

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480007630.6

[51] Int. Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

A01N 37/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 10 月 18 日

[11] 公开号 CN 1849131A

[22] 申请日 2004.3.22

[21] 申请号 200480007630.6

[30] 优先权

[32] 2003.3.21 [33] US [31] 60/456,920

[86] 国际申请 PCT/US2004/008833 2004.3.22

[87] 国际公布 WO2004/084835 英 2004.10.7

[85] 进入国家阶段日期 2005.9.21

[71] 申请人 WYETH 公司

地址 美国新泽西

[72] 发明人 M·柯林斯 E·Y·钦

M·塞尼塞斯 D·A·扬

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 程 泳

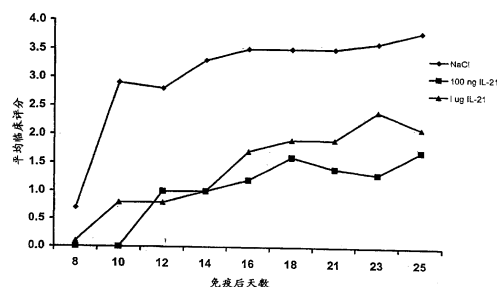
权利要求书 4 页 说明书 42 页 序列表 20 页  
附图 6 页

## [54] 发明名称

用白介素-21/白介素-21 受体的激动剂治疗  
免疫性疾病

## [57] 摘要

本发明公开了用 IL-21 或 IL-21 受体 (“IL-21R” 或 “MU-1”) 的激动剂调节白介素-21 (IL-21)/IL-21 受体 (MU-1) 活性的方法和组合物。IL-21/IL-21R 激动剂可以单独使用或与抗炎剂联合使用以治疗, 例如改善与神经系统的免疫性疾病, 例如多发性硬化症有关的症状。



1. 一种改善受试者中的多发性硬化症的症状的方法, 该方法包括:  
以足以改善多发性硬化症的症状的量将白介素-21 (IL-21) /IL-21 受体  
5 (IL-21R) 的激动剂给予受试者, 其中所述激动剂选自 IL-21 多肽, 激动性抗-IL21R 抗体和激动性抗-IL21R 抗体的抗原结合片段。
2. 权利要求 1 的方法, 其中激动剂是 IL-21 多肽, 所述 IL-21 多肽包含与  
SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列至少有 90%同一性的序列并且能与 IL-21R 结合。
3. 权利要求 1 的方法, 其中激动剂是 IL-21 多肽, 所述 IL-21 多肽包含与  
10 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列至少有 95%同一性的序列并且能与 IL-21R 结合。
4. 权利要求 1 的方法, 其中激动剂是包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的  
IL-21 多肽。
5. 权利要求 1 的方法, 其中激动剂是激动性抗-IL21R 抗体或其抗原结合  
片段。
- 15 6. 权利要求 5 的方法, 其中激动性抗-IL21R 抗体是人抗体。
7. 权利要求 1 的方法, 进一步包括给予受试者至少一种抗炎剂。
8. 权利要求 7 的方法, 其中抗炎剂选自 IFN  $\beta$ -1  $\alpha$ , IFN  $\beta$ -1  $\beta$ , TNF 拮抗  
剂, IL-12 拮抗剂, IL-23 拮抗剂, 氨甲蝶呤, 来氟米特, 西罗莫司 (雷帕霉素),  
和 CCI-779。
- 20 9. 权利要求 1 的方法, 其中受试者是哺乳动物。
10. 权利要求 1 的方法, 其中以单剂量形式给予 IL-21/IL-21R 激动剂。
11. 权利要求 1 的方法, 其中以由几天、几周或几个月的间隔分隔的一系  
列剂量给予 IL-21/IL-21R 激动剂。
12. 权利要求 1 的方法, 其中通过注射给予 IL-21/IL-21R 激动剂。
- 25 13. 权利要求 12 的方法, 其中将 IL-21/IL-21R 激动剂注射至中枢神经系  
统。
14. 权利要求 12 的方法, 其中鞘内或静脉内注射 IL-21/IL-21R 激动剂。
15. 权利要求 12 的方法, 其中将 IL-21/IL-21R 激动剂注射至腰部脑脊髓  
液。
- 30 16. 权利要求 1 的方法, 进一步包括通过评估受试者的 IL-10 参数来评估

受试者的多发性硬化症风险。

17. 权利要求 1 的方法, 进一步包括, 在给药之前, 评估受试者的 IL-10 参数。

18. 权利要求 17 的方法, 进一步包括, 在给药之后, 评估受试者的 IL-10 参数, 其中 IL-10 参数的增加表示具有治疗效果。

19. 权利要求 1 的方法, 进一步包括, 在给药之后, 评估受试者的 IL-10 参数。

20. 一种药物组合物, 其包含 IL-21/IL-21R 激动剂和抗炎剂, 其中所述 IL-21/IL-21R 激动剂选自 IL-21 多肽, 激动性抗-IL21R 抗体和激动性抗-IL21R 抗体的抗原结合片段。

21. 权利要求 20 的药物组合物, 其中 IL-21 多肽具有与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列至少有 90%同一性的序列并且能与 IL-21R 结合。

22. 权利要求 20 的药物组合物, 其中 IL-21 多肽具有与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列至少有 95%同一性的序列并且能与 IL-21R 结合。

23. 权利要求 20 的药物组合物, 其中所述 IL-21/IL-21R 激动剂包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。

24. 权利要求 20 的药物组合物, 其中抗炎剂选自 IFN  $\beta$ -1  $\alpha$ , IFN  $\beta$ -1  $\beta$ , TNF 拮抗剂, IL-12 拮抗剂, IL-23 拮抗剂, 氨甲蝶呤, 来氟米特, 西罗莫司 (雷帕霉素), 和 CCI-779。

25. 权利要求 20 的药物组合物, 其中激动剂是激动性抗-IL21R 抗体或其抗原结合片段。

26. 权利要求 25 的药物组合物, 其中激动性抗-IL21R 抗体是人抗体。

27. 一种药物组合物, 其包含 IL-21/IL-21R 激动剂和模拟髓鞘碱性蛋白的蛋白, 其中所述 IL-21/IL-21R 激动剂选自 IL-21 多肽, 激动性抗-IL21R 抗体和激动性抗-IL21R 抗体的抗原结合片段。

28. 权利要求 27 的药物组合物, 其中 IL-21/IL-21R 激动剂是包含 IL-21 多肽的蛋白, 并且模拟髓鞘碱性蛋白的蛋白包括乙酸格拉默。

29. 一种改善哺乳动物受试者中的多发性硬化症的方法, 该方法包括:

以足以改善受试者中的多发性硬化症, 或至少一种多发性硬化症的症状的量将白介素-21 (IL-21) 多肽给予受试者。

30. 权利要求 29 的方法, 其中受试者是人, IL-21 多肽是人 IL-21 多肽。
31. 权利要求 30 的方法, 其中 IL-21 多肽包含 SEQ ID NO: 2。
32. 权利要求 30 的方法, 其中 IL-21 多肽通过重组制备。
33. 权利要求 30 的方法, 其中 IL-21 多肽在细菌细胞中通过重组制备。
- 5 34. 一种调节哺乳动物受试者中的 IL-10 缺乏, 或与 IL-10 缺乏相关的疾病的方法, 该方法包括:  
以足以增强受试者中 IL-10 表达或活性的量将白介素-21 (IL-21) 多肽给予受试者。
35. 一种治疗或预防哺乳动物受试者中的免疫性疾病的方法, 该方法包括:  
10 评估哺乳动物受试者的 IL-10 参数; 和  
以取决于评估的 IL-10 参数的结果的量将白介素-21 (IL-21) 多肽给予受试者。
36. 权利要求 35 的方法, 其中 IL-10 参数包括关于 IL-10 蛋白或 IL-10 mRNA 水平的定量信息。
- 15 37. 权利要求 35 的方法, 其中 IL-10 参数包括关于 IL-10 蛋白活性水平的定量信息。
38. 权利要求 35 的方法, 其中免疫性疾病是神经障碍。
39. 权利要求 38 的方法, 其中受试者是人, 免疫性疾病是多发性硬化症。
40. 权利要求 38 的方法, 其中免疫性疾病引起髓鞘损伤或改变。
- 20 41. 一种评估哺乳动物受试者中的多发性硬化症的治疗的方法, 该方法包括:  
给予受试者白介素-21 (IL-21) /IL-21 受体 (IL-21R) 的激动剂; 和  
评估受试者的 IL-10 参数。
42. 权利要求 41 的方法, 进一步包括给予受试者第二剂激动剂, 其中第二  
25 剂以评估的 IL-10 参数的函数进行给予。
43. 权利要求 41 的方法, 其中激动剂选自 IL-21 多肽, 激动性抗-IL21R 抗体和激动性抗-IL21R 抗体的抗原结合片段。
44. 权利要求 43 的方法, 其中激动剂是 IL-21 多肽。
45. 权利要求 44 的方法, 其中受试者是人, IL-21 多肽是人 IL-21 多肽。
- 30 46. 权利要求 44 的方法, 其中 IL-21 多肽包含 SEQ ID NO: 2。

47. 一种产品, 包括

(i) 包含一个或多个单位剂量的药物组合物的容器, 所述药物组合物包含 IL-21 多肽; 和

(ii) 将单位剂量给予患有或怀疑患有多发性硬化症的受试者的说明书。

5 48. 权利要求 47 的产品, 其中在标签上提供说明书。

49. 权利要求 48 的产品, 其中将标签附于容器的外表面上。

## 用白介素-21/白介素-21 受体的激动剂治疗免疫性疾病

## 5 相关申请的交叉引用

本申请要求 2003 年 3 月 21 日提交的 U. S. 申请号 60/456, 920 的优先权, 其内容全文引入此处作为参考。

## 发明领域

本发明涉及使用 IL-21/IL-21 受体激动剂, 例如 IL-21 多肽或其活性片段, 10 治疗或预防神经系统的免疫性疾病, 例如多发性硬化症的方法和组合物。

## 发明背景

人 IL-21 是一种细胞因子。其成熟形式长约 131 个氨基酸并与 IL-2、IL-4 和 IL-15 的序列同源 (Parrish-Novak 等 (2000) *Nature* 408: 57-63)。尽管白介素细胞因子之间的序列同源性很低, 但这些细胞因子共享一个共同的包括 15 特征性“4-螺旋-束”(four-helix-bundle) 结构的折叠。多数细胞因子与 I 类或 II 类细胞因子受体结合。II 类细胞因子受体包括 IL-10 和干扰素的受体, 而 I 类细胞因子受体包括 IL-2、IL-7、IL-9、IL-11-13 和 IL-15 以及造血生长因子、瘦蛋白和生长激素的受体 (Cosman, D. (1993) *Cytokine* 5: 95-106)。

人 IL-21R 是由淋巴样细胞, 特别是由 NK 细胞、B 细胞和 T 细胞表达的 I 20 类细胞因子受体 (Parrish-Novak 等 (2000) 出处同上)。WO 00/53761、WO 01/85792、Parrish-Novak 等 (2000) 出处同上和 Ozaki 等 (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11439-11444 描述了编码人白介素-21 (IL-21) 及其受体 (IL-21R) 的示例性核酸序列, 还描述了相应的氨基酸序列。IL-21R 显示出与 IL-2 受体  $\beta$  链和 IL-4 受体  $\alpha$  链的高度序列同源性 (Ozaki 等 (2000) 出处同上)。 25 一旦与配体结合, IL-21R 就与由 IL-2、IL-3、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13 和 IL-15 的受体共享的共有  $\gamma$  细胞因子受体链 ( $\gamma c$ ) 结合 (Ozaki 等 (2000) 出处同上; Asao 等 (2001) *J. Immunol.* 167: 1-5)。IL-21R 的广泛淋巴分布说明 IL-21 在免疫调节中起作用。的确, 体外研究表明 IL-21 显著地调节 B 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞以及 NK 细胞的功能 (Parrish-Novak 等 (2000) 出处同上; 30 Kasaian, M. T. 等 (2002) *Immunity*. 16: 559-569)。Parrish-Novak 等 (2000)

提出 IL-21 能激活或刺激自然杀伤细胞 (NK) 的增殖和成熟, 抗 CD40 共刺激的成熟 B 细胞群体的增殖, 抗 CD3 共刺激的 T 细胞的增殖。

#### 发明概述

本发明公开了使用 IL-21 或 IL-21R 的激动剂 (本文中也称为“IL-21/IL-21R 激动剂”或“激动剂”) 提高白介素-21 (IL-21) 和 IL-21 受体 (本文中也称为“IL-21R”或“MU-1”) 的活性, 和/或它们之间相互作用的方法和组合物。该方法和组合物可用于调节神经系统的免疫性疾病或与 IL-10 缺乏有关的疾病或紊乱。例如, 该方法和组合物可用于治疗或预防多发性硬化症 (MS)。

例如, 我们已经发现, 用 IL-21/IL-21R 激动剂, 例如鼠 IL-21 多肽预防性地处理小鼠, 会导致实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 小鼠模型的症状改善。在用髓鞘少突神经胶质细胞糖蛋白 (MOG) 肽 (例如 MOG 35-55) 和蛋白脂质蛋白 (PLP; 例如 PLP 139-151) 产生的小鼠模型中可检测到 EAE 症状的调节。IL-21 体外诱导 T 细胞增殖。存在 IL-21 时培养的淋巴细胞产生 IL-10 的量增加, 干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 的水平降低。相应地, IL-21/IL-21R 活性的激动剂可用于预防性地或治疗性地治疗神经系统的免疫性疾病 (例如神经系统的慢性免疫性疾病, 包括多发性硬化症)。

相应地, 一方面, 本发明描述了治疗 (例如治愈、抑制、改善、减轻或延缓) 或预防 (例如预防疾病发作, 或预防疾病重现或复发) 受试者的神经系统免疫性疾病 (例如神经系统的慢性免疫性疾病, 包括多发性硬化症) 的方法。该方法包括: 以足以调节免疫细胞活性和/或数目的量 (例如调节细胞因子水平, 例如细胞因子表达、产生和/或释放) 将 IL-21/IL-21R 激动剂给予受试者, 从而治疗或预防神经系统的免疫性疾病, 例如多发性硬化症。在一个实施方案中, 在症状发生之前给予 IL-21/IL-21R 激动剂, 从而例如延缓或预防症状发生或预防症状再现或复发。例如, 当受试者, 例如 MS 患者的症状缓和时, 可给予 IL-21/IL-21R 激动剂。在另一个实施方案中, 在症状发生或发病之后给予 IL-21/IL-21R 激动剂。MS 的示例性全身症状包括震颤、协调较差、行走困难以及其它问题。

可以单独或与本文所述的其它治疗形式联合将 IL-21/IL-21R 激动剂给予受试者。优选地, 受试者是哺乳动物, 例如患有神经系统的免疫性疾病, 例如多发性硬化症的人。

在一个实施方案中，IL-21/IL-21R 激动剂与 IL-21 或 IL-21R，优选哺乳动物例如人的 IL-21 或 IL-21R 相互作用（例如结合），并提高或增强一种或多种 IL-21 或 IL-21R 活性。本文中 IL-21 的激动剂称作“IL-21 激动剂”，IL-21R 的激动剂称为“IL-21R 激动剂”。IL-21 多肽本身就是 IL-21R 激动剂。优选的激动剂以高亲合力与 IL-21 或 IL-21R 结合，例如亲合常数至少约  $10^7 \text{M}^{-1}$ ，优选约  $10^8 \text{M}^{-1}$ ，更优选约  $10^8 \text{M}^{-1}$  至  $10^{10} \text{M}^{-1}$  或更高。IL-21/IL-21R 激动剂可以是，例如 IL-21 多肽或其活性片段，IL-21 融合蛋白，肽激动剂，抗体激动剂或其抗原结合片段，或小分子激动剂。

在一个实施方案中，IL-21/IL-21R 激动剂是 IL-21 多肽，例如人的、牛或鼠的 IL-21 多肽，或其活性片段（例如包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，或者由 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列或与其至少有 85%、90%、95%、98% 或更高同一性的序列所编码的氨基酸序列的人 IL-21 多肽）。在另一个实施方案中，IL-21/IL-21R 激动剂是鼠 IL-21 多肽或其活性片段（例如包含 SEQ ID NO: 4 所示氨基酸序列，或者由 SEQ ID NO: 3 所示核苷酸序列或与其至少有 85%、90%、95%、98% 或更高同一性的序列所编码的氨基酸序列的鼠 IL-21 多肽）。在另一个实施方案中，IL-21/IL-21R 激动剂是包含 IL-21 多肽例如人或鼠 IL-21 多肽或其片段，和（例如融合的）第二个部分的融合蛋白，所述第二个部分例如为多肽（例如 GST、Lex-A、MBP 多肽序列或免疫球蛋白链，包括例如 Fc 片段、各种同种型的重链恒定区，包括 IgG1、IgG2、IgG3 IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 和 IgE）；与 IL-21 受体结合的激动性抗体或其抗原结合片段；或小分子激动剂或肽激动剂。在其他实施方案中，IL-21/IL-21R 激动剂是通过例如增加功能性 IL-21 的表达、加工和/或分泌从而提高 IL-21 活性或水平的试剂。也可以将编码上述 IL-21/IL-21R 激动剂的核酸给予受试者。

融合蛋白可额外包括将第一个部分，例如 IL-21 片段与第二个部分，例如免疫球蛋白片段连接的接头序列。在其它实施方案中，可在融合蛋白的 N 末端或 C 末端添加附加的氨基酸序列以促进表达、空间柔性、检测和/或分离或纯化。

本文所述的 IL-21/IL-21R 激动剂，例如本文所述的 IL-21 多肽或融合蛋白可衍生至或连接至另一个官能分子，例如另一个肽或蛋白（例如 Fab' 片段）。例如，融合蛋白或抗体，或抗原结合部分可与一个或多个其他分子实体，尤其例如抗体（例如双特异性抗体或多特异性抗体）、毒素、放射性同位素、细胞毒素



或细胞生长抑制剂功能性地连接（例如通过化学偶联、基因融合、非共价结合等）。

在另一个实施方案中，IL-21/IL-21R 激动剂是抗体，例如 IL-21R，优选人 IL-21R 的激动性抗体，或其抗原结合片段。抗体或其抗原结合片段可以是人源化的抗体、嵌合的抗体、人抗体（例如体外产生的），或其抗原结合片段。在一个实施方案中，抗体是双特异性抗体，例如与 IL-21R 和另一个受体链相互作用的抗体。

在一个实施方案中，该方法包括评估受试者的 IL-10 参数。“IL-10 参数”是关于 IL-10 的水平或活性，例如 IL-10 mRNA 或蛋白水平或活性的定性或定量信息。信息可包括，例如受试者的一个或多个组织或一个或多个样品中的 IL-10 浓度。可以在例如给药之前，例如至少在给予第一剂之前评估受试者。可以在例如给药之后，例如在以规律的间隔给药一次或多次之后，或者在连续给药情况下，在一次或多次间隔之后，评估受试者。可以在给药之前和之后均评估受试者。评估 IL-10 参数所得的信息可用于调整 IL-21/IL-21R 激动剂的给予。例如，IL-10 参数增加到正常范围内的值预示达到所需治疗效果。IL-10 参数减小预示给药不足或无应答。类似地，可以评估相应的 IFN $\gamma$  参数。在此情况下，IFN $\gamma$  参数减少到正常范围内的值预示达到所需治疗效果。IFN $\gamma$  参数增加预示给药不足或无应答。与其他细胞因子和因子相关的可评估的其他参数见表 3。

在一个实施方案中，方法包括评估受试者患神经系统免疫性疾病（例如多发性硬化症），或该疾病的一种或多种症状的风险。评估风险的一种方法包括评估 IL-10 参数。

在一个实施方案中，根据受试者状态的改变，例如根据与 MS 有关的疾病突发或发作给予 IL-21/IL-21R 激动剂。

可以单剂量形式，或以由几天、几周或几个月的间隔分隔的一系列剂量形式给予 IL-21/IL-21R 激动剂。可通过注射，例如注射到受试者的中枢神经系统中而给予 IL-21/IL-21R 激动剂。例如，IL-21/IL-21R 激动剂可注射到腰部脑脊髓液中（鞘内）。在其他实施方案中，静脉内给予 IL-21/IL-21R 激动剂。

在一个实施方案中，在联合治疗中给予本文所述的 IL-21/IL-21R 激动剂，例如其药物组合物，即与其他试剂，例如有利于治疗或预防神经系统免疫性疾病，例如多发性硬化症的治疗剂联合。例如，联合治疗可包括与一种或多种附

加治疗剂,例如一种或多种细胞因子和生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂,和/或细胞毒素或细胞生长抑制剂共同配制的和/或共同给予的一种或多种 IL-21/IL-21R 激动剂,例如 IL-21 多肽或其活性片段,IL-21 融合蛋白,肽激动剂,抗体激动剂,或小分子激动剂,如本文进一步所述。

5 可与一种或多种 IL-21/IL-21R 激动剂共同给予和/或共同配制以治疗多发性硬化症的治疗剂的实例,包括但不限于,一种或多种下述物质:干扰素  $\beta$ ,例如 IFN  $\beta$ -1  $\alpha$  和 IFN  $\beta$ -1  $\beta$ ;模拟髓鞘碱性蛋白的蛋白(例如合成蛋白,例如乙酸格拉默, COPAXONE<sup>®</sup>);皮质类固醇;IL-1 抑制剂;TNF 抑制剂;CD40 配体和 CD80 的抗体;IL-12 和 IL-23 的拮抗剂,例如 IL-12 和 IL-23 的 p40 亚基的拮抗剂(例如抗 p40 亚基的抑制性抗体);IL-22 拮抗剂;小分子抑制剂,例如  
10 氨甲蝶呤、来氟米特、西罗莫司(雷帕霉素)及其类似物,例如 CCI-779;Cox-2 和 cPLA2 抑制剂;NSAIDs; p38 抑制剂;TPL-2; M $\kappa$ -2; NF  $\kappa$   $\beta$  抑制剂;RAGE 或可溶性 RAGE; P-选择蛋白或 PSGL-1 抑制剂(例如小分子抑制剂、抗体,例如 P-选择蛋白的抗体);雌激素受体  $\beta$  (ERB) 激动剂或 ERB-NF  $\kappa$   $\beta$  拮抗剂。

15 TNF 抑制剂的实例包括,例如与 TNF 结合的嵌合的、人源化的、实际上是人的(effectively human)、人的或体外产生的抗体,或其抗原结合片段;TNF 受体的可溶性片段,例如 p55 或 p75 人 TNF 受体或其衍生物,例如 75kd TNFR-IgG (75 kD 的 TNF 受体-IgG 融合蛋白, ENBRELM<sup>™</sup>), p55 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白;TNF 酶拮抗剂,例如 TNF  $\alpha$  转化酶(TACE)抑制剂。

20 可与一种或多种 IL-21/IL-21R 激动剂共同给予的和/或共同配制的附加治疗剂包括一种或多种下述物质:干扰素  $\beta$ ,例如 IFN  $\beta$ -1  $\alpha$  和 IFN  $\beta$ -1  $\beta$ ;COPAXONE<sup>®</sup>;皮质类固醇;IL-1 抑制剂;TNF 拮抗剂(例如 TNF 受体的可溶性片段,例如 p55 或 p75 人 TNF 受体或其衍生物,例如 75kd TNFR-IgG (75 kD 的 TNF 受体-IgG 融合蛋白, ENBRELM<sup>™</sup>);CD40 配体和 CD80 的抗体;IL-12 和 IL-23 的拮抗剂,例如 IL-12 和 IL-23 的 p40 亚基的拮抗剂(例如与 IL-12 和 IL-23 的 p40  
25 亚基结合的抑制性抗体);氨甲蝶呤、来氟米特、西罗莫司(雷帕霉素)或其类似物,例如 CCI-779。

另一方面,本发明描述了调节,例如增加或降低免疫细胞活性和/或数目(例如免疫细胞,例如淋巴细胞(例如 T 细胞)或免疫细胞群,例如混合的或基本  
30 纯化的免疫细胞群的活性和/或数目)的方法。该方法包括将免疫细胞,例如本

文所述的免疫细胞与 IL-21/IL-21R 激动剂,例如本文所述的激动剂接触,激动剂的量足以调节,例如增加或降低免疫细胞活性和/或数目。在一个实施方案中,活性包括调节,例如增加或降低细胞因子的活性或水平。例如,IL-21/IL-21R 激动剂可增加 IL-10 的淋巴细胞产生或水平和/或降低干扰素- $\gamma$  的产生或水平。

5 本发明的方法可用于培养的细胞,例如体外或来自体内。例如,免疫细胞如本文所述的 T 细胞可以在培养基中体外培养,而接触步骤可通过在培养基中添加一种或多种 IL-21/IL-21R 激动剂,例如本文所述的激动剂来进行。或者,可将该方法实施于受试者中存在的细胞(例如本文所述的免疫细胞),例如作为体内(例如治疗性或预防性)方案的一部分。

10 免疫细胞活性的变化包括任何改变,例如与参照,如未处理的免疫细胞相比,接触了 IL-21/IL-21R 激动剂的免疫细胞在下述一个或几个方面的提高/降低:尤其是增殖、细胞因子分泌和/或产生、存活、分化、细胞应答(例如脱敏)、细胞溶解活性、效应细胞活性、基因表达。例如,将免疫细胞与 IL-21/IL-21R 激动剂,例如 IL-21 多肽接触可诱导胸腺细胞、淋巴细胞、淋巴结 T 细胞、成熟 CD4+T 细胞、成熟 CD8+T 细胞或巨噬细胞中的一种或多种细胞的以下一种或  
15 多种情况:增殖、细胞溶解活性、效应细胞功能或细胞因子分泌。在一个实施方案中,IL-21/IL-21R 激动剂可以增加 IL-10 的淋巴细胞产生或水平和/或降低干扰素- $\gamma$  的产生或水平。

另一方面,本发明描述了调节哺乳动物受试者中的 IL-10 缺乏,或与 IL-10  
20 缺乏有关的疾病的方法。该方法包括给予受试者白介素-21(IL-21)多肽,给予的量足以增加受试者中 IL-10 的表达或活性,例如至少增加 1.2、1.5、2、2.5、3、3.5、5 或 10 倍,例如增加 1.2-2.5 倍或增加 2.5-5 倍,5-10 倍,或增加超过 10 或 20 倍。“IL-10 缺乏”指相对于相应的正常受试者,IL-10 在统计学上显著降低。例如,降低的 P 值小于 0.05。因为 IL-21 或其它 IL-21/IL-21R 激动  
25 剂可用于提高 IL-10 的水平或活性,所以 IL-21 和这样的激动剂可用于调节 IL-10 缺乏。

IL-10 水平可在例如血液、血清或脑脊髓液中监测。与 IL-10 缺乏有关的示例性疾病包括多发性硬化症、明显炎症(包括缺血-再灌注损伤)、牛皮癣和天疱疮。因为 IL-21 可提高 IL-10 的水平,所以 IL-21 可用于治疗这些疾病和  
30 其它与 IL-10 缺乏有关疾病的至少一种症状。

另一方面, 本发明描述了改善哺乳动物受试者, 例如人的多发性硬化症的方法。该方法包括: 给予受试者白介素-21 (IL-21) 多肽, 给予的量足以改善受试者的多发性硬化症或多发性硬化症的至少一种症状。例如, 当受试者是人时, IL-21 多肽可以是人 IL-21 多肽, 例如包括 SEQ ID NO: 2 的多肽, 或实际上是人的 IL-21 多肽。例如, 多肽是在例如细菌细胞中重组产生的。在一个实施方案中, 该方法包括给予受试者白介素-21 (IL-21) 多肽, 给予的量足以增加 IL-10 在受试者中的表达或活性, 例如至少增加 1.2、1.5、2、2.5、3、3.5、5 或 10 倍, 例如增加 1.2-2.5 倍或增加 2.5-5 倍, 5-10 倍, 或增加超过 10 或 20 倍。该方法可包括本文所述的其他特征。

10 另一方面, 本发明描述了治疗或预防哺乳动物受试者中的免疫性疾病的方法。该方法包括评估哺乳动物受试者的 IL-10 参数; 以及给予受试者白介素-21 (IL-21) 多肽, 给予的量取决于评估的 IL-10 参数的结果。例如, IL-10 参数包括关于 IL-10 蛋白或 IL-10 mRNA 水平的定性或定量信息。在另一个实施例中, IL-10 参数包括关于 IL-10 蛋白活性水平的定量信息。

15 在一个实施方案中, 免疫性疾病是神经障碍。例如, 受试者是人, 免疫性疾病是多发性硬化症或引起髓鞘损伤或改变的免疫性疾病。该方法可包括本文所述的其他特征。

另一方面, 本发明描述了对哺乳动物受试者中的多发性硬化症的治疗进行评估的方法。该方法包括: 给予受试者白介素-21 (IL-21) / IL-21 受体 (IL-21R) 的激动剂 (例如 IL-21 多肽、激动性抗 IL-21R 抗体和激动性抗 IL-21R 抗体的抗原结合片段); 和评估受试者的 IL-10 参数。在一个实施方案中, 方法进一步包括给予受试者第二剂激动剂, 其中第二剂作为评估的 IL-10 参数的函数进行给予。

25 在一个实施方案中, 受试者是人, IL-21 多肽是人 IL-21 多肽, 例如包括 SEQ ID NO: 2 的多肽。

在一个实施方案中, 使第二剂或任何后续剂量适于递送白介素-21 (IL-21) 多肽, 递送的量足以使 IL-10 在受试者中的表达或活性相对于例如第一次治疗之前的基线, 增加例如至少 1.2、1.5、2、2.5、3、3.5、5 或 10 倍, 例如增加 1.2-2.5 倍或增加 2.5-5 倍, 5-10 倍, 或增加超过 10 或 20 倍。在相关方法中  
30 第一剂是如此定制的。该方法可包括本文所述的其他特征。

另一方面, 本发明提供了包括药学可接受载体和至少一种本文所述的 IL-21/IL-21R 激动剂 (例如本文所述的 IL-21 多肽或融合蛋白) 的组合物, 例如药物组合物。在一个实施方案中, 组合物, 例如药物组合物, 包含两种或更多种上述 IL-21/IL-21R 激动剂的组合。IL-21/IL-21R 激动剂和药物, 例如治疗  
5 剂 (例如一种或多种细胞因子和生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂和/或细胞毒素或细胞生长抑制剂, 如本文进一步所述) 的组合也在本发明范围内。

在一个实施方案中, 药物组合物包括药学可接受载体中的 IL-21/IL-21R 激动剂和至少一种附加治疗剂。可与一种或多种 IL-21/IL-21R 激动剂共同配制  
10 在组合物, 例如药物组合物中的优选附加治疗剂的实例, 包括但不限于, 以下的一种或多种: 干扰素  $\beta$ , 例如 IFN  $\beta$ -1  $\alpha$  和 IFN  $\beta$ -1  $\beta$ ; 模拟髓鞘碱性蛋白的蛋白 (例如 COPAXONE<sup>®</sup>); 皮质类固醇; IL-1 抑制剂; TNF 拮抗剂 (例如 TNF 受体的可溶性片段, 例如 p55 或 p75 人 TNF 受体或其衍生物, 例如 75kdTNFR-IgG (75 kD 的 TNF 受体-IgG 融合蛋白, ENBREL<sup>™</sup>); 与 CD40 配体和 CD80 结合的抗  
15 体; IL-12 和/或 IL-23 的拮抗剂, 例如 IL-12 和 IL-23 的 p40 亚基的拮抗剂 (例如抗 p40 亚基的抑制性抗体); 氨甲蝶呤、来氟米特、西罗莫司 (雷帕霉素) 或其类似物, 例如 CCI-779。

另一方面, 本发明描述了一种产品, 其包括 (i) 包含一个或多个单位剂量的药物组合物的容器, 所述药物组合物包含 IL-21 多肽; 和 (ii) 对患有或怀疑患有多发性硬化症的受试者给予单位剂量的说明书。例如说明书可提供于标  
20 签上。标签可以附着在容器的外表面。在一个实施方案中, 该产品还包括第二容器, 例如该容器包含附加的单位剂量的药物组合物, 所述药物组合物包含 IL-21 多肽。在一个实施方案中, 该产品还包括第二容器, 该容器包括第二药物组合物, 所述药物组合物包含治疗多发性硬化症的试剂, 即 IL-21 之外的试剂。  
25 例如, 该试剂是乙酸格拉默或本文所述的其它试剂。在另一个实施方案中, 第一容器中的包含 IL-21 多肽的药物组合物进一步包含治疗多发性硬化症的第二试剂, 例如乙酸格拉默。

术语 “MU-1” 和 “IL-21R” 在本文中可以交换使用。术语 “肽”、“多肽” 和 “蛋白质” 在本文中可以交换使用。蛋白质可包括一条或多条链。

30 统计学显著性可通过本领域已知的任何方法进行确定。示例性的统计检验

包括: Students T-检验, Mann-Whitney U 非参量检验, 和 Wilcoxon 非参量统计检验。某些统计学显著相关性的 P 值小于 0.05 或 0.02。IL-21/IL-21R 激动剂介导的特定效果显示出统计学上显著的差异(例如 P 值<0.05 或 0.02)。术语“诱导”、“抑制”、“增强”、“提高”、“增加”、“降低”或例如表示两个状态之间可区分的定性或定量差异的其它术语, 可指两个状态之间的差异, 例如统计

5 学上显著的差异。

除非另有说明, 本文所用的全部技术和科学术语与本发明所属领域普通技术人员通常理解的意义相同。虽然与本文所述的类似或等效的方法和材料可用于实践或检验本发明, 但适宜的方法和材料描述如下。本文提及的全部出版物、

10 专利申请、专利以及其它参考文献全文引入作为参考。在有抵触的情况下, 本说明书(包括定义、对照)。此外, 材料、方法和实施例仅仅是说明性的而不是意图限制。

从下述详细说明和权利要求中显然可得出本发明的其他特征和优点。

#### 附图简述

15 图 1A 是描述存在各种稀释度的 20ng/ml 鼠 IL-21 时培养的淋巴结细胞增殖增加的线状图。例如, 1: 50 稀释时, 与仅用肽刺激的细胞相比较, IL-21 引起淋巴结细胞增殖增加。

图 1B 是描述与仅用 1  $\mu$ g/ml PLP 处理的细胞相比, 用所示浓度的鼠 IL-21 (ng/ml) 和 1  $\mu$ g/ml PLP 培养的蛋白脂质蛋白 (PLP) 转基因小鼠的 T 细胞增

20 殖增加的线状图。此图显示 IL-21 诱导 PLP 转基因小鼠的 T 细胞增殖。

图 2 是描述与未处理的细胞相比较, 存在所示浓度的小鼠 IL-21 的情况下, IL-10 分泌增加的柱形图。响应是可饱和的, 在 IL-21 的最高测试浓度 (25ng/ml), 细胞产生的 IL-10 比对照组约多 2.5 倍。IL-10 产生水平提高说明 IL-21 处理使抗原特异性细胞向 Th2 模式倾斜。

25 图 3 是显示与对照细胞相比较, 用所示浓度的鼠 IL-21 处理的脾细胞和淋巴结细胞分泌的 IFN  $\gamma$  减少的柱形图。将 IL-21 添加到免疫的小鼠的 MOG 33-35 刺激的脾细胞中使 IFN  $\gamma$  减少两倍, 而添加 IL-21R 使 IFN 增加两倍。

图 4 描述了 EAE 模型中疾病的临床症状减轻。此图显示 IL-21 抑制 IFN $\gamma$  并促进 IL-10。图 4 是显示与未处理的培养物相比较, IL-21 处理的 PLP 脾细胞中

30 检测的 EAE 症状的减少对体内转移后天数的线状图。

图5描述了EAE模型中疾病的临床症状减轻。它是描述与对照小鼠相比较,用低剂量(100ng/日)或高剂量(1μg/日)的鼠IL-21处理的小鼠中,EAE严重程度降低的柱形图。

#### 发明详述

5 本发明公开了使用IL-21或IL-21受体(“IL-21R”或“MU-1”)的激动剂调节白介素-21(IL-21)/IL-21受体(MU-1)活性的方法和组合物。在一个实施方案中,申请人说明用IL-21/IL-21R激动剂,例如鼠IL-21多肽处理小鼠引起实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)小鼠模型的症状改善。在用髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)肽(例如MOG 35-55)和蛋白脂质蛋白(PLP)产生的小鼠模型中检测对EAE症状的调节。IL-21体外诱导T细胞增殖。存在IL-21的情况下培养的淋巴细胞产生的IL-10的量增加,干扰素-γ的水平降低。因此,IL-21/IL-21R活性的激动剂可用于治疗或预防神经系统的免疫性疾病(例如神经系统的慢性免疫性疾病,包括多发性硬化症)。

15 为更易于理解本发明,首先给出某些术语的定义。其它定义将在详细的描述中给出。

术语“白介素-21”、“IL-21”和“IL-21多肽”指能与IL-21R(例如哺乳动物,例如鼠或人蛋白)相互作用例如结合,并具有下述特征之一的蛋白(例如哺乳动物,例如鼠或人蛋白):(i)天然存在的哺乳动物IL-21的氨基酸序列或其片段,例如SEQ ID NO: 2(人)或SEQ ID NO: 4(鼠)所示的氨基酸序列或其片段;(ii)与SEQ ID NO: 2(人)或SEQ ID NO: 4(鼠)所示氨基酸序列或其片段基本同源,例如至少85%、90%、95%、98%、99%同源的氨基酸序列;(iii)由天然存在的哺乳动物IL-21核苷酸序列或其片段(例如SEQ ID NO: 1(人)或SEQ ID NO: 3(鼠),或其片段,例如成熟形式的编码区)编码的氨基酸序列;(iv)由与SEQ ID NO: 1(人)或SEQ ID NO: 3(鼠)所示核苷酸序列,或其片段(例如成熟形式的编码区)基本同源,例如至少85%、90%、95%、98%、99%同源的核苷酸序列编码的氨基酸序列;(v)由天然存在的IL-21核苷酸序列或其片段(例如SEQ ID NO: 1(人)或SEQ ID NO: 3(鼠),或其片段(例如成熟形式的编码区))的简并核苷酸序列编码的氨基酸序列;或(vi)由与一种上述核苷酸序列的互补链在严紧条件下,例如高度严紧条件下杂交的核苷酸序列(例如与编码成熟IL-21蛋白的区域杂交的核苷酸序列)编码的至少

115 个氨基酸的氨基酸序列。IL-21 与 IL-21R 的结合可引起 stat5 或 stat3 信号 (Ozaki 等 (2000) 出处同上)。IL-21 多肽可由包括信号序列的新生蛋白经加工而成为除去信号序列的成熟蛋白。

“实际上是人的” IL-21 多肽是包含足够数量的人氨基酸位置的 IL-21 多肽, 因此该多肽在正常人中不会诱发免疫原性反应, 和因此该 IL-21 多肽与人 IL-21R 相互作用。

术语“MU-1”、“MU-1 蛋白”、“白介素-21 受体”或“IL-21R”指能与 IL-21 (例如哺乳动物, 例如鼠或人的 IL-21) 相互作用例如结合, 并具有下述特征之一的受体 (例如哺乳动物, 例如鼠源或人源的): (i) 天然存在的哺乳动物 MU-1 多肽 IL-21R/MU-1 的氨基酸序列或其片段, 例如 SEQ ID NO: 6 (人) 或 SEQ ID NO: 8 (鼠) 所示的氨基酸序列或其片段 (例如成熟区); (ii) 与 SEQ ID NO: 6 (人) 或 SEQ ID NO: 8 (鼠) 所示氨基酸序列或其片段 (例如成熟区) 基本同源, 例如至少 85%、90%、95%、98%、99% 同源的氨基酸序列; (iii) 由天然存在的哺乳动物 IL-21R/MU-1 核苷酸序列 (例如 SEQ ID NO: 5 (人) 或 SEQ ID NO: 7 (鼠)) 或其片段 (例如成熟区) 编码的氨基酸序列; (iv) 由与 SEQ ID NO: 5 (人) 或 SEQ ID NO: 7 (鼠) 所示核苷酸序列或其片段 (例如成熟区) 基本同源, 例如至少 85%、90%、95%、98%、99% 同源的核苷酸序列编码的氨基酸序列; (v) 由天然存在的 IL-21R/MU-1 核苷酸序列或其片段 (例如 SEQ ID NO: 5 (人) 或 SEQ ID NO: 7 (鼠) 或其片段 (例如成熟区)) 的简并核苷酸序列编码的氨基酸序列; 或 (vi) 由与一种上述核苷酸序列在严紧条件下, 例如高度严紧条件下杂交的核苷酸序列编码的至少 450 个氨基酸的氨基酸序列。人 IL-21R 的成熟区是 SEQ ID NO: 6 的约 20-538 位氨基酸。

示例性的 IL-21R/MU-1 cDNA 于 1998 年 3 月 10 日保藏于美国典型培养物保藏中心, 保藏号 ATCC 98687。

IL-21R 是 I 类细胞因子家族受体, 也称作 NILR (WO 01/85792; Parrish-Novak 等 (2000) *Nature* 408: 57-63; Ozaki 等 (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11439-11444)。IL-21R 与 IL-2 和 IL-15 受体共有的  $\beta$  链以及 IL-4 受体的  $\alpha$  链同源 (Ozaki 等 (2000) 出处同上)。一旦与配体结合, IL-21R/MU-1 就能与共同的  $\gamma$  细胞因子受体链 ( $\gamma c$ ) 相互作用 (Asao 等 (2001) *J. Immunol.* 167: 1-5), 并且诱导 STAT1 和 STAT3 (Asao 等 (2001)) 或 STAT5



(Ozaki 等 (2000)) 磷酸化。IL-21R 显示出广泛的淋巴组织分布。

小于全长的 IL-21 蛋白形式可用于本文所述的方法和组合物, 只要其保留与 IL-21R 多肽结合的能力。通过在宿主细胞内表达编码全长 IL-21 蛋白的多核苷酸的相应片段, 或通过表达编码经修饰的蛋白的多核苷酸 (例如除去一个或多个内部的氨基酸) 可产生小于全长的 IL-21 蛋白。小于全长的 IL-21 多肽的一种形式是成熟 IL-21, 例如 SEQ ID NO: 2 的 IL-21。另一种形式是比全长的成熟 IL-21 短的多肽, 例如小于 131、130、129、128 或 125 个氨基酸, 例如长度为 115 至 130 个氨基酸。例如, 源自 SEQ ID NO: 2 的 IL-21 多肽可失去最后的 8 个氨基酸或其子集, 例如 IL-21 多肽包含 1-122 位氨基酸。相应的多核苷酸片段也可用于本发明的方法和组合物。如上所述的经修饰的多核苷酸可通过标准分子生物学技术, 包括构建适合的所需缺失突变体、定点诱变方法或使用合适寡核苷酸引物的聚合酶链式反应来制备。

短语 MU-1 或 IL-21R 多肽的“生物活性”是指相应的成熟 MU-1 蛋白的一种或多种生物活性, 包括但不限于 (1) 与 IL-21 多肽 (例如人 IL-21 多肽) 相互作用, 例如结合; (2) 与信号转导分子, 例如  $\gamma$ c、jak1 结合; (3) 刺激 stat 蛋白, 例如 STAT5 和/或 STAT3 的磷酸化和/或活化; 和/或 (4) 调节, 例如刺激或降低免疫细胞, 例如 T 细胞 (CD8+ T 细胞、CD4+ T 细胞)、NK 细胞、B 细胞、巨噬细胞和巨核细胞的增殖、分化、效应细胞功能、细胞溶解活性、细胞因子分泌和/或存活。

本文所用的“IL-21/IL-21R 激动剂”是指增强、诱导或提高 IL-21R/MU-1 多肽的一种生物活性, 例如本文所述的生物活性的试剂。例如, 激动剂与 IL-21R/MU-1 多肽相互作用, 例如结合。在一个实施方案中, 激动剂与 IL-21R 和另一个受体链, 例如  $\gamma$  细胞因子受体链相互作用。例如, 激动剂将 IL-21R 和  $\gamma$  细胞因子受体链交联。

本文所用的 IL-21/IL-21R 激动剂的“治疗有效量”是指这样的试剂量, 即当单剂量或多剂量给予受试者例如患者时, 其能有效地治愈疾病 (例如本文所述的疾病), 减轻疾病严重程度, 改善疾病的一种或多种症状, 或延长受试者的存活至超过没有这种治疗时预期的存活时间。

本文所用的 IL-21/IL-21R 激动剂的“预防有效量”是指这样的 IL-21/IL-21R 激动剂量, 即当单剂量或多剂量给予受试者例如患者时, 其能有

效地预防或延缓疾病（例如本文所述的疾病）发病或复发。

术语“诱导”、“抑制”、“增强”、“提高”、“增加”、“降低”或例如表示两个状态之间定量差异的术语，指两个状态之间的至少统计学上显著的差异。

本文中的术语“联合”是指基本同时地，同时地或顺次地给予试剂。如果  
5 顺次地给予，那么在开始给予第二个化合物时，优选仍然能在治疗位点检测到有效浓度的这两个化合物中的第一个化合物。

本文所用的“融合蛋白”是指包含两个或更多个可操作地结合（例如连接）的部分（例如蛋白部分）的蛋白。优选，这些部分是共价结合的。这些部分可以直接结合或经由间隔子或接头连接。

10 与本文公开的序列相似或同源的序列（例如至少约 85%序列同一性）也是本申请的一部分。在某些实施方案中，序列同一性可以是约 90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%或更高。或者，当核酸片段在选择性杂交条件（例如高度严谨杂交条件）下与互补链杂交时，存在基本同一性。核酸可存在于完整细胞、细胞溶解物中，或是部分纯化或基本纯的形式。

15 计算两个序列之间的“同源性”或“序列同一性”（本文中可交换使用的术语）如下进行。为了最佳比较的目的将序列进行比对（例如在第一条和第二条氨基酸或核酸序列的其中一条或两条中引入缺口以获得最佳比对，并且为了比较目的可以忽略非同源序列）。在优选实施方案中，为了比较目的而进行比对的参照序列长度是参照序列长度的至少 30%，优选至少 40%，更优选至少 50%，甚至更优选至少 60%，甚至更优选至少 70%，80%，90%，100%。然后比较在相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一条序列的一个位置被第二  
20 条序列相应位置的相同氨基酸残基或核苷酸占据时，那么这两个分子在这个位置相同（本文所用的氨基酸或核酸“同一性”等于氨基酸或核酸“同源性”）。两个序列之间的同一性百分比是这两个序列共享的相同位置数目的函数，考虑了为了最佳地比对两个序列而需要引入的缺口的数目和每个缺口的长度。  
25

比较序列和测定两个序列之间的同一性百分比可以使用数学算法来完成。比较使用了 GCG 软件包的 GAP 程序（www. gcg. com）和包括 Blossum 62 评分矩阵的参数，其中缺口罚分是 12，缺口扩展罚分是 4，移码缺口罚分是 5。

本文所用的术语“在严谨条件下杂交”描述了杂交和洗涤的条件。严谨条件是本领域技术人员已知的并在 *Current Protocols in Molecular Biology*,  
30

John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. 中有记载。这个参考文献描述了含水的和非水的方法并且可以使用任意一种。严紧杂交条件的优选实例是在  $6\times$  氯化钠/柠檬酸钠 (SSC) 中于约  $45^{\circ}\text{C}$  杂交, 接着用  $0.2\times$  SSC、 $0.1\%$  SDS 在  $50^{\circ}\text{C}$  洗涤一次或多次。严紧杂交条件的另一个实例是在  $6\times$  SSC 中于约  $45^{\circ}\text{C}$  杂交, 接着用  $0.2\times$  SSC、 $0.1\%$  SDS 在  $55^{\circ}\text{C}$  洗涤一次或多次。严紧杂交条件的另一个例子是在  $6\times$  SSC 中于约  $45^{\circ}\text{C}$  杂交, 接着用  $0.2\times$  SSC、 $0.1\%$  SDS 在  $60^{\circ}\text{C}$  洗涤一次或多次。优选, 严紧杂交条件是在  $6\times$  SSC 中于约  $45^{\circ}\text{C}$  杂交, 接着用  $0.2\times$  SSC、 $0.1\%$  SDS 在  $65^{\circ}\text{C}$  洗涤一次或多次。特别优选的高度严紧条件 (以及如果操作者不确定应该用什么条件来测定分子是否在杂交限度内时应该使用的条件) 是在  $0.5\text{M}$  磷酸钠、 $7\%$  SDS 中于  $65^{\circ}\text{C}$  杂交, 接着用  $0.2\times$  SSC、 $1\%$  SDS 在  $65^{\circ}\text{C}$  洗涤一次或多次。

IL-21/IL-21R 激动剂可以具有基本不影响其功能的附加的保守或非必需的氨基酸取代。“保守的氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替换的取代。现有技术已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸 (例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸), 具有酸性侧链的氨基酸 (例如天冬氨酸、谷氨酸), 具有不带电荷的极性侧链的氨基酸 (例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸), 具有非极性侧链的氨基酸 (例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸), 具有  $\beta$ -分枝侧链的氨基酸 (例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸) 和具有芳香族侧链的氨基酸 (例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

#### IL-21/IL-21R 激动剂

用于本方法和组合物的 IL-21/IL-21R 激动剂可以是 IL-21 多肽, 例如人或鼠的 IL-21 多肽, 或其活性片段 (例如包含下列氨基酸序列的人 IL-21 多肽, 即 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列, 或包括由 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列或与其至少有 85%, 90%, 95%, 98% 或更高同一性的序列 (例如编码成熟 IL-21 多肽的 SEQ ID NO: 1 的区域) 编码的区域的氨基酸序列)。在另一个实施方案中, IL-21/IL-21R 激动剂是鼠 IL-21 多肽或其活性片段 (例如包含 SEQ ID NO: 4 所示氨基酸序列, 或由 SEQ ID NO: 3 所示核苷酸序列或与其至少有 85%, 90%, 95%, 98% 或更高同一性的序列编码的氨基酸序列的鼠 IL-21 多肽), 或另一个哺

哺乳动物的 IL-21 多肽, 例如非人灵长类动物, 牛, 等等。

IL-21 多肽的氨基酸序列是公知的。例如, 人 IL-21 的核苷酸序列和氨基酸序列可从 GENBANK® Acc. No. X\_011082 获得。示例性的公开的人 IL-21 核苷酸序列如下:

```

1 gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtcc
61 tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatgggtcatc ttcttgggga cactgggtcca
121 caaatcaagc tccaagggtc aagatcgcca catgattaga atgcgtcaac ttatagatat
181 tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga cttgggtccct gaatttctgc cagctccaga
241 agatgtagag acaaaactgtg agtggtcagc tttttcctgc tttcagaagg cccaactaaa
301 gtcagcaaat acaggaaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag
361 gaaaccacct tccacaaatg cagggaagaag acagaaacac agactaacat gcccttcattg
421 tgattcttat gagaaaaaac caccacaaaga attccttagaa agattcaaat cacttctcca
481 aaagatgatt catcagcatc tgcctcttag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc
541 taacttgtag ttggacacta tgttacatac tctaataatag tagtgaaagt catttctttg
601 tattccaagt ggaggag (SEQ ID NO:1)

```

5

其它核苷酸序列信息可从, 例如提供了编码示例性 IL-21 多肽的 642bp mRNA 序列的 AF254069 [gi:11093535] 获得。某些实施方案中, 使用编码成熟 IL-21 的核苷酸序列的区域 (例如没有编码信号序列的区域) 是足够的。示例性的成熟人 IL-21 多肽的氨基酸序列如下:

```

QDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANT
GNNERIINVSIIKKLRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKM
IHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:2)

```

10

成熟序列根据 Parrish-Novak 等 (2000) *Nature* 408: 57-63。全长序列是:

```

MRSSPGNMERIVICLMVIFLGLTVHKSSSQGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVP
EFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLRKPPSTNAGRRQ
KHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID
NO:10)

```

提供人 IL-21 多肽氨基酸序列的其它入口如下:

gi | 11141875 | ref | NP\_068575.1 | Interleukin 21 [Homo sapiens];

15

gi | 11093536 | gb | AAG29348.1 | Interleukin 21 [Homo sapiens];

gi | 42542586 | gb | AAH66259.1 | Interleukin 21 [Homo sapiens];

gi | 42542588 | gb | AAH66260.1 | Interleukin 21 [Homo sapiens];

gi | 42542657 | gb | AAH66261.1 | Interleukin 21 [Homo sapiens];

gi | 42542659 | gb | AAH66258.1 | Interleukin 21 [Homo sapiens]; 和

20

gi | 42542807 | gb | AAH66262.1 | Interleukin 21 [Homo sapiens]。人

IL-21 多肽可以是本文所述多肽的变体, 只要它保留功能。

IL-21 多肽可由与 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 所示核苷酸序列或其互补链在本文所述条件下,例如高度严谨条件(例如  $0.1 \times \text{SSC}$ ,  $65^{\circ}\text{C}$ )下杂交的核酸编码。也可使用编码 IL-21/IL-21R 蛋白或融合蛋白,但由于遗传密码简并性而不同于 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 所示核苷酸序列的分离的多核苷酸。还可使用通过点突变或通过诱导修饰产生的 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 所示核苷酸序列的变体。

在其他实施方案中,IL-21/IL-21R 激动剂是包含 IL-21 多肽例如人或鼠 IL-21 多肽或其片段,和(例如融合的)第二个部分的融合蛋白,所述第二个部分例如为多肽(例如 GST、Lex-A、MBP 多肽序列或免疫球蛋白链,包括例如 Fc 片段、各种同种型的重链恒定区,包括 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 和 IgE)。

融合蛋白还可包括将 IL-21 或 IL-21R 片段与第二部分连接的接头。例如,融合蛋白可包括肽接头,例如长约 4 至 20 个,更优选 5 至 10 个氨基酸的肽接头;肽接头长度为 8 个氨基酸。肽接头的每个氨基酸选自 Gly、Ser、Asn、Thr 和 Ala;肽接头包含 Gly-Ser 元件。其他实施方案中,融合蛋白包括肽接头并且肽接头包括具有下述通式的序列: (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly, SEQ ID NO: 11)<sub>y</sub>, 其中 y 是例如 1、2、3、4、5、6、7 或 8。

在其他实施方案中,附加的氨基酸序列可以添加到融合蛋白的 N-末端或 C-末端以促进表达、检测和/或分离或纯化。例如,IL-21 融合蛋白可与一个或多个附加部分,例如 GST、His6 标记、FLAG 标记连接。例如,融合蛋白可以额外地与 GST 融合蛋白连接,其中融合蛋白序列与 GST(即谷胱甘肽 S-转移酶)序列的 C-末端融合。这种融合蛋白可促进融合蛋白的纯化。

另一个实施方案中,融合蛋白的 N-末端包括异源信号序列(即 IL-21 核酸编码的多肽中不存在的多肽序列)。例如,天然信号序列可被除去并用另一个蛋白的信号序列替换。在某些宿主细胞中(例如,哺乳动物宿主细胞),使用异源信号序列可提高 IL-21/IL-21R 激动剂的表达和/或分泌。因此,使用相似方法还可产生 IL-21R 蛋白及其片段,从而例如提供免疫原以获得与 IL-21R 相互作用的激动性抗体。

可通过标准重组 DNA 技术产生嵌合或融合蛋白。例如,按照常规技术,例

如通过使用平头末端或粘性末端进行连接、限制性内切酶消化以提供合适的末端、视情况而定补齐粘性末端、碱性磷酸酶处理以避免不需要的连接以及酶催化连接,将编码不同多肽序列的 DNA 片段在框内连接起来。在另一个实施方案中,通过常规技术,包括自动化 DNA 合成仪可以合成融合基因。或者,可进行基因片段的 PCR 扩增,其中使用在两个连续基因片段之间产生互补突出的锚定引物,随后退火、再扩增而产生嵌合基因序列(参见例如 Ausubel 等(编者) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992)。此外,许多表达载体是可商业获得的编码融合部分(例如免疫球蛋白重链的 Fc 区)的载体。IL-21/IL-21R 激动剂编码核酸可以克隆到这种表达载体中,因此融合部分与免疫球蛋白在框内连接。

在某些实施方案中,融合多肽以寡聚体,如二聚体(例如同二聚体或异二聚体)或三聚体的形式存在。用本领域的已知方法可以构建第一个多肽和/或编码第一个多肽的核酸。

在某些实施方案中,第一个多肽包括全长 IL-21/IL-21R 激动剂多肽(例如 IL-21 本身)。或者,第一个多肽包含小于全长的 IL-21/IL-21R 多肽。可包括在融合蛋白中的信号肽是 MPLLLLLLLLLPSPLHP (SEQ ID NO: 9)。如果需要,包含 IL-21/IL-21R 激动剂部分的第一个多肽部分和第二个多肽部分之间可以额外插入一个或多个氨基酸。

第二个多肽优选是可溶的。在某些实施方案中,第二个多肽增加连接的多肽的半衰期(例如血清半衰期)。在某些实施方案中,第二个多肽包括促进融合多肽与第二个 IL-21/IL-21R 激动剂多肽结合的序列。在优选实施方案中,第二个多肽包括免疫球蛋白多肽的至少一个区域。免疫球蛋白融合多肽是本领域已知的,并在例如 US 5,516,964; 5,225,538; 5,428,130; 5,514,582; 5,714,147; 和 5,455,165 中有描述。

在某些实施方案中,第二个多肽包含全长免疫球蛋白多肽。或者,第二个多肽包含小于全长的免疫球蛋白多肽,例如重链、轻链、Fab、Fab<sub>2</sub>、Fv 或 Fc。第二个多肽可以包括免疫球蛋白多肽的重链。第二个多肽可以包括免疫球蛋白多肽的 Fc 区。

在某些实施方案中,第二个多肽的效应子功能比野生型免疫球蛋白重链 Fc 区的效应子功能差。Fc 效应子功能包括例如, Fc 受体结合、补体结合和 T 细胞

消耗活性（参见例如 US 6,136,310）。检测 T 细胞消耗活性、Fc 效应子功能和抗体稳定性的方法是本领域已知的。在一个实施方案中，第二个多肽对 Fc 受体的亲合力很低或没有亲合力。在另一种实施方案中，第二个多肽对补体蛋白 C1q 的亲合力很低或没有亲合力。

- 5       本文所述的分离的 IL-21/IL-21R 激动剂多核苷酸可与表达控制序列，如 Kaufman 等，*Nucleic Acids Res.* 19, 4485-4490 (1991) 公开的 pMT2 或 pED 表达载体可操作地连接以重组产生蛋白。许多合适的表达控制序列是本领域已知的。表达重组蛋白的一般方法也是已知的，并且 R. Kaufman, *Methods in Enzymology* 185, 537-566 (1990) 中有举例说明。本文定义的“可操作地连接”  
10       是指酶连接或化学连接从而在编码目标蛋白的特定多核苷酸和表达控制序列之间形成共价键，以这种方式可由已用连接的多核苷酸/表达控制序列转化（转染）的宿主细胞表达出目标蛋白（例如 IL-21 或另一 IL-21/IL-21R 激动剂）。

- 本文所用的术语“载体”指能够转运或者保持或复制与其连接的另一个核酸的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”，是指其中可连接附加 DNA 片段的环  
15       状双链 DNA 环。载体的另一种类型是病毒载体，其中附加 DNA 片段可与病毒基因组连接。某些载体能在引入它们的宿主细胞中自主复制（例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）。其他载体（例如非附加型哺乳动物载体）一旦引入宿主细胞就可以整合到宿主细胞基因组中从而与宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够指导与其可操作地连接的基因的表达。这种载体在  
20       本文中称作“重组表达载体”（或简单地说“表达载体”）。通常，重组 DNA 技术中有用的表达载体常常是质粒形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可以交换使用，因为质粒是最常用的载体形式。然而，本发明意图包括表达载体的其他形式，如发挥同样功能的病毒载体（例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒）。

- 25       术语“调节序列”包括控制抗体链基因转录或翻译的启动子、增强子以及其它表达控制元件（例如聚腺苷酸化信号）。例如 Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) 描述了这种调节序列。本领域技术人员应当理解设计表达载体，包括选择调节序列取决于这些因素，如选择转化的宿主细胞、所需蛋白的表达水平  
30       等等。优选的哺乳动物宿主细胞表达的调节序列包括在哺乳动物细胞中指导蛋

白高水平表达的病毒元件,如得自 FF-1a 启动子和 BGH poly A,巨细胞病毒(CMV) (如 CMV 启动子/增强子),猿猴病毒 40 (SV40) (如 SV40 启动子/增强子),腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多形瘤的启动子和/或增强子。参见例如 Stinski 的 US 5,168,062, Bell 等的 US 4,510,245 和 Schaffner 等的 US 4,968,615, 其中进一步描述了病毒调控元件及其序列。

重组表达载体可以携带附加序列,如调节载体在宿主细胞中复制的序列(例如复制起始点)和选择标记基因。选择标记基因便于筛选已经引入载体的宿主细胞(参见例如 Axel 等的 US 4,399,216, US 4,634,665 和 US 5,179,017)。例如一般,选择标记基因使已经引入载体的宿主细胞具有对药物,如 G418、潮霉素或氨甲蝶呤的耐受性。优选的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于经氨甲蝶呤筛选/扩增的 dhfr<sup>-</sup>宿主细胞)和 neo 基因(用于 G418 筛选)。

许多细胞类型可作为表达 IL-21/IL-21R 激动剂蛋白或其融合蛋白的合适的宿主细胞。可以使用能够表达功能性 IL-21/IL-21R 蛋白的任意细胞类型。合适的哺乳动物宿主细胞包括,例如猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人肾 293 细胞、人表皮 A431 细胞、人 Colo 205 细胞、3T3 细胞、CV-1 细胞、其他转化的灵长类动物细胞系、正常的二倍体细胞、由体外培养原代组织、原代外植体获得的细胞株、HeLa 细胞、小鼠 L 细胞、BHK、HL-60、U937、HaK、Rat2、BaF3、32D、FDCP-1、PC12、M1x 或 C2C12 细胞。

通过将编码这种蛋白的多核苷酸与一种或多种昆虫表达载体中的合适的控制序列可操作地连接,并使用昆虫表达系统也可产生 IL-21/IL-21R 激动剂蛋白或其融合蛋白。可以从例如 Invitrogen, San Diego, Calif. U. S. A. 商业获得试剂盒形式(MAXBAC<sup>®</sup>试剂盒)的杆状病毒/昆虫细胞表达系统的材料和方法,并且这种方法是本领域公知的,如 Summers 和 Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1978) 所描述的,引入本文作为参考。用如上所述合适的分离的多核苷酸还可以在昆虫细胞中产生可溶形式的 MU-1 蛋白。

或者,可在低级真核生物如酵母或原核生物如细菌中产生 IL-21/IL-21R 激动剂蛋白或其融合蛋白。合适的酵母菌株包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、克鲁维氏酵母属(*Kluyveromyces*)菌株、念珠菌(*Candida*)或能够表达异源蛋白的任意酵母



菌株。合适的细菌菌株包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 或能够表达异源蛋白的任意细菌菌株。

5 在一个实施方案中, 细菌产生没有信号序列的 IL-21 (例如没有原核或真核信号序列)。在细菌中表达可形成掺有重组蛋白质的包涵体。因此, 需要重新折叠重组蛋白质以便产生具有活性或更多活性的物质。从细菌包涵体获得正确折叠的异源蛋白的一些方法是本领域已知的。这些方法通常包括溶解包涵体的蛋白, 然后用离液剂使蛋白完全变性。

当蛋白的一级氨基酸序列中存在半胱氨酸残基时, 在促进形成正确二硫键的环境 (例如氧化还原系统) 中可以重新折叠蛋白。Kohn, Meth. Enzym. 185: 187-195 (1990) 公开了重新折叠的一般方法。EP 0433225 和 US 5, 399, 677, Asano 等 (2002) *FEBS Lett* 528 (1-3): 70-6 描述了重新折叠细菌细胞产生的 IL-21 的示例性方法。例如, 大肠杆菌以不溶性包涵体形式表达 rIL-21 (重组 IL-21), 然后溶解 (例如使用变性剂) 并用其中引入氧化还原试剂的经改进的透析方法重新折叠。

IL-21/IL-21R 激动剂蛋白或其融合蛋白还可作为转基因动物的产品形式表达, 例如作为转基因奶牛、山羊、猪或绵羊的奶的成分, 这些转基因动物的特点是体细胞或生殖细胞包含编码 IL-21/IL-21R 激动剂蛋白或其融合蛋白的多核苷酸序列。

20 通过在表达所需蛋白必需的培养条件下培养转化的宿主细胞可以制备 IL-21/IL-21R 激动剂蛋白或其融合蛋白。然后从培养基或细胞提取物中纯化获得的表达蛋白。可溶形式的 IL-21/IL-21R 激动剂蛋白或其融合蛋白可从条件培养基中纯化。通过从表达细胞中制备总的膜级分并用非离子型洗涤剂如 Triton X-100 提取膜可以纯化 MU-1 蛋白的膜结合形式。

25 可以用本领域技术人员已知的方法纯化 IL-21/IL-21R 激动剂蛋白或融合蛋白。例如用商业获得的蛋白浓缩过滤器, 例如 AMICON® 或 MILLIPORE® PELLICON™ 超滤装置可以浓缩 IL-21/IL-21R 激动剂蛋白。浓缩步骤之后, 浓缩物可以施加到纯化基质如凝胶过滤介质。或者可以使用阴离子交换树脂, 例如具有侧面的二乙氨基乙基 (DEAE) 或聚乙烯亚胺 (PEI) 基团的基质或基底。基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或通常用于蛋白质纯化的其他类

30

型。或者可以使用阳离子交换步骤。合适的阳离子交换剂包括包含磺丙基或羧甲基基团的不溶性基质。优选磺丙基基团(例如 S-Sepharose®柱)。从培养上清液纯化 MU-1 蛋白质或融合蛋白还可包括在如伴刀豆球蛋白 A-琼脂糖、肝素-TOYOPEARL®或 Cibacrom blue 3GA SEPHAROSE®的亲合树脂上进行的一个或多个柱步骤; 或通过用如苯基醚、丁基醚或丙基醚的树脂进行的疏水相互作用层析; 或通过免疫亲和层析。最后通过使用疏水性 RP-HPLC 介质, 例如具有侧面的甲基或其他脂肪族基团的硅胶进行一个或多个反向高效液相色谱(RP-HPLC)步骤可以进一步纯化 IL-21/IL-21R 激动剂蛋白。包括抗 IL-21/IL-21R 激动剂蛋白的抗体的亲和柱也可用于根据已知方法进行的纯化。还可使用上述全部或某些纯化步骤的各种组合或与其他已知方法的各种组合从而提供基本纯化的分离的重组蛋白。优选地, 分离的 IL-21/IL-21R 激动剂蛋白是纯化的, 因此基本不含其他哺乳动物蛋白, 或如果是在细菌中产生的, 基本不含其他细菌蛋白, 例如内毒素。

在其他实施方案中, IL-21/IL-21R 激动剂是与例如 IL-21R, 优选哺乳动物(例如人或鼠)IL-21 或 IL-21R 结合并激活 IL-21R 活性的抗体或其抗原结合片段。

本文所用的术语“抗体”是指包含至少一个, 优选两个重链(H)可变区(本文缩写为 VH), 和至少一个, 优选两个轻链(L)可变区(本文缩写为 VL)的蛋白。VH 和 VL 可进一步细分为超变区, 称为“互补性决定区”(“CDR”), 它分散在较保守的称作“构架区”(“FR”)的区域中。已经精确定义了构架区和 CDR 的界限(参见 Kabat E. A. 等(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 和 Chothia C. 等(1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, 引入本文作为参考)。每个 VH 和 VL 由从氨基端向羧基端以下述顺序排列的三个 CDR 和四个 FR 组成: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

抗体可进一步包括重链恒定区和轻链恒定区, 从而分别形成免疫球蛋白的重链和轻链。在一个实施方案中, 抗体是两个免疫球蛋白重链和两个免疫球蛋白轻链的四聚体, 其中免疫球蛋白的重链和轻链通过例如二硫键而相互连接。重链恒定区包含三个功能域, CH1、CH2 和 CH3。轻链恒定区包含一个功能域 CL。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体恒定区一般介导抗体

与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一个成分(C1q)的结合。

本文使用的术语“免疫球蛋白”是指由基本由免疫球蛋白基因编码的一个或多个多肽组成的蛋白。公认的人免疫球蛋白基因包括 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ (IgA1和IgA2)、 $\gamma$ (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ 恒定区基因以及无数的免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白“轻链”(约25 Kd或214个氨基酸)由可变区基因编码NH<sub>2</sub>末端(约110个氨基酸),由 $\kappa$ 或 $\lambda$ 恒定区基因编码COOH末端。全长免疫球蛋白“重链”(约50 Kd或446个氨基酸)类似地由可变区基因(约116个氨基酸)和上述其它恒定区基因之一,例如 $\gamma$ (编码约330个氨基酸)编码。

本文中“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体种类(例如IgM或IgG1)。

本文所用的术语抗体的“抗原结合片段”(或简称“抗体部分”或“片段”)是指保留与抗原(例如IL-21R)特异性结合能力的全长抗体的一种或多种片段。包括在术语抗体的“抗原结合片段”范围内的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1组成的单价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,包含在绞链区由二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由VH和CH1组成的Fd片段;(iv)由抗体单个臂的VL和VH组成的Fv片段,(v)由VH组成的dAb片段(Ward等(1989) *Nature* 341: 544-546);和(vi)分离的互补性决定区(CDR)。此外,虽然Fv片段的两个功能域VL和VH由分开的基因编码,但使用重组方法通过能使它们形成单个蛋白链(其中VL和VH对形成单价分子)的合成接头可以连接这两个片段(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等(1988) *Science* 242: 423-426;和Huston等(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883)。这种单链抗体也包括在术语抗体的“抗原结合片段”范围内。用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并且将这些片段以与完整抗体相同的方法进行筛选而加以应用。“实际上是人的”免疫球蛋白可变区是包括足够数量的人框架氨基酸位置的免疫球蛋白可变区,因此免疫球蛋白可变区在正常人中不诱发免疫原性反应。“实际上是人的”抗体是包括足够数量的人氨基酸位置的抗体,因此抗体在正常人中不诱发免疫原性反应。可以使用人的和实际上是人的免疫球蛋白可变区和抗体。

IL-21 或 IL-21R 蛋白可用来免疫动物 (例如非人动物和包括人免疫球蛋白基因的非人动物) 以获得与 IL-21/IL-21R 激动剂蛋白特异性反应并激活 IL-21R 的多克隆抗体和单克隆抗体。用完整的 IL-21/IL-21R 激动剂蛋白作为免疫原, 或使用 IL-21/IL-21R 的片段可以获得这种抗体。肽免疫原的羧基末端可额外包  
5 含半胱氨酸残基, 并与半抗原如匙孔血蓝蛋白 (KLH) 缀合。用硫酸酪氨酸残基取代酪氨酸残基可以产生其它肽免疫原。合成这种肽的方法是本领域已知的, 例如 R. P. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963); J. L. Krstenansky 等, FEBS Lett. 211, 10 (1987)。

用携带人免疫球蛋白基因而不是小鼠体系的转基因小鼠可以产生抗 IL-21  
10 或 IL-21R 的人单克隆抗体 (mAbs)。这些用目标抗原免疫的转基因小鼠的脾细胞用来产生分泌对人蛋白的表位有特异性亲合力的人 mAbs 的杂交瘤 (参见例如 WO 91/ 00906; WO 91/ 10741; WO 92/ 03918; WO 92/ 03917; Lonberg, N. 等, 1994 *Nature* 368: 856-859; Green, L. L. 等, 1994 *Nature Genet.* 7: 13-21; Morrison, S. L. 等, 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855; Bruggeman  
15 等, 1993 *Year Immunol* 7: 33-40; Tuailon 等, 1993 *PNAS* 90: 3720-3724; Bruggeman 等, 1991 *Eur. J. Immunol.* 21: 1323-1326)。

还可以用重组 DNA 技术领域技术人员已知的其他方法产生单克隆抗体。已经研究了一种替代方法, 称为“组合抗体展示”方法, 来鉴别和分离具有特定抗原特异性的抗体片段, 并可用于生产单克隆抗体 (对组合抗体展示的描述参  
20 见例如 Sastry 等, 1989 *PNAS* 86: 5728; Huse 等, 1989 *Science* 246: 1275; 和 Orlandi 等, 1989 *PNAS* 86: 3833)。用如上所述的免疫原免疫动物后, 克隆获得的 B 细胞群体的抗体库。用寡聚引物的混合物和 PCR 获得不同群体的免疫球蛋白分子的可变区 DNA 序列的方法是公知的。例如, 对应于 5' 前导 (信号肽) 序列和/或框架 1 (FR1) 序列的混合寡核苷酸引物以及保守的 3' 恒定区引物的  
25 引物可用于从许多鼠抗体 PCR 扩增重链和轻链可变区 (Larrick 等, 1991 *Biotechniques* 11: 152-156)。类似策略也可用来从人抗体扩增人重链和轻链可变区 (Larrick 等, 1991 *Methods: Companion to Methods in Enzymology* 2: 106-110)。

嵌合抗体, 包括嵌合的免疫球蛋白链, 可通过本领域已知的重组 DNA 技术  
30 生产。例如, 用限制性内切酶消化编码鼠 (或其他物种) 单克隆抗体分子的 Fc

恒定区的基因,以除去编码鼠类 Fc 的区域,取代编码人 Fc 恒定区的基因的等效部分(参见 Robinson 等,国际专利公开 PCT/US86/02269; Akira 等,欧洲专利申请 184,187; Taniguchi, M., 欧洲专利申请 171,496; Morrison 等,欧洲专利申请 173,494; Neuberger 等,国际申请 WO 86/01533; Cabilly 等美国  
5 专利号 4,816,567; Cabilly 等,欧洲专利申请 125,023; Better 等(1988 *Science* 240: 1041-1043); Liu 等(1987) *PNAS* 84: 3439-3443; Liu 等,1987, *J. Immunol.* 139: 3521-3526; Sun 等(1987) *PNAS* 84: 214-218; Nishimura 等,1987, *Canc. Res.* 47: 999-1005; Wood 等(1985) *Nature* 314: 446-449; 和 Shaw 等,1988, *J. Natl Cancer Inst.* 80: 1553-1559)。

10 可以用本领域已知的方法人源化抗体或免疫球蛋白链。通过用来自人 Fv 可变区的等同序列替换不直接参与抗原结合的 Fv 可变区序列可以产生人源化抗体(包括人源化的免疫球蛋白链)。产生人源化抗体的一般的方法由 Morrison, S. L., 1985, *Science* 229: 1202-1207; Oi 等,1986, *BioTechniques* 4: 214; 和 Queen 等 US 5,585,089, US 5,693,761 和 US 5,693,762 提供,其全文引入  
15 此处作为参考。这些方法包括分离、处理和表达核苷酸序列,所述核苷酸序列编码来自至少一条重链或轻链的免疫球蛋白 Fv 可变区的全部或部分核苷酸序列。上述核酸的来源是本领域技术人员所公知的,例如,可获自产生针对预定目标的抗体的杂交瘤。然后可将编码人源化抗体或其片段的重组 DNA 克隆至适当的表达载体中。

20 人源化或 CDR 移植抗体分子或免疫球蛋白可通过 CDR 移植或 CDR 替换制备,其中可以替换免疫球蛋白链的一个、两个或全部 CDR。参见例如,美国专利 5,225,539; Jones 等 1986 *Nature* 321: 552-525; Verhoeyan 等 1988 *Science* 239: 1534; Beidler 等 1988 *J. Immunol.* 141: 4053-4060; Winter US 5,225,539,由此引入作为参考。Winter 描述了 CDR-移植方法。其可用于制备  
25 人源化抗体(UK 专利申请 GB 2188638A,提交于 1987 年 3 月 26 日; Winter US 5,225,539),其内容引入作为参考。特定人抗体的所有 CDR 可用非人 CDR 的至少一部分进行替换或仅一些 CDR 可用非人 CDR 替换。仅需替换人源化抗体结合至预定抗原所需的 CDR 数目。

某些实施方案中,单克隆抗体、嵌合抗体和人源化抗体可通过,例如,删  
30 除、增加或替换抗体的其他部分(例如,恒定区)进行修饰。例如,抗体可按

以下进行修饰: (i) 通过删除恒定区; (ii) 通过用另一恒定区, 例如意在增加抗体的半寿期、稳定性或亲和性的恒定区, 或来自另外物种或抗体种类的恒定区替换该恒定区; 或 (iii) 通过修饰恒定区的一个或多个氨基酸以改变, 尤其是例如糖基化位点的数目、效应细胞功能、Fc 受体 (FcR) 结合、补体结合。

5       改变抗体恒定区的方法是本领域已知的。具有改变的功能, 例如改变的对于效应物配体 (如细胞上的 FcR, 或补体的 C1 组分) 的亲和性的抗体可通过用不同残基替换抗体恒定部分的至少一个氨基酸残基进行制备 (参见例如, EP 388, 151 A1, US 5, 624, 821 和 US 5, 648, 260)。可描述相似类型的改变, 其若应用于鼠科动物或其他物种的免疫球蛋白, 将减少或消除这些功能。

10       例如, 可通过用其侧链上具有适当官能性的残基替代特定的残基, 或通过引入带电荷的官能团诸如谷氨酸或天冬氨酸, 或可能是芳香族非极性残基诸如苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸或丙氨酸来改变抗体 (例如, IgG, 例如人 IgG) 的 Fc 区对于 FcR (例如, Fc  $\gamma$ R1), 或对于 C1q 结合的亲和性 (参见例如, US 5, 624, 821)。

15       在一个实施方案中, IL-21R 的激动剂是与 IL-21R 和另一受体亚基 (例如,  $\gamma$ c) 相互作用的试剂。例如, 试剂可以是与 IL-21R 和另一受体亚基 (例如,  $\gamma$ c) 相互作用的蛋白。蛋白可以是, 例如, 包含一个与 IL-21R 相互作用的抗原结合部位和另一与  $\gamma$ c 相互作用的抗原结合部位的双特异抗体。所述蛋白的结合可用于交联和激动受体, 例如, 激活或增强 STAT3 或 STAT5 信号。

20       在一个实施方案中, IL-21/IL-21R 激动剂是稳定 IL-21/IL-21R 相互作用 (例如, 通过与 IL-21 和 IL-21R 的一个或全部结合) 的试剂 (例如, 免疫球蛋白)。

采用本领域已知的方式可以就例如结合和/或激活 IL-21R 多肽而对 IL-21/IL-21R 蛋白的激动剂进行筛选。使用所需结合蛋白 (无论是否固定) 的结合测定是本领域已知的, 可用于此处描述的使用 IL-21R 蛋白的目的。可使用  
25       以纯化的细胞为基础的或以蛋白为基础的 (无细胞) 筛选检测来鉴定所述激动剂。例如, 可将纯化型 IL-21R 蛋白固定在载体上, 然后可以测定纯化的 IL-21R 蛋白的结合或潜在的配体。用于评估 IL-21R 活性和 STAT3 或 STAT5 信号的以细胞为基础的测定是已知的。本文中描述了实例。

30       药物组合物

与药学上可接受的载体组合时, IL-21/IL-21R 激动剂可被用作药物组合  
物。该组合物可包括, 除 IL-21/IL-21R 激动剂和载体之外, 各种稀释剂, 填充  
剂, 盐, 缓冲质, 稳定剂, 增溶剂, 和本领域众所周知的其他物质。术语“药  
学上可接受的”是指不干扰活性成分的生物活性效能的无毒物质。载体特性将  
5 依赖于给药途径。

药物组合物可进一步包含其他抗炎剂, 如下面更详细地描述。所述添加的  
因子和/或试剂可包含于药物组合物中, 以产生与 IL-21/IL-21R 激动剂的协同  
效应, 或将 IL-21/IL-21R 激动剂引起的副作用降到最低。相反, IL-21/IL-21R  
激动剂可包含于特定抗炎剂的制剂中, 以使抗炎剂的副作用降到最低。

10 药物组合物可以是脂质体的形式, 其中 IL-21/IL-21R 激动剂(除了其他药  
学上可接受的载体之外)与两亲试剂组合, 诸如以聚集体形式例如胶束、不溶  
解单层、液晶或在水溶液中的片状层存在的脂质。用于脂质体制剂的适宜脂质  
包括但不限于, 甘油单酯, 甘油二酯, 硫脑苷脂类, 溶血卵磷脂, 磷脂类, 皂  
苷, 胆汁酸, 等。该脂质体制剂的制备是本领域技术人员可实现的, 诸如, 例  
15 如美国专利号 4, 235, 871; 美国专利号 4, 501, 728; 美国专利号 4, 837, 028; 和  
美国专利号 4, 737, 323 中所示, 其引入此处作为参考。

如本文所使用的, 术语“治疗有效量”是指药物组合物或方法的各活性成  
分足以显示出有意义的患者受益, 例如, 所述病症的症状改善、康复或康复率  
增加的总量。当用于单个活性成分(单独给予)时, 该术语是指单独的成分。  
20 当用于组合时, 该术语是指产生治疗效果的活性成分的组合量, 不论是组合,  
连续或同时地给予。

在治疗方法或应用的实施中, 将治疗有效量的 IL-21/IL-21R 激动剂给予受  
试者, 例如, 哺乳动物(例如, 人)。IL-21/IL-21R 激动剂可单独给予或与其他  
治疗(诸如使用抗炎剂的治疗)组合。当与一种或多种试剂共同给予时, IL-21  
25 和/或 IL-21R 激动剂可与第二种试剂同时或顺次地给予。如果顺次地给予, 主  
治医师可确定 IL-21/IL-21R 激动剂与其他试剂组合给予的适宜次序。

药物组合物中使用的或实施本发明方法的 IL-21/IL-21R 激动剂的给予可  
用多种常规方法施行, 诸如口服、颅内、吸入, 或者皮肤、皮下、或静脉注射  
或给药。例如, 组合物可以以硬膜外等的方式递送, 例如, 递送至脑脊髓液。

30 当口服给予治疗有效量的 IL-21/IL-21R 激动剂时, 结合剂应是片剂、胶囊、

散剂、溶液或酞剂的形式。当以片剂形式给予时，药物组合物还可包含固体载体诸如明胶或佐剂。片剂、胶囊和散剂含有约 5-95%结合剂，优选约 25-90% 结合剂。当以液体形式给予时，可以加入诸如水，石油，动物油或植物油（诸如花生油、矿物油、大豆油或芝麻油）或者合成油的液体载体。药物组合物的液体形式可进一步包含生理盐水溶液、葡萄糖或其他糖类溶液、或二醇（诸如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇）。当以液体形式给予时，药物组合物含有约 0.5-90 重量%的结合剂，优选约 1-50%的结合剂。

当通过静脉内、皮肤或皮下注射给予治疗有效量的 IL-21/IL-21R 激动剂时，结合剂应是无热源的、肠胃外途径可接受的含水溶液形式。所述肠胃外途径可接受的蛋白溶液（具有相应的 pH，等张性，稳定性，等）的制备是本领域的已知技术。用于静脉内、皮肤或皮下注射的优选药物组合物可包含（除结合剂之外）等张赋形剂例如氯化钠注射液，林格注射液，葡萄糖注射液，葡萄糖和氯化钠注射液，乳酸林格注射液或本领域已知的其他赋形剂。本发明的药物组合物还可包含稳定剂、防腐剂、缓冲质、抗氧化剂、或本领域技术人员已知的其它添加剂。

本发明药物组合物中 IL-21/IL-21R 激动剂的量要依据需要治疗的病状的性质和严重程度，和患者经受的在先治疗的性质。主治医师可以确定治疗每个单独的患者的激动剂的量。最初，例如，主治医师可给予小剂量的结合剂，然后观察患者的反应。给予更大剂量的结合剂直到患者达到最佳治疗效果（此时剂量通常不再增加），或通过检测细胞因子水平或一种或多种症状。可以预期，用于实施本发明的方法的多种药物组合物应包含约 0.1  $\mu$ g -约 100 mg/公斤体重的 IL-21/IL-21R 激动剂。例如，可用剂量可包括约 10  $\mu$ g-1mg，0.1-5mg，和 3-50mg/公斤体重的 IL-21/IL-21R 激动剂。IL-21 的可用剂量可进一步包括约 5  $\mu$ g-1mg，0.1-5mg，和 3-20 mg/公斤体重的 IL-21/IL-21R 激动剂。

使用药物组合物的静脉治疗的持续时间可根据要治疗的疾病的严重程度和每个单独的患者的情况和潜在的特异性反应而改变。IL-21/IL-21R 激动剂的每次应用的持续时间可以是，例如，连续静脉内给予 12-24 小时。主治医师可以确定使用本发明药物组合物的静脉内治疗的适宜持续时间。

除 IL-21/IL-21 激动剂之外，当所述激动剂是蛋白时，疾病或病症可通过给予或使用编码该蛋白的多核苷酸（例如，在基因治疗或适于引入 DNA 的载体



中)进行治疗或预防。

#### 使用 IL-21/IL-21R 激动剂以增强免疫应答

一方面,本发明提供了在受试者中治疗(例如,治愈、抑制、改善、延迟或预防发病、或预防再现或复发)或预防神经系统的免疫性疾病(例如,慢性神经系统的免疫性疾病,包括多发性硬化症)的方法。该方法包括:给予受试者 IL-21/IL-21R 激动剂,给予量足以调节免疫细胞活性和/或细胞数量(例如,调节细胞因子水平,例如,细胞因子表达、产生和/或释放),从而治疗或预防神经系统的免疫性疾病,例如,多发性硬化症。

多发性硬化症(MS)是一种中枢神经系统疾病,其特征是炎症和髓鞘(隔离神经且是正常神经功能需要的脂肪物质)的丧失。可用本文描述的 IL-21/IL-21R 激动剂预防或治疗由 IL-21 调节的免疫应答引起的炎症。在多发性硬化症的实验性自身免疫性脑炎(EAE)小鼠模型中(Tuohy 等(J. Immunol. (1988) 141: 1126-1130), Sobel 等(J. Immunol. (1984) 132: 2393-2401), 和 Traugott (Cell Immunol. (1989) 119 : 114-129)),小鼠在 EAE 诱导之前用 IL-21 注射剂治疗减轻了疾病的症状。因此,本文描述的 IL-21/IL-21R 激动剂可相似地用于治疗或预防人的多发性硬化症。

适合这种治疗的患者可通过由 MS 诊断研讨会所定义的确立临床确诊的 MS 的诊断的标准进行鉴别(Poser 等, Ann. Neurol. 13: 227, 1983)。简言之,临床确诊的 MS 的个体已具有两次发病,和两个损害或一个损害的临床证据及另一分开的损伤的临床旁学(paraclinical)证据。确诊的 MS 还可通过两次发病的证据和脑脊髓液中 IgG 的寡克隆(oligoclonal)带,或通过结合发病、两个损害的临床证据和脑脊髓液中 IgG 的寡克隆带进行诊断。略低的标准用于诊断临床可能的 MS。

可以通过几个不同的方法检测多发性硬化症的有效治疗。表明满足下列任何标准表明有效的治疗。使用三个主要标准:EDSS(扩展的残疾状态量表),恶化表现或 MRI(核磁共振成像)。EDSS 是一种分级由于 MS 的临床病损的方法(Kurtzke, Neurology 33: 1444, 1983)。评估八个功能系统的神经损伤的类型和严重程度。简言之,在治疗前,评估患者下列系统的病损:锥体,小脑,脑干,知觉器官,肠和膀胱,视觉,大脑,等。以确定的间隔实施追踪观察。标度范围从 0(正常)到 10(由于 MS 死亡)。一个完整步骤的减少定义了本发明

上下文中的有效治疗 (Kurtzke, Ann. Neurol. 36: 573-79, 1994)。恶化被定义为新症状的出现, 该新症状归因于 MS 且伴随有适当的新的神经异常 (IFNB MS Study Group, 出处同上)。此外, 恶化必须至少持续 24 小时且在稳定或改善之前至少 30 天。简言之, 临床医生给予患者标准的神经系统检查。依照神经学上的评定量表中的变化, 恶化是轻度、中度或剧烈的 (Sipe 等, Neurology 34: 1368, 1984)。测定每年的恶化率和无恶化患者的比例。如果对于这些测量的任一种, 治疗组和安慰剂组之间无恶化患者的比率或比例存在统计学上显著的差异, 则治疗被认为是有效的。此外, 首次恶化时间以及恶化持续时间和严重度也要测量。此时治疗有效性的量度是在治疗组与对照组比较中首次恶化时间或持续时间和严重度的统计学上显著的差异。

MRI 可用于使用钆-DTPA-增强成像测量活性损害 (McDonald 等 Ann. Neurol. 36: 14, 1994) 或用于使用 T<sub>2</sub> 加权技术 (T<sub>2</sub>-weighted techniques) 测量损害的部位和范围。简言之, 获得基线 MRIs。相同的成像平面和患者位置可用于各随后的研究。选择定位和成像序列以最大化损害检测且易于损害追踪。同样的定位和成像序列可用于随后的研究。如今, 放射科医师可以确定 MS 损害的部位和范围。可以描绘出损害的区域, 并对其就全部损害区域一片一片地进行总计。可实施三种分析: 新损害的证据, 活性损害的出现率, 损害区域的百分比变化 (Paty 等, Neurology 43: 665, 1993)。通过在与基线相比的患者个体中或在与安慰剂组对比的治疗组中的统计学上显著的改善可确立由于治疗而得到的改善。

与多发性硬化症伴发的示例性症状包括: 视神经炎, 复视, 眼球震颤, 眼睛辨距障碍, 核间性眼肌麻痹, 运动和声音光幻视, 传入性瞳孔缺陷, 轻瘫, 单肢轻瘫, 下肢轻瘫, 轻偏瘫, 四肢轻瘫, 瘫痪, 截瘫, 半身不遂, 四肢瘫痪, 四肢麻痹, 痉挛状态, 发音困难, 肌内萎缩, 痉挛, 痛性痉挛, 张力过低, 阵挛, 肌阵挛, 肌纤维颤搐, 下肢不宁综合征, 足下垂, 功能不良性反射, 感觉异常, 感觉缺失, 神经痛, 神经病和神经源性疼痛, l'hermitte's, 本体感受性机能障碍, 三叉神经痛, 共济失调, 意向震颤, 辨距困难, 前庭性共济失调, 眩晕, 语言共济失调, 张力失常, 轮替动作困难, 频繁排尿, 膀胱痉挛, 膀胱松弛, 逼尿肌括约肌协同失调, 勃起机能障碍, 性快感缺失, 冷淡, 便秘, 便急, 大便失禁, 抑郁, 认知功能障碍, 痴呆, 心境不稳, 情绪不稳, 欣快, 双

极综合征 (bipolar syndrome), 焦虑, 失语, 言语困难, 疲劳, 乌托夫症状 (Uhthoff's symptom), 胃食管反流, 和睡眠障碍。

可以通过存在遗传因子来鉴别用于预防的候选患者。例如, 大部分 MS 患者具有 HLA-型 DR2a 和 DR2b。适于治疗的具有 MS 遗传特质的 MS 患者可分为两组。

- 5 第一组是患有复发缓和类型的早期疾病的患者。入围标准可包括超过一年的疾病持续时间, EDSS 得分 1.0-3.5, 恶化率大于每年 0.5, 和研究前有 2 个月无临床上恶化的。第二组包括在过去两年以来, 疾病进展大于 1.0 EDSS 单位/年的人。可以通过评估细胞因子参数 (例如, IL-10 或 IL-21 参数) 来鉴定用于预防的候选患者。

- 10 预防情况中 IL-21/IL-21R 激动剂的效能根据下列标准进行判断: 通过有限稀释确定的 MBP 反应性 T 细胞的频率, MBP 反应性 T 细胞系和克隆的增殖反应, 通过患者建立的 T 细胞系和克隆对 MBP 的细胞因子分布特性。通过反应性细胞的频率下降, 改变的肽与天然的肽相比胸腺嘧啶核苷掺入的减少, 以及 TNF 和 IFN- $\alpha$  的减少可确定有效性。临床检测包括 1 和 2 年间隔的复发率, 和 EDSS 的
- 15 变化, 包括在持续六个月的 EDSS 上从基线进展 1.0 单位的时间。在 Kaplan-Meier 曲线上, 残疾的持续进展的延迟表明有效性。其他标准包括 MRI 上 T2 影像的区域和大小的变化, 和通过钆强化影像而测定的损害的数量和大小。

- 在一个实施方案中, IL-21/IL-21R 激动剂, 例如其药物组合物在联合治疗中给予, 亦即, 与其他试剂例如治疗剂 (其用于治疗病理学状况或疾病, 例如
- 20 脑的免疫性和炎症性疾病, 例如, 多发性硬化症) 联合。术语“联合”在本文中是指试剂基本上同时, 或者同时或顺次给予。如果顺次给予, 那么在开始给予第二种化合物时, 两种化合物的第一种优选地在治疗的位置上仍可以以有效浓度被检测到。

- 例如, 联合治疗可包含一种或多种 IL-21/IL-21R 激动剂 (例如, IL-21
- 25 多肽或融合蛋白, 肽激动剂或小分子激动剂) 与一种或多种另外的治疗剂 (例如, 一种或多种细胞因子和生长因子抑制剂, 免疫抑制剂, 抗炎剂, 代谢抑制剂, 酶抑制剂, 和/或细胞毒素或细胞生长抑制剂, 如下面更多详述的) 共同配制和/或共同给予。此外, 此处描述的一种或多种 IL-21/IL-21R 激动剂可与两种或更多种此处描述的治疗剂联合使用。所述联合治疗可益于使用较低剂量的所
- 30 给予的治疗剂, 由此避免可能的毒性或与多种单一疗法伴随的并发症。而且,

此处公开的治疗剂作用于与 IL-21/IL-21R 受体途径不同的途径, 由此预期其增强 IL-21/IL-21R 激动剂的效应和/或与 IL-21/IL-21R 激动剂的效应协同作用。优选的与 IL-21/IL-21R 激动剂联合使用的治疗剂是那些干扰自身免疫和随后的炎症应答中不同阶段的试剂。

5        治疗或预防多发性硬化症的试剂(可与 IL-21-/IL21R 激动剂联合)的非限制性实例包括如下物质: 干扰素, 例如, 干扰素- $\beta$ -1 $\alpha$ (例如, AVONEX™; Biogen) 和干扰素-1 $\beta$ (BETASERON™; 在 17 位取代的人干扰素 $\beta$ ; Berlex/Chiron); 乙酸格拉默(也称为共聚物 1, Cop-1; COPAXONE™; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); 高压氧; 静脉内施用的免疫球蛋白; 克拉屈滨(clabribine);  
10   本文所述的 TNF 拮抗剂; 皮质类固醇; 泼尼松龙; 甲泼尼龙; 硫唑嘌呤; 环磷酰胺; 环孢素; 氨甲蝶呤; 4-氨基吡啶; 和替扎尼定。可用于联合 IL-21 激动剂的其它拮抗剂包括, 其他人细胞因子或生长因子(例如, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-1 1, GM-CSF, FGF, 和 PDGF)的抗体或拮抗剂。此处描述的 IL-21 激动剂可与细胞表面分子诸如 CD2、  
15   CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90 或其配体的抗体联合。IL-21 激动剂还可联合诸如氨甲蝶呤, 环孢素, FK506, 雷帕霉素, 麦考酚酸吗乙酯, 来氟米特, NSAIDs 例如布洛芬, 皮质类固醇例如泼尼松龙, 磷酸二酯酶抑制药, 腺苷激动剂, 抗凝血剂, 补体抑制因子, 肾上腺素能药物, 干扰此处描述的促炎细胞因子的信号传导的试剂, IL-1 $\beta$ 转化酶  
20   抑制剂(例如, Vx740), 抗-P7s, PSGL, TACE 抑制剂, T-细胞信号传导抑制剂例如激酶抑制剂, 金属蛋白酶抑制剂, 柳氮磺吡啶, 硫唑嘌呤, 6-巯嘌呤, 血管紧张素转化酶抑制剂, 此处描述的可溶的细胞因子受体和其衍生物, 和抗炎细胞因子(例如 IL-4, IL-10, IL-13 和 TGF)的试剂。

用于治疗或预防多发性硬化症的治疗剂(可与 IL-21/IL-21R 激动剂联合)  
25   的实例包括干扰素- $\beta$ , 例如, IFN  $\beta$ -1 $\alpha$  和 IFN  $\beta$ -1 $\beta$ ; 乙酸格拉默(例如, COPAXONE®), 皮质类固醇, IL-1 抑制剂, TNF 抑制剂, CD40 配体和 CD80 的抗体, 和 IL-12 拮抗剂。另外的实例包括可以用于治疗 MS 的一种或多种症状或副作用的试剂, 例如, 金刚烷胺, 巴氯芬, 矿物油, 巯基碱, 美克洛嗪, 羟嗪, 磺胺甲噁唑, 环丙沙星, 多库酯, 环丙沙星, 匹莫林, 丹曲林, 去氨加压素,  
30   去氨加压素, 地塞米松, 泼尼松, 托特罗定, 苯妥英, 奥昔布宁, 奥昔布

宁(延长释放剂型), 比沙可啶, 文拉法辛, 阿米替林, 多库酯钠胶囊剂缓泻药, 磷酸钠, 乌洛托品, 巴氯芬(鞘内的), 氯硝西洋, 异烟肼, 伐地那非, 呋喃妥因, 欧车前亲水胶, 前列地尔, 加巴喷丁, 米托蒽醌, 奥昔布宁, 去甲替林, 帕罗西汀, 氢氧化镁, 溴丙胺太林, 前列地尔, 莫达非尼, 氟西汀, 非那吡啶, 5 甘油, 甲泼尼龙, 卡马西平, 丙米嗪, 安定, 西地那非, 安非他酮, 替扎尼定和舍曲林。

那些试剂的实例包括 IL-12 拮抗剂, 诸如结合 IL-12 (优选人 IL-12) 的嵌合、人源化、人或体外产生的抗体 (或其抗原结合片段), 例如 WO 00/56772 中公开的抗体 (Genetics Institute/BASF); IL-12 受体抑制剂, 例如, 人 IL-12 10 受体的抗体; 和 IL-12 受体, 例如人 IL-12 受体的可溶性片段。IL-15 拮抗剂的实例包括抗 IL-15 或其受体的抗体 (或其抗原结合片段), 例如, 人 IL-15 或它的受体的嵌合、人源化、人或体外产生的抗体, IL-15 受体的可溶性片段, 和 IL-15 结合蛋白。IL-18 拮抗剂的实例包括抗体, 例如, 人 IL-18 的嵌合、人源化、人或体外产生的抗体 (或其抗原结合片段), IL-18 受体的可溶性片段, 和 15 IL-18 结合蛋白 (IL-18BP, Mallet 等 (2001) Circ. Res. 28)。IL-1 拮抗剂的实例包括白介素-1-转化酶 (ICE) 抑制剂, 例如 Vx740, IL-1 拮抗剂, 例如, IL-1RA (ANIKINRA, AMGEN), sIL1RII (Immunex), 和抗-IL-1 受体抗体 (或其抗原结合片段)。

TNF 拮抗剂的实例包括, TNF (例如, 人 TNF  $\alpha$ ) 的嵌合、人源化、人或体 20 外产生的抗体 (或其抗原结合片段), 诸如 D2E7, (人 TNF $\alpha$  抗体, U. S. 6, 258, 562; BASF), CDP-571/ CDP-870/ BAY-10-3356 (人源化的抗-TNF $\alpha$  抗体; Celltech/Pharmacia), cA2 (嵌合的抗-TNF $\alpha$  抗体; Remicade<sup>TM</sup>, Centocor); 抗-TNF 抗体片段 (例如, CPD870); TNF 受体的可溶性片段, 诸如, p55 或 p75 人 TNF 受体或其衍生物, 例如, 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白, 25 ENBREL<sup>TM</sup>; Immunex; 参见例如, Arthritis & Rheumatism (1994) Vol. 37, S295; J. Invest. Med. (1996) Vol. 44, 235A), p55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白 (LENERCEPT<sup>TM</sup>)); 酶拮抗剂, 例如, TNF $\alpha$  转化酶 (TACE) 抑制剂 (例如,  $\alpha$ -磺酰基异羟肟酸衍生物, WO01/55112, 和 N-羟基甲酰胺 TACE 抑制剂 GW 3333、-005 或-022); 和 TNF-bp/s-TNFR (可溶性 TNF 结合蛋白; 参见 30 例如, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (增刊), S284; Amer.

J. Physiol. -Heart and Circulatory Physiology(1995)Vol. 268, pp. 37-42). 优选的 TNF 拮抗剂是 TNF 受体的可溶性片段, 例如, p55 或 p75 人 TNF 受体或其衍生物, 例如, 75 kdTNFR-IgG, 和 TNFa 转化酶 (TACE) 抑制剂。

在其它实施方案中, 此处描述的 IL-21-/IL21R 激动剂可与下列一种或多  
5 种联合给予: IL-13 拮抗剂, 例如, 可溶性 IL-13 受体 (sIL-13) 和/或抗 IL-13 抗体; IL-2 拮抗剂, 例如, DAB 486-IL-2 和/或 DAB 389-IL-2 (IL-2 融合蛋白; Seragen; 参见例如, Arthritis & Rheumatism (1993) Vol. 36, 1223), 和/或 IL-2R 抗体, 例如, 抗-Tac(人源化的抗-IL-2R; Protein Design Labs, Cancer Res. 1990 Mar 1; 50 (5): 1495-502)。而另一联合包括 IL-21 拮抗剂与非消  
10 耗性抗-CD4 抑制剂 (IDEC-CE9.1/SB 210396 (非消耗性灵长类源化的抗-CD4 抗体; IDEC/SmithKline) 联合。而其他优选的联合包括共刺激途径 CD80 (B7.1) 或 CD86 (B7.2) 的拮抗剂, 包括抗体、可溶性受体或拮抗性配体; 以及 p-选择蛋白糖蛋白配体 (PSGL), 抗炎细胞因子, 例如, IL-4 (DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; 重组 IL-10 DNAX/Schering); IL-13 和 TGF, 及其激动剂 (例如,  
15 激动性抗体)。

在其它实施方案中, 一种或多种 IL-21-/IL21R 激动剂可与一种或多种抗炎药、免疫抑制剂或代谢或酶抑制剂共同配制和/或共同给予。可用于与此处描述的 IL-21 激动剂联合的药物或抑制剂的非限制性实例包括但不限于以下一种或多种: 非类固醇类抗炎药 (NSAIDs), 例如, 布洛芬, 替尼达普 (参见例如,  
20 Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (增刊), S280)), 萘普生 (参见例如, Neuro Report (1996) Vol. 7, pp. 1209-1213), 美洛昔康, 吡罗昔康, 双氯芬酸和吲哚美辛; 柳氮磺吡啶 (参见例如, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (增刊), S281); 皮质类固醇例如泼尼松龙; 细胞因子抑制型抗炎药 (CSAIDs); 核苷酸生物合成的抑制剂, 例如, 嘌呤生物合成抑制剂, 叶  
25 酸拮抗剂 (例如, 氨甲蝶呤 (N-[4-[[ (2, 4-二氨基-6-蝶啶基) 甲基] 甲基氨基] 苯甲酰基]-L-谷氨酸); 和嘧啶生物合成的抑制剂, 例如, 二氢乳清酸脱氢酶 (DHODH) 抑制剂 (例如, 来氟米特 (参见例如, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (增刊), S131; Inflammation Research (1996) Vol. 45, pp. 103-107)。优选的用于联合 IL-21/IL-21R 拮抗剂的治疗剂包括 NSAIDs, CSAIDs,  
30 (DHODH) 抑制剂 (例如, 来氟米特), 和叶酸拮抗剂 (例如, 氨甲蝶呤)。

其它抑制剂的实例包括以下一种或多种：皮质类固醇（口服，吸入和局部注射）；免疫抑制剂，例如，环孢素，他克莫司（FK-506）；和 mTOR 抑制剂，例如，西罗莫司（雷帕霉素）或雷帕霉素衍生物，例如，可溶性雷帕霉素衍生物（例如，酯类雷帕霉素衍生物，例如，CCI-779 (Elit. L. (2002) *Current Opinion Investig. Drugs* 3(8): 1249-53; Huang, S. 等 (2002) *Current Opinion Investig. Drugs* 3(2): 295-304)；干扰促炎细胞因子例如 TNF $\alpha$  或 IL-1 的信号传导的试剂（例如 IRAK、NIK、IKK、p38 或 MAP 激酶抑制剂）；COX2 抑制剂，例如，塞来考昔和其变体，MK-966（参见例如，*Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (增刊), S81)；磷酸二酯酶抑制药，例如，R973401（磷酸二酯酶 IV 型抑制剂；参见例如，*Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (增刊), S282)；磷脂酶抑制剂，例如，胞质磷脂酶 2 (cPLA2) 抑制剂（例如，三氟甲基酮类似物 (U.S. 6,350,892)）；血管内皮细胞生长因子或生长因子受体的抑制剂，例如，VEGF 抑制剂和/或 VEGF-R 抑制剂；和血管发生的抑制剂。用于联合 IL-21/IL-21R 拮抗剂的优选治疗剂是免疫抑制剂，例如，环孢素，他克莫司（FK-506）；和 mTOR 抑制剂，例如，西罗莫司（雷帕霉素）或雷帕霉素衍生物，例如，可溶性雷帕霉素衍生物（例如，酯类雷帕霉素衍生物，例如，CCI-779）；COX2 抑制剂，例如，塞来考昔和其变体；和磷脂酶抑制剂，例如，胞质磷脂酶 2 (cPLA2) 的抑制剂（例如，三氟甲基酮类似物）

可与 IL-21/IL-21R 激动剂联合的治疗剂的其它实例包括以下一种或多种：6-巯嘌呤（6-MP）；硫唑嘌呤；柳氮磺吡啶；美沙拉秦；奥沙拉秦；氯喹/羟氯喹；青霉胺；金硫丁二酸（aurothiomalate）（肌肉和口腔）；硫唑嘌呤；秋水仙碱（colchicine）； $\beta$ -2 肾上腺素受体激动剂（沙丁胺醇，特布他林，沙美特罗）；黄嘌呤（茶碱，氨茶碱）；色甘酸盐；奈多罗米；酮替芬；ipratropium 和 oxitropium；麦考酚酸吗乙酯；腺苷激动剂；抗凝血剂；补体抑制因子；和肾上腺素能药物。

由此本发明另一方面涉及实施 IL-21/IL21R 拮抗剂与其他治疗化合物联合给予的试剂盒。在一个实施方案中，该试剂盒包含，在一个或多个分开的药制剂中，在药学载体中配制的一种或多种结合剂，和至少一种试剂，例如，需要时配制的治疗剂。

### 30 评估细胞因子水平的测定法

可使用任何标准的测定法来评估样品或受试者中细胞因子水平。例如，样品可获自受试者或可包括培养细胞。示例性样品可获自或源自于一种或多种细胞、组织或体液例如血液、尿液、淋巴液、脑脊髓液或羊水，培养的细胞（例如，组织培养细胞），口腔拭子，漱口液，粪便，组织切片和活检材料（例如，  
5 活检抽吸物）。

评估细胞因子水平的方法包括评估核酸以检测编码目标细胞因子（例如，IL-10 或 IL-21）的 mRNA 或 cDNA，或者评估蛋白以检测细胞因子自身。核酸可通过，例如，使用 RT-PCR（例如，定量 PCR）或核酸微阵列评估。蛋白可通过，例如，使用质谱分析或免疫测定评估。

10 ELISA 提供了一种便利的免疫测定形式。例如，Biosource International, Camarillo CA 提供了可用于检测 IL-10（敏感性<0.2 pg/ml），和用于检测 IL-12（敏感性<2 pg/ml）的试剂。相似地，R & D Systems 提供了可用于检测 IFN- $\gamma$ （敏感性<8 pg/ml）或用于检测 TGF- $\beta$  1（敏感性<7 pg/ml）的试剂。

15 SEARCHLIGHT™ Proteome Array System（Pierce, Boston Technology Center）提供了实时评估多种细胞因子的种类广泛的试剂。

这些方法可用于评估 IL-21/IL-21R 激动剂的给予。例如，确定所述激动剂是否引起细胞因子例如，IL-10 或 IFN  $\gamma$  水平的统计学上显著的变化，或确定其是否引起例如细胞因子例如，IL-10 或 IFN  $\gamma$  的正常范围水平的可接受的变化。评估所得信息可用于调整激动剂的剂量。例如，如果 IL-10 水平未增加至正常  
20 受试者的范围内的水平，则可以增加激动剂的给予，例如，通过增加剂量或频率。相反，如果 IL-10 水平的增加超过想要得到的范围，则可减少激动剂的给予，例如，通过减少剂量或频率。

#### 用于评估 IL-21/IL21R 激动剂作为免疫激活剂的活性的测定法

25 IL-21/IL21R 激动剂作为免疫系统激活剂的活性尤其可通过下列方法检测：

适合胸腺细胞或脾细胞细胞毒性的测定法，包括但不限于以下所描述的：Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience（Chapter 3, In Vitro assays for Mouse  
30 Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans）;



Herrmann 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78: 2488-2492, 1981; Herrmann 等, J. Immunol. 128: 1968-1974, 1982; Handa 等, J. Immunol. 135: 1564-1572, 1985; Takai 等, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai 等, J. Immunol. 140: 508-512, 1988; Herrmann 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78: 2488-2492, 1981; Herrmann 等, J. Immunol. 128: 1968-1974, 1982; Handa 等, J. Immunol. 135: 1564-1572, 1985; Takai 等, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Bowman 等, J. Virology 61: 1992-1998; Takai 等, J. Immunol. 140: 508-512, 1988; Bertagnolli 等, Cellular Immunology 133: 327-341, 1991; Brown 等, J. Immunol. 153: 3079-3092, 1994.

10 T 细胞依赖性免疫球蛋白反应和同种型转换的测定法 (其尤其将鉴定调节 T-细胞依赖性抗体反应且影响 Th1/Th2 分布特性的蛋白), 包括但不限于以下所描述的: Maliszewski, J. Immunol. 144: 3028-3033, 1990; 和 Assays for B cell function: In vitro antibody production, Mond, J. J. 和 Brunswick, M., Current Protocols in Immunology. J. E. e.a. Coligan eds. Vol 1 pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

15 混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定法 (其尤其将鉴定主要产生 Th1 和 CTL 反应的蛋白), 包括但不限于以下所描述的: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience 20 (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in humans); Takai 等, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai 等, J. Immunol. 140: 508-512, 1988; Bertagnolli 等, J. Immunol. 149: 3778-3783, 1992.

25 树突细胞依赖性测定法 (其尤其将鉴定由激活天然 T 细胞的树突细胞所表达的蛋白), 包括但不限于以下所描述的: Guery 等, J. Immunol. 134: 536-544, 1995; Inaba 等, Journal of Experimental Medicine 173: 549-559, 1991; Macatonia 等, Journal of Immunology 154: 5071-5079, 1995; Porgador 等, Journal of Experimental Medicine 182: 255-260, 1995; Nair 等, Journal of Virology 67: 4062-4069, 1993; Huang 等, Science 264: 961-965, 1994; 30 Macatonia 等, Journal of Experimental Medicine 169: 1255-1264, 1989;

Bhardwaj 等, *Journal of Clinical Investigation* 94: 797-807, 1994; 和 Inaba 等, *Journal of Experimental Medicine* 172: 631-640, 1990.

淋巴细胞存活/凋亡的测定法(其尤其将鉴定预防超抗原诱导后的细胞凋亡的蛋白和调节淋巴细胞内稳态的蛋白), 包括但不限于以下所描述的:

- 5 Darzynkiewicz 等, *Cytometry* 13: 795-808, 1992; Gorczyca 等, *Leukemia* 7: 659-670, 1993; Gorczyca 等, *Cancer Research* 53: 1945-1951, 1993; Itoh 等, *Cell* 66: 233-243, 1991; Zacharchuk, *Journal of Immunology* 145: 4037-4045, 1990; Zamai 等, *Cytometry* 14: 891-897, 1993; Gorczyca 等, *International Journal of Oncology* 1: 639-648, 1992.

- 10 影响 T 细胞定型和发育的早期步骤的蛋白的测定法, 包括但不限于以下所描述的: Antica 等, *Blood* 84: 111-117, 1994; Fine 等, *Cellular Immunology* 155: 111-122, 1994; Galy 等, *Blood* 85: 2770-2778, 1995; Toki 等, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 7548-7551, 1991.

- 15 评估 STAT 活化的测定法描述于, 例如, Gilmour 等 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10772-10776 中。例如, 可溶解评估的细胞 (例如, 用激动剂或候选激动剂处理的细胞), 并可用抗-磷酸酪氨酸抗体免疫沉淀酪氨酸磷酸化的蛋白。然后可使用对信号传导途径组分特异的抗体 (例如, STAT 蛋白如 STAT5 的抗体) 评估沉淀物。

- 20 检测 IL-21/IL21R 激动剂作为细胞因子产生和细胞增殖/分化的调节剂的活性的测定法

IL-21/IL21R 激动剂作为细胞因子产生和细胞增殖/分化的调节剂的活性可以使用多种常规的因子依赖性细胞增殖测定法中的任何一种对细胞系进行测定, 细胞系包括但不限于 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+ (preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1 165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e 和 CMK。

- 25 T 细胞或胸腺细胞增殖的测定法, 包括但不限于以下所描述的: *Current Protocols in Immunology*, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Takai  
30 等, *J. Immunol.* 137: 3494-3500, 1986; Bertagnolli 等, *J. Immunol.* 145:

1706-1712, 1990; Bertagnolli 等, Cellular Immunology 133: 327-341, 1991; Bertagnolli, 等, J. Immunol. 149: 3778-3783, 1992; Bowman 等, J. Immunol. 152: 1756-1761, 1994.

脾细胞、淋巴结细胞或胸腺细胞的细胞因子产生和/或增殖的测定法, 包括  
5 但不限于以下所描述的: Polyclonal T cell stimulation, Kruisbeek, A. M.  
和 Shevach, E. M., Current Protocols in Immunology, J. E. e.a. Coligan  
eds. Vol 1 pp. 3.12. 1-3.12. 14, John Wiley and Sons, Toronto. 1994;  
和 Measurement of mouse and human Interferon gamma, Schreiber, R. D.,  
Current Protocols in Immunology, J. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.8. 1-6.8.  
10 8, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

造血细胞和淋巴细胞生成细胞的增殖和分化的测定法, 包括但不限于以下  
所描述的: Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin  
4, Bottomly, K., Davis, L. S. 和 Lipsky, P. E., Current Protocols in  
Immunology, J. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.3. 1-6.3. 12, John Wiley and Sons,  
15 Toronto. 1991; deVries 等, J. Exp. Med. 173: 1205-1211, 1991; Moreau  
等, Nature 336: 690-692, 1988; Greenberger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.  
80: 2931-2938, 1983; Measurement of mouse and human interleukin 6—Nordan,  
R., Current Protocols in Immunology, J. E. e.a. Coligan eds. Vol 1 pp.  
6.6. 1-6.6. 5, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; Smith 等, Proc. Natl.  
20 Acad. Sci. U.S.A. 83: 1857-1861, 1986; Measurement of human Interleukin  
11—Bennett, F., Giannotti, J., Clark, S. C. 和 Turner, K. J., Current  
Protocols in Immunology, J. E. e.a. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.15. 1 John  
Wiley and Sons, Toronto. 1991; Measurement of mouse and human Interleukin  
9—Ciarletta, A., Giannotti, J., Clark, S. C. 和 Turner, K. J., Current  
25 Protocols in Immunology, J. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.13. 1, John Wiley  
and Sons, Toronto. 1991.

对抗原的 T 细胞克隆反应 (其尤其将通过测量增殖和细胞因子产生来鉴定  
影响 APC-T 细胞相互作用, 以及指导 T 细胞作用的蛋白) 的测定法, 包括但不  
限于以下所描述的: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan,  
30 A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene

Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function; Chapter 6, Cytokines and their cellular receptors; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Weinberger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 6091-6095, 1980; Weinberger 等, Eur. J. Immun. 11: 405-411, 1981; Takai 等, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai 等, J. Immunol. 140: 508-512, 1988.

在下列非限制性实施例中, 我们尤其证明了 IL-21 导致 EAE 小鼠中的部分保护。

#### 实施例: IL-21 导致 EAE 小鼠中的部分保护

##### 10 试剂

##### 小鼠

雌性 C57BL/6 和雌性 SJL/J 小鼠获自 Jackson 实验室。动物饲养于经 AAALAC 批准的隔栅装置中, 并监测寄生虫以及细菌和病毒病原体。全部小鼠均在 8-10 周龄时进行使用。

##### 15 增殖反应

在免疫接种后 20 日, 从小鼠中收集用小鼠少突神经胶质细胞糖蛋白 (MOG)<sub>35-55</sub> 肽攻击的 C57BL/6 雌性小鼠的淋巴结细胞。将细胞培养于包含 10% 胎牛血清 (FCS) 的 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基 (DME) 中。用 MOG<sub>35-55</sub> 肽 (25 µg/ml) 再次刺激细胞, 然后将细胞置于平底 96 孔微量滴定板中在有或无鼠 IL-21 的条件下生长。72 小时后, 滴定板以 0.5 µCi 氚标记的胸苷/孔进行脉冲, 然后培养 4-6 小时。通过闪烁计数器检测三份孔中 DNA 中胸苷的平均掺入量。

##### 细胞因子定量

来自经免疫的小鼠的淋巴结细胞在体外用 25 µg/ml MOG<sub>35-55</sub> 肽进行活化。将细胞培养于包含 10% FCS 和 IL-2 (10 U/ml) 以及多种浓度的鼠 IL-21 (5 ng/ml-25 ng/ml) 的 DME 中。72 小时后收集培养上清, 然后采用 SEARCHLIGHT™ Proteome Array System (Pierce, Boston Technology Center) 分析细胞因子和趋化因子的产生。

##### 诱导并评估实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE)

采用在添加了 800 µg 结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis) H37 Ra (Difco 实验室) 的完全弗氏佐剂中乳化的 100 µg 蛋白脂质蛋白质 (PLP)

139-151 肽经皮下免疫雌性 SJL/J 小鼠。在免疫时和 48 小时后，还用 400 ng 百日咳毒素 (List 生物学实验室) 对小鼠进行腹膜内注射。依据以下标度：0，无疾病；1，尾巴软弱无力；2，后肢无力或部分麻痹；3，完全后肢麻痹；4，前肢和后肢麻痹；以及 5，垂死，每日对动物进行 EAE 临床症状的评分。通过将各组中小鼠的各个评分平均而计算得出平均临床评分。

体内给予 IL-21

EAE 致敏小鼠经腹膜内注射给予鼠 IL-21，使用量为在 0.2 ml PBS 中，100 ng/日或 1 μg/日。对照小鼠给予 0.2 ml 盐水。在用 PLP<sub>139-151</sub> 肽免疫前的那一日开始治疗，然后隔日持续全部十个剂量。

10 由鼠 IL-21 诱导的增殖反应和细胞因子产生

评估 IL-21 诱导和扩大 MOG<sub>35-55</sub>-特异性 T 细胞反应的作用。结果显示 IL-21 以剂量依赖性模式诱导淋巴细胞的增殖。在图 1A 和表 1 中，与单用肽刺激的细胞相比，用 20 ng/ml IL-21 培养的淋巴细胞在增殖上表现出显著的 3.5 倍增加。通过滴定细胞因子，细胞表现出与对照细胞相似的增殖能力。

15 表 1: 存在 IL-21 下的淋巴细胞增殖

| 稀释度          | 对照      | IL-21   | ng/ml  |
|--------------|---------|---------|--------|
|              | CPM/bgd | CPM/bgd |        |
| 1: 50        | 1.14    | 3.57    | 20     |
| 1: 250       | 0.95    | 3.01    | 4      |
| 1: 1250      | 1.04    | 2.02    | 0.8    |
| 1: 6250      | 1.49    | 1.86    | 0.16   |
| 1: 31250     | 1.13    | 1.70    | 0.032  |
| 1: 156250dil | 1.77    | 1.45    | 0.0064 |

图 1B 显示了与仅用 1 μg/ml PLP 处理的细胞相比，在所示浓度的鼠 IL-21 (ng/ml) 下培养的蛋白脂质蛋白质 (PLP) 转基因小鼠的 T 细胞增殖增加。

为了鉴定增殖性 T 细胞反应是否可与细胞因子产生相关联，将淋巴细胞用 IL-21 进行培养。与未处理的细胞相比，IL-21 诱导了 Th2 细胞因子 (IL-10) 的分泌增加。该反应是可饱和的 (图 2 和表 2)，在 IL-21 的最高试验浓度 (25 ng/ml) 时，细胞产生的 IL-10 比对照组大约高 2.5-倍。

表 2: IL-21 诱导 IL-10 分泌

| IL-21<br>(ng/ml) | 检测的 IL-10<br>(pg/ml) |
|------------------|----------------------|
| 0                | 189.3                |
| 5                | 260.8                |
| 10               | 457.3                |
| 15               | 466.8                |
| 20               | 486.1                |
| 25               | 515.0                |

图 3 显示了与对照细胞相比，用所示浓度的鼠 IL-21 处理的脾细胞分泌的 IFN  $\gamma$  降低。将 IL-21 加入来自经免疫的小鼠的 MOC<sub>33-55</sub> 刺激的脾细胞导致 IFN  $\gamma$  降低两倍，而加入 IL-21R 导致增加两倍。当淋巴结细胞用 IL-21 处理时，IFN  $\gamma$  水平从 20,000 pg/ml (对照) 或 15840 pg/ml (模拟处理的) 降至 3260 pg/ml (IL-21 处理的)。

IL-21 或 IL-21 R 处理导致的细胞因子分泌的改变在表 3 中总结如下。

表 3: 细胞因子分泌的改变

|     | IL-21 处理                                                                                      | IL-21R 处理                                                                                                          |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 增加  | IL-10                                                                                         | IL-12, IFN $\gamma$ , TGF $\beta$                                                                                  |
| 减少  | IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-6, IFN $\gamma$ , IL-18                                              | 无                                                                                                                  |
| 无变化 | IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , GM-CSF | IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-18, TNF $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , GM-CSF |

用 IL-21 处理的小鼠中 EAE 的发展

为了确定 IL-21 在 EAE 发展中的作用，用在 CFA 中的致脑炎性 PLP<sub>139-151</sub> 肽加百日咳毒素免疫小鼠，并用 IL-21 的预防性方案对其进行处理。将 EAE 的临床进程与在用盐水或 IL-21 处理的小鼠中的进行比较。

表 4 描述了在有或无鼠 IL-21 时处理的两个示例性 PLP 培养物中细胞因子分泌的平均变化。将未处理的对照细胞中的细胞因子水平标化为 100。

表 4

| 细胞因子         | 对照  | 处理的<br>w/ mIL-21 |
|--------------|-----|------------------|
| IL2          | 100 | 59               |
| IL5          | 100 | 73               |
| IL6          | 100 | 56               |
| IL10         | 100 | 250              |
| IFNg         | 100 | 39               |
| TNF $\alpha$ | 100 | 56               |
| GMCSF        | 100 | 15               |

如图 4 和 5 中所示, 对照小鼠对疾病高度易感。相反, 用低 (100 ng/日) 或高 (1  $\mu$ g/日) 剂量的 IL-21 治疗的小鼠具有严重性较低的临床评分。

图 5 和表 5 显示了与对照小鼠相比, 用低 (100 ng/日) 或高 (1  $\mu$ g/日) 剂量的 IL-21 治疗的小鼠中 EAE 的严重度降低。

表 5

| 日  | NaCl | 100 ng IL-21 | 1 $\mu$ g IL-21 |
|----|------|--------------|-----------------|
| 8  | 0.7  | 0.0          | 0.1             |
| 10 | 2.9  | 0.0          | 0.8             |
| 12 | 2.8  | 1.0          | 0.8             |
| 14 | 3.3  | 1.0          | 1.0             |
| 16 | 3.5  | 1.2          | 1.7             |
| 18 | 3.5  | 1.6          | 1.9             |
| 21 | 3.5  | 1.4          | 1.9             |
| 23 | 3.6  | 1.3          | 2.4             |
| 25 | 3.8  | 1.7          | 2.1             |

我们的发现显示出 IL-21 参与了调节 EAE 的进程, 该途径由 IL-10 的上调进行介导。

本申请通篇引用的所有参考文件、待审批的专利申请和公开的专利的内容特此清楚地引入作为参考。

#### 等效形式

本领域技术人员仅使用常规实验应能理解, 或能确定本文所述发明的特定实施方案的多种等效形式。所述等效形式也是要包含于下述权利要求中。

<110> Wyeth

<120> 用白介素-21/白介素-21 受体的激动剂治疗免疫性疾病

<130> 01997.043200.PC

<150> US 60/456,920

<151> 2003-03-21

<160> 13

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 617

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtcc      60
tggcaacatg gagaggattg tcactctgtc gatggtcac ttcttgggga cactggtcca      120
caaatcaagc tcccaaggtc aagatcgcca catgattaga atgcgtcaac ttatagatat      180
tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga cttggtcctt gaatttctgc cagctccaga      240
agatgtagag acaaactgtg agtggtcagc ttttctctgc tttcagaagg cccaactaaa      300
gtcagcaaat acaggaaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag      360
gaaaccacct tccacaaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcacg      420
tgattcttat gagaaaaaac cacccaaaga attcctagaa agattcaaatt cacttctcca      480
aaagatgatt catcagcacc tgcctcttag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc      540
taacttgcag ttggacacta tggtacatac tctaatatag tagtgaaagt catttctttg      600
tattccaagt ggaggag                                          617

```



&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 131

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Asp | Arg | His | Met | Ile | Arg | Met | Arg | Gln | Leu | Ile | Asp | Ile | Val | Asp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Leu | Lys | Asn | Tyr | Val | Asn | Asp | Leu | Val | Pro | Glu | Phe | Leu | Pro | Ala |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Glu | Asp | Val | Glu | Thr | Asn | Cys | Glu | Trp | Ser | Ala | Phe | Ser | Cys | Phe |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Lys | Ala | Gln | Leu | Lys | Ser | Ala | Asn | Thr | Gly | Asn | Asn | Glu | Arg | Ile |
|     | 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Asn | Val | Ser | Ile | Lys | Lys | Leu | Lys | Arg | Lys | Pro | Pro | Ser | Thr | Asn |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Gly | Arg | Arg | Gln | Lys | His | Arg | Leu | Thr | Cys | Pro | Ser | Cys | Asp | Ser |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Glu | Lys | Lys | Pro | Pro | Lys | Glu | Phe | Leu | Glu | Arg | Phe | Lys | Ser | Leu |
|     |     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Gln | Lys | Met | Ile | His | Gln | His | Leu | Ser | Ser | Arg | Thr | His | Gly | Ser |
|     |     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| Glu | Asp | Ser |
| 130 |     |     |

---

<210> 3  
 <211> 3072  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 3  
 gagaaccaga ccaaggccct gtcacagct cctggagact cagttctggt ggcattggaga 60  
 ggacccttgt ctgtctggta gtcattcttct tggggacagt ggcccataaa tcaagccccc 120  
 aagggccaga tcgcctcctg attagacttc gtcacattat tgacattgtt gaacagctga 180  
 aaatctatga aaatgacttg gatcctgaac ttctatcagc tccacaagat gtaaaggggc 240  
 actgtgagca tgcagctttt gcctgttttc agaaggccaa actcaagcca tcaaaccctg 300  
 gaaacaataa gacattcatc attgacctcg tggcccagct caggaggagg ctgcctgcca 360  
 ggaggggagg aaagaacag aagcacatag ctaaattgcc ttctgtgat tcgtatgaga 420  
 aaaggacacc caaagaattc ctagaagac taaaatggct cttcaaaag atgattcatc 480  
 agcatctctc ctagaacaca taggacccga agattcctga ggatccgaga agattcccga 540  
 ggactgagga gacgccggac actatagacg ctacgaatg caggagtaca tcttgccctc 600  
 tgggattgca agtggagaag tacgatacgt tatgataaga acaactcaga aaagctatag 660  
 gttaagatcc ttctgcccac taactaagca gacattgtgg ttccctgcac agactccatg 720  
 ctgtcaacat ggaaaatctc aactcaacaa gagcccagct tcccgtgtca gggatttctg 780  
 gtgtttctca agctgtgget tcattcttatt gcccaactgt gacattcttt gattggaagg 840  
 ggaaaactaa agcttttagc aaaaatacag ctagggaatt tgcgatctg cgagagtaag 900  
 acctcttatg atcctaacgg aatgatgtaa gctggaaata ataagcataa gatgaaattg 960  
 aaaattgaag tcittattct ttaagaaaaa cttgtactt gaaagcatgt ctgaagagt 1020  
 tactcattac cacaacatc tagcatattg ataactaaca tctttatact ctacaagaga 1080  
 ggctttccag ataggtacag tttttcttct ctattaggtc tatcaaaatt taacctatta 1140

---

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tgagggtcac ccctggcttt cactgttttt ctaaagaggc aagggtgtag taagaagcag  | 1200 |
| gcttaagttg ctttctccc aatgtcaagt tcctttataa gctaatagtt taatcttggtg  | 1260 |
| aagatggcaa tgaaagcctg tggaagtgc aacctcacta tcttctggag ccaagtagaa   | 1320 |
| ttttcaagtt tgtagctctc acctcaagtg gttatgggtg tcctgtgatg aatctgctag  | 1380 |
| ctccagcctc agtctcctct cccacatcct ttcctttctt tcctctttga aacttctaag  | 1440 |
| aaaaagcaat ccaacaagt tcagcactta agacacattg catgcacact ttgataagt    | 1500 |
| taaatccaac catctattta aaatcaaat caggagatga gccaaagagac cagaggttct  | 1560 |
| gttccagttt taaacagact ttactgaac atcccaatct ttaaccaca gaggctaaat    | 1620 |
| tgagcaaata gttttgcat ttgatataat ttccaacagt atgtttcaat gtcaagttaa   | 1680 |
| aaagtctaca aagctatttt ccctggagtg gtatcatcgc ttgagaatt tcttatggtt   | 1740 |
| aaaatggatc tgagatccaa gcatggcctg ggggatgggt ttgatctaag gaaaaagggtg | 1800 |
| tctgtacctc acagtgcctt taaaacaagc agagatcccg tgtaccgcc taagatagca   | 1860 |
| cagactagtg ttaactgatt ccagaaaaag tgtcacaatc agaaccaacg cattctctta  | 1920 |
| aactttaaaa atatgtattg caaagaactt gtgtaactgt aaatgtgtga ctgttgatga  | 1980 |
| cattatacac acatagccca cgtaagtgtc caatgggtgt agcattgggt gctgagtttg  | 2040 |
| ctgctcgaaa gctgaagcag agatgcagtc cttcacaag caatgatgga cagagagggg   | 2100 |
| agtctccatg ttttattctt ttgttgtttc tggctgtgta actgttgact tcttgacatt  | 2160 |
| gtgattttta tatttaagac aatgtattta ttttgggtgtg tttattgttc tagcctttta | 2220 |
| aatcactgac aatttctaata caagaagtac aaataattca atgcagcaca ggctaagagc | 2280 |
| ttgtatcggt tggaagagcc agtgaaggct tctccactag ccatgggaaa gctacgcttt  | 2340 |
| agagtaaaact agacaaaatt gcacagcagt cttgaacctc tctgtgctca agactcagcc | 2400 |
| agtcctttga cattattggt cactgtgggt gggaacacat tggacctgac acactgttgt  | 2460 |

---

```

gtgtccatga aggttgccac tgggtgaagc ttttttgggt tttcattctc ttatctgtag 2520

aacaagaatg tggggctttc ctaagtctat tctgtatttt attctgaact tcgtatgtct 2580

gagttttaat gttttgagta ctcttacagg aacacctgac cacacttttg agttaaat 2640

tatcccaagt gtgatattta gttgttcaaa aagggaaggg atatacatat atacatacat 2700

acatacatat atatatatat atatataac atatatatat atatatatat gtatatatat 2760

atatatatag agagagagag agagagagag agagaaagag agagagggtg ttgtaggtca 2820

taggagttca gaggaaatca gttatggccg ttaatactgt agctgaaagt gttttctttg 2880

tgaataaatt catagcatta ttgatctatg ttattgctct gttttattta cagtcacacc 2940

tgagaattta gttttaatat gaatgatgta ctttataact taatgattat ttattatgta 3000

tttggttttg aatgtttgtg ttcatggctt cttatttaag acctgatcat attaaatgct 3060

acccagtcgg ga 3072

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 4

```

Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu Arg His Leu Ile Asp Ile Val Glu
1           5           10           15

```

```

Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp Leu Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala
          20           25           30

```

```

Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys Glu His Ala Ala Phe Ala Cys Phe
          35           40           45

```

```

Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser Asn Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe
          50           55           60

```

Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu Arg Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg  
65 70 75 80

Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile Ala Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser  
85 90 95

Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu  
100 105 110

Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser  
115 120

<210> 5

<211> 2665

<212> DNA

<213> 智人

<400> 5

```

gtcgactgga ggcccagctg cccgtcatca gagtgacagg tcttatgaca gccatgattgg      60
tgactcgggc tgggtgtgga ttctcacccc aggcctctgc ctgctttctc agaccctcat      120
ctgtcacccc cacgtgaac ccagctgcca cccccagaag cccatcagac tgcccccagc      180
acacggaatg gattttctgag aaagaagccg aaacagaagg cccgtgggag tcagcatgcc      240
gctgggtggt gccgccccct tgctcctgct gctgctccag ggaggctggg gctgccccga      300
cctcgtctgc tacaccgatt acctccagac ggtcatctgc atcctggaaa tgtggaacct      360
ccaccccagc acgctcacc ttacctggca agaccagtat gaagagctga aggacgaggc      420
cacctcctgc agcctccaca ggtcggccca caatgccacg catgccacct acacctgcca      480
catggatgta ttccacttca tgcccgacga cattttcagt gtcaacatca cagaccagtc      540
tggaactac tcccaggagt gtggcagctt tctcctggct gagagcatca agccggtcc      600

```

---

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| ccctttcaac gtgactgtga ctttctcagg acagtataat atctcctggc gtcagatta  | 660  |
| cgaagacctt gccttctaca tgctgaaggg caagcttcag tatgagctgc agtacaggaa | 720  |
| ccggggagac ccttgggctg tgagtccgag gagaaagctg atctcagtgg actcaagaag | 780  |
| tgtctccctc ctccccctgg agttccgcaa agactcgagc tatgagctgc aggtgcgggc | 840  |
| agggcccatg cctggctcct cctaccaggg gacctggagt gaatggagtg acccggtcat | 900  |
| ctttcagacc cagtcagagg agttaaagga aggctggaac cctcacctgc tgcttctcct | 960  |
| cctgcttgct atagtcttca ttctgcctt ctggagcctg aagaccatc cattgtggag   | 1020 |
| gctatggaag aagatatggg ccgtccccag ccctgagcgg ttcttcatgc ccctgtacaa | 1080 |
| gggctgcagc ggagacttca agaaatgggt ggggtcaccc ttactggct ccagcctgga  | 1140 |
| gctgggaccc tggagcccag aggtgccctc caccctggag gtgtacagct gccaccacc  | 1200 |
| acggagcccc gccaaaggc tgcagctcac ggagctacaa gaaccagcag agctgggtgga | 1260 |
| gtctgacggt gtgcccagc ccagcttctg gccgacagcc cagaactcgg ggggctcagc  | 1320 |
| ttacagttag gagaggatc ggccatacgg cctgggtgcc attgacacag tgactgtgct  | 1380 |
| agatgcagag gggccatgca cctggccctg cagctgtgag gatgacggct acccagcct  | 1440 |
| ggacctggat gctggcctgg agcccagccc aggcctagag gaccactct tggatgcagg  | 1500 |
| gaccacagtc ctgtcctgtg gctgtgtctc agctggcagc cctgggctag gagggccct  | 1560 |
| gggaagcctc ctggacagac taaagccacc ccttgcagat ggggaggact gggctggggg | 1620 |
| actgccctgg ggtggccggt cacctggagg ggtctcagag agtgaggcgg gtcaccct   | 1680 |
| ggccggcctg gatatggaca cgtttgacag tggttttggt ggctctgact gcagagccc  | 1740 |
| tgtggagtgt gacttcacca gccccggga cgaaggaccc ccccgagct acctcccca    | 1800 |
| gtgggtggtc attctccgc cactttcgag ccttggaccc caggccagct aatgaggctg  | 1860 |
| actggatgtc cagagctggc caggccactg ggccctgagc cagagacaag gtcacctggg | 1920 |

---

```

ctgtgatgtg aagacacctg cagcctttgg tctcctggat gggcctttga gcctgatgtt 1980

tacagtgtct gtgtgtgtgt gtgcatatgt gtgtgtgtgc atatgcatgt gtgtgtgtgt 2040

gtgtgtctta ggtgcgcagt ggcatgtcca cgtgtgtgtg tgattgcacg tgcctgtggg 2100

cctgggataa tgcccatggt actccatgca ttcacctgcc ctgtgcatgt ctggactcac 2160

ggagctcacc catgtgcaca agtgtgcaca gtaaactgtt ttgtgggtcaa cagatgacaa 2220

cagccgtcct ccctcctagg gtcttgtgtt gcaagttggt ccacagcatc tccggggctt 2280

tgtgggatca gggcattgcc tgtgactgag gcggagccca gccctccagc gtctgcctcc 2340

aggagctgca agaagtccat attgttcctt atcacctgcc aacaggaagc gaaaggggat 2400

ggagttagcc catggtgacc tcgggaatgg caatttttig ggcggcccct ggacgaaggt 2460

ctgaatcccg actctgatac cttctggctg tgctacctga gccaagtcgc ctcccctctc 2520

tgggctagag tttccttata cagacagtgg ggaaggcatg acacacctgg gggaaattgg 2580

cgatgtcacc cgtgtacggt acgcagccca gagcagacc tcaataaacg tcagcttcct 2640

tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaat ctaga 2665

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 538

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 6

```

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1           5           10           15

```

```

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
          20           25           30

```

```

Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
          35           40           45

```

Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser  
50 55 60

Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr  
65 70 75 80

Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val  
85 90 95

Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe  
100 105 110

Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val  
115 120 125

Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp  
130 135 140

Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr  
145 150 155 160

Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile  
165 170 175

Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys  
180 185 190

Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser  
195 200 205

Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln  
210 215 220



Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu  
225 230 235 240

Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser Leu Lys  
245 250 255

Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser  
260 265 270

Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe  
275 280 285

Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly  
290 295 300

Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His  
305 310 315 320

Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu  
325 330 335

Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp  
340 345 350

Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp  
355 360 365

Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala  
370 375 380

Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro  
385 390 395 400

Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp  
405 410 415

Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser  
420 425 430

Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg  
435 440 445

Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro  
450 455 460

Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser  
465 470 475 480

Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly  
485 490 495

Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp  
500 505 510

Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro  
515 520 525

Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser  
530 535

<210> 7

<211> 2628

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

---

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| gtcgacgcgg cggtaccagc tgtctgccca ctctctctgt ggtgtgcctc acggtcactt | 60   |
| gcttgcttga ccgaagtct gcccatccct ggggcagcca actggcctca gcccggtgcc  | 120  |
| caggcgtgcc ctgtctctgt ctggctgccc cagccctact gtcttctctt gtgtaggctc | 180  |
| tgtccagatg cccggctggt cctcagcctc aggactatct cagcagtga tccccgtatt  | 240  |
| ctggacttgc acctgactga actcctgccc acctcaaacc ttacctccc accaccacca  | 300  |
| ctccgagtc cgctgtgact cccacgcca ggagaccacc caagtcccc agcctaaaga    | 360  |
| atggctttct gagaagacc ctgaaggagt aggtctggga cacagcatgc cccggggccc  | 420  |
| actggctgcc ttactcctgc tgattctcca tggagcttgg agctgcctgg acctcacttg | 480  |
| ctacactgac tacctctgga ccatcacctg tgcctggag acacggagcc ccaaccccag  | 540  |
| catactcagt ctcacctggc aagatgaata tgaggaactt caggaccaag agaccttctg | 600  |
| cagcctacac aggtctggcc acaacaccac acatatatgg tacacgtgcc atatgcgctt | 660  |
| gtctcaattc ctgtccgatg aagttttcat tgtcaatgtg acggaccagt ctggcaacaa | 720  |
| ctcccaagag tgtggcagct ttgtcctggc tgagagcatc aaaccagctc ccccttgaa  | 780  |
| cgtgactgtg gccttctcag gacgtatga tatctcctgg gactcagctt atgacgaacc  | 840  |
| ctccaactac gtgctgaggg gcaagctaca atatgagctg cagtatcgga acctcagaga | 900  |
| cccctatgct gtgaggccgg tgaccaagct gatctcagt gactcaagaa acgtctctct  | 960  |
| tctccctgaa gatttcaca aagattctag ctaccagctg caggtgcggg cagcgctca   | 1020 |
| gccaggcact tcattcaggg ggacctggag tgagtggagt gacccgtca tctttcagac  | 1080 |
| ccaggctggg gagcccgagg caggctggga cctcacatg ctgctgctcc tggtgtctt   | 1140 |
| gatcattgtc ctggttttca tgggtctgaa gatccacctg ccttgaggc tatggaaaaa  | 1200 |
| gatatgggca ccagtccca cccctgagag tttcttcag cccctgtaca gggagcacag   | 1260 |
| cggaacttc aagaaatggg ttaatacccc tttcacggc tccagcatag agttggtgcc   | 1320 |

---

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| acagagttcc acaacaacat cagccttaca tctgtcatlg tatccagcca aggagaagaa | 1380 |
| gttccccggg ctgccgggtc tggaagagca actggagtgt gatggaatgt ctgagcctgg | 1440 |
| tcactggtgc ataatcccct tggcagctgg ccaagcggtc tcagcctaca gtgaggagag | 1500 |
| agaccggcca tatggtctgg tgtccattga cacagtgact gtgggagatg cagagggcct | 1560 |
| gtgtgtctgg ccctgtagct gtgaggatga tggctatcca gccatgaacc tggatgctgg | 1620 |
| ccgagagtct ggccctaatt cagaggatct gctcttggtc acagaccctg cttttctgtc | 1680 |
| ttgcggctgt gtctcaggta gtggtctcag gcttggaggc tccccaggca gcctactgga | 1740 |
| caggttgagg ctgtcatttg caaaggaagg ggactggaca gcagacccaa cctggagaac | 1800 |
| tgggtcccca ggagggggct ctgagagtga agcaggttcc ccccttggtc tggacatgga | 1860 |
| cacatttgac agtggcttgg caggttcaga ctgtggcagc cccgtggaga ctgatgaagg | 1920 |
| accccctcga agctatctcc gccagtgggt ggtcaggacc cctccacctg tggacagtgg | 1980 |
| agcccagagc agctagcata taataaccag ctatagttag aagaggcctc tgagcctggc | 2040 |
| atttacagt tgaacatgta ggggtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg  | 2100 |
| tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtcttgggt tgtgtgttag cacatccatg ttgggatttg | 2160 |
| gtctgttgct atgtattgta atgctaaatt ctctacccaa agttctaggc ctacgagtga | 2220 |
| attctcatgt ttacaaactt gctgtgtaaa ccttgttcct taatttaata ccattggta  | 2280 |
| aataaaattg gctgcaacca attactggag ggattagagg tagggggctt ttgagttacc | 2340 |
| tgtttggaga tggagaagga gagaggagag accaagagga gaaggaggaa ggagaggaga | 2400 |
| ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggctgccgtg | 2460 |
| aggggagagg gaccatgagc ctgtggccag gagaacagc aagtatctgg ggtacactgg  | 2520 |
| tgaggaggtg gccaggccag cagttagaag agtagattag gggtgacctc cagtatttgt | 2580 |
| caaagccaat taaaataaca aaaaaaaaaa aaaagcggcc gctctaga              | 2628 |

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 529

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 8

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Pro | Arg | Gly | Pro | Val | Ala | Ala | Leu | Leu | Leu | Leu | Ile | Leu | His | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Trp | Ser | Cys | Leu | Asp | Leu | Thr | Cys | Tyr | Thr | Asp | Tyr | Leu | Trp | Thr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Thr | Cys | Val | Leu | Glu | Thr | Arg | Ser | Pro | Asn | Pro | Ser | Ile | Leu | Ser |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Thr | Trp | Gln | Asp | Glu | Tyr | Glu | Glu | Leu | Gln | Asp | Gln | Glu | Thr | Phe |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Ser | Leu | His | Arg | Ser | Gly | His | Asn | Thr | Thr | His | Ile | Trp | Tyr | Thr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | His | Met | Arg | Leu | Ser | Gln | Phe | Leu | Ser | Asp | Glu | Val | Phe | Ile | Val |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Val | Thr | Asp | Gln | Ser | Gly | Asn | Asn | Ser | Gln | Glu | Cys | Gly | Ser | Phe |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Leu | Ala | Glu | Ser | Ile | Lys | Pro | Ala | Pro | Pro | Leu | Asn | Val | Thr | Val |
|     |     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Phe | Ser | Gly | Arg | Tyr | Asp | Ile | Ser | Trp | Asp | Ser | Ala | Tyr | Asp | Glu |
|     | 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |

---

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Ser | Asn | Tyr | Val | Leu | Arg | Gly | Lys | Leu | Gln | Tyr | Glu | Leu | Gln | Tyr |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Asn | Leu | Arg | Asp | Pro | Tyr | Ala | Val | Arg | Pro | Val | Thr | Lys | Leu | Ile |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Val | Asp | Ser | Arg | Asn | Val | Ser | Leu | Leu | Pro | Glu | Glu | Phe | His | Lys |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ser | Ser | Tyr | Gln | Leu | Gln | Val | Arg | Ala | Ala | Pro | Gln | Pro | Gly | Thr |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Phe | Arg | Gly | Thr | Trp | Ser | Glu | Trp | Ser | Asp | Pro | Val | Ile | Phe | Gln |
|     | 210 |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Gln | Ala | Gly | Glu | Pro | Glu | Ala | Gly | Trp | Asp | Pro | His | Met | Leu | Leu |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Leu | Ala | Val | Leu | Ile | Ile | Val | Leu | Val | Phe | Met | Gly | Leu | Lys | Ile |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Leu | Pro | Trp | Arg | Leu | Trp | Lys | Lys | Ile | Trp | Ala | Pro | Val | Pro | Thr |
|     |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Glu | Ser | Phe | Phe | Gln | Pro | Leu | Tyr | Arg | Glu | His | Ser | Gly | Asn | Phe |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Lys | Trp | Val | Asn | Thr | Pro | Phe | Thr | Ala | Ser | Ser | Ile | Glu | Leu | Val |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Gln | Ser | Ser | Thr | Thr | Thr | Ser | Ala | Leu | His | Leu | Ser | Leu | Tyr | Pro |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |

---

Ala Lys Glu Lys Lys Phe Pro Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Gln Leu  
                                   325                                  330                                  335

Glu Cys Asp Gly Met Ser Glu Pro Gly His Trp Cys Ile Ile Pro Leu  
                                   340                                  345                                  350

Ala Ala Gly Gln Ala Val Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro  
                                   355                                  360                                  365

Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Gly Asp Ala Glu Gly  
                                   370                                  375                                  380

Leu Cys Val Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Met  
                                   385                                  390                                  395                                  400

Asn Leu Asp Ala Gly Arg Glu Ser Gly Pro Asn Ser Glu Asp Leu Leu  
                                   405                                  410                                  415

Leu Val Thr Asp Pro Ala Phe Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Gly Ser  
                                   420                                  425                                  430

Gly Leu Arg Leu Gly Gly Ser Pro Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Arg  
                                   435                                  440                                  445

Leu Ser Phe Ala Lys Glu Gly Asp Trp Thr Ala Asp Pro Thr Trp Arg  
                                   450                                  455                                  460

Thr Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Pro  
                                   465                                  470                                  475                                  480

Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Ala Gly Ser Asp Cys  
                                   485                                  490                                  495

---

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ser | Pro | Val | Glu | Thr | Asp | Glu | Gly | Pro | Pro | Arg | Ser | Tyr | Leu | Arg |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     |     | 510 |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Trp | Val | Val | Arg | Thr | Pro | Pro | Pro | Val | Asp | Ser | Gly | Ala | Gln | Ser |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |

Ser

<210> 9  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 9

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Pro | Leu | Leu | Leu | Leu | Leu | Leu | Leu | Pro | Ser | Pro | Leu | His | Pro |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

<210> 10  
 <211> 162  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 10

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Arg | Ser | Ser | Pro | Gly | Asn | Met | Glu | Arg | Ile | Val | Ile | Cys | Leu | Met |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Ile | Phe | Leu | Gly | Thr | Leu | Val | His | Lys | Ser | Ser | Ser | Gln | Gly | Gln |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Arg | His | Met | Ile | Arg | Met | Arg | Gln | Leu | Ile | Asp | Ile | Val | Asp | Gln |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Lys | Asn | Tyr | Val | Asn | Asp | Leu | Val | Pro | Glu | Phe | Leu | Pro | Ala | Pro |
|     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |



Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln  
65 70 75 80

Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile  
85 90 95

Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala  
100 105 110

Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr  
115 120 125

Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu  
130 135 140

Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu  
145 150 155 160

Asp Ser

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成接头

<400> 11

Ser Gly Gly Gly Gly  
1 5

---

<210> 12

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bos taurus

&lt;400&gt; 12

Gln Asp Arg Leu Phe Ile Arg Leu Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp  
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Asp Pro Glu Phe Leu Pro Ala  
 20 25 30

Pro Glu Asp Val Lys Arg His Cys Glu Arg Ser Ala Phe Ser Cys Phe  
 35 40 45

Gln Lys Val Gln Leu Lys Ser Ala Asn Asn Gly Asp Asn Glu Lys Ile  
 50 55 60

Ile Asn Ile Leu Thr Lys Gln Leu Lys Arg Lys Leu Pro Ala Thr Asn  
 65 70 75 80

Thr Gly Arg Arg Gln Lys His Glu Val Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser  
 85 90 95

Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Tyr Leu Glu Arg Leu Lys Ser Leu  
 100 105 110

Ile Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 146

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

---

<400> 13

Met Glu Arg Thr Leu Val Cys Leu Val Val Ile Phe Leu Gly Thr Val  
1 5 10 15

Ala His Lys Ser Ser Pro Gln Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu  
20 25 30

Arg His Leu Ile Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp  
35 40 45

Leu Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys  
50 55 60

Glu His Ala Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser  
65 70 75 80

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

Arg Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile  
100 105 110

Ala Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu  
115 120 125

Phe Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His  
130 135 140

Leu Ser  
145

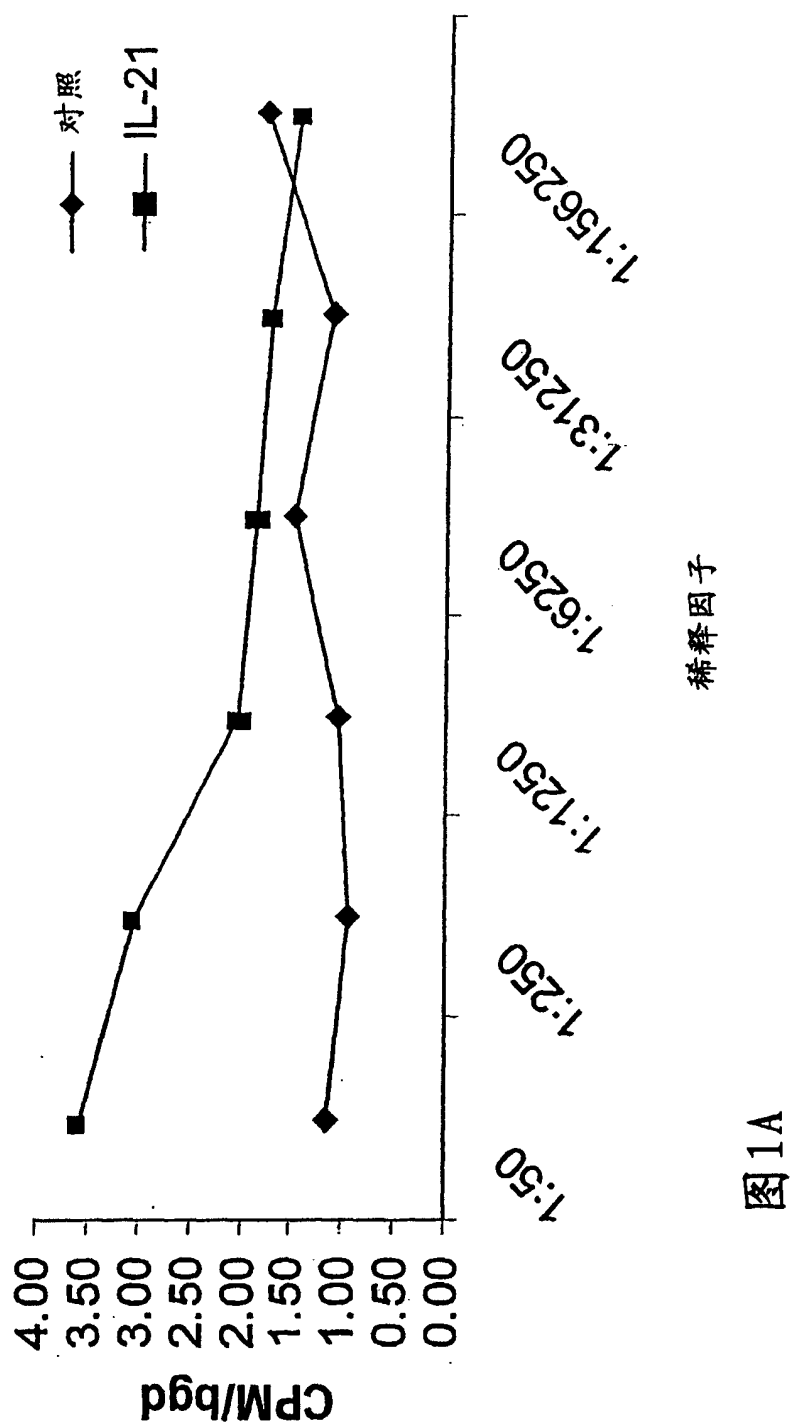


图 1A

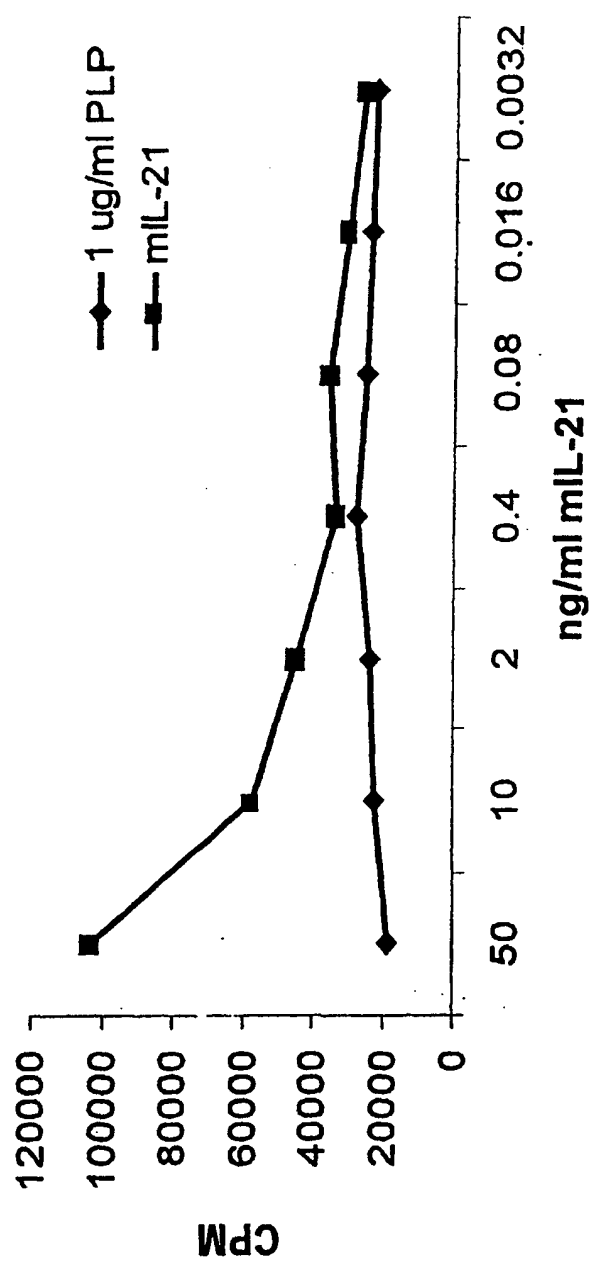


图1B

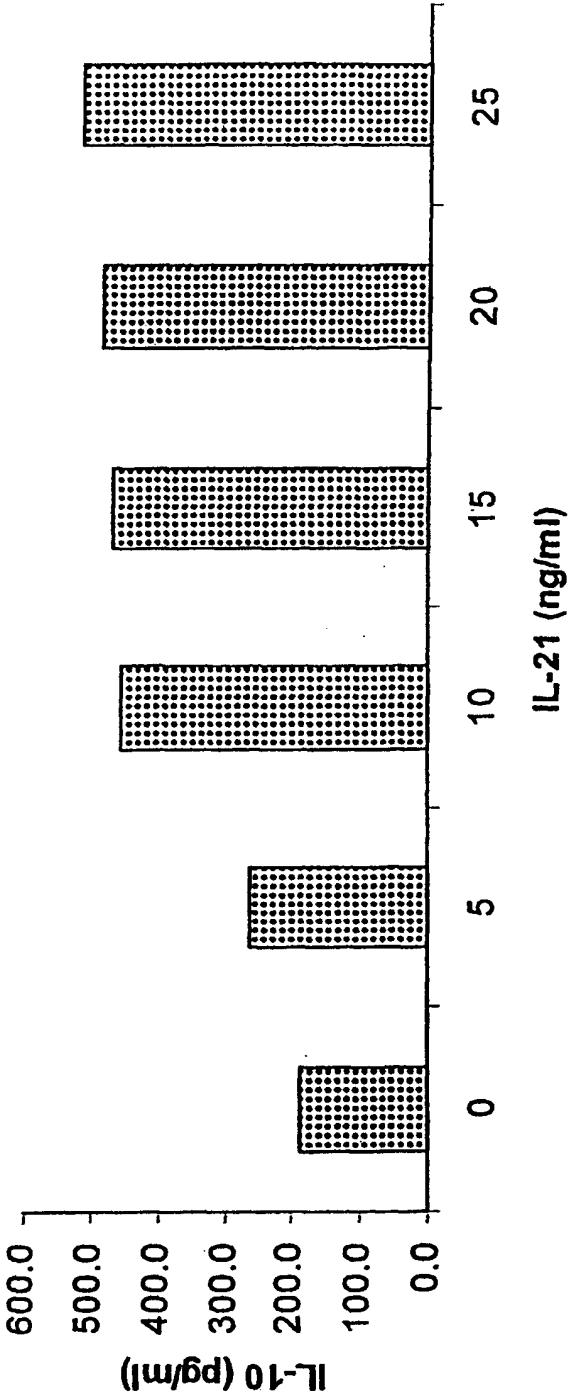


图 2

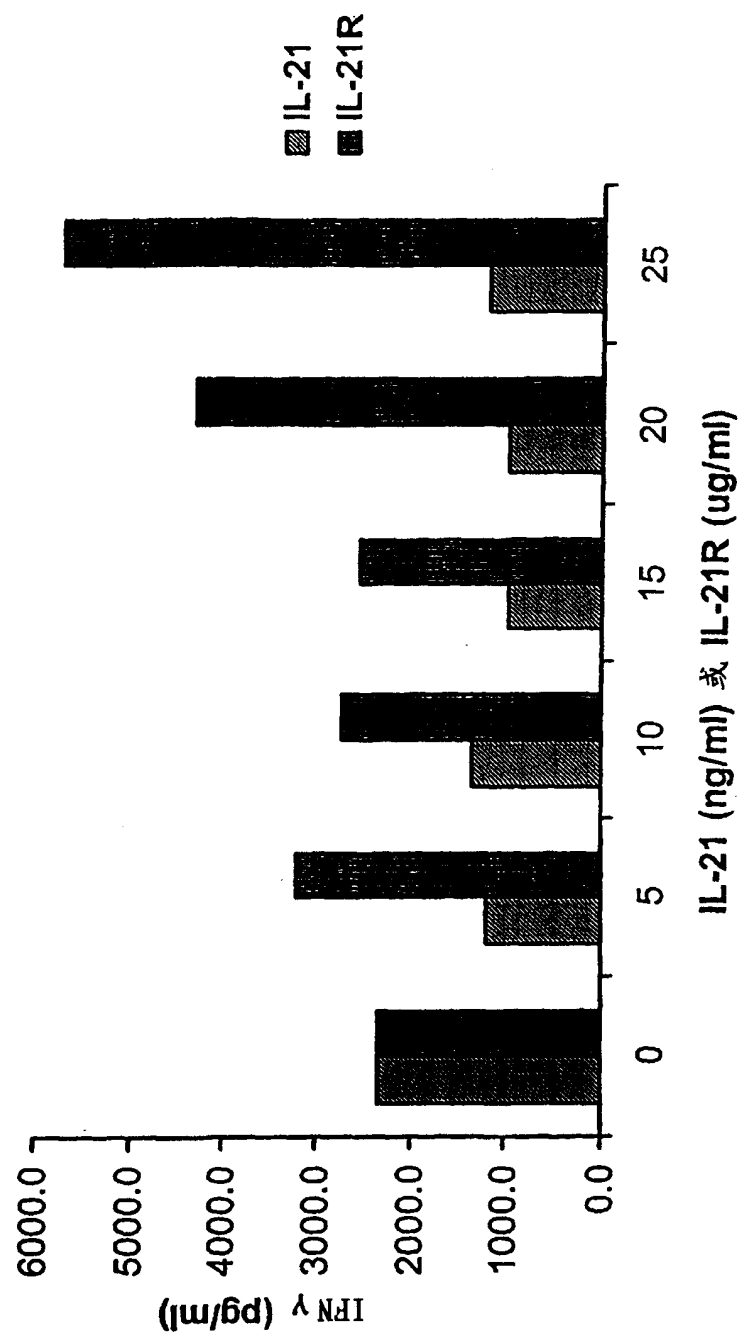


图 3

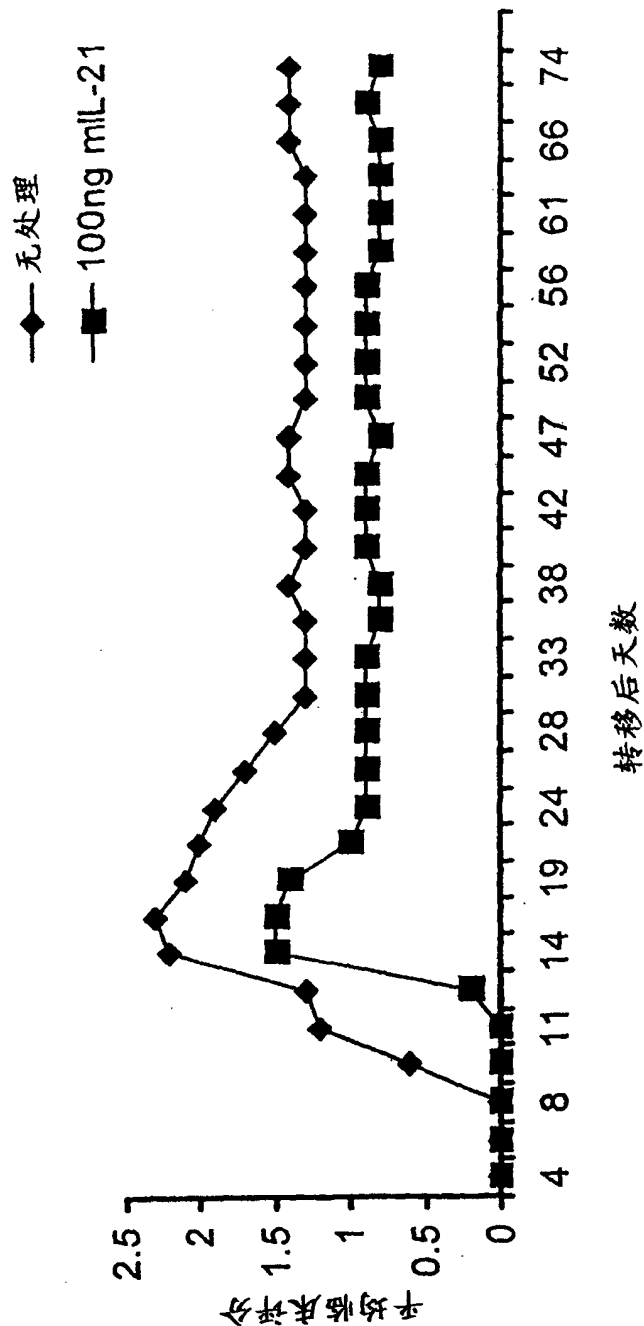


图4



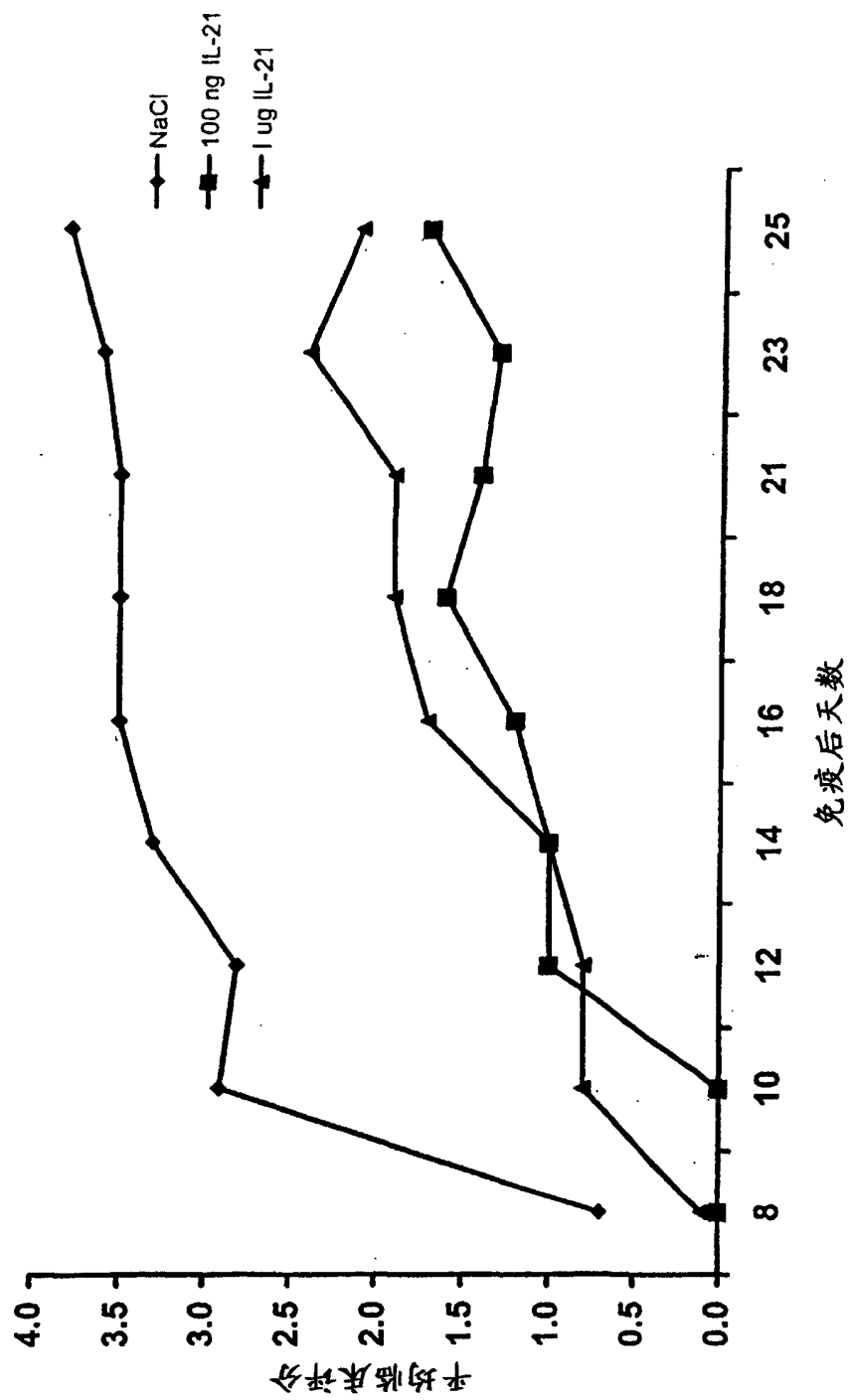


图5