

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580005070.5

[51] Int. Cl.

*A61K 39/395 (2006.01)*  
*A61K 38/20 (2006.01)*  
*A61K 38/17 (2006.01)*  
*A61P 11/06 (2006.01)*  
*A61P 19/02 (2006.01)*  
*A61P 25/02 (2006.01)*

[43] 公开日 2007年2月21日

[11] 公开号 CN 1917902A

[51] Int. Cl. (续)

*A61P 31/00 (2006.01)*  
*A61P 35/00 (2006.01)*  
*A61P 37/00 (2006.01)*  
*C07K 14/54 (2006.01)*  
*C07K 16/24 (2006.01)*  
*C07K 16/28 (2006.01)*  
*C07K 14/715 (2006.01)*

[22] 申请日 2005.2.15

[21] 申请号 200580005070.5

[30] 优先权

[32] 2004.2.17 [33] US [31] 60/545,730

[86] 国际申请 PCT/US2005/004743 2005.2.15

[87] 国际公布 WO2005/079844 英 2005.9.1

[85] 进入国家阶段日期 2006.8.16

[71] 申请人 先灵公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 J·施米茨 M·奥夫特

R·A·卡斯特莱因 J·F·巴赞

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 权陆军 黄可峻

权利要求书 3 页 说明书 38 页 序列表 23 页  
附图 3 页

[54] 发明名称

白细胞介素 - 33 (IL - 33) 和 IL - 33 受体复合物的用途

[57] 摘要

提供了调节细胞因子活性, 例如用于治疗免疫和炎性病症, 包括肿瘤和癌症的方法。还提供了施用 IL - 33 和 IL - 33 受体的激动剂或者拮抗剂的方法。

1. 调节免疫病症或者状况的方法，其包括施用有效量的 IL-33 或者 IL-33 受体复合体(IL-33R)的激动剂或者拮抗剂。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述病症或者状况包括：
  - a) 先天性应答；
  - b) 哮喘或者变态反应；
  - c) 多发性硬化；
  - d) 炎性肠病；
  - e) 关节炎；
  - f) 感染；
  - g) 癌症或者肿瘤。
3. 权利要求 2 的方法，其中所述感染包含：
  - a) 细胞内病原体；
  - b) 细菌；
  - c) 寄生物；或者
  - d) 病毒。
4. 权利要求 3 的方法，其中所述细胞内病原体是：
  - a) 利什曼虫属物种；
  - b) 分枝杆菌属物种；
  - c) 利斯特氏菌属物种；
  - d) 弓形体属物种；
  - e) 血吸虫属；或者
  - f) 呼吸病毒。
5. 权利要求 1 的方法，其中所述免疫病症或者状况包含：
  - a) TH1 型应答；或者
  - b) TH2 型应答。
6. 权利要求 5 的方法，其中所述 TH2 型应答包含 TH2 型应答中的早期事件。
7. 权利要求 1 的方法，其中所述关节炎包含：
  - a) 类风湿性关节炎；
  - b) 骨关节炎；或者
  - c) 牛皮癣性关节炎。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述激动剂包含：

- a) IL-33 或者；
- b) 核酸。

9. 权利要求 11 的方法，其中所述核酸编码 IL-33。

10. 权利要求 1 的方法，其中所述拮抗剂包含来自抗体的结合组合物，该结合组合物特异性结合：

- a) IL-33；
- b) IL-33R 复合体；或者
- c) IL-33 和 IL-33R 的复合体。

11. 权利要求 10 的方法，其中来自抗体的结合组合物包含：

- a) 多克隆抗体；
- b) 单克隆抗体；
- c) 人源化抗体或者其片段；
- d) Fab、Fv 或者 F(ab')<sub>2</sub> 片段；
- e) 抗体的肽模拟物，或者
- f) 可检测标记。

12. 权利要求 1 的方法，其中所述拮抗剂包含：

- a) 可溶性 IL-33R；
- b) 小分子；或者
- c) 核酸。

13. 权利要求 14 的方法，其中所述核酸与编码 IL-33 的多核苷酸特异杂交。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述核酸包含：

- a) 反义核酸；或者
- b) 小干扰 RNA(siRNA)。

15. 调节血细胞计数的方法，其包括施用有效量的 IL-33 的激动剂或者拮抗剂。

16. 权利要求 17 的方法，其中所述 IL-33 激动剂增加：

- a) 总白细胞；
- b) 嗜中性粒细胞；
- c) 淋巴细胞；或者
- d) 嗜酸性粒细胞的计数。

17. 权利要求 15 的方法, 其中所述 IL-33 拮抗剂增加血小板的计数。

18. 权利要求 16 的方法, 其中所述 IL-33 拮抗剂减小:

- a) 总白细胞;
- b) 嗜中性粒细胞;
- c) 淋巴细胞; 或者
- d) 嗜酸性粒细胞的计数。

19. 权利要求 1 的免疫状况或者病症的诊断方法, 其包括将结合组合物与生物样品接触, 其中结合组合物特异结合 IL-33, 和测量或者测定结合组合物与生物样品的特异结合。

20. 权利要求 1 的免疫状况或者病症的诊断试剂盒, 其包含隔室和结合组合物, 该结合组合物特异结合:

- a) IL-33;
- b) IL-33R 复合体;
- c) IL-33 和 IL-33R 的复合体; 或者
- d) 编码 IL-33 的核酸。

## 白细胞介素-33 (IL-33) 和 IL-33 受体复合物的用途

### 发明领域

本发明总的来说涉及哺乳动物细胞因子的用途。更具体地，本发明公开了 IL-33 和 IL-33 受体的使用方法。

### 发明背景

免疫系统保护个体免于传染物，如细菌、多细胞生物以及癌症。该系统包括几种类型的淋巴样细胞和骨髓细胞，如单核细胞、巨噬细胞、树突细胞(DC)、嗜酸性粒细胞、T 细胞、B 细胞和嗜中性粒细胞。这些淋巴样细胞和骨髓细胞通常产生称为细胞因子的信号传导蛋白。免疫应答包括炎症，即全身地或者在身体的特定位置积累免疫细胞。应答传染物或者外来物质时，免疫细胞分泌细胞因子，细胞因子又调节免疫细胞增殖、发育、分化或者迁移。免疫系统有时导致病理后果，即，炎性病症。这些炎性病症涉及免疫细胞和细胞因子，包括例如，牛皮癣、类风湿性关节炎、Crohn 氏病、多发性硬化和动脉粥样硬化(见，例如，Abbas,等人(编著) (2000) *Cellular and Molecular Immunology*, W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA; Oppenheim 和 Feldmann (编著) (2001) *Cytokine Reference*, Academic Press, San Diego, CA; Kaufmann, 等人(2001) *Immunobiol.* 204: 603-613; Saurez 和 Schultz-Cheery (2000) *Dev. Comp. Immunol.* 24: 269-283; van Reeth 和 Nauwynck (2000) *Vet. Res.* 31: 187-213; Garcia-Sastre (2001) *Virology* 279: 375- 384; Katze,等人(2002)*Nat. Rev. Immunol.* 2: 675-687; van Reeth (2000) *Vet. Microbiol.* 74: 109-116; Tripp (2003) *Curr. Pharm. Des.* 9: 51-59)。

细胞因子的白细胞介素-1(IL-1)家族造成炎性病症和增殖性状况的病理，例如，关节炎和癌症。IL-1 家族的细胞因子包括 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\delta$ 、IL-1 $\epsilon$ 、碱性成纤维细胞生长因子、IL-18、GREG 和 GREG2。IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  作为 31 kDa 多肽生物合成，其进一步加工成成熟的 17 kDa 形式，而 IL-1 $\delta$  和 IL-1 $\epsilon$  似乎不具有明显的前体形式(见，例如，Debets, 等人(2001) *J. Immunol.* 167: 1440-1446;

McMahon, 等人(1997)*J. Biol. Chem.* 272: 28202-28205; Irikura, 等人(2002) *New Engl. J Med.* 169: 393-398; Kim, 等人(2002)*J. Biol. Chem.* 277: 10998-11003)。

IL-1 家族还包括 IL-1 受体, 即, IL-1RI、IL-1RII 和 IL-1R 辅助蛋白(分别又称为 IL-1R1、IL-1R2 和 IL-1R3)。IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  通过结合 IL-1R1 触发细胞信号传导, 而 IL-1RII 可以发挥吸收循环的配体的分子的功能。IL-1 受体拮抗剂(IL-1Ra)是另一种 IL-1 家族蛋白质, 它结合 IL-1 受体而不传递信号并且作为 IL-1 的抑制剂。IL-1ra 和 IL-1 $\delta$  通过受体在拮抗信号传导中起相似作用, 即, IL-1ra 通过 IL-1R1 拮抗 IL-1 $\alpha$  介导的信号传导, 而 IL-1 $\delta$  通过 IL-1R6 拮抗 IL-1 $\epsilon$  介导的信号传导(见, 例如, You, 等人(2001) *New Engl. J. Med.* 193: 101-109). Debets, 等人(2001)*J. Immunol.* 167: 1440-1446; Apte 和 Voronov (2002)*Sem. Cancer Biol.* 12: 277-290; Wong, 等人(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 227-232)。

IL-1 家族成员在炎症状况中起作用, 所述炎症状况为例如, 类风湿性关节炎、牛皮癣、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、脓毒病和炎症性肠病(IBD)。类风湿性关节炎(RA)是一种常见的慢性炎症病症, 其特征是关节, 例如滑膜、软骨和骨的降解。该病症影响约 1% 的人口并且不能被治愈。IL-1 刺激参与关节炎的许多细胞, 例如, 成纤维细胞、破骨细胞、软骨细胞和嗜中性粒细胞, 它们可以表现出异常增殖和释放导致关节破坏的酶(见例如, (Debets, 等人(1997) *J. Immunol.* 158: 2955-2963; Lacey, 等人(2003) *Arthritis Rheum.* 48: 103-109; Chung (2001) *Eur. Resp. J. Suppl.* 34:50s-59s ; Freeman 和 Buchman (2001) *Expert Opin. Biol. Ther.* 1: 301-308; Dinarello (2000) *Chest* 118: 503-508). Krause, 等人(2002)*J. Immunol.* 169: 6610-6616; Choy 和 Panayi (2001) *New Engl. J. Med.* 344: 907-916; Woolley (2003) *New Engl. J. Med.* 348: 1709-1711; Williams, 等人(2000) *New Engl. J. Med.* 164: 7240-7245; Feldmann 和 Maini (2001) *Annu. Rev. Immunol.* 19: 163-196; Lacey, 等人, 同上; Niki, 等人(2001) *J. Clin. Invest.* 107: 1127-1135; Attur, 等人(2000)*J. Biol. Chem.* 51: 40307-40315)。

增殖性病症是美国中死亡的第二位最常见的原因(Anderson (2002) *National Vital Statistics Reports* 50: 1-86; Toribara 和

Sleisenger (2003) *New Engl. J. Med.* 332: 861-867; Janne 和 Mayer (2000) *New Engl. J. Med.* 342: 1960-1968; Fuchs 和 Mayer (1995) *New Engl. J. Med.* 333: 32-41)。IL-1 家族的细胞因子已经牵涉于增殖性疾病，例如癌症的控制和病理。IL-1 例如通过改变依赖细胞周期蛋白的激酶和依赖细胞周期蛋白的激酶抑制剂的表达来调节通过细胞周期的进展，而低剂量可以促进肿瘤的免疫根除(见，例如，Zeisler, 等人 (1998) *Eur. J. Cancer* 34: 931-933; Yoshida, 等人 (2002) *Brit. J. Cancer* 86: 1396-1400; Nesbit, 等人 (1999) *Oncogene* 18: 6469-6476; Dinarello, 等人 (1998) *J. Leuko. Biol.* 63: 658-664; Apte 和 Voronov, 同上; Saijo, 等人 (2002) *New Engl. J. Med.* 169: 469-475; Murai, 等人 (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 6797-6806; Koudssi, 等人 (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 25796-25803; Zeki, 等人 (1999) *J. Endocrinol.* 160: 67-73; Osawa, 等人 (2000) *J. Biochem.* 127: 883-893)。

对于治疗炎性和免疫病症的需要还没有满足。本发明通过提供使用 IL-33 或者 IL-33 受体的激动剂和拮抗剂的方法满足了该需要。

### 发明概述

本发明部分基于发现了 IL-33 或者 IL-33 受体(以前称作 IL-100 和 IL-100 受体)的激动剂和拮抗剂调节对许多免疫和炎性状况的应答。

本发明提供了调节免疫病症或者状况的方法，其包括施用有效量的 IL-33 或者 IL-33R 复合体的激动剂或者拮抗剂。还提供了上面的方法，其中所述病症或者状况包括：a)先天性应答；b)哮喘或者变态反应；c)多发性硬化；d)炎性肠病；e)关节炎；f)感染；g)癌症或者肿瘤。还提供了上面的方法，其中感染包含：a)细胞内病原体；b)细菌；c)寄生物；或者 d)病毒；和上面的方法，其中细胞内病原体为 a)利什曼虫属物种(*Leishmania sp.*)；b)分枝杆菌属物种(*Mycobacterium sp.*)；c)利斯特氏菌属物种(*Listeria sp.*)；d)弓形体属物种(*Toxoplasma sp.*)；e)血吸虫属(*Schistosoma*)；或者 f)呼吸病毒。此外，本发明提供了上面的方法，其中免疫病症或者状况包含 TH1 型应答或者 TH2 型应答；和上面的方法，其中 TH2-型应答包含 TH2 型应答中的早期事件；以及上面的方法，其中关节炎包含类风湿性关节炎、骨关节炎

或者牛皮鲜性关节炎。

在另一实施方案中，本发明提供了上面的方法，其中激动剂包含 IL-33 或者核酸；以及上面的方法，其中核酸编码 IL-33；和上面的方法，其中拮抗剂包含来自抗体的结合组合物，该结合组合物特异性结合 IL-33 或者 IL-33、T1/ST2 和 SIGIRR (IL-33R)的复合体。在再一个实施方案中，本发明提供了上面的方法，其中来自抗体的结合组合物包含多克隆抗体；单克隆抗体；人源化抗体或者其片段；Fab、Fv 或者 F(ab')<sub>2</sub> 片段；抗体的肽模拟物；或者可检测标记。还提供了上面的方法，其中拮抗剂包含：a)可溶性 IL-33R；b)小分子；或者 c)核酸；和上面的方法，其中核酸与编码 IL-33 的多核苷酸特异杂交；以及上面的方法，其中核酸包含反义核酸或者小干扰 RNA(siRNA)。

另一方面，本发明提供了调节血细胞计数的方法，其包括施用有效量的 IL-33 的激动剂或者拮抗剂；和上面的方法，其中 IL-33 激动剂增加总白细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞或者嗜酸性粒细胞的计数；以及上面的方法，其中 IL-33 拮抗剂增加血小板计数；和上面的方法，其中 IL-33 拮抗剂减小总白细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞或者嗜酸性粒细胞的计数。

本发明的再一个方面提供了诊断上述免疫状况或者病症的方法，其包括将结合组合物与生物样品接触，其中结合组合物特异结合 IL-33，和测量或者测定结合组合物与生物样品的特异结合。还提供了用于诊断权利要求 1 的免疫状况或者病症的试剂盒，其包含隔室和特异结合:IL-33、IL-33R 复合体、IL-33 和 IL-33R 的复合体或者编码 IL-33 的核酸的结合组合物。

#### 附图简述

图 1 显示了在 IL-33+抗 IL-33 抗体处理的小鼠相对于仅 IL-33 和同种型对照抗体处理的小鼠中 IL-5 的产生。

图 2 显示了抗-IL-33 和同种型对照处理的小鼠的 CIA 疾病得分。

图 3 显示了抗-IL-33 和同种型对照处理的小鼠中 CIA 的发病率。

图 4 显示了用抗 IL-33 抗体或者同种型对照抗体处理的小鼠中关节炎爪的平均数。

图 5 显示了抗 IL-33 和同种型对照处理的小鼠中的 EAE 疾病得

分。

图 6 显示了抗 IL-33 和同种型对照处理的小鼠中的 EAE 发病率。

### 优选实施方案的详细描述

如本文所用的，包括所附权利要求，除非上下文另外明确指出，词语的单数形式如“一个 (a)”、“一个 (an)”和“这个”包括它们对应的复数形式。

本文应用的所有参考文献都并入本文作为参考，就像每个单独的出版物或者专利申请具体并且单独指出并入本文作为参考一样。

### 1. 定义

“活化”、“刺激”和“处理”当应用于细胞或者受体时，除非上下文另外说明或者明确指出，可以具有相同含义，例如，用配体活化、刺激或者处理细胞或者受体。“配体”包含天然的和合成的配体，例如，细胞因子、细胞因子变体、类似物、突变蛋白和来自抗体的结合组合物。“配体”还包括小分子，例如，细胞因子的肽模拟物和抗体的肽模拟物。“活化”可以指如通过内部机制以及通过外部或者环境因素调节的细胞活化。“应答”，例如，细胞、组织、器官或者生物的应答包括生物化学或者生理行为的改变，所述行为为例如浓度、密度、粘附或者生物隔室中的迁移、基因表达速率，或者分化状态，其中该改变与活化、刺激或者处理相关，或者与内部机制，如基因编程 (genetic programming) 相关。

分子的“活性”可以描述或者表示分子结合配体或者受体，表示催化活性；表示刺激基因表达或者细胞信号传导、分化或者成熟的能力；表示抗原活性，表示其他分子的活性的调节，等等。分子的“活性”还可以表示调节或者维持细胞-细胞相互作用(例如，粘附)中的活性，或者维持细胞结构(例如，细胞膜或者细胞骨架)的活性。“活性”还可以表示比活性，例如，[催化活性]/[mg 蛋白质]，或者[免疫活性]/[mg 蛋白质]，生物隔室中的浓度，等等。“增殖活性”包括促进例如正常细胞分裂，以及癌症、肿瘤、发育不良、细胞转化、转移和血管发生，是其所必需的或与其特异相关的活性。

“施用”和“治疗”当应用于 IL-33 的激动剂或者拮抗剂施用于

例如，动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，表示使外源药物、治疗剂、诊断剂、化合物或者组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或者生物流体接触。“施用”和“治疗”可以表示例如，治疗、安慰剂、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。“细胞的治疗”包括使试剂与细胞接触，以及使试剂与流体接触，其中流体与细胞接触。“施用”和“治疗”还表示通过试剂、诊断剂、结合组合物或者通过另一种细胞体外和离体 (*ex vivo*) 处理，例如细胞。“治疗”当应用于人、兽医或者研究受试者时，表示治疗性治疗、预防或者防止性措施，研究和诊断应用。“治疗”当应用于人、兽医或者研究受试者、或者细胞、组织或者器官时，包括使 IL-33 激动剂或者 IL-33 拮抗剂接触人或者动物受试者、细胞、组织、生理隔室，或者生理流体。“细胞的治疗”还包括这样的情况，其中 IL-33 激动剂或者 IL-33 拮抗剂例如在流体相或者胶体相接触 IL-33 受体 (T1/ST2)，以及这样的情况，其中所述激动剂或者拮抗剂接触流体，例如，其中流体接触细胞或者受体，但是还没有证明该激动剂或者拮抗剂接触该细胞或者受体。

“结合组合物”表示分子、小分子、大分子、抗体、其片段或者类似物、或者可溶性受体，它们能够结合靶，其中靶是例如，IL-33 或者 IL-33R。“结合组合物”还可以表示分子的复合体，例如，非共价复合体，表示离子化的分子，和共价或者非共价修饰的分子，例如，通过磷酸化、酰化、交联、环化或者有限切割修饰的分子，该分子能够结合靶。“结合组合物”还可以表示与稳定剂、赋形剂、盐、缓冲剂、溶剂或者添加剂组合的能够结合靶的分子。“结合”可以定义为结合组合物与靶的结合，其中当结合组合物可以溶解或者悬浮在溶液中时，该结合导致结合组合物的正常布朗运动减小。

“保守修饰的变体”应用于氨基酸和核酸序列。对于特定核酸序列，保守修饰的变体表示编码相同或者基本相同的氨基酸序列的那些核酸，或者在核酸不编码氨基酸序列时，表示基本上相同的核酸序列。因为遗传密码的简并性，许多功能上相同的核酸可以编码任何给定蛋白质。对于氨基酸序列，技术人员将认识到对于核酸、肽、多肽或者蛋白质序列的如下单个替代是“保守修饰的变体”，所述替代对保守氨基酸的编码序列中的一个氨基酸或者很小百分比的氨基酸进

行了替代。提供功能上相似的氨基酸的保守替代表是本领域熟知的。保守替代的一个实例是在下面组之一的一个氨基酸与相同组的另一氨基酸交换(授予 Lee,等人的美国专利号 5,767,063; Kyte 和 Doolittle (1982)J. Mol. Biol. 157: 105-132):

- (1) 疏水的: 正亮氨酸、Ile、Val、Leu、Phe、Cys 或者 Met;
- (2) 中性亲水的: Cys、Ser、Thr;
- (3) 酸性的: Asp、Glu;
- (4) 碱性的: Asn、Gln、His、Lys、Arg;
- (5) 影响链取向的残基: Gly、Pro;
- (6) 芳族的: Trp、Tyr、Phe;
- (7) 小氨基酸: Gly、Ala、Ser。

“衍生的”可以用于描述例如,从亲本肽、寡肽或者多肽,如抗体衍生肽、寡肽或者多肽的结构。在该上下文中,衍生的包括例如,肽结构,其中该肽具有与亲本中发现的相同的序列,例如,其中肽与亲本相同但是在亲本的 N-末端、C-末端或者 N-和 C-末端具有截短,或者具有截短和融合,或者仅有融合。衍生的还表示肽具有与亲本中发现的相同的序列,但是具有保守氨基酸改变,或者具有缺失或插入,其中缺失或者插入保留了该肽中亲本固有的生物学性质。“衍生的”包括这样的情况,其中用亲本作为起始化合物合成肽或者多肽,并且其中使用亲本的结构作为指导,从头合成肽或者多肽。

本发明的 IL-33 的激动剂或者拮抗剂的“有效量”或者“治疗有效量”表示足够减轻病症或者生理状况的症状或者病征的量或者足够允许或者促进诊断病症或者病理状况的量。对于特定患者或者兽医受试者,有效量可以取决于多种因素而变化,这些因素为诸如所治疗的状况、患者的总体健康、施用的方法途径和剂量和副作用的严重性(见,例如,授予 Netti 等人的美国专利号 5,888,530)。有效量可以是避免严重副作用或者毒性作用的最大剂量或者给药方案。该效果将导致诊断措施、参数或者可检测的信号提高至少 5%,通常至少 10%,更通常至少 20%,最通常至少 30%,优选至少 40%,更优选至少 50%,最优选至少 60%,理想地至少 70%,更理想地至少 80%,且最理想地至少 90%,其中 100%定义为正常受试者显示的诊断参数(见,例如,Maynard, 等人(1996) A Handbook of SOPs for Good

**Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, 英国)。**

取决于上下文，“外源的”表示在生物、细胞或者人体外产生的物质。取决于上下文，“内源的”表示在细胞、生物或者人体内产生的物质。

“病症”表示病理状态，或者与病理状态相关或者倾向于病理状态的状况。“感染性病症”指例如微生物、细菌、寄生物、病毒等等引起的病症，以及对该病症的不适宜的、无效的或者病理的免疫应答。“致癌病症”包括癌症、转化的细胞、肿瘤、发育不良、血管发生、转移等等，以及对该病症的不适宜的、无效的或者病理的免疫应答。

“有效量”表示例如，足够减轻病症、状况或者疾病状态的症状或者病征的 IL-33 激动剂、IL-33 拮抗剂、结合化合物或者结合组合物的量。“有效量”还表示足够允许或者促进诊断病症、状况或者疾病状态的症状或者病征的 IL-33 激动剂、拮抗剂、或结合化合物或者组合物的量。

“抑制剂”和“拮抗剂”或者“活化剂”和“激动剂”分别表示抑制性或者活化分子，例如，用于活化例如配体、受体、辅因子、基因、细胞、组织或者器官。例如，基因、受体、配体或者细胞的调节剂是改变基因、受体、配体或者细胞的活性的分子，其中活性的调节性质可以受到活化、抑制或者改变。调节剂可以单独作用或者，或者它可以使用辅因子，例如，蛋白质、金属离子或者小分子。抑制剂是减小、阻断、防止、延迟活化、灭活、脱敏或者下调例如，基因、蛋白质、配体、受体或者细胞的化合物。活化剂为增加、活化、促进、增强活化、敏化或者上调例如，基因、蛋白质、配体、受体或者细胞的化合物。抑制剂还可以定义为减小、阻断或者灭活组成型活性的组合物。“激动剂”是与靶相互作用以导致或者促进靶活化的增加的化合物。“拮抗剂”是与激动剂作用相反的化合物。拮抗剂防止、减小、抑制或者中和激动剂的活性。拮抗剂也可以防止、抑制或者减小靶，例如靶受体的组成型活性，甚至当没有鉴定的激动剂时也是如此。

为了检查抑制的程度，例如，将包含给定的，例如蛋白质、基因、

细胞或者生物样品或者测定用潜在活化剂或者抑制剂处理并与没有抑制剂的对照样品比较。给对照样品，即没有用拮抗剂处理的样品分配 100% 的相对活性值。当相对于对照的活性值为约 90% 或以下，通常 85% 或以下、更通常 80% 或以下、最通常 75% 或以下、一般 70% 或以下、更一般 65% 或以下、最一般 60% 或以下、通常 55% 或以下、通常 50% 或以下、更通常 45% 或以下、最通常 40% 或以下、优选 35% 或以下、更优选 30% 或以下、还更优选 25% 或以下、且最优选 25% 以下时，实现了抑制。当相对于对照的活性值为约 110%，通常至少 120%，更通常至少 140%，更通常至少 160%，通常至少 180%，更通常至少 2 倍，最通常至少 2.5 倍，通常至少 5 倍，更通常至少 10 倍，优选至少 20 倍，更优选至少 40 倍，且最优选 40 倍以上时，实现了活化。

可以如下监控活化或者抑制的终点。可以通过终点监控例如，细胞、生理流体、组织、器官和动物或者人类受试者的活化、抑制和对治疗的反应。终点可以包含预定量或者百分数的例如，炎症的标记、致癌性、或者细胞脱粒或者分泌，如细胞因子、毒性氧或者蛋白酶的释放。终点可以包含例如，预定量的离子流或者转运、细胞迁移、细胞粘附、细胞增殖、转移潜力、细胞分化和表型的改变，例如，与炎症、编程性细胞死亡、转化、细胞周期或者转移有关的基因的表达（见，例如，Knight (2000) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30: 145-158; Hood 和 Cheresch (2002) *Nature Rev. Cancer* 2: 91-100; Timme, 等人(2003) *Curr. Drug Targets* 4: 251-261; Robbins 和 Itzkowitz (2002) *Med. Clin. North Am.* 86: 1467-1495; Grady 和 Markowitz (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3: 101-128; Bauer, 等人(2001) *Glia* 36: 235-243; Stanimirovic 和 Satoh (2000) *Brain Pathol.* 10: 113-126)。

抑制的终点通常为对照的 75% 或以下，优选对照的 50% 或以下，更优选对照的 25% 或以下，且最优选对照的 10% 或以下。通常，活化的终点为对照的至少 150%，优选对照的至少 2 倍，更优选对照的至少 4 倍，且最优选对照的至少 10 倍。

“表达”指特定基因编码的 mRNA 或者多肽的测量。表达的单位可以是在通过细胞、组织、细胞提取物或者组织提取物对表达的测量中，测量例如，mRNA 或者多肽的分子数/mg 蛋白质、mRNA 或者

多肽的分子数/细胞。表达的单位可以是相对的，例如，来自对照和实验哺乳动物的信号的比较或者使用对 mRNA 或者多肽特异的试剂相对于使用非特异试剂所得信号的比较。

当在至少约 30 个核苷酸的一段序列上有至少约 55% 同源性，优选在约 25 个核苷酸的一段序列上有至少约 75% 同源性，且最优选在约 20 个核苷酸的一段序列上有至少约 90% 同源性时，通常发生特异或者选择性“杂交”（见，例如，Kanehisa (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 203-213)。例如，第一种核酸和第二种核酸在严格条件下的杂交为：  
(1) 使用低离子强度和高温度进行洗涤，例如，0.015 M 氯化钠/0.0015 M 柠檬酸钠/0.1% 十二烷基硫酸钠在 50℃；(2) 在杂交期间使用变性剂，如甲酰胺，例如，具有 0.1% 牛血清清蛋白的 50% (体积/体积) 甲酰胺/0.1% Ficoll® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮/具有 750 mM 氯化钠, 75 mM 柠檬酸钠的 50 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.5)，在 42℃；(3) 使用 50% 甲酰胺，5 X SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 柠檬酸钠)，50 mM 磷酸钠 (pH 6.8)，0.1% 焦磷酸钠，5 X Denhardt 氏溶液，超声处理的鲑精 DNA (50 ng/ml)，0.1% SDS，和 10% 硫酸葡聚糖，在 42℃ 下，在 42℃ 下在 0.2 X SSC 和 0.1% SDS 中洗涤；或者 (4) 使用 10% 硫酸葡聚糖，2 X SSC (氯化钠/柠檬酸钠)，和 50% 甲酰胺的缓冲液，在 55℃，然后为由含有 EDTA 的 0.1 X SSC 组成的在 55℃ 进行的高严格性洗涤 (授予 Botstein 等人的美国专利号 6,387,657)。

核酸杂交的严格条件为盐、温度、有机溶剂和离液剂的函数。严格温度条件将通常包括超过约 30℃，更通常超过约 37℃，通常超过约 45℃，更通常超过约 50℃，优选超过约 65℃，且更优选超过约 70℃ 的温度。严格盐条件将通常小于约 1M，更通常小于约 500 mM，通常小于约 400 mM，更通常小于约 300 mM，通常小于约 200 mM，优选小于约 100 mM，且更优选小于约 80 mM，甚至低至小于约 20 mM。然而，参数的组合对于任何单个参数的测量更重要 (Wetmur 和 Davidson (1968) *J. Mol. Biol.* 31: 349-370)。

“免疫状况”或者“免疫病症”包括例如，病理炎症、炎性病症和自身免疫病症或者疾病。“免疫状况”也指感染、持续感染和增殖性状况，如癌症、肿瘤和血管发生，包括抗免疫系统清除的感染、肿瘤和癌症。“癌性状况”包括例如，癌症、癌细胞、肿瘤、血管发生

和癌前期状况，如发育不良。

“炎症病症”是指病症或者病理状况，其中该病理完全或者部分是由例如，免疫系统的细胞数的改变、迁移速率的改变或者活化的改变引起的。免疫系统的细胞包括例如，T细胞、B细胞、单核细胞或者巨噬细胞、抗原呈递细胞(APC)、树突细胞、小胶质细胞、NK细胞、NKT细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞或者与免疫学特别有关的任何其他细胞，例如，产生细胞因子的内皮或者上皮细胞。

“炎症病症”表示病症或者病理状况，其中该病理完全或者部分是由免疫系统的细胞数的增加和/或细胞活化的增加引起的，所述细胞为例如，T细胞、B细胞、单核细胞或者巨噬细胞、肺泡巨噬细胞、树突细胞、NK细胞、NKT细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或者肥大细胞。

本文所用的“IL-33受体”、“IL-33R”或者“IL-33R复合体”应表示两个IL-1R家族成员T1/ST2和SIGIRR结合形成对IL-33刺激起反应的受体复合体。

“配体”是指例如，可以作为受体的激动剂或者拮抗剂的小分子、肽、多肽和膜缔合或者膜结合分子，或者其复合体。“配体”还包括这样的试剂，其不是激动剂或者拮抗剂，但是可以结合受体而不显著影响它的生物学性质，例如，信号传导或者粘附。此外，“配体”包括例如，通过化学或者重组方法改变成膜结合的配体的可溶形式的膜结合的配体。通常，当配体膜结合在第一个细胞上时，受体通常在另一个细胞上发生。第二个细胞可以与第一个细胞有相同或不同的特征。配体或者受体可以是完全细胞内的，即，它可以存在于胞质溶胶、细胞核或者一些其他细胞内隔室中。配体或者受体可以改变它的位置，例如，从细胞内隔室到质膜的外侧面。配体和受体的复合体称作“配体受体复合体”。当配体和受体参与信号传导途径时，配体在信号传导途径上游位置发生，而受体在信号传导途径的下游位置发生。

“第一条多肽链”和“第二条多肽链”是指不是通过常规的肽键连接在一起的两条多肽链。通常，第一条多肽链包含N-末端和C-末端，且第二条多肽链包含另一个N-末端和另一个C-末端，即，共有

两个 N-末端和两个 C-末端。第一条多肽链可以由第一个载体编码，而第二条多肽链可以由第二个载体编码。第一条多肽链和第二条多肽链可以由一个载体编码，其中第一个启动子可操作地连接第一条多肽链，而第二个启动子可操作地连接第二条多肽链，或者在另一实施方案中，第一条和第二条多肽链的表达可以可操作地连接相同的启动子。

“敏感性”，例如，受体对配体的敏感性表示配体对受体的结合导致受体中，或者与受体特异结合的事件或者分子中可检测的改变，例如，构象改变、磷酸化、与受体结合的蛋白质的性质或量，或者受体介导或者与受体有关的基因表达的改变。

提供了“小分子”用于治疗肿瘤和癌症的生理和病症。“小分子”定义为分子量小于 10kD，通常小于 2kD，且优选小于 1 kD 的分子。小分子包括，但不限于，无机分子、有机分子、含无机组分的有机分子、包含放射性原子的分子、合成分子、肽模拟物和抗体模拟物。作为治疗剂，小分子比大分子对细胞更易透过，对降解更不敏感，并且较不易引起免疫反应。描述了小分子，如抗体和细胞因子的肽模拟物，以及小分子毒素(见，例如，Casset, 等人(2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307: 198-205; Muylldermans (2001) *J. Biotechnol.* 74: 277-302; Li (2000) *Nat. Biotechnol.* 18: 1251-1256; Apostolopoulos, 等人(2002) *Curr. Med. Chem.* 9: 411-420; Monfardini, 等人(2002) *Curr. Pharm. Des.* 8: 2185-2199; Domingues, 等人(1999) *Nat. Struct. Biol.* 6: 652-656; Sato 和 Sone (2003) *Biochem. J.* 371: 603-608; 授予 Stewart 等人的美国专利号 6,326,482)。

“可溶性受体”指水溶性的并且例如，发生在细胞外流体、细胞内流体、或者与膜弱结合的受体。可溶性受体还指经工程化而可溶于水的受体。对于 T1/ST2，可溶性或者细胞外结构域定义为 SEQ ID NO: 6(人)的残基 1-337 和 SEQ ID NO: 8(小鼠)的残基 1-342。对于 SIGIRR，可溶性或者细胞外结构域定义为 SEQ ID NO: 10(人)的残基 1-118 和 SEQ ID NO: 12(小鼠)的残基 1-117。

“结合的特异性”、“结合的选择性”等等指预定的配体和预定受体之间的结合相互作用，其使得人们可以区分预定的配体和其他配体，或者预定的受体和其他受体。“特异地”或者“选择地”结合当

涉及配体/受体、抗体/抗原，或者其他结合对时，表示结合反应，其确定蛋白质和其他生物制品的异源群体中所述蛋白质的存在。从而，在指定的条件下，特定配体结合特定受体并且不以显著量结合样品中存在的其他蛋白质。抗体，或者衍生自抗体的抗原结合部位的结合组合物结合到它的抗原，其亲和力为对任何其他抗原的亲和力的至少 2 倍，优选至少 10 倍，更优选至少 20 倍，且最优选至少 100 倍。在优选实施方案中，抗体将具有大于约  $10^9$  升/摩尔的亲和力(见，例如，Munsen, 等人(1980) *Analyt. Biochem.* 107: 220-239)。

## II. 概要

本发明提供了调节或者治疗许多免疫状况和病症的方法。具体地，本发明提供了 IL-33 的激动剂和拮抗剂，其用于治疗 and 诊断例如，哮喘、变态反应、关节炎和对细胞内病原体如寄生物的反应，和对涉及肉芽肿的病症(例如，结核、结节病和 Crohn 氏病)的反应。

原初 T 细胞似乎不在它们的表面表达 T1/ST2，而与分化的 TH2 效应细胞上的抗原接触后诱导表达。T1/ST2 已经用作 TH2-型 T 细胞的标记。T1/ST2 也在肥大细胞和成纤维细胞上表达。

用 T1/ST2 敲除小鼠进行的研究似乎提示 T1/ST2 不在原初 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 TH2-型 T 细胞的分化中起作用，尽管这些结果似乎为所用测定法性质的函数，所述性质为例如，哪种病原生物用于攻击研究，或者研究 TH-应答的哪个阶段。证据还表明 T1/ST2 在 TH2-应答的早期事件中的作用(见，例如，Kropf, 等人 (2002) *Infect. Immunity* 70: 5512-5520; Hoshino, 等人(1999) *J. Exp. Med.* 190: 1541-1547; Senn, 等人(2000) *Eur. J. Immunol.* 30: 1929-1938; Townsend, 等人(2000) *J. Exp. Med.* 191: 1069-1075)。

抗 T1/ST2 抗体已经用于许多研究 T1/ST2 在免疫功能中的作用的研究中，而其他研究已检查了 T1/ST2 表达动物模型的免疫应答。用抗 T1/ST2 抗体处理导致降低的 TH2 型免疫应答。该抗体抑制嗜酸性粒细胞浸润、IL-5 产生和 IgE 产生。血吸虫感染引起 T1/ST2 的上调，如通过评估肺和肝脏肉芽肿中的表达所测定的。哮喘动物模型例如，用尘螨提取物或者用卵清蛋白处理时，导致 T1/ST2 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞上的表达增加，表明 T1/ST2 在变态反应性或者哮喘反应中的作

用。用 BALB/c 小鼠进行的研究揭示用抗-T1/ST2 抗体处理诱导了较高的 TH1-型应答,增强了 CD4<sup>+</sup> T 细胞应答 IL-12 的能力。抗 T1/ST2 抗体也减小由于硕大利什曼虫 (*Leishania major*) 感染引起的病变,并且减小 TH2 型细胞因子的表达。抗 T1/ST2 抗体加重了关节炎的动物模型(胶原诱导的关节炎; CIA)。具体地, T1/ST2 在 TH2 型应答的产生中的早期事件中发挥功能。长期暴露于多种变应原导致 CD4<sup>+</sup> T 细胞上 T1/ST2 的表达增加。T1/ST2 在介导先天性应答中起作用,因为抗-T1/ST2 抗体加重脂多糖(LPS)的毒性效果。针对 T1/ST2 的抗体也调节对病毒,例如,呼吸道合胞病毒的免疫应答(见,例如, Xu, 等人(1998) *J. Exp. Med.* 187: 787-794; Lohning, 等人(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6930-6935; Coyle, 等人 (1999) *J. Exp. Med.* 190: 895-902; Lohning, 等人(1999) *J. Immunol.* 162: 3882-3889; Johnson, 等人(2003) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169: 378-385; Kropf, 等人(2003) *Infect. Immunity* 71:1961-1971 ; Xu, 等人(1998) *J. Exp. Med.* 187: 787-794; Kropf, 等人 (2002) *Eur. J. Immunol.* 32: 2450-2459; Swirski, 等人(2002) *J. Immunol.* 169: 3499-3506; Sweet, 等人(2001) *J. Immunol.* 166: 6633-6639; Walzl, 等人(2001) *J. Exp. Med.* 193: 785-792。

IL-1 家族成员通常结合 IL-1 受体家族的异二聚体成员。已表明另一种已知的 IL-1R 家族成员 SIGIRR(单一 Ig IL-1 受体相关的蛋白质)与 T1/ST2 复合形成 IL-33 的功能性受体复合体。SIGIRR 最初发现为孤儿 IL-1R 成员(见,例如, Garlanda, 等人(2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 3522-3526; Clark, 等人(2003) *Genome Res.* 13: 2265-2270; Thomassen 等人(1999) *Cytokine* 11: 389-399; GenBank 检索号 NP\_068577; GenBank 检索号 NM\_021805; GenBank 检索号 NP\_075546; 和 GenBank 检索号 NM\_0230459)。SIGIRR 是广泛表达的 IL-1R 成员。

在用生物素化的成熟人 IL-33(SEQ ID NO: 2 的残基 112-270)、T1/ST2-Fc 融合体和 SIGIRR-Fc 融合体进行的沉淀实验中,表明 IL-33 可以结合两种受体融合蛋白,然而, IL-33 对 SIGIRR 的结合与 IL-33 和 T1/ST2 的结合相比更弱。为了测试一种或两种受体的信号传导能力,进行了依赖 NF- $\kappa$ B-的测定。在用 IL-33 刺激后, T1/ST2

和 SIGIRR 的共表达对于活化 NF- $\kappa$ B 信号传导和 MAP 激酶既是必要的又是足够的。还观察到 JNK 激酶的活化。

### III. 激动剂、拮抗剂和结合组合物

本发明提供了 IL-33 的激动剂和拮抗剂，包括特异结合 IL-33 或者 IL-33 受体复合体(T1/ST2 和 SIGIRR)的结合组合物。结合组合物包括抗体、抗体片段和可溶性受体。本发明预期结合 IL-33 或者 IL-33R 的封闭性抗体，或者通过 IL-33R 复合体刺激信号传导的激动性抗体。本发明的结合组合物还包括与编码 IL-33 或者 IL-33R 的核酸特异杂交的核酸，例如，反义核酸和小干扰 RNA(siRNA)。还可以使用抗独特型抗体。人 IL-33 由 GenBank NM\_033439 公开。使用 Vector NTI®Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD)，根据 Parker plot，适于制备抗-IL-33 抗体的具有增加的抗原性的区域发生在例如，GenBank NM\_033439 的氨基酸 1-23、30-38、61-78、84-93、99-106、127-133、139-144、148-158、166-180、196-204、231-237 和 252-257。

基于这些细胞外区域的受体不受到这些确切的 N-末端和 C-末端氨基酸的限制，而是可以更长或者更短，例如，长或者短 1、2、3 或更多个氨基酸，只要基本上维持配体结合性质即可。还预期基于可溶性受体的融合蛋白，例如，用于促进纯化或者稳定性或者提供功能结构域，例如，毒性多肽。

可以制备单克隆、多克隆和人源化抗体(见，例如，Sheperd 和 Dean (编著) (2000) *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, New York, NY; Kontermann 和 Dubel (编著) (2001) *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, New York; Harlow 和 Lane (1988) *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 139-243; Carpenter, 等人(2000) *J. Immunol.* 165: 6205; He, 等人(1998) *J. Immunol.* 160: 1029; Tang, 等人(1999) *J. Biol. Chem.* 274: 27371-27378; Baca, 等人(1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684; Chothia, 等人(1989) *Nature* 342: 877-883; Foote 和 Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224: 487-499; 授予 Vasquez 等人的美国专利号 6,329,511)。预期抗体和可溶性受体的突变蛋白和变体，例如，聚乙二醇化 (pegylation) 或者诱变以除去或者替换脱酰胺的 Asn 残

基。

抗原的纯化对于抗体的产生不是必需的。可以通过 DNA 载体免疫进行免疫。见, 例如, Wang, 等人(1997) *Virology* 228: 278-284。备选地, 可以用带有目的抗原的细胞免疫动物。然后可以从经免疫的动物分离脾细胞, 并且可以将脾细胞与骨髓瘤细胞系融合产生杂交瘤 (Meyaard, 等人 (1997) *Immunity* 7: 283-290; Wright, 等人(2000) *Immunity* 13: 233-242; Preston, 等人 (1997) *Eur. J. Immunol.* 27: 1911-1918)。可以通过功能测定或者生物学测定, 即, 不依赖于所纯化抗原的拥有的测定来筛选所得杂交瘤用来产生所希望的抗体。可以证明用细胞免疫来产生抗体优于用纯化的抗原进行免疫(Kaithamana, 等人(1999) *J. Immunol.* 163: 5157-5164)。

抗体将通常以至少约  $10^{-3}$ M、更通常至少  $10^{-6}$ M、通常至少  $10^{-7}$ M、更通常至少  $10^{-8}$ M、优选至少约  $10^{-9}$ M、且更优选至少  $10^{-10}$ M、且最优选至少  $10^{-11}$ M 的  $K_D$  结合(见, 例如, Presta, 等人(2001) *Thromb. Haemost.* 85: 379-389; Yang, 等人(2001) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 38: 17-23; Carnahan, 等人(2003) *Clin. Cancer Res. (Suppl.)* 9: 3982s-3990s)。

由于已经鉴定了每个亚单位的胞质、跨膜和细胞外区域, 所以可以制备包含 IL-33 受体复合体(T1/ST2 和 SIGIRR)的细胞外结构域的可溶性受体(见, 例如, Lecart, 等人 (2002) *Eur. J. Immunol.* 32: 2979-2987; Mitcham, 等人(1996)*J. Biol. Chem.* 271: 5777- 5783; 和下面的序列列表)。

可以根据标准方法制备和使用可溶性受体(见, 例如, Jones, 等人(2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1592: 251-263; Prudhomme, 等人 (2001) *Expert Opinion Biol. Ther.* 1: 359-373; Fernandez-Botran (1999) *Crit. Rev. Clin. Lab Sci.* 36: 165-224)。还提供了用于 siRNA 干扰的组合物(见, 例如, Arenz 和 Schepers (2003) *Naturwissenschaften* 90: 345-359; Sazani 和 Kole (2003) *J. Clin. Invest.* 112: 481-486; Pirolo, 等人(2003) *Pharmacol. Therapeutics* 99: 55-77; Wang, 等人 (2003) *Antisense Nucl. Acid Drug Devel.* 13: 169-189)。

#### IV. 治疗组合物、方法

本发明提供了治疗和诊断先天性反应、哮喘、变态反应和关节炎的方法。

为了制备包括 IL-33 的激动剂或拮抗剂的药物组合物或无菌组合物，将试剂与可药用载体或者赋形剂混合。可以通过与生理学上可接受的载体、赋形剂或者稳定剂以例如，冻干粉末、膏剂、水性溶液、洗剂或者悬浮液的形式混合来制备治疗剂和诊断剂的制剂(见，例如，Hardman, 等人 (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) Remington : The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, 等人(编著) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms : Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, 等人(编著) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms : Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, 等人(编著) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms : Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner 和 Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc. , New York, NY)。

治疗剂的施用方案的选择取决于几种因素，包括实体的血清或者组织周转率、症状的水平、实体的免疫原性和生物学基质中靶细胞的可及性。优选地，施用方案使递送到患者的治疗剂的量最大化，同时使副作用保持在可接受的水平。因此，生物学递送的量部分取决于特定实体和所治疗的状况的严重性。可以得到在选择抗体、细胞因子和小分子的合适剂量中的指导(见，例如，Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (编著)(1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, NY; Baert,等人(2003) New Engl. J. Med. 348: 601-608; Milgrom, 等人(1999) New Engl. J. Med. 341: 1966-1973; Slamon,等人(2001)New Engl. J. Med. 344: 783-792; Beniaminovitz,等人(2000) New Engl. J. Med. 342: 613-619; Ghosh, 等人(2003) New Engl. J. Med. 348: 24-32; Lipsky,等人(2000)New Engl. J Med. 343: 1594-1602)。

通过连续输注，或者通过间隔例如，一天、一周或者每周 1-7 次

的给药，可以提供抗体、抗体片段和细胞因子。可以静脉内、皮下、局部、经口、经鼻、直肠、肌内、大脑内或者通过吸入提供剂量。优选的剂量方案是包括避免显著的不希望的副作用的最大剂量和给药频率的方案。总的每周一次剂量通常为至少  $0.05 \mu\text{g}/\text{kg}$  体重，更通常至少  $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，最通常至少  $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，通常至少  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，更通常至少  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，最通常至少  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，优选至少  $0.2\text{mg}/\text{kg}$ ，更优选至少  $1.0 \text{mg}/\text{kg}$ ，最优选至少  $2.0 \text{mg}/\text{kg}$ ，最佳地至少  $10 \text{mg}/\text{kg}$ ，更加最佳地至少  $25 \text{mg}/\text{kg}$ ，最最佳地至少  $50 \text{mg}/\text{kg}$ (见，例如，Yang,等人(2003) *New Engl. J. Med.* 349: 427-434; Herold,等人(2002) *New Engl. J. Med.* 346: 1692-1698; Liu,等人(1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67 : 451-456; Portielji,等人 (20003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 133-144)。基于摩尔/kg 体重，小分子治疗剂，例如，肽模拟物、天然产物或者有机化学药品的所希望的剂量与抗体或者多肽大概相同。基于摩尔/kg 体重，小分子治疗剂的所希望的血浆浓度与抗体大概相同。

特定患者的有效量可以根据一些因素而变化，所述因素为例如所治疗的状况、患者的总体健康、施用的方法途径和剂量和副作用的严重性(见，例如，Maynard, 等人(1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ. , London, UK)。

一般的兽医、实验或者研究受试者包括猴子、狗、猫、大鼠、小鼠、兔、豚鼠、马和人。

由临床医生，例如，使用本领域已知或者怀疑影响治疗或者预期影响治疗的参数或者因素进行合适剂量的确定。通常，以稍微小于最佳剂量的量开始给药，之后以小的增量增加剂量，直到相对于任何不利副作用实现所希望的或者最佳效果。重要的诊断测量包括例如，所产生的炎症或者炎性细胞因子的水平的症状的测量。优选地，将使用的生物制品衍生自与靶向于治疗的动物相同的物种，从而最小化对该试剂的体液应答。

与第二种治疗剂，例如，细胞因子、类固醇、化学治疗剂、抗生素或者辐射共同施用或者治疗的方法是本领域公知的(见，例如，

Hardman, 等人 (编著) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第 10 版, McGraw-Hill, New York, NY; Poole 和 Peterson (编著) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice : A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila. , PA; Chabner 和 Longo (编著) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila. , PA)。有效治疗量将通常减轻症状至少 10%; 通常至少 20%, 优选至少约 30%, 更优选至少 40%, 且最优选至少 50%。

施用途径为通过例如, 局部或者皮肤应用、通过静脉内、腹膜内、大脑内、肌内、眼内、动脉内、脑脊髓内 (intracerebrospinal)、病灶内 (intralesional) 注射或者输注, 或者经肺途径, 或者通过缓释系统或者植入物(见, 例如, Sidman 等人(1983) Biopolymers 22: 547-556; Langer, 等人(1981), J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277; Langer (1982) Chem. Tech. 12: 98-105; Epstein, 等人(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 3688-3692; Hwang, 等人 (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030-4034; 美国专利号 6,350466 和 6,316,024)。

## V. 试剂盒和诊断试剂

可以得到基于抗体、核酸杂交和 PCR 方法的对炎症病症, 例如, 牛皮癣、Crohn 氏病、类风湿性关节炎、哮喘或者变态反应、动脉粥样硬化, 和癌症的诊断方法。

本发明提供了诊断试剂盒中 IL-33 的多肽、其片段、IL-33 的核酸, 和其片段, 该试剂盒例如, 用于诊断病毒病症, 包括 A 型流感, 和呼吸道和粘膜组织的病毒病症。还提供了结合组合物, 其包括抗体或者抗体片段, 用于检测 IL-33, 和其代谢物和分解产物。通常, 试剂盒将具有隔室, 该隔室含有 IL-33 多肽, 或者其抗原性片段、其结合组合物, 或核酸, 如核酸探针、引物或者分子信标(见, 例如, Rajendran, 等人(2003) Nucleic Acids Res. 31: 5700-5713; Cockerill (2003) Arch. Pathol. Lab. Med. 127: 1112-1120; Zammattéo, 等人 (2002) Biotech. Annu. Rev. 8:85-101 ; Klein (2002) Trends Mol. Med. 8: 257-260)。

诊断方法可以包括将来自受试者, 例如, 测试受试者的样品与特

异结合 IL-33 或者 IL-33 受体的多肽或者核酸的结合组合物接触。该方法可以还包括将来自对照受试者、正常受试者或测试受试者的正常组织或者流体的样品与结合组合物接触。此外，该方法可以还包括将组合物与测试受试者的特异结合与组合物与正常受试者、对照受试者或测试受试者的正常组织或者流体的特异结合相比较。测试样品或者测试受试者的表达或者活性可以与来自对照样品或者对照受试者的表达或活性比较。对照样品可以包含例如，患有免疫病症的患者中非侵袭或者无炎症的组织的样品。来自对照受试者或者对照样品的表达或者活性可以作为预定值提供，例如，从对照受试者的统计学上合适的组获得。

试剂盒可以包含例如，试剂和隔室、试剂和使用说明，或者试剂与隔室和使用说明。试剂可以包含 IL-33 的激动剂或者拮抗剂，或者其抗原性片段、结合组合物，或者正义和/或反义方向的核酸。用于测定例如，从生物样品或者化学文库得到的测试化合物的结合的试剂盒可以包含对照化合物、标记的化合物，和分离游离的标记化合物与结合的标记化合物的方法。对照化合物可以包含 IL-33 或者 IL-33 受体多肽的片段或者编码 IL-33 或者 IL-33 受体的核酸。该片段可以包含 0、1、2 或者更多抗原性片段。

“标记的”组合物是通过分光术、光化学、生物化学、免疫化学、同位素或者化学方法可以直接或者间接检测的。例如，有用的标记包括  $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、稳定同位素、荧光染料、电子密试剂、底物、附加表位或者酶，例如，用于酶联免疫测定或者 fluorettes(Rozinov 和 Nolan (1998) *Chem. Biol.* 5: 713-728)中的标记。

诊断测定法可以使用生物学基质，如活细胞、细胞提取物、细胞裂解物、固定的细胞、细胞培养物、体液或者法医样品。用于诊断或者试剂盒目的的缀合的抗体包括偶联染料、同位素、酶和金属的抗体，见，例如，Le Doussal, 等人(1991) *New Engl. J. Med.* 146: 169-175; Gibellini, 等人(1998) *J. Immunol.* 160:3891-3898 ; Hsing 和 Bishop (1999) *New Engl. J. Med.* 162: 2804-2811; Everts, 等人(2002) *New Engl. J. Med.* 168: 883-889。存在多种测定形式，如放射免疫测定法 (RIA)、ELISA、和芯片实验室 (lab on a chip) (美国专利号 6,176,962

和 6,517,234)。

基因表达数据是疾病和病理状况的诊断和治疗中的有用工具(见,例如, Li 和 Wong (2001) *Genome Informatics* 12: 3-13; Lockhart, 等人(1996) *Nature Biotechnol.* 14: 1675-1680; Homey, 等人(2000) *J. Immunol.* 164: 3465-3470; Debets, 等人(2000) *J. Immunol.* 165 : 4950-4956)。

## VI. 用途

本发明提供了用于治疗 and 诊断炎性和免疫病症(包括对感染的不适宜或者无效应答)的方法。提供了涉及例如,哮喘、变态反应、关节炎、涉及嗜酸性粒细胞炎症的病症,和涉及致病性或者无效 TH2 型应答的病症的方法。

本发明提供了刺激针对细菌、寄生物和病毒、细胞内病原体、和癌症和肿瘤的免疫防御的方法。提供了用于治疗细胞内细菌的方法。细胞内细菌物种包括沙门氏菌属物种(*Salmonella sp.*)、志贺氏菌属物种(*Shigella sp.*)、利斯特氏菌属物种、弗朗西丝氏菌属物种(*Francisella sp.*)、分枝杆菌属物种(结核、麻风病)、军团菌属物种(*Legionella sp.*)、立克次氏体属物种(*Rickettsia sp.*)、*Orientia sp.*、埃里希氏体属物种(*Ehrlichia sp.*)、无形体属物种(*Anaplasma sp.*)、新立克次氏体属物种(*Neorickettsia sp.*)、衣原体属物种(*Chlamydia sp.*)和考克斯氏体属物种(*Coxiella sp.*)。此外, IFN  $\gamma$  介导对寄生物的应答,所述寄生物为例如,疟虫属物种(*Plasmodia sp.*)(疟疾)、弓形体属物种、利什曼虫属物种、锥虫属物种(*Trypanosoma sp.*)和隐孢子虫属物种(*Cryptosporidium sp.*)。提供了治疗病毒的方法,所述病毒为例如, HIV、正痘病毒,如天花病毒和痘苗病毒(天花)、和疱疹病毒,包括  $\alpha$  疱疹病毒,例如,单纯疱疹病毒和  $\beta$  疱疹病毒,例如,巨细胞病毒。还提供了治疗慢性炎症性病症的方法(见,例如, Kent, 等人(2000) *Vaccine* 18: 2250-2256; Ismail, 等人(2002) *FEMS Microbiol. Lett.* 207: 111-120; Kaufmann (2001) *Nature Revs. Immunol.* 1: 20-30; Goebel 和 Gross (2001) *TRENDS Microbiol.* 9: 267-273; Heussler, 等人(2001) *Int. J. Parasitol.* 31: 1166-1176; Luder, 等人(2001) Carsten, 等人(2001) *TRENDS Parasitol.* 17 : 480-486; Rook, 等人(2001) *Eur. Resp. J.* 17:

537-557; Stenger 和 Rollinghoff (2001) *Ann. Rheum. Dis.* 60:iii43-iii46 ; Haas, 等人(2002) *Am. J. Dermatopathol.* 24: 319-323; Dorman 和 Holland (2000) *Cytokine Growth Factor Revs.* 11: 321-333; Smith, 等人(2002)*J. Gen. Virol.* 83 (Pt. 12)2915-2931 ; Cohrs 和 Gilden (2001) *Brain Pathol.* 11: 465-474; Tannenbaum 和 Hamilton (2002) *Sem. Cancer Biol.* 10: 113-123; Ikeda, 等人(2002) *Cytokine Growth Factor Revs.* 13: 95-109; Klimp, 等人 (2002) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 44: 143-161; Frucht, 等人(2001) *TRENDS Immunol.* 22: 556-560).

本发明提供了治疗或者诊断增殖性状况或者病症的方法, 所述增殖性状况或者病症为例如, 子宫、子宫颈、乳腺、前列腺、睾丸、阴茎、胃肠道的癌症, 例如, 食管、口咽、胃、小肠或大肠、结肠或者直肠、肾、肾细胞、膀胱、骨、骨髓、皮肤、头或者颈、皮肤、肝、胆囊、心脏、肺、胰腺、唾液腺、肾上腺、甲状腺、脑、神经节、中枢神经系统(CNS)和外周神经系统(PNS), 和免疫系统, 例如, 脾脏或者胸腺的癌症。本发明提供了例如, 免疫原性肿瘤、非免疫原性肿瘤、休眠肿瘤、病毒诱导的癌症, 例如, 上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌、乳头瘤病毒、腺癌、淋巴瘤、癌、黑素瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤、畸胎瘤、化学诱导的癌、转移和血管发生的治疗方法。本发明还预期例如, 通过调节调节性 T 细胞(Treg)的活性减小对肿瘤细胞或者癌细胞抗原的耐受性(见, 例如, Ramirez- Montagut, 等人(2003) *Oncogene* 22: 3180-3187; Sawaya, 等人(2003) *New Engl. J. Med.* 349: 1501-1509; Farrar, 等人(1999)*J. Immunol.* 162: 2842-2849; Le, 等人(2001)*J. Immunol.* 167: 6765-6772; Cannistra 和 Niloff (1996) *New Engl. J. Med.* 334: 1030-1038; Osborne (1998) *New Engl. J. Med.* 339: 1609-1618; Lynch 和 Chapelle (2003) *New Engl. J. Med.* 348: 919-932; Enzinger 和 Mayer (2003) *New Engl. J. Med.* 349: 2241-2252; Forastiere, 等人(2001) *New Engl. J. Med.* 345: 1890-1900; Izbicki, 等人(1997) *New Engl. J. Med.* 337: 1188-1194; Holland, 等人(编著) (1996) *Cancer Medicine Encyclopedia of Cancer*, 第四版, Academic Press, San Diego, CA)。

本发明提供了用 IL-33 的激动剂或者拮抗剂与至少一种额外的治疗剂或者诊断剂治疗增殖性状况、癌症、肿瘤或者癌前期状况, 如发

育不良的方法。所述至少一种额外治疗剂或者诊断剂可以为例如，细胞因子或者细胞因子拮抗剂，如干扰素- $\alpha$ ，或者抗-表皮生长因子受体、阿霉素、表阿霉素、抗叶酸剂，例如，氨甲喋呤或者氟尿嘧啶、伊立替康、环磷酰胺、放射疗法、激素或者抗激素疗法，例如，雄激素、雌激素、抗雌激素、氟利坦或者己烯雌酚、手术、他莫昔芬、异环磷酰胺、二溴卫矛醇、烷化剂，例如，苯丙氨酸氮芥或者顺铂、依托泊苷、长春烯碱、长春碱、长春地辛、糖皮质激素、组胺受体拮抗剂、血管发生抑制剂、辐射、辐射敏化剂、蒽环类抗生素、长春花生物碱、紫杉烷，例如，紫杉醇和多西他赛、细胞周期抑制剂，例如，依赖细胞周期蛋白的激酶抑制剂、单克隆抗体、单克隆抗体和毒素的复合体、T细胞佐剂、骨髓移植或者抗原呈递细胞，例如，树突细胞疗法。疫苗可以例如，作为可溶性蛋白质或者作为编码该蛋白质的核酸提供(见，例如，Le,等人，上文；Greco和Zellefsky(编者)(2000) *Radiotherapy of Prostate Cancer*, Harwood Academic, Amsterdam; Shapiro和Recht(2001) *New Engl. J. Med.* 344: 1997-2008; Hortobagyi(1998) *New Engl. J. Med.* 339: 974-984; Catalona(1994) *New Engl. J. Med.* 331 :996-1004 ; Naylor和Hadden(2003) *Int. Immunopharmacol.* 3: 1205-1215; The Int. Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group(2004) *New Engl. J. Med.* 350: 351-360; Slamon, 等人(2001) *New Engl. J. Med.* 344: 783-792; Kudelka, 等人(1998) *New Engl. J. Med.* 338: 991-992; van Netten,等人(1996) *New Engl. J. Med.* 334 :920-921)。

可以得到用于对炎症病症，例如，牛皮癣、Crohn氏病和类风湿性关节炎打分的许多生物标记和方法(见，例如，Bresnihan(2003) *Arthritis Res. Ther.* 5: 271-278; Barnero和Delmas(2003) *Curr. Opin. Rheumatol.* 15: 641-646; Gionchetti, 等人(2003) *Dig. Dis.* 21: 157-167; Wiik(2002) *Autoimmune Rev.* 1: 67-72; Sostegni,等人(2003) *Aliment Pharmacol. Ther.* 17 (Suppl. 2):11-17)。

还描述了用于对癌症打分的生物标记和方法(见，例如，Alison(编著)(2001) *The Cancer Handbook*, Grove's Dictionaries, Inc. , St. Louis, MO ; Oldham(编著)(1998) *Principles of Cancer Biotherapy*, 第三版, Kluwer Academic Publ., Hingham, MA; Thompson, 等人(编

者) (2001) *Textbook of Melanoma*, Martin Dunitz, Ltd., London, UK; Devita, 等人(编者) (2001) *Cancer : Principles and Practice of Oncology*, 第六版, Lippincott, Phila, PA; Holland, 等人(编者) (2000) *Holland-Frei Cancer Medicine*, BC Decker, Phila. , PA; Garrett 和 Sell (编者) (1995) *Cellular Cancer Markers*, Humana Press, Totowa, NJ; MacKie (1996) *Skin Cancer*, 第二版, Mosby, St. Louis; Moertel (1994) *New Engl. J. Med.* 330: 1136-1142; Engleman (2003) *Semin. Oncol.* 30 (3 Suppl. 8): 23-29; Mohr, 等人(2003) *Onkologie* 26: 227-233)。

参考下面的实施例可以最好地理解本发明的宽范围, 这些实施例不意在将本发明限制于这些特定实施方案。

## 实施例

### I. 一般方法

描述了生物化学和分子生物学中的标准方法(见, 例如, Maniatis, 等人(1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook 和 Russell (2001) *Molecular Cloning*, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA)。标准方法也出现在 Ausbel, 等人(2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, 其描述了细菌细胞中的克隆和 DNA 诱变(卷 1)、哺乳动物和酵母中的克隆(卷 2)、糖缀合物和蛋白质表达(卷 3)和生物信息学(卷 4)。

还描述了蛋白质纯化的方法, 包括免疫沉淀、层析、电泳、离心和结晶(Coligan, 等人(2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc. , New York)。描述了化学分析、化学修饰、翻译后修饰、融合蛋白的产生、蛋白质的糖基化(见, 例如, Coligan, 等人(2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc. , New York; Ausubel, 等人(2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc. , NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for*

Life Science Research, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) BioDirectory, Piscataway, N. J. , pp. 384-391)。描述了多克隆和单克隆抗体的制备、纯化和片段化方法(Coligan, 等人(2001)Current Protcols in Immunology, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc. , New York; Harlow 和 Lane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow 和 Lane, 上文)。可以得到表征配体/受体相互作用的标准技术(见, 例如, Coligan, 等人(2001) Current Protcols in Immunology, Vol. 4, John Wiley, Inc. , New York)。

可以得到流式细胞术的方法, 包括荧光激活细胞分类术(FACS)(见, 例如, Owens, 等人(1994) Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) Flow Cytometry, 第二版; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ)。可以得到适于修饰核酸(包括核酸引物和探针)、多肽和抗体以用作例如诊断试剂的荧光试剂(见, 例如, Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) Catalogue, St. Louis, MO)。

描述了免疫系统的组织学的标准方法(见, 例如, Muller-Harmelink (编著) (1986) Human Thymus : Histopathology and Pathology, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt, 等人(2000) Color Atlas of Histology, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louis, 等人(2002) Basic Histology : Text and Atlas, McGraw-Hill, New York, NY)。

可以得到使用动物模型, 例如敲除小鼠和基于细胞的测定法测试、评估和筛选诊断剂、治疗剂和药剂的方法(见, 例如, Car 和 Eng (2001) Vet. Pathol. 38: 20-30; Kenyon, 等人 (2003) Toxicol.Appl. Pharmacol. 186: 90-100; Deurloo, 等人(2001) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 25: 751-760; Zuberi, 等人(2000)J. Immunol. 164: 2667-2673; Temelkovski, 等人(1998) Thorax 53 : 849-856; Horrocks, 等人(2003) Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 6: 570-575; Johnston, 等人(2002) Drug Discov. Today 7: 353-363)。

可以得到用于测定例如抗原性片段、前导序列、蛋白质折叠、功能结构域、糖基化位点和序列比对的软件包和数据库(见, 例如, GenBank, Vector NTI®Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc. , San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp. , Crystal Bay, Nevada); Menne, 等人 (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne, 等人 (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16: 741-742; Wren, 等人 (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68: 177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133: 17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14: 4683-4690)。

## II. 白细胞介素 100

人 IL-33 的氨基酸序列与 IL-1 家族的其他成员的相似性如下: 与 IL-1Ra 的相似性为 34% 相似性, 与 IL-1 $\delta$  的相似性为 36%, 与 IL-1F10 的相似性为 36%, 与 IL-1 $\zeta$  的相似性为 9%, 与 IL-1F8 的相似性为 32%; 与 IL-1 $\epsilon$  的相似性为 40%; 与 IL-1F9 的相似性为 31%。

使用计算机序列分析发现了白细胞介素-100 并且通过分别与 IL-1 家族成员 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的二级结构比较将白细胞介素-100 鉴定为新的 IL-1 家族成员。IL-1 家族成员是免疫系统应答病原性攻击释放的高度炎性调节剂。鉴定了人和小鼠的 IL-33 同源物以及大鼠和狗 IL-33。基因表达分析表明人 IL-33 在上皮细胞、平滑肌细胞和肾小球膜细胞中表达。在用 IL-1 $\beta$  和 INF- $\alpha$  刺激后, 在原代正常人皮肤和肺成纤维细胞以及在支气管平滑肌细胞中高度诱导了人 IL-33 mRNA 水平。牛皮癣皮肤样品以及肺的肺泡蛋白沉积症中 IL-33 mRNA 的表达显著升高。

类似于 IL-1 和 IL-18, IL-33 没有信号肽。相反, IL-33 作为大的前蛋白原产生和分泌, 该前蛋白原需要充分加工以释放成熟的生物活性形式。可能前 IL-33 原被天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶加工。我们鉴定了蛋白质序列中的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶切割位点并且表明体外翻译的人 IL-33 被重组的组成型活性的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 切割。为了研究 IL-33 的推定的生物学作用, 在大肠杆菌 (*E. coli*) 中表达并纯化重组蛋白质。因此, 将 IL-33 基因克隆到 pET3a 细菌表达载体。通过比较 IL-33 与 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的成熟序

列选择重组蛋白质的 N-末端, 从而成熟的生物活性蛋白质将缺少前-结构域。全长蛋白质的氨基酸 112 被选择作为 N-末端氨基酸。从大肠杆菌表达和纯化重组蛋白质。进行体内研究。以  $5\ \mu\text{g}/\text{天}$  或者  $50\ \mu\text{g}/\text{天}$  的剂量将重组人 IL-33 腹膜内(IP)注射到小鼠(C57BL/6J)在 7 天后导致严重的嗜曙红细胞增多和脾大。在第 3 天和第 7 天测试了几种细胞因子的血清水平。在第 3 天观察到在  $50\ \mu\text{g}\ \text{rhIL-33}/\text{天}$  组中诱导最高达  $10000\ \text{pg}/\text{ml}$  的 IL-5 和在  $5\ \mu\text{g}\ \text{rhIL-33}/\text{天}$  组中诱导最高达  $1000\ \text{pg}/\text{ml}$  的 IL-5。在  $50\ \mu\text{g}\ \text{rhIL-33}/\text{天}$  组中 IL-5 的血清水平降低到  $1100\ \text{pg}/\text{ml}$ , 且在  $5\ \mu\text{g}\ \text{rhIL-33}/\text{天}$  组中 IL-5 的血清水平降低到  $500\ \text{pg}/\text{ml}$ 。用  $5\ \mu\text{g}$  或者  $50\ \mu\text{g}\ \text{IL-33}/\text{天}$  处理后第 7 天也检测到分别为  $30\ \text{pg}/\text{ml}$  和  $100\ \text{pg}/\text{ml}$  的 IL-13 血清水平。在 PBS 处理的对照组中不能检测到 IL-5 和 IL-13。此外, 在 IL-33 处理的小鼠组或者对照组中没有检测到 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-10、IL-6、IL-4、IL-2 或者 MCP-1 的水平升高。

IP 注射  $50\ \mu\text{g}\ \text{rhIL-33}/\text{天}$  进行 2 天后收获肝脏淋巴细胞。将细胞以  $2 \times 10^6/\text{ml}$  培养基铺平板在培养皿中并用  $50\ \text{ng}/\text{ml}$  PMA 和  $1\ \mu\text{M}$  离子霉素刺激 4 小时。在最后 2 小时中, 加入一种分泌抑制剂 Brefelding A。对细胞对于 CD3 和 NK1.1 进行表面染色并对于 IL-5 或者 IL-4 进行细胞内染色, 并通过 FACS 进行分析。从用 IL-33 处理 2 天的小鼠得到的 CD3/NK1.1 阳性肝脏淋巴细胞表明 IL-5 和 IL-4 的积累。这些结果表明 IL-33 活化 NKT 细胞分泌 IL-4 和 IL-5。

为了测试 IL-33 是否结合 NKT 细胞, 将生物素化的 IL-33 用于结合实验。来自 PBMC 的人 NKT 细胞与 Streptavidin-PE 或者生物素化的 rhIL-33 和 Streptavidin-PE 温育。通过 FACS 分析染色的细胞。观察 rhIL-33 与人 NKT 细胞的结合。该结合可以与未生物素化的 rhIL-33 竞争。

IL-1 家族成员通过与细胞表面受体相互作用发挥它们的生物学应答。我们已经鉴定了孤儿 IL-1 受体 ST2/T1 为 IL-33 的细胞受体。小鼠肥大细胞系用 ST2/T1 特异的单克隆抗体进行的 FACS 染色表明该肥大细胞系表达 ST2/T1 受体。该染色可以通过将肥大细胞系与 IL-33 蛋白质温育受到特异和依赖剂量的竞争。

NKT 细胞对于哮喘的小鼠模型中气道炎症和变应原诱导的气道

活动过强中 IL-4 和 IL-13 的产生是必需的。NKT 细胞中 IL-33 对 IL-5 和 IL-13 的诱导提示 IL-33 可以在这些疾病的诱导中起作用。中和 IL-13 的治疗性抗体的产生对于这些疾病的治疗可能是有益的。

NKT 细胞已经涉及许多疾病。将 IL-33 鉴定为 NKT 细胞的调节剂提示 IL-33 可以影响其他疾病，如狼疮、多发性硬化、恶性肿瘤、气道炎症和感染性疾病。IL-33 对 Th2 细胞因子如 IL-5 和 IL-13 的诱导可以帮助保护免受微生物感染和保护免于产生肿瘤。

IL-1 家族成员通常结合 IL-1 受体家族的两种不同的成员以形成完整的受体复合体。IL-33 和 ST2/T1 鉴定为组成 IL-33 受体的亚基之一使得可能鉴定第二个 IL-33 受体亚基。完整 IL-33 受体的鉴定将允许详细鉴定 IL-33 诱导的生物学应答。

使用 Taqman 进行的实时 PCR 分析揭示 IL-33 由许多细胞和组织表达(表 1)。本发明提供了用于调节炎性和自身免疫病症和状况的 IL-33 激动剂和拮抗剂，所述病症和状况为例如，牛皮癣、哮喘、变态反应和炎性肠病，例如，胃炎、溃疡性结肠炎、Crohn 氏病、腹部疾病和过敏性肠综合征。

**表 1. 相对于遍在蛋白质(1.0)的 IL-33 表达的实时 PCR 分析。**

人皮肤牛皮癣		正常的相邻人皮肤			
皮肤样品号	表达	皮肤样品号	表达		
PS-034	757	PS-034	261		
PS-037	731	PS-037	267		
PS-028	443	PS-028	285		
PS-025	446	PS-025	261		
PS-023	602	PS-023	235		
结肠对照	0.5				
结肠 Crohn 氏病 号4003197A	87				
结肠 Crohn 氏病 号9609C144	125				
结肠 Crohn 氏病 号 403242A	114				
如通过实时 PCR Taqman 分析测定的巴西日 圆线虫( <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> )感染引起的细胞因子的表达					
样品	测试的细胞因子				
	IL-25	IL-13	IL-4	IL-5	IL-33
未处理的胃	0.86	0.03	0.51	0.01	9.43
胃 2 天	1.46	0.69	0.09	0.02	56.4
胃 4 天	0.73	0.67	0.39	0.09	80.32
胃 8 天	1.04	3.30	0.33	0.44	84.9
胃 11 天	0.27	1.22	1.77	0.01	8.86
胃 16 天	0.35	0.38	1.31	0.12	3.43
未处理的对照肺	0.29	0.01	0.57	0.66	56.8
肺 nippo 2 天	0.91	0.37	0.61	0.65	90.37
肺 nippo 4 天	0.59	13.34	4.65	3.78	356.49
肺 nippo 8 天	0.36	55.88	8.78	1.14	48.76
肺 nippo 11 天	0.35	33.93	16.05	2.11	116.79
肺 nippo 16 天	0.04	23.77	25.48	0.84	30.65

将 IL-1 $\beta$  加上 TNF- $\alpha$  诱导(8 小时)的 IL-33 与仅培养基诱导的 IL-33 进行比较。在所示细胞类型中研究了诱导(表 2)。

表 2. IL-33 诱导。ND 表示不可检测；数目相对于遍在蛋白质(1.0)。

细胞	IL-1 $\beta$ 加上 TNF- $\alpha$	仅培养基
NHDF	3250	50
NHEK	ND	ND
NHBE	25	25
PAEC	100	200
NHLF	25	ND
BSMC	2025	350

发现体外翻译的人 IL-33 被天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 切割。不用天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶处理，用 SDS PAGE 分析揭示在约 32 kDa 的一条带，对应于原-人 IL-33。用天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 在 37 $^{\circ}$ C 处理 1 小时产生约相等强度的两条带，一条对应于原-IL-33，而另一条迁移到约 20-22kDa(成熟人 IL-33)。在 37 $^{\circ}$ C 处理 2 小时导致相同的两条带，但是约 2/3 的蛋白质迁移到约 22 kDa。类似的研究证明体外翻译的人 IL-33 也可以被弹性蛋白酶或者组织蛋白酶 G 切割成迁移到约 20-22 kDa 的种类，而 MMP-3 处理在所用条件下不导致切割。由于与其他 IL-1 家族成员的同源性，认为 IL-33 的氨基酸 112 是切割位置，从而产生成熟的 IL-33。

将 T1/ST2 鉴定为人 IL-33 的受体的至少一个亚基。T1/ST2 的表达如下(表 3)。

表 3. 人或者小鼠细胞的 T1/ST2 表达。

细胞类型	人细胞	小鼠细胞
TH1 型 T 细胞	-/+	-/+
TH2 型 T 细胞	-/+	+++
肥大细胞	+++	++
用 LPS 处理的单核细胞/PBMC	++	未确定
树突细胞 ex BM	(未确定)	+

在 pET3a 载体中克隆人 IL-33 并且在大肠杆菌中表达。所克隆的蛋白质以氨基酸 112 开始并且长为 158 个氨基酸(18 kDa)。用 IPTG

诱导表达，并且发现蛋白质是水溶性的。用 A-柱和交联葡聚糖（Sephadex）凝胶过滤纯化表达的蛋白质。对纯化的制剂测试内毒素，其中结果表现出约 0.023EU/微克蛋白质。通过 SDS PAGE 用非还原条件分析揭示至少 95%蛋白质迁移到 18kDa 的单一分子量。

将 IL-33 腹腔内(i.p.)注射到 B6/Balb/c 小鼠。使用三组小鼠：(1) 用磷酸缓冲盐水(PBS)注射；(2)hIL-33(5 微克/天)；和(3)hIL-33(50 微克/天)。该方案也包括注射(i.p.)3 天，处理 3 天后处死小鼠，或者注射(i.p.)7 天，处理 7 天后处死小鼠。进行血液、血清、血涂片、白细胞分化、组织学。通过 FACS 分析来分析胸腺/脾细胞悬浮液。

如通过测量 IL-5 和 IL-13 的血清水平确定的(表 4)，IL-33 诱导 IL-5 和 IL-13。还测量了施用 IL-33 的多种器官中的细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-13。测试的器官为胸腺、肺、脾和肝。如用 IL-33 处理后 7 天测定的，发现诱导了所有这三种细胞因子。在两种水平的 IL-33(5 和 50 微克 IL-33)下都发现了增加。例如，在肺中，用盐水处理的 IL-4、IL-5 和 IL-13 表达为约 1.0 或者更小。但是用 IL-33(50 微克)处理，IL-4 的表达为 8.0；IL-5 的表达为 11.0；且 IL-13 的表达为 41.0。IL-33 处理还引起血清 IgE 和 IgA 的增加。对于 7 天处理，IgE 水平为 30,000 ng/ml (PBS) 和 17,000 ng/ml (50 微克 IL-33)。对于 7 天处理，IgA 水平为 90 ng/ml (PBS) 和 420 ng/ml(50 微克 IL-33)。IL-33 处理也导致脾大，其中 PBS(对照)处理的小鼠中脾质量为约 80mg，用 5 微克 IL-33 处理 7 天（150mg 脾），用 50 微克 IL-33 处理 7 天（190mg 脾）。IL-33 处理还产生脾骨髓外造血和胸腺发育不全(胸腺大小减小)和胸腺皮质的发育不全。

表 4. IL-33 处理和第 3 和 7 天时的白细胞计数、血小板计数和细胞因子水平。			
白细胞计数 (白细胞 / 微升血)			
	PBS	5 微克 IL-33/天	50 微克 IL-33/天
第 3 天	12,000	12,000	14,000
第 7 天	12,000	20,000	25,000
血小板 (血小板 / 微升血)			
第 3 天			
第 7 天	1,300,000	1,000,000	600,000
嗜中性粒细胞			
第 3 天	500	350	520
第 7 天	750	700	1200
淋巴细胞			
第 3 天	10,000	10,000	7,500
第 7 天	11,000	15,500	18,000
单核细胞			
第 3 天	230	130	200
第 7 天	400	250	300
嗜酸性粒细胞			
第 3 天	420	220	130
第 7 天	500	2000	1750
IL-5 的血清水平 (pg/ml)			
	PBS	5 微克 IL-33/天	50 微克 IL-33/天
第 3 天	ND	500	7500
第 7 天	ND	500	1100
IL-7 的血清水平 (pg/ml)			
第 7 天	ND	40	78

将转化和非转化的细胞注射到小鼠，随后为在小鼠内细胞的温育期，且回收并纯化所注射的细胞，评估 T1/ST2 表达(表 5)。使用非转化的乳腺细胞和 ras 转化的乳腺细胞。将 ras 转化的细胞注射到宿主免疫缺陷的裸鼠时，ras 转化的细胞以增加的水平表达 T1/ST2，即，表达为 103(表 5)。将 ras 转化的细胞注射到具有完整免疫系统的宿主

小鼠时，回收转化的细胞，且 Taqman®分析揭示 T1/ST2 表达的更大的增加。认为 T1/ST2 表达的这些增加反映了可溶性 T1/ST2 的增加，其中可溶性 T1/ST2 作为诱饵。当可溶性 T1/ST2 作为诱饵时，它结合 IL-33，并抑制宿主产生针对肿瘤细胞的 TH2 型免疫应答。所用的具有完整免疫系统的宿主小鼠为 Xtb 小鼠和 XBalb 小鼠(表 6)。描述了 T1/ST2 的可溶形式(也称作 Fit1)(见，例如，Bergers, 等人 (1994)EMBO J. 13: 1176-1188; Reikerstorfer, 等人 (1995)J. Biol. Chem. 270: 17645-17648)。

对含有 4T1 乳腺癌的小鼠施用 IL-33。施用的 IL-33 有效减小肿瘤大小(表 6)。本发明提供了 IL-33(例如，IL-33 或者编码 IL-3 的核酸)的激动剂，以用于治疗增殖性状况，包括癌症和肿瘤。

表 5. 将 ras 转化的细胞注射到裸鼠和免疫活性小鼠，随后为通过 Taqman 分析回收的 ras 转化的细胞的 T1/ST2 表达。

	T1/ST2 的表达
裸鼠宿主	103
Xtb 小鼠宿主	421
XBalb 小鼠宿主	669

表 6. 施用的 IL-33 减小了小鼠中的肿瘤大小。

处理	肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )										
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
IL-33	175	125	125	200	180	170	205	200	200	240	240
无 IL-33	175	200	225	240	280	300	370	405	430	470	500

人组织样品的 Taqman 分析揭示多种癌(例如，乳腺癌和卵巢癌)中 IL-33 的表达降低(表 7)。结果表明为了避免激活免疫系统产生抗肿瘤应答，肿瘤细胞避免产生 IL-33(表 7)。

	癌性组织	正常的相邻组织
人乳腺 6221 (浸润管)	30.4	435.0
人乳腺 6612 (浸润管)	59.7	54.7
人乳腺 6652 (浸润管)	2.4	292.0
人乳腺 7748/02 小叶的	2.6	411.0
人乳腺 7156 小叶的	77.4	189.1
人卵巢浆液性 乳头状囊腺癌 1590	1872.7	609.4
人卵巢浆液性 乳头状囊腺癌 3572/02	206.6	793.9
人卵巢浆液性 乳头状囊腺癌 246869	235.1	1052.7

IL-33 处理延长了实验性自身免疫性脑炎，其是多发性硬化的动物模型。EAE 由蛋白脂质蛋白 (PLP) 诱导 (Kjellen, 等人 (2001) *J. Neuroimmunol.* 120: 25-33; Laman, 等人 (2001) *J. Neuroimmunol.* 119: 124-130; Fife, 等人 (2001) *J. Immunol.* 166: 7617-7624)。三组小鼠用于注射 PBS、0.5 微克 IL-33 或者 2.0 微克 IL-33，从第 0 天到第 12 天每天一次腹膜内注射。在第 7 到 23 天评估疾病得分 (表 8)。结果证明，在 PBS 处理的小鼠中，该疾病自发地消退。然而，用任一种剂量的 IL-33 处理的，该疾病都延长，高于用 PBS 处理发现的时间，并且维持 2.5 到 3.0 的疾病得分 (表 8)。本发明提供了 IL-33 的拮抗剂，其用于治疗自身免疫病，包括中枢神经系统的自身免疫病，例如，多发性硬化。

表 8. 用 PBS 或者 IL-33 处理后所选天数时小鼠中的 EAE 疾病得分。

	第 11 天	第 13 天	第 15 天	第 17 天	第 19 天	第 21 天
PBS	0	2.05	1.75	0.45	0.20	0.0
0.5 微克 IL-33	0	0.75	1.15	2.4	2.9	2.9
2.0 微克 IL-33	0	1.95	1.95	3.1	2.3	2.55

IL-33 处理导致在 NKT 细胞中诱导 IL-5。通过存在 NK1.1 标记和 CD3 标记鉴定 NKT 细胞。将 Black-6 小鼠用 PBS 或者 50 微克/天 IL-33 处理两天。将肝脏淋巴细胞分离，并用 PMA 离子霉素再刺激 3 小时并用布雷菲德菌素处理 1 小时。结果证明 IL-33 在 NKT 细胞中诱导 IL-5。

测试抗-T1/ST2 抗体结合野生型肥大细胞(WTMC)的能力，和所加入的 IL-33 对该抗体与肥大细胞结合的影响。加入 IL-33 消除了抗 T1/ST2 抗体结合肥大细胞的能力，从而证明 IL-33 的受体是 T1/ST2。

### III. IL-33 抗体处理的体内效果

用本领域公知的方法产生针对人 IL-33 的小鼠单克隆抗体(见上文)。为了测试该抗体拮抗 IL-33 活性的能力，在第 0 天，将 Balb/c 小鼠皮下注射 0.2mg 抗-IL-33 抗体。在第 1 天，用 100ng mL IL-33 腹腔内注射小鼠。在第 2 天收集血清，并测量 IL-5 水平。当与仅用 IL-33 处理的小鼠和用同种型对照抗体和 IL-33 处理的小鼠相比时，用抗-IL33 抗体处理导致很少或者不产生 IL-5(见图 1)。

### IV. 胶原诱导的关节炎(CIA)的治疗

对已知易患 CIA 的 B10.RIII 小鼠用完全弗氏佐剂(Difco)中的牛 II 型胶原(牛 CII; Sigma)进行注射。在小鼠的尾巴根部上面注射 100  $\mu$ l 1mg/ml 的牛 CII 乳剂。在第 21 天施用第二次加强剂量。通过下面的临床等级评估小鼠：0 = 正常的；1 = 在一个关节/部位发红和/或肿胀；2 = 在一个以上的关节/部位发红和/或肿胀；和 3 = 在整个爪子发红和/或肿胀。CIA 诱导的小鼠有 70-90%的疾病发作百分数。

在第 23 天用 1mg 抗-IL-33 抗体或者同种型对照抗体处理小鼠。

每 7 天施用抗体再进行两次治疗。抗-IL-33 治疗的小鼠的疾病得分降低并且具有较低的疾病发病率百分数(见图 2 和 3)。抗-IL-33 治疗的小鼠的关节炎爪的平均数也较低(见图 4)。

#### V. 实验性自身免疫性脑炎(EAE)的治疗

将 C57BL/6 小鼠用 50  $\mu$ g 髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)肽免疫以诱导 EAE。疾病的临床评估如下打分: 1 = 软弱尾部; 2 = 后肢虚弱; 3 = 右侧无力 + 一只后肢虚弱; 4 = 右侧无力 + 一只后肢麻痹; 5 = 双侧后肢麻痹; 6 = 双侧后肢麻痹 + 腹部萎陷; 和 7 = 6 + 濒死。将 EAE 小鼠用 100mg 抗-IL-33 抗体或者同种型对照抗体皮下治疗。抗-IL-33 抗体治疗的小鼠显示出比对照组较低的疾病得分和较低的疾病发病率(见图 5 和 6)。

#### VI. 用以鉴定 IL-33R 复合体的 pull down 测定

将 IL-33 用 EX-LINK Supho-NHS-生物素 (Pierce)生物素化。在 500  $\mu$ l RIPA 裂解缓冲液(upstate 细胞信号传导溶液)中用 50  $\mu$ l 琼脂糖结合的抗生物素蛋白 D 的 50%浆液(Vector Laboratories)进行 2  $\mu$ g 生物素化 IL-33 的 pull down。使用 5  $\mu$ g 重组细胞外 ST2-Fc (R & D Systems)或者 SIGIRR- Fc (R & D Systems)。在 4 $^{\circ}$ C 过夜温育后, 将沉淀物用 500  $\mu$ l RIPA 裂解缓冲液洗涤 3 次。通过 SDS-PAGE 分离沉淀的蛋白质、电印迹并用对 ST2 (R & D Systems) 或者 SIGIRR (R & D Systems)特异的抗体通过蛋白质印迹/ECL 反应显色。以与上面相同的方式进行 ST2-Fc 或者 SIGIRR-Fc 对生物素化 IL-33 的 pull down, 只是用 G 蛋白-琼脂糖 (Protein G-Sepharose) (Amersham Bioscience)代替琼脂糖结合的抗生物素蛋白 D。通过链霉抗生物素蛋白-HRP 缀合物(Pierce)和 ECL 反应显示存在的 IL-33。

#### VII. NF- $\kappa$ B 和 MAP 激酶的磷酸化

肥大细胞系 WTMC 如以前描述(见, 例如, Wright, 等人 (2003). *J. Immunol.* 171: 3034-3046. )。细胞在含有 Complete Mini 蛋白酶抑制剂混合物(Roche)和 10 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  的 RIPA 裂解缓冲液(Upstate)中裂解。通过 SDS-PAGE 分离蛋白质, 转移到 Immobilon-P 膜(Millipore)

并用抗体进行免疫印迹,这些抗体为抗磷酸化的 p65 NF- $\kappa$  B、p65 NF- $\kappa$  B、磷酸化的 p44/42 MAP 激酶、p44/42 MAP 激酶、磷酸化的 p38 MAP 激酶和 p38 MAP 激酶的抗体(所有抗体均购自 Cell Signaling Technology)。

#### VIII. 瞬时转染和报道基因测定法

将 HEK293FT 细胞接种后,用 NF- $\kappa$  B 驱动的 GFP 报道基因构建体(pNF- $\kappa$  B-hrGFP ; Stratagene)并用编码 ST2、或者 SIGIRR 或者两者的质粒组合,如所示的用 Fugene-6 (Roche)根据生产商的推荐进行转染。在转染后 24 小时将细胞分开培养。24 小时后,将细胞不处理或者用浓度为 50 ng/ml 的小鼠 IL-33 刺激。刺激后 16 小时,通过 FACS 分析细胞的 GFP 表达。

表 9: 序列标识符	
SEQ ID NO:1	人 IL-33 核酸序列
SEQ ID NO:2	人 IL-33 多肽序列
SEQ ID NO:3	小鼠 IL-33 核酸序列
SEQ ID NO:4	小鼠 IL-33 多肽序列
SEQ ID NO:5	人 T1/ST2 核酸序列
SEQ ID NO:6	人 T1/ST2 多肽序列
SEQ ID NO:7	小鼠 T1/ST2 核酸序列
SEQ ID NO:8	小鼠 T1/ST2 多肽序列
SEQ ID NO:9	人 SIGIRR 核酸序列
SEQ ID NO:10	人 SIGIRR 多肽序列
SEQ ID NO:11	小鼠 SIGIRR 核酸序列
SEQ ID NO:12	小鼠 SIGIRR 多肽序列

本文的所有引用都引入本文作为参考,就好像每个单独的出版物、专利申请或者专利(包括所有附图和图)具体并且个别地指出引入作为参考一样。

如对本领域普通技术人员显而易见的,可以做出本发明的许多修饰和改变来适应特定情况、材料、物质的组成、方法、方法步骤,来

---

保存本发明的目的、精神和范围。所有此类修饰都意在包括在所附权利要求的范围内而不背离本发明的精神和范围。本文描述的特定实施方案仅作为实例提供，并且本发明将受到所附权利要求以及这些权利要求的等同方案的完整范围的限制；且本发明不受到本文中作为实例陈述的特定实施方案的限制。

<110> Schering Corporation

<120> 调节哺乳动物细胞因子的方法

<130> DX06173 WO 01

<150> US 60/545,730

<151> 2004-02-17

<160> 12

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 813

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

atgaagccta aaatgaagta ttcaaccaac aaaatttcca cagcaaagtg gaagaacaca 60

gcaagcaaag ccttgtgttt caagctggga aaatccaac agaaggcaa agaagtttgc 120

cccatgtact ttatgaagct ccgctctggc cttatgataa aaaaggagge ctgttacttt 180

aggagagaaa ccacaaaag gccttactg aaaacaggta gaaagcaca aagacatctg 240

gtactcgtg cctgtcaaca gcagtctact gtggagtgt ttgcctttgg tatatcaggg 300

gtccagaaat atactagagc acttcatgat tcaagtatca caggaatttc acctattaca 360

gagtatcttg cttctctaag cacatacaat gatcaatcca ttacttttgc ttggaggat 420

gaaagttagt agatatatgt tgaagactg aaaaagatg aaaagaaaga taaggtgtta 480

ctgagttact atgagtctca acaccctca aatgaatcag gtgacggtgt tgatggtaag 540

atgttaatgg taaccctgag tcctacaaaa gacttctggt tgcatgcaa caacaaggaa 600

cactctgtgg agtccataa gtgtgaaaaa cactgccag accaggcctt cttgtcctt 660

cataatatgc actccaactg tgtttcattt gaatgcaaga ctgatcctgg agtgtttata 720

gggtgtaaagg ataatcatct tgctctgatt aaagtagact cttctgagaa ttgtgtact 780

gaaaatatct tgtttaagct ctctgaaact tag 813

<210> 2

<211> 270

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Met Lys Pro Lys Met Lys Tyr Ser Thr Asn Lys Ile Ser Thr Ala Lys  
1 5 10 15

Trp Lys Asn Thr Ala Ser Lys Ala Leu Cys Phe Lys Leu Gly Lys Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ala Lys Glu Val Cys Pro Met Tyr Phe Met Lys Leu Arg  
35 40 45

Ser Gly Leu Met Ile Lys Lys Glu Ala Cys Tyr Phe Arg Arg Glu Thr  
50 55 60

Thr Lys Arg Pro Ser Leu Lys Thr Gly Arg Lys His Lys Arg His Leu  
65 70 75 80

Val Leu Ala Ala Cys Gln Gln Gln Ser Thr Val Glu Cys Phe Ala Phe  
85 90 95

Gly Ile Ser Gly Val Gln Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp Ser Ser  
100 105 110

Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Thr  
115 120 125

Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu  
 130 135 140

Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val Leu  
 145 150 155 160

Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp Gly  
 165 170 175

Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe  
 180 185 190

Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys Cys  
 195 200 205

Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Met His  
 210 215 220

Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe Ile  
 225 230 235 240

Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser Glu  
 245 250 255

Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr  
 260 265 270

<210> 3

<211> 801

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 3  
 atgagaccta gaatgaagta ttccaactcc aagatttccc cggcaaagtt cagcagcacc 60  
 gcaggggaac gctcgggtccc gccttgcaaa ataagaagat cccaacagaa gaccaaagaa 120  
 ttttgccatg tctactgcat gagactccgt tctggcctca ccataagaaa ggagactagt 180  
 tatttttagga aagaaccac gaaaagatat tcaactaaaat cgggtaccaa gcatgaagag 240  
 aactttctctg cctatccacg ggattctagg aagagatcct tgcttggcag tatccaagca 300  
 tttgctgcgt ctggtgacac attgagcatc caaggaactt cacttttaac acagtctcct 360  
 gcctccctga gtacatacaa tgaccaatct gttagttttg ttttggagaa tggatgttat 420  
 gtgatcaatg ttgacgactc tggaaaagac caagagcaag accaggtgct actacgctac 480  
 tatgagtctc cctgtcctgc aagtcaatca ggcgacggtg tggatgggaa gaagctgatg 540  
 gtgaacatga gttccatcaa agacacagac atctggctgc atgccaacga caaggactac 600  
 tccgtggagc ttcaaagggg tgacgtctcg cctccggaac aggccttctt cgtccttcac 660  
 aaaaagtcct cggactttgt ttcatttgaa tgcaagaatc ttcttggcac ttacatagga 720  
 gtgaaggaca accagctggc tctagtggag gaaaaagatg agagctgcaa caatattatg 780  
 tttaagctct cgaaaatcta a 801

<210> 4  
 <211> 266  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 4

Met Arg Pro Arg Met Lys Tyr Ser Asn Ser Lys Ile Ser Pro Ala Lys  
 1 5 10 15

Phe Ser Ser Thr Ala Gly Glu Ala Leu Val Pro Pro Cys Lys Ile Arg  
 20 25 30

Arg Ser Gln Gln Lys Thr Lys Glu Phe Cys His Val Tyr Cys Met Arg  
 35 40 45

Leu Arg Ser Gly Leu Thr Ile Arg Lys Glu Thr Ser Tyr Phe Arg Lys  
 50 55 60

Glu Pro Thr Lys Arg Tyr Ser Leu Lys Ser Gly Thr Lys His Glu Glu  
 65 70 75 80

Asn Phe Ser Ala Tyr Pro Arg Asp Ser Arg Lys Arg Ser Leu Leu Gly  
 85 90 95

Ser Ile Gln Ala Phe Ala Ala Ser Val Asp Thr Leu Ser Ile Gln Gly  
 100 105 110

Thr Ser Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Thr Tyr Asn Asp  
 115 120 125

Gln Ser Val Ser Phe Val Leu Glu Asn Gly Cys Tyr Val Ile Asn Val  
 130 135 140

Asp Asp Ser Gly Lys Asp Gln Glu Gln Asp Gln Val Leu Leu Arg Tyr  
 145 150 155 160

Tyr Glu Ser Pro Cys Pro Ala Ser Gln Ser Gly Asp Gly Val Asp Gly  
 165 170 175

Lys Lys Leu Met Val Asn Met Ser Pro Ile Lys Asp Thr Asp Ile Trp  
 180 185 190

Leu His Ala Asn Asp Lys Asp Tyr Ser Val Glu Leu Gln Arg Gly Asp  
 195 200 205

Val Ser Pro Pro Glu Gln Ala Phe Phe Val Leu His Lys Lys Ser Ser  
 210 215 220

Asp Phe Val Ser Phe Glu Cys Lys Asn Leu Pro Gly Thr Tyr Ile Gly  
 225 230 235 240

Val Lys Asp Asn Gln Leu Ala Leu Val Glu Glu Lys Asp Glu Ser Cys  
 245 250 255

Asn Asn Ile Met Phe Lys Leu Ser Lys Ile  
 260 265

<210> 5  
 <211> 1671  
 <212> DNA  
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5  
 atgggggtttt ggatcttagc aattctcaca attctcatgt attccacagc agcaaagttt 60  
 agtaaacaat catggggcct ggaaaatgag gctttaattg taagatgtcc tagacaagga 120  
 aaacctagtt acaccgtgga ttggtattac tcacaaaca acaaagtat tcccactcag 180  
 gaaagaaatc gtgtgtttgc ctcaggcaa cttctgaagt ttctaccagc tgaagttgct 240  
 gattctggta ttataactg tattgtcaga agtcccacat tcaataggac tggatatgcg 300  
 aatgtcacca tatataaaaa acaatcagat tgcaatgttc cagattattt gatgtattca 360  
 acagtatctg galcagaaaa aaattccaaa atttattgtc ctaccattga cctctacaac 420  
 tggacagcac ctcttgagtg gtttaagaat tgtcaggctc ttcaaggatc aaggtacagg 480  
 gcgcacaagt catttttggc cattgataat gtgatgactg aggacgcagg tgattacacc 540  
 tgtaaattta tacacaatga aatggagcc aattatagtg tgacggcgac caggtccttc 600

---

acggcaagg atgagcaagg cttttctctg tttccagtaa tcggagcccc tgcacaaaat 660  
 gaaataaagg aagtggaaat tggaaaaaac gcaaacctaa cttgctctgc ttgttttggga 720  
 aaaggcactc agttcttggc tgccgtcctg tggcagctta atggaacaaa aattacagac 780  
 tttggtgaac caagaattca acaagaggaa gggcaaaatc aaagtttcag caatgggctg 840  
 gcttgcttag acatggtttt aagaatagct gacgtgaagg aagaggattt attgctgcag 900  
 tacgactgtc tgccctgaa tttgcatggc ttgagaaggc acaccgtaag actaagtagg 960  
 aaaaatccaa ttgatcatca tagcatctac tgcataatg cagtatgtag tgtattttta 1020  
 atgctaataca atgicctggg tatcatccta aaaatgttct ggattgaggc cactctgctc 1080  
 tggagagaca tagctaaacc ttacaagact aggaatgatg gaaagctcta tgatgcttat 1140  
 gttgtctacc cacggaacta caaatccagt acagatgggg ccagtcgtgt agagcacttt 1200  
 gttcaccaga ttctgcctga tgttcttgaa aataaatgtg gctatacctt atgcatttat 1260  
 gggagagata tgctacctgg agaagatgta gtcactgcag tggaaaccaa catacgaaag 1320  
 agcaggcggc acattttcat cctgaccctc cagatcactc acaataagga gttgcctac 1380  
 gagcaggagg ttgccctgca ctgtgcctc atccagaacg acgccaaggt gatacttatt 1440  
 gagatggagg ctctgagcga gctggacatg ctgcaggctg aggcgcttca ggactcctc 1500  
 cagcatctta tgaaagtaca ggggaccatc aagtggaggg aggaccacat tgccaataaa 1560  
 aggtccctga attccaaatt ctggaagcac gtgaggtacc aaatgcctgt gccaagcaaa 1620  
 attcccagaa aggcctctag tttgactccc ttggctgccc agaagcaata g 1671

<210> 6

<211> 556

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 6

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr  
1                   5                   10                   15

Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu  
          20                   25                   30

Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp  
          35                   40                   45

Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg  
          50                   55                   60

Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Glu Val Ala  
65                   70                   75                   80

Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg  
          85                   90                   95

Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn  
          100                   105                   110

Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn  
          115                   120                   125

Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro  
          130                   135                   140

Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg  
145                   150                   155                   160

Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala  
          165                   170                   175

Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr  
 180 185 190

Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe  
 195 200 205

Ser Leu Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu  
 210 215 220

Val Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly  
 225 230 235 240

Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr  
 245 250 255

Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln  
 260 265 270

Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg  
 275 280 285

Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu  
 290 295 300

Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg  
 305 310 315 320

Lys Asn Pro Ile Asp His His Ser Ile Tyr Cys Ile Ile Ala Val Cys  
 325 330 335

Ser Val Phe Leu Met Leu Ile Asn Val Leu Val Ile Ile Leu Lys Met  
 340 345 350

Phe Trp Ile Glu Ala Thr Leu Leu Trp Arg Asp Ile Ala Lys Pro Tyr  
 355 360 365

Lys Thr Arg Asn Asp Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Val Val Tyr Pro  
 370 375 380

Arg Asn Tyr Lys Ser Ser Thr Asp Gly Ala Ser Arg Val Glu His Phe  
 385 390 395 400

Val His Gln Ile Leu Pro Asp Val Leu Glu Asn Lys Cys Gly Tyr Thr  
 405 410 415

Leu Cys Ile Tyr Gly Arg Asp Met Leu Pro Gly Glu Asp Val Val Thr  
 420 425 430

Ala Val Glu Thr Asn Ile Arg Lys Ser Arg Arg His Ile Phe Ile Leu  
 435 440 445

Thr Pro Gln Ile Thr His Asn Lys Glu Phe Ala Tyr Glu Gln Glu Val  
 450 455 460

Ala Leu His Cys Ala Leu Ile Gln Asn Asp Ala Lys Val Ile Leu Ile  
 465 470 475 480

Glu Met Glu Ala Leu Ser Glu Leu Asp Met Leu Gln Ala Glu Ala Leu  
 485 490 495

Gln Asp Ser Leu Gln His Leu Met Lys Val Gln Gly Thr Ile Lys Trp  
 500 505 510

Arg Glu Asp His Ile Ala Asn Lys Arg Ser Leu Asn Ser Lys Phe Trp

515	520	525	
Lys His Val Arg Tyr Gln Met Pro Val Pro Ser Lys Ile Pro Arg Lys			
530	535	540	
Ala Ser Ser Leu Thr Pro Leu Ala Ala Gln Lys Gln			
545	550	555	
<210>	7		
<211>	1704		
<212>	DNA		
<213>	小鼠 (Mus musculus)		
<400>	7		
atgattgaca gacagagaat gggactttgg gctttggcaa ttctgacct tcccatgtat			60
ttgacagtta cggagggcag taaatcgtcc tggggctctgg aaaatgaggc ttaattgtg			120
agatgcccc aaagaggacg ctcgacttat cctgtggaat ggtattactc agatacaaat			180
gaaagtattc ctactcaaaa aagaaatcgg atctttgtct caagagatcg tctgaagttt			240
ctaccagcca gagtgaaga ctctgggatt tatgcttggt ttatcagaag cccaacttg			300
aataagactg gatacttgaa tgtcaccata cataaaaagc cgccaagctg caatatecct			360
gattatttga tgtactcgac agtacgtgga tcagataaaa atttcaagat aacgtgtcca			420
acaattgacc tgtataattg gacagcacct gttcagtgg ttaagaactg caaagctctc			480
caagagccaa ggttcagggc acacaggtcc tacttgttca ttgacaactg gactcatgat			540
gatgaagggtg actacacttg tcaattcaca cacgcggaga atggaaccaa ctacatcgtg			600
acggccacca gatcattcac agttgaagaa aaaggctttt ctatgtttcc agtaattaca			660
aatcctccat acaaccacac aatggaagtg gaaataggaa aaccagcaag tattgctgtg			720
tcagcttget ttggcaaagg ctctcacttc ttggctgatg tcctgtggca gattaacaaa			780
acagtagttg gaaattttgg tgaagcaaga attcaagaag aggaaggtcg aatgaaagt			840

---

tccagcaatg acatggattg tttaacctca gtgtaagga taactggtgt gacagaaaag 900

gacctgtccc tggaaataga ctgtctggcc ctgaaccttc atggcatgat aaggcacacc 960

ataaggctga gaaggaaaca accaattgat caccgaagca tctactacat agttgctgga 1020

tgtagtttat tgctaattgt tatcaatgtc ttgggatag tcttaaaagt gttctggatt 1080

gaggttgctc tgttctggag agatatagtg acaccttaca aaaccgga c gatggcaag 1140

ctctacgatg cgtacatcat ttaccctcgg gtcttccggg gcagcgcggc gggaaccac 1200

tctgtggagt actttgttca ccacactctg cccgacgttc ttgaaaataa atgtggctac 1260

aaattgtgca tttatgggag agacctgta cctgggcaag atgcagccac cgtggtggaa 1320

agcagtatcc agaatagcag aagacaggtg tttgttctgg ccctcacat gatgcacagc 1380

aaggaatttg cctacgagca ggagattgct ctgcacagcg ccctcatcca gaacaactcc 1440

aagtgatttc ttattgaaat ggagcctctg ggtgaggcaa gccgactaca ggttggggac 1500

ctgcaagatt ctctccagca tcttgtgaaa attcagggga ccatcaagtg gagggaagat 1560

catgtggccg acaagcagtc tctaagttcc aaattctgga agcatgtgag gtaccaaatg 1620

ccagtgccag aaagagcctc caagacggca tctgttgccg ctccgttgag tggcaaggca 1680

tgcttagacc tgaaacactt ttga 1704

<210> 8

<211> 567

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 8

Met Ile Asp Arg Gln Arg Met Gly Leu Trp Ala Leu Ala Ile Leu Thr  
1                   5                   10                   15

Leu Pro Met Tyr Leu Thr Val Thr Glu Gly Ser Lys Ser Ser Trp Gly

---

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

Glu Asn Gly Thr Asn Tyr Ile Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val  
 195 200 205

Glu Glu Lys Gly Phe Ser Met Phe Pro Val Ile Thr Asn Pro Pro Tyr  
 210 215 220

Asn His Thr Met Glu Val Glu Ile Gly Lys Pro Ala Ser Ile Ala Cys  
 225 230 235 240

Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly Ser His Phe Leu Ala Asp Val Leu Trp  
 245 250 255

Gln Ile Asn Lys Thr Val Val Gly Asn Phe Gly Glu Ala Arg Ile Gln  
 260 265 270

Glu Glu Glu Gly Arg Asn Glu Ser Ser Ser Asn Asp Met Asp Cys Leu  
 275 280 285

Thr Ser Val Leu Arg Ile Thr Gly Val Thr Glu Lys Asp Leu Ser Leu  
 290 295 300

Glu Tyr Asp Cys Leu Ala Leu Asn Leu His Gly Met Ile Arg His Thr  
 305 310 315 320

Ile Arg Leu Arg Arg Lys Gln Pro Ile Asp His Arg Ser Ile Tyr Tyr  
 325 330 335

Ile Val Ala Gly Cys Ser Leu Leu Leu Met Phe Ile Asn Val Leu Val  
 340 345 350

Ile Val Leu Lys Val Phe Trp Ile Glu Val Ala Leu Phe Trp Arg Asp  
 355 360 365

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

Tyr Ile Ile Tyr Pro Arg Val Phe Arg Gly Ser Ala Ala Gly Thr His  
 385 390 395 400

Ser Val Glu Tyr Phe Val His His Thr Leu Pro Asp Val Leu Glu Asn  
 405 410 415

Lys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys Ile Tyr Gly Arg Asp Leu Leu Pro Gly  
 420 425 430

Gln Asp Ala Ala Thr Val Val Glu Ser Ser Ile Gln Asn Ser Arg Arg  
 435 440 445

Gln Val Phe Val Leu Ala Pro His Met Met His Ser Lys Glu Phe Ala  
 450 455 460

Tyr Glu Gln Glu Ile Ala Leu His Ser Ala Leu Ile Gln Asn Asn Ser  
 465 470 475 480

Lys Val Ile Leu Ile Glu Met Glu Pro Leu Gly Glu Ala Ser Arg Leu  
 485 490 495

Gln Val Gly Asp Leu Gln Asp Ser Leu Gln His Leu Val Lys Ile Gln  
 500 505 510

Gly Thr Ile Lys Trp Arg Glu Asp His Val Ala Asp Lys Gln Ser Leu  
 515 520 525

Ser Ser Lys Phe Trp Lys His Val Arg Tyr Gln Met Pro Val Pro Glu  
 530 535 540

Arg Ala Ser Lys Thr Ala Ser Val Ala Ala Pro Leu Ser Gly Lys Ala  
 545 550 555 560

Cys Leu Asp Leu Lys His Phe  
 565

<210> 9

<211> 1233

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 9

atgccagggtg tctgtgatag ggcccctgac ttccctctccc cgtctgaaga ccagggtgctg 60

aggcctgcct tgggcagctc agtggctctg aactgcacgg cttgggtagt ctctgggccc 120

cactgctccc tgccttcagt ccagtggtctg aaagacgggc ttccattggg aattgggggc 180

cactacagcc tccacagata ctctgggtc aaggccaacc tgtcagaggt gcttgtgtcc 240

agtgtctctgg ggggtcaacgt gaccagcact gaagtctatg gggccttcac ctgetccatc 300

cagaacatca gcttctcctc cttcactctt cagagagctg gccctacaag ccacgtggct 360

gcggtgctgg cctccctcct ggtcctgctg gccctgctgc tggccgccct gctctatgtc 420

aagtgccgtc tcaacgtgct gctctggtac caggacgcgt atggggaggt ggagataaac 480

gacgggaage tctacgacgc ctacgtctcc tacagcgaact gccccgagga ccgcaagttc 540

gtgaacttca tcctaaagcc gcagctggag cggcgctcggg gctacaagct cttcctggac 600

gaccgcgacc tctgcccgcg cgtgagccc tccgccgacc tcttggtgaa cctgagcccgc 660

tgccgacgcc tcatcgtggt gctttcggac gccttctctga gccgggctg gtgcagccac 720

agcttccggg agggcctgtg ccggtgctg gagctcacc gcagacccat cttcatcacc 780

---

ttcgagggcc agaggcgcga ccccgcgcac ccggcgctcc gcttctgctg ccagcaccgc 840  
 cacctggtga ccttctgct ctggaggccc ggctccgtga ctccttctc cgatttttgg 900  
 aaagaagtgc agctggcgct gccgcggaag gtgcggtaca ggccggtgga aggagacccc 960  
 cagacgcagc tgcaggacga caaggacccc atgctgattc ttcgaggccg agtccctgag 1020  
 ggccgggccc tggactcaga ggtggacccc gaccctgagg gcgacctggg tgtccggggg 1080  
 cctgtttttg gagagccatc agctccaccg cacaccagtg gggctctgct gggagagagc 1140  
 cggagcagcg aagtggacgt ctcgatctc ggctcgcgaa actacagtgc ccgcacagac 1200  
 ttctactgcc tgggtgtccaa ggatgatatg tag 1233

<210> 10

<211> 410

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 10

Met Pro Gly Val Cys Asp Arg Ala Pro Asp Phe Leu Ser Pro Ser Glu  
 1                    5                    10                    15

Asp Gln Val Leu Arg Pro Ala Leu Gly Ser Ser Val Ala Leu Asn Cys  
                   20                    25                    30

Thr Ala Trp Val Val Ser Gly Pro His Cys Ser Leu Pro Ser Val Gln  
           35                    40                    45

Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Leu Gly Ile Gly Gly His Tyr Ser Leu  
       50                    55                    60

His Glu Tyr Ser Trp Val Lys Ala Asn Leu Ser Glu Val Leu Val Ser  
 65                    70                    75                    80

Ser Val Leu Gly Val Asn Val Thr Ser Thr Glu Val Tyr Gly Ala Phe  
85 90 95

Thr Cys Ser Ile Gln Asn Ile Ser Phe Ser Ser Phe Thr Leu Gln Arg  
100 105 110

Ala Gly Pro Thr Ser His Val Ala Ala Val Leu Ala Ser Leu Leu Val  
115 120 125

Leu Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Tyr Val Lys Cys Arg Leu  
130 135 140

Asn Val Leu Leu Trp Tyr Gln Asp Ala Tyr Gly Glu Val Glu Ile Asn  
145 150 155 160

Asp Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Val Ser Tyr Ser Asp Cys Pro Glu  
165 170 175

Asp Arg Lys Phe Val Asn Phe Ile Leu Lys Pro Gln Leu Glu Arg Arg  
180 185 190

Arg Gly Tyr Lys Leu Phe Leu Asp Asp Arg Asp Leu Leu Pro Arg Ala  
195 200 205

Glu Pro Ser Ala Asp Leu Leu Val Asn Leu Ser Arg Cys Arg Arg Leu  
210 215 220

Ile Val Val Leu Ser Asp Ala Phe Leu Ser Arg Ala Trp Cys Ser His  
225 230 235 240

Ser Phe Arg Glu Gly Leu Cys Arg Leu Leu Glu Leu Thr Arg Arg Pro  
245 250 255

Ile Phe Ile Thr Phe Glu Gly Gln Arg Arg Asp Pro Ala His Pro Ala  
 260 265 270

Leu Arg Leu Leu Arg Gln His Arg His Leu Val Thr Leu Leu Leu Trp  
 275 280 285

Arg Pro Gly Ser Val Thr Pro Ser Ser Asp Phe Trp Lys Glu Val Gln  
 290 295 300

Leu Ala Leu Pro Arg Lys Val Arg Tyr Arg Pro Val Glu Gly Asp Pro  
 305 310 315 320

Gln Thr Gln Leu Gln Asp Asp Lys Asp Pro Met Leu Ile Leu Arg Gly  
 325 330 335

Arg Val Pro Glu Gly Arg Ala Leu Asp Ser Glu Val Asp Pro Asp Pro  
 340 345 350

Glu Gly Asp Leu Gly Val Arg Gly Pro Val Phe Gly Glu Pro Ser Ala  
 355 360 365

Pro Pro His Thr Ser Gly Val Ser Leu Gly Glu Ser Arg Ser Ser Glu  
 370 375 380

Val Asp Val Ser Asp Leu Gly Ser Arg Asn Tyr Ser Ala Arg Thr Asp  
 385 390 395 400

Phe Tyr Cys Leu Val Ser Lys Asp Asp Met  
 405 410

<210> 11

<211> 1229

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 11

atggcaggtg tctgtgacat ggcccctaat ttcctttccc catctgaaga ccaggccttg 60

ggctttgccc ttggcagaga agttgctttg aattgcacag cttgggtgtt ctctaggccc 120

cagtgtcccc agccatcagt gcagtggctg aaagatggtc tggcattggg caatggaagc 180

cacttcagcc tccatgagga cttctgggtc agcgccaact tctcagagat tgtgtccagt 240

gtcctgggtg tcaacttgac caatgcagag gactatggaa ccttcacctg ttctgtctgg 300

aatgtcagct cccattcctt cactctttgg cgagetggcc ctgctggcca tgtggctgca 360

gtactggctt cctcctgggt cctgggtggt ctgctgctgg tggccctgct ctatgttaag 420

tgtcggctga acatgctgct ttggtaccaa gacacttacg gggaggtgga gatgaacgat 480

gggaagttat acgatgccta cgtgtcctat agcgactgcc cagaggaccg caaatttgta 540

aattttattc tgaagcctca gttggagcgg cgtcggggat acaaactctt cctagaggac 600

cgcgacctct tgccctgcgc ggagccctct gccgaccttt tggtgaacct gagtcgctgt 660

cggcgtctca tcgtggttct ttcagatgcc ttctaagcc ggccctgggtg tagccagagc 720

ttccgggagg gactgtgccg cctactggag ctcaccgcga gacctatctt catcaccttt 780

gagggccaga ggcgtgagcc catacacctt gctctccggc tcttgcgcca gcaccgccac 840

ctcgtgacct tgggtgctttg gaagcctggc tccgtgactc cttcctctga tttttgaaa 900

gagctacagc tagcactgcc acgaaggtgc agtacaggcc ggtggagga gacctcaaa 960

cccgaattca ggatgacaaa gatcccatgc taatcgtgag aggacgtgct gcccagggcc 1020

ggggcatgga gtcagagctg gatccagacc ctgagggaga cctgggtgtc cgtggacctg 1080

tctttgggga gccaccaact cactgcagg aaaccaggat ctgcatagga gagagccacg 1140

gcagtgaaat ggatgtctct gacctcggct ctcgaaacta cagtgcacgg acagacttct 1200

actgcctcgt gtctgaggat gatgtgtag 1229

<210> 12

<211> 409

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 12

Met Ala Gly Val Cys Asp Met Ala Pro Asn Phe Leu Ser Pro Ser Glu  
1                   5                   10                   15

Asp Gln Ala Leu Gly Leu Ala Leu Gly Arg Glu Val Ala Leu Asn Cys  
                  20                   25                   30

Thr Ala Trp Val Phe Ser Arg Pro Gln Cys Pro Gln Pro Ser Val Gln  
  
                  35                   40                   45

Trp Leu Lys Asp Gly Leu Ala Leu Gly Asn Gly Ser His Phe Ser Leu  
50                   55                   60

His Glu Asp Phe Trp Val Ser Ala Asn Phe Ser Glu Ile Val Ser Ser  
65                   70                   75                   80

Val Leu Val Leu Asn Leu Thr Asn Ala Glu Asp Tyr Gly Thr Phe Thr  
                  85                   90                   95

Cys Ser Val Trp Asn Val Ser Ser His Ser Phe Thr Leu Trp Arg Ala  
                  100                   105                   110

Gly Pro Ala Gly His Val Ala Ala Val Leu Ala Ser Leu Leu Val Leu  
                  115                   120                   125

Val Val Leu Leu Leu Val Ala Leu Leu Tyr Val Lys Cys Arg Leu Asn  
 130 135 140

Met Leu Leu Trp Tyr Gln Asp Thr Tyr Gly Glu Val Glu Met Asn Asp  
 145 150 155 160

Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Val Ser Tyr Ser Asp Cys Pro Glu Asp  
 165 170 175

Arg Lys Phe Val Asn Phe Ile Leu Lys Pro Gln Leu Glu Arg Arg Arg  
 180 185 190

Gly Tyr Lys Leu Phe Leu Glu Asp Arg Asp Leu Leu Pro Arg Ala Glu  
 195 200 205

Pro Ser Ala Asp Leu Leu Val Asn Leu Ser Arg Cys Arg Arg Leu Ile  
 210 215 220

Val Val Leu Ser Asp Ala Phe Leu Ser Arg Pro Trp Cys Ser Gln Ser  
 225 230 235 240

Phe Arg Glu Gly Leu Cys Arg Leu Leu Glu Leu Thr Arg Arg Pro Ile  
 245 250 255

Phe Ile Thr Phe Glu Gly Gln Arg Arg Glu Pro Ile His Pro Ala Leu  
 260 265 270

Arg Leu Leu Arg Gln His Arg His Leu Val Thr Leu Val Leu Trp Lys  
 275 280 285

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



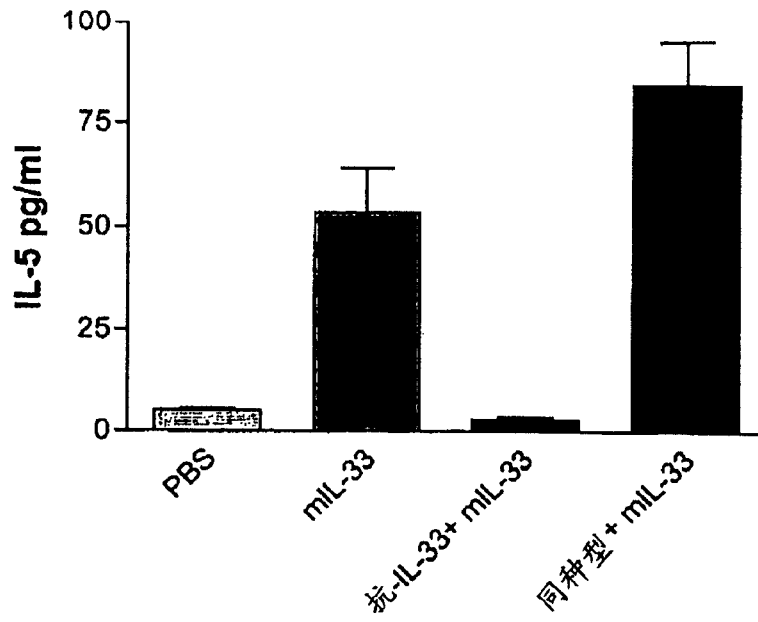


图 1

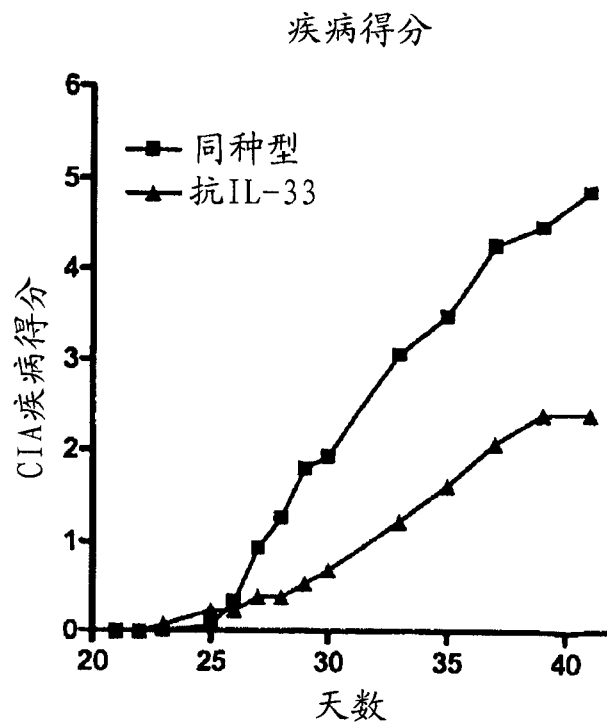


图 2

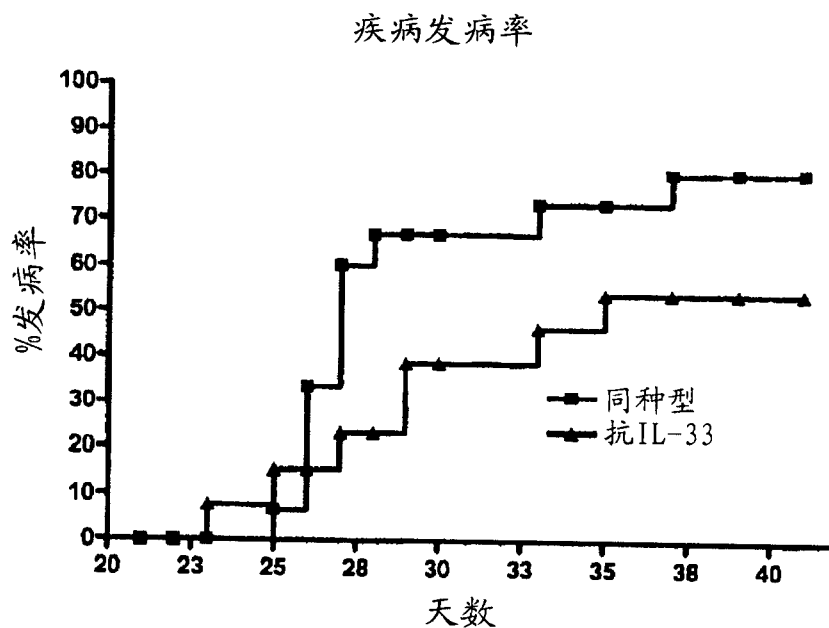


图 3

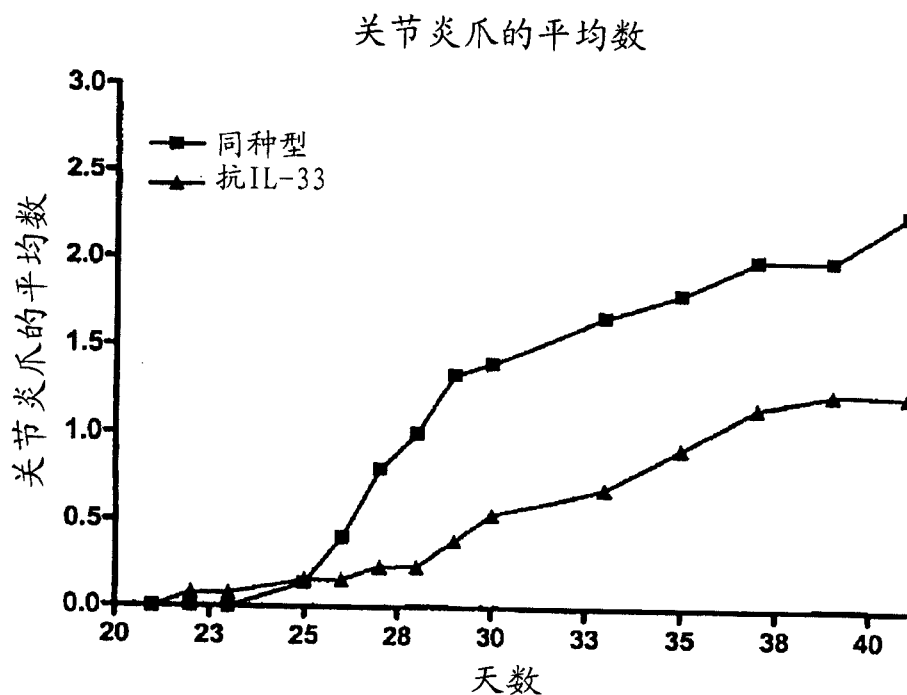


图 4

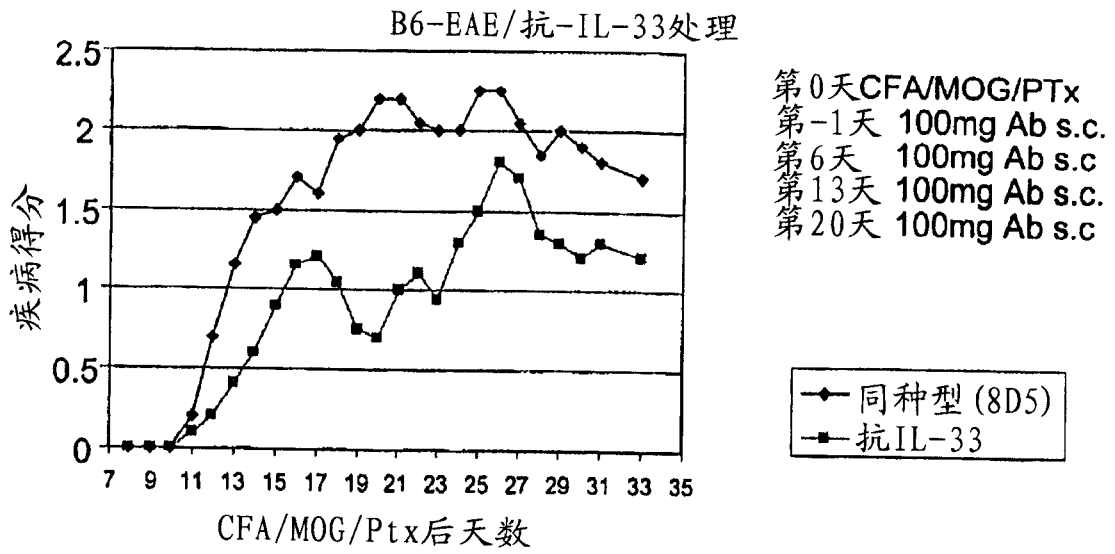


图 5

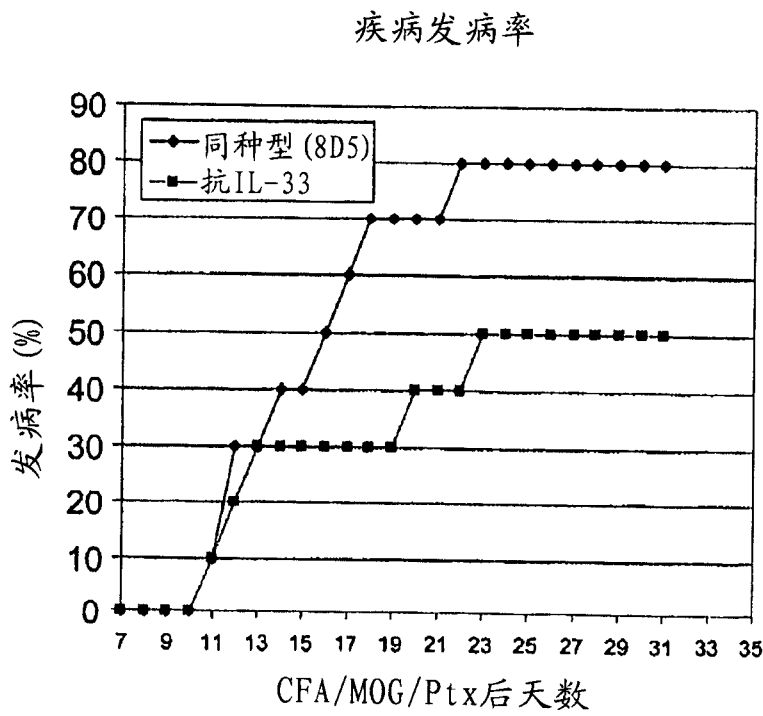


图 6