



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107407677 B

(45)授权公告日 2020.07.17

(21)申请号 201680012171.3

(22)申请日 2016.01.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107407677 A

(43)申请公布日 2017.11.28

(30)优先权数据
62/108,914 2015.01.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.08.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/015344 2016.01.28

(87)PCT国际申请的公布数据
W02016/123329 EN 2016.08.04

(73)专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 M·汤森德 A·F·塞蒂亚迪
T·斯塔顿

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 凌立 黄革生

(51)Int.Cl.
G01N 33/564(2006.01)

审查员 贾静

权利要求书1页 说明书35页
序列表12页 附图31页

(54)发明名称

多发性硬化的基因表达标志和治疗

(57)摘要

本发明涉及多发性硬化的标志、其用途及用IL-17拮抗剂(包括IL-17抗体)治疗这类标志的水平提高的个体。

1. 试剂在制备用于鉴定罹患多发性硬化 (MS) 或处于发展MS风险的哺乳动物个体的试剂盒中的用途,其试剂用于在获自所述个体的生物样品中测量LRG1及选自TIMP1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的至少一个或多个基因的表达水平,

其中相对于对照提高的表达水平指示个体罹患多发性硬化或处于发展多发性硬化风险。

2. 权利要求1的用途,其中试剂用于测量TIMP1和LRG1的表达水平。

3. 权利要求2的用途,其中试剂用于在CSF中测量TIMP1和LRG1的表达水平。

4. 试剂在制备用于鉴定或预测有可能对IL-17拮抗剂治疗有反应的罹患多发性硬化 (MS) 或处于发展MS风险的哺乳动物个体的试剂盒中的用途,其试剂用于在获自所述个体的生物样品中测量LRG1及选自TIMP1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的至少一个或多个基因的表达水平,

如果一个或多个基因的表达水平相对于对照提高,则确定个体可能对治疗有反应。

5. 试剂在制备用于鉴定或预测对IL-17拮抗剂治疗有反应的可能性低的罹患多发性硬化 (MS) 或处于发展MS风险的哺乳动物个体的试剂盒中的用途,其试剂用于在获自所述个体的生物样品中测量LRG1及选自TIMP1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的至少一个或多个基因的表达水平,

如果一个或多个基因的表达水平相对于对照降低或处于同一水平,则确定个体对治疗有反应的可能性低。

6. 试剂在制备用于监测用IL-17拮抗剂治疗的罹患多发性硬化 (MS) 的哺乳动物个体的试剂盒中的用途,其试剂用于在获自所述个体的生物样品中测量LRG1及选自TIMP1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的至少一个或多个基因的表达水平,

确定一个或多个基因的表达水平是否相对于对照提高。

7. 权利要求4-6中任一项的用途,其中试剂用于测量TIMP1和LRG1的表达水平。

8. 权利要求7的用途,其中试剂用于在CSF中测量TIMP1和LRG1的表达水平。

9. 权利要求4-6中任一项的用途,其中试剂用于测量LRG1和TIMP1和/或G-CSF的表达水平。

10. IL-17拮抗剂在制备用于治疗罹患多发性硬化 (MS) 或处于发展MS风险的哺乳动物个体的药物中的用途,其中哺乳动物个体中选自TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的一个或多个基因的表达水平相对于对照提高,

其中IL-17拮抗剂是抗体或其抗原结合片段。

11. 权利要求10的用途,其中抗体是IL-17抗体或IL-17受体抗体或其抗原结合片段。

12. 权利要求11的用途,其中抗体是选自brodalumab、secukinumab、ixekizumab、bimekizumab、CNT0 6785、ALX-0761和afasevikumab的至少一种抗体。

13. 试剂在制备用于检测疑似罹患复发-缓解型多发性硬化 (RRMS) 或处于发展RRMS风险的哺乳动物个体中一个或多个基因的表达水平的试剂盒中的用途,其中试剂用于从个体获得的生物样品中测量LRG1及选自TIMP1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的至少一个或多个基因的表达水平,

其中如果表达水平相对于对照提高,则个体罹患RRMS或处于发展RRMS风险。

多发性硬化的基因表达标志和治疗

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2015年1月28日提交的美国临时申请号62/108,914的优先权,该临时申请在此以其整体引入作为参考。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表以ASCII格式电子提交,在此以其整体引入作为参考。于2016年1月13日创建的该ASCII拷贝命名为P32496W0_PCTSequenceListing.txt,大小为34,331字节。

技术领域

[0005] 本发明涉及多发性硬化的标志,该标志在鉴定罹患MS、处于发展MS的风险和/或用IL-17拮抗剂(如IL-17抗体)治疗的患者中的用途。

背景技术

[0006] 多发性硬化

[0007] 多发性硬化(MS)是影响中枢神经系统的脱髓鞘疾病,其中炎症发作导致高变的症状过程和进展(Compston,A.等,Lancet 372:1502-1517(2008))。发病通常在30-50岁之间,在女性中流行率更高,且具有显著的地理变异(Rosati,G.,Neurol Sci 22:117-139(2001))。存在一大系列症状,反映了脱髓鞘的多样化解剖学靶标,但典型症状包括:虚弱、疲劳、视力丧失、认知受损及平衡和协调受损(Compston,上文)。MS发作在时间上也无规律,导致MS病灶在空间(位置)和时间上都分散的一般规律(Adams,R等,Principles of Neurology.第6版,(McGraw-Hill,1997))。这些症状通常可足以作出MS的诊断,但磁共振成像(MRI)也有帮助,连同分析脑脊液和神经诱发电位测量结果。MS通常始于可逆神经功能缺损(复发-缓解期或RRMS),其最终在晚年进展至固定的失能(继发性进展期)(Adams等,上文)。与该疾病的其他方面一样,此进展的类型、严重度和时间在患者间可以非常不同,一些患者在开始时出现伴随快速进展的严重失能(原发性进行性MS或PPMS),而少数其他患者具有孤立的相对轻的症状。

[0008] 目前没有MS的治愈方法,虽然目前在新治疗中取得一些进展,但该疾病仍然是治疗挑战(Kieseier,B.C.等,Curr Opin Neurol 20:286-293(2007))。标准治疗包括旨在抑制急性复发期间的炎症反应的糖皮质激素,有时用血浆去除术来从血流去除循环抗体(Giovannoni,G.等,Curr Opin Neurol 20:261-268(2007))。醋酸格拉默(Glatiramer acetate)和干扰素 β 1a也用于RRMS,但即使早期干预,在PPMS中和在改变MS的最终过程不是尤其有效(Compston等,上文;Kieseier等,上文)。更特异的免疫治疗使用单克隆抗体来靶向涉及MS的具体表面分子。那他珠单抗(Natalizumab)结合白细胞上的 α 4整联蛋白,从而减少其数目,但由于进行性多灶性白质脑病(PML)的不良反应,此药物仅在其他治疗失败时使用(Kieseier等,上文)。其他单克隆抗体利妥昔单抗(rituximab)(抗CD20抗体)和达利珠单抗(daclizumab)(靶向CD-25)具有相似的原理,但同样不是治愈性的,且具有其他免疫学副

作用。

[0009] IL-17

[0010] 白细胞介素-17A (IL-17A, 本领域中常称为IL-17) 是T细胞来源的促炎症分子, 其刺激上皮、内皮和成纤维细胞来产生其他炎症细胞因子和趋化因子, 包括IL-6、IL-8、G-CSF和MCP-1 (参见Yao, Z. 等, *J. Immunol.*, 122 (12) : 5483-5486 (1995); Yao, Z. 等, *Immunity*, 3 (6) : 811-821 (1995); Fossiez, F. 等, *J. Exp. Med.*, 183 (6) : 2593-2603 (1996); Kennedy, J. 等, *J. Interferon Cytokine Res.*, 16 (8) : 611-7 (1996); Cai, X.Y. 等, *Immunol. Lett.*, 62 (1) : 51-8 (1998); Jovanovic, D.V. 等, *J. Immunol.*, 160 (7) : 3513-21 (1998); Laan, M. 等, *J. Immunol.*, 162 (4) : 2347-52 (1999); Linden, A. 等, *Eur Respir J*, 15 (5) : 973-7 (2000); 及 Aggarwal, S. 和 Gurney, A.L., *J Leukoc Biol.* 71 (1) : 1-8 (2002)。IL-17还与其他细胞因子 (包括TNF- α 和IL-1 β) 协同作用来进一步诱导趋化因子表达 (Chabaud, M. 等, *J. Immunol.* 161 (1) : 409-14 (1998))。IL-17A对多种类型的细胞显示多效性生物活性。IL-17A还具有诱导ICAM-1表面表达、T细胞增殖及人CD34⁺人祖细胞生长和分化为嗜中性粒细胞的能力。还已将IL-17A与骨代谢相关联, 已提出其在特征在于活化T细胞的存在和TNF- α 产生的病理病症 (如类风湿性关节炎和骨植入物松弛) 中发挥重要作用 (Van Bezooijen等, *J. Bone Miner. Res.*, 14:1513-1521 (1999))。

[0011] 白细胞介素17A已被公认为不断出现的细胞因子家族的原型成员。人和其他脊椎动物基因组的大规模测序已揭示存在编码与IL-17A明显相关的蛋白质的其他基因, 从而定义了新的细胞因子家族。人类和小鼠中存在至少6个IL-17家族成员, 包括IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F (参见2001年6月28日公开的W001/46420)。IL-17A和IL-17F都作为二硫键连接的同型二聚体 (分别为“IL-17AA”和“IL-17FF”) 分泌。此外, 已鉴定出包含二硫键连接的IL-17A和IL-17F的异型二聚体种类 (“IL-17A/F”)。初步表征表明, 与IL-17A一样, 这些新鉴定出的IL-17分子中的若干个具有调节免疫功能的能力。针对这些因子中的若干个鉴定出的有效的炎症作用和不断出现的与主要人疾病的相关性表明, 这些蛋白质在炎症过程中可具有显著的作用, 可以提供治疗干预的机会。

[0012] 编码人IL-17F的基因邻近IL-17A定位 (Hymowitz, S.G. 等, *Embo J*, 20 (19) : 5332-41 (2001))。IL-17A和IL-17F具有约44%氨基酸同一性, 而IL-17家族的其他成员具有更有限的15-27%氨基酸同一性, 表明IL-17A和IL-17F在IL-17家族内形成不同亚组 (Starnes, T. 等, *J Immunol.* 167 (8) : 4137-40 (2001); Aggarwal, S. 和 Gurney, A.L., *J. Leukoc Biol.* 71 (1) : 1-8 (2002))。IL-17F似乎具有与IL-17A相似的生物学作用, 能够促进从多种细胞产生IL-6、IL-8和G-CSF。与IL-17A类似, 它能够诱导软骨基质释放和抑制新软骨基质合成 (参见2002年11月28日公开的U.S. 2002-0177188-A1)。因此, 与IL-17A一样, IL-17F可能促成炎症障碍的病理。已报到, IL-17A和IL-17F二者都通过白细胞介素23 (IL-23) 的作用在T细胞中诱导 (Aggarwal, S. 等, *J. Biol. Chem.*, 278 (3) : 1910-4 (2003))。更具体而言, IL-17A和IL-17F二者都已作为人类和人疾病的小鼠模型中多种炎性和自身免疫疾病的进展和病理的促进剂涉及。实际上, IL-17A和 (在较小程度上) IL-17F已作为触发炎症反应从而促成许多自身炎性 (自身免疫) 疾病 (包括多发性硬化 (MS)) 的效应细胞因子涉及 (Matusevicius等, *Mult. Scler.*, 5:101-104 (1999); Kurasawa, K. 等, *Arthritis Rheu* 43 (11) : 2455-63 (2000))。

[0013] IL-17A的人受体IL-17RA的氨基酸序列在NCBI GenBank检索号NP_055154.3下可得。迄今为止,已根据与IL-17RA的序列同源性在IL-17R家族中鉴定出至少4个其他受体(IL-17RB、IL-17RC、IL-17RD和IL-17RE),其中已显示IL-17RC与IL-17RA物理结合,表明它可以是IL-17R复合物中的功能性成分(Toy, D.等, *J. Immunol.* 177:36-39 (2006))。已报道,IL-17RC是IL-17A和IL-17F二者的受体(Presnell等, *J. Immunol.* 179 (8):5462-73 (2007))。

[0014] 发明概述

[0015] 在一方面,本发明提供鉴定罹患多发性硬化(MS)或处于发展MS风险的哺乳动物个体的方法,其包括在获自该个体的生物样品中测量选自TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的一个或多个基因的表达水平;其中相对于对照提高的表达水平指示该个体罹患多发性硬化或处于发展多发性硬化的风险。

[0016] 在另一方面,本发明提供鉴定或预测可能对IL-17拮抗剂治疗有反应的罹患多发性硬化(MS)或处于发展MS风险的哺乳动物个体的方法,其包括在获自该个体的生物样品中测量选自TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的一个或多个基因的表达水平;如果该一个或多个基因的表达水平相对于对照提高,则确定该个体可能对治疗有反应。

[0017] 在另一方面,本发明提供鉴定或预测对IL-17拮抗剂治疗有反应的可能性低的罹患多发性硬化(MS)或处于发展MS风险的哺乳动物个体的方法,其包括在获自该个体的生物样品中测量选自TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的一个或多个基因的表达水平;如果该一个或多个基因的表达水平相对于对照降低或处于同一水平,则确定该个体对治疗有反应的可能性低。

[0018] 在另一方面,本发明提供监测用IL-17拮抗剂治疗的罹患多发性硬化(MS)的哺乳动物个体的方法,其包括在获自该个体的生物样品中测量选自TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的一个或多个基因的表达水平,并确定该一个或多个基因的表达水平是否相对于对照提高。在本发明的实施方案中,相对于对照提高的表达水平指示继续用IL-17拮抗剂治疗。

[0019] 在另一方面,本发明还提供治疗罹患多发性硬化(MS)或处于发展MS风险的哺乳动物个体的方法,其包括在获自该个体的生物样品中测量选自TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的一个或多个基因的表达水平;并对该一个或多个基因的表达水平相对于对照提高的个体施用有效量的IL-17拮抗剂。

[0020] 在另一方面,本发明提供检测疑似罹患复发-缓解型多发性硬化(RRMS)或处于发展RRMS风险的哺乳动物个体中一个或多个基因的表达水平的方法,其包括从该个体获得生物样品;在该生物样品中测量选自TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的一个或多个基因的表达水平。在本发明的实施方案中,该方法进一步包括,如果该表达水平相对于对照提高,则确定该个体罹患RRMS或处于发展RRMS风险。

[0021] 在本发明的任意方面的实施方案中,该哺乳动物个体是人患者。在另一实施方案中,该多发性硬化的特征在于IL-17水平提高。在具体实施方案中,该个体的脑脊液(CSF)中的IL-17水平提高。在另一实施方案中,该多发性硬化是复发-缓解型多发性硬化(RRMS)。还在另一实施方案中,该IL-17是IL-17AA。在另一实施方案中,测量一个或多个基因的RNA转录物的表达水平,在另一实施方案中,测量一个或多个基因的蛋白质产物的表达水平。

[0022] 在本发明的任意方面的另一实施方案中,该生物样品是生物流体。在一个实施方案中,该生物流体是脑脊液(CSF)。在另一实施方案中,该生物流体是血清,还在另一实施方案中,该生物流体是血浆。

[0023] 还在本发明的任意方面的另一实施方案中,测量TIMP1的表达水平。在另一实施方案中,测量LRG1的表达水平。还在另一实施方案中,测量NF κ BIZ的RNA转录物的表达水平。在本发明的实施方案中,在血清中测量G-CSF的表达水平。在另一实施方案中,在血浆中测量选自CXCL1、CXCL5和CXCL10的一个或多个基因的表达水平。在另一实施方案中,测量该基因中的两个或多个的表达水平,在另一实施方案中,测量该基因中的三个或多个的表达水平。

[0024] 在本发明的任意方面的另一实施方案中,测量TIMP1和选自LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NF κ BIZ、YKL40和G-CSF的至少一个或多个基因的表达水平。在另一实施方案中,测量LRG1和选自TIMP1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NF κ BIZ、YKL40和G-CSF的至少一个或多个基因的表达水平。在具体实施方案中,测量TIMP1和LRG1的表达水平。在另一实施方案中,在CSF中测量TIMP1和LRG1的表达水平。在另一实施方案中,测量TIMP1和/或LRG1和G-CSF的表达水平。还在另一实施方案中,在CSF中测量TIMP1和/或LRG1的表达水平,在血清中测量G-CSF的表达水平。在另一实施方案中,测量TIMP1、LRG1和G-CSF的表达水平。

[0025] 在本发明的任意方面的另一实施方案中,本发明的方法进一步包括对鉴定罹患MS、预测罹患MS或处于发展MS风险的个体施用有效量的IL-17拮抗剂。在本发明的任意方面的具体实施方案中,本发明的方法进一步包括对确定为所公开的基因中的一个或多个的表达水平相对于对照提高的个体施用有效量的IL-17拮抗剂。在本发明的实施方案中,该IL-17拮抗剂是抗体或其抗原结合片段。在具体实施方案中,该抗体是IL-17抗体或IL-17受体抗体。在一个实施方案中,该抗体是选自brodalumab、secukinumab、ixekizumab、bimekizumab、CNT0 6785、ALX-0761和afasevikumab的至少一种抗体。在另一实施方案中,该抗体是IL-17抗体,该IL-17抗体结合IL-17A同型二聚体、IL-17F同型二聚体和/或IL-17AF异型二聚体。在一个实施方案中,该抗体是结合IL-17A同型二聚体的IL-17抗体。在另一实施方案中,该IL-17抗体结合IL-17AA和IL-17AF。还在另一实施方案中,该抗体是结合IL-17F同型二聚体的IL-17抗体。在另一实施方案中,该抗体是结合IL-17A/F异型二聚体的IL-17抗体。在另一实施方案中,该抗体是单克隆抗体。还在另一实施方案中,该抗体是嵌合、人源化或人抗体。还在另一实施方案中,该抗体是双特异性、多特异性或交叉反应性抗体。

[0026] 还在本发明的任意方面的另一实施方案中,本发明的方法进一步包括施用有效量的多发性硬化(MS)治疗剂。在本发明的一个实施方案中,该MS治疗剂是选自反丁烯二酸二甲酯、FTY-720、那他珠单抗、糖皮质激素、 β -干扰素、醋酸格拉默、特立氟胺(teriflunomide)、米托蒽醌(mitoxantrone)和抗CD20抗体的至少一种药物。

[0027] 在另一方面,本发明提供用于检测罹患多发性硬化(MS)或处于发展MS风险的哺乳动物个体中一个或多个基因的表达水平的试剂盒,其包含至少一个含有用于检测选自TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NF κ BIZ、YKL40和G-CSF的一个或多个基因的表达水平的一种或多种试剂的容器。在本发明的一个实施方案中,该一种或多种试剂包含用于检测一个或多个基因的RNA转录物的表达水平和/或蛋白质产物的表达水平的试剂。在另一实施方案中,该试剂包含该一个或多个基因的一个或多个基因特异性引物或探针。在另一

实施方案中,该一种或多种试剂包含用于检测该一个或多个基因的蛋白质产物的表达水平的试剂。还在另一实施方案中,该试剂包含结合该一个或多个基因的蛋白质产物的一种或多种抗体或其抗原结合片段。本发明的试剂盒可以进一步包含含有IL-17拮抗剂的容器和对该个体施用该IL-17拮抗剂的标签或说明书。在一个实施方案中,该IL-17拮抗剂是抗体或其抗原结合片段。在另一实施方案中,该抗体是IL-17抗体或IL-17受体抗体。在另一实施方案中,该抗体是结合IL-17A同型二聚体、IL-17F同型二聚体和/或IL-17AF异型二聚体的IL-17抗体。在本发明的多种实施方案中,MS是复发-缓解型MS (RRMS)。

[0028] 附图简述

[0029] 图1A-1B显示(A)天然人IL-17A cDNA的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)和(B)源自图1A中所示SEQ ID NO:1的编码序列的天然人IL-17A的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。信号肽下划线。

[0030] 图2A-2B显示(A)天然人IL-17F cDNA的核苷酸序列(SEQ ID NO:3)和(B)源自图2A中所示SEQ ID NO:3的编码序列的天然人IL-17F的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。信号肽下划线。

[0031] 图3A-3E显示(A-D)天然人IL-17RA cDNA的核苷酸序列(SEQ ID NO:5)和(E)源自图3A-3C中所示SEQ ID NO:4的编码序列的天然人IL-17RA的氨基酸序列(SEQ ID NO:6)。

[0032] 图4A-4B显示(A)天然人IL-17RC cDNA的核苷酸序列(SEQ ID NO:7)和(B)源自图4A中所示SEQ ID NO:8的编码序列的天然人IL-17RC的氨基酸序列(SEQ ID NO:8)。

[0033] 图5显示IL-17途径在MS病理发生中可能的作用。

[0034] 图6显示下文实施例1中所述在RRMS CSF样品中提高的多种炎症介质eotaxin、CXCL10、TARC和MCP4(对于所有分析物,与健康供体(HD)相比, $p < 0.03$)。

[0035] 图7A-7B显示,如下文实施例1中所述,(A)与健康供体(HD)相比,RRMS患者中CSF IL-17AA和IL-17FF提高($p < 0.0001$,Wilcoxon检验),(B)与HD相比,RRMS患者中血清IL-17AA或IL-17FF未提高。

[0036] 图8A-8B显示,IL-17A刺激时,(A)人脑内皮细胞和(B)小胶质细胞中的NF κ BIZ、CXCL1、IL-6和CSF3上调,且在TNFa和IL-6+6R存在下进一步放大(除括号中有“FC”(代表“倍数变化”)的那些之外,对于所有比较, $p < 0.05$ (配对t检验))。参见下文实施例2。

[0037] 图9显示用来评估MS的实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型中的基因表达的方法,及IL-17抗体对基因表达途径的影响,如下文实施例3中所述。

[0038] 图10A-1和图10A-2显示淋巴细胞(CD4和CD45)增加,图10B-1和图10B-2显示顶峰EAE疾病时髓鞘质(myelin)成分(Mobp和Mog)基因表达减少,如下文实施例3中所述。

[0039] 图11显示疾病顶峰时EAE脊髓中CHI3L1、TIMP1、IL-6、CXCL1、LRG1和NF κ B1的上调,及抗IL-17AA/AF+抗IL-17FF抗体对基因表达的阻断,如下文实施例3中所述。

[0040] 图12A-12F显示多种处理的EAE模型中基因(A)NF κ BIZ、(B)CXCL1、(C)IL-6、(D)YKL40(CHI3L1)、(E)TIMP1和(F)LRG1的转录物丰度图,如下文实施例3中所述。

[0041] 图13显示多种处理的EAE模型中CXCL5的转录物丰度图,如下文实施例3中所述。

[0042] 图14显示RRMS CSF中TIMP1和LRG1提高,且与CSF IL-17AA相关,如下文实施例4中所述。

[0043] 图15显示多种处理的EAE模型中血清G-CSF水平,如下文实施例5中所述。

[0044] 图16显示来自正常个体和RRMS患者的血清中的人G-CSF水平,如下文实施例5中所述。

[0045] 发明详述

[0046] 定义

[0047] 除非另有说明,本文中所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员的通常理解相同的含义。Singleton等,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology第2版,J.Wiley&Sons (New York,NY 1994)和March,Advanced Organic Chemistry Reactions,Mechanisms and Structure第4版,John Wiley&Sons (New York,NY 1992)为本领域技术人员提供了本申请中所用的许多术语的一般指导。

[0048] 本领域技术人员将辨认出于本文所述的方法和材料相似或等同的许多方法和材料,这些方法和材料可用于实施本发明。实际上,本发明不以任何方式限于所述的方法和材料。为了本发明的目的,下文定义以下术语。

[0049] 除非另有说明,本文所用的术语“IL-17”指IL-17A和/或IL-17F,以及它们的同型二聚体和异型二聚体,且除非另有说明,指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,如灵长类(例如人类)和啮齿类(例如小鼠和大鼠))的任何天然IL-17。该术语涵盖全长未加工的IL-17,以及产生自细胞内加工的任何形式的IL-17,包括该蛋白质的前体形式和成熟形式。该术语还涵盖天然存在的IL-17变体,例如剪接变体或等位基因变体。除包含二硫键连接的IL-17A和IL-17F的异型二聚体种类(“IL-17A/F”)外,IL-17A和IL-17F都作为二硫键连接的同型二聚体(分别为“IL-17AA”和“IL-17FF”)分泌。因此,该术语还涵盖IL-17的同型二聚体和异型二聚体。本文所用的“IL-17AA”指IL-17A同型二聚体,“IL-17FF”指IL-17F同型二聚体。“IL-17A/F”或“IL-17AF”指IL-17A和IL-17F异型二聚体。除非另有说明,本文所用的“IL-17A”指IL-17A同型二聚体(IL-17AA),除非另有说明,“IL-17F”指IL-17F同型二聚体(IL-17FF)。在本发明的一个实施方案中,IL-17是IL-17AA。在本发明的另一实施方案中,IL-17是IL-17FF。还在另一实施方案中,IL-17是IL-17A/F。人IL-17A和IL-17F的全长多肽链所包含的氨基酸序列分别显示在图1B和2B(SEQ ID NO:2和4)中,其对应的核酸序列分别显示在图1A和2A(SEQ ID NO:1和3)中。起始和终止密码子在图中显示为黑体和下划线。

[0050] 术语“IL-17受体”用于泛指IL-17受体家族的成员,包括IL-17RA,IL-17RB,IL-17RC,IL-17RD和IL-17RE及其复合物,且除非另有说明,指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,如灵长类(例如人类)和啮齿类(例如小鼠和大鼠))的任何天然IL-17受体。该术语涵盖全长未加工的IL-17受体,以及产生自细胞内加工的任何形式的IL-17受体,包括成熟IL-17受体、可溶性IL-17受体,如可溶性IL-17RA和/或可溶性IL-17RC。该术语还涵盖天然存在的IL-17受体变体,例如剪接变体或等位基因变体。天然序列IL-17RA多肽的核苷酸序列及其氨基酸序列分别显示在图3A-D和图3E(SEQ ID NO:5和6)中。天然序列IL-17RC多肽的核苷酸序列及其氨基酸序列分别显示在图4A和图4B(SEQ ID NO:7和8)中。

[0051] 本文所用的“IL-17拮抗剂”包括干扰IL-17的功能或结合、阻断和/或中和IL-17的相关活性的任何分子。因此,IL-17拮抗剂包括抗IL-17抗体、抗IL-17受体抗体(包括抗IL-17RA抗体和抗IL-17RC抗体)或可溶性IL-17受体(包括可溶性IL-17RA和可溶性IL-17RC)。

[0052] “IL-17抗体”、“抗IL-17抗体”或“结合IL-17的抗体”指抗体或其抗原结合片段,其能够以足够的亲和力结合IL-17A同型二聚体、IL-17F同型二聚体和/或IL-17AF异型二聚体

或其部分,使得该抗体可在靶向IL-17中用作检测剂、分析剂、诊断剂和/治疗剂。IL-17抗体可进一步干扰IL-17活性。此外,IL-17抗体可干扰其他基因或蛋白质的表达。在一个实施方案中,IL-17抗体能够结合IL-17AA、IL-17FF和/或IL-17AF。在一些实施方案中,抗IL-17抗体能够结合IL-17A同型二聚体。在某些实施方案中,抗IL-17抗体能够结合IL-17A同型二聚体和IL-17AF异型二聚体。在某些实施方案中,抗IL-17抗体能够结合IL-17A同型二聚体,不能结合IL-17AF异型二聚体。在某些实施方案中,抗IL-17抗体能够结合IL-17F同型二聚体,不能结合IL-17AF异型二聚体。在某些实施方案中,抗IL-17抗体能够结合IL-17A同型二聚体、IL-17F同型二聚体和IL-17AF异型二聚体。在某些这类实施方案中,能够结合IL-17A同型二聚体、IL-17F同型二聚体和IL-17AF异型二聚体的抗IL-17抗体也可以称为IL-17A和F抗体或IL-17A和IL-17F交叉反应性抗体或IL-17A/F交叉反应性抗体。在某些这类实施方案中,该IL-17A和F交叉反应性抗体结合IL-17A、IL-17F和/或IL-17AF异型二聚体上相同或相似的表位。在某些这类实施方案中,该IL-17A和F交叉反应性抗体以足够的亲和力结合IL-17A、IL-17F和/或IL-17AF异型二聚体上相同或相似的表位。在某些有利的实施方案中,该IL-17A和F交叉反应性抗体以高亲和力结合IL-17A、IL-17F和IL-17AF。已报道了IL-17A和IL-17F的结构。参见Hymowitz等,2001,Embo J,20(19):5332-41,Ely等,2009,Nature Immunology 10(12):1245-1252及Liu等,2013,Nature Communications DOI:10.1038/ncomms2880。可从结构推导包含存在于IL-17A和IL-17F的表面区域中的氨基酸残基的相似或相同的表位。

[0053] “IL-17受体抗体”、“抗IL-17受体抗体”或“结合IL-17受体的抗体”指这样的抗体,其能够以足够的亲和力结合IL-17受体或其部分,使得该抗体可用作靶向IL-17受体的诊断和/或治疗剂。此外,IL-17受体抗体可干扰IL-17受体活性,如下游信号发放。IL-17受体抗体还可干扰其他基因或蛋白质的表达。在一个实施方案中,IL-17受体抗体能够结合IL-17RA和/或IL-17RC。在其他实施方案中,IL-17受体抗体能够结合IL-17RA。在一些其他实施方案中,IL-17受体抗体能够结合IL-17RC。在某些实施方案中,IL-17受体抗体能够结合IL-17RA和IL-17RC。

[0054] “结合”目的抗原的抗体、寡肽或其他有机分子(例如结合IL-17A同型二聚体、IL-17F同型二聚体和/或IL-17AF异型二聚体的IL-17抗体)是这样的分子,其以足够的亲和力结合抗原,使得该抗体、寡肽或其他有机分子不非特异性地结合其他不相关蛋白质。在一个实施方案中,如通过荧光激活细胞分选(FACS)分析、放射免疫沉淀(RIA)或其他手段测定,该抗体、寡肽或其他有机分子与“非靶标”蛋白质结合的程度将小于该抗体、寡肽或其他有机分子与其具体靶蛋白的结合的约10%。在某些实施方案中,结合IL-17或IL-17受体的抗体具有至少约 10^{-4} M、或者至少约 10^{-5} M、或者至少约 10^{-6} M、或者至少约 10^{-7} M、或者至少约 10^{-8} M、或者至少约 10^{-9} M、或者至少约 10^{-10} M、或者至少约 10^{-11} M、或者至少约 10^{-12} M或更大的解离常数(Kd)。

[0055] 本文的术语“抗体”以最广泛的含义使用,且明确涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗原结合片段,只要它们显示希望得到的生物活性。

[0056] 本文所用的术语“单克隆抗体”指来自基本上同质的抗体群体的抗体,即除了可以在产生单克隆抗体的过程中出现的可能的变体(这类变体通常以较小的量存在)外,包含该群体的单个抗体是相同的和/或结合相同的表位。这种单克隆抗体通常包含含有结合靶标

的多肽序列的抗体,其中通过包括从多个多肽序列选择单个靶标结合多肽序列的方法来获得靶标结合多肽序列。例如,选择方法可以从多个克隆(如一系列杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆)选择独特的克隆。应理解,可以进一步改变所选择的靶标结合序列,例如以改善对靶标的亲和力、人源化靶标结合序列、改善其在细胞培养物中的产生、降低其在体内的免疫原性、产生多特异性抗体等,包含改变的靶标结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除它们的特异性外,单克隆抗体制剂的优势在于它们通常未受其他免疫球蛋白污染。修饰词“单克隆的”指抗体获自基本上同质的抗体群体的特征,而不解释为需要通过任意具体的方法来产生抗体。例如,待按照本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,包括例如:杂交瘤法(例如Kohler等,Nature, 256:495 (1975);Harlow等,Antibodies:A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版1988);Hammerling等,in:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (Elsevier,N.Y.,1981));重组DNA法(参见例如美国专利号4,816,567);噬菌体展示技术(参见例如Clackson等,Nature,352:624-628 (1991);Marks等,J.Mol.Biol.,222:581-597 (1991);Sidhu等,J.Mol.Biol.338 (2):299-310 (2004);Lee等,J.Mol.Biol.340 (5):1073-1093 (2004);Fellouse,Proc.Nat.Acad.Sci.USA101 (34):12467-12472 (2004);及Lee等J.Immunol.Methods 284 (1-2):119-132 (2004);及用于在具有部分或全部编码人免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因座或基因的动物中产生人抗体或人样抗体的技术(参见例如WO 1998/24893;WO 1996/34096;WO 1996/33735;WO 1991/10741;Jakobovits等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551 (1993);Jakobovits等,Nature,362:255-258 (1993);Bruggemann等,Year in Immuno.,7:33 (1993);美国专利号5,545,806、5,569,825、5,591,669(全都属于GenPharm);美国专利号5,545,807;WO 1997/17852;美国专利号5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425和5,661,016;Marks等,Bio/Technology,10:779-783 (1992);Lonberg等,Nature,368:856-859 (1994);Morrison,Nature,368:812-813 (1994);Fishwild等,Nature Biotechnology,14:845-851 (1996);Neuberger,Nature Biotechnology,14:826 (1996);及Lonberg和Huszar,Intern.Rev.Immunol.,13:65-93 (1995))。

[0057] 本文的单克隆抗体明确包括“嵌合”抗体,其中部分重链和/或轻链与源自特定物种或隶属于特定抗体种类或亚类的抗体中对应的序列相同或同源,而一条或多条链的其余部分与源自另一物种或隶属于另一抗体种类或亚类的抗体中对应的序列相同或同源,以及这类抗体的片段,只要它们显示希望得到的生物学活性(美国专利号4,816,567;及Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855 (1984))。本文的目的嵌合抗体包括“灵长类源化(primatized)”抗体,其包含源自非人灵长类(例如旧大陆猴、猿等)的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列,以及“人源化”抗体。

[0058] 非人(例如啮齿动物)抗体的“人源化”形式是嵌合抗体,其包含最少的源自非人免疫球蛋白的序列。在大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中用来自具有希望得到的特异性、亲和力和容量的诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的非人物种的高变区(供体抗体)的残基取代来自受体的高变区的残基。在一些情况下,用对应的非人残基取代人免疫球蛋白的构架区(FR)残基。此外,人源化抗体可以包含不见于受体抗体中或供体

抗体中的残基。产生这些修饰来进一步改进抗体性能。通常,人源化抗体将包含至少一个(且通常为两个)可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,全部或基本上全部FR是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体还将可选地包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。进一步的详情参见Jones等,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。

[0059] 本文所用的“完整抗体”是包含两个抗原结合区,以及Fc区的抗体。优选地,完整抗体具有功能性Fc区。

[0060] “抗原结合片段”包含完整抗体的含有其抗原结合区的部分。抗原结合片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;及形成自抗体片段的多特异性抗体。

[0061] “天然抗体”通常是由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成的约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间不同。每条重链和轻链还具有规则间隔开的链内二硫键。每条重链在一端具有可变结构域(V_H),随后是许多恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域(V_L),在其另一端具有恒定结构域。轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。认为特定氨基酸残基形成轻链可变结构域和重链可变结构域之间的界面。

[0062] 术语“可变的”指这样的事实,可变结构域的某些部分的序列在抗体间广泛不同,且用于各具体抗体对其具体抗原的结合和特异性。但是,可变性并非在抗体的整个可变结构域内均匀分布。它集中在轻链可变结构域和重链可变结构域二者中称为高变区的三个区段中。可变结构域的更高度保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各包含四个FR,四个FR主要采用β-折叠构型,通过三个高变区连接,该高变区形成连接β-折叠结构且在一些情况下形成β-折叠结构的部分的环。各链中的高变区通过FR近距离保持在一起,并与来自另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合部位的形成(参见Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))。恒定结构域不直接涉及抗体与抗原的结合,但显示多种效应子功能,如抗体在依赖抗体的细胞毒性(ADCC)中的参与。

[0063] 在本文中使用时,术语“高变区”指抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如,轻链可变结构域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3),重链可变结构域中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)))和/或来自“高变环”的那些残基(例如轻链可变结构域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3),重链可变结构域中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)(Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987)))。“构架区”或“FR”残基是除本文定义的高变区残基之外的那些可变结构域残基。

[0064] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段(称为“Fab”片段,各具有单个抗原结合部位)和残余的“Fc”片段(其名称反映了它易于结晶的能力)。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合部位,且仍能够交联抗原。

[0065] “Fv”是包含完整的抗原识别和抗原结合部位的最小抗体片段。此区域由紧密非共价结合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成。各可变结构域的三个高变区正是在此构型中相互作用来定义VH-VL二聚体表面上的抗原结合部位。六个高变区共同赋予抗体抗原结合特异性。但是,甚至单个可变结构域(或Fv的一半,其仅包含三个对抗原特异的高变区)也具有识别和结合抗原的能力,虽然亲和力低于整个结合部位。

[0066] Fab片段还包含轻链恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的区别在于,在重链CH1结构域的羧基端加入了几个残基,其包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH是本文中对其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基具有至少一个自由巯基的Fab'的命名。F(ab')₂抗体片段最初作为其间具有较合部半胱氨酸的Fab'片段对产生。还已知抗体片段的其他化学偶联。

[0067] 根据其恒定结构域的氨基酸序列,可以将来自任意脊椎动物物种的抗体的“轻链”分配至称为κ和λ的两个明显不同的类型之一。

[0068] 术语“Fc区”用来定义免疫球蛋白重链的C-端区域,包括天然序列Fc区和变体Fc区。虽然免疫球蛋白重链的Fc区的边界可变,但是人IgG重链Fc区通常定义为从Cys226或从Pro230位的氨基酸残基延伸至其羧基端。Fc区的C-端赖氨酸(EU编号系统的残基447)可以例如在抗体的产生或纯化期间去除,或者通过重组改造编码抗体重链的核酸来去除。因此,完整抗体的组合物可以包含去除了所有K447残基的抗体群体、没有去除K447残基的抗体群体及具有含和不含K447残基的抗体的混合物的抗体群体。

[0069] 除非另有说明,在本文中,免疫球蛋白重链中的残基的编号是Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中的EU指数的编号,其在此明确引入作为参考。“Kabat中的EU指数”指人IgG1 EU抗体的残基编号。

[0070] “功能性Fc区”具有天然序列Fc区的“效应子功能”。示例性“效应子功能”包括C1q结合、依赖补体的细胞毒性、Fc受体结合、依赖抗体的细胞毒性(ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)的下调等。此类效应子功能一般需要Fc区与结合结构域(例如,抗体可变结构域)结合,且可以例如用本文中公开的多种测定来评估。

[0071] “天然序列Fc区”包含与见于自然界中的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1Fc区(非A和A同种异型);天然序列人IgG2Fc区;天然序列人IgG3Fc区;天然序列人IgG4Fc区;及其天然存在的变体。

[0072] “变体Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰(优选一个或多个氨基酸取代)而不同于天然序列Fc区的氨基酸序列的氨基酸序列。优选地,与天然序列Fc区或与亲本多肽的Fc区相比,变体Fc区在天然序列Fc区中或在亲本多肽的Fc区中具有至少一个氨基酸取代,例如从约一个至约十个氨基酸取代,优选从约一个至约五个氨基酸取代。本文的变体Fc区将与天然序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%同源性,最优选与之具有至少约90%同源性,更优选与之具有至少约95%同源性。

[0073] 取决于其重链恒定结构域的氨基酸序列,可以将完整抗体分配至不同“种类”。存在五个主要种类的完整抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,这些中的几个可以进一步划分为亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于不同种类的抗体的重链恒定结构域分别称为α、δ、ε、γ和μ。不同种类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型众所周知。

[0074] “依赖抗体的细胞毒性”和“ADCC”指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体,随后引起靶细胞的裂解。用于介导ADCC的主要细胞(NK细胞)仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)的464页上的表3中。为了评估目的分子的ADCC活性,可以进行体外ADCC测定,如描述于美国专利号5,500,362或5,821,337中的体外ADCC测定。用于这类测定的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地,或此外,可以在体内,例如在诸如公开于Clynes等PNAS (USA) 95:652-656 (1998)中的动物模型中评估目的分子的ADCC活性。

[0075] “人效应细胞”是表达一种或多种FcR并执行效应子功能的白细胞。优选地,该细胞至少表达Fc γ RIII,并执行ADCC效应子功能。介导ADCC的人白细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性粒细胞;优选PBMC和NK细胞。可以从其天然来源,例如从本文所述的血液或PBMC分离效应细胞。

[0076] 术语“Fc受体”或“FcR”用来描述与抗体的Fc区结合的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体的FcR(γ 受体),且包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和选择性剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA (“活化受体”)和Fc γ RIIB (“抑制受体”),其具有相似的氨基酸序列,主要在其胞质结构域中不同。活化受体Fc γ RIIA在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM) (参见Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)中的综述)。FcR综述于Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel等, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 及 de Haas等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)中。本文的术语“FcR”涵盖其他FcR,包括有待将来鉴定的那些。该术语还包括负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等, *J. Immunol.* 117:587 (1976)和Kim等, *J. Immunol.* 24:249 (1994))并调节免疫球蛋白的稳态的新生儿受体FcRn。

[0077] “依赖补体的细胞毒性”或“CDC”指分子在补体存在下裂解靶标的能力。补体激活途径由补体系统第一成分(C1q)与复合关联抗原的分子(例如抗体)的结合起始。为了评估补体激活,可以进行例如Gazzano-Santoro等, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)中所述的CDC测定。

[0078] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于单条多肽链中。优选地,Fv多肽进一步在V_H和V_L结构域之间包含多肽接头,该多肽接头使得scFv能够形成希望得到的结构用于抗原结合。scFv的综述参见Plückthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 113卷, Rosenburg和Moore编辑, Springer-Verlag, 纽约, 269-315页 (1994)。

[0079] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合部位的小的抗体片段,该片段包含在同一条多肽链中与可变轻链结构域(V_L)连接的可变重链结构域(V_H) (V_H-V_L)。通过使用太短而不允许同一条链上的两个结构域之间配对的接头,迫使结构域与另一条链上的互补结构域配对,并产生两个抗原结合部位。双抗体更充分地描述于例如EP 404,097; WO 93/11161; 和 Hollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)中。

[0080] “裸抗体”是未与异源分子(如毒性部分或放射性标记)缀合的抗体。

[0081] “分离的”抗体是已鉴定并从其天然环境的成分分离和/或回收的抗体。它的天然环境的污染成分是将干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,且可以包括酶、激素和其他蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选实施方案中,将该抗体纯化至:(1)通过Lowry法测定抗体大于95wt%,最优选超过99wt%;(2)足以通过使用旋杯式测序仪获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3)考马斯蓝染色或优选银染的还原或非还原条件下的SDS-PAGE显示同质。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为将不存在该抗体的天然环境的至少一种成分。但是,通常将通过至少一个纯化步骤来制备分离的抗体。

[0082] “亲和力成熟的”抗体是在其一个或多个高变区中具有一个或多个改变的抗体,与不具有那些改变的亲本抗体相比,该改变导致抗体对抗原的亲合力的改善。优选的亲和力成熟的抗体将对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲合力。通过本领域已知的方法产生亲和力成熟的抗体。Marks等*Bio/Technology* 10:779-783(1992)描述了通过VH和VL结构域改组进行亲和力成熟。Barbas等*Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813(1994); Schier等*Gene* 169:147-155(1996); Yelton等*J. Immunol.* 155:1994-2004(1995); Jackson等, *J. Immunol.* 154(7):3310-9(1995);和Hawkins等*J. Mol. Biol.* 226:889-896(1992)描述了CDR和/或构架残基的随机诱变。

[0083] 本文的“氨基酸序列变体”抗体是具有不同于主要种类抗体的氨基酸序列的抗体。通常,氨基酸序列变体将与主要种类抗体至少约70%同源,优选地,它们将与主要种类抗体至少约80%、更优选至少约90%同源。氨基酸序列变体在主要种类抗体的氨基酸序列内部或相邻的某些位置上具有取代、缺失和/或添加。本文的氨基酸序列变体的实例包括酸性变体(如脱酰胺化的抗体变体)、碱性变体、在其一条或两条轻链上具有氨基端前导序列延伸(例如VHS-)的抗体、在其一条或两条重链上具有C-端赖氨酸残基的抗体等,且包括重链和/或轻链的氨基酸序列变异的组合。本文的尤其重要的抗体变体是这样的抗体,相对于主要种类抗体,在其一条或两条轻链上包含氨基端前导序列延伸,可选地进一步包含其他氨基酸序列和/或糖基化差异。

[0084] 本文的“糖基化变体”抗体是具有附着于该抗体的一个或多个糖类部分的抗体,该糖类部分不同于附着于主要种类抗体的一个或多个糖类部分。

[0085] 在抗体具有Fc区时,寡糖结构可以例如在残基299(298,残基的Eu编号)处附着于该抗体的一条或两条重链。

[0086] 本文的“氨基端前导序列延伸”指存在于抗体的任意一条或多条重链或轻链的氨基端的氨基端前导序列的一个或多个氨基酸残基。示例性氨基端前导序列延伸包含存在于抗体变体的一条或两条轻链上的三个氨基酸残基VHS或由其组成。

[0087] “脱酰胺化”抗体是这样的抗体,其中其一个或多个天冬酰胺残基已衍生为例如天冬氨酸、琥珀酰亚胺或异天冬氨酸。

[0088] 如本文所使用,应用于基因的术语“表达水平”指基因产物的水平,例如,针对基因的RNA转录物的水平或针对基因的蛋白质产物的水平测定的值。

[0089] 术语“下调”、“减少”和“降低”可互换使用,指基因或基因的RNA转录物或蛋白质产物的表达、活性或水平相对于一个或多个对照(例如一个或多个阳性和/或阴性对照)更低。

[0090] 术语“上调”、“增加”或“提高”用来指基因或基因的RNA转录物或蛋白质产物的表

达、活性或水平相对于一个或多个对照(例如一个或多个阳性和/或阴性对照)更高。

[0091] “个体”包括哺乳动物和人个体。哺乳动物包括但不限于人类、啮齿类、运动动物、动物园动物、宠物或农场动物,如狗、猫、牛、绵羊、猪、马和非人灵长类,如猴。优选地,啮齿类是小鼠或大鼠。优选地,该哺乳动物是人,本文中也称为患者。

[0092] “处理”指以对抗本发明所靶向的任何疾病或病症(非限制性地包括多发性硬化,尤其是复发-缓解型多发性硬化(RRMS))为目的来管理和护理个体。希望得到的处理作用包括但不限于防止疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接的病理结果、降低疾病进展的速率、改善或缓和疾病状态及消退或改善的预后。在一些实施方案中,用本发明的IL-17拮抗剂来延迟疾病的发展或减慢疾病的进展。

[0093] “多发性硬化”或“MS”也称为播散性硬化或播散性脑脊髓炎,是其中脑和脊髓中神经细胞的绝缘外罩损伤或脱髓鞘的炎症性疾病。MS分为四种一般类型,包括复发-缓解型(RRMS)、继发进展型(SPMS)、原发进展型(PPMS)和进展复发型MS。RRMS的特征在于,不可预测的复发后长达数月至数年的缓解,没有新的疾病活动迹象,是多数罹患MS的个体的初始过程。罹患RRMS的个体随后可以发展为SPMS,在急性发作之间经历进行性神经衰退,没有任何明确的缓解期。PPMS的特征在于从发病开始进行性失能,没有或仅偶尔有很小的缓解和改善。进展复发型MS是最不常见的类型,其特征在于从发病起稳定的神经衰退和明显的叠加发作。参见Lublin等,Neurology 83:278-286(2014)。

[0094] “多发性硬化(MS)治疗剂”指用于治疗MS的除IL-17拮抗剂外的治疗剂,例如反丁烯二酸二甲酯(TECFIDERA[®])、FTY-720(芬戈莫德, GILENYA[®])、那他珠单抗(TYSABRI[®])、糖皮质激素、 β -干扰素、醋酸格拉默(COPAXONE[®])、特立氟胺(AUBAGIO[®])、米托蒽醌和抗CD20抗体(如奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、利妥昔单抗和奥法木单抗(ofatumumab))。

[0095] 术语“有效量”指对在患者中治疗多发性硬化有效的药物(如IL-17拮抗剂)的量。

[0096] 在本发明的背景中,提到任何具体基因背景中所列的基因中的“至少一个”、“至少两个”、“至少三个”、“至少四个”、“至少五个”等意指所列基因的任意一个或任何和全部组合。

[0097] 除非另有说明,本发明的实施将利用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学和生物化学的常规技术,该常规技术在本领域技术范围之内。这类技术更充分地阐述于文献中,如“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第2版(Sambrook等,1989);“Oligonucleotide Synthesis”(M.J.Gait编辑,1984);“Animal Cell Culture”(R.I.Freshney编辑,1987);“Methods in Enzymology”(Academic Press,Inc.);“Handbook of Experimental Immunology”,第4版(D.M.Weir&C.C.Blackwell编辑,Blackwell Science Inc.,1987);“Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells”(J.M.Miller&M.P.Calos编辑,1987);“Current Protocols in Molecular Biology”(F.M.Ausubel等编辑,1987);和“PCR:The Polymerase Chain Reaction”,(Mullis等编辑,1994)。

[0098] 多发性硬化(MS)是中枢神经系统(CNS)的脱髓鞘炎症性障碍,其涉及对髓鞘质抗原的自身免疫反应。实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)(MS的动物模型)中的研究提供了对自

身抗原特异的T细胞介导这些疾病中的病理的证据。直至目前,认为1型T辅助(Th1)细胞是造成自身免疫性炎症的主要效应T细胞。但是,更近的研究表明分泌IL-17的CD4⁺T细胞(称为Th17)的致病作用。参见图5。认为活化的髓鞘特异性T细胞进入血流,并进入中枢神经系统(CNS)。发生血脑屏障(BBB)的破坏,允许招募其他炎症细胞进入CNS。进入CNS的T细胞遇到其关联髓鞘抗原,再次由局部APC激活。T细胞扩增,并释放炎症介质,炎症介质帮助招募其他免疫细胞至炎症部位。局部小胶质细胞和浸润细胞的激活导致促进炎症、细胞死亡、直接神经损伤和脱髓鞘的蛋白酶、谷氨酸、活性氧类别和其他细胞毒剂的产生。轴突周围髓鞘损伤后是轴突损伤和神经功能损伤。

[0099] 本发明至少部分基于这样的发现,发现IL-17尤其是IL-17AA在多发硬化患者尤其是复发-缓解型MS(RRMS)患者亚群的脑脊液(CSF)中提高。因此,MS患者中IL-17尤其是IL-17AA的表达水平可作为鉴定罹患MS、处于发展MS风险和可能对IL-17拮抗剂如IL-17抗体治疗有反应的患者的生物标志。这些患者还可以从IL-17拮抗剂与其他多发硬化治疗剂组合的新的联合治疗受益。

[0100] 其表达与IL-17尤其是IL-17AA的表达正向或负向协同调节的替代标志也适合作为MS的生物标志。替代标志包括是与由IL-17尤其是IL-17AA正调的途径相同的途径或下游途径的正调节物的基因。这类基因的表达相对于对照提高可以鉴定罹患MS、处于发展MS风险和/或可能对IL-17拮抗剂如IL-17抗体治疗有反应的患者。替代标志还包括其表达与IL-17尤其是IL-17AA的表达负相关的基因。这类基因的表达相对于对照降低也可以鉴定罹患MS、处于发展MS风险和/或可能对IL-17拮抗剂如IL-17抗体有反应的患者。因此,本发明寻求IL-17尤其是IL-17AA的替代生物标志。

[0101] 多发硬化中IL-17AA的替代标志

[0102] 根据本发明,将以下基因鉴定为与RRMS患者中提高的IL-17AA水平相关:TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL8、NFκBIZ、YKL40(CHI3L1)和G-CSF(CSF3)。这些基因也在表1中列出,表1列出本文所分析的选定基因,连同其代表性NCBI GenBank检索号。获自个体的生物样品中一个或多个这些基因的RNA转录物或其蛋白质产物的表达水平相对于对照提高指示该个体可罹患MS、处于发展MS风险和/或更有可能对IL-17拮抗剂如IL-17抗体治疗有反应。一个或多个所公开的基因的表达水平相对于对照降低或相对于对照处于相同水平指示该个体可未罹患MS、未处于发展MS风险和/或对IL-17拮抗剂治疗有反应的可能性低。

[0103] 对照可以是例如存在于同一细胞中的已知在多发硬化患者中上调的基因的表达(阳性对照)。备选地,或此外,对照可以是相同细胞类型的正常细胞中与标志基因相同的基因的表达(阴性对照)。可以将表达水平例如对持家基因(如甘油醛-3-磷酸-脱氢酶(GAPDH)和/或β-肌动蛋白)的表达水平或对所测试的样品中所有基因的表达水平归一化。对照值可以是相关一般群体获得的预先确定的平均值。这些及其他对照和方法为本领域公知,对本领域技术人员而言显而易见。

[0104] 令人惊奇地发现,所公开的基因与RRMS患者中提高的IL-17AA水平相关。例如,TIMP1是公认的基质金属蛋白酶(MMP)家族胞外蛋白酶的內源调节物,但它在髓鞘病理中的作用仍不清楚,因为TIMP1似乎在CNS髓鞘损伤中显示正向和负向作用。一些文献报道,通过响应CNS髓鞘损伤而促进髓鞘再生,TIMP1在抑制MMP介导的病理发生中发挥保护作用(参见例如Ichiyama等,J.Neuroimmunology 172:182-186,2006;Moore等,J.Neuroscience 31:

6247-6254, 2011), 而其他文献表明, T细胞分泌的TIMP1促进神经病理(参见例如Adamson等, PLoS ONE 8:e59367.doi:10.1371/journal.pone.0059367, 2013)。LRG1是显示涉及蛋白质-蛋白质相互作用、信号转导及细胞黏附和发育且由炎症产生的蛋白质(参见例如Wang等, Nature 499:306-311, 2013; Miyajima等, PLoS ONE 8:e74453.doi:10.1371/journal.pone.0074453, 2013)。虽然已将LRG1与帕金森病伴痴呆(PDD)和进行性核上麻痹(PSP)相关(参见例如Miyajima上文), 但还没有LRG1和多发性硬化尤其是RRMS之间相关性的报道。

[0105] 表1

基因	名称	示例性检索号和序列
IL-17A	白细胞介素 17A	NP_002181
IL-17F	白细胞介素 17F	NM_052872
IL-17RA	白细胞介素 17 受体 A	NP_005154.3
IL-17RC	白细胞介素 17 受体 C	AY359098
TIMP1	金属蛋白酶组织抑制剂 1	NM_003254
LRG1	富含亮氨酸的 α -2-糖蛋白 1	NM-052972.2
CXCL1	趋化因子(C-X-C 基序)配体 1	NM_001511.3
CXCL5	趋化因子(C-X-C 基序)配体 5	NM_002994.3
CXCL10	趋化因子(C-X-C 基序)配体 10	NM_001565.3
IL8	白细胞介素 8	AF385628.2
[0106] NF κ BIZ	B 细胞抑制剂 ζ 中的 κ 轻多肽基因增强子的核因子	NM_031419.3
YKL40 (CHI3L1)	几丁质酶 3-样 1	NM_001276.2
G-CSF (CSF3)	集落刺激因子 3	NM_000759.3
TARC (CCL17)	趋化因子(C-C 基序)配体 17	NM_002987.2
MCP4 (CCL13)	趋化因子(C-C 基序)配体 13	NM_005408.2
IL-6	白细胞介素 6	NM_000600.3
CD4	CD4 分子	NM_000616.4
CD45 (PTPRC)	蛋白质酪氨酸磷酸酶, 受体型, C	NM_002838.4
Mobp	髓鞘质相关少突胶质细胞碱性蛋白	NM_001278322.1
Mog	髓鞘质少突胶质细胞糖蛋白	NM_206809.3/NM_002433.4
Eotaxin (CCL11)	趋化因子(C-C 基序)配体 11	NM_002986.2

[0107] 诊断和预测

[0108] 在多种方面, 本发明提供鉴定罹患MS、处于发展MS风险和/或可能对IL-17拮抗剂治疗有反应的个体的方法。该方法包括在获自该个体的生物样品中测量选自TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NF κ BIZ、YKL40 (CHI3L1) 和G-CSF (CSF3) 的一个或多个基因的表达水平的步骤。该方法可以进一步包括将该一个或多个基因的表达水平与对照基因的表达水平相比较。表达水平相对于对照提高指示该个体罹患MS、处于发展MS风险和/或可能对IL-17拮抗剂治疗有反应。备选地, 相对于对照降低的表达水平或相同的表达水平指示该个体不罹患MS、不处于发展MS风险和/或对IL-17拮抗剂治疗有反应的可能性低。

[0109] 生物样品可以是例如生物活检组织样品或生物流体, 其非限制性地包括脑脊液(CSF)、血液、尿液、唾液、腹水或衍生物, 如血清和血浆, 等等。在一方面, 所测量的表达水平是基因的RNA转录物的表达水平。在另一方面, 所测量的表达水平是基因的蛋白质产物的表达水平。可以测量一个、两个、三个、四个、或五个、六个、七个、八个、或更多个基因的RNA转

录物或蛋白质产物的表达水平。在本发明的实施方案中,可以测量TIMP1的RNA转录物或其蛋白质产物的表达水平。在具体实施方案中,可以测量TIMP1的RNA转录物或其蛋白质产物以及选自LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的至少一个或多个基因的表达水平。在另一实施方案中,可以测量LRG1的RNA转录物或其蛋白质产物的表达水平。在另一具体实施方案中,可以测量LRG1的RNA转录物或其蛋白质产物以及选自TIMP1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的至少一个或多个基因的表达水平。还在另一实施方案中,可以测量TIMP1和LRG1的RNA转录物或其蛋白质产物的表达水平。在另一实施方案中,可以测量TIMP1和/或LRG1及G-CSF的RNA转录物或其蛋白质产物的表达水平。在具体实施方案中,可以测量TIMP1、LRG1和G-CSF的RNA转录物或其蛋白质产物的表达水平。在另一实施方案中,在该方法包括测量选自TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL8、YKL40和G-CSF的任意一个基因的表达水平时,测量其蛋白质产物。在该方法包括测量NFκBIZ的表达水平时,测量其RNA转录物。

[0110] 在一个实施方案中,可以从获自MS患者的CSF测量选自TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的一个或多个基因的表达水平。在具体实施方案中,在该方法包括测量选自CXCL1、CXCL5和CXCL10的一个或多个基因的表达水平时,可以从获自MS患者的血浆测量其RNA转录物或蛋白质产物。在另一实施方案中,在该方法包括测量G-CSF的表达水平时,可以从获自MS患者的血清测量其RNA转录物或蛋白质产物。在具体实施方案中,从血清测量G-CSF的蛋白质产物的表达水平。

[0111] 在任意方法和实施方案中,MS可以是RRMS。

[0112] 用于测量表达水平的方法

[0113] 用于测定RNA转录物(例如mRNA)或蛋白质的表达水平的多种方法包括但不限于:基因表达谱分析,包括定量实时PCR(qRT-PCR)的聚合酶链反应(PCR),按照厂家流程通过市售设备进行的微阵列分析(如通过使用Affymetrix GenChip技术),基因表达的系列分析(SAGE)(Velculescu等,Science 270:484-487(1995);和Velculescu等,Cell 88:243-51(1997)),MassARRAY,大规模平行测序(MPSS)的基因表达分析(Brenner等,Nature Biotechnology 18:630-634(2000)),蛋白质组学,免疫组织化学(IHC)等。在本发明的实施方案中,定量mRNA。在另一实施方案中,用聚合酶链反应(PCR)的技术或通过微阵列分析进行这种mRNA分析。在利用PCR时,优选的PCR形式是定量实时PCR(qRT-PCR)。

[0114] 用于mRNA提取的一般方法为本领域公知,并公开于分子生物学标准教科书中,包括Ausubel等,Current Protocols of Molecular Biology,John Wiley and Sons(1997)。可以按照厂家说明书用来自供应商(如Qiagen)的纯化试剂盒、缓冲液组和蛋白酶进行RNA分离。例如,可以用Qiagen RNeasy微型柱分离来自培养细胞的总RNA。其他市售RNA分离试剂盒包括MasterPure™全DNA和RNA纯化试剂盒(**EPICENTRE®**,Madison,WI)和石蜡快RNA分离试剂盒(Ambion,Inc.)。可以用RNA Stat-60(Tel-Test)分离来自组织样品的总RNA。还可以例如通过氯化铯密度梯度离心分离RNA。分析RNA浓度后,必要时可以包括RNA修复和/或扩增步骤,用基因特异性启动子反转录RNA后进行PCR。优选地,使用实时PCR,其与定量竞争PCR(其中用各靶序列的内部竞争序列进行归一化)和定量比较PCR(用包含在样品内的归一化基因或持家基因进行RT-PCR)二者相容。进一步详情参见例如“PCR:The Polymerase Chain Reaction”,Mullis等编辑,1994;和Held等,Genome Research 6:986-

994 (1996)。

[0115] 还可以例如使用多种类型的免疫测定或蛋白质组学技术,在蛋白质水平测定表达水平。

[0116] 在免疫测定中,通过使用特异性结合标志的抗体来检测目标诊断蛋白标志。抗体通常将用可检测部分标记。许多标记可用,其一般可分为以下种类:

[0117] 1) 放射性同位素,如³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I。可以使用例如Current Protocols in Immunology,第1和2卷,Coligen等(1991)编辑Wiley-Interscience,New York,New York, Pubs中所述的技术,用放射性同位素标记抗体,并可以用闪烁计数测量放射性。

[0118] 2) 荧光标记,如稀土螯合剂(钆螯合剂)、或荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹磺酰、丽丝胺、藻红蛋白和德克萨斯红可用。可以用例如Current Protocols in Immunology,上文中所公开的技术将荧光标记缀合至抗原。荧光可以用荧光计定量。

[0119] 3) 多种酶-底物标记可用,美国专利号4,275,149提供了这些标记中的一些的综述。酶通常催化可以用多种技术测量的生色底物的化学变化。例如,酶可以在底物中催化可通过分光光度计测量的颜色变化。备选地,酶可以改变底物的荧光或化学发光。上文描述了用于定量荧光变化的技术。化学发光底物通过化学反应变为电子激发态,然后可以发射可以测量(用例如化学发光计)的光或贡献能量给荧光受体。酶标记的实例包括萤光素酶(例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶;美国专利号4,737,456)、荧光素、2,3-二氢酞嗪二酮、苹果酸脱氢酶、脲酶、过氧化物酶如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(如尿酸氧化酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶体等。Methods in Enzym. (ed J.Langone&H.Van Vunakis),Academic press,New York 73:147-166中的O'Sullivan等(1981)Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay中描述了用于将酶缀合至抗体的技术。

[0120] 酶-底物组合的实例包括,例如:

[0121] a) 以过氧化氢酶为底物的辣根过氧化物酶(HRPO),其中过氧化氢酶氧化染料前体(例如邻苯二胺(OPD)或3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐(TMB));

[0122] b) 以对硝基苯磷酸酯为生色底物的碱性磷酸酶(AP);和

[0123] c) 具有生色底物(例如对硝基苯基- β -D-半乳糖苷酶)或荧光底物4-甲基伞形基- β -D-半乳糖苷酶的 β -D-半乳糖苷酶(β -D-Gal)。

[0124] 本领域技术人员可用许多其他酶-底物组合。这些组合的一般综述参见美国专利号4,275,149和4,318,980。

[0125] 有时,将标记直接与抗体缀合。技术人员可意识到用于达到此目的的多种技术。例如,可将抗体与生物素缀合,可将上文提到的三大类标记中的任一种与抗生物素蛋白缀合,或反之亦然。生物素选择性结合抗生物素蛋白,因此可以以这种间接方式将标记与抗体缀合。备选地,为了达到将标记与抗体间接缀合,将抗体与小的半抗原(例如地高辛)缀合,将上文提到的不同类型标记中的一种与抗半抗原抗体(例如抗地高辛抗体)缀合。因此,可以达到标记与抗体的间接缀合。

[0126] 在其他形式的免疫测定技术中,无需标记抗体,可以用结合该抗体的标记抗体检测其存在。

[0127] 本文所述的免疫测定可以是任何测定型式,例如竞争结合测定、直接和间接夹心测定和免疫沉淀测定。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, 147-158 页 (CRC Press, Inc. 1987)。

[0128] 竞争结合测定依赖于标记的标准品与测试样品分析物竞争结合有限量的抗体的能力。测试样品中抗原的量与结合于抗体的标准品的量成反比。为便于测定结合的标准品的量,通常在竞争之前或之后使抗体不溶解,使得可以方便地将结合于抗体的标准品和分析物从保持不结合的标准品和分析物分开。

[0129] 夹心测定涉及使用两种抗体,每种抗体能够结合待检测的蛋白质的不同免疫原性部分或表位。在夹心测定中,固定于固体支持物上的第一抗体结合测试样品分析物,然后第二抗体结合分析物,从而形成不可溶的三元复合物。参见例如美国专利号4,376,110。第二抗体本身可以用可检测部分标记(直接夹心测定)或可以用可检测部分标记的抗免疫球蛋白抗体测量(间接夹心测定)。例如,一类夹心测定是ELISA测定,在这种情况下,可检测部分是酶。

[0130] 也可以用蛋白质组学技术检测蛋白质水平。术语“蛋白质组”定义为在某个时间点存在于样品(例如组织、器官或细胞培养物)中的蛋白质的整体。蛋白质组学包括研究样品中的蛋白质表达的总改变(也称为“表达蛋白质组学”)等。蛋白质组学通常包括以下步骤:(1)通过2-D凝胶电泳(2-D PAGE)分离样品中的单种蛋白质;(2)例如通过质谱分析法或N端测序鉴定从凝胶回收的单种蛋白质;和(3)用生物信息学分析数据。蛋白质组学方法是其他基因表达分析方法的有价值的替代或补充,可以单独或与其他方法组合用于检测本发明的肿瘤抗性标志的产物。

[0131] 可以通过使用由适宜的处理器执行的软件程序来进行生物标志表达水平的测量。适宜的软件和处理器为本领域公知,并可购得。程序可以包含在存储于有形介质(如CD-ROM、软盘、硬盘、DVD或处理器固有内存)上的软件中,但本领域普通技术人员易于理解,整个程序或其部分可以备选地由处理器之外的装置执行,和/或以公知的方式包含在固件和/或专用硬件中。

[0132] 测量本文所鉴定的一个或多个基因的RNA转录物或其蛋白质产物的表达水平后,通常记录测定结果、发现、诊断、预测、预后和/或治疗建议,并与例如技术人员、医生和/或患者沟通。在某些实施方案中,将用计算机将这种信息传递给最感兴趣的当事人,如患者和/或主治医生。在一些实施方案中,将在不同于结果或诊断所传递至的国家或辖区的国家或辖区进行测定或分析测定结果。

[0133] 在优选实施方案中,在完成测定并产生诊断和/或预测后,尽快将基于本文公开的一种或多种生物标志在测试个体中的表达水平的诊断、预测、预后和/或治疗建议传递给个体。结果和/或相关信息可以由个体的主治医生传递给个体。备选地,可通过任何沟通手段将结果直接传递给测试个体,包括写信、电子沟通形式,如电子邮件或电话。通过使用计算机可便于沟通,如在电子邮件沟通的情况下。在某些实施方案中,可以产生包含诊断测试的结果和/或从测试下的结论和/或基于测试的治疗建议的沟通,并用电讯领域技术人员所熟悉的计算机硬件和软件的组合自动发送给个体。美国专利号6,283,761中描述了医疗保健导向的通信系统的一个实例;但是,本发明不限于利用这种具体通信系统的方法。在本发明的方法的某些实施方案中,可以在多样的(例如外部)辖区进行全部或一些方法步骤,包括

样品测定、疾病诊断和测定结果或诊断的沟通。

[0134] 为便于诊断和/或给出治疗建议,可将本发明的本文所呈现的一种或多种生物标志的参考和/或个体生物标志谱或表达水平显示在显示设备上、以电子形式包含或存储在机器可读介质中,如但不限于模拟磁带(如可通过VCR、CD-ROM、DVD-ROM读取的那些)、USB闪存介质等。这类机器可读介质还可以包含附加测试结果,如但不限于临床参数和传统实验室风险因素的测量结果。备选地或此外,机器可读介质还可以包含个体信息,如病历和任何相关家族史。

[0135] 治疗和监测治疗的方法

[0136] 按照本发明鉴定为表达与IL-17尤其是IL-17AA相关的生物标志的个体可能对IL-17拮抗剂治疗有反应。因此,本发明提供通过在获自个体的生物样品中测量选自上文所述TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL8、NFκBIZ、YKL40 (CHI3L1) 和G-CSF (CSF3) 的一个或多个基因的RNA转录物或其蛋白质产物的表达水平来治疗罹患MS或处于发展MS风险的个体的方法。该方法可以进一步包括将该一个或多个基因的表达水平与对照基因的表达水平相比较。用有效量的IL-17拮抗剂治疗一个或多个基因的表达相对于对照提高的个体。

[0137] 此外,本发明提供用于监测用IL-17拮抗剂治疗的罹患MS的个体的方法。该方法包括在获自该个体的生物样品中测量选自上文所述TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL-8、NFκBIZ、YKL40 (CHI3L1) 和G-CSF (CSF3) 的一个或多个基因的RNA转录物或其蛋白质产物的表达水平,并确定该一个或多个基因的表达水平是否相对于对照提高。在本发明的实施方案中,相对于对照提高的表达水平指示在该个体中继续用IL-17拮抗剂治疗。本发明的实施方案提供进一步对该个体施用IL-17拮抗剂。

[0138] 在本发明的这些方法中,所使用和/或获得的生物样品可以是例如生物流体,其非限制性地包括脑脊液(CSF)、血液、尿液、唾液、腹水或衍生物,如血清和血浆,等等。在本发明的一方面,所测量的表达水平是基因的RNA转录物的表达水平。在另一方面,所测量的表达水平是基因的蛋白质产物的表达水平。可以测量一个、两个、三个、四个、或五个、六个、七个、八个、或更多个基因的RNA转录物或蛋白质产物的表达水平。在本发明的实施方案中,可以测量TIMP1的RNA转录物或其蛋白质产物的表达水平。在具体实施方案中,可以测量TIMP1的RNA转录物或其蛋白质产物以及选自LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的至少一个或多个基因的表达水平。在另一实施方案中,可以测量LRG1的RNA转录物或其蛋白质产物的表达水平。在另一具体实施方案中,可以测量LRG1的RNA转录物或其蛋白质产物以及选自TIMP1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的至少一个或多个基因的表达水平。还在另一实施方案中,可以测量TIMP1和LRG1的RNA转录物或其蛋白质产物的表达水平。在另一实施方案中,可以测量TIMP1和/或LRG1及G-CSF的RNA转录物或其蛋白质产物的表达水平。在具体实施方案中,可以测量TIMP1、LRG1和G-CSF的RNA转录物或其蛋白质产物的表达水平。在另一实施方案中,在该方法包括测量选自TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL8、YKL40和G-CSF的任意一个基因的表达水平时,测量其蛋白质产物。在该方法包括测量NFκBIZ的表达水平时,测量其RNA转录物。

[0139] 在一个实施方案中,可以从获自MS患者的CSF测量选自TIMP1、LRG1、CXCL1、CXCL5、CXCL10、IL8、NFκBIZ、YKL40和G-CSF的一个或多个基因的表达水平。在具体实施方案中,在该方法包括测量选自CXCL1、CXCL5和CXCL10的一个或多个基因的表达水平时,可以从获自

MS患者的血浆测量其RNA转录物或蛋白质产物。在另一实施方案中,在该方法包括测量G-CSF的表达水平时,可以从获自MS患者的血清测量其RNA转录物或蛋白质产物。在具体实施方案中,从血清测量G-CSF的蛋白质产物的表达水平。

[0140] 在上文所述的任意方法和实施方案中,MS可以是RRMS。

[0141] 可以通过本领域已知的多种测定或测试来测量施用IL-17拮抗剂对多发性硬化的影响。可以用许多测量(包括临床测量、基于MRI扫描的那些和基于生活质量的那些)来评估产物在治疗MS中的功效。扩展失能状态量表(EDSS)是广泛用于跟踪MS中的失能过程的工具。它将最常见的MS相关神经功能损伤分类为从0至10的失能等级,每个连续步骤描述疾病的恶化。在EDSS量表的低限范围中,疾病进展主要定义为在神经学检查期间测量的具体功能系统中的失能等级逐渐提高。1.0至3.5的得分描述功能系统中的轻度至中度失能。4.0及以上的更高得分指示影响移动的越来越严重的失能,包括需要辅助装置,如手杖(EDSS为6.0)、助行架(EDSS为6.5)或轮椅(EDSS为7.0)。高于7.0的得分将患者归类为卧病在床。

[0142] MS功能复合量表(MSFC)(Whitaker等, *Multiple Sclerosis* 1:37-47(1995))也用于评估功效。与源自标准神经学检查的传统MS临床结果测量不同,MSFC基于腿功能/步行(定时步行25英尺)、手臂功能(九洞插板测试)和认知功能(听觉系列加法测试(PASAT 3))的定量测试,其在EDSS测量结果上扩展,并评估不能通过此量表很好地捕捉到的临床维度的影响。

[0143] MRI是另一种用于评估治疗MS的功效的工具,可以单独使用或用来支持临床数据,以评估对复发和失能终点的疗效。MRI是用于监测疾病活动的灵敏工具,在复发-缓解型MS和继发进展型MS患者中检测到比临床上明显的疾病活动多5至10倍的疾病活动(Isaac等, *Neurology* 38:1511-1515(1988); Willoughby等, *Ann. Neurol.* 25:43-44(1989); Khoury等, *Neurology* 44:2120-2124(1994); Thompson等, *Ann. Neurol.* 9:53-62(1991); Thompson等, *Neurology* 42:60-63(1992))。MS患者中的T2加权序列检测急性脱髓鞘的新区域,以及脱髓鞘和神经胶质增生的更慢性区域。为此,T2加权MRI是用于监测病灶随时间推移累积(活性病灶计数或这类病灶的总体积的变化)的良好工具。

[0144] 获取T1加权序列期间灌注二亚乙基三胺五乙酸钆(Gd-DPTA)允许显示急性MS病灶的炎症特征继发的血脑屏障破坏。迄今为止的证据表明,钆(Gd)增强是与临床复发相关的疾病活动的有用标志(Molyneux等, *Ann. Neurol.* 43:332-339(1998); Kappos等, *Lancet* 353:964-969(1999); McFarland等, *Multiple Sclerosis* 8:40-51(2002))。

[0145] MS患者中T1加权序列上的新低密度病灶对应炎性Gd增强病灶(包含水肿、脱髓鞘、轴突丧失或这些病理的组合)(Bruck等, *Ann. Neurol.* 42:783-793(1997))或伴随显著轴突丧失的慢性病灶。MRI上约一半的急性T1低密度将发展为慢性“T1黑洞”,其与失能进展相关(Simon等, *Neurology* 55:185-192(2000))。

[0146] IL-17拮抗剂

[0147] IL-17拮抗剂包括抑制、降低或干扰IL-17(如IL-17AA、IL-17FF和/或IL-17A/F)的功能或与受体的结合,阻断和/或中和IL-17的相关活性的任何分子。IL-17拮抗剂可以阻止IL-17(包括IL-17AA、IL-17FF和/或IL-17A/F)和其一个或多个受体之间的相互作用。这类拮抗剂通过例如以足以干扰IL-17活性的亲和力和特异性结合IL-17或IL-17受体来达到此作用。术语“IL-17拮抗剂”用来指IL-17AA、IL-17FF、IL-17A/F、IL-17RA和IL-17RC的拮抗剂

中的任一种和全部。在某些实施方案中,该抑制、降低、干扰、阻断或中和可以是部分或全部抑制、降低、干扰、阻断或中和IL-17AA、IL-17FF和/或IL-17A/F的活性。在某些其他实施方案中,该抑制、降低、干扰、阻断或中和可以是IL-17AA、IL-17FF和/或IL-17A/F活性的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%抑制、降低、干扰、阻断或中和。

[0148] 此组拮抗剂内还包括例如抗IL-17或其部分、与IL-17反应或抗IL-17受体或其部分的抗体,包括结合IL-17AA、IL-17FF、IL-17A/F、IL-17RA和/或IL-17RC的抗体,及IL-17受体的可溶性分子,如可溶性IL-17RA和可溶性IL-17RC。术语拮抗剂还包括可干扰IL-17AA、IL-17FF和/或IL-17A/F的产生或拮抗IL-17受体(如IL-17RA和/或IL-17RC)的任何活性剂。这类拮抗剂可以是用于将活性剂的功能与载体蛋白质结合以提高治疗剂的血清半衰期或赋予物种交叉耐受性的嵌合杂合体的形式。因此,这类拮抗剂的实例包括生物有机分子(例如拟肽)、抗体、蛋白质、肽、糖蛋白、糖肽、糖脂、多糖、寡糖、核酸、药理活性剂及其代谢物、转录和翻译控制序列等。在一个实施方案中,该拮抗剂是能够结合IL-17AA、IL-17FF和/或IL-17A/F的IL-17抗体,或能够结合IL-17RA和/或IL-17RC的IL-17受体抗体。

[0149] 示例性IL-17抗体包括secukinumab(例如美国专利号7,807,155)、ixekizumab(例如美国专利号7,838,638)、bimekizumab(例如美国专利号8,580,265)、ALX-0761(例如美国公开号20140314743)、CNT0 6785(例如美国专利号8,519,107)和afasevikumab(美国专利号8,715,669中所示抗IL17CDR序列)。示例性IL-17受体抗体包括brodalumab(例如美国专利号7,833,527)

[0150] 抗体的产生

[0151] 下文提供产生用于本发明的抗体的示例性技术。用于产生抗体的抗原可以是全长,或其包含所希望的表位的部分。备选地,可以用在其细胞表面表达所希望的抗原或表位的细胞来产生抗体。用于产生抗体的其他形式的抗原对本领域技术人员而言显而易见。

[0152] 多克隆抗体

[0153] 优选通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂来在动物中制备多克隆抗体。用双功能剂或衍生剂(例如马来酰亚胺基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酐、SOCl₂或R¹N=C=NR,其中R和R¹是不同的烷基)将相关抗原与在待免疫的物种中具有免疫原性的蛋白质(例如匙孔瓣血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)缀合可以是有用的。

[0154] 通过将例如100μg或5μg的蛋白质或缀合物(分别对于兔或小鼠)与3体积的弗氏完全佐剂组合,并在多个部位皮内注射该溶液来针对抗原、免疫原性缀合物或衍生物免疫动物。一个月后,通过在多个部位皮下注射来用弗氏完全佐剂中的初始量的1/5至1/10的肽或缀合物加强免疫动物。7至14天后,对动物进行采血,并测定血清的抗体效价。加强免疫动物,直至效价平台期。优选地,用同一抗原的缀合物加强免疫动物,但该抗原与不同的蛋白质缀合和/或通过不同的交联剂缀合。缀合物还可以作为蛋白质融合物在重组细胞培养物中制备。另外,适宜地用诸如明矾的聚集剂来增强免疫应答。

[0155] 单克隆抗体

[0156] 本领域中有多种用于制备本文的单克隆抗体的方法可用。例如,单克隆抗体可以用最先由Kohler等,Nature 256:495(1975)描述的杂交瘤法、通过重组DNA法(美国专利号4,816,567)制备。

[0157] 在杂交瘤法中,按上文所述免疫小鼠或其他适宜的宿主动物(如仓鼠)来引出淋巴细胞,该淋巴细胞产生或能够产生将特异性结合用于免疫的蛋白质的抗体。备选地,可以体外免疫淋巴细胞。然后用适宜的融合剂(如聚乙二醇)使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤细胞(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103页(Academic Press, 1986))。

[0158] 将这样制备的杂交瘤细胞接种和培养在适宜的培养基中,该培养基优选包含一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则用于杂交瘤的培养基通常将包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT培养基),这些物质阻止缺乏HGPRT的细胞生长。

[0159] 优选的骨髓瘤细胞是高效融合、通过所选择的产抗体细胞支持抗体的稳定高水平产生、且对诸如HAT培养基的培养基敏感的那些。在这些中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤细胞系,如可从Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA获得的衍生自MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的那些,及可从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection), Rockville, Maryland USA获得的SP-2或X63-Ag8-653细胞。还针对人单克隆抗体的产生描述了人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤(heteromyeloma)细胞系(Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001 (1984); 及Brodeur等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 51-63页(Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1987))。

[0160] 针对抗该抗原的单克隆抗体的产生测定杂交瘤细胞在其中生长的培养基。优选地,通过免疫沉淀或通过诸如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)的体外结合测定来测定杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0161] 可以例如通过Munson等, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980)的Scatchard分析来测定单克隆抗体的结合亲和力。

[0162] 鉴定出产生具有希望得到的特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以通过有限稀释法亚克隆该克隆,并通过标准方法培养(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* 59-103页(Academic Press, 1986))。适合用于此目的的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。此外,可以在动物中作为腹水肿瘤体内培养该杂交瘤细胞。

[0163] 通过常规抗体纯化方法(例如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析)适宜地从培养基、腹水或血清分离该亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0164] 编码该单克隆抗体的DNA易于用常规方法分离和测序(例如,通过使用能够特异性结合编码鼠抗体的重链和轻链的基因的探针)。杂交瘤细胞可作为这种DNA的优选来源。一旦分离,即可以将该DNA放入表达载体中,然后将该表达载体转染入诸如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不以其他方式产生抗体蛋白质的骨髓瘤细胞的宿主细胞中,以获得单克隆抗体在该重组宿主细胞中的合成。关于在细菌中重组表达编码抗体的DNA的综述文章包括Skerra等, *Curr. Opin. in Immunol.* 5:256-262 (1993) 和Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992)。

[0165] 在另一实施方案中,可以从用描述于McCafferty等, *Nature* 348:552-554 (1990)中的技术产生的抗体噬菌体文库分离单克隆抗体或抗体片段。Clackson等, *Nature* 352:

624-628 (1991) 和Marks等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) 分别描述了用噬菌体文库分离鼠抗体和人抗体。随后的出版物描述了通过链改组产生高亲和力 (nM范围) 人抗体 (Marks等, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)), 以及作为构建非常大的噬菌体文库的策略的组合感染和体内重组 (Waterhouse等, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993))。因此, 这些技术是除传统单克隆抗体杂交瘤技术之外用于分离单克隆抗体的可行的选择。

[0166] 还可以例如通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代同源鼠序列 (美国专利号4,816,567; 及Morrison等, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984)), 或通过将免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列共价连接来修饰DNA。

[0167] 通常, 这类非免疫球蛋白多肽取代抗体的恒定区, 或者它们取代抗体的一个抗原结合部位的可变结构域来产生嵌合二价抗体, 该嵌合二价抗体包含对抗原具有特异性的一个抗原结合部位和对不同抗原具有特异性的另一抗原结合部位。

[0168] 人源化抗体

[0169] 本领域中已描述了用于人源化非人抗体的方法。优选地, 人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入其中的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“输入”残基, 其通常取自“输入”可变结构域。基本上可以按照Winter及其同事的方法 (Jones等, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann等, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, *Science* 239:1534-1536 (1988)), 通过用高变区序列取代对应的人抗体序列来进行人源化。因此, 这类“人源化”抗体是嵌合抗体 (美国专利号4,816,567), 其中用对应的来自非人物种的序列取代了基本上少于完整的人可变结构域。实际上, 人源化抗体通常是人抗体, 其中用来自啮齿动物抗体中类似位点的残基取代了一些高变区残基, 且可能取代一些FR残基。

[0170] 用于产生人源化抗体的人可变结构域 (轻链和重链二者) 的选择对降低抗原性非常重要。按照所谓的“最佳适合”法, 针对已知的人可变结构域序列的整个文库筛选啮齿动物抗体的可变结构域序列。然后接受最接近于啮齿动物序列的人序列作为该人源化抗体的人构架区 (FR) (Sims等, *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia等, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987))。另一种方法使用衍生自特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列的特定构架区。同一构架可以用于几种不同的人源化抗体 (Carter等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); Presta等, *J. Immunol.* 151:2623 (1993))。

[0171] 保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性来人源化抗体也很重要。为了达到此目的, 按照优选方法, 通过用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和多种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常可得, 并为本领域技术人员所熟悉。说明和显示所选择的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序也可得。这些显示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中可能的作用, 即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样, 可以从受体序列和输入序列选择和组合FR残基, 使得达到希望得到的抗体特征, 如增加的对一种或多种靶抗原的亲和力。通常, 高变区残基直接且最实质性地涉及影响抗原结合。

[0172] 考虑多种形式的人源化抗体或亲和力成熟的抗体。例如, 人源化抗体或亲和力成熟的抗体可以是抗体片段, 如Fab, 其可选地与一种或多种细胞毒剂缀合, 以产生免疫缀合物。备选地, 人源化抗体或亲和力成熟的抗体可以是完整抗体, 如完整IgG1抗体。

[0173] 人抗体

[0174] 作为人源化之外的选择,可以产生人抗体。例如,现在可能产生转基因动物(例如小鼠),其在免疫时能够在缺乏内源免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的所有组成成分。例如,已描述了嵌合和种系突变体小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合缺失导致内源抗体产生的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转入这类种系突变体小鼠将导致在抗原攻击时产生人抗体。参见例如Jakobovits等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2551(1993); Jakobovits等,Nature 362:255-258(1993); Bruggermann等,Year in Immuno.7:33(1993);及美国专利号5,591,669、5,589,369和5,545,807。备选地,可以用噬菌体展示技术(McCafferty等,Nature 348:552-553(1990))来在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因库产生人抗体和抗体片段。根据此技术,将抗体V结构域基因符合读框地克隆入丝状噬菌体(如M13或fd)的主要或次要外被蛋白基因中,并作为功能性抗体片段展示在噬菌体颗粒的表面上。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝,基于抗体功能特性的选择还导致编码显示那些特性的抗体的基因的选择。因此,噬菌体模拟了B细胞的一些特性。噬菌体展示可以以多种形式进行;它们的综述参见例如Johnson, Kevin S.和Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)。可以将V基因区段的几个来源用于噬菌体展示。Clackson等,Nature 352:624-628(1991)从衍生自免疫小鼠的脾的V基因的小的随机组合文库分离了一系列多样化的抗-恶唑酮抗体。可以构建来自未免疫的人供体的V基因库,且可以基本上按照Marks等,J.Mol.Biol.222:581-597(1991)或Griffith等,EMBO J.12:725-734(1993)所述的技术分离抗一系列多样化抗原(包括自身抗原)的抗体。还参见美国专利号5,565,332和5,573,905。

[0175] 如上文所讨论,还可以通过体外活化B细胞来产生人抗体(参见美国专利号5,567,610和5,229,275)。

[0176] 抗原结合片段

[0177] 已发展了多种技术来产生包含一个或多个抗原结合区的抗体片段。通常,通过完整抗体的蛋白水解消化来衍生这些片段(参见例如Morimoto等,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992)和Brennan等,Science 229:81(1985))。但是,现在可以通过重组宿主细胞直接产生这些片段。例如,可以从上文讨论的抗体噬菌体文库分离抗原结合片段。备选地,可以从大肠杆菌直接回收Fab'-SH片段,并化学偶联来形成F(ab')₂片段(Carter等,Bio/Technology 10:163-167(1992))。根据另一种方法,可以从重组宿主细胞培养物直接分离F(ab')₂片段。用于产生抗体片段的其他技术对熟练的从业者而言显而易见。在其他实施方案中,所选择的抗体是单链Fv片段(scFv)。参见WO 93/16185;美国专利号5,571,894;及美国专利号5,587,458。抗体片段还可以是描述于例如美国专利号5,641,870中的“线性抗体”。这类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0178] 多特异性抗体

[0179] 多特异性抗体对至少两个不同表位具有结合特异性,其中该表位通常来自不同抗原。虽然这类分子通常将仅结合两个不同表位(即双特异性抗体,BsAb),但在本文中使用时,此表述涵盖具有附加特异性的抗体,如三特异性抗体。用于产生双特异性抗体的方法为本领域已知。全长双特异性抗体的传统产生基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条链具有不同的特异性(Millstein等,Nature 305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四价体杂交瘤(quadromas))产生10种不同抗体分子

的可能的混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化(通常通过亲和层析步骤进行)非常麻烦,且产物产率低。WO 93/08829和Traunecker等,EMBO J.,10:3655-3659(1991)中公开了类似的方法。根据不同的方法,将具有希望得到的结合特异性(抗体-抗原结合部位)的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。该融合优选是与包含至少部分铰链区、CH2区和CH3区的免疫球蛋白重链恒定结构域融合。优选使包含轻链结合所必需的部位的第一重链恒定区(CH1)存在于该融合的至少一个中。将编码免疫球蛋白重链融合和(如果希望)免疫球蛋白轻链的DNA插入分开的表达载体,并共转染入适宜的宿主生物。在将不等比例的三条多肽链用于构建提供最佳产率时,这在实施方案中调整三个多肽片段的相互比例提供了极大的灵活性。但是,在表达等比例的至少两种多肽链导致高产率时,或在该比例无特殊意义时,可能将两种或全部三种多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0180] 在此方法的优选实施方案中,该双特异性抗体由一条臂中具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一条臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。发现此不对称结构便于从不想要的免疫球蛋白链组合分离希望得到的双特异性化合物,因为免疫球蛋白轻链仅存在于该双特异性分子的一半中提供了容易的分离方式。此方法公开于WO 94/04690中。产生双特异性抗体的进一步详情参见例如Suresh等,Methods in Enzymology 121:210(1986)。

[0181] 根据WO96/27011中所述的另一种方法,可以改造抗体分子对间的界面来最大化从重组细胞培养物回收的异型二聚体的百分比。优选的界面包含抗体恒定结构域的C_H3结构域的至少一部分。在此方法中,用较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)取代来自第一抗体分子的界面的一个或多个小的氨基酸侧链。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)取代大的氨基酸侧链来在第二抗体分子的界面上产生与该一个或多个大的侧链相同或相似大小的补偿“凹陷”。这提供了增加异型二聚体的产率超过其他不想要的终产物(如同型二聚体)的机制。

[0182] 双特异性抗体包括交联抗体或“异缀合物”抗体。例如,异缀合物中的抗体之一可以与生物素蛋白偶联,另一种与生物素偶联。例如,已提出这类抗体将免疫系统细胞靶向至不需要的细胞(美国专利号4,676,980),并用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373)。可以用任意方便的交联方法产生异缀合物抗体。适宜的交联剂为本领域公知,并连同许多交联技术一起公开于美国专利号4,676,980中。在某些实施方案中,该IL-17抗体是结合IL-17AA、IL-17FF和/或IL-17AF的双特异性或多特异性抗体。在某些其他实施方案中,该IL-17抗体是双特异性或多特异性抗体,其中一个抗原结合部位结合IL-17AA和IL-17AF,另一个抗原结合部位结合IL-17FF;而还在其他实施方案中,一个抗原结合部位结合IL-17AA,另一个抗原结合部位结合IL-17FF和IL-17AF。在某些其他实施方案中,一个结合部位结合IL-17AF和IL-17FF,另一个抗原结合部位结合IL-17AA、IL-17FF和IL-17AF。在某些其他实施方案中,双特异性或多特异性抗体的一个抗原结合部位结合IL-17AA、IL-17AF和/或IL-17FF,另一个抗原结合部位结合第二抗原。在一些实施方案中,该第二抗原是炎症介质。在一些实施方案中,该第二抗原是TNF α 或IL-1。

[0183] 还已在文献中描述了用于从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如,可以用化学连接制备双特异性抗体。Brennan等,Science 229:81(1985)描述了蛋白酶解切割完整抗

体来产生F(ab')₂片段的方法。在二巯基络合剂亚砷酸钠的存在下还原这些片段,以稳定邻位二巯基并阻止分子间二硫化物形成。然后将产生的Fab'片段转化为硫代硝基苯甲酸盐(TNB)衍生物。然后通过用巯基乙胺还原来将Fab'-TNB衍生物之一再转化为Fab'-巯基,并与等摩尔量另一Fab'-TNB衍生物混合形成双特异性抗体。可以将产生的双特异性抗体用于选择性固定酶的试剂。

[0184] 还可以从大肠杆菌直接回收Fab'-SH片段,并可以化学偶联形成双特异性抗体。Shalaby等,J.Exp.Med.,175:217-225(1992)描述了全人源化双特异性抗体F(ab')₂分子的产生。使各Fab'片段分别从大肠杆菌分泌,并在体外进行直接化学偶联,以形成双特异性抗体。

[0185] 还已描述了用于直接从重组细胞培养物产生和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体。Kostelny等,J.Immunol.148(5):1547-1553(1992)。通过基因融合将来自Fos和Jun蛋白质的亮氨酸拉链肽与两种不同抗体的Fab'部分连接。在铰链区还原抗体同型二聚体形成单体,然后再氧化形成抗体异型二聚体。还可以利用此方法来产生抗体同型二聚体。Hollinger等,Proc.Nat.Acad.Sci.USA90:6444-6448(1993)所述的“双抗体”技术提供了用于产生双特异性抗体片段的备选机制。片段包含通过接头与轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H),该接头太短而不允许同一条链上的两个结构域间配对。因此,迫使一个片段的V_H和V_L结构域与另一片段的互补的V_L和V_H结构域配对,从而形成两个抗原结合部位。还已报道了通过使用单链Fv(sFv)二聚体来产生双特异性抗体片段的另一策略。参见Gruber等,J.Immunol.152:5368(1994)。

[0186] 考虑超过二价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。Tuft等,J.Immunol.147:60(1991)。

[0187] 其他氨基酸序列修饰

[0188] 考虑本文所述抗体的氨基酸序列修饰。例如,可以希望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。通过在抗体核酸中引入适当的核苷酸改变或通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。这类修饰包括例如从抗体的氨基酸序列内缺失残基,和/或在抗体的氨基酸序列内插入残基,和/或取代抗体的氨基酸序列内的残基。产生缺失、插入和取代的任意组合来达到最终构建体,只要该最终构建体具有希望得到的特征。氨基酸改变还可以改变抗体的翻译后加工,如改变糖基化位点的数目或位置。

[0189] 如Cunningham和Wells,Science 244:1081-1085(1989)所述,用于鉴定抗体的某些残基或区域作为优选的诱变位置的方法称为“丙氨酸扫描诱变”。在此,鉴定残基或靶基因组(例如带电荷残基,如arg、asp、his、lys和glu),并用中性氨基酸或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)取代,以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后通过在取代位点或针对取代位点引入进一步的变体或其他变体来精炼对取代显示功能敏感性的那些氨基酸位置。因此,虽然预先确定引入氨基酸序列变异的位点,但无需预先确定突变本身的性质。例如,为了分析给定位点上的突变的表现,在靶密码子或靶区域处进行丙氨酸扫描或随机诱变,并针对希望得到的活性筛选所表达的抗体变体。

[0190] 氨基酸序列插入包括长度在一个残基至含有一百或更多个残基的多肽的范围内的氨基端和/或羧基端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N端蛋氨酸残基的抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。抗体分子的其他插入变体包

括抗体的N或C端与酶(例如,对于ADEPT)或增加抗体血清半衰期的多肽融合。

[0191] 另一类变体是氨基酸取代变体。这些变体在抗体分子中具有至少一个被不同残基取代的氨基酸残基。对取代诱变而言,最有意义的位点包括高变区,但也考虑FR改变。表2在“优选的取代”的表头下显示保守取代。如果这类取代导致生物学活性的改变,则可以引入下表中命名为“示例性取代”或如下文参考氨基酸种类进一步描述的更实质性的改变,并筛选产物。

[0192] 表2

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

[0194] 通过选择这样的取代来达到抗体的生物学特性的实质性修饰,该取代在其对维持以下的作用上显著不同:(a) 取代区域的多肽主链的结构,例如,作为折叠或螺旋构象;(b) 该分子在靶位点处的电荷或疏水性;或(c) 侧链的大小。可以根据其侧链性质的相似性来分组氨基酸(在A.L.Lehninger, in Biochemistry第2版,73-75页,Worth Publishers,纽约(1975)中):

[0195] 非极性氨基酸:Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M);

[0196] 不带电荷的极性氨基酸:Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q);

[0197] 酸性氨基酸:Asp (D)、Glu (E);

[0198] 碱性氨基酸:Lys (K)、Arg (R)、His (H)。

[0199] 备选地,可以根据共同的侧链特性来对天然存在的残基进行分组:

- [0200] 疏水性氨基酸:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- [0201] 中性亲水性氨基酸:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- [0202] 酸性氨基酸:Asp、Glu;
- [0203] 碱性氨基酸:His、Lys、Arg;
- [0204] 影响链取向的残基:Gly、Pro;
- [0205] 芳族氨基酸:Trp、Tyr、Phe。
- [0206] 非保守取代必需将这些种类之一的成员换为另一种类。
- [0207] 还可以取代(通常用丝氨酸)不涉及维持抗体的正确构象的任意半胱氨酸残基来改善该分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反,可以向抗体中加入一个或多个半胱氨酸键来改善其稳定性(尤其是在该抗体是诸如Fv片段的抗体片段时)。
- [0208] 尤其优选的取代变体的类型涉及取代亲本抗体(例如人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,相对于它们所产生自的亲本抗体,所得到的选择用于进一步研发的一个或多个变体将具有改善的生物学特性。用于产生这类取代变体的方便的方式涉及使用噬菌体展示的亲合力成熟。简言之,突变几个高变区位点(例如6-7个位点)来产生各位点上所有可能的氨基酸取代。这样产生的抗体变体作为与包装在各颗粒内的M13的基因III产物的融合以单价形式从丝状噬菌体颗粒展示。然后按照本文所公开针对它们的生物学活性(例如结合亲和力)筛选噬菌体展示的变体。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可以进行丙氨酸扫描诱变来鉴定显著促成抗原结合的高变区残基。备选地,或此外,分析抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体和抗原之间的接触点可以是有益的。这类接触残基和邻近残基是按照本文所述技术进行取代的候选残基。一旦产生这类变体,即可以按照本文所述对该系列变体进行筛选,并选择在一项或多项相关测定中具有较优特性的抗体用于进一步研发。
- [0209] 抗体的另一类氨基酸变体改变抗体原来的糖基化模式。改变意指缺失一个或多个见于该抗体中的糖类部分,和/或加入一个或多个不存在于该抗体中的糖基化位点。
- [0210] 抗体的糖基化通常是N联糖基化或O联糖基化。N联糖基化指糖类部分附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸外的任意氨基酸)是糖类部分酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。因此,这些三肽序列中的任一个在多肽中的存在将产生潜在的糖基化位点。O联糖基化指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。
- [0211] 通过改变氨基酸序列,使得它包含一个或多个上述三肽序列(对于N联糖基化位点)来方便地达到在抗体中加入糖基化位点。还可以通过向原抗体序列中加入一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或用一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代原抗体序列来产生改变(对于O联糖基化位点)。
- [0212] 在抗体包含Fc区时,可以改变附着于其上的糖类。例如,Presta,L的美国专利申请号US 2003/0157108A1中描述了具有附着于抗体Fc区的缺乏岩藻糖的成熟糖类结构的抗体。还参见US 2004/0093621A1(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。Jean-Mairet等的W003/011878和Umana等的美国专利号6,602,684中提到了在附着于抗体Fc区的糖类中具有二等分N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)的抗体。Patel等的W097/30087中报道了在附着于抗体Fc区的寡

糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体。关于具有改变的附着于其Fc区的糖类的抗体,还参见W098/58964 (Raju, S.) 和W099/22764 (Raju, S.)。

[0213] 可以希望就效应子功能修饰本发明的抗体,例如以增强抗体的依赖抗体的细胞毒性(ADCC)和/或依赖补体的细胞毒性(CDC)。这可以通过在该抗体的Fc区中引入一个或多个氨基酸取代来达到。备选地,或此外,可以在Fc区中引入一个或多个半胱氨酸残基,从而允许在此区域中形成链间二硫键。这样产生的同型二聚体抗体可以具有改善的内化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和依赖抗体的细胞毒性(ADCC)。参见Caron等, *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992) 和Shopes, B. J., *Immunol.* 148:2918-2922 (1992)。还可以用Wolff等, *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993) 中所述的异双功能交联剂来制备具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚体抗体。备选地,可以改造抗体,使其具有双Fc区,从而可以具有增强的补体介导的裂解和ADCC能力。参见Stevenson等, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)。

[0214] W000/42072 (Presta, L.) 描述了在人效应细胞存在下具有改善的ADCC功能的抗体,其中该抗体在其Fc区中包含氨基酸取代。优选地,具有改善的ADCC的抗体在Fc区的298、333和/或334位(残基的Eu编号)包含取代。优选地,该改变的Fc区是包含一个、两个或三个这些位置上的取代的人IgG1Fc区。这类取代可选地与提高C1q结合和/或CDC的一个或多个取代组合。

[0215] W099/51642、美国专利号6,194,551B1、美国专利号6,242,195B1、美国专利号6,528,624B1和美国专利号6,538,124 (Idusogie等) 中描述了具有改变的C1q结合和/或依赖补体的细胞毒性(CDC)的抗体。该抗体在其Fc区的氨基酸位置270、322、326、327、329、313、333和/或334(残基的Eu编号)中的一个或多个上包含氨基酸取代。

[0216] 为了增加抗体的血清半衰期,可以按例如美国专利5,739,277中所述在抗体(尤其是抗体片段)中掺入挽救受体结合表位。本文所用的术语“挽救受体结合表位”指IgG分子(例如IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄)的Fc区的表位,其负责增加IgG分子的体内血清半衰期。

[0217] 具有改善的新生儿Fc受体(FcRn)结合和增加的半衰期的抗体描述于W000/42072 (Presta, L.) 和US2005/0014934A1 (Hinton等)。这些抗体包含其中具有一个或多个取代的Fc区,该取代改善Fc区与FcRn的结合。例如,该Fc变体可以在位置238、250、256、265、272、286、303、305、307、311、312、314、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428或434(残基的Eu编号)中的一个或多个处具有取代。优选的具有改善的FcRn结合的含有Fc区的抗体变体在其Fc区的位置307、380和434(残基的Eu编号)中的一个、两个或三个处包含氨基酸取代。

[0218] 还考虑具有三个或更多个(优选四个)功能性抗原结合部位的改造抗体(Miller等的美国申请号US2002/0004587A1)。

[0219] 编码抗体的氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然存在的氨基酸序列变体的情况下),或通过抗体的早先制备的变体或非变体形式的寡核苷酸介导(定位)诱变、PCR诱变和盒诱变来制备。

[0220] 施用和制剂

[0221] IL-17拮抗剂可以通过任何适宜的途径施用,包括胃肠外给药途径,如但不限于静脉内(IV)、肌内(IM)、皮下(SC)和腹腔内(IP),以及经皮、含服、舌下、直肠内、鼻内和吸入途

径。IV、IM、SC和IP施用可以是通过推注或输注,在SC的情况下,还可以是通过缓释可植入装置,包括但不限于泵、缓释制剂和机械装置。在本发明的实施方案中,施用时全身施用。

[0222] 在具体实施方案中,用于施用IL-17拮抗剂的方法是通过皮下输注,尤其是使用定量输注装置,如泵。这种泵可以是可重复使用的或一次性的,且可植入或可外部安装。用于此目的的药物输注泵包括例如美国专利号5,637,095、5,569,186和5,527,307中公开的泵。组合物可以从这类装置连续施用或间歇施用。

[0223] 适于保存的IL-17拮抗剂的治疗制剂包含具有希望得到的纯度的拮抗剂与可药用载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)的冻干制剂或水溶液形式的混合物。可药用载体、赋形剂或稳定剂在所利用的剂量和浓度下对受体无毒性,且包括:缓冲剂,如磷酸、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯己双铵;氯苄烷铵;苄索氯铵;苯酚;丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂,如TWEENTTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。冻干抗IL-17抗体制剂的实例描述于WO 97/04801中。这些组合物包含含有从约0.1wt%至90wt%和更通常从约10wt%至30wt%活性拮抗剂(优选可溶形式)的IL-17拮抗剂。

[0224] 活性成分可以包载在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微囊(例如,分别为羟甲基纤维素微囊或明胶微囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊)中、胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米颗粒和纳米囊(nanocapsule))中或粗滴乳状液中。这类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences,上文中。

[0225] 本文公开的IL-17拮抗剂(如抗IL-17抗体)还可以配制为免疫脂质体。通过如Epstein等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); 美国专利号4,485,045和4,544,545;及1997年10月23日公开的W097/38731中描述的本领域已知的方法制备包含抗体的脂质体。美国专利号5,013,556中公开了具有增强的循环时间的脂质体。

[0226] 尤其有用的脂质体可以通过用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物进行反相蒸发来产生。通过具有确定孔径的滤器挤出脂质体来产生具有希望得到的直径的脂质体。本发明的抗体的Fab'片段可以通过二硫键交换反应与Martin等,J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982)中所述的脂质体缀合。

[0227] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的适宜实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质是成形物品的形式,例如膜或微囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(甲基丙烯酸-2-羟乙酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如LUPRON DEPOTTM(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0228] 可将任何具体拮抗剂与载体蛋白质结合来提高治疗拮抗剂的血清半衰期。例如，可以按美国专利号5,116,964中所述针对每种具体的IL-17拮抗剂或其拮抗部分获得如本文所述的可溶性免疫球蛋白嵌合体。通过结合IgG的蛋白A-琼脂糖层析容易地纯化免疫球蛋白嵌合体。嵌合体具有形成同时具有更高亲和力和血清半衰期的免疫球蛋白二聚体的能力。

[0229] 待用于体内施用的制剂必须无菌。这易于通过滤过无菌滤膜来实现。

[0230] 本文的制剂还可以包含所治疗的具体适应症必需的一种以上活性化合物，通常是相互无不利影响的具有互补活性的那些。另外，这类活性化合物可以分开对所治疗的哺乳动物施用。

[0231] 例如，可以希望进一步提供非IL-17拮抗剂的多发性硬化治疗剂。多发性硬化(MS)治疗剂非限制性地包括反丁烯二酸二甲酯(**TECFIDERA[®]**)、FTY-720(芬戈莫德，**GILENYA[®]**)、那他珠单抗(**TYSABRI[®]**)、糖皮质激素、 β -干扰素、醋酸格拉默(**COPAXONE[®]**)、特立氟胺(**AUBAGIO[®]**)、米托蒽醌和抗CD20抗体(如奥瑞珠单抗、利妥昔单抗和奥法木单抗)。在具体实施方案中，该MS治疗剂是反丁烯二酸二甲酯。在另一实施方案中，该MS治疗剂是FTY-720。

[0232] 多发性硬化治疗剂可以与IL-17拮抗剂一起或分开施用。这类多发性硬化治疗剂以对预期目的有效的量适宜地存在或组合施用，该量通常小于在无IL-17拮抗剂的情况下单独施用它们时所使用的量。如果将它们配制在一起，则可以按根据例如适应症类型、个体、个体的年龄和体重、当前临床状态、施用时间、剂型、施用方法等确定的量配制它们。例如，相对于一份重量的IL-17拮抗剂，优选按约0.0001至10,000份重量的比例使用并行药物。

[0233] 对罹患多发性硬化的个体施用的拮抗剂剂量可以由医生根据相关情况确定，包括个体的病症、拮抗剂的类型、适应症的类型和所选择的给药途径。本文提供的剂量范围并非旨在以任何方式限制本发明的范围。对于多发性硬化，用于本文目的的“有效量”由以上因素决定，但通常为约0.01至100mg/kg体重/天。在一个实施方案中，该剂量是约0.1-50mg/kg/天、更尤其优选0.1至25mg/kg/天。另外，在每天施用IL-17拮抗剂时，用于人的静脉内或肌肉内剂量可以是约0.3至10mg/kg体重/天、更尤其是约0.5至5mg/kg。对于皮下施用，剂量可以高于静脉内或肌肉内提供的治疗等同剂量。在一个实施方案中，用于人的每日皮下剂量是约0.3至20mg/kg、更尤其是约0.5至5mg/kg。

[0234] 本发明考虑多种给药方案。本发明涵盖连续给药方案，其中有规律(每天、每周、或每月，取决于剂量和剂型)施用IL-17拮抗剂而无实质性中断。在一个实施方案中，连续给药方案包括每日连续输注，其中每天输注IL-17拮抗剂，及连续推注施用方案，其中通过推注或吸入或鼻内途径至少每天一次施用IL-17拮抗剂。本发明还涵盖不连续给药方案。不连续施用方案的精确参数将根据制剂、递送方法和所治疗的个体的临床需要而变。例如，如果通过输注施用IL-17拮抗剂，则施用方案可以包括第一施用期和随后的第二施用期，其中第二施用期施用高于、等于或低于第一施用期的IL-17拮抗剂。

[0235] 在通过推注尤其是缓释制剂的推注来施用，给药方案也可以是连续的，因为每天施用IL-17拮抗剂，或者可以是不连续的，第一和第二施用期如上文所述。

[0236] 通过任何方法进行的连续和不连续施用还包括这样的给药方案,其中在整个第一施用期调节剂量,使得例如在第一施用期开始时剂量低并提高直至第一施用期结束,最初剂量高并在第一施用期期间降低,最初剂量低、提高至峰值水平、然后降低至第一施用期结束,及其任意组合。

[0237] 试剂盒

[0238] 用于本发明方法的材料适于制备试剂盒。本发明的试剂盒可以包含用于定量本文公开的基因的RNA转录物的表达水平的一种或多种基因特异性或基因选择性探针和/或引物。这类试剂盒可以可选地包含用于从生物样品提取RNA的一种或多种试剂。该试剂盒可以包含一个或多个容器,每个容器包含用于该方法的多种材料或试剂中的一种或多种,包括例如层析柱、预制微阵列、缓冲液、适当的核苷三磷酸、反转录酶、DNA聚合酶、RNA聚合酶,及用于定量本文公开的RNA转录物的表达水平的一种或多种探针和引物。

[0239] 备选地,或此外,本发明的试剂盒可以包含用于定量本文公开的基因的蛋白质产物的表达水平的一种或多种试剂。这类试剂包括对蛋白质产物特异且可以可选地标记的抗体。

[0240] 本发明的试剂盒可以附加地或分开地包含含有一种或多种IL-17拮抗剂(如IL-17抗体)的一个或多个容器。该试剂盒可以进一步包含一套涉及IL-17拮抗剂在治疗多发性硬化中的用途和剂量的说明书,通常为书面说明书。试剂盒所包含的说明书通常包含关于治疗多发性硬化的剂量、给药方案和给药途径的信息。IL-17拮抗剂可以以单位剂量、大包装(例如多剂量包装)或亚单位剂量提供。

[0241] 本发明的其他细节将在以下非限制性实施例中描述。

[0242] 实施例1

[0243] RRMS患者中CSF IL17水平和其他炎症介质提高

[0244] 使用基于**Erenna**[®]免疫测定平台(Singulex, Inc.)的免疫测定(在IL-17A和IL-17F的情况下)或标准夹心免疫测定,在来自50名接受标准治疗的RRMS患者和20名健康供体(HD)的脑脊液(CSF)和血清中测量了IL-17AA、IL-17FF和多种其他蛋白质。IL-17A免疫测定特异性测量IL-17AA同型二聚体细胞因子,与IL-17AF异型二聚体有约30%交叉反应性,而IL-17F测定仅测量IL-17FF同型二聚体,与IL-17AF或AA无可测量到的交叉反应性。所有免疫测定都利用单克隆捕获和检测抗体。

[0245] 如图6中所示,在一些RRMS CSF样品中,多种炎症介质提高,包括eotaxin、CXCL10、TARC和MCP4(对于所有分析物,与健康供体相比, $p < 0.03$)。

[0246] 还在RRMS患者的CSF样品中分析了IL-17AA和IL-17FF水平。图7中的结果显示,RRMS患者CSF中的IL-17AA水平高于对照个体中的IL-17AA水平。具体而言,与对照个体的50%相比,可在76%的RRMS患者中检测到IL-17AA,与对照个体中的0.07pg/mL(具有约10倍的动态范围)相比,RRMS患者中的中位数CSF IL-17AA水平为0.4pg/mL。参见图7A,左图(* $p < 0.0001$, Wilcoxon检验)。与对照患者中的0%相比,可在12%RRMS患者的CSF中检测到IL-17FF水平。参见图7A,右图。相反,未观察到RRMS患者中血清IL-17AA和IL-17FF水平的提高。参见图7B。

[0247] 但是,认为CSF中IL-17AA和IL-17FF的水平低而不能称为体外诊断的有用生物标志。因此,为显示高IL-17AA水平的RRMS患者亚组寻找替代生物标志。

[0248] 实施例2

[0249] 在体外上调人脑内皮细胞和小胶质细胞中的IL-17反应性基因

[0250] 用标准细胞培养流程扩大hCMEC/D3永生化人脑内皮细胞系和SV40转化的人小胶质细胞系,然后用TNF α 、IL-6加sIL-6R、IL-17AA或这些细胞因子的组合刺激6小时。然后从细胞分离RNA,进行微阵列分析来比较在有或无附加细胞因子情况下由IL-17诱导的基因表达。

[0251] 在存在或缺乏TNF α 和IL-6+6R的情况下用IL-17A刺激人脑内皮细胞(参见图8A)和小胶质细胞(参见图8B)。图8A和8B显示,IL-17A提高了STAT和NF- κ B信号发放相关基因表达(如NF κ BIZ、CXCL1、IL-6和CSF3(G-CSF))的放大,但在TNF α 或IL6+IL6R存在下两种细胞类型中都进一步放大(除括号中有“FC”(代表“倍数变化”)的那些之外,对于所有比较,p<0.05(配对t检验))。

[0252] 实施例3

[0253] 体内EAE模型中鉴定RRMS生物标志

[0254] 小鼠中的实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)是CD4⁺T细胞介导的自身免疫病,其特征在于血管周围CD4⁺T细胞和单核细胞炎症及随后中枢神经系统(CNS)中轴突轨迹的初步脱髓鞘,导致进行性后肢麻痹。EAE为研究CD4⁺T_{H1}/T_{H17}介导的组织损伤的病理发生和免疫调节提供了有力的模型,通常认为是人免疫介导脱髓鞘疾病多发性硬化的相关模型。在C57BL/6小鼠中,通过用对应于MOG(MOG₃₅₋₅₅)的免疫显性表位的肽免疫来诱导EAE。通过测定多种IL-17阻断抗体对生物标志的调节,用EAE模型来鉴定与IL-17AA相关的生物标志。

[0255] 对分离自来自在用抗IL-17抗体和对照处理48小时后具有活动性EAE的小鼠的脊髓组织的RNA进行了全基因组表达分析。参见图9。具体而言,用含有800 μ g热灭活结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) (Mtb)的弗氏完全佐剂中的300 μ g MOG₃₅₋₅₅免疫C57BL/6小鼠(第0天)。此外,在免疫后第0天和第2天施用200ng百日咳毒素(PTX)。小鼠(每组8只小鼠)在疾病顶峰时(第14天)随机化为以下表3中所示的治疗组:

[0256] 表3

治疗	剂量
aIL-17AA(对 IL-17AA 同型二聚体特异的抗体)	10 mg/kg 0.2ml IP
aIL-17 FF(对 IL-17FF 同型二聚体特异的抗体)	10 mg/kg 0.2ml IP
aIL-17AA + FF (aIL-17AA 和 aIL-17FF 的组合)	各 10 mg/kg, 0.2ml IP
aIL-17AA/AF(对 IL-17A 特异且结合 IL-17AA 同型二聚体和 IL-17AF 异型二聚体的抗体)	10 mg/kg 0.2ml IP
aIL-17AA/AF + aIL-17FF (aIL-17AA/AF 和 aIL-17FF 组合)	各 10 mg/kg , 0.2ml IP
a-gp120 mIgG2a(对照)	10 mg/kg 0.2ml IP
反丁烯二酸二甲酯(DMF) (TECFIDERA [®])	30 mg/kg/天 b.i.d. PO 5ml/kg
载体	b.i.d. PO 5ml/kg
FTY-720 (芬戈莫德, GILENYA [®])	3 mg/kg IP QD (每天一次) 0.2ml
疾病顶峰对照	
首次用于实验的对照	

[0258] 将抗IL-17抗体的作用与批准用于治疗多发性硬化的小分子药物相比较。反丁烯二酸二甲酯(TECFIDERA[®])是在美国批准用于治疗多发性硬化的复发形式(包括

RRMS) 的口服治疗剂。已知反丁烯二酸二甲酯不影响IL-17途径。FTY720 (芬戈莫德, **GILENYA**[®]) 是批准用于治疗MS的复发形式 (RRMS) 的鞘氨醇1-磷酸 (S1P) 调节物。

[0259] 抗体治疗组 (IL-17抗体和对照抗gp-120抗体) 按照表3中所示剂量在第14天治疗, 并在48小时后在第16天停药 (总计一个剂量)。DMF和载体治疗组从第14天开始至第15天 b.i.d. (每天两次) 给药 (pm剂量; 总计4个剂量), 并在第16天停药。FTY-120治疗组在第14至第15天QD (每天一次) 给药 (总计2个剂量), 并在第16天停药。

[0260] 在第16天停药时收集脊髓和血清, 对脊髓组织RNA进行基因表达分析。

[0261] 图10A显示, 顶峰EAE疾病时, 通过诸如CD4和CD45的标志测量的淋巴细胞水平提高, 而图10B显示, 对于所有基因, 与首次用于实验的对照相比, 在顶峰EAE疾病时, 髓鞘成分的转录物丰度 (如髓鞘相关少突胶质细胞碱性蛋白 (Mbp) 和髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (Mog) 的转录物丰度) 降低 $p < 0.0007$ (每一对的Wilcoxon检验)。图10中所示炎症相关基因和髓鞘形成相关基因的表达水平的改变与疾病的诱导相关, 从而确认了MS的EAE动物模型; 但是, 抗IL-17治疗未调节基因表达。

[0262] 图11A显示所选择的顶峰疾病时EAE脊髓中上调的其他基因的热图, 及那些基因的表达在抗IL-17AA/AF+抗IL-17FF治疗时的降低。该研究的目的是鉴定之前未鉴定为与IL-17相关或与RRMS或其他神经变性疾病相关的基因。图11中的结果显示, CHI3L1, TIMP1, IL-6, CXCL1, LRG1和NF κ BIZ的RNA水平在疾病顶峰时提高 (与疾病前对照相比), 与对照治疗 (抗豚草和CTLA-4免疫黏附素) 相比, 在用抗IL-17AA/AF和抗IL-17FF抗体治疗时降低。图12A-F显示每种治疗下这些基因中每一个的转录物丰度图。图13显示抗IL-17抗体治疗也降低CXCL5的基因表达。与单独用抗IL-17AA抗体或抗IL-FF抗体治疗相比, 包括抗IL-17AA/AF抗体的治疗在一些情况下更好地达到EAE脊髓中IL-17靶基因的阻断。参见图12和13。

[0263] 实施例4

[0264] 人样品中的RRMS生物标志

[0265] 使用实施例1中所述的 **Erenna**[®] 免疫测定平台 (Singulex, Inc.) 或夹心免疫测定, 在来自50名RRMS患者和20名健康供体 (HD) 的脑脊液 (CSF) 中测量了IL-17A、IL-17F和多种靶蛋白。

[0266] 下文表4显示在人CSF样品中测试的所选择的基因 (包括LRG1、TIMP1、YKL40 (CHI3L1)、CXCL1、CXCL10、IL-6和IL-8) 的蛋白质水平。与健康对照相比, 在RRMS中, 所有基因的蛋白质水平都显示显著提高 (参见表4中的“差异诊断水平”栏)。除IL-6外, 表4中所有基因的蛋白质水平都显示与人RRMS CSF样品中IL-17AA蛋白质水平的良好相关 (参见“与IL17CSF的Spearman相关”栏)。

[0267] 表4

[0268]

生物标志	单位	位置	差异诊断水平		与 IL17 CSF 的 Spearman 相关(仅 RRMS)	
			Wilcoxon p-值	logFC	p-值	rho
LRG1	ng/ml	CSF	0.07	0.45	0.1255	0.22
TIMP1	ng/ml	CSF	0.004	0.26	0.0005	0.48
YKL40	ng/ml	CSF	0.01	0.42	0.6522	0.07
CXCL1	pg/ml	CSF	0.005	-0.49	0.0428	0.29
CXCL10	pg/ml	CSF	0.0005	1.05	0.0262	0.31
IL6	pg/ml	CSF	0.13	0.66	0.2437	-0.17
IL8	pg/ml	CSF	0.15	0.23	0.0042	0.40

[0269] 具体而言,TIMP1和LRG1与IL-17AA的相关显示在图14中。图14中显示,人RRMS患者的CSF样品中TIMP1和LRG1蛋白质水平提高,且它们在CSF中的蛋白质水平也与人RRMS患者CSF中IL-17AA的蛋白质水平相关,确认了来自小鼠EAE模型的结果。此外,CSF中的IL17A、TIMP1和LRG1水平与CSF/血清白蛋白比值(血脑屏障通透性的测量)相关。使用厂家的指南,用Sigma白蛋白ELISA试剂盒(目录#RAB0603)测量血清和CSF白蛋白。血清1/1,000,000稀释、CSF 1/5,000稀释用于测定。结果显示在下文表5中。

[0270] 表5

变量	因变量	Spearman rho	p-值
CSF/血清白蛋白	CSF中的IL17AA	0.3	0.02
CSF/血清白蛋白	CSF中的TIMP1	0.4	0.008
CSF/血清白蛋白	CSF中的LRG1	0.6	<0.0001

[0272] 实施例5

[0273] G-CSF为RRMS的血清标志

[0274] G-CSF(CSF3)是在多种细胞系中受IL-17调节的细胞因子,是嗜中性粒细胞增殖的关键因子。在CSF中检测不到但在血清中可检测到G-CSF。因此,在EAE模型中及在人血清样品中都考察了G-CSF血清水平与IL-17AA的相关。

[0275] 在图9中所指出和显示的时间点从上文实施例3中所述EAE小鼠获得血清。用对G-CSF特异的单克隆抗体通过夹心ELISA测量G-CSF。

[0276] 如图15中所示,在EAE模型中,在临床疾病表现之前观察到G-CSF的峰值水平(在第8天,临床评分为0)。血清G-CSF在用包含上文表3中所述aIL-17AA/AF+aIL-17FF(aIL-17AA/AF和aIL-17FF的组合)的抗IL-17抗体的混合物处理后降低,而在DMF或FTY-720处理后未降低。

[0277] 在人血清样品中,G-CSF在IL-17AA高的RRMS患者中提高,且显示与CSF IL-17水平相关。参见图16。

[0278] 因此,在鉴定IL-17AA高的RRMS患者,尤其是可从靶向IL-17AA、IL-17FF和/或IL-17AF的治疗受益的IL-17AA高的RRMS患者中,血清G-CSF水平可用作血清标志。

[0279] 虽然在前面的描述中参考某些实施方案说明了本发明,但它不受如此的限制。实际上,对本领域技术人员而言,本发明除本文中所显示和描述的那些之外的多种修改,将从前面的描述变得显而易见,且落在所附权利要求的范围之内。

[0280] 本说明书通篇引用的所有参考文献及其中所引用的参考文献在此明确以其整体引入作为参考。

序 列 表

- <110> 基因泰克公司 (GENENTECH, INC.) 等
- <120> 多发性硬化的基因表达标志和治疗
- <130> P32496-W0
- <140>
- <141>
- <150> 62/108, 914
- <151> 2015-01-28
- <160> 8
- <170> PatentIn 版本 3.5

- <210> 1
- <211> 1859
- <212> DNA
- <213> 人类
- <400> 1

[0001]

```

gcaggcaciaa actcatccat ccccagttga ttggaagaaa caacgatgac tcttgggaag      60
acctcattgg tgtactgct actgctgctg agcctggagg ccatagtga ggcaggaatc      120
acaatcccac gaaatccagg atgcccacaaat tctgaggaca agaacttccc cggactgtg      180
atggtcaacc tgaacatcca taaccggaat accaatacca atcccacaaag gtcctcagat      240
tactacaacc gatccacctc accttggaaat ctccaccgca atgaggacce tgagagatat      300
cctctgtgta tctgggagge aaagtgccgc cacttgggct gcatcaacgc tgatgggaac      360
gtggactacc acatgaactc tgtcccacatc cagcaagaga tcttggctct ggcgaggag      420
cctccacact gccccaactc cttccggctg gagaagatac tgggtgccgt gggctgcacc      480
tgtgtcacc cgtattgtcca ccatgtggcc taagagctct ggggagccca cactcccaaa      540
agcagttaga ctatggagag cgcaccagc cctcaggaa cctcctcct tcaaagacag      600
cctcatttcg gactaaaact attagagttc ttaaggcagt ttgtccaatt aaagcttcag      660
aggtaacact tggccaagat atgagatctg aattacctt cctctttcc aagaaggaag      720
gtttgactga gtaccaattt gcttcttgtt tactttttta agggctttta gttatttatg      780
tatttaatat gccctgagat aactttgggg tataagattc cattttaatg aattacctac      840
tttattttgt ttgtcttttt aaagaagata agattctggg cttgggaatt ttattattta      900
aaaggtaaaa cctgtattta tttgagctat ttaaggatct atttatgttt aagtatttag      960
aaaaaggtga aaaagcacta ttatcagttc tgcctaggtg aatgtaagat agaattaaat      1020
ggcagtgcaa aatttctgag tctttacaac ataccgatag agtatttctt cctctttggt      1080
tttaaaagtt ataacatgac tgaagagaaa gattaaacct actttcatat gtattaattt      1140
aaattttgca atttgttgag gttttacaag agatacagca agtctaactc tctgttccat      1200
taaaccctta taataaaatc cttctgtaat aataaagttt caaaagaaaa tgtttatttg      1260
ttctcattaa atgtatttta gcaaacctcag ctcttcctta ttgggaagag ttatgcaaat      1320
tctcctataa gcaaaacaaa gcatgtcttt gagtaacaat gacctggaaa taccacaaat      1380
tccaagttct cgatttcaca tgccttcaag actgaacacc gactaagggt ttcatactat      1440
tagccaatgc ttagacaga agcattttga taggaataga gcaataaga taatggccct      1500
gaggaatggc atgtcattat taaagatcat atggggaaaa tgaaacctc cccaaaatac      1560
aagaagttct gggaggagac attgtcttca gactacaatg tccagtttct cccctagact      1620
caggcttctt ttggagatta aggccctca gagatcaaca gaccaacatt tttctcttcc      1680
tcaagcaaca ctcttagggc ctggcttctg tctgatcaag gcaccacaca acccagaaag      1740

```

gagctgatgg ggcagaacga actttaagta tgagaaaagt tcagcccaag taaaataaaa 1800
 actcaatcac attcaattcc agagtagttt caagtttcac atcgtaacca ttttcgccc 1859

<210> 2

<211> 155

<212> PRT

<213> 人类

<400> 2

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly
 20 25 30
 Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn
 35 40 45
 Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser
 50 55 60
 Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu
 65 70 75 80
 Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His
 85 90 95
 Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser
 100 105 110
 [0002] Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His
 115 120 125
 Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys
 130 135 140
 Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
 145 150 155

<210> 3

<211> 535

<212> DNA

<213> 人类

<400> 3

agccaccage gcaacatgac agtgaagacc ctgcatggcc cagccatggt caagtacttg 60
 ctgctgtcga tattggggct tgcctttctg agtgaggcgg cagctcggaa aatccccaaa 120
 gtaggacata cttttttcca aaagcctgag agttgcccgc ctgtgccagg aggtagtatg 180
 aagcttgaca ttggcatcat caatgaaaac cagcgcgttt ccatgtcacg taacatcgag 240
 agccgctcca cctccccctg gaattacact gtcacttggg accccaaccg gtaccctcgc 300
 gaagttgtac aggccagtg taggaacttg ggctgcatca atgctcaagg aaaggaagac 360
 atctccatga attccgttcc catccagcaa gagaccctgg tcgtccggag gaagcaccia 420
 ggctgctctg tttctttcca gttggagaag gtgctgggtg ctgttggctg cacctgcgtc 480
 acccctgtca tccaccatgt gcagtaagag gtgcatatcc actcagctga agaag 535

<210> 4

<211> 163
 <212> PRT
 <213> 人类
 <400> 4
 Met Thr Val Lys Thr Leu His Gly Pro Ala Met Val Lys Tyr Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ile Leu Gly Leu Ala Phe Leu Ser Glu Ala Ala Ala Arg Lys
 20 25 30
 Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu Ser Cys Pro
 35 40 45
 Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly Ile Ile Asn Glu
 50 55 60
 Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg Ser Thr Ser
 65 70 75 80
 Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr Pro Ser Glu
 85 90 95
 Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly
 100 105 110
 Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Thr Leu
 115 120 125
 Val Val Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln Leu Glu
 130 135 140
 [0003] Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Val Ile His
 145 150 155 160
 His Val Gln

<210> 5
 <211> 8608
 <212> DNA
 <213> 人类
 <400> 5
 ctgggcccgg gctggaagcc ggaagcgagc aaagtggagc cgactcgaac tccaccgcgg 60
 aaaagaaagc ctcagaacgt tcgttcgctg cgtccccagc cggggccgag ccctccgca 120
 cgccagccgg gccatggggg ccgcacgcag cccgccgtcc gctgtcccgg ggccccctgct 180
 ggggctgctc ctgctgctcc tgggcgtgct ggccccgggt ggcgcctccc tgcgactcct 240
 ggaccaccgg gcgctggtct gctcccagcc ggggctaaac tgcacggtea agaatagtac 300
 ctgcttgat gacagctgga ttcaccctcg aaacctgacc ccctcctccc caaaggacct 360
 gcagatccag ctgcactttg cccacacca acaaggagac ctgttccccg tggctcacat 420
 cgaatggaca ctgcagacag acgccagcat cctgtacctc gaggggtcag agttatctgt 480
 cctgcagctg aacaccaatg aacgtttgtg cgtcaggttt gagtttctgt ccaaactgag 540
 gcataccac aggcggtggc gttttacctt cagccacttt gtggttgacc ctgaccagga 600
 atatgaggtg accgttcacc acctgcccaa gccatccct gatggggacc caaaccacca 660
 gtccaagaat ttccttgtgc ctgactgtga gcacgccagg atgaaggtaa ccacgccatg 720
 catgagctca ggcagcctgt gggaccccaa catcaccgtg gagaccctgg aggccacca 780

	gctgcgtgtg agcttcaccc tgtggaacga atctacccat taccagatcc tgctgaccag	840
	ttttccgcac atggagaacc acagttgctt tgagcacatg caccacatac ctgcgcccag	900
	accagaagag ttccaccagc gatccaacgt cacactcact ctacgcaacc ttaaagggtg	960
	ctgtcgccac caagtgcaga tccagccctt cttcagcage tgccctaatg actgcctcag	1020
	acactccgcg actgtttcct gccagaaat gccagacact ccagaaccaa ttccggacta	1080
	catgcccctg tgggtgtact ggttcatcac gggcatctcc atcctgctgg tgggctccgt	1140
	catcctgctc atcgtctgca tgacctggag gctagctggg cctggaagtg aaaaatacac	1200
	tgatgacacc aaatacaccg atggcctgcc tgcggctgac ctgatcccc caccgctgaa	1260
	gcccaggaag gtctggatca tctactcagc cgaccacccc ctctacgtgg acgtggtcct	1320
	gaaattcgcc cagttcctgc tcaccgcctg cggcacggaa gtggccctgg acctgctgga	1380
	agagcaggcc atctcggagg caggagtcac gacctgggtg ggccgtcaga agcaggagat	1440
	ggtggagagc aactctaaga tcatcgtcct gtgctcccgc ggcacgcgcg ccaagtggca	1500
	ggcctcctg ggccgggggg cgctgtgctg gctgcctgac gaccacggaa agcccgtggg	1560
	ggacctgttc actgcagcca tgaacatgat cctcccggac ttcaagagge cagcctgctt	1620
	cggcacctac gtagtctgct acttcagcga ggtcagctgt gacggcgacg tccccacct	1680
	gttcggcgcg gcgccgggt acccgctcat ggacaggttc gaggaggtgt acttccgcat	1740
	ccaggacctg gagatgttcc agccgggccc catgcaccgc gtaggggagc tgcggggga	1800
	caactacctg cggagcccgg gcggcaggca gctccgcgcc gccctggaca ggttccggga	1860
	ctggcaggtc cgctgtcccc actggttcca atgtgagaac ctctactcag cagatgacca	1920
	ggatgccccg tccctggacg aagaggtggt tgaggagcca ctgctgcctc cgggaaccgg	1980
	catcgtgaag cgggcgcccc tgggtcgcgga gcctggctcc caggcctgcc tggccataga	2040
	cccgtggtc ggggaggaag gaggagcagc agtggcaaaag ctggaacctc acctgcagcc	2100
[0004]	ccggggtcag ccagcgccgc agcccccca caccctggtg ctgccgcag aggagggggc	2160
	cctggtggcc gcggtggagc ctggccccct ggctgacggt gccgcagtcc ggctggcact	2220
	ggcgggggag ggcgaggcct gcccgtgct gggcagcccc ggcgctgggc gaaatagcgt	2280
	cctcttctc cccgtggacc ccgaggactc gccccttggc agcagcacc ccatggcgtc	2340
	tcctgacctc cttccagagg acgtgaggga gcacctgaa ggcttgatgc tctcgtctt	2400
	cgagcagagt ctgagctgcc agggccaggg gggtgcagt agaccgcga tggctctcac	2460
	agaccacac acgccctacg aggaggagca gcggcagtca gtgcagtctg accagggcta	2520
	catctccagg agctccccgc agcccccca gggactcacg gaaatggagg aagaggagga	2580
	agaggagcag gaccagggga agccggccct gccactctct cccgaggacc tggagagcct	2640
	gaggagcctc cagcggcagc tgcttttccg ccagctgcag aagaactcgg gctgggacac	2700
	gatggggtca gagtcagagg ggcccagtgc atgagggcgg ctccccagg accgccaga	2760
	tcccagcttt gagagaggag tgtgtgtgca cgtattcacc tgtgtgtaca tgtctcatg	2820
	tgtatatgtt cgtgtgtgaa atgtaggctt taaaatgtaa atgtctggat tttaatccca	2880
	ggcaccctc ctaacttttc tttgtgcagc ggtctggtta tcgtctatcc ccaggggaat	2940
	ccacacagcc cgtcccagg agctaatggt agagcgtcct tgaggctcca ttattcgttc	3000
	attcagcatt tattgtgac ctactatgtg gcgggcattt gggatacaca gataaattgc	3060
	atgcggcatg gccccagcca tgaaggaact taaccgctag tgccaggac acgttaaacg	3120
	aacaggatgg gccgggcagc gtggtctcac cctgtaatec cagcactctg ggaggccgag	3180
	gcaggtggat cactctgagg tcaggagttt gagccagcct ggccaacatg gtgaaacccc	3240
	atctccacta aaaatagaaa aattagccgg gcattggtgac acatgcctgt agtctagct	3300
	acttgggagg ctgaggcagg agaattgctt gaatctggga ggcagaggtt gcagtgagcc	3360
	gagattgtgc cattgcactg cagcctggat gacagagcga gactctatct caaaaaaaaa	3420
	aaaaaaaaaa gatggtcacg cgggatgtaa acgctgaatg ggccagggtc agtggctcat	3480

gcttgaatc ccagcacttt gggaaggcga ggcaggtgga ttgcttgagc tcaggagttc	3540
aagaccagcc tgggcgacat agtgagacct catctctacc taaatTTTT tttagttagt	3600
catggtggca catgcctgta gtcccagcta ctcgggaggc tgatgccaga tgatcacttg	3660
agcccaggag gtagaggctg cagttagcta taatggtacc attgcaatcc agcctgggca	3720
gcagagtgag accctgtctc aaaaaaata aaaaagtaga aagatggagt ggaagcctgc	3780
ccagggttgt gagcatgcac gggaaggca cccaggtcag ggggatccc cgaggagatg	3840
cctgagctga aggattgtgg ttggggaaag cgtagtccca gcaaggaagc agtttgtggg	3900
taagtgtctg gaggtgagt gagtgagctt gtcagggagc tgctggtgga gcctggaggg	3960
gaaggaggga ggcagtgaga gagatcgggg tgggggtg ggggatgtcg ccagagctca	4020
ggggtgggga cagccttgtg cgcatcagtc ctgagcctg gggcaccttt cgtctgatga	4080
gcctctgcat ggagagagge tgagggctaa acacagctgg atgtcacctg agttcattta	4140
taggaagaga gaaatgtcga ggtgaaacgt aaaagcatct ggcaggaagg tgagtctgaa	4200
gccctgcacc cgcgttccga ctatcagtgg ggagctgtta gcacgtagga ttcttcagag	4260
cagctgggct ggagctcccc tgagctcagg aagccccagg gtgcaagggc aaggaaatga	4320
ggggtggtgg gtcagtgaag atctgggcag acctgtgtg gggaagggt gctgctgtga	4380
cttcagggtc tgagggtcaa agacagcatt tgaagagg ctctgaagcc agtgtttgaa	4440
gaatttgttc ctgaagtacc tcctgggggt aggctagagg cttctggctt cagggtcctg	4500
aagaacacat tgagggtccc tctgacactg gaatagggtg cccttcattc ctatgcctga	4560
gtccttaact atatttcaa cctccagtga ggaggagaag attcggaaat gtgacaggag	4620
agcaaacagg acagtttga tgtgtgtgtg cgcacacata catgtgcgtg aaagattatc	4680
aataaaagtg cataaattt ttgatctggt aagagttct agcaggaagg tcgagccact	4740
tactgtaggt caagaagtgt ctagtgtcgg agtttttct tgcagttaga ctttacctag	4800
[0005] tggtagcagg gccaccaaag ctctgtgtcc cagatggtgt atggcccata atccaccaa	4860
cagcagcaaa ggaccaggca aaggagaaca ggagcagaag cctcccagcc actagccttt	4920
tgggctcagt ctctccaata atcctggaga ggggcttcgt tgggtctgga cacctacat	4980
gcattctgtg acctttccct agcttccaat aaataactgt ttgaccccga gagtacagga	5040
taccacaatg cactcttctt gcgtagagca catgttccca tctgctccca ttctcagga	5100
acctgaatt ctagctctgc tggccttga gcccatgcca gtaaatgtcc tgatgggcat	5160
tgctactat ctccaggca gctgcctttg tcctcctaac agctttattg gagtacagtt	5220
cacttaccat acaatccaca attgacctg cacaattga tgccggttta gtatagtcac	5280
agttcagcag ccatcagcac agtcagtctt agagtttact acccccmeta gaaatccagc	5340
cccccttagt caccacccc acctcccat ccctagcac ccctaggcta ctttgatctc	5400
tgtagacttg cctcttctg acatgacata gagaaaggag tcataaattc tccaaggtgt	5460
ctgtttcttc tttaatgtca ttccctgttt ctctcact tccctccca tttctgggc	5520
ccagtctcac actggtcctt gcttacccta aatgctatta attccatcac tctgagtatg	5580
gtgtttgctg tccgctgaat gccaaagct tcaagagtgt gtgtaataa agccacacct	5640
ttatTTTTgt attattctga accatggcta ataaatggt tcaccaagaa atgtctctct	5700
aagaacaggt gccctccag ctgtgcccc cccacctctt cagctcgtct cctgagtgtg	5760
cagaggtggt tccggttgg aaagaagcag cggagcatct aacctgcct gtgtccaggc	5820
cgattatgca cgcagccacc aacaagctc caactcccgc gtagagtttc atgacttttt	5880
cctgcctact atcttgatcc tagtttttt tttgttttt tttttttta ggaataatta	5940
ctttgattca aaaccagttt ctctttctg cataggaagg tccttgaagg tgtttagggt	6000
ctaaaaaggg tgggttctg tctctgaaac atccattcag cagtttgagc tgggatctct	6060
gaatgcaagg gtagatgga tatacttctt tcttgctttt gttgtgtttt ggTTTTgt	6120
ttgttttta gtcagggtct ctctgtcacc aggtgtatt acagtgggtc aatcatggct	6180

cactgcagcc	tcgacctccc	aggctcaagc	catctttcca	cctcagcctg	ccagtggcta	6240
gaactacagg	cgtgcaccac	tgtgcccggc	taatttgtgt	gtatatattt	tgtagaaatg	6300
gggtttcacc	atgttgtcca	ggctggtcac	gaactcctgg	gctcaagcca	tctgcccgcc	6360
tcactctccc	aaagtgtctg	gattataggc	ctgagcccac	cgtgcctggc	ctttcctggt	6420
tatctttgaa	aattaaaatg	ggcataagag	agaagaagat	gtacttacia	tgcagtgggt	6480
ggttttaact	ctatagcctt	tgggctctgt	ggttgggtct	ccccttccta	aataaatgag	6540
gtgtatgcag	ggccctcttc	tgecttagcg	ccctgccagc	tgggactcca	gcaaggcccc	6600
gggcacctga	ggacagagtg	agatggaggg	ccgctgctcc	agcagccggg	cctgcatccc	6660
acaagtcaac	tgtgtcggac	agaggatcct	tacaaagaag	aggcagcagg	gttgggggct	6720
ggccagctgc	tcgtccgccc	taggtagctt	gctcatctgt	aaagtgggtg	gggcaggagt	6780
tcccacctca	tgggttctctg	gcaagcctgc	agtatccccg	agtggcacca	gctgtctctt	6840
ggggcagagc	agtttgtgcc	ccctgaggta	ccactgatcc	tctttccctg	ctattaggta	6900
ttgtctctct	cctccggtgt	ttgccttttc	agattataga	agtaatatgt	gttcccatat	6960
ttggcgtctc	tcaggagctc	aggaagtact	tggctgagtg	aacatgtcca	ttgtggaaaa	7020
atggcaacaa	tatggattcc	atgggtatat	tttatagaag	aatatgaaga	aaagcagcta	7080
cccctaaacc	cattgcacaa	gctgttcatg	ttaattctgt	acccgacgct	ttccccacgg	7140
ggcctcccct	cactctgaaa	tggcatccag	gtccatcttg	ccctccacct	ctgcatggct	7200
ctccatgccc	catcgctctt	cccagatcct	agcactgggt	ccacactctc	gccctgtcca	7260
tttaggttga	tгааagcagg	cagtcacccg	ggtgggccag	tcttgctgtg	gggaggaaca	7320
tgcagtctcc	tgtctcatgg	tttgaagtgt	gccaggaagc	ctggcccagc	ccacctcccc	7380
ctggagtctt	tcccaggagg	aataaccctt	taggtcattg	actataagat	gagttcgctc	7440
actggatcct	tcctctctga	tgagacagga	agaaggtaca	cagtgaccag	gtaggaggag	7500
[0006] gagagggagt	agaaaggagg	gatgcgggtg	gctgttccct	gcatttgctt	gcttccctgc	7560
acgggtgtcc	cactggccgc	ctctgctcac	cagtgtcatg	ggattctctc	agaagatgaa	7620
aacagccccct	gcttttttgc	tagaatggct	gagctttcat	ggaaaggaag	ctggacccaa	7680
gcaacagccg	actaccgaag	gttgcttga	gcagtgcaga	tgtgggagga	agaagggcct	7740
tgggtgcacac	tggcttttct	tcctgactgc	aatgtggcat	tgtgccagct	acctctctt	7800
tctcggcctc	aggaaaaatg	agagaaagca	gccctgaagg	tggctgtgac	gagggaaggg	7860
gcagagggcc	tgacagtcaa	ccacgcgcta	tattttcctg	ttcttcctta	gggcaagaac	7920
tgcatggcca	gactcaggca	aggcctaggt	gtgggctggg	cattgcctac	acgtgaagag	7980
atcactccgc	gtccctactg	cacctgtcac	aaagtgcctt	ctgatatgcc	tggcaaacca	8040
aaatcgggtga	gcgccagctt	gcttccctag	aagacatttc	taaattttca	taacatgctt	8100
gctcaaatca	atcaccttat	tttacctccg	ctccaggagg	aaatgaagac	atggctctac	8160
gttgttctgt	aattattttc	tatgtaaatt	ttgttccctg	ttacaattat	atatgtctta	8220
ggggaaagga	ccatttcaca	tgtgtcacct	catgtgattc	tcaccacagc	cctgtgattg	8280
ctctgtttt	ataaataatg	acatagtctc	agttgatggc	caaagccaca	gctaacgaga	8340
ggcagagaga	gctcaggctc	ccaggagctt	ccactctcag	accttgcttc	ccgggctgcc	8400
ctgagtga	gccttgcctta	gcatttggca	cagccagaag	cagcaagcta	gggtcacaac	8460
acagagaggg	gctgtgtaat	actggctgcc	tctgtgctaa	gaaaaaaaaa	aaatcactgt	8520
gtgtttgttt	atthttgtgc	aggcccagtg	ttcttgcctta	gacttaatac	tacccttcat	8580
gttaaaataa	aaccaacaaa	aaacccat				8608

- <210> 6
- <211> 866
- <212> PRT

	340	345	350	
	Glu Lys Tyr Ser Asp Asp Thr Lys Tyr Thr Asp Gly Leu Pro Ala Ala			
	355	360	365	
	Asp Leu Ile Pro Pro Pro Leu Lys Pro Arg Lys Val Trp Ile Ile Tyr			
	370	375	380	
	Ser Ala Asp His Pro Leu Tyr Val Asp Val Val Leu Lys Phe Ala Gln			
	385	390	395	400
	Phe Leu Leu Thr Ala Cys Gly Thr Glu Val Ala Leu Asp Leu Leu Glu			
	405	410	415	
	Glu Gln Ala Ile Ser Glu Ala Gly Val Met Thr Trp Val Gly Arg Gln			
	420	425	430	
	Lys Gln Glu Met Val Glu Ser Asn Ser Lys Ile Ile Val Leu Cys Ser			
	435	440	445	
	Arg Gly Thr Arg Ala Lys Trp Gln Ala Leu Leu Gly Arg Gly Ala Pro			
	450	455	460	
	Val Arg Leu Arg Cys Asp His Gly Lys Pro Val Gly Asp Leu Phe Thr			
	465	470	475	480
	Ala Ala Met Asn Met Ile Leu Pro Asp Phe Lys Arg Pro Ala Cys Phe			
	485	490	495	
	Gly Thr Tyr Val Val Cys Tyr Phe Ser Glu Val Ser Cys Asp Gly Asp			
	500	505	510	
[0008]	Val Pro Asp Leu Phe Gly Ala Ala Pro Arg Tyr Pro Leu Met Asp Arg			
	515	520	525	
	Phe Glu Glu Val Tyr Phe Arg Ile Gln Asp Leu Glu Met Phe Gln Pro			
	530	535	540	
	Gly Arg Met His Arg Val Gly Glu Leu Ser Gly Asp Asn Tyr Leu Arg			
	545	550	555	560
	Ser Pro Gly Gly Arg Gln Leu Arg Ala Ala Leu Asp Arg Phe Arg Asp			
	565	570	575	
	Trp Gln Val Arg Cys Pro Asp Trp Phe Glu Cys Glu Asn Leu Tyr Ser			
	580	585	590	
	Ala Asp Asp Gln Asp Ala Pro Ser Leu Asp Glu Glu Val Phe Glu Glu			
	595	600	605	
	Pro Leu Leu Pro Pro Gly Thr Gly Ile Val Lys Arg Ala Pro Leu Val			
	610	615	620	
	Arg Glu Pro Gly Ser Gln Ala Cys Leu Ala Ile Asp Pro Leu Val Gly			
	625	630	635	640
	Glu Glu Gly Gly Ala Ala Val Ala Lys Leu Glu Pro His Leu Gln Pro			
	645	650	655	
	Arg Gly Gln Pro Ala Pro Gln Pro Leu His Thr Leu Val Leu Ala Ala			
	660	665	670	
	Glu Glu Gly Ala Leu Val Ala Ala Val Glu Pro Gly Pro Leu Ala Asp			
	675	680	685	
	Gly Ala Ala Val Arg Leu Ala Leu Ala Gly Glu Gly Glu Ala Cys Pro			
	690	695	700	

Leu Leu Gly Ser Pro Gly Ala Gly Arg Asn Ser Val Leu Phe Leu Pro
 705 710 715 720
 Val Asp Pro Glu Asp Ser Pro Leu Gly Ser Ser Thr Pro Met Ala Ser
 725 730 735
 Pro Asp Leu Leu Pro Glu Asp Val Arg Glu His Leu Glu Gly Leu Met
 740 745 750
 Leu Ser Leu Phe Glu Gln Ser Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Gly Cys
 755 760 765
 Ser Arg Pro Ala Met Val Leu Thr Asp Pro His Thr Pro Tyr Glu Glu
 770 775 780
 Glu Gln Arg Gln Ser Val Gln Ser Asp Gln Gly Tyr Ile Ser Arg Ser
 785 790 795 800
 Ser Pro Gln Pro Pro Glu Gly Leu Thr Glu Met Glu Glu Glu Glu Glu
 805 810 815
 Glu Glu Gln Asp Pro Gly Lys Pro Ala Leu Pro Leu Ser Pro Glu Asp
 820 825 830
 Leu Glu Ser Leu Arg Ser Leu Gln Arg Gln Leu Leu Phe Arg Gln Leu
 835 840 845
 Gln Lys Asn Ser Gly Trp Asp Thr Met Gly Ser Glu Ser Glu Gly Pro
 850 855 860
 Ser Ala
 865

[0009]

<210> 7
 <211> 2380
 <212> DNA
 <213> 人类
 <400> 7
 aacttgcca aacaaaaacg aaagcactcc gtgctggaag taggaggaga gtcaggactc 60
 ccaggacaga gagtgcacaa actaccaccg acagcccccct ccgccccctc tggaggetga 120
 agagggattc cagcccctgc caccacacaga cacgggctga ctgggggtgtc tgccccctt 180
 gggggggggc agcacagggc ctcaggcctg ggtgccacct ggcacctaga agatgcctgt 240
 gccttggttc ttgctgtect tggcactggg ccgaagccca gtggtccttt ctctggagag 300
 gcttgtgggg cctcaggacg ctaccactg ctctccgggc ctctcctgcc gcctctggga 360
 cagtgcacata ctctgcctgc ctggggacat cgtgcctgct ccgggccccg tgctggcgcc 420
 tacgcacctg cagacagagc tgggtctgag gtgccagaag gagaccgact gtgacctctg 480
 tctgcgtgtg gctgtccact tggccgtgca tgggactgg gaagagcctg aagatgagga 540
 aaagtttga ggagcagctg actcaggggt ggaggagcct aggaatgcct ctctccagc 600
 ccaagtctg ctctccttcc aggcctacce tactgcccgc tgcgtcctgc tggaggtgca 660
 agtgcctgct gcccttgtgc agtttggta gtctgtgggc tctgtggtat atgactgctt 720
 cgagctgcc ctagggagt aggtacgaat ctggtcctat actcagccca ggtacagaaa 780
 ggaactcaac cacacacagc agctgcctgc cctgccctgg ctcaacgtgt cagcagatgg 840
 tgacaacgtg catctgggtc tgaatgtctc tgaggagcag cacttcggcc tctccctgta 900
 ctggaatcag gtccagggcc ccccaaaacc ccggtggcac aaaaacctga ctggaccgca 960
 gatcattacc ttgaaccaca cagacctggt tccctgcctc tgtattcagg tgtggcctct 1020

Phe Gln Ala Tyr Pro Thr Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val
 130 135 140
 Pro Ala Ala Leu Val Gln Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr
 145 150 155 160
 Asp Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr
 165 170 175
 Thr Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro
 180 185 190
 Ala Leu Pro Trp Leu Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu
 195 200 205
 Val Leu Asn Val Ser Glu Glu Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp
 210 215 220
 Asn Gln Val Gln Gly Pro Pro Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr
 225 230 235 240
 Gly Pro Gln Ile Ile Thr Leu Asn His Thr Asp Leu Val Pro Cys Leu
 245 250 255
 Cys Ile Gln Val Trp Pro Leu Glu Pro Asp Ser Val Arg Thr Asn Ile
 260 265 270
 Cys Pro Phe Arg Glu Asp Pro Arg Ala His Gln Asn Leu Trp Gln Ala
 275 280 285
 Ala Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro
 290 295 300
 [0011] Cys Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly
 305 310 315 320
 Asp Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr
 325 330 335
 Val Asp Lys Val Leu Glu Phe Pro Leu Leu Lys Gly His Pro Asn Leu
 340 345 350
 Cys Val Gln Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu
 355 360 365
 Trp Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu
 370 375 380
 Thr Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser
 385 390 395 400
 Gly Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu
 405 410 415
 Gly Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu
 420 425 430
 Trp Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr
 435 440 445
 Ile His Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala
 450 455 460
 Ala Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Gly
 465 470 475 480
 Trp Leu Arg Leu Leu Lys Gln Asp Val Arg Ser Gly Ala Ala Ala Arg

NM_002190 (GenBank)

1 gcaggcaca actcatccat ccccagttga ttggaagaaa caacgatgac tcctgggaag
61 acctcattgg tgtcaactgt actgtctgctg agcctggagg ccatagtgaa ggcaggaaac
121 acaatcccac gaaatcccagg atgcccaaat tctgaggaca agaacttccc cggactgtg
181 atggtcaacc tgaacatcca taaccggaat accaatacca atcccaaaag gtcctcagat
241 tactacaacc gatccacctc accttggaaat ctccaccgca atgaggacc tggagagatat
301 cctctgtgta tctgggaggc aaagtcccgc cacttgggt gcatacagc tgatgggaa
361 gtggactacc acatgaactc tgtcccacac cagcaagaga tccctggtcct ggcagggag
421 cctccacact gcccaactc cttccggctg gagaagatac tgggtgctcgt gggtgcacc
481 tgtgtcacc cgattgtcca ccattgtgccc taagagctct gggagagcca cactcccac
541 agcagttaga ctatggagag ccgaccacgc cctccaggaa cctcactcct tcaagacag
601 cctcatttcg gactaaactc attagagttc ttaaggcagt ttgtccaatt aaagcttcag
661 aggtaacact tggccaagt atgagatctg aattaccctt cctctcttc aagaaggaag
721 gtttgactga gtaccaattt gcttcttgtt tactttttaa agggctttaa gttattttatg
781 tattaatat gccctgagat aactttgggg tataagattc cattttaatg aattaccctac
841 ttattttgt ttgtcttttt aaagaagata agattctggg cttgggaatt ttattatta
901 aaaggtaaa cctgtattta ttgagctat ttaaggatct attatggtt aagtatttag
961 aaaaagtga aaaagcacta ttatcagttc tgcttagtga aatgtaagat agaatttaaat
1021 ggcagtgcaa aattctgag tctttacaac atcgggatat agtatttct cctctttgtt
1081 tttaaaagt ataacatggc tgaaaagaaa gataaaacct acttccatg gtattaattt
1141 aaattttgca attgttgag gttttacaag agatacagca agtctaact tctgttccat
1201 taaccctta taataaactc cttctgtaat aataaagttt caaaagaaaa tgtttatttg
1261 ttctcattaa atgtatttta gcaaacctcag ctcttcccta ttgggaagag ttatgcaaat
1321 tctctataa gcaaaacaaa gcatgtcttt gactaacaat gacctggaaa taccctaaat
1381 tccaaagtct cgatttcaca tgccttcaag actgaacacc gactaagggtt ttcatactat
1441 tagccaatgc tgtagacaga agcattttga taggaataga gcaaataga taatggccct
1501 gaggaatggc atgtcattat taaagatcat atggggaaaa tgaaacctc ccaaaatc
1561 aagaagtctt gggaggagac atgtcttca gactacaatg tccagttctt cccctagact
1621 caggcttctt ttggagatta aggccctca gagatcaaca gaccaacatt ttctcttc
1681 tcaagcaaca ctctagggc ctggcttctg tctgatcaag gcaaccaca acccagaag
1741 gagctgatgg ggcagaacga actttaagta tgagaaaagt tcagcccaag taaaataaaa
1801 actcaatcac attcaattcc agagtgttt caagtttcac atcgttaacca ttctgccc

(SEQ. ID NO:1)

图1A

NP_002181 (GenBank)
1 mtpgktslvs lllllsleai vkagitiprn pggpnsedkn fprtvmvnl*n* i*h*nrntntnp
61 krssdyynrs tspwnlhrne dperypsviw eakcrhl*g*ci nadgnvdyhm nsvpi*g*geil
121 vlirrepph*cp* nsfrlekilv sv*g*ctcvtpi vhhva (SEQ. ID NO:2)

图1B

AGCCACCAGCGCAACATGACAGTGAAGACCCTGCATGGCCCAGCCATGGTCAAGTACTTG
CTGCTGTCGATATPGGGGCTTGCCTTTCTGAGTGAGGCGGCAGCTCGGAAAATCCCCAAA
GTAGGACATACTTTTTTCCAAAAGCCTGAGAGTTGCCCGCCTGTGCCAGGAGGTAGTATG
AAGCTTGACATTGGCATCATCAATGAAAACCAGCGCGTTTCCATGTCACGTAACATCGAG
AGCCGCTCCACCTCCCCCTGGAATTACACTGTCACTTGGGACCCCAACCGGTACCCCTCG
GAAGTTGTACAGGCCCAGTGTAGGAACTTGGGCTGCATCAATGCTCAAGGAAAGGAAGAC
ATCTCCATGAATTCCGTTCCCATCCAGCAAGAGACCCTGGTCGTCCGGAGGAAGCACCAA
GGCTGCTCTGTTTCTTTCCAGTTGGAGAAGGTGCTGGTGACTGTTGGCTGCACCTGCGTC
ACCCCTGTCATCCACCATGTGCAGTAAGAGGTGCATATCCACTCAGCTGAAGAAG

(SEQ. ID NO:3)

图2A

MTVKTLHGPAMVKYLLLSILGLAFLSEAAARKIPKVGHTFFQKPESCPPVPPGGSMKLDIG
IINENQRVSMsrNIESRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQAQCRNLGCINAQKEDISMNS
VPIQQETLVVRRKHQGSVVSFQLEKVLVTVGCTCVTPVIHHVQ

(SEQ. ID NO:4)

图2B

```

1      ctgggcccgg gctggaagcc ggaagcgagg cgaactcgaac tccaccgcgg
61     aaaagaaagc ctcagaacgt tggttcgctg cggggcccag cctccgcgga
121    cgccagccgg gccatggggg ccgcaagcag cctgtcccgg ggcctccgct
181    ggggctgctc ctgctgctcc tgggctgctt gctcccagcc ggcctcccgc
241    ggaccaccgg gcgctggtct tccacctcg aaacctgacc cctccctccc
301    ctgcctggat gacagctgga tccacctcg aaacctgacc cctccctccc
361    gcagatccag ctgcaacttg ccacaccca caaaggagac ctggtccccg
421    cgaatggaca ctgcaagacg acgccagcat cctgtacctc gagggtgcag
481    cctgcagctg aacaccaatg aacgtttgtg cctgcagttt gaggttctgt
541    gcatcaccac aggcggtggc gttttacctt cagccacttt gtggttgacc
601    atatgaggtg accgttcacc acctgcccga gcccatcctt gatggggacc
661    gtccaagaat ttctttgtgc ctgacttga gcacgccagg atgaaggtaa
721    catgagctca ggcagcctgt gggaccacaa catcacctgt gagaccctgg
781    gctgcgtgtg agcttcaccc tgtggaacga atctaccat taccagatcc
841    ttttccgcac atggagaacc acagtbgtt tggacacatg caccacatcc
901    accagaagag ttccaccagc gatccaactt cacactcaat ctacgcaacc
961    ctgtcggcac caagtgcaga tccagcctt cttcagcagc tgcctcaatg
1021   acactccggc actgtttctt gccagaaat gccagacat ccagaaccaa
1081   catgcccctg tgggtgtact ggttcatac ggtcatctcc acctgctgg
1141   catcctgctc atcgttgca tgacctggag cctggaagtg cctggaagtg
1201   tgatgacacc aaatacacg atggcctgac tgcggtgac ctgatcccc
1261   gccaggaag gtcggatca tctactcagc cgaccaccc ctctactggt
1321   gaaattgcc cagttcctgc tcaccgctg cggcacggaa gtggccctgg
1381   agagcaggcc atctcggagg caggagtcat gacctgggtg gcccgtcaga
1441   ggtggagagc aactctaaga tcctgtctt gtgctcccgc ggcacgcgcg
1501   ggcgctcctg gcccgggggg cgcctgtgcg gctgcgctgc gaccacggaa
1561   ggacctgctt actgcagcca tgaacatgat cctcccggac tcaagaggc
1621   cggcacctac gtagtctgct acttcagcga ggtcagctgt gacggcgacg
1681   gttcggcgcg gcgcccgggt accgctcat ggcaggttc gaggaggtgt
1741   ccaggacctg gagatgttcc agccggcccg catgcaccgc ttagggggag
1801   caactacctg cggagcccgg gcggcaggca cctccgccc gccctggaca
1861   ctggcaggtc cgctgtcccg actggttga atgtgagaac ctctactcag
1921   ggatgccccg tccctggagc aagaggtgtt tgaggagcca ctgctgcctc
1981   catcgtgaag cgggcccgcg tggtcgcca gctggctcc caggcctgcc
2041   cccgctggtc ggggaggaag gagagcagc agtggcaaa gctgaaacctc
2101   ccggggtcag ccagcgcgcg agcccctcca cacctggtg ctgcccgcag
2161   cctggtggcc gcggtggagc ctgggcccct ggctgacggt gccgcagtcc
2221   ggcgggggag ggcgaggcct gcccgtgctt ggcagcccg ggcgtgggc
2281   cctctctctc cccgtggacc ccgaggactc gcccttggc agcagcacc

```

图3A

2341 tcttgacctc cttccagagg acgtgagggg gcaacctgaa ggcttgatgc tctcgtcttt
2401 cgagcagagt ctgagctgcc agcccaggg gggctgcagt agaccgcga tggctcctcac
2461 agaccacac acgccctacg aggaggagca gcggcagtca gtgcagtctg accagggcta
2521 catctccagg agctccccgc agccccccga gggactcacg ggaatggagg aagaggagga
2581 agaggagcag gaccaggga agccggccct gccactctct ccgaggacc tggagagcct
2641 gaggagcctc cagcggcagc tgcctttccg ccagctgcag aagaactcg gctgggacac
2701 gatggggtca ggtcagagg gcccagctgc atgaggcgg ctccccagg accgccaca
2761 tcccagcttt gagagaggag tgtgtgtgca cgtattcact tgtgtgtaca tgtctgcatg
2821 tgtatatgtt cgtgtgtgaa atgtaggctt taaaatgtaa atgtctgat ttaaatocca
2881 ggcacccctc ctaactttc tttgtgcag ggtctgggta tctctatcc ccaggggaat
2941 ccacacagcc cgtcccagg agctaattgt agagctcct tgaggctca ttattcgttc
3001 attcagcatt tattgtgcac ctactatgtg gcgggcattt gggataccaa gataaattgc
3061 atgcggcatg gccccagcca tgaaggaaact taaccgctag tgccgaggac acgttaaacg
3121 aacaggatgg gccgggcacg gtggctcacg cctgtaatcc cctgtaatcc ggagggcag
3181 gcagggtggat cactctgagg tcaggagttt gagccagcct ggcacaactg gtgaaaoccc
3241 atctccacta aaaatagaaa aattagccgg gcattggtgac acatgcctgt agtccctagct
3301 acttgggagg ctgaggcagg agaattgctt gaatctgga gccagaggtt gcagtgagcc
3361 gagattgtgc cattgcactg cagcctggat gacagagcga gactctatct caaaaaaaa
3421 aaaaaaaaa gatggtcacg cgggatgtaa acgctgaatg gcccaggtgc agtggctcat
3481 gcttghtaat ccagcacttt gggaaaggcga ggcaggtgga ttgcttgagc tcaggagttc
3541 aagaccagcc tgggcgacat agtgagacct catctctacc taaatttttt tttagtcaat
3601 catggtggca catgcctgta gtcccagcta ctccggaggc tgatgccaga tgatcacttg
3661 agcccaggag gttagaggctg cagttagcta taatggtacc attgcaatcc agcctgggca
3721 gcagagtgag accctgtctc aaaaaaata aaaaagtaga aagatggagt ggaagcctgc
3781 ccagggttgt gagcatgcac gggaaaaggca cccaggtcag gggggatccc cgaggagatg
3841 cctgagctga aggatgtgg ttgggaaag cgtagtccca gcaaggaagc agtttgtggg
3901 taagtgcctgg gaggtgagtg gagttagctt gtcagggagc tgcctgggga gctggaggg
3961 gaaaggagga ggcagtgaya gagatcgggg tgggggggtg ggggatgtcg ccagagctca
4021 ggggtgggga cagccttgtg cgcatactc ctgagggcctg gggcaccttt cgtctgatga
4081 gcctctgcat ggagagaggc tgagggtcaa acacagctgg atgtcacctg agttcattta
4141 taggaagaga gaaatgtcga ggtgaaactt aaaagcatct ggcaggaagg tgagtctgaa
4201 gccctgcacc cgcgttccga ctatcagtgg gtagctgtta gcactagga tctctcagag
4261 cagctgggct ggagctcccc tgagctcagg aagccccagg gtgcaagggc aagaaatga
4321 ggggtgggtg gtcagtgaag atctgggagg acctgtgtg ggaaggggtt gctgctgtga
4381 cttcagggtc tgagggtcaa agacagcatt tgaaaagag ctcctgaaagc agtgtttgaa
4441 gaatttgttc ctgaagtacc tcttgggggt aggctagagg cttctggctt cagggtcctg
4501 aagaacacat tgagggtccc tctgacactg gaatagggtg cccttcattc ctatgcctga
4561 gtccttaact atatttccaa cctccagtga ggaggagaag attcggaaat gtagcaggag
4621 agcaaacagg acagtttgca tgtgtgtgtg cgcacacata catgtgcgtg aaagattatc
4681 aataaaagtg cataaatttg ttgatctggt aagagtttct agcaggaagg tcgagccact

图3B

4741 tactgtaggt caagaagttg ctagttagcg agttttttct tgcagttaga ctttacctag
4801 tggtagcagg gccaccaag ctctgtgtcc cagatggtgt atggcccata atccacccaa
4861 cagcagaaa ggaccaggca aaggagaaca ggagcagaag cctccagcc actagccttt
4921 tgggtcaggt ctctccaata atcctggaga ggggtctcgt tgggtctgga cacctaccat
4981 gcattctgtg accttccct agcttccaat aaataactgt ttgacgccc gagtacagga
5041 taccacaatg cactcttctt gcgtagagca catgttccc tctgctcca tccctcagga
5101 acctgaatt ctagctctgc tggccttga gccatgcca gtaaatgtcc tgatggcat
5161 tgcctactat ctccagggca gctgccttg tccctctaac agctttattg gattacagtt
5221 cacttaccat acaatccaca attgacctg cacaaattga tgcgggttta gatatgtcac
5281 agttcagcag ccatcagcac agtcagtctt agagttaact acccccataa gaaatccagc
5341 ccccttagt caccacccc acctcccat ccttaggcac ccttaggcta ctttgatctc
5401 tgtagacttg cctctcttgg acatgacata gagaaaggag tcataaatc tccaagggtg
5461 ctgtttcttc ttaaatgtca tccctgttt ctcctcacat tccctccca tttcctgggc
5521 ccagtctcac actggtcctt gcttacccta aatgctatta attccatcac tctgaglatg
5581 tggttgtctg tccgtgaat gccaaagct tcaagagtgt gtgtaataa agccacacct
5641 ttatttttgt attattctga acctaggcta ataaattgtt tcaccaagaa atgtctctct
5701 aagaacaggt gccctccacg ctgtgcccct cccacctct cagctcgtct cctgagtgtg
5761 cagaggtggt tccggttggg aagaagcag cggagcatct aacctgctt ggtccagggc
5821 cgattatgca cgcagccacc acaagctcc caactcccgc gttagagttc atgacttttt
5881 cctgcctact atcttgatcc tagttttttt tttgtttttt ttttttttaa ggaataatta
5941 ctttgattca aaaccagttt ctctttctg cataggaagg tccctgaagg tgttttaggt
6001 ctaaaaagg tgggttctgg tctctgaac atccattcag cagtttgagc tgggactctc
6061 gaatgcaagg gtatgatgga tatactctt tctgtctttt gttgtgtttt ggttttttgt
6121 ttgtttttaa gtcagggtct ctctgtacc aggtgtatt acagtgtgc aatcatggct
6181 cactgcagcc tcgacctccc aggtcraag catctttcca cctcagcctg ccagtggcta
6241 gaactacagg cgtgcaccac tgtgcccggc taatttgtgt gtatatattt ttagaanaatg
6301 gggtttcacc atgttgtcca gctggtctac gaactcctgg gctcaagcca tctgcccggc
6361 tcctcctccc aaagtgtggt gattatagg ctgagcccac cgtgcccggc ctttctgttt
6421 tatctttgaa aattaataag gccataagag agaagaagt gtacttaca tgcagtgggt
6481 ggttttaact ctatagcctt tgggctctgt ggttgggtct ccccttcta aataaalgag
6541 gtgtatgtag ggcctcttc tgccttagcg cctgcccagc tgggactcca gcaaggcccg
6601 gggcacctga ggacagagtg agatggagg ccgctgtccc aggcagcagg cctgcatccc
6661 acaagtcaac tgtgtcggac agaggatcct tacaagaag aggcagcagg gttgggggct
6721 ggccagctgc tcgtccggcc taggtagctt gctcatctgt aaagtgggtg gggcaggagt
6781 tcccacctca tggggtcctg gcaagcctgc agtatcccc agtggacca gctgctctc
6841 gggcagagc agtttgtgcc cctgaggtta ccactgatcc tctttccctg ctattaggtta
6901 ttgctctctt cctccgggtg ttgcctttc agattataga agtaatatgt gttcccatat
6961 ttggcgtctc tcaggagctc aggaagtaact tggctgagt aacatgtcca ttgtggaana
7021 atggcaacaa tatggatccc atgggtatat tttatagaag aatatgaaga aaagcagcta
7081 ccctaaacc cattgcacaa gctgttctat ttaattctgt acccgacgct tccccacgg

图3C

```

7141 ggccctccc cactctgaaa tggcatccag gtccatcttg cccctccact ctgcattggct
7201 ctccatgccc catcgctct cccagatccct agcactgggt cccactctc gccctgtcca
7261 tttagggtga tgaaggcagg cagtcacccg ggtggcccag tcttccctgt gggaggaaca
7321 tgcatctcc tgctcatgg ttgaaagtgt gccaggaaag ctggcccag ccacctccc
7381 ctggagtcc tcccaggag aataaccct taggtcatt actataagt gatttcgctc
7441 actggatcc tccctctga tgagacagga agaaggtaca cagtaccag gtaggaggag
7501 gagaggagt agaaaggag gatcgggg gctggctcc gctttgctt gcttccctgc
7561 acgggtgccc cactggccc ctctgtcac cagtgtcat ggtttctc agaagatgaa
7621 aacagcccct gctttttgc tajaatgget gactttcat ggaaggaaag ctggacccaa
7681 gcaacagccg actaccgag gtgcctgga gcagtgcga tgtgggagga agaaggcctt
7741 tggcgcacac tggctttct tccctgactgc aatgtgcat tgtgccagct acctcctctt
7801 tctcggctc aggaaatgg agagaaagca gccctgaag tggctgtac gaggaagg
7861 gcagaggccc tgacagtc aaacgcgcta ttttctctg tcttctta ggcagaagac
7921 tgcattggcca gactcaggca agccctaggt gtggcctggg cttgctac acgtgaagag
7981 atcactccgc gtcctactg cactgtcac aaagtccct ctgatatgc tggcaacca
8041 aaatcgtga gcgccagctt gcttccctag aagacattc taatatcca taacatgctt
8101 gctcaaatca atcaccttat ttacatccg ctccaggag aatgaagac atggtctac
8161 gttgtctgt aattatttc tatgaaatt ttgttcttg ttacaattat atatgtctta
8221 ggggaaagga ccatttcaca tgtgtaccct catgtattc tcaccacag cctgtgattg
8281 ctctgtttt ataaataatg acatagtcc agttgatgc caagccaca gctaacgaga
8341 ggcagagaga gctcaggctc ccaggagctt ccactctcag acctgccc ccggctgccc
8401 ctgagtga aa cgcctgctta gcatttggca cagccagaag cagcaagcta ggttcacaac
8461 acagagaggg gctgtgtaat actggctgcc tctgtgctaa gaaaaaaa aatcactgt
8521 gtgttgttt atttgggtgc aggccagtg ttcttgctta gacttaatac tacccttcat
8581 gttaaaaataa aaccaaaca aaacccat

```

(SEQ. ID NO:5)

图3D

```

1  mgaarsppsa  vpgpllglll  llqvlapqg  asrlldhra  lvcsppqinc  tvknstcldd
61  swihprnltp  sspkdlgiql  hfahtqqgd  fpvahiewtl  qtdasilyle  gaelsvqln
121  tnerlcvrfe  flsklrhhhr  rwrftshfv  vpdqeyevt  vhhlpkpid  gdpnhqsknf
181  lvpdceharm  kvitpcmssg  slwdpnitve  tleahqlrvs  ftlwnesthy  qilltsfphm
241  ehscfehmh  hipaprpeef  hqrsnvtltl  rnlkgccrhq  vqiqpffssc  lndclrhsat
301  vscpempdtp  epipdympw  vwyfitqisi  llvgsvilli  vcmtrilagg  gsekysdtk
361  ytdglpaadl  ippplkprk  wliysadhpl  yvdvvlkfaq  flttacgtev  aldllleeqai
421  seagvmtwvq  rqqemvesn  skiivlcsrg  trakwqallg  rgapvrlrcd  hgkpvqdlft
481  aammilpdi  krpacfgtyv  vcyfsevsd  qdvpdlfgaa  prypimdrfe  evyfriqdle
541  mfgpgrmhrv  gelsgdnylr  spggrqlraa  ldrfrdwqvr  cpdwfecenl  ysaddqdaps
601  ldeevfeep  lppgtgivr  aplvrepqsg  aclaidplvg  eeggaavaki  ephlqprgqp
661  apqplhtlvi  aaeegalvaa  vepgpladga  avrlalageg  eacpllgspg  agrnsvlflp
721  vpedspplgs  stpmaspdli  pedvrehleg  lmlslfeqsi  scqaqggsr  pamvltbdpht
781  pyeeegrqsv  qsdqgyisrs  spqpeglte  meeeeeeeq  pgkpalplsp  edleslrsiq
841  iqllfrqlqk  nsqwdtmgse  segpsa

```

(SEQ. ID NO:6)

图3E

ACACTGGCCAAACAAAAACGAAAGCACTCCGTGCTGGAAGTAGGAGGAGAGTCAGGACTC
 CCAGGACAGAGAGTGCACAAACTACCCAGCACAGCCCCCTCCGCCCCCTCTGGAGGCTGA
 AGAGGGATTCCAGCCCCCTGCCACCCACAGACACGGGCTGACTGGGGTGTCTGCCCCCTT
 GGGGGGGGGCAGCACAGGGCCTCAGGCCTGGGTGCCACCTGGCACCTAGAAGATGCTGT
 GCCCTGGTCTTGTGCTCCTTGGCACTGGGCCGAAGCCCAGTGGTCTTTCTCTGGAGAG
 GCTTGTGGGGCCTCAGGACGCTACCCACTGCTCTCCGGGCCTCTCCTGCCGCCTCTGGGA
 CAGTGACATACTCTGCCTGCCTGGGGACATCGTGCCTGCTCCGGGCCCCGTGCTGGCGCC
 TACGCACCTGCAGACAGAGCTGGTGCTGAGGTGCCAGAAGGAGACCAGCTGTGACCTCTG
 TCTGCGTGTGGCTGTCCACTTGGCCGTGCATGGGCACTGGGAAGAGCCTGAAGATGAGGA
 AAAGTTTGGAGGAGCAGCTGACTCAGGGGTGGAGGAGCCTAGGAATGCCTCTCTCCAGGC
 CCAAGTCGTGCTCTCCTTCCAGGCCTACCCTACTGCCCGCTGCGTCTGCTGGAGGTGCA
 AGTGCCTGCTGCCCTTGTGCAGTFTGGTCACTGTGGGCTCTGTGGTATATGACTGCTT
 CGAGGCTGCCCTAGGGAGTGAGGTACGAATCTGGTCTTATACTCAGCCCAGGTACGAGAA
 GGAACCAACCACACACAGCAGCTGCCTGCCCTGGCTCAACGTGTCAGCAGATGG
 TGACAACGTGCATCTGGTTCTGAATGTCTCTGAGGAGCAGCACTTCGGCCTCTCCCTGTA
 CTGGAATCAGGTCCAGGGCCCCCAAACCCCGGTGGCACAAAAACCTGACTGGACCACA
 GATCATTACCTTGAACACACAGACCTGGTTCCTTGCCTCTGTATTCAAGTGTGGCCTCT
 GGAACCTGACTCCGTTAGGACGAACATCTCCCCCTTCAAGGAGGACCCCCGCGCACCA
 GAACCTCTGGCAAGCCGCCGACTGCGACTGCTGACCCTGCAGAGCTGGCTGCTGGACGC
 ACCGTGCTCGCTGCCCGCAGAAGCGGCACTGTGCTGGCGGGCTCCGGGTGGGGACCCCTG
 CCAGCCACTGGTCCCACCGCTTTCCTGGGAGAACGTCCTGTGGACAAGGTTCTCGAGTT
 CCCATTGCTGAAAGGCCACCCTAACCTCTGTGTTCAAGGTGAACAGCTCGGAGAAGCTGCA
 GCTGCAGGAGTGTCTGTGGGCTGACTCCCTGGGGCCTCTCAAAGACGATGTGCTACTGTT
 GGAGACACGAGGCCCCCAGGACAACAGATCCCTCTGTGCCTTGGAAACCAGTGGCTGTAC
 TTCACTACCCAGCAAAGCCTCCACGAGGGCAGCTCGCCTTGGAGAGTACTTACTACAAGA
 CCTGCAGTCAGGCCAGTGTCTGCAGCTATGGGACGATGACTTGGGAGCGCTATGGGCCTG
 CCCCATGGACAAATACATCCACAAGCGCTGGGCCCTCGTGTGGCTGGCCTGCCTACTCTT
 TGCCGCTGCGCTTTCCTCATCCTCCTTCTCAAAAAGGATCACGCGAAAGGGTGGCTGAG
 GCTCTTGAACAGGACGTCGCTCGGGGGCGGCCGCAAGGGGCCGCGCGGCTCTGCTCCT
 CTACTCAGCCGATGACTCGGGTTCGAGCGCCTGGTGGGCGCCCTGGCGTCCGGCCCTGTG
 CCAGTGCCTGCTGCGCTGGCCGTAGACCTGTGGAGCCGTCGTGAACTGAGCGCGCAGGG
 GCCCGTGGCTTGGTTCACGCGCAGCGGCCAGACCCTGCAGGAGGGCGCGTGGTGGT
 CTTGCTCTTCTCTCCCGGTGCGGTGGCGCTGTGCAGCGAGTGGCTACAGGATGGGGTGT
 CGGGCCCCGGGGCGCACGGCCCCGACGACGCTTCCGCGCCTCGCTCAGCTGCGTGTGCC
 CGACTTCTTGCAGGGCCGGGCGCCCCGACGCTACGTGGGGGCTGCTTCGACAGGCTGCT
 CCACCCGGACGCCGTACCCGCCCTTTTCCGACCCGTGCCCGTCTTACACTGCCCTCCCA
 ACTGCCAGACTTCTGGGGGCCCTGCAGCAGCCTCGCGCCCCGCGTTCGGGGCGGCTCCA
 AGAGAGAGCGGAAAGTGTCCCAGGGCCCTTCCAGCCAGCCCTGGATAGCTACTTCCATCC
 CCCGGGACTCCCAGCGGGGACCGGGTGGACCAGGGGCGGGACCTGGGGCGGGGA
 CGGGACTTAAATAAAGGCAGACGCTGTTTTTCTAAAAAA (SEQ. ID NO:7)

图4A

MPVPWFLLSLALGRSPVLSLERLVGPQDATHCSPGLSCLRWDSIDILCLPGDIVPAPGPV
 LAPTHLQTELVLRQKETDCDLCLRVAVHLAVHGHWEPEDEEKFGGAADSGVEEPRNAS
 LQAQVVLQFQAYPTARCVLLEVQVPAALVQFGQSVGSVVYDCFRAALGSEVRIWSYTPR
 YEKELNHTQQLPALPWLNVSDAGDNVHLVNLVSEEQHFGLSLYWNQVQGGPKPRWHKNLT
 GPQIIITLNHTDLVPCLCIQVWPLEPDSVRTNICPFREDPRAHQNLWQAARLRLTLQSWL
 LDAPCSLPAEAALCWRAPGGDPCQPLVPPLSWENVTVDKVLEFPLLKGHPNLCVQVNSSE
 KLQEQECLWADSLGPLKDDVLLLETRGPQDNRSLEPSGCTSLPSKASTRAARLGEYL
 LQDLQSGQCLQLWDDDLGALWACPMKYIHKRWLVWLAELLFAAALSILLLKKDHAKG
 WLRLKQDVRSGAAARGRAALLLYSADDSGFERLVGALASALCQLPLRVAVDLWSRRELS
 AQGPVAVFHAQRRLQEGGVVLLFSPGAVALCSEWLQDGVSGPAGHGHDAFRASLSC
 VLPDFLQGRAPGSYVGFDRLLHPDAVPALFRTVPVFTLPSQLPDLGALQOPRAPRSG
 RLQERAEQVSRALQPALDSYFHPGTPAPGRGVGPGAGPGAGDGT (SEQ. ID NO:8)

图4B

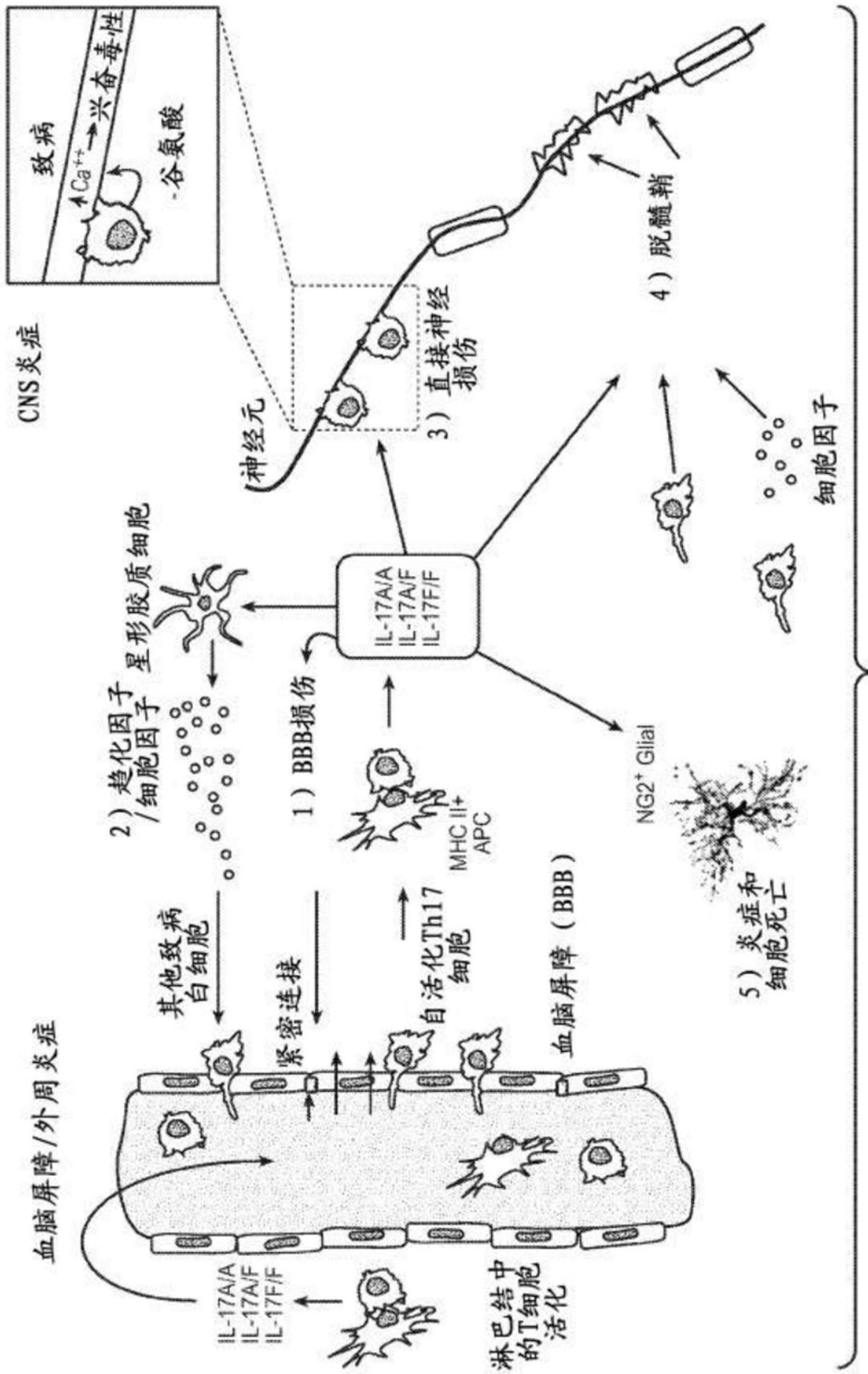


图5

图5

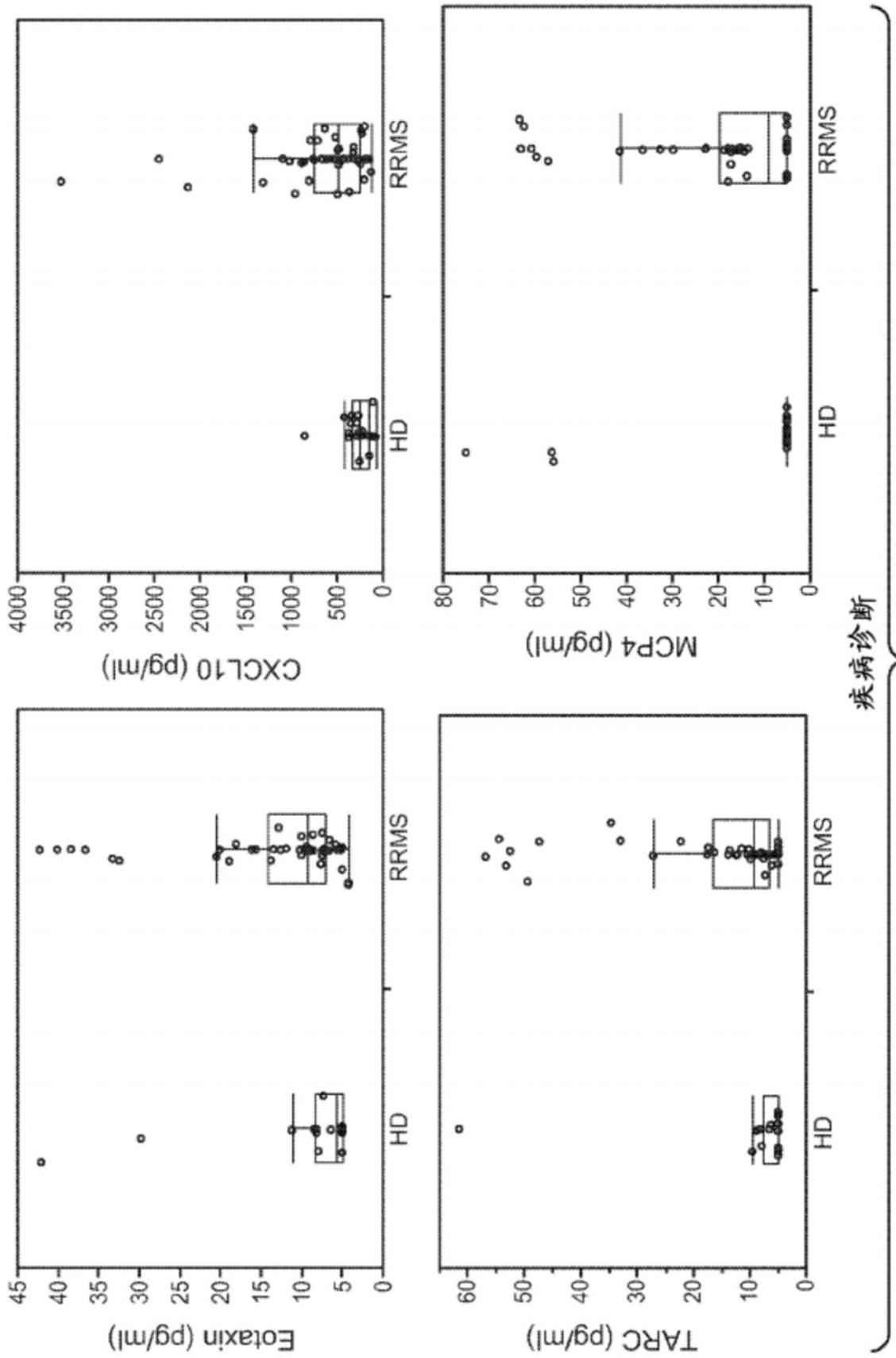


图6

图6

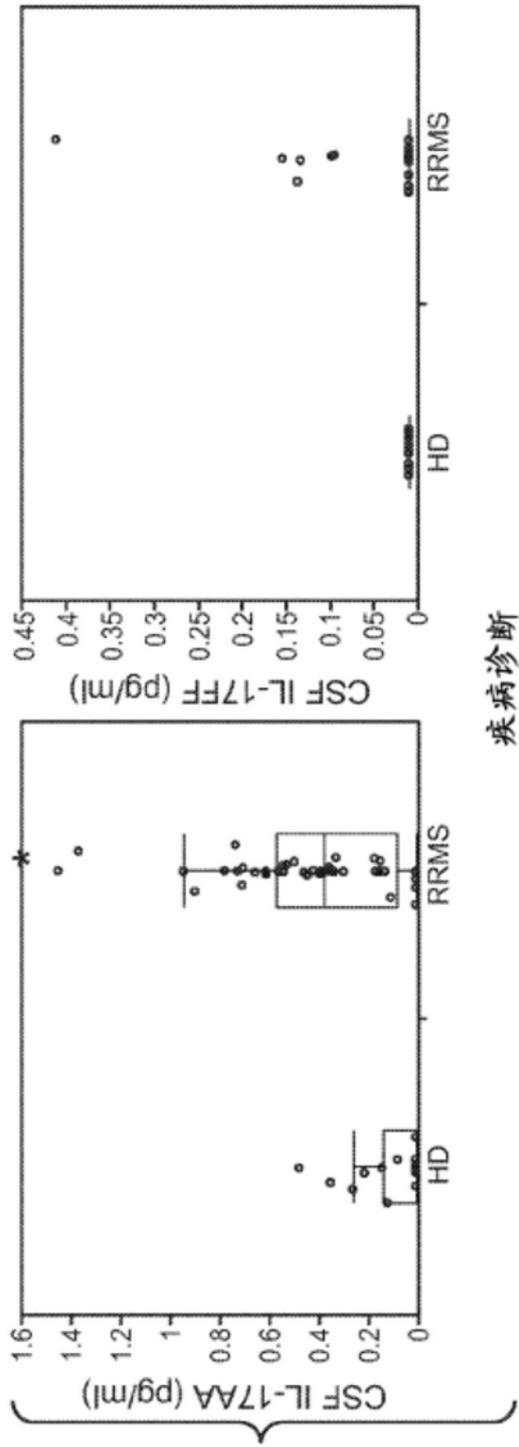


图7A

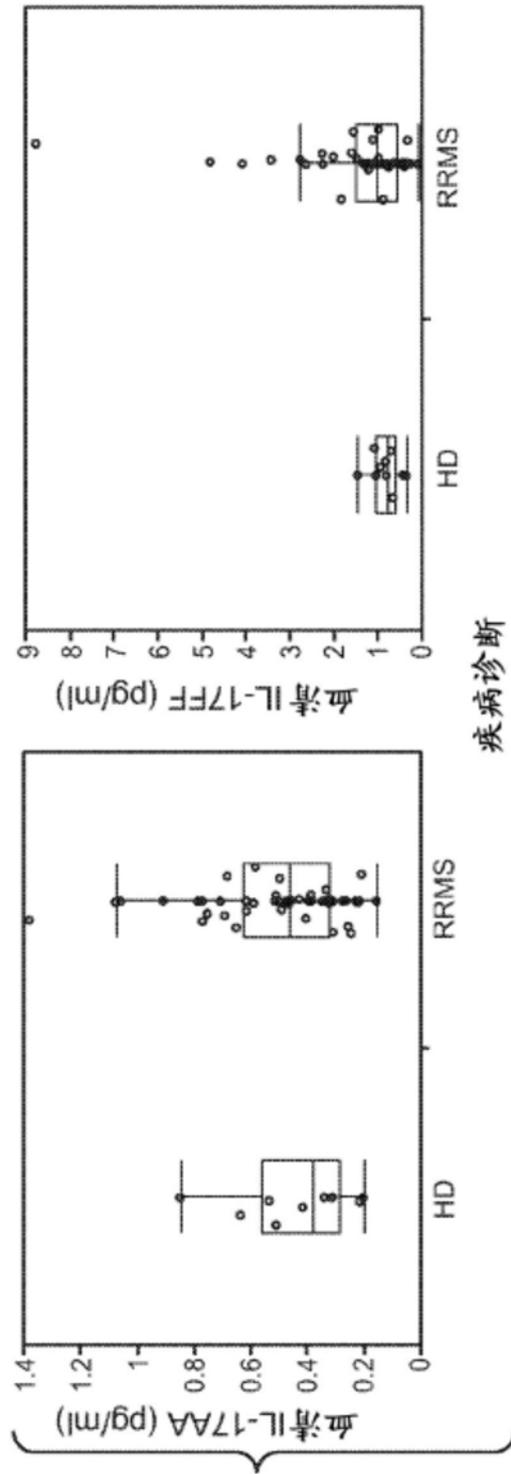


图7B

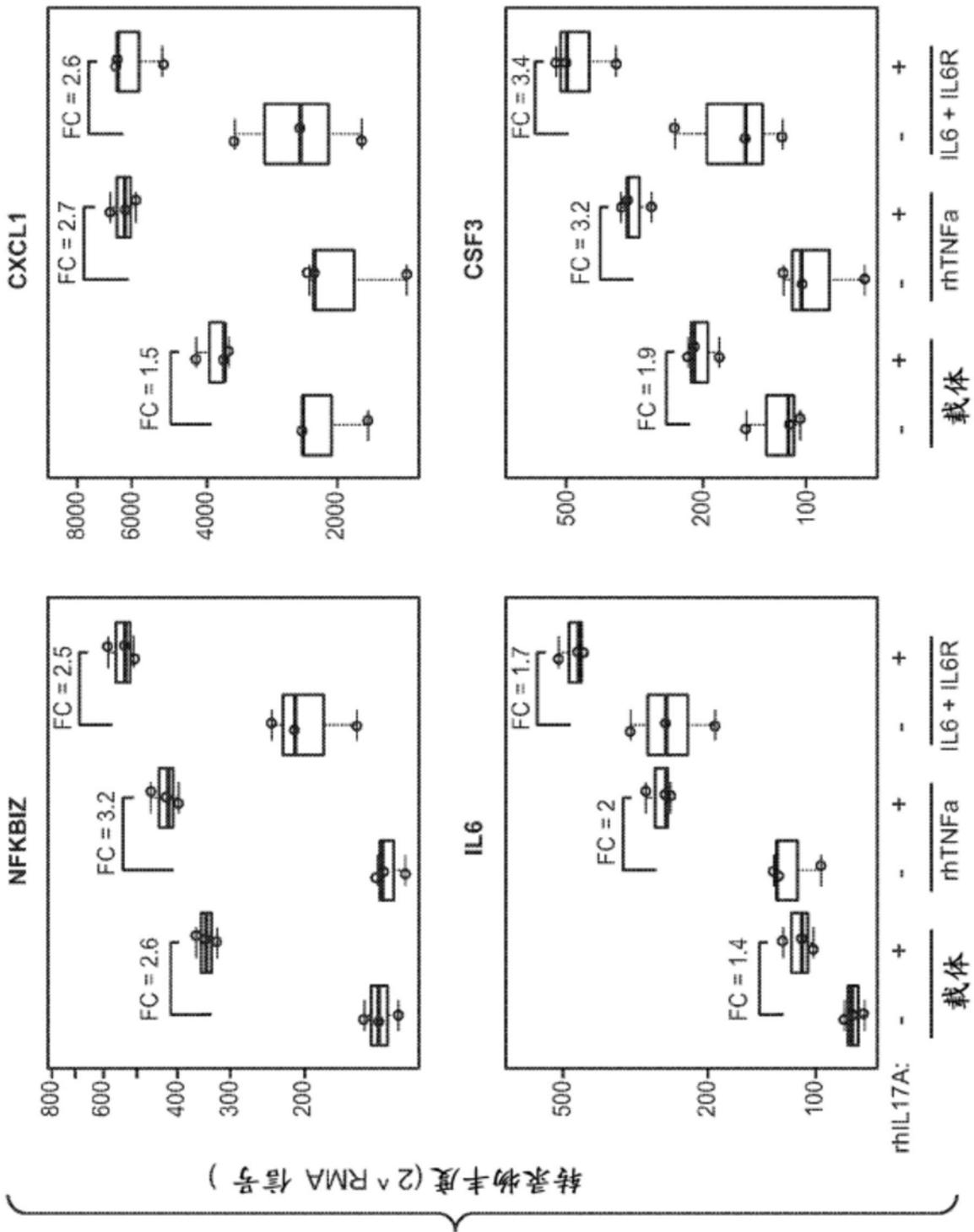


图8A

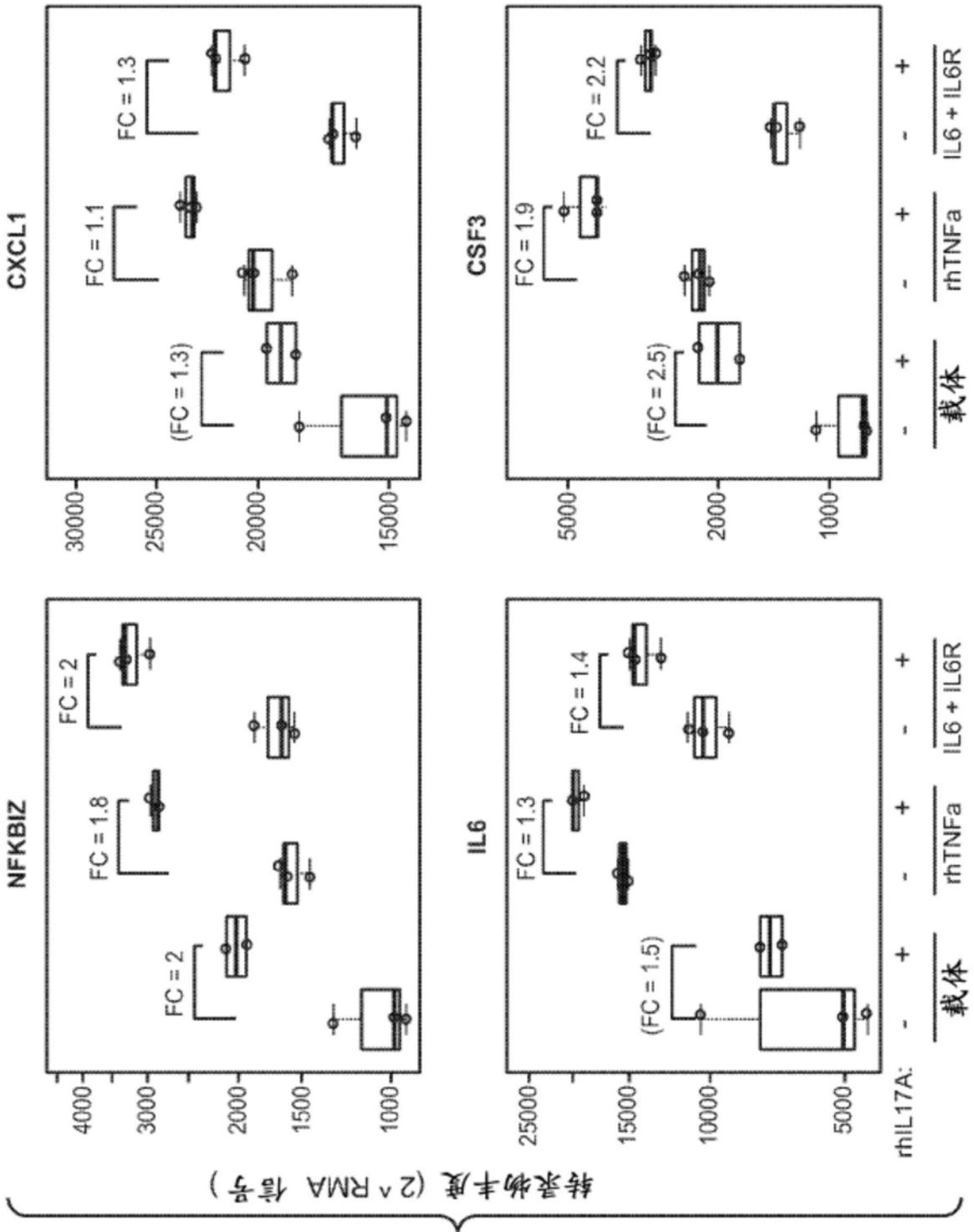


图8B

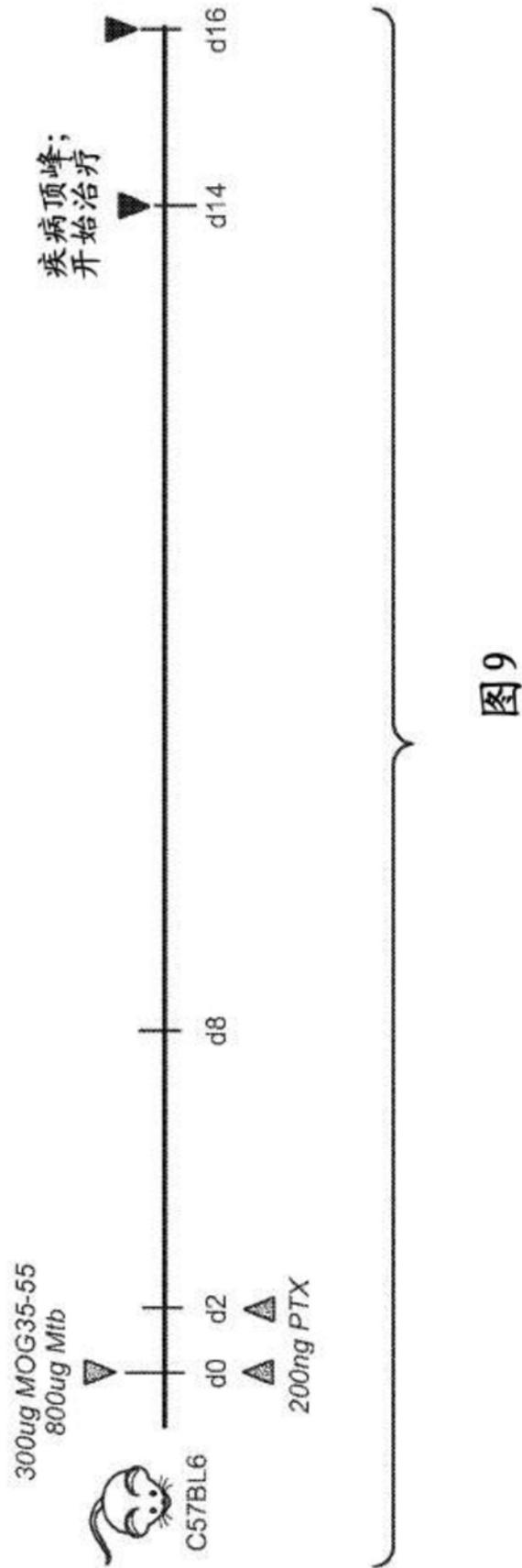


图9

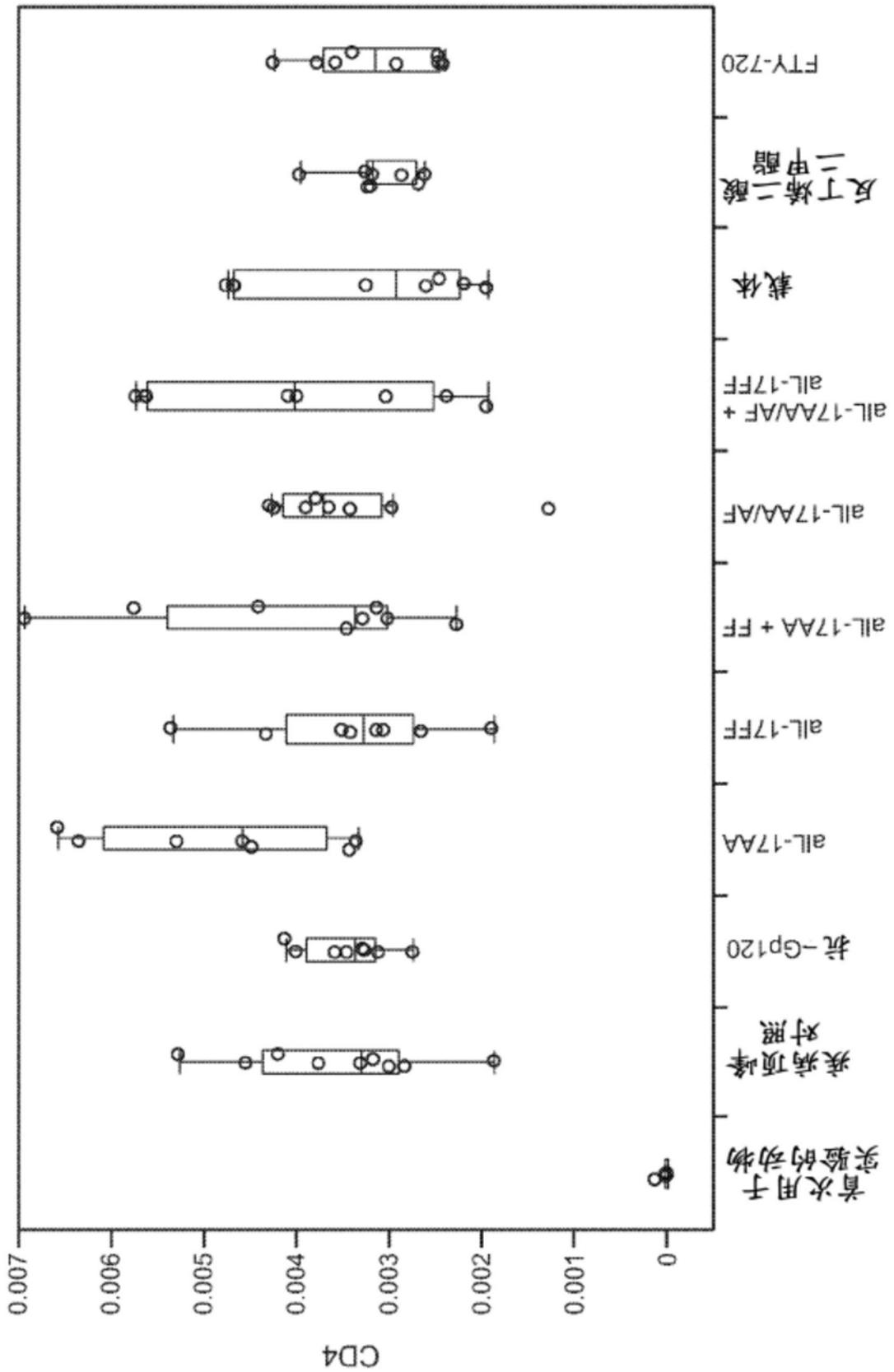


图1-A01

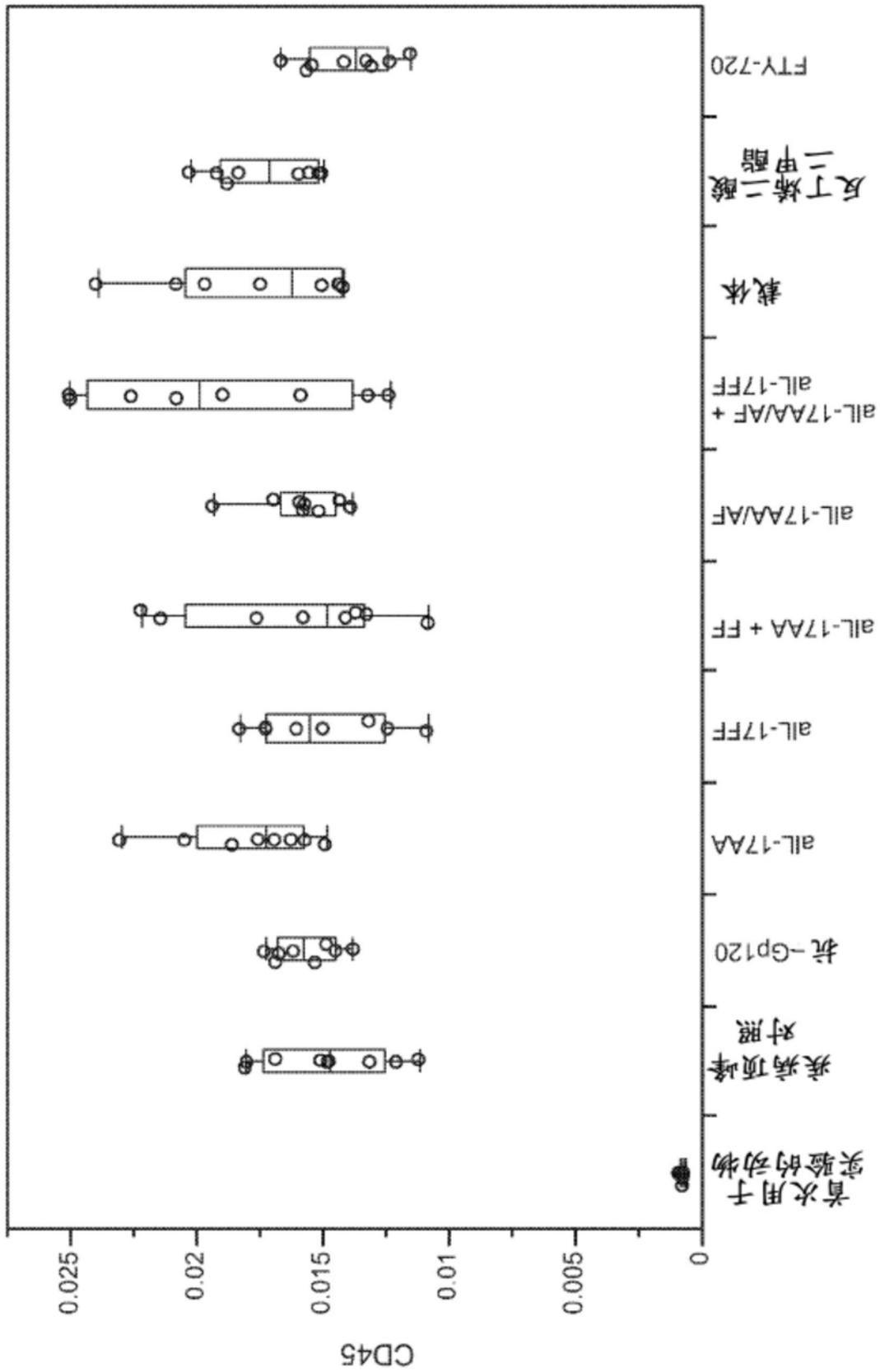


图10A-2

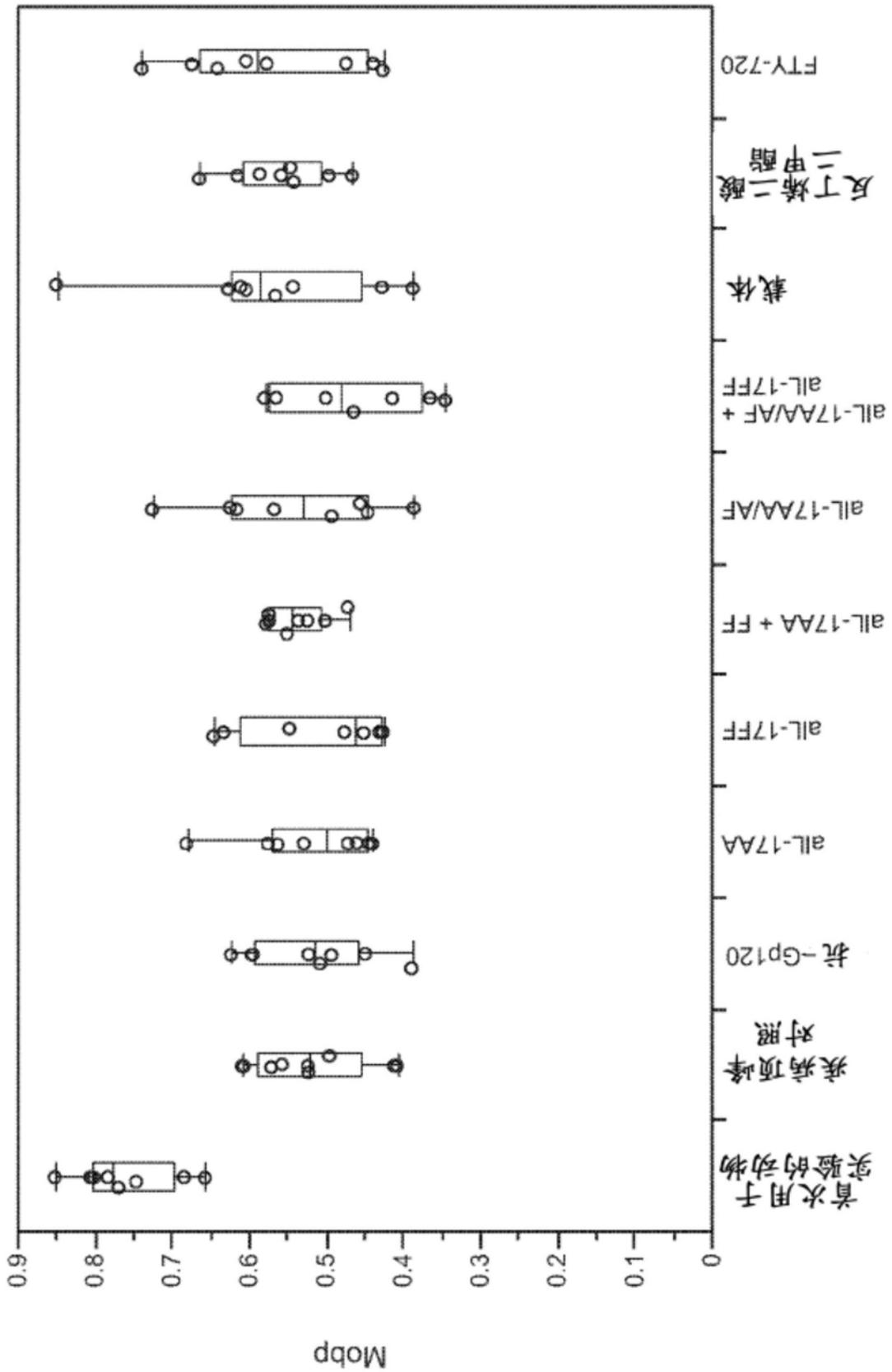


图10B-1

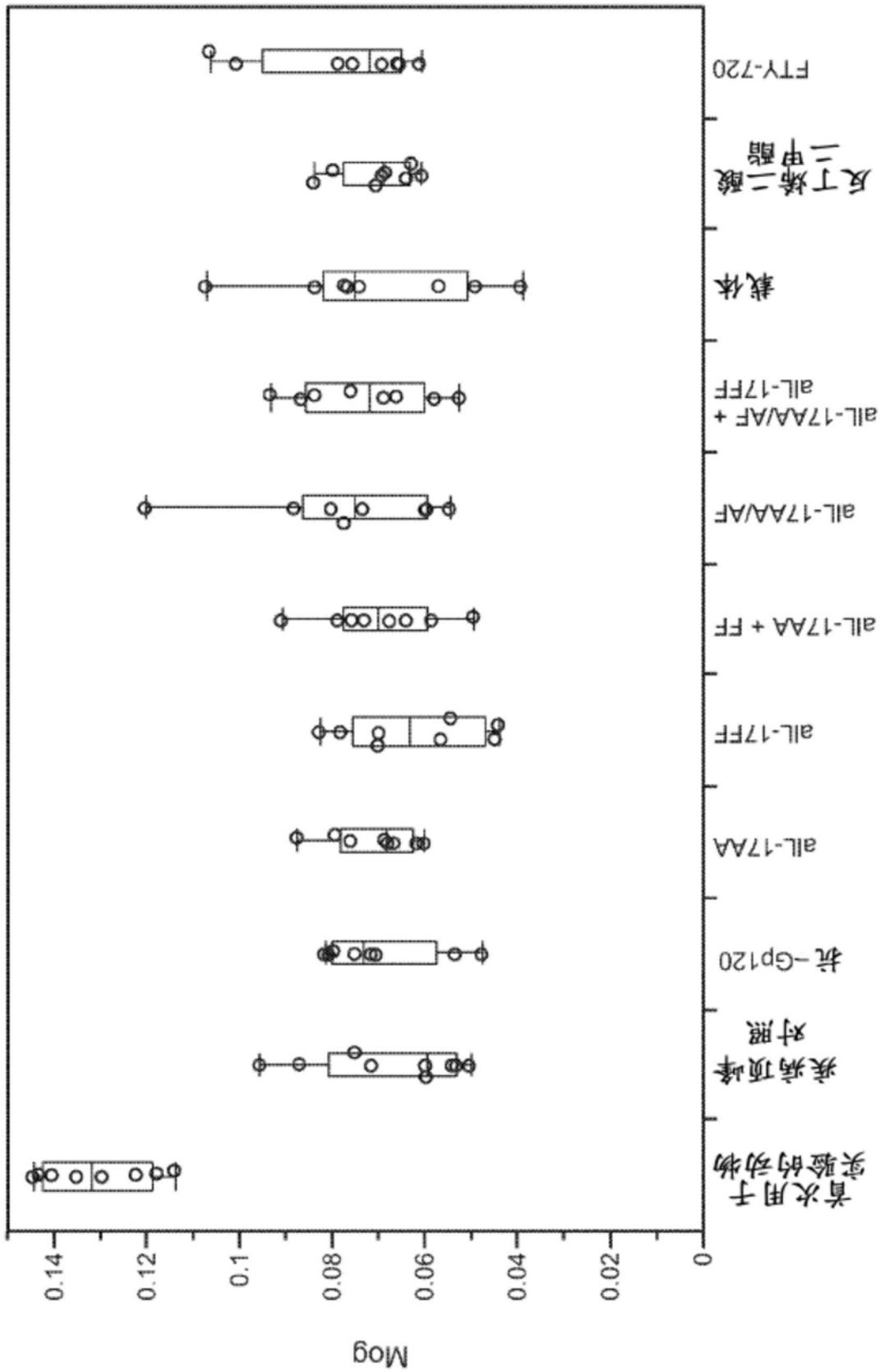


图10B-2

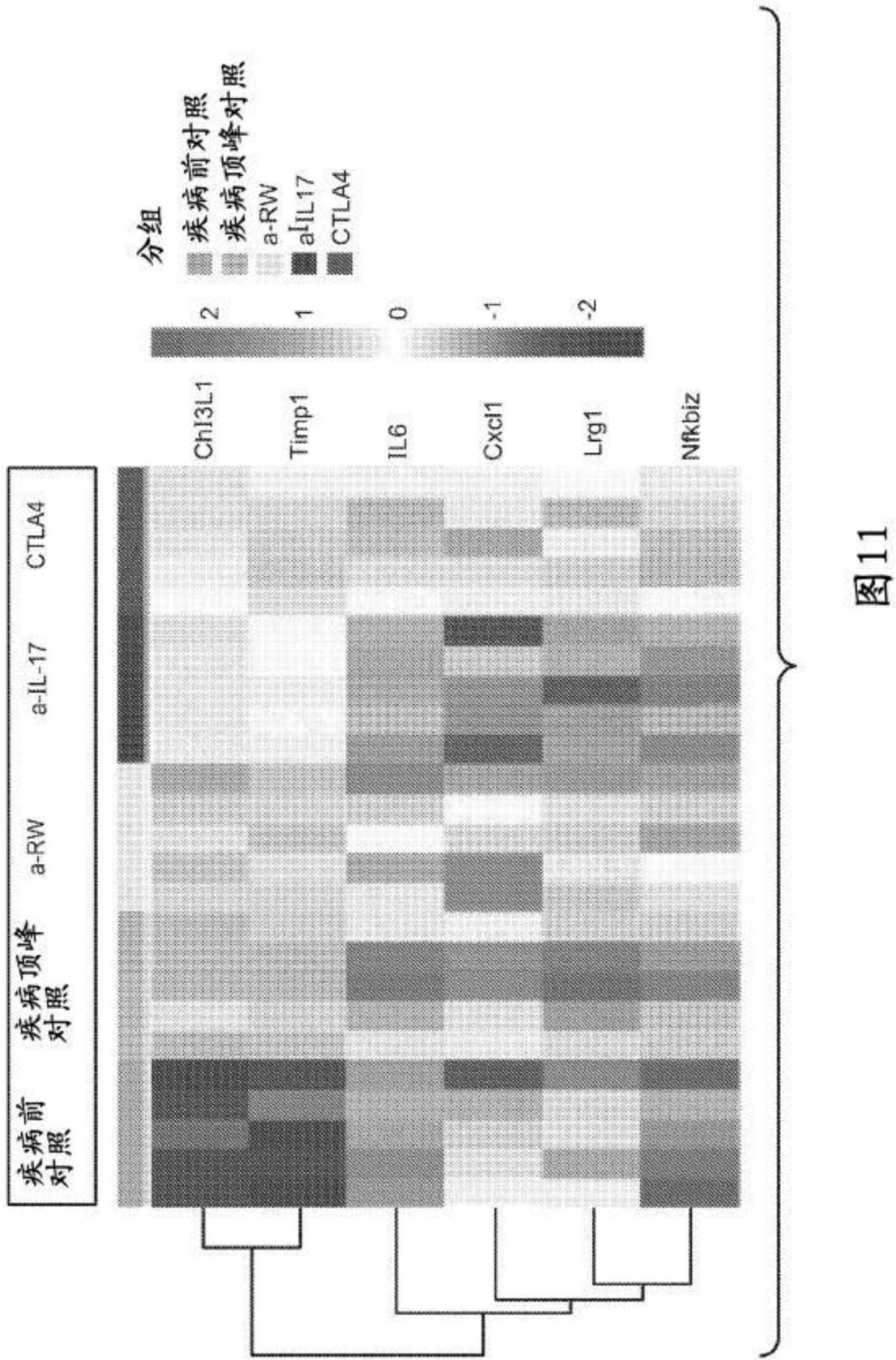


图11

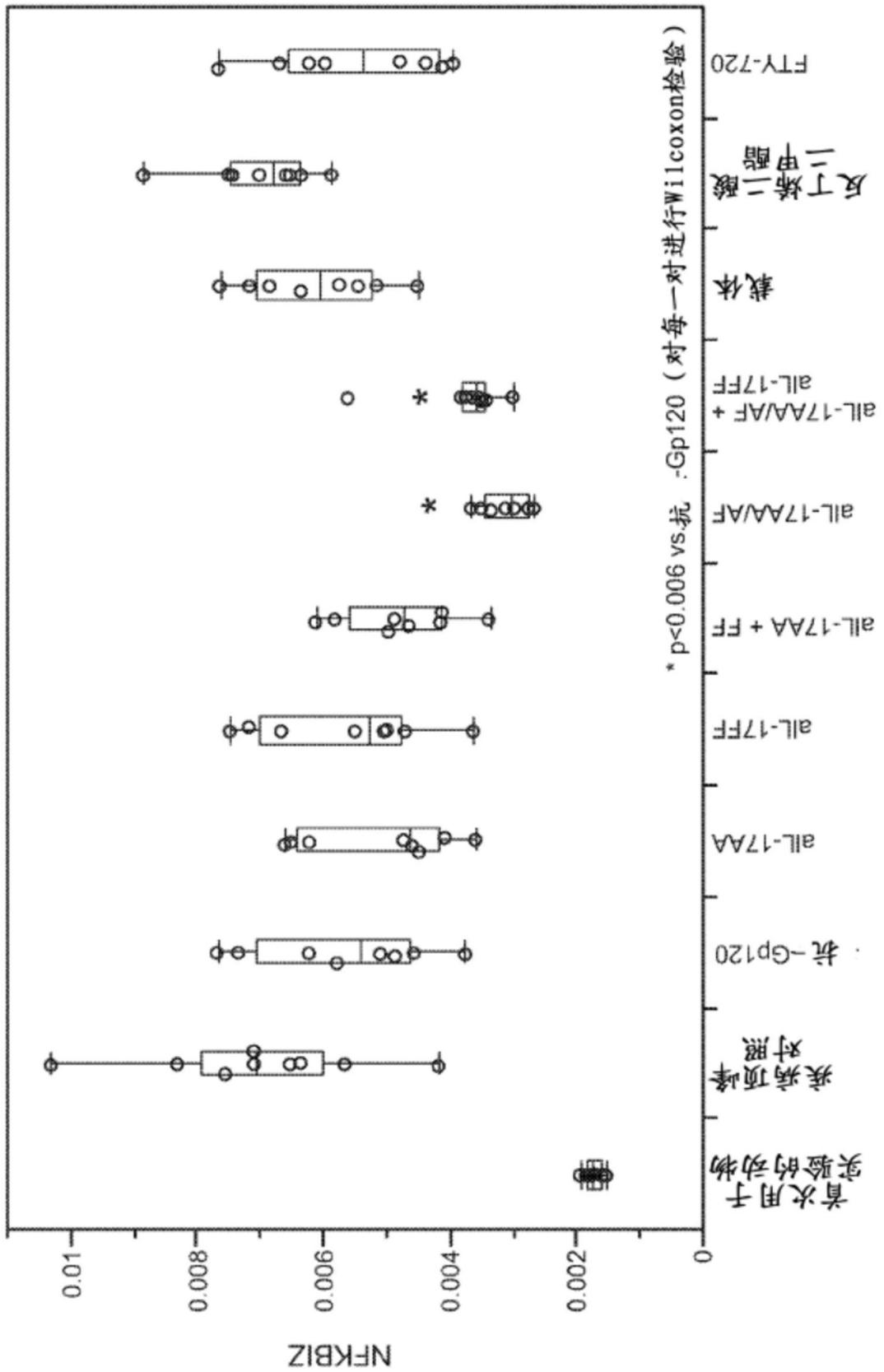


图12A

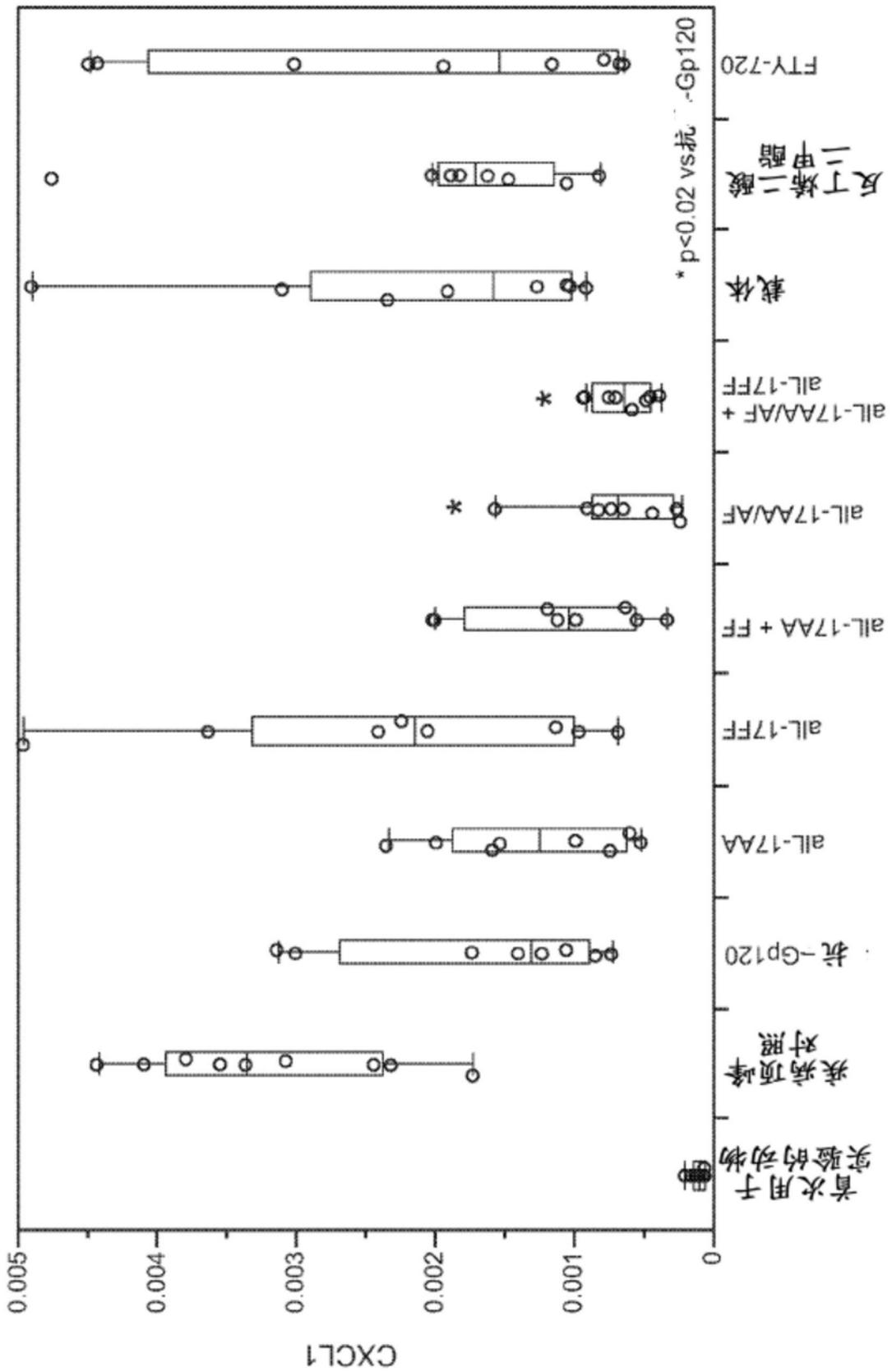


图12B

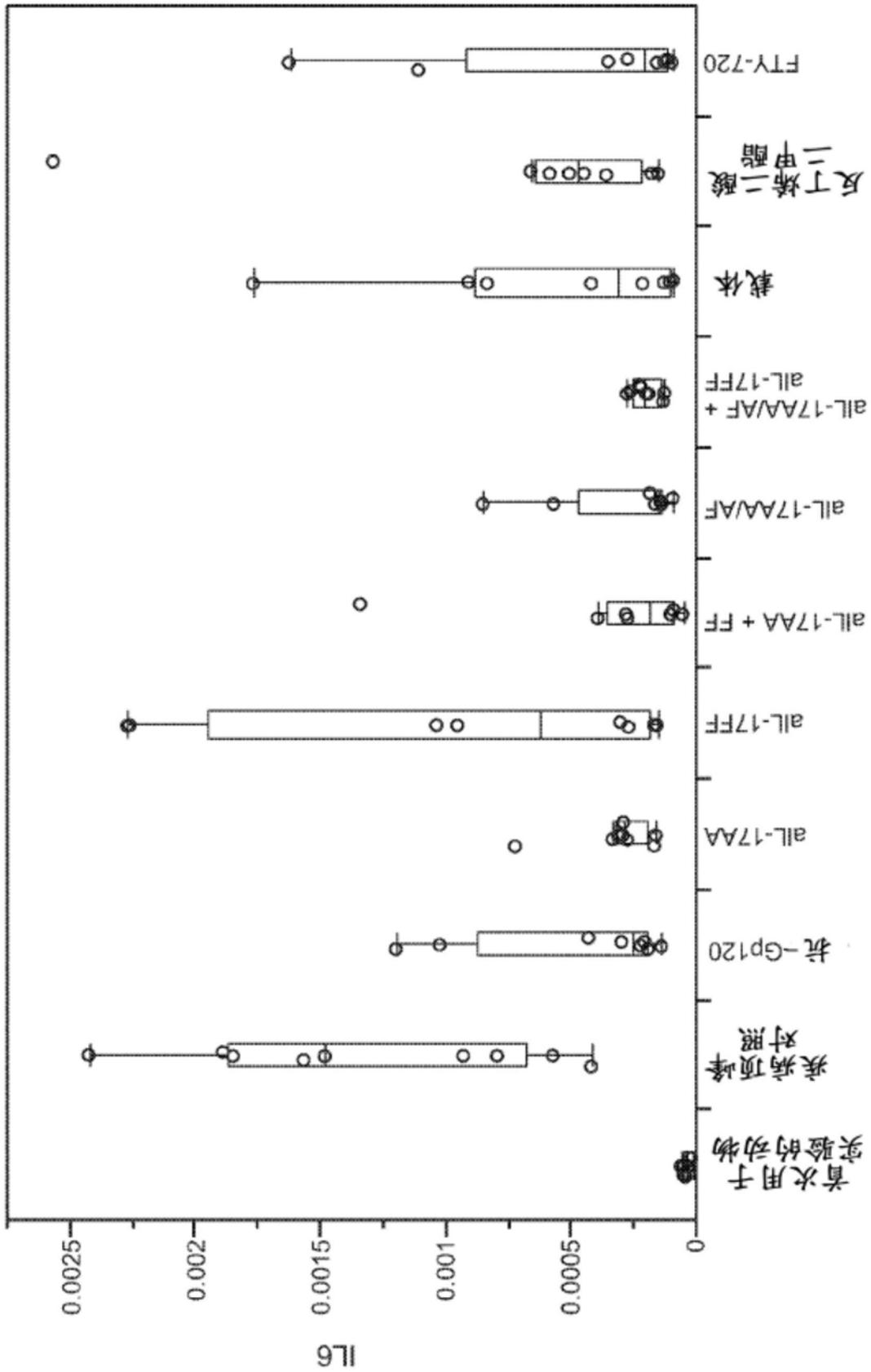


图12C

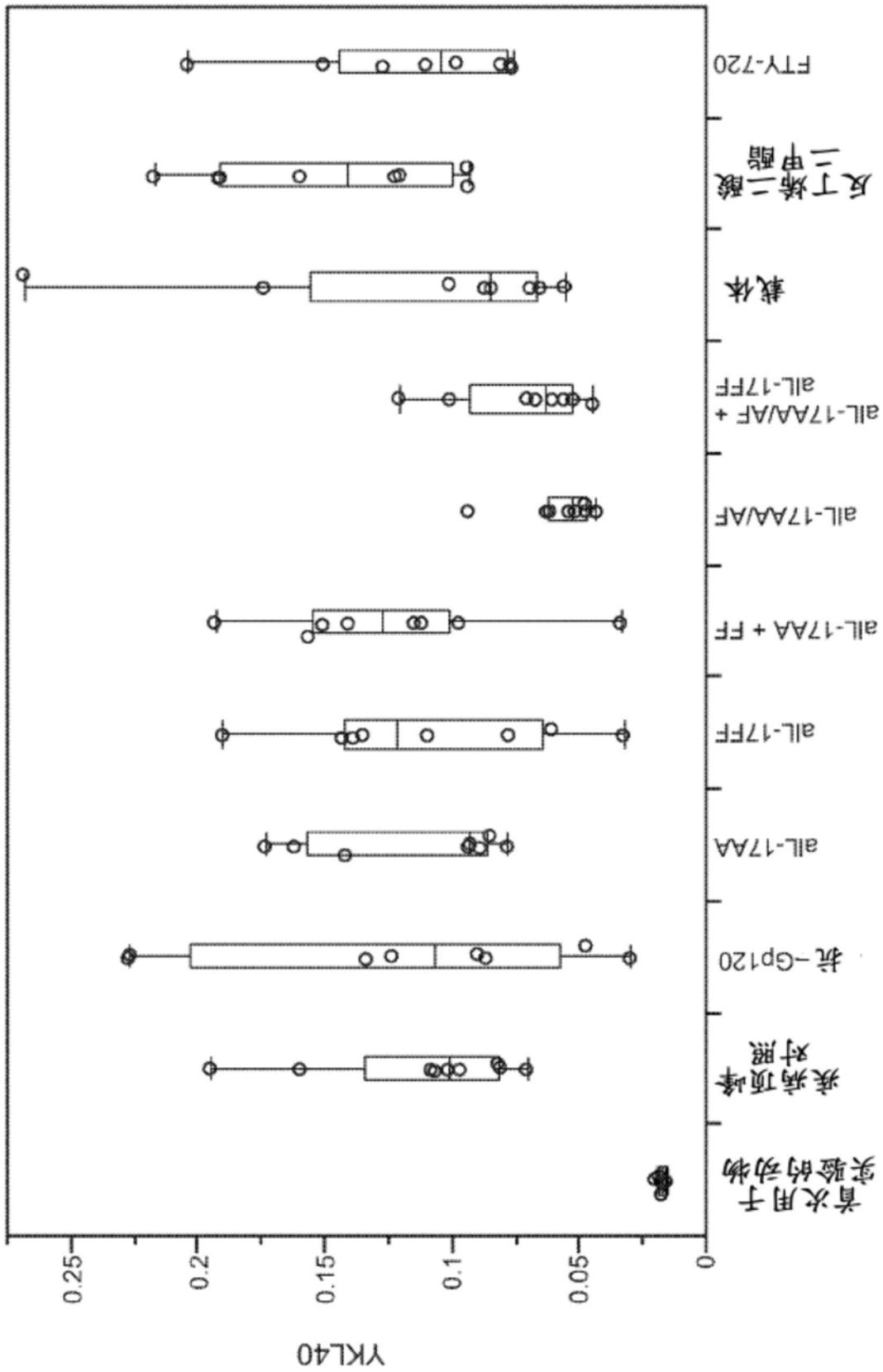


图12D

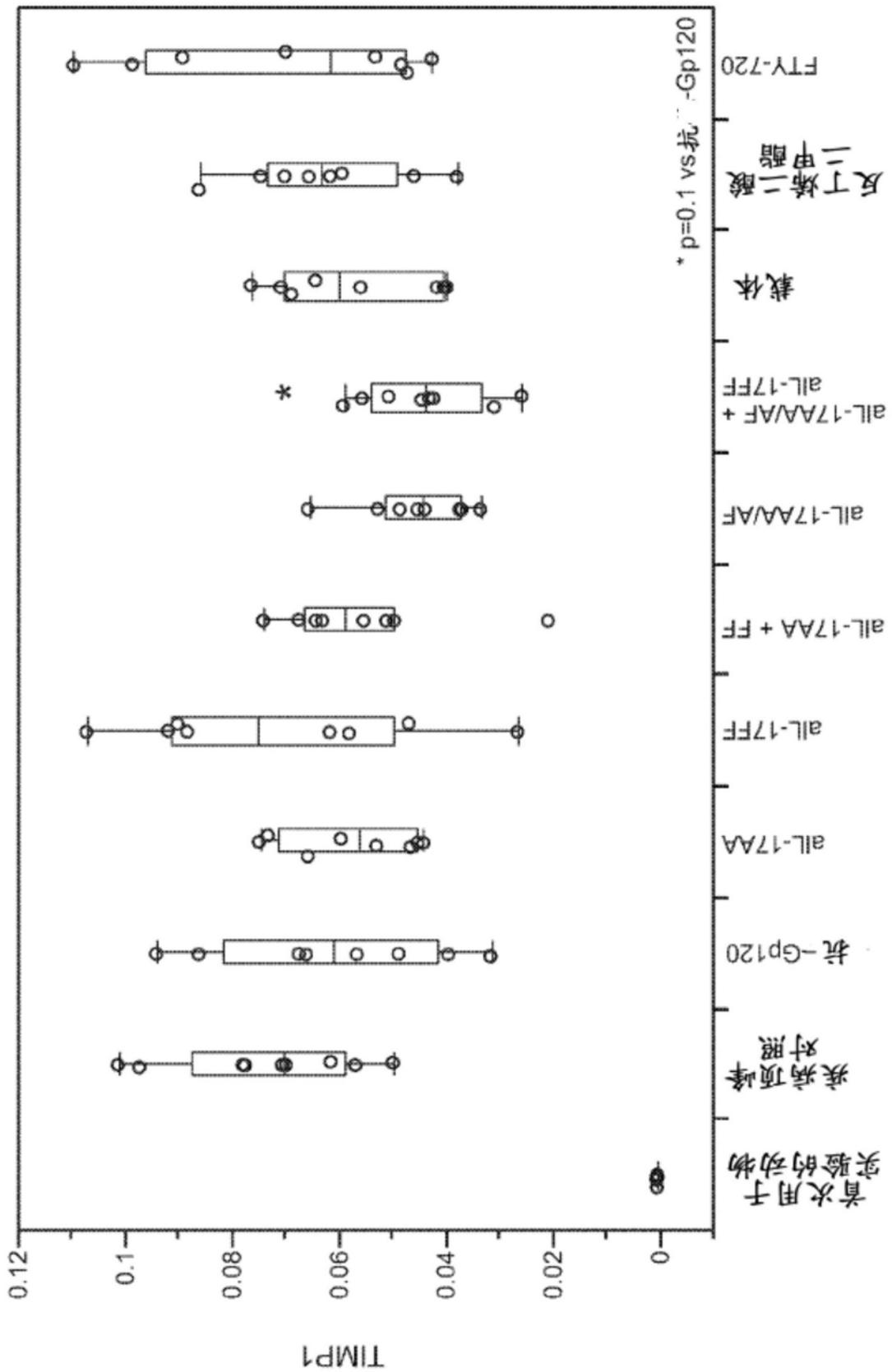


图12E

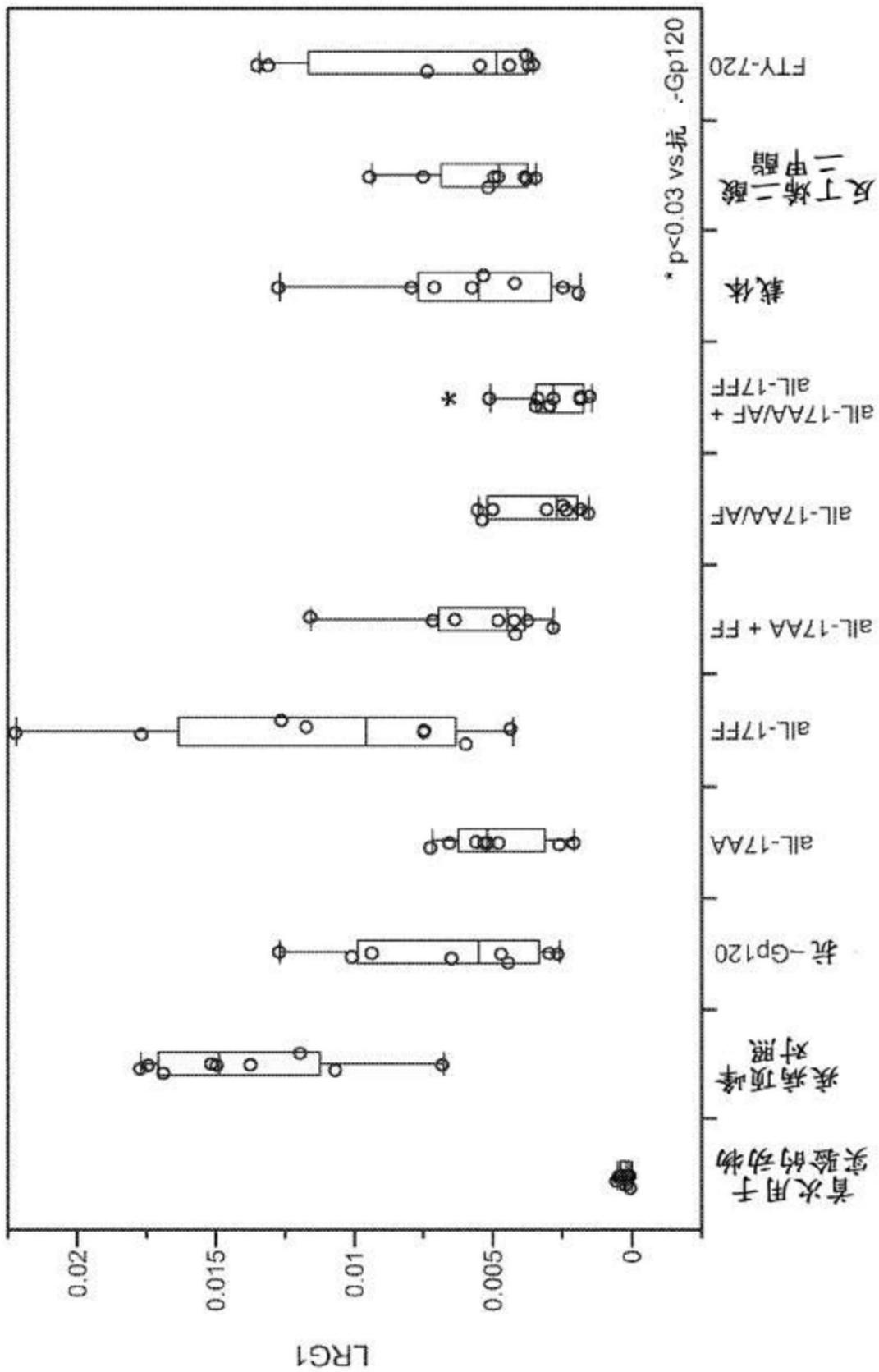


图12F

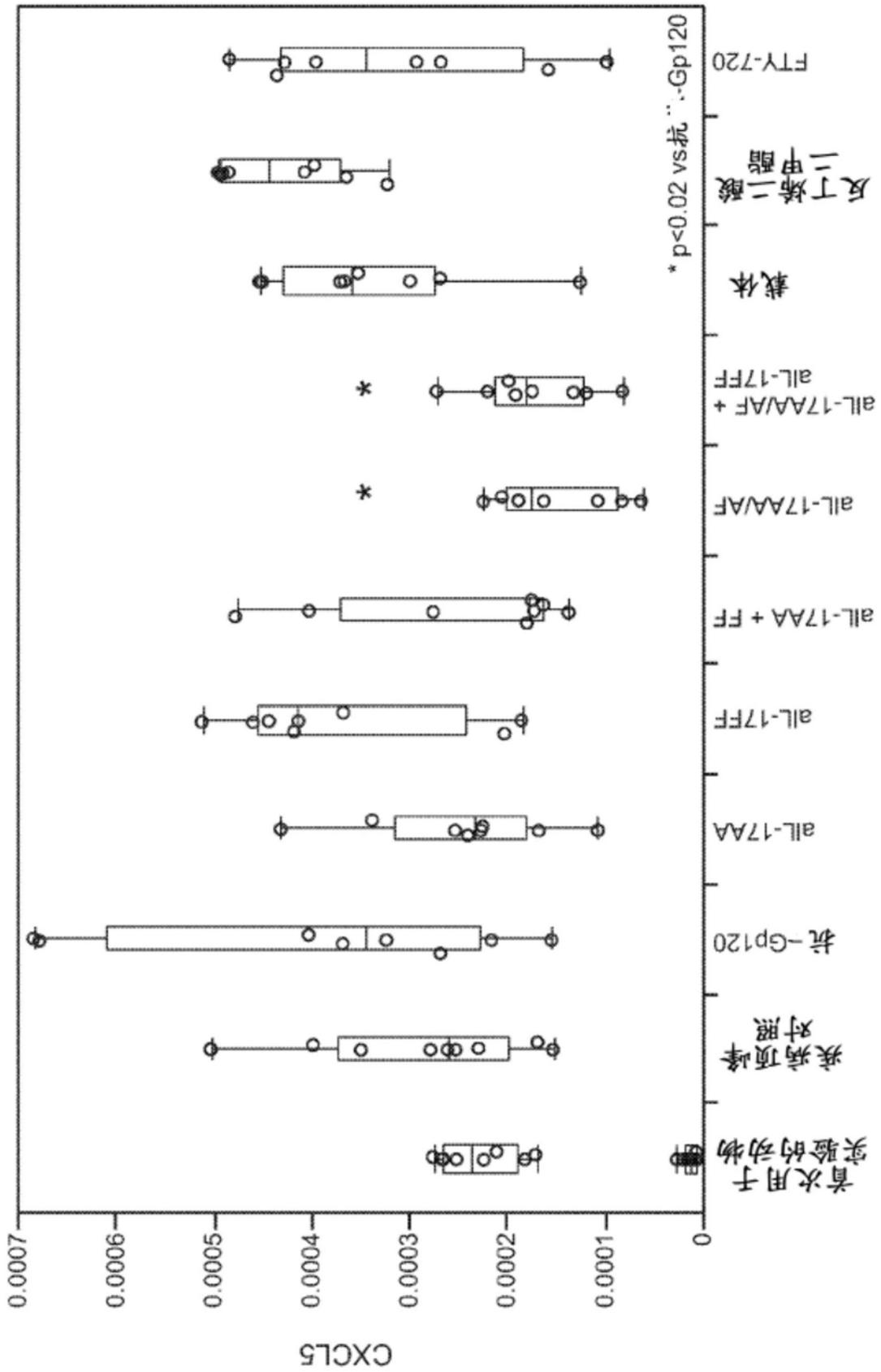


图13

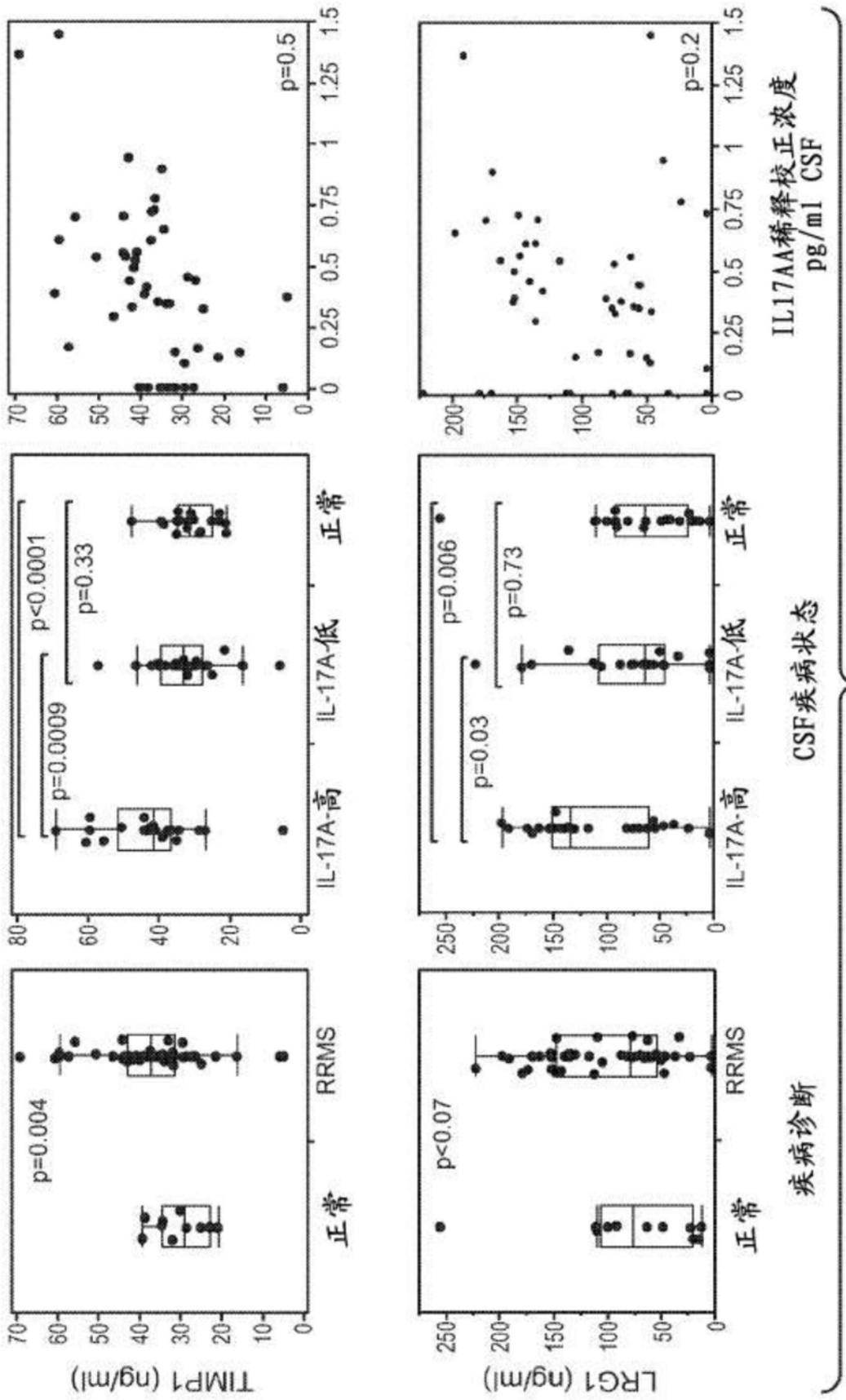


图14

图14

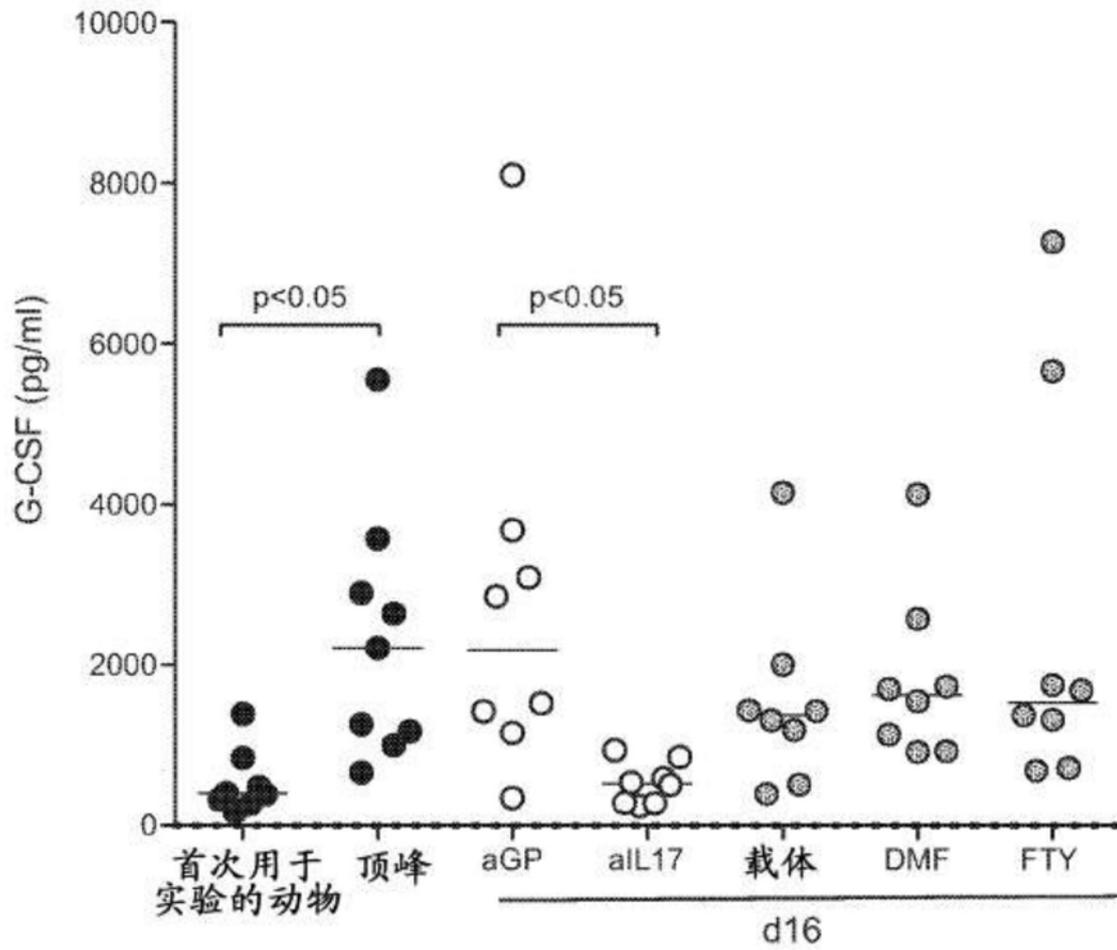


图15

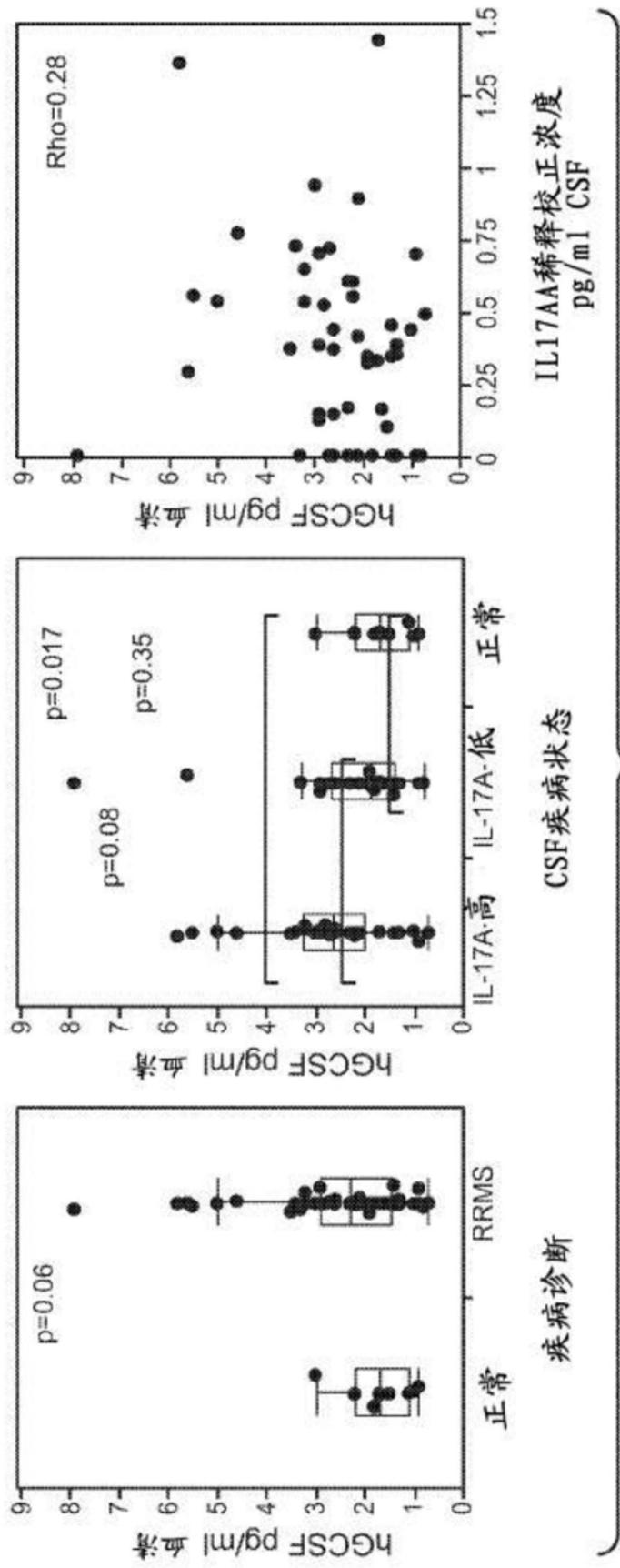


图16

图16