



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102989012 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201210536271. X

(22) 申请日 2006. 03. 30

(30) 优先权数据

60/667, 463 2005. 03. 31 US

(62) 分案原申请数据

200680019187. 3 2006. 03. 30

(73) 专利权人 通用医疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 迈克尔·德特马 肯塔罗·卡吉亚

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 岑晓东

(51) Int. Cl.

A61K 48/00(2006. 01)

A61K 31/7105(2006. 01)

A61K 45/00(2006. 01)

A61P 7/10(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 01/21214 A1, 2001. 03. 29, 全文.

CN 1358543 A, 2002. 07. 17, 全文.

ROGER ABOUNADER et al.. In vivo

targeting of SF/HGF and c-met expression via UlsnRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. 《The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology》. 2002, 第 16 卷 (第 1 期), 108-110.

蒋逸凤等. 肝细胞生长因子和血管内皮细胞生长因子对血管壁细胞增殖的影响. 《解放军医学杂志》. 2003, 第 28 卷 (第 9 期), 814-815.

审查员 靳春鹏

权利要求书1页 说明书34页

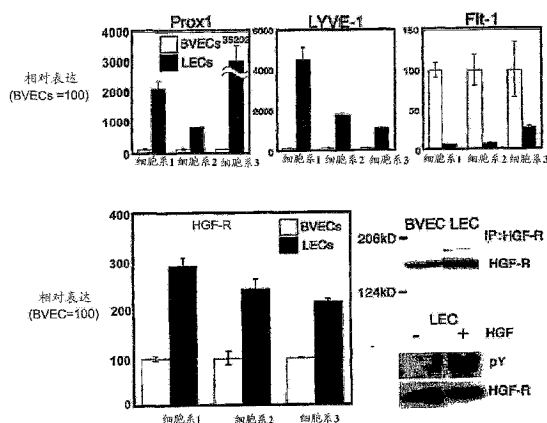
序列表20页 附图11页

(54) 发明名称

监测和调制 HGF/HGFR 活性

(57) 摘要

本发明涉及监测和调制 HGF/HGFR 活性。本发明提供用于调制肝细胞生长因子活性以调节淋巴管的发育和功能的方法和组合物。本发明公开用于监测和治疗皮肤病、淋巴水肿和转移性癌症的方法和组合物。本发明还描述了鉴定肝细胞生长因子依赖性淋巴管生成的抑制剂的方法。



1. 治疗有效量的编码肝细胞生长因子 (HGF) 的核酸在制备用于治疗患有淋巴水肿或有罹患淋巴水肿的风险的个体的药物中的用途。
2. 权利要求 1 的用途, 其中 HGF 的序列为 SEQ ID NO:1 的氨基酸 55-728 表示的序列。
3. 权利要求 1 的用途, 其中药物通过局部施用或通过胃肠外施用来施用。
4. 权利要求 2 的用途, 其中药物通过局部施用或通过胃肠外施用来施用。
5. 权利要求 3-4 中任一项的用途, 其中胃肠外施用为静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内、动脉内或鞘内施用。
6. 权利要求 1 的用途, 其中药物进一步包含药学可接受载体。
7. 权利要求 2 的用途, 其中药物进一步包含药学可接受载体。
8. 权利要求 3 的用途, 其中药物进一步包含药学可接受载体。
9. 权利要求 4 的用途, 其中药物进一步包含药学可接受载体。
10. 权利要求 1 至 4 和 6 至 9 中任一项的用途, 其中药物为受控释放而配制。
11. 权利要求 1 至 4 和 6 至 9 中任一项的用途, 其中个体为人。

监测和调制 HGF/HGFR 活性

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 3 月 30 日、中国申请号为 200680019187.3、发明名称为“监测和调制 HGF/HGFR 活性”的发明申请的分案申请。

[0002] Z 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求 2005 年 3 月 31 日提交的美国申请系列号 60/667,463 的优先权。由此该申请的内容全部并入作为参考。

背景技术

[0004] 肝细胞生长因子 (HGF) 是一种可以在人血清中找到的生长因子。HGF 受体 (HGFR) 已经被鉴定为 c-Met 原癌基因的产物。见例如, Bottaro 等, Science, 251:802-804(1991); Naldini 等, Oncogene, 6:501-504(1991); WO 92/13097; 和 WO 93/15754。

发明内容

[0005] 一方面, 本公开涉及治疗患有不希望有的皮肤情况 (unwanted skin condition), 例如损伤皮肤结构的疾病情况的个体的方法。该方法包括给所述个体施用治疗有效量的 HGF/HGFR 调制剂。一方面, 本公开涉及治疗有效量的 HGF/HGFR 调制剂 (例如, 激动剂或拮抗剂) 在制备药物中的用途。

[0006] 在一个实施方案中, 所述调制剂是 HGF/HGFR 激动剂。HGF/HGFR 激动剂是可以在所述个体中直接或间接地增加 HGF/HGFR 活性的药剂。该激动剂可以用于治疗其中期望增加淋巴管形成的疾病情况或用于制备治疗该疾病情况的药物。此类疾病情况包括淋巴水肿, 例如, 后天性淋巴水肿。后天性淋巴水肿的实例包括手术或放疗后获得的淋巴水肿或者至少部分地由感染, 例如病原体, 例如诸如丝虫病之类的感染所引起的淋巴水肿。其中期望增加淋巴管形成的其它疾病情况包括老化的皮肤或损伤的皮肤, 例如 UVB 损伤的皮肤。其它疾病情况还包括部分地由遗传或环境因素, 例如紫外线辐射, 引起的那些疾病。例如, 所述疾病情况是表皮松解 (epidermolysis), 如由衰老或过度暴露于紫外线所引起的表皮松解。

[0007] 许多 HGF/HGFR 激动剂可以增加 HGFR 信号的活性。HGF/HGFR 激动剂的实例包括包含肝细胞生长因子多肽 (如, 修饰成其成熟异二聚体形式的多肽) 或其生物活性片段或类似物在内的蛋白质、编码肝细胞生长因子或其生物活性片段或类似物的核酸。其它蛋白质和分子, 例如抗体和小分子, 也可以用于增加 HGFR 活性。例如, 与 HGFR 结合并任选地与之交联 (例如, 二聚体化) 的抗体可以用于增加 HGFR 活性。

[0008] 所述不希望有的情况 (unwanted condition) 是例如, 炎性或自身免疫性皮肤病症 (例如, 银屑病) 或红斑痤疮皮肤病 (rosacea dermatosis)。治疗有效量的 HGF/HGFR 激动剂可以用于制备治疗此类炎性或自身免疫性皮肤病症或红斑痤疮皮肤病的药物。

[0009] 一个实施方案中, 所述调制剂是 HGF/HGFR 拮抗剂。HGF/HGFR 拮抗剂是可以在细胞中或在个体中直接地或间接地降低 HGF/HGFR 活性的药剂。拮抗剂包括核酸和蛋白质, 例如, 抗体或可溶性 HGF 受体片段。例如, 拮抗剂可以是与 HGF 相互作用并且例如降低 HGF 与细胞表面 HGFR 的结合亲和力的蛋白质。例如, 所述蛋白质可以是 (i) 识别 HGF 或 HGFR 的

抗体,或(ii)包括HGFR的细胞外区域的蛋白质,例如,可溶性HGF受体(例如,与Fc域融合)。拮抗剂的实例包括:可以结合或者抑制HGF mRNA,例如mRNA的产生、加工或翻译的核酸分子。其它拮抗剂还包括:显性失活的HGF蛋白质或其片段和降低HGF核酸表达的药剂(例如,人工转录因子或编码人工转录因子的核酸)。

[0010] 一些实施方案中,所述调制剂降低内源HGF或HGFR水平。

[0011] 在一方面,本公开涉及治疗患有肿瘤性转化疾病(neoplastic disorder)或者有罹患肿瘤性转化疾病的风险的个体的方法,其中所述肿瘤性转化疾病是例如转移性癌症,尤其是包括了淋巴管中的细胞转移的转移性癌症或者具有转移至淋巴结的潜力的癌症。所述方法包括给所述个体施用治疗有效量的可以降低所述个体中的HGF/HGFR活性的HGF/HGFR拮抗剂。治疗有效量的HGF/HGFR拮抗剂可以用于制备治疗患有肿瘤性转化疾病,例如,转移性癌症或者有罹患该疾病的风险的个体的药物。

[0012] 拮抗剂包括核酸和蛋白质,例如抗体或可溶性HGF受体片段。例如,拮抗剂可以是与HGF相互作用并例如降低HGF与细胞表面HGFR的结合亲和力的蛋白质或其它药剂。所述蛋白质可以是例如HGF抗体或者HGFR的细胞外区域,例如可溶性HGF受体。拮抗剂的实例包括:可以结合或抑制HGF mRNA,例如,mRNA的产生、加工或翻译的核酸分子。其它拮抗剂还包括:显性失活的HGF蛋白质或其片段和降低HGF核酸表达的药剂(例如,人工转录因子或编码人工转录因子的核酸)。

[0013] 另一方面,本公开涉及治疗患有肿瘤性转化疾病或者有罹患该疾病的风险的个体的方法,其中所述肿瘤性转化疾病是例如转移性癌症,尤其是包括了淋巴管中的细胞转移的转移性癌症或者具有转移至淋巴结的潜力的癌症。所述方法包括给所述个体施用治疗有效量的可以在所述个体中降低 $\alpha 9$ 整联蛋白活性的 $\alpha 9$ 整联蛋白拮抗剂。所述拮抗剂是例如可以与 $\alpha 9$ 整联蛋白或者配对的整联蛋白 β 亚基相互作用并且例如降低整联蛋白与细胞的结合亲和力的蛋白质或其它药剂。所述蛋白可以是例如 $\alpha 9$ 整联蛋白或配对的整联蛋白 β 亚基的抗体或者 $\alpha 9$ 整联蛋白受体的细胞外区域。治疗有效量的 $\alpha 9$ 整联蛋白拮抗剂可以用于制备治疗患有肿瘤性转化疾病如转移性癌症或者有罹患该疾病的风险的个体的药物。

[0014] 拮抗剂的实例包括:可以结合或者抑制 $\alpha 9$ 整联蛋白 mRNA,例如mRNA的产生、加工或翻译的核酸分子。其它拮抗剂还包括:显性失活的 $\alpha 9$ 整联蛋白或其片段和可以降低 $\alpha 9$ 整联蛋白核酸表达的药剂(例如,人工转录因子或编码人工转录因子的核酸)。

[0015] 另一方面,本公开涉及评价细胞或个体(例如,使用获自该个体的细胞)的方法。该方法包括评价所述细胞或者来自所述个体的细胞中整联蛋白 $\alpha 9$ 和司腺钙蛋白1(stanniocalcin 1)mRNA或蛋白质的表达。该方法可以用于评价所述个体中HGF的活性。所述细胞或获自所述个体的细胞包括例如内皮细胞,如淋巴内皮细胞(LEC)。可以例如在实施所述评价之前、期间或之后,用本文描述的药剂,如HGF/HGFR的激动剂或拮抗剂处理所述细胞或个体。该方法可以用于监测患有本文所述疾病或有罹患本文所述疾病的风险的个体以及可以用本文所述药剂治疗的个体。

[0016] 另一方面,本公开涉及鉴定可以调制淋巴内皮细胞的活性,例如增殖或迁移的化合物的方法。该方法包括:提供可以检测其中的HGF/HGFR活性的细胞或生物体;使所述细胞或生物体与待测化合物接触;以及评价所述细胞或生物体中的HGF/HGFR活性。例如,所

述细胞包括 HGF/HGFR 活性的报道分子或包含该细胞的生物体。HGF/HGFR 活性可以通过分析,例如蛋白质或 mRNA 的表达或者报道分子的活性来进行评价。例如,报道分子活性或者其它相关参数的改变可以指示 HGF/HGFR 活性的改变。该方法还可以包括评价待测化合物对细胞增殖或细胞迁移,例如淋巴内皮细胞的增殖或迁移的影响。

[0017] 一个实施方案中,报道分子是包含编码可检测蛋白质的序列和可操作连接的启动子的基因,其中所述启动子包括 HGF 或 HGFR 基因的启动子区域,例如,从转录起始位点至上游至少 100、200、300、500、800、1000、2000 或 5000 碱基位置的区域、从起始 MET 密码子至上游至少 100、200、300、500、800、1000、2000 或 5000 碱基位置的区域、或者从 TATA 盒至上游至少 100、200、300、500、800、1000、2000 或 5000 碱基位置的区域。

[0018] 所述细胞或生物体一般是哺乳动物,例如人或非人哺乳动物,例如,小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、猴等。

[0019] 另一方面,本公开涉及鉴定可以调制内皮细胞活性的化合物,例如可以抑制肝细胞生长因子依赖性淋巴内皮细胞增殖或迁移的化合物的方法。该方法包括:提供表达肝细胞生长因子受体的内皮细胞(例如,淋巴内皮细胞);使该内皮细胞与肝细胞生长因子和待测化合物接触;和评价该细胞,例如评价该细胞的性质,例如受 HGF/HGFR 调节的性质,如增殖或迁移。例如,该方法可以包括确定在待测化合物存在时淋巴内皮细胞是否增殖或迁移。增殖或迁移的减少可能指示待测化合物抑制肝细胞生长因子依赖性淋巴内皮细胞增殖。

[0020] 所述内皮细胞可以是哺乳动物细胞,例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠、或人的细胞。所述细胞可以是培养的或分离的;例如,所述细胞来自细胞系或原代细胞。一个实施方案中,所述细胞表达 Prox1 及透明质酸(hyaluronan)受体 LYVE-1。

[0021] 该方法可以包括在存在另一 HGF/HGFR 途径调制剂时,例如在存在包括可溶性 HGF 的蛋白质、包括 HGFR 的可溶性细胞外域的蛋白质、或抗 HGF 或 HGFR 的抗体时,评价待测化合物。

[0022] 该方法可以包括评价肝细胞生长因子受体的酪氨酸磷酸化,例如,确定待测化合物是否引起肝细胞生长因子受体的酪氨酸磷酸化降低。一个实施方案中,所述淋巴内皮细胞表达重组的肝细胞生长因子受体或其突变体。

[0023] 该方法还可以包括将待测化合物施用给生物体,例如人或非人哺乳动物。该方法还可以包括将待测化合物或保留该待测化合物的生物学活性的修饰的待测化合物配制为药物组合物,例如,通过将所述化合物与药学可接受载体混合以进行配制。

[0024] 在再一方面,本公开涉及评价待测化合物的方法,其中所述待测化合物为例如,局部施用于待测生物体,例如包括 HGF/HGFR 途径活性的报道分子的转基因生物体的化合物。该方法包括使待测化合物与待测生物体接触和评价 HGF/HGFR 途径的活性。例如,该评价可以包括评价 HGF、HGFR 的蛋白质或 mRNA 的表达、或者受 HGFR 调节的基因或基因产物,例如 $\alpha 9$ 整联蛋白或司腺钙蛋白 1。该方法也可以包括在存在另一 HGF/HGFR 途径调制剂时,例如,在存在包括可溶性 HGF 的蛋白质、包括 HGFR 的可溶性细胞外域的蛋白质、或抗 HGF 或 HGFR 的抗体时,评价待测化合物。

[0025] 一个实施方案中,报道分子是包括编码可检测蛋白的序列和可操作连接的启动子的基因,其中所述启动子包括 HGF 或 HGFR、 $\alpha 9$ 整联蛋白或司腺钙蛋白 1 基因的启动子区域,例如,从转录起始位点至上游至少 100、200、300、500、800、1000、2000 或 5000 碱基位置

的区域、从起始 MET 密码子至上游至少 100、200、300、500、800、1000、2000 或 5000 碱基位置的区域、或者从 TATA 盒至上游至少 100、200、300、500、800、1000、2000 或 5000 碱基位置的区域。该方法也可以包括评价两个或更多个此类受体。

[0026] 该方法可以包括如果待测化合物增加或降低 HGF/HGFR 途径的活性,则选择该待测化合物(例如,从待测化合物文库中)。所选的待测化合物可以配制为例如药物组合物,例如,适于局部施用或其它施用途径的药物组合物。该方法还可以包括将该药物组合物施用于个体,例如,患有本文所述疾病或有罹患该疾病的风险的个体。

[0027] 本发明的一个或多个实施方案的细节将在附图和下面的详述部分中进行阐述。从本发明的详述和附图以及本发明的权利要求,本发明的其它特征、目标和优点将是明显的。所有引用的专利、申请和参考文献并入此处作为参考。

[0028] 本发明涉及下述各项。

[0029] 1. 治疗有效量的肝细胞生长因子活性的激动剂在制备用于治疗患有不希望有的皮肤情况或有罹患该不希望有的皮肤情况的风险的个体的药物中的用途。

[0030] 2. 项 1 的用途,其中所述不希望有的皮肤情况是影响皮肤结构的疾病情况。

[0031] 3. 项 1 的用途,其中所述疾病情况可以由遗传因素引起。

[0032] 4. 项 3 的用途,其中所述遗传因素是表皮松解。

[0033] 5. 项 1 的用途,其中所述疾病情况由环境因素引起。

[0034] 6. 项 5 的用途,其中所述环境因素是紫外线辐射。

[0035] 7. 项 1 的用途,其中所述不希望有的情况是老化的皮肤。

[0036] 8. 项 1 的用途,其中所述不希望有的情况是银屑病。

[0037] 9. 项 1 的用途,其中所述不希望有的情况是红斑痤疮皮肤病。

[0038] 10. 项 1 的用途,其中所述不希望有的情况是由光辐射引起的皮肤损伤。

[0039] 11. 项 1 的用途,其中肝细胞生长因子活性的激动剂选自:肝细胞生长因子多肽或其生物学活性片段或类似物、编码肝细胞生长因子或其生物学活性片段或类似物的核酸,以及肝细胞生长因子的激动剂。

[0040] 12. 项 1 的用途,其中肝细胞生长因子活性的激动剂是可以有效增加内源性肝细胞生长因子水平的药剂。

[0041] 13. 治疗有效量的肝细胞生长因子活性的激动剂在制备用于治疗患有淋巴水肿或有罹患淋巴水肿的风险的个体的药物中的用途。

[0042] 14. 项 13 的用途,其中肝细胞生长因子活性的激动剂选自:肝细胞生长因子多肽或其生物学活性片段或类似物、编码肝细胞生长因子或其生物学活性片段或类似物的核酸,以及肝细胞生长因子的激动剂。

[0043] 15. 项 13 的用途,其中肝细胞生长因子活性的激动剂是可以有效增加内源性肝细胞生长因子水平的药剂。

[0044] 16. 治疗有效量的肝细胞生长因子活性的拮抗剂在制备用于治疗患有肿瘤性转化疾病或者有罹患肿瘤性转化疾病的风险的个体的药物中的用途。

[0045] 17. 项 16 的用途,其中所述肿瘤性转化疾病是癌症。

[0046] 18. 项 17 的用途,其中所述癌症是转移性癌症。

[0047] 19. 项 17 的用途,其中所述癌症的特征在于有向淋巴结转移的风险。

- [0048] 20. 项 18 的用途,其中所述转移性癌症包括淋巴管内的细胞转移。
- [0049] 21. 项 16 的用途,其中肝细胞生长因子活性的拮抗剂选自:可以结合细胞肝细胞生长因子 mRNA 并抑制该蛋白质表达的肝细胞生长因子核酸分子、可以特异地结合肝细胞生长因子蛋白的抗体、可溶性肝细胞生长因子受体、显性失活的肝细胞生长因子蛋白或其片段、以及可以降低肝细胞生长因子核酸表达的药剂。
- [0050] 22. 项 16 的用途,其中肝细胞生长因子活性的拮抗剂是可以有效降低内源性肝细胞生长因子水平的药剂。
- [0051] 23. $\alpha 9$ 整联蛋白活性的拮抗剂在制备用于治疗患有肿瘤性转化疾病或有罹患该疾病的风险的个体的药物中的用途。
- [0052] 24. 项 23 的用途,其中所述肿瘤性转化疾病是癌症。
- [0053] 25. 项 24 的用途,其中所述癌症是转移性癌症。
- [0054] 26. 项 24 的用途,其中所述癌症的特征在于有向淋巴结转移的风险。
- [0055] 27. 项 25 的用途,其中所述转移性癌症包括淋巴管内的细胞转移。
- [0056] 28. 项 23 的用途,其中 $\alpha 9$ 整联蛋白活性的拮抗剂选自:可以结合细胞 $\alpha 9$ 整联蛋白 mRNA 并抑制该蛋白质表达的 $\alpha 9$ 整联蛋白核酸分子、可以特异地结合 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体、可溶性 $\alpha 9$ 整联蛋白受体、显性失活的 $\alpha 9$ 整联蛋白或其片段、以及可以降低 $\alpha 9$ 整联蛋白核酸表达的药剂。
- [0057] 29. 鉴定可以抑制肝细胞生长因子依赖性淋巴内皮细胞增殖的化合物的方法,包括:
- [0058] 提供表达肝细胞生长因子受体的淋巴内皮细胞;
- [0059] 使该淋巴内皮细胞与肝细胞生长因子及待测化合物接触;和
- [0060] 确定在该待测化合物存在下该淋巴内皮细胞的增殖是否减少,增殖的减少指示该待测化合物可以抑制肝细胞生长因子依赖性的淋巴内皮细胞增殖。
- [0061] 30. 项 29 的方法,其中所述淋巴内皮细胞是哺乳动物细胞。
- [0062] 31. 项 30 的方法,其中哺乳动物细胞选自:小鼠、大鼠、兔、仓鼠和人。
- [0063] 32. 项 31 的方法,其中哺乳动物细胞是人细胞。
- [0064] 33. 项 29 的方法,其中淋巴内皮细胞是培养的细胞。
- [0065] 34. 项 30 的方法,其中哺乳动物细胞表达 Prox1 和透明质酸受体 LYVE-1。
- [0066] 35. 项 33 的方法,其中所述培养的细胞来自细胞系。
- [0067] 36. 项 29 的方法,其中待测化合物是肽。
- [0068] 37. 项 29 的方法,其中待测化合物是抗体。
- [0069] 38. 项 29 的方法,还包括确定所述肝细胞生长因子受体的酪氨酸磷酸化是否被降低。
- [0070] 39. 项 29 的方法,其中淋巴内皮细胞表达重组肝细胞生长因子受体或其突变体。
- [0071] 40. 通过项 29 的方法鉴定的、可以抑制淋巴内皮细胞增殖的待测化合物。
- [0072] 41. 鉴定可以抑制肝细胞生长因子依赖性淋巴内皮细胞迁移的化合物的方法,包括:
- [0073] 提供表达肝细胞生长因子受体的淋巴内皮细胞;
- [0074] 使该细胞与肝细胞生长因子及待测化合物接触;和

[0075] 确定在该待测化合物存在下该淋巴内皮细胞的迁移是否减少,迁移的减少指示该待测化合物可以抑制肝细胞生长因子依赖性的淋巴内皮细胞迁移。

[0076] 42. 项 41 的方法,其中所述淋巴内皮细胞是哺乳动物细胞。

[0077] 43. 项 42 的方法,其中哺乳动物细胞选自:小鼠、大鼠、兔、仓鼠和人。

[0078] 44. 项 43 的方法,其中哺乳动物细胞是人细胞。

[0079] 45. 项 41 的方法,其中淋巴内皮细胞是培养的细胞。

[0080] 46. 项 42 的方法,其中哺乳动物细胞表达 Prox1 和透明质酸受体 LYVE-1。

[0081] 47. 项 45 的方法,其中所述培养的细胞来自细胞系。

[0082] 48. 项 41 的方法,其中待测化合物是肽。

[0083] 49. 项 41 的方法,其中待测化合物是抗体。

[0084] 50. 项 41 的方法,还包括确定所述肝细胞生长因子受体的酪氨酸磷酸化是否被降低。

[0085] 51. 项 41 的方法,其中淋巴内皮细胞表达重组肝细胞生长因子受体或其突变体。

[0086] 52. 通过项 41 的方法鉴定的、可以抑制淋巴内皮细胞迁移的待测化合物。

[0087] 53. 鉴定可以抑制肝细胞生长因子依赖性淋巴管发生的化合物的方法,包括:

[0088] 提供表达肝细胞生长因子受体的淋巴内皮细胞;

[0089] 使该淋巴内皮细胞与肝细胞生长因子及待测化合物接触;和

[0090] 确定淋巴管发生是否减少,其中淋巴管发生的减少指示该化合物可以抑制肝细胞生长因子依赖性的淋巴管发生。

[0091] 54. 项 53 的方法,其中在体内提供所述细胞。

[0092] 55. 项 53 的方法,其中所述淋巴内皮细胞是哺乳动物细胞。

[0093] 56. 项 55 的方法,其中哺乳动物细胞选自:小鼠、大鼠、兔、仓鼠和人。

[0094] 57. 项 56 的方法,其中哺乳动物细胞是人细胞。

[0095] 58. 项 55 的方法,其中所述哺乳动物细胞是培养的细胞。

[0096] 59. 项 55 的方法,其中哺乳动物细胞表达 Prox1 和透明质酸受体 LYVE-1。

[0097] 60. 项 58 的方法,其中所述培养的细胞来自细胞系。

[0098] 61. 项 53 的方法,其中待测化合物是肽。

[0099] 62. 项 53 的方法,其中待测化合物是抗体。

[0100] 63. 项 53 的方法,其中待测化合物是肽。

[0101] 附图简述

[0102] 图 1A-1F 显示淋巴细胞系标志物的 mRNA 水平的定量 RT-PCR 数据和分别用于 HGFR mRNA 和蛋白质的定量 RT-PCR 及免疫印迹分析试验。

[0103] 图 2A-2L 显示针对淋巴管中淋巴标志物 LYVE-1 (绿色) 和 HGFR (红色) 的双重免疫荧光染色。

[0104] 图 3A-3I 显示针对小鼠胚胎发育过程中淋巴囊内皮细胞中淋巴标志物 LYVE-1 (绿色) 和 HGFR (红色) 的双重免疫荧光。

[0105] 图 4A-4C 显示在用 HGF 处理的 LEC 上获得的淋巴内皮细胞 (LEC) 增殖和迁移试验数据。

[0106] 图 5A-5D 显示响应 HGF 体外 LEC 管形成以及体内淋巴管形成的数据。

[0107] 图 6A-6E 显示在实验性皮肤炎症后针对 LYVE-1 (绿色) 和 CD31 (红色) 的淋巴管双重免疫荧光染色。

[0108] 图 7A-7B 显示在用 HGF 处理后 LEC 中整联蛋白 $\alpha 9$ 和司腺钙蛋白 1 (stanniocalcin) mRNA 水平的 QPCR 数据。

[0109] 图 8A-8H 显示 HGF 转基因小鼠 (图 8B、8D、8F、8H) 和野生型小鼠 (图 8A、8C、8E、8G) 的回肠的代表性组织学图像 (H&E 染色和免疫荧光以检测 podoplanin)。比例条: 100 μ m。

[0110] 图 9A-9C 显示小鼠耳切片 LYVE-1 (绿色) 和 CD31 (红色) 的双荧光染色分析。植入含 HGF 的缓释丸 14 天后观察到诱导形成了 LYVE-1 阳性的淋巴管 (图 9B, 9C, 箭头所指), 而在对照小丸周围则无淋巴管形成 (图 9A)。与对照 IgG 处理 (图 9B) 相比, 用封闭性抗 VEGFR-3 抗体系统处理并没有抑制 HGF 诱导的淋巴管形成 (图 9C)。在所有的样品中都观察到有新形成的血管。P: 小丸。比例条: 100 μ m。

[0111] 发明详述

[0112] 我们发现, 除了别的以外, 肝细胞生长因子受体 (HGFR) 在淋巴系统的淋巴内皮细胞 (LEC) 中高度表达。用 HGF 处理 LEC 可以促进 LEC 向淋巴管中增殖、迁移以及构成组织 (organization)。此外, 给小鼠施用 HGF 可以有力地促进新的淋巴管形成。而且, LEC 迁移的诱导在很大程度上是通过 $\alpha 9$ 整联蛋白介导的。

[0113] 因此, 可以通过调制 HGF/HGFR 活性, 治疗受淋巴系统影响的病理情况。也可以通过评价对 HGF/HGFR 活性进行评估的参数, 对个体实施诊断。可以, 例如, 使用本文描述的试验和筛选方法鉴定可以调制 HGF/HGFR 活性的药剂。

[0114] 1. HGF 和 HGFR

[0115] 人 HGF 的成熟形式, 对应于从人血清中纯化出的主要形式, 是通过在该人激素原 (pro-hormone) 的氨基酸 R494 和 V495 之间的蛋白水解切割产生的二硫键连接的异二聚体。该切割过程产生由 440 个氨基酸的 α 亚基 (M.W. 69kDa) 和 234 个氨基酸的 β 亚基 (M.W. 34kDa) 组成的分子。该 α 和 β 链产生自编码前原蛋白前体 (pre-pro precursor protein) 的单个开放阅读框。在示例性成熟 hHGF 的预测一级结构中, 在 α 链的 Cys487 和 β 链的 Cys604 之间形成链间 S-S 桥 (见例如, Nakamura 等, Nature 342:440-443, (1989))。 α 链的 N 端之前有 54 个氨基酸, 起始于甲硫氨酸基团。该片段包括 31 个残基的特征性疏水前导 (信号) 序列和前序列。 α 链起始于第 55 位氨基酸 (aa), 并含有 4 个 Kringle 域。 Kringle 1 域从 α 链的约 aa 128 延伸至约 aa 206, Kringle 2 域位于约 aa211 和约 aa288 之间, Kringle 3 域被确定为从约 aa 303 延伸至约 aa383, Kringle 4 域从约 aa391 延伸至约 aa464。示例性 HGF 含有 4 个推测的糖基化位点, 这些位点位于 α 链的 294 和 402 位以及 β 链的 566 和 653 位。

[0116] HGF 受体 (HGFR) 已经被鉴定为 c-Met 原癌基因的产物, Bottaro 等, Science, 251:802-804(1991); Naldini 等, Oncogene, 6:501-504(1991); 1992 年 8 月 6 日公布的 W0 92/13097; 1993 年 8 月 19 日公布的 W0 93/15754。天然形式的该受体 (AKA c-Met) 典型地包含 190kDa 异二聚体 (二硫键连接的 50kDa α 链和 145kDa β 链) 跨膜酪氨酸激酶蛋白 (Park 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:6379-6383(1987))。

[0117] 据信, HGF 与其受体的结合活性是由位于 HGF 分子 N 端部分的功能域传递的, 该功能域包括头两个 Kringle 域 (Matsumoto 等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 181:691-

699(1991);Hartmann 等,Proc.Natl.Acad.Sci.,89:11574-11578(1992);Lokker 等,EMBO J.,11:2503-2510(1992);Lokker 和 Godowski,J.Biol.Chem.,268:17145-17150(1991))。HGF 结合后,该 c-Met 蛋白在 145kDa β 亚基的酪氨酸残基上磷酸化。

[0118] 关于本文公开的方法,HGF 可以以纯化的多肽形式产生,其中所述多肽的氨基酸序列可以与下列 SEQ ID NO:1-4 中的任一个或其它天然 HGF 变体有至少 80%同一性(即,85%、87%、89%、90%、92%、94%、96%、98%、99%或 100%同一性)。HGF 的受体(HGFR)可以以纯化的多肽形式产生,其中所述多肽的氨基酸序列可以与下列 SEQ ID NO:5-8 中的任一个或其它天然 HGFR 变体有至少 80%同一性(即,85%、87%、89%、90%、92%、94%、96%、98%、99%或 100%同一性)。

[0119] 人 HGF (SEQ ID NO:1)

[0120] 1 MWVTKLLPAL LLQHVLLHLL LLPIAIPYAE GQRKRRNTIH EFKKSAKTTL

[0121] 51 IKIDPALKIK TKKVNTADQC ANRCTRNGKL PFTCKAFVFD KARKQCLWFP

[0122] 101 FNSMSSGVKK EFGHEFDLYE NKDYIRNCII GKGRSYKGTV SITKSGIKCQ

[0123] 151 PWSSMIPHEH SFLPSSYRGK DLQENYCRNP RGEEGGPWCF TSNPEVRYEV

[0124] 201 CDIPQCSEVE CMTCNESYR GLMDHTESGK ICQRWDHQTP HRHKFLPERY

[0125] 251 PDKGFDDNYC RNPDGQRPW CYTLDPHTRW EYCAIKTCAD NTMNDTDVPL

[0126] 301 ETTECIQGGG EGYRGTVNTI WNGIPCQRWD SQYPHEHDMT PENFKCKDLR

[0127] 351 ENYCRNPDGS ESPWCFTTDP NIRVGYCSQI PNCDMSHGQD CYRGNGKNYM

[0128] 401 GNLSQTRSLG TCSMWKDNME DLHRHIFWEP DASKLNENYC RNPDDDAHGP

[0129] 451 WCYTGNPLIP WDYCPISRCE GDTTPTIVNL DHPVISCAKT KQLRVVNGIP

[0130] 501 TRTNIGWMVS LRYRNKHICG GSLIKESWVL TARQCFPSRD LKDYEAWLGI

[0131] 551 HDVHGRGDEK CKQVLNVSQV VYGPEGSDLV LMKLARPAVL DDFVSTIDL

[0132] 601 NYGCTIPEKT SCSVYGWGYT GLINYDGLLR VAHLYIMGNE KCSQHHRGKV

[0133] 651 TLNESEICAG AEKIGSGPCE GDYGGPLVCE QHKMRMVLGV IVPGRGCAIP

[0134] 701 NRPGIFVRVA YYAKWIHKII LTYKVPQS

[0135] 黑猩猩 (chimpanzee) HGF (SEQ ID NO:2)

[0136] 1 MWVTKLLPAL LLQHVLLHLL LLPIAIPYAE GQRKRRNTIH EFKKSAKTTL

[0137] 51 IKIDPALKIK TKKVNTADQC ANRCTRNGKL PFTCKAFVFD KARKQCLWFP

[0138] 101 FNSMSSGVKK EFGHEFDLYE NKGHETFGRF LPSSYRGKDL QENYCRNPRG

[0139] 151 EEGGPWCFTS NPEVRYEVC D IPQCSEVECM TCNGESYRGL MDHTESGKIC

[0140] 201 QRWDHQTPHR HKFLPERYPD KGFDDNYCRN PDGQRPWCY TLDPHTRWEY

[0141] 251 CAIKTCADNT MNDTDVPLET TECIQGGGEG YRGTVNTIWN GIPCQRWDSQ

[0142] 301 YPHEHDMTPE NFKCKDLREN YCRNPDGSES PWCFTTDPNI RVGYCSQIPN

[0143] 351 CDMSHGQDCY RGNGKNYMG N LSQTRSLGTC SMWDKNMEDL HRHIFWEPDA

[0144] 401 SKLNENYCRN PDDDAHGPWC YTGNPLIPWD YCPISRCEGD TTPTIVNLDH

[0145] 451 PVISCAKTKQ LRVVNGIPTR TNVGMVSLR YRNKHICGGS LIKESWVLTA

[0146] 501 RQCFPSRDLK DYEAWLGIHD VHGRGDEKCK QVLNVSQVLY GPEGSDLVLM

[0147] 551 KLARPAVLDD FVSTIDL PNY GCTIPEKTSC SVYGWGYTGL INYDGLLRVA

[0148] 601 HLYIMGNEKC SQHHRGKVTL NESEICAGAE KIGSGPCEGD YGGPLVCEQH

[0149] 651 KMRMVLGVIV PGRGCAIPNR PGIFVRVAYY AKWIIHKIILT YKVPQS

[0150] 小鼠 HGF (SEQ ID NO:3)

[0151] 1 MMWGTKLLPV LLLQHVLHL LLLHVAIPYA EGQKKRRNTL HEFKKSAKTT

[0152] 51 LTKEDPLLKI KTKKVNSADE CANRCIRNRG FTFTCKAFVF DKSRRKCYWY

[0153] 101 PFNSMSSGVK KGFGHEFDLY ENKDYIRNCI IGKGGSYKGT VSITKSGIKC

[0154] 151 QPWNMIPHE HSFLPSSYRG KDLQENYCRN PRGEEGPPWC FTSNPEVRYE

[0155] 201 VCDIPQCSEV ECMTCNESY RGPMDHTESG KTCQRWDQQT PHRHKFLPER

[0156] 251 YPDKGFDDNY CRNPDGKPRP WCYTLDPDTP WEYCAIKTCA HSAVNETDVP

[0157] 301 METTECIQGG GEGYRGTSNT IWNGIPCQRW DSQYPHKHDI TPENFKCKDL

[0158] 351 RENYCRNPDG AESPWCFTTD PNIRVGYSQ IPKCDVSSGQ DCYRGNGKNY

[0159] 401 MGNSKTRSG LTCSMWDKNM EDLHRHIFWE PDASKLNKNY CRNPDDDAHG

[0160] 451 PWCYTGNPLI PWDYCPISRC EGDTPPTIVN LDHPVISCAL TKQLRVVNGI

[0161] 501 PTQTTVGWMV SLKYRNKHIC GGSLIKESWV LTARQCFPAR NKDLKDYEAW

[0162] 551 LGIHDVHERG EEKRRQILNI SQLVYGPEGS DLVLLKLARP AILDNFVSTI

[0163] 601 DLPSYGCTIP EKTTCIYGW GYTGLINADG LLRVAHLYIM GNEKCSQHHQ

[0164] 651 GKVTLNESEL CAGAEKIGSG PCEGDYGGPL ICEQHKMRMV LGVIVPGRGC

[0165] 701 AIPNRPGIFV RVAYYAKWII KVILTYKL

[0166] 大鼠 HGF (SEQ ID NO:4)

[0167] 1 MWVTKLLPAL LLQHVLHLHLL LLPIAIPYAE GHKKRRNTIH EFKKSAKTTL

[0168] 51 IKIDPALKIK TTKVNTADQC ANRCTRNNGL PFTCKAFVFD EARKQCLWFP

[0169] 101 FNSMSSGVKK EFGHEFDLYE NKDYIRNCII GKGRSYKGTV SITKSGIKCQ

[0170] 151 PWSSMIPHEH SFLPSSYRGK DLQENYCRNP RGEEGPPWCF TSNPEVRYEV

[0171] 201 CDIPQCSEVE CMTCNESYR GLMDHTESGK ICQRWDHQTP HRHKFLPERY

[0172] 251 PDKGFDDNYC RNPDGQPRPW CYTLDPHTRW EYCAIKTCAD NTVNDTDVPM

[0173] 301 ETTECIQGGG EGYRGTAINTI WNGIPCQRWD SQYPHKHDMT PENFKCKDLR

[0174] 351 ENYCRNPDGS ESPWCFTTDP NIRVGYSQI PNCDMSNGQD CYRGNGKNYM

[0175] 401 GNLSQTRSGT TCSMWKNME DLHRHIFWEP DASKLNENYC RNPDDDAHGP

[0176] 451 WCYTGNPLIP WDYCPISRCE GDTTPTIVNL DHPVISCALT KQLRVVNGIP

[0177] 501 TRTNVGWMIS LRYRNKHICG GSLIKESWVL TARQCFPSRD LKDYEAWLGI

[0178] 551 HDVHGRGEEK RKQVLNVSQV VYGPEGSQDLV LMKLARPAVL DDFVNTIDL

[0179] 601 NYGCTIPEKT SCSVYGWGYT GLINYDGLLR VAHLYIMGNE KCSQHHRGKV

[0180] 651 TLNESEICAG AEKIGSGPCE GDYGGPLVCE QHKMRMVLGV IVPGRGCAIP

[0181] 701 NRPGLFVRVA YYAKWIIKII LTYKVPES

[0182] 人 HGFR (SEQ ID NO:5)

[0183] 1 MKAPAVLAPG ILVLLFTLVQ RSNGECKEAL AKSEMNVNMK YQLPNFTAET

[0184] 51 PIQNVILHEH HIFLGATNYI YVLNEEDLQK VAEYKTGPVL EHPDCFPCQD

[0185] 101 CSSKANLSGG VWKDINMAL VVDYYDDQL ISCGSVNRGT CQRHVFPHNH

[0186] 151 TADIQSEVHC IFSPQIEEPS QCPDCVVSAL GAKVLSSVKD RFINFFVGNT

[0187] 201 INSSYFPDHP LHSISVRRLK ETKDGFMTLT DQSYIDVLPE FRDSYPIKYV

[0188]	251	HAFESNNFIY FLTVQRETLD AQTFTHTRIIR FCSINSGLHS YMEMPLLECIL
[0189]	301	TEKRKKRSTK KEVFNILQAA YVSKPGAQLA RQIGASLNDD ILFGVFAQSK
[0190]	351	PDSAEPMDRS AMCAFPKIVY NDFFNKIVNK NNVRLQHFY GPNHEHCFNR
[0191]	401	TLLRNSSGCE ARRDEYRTEF TTALQRVDLF MGQFSEVLLT SISTFIKGD
[0192]	451	TIANLGTSEG RFMQVVVSRS GPSTPHVNFL LDSHPVSPEV IVEHTLNQNG
[0193]	501	YTLVITGKKI TKIPLNGLGC RHFQSCSQCL SAPPFVQCGW CHDKCVRSEE
[0194]	551	CLSGTWTQQI CLPAIKVFP NSAPLEGGTR LTICGWDFGF RRNNKFDLKK
[0195]	601	TRVLLGNESC TLTLSESTMN TLKCTVGPAM NKHFNMSSII SNGHGTQYS
[0196]	651	TFSYVDPVIT SISPKYGPM GGTLLTLTGN YLNSGNSRHI SIGGKTCTLK
[0197]	701	SVSNSILECY TPAQTISTEF AVKLKIDLAN RETSIFSYRE DPIVYEIHPT
[0198]	751	KSFISGGSTI TGVGKNLSV SVPRMVINVH EAGRNFVAC QHRSNSEIIC
[0199]	801	CTTPSLQQLN LQLPLKTKAF FMLDGILSKY FDLIYVHNPV FKPFEKPVMI
[0200]	851	SMGNEVLEI KGNDIDPEAV KGEVLKVGNK SCENIHLHSE AVLCTVPNDL
[0201]	901	LKLNSSELNIE WKQAISSTVL GKVIVQPDQN FTGLIAGVVS ISTALLLLLG
[0202]	951	FFLWLKKRKQ IKDLGSELVR YDARVHTPHL DRLVSARSVS PTTEMVSNES
[0203]	1001	VDYRATFPED QFPNSSQNGS CRQVQYPLTD MSPILTSQGS DISSPLLQNT
[0204]	1051	VHIDLSALNP ELVQAVQHVV IGPSSLIVHF NEVIGRGHFG CVYHGTLLDN
[0205]	1101	DGKKIHCAVK SLNRITDIGE VSQFLTEGII MKDFSHPNVL SLLGICLRSE
[0206]	1151	GSPLVVLPMY KHGDLRNFIR NETHNPTVKD LIGFGLQVAK GMKYLASKKF
[0207]	1201	VHRDLAARNC MLDEKFTVKV ADFGLARDMY DKEYYSVHNK TGAKLPVKWM
[0208]	1251	ALESLQTQKF TTKSDVWSFG VLLWELMTRG APPYPDVNTF DITVYLLQGR
[0209]	1301	RLLQPEYCPD PLYEVMKWCW HPAEMRPSF SELVSRISAI FSTFIGEHYV
[0210]	1351	HVNATYVNVK CVAPYPSLLS SEDNADDEV D TRPASFWETS
[0211]	黑猩猩 HGFR (SEQ ID NO:6)	
[0212]	1	MKAPAVLAPG ILVLLFTLVQ RSNGECKEAL AKSEMNVNMK YQLPNFTAET
[0213]	51	PIQNVILHEH HIFLGATNYI YVLNEEDLQK VAEYKTGPVL EHPDCFPQD
[0214]	101	CSSKANLGG VWKDNINMAL VVDTYDDQL ISCGSVNRGT CQRHVFPNH
[0215]	151	TADIQSEVHC IFSPQIEEPS QCPDCVVSAL GAKVLSSVKD RFINFFVGNT
[0216]	201	INSSYFPDHP LHSISVRLK ETKDGFMTLT DQSYIDVLPE FRDSYPIKYV
[0217]	251	HAFESNNFIY FLTVQRETLD AQTFTHTRIIR FCSINSGLHS YMEMPLLECIL
[0218]	301	TEKRKKRSTK KEVFNILQAA YVSKPGAQLA RQIGASLNDD ILFGVFAQSK
[0219]	351	PDSAEPMDRS AMCAFPKIVY NDFFNKIVNK NNVRLQHFY GPNHEHCFNR
[0220]	401	TLLRNSSSCE ARRDEYRTEF TTALQRVDLF MGQFSEVLLT SISTFIKGD
[0221]	451	TIANLGTSEG RFMQVVVSRS GPSTPHVNFL LDSHPVSPEV IVEHTLNQNG
[0222]	501	YTLVVTGKKI TKIPLNGLGC RHFQSCSQCL SAPPFVQCGW CHDKCVRSEE
[0223]	551	CLSGTWTQQI CLPAIKVFP NSAPLEGGTR LTICGWDFGF RRNNKFDLKK
[0224]	601	TRVLLGNESC TLTLSESTMN TLKCTVGPAM NKHFNMSSII SNGHGTQYS
[0225]	651	TFSYVDPVIT SISPKYGPM GGTLLTLTGN YLNSGNSRHI SIGGKTCTLK
[0226]	701	SVSNSILECY TPAQTISTEF AVKLKIDLAN RETSIFSYRE DPIVYEIHPT

[0227]	751	KSFISTWWKE	PLNIVSFLFC	FASGGSTITG	VGKNLNSVSV	PRMVINVHEA
[0228]	801	GRNFTVACQH	RSNSEIICCT	TPSLQQNLQ	LPLKTKAFFM	LDGILSKYFD
[0229]	851	LIYVHNVPFK	PFEKPVISM	GNENVLEIKG	NDIDPEAVKG	EVLKVGKNSC
[0230]	901	ENIHLHSEAV	LCTVPNDLLK	LNSELNIEWK	QAISSTVLGK	VIVQPDQNF
[0231]	951	GLIAGVVSIS	IALLLLLGFF	LWLKKRKQIK	DLGSELVRYD	ARVHTPHLDR
[0232]	1001	LVSARVSPT	TEMVSNESVD	YRATFPEDQF	PNSSQNGSCR	QVQYPLTDM
[0233]	1051	PILTSGDSI	SSPLLQNTVH	IDLSALNPEL	VQAVQHVVIG	PSSLIVHFNE
[0234]	1101	VIGRGHFGCV	YHGTLNDNDG	KKIHCAVKSL	NRITDIEVS	QFLTEGIIMK
[0235]	1151	DFSHPNVLSL	LGICLRSEGS	PLVVLPMKH	GDLRNFIRNE	THNPTVKDLI
[0236]	1201	GFGLQVAKGM	KYLASKKFVH	RDLAARNCL	DEKFTVKVAD	FGLARDMYDK
[0237]	1251	EYYSVHNKTG	AKLPVKWMAL	ESLQTQKFTT	KSDVWSFGVL	LWELMTRGAP
[0238]	1301	PYPDVNTFDI	TVYLLQGRRL	LQPEYCPDPL	YEVMLKCWHP	KAEMRPSFSE
[0239]	1351	LVSRIASIFS	TFIGEHYVHV	NATYVNVKCV	APYPSLLSSE	DNADDEVDR
[0240]	1401	PASFWETS				
[0241]	小鼠 HGFR (SEQ ID NO:7)					
[0242]	1	MKAPTVLAPG	ILVLLSLVQ	RSHGECKEAL	VKSEMNVNMK	YQLPNFTAET
[0243]	51	PIQNVVLHGH	HIYLGATNYI	YVLNDKDLQK	VSEFKTGPNL	EHPDCLPCR
[0244]	101	CSSKANSSGG	VWKDNINMAL	LVDITYDDQL	ISCGSVNRGT	CQRHVLPPDN
[0245]	151	SADIQSEVHC	MFSPEEESGQ	CPDCVVSALG	AKVLLSEKDR	FINFFVGNIT
[0246]	201	NSSYPGYSL	HSISVRRLKE	TQDGFKFLTD	QSYIDVLPEF	LDSYPIKYIH
[0247]	251	AFESNHFIFY	LTVQKETLDA	QTFHTRIIRF	CSVDSGLHSY	MEMPLECIL
[0248]	301	EKRRKRSTRE	EVFNILQAAY	VSKPGANLAK	QIGASPSDDI	LFGVFAQSKP
[0249]	351	DSAEVNRSA	VCAFPKIYVN	DFFNKIVNKN	NVRCLQHFYG	PNHEHCFNRT
[0250]	401	LLRNSSGCEA	RSDEYRTEFT	TALQRVDLFM	GRLNQVLLTS	ISTFIKGDLT
[0251]	451	IANLGTSEGR	FMQVLSRTA	HLTPHVNFL	DSHPVSPEVI	VEHPSNQNGY
[0252]	501	TLVVTGKKIT	KIPLNGLGCG	HFQSCSQCLS	APYFIQCGWC	HNQCVRFDEC
[0253]	551	PSGTWTQEIC	LPAVYKVFPT	SAPLEGGTVL	TICGWDFGFR	KNNKFDLRKT
[0254]	601	KVLLGNESCT	LTLSESTTNT	LKCTVGPAMS	EHFNVSIIIS	NSRETTQYSA
[0255]	651	FSYVDPVITS	ISPRYGPQAG	GTLLTLTGKY	LNSGNSRHIS	IGGKTCTLKS
[0256]	701	VSDSILECYT	PAQTTSDEFP	VKLKIDLANR	ETSSFSYRED	PVVYEIHPTK
[0257]	751	SFISGGSTIT	GIGKTLNSVS	LPLKVIDVHE	VGNYTVACQ	HRSNSEIICC
[0258]	801	TTPSLKQLGL	QLPLKTKAFF	LLDGILSKHF	DLTYVHNVPF	EPFEKPVISM
[0259]	851	MGNENVVEIK	GNNIDPEAVK	GEVLKVGNSQ	CESLHWHSGA	VLCTVPSDLL
[0260]	901	KLNSSELNIEW	KQAVSSTVLG	KVIVQPDQNF	AGLIIGAVSI	SVVLLLLSGL
[0261]	951	FLWMRK RKHK	DLGSELVRYD	ARVHTPHLDR	LVSARVSPT	TEMVSNESVD
[0262]	1001	YRATFPEDQF	PNSSQNGACR	QVQYPLTDL	PILTSGDSI	SSPLLQNTVH
[0263]	1051	IDLSALNPEL	VQAVQHVVIG	PSSLIVHFNE	VIGRGHFGCV	YHGTLNDNDG
[0264]	1101	KKIHCAVKSL	NRITDIEEVS	QFLTEGIIMK	DFSHPNVLSL	LGICLRSEGS
[0265]	1151	PLVVLPMKH	GDLRNFIRNE	THNPTVKDLI	GFGLQVAKGM	KYLASKKFVH

[0266]	1201	RDLAARNCML DEKFTVKVAD FGLARMDYDK EYYSVHNKTG AKLPVKWMAL
[0267]	1251	ESLQTQKFTT KSDVWSFGVL LWELMTRGAP PYPDVNTFDI TIYLLQGRRL
[0268]	1301	LQPEYCPDAL YEVMKLCWHP KAEMRPSFSE LVSRISSIFS TFIGEHYVHV
[0269]	1351	NATYVNVKCV APYPSLLPSQ DNIDGEGNT
[0270]	大鼠 HGFR (SEQ ID NO:8)	
[0271]	1	MKAPTALAPG ILLLLLTLAQ RSHGECKEAL VKSEMNVNMK YQLPNFTAET
[0272]	51	PIQNVVLHGH HIYLGATNYI YVLNDKDLQK VSEFKTGPVV EHPDCFPQCQD
[0273]	101	CSSKANVSGG VWKDNVNMAL LVDITYDDQL ISCGSVNRGT CQRHVLPPDN
[0274]	151	AADIQSEVHC MFSPLAEEES GQCPDCVVSA LGAKVLLSEK DRFINFFVGN
[0275]	201	TINSSYPDY SLHSISVRRL KETQDGFKFL TDQSYIDVLG EFRDSYPIKY
[0276]	251	IHAFESNHFI YFLTQKETL DAQTFHTRII RFCSVDSGLH SYMEMPLECI
[0277]	301	LTEKRRKRST REEVFNILQA AYVSKPGANL AKQIGASPYD DILYGVFAQS
[0278]	351	KPDSAEPMNR SAVCAPIKY VNDFFNKIVN KNNVRCLQHF YGPNHEHCFN
[0279]	401	RTLLRNSSGC EVRSDEYRTE FTTALQAVDL FMGRLNHVLL TSISTFIKGD
[0280]	451	LTIANLGTSE GRFMQVLSR TAHFTPHVNF LLDSHPVSPE VIVEHPSNQN
[0281]	501	GYTLVVTGKK ITKIPLNGLG CGHFQSCSQC LSAPYFIQCG WCHNRCVHSN
[0282]	551	ECPSGTWTQE ICLPAVYKVF PTSAPLEGGT MLTICGWDFG FKKNNKFDLR
[0283]	601	KTKVLLGNES CTLTLSESTT NTLKCTVGPA MSEHFNVSVI VSNSRETTQY
[0284]	651	SAFSYVDPVI TSISPRYGPH AGGTLLTLTG KYLNSGNSRH ISIGGKTCTL
[0285]	701	KSVSDSILEC YTPGHTVSAE FPVKLKIDLA DRVTSSFSYG EDPFVSEIHP
[0286]	751	TKSFISGGST ITGIGKNLNS VSTPKLVIEV HDVGVNYTVA CQHRSSSEII
[0287]	801	CCTTPSLQQL DLQLPLKTKA FFLLDGILSK HFDLTYVHDP MFKPFKPPVM
[0288]	851	ISMGNENVVE IKGDDIDPEA VKGEVLKVGK KSCENLHWHS EALLCTVPSPD
[0289]	901	LLKLNGGELN IEWKQAVSST VLGKVIVQPD QNFAGLIIGA VSISVVVLLV
[0290]	951	SGLFLWLRKR KHKDLGSELV RYDARVHTPH LDRLVSARSV SPTTEMVSNE
[0291]	1001	SVDYRATFPE DQFPNSSQNG ACRQVQYPLT DLSPILTSKD SDISSPLLQN
[0292]	1051	TVHIDLSALN PELVQAVQHV VIGPSSLIVH FNEVIGRGHF GCVYHGTLDD
[0293]	1101	SDGKKIHCAV KSLNRITDIE EVSQFLTEGI IMKDFSHPNV LSLLGICLRS
[0294]	1151	EGSPLVVLPI MKHGDRLNFI RNETHNPTVK DLIGFGLQVA KGMKYLASKK
[0295]	1201	FVHRDLAARN CMLDEKFTVK VADFGGLARM YDKEYYSVHN KTGAKLPVKW
[0296]	1251	MAESLQTQK FTTKSDVWSF GVLLWELMTR GAPPYPDVNT FDTIYLLQG
[0297]	1301	RRLQPEYCP DALYEVMLKC WHPKAEMRPS FSELVSRIS IFSTFIGEHY
[0298]	1351	VHVNATYVNV KCVAPYPSLL PSQDNIDGEA NT
[0299]	示例性 HGFR 区域包括：	
[0300]	区域	52..487
[0301]		/ 区域名 = “semaphorin 域”
[0302]		/ 注释 = “Sema”
[0303]		/db_xref = “CDD:25341”
[0304]	区域	519..561

- [0305] / 区域名 = “Plexins, Semaphorins 和整联蛋白中存在的域”
- [0306] / 注释 = “PSI”
- [0307] /db_xref = “CDD:25325”
- [0308] 区域 563..656
- [0309] / 区域名 = “Plexins 和细胞表面受体 (PCSR) 的 IPT 域的第一个重复”
- [0310] / 注释 = “IPT_plexin_repeat1”
- [0311] /db_xref = “CDD:27712”
- [0312] 区域 657..740
- [0313] / 区域名 = “Plexins 和细胞表面受体 (PCSR) 的 IPT 域的第二重复”
- [0314] / 注释 = “IPT_plexin_repeat2”
- [0315] /db_xref = “CDD:27711”
- [0316] 区域 742..837
- [0317] / 区域名 = “Plexins 和细胞表面受体 (PCSR) 的 IPT 域的第三个重复”
- [0318] / 注释 = “IPT_plexin_repeat3”
- [0319] /db_xref = “CDD:27713”
- [0320] 区域 839..932
- [0321] / 区域名 = “Plexins 和细胞表面受体 (PCSR) 及相关蛋白的 IPT 域”
- [0322] / 注释 = “IPT_PCSR”
- [0323] /db_xref = “CDD:27705”

[0324] 一些实施方案中,以纯化的多肽形式提供 HGF 及其生物学活性片段。纯化的多肽包括体外(例如,通过体外翻译或通过使用自动多肽合成仪)产生的多肽以及最初在细胞(例如,原核细胞、真核细胞、昆虫细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、植物细胞)中表达并随后纯化的多肽。表达纯化多肽的细胞可以包括编码内源基因的细胞、用编码多肽的表达载体转导的细胞、和经实验操作而使典型地在原细胞类型中不表达的内源基因发生表达的细胞(基因活化技术)。一些实施方案中,多肽是融合蛋白(例如,HGFR-谷胱甘肽-S-转移酶融合物),该融合蛋白可以包括蛋白酶切割位点以允许将融合蛋白切割并分离为分开的多肽。一些实施方案中,多肽可以包括利于该多肽纯化的氨基酸序列(例如,多组氨酸标签、FLAG 标签等)。从细胞或细胞表达的多肽中分离蛋白质的方法包括亲和纯化、大小排阻层析、高效液相层析和其它层析纯化方法。多肽可以是翻译后修饰的,例如糖基化的。

[0325] 纯化的 HGF(例如,纯化的人 HGF)可以从稳定转染了编码人 HGF 多肽(本文所列的 SEQ ID NO:2)的 cDNA 并如 Schwall 的美国专利 5,686,292,或 Naka 等,Journal of Biol. Chem. 267(28):20114-20119(1992)所述的分泌成熟 HGF 的哺乳动物细胞系获得。在一些实施方案中,HGF 可以是如 Lokker 等,EMBO J. 11(7):2503-2510,(1992)中所述的、缺乏促有丝分裂活性但保留高亲和受体结合活性的单链变体。

[0326] II. HGF 和 HGFR 及 HGF/HGFR 调制剂

[0327] 多种药剂可以用作 HGF/HGFR 调制剂以治疗与淋巴系统相关的病理状况,例如,诱发的淋巴水肿、淋巴管瘤、肿瘤的淋巴管生成或者肿瘤转移。该药剂可以是能够施用给个体的任何类型化合物(例如,抗体、蛋白质、肽、糖蛋白、糖肽、糖脂、多糖、寡糖、核酸、生物有机分子、肽模拟物(Peptidomimetics)、药物试剂及其代谢物、转录和翻译控制序列,等

等)。一个实施方案中, HGF/HGFR 分子是生物学的, 例如, 具有 5-300kDa 分子量的蛋白质。

[0328] 例如, HGF/HGFR 调制剂可以抑制 HGF 与 HGFR 结合或者可以阻止 HGF 介导的 NF- κ B 活化。一种典型的 HGF/HGFR 调制剂能够结合 HGFR, 例如, 缺乏促有丝分裂活性但是保留了高的受体结合亲和力的单链 HGF 变体 (见, 例如, Lokker 等, EMBO J. 11 (7):2503-2510, (1992))。与 HGF 结合的 HGF/HGFR 调制剂可以改变 HGF 构象, 阻碍 HGF 与 HGFR 结合, 或者不然的话, 降低 HGF 对 HGFR 的亲和力或阻止 HGF 与 HGFR 之间的相互作用。

[0329] HGF/HGFR 调制剂 (例如抗体) 可以以小于 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、或 10^{-10} M 的 K_d 与 HGF 或 HGFR 结合。一个实施方案中, HGF/HGFR 调制剂以比其对肝细胞生长因子样 / 巨嗜细胞刺激蛋白 (HGF1/MSP) 的亲和力高至少 5、10、20、50、100、200、500 或 1000 倍的亲和力和 HGF 结合。一个实施方案中, HGF/HGFR 调制剂以比其对巨嗜细胞刺激 1 受体 (RON) (例如, NP_002438) 的亲和力高至少 5、10、20、50、100、200、500 或 1000 倍的亲和力和 HGF 或 HGFR 结合。优选的 HGF/HGFR 调制剂特异地结合 HGF 或 HGFR, 例如, HGF 或 HGFR 的特异性抗体。

[0330] 示例性 HGF 蛋白质分子包括人 HGF (例如, NP_001010932, 如 SEQ ID NO:1 所示)、黑猩猩 HGF (例如, XP_519174, 如 SEQ ID NO:2 所示)、小鼠 HGF (例如, CAA51054, 如 SEQ ID NO:3 所示) 和大鼠 HGF (例如, 1602237A, 如 SEQ ID NO:4 所示)。也包括包含与前述 HGF 蛋白质的成熟加工后区域有至少 90、92、95、97、98、99% 同一性或完全相同的氨基酸序列 (例如, 与 SEQ ID NO:1 氨基酸 25-1390 有至少 90、92、95、97、98、99% 同一性或完全相同的氨基酸序列) 的蛋白质以及由在高度严谨条件下与编码天然 HGF 蛋白的人、黑猩猩、小鼠或大鼠基因杂交的核酸编码的蛋白质。优选地, HGF 蛋白质以其加工后的成熟形式能够提供至少一种 HGF 活性, 例如, 与 HGFR 的结合。

[0331] 两个序列之间的“同源性”或“序列同一性”的计算 (这些术语在本文中可以互换使用) 按如下进行。将这两个序列进行比对 (alignment) 以便获得最佳比较 (例如, 可以为了获得最佳比对而在第一和第二氨基酸或核酸序列之一或两者中引入缺口, 并且可以为了比较的目的而忽略非同源序列)。最佳比对按照使用 GCG 软件包中的 GAP 程序以及 Blossum 62 评分矩阵和 12 的缺口罚分、4 的缺口延伸罚分及 5 的移框缺口罚分 (frameshift gap penalty) 时得到的最佳得分来确定。然后, 比较位于相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当占据第一序列中某一位置的氨基酸或核苷酸与第二序列中相应位置处的氨基酸或核苷酸相同时, 则这些分子在此位置是相同的 (在本文中, 氨基酸或核苷酸“同一性”等价于氨基酸或核苷酸“同源性”)。两个序列之间的同一性百分数是这两个序列共享的相同位置的数目的函数。

[0332] 本文中, 术语“在高度严谨杂交条件下杂交”描述用于杂交和洗涤的条件。关于实施杂交反应的教导可以见于 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6. 3. 1-6. 3. 6, 该文献并入作为参考。在该文献中描述了水相的和非水相的方法, 这两种方法均可以使用。高度严谨杂交条件包括在 $6\times$ SSC 中大约 45°C 杂交, 之后在 $0.2\times$ SSC、0.1% SDS 中 65°C 下或者在基本上相似的条件下进行一次或两次洗涤。

[0333] 示例性 HGF/HGFR 调制剂包括与 HGF 或 HGFR 结合的抗体、与细胞表面 HGFR 竞争结合 HGF 的 HGFR 可溶形式。HGFR 可溶形式的一个例子是包括 HGFR 细胞外域的至少一部分 (例如, HGFR 的可溶性 HGF 结合片段) 的 Fc 融合蛋白, 称作 HGFR-Fc (见例如, Mark 等, Journal

of Biol. Chem., 267(36):26166-26171(1992))。也可以使用HGFR的其它可溶性形式,例如,不包括Fc域的形式。抗体HGF/HGFR调制剂在以下进一步描述。其它类型的HGF/HGFR调制剂,例如,小分子、核酸或基于核酸的适体(apptamer)和肽,可以通过筛选,例如,Jhaveri等Nat. Biotechnol. 18:1293及美国专利5,223,409中描述的方法,来分离。用于确定一种药剂是否与HGF或HGFR结合以及用于确定一种药剂是否调制HGF/HGFR相互作用的示例性分析试验可见于例如Schwall等的美国专利6,468,529。

[0334] HGFR蛋白质的一个示例性可溶性形式包括HGFR蛋白中与HGF结合的区域,例如,细胞外域,例如,细胞外区域中的域。该区域可以在其N或C端与另一氨基酸序列,例如Fc域,物理性地结合,例如融合。来自HGFR的该区域可以通过接头与该异源氨基酸序列相间隔。Michieli等(2005),Cancer Cell,6:61-73,描述了示例性的HGFR融合蛋白。

[0335] A. 抗体

[0336] 示例性HGF/HGFR调制剂包括与HGF和/或HGFR结合的抗体。一个实施方案中,该抗体抑制HGF与HGFR之间的相互作用,例如,物理性地阻断该相互作用、降低HGF和/或HGFR对其配对物的亲和力、使HGF复合物瓦解或者丧失稳定性、隔离HGF或HGFR、或靶向HGF或HGFR以便实现降解。一个实施方案中,抗体可以与HGF或HGFR在如下表位处结合,所述表位包括一个或多个参与HGF/HGFR结合界面的氨基酸残基。这些氨基酸残基可以例如通过丙氨酸扫描来鉴定。另一实施方案中,抗体可以与不参与HGF/HGFR结合的残基结合。例如,抗体可以改变HGF或HGFR的构象,并由此降低结合亲和力,或者抗体可以对HGF/HGFR结合造成空间位阻。抗体可以与HGF的 α 亚基或 β 亚基结合。

[0337] 除了与HGF和/或HGFR结合的抗体外,也可以使用其它抗体。一个实施方案中,抗体可以阻止对HGF/HGFR介导的事件或活性的激活。例如,可以针对被HGF上调的 $\alpha 9$ 整合蛋白使用抗体。例如,某些抗 $\alpha 9$ 抗体可以抑制HGF诱导的细胞迁移。

[0338] 本文中,术语“抗体”指包括至少一个免疫球蛋白可变区,例如,提供免疫球蛋白可变域的氨基酸序列或免疫球蛋白可变域序列,的蛋白质。例如,抗体可以包括重链(H)可变区(本文中缩写为VH)和轻链(L)可变区(本文中缩写为VL)。在另一例子中,抗体包括两个重链(H)可变区和两个轻链(L)可变区。术语“抗体”包括抗体的抗原结合片段(例如,单链抗体、Fab片段、F(ab')₂片段、Fd片段、Fv片段和dAb片段)以及完整抗体,例如,完整的和/或全长的IgA、IgG(如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgE、IgD、IgM型(及其亚型)免疫球蛋白。免疫球蛋白的轻链可以是 κ 或 λ 型的。一个实施方案中,抗体是糖基化的。抗体可以具备用于抗体依赖性细胞毒性和/或补体介导的细胞毒性的功能,或者可以不具备用于以上活性之一或两者的功能。

[0339] VH和VL区可以进一步细分出称作“互补决定区”(“CDR”)的超变区,在这些超变区之间散布着较为保守的称作“框架区”(FR)的区域。FR和CDR的范围已经有精确定义(见例如,Kabat,E.A.等(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,US Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242;和Chothia,C.等(1987)J.Mol.Biol.196:901-917)。本文中使用Kabat定义。每一个VH和VL典型地都由自氨基端至羧基端按如下顺序排列的3个CDR和4个FR组成:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。

[0340] “免疫球蛋白域”指来自免疫球蛋白分子可变域或恒定域的域(domain)。免疫

球蛋白域典型地含有由大约 7 个 β 链以及保守的二硫键形成的两个 β 片层（见，例如，A. F. Williams 和 A. N. Barclay (1988) Ann. Rev. Immunol. 6:381-405）。“免疫球蛋白可变域序列”指可以形成足以安置构象适于抗原结合的 CDR 序列的结构的氨基酸序列。例如，该序列可以包括天然存在的可变区的全部或部分氨基酸序列。例如，该序列可以省去一个或两个或更多个 N 端或 C 端氨基酸、内部氨基酸，可以包括一个或多个插入或额外的末端氨基酸，或者可以包括其它改变。一个实施方案中，包括免疫球蛋白可变域序列的多肽可以与另一免疫球蛋白可变域序列结合以形成靶结合结构（或“抗原结合位点”，例如，与 HGF 或 HGFR 相互作用的结构。

[0341] 抗体的 VH 或 VL 链可以进一步包括重链或轻链恒定区的全部或部分，由此分别形成重链或轻链免疫球蛋白链。一个实施方案中，抗体是两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链组成的四聚体。该免疫球蛋白重链和轻链可以通过二硫键连接。重链恒定区典型地包括三个恒定域，CH1、CH2 和 CH3。轻链恒定区典型地包括 CL 域。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区典型地介导抗体与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞（例如，效应细胞）和经典补系统的第一成分（C1q），的结合。

[0342] 抗体的一个或多个区域可以是人的，有效的人的，或人源化的。例如，一个或多个可变区可以是人的或有效的人的。例如，一个或多个 CDR，例如，HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 和 LC CDR3 可以是人的。每一个轻链 CDR 都可以是人的。HC CDR3 可以是人的。一个或多个框架区可以是人的，例如 HC 或 LC 的 FR1、FR2、FR3 和 FR4。一个实施方案中，所有的框架区都是人的，例如，来源于人体细胞，例如产生免疫球蛋白的造血细胞或非造血细胞。一个实施方案中，所述人序列是生殖系序列，例如，由生殖系核酸编码的序列。一个或多个恒定区可以是人的，有效的人的、或人源化的。另一实施方案中，至少 70、75、80、85、90、92、95 或 98% 的框架区（例如，FR1、FR2 和 FR3 集体，或者 FR1、FR2、FR3 和 FR4 集体）或者整个抗体可以是人的、有效的人的、或人源化的。例如，FR1、FR2 和 FR3 集体可以与人生殖系区段编码的人序列有至少 70、75、80、85、90、92、95、98 或 99% 的同一性，或者完全相同。

[0343] “有效的人的 (effectively human)”免疫球蛋白可变区是包括足够数量的人框架氨基酸位置以致于在正常人体内不引起免疫反应的免疫球蛋白可变区。“有效的人的”抗体是包括足够数量的人氨基酸位置以致于在正常人体内不引起免疫反应的抗体。

[0344] “人源化的”免疫球蛋白可变区是经修饰的免疫球蛋白可变区，所述修饰形式与未修饰的形式相比在人体内引起较少的免疫反应，例如，经修饰以包括足够数量的人框架氨基酸位置以致于在正常人体内不引起免疫反应的免疫球蛋白可变区。“人源化”免疫球蛋白的描述包括例如，美国专利 6,407,213 和 5,693,762。一些情况下，人源化免疫球蛋白可以在一个或多个框架氨基酸位置包括非人氨基酸。

[0345] 与 HGF 或 HGFR 结合的抗体可以通过多种方法，包括免疫（如使用动物）或者体外方法如噬菌体展示来产生。HGF 或 HGFR 的全部或部分可以作为免疫原使用或作为靶标用于筛选。例如，HGF 或其片段或 HGFR 或其片段可以用作免疫原。一个实施方案中，经免疫的动物含有具有天然的、人的、或部分人的免疫球蛋白基因座的免疫球蛋白生产细胞。一个实施方案中，该非人动物包括至少一部分人免疫球蛋白基因。例如，可以工程化制备具有人 Ig 基因座的大片段的、在小鼠抗体生产方面具有缺陷的小鼠。因此，通过使用杂交瘤

技术,可以产生并选择具有期望特异性的至少部分人的抗原特异性单克隆抗体。见,例如,XENOMOUSE™, Green 等 (1994) Nat. Gen. 7:13-21; US 2003-0070185; 美国专利 5,789,650; 和 WO 96/34096。

[0346] 也可以,例如,在啮齿动物中,制备 HGF 和 HGFR 的非抗体。该非人抗体可以是人源化的,例如,按 EP 239400; 美国专利 6,602,503; 5,693,761; 和 6,407,213 所述人源化的、去免疫化的 (deimmunized)、或者否则经修饰以致于是有效地人的。

[0347] EP 239 400 (Winter 等) 描述了通过将物种的互补决定区 (在给定的可变区中) 替代为另一个物种的互补决定区 (CDR) 来改变抗体。典型地,通过使用重组核酸技术产生编码经替代的期望抗体的序列,将非人 (如,鼠源的) 抗体的 CDR 代入入人抗体的相应区域。可以加入期望同种型 (通常,对于 CH 是 $\gamma 1$, 对于 CL 是 κ) 的人恒定区基因区段,并且该人源化的重链和轻链基因可以在哺乳动物细胞中共表达以产生可溶性的人源化抗体。也可以使用其它抗体人源化方法。例如,可以利用其它方法来说明抗体的三维结构、三维结构上邻近结合决定簇的框架位置、以及免疫原性肽序列。见例如,WO90/07861; 美国专利 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; 和 5,530,101; Tempest 等 (1991) Biotechnology 9:266-271 和美国专利 6,407,213。

[0348] 与 HGF 和 HGFR 结合的完全人单克隆抗体可以例如,使用体外接触过抗原的人脾细胞,如 Boerner 等 (1991) J. Immunol. 147:86-95 所述制备。它们可以通过抗体谱克隆,如 Persson 等 (1991) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:2432-2436 或 Huang 及 Stollar (1991) J. Immunol. Methods 141:227-236; 以及美国专利 5,798,230 所述制备。也可以使用大的未免疫的人噬菌体展示文库,通过标准噬菌体技术,分离能够发展成为人类药物的高亲和力抗体 (见例如, Hoogenboom 等 (1998) Immunotechnology 4:1-20; Hoogenboom 等 (2000) Immunol. Today 2:371-378; 和 US 2003-0232333)。

[0349] 本文描述的抗体和其它蛋白质可以在原核和真核细胞中制备。一个实施方案中,抗体 (例如, scFv) 在酵母细胞例如毕赤酵母 (Pichia) (见例如, Powers 等 (2001) J. Immunol. Methods 251:123-35)、汉逊酵母 (Hansenula) 或酿酒酵母 (Saccharomyces) 中表达。

[0350] 抗体,尤其是全长抗体,如 IgG,可以在哺乳动物细胞中制备。用于重组表达的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞) (包括二氢叶酸还原酶阴性 CHO 细胞,见 Urlaub 和 Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 与 DHFR 选择标记一起使用,例如,参见 Kaufman 和 Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621)、淋巴细胞系如 NS0 骨髓细胞和 SP2 细胞、COS 细胞、K562、及来自转基因动物如转基因哺乳动物的细胞。例如,所述细胞可以是哺乳动物上皮细胞。

[0351] 除了编码免疫球蛋白域的核酸序列外,重组表达载体可以带有其它核酸序列,例如,调节载体在宿主细胞中的复制的序列 (例如,复制起点) 和选择标记基因。选择标记基因将有利于选出其中已经导入了载体的宿主细胞 (见例如,美国专利 4,399,216; 4,634,665; 和 5,179,017)。示例性选择标记基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因 (在 dhfr 宿主细胞中配合氨甲蝶呤选择 / 扩增一起使用) 和 neo 基因 (用于 G418 选择)。

[0352] 在一个重组表达抗体 (例如,全长抗体或其抗原结合部分) 的示例性系统中,通过磷酸钙介导的转导,将既编码抗体重链又编码抗体轻链的重组表达载体引入 dhfr-CHO 细

胞中。在该重组表达载体中,抗体重链和轻链基因均与增强子/启动子调节元件(例如,来源于SV40、CMV、腺病毒等,如CMV增强子/AdMLP启动子调节元件或者SV40增强子/AdMLP启动子调节元件)可操作连接以便驱动这些基因实现高水平转录。该重组表达载体还带有DHFR基因,该基因使得可以通过氨甲蝶呤选择/扩增来选出已经转染了该载体的CHO细胞。培养所选择的转化宿主细胞以允许所述抗体重链和轻链的表达,并从培养基中回收完整抗体。可以使用标准分子生物学技术制备该重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化体、培养宿主细胞和从培养基回收抗体。例如,一些抗体可以通过使用蛋白A和蛋白G进行亲和层析以分离。

[0353] 抗体(和Fc融合物)也可以包括修饰,例如,改变Fc功能的修饰,例如,以降低或除去与Fc受体或与C1q或与两者的相互作用。例如,可以对人IgG1恒定区的一个或多个残基,例如残基234-237(例如,按照美国专利5,648,260中的编号)中的一个或多个进行突变。其它示例性修饰包括美国专利5,648,260中描述的那些。

[0354] 对于包括Fc域的一些蛋白质,可以设计抗体/蛋白质生产系统以合成其中Fc区被糖基化的抗体或其它蛋白质。例如,IgG分子的Fc域在CH2域中于天冬酰胺297位糖基化。该Fc域也可以包括其它的真核翻译后修饰。在其它情况下,该蛋白可以以未糖基化的形式产生。

[0355] 抗体和其它蛋白质也可以通过转基因动物制备。例如,美国专利5,849,992描述了在转基因哺乳动物的乳腺中表达抗体的方法。构建包括奶特异性启动子和编码目的抗体(例如,本文所述抗体)及分泌信号序列的核酸序列的转基因。由该转基因哺乳动物的雌性产生的奶将包括分泌于其中的目的蛋白质,例如抗体或Fc融合蛋白。该蛋白质可以从奶中纯化出来,或者对于一些应用而言,直接使用。

[0356] 在有关抗体的上下文中描述到的方法可以经过修改而适用于其它蛋白质,例如,Fc融合蛋白和可溶性受体片段。

[0357] B. HGF 变体

[0358] 一些实施方案中,HGF蛋白质可以是能够抵抗能够体内将HGF转化成其双链形式的酶的蛋白水解切割作用的HGF变体。优选通过在能够将HGF转化成其双链形式的酶所识别的区域中定点诱变,使单链形式的所述变体稳定化。这些HGF变体保留相应野生型HGF的基本上全部的受体结合亲和力,但不能激活HGFR。在一个实施方案中,相对于相应的野生型HGF,HGF变体可能已提高了受体结合亲和力,但不能激活HGFR。这些化合物是相应野生型HGF的竞争性拮抗剂,当以足够浓度存在时,其能抑制野生型HGF与HGFR的结合。见例如,Lokker等EMBO J. 11(7):2503-2510(1992)和Godowski等的美国专利5,316,921。因此,这些化合物可以用作HGF/HGFR拮抗剂。

[0359] C. 肽

[0360] 一些实施方案中,HGF/HGFR调制剂可以是能够独立地与靶分子结合但不激活靶分子(例如,HGFR)的、具有32个或更少个氨基酸的肽。一些这种肽可以包括一个或多个二硫键。称作“线性肽”的其它肽无半胱氨酸。一个实施方案中,所述肽是人工的,即,不存在于自然界中或者不存在于一个或多个目的基因组,如人基因组编码的蛋白质中。合成的肽可以在溶液中几乎不具有或完全不具有结构(无结构的)、或者具有异质结构(例如,可变构象或松散结构的)、或者具有独特的天然结构(例如,协同折叠的)。一些合成肽当与靶

分子结合时将采取特定的结构。一些示例性合成肽是具有至少一个二硫键和例如大约 4-12 个非半胱氨酸残基的环的所谓的“环肽”。示例性肽具有小于 28、24、20 或 18 个氨基酸的长度。

[0361] 可以通过各种方法鉴定独立地与 HGFR 结合的肽序列。例如，它们可以从展示文库或任何肽阵列中选择。鉴定之后，可以以合成方式或以重组方式，产生这些肽。可以将这些序列并入（例如，插入、添加、或附着）到更长的序列中。

[0362] Kay 等 Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual (Academic Press, Inc., San Diego 1996) 和美国专利 5, 223, 409 中描述的技术可用于制备对应于所选择的亲本模板的潜在结合分子文库。可以根据该技术制备肽展示文库，并进行筛选以选出与 HGFR 结合并抑制 HGFR 的肽。

[0363] 此外，对噬菌体文库或从噬菌体文库选出的群体可以进行反向选择，例如，通过用缺乏 SEMA (semaphorin) 域或 PSI (plexin/semaphoring/ 整联蛋白) 域（两者均有助于 HGF 结合）的 HGFR 结合域进行反向选择。该程序可以用于剔除不与 HGF 结合位点发生接触的肽。

[0364] 也可以使用替代性骨架，例如，类肽 (peptoid) 骨架，合成肽，以便例如产生具有增加的蛋白酶抗性的化合物。尤其是，可以使用该方法制备与 HGFR 结合并抑制 HGFR 活化但不被例如血清蛋白酶切割的化合物。

[0365] 抑制 HGFR 活化的多肽可以与聚合物连接（例如，缀合），所述聚合物如基本上无抗原性的聚合物，例如聚环氧烷或聚环氧乙烷。适宜的聚合物在重量上将有相当大的变化。可以使用平均分子量在大约 200 至大约 35, 000（或者大约 1, 000 至大约 15, 000，以及 2, 000 至大约 12, 500）之间的聚合物。一个多肽上可以附着多个聚合物部分，例如，至少两个、三个或四个这样的部分，例如，具有大约 2, 000 至 7, 000 道尔顿平均分子量的聚合物部分。

[0366] 例如，多肽可以与水溶性聚合物，例如亲水性聚乙烯聚合物，例如聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮，缀合。此类聚合物的非限制性例子包括聚环氧烷均聚物，如聚乙二醇 (PEG) 或聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇类、其共聚物及其嵌段共聚物，条件是嵌段共聚物的水溶性得以保持。其它有用的聚合物包括聚氧化烯类，例如聚氧乙烯、聚氧丙烯、及聚氧乙烯和聚氧丙烯的嵌段共聚物 (Pluronic)；聚甲基丙烯酸酯；卡波姆 (carbomer)；含糖单体 D- 甘露糖、D- 和 L- 半乳糖、岩藻糖、果糖、D- 木糖、L- 阿拉伯糖、D- 葡萄糖酸、唾液酸、D- 半乳糖醛酸、D- 甘露糖醛酸（例如，聚甘露糖醛酸、或海藻酸）、D- 葡萄糖胺、D- 半乳糖胺、D- 葡萄糖和神经氨酸的分支的或不分支的多糖，包括同多糖和杂多糖例如乳糖、支链淀粉、淀粉、羟基乙基淀粉、直链淀粉、硫酸葡聚糖、葡聚糖、糊精、糖原，和酸性粘多糖例如透明质酸的多糖亚基；糖醇例如聚山梨糖醇和聚甘露糖醇的聚合物；肝素或类肝素 (heparan)。

[0367] 也可以在同一聚合物上附着其它化合物，例如，细胞毒素、标签、或其它靶向剂或无关试剂。单活化的、烷氧基封端的聚环氧烷 (PAO)，例如，单甲氧基封端的聚乙二醇 (mPEG)；C₁₋₄ 烷基封端的聚合物；和双活化的聚环氧乙烷（二 / 多元醇类 (glycols)）可以用于交联。见例如 U. S. 5, 951, 974。

[0368] D. 核酸拮抗剂

[0369] 在某些实施方案中，使用核酸拮抗剂降低编码 HGF、HGFR、整联蛋白 $\alpha 9$ 或司腺钙蛋白 1 的内源性基因的表达。一个实施方案中，核酸拮抗剂是靶向编码 HGF 或 HGFR 的 mRNA

的 siRNA。也可以使用其它类型的核酸拮抗剂,例如,dsRNA、核酶、三链 (triple-helix) 形成物、或反义核酸。一些实施方案中,核酸拮抗剂可以指向 HGFR 活化的下游效应物靶标(例如,人 $\alpha 9$ 整联蛋白,其的一个示例性序列是 Genbank No. NM_002207)。

[0370] siRNA 是任选地包括突出端的小双链 RNA(ds RNA)。例如,siRNA 的双链区长大约 18 至 25 个核苷酸,例如,大约 19、20、21、22、23、或 24 个核苷酸。典型地,siRNA 序列与靶 mRNA 完全互补。dsRNA 和 siRNA 尤其可以用于哺乳动物细胞(例如人细胞)中使基因表达沉默。siRNA 也包括具有 29 个碱基对的茎和 2 个核苷酸的 3' 突出端的短发夹 RNA(shRNA)。见例如,Clemens 等 (2000)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6499-6503;Billy 等 (2001)Proc. Natl. Sci. USA 98:14428-14433;Elbashir 等, (2001)Nature 411:494-8;Yang 等 (2002)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:9942-9947;Siolas 等 (2005)Nat. Biotechnol. 23(2):227-31;20040086884;U. S. 20030166282;20030143204;20040038278;和 20030224432。

[0371] 反义试剂可以包括例如大约 8 至大约 80 个核苷碱基 (nucleobase)(即,大约 8 至大约 80 个核苷酸),例如,大约 8 至大约 50 个核苷碱基,或大约 12 至大约 30 个核苷碱基。反义化合物包括核酶、外部引导序列 (external guide sequence, EGS) 寡核苷酸 (oligozyme)、以及与靶核酸杂交并调制其表达的其它短催化性 RNA 或催化寡核苷酸。反义化合物可以包括与靶基因中的序列互补的具有至少 8 个连续核苷碱基的链。寡核苷酸不需要与其能够特异性杂交的靶核酸序列 100% 互补。当寡核苷酸与靶的结合干扰靶分子的正常功能从而造成效用丧失,并且在期望发生特异结合的条件下,即,对于体内试验或治疗处理而言在生理条件下,或对于体外试验而言在实施该试验的条件下,该寡核苷酸与靶之间有足够程度的互补性以避免该寡核苷酸与非靶序列的非特异性结合时,则该寡核苷酸是能够特异杂交的。

[0372] 反义寡核苷酸与 mRNA(例如,编码 HGF 或 HGFR 的 mRNA) 杂交能够干扰该 mRNA 的一种或多种正常功能。待被干扰的 mRNA 功能包括所有的关键功能,例如,该 RNA 向蛋白质翻译位点的移位、自该 RNA 向蛋白质的翻译、该 RNA 的拼接以产生一种或多种 mRNA、以及该 RNA 可能从事的催化活性。该 RNA 与特异蛋白质(一种或多种)的结合也可以通过反义寡核苷酸与该 RNA 的杂交而被干扰。

[0373] 示例性反义化合物包括与靶核酸,例如编码 HGF 或 HGFR 的 mRNA,特异杂交的 DNA 或 RNA 序列。互补区域可以长大约 8 至大约 80 个核苷碱基。所述化合物可以包括一个或多个修饰的核苷碱基。修饰的核苷碱基可以包括,例如,5- 取代的嘧啶,例如,5- 碘尿嘧啶、5- 碘胞嘧啶,和 C5- 丙炔基嘧啶,例如, C5- 丙炔基胞嘧啶和 C5- 丙炔基尿嘧啶。其它适宜的修饰核苷碱基包括 N^4 -(C_1 - C_{12}) 烷基氨基胞嘧啶和 N^4 , N^4 -(C_1 - C_{12}) 二烷基氨基胞嘧啶。修饰的核苷碱基也可以包括 7- 取代的 -8- 氮杂 -7- 去氮杂嘌呤和 7- 取代的 -7- 去氮杂嘌呤,例如,7- 碘 -7- 去氮杂嘌呤、7- 氰基 -7- 去氮杂嘌呤、7- 氨基羰基 -7- 去氮杂嘌呤。这些核苷碱基的实例包括 6- 氨基 -7- 碘 -7- 去氮杂嘌呤、6- 氨基 -7- 氰基 -7- 去氮杂嘌呤、6- 氨基 -7- 氨基羰基 -7- 去氮杂嘌呤、2- 氨基 -6- 羟基 -7- 碘 -7- 去氮杂嘌呤、2- 氨基 -6- 羟基 -7- 氰基 -7- 去氮杂嘌呤、2- 氨基 -6- 羟基 -7- 氨基羰基 -7- 去氮杂嘌呤。此外, N^6 -(C_1 - C_{12}) 烷基氨基嘌呤和 N^6 , N^6 -(C_1 - C_{12}) 二烷基氨基嘌呤,包括 N^6 - 甲基氨基腺嘌呤和 N^6 , N^6 - 二甲基氨基腺嘌呤,也是适宜的修饰的核苷碱基。类似地,其它 6- 取代的嘌呤,包括例如,6- 硫代鸟嘌呤也可以组成适宜的修饰的核苷碱基。其它适宜的核苷碱基包括 2- 硫代

尿嘧啶、8- 溴腺嘌呤、8- 溴鸟嘌呤、2- 氟腺嘌呤、和 2- 氟鸟嘌呤。任何上述修饰的核苷碱基的衍生物也是适宜的。任何前述化合物的取代基可以包括 C_1 - C_{30} 烷基、 C_2 - C_{30} 烯基、 C_2 - C_{30} 炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、卤代基、氨基、酰胺基、硝基、巯基、磺酰基、羧基、烷氧基、烷基羰基、烷氧基羰基等。

[0374] 也可以获得其它核酸试剂的描述。见例如,美国专利 4,987,071;5,116,742 和 5,093,246;Woolf 等 (1992)Proc Natl Acad Sci USA;Antisense RNA and DNA, D. A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988);89:7305-9;Haselhoff 和 Gerlach(1988)Nature 334:585-59;Helene, C. (1991)Anticancer Drug Des. 6:569-84;Helene(1992)Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:27-36; 和 Maher(1992)Bioassays 14:807-15。

[0375] E. 人工转录因子

[0376] 也可以使用人工转录因子调节 HGF、HGFR、整联蛋白 $\alpha 9$ 或司腺钙蛋白 1 的表达。可以设计或从文库中选择该人工转录因子,以便例如其能够结合编码 HGF 或 HGFR 的内源基因中的序列,例如,调节区中的序列,例如启动子。例如,可以通过体外(例如,使用噬菌体展示,美国专利 6,534,261)或体内选择,或者通过基于识别密码进行设计(见例如,WO 00/42219 和美国专利 6,511,808),制备人工转录因子。其中,对于构建由各种锌指域组成的文库的方法,见例如,Rebar 等 (1996)Methods Enzymol 267:129;Greisman 和 Pabo(1997)Science 275:657;Isalan 等 (2001)Nat. Biotechnol 19:656; 和 Wu 等 (1995)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:344。

[0377] 任选地,人工转录因子可以和转录调节域,例如激活域融合以激活转录,或者与阻遏域融合以阻遏转录。尤其是,可以使用阻遏域降低编码 HGF 或 HGFR 的内源基因的表达。人工转录因子本身可以由递送至细胞的外源核酸编码,或者可以将该蛋白质本身递送至细胞(见例如,美国专利 6,534,261)。包括编码该人工转录因子的序列的异源核酸可以可操作地与诱导型启动子连接,例如,以允许良好地控制该人工转录因子在细胞,例如内皮细胞中的水平。

[0378] F. 药物组合物

[0379] HGF/HGFR 调制剂(例如,抗体或可溶性 HGFR 蛋白质,例如与 Fc 融合的 HGFR 细胞外区域)可以配制成药物组合物,例如,用于施用给患有与淋巴系统相关的病理情况(例如,本文描述的疾病,如淋巴水肿、淋巴丝虫病、淋巴管瘤、肿瘤的淋巴管生成、或肿瘤转移)的个体。典型地,药物组合物包括药物可接受载体。本文中,“药物可接受载体”包括生理相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。该组合物可以包括药物可接受盐,例如,酸加成盐或碱加成盐(见例如 Berge, S. M. 等 (1977)J. Pharm. Sci. 66:1-19)。

[0380] 可以根据标准方法配制 HGF/HGFR 调制剂。药物的配制是成熟的现有技术,而且关于其的描述可见例如, Gennaro(编)Remington:The Science and practice of Pharmacy, 第 20 版, Lippincott, Williams & Wilkins(2000) (ISBN:0683306472);Ansel 等 Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 第 7 版, Lippincott Williams & Wilkins Publishers(1999) (ISBN:0683305727); 和 Kibbe(编), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 第 3 版 (2000)

(ISBN:091733096X)。

[0381] 一个实施方案中,HGF/HGFR 调制剂(例如抗体或 HGFR-Fc)可以用赋形剂物质,例如,氯化钠、磷酸氢二钠七水合物、磷酸二氢钠和稳定剂进行配制。其可以在例如缓冲溶液中以适宜浓度提供,并可以在 2-8℃贮存。

[0382] 所述药物组合物可以是各种形式。这些包括例如,液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液剂(例如,可注射和可输注的溶液)、分散剂、悬浮剂、片剂、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。优选的形式可能取决于意欲实行的施用模式和治疗应用。典型地,用于本文所述药剂的组合物为可注射或可输注的溶液形式。

[0383] 此类组合物可以通过肠胃外模式(例如,静脉内、皮下、腹膜内或肌内注射)施用。术语“胃肠外施用”以及“以胃肠外方式施用”在本文中指非肠道和局部施用的施用方式,通常通过注射来实现,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、椎管内(intraspinal)、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0384] 组合物可以配制成溶液、微乳剂、分散剂、脂质体或其它适于高浓度稳定储存的有序结构。无菌注射溶液可以通过将所需量的本文所述药剂按需要与上述一种成分或多种成分的组合一起溶入适宜的溶剂中然后过滤灭菌以制备。一般地,分散剂通过将本文所述药剂混入含有基本分散介质以及来自上述成分的所需其它成分的无菌赋形剂(vehicle)中而制备。对于用于制备无菌注射溶液的无菌粉末,优选的制备方法是真空干燥和冻干以使本文所述药剂加上任何额外的期望成分从之前的无菌过滤溶液形成粉末。溶液的适当流动性可以例如通过使用包衣材料如卵磷脂、对于分散剂的情况通过保持所需的颗粒大小以及通过使用表面活性剂来维持。可以通过在可注射组合物中包括延迟吸收的药剂,例如,单硬脂酸盐和明胶,延长该组合物的吸收。

[0385] 在某些实施方案中,HGF/HGFR 调制剂可以用保护该化合物防止其快速释放的载体制备,例如控释制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯类(polyorthoesters)和聚乳酸。制备此类制剂的方法许多是取得专利的或者是公知的。见例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson 编, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0386] 可以修饰 HGF/HGFR 调制剂(例如抗体或可溶性 HGFR 蛋白),例如用使其在循环系统如血液、血清或其它组织中的稳定性和/或保持力至少提高 1.5、2、5、10 或 50 倍的组成部分(moiety)进行所述修饰。

[0387] 例如,HGF/HGFR 调制剂(例如抗体或可溶性 HGFR 蛋白)可以结合聚合物,例如,基本上无抗原性的聚合物,例如聚环氧烷或聚环氧乙烷。适宜的聚合物将在重量上有相当大的变化。可以使用具有大约 200 至大约 35,000 道尔顿(或大约 1,000 至大约 15,000,以及 2,000 至大约 12,500)的平均分子量的聚合物。

[0388] 例如,HGF/HGFR 调制剂可以和水溶性聚合物,例如亲水性聚乙烯聚合物,例如聚乙烯醇或聚乙烯吡咯烷酮缀合。此类聚合物的非限制性例子包括聚环氧烷均聚物,如聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇类、其共聚物及其嵌段共聚物,条件是该嵌段共聚物的水溶性得以保持。其它有用的聚合物包括聚氧化烯类,例如聚氧乙烯、聚氧丙烯、及聚

氧乙烯和聚氧丙烯的嵌段共聚物 (Pluronics) ; 聚甲基丙烯酸酯 ; 卡波姆 (carbomer) ; 和分支的或不分支的多糖。

[0389] 当 HGF/HGFR 调制剂 (例如, 抗体或可溶性 HGFR 蛋白) 与第二药剂联合使用时, 这两个药剂可以单独配制成药剂或一起配制成药剂。例如, 可以将分开的药物组合物混和, 例如在临施用之前混和, 并一起施用, 或者可以单独地分开施用, 例如, 在相同或不同的时间施用。

[0390] 淋巴管系统在组织液的体内稳态方面起着关键作用, 该稳态影响着多种病理情况并受到多种病理情况的影响, 所述病理情况如癌细胞转移; 后天获得性淋巴水肿, 例如, 手术、放疗和感染诱导的淋巴水肿; 皮肤疾病情况, 例如, 由衰老或过度暴露于紫外线引起的表皮松解。此外, 肿瘤转移主要通过淋巴系统进行, 淋巴结的牵连程度是疾病严重性的一个关键预后因素。动物实验中已经将原发性肿瘤中的淋巴管发生和肿瘤内淋巴管的数量与肿瘤转移联系起来, 例如对于乳腺癌的情况即是这样 (Skobe 等, *Nature Medicine* 7(2):192-198 (2001))。肿瘤内淋巴管结构可以在许多类型的肿瘤, 例如乳腺癌、结肠癌、肺癌、甲状腺癌、胃癌、鳞状细胞癌、间皮瘤、骨肉瘤和成神经细胞瘤 (neuroblastomas) 的转移中起着重要作用。

[0391] G. 施用

[0392] HGF/HGFR 调制剂 (例如抗体或可溶性 HGFR 蛋白) 或其它药剂可以通过各种方法施用给个体, 例如人类个体。对于许多应用, 施用途径可以是下列途径中的一种: 静脉注射或输注 (IV)、皮下注射 (SC)、腹膜内 (IP) 或肌肉注射。HGF/HGFR 调制剂可以以固定剂量或根据个体的体重调整后的剂量 (例如, mg/kg 剂量) 施用。

[0393] 也可以对剂量进行选择以便降低或避免抗 HGF/HGFR 调制剂的抗体产生。

[0394] 也可以根据每一不同情况, 例如, 通过监测个体, 例如使用 X 线断层成像、淋巴管造影术, 以及与特定疾病有关的标准参数, 例如用于评价淋巴及淋巴系统相关疾病的标准, 来调整施用途径和 / 或方式。

[0395] 可以调整剂量方案以提供期望的反应, 例如, 治疗反应或联合疗效。一般地, 可以使用 HGF/HGFR 调制剂 (例如抗体) (及任选地第二药剂) 的任何制剂的组合 (以分开的制剂或制备在一起的制剂的形式) 来给个体提供生物可利用量的该药剂。例如, 可以施用 1mg/kg-100mg/kg、0.5-20mg/kg 或 1-10mg/kg 的剂量。

[0396] 本文中, 剂量单位形式或“固定剂量”指适宜作为单位剂量 (unitary dosage) 用于待治疗个体的物理分离的单位; 每个单位含有经计算可以产生期望疗效的预定量的活性化合物以及必需的药物载体和任选地其它药剂。

[0397] HGF/HGFR 调制剂可以在淋巴或淋巴系统相关病症的症状或表现发作之后大约 10 分钟至大约 48 小时, 更优选地, 大约 10 分钟至大约 24 小时, 更优选地 3 个小时以内, 施用至少一次。例如, 可以将该药剂施用给患有淋巴水肿或有罹患该病风险的患者。可以单次或多次给予给药。备选地, 或者进一步地, 可以通过连续输注施用 HGF/HGFR 调制剂。该处理可以持续数天、数周、数月或甚至数年, 以便充分地调制淋巴或淋巴系统相关病症中的淋巴管发生。

[0398] HGF/HGFR 调制剂可以每周施用一次, 持续大约 1 至 10 周, 优选地 2 至 8 周, 更优选地大约 3 至 7 周, 甚至更优选地大约 4、5 或 6 周。本领域技术人员将明了某些因素可能影

响为了有效治疗个体所需的剂量和给药时间,这些因素包括但不限于,疾病或病症的严重程度、先前的治疗、个体的一般健康情况和/或年龄、以及存在的其它疾病。此外,用治疗有效量的化合物治疗个体可以包括单次治疗,或者优选地可以包括一系列的治疗。

[0399] 如果个体有罹患本文所述病症(例如丝虫病)或其它淋巴系统相关病症的风险,则可以在该病症发作之前作为预防措施施用 HGF/HGFR 调制剂。该预防性治疗的持续时间可以是一次给予 HGF/HGFR 调制剂,或者该治疗可以持续(例如,多次给药)进行,例如对于有罹患本文所述病症的个体而言,可以用 HGF/HGFR 调制剂治疗数天、数周、数月或甚至数年以预防所述损害的发生。

[0400] 药物组合物可以包括“治疗有效量”的本文所述药剂。该有效量可以基于所施用的药剂的效果、或者在使用一种以上药剂时这些药剂的联合效果来决定。一种药剂的治疗有效量也可以因多种因素例如疾病状况、个体的年龄、性别和体重、以及该化合物在个体中引起期望反应(例如,造成至少一个疾病参数或者至少一个疾病症状好转)的能力而变化。治疗有效量也是组合物的治疗有益效果超过其任何毒性或有害效果时的用量。

[0401] HGF/HGFR 拮抗剂可以用于治疗癌症。癌性疾病的实例包括但不限于实体瘤、软组织肿瘤和癌转移病灶(metastatic lesion)。实体瘤的例子包括恶性肿瘤,例如,各种器官系统的肉瘤、腺癌和癌(carcinoma),例如,侵袭肺、乳腺、淋巴、胃肠道(例如结肠)和泌尿生殖道(例如,肾、尿道上皮细胞)、咽喉、前列腺、卵巢的那些,以及包括恶性肿瘤的腺癌,例如大多数结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌、小肠癌等等。也可以使用本文所述方法和组合物治疗或预防上述癌症的转移病灶,以及尤其是这些癌症的转移形式。

[0402] 该方法可以用于治疗各种器官系统的恶性肿瘤,例如,侵袭肺、乳腺、淋巴、胃肠道(例如结肠)和泌尿生殖道、前列腺、卵巢、咽喉的那些,以及包括恶性肿瘤的腺癌,例如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、非小细胞肺癌、小肠癌及食管癌。可以治疗的实体癌的实例包括:纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索癌、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤(synovioma)、间皮瘤、尤文氏肿瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状上皮细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌(bronchogenic carcinoma)、肾细胞癌、肝细胞瘤(hepatoma)、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌(embryonal carcinoma)、Wilm 氏肿瘤(Wilms' tumor)、宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤(medulloblastoma)、颅咽管瘤、室管膜细胞瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听觉神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤。

[0403] 术语“癌(carcinoma)”是本领域技术人员明了的,指上皮或内分泌组织的恶性肿瘤,包括呼吸系统癌、胃肠道系统癌、生殖泌尿系统癌、睾丸癌、乳腺癌、前列腺癌、内分泌系统癌和黑素瘤。癌的实例包括从子宫颈、肺、前列腺、乳腺、头和颈、结肠和卵巢的组织形成的那些。该术语也包括癌肉瘤,例如,包括由癌瘤性和肉瘤性组织组成的恶性肿瘤的癌肉瘤。“腺癌”指来源于腺体组织或者其中的肿瘤细胞形成可辨认的腺体结构的癌。术语“肉瘤”是本领域技术人员明了的,指间充质来源的恶性肿瘤。

[0404] H. 装置和药盒

[0405] 包括 HGF/HGFR 调制剂(例如抗体或可溶性 HGFR)的药物组合物可以利用药学装

置来施用。可以设计该装置以使其具有诸如以下的特性：轻便、室温储存、和易于使用以致于其可以在紧急情况下，例如由未受过训练的人或由急救人员在野外使用，而不涉及到医疗设施和其它医疗设备的应用。该装置可以包括例如，一个或多个用于贮存包括 HGF/HGFR 调制剂的药物制剂的容器，并且可以配置成能够递送一个或多个单位剂量的 HGF/HGFR 调制剂的形式。

[0406] 例如，该药物组合物可以用无针头皮下注射装置，例如美国专利 5,399,163;5,383,851;5,321,335;5,064,413;4,941,880;4,790,824;或 4,596,556 中公开的装置来施用。熟知的植入物和组件的实例包括：美国专利 4,487,603，其中公开了用于以可控速度施与药物的可植入式微型输注泵；美国专利 4,486,194，其中公开了用于通过皮肤施用药物的治疗性装置；美国专利 4,447,233，其中公开了用于以精确的输注速度递送药物的药物输注泵；美国专利 4,447,224，其中公开了用于连续药物递送的可变流速可植入式输注装置；美国专利 4,439,196，其中公开了具有多室的隔间的渗透性药物递送系统；美国专利 4,475,196，其中公开了渗透性药物递送系统。许多其它的装置、植入物、递送系统和组件 (module) 也是已知的。

[0407] HGF/HGFR 调制剂（例如，抗体或可溶性 HGFR 蛋白）可以在药盒中提供。一个实施方案中，药盒包括 (a) 含有包括 HGF/HGFR 调制剂的组合物的容器，和任选地 (b) 信息材料。该信息材料可以是涉及本文所述方法和 / 或药剂的治疗有益用途的描述性的、指导性的、销售性的材料或其它材料。一个实施方案中，药盒还包括用于治疗淋巴和淋巴系统相关病症的第二药剂。例如，药盒包括含有包括 HGF/HGFR 调制剂的组合物的第一容器和包括第二药剂的第二容器。

[0408] 药盒的信息材料的形式是非限制性的。一个实施方案中，该信息材料可以包括关于化合物的制备、化合物的分子量、浓度、使用期限、批次或生产地信息等的信息。一个实施方案中，该信息材料涉及施用 HGF/HGFR 调制剂（例如，抗体或可溶性 HGFR 蛋白）的方法，例如，适宜的剂量、剂型或施用方式（例如，本文描述的剂量、剂型或施用方式），以便治疗已经患有淋巴或淋巴系统相关病症或者有罹患所述病症的风险的个体。该信息可以以各种格式提供，包括印刷的文本、计算机可读材料、录像带、或录音带，或者可以采取提供连接到实质性材料的链接或地址的信息形式。

[0409] 除了 HGF/HGFR 调制剂外，药物中的组合物可以包括其它成分，例如溶剂或缓冲液、稳定剂或防腐剂。HGF/HGFR 调制剂可以以任何形式，例如液体、干燥的或冻干的形式，优选地基本上纯的和 / 或无菌的形式提供。当在液体溶液中提供药剂时，该液体溶液优选是水性溶液。当以干燥形式提供药剂时，一般通过添加适宜的溶剂来实现复水。可以任选地在药盒中提供该溶剂，例如无菌水或缓冲液。

[0410] 药盒可以包括一个或多个用于所述组合物或包含所述药剂的组合物的容器。一些实施方案中，该药盒含有分开的容器、隔间或区室用于组合物和信息材料。例如，组合物可以包含在瓶、小瓶或注射器中，信息材料可以包含在塑料套或包中。其它实施方案中，药盒的各分开的元件包含在单一一个不分开容器中。例如，组合物包含在上面以标签形式附有信息材料的瓶、小瓶或注射器中。一些实施方案中，药盒包括多个（例如，一套）独立容器，每个容器各含有药剂的一个或多个单位剂型 (unit dosageform)（例如，本文描述的剂型）。这些容器可以包括组合单位剂型 (combination unit dosage)，例如，既包括 HGF/HGFR

调制剂又包括第二药剂(例如,以期望的比例)的单位。例如,药盒包括多个注射器、安瓿、箔包、透明塑料罩(blister pack)或医药装置,例如,各含有单一一个组合单位剂量。药盒的容器可以是气密性的、防水的(例如,不能渗透以造成湿度的改变或蒸发)、和/或避光的。

[0411] 药盒任选包括适用于组合物的施用的装置,例如,注射器或其它适宜的递送装置。该装置可以以预先装载了所述药剂中的一种或两者的形式提供,或者可以是空的但是是适于装载药剂的形式。

[0412] III. 筛选 HGF/HGFR 途径活性的调制剂的方法

[0413] 对于推测的调制 HGF/HGFR 途径(例如,HGF、HGFR、整联蛋白 $\alpha 9$ 和司腺钙蛋白 1)的表达的调制剂的筛选可以通过在体外或体内测定该调制剂对 HGF 或 HGFR 启动子活性的影响来实现。例如,包括 HGFR 启动子(例如,人的、猴的或小鼠的 HGFR 基因)或其调节区域(见例如, Gambarotta 等(1994) J. Biol. Chem., 269(17):12852-12857)或者例如 HGF 启动子(例如,人的、猴的或小鼠的 HGF 基因)或其调节区域(见例如, Bell 等(1998) J. Biol. Chem., 273(12):6900-6908)的核酸可以可操作地与编码报道多肽例如下述报道多肽之一(例如,增强的绿色荧光蛋白)的核酸连接。可以使用的其它启动子包括受 HGF/HGFR 途径活性调制的其它基因,例如整联蛋白 $\alpha 9$ 和司腺钙蛋白 1,的启动子。可以将包括与报道核酸可操作连接的靶启动子的核酸导入培养的细胞中和/或用于产生转基因动物,从而允许对启动子活性进行体内评价。一些实施方案中,也可以评价转基因动物的受到施用 HGF/HGFR 调制剂的影响的其它表型(例如,皮肤中基因表达的诱导或阻遏)。

[0414] A. 评价推测的 HGF/HGFR 调制剂对皮肤的影响

[0415] 本文公开的方法允许在实验对象上评价化合物对 HGF 或 HGFR 或其它靶基因的表达的影响。一些实施方案中,可以在同一实验对象上测定表达并评价化合物对皮肤(例如,治疗性化合物对皮肤疾病情况)的影响。通常,对皮肤的影响由处于皮肤代谢相关启动子控制下的基因表达所受到的影响来确定。此类启动子包括控制如下产物的表达和/或合成的那些启动子:构成皮肤成分,例如真皮或表皮的产物;影响皮肤的水合或营养的产物;促进皮肤成分的合成或降解的产物;影响皮肤的脉管结构(vasculature)的产物;影响毛囊代谢的产物;影响皮肤腺体结构的产物;影响皮下肌肉组织的产物;影响脂肪组织的产物;或影响皮肤神经的产物。

[0416] 本发明方法可用于评价化合物对与皮肤外观或健康相关的参数的影响,所述参数如皮肤的弹性、皮肤起皱的倾向、皮肤保持液体(例如,水或油)的能力,皮肤抵抗或修复损伤(例如光或 UV 诱导的损伤)的能力、毛囊的代谢包括生长周期或色素沉着,或者皮下肌肉的紧张性(tone)和功能。一般地,对这些参数的影响可以例如通过处于如下启动子控制下的报道基因的表达所受到的影响来间接地评价,其中所述启动子正常情况下与编码影响这些参数中的任何参数的产物的基因偶联。

[0417] 转基因动物

[0418] 可以用于本发明方法中的转基因动物包括非人哺乳动物,例如猪、例如,微型猪;或啮齿类动物,例如,小鼠、大鼠或豚鼠,例如,无毛小鼠(描述在例如, Begona M. 等(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:7717-7721 中)、裸鼠、衰老加速的小鼠(描述于例如 Takeda 等(1991) L. Am. Geriatr. Soc. 39:911-19)或表现出加速衰老的表型的转基因突变小鼠。该动物的一个或多个,优选地所有的细胞包含转基因。就转基因而言,该转基因动物可以是纯合

的或杂合的。小鼠是优选的动物对象。

[0419] 制备转基因动物,例如,小鼠,的许多方法是本领域已知的。一个示例性方法描述如下。

[0420] 用于胚胎操作和显微注射的程序描述于例如 *Manipulating the Mouse Embryo* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986, 该文献的内容并入此处作为参考)。可以从使用孕母马血清 (PMS) 及 48 小时后使用人绒毛膜促性腺激素造成了超排卵的六周龄雌性小鼠收集小鼠受精卵。将经过处理的雌性小鼠与雄性小鼠放置在一起,并于第二日上午检查阴道栓子。选择动情期的假孕雌性,将其与经证实不育的输精管被切除的雄性小鼠放置在一起,并用作受体。收集受精卵,并去除卵丘细胞。而且,可以收集胚胎。从与雄性交配后的雌性小鼠回收原核胚胎。用孕母马血清 PMS 处理雌性小鼠以诱导卵泡生长,并用人绒毛膜促性腺激素处理以诱导排卵。在 Dulbecco 氏改良的磷酸缓冲盐水 (DPBS) 中回收胚胎,并在补加了 10% 胎牛血清的 Dulbecco 氏改良的基本培养基 (DMEM) 中维持胚胎。

[0421] 转基因构建体的显微注射可以使用附在显微镜上的标准显微操作仪进行。例如,典型地,在显微注射时,将胚胎置于 100 μ l 的 DPBS 液滴中放在油下。将 DNA 溶液显微注射入雄性原核内。由原核的膨胀来监测成功的注射。可以使用相似技术将重组 ES 细胞注射至卵泡中。注射后马上将胚胎转移至受体雌性,例如与输精管切除的雄性小鼠交配后的成熟小鼠中。在一般的操作程序中,麻醉受体雌性动物,造成腰侧切口以暴露输卵管,将胚胎转至输卵管壶腹区。缝合体壁并利用伤口夹闭合皮肤。

[0422] 筛选以甄别靶构建体的存在

[0423] 转基因动物于出生后利用标准方案进行鉴定。可以使用 Southern 印迹和 / 或 PCR 对来自尾部组织的 DNA 进行筛选以甄别靶构建体的存在。然后,如果表现为嵌合体的子代被认为在其生殖系中带有靶构建体,则使它们相互杂交以产生纯合的转基因动物。如果不清楚子代是否具有生殖系传递,可以使它们与亲本或其它株系杂交,并筛选杂合子代。杂合子通过 Southern 印迹和 / 或 DNA 的 PCR 扩增来鉴定。

[0424] 然后该杂合子可以彼此杂交以产生纯合转基因子代。可以通过对来自该杂交所产生的小鼠以及已知为杂合子的小鼠以及野生型小鼠的等量基因组 DNA 进行 Southern 印迹,鉴定纯合子。用于筛选 Southern 印迹的探针可以如上述进行设计。

[0425] 鉴定和表征转基因子代的其它方法是本领域已知的。例如,可以使用 Northern 印迹探针检查 mRNA 以确定编码报道基因的转录物是否存在。此外,可以使用 Western 印迹,通过用抗转基因所编码的蛋白质的抗体或者在表达标记基因的情况下用抗标记基因产物的抗体作为探针探索该 Western 印迹,评估转基因在这些子代的各种组织中的表达水平。最后,可以使用适宜的抗体,对来自子代的各种细胞实施原位分析(例如,固定细胞并用抗体进行标记)和 / 或 FACS(荧光激活的细胞分拣)分析,以寻找是否存在转基因产物。可以产生具有二种分开的转基因的转基因动物,所述转基因具有可操作地与可检测的不同报道分子连接的不同启动子,例如可以通过使具有各不同的启动子-报道分子转基因的转基因小鼠进行品种间杂交来产生这样的转基因动物。

[0426] 本发明方法中也可以使用其它转基因动物。制备各种动物的方法是本领域已知的。制备转基因猪的方案可以见于 White 和 Yannoutsos, *Current Topics in*

Complement Research:64th Forum in Immunology, pp.88-94; 美国专利 5,523,226; 美国专利 5,573,933; PCT 申请 WO 93/25071; 和 PCT 申请 WO 95/04744。制备转基因大鼠的方案可以见于 Bader 和 Ganten, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Supp. 3:S81-S87, 1996。制备转基因奶牛的方案可以见于 Transgenic Animal Technology, A Handbook, 1994, Ed., Carl A. Pinkert, Academic Press, Inc.。制备转基因绵羊的方案可以见于 Transgenic Animal Technology, A handbook, 1994, ed., Carl A. Pinkert, Academic Press, Inc.。

[0427] 报道基因

[0428] 可以通过将目的启动子（例如 HGF、HGFR、整联蛋白 9 或司腺钙蛋白 1 的启动子）与报道基因偶联，分析启动子活性。报道基因可以是编码可检测产物的任何基因，所述可检测产物优选地是可以相对容易地检测的产物，例如，发荧光的基因产物，或者催化能够通过有色的、发荧光的或发光的产物的形成而确定的反应的基因产物。例如，报道基因可以编码酶，例如，产生可检测产物，例如，有色的、发荧光的或发光的产物，的酶。报道基因是本领域已知的，包括 β -半乳糖苷酶基因、萤光酶基因、绿色荧光蛋白基因、青色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、碱性磷酸酶基因、辣根过氧化物酶基因、 β -内酰胺酶基因、或氯霉素乙酰转移酶基因。报道基因的描述见于例如 Sambrook, J., Fritsh, E. F., 和 Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989。

[0429] IV. 诊断分析试验

[0430] A. 核酸和蛋白质检测

[0431] 阵列是表征样品，例如来自个体的样品，的有用分子工具。例如，具有针对多种基因的捕获探针（包括用于 HGF、HGFR、整联蛋白 α 9 和司腺钙蛋白 1 的核酸的探针）或者针对多种蛋白质的捕获探针的阵列。阵列可以在基质上具有许多地址 (address)，例如可定位的位置。本发明的阵列可以被设置成各种形式，以下描述了这些形式的非限制性例子。

[0432] 基质可以是不透明的、半透明的或透明的。地址可以在基质上作一维分布，例如，线性阵列；作二维分布，例如平面阵列；或者作三维分布，例如三维阵列。固体基质可以是任何方便的形状或形式，例如，方的、长方的、椭圆的或圆的。

[0433] 可以使用各种方法制作阵列，例如，照相平版印刷术（见例如美国专利 5,143,854; 5,510,270; 和 5,527,681）、机械方法（例如，定向流方法 (directed-flow methods)，见美国专利 5,384,261）、基于针 (pin) 的方法（例如，见于美国专利 5,288,514）和基于珠子的技术（例如，见于 PCT US/93/04145）。

[0434] 捕获探针可以是单链核酸、双链核酸（例如，在杂交之前或期间变性）、或具有单链区和双链区的核酸。优选地，捕获探针是单链的。捕获探针可以通过各种标准选择，优选地，通过计算机程序利用优化参数设计捕获探针。可以选择捕获探针以便其与基因的序列富含（例如，非同聚的）区域杂交。捕获探针的 T_m 可以通过谨慎选择互补区和长度而优化。理想地，阵列上所有捕获探针的 T_m 相似，例如，彼此相差 20、10、5、3、或 2°C 以内。

[0435] 该分离的核酸优选是 mRNA，其可以通过常规方法，例如，包括 DNase 处理以除去基因组 DNA 以及与寡聚 dT 偶联的固体基质杂交，来分离（见例如，Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. 所述）。洗涤所述基质，并洗脱 mRNA。

[0436] 可以将该分离的 mRNA 反转录并任选地扩增,例如通过反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)进行,见例如美国专利 4,683,202。该核酸可以是扩增产物,例如,来自 PCR(美国专利 4,683,196 和 4,683,202);滚环扩增(“RCA”,美国专利 5,714,320)、等温 RNA 扩增或 NASBA(美国专利 5,130,238;5,409,818;5,554,517)和链置换扩增(美国专利 5,455,166)的扩增产物。可以在扩增过程,例如,通过使标记的核苷酸并入,以标记所述核酸。优选的标记物的实例包括荧光标记,例如,红色荧光染料 Cy5TM(Amersham)或绿色荧光染料 Cy3TM(Amersham)和化学发光标记物,例如,美国专利 4,277,437 中描述的。或者,核酸可以用生物素标记,并在与标记的链霉亲和素,例如,链霉亲和素-藻红蛋白(Molecular Probes)杂交后进行检测。

[0437] 可以使标记的核酸与阵列接触。此外,可以使对照核酸或参考核酸与同一阵列接触。对照核酸或参考核酸可以用与标记样品核酸的标记物不同的标记物,例如,具有不同的发射最大值的标记物,实施标记。可以在杂交条件下使标记的核酸与阵列接触。可以洗涤该阵列,然后通过成像检测阵列的每个地址上的荧光。

[0438] HGF 或 HGFR 蛋白的表达水平可以使用针对所述多肽的特异性抗体进行确定(例如,使用 western 印迹或 ELISA 试验)。此外,多种蛋白质,包括 HGF 和 HGFR,的表达水平可以使用具有针对这些多肽之每一个的抗体捕获探针的多肽阵列,快速地平行测定。多肽的特异性抗体可以通过本文所述方法(见“抗体制备”)产生。

[0439] 已经研发了低密度(96 孔格式)的蛋白质阵列,其中蛋白质被点在硝化纤维素膜上(Ge(2000)Nucleic Acids Res.28,e3,I-VII)。用于抗体筛选的高密度蛋白阵列(例如,222×222mm 内 100,000 个样品)可以通过将蛋白点在聚偏二氟乙烯(PVDF)上而制备(Lueking 等(1999)Anal.Biochem.270:103-111)。也参见例如,Mendoza 等(1999)Biotechniques 27:778-788;MacBeath 和 Schreiber(2000)Science 289:1760-1763;和 De Wildt 等(2000)Nature Biotech.18:989-994。可以使用这些本领域已知的方法及其其它方法产生抗体阵列用于检测样品中多肽的丰度。可以对样品进行标记,例如生物素化,以便随后使用与荧光标记物偶联的链霉亲和素实施检测。然后可以扫描该阵列以测量每个地址上的结合情况。

[0440] 本发明的核酸和多肽阵列可以用于多种用途中。例如,可以使用阵列分析患者样品。将该样品与先已获得的数据,例如已知的临床样本或其它患者样品进行比较。而且,可以使用阵列表征细胞培养物样品,例如,以确定在变换参数,例如将细胞培养物暴露于抗原、转基因或待测化合物后细胞的状况。

[0441] 表达数据可以储存在数据库中,例如关系数据库(relational database),例如,SQL 数据库(如,Oracle 或 Sybase 数据库环境)。该数据库可以具有多个表(table)。例如,原始表达数据可以储存在一张表中,其中每一列对应于所分析的基因,例如,地址或阵列,而每一行对应于样品。一张单独的表可以储存标识符和样品信息,例如,所用阵列的批号、日期、及其它质量控制信息。

[0442] 从阵列上的基因表达分析获得的表达谱可以用于比较处于各种状况的样品和/或细胞,见 Golub 等(1999)Science 286:531。一个实施方案中,编码 HGF 的基因和/或编码 HGFR 的基因的表达(例如,mRNA 表达或蛋白质表达)信息,通过例如与参考值比较来加以评价。参考值可以从对照、参考个体获得。参考值也可以从统计分析获得,例如,以提供

用于一组个体,例如,年龄和性别匹配的个体,例如,正常个体或患有淋巴或淋巴系统相关病症或者有罹患该病症的风险的个体,的参考值。可以通过与特定参考(例如,用于风险相关组群的参考)或者正常组群的统计学相似性,评价(例如,指示罹患淋巴病症的风险)个体,例如,以前未得过淋巴病症的个体、有罹患淋巴病症的风险(例如,遗传倾向)的个体、或者已经患有淋巴病症的个体。

[0443] 也可以通过 HGF/HGFR 途径活性的表达和 / 或活性,例如 HGF 的表达、HGFR 的表达、整联蛋白 $\alpha 9$ 的表达和司腺钙蛋白 1 的表达,以及改变的状况或与这些因素有关的其它参数,评价适于治疗的个体。一些实施方案中,如果相对于参考,例如参考值,例如与正常相关的参考值, HGF 和 / 或 HGFR 的表达和 / 或活性发生改变(例如,升高),则个体被鉴定为是适于治疗的。

[0444] 正在接受本文所述药剂或其它用于淋巴或淋巴系统相关病症的疗法的个体可以按照所述通过 HGF 和 / 或 HGFR 的表达和 / 或活性来评价。可以对该个体作多次评价,例如,在治疗过程中,例如,在一个疗程中多次评价。可以根据个体对治疗的反应情况,修改治疗方案。例如,如果施用的药剂是拮抗剂,则 HGF 和 / 或 HGFR 表达或活性的降低可以指示响应度。

[0445] 由药剂介导的特定效果可能表现出具有统计学显著性(例如, P 值 < 0.05 或 0.02) 的差异(例如,相对于未治疗的个体、对照个体、或其它参考对象)。统计学显著性可以通过本领域已知的任何方法确定。统计学检验的实例包括: Students T 检验、Mann Whitney U 非参数检验、和 Wilcoxon 非参数统计学检验。一些统计学显著的关系具有小于 0.05 或 0.02 的 P 值。

[0446] B. 评价遗传物质的方法

[0447] 有许多评价遗传物质以提供遗传信息的方法。这些方法可以用于评价包括编码 HGF 的基因或者编码 HGFR 的基因的基因座位以及其它座位。这些方法可以用于评价一个或多个核苷酸,例如,基因的编码或非编码区,例如,调节区(例如,启动子、编码非翻译区的区域或内含子等等)中的核苷酸。

[0448] 可以使用生物物理技术(例如,杂交、电泳等)、测序、基于酶的技术及其组合,分析核酸样品。例如,可以通过样品核酸与核酸微阵列的杂交,评价 mRNA 群体中的序列以及评价遗传多态性。其它基于杂交的技术包括序列特异性引物结合(例如,PCR 或 LCR); DNA, 例如基因组 DNA 的 Southern 分析; RNA, 例如 mRNA 的 Northern 分析; 基于荧光探针的技术(见例如, Beaudet 等 (2001) Genome Res. 11(4):600-8); 等位基因特异性扩增。酶学技术包括限制性酶切; 测序; 和单碱基延伸 (SBE)。这些及其它技术是本领域技术人员熟知的。

[0449] 电泳技术包括毛细管电泳和单链构象多态性 (SSCP) 检测(见例如 Myers 等 (1985) Nature 313:495-8 和 Ganguly (2002) Hum Mutat. 19(4):334-42)。其它生物物理方法包括变性高压液相层析 (DHPLC)。

[0450] 一个实施方案中,可以使用依赖于选择性 PCR 扩增的等位基因特异性扩增技术获得遗传信息。作为引物用于特异扩增的寡核苷酸可以在分子中心(以便扩增取决于差别杂交)(Gibbs 等, (1989) Nucl. Acids Res. 17:2437-2448) 或者一个引物的最 3' 端(在适当条件下此处的错配可以防止或者降低聚合酶的延伸, Prossner (1993) Tibtech 11:238) 带有目的突变。此外,可以在该突变的区域引入限制性位点以实现基于切割的检测 (Gasparini

等 (1992) Mol. Cell Probes 6:1)。另一实施方案中,可以使用用于扩增的 Taq 连接酶进行扩增 (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189)。在此类情况下,连接将仅发生在 5' 序列的 3' 末端存在完全匹配的情况下,由此使得可以通过检查扩增物的存在与否来检测特定位置是否存在已知突变。

[0451] 用于检测序列的酶学方法包括基于扩增的方法,例如聚合酶链式反应 (PCR; Saiki 等 (1985) Science 230:1350-1354) 和连接酶链式反应 (LCR; Wu 等 (1989) Genomics 4:560-569; Barringer 等 (1990), Gene 1989; 117-122; F. Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988:189-193); 基于转录的方法利用 RNA 聚合酶引起 RNA 合成以扩增核酸 (美国专利 6,066,457; 6,132,997; 5,716,785; Sarkar 等 (1989) Science 244:331-34; Stofler 等 (1988) Science 239:491); NASBA (美国专利 5,130,238; 5,409,818; 5,554,517); 滚环扩增 (RCA; 美国专利 5,854,033 和 6,143,495) 和链置换扩增 (SDA; 美国专利 5,455,166 和 5,624,825)。扩增方法可以和其它技术联用。

[0452] 其它酶学技术包括使用聚合酶,例如 DNA 聚合酶的技术,及其变异技术,例如单碱基延伸技术。见例如美国专利 6,294,336; 6,013,431 和 5,952,174。

[0453] 也可以使用基于荧光的检测方法检测核酸多态性。例如,可以用不同荧光染料标记不同的终止子 ddNTP。引物可以在接近或紧靠多态的位置延伸,多态位点的核苷酸可以通过并入的荧光类型 (例如,“颜色”) 检测。

[0454] 也可以通过与微阵列杂交检测多态性,包括 SNP。例如,可以将不同位置具有多态核苷酸的一组不同的寡核苷酸置于核酸阵列上。可以通过作为位置的函数的杂交程度以及与特异于其它等位基因的寡核苷酸的杂交,确定是否存在特定的多态。见例如,美国专利 6,066,454。

[0455] 一个实施方案中,杂交探针可以包括一个或多个额外的错配以降低双链形成的稳定性以及增加该试验的灵敏度。错配可以直接靠近所查询的位置,或者距该查询的位置 10 个、7 个、5 个、4 个、3 个或 2 个核苷酸。也可以选择具有特定 T_m , 例如 45-60°C、55-65°C 或 60-75°C 的杂交探针。在一个多重试验中可以选择 T_m 使其彼此差距在 5、3 或 2°C 以内。

[0456] 也可以,例如通过扩增和测序、或扩增、克隆和测序,直接确定特定基因座位的核酸序列。可以使用高通量自动 (例如,基于毛细管或微芯片的) 测序仪。在再其它实施方案中,通过分析目的蛋白的序列以推断其基因序列。分析蛋白质序列的方法包括蛋白测序、质谱、序列 / 表位特异性免疫球蛋白、和蛋白酶消化。

[0457] 也可以使用上述方法的任何联合。可以使用上述方法评价任何基因座位,例如,在用于分析来自特定个体群的遗传信息的方法中,或者在用于分析与淋巴或淋巴系统相关病症联系的多态性 (例如,在编码 HGF、HGFR、整联蛋白 $\alpha 9$ 或司腺钙蛋白 1 的基因中) 的方法中。

[0458] C. 体内成像

[0459] 可以使用 HGFR HGF/HGFR 结合剂 (例如抗体) 在体内 (例如,在个体中体内成像) 分别检测 HGF 和 / 或 HGFR 的存在。该方法可以用于评价 (例如,诊断、定位、划分阶段) 本文所述的疾病情况,例如,淋巴病症或罹患该病症的风险。该方法包括:(i) 在允许 HGF/HGFR 结合剂 (例如,结合 HGF 或 HGFR 的抗体) 与 HGF 或 HGFR 发生相互作用的条件下,给个体 (及任选地对照个体) 施用该结合剂;和 (ii) 检测该结合剂,以例如定位或者鉴定 HGF

或 HGFR 表达细胞。相对于参照,例如,对照个体或个体基线,个体中所述复合物量的统计学显著增加可以作为一个可能导致对淋巴或淋巴系统相关病症或该病风险的诊断的因素。

[0460] 优选地,在体内(及体外)诊断方法中使用的该 HGF/HGFR 结合剂用可检测物质直接或间接地标记,以便利于对发生结合的或未发生结合的结合剂的检测。适宜的可检测物质包括各种酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射性物质。一个实施方案中,HGF 或 HGFR 结合蛋白与放射性离子,例如,铟 (^{111}In)、碘 (^{131}I 或 ^{125}I)、钇 (^{90}Y)、锕 (^{225}Ac)、铋 (^{212}Bi 或 ^{213}Bi)、硫 (^{35}S)、碳 (^{14}C)、氚 (^3H)、铑 (^{188}Rh) 或磷 (^{32}P) 偶联。另一实施方案中,HGF/HGFR 结合蛋白用 NMR 造影剂标记。

[0461] 一个方面,本发明涉及在患者中对脉管结构(例如,淋巴管结构)进行成像的方法,其中所述患者有罹患淋巴或淋巴系统相关病症的风险或者患有正处于发展中的此类病症。该方法包括:提供可以与 HGF 或 HGFR 结合的药剂,例如本文所述药剂,其中该蛋白质与成像剂物理连接;将所述药剂施用给患者,例如,有罹患淋巴或淋巴系统相关病症的风险的患者;和,例如通过对患者进行成像,定位所述药剂在患者体内的位置,例如以检测 HGF 或 HGFR 表达细胞。

实施例

[0462] 实施例 1:淋巴内皮细胞比血管内皮细胞具有更高的 HGFR 表达水平并且 HGFR 是功能性的。

[0463] 定量实时 RT-PCR(QPCR)证实,相对于血管内皮细胞(BVEC),三个独立建立的原代 LEC 系都高水平表达主要淋巴谱系标志物 Prox1 和 LYVE-1 的 mRNA,但低水平表达血管谱系标志物 Flt-1(图 1A-1C)。LEC 中的 HGFR mRNA 水平通过 QPCR 定量,发现其比 BVEC 中的水平高 2 倍以上(图 1D)。此外,免疫沉淀和 Western 印迹分析说明,HGFR 蛋白的表达在 LEC 中比在 BVEC 中高(图 1E)。由于 LEC 用 30ng/ml HGF 处理导致了 HGFR 磷酸化的增加(图 1F),故 HGFR 在 LEC 中是有功能的。总之,HGFR 在 LEC 中比在 BVEC 中具有更高的表达水平,而且当用 HGF 处理 LEC 时 HGFR 被活化。

[0464] 实施例 2. 体内 HGFR 在炎症及组织修复过程中于淋巴管中表达

[0465] 使用抗 HGFR 的抗体和抗淋巴特异性透明质酸受体 LYVE-1 的抗体,对正常小鼠皮肤进行差别免疫荧光分析。在正常皮肤的静止淋巴管中检测到几乎没有或完全没有 HGFR 表达。为了确定淋巴内皮中的 HGFR 是否可以在病理过程中上调,我们对慢性炎症的鼠皮肤的样品进行免疫染色,其中所述样品获自实验诱导了迟发型超敏反应的 VEGF-A 转基因小鼠(VEGF-TG),该小鼠的特征在于淋巴管扩大和增生,Kunstfeld 等(2004) Blood, 104(4):1048-1057。诱导皮肤炎症后几天,在 VEGF-TG 小鼠中检测到扩大的 LYVE-1 阳性淋巴管,而野生型小鼠中未检测到这样的淋巴管(图 2A,2D)。LYVE-1 阳性淋巴管强烈表达 HGFR,而在野生型小鼠的正常淋巴管中几乎或完全检测不到 HGFR 表达(图 2A-2F)。

[0466] 在小鼠中实验诱导完全厚度的皮肤伤口后 2 至 3 周,在肉芽组织中发现显著的淋巴管生成。损伤后的第 21 天对伤口组织进行的双重免疫荧光分析,显示出几根也表达 HGFR 的 LYVE-1 阳性淋巴管(图 2G-2L)。

[0467] 为了进一步表征 HGFR 在胚胎淋巴管形成过程中的可能作用,在 10.5 天至 14.5 天胎龄期(E)当淋巴管祖先发生活跃的出芽和增生时检查小鼠胚胎组织。在 E11.5,在前主静

脉的内皮细胞中检测到 LYVE-1 表达。这些细胞几乎不或完全不表达 HGFR,而已经在前肠 (foregut) 的咽喉区和间充质细胞中检测到 HGFR 表达 (图 3A-3C)。然而,在 E12.5,在前主静脉的 LYVE-1 阳性内皮细胞上可以清楚地检测到 HGFR 表达 (图 3F;箭头),而在与 LYVE-1 反应性重叠的位于原始淋巴囊内部的内皮细胞上仅发现偶然的 HGFR 表达。到 E14.5,在非常大多数的 LYVE-1 阳性淋巴内皮细胞上检测到强的 HGFR 表达 (图 3G-3I)。在此阶段,位于颈静脉和动脉内部的 LYVE-1 阴性内皮细胞仍弱表达 HGFR。

[0468] 实施例 3. HGF 直接促进 LEC 增殖和迁移

[0469] HGF 是仅已知的 HGFR 配体,已经证实 HGF 可以诱导人血管内皮细胞 (HVEC) 的增殖和迁移,见例如 Bussolino 等 (1992) *J. Cell Biol.* 119:629-641。为了研究 LEC 和 BVEC 之间的 HGFR 差异表达水平是否可能导致它们对 HGF 刺激的差异反应,我们接着调查了体外 HGF 对 LEC 及 BVEC 增殖的影响。与未处理的对照培养物相比,HGF 有力地诱导了 LEC 增殖,具有 1ng/ml 的最小有效浓度 ($p < 0.01$)。尽管在此浓度 HGF 也诱导 BVEC 增殖,但是在 LEC 中比在 BVEC 中生长刺激程度更高 (图 4A)。迄今,VEGF-C 和 VEGF-D 是唯一已知的通过激活 VEGF 受体 3 (VEGFR-3) 直接促进 LEC 增殖的生长因子,见例如 Jussila 和 Alitalo (2002) *Physiol Rev*, 82:673-700, 而且 FGF-2 对淋巴管发生的作用已经被提示是 VEGFR-3 配体上调的结果,因为这些作用能够被 VEGFR-3 途径的阻断剂所抑制,见例如,Chang 等 (2004) *PNAS*, 101:11658-11663; Kubo 等 (2002), *PNAS*, 99:8868-8873。为了研究 HGF 是直接还是间接地刺激 LEC 增殖,我们接着在抗 VEGFR-3 或 HGFR 的封闭性抗体存在或不存在的条件下用 HGF 处理 LEC。LEC 与 HGFR 封闭性抗体一起温育,有力地阻断了 HGF 对 LEC 增殖的刺激作用 ($p < 0.001$);而与封闭性 VEGFR-3 抗体——以有效地阻断 VEGF-C 的生长刺激作用的剂量 (数据未显示)——或者与对照 IgG 一起温育,不影响 HGF 诱导的增殖 (图 4B)。这些结果说明,HGF 诱导的 LEC 增殖的发生独立于 VEGFR3 途径的活化,但依赖于 HGF 与其受体的有效结合。

[0470] HGF 处理还剂量依赖性地促进 LEC 和 BVEC 的迁移,具有 3ng/ml 的最小有效浓度 (图 4C)。为了研究 HGF 的刺激作用是否也体外促进淋巴管的形成,如先前 Hirakawa 等 (2003) *Am. J. Pathol.* 162:575-586 的描述,在汇合的 LEC 培养物上覆盖 I 型胶原蛋白。与未处理的对照培养物相比,HGF 强有利地诱导了 LEC 形成条索状,具有 3ng/ml 的最小有效浓度 ($p < 0.001$) (图 5A, 5B)。

[0471] 实施例 4. 体内 HGF 促进淋巴管形成

[0472] 为了研究 HGF 是否也可以体内诱导淋巴管发生,按照 Hirakawa 等 (2003) *Am. J. Pathol.* 162:575-586 所述,我们将带有或不带有 HGF 的 matrigel 皮下植入 FVB 小鼠中。淋巴特异性糖蛋白 podoplanin 的免疫染色 (见例如, Schacht 等 (2003), *EMBO J.* 22:3546-3556),显示出植入后第 7 天在含有 HGF 的 matrigel 中存在明显的新淋巴管形成,而在对照 matrigel 中未观察到淋巴管 (图 5C, 5D)。

[0473] 实施例 5. 在实验性皮肤炎症过程中 HGFR 的系统阻断可以抑制淋巴管的扩大

[0474] 由于我们发现在小鼠中在实验性皮肤炎症过程中扩大的淋巴管强烈表达 HGFR,故我们接着调查在体内 HGF 是否可以直接地促进淋巴管扩大。通过按照 Kunstfeld 等 (2004) *Blood*, 104(4):1048-1057 所述,对小鼠的耳作局部施用,诱导迟发型超敏反应。在诱导实验性炎症前的一天,腹膜内注射 100 μ g 封闭性抗 HGFR 抗体或等量的对照免疫球蛋白 G。诱导

炎症后第 24 小时进行免疫荧光分析,结果揭示出与接受对照 IgG 的小鼠相比,在接受了封闭性 HGFR 抗体处理的小鼠中淋巴管的大小有极大的降低(图 6A, 6B)。对其中 LYVE-1 和 CD31 被染色的切片进行的计算机辅助的形态度量分析,说明,与对照 IgG 处理的小鼠相比,在注射封闭性 HGFR 抗体后淋巴管的平均尺寸和淋巴管所覆盖的组织面积的百分数显著地降低(图 6C, 6D) ($P < 0.01$)。在二个处理组之间淋巴管密度明显不同(图 6E)。

[0475] 实施例 6. HGF 通过整联蛋白 $\alpha 9$ 促进 LEC 迁移

[0476] 为了明确可以介导 HGF 对 LEC 的作用的可能分子机制,在有或没有 30ng/ml HGF 的情况下温育两个独立的 LEC 系 6 小时,之后使用 Affymetrix HU133v2™ 阵列进行微阵列分析。我们发现,司腺钙蛋白 1 是 HGF 处理后被最大上调的基因之一。而且,整联蛋白 $\alpha 9$ 的表达在 HGF 处理后也被显著地上调。这些结果被 QPCR 分析所证实(图 7A)。

[0477] 在有或无特异性整联蛋白 $\alpha 9$ 封闭性抗体的情况下 LEC 与 HGF 的共孵育显示出,整联蛋白 $\alpha 9$ 的封闭部分地阻断了 HGF 诱导的迁移 ($p = 0.0143$),而与 HGFR 封闭性抗体一起温育则完全地抑制了 HGF 对 LEC 迁移的影响 ($p = 0.0074$)(图 7B)。

[0478] 实施例 7. HGF 在体内独立于 VEGF 促进淋巴管形成

[0479] 为了确定 HGF 体内过表达的影响,在先已建立的金属硫蛋白 I 启动子驱动的 HGF 转基因小鼠 (Takayama 等 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:5866-5871) 中研究淋巴管结构。该分析聚焦于在遗传小鼠模型中淋巴管最为丰富而且淋巴系统的异常最易于被检测到的皮肤和小肠。与野生型小鼠(图 8A)相比,在 HGF 转基因小鼠中在回肠的粘膜和粘膜下层中检测到淋巴管的扩大(图 8B)。对淋巴特异性标志物 podoplanin 的免疫荧光染色显示出,在 HGF 转基因小鼠中在回肠的粘膜下层中中央乳糜管明显扩张而且淋巴管扩大(图 8C, 8D)。podoplanin 染色也显示出在 HGF 转基因小鼠的皮肤中淋巴管扩大并且数量增加(图 8G, 8H),但没有观察到主要的组织学异常(图 8E, 8F)。在 HGF 转基因小鼠的十二指肠和肝脏中也观察到增加的淋巴管形成和扩大。

[0480] 为了检查 HGF 是否通过 VEGFR-3 途径直接或间接地促进新的淋巴管形成,在小鼠耳中皮下植入缓释丸(有或无 HGF),用抗小鼠 VEGFR-3 的封闭性抗体或者用对照 IgG 系统地处理小鼠。14 天后,免疫荧光染色 CD31 和 LYVE-1,结果显示在含有 HGF 的小丸周围有明显的淋巴管形成,而在对照小丸周围则无淋巴管形成(图 9A-9C)。然而,用封闭性抗 VEGFR-3 抗体处理并没有阻止 HGF 诱导的淋巴管形成(图 9B, 9C)。植入了含有 HGF 的小丸的小鼠表现出适度增强的血管形成。

[0481] 这些实施例的结果说明 HGF 是可以用于控制淋巴管发生的蛋白质靶标。

[0482] 其它实施方案

[0483] 在此已经描述了本发明的许多实施方案。然而,可以理解,可以进行各种修改而不偏离本发明的精神和范围。例如,可以考虑 HGF 和 HGFR 活性的核酸和抗体调制剂的组合。因此,其它的实施方案也在下面的权利要求的范围内。

[0001]

序列表

<110> 通用医疗公司(The General Hospital Corporation)

<120> 监测和调制 HGF/HGFR 活性

<130> 10287-086WO1

<140> PCT/US2006/012389

<141> 2006-03-30

<150> US 60/667,463

<151> 2005-03-31

<160> 8

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 728

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

```

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

```

[0002]

Asp	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Gln	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys	Tyr	260	265	270
Thr	Leu	Asp	Pro	His	Thr	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Ala	Ile	Lys	Thr	Cys	275	280	285
Ala	Asp	Asn	Thr	Met	Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Thr	Glu	290	295	300
Cys	Ile	Gln	Gly	Gln	Gly	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Asn	Thr	Ile	305	310	315
Trp	Asn	Gly	Ile	Pro	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	Ser	Gln	Tyr	Pro	His	Glu	325	330	335
His	Asp	Met	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Lys	Cys	Lys	Asp	Leu	Arg	Glu	Asn	340	345	350
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	355	360	365
Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Val	Gly	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ile	Pro	Asn	Cys	Asp	370	375	380
Met	Ser	His	Gly	Gln	Asp	Cys	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	Met	385	390	395
Gly	Asn	Leu	Ser	Gln	Thr	Arg	Ser	Gly	Leu	Thr	Cys	Ser	Met	Trp	Asp	405	410	415
Lys	Asn	Met	Glu	Asp	Leu	His	Arg	His	Ile	Phe	Trp	Glu	Pro	Asp	Ala	420	425	430
Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asp	Asp	Ala	His	435	440	445
Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Gly	Asn	Pro	Leu	Ile	Pro	Trp	Asp	Tyr	Cys	450	455	460
Pro	Ile	Ser	Arg	Cys	Glu	Gly	Asp	Thr	Thr	Pro	Thr	Ile	Val	Asn	Leu	465	470	475
Asp	His	Pro	Val	Ile	Ser	Cys	Ala	Lys	Thr	Lys	Gln	Leu	Arg	Val	Val	485	490	495
Asn	Gly	Ile	Pro	Thr	Arg	Thr	Asn	Ile	Gly	Trp	Met	Val	Ser	Leu	Arg	500	505	510
Tyr	Arg	Asn	Lys	His	Ile	Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Ile	Lys	Glu	Ser	Trp	515	520	525
Val	Leu	Thr	Ala	Arg	Gln	Cys	Phe	Pro	Ser	Arg	Asp	Leu	Lys	Asp	Tyr	530	535	540
Glu	Ala	Trp	Leu	Gly	Ile	His	Asp	Val	His	Gly	Arg	Gly	Asp	Glu	Lys	545	550	555
Cys	Lys	Gln	Val	Leu	Asn	Val	Ser	Gln	Leu	Val	Tyr	Gly	Pro	Glu	Gly	565	570	575
Ser	Asp	Leu	Val	Leu	Met	Lys	Leu	Ala	Arg	Pro	Ala	Val	Leu	Asp	Asp	580	585	590
Phe	Val	Ser	Thr	Ile	Asp	Leu	Pro	Asn	Tyr	Gly	Cys	Thr	Ile	Pro	Glu	595	600	605
Lys	Thr	Ser	Cys	Ser	Val	Tyr	Gly	Trp	Gly	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ile	Asn	610	615	620
Tyr	Asp	Gly	Leu	Leu	Arg	Val	Ala	His	Leu	Tyr	Ile	Met	Gly	Asn	Glu	625	630	635
Lys	Cys	Ser	Gln	His	Arg	Gly	Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Glu	Ser	Glu		645	650	655
Ile	Cys	Ala	Gly	Ala	Glu	Lys	Ile	Gly	Ser	Gly	Pro	Cys	Glu	Gly	Asp	660	665	670
Tyr	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Cys	Glu	Gln	His	Lys	Met	Arg	Met	Val	Leu	675	680	685
Gly	Val	Ile	Val	Pro	Gly	Arg	Gly	Cys	Ala	Ile	Pro	Asn	Arg	Pro	Gly	690	695	700
Ile	Phe	Val	Arg	Val	Ala	Tyr	Tyr	Ala	Lys	Trp	Ile	His	Lys	Ile	Ile	705	710	715
																		720

[0003]

Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
725

<210> 2

<211> 696

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 2

Met	Trp	Val	Thr	Lys	Leu	Leu	Pro	Ala	Leu	Leu	Gln	His	Val	Leu
1				5					10				15	
Leu	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ile	Ala	Ile	Pro	Tyr	Ala	Glu	Gly
			20					25					30	Gln
Arg	Lys	Arg	Arg	Asn	Thr	Ile	His	Glu	Phe	Lys	Lys	Ser	Ala	Lys
			35				40					45		Thr
Thr	Leu	Ile	Lys	Ile	Asp	Pro	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys	Thr	Lys	Lys
	50					55					60			Val
Asn	Thr	Ala	Asp	Gln	Cys	Ala	Asn	Arg	Cys	Thr	Arg	Asn	Lys	Gly
65					70					75				80
Pro	Phe	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Val	Phe	Asp	Lys	Ala	Arg	Lys	Gln
				85					90					95
Leu	Trp	Phe	Pro	Phe	Asn	Ser	Met	Ser	Ser	Gly	Val	Lys	Lys	Glu
			100					105					110	Phe
Gly	His	Glu	Phe	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Lys	Gly	His	Glu	Thr	Phe
		115					120					125		Gly
Arg	Phe	Leu	Pro	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Lys	Asp	Leu	Gln	Glu	Asn
	130						135				140			Tyr
Cys	Arg	Asn	Pro	Arg	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr
145					150					155				160
Asn	Pro	Glu	Val	Arg	Tyr	Glu	Val	Cys	Asp	Ile	Pro	Gln	Cys	Ser
				165					170				175	Glu
Val	Glu	Cys	Met	Thr	Cys	Asn	Gly	Glu	Ser	Tyr	Arg	Gly	Leu	Met
			180					185					190	Asp
His	Thr	Glu	Ser	Gly	Lys	Ile	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	His	Gln	Thr
		195					200					205		Pro
His	Arg	His	Lys	Phe	Leu	Pro	Glu	Arg	Tyr	Pro	Asp	Lys	Gly	Phe
	210					215					220			Asp
Asp	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Gln	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys
225					230					235				240
Thr	Leu	Asp	Pro	His	Thr	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Ala	Ile	Lys	Thr
				245					250					255
Ala	Asp	Asn	Thr	Met	Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Thr
			260					265					270	Glu
Cys	Ile	Gln	Gly	Gln	Gly	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Asn	Thr
		275					280					285		Ile
Trp	Asn	Gly	Ile	Pro	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	Ser	Gln	Tyr	Pro	His
	290					295					300			Glu
His	Asp	Met	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Lys	Cys	Lys	Asp	Leu	Arg	Glu
305					310					315				320
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr
			325						330					335
Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Val	Gly	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ile	Pro	Asn	Cys
			340					345					350	Asp
Met	Ser	His	Gly	Gln	Asp	Cys	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr
		355					360					365		Met
Gly	Asn	Leu	Ser	Gln	Thr	Arg	Ser	Gly	Leu	Thr	Cys	Ser	Met	Trp
	370					375					380			Asp

[0004]

```

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

```

<210> 3

<211> 728

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 3

```

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

```

[0005]

Phe	Thr	Phe	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Val	Phe	Asp	Lys	Ser	Arg	Lys	Arg	85	90	95
Cys	Tyr	Trp	Tyr	Pro	Phe	Asn	Ser	Met	Ser	Ser	Gly	Val	Lys	Lys	Gly	100	105	110
Phe	Gly	His	Glu	Phe	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Lys	Asp	Tyr	Ile	Arg	Asn	115	120	125
Cys	Ile	Ile	Gly	Lys	Gly	Gly	Ser	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Ile	Thr	130	135	140
Lys	Ser	Gly	Ile	Lys	Cys	Gln	Pro	Trp	Asn	Ser	Met	Ile	Pro	His	Glu	145	150	155
His	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Lys	Asp	Leu	Gln	Glu	Asn	165	170	175
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Arg	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	180	185	190
Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Arg	Tyr	Glu	Val	Cys	Asp	Ile	Pro	Gln	Cys	Ser	195	200	205
Glu	Val	Glu	Cys	Met	Thr	Cys	Asn	Gly	Glu	Ser	Tyr	Arg	Gly	Pro	Met	210	215	220
Asp	His	Thr	Glu	Ser	Gly	Lys	Thr	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	Gln	Gln	Thr	225	230	235
Pro	His	Arg	His	Lys	Phe	Leu	Pro	Glu	Arg	Tyr	Pro	Asp	Lys	Gly	Phe	245	250	255
Asp	Asp	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Lys	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys	260	265	270
Tyr	Thr	Leu	Asp	Pro	Asp	Thr	Pro	Trp	Glu	Tyr	Cys	Ala	Ile	Lys	Thr	275	280	285
Cys	Ala	His	Ser	Ala	Val	Asn	Glu	Thr	Asp	Val	Pro	Met	Glu	Thr	Thr	290	295	300
Glu	Cys	Ile	Gln	Gly	Gln	Gly	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ser	Asn	Thr	305	310	315
Ile	Trp	Asn	Gly	Ile	Pro	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	Ser	Gln	Tyr	Pro	His	325	330	335
Lys	His	Asp	Ile	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Lys	Cys	Lys	Asp	Leu	Arg	Glu	340	345	350
Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Ala	Glu	Ser	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	355	360	365
Thr	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Val	Gly	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ile	Pro	Lys	Cys	370	375	380
Asp	Val	Ser	Ser	Gly	Gln	Asp	Cys	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	385	390	395
Met	Gly	Asn	Leu	Ser	Lys	Thr	Arg	Ser	Gly	Leu	Thr	Cys	Ser	Met	Trp	405	410	415
Asp	Lys	Asn	Met	Glu	Asp	Leu	His	Arg	His	Ile	Phe	Trp	Glu	Pro	Asp	420	425	430
Ala	Ser	Lys	Leu	Asn	Lys	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asp	Asp	Ala	435	440	445
His	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Gly	Asn	Pro	Leu	Ile	Pro	Trp	Asp	Tyr	450	455	460
Cys	Pro	Ile	Ser	Arg	Cys	Glu	Gly	Asp	Thr	Thr	Pro	Thr	Ile	Val	Asn	465	470	475
Leu	Asp	His	Pro	Val	Ile	Ser	Cys	Ala	Lys	Thr	Lys	Gln	Leu	Arg	Val	485	490	495
Val	Asn	Gly	Ile	Pro	Thr	Gln	Thr	Thr	Val	Gly	Trp	Met	Val	Ser	Leu	500	505	510
Lys	Tyr	Arg	Asn	Lys	His	Ile	Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Ile	Lys	Glu	Ser	515	520	525
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Arg	Gln	Cys	Phe	Pro	Ala	Arg	Asn	Lys	Asp	Leu	530	535	540

[0006]

```

Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Glu Arg Gly
545                    550                    555                    560
Glu Glu Lys Arg Lys Gln Ile Leu Asn Ile Ser Gln Leu Val Tyr Gly
                    565                    570                    575
Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Leu Lys Leu Ala Arg Pro Ala Ile
                    580                    585                    590
Leu Asp Asn Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Ser Tyr Gly Cys Thr
                    595                    600                    605
Ile Pro Glu Lys Thr Thr Cys Ser Ile Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly
610                    615                    620
Leu Ile Asn Ala Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met
625                    630                    635                    640
Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His His Gln Gly Lys Val Thr Leu Asn
                    645                    650                    655
Glu Ser Glu Leu Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys
660                    665                    670
Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Ile Cys Glu Gln His Lys Met Arg
675                    680                    685
Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn
690                    695                    700
Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His
705                    710                    715                    720
Lys Val Ile Leu Thr Tyr Lys Leu
                    725

```

<210> 4

<211> 728

<212> PRT

<213> 大鼠(Rattus norvegicus)

<400> 4

```

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
1                    5                    10                    15
Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly His
20                    25                    30
Lys Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
35                    40                    45
Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
50                    55                    60
Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Asn Gly Leu
65                    70                    75                    80
Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
85                    90                    95
Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
100                    105                    110
Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
115                    120                    125
Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
130                    135                    140
Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
145                    150                    155                    160
Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr
165                    170                    175
Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser
180                    185                    190
Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu
195                    200                    205

```

[0007]

Val	Glu	Cys	Met	Thr	Cys	Asn	Gly	Glu	Ser	Tyr	Arg	Gly	Leu	Met	Asp	210	215	220
His	Thr	Glu	Ser	Gly	Lys	Ile	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	His	Gln	Thr	Pro	225	230	235
His	Arg	His	Lys	Phe	Leu	Pro	Glu	Arg	Tyr	Pro	Asp	Lys	Gly	Phe	Asp	245	250	255
Asp	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Gln	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys	Tyr	260	265	270
Thr	Leu	Asp	Pro	His	Thr	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Ala	Ile	Lys	Thr	Cys	275	280	285
Ala	Asp	Asn	Thr	Val	Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Pro	Met	Glu	Thr	Thr	Glu	290	295	300
Cys	Ile	Gln	Gly	Gln	Gly	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ala	Asn	Thr	Ile	305	310	315
Trp	Asn	Gly	Ile	Pro	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	Ser	Gln	Tyr	Pro	His	Lys	325	330	335
His	Asp	Met	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Lys	Cys	Lys	Asp	Leu	Arg	Glu	Asn	340	345	350
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	355	360	365
Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Val	Gly	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ile	Pro	Asn	Cys	Asp	370	375	380
Met	Ser	Asn	Gly	Gln	Asp	Cys	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	Met	385	390	395
Gly	Asn	Leu	Ser	Gln	Thr	Arg	Ser	Gly	Leu	Thr	Cys	Ser	Met	Trp	Asn	405	410	415
Lys	Asn	Met	Glu	Asp	Leu	His	Arg	His	Ile	Phe	Trp	Glu	Pro	Asp	Ala	420	425	430
Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asp	Asp	Ala	His	435	440	445
Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Gly	Asn	Pro	Leu	Ile	Pro	Trp	Asp	Tyr	Cys	450	455	460
Pro	Ile	Ser	Arg	Cys	Glu	Gly	Asp	Thr	Thr	Pro	Thr	Ile	Val	Asn	Leu	465	470	475
Asp	His	Pro	Val	Ile	Ser	Cys	Ala	Lys	Thr	Lys	Gln	Leu	Arg	Val	Val	485	490	495
Asn	Gly	Ile	Pro	Thr	Arg	Thr	Asn	Val	Gly	Trp	Met	Ile	Ser	Leu	Arg	500	505	510
Tyr	Arg	Asn	Lys	His	Ile	Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Ile	Lys	Glu	Ser	Trp	515	520	525
Val	Leu	Thr	Ala	Arg	Gln	Cys	Phe	Pro	Ser	Arg	Asp	Leu	Lys	Asp	Tyr	530	535	540
Glu	Ala	Trp	Leu	Gly	Ile	His	Asp	Val	His	Gly	Arg	Gly	Glu	Glu	Lys	545	550	555
Arg	Lys	Gln	Val	Leu	Asn	Val	Ser	Gln	Leu	Val	Tyr	Gly	Pro	Glu	Gly	565	570	575
Ser	Asp	Leu	Val	Leu	Met	Lys	Leu	Ala	Arg	Pro	Ala	Val	Leu	Asp	Asp	580	585	590
Phe	Val	Asn	Thr	Ile	Asp	Leu	Pro	Asn	Tyr	Gly	Cys	Thr	Ile	Pro	Glu	595	600	605
Lys	Thr	Ser	Cys	Ser	Val	Tyr	Gly	Trp	Gly	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ile	Asn	610	615	620
Tyr	Asp	Gly	Leu	Leu	Arg	Val	Ala	His	Leu	Tyr	Ile	Met	Gly	Asn	Glu	625	630	635
Lys	Cys	Ser	Gln	His	His	Arg	Gly	Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Glu	Ser	Glu	645	650	655
Ile	Cys	Ala	Gly	Ala	Glu	Lys	Ile	Gly	Ser	Gly	Pro	Cys	Glu	Gly	Asp	660	665	670

[0008]

```

Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu
    675                      680                      685
Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly
    690                      695                      700
Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
705                      710                      715                      720
Leu Thr Tyr Lys Val Pro Glu Ser
                      725

```

<210> 5

<211> 1390

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 5

```

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
 1                      5                      10                      15
Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys
                      20                      25                      30
Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
                      35                      40                      45
Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50                      55                      60
Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
65                      70                      75                      80
Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
                      85                      90                      95
Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
                      100                      105                      110
Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
115                      120                      125
Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
130                      135                      140
Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
145                      150                      155                      160
Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
                      165                      170                      175
Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
                      180                      185                      190
Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
195                      200                      205
His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
210                      215                      220
Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
225                      230                      235                      240
Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
                      245                      250                      255
Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
260                      265                      270
Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
275                      280                      285
His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
290                      295                      300
Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
305                      310                      315                      320
Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
                      325                      330                      335

```

[0009]

Leu	Asn	Asp	Asp	Ile	Leu	Phe	Gly	Val	Phe	Ala	Gln	Ser	Lys	Pro	Asp	340	345	350
Ser	Ala	Glu	Pro	Met	Asp	Arg	Ser	Ala	Met	Cys	Ala	Phe	Pro	Ile	Lys	355	360	365
Tyr	Val	Asn	Asp	Phe	Phe	Asn	Lys	Ile	Val	Asn	Lys	Asn	Asn	Val	Arg	370	375	380
Cys	Leu	Gln	His	Phe	Tyr	Gly	Pro	Asn	His	Glu	His	Cys	Phe	Asn	Arg	385	390	395
Thr	Leu	Leu	Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Cys	Glu	Ala	Arg	Arg	Asp	Glu	Tyr	405	410	415
Arg	Thr	Glu	Phe	Thr	Thr	Ala	Leu	Gln	Arg	Val	Asp	Leu	Phe	Met	Gly	420	425	430
Gln	Phe	Ser	Glu	Val	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Phe	Ile	Lys	Gly	435	440	445
Asp	Leu	Thr	Ile	Ala	Asn	Leu	Gly	Thr	Ser	Glu	Gly	Arg	Phe	Met	Gln	450	455	460
Val	Val	Val	Ser	Arg	Ser	Gly	Pro	Ser	Thr	Pro	His	Val	Asn	Phe	Leu	465	470	475
Leu	Asp	Ser	His	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Val	Ile	Val	Glu	His	Thr	Leu	485	490	495
Asn	Gln	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Val	Ile	Thr	Gly	Lys	Lys	Ile	Thr	Lys	500	505	510
Ile	Pro	Leu	Asn	Gly	Leu	Gly	Cys	Arg	His	Phe	Gln	Ser	Cys	Ser	Gln	515	520	525
Cys	Leu	Ser	Ala	Pro	Pro	Phe	Val	Gln	Cys	Gly	Trp	Cys	His	Asp	Lys	530	535	540
Cys	Val	Arg	Ser	Glu	Glu	Cys	Leu	Ser	Gly	Thr	Trp	Thr	Gln	Gln	Ile	545	550	555
Cys	Leu	Pro	Ala	Ile	Tyr	Lys	Val	Phe	Pro	Asn	Ser	Ala	Pro	Leu	Glu	565	570	575
Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Cys	Gly	Trp	Asp	Phe	Gly	Phe	Arg	Arg	580	585	590
Asn	Asn	Lys	Phe	Asp	Leu	Lys	Lys	Thr	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Asn	Glu	595	600	605
Ser	Cys	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Glu	Ser	Thr	Met	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	610	615	620
Thr	Val	Gly	Pro	Ala	Met	Asn	Lys	His	Phe	Asn	Met	Ser	Ile	Ile	Ile	625	630	635
Ser	Asn	Gly	His	Gly	Thr	Thr	Gln	Tyr	Ser	Thr	Phe	Ser	Tyr	Val	Asp	645	650	655
Pro	Val	Ile	Thr	Ser	Ile	Ser	Pro	Lys	Tyr	Gly	Pro	Met	Ala	Gly	Gly	660	665	670
Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Thr	Gly	Asn	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Asn	Ser	Arg	675	680	685
His	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Lys	Thr	Cys	Thr	Leu	Lys	Ser	Val	Ser	Asn	690	695	700
Ser	Ile	Leu	Glu	Cys	Tyr	Thr	Pro	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Thr	Glu	Phe	705	710	715
Ala	Val	Lys	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Thr	Ser	Ile	Phe	725	730	735
Ser	Tyr	Arg	Glu	Asp	Pro	Ile	Val	Tyr	Glu	Ile	His	Pro	Thr	Lys	Ser	740	745	750
Phe	Ile	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Thr	Gly	Val	Gly	Lys	Asn	Leu	Asn	755	760	765
Ser	Val	Ser	Val	Pro	Arg	Met	Val	Ile	Asn	Val	His	Glu	Ala	Gly	Arg	770	775	780
Asn	Phe	Thr	Val	Ala	Cys	Gln	His	Arg	Ser	Asn	Ser	Glu	Ile	Ile	Cys	785	790	795
																		800

[0010]

Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys																	
				805					810						815		
Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp																	
				820				825							830		
Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val																	
				835				840							845		
Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp																	
				850				855							860		
Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys																	
								870							875		880
Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val																	
				885					890								895
Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys																	
				900				905							910		
Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp																	
				915				920							925		
Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala																	
				930				935							940		
Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln																	
								950							955		960
Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His																	
				965					970								975
Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr																	
				980				985									990
Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro																	
				995				1000							1005		
Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln Val																	
				1010				1015							1020		
Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly Asp Ser																	
				1025				1030							1035		1040
Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile Asp Leu Ser																	
				1045					1050								1055
Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His Val Val Ile Gly																	
				1060				1065									1070
Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His																	
				1075				1080									1085
Phe Gly Cys Val Tyr His Gly Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys																	
				1090				1095							1100		
Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu																	
				1105				1110							1115		1120
Val Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His																	
				1125					1130								1135
Pro Asn Val Leu Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser																	
				1140				1145									1150
Pro Leu Val Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe																	
				1155				1160									1165
Ile Arg Asn Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe																	
				1170				1175									1180
Gly Leu Gln Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe																	
				1185				1190							1195		1200
Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe																	
				1205					1210								1215
Thr Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys																	
				1220				1225									1230
Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys																	
				1235				1240									1245
Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys Ser																	
				1250				1255									1260

[0011]

```

Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr Arg Gly
1265                1270                1275                1280
Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr Val Tyr Leu
                1285                1290                1295
Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu
                1300                1305                1310
Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro
                1315                1320                1325
Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe
                1330                1335                1340
Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys
1345                1350                1355                1360
Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp
                1365                1370                1375
Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser
                1380                1385                1390

```

<210> 6

<211> 1408

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 6

```

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

```

[0012]

Thr	Phe	His	Thr	Arg	Ile	Ile	Arg	Phe	Cys	Ser	Ile	Asn	Ser	Gly	Leu	275	280	285
His	Ser	Tyr	Met	Glu	Met	Pro	Leu	Glu	Cys	Ile	Leu	Thr	Glu	Lys	Arg	290	295	300
Lys	Lys	Arg	Ser	Thr	Lys	Lys	Glu	Val	Phe	Asn	Ile	Leu	Gln	Ala	Ala	305	310	315
Tyr	Val	Ser	Lys	Pro	Gly	Ala	Gln	Leu	Ala	Arg	Gln	Ile	Gly	Ala	Ser	325	330	335
Leu	Asn	Asp	Asp	Ile	Leu	Phe	Gly	Val	Phe	Ala	Gln	Ser	Lys	Pro	Asp	340	345	350
Ser	Ala	Glu	Pro	Met	Asp	Arg	Ser	Ala	Met	Cys	Ala	Phe	Pro	Ile	Lys	355	360	365
Tyr	Val	Asn	Asp	Phe	Phe	Asn	Lys	Ile	Val	Asn	Lys	Asn	Asn	Val	Arg	370	375	380
Cys	Leu	Gln	His	Phe	Tyr	Gly	Pro	Asn	His	Glu	His	Cys	Phe	Asn	Arg	385	390	395
Thr	Leu	Leu	Arg	Asn	Ser	Ser	Ser	Cys	Glu	Ala	Arg	Arg	Asp	Glu	Tyr	405	410	415
Arg	Thr	Glu	Phe	Thr	Thr	Ala	Leu	Gln	Arg	Val	Asp	Leu	Phe	Met	Gly	420	425	430
Gln	Phe	Ser	Glu	Val	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Phe	Ile	Lys	Gly	435	440	445
Asp	Leu	Thr	Ile	Ala	Asn	Leu	Gly	Thr	Ser	Glu	Gly	Arg	Phe	Met	Gln	450	455	460
Val	Val	Val	Ser	Arg	Ser	Gly	Pro	Ser	Thr	Pro	His	Val	Asn	Phe	Leu	465	470	475
Leu	Asp	Ser	His	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Val	Ile	Val	Glu	His	Thr	Leu	485	490	495
Asn	Gln	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Val	Val	Thr	Gly	Lys	Lys	Ile	Thr	Lys	500	505	510
Ile	Pro	Leu	Asn	Gly	Leu	Gly	Cys	Arg	His	Phe	Gln	Ser	Cys	Ser	Gln	515	520	525
Cys	Leu	Ser	Ala	Pro	Pro	Phe	Val	Gln	Cys	Gly	Trp	Cys	His	Asp	Lys	530	535	540
Cys	Val	Arg	Ser	Glu	Glu	Cys	Leu	Ser	Gly	Thr	Trp	Thr	Gln	Gln	Ile	545	550	555
Cys	Leu	Pro	Ala	Ile	Tyr	Lys	Val	Phe	Pro	Asn	Ser	Ala	Pro	Leu	Glu	565	570	575
Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Cys	Gly	Trp	Asp	Phe	Gly	Phe	Arg	Arg	580	585	590
Asn	Asn	Lys	Phe	Asp	Leu	Lys	Lys	Thr	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Asn	Glu	595	600	605
Ser	Cys	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Glu	Ser	Thr	Met	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	610	615	620
Thr	Val	Gly	Pro	Ala	Met	Asn	Lys	His	Phe	Asn	Met	Ser	Ile	Ile	Ile	625	630	635
Ser	Asn	Gly	His	Gly	Thr	Thr	Gln	Tyr	Ser	Thr	Phe	Ser	Tyr	Val	Asp	645	650	655
Pro	Val	Ile	Thr	Ser	Ile	Ser	Pro	Lys	Tyr	Gly	Pro	Met	Ala	Gly	Gly	660	665	670
Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Thr	Gly	Asn	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Asn	Ser	Arg	675	680	685
His	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Lys	Thr	Cys	Thr	Leu	Lys	Ser	Val	Ser	Asn	690	695	700
Ser	Ile	Leu	Glu	Cys	Tyr	Thr	Pro	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Thr	Glu	Phe	705	710	715
Ala	Val	Lys	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Thr	Ser	Ile	Phe	725	730	735

[0013]

```

Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
      740      745      750
Phe Ile Ser Thr Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu
      755      760      765
Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn
      770      775      780
Leu Asn Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala
      785      790      795      800
Gly Arg Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile
      805      810      815
Ile Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro
      820      825      830
Leu Lys Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr
      835      840      845
Phe Asp Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys
      850      855      860
Pro Val Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly
      865      870      875      880
Asn Asp Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly
      885      890      895
Asn Lys Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys
      900      905      910
Thr Val Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu
      915      920      925
Trp Lys Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln
      930      935      940
Pro Asp Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser
      945      950      955      960
Ile Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg
      965      970      975
Lys Gln Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg
      980      985      990
Val His Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser
      995      1000      1005
Pro Thr Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr
      1010      1015      1020
Phe Pro Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg
      1025      1030      1035      1040
Gln Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly
      1045      1050      1055
Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile Asp
      1060      1065      1070
Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His Val Val
      1075      1080      1085
Ile Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val Ile Gly Arg
      1090      1095      1100
Gly His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly
      1105      1110      1115      1120
Lys Lys Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile
      1125      1130      1135
Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe
      1140      1145      1150
Ser His Pro Asn Val Leu Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu
      1155      1160      1165
Gly Ser Pro Leu Val Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg
      1170      1175      1180
Asn Phe Ile Arg Asn Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile
      1185      1190      1195      1200

```

[0014]

```

Gly Phe Gly Leu Gln Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys
      1205                      1210                      1215
Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu
      1220                      1225                      1230
Lys Phe Thr Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr
      1235                      1240                      1245
Asp Lys Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro
      1250                      1255                      1260
Val Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr
      1265                      1270                      1275                      1280
Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr
      1285                      1290                      1295
Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr Val
      1300                      1305                      1310
Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys Pro Asp
      1315                      1320                      1325
Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys Ala Glu Met
      1330                      1335                      1340
Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser
      1345                      1350                      1355                      1360
Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn
      1365                      1370                      1375
Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn
      1380                      1385                      1390
Ala Asp Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser
      1395                      1400                      1405

```

<210> 7

<211> 1379

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 7

```

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

```

[0015]

Asn	Phe	Phe	Val	Gly	Asn	Thr	Ile	Asn	Ser	Ser	Tyr	Pro	Pro	Gly	Tyr	195	200	205
Ser	Leu	His	Ser	Ile	Ser	Val	Arg	Arg	Leu	Lys	Glu	Thr	Gln	Asp	Gly	210	215	220
Phe	Lys	Phe	Leu	Thr	Asp	Gln	Ser	Tyr	Ile	Asp	Val	Leu	Pro	Glu	Phe	225	230	235
Leu	Asp	Ser	Tyr	Pro	Ile	Lys	Tyr	Ile	His	Ala	Phe	Glu	Ser	Asn	His	245	250	255
Phe	Ile	Tyr	Phe	Leu	Thr	Val	Gln	Lys	Glu	Thr	Leu	Asp	Ala	Gln	Thr	260	265	270
Phe	His	Thr	Arg	Ile	Ile	Arg	Phe	Cys	Ser	Val	Asp	Ser	Gly	Leu	His	275	280	285
Ser	Tyr	Met	Glu	Met	Pro	Leu	Glu	Cys	Ile	Leu	Thr	Glu	Lys	Arg	Arg	290	295	300
Lys	Arg	Ser	Thr	Arg	Glu	Glu	Val	Phe	Asn	Ile	Leu	Gln	Ala	Ala	Tyr	305	310	315
Val	Ser	Lys	Pro	Gly	Ala	Asn	Leu	Ala	Lys	Gln	Ile	Gly	Ala	Ser	Pro	325	330	335
Ser	Asp	Asp	Ile	Leu	Phe	Gly	Val	Phe	Ala	Gln	Ser	Lys	Pro	Asp	Ser	340	345	350
Ala	Glu	Pro	Val	Asn	Arg	Ser	Ala	Val	Cys	Ala	Phe	Pro	Ile	Lys	Tyr	355	360	365
Val	Asn	Asp	Phe	Phe	Asn	Lys	Ile	Val	Asn	Lys	Asn	Asn	Val	Arg	Cys	370	375	380
Leu	Gln	His	Phe	Tyr	Gly	Pro	Asn	His	Glu	His	Cys	Phe	Asn	Arg	Thr	385	390	395
Leu	Leu	Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Cys	Glu	Ala	Arg	Ser	Asp	Glu	Tyr	Arg	405	410	415
Thr	Glu	Phe	Thr	Thr	Ala	Leu	Gln	Arg	Val	Asp	Leu	Phe	Met	Gly	Arg	420	425	430
Leu	Asn	Gln	Val	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Phe	Ile	Lys	Gly	Asp	435	440	445
Leu	Thr	Ile	Ala	Asn	Leu	Gly	Thr	Ser	Glu	Gly	Arg	Phe	Met	Gln	Val	450	455	460
Val	Leu	Ser	Arg	Thr	Ala	His	Leu	Thr	Pro	His	Val	Asn	Phe	Leu	Leu	465	470	475
Asp	Ser	His	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Val	Ile	Val	Glu	His	Pro	Ser	Asn	485	490	495
Gln	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Val	Val	Thr	Gly	Lys	Lys	Ile	Thr	Lys	Ile	500	505	510
Pro	Leu	Asn	Gly	Leu	Gly	Cys	Gly	His	Phe	Gln	Ser	Cys	Ser	Gln	Cys	515	520	525
Leu	Ser	Ala	Pro	Tyr	Phe	Ile	Gln	Cys	Gly	Trp	Cys	His	Asn	Gln	Cys	530	535	540
Val	Arg	Phe	Asp	Glu	Cys	Pro	Ser	Gly	Thr	Trp	Thr	Gln	Glu	Ile	Cys	545	550	555
Leu	Pro	Ala	Val	Tyr	Lys	Val	Phe	Pro	Thr	Ser	Ala	Pro	Leu	Glu	Gly	565	570	575
Gly	Thr	Val	Leu	Thr	Ile	Cys	Gly	Trp	Asp	Phe	Gly	Phe	Arg	Lys	Asn	580	585	590
Asn	Lys	Phe	Asp	Leu	Arg	Lys	Thr	Lys	Val	Leu	Leu	Gly	Asn	Glu	Ser	595	600	605
Cys	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Glu	Ser	Thr	Thr	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	Thr	610	615	620
Val	Gly	Pro	Ala	Met	Ser	Glu	His	Phe	Asn	Val	Ser	Val	Ile	Ile	Ser	625	630	635
Asn	Ser	Arg	Glu	Thr	Thr	Gln	Tyr	Ser	Ala	Phe	Ser	Tyr	Val	Asp	Pro	645	650	655

[0016]

Val	Ile	Thr	Ser	Ile	Ser	Pro	Arg	Tyr	Gly	Pro	Gln	Ala	Gly	Gly	Thr	660	665	670
Leu	Leu	Thr	Leu	Thr	Gly	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Asn	Ser	Arg	His	675	680	685
Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Lys	Thr	Cys	Thr	Leu	Lys	Ser	Val	Ser	Asp	Ser	690	695	700
Ile	Leu	Glu	Cys	Tyr	Thr	Pro	Ala	Gln	Thr	Thr	Ser	Asp	Glu	Phe	Pro	705	710	715
Val	Lys	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	725	730	735
Tyr	Arg	Glu	Asp	Pro	Val	Val	Tyr	Glu	Ile	His	Pro	Thr	Lys	Ser	Phe	740	745	750
Ile	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Thr	Gly	Ile	Gly	Lys	Thr	Leu	Asn	Ser	755	760	765
Val	Ser	Leu	Pro	Lys	Leu	Val	Ile	Asp	Val	His	Glu	Val	Gly	Val	Asn	770	775	780
Tyr	Thr	Val	Ala	Cys	Gln	His	Arg	Ser	Asn	Ser	Glu	Ile	Ile	Cys	Cys	785	790	795
Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys	Gln	Leu	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys	Thr	805	810	815
Lys	Ala	Phe	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ser	Lys	His	Phe	Asp	Leu	820	825	830
Thr	Tyr	Val	His	Asn	Pro	Val	Phe	Glu	Pro	Phe	Glu	Lys	Pro	Val	Met	835	840	845
Ile	Ser	Met	Gly	Asn	Glu	Asn	Val	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Asn	Asn	Ile	850	855	860
Asp	Pro	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Glu	Val	Leu	Lys	Val	Gly	Asn	Gln	Ser	865	870	875
Cys	Glu	Ser	Leu	His	Trp	His	Ser	Gly	Ala	Val	Leu	Cys	Thr	Val	Pro	885	890	895
Ser	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Glu	Leu	Asn	Ile	Glu	Trp	Lys	Gln	900	905	910
Ala	Val	Ser	Ser	Thr	Val	Leu	Gly	Lys	Val	Ile	Val	Gln	Pro	Asp	Gln	915	920	925
Asn	Phe	Ala	Gly	Leu	Ile	Ile	Gly	Ala	Val	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Val	930	935	940
Leu	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Phe	Leu	Trp	Met	Arg	Lys	Arg	Lys	His	Lys	945	950	955
Asp	Leu	Gly	Ser	Glu	Leu	Val	Arg	Tyr	Asp	Ala	Arg	Val	His	Thr	Pro	965	970	975
His	Leu	Asp	Arg	Leu	Val	Ser	Ala	Arg	Ser	Val	Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	980	985	990
Met	Val	Ser	Asn	Glu	Ser	Val	Asp	Tyr	Arg	Ala	Thr	Phe	Pro	Glu	Asp	995	1000	1005
Gln	Phe	Pro	Asn	Ser	Ser	Gln	Asn	Gly	Ala	Cys	Arg	Gln	Val	Gln	Tyr	1010	1015	1020
Pro	Leu	Thr	Asp	Leu	Ser	Pro	Ile	Leu	Thr	Ser	Gly	Asp	Ser	Asp	Ile	1025	1030	1035
Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Asn	Thr	Val	His	Ile	Asp	Leu	Ser	Ala	Leu	1045	1050	1055
Asn	Pro	Glu	Leu	Val	Gln	Ala	Val	Gln	His	Val	Val	Ile	Gly	Pro	Ser	1060	1065	1070
Ser	Leu	Ile	Val	His	Phe	Asn	Glu	Val	Ile	Gly	Arg	Gly	His	Phe	Gly	1075	1080	1085
Cys	Val	Tyr	His	Gly	Thr	Leu	Leu	Asp	Asn	Asp	Gly	Lys	Lys	Ile	His	1090	1095	1100
Cys	Ala	Val	Lys	Ser	Leu	Asn	Arg	Ile	Thr	Asp	Ile	Glu	Glu	Val	Ser	1105	1110	1115
																		1120

[0017]

Gln Phe Leu Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn
 1125 1130 1135
 Val Leu Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu
 1140 1145 1150
 Val Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg
 1155 1160 1165
 Asn Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly Leu
 1170 1175 1180
 Gln Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe Val His
 1185 1190 1195 1200
 Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe Thr Val
 1205 1210 1215
 Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys Glu Tyr
 1220 1225 1230
 Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys Trp Met
 1235 1240 1245
 Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys Ser Asp Val
 1250 1255 1260
 Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro
 1265 1270 1275 1280
 Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr Ile Tyr Leu Leu Gln
 1285 1290 1295
 Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Ala Leu Tyr Glu
 1300 1305 1310
 Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe
 1315 1320 1325
 Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser Ser Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly
 1330 1335 1340
 Glu His Tyr Val His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val
 1345 1350 1355 1360
 Ala Pro Tyr Pro Ser Leu Leu Pro Ser Gln Asp Asn Ile Asp Gly Glu
 1365 1370 1375
 Gly Asn Thr

<210> 8

<211> 1382

<212> PRT

<213> 大鼠(Rattus norvegicus)

<400> 8

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

[0018]

Gln	Leu	Ile	Ser	Cys	Gly	Ser	Val	Asn	Arg	Gly	Thr	Cys	Gln	Arg	His
130						135					140				
Val	Leu	Pro	Pro	Asp	Asn	Ala	Ala	Asp	Ile	Gln	Ser	Glu	Val	His	Cys
145					150					155					160
Met	Phe	Ser	Pro	Leu	Ala	Glu	Glu	Glu	Ser	Gly	Gln	Cys	Pro	Asp	Cys
				165					170					175	
Val	Val	Ser	Ala	Leu	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Leu	Ser	Glu	Lys	Asp	Arg
			180					185					190		
Phe	Ile	Asn	Phe	Phe	Val	Gly	Asn	Thr	Ile	Asn	Ser	Ser	Tyr	Pro	Pro
		195					200					205			
Asp	Tyr	Ser	Leu	His	Ser	Ile	Ser	Val	Arg	Arg	Leu	Lys	Glu	Thr	Gln
210						215					220				
Asp	Gly	Phe	Lys	Phe	Leu	Thr	Asp	Gln	Ser	Tyr	Ile	Asp	Val	Leu	Gly
225					230					235					240
Glu	Phe	Arg	Asp	Ser	Tyr	Pro	Ile	Lys	Tyr	Ile	His	Ala	Phe	Glu	Ser
				245					250					255	
Asn	His	Phe	Ile	Tyr	Phe	Leu	Thr	Val	Gln	Lys	Glu	Thr	Leu	Asp	Ala
			260					265					270		
Gln	Thr	Phe	His	Thr	Arg	Ile	Ile	Arg	Phe	Cys	Ser	Val	Asp	Ser	Gly
		275					280					285			
Leu	His	Ser	Tyr	Met	Glu	Met	Pro	Leu	Glu	Cys	Ile	Leu	Thr	Glu	Lys
290					295					300					
Arg	Arg	Lys	Arg	Ser	Thr	Arg	Glu	Glu	Val	Phe	Asn	Ile	Leu	Gln	Ala
305					310					315					320
Ala	Tyr	Val	Ser	Lys	Pro	Gly	Ala	Asn	Leu	Ala	Lys	Gln	Ile	Gly	Ala
				325					330					335	
Ser	Pro	Tyr	Asp	Asp	Ile	Leu	Tyr	Gly	Val	Phe	Ala	Gln	Ser	Lys	Pro
			340					345					350		
Asp	Ser	Ala	Glu	Pro	Met	Asn	Arg	Ser	Ala	Val	Cys	Ala	Phe	Pro	Ile
		355					360					365			
Lys	Tyr	Val	Asn	Asp	Phe	Phe	Asn	Lys	Ile	Val	Asn	Lys	Asn	Asn	Val
370					375					380					
Arg	Cys	Leu	Gln	His	Phe	Tyr	Gly	Pro	Asn	His	Glu	His	Cys	Phe	Asn
385					390					395					400
Arg	Thr	Leu	Leu	Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Cys	Glu	Val	Arg	Ser	Asp	Glu
				405					410					415	
Tyr	Arg	Thr	Glu	Phe	Thr	Thr	Ala	Leu	Gln	Ala	Val	Asp	Leu	Phe	Met
			420					425					430		
Gly	Arg	Leu	Asn	His	Val	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Phe	Ile	Lys
		435					440					445			
Gly	Asp	Leu	Thr	Ile	Ala	Asn	Leu	Gly	Thr	Ser	Glu	Gly	Arg	Phe	Met
450					455						460				
Gln	Val	Val	Leu	Ser	Arg	Thr	Ala	His	Phe	Thr	Pro	His	Val	Asn	Phe
465					470					475					480
Leu	Leu	Asp	Ser	His	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Val	Ile	Val	Glu	His	Pro
				485					490					495	
Ser	Asn	Gln	Asn	Gly	Tyr	Thr	Leu	Val	Val	Thr	Gly	Lys	Lys	Ile	Thr
		500						505					510		
Lys	Ile	Pro	Leu	Asn	Gly	Leu	Gly	Cys	Gly	His	Phe	Gln	Ser	Cys	Ser
		515					520					525			
Gln	Cys	Leu	Ser	Ala	Pro	Tyr	Phe	Ile	Gln	Cys	Gly	Trp	Cys	His	Asn
		530				535					540				
Arg	Cys	Val	His	Ser	Asn	Glu	Cys	Pro	Ser	Gly	Thr	Trp	Thr	Gln	Glu
545					550					555					560
Ile	Cys	Leu	Pro	Ala	Val	Tyr	Lys	Val	Phe	Pro	Thr	Ser	Ala	Pro	Leu
				565					570					575	
Glu	Gly	Gly	Thr	Met	Leu	Thr	Ile	Cys	Gly	Trp	Asp	Phe	Gly	Phe	Lys
			580					585					590		

[0019]

Lys	Asn	Asn	Lys	Phe	Asp	Leu	Arg	Lys	Thr	Lys	Val	Leu	Leu	Gly	Asn	595	600	605
Glu	Ser	Cys	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Glu	Ser	Thr	Thr	Asn	Thr	Leu	Lys	610	615	620
Cys	Thr	Val	Gly	Pro	Ala	Met	Ser	Glu	His	Phe	Asn	Val	Ser	Val	Ile	625	630	635
Val	Ser	Asn	Ser	Arg	Glu	Thr	Thr	Gln	Tyr	Ser	Ala	Phe	Ser	Tyr	Val	645	650	655
Asp	Pro	Val	Ile	Thr	Ser	Ile	Ser	Pro	Arg	Tyr	Gly	Pro	His	Ala	Gly	660	665	670
Gly	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Gly	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Asn	Ser		675	680	685
Arg	His	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Lys	Thr	Cys	Thr	Leu	Lys	Ser	Val	Ser	690	695	700
Asp	Ser	Ile	Leu	Glu	Cys	Tyr	Thr	Pro	Gly	His	Thr	Val	Ser	Ala	Glu	705	710	715
Phe	Pro	Val	Lys	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	Ala	Asp	Arg	Val	Thr	Ser	Ser	725	730	735
Phe	Ser	Tyr	Gly	Glu	Asp	Pro	Phe	Val	Ser	Glu	Ile	His	Pro	Thr	Lys	740	745	750
Ser	Phe	Ile	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Thr	Gly	Ile	Gly	Lys	Asn	Leu	755	760	765
Asn	Ser	Val	Ser	Thr	Pro	Lys	Leu	Val	Ile	Glu	Val	His	Asp	Val	Gly	770	775	780
Val	Asn	Tyr	Thr	Val	Ala	Cys	Gln	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Glu	Ile	Ile	785	790	795
Cys	Cys	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Gln	Gln	Leu	Asp	Leu	Gln	Leu	Pro	Leu	805	810	815
Lys	Thr	Lys	Ala	Phe	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Ser	Lys	His	Phe	820	825	830
Asp	Leu	Thr	Tyr	Val	His	Asp	Pro	Met	Phe	Lys	Pro	Phe	Glu	Lys	Pro	835	840	845
Val	Met	Ile	Ser	Met	Gly	Asn	Glu	Asn	Val	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Asp	850	855	860
Asp	Ile	Asp	Pro	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Glu	Val	Leu	Lys	Val	Gly	Asn	865	870	875
Lys	Ser	Cys	Glu	Asn	Leu	His	Trp	His	Ser	Glu	Ala	Leu	Leu	Cys	Thr	885	890	895
Val	Pro	Ser	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Asn	Gly	Gly	Glu	Leu	Asn	Ile	Glu	900	905	910
Trp	Lys	Gln	Ala	Val	Ser	Ser	Thr	Val	Leu	Gly	Lys	Val	Ile	Val	Gln	915	920	925
Pro	Asp	Gln	Asn	Phe	Ala	Gly	Leu	Ile	Ile	Gly	Ala	Val	Ser	Ile	Ser	930	935	940
Val	Val	Val	Leu	Leu	Val	Ser	Gly	Leu	Phe	Leu	Trp	Leu	Arg	Lys	Arg	945	950	955
Lys	His	Lys	Asp	Leu	Gly	Ser	Glu	Leu	Val	Arg	Tyr	Asp	Ala	Arg	Val	965	970	975
His	Thr	Pro	His	Leu	Asp	Arg	Leu	Val	Ser	Ala	Arg	Ser	Val	Ser	Pro	980	985	990
Thr	Thr	Glu	Met	Val	Ser	Asn	Glu	Ser	Val	Asp	Tyr	Arg	Ala	Thr	Phe	995	1000	1005
Pro	Glu	Asp	Gln	Phe	Pro	Asn	Ser	Ser	Gln	Asn	Gly	Ala	Cys	Arg	Gln	1010	1015	1020
Val	Gln	Tyr	Pro	Leu	Thr	Asp	Leu	Ser	Pro	Ile	Leu	Thr	Ser	Gly	Asp	1025	1030	1035
Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Asn	Thr	Val	His	Ile	Asp	Leu	1045	1050	1055

[0020]

```

Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His Val Val Ile
      1060                      1065                      1070
Gly Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly
      1075                      1080                      1085
His Phe Gly Cys Val Tyr His Gly Thr Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys
      1090                      1095                      1100
Lys Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Glu
1105                      1110                      1115                      1120
Glu Val Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser
      1125                      1130                      1135
His Pro Asn Val Leu Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly
      1140                      1145                      1150
Ser Pro Leu Val Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn
      1155                      1160                      1165
Phe Ile Arg Asn Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly
      1170                      1175                      1180
Phe Gly Leu Gln Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys
1185                      1190                      1195                      1200
Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys
      1205                      1210                      1215
Phe Thr Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp
      1220                      1225                      1230
Lys Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val
      1235                      1240                      1245
Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys
      1250                      1255                      1260
Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr Arg
1265                      1270                      1275                      1280
Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr Ile Tyr
      1285                      1290                      1295
Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Ala
      1300                      1305                      1310
Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys Ala Glu Met Arg
      1315                      1320                      1325
Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser Ser Ile Phe Ser Thr
      1330                      1335                      1340
Phe Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val
1345                      1350                      1355                      1360
Lys Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu Leu Pro Ser Gln Asp Asn Ile
      1365                      1370                      1375
Asp Gly Glu Ala Asn Thr
      1380

```

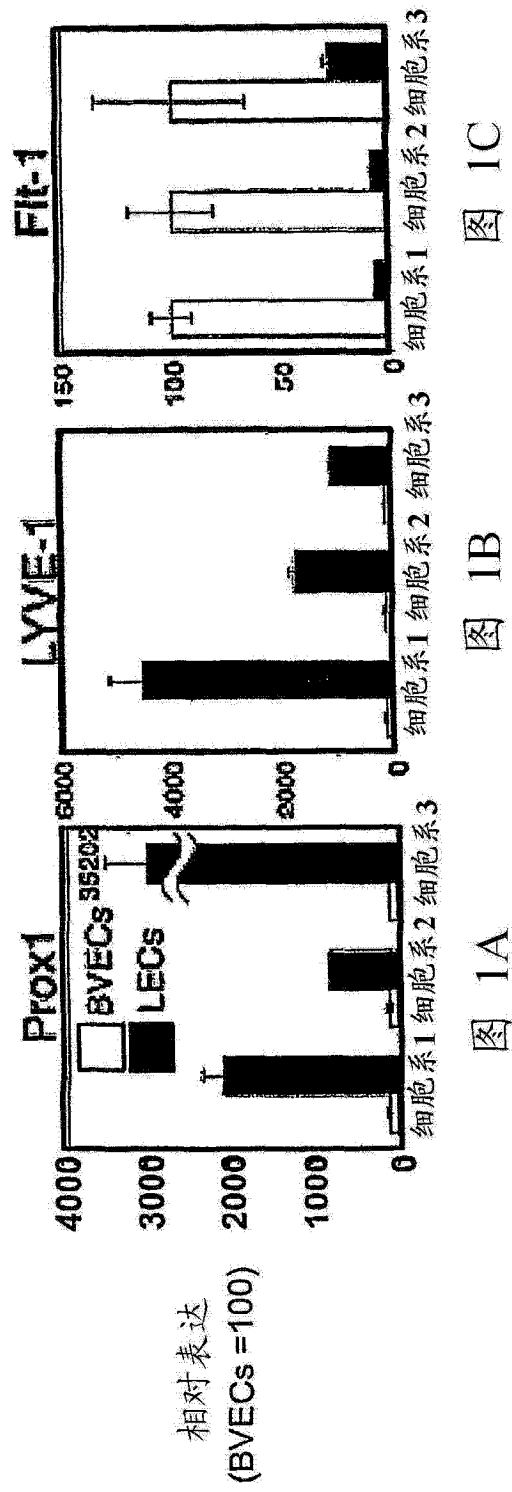


图 1C

图 1B

图 1A

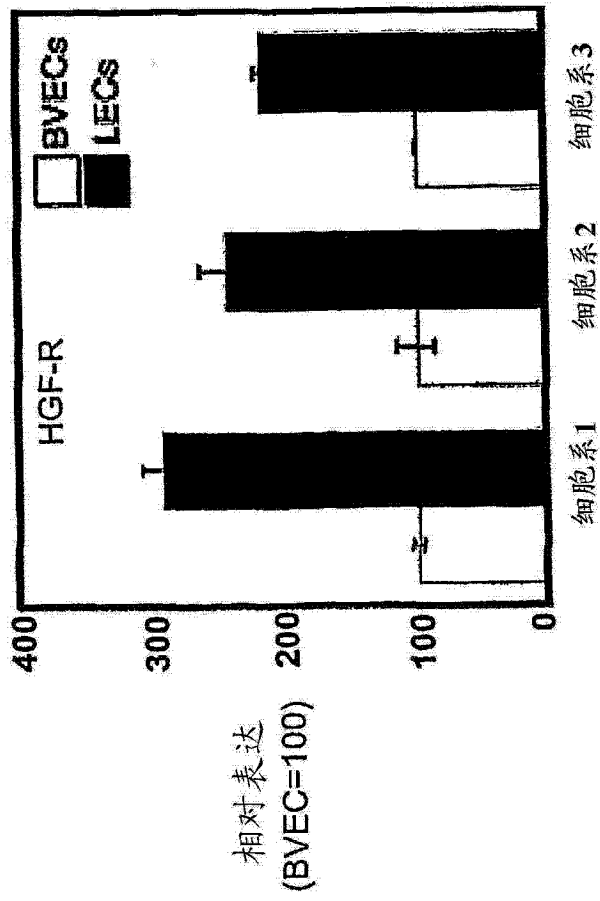


图 1D

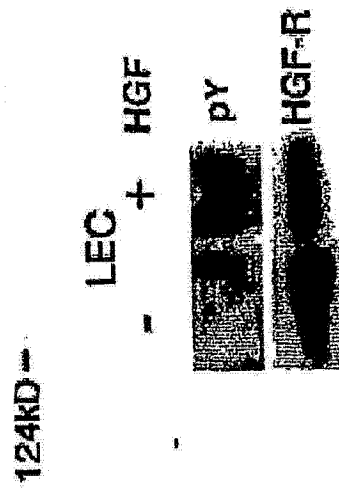
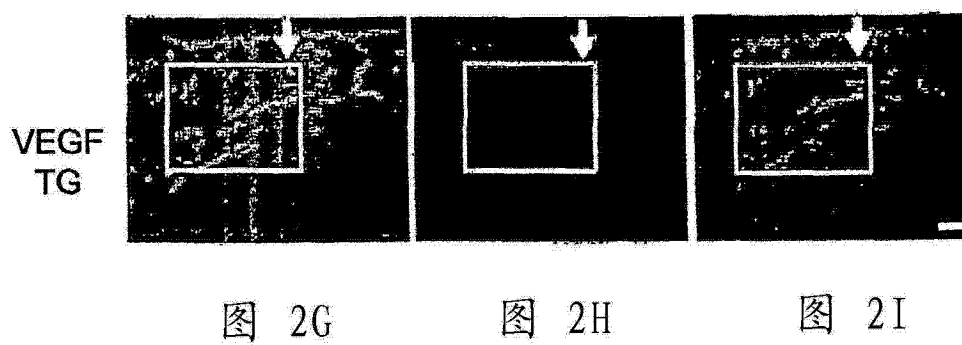
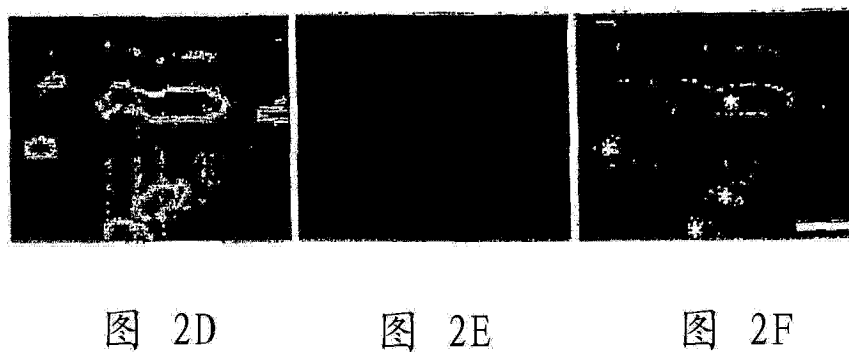
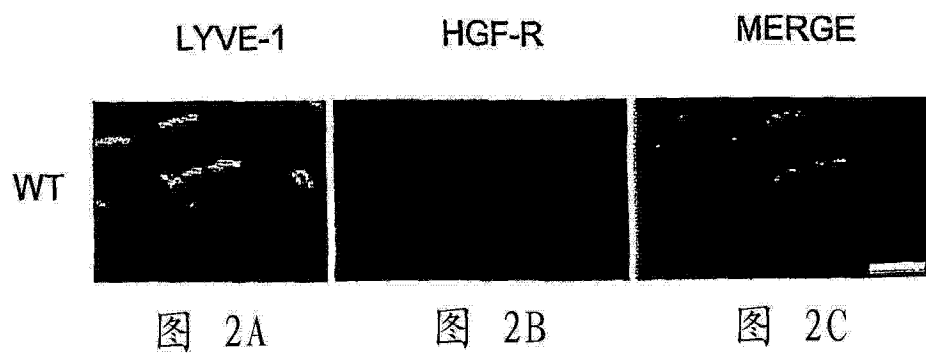


图 1F



图 1E



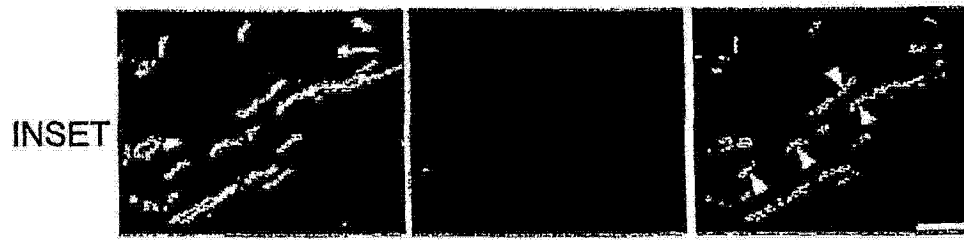


图 2J

图 2K

图 2L

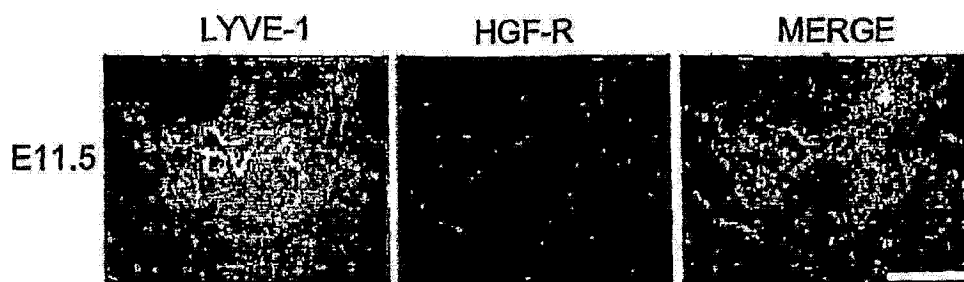


图 3A

图 3B

图 3C



图 3D

图 3E

图 3F

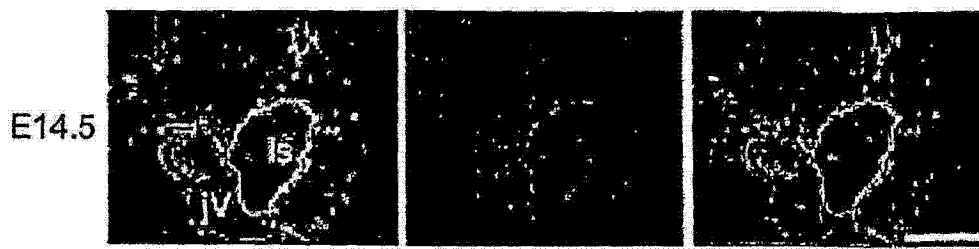


图 3G

图 3H

图 3I

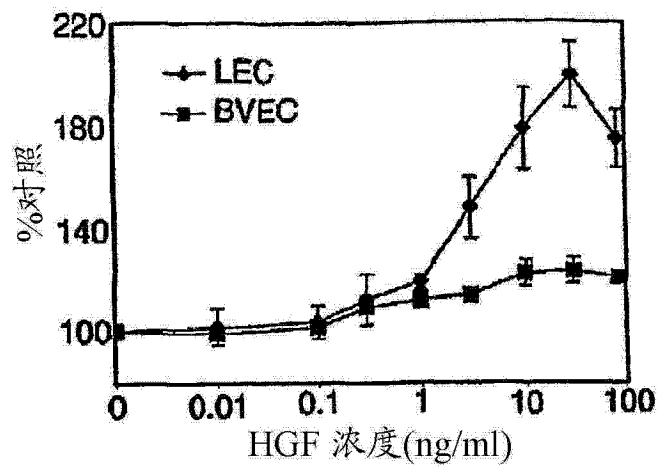


图 4A

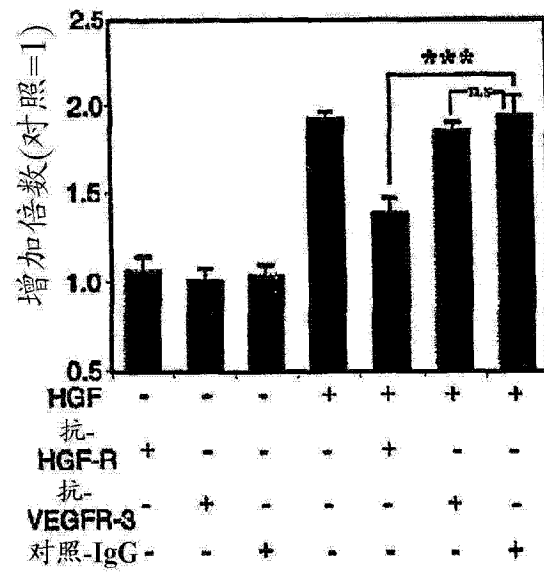


图 4B

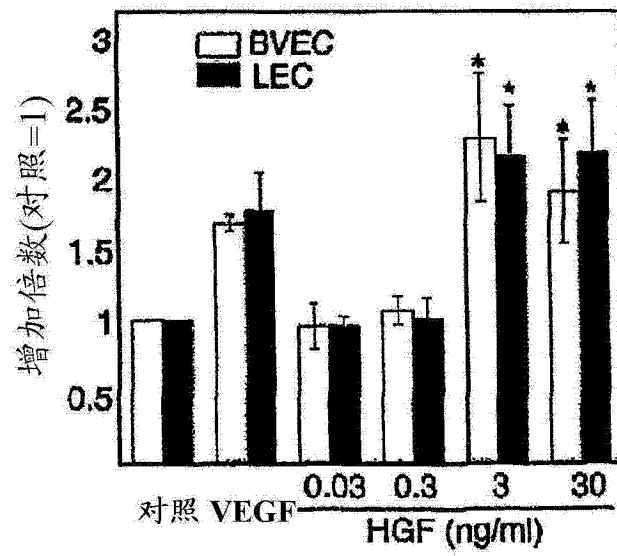


图 4C

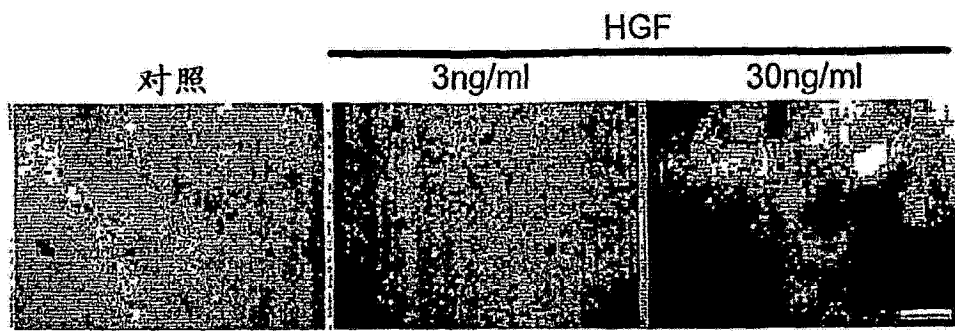


图 5A

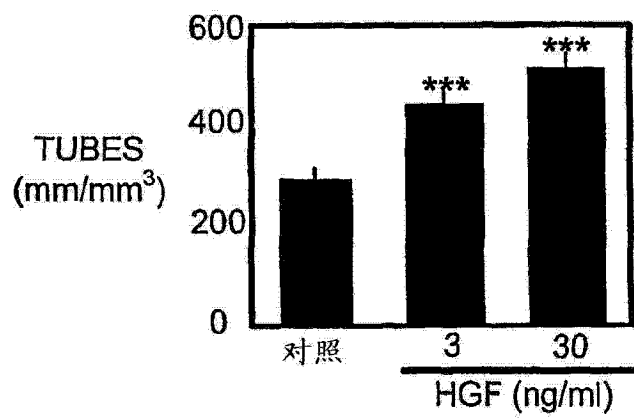


图 5B

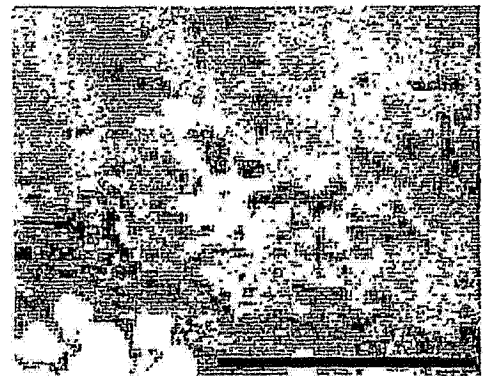


图 5C

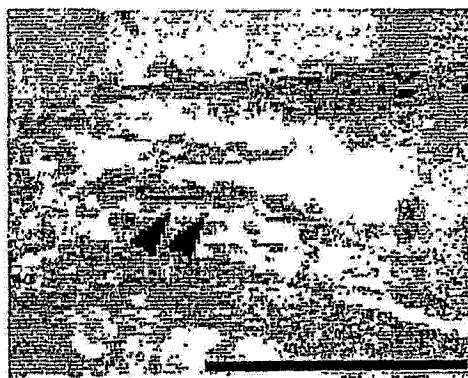


图 5D

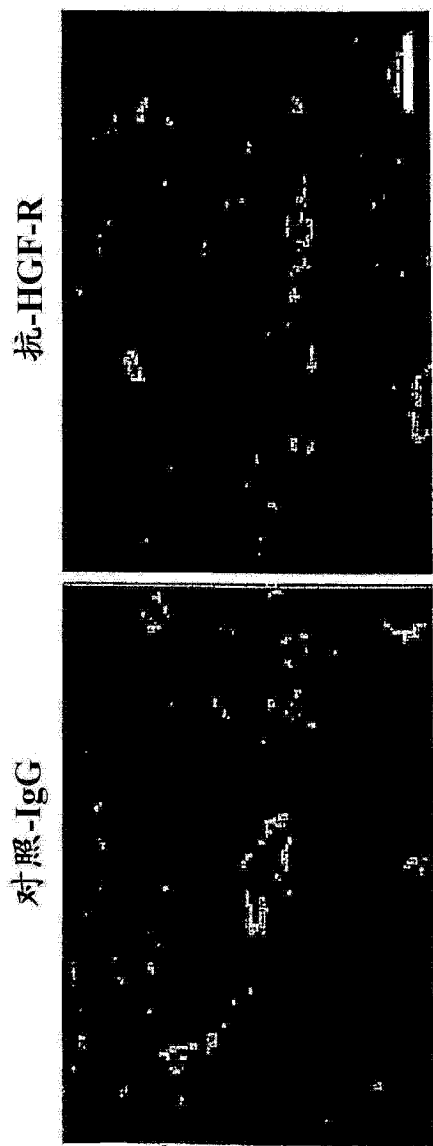


图 6B

图 6A

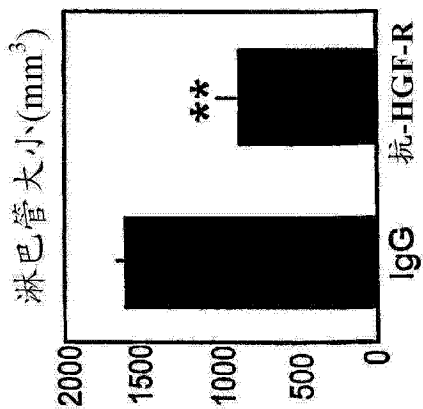


图 6D

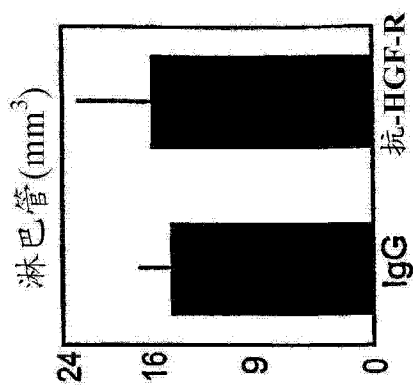


图 6E

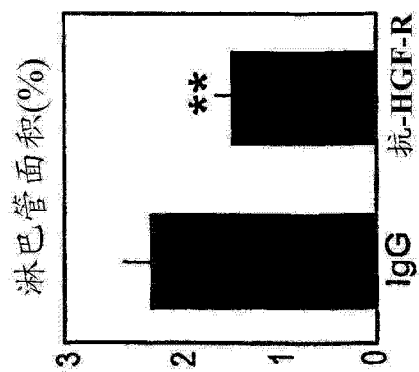


图 6C

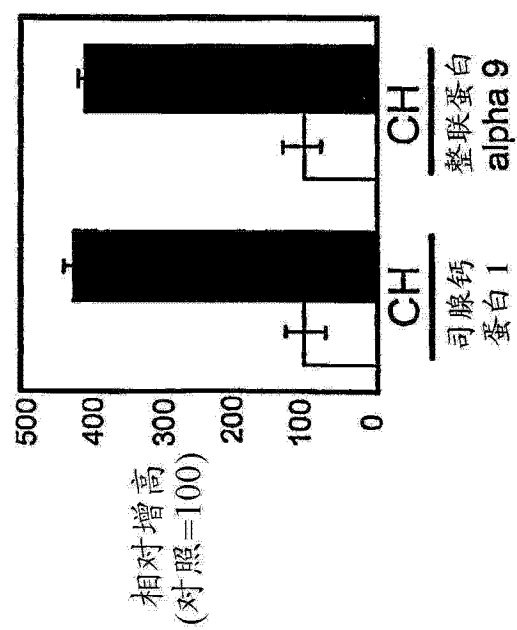


图 7A

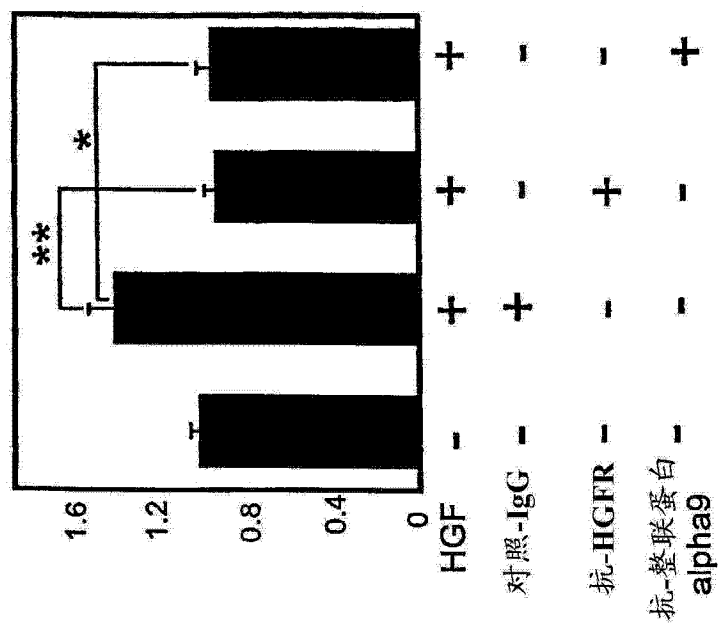


图 7B

