow 等人(Science(1992)257:789-792)描述。本发明的抗体和组合物可用于减少 MLR 和治疗人中依赖 IL-21 的移植排斥和相关疾病(例如,移植物抗宿主疾病)。

[0144] 全身性红斑狼疮(SLE)是一种自身免疫疾病,其特征存在于自身抗体,包括抗 DNA、核抗原和核糖核蛋白的抗体。这些自身抗体与组织和器官的破坏相关。导致 SLE 的原因尚不清楚,但自身抗体的出现说明对自身反应性 T 细胞或 B 细胞的抑制不够。本发明的抗体和组合物可用于抑制 IL-21 介导的自身反应性 T 细胞和 B 细胞的活性,并且可在 NZB X NZW 小鼠(有关 SLE 的小鼠模型)(Immunologic Defects in Laboratory Animals, Gershwin 等人(编者),Plenum Press,1981)或人中治疗 SLE 或相关疾病。

[0145] 本发明的抗体也可用于治疗与 IL-21 应答细胞和 IL-21R 应答细胞的异常活性相关的过度增殖性疾病。这类细胞的例子包括造血来源的致瘤性细胞,例如源于骨髓细胞、淋巴细胞或红细胞谱系细胞或者其前体细胞的细胞。这类致瘤性疾病包括白血病癌症以及血液、骨髓(例如,骨髓瘤)和淋巴组织(例如,淋巴瘤)的肿瘤。在某些实施方案中,本发明旨在治疗各种白血病癌症,包括但不限于急性早幼粒细胞性白血病(APML)、急性髓细胞性白血病(AML)和慢性髓细胞性白血病(CML)(综述于 Vaickus, L. (1991) Crit. Rev. in Oncol. / Hemotol. 11:267-97)。可通过本发明方法治疗的淋巴恶性肿瘤的例子包括但不限于急性成淋巴细胞性白血病(ALL,包括 B 谱系 ALL 和 T 谱系 ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、前淋巴细胞性白血病(PLL)、毛细胞性白血病(HLL)和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(WM)。可用本发明治疗的恶性淋巴瘤的另外形式包括但不限于非何杰金淋巴瘤、外周 T 细胞淋巴瘤、成人 T 细胞性白血病/淋巴瘤(ATL)、皮肤 T 细胞淋巴瘤(CTCL)、大颗粒淋巴细胞性白血病(LGF)、何杰金淋巴瘤和其变体。

[0146] 组合治疗

[0147] 在一个实施方案中,在组合治疗中可施用包含至少一种抗 IL-21R 抗体和至少一种治疗性试剂的药物组合物。所述治疗可用于治疗病理学状况或疾病,例如免疫或炎性疾病。在本文中的术语“以组合方式”的意思是,基本上同期即同时或顺次给出抗体组合物和

治疗性试剂。如果是顺次给出,在施用第二种化合物的开始,两种化合物中的第一种仍可以在治疗位点处以有效浓度被检测到。

[0148] 例如,组合治疗可包括至少一种抗 IL-21R 抗体,其与至少一种另外的治疗性试剂共配制和 / 或共施用。所述另外的试剂可以包括至少一种如下面将更加详细描述 of 的细胞因子抑制剂、生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎性试剂、代谢抑制剂、酶抑制剂、细胞毒性剂和细胞抑制剂。这样的组合治疗可有利地利用更低的所施用的治疗性试剂的剂量,因而避免与各种单一疗法相关的可能毒性或并发症。此外,此处公开的治疗性试剂在不同于 IL-21/IL-21R 途径的途径上起作用,因而预期可增强和 / 或协同加强抗 IL-21R 抗体的效果。

[0149] 用于与抗 IL-21R 抗体组合的治疗性试剂可为在自身免疫和随后的炎性反应的不同阶段进行干预的那些试剂。在一个实施方案中,可以将至少一种此处描述的抗 IL-21R 抗体与至少一种细胞因子和 / 或生长拮抗剂共配制和 / 或共施用。所述拮抗剂可包括可溶性受体、肽抑制剂、小分子、配体融合物、抗体(结合细胞因子或生长因子或其受体或者其它细胞表面分子)和“抗炎性细胞因子”及其激动剂。

[0150] 能用于与此处描述的抗 IL-21R 抗体组合的试剂的非限制性例子包括但不限于,至少一种白细胞介素(例如,IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18 和 IL-22)、细胞因子(例如,TNF α 、LT、EMAP-II 和 GM-CSF) 和生长因子(例如,FGF 和 PDGF) 的拮抗剂。所述试剂也可包括但不限于至少一种白细胞介素、细胞因子和生长因子的受体的拮抗剂。抗 IL-21R 抗体也可与细胞表面分子例如 CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80 (B7. 1)、CD86 (B7. 2)、CD90 或其配体(例如,CD154(gp39, CD40L)) 或 LFA-1/ICAM-1 和 VLA-4/VCAM-1 的抑制剂组合(Yusuf-Makagianser 等人(2002) Med Res Rev22(2):146-67))。可用于与此处描述的抗 IL-21R 抗体组合的拮抗剂可包括 IL-1、IL-2、TNF α 、IL-15、IL-17、IL-18、IL-22 和其受体的拮抗剂。

[0151] 这些试剂的例子包括 IL-12 拮抗剂(例如结合 IL-12 的抗体(参见例如, W000/56772, Genetics Institute/BASF))、IL-12 受体抑制剂(例如 IL-12 受体的抗体) 和可溶性 IL-12 受体及其片段。IL-15 拮抗剂的例子包括抗 IL-15 或其受体的抗体、IL-15 受体的可溶性片段和 IL-15 结合蛋白。IL-18 拮抗剂的例子包括 IL-18 的抗体、IL-18 受体的可溶性片段和 IL-18 结合蛋白(IL-18BP, Mallet 等人(2001) Circ. Res. 28)。IL-1 拮抗剂的例子包括白细胞介素-1-转化酶(ICE)抑制剂(例如 Vx740)、IL-1 拮抗剂(例如, IL-1RA (ANIKINRA, AMGEN))、sIL-1RII (Immunex) 和抗 IL-1 受体抗体。

[0152] TNF 拮抗剂的例子包括 TNF(例如人 TNF α) 的抗体,例如 D2E7(人抗 TNF α 抗体, 美国 6, 258, 562, Humira[™], BASF); CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356(人源化的抗 TNF α 抗体, Celltech/Pharmacia); cA2(嵌合型抗 TNF α 抗体, Remicade[™], Centocor); 和抗 TNF 抗体片段(例如, CPD870)。其它例子包括可溶性 TNF 受体(例如,人 p55 或 p75) 片段和衍生物,例如 p55kdTNFR-IgG(55kd TNF 受体-IgG 融合蛋白, Lenercept[™]) 和 75kdTNFR-IgG(75kd TNF 受体-IgG 融合蛋白, Enbrel[™], Immunex, 参见例如 Arthritis & Rheumatism(1994) 第 37 卷, S295; J. Invest. Med. (1996) 第 44 卷, 235A)。进一步的例子包括酶拮抗剂(例如, TNF α 转化酶抑制剂(TACE), 如 α -磺酰基异羟肟酸衍生物(W001/55112) 或 N-羟甲酰胺抑制剂(GW 3333, -005, 或 -022) 和 TNF-bp/s-TNFR(可溶性 TNF 结合蛋白, 参见例如 Arthritis &

Rheumatism(1996) 第 39 卷, No. 9(增刊), S284;和 Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. (1995) 第 268 卷, 第 37-42 页)。TNF 拮抗剂可以是可溶性 TNF 受体(例如, 人 p55 或 p75) 片段和衍生物, 例如 75kdTNFR-IgG;和 TNF α 转化酶 (TACE) 抑制剂。

[0153] 在其他实施方案中, 此处描述的抗 IL-21R 抗体可以与至少一种下列药物组合施用, 所述药物是: IL-13 拮抗剂, 例如可溶性 IL-13 受体和 / 或抗 IL-13 抗体;和 IL-2 拮抗剂, 例如 IL-2 融合蛋白(例如, DAB 486-IL-2 和 / 或 DAB 389-IL-2, Seragen, 参见例如 Arthritis & Rheumatism(1995) 第 36 卷, 1223) 和抗 IL-2R 抗体(例如, 抗 Tac(人源化抗体, Protein Design Labs, 参见 Cancer Res. 1990 Mar 1;50(5):1495-502))。另一组合包括与非损耗性抗 CD4 抑制剂例如 IDEC-CE9.1/SB 210396(抗 CD4 抗体, IDEC/SmithKline) 组合的抗 IL-21R 抗体。其它组合包括具有 CD80(B7.1) 和 CD86(B7.2) 共刺激途径拮抗剂(例如抗体、可溶性受体或拮抗性配体)的抗 IL-21R;P 选择蛋白糖蛋白配体 (PSGL);和抗炎性细胞因子和其激动剂(例如, 抗体)组合的抗 IL-21R 抗体。抗炎性细胞因子包括 IL-4(DNAX/Schering);IL-10(SCH 52000, 重组 IL-10, DNAX/Schering);IL-13;和 TGF。

[0154] 在其它实施方案中, 至少一种抗 IL-21R 可与至少一种抗炎性药物、免疫抑制剂、代谢抑制剂和酶抑制剂共配制和 / 或共施用。可与此处描述的 IL-21 拮抗剂组合使用的药物或抑制剂的非限制性例子包括但不限于下列药物中的至少一种: 非类固醇抗炎性药物 (NSAID)(例如布洛芬, 替尼达普(参见例如, Arthritis & Rheumatism(1996) 第 39 卷, No. 9(增刊), S280)、萘普生(参见例如, NeuroReport(1996) 第 7 卷, 第 1209-1213 页)、美洛昔康、吡罗昔康、双氯芬酸和吲哚美辛);柳氮磺吡啶(参见例如, Arthritis & Rheumatism(1996) 第 39 卷, No. 9(增刊), S281);皮质类固醇(例如泼尼松龙);细胞因子抑制性抗炎药物 (CSAID);和核苷酸生物合成抑制剂(例如嘌呤生物合成抑制剂(例如, 叶酸拮抗剂例如甲氨蝶呤)和嘧啶生物合成抑制剂(例如, 二氢乳清酸脱氢酶 (DHODH) 抑制剂例如来氟米特(参见例如, Arthritis & Rheumatism(1996) 第 39 卷, No. 9(增刊), S131;Inflammation Research(1996) 第 45 卷, 第 103-107 页))。用于与 IL-21/IL-21R 拮抗剂组合使用的治疗性试剂可包括 NSAID、CSAID、DHODH 抑制剂(例如来氟米特)和叶酸拮抗剂(例如甲氨蝶呤)。

[0155] 另外的抑制剂的例子包括下列药物中的至少一种: 皮质类固醇(口服、吸入和局部注射);免疫抑制剂(例如环孢素和他克莫司 (FK-506));mTOR 抑制剂(例如西罗莫司(雷帕霉素)或雷帕霉素衍生物(雷帕霉素酯衍生物例如 CCI-779(Elit. L. (2002) Current Opinion Investig. Drugs 3(8):1249-53;Huang, S. 等人 (2002) Current Opinion Investig. Drugs 3(2):295-304));干扰前炎性 (proinflammatory) 细胞因子例如 TNF α 和 IL-1 信号传导的试剂(例如, IRAK、NIK、IKK、p38 或 MAP 激酶抑制剂);COX2 抑制剂(例如, 塞来考昔和其变体 (MK-966), 参见例如, Arthritis & Rheumatism(1996) 第 39 卷, No. 9(增刊), S81);磷酸二酯酶抑制剂(例如 R973401, 参见例如, Arthritis & Rheumatism(1996) 第 39 卷, No. 9(增刊), S282);磷脂酶抑制剂(例如, 胞质磷脂酶 2 抑制剂 (cPLA2) 例如三氟甲基酮类似物(美国 6, 350, 892));血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 的抑制剂;VEGF 受体的抑制剂;和血管发生的抑制剂。用于与抗 IL-21R 抗体组合使用的治疗性试剂可包括免疫抑制剂(例如环孢素和他克莫司 (FK-506));和 mTOR 抑制剂(例如西罗莫司(雷帕霉素)或雷帕霉素衍生物(例如, 雷帕霉素酯衍生物例如 CCI-779));COX2 抑

制剂（例如，塞来考昔和其变体）；和磷脂酶抑制剂（例如，胞质磷脂酶 2 抑制剂（cPLA2）（例如，三氟甲基酮类似物））。

[0156] 可与至少一种抗 IL-21R 抗体共施用和 / 或共配制的治疗性试剂的例子包括但不限于下列药物中的至少一种：TNF 拮抗剂（例如抗 TNF 抗体）；TNF 受体（例如，人 p55 或 p75）的可溶性片段和其衍生物（例如 p55kdTNFR-IgG(55kd TNF 受体 -IgG 融合蛋白，Lenercept™) 和 75kdTNFR-IgG(75kd TNF 受体 -IgG 融合蛋白，Enbrel™)）；TNF 酶拮抗剂（例如 TACE 抑制剂）；IL-12、IL-15、IL-17、IL-18 和 IL-22 的拮抗剂；T 细胞和 B 细胞损耗性试剂（例如抗 CD4 或抗 CD22 抗体）；小分子抑制剂（例如甲氨蝶呤和来氟米特）；西罗莫司（雷帕霉素）和其类似物（例如 CCI-779）；COX2 和 cPLA2 抑制剂；p38、TPL-2、Mk-2 和 NF κ B 抑制剂；RAGE 和可溶性 RAGE；P 选择蛋白和 PSGL-1 抑制剂（例如抗体和小分子抑制剂）；以及雌激素受体 - β (ERB) 激动剂和 ERB-NF κ b 拮抗剂。可与至少一种抗 IL-21R 抗体共施用和 / 或配制的治疗性试剂可包括下列药物中的至少一种：TNF 受体（例如，人 p55 或 p75）的可溶性片段例如 75kdTNFR-IgG(75kd TNF 受体 -IgG 融合蛋白，Enbrel™)；甲氨蝶呤；来氟米特；和西罗莫司（雷帕霉素）及其类似物（例如 CCI-779）。

[0157] 此处公开的抗 IL-21R 抗体与其它治疗性试剂组合使用来治疗下面将进一步详细讨论的特定免疫疾病。

[0158] 用于治疗关节炎病症（例如，类风湿性关节炎、炎性关节炎、类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣性关节炎）的并且可与抗 IL-21R 抗体组合使用的试剂的非限制性例子包括下列药物中的至少一种：TNF 拮抗剂（例如抗 TNF 抗体）；TNF 受体（例如，人 p55 或 p75）的可溶性片段和其衍生物（例如 p55kdTNFR-IgG(55kdTNF 受体 -IgG 融合蛋白，Lenercept™) 和 75kdTNFR-IgG(75kd TNF 受体 -IgG 融合蛋白，Enbrel™)）；TNF 酶拮抗剂（例如 TACE 抑制剂）；IL-12、IL-15、IL-17、IL-18 和 IL-22 的拮抗剂；T 细胞和 B 细胞损耗性试剂（例如抗 CD4 或抗 CD22 抗体）；小分子抑制剂（例如甲氨蝶呤和来氟米特）；西罗莫司（雷帕霉素）和其类似物（例如 CCI-779）；COX2 和 cPLA2 抑制剂；NSAID；p38、TPL-2、Mk-2 和 NF κ B 抑制剂；RAGE 和可溶性 RAGE；P 选择蛋白或 PSGL-1 抑制剂（例如小分子抑制剂和抗体）；雌激素受体 - β (ERB) 激动剂和 ERB-NF κ b 拮抗剂。可与至少一种 IL-21/IL-21R 拮抗剂共施用和 / 或共配制的治疗性试剂可包括下列药物中的至少一种：TNF 受体（例如，人 p55 或 p75）的可溶性片段例如 75kdTNFR-IgG(75kd TNF 受体 -IgG 融合蛋白，Enbrel™)；甲氨蝶呤；来氟米特；和西罗莫司（雷帕霉素）或其类似物（例如 CCI-779）。

[0159] 用于治疗多发性硬化的并且可与抗 IL-21R 抗体组合的试剂的非限制性例子包括干扰素 - β （例如，IFN β -1a 和 IFN β -1b）、copaxone、皮质类固醇、IL-1 抑制剂、TNF 抑制剂、CD40 配体的抗体、CD80 的抗体和 IL-12 拮抗剂。

[0160] 用于治疗炎性肠病或克罗恩病的并且可与抗 IL-21R 抗体组合的试剂的非限制性例子包括 budenoside；表皮生长因子；皮质类固醇；环孢素；柳氮磺吡啶；氨基水杨酸盐；6- 巯基嘌呤；硫唑嘌呤；甲硝唑；脂肪氧化酶抑制剂；5- 氨基水杨酸；奥沙拉秦；巴柳氮；抗氧化剂；血栓烷抑制剂；IL-1 受体拮抗剂；抗 IL-1 单克隆抗体；抗 IL-6 单克隆抗体；生长因子；弹性蛋白酶抑制剂；吡啶基 - 咪唑化合物；描述的 TNF 拮抗剂；IL-4、IL-10、IL-13 和 / 或 TGF β 或其激动剂（例如，激动剂抗体）；IL-11；泼尼松龙、地塞米松或布地奈德的葡糖苷酸或葡聚糖缀合的前体药物；ICAM-1 反义硫代磷酸寡脱氧核苷酸 (ISIS 2302；Isis

Pharmaceuticals, Inc.) ;可溶性互补受体 1(TP10 ;T Cell Sciences, Inc.) ;缓效美沙拉秦 ;甲氨蝶呤 ;血小板活化因子 (PAF) 的拮抗剂 ;环丙沙星 ;和利多卡因。

[0161] 在其他实施方案中,抗 IL-21R 抗体可与至少一个旨在其它涉及调节免疫应答例如移植排斥或移植物抗宿主疾病的目的的抗体组合使用。用于治疗免疫应答的并且可与本发明的 IL-21/IL-21R 拮抗剂组合的试剂的非限制性例子包括下列:抗细胞表面分子的抗体,包括但不限于 CD25(IL-2 受体 α)、CD11a(LFA-1)、CD54(ICAM-1)、CD4、CD45、CD28/CTLA4、CD80(B7-1)、CD86(B7-2) 或其组合。在另一实施方案中,抗 IL-21R 抗体与至少一种通用免疫抑制剂例如环孢素 A 或 FK506 组合使用。

[0162] 因而,本发明的另一方面涉及用于进行抗 IL-21R 抗体与其它治疗性试剂组合使用的试剂盒。在一个实施方案中,所述试剂盒包括至少一种配制在药用载体中的抗 IL-21R 抗体和至少一种治疗性试剂,所述治疗性试剂以合适的方式配制在一种或多种分开的药物制剂中。

[0163] 诊断用途

[0164] 根据本发明的抗体也可用于检测 IL-21R 在生物样品中的存在。通过将蛋白质的存在或水平与医学状况联系起来,本领域技术人员可诊断出相关的医学状况。例如,经刺激的 T 细胞会增加其 IL-21R 的表达,并且通常在关节中表达高浓度的 IL-21R 的 T 细胞可能表示关节炎和可能还有关节炎。可通过本发明的抗体诊断的示例性的医学状况包括多发性硬化、类风湿性关节炎和移植排斥。

[0165] 基于抗体的检测方法在本领域是众所周知的,并且包括 ELISA、放射免疫测定法、免疫印迹法、Western 印迹法、流式细胞测量术、免疫荧光、免疫沉淀和其它相关技术。抗体可由整合有至少一种这些检测 IL-21R 的方法的诊断试剂盒提供。所述试剂盒可含有其它成分、包装、说明书或其它帮助检测所述蛋白质和使用所述试剂盒的材料。

[0166] 抗体可用可检测的标记进行修饰,所述可检测的标记包括配体基团(例如,生物素)、荧光团和发色团、放射性同位素、电子致密试剂或酶。酶可通过其活性进行检测。例如,辣根氧化物酶可通过其将四甲基联苯胺(TMB)转变成蓝色色素的能力进行检测,用分光光度计进行定量检测。其它合适的结合配偶体包括生物素和抗生物素蛋白、IgG 和 A 蛋白,和其它本领域已知的受体-配体对。

[0167] 也可将抗体功能性地连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其它)到至少一个其他分子实体上,除了其他以外,例如另一抗体(例如,双特异性或多特异性抗体)、毒素、放射性同位素、细胞毒剂或细胞抑制剂或其它。其它的改变和可能性对本领域技术人员来说是显而易见的,并且认为它们在本发明范围内是等价的。

[0168] 药物组合物和施用方法

[0169] 本发明的某些实施方案包括包含公开的抗体的组合物。所述组合物可适合于药物使用和对患者施用。所述组合物包含本发明的抗体和药物赋形剂。在此处使用时,“药物赋形剂”包括与药物施用相容的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和真菌剂、等渗和吸收延缓试剂等。这些对于药物活性物质的试剂的用途在本领域是众所周知的。组合物也可以含有其它提供补充、附加或增强的治疗功能的活性化合物。所述药物组合物也可以连同施用说明书一起置于容器、包装或分配器中。

[0170] 配制本发明的药物组合物以与其想要的施用途径相容。进行施用的方法对本领域

技术人员来说是已知的。也可以制造新的组合物,该新的组合物可进行局部或口服施用,或有可能能够穿过粘膜传递。例如,施用可以是静脉内、腹膜内、肌内、腔内、皮下或经皮肤的施用。

[0171] 用于皮内或皮下应用的溶液或悬浮液通常包括至少一种下列成分:灭菌的稀释剂例如水、盐溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成的溶剂;抗菌剂例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂例如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲液例如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和涨度剂(tonicity)例如氯化钠或葡萄糖。pH可用酸或碱调节。这些制剂可封装于安瓿、一次性注射器或多剂小瓶中。

[0172] 用于静脉内施用的溶液或悬浮液包括载体例如生理学盐水、抑菌水、Cremophor ELTM(BASF, Parsippany, NJ)、乙醇或多元醇。在所有情况下,所述组合物必需灭菌,并且是流动的以便注射。通常使用卵磷脂或表面活性剂可获得合适的流动性。所述组合物在生产 and 贮存的条件下也必需稳定。微生物的防止可用抗菌剂和抗真菌试剂例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸和硫柳汞等获得。在许多情况下,等渗试剂(糖类)、多元醇(甘露醇和山梨醇)或氯化钠可包含于所述组合物中。通过加入延缓吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶可实现对所述组合物的延长的吸收。

[0173] 口服组合物包括惰性稀释剂或可食用的载体。所述组合物可封装在明胶中或挤压成片剂。为了口服施用的目的,可将抗体与赋形剂整合并置入片剂、锭剂或胶囊中。药物相容性粘合试剂或佐剂材料可包含于所述组合物中。片剂、锭剂和胶囊可含有(1)粘合剂例如微晶纤维素、黄耆胶或明胶;(2)赋形剂例如淀粉或乳糖;(3)崩解剂例如褐藻酸、Primogel 或玉米淀粉;(4)润滑剂例如硬脂酸镁;(5)助流剂例如胶体二氧化硅;或(6)增甜剂或调味剂。

[0174] 组合物也可以通过经粘膜或经皮肤途径施用。例如,含有Fc部分的抗体有可能能够穿过肠、嘴或肺的粘膜(通过Fc受体)。通过使用锭剂、鼻喷雾剂、吸入剂或栓剂可进行经粘膜施用。也可通过使用含有本领域已知的软膏、药膏、凝胶或乳膏的组合物进行经皮肤施用。对于经粘膜或经皮肤施用,使用适合于待穿过的屏障的渗透剂。对于通过吸入的施用,抗体通过来自加压的容器或分配器的气雾剂喷雾进行递送,所述容器或分配器包含推进剂(例如,液体或气体)或喷雾器。

[0175] 在某些实施方案中,用载体制备本发明抗体以防止抗体从体内快速消除。经常使用生物可降解聚合物(例如,乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯(polyorthoester)、聚乳酸)。本领域技术人员已知用于制备这类制剂的方法。脂质体悬浊液也可用作药物上可接受的载体。根据本领域已知的已建立的方法可制备脂质体(美国专利号 4,522,811)。

[0176] 本发明的抗体或抗体组合物可以以所述的治疗有效量进行施用。治疗有效量可根据受试者的年龄、状态、性别和医学状况的严重程度而变化。医生根据临床指标可确定合适的剂量。可以以大丸药剂给药来提供抗体或组合物以最大化抗体的循环水平而获取最长的作用时间。也可在大丸药剂给药后使用连续输注。

[0177] 在此处使用时,术语“受试者”是想要包括人和非人类动物。受试者可包括具有以表达 IL-21R 的细胞例如癌细胞或免疫细胞为特征的疾病的病人。本发明的术语“非人类动物”包括所有的脊椎动物、例如非人类灵长类动物、绵羊、狗、奶牛、鸡、两栖动物、爬行动物

等。

[0178] 可对受试者施用的剂量范围的例子可选自： $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $20\text{mg}/\text{kg}$ 、 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、 $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、 $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、 $500\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $1\text{mg}/\text{kg}$ 。

[0179] 以剂量单位形式配制组合物对方便施用和剂量的一致性可以是有利的。此处所使用的剂量单位形式是指适合于患者的物理上分开的单位。每个剂量单位包含预先确定量的与载体缔合的抗体，所述抗体量经计算可产生治疗效果。剂量单位由所述抗体的特征和要达到的特定治疗效果来确定。

[0180] 通过对细胞培养物或实验动物进行标准的药理学流程，例如测定 LD_{50} （50%群体的致死剂量）和 ED_{50} （50%群体的治疗有效剂量），可确定所述组合物的毒性和治疗功效。毒性和治疗功效之间的剂量比例就是治疗指数，其可表示为 $\text{LD}_{50}/\text{ED}_{50}$ 。表现大的治疗指数的抗体可能毒性较小和/或治疗功效较高。

[0181] 获自细胞培养物测定法和动物研究的数据可用来制定人使用的剂量范围。这些化合物的剂量可位于血液中循环抗体浓度的范围（包括具有较少或没有毒性的 ED_{50} ）之内。所述剂量可在这种由所使用的剂量组合物形式和施用途径来确定的范围内变动。对于任何在本发明中使用的抗体，开始时通过使用细胞培养物测定法可对治疗有效剂量进行估计。在动物模型中可制定一个剂量以达到包括 IC_{50} （即，达到症状的半最大抑制时的抗体浓度）的循环血浆浓度范围。任何特定剂量的效果可通过合适的生物学测定法进行监控。合适的生物学测定法的例子包括DNA复制测定法、基于转录的测定法、IL-21R/IL-21结合测定法和其它免疫测定法。

[0182] 下列实施无论如何不是限定本发明的范围。本领域技术人员会认识到，在不改变本发明的精神和范围的情况下可进行大量的修改和变化。这种修改和变化包括在本发明的范围内。本申请中所引用的所有文献、专利和出版的专利申请的全部内容被引用作为参考。

实施例

[0183] 实施例 1：MUF 和 MU11 抗 IL-21R scFv 的选择

[0184] 使用 scFv 噬菌粒文库筛选对于人 IL-21R 特异的抗体，所述 scFv 噬菌粒文库是由 Vaughan 等人（(1996) Nature Biotech., 14:309-314）描述的 1.38×10^{10} 文库的扩增版。用可溶性 IL-21R 融合蛋白或对照融合蛋白（ $5\text{--}20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ，于磷酸缓冲盐溶液（PBS）中）涂覆微量滴定板的小孔，并在 4°C 下孵育过夜。用 PBS 洗涤小孔，然后在 MPBS（3% 的奶粉溶于 PBS）中于 37°C 下封闭 1 小时。将用 MPBS 封闭 1 小时的纯化的噬菌体（ 10^{12} 转导单位）加入到对照融合蛋白涂覆的小孔中并孵育 1 小时。然后将未结合的噬菌体转移到 IL-21R 融合蛋白小孔中并孵育 1 小时。用 PBST（含有 0.1% v/v Tween 20 的 PBS）洗涤小孔 5 次，然后用 PBS 洗涤 5 次。将结合的噬菌体洗脱，并用来感染呈指数生长的大肠杆菌 TG1。将感染的细胞在 2TY 液体培养中于 37°C 下培养 1 小时，然后在 2TYAG 板上划线并于 30°C 下孵育过夜。第二天，将菌落转移到 10ml 加有 15% 甘油的 2TY 液体培养基中，并于 -70°C 下贮存。以后，将来自第一轮选择的菌落融解，并用辅助噬菌体超感染以便为第二轮选择拯救出（产生）表达 scFv 抗体的噬菌体。

[0185] 实施例 2：R18 和 19F5 抗 IL-21R scFv 的选择

[0186] 使用 200nM 生物素化的人 IL-21R 融合蛋白 (bio. hIL21R) (Wyeth, Giralda Farms, NJ) 溶液分离抗 IL21R scFv (R18)。如上面实施例 1 中所描述的, 用 MPBS 和 125g/ml 对照融合蛋白封闭纯化的 scFv 噬菌体 (10^{12} tu)。将生物素化的 IL-21R 融合蛋白加入到经封闭的噬菌体中至终浓度为 200nM, 并在室温下孵育 1 小时。将噬菌体 / 抗原加入到 75 μ l 已用 1ml 3% MPBS 在室温下封闭 90 分钟的 Dynal M289 链霉抗生物素蛋白磁珠 (Dynal Biotech Inc., Lake Success, NY) 中。将所述混合物在室温下以不断混合的方式孵育 15 分钟。使用磁性支架捕获磁珠, 并用 1ml PBST 洗涤 5 次, 接着用 PBS 洗涤 3 次。用 500 μ l 10 μ g/ml 存在于 0.2M pH7.0 的磷酸钠缓冲液中的胰蛋白酶洗脱下结合的噬菌体, 并在 37°C 下孵育 30 分钟。如上所述将洗脱下的噬菌体用来感染 10ml 呈指数生长的大肠杆菌 TG-1 细胞。在三轮选择后分离出 scFv 克隆。

[0187] 通过加入 1mM IPTG 到呈指数生长的培养物中并在 30°C 下孵育过夜来诱导 scFv 产生。就抑制人 IL-21R 融合蛋白与人 IL-21-FLAG 标记的蛋白质结合的能力来筛选含有 scFv 的粗制周质提取物。简而言之, 将抗 FLAG 抗体固定在塑料上并用来捕获 FLAG 标记的人 IL-21 蛋白。用针对 IL-21R 融合蛋白的钼标记的抗体来检测人 IL-21R 融合蛋白的结合, 并用 DELFIA 试剂盒 (PerkinElmer, Boston, MA) 检测时间分辨荧光。纯化的 scFv R18 克隆就抑制 IL-21R 融合蛋白与 IL-21-FLAG 标记的蛋白结合来说展现出 770nM 的 IC_{50} 值。

[0188] 通过用于 R18 的选择方法分离抗 IL21R 克隆 19F5, 除了在第三轮选择中使用 50nM 人 IL-21R 融合蛋白。

[0189] 实施例 3: 18A5 和 18G4 抗 IL-21R scFv 的选择

[0190] 通过在溶液中选择表达 IL-21R 的细胞系和 IL-21R 融合蛋白来分离抗 IL21R scFv (18A5 和 18G4)。使用标准的组织培养方法培养在细胞表面上表达人 IL-21R 的转染的 hBaf3Mu-1 细胞 (Wyeth, Giralda Farms, NJ)。用 1×10^8 个未感染的 Baf3 细胞在 MPBS 中于室温下封闭纯化的 scFv 噬菌体 (10^{12} tu) 1 小时。

[0191] 将经封闭的噬菌体加入到已在 MPBS 中预孵育 1 小时的 1×10^7 个 hBaf3Mu-1 细胞中。然后在室温下以不断混合的方式孵育 1 小时。然后用 PBST 洗涤 hBaf3Mu-1 细胞 6 次。使用 10 μ g/ml 存在于 0.2M pH7.0 的磷酸钠缓冲液中的胰蛋白酶从细胞中洗脱下特异性地结合的噬菌体, 并于 37°C 下摇动孵育 30 分钟。如上所述, 将洗脱下的噬菌体上清液用于感染大肠杆菌 TG-1 细胞。

[0192] 如上所述产生用于第二轮选择的表达 scFv 的噬菌体。用 MPBS 和 125 μ g/ml 对照融合蛋白封闭噬菌体。根据对于 R18 所描述的选择方法在溶液中用生物素化的人 IL-21R 融合蛋白 (Wyeth) 进行选择, 除了在用 1ml MPBS/0.1% (v/v) Tween 20 洗涤磁珠 5 次后用 PBS 洗涤 3 次。

[0193] 如上所述, 接着采用使用 hBaf3Mu-1 细胞的筛选方法进一步对表达 scFv 抗体的噬菌体颗粒进行筛选。

[0194] 实施例 4: CP5G2 抗 IL-21R scFv 的选择

[0195] 通过对用六组氨酸 (hexahistidine) 和 Flag 亲和标记所标记的鼠科动物 IL-21R (hIL21R. His. Flag) (Wyeth, Giralda Farms, NJ) 进行筛选来分离克隆 CP5G2。用加入了 30 μ l 抗 Flag 琼脂糖小珠的 MPBS 在室温下封闭纯化的 scFv 噬菌体 (10^{12} tu) 1 小时。以 MPBS 中的 25nM 的终浓度将 hIL-21R. His. Flag 加入到经封闭的噬菌体中, 并在室温下孵

育 1 小时。然后将文库 / 抗原混合物加入到 100 μ l 已用 MPBS 在室温下封闭了 2 小时的抗 Flag 琼脂糖小珠中,用 PBS 洗涤 3 次,并进一步混合孵育 30 分钟。如上所述,用 PBST 洗涤小珠 4 次,接着用 PBS 洗涤 4 次,并用 0.5 μ g/ml 存在于 50mM Tris, pH8.0, 1mM CaCl_2 中的胰蛋白酶将噬菌体从小珠中洗脱出来。通过离心收集小珠。如上所述,将洗脱下的噬菌体用于感染 10ml 大肠杆菌 TG-1 细胞。同样如上所述,进行第二轮可溶性筛选。

[0196] 将菌落挑入含有 100 μ l 2TYAG 的 96 孔板中。如上所述产生含有 scFv 的粗制周质提取物,除了所使用的缓冲液含有 20% (w/v) 蔗糖, 50mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EDTA。在 96 孔微量滴定板测定法中,就抑制 16ng/ml 生物素化的鼠科动物 IL-21 (bio.mIL21) 与固定在塑料上的鼠科动物 IL-21R 蛋白结合的能力来筛选含有 scFv 的粗制提取物。通过采用使用 DELFIA 试剂盒 (PerkinElmer, Boston, MA) 检测的 TRF 和铕标记的链霉抗生物素蛋白检测 bio.mIL21 的结合。

[0197] 在上述测定法中,纯化的 CP5G2 scFv 表现出抑制 IL-21 与 IL-21R 结合的 590nM 的 IC_{50} 值。

[0198] 实施例 5: 鉴定来自 MUF 和 MU11 噬菌体克隆的 scFv

[0199] 为确定针对 IL-21R 的 scFv 的特异性,进行抗 IL-21R 融合蛋白的噬菌体 ELISA。将来自第二轮筛选的单个的 TG1 细胞菌落转移至含有 100 μ l 2TYAG 培养基的微量滴定孔中。将 M13K07 辅助噬菌体 (10moi) 加入到呈指数生长的 TG1 培养物中,并将所述样品在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时。将板离心并移去上清液,然后将所剩下的沉淀在 100 μ l 2TYAG 中悬浮并于 30 $^{\circ}$ C 下摇动孵育过夜。第二天,将板离心并将噬菌体上清液转移到新的微量滴定板小孔中。在 ELISA 之前用 MPBS 封闭噬菌体。

[0200] 用 IL-21R 融合蛋白或对照融合蛋白 (0.5-2.5 μ g/ml) 涂覆微量滴定板的小孔并在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。第二天,移走融合蛋白溶液,并用 MPBS 封闭小孔 1 小时。用 PBS 洗涤小孔,接着加入 50 μ l 的经封闭的噬菌体。将板孵育 1 小时,然后用 PBST 洗涤 3 次并用 PBS 洗涤 3 次。向小孔中加入抗 MB-HRP 缀合物 (Pharmacia, Peapack, NJ), 并将样品孵育 1 小时。用 PBST 洗涤 3 次小孔并用 PBS 洗涤 3 次。在小孔中加入 TMB 并孵育样品直至产生颜色。用 25 μ l 0.5M H_2SO_4 终止反应。通过使用微量滴定板读取器在 450nm 读取吸光度来测量颜色信号。两个噬菌体克隆显示与 IL-21R 融合蛋白的特异性结合而不与对照融合蛋白结合,在本申请中将这两个克隆称为 MUF 和 MU11 噬菌体克隆。

[0201] 将单个含有 MUF 和 MU11 噬菌体克隆的 TG-1 克隆在 2TYAG 平板上划线并于 30 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。通过使用 pCANTAB6 载体特异性寡核苷酸,用 PCR 对所述噬菌体的 V_H 和 V_L 区域进行扩增,并进行测序。数据库搜索显示, MUF 噬菌体克隆的 V_L 区域来自 λ 链,而 MU11 噬菌体克隆的 V_L 区域来自 κ 链。

[0202] 实施例 6: 将 scFv 转变成 IgG

[0203] 使用克隆特异性引物通过 PCR 对来自 MUF 和 MU11 噬菌体克隆的 V_H 和 V_L 区域进行扩增。用限制性酶消化所述 PCR 产物并亚克隆入合适的载体 (参见实施例 2), 所述载体含有人 IgG_1 重链恒定结构域 (Takahashi 等人 (1982) Cell 29, 671) 或人 λ 轻链恒定结构域或人 κ 轻链恒定结构域 (Hieter 等人 (1982) Nature 294:536)。所述四个构建体编码在本申请中称作 MUF 重链、MUF 轻链、MU11 重链和 MU11 轻链的多肽。

[0204] 对含有 MUF 重链、MUF 轻链、MU11 重链和 MU11 轻链的载体进行制备、测序并使用标

准技术将其用于感染 HEK293 或 CHO 细胞。表达 MUF 重链和轻链的细胞产生 MUF 抗体,所述 MUF 抗体在本申请中称为“MUF”,而表达 MU11 重链和轻链的细胞产生 MU11 抗体,所述 MU11 抗体在本申请中称为“MU11”。使用 A 蛋白 Sepharose (Pharmacia) 纯化分泌的抗体,接着用 PBS 进行透析。

[0205] 如下确定抗体的结合特异性:用 2.5 μ g/ml 的 IL-21R 融合蛋白涂覆 ELISA 板过夜。用 PBSB (PBS+1% 牛血清白蛋白) 洗涤板,然后于 25°C 下用各种浓度的 MUF 或 MU11 孵育 2 小时。洗涤板,接着加入饱和量的 HRP 缀合的山羊抗人抗体。将板于 25°C 下孵育 1 小时,接着用 PBSB 洗涤并用 TMB 显色。图 1A 展示了通过 ELISA 获得的结果的例子。

[0206] 通过细胞表面染色进一步确定所述抗体的结合特异性。用纯化的或生物素化的 MUF 或 MU11 (1mg/ml) 结合人 IL-21R 转导的 TF-1 细胞。将细胞在冰上孵育 30 分钟,用 PBSB 洗涤,接着悬浮于含有 PE 缀合的抗人 IgG 抗体或 PE 缀合的抗生物素蛋白的溶液中。将细胞在冰上孵育 30 分钟,洗涤,接着在 FACSscan 上进行分析。所述结果呈现于图 1B 中。类似地用 MUF 对纯化的小鼠 B 细胞进行染色,结果呈现于图 1C 中。

[0207] 实施例 7: MUF 阻断 IL-21 与 IL-21R 的结合

[0208] 施行抑制测定法以估测所述抗体阻断 IL-21 与 IL-21R 结合的能力。以实施例 3 中所描述的并具有下列改变的方法进行 ELISA。在用 MUF 或 MU11 于 25°C 下孵育 2 小时后,加入生物素缀合的 IL-21 (1 μ g/ml),并将所述样品于 25°C 下孵育 1 小时。洗涤后,加入饱和量的抗生物素蛋白-HRP,并将样品于 25°C 下进一步孵育 1 小时。用 PBSB 洗涤小孔,并将样品用 TMB 进行显色。结果显示于图 2 中。在这些条件下,MUF 阻断 IL-21 与 IL-21R 的结合,而 MU11 却不阻断 IL-21 与 IL-21R 的结合。这些数据表示 MUF 和 MU11 识别 IL-21R 的不同抗原决定部位

[0209] 实施例 8: MUF 和 MU11 减弱 T 细胞应答

[0210] 施行增殖测定法以估测所述抗体阻断 IL-21 介导的 T 细胞增殖的能力。用 PHA (植物凝集素) 和人 IL-21 刺激人 CD4+T 细胞 (5x10⁴ 个细胞/孔)。将 COS 细胞培养基 (COS CM) 中的 IL-21 以各种浓度加入到不同的样品中。在指定的样品中,加入 MUF、MU11 或人 IgG₁ 同种型对照。72 小时后,加入 ³H- 胸苷,并通过使用 LKB 1205 液闪计数器测量整合的放射活性来测量细胞的增殖。如图 3A 中所显示的,IL-21 增加了 PHA- 刺激的 T 细胞的增殖。在大约 1 : 500 和 1 : 10,000 之间的范围内,MUF 的加入阻断了 IL-21 增加增殖的能力。以更高剂量的 IL-21 可克服 MUF 的阻断。MU11 或同种型对照抗体的加入不会显著影响 IL-21 促进的人 T 细胞的增殖。

[0211] 在图 3B 中,用 PLP 肽 (1 μ g/ml) 和 SJL 小鼠脾细胞刺激 PLP- 特异性小鼠 CD4+T 细胞系。如 X 轴上所示对 COS 细胞培养基 (COS IL-21) 中的 IL-21 进行滴定。“Cos Mock”是指不含 IL-21 的 COS 培养基。在指定的样品中,加入 MU11 (1 μ g/ml)。72 小时后,加入 ³H- 胸苷,并通过整合的放射活性来测量细胞的增殖。如图 3B 所显示的,IL-21 增加了受刺激的小鼠 T 细胞的增殖。加入 MU11 阻断了 IL-21 增加小鼠 CD4+T 细胞增殖的能力。这些数据显示 MU11 起着非竞争性抑制剂的作用:其阻断 IL-21 增加增殖的能力,即使其不阻碍 IL-21 与受体结合。

[0212] 在图 3C 中,用包被有抗 CD3 抗体的甲苯磺酰基小珠 (Dyna1, Great Neck, NY) 刺激纯化的 CD8+ 小鼠 T 细胞。如 X 轴上所示,对 COS 细胞培养基 (COS s/n) 中的 IL-21 进行

滴定。将标记为“无抗体”的样品用作对照。在指定的样品中,以标明的浓度加入 MU11。72 小时后,加入 ^3H - 胸苷,并通过整合的放射活性来测量细胞的增殖。如图 3C 所显示的, MU11 的加入以剂量依赖方式阻断了 IL-21 增加 CD8+T 细胞增殖的能力。

[0213] 实施例 9 :通过 scFv 和 IgG 抑制细胞增殖

[0214] 在基于细胞的测定法中检测本发明的抗体对 IL-21R 的拮抗作用。在一个这样的实验中,在基于细胞的测定法中对如实施例 1-3 所述分离得到的各种 scFv 噬菌体克隆就其通过阻断 IL-21 与 IL-21R 结合来抑制细胞增殖的能力进行测试。将表达人 IL-21R 的 hBaf3Mu-1 细胞悬浮物用于这样的测定法。洗涤 hBaf3Mu-1 细胞 (Wyeth) 以除去来自其培养基中的痕量鼠科动物 IL-3,并在含有 10% 无 IL-3 的胎牛血清的生长 RPMI Glutamax 中于 37°C 下在 5% CO_2 培养箱中温育 2 小时。向 96 孔组织培养板中的每个孔中加入大约 10,000 到 20,000 个 Baf3Mu-1 细胞,然后用 scFv 或 IgG 在 37°C 下孵育 30 分钟。然后加入 IL-21 (Wyeth, Giralda Farms, NJ) 至浓度为 5ng/ml,并将细胞孵育 24 小时。然后将细胞用 0.1mCi/孔的 ^3H 胸苷于 37°C 脉冲标记过夜,然后收集细胞,以测量作为细胞增殖指标的胸苷的整合。作为可选择的方法,加入 IL-21 至浓度为 0.3ng/ml,并将细胞孵育 48 小时。然后将细胞加温至室温,并加入 15ml/孔的 Cell Titer-Glo (Promega, WI)。在混合和 10 分钟的孵育后,在 Wallac MicroBeta 1450TriLux 计数器上 (PerkinElmer, Boston, MA) 测量作为细胞增殖或活力指标的发光。

[0215] 通过绘制细胞增殖的测量值 (例如胸苷整合) 相对 IL-21 浓度的对数值的曲线图可确定对于每种 scFv 的 IC_{50} 值 (即,达到 50% 竞争所需的抗体浓度)。通常, IC_{50} 越低,抗体具有的对 IL-21R 的亲和力越高。在一个描述于图 4 的实验中, MUF 抑制细胞对 IL-21 的应答,作为 scFv 时具有 268nM 的 IC_{50} 值而作为 IgG 时为 3nM。如下面表 4 所概括的,随后将其它 scFv 克隆的 IC_{50} 值与 MUF 的 IC_{50} 值进行比较。

[0216] 表 4 :各种 scFv 的 IC_{50} 值

[0217]

克隆	IC_{50} 值 (nM) ScFv
MUF	140
hIL21R18	473
18A5	213
18G4	522
19F5	91
CP5G2	329

[0218] 实施例 10 :MUF 种系转化

[0219] 通过使用 VBASE, 将 scFv 克隆的序列数据用于鉴定对于 MUF 克隆的重链和轻链来说最相近的种系序列。应用标准的定点诱变技术并使用合适的诱变引物来制造突变。通过序列分析确认 scFv 序列的突变。经种系转化的 scFv 和 MUF 的 V_H 和 V_L 结构域序列分别列于 SEQ ID NO :85、83 和 84。

[0220] 接着在此处描述的测定法中测定所述 MUF scFv 种系转化的序列阻断 IL-2 诱导 hBaf3Mu-1 细胞系增殖的能力。当与非种系转化的 MUFscFv 相比较时, 种系转化的 MUF 阻断 Baf3Mu-1 细胞增殖的能力并无显著差别。

[0221] 实施例 11 : 抗原决定部分竞争测定法

[0222] 在抗原决定部位竞争测定法中, 进一步检验所述 scFv 克隆 18A5、19F5 和 18G4 以确定其与 MUF 相比是否结合相同或不同的抗原决定部分。如上所述制备各种克隆的包含 scFv 的周质提取物。最终使用的缓冲液是 50mM MOPS, pH7.4, 0.5mM EDTA, 0.5M 山梨醇的溶液。在 96 孔微量滴定板测定法中, 对包含 scFv 的粗制周质提取物就抑制生物素化的人 IL-21R 融合蛋白 (bio. hIL21R) 与固定在塑料上的 MUF IgG 蛋白结合的能力进行筛选。通过采用使用 DELFIA 试剂盒 (PerkinElmer) 检测的 TRF 和铕标记的链霉抗生物素蛋白来检测 bio. hIL21R 的结合。将阳性克隆用于此处描述的抗原决定部位竞争测定法。

[0223] 在抗原决定部位竞争测定法中获得的各克隆的 IC_{50} 值概括于表 5 中。

[0224] 表 5 : 抗原决定部位竞争测定法

[0225]

克隆	IC_{50} (nM)
MUF IgG	0.4
负对照	0.0
18A5	114
18G4	1.4
19F5	弱抑制

[0226] 实施例 12 : 治疗关节炎

[0227] 将 IL-21 用于研究其对来自滑膜的细胞的影响, 所述滑膜是沿关节排列的膜。从进行关节手术的类风湿性关节炎患者的滑膜组织中分离人成纤维样滑膜细胞 (HFSL) (Cell Applications (San Diego, CA))。将 HFSL 细胞用人 IL-21 培养 48 小时, 然后除去上清液并通过 ELISA 检测趋化因子 MCP-1 (单核细胞化学引诱蛋白或 CCL11)、GRO (生长调节的癌基因或 CXC 配体 1)、I-309 (CCL1)、TARC (胸腺和活化调节的趋化因子)、Eotaxin、MDC (巨噬细胞来源的趋化因子或 CCL22)、LYMPH (lymphotoactin 或 XCL1)、SDF-1B (基质来源的因子 -1B 或 CXC 配体 12)、IP-10 (CXC 配体 10)、I-TAC (T 吸引细胞的趋化因子或 CXC 配体 11)、MG (由干扰素或 CXC 配体 9 诱导的单核因子)、MP3B (巨噬细胞抑制蛋白) 和细胞因子 IFN- α 、TNF- α 、IL-6 和 IL-8。这些趋化因子和细胞因子在本域已知是通过许多活性促进炎症的,

并且在关节中由 IL-21 引起的增加的浓度加重炎症和 RA。

[0228] 如图 5A-5D 所示, IL-21 反复增加 HFLS 分泌趋化因子 MCP-1、GRO、I-309、TARC、Eotaxin、MDC、LYMPH、SDF-1B、IP-10、I-TAC、MG、MP3B 和细胞因子 IFN- α 、TNF- α 、IL-6 和 IL-8。IL-21 被用于调节 CIA(胶原蛋白诱导的关节炎)的临床进程。CIA 是用于研究类风湿性关节炎的标准的小鼠和大鼠模型,参见例如, Holmdahl 等人, (2002) Ageing Res. Rev., 1:135。在第 0 天,用 100 μ g 存在于完全弗氏佐剂中的 II 型胶原蛋白注射小鼠,并在第 21 天,用 100 μ g 存在于不完全弗氏佐剂中的 II 型胶原蛋白增强对小鼠的免疫刺激。在第 21 天,小鼠每天还用 1 μ g 的 IL-21 进行注射,并且每天对小鼠进行疾病检查。对临床症状如下进行评分:0 = 没有肿胀,1 = 1 到 2 个肿胀的脚趾或肿胀的踝,2 = 超过 2 个肿胀的脚趾或中度的爪子肿胀,3 = 强烈的爪肿胀,和 4 = 爪关节强硬。如图 5E 所示,在胶原蛋白注射后用 PBS 注射的小鼠逐渐发展出疾病。在胶原蛋白注射后用 IL-21 注射的小鼠逐渐发展出更严重的疾病。因为用 IL-21 的处理特异性地加重 CIA,所以预期用抗 IL-21R 抗体的处理可抑制或延缓 CIA。因此,由于该模型预知对 RA 具有治疗功效,所以用抗 IL-21R 抗体的处理也预期可抑制或延缓人中的 RA。

[0229] 实施例 13:治疗移植排斥

[0230] 移植排斥是这样一种免疫学现象,即其中来自供体的组织特异性地遭受到宿主免疫细胞的“攻击”。体外研究移植排斥的一个测定法是混合淋巴细胞反应 (MLR)。在 MLR 测定法中,将“供体”细胞和“宿主”细胞在体外混合,而且所述宿主细胞逐渐被激活并增殖。在第 3 和第 5 天之间,加入 ^3H - 胸苷并通过使用液闪计数器测量整合的放射活性来测量增殖。

[0231] 在图 6 中,将 C57BL/6J 小鼠脾细胞 (500,000) 和被辐射的 BDF1 小鼠脾细胞 (500,000) 悬浮在 200 μ l 微量滴定板小孔中的培养基中。向 3 \times 2 孔中补充以不同量的小鼠 IL-21。第四天,加入 ^3H - 胸苷,并在第 5 天用 LKB 1205 液体闪烁计数器测量整合的放射活性。样品“0”和“mock”表示不含 IL-21 的培养物。在 IL-21 不存在的情况下,C57BL/6J 细胞适度地增殖 (~ 6000 拉德)。在 IL-21 存在的情况下,C57BL/6J 细胞更加强烈地增殖 (~ 28,000-38,000 拉德)。使用 IL-21 的处理促进 C57BL/6J 细胞(所述“宿主”或同种异体反应性细胞)的增殖,表明 IL-21 介导 MLR。因此,预期加入抗 IL-21R 抗体或用抗 IL-21R 抗体处理可抑制或延缓 MLR 和移植排斥和相关疾病(例如,移植物抗宿主疾病)。

[0232] 在本说明书内引用的文献教导下本说明书是最容易明白的,所有的文献在此全文引用作为参考。本说明书中的实施方案提供本发明的实施方案的举例说明,不应当被认为限制本发明的范围。本领域技术人员会认识到,许多其它实施方案包含于要求保护的本发明中,并且理解本说明书和实施例仅是作为示例,本发明的真正范围和精神由下面的权利要求表明。

序列表

<110>WYETH

CAMBRIDGE ANTIBODY TECHNOLOGY

<120> 抗人 IL-21 受体的抗体及其应用

<130>01997. 043500. PC

<140>

<141>

<150>60/454, 336

<151>2003-03-14

<160>154

<170>PatentIn Ver. 3. 2

<210>1

<211>113

<212>PRT

<213> 智人

<400>1

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

Thr

<210>2

<211>113

<212>PRT

<213> 智人

<400>2

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

Ser

<210>3

<211>253

<212>PRT

<213> 智人

<400>3

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

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

<210>4

<211>5

<212>PRT

<213> 智人

<400>4

Ile Tyr Ser Val Ser

1

5

<210>5

<211>17

<212>PRT

<213> 智人

<400>5

Arg Ile Ile Pro Met Arg Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

1	5	10	15
Gly			
<210>6			
<211>7			
<212>PRT			
<213> 智人			
<400>6			
Leu Ala Gly Pro Leu Asp Ser			
1	5		
<210>7			
<211>11			
<212>PRT			
<213> 智人			
<400>7			
Gln Gly Gly Ser Leu Arg Gln Tyr Tyr Ala Ser			
1	5	10	
<210>8			
<211>7			
<212>PRT			
<213> 智人			
<400>8			
Gly Lys Asn Lys Arg Pro Ser			
1	5		
<210>9			
<211>13			
<212>PRT			
<213> 智人			
<400>9			
Lys Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Pro Leu Tyr Val			
1	5	10	
<210>10			

<211>339

<212>DNA

<213> 智人

<400>10

```
caggtccagc  tgggtgcagtc  tggggctgag  gtgaagaagc  ctgggtcctc  ggtgagggtc  60
tcctgcaagg  cttctggagg  caccttcaac  atctatagtg  tcagctgggt  gcgacaggcc  120
cctggacagg  ggcttgagtg  gatgggaagg  atcatcccta  tgcgtgatat  tgcaaacctac  180
gcgcagaggt  tccagggcag  ggtcacactt  accgcggaca  agtcctcggg  gacagcctac  240
atggagttgc  gcggcctgag  atctgacgac  acggccgtct  attggtgtgc  gacattgget  300
ggccccttgg  actcctgggg  ccagggcacc  ctggtcacc  339
```

<210>11

<211>339

<212>DNA

<213> 智人

<400>11

```
tcgtctgagc  tgactcagga  cccagctgtg  tctgtgggct  tgggacagac  agtcacgatac  60
acatgtcaag  gcggcagcct  cagacaatat  tatgcaagtt  ggtaccaaca  gaagccagga  120
caggcccctg  tggttgtcat  ctatggtaaa  aataagcgac  cctcagggat  cccagaccga  180
ttctctggca  ccacctcagg  caacacagct  tccttgacca  tcaactggggc  tcaggcggaa  240
gatgaggctg  actactattg  taagteccgg  gacagcagtg  gtaaccatcc  cctttatgtc  300
ttcggagcag  ggaccaagct  gaccgtecta  ggtgagtca  339
```

<210>12

<211>759

<212>DNA

<213> 智人

<400>12

```
caggtgcagc  tgggtgcagtc  tggggctgag  gtgaagaagc  ctgggtcctc  ggtgagggtc  60
tcctgcaagg  cttctggagg  caccttcaac  atctatagtg  tcagctgggt  gcgacaggcc  120
cctggacagg  ggcttgagtg  gatgggaagg  atcatcccta  tgcgtgatat  tgcaaacctac  180
gcgcagaggt  tccagggcag  ggtcacactt  accgcggaca  agtcctcggg  gacagcctac  240
atggagttgc  gcggcctgag  atctgacgac  acggccgtct  attggtgtgc  gacattgget  300
ggccccttgg  actcctgggg  ccagggcacc  ctggtcaccg  tctcgagtgg  aggcggcggt  360
tcaggcggag  gtggctctgg  cggtggcgga  agtgcacttt  cttctgagct  gactcaggac  420
ccagctgtgt  ctgtgggctt  gggacagaca  gtcacgatca  catgtcaagg  cggcagcctc  480
```

agacaatatt atgcaagttg gtaccaacag aagccaggac aggcccctgt gttgtcatc 540
 tatggtaaaa ataagegacc ctcagggate ccagaccgat tctctggcac cacctcagge 600
 aacacagctt ccttgacat cactggggct caggcggaag atgaggctga ctactattgt 660
 aagtcccggg acagcagtgg taaccatccc ctttatgtct tcggagctgg gaccaagctg 720
 accgtcctag gtgcggccgc acatcatcat caccatcac 759

<210>13

<211>15

<212>DNA

<213> 智人

<400>13

atctatagtg tcage 15

<210>14

<211>51

<212>DNA

<213> 智人

<400>14

aggatcatcc ctatgcgtga tattgcaaac tacgcgcaga gttccaggg c 51

<210>15

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>15

ttggctggcc ccttgactc c 21

<210>16

<211>33

<212>DNA

<213> 智人

<400>16

caaggcgga gcctcagaca atattatgca agt 33

<210>17

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>17

ggtaaaaata agcgaccctc a

21

<210>18

<211>39

<212>DNA

<213> 智人

<400>18

aagtcccggg acagcagtgg taaccatccc ctttatgtc

39

<210>19

<211>118

<212>PRT

<213> 智人

<400>19

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

<210>20

<211>108

<212>PRT

<213> 智人

<400>20

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

<210>21

<211>242

<212>PRT

<213> 智人

<400>21

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

	100		105		110
Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly					
	115		120		125
Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser					
	130		135		140
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly					
145		150		155	160
Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro					
	165		170		175
Lys Val Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser					
	180		185		190
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser					
	195		200		205
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr					
	210		215		220
Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg					
225		230		235	240
Ala Ala					

<210>22

<211>5

<212>PRT

<213> 智人

<400>22

Ser Tyr Gly Met His

1

5

<210>23

<211>17

<212>PRT

<213> 智人

<400>23

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210>24

<211>9

<212>PRT

<213> 智人

<400>24

His Gly Gln Tyr Ala Leu Asp Ile Trp

1

5

<210>25

<211>11

<212>PRT

<213> 智人

<400>25

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1

5

10

<210>26

<211>7

<212>PRT

<213> 智人

<400>26

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

1

5

<210>27

<211>9

<212>PRT

<213> 智人

<400>27

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr

1

5

<210>28

<211>417

<212>DNA

<213> 智人

<400>28

atgaaattct tagtcaacgt tgcccttggt tttatggctg tgtacatttc ttacatctat 60
 gccaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcgtggctc agcctgggag gtccctgaga 120
 ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttc agtagctatg gcatgcactg ggtccgccag 180
 gctccaggca aggggctgga gtgggtggca gttatatcat atgatggaag taataaatac 240
 tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaattccaa gaacacgctg 300
 tatctgcaaa tgaacagcct gagagacgag gacacggctg tgtattactg tgcgaggcat 360
 ggtcagtacg ctcttgatat ctgggggcaa gggacaatgg tcaccgtctc ctcaggt 417

<210>29

<211>381

<212>DNA

<213> 智人

<400>29

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgac 60
 atccagatga cccagtctcc ttccaccctg tctgcatctg taggagacag agtcaccatc 120
 acttgccggg ccagtcaggg tattagtagc tggttggcct ggtatcagca gaaaccaggg 180
 agagccccta aggtcttgat ctataaggca tctactttag aaagtgggt cccatcaagg 240
 ttcagcggca gtggatctgg gacagatttc actctcacca tcagcagtct gcaacctgaa 300
 gattttgcaa cttactactg tcaacagagt tacagtaccc cgtggacgtt cggccaaggg 360
 accaagctcg agatcaaacg t 381

<210>30

<211>728

<212>DNA

<213> 智人

<400>30

gaggtgcagc tgggtgcagtc tgggggagge gtggtccagc ctgggaggte cctgagacte 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccagget 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgetgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agacgaggac acggctgtgt attactgtgc gaggcattgt 300
 cagtacgctc ttgatatctg ggggcaaggg acaatggca cctctcttc aggtggagge 360
 ggttcaggcg gaggtggcag cggcggtggc ggatcggaca tcgtgatgac ccagtctctc 420
 tccaccctgt ctgcatctgt aggagacaga gtcaccatca cttgccgggc cagtcagggt 480
 attagtagct ggttggcctg gtatcagcag aaaccaggga gagcccctaa ggtcttgatc 540

tataaggcat ctactttaga aagtggggtc ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg 600
 acagatttca ctctcacat cagcagtctg caacctgaag attttgcaac ttactactgt 660
 caacagagtt acagtacccc gtggacgttc ggccaagga ccaagctgga gatcaaactg 720
 gcggccgc 728

<210>31

<211>18

<212>DNA

<213> 智人

<400>31

agtagctatg gcatgcac 18

<210>32

<211>51

<212>DNA

<213> 智人

<400>32

gttatatcat atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg c 51

<210>33

<211>30

<212>DNA

<213> 智人

<400>33

aggcatggtc agtacgctct tgatatctgg 30

<210>34

<211>33

<212>DNA

<213> 智人

<400>34

cgggccagtc aggtattag tagctggttg gcc 33

<210>35

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>35

aaggcatcta ctttagaaag t

21

<210>36

<211>27

<212>DNA

<213> 智人

<400>36

caacagagtt acagtacccc gtggacg

27

<210>37

<211>329

<212>PRT

<213> 智人

<400>37

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Gly

1

5

10

15

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe

20

25

30

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly

35

40

45

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu

50

55

60

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr

65

70

75

80

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys

85

90

95

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

100

105

110

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

115

120

125

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

130

135

140

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

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

<210>38

<211>1599

<212>DNA

<213> 智人

<400>38

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagegg cctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtc cacaccttcc cggtcttctt acagtctctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtagtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttggtgag 300
aggccagcac agggaggag ggtgtctgct ggaagccagg ctcagcgtc ctgcctggac 360
gcatcccggc tatgcagccc cagtccaggg cagcaaggca ggccccgtct gcctcttca 420
ccggaggcct ctgcccgcct cactcatgct caggagagg gtcttcttggc ttttcccca 480
ggctctgggc aggcacagc taggtgcccc taaccagc cctgcacaca aaggggcagg 540

```

```

tgctgggctc agacctgcca agagccatat ccgggaggac cctgcccctg acctaagccc 600
accccaaagg ccaaactctc cactccctca gctcggacac cttctctcct ccagattcc 660
agtaactccc aatcttctct ctccagagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc 720
accgtgcccc ggtaagccag cccaggcctc gccctccagc tcaaggcggg acaggtgccc 780
tagggtagcc tgcattccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacacgtcc acctccatct 840
cttctcagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca 900
aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc 960
acgaagacce tgaggtaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca 1020
agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg 1080
tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc 1140
tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg tgggaccctg ggggtgcgag 1200
ggccacatgg acagaggccg gctcggcccc ccctctgccc tgagagtac cgctgtacca 1260
acctctgtcc ctacagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1320
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1380
gacatgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1440
cccgtgctgg actcagcgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1500
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1560
tacacgcaga agagcctctc cttaagtccg ggaaaataa 1599

```

<210>39

<211>106

<212>PRT

<213> 智人

<400>39

```

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

```

<210>40

<211>321

<212>DNA

<213> 智人

<400>40

```

ggtcagccca aggctgcccc ctgggtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa 60
gccaacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120
gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180
caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240
tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
gccctacag aatgttcata g                                     321

```

<210>41

<211>105

<212>PRT

<213> 智人

<400>41

```

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

```

<210>42

<211>324

<212>DNA

<213> 智人

<400>42

ggaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcate ttcccccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctggtgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcage accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagttcacc ggtgacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg ttag 324

<210>43

<211>538

<212>PRT

<213> 智人

<400>43

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

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

	500		505		510
Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro					
	515		520		525
Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser					
	530		535		

<210>44

<211>2665

<212>DNA

<213> 智人

<400>44

```

gtcgactgga ggcccagctg cccgtcatca gagtgacagg tcttatgaca gcctgattgg 60
tgactcgggc tgggtgtgga ttctcacccc aggcctctgc ctgctttctc agacctcat 120
ctgtcacccc cacgctgaac ccagctgcca cccccagaag cccatcagac tgcccccage 180
acacggaatg gatttctgag aaagaagccg aaacagaagg cccgtgggag tcagcatgcc 240
gcgtggctgg gccgcccct tgctcctgct gctgctccag ggaggctggg gctgccccga 300
cctcgtctgc tacaccgatt acctccagac ggcatctgc atcctggaaa tgtggaacct 360
ccaccccage acgctcacce ttacctggca agaccagtat gaagagctga aggacgagge 420
cacctcctgc agcctccaca ggteggceca caatgccacg catgccacct acacctgcca 480
catggatgta ttccacttca tggecgacga cttttcagt gtcaacatca cagaccagtc 540
tggcaactac tcccaggagt gtggcagctt tctcctggct gagagcatca agccggctcc 600
ccctttcaac gtgactgtga cttctcagg acagtataat atctcctggc gtcagatta 660
cgaagacct gccttctaca tgctgaaggg caagcttcag tatgagctgc agtacaggaa 720
ccggggagac ccctgggctg tgagtccgag gagaaagctg atctcagtgg actcaagaag 780
tgtctccctc ctccccctgg agttccgcaa agactcgagc tatgagctgc aggtgcgggc 840
agggcccctg cctggctcct cctaccaggg gacctggagt gaatggagtg acccggtcat 900
ctttcagacc cagtcagagg agttaaagga aggctggaac cctcacctgc tgcttctcct 960
cctgcttgte atagtcttca ttctgcctt ctggagcctg aagaccctc cattgtggag 1020
gctatggaag aagatatggg ccgtccccag ccctgagcgg ttcttcatgc ccctgtacaa 1080
gggctgcage ggagacttca agaaatgggt ggggtgcaccc ttcactggct ccagcctgga 1140
gctgggaccc tggagcccag aggtgccctc caccctggag gtgtacagct gccaccacc 1200
acggagcccg gccaagagge tgcagctcac ggagctacaa gaaccagcag agctgggtgga 1260
gtctgacggt gtgcccgaag ccagcttctg gccgacagcc cagaactcgg ggggctcage 1320
ttacagtgag gagagggatc ggccatacgg cctgggtgtcc attgacacag tgactgtget 1380
agatgcagag gggccatgca cctggccctg cagctgtgag gatgacggct acccagcct 1440
ggacctggat gctggcctgg agcccagccc aggcctagag gaccactct tggatgcagg 1500
gaccacagtc ctgtcctgtg gctgtgtctc agctggcagc cctgggctag gagggcccct 1560
gggaagcctc ctggacagac taaagccacc ccttgcagat ggggaggact gggtggggg 1620

```

actgccctgg ggtggccggt cacctggagg ggtctcagag agtgaggcgg gtcaccacct 1680
 gcccggcctg gatattgaca cgtttgacag tggctttgtg ggctctgact gcagcagccc 1740
 tgtggagtgt gacttcacca gccccgggga cgaaggaccc ccccggagct acctccgcca 1800
 gtgggtggtc attcctccgc cactttcgag ccctggaccc caggccagct aatgaggctg 1860
 actggatgtc cagagctggc caggccactg ggccctgagc cagagacaag gtcacctggg 1920
 ctgtgatgtg aagacacctg cagcctttgg tctcctggat gggcctttga gcctgatggt 1980
 tacagtgtct gtgtgtgtgt gtgcatatgt gtgtgtgtgc atatgcatgt gtgtgtgtgt 2040
 gtgtgtctta ggtgcgcagt ggcattgtcca cgtgtgtgtg tgattgcacg tgctgtggg 2100
 cctgggataa tgcccatggt actccatgca ttcacctgcc ctgtgcatgt ctggactcac 2160
 ggagctcacc catgtgcaca agtgtgcaca gtaaactgtt ttgtgggtcaa cagatgacaa 2220
 cagccgtcct cctcctagg gtcttgtgtt gcaagttggt ccacagcatc tccggggctt 2280
 tgtgggatca gggcattgcc tgtgactgag gcgagaccca gccctccagc gtctgcctcc 2340
 aggagctgca agaagtccat attgttcctt atcacctgcc aacaggaagc gaaaggggat 2400
 ggagtgagcc catggtgacc tcgggaatgg caatTTTTTg ggcggcccct ggacgaaggt 2460
 ctgaatcccg actctgatac cttctggctg tgctacctga gccaaagtcg ctcccctctc 2520
 tgggctagag tttccttacc cagacagtgg ggaaggcatg acacacctgg gggaaattgg 2580
 cgatgtcacc cgtgtacggt acgcagccca gagcagaccc tcaataaacg tcagcttctc 2640
 tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaat ctaga 2665

<210>45

<211>529

<212>PRT

<213>Mus musculus

<400>45

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

Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val
 115 120 125
 Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu
 130 135 140
 Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
 145 150 155 160
 Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile
 165 170 175
 Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys
 180 185 190
 Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr
 195 200 205
 Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
 210 215 220
 Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Pro His Met Leu Leu
 225 230 235 240
 Leu Leu Ala Val Leu Ile Ile Val Leu Val Phe Met Gly Leu Lys Ile
 245 250 255
 His Leu Pro Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Pro Val Pro Thr
 260 265 270
 Pro Glu Ser Phe Phe Gln Pro Leu Tyr Arg Glu His Ser Gly Asn Phe
 275 280 285
 Lys Lys Trp Val Asn Thr Pro Phe Thr Ala Ser Ser Ile Glu Leu Val
 290 295 300
 Pro Gln Ser Ser Thr Thr Thr Ser Ala Leu His Leu Ser Leu Tyr Pro
 305 310 315 320
 Ala Lys Glu Lys Lys Phe Pro Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Gln Leu
 325 330 335
 Glu Cys Asp Gly Met Ser Glu Pro Gly His Trp Cys Ile Ile Pro Leu
 340 345 350
 Ala Ala Gly Gln Ala Val Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro
 355 360 365
 Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Gly Asp Ala Glu Gly
 370 375 380
 Leu Cys Val Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Met
 385 390 395 400
 Asn Leu Asp Ala Gly Arg Glu Ser Gly Pro Asn Ser Glu Asp Leu Leu
 405 410 415
 Leu Val Thr Asp Pro Ala Phe Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Gly Ser

	420		425		430										
Gly	Leu	Arg	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Leu	Leu	Asp	Arg	Leu	Arg
	435		440		445										
Leu	Ser	Phe	Ala	Lys	Glu	Gly	Asp	Trp	Thr	Ala	Asp	Pro	Thr	Trp	Arg
	450		455		460										
Thr	Gly	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ser	Glu	Ala	Gly	Ser	Pro	Pro
465			470		475		480								
Gly	Leu	Asp	Met	Asp	Thr	Phe	Asp	Ser	Gly	Phe	Ala	Gly	Ser	Asp	Cys
			485		490		495								
Gly	Ser	Pro	Val	Glu	Thr	Asp	Glu	Gly	Pro	Pro	Arg	Ser	Tyr	Leu	Arg
	500		505		510										
Gln	Trp	Val	Val	Arg	Thr	Pro	Pro	Pro	Val	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln	Ser
	515		520		525										

Ser

<210>46

<211>2628

<212>DNA

<213> 智人

<400>46

```

gtcgacgcgg cggtaccagc tgtctgceca cttctcctgt ggtgtgcctc acggtcactt 60
gcttgtctga ccgcaagtct gcccatecct ggggcagcca actggcctca gcccggtgcc 120
cagcgtgccc ctgtctctgt ctggtgcccc cagccctact gtcttcctct gtgtaggctc 180
tgcccagatg cccggctggt cctcagcctc aggactatct cagcagtgac tcccctgatt 240
ctggacttgc acctgactga actcctgccc acctcaaacc ttcacctccc accaccacca 300
ctccgagtcc cgctgtgact cccacgceca ggagaccacc caagtgcccc agcctaaaga 360
atggctttct gagaaagacc ctgaaggagt aggtctggga cacagcatgc cccggggccc 420
actggctgcc ttactcctgc tgattctcca tggagcttgg agctgcctgg acctcacttg 480
ctacactgac tacctctgga ccatcacctg tgtcctggag acacggagcc ccaaccccag 540
catactcagt ctcacctggc aagatgaata tgaggaactt caggaccaag agaccttctg 600
cagcctacac aggtctggcc acaacaccac acatatatgg tacacgtgcc atatgcgett 660
gtctcaatte ctgtccgatg aagttttcat tgtcaatgtg acggaccagt ctggcaacaa 720
ctcccaagag tgtggcagct ttgtcctggc tgagagcatc aaaccagctc ccccttgaa 780
cgtgactgtg gccttctcag gacgctatga tatctcctgg gactcagctt atgacgaacc 840
ctccaactac gtgctgaggg gcaagctaca atatgagctg cagtatcgga acctcagaga 900
ccctatgct gtgaggccgg tgaccaagct gatctcagtg gactcaagaa acgtctctct 960
tctcctgaa gagttccaca aagattctag ctaccagctg caggtgcggg cagegctca 1020
gccaggcact tcattcaggg ggacctggag tgagtggagt gaccccgtea tctttcagac 1080

```

```

ccaggctggg gagcccgagg caggctggga ccctcacatg ctgctgctcc tggctgtctt 1140
gatcattgtc ctggttttca tgggtctgaa gatccacctg ccttggaggc tatggaaaaa 1200
gatatgggca ccagtgccca cccctgagag tttcttccag cccctgtaca gggagcacag 1260
cgggaacttc aagaaatggg ttaatacccc tttcacggcc tccagcatag agttggtgcc 1320
acagagttcc acaacaacat cagcettaca tctgtcattg tatccagcca aggagaagaa 1380
gttcccgggg ctgccgggtc tggaagagca actggagtgt gatggaatgt ctgagcctgg 1440
tactggtgc ataatcccct tggcagctgg ccaagcggtc tcagcctaca gtgaggagag 1500
agaccggcca tatggtctgg tgtccattga cacagtgact gtgggagatg cagagggcct 1560
gtgtgtctgg ccctgtagct gtgaggatga tggctatcca gccatgaacc tggatgctgg 1620
ccgagagtct ggccctaatt cagaggatct gctcttggtc acagaccctg cttttctgtc 1680
ttgcggtgt gtctcaggta gtggtctcag gcttggaggc tccccaggca gcctactgga 1740
caggttgagg ctgtcatttg caaaggaagg ggactggaca gcagacccaa cctggagaac 1800
tgggtcccca ggagggggct ctgagagtga agcaggttcc cccctggtc tggacatgga 1860
cacatttgac agtggctttg caggttcaga ctgtggcagc cccgtggaga ctgatgaagg 1920
accccctga agctatctcc gccagtgggt ggtcaggacc cctccacctg tggacagtgg 1980
agcccagagc agctagcata taataaccag ctatagttag aagaggcctc tgagcctggc 2040
atttacagtg tgaacatgta ggggtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 2100
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtcttgggt tgtgtgttag cacatccatg ttgggatttg 2160
gtctgttgc atgtattgta atgctaaatt ctctacccaa agttctagc ctacgagtga 2220
attctcatgt ttacaaactt gctgtgtaaa ccttgttccct taatttaata ccattggtta 2280
aataaaattg gctgcaacca attactggag ggattagagg tagggggctt ttgagttacc 2340
tgtttgagaga tggagaagga gagaggagag accaagagga gaaggaggaa ggagaggaga 2400
ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggctgccgtg 2460
aggggagagg gaccatgagc ctgtggccag gagaaacagc aagtatctgg ggtacactgg 2520
tgaggaggtg gccaggccag cagttagaag agtagattag gggtgacctc cagtatttgt 2580
caaagccaat taaaataaca aaaaaaaaaa aaaagcggcc gctctaga 2628

```

<210>47

<211>116

<212>PRT

<213> 智人

<400>47

```

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

```

Gly Arg Ile Ile Pro Met Arg Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Gly Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Trp Cys
 85 90 95
 Ala Thr Leu Ala Gly Pro Leu Asp Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210>48

<211>109

<212>PRT

<213> 智人

<400>48

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

<210>49

<211>242

<212>PRT

<213> 智人

<400>49

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

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

<210>50

<211>5

<212>PRT

<213> 智人

<400>50

Ile Tyr Ser Val Ser

1

5

<210>51

<211>17

<212>PRT

<213> 智人

<400>51

Arg Ile Ile Pro Met Arg Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210>52

<211>7

<212>PRT

<213> 智人

<400>52

Leu Ala Gly Pro Leu Asp Ser

1

5

<210>53

<211>11

<212>PRT

<213> 智人

<400>53

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Thr Tyr Tyr Ala Ser

1

5

10

<210>54

<211>7

<212>PRT

<213> 智人

<400>54

Gly Arg Asn Lys Arg Pro Ser

1

5

<210>55

<211>11

<212>PRT

<213> 智人

<400>55

Lys Ser Arg Ala Tyr Ser Gly Asn Leu Val Glu

1 5 10

<210>56

<211>348

<212>DNA

<213> 智人

<400>56

```
gaggtgcagc  tggtgcagtc  tggggctgag  gtgaagaagc  ctgggtcctc  ggtgaaggtc  60
tcctgcaagg  cttctggagg  caccttcaac  atctatagtg  tcagctgggt  gcgacaggcc  120
cctggacagg  ggcttgagtg  gatgggaagg  atcatcccta  tgcgtgatat  tgcaaacctac  180
gcgcagaggt  tccagggcag  ggtecacactt  acccgggaca  agtcctcggg  gacagcctac  240
atggagttgc  gcagcctgag  atctgacgac  acggcctct  attggtgtgc  gacattgget  300
ggccccttgg  actcctgggg  cagaggaacc  ctggtcaccg  tctcgagt  348
```

<210>57

<211>327

<212>DNA

<213> 智人

<400>57

```
tcttctgagc  tgactcagga  ccctgctgtg  tctgtggcct  tgggacagac  agtcaggatc  60
acatgccagg  gagacagcct  cagaacttat  tatgagagct  ggtaccagaa  gagccagga  120
cagggcccta  tacttgatc  gtatggtaga  aataagaggc  cctcagggat  cccagaccga  180
ttctctgget  cttctcagg  gaacagagct  tccttgacca  tcaactgggc  tcaggcggaa  240
gatgaggetg  actattactg  taaatcccgg  gcctacagtg  gtaacctcgt  agaattcgge  300
ggagggacca  agctgaccgt  cctaggt  327
```

<210>58

<211>726

<212>DNA

<213> 智人

<400>58

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggagg caccttcaac atctatagtg tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacagg ggcttgagtg gatgggaagg atcatcccta tgcgtgatat tgcaaactac 180
 gcgcagaggt tccagggcag ggtcacactt accgcggaca agtcctcggg gacagcctac 240
 atggagttgc gcagcctgag atctgacgac acggcctctt attggtgtgc gacattggct 300
 ggccccttgg actcctgggg cagaggaacc ctggtcaccg tctcgagtgg aggcggcggt 360
 tcaggcggag gtggctctgg cggtagcgga agtgcacttt cttctgagct gactcaggac 420
 cctgctgtgt ctgtggcctt gggacagaca gtcaggatca catgccaggg agacagcctc 480
 agaacttatt atgcgagctg gtaccagaag aggcaggac aggccctat acttgtcatg 540
 tatggtagaa ataagaggcc ctcagggate ccagaccgat tctctggctc cttctcaggg 600
 aacagagctt ccttgaccat cactggggct caggcggaag atgaggctga ctattactgt 660
 aaatcccggg cctacagtgg taacctcgta gaattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc 720
 ctaggt 726

<210>59

<211>15

<212>DNA

<213> 智人

<400>59

atctatagtg tcagc 15

<210>60

<211>51

<212>DNA

<213> 智人

<400>60

aggatcatcc ctatgcgtga tattgcaaac tacgcgcaga ggttccaggg c 51

<210>61

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>61

ttgcttgccc ccttggactc c 21

<210>62

<211>33

<212>DNA

<213> 智人

<400>62

caggagaca gcctcagaac ttattatgcg agc

33

<210>63

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>63

ggtagaaata agaggccctc a

21

<210>64

<211>33

<212>DNA

<213> 智人

<400>64

aaatcccggg cctacagtgg taacctegta gaa

33

<210>65

<211>118

<212>PRT

<213> 智人

<400>65

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Thr Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly

20 25 30

Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Ser Ile Ser His Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Pro Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn Pro His Val Leu

1 5 10

<210>74

<211>354

<212>DNA

<213> 智人

<400>74

```
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaaga cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctctggtta ctccatcagc agtggttact actggggctg gatccggcag 120
ccccagga aggggttga gtggattggg agtatctctc atactgggaa cacctactac 180
aaccgcccc tcaagagtcg cgtcaccata tcagtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 240
ctgaaactga gctctgtgac cgccgcagac acggccgtgt attactgtgc gcgaggtggg 300
ggaattagca ggccggagta ctggggcaaa ggcaccctgg tcaccgtctc gagt 354
```

<210>75

<211>330

<212>DNA

<213> 智人

<400>75

```
tcttctgagc tgactcagga ccctctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcacgctc 60
acatgccaaag gagacagcct cagaacctat tatgcaagct ggtaccagca gaagtcagga 120
caggecccta tacttctect ctatggtaaa cacaaacggc cctcagggat cccagaccgc 180
ttctctggct ccacctcagg agacacagct tccttgacca tcaactggggc tcaggcggaa 240
gacgaggctg actattactg taactcccgg gactccagtg gcaacccccca tgttctgttc 300
ggcggaggga cccagctcac cgttttaagt 330
```

<210>76

<211>735

<212>DNA

<213> 智人

<400>76

```
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaaga cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctctggtta ctccatcagc agtggttact actggggctg gatccggcag 120
ccccagga aggggttga gtggattggg agtatctctc atactgggaa cacctactac 180
aaccgcccc tcaagagtcg cgtcaccata tcagtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 240
ctgaaactga gctctgtgac cgccgcagac acggccgtgt attactgtgc gcgaggtggg 300
```

ggaattagca ggccggagta ctggggcaaa ggcaccctgg tcaccgtctc gagtggagge 360
 ggcggttcag gcgaggtgg ctctggcggt ggcggaagtg cactttcttc tgagctgact 420
 caggaccctc ctgtgtctgt ggccttggga cagacagtca cgctcacatg ccaaggagac 480
 agcctcagaa cctattatgc aagctggtac cagcagaagt caggacagge ccctatactt 540
 ctctctatg gtaaacacaa acggccctca gggatcccag accgcttctc tggctccacc 600
 tcaggagaca cagcttcctt gaccatcact ggggctcagg cggaagacga ggctgactat 660
 tactgtaact cccgggactc cagtggcaac ccccatgttc tgttcggcgg agggaccag 720
 ctcaccgttt taagt 735

<210>77

<211>18

<212>DNA

<213> 智人

<400>77

agtggttact actggggc 18

<210>78

<211>48

<212>DNA

<213> 智人

<400>78

agtatctctc atactgggaa cacctactac aaccgcccc tcaagagt 48

<210>79

<211>27

<212>DNA

<213> 智人

<400>79

ggtgggggaa ttagcaggcc ggagtac 27

<210>80

<211>33

<212>DNA

<213> 智人

<400>80

115

<210>84

<211>111

<212>PRT

<213> 智人

<400>84

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

<210>85

<211>244

<212>PRT

<213> 智人

<400>85

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

Gly

<210>88

<211>7

<212>PRT

<213> 智人

<400>88

Leu Ala Gly Pro Leu Asp Ser

1

5

<210>89

<211>11

<212>PRT

<213> 智人

<400>89

Gln Gly Gly Ser Leu Arg Gln Tyr Tyr Ala Ser

1

5

10

<210>90

<211>7

<212>PRT

<213> 智人

<400>90

Gly Lys Asn Lys Arg Pro Ser

1

5

<210>91

<211>13

<212>PRT

<213> 智人

<400>91

Lys Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Pro Leu Tyr Val

1

5

10

<210>92

<211>348

<212>DNA

<213> 智人

<400>92

```
caggtgcagc  tgggtgcagtc  tggggctgag  gtgaagaagc  ctgggtcctc  ggtgaaggtc  60
tcctgcaagg  cttctggagg  caccttcaac  atctatagtg  tcagctgggt  gcgacaggcc  120
cctggacagg  ggcttgagtg  gatgggaagg  atcatcccta  tgcgtgatat  tgcaaaactac  180
gcgcagaggt  tccagggcag  ggtcacaatt  accgcggaca  agtccacgag  cacagcctac  240
atggagttga  gcagcctgag  atctgaagac  acggccgtct  attattgtgc  gacattggct  300
ggccccttgg  actcctgggg  ccagggcacc  ctggtcaccg  tctcgagt    348
```

<210>93

<211>333

<212>DNA

<213> 智人

<400>93

```
tcttctgagc  tgactcagga  cccagctgtg  tctgtggcct  tgggacagac  agtcaggatc  60
acatgtcaag  gcggcagcct  cagacaatat  tatgcaagtt  ggtaccaaca  gaagccagga  120
caggcccctg  tgcttgteat  ctatggtaaa  aataagcgac  cctcagggat  cccagaccga  180
ttctctggct  cctcctcagg  caacacagct  tccttgacca  tcaactggggc  tcaggcggaa  240
gatgaggctg  actactattg  taagteccgg  gacagcagtg  gtaaccatcc  cctttatgtc  300
ttcggagctg  ggaccaagct  gaccgtecta  ggt    333
```

<210>94

<211>732

<212>DNA

<213> 智人

<400>94

```
caggtgcagc  tgggtgcagtc  tggggctgag  gtgaagaagc  ctgggtcctc  ggtgaaggtc  60
tcctgcaagg  cttctggagg  caccttcaac  atctatagtg  tcagctgggt  gcgacaggcc  120
cctggacagg  ggcttgagtg  gatgggaagg  atcatcccta  tgcgtgatat  tgcaaaactac  180
gcgcagaggt  tccagggcag  ggtcacaatt  accgcggaca  agtccacgag  cacagcctac  240
atggagttga  gcagcctgag  atctgaagac  acggccgtct  attattgtgc  gacattggct  300
ggccccttgg  actcctgggg  ccagggcacc  ctggtcaccg  tctcgagtgg  aggcggcggt  360
tcaggcggag  gtggctctgg  cggtggcgga  agtgcacttt  cttctgagct  gactcaggac  420
ccagctgtgt  ctgtggcctt  gggacagaca  gtcaggatca  catgtcaagg  cggcagcctc  480
agacaatatt  atgcaagttg  gtaccaacag  aagccaggac  aggcccctgt  gcttgtcate  540
```

tatggtaaaa ataagegacc ctcagggate ccagaccgat tctctggctc ctcctcaggc 600
aacacagctt ccttgaccat cactggggct caggcggaag atgaggctga ctactattgt 660
aagtcccggg acagcagtgg taaccatccc ctttatgtct tcggagctgg gaccaagctg 720
accgtcctag gt 732

<210>95

<211>15

<212>DNA

<213> 智人

<400>95

atctatagtg tcagc 15

<210>96

<211>51

<212>DNA

<213> 智人

<400>96

aggatcatcc ctatgcgtga tattgcaaac tacgcgcaga ggttccaggg c 51

<210>97

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>97

ttggctggcc ccttgactc c 21

<210>98

<211>33

<212>DNA

<213> 智人

<400>98

caaggcggca gcctcagaca atattatgca agt 33

<210>99

<211>21

<212>DNA

<213> 智人

<400>99

ggtaaaaata agcgaccctc a

21

<210>100

<211>39

<212>DNA

<213> 智人

<400>100

aagtcccggg acagcagtgg taaccatccc ctttatgtc

39

<210>101

<211>120

<212>PRT

<213> 智人

<400>101

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

<210>102

<211>110

<212>PRT

<213> 智人

<400>102

```

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

```

<210>103

<211>247

<212>PRT

<213> 智人

<400>103

```

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

```

115	120	125	
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp			
130	135	140	
Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln			
145	150	155	160
Gly Asp Ser Leu Arg Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro			
	165	170	175
Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Phe Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser			
	180	185	190
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser			
	195	200	205
Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys			
	210	215	220
Asn Ser Arg Asp Thr Ser Ile Asn His Pro Val Ile Phe Gly Gly Gly			
225	230	235	240
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly			
	245		

<210>104

<211>5

<212>PRT

<213> 智人

<400>104

Asp Asn Tyr Ile His

1

5

<210>105

<211>17

<212>PRT

<213> 智人

<400>105

Trp Ile Asn Pro Lys Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210>106

<211>11

<212>PRT

<213> 智人

<400>106

Ser Leu Ser Pro Tyr Gly Gly Gln Leu Leu Tyr

1

5

10

<210>107

<211>11

<212>PRT

<213> 智人

<400>107

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Arg Tyr Tyr Ala Ser

1

5

10

<210>108

<211>7

<212>PRT

<213> 智人

<400>108

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser

1

5

<210>109

<211>12

<212>PRT

<213> 智人

<400>109

Asn Ser Arg Asp Thr Ser Ile Asn His Pro Val Ile

1

5

10

<210>110

<211>360

<212>DNA

<213> 智人

<400>110

gaggtccagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgtaagg cttccggata cgccttcacc gacaactata tacactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgaatg gatgggatgg atcaacccta agactgggtg cacaaactat 180
 gcacaaaagt ttcagggcag ggtcagcatg accagggaca cgtccatcaa cacagcctac 240
 atggacctaa gtaggctgac atctgacgac acggccgtct attactgtac gagaagcctt 300
 tccccatatg gtggccaact cctctactgg ggccggggga caatgggtcac cgtctcgagt 360

<210>111

<211>330

<212>DNA

<213> 智人

<400>111

tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
 acatgccaaag gagacagcct cagaagatat tatgcaagct ggttccagca gaagccagga 120
 caggcccctg tacttgtcat ctttggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180
 ttctctgcct ccagttcagg aaacacagct tccttgacca tcaactggggc tcaggcggaa 240
 gatgaggctg actattactg taactcccgg gacaccagta ttaaccatcc cgtgatattc 300
 ggccgggggga ccaagctgac cgtcctaggt 330

<210>112

<211>741

<212>DNA

<213> 智人

<400>112

gaggtccagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgtaagg cttccggata cgccttcacc gacaactata tacactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgaatg gatgggatgg atcaacccta agactgggtg cacaaactat 180
 gcacaaaagt ttcagggcag ggtcagcatg accagggaca cgtccatcaa cacagcctac 240
 atggacctaa gtaggctgac atctgacgac acggccgtct attactgtac gagaagcctt 300
 tccccatatg gtggccaact cctctactgg ggccggggga caatgggtcac cgtctcgagt 360
 ggagcgggcg gttcaggcgg aggtggctct ggccggtggcg gaagtgcact ttcttctgag 420
 ctgactcagg accctgctgt gtctgtggcc ttgggacaga cagtcaggat cacatgcca 480
 ggagacagcc tcagaagata ttatgcaagc tggttccagc agaagccagg acagggccct 540
 gtacttgtca tctttggtaa aaacaaccgg ccctcaggga tcccagaccg attctctgce 600
 tccagttcag gaaacacagc ttccttgacc atcaactggg ctcaggcgga agatgagget 660
 gactattact gtaactccc ggacaccagt attaaccatc ccgtgatatt cgccgggggg 720
 accaagctga cgtcctaggt t 741

<210>113	
<211>15	
<212>DNA	
<213> 智人	
<400>113	
gacaactata tacac	15
<210>114	
<211>54	
<212>DNA	
<213> 智人	
<400>114	
tggatcaacc ctaagactgg tggcacaac tatgcacaaa agtttcaggg cagg	54
<210>115	
<211>33	
<212>DNA	
<213> 智人	
<400>115	
agcctttccc catatggtgg ccaactecte tac	33
<210>116	
<211>33	
<212>DNA	
<213> 智人	
<400>116	
caaggagaca gcctcagaag atattatgca agc	33
<210>117	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 智人	
<400>117	
ggtaaaaaca accggcctc a	21

<210>118
<211>36
<212>DNA
<213> 智人

<400>118
aactcccggg acaccagtat taaccatccc gtgata

36

<210>119
<211>118
<212>PRT
<213> 智人

<400>119
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Gly Gly Trp Lys Leu Pro Phe Phe Ala Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210>120
<211>110
<212>PRT
<213> 智人

<400>120
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

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

<210>121

<211>245

<212>PRT

<213> 智人

<400>121

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

Ser Leu Arg Thr Phe Tyr Ala Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 165 170 175
 Ala Pro Ile Leu Val Ile Tyr Gly Lys Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile
 180 185 190
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 195 200 205
 Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser
 210 215 220
 Arg Asp Arg Ser Gly Asn His Leu Gly Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Thr Val Leu Gly
 245

<210>122

<211>5

<212>PRT

<213> 智人

<400>122

Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210>123

<211>17

<212>PRT

<213> 智人

<400>123

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

<210>124

<211>9

<212>PRT

<213> 智人

<400>124

Gly Trp Lys Leu Pro Phe Phe Ala Tyr
 1 5

<210>125

<211>11

<212>PRT

<213> 智人

<400>125

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Thr Phe Tyr Ala Asn

1 5 10

<210>126

<211>7

<212>PRT

<213> 智人

<400>126

Gly Lys Ser Asn Arg Pro Ser

1 5

<210>127

<211>12

<212>PRT

<213> 智人

<400>127

Tyr Ser Arg Asp Arg Ser Gly Asn His Leu Gly Met

1 5 10

<210>128

<211>354

<212>DNA

<213> 智人

<400>128

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccagget 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgetgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ggggggggtgg 300

aaacttccat tttttgccta ctggggccgg ggcaccctgg tcaccgtctc gagt 354

<210>129

<211>330

<212>DNA

<213> 智人

<400>129

tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
 acatgccaaag gagacagcct cagaaccttt tatgcaaact ggtaccagca gaagccagga 120
 caggccccta tactttgcat ctatggtaaa agcaaccgtc cctcagggat cccagaccga 180
 ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcaactggggc tcaggcggaa 240
 gatgaggctg actattactg ttactcccgg gacagaagtg gtaacatct agggatgttc 300
 ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaggt 330

<210>130

<211>735

<212>DNA

<213> 智人

<400>130

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagge ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttage agctatgcca tgagctgggt ccgccaggt 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gggggggtgg 300
 aaacttccat tttttgccta ctggggccgg ggcaccctgg tcaccgtctc gagtggagge 360
 ggcggttcag gcgaggttg ctctggcggt ggcggaagtg cactttcttc tgagctgact 420
 caggaccctg ctgtgtctgt ggcttggga cagacagtca ggatcacatg ccaaggagac 480
 agcctcagaa ccttttatgc aaactggtac cagcagaagc caggacagge ccctatactt 540
 gtcactatg gtaaaagcaa ccgtccctca gggatcccag accgattctc tggetccage 600
 tcaggaaaca cagcttcctt gaccatcact ggggctcagg cggaagatga ggctgactat 660
 tactgttact cccgggacag aagtggtaac catctagga tgttcggcgg agggaccaag 720
 ctgaccgtcc taggt 735

<210>131

<211>15

<212>DNA

<213> 智人

<400>131 agctatgccca tgagc	15
<210>132 <211>54 <212>DNA <213> 智人	
<400>132 gctattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg ccgg	54
<210>133 <211>27 <212>DNA <213> 智人	
<400>133 gggtggaaac ttccattttt tgcctac	27
<210>134 <211>33 <212>DNA <213> 智人	
<400>134 caaggagaca gcctcagaac cttttatgca aac	33
<210>135 <211>21 <212>DNA <213> 智人	
<400>135 ggtaaaagca accgtccctc a	21
<210>136 <211>36 <212>DNA <213> 智人	

<400>136

tactcccggg acagaagtgg taaccatcta gggatg

36

<210>137

<211>121

<212>PRT

<213> 智人

<400>137

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

<210>138

<211>109

<212>PRT

<213> 智人

<400>138

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Lys Tyr His Ala
 20 25 30
 Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45

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

<210>139

<211>247

<212>PRT

<213> 智人

<400>139

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

Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala
 195 200 205
 Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
 210 215 220
 Cys Asn Ser Arg Asp Thr Ser Gly Leu His Tyr Val Phe Gly Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 245

<210>140

<211>5

<212>PRT

<213> 智人

<400>140

Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210>141

<211>17

<212>PRT

<213> 智人

<400>141

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

<210>142

<211>12

<212>PRT

<213> 智人

<400>142

His Ile Ser Glu Arg Pro Arg Gly Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210>143

<211>11

<212>PRT

<213> 智人

<400>143

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Lys Tyr His Ala Thr
 1 5 10

<210>144

<211>7

<212>PRT

<213> 智人

<400>144

Gly Lys Asn Arg Arg Pro Ser
 1 5

<210>145

<211>11

<212>PRT

<213> 智人

<400>145

Asn Ser Arg Asp Thr Ser Gly Leu His Tyr Val
 1 5 10

<210>146

<211>363

<212>DNA

<213> 智人

<400>146

caggtgcagc tgcaggagtc ggggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccagget 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtactag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgetgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaagac acggccgtat attactgtgc gacacatate 300
 tcggaacgtc cacgtgggtgc ttttgatate tggggccggg ggacaatggt caccgtctcg 360
 agt 363

<210>147

<211>327

<212>DNA

<213> 智人

<400>147

```
tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggccc tgggacagac agtcaggatc 60
acatgcccaag gagacagcct cagaaagtat catgcaactt ggtaccagca gaagccaagg 120
caggcccctg tacttgtcgt ctatggtaaa aacaggcgcc cctcagggat ccccgaccga 180
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccctgacca tctactggggc tcaggcggga 240
gatgaggctg actattactg taactcccgg gacaccagtg gtcttcatta tgtcttcgga 300
gctgggacca agctgaccgt cctaggt 327
```

<210>148

<211>741

<212>DNA

<213> 智人

<400>148

```
caggtgcagc tgcaggagtc ggggggagge ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttage agctatgcca tgagctgggt ccgccaggt 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtactag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccate tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaagac acggccgtat attactgtgc gacacatac 300
tcggaacgtc cacgtgggtc ttttgatata tggggccggg ggacaatggt caccgtctcg 360
agtggaggcg gcggttcagg cggagggtgc tctggcggtg gcggaagtgc actttcttct 420
gagctgactc aggaccctgc tgtgtctgtg gccctgggac agacagtcag gatcacatgc 480
caaggagaca gcctcagaaa gtatcatgca acttgggtacc agcagaagcc aaggcaggcc 540
cctgtacttg tcgtctatgg taaaaacagg cggccctcag ggatccccga ccgattctct 600
ggctccagct caggaaacac agcttccctg accatcactg gggctcagge gggagatgag 660
gctgactatt actgtaacte ccgggacacc agtgggtcttc attatgtctt cggagetggg 720
accaagctga ccgtcctagg t 741
```

<210>149

<211>15

<212>DNA

<213> 智人

<400>149

agctatgcca tgage

15

<210>150	
<211>51	
<212>DNA	
<213> 智人	
<400>150	
ggtattagtg gtagtggtac tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c	51
<210>151	
<211>36	
<212>DNA	
<213> 智人	
<400>151	
catatctcgg aacgtccacg tgggtcctttt gatatac	36
<210>152	
<211>33	
<212>DNA	
<213> 智人	
<400>152	
caaggagaca gcctcagaaa gtatcatgca act	33
<210>153	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 智人	
<400>153	
ggtaaaaaca ggcgcccctc a	21
<210>154	
<211>33	
<212>DNA	
<213> 智人	
<400>154	

aactcccggg acaccagtgg tcttcattat gtc

33

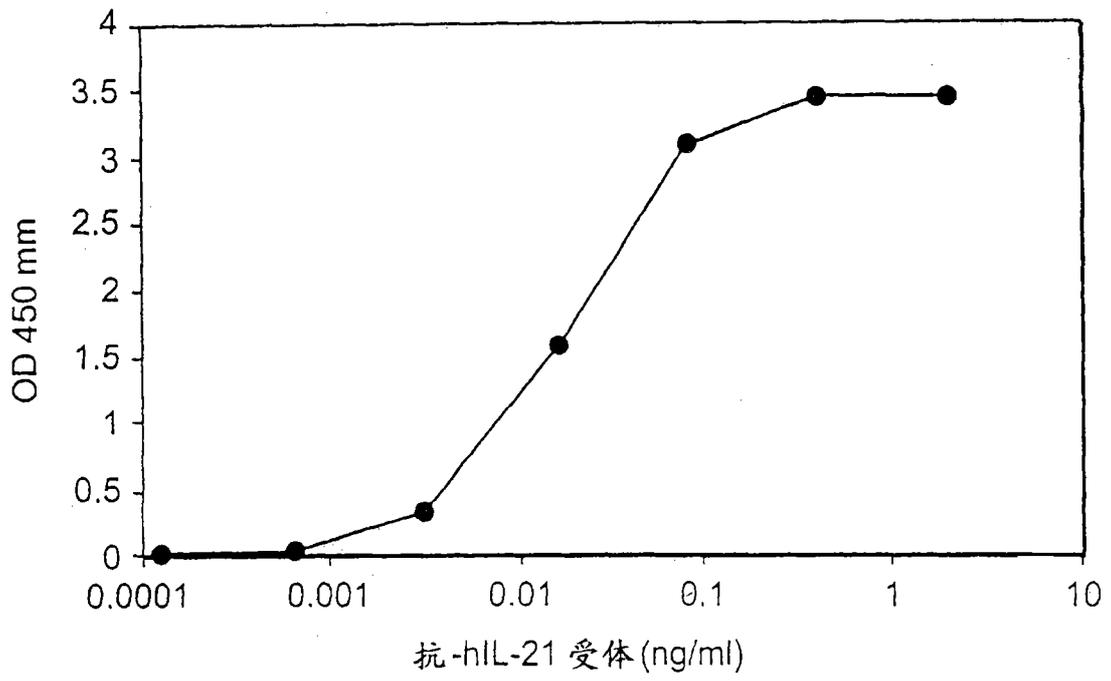


图 1A

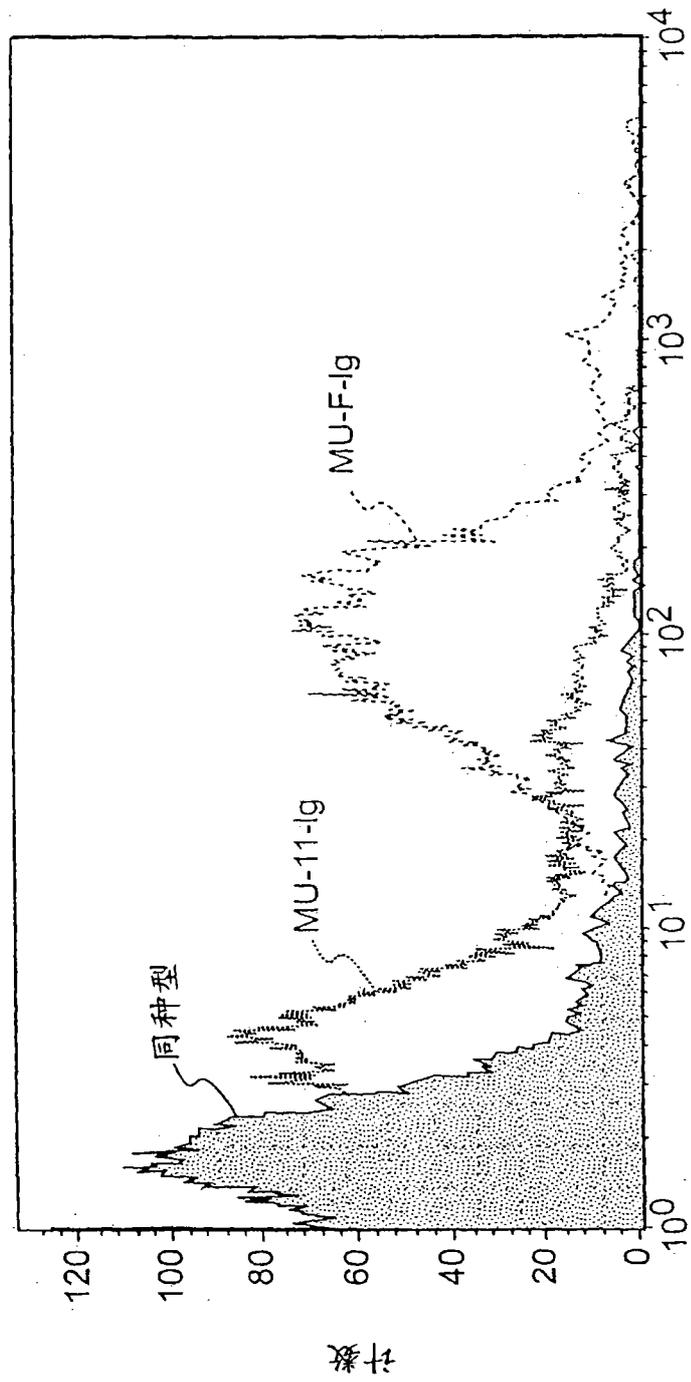


图 1B

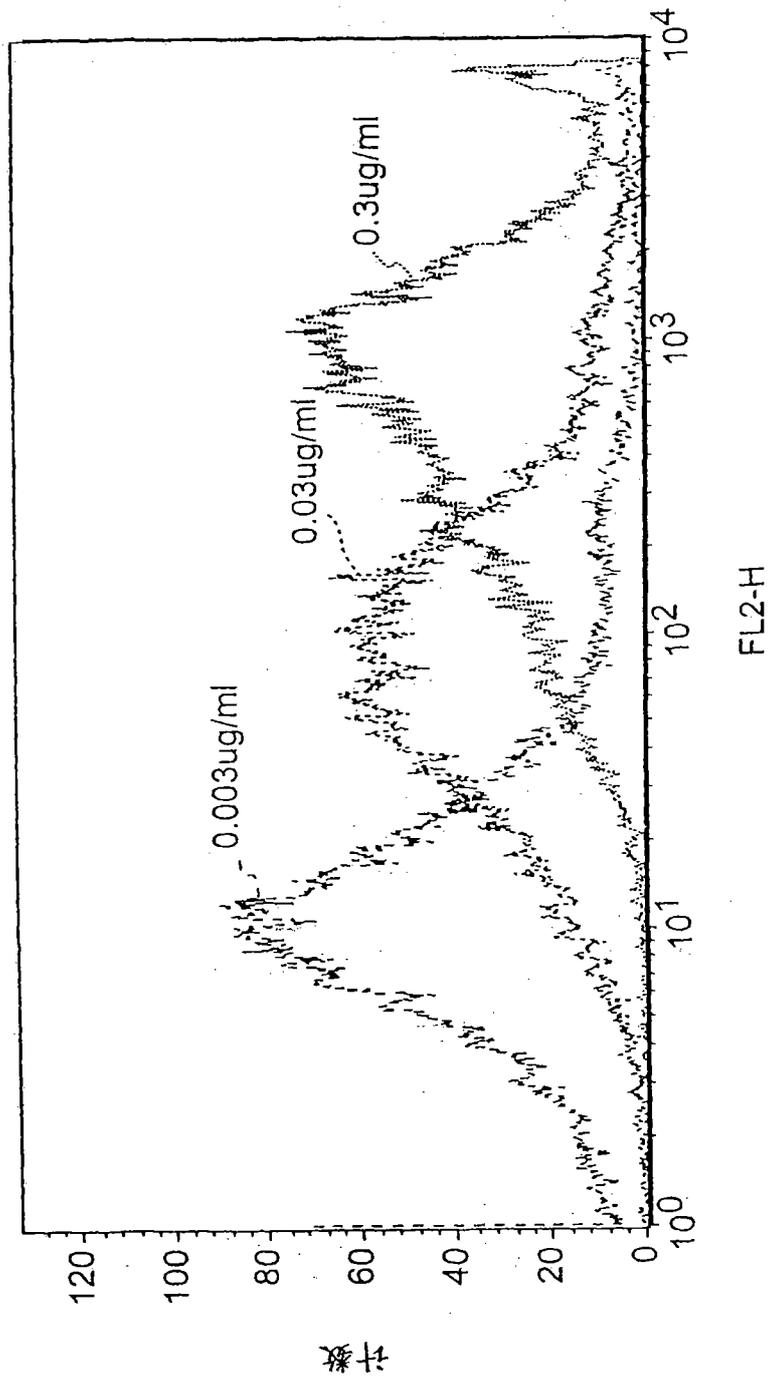


图 1C

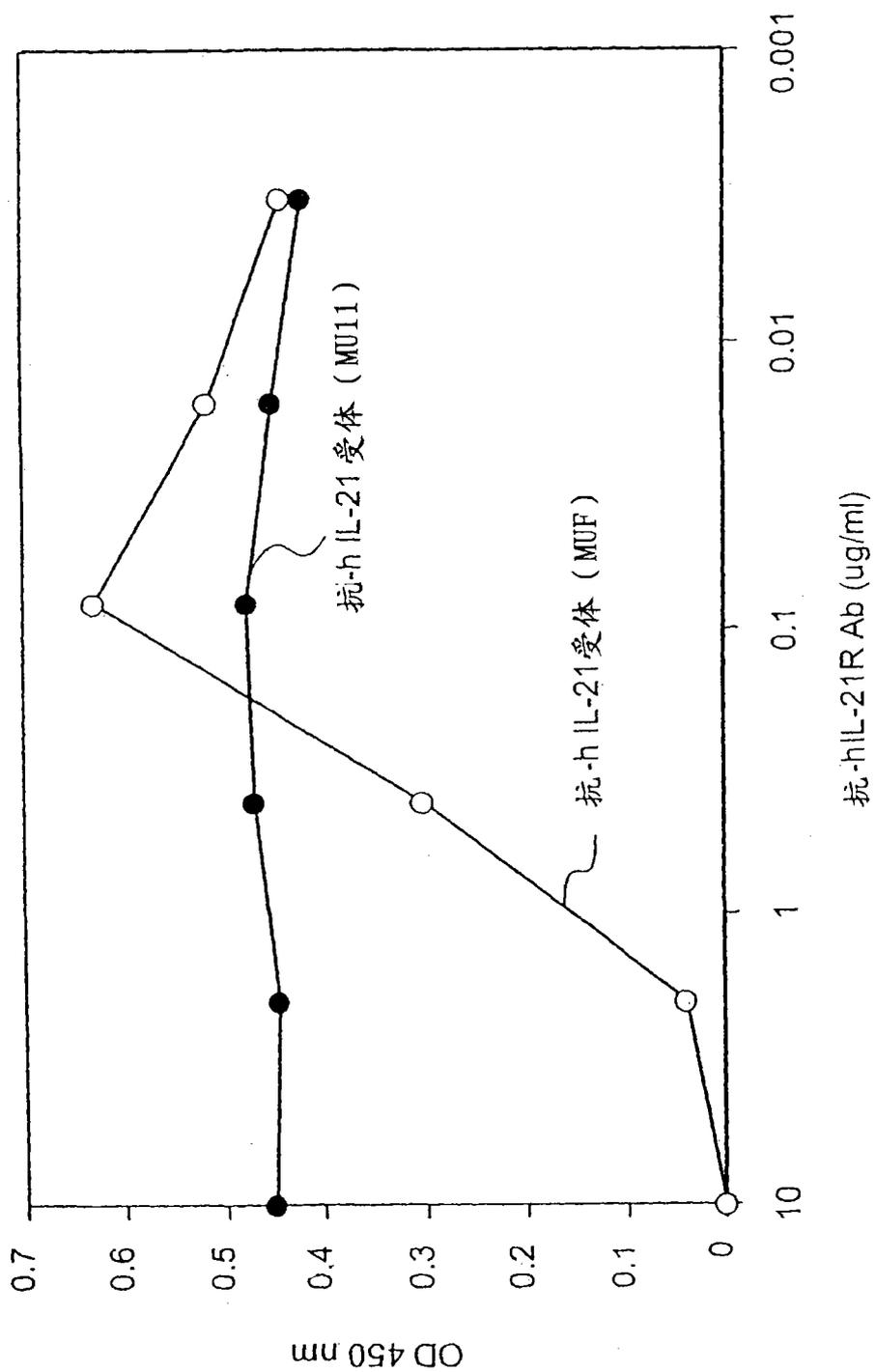


图 2

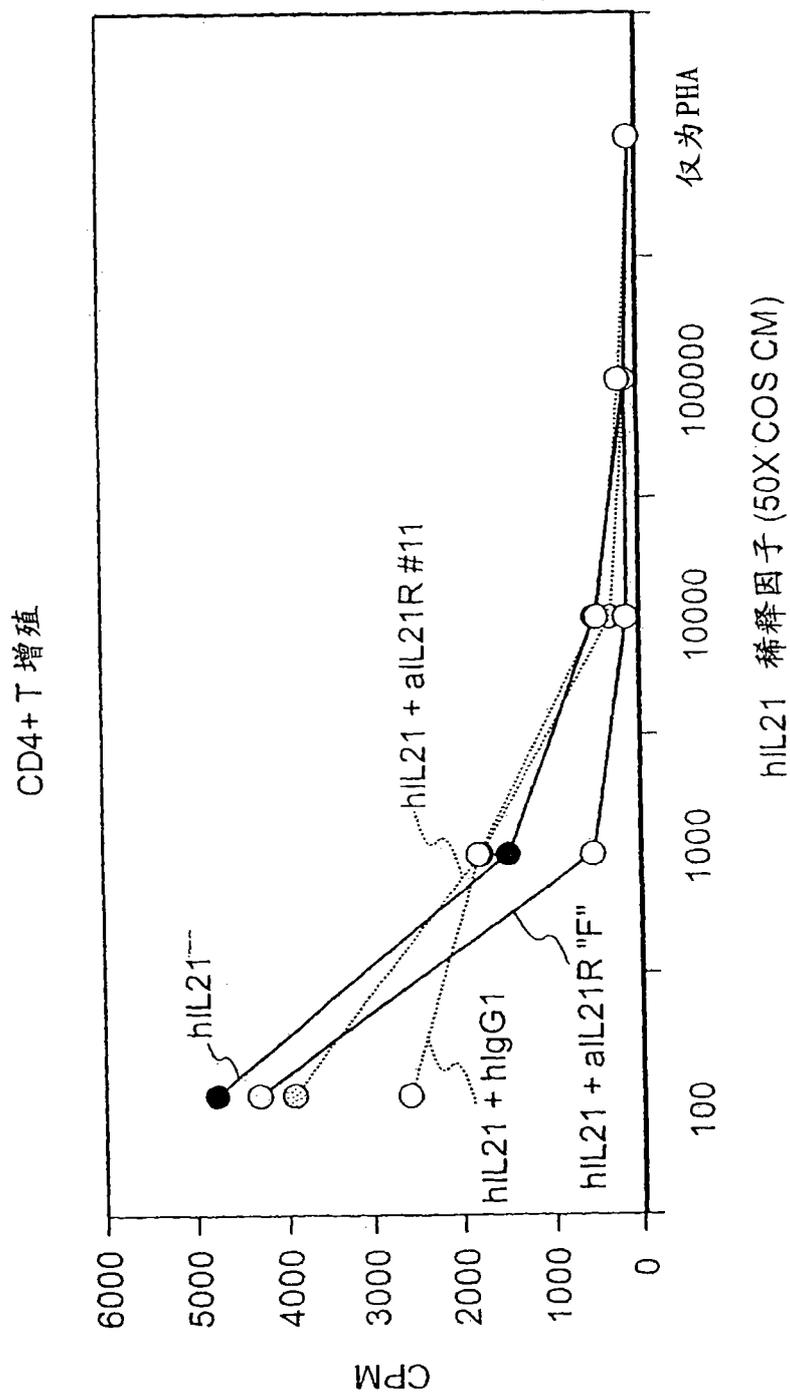


图 3A

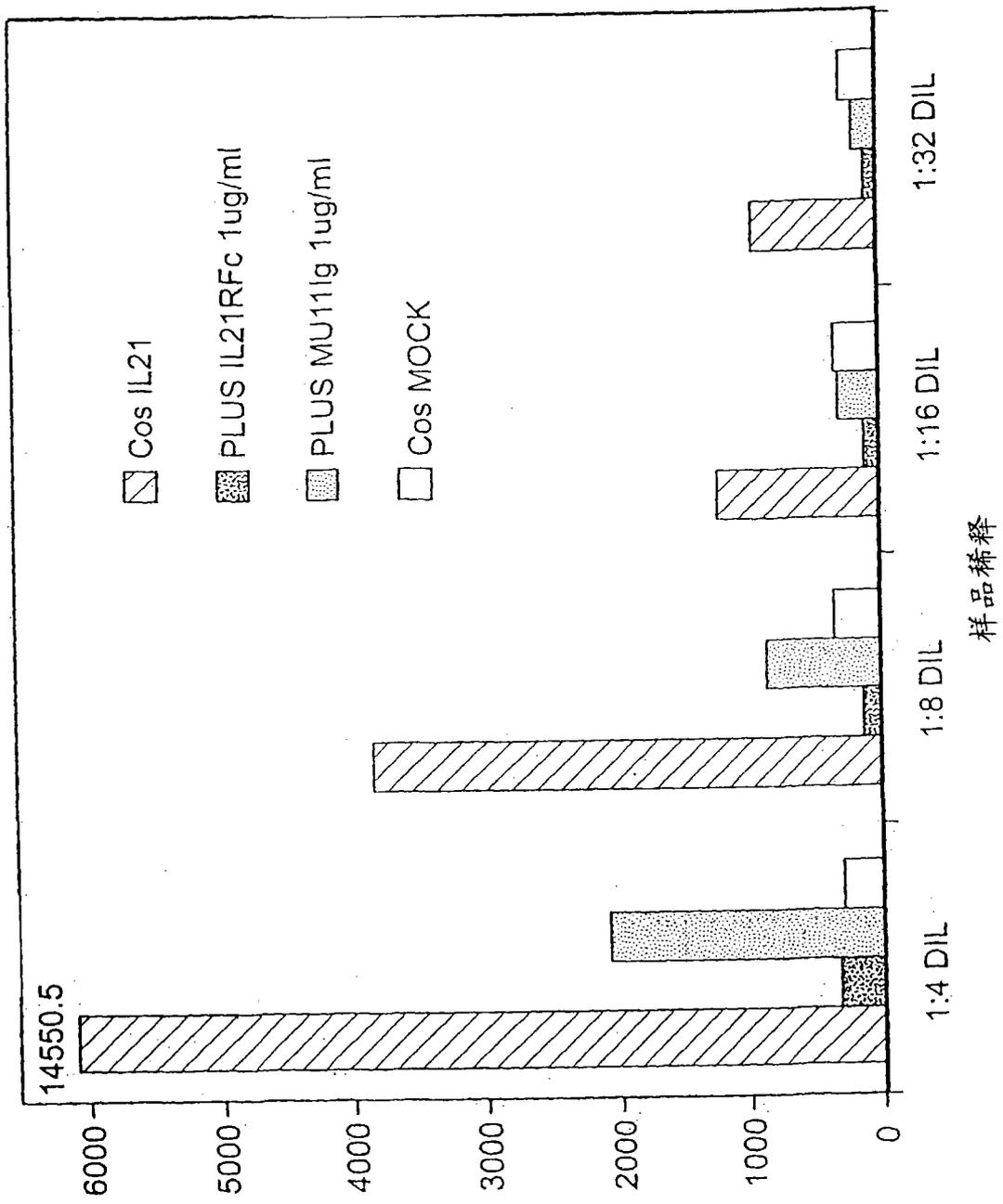


图 3B

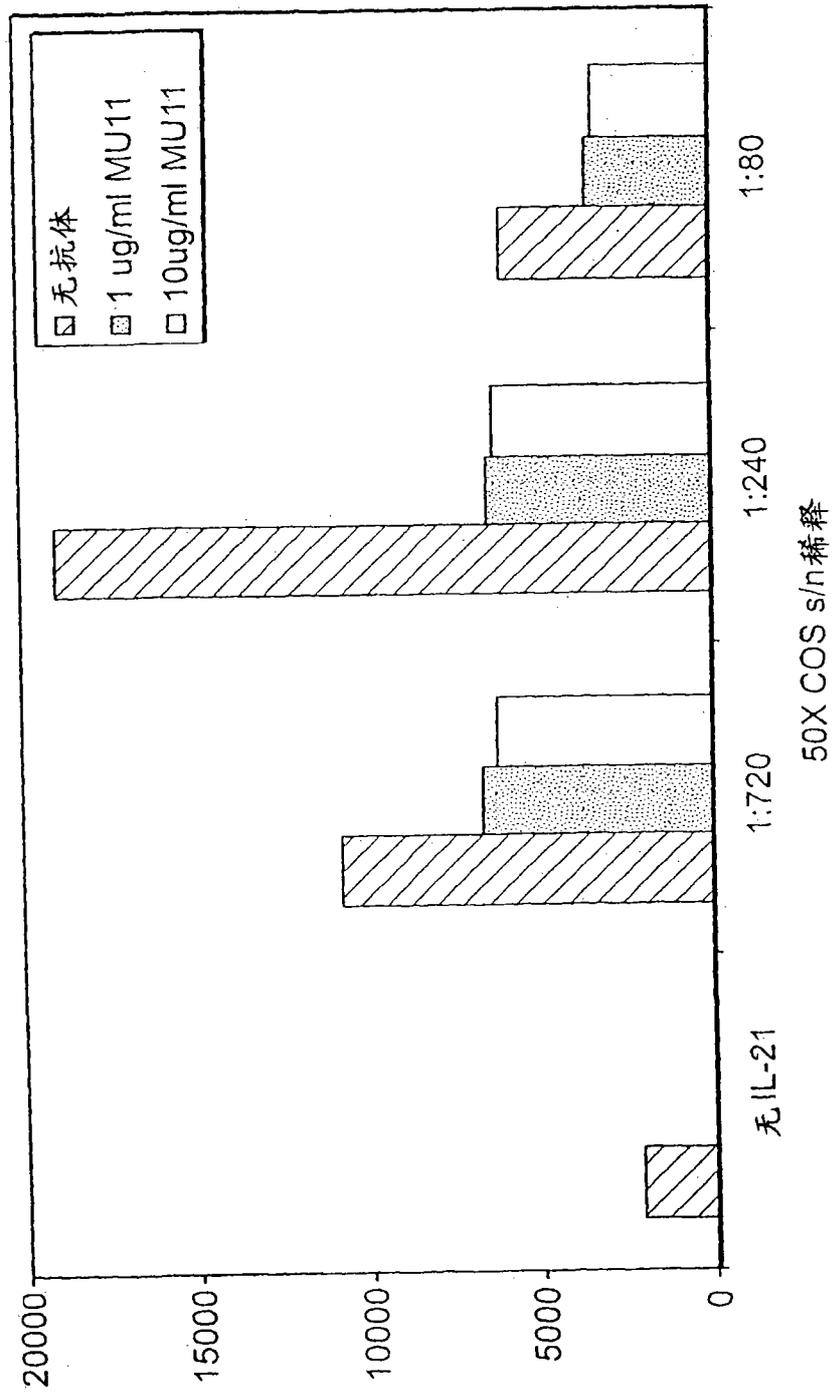


图 3C

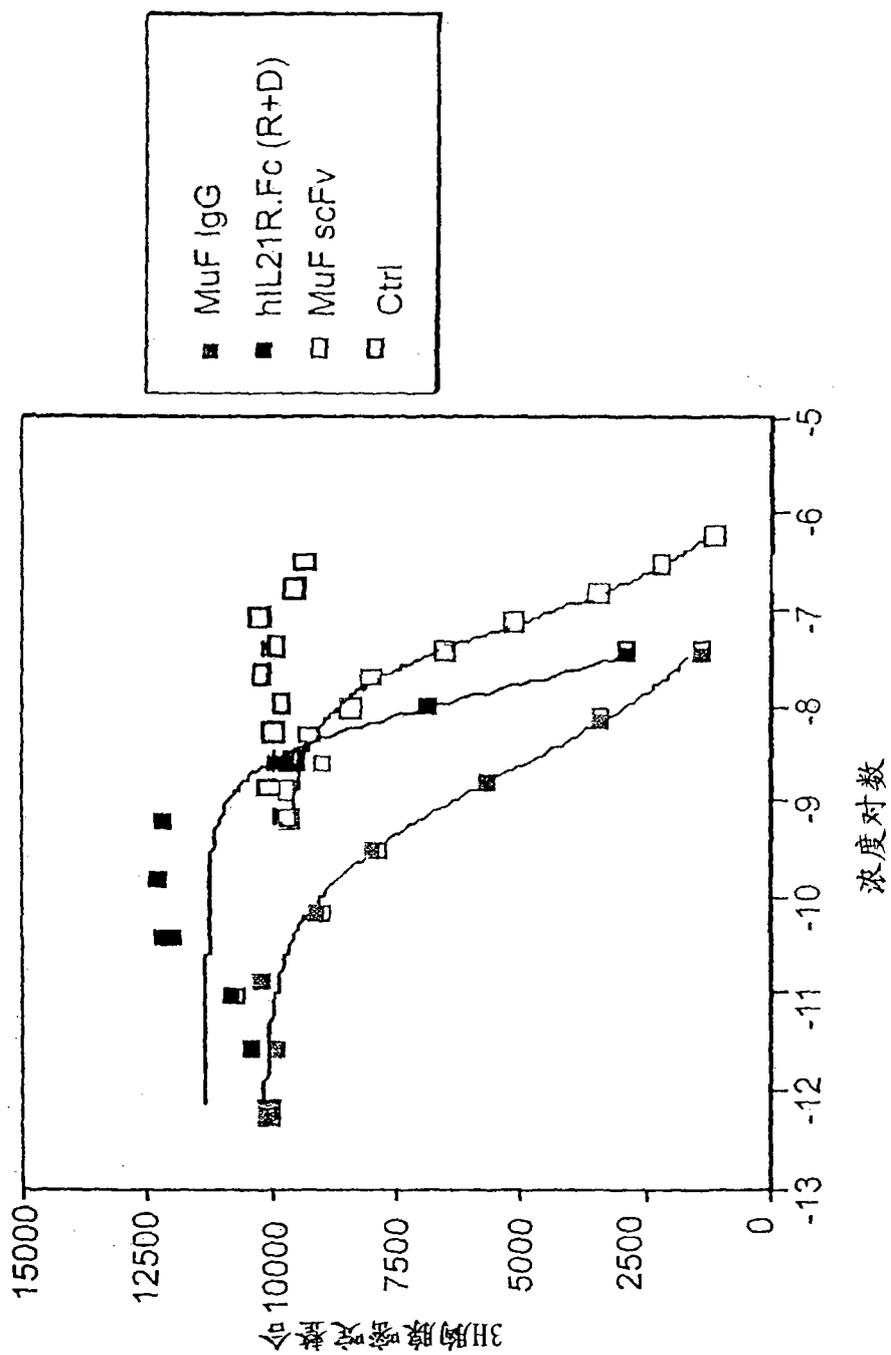


图 4

趋化因子

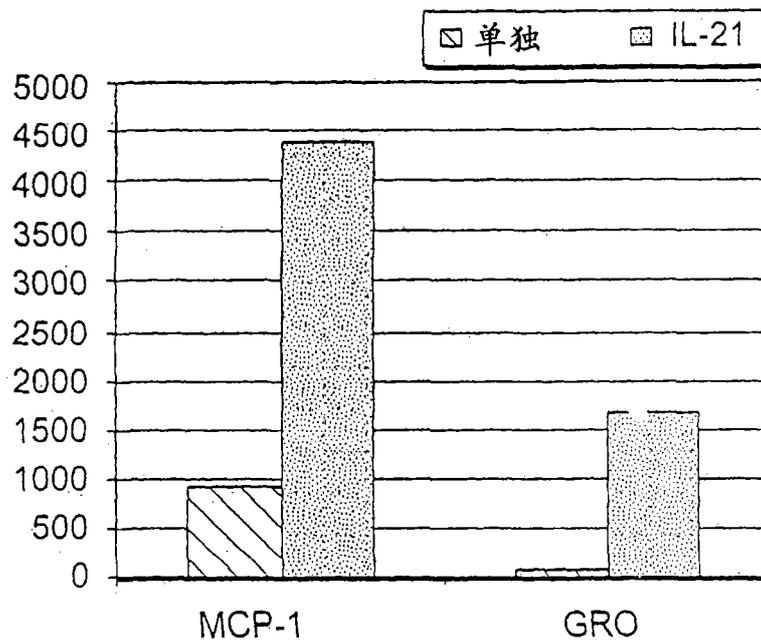


图 5A

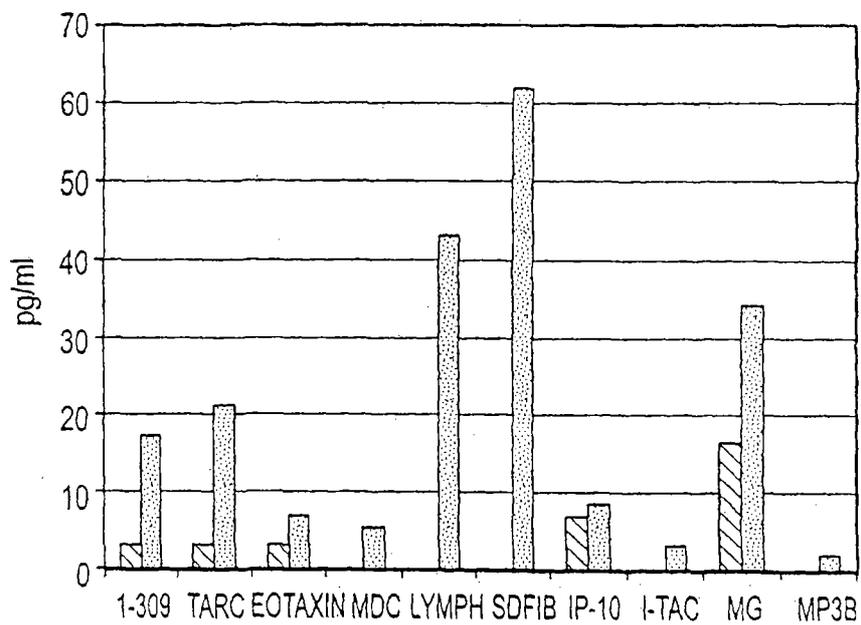


图 5B

细胞因子

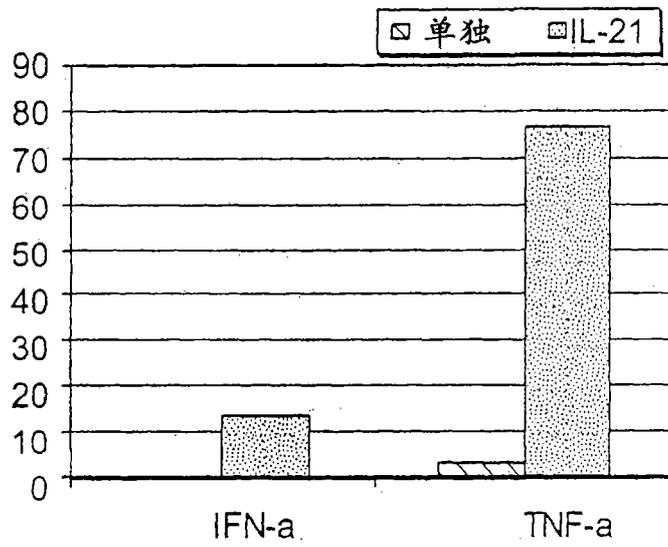


图 5C

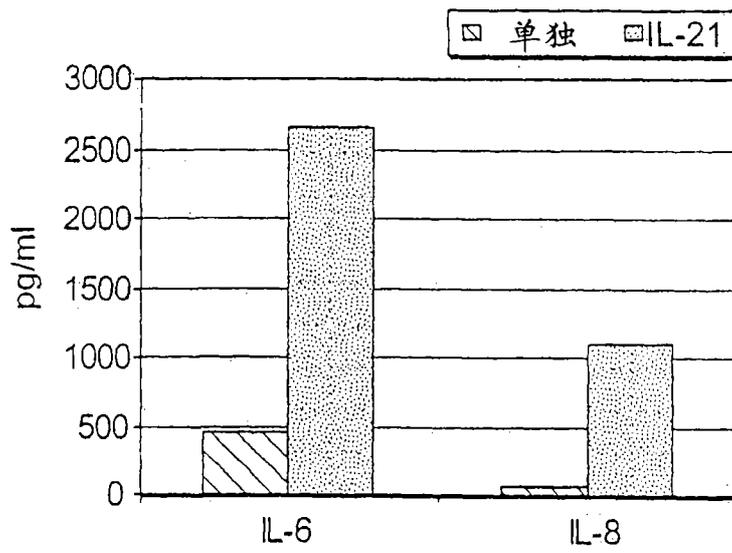


图 5D

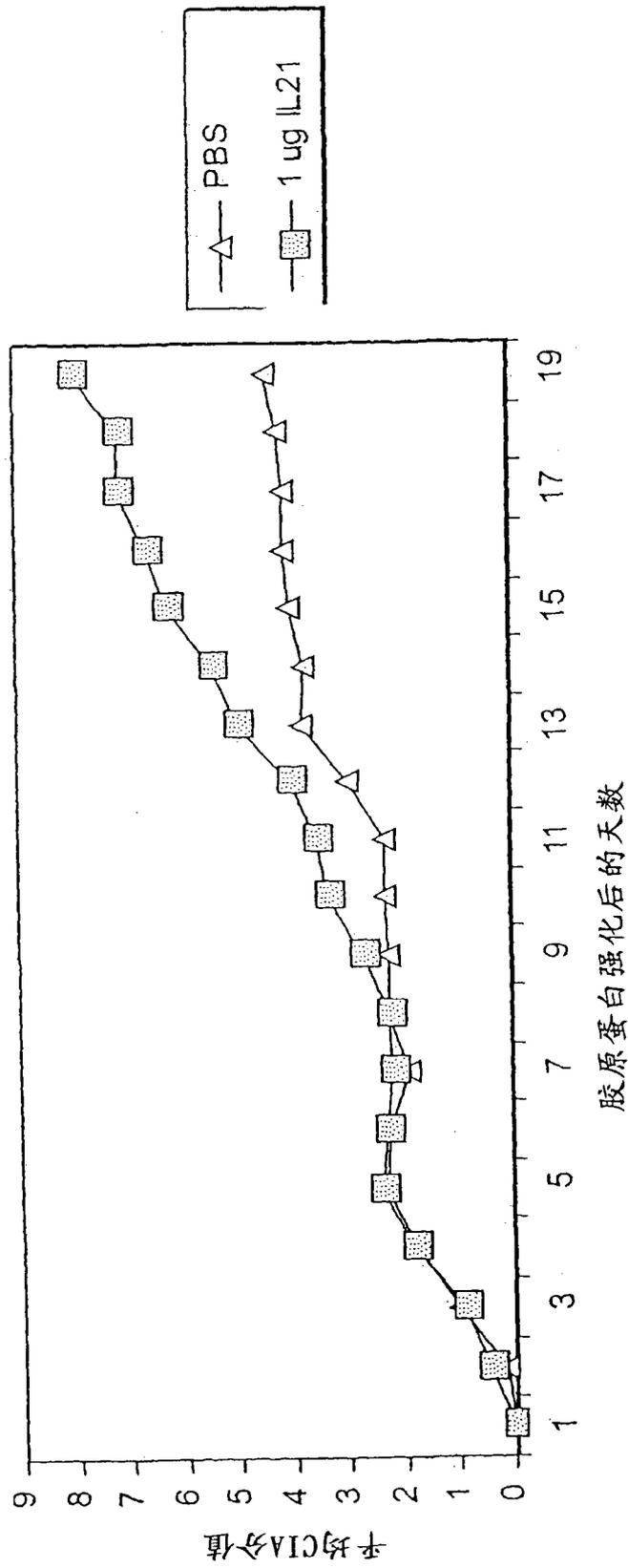


图 5E

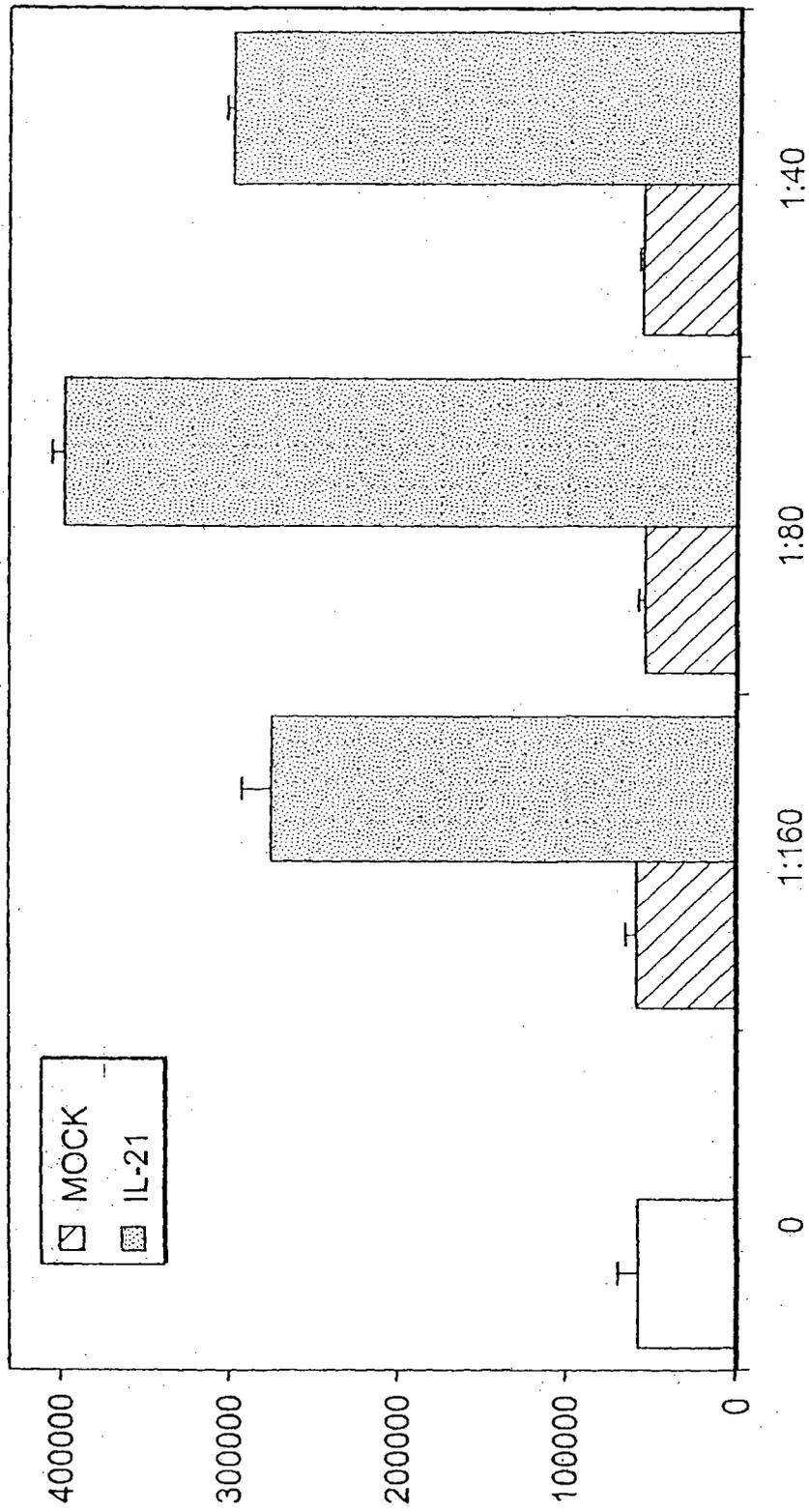


图 6

专利名称(译)	抗人IL-21受体的抗体及其应用		
公开(公告)号	CN102040662A	公开(公告)日	2011-05-04
申请号	CN201010165730.9	申请日	2004-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司 医学免疫有限公司		
申请(专利权)人(译)	惠氏有限责任公司 医学免疫有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	惠氏有限责任公司 医学免疫有限公司		
[标]发明人	DA扬 MJ惠特斯 V 瓦尔格 阿彻 M柯林斯 AJ威廉姆斯 J维特克		
发明人	D·A·扬 M·J·惠特斯 V·瓦尔格-阿彻 M·柯林斯 A·J·威廉姆斯 J·维特克		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/13 C12N15/63 C12N1/21 C12N1/19 C12N5/10 C12N5/20 C12P21/00 A61K39/395 A61P19/02 A61P19/04 A61P29/00 A61P37/02 A61P25/28 A61P19/08 A61P37/06 A61P17/00 A61P17 /06 A61P1/00 A61P35/00 G01N33/53 C12R1/91 A61P37/00		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/08 A61P25 /02 A61P25/28 A61P29/00 C07K16/2866 C07K2317/56 C07K2317/622		
优先权	60/454336 2003-03-14 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了特异性结合人白细胞介素-21受体(IL-21R)的人抗体和其抗原结合片段。所述抗体可作为IL-21R活性的拮抗剂，因此在总体上调节免疫应答，特别是那些由IL-21R介导的免疫应答。所述公开的组合物和方法可用于例如诊断、治疗和预防炎性疾病、自身免疫疾病、过敏、移植排斥、癌症和其它免疫系统疾病。

