



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108138234 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680034923.6

(22)申请日 2016.04.15

(30)优先权数据

62/148,005 2015.04.15 US

62/218,869 2015.09.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.12.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/027773 2016.04.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/168612 EN 2016.10.20

(71)申请人 普罗麦迪奥股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 伊丽莎白·特雷胡布

理查德·M·杰克

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 杨青 穆德骏

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

A61K 38/17(2006.01)

权利要求书6页 说明书88页
序列表28页

(54)发明名称

治疗骨髓增生性障碍的方法

(57)摘要

本公开部分涉及通过施用一种或多种血清淀粉样蛋白(SAP)来治疗骨髓增生性障碍的方法。在某些情况下,所述方法还包括通过测量突变等位基因负荷的变化来监测治疗功效。在某些情况下,本公开涉及在某些细胞中带有骨髓纤维化相关突变的患者亚群体中通过施用SAP蛋白来治疗骨髓纤维化的方法。

1. 一种治疗骨髓增生性障碍的方法,所述方法包括:
 - (i) 确定具有骨髓增生性障碍的对象的细胞在选自下列的一个或多个基因中是否包含与骨髓增生性障碍相关的突变:JAK2,MPL,CALR,ASXL1,EZH2,SRSF2,IDH1或IDH2;并且如果所述对象包含所述突变的等位基因,则
 - (ii) 向所述对象施用有效量的血清淀粉样P (SAP) 蛋白。
2. 权利要求1的方法,其中所述骨髓增生性障碍包含骨髓纤维化。
3. 权利要求2的方法,其中所述骨髓纤维化包含原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症后的骨髓纤维化或原发性血小板增多症后的骨髓纤维化。
4. 权利要求1的方法,其中所述骨髓增生性障碍包含真性红细胞增多症、原发性血小板增多症或慢性髓系白血病(CML)。
5. 权利要求1至4任一项的方法,其中所述方法包括确定所述对象是否在JAK2的617位密码子处包含突变。
6. 权利要求5的方法,其中所述突变在JAK2中引起V617F氨基酸替换。
7. 权利要求1至4任一项的方法,其中所述方法包括确定所述对象是否在JAK2的外显子12或外显子14中包含突变。
8. 权利要求1至7任一项的方法,其中所述方法包括确定所述对象是否在MPL的515位密码子处包含突变。
9. 权利要求8的方法,其中所述突变在MPL中引起W515L、W515K、W515A或W515R氨基酸替换。
10. 权利要求1至7任一项的方法,其中所述方法包括确定所述对象是否在MPL的外显子10中包含突变。
11. 权利要求1至10任一项的方法,其中所述方法包括确定所述对象是否在CALR的外显子9中包含突变。
12. 权利要求1至11任一项的方法,其中所述方法包括确定所述对象是否在ASXL1的外显子12中包含突变。
13. 权利要求1至12任一项的方法,其中所述方法包括确定所述对象是否在IDH1的外显子4中包含突变。
14. 权利要求1至12任一项的方法,其中所述方法包括确定所述对象是否在IDH1的132位密码子处包含突变。
15. 权利要求1至14任一项的方法,其中所述方法包括确定所述对象是否在IDH2的外显子4中包含突变。
16. 权利要求1至14任一项的方法,其中所述方法包括确定所述对象是否在IDH2的140位密码子处包含突变。
17. 权利要求1至16任一项的方法,其中所述方法包括确定所述对象是否在IDH2的172位密码子处包含突变。
18. 权利要求1至17任一项的方法,其中所述一个或多个基因中与骨髓增生性障碍相关的突变是缺失、插入、点突变或易位。
19. 权利要求18的方法,其中所述突变导致由所述一个或多个基因编码的一种或多种蛋白质的表达缺失或导致表达截短的蛋白质。

20. 权利要求1至19任一项的方法,其中所述一个或多个基因中与骨髓增生性障碍相关的突变存在于所述一个或多个基因的一个或两个等位基因上。

21. 一种使用血清淀粉样P (SAP) 蛋白治疗骨髓增生性障碍的方法,所述方法包括:

(i) 测量选自下列的与骨髓增生性障碍相关的一个或多个基因中突变的第一突变等位基因负荷: JAK2, MPL, CALR, ASXL1, EZH2, SRSF2, IDH1 或 IDH2, 其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;

(ii) 测量在(i)中测量的相同突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;并且

(iii) 鉴定所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异,

其中所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低,表明所述SAP蛋白的施用在治疗所述骨髓增生性障碍中有效。

22. 权利要求21的方法,其中所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低为10%至90%,或者所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异是10%至90%的减少。

23. 权利要求21的方法,其中所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低为25%至50%,或者所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异是25%至50%的减少。

24. 权利要求21的方法,其中所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低为至少50%,或者所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异是至少50%的减少。

25. 权利要求21的方法,其中所述差异是完全分子响应。

26. 权利要求21至25任一项的方法,其中所述方法包括获得第一生物样品并测量所述第一生物样品中的第一突变等位基因负荷,以及获得第二生物样品并测量所述第二生物样品中的第二突变等位基因负荷。

27. 权利要求26的方法,其中所述第一和第二生物样品包含血液样品和/或骨髓样品。

28. 权利要求21至27任一项的方法,其中所述测量步骤包括扩增核酸,所述核酸包含所述与骨髓增生性障碍相关的一个或多个基因的全部或一部分。

29. 权利要求21至28任一项的方法,其中所述测量步骤包括确定所述与骨髓增生性障碍相关的一个或多个基因的突变核酸与野生型核酸的比例。

30. 权利要求21至29任一项的方法,其还包括在所述治疗的有效性的基础上提高、降低或维持所述SAP蛋白的剂量方案。

31. 权利要求21至30任一项的方法,其中所述一个或多个基因中的至少一个突变是JAK2的617位密码子处的突变。

32. 权利要求31的方法,其中所述突变在JAK2中引起V617F氨基酸替换。

33. 权利要求21至30任一项的方法,其中所述一个或多个基因中的至少一个突变在JAK2的外显子12或外显子14中。

34. 权利要求21至33任一项的方法,其中所述一个或多个基因中的至少一个突变在MPL的515位密码子处。

35. 权利要求34的方法,其中所述突变在MPL中引起W515L、W515K、W515A或W515R氨基酸

替换。

36. 权利要求21至35任一项的方法,其中所述一个或多个基因中的至少一个突变在MPL的外显子10中。

37. 权利要求21至36任一项的方法,其中所述一个或多个基因中的至少一个突变在CALR的外显子9中。

38. 权利要求21至37任一项的方法,其中所述一个或多个基因中的至少一个突变在ASXL1的外显子12中。

39. 权利要求21至38任一项的方法,其中所述一个或多个基因中的至少一个突变在IDH1的外显子4中。

40. 权利要求21至38任一项的方法,其中所述一个或多个基因中的至少一个突变在IDH1的132位密码子处。

41. 权利要求21至40任一项的方法,其中所述一个或多个基因中的至少一个突变在IDH2的外显子4中。

42. 权利要求21至40任一项的方法,其中所述一个或多个基因中的至少一个突变在IDH2的140位密码子处。

43. 权利要求21至42任一项的方法,其中所述一个或多个基因中的至少一个突变在IDH2的172位密码子处。

44. 权利要求21至43任一项的方法,其中所述一个或多个基因中的突变是缺失、插入、点突变或易位。

45. 权利要求44的方法,其中所述突变导致由所述一个或多个基因编码一种或多种蛋白质的表达缺失或导致表达截短的蛋白质。

46. 权利要求21至45任一项的方法,其中所述一个或多个基因中的突变存在于所述一个或多个基因的一个或两个等位基因上。

47. 一种治疗骨髓增生性障碍的方法,所述方法包括向需要的对象施用有效量的血清淀粉样P (SAP) 蛋白,其中所述对象的某些细胞在选自下列的一个或多个基因中包含与骨髓增生性障碍相关的突变: JAK2, MPL, CALR, ASXL1, EZH2, SRSF2, IDH1 或 IDH2。

48. 一种治疗骨髓增生性障碍的方法,所述方法包括向需要的对象施用有效量的血清淀粉样P (SAP) 蛋白,其中所述对象的某些细胞在选自下列的一个或多个基因中包含与骨髓增生性障碍相关的突变: JAK2, MPL, CALR, ASXL1, EZH2, SRSF2, IDH1 或 IDH2, 并且其中按照有效降低所述对象中所述基因的突变等位基因负荷的剂量方案施用所述SAP蛋白。

49. 权利要求47或48的方法,其中所述骨髓增生性障碍包含骨髓纤维化。

50. 权利要求49的方法,其中所述骨髓纤维化包含原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症后的骨髓纤维化或原发性血小板增多症后的骨髓纤维化。

51. 权利要求47或48的方法,其中所述骨髓增生性障碍包含真性红细胞增多症、原发性血小板增多症或慢性髓系白血病 (CML)。

52. 权利要求47至51任一项的方法,其中所述对象在JAK2的617位密码子处包含突变。

53. 权利要求52的方法,其中所述突变在JAK2中引起V617F氨基酸替换。

54. 权利要求47至51任一项的方法,其中所述对象在JAK2的外显子12或外显子14中包含突变。

55. 权利要求47至54任一项的方法,其中所述对象在MPL的515位密码子处包含突变。
56. 权利要求55的方法,其中所述突变在MPL中引起W515L、W515K、W515A或W515R氨基酸替换。
57. 权利要求47至54任一项的方法,其中所述对象在MPL的外显子10中包含突变。
58. 权利要求47至57任一项的方法,其中所述对象在CALR的外显子9中包含突变。
59. 权利要求47至58任一项的方法,其中所述对象在ASXL1的外显子12中包含突变。
60. 权利要求47至59任一项的方法,其中所述对象在IDH1的外显子4中包含突变。
61. 权利要求47至59任一项的方法,其中所述对象在IDH1的132位密码子处包含突变。
62. 权利要求47至61任一项的方法,其中所述对象在IDH2的外显子4中包含突变。
63. 权利要求47至61任一项的方法,其中所述对象在IDH2的140位密码子处包含突变。
64. 权利要求47至63任一项的方法,其中所述对象在IDH2的172位密码子处包含突变。
65. 权利要求47至64任一项的方法,其中所述一个或多个基因中与骨髓增生性障碍相关的突变是缺失、插入、点突变或易位。
66. 权利要求65的方法,其中所述突变导致由所述一个或多个基因编码的一种或多种蛋白质的表达缺失或导致表达截短的蛋白质。
67. 权利要求47至66任一项的方法,其中所述一个或多个基因中与骨髓增生性障碍相关的突变存在于所述一个或多个基因的一个或两个等位基因上。
68. 一种在患有骨髓增生性障碍的对象中降低突变等位基因负荷的方法,所述方法包括向需要的对象施用有效量的血清淀粉样P (SAP) 蛋白,其中所述对象在选自下列的一个或多个基因中包含与骨髓增生性障碍相关的突变: JAK2, MPL, CALR, ASXL1, EZH2, SRSF2, IDH1 或 IDH2。
69. 权利要求68的方法,其中所述骨髓增生性障碍包含骨髓纤维化。
70. 权利要求69的方法,其中所述骨髓纤维化包含原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症后的骨髓纤维化或原发性血小板增多症后的骨髓纤维化。
71. 权利要求1至70任一项的方法,其中所述SAP蛋白包含SAP多肽,所述多肽包含与SEQ ID NO:1具有至少85%的同一性的氨基酸序列。
72. 权利要求1至71任一项的方法,其中所述SAP蛋白包含糖基化的重组人SAP多肽,其包含N-连接的寡糖链,其中所述寡糖链的至少一条支链以 α 2,3-连接的唾液酸组成部分为末端。
73. 权利要求72的方法,其中所述寡糖链的所有唾液酸化的支链以 α 2,3-连接的唾液酸组成部分为末端。
74. 权利要求72的方法,其中所述寡糖链基本上不含 α 2,6-连接的唾液酸组成部分。
75. 权利要求71至74任一项的方法,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:1具有至少90%的同一性的氨基酸序列。
76. 权利要求71至74任一项的方法,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:1具有至少95%的同一性的氨基酸序列。
77. 权利要求71至76任一项的方法,其中所述多肽是包含SAP结构域和一个或多个异源结构域的融合蛋白。
78. 权利要求77的方法,其中所述一个或多个异源结构域增强体内稳定性、体内半衰

期、摄入/施用、组织定位/分布、蛋白质复合体的形成和/或纯化中的一者或多者。

79. 权利要求71至77任一项的方法,其中所述多肽包含一个或多个修饰的氨基酸残基。

80. 权利要求79的方法,其中所述一个或多个修饰的氨基酸残基包含PEG化的氨基酸、异戊二烯化的氨基酸、乙酰化的氨基酸、生物素化的氨基酸和/或偶联到有机衍生试剂的氨基酸。

81. 权利要求1至80任一项的方法,其中所述SAP蛋白通过选自以下的方式施用:注射、静脉内注射或输注、皮下注射、通过储库或泵连续释放或其组合。

82. 权利要求1至81任一项的方法,其中所述方法还包括向所述患者施用另外的抗癌治疗剂。

83. 权利要求82的方法,其中所述另外的抗癌治疗剂选自化疗药剂、基于抗体的药剂、激酶抑制剂(例如鲁索替尼)、免疫调节剂、生物药剂或其组合。

84. 权利要求83的方法,其中所述化疗药剂选自:放线菌素D,阿地白介素,阿利维A酸,全反式视黄酸/ATRA,六甲蜜胺,安吡啶,天冬酰胺酶,阿扎胞苷,硫唑嘌呤,卡介苗/BCG,苯达莫司汀盐酸盐,蓓萨罗丁,比卡鲁胺,博来霉素,硼替佐米,白消安,卡培他滨,卡铂,卡非佐米,卡莫司汀,苯丁酸氮芥,顺氯氨铂/顺铂,克拉屈滨,环磷酰胺/细胞磷烷,阿糖胞苷,达卡巴嗪,正定霉素/道诺霉素,地尼白介素-白喉毒素连接物,右雷佐生,多西他赛,多柔比星,表柔比星,依托泊苷,氟达拉滨,氟尿嘧啶(5-FU),吉西他滨,戈舍瑞林,氢化可的松,羟基脲,伊达比星,异环磷酰胺,干扰素 α ,伊立替康CPT-11,拉帕替尼,来那度胺,亮丙瑞林,二氯甲基二乙胺/双氯乙基甲胺/氮芥/HN2,巯基嘌呤,甲氨蝶呤,甲基强的松龙,丝裂霉素,米托坦,米托蒽醌,奥曲肽,奥普瑞白介素,奥沙利铂,紫杉醇,帕米膦酸盐,培门冬酶,培非格司亭,PEG干扰素,培美曲塞,喷司他丁,苯丙氨酸氮芥,普卡霉素/光神霉素,泼尼松,泼尼松龙,丙卡巴肼,雷洛昔芬,罗米司亭,沙格司亭,链脲菌素,他莫昔芬,替莫唑胺,替西罗莫司,替尼泊苷,沙利度胺,硫鸟嘌呤,硫代磷酰胺/噻替派,噻替派,盐酸拓扑替康,托瑞米芬,维甲酸,戊柔比星,长春花碱,长春新碱,长春地辛,长春瑞滨,伏立诺他,唑来膦酸,或其组合。

85. 权利要求83的方法,其中所述基于抗体的药剂选自:阿仑单抗,贝伐单抗,西妥昔单抗,夫苏木单抗,吉妥单抗奥佐米星,替伊莫单抗,伊匹单抗,奥法木单抗,帕尼单抗,利妥昔单抗,托西莫单抗,曲妥珠单抗,曲妥珠单抗DM1或其组合。

86. 权利要求83的方法,其中所述激酶抑制剂选自:阿西替尼,巴非替尼,博舒替尼,西地尼布,克唑替尼,达沙替尼,埃罗替尼,吉非替尼,伊马替尼,拉帕替尼,来那替尼,尼罗替尼,帕唑帕尼,帕纳替尼,奎扎替尼,瑞戈非尼,索拉非尼,舒尼替尼,凡德他尼,瓦他拉尼,威罗非尼或其组合。

87. 权利要求83的方法,其中所述免疫调节剂选自:萨力多胺,来那度胺,泊马度胺,甲氨蝶呤,来氟米特,环磷酰胺,环孢霉素A,米诺环素,硫唑嘌呤,他克莫司,甲基强的松龙,霉酚酸酯,雷帕霉素,咪唑立宾,脱氧精胍菌素,布喹那,5,6-二甲基咕吨酮-4-乙酸(DMXAA),乳铁蛋白,poly AU,polyI:polyC12U,poly-ICLC,咪喹莫特,瑞喹莫特,未甲基化的CpG二核苷酸(CpG-ODN)或伊匹单抗。

88. 权利要求83的方法,其中所述激酶抑制剂是Janus激酶抑制剂,其选自:AC-430, AZD1480,巴瑞克替尼,BMS-911453,CEP-33779,CYT387,GLPG-0634,INCB 18424,来他替尼,LY2784544,NS-018,帕克替尼,鲁索替尼,TG 101348(SAR302503),托法替尼,VX-509,R-

348,R723或其组合。

89. 权利要求83的方法,其中所述生物药剂选自:IL-2,IL-3,促红细胞生成素,G-CSF,非格司亭,干扰素 α ,硼替佐米或其组合。

90. 权利要求82的方法,其中所述另外的抗癌治疗剂选自:AB0024,AZD1480,AT-9283,BMS-911543,CYT387,依维莫司,吉维司他,伊美司他,来他替尼,LY2784544,NS-018,口服砷,帕克替尼,帕比司他,聚乙二醇化干扰素 α -2a,泊马度胺,帕西司他,鲁索替尼,TAK-901或TG 101438 (SAR302503)。

91. 权利要求1至90任一项的方法,其中按照有效地将脾脏体积相对于基线减小至少25%的剂量方案施用所述SAP蛋白。

92. 权利要求91的方法,其中按照有效地将脾脏体积相对于基线减小至少50%的剂量方案施用单独的或与另外的抗癌治疗剂组合的所述SAP蛋白。

93. 权利要求1至92任一项的方法,其中按照有效地将MPN-SAF症状总分相对于基线降低至少25%的剂量方案施用所述SAP蛋白。

94. 权利要求93的方法,其中按照有效地将MPN-SAF症状总分相对于基线降低至少50%的剂量方案施用所述SAP蛋白。

95. 权利要求1至94任一项的方法,其中按照有效地将血红蛋白水平相对于基线提高至少1g/L的剂量方案施用所述SAP蛋白。

96. 权利要求1至95任一项的方法,其中按照有效地将血红蛋白水平提高到至少100g/L的剂量方案施用所述SAP蛋白,其中在基线时基线血红蛋白低于100g/L。

97. 权利要求1至96任一项的方法,其中按照有效地将红细胞(RBC)输血相对于基线减少至少25%的剂量方案施用所述SAP蛋白。

98. 权利要求1至97任一项的方法,其中按照有效地将红细胞(RBC)输血相对于基线减少至少50%的剂量方案施用所述SAP蛋白。

99. 权利要求1至98任一项的方法,其中按照有效地实现RBC输血不依赖性的剂量方案施用所述SAP蛋白。

100. 权利要求1至99任一项的方法,其中按照有效地将血小板输血减少至少25%的剂量方案施用所述SAP蛋白。

101. 权利要求1至100任一项的方法,其中按照有效地将血小板输血减少至少50%的剂量方案施用单独的或与另外的抗癌治疗剂组合的所述SAP蛋白。

102. 权利要求1至101任一项的方法,其中按照有效地使骨髓纤维化降低1个等级的剂量方案施用单独的或与另外的抗癌治疗剂组合的所述SAP蛋白。

103. 权利要求1至101任一项的方法,其中所述方法包括按照相对于单独使用另外的抗癌治疗剂的治疗降低一种或多种副作用的剂量方案施用SAP蛋白和所述另外的抗癌治疗剂。

104. 一种试剂盒,其包含:a) SAP蛋白;b) 能够扩增选自下列的一个或多个基因的区域的一种或多种寡核苷酸:JAK2,MPL,CALR,ASXL1,EZH2,SRSF2,IDH1和IDH2;以及c) 使用说明书。

治疗骨髓增生性障碍的方法

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求美国临时专利申请系列号62/148,005 (2015年4月15日提交) 和62/218,869 (2015年9月15日提交) 的优先权和利益,所述临时专利申请的公开内容整体通过参考并入本文。

背景技术

[0003] 骨髓增生性疾病 (MPD) 也被称为骨髓增生性肿瘤 (MPN), 是指一组以血液细胞例如髓系血液细胞和前体的克隆性异常为特征的障碍。这些障碍可能影响髓系、红系和血小板细胞。骨髓增生性障碍对诊断和治疗提出挑战。

[0004] 在某些增生性病症例如骨髓纤维化 (MF) 中, 健康器官组织被纤维化替换引起器官功能不足, 其造成所述障碍的症状。骨髓纤维化 (包括原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症后的骨髓纤维化和原发性血小板增多症后的骨髓纤维化) 是一种克隆性骨髓增生性肿瘤, 其特征在于进行性骨髓纤维化和随后无效的红细胞生成、发育异常的巨核细胞增生和髓外造血。典型的临床表现包括显著脾肿大、进行性贫血和与高发病率和死亡率相关的体质。此外, 大多数患者不是适合的移植候选者。

[0005] 直到最近, 仍没有批准的用于MF的医学疗法, 大多数对象使用生长因子、免疫调节剂、细胞毒性化学疗法和甾类化合物的各种不同组合进行管理。这些疗法都不能在大多数对象中产生显著响应。因此, 直到最近, 没有药物被批准用于MF。

[0006] 鲁索替尼是一种Janus激酶抑制剂, 最近在US和EU被批准用于治疗具有中或高风险骨髓纤维化, 包括原发性骨髓纤维化 (PMF)、真性红细胞增多症后的骨髓纤维化 (post-PV MF) 和原发性血小板增多症后的骨髓纤维化 (post-ET MF) 的对象 (JAKAFI® Full Prescribing Information 2011)。使用鲁索替尼的治疗引起脾脏体积减小和体质症状的改善, 但似乎对骨髓纤维化或等位基因负荷没有效果。

[0007] 对于可以在患有骨髓纤维化的对象中改善骨髓纤维化并获得血液计数和其他疾病相关因子的改善的新疗法, 存在明显未满足的医疗需求。尽管已开发并在MF临床试验中评估了大量药物, 但到目前为止尚没有药物表现出选择性抗克隆性效应, 尽管在缓解其他症状中有活性。因此, 对于为骨髓增生性障碍例如骨髓纤维化的治疗开发其他治疗选项, 仍存在需求。

[0008] 发明概述

[0009] 本公开提供了各种不同方法, 例如治疗骨髓增生性障碍的各种不同方法。所述方法包括按照剂量方案, 以多剂量向对象施用血清淀粉样P (SAP) 蛋白或穿透素-2, 例如施用SAP蛋白的各种不同方法。任选地, 所述方法包括一个或多个步骤, 其中对从所述对象获取的样品中的一个或多个基因进行评估, 以确定突变状态 (例如所述对象的某些细胞是否包含与骨髓增生性障碍相关的突变)。在某些实施方式中, 特别地选择具有某种突变状态的对象进行治疗, 或者根据突变状态调整剂量方案。在其他实施方式中, 在治疗过程中评估突变状态, 以确定治疗对等位基因负荷的影响。在某些实施方式中, 在患者的响应性, 例如对等

位基因负荷的影响或对症状改善的一种或多种其他度量的影响的基础上调整剂量方案。

[0010] 在某些方面,本公开提供了一种治疗骨髓增生性障碍的方法,所述方法包括向需要的对象施用有效量的血清淀粉样P (SAP) 蛋白,其中所述对象的某些细胞在选自下列的一个或多个基因中包含与骨髓增生性障碍相关的突变:JAK2,MPL,CALR,ASXL1,EZH2,SRSF2,IDH1或IDH2。换句话说,所述对象的某些细胞携带与骨髓增生性障碍相关的突变(例如所述对象包含在一个或多个上述基因中带有突变的细胞)。在某些实施方式中,所述对象包含超过一个与骨髓增生性障碍相关的突变,例如在两个或三个(或超过三个)上述基因中的突变。在某些实施方式中,施用包括按照给药计划和/或剂量方案以多剂量施用所述SAP蛋白,以例如实现治疗效果。

[0011] 在某些方面下,本公开提供了一种治疗骨髓增生性障碍的方法,所述方法包括向需要的对象施用有效量的血清淀粉样P (SAP) 蛋白,其中所述对象的某些细胞在选自下列的一个或多个基因中包含与骨髓增生性障碍相关的突变:JAK2,MPL,CALR,ASXL1,EZH2,SRSF2,IDH1或IDH2,并且其中所述SAP蛋白按照在所述对象中有效降低所述基因的突变等位基因负荷的剂量方案施用。换句话说,所述对象的某些细胞携带与骨髓增生性障碍相关的突变(例如所述对象包含在一个或多个上述基因中带有突变的细胞)。在某些实施方式中,所述对象包含超过一个与骨髓增生性障碍相关的突变,例如在两个或三个(或超过三个)上述基因中的突变。在某些实施方式中,所述剂量方案也有效地改善所述骨髓增生性障碍的一种或多种其他表现形式,例如有效地将骨髓纤维化降低至少一个等级。

[0012] 在某些方面,本公开提供了一种在患有骨髓增生性障碍的对象中降低突变等位基因负荷的方法,所述方法包括向需要的对象施用有效量的血清淀粉样P (SAP) 蛋白,其中所述对象在选自下列的一个或多个基因中包含与骨髓增生性障碍相关的突变:JAK2,MPL,CALR,ASXL1,EZH2,SRSF2,IDH1或IDH2。换句话说,所述对象的某些细胞携带与骨髓增生性障碍相关的突变(例如所述对象包含在一个或多个上述基因中带有突变的细胞)。在某些实施方式中,所述对象包含超过一个与骨髓增生性障碍相关的突变,例如在两个或三个(或超过三个)上述基因中的突变。在某些实施方式中,所述剂量方案也有效地改善所述骨髓增生性障碍的一种或多种其他表现形式,例如有效地将骨髓纤维化降低至少一个等级。在某些实施方式中,施用有效量包括按照剂量方案施用SAP蛋白(例如按照给药计划施用多剂量)。

[0013] 在某些情况下,本公开提供了一种使用血清淀粉样P (SAP) 蛋白治疗骨髓增生性障碍的方法,所述方法包括:(i) 测量在选自下列的一个或多个基因中与骨髓增生性障碍相关的突变的第一突变等位基因负荷:JAK2,MPL,CALR,ASXL1,EZH2,SRSF2,IDH1或IDH2,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii) 测量在(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;并且(iii) 鉴定所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异,其中所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低,表明施用所述SAP蛋白在治疗所述骨髓增生性障碍中有效。在某些实施方式中,测量超过一个基因中(例如两个、三个或超过三个基因中)的突变等位基因负荷。在某些实施方式中,在步骤(ii)中进行的所述测量在治疗约1个周期后和/或治疗约1个月后进行。在其他实施方式中,在步骤(ii)中进行的所述测量在治疗约2或3个周期后和/或在治疗约2或3个月后进行。然而,在治疗过程中步骤(ii)可以更早或更晚进行。此外,本公开设想了可以随着治疗时间评估等位

基因负荷,以确定等位基因负荷的降低和响应的持久性。

[0014] 在某些方面,本公开提供了一种治疗骨髓增生性障碍的方法,所述方法包括:(i) 确定具有骨髓增生性障碍的对象的细胞在选自下列的一个或多个基因中是否包含与骨髓增生性障碍相关的突变:JAK2,MPL,CALR,ASXL1,EZH2,SRSF2,IDH1或IDH2;并且如果所述对象携带所述突变的等位基因,则(ii)向所述对象施用有效量的血清淀粉样P(SAP)蛋白。换句话说,所述对象的某些细胞携带与骨髓增生性障碍相关的突变(例如所述对象包含在一个或多个上述基因中带有突变的细胞)。在某些实施方式中,所述对象包含超过一个与骨髓增生性障碍相关的突变,例如在两个或三个(或超过三个)上述基因中的突变。在某些实施方式中,所述与骨髓增生性障碍相关的突变不是JAK2V617F。在某些实施方式中,施用包括按照给药计划和/或剂量方案以多剂量施用所述SAP蛋白,以例如实现治疗效果。在某些实施方式中,所述剂量方案有效地降低等位基因负荷和/或改善骨髓增生性障碍的一种或多种其他表现形式,例如有效地将骨髓纤维化降低至少一个等级。

[0015] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述与骨髓增生性障碍相关的突变是激活性突变。在某些实施方式中,所述对象包含超过一个与骨髓增生性障碍相关的突变,例如在超过一个(例如两个、三个、超过三个)上述基因中的突变。在某些实施方式中,所述对象是需要治疗骨髓增生性障碍的对象(例如需要的对象)。

[0016] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述对象在JAK2的617位密码子处包含突变(例如所述与骨髓增生性障碍相关的突变是JAK2V617F)。在某些实施方式中,所述对象在JAK2的外显子12或外显子14中包含突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL的515位密码子处包含突变。在某些实施方式中,所述突变在MPL中引起W515L、W515K、W515A或W515R氨基酸替换。在某些实施方式中,所述对象在MPL的外显子10中包含突变。在某些实施方式中,所述对象在CALR的外显子9中包含突变。在某些实施方式中,所述对象在ASXL1的外显子12中包含突变。在某些实施方式中,所述对象在ASXL1的外显子12中包含突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的外显子4中包含突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的132位密码子处包含突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的外显子4中包含突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的140位密码子处包含突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的172位密码子处包含突变。在某些实施方式中,所述突变不是JAK2V617F。在某些实施方式中,如果所述突变是JAK2V617F,则所述对象还包含一个或多个其他与骨髓增生性障碍相关的突变。在某些实施方式中,所述对象包含超过一个与骨髓增生性障碍相关的突变,例如在超过一个(例如两个、三个、超过三个)上述基因中的突变。在某些实施方式中,所述对象包含在JAK2、CALR和MPL以及任选地一个或多个其他基因中的突变,或针对所述突变对所述对象进行评估。应该理解,对“所述对象包含”的指称也指称所述对象包含含有所述突变的细胞或所述对象包含携带所述突变的细胞。

[0017] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述与骨髓增生性障碍相关的突变是缺失、插入、点突变或易位。在某些实施方式中,所述突变导致由所述一个或多个基因编码的一种或多种蛋白质的表达缺失或导致表达截短的蛋白质。在某些实施方式中,所述突变是激活性突变。在某些实施方式中,所述激活性突变是JAK2V617F。在某些实施方式中,所述激活性突变是在MPL的515位密码子处的突变。

[0018] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述与骨髓增生性障碍相关的突变存

在于所述一个或多个基因的一个或两个等位基因上。

[0019] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,SAP蛋白以多剂量施用,例如按照给药计划和/或剂量方案。示例性的剂量方案提供在本文中。

[0020] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,在SAP蛋白施用之前和/或之后,在所述对象中测量骨髓增生性障碍的一种或多种表现形式,例如等位基因负荷、骨髓纤维化等。示例性的其他表现形式/终点提供在本文中。在某些实施方式中,所述SAP蛋白的施用有效地改善一种或多种这些表现形式/终点,任选地没有不利的骨髓抑制。

[0021] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,在使用SAP蛋白治疗后,在一个或多个与骨髓增生性障碍相关的基因中突变等位基因负荷的降低为10至90%。在某些实施方式中,所述突变等位基因负荷的降低为25%至50%。在某些实施方式中,所述突变等位基因负荷的降低为至少50%,例如约50-60%、50-70%、50-75%或50-80%。在某些实施方式中,观察到完全分子响应。在某些实施方式中,所述突变等位基因负荷的降低在一个治疗周期后或30天后评估。在某些实施方式中,所述突变等位基因负荷的降低在治疗开始后60天、90天或120天评估。在某些实施方式中,突变等位基因负荷的降低在多个时间点评估。在某些实施方式中,除了突变等位基因负荷之外,在治疗之前和/或期间评估一种或多种其他症状。

[0022] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述生物样品是血液样品。在某些实施方式中,所述生物样品是骨髓。换句话说,在某些实施方式中,当出于例如评估突变的存在或评估等位基因负荷的目的从对象获取样品时,所述样品是血液样品或骨髓样品。在某些实施方式中,从对象获取血液样品或骨髓样品,以评估骨髓增生性障碍的其他表现形式例如骨髓纤维化。

[0023] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述测量步骤包括扩增包含所述与骨髓增生性障碍相关的一个或多个基因的全部或一部分的核酸。换句话说,在某些实施方式中,当测定与骨髓增生性障碍相关的基因以例如确定对象是否携带与骨髓增生性障碍相关的突变或评估等位基因负荷或等位基因负荷的变化时,所述评估可以包括扩增包含所述与骨髓增生性障碍相关的一个或多个基因的全部或一部分的核酸。在某些实施方式中,作为所述测定或方法的一部分,评估或测量多个候选基因(例如两个、三个或超过三个)。

[0024] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述测量步骤包括确定所述与骨髓增生性障碍相关的一个或多个基因的突变核酸与野生型核酸的比例。

[0025] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述SAP蛋白是包含一个或多个原体的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白是包含5个原体的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白被提供为包含SAP蛋白的组合物,例如药物组合物,并且所述SAP蛋白和组合物可用于本文中描述的任何方法中。

[0026] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,SAP蛋白是糖基化的人SAP蛋白。例如,所述SAP蛋白可以包含SAP多肽,例如糖基化的人SAP多肽,例如具有与从人类血清分离的SAP蛋白不同的糖基化的糖基化的人SAP多肽(例如包含N-连接的寡糖链的人SAP,其中所述寡糖链的至少一条支链以 α 2,3-连接的唾液酸组成为末端)。在某些实施方式中,所述SAP蛋白是重组人SAP(例如rhSAP)。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含在本领域中也称为PRM-151的重组人SAP。Duffield和Lupher, Drug News&Perspectives 2010,23(5): 305-315。任选地,rhSAP可以在CHO细胞或其他适合的细胞系中制备。在某些实施方式中,本

文中描述的任何方法包括施用所述被称为PRM-151的重组人SAP。

[0027] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述SAP蛋白是包含N-连接的寡糖链的糖基化的人SAP蛋白,其中所述寡糖链的至少一条支链以 $\alpha 2,3$ -连接的唾液酸组成为末端。在某些实施方式中,所述寡糖链的所有唾液酸化的支链以 $\alpha 2,3$ -连接的唾液酸组成为末端。在某些实施方式中,所述寡糖链基本上不含 $\alpha 2,6$ -连接的唾液酸组成部分。例如,所述SAP蛋白可以包含这种糖基化的人SAP蛋白。在某些实施方式中,所述糖基化的人SAP蛋白也被称为重组人穿透素-2 (hPTX-2) 的重组人SAP,正如在Duffield和Lupher, Drug News & Perspectives 2010, 23 (5) :305-315中所述。在某些实施方式中,本公开的方法包括施用包含糖基化的人SAP蛋白的组合物,其中所述人SAP蛋白包含5个SAP原体。在某些实施方式中,所述组合物包含含有N-连接的寡糖链的SAP蛋白,其中所述寡糖链的至少一条支链以 $\alpha 2,3$ -连接的唾液酸组成为末端。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含5个SAP原体,其中每个原体包含N-连接的寡糖链,其中所述寡糖链的至少一条支链以 $\alpha 2,3$ -连接的唾液酸组成为末端。在某些实施方式中,包含SAP蛋白的所述组合物或所述SAP蛋白与血清来源的SAP相比包含少85%的 $\alpha 2,6$ -连接的唾液酸。在某些实施方式中,所有所述寡糖链的所有唾液酸化的支链以 $\alpha 2,3$ -连接的唾液酸组成为末端。在某些实施方式中,所述寡糖链基本上不含 $\alpha 2,6$ -连接的唾液酸组成部分。

[0028] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述SAP蛋白包含与SEQ ID NO:1具有至少85%的同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含与SEQ ID NO:1具有至少95%的同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述SAP蛋白是具有与从血清纯化的人SAP不同的糖基化的糖基化的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含5条多肽链,每条多肽链包含与SEQ ID NO:1具有至少85%、至少90%、95%、98%或甚至100%的同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含5个SAP原体,并且每个原体包含与SEQ ID NO:1具有至少85% (或至少90、95、98、99或100%) 的同一性的氨基酸序列。

[0029] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述SAP蛋白是包含SAP结构域和一个或多个异源结构域的融合蛋白。在某些实施方式中,所述一个或多个异源结构域提高体内稳定性、体内半衰期、摄入/施用、组织定位/分布、蛋白质复合体的形成和/或纯化中的一者或多者。

[0030] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述SAP蛋白包含一个或多个修饰的氨基酸残基。在某些实施方式中,所述一个或多个修饰的氨基酸残基包括PEG化的氨基酸、异戊二烯化的氨基酸、乙酰化的氨基酸、生物素化的氨基酸和/或偶联到有机衍生试剂的氨基酸。

[0031] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述SAP蛋白通过选自下列的方式施用:口服,表面,注射,静脉内注射,皮下注射,吸入,通过储库 (depot) 或泵连续释放,或其组合。

[0032] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述方法还包括向所述患者施用抗癌治疗剂 (例如另外的抗癌治疗剂)。

[0033] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述抗癌治疗剂选自化疗药剂、基于抗体的药剂、激酶抑制剂 (例如酪氨酸激酶抑制剂、丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂等)、免疫调节剂、生物药剂及其组合。单个另外的药剂或多个另外的药剂或治疗方式可以被共同施用

(在相同或不同时间点和/或通过相同或不同的施用途径和/或按照相同或不同的给药计划)。在某些实施方式中,SAP蛋白与另外的抗癌治疗剂的组合被指明用于单独的所述另外的抗癌治疗剂不被指明用于的病症、患者群体或亚群体。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化的SAP蛋白,例如具有与从血清纯化的人SAP不同的糖基化的SAP蛋白。

[0034] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述化疗药剂选自但不限于:放线菌素D,阿地白介素,阿利维A酸,全反式视黄酸/ATRA,六甲蜜胺,安吡啶,天冬酰胺酶,阿扎胞苷,硫唑嘌呤,卡介苗/BCG,苯达莫司汀盐酸盐,蓓萨罗丁,比卡鲁胺,博来霉素,硼替佐米,白消安,卡培他滨,卡铂,卡非佐米,卡莫司汀,苯丁酸氮芥,顺氯氨铂/顺铂,克拉屈滨,环磷酸胺/细胞磷烷(cytosphane),阿糖胞苷(cytarabine),达卡巴嗪,正定霉素/道诺霉素,地尼白介素-白喉毒素连接物,右雷佐生,多西他赛,多柔比星,表柔比星,依托泊苷,氟达拉滨,氟尿嘧啶(5-FU),吉西他滨,戈舍瑞林,氢化可的松,羟基脲,伊达比星,异环磷酸胺,干扰素 α ,伊立替康CPT-11,拉帕替尼,来那度胺,亮丙瑞林,二氯甲基二乙胺/双氯乙基甲胺/氮芥/HN2,巯基嘌呤,甲氨蝶呤,甲基强的松龙,丝裂霉素,米托坦,米托蒽醌,奥曲肽,奥普瑞白介素,奥沙利铂,紫杉醇,帕米膦酸盐,培门冬酶,培非格司亭,PEG干扰素,培美曲塞,喷司他丁,苯丙氨酸氮芥,普卡霉素/光神霉素,泼尼松,泼尼松龙,丙卡巴肼,雷洛昔芬,罗米司亭,沙格司亭,链脲菌素,他莫昔芬,替莫唑胺,替西罗莫司,替尼泊苷,沙利度胺,硫鸟嘌呤,硫代磷酸胺/噻替派,噻替派,盐酸拓扑替康,托瑞米芬,维甲酸,戊柔比星,长春花碱,长春新碱,长春地辛,长春瑞滨,伏立诺他,唑来膦酸,或其组合。在某些实施方式中,所述方法包括施用所述SAP蛋白与另外的抗癌治疗剂的组合,所述另外的抗癌治疗剂是化学治疗剂,例如单个化学治疗剂或两种或更多种化学治疗剂的组合。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化的SAP蛋白,例如具有与从血清纯化的人SAP不同的糖基化的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述化学治疗剂选自任何上述药剂。

[0035] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述基于抗体的药剂选自但不限于:阿仑单抗,贝伐单抗,西妥昔单抗,夫苏木单抗(fresolimumab),吉妥单抗奥佐米星,替伊莫单抗,伊匹单抗,奥法木单抗,帕尼单抗,利妥昔单抗,托西莫单抗,曲妥珠单抗,曲妥珠单抗DM1及其组合。在某些实施方式中,所述方法包括施用所述SAP蛋白和另外的抗癌治疗剂,所述另外的抗癌治疗剂是基于抗体的药剂。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化的SAP蛋白,例如具有与从血清纯化的人SAP不同的糖基化的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述化学治疗剂选自任何上述药剂。

[0036] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述激酶抑制剂(例如酪氨酸激酶抑制剂、丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂等)选自但不限于:阿西替尼,巴非替尼,博舒替尼,西地尼布,克唑替尼,达沙替尼,埃罗替尼,吉非替尼,伊马替尼,拉帕替尼,来那替尼,尼罗替尼,帕唑帕尼,帕纳替尼,奎扎替尼,瑞戈非尼,索拉非尼,舒尼替尼,凡德他尼,瓦他拉尼,威罗非尼及其组合。在某些实施方式中,所述方法包括施用所述SAP蛋白和另外的抗癌治疗剂,所述另外的抗癌治疗剂是激酶抑制剂。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化的SAP蛋白,例如具有与从血清纯化的人SAP不同的糖基化的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述化学治疗剂选自任何上述药剂。

[0037] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述免疫调节剂选自但不限于:萨力多胺,来那度胺,泊马度胺,甲氨蝶呤,来氟米特,环磷酸胺,环孢霉素A,米诺环素,硫唑嘌呤

吟,他克莫司,甲基强的松龙,霉酚酸酯,雷帕霉素,咪唑立宾,脱氧精肌菌素,布喹那,5,6-二甲基咕吨酮-4-乙酸(DMXAA),乳铁蛋白,poly AU,poly I:poly C12U,poly-ICLC,咪喹莫特,瑞喹莫特,未甲基化的CpG二核苷酸(CpG-ODN)和伊匹单抗。在某些实施方式中,所述方法包括施用所述SAP蛋白和另外的抗癌治疗剂,所述另外的抗癌治疗剂是免疫调节剂。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化的SAP蛋白,例如具有与从血清纯化的人SAP不同的糖基化的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述化学治疗剂选自任何上述药剂。

[0038] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述激酶抑制剂是Janus激酶抑制剂,其选自但不限于:AC-430,AZD1480,巴瑞克替尼,BMS-911453,CEP-33779,CYT387,GLPG-0634,INCB 18424,来他替尼,LY2784544,NS-018,帕克替尼(pacritinib),鲁索替尼,TG 101348(SAR302503),托法替尼,VX-509,R-348,R723及其组合。在某些实施方式中,所述方法包括施用所述SAP蛋白和另外的抗癌治疗剂,所述另外的抗癌治疗剂是Janus激酶抑制剂。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化的SAP蛋白,例如具有与从血清纯化的人SAP不同的糖基化的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述化学治疗剂选自任何上述药剂。

[0039] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述生物药剂选自但不限于:IL-2,IL-3,促红细胞生成素,G-CSF,非格司亭,干扰素 α ,硼替佐米及其组合。在某些实施方式中,所述化学治疗剂选自任何上述药剂。

[0040] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述抗癌治疗剂选自但不限于:AB0024,AZD1480,AT-9283,BMS-911543,CYT387,依维莫司,吉维司他(givinostat),伊美司他,来他替尼,LY2784544,NS-018,口服砷,帕克替尼,帕比司他,聚乙二醇化干扰素 α -2a,泊马度胺,帕西司他(pracinostat),鲁索替尼,TAK-901和TG 101438(SAR302503)。在某些实施方式中,所述化学治疗剂选自任何上述药剂。

[0041] 在某些实施方式中,所述SAP蛋白和所述一种或多种另外的活性剂(例如所述另外的抗癌治疗剂)被共同配制。在某些实施方式中,所述SAP蛋白和所述一种或多种另外的活性剂同时施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白和所述一种或多种另外的活性剂在彼此的一定时间内施用,以在所述患者中产生交叠的治疗效果。当所述SAP蛋白和所述一种或多种另外的活性剂同时或在彼此的一定时间内施用以产生交叠的治疗效果时,所述药剂可以通过相同或不同的施用途径(例如口服相比于输注)施用。

[0042] 在某些实施方式中,所述骨髓增生性障碍是骨髓纤维化。在某些实施方式中,所述骨髓纤维化是原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症后的骨髓纤维化或原发性血小板增多症后的骨髓纤维化。在某些实施方式中,所述骨髓增生性障碍是真性红细胞增多症后或原发性血小板增多症后的。在某些实施方式中,本公开的方法涉及使用SAP作为单一疗法。

[0043] 在某些实施方式中,在使用SAP的治疗开始之前,所述患者具有临床上显著的贫血和/或血小板减少症。

[0044] 在某些实施方式中,所述骨髓增生性障碍是真性红细胞增多症、原发性血小板增多症或慢性髓系白血病。

[0045] 在某些实施方式中,治疗包括按照给药计划例如本文中描述的任何给药计划施用所述SAP蛋白。在某些实施方式中,施用和/或治疗有效量在本领域中被理解为包括按照在临床研究方案中所定义的有效产生治疗益处的剂量和给药计划、全部处方信息、研究人员手册,或依据在本领域专家通常理解的对患有相应疾病的患者有益的度量方面的改进,进

行施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白不论是单独还是作为组合疗法的一部分施用,都可以按照提供每周少于一次的施用的给药计划施用。在某些实施方式中,这种频率较低的给药发生在最初的载药阶段之后,其中例如在治疗周期的第一周期间,所述SAP蛋白被多次施用。

[0046] 在任一上述方面的某些实施方式中,治疗改善器官功能(例如治疗功效包含器官功能的改善;SAP蛋白被单独或组合施用并改善器官功能)。在某些实施方式中,所述器官是骨髓,并且器官功能的改善通过评估血红蛋白和/或血小板的改善来评估(例如这些指标之一或两者的改善表明器官功能的改善:在血小板的情况下,血小板的改善是指在患有低血小板水平疾病的对象中增加血小板;在血红蛋白的情况下,血红蛋白的改善是指在患有低血红蛋白水平疾病的对象中增加血红蛋白)。在某些实施方式中,治疗通过例如减少纤维化来恢复正常组织(例如治疗功效包含正常组织的恢复)。在某些实施方式中,恢复正常组织通过评估骨髓纤维化来评估。在某些实施方式中,治疗降低突变等位基因负荷。

[0047] 在某些方面,所述方法包括按照剂量方案施用SAP蛋白和另外的抗癌治疗剂,使得一种或多种副作用相对于单独使用所述另外的抗癌治疗剂的治疗降低。

[0048] 在某些方面,本公开提供了一种试剂盒,其包含:a)包含SAP蛋白的组合物或药物组合物;b)能够扩增选自下列的一个或多个基因的区域的一种或多种寡核苷酸:JAK2,MPL,CALR,ASXL1,EZH2,SRSF2,IDH1和IDH2;以及c)使用说明书。在某些实施方式中,所检测的突变不是JAK2V617F。

[0049] 本公开设想了本发明的任何特征的所有适合的组合,例如本文中描述的任何方面和实施方式组合。例如,本公开设想了任何上述方面和实施方式可以彼此组合和/或与本文中公开的任何实施方式组合。例如,使用功能和/或结构特征的任何组合描述的SAP蛋白可以单独地或在组合疗法中用于本文中描述的任何方法,以治疗本文中描述的任何病症、患者群体或患者亚群体,例如在任一种或多种症状的基础上描述的患者

[0050] 发明详述

[0051] 概述

[0052] 本公开提供了用于在患有骨髓增生性障碍的对象中评估等位基因负荷的方法和试剂盒,包括用于降低等位基因负荷和/或使用等位基因负荷评估治疗功效的方法和试剂盒。本公开还提供了治疗患骨髓增生性障碍的对象的方法,其中所述对象在一个或多个基因中带有突变(例如所述对象包含含有与骨髓增生性障碍相关的一个或多个突变的细胞)。

[0053] 已发现许多预后相关的体细胞突变和细胞遗传学异常与骨髓增生性障碍相关。预后相关的突变已在多种多样的基因中鉴定到,包括JAK2、MPL、CALR、ASXL1、SRSF2、EZH2、IDH1和IDH2。在最近的研究中,已发现JAK2、MPL、CALR、ASXL1和SRSF2突变的存在是原发性骨髓纤维化中存活期缩短的独立预测因子(Tefferi等,ASH2014摘要406),并且在另一个组群中,JAK2、MPL和CALR的三阴性(TN)、JAK2或MPL突变以及ASXL1、SRSF2、EZH2或IDH1/2中的突变被鉴定为存活率低的风险因子(Vanucchi等,ASH 2015摘要405)。因此,突变状态是不良结果的预测因子。

[0054] 原发性骨髓纤维化中的细胞遗传学异常最近被分层为四个风险等级:非常高风险(MK,inv(3),i(17q),-7/7q-,11q或12p异常),高风险(不含MK的复合体,未包含在非常高风险类别中的两种异常5q-、+8,除了+9之外的其他常染色体三体,以及未包含在其他风险类

别中的其他单独异常),中风险(20q-、1q重复或任何其他易位的单独异常,以及-Y或其他性染色体异常)和低风险(13q-或+9的常规或单独异常)(Tefferi等,ASH 2014摘要631)。

[0055] 等位基因负荷是在例如造血细胞中突变和野生型核酸之间的比率。到目前为止,在人类中JAK抑制剂疗法对JAK2V617F等位基因负荷或骨髓纤维化仅有很小效果(Tefferi.Blood 119(12):2721-2730)。除了JAK2V617F之外,PMF和其他BCR-ABL1阴性骨髓增生性肿瘤的特征在于如上所示的许多其他体细胞突变,包括MPL、TET2、ASXL1、CBL、IDH1、IDH2、IKZF1、LNK、EZH2、DNMT3A、CUX1和SF3B1突变(Tefferi等,Mayo Clin Proc.2012,87(1):25-33)。其他预后相关的体细胞突变的定量分析和细胞遗传学分析也有助于监测和管理骨髓增生性障碍。

[0056] 本公开提供了使用SAP蛋白治疗骨髓增生性障碍的新的基于遗传学的治疗方案。

[0057] 骨髓纤维化的特征在于在骨髓中存在致密的纤维化组织。治疗性干预的一个目标是通过阻止或减少过量的纤维化组织来恢复正常器官功能。引起纤维化的事件的管理涉及至少两个主要事件。一个是纤维细胞的增殖和分化。纤维细胞是源自于外周血单核细胞的成纤维细胞样细胞的独特群体,其在正常情况下进入组织损伤位点以促进血管生成和伤口愈合。纤维细胞在肿瘤、特别是肿瘤中的基质组织的形成中是重要的。纤维细胞从CD14+外周血单核细胞分化而来,并且可以从其他PBMC细胞分化而来。SAP、IL-12、层粘连蛋白-1、抗Fc γ R抗体、交联的IgG和/或聚集的IgG的存在,可以抑制或至少部分延迟这一过程。

[0058] 第二个主要事件是纤维化组织的形成和维持。纤维化组织可以通过单核细胞向纤维细胞、巨噬细胞或肌成纤维细胞的分化、成纤维细胞的召集和增殖、新的细胞外基质的形成和新的血管组织的生长来形成和维持。在病理性纤维化例如慢性炎症、损伤、恶性肿瘤后的纤维化或特发性纤维化中,正是这种过量的纤维化组织可以引起组织损伤和破坏。

[0059] 最近已提出,血清淀粉样P(SAP)或穿透素-2(PTX-2)可作为治疗剂用于治疗各种不同障碍,包括与纤维化相关的障碍、超敏障碍、自体免疫障碍、粘膜炎和炎症障碍例如由微生物感染引起的炎症障碍。参见例如美国专利号8,247,370和8,497,243,以及美国专利申请号12/720,845和12/720,847。SAP结合到Fc γ R,为纤维细胞、纤维细胞前体、肌成纤维细胞前体和/或造血单核细胞前体的分化提供了抑制性信号。SAP和SAP激动剂作为用于纤维化的治疗性治疗,描述在美国专利号7,763,256和8,247,370中,所述专利通过参考并入本文。在本文中描述的任何方法的某些实施方式中,所述方法包括施用SAP蛋白(参见实施例)。在某些实施方式中,所述SAP是也被称为重组人穿透素-2的重组人SAP,例如在CHO细胞中产生的重组人SAP。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含人SAP蛋白,例如具有与从人类血清纯化的SAP不同的糖基化的人SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含人SAP蛋白,其中所述N-连接的寡糖链的所有唾液酸化的支链以 α 2,3-连接的唾液酸组成部分为末端,和/或其中所述N-连接的寡糖链基本上不含 α 2,6-连接的唾液酸组成部分。在某些实施方式中,本公开的方法包括施用包含糖基化的人SAP蛋白的组合物,其中所述人SAP蛋白包含5个SAP原体。在某些实施方式中,至少一个所述原体或1、2、3、4或5个这样的原体包含N-连接的寡糖链,其中所述寡糖链的至少一条支链以 α 2,3-连接的唾液酸组成部分为末端。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含5个SAP原体,其中每个原体包含N-连接的寡糖链,其中所述寡糖链的至少一条支链以 α 2,3-连接的唾液酸组成部分为末端,或者其中所述SAP蛋白的所有唾液酸化的支链以 α 2,3-连接的唾液酸组成部分为末端。在某些实施方式中,包含所

述SAP蛋白的组合物或所述SAP蛋白与血清来源的SAP相比包含少85%的 $\alpha 2,6$ -连接的唾液酸。在某些实施方式中,所述寡糖链的所有唾液酸化的支链以 $\alpha 2,3$ -连接的唾液酸组成为末端。在某些实施方式中,所述寡糖链基本上不含 $\alpha 2,6$ -连接的唾液酸组成部分。

[0060] 本公开提供了治疗骨髓增生性障碍的方法。所述方法总体包括施用有效量的抗纤维化药剂例如SAP蛋白,其作为单一药剂或与另外的药剂组合。

[0061] 在某些实施方式中,SAP蛋白的有效量是当单独或在组合疗法中施用,与使用所述SAP蛋白的治疗之前所述个体中的突变等位基因负荷相比,有效地将突变等位基因负荷降低至少约10%,更优选地至少约15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或甚至至少约50%、60%、70%、80%、90%或更多的量。在某些实施方式中,突变等位基因负荷的降低为约10%-90%、10%-75%、10%-50%、20%-75%、30%-75%、20%-50%、30%-60%等。在某些实施方式中,所述SAP蛋白按照给药计划和/或剂量方案以多剂量施用,并且等位基因负荷的降低在多剂药剂后评估(例如在治疗约1、2、3、4或5个月后)。在某些实施方式中,所述SAP蛋白按照给药计划和/或剂量方案施用,并且当单独或在组合疗法中施用,与使用SAP蛋白的治疗之前所述个体中的纤维化程度相比,有效地将纤维化减少至少约10%,更优选地至少约15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或甚至至少约50%或更多。在某些实施方式中,纤维化是骨髓纤维化,所述有效的治疗是使骨髓纤维化降低至少一个等级,任选地至少2个等级。在某些实施方式中,所述SAP蛋白按照给药计划和/或剂量方案以多剂量施用,并且纤维化的减少在多剂药剂后评估(例如在治疗约1、2、3、4或5个月后)。

[0062] 本公开的方法可用于评估骨髓增生性障碍中常见的所选遗传突变和细胞遗传学异常与SAP蛋白之间的相互作用。本公开的方法可用于评估基线突变状态或细胞遗传学异常与对使用SAP蛋白的治疗的响应的相关性。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化的SAP蛋白(例如包含糖基化的SAP蛋白的SAP,例如具有与从人类血清纯化的SAP不同的糖基化的糖基化的SAP蛋白;重组人SAP,例如重组人穿透素-2或PRM-151)。

[0063] 定义

[0064] 除非另有定义,否则在本文中使用的所有技术和科学术语一般都具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的意义。总的来说,在本文中使用的命名法和细胞培养、分子遗传学、有机化学以及核酸化学和杂交中的实验室程序,在本领域中是公知且常用的。标准技术被用于核酸和肽合成。所述技术和程序通常按照本领域中的常规方法和各种不同的通用参考书(例如Sambrook等,1989,《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.)进行,其被提供在整个本文献中。

[0065] 没有具体数目的指称在本文中用于指称一个或超过一个(即至少一个)所指称的语法对象。例如,“元件”意味着一个元件或超过一个元件。

[0066] 当在本文中使用时,术语“约”意味着与其一起使用的数字的数值的 $\pm 10\%$ 。因此,约50%意味着在45%-55%的范围内。

[0067] 当在本文中使用时,术语“基本上”意味着极大部分是但不完全是所指明的情况。例如,术语“基本上相似”对于核苷酸序列来说,表明所述序列与同一蛋白质或肽的另一个报道的序列极大地一致;然而,所述核苷酸序列可能包括任何数目的不影响得到的蛋白质的结构或功能的变化或突变。

[0068] 当与治疗剂联合使用时,术语“施用”意味着将治疗剂直接施用到靶组织中或其上,或将治疗剂施用于患者,使得所述治疗剂可以影响所述患者。因此,当在本文中使用时,术语“施用”当与SAP蛋白联合使用时,包括但不限于通过例如静脉内注射(例如其可以是静脉内输注)、皮下递送(例如皮下注射或皮下递送装置的植入)将SAP蛋白系统性地提供给对象,由此使所述治疗剂到达靶组织。

[0069] “施用”组合物可以通过例如静脉内、皮下、肌肉内或病灶内注射、口服施用、表面施用,或通过与其他已知技术的组合来实现。这些组合技术包括加热、辐照、超声和使用递送药剂。当施用超过一种不同的治疗剂时,所述药剂可以通过相同或不同的施用途径和/或在相同或不同时间施用。正如在本领域中理解的,药剂可以按照给药计划施用。

[0070] 当在本文中使用时,术语“剂量方案”涵盖了用量或剂量(即所述SAP蛋白的量)和给药计划(即施用频率或所述SAP蛋白的连续剂量之间的时间间隔)两者。

[0071] 当与治疗剂联合使用时,“提供”意味着将治疗剂直接施用到靶组织中或其上,或将治疗剂施用到患者,使所述治疗剂可以影响所述患者。

[0072] 术语“改善”被用于表达本公开改变它所提供、应用或施用到的组织的特征和/或物理属性。术语“改善”也可以与疾病状态联合使用,使得当疾病状态被“改善”时,与所述疾病状态相关的症状、表现形式或身体特征被减弱、减少或消除。

[0073] 当在本文中使用时,“分离的”意味着通过人类干预从天然状态被改变或取出。例如,天然存在于活动物中的SAP不是“分离的”,但合成的SAP蛋白或重组SAP蛋白或与其天然状态的共存材料部分或完全分离开的SAP蛋白,是“分离的”。分离的SAP蛋白可以以基本上纯化的形式存在,或者可以存在于非本源环境中,例如所述SAP蛋白已被递送到的细胞中。

[0074] 术语“模拟物”和“肽模拟物”在本文中可互换使用,并且一般是指模拟所选天然肽或蛋白质功能结构域(例如结合基序或活性位点)的三级结合结构或活性的肽、部分肽或非肽分子。这些肽模拟物包括重组或化学修饰的肽以及非肽药剂例如小分子药物模拟物,正如在下文进一步描述的。

[0075] 当在本文中使用时,术语“核酸”是指多核苷酸例如脱氧核糖核酸(DNA)和在适当情况下核糖核酸(RNA)。该术语也应该被理解为作为等同物,包括由核苷酸类似物制成的RNA或DNA的类似物,以及当适用于所描述的实施方式时,单链(例如正义或反义)和双链多核苷酸。

[0076] “任选的”或“任选地”意味着随后描述的事件或环境可能发生也可能不发生,并且所述描述包括所述事件发生的情况和所述事件不发生的情况。

[0077] 术语“肽”、“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用。术语“纯化的蛋白质”是指优选地与在细胞或细胞裂解物中与所述蛋白质通常相伴的其他蛋白质分离开或以其他方式基本上不含所述其他蛋白质的一种或多种蛋白质的制备物。术语“基本上不含其他细胞蛋白质”或“基本上不含其他污染蛋白质”被定义为涵盖每种所述蛋白质的各个制备物包含少于20%(以干重计)的污染蛋白质,并且优选地包含少于5%的污染蛋白质。正如本领域中公知的,每种所述蛋白质的功能性形式可以使用克隆的基因制备成纯化的制备物。“纯化的”意味着所指定的分子以基本上不存在其他生物大分子例如其他蛋白质(特别是可能显著掩盖、减弱、混淆或改变所述组分蛋白质作为纯化的制备物或它们在对象重构的混合物中的功能中的特性的其他蛋白质)的形式存在。当在本文中使用时,术语“纯化的”意味着存在以

干重计至少80%，更优选地85重量%、更优选地95-99重量%的范围内、最优选地至少99.8重量%的同一类型的生物大分子(但是水、缓冲剂和其他小分子，特别是分子量小于5000的分子可以存在)。当在本文中使用时，术语“纯的”优选地具有与上述“纯化的”相同的数值限度。

[0078] 当指称组合物、载体、稀释剂和试剂或配方的其他成分时，“可药用的”、“生理上可耐受的”及其语法变化形式可以互换使用，并表明所述材料能够施用并且不产生不想要的生理效应例如恶心、头晕、皮疹、胃部不适或对其接受者的其他有害效应。

[0079] “可药用盐”包括酸和碱加成盐两者。“可药用酸加成盐”是指那些保留了游离碱的生物有效性和性质且在生物学或其他方面不是不合乎需要的，并且使用无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、碳酸、磷酸等形成的盐。有机酸可以选自脂族、环脂族、芳香族、芳脂族、杂环、羧酸和磺酸类别的有机酸，例如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、葡萄糖酸、乳酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、延胡索酸、酒石酸、柠檬酸、天冬氨酸、抗坏血酸、谷氨酸、邻氨基苯甲酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、帕莫酸、苯乙酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等。

[0080] 当在本文中使用时，术语“可药用盐、酯、酰胺和前体药物”是指所述化合物的羧酸盐、氨基酸加成盐、酯、酰胺和前体药物，其在合理的医学判断的范围内，适用于与患者的组织相接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应等，与合理的利益/风险比相称，并且对它们所打算的用途有效，以及在可能时本公开的化合物的两性离子形式。

[0081] 当在本文中使用时，术语“治疗剂”意味着用于治疗、抗争、减轻、预防或改善患者的不想要的病症或疾病的药剂。本公开的实施方式部分针对骨髓增生性疾病或细胞的异常增殖的治疗。

[0082] 组合物的“有效量”是经计算实现所需结果的预先确定的量。有效量是与剂量方案相一致的量，其在一段时间后产生所需治疗效果。为了使有效量在治疗上有效，可能需要随时间的多剂药剂。在本文的某些实施方式中，当有效量特定时，也可以被称为治疗有效量。所需的结果可以是症状、表现形式的维持、改善或消解，或本文中描述的任何效果，或在本领域中通常被认为是有效效果的任何效果。在适合情况下，本发明的方法所设想的活动包括医学治疗性和/或预防性治疗两者。按照本公开施用以获得治疗性和/或预防性效果的化合物的具体剂量，当然由所述病例的特定环境，包括例如施用的化合物、施用途径和待治疗的病症来决定。本公开的化合物的有效量通常是当在生理上可耐受的赋形剂组合物中施用足量的量。“治疗有效量”可以按照给药计划施用。应该理解，当按照给药计划施用药物时，在观察到症状或表现形式的改善之前可能花费一段时间。然而，施用单独或组合地引起或打算引起症状或表现形式的改善和/或等位基因负荷的降低的一剂或多剂药剂，是施用有效量的实例。

[0083] “N-连接的”寡糖是利用天冬酰胺-N-乙酰葡萄糖胺连键，通过天冬酰胺连接到肽骨架的寡糖。N-连接的寡糖也被称为“N-聚糖”。天然存在的N-连接的寡糖具有共同的五糖核心Man $[(\alpha 1,6-)-(\text{Man}(\alpha 1,3))-\text{Man}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,N)]$ 。它们的差异在于周围糖例如N-乙酰葡萄糖胺、半乳糖、N-乙酰半乳糖胺、岩藻糖和唾液酸的支链(也被称为天线)的存在和数目。任选地，这种结构也可以含有核心岩藻糖分子和/或木糖分子。

[0084] 术语“唾液酸”是指9碳的羧化糖家族的任何成员。唾液酸家族的最常见成员是N-

乙酰-神经氨酸(通常简称为NeuSAc、NeuAc或NANA)。所述家族的第二个成员是N-羟乙酰基-神经氨酸(Neu5Gc或NeuGc),其中NeuAc的N-乙酰基被羟化。第三个唾液酸家族成员是2-酮基-3-脱氧-壬酮糖酸(nonulosonic acid)(KDN)(Nadano等,(1986)J.Biol.Chem.261:11550-11557;Kanarnon等,J.Biol.Chem.265:21811-21819(1990))。还包括9-取代的唾液酸例如9-O-C₁C₆-酰基-Neu5Ac,例如9-O-乳酰基-Neu5Ac或9-O-乙酰基-Neu5Ac、9-脱氧-9-氟-Neu5Ac和9-叠氮基-9-脱氧-Neu5Ac。对于唾液酸家族的综述,参见例如Varki, Glycobiology 2:25-40(1992);《唾液酸:化学、代谢和功能》(Sialic Acids:Chemistry, Metabolism and Function),R.Schauer主编,(Springer-Verlag,New York(1992))。

[0085] “遗传工程改造的”或“重组的”细胞是对细胞的遗传物质做出一个或多个修饰的细胞。这些修饰包括但不限于遗传物质的插入、遗传物质的缺失和染色体外的遗传物质的插入,不论这种物质是否稳定地维持。

[0086] 当在本文中使用时,术语“修饰的糖”是指天然或非天然存在的糖类,其在本公开的过程中被酶法添加到肽的氨基酸或糖基残基上。所述修饰的糖选自多种酶底物,包括但不限于糖核苷酸(单、二和三磷酸酯)、活化的糖(例如糖基卤化物、糖基甲磺酸酯)和既未活化也不是核苷酸的糖类。“修饰的糖”可以用“修饰基团”共价官能化。有用的修饰基团包括但不限于水溶性和水不溶性聚合物、治疗性组成部分、诊断性组成部分和生物分子。使用所述修饰基团官能化的位置被选择成使得它不阻止所述“修饰的糖”被酶法添加到肽或肽的糖基残基上。

[0087] 当在本文中使用时,术语“接合性状态”是指当通过本领域中已知和本文中描述的测试方法确定时,样品、细胞群体或生物体表现为杂合、纯合或半合的。术语“核酸的接合性状态”意味着确定所述核酸源是否表现为杂合、纯合还是半合的。“接合性状态”可以是指序列中单一核苷酸的差异。在某些方法中,对于单突变来说,样品的接合性状态可以被分类为纯合的野生型、杂合的(即一个野生型等位基因和一个突变的等位基因)、纯合的突变体、或半合的(即野生型或突变的等位基因的单一拷贝)。由于在临床实验室中日常进行的血浆或细胞样品的直接测序不能可靠地辨别半合性和纯合性,因此在某些实施方式中,将这些类别归类。例如,其中检测到没有或极少量的野生型核酸的样品被称为“半合/纯合的突变体”。在某些实施方式中,“极少量”可以在约1-2%之间。在其他实施方式中,极少量可以在约1-3%之间。在其他实施方式中,“极少量”可以低于1%。

[0088] 治疗方法

[0089] 本公开部分地提供了使用SAP蛋白治疗骨髓增生性障碍(MPD)的新的基于遗传学的治疗方式。在一方面,本公开提供了在带有与MPD相关的一个或多个体细胞突变或细胞遗传学异常的对象中治疗MPD的方法。在某些实施方式中,所述方法包括向在选自下列的一个或多个基因中带有与MPD相关的突变的对象(例如所述突变可能存在于所述对象的某些造血细胞中)施用治疗有效量的血清淀粉样P(SAP)蛋白:JAK2,MPL,CALR,ASXL1,EZH2,SRSF2,IDH1或IDH2。本公开的SAP蛋白单独地或与另外的药剂组合,被用于治疗MPD。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)被用作单一疗法。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)与抗癌药剂组合使用。在某些实施方式中,所述与MPD相关的突变不是JAK2V617F。本公开设想了具有本文中描述的特征的任何组合的本文中描述的任何方法。

[0090] 在一方面,本公开提供了通过按照有效减少突变等位基因负荷和/或细胞遗传学异常的给药计划和/或剂量方案施用SAP蛋白,在带有与MPD相关的一个或多个体细胞突变或细胞遗传学异常的对象中治疗MPD的方法。在某些实施方式中,所述方法包括向在选自下列的一个或多个基因中带有与骨髓增生性障碍相关的突变的对象(例如所述突变可能存在于所述对象的某些造血细胞中)施用治疗有效量的血清淀粉样P(SAP)蛋白:JAK2,MPL,CALR,ASXL1,EZH2,SRSF2,IDH1或IDH2,并且其中所述SAP蛋白按照在所述对象中有效降低所述基因的突变等位基因负荷的剂量方案施用。本公开的SAP蛋白单独地或与另外的药剂组合,被用于治疗MPD。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)被用作单一疗法。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)与抗癌药剂组合使用。在某些实施方式中,所述与MPD相关的突变不是JAK2V617F。

[0091] 在一方面,本公开提供了通过施用SAP蛋白来减少与MPD相关的突变等位基因负荷和/或细胞遗传学异常的方法。在某些实施方式中,本公开提供了一种在选自下列的一个或多个基因中降低突变等位基因负荷的方法:JAK2,MPL,CALR,ASXL1,EZH2,SRSF2,IDH1或IDH2。本公开的SAP蛋白单独地或与另外的药剂组合,被用于治疗MPD。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)被用作单一疗法。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)与抗癌药剂组合使用。在某些实施方式中,所述与MPD相关的突变不是JAK2V617F。

[0092] 在一方面,本公开提供了基于接受所述SAP蛋白的对象的突变状态和/或细胞遗传学信息的定量和定性分析,来监测SAP蛋白疗法对MPD的有效性的方法。所述突变状态的定量分析可以包括测量所述突变等位基因负荷,并且可以包括将开始SAP蛋白疗法之前和疗法过程中不同时间点的突变状态进行比较。同样地,细胞遗传学分析在开始疗法之前和疗法过程中的不同时间点进行。在某些实施方式中,所述方法包括:(i) 测量选自下列的与MPD相关的一个或多个基因中突变的第一突变等位基因负荷:JAK2,MPL,CALR,ASXL1,EZH2,SRSF2,IDH1或IDH2,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii) 测量在(i)中测量的相同突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;并且(iii) 鉴定所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低,表明所述SAP蛋白的施用在治疗MPD中有效,并且所述剂量方案可以被维持或修改以降低施用剂量和/或频率。本公开的SAP蛋白单独地或与另外的药剂组合,被用于治疗MPD。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)被用作单一疗法。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)与抗癌药剂组合使用。在某些实施方式中,所述与骨髓增生性障碍相关的突变不是JAK2V617F。

[0093] 在一方面,本公开提供了基于与MPD相关的一种或多种体细胞突变和/或细胞遗传学异常的存在或不存在,来确定对SAP蛋白或激动剂疗法的响应性的方法。在某些实施方式中,所述方法包括:(i) 确定具有骨髓增生性障碍的对象的细胞在选自下列的一个或多个基因中是否携带与骨髓增生性障碍相关的突变:JAK2,MPL,CALR,ASXL1,EZH2,SRSF2,IDH1或IDH2,并且如果所述对象携带所述突变的等位基因,则(ii) 向所述对象施用治疗有效量的

血清淀粉样P (SAP) 蛋白。本公开的SAP蛋白单独地或与另外的药剂组合,被用于治疗MPD。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)被用作单一疗法。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)与抗癌药剂组合使用。在某些实施方式中,所述与MPD相关的突变不是JAK2V617F。在本公开的任何上述情况的某些实施方式中,所述对象在选自TET2、CBL、IKZF1、LNK、DNMT3A、CUX1、U2AF1和SF3B1的一个或多个基因中包含突变,和/或本公开的方法还包括进行选自TET2、CBL、IKZF1、LNK、DNMT3A、CUX1、U2AF1和SF3B1的一个或多个基因的突变分析。

[0094] 本公开的任何上述情况可以进一步与细胞遗传学分析结合,以测定一种或多种与MPD相关的细胞遗传学异常,例如但不限于单体核型、inv(3)、i(17q)、-7/7q-、11q或12p异常、复杂的非单体、5q-、+8、除了+9之外的其他常染色体三体、20q-、1q重复或任何其他易位的单独异常,以及-Y或其他性染色体异常,13q-或+9的常规或单独异常,或其他单独异常。Tefferi等,ASH 2014摘要631。在某些实施方式中,细胞遗传学分析按照国际人类细胞遗传学命名系统(International System for Human Cytogenetic Nomenclature)(Cytogenetic and genome research.2013.在2013/07/03作为DOI 10.1159/000353118预先出版)来进行。在某些实施方式中,对“正常”核型的指派需要分析至少10个分裂中期。在某些实施方式中,复杂的核型被定义为存在3个或更多个不同的结构或数值异常。在某些实施方式中,单体核型被定义为2个或更多个不同的常染色体单体或单个常染色体单体并伴有至少一个结构异常(JCO.2008;26:4791;Tefferi等,ASH 2014摘要631)。

[0095] 骨髓增生性疾病(MPD)是指一组以造血细胞的克隆性异常为特征的障碍,其引起骨髓中各种不同血液细胞的过量生产。由于造血干细胞产生髓系、红细胞系和血小板细胞,因此在任一或所有这些细胞系中可以看到定性和定量的变化。骨髓增生性障碍可能对诊断和治疗形成挑战。术语“骨髓增生性障碍(MPD)”或“骨髓增生性疾病”打算包括起源于造血干细胞或其后代的非淋巴系发育异常或瘤性病症。“MPD患者”包括已被诊断患有MPD的患者。“骨髓增生性疾病”打算涵盖特定的、已分类的骨髓增生性疾病类型,包括真性红细胞增多症(PV)、原发性血小板增多症(ET)和特发性骨髓纤维化(IMF)或原发性骨髓纤维化(PMF)。在所述定义中还包括高嗜酸粒细胞综合征(HES)、慢性中性粒细胞白血病(CNL)、伴有骨髓组织异生的骨髓纤维化(MMM)、慢性粒单核细胞白血病(CMML)、青少年粒单核细胞白血病、慢性嗜碱性粒细胞白血病、嗜酸性粒细胞白血病和系统性肥大细胞增多症(SM)。“骨髓增生性障碍”还打算涵盖任何未分类的骨髓增生性疾病(UMPD或MPD-NC)。

[0096] 在某些方面,本公开涵盖了将SAP蛋白作为单一药剂或与另一种药剂组合,用于骨髓纤维化的基于遗传学的治疗。骨髓纤维化(“MF”)是一种BCR-ABL1阴性的骨髓增生性肿瘤(“MPN”),其表现为从头开始的(原发性),或者可能在真性红细胞增多症(“PV”)或原发性血小板增多症(“ET”)之后。原发性骨髓纤维化(PMF)(在文献中也被称为特发性骨髓组织异生和特发性髓样化生)是单核细胞谱系的多能造血祖细胞的克隆性障碍(综述在Abdel-Wahab, O.等,(2009) Annu. Rev. Med. 60:233-45; Vancchio, L.等,(2009) Expert Rev. Hematol. 2(3):315-334; Agrawal, M.等,(2011) Cancer 117(4):662-76中)。骨髓纤维化源自于获得性突变,所述突变靶向造血干细胞并引起激酶信号传导的调节异常、克隆性骨髓增生和异常的细胞因子表达(Tefferi. Blood 2011, 117(13):3494-3504)。所述疾病以贫血、脾肿大和髓外造血为特征,并且以进行性骨髓纤维化和非典型巨核细胞增生为标志。

CD34+干细胞/祖细胞在外周血中异常转运和多器官髓外红细胞生成是所述疾病的标志,特别是在脾脏和肝脏中。由于进行性纤维化、新血管生成和骨沉积物的增加,骨髓结构发生改变。根据目前鉴定到的预后因子,存活期中位数在少于2年到超过15年的范围内(Cervantes F等,Blood 113:2895-2901,2009;Hussein K等,Blood 115:496-499,2010;Pataaik M M等,Eur J Haematol 84:105-108,2010)。

[0097] 在文献中已知JAK2的抑制剂可用于MPD的治疗和/或预防。参见例如Tefferi,A.和Gilliland,D.G.,Mayo Clin.Proc.80(7):947-958(2005);Fernandez-Luna,J.L.等,Haematologica 83(2):97-98(1998);Harrison,C.N.Br.J.Haematol.130(2):153-165(2005);Leukemia(2005)19,1843-1844;以及Tefferi,A.和Barbui,T,Mayo Clin.Proc.80(9):1220-1232(2005)。然而,MF的管理选项目前不足以满足所有患者的需求。因此,对于为MF患者提供另外的疗法选项例如本文中所提供的疗法选项,存在着需求。

[0098] 在本文中提供的方法的某些实施方式中,所述对象患有原发性骨髓纤维化。在本文中提供的组合物和方法的某些实施方式中,所述对象患有真性红细胞增多症后的骨髓纤维化(post-PV MF)。在某些实施方式中,所述对象患有原发性血小板增多症后的骨髓纤维化(post-ET MF)。在某些实施方式中,所述对象具有高风险骨髓纤维化。在某些实施方式中,所述对象具有中风险骨髓纤维化(例如中风险水平1或中风险水平2)。在某些实施方式中,所述对象具有低风险骨髓纤维化。在某些实施方式中,所述对象具有PV或ET而没有纤维化。在某些实施方式中,所述对象对人Janus激酶2(JAK2)的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变是阳性的(例如所述突变存在),或者对与人JAK2的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变相应的突变是阳性的。在某些实施方式中,所述对象对人Janus激酶2(JAK2)的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变是阴性的(例如所述突变不存在),或者对与人JAK2的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变相应的突变是阴性的。在某些实施方式中,所述对象在JAK2的外显子12或外显子14中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL的515位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL中具有W515L、W515K、W515A或W515R氨基酸替换。在某些实施方式中,所述对象在MPL的外显子10中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在CALR的外显子9中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在ASXL1的外显子12中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的132位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的140位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的172位密码子处具有突变。在某些实施方式中,在使用本公开的SAP蛋白的治疗开始之前,所述对象具有骨髓纤维化,并且所述纤维化可以按照关于骨髓纤维化分级的欧洲共识文件(European Consensus on Grading of Bone Marrow Fibrosis)的分级系统来测量。在某些实施方式中,在使用本公开的SAP蛋白的治疗开始之前,所述对象具有高于或等于2级的骨髓纤维化。在其他实施方式中,在使用本公开的SAP蛋白的治疗开始之前,所述对象具有3级的骨髓纤维化。在其他实施方式中,在使用本公开的SAP蛋白的治疗开始之前,所述对象具有1级的骨髓纤维化。

[0099] 在某些实施方式中,骨髓的纤维化病症是骨髓的慢性骨髓增生性肿瘤的固有特征,例如原发性骨髓纤维化。在其他实施方式中,骨髓纤维化伴有恶性病症或由克隆增殖性疾病或血液障碍引起的病症,例如但不限于毛细胞白血病、淋巴瘤(例如霍奇金或非霍奇金

淋巴瘤)、多发性骨髓瘤或慢性髓系白血病(CML)。在其他实施方式中,骨髓纤维化伴有实体肿瘤向骨髓转移。

[0100] 在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如包括糖基化的SAP蛋白、重组人SAP蛋白等的SAP蛋白)通过减少纤维化以恢复器官功能,被用于治疗骨髓纤维化。本公开的SAP蛋白作为单一药剂或作为组合疗法的一部分施用,引起器官纤维化(例如骨髓纤维化)减少,导致器官功能的改进和/或恢复、血红蛋白的改善、血液计数例如血小板或白细胞的改善或症状的改善。器官功能的改善可以例如通过在治疗过程中,例如在治疗的12、20、24或超过24周(例如超过30周、超过36周、超过42周、超过48周)中评估对象中血小板水平和/或血红蛋白的改善来评估。

[0101] 正如本文中所述,在某些实施方式中,SAP蛋白在具有一个或多个与MPD相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)中的突变或一种或多种与MPD相关的细胞遗传学异常的对象中用作单一疗法。任选地,所述对象基于其他特点(例如表现形式的水平,例如骨髓纤维化或其他症状的初始水平)来表征。在某些实施方式中,所述对象对人Janus激酶2(JAK2)的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变是阳性的(例如所述突变存在),或者对与人JAK2的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变相应的突变是阳性的。在某些实施方式中,所述对象对人Janus激酶2(JAK2)的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变是阴性的(例如所述突变不存在),或者对与人JAK2的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变相应的突变是阴性的。在某些实施方式中,所述对象在JAK2的外显子12或外显子14中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL的515位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL中具有W515L、W515K、W515A或W515R氨基酸替换。在某些实施方式中,所述对象在MPL的外显子10中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在CALR的外显子9中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在ASXL1的外显子12中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的132位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的140位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的172位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述与MPD相关的突变不是JAK2V617F。在某些实施方式中,所述对象在选自TET2、CBL、IKZF1、LNK、DNMT3A、CUX1、U2AF1和SF3B1的一个或多个基因中具有一个或多个突变。在某些实施方式中,所述对象具有一种或多种细胞遗传学异常,其选自单体核型、inv(3)、i(17q)、-7/7q-、11q或12p异常、复杂的非单体、5q-、+8、除了+9之外的其他常染色体三体、20q-、1q重复或任何其他易位的单独异常,以及-Y或其他性染色体异常,13q-或+9的常规或单独异常,或其他单独异常。

[0102] 正如本文中所述,在某些实施方式中,将SAP加入治疗方案或用SAP疗法替换治疗方案,被用于对治疗无响应、有抗性或以其他方式难治(在不存在SAP的情况下)的对象,或治疗的功效衰退或已经衰退的对象。在某些实施方式中,SAP的添加或替换被用于扩展使用另一种治疗剂的治疗适用的患者群体(例如SAP扩展另一种药物的治疗窗或患者群体)。在某些实施方式中,所述患者对治疗不耐受或不适合于所述治疗(例如在不存在SAP的情况下的鲁索替尼疗法)。例如,已知某些癌症对化学疗法无响应。不受理论限制,纤维化可能阻碍药物有效进入肿瘤。在某些实施方式中,所述对象对人Janus激酶2(JAK2)的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变是阳性的(例如所述突变存在),或者对与人JAK2的617位缬氨酸向苯丙氨酸

酸的突变相应的突变是阳性的。在某些实施方式中,所述对象对人Janus激酶2 (JAK2) 的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变是阴性的(例如所述突变不存在),或者对与人JAK2的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变相应的突变是阴性的。在某些实施方式中,所述对象在JAK2的外显子12或外显子14中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL的515位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL中具有W515L、W515K、W515A或W515R氨基酸替换。在某些实施方式中,所述对象在MPL的外显子10中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在CALR的外显子9中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在ASXL1的外显子12中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的132位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的140位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的172位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述与MPD相关的突变不是JAK2V617F。在某些实施方式中,所述对象在选自TET2、CBL、IKZF1、LNK、DNMT3A、CUX1、U2AF1和SF3B1的一个或多个基因中具有一个或多个突变。在某些实施方式中,所述对象具有一种或多种细胞遗传学异常,其选自单体核型、inv (3)、i (17q)、-7/7q-、11q或12p异常、复杂的非单体、5q-、+8、除了+9之外的其他常染色体三体,20q-、1q重复或任何其他易位的单独异常,以及-Y或其他性染色体异常,13q-或+9的常规或单独异常,或其他单独异常。

[0103] 在某些实施方式中,SAP蛋白被用作单一疗法和/或被用于治疗初次接触所述疗法的患者。在某些实施方式中,SAP蛋白被用于其疾病具有一定的纤维化评分,例如通过关于骨髓纤维化分级的欧洲共识文件(European Consensus on Grading of Bone Marrow Fibrosis)所评估的2级或3级骨髓纤维化的患者。在某些实施方式中,所述对象对人Janus激酶2 (JAK2) 的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变是阳性的(例如所述突变存在),或者对与人JAK2的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变相应的突变是阳性的。在某些实施方式中,所述对象对人Janus激酶2 (JAK2) 的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变是阴性的(例如所述突变不存在),或者对与人JAK2的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变相应的突变是阴性的。在某些实施方式中,所述对象在JAK2的外显子12或外显子14中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL的515位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL中具有W515L、W515K、W515A或W515R氨基酸替换。在某些实施方式中,所述对象在MPL的外显子10中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在CALR的外显子9中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在ASXL1的外显子12中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的132位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的140位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的172位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述与MPD相关的突变不是JAK2V617F。在某些实施方式中,所述对象在选自TET2、CBL、IKZF1、LNK、DNMT3A、CUX1、U2AF1和SF3B1的一个或多个基因中具有一个或多个突变。在某些实施方式中,所述对象具有一种或多种细胞遗传学异常,其选自单体核型、inv (3)、i (17q)、-7/7q-、11q或12p异常、复杂的非单体、5q-、+8、除了+9之外的其他常染色体三体,20q-、1q重复或任何其他易位的单独异常,以及-Y或其他性染色体异常,13q-或+9的常规或单独异常,或其他单独异常。

[0104] 在某些实施方式中,SAP蛋白被用作单一疗法和/或被用于治疗贫血或血小板减少

的患者。在某些实施方式中,所述对象对人Janus激酶2 (JAK2) 的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变是阳性的(例如所述突变存在),或者对与人JAK2的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变相应的突变是阳性的。在某些实施方式中,所述对象对人Janus激酶2 (JAK2) 的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变是阴性的(例如所述突变不存在),或者对与人JAK2的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变相应的突变是阴性的。在某些实施方式中,所述对象在JAK2的外显子12或外显子14中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL的515位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL中具有W515L、W515K、W515A或W515R氨基酸替换。在某些实施方式中,所述对象在MPL的外显子10中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在CALR的外显子9中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在ASXL1的外显子12中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的132位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的140位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的172位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述与MPD相关的突变不是JAK2V617F。在某些实施方式中,所述对象在选自TET2、CBL、IKZF1、LNK、DNMT3A、CUX1、U2AF1和SF3B1的一个或多个基因中具有一个或多个突变。在某些实施方式中,所述对象具有一种或多种细胞遗传学异常,其选自单体核型、inv (3)、i (17q)、-7/7q-、11q或12p异常、复杂的非单体、5q-、+8、除了+9之外的其他常染色体三体,20q-、1q重复或任何其他易位的单独异常,以及-Y或其他性染色体异常,13q-或+9的常规或单独异常,或其他单独异常。

[0105] 在某些情况下,所述骨髓增生性疾病是真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、骨髓纤维化或未分类的骨髓增生性疾病。在某些实施方式中,所述骨髓纤维化是原发性骨髓纤维化、PV后骨髓纤维化或ET后骨髓纤维化。

[0106] 在任何上述情况下,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)可以与本文中描述的任何其他治疗剂组合使用。在某些实施方式中,所述其他治疗剂是抗癌药剂。

[0107] 示例性的与骨髓增生性障碍相关的突变

[0108] JAK2

[0109] Janus激酶2 (JAK2) 是一种非受体酪氨酸激酶,并充当膜结合的细胞因子受体与信号转导通路的下游成员例如STAT (信号转导和转录激活蛋白) 分子之间的中介物,所述下游成员随后在核中充当转录因子。长时间以来,假定由突变和其他遗传改变引起的蛋白质酪氨酸激酶 (PTK) 信号转导的扰乱与MPD相关。突变的PTK例如Janus激酶2 (JAK2) 基因突变,可以在MPD患者中引起组成性活性 (constitutive activity) 或其他缺陷。因此,在某些实施方式中,接受治疗的对象在JAK2中具有突变例如本文中描述的突变,和/或在治疗之前和/或期间评估所述对象的等位基因负荷。

[0110] JAK2V617F替换解除了它的激酶活性的自动抑制,产生有组成性活性的激酶并增强下游JAK2-STAT信号转导通路(参见例如Saharinen等, Mol Cell Biol. 2000, 20:3387-3395; Saharinen等, Mol Biol Cell 2003, 14 (4):1448-1459)。所述突变已从血液样品、骨髓和颊样品检测到,并对MPD的发病机理有贡献(参见例如Baxter等, Lancet 2005, 365:1054-1060; James等, Nature 2005, 438:1144-1148; Zhao等, J. Biol. Chem. 2005, 280 (24):22788-22792; Levine等, Cancer Cell 2005, 7:387-397; Kralovics等, New

Eng. J. Med. 2005, 352 (17) 1779-1790), 并且在MPD患者中已报道了纯合和杂合的细胞群体 (Baxter等, Lancet 2005, 365:1054-1060)。人类中的其他JAK2突变、包括易位、点突变、缺失和插入, 已被报道。参见例如Scott等, N Engl J Med. 2007, 356:459-468; Li等, Blood 2008, 111:3863-3866。

[0111] 在JAK2的外显子12中已发现超过10种不同的序列变化, 大多数发生在536位和544位密码子之间, 并涉及3至6个核苷酸的缺失。也已发现一些重复和一些2-bp置换 (Laughlin等, J Mol Diagn. 2010, 12 (3):278-282)。

[0112] JAK2中的其他示例性突变包括: 外显子12错义突变例如T514M、N533Y、L545V、F547L; 外显子13错义突变例如F556V、R564L、R564Q、V567L、V567A、G571S、G571R、L579F、H587N、S591L, 外显子14错义突变H606Q, 外显子14缺失S593-N622, 外显子15错义突变L624P、I645V (参见例如美国专利申请公布号2010/0112571); K539L、V617I、C618R、L624P, 全外显子14缺失 (Lee等, BMC Struct Biol. 2009, 9:58)。

[0113] JAK2基因组核酸位于人类9号染色体中。全部或部分人JAK2mRNA的示例性序列包括但不限于GenBank登记号NM_004972 (SEQ ID NO:5)。这些序列通过参考并入本文。

[0114] 对于JAK2核酸序列来说, “突变”意味着与参比序列GenBank登记号NM_004972 (SEQ ID NO:5) 相比包括至少一个核酸变化的JAK2核酸序列。JAK2核酸中的突变可能引起编码的多肽序列中的变化, 或者所述突变对于编码的多肽序列来说可能是沉默的。氨基酸序列的变化可以与作为参比氨基酸序列的NP_004963 (SEQ ID NO:6) 进行比较来确定。

[0115] 在某些实施方式中, 所述JAK2突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。在某些实施方式中, JAK2中的突变包括外显子12突变或外显子14突变。在某些实施方式中, 所述JAK2突变是JAK2V617F。在某些实施方式中, 所述JAK2突变是T514M、N533Y、L545V、F547L、F556V、R564L、R564Q、V567L、V567A、G571S、G571R、L579F、H587N、S591L、H606Q、L624P、I645V、K539L、V617I、C618R、L624P、外显子14缺失S593-N622或全外显子14缺失。

[0116] 在某些实施方式中, 本公开提供了一种治疗MPD的方法, 所述方法包括向在JAK2中带有突变的对象 (例如对象的某些造血细胞携带JAK2突变) 施用治疗有效量的SAP蛋白。在某些实施方式中, 本公开提供了一种治疗MPD的方法, 所述方法包括向在JAK2中带有突变 (例如所述突变可能存在于所述对象的某些造血细胞中) 的对象施用治疗有效量的SAP蛋白, 所述施用按照在所述对象中有效降低突变的JAK2等位基因负荷的剂量方案进行。在某些实施方式中, 本公开提供了一种在患有骨髓增生性障碍的对象中降低JAK2中的突变等位基因负荷的方法。在某些实施方式中, 本公开提供了基于JAK2突变状态来监测SAP蛋白疗法对MPD的有效性的方法。在一个实施方式中, 所述方法包括: (i) 测量JAK2中的突变的第一突变等位基因负荷, 其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量; (ii) 测量 (i) 中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷, 其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量; 以及 (iii) 鉴定所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中, 所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了所述SAP蛋白的施用在治疗所述骨髓增生性障碍中有效, 并且所述剂量方案可以被维持或修改以降低施用剂量和/或频率。在可选实施方式中, 如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化, 所述剂量方案可以被修改以提高施用剂量和/或频率。在一方面, 本公开提供了基于JAK2中存在或不存在一

种或多种体细胞突变来确定对SAP蛋白或激动剂疗法的响应性的方法。在某些实施方式中,所述方法包括(i)确定具有骨髓增生性障碍的对象的细胞是否在JAK2中带有与骨髓增生性障碍相关的突变;并且如果所述对象带有所述突变的等位基因,则(ii)向所述对象施用治疗有效量的SAP蛋白。在一方面,本公开提供了一种将JAK2突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:(i)测量JAK2中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii)测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii)测量所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了正向预后。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,指示了中性或负向预后。在某些实施方式中,所述JAK2突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。在某些实施方式中,JAK2中的突变包括外显子12突变或外显子14突变。在某些实施方式中,所述JAK2突变是JAK2V617F。在某些实施方式中,所述JAK2突变是T514M、N533Y、L545V、F547L、F556V、R564L、R564Q、V567L、V567A、G571S、G571R、L579F、H587N、S591L、H606Q、L624P、I645V、K539L、V617I、C618R、L624P、外显子14缺失S593-N622或全外显子14缺失。本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)单独或与另外的药剂组合使用,以治疗骨髓增生性障碍。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)被用作单一疗法。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)与抗癌药剂组合使用。在某些实施方式中,所述与骨髓增生性障碍相关的突变不是JAK2V617F。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一个或多个与MPD相关的基因例如但不限于MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定TET2、CBL、IKZF1、LNK、DNMT3A、CUX1、U2AF1或SF3B1中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一种或多种细胞遗传学异常例如单体核型、inv(3)、i(17q)、-7/7q-、11q或12p异常、复杂的非单体、5q-、+8、除了+9之外的其他常染色体三体、20q-、1q重复或任何其他易位的单独异常,以及-Y或其他性染色体异常,13q-或+9的常规或单独异常,或其他单独异常。在本公开的任何上述方面的某些实施方式中,所述MPD是真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、骨髓纤维化或未分类的骨髓增生性疾病。在某些实施方式中,所述骨髓纤维化是原发性骨髓纤维化、PV后的骨髓纤维化或ET后的骨髓纤维化。

[0117] 本公开的方法涉及评估含有核酸的样品中JAK2突变的存在或不存在,所述样品来自于具有或怀疑具有MPD的个体。所述样品可以是任何适合的生物样品,包括例如全血(例如从所述细胞级分提取JAK2核酸)、血浆、血清、骨髓和组织样品(例如活检和石蜡包埋的组织)。所述JAK2核酸可以是任何方便的核酸类型,包括例如基因组DNA、RNA(例如mRNA)或从对象RNA制备的cDNA。或者,所述JAK2核酸突变可以通过评估来自于所述个体的JAK2蛋白来推断。例如,鉴定到突变的JAK2蛋白指示了JAK2基因中的突变。适合的检测方法包括寡核苷酸探针杂交、引物延伸反应、核酸测序和蛋白质测序。在某些实施方式中,在筛查所述JAK2核酸突变的同时或之前,筛查所述个体在一个或多个另外的与MPD相关的基因(例如MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)中其他病理性突变的存在。在某些实施方式中,除了

JAK2突变之外,将一个或多个(例如2、3、4、5、6、7或8个)突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应。

[0118] MPL

[0119] 骨髓增生性白血病蛋白(MPL)是调控骨髓的血小板生产的促血小板生成素的受体。最近,已报道MPL的跨膜-近膜区中的获得性突变(MPLW515突变)存在于约5%的JAK2V617F阴性PMF和约1%的全部ET病例中(Pardanani等,Blood.2006,108(10):3472-3476和Pikman等,PLoS Med.2006,3:e270)。与JAK2V617F相同,所述MPL突变赋予JAK-STAT通路的组成性激活。

[0120] 其他示例性MPL突变包括MPL核酸中的突变,例如美国专利申请出版号2013/0053262中描述的外显子10和11中的缺失/插入突变。

[0121] MPL基因组核酸位于人类1号染色体中。全部或部分人MPL mRNA的示例性序列包括但不限于GenBank登记号NM_005373(SEQ ID NO:7)。这些序列通过参考并入本文。

[0122] 对于MPL核酸序列来说,“突变”意味着与参比序列GenBank登记号NM_005373(SEQ ID NO:7)相比包括至少一个核酸变化的MPL核酸序列。MPL核酸中的突变可能引起编码的多肽序列中的变化,或者所述突变对于编码的多肽序列来说可能是沉默的。氨基酸序列的变化可以与作为参比氨基酸序列的NP_005364(SEQ ID NO:8)进行比较来确定。

[0123] 在某些实施方式中,所述MPL突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。在某些实施方式中,MPL中的突变包括MPL的外显子10中的插入/缺失突变。在某些实施方式中,MPL中的突变包括MPL的外显子11中的插入/缺失突变。在某些实施方式中,MPL中的突变包括515位密码子中的突变。在某些实施方式中,MPL中的突变包括MPLW515L、MPLW515K、MPLW515A或MPLW515R。

[0124] 在某些实施方式中,本公开提供了一种治疗MPD的方法,所述方法包括向在MPL中带有突变的对象(例如对象的某些造血细胞携带MPL突变)施用治疗有效量的SAP蛋白。在某些实施方式中,本公开提供了一种治疗MPD的方法,所述方法包括向在MPL中带有突变(例如所述突变可能存在于所述对象的某些造血细胞中)的对象施用治疗有效量的SAP蛋白,所述施用按照在所述对象中有效降低突变的MPL等位基因负荷的剂量方案进行。在某些实施方式中,本公开提供了一种在患有骨髓增生性障碍的对象中降低MPL中的突变等位基因负荷的方法。在某些实施方式中,本公开提供了基于MPL突变状态来监测SAP蛋白疗法对MPD的有效性的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:(i)测量MPL中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii)测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii)鉴定所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了所述SAP蛋白的施用在治疗所述骨髓增生性障碍中有效,并且所述剂量方案可以被维持或修改以降低施用剂量和/或频率。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,所述剂量方案可以被修改以提高施用剂量和/或频率。在一方面,本公开提供了基于MPL中存在或不存在一种或多种体细胞突变来确定对SAP蛋白疗法的响应性的方法。在某些实施方式中,所述方法包括(i)确定具有骨髓增生性障碍的对象的细胞是否在MPL中带有与骨髓增生性障碍相关的突变;

并且如果所述对象带有所述突变的等位基因,则(ii)向所述对象施用治疗有效量的SAP蛋白。在一方面,本公开提供了一种将MPL突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:(i)测量MPL中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii)测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii)测量所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了正向预后。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,指示了中性或负向预后。在某些实施方式中,所述MPL突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。在某些实施方式中,MPL中的突变包括MPL的外显子10中的插入/缺失突变。在某些实施方式中,MPL中的突变包括MPL的外显子11中的插入/缺失突变。在某些实施方式中,MPL中的突变包括515位密码子处的突变。在某些实施方式中,MPL中的突变包括MPLW515L、MPLW515K、MPLW515A或MPLW515R。本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)单独或与另外的药剂组合使用,以治疗骨髓增生性障碍。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)被用作单一疗法。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)与抗癌药剂组合使用。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一个或多个与MPD相关的基因例如但不限于JAK2、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定TET2、CBL、IKZF1、LNK、DNMT3A、CUX1、U2AF1或SF3B1中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一种或多种细胞遗传学异常例如单体核型、inv(3)、i(17q)、-7/7q-、11q或12p异常、复杂的非单体、5q-、+8、除了+9之外的其他常染色体三体、20q-、1q重复或任何其他易位的单独异常,以及-Y或其他性染色体异常,13q-或+9的常规或单独异常,或其他单独异常。在本公开的任何上述方面的某些实施方式中,所述MPD是真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、骨髓纤维化或未分类的骨髓增生性疾病。在某些实施方式中,所述骨髓纤维化是原发性骨髓纤维化、PV后的骨髓纤维化或ET后的骨髓纤维化。

[0125] 本公开的方法涉及评估含有核酸的样品中MPL突变的存在或不存在,所述样品来自于具有或怀疑具有MPD的个体。所述样品可以是任何适合的生物样品,包括例如全血(即从所述细胞级分提取MPL核酸)、血浆、血清、骨髓和组织样品(例如活检和石蜡包埋的组织)。所述MPL核酸可以是任何方便的核酸类型,包括例如基因组DNA、RNA(例如mRNA)或从对象RNA制备的cDNA。或者,所述MPL核酸突变可以通过评估来自于所述个体的MPL蛋白来推断。例如,鉴定到突变的MPL蛋白指示了MPL基因中的突变。适合的检测方法包括寡核苷酸探针杂交、引物延伸反应、核酸测序和蛋白质测序。在某些实施方式中,在筛查所述MPL核酸突变的同时或之前,筛查所述个体在一个或多个另外的与骨髓增生性障碍相关的基因(例如JAK2、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)中其他病理性突变的存在。在某些实施方式中,除了MPL突变之外,将一个或多个(例如2、3、4、5、6、7或8个)突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应。

[0126] CALR

[0127] 钙网蛋白(CALR)是高度保守的多功能的内质网(ER)蛋白,并在钙体内平衡和ER内

的蛋白质折叠中发挥不可或缺的作用。在ER外,CALR调控各种不同的整合蛋白介导的细胞粘附、基因核运输、程序性细胞去除和免疫原性细胞死亡。编码CALR蛋白的CALR位于染色体19p13.2上,含有9个外显子并跨越4.2-kb的区域。在高达70%至84%的具有未突变的JAK2的骨髓增生性肿瘤样品中存在CALR的外显子9中的体细胞插入或缺失(Klampfl等,N Engl J Med.2013,369(25):2379-90和Nangalia等,N Engl J Med.2013,369(25):2391-2405)。所述CALR突变造成移码,产生含有大量带正电荷的氨基酸的新的C-端,而野生型C-端主要是带负电荷的。

[0128] 在原发性血小板增多症和原发性骨髓纤维化中,CALR突变与JAK2和MPL突变是相互排斥的(Klampfl等,N Engl J Med.2013,369(25):2379-90)。由于相对高的频率,CALR突变是JAK2/MPL阴性ET或PMF患者的有用的诊断标志物。此外,表型表现形式与JAK2突变的表型表现形式不同。

[0129] CALR基因组核酸位于人类19号染色体中。全部或部分人CALR mRNA的示例性序列包括但不限于GenBank登记号NM_004343(SEQ ID NO:9)。这些序列通过参考并入本文。

[0130] 对于CALR核酸序列来说,“突变”意味着与参比序列GenBank登记号NM_004343(SEQ ID NO:9)相比包括至少一个核酸变化的CALR核酸序列。CALR核酸中的突变可能引起编码的多肽序列中的变化,或者所述突变对于编码的多肽序列来说可能是沉默的。氨基酸序列的变化可以与作为参比氨基酸序列的NP_004334(SEQ ID NO:10)进行比较来确定。

[0131] 在某些实施方式中,所述CALR突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。在某些实施方式中,CALR中的突变包括CALR的外显子9中的插入/缺失突变。

[0132] 在某些实施方式中,本公开提供了一种治疗MPD的方法,所述方法包括向在CALR中带有突变的对象(例如对象的某些造血细胞携带CALR突变)施用治疗有效量的SAP蛋白。在某些实施方式中,本公开提供了一种治疗MPD的方法,所述方法包括向在CALR中带有突变(例如所述突变可能存在于所述对象的某些造血细胞中)的对象施用治疗有效量的SAP蛋白,所述施用按照在所述对象中有效降低突变的CALR等位基因负荷的剂量方案进行。在某些实施方式中,本公开提供了一种在患有骨髓增生性障碍的对象中降低CALR中的突变等位基因负荷的方法。在某些实施方式中,本公开提供了基于CALR突变状态来监测SAP蛋白疗法对MPD的有效性的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:(i) 测量CALR中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii) 测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii) 鉴定所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了所述SAP蛋白的施用在治疗所述骨髓增生性障碍中有效,并且所述剂量方案可以被维持或修改以降低施用剂量和/或频率。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,所述剂量方案可以被修改以提高施用剂量和/或频率。在一方面,本公开提供了基于CALR中存在或不存在一种或多种体细胞突变来确定对SAP蛋白疗法的响应性的方法。在某些实施方式中,所述方法包括(i) 确定具有骨髓增生性障碍的对象的细胞是否在CALR中带有与骨髓增生性障碍相关的突变;并且如果所述对象带有所述突变的等位基因,则(ii) 向所述对象施用治疗有效量的SAP蛋白。在一方面,本公开提供了一种将CALR突变作为预后标志物用于测量对使用本公

开的SAP蛋白的治疗的响应的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:(i) 测量CALR中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii) 测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii) 测量所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了正向预后。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,指示了中性或负向预后。在某些实施方式中,所述CALR突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。在某些实施方式中,CALR中的突变包括CALR的外显子9中的插入/缺失突变。本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)单独或与另外的药剂组合使用,以治疗骨髓增生性障碍。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)被用作单一疗法。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)与抗癌药剂组合使用。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一个或多个与MPD相关的基因例如但不限于JAK2、MPL、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定TET2、CBL、IKZF1、LNK、DNMT3A、CUX1、U2AF1或SF3B1中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一种或多种细胞遗传学异常例如单体核型、inv(3)、i(17q)、-7/7q-、11q或12p异常、复杂的非单体、5q-、+8、除了+9之外的其他常染色体三体、20q-、1q重复或任何其他易位的单独异常,以及-Y或其他性染色体异常,13q-或+9的常规或单独异常,或其他单独异常。在本公开的任何上述方面的某些实施方式中,所述MPD是真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、骨髓纤维化或未分类的骨髓增生性疾病。在某些实施方式中,所述骨髓纤维化是原发性骨髓纤维化、PV后的骨髓纤维化或ET后的骨髓纤维化。

[0133] 本公开的方法涉及评估含有核酸的样品中CALR突变的存在或不存在,所述样品来自于具有或怀疑具有MPD的个体。所述样品可以是任何适合的生物样品,包括例如全血(即从所述细胞级分提取CALR核酸)、血浆、血清、骨髓和组织样品(例如活检样品和石蜡包埋的组织)。所述CALR核酸可以是任何方便的核酸类型,包括例如基因组DNA、RNA(例如mRNA)或从对象RNA制备的cDNA。或者,所述CALR核酸突变可以通过评估来自于所述个体的CALR蛋白来推断。例如,鉴定到突变的CALR蛋白指示了CALR基因中的突变。适合的检测方法包括寡核苷酸探针杂交、引物延伸反应、核酸测序和蛋白质测序。在某些实施方式中,在筛查所述CALR核酸突变的同时或之前,筛查所述个体在一个或多个另外的与MPD相关的基因(例如JAK2、MPL、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)中其他病理性突变的存在。在某些实施方式中,除了CALR突变之外,将一个或多个(例如2、3、4、5、6、7或8个)突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应。

[0134] ASXL1

[0135] 额外性别梳子样转录调控物1(ASXL1)为正常的造血作用所需,并且被认为参与转录因子的活化和转录阻遏。在骨髓增生性肿瘤中ASXL1突变据认为造成了表观遗传学调节异常的效应。ASXL1突变涉及外显子12,并将ASXL1的普列克底物蛋白同源结构域截短。在最近的研究中,ASXL1突变频率在PMF中为13%,在PV/ET后MF中为23%,并且在急变期MPN中为18%(同一项研究证实突变的ASXL1与TET2、JAK2、EZH2、IDH和MPL突变同时发生(Abdel-

Wahab等,ASH Annu Meet Abstr.2010,116:3070)。

[0136] ASXL1基因组核酸位于人类20号染色体中。全部或部分人ASXL1mRNA的示例性序列包括但不限于GenBank登记号NM_001164603 (SEQ ID NO:11)。这些序列通过参考并入本文。

[0137] 对于ASXL1核酸序列来说,“突变”意味着与参比序列GenBank登记号NM_001164603 (SEQ ID NO:11)相比包括至少一个核酸变化的ASXL1核酸序列。ASXL1核酸中的突变可能引起编码的多肽序列中的变化,或者所述突变对于编码的多肽序列来说可能是沉默的。氨基酸序列的变化可以与作为参比氨基酸序列的NP_001158075 (SEQ ID NO:12)进行比较来确定。

[0138] 在某些实施方式中,所述ASXL1突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。在某些实施方式中,ASXL1中的突变包括ASXL1的外显子12中的插入/缺失突变。

[0139] 在某些实施方式中,本公开提供了一种治疗MPD的方法,所述方法包括向在ASXL1中带有突变的对象(例如对象的某些造血细胞携带ASXL1突变)施用治疗有效量的SAP蛋白。在某些实施方式中,本公开提供了一种治疗MPD的方法,所述方法包括向在ASXL1中带有突变(例如所述突变可能存在于所述对象的某些造血细胞中)的对象施用治疗有效量的SAP蛋白,所述施用按照在所述对象中有效降低突变的ASXL1等位基因负荷的剂量方案进行。在某些实施方式中,本公开提供了一种在患有骨髓增生性障碍的对象中降低ASXL1中的突变等位基因负荷的方法。在某些实施方式中,本公开提供了基于ASXL1突变状态来监测SAP蛋白疗法对MPD的有效性的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:(i) 测量ASXL1中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii) 测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii) 鉴定所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了所述SAP蛋白的施用在治疗所述骨髓增生性障碍中有效,并且所述剂量方案可以被维持或修改以降低施用剂量和/或频率。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,所述剂量方案可以被修改以提高施用剂量和/或频率。在一方面,本公开提供了基于ASXL1中存在或不存在一种或多种体细胞突变来确定对SAP蛋白疗法的响应性的方法。在某些实施方式中,所述方法包括(i) 确定具有骨髓增生性障碍的对象的细胞是否在ASXL1中带有与骨髓增生性障碍相关的突变;并且如果所述对象带有所述突变的等位基因,则(ii) 向所述对象施用治疗有效量的SAP蛋白。在一方面,本公开提供了一种将ASXL1突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:(i) 测量ASXL1中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii) 测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii) 测量所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了正向预后。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,指示了中性或负向预后。在某些实施方式中,所述ASXL1突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。在某些实施方式中,ASXL1中的突变包括ASXL1的外显子12中的插入/缺失突变。本公

开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)单独或与另外的药剂组合使用,以治疗骨髓增生性障碍。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)被用作单一疗法。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)与抗癌药剂组合使用。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一个或多个与MPD相关的基因例如但不限于JAK2、MPL、CALR、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定TET2、CBL、IKZF1、LNK、DNMT3A、CUX1、U2AF1或SF3B1中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一种或多种细胞遗传学异常例如单体核型、inv(3)、i(17q)、-7/7q-、11q或12p异常、复杂的非单体、5q-、+8、除了+9之外的其他常染色体三体,20q-、1q重复或任何其他易位的单独异常,以及-Y或其他性染色体异常,13q-或+9的常规或单独异常,或其他单独异常。在本公开的任何上述方面的某些实施方式中,所述MPD是真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、骨髓纤维化或未分类的骨髓增生性疾病。在某些实施方式中,所述骨髓纤维化是原发性骨髓纤维化、PV后的骨髓纤维化或ET后的骨髓纤维化。

[0140] 本公开的方法涉及评估含有核酸的样品中ASXL1突变的存在或不存在,所述样品来自于具有或怀疑具有MPD的个体。所述样品可以是任何适合的生物样品,包括例如全血(即从所述细胞级分提取ASXL1核酸)、血浆、血清、骨髓和组织样品(例如活检和石蜡包埋的组织)。所述ASXL1核酸可以是任何方便的核酸类型,包括例如基因组DNA、RNA(例如mRNA)或从对象RNA制备的cDNA。或者,所述ASXL1核酸突变可以通过评估来自于所述个体的ASXL1蛋白来推断。例如,鉴定到突变的ASXL1蛋白指示了ASXL1基因中的突变。适合的检测方法包括寡核苷酸探针杂交、引物延伸反应、核酸测序和蛋白质测序。在某些实施方式中,在筛查所述ASXL1核酸突变的同时或之前,筛查所述个体在一个或多个另外的与MPD相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)中其他病理性突变的存在。在某些实施方式中,除了ASXL1突变之外,将一个或多个(例如2、3、4、5、6、7或8个)突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应。

[0141] EZH2

[0142] zeste的增强子2多梳阻遏复合物(polycomb repressive complex)2亚基(EZH2)是甲基转移酶的一部分(与H3 Lys-27三甲基化相关的多梳阻遏复合物2)。在一项研究中,EZH2的突变频率在CML中为13%,在非典型CML中为13%,在MF(PMF或PV/ET后MF)中为13%,在MDS/MPN-U中为10%,在MDS中为6%,在PV中为3%,并且在嗜酸性粒细胞增多综合征/慢性嗜酸性粒细胞白血病中为3%(Ernst等,Nat Genet.2010,42:722-726)。在这项研究中,EZH2变体包括错义、移码或终止突变,预期引起过早的链终止或关键结构域的截短。据认为与MPN相关的EZH2突变具有肿瘤抑制活性。

[0143] EZH2基因组核酸位于人类7号染色体中。全部或部分人EZH2mRNA的示例性序列包括但不限于GenBank登记号NM_001203247(SEQ ID NO:13)。这些序列通过参考并入本文。

[0144] 对于EZH2的核酸序列来说,“突变”意味着与参比序列GenBank登记号NM_001203247(SEQ ID NO:13)相比包括至少一个核酸变化的EZH2核酸序列。EZH2核酸中的突变可能引起编码的多肽序列中的变化,或者所述突变对于编码的多肽序列来说可能是沉默的。氨基酸序列的变化可以与作为参比氨基酸序列的NP_001190176(SEQ ID NO:14)进行比较来确定。

[0145] 在某些实施方式中,所述EZH2突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。

[0146] 在某些实施方式中,本公开提供了一种治疗MPD的方法,所述方法包括向在EZH2中带有突变的对象(例如对象的某些造血细胞携带EZH2突变)施用治疗有效量的SAP蛋白。在某些实施方式中,本公开提供了一种治疗MPD的方法,所述方法包括向在EZH2中带有突变(例如所述突变可能存在于所述对象的某些造血细胞中)的对象施用治疗有效量的SAP蛋白,所述施用按照在所述对象中有效降低突变的EZH2等位基因负荷的剂量方案进行。在某些实施方式中,本公开提供了一种在患有骨髓增生性障碍的对象中降低EZH2中的突变等位基因负荷的方法。在某些实施方式中,本公开提供了基于EZH2突变状态来监测SAP蛋白疗法对MPD的有效性的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:(i) 测量EZH2中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii) 测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii) 鉴定所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了所述SAP蛋白(例如SAP蛋白)的施用在治疗所述骨髓增生性障碍中有效,并且所述剂量方案可以被维持或修改以降低施用剂量和/或频率。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,所述剂量方案可以被修改以提高施用剂量和/或频率。在一方面,本公开提供了基于EZH2中存在或不存在一种或多种体细胞突变来确定对SAP蛋白疗法的响应性的方法。在某些实施方式中,所述方法包括(i) 确定具有骨髓增生性障碍的对象的细胞是否在EZH2中带有与骨髓增生性障碍相关的突变;并且如果所述对象带有所述突变的等位基因,则(ii) 向所述对象施用治疗有效量的SAP蛋白。在一方面,本公开提供了一种将EZH2突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:(i) 测量EZH2中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii) 测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii) 测量所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了正向预后。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,指示了中性或负向预后。在某些实施方式中,所述EZH2突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)单独或与另外的药剂组合使用,以治疗骨髓增生性障碍。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)被用作单一疗法。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)与抗癌药剂组合使用。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一个或多个与MPD相关的基因例如但不限于JAK2、MPL、CALR、ASXL1、SRSF2、IDH1或IDH2中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定TET2、CBL、IKZF1、LNK、DNMT3A、CUX1、U2AF1或SF3B1中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一种或多种细胞遗传学异常例如单体核型、inv(3)、i(17q)、-7/7q-、11q或12p异常、复杂的非单体、5q-、+8、除了+9之外的其他常染色体三体、20q-、1q重复或任何其他易位的单独异常,以及-Y或其他性染色体异常,13q-或+9的常规或单独异常,

或其他单独异常。在本公开的任何上述方面的某些实施方式中,所述MPD是真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、骨髓纤维化或未分类的骨髓增生性疾病。在某些实施方式中,所述骨髓纤维化是原发性骨髓纤维化、PV后的骨髓纤维化或ET后的骨髓纤维化。

[0147] 本公开的方法涉及评估含有核酸的样品中EZH2突变的存在或不存在,所述样品来自于具有或怀疑具有MPD的个体。所述样品可以是任何适合的生物样品,包括例如全血(即从所述细胞级分提取EZH2核酸)、血浆、血清、骨髓和组织样品(例如活检和石蜡包埋的组织)。所述EZH2核酸可以是任何方便的核酸类型,包括例如基因组DNA、RNA(例如mRNA)或从对象RNA制备的cDNA。或者,所述EZH2核酸突变可以通过评估来自于所述个体的EZH2蛋白来推断。例如,鉴定到突变的EZH2蛋白指示了EZH2基因中的突变。适合的检测方法包括寡核苷酸探针杂交、引物延伸反应、核酸测序和蛋白质测序。在某些实施方式中,在筛查所述EZH2核酸突变的同时或之前,筛查所述个体在一个或多个另外的与MPD相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、SRSF2、IDH1或IDH2)中其他病理性突变的存在。在某些实施方式中,除了EZH2突变之外,将一个或多个(例如2、3、4、5、6、7或8个)突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应。

[0148] SRSF2

[0149] 丝氨酸/精氨酸丰富剪接因子2(SRSF2)是RNA剪接机构(machinery)的组分。SRSF2突变改变前体mRNA剪接,在原发性骨髓纤维化中相对常见,并且似乎预测不良结果。在一项研究中研究了187位PMF患者,并且发现17%带有SRSF2突变,包括错义突变例如P95H、P95L、P95R和P95S,24-bp的缺失(de1P95-R102)和插入突变274-275insACC(G93D;P95R)。SRSF2突变与IDH突变簇集(Lasho等,Blood 2012,120(20):4168-71)。

[0150] SRSF2基因组核酸位于人类17号染色体中。全部或部分人SRSF2mRNA的示例性序列包括但不限于GenBank登记号NM_001195427(SEQ ID NO:15)。这些序列通过参考并入本文。

[0151] 对于SRSF2核酸序列来说,“突变”意味着与参比序列GenBank登记号NM_001195427(SEQ ID NO:15)相比包括至少一个核酸变化的SRSF2核酸序列。SRSF2核酸中的突变可能引起编码的多肽序列中的变化,或者所述突变对于编码的多肽序列来说可能是沉默的。氨基酸序列的变化可以与作为参比氨基酸序列的NP_001182356(SEQ ID NO:16)进行比较来确定。

[0152] 在某些实施方式中,所述SRSF2突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。在某些实施方式中,SRSF2中的突变包括P95H、P95L、P95R、P95S、de1P95-R102或G93D;P95R插入。

[0153] 在某些实施方式中,本公开提供了一种治疗MPD的方法,所述方法包括向在SRSF2中带有突变的对象(例如对象的某些造血细胞携带SRSF2突变)施用治疗有效量的SAP蛋白。在某些实施方式中,本公开提供了一种治疗MPD的方法,所述方法包括向在SRSF2中带有突变(例如所述突变可能存在于所述对象的某些造血细胞中)的对象施用治疗有效量的SAP蛋白,所述施用按照在所述对象中有效降低突变的SRSF2等位基因负荷的剂量方案进行。在某些实施方式中,本公开提供了一种在患有骨髓增生性障碍的对象中降低SRSF2中的突变等位基因负荷的方法。在某些实施方式中,本公开提供了基于SRSF2突变状态来监测SAP蛋白疗法对MPD的有效性的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:(i)测量SRSF2中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii)测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负

荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii)鉴定所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了所述SAP蛋白的施用在治疗所述骨髓增生性障碍中有效,并且所述剂量方案可以被维持或修改以降低施用剂量和/或频率。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,所述剂量方案可以被修改以提高施用剂量和/或频率。在一方面,本公开提供了基于SRSF2中存在或不存在一种或多种体细胞突变来确定对SAP蛋白疗法的响应性的方法。在某些实施方式中,所述方法包括(i)确定具有骨髓增生性障碍的对象的细胞是否在SRSF2中带有与骨髓增生性障碍相关的突变;并且如果所述对象带有所述突变的等位基因,则(ii)向所述对象施用治疗有效量的SAP蛋白。在一方面,本公开提供了一种将SRSF2突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应的方法。一个实施方式中,所述方法包括:(i)测量SRSF2中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii)测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii)测量所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了正向预后。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,指示了中性或负向预后。在某些实施方式中,所述SRSF2突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。在某些实施方式中,SRSF2中的突变包括P95H、P95L、P95R、P95S、delP95-R102或G93D;P95R插入。本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)单独或与另外的药剂组合使用,以治疗骨髓增生性障碍。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)被用作单一疗法。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)与抗癌药剂组合使用。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一个或多个与MPD相关的基因例如但不限于JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、IDH1或IDH2中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定TET2、CBL、IKZF1、LNK、DNMT3A、CUX1、U2AF1或SF3B1中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一种或多种细胞遗传学异常例如单体核型、inv(3)、i(17q)、-7/7q-、11q或12p异常、复杂的非单体、5q-、+8、除了+9之外的其他常染色体三体、20q-、1q重复或任何其他易位的单独异常,以及-Y或其他性染色体异常,13q-或+9的常规或单独异常,或其他单独异常。在本公开的任何上述方面的某些实施方式中,所述MPD是真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、骨髓纤维化或未分类的骨髓增生性疾病。在某些实施方式中,所述骨髓纤维化是原发性骨髓纤维化、PV后的骨髓纤维化或ET后的骨髓纤维化。

[0154] 本公开的方法涉及评估含有核酸的样品中SRSF2突变的存在或不存在,所述样品来自于具有或怀疑具有MPD的个体。所述样品可以是任何适合的生物样品,包括例如全血(即从所述细胞级分提取SRSF2核酸)、血浆、血清、骨髓和组织样品(例如活检和石蜡包埋的组织)。所述SRSF2核酸可以是任何方便的核酸类型,包括例如基因组DNA、RNA(例如mRNA)或从对象RNA制备的cDNA。或者,所述SRSF2核酸突变可以通过评估来自于所述个体的SRSF2蛋白来推断。例如,鉴定到突变的SRSF2蛋白指示了SRSF2基因中的突变。适合的检测方法包括寡核苷酸探针杂交、引物延伸反应、核酸测序和蛋白质测序。在某些实施方式中,在筛查所

述SRSF2核酸突变的同时或之前,筛查所述个体在一个或多个另外的与MPD相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、IDH1或IDH2)中其他病理性突变的存在。在某些实施方式中,除了SRSF2突变之外,将一个或多个(例如2、3、4、5、6、7或8个)突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应。

[0155] IDH1和IDH2

[0156] 异柠檬酸脱氢酶(IDH)突变涉及外显子4并影响3个精氨酸残基,即IDH1中的R132和R172和IDH2中的R140。IDH1突变引起异柠檬酸向2-酮戊二酸转化活性的丧失并获得2-酮戊二酸向2-羟基戊二酸的转化活性。一项研究鉴定到IDH突变频率在PV中为~2%,在ET中为1%,在PMF中为4%,并且在急变期MPN中为22%(Tefferi等,Leukemia.2010,24:1302-1309)。IDH突变的患者更可能对JAK2 46/1单倍型是空合的(nullizygous),并且更少可能表现出复杂核型。

[0157] IDH1基因组核酸位于人类2号染色体中。全部或部分人IDH1 mRNA的示例性序列包括但不限于GenBank登记号NM_005896(SEQ ID NO:17)。这些序列通过参考并入本文。

[0158] 对于IDH1的核酸序列来说,“突变”意味着与参比序列GenBank登记号NM_005896(SEQ ID NO:17)相比包括至少一个核酸变化的IDH1核酸序列。IDH1核酸中的突变可能引起编码的多肽序列中的变化,或者所述突变对于编码的多肽序列来说可能是沉默的。氨基酸序列的变化可以与作为参比氨基酸序列的NP_005887(SEQ ID NO:18)进行比较来确定。

[0159] 在某些实施方式中,所述IDH1突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。在某些实施方式中,IDH1中的突变包括IDH1的外显子4中的插入/缺失突变。在某些实施方式中,IDH1中的突变包括R132位置处的错义突变。

[0160] 在某些实施方式中,本公开提供了一种治疗MPD的方法,所述方法包括向在IDH1中带有突变的对象(例如对象的某些造血细胞携带IDH1突变)施用治疗有效量的SAP蛋白。在某些实施方式中,本公开提供了一种治疗MPD的方法,所述方法包括向在IDH1中带有突变(例如所述突变可能存在于所述对象的某些造血细胞中)的对象施用治疗有效量的SAP蛋白,所述施用按照在所述对象中有效降低突变的IDH1等位基因负荷的剂量方案进行。在某些实施方式中,本公开提供了一种在患有骨髓增生性障碍的对象中降低IDH1中的突变等位基因负荷的方法。在某些实施方式中,本公开提供了基于IDH1突变状态来监测SAP蛋白疗法对MPD的有效性的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:(i) 测量IDH1中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii) 测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii) 鉴定所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了所述SAP蛋白的施用在治疗所述骨髓增生性障碍中有效,并且所述剂量方案可以被维持或修改以降低施用剂量和/或频率。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,所述剂量方案可以被修改以提高施用剂量和/或频率。在一方面,本公开提供了基于IDH1中存在或不存在一种或多种体细胞突变来确定对SAP蛋白或激动剂疗法的响应性的方法。在某些实施方式中,所述方法包括(i) 确定具有骨髓增生性障碍的对象的细胞是否在IDH1中带有与骨髓增生性障碍相关的突变;并且如果所述对象带有所述突变的等位基因,则(ii) 向所述对象施用治

疗有效量的SAP蛋白。在一方面,本公开提供了一种将IDH1突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:(i) 测量IDH1中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii) 测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii) 测量所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了正向预后。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,指示了中性或负向预后。在某些实施方式中,所述IDH1突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。在某些实施方式中,IDH1中的突变包括IDH1的外显子4中的插入/缺失突变。在某些实施方式中,IDH1中的突变包括R132位置处的错义突变。本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)单独或与另外的药剂组合使用,以治疗骨髓增生性障碍。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)被用作单一疗法。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)与抗癌药剂组合使用。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一个或多个与MPD相关的基因例如但不限于JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2或IDH2中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定TET2、CBL、IKZF1、LNK、DNMT3A、CUX1、U2AF1或SF3B1中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一种或多种细胞遗传学异常例如单体核型、inv(3)、i(17q)、-7/7q-、11q或12p异常、复杂的非单体、5q-、+8、除了+9之外的其他常染色体三体、20q-、1q重复或任何其他易位的单独异常,以及-Y或其他性染色体异常,13q-或+9的常规或单独异常,或其他单独异常。在本公开的任何上述方面的某些实施方式中,所述MPD是真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、骨髓纤维化或未分类的骨髓增生性疾病。在某些实施方式中,所述骨髓纤维化是原发性骨髓纤维化、PV后的骨髓纤维化或ET后的骨髓纤维化。

[0161] 本公开的方法涉及评估含有核酸的样品中IDH1突变的存在或不存在,所述样品来自于具有或怀疑具有MPD的个体。所述样品可以是任何适合的生物样品,包括例如全血(即从所述细胞级分提取IDH1核酸)、血浆、血清、骨髓和组织样品(例如活检和石蜡包埋的组织)。所述IDH1核酸可以是任何方便的核酸类型,包括例如基因组DNA、RNA(例如mRNA)或从对象RNA制备的cDNA。或者,所述IDH1核酸突变可以通过评估来自于所述个体的IDH1蛋白来推断。例如,鉴定到突变的IDH1蛋白指示了IDH1基因中的突变。适合的检测方法包括寡核苷酸探针杂交、引物延伸反应、核酸测序和蛋白质测序。在某些实施方式中,在筛查所述IDH1核酸突变的同时或之前,筛查所述个体在一个或多个另外的与MPD相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2或IDH2)中其他病理性突变的存在。在某些实施方式中,除了IDH1突变之外,将一个或多个(例如2、3、4、5、6、7或8个)突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应。

[0162] IDH 2基因组核酸位于人类15号染色体中。全部或部分人IDH 2 mRNA的示例性序列包括但不限于GenBank登记号NM_001289910(SEQ ID NO:19)。这些序列通过参考并入本文。

[0163] 对于IDH2的核酸序列来说,“突变”意味着与参比序列GenBank登记号NM_

001289910 (SEQ ID NO:19) 相比包括至少一个核酸变化的IDH2核酸序列。IDH2核酸中的突变可能引起编码的多肽序列中的变化,或者所述突变对于编码的多肽序列来说可能是沉默的。氨基酸序列的变化可以与作为参比氨基酸序列的NP_001276839 (SEQ ID NO:20) 进行比较来确定。

[0164] 在某些实施方式中,所述IDH2突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。在某些实施方式中,IDH2中的突变包括IDH2的外显子4中的插入/缺失突变。在某些实施方式中,IDH2中的突变包括R172或R140位置处的错义突变。

[0165] 在某些实施方式中,本公开提供了一种治疗MPD的方法,所述方法包括向在IDH2中带有突变的对象(例如对象的某些造血细胞携带IDH2突变)施用治疗有效量的SAP蛋白。在某些实施方式中,本公开提供了一种治疗MPD的方法,所述方法包括向在IDH2中带有突变(例如所述突变可能存在于所述对象的某些造血细胞中)的对象施用治疗有效量的SAP蛋白,所述施用按照在所述对象中有效降低突变的IDH2等位基因负荷的剂量方案进行。在某些实施方式中,本公开提供了一种在患有骨髓增生性障碍的对象中降低IDH2中的突变等位基因负荷的方法。在某些实施方式中,本公开提供了基于IDH2突变状态来监测SAP蛋白疗法对MPD的有效性的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:(i) 测量IDH2中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii) 测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii) 鉴定所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了所述SAP蛋白的施用在治疗所述骨髓增生性障碍中有效,并且所述剂量方案可以被维持或修改以降低施用剂量和/或频率。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,所述剂量方案可以被修改以提高施用剂量和/或频率。在一方面,本公开提供了基于IDH2中存在或不存在一种或多种体细胞突变来确定对SAP蛋白疗法的响应性的方法。在某些实施方式中,所述方法包括(i) 确定具有骨髓增生性障碍的对象的细胞是否在IDH2中带有与骨髓增生性障碍相关的突变;并且如果所述对象带有所述突变的等位基因,则(ii) 向所述对象施用治疗有效量的SAP蛋白。在一方面,本公开提供了一种将IDH2突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:(i) 测量IDH2中的突变的第一突变等位基因负荷,其中所述第一突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之前测量;(ii) 测量(i)中测量的同一突变的第二突变等位基因负荷,其中所述第二突变等位基因负荷在施用所述SAP蛋白之后测量;以及(iii) 测量所述第二突变等位基因负荷与所述第一突变等位基因负荷之间的差异。在另一个实施方式中,所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷的降低指示了正向预后。在可选实施方式中,如果所述第二突变等位基因负荷相对于所述第一突变等位基因负荷不存在变化,指示了中性或负向预后。在某些实施方式中,所述IDH2突变是错义突变、缺失突变、插入突变或易位。在某些实施方式中,IDH2中的突变包括IDH2的外显子4中的插入/缺失突变。在某些实施方式中,IDH2中的突变包括R172或R140位置处的错义突变。本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)单独或与另外的药剂组合使用,以治疗骨髓增生性障碍。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)被用作单一疗法。在某些实

施方式中,本公开的SAP蛋白(例如重组人SAP蛋白,例如糖基化的SAP蛋白)与抗癌药剂组合使用。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一个或多个与MPD相关的基因例如但不限于JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2或IDH1中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定TET2、CBL、IKZF1、LNK、DNMT3A、CUX1、U2AF1或SF3B1中的一个或多个突变。在某些实施方式中,任一上述方法还包括测定一种或多种细胞遗传学异常例如单体核型、inv(3)、i(17q)、-7/7q-、11q或12p异常、复杂的非单体、5q-、+8、除了+9之外的其他常染色体三体、20q-、1q重复或任何其他易位的单独异常,以及-Y或其他性染色体异常,13q-或+9的常规或单独异常,或其他单独异常。在本公开的任何上述方面的某些实施方式中,所述MPD是真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、骨髓纤维化或未分类的骨髓增生性疾病。在某些实施方式中,所述骨髓纤维化是原发性骨髓纤维化、PV后的骨髓纤维化或ET后的骨髓纤维化。

[0166] 本公开的方法涉及评估含有核酸的样品中IDH2突变的存在或不存在,所述样品来自于具有或怀疑具有MPD的个体。所述样品可以是任何适合的生物样品,包括例如全血(即从所述细胞级分提取IDH2核酸)、血浆、血清、骨髓和组织样品(例如活检和石蜡包埋的组织)。所述IDH2核酸可以是任何方便的核酸类型,包括例如基因组DNA、RNA(例如mRNA)或从对象RNA制备的cDNA。或者,所述IDH2核酸突变可以通过评估来自于所述个体的IDH2蛋白来推断。例如,鉴定到突变的IDH2蛋白指示了IDH2基因中的突变。适合的检测方法包括寡核苷酸探针杂交、引物延伸反应、核酸测序和蛋白质测序。在某些实施方式中,在筛查所述IDH2核酸突变的同时或之前,筛查所述个体在一个或多个另外的与MPD相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2或IDH1)中其他病理性突变的存在。在某些实施方式中,除了IDH2突变之外,将一个或多个(例如2、3、4、5、6、7或8个)突变作为预后标志物用于测量对使用本公开的SAP蛋白的治疗的响应。

[0167] 在任一上述方面的某些方法中,本公开提供了被确定包含与MPD相关的突变、例如一个或多个上述基因中的突变的对象(例如所述对象的某些细胞带有所述突变)的治疗方法。在任一上述方面的某些实施方式中,所述对象是杂合或纯合的。在某些实施方式中,所述对象带有超过一个与MPD相关的突变(例如2、3或超过3个)。

[0168] 检测方法

[0169] 本公开的方法也可用于检测与骨髓增生性障碍相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH 2)中的突变或检测其他遗传改变例如细胞遗传学异常。在某些实施方式中,所述方法包括在来自于所述对象的细胞(例如体液细胞例如血液细胞、骨髓细胞等)样品中检测与骨髓增生性障碍相关的基因中的遗传突变的存在或不存在。例如,这些遗传突变可以通过确定下述中的至少一者的存在来检测:1)从一个或多个基因缺失一个或多个核苷酸;2)向一个或多个基因添加一个或多个核苷酸;3)替换一个或多个基因的一个或多个核苷酸;4)一个或多个基因的染色体重排(例如易位);5)一个或多个基因的信使RNA转录物的水平变化;6)一个或多个基因的异常修饰,例如基因组DNA的甲基化模式;7)一个或多个基因的信使RNA转录物的非野生型剪接模式的存在;8)一种或多种蛋白质的非野生型水平;9)一个或多个基因的等位基因丢失;以及10)一种或多种蛋白质的不适合的翻译后修饰。正如本文中所述,存在大量本领域中已知的可用于检测一个或多个基因中的突变的测定法。在某些实施方式中,基因的突变状态如下测量:收集外周血样品,从所述样品

提取DNA,以及通过PCR进行分析。在某些实施方式中,基因组DNA从外周血白细胞提取。在某些实施方式中,基因组DNA从外周血粒细胞提取。在某些实施方式中,一个或多个基因中的突变通过PCR来检测。在某些实施方式中,一个或多个基因中的突变通过全外显子组测序来检测。在某些实施方式中,一个或多个基因中的突变通过Sanger测序来检测。在某些实施方式中,一个或多个基因中的突变通过全基因组测序来检测。

[0170] 在某些实施方式中,所述遗传突变的检测涉及在聚合酶链反应(PCR)(参见例如美国专利号4,683,195、4,683,202和5,854,033)例如实时PCR、COLD-PCR、锚定PCR、递归PCR或RACE PCR中,或者在连接酶链反应(LCR)(参见例如Landegran等,(1988) *Science* 241:1077;Prodromou和Pearl,(1992) *Protein Eng.* 5:827;以及Nakazawa等,(1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91:360)中使用探针/引物,后者对于检测与骨髓增生性障碍相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH 2)中的点突变可能是特别有用的(参见Abravava等,(1995) *Nucleic Acids Res.* 23:675)。这种方法可以包括下述步骤:从对象收集细胞样品,从所述样品的细胞分离核酸(例如基因组、mRNA或两者),将所述核酸样品与特异性杂交到与骨髓增生性障碍相关的基因的一种或多种引物,在使所述基因(如果存在的话)的杂交或扩增发生的条件下相接触,以及检测扩增产物的存在或不存在,或检测所述扩增产物的尺寸并将所述长度与对照样品进行比较。预期PCR和/或LCR可以理想地用作初步扩增步骤,与用于检测本文中描述的突变的任何技术相结合。

[0171] 可替选的扩增方法包括:自我持续序列复制(Guateili等,(1990) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:1874),转录扩增系统(Kwoh等,(1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:1173),Q-Beta复制酶(Lizardi等,(1988) *Bio-Technology* 6:1197)或任何其他核酸扩增方法,然后使用本领域技术人员公知的技术检测扩增的分子。这些检测方案对于核酸分子的检测特别有用,如果这些分子以非常低的数量存在的话。

[0172] 在可选实施方式中,来自于样品细胞的一个或多个与骨髓增生性障碍相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH 2)中的突变可以通过限制性酶切模式的改变来鉴定。例如,分离样品和对照DNA,任选地扩增,用一种或多种限制性内切核酸酶消化,通过凝胶电泳确定片段长度尺寸并进行比较。样品与对照DNA之间片段长度尺寸的差异指示所述样品DNA中的突变。此外,可以使用序列特异性核酶(参见例如美国专利号5,498,531),通过核酶切割位点的产生或丧失评定特定突变的存在。

[0173] 在其他实施方式中,本文描述的一个或多个与骨髓增生性障碍相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH 2)中的遗传突变,可以通过将样品和对照核酸例如DNA或RNA杂交到含有成百上千个寡核苷酸探针的高密度阵列来鉴定(Cronin等,(1996) *Human Mutation* 7:244;Kozal等,(1996) *Nature Medicine* 2:753)。例如,核酸中的遗传突变可以在如Cronin,M.T.等,同上中所述的含有光产生的DNA探针的二维阵列中鉴定。简单来说,通过制造顺序交叠的探针的线性阵列,可以使用探针的第一杂交阵列扫描样品和对照中的长段DNA,以鉴定序列之间的碱基变化。这个步骤允许鉴定点突变。在这个步骤后跟随第二杂交阵列,其允许使用与所有检测的变体或突变互补的较小的特制探针阵列表征特定突变。每个突变阵列由平行的探针组构成,一组与野生型基因互补,另一组与突变的基因互补。

[0174] 在另一个实施方式中,可以使用本领域中已知的各种测序反应中的任一者对与骨

髓增生性障碍相关的基因直接测序,并通过将样品基因的序列与相应的野生型(对照)序列进行比较来检测突变。测序反应的实例包括基于由Maxam和Gilbert((1977) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:560)或Sanger((1977) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463)开发的技术的测序反应。还设想了当进行诊断测定法时可以利用各种不同的自动测序程序中的任一者((1995) Biotechniques 19:448),包括通过质谱术的测序(参见例如PCT国际公布号W0 94/16101;Cohen等,(1996) Adv.Chromatogr.36:127-162;和Griffin等,(1993) Appl.Biochem,Biotechnol.38:147)。

[0175] 用于检测与骨髓增生性障碍相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH 2)中的突变的其他方法包括其中使用对抗切割试剂的保护来检测RNA/RNA或RNA/DNA异源双链体中的错配碱基的方法(Myers等,(1985) Science 230:1242)。总的来说,本领域的“错配切割”技术始于提供异源双链体,其通过将含有野生型序列的(标记的)RNA或DNA与从组织样品获得的可能突变的RNA或DNA杂交来形成。将所述双链的双链体用切开所述双链体的单链区域的试剂处理,例如所述单链区域由于对照与样品链之间的碱基对错配而存在。例如,RNA/DNA双链体可以用RNase处理,并且DNA/DNA杂交体用S1核酸酶处理,以酶法消化错配的区域。在其他实施方式中,可以将DNA/DNA或RNA/DNA双链体用羟胺或四氧化钨并用哌啶处理,以便消化错配的区域。在消化所述错配的区域后,将得到的材料随后在变性聚丙烯酰胺凝胶上按尺寸分离,以确定突变的位点。参见例如Cotton等,(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA85:4397;Saleeba等,(1992) Methods Enzymol.217:286。在一个实施方式中,所述对照DNA或RNA可以被标记以备检测。

[0176] 在另一个实施方式中,所述错配切割反应利用在用于检测和测绘(mapping)从细胞样品获得的cDNA中的点突变的限定系统中识别双链DNA中的错配碱基对的一种或多种蛋白质(所谓的“DNA错配修复”酶)。例如,大肠杆菌(E.coli)的mutY酶在G/A错配处切开A,并且来自于HeLa细胞的胸腺嘧啶DNA糖基化酶在G/T错配处切开T(Hsu等,(1994) Carcinogenesis 15:1657)。根据示例性实施方式,将基于与骨髓增生性障碍相关的基因序列例如野生型序列的探针杂交到来自于测试细胞的cDNA或其他DNA产物。将所述双链体用DNA错配修复酶处理,并且切割产物如果存在的话,可以从电泳流程等检测。参见例如美国专利号5,459,039。

[0177] 在其他实施方式中,电泳迁移率的改变可用于鉴定与骨髓增生性障碍相关的基因中的突变。例如,单链构象多态性(SSCP)可用于检测突变体和野生型核酸之间的电泳迁移率差异(Orita等,(1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:2766;也参见Cotton(1993) Mutat.Res,285:125;以及Hayashi(1992) Genet.Anal.Tech.Appl.9:73)。将样品和对照核酸的单链DNA片段变性并允许其复性。单链核酸的二级结构根据序列而变,得到的电泳迁移率的改变能够实现甚至是单碱基变化的检测。所述DNA片段可以被标记或用标记的探针检测。所述测定法的灵敏度可以通过使用二级结构对序列变化更加敏感的RNA(而不是DNA)来增强。在一个实施方式中,所述主题方法利用异源双链体分析,在电泳迁移率变化的基础上分离双链异源双链体分子(Keen等,(1991) Trends Genet.7:5)。

[0178] 在另一个实施方式中,使用变性梯度凝胶电泳(DGGE)来测定突变体或野生型片段在含有变性剂梯度的聚丙烯酰胺凝胶中的移动(Myers等,(1985) Nature 313:495)。当使用DGGE作为分析方法时,将DNA进行修饰以确保它不完全变性,例如通过PCR添加约40bp的GC

夹,所述GC夹是高熔点的富含GC的DNA。在另一个实施方式中,使用温度梯度代替变性梯度来鉴定对照和样品DNA的迁移率差异(Rosenbaum和Reissner(1987) *Biophys.Chem.* 265: 12753)。

[0179] 用于检测点突变的其他技术的实例包括但不限于选择性寡核苷酸杂交、选择性扩增或选择性引物延伸。例如,可以制备将已知突变置于中央的寡核苷酸引物,然后将其在只有存在完美匹配时才允许杂交的条件下杂交到靶DNA(Saiki等,(1986) *Nature* 324:163; Saiki等,(1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:6230)。将这些等位基因特异性寡核苷酸杂交到PCR扩增的靶DNA或多个不同突变,此时所述寡核苷酸被连接到杂交膜并与标记的靶DNA杂交。

[0180] 或者,依赖于选择性PCR扩增的等位基因特异性扩增技术可以与本公开相结合使用。作为引物用于特异性扩增的寡核苷酸可以在分子的中央带有目标突变(使得扩增依赖于差异杂交)(Gibbs等,(1989) *Nuci.Acids Res.* 17:2437),或者在一条引物的3'末端处带有目标突变,此处适合条件下可以防止错配或减少聚合酶延伸(Prossner(1993) *Tibtech* 11:238)。此外,在所述突变的区域中引入新的限制性位点可能是理想的,以产生基于切割的检测(Gasparini等,(1992) *Mol.Cell Probes* 6:1)。预计在某些实施方式中,扩增也可以使用用于扩增的Taq连接酶来进行(Barany(1991) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88: 189)。在这些情况下,只有在5'序列的3'末端处存在完美匹配的情况下才发生连接,使得可以通过寻找扩增的存在或不存在来检测特定位点处已知突变的存在。在某些实施方式中,使用例如定量实时等位基因特异性PCR来检测和/或定量突变的存在或不存在,在所述PCR中等位基因辨别通过-1位置中的错配与-2位置处的锁核酸(LNA)的协同效应来提高(Nussenzveig等,(2007) *Exp Hematol.* 35(1):32-8)。

[0181] 在某些示例性实施方式中,与所述与骨髓增生性障碍相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)相对应的mRNA的水平,可以使用本领域中已知的方法,在生物样品中通过原位和/或体外方式来确定。在某些实施方式中,与MPD相关的miRNA的水平可以使用本领域中已知的方法,在生物样品中通过原位和/或体外方式来确定。在某些实施方式中,与MPD相关的mRNA或miRNA存在于外来体中。许多表达检测方法使用分离的RNA。对于体外方法,可以利用其选择过程不妨碍mRNA的分离的任何RNA分离技术,从血液细胞纯化RNA(参见例如Ausubel等主编,《分子生物学现代方法》(*Current Protocols in Molecular Biology*), John Wiley&Sons, New York 1987 1999)。此外,使用本领域技术人员公知的技术例如Chomczynski的单步RNA分离方法(1989,美国专利号4,843,155),可以容易地处理大量细胞和/或样品。

[0182] 分离的mRNA可用于杂交或扩增测定法,其包括但不限于Southern或Northern分析、聚合酶链反应分析和探针阵列。在某些示例性实施方式中,用于检测mRNA水平的诊断方法涉及将所述分离的mRNA与可以杂交到由待检测的基因编码的mRNA的核酸分子(探针)相接触。所述核酸探针可以是例如全长cDNA或其一部分,例如长度为至少7、15、30、50、100、250或500个核苷酸并且足以在严紧条件下特异性杂交到编码与骨髓增生性障碍相关的基因的mRNA或基因组DNA的寡核苷酸。在本公开的诊断测定法中使用的其他适合的探针在本文中描述。mRNA与所述探针的杂交指示所讨论的突变正被表达。

[0183] 在一种方式中,将mRNA固定化在固体表面上并与探针相接触,例如通过将分离的

mRNA在琼脂糖凝胶上运行,并将所述mRNA从所述凝胶转移到膜例如硝酸纤维素膜。在可选方式中,将探针固定化在固体表面上,并将mRNA与所述探针相接触,例如在基因芯片阵列中。专业技术人员可以容易地使已知的mRNA检测方法适用于检测由与骨髓增生性障碍相关的基因编码的mRNA的水平。

[0184] 用于确定与样品中与骨髓增生性障碍相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)相对应的mRNA的水平的可替代方法涉及核酸扩增过程,例如通过rtPCR(美国专利号4,683,195和4,683,202中阐述的实验实施方式)、定量实时等位基因特异性PCR(Borowczyk等,(2015) *Thromb Res.* 135 (2):272-80)、COLD-PCR(Li等,(2008) *Nat. Med.* 14:579)、连接酶链反应(Barany,1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:189)、自我持续序列复制(Guatelli等,1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874)、转录扩增系统(Kwoh等,(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173)、Q-Beta复制酶(Lizardi等,(1988) *Bio/Technology* 6:1197)、滚环复制(美国专利号5,854,033)或任何其他核酸扩增方法,随后使用本领域技术人员公知的技术检测扩增的分子。这些检测方案对于核酸分子的检测特别有用,如果这些分子以非常低的数量存在的话。当在本文中使用时,扩增引物被定义为一对核酸分子,其可以退火到基因的5'或3'区(分别为正链和负链,或与之相反)并且在两者之间含有短的区域。一般来说,扩增引物的长度为约10至30个核苷酸,并且在长度为约50至200个核苷酸的区域两侧。在适合条件下并使用适合试剂,这些引物允许扩增包含被所述引物夹在中间的核苷酸序列的核酸分子。

[0185] 对于原位方法来说,在检测之前mRNA不必从样品(例如体液(例如血液细胞))分离。在这些方法中,使用已知的组织学方法制备/加工细胞或组织。然后将所述样品固定化在支持物、通常为玻璃载片上,然后与可以杂交到本公开的mRNA的探针相接触。

[0186] 测定可以基于与骨髓增生性障碍相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)的归一化的表达水平。通过将标志物的表达与不是标志物的基因例如组成性表达的看家基因的表达进行比较以校正所述标志物的绝对表达水平,由此将表达水平归一化。适用于归一化的基因包括看家基因例如肌动蛋白基因或上皮细胞特异性基因。这种归一化允许将来自于一个来源的患者样品与来自于另一个来源的患者样品中的表达水平进行比较。

[0187] 根据本公开,骨髓增生性障碍相关突变的存在或不存在,也可以通过分析由所述突变的基因编码的蛋白质(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)来确定。突变在蛋白质水平上的检测,可以通过本领域中公知的任何方法来检测。在一个实施方式中,所述与骨髓增生性障碍相关的蛋白质中突变的检测通过分离所述蛋白质并对它进行氨基酸序列测定来进行。这可能需要在测序之前通过蛋白水解或化学手段将所述蛋白质片段化。确定氨基酸序列的方法在本领域中是公知的。

[0188] 突变的蛋白质的检测可以使用例如抗体、适体、配体、底物、其他蛋白质或蛋白质片段、其他蛋白结合试剂或片段的质谱分析来实现。优选地,蛋白检测试剂特异性针对本公开的突变的蛋白质,因此可以区分突变的蛋白质和野生型蛋白质或另一种变体形式。这通常可以通过例如选择或设计结合到蛋白质的、在所述变体与野生型蛋白质之间不同的区域的检测试剂来实现。

[0189] 一种用于检测突变蛋白的优选试剂是能够选择性结合到所述蛋白质的变体形式

的抗体。能够区分野生型和突变的蛋白质的抗体,可以通过本领域中已知的任何适合的方法来产生。所述抗体可以是单克隆或多克隆抗体、单链或双链、嵌合或人源化抗体,或含有在本领域技术状态中已知对应于抗原结合片段的部分的免疫球蛋白分子的部分。

[0190] 用于制造多克隆抗体的方法在本领域中是公知的。通常,抗体通过将含有所述突变的突变蛋白质的免疫原性片段施用(例如通过皮下注射)到新西兰白兔来产生。通常将抗原(例如突变的JAK2、MPL、CLR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)注射在多个位点处,并将所述注射重复多次(例如约每两周一次)以诱导免疫应答。理想情况下,向所述兔同时施用佐剂以增强免疫力。然后从血清样品纯化所述多克隆抗体,例如通过亲和层析,使用同一原来捕获所述抗体。通过除去与本源蛋白质交叉反应的抗体,可以制造对所述突变特异的抗体。

[0191] 用于检测突变的蛋白质(例如突变的JAK2、MPL、CLR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)的体外方法还包括例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)、蛋白质印迹、免疫沉淀、免疫荧光和蛋白质阵列芯片(例如抗体或适体阵列)。关于免疫测定法和相关的蛋白质检测方法的进一步信息,参见《免疫学现代方法》(Current Protocols in Immunology), John Wiley&Sons, N.Y. 和Flage, “免疫测定法”(Immunoassays), Anal Chem: 1999 Jun. 15; 71 (12): 294R-304R。检测氨基酸变体的其他分析方法包括但不限于电泳迁移率的改变(例如2维电泳)、胰蛋白酶消化物的改变、在基于细胞或无细胞测定法中JAK2激酶活性的改变、配体或抗体结合模式的改变、等电点的改变和直接氨基酸测序。

[0192] 本公开还涵盖了用于检测生物样品中一个或多个与骨髓增生性障碍相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)中的一个或多个突变的存在的试剂盒。例如,所述试剂盒可以包含能够检测生物样品中的标志物基因组DNA、多肽、蛋白质、mRNA等的标记的化合物或试剂;以及用于确定所述样品中所述突变的存在或不存在的手段。所述化合物或试剂可以包装在适合的容器中。所述试剂盒还可以包含使用所述试剂盒来检测所述标志物肽或核酸中的突变的说明书。

[0193] 生物样品的收集和制备

[0194] 本公开的方法和组合物可使用从个体获得的生物样品,用于检测与骨髓增生性障碍相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)和/或与骨髓增生性障碍相关的蛋白质(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)中的突变。获得测试样品的方法对于本领域技术人员来说是公知的,并且包括但不限于抽吸、组织切片、抽取血液或其他流体、手术或穿刺活组织检查等。所述测试样品可以从被诊断为患有骨髓增生性障碍或怀疑患有骨髓增生性障碍或正在经历用于骨髓增生性障碍的疗法的个体或患者获得。所述测试样品可以是含有细胞的液体或组织。样品可以包括但不限于羊水、活检组织、血液、血细胞、骨髓、细针活检样品、腹膜液、羊水、血浆、胸膜液、唾液、精液、血清、组织或组织匀浆物、组织的冷冻或石蜡切片。样品也可以被加工,例如组织的切片、分级、纯化或细胞器分离。如有必要,样品可以通过离心等收集或浓缩。可以对样品的细胞进行裂解,例如通过用酶、热、表面活性剂、超声或其组合进行处理。进行所述裂解处理是为了获得足够量的源自于所述个体的细胞的核酸,以使用例如聚合酶链反应检测。或者,所述与骨髓增生性障碍相关的基因中的突变可以按照通过参考并入本文的美国专利申请系列号11/408,241(公布号US 2007-0248961)中描述的方法,使用无细胞体液来检测。

[0195] 血浆和血清制备方法在本领域中是公知的。“新鲜的”血浆或血清或冷冻(储存)并随后融化的血浆或血清均可使用。冷冻(储存)的血浆或血清应该最佳地维持在-20至-70℃的储存条件下,直至融化并使用。“新鲜的”血浆或血清应该被冷藏或维持在冰上直至使用,其中核酸(例如RNA、DNA或总核酸)提取应该尽可能快地进行。下文描述了示例性方法。血液可以通过标准方法抽取到收集管中,通常为硅化的玻璃管,对于血清的制备来说不含抗凝剂,或者对于血浆的制备来说含有EDTA、柠檬酸钠、肝素或类似的抗凝剂。如果制备用于储存的血浆或血清,尽管不是绝对要求,但优选地在冷冻之前将血浆或血清首先从全血分级。这降低了从冷冻并融化的细胞的裂解释放出的无关的细胞内RNA的负担,所述负担可能降低扩增测定法的灵敏度或通过向PCR释放抑制剂例如卟啉和血色素而干扰所述扩增测定法。“新鲜的”血浆或血清可以通过离心,使用300-800倍重力下5至10分钟的轻柔离心从全血分级,或者通过其他标准方法分级。能够分级出凋亡体的高离心速率应该避免。由于肝素可能干扰RT-PCR,肝素化血液的使用可能需要用肝素酶预处理,然后在反转录之前除去钙。Imai,H.等,J.Virol.Methods 36:181-184,(1992)。因此,对于计划在其中进行PCR扩增的血液样本来说,EDTA是适合的抗凝剂。

[0196] 核酸提取和扩增

[0197] 待扩增的核酸可以来自于生物样品例如生物体、细胞培养物、组织样品等。所述生物样品可以来自于包括任何动物、优选为哺乳动物的对象。优选的对象是人,其可以是为了疾病的诊断或治疗而出现在医疗提供者面前的患者。所述生物样品可以从各种生命阶段获得,例如胎儿、青年人、成年人等。特别优选的对象是待测试与骨髓增生性障碍相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)中的突变的人。

[0198] 各种不同的提取方法适用于分离DNA或RNA。适合的方法包括苯酚和氯仿抽提。参见Maniatis等,《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning,A Laboratory Manual),第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,page 16.54(1989)。多种可商购的试剂盒也获得适合的DNA和RNA,包括但不限于QIAamp™小量血液试剂盒、Agencourt Genfind™、RocheCobas®Roche MagNA Pure®或使用Eppendorf Phase LockGels®的苯酚:氯仿抽提,以及NucliSens提取试剂盒(Biomerieux,Marcy l'Etoile,France)。在其他方法中,可以使用MagNA Pure LC mRNA HS试剂盒和MagNA Pure LC仪器(Roche Diagnostics Corporation,Roche Applied Science,Indianapolis,Ind.),从患者的血液/骨髓样品提取mRNA。

[0199] 在本领域中已知多种方法用于从血液、血清、血浆和骨髓或其他造血组织分离总核酸、DNA和RNA。事实上,有多种已发表的流程以及商品化试剂盒和系统可用。例如,但不是限制性的,在下文中描述了这些试剂盒、系统和已发表的流程的实例。可商购的试剂盒包括Qiagen产品例如QiaAmp DNA血液小量试剂盒(目录号51104,Qiagen,Valencia,Calif.)、QiaAmp RNA血液小量试剂盒(目录号52304,Qiagen,Valencia,Calif.)、Promega产品例如Wizard基因组DNA试剂盒(目录号A1620,Promega Corp.Madison,Wis.)、Wizard SV基因组DNA试剂盒(目录号A2360,Promega Corp.Madison,Wis.)、SV总RNA试剂盒(目录号X3100,Promega Corp.Madison,Wis.)、PolyAtract系统(目录号Z5420,Promega Corp.Madison,Wis.)或PurYield RNA系统(目录号23740,Promega Corp.Madison,Wis.)。

[0200] 从血浆或血清提取RNA

[0201] 血浆RNA是高度敏感的,并且由于RNA的相对丰富性和在检测缺失例如JAK2外显子14的缺失中的容易性,可以替代基于DNA的测试。循环细胞外脱氧核糖核酸(DNA),包括肿瘤来源或相关的细胞外DNA,也存在于血浆和血清中。参见Stroun,M.等,Oncology 46:318-322 (1989)。由于在上面描述的RNA提取方法期间这种DNA另外地被提取到不同程度,因此在进行进一步RNA分析之前进一步纯化所述RNA提取物并除去痕量DNA可能是理想的或必需的(取决于临床目的)。这可以使用DNase,通过例如如下Rashtchian,A.,PCR Methods Applic.4:S83-S91, (1994)所描述的方法来实现。

[0202] 玻璃珠、二氧化硅粒子或硅藻土提取:可以使用二氧化硅粒子、玻璃珠或硅藻土从血浆或血清提取RNA,正如下述文献的方法或改编方案:Boom,R.等,J.Clin.Micro.28:495-503, (1990);Cheung,R.C等,J.Clin Micro,32:2593-2597, (1994)。

[0203] 酸性硫氰酸胍-苯酚-氯仿提取:作为可替代的方法,可以使用Chomczynski,P.和Sacchi,N.,Analytical Biochemistry 162:156-159, (1987)所述的酸性硫氰酸胍-苯酚-氯仿提取方法从血浆或血清提取RNA,参见下文。

[0204] 可替代的核酸提取方法:可以使用可替代方法从体液提取RNA,包括但不限于通过氯化铯梯度离心,包括Chirgwin,J.M.等,Biochemistry 18:5294-5299, (1979)所描述的方法,以及细胞外RNA与明胶从血浆或血清的共沉淀,例如通过Foumie,G.J.等,Analytical Biochemistry 158:250-256, (1986)的方法的适用于RNA提取的改编方案。

[0205] 细胞遗传学分析

[0206] 中期细胞遗传学分析可以通过标准的核型方法、荧光原位杂交(FISH)、光谱核型分析或多重FISH(M-FISH)、多色FISH(mFISH)和比较基因组杂交和/或原位杂交来进行。应该理解,在本公开的方法中可以使用任何可商购的用于进行FISH分析(例如Abbott Molecular VYSIS FISH Technology)的探针。在一个实施方式中,所述方法包括:将从所述对象获得的样品例如染色体样品或分级的、富集的或以其他方式预处理的样品与探针(例如特异性针对所需序列的探针)在适合于杂交的条件下相接触,并确定所述基因(例如染色体区域中与细胞遗传学异常相关的基因组DNA)中的一个或多个异常的存在或不存在。在某些实施方式中,细胞遗传学分析在从未刺激过的骨髓吸取液培养物获得的中期细胞上,使用本领域中已知的标准技术来进行(Tam等,Blood 113 (18):4171-4178)。所述方法可以任选地包括富集样品中的基因或基因产物。在某些实施方式中,细胞遗传学分析按照国际人类细胞遗传学命名系统(International System for Human Cytogenetic Nomenclature) (Cytogenetic and genome research.2013.于2013/07/03作为DOI 10.1159/000353118重新发表)来进行。

[0207] 在任一上述或下述方面的某些实施方式中,所述治疗方法可以有效地改善MPD的一种或多种表现形式,例如骨髓纤维化或本文描述的其他表现形式。在某些实施方式中,所述治疗方法对降低等位基因负荷和改善一种或多种另外的表现形式两者均有效。在某些实施方式中,随时间的改善通过确定一种或多种表现形式例如骨髓纤维化的变化来评估。

[0208] 施用方法

[0209] 在一个方面,本公开提供了通过向需要的患者施用治疗有效量的本公开的SAP蛋白,在患者中治疗骨髓增生性障碍的方法。在一个方面,本公开提供了通过施用治疗有效量的本公开的SAP蛋白,在带有与骨髓增生性障碍相关的突变(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、

EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中的突变)的患者中治疗骨髓增生性障碍的方法。治疗的剂量和频率可以由本领域技术人员确定,并且将取决于患者的症状、年龄和体重,以及待治疗或预防的障碍的本质和严重性而变化。本公开鉴定到了在治疗骨髓纤维化中有效的给药方案。

[0210] 在一个方面,本公开提供了通过按照有效降低突变等位基因负荷的剂量方案向需要的患者施用治疗有效量的本公开的SAP蛋白,在带有与骨髓增生性障碍相关的突变(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中的突变)的患者中治疗骨髓增生性障碍的方法。在某些实施方式中,所述患者在施用所述SAP蛋白之前未接受输血之外的任何疗法。在某些实施方式中,所述患者是贫血或血小板减少的。

[0211] 当在本文中使用时,术语“剂量方案”涵盖药剂或剂量(即所述SAP蛋白的量)和给药计划(即施用频率或连续的SAP蛋白药剂之间的时间间隔)两者。

[0212] 本公开的SAP蛋白单独地或与另一种药剂例如另外的抗癌药剂相组合,按照每周一次的给药计划或频率更低的给药计划(例如少于每周一次,例如每4周一次)的施用,引起骨髓增生性障碍症状的显著改善。此外,本公开的方法也基于下述发现,即本公开的SAP蛋白单独地或与另一种抗癌治疗剂组合时被良好地耐受,没有由SAP治疗引起的临床上显著的骨髓抑制例如治疗相关的骨髓抑制的迹象。

[0213] 在某些方面,本公开提供了通过以有效降低突变等位基因负荷的量向需要的患者施用本公开的SAP蛋白,在患者中治疗骨髓增生性障碍的方法。在某些方面,本公开提供了通过以有效改善受影响器官的功能的量向需要的患者施用本公开的SAP蛋白,在患者中治疗骨髓增生性障碍的方法。功能的改善可以通过例如评估器官纤维化的减少、血小板水平的提高和/或血红蛋白的增加来评估。在某些实施方式中,所述纤维化器官是骨髓。在某些实施方式中,所述骨髓增生性障碍是骨髓纤维化。

[0214] 在某些实施方式中,将SAP蛋白每日一次或两次、每周一次或两次、每月一次或两次或每月一次或在症状即将发作前或发作时施用到患者。在某些实施方式中,将所述SAP蛋白在治疗方案开始时更频繁地施用到患者(例如第一周每隔天一次并在其后每4周一次)。在某些实施方式中,将SAP蛋白施用到尚未发展出纤维化的具有PV或ET的患者,以防止纤维化的发展。在某些实施方式中,在症状发作之前将SAP蛋白施用到已确定带有与骨髓增生性障碍相关的突变或细胞遗传学异常(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2一者或多者中的突变)的患者。

[0215] 剂量可以通过本领域技术人员已知的或本文中教导的技术来容易地确定。SAP蛋白的毒性和治疗功效可以通过标准的制药学程序,在实验动物中确定,例如确定LD₅₀和ED₅₀。ED₅₀(有效剂量50)是在50%的动物群体中产生指定效果所需的药物的量。LD₅₀(致死剂量50)是杀死50%的样品群体的药物剂量。

[0216] 在某些方面,将SAP蛋白作为单一药剂施用,用于在对象中治疗骨髓增生性障碍。在某些方面,SAP蛋白(例如本公开的变体SAP蛋白)与另外的抗癌治疗剂(例如化学治疗剂或激酶抑制剂)的组合施用任选地为在对象中治疗骨髓增生性障碍例如例如骨髓纤维化提供了协同效应。在某些实施方式中,所述SAP蛋白和另外的抗癌治疗剂(例如化学治疗剂或激酶抑制剂)作用于所述疾病的不同方面。这种方法,两种类型的药剂的组合或共同施用,可用于治疗患有骨髓增生性障碍并且对当前可用的疗法无响应或有抗性的个体。对于对目前可用的疗法无响应的个体来说,本文中提供的组合疗法也可用于提高这些目前可用的疗

法的功效和/或降低其副作用。

[0217] 在某些实施方式中,本公开提供了在带有一个或多个与骨髓纤维化相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)中的突变和/或一种或多种与MPD相关的细胞遗传学异常的患者中治疗骨髓纤维化的方法,所述方法包括按照对改善骨髓纤维化的一种或多种症状和降低突变等位基因负荷有效的给药方案(例如剂量和给药计划)和/或给药计划,向需要的对象施用一定量的SAP蛋白,其中所述需要的对象未接受输血(transfusion)之外的用于骨髓纤维化的疗法。在某些实施方式中,所述对象是贫血或血小板减少的。在某些实施方式中,本公开的方法不引起与治疗相关的骨髓抑制[例如所述SAP蛋白不引起临床上显著的骨髓抑制和/或不增加(并可能甚至降低)在基线时存在的骨髓抑制]。换句话说,在某些实施方式中,本公开的方法不引起或导致与例如在治疗开始之前观察到的相比更强的骨髓抑制。骨髓抑制可以按照“不利事件编码常用术语”(Common Terminology for Coding of Adverse Events) (CTCAE) 在0级至5级的量表上评估(参见国立癌症研究所不利事件常用术语判据(National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events), 4.0版,NCI,NIH,DHHS.2009年5月29日,NIH出版号09-7473)。在某些实施方式中,骨髓抑制的一种或多种度量例如贫血,没有作为治疗的结果而恶化(例如从3级到4级不利事件;从2级到3或4级不利事件;从1级到2、3或4级不利事件;从0级到1、2、3或4级不利事件)。

[0218] 在一个方面,本公开提供了一种在某些细胞中带有与骨髓增生性障碍相关的突变(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中的突变)和/或一种或多种与骨髓增生性障碍相关的细胞遗传学异常的个体中治疗骨髓增生性障碍的方法,所述方法包括:a)从所述个体获得样品,其中所述样品包含目标核酸,b)评估来自于所述个体的样品的所述目标核酸中一个或多个突变和/或细胞遗传学异常的存在或不存在,以及c)向带有与骨髓增生性障碍相关的突变和/或细胞遗传学异常(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中的突变)的个体施用本公开的SAP蛋白。

[0219] 在一个方面,本公开提供了一种在某些细胞中带有与骨髓增生性障碍相关的突变(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中的突变)和/或一种或多种与骨髓增生性障碍相关的细胞遗传学异常的个体中治疗骨髓增生性障碍的方法,所述方法包括:a)从所述个体获得样品,其中所述样品包含JAK2核酸,b)评估来自于所述个体的样品的JAK2核酸中一个或多个突变的存在或不存在,以及c)按照有效降低JAK2突变等位基因负荷的剂量方案施用本公开的SAP蛋白。

[0220] 在一个方面,本公开提供了一种在患有骨髓增生性障碍的患者中降低突变等位基因负荷的方法,所述方法包括施用本公开的SAP蛋白。

[0221] 在一个方面,本公开提供了一种在被诊断患有骨髓增生性疾病的个体中确定治疗功效的方法,所述方法包括:(a)确定JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2核酸样品中一个或多个突变的存在;b)施用本公开的SAP蛋白,以及c)当所述核酸样品中存在的一个或多个突变的突变等位基因负荷降低时,将所述治疗鉴定为是有效的。在某些实施方式中,预先存在的异常(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中的突变的等位基因负荷)的根除被认为是完全响应,而等位基因负荷的>50%的降低被认为是部分响应。在某些实施方式中,部分响应只应用于在基线时具有至少20%的突变等位基因负荷的

患者(Tefferi等,Blood 2013,122:1395-1398)。

[0222] 在一个方面,本公开提供了在被诊断患有骨髓增生性疾病的个体中确定治疗功效的方法,所述方法包括:(a) 确定一种或多种细胞遗传学异常的存在;b) 施用本公开的SAP蛋白,以及(c) 当所述一种或多种细胞遗传学异常减少时,将所述治疗鉴定为是有效的。在某些实施方式中,预先存在的异常(例如细胞遗传学异常)的根除被认为是完全响应,而异常中期的>50%的减少被认为是部分响应。在某些实施方式中,部分响应只应用于在基线时具有至少10个异常中期的患者(Tefferi等,Blood 2013,122:1395-1398)。

[0223] 在另一个方面,本公开提供了一种为具有造血障碍的个体选择疗法的方法,所述方法包括评估来自于所述个体的含有核酸的样品的JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2核酸中的一个或多个突变的存在或不存在,并在所述一个或多个突变的存在的基础上选择疗法。

[0224] 可以使用下述确定中的一者或多者来选择治疗计划:确定特定的与骨髓增殖性障碍相关的突变(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中的突变)的存在或不存在,确定所述样品的接合性状态,以及确定所述样品中突变体与野生型核酸或mRNA的比例(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2的突变体与野生型比例)。例如,通过本公开的方法发现携带有特定的JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2突变的患者,可以推荐使用本公开的SAP蛋白的治疗,或者所述突变的检测可用于测量使用本公开的SAP蛋白的治疗的有效性。同样地,本公开的方法可用于治疗没有MPD症状的患者,例如处于MPD的非常早期阶段的患者。突变也可以在正在经历治疗的MPD患者中检测到;如果在治疗期间所述样品的突变体与野生型核酸的比例或接合性状态改变,可以做出不同的诊断。

[0225] 下述确定中的一者或多者可用于使用本公开的SAP蛋白治疗患者:确定特定的与骨髓增殖性障碍相关的突变(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中的突变)的存在或不存在,确定所述样品的接合性状态,以及确定所述样品中突变体与野生型核酸的比例(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2的突变体与野生型比例)。医生或治疗专家可以在一个或多个所述确定的基础上施用、放弃或改变治疗或治疗方案。或者,医生或治疗专家可以在一个或多个所述确定的基础上决定维持所述治疗方案。此外,带有所述突变的细胞的数目在MPD过程中可能改变,并且监测所述比例、接合性状态和/或突变的存在或不存在可以指示疾病状态或治疗功效。例如,治疗可能减少突变细胞的数目,或者所述疾病可能随时间变得恶化,并且患病细胞的数目可能增加。另外,一个或多个所述确定可能有助于患者的预后和生命质量决定。例如,可以做出关于是否继续痛苦的使人衰弱的治疗例如化疗或所述治疗继续多长时间的决定。

[0226] 样品中的接合性状态和野生型核酸与突变核酸的比例可以通过本领域中已知的方法来确定,包括序列特异性的定量检测方法。其他方法可以包括确定来自于标准测序电泳图、例如使用ABI测序系统(Applied Biosystems,Foster City Calif.)产生的测序电泳图的测序峰的曲线下面积。例如,在电泳图上在代表特定核苷酸的位置中存在仅仅单一峰例如“G”,指示了所述样品中的核酸在该位置处仅含有一种核苷酸,即“G”。然后将所述样品归类为纯合的,因为只检测到一个等位基因。在电泳图上同一位置中存在两个峰,例如“G”峰和“T”峰,指示所述样品含有两种核酸;一种在所讨论的核苷酸位置处带有“G”,另一种在所讨论的核苷酸位置处带有“T”。然后将所述样品归类为杂合的,因为检测到超过

一个等位基因。

[0227] 可以确定所述两个峰的尺寸(例如通过确定每个曲线下的面积),并且可以计算两种不同核酸的比例。野生型核酸与突变核酸的比例(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2的突变体与野生型比例)可用于监测疾病进展,确定治疗或做出诊断。例如,带有特定JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2突变的癌细胞的数目在MPD过程中可能变化。如果基线比例在疾病的早期建立,较晚确定的突变核酸相对于野生型核酸的较高比例可能指示所述疾病正在恶化或治疗无效;所述患者中带有所述突变的细胞的数目可能增加。突变体相对于野生型核酸的较低比例可能指示治疗起作用或者所述疾病没有发展;所述患者中带有所述突变的细胞的数目可能减少。

[0228] 在某些实施方式中,所述对象在一个或多个与骨髓增生性障碍相关的基因例如但不限于JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中带有突变。在某些实施方式中,所述对象在JAK2的617位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在JAK2的外显子12或外显子14中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL的515位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL中具有W515L、W515K、W515A或W515R氨基酸替换。在某些实施方式中,所述对象在MPL的外显子10中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在CALR的外显子9中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在ASXL1的外显子12中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的132位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的140位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的172位密码子处具有突变。

[0229] 在本公开的任一上述方面的某些实施方式中,所述骨髓增生性疾病是真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、骨髓纤维化或未分类的骨髓增生性疾病。在某些实施方式中,所述骨髓纤维化是原发性骨髓纤维化、PV后的骨髓纤维化或ET后的骨髓纤维化。

[0230] 在某些实施方式中,评估或确定目标核酸样品中一个或多个突变的存在或不存在包括进行等位基因特异性PCR。在本公开的任一上述方面的其他实施方式中,评估或确定目标核酸样品中一个或多个突变的存在或不存在包括扩增所述目标核酸并进行所述扩增的核酸的直接测序分析。其他适合的检测方法包括引物延伸反应和蛋白质测序。在上述方面的某些实施方式中,评估样品或确定与骨髓增生性障碍相关的多肽中一个或多个突变的存在或不存在,包括使用特异性结合到所述突变的JAK2多肽的抗体。在本公开的任何上述方面的某些实施方式中,所述核酸和/或多肽样品来自于适合的生物样品,包括例如全血(即从细胞级分提取JAK2核酸)、血浆、血清和组织样品(例如活检组织和石蜡包埋的组织)。

[0231] 在一个方面,本公开提供了通过施用SAP蛋白与一种或多种其他药剂例如另一种抗癌治疗剂的组合来治疗骨髓增生性障碍(例如骨髓纤维化)的方法。当在本文中使用,“与……相组合”或“联合施用”是指使得所述一种或多种其他药剂在体内仍然有效的任何施用形式(例如所述两种药剂、三种药剂、四种药剂等在患者中同时有效,其可以包括所述两种化合物的协同效应)。有效性可能不与血液、血清或血浆中所述药剂的可测量的浓度相关联。例如,所述不同的治疗剂可以在同一配方或分开的配方中,同时或顺序地并按照不同给药计划施用。因此,接受这种治疗的个体可以从不同治疗剂的组合效果获益。所述SAP蛋白可以在一种或多种另外的药剂的同时、之前或之后施用。

[0232] 一般来说,每种治疗剂以为该特定药剂确定的剂量和/或时间计划施用。在方案中使用的特定组合将所述SAP蛋白与所述药剂的相容性和/或待实现的所需治疗效果考虑在内。

[0233] 本公开的抗癌治疗剂可以包括但不限于化疗药剂、基于抗体的药剂、激酶抑制剂(例如酪氨酸激酶抑制剂、丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂等)、免疫调节剂和生物药剂或其组合。化疗药剂包括但不限于放线菌素D、阿地白介素、阿利维A酸、全反式视黄酸/ATRA、六甲蜜胺、安吡啶、天冬酰胺酶、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、卡介苗/BCG、苯达莫司汀盐酸盐、蓓萨罗丁、比卡鲁胺、博来霉素、硼替佐米、白消安、卡培他滨、卡铂、卡非佐米、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺氯氨铂/顺铂、克拉屈滨、环磷酰胺/细胞磷烷、阿糖胞苷、达卡巴嗪、正定霉素/道诺霉素、地尼白介素-白喉毒素连接物、右雷佐生、多西他赛、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶(5-FU)、吉西他滨、戈舍瑞林、氢化可的松、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、干扰素 α 、伊立替康CPT-11、拉帕替尼、来那度胺、亮丙瑞林、二氯甲基二乙胺/双氯乙基甲胺/氮芥/HN2、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、甲基强的松龙、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、奥曲肽、奥普瑞白介素、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸盐、帕唑帕尼、培门冬酶、培非格司亭、PEG干扰素、培美曲塞、喷司他丁、苯丙氨酸氮芥、普卡霉素/光神霉素、泼尼松、泼尼松龙、丙卡巴肼、雷洛昔芬、罗米司亭、沙格司亭、链脲菌素、他莫昔芬、替莫唑胺、替西罗莫司、替尼泊苷、沙利度胺、硫鸟嘌呤、硫代磷酰胺/噻替派、噻替派、盐酸拓扑替康、托瑞米芬、维甲酸、戊柔比星、长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、伏立诺他、唑来膦酸或其组合。基于抗体的药剂包括但不限于阿仑单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、夫苏木单抗、吉妥单抗奥佐米星、替伊莫单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、曲妥珠单抗DM1及其组合。免疫调节性化合物包括但不限于有机小分子,其抑制TNF α 、LPS诱导的单核细胞IL1 β 、IL12和IL6生产。在某些实施方式中,免疫调节性化合物包括但不限于甲氨蝶呤、来氟米特、环磷酰胺、环孢霉素A、米诺环素、硫唑嘌呤、抗生素(例如他克莫司)、甲基强的松龙、皮质类固醇、甾类、霉酚酸酯、雷帕霉素、咪唑立宾、脱氧精胍菌素、布喹那、T细胞受体调节剂或细胞因子受体调节剂,以及Toll样受体(TLR)激动剂。在某些实施方式中,免疫调节性化合物包括5,6-二甲基咕吨酮-4-乙酸(DMXAA)、萨力多胺、来那度胺、泊马度胺、乳铁蛋白、聚腺苷-聚尿苷酸(poly AU)、rintatolimod(poly I:poly C 12U; Hemispherx Biopharma)、用聚L-赖氨酸和羧甲基纤维素稳定化的聚肌苷酸-聚胞苷酸(Poly-ICLC, Hiltonol®)、咪喹莫特(3M)和瑞喹莫特(R848; 3M)、未甲基化的CpG二核苷酸(CpG-ODN)和伊匹单抗。生物药剂包括单克隆抗体(MAB)、CSF、干扰素和白介素。在某些实施方式中,所述生物药剂是IL-2、IL-3、促红细胞生成素、G-CSF、非格司亭、干扰素 α 、阿仑单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、吉妥单抗奥佐米星、替伊莫单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗或曲妥珠单抗。

[0234] 激酶抑制剂(例如酪氨酸激酶抑制剂、丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂等)包括但不限于阿西替尼、巴非替尼、博舒替尼、西地尼布、克唑替尼、达沙替尼、埃罗替尼、吉非替尼、伊马替尼、拉帕替尼、来那替尼、尼罗替尼、帕纳替尼、奎扎替尼、瑞戈非尼、索拉非尼、舒尼替尼、凡德他尼、瓦他拉尼、威罗非尼及其组合。

[0235] 在某些实施方式中,所述抗癌治疗剂是JAK激酶抑制剂例如但不限于AC-430、AZD 1480、巴瑞克替尼、BMS-911453、CEP-33779、CYT387、GLPG-0634、来他替尼、LY2784544、NS-018、帕克替尼、R-348、R723、鲁索替尼、TG101348(SAR302503)、托法替尼和VX-509。

[0236] 在某些实施方式中,所述抗癌治疗剂包括但不限于抗代谢物(例如5-氟-尿嘧啶、阿糖胞苷、甲氨蝶呤、氟达拉滨等)、抗微管蛋白药剂(例如长春花生物碱例如长春新碱、长春花碱;紫杉烷类例如紫杉醇和多西他赛)、烷化剂(例如环磷酰胺、美法仑、卡莫司汀、亚硝基脲类例如双氯乙基亚硝基脲和羟基脲)、铂药剂(例如顺铂、卡铂、奥沙利铂、赛特铂和CI-973)、蒽环霉素类(例如多柔比星和正定霉素)、抗肿瘤抗生素(例如丝裂霉素、伊达比星、阿霉素和道诺霉素)、拓扑异构酶抑制剂(例如依托泊苷和喜树碱)、抗血管生成药剂(例如舒尼替尼、索拉非尼和贝伐单抗)或任何其他细胞毒性药剂(例如磷酸雌莫司汀、泼尼莫司汀)、激素或激素激动剂、拮抗剂、部分激动剂或部分拮抗剂、激酶抑制剂(例如伊马替尼)和辐射治疗。

[0237] 如有需要或要求,可以重复本公开的任何治疗方法。例如,可以定期进行治疗。施用治疗的频率可以由本领域技术人员确定。例如,治疗可以每周一次施用为期几周,每四周一次或一周多次施用一段时间(例如在治疗的第一周内3次)。在某些实施方式中,在初始负荷剂量期后跟随维持剂量。在某些实施方式中,所述负荷剂量被定期重复。在某些实施方式中,所述初始负荷剂量期包括一周多次施用治疗(例如在治疗的第一周内3次)。在某些实施方式中,可以每隔周、每月、每两个月、每3个月或每6个月或根据需要重复所述负荷剂量,在负荷剂量之间使用或不使用连续定期给药。通常,与癌症相关的纤维化的改善持续一段时间,优选为至少数月,但抗纤维化效果的维持和/或纤维化复发的预防可能需要在无限制的时间段内连续定期给药SAP蛋白。随着时间,患者可能经历症状的复发,在此时可以重复所述治疗。

[0238] 在某些方面,本文提供了在对象中治疗骨髓纤维化、延迟骨髓纤维化的发展和/或预防骨髓纤维化的方法,所述方法包括向所述对象单独或与抗癌治疗剂相组合地施用有效量的SAP蛋白或其可药用盐。在某些实施方式中,所述对象具有骨髓纤维化。在某些实施方式中,所述对象处于发展出骨髓纤维化的风险中。在某些实施方式中,所述对象是人类对象。在某些实施方式中,所述对象已被确定带有与骨髓增生性障碍相关的突变(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中的突变)。本文描述的任一配方例如本文描述的胶囊或单位剂型可用于治疗具有骨髓纤维化的对象。

[0239] 可以通过本文描述的方法治疗的骨髓纤维化包括原发性骨髓纤维化(PMF)和继发性骨髓纤维化(例如由先行的真性红细胞增多症(PV)后的MF)或原发性血小板增多症(ET)后的MF)引起的骨髓纤维化)。可以通过本文描述的方法治疗的骨髓纤维化还包括高风险、中风险例如中风险水平1或中风险水平2和低风险的骨髓纤维化。用于诊断各种不同类型的骨髓纤维化的方法在本领域中是已知的。参见例如Cervantes等,Blood 2009,113(13):2895-901。在某些实施方式中,解释了对诊断后风险情况的修改的动态预后模型可能被证明是有用的。参见例如Passamonti等,Blood 2010,115:1703-1708。在某些实施方式中,所述对象具有可触及的脾肿大。在某些实施方式中,所述具有骨髓纤维化的对象当通过触诊测量时具有比肋缘低至少5cm的脾脏。在某些实施方式中,所述对象具有贫血和/或血小板减少症和/或白细胞减少症。在某些实施方式中,所述对象不具有贫血或血小板减少症或白细胞减少症。在某些实施方式中,所述对象是输血依赖性的。在某些实施方式中所述对象不是输血依赖性的。在某些实施方式中,所述对象根据WHO诊断判据具有病理学上确认的PMF诊断或ET/PV后MF,包括按照IWG-MRT国际动态预后评分系统(IWG-MRT Dynamic International

Prognostic Scoring System) 存在至少2级骨髓纤维化并伴有中风险-1、中风险-2或高风险疾病。在某些实施方式中,所述对象根据WHO诊断判据具有病理学上确认的PMF诊断或ET/PV后MF,并且按照IWG-MRT国际动态预后评分系统(IWG-MRT Dynamic International Prognostic Scoring System)具有0或1级骨髓纤维化和低风险、中风险-1、中风险-2、高风险或低风险疾病。在某些实施方式中,所述对象具有“前纤维化的”骨髓纤维化。在某些实施方式中,所述对象具有PV或ET并接受SAP蛋白以预防骨髓纤维化的发展。在某些实施方式中,所述对象在JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中具有突变。

[0240] 在某些实施方式中,如果所述对象是人类,则所述对象在Janus激酶2(JAK2激酶)中具有617位从缬氨酸向苯丙氨酸的点突变(JAK2V617F),或者如果所述对象不是人类,则所述对象具有与Janus激酶2(JAK2激酶)中617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变相对应的点突变。在某些实施方式中,如果所述对象是人类,则所述对象对JAK2的617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变为阴性,或者如果所述对象不是人类,则所述对象对与Janus激酶2(JAK2激酶)中617位缬氨酸向苯丙氨酸的突变相对应的突变为阴性。对象对JAK2V617F是阳性还是阴性,可以使用来自于骨髓细胞或血液细胞(例如全血白细胞)的基因组DNA,通过聚合酶链反应(“PCR”)分析来确定。所述PCR分析可以是等位基因特异性PCR(例如等位基因特异性定量PCR)或PCR测序。参见Kittur J等,Cancer 2007,109(11):2279-84和McLornan D等,Ulster Med J.2006,75(2):112-9,其各自明确地通过参考并入本文。在某些实施方式中,所述对象在JAK2的外显子12或外显子14中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL的515位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL中具有W515L、W515K、W515A或W515R氨基酸替换。在某些实施方式中,所述对象在MPL的外显子10中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在CALR的外显子9中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在ASXL1的外显子12中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的132位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的140位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的172位密码子处具有突变。

[0241] 在某些实施方式中,用本文描述的方法治疗的对象以前已接收或目前正接受另一种骨髓纤维化疗法或治疗。在某些实施方式中,所述对象是所述其他骨髓纤维化疗法的非响应者,或者在接受所述其他骨髓纤维化疗法后具有复发。所述以前的疗法可能是JAK2抑制剂(例如INCB0 18424(也被称为鲁索替尼,可以从Incyte获得)、CEP-701(来他替尼,可以从Cephalon获得)或XL019(可以从Exelixis获得))(参见Verstovsek S.,Hematology Am Soc Hematol Educ Program.2009:636-42)或非JAK2抑制剂(例如羟基脲)。在某些实施方式中,所述以前的疗法可能是JAK激酶抑制剂,例如但不限于AC-430、AZD1480、巴瑞克替尼、BMS-911453、CEP-33779、CYT387、GLPG-0634、INCB18424、来他替尼、LY2784544、NS-018、帕克替尼、鲁索替尼、TG101348(SAR302503)、托法替尼、VX-509、R-348或R723。在某些实施方式中,所述对象已接受鲁索替尼治疗至少3个月,用于原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症后的骨髓纤维化(PV后的MF)、原发性血小板增多症后的骨髓纤维化(ET后的MF)、真性红细胞增多症或原发性血小板增多症。在某些实施方式中,所述对象已接受鲁索替尼治疗少于3个月,用于原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症后的骨髓纤维化(PV后的MF)、原发性血小板增多症后的骨髓纤维化(ET后的MF)、真性红细胞增多症或原发性血小板增多症。在

某些实施方式中,所述对象已接受鲁索替尼治疗至少3个月,用于原发性骨髓纤维化、真性红细胞增多症后的骨髓纤维化(PV后的MF)、原发性血小板增多症后的骨髓纤维化(ET后的MF)、真性红细胞增多症或原发性血小板增多症。在某些实施方式中,在继续鲁索替尼疗法后至少一种或多种症状已停止改善。在某些实施方式中,所述对象不再对鲁索替尼响应。在某些实施方式中,所述对象以前已接收另一种骨髓纤维化疗法至少6个月、至少5个月、至少4个月、至少3个月、至少2个月、至少1个月、至少3周或至少2周。在某些实施方式中,所述对象不再对所述其他骨髓纤维化疗法响应。在某些实施方式中,所述以前的疗法是本文中描述的抗癌治疗剂,并且在来自于所述对象的血清中的淀粉酶、脂肪酶、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和/或肌酐中的一者或多者的水平升高的指征后,和/或在选自贫血、血小板减少症和中性粒细胞减少症的血液病症的指征后,或出于在治疗医师的决定或患者要求的基础上的任何其他原因,所述以前的疗法已被中断。在某些实施方式中,在所述第二次治疗中所述化合物的剂量与所述以前的疗法中的剂量相同或更低。在某些实施方式中,所述对象尚未接受除了输血之外的任何疗法。在某些实施方式中,所述对象尚未接受任何在先疗法。

[0242] 在某些实施方式中,所述SAP蛋白与JAK激酶抑制剂相组合施用,所述JAK激酶抑制剂例如但不限于AC-430、AZD1480、巴瑞克替尼、BMS-911453、CEP-33779、CYT387、GLPG-0634、INCB18424、来他替尼、LY2784544、NS-018、帕克替尼、鲁索替尼、TG101348(SAR302503)、托法替尼、VX-509、R-348或R723(参见Kontzias等,Curr Opin Pharmacol. 2012, 12(4):464-470)。在某些实施方式中,所述SAP蛋白与已知减轻骨髓纤维化的症状的药剂相组合施用,所述药剂例如但不限于AB0024、AZD1480、AT-9283、BMS-911543、CYT387、依维莫司、吉维司他、伊美司他、来他替尼、LY2784544、口服砷、NS-018、帕克替尼、帕比司他、聚乙二醇化干扰素 α -2a,泊马度胺,帕西司他,鲁索替尼,TAK-901或TG101438(SAR302503)(Mesa, Leuk Lymphoma 2013, 54(2):242-251; Gupta等, 2012, 2(3):170-186; Kucine和Levine 2011, 2(4):203-211)。

[0243] 所述对象(例如人类)可以通过以约0.1mg/kg至约40mg/kg的剂量施用所述SAP蛋白来治疗。在某些实施方式中,所述SAP蛋白以0.3mg/kg的剂量施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白以3mg/kg的剂量施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白以10mg/kg的剂量施用。在某些实施方式中,所述化合物以约0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、12mg/kg、15mg/kg、18mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg或40mg/kg任一剂量施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白以约0.1-0.3、0.3-0.5、0.5-0.8、0.8-1、1-5、5-10、10-15、15-20、20-25、25-30、30-35或35-40mg/kg的剂量施用。所述化合物可以在本文描述的胶囊和/或单位剂型中。在某些实施方式中,所述化合物被静脉内(IV)施用。在某些实施方式中,所述化合物通过注射(例如皮下(SubQ)、肌肉内(IM)、腹膜内(IP))、通过吸入或吹入(通过口或鼻)施用,或者所述施用是口服、颊、舌下、透皮、鼻、肠胃外或直肠施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白通过静脉内输注来施用。在某些实施方式中,对于每个剂量来说,输注为期约1小时。然而,可以使用更长或更短的输注时间(例如30分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟、60分钟、1小时10分钟、1小时15分钟、90分钟等)。当所述方法包括施用另外的抗癌治疗剂时,该治疗剂可以通过相同的施用途径或通过不同的施用途径来施用。

在某些实施方式中,另外的抗癌治疗剂被口服施用。

[0244] 在某些实施方式中,所述SAP蛋白以0.3mg/kg的剂量通过IV输注施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白以0.3mg/kg的剂量皮下施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白以低于0.3mg/kg的剂量皮下施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白以3mg/kg的剂量通过IV输注施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白以10mg/kg的剂量通过IV输注施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白每四周施用一次。在某些实施方式中,在初始负荷剂量期后跟随维持剂量(例如在每周三次,并在其后每四周一次)。

[0245] 本文还提供了改善与骨髓纤维化相关的一种或多种表现形式或症状的方法。例如,使用本文中描述的方法的治疗有效地降低一个或多个与骨髓纤维化相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)中的突变等位基因负荷。在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗有效地减小脾脏尺寸,改善体质症状(例如早饱、疲劳、盗汗、咳嗽和皮肤瘙痒),降低MPN-SAF症状总分,改善通过EORTC QLQ-C30所度量的生命质量,减轻白细胞增多,减轻血小板增多,改善贫血,改善血小板减少症,改善白细胞减少症,减轻输血依赖性,降低JAK2V617F等位基因负荷,降低MPL515W等位基因负荷,降低CALR突变等位基因负荷,降低ASXL1突变等位基因负荷,降低EZH2突变等位基因负荷,降低SRSF2突变等位基因负荷,降低IDH1突变等位基因负荷,降低IDH2突变等位基因负荷,减少外周血胚细胞(peripheral blood blasts),减少骨髓胚细胞(bone marrow blasts),降低骨髓纤维化,引起正如通过FDG或FLT PET-CT扫描所测量的指示了骨髓、脾脏和/或肝脏中纤维化的降低的代谢活性的变化,改善皮肤瘙痒,改善恶病质和/或降低或提高骨髓细胞性。所述减轻、减少、改进或改善可以是与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比至少5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%。在某些实施方式中,在治疗后所述对象中的骨髓纤维化减少。在某些实施方式中,在治疗后骨髓纤维化变为0级。在某些实施方式中,在治疗后骨髓纤维化变为1级。在某些实施方式中,所述骨髓纤维化降低至少一级,例如从3级到2级或1级,或从2级到1级或0级。在某些实施方式中,当通过定量图像分析或其他定量手段测量时,所述骨髓纤维化从基线降低可测量的百分数。在某些实施方式中,在治疗后脾脏在所述对象中变得不可触及。在某些实施方式中,所述对象在治疗后已完全消解白细胞增多和/或血小板增多。在某些实施方式中,所述对象在治疗后已完全消解贫血、血小板减少症和/或白细胞减少症。在某些实施方式中,所述对象在治疗后变成输血不依赖性(例如红细胞输血或血小板输血)。在某些实施方式中,所述对象的输血减少50%。在某些实施方式中,所述对象的输血减少40%-60%、30%-70%、40%-50%、50%、60%。在某些实施方式中,所述对象在治疗后已完全消解皮肤瘙痒。在某些实施方式中,所述治疗的功效通过评价整体响应率(ORR)来评估,所述整体响应率按照国际工作组(International Working Group)(TWG)判据来归类,所述判据被修改成包括骨髓纤维化改善至少一级的稳定疾病作为响应。在某些实施方式中,所述治疗的功效通过按照骨髓纤维化评级的欧洲共识文件(European Consensus on Grading of Bone Marrow Fibrosis)评估骨髓纤维化分值改善至少一级来评估。在某些实施方式中,治疗功效通过评估对预先存在的异常例如遗传突变的分子效应来评估。预先存在的异常(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2中的突变的等位基因负荷)的根除被认为是完全响应,而等位基因负荷降低>50%被认为是部分响应。部分响应只应用于在基线时具有至少20%的突变等位基因负荷的患者(Tefferi等,Blood 2013,122:1395-

1398)。在某些实施方式中,治疗功效通过评估循环血浆细胞因子水平的变化来评估,所述细胞因子包括但不限于CRP、IL-1Ra、MIP-1 β 、TNF α 、IL-6和VEGF。在某些实施方式中,治疗功效通过评估PBMC mRNA和miRNA表达水平的变化来评估。在某些实施方式中,治疗功效通过缺少PV或ET向骨髓纤维化的进展来评估。在某些实施方式中,治疗功效通过缺少骨髓纤维化提高至少一级来评估。

[0246] 在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法)有效地将一个或多个与骨髓增生性障碍相关的基因(例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2)中的突变等位基因负荷与使用本文中提供的方法的治疗开始之前的等位基因负荷相比(例如与基线相比)降低至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%或至少70%。在某些实施方式中,所述治疗有效地将突变等位基因负荷降低约20-70%、约20-60%、约25-60%、约25-55%或约25%-50%。在某些实施方式中,所述突变等位基因负荷降低25%至50%。在某些实施方式中,所述突变等位基因负荷降低至少50%。在某些实施方式中,所述治疗有效地实现完全的分子响应。在某些实施方式中,等位基因负荷可以通过在从血液提取的核酸样品上进行的PCR来测量。本领域技术人员应该理解,也可以使用其他已知方法来测量等位基因负荷。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的患者中降低等位基因负荷的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将等位基因负荷降低至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少50%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白,并且所述另外的抗癌治疗剂是JAK激酶抑制剂。在某些实施方式中,等位基因负荷降低约25-55%、约25-50%或约25-40%。在某些实施方式中,所述对象具有JAK2V617F突变。在某些实施方式中,所述对象在JAK2的外显子12或外显子14中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL的515位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在MPL中具有W515L、W515K、W515A或W515R氨基酸替换。在某些实施方式中,所述对象在MPL的外显子10中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在CALR的外显子9中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在ASXL1的外显子12中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH1的132位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的外显子4中具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的140位密码子处具有突变。在某些实施方式中,所述对象在IDH2的172位密码子处具有突变。在某些实施方式中,在治疗后 $\geq$ 12个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周)观察到等位基因负荷的降低。

[0247] 在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法)有效地将脾脏体积与使用本文中提供的方法的治疗开始之前的水平相比(例如与基线相比)减小至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%或至少70%。在某些实施方式中,所述治疗有效地将脾脏体积减小至少10%。在某些实施方式中,所述治疗有效地将脾脏体积减小至少25%。在某些实施方式中,所述治疗有效地将脾脏体积减小至少35%。在某些实施方式中,所述治疗有效地将脾脏体积减小至少50%。在某些实施方式中,所述治疗有效地将脾脏体积减小约20-70%、约20-60%、约25-60%、约25-55%或约25%-50%。在某些实施方式

中,脾脏体积可以通过人工触诊来测量。本领域技术人员应该理解,也可以使用其他已知方法来测量脾脏体积,例如通过磁共振成像来测量。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的患者中减小脾脏体积的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将脾脏体积减小至少10%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%或至少55%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白,并且所述另外的抗癌治疗剂是JAK激酶抑制剂。在某些实施方式中,脾脏体积被减小约10-25%、约25-55%、约25-50%或约25-40%。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周)观察到脾脏体积减小至少10%、至少25%或至少50%。

[0248] 在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法)有效地将所述骨髓增生性肿瘤症状评估表(MPN-SAF)症状总分与使用本文描述的方法的治疗开始之前的分值相比降低至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%或至少70%。对于骨髓增生性肿瘤症状评估表症状总分的描述和讨论,参见Emanuel等,2012,Journal of Clinical Oncology,第30卷,第33期,第4098-4113页。在某些实施方式中,所述治疗有效地将所述MPN-SAF症状总分降低至少25%。在某些实施方式中,所述治疗有效地将所述MPN-SAF症状总分降低至少50%。在某些实施方式中,所述症状使用MPN-SAF患者报告的结果工具来评估(Emanuel等,2012,Journal of Clinical Oncology 30(33):4098-4113)。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的患者中降低MPN-SAF症状总分的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将MPN-SAF症状总分降低至少约25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少55%或至少60%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白,并且所述另外的抗癌治疗剂是JAK激酶抑制剂。在某些实施方式中,所述MPN-SAF症状总分被降低约25-60%、约25-55%或约25-50%。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周),MPN-SAF症状总分被降低至少25%或至少50%。

[0249] 在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法)有效地将以EORTC QLQ-C30分值计的生命质量与使用本文描述的方法的治疗开始之前的分值相比提高至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%或至少70%。对于EORTC QLQ-C30调查问卷和评分系统的描述和讨论,参见EORTC QLQ-C30(第三版)1995,EORTC Quality of Life Group。在某些实施方式中,所述治疗有效地将所述EORTC QLQ-C30分值提高至少25%。在某些实施方式中,所述治疗有效地将所述EORTC QLQ-C30分值提高至少50%。在某些实施方式中,所述分值使用EORTC QLQ-C30(第三版)1995,EORTC Quality of Life Group中概述的问题和评分系统来评估。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的患者中提高EORTC QLQ-C30分值的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将所述EORTC QLQ-C30分值提高至少约25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少55%或至少60%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白,并且所述另外的抗癌治疗剂是JAK激酶抑制剂。

在某些实施方式中,所述EORTC QLQ-C30分值被提高约25-60%、约25-55%或约25-50%。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周,所述EORTC QLQ-C30分值的提高为至少25%或至少50%。

[0250] 在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法)有效地将血红蛋白水平与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比(例如与基线相比)提高至少约500mg/L、1g/L、2g/L、3g/L、5g/L、10g/L或20g/L。在某些实施方式中,所述治疗有效地将血红蛋白水平与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比(例如与基线相比)提高500-1000mg/L、1-2g/L、2-3g/L或3-5g/L。在某些实施方式中,所述治疗有效地将血红蛋白水平提高1g/L。在某些实施方式中,所述治疗有效地将血红蛋白水平提高到至少80g/L、至少90g/L、至少100g/L、至少110g/L、至少120g/L、至少130g/L或至少140g/L。在某些实施方式中,所述治疗有效地将血红蛋白水平提高到至少100g/L。在某些实施方式中,所述血红蛋白水平作为常规全血计数(CBC)的一部分来测量。本领域技术人员应该理解,也可以使用其他已知方法来测量血红蛋白水平。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的患者中提高血红蛋白水平的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将所述血红蛋白水平提高至少约500mg/L、1g/L、2g/L、3g/L或5g/L的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白,并且所述另外的抗癌治疗剂是JAK激酶抑制剂。在某些实施方式中,所述血红蛋白水平被提高约500-1000mg/L、1-2g/L、2-3g/L或3-5g/L。在某些实施方式中,所述血红蛋白水平被提高到至少约80g/L、90g/L、100g/L、110g/L、120g/L、130g/L或140g/L。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周观察到血红蛋白水平的提高。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周),在没有输血的情况下,所述血红蛋白水平被提高约 ≥ 10 g/L。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周),在没有输血的情况下,观察到所述血红蛋白水平提高约 ≥ 20 g/L。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周),观察到血红蛋白水平提高到至少约100g/L。

[0251] 在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法)有效地将红细胞(RBC)输血与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比减少至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%或至少60%。在某些实施方式中,所述治疗有效地将RBC输血减少至少25%。在某些实施方式中,所述治疗有效地将RBC输血减少至少50%。在某些实施方式中,所述治疗有效地实现RBC输血不依赖性。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的患者中减少RBC输血的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将RBC输血减少至少约25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少55%或至少60%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白,并且所述另外的抗癌治疗剂是JAK激酶抑制剂。在某些实施方式中,RBC输血减少约25-60%、约25-55%或约25-50%。在某些实施方式中,在治疗后所述患者变得不依赖输血。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周,所述患者变得不依赖输血。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过

48周), 患者的输血减少 $\geq 50\%$ 。

[0252] 在某些实施方式中, 使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法) 有效地改善存在的血小板减少症。在某些实施方式中, 所述治疗将血小板与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比增加至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%。在某些实施方式中, 所述治疗将血小板与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比增加至少20%-30%、至少30%-40%、至少40%-50%、至少50%-60%、至少60%-70%、至少70%-80%、至少80%-90%或至少90%-100%。在某些实施方式中, 所述治疗有效地将血小板增加至少100%。在某些实施方式中, 所述治疗将血小板增加到至少 $25 \times 10^9/\text{L}$ 、 $30 \times 10^9/\text{L}$ 、 $40 \times 10^9/\text{L}$ 、 $50 \times 10^9/\text{L}$ 、 $60 \times 10^9/\text{L}$ 、 $70 \times 10^9/\text{L}$ 、 $80 \times 10^9/\text{L}$ 、 $90 \times 10^9/\text{L}$ 或 $100 \times 10^9/\text{L}$ 。在某些实施方式中, 所述治疗将血小板增加到至少 $25-50 \times 10^9/\text{L}$ 、 $50-75 \times 10^9/\text{L}$ 、 $75-100 \times 10^9/\text{L}$ 或 $100-150 \times 10^9/\text{L}$ 。在某些实施方式中, 所述治疗将血小板增加到 $50 \times 10^9/\text{L}$ 。在某些实施方式中, 所述治疗将血小板增加到 $100 \times 10^9/\text{L}$ 。在某些实施方式中, 血小板作为常规全血计数(CBC)的一部分来测量。本领域技术人员应该理解, 也可以使用其他已知方法来测量血小板。在某些实施方式中, 本公开提供了在需要的患者中增加血小板的方法, 其中所述需要的患者具有骨髓纤维化, 所述方法包括按照有效地将血小板增加至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中, 所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白, 并且所述另外的抗癌治疗剂是JAK激酶抑制剂。在某些实施方式中, 血小板被增加约50%-60%、60%-70%、70%-80%、80%-90%或90%-100%。在某些实施方式中, 在治疗后 ≥ 12 个连续周, 所述患者具有 $>25 \times 10^9/\text{L}$ 的血小板计数。在某些实施方式中, 在治疗后 ≥ 12 个连续周, 所述患者具有 $>50 \times 10^9/\text{L}$ 的血小板计数。在某些实施方式中, 在治疗后 ≥ 12 个连续周, 所述患者具有 $>100 \times 10^9/\text{L}$ 的血小板计数。在某些实施方式中, 在 ≥ 12 个连续周, 在没有输血的情况下, 所述患者具有基线血小板计数的倍增。在某些实施方式中, 在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周), 所述患者的输血减少 $\geq 50\%$ 。

[0253] 在某些实施方式中, 使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法) 在血红蛋白 $<100\text{g/L}$ 并且血小板 $<50 \times 10^9/\text{L}$ 的对象中有效地改善血红蛋白水平或血小板水平中的任一者或两者, 并且不使血红蛋白或血小板与基线相比恶化。在某些实施方式中, 使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法) 在血红蛋白 $<100\text{g/L}$ 的对象中有效地改善血红蛋白水平, 并且不使血小板恶化到 $<50 \times 10^9/\text{L}$ 。在某些实施方式中, 使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法) 在血小板 $<50 \times 10^9/\text{L}$ 的对象中有效地改善血小板水平, 并且不使血红蛋白恶化到 $<100\text{g/L}$ 或产生新的输血依赖性。

[0254] 在某些实施方式中, 使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP的单一药剂或组合疗法) 提高无进展生存期和/或总生存期, 例如与标准治疗相比。在某些实施方式中, 无进展生存期和/或总生存期与无治疗相比或与标准治疗方法相比来测量。

[0255] 在某些实施方式中, 使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法) 有效地将血小板输血与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比减少至少25%、30%、40%、50%、60%、75%或100%。在某些实施方式中, 所述治疗将血小板输

血减少至少50%。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的患者中减少血小板输血的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将血小板输血减少至少30%、至少40%、至少50%、至少60%或至少70%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白。在某些实施方式中,血小板输血被减少约25%-40%、25%-50%、50%-70%或70%-100%。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周,所述患者变得不依赖输血。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周),所述患者的输血减少 $\geq 50\%$ 。

[0256] 在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法)有效地改善存在的血小板增多。在某些实施方式中,所述治疗将血小板与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少50%。在某些实施方式中,所述治疗将血小板减少25%。在某些实施方式中,所述治疗将血小板减少到正常水平。在某些实施方式中,血小板作为常规全血计数(CBC)的一部分来测量。本领域技术人员应该理解,也可以使用其他已知方法来测量血小板。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的对象中减少血小板的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将血小板减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少50%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白。在某些实施方式中,血小板被减少约10%-15%、至少15%-25%或至少25%-35%。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周)观察到血小板计数的减少。

[0257] 在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法)有效地改善存在的中性粒细胞减少症。在某些实施方式中,所述治疗将绝对中性粒细胞计数(ANC)与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比增加至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%。在某些实施方式中,所述治疗将ANC与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比增加至少20%-30%、至少30%-40%、至少40%-50%、至少50%-60%、至少60%-70%、至少70%-80%、至少80%-90%或至少90%-100%。在某些实施方式中,所述治疗有效地将ANC增加至少50%。在某些实施方式中,所述治疗将ANC增加到至少1000个细胞/ μL 、至少1250个细胞/ μL 、至少1500个细胞/ μL 、至少1750个细胞/ μL 或至少2000个细胞/ μL 。在某些实施方式中,所述治疗将ANC增加到至少1250-1500个细胞/ μL 、至少1500-1750个细胞/ μL 或至少1750-2000个细胞/ μL 。在某些实施方式中,所述治疗将ANC增加到至少1500个细胞/ μL 。在某些实施方式中,ANC作为常规全血计数(CBC)的一部分来测量。本领域技术人员应该理解,也可以使用其他已知方法来测量ANC。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的患者中增加ANC的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将ANC增加至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白。在某些实施方式中,ANC被增加约20%-30%、至少30%-40%、至少40%-50%、至少50%-60%、至少60%-70%、至少70%-80%、至少80%-90%或至少

90%-100%。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周),所述治疗将ANC增加到至少1500个细胞/ μL 。

[0258] 在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法)有效地改善存在的白细胞减少症。在某些实施方式中,所述治疗将白细胞(WBC)与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比增加至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%。在某些实施方式中,所述治疗将WBC与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比增加至少20%-30%、至少30%-40%、至少40%-50%、至少50%-60%、至少60%-70%、至少70%-80%、至少80%-90%或至少90%-100%。在某些实施方式中,所述治疗有效地将WBC增加至少50%。在某些实施方式中,所述治疗将WBC增加到至少 $4 \times 10^9/\text{L}$ 、 $5 \times 10^9/\text{L}$ 、 $7.5 \times 10^9/\text{L}$ 或 $10 \times 10^9/\text{L}$ 。在某些实施方式中,所述治疗将WBC增加到 $10 \times 10^9/\text{L}$ 。在某些实施方式中,所述治疗将WBC增加到正常范围。在某些实施方式中,WBC作为常规全血计数(CBC)的一部分来测量。本领域技术人员应该理解,也可以使用其他已知方法来测量WBC。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的患者中增加WBC的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将WBC增加至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白。在某些实施方式中,WBC被增加约20%-30%、至少30%-40%、至少40%-50%、至少50%-60%、至少60%-70%、至少70%-80%、至少80%-90%或至少90%-100%。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周)观察到WBC的增加。

[0259] 在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法)有效地改善存在的白细胞增多。在某些实施方式中,所述治疗将ANC与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少60%或至少70%,而不使ANC减少到低于1500/ μL 。在某些实施方式中,所述治疗将ANC减少25%。在某些实施方式中,所述治疗将ANC减少50%。在某些实施方式中,所述治疗将ANC减少到正常水平。在某些实施方式中,所述治疗将白细胞(WBC)与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少60%或至少70%,而不使WBC减少到低于正常下限。在某些实施方式中,所述治疗将WBC减少25%。在某些实施方式中,所述治疗将WBC减少50%。在某些实施方式中,所述治疗将WBC减少到 $< 35 \times 10^9/\text{L}$ 、 $< 30 \times 10^9/\text{L}$ 、 $< 25 \times 10^9/\text{L}$ 、 $< 20 \times 10^9/\text{L}$ 或 $< 15 \times 10^9/\text{L}$ 。在某些实施方式中,所述治疗将WBC减少到 $< 25 \times 10^9/\text{L}$ 。在某些实施方式中,所述治疗将WBC减少到正常范围。在某些实施方式中,ANC和WBC作为常规全血计数(CBC)的一部分来测量。本领域技术人员应该理解,也可以使用其他已知方法来测量ANC或WBC。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的患者中减少ANC或WBC的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将ANC或WBC减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少60%或至少70%而不使WBC减少到低于正常下限的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白。在某些实施方式中,ANC或WBC被减少约20%-30%、至少30%-40%、至少40%-

50%、至少50%-60%或至少60%-70%，而不使WBC减少到低于正常下限。在某些实施方式中，在治疗后 ≥ 12 个连续周（例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周），所述治疗将WBC减少到 $< 25 \times 10^9/L$ 。

[0260] 在某些实施方式中，使用本文中描述的方法的治疗（例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法）有效地将外周血胚细胞与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比减少至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%或至少70%。在某些实施方式中，所述治疗有效地将外周血胚细胞减少至少50%。在某些实施方式中，所述治疗有效地将外周血胚细胞从 $\geq 1\%$ 减少到 $< 1\%$ 。本领域技术人员应该理解，可以使用本领域中已知的任何方法来测量外周血胚细胞。在某些实施方式中，本公开提供了在需要的患者中减少外周血胚细胞的方法，其中所述需要的患者具有骨髓纤维化，所述方法包括按照有效地将外周血胚细胞减少至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%或至少70%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中，所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白。在某些实施方式中，外周血胚细胞被减少约20%-30%、至少30%-40%、至少40%-50%、至少50%-60%或至少60%-70%。在某些实施方式中，外周血胚细胞从 $\geq 1\%$ 减少到 $< 1\%$ 。在某些实施方式中，在治疗后 ≥ 12 个连续周（例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周），外周血胚细胞从 $\geq 1\%$ 减少到 $< 1\%$ 。

[0261] 在某些实施方式中，使用本文中描述的方法的治疗（例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法）有效地将骨髓纤维化从3级降低到2级。在某些实施方式中，所述治疗有效地将骨髓纤维化从3级降低到1级。在某些实施方式中，所述治疗有效地将骨髓纤维化从3级降低到0级。在某些实施方式中，所述治疗有效地将骨髓纤维化从2级降低到1级。在某些实施方式中，所述治疗有效地将骨髓纤维化从2级降低到0级。在某些实施方式中，所述治疗有效地将骨髓纤维化与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比减少至少5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%。本领域技术人员应该理解，可以使用本领域中已知的任何方法来评估骨髓纤维化。在某些实施方式中，本公开提供了在需要的患者中减少骨髓纤维化的方法，其中所述需要的患者具有骨髓纤维化，所述方法包括按照有效地将骨髓纤维化减少至少5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中，所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白。在某些实施方式中，骨髓纤维化被减少约20%-30%、至少30%-40%、至少40%-50%、至少50%-60%或至少60%-70%。在某些实施方式中，在治疗后 ≥ 12 个连续周（例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周），观察到骨髓纤维化降低超过1级。

[0262] 在某些实施方式中，使用本文中描述的方法的治疗（例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法）有效地减少骨髓纤维化，正如通过定量图像分析所测量的。在某些实施方式中，所述治疗有效地将骨髓纤维化与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比减少至少5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%。本领域技术人员应该理解，可以使用本领域中已知的任何定量图像分析方法来评估骨髓纤维化。在某些实施方式中，在来自于患者的连续骨髓样本的全载片扫描图上进行计算机辅助图像分析(CIA)，以客观定量所有治疗后样品与基线样品相比的总体纤维化水平和骨硬化。计算被骨小梁（总核心活检组织的%）和网状纤维（不包括脂肪的造血区域的%）所占据的面积。在某些实施方式中，本公开提供了在需

要的患者中减少骨髓纤维化的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将骨髓纤维化减少至少5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白。在某些实施方式中,骨髓纤维化被减少约20%-30%、至少30%-40%、至少40%-50%、至少50%-60%或至少60%-70%。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周)观察到超过10%的骨髓纤维化减少。

[0263] 在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合法)有效地改善骨髓形态,所述骨髓形态指示了造血作用的愈合和恢复。在某些实施方式中,所述治疗有效地将巨核细胞形貌与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比改善至少5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%。在某些实施方式中,所述治疗有效地将髓系与红系(M:E)比例与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比正常化至少5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%。在某些实施方式中,所述治疗有效地将胶原蛋白和骨硬化与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比减少至少5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%。本领域技术人员应该理解,可以使用本领域中已知的任何方法来评估骨髓形态。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的患者中改善骨髓形态(例如下述一者或多者:改善巨核细胞形貌,将M:E比例正常化,减少胶原蛋白和骨硬化)的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将骨髓形态改善至少5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白。在某些实施方式中,骨髓形态被改善约20%-30%、至少30%-40%、至少40%-50%、至少50%-60%或至少60%-70%。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周)观察到超过10%的骨髓形态改善。

[0264] 在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合法)有效地减少骨髓、脾脏和肝脏中的纤维化。在某些实施方式中,所述纤维化通过正电子发射断层扫描术/计算机断层扫描术(PET/CT)来测量。在某些实施方式中,所述纤维化通过3'-¹⁸氟-3'-脱氧-L-胸苷(¹⁸F-FLT) PET来测量(Andreoli等,ASH 2014摘要3195)。在某些实施方式中,所述纤维化通过1866 ¹⁸F-氟脱氧葡萄糖正电子发射断层扫描术/计算机断层扫描术¹⁸FDG-PET/CT来测量(Derlin等,ASH 2014摘要1866)。在某些实施方式中,所述治疗有效地将骨髓、脾脏或肝脏纤维化与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比减少至少5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的患者中减少骨髓、脾脏或肝脏纤维化的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将骨髓、脾脏或肝脏纤维化减少至少5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白。在某些实施方式中,骨髓、脾脏或肝脏纤维化被减少约20%-30%、至少30%-40%、至少40%-50%、至少50%-60%或至少60%-70%。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周)观察到骨髓、脾脏或肝脏纤维化减少超过10%。

[0265] 在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂

或组合疗法)有效地将骨髓胚细胞从 $\geq 5\%$ 减少到 $< 5\%$ 。本领域技术人员应该理解,可以使用本领域中已知的任何方法来测量骨髓胚细胞。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的患者中减少骨髓胚细胞的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将骨髓胚细胞减少至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%或至少70%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白。在某些实施方式中,骨髓胚细胞被减少约20%-30%、至少30%-40%、至少40%-50%、至少50%-60%或至少60%-70%。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周)观察到骨髓胚细胞减少。

[0266] 在某些实施方式中,所述治疗有效地提高骨髓细胞性。所述提高可以是与使用本文提供的方法的治疗开始之前的水平相比至少20、30、40、50、60或70%。在某些实施方式中,本公开提供了在需要的患者中提高骨髓细胞性的方法,其中所述需要的患者具有骨髓纤维化,所述方法包括按照有效地将骨髓细胞性提高至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%或至少70%的给药计划施用一定量的SAP蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白。在某些实施方式中,骨髓细胞性被提高约20%-30%、至少30%-40%、至少40%-50%、至少50%-60%或至少60%-70%。在某些实施方式中,在治疗后 ≥ 12 个连续周(例如超过24周、超过30周、超过36周、超过42周、超过48周)观察到骨髓细胞性的提高。

[0267] 在某些实施方式中,所述治疗有效地减轻成白红细胞增多症。在某些实施方式中,所述治疗有效地消除成白红细胞增多症。在某些实施方式中,所述治疗在治疗后 ≥ 12 个连续周有效地减轻或消除成白红细胞增多症。在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗(例如使用SAP蛋白的单一药剂或组合疗法)引起至少一种本文描述的效果(例如突变等位基因负荷的降低,脾脏体积的减小,MPN-SAF症状总分降低,通过EORTC QLQ-C30所度量的生命质量的改善,血红蛋白的提高,RBC输血的减少,血小板减少症的改善,血小板输血的减少,血小板增多的改善,中性粒细胞减少症的改善,白细胞增多的改善,外周血胚细胞的减少,骨髓纤维化的减少,骨髓胚细胞的减少,外周血胚细胞的减少或骨髓细胞性的提高)。在某些实施方式中,使用本文中描述的方法的治疗引起至少两种本文描述的效果。在某些实施方式中,使用上述方法的治疗引起至少3、4、5、6、7、8、9或10种本文描述的效果。在任何上述方面的某些实施方式中,在随着时间的一个或多个时间点,例如在治疗至少12、18、20或至少24周后,或者在治疗超过24周(例如超过30周、超过36周、超过42周、超过48周)后,评估特定程度的症状改善或治疗效果是否已经实现。

[0268] 在某些实施方式中,使用本文描述的一种或多种方法的治疗(例如使用本公开的SAP蛋白的单一药剂或组合疗法)引起至少一种本文描述的效果(例如脾脏体积的减小,MPN-SAF症状总分降低,通过EORTC QLQ-C30所度量的生命质量的改善,血红蛋白的提高,RBC输血的减少,输血不依赖性的实现,血小板减少症的改善,血小板输血的减少,血小板增多的改善,中性粒细胞减少症的改善,白细胞增多的改善,外周血胚细胞的减少,骨髓纤维化的减少,骨髓胚细胞的减少或骨髓细胞性的提高),而不造成或引起临床上显著的骨髓抑制。在某些实施方式中,使用本文描述的一种或多种方法的治疗引起至少两种本文描述的效果,而不造成或引起临床上显著的骨髓抑制。在某些实施方式中,使用本文描述的一种或

多种方法的治疗引起至少3、4、5、6、7、8、9或10种本文描述的效果,而不造成或引起临床上显著的骨髓抑制。在某些实施方式中,使用本文描述的一种或多种方法的治疗不引起骨髓抑制。在某些实施方式中,任一上述方法包括施用SAP,其包含糖基化与从人类血清纯化的SAP的糖基化不同的SAP蛋白,例如重组人SAP(例如在CHO细胞中生产的重组人穿透素-2)。在某些实施方式中,任何上述方法包括按照给药计划施用所述SAP蛋白,其中在按照所述给药计划施用后实现任一上述治疗效果。在某些实施方式中,在按照给药计划施用(例如施用包括按照给药计划施用)后实现一种或多种上述治疗效果。在治疗期间的一个或多个时间点,例如在治疗至少12、至少18、至少20、至少24或超过24周(例如超过30周、超过36周、超过42周、超过48周)后,评估任何上述参数的改善(例如症状的减轻)。

[0269] 对于患者中的改善例如一种或多种症状的改善的任何上述实例来说,在某些实施方式中,本公开提供了上述治疗包括以有效地获得所述治疗效果的剂量和给药计划施用SAP蛋白。在某些实施方式例如任何上述方面的某些实施方式中,SAP在没有另外的抗癌治疗剂的情况下施用。

[0270] 在某些实施方式中,所述SAP蛋白以包括下述的给药计划施用:SAP蛋白每4周一次施用至少1个循环、至少2个循环、至少3个循环、至少4个循环、至少5个循环、至少6个循环、至少7个循环或至少8个循环,每个循环为28天或4周。在某些实施方式中,所述SAP蛋白每4周一次施用到所述对象至少6个循环,每个循环28天;至少8个循环,每个循环28天;至少10个循环,每个循环28天;至少12个循环,每个循环28天;至少15个循环,每个循环28天;至少18个循环,每个循环28天;或至少24个循环,每个循环28天。在某些实施方式中,所述化合物每4周一次施用到所述对象至少一个月、至少两个月、至少三个月、至少四个月、至少五个月、至少六个月、至少八个月、至少一年或至少两年,并且可能在所述患者的生命期间长期施用。在另一个实施方式中,所述SAP蛋白在治疗的第一周中每隔天施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白每4周几天(例如第1、3和5天)施用至少6个循环,每个循环28天;至少8个循环,每个循环28天;至少10个循环,每个循环28天;至少12个循环,每个循环28天;至少15个循环,每个循环28天;至少18个循环,每个循环28天;或至少24个循环,每个循环28天。在某些实施方式中,所述化合物每4周几天(例如第1、3和5天)施用到所述对象至少一个月、至少两个月、至少三个月、至少四个月、至少五个月、至少六个月、至少八个月、至少一年或至少两年,并且可能在所述患者的生命期间长期施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白以包含下述的给药计划施用到所述对象:所述SAP蛋白每周至少一次施用至少1个循环、至少2个循环、至少3个循环、至少4个循环、至少5个循环、至少6个循环、至少7个循环或至少8个循环,每个循环28天。在某些实施方式中,所述SAP蛋白每周至少一次施用到所述对象至少6个循环,每个循环28天;至少8个循环,每个循环28天;至少10个循环,每个循环28天;至少12个循环,每个循环28天;至少15个循环,每个循环28天;至少18个循环,每个循环28天;或至少24个循环,每个循环28天。在某些实施方式中,所述化合物每周一次施用到所述对象至少一个月、至少两个月、至少三个月、至少四个月、至少五个月、至少六个月、至少八个月、至少一年或至少两年。在其他实施方式中,所述化合物在治疗的第一周中每隔天施用。在某些实施方式中,所述给药计划引起至少一种本文描述的效果(例如一种或多种症状或参数的改善)(例如脾脏体积的减小,MPN-SAF症状总分降低,血红蛋白的提高,RBC输血的减少,输血不依赖性的实现,血小板减少症的改善,血小板输血的减少,血小板增多的改善,中性粒细胞减

少症的改善,白细胞增多的改善,外周血胚细胞的减少,骨髓纤维化的减少,骨髓胚细胞的减少或骨髓细胞性的提高)。在某些实施方式中,所述给药计划引起至少两种本文描述的效果。在某些实施方式中,所述给药计划引起至少3、4、5、6、7、8、9或10种本文描述的效果。在某些实施方式中,所述SAP激动剂包含重组人SAP。

[0271] 在某些实施方式中,本公开提供了按照给药计划施用一定量的SAP蛋白的方法,所述给药计划包括在第一个循环的第1、3、5天和随后每个28天的循环的第1天使用一定的剂量方案施用SAP蛋白,所述剂量方案包括施用10mg/kg的SAP蛋白,例如糖基化与从血清纯化的人SAP的糖基化不同的SAP蛋白。

[0272] 在某些实施方式中,本公开提供了按照给药计划施用一定量的SAP蛋白的方法,所述给药计划包括在第一个循环的第1、3、5天和随后每个28天的循环的第1天使用一定的剂量方案施用SAP蛋白,所述剂量方案包括施用3mg/kg的SAP蛋白。

[0273] 在某些实施方式中,本公开提供了按照给药计划施用一定量的SAP蛋白的方法,所述给药计划包括在第一个循环的第1、3、5天和随后每个28天的循环的第1天使用一定的剂量方案施用SAP蛋白,所述剂量方案包括施用0.3mg/kg的SAP蛋白。

[0274] 在某些实施方式中,所述SAP蛋白在第一周期间多次施用(例如第1、3和5天),然后每周、每两周、每三周或每四周施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白每周、每隔周、每三周、每个月、每两个月、每三个月、每六个月施用多次或根据需要施用多次。在某些实施方式中,所述SAP蛋白通过IV输注施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白皮下施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白以10mg/kg的剂量施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白以3mg/kg的剂量施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白以0.3mg/kg的剂量施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白以本文描述的任何剂量施用。在某些实施方式中,本文描述的剂量方案根据需要进行调整以实现本文描述的治疗结果之一。

[0275] 在某些实施方式中,本文公开的方法包括在实现初始响应后施用另外的一剂或多剂所述SAP蛋白。在某些实施方式中,在对象中实现初始响应后施用另外的一剂或多剂所述SAP蛋白之后,实现后续响应。后续响应可以是另外的响应(例如一开始没有观察到的本文描述的任何响应)、初始响应的维持或在初始响应后的改善。在某些实施方式中,另外的一剂或多剂的施用基本上维持所述初始响应。在某些实施方式中,另外的一剂或多剂的施用提供相对于所述初始响应的进一步改善。在某些实施方式中,另外的一剂或多剂的施用提供了一开始没有观察到的另外的一种或多种响应。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含重组人SAP。

[0276] 在某些实施方式中,在将SAP蛋白或其可药用盐施用到对象例如人类对象后,在给药后约0.5至约5小时、约1.5至约4.5小时、约2至约4小时或约2.5至约3.5小时达到所述化合物的C_{max}(最高药物浓度)。在某些实施方式中,在将所述化合物施用到人类对象后,所述化合物的消除半衰期为约11至110小时、20-72小时、12至约40小时、约16至约34小时或约20至约40小时。在某些实施方式中,在约0.1mg至约40mg/kg的范围内,随着剂量增加,所述化合物的平均AUC超过比例地增加。在某些实施方式中,当所述化合物每周一次给药时,在稳态下所述化合物的积累为约1.1至约5倍、约1.25至约4.0倍、约1.5至约3.5倍、约2至约3倍。在某些实施方式中,当每周给药时,所述化合物不积累。

[0277] SAP蛋白和SAP激动剂

[0278] 本公开的一个方面提供了在骨髓增生性障碍的治疗中有用的SAP蛋白。本公开的一个方面提供了在骨髓增生性障碍的治疗中有用的SAP激动剂。SAP激动剂涵盖了提高或以其他方式模拟内源SAP信号传导的所有化合物和组合物,包括提高SAP活性的化合物。在任一上述方法的某些实施方式中,在使用SAP蛋白的任何场合,可以单独地或与本公开的SAP蛋白相组合使用SAP激动剂。下文描述了示例性的SAP激动剂。在整个本公开中指称“SAP蛋白”。除非另有指明,否则这种指称考虑到了使用本文公开的任何SAP蛋白,包括使用重组的SAP,例如包含人SAP的SAP蛋白,所述SAP蛋白的糖基化不同于从人类血清分离的SAP的糖基化。本公开设想了在本文描述的任何方法中使用任何本文公开的SAP蛋白和SAP激动剂,包括单独或作为组合疗法使用。

[0279] SAP

[0280] SAP或穿透素-2是哺乳动物中天然存在的一种血清蛋白质,由5个相同的亚基或原体构成,它们非共价结合在圆盘状复合体中。SAP属于蛋白质的穿透素超家族,其特征在于这种环状五聚体结构。经典的短穿透素包括SAP和C反应蛋白(Osmand, A. P. 等, Proc. Nat. Acad. Sci., 74:739-743, 1997)。长穿透素包括穿透素-3。SAP通常在肝脏中合成,并具有24小时的生理半衰期。人SAP(hSAP)以约20-40 μ g/ml的浓度在血浆中作为均五聚体循环。人SAP亚基的序列公开在SEQ ID NO:1中,其对应于Genbank登记号NP_001630的20-223位氨基酸(信号序列未示出)。

[0281] 以前的研究证实,SAP在免疫应答的初始和消解期两者中具有重要作用。hSAP在对微生物的先天抗性和细胞碎片的清除和细胞吞噬中起作用,并且似乎在伤口愈合和纤维化的调控中发挥作用。这些功能可能包括:(i)以Ca²⁺依赖性方式结合到与如上指明的微生物和细胞碎片相关的配体和各种不同的细胞外基质蛋白,(ii)结合到C1q,通过促进C3b和iC3b的调理作用用于补体激活,(iii)结合到Fc γ 受体以启动直接调理作用和随后的细胞吞噬或胞吞,以及(iv)单核细胞功能和分化的后续调控。因此,hSAP分子定位到损伤和修复位点并可以通过结合这些分子而靶向和/或集中在这些位置中。

[0282] hSAP的3D结构已通过X-射线结晶学确定,并且与不同配体复合的几种晶体结构也已被报道。hSAP的五聚体结构具有5重旋转对称,具有相当高的刚性并具有孔眼。所述hSAP五聚体的直径约为100 Å,并且中央孔眼的直径为20 Å,深为35 Å。每个原体由排列在两个片层中的反向平行的 β -链构成,其疏水核心具有卷芯拓扑结构。所述hSAP五聚体具有2个面,A面具有5个螺旋,每个原子上各一个,B面具有5组双钙结合位点。所述B面被认为提供了钙依赖性配体结合面,并且已鉴定到几种结合B面的钙依赖性配体,包括磷酸乙醇胺、DNA、硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素和硫酸葡聚糖、层粘连蛋白和胶原蛋白IV。hSAP的A面似乎也结合分子例如C1q,并可能通过结合到Fc γ 受体而介导细胞吞噬。每个原体可以在单个位点Asn32处被糖基化。

[0283] N-和C-端是溶剂可接近的,并且位于每个原体分子的内缘上。N-端位于每个原体的外缘上和由5个原体形成的环的周边上。C-端位置更朝向五聚体环的内周和孔眼,但是朝外指向A面。一个原体内的N-和C-端相隔约25 Å。所述末端似乎不参与亚基相互作用,并且它们远离附连在Asn32处的聚糖链。hSAP的亚基非共价地保持在一起,其中每个亚基的约15%的表面参与这些相互作用。这些广泛的相互作用解释了hSAP五聚体的相当高的稳定性。

[0284] 本文描述的实施方式所涵盖的SAP包括来自于任何来源的SAP,例如人SAP或来自于其他脊椎动物或哺乳动物来源的异构体或类似物。SAP还涵盖具有从本源PTX-2氨基酸序列通过例如定点诱变引入的修饰的SAP分子。这种修饰可能改变特定氨基酸和/或分子的其他特征,同时保留分子的总体五聚体的穿透素本质。“SAP蛋白”可用于涵盖SAP五聚体和SAP原体两者。“SAP五聚体”或“五聚体SAP”是指至少包括5个SAP原体的蛋白复合体,并且“SAP原体”是指SAP五聚体的一个个体蛋白单元。在本公开的任何方面和实施方式的某些实施方式中,本公开包括施用包含一个或多个原体的SAP蛋白,所述原体包含SEQ ID NO:1中提出的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述SAP蛋白是包含5个原体的蛋白。在某些实施方式中,所述SAP蛋白包含重组人SAP。示例性的重组人SAP包含PRM-151。在某些实施方式中,所述SAP激动剂包含重组SAP。重组制造总的来说蛋白质以及具体来说人穿透素-2的方法,在本领域中是已知的。可以选择适合于重组表达的细胞例如昆虫或哺乳动物细胞。SEQ ID NO:1对应于人SAP原体的氨基酸序列。

[0285] 人SAP蛋白上的聚糖结构的修饰可以提高所述SAP蛋白相对于从人类血清分离的野生型SAP的相应样品的生物活性。从人类血清分离的SAP仅含有 α 2,6-连接的唾液酸残基。相反,在CHO细胞中生产的重组人SAP (rhSAP) 仅含有 α 2,3-连接的唾液酸残基。在基于细胞的体外生物测定法中, α 2,3-连接的唾液酸SAP蛋白与从人类血清分离的野生型SAP (即 α 2,6-连接的唾液酸) 相比表现出始终更高的活性。本公开的变体SAP蛋白由于提高的生物效价,作为治疗剂更加有效。例如,相对于从人类血清分离的野生型,更强效的SAP变体可能需要更低的剂量和/或更低的给药频率。本公开提供了变体人SAP蛋白及其制造方法两者。具体来说,本公开包括用于糖残基的体外和体内添加、缺失或修饰的方法和组合物,以生产具有所需糖基化模式的人SAP蛋白。

[0286] 变体SAP蛋白

[0287] 部分地,本公开提供了用于治疗骨髓增生性障碍的变体血清淀粉样P (SAP) 多肽。具体来说,本公开的SAP变体包括糖基化的人SAP蛋白,其包含一个或多个N-连接的或O-连接的寡糖链,每个寡糖链独立地具有1、2、3、4或5个以 α 2,3-连接的唾液酸组成为末端的支链。在某些实施方式中,所述N-连接的或O-连接的寡糖链的所有唾液酸化的支链以 α 2,3-连接的组成为末端。在某些实施方式中,所述N-连接的或O-连接的寡糖链的15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%或甚至至少95%的唾液酸化的支链以 α 2,3-连接的组成为末端。本公开的其他SAP变体包括含有N-连接的或O-连接的寡糖链的糖基化的人SAP蛋白,与源自于人类血清的野生型SAP蛋白相比,所述寡糖链具有至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%或甚至至少95%的 α 2,6-连接的唾液酸组成为末端。在某些实施方式中,所述N-连接的或O-连接的寡糖链基本上不含 α 2,6-连接的唾液酸组成为末端。本公开的糖变体SAP蛋白可以包含具有一个或多个支链 (例如具有双支链、三支链、四支链、五支链等结构) 的N-连接的寡糖或O-连接的链。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白包含N-连接的或O-连接的寡糖链,其中所述寡糖链的1、2、3、4或5个支链基本上不含半乳糖和N-乙酰葡萄糖胺。本公开的某些SAP蛋白具有N-连接的或O-连接的寡糖链,所述寡糖链基本上不含半乳糖和N-乙酰葡萄糖胺。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白包含N-连接的或O-连接的寡糖链,其中所述寡糖链的1、2、3、4或5个支链含有一个或多个甘露糖残基。在某些实施方式中,本公开

的SAP蛋白包含N-连接的寡糖,所述寡糖具有五糖核心Man[(α 1,6)-(Man(α 1,3)]-Man(β 1,4)-GlcNAc(β 1,4)-GlcNAc(β 1,N)-Asn。这种五糖核心也可包含一个或多个岩藻糖或木糖残基。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白包含N-连接的寡糖链,其中所述寡糖链的1、2、3、4或5个支链具有结构NeuNAc2 α 3Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6。本公开的SAP蛋白也可能包含N-连接的寡糖链,其中所有支链具有结构NeuNAc2 α 3Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6。

[0288] 本公开的变体SAP蛋白可能包含一个或多个“修饰的”糖残基。修饰的糖在允许附连修饰组成部分或基团并仍允许所述糖作为用于将所述修饰的糖偶联到肽的酶的底物而起作用的任何位置处被取代。修饰基团可以通过酶手段、化学手段或其组合附连到糖组成部分,由此产生修饰的糖,例如修饰的半乳糖、岩藻糖或唾液酸。在下面的部分中描述了适合用于本公开的修饰基团以及将这些修饰基团偶联到糖残基的方法。

[0289] 在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白可以包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性的氨基酸序列,正如使用基于Brutlag等的算法(Comp.App.Biosci.,6:237-245(1990))的FASTDB计算机程序所确定的。在特定实施方式中,用于计算氨基酸比对的同一性和相似性百分数的参数包括:矩阵=PAM 150,k-元组=2,错配罚分=1,加入罚分=20,随机化组长度=0,截止分值=1,空隙罚分=5,空隙大小罚分=0.05。

[0290] 与SEQ ID NO:1具有至少95%的同一性的多肽可以包括在这些分歧区域中具有保守替换的多肽。术语“SAP蛋白”涵盖了包含任何上述多肽的功能性片段和融合蛋白。通常,SAP蛋白在生物相关的温度、pH水平和摩尔渗透压浓度下可溶于水性溶液。非共价结合在一起以形成五聚体SAP复合体的SAP原体可能具有相同的氨基酸序列和/或翻译后修饰,或者单一复合体中的各个SAP原体可能具有不同的序列和/或修饰。术语SAP蛋白包括包含任何天然存在的SAP蛋白及其任何变体(包括突变体、片段和融合体)的多肽。本公开的SAP蛋白可以是重组多肽。在优选实施方式中,本公开的SAP蛋白是人SAP蛋白。

[0291] 在某些实施方式中,提供了包含本公开的变体SAP蛋白或其功能性片段的药物组合物。在某些方面,SAP变体的氨基酸序列可能与SEQ ID NO:1相差一个或多个保守或非保守替换。在其他方面,SAP变体的氨基酸序列可能与SEQ ID NO:1相差一个或多个保守替换。当在本文中使用“保守替换”是在物理上或功能上与相应的参比残基相似的残基,即保守替换及其参比残基具有相似的尺寸、形状、电荷、化学性质(包括形成共价键或氢键的能力)等。优选的保守替换是满足Dayhoff等,Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352(1978&Supp.)中为已接受的点突变所定义的判据的氨基酸替换。保守替换的实例是在下列组内的替换:(a)缬氨酸,甘氨酸;(b)甘氨酸,丙氨酸;(c)缬氨酸,异亮氨酸,亮氨酸;(d)天冬氨酸,谷氨酸;(e)天冬酰胺,谷氨酰胺;(f)丝氨酸,苏氨酸;(g)赖氨酸,精氨酸,甲硫氨酸;以及(h)苯丙氨酸,酪氨酸。关于哪种氨基酸改变可能在表型上是沉默的另外的指导,可以在Bowie等,Science 247:1306-1310(1990)中找到。

[0292] 保留生物功能的变体SAP蛋白及其片段在本文描述的药物组合物和方法中是有用的。在某些实施方式中,变体SAP蛋白或其片段结合到一种或多种Fc γ 受体。在某些实施方式中,所述Fc γ 受体是Fc γ RI、Fc γ RIIA和/或Fc γ RIIIB。在某些实施方式中,变体SAP蛋白或其片段抑制纤维细胞、纤维细胞前体、肌成纤维细胞前体和/或造血单核细胞前体分化中的

一者或多者。在某些实施方式中,变体SAP蛋白或其片段抑制单核细胞分化成纤维细胞。测量巨噬细胞衍生趋化因子(MDC)的表达是确定纤维细胞分化的有效方法。SAP变体可以通过修饰SAP蛋白的结构来产生,所述修饰的目的是例如增强治疗功效或稳定性(例如离体储存期限和在体内对蛋白水解降解的抗性)。

[0293] 在某些方面,除了SAP蛋白中天然存在的任何修饰之外,本公开的变体SAP蛋白可以进一步包含翻译后修饰。这些修饰包括但不限于乙酰化、羧化、糖基化(例如O-连接的寡糖、N-连接的寡糖等)、磷酸化、脂化和酰基化。作为结果,所述修饰的SAP蛋白可能含有非氨基酸元件,例如聚乙二醇、脂类、多糖或单糖和磷酸酯。

[0294] 生产具有改变的N-糖基化的变体hSAP蛋白的方法被描述在美国专利申请号12/794,132中,其通过参考并入本文。在某些实施方式中,变体SAP蛋白的一个或多个原体在SEQ ID NO:1的32位处包含不是天冬酰胺的氨基酸,引起糖基化模式改变。在某些实施方式中,一个或多个SAP原体基本上不含N-连接的或O-连接的聚糖。

[0295] 在某些方面,对本文描述的SAP蛋白的一种或多种修饰可能增强所述SAP蛋白的稳定性。例如,这些修饰可能提高所述SAP蛋白的体内半衰期或减少所述SAP蛋白的蛋白水解降解。

[0296] 在某些方面,本公开的变体SAP蛋白包括融合蛋白,其具有所述人SAP蛋白的至少一部分和一个或多个融合结构域或异源部分。这些融合结构域的公知的实例包括但不限于聚组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽S转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白A、蛋白G和免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。可以选择融合结构域以便提供所需性质。例如,某些融合结构域对于通过亲和层析分离所述融合蛋白特别有用。出于亲和纯化的目的,使用相关的用于亲和层析的基质,例如谷胱甘肽、淀粉酶以及镍或钴偶联的树脂。作为另一个实例,可以选择融合结构域以便于SAP蛋白的检测。这种检测结构域的实例包括各种不同的荧光蛋白(例如GFP)以及“表位标签”,所述表位标签通常是短的肽序列,针对它的特异性抗体是可获得的。针对它的特异性单克隆抗体可以容易地获得的公知的表位标签包括FLAG、流感病毒血凝素(HA)和c-myc标签。在某些情况下,所述融合结构域具有蛋白酶切割位点,其允许相关蛋白酶部分消化所述融合蛋白并因此从中释放出重组蛋白。然后通过随后的层析分离将释放出的蛋白与融合结构域分离开。在某些情况下,可以将SAP蛋白融合到使所述SAP蛋白在体内稳定化的异源结构域。“稳定化”意味着提高血清半衰期的任何情况,不论这是由于破坏减少、被肝脏和/或肾脏的清除减少还是其他药物动力学效应。已知与免疫球蛋白的Fc部分和血清白蛋白的融合提供了增加的稳定性。

[0297] 应该理解,融合蛋白的不同元件可以以与所需功能相一致的任何方式排列。例如,SAP蛋白可以放置在异源结构域的C-端,或者异源结构域可以放置在SAP蛋白的C-端。所述SAP蛋白和异源结构域在融合蛋白中不一定相邻,并且在任一结构域的C-或N-端或所述结构域之间可以包括其他结构域或氨基酸序列(例如连接物序列)。

[0298] 本公开的SAP蛋白可以包含一个或多个“修饰的”糖残基。修饰基团可以通过酶手段、化学手段或其组合附连到糖组成部分,由此产生修饰的糖,例如修饰的半乳糖、岩藻糖或唾液酸。当使用修饰的唾液酸时,在这些方法中可以使用唾液酸基转移酶或转唾液酸酶。所述糖可以在允许附连修饰组成部分并且仍允许所述糖作为用于将所述修饰的糖偶联到肽的酶的底物而起作用的任何位置处被取代。

[0299] 一般来说,所述糖组成部分和修饰基团通过使用反应性基团连接在一起,所述反应性基团通常被连接过程转化成新的有机官能团或无反应性物质。所述糖的反应性官能团可以位于所述糖组成部分的任何位置处。在实践本公开中有用的反应性基团和反应类别通常是生物偶联化学领域中公知的。使用反应性糖组成部分可获得的当前偏爱的反应类别是在相对温和条件下进行的反应。它们包括但不限于亲核取代(例如胺和醇与酰卤、活性酯的反应)、亲电取代(例如烯胺反应)和向碳-碳和碳-杂原子多重键的加成(例如Michael反应、Diels-Alder加成)。在例如下述文献中讨论了这些和其他有用的反应:Smith和March,《高等有机化学》(Advanced Organic Chemistry),第5版,John Wiley&Sons,New York,2001;Hermanson,《生物偶联技术》(Bioconjugate Techniques),Academic Press,San Diego,1996;以及Feeney等,“蛋白质修饰”(Modification of Proteins),Advances in Chemistry Series,Vol.198,American Chemical Society,Washington,D.C.,1982。

[0300] 从糖核或修饰基团悬垂的有用的反应性官能团包括但不限于:(a) 羧基及其各种不同衍生物(例如N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基苯并三唑酯、酰基卤、酰基咪唑、硫酯、对硝基苯基酯、烷基、烯基、炔基和芳香族酯);(b) 羟基,其可以被转变成例如酯、醚、醛等;(c) 卤代烷基,其中所述卤素可以在晚些时候用亲核基团例如胺、羧酸阴离子、硫醇阴离子、碳负离子或烷氧离子替代,由此引起新基团在卤素原子的官能团处的共价附连;(d) 亲二烯基团,其能够参与Diels-Alder反应,例如马来酰亚胺基;(e) 醛或酮基,使得可以通过羰基衍生物例如亚胺、腙、半碳酰腙或肟的形成或通过诸如Grignard加成或烷基锂加成的机制进行后续衍生;(f) 磺酰卤基团,用于随后与例如胺反应以形成磺酰胺;(g) 硫醇基团,其可以例如转变成二硫化物或与烷基和酰基卤反应;(h) 胺或巯基,其可以被例如酰基化、烷基化或氧化;(i) 烯烃,其可以经历例如环加成、酰基化、Michael加成、复分解、Heck反应等;(j) 环氧化物,其可以与例如胺和羟基化合物反应。

[0301] 所述反应性官能团可以被选择成使得它们不参与或干扰组装所述反应性糖核或修饰基团所必需的反应。或者,可以通过保护基团的存在保护反应性官能团以防参与反应。本领域技术人员了解如何保护特定官能团以使它不干扰所选的一组反应条件。对于有用的保护基团的实例,参见例如Greene等,《有机合成中的保护基团》(Protective Groups in Organic Synthesis),John Wiley&Sons,New York,1991。

[0302] 在某些实施方式中,所述修饰的糖是活化的糖。在本公开中有用的活化的修饰糖通常是已通过合成方法被改变成包含活化的离去基团的糖苷。当在本文中使用时,术语“活化的离去基团”是指在酶调节的亲核取代反应中容易被替换的那些组成部分。许多活化的糖是本领域中已知的。参见例如Vocadlo等,在《糖化学和生物学》(Carbohydrate Chemistry and Biology),Vol.2中,Ernst等主编,Wiley-VCH Verlag:Weinheim,Germany,2000;Kodama等,Tetrahedron Lett.34:6419(1993);Lougheed等,J.Biol.Chem.274:37717(1999)。这些离去基团的实例包括氟、氯、溴、甲苯磺酸、甲磺酸、三氟甲磺酸等。在本公开中使用的优选的活化的离去基团是不显著立体阻碍糖苷向受体的酶促转移的离去基团。因此,活化的糖苷衍生物的优选实施方式包括糖基氟化物和糖基甲磺酸酯,其中糖基氟化物是特别优选的。在糖基氟化物中, α -半乳糖基氟化物、 α -甘露糖基氟化物、 α -葡萄糖基氟化物、 α -岩藻糖基氟化物、 α -木糖基氟化物、 α -唾液酸基氟化物、 α -N-乙酰葡萄糖胺基氟化物、 α -N-乙酰半乳糖胺基氟化物、 β -半乳糖基氟化物、 β -甘露糖基氟化物、 β -葡萄糖基氟化物、

β -岩藻糖基氟化物、 β -木糖基氟化物、 β -唾液酸基氟化物、 β -N-乙酰葡萄糖胺基氟化物和 β -N-乙酰半乳糖胺基氟化物是最优选的。

[0303] 在某些方面,修饰的糖残基被偶联到一种或多种水溶性聚合物。许多水溶性聚合物对于本领域技术人员来说是已知的,并且可用于实践本公开。术语水溶性聚合物涵盖各种物质例如糖类(例如葡聚糖、直链淀粉、透明质酸、聚唾液酸、乙酰肝素、肝素等)、聚氨基酸、核酸、合成聚合物(例如聚丙烯酸、聚醚例如聚乙二醇)、肽、蛋白质等。本公开可以使用任何水溶性聚合物来实践,唯一的限制是所述聚合物必须包括偶联物的剩余部分可以附连到的点。

[0304] 文献中描述了用于水溶性聚合物和糖类的活化的方法和化学以及用于将糖类和聚合物偶联到各种不同物质的方法。常用于聚合物活化的方法包括使用溴化氰、高碘酸盐、戊二醛、双环氧化物、表氯醇、二乙烯砷、碳二亚胺、磺酰卤、三氯三嗪等来活化官能团(参见R.F.Taylor(1991),《蛋白质固定化基础与应用》(Protein Immobilisation,Fundamentals and Applications),Marcel Dekker,N.Y.;S.S.Wong,(1992),《蛋白质偶联和交联化学》(Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking),CRC Press,Boca Raton;G.T.Hermanson等,(1993),《固定化亲和配体技术》(Immobilized Affinity Ligand Techniques),Academic Press,N.Y.;Dunn,R.L.等主编,《聚合物药物和药物递送系统》(Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems),ACS Symposium Series Vol.469,American Chemical Society,Washington,D.C.1991)。

[0305] 在某些方面,修饰的糖残基被偶联到一种或多种水不溶性聚合物。在某些实施方式中,与水不溶性聚合物的偶联可用于将治疗性肽以受控方式递送。聚合物药物递送系统在本领域中是已知的。参见例如Dunn等主编,《聚合物药物和药物递送系统》(Polymeric drugs and Drug Delivery Systems),ACS Symposium Series Vol.469,American Chemical Society,Washington,D.C.1991。本领域技术人员将会认识到,基本上任何已知的药物递送系统都适用于本公开的偶联物。

[0306] 代表性的水不溶性聚合物包括但不限于聚磷嗪、聚乙烯醇、聚酰胺、聚碳酸酯、聚烯烃、聚丙烯酰胺、聚亚烷基二醇、聚亚烷基氧化物、聚亚烷基对苯二甲酸酯、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚乙烯卤化物、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙交酯、聚硅氧烷、聚氨酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸乙酯、聚甲基丙烯酸丁酯、聚甲基丙烯酸异丁酯、聚甲基丙烯酸己酯、聚甲基丙烯酸异癸酯、聚甲基丙烯酸月桂酯、聚甲基丙烯酸苯基酯、聚丙烯酸甲酯、聚丙烯酸异丙酯、聚丙烯酸异丁酯、聚丙烯酸十八烷基酯、聚乙烯、聚丙烯、聚乙二醇、聚乙烯氧化物、聚对苯二甲酸乙二酯、聚乙酸乙烯酯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮、普朗尼克和聚乙烯苯酚及其共聚物。

[0307] 这些以及本文讨论的其他聚合物可以容易地从商业来源例如Sigma Chemical Co.(St.Louis,Mo.)、Polysciences(Warrenton,Pa.)、Aldrich(Milwaukee,Wis.)、Fluka(Ronkonkoma,N.Y.)和BioRad(Richmond,Calif.)获得,或者使用标准技术从获自这些供应商的单体合成。在本公开的偶联物中有用的代表性的可生物降解的聚合物包括但不限于聚丙交酯、聚乙交酯及其共聚物、聚对苯二甲酸乙二酯、聚丁酸、聚戊酸、聚(丙交酯-共-己内酯)、聚(丙交酯-共-乙交酯)、聚酸酐、聚原酸酯、其掺混物和共聚物。特别有用的是形成凝胶的组合物,例如包含胶原蛋白和普朗尼克的组合物。

- [0308] 在优选实施方式中,可以将一个或多个修饰的糖残基偶联到一个或多个PEG分子。
- [0309] 在某些方面,所述修饰的糖被偶联到生物分子。本公开的生物分子可以包括但不限于有功能的蛋白质、酶、抗原、抗体、肽、核酸(例如单核苷酸或核苷、寡核苷酸、多核苷酸以及单链和更多链核酸)、凝集素、受体或其组合。
- [0310] 一些优选的生物分子基本上是非荧光的,或发射极少量的荧光以致它们不适合在测定法中用作荧光标记物。其他生物分子可以是荧光的。
- [0311] 在某些实施方式中,所述生物分子是靶向组成部分。当在本文中使用时,“靶向组成部分”和“靶向剂”是指选择性定位在身体的特定组织或区域中的物质。在某些实施方式中,生物分子被选择为将本公开的SAP蛋白导向特定细胞内区室,由此与未衍生化的肽被递送到组织的量相比,增强所述肽向该细胞内区室的递送。所述定位由分子决定簇的特异性识别、靶向剂或偶联物的分子尺寸、离子相互作用、疏水相互作用等介导。将药剂靶向特定组织或区域的其他机制对于本领域技术人员来说是已知的。
- [0312] 在某些实施方式中,所述修饰的糖包括治疗性组成部分。本领域技术人员将会认识到,在治疗性组成部分和生物分子类别之间存在交叠,即许多生物分子具有治疗性质或潜力。
- [0313] 有用的治疗性组成部分的类型包括例如非甾类消炎药、甾类消炎药、辅药、抗组胺药物、止咳药、止痒药、抗胆碱能药、止吐和止恶心药、抑制食欲药物、中枢兴奋药、抗心律失常药、 β -肾上腺素能阻断药、强心药、抗高血压药、利尿药、扩血管药、血管收缩药、抗溃疡药、麻醉药、抗抑郁药、安神剂和镇定药、抗精神病药和抗微生物药。
- [0314] 在实践本公开中有用的其他药物组成部分包括抗肿瘤药、杀细胞剂、抗雌激素药和抗代谢药。在这一类型中还包括用于诊断(例如成像)和治疗两者的基于放射性同位素的药剂和偶联毒素。
- [0315] 所述治疗性组成部分也可以是激素、肌肉松弛剂、止痉挛药、骨激活剂、内分泌调节剂、糖尿病调节剂、雄性激素、抗利尿剂或降钙素药物。
- [0316] 其他有用的修饰基团包括免疫调节药、免疫抑制剂等。具有抗炎活性的基团例如舒林酸、依托度酸、酮洛芬和酮咯酸,也可以使用。与本公开联合使用的其他药物对于本领域技术人员来说是显而易见的。
- [0317] 通过本公开的方法生产的改变的N-糖基化SAP蛋白可以是均质的(即SAP蛋白的样品的特定N-聚糖结构是均匀的)或基本上均质的。“基本上均质的”意味着至少约25%(例如至少约27%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%或至少约99%)的SAP蛋白含有相同的特定N-聚糖结构。
- [0318] 在某些实施方式中,本公开的变体SAP蛋白在体外抑制单核细胞分化成纤维细胞的 IC_{50} ,低于从人类血清分离的野生型SAP的相应样品的 IC_{50} 的1/2、低于1/3、低于1/4、低于1/10或低于1/100。在某些实施方式中,本公开的变体SAP蛋白在体外抑制单核细胞分化成纤维细胞的 IC_{50} ,低于从人类血清分离的野生型SAP的相应样品的 IC_{50} 的一半。存在许多研究得很透彻的方法用于确定对于纤维细胞分化来说,外周血单核细胞(PBMC)或单核细胞对SAP的响应性。在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白抑制IL-8的产生。在某些实施方式中,测量本公开的SAP蛋白阻断乙酸肉豆蔻酸佛波酯(PMA)诱导的IL-8生产的抑制效应。这些方

法可用于确定任何本公开的SAP变体多肽与人类血清来源的SAP、任何其他SAP变体多肽或其他纤维细胞抑制剂或激活剂的样品相比的相对效价。适合用于这些方法的PBMC或单核细胞可以从各种不同的组织培养株系获得。或者,适合用于纤维细胞分化测定法的细胞可以从含有PBMC或单核细胞的任何生物样品获得。所述生物样品可以从血清、血浆、健康组织或纤维化组织获得。一般来说,纤维细胞分化测定法通过将PBMC或单核细胞在具有各种不同浓度的SAP蛋白的培养基中温育来进行,以确定纤维细胞分化的程度。SAP的浓度可以在0.0001 μ g/mL至1mg/mL的范围内,并且在某些实施方式中为0.001 μ g/mL、1.0 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、15 μ g/mL、20 μ g/mL、25 μ g/mL、30 μ g/mL、35 μ g/mL、40 μ g/mL、45 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL、300 μ g/mL或500 μ g/mL。在某些测定法中,所述培养基可以增补有1-100ng/ml之间的hMCSF;hMCSF的优选浓度为25ng/mL。PBMC和单核细胞已分化成纤维细胞的指示可以由本领域技术人员确定。一般来说,纤维细胞在形态上被定义为具有细长的纺锤形状并存在卵形核的贴壁细胞。在某些测定法中,将细胞固定并用Hema 3染色,然后例如使用倒置显微镜通过直接计数对纤维细胞计数。纤维细胞分化的量由本领域技术人员解释为细胞对SAP的响应性的指示。纤维细胞分化的更大抑制指示更高程度的SAP响应性。测量纤维细胞分化的可替代方法包括确定纤维细胞特异性细胞表面标志物或分泌的因子例如细胞因子(例如IL-1ra、ENA-78/CXCL-5、PAI-1)、纤连蛋白、胶原蛋白-1的表达。检测和/或定量细胞表面标志物或分泌的因子的方法在本领域中是公知的,包括但不限于使用针对一种或多种纤维细胞特异性标志物的免疫反应性抗体的各种不同的基于ELISA和FACS的技术。测量巨噬细胞衍生趋化因子(MDC)的表达是确定纤维细胞分化的有效方法。

[0319] 用于检测和/或表征SAP蛋白的N-糖基化(例如改变的N-糖基化)的方法包括DNA测序仪辅助(DSA)、荧光团辅助的糖类电泳(FACE)或表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱术(SELDI-TOF MS)。例如,分析可以利用DSA-FACE,其中例如将糖蛋白变性,然后固定化在例如膜上。然后可以将所述糖蛋白用适合的还原剂例如二硫苏糖醇(DTT)或 β -巯基乙醇还原。所述蛋白的巯基可以使用酸例如碘乙酸来羧化。接下来,可以使用酶例如N-糖苷酶F从所述蛋白释放出N-聚糖。N-聚糖任选地可以通过还原胺化来重构并衍生。然后可以将衍生化的N-聚糖浓缩。适用于N-聚糖分析的仪器包括例如ABI PRISM®377DNA测序仪(Applied Biosystems)。数据分析可以使用例如GENESCAN®3.1软件(Applied Biosystems)来进行。任选地,分离的甘露糖蛋白可以用一种或多种酶进一步处理,以确认它们的N-聚糖状态。示例性的酶包括例如 α -甘露糖苷酶或 α -1,2甘露糖苷酶。N-聚糖分析的其他方法包括例如质谱术(例如MALDI-TOF-MS),正相、反相高压液相色谱(HPLC),和离子交换层析(例如当聚糖未被标记时使用脉冲安培检测,如果聚糖被适合地标记的话使用UV吸收或荧光检测)。也参见Callewaert等,(2001)Glycobiology 11(4):275-281和Freire等,(2006)Bioconjug.Chem.17(2):559-564,每个所述文献的公开内容整体通过参考并入本文。

[0320] 抗Fc γ R抗体作为SAP激动剂

[0321] 在本公开的一个方面,提供了模拟SAP信号传导的一种或多种化合物。在某些实施方式中,所述SAP信号传导激动剂是抗Fc γ R抗体,其中所述抗体选自分别能够结合到Fc γ RI、Fc γ RIIA或Fc γ RIII的抗Fc γ RI、抗Fc γ RIIA和抗Fc γ RIII抗体类别。抗Fc γ R抗体是结合到IgG抗体的Fc部分的受体(Fc γ R)的抗体。抗Fc γ R抗体通过它们的可变区并且不通过它们的恒定(Fc)区来结合。抗Fc γ R抗体可以包括抗体的任何同种型。抗Fc γ R抗体可以

进一步交联或聚集,含有或不含其他抗体或其他工具。这个过程启动了与Fc γ R激活相一致的细胞内信号传导事件。在某些实施方式中,所述SAP信号传导激动剂可以是交联的Fc γ R。

[0322] 聚集的Fc结构域和含Fc抗体

[0323] 在某些实施方式中,所述SAP信号传导激动剂是交联或聚集的IgG。交联或聚集的IgG可以包括能够通过其Fc区结合靶Fc γ R的任何IgG,只要至少两个这样的IgG抗体彼此物理连接即可。

[0324] 交联或聚集的IgG可以包括完整抗体或其一部分,优选为在纤维化障碍的抑制中有功能的部分。例如,它们可以包括能够交联Fc γ R的任何抗体部分。这可以包括聚集或交联的抗体或其片段,例如聚集或交联的完整抗体、Fab片段、F(ab')₂片段、Fab'片段以及甚至可能是Fc片段。

[0325] 抗体的聚集或交联可以通过任何已知方法来实现,例如热或化学聚集。任何水平的聚集或交联可能是足够的,尽管增加的聚集可能引起增加的纤维化障碍抑制。抗体可以是多克隆或单克隆的,例如从杂交瘤细胞产生的抗体。组合物和方法可以利用抗体的混合物,例如多种单克隆抗体的混合物,所述抗体可以交联或聚集到相似或不同的抗体。

[0326] SAP肽模拟物

[0327] 在某些实施方式中,所述SAP激动剂包括肽模拟物。当在本文中使用时,术语“肽模拟物”包括化学修饰的肽和含有非天然存在的氨基酸的肽样分子、类肽等。用于鉴定肽模拟物的方法在本领域中是公知的,并包括含有潜在肽模拟物文库的数据库的筛查。例如,剑桥结构数据库(Cambridge Structural Database)含有超过300,000种具有已知晶体结构的化合物的集合(Allen等,Acta Crystallogr. Section B, 35:2331 (1979))。当靶分子的晶体结构不可用时,可以使用例如CONCORD程序来产生结构(Rusinko等, J.Chem.Inf.Comput.Sci. 29:251 (1989))。另一个数据库Available Chemicals Directory (Molecular Design Limited, Informations Systems; San Leandro Calif.)含有约100,000种化合物,它们是可商购的并且也可以搜索,以鉴定SAP蛋白的潜在肽模拟物。

[0328] 提高SAP活性

[0329] 在某些实施方式中,SAP激动剂提高SAP活性,SAP活性可以通过例如提高SAP转录、提高翻译、提高SAP分泌、提高SAP RNA稳定性、提高SAP蛋白稳定性或减少SAP蛋白降解以提高SAP浓度来提高。SAP活性也可以通过例如减少SAP内源结合配偶体以特异性提高SAP的“游离浓度”或非结合形式来提高。

[0330] Fc γ R交联剂

[0331] 在某些实施方式中,基于纤连蛋白的支架结构域蛋白可用作SAP激动剂以交联Fc γ R。基于纤连蛋白的支架结构域蛋白可能包含纤连蛋白III型结构域(Fn3),特别是纤连蛋白III型第十结构域(¹⁰Fn3)。

[0332] 为了交联Fc γ R,可以如美国专利号7,115,396中所述产生Fc γ R结合性Fn3结构域的多聚体。

[0333] 纤连蛋白III型(Fn3)结构域按照从N-端到C-端的顺序包含 β 或 β 样链A,环AB, β 或 β 样链B,环BC, β 或 β 样链C,环CD, β 或 β 样链D,环DE, β 或 β 样链E,环EF, β 或 β 样链F,环FG和 β 或 β 样链G。所述BC、DE和FG环在结构和功能两者上都类似于来自于免疫球蛋白的互补决定区(CDR)。Fn3结构域可以被设计成通过改变BC、DE和FG环中的一者或多者的序列来结合几乎

任何化合物。产生特异性结合物的方法已被描述在公开了高亲和性TNF α 结合物的美国专利号7,115,396和公开了高亲和性VEGFR2结合物的美国公布号2007/0148126中。基于纤连蛋白的支架蛋白的实例是AdnectinsTM (Adnexus, Bristol-Myers Squibb R&D Company)。

[0334] 在某些实施方式中,所述SAP激动剂是适体。为了交联Fc γ R,可以产生Fc γ R结合性适体的多聚体。

[0335] 适体是寡核苷酸,其可以是合成或天然的,并结合到特定靶分子例如蛋白质或代谢物。通常,所述结合是通过除了经典的Watson-Crick碱基配对之外的相互作用来实现的。适体代表了目前在临床前和临床开发中的一类有希望的治疗剂。与生物物质例如肽或单克隆抗体相似,适体能够特异性结合到分子靶,并通过结合而抑制靶的功能。典型的适体大小为10-15kDa (即30-45个核苷酸),以低于纳摩尔浓度的亲和性结合它的靶,并辨别密切相关的靶 (例如通常不结合来自于同一基因家族的其他蛋白质) (Griffin等, (1993), Gene 137 (1):25-31; Jenison等, (1998), Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 8 (4):265-79; Bell等, (1999), In vitro Cell. Dev. Biol. Anim 35 (9):533-42; Watson等, (2000), Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10 (2):63-75; Daniels等, (2002), Anal. Biochem. 305 (2):214-26; Chen等, (2003), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (16):9226-31; Khati等, (2003), J. Virol. 77 (23):12692-8; Vaish等, (2003), Biochemistry 42 (29):8842-51)。

[0336] 适体具有用作治疗剂的许多有吸引力的特性。除了高的靶亲和性和特异性之外,适体在标准测定法中显示出很少或没有毒性或免疫原性 (Wlotzka等, (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (13):8898-902)。事实上,几种治疗性适体已被优化并向前推进通过临床前开发的不同阶段,包括药物动力学分析、在细胞和动物疾病模型中的生物学功效的表征和初步安全性药理学评估 (Reyderman和Stavchansky, (1998), Pharmaceutical Research 15 (6):904-10; Tucker等, (1999), J. Chromatography B. 732:203-212; Watson等, (2000), Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10 (2):63-75)。

[0337] 用于产生针对目标靶的适体的适合的方法是使用题为“通过指数富集进行的配体的系统性演化” (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (“SELEXTM”)的方法。所述SELEXTM方法是用于核酸分子的体内演化以获得与靶分子的高度特异性结合的方法,并被描述在例如1990年6月11日提交但现在放弃的美国专利申请系列号07/536,428、题为“核酸配体” (Nucleic Acid Ligands) 的美国专利号5,475,096和题为“核酸配体” (Nucleic Acid Ligands) 的美国专利号5,270,163 (也参见WO 91/19813) 中。每种SELEXTM鉴定到的核酸配体是给定靶化合物或分子的特异性配体。所述SELEXTM方法是基于以下认识:核酸可以形成各种不同的二维和三维结构,并在它们的单体内具有足够的化学通用性以充当事实上不论是单体还是聚合物的任何化学化合物的配体 (形成特异性结合对)。任何尺寸或组成的分子可以充当靶。应用于高亲和性结合应用的SELEXTM方法包括从候选寡核苷酸的混合物进行选择,并使用相同的总体选择方案进行结合、分隔和扩增的逐步迭代,以达到事实上任何所需的结合亲和性和特异性标准。从优选地包含随机化序列的区段的核酸混合物开始,SELEXTM方法包括下述步骤:将所述混合物与靶在有利于结合的条件下相接触,将未结合的核酸与已特异性结合到靶分子的核酸分隔开,解离核酸-靶复合体,扩增从核酸-靶复合体解离的核酸以产生配体富集的核酸混合物,然后根据需要将结合、分隔、解离和扩增的步骤重复多个循环,以获得针对靶分子的高特异性高亲和性核酸配体。

SELEX™是用于为任何所需靶制造核酸配体的方法,正如在例如美国专利号5,475,096和5,270,163以及PCT/US91/04078中所描述的,每个所述专利被具体地通过参考并入本文。

[0338] 在某些实施方式中,SAP激动剂是纳米抗体®。纳米抗体®是抗体来源的治疗性蛋白,其含有天然存在的重链抗体的独特的结构和功能性质。纳米抗体®技术最初是在发现骆驼科动物(骆驼和美洲驼)具有缺少轻链但功能完全的抗体后开发的。这些重链抗体含有单个可变结构域(VHH)和两个恒定结构域(CH2和CH3)。重要的是,克隆并分离到的VHH结构域是具有原始重链抗体的完全的抗原结合能力的稳定的多肽。这些具有独特的结构和功能性质的VHH结构域形成了新一代治疗性抗体的基础。

[0339] 药物制剂和配方

[0340] 在某些实施方式中,本文描述的方法包括向对象施用至少一种本公开的SAP蛋白作为治疗剂。本公开的治疗剂可以以常规方式,使用一种或多种生理上可接受的载体或赋形剂来配制。例如,治疗剂和它们的生理上可接受的盐和溶剂化物可以被配制成为用于通过例如静脉内输注(IV)、注射(例如SubQ、IM、IP)、吸入或吹入(通过口或鼻)或口服、颊、舌下、透皮、鼻、肠胃外或直肠施用来施用。在某些实施方式中,治疗剂可以在存在靶细胞的位点处,即在特定组织、器官或流体(例如血液、脑脊液、肿瘤块等)中局部施用。换句话说,本公开设想对于本文描述的任何方法来说,所述方法包括施用SAP或包含SAP的组合物(例如药物组合物)。在某些优选实施方式中,所述组合物是包含SAP的组合物,其中所述组合物的活性和/或SAP唾液酸化与人类血清中的不同。

[0341] 本公开还提供了本公开的任何SAP蛋白在制造用于在患者中治疗或预防本文所描述的障碍或病症的药物中的用途,例如,SAP蛋白在制造用于治疗本文描述的障碍或病症的药物中的用途。在某些方面,本公开的SAP蛋白可用于制造用于治疗或预防本文描述的疾病或病症的药物制剂。

[0342] 治疗剂可以被配制成为用于各种不同的施用方式,包括全身和表面或局部施用。技术和配方一般可以在《雷明顿制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),Meade Publishing Co.,Easton,PA中找到。对于肠胃外施用来说,注射是优选的,包括肌肉内、静脉内、腹膜内和皮下。对于注射来说,可以将化合物配制在液体溶液中,优选为生理相容的缓冲液例如Hank's溶液或Ringer's溶液中。此外,可以将化合物配制成为固体形式并在即将使用之前重新溶解或悬浮。也包括冷冻干燥形式。在某些实施方式中,所述治疗剂可以通过本领域技术人员已知的各种不同方法施用到细胞,包括但不限于囊封在脂质体中、通过离子电渗或通过并入到其他介质例如水凝胶、环糊精、可生物降解的纳米胶囊和生物粘附性微球中。

[0343] 对于口服施用来说,所述药物组合物可以采取例如片剂、锭剂或胶囊的形式,其通过常规手段,使用可药用赋形剂例如粘合剂(例如预明胶化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素)、填充剂(例如乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙)、润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石或二氧化硅)、崩解剂(例如马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠)或润湿剂(例如月桂基硫酸钠)来制备。片剂可以通过本领域中公知的方法包衣。用于口服施用的液体制剂可以采取例如溶液、糖浆或悬液的形式,或者它们可以作为干燥产品呈现,在使用前用水或其他适合的介质构建。这些液体制剂可以通过常规手段,使用可药用添加剂例如悬浮剂(例如山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化可食用脂肪)、乳化剂(例如卵磷脂或阿拉伯树胶)、非水性介质

(例如杏仁油、油性酯、乙醇或分级的植物油)和防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯或山梨酸)来制备。如果适合,所述制剂也可以含有缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。用于口服施用的制剂可以被适合地配制成提供活性化合物的受控释放。

[0344] 对于吸入施用(例如肺递送)来说,治疗剂可以以从加压包装或喷雾器进行气溶胶喷雾呈递的形式,使用适合的推进剂例如二氯二氟甲烷、三氯一氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他适合的气体,方便地递送。在加压气溶胶的情形中,剂量单元可以通过提供阀门来确定,以递送计量过的量。在吸入器或吹入器中使用的例如明胶的胶囊和药筒,可以被配制成含有所述化合物与适合的粉末基料例如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0345] 在本公开的方法中,所述药物化合物也可以通过鼻内或支气管内途径施用,包括吹入、粉剂和气溶胶配方(例如甙类吸入剂,参见Rohatagi (1995) J.Clin.Pharmacol.35:1187-1193;Tjwa (1995) Ann.Allergy Asthma Immunol.75:107-111)。例如,可以将气溶胶配方置于加压的可接受的推进剂例如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等中。它们也可以被配制成用于非加压制剂的药物例如在喷雾器或雾化器中。通常,这种施用是在水性可药用缓冲液中。

[0346] 适合于SAP蛋白的呼吸递送(例如鼻内、吸入等)的药物组合物可以被制备成固体或液体形式。

[0347] 本公开的SAP蛋白可以被配制成用于通过注射例如通过快速浓注或连续输注进行肠胃外施用。在某些实施方式中,所述SAP蛋白被配制成用于静脉内递送。用于注射的配方可以以单位剂型呈现,例如在安瓿或多剂量容器中,并添加有防腐剂。所述组合物可以采取诸如在油性或水性介质中的悬液、溶液或乳液的形式,并且可能含有配制剂例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,所述活性成分可以采取粉剂形式,在使用前用适合的介质例如无菌无热原的水构建。

[0348] 本公开的SAP蛋白可以被配制成用于皮下递送,例如通过注射。用于注射的配方可以以单位剂型呈现,例如在安瓿或多剂量容器中,并添加或不添加防腐剂。所述组合物可以采取诸如在油性或水性介质中的悬液、溶液或乳液的形式,并且可能含有配制剂例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,所述活性成分可以采取粉剂形式,在使用前用适合的介质例如无菌无热原的水构建。

[0349] 此外,本公开的SAP蛋白也可以被配制成储库型制剂。这种长效配方可以通过植入(例如皮下或肌肉内)或通过肌肉内注射来施用。因此,例如,治疗剂可以用适合的聚合或疏水材料(例如作为在可接受的油中的乳液)或离子交换树脂来配制,或配制成难溶的衍生物例如难溶的盐。受控释放配方也包括贴剂。

[0350] 在某些实施方式中,本公开的SAP蛋白被并入到表面配方中,其含有通常适合于表面药物施用的表面用载体并包含本领域中已知的任何这种材料。可以选择表面用载体以便将所述组合物提供成所需形式,例如作为油膏、洗剂、霜剂、微乳液、凝胶、油、溶液等,并且所述表面用载体可以包含天然存在或合成来源的材料。优选地,所选载体不会不利地影响所述表面配方的活性剂或其他组分。适合在本文中使用的表面用载体的实例包括水、醇和其他无毒性有机溶剂、甘油、矿物油、硅酮、凡士林、羊毛脂、脂肪酸、植物油、对羟基苯甲酸酯、蜡等。

[0351] 药物组合物(包括美容制剂)可以包含以重量计约0.00001至100%,例如0.001至

10%或0.1%至5%的一种或多种本文描述的SAP蛋白。在某些表面配方中,所述活性剂以所述配方的约0.25wt.%至75wt.%范围内,优选地所述配方的约0.25wt.%至30wt.%范围内,更优选地所述配方的约0.5wt.%至15wt.%范围内,最优选地所述配方的约1.0wt.%至10wt.%范围内的量存在。

[0352] 本文描述的治疗剂可以按照本领域中的方法储存在无氧环境中。

[0353] 示例性组合物包含SAP蛋白和一种或多种可药用载体和任选的其他治疗成分。所述载体必须与与所述组合物的其他成分相容并且不在所述对象中引发不可接受的有害效应的意义上是“可药用的”。这些载体被描述在本文中,或者是制药学领域的技术人员公知的。在某些实施方式中,所述药物组合物是无热原的,并适合于施用到人类患者。在某些实施方式中,所述药物组合物是无刺激的,并且适合于施用到人类患者。在某些实施方式中,所述药物组合物是无过敏原的,并适合于施用到人类患者。所述组合物可以通过药物学领域中公知的任何方法来制备。

[0354] 在某些实施方式中,SAP蛋白在时间释放配方中,例如在包括缓释聚合物的组合物中施用。SAP蛋白可以使用针对快速释放提供保护的载体来制备。实例包括受控释放介质,例如聚合物、微囊封的递送系统或生物粘附性凝胶。或者,SAP蛋白的延长释放可以通过在所述组合物中包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝水凝胶和明胶来实现。

[0355] 在某些实施方式中,本公开的方法包括通过上述任一施用途例如静脉内或皮下途径进行施用。在某些实施方式中,施用是皮下的,特别是当待施用的每个剂量在小体积中时。在某些实施方式中,施用是静脉内的。

[0356] 下面的实施例用于更充分地描述使用上述公开内容的方式,并阐述了为执行本公开的各种不同方面而设想的最佳方式。应该理解,这些实施例绝不用于限制本公开的真实范围,而是出于说明的目的而提出。

实施例

[0357] 实施例1.使用重组人SAP(rhSAP)治疗骨髓纤维化

[0358] 测试被诊断为患有骨髓纤维化(包括PMF、PV后的MF或ET后的MF)的患者在一个或多个基因例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1和IDH2中的基线突变状态。为了测量所述基线突变状态,从所述患者收集外周血样品,从所述样品提取DNA并通过实时定量等位基因特异性PCR进行分析,以测量一个或多个基因例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2的突变状态(即鉴定一个或多个突变的存在或不存在)。患者接受在CHO细胞中重组表达的含有 α 2,3-唾液酸的人SAP(在CHO细胞中表达的rhSAP;包含至少一个 α 2,3连键并且糖基化与源自于人类血清的SAP不同的SAP;本公开的示例性SAP蛋白)。功效通过骨髓响应率的评估来评估,所述骨髓响应率被定义为如EU共识判据(EU Consensus Criteria)中所描述的WHO骨髓纤维化等级降低一级。对SAP治疗的响应率将与患者的突变状态相关联。这种方法可用于鉴定特别适合于使用rhSAP治疗的骨髓纤维化患者的亚群(例如具有基因例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1和IDH2中的突变的一种或多种特定组合的患者)。此外,定期测量一个或多个基因例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1和IDH2的突变状态的变化,以评估响应性的任何差异或等位基因负荷的变化。如果观察到一个或多个基因中等位基因负荷的降低,则维持所述剂量方案。只要有益,对疗法有响

应的对象将继续接受它。

[0359] 实施例2. 使用重组人SAP (rhSAP) 治疗骨髓纤维化

[0360] 测试被诊断为患有骨髓纤维化(包括PMF、PV后的MF或ET后的MF)的患者在一个或多个基因例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1和IDH2中的基线突变状态。为了测量所述基线突变状态,从所述患者收集外周血样品,从所述样品提取DNA并通过实时定量等位基因特异性PCR进行分析,以测量一个或多个基因例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2的突变状态(即鉴定一个或多个突变的存在或不存在)。患者接受在CHO细胞中重组表达的含有 α 2,3-唾液酸的人SAP(在CHO细胞中表达的rhSAP;包含至少一个 α 2,3连键并且糖基化与源自于人类血清的SAP不同的SAP)。功效通过骨髓响应率的评估来评估,所述骨髓响应率被定义为如EU共识判据(EU Consensus Criteria)中所描述的WHO骨髓纤维化等级降低一级。定期测量一个或多个基因例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1和IDH2的突变状态的改变,以评估响应性的任何差异或等位基因负荷的变化。如果在任何测试的基因中都没有观察到等位基因负荷的变化,则修改所述剂量方案以提高rhSAP的剂量和/或增加rhSAP施用的频率。

[0361] 实施例3. 使用重组人SAP (rhSAP) 在骨髓纤维化中降低突变等位基因负荷

[0362] 测试被诊断为患有骨髓纤维化(包括PMF、PV后的MF或ET后的MF)的患者在一个或多个基因例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1和IDH2中的基线突变状态。为了测量所述基线突变状态,从所述患者收集外周血样品,从所述样品提取DNA并通过实时定量等位基因特异性PCR进行分析,以测量一个或多个基因例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2的突变状态(即鉴定一个或多个突变的存在或不存在)。在一个或多个基因中具有突变的患者接受在CHO细胞中重组表达的含有 α 2,3-唾液酸的人SAP(在CHO细胞中表达的rhSAP;包含至少一个 α 2,3连键并且糖基化与源自于人类血清的SAP不同的SAP)。调整剂量以有效地在一个或多个基因中降低突变等位基因负荷。只要有益,对疗法有响应的对象继续接受它。

[0363] 实施例4. 作为使用重组人SAP (rhSAP) 的治疗功效的指示物的突变等位基因负荷的降低

[0364] 测试被诊断为患有骨髓纤维化(包括PMF、PV后的MF或ET后的MF)的患者在一个或多个基因例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1和IDH2中的基线突变状态。为了测量所述基线突变状态,从所述患者收集外周血样品,从所述样品提取DNA并通过实时定量等位基因特异性PCR进行分析,以测量一个或多个基因例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2的等位基因负荷。患者接受在CHO细胞中重组表达的含有 α 2,3-唾液酸的人SAP(在CHO细胞中表达的rhSAP;包含至少一个 α 2,3连键并且糖基化与源自于人类血清的SAP不同的SAP)。在施用所述SAP蛋白之后测量相同突变的第二突变等位基因负荷。所述第二突变等位基因负荷相对于第一突变等位基因负荷的降低指示了所述SAP蛋白的施用有效地治疗所述骨髓增生性障碍。突变等位基因负荷可以在治疗开始后的一个或多个时间点例如治疗约1个月、2个月、3个月、4个月或5个月后测量。随后可以监测突变等位基因的水平以评估响应的持久性。

[0365] 实施例5. 使用重组人SAP (rhSAP) 治疗在JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1和IDH2的一者或多者中具有突变的骨髓纤维化患者

[0366] 测试被诊断为患有骨髓纤维化(包括PMF、PV后的MF或ET后的MF)的患者在一个或多个基因例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1和IDH2中的突变状态。为了测量所述基线突变状态,从所述患者收集外周血样品,从所述样品提取DNA并通过实时定量等位基因特异性PCR进行分析,以测量一个或多个基因例如JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1或IDH2的突变状态(即鉴定一个或多个突变的存在或不存在)。在一个或多个所述基因中带有突变的患者接受在CHO细胞中重组表达的含有 $\alpha 2,3$ -唾液酸的人SAP(在CHO细胞中表达的rhSAP;包含至少一个 $\alpha 2,3$ 连键并且糖基化与源自于人类血清的SAP不同的SAP)。功效通过骨髓响应率的评估来评估,所述骨髓响应率被定义为如EU共识判据(EU Consensus Criteria)中所描述的WHO骨髓纤维化等级降低一级。只要有益,对疗法有响应的对象继续接受它。任选地,测量其他判据,例如血红蛋白、血小板计数、症状、突变等位基因状态等。这些判据中的任一者或多者可以在治疗开始后的一个或多个时间点例如治疗约1个月、2个月、3个月、4个月或5个月后测量。随后可以监测这些判据中的任一者或多者以评估响应的持久性。

[0367] 实施例6. 使用单独的PRM-151治疗骨髓纤维化患者:2期

[0368] 这项研究评估载药期后每四周的给药计划。将重组人SAP,在这种情况下是被称为PRM-151的重组人SAP,施用到具有PMF、PV后的PMF或ET后的PMF的中风险-2或高风险患者,以评估三种不同剂量的PRM-151在将骨髓纤维化降低 ≥ 1 级中的安全性和功效。贫血或血小板减少并且未接受输血之外的用于MF的疗法的患者,对于这项研究来说是合格的。基于血小板计数 $< 50 \times 10^9/L$ 或Hgb $< 100g/L$,患者不是鲁索替尼的候选者,在进入研究之前的12周内接受过 ≥ 2 单位的PRBC,并且对鲁索替尼不耐受或者响应不足。

[0369] 将满足资格要求的具有中风险-2或高风险MF的84位患者随机分组到接受使用单一药剂PRM-151治疗的3个组之一。组1:在至少4周内未接受用于MF的MF针对性药物治疗的患者(i)在第1个循环(28天的循环)的第1、3和5天通过静脉内输注接受0.3mg/kg的PRM-151的初始负荷剂量,并且(ii)随后在每个后续的28天循环的第1天通过静脉内输注以0.3mg/kg施用一剂PRM-151,共9个循环。组2:在至少4周内未接受用于MF的MF针对性药物治疗的患者(i)在第1个循环(28天的循环)的第1、3和5天通过静脉内输注接受3mg/kg的PRM-151的初始负荷剂量,并且(ii)随后在每个后续的28天循环的第1天通过静脉内输注以3mg/kg施用一剂PRM-151,共9个循环。组3:在至少4周内未接受用于MF的MF针对性药物治疗的患者(i)在第1个循环(28天的循环)的第1、3和5天通过静脉内输注接受10mg/kg的PRM-151的初始负荷剂量,并且(ii)随后在每个后续的28天循环的第1天通过静脉内输注以10mg/kg施用一剂PRM-151,共9个循环。在某些实施方式中,所述随机分组按照对象类型进行分层(Hgb $< 100g/L$ 并且在进入研究之前的12周内已接受过 ≥ 2 单位的PRBC的对象,或血小板计数 $< 50 \times 10^9/L$ 的对象),并确保最终的研究群体包括至少50%的来自于第二层的对象(血小板计数 $< 50 \times 10^9/L$)。所有对象可能切换到开放标签延长期并每4周接受10mg/kg PRM-151,完成最初指定的治疗的9个循环。在研究完成和数据分析后,所有在PRM-151后留下的对象切换到在研究结果的基础上为未来开发而选择的剂量。登记的对象,如果他们使用研究药物至少12周,被认为可用于响应评估。

[0370] 监测每个组群中的患者的骨髓纤维化(BMF)(通过例如定量图像分析)和与疾病相关的贫血、血小板减少、外周血胚细胞、体质症状和脾脏尺寸的改善。评估IWG-MRT响应(完

全响应、部分响应、临床改善)和PRM-151对稳定和渐进性疾病的比率的影响。此外,监测患者的其他与疾病相关的血液学异常的变化,通过DIPSS(国际动态预后评分系统(Dynamic International Prognostic Scoring System))度量的与死亡率提高相关的预后因子的变化,骨髓形态的变化,通过PET成像测量的骨髓代谢的变化。此外,评估遗传突变和细胞遗传学异常与对PRM-151的响应之间的相互作用,并评估骨髓样品中PRM-151活性的生物标志物。评估基线SAP水平与患者结果之间的相关性。评估骨髓纤维化减轻与血液学改善之间的关系。还按照关于伴有髓样化生的骨髓纤维化中的治疗响应的国际工作组共识判据监测患者的整体响应率(Tefferi A, Cervantes F, Mesa R等,修订的骨髓纤维化响应判据:国际工作组—骨髓增生性肿瘤研究与治疗(IWG-MRT)和欧洲白血病网(ELN)共识报告(Revised response criteria for myelofibrosis: International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) and European LeukemiaNet (ELN) consensus report). Blood. 2013;122:1395-1398)。还监测患者的不利事件的发生,通过骨髓纤维化分级的欧洲共识文件(European Consensus on Grading of Bone Marrow Fibrosis)中所描述的WHO判据确定的骨髓纤维化的变化(Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F等,关于骨髓纤维化分级和细胞性评估的欧洲共识(European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity). Haematologica 2005;90:1128-1132),改良的骨髓增生性肿瘤症状评估表(MPN-SAF)分值的变化(Emanuel等,2012, Journal of Clinical Oncology 30(33):4098-4103)和通过EORTC QLQ-C30分价值量的生命质量的变化(EORTC QLQ-C30(第3版),1995, EORTC Quality of Life Group)。测量无进展和总生存期。

[0371] 任选地,监测每个组群中的患者的一种或多种本文描述的效应,例如,评估治疗对骨髓纤维化分值按照WHO判据降低至少一级的影响,正如由对象、治疗和组织活检时间不知情的血液病理学专家中央裁决组所确定的。任选地,进一步监测治疗对血液学改善(例如RBC输血不依赖性、血小板输血依赖性 or 血红蛋白水平提高1-20g/L)的影响。

[0372] 在治疗开始之前任选地评估突变状态和等位基因负荷。等位基因负荷任选地在治疗开始后评估,并且可以在治疗过程中评估多次(例如在1、2、3、4、5或6个循环后)。在整个研究中的多个时间点收集血液样品并从外周全血分离DNA,用于将基线突变状态与所选的第一和第二终点相关联的目的。分析样品的JAK2、MPL、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1和/或IDH2的突变状态。也在例如第36周(第1个循环的第1天到第9个循环的第29天)分析样品以评估JAK2V617F的等位基因负荷的变化。也在例如第36周分析样品以评估MPLW515、CALR、ASXL1、EZH2、SRSF2、IDH1和/或IDH2的等位基因负荷的变化。

[0373] 任选地进行另外的骨髓活检样品的免疫组织化学分析,以评估与疾病和机制相关的蛋白质和细胞标志物。

[0374] 通过参考并入

[0375] 本文中提到的所有出版物和专利整体通过参考并入本文,如同每个单个出版物或专利被具体且单个地指明通过参考并入。

[0376] 尽管已经讨论了主题内容的特定实施方式,但上面的说明书是说明性而不是限制性的。在阅读了本说明书和权利要求书之后,许多改变对于本领域技术人员来说是显而易见的。本公开的完整范围应该参考权利要求以及它们的等同物的完整范围和本说明书以及

这些改变来确定。

[0377] 序列表

[0378] SEQ ID NO:1人血清淀粉样蛋白P

[0379] HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIITPLEKPLQNFTLCFRAYSDLRSAYSLFSYNTQGRDNELLVYKERVG
EYSLYIGRHKVT SKVIEKFPAPVHICVSWESSSGIAEFWINGTPKVKKGLRQGYFVEAQP KIVLGQE QDSYGGKFDR
SQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQG TPLPANILDWQALN YEIRGYV I IKPLVWV

[0380] SEQ ID NO:2原鸡 (*Gallus gallus*) 血清淀粉样蛋白P

[0381] QEDLYRKVFVFREDPSDAYVLLQVQLERPLL NFTVCLRSYTDLTRPHSLFSYATKAQDNEILLFKPKPG
EYRFYVGGKYVTFRVPENRGEWEHVCASWESGSGIAEFWLN GRPWPRKGLKQGYEVGNEAVV MLGQE QDAYGGGF DV
YNSFTGEMADVHLWDAGLSPDKMRSAYLALRLPPAPLAWGRLRYEAKGDV VVKPRLREALGA

[0382] SEQ ID NO:3牛 (*Bos taurus*) 血清淀粉样蛋白P

[0383] QTDLRGKVFVFPRESSTDHVT LITKLEKPLKNLTCLRAYSDLSRGYSLFSYNIH SKDNELLVFKNIG
EYSLYIGTKVTVRATEKFPSPVHICTSWESSTGIEEFWINGKPLVKRGLKQGYAVGAHPKIVLGQE QDSYGGGF DK
NQSFMGEIGDLYMWDSVLSPEEILLVYQGSSSISPTILDWQALKYEIKGYVIVKPMVWG

[0384] SEQ ID NO:4灰仓鼠 (*Cricetulus migratorius*) 血清淀粉样蛋白P

[0385] QTDLTGKVFVFPRESESDYVKLIPRLEKPLENFTLCFR TYTDLSRPHSLFSYNTKNKDNELL IYKERMG
EYGLYIENVGAIVRGVEEFASPVHFCTSWESSSGIADFWVNGIPWVKKGLKKGYTVKTQPSI ILGQE QDNYGGGF DK
SQSFVGEMGDLNMWDSVLTPEEIKSVYEGSWLEPNILDWRALNYEMSGYAVIRPRVWH

[0386] (SEQ ID NO:5) NM_004972智人Janus激酶2 (JAK2) ,mRNA

[0387]

```

1  ctgcagggaag gagagaggaa gaggagcaga aggggggcagc agcgggacgoc gctaacggcc
61  tccctcggcg ctgacaggct gggcgggcgc cgggctcgct tgggtgttgc cgtcgccact
121  tccgcttctc ggccgggtcg gccctcggc cgggcttgc ggcgcgctc ggggctgagg
181  gctgctgagg cgcagggaga ggctcgttc togtctgcga gggatgtgag tgggagctga
241  gccacactg gagggccccc gaggggccag cctggaggta gttcagagcc gtgcccgtcc
301  cggggcttcg cagacettga cccgcgggt aggagccgcc cctgcggct cgagggcgcg
361  ctctggtcgc ccgatctgtg tagccgggtt cagaagcagg caacaggaac aagatgtgaa
421  ctgtttctct totgcagaaa aagaggctct tctctctct cccgcgacgg caaatgtctc
481  gaaaaagact ctgcatggga atggcctgoc ttaogatgac agaaatggag ggaacatcca
541  cctcttctat atatcagaat ggtgatattt ctggaaatgc caattctatg aagcaatag
601  atccagttct tcagggtgat ctllaccatt ccttgggaa atctgaggca gallatctga
661  cctttccatc tggggaglat gttgcagaa aaatctgtat tgccttct aaagcttgtg
721  gtatcacacc tgtgtatcat aatatgtttg ctttaatgag tgaacagaa aggatctggt

781  atccaaccac coactgtctc catatagatg agtcaaccag gcataatgtc ctctacagaa
841  taagatttta ctttccctgt tggatattga gtggcagcaa cagagcctat cggcatggaa
901  tatctogagg tgcgaagct cctctctctg atgactttgt catgtcttac ctctttgtct
961  agtggcgcca tgattttgtg cccggatgga taaaagtaac tgtgactcat gaaacacagg
1021  aagaatgtct tgggatggca gtgttagata tgaatgagaat agcnaaaagaa aacgatccaa
1081  cccactggc catctataac totatcagct acaagacatt cttaacaaaa tgtattogag
1141  caaagatcca agaactatcat attttgacaa ggaagcgaat aaggtacaga ttctgcagat
1201  ttattcagca attcagocaa tgcnaagcca ctgccagaaa cttgaaactt aagtatctta
1261  taaatctgga aactctgcag totgccttct acacagagaa atttgaagta aaagaacctg
1321  gaegtgggtc ttcagggtgag gagatthttg caaccattat aataactgga aacgggtggaa
1381  ttcagtggto aagagggaaa cataaagaaa gtgagacact gacagaacag gatttacagt
1441  tatattgcga ttttccctaa aktattgatg tcagtaataa gcaagcaaac caagagggtc
1501  caaatgaaag ccgagttgta actatccata agcaagatgg taaaaatctg gaaattgaac
1561  ttagctcatt aagggaagct ttgtcttctc tgtcattaat tgaatggatat tatagattaa
1621  ctgcagatgc acatcattac ctctgtaaag aagtagcacc tccagccgtg cttgaaaata
1681  tacaagcaa ctgtcatggc ccaatttoga tggattttgc catlagtaaa ctgaagaag
1741  caggtaatca gactggactg tatgtacttc gatgcagtc ctaaggacttt aataaatatt
1801  ttttgacttt tgcgtctgag cgagaaaatg tcaattgaata taacacatgt ttgattacaa
1861  aaaatgagaa tgaagagtec aaactcagtg ggaacaaaga gaacttcagc agctttaag
1921  atcttttgaa ttgttacag atggaactg ttgcctcaga caataatatt ttccagttta
1981  ctaaatgotg tcccccnaag ccaaaagata aatcaaacct tctagtcttc agaacgaatg
2041  gtgtttctga tgtaccaacc tcaaccaact tacagaggcc tactcatatg aaccaaatgg

```

[0388]

```
2101 tgtttccacaa aalcagaaat gaagatttga taittaatga aagccltggc caaggcaott
2161 ttacaaagat ttttaaaggc gtacgaagag aagtaggaga ctacggfcaa ctgcatgaaa
2221 cagaagttct tttaaaagtt ctggataaag cacacagaaa ctattcagag tctttctttg
2281 aagcagcaag tatgatgagc aagccttctc scaagcattt gggttttaat latggaglat
2341 ggtctctgtg agacgagaat attctgggtc aggagtttgt aaattttgga tcaactagata
2401 catatctgaa aaagaataaa aattglataa atatatattg gaaacttgaa gtigtataac
2461 agttggcatg ggccatgcct ttctatagaag aaaaacacct tattcatggg aatgtatgtg
2521 ccaaaaatat tctgcttate agagaagaag acaggaagac aggaattcct cctttcatca
2581 aacttagtga tectggcatt agtattacag ttitgcaaaa ggaacttctt caggagagaa
2641 taccatgggt accacctgaa tgcattgaaa atcctaaaaa tttaaatttg gcaacagaca
2701 aatggagttt tggtaaccact ttgtgggaaa tctgcagtgg aggagataaa cctctaagtg
2761 cctctggattc tcasagaaag ctacaatttt atgaagatag gcatoagctt colgcaccaa
2821 agtgggcaga attagcaaac ctataaata attgtatgga ttatgaacca gatttcaggo
2881 cttcttttcag agccatcata cgagatctta acagtttgtt tacuccagat tatgaactat
2941 taacagaaaa tgacatgtta ccaaatatga ggatagggtg colggggttt tctgggtgct
3001 ttgaagaccg ggalcctaoc cagtttgaaag agagacattt gaaatttcta cagcaacttg
3061 gcaagggtaa ttttggggagt gtggagatgt gccggtatga cctctacag gacaacactg
3121 gggaggttgt cgtgttaaaa aagcttcagc atagtactga agagcaccta agagactttg
3181 aaagggaaat tgaaatcctg aatccctac agcatgacaa cattgtaaag tacaagggag
3241 tgtgtacacg tgcctggctgg cgtaatclaa aattaattat ggaatattta ccatatggaa
3301 gtllacgaga ctatcttcaa aaacalaaag aacggataga tccataaaaa cttctgcagt
3361 acacatctca gatatgcaag ggtatggagt atotttggtac aaaaaggat atocacaggg
3421 atctggcaac gagaaatata ttgggtggaga acgagaacag agttaaatat ggagattttg
3481 ggtaaaccaa agtcttgcca caagacaaag aalactataa agtaaaaaga colgggtgaa
3541 gtcccatatt ctggtatgct ccagaatcac tgacagagag caagttttol gtggcctcag
3601 atgttttgag ctttggagtg gtctctgtat aacttttcaa atacaltgag aagagttaaa
3661 gtccaccagc ggaatttatg cgtatgattg gcaatgacaa acaggacag atgatcgtgt
3721 tccatttgat agaacttttg aagaataatg gaagatlace aagaccagat ggtgcccag
3781 atgagatcta talgalcatg acagaatgct ggaacaataa tglaaatcaa cgcctctctt
3841 ttagggatct agctcttcca gtgatalcaa taagggataa catggctgga tgaagaaat
3901 gaccttcatt ctgagaccaa agtagattta cagaacaaag ttttatattt cacattgtgt
3961 tggactatta ttacatatat caltakata taantcatga tgetagccag caaagatgtg
4021 aaeatatctg ctcaaaactt ccnaagttta gtaagttttt cticattgagg ccaccagtaa
4081 aagacattaa tgagaattcc ttagcaagga ttttgttaaga agttttctaa acattgtcag
4141 ttaacatcac tctgtctggt caaagaaaaa aaatagact ttttcaactc agctttttga
4201 gacctgaaaa aattattatg taatttttgc aatgttaaa atgcacagaa tatgtatgta
4261 tagtttttac cacagtggat gtataatacc ttggcatctt gtgtgatgtt ttacacacat
4321 gagggctggt gthcaaktaat actgttttct aatttttcaa tagttaatct ataattaat
4381 acttcaactat ccaaacaaat taagatgttc agataattga ateaqtacot ttgtgtcctt
4441 gttcatthtat atcgttggcc agcaatataa gcagggtgat aotttllagct tgtagtcca
4501 tgtactgtaa atatttttca cataaagggg acaaatgtot agttttcttt gtataggaaa
4561 tttccctgac cctaaataat acattttgaa atgaacaaag cttacaaaga tataatctat
4621 tttatttatg tttcccttgt abctatttgt ggtgaatgtg ttttttaaat ggaactatct
4681 ccaaattttt ctaagactac tatgaacagt tttcttttaa aattttgaga ttaagaatgc
4741 caggaatatt gtcactcttt gagctgtctga ctgccaataa cattcttcca tctctgggat
4801 ttatgtctcat gaactaaatt caagcttaag ccataaaata gattagattg ttttttaaaa
4861 atggatagct catlaagaag tgcagpaggt taagaatttt ttoclaaaga ctgtatatit
4921 gaggggtttc agaattttgc attgcaagtca tagaagagat ttatttcttt tttagagggg
4981 aatgaggtta aataagtaaa aaagtatgct tgtteatttt attcaagaat gccagtagaa
5041 aatlcataac gtgtatcttt aegaaaaatg agcatacaco ttaaatcttt tcaattaaat
5101 ataaggggtt gtlcgttgtt gtcatttgtt atagtgtctc tccactttag acaccatago
5161 taaaaataaaa tatgggtgggt ttgtgtgtgt tgtgtgtgt tgtgtgtgt tgtgtgtgt
5221 tgttatttat acaaaactta aaataacttg tgttttgatt aaaaagaaaa tagttttctt
5281 cttt
```

[0389] (SEQ ID NO:6) NP_004963酪氨酸蛋白激酶JAK2[智人]

[0390]

```

1  mgnacitmtte megststasiy qngdisgnan smkqidpvlq vylyhsigka eadyltfpsg
61  eyvaeicla askacgitpv yhamfalmse teriwyppnh vfhidestrh nvlyrirfyf
121 prwycagenr ayrhgisrga eapllddfvn sylfaqwrhd fvhgwikvpv thetgeecig
181 mavldmria kendgtplai ynsisayktfl pkcirakiqd yhilltrkrir yzfrfiiqqf
241 sqckatarnl klkylinlet lqsafytekf evkepgsgps geeifatili tgnggiqwer
301 gkhkesetlt egdlglycdf pnildvsikq aneggsnesr vvtihkqdgk alelelsalr
361 ealsfvslid gyyritadah hylckeavapp avleniqenc hgpismdfai sklkkagnqt
421 glyvlrcspk dfnkyltfa verenvieyk bolitknene eyalsgtkkn fselkdllnc
481 yqmetvredn iilqitkccp pkpkdksnll vfrtagvsdv ptsptlqrpt hanqmvfhki
541 rnedlifnes lqqgtftkif kgvrrevgdy gqihetevll kvldkahrny sesffeaasm
601 msklshkhlv lnygvvcvgd enilvgfvlk fgsldtylkk nkncinilwk levakqlawa
661 mhfleentli hgnvcaknil lireedrktg nppfiklsdp gisitvlpkd ilqeripwvp
721 pacienpknl alatkwsfg ttllweicsgg dkplsaldeq rklqfyedrb qlpapkwsel
781 aalinncmdy epdlrpsfra ilrdinslft pdyelltend mlpmurigal gfgafedrd
841 ptqfeerhik flqqigkgnf gavemcrydp lqndtgevva vkkliqstee hirdfereie
901 ilkslqhndi vkykgvcyaa grmkklime ylpysalrny lqkheridh ikllqytsqi
961 ckqmeylgsk ryihrdlatr nilvenenrv kigdfigltkv lqdkkeyykv kepgespifw
1021 yapesltesk fsvasdwsaf gvviyelfty lekskspae farmigndkq gqmivfhlie
1081 likangripr pdgcpdeilm imtecwanav nqrpsfrdla lrvdqirdam ag

```

[0391] (SEQ ID NO:7) NM_005373智人MPL原癌基因,促血小板生成素受体(MPL),mRNA

[0392]

```

1  cctgaaggga gcatgggcta aggcaggcac acagtggcgg agaagatgco ctccctgggco
61  ctcttcacgg tcacotctctg cctctctctg gccctcaaaa acctggccca agtcagcago
121 caagatgtct ccttgcctggc atcagactca gagccootga agtglttctc ccgaacattt
181 gaggacotra cttgcttctg gcatgaggaa gaggcagcgc ccagtgggac ataccagctg
241 ctgtatgctt acccggggga gaagcccctg ccttgcccc tgagttccca gacatgccc
301 cactttggaa ccgatacgt gtgcccagtt ccagaccagg aggaagtggc tctcttcttt
361 ccgtctgccc tctgggtgaa gaattgtgtt ctaaaccaga ctgggaacta gcgagtcctc
421 ttgttggaac gtgtaggcct gccggctccc ccagtatca tcaaggacat ggggtgggagc
481 cagccagggg aaacttcagat cagctgggag gagctagctc cagaaatcag tgatttctg
541 aggtacgaac tccgtatgg ccacagagat ccaagaact ccactggccc cacggtcata
601 cagctgattg ccacagaaac ctgctgccct gctctgcaga ggcctcactc agcctctgct
661 ctggaccagt ctccatgtgc tcagcccaca atgcctggc aagatggacc aaagcagacc
721 tccccagta gagaagcttc agctctgaca gcagagggtg gaagctgcct catctcagga
781 ctccagcctg gcaactccta ctggctgcag ctgcccagcg aaactgatgg gatctcctc
841 ggtggctcct ggggatactg gtccctcctt gtgactgtgg acctgctgg agatgcagtg
901 gcacttggac tgcaatgctt taccttgga ctgaagaatg ttacctgta atggcagcaa
961 caggaccctg ctagctccc aggttcttc tcccacagca gggcacgggt ctgccccaga
1021 gacaggtacc caatctggga gaactgcgaa gaggaaagaa aaacaaatcc aggaatacag
1081 accccacagt tctctgctg caacttcaag tcaggaatg acagcattac tcacatctt
1141 gtggaggtga ccacagcccc gggtactgtt cacagctacc tgggctcccc tttctggctc

```

[0393]

```

1201 caccaggetg tgegcctccc ccccccaaac ttgcactgga gggagatctc cagtgggcat
1261 ctggaattgg agtgggagca cccatcgctc tgggcagccc aagagacctg ttatcaactc
1321 cgatacacag gagaaggcca tcaggactgg aagggtgctg agccgcctct cggggccnga
1381 ggaggggacc tggagctgcg cccgcgatct cgtaccggtt tacagctgcg cgcagggctc
1441 aacggcccca cctaccaagg tccctggagg tctgtggtcg acccaactag ggtggagacc
1501 gccacccaga ccgcctggat ctccctgggt accgctctgc atctagtgcg gggcctcagc
1561 gccgtcctgg gcctgctgct gctgagggtg cagtttcttg cactctacag gagactgagg
1621 catgccttgt ggcctcact tccagacctg caccgggtcc taggcagta ccttagggac
1681 actgcagccc tgagcccgcc caaggccaca gtctcagata cctgtgaaga agtggaaacc
1741 agcctccttg aaatcctccc caagtcctca gagaggactc ctttgccccc gtgttctctc
1801 caggccccaga tggactaccc aagattgcag ccttcttgcc tggggaccat gccctgtctt
1861 gtgtgccccc ccatggctga gtcagggtcc tgetgtacca cccacattgc caaccattcc
1921 tacctaccac taagctattg gcagcagcct tgaggacagg ctctcactc ccagttcctt
1981 ggacagagct aaactctcga gacttctctg tgaacttccc taccctacc ccacaacaca
2041 agcaccccag acctcaccct catcccccct tgtctgcctt cacaattagg cttcatttgc
2101 ctgatcttac tctactgctg ctgacataaa accaggaccc ttctccaca ggcaggctca
2161 tttaactaag ctctcctttt actttctctc tctcttttga tgtcaaacgc cttgaaaaca
2221 agcctccact tcccacact tcccatttac tcttgagact acttcaatta gtlcccttac
2281 tacactttgc tagtgaaact gccaggccaa agtgccacct aaatcttcta attccaagat
2341 ccaataggat ctggttaact atcagttcct ttgatctcgc tgaagattt gtcaaggctg
2401 actaactcact tctcctttta attctttcct accttggtcc tgcctctttg agtatattag
2461 taggtttttt ttatttggtt gagacagggt ctactctgt caccaggtc gcagtgcatt
2521 ggogcgatct cagctcactg caacctccac ctccgggttc aagcgattct tgtgcctcgg
2581 cctccctagt agctgggatt acagggcacc acccccacac acagctaatt tttttttttt
2641 tttttttttt tttttcttag acggagcctt gctctgttgc cagactggag tgcagtggca
2701 cgatctgggc tcaactgcaac ctctgcctcc cgggttcaag ccattctgac tcagcctccc
2761 aagtagctgg gagtacaggc gtcctgcaac atgcctaatt tttttctatt tttaggagag
2821 accggttttc accacgttgg ccaggatggt ctcgatatcc tgatctctgt atccgcctgc
2881 ctctgcctcc caaagtgtcg ggattacagg tgtgacccac tgcgcacagc cccagctaat
2941 tttaatatatt ttagtagaga cagggttttg ccattgttgc caggctggtc ttgaactcct
3001 aacctcgggt gatccaccca ccttggcctc ccaagtggtt aggattacag gcattgagcca
3061 ctgcgcctgg ctgagtgtac tagtagttaa ggaataaac tagatctaga atcagagctg
3121 gattcaattc ctgtccttca catctactag ctgtgcaacc ttgggcacat aacttaattg
3181 ctttgagcct tagttttttc atctgtaaaa cagggtataat aacagcacc ctagaggttg
3241 tgaacaggat tgagataatc taagtaaacg acagtcccta ggacatagta aatgattcac
3301 atatccgaac tactgttata attattcctt ctactctccc tcttctagca ttctctccaa
3361 ctattacagt cttcaagat tccatttctt aacagctctc aaleccattc attctctgca
3421 tttaotatat gttgaccatt ccaagttctt tatctctagc tcagacatct actacagcac
3481 tgtgatgctt tatgcaacta actgtttaca tatctgtccc ctgctaactg attgtgagct
3541 ccttgaggga aaggaaactg atttatttgt ccttttcccc cagcacctag agtagtgctt
3601 ggtgcattgat agtaggcctt caataaattt ttctaaatg aatga

```

[0394] (SEQ ID NO:8) NP_005364促血小板生成素受体前体[智人]

[0395]

```

1 mpswalfmvt scillapqnl aqvssqdvsl lasdseplkc fstrtfeditc fwdaseaaaps
61 gtyqillyayp rekprapcle sqamphfgtr yvcqfpdgee vriffplhlw vknvflngtr
121 tqrviifvdsy qipappsilik amggagpgel qlsweepape isdflyeair yqprdpknst
181 gptviqliat etccpalqrp hsaasaldqsp caqptmpwqd gpkqtsapere asaltasaggs
241 cliaglgpgn sywlglrsep dgislggswwy swslpvtvdl pgdavalglq cftldlkavt
301 cqwwqqqdhss eqgffyhsra rccprdrypi wenceeeekt npglqtpqfs rchfkxrnds
361 lihilvevtt apgtvhsylg spfwihqavr lptpnlhwre isaghlelew qhpsswaage
421 tcyqlrytge qhqdwkvlep plgarggtle lrprsrlyrlq lrarlngpty qgpwseswsp
481 trvetateta wislvthalhl vlglsavlgf lllrwqfpah yrrlrhalwp slpdlhrvlg
541 qylrdaals ppkatvsdte eevepsallei lpkesertpl plcsaqaamd yrrlqpsclg
601 tnxplsvcpmm aessgcctth laahsylvle ywqgqp

```

[0396] (SEQ ID NO:9) NM_004343 智人钙网蛋白 (CALR), mRNA

[0397]

```

1 ggggagtcgg tccgtactgc agagccgctg ccggagggtc gttttaaagg gcccgccggt
61 tggcgccccc tgggcacgcc atgatgctat ccgtgcctgt gctgcteggc ctctctggcc
121 tggccgtcgc cgagcctgcc gtctacttca aggagcagtt tctggacgga gacgggtgga
181 ctcccgctg gatcgaaatc aaacacaagt cagatttttg caaatctgtt ctcagttcgg
241 gcaagttcta cgggtgacgag gagaaagata aaggtttgca gacaagccag gatgcaagct
301 tttatgctct gtgggcaggt ttccagacct tcagcaacaa aggcacagac ctggtggtgc
361 agttcacggg gaaacatgag cagaacatcg actgtggggg cggctatgtg aagctgtttc
421 ctaatatgtt ggaccagaca gacatgcacg gagactcaga atacaacatc atgtttggtc
481 ccgacatctg tggccctggc accaagaagg ttcatgtcat ctccaactac aagggcaaga
541 acgtgctgat caacaaggac atccgttgca aggatgatga gtttacacac ctgtacacac
601 tgattgtgog gccagacaaac acctatgagg tgaagattga caacagccag gtggagtcog
661 gctccttgga agacgattgg gacttccctg cccccagaa gataaaggat cctgatgctt
721 caaaaccgga agactgggat gagcggggca agatcgatga tcccacagac tccaaagctg
781 aggactggga caagcccgag catatccctg accctgatgc taagaagccc gaggactggg
841 atgaagagat ggacggagag tgggaacccc cagtgatcca gaaccccgag tacaagggtg
901 agtggaaagc ccggcagatc gacaacccc attacaaggg cacttggtac caccacagaa
961 ttgacaaccc cgagtattct ccgcatccca gtatctatgc ctatgataac tttyggcgtg
1021 tgggcctgga cctctggcag gtcaagtcct gcaaccatct tgacaacttc ctcatcaca
1081 acgatgagga atacgctgag gactttggca acgagacgtg gggcgttaac aaggcagcag
1141 agaaacaaat gaaggacaaa caggacgagg agcagaggct taaggaggag gaagaagaca
1201 agaaacgcaa agaggaggag gaggcagagg accaggagga tgatgaggac aaagatgagg
1261 atgaggagga tgaggaggac aaggaggaaag atgaggagga agatgtccc gcccaggcca
1321 aggacgagct gtagagagga ctgcctccag ggcctggact aggcctgagc gctcctgcog
1381 cagagctggc ccgcgcaaat aatgtctctg tgagactcga gaactttcat ttttttccag
1441 gctggttcgg atttgggggt gatatttggt ttgttccctt cctccactct ccccccccc
1501 ctccccgccc tttttttttt ttttttttaa actggtatatt tatctttgat tctccttcag
1561 cctccacccc tggttctcat ctttcttgat caacatcttt tcttgccctt gtccccttct
1621 ctcatctctt agctccctct caacctgggg ggcagtggtg tggagaagcc acaggcctga
1681 gatttctatct gctctccttc ctggagccca gaggaggcca gcagaagggg gtggtgtctc
1741 caacccccca gcactgagga agaaaggggc tcttctcatt tcacccctcc ctltctcccc
1801 tgcctcccag actgggcccac ttctgggtgg ggcagtggtt ccagattgg ctccactga
1861 gaatgtaaga actacaaaca aaatttctat taaattaaat tttgtgtctc caaaaaaaaa
1921 aaaaaaaaaa

```

[0398] (SEQ ID NO:10) NP_004334 钙网蛋白前体[智人]

[0399]

```

1  mllsvplllg llglavaepa vyfkeqfldg dgwtarwies khksdfgkfv lssgkfygde
61  ekdkqlqtasq darfyalsas fepfsnkqqt lvvqftvkne qnldcgggyv klfpasldgt
121 dmhgdsseynt mfgpdicqpg tkkvhvlfny kgkavlinkd lrcckddefth lytlivrdna
181 tyevkidnsq vesgsleddw dflppkkikd pdaskpedwd erakiddptd skpedwdkpe
241 hipdpdakkp edwdeemdge weppviqape ykgewkprqi dnpdykgtwi hpeidnpeys
301 pdpsiyaydn fgvgldldwq vksgtlfdnf litndeayae efgnetwgvv kaaekqmkdk
361 qdeeqrlkne eedkkkrkee eadkedded kdedeedeed keedeedvvp gqakdel

```

[0400] (SEQ ID NO:11)NM 001 164603智人额外性别梳子样转录调控物1 (ASXL1), 转录变体2, mRNA

[0401]

```

1  caccaccacg gcagacacgc acgcaccccg ggcgcgaagg gaasgcgcgg tctcgccctc
61  cgcgcccgcc gtccgtctctg tctcagtcoc tcagcagagc gggaaagcgg aggcgcggagc
121 cgtgaacctt gaccocgtgg ttatgcggag ccgcgcgcat ccttagcgat cgcggggcag
181 cgcgcgctgc cgcgcgtggc gactgacgca ggcgcggcgc gtggagccgc cgcgcgcctt
241 cccccacgcg cgtctctcgc ccagcgcgtc ccgcgcgtgc cgcgccttct cccgcgcgcg
301 acccgagacg tcgcgcgcgc ccgcgcgcgc ggcgcgcgcg cgcgcgcgcg gcgcgcgcag
361 cccgcgcgcg ccgcgcgcgc ccgcgcgcgc cgcgcgcgcg gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc
421 ccggggagaa gcatgaagga caaacagaag aagaagaagg agcgcacgtg gcgcgcgcgc
481 gcgcgccttg tattagaaaa ctactcggat gctccaatga caccaaaaca gattctgcag
541 gtcatagagg cagaaggact aaaggaaatg agaagtggga ctcccccctc cgcgcgcctc
601 aatgcctatg tacattccaa ttcaagagga ggagaggggt tgttttataa actgcctggc
661 cgaatcagcc ttctcacgct caagggtgta gccactgcac caggccccct catcttaatt
721 ttaatatatc ttgaaataaa caccattgta tgaacctgct gtaagcttgg gagtggctcg
781 ttagctctac gcttgtgtct gagatgtgct aattgaatat ttgctcagta cctcatctta
841 actgcctttg gctttatggt gcttatcctt catagtatct tgttcattgg ccttttacat
901 ccataggcat cactctctcg atattcgttg tgcctcttta atggattaat ggtttgcttg
961 gtfggttcct ctagttagac tgtaaactcc ttgagagcag agctctgatt ttattaatta
1021 cccacagtac taggtacata gttgccttca ataaatatat atttaatgaa aaaaaaaaaa
1081 aaaa

```

[0402] (SEQ ID NO:12)NP 001158075推定的多梳家族蛋白ASXL1同种型2[智人]

[0403]

```

1  mkdkqkkkke rtwaesarl v lenysdpm t pkqilqvlea eglkemrsgt splaclnaml
61  hnsrsggeql fyklpgrisl ftlkv

```

[0404] (SEQ ID NO:13)NM_001203247智人zeste的增强子同源物2 (果蝇) (EZH2), 转录变体3, mRNA

[0405]

```
1  ggccggcgctt gattgggctg ggggggccc aaataaagcga tggcgattgg gctgcccgcg
61  ttggcgctcg gtcgggtcgc gtcggacacc cggctgggact cagaaggcag tggagccccc
121  gggggggcgg cggcggcgcg cggggggcga cgcggggaac aacgcgagtc ggcgcggggg
181  acgaagaata atcatgggac agactgggaa gaattctgag aagggaaccg ttgtgtggcg
241  gaagcgtgta aatcagagt acatgcgact gagacagctc aagaggttca gacgagctga
301  tgaagttaag agtatgttta gttccaatcg tcagaaaatt ttggaaagaa cggaaatcct
361  aaaccaagaa tggaaacagc gaaggatata gcctgtgcac atcctgactt ctgtgagctc
421  attgcgcggg actagggagt gttcgggtga cagtgaactt gatattccaa cacaagtcac
481  cccattaaag actctgaatg cagttgcttc agtaccata atgtattctt ggctccctct
541  acagcagaat ttatgggtgg aagatgaaac tgttttacat aacattcctt atatgggaga
601  tgaagtttta gatcaggatg gtactttcat tgaagaacta ataaaaaatt atgatgggaa
661  agtacacggg gatagagaat gtgggtttat aatgatgaa atttttgtgg agttggtgaa
721  tgcccttggc caatataatg atgatgacga tgatgatgat ggagacgato ctgaagaag
781  agaagaaaag cagaagatc tggaggatca cagagatgat aagaaaagcc gcccaacctc
841  gaaatttctt tctgataaaa tttttgaagc catttctcca atgtttccag ataagggcac
901  agcagaagaa cttaaggaaa aatataaaga acacaccgaa cagcagctcc caggcgacat
961  tccctctgaa tgtaccacca acatagatgg accaatgct aaatctgttc agagagagca
1021  aagcttacac tcttttcata cgtttttctg taggcgatgt tttaaatatg actgcttctt
1081  acatcctttt catgcaaac ccaacactta taagcggaag aacacagaaa cagctctaga
1141  caacaaacct tgtggaccac agtggtacca gcatttggag ggagcaagg agtttgcctc
1201  tctctcaac gctgagcgga taagaccacc accaaaacgt ccaggaggcc gcagaagagg
1261  acggcttccc aataacagta gcaggcccag cccccccc attaatgtgc tggaatcaaa
1321  ggatacagac agtgataggg aagcagggac tgaacgggg ggagageaca atgataaaga

1381  agaagaagag aagaaagatg aaacttcagc ctctctgaa gcaaatctc ggtgtcaaac
1441  accaataaag atgaagccaa atattgaacc tctgagaat gtggagtgga gtggtgctga
1501  agcctcaatg tttagagtc ccatgggac ttactatgac aatttctgtg ccattgctag
1561  gtttaattggg accaaaacat gttagacaggt gtatgagttt agagtcaaag aatctagcat
1621  catagctcca gctcccgctg agcatgtgga tactctcca aggaaaaaa agaggaaaca
1681  ccggtttgtg gctgcacact gcagaaagat acagctgaaa aaggacggct cctctaacca
1741  tgtttacaa latcaacct gtgatcatcc acggcagcct tgtgacagth cgtgccttg
1801  tgtgatagca caaaattttt gtgaaaagtt ttgtcaatgt agttcagagt glcaaaaacc
1861  etttccggga tgcgcgtgca aagcacagtg caacaccaag cagtgcctgt gtaactggc
1921  tgtccgagag tgtgacctg acctctgtct tacttgtgga gcgcctgacc attgggacag
1981  taaaaatgtg tctgcaaga actgcagtat tcagggggc tcaaaaaagc atctattgct
2041  ggcaccatct gacgtggcag gctgggggat ttttatcaa gatcctgtgc agaaaaatga
2101  attcatctca gaatactgtg gagagattat ttctcaagat gaagctgaca gaagaaggaa
2161  agtgtatgat aaatacatgt gcagctttct gttcaacttg acaatgatt ttgtggtgga
2221  tgcaaacccg cagggttaaca aaattcgttt tgcaaatcat tcggtaaatc caactgcta
2281  tgcaaaagtt atgatggtta accgtgatca caggataggt atttttgcca agagagcact
2341  ccagactggc gaagagctgt tttttgatta cagatacagc caggctgatg cctgaagta
2401  tgtcggcatc gaaagagaaa tggaaatcc ttgacatctg ctactctctc cccctctctc
2461  tgaaacagct gccttagctt caggaaacct gagtactgtg ggcaatttag aaaaagaaca
2521  tgcagcttga aattctgaat ttgcaaaagta ctgtaagaat aatttatagt aatgagttta
2581  aaaaatcaact ttttattgca ttctcaccag ctgcaaaagt ttttgtacca gtgaattttt
2641  gcaataatgc agtatggtaa atttttcaac ttgaaataaa gaatacttga aactgtctt
2701  gttgaatc
```

[0406] (SEQ ID NO:14) NP_001190176组蛋白赖氨酸N-甲基转移酶EZH2同种型c[智人]

```
1 mggtgkksek gpvcwkrvk seymalrqlk zfradevks mfsnrqkil ertellnqew
61 kqrriqpvhi ltavsslrqt recavtsdld fptqvipikt lnavaavpim yawsplqgnf
121 mvedetvlbn ipymgdevld qdgtfleeli knydgkvhgd recgflndei fvelvnlqg
181 ynddddddgd ddpseereekq kdledhrddk esrpprkfps dkifeaism fpdkgtasel
241 kekykelteq qipgalppep tpaiddgnak svqregslhs fntlforrcf kydcflhpfn
301 atpatykrka letaldakpc gpqcyqhleg akefaaalta eriktpkhrp ggrrrglrpn
361 nsrpsatpti nvleskdids dreagtetgg enndkeeeek kdetssassea nsrsgtpikm
421 kpnleppesv ewsgaeasmf rvligttydn fcailrligt ktrqvyefr vkessliapa
481 paedvdtppr kkkrrkhrwa aherkiqlkk dgssnhvyny qpodhprqpc dsacpcvialq
541 nfcekfocgs secqnrffgc rckaquentkq cpoylavrec dpdlcltoga adhwdsknvs
601 ckncsiqrqs kkhlllapad vagwgifikd pvqknefise ycgellsqde adrrgkvdyk
661 ymcslflnln ndfvvdatrk gnkirfanhs vnpncyakvm mvngdhrigl fakraigtge
721 elffdyrysq adalkyvgie remelp
```

[0407] (SEQ ID NO:15) NM_001195427 智人富丝氨酸/精氨酸剪接因子2 (SRSF2), 转录变体2, mRNA

[0408]

```
1 agaaggtttc atttcggggt ggcgcggggc coattctgtg aggagcgata taaacgggcg
61 cagaggccgg ctgcccgcgc agtcgttact cagggtgcgt agcctgcgga gcccgctcgt
121 gctgttctgc ggcaaggcct ttcctcagtg cccacgcgg aaggcaactg cctgagaggg
181 gcggcgctgc accgcccaga gctgagggaag cggcgccag ttgcgggggc tccggggcgc
241 cactcagagc tatgagctac ggcgcgcgc ctcccgatgt ggagggtatg acctccctca
301 aggtggacaa cctgacctac cgcacctgc cogacacgt gaggcgcgtc ttcgagaagt
361 acggcgcggt cggcgacgtg taactccgc gggaccgcta caccaaggag tcccgcggt
421 tcgcttctgt tgccttctac gacacgcgg acgctgagga cgttatgga gccatggacg
481 gggcgctgct ggacggcggc gagctgcggg tgcacatggc gcgctacggc cgcctcccg
541 actcacacca cagcgcgcgg ggcgcgcgc ccgcaggtg cggggcgggk ggcctacggc
601 gcgggagcgc cagcctcagg cggcgctgc gcagcgcgt cgggagtcg agcgcctcga
661 ggtctcgcag cgcctcgcgc taccgcgcgt cgaagtcctg gtcccgcaat cgttctcgt
721 ctgggtcgac ctccagctc agatccgcgc gaaggtccaa gtccagctc tctctggctc
781 ccagatctcg ttgcgggtcc aggtcccggt ctccggtcag ggtcctccc ccaggtccca
841 agagggaatc caaatccagg tgcgcgcgc agagtcctcc caagtcctcc gaagagggaag
901 gagcggtgtc ctcttaagaa aatgatgtat cggcaagcag tctaaacgga ggacttgggg
961 aaaaaggacc acatagtcga tgcagaaga gtccttggaa caagcaactg gctattgaaa
1021 aggttatctt gtaacatttg tctaaccttt tacttcttta agctttgcct cagttggcaa
1081 acttcatttt atgtgocatt ttgttgcgtt cattcaaat tcttgtaatt tagtgagggt
1141 aacgacttca gatttcatta ttggatttgg atatttgagg taaaatttca ttttgttata
1201 tagtgcctga ttttttctgt tgaatttaa cagattggtt acctaatctg tggcctcctg
1261 acttttaagg aaaaagtggt cagcatttac acacagcta agctgtcga gagattgact
1321 cggcattgca ttcattcctt aaaaattaaa acctacaaa gttggtgtaa atttgtatat
1381 gttatttacc ttcagatcta aatygtaatc tgaacccaaa ttgtataaaa gactttttag
1441 gtgaacagac ttgatttttt gaaggatttg tttatcaaac acaattctaa tctctctctc
1501 tatgtatttt tgtgcactag ggcagttgt gtagcagttg agtaatgctg gttagctgtt
1561 aaggtggcgt gttgcagtcg agagtccttg gctgttctct gtttctctcc gattgctctc
1621 gtgtaaagat gccttgctgt gcagaacaaa atggctgtcc agtttattaa aatgcctgac
1681 aactgcactt ccagtcaccc gggccttgcg tataataaac ggagcatata gtyagacatc
1741 ctagctgatg ataaatacac ctttttttcc ctcttccccc taaaaatggg aatatctgatc
1801 atatctacat gtatgaactt aacatggaaa atgttaagga agcaaatggg tgtaaacttg
1861 taagtaacta taacatgggt tatctttttg ctlatgaata tctctgtatta taaccattgt
1921 tctgtagctt taattaaaac atttctcttg tgctagcttt tctcagaaa aaaaaaaaaa
1981 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

[0409] (SEQ ID NO:16) NP_001_182356 富丝氨酸/精氨酸剪接因子2 [智人]

[0410]

```
1 msygrpppdr egmtslkvdn ltyrtspdtl rrvfkyqrv gdvyiprdry tkearqfafv
61 rfhdkrdaed amdanadgavl dgralrvqna rygrppdshh srsgppprcy ggggygrsr
121 sprrrrrrrr rrrrrrrrrr rrrrrrrrrr rrrrrrrrrr rrrrrrrrrr rrrrrrrrrr
181 rrrrrrrrrr rrrrrrrrrr rrrrrrrrrr rrrrrrrrrr rrrrrrrrrr rrrrrrrrrr
```

[0411] (SEQ ID NO:17) NM_005896智人异柠檬酸脱氢酶1 (NADP+),可溶型 (IDH1),转录变体1,mRNA

[0412]

```
1 gggctgagga ggcgggggcct gggagggggac aaagccggga agaggaaaag ctgggaccta
```

[0413]

```
61 ccctgtgggc cggggtttct gcagagtcta cttcagaagg ggaggcactg ggagtcoggt
121 ttgggattgc caggctgtgg ttgtgagctt gagcttgtga gcggctgtgg cggcccaact
181 ctctggccagc atatcatccc ggcaggcgat aaactacatt cagttgagtc tgcaggactg
241 ggaggaaact gggtgataag aaatctatto actgtcaagg tttattgaag tcaaaatgtc
301 caaaaaaatc agtggcggtt ctgtggtaga gatgcaagg gattgaatga cagcaatcat
361 ttgggaattg attaaagaga aactcatttt tccctacgtg gaattggatc tacatagcta
421 tgattttaggc atagagaatc gtgatgcac caagaccaa gtcaccaagg atgctgcaga
481 agctataaag aagcataatg ttggcgctca atgtgcact atcaactctg atgagaagag
541 ggttgaggag ttcaagttga acaaatgtg gaaatcaca aatggcaca taagaaatat
601 tctgggtggc acgggtcttc gagaagccat tatctgcaa aatatcccc gccttqbtgag
661 tggatgggtt aaacctatca tcataggtcg tcatgcttat ggggatcaat acagagcaac
721 tgatttttgt gttcctgggc ctggaaaagt agagataacc tacacacca gtgacgggac
781 caaaaagggt acataacctg tacataactt tgaagaagg ggtgggtgtt ccattgggat
841 gtataatcaa gataagtcaa ttgaagattt tgcacacagt tcttccaaa tggctctgtc
901 taagggttgg cttttgtatc tgagcaccac aaacactatt ctgaagaaat atgtggggcg
961 ttttaagagc atctttcagg agatatatga caagcagtac aagtcccaat ttgaagctca
1021 aaagatctgg tatgagcata ggtcatcaga cagcatgggt gcccaagata tgaatcaga
1081 gggaggcttc atctgggcct gtaaaaacta tgatgggtgac gtgcagtcgg actctgtggc
1141 ccaagggtat ggtctctctg gcatgatgac cagcgtgctg gtttgtccag atggcaggac
1201 agtagaagca gaggtgtccc acgggactgt aaccgtcac tacgcctgt accagaaagg
1261 acaggagacg tccaccaatc ccatctgttc catttttgc tggaccagag ggttagccca
1321 cagagcaagg cttgataaca ataaagagct tgccttcttt gcaaatgtct tggagaaggt
1381 ctctatttgg acaattgagg ctggcttcat gcccaaggac ttggctgctt gcattaaagg
1441 tttaacccat gtgcaacgtt ctgactactt gaatacattt gagttcatgg ataaacttgg
1501 agaaaaactg aagatcaaac tagctcagga caaactttaa gttcatacct gagotsagaa
1561 ggataattgt cttttggtaa ctagggtctac aggtttacat tttttgtgtc tacactcaag
1621 gataaaggca aaatcaattt tgaatttgt ttagaagcca gagtttatct tttctataag
1681 tttaacagct ttttcttata tatacagtta ttgtcaactt tgtgaacatg gcaagggaat
1741 tttttacaa ttttatttta ttttctagta ccagcctagg aattcggtta gtaactcattt
1801 gtattcaact tcaacttttc tcatgttcta attataaatg accaaaatca agattgctca
1861 aaagggtaaa tgatagccac agtattgtct cctaaaatat gcataaagta gaaattcaat
1921 gccttccctc cctgtccatg accttgggca cagggaagtt ctgggtgtcat agatatcccg
1981 ttttgtgagg tagagctgtg cattaaactt gcacatgact ggaacgaagt atgagtgcac
2041 ctcaaatgtg ttgaagatac tgcagtcatt ttgtgaaaga ctttgcctga tgtttccaat
2101 agaataaata ctgtttagga cgcaggagag ttggaatcc ggaataaata ctactggag
2161 gtttgtcttc tccatttttc tcttctctct cctggcctgg cctgaatatt atactctct
2221 aaatagcata tttcatccaa gtgcaataat gtaagctgaa tcttttttgg acttctgtgt
2281 gcctgtttta tttcttttat ataaatgtga tttctcagaa attgatatta aacactatct
2341 tatcttctcc tgaactgttg attttaatta aaattaagtg cttaattacca ttaaaaaaaa
2401 aa
```

[0414] (SEQ ID NO:18) NP_005887异柠檬酸脱氢酶[NADP]细胞质型[智人]

[0415]

```
1 mskkisggsv vemqgdemtr liwelikekl ifpyveldih sydlgienrd atndqvtkda
61 asaikkhnvg vkcatitpde krveefklkq mwkspnqtir nilggtvfre ailekniprl
121 vsgwvkipli grhaygdqyr atdfvvpqpg kveitytpsd gtqkvtylvh nfeegggvam
181 gmyngqksie dfahssfgma lskgwplyls tkntilkkyd grfkdfiqei ydkqykgqfs
241 agkliwyehrl iddmvqgamk saggfiwack nydgdvqsda vaqgygslqm mtaavlvcpgd
301 ktveaaaahg tvtrhyrmyq kggetstnpi asifawtrgi ahrakldnnk elaffanaie
361 evsietieag fmkdlaaci kglpnvqrsd ylntfefmdk lgenikikla qakl
```

[0416] (SEQ ID NO:19) NM_G01289910 智人异柠檬酸脱氢酶2 (NADP+) 线粒体型 (IDH2), 转录变体2,

[0417] mRNA

[0418]

```
1 attttgcaac gccataggct tccagsgact gctgggtgatg tttctgatgc cgacaaaagg
61 atcaagggtgg cgaagcccggt ggtggagatg gatgggtgatg agatgacccg tattatctgg
121 cagttcatca aggagaagct catcctgccc cagctggaca tccagctaaa gtattttgac
181 ctccgggctcc caaacccgtga ccagactgat gaccagggtca ccattgactc tgcactggcc
241 acccagaagt acagtgtggc tgtcaagtgt gccacocatc cccctgatga ggcctgtgtg
301 gaagagttca agctgaagaa gatgtggaaa agtcccaatg gaactatccg gaacatcctg
361 ggggggactg tcttcgggga gccatcactc tgcaaaaaca tcccacgctt agtccctggc
421 tggaccaagc ccatcaccat tggcaggcac gcccatggcg accagtacaa ggcacacagc
481 tttgtggcag accgggcccg cactttcaaa atgggtcttc ccccaaaaag tggcagtggt
541 gtcaaggagt gggaagtgtc caacttcccc gcaggcggcg tgggcatggg catgtacaac
601 accgacgagt ccatctcagg ttttgccgac agctgcttcc agtatgccat ccagaagaaa
661 tggccgctgt acatgagcac caagaacacc atactgaaag cctacgatgg gcgtttcaag
721 gacatcttcc aggagatctt tgacaagcac tataagaccg acttcgacaa gaataagatc
781 tgggtatgagc accggctcat tgatgacatg gtggctcagg tctcgaagtc ttccgggtggc
841 tttgtgtggg cctgcaagaa ctatgacgga gatgtgcagt cagacatctt ggcccagggg
901 tttggctccc ttggcctgat gacgtccgtc ctgggtctgc ctgatgggaa gacgatttag
961 gctgaggccg ctcatgggac cgtcacccgc cactatcggt agcaccagaa ggcccgcccc
1021 accagcacca accccctcgc cagcatcttt gcttggaacac gtggccctgga gcaccggggg
1081 aaagctggatg ggaaccaaga cctcatcagg tttgcccaga tgctggagaa ggtgtgcgtg
1141 gagacggtgg agagtggagc catgaccaag gacctggcgg gctgcattca cggcctcagc
1201 aatgtgaagc tgaacgagca ctctctgaac accacggact tcttcgacac catcaagagc
1261 aacctggaca gagccctggg caggcagtag ggggagggcg caccatggc tgcagtggag
1321 gggccagggc tgagcggcg ggtctctctg agcgcgagc aggggtgagc tcacagcccc
1381 tctctggagg cctttctagg ggatgttttt ttataagcca gatgttttta aaagcatatg
1441 tgtgttttcc ctcatgggtg cgtgaggcag gacgagtgcg ttttacctca gccagtcagt
1501 atgtttttga tactgttaatt tataattgcc ttggaacaca tgggtgccata tttagctact
1561 aaaaagctct tcacaaa
```

[0419] (SEQ ID NO:20) NP_001276839 异柠檬酸脱氢酶 [NADP], 线粒体同种型2 [智人]

[0420]

```
1 mdgdemtrli wqfikeklil phvdiglkyl dglpnrdgt ddqvtidsal atqkysvavk
61 catitpdear veefklkkmw kspngtirni lggtvfrepi leknlprlvp gwtkpitigr
121 hahgdqykat dfvadragtf kmvftpkdgs gvkewevynf paggvvmgmy ntdeisagfa
181 hacfqyalqk kwplymstkn tilkaydgrf kdifgeifdk hyktddfdknk lwyehrlidd
241 mvaqvlkseg gfvwacknyd gdvgdilaq gfgslgmts vlvcpdgkti eaaahgtvt
301 zhyrehqkgr ptstapiasi fawtrglehr ghldngqdli rfagmlekvc vetvesgamt
361 kdlaagcinqi envkinehfi nttofidtik enldraigrq
```

序列表

<110> 普罗麦迪奥股份有限公司

<120> 治疗骨髓增生性障碍的方法

<130> 104112-0023-W01

<150> 62/218,869

<151> 2015-09-15

<150> 62/148,005

<151> 2015-04-15

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 204

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

```

	180		185		190
Arg Gly Tyr Val Ile Ile Lys Pro Leu Val Trp Val					
	195		200		
<210> 2					
<211> 208					
<212> PRT					
<213> Gallus gallus					
<400> 2					
Gln Glu Asp Leu Tyr Arg Lys Val Phe Val Phe Arg Glu Asp Pro Ser					
1	5		10		15
Asp Ala Tyr Val Leu Leu Gln Val Gln Leu Glu Arg Pro Leu Leu Asn					
	20		25		30
Phe Thr Val Cys Leu Arg Ser Tyr Thr Asp Leu Thr Arg Pro His Ser					
	35		40		45
Leu Phe Ser Tyr Ala Thr Lys Ala Gln Asp Asn Glu Ile Leu Leu Phe					
	50		55		60
Lys Pro Lys Pro Gly Glu Tyr Arg Phe Tyr Val Gly Gly Lys Tyr Val					
65	70		75		80
Thr Phe Arg Val Pro Glu Asn Arg Gly Glu Trp Glu His Val Cys Ala					
	85		90		95
Ser Trp Glu Ser Gly Ser Gly Ile Ala Glu Phe Trp Leu Asn Gly Arg					
	100		105		110
Pro Trp Pro Arg Lys Gly Leu Gln Lys Gly Tyr Glu Val Gly Asn Glu					
	115		120		125
Ala Val Val Met Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ala Tyr Gly Gly Gly Phe					
	130		135		140
Asp Val Tyr Asn Ser Phe Thr Gly Glu Met Ala Asp Val His Leu Trp					
145	150		155		160
Asp Ala Gly Leu Ser Pro Asp Lys Met Arg Ser Ala Tyr Leu Ala Leu					
	165		170		175
Arg Leu Pro Pro Ala Pro Leu Ala Trp Gly Arg Leu Arg Tyr Glu Ala					
	180		185		190
Lys Gly Asp Val Val Val Lys Pro Arg Leu Arg Glu Ala Leu Gly Ala					
	195		200		205
<210> 3					
<211> 205					
<212> PRT					
<213> Bos taurus					
<400> 3					

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

<210> 4

204 $\langle 211 \rangle$

<212> PRT

〈213〉 *Cricetulus migratorius*

 $\langle 400 \rangle$ 4

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

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

<210> 5

<211> 5284

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ctgcaggaag gagagaggaa gaggagcaga agggggcagc agcggacgcc gctaacggcc 60
 tccctcggcg ctgacaggct gggccggcgc ccggctcgct tgggtgttcg cgtcgccact 120
 tcggcttctc ggccggtcgg gcccctcggc ccgggcttgc ggcgcgcgtc ggggctgagg 180
 gctgctgcgg cgcagggaga ggcctggtcc tcgctgccga gggatgtgag tgggagctga 240
 gcccacactg gagggcccc gagggcccag cctggaggtc gttcagagcc gtgcccgtcc 300
 cggggcttcg cagacctga cccgccgggt aggagccgcc cctgcgggct cgagggcgcg 360
 ctctggtcgc ccgactgtg tagccggttt cagaagcagg caacaggaac aagatgtgaa 420
 ctgtttctct tctgcagaaa aagaggtctt tectectect cccgcgacgg caaatgttct 480
 gaaaaagact ctgcatggga atggcctgcc ttacgatgac agaaatggag ggaacatcca 540
 cctcttctat atatcagaat ggtgatattt ctggaaatgc caattctatg aagcaaatag 600
 atccagttct tcagggtgat ctttaccatt cccttgggaa atctgaggca gattatctga 660
 cctttccatc tggggagtat gttgcagaag aaatctgtat tgctgcttct aaagcttgtg 720
 gtatcacacc tgtgtatcat aatatgtttg ctttaatgag tgaaacagaa aggatctggt 780
 atccacccaa ccatgtcttc catatagatg agtcaaccag gcataatgta ctctacagaa 840
 taagatttta ctttctcgt tggatttgca gtggcagcaa cagagcctat cggcatggaa 900
 tatctcgagg tgctgaagct cctcttcttg atgactttgt catgtcttac ctctttgctc 960

```

agtggcggca tgattttgtg cacggatgga taaaagtacc tgtgactcat gaaacacagg 1020
aagaatgtct tgggatggca gtgttagata tgatgagaat agccaaagaa aacgatcaaa 1080
ccccactggc catctataac tctatcagct acaagacatt cttacaaaaa tgtattcgag 1140
caaagatcca agactatcat attttgacaa ggaagcgaat aaggtacaga tttcgcatat 1200
ttattcgaca attcagccaa tgcaaagcca ctgccagaaa cttgaaactt aagtatctta 1260
taaactctgga aactctgcag tctgccttct acacagagaa atttgaagta aaagaacctg 1320
gaagtgggcc ttcaggtgag gagatttttg caaccattat aataactgga aacggtggaa 1380
ttcagtggtc aagagggaaa cataaagaaa gtgagacact gacagaacag gatttacagt 1440
tatattgcga ttttctaat attattgatg tcagtattaa gcaagcaaac caagagggtt 1500
caaatgaaaag ccgagttgta actatccata agcaagatgg taaaaatctg gaaattgaac 1560
ttagctcatt aagggaagct ttgtctttcg tgtcattaat tgatggatat tatagattaa 1620
ctgcagatgc acatcattac ctctgtaaaag aagtagcacc tccagccgtg cttgaaaata 1680
tacaaagcaa ctgtcatggc ccaatttcga tggattttgc cattagtaaa ctgaagaaag 1740
caggtaatca gactggactg tatgtacttc gatgcagtc taaggacttt aataaatatt 1800
ttttgacttt tgctgtcgag cgagaaaatg tcattgaata taaacactgt ttgattacaa 1860
aaaatgagaa tgaagagtac aacctcagtg ggacaaagaa gaacttcagc agtcttaaag 1920
atcttttgaa ttgttaccag atggaaaactg ttcgtcaga caatataatt ttccagttta 1980
ctaaatgctg tccccaaaag ccaaaagata aatcaaacct tctagtcttc agaacgaatg 2040
gtgtttctga tgtaccaacc tcaccaacat tacagaggcc tactcatatg aaccaaattg 2100
tgtttcacaa aatcagaaat gaagatttga tatttaatga aagccttggc caaggcactt 2160
ttacaaagat ttttaaaggc gtacgaagag aagtaggaga ctacggtcaa ctgcatgaaa 2220
cagaagttct tttaaaagtt ctggataaag cacacagaaa ctattcagag tctttctttg 2280
aagcagcaag tatgatgagc aagctttctc acaagcattt ggttttaaat tatggagtat 2340
gtgtctgtgg agacgagaat attctggttc aggagtttgt aaaatttgga tcactagata 2400
catatctgaa aaagaataaa aattgtataa atatattatg gaaacttgaa gttgctaaac 2460
agttggcatg ggccatgcat tttctagaag aaaacaccct tattcatggg aatgtatgtg 2520
ccaaaaatat tctgcttatac agagaagaag acaggaagac aggaaatcct cttttcatca 2580
aacttagtga tcctggcatt agtattacag ttttgccaaa ggacattctt caggagagaa 2640
taccatgggt accacctgaa tgcattgaaa atcctaaaaa tttaaatttg gcaacagaca 2700
aatggagttt tggtaggact ttgtgggaaa tctgcagtgg aggagataaa cctctaagtg 2760
ctctggattc tcaaagaaaag ctacaatttt atgaagatag gcatcagctt cctgcacca 2820
agtgggcaga attagcaaac cttataaata attgtatgga ttatgaacca gatttcaggc 2880
cttctttcag agccatcata cgagatetta acagtttggt tactccagat tatgaactat 2940
taacagaaaa tgacatgta ccaaataatga ggataggtgc cctgggggtt tctggtgcct 3000
ttgaagaccg ggatcctaca cagtttgaag agagacattt gaaatttcta cagcaacttg 3060
gcaagggtaa ttttgggagt gtggagatgt gccggtatga ccctctacag gacaacactg 3120
gggaggtggt cgctgtaaaa aagcttcagc atagtactga agagcaccta agagactttg 3180
aaagggaaat tgaaatcctg aaatccctac agcatgacaa cattgtaaag tacaagggag 3240
tgtgctacag tgctggtcgg cgtaatctaa aattaattat ggaatattta ccatatggaa 3300

```

gtttacgaga ctatcttcaa aaacataaag aacggataga tcacataaaa cttctgcagt 3360
 acacatctca gatatgcaag ggtatggagt atcttggtag aaaaaggtat atccacaggg 3420
 atctggcaac gagaaatata ttgggtggaga acgagaacag agttaaaatt ggagattttg 3480
 ggttaaccaa agtcttgcca caagacaaag aatactataa agtaaaagaa cctggtgaaa 3540
 gtcccatatt ctgggtatgct ccagaatcac tgacagagag caagttttct gtggcctcag 3600
 atgtttggag ctttggagtg gttctgtatg aacttttcac atacattgag aagagtaaaa 3660
 gtccaccagc ggaatttatg cgtatgattg gcaatgacaa acaaggacag atgatcgtgt 3720
 tccatttgat agaacttttg aagaataatg gaagattacc aagaccagat ggatgcccgag 3780
 atgagatcta tatgatcatg acagaatgct ggaacaataa tgtaaatcaa cgccccctct 3840
 ttagggatct agctcttcga gtggatcaaa taagggataa catggctgga tgaaagaaat 3900
 gaccttcatt ctgagaccaa agtagattta cagaacaaag ttttatattt cacattgctg 3960
 tggactatta ttacatatat cattattata taaatcatga tgctagccag caaagatgtg 4020
 aaaatatctg ctcaaaactt tcaaagttaa gtaagttttt cttcatgagg ccaccagtaa 4080
 aagacattaa tgagaattcc ttagcaagga ttttgtaaga agtttcttaa acattgtcag 4140
 ttaacatcac tcttgtctgg caaaagaaaa aaaatagact ttttcaactc agctttttga 4200
 gacctgaaaa aattattatg taaattttgc aatgttaaag atgcacagaa tatgtatgta 4260
 tagtttttac cacagtggat gtataatacc ttggcatctt gtgtgatgtt ttacacacat 4320
 gagggctggg gttcattaat actgttttct aatttttcca tagttaatct ataattaatt 4380
 acttcactat acaaacaaat taagatgttc agataattga ataagtacct ttgtgtcctt 4440
 gttcatttat atcgctggcc agcattataa gcagggtgat acttttagct tgtagttcca 4500
 tgtactgtaa atatttttca cataaaggga acaaatgtct agttttattt gtataggaaa 4560
 tttccctgac cctaaataat acattttgaa atgaaacaag cttacaaaga tataatctat 4620
 tttattatgg tttcccttgt atctatttgt ggtgaatgtg ttttttaaag ggaactatct 4680
 ccaaattttt ctaagactac tatgaacagt tttcttttaa aattttgaga ttaagaatgc 4740
 caggaatatt gtcacctttt gagctgctga ctgccaataa cattcttcga tctctgggat 4800
 ttatgctcat gaactaaatt taagcttaag ccataaaata gattagattg ttttttaaaa 4860
 atggatagct cattaagaag tgcagcaggt taagaatttt ttcctaaaga ctgtatatatt 4920
 gaggggtttc agaattttgc attgcagtca tagaagagat ttatttcctt ttagagggg 4980
 aaatgaggta aataagtaaa aaagtatgct tgtaaatattt attcaagaat gccagtagaa 5040
 aattcataac gtgtatcttt aagaaaaatg agcatacatc ttaaattctt tcaattaagt 5100
 ataaggggtt gttcgttggt gtcatttggt atagtgtac tccactttag acaccatagc 5160
 taaaataaaa tatgggtgggt tttgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 5220
 tgttatttat acaaaactta aaataactgc tgttttgatt aaaaagaaaa tagtttctta 5280
 cttt 5284

<210> 6

<211> 1132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

305	310	315	320
Pro Asn Ile Ile Asp Val Ser Ile Lys Gln Ala Asn Gln Glu Gly Ser			
	325	330	335
Asn Glu Ser Arg Val Val Thr Ile His Lys Gln Asp Gly Lys Asn Leu			
	340	345	350
Glu Ile Glu Leu Ser Ser Leu Arg Glu Ala Leu Ser Phe Val Ser Leu			
	355	360	365
Ile Asp Gly Tyr Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Ala His His Tyr Leu Cys			
	370	375	380
Lys Glu Val Ala Pro Pro Ala Val Leu Glu Asn Ile Gln Ser Asn Cys			
385	390	395	400
His Gly Pro Ile Ser Met Asp Phe Ala Ile Ser Lys Leu Lys Lys Ala			
	405	410	415
Gly Asn Gln Thr Gly Leu Tyr Val Leu Arg Cys Ser Pro Lys Asp Phe			
	420	425	430
Asn Lys Tyr Phe Leu Thr Phe Ala Val Glu Arg Glu Asn Val Ile Glu			
	435	440	445
Tyr Lys His Cys Leu Ile Thr Lys Asn Glu Asn Glu Glu Tyr Asn Leu			
	450	455	460
Ser Gly Thr Lys Lys Asn Phe Ser Ser Leu Lys Asp Leu Leu Asn Cys			
465	470	475	480
Tyr Gln Met Glu Thr Val Arg Ser Asp Asn Ile Ile Phe Gln Phe Thr			
	485	490	495
Lys Cys Cys Pro Pro Lys Pro Lys Asp Lys Ser Asn Leu Leu Val Phe			
	500	505	510
Arg Thr Asn Gly Val Ser Asp Val Pro Thr Ser Pro Thr Leu Gln Arg			
	515	520	525
Pro Thr His Met Asn Gln Met Val Phe His Lys Ile Arg Asn Glu Asp			
	530	535	540
Leu Ile Phe Asn Glu Ser Leu Gly Gln Gly Thr Phe Thr Lys Ile Phe			
545	550	555	560
Lys Gly Val Arg Arg Glu Val Gly Asp Tyr Gly Gln Leu His Glu Thr			
	565	570	575
Glu Val Leu Leu Lys Val Leu Asp Lys Ala His Arg Asn Tyr Ser Glu			
	580	585	590
Ser Phe Phe Glu Ala Ala Ser Met Met Ser Lys Leu Ser His Lys His			
	595	600	605
Leu Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Val Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu			
610	615	620	

Val	Gln	Glu	Phe	Val	Lys	Phe	Gly	Ser	Leu	Asp	Thr	Tyr	Leu	Lys	Lys
625					630				635					640	
Asn	Lys	Asn	Cys	Ile	Asn	Ile	Leu	Trp	Lys	Leu	Glu	Val	Ala	Lys	Gln
			645						650					655	
Leu	Ala	Trp	Ala	Met	His	Phe	Leu	Glu	Glu	Asn	Thr	Leu	Ile	His	Gly
			660						665					670	
Asn	Val	Cys	Ala	Lys	Asn	Ile	Leu	Leu	Ile	Arg	Glu	Glu	Asp	Arg	Lys
			675						680					685	
Thr	Gly	Asn	Pro	Pro	Phe	Ile	Lys	Leu	Ser	Asp	Pro	Gly	Ile	Ser	Ile
			690						695					700	
Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Asp	Ile	Leu	Gln	Glu	Arg	Ile	Pro	Trp	Val	Pro
705					710					715					720
Pro	Glu	Cys	Ile	Glu	Asn	Pro	Lys	Asn	Leu	Asn	Leu	Ala	Thr	Asp	Lys
					725					730					735
Trp	Ser	Phe	Gly	Thr	Thr	Leu	Trp	Glu	Ile	Cys	Ser	Gly	Gly	Asp	Lys
			740						745					750	
Pro	Leu	Ser	Ala	Leu	Asp	Ser	Gln	Arg	Lys	Leu	Gln	Phe	Tyr	Glu	Asp
			755						760					765	
Arg	His	Gln	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Trp	Ala	Glu	Leu	Ala	Asn	Leu	Ile
			770						775					780	
Asn	Asn	Cys	Met	Asp	Tyr	Glu	Pro	Asp	Phe	Arg	Pro	Ser	Phe	Arg	Ala
785					790					795					800
Ile	Ile	Arg	Asp	Leu	Asn	Ser	Leu	Phe	Thr	Pro	Asp	Tyr	Glu	Leu	Leu
					805					810					815
Thr	Glu	Asn	Asp	Met	Leu	Pro	Asn	Met	Arg	Ile	Gly	Ala	Leu	Gly	Phe
					820					825				830	
Ser	Gly	Ala	Phe	Glu	Asp	Arg	Asp	Pro	Thr	Gln	Phe	Glu	Glu	Arg	His
			835						840					845	
Leu	Lys	Phe	Leu	Gln	Gln	Leu	Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	Gly	Ser	Val	Glu
			850						855					860	
Met	Cys	Arg	Tyr	Asp	Pro	Leu	Gln	Asp	Asn	Thr	Gly	Glu	Val	Val	Ala
865					870					875					880
Val	Lys	Lys	Leu	Gln	His	Ser	Thr	Glu	Glu	His	Leu	Arg	Asp	Phe	Glu
					885					890				895	
Arg	Glu	Ile	Glu	Ile	Leu	Lys	Ser	Leu	Gln	His	Asp	Asn	Ile	Val	Lys
					900					905				910	
Tyr	Lys	Gly	Val	Cys	Tyr	Ser	Ala	Gly	Arg	Arg	Asn	Leu	Lys	Leu	Ile
			915						920					925	
Met	Glu	Tyr	Leu	Pro	Tyr	Gly	Ser	Leu	Arg	Asp	Tyr	Leu	Gln	Lys	His

930	935	940
Lys Glu Arg Ile Asp His Ile Lys Leu Leu Gln Tyr Thr Ser Gln Ile		
945	950	955
Cys Lys Gly Met Glu Tyr Leu Gly Thr Lys Arg Tyr Ile His Arg Asp		
965	970	975
Leu Ala Thr Arg Asn Ile Leu Val Glu Asn Glu Asn Arg Val Lys Ile		
980	985	990
Gly Asp Phe Gly Leu Thr Lys Val Leu Pro Gln Asp Lys Glu Tyr Tyr		
995	1000	1005
Lys Val Lys Glu Pro Gly Glu Ser Pro Ile Phe Trp Tyr Ala Pro		
1010	1015	1020
Glu Ser Leu Thr Glu Ser Lys Phe Ser Val Ala Ser Asp Val Trp		
1025	1030	1035
Ser Phe Gly Val Val Leu Tyr Glu Leu Phe Thr Tyr Ile Glu Lys		
1040	1045	1050
Ser Lys Ser Pro Pro Ala Glu Phe Met Arg Met Ile Gly Asn Asp		
1055	1060	1065
Lys Gln Gly Gln Met Ile Val Phe His Leu Ile Glu Leu Leu Lys		
1070	1075	1080
Asn Asn Gly Arg Leu Pro Arg Pro Asp Gly Cys Pro Asp Glu Ile		
1085	1090	1095
Tyr Met Ile Met Thr Glu Cys Trp Asn Asn Asn Val Asn Gln Arg		
1100	1105	1110
Pro Ser Phe Arg Asp Leu Ala Leu Arg Val Asp Gln Ile Arg Asp		
1115	1120	1125
Asn Met Ala Gly		
1130		

<210> 7

<211> 3645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cctgaaggga ggatgggcta aggcaggcac acagtggcgg agaagatgcc ctctgggcc 60
ctcttcatgg tcacctcctg cctcctcctg gcccetcaaa acctggccca agtcagcagc 120
caagatgtct ccttgctggc atcagactca gagccctga agtgtttctc ccgaacattt 180
gaggacctca cttgcttctg ggatgaggaa gaggcagcgc ccagtgggac ataccagctg 240
ctgtatgcct acccgcggga gaagccccgt gcttgcccc tgagttccca gagcatgccc 300
cactttggaa cccgatacgt gtgccagttt ccagaccagg aggaagtgcg tctcttcttt 360
ccgctgcacc tctgggtgaa gaatgtgttc ctaaaccaga ctcggactca gcgagtcctc 420

```

tttgtggaca gtgtaggcct gccggctccc cccagtatca tcaaggccat ggggtgggagc 480
cagccagggg aacttcagat cagctgggag gagccagctc cagaaatcag tgatttcctg 540
aggtacgaac tccgctatgg ccccagagat cccaagaact ccactgggtcc cacggtcata 600
cagctgattg ccacagaaac ctgctgccct gctctgcaga ggcctcactc agcctctgct 660
ctggaccagt ctccatgtgc tcagcccaca atgccctggc aagatggacc aaagcagacc 720
tccccaahta gagaagcttc agctctgaca gcagaggggtg gaagctgcct catctcagga 780
ctccagcctg gcaactccta ctggctgcag ctgcgcagcg aacctgatgg gatctccctc 840
gggtggctcct ggggatcctg gtccctccct gtgactgtgg acctgcctgg agatgcagtg 900
gcacttggac tgcaatgctt taccttggac ctgaagaatg ttacctgtca atggcagcaa 960
caggaccatg ctagctccca aggtttcttc taccacagca gggcacgggtg ctgccccaga 1020
gacaggtacc ccatctggga gaactgcgaa gaggaagaga aaacaaatcc aggactacag 1080
accccacagt tctctcgtg ccaattcaag tcacgaaatg acagcattat tcacatcctt 1140
gtggagggtga ccacagcccc gggtaactgtt cacagctacc tgggtcctccc tttctggatc 1200
caccaggtg tgccctccc caccctaaac ttgcaactga gggagatctc cagtgggcat 1260
ctggaattgg agtggcagca cccatcgtcc tgggcagccc aagagacctg ttatcaactc 1320
cgatacacag gagaaggcca tcaggactgg aaggtgctgg agccgctctc cggggcccca 1380
ggaggggacc tggagctgcg cccgcgatct cgctaccgtt tacagctgcg cgccaggctc 1440
aacggcccca cctaccaagg tccctggagc tcgtggctcg acccaactag ggtggagacc 1500
gccaccgaga ccgcttggat ctcttgggtg accgctctgc atctagtgt gggcctcagc 1560
gccgtcctgg gctgtctgt gctgaggtgg cagtttcctg cactactacag gagactgagg 1620
catgccctgt ggccctcact tccagacctg caccgggtcc taggccagta ccttagggac 1680
actgcagccc tgagcccgcc caaggccaca gtctcagata cctgtgaaga agtggaaacc 1740
agcctccttg aaatcctccc caagtcctca gagaggactc ctttgccctc gtgttcctcc 1800
caggcccaga tggactaccg aagattgcag cttcttggcc tggggaccat gccctgtct 1860
gtgtgcccac ccatggctga gtcagggtcc tgctgtacca cccacattgc caaccattcc 1920
tacctaccac taagctattg gcagcagcct tgaggacagg ctctcactc ccagttccct 1980
ggacagagct aaactctcga gacttctctg tgaacttccc taccctaccc ccacaacaca 2040
agcaccaccag acctcacctc catccctcct tgtctgccct cacaattagg cttcattgca 2100
ctgatcttac tctactgtg ctgacataaa accaggacct tttctccaca ggcaggctca 2160
tttactaag ctctcctttt actttctctc tctcttttga tgtaaacgc cttgaaaaca 2220
agcctccact tccccacact tcccatttac tcttgagact attcaatta gttcccttac 2280
tacactttgc tagtgaaaact gccagggcaa agtgcacctc aaatcttcta attccaagat 2340
ccaataggat ctctgtaaat atcagttcct ttgatctcgc tgtaagattt gtcaaggctg 2400
actactcact tctcctttaa attctttcct accttggtec tgctcttttg agtatattag 2460
taggtttttt ttatttggtt gagacagggt ctactctgt caccaggtc gcagtgaat 2520
ggcgcgatct cagctcactg caacctccac ctccgggttc aagcgattct tgtgcctcgg 2580
cctccctagt agctgggatt acaggcgcac accaccacac acagctaatt tttttttttt 2640
tttttttttt ttttttttag acggagcctt gctctgttgc cagactggag tgcagtggca 2700
cgatctcggc tcaactgcaac ctctgcctcc cgggttcaag ccattctgcc tcagcctccc 2760

```

aagtagctgg gagtacaggc gtctgccacc atgcctaatt tttttctatt tttaggagag 2820
accggttttc accacgttgg ccaggatggg ctcgatatcc tgatctcgtg atccgcctgc 2880
ctctgcctcc caaagtgtg ggattacagg tgtgaccacac tgcgcacagc cccagctaata 2940
tttcatatatt ttagtagaga cagggttttg ccatgttgcc caggctggtc ttgaactcct 3000
aacctcgggt gatccaccca ccttggcctc ccaaagtgtt aggattacag gcatgagcca 3060
ctgcgccccg ctgagtgtac tagtagttaa gagaataaac tagatctaga atcagagctg 3120
gattcaattc ctgtccttca catttactag ctgtgcaacc ttgggcacat aacttaatgt 3180
ctttgagcct tagttttttc atctgtaaaa cagggataat aacagcacc catagagttg 3240
tgacgaggat tgagataate taagtaaagc acagtccta ggacatagta aatgattcat 3300
atatccgaac tactgttata attattcctt cttactctcc tcttctagca tttcttccaa 3360
ttattacagt ccttcaagat tccatttctt aacagtctcc aatcccatct attctctgcc 3420
tttactatat gttgaccatt ccaaagtctt tatctctage tcagacatct actacagcac 3480
tgtgatgctt tatgcaacta actgtttaca tatctgtccc ctgctactag attgtgagct 3540
ccttgaggga aaggaacatg atttatttgt ccttttcccc cagcacctag agtagtgctt 3600
ggtgcatgat agtaggcctt caataaattt tttctaaatg aatga 3645

<210> 8

<211> 635

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

Leu Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp Ser Asp Pro			
465	470	475	480
Thr Arg Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Ile Ser Leu Val Thr			
	485	490	495
Ala Leu His Leu Val Leu Gly Leu Ser Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu			
	500	505	510
Leu Arg Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg His Ala Leu			
	515	520	525
Trp Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln Tyr Leu Arg			
	530	535	540
Asp Thr Ala Ala Leu Ser Pro Pro Lys Ala Thr Val Ser Asp Thr Cys			
545	550	555	560
Glu Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys Ser Ser Glu			
	565	570	575
Arg Thr Pro Leu Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ala Gln Met Asp Tyr Arg			
	580	585	590
Arg Leu Gln Pro Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser Val Cys Pro			
	595	600	605
Pro Met Ala Glu Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile Ala Asn His			
	610	615	620
Ser Tyr Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro			
625	630	635	

<210> 9

<211> 1929

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

```

gcggcgctccg tccgtactgc agagccgctg ccggagggtc gttttaaagg gcccgcgcgt 60
tgccgcccc tggcccgcc atgtgttat ccgtgccgct gctgctcggc ctctcggcc 120
tgcccgctgc cgagcctgcc gtctacttca aggagcagtt tctggacgga gacgggtgga 180
cttcccgcgtg gatcgaatcc aaacacaagt cagattttgg caaatcggtt ctgagttccg 240
gcaagttcta cggtagcgag gagaaagata aaggtttgca gacaagccag gatgcacgct 300
tttatgctct gtcggccagt ttcgagcett tcagcaaca aggccagacg ctggtggtgc 360
agttcacggt gaaacatgag cagaacatcg actgtggggg cggtatgtg aagctgtttc 420
ctaatagttt ggaccagaca gacatgcacg gagactcaga atacaacatc atgtttggtc 480
ccgacatctg tgccctggc accaagaagg ttcatgtcat cttcaactac aagggaaga 540
acgtgctgat caacaaggac atccgttgca aggatgatga gtttacacac ctgtacacac 600
tgattgtgcg gccagacaac acctatgagg tgaagattga caacagccag gtggagtccg 660
gtcccttgga agacgattgg gacttcctgc cacccaagaa gataaaggat cctgatgctt 720

```

caaaaccgga agactgggat gagcgggcca agatcgatga tcccacagac tccaagcctg 780
 aggactggga caagcccag catatccctg accctgatgc taagaagccc gaggactggg 840
 atgaagagat ggacggagag tgggaacccc cagtgattca gaaccctgag tacaagggtg 900
 agtggaaagcc ccggcagatc gacaaccag attacaaggg cacttggatc caccagaaa 960
 ttgacaaccc cgagtattct cccgatccca gtatctatgc ctatgataac tttggcgtgc 1020
 tgggcctgga cctctggcag gtcaagtctg gcaccatctt tgacaacttc ctcatcacca 1080
 acgatgaggc atacgctgag gagtttggca acgagacgtg gggcgtaaca aaggcagcag 1140
 agaaacaaat gaaggacaaa caggacgagg agcagaggct taaggaggag gaagaagaca 1200
 agaaacgcaa agaggaggag gaggcagagg acaaggagga tgatgaggac aaagatgagg 1260
 atgaggagga tgaggaggac aaggaggaag atgaggagga agatgtcccc ggccaggcca 1320
 aggacgagct gtagagaggc ctgcctccag ggctggactg aggctgagc gctcctgccg 1380
 cagagctggc cgcgccaaat aatgtctctg tgagactcga gaactttcat ttttttccag 1440
 gctggttcgg atttggggtg gattttggtt ttgttccct cctccactct cccccaccc 1500
 ctccccgcc ttttttttt ttttttttaa actggtattt tatctttgat tctccttcag 1560
 cctcacccc tggttctcat ctttcttgat caacatcttt tcttgcctct gtecccttct 1620
 ctcatctctt agctcccctc caacctgggg ggcagtgggt tggagaagcc acaggcctga 1680
 gatttcatct gctctccttc ctggagccca gaggagggca gcagaagggg gtggtgtctc 1740
 caacccccca gcactgagga agaacggggc tcttctcatt tcaccctcc ctttctcccc 1800
 tgccccagg actggggccac ttctgggtgg ggcagtgggt ccagattgg ctacactga 1860
 gaatgtaaga actacaaaca aaatttctat taaattaaat tttgtgtctc caaaaaaaaa 1920
 aaaaaaaaa 1929

<210> 10

<211> 417

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

100	105	110
Phe Pro Asn Ser Leu Asp Gln Thr Asp Met His Gly Asp Ser Glu Tyr		
115	120	125
Asn Ile Met Phe Gly Pro Asp Ile Cys Gly Pro Gly Thr Lys Lys Val		
130	135	140
His Val Ile Phe Asn Tyr Lys Gly Lys Asn Val Leu Ile Asn Lys Asp		
145	150	155
Ile Arg Cys Lys Asp Asp Glu Phe Thr His Leu Tyr Thr Leu Ile Val		
165	170	175
Arg Pro Asp Asn Thr Tyr Glu Val Lys Ile Asp Asn Ser Gln Val Glu		
180	185	190
Ser Gly Ser Leu Glu Asp Asp Trp Asp Phe Leu Pro Pro Lys Lys Ile		
195	200	205
Lys Asp Pro Asp Ala Ser Lys Pro Glu Asp Trp Asp Glu Arg Ala Lys		
210	215	220
Ile Asp Asp Pro Thr Asp Ser Lys Pro Glu Asp Trp Asp Lys Pro Glu		
225	230	235
His Ile Pro Asp Pro Asp Ala Lys Lys Pro Glu Asp Trp Asp Glu Glu		
245	250	255
Met Asp Gly Glu Trp Glu Pro Pro Val Ile Gln Asn Pro Glu Tyr Lys		
260	265	270
Gly Glu Trp Lys Pro Arg Gln Ile Asp Asn Pro Asp Tyr Lys Gly Thr		
275	280	285
Trp Ile His Pro Glu Ile Asp Asn Pro Glu Tyr Ser Pro Asp Pro Ser		
290	295	300
Ile Tyr Ala Tyr Asp Asn Phe Gly Val Leu Gly Leu Asp Leu Trp Gln		
305	310	315
Val Lys Ser Gly Thr Ile Phe Asp Asn Phe Leu Ile Thr Asn Asp Glu		
325	330	335
Ala Tyr Ala Glu Glu Phe Gly Asn Glu Thr Trp Gly Val Thr Lys Ala		
340	345	350
Ala Glu Lys Gln Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Leu Lys		
355	360	365
Glu Glu Glu Glu Asp Lys Lys Arg Lys Glu Glu Glu Glu Ala Glu Asp		
370	375	380
Lys Glu Asp Asp Glu Asp Lys Asp Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp		
385	390	395
Lys Glu Glu Asp Glu Glu Glu Asp Val Pro Gly Gln Ala Lys Asp Glu		
405	410	415

Leu

<210> 11

<211> 1084

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

cacacccacg gcagacacgc acgcacccgg gcgccgaagg gaaagccgcg tctcgccctc 60
ccgccccgcc gtcggtcctg tctcagtccc tcagcagagc gggaaagcgg aggccggagc 120
cgtgacctct gaccccgctg ttatgcggag ccgccgcatt ccttagcgat cgcggggcag 180
ccgccgctgc cgccgtgggc gactgacgca gcgcggggcg gtggagccgc cgccgcccct 240
ccccaccgc cgctctcgcg ccagccggtc cccgcgtgcc cgccecttct ccccgggcgc 300
acccgagacc tcgcgcgccg ccgctgccac gcgccecccc caccgcgcgc gccgccccag 360
ccccgcgcca ccgccccagc ccgcccagcc cggaggtccc gcgtggagct gccgcccgcg 420
ccggggagaa ggatgaagga caaacagaag aagaagaagg agcgcacgtg ggccgaggcc 480
gcgcgcctgg tattagaaaa ctactcggat gtcceaatga caccaaaaca gattctgcag 540
gtcatagagg cagaaggact aaaggaaatg agaagtggga cttccctctc cgcatgcctc 600
aatgctatgc tacattccaa ttcaagagga ggagaggggt tgttttataa actgcctggc 660
cgaatcagcc ttttcacgct caaggtgtga gccactgcac caggccccct catcttaatt 720
ttaatatatc tttgaataaa caccattgta tgaacctgct gtaagcttgg gagtggctctg 780
ttagtctaca gcttgtgtct gagatgtgct aattgaatat ttgctcagta cctcatctta 840
actgcctttg gctttatgtt gcttatcctt catagtatct tgttcattgg ctttttacat 900
ccataggcat cacttctctg atattcgttg tgctctttta atggattaat ggtttgcttg 960
gttggttcct ctagttagac tgtaaactcc ttgagagcag agtctgtatt ttattaatta 1020
cccacagtac taggtacata gttgccttca ataaatatat atttaatgaa aaaaaaaaaa 1080
aaaa 1084

```

<210> 12

<211> 85

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

```

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

```

65	70	75	80
Phe Thr Leu Lys Val			
	85		
<210> 13			
<211> 2708			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 13			
ggcggcgctt gattgggctg ggggggcca ataaaagcga tggcgattgg gctgccgcgt	60		
ttggcgctcg gtccggtcgc gtccgacacc cgggtgggact cagaaggcag tggagccccg	120		
gcggcgggcg cgggcgcgcg cgggggcgac gcgcgggaac aacgcgagtc ggcgcgcggg	180		
acgaagaata atcatgggcc agactgggaa gaaatctgag aaggaccag tttgttggcg	240		
gaagcgtgta aaatcagagt acatgcgact gagacagctc aagaggttca gacgagctga	300		
tgaagtaaag agtatgttta gttccaatcg tcagaaaatt ttggaaagaa cggaaatctt	360		
aaaccaagaa tggaaacagc gaaggataca gcctgtgcac atcctgactt ctgtgagctc	420		
attgcgcggg actagggagt gttcggtgac cagtgacttg gattttccaa cacaagtcac	480		
cccattaaag actctgaatg cagttgcttc agtaccata atgtattctt ggtctccctt	540		
acagcagaat tttatggtgg aagatgaaac tgttttacat aacattcctt atatgggaga	600		
tgaagtttta gatcaggatg gtactttcat tgaagaacta ataaaaaatt atgatgggaa	660		
agtacacggg gatagagaat gtgggtttat aaatgatgaa atttttgtgg agttggtgaa	720		
tgcccttggg caatataatg atgatgacga tgatgatgat ggagacgatc ctgaagaaag	780		
agaagaaaag cagaaagatc tggaggatca ccgagatgat aaagaaagcc gccacacctg	840		
gaaatttcct tctgataaaa tttttgaagc catttctca atgtttccag ataagggcac	900		
agcagaagaa ctaaaggaaa aatataaaga actcacgaa cagcagctcc caggcgcact	960		
tcctcctgaa tgtaccccc aatagatgg accaaatgct aaatctgttc agagagagca	1020		
aagcttacac tcctttcata cgcttttctg taggcgatgt tttaaataatg actgcttcct	1080		
acatcctttt catgcaacac ccaacactta taagcggaag aacacagaaa cagctctaga	1140		
caacaaacct tgtggaccac agtggtacca gcatttggag ggagcaaagg agtttgctgc	1200		
tgctctcacc gctgagcgga taaagacccc accaaaacgt ccaggaggcc gcagaagagg	1260		
acggcttccc aataacagta gcaggcccag caccceccac attaatgtgc tggaatcaaa	1320		
ggatacagac agtgataggg aagcaggggac tgaacggggg ggagagaaca atgataaaga	1380		
agaagaagag aagaaaagatg aaacttcgag ctctctgaa gcaaattctc ggtgtcaaac	1440		
accaataaag atgaagccaa atattgaacc tcctgagaat gtggagtgga gtggtgctga	1500		
agcctcaatg tttagagtcc tcattggcac ttactatgac aatttctgtg ccattgctag	1560		
gttaattggg accaaaacat gtagacaggt gtatgagttt agagtcaaag aatctagcat	1620		
catagctcca gctcccgtg aggatgtgga tactctcca aggaaaaaga agaggaaaca	1680		
ccggttgtgg gctgcacact gcagaaagat acagctgaaa aaggacggct cctctaacca	1740		
tgtttacaac tatcaaccct gtgatcatcc acggcagcct tgtgacagtt cgtgcccttg	1800		
tgtgatagca caaaattttt gtgaaaagtt ttgtcaatgt agttcagagt gtcaaaaccg	1860		

ctttccggga tgccgctgca aagcacagtg caacaccaag cagtgcccgct gctacctggc 1920
 tgtccgagag tgtgacctg acctctgtct tactttgtgga gccgctgacc attgggacag 1980
 taaaaatgtg tcctgcaaga actgcagtat tcagcgggggc tccaaaaagc atctattgct 2040
 ggcaccatct gacgtggcag gctgggggat ttttatcaaa gatcctgtgc agaaaaatga 2100
 attcatctca gaatactgtg gagagattat ttctcaagat gaagctgaca gaagaggga 2160
 agtgtatgat aaatacatgt gcagctttct gttcaacttg aacaatgatt ttgtggtgga 2220
 tgcaaccgc aagggttaaca aaattcgttt tgcaaatcat tcggtaaatc caaactgcta 2280
 tgcaaaagtt atgatggta acggtgatca caggataggt atttttgcca agagagccat 2340
 ccagactggc gaagagctgt tttttgatta cagatacagc caggctgatg ccctgaagta 2400
 tgtcggcatc gaaagagaaa tggaaatccc ttgacatctg ctacctctc cccctctctc 2460
 tgaacagct gccttagctt caggaaacct gagtactgtg ggcaatttag aaaaagaaca 2520
 tgcagtttga aattctgaat ttgcaaagta ctgtaagaat aatttatagt aatgagttta 2580
 aaaatcaact ttttattgcc ttctcaccag ctgcaaagt tttgtacca gtgaattttt 2640
 gcaataatgc agtatggtac atttttcaac tttgaataaa gaatacttga acttgtcctt 2700
 gttgaatc 2708

<210> 14

<211> 746

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

Gln Val Tyr Glu Phe Arg Val Lys Glu Ser Ser Ile Ile Ala Pro Ala			
465	470	475	480
Pro Ala Glu Asp Val Asp Thr Pro Pro Arg Lys Lys Lys Arg Lys His			
	485	490	495
Arg Leu Trp Ala Ala His Cys Arg Lys Ile Gln Leu Lys Lys Asp Gly			
	500	505	510
Ser Ser Asn His Val Tyr Asn Tyr Gln Pro Cys Asp His Pro Arg Gln			
	515	520	525
Pro Cys Asp Ser Ser Cys Pro Cys Val Ile Ala Gln Asn Phe Cys Glu			
	530	535	540
Lys Phe Cys Gln Cys Ser Ser Glu Cys Gln Asn Arg Phe Pro Gly Cys			
545	550	555	560
Arg Cys Lys Ala Gln Cys Asn Thr Lys Gln Cys Pro Cys Tyr Leu Ala			
	565	570	575
Val Arg Glu Cys Asp Pro Asp Leu Cys Leu Thr Cys Gly Ala Ala Asp			
	580	585	590
His Trp Asp Ser Lys Asn Val Ser Cys Lys Asn Cys Ser Ile Gln Arg			
	595	600	605
Gly Ser Lys Lys His Leu Leu Leu Ala Pro Ser Asp Val Ala Gly Trp			
	610	615	620
Gly Ile Phe Ile Lys Asp Pro Val Gln Lys Asn Glu Phe Ile Ser Glu			
625	630	635	640
Tyr Cys Gly Glu Ile Ile Ser Gln Asp Glu Ala Asp Arg Arg Gly Lys			
	645	650	655
Val Tyr Asp Lys Tyr Met Cys Ser Phe Leu Phe Asn Leu Asn Asn Asp			
	660	665	670
Phe Val Val Asp Ala Thr Arg Lys Gly Asn Lys Ile Arg Phe Ala Asn			
	675	680	685
His Ser Val Asn Pro Asn Cys Tyr Ala Lys Val Met Met Val Asn Gly			
	690	695	700
Asp His Arg Ile Gly Ile Phe Ala Lys Arg Ala Ile Gln Thr Gly Glu			
705	710	715	720
Glu Leu Phe Phe Asp Tyr Arg Tyr Ser Gln Ala Asp Ala Leu Lys Tyr			
	725	730	735
Val Gly Ile Glu Arg Glu Met Glu Ile Pro			
	740	745	

<210> 15

<211> 2008

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

```

agaaggtttc atttccgggt ggcgcgggcg ccattttgtg aggagcgata taaacgggcg 60
cagaggccgg ctgcccggcc agttgttact caggtgcgct agcctgcgga gcccgtccgt 120
gctgtttctgc ggcaaggcct ttcccagtgt cccacgcgg aaggcaactg cctgagaggc 180
gcggcgctgc accgcccaga gctgaggaag ccggcgccag ttcgcggggc tccgggcccgc 240
cactcagagc tatgagctac ggccgcccc ctcccgatgt ggagggtatg acctccctca 300
aggtggacaa cctgacctac cgcacctgc ccgacacgt gaggcgcgtc ttcgagaagt 360
acggggcgct cggcgacgtg tacatcccgc gggaccgcta caccaaggag tcccgcggt 420
tcgccttcgt tcgctttcac gacaagcgcg acgtgagga cgctatggat gccatggacg 480
gggccgtgct ggacggccgc gagctgcggg tgcaaattggc gcgctacggc cgcccccg 540
actcacacca cagccggccg ggaccgccac cccgcagta cggggggcgg ggctacggac 600
gccggagccg cagccctagg cggcgtcgcc gcagccgatc ccggagtcgg agccgttcca 660
ggtctcgcag ccgatctgc tacagccgt cgaagtctcg gtcccgact cgttctcgat 720
ctcggtcgac ctccaagtcc agatccgcac gaaggtccaa gtccaagtcc tcgtcggctt 780
ccagatctcg ttcgcggtcc aggtcccgg ttcggtccag gagtctccc ccagtgtcca 840
agagggaatc caaatccagg tcgcgatcga agagtcccc caagtctcct gaagaggaag 900
gagcgggtgc ctcttaagaa aatgatgtat cggcaagcag tgtaaacgga ggacttgggg 960
aaaaaggacc acatagtcca tcgaagaaga gtccttgaa caagcaactg gctattgaaa 1020
aggttatttt gtaacatttg tctaactttt tacttgttta agctttgcct cagttggcaa 1080
acttcatttt atgtgccatt ttgttgctgt tattcaaatt tcttgtaatt tagtgagggt 1140
aacgacttca gatttcatta ttggatttgg atatttgagg taaaatttca tttgtttata 1200
tagtgctgac tttttttgtt tgaaattaaa cagatttgta acctaatgtg tggcctcctg 1260
acttttaagg aaaacgtgtg cagccattac acacagccta aagctgtcaa gagattgact 1320
cggcattgcc ttcattcctt aaaattaaaa acctacaaaa gttggtgtaa atttgtatat 1380
gttatattacc ttcagatcta aatggtaatc tgaacccaaa tttgtataaa gacttttcag 1440
gtgaaaagac ttgatttttt gaaaggattg tttatcaaac acaattctaa tctcttctct 1500
tatgtatttt tgtgcactag gcgcagttgt gtagcagttg agtaatgctg gttagctgtt 1560
aaggtggcgt gttgcagtgc agagtgett gctgtttcct gttttctccc gattgctcct 1620
gtgtaaagat gccttgctgt gcagaaacaa atggtgtcc agtttattaa atgcctgac 1680
aactgcactt ccagtcaccc gggcettgca tataaataac ggagcataca gtgagcacat 1740
ctagctgatg ataaatacac ctttttttcc ctcttcccc taaaaatgg aaatctgatc 1800
atatctacat gtatgaactt aacatggaaa atgttaagga agcaaattgg tgtaactttg 1860
taagtactta taacatgggt tatctttttg cttatgaata ttctgtatta taaccattgt 1920
ttctgtagtt taattaaaac attttcttgg tgtagcttt tctcagaaaa aaaaaaaaaa 1980
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2008

```

<210> 16

<211> 221

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ser Tyr Gly Arg Pro Pro Pro Asp Val Glu Gly Met Thr Ser Leu
1 5 10 15

Lys Val Asp Asn Leu Thr Tyr Arg Thr Ser Pro Asp Thr Leu Arg Arg
 20 25 30

Val Phe Glu Lys Tyr Gly Arg Val Gly Asp Val Tyr Ile Pro Arg Asp
 35 40 45

Arg Tyr Thr Lys Glu Ser Arg Gly Phe Ala Phe Val Arg Phe His Asp
 50 55 60

Lys Arg Asp Ala Glu Asp Ala Met Asp Ala Met Asp Gly Ala Val Leu
65 70 75 80

Asp Gly Arg Glu Leu Arg Val Gln Met Ala Arg Tyr Gly Arg Pro Pro
 85 90 95

Asp Ser His His Ser Arg Arg Gly Pro Pro Pro Arg Arg Tyr Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Tyr Gly Arg Arg Ser Arg Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser
 115 120 125

Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Tyr
 130 135 140

Ser Arg Ser Lys Ser Arg Ser Arg Thr Arg Ser Arg Ser Arg Ser Thr
145 150 155 160

Ser Lys Ser Arg Ser Ala Arg Arg Ser Lys Ser Lys Ser Ser Ser Val
 165 170 175

Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Pro
 180 185 190

Pro Pro Val Ser Lys Arg Glu Ser Lys Ser Arg Ser Arg Ser Lys Ser
 195 200 205

Pro Pro Lys Ser Pro Glu Glu Glu Gly Ala Val Ser Ser
 210 215 220

<210> 17

<211> 2402

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

gggctgagga ggcggggcct gggaggggac aaagccggga agaggaaaag ctcgaccta 60
ccctgtggtc ccgggtttct gcagagteta cttcagaagc ggaggcactg ggagtccggt 120
ttgggattgc caggctgtgg ttgtgagtct gagcttgtga gcggctgtgg cgccccaact 180
cttcgccage atatcatccc ggcaggcgat aaactacatt cagttgagtc tgcaagactg 240

```

ggaggaactg gggtgataag aaatctattc actgtcaagg tttattgaag tcaaaatgtc 300
caaaaaaatc agtggcggtt ctgtggtaga gatgcaagga gatgaaatga cacgaatcat 360
ttgggaattg attaaagaga aactcatttt tccctacgtg gaattggatc tacatagcta 420
tgatttaggc atagagaatc gtgatgccac caacgaccaa gtcaccaagg atgctgcaga 480
agctataaag aagcataatg ttggcgtcaa atgtgccact atcactcctg atgagaagag 540
ggttgaggag ttcaagttga aacaaatgtg gaaatcacca aatggcacca tacgaaatat 600
tctgggtggc acggtcttca gagaagccat tatctgcaaa aatatccccc ggcttgtgag 660
tggtatgggtg aaacctatca tcataggtcg tcatgcttat ggggatcaat acagagcaac 720
tgattttgtt gttcctgggc ctggaaaagt agagataacc tacacaccaa gtgacggaac 780
ccaaaagggtg acatacctgg tacataactt tgaagaaggt ggtggtgttg ccatggggat 840
gtataatcaa gataagtcaa ttgaagattt tgcacacagt tecttccaaa tggctctgtc 900
taagggttgg ctttgtatc tgagcaccaa aaacactatt ctgaagaaat atgatgggag 960
ttttaagac atctttcagg agatatatga caagcagtag aagtcccagt ttgaagctca 1020
aaagatctgg tatgagcata ggctcatcga cgacatgggtg gccaagcta tgaaatcaga 1080
gggaggcttc atctgggcct gtaaaaaacta tgatgggtgac gtgcagtcgg actctgtggc 1140
ccaagggtat ggctctctcg gcatgatgac cagcgtgctg gtttgtccag atggcaagac 1200
agtagaagca gaggctgccc acgggactgt aaccgcgtcac taccgcatgt accagaaagg 1260
acaggagacg tccaccaatc ccattgcttc ctttttggc ttgaccagag ggttagccca 1320
cagagcaaag cttgataaca ataaagagct tgccttcttt gcaaagtctt tggaagaagt 1380
ctctattgag acaattgagg ctggcttcat gaccaaggac ttggctgctt gcattaaagg 1440
tttaccatgt gtgcaacgtt ctgactactt gaatacattt gagttcatgg ataaacttgg 1500
agaaaacttg aagatcaaac tagctcaggc caaactttaa gttcatacct gagctaagaa 1560
ggataattgt cttttggtaa ctaggtctac aggtttacat ttttctgtgt tactctcaag 1620
gataaaggca aaatcaattt tgtaatttgt ttagaagcca gagtttatct tttctataag 1680
tttacagcct ttttcttata tatacagtta ttgccacctt tgtgaacatg gcaagggact 1740
tttttacaat ttttatttta ttttctagta ccagcctagg aattcggtta gtactcattt 1800
gtattcactg tcactttttc tcatgttcta attataaatg accaaaatca agattgctca 1860
aaagggtaaa tgatagccac agtattgctc cctaaaatat gcataaagta gaaattcact 1920
gccttccccct cctgtccatg accttgggca cagggaagtt ctggtgtcat agatatcccg 1980
ttttgtgagg tagagctgtg cattaaactt gcacatgact ggaacgaagt atgagtgcaa 2040
ctcaaatgtg ttgaagatac tgcagtcatt tttgtaaaga ctttctgaa tgtttccaat 2100
agactaaata ctgttttaggc cgaggagag tttggaatcc ggaataaata ctacctggag 2160
gtttgtcctc tccatttttc tctttctcct cctggcctgg cctgaatatt atactactct 2220
aaatagcata tttcatccaa gtgcaataat gtaagctgaa tcttttttgg acttctgctg 2280
gcctgtttta tttcttttat ataaatgtga tttctcagaa attgatatta aacactatct 2340
tatcttctcc tgaactgttg attttaatta aaattaagtg ctaattacca ttaaaaaaaaa 2400
aa 2402
<210> 18
<211> 414

```

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

```

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

```

Gly Met Met Thr Ser Val Leu Val Cys Pro Asp Gly Lys Thr Val Glu			
290	295	300	
Ala Glu Ala Ala His Gly Thr Val Thr Arg His Tyr Arg Met Tyr Gln			
305	310	315	320
Lys Gly Gln Glu Thr Ser Thr Asn Pro Ile Ala Ser Ile Phe Ala Trp			
	325	330	335
Thr Arg Gly Leu Ala His Arg Ala Lys Leu Asp Asn Asn Lys Glu Leu			
	340	345	350
Ala Phe Phe Ala Asn Ala Leu Glu Glu Val Ser Ile Glu Thr Ile Glu			
	355	360	365
Ala Gly Phe Met Thr Lys Asp Leu Ala Ala Cys Ile Lys Gly Leu Pro			
	370	375	380
Asn Val Gln Arg Ser Asp Tyr Leu Asn Thr Phe Glu Phe Met Asp Lys			
385	390	395	400
Leu Gly Glu Asn Leu Lys Ile Lys Leu Ala Gln Ala Lys Leu			
	405	410	

<210> 19

<211> 1578

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

```

attttgcaac gccataggct tccagcgact gctggtgatg tttctgatgc cgacaaaagg 60
atcaaggtgg cgaagcccgt ggtggagatg gatggtgatg agatgaccg tattatctgg 120
cagttcatca aggagaagct catcctgccc cacgtggaca tccagctaaa gtattttgac 180
ctcgggctcc caaacctga ccagactgat gaccaggta ccattgactc tgcactggcc 240
accagaagt acagtgtggc tgtcaagtgt gccaccatca cccctgatga ggcccgtgtg 300
gaagagttca agctgaagaa gatgtggaaa agtcccaatg gaactatccg gaacatcctg 360
ggggggactg tcttccggga gcccacatc tgcaaaaaca tcccacgect agtccctggc 420
tggaaccaagc ccatcaccat tggcaggcac gcccattggc accagtacaa ggccacagac 480
tttgtggcag accgggcccgg cactttcaaa atggtcttca ccccaaaaga tggcagtggg 540
gtcaaggagt gggaagtgt caacttcccc gcaggcggcg tgggcatggg catgtacaac 600
accgacgagt ccatctcagg ttttgcgcac agctgcttcc agtatgcat ccagaagaaa 660
tggccgctgt acatgagcac caagaacacc ataactgaaag cctacgatgg gcgtttcaag 720
gacatcttcc aggagatctt tgacaagcac tataagaccg acttcgacaa gaataagatc 780
tggtatgagc accggctcat tgatgacatg gtggtcagg tcctcaagtc ttcgggtggc 840
tttgtgtggg cctgcaagaa ctatgacgga gatgtgcagt cagacatcct ggcccagggc 900
tttggtcccc ttggcctgat gacgtccgtc ctggtctgcc ctgatgggaa gacgattgag 960
gctgaggccg ctcatgggac cgtcacccgc cactatcggg agcaccagaa gggccggccc 1020
accagacca accccatcgc cagcatcttt gcctggacac gtggcctgga gcaccggggg 1080

```

aagctggatg ggaaccaaga cctcatcagg tttgccaga tgctggagaa ggtgtgcgtg 1140
 gagacggtgg agagtggagc catgaccaag gacctggcgg gctgcattca cggcctcagc 1200
 aatgtgaagc tgaacgagca cttcctgaac accacggact tcctcgacac catcaagagc 1260
 aacctggaca gagccctggg caggcagtag ggggaggcgc cacccatggc tgcagtggag 1320
 gggccagggc tgagccggcg ggtcctcctg agcgcggcag agggtagacc tcacagcccc 1380
 tctctggagg cctttctagg ggatgttttt ttataagcca gatgttttta aaagcatatg 1440
 tgtgtttccc ctcatggtga cgtgaggcag gagcagtgcg ttttacctca gccagtcagt 1500
 atgttttgca tactgtaatt tatattgcc ttggaacaca tggtgccata ttagctact 1560
 aaaaagctct tcacaaaa 1578

<210> 20

<211> 400

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

195	200	205
Arg Phe Lys Asp Ile Phe Gln Glu Ile Phe Asp Lys His Tyr Lys Thr		
210	215	220
Asp Phe Asp Lys Asn Lys Ile Trp Tyr Glu His Arg Leu Ile Asp Asp		
225	230	235
Met Val Ala Gln Val Leu Lys Ser Ser Gly Gly Phe Val Trp Ala Cys		240
245	250	255
Lys Asn Tyr Asp Gly Asp Val Gln Ser Asp Ile Leu Ala Gln Gly Phe		
260	265	270
Gly Ser Leu Gly Leu Met Thr Ser Val Leu Val Cys Pro Asp Gly Lys		
275	280	285
Thr Ile Glu Ala Glu Ala Ala His Gly Thr Val Thr Arg His Tyr Arg		
290	295	300
Glu His Gln Lys Gly Arg Pro Thr Ser Thr Asn Pro Ile Ala Ser Ile		
305	310	315
Phe Ala Trp Thr Arg Gly Leu Glu His Arg Gly Lys Leu Asp Gly Asn		
325	330	335
Gln Asp Leu Ile Arg Phe Ala Gln Met Leu Glu Lys Val Cys Val Glu		
340	345	350
Thr Val Glu Ser Gly Ala Met Thr Lys Asp Leu Ala Gly Cys Ile His		
355	360	365
Gly Leu Ser Asn Val Lys Leu Asn Glu His Phe Leu Asn Thr Thr Asp		
370	375	380
Phe Leu Asp Thr Ile Lys Ser Asn Leu Asp Arg Ala Leu Gly Arg Gln		
385	390	395
		400