



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106659767 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 30

(21) 申请号 201580040646.5
(22) 申请日 2015.06.08
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 106659767 A
(43) 申请公布日 2017.05.10
(30) 优先权数据
 1410116.6 2014.06.06 GB
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2017.01.25
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2015/062742 2015.06.08
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02015/185760 EN 2015.12.10
(73) 专利权人 沃卢申伊缪诺制药公司
 地址 瑞士日内瓦
(72) 发明人 维恩·H·维斯顿-戴维斯
(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所
 11517
 专利代理师 顾云峰 吴龙瑛
(51) Int.Cl.
 A61K 38/17 (2006.01)

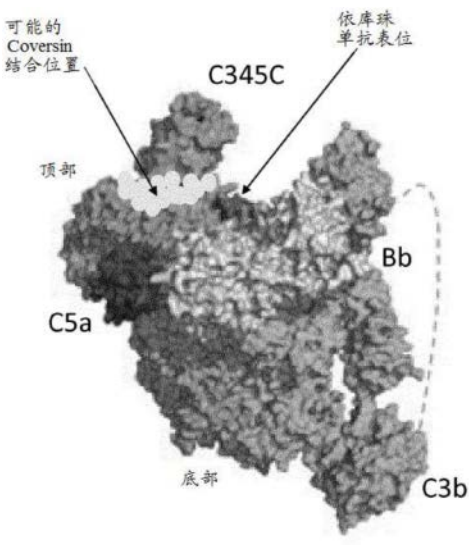
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2008029169 A2, 2008.03.13
US 2010111929 A1, 2010.05.06
W0 2008029167 A1, 2008.03.13
W0 2011083317 A1, 2011.07.14
W0 2007028968 A1, 2007.03.15
US 2010105611 A1, 2010.04.29
梁剑平.“抗流感病毒药物的分类及研究展望”.《中兽医医药杂志》.2006, (第2期),
古意.“流感怎么分类”.《养猪》.2009, 第71
页.
审查员 陈小燕

权利要求书2页 说明书21页
序列表7页 附图8页

(54) 发明名称
用于治疗具有C5多态性的患者的补体介导的疾病的毛白钝缘蟬补体抑制剂

(57) 摘要
本发明涉及治疗或预防具有补体C5多态性的受试者的补体介导的疾病和/或病症的方法, 其包括向有需要的受试者施用治疗或防治有效量的a) 抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径; 和/或b) 抑制类花生酸活性的药剂。本发明也涉及鉴定可用a) 抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径; 和/或b) 抑制类花生酸活性的特定药剂治疗的具有C5多态性的患者群体的方法。



106659767 B

1. 一种抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂在制备用于治疗已知具有补体C5多态性的受试者的补体介导的疾病和/或病症的药物中的用途,其中所述药剂是:

- (a) 由SEQ ID NO: 2表示的氨基酸序列的第19至168位氨基酸组成的蛋白质;
- (b) 由SEQ ID NO: 2表示的氨基酸序列的第1至168位氨基酸组成的蛋白质;或者
- (c) 编码如(a)或(b)所述蛋白质的核酸分子;

其中所述补体介导的疾病和/或病症选自:阵发性夜间血红蛋白尿、移植物抗宿主疾病、血栓性血小板减少性紫癜、非典型溶血性尿毒综合征、重症肌无力、感染后脱髓鞘多神经根神经病变、哮喘、免疫复合物肺炎和创伤性脑损伤;

其中所述补体C5多态性在野生型C5的Arg885残基处并且使依库珠单抗的有效性降低,并且

所述受试者是人。

2. 一种抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂在制备用于治疗补体介导的疾病和/或病症的药物中的用途,其中所述治疗包括以下步骤:

a) 鉴定在野生型C5的Arg885残基处具有补体C5多态性的受试者,所述补体C5多态性使依库珠单抗的有效性降低;以及

b) 鉴定在所述受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的所述药剂;以及

c) 向所述受试者施用治疗有效量的在步骤(b)中鉴定的所述药剂,其中所述药剂是:

- (i) 由SEQ ID NO: 2表示的氨基酸序列的第19至168位氨基酸组成的蛋白质;
- (ii) 由SEQ ID NO: 2表示的氨基酸序列的第1至168位氨基酸组成的蛋白质;或者
- (iii) 编码如(i)或(ii)所述蛋白质的核酸分子;

其中所述补体介导的疾病和/或病症选自:阵发性夜间血红蛋白尿、移植物抗宿主疾病、血栓性血小板减少性紫癜、非典型溶血性尿毒综合征、重症肌无力、感染后脱髓鞘多神经根神经病变、哮喘、免疫复合物肺炎和创伤性脑损伤,并且

所述受试者是人。

3. 一种抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂在制备用于在具有补体C5多态性的受试者中治疗补体介导的疾病或病症的药物中的用途,其中基于受试者已被确定具有补体C5多态性来向所述受试者施用所述药剂,

其中所述药剂是:

- (a) 由SEQ ID NO: 2表示的氨基酸序列的第19至168位氨基酸组成的蛋白质;
- (b) 由SEQ ID NO: 2表示的氨基酸序列的第1至168位氨基酸组成的蛋白质;或者
- (c) 编码如(a)或(b)所述蛋白质的核酸分子,并且

其中所述补体C5多态性在野生型C5的Arg885残基处并且使依库珠单抗的有效性降低;

其中所述补体介导的疾病和/或病症选自:阵发性夜间血红蛋白尿、移植物抗宿主疾病、血栓性血小板减少性紫癜、非典型溶血性尿毒综合征、重症肌无力、感染后脱髓鞘多神经根神经病变、哮喘、免疫复合物肺炎和创伤性脑损伤,并且

所述受试者是人。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中通过如下途径鉴定具有补体C5多态

性的受试者：

- (a) 对抑制一种补体途径的药剂具有出乎意料不良临床响应；和/或
- (b) 测试药剂在受试者中抑制一种补体途径从而抑制补体活化的能力；和/或
- (c) 分子遗传分析。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途，其中通过来自受试者的样本来鉴定所述具有补体C5多态性的受试者，所述受试者已确定在依库珠单抗存在下具有至少60%的正常血清补体活性。

6. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途，其中所述补体C5多态性是Arg885Cys或Arg885His。

7. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途，其中通过对编码C5的基因进行测序或通过其它分子遗传分析来鉴定或确认所述补体C5多态性。

8. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途，其中所述补体介导的疾病和/或病症选自阵发性夜间血红蛋白尿、移植物抗宿主疾病、血栓性血小板减少性紫癜和非典型溶血性尿毒综合征。

9. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途，其中所述补体介导的疾病和/或病症是重症肌无力。

用于治疗具有C5多态性的患者的补体介导的疾病的毛白钝缘 蟬补体抑制剂

发明领域

[0001] 本发明涉及治疗和预防具有补体C5多态性的受试者的补体介导的疾病和病症的方法。

[0002] 正文中提及以及在本描述的结尾所列的所有文件都以引用的方式并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 在大多数物种中,多态性常见于除最保守基因之外的所有基因中。多态性存在于人健康疾病和病症中涉及的基因中已导致个性化用药的出现。个性化用药允许使用包括分子遗传分析的多种工具来针对个体定制健康护理。可针对个别患者订制医疗决策、药物选择和/或治疗方案。诊断测试和基因分型可用于基于受试者对特定药物的个别响应性来选择适当和最优疗法。

[0005] 近来已众所周知的是,某些人C5遗传变体或C5多态性导致对抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的某些药剂缺乏响应。在患有补体介导的病症阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)的特定日本患者群体中进行的一项依库珠单抗(eculizumab)临床试验中,若干患者具有不良响应。这些患者显示C5多态性c.2653C>T(p.Arg885Cys)或c.2654G>A(p.Arg885His)。在这个类型的情况下,可鉴定不能通过常规手段治疗,或如果不存在替代性可用药物,或如果所有已知药物都通过相同机理起作用,也许完全不能治疗的患者亚群体。

[0006] 在目前情况下,针对当前使用依库珠单抗治疗的补体介导的疾病和病症,不存在可用的替代治疗。因此,有需要鉴定治疗具有C5多态性的患者亚群体的手段,所述C5多态性致使他们当前不可治疗。

[0007] 发明概述

[0008] 惊人的是,本发明者已发现蟬虫蛋白Coversin(在本领域中以及在本文中也被称为EV576和OmCI[25])可用于治疗和预防具有补体C5多态性的受试者的补体介导的疾病和病症。

[0009] 因此,本发明提供一种治疗或预防补体介导的疾病和/或病症的方法,其包括向具有补体C5多态性以及有需要的受试者施用治疗或防治有效量的抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂。

[0010] 本发明也提供一种用于治疗或预防具有补体C5多态性的受试者的补体介导的疾病和/或病症的抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂。

[0011] 本发明也提供一种治疗或预防补体介导的疾病和/或病症的方法,其包括以下步骤:

[0012] a) 鉴定具有C5多态性的受试者;以及

[0013] b) 鉴定在所述受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂;以及

[0014] c) 向所述受试者施用治疗或防治有效量的在步骤(b)中鉴定的所述药剂。

[0015] 本发明也提供一种用于治疗或预防补体介导的疾病和/或病症的方法中的抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂,其中所述治疗或预防方法包括以下步骤:

[0016] a) 鉴定具有C5多态性的受试者;以及

[0017] b) 鉴定在所述受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂;以及

[0018] c) 向所述受试者施用治疗或防治有效量的在步骤(b)中鉴定的所述药剂。

[0019] 在另一实施方案中,本发明提供一种选择患有补体介导的疾病或病症的受试者来用在具有C5多态性的受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的第一药剂治疗的方法,其包括确定抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的第二药剂在所述受试者中的有效性,其中如果所述第二药剂在具有C5多态性的受试者中显示有效性降低,那么选择所述受试者来用所述第一药剂治疗。

[0020] 在另一实施方案中,本发明提供一种用于治疗补体介导的疾病或病症的抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂,其中基于受试者已被确定具有C5多态性来向所述受试者施用所述药剂。

[0021] 补体

[0022] 补体系统是身体针对外来侵袭的天然防御机制的必需部分,并且也涉及于炎症过程中。超过30种在血清中以及在细胞表面的蛋白质涉及于补体系统功能和调控中。近来,已变得显而易见的是不仅补体系统的约35种已知组分可与有益过程与病理过程两者相关联,而且补体系统自身与功能包括血管生成、血小板活化、葡萄糖代谢和精子生成的至少85种生物途径相互作用。

[0023] 补体系统因存在外来抗原而被活化。存在三种活化途径:(1)由IgM和IgG复合物或通过识别碳水化合物来活化的经典途径;(2)由非自身表面(缺乏特定调控分子)以及由细菌内毒素活化的替代途径;和(3)通过甘露糖结合凝集素(MBL)结合病原体表面上的甘露糖残基来活化的凝集素途径。三种途径包含平行事件级联,其导致通过在细胞表面上形成类似C3和C5转化酶,从而导致释放急性炎症介质(C3a和C5a)和形成膜攻击复合物(MAC)来产生补体活化。

[0024] 经典途径和替代途径中涉及的平行级联显示于图1中。

[0025] 经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径在本文中统称为补体途径。

[0026] 补体C5多态性

[0027] 已报道人C5的若干多态性[1-5]。编码C5的基因中的突变已与各种病变相关联,包括补体组分5缺乏症,即一种其中患者显示重度复发性感染倾向的疾病。这个基因的缺陷也已与肝纤维化和类风湿性关节炎易感性相关联。人C5中的多态性包括插入、缺失、单氨基酸取代、框移、截短以及这些变化的组合。

[0028] 某些多态性改变C5与补体途径活化抑制剂的相互作用。某些其它多态性改变具有临床意义的C5活性。影响野生型C5的Arg885的多态性受到关注。两种受到特别关注的多态性是Arg885Cys(由c.2653C>T编码)和p.Arg885His(由c.2654G>A编码),其两者均使mAb依库珠单抗的有效性降低[4]。

[0029] 术语“C5多态性”在本文中用于意指除野生型C5以外的任何C5变体。在人受试者

中,野生型C5是具有登记号NP_001726.2;GI:38016947形式的C5蛋白。术语“C5多态性”包括C5蛋白中的插入、缺失、单氨基酸取代或多氨基酸取代、框移、截短以及这些变化的组合。

[0030] 这些多态性可以杂合性或纯合性多态性形式存在,诸如关于给定多态性的杂合性C5、关于一种多态性的纯合性或关于不同多态性的杂合性。

[0031] 目标多态性包括野生型C5的接近于依库珠单抗表位(即879KSSKC883,包括K879、S880、S881、K882和/或C883)或在所述表位内的氨基酸序列的变化。举例来说,任何变化都可在依库珠单抗表位中,或在依库珠单抗表位的N末端或C末端的多达10、9、8、7、6、5、4、3、2、1个氨基酸中。

[0032] 优选地,氨基酸变化不在C5的Coversin结合位点内或接近于所述结合位点。据信这是在C5的高度保守CUB-C5d-MG8超结构域的远端在C5 α 顶部的保守区域。

[0033] 本发明中特别关注的是使一种或多种在具有野生型C5的受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂的有效性降低的C5多态性。就“使有效性降低”来说,其意指药剂对多态性C5蛋白的IC₅₀比相同药剂对野生型C5蛋白的IC₅₀大至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、100、1000倍或更多倍。

[0034] 在一优选实施方案中,C5多态性使一种或多种抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂的有效性降低,但不降低Coversin或其功能性等效物的有效性。在另一优选实施方案中,C5多态性使一种或多种在具有野生型C5的受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的抗C5单克隆抗体的有效性降低,但不降低通过结合C5而不阻断C5转化酶结合位点来抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的其它药剂的有效性。

[0035] 就“不降低有效性”来说,其意指Coversin或通过结合C5而不阻断C5转化酶结合位点来抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的其它药剂对野生型C5蛋白的IC₅₀是Coversin或通过结合C5而不阻断C5转化酶结合位点来抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的其它药剂对多态性C5蛋白的IC₅₀的至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。术语“不降低”也涵盖有效性增加。

[0036] 在一替代性实施方案中,可通过测量药剂抑制取自受试者的血清中的补体活化的能力来测量有效性。举例来说,可通过本领域中已知或本文所述的任何手段,例如参考文献[6]中所述的溶血测定来测量所述受试者的血清中的补体活性。

[0037] 如果相较于对照,在药剂存在下,补体活性降低,那么所述药剂将被视为在所述受试者中抑制补体活性。就在这种情形下的“降低”来说,其意指相较于对照,处理样本中的补体活性降低至少10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%。

[0038] 在一特定实施方案中,C5多态性使单克隆抗体药剂在抑制一种或多种补体途径的活化方面的有效性降低。在一特定实施方案中,C5多态性使单克隆抗体依库珠单抗在抑制一种或多种补体途径的活化方面的有效性降低。在另一实施方案中,C5多态性使通过阻断C5转化酶结合位点来抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂的有效性降低。在另一特定实施方案中,C5多态性在位置Arg885处。在这个位置处的特定多态性包括Arg885Cys或Arg885His。

[0039] 改变C5与已知抗C5单克隆抗体(诸如依库珠单抗、培克珠单抗(Pexelizumab)和/或N19-8)的结合亲和力或肽补体抑制剂(诸如ARC1905)的有效性的多态性在本发明的情形

下也受到关注。

[0040] 因此,在一特定实施方案中,本发明提供一种治疗或预防补体介导的疾病和/或病症的方法,其包括向具有补体C5多态性以及有需要的受试者施用治疗或防治有效量的抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂,其中所述补体C5多态性使通过阻断C5转化酶结合位点来抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂的有效性降低,但不降低抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径而不阻断C5转化酶结合位点的药剂的有效性。

[0041] 因此,在一特定实施方案中,本发明提供一种治疗或预防补体介导的疾病和/或病症的方法,其包括向具有补体C5多态性以及有需要的受试者施用治疗或防治有效量的抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂,其中所述补体C5多态性使抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的单克隆抗体的有效性降低,但不降低Coversin或这种药剂的功能性等效物的有效性。

[0042] 在这个特定实施方案中,本发明也提供用于治疗或预防具有补体C5多态性的受试者的补体介导的疾病和/或病症的治疗或防治有效量的抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂,其中所述补体C5多态性使通过阻断C5结合位点来抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂的有效性降低,但不降低抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径而不阻断C5结合位点的药剂的有效性。

[0043] 在这个特定实施方案中,本发明也提供用于治疗或预防具有补体C5多态性的受试者的补体介导的疾病和/或病症的治疗或防治有效量的抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂,其中所述补体C5多态性使抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的单克隆抗体的有效性降低,但不降低Coversin或这种药剂的功能性等效物的有效性。

[0044] 因此,在另一特定实施方案中,本发明提供一种治疗或预防补体介导的疾病和/或病症的方法,其包括向具有补体C5多态性以及有需要的受试者施用治疗或防治有效量的抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂,其中所述补体C5多态性在位置Arg885处,并且其中所述药剂是包含用SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列的氨基酸19至168或由所述氨基酸组成的蛋白质或是这种蛋白质的功能性等效物。

[0045] 在这个特定实施方案中,本发明也提供用于治疗或预防具有补体C5多态性的受试者的补体介导的疾病和/或病症的治疗或防治有效量的抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂,其中所述补体C5多态性在位置Arg 885处,并且其中所述药剂是包含用SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列的氨基酸19至168或由所述氨基酸组成的蛋白质或是这种蛋白质的功能性等效物。

[0046] 鉴定用于治疗的受试者

[0047] 本发明特别适用于具有补体C5多态性的受试者中。受试者可已知具有C5多态性,或可被怀疑具有C5多态性。受试者可例如由于具有补体介导的病症的临床征象,由于种族来源或谱系发生C5多态性,或由于对抑制一种补体途径的药剂具有出乎意料不良响应和/或出乎意料高响应而被怀疑具有C5多态性。

[0048] 本发明可适用于对一种或多种抑制一种补体途径的药剂具有出乎意料不良响应的受试者亚群体中。特定来说,本发明适用于具有使单克隆抗体药剂在抑制一种或多种补

体途径的活化方面的有效性降低的C5多态性的受试者亚群体中。在一特定实施方案中,C5多态性使单克隆抗体依库珠单抗在抑制一种或多种补体途径的活化方面的有效性降低。

[0049] 举例来说,在位置Arg885(c.2653C>T(p.Arg885Cys)和c.2654G>A(p.Arg885His))处具有两种C5多态性的受试者不对依库珠单抗发生响应。然而,已显示Coversin甚至在在这些受试者中也能够抑制C5裂解和补体途径活化。Coversin以不同于已知抗C5mAb的方式与补体C5蛋白相互作用,并且因此预期Coversin也将适用于不对已知抗C5mAb发生响应的受试者亚群体中以及具有其它C5多态性的受试者中。Coversin结合C5,此导致C5的整体构象的稳定化,而不阻断C5转化酶裂解位点[7]。相比之下,依库珠单抗阻断C5转化酶结合位点[8]。

[0050] 多态性Arg885Cys和Arg885His在日本人和汉族中国人来源的受试者中特别普遍。因此,在具有这些种族来源的亚群体中,Coversin是特别有利的药剂选择。

[0051] 如可由实施例所见,这些多态性不限于日本人和汉族中国人来源的受试者。也可通过其它常规技术来鉴定具有C5多态性的受试者,包括对编码C5蛋白的基因的分子遗传分析,包括对基因测序[4];如本文所述或通过本领域中已知的其它方法来测试各种药剂在受试者中抑制补体活化的能力;和/或对来自受试者的C5蛋白的生物化学分析,包括等电聚焦和功能性检测[9]。在临床环境中,可通过对抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂的出乎意料不良响应来鉴定具有C5多态性的受试者。

[0052] 也预期Coversin将适用于对抑制一种补体途径的其它药剂出乎意料敏感的受试者亚群体中。举例来说,如果多态性使诸如依库珠单抗的另一药剂对C5蛋白的亲合力增加,那么可难以恰当地用所述药剂给药。必须严密控制补体活化以防止对身体的自身组织的损害,并且因此在这个情况下,Coversin将为更具吸引力的替代物。

[0053] 一旦已鉴定具有C5多态性的受试者,即有可能鉴定在所述受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂。为鉴定抑制补体途径的药剂,如本文所述在存在和不存在抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的多种药剂下评估受试者的血清中的补体活性。在一个特定实施方案中,在所述受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂是Coversin或其功能性等效物。

[0054] 可通过本领域中已知或本文所述的任何手段来测量所述受试者的血清中的补体活性,例如参考文献[10]中所述的溶血测定和/或通过使用如实施例中提及的Quidel CH50方法。如果相较于对照,在药剂存在下,补体活性降低,那么所述药剂将被视为在所述受试者中抑制补体活性。就在这种情形下的“降低”来说,其意指相较于对照,处理样本中的补体活性降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%。

[0055] 因此,本发明提供一种治疗或预防补体介导的疾病和/或病症的方法,其包括以下步骤:

[0056] a) 鉴定具有C5多态性的受试者;以及

[0057] b) 鉴定在所述受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂;以及

[0058] c) 向所述受试者施用治疗或防治有效量的在步骤(b)中鉴定的所述药剂。

[0059] 本发明也提供用于治疗或预防补体介导的疾病和/或病症的方法中的治疗或防治有效量的抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂,其中所述治疗或预

防方法包括以下步骤:

[0060] a) 鉴定具有C5多态性的受试者;以及

[0061] b) 鉴定在所述受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂;以及

[0062] c) 向所述受试者施用治疗或防治有效量的在步骤(b)中鉴定的所述药剂。

[0063] 在另一实施方案中,本发明提供一种用于治疗补体介导的疾病或病症的在具有C5多态性的受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂,其中基于受试者已被确定具有C5多态性来向所述受试者施用所述药剂。

[0064] 在另一特定实施方案中,本发明提供用于治疗受试者的补体介导的疾病或病症的在具有C5多态性的受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂,其中

[0065] a) 测定来自所述受试者的生物样本中C5多态性的存在或不存在,以及

[0066] b) 基于所述C5多态性的存在来向个体选择性施用治疗有效量的所述药剂。

[0067] 在一特定实施方案中,通过对在野生型受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的单克隆抗体缺乏响应来鉴定具有C5多态性的受试者。这个受试者亚群体被称为“非响应者”。可通过确认在于具有野生型C5的受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的单克隆抗体存在下,血清补体活性是正常血清补体活性的至少60%来鉴定非响应者。

[0068] 本发明中特别关注的是作为依库珠单抗、培克珠单抗、N19-8和/或ARC1095的非响应者的受试者。

[0069] 在其它特定实施方案中,可通过对编码C5的基因进行测序或通过其它分子遗传分析来鉴定或确认特定C5多态性。

[0070] 在另一实施方案中,本发明提供一种选择患有补体介导的疾病或病症的受试者来用在具有C5多态性的受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的第一药剂治疗的方法,其包括确定在野生型受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的第二药剂在所述受试者中的有效性,其中如果在野生型受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的所述第二药剂在具有C5多态性的受试者中显示有效性降低,那么选择所述受试者来治疗。

[0071] 可通过如本文所述测量药剂阻止来自受试者的血清中的补体活化的能力来测量在所述受试者中对经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的抑制。

[0072] 在一特定实施方案中,本发明提供一种用于治疗补体介导的疾病或病症的抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂,其中基于来自己被确定在于具有野生型C5的受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的抗C5单克隆抗体存在下,具有至少60%的正常血清补体活性的受试者的样本来向所述受试者施用所述药剂。

[0073] 在另一特定实施方案中,本发明提供一种用于治疗受试者的补体介导的疾病或病症的抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂,其中

[0074] a) 测定来自所述受试者的生物样本中在于具有野生型C5的受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的抗C5单克隆抗体存在下,至少60%的正常血清

补体活性的存在或不存在,以及

[0075] b) 基于在于具有野生型C5的受试者中抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的抗C5单克隆抗体存在下,至少60%的正常血清补体活性的存在来向个体选择性施用治疗有效量的所述药剂。

[0076] 就“在抗C5单克隆抗体存在下至少60%的正常血清补体活性”来说,其意指受试者的血清补体活性是正常未治疗对照受试者的血清补体活性的至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或更多。对照受试者可具有野生型C5,或可为在用抗C5单克隆抗体治疗之前的同一受试者。

[0077] 在一些实施方案中,抗C5单克隆抗体是依库珠单抗、培克珠单抗和/或N19-8。

[0078] 这些方法可用于鉴定对用Coversin及其功能性等效物治疗敏感的受试者和受试者群体。

[0079] 补体介导的疾病和病症

[0080] 必须严密控制补体活化以防止对身体的自身组织的损害。已显示补体活化控制失效在多种疾病中起作用,所述疾病尤其包括急性胰腺炎、年龄相关的黄斑变性(AMD)、非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)、亨廷顿氏病(Huntingdon's disease)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、过敏性脑脊髓炎、同种异体移植、哮喘、成人呼吸窘迫综合征、流感、灼烧损伤、克罗恩氏病(Crohn's disease)、肾小球性肾炎、溶血性贫血症、血液透析、遗传性血管性水肿、局部缺血再灌注损伤、多系统器官衰竭、多发性硬化症、重症肌无力、心肌梗塞、阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、牛皮癣、类风湿性关节炎、败血性休克、全身性红斑狼疮、中风、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、创伤性脑损伤、血管渗漏综合征及移植排斥和移植物抗宿主疾病(GvHD)以及各种其它外周神经病症和呼吸道病症[11-16]。

[0081] 如参考文献15中所列的外周神经病症包括感染后脱髓鞘多神经根神经病变(格林巴雷综合征(Guillain Barré syndrome))、米勒费雪综合征(Miller Fisher syndrome)、急性炎症性脱髓鞘多神经根神经病变(AIDP)、慢性炎症性脱髓鞘多神经根神经病变(CIDP)、糖尿病性神经病变、尿毒症性瘙痒、多灶性运动神经病变、副蛋白血症性神经病变、抗Hu神经病变、白喉后脱髓鞘神经病变、多发性硬化症、放射性脊髓病、巨细胞动脉炎(颞动脉炎)、横贯性脊髓炎、运动神经元疾病、皮肤肌炎。

[0082] 如参考文献14中所列的呼吸道病症包括哮喘(包括重度和类固醇抗性哮喘)、COPD、免疫复合物肺炎,包括由暴露于有机粉尘、霉菌、空气传播的过敏原、矿物粉尘、化学品等引起的那些。呼吸道病症的定义中包括的其它病状包括:农民肺、养鸽人或养鸟人肺、畜舍热、磨坊主肺、金属制造工肺、增湿器热、硅肺病、肺尘埃沉着病、石棉沉着病、棉屑沉着病、铍中毒、间皮瘤、鼻炎、肺炎或由暴露于全身性药物或吸入药物和化学剂(包括但不限于:博莱霉素(bleomycin)、丝裂霉素(mitomycin)、青霉素(penicillin)、磺酰胺(sulphonamide)、头孢菌素(cephalosporin)、阿司匹林(aspirin)、NSAID、酒石黄(tartrazine)、ACE抑制剂、含碘对比介质、非选择性β阻断药物、丁二酰胆碱(suxamethonium)、六甲季铵(hexamethonium)、硫贲妥钠(thiopentone)、胺碘酮(amiodarone)、硝呋妥因(nitrofurantoin)、百草枯(paraquat)、氧、细胞毒性剂、四环素(tetracycline)、苯妥英(phenytoin)、卡马西平(carbamazepine)、氯磺丙脲

(chlorpropamide)、肼苯哒嗪 (hydralazine)、普鲁卡因酰胺 (procainamide)、异烟肼 (isoniazid)、对氨基水杨酸) 引起的弥漫性纤维化肺病。此外,所述术语包括物理肺损害,包括但不限于:挤压损伤、烟尘和热气吸入、爆炸损伤、放射损伤、吸入性肺炎、类脂性肺炎;与包括但不限于:心脏移植、肺移植、骨髓移植的器官移植相关的肺损害。呼吸道病症的定义内也包括隐源性纤维性肺泡炎、过敏性肉芽肿 (车格-施特劳斯综合征 (Churg-Strauss syndrome))、韦格纳氏肉芽肿病 (wegener's granulomatosis)、闭塞性细支气管炎、间质性肺纤维化、囊性纤维化。

[0083] 也包括自体免疫和结缔组织疾病的呼吸道表现形式,所述疾病包括但不限于:类风湿病、全身性红斑狼疮、全身性硬化症、多发性结节性动脉炎、多发性肌炎、皮肤肌炎、休格连氏综合征 (sjögren's syndrome)、僵直性脊椎炎、卡普兰氏综合征 (caplan's syndrome)、古德帕斯彻氏综合征 (goodpasture's syndrome)、肺泡蛋白沉着病、特发性肺含铁血黄素沉着病、组织细胞增多病X、肺浸润伴嗜酸粒细胞增多 (PIE),包括但不限于:单纯肺嗜酸粒细胞增多、迁延性肺嗜酸粒细胞增多、哮喘性支气管肺嗜酸粒细胞增多、过敏性支气管肺曲霉病、曲霉病、侵袭性曲霉病、热带性肺嗜酸粒细胞增多、嗜酸粒细胞增多综合征、寄生虫感染和淋巴管肌瘤病 (LAM)。

[0084] 本发明中特别关注的是阵发性夜间血红蛋白尿 (PNH)、移植物抗宿主疾病 (GvHD)、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP) 和非典型溶血性尿毒综合征 (aHUS)。

[0085] 待用于本发明中的药剂

[0086] 在本发明的一个方面,药剂可结合补体C5,包括来自具有补体C5多态性的受试者的补体C5。药剂可起防止补体C5 (包括来自具有补体C5多态性的受试者的补体C5) 由C5转化酶裂解成补体C5a和补体C5b-9的作用。药剂可起使受试者中的C5a水平相较于未治疗受试者降低的作用。

[0087] 在本发明的一个方面,抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径的药剂以使C5的整体构象稳定,而非阻断C5转化酶裂解位点的方式结合C5。Coversin与C5结合导致C5的整体构象的稳定化,而不阻断转化酶裂解位点。

[0088] 补体C5蛋白,在本文中也称为C5,由C5转化酶裂解,所述C5转化酶自身由作为替代途径的较早产物的C3a形成 (图1)。这个裂解的产物包括过敏毒素C5a和也称为膜攻击复合物 (MAC) 的溶解性复合物C5b-9。C5a是牵涉于许多病理炎症性过程中的高度反应性肽,所述过程包括嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞趋化、嗜中性粒细胞活化、毛细血管渗透性增加和嗜中性粒细胞凋亡抑制[17]。

[0089] MAC与包括类风湿性关节炎[18;19]、增生性肾小球性肾炎[20]、特发性膜性肾病变[21]、蛋白尿[22]、在急性轴突损伤之后的脱髓鞘[23]的其它重要病理过程相关联,并且也导致在异种移植之后的急性移植物排斥[24]。

[0090] 已开发结合和抑制C5的单克隆抗体和小分子来治疗各种疾病[12],特别是PNH、牛皮癣、类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮和移植排斥。然而,这些单克隆抗体不结合来自具有C5多态性的受试者的某些C5蛋白,并且因此在这些受试者中无效[4]。

[0091] 相比之下,Coversin及其功能性等效物在具有野生型C5的受试者中以及在具有C5多态性的受试者中均抑制补体C5裂解。

[0092] 可通过本领域中已知的标准体外测定,例如通过在将蛋白质于凝胶上与标记的C5

一起孵育之后进行蛋白质印迹来确定药剂结合C5 (包括来自具有C5多态性的受试者的C5) 的能力。优选地,根据本发明的药剂结合野生型C5和/或来自具有C5多态性的受试者的C5的 IC_{50} 小于0.2mg/ml,优选小于0.1mg/ml,优选小于0.05mg/ml,优选小于0.04mg/ml,优选小于0.03mg/ml,优选是0.02mg/ml,优选小于1 μ g/ml,优选小于100ng/ml,优选小于10ng/ml,还要更优选小于1ng/ml。药剂无需对野生型C5和来自具有C5多态性的受试者的C5具有相同亲和力。它可对野生型C5和来自具有C5多态性的受试者的C5显示较高、较低或相同亲和力。

[0093] 可通过测量药剂抑制血清中的补体活化的能力来确定所述药剂抑制补体活化的能力。举例来说,可通过本领域中已知或本文所述的任何手段来测量血清中的补体活性。

[0094] 根据本发明的一个实施方案,结合C5的药剂不是抗C5单克隆抗体。

[0095] 本发明也提供一种治疗或预防具有补体C5多态性的受试者的补体介导的疾病和/或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗或防治有效量的抑制类花生酸(eicosanoid)活性的药剂。

[0096] 本发明也提供用于治疗或预防具有补体C5多态性的受试者的补体介导的疾病和/或病症的治疗或防治有效量的抑制类花生酸活性的药剂。

[0097] 根据本发明的这个方面的药剂可抑制白三烯(leukotrine) B4 (LTB4) 活性。特定来说,根据本发明的这个方面的药剂可结合LTB4。可通过本领域中已知的标准体外测定,例如通过在将蛋白质于凝胶上与标记的LTB4一起孵育之后进行蛋白质印迹来确定药剂结合LTB4的能力。根据本发明的药剂结合LTB4的 IC_{50} 可小于0.2mg/ml,优选小于0.1mg/ml,优选小于0.05mg/ml,优选小于0.04mg/ml,优选小于0.03mg/ml,优选是0.02mg/ml,优选小于1 μ g/ml,优选小于100ng/ml,优选小于10ng/ml,还要更优选小于1ng/ml。

[0098] 在一个方面,本发明提供一种治疗或预防具有补体C5多态性的受试者的补体介导的疾病和/或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗或防治有效量的药剂,所述药剂:

[0099] a) 抑制经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径;和/或

[0100] b) 抑制类花生酸活性。

[0101] 本发明也提供一种药剂,其抑制:

[0102] a) 经典补体途径、替代补体途径和凝集素补体途径;和/或

[0103] b) 类花生酸活性,

[0104] 其用于治疗或预防具有补体C5多态性的受试者的补体介导的疾病和/或病症。

[0105] 根据本发明的这个方面的一个实施方案,药剂结合C5、来自具有C5多态性的受试者的C5、和LTB4中的全部。因此,根据这个实施方案的药剂可起防止补体C5由C5转化酶裂解成补体C5a和补体C5b-9 (MAC),并且也抑制LTB4活性的作用。使用结合C5与LTB4两者的药剂是特别有利的。C5与类花生酸途径均据信促成在许多补体介导的疾病和病症中观察到的病理学。因此,相较于使用仅抑制补体介导的疾病和病症的炎症效应中涉及的单一途径的药剂,通过使用抑制补体介导的疾病和病症的炎症效应中涉及的多个途径的单一药剂,可实现作用增强。此外,存在与施用单一分子相关的实际优势。

[0106] 优选地,本发明的药剂源于吸血性节肢动物。术语“吸血性节肢动物”包括从适合宿主获取血液餐食的所有节肢动物,诸如昆虫、蜱虫、虱子、跳蚤和螨。优选地,药剂源于蜱虫,优选源于蜱虫毛白钝缘蜱(Ornithodoros moubata)。

[0107] 根据本发明的一个实施方案,药剂是包含图2中的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的氨基酸19至168的蛋白质,或是这种蛋白质的功能性等效物。药剂可为由图2中的氨基酸序列的氨基酸19至168组成的蛋白质,或可为这种蛋白质的功能性等效物。

[0108] 根据一替代性实施方案,根据本发明的这个实施方案使用的蛋白质可包含图2中的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的氨基酸1至168或由所述氨基酸组成,或可为其功能性等效物。图2中给出的蛋白质序列的前18个氨基酸形成不为C5结合或LTB4结合活性所需的信号序列,并且因此这可任选被省却,例如以达成重组蛋白产生效率。

[0109] 具有图2中给出的氨基酸序列的蛋白质,在本文中也称为Coversin蛋白,从蜉蝣毛白钝缘蜉的唾液腺分离。Coversin是载脂蛋白家族的外围成员,并且是首个显示抑制补体活化的载脂蛋白家族成员。Coversin蛋白通过结合C5以及防止它由C5转化酶裂解成补体C5a和补体C5b-9,由此抑制C5a肽的作用与MAC的作用两者来抑制替代性、经典和凝集素补体途径。Coversin蛋白也结合LTB4。如本文所用的术语“Coversin蛋白”是指图2中给出的具有或不具有信号序列的序列。

[0110] Coversin蛋白以及这种蛋白抑制补体活化的能力已公开于[25]中,其中Coversin蛋白被称为“OmCI蛋白”。也已显示Coversin蛋白有效治疗重症肌无力[13]、呼吸道病症[14]和外周神经病症[15]。Coversin蛋白结合包括LTB4的类花生酸的能力以及它治疗由白三烯或羟基类花生酸介导的疾病的用途已在[26]中表明。这些公开都未表明Coversin蛋白可适用于治疗或预防具有C5多态性的受试者的补体介导的病症。

[0111] 现已发现Coversin蛋白在治疗和预防具有C5多态性的受试者的补体介导的病症方面是惊人有效的。本文呈现的数据证明在具有Arg885His多态性的受试者中,体外补体活性抑制对依库珠单抗具有抗性(充其量30%或30-80%补体抑制),但对Coversin完全敏感,其中在所有测试浓度下都100%抑制。

[0112] 因此,依库珠单抗不完全抑制来自具有Arg885His多态性的患者的血清中的补体活性,并且这些患者未从用依库珠单抗进行治疗性治疗得到临床益处。这些数据显示在补体相关病症治疗(例如PNH治疗)中用依库珠单抗进行补体抑制不足以观察到临床益处。相反地,已显示Coversin在降低来自具有这种多态性的患者的血清中的补体活性方面保持正常有效性,并且在病例研究中展现有效性(参见实施例2、3和4)。这表明例如用Coversin达成的如所见的补体抑制产生临床益处,例如当补体抑制处于可由Coversin实现的水平时,可观察到临床益处。

[0113] 根据本发明的另一实施方案,药剂可为编码Coversin蛋白或其功能性等效物的核酸分子。举例来说,基因疗法可用于在体内或离体通过相关细胞实现在受试者中内源性产生Coversin蛋白。另一方法是施用“裸露DNA”,其中将治疗性基因直接注射至血流中或肌肉组织中。

[0114] 优选地,这种核酸分子包含图2中的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)的碱基55至507或由所述碱基组成。这个核苷酸序列编码图2中的不具有信号序列的Coversin蛋白。图2中的核苷酸序列的前54个碱基编码不为补体抑制活性或LTB4结合活性所需的信号序列。或者,核酸分子可包含图2中的核酸序列的碱基1至507或由所述碱基组成,所述碱基编码具有信号序列的蛋白质。

[0115] 已证明Coversin蛋白结合C5,并且防止它在大鼠、小鼠和人血清中由C5转化酶裂

解,其中 IC_{50} 是约0.02mg/ml。优选地,Coversin蛋白的功能性等效物保留结合C5的 IC_{50} 小于0.2mg/ml,优选小于0.1mg/ml,优选小于0.05mg/ml,优选小于0.02mg/ml,优选小于1 μ g/ml,优选小于100ng/ml,优选小于10ng/ml,还要更优选小于1ng/ml的能力。

[0116] 也已证明Coversin蛋白结合LTB₄。Coversin蛋白的功能性等效物也可保留以与Coversin蛋白类似的亲和力结合LTB₄的能力。

[0117] 在一个方面,术语“功能性等效物”在本文中用于描述Coversin蛋白的同源物和片段,其:a)保留它结合C5(野生型C5或来自具有C5多态性的受试者的C5),以及防止补体C5由C5转化酶裂解成补体C5a和补体C5b-9的能力;和/或b)保留它结合LTB₄的能力。

[0118] 术语“功能性等效物”也指在结构上类似于Coversin蛋白或特别是在Coversin蛋白的一个或多个结合C5(野生型C5或来自具有C5多态性的受试者的C5)和/或LTB₄的活性位点的环境中含有类似或相同三级结构的分子,诸如合成分子。Coversin中可能为LTB₄结合所需的氨基酸描述于[26]中。

[0119] 术语“同源物”意图包括涉及图2中明确标识的Coversin序列的旁系同源物和直系同源物,包括例如来自其它蜱虫物种的Coversin蛋白序列,所述蜱虫物种包括具尾扇头蜱(*Rhipicephalus appendiculatus*)、血红扇头蜱(*R. sanguineus*)、囊状扇头蜱(*R. bursa*)、美洲钝眼蜱(*A. americanum*)、卡延钝眼蜱(*A. cajennense*)、希伯来钝眼蜱(*A. hebraeum*)、微小牛蜱(*Boophilus microplus*)、具环牛蜱(*B. annulatus*)、消色牛蜱(*B. decoloratus*)、网纹革蜱(*Dermacentor reticulatus*)、安氏革蜱(*D. andersoni*)、边缘革蜱(*D. marginatus*)、变异革蜱(*D. variabilis*)、铁角血蜱(*Haemaphysalis inermis*)、犬血蜱(*Ha. leachii*)、长棘血蜱(*Ha. punctata*)、小亚璃眼蜱(*Hyalomma anatolicum anatolicum*)、骆驼璃眼蜱(*Hy. dromedarii*)、边缘璃眼蜱(*Hy. marginatum marginatum*)、蓖子硬蜱(*Ixodes ricinus*)、全沟硬蜱(*I. persulcatus*)、肩突硬蜱(*I. scapularis*)、六角形硬蜱(*I. hexagonus*)、波斯锐缘蜱(*Argas persicus*)、鸽锐缘蜱(*A. reflexus*)、游走鸟钝缘蜱(*Ornithodoros erraticus*)、毛白钝缘蜱(*O. moubata moubata*)、猪毛白钝缘蜱(*O. m. porcinus*)和萨氏钝缘蜱(*O. savignyi*)。术语“同源物”也意图包括来自蚊物种,包括库蚊属(*Culex*)、按蚊属(*Anopheles*)和伊蚊属(*Aedes*)的那些,特别是致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)和冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*);跳蚤物种,诸如猫栉头蚤(*Ctenocephalides felis*) (猫蚤);马蝇;沙蝇;黑蝇;采采蝇(tsetse fly);虱子;螨;水蛭;和扁形虫的等效Coversin蛋白序列。天然Coversin蛋白被认为以另外三种约18kDa形式存在于毛白钝缘蜱中,并且术语“同源物”意图包括Coversin的这些替代性形式。

[0120] 用于鉴定图2中给出的Coversin序列的同源物的方法将为本领域技术人员显而易见。举例来说,可通过对公共序列数据库与私有序列数据库两者进行同源性搜索来鉴定同源物。合宜的是,可使用公开可用数据库,但私有或可商购获得的数据库将同等适用,特别是如果它们含有公共数据库中未提供的数据。初级数据库是一级核苷酸或氨基酸序列数据存放场所,并且可公开获得或商购获得。公开可用初级数据库的实例包括GenBank数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、EMBL数据库(<http://www.ebi.ac.uk/>)、DDBJ数据库(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)、SWISS-PROT蛋白质数据库(<http://expasy.hcuge.ch/>)、PIR(<http://pir.georgetown.edu/>)、TrEMBL(<http://www.ebi.ac.uk/>)、TIGR数据库(参见

<http://www.tigr.org/tdb/index.html>)、NRL-3D数据库(<http://www.nbrfa.georgetown.edu>)、蛋白质数据库(<http://www.rcsb.org/pdb>)、NRDB数据库(<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/nrdb/README>)、OWL数据库(<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/dbbrowser/OWL/>)以及二级数据库PROSITE(<http://expasy.hcuge.ch/sprot/prosite.html>)、PRINTS(<http://iupab.leeds.ac.uk/bmb5dp/prints.html>)、Profiles(http://ulrec3.unil.ch/software/PFSCAN_form.html)、Pfam(<http://www.sanger.ac.uk/software/pfam>)、Identify(<http://dna.stanford.edu/identify/>)和Blocks(<http://www.blocks.fhcrc.org>)数据库。可商购获得的数据库或私有数据库的实例包括PathoGenome (Genome Therapeutics Inc.)和PathoSeq (先前属于Incyte Pharmaceuticals Inc.)。

[0121] 通常,在两个多肽之间(优选历经诸如活性位点的指定区域)大于30%同一性被视为指示具有功能等效性,并且因此指示两种蛋白质具有同源性。优选地,作为同源物的蛋白质与图2中标识的Coversin蛋白序列(SEQ ID NO:2)具有大于60%的序列同一性程度。更优选的同源物与图2中给出的Coversin蛋白序列(SEQ ID NO:2)分别具有大于70%、80%、90%、95%、98%或99%同一性程度。使用2.1.3版BLAST,利用由NCBI(国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information);<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)指定的缺省参数[Blosum 62矩阵;空位开放罚分=11和空位延伸罚分=1]确定如本文提及的同一性百分比。

[0122] 图2中给出的Coversin蛋白序列的功能性等效物包括含有从野生型序列的例如1、2、3、4、5、7、10个或更多个氨基酸的氨基酸取代、插入或缺失的突变体,前提是所述突变体保留结合野生型C5和/或来自具有C5多态性的受试者的C5的能力。因此,突变体包括含有不以不利方式影响蛋白质的功能或活性的保守性氨基酸取代的蛋白质。这个术语也意图包括天然生物变体(例如Coversin蛋白所源于的物种内的等位基因变体或地理变化形式)。也可通过使蛋白质序列中特定残基进行系统性或定向突变来设计结合野生型C5和/或来自具有C5多态性的受试者的C5和/或LTB4的能力改进的突变体。

[0123] Coversin蛋白的片段和Coversin蛋白同源物的片段也由术语“功能性等效物”涵盖,只要所述片段保留结合野生型C5和/或来自具有C5多态性的受试者的C5和/或LTB4的能力即可。片段可包括例如源于Coversin蛋白序列的是小于150个氨基酸、小于125个氨基酸、小于100个氨基酸、小于75个氨基酸、小于50个氨基酸或甚至是25个氨基酸或更少的多肽,前提是这些片段保留结合补体野生型C5和/或来自具有C5多态性的受试者的C5和/或LTB4的能力。片段可包括例如源于Coversin蛋白序列的是至少150个氨基酸、至少125个氨基酸、至少100个氨基酸、至少75个氨基酸、至少50个氨基酸或至少25个氨基酸的多肽,前提是这些片段保留结合补体野生型C5和/或来自具有C5多态性的受试者的C5和/或LTB4的能力。

[0124] 任何功能性等效物或其片段都优选保留见于Coversin中的半胱氨酸残基的样式。举例来说,所述功能性等效物包含6个相对于彼此以相隔32个氨基酸,相隔62个氨基酸,相隔28个氨基酸,相隔1个氨基酸以及相隔21个氨基酸的距离间隔的半胱氨酸残基,如从根据图2中的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的氨基酸1至168的序列的氨基末端至羧基末端所排列。Coversin蛋白的示例性片段以SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14公开。编码相应片段的DNA以SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ

ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13公开。

[0125] 作为所述片段包括的是不仅本文在图2中明确标识的毛白钝缘蟬Coversin蛋白的片段,而且这种蛋白质的如上所述同源物的片段。同源物的所述片段将通常与图2中的Coversin蛋白序列的片段具有大于60%同一性,但同源物的更优选片段将显示与图2中的Coversin蛋白序列的片段分别大于70%、80%、90%、95%、98%或99%的同一性程度。当然,可通过使野生型序列系统性突变或片段化,随后进行适当活性测定来合理设计改进片段。片段可对野生型C5、C5的多态性变体或两者和/或LTB4展现与Coversin类似或更大的亲和力和。

[0126] 根据本发明使用的功能性等效物可为例如通过与异源性蛋白质序列的编码序列同框克隆编码Coversin蛋白的多核苷酸来获得的融合蛋白。术语“异源的”当在本文中使用时意图指定除Coversin蛋白或它的功能性等效物以外的任何多肽。可在N末端或在C末端包含在可溶性融合蛋白中的异源序列的实例是以下:膜结合蛋白质的细胞外结构域、免疫球蛋白恒定区(Fc区)、多聚化结构域、细胞外蛋白质的结构域、信号序列、输出序列或允许通过亲和色谱法纯化的序列。这些异源性序列中的许多可于表达质粒中商购获得,因为这些序列通常包括在融合蛋白中以在不显著损害融合于它们的蛋白质的特定生物活性下提供额外性质[27]。所述额外性质的实例是在体液中半衰期持续较长久,细胞外定位,或如通过标签(诸如组氨酸、GST、FLAG、抗生物素蛋白或HA标签)所允许的较容易的纯化程序。

[0127] 可通过在宿主细胞中表达来以重组形式制备Coversin蛋白及其功能性等效物。所述表达方法为本领域技术人员所熟知,并且由[28]和[29]详述。重组形式的Coversin蛋白及其功能性等效物优选未被糖基化。

[0128] 本发明的蛋白质和片段也可使用常规蛋白质化学技术制备。举例来说,可通过化学合成制备蛋白质片段。用于产生融合蛋白的方法在本领域中是标准的,并且将为熟练读者所知。举例来说,最一般性分子生物学、微生物学重组DNA技术和免疫学技术可见于[28]或[30]中。

[0129] 施用模式

[0130] Coversin和它的功能性等效物不需要医学专业人员来进行施用,并且这些分子被快速吸收。许多重组抗体被极缓慢吸收,并且因此需要历经长久时期加以输注(例如静脉内)。因此,施用所述分子也需要医学专业人员。因此,不仅具有在具有C5多态性的受试者中更有效抑制补体途径的活化的优势,Coversin也具有比诸如像依库珠单抗的抗体的其它药剂更易于施用的优势。

[0131] 在实施本发明时向其施用药剂的受试者优选是哺乳动物,优选是人。受试者可为成人、儿童或婴儿。向其施用药剂的受试者也可罹患补体介导的疾病或病症。特定来说,受试者可已知具有或被怀疑具有补体C5多态性。

[0132] 以治疗或防治有效量施用药剂。术语“治疗有效量”是指药剂的为治疗补体介导的疾病或病症所需的量,如在本文其它地方所确定。本文所用的术语“防治有效量”是指药剂的为预防补体介导的疾病或病症所需的量,如在本文其它地方所定义。优选地,药剂的剂量足以结合受试者中尽可能多的可用C5,更优选地,所有可用C5。或者,药剂的剂量可足以结合受试者中尽可能多的可用LTB4,更优选地,所有可用LTB4。在一些方面,药剂的剂量足以结合尽可能多的可用C5和LTB4,例如所有可用C5和LTB4。供给的药剂的剂量是为结合受试

者中所有可用C5和/或LTB4所需的摩尔剂量的至少两倍。供给的药剂的剂量可为结合受试者中所有可用C5和/或LTB4所需的摩尔剂量的2.5倍、3倍或4倍。优选地,剂量是0.0001mg/kg (药物质量相较于患者质量)至20mg/kg,优选是0.001mg/kg至10mg/kg,优选是0.01mg/kg至2mg/kg,优选是0.1mg/kg至1mg/kg;或者0.2mg/kg至0.8mg/kg;或者0.3mg/kg至0.7mg/kg;或者0.4mg/kg至0.6mg/kg;例如0.14mg/kg或0.57mg/kg。治疗或防治有效量可另外以对终末补体的抑制来确定,例如某一量意指相较于在不存在治疗下的终末补体活性,终末补体活性被降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%。可调整剂量和频率以维持终末补体活性处于所需水平,其可为相较于在不存在治疗下的终末补体活性,例如10%或更小,例如9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小。

[0133] 需要以其施用剂量的频率将取决于涉及的药剂的半衰期。当药剂是Coversin蛋白或其功能性等效物时,剂量可以连续输液形式,以团注剂量,或基于每日,基于每日两次,或每2天、3天、4天、5天、6天、7天、10、15或20天或更久加以施用。如在其它地方所指示,Coversin蛋白和它的功能性等效物的特定优势是它可被施用所具有的相对容易性和快速性,以及不需要医学专业人员进行施用的事实。

[0134] 可施用单次或多次剂量。举例来说,可施用至少2、3、4、5、6、7或8次剂量。单次剂量是一个实施方案。精确剂量和剂量频率也可取决于患者在施用时的状态。在确定剂量时可考虑的因素包括是需要治疗还是防治、患者的疾病状态的严重性、患者的总体健康、年龄、重量、性别、膳食、施用时间和频率、药物组合、反应敏感性和患者对疗法的耐受性或响应性。可通过常规实验来确定准确量,但可最终在于临床医师的判断。

[0135] 剂量方案也可采用初始“负荷剂量”,随后一次或多次后继“维持剂量”的形式。一般来说,负荷剂量将大于维持剂量。负荷剂量可比维持剂量大2、5、10倍或更多倍。负荷剂量可以单次剂量形式施用,或以在特定时限内一次或多次剂量形式施用。通常,负荷剂量将为在单一24小时时期内施用的1、2、3、4或5次剂量。维持剂量将通常是在定期间隔下重复的较低剂量,诸如每3、4、6、8、12、24或48小时重复。可通过常规实验来确定准确方案,但可最终在于临床医师的判断。

[0136] 负荷剂量可为0.0001mg/kg (药物质量相较于患者质量)至20mg/kg,并且维持剂量可在0.0001mg/kg至20mg/kg之间;或者,负荷剂量是0.001mg/kg至10mg/kg,并且维持剂量是0.001mg/kg至10mg/kg,或者,负荷剂量是0.01mg/kg至2mg/kg,并且维持剂量是0.01mg/kg至2mg/kg;或者,负荷剂量是0.1mg/kg至1mg/kg,并且维持剂量是0.1mg/kg至1mg/kg;或者,负荷剂量是0.1mg/kg至1mg/kg,并且维持剂量是0.05mg/kg至0.5mg/kg;或者,负荷剂量是0.2mg/kg至0.8mg/kg,并且维持剂量是0.1mg/kg至0.4mg/kg;或者,负荷剂量是0.3mg/kg至0.7mg/kg,并且维持剂量是0.1mg/kg至0.3mg/kg;或者,负荷剂量是0.4mg/kg至0.6mg/kg,并且维持剂量是0.1mg/kg至0.2mg/kg,例如其中负荷剂量是0.57mg/kg,并且维持剂量是0.14mg/kg。

[0137] 负荷剂量可为0.0001mg/kg (药物质量相较于患者质量)至20mg/kg,并且维持剂量可在0.0001mg/kg至20mg/kg之间;或者,维持剂量可为0.001mg/kg至10mg/kg,或者,维持剂量可为0.01mg/kg至2mg/kg;或者,维持剂量可为0.1mg/kg至1mg/kg;或者,维持剂量可为0.1mg/kg至0.8mg/kg;或者,维持剂量可为0.1mg/kg至0.6mg/kg;或者,维持剂量可为

0.1mg/kg至0.4mg/kg;或者,维持剂量可为0.1mg/kg至0.2mg/kg。

[0138] 负荷剂量可为0.0001mg/kg (药物质量相较于患者质量) 至20mg/kg,并且维持剂量可在0.0001mg/kg至20mg/kg之间;或者,负荷剂量可为0.001mg/kg至10mg/kg,或者,负荷剂量可为0.01mg/kg至2mg/kg;或者,负荷剂量可为0.1mg/kg至1mg/kg;或者,负荷剂量可为0.1mg/kg至1mg/kg;或者,负荷剂量可为0.2mg/kg至0.8mg/kg;或者,负荷剂量可为0.3mg/kg至0.6mg/kg;或者,负荷剂量可为0.4mg/kg至0.6mg/kg。药剂将通常与药学上可接受的载体联合施用。如本文所用的术语“药学上可接受的载体”包括基因、多肽、抗体、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸和非活性病毒粒子或实际上任何其它试剂,前提是载体自身不诱导毒性作用或导致产生对接受药物组合物的个体有害的抗体。药学上可接受的载体可另外含有液体,诸如水、盐水、甘油、乙醇;或辅助物质,诸如湿润剂或乳化剂、pH缓冲物质等。因此,采用的药物载体将视施用途而变化。载体可使得药物组合物能够被配制成片剂、丸剂、糖衣片、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆、浆液、混悬液以辅助由患者摄取。对药学上可接受的载体的透彻讨论可见于[31]。

[0139] 可通过任何已知的施用途来递送药剂。可局部或全身递送药剂。可通过胃肠外途径(例如通过皮下、腹膜内、静脉内或肌肉内注射或递送至组织的间质间隙中)来递送药剂。也可将组合物施用至病变中。其它施用模式包括口服和经肺施用、栓剂和经皮或透皮施加、针和无痛皮下喷射器。

[0140] 优选地,通过皮下注射来递送药剂。在一些实施方案中,这是通过以下方式来完成:每日一次例如以在0.0001mg/kg (药物质量相较于患者质量) 至20mg/kg之间的初始负荷剂量皮下注射,随后每日一次在0.0001mg/kg至20mg/kg之间的维持剂量或在本文其它地方公开的其它剂量。或者,可通过皮下注射每隔一天递送药剂。

[0141] 在一优选实施方案中,通过以下方式来递送药剂:每日一次以0.4mg/kg-0.6mg/kg (例如0.57mg/kg) 的初始负荷剂量皮下注射,随后每日一次0.1mg/kg-0.2mg/kg (例如0.14mg/kg) 的维持剂量。

[0142] 药剂可单独或作为治疗方案的一部分施用,所述治疗方案也涉及施用当前用于治疗患有补体介导的疾病或病症的患者的其它药物。

[0143] 药剂可与其它药物同时、依序或分开施用。举例来说,药剂可在施用其它药物之前或之后施用。特定来说,药剂可在先前药物已未能治疗补体介导的疾病或病症之后施用。在一特定实施方案中,药剂可在抗C5单克隆抗体之后施用。

[0144] 在特定实施方案中:

[0145] (i) 补体介导的疾病是阵发性夜间血红蛋白尿(PNH);

[0146] (ii) 补体C5多态性在残基Arg885处;

[0147] (iii) 用于治疗的药剂是Coversin蛋白或Coversin蛋白的片段或同源物,只要所述片段保留结合野生型C5和/或来自具有C5多态性的受试者的C5的能力即可;

[0148] (iv) 皮下递送药剂。

[0149] 在某些实施方案中,皮下注射是以0.4mg/kg-0.6mg/kg (药物质量相较于患者质量) 的初始负荷剂量每日一次,随后每日一次0.1mg/kg-0.2mg/kg的维持剂量;更优选以0.57mg/kg (药物质量相较于患者质量) 的初始负荷剂量,随后每日一次0.14mg/kg的维持剂量。

[0150] 在特定实施方案中：

[0151] (i) 补体介导的疾病是移植物抗宿主疾病 (GvHD)；

[0152] (ii) 补体C5多态性在残基Arg885处；

[0153] (iii) 用于治疗的药剂是Coversin蛋白或Coversin蛋白的片段或同源物，只要所述片段保留结合野生型C5和/或来自具有C5多态性的受试者的C5的能力即可；

[0154] (iv) 皮下递送药剂。

[0155] 在某些实施方案中，皮下注射是以0.4mg/kg-0.6mg/kg (药物质量相较于患者质量) 的初始负荷剂量每日一次，随后每日一次0.1mg/kg-0.2mg/kg的维持剂量；更优选以0.57mg/kg (药物质量相较于患者质量) 的初始负荷剂量，随后每日一次0.14mg/kg的维持剂量。

[0156] 在特定实施方案中：

[0157] (i) 补体介导的疾病是血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)；

[0158] (ii) 补体C5多态性在残基Arg885处；

[0159] (iii) 用于治疗的药剂是Coversin蛋白或Coversin蛋白的片段或同源物，只要所述片段保留结合野生型C5和/或来自具有C5多态性的受试者的C5的能力即可；

[0160] (iv) 皮下递送药剂。

[0161] 在某些实施方案中，皮下注射是以0.4mg/kg-0.6mg/kg (药物质量相较于患者质量) 的初始负荷剂量每日一次，随后每日一次0.1mg/kg-0.2mg/kg的维持剂量；更优选以0.57mg/kg (药物质量相较于患者质量) 的初始负荷剂量，随后每日一次0.14mg/kg的维持剂量。

[0162] 在特定实施方案中：

[0163] (i) 补体介导的疾病是非典型溶血性尿毒综合征 (aHUS)；

[0164] (ii) 补体C5多态性在残基Arg885处；

[0165] (iii) 用于治疗的药剂是Coversin蛋白或Coversin蛋白的片段或同源物，只要所述片段保留结合野生型C5和/或来自具有C5多态性的受试者的C5的能力即可；

[0166] (iv) 皮下递送药剂。

[0167] 在某些实施方案中，皮下注射是以0.4mg/kg-0.6mg/kg (药物质量相较于患者质量) 的初始负荷剂量每日一次，随后每日一次0.1mg/kg-0.2mg/kg的维持剂量；更优选以0.57mg/kg (药物质量相较于患者质量) 的初始负荷剂量，随后每日一次0.14mg/kg的维持剂量。

[0168] 现将通过举例方式更详细描述本发明的各个方面和实施方案。应了解可在不脱离本发明的范围下对细节进行修改。

[0169] 附图简述：

[0170] 图1:经典和替代补体活化途径的示意图。酶组分，暗灰色。过敏毒素圈闭在星爆炸符号中。

[0171] 图2:Coversin的一级序列。信号序列加下划线。半胱氨酸残基呈粗体类型。在右侧指示核苷酸和氨基酸编号。

[0172] 图3:来自在实施例2中治疗的患者的峰值和谷底血小板计数。

[0173] 图4:在用可变剂量的Coversin和依库珠单抗外加之后，通过CH50测定对来自实施

例4中的患者的血清的体外测试(表示为对照的百分比)。显示在依库珠单抗或Coversin存在下,相较于对照血清,来自实施例4中的患者的血清中的补体活性百分比。图例:Ecu,用依库珠单抗外加;Cov,用Coversin外加。NC3,正常对照血清;R2,患者血清。

[0174] 图5:在用可变剂量的Coversin和依库珠单抗外加之后,通过CH50测定对来自实施例4中的患者的血清的体外测试。显示在依库珠单抗或Coversin存在下,相较于对照血清,来自实施例4中的患者的血清中的用CH50Eq/ml单位表示的补体活性。图例:Ecu,用依库珠单抗外加;Cov,用Coversin外加。NC3,正常对照血清;R2,患者血清。

[0175] 图6:在用可变剂量的Coversin和依库珠单抗外加之后,通过CH50测定对来自实施例3中的患者的血清的体外测试(表示为对照的百分比)。显示在依库珠单抗或Coversin存在下,相较于对照血清,实施例3中的患者的补体活性百分比。图例:Ecu,用依库珠单抗外加;Cov,用Coversin外加。NC,正常对照血清;BJ1,使用患者血清进行的重复实验1;BJ2,使用患者血清进行的重复实验2。

[0176] 图7:在用可变剂量的Coversin和依库珠单抗外加之后,通过CH50测定对来自实施例3中的患者的血清的体外测试。显示在依库珠单抗或Coversin存在下,实施例3中的患者的用CH50Eq/ml单位表示的补体活性。图例:Ecu,用依库珠单抗外加;Cov,用Coversin外加。BJ1和BJ2被提及为Pat 1a和Pat 1b。

[0177] 图8:显示依库珠单抗表位位置和Coversin的可能结合位点的分子模型。

实施例

[0178] 实施例1-体外抑制C5活性

[0179] 通过Quidel CH₅₀溶血测定来测量来自被发现在编码补体C5的基因中具有罕见遗传多态性(c.2654G>A (p.Arg885His))的4岁男性白种人患者的血清中的终末补体活性。

[0180] Quidel Microvue CH50Eq酶免疫测定(目录号A018)用于体外测量人血清中的总经典途径活性。http://www.quidel.com/sites/quidel.com/files/product/documents/a018_microvue_ch50_eq_english_1.pdf

[0181] 试剂盒提供在标准条件下对终末补体复合物(TCC)形成的直接测量。用试剂盒测量CH50具有3个步骤:

[0182] 1.活化未稀释血清中的经典补体途径,从而导致形成TCC。

[0183] 2.稀释血清并添加至用捕集TCC的抗体涂布的微测定孔中。

[0184] 3.用抗TCC辣根过氧化物酶(HRP)缀合抗体定量捕集的TCC。

[0185] 在添加底物时的颜色强度与各反应中存在的TCC的浓度成比例。使用试剂盒标准曲线(在各测定期间确定),用每毫升CH50单位当量(CH50U Eq/ml)表示测定结果。

[0186] 试剂盒的线性范围是30-310U Eq/ml。

[0187] 根据制造商,由234个个人样本确定的正常截断值是70CH50U Eq/ml。

[0188] 在用依库珠单抗治疗之后,相较于具有野生型C5的正常对照的血清中的补体活性,患者保留70%补体活性。

[0189] 用30、60和120μg/ml Coversin外加至在施用依库珠单抗之后获取的血清中导致补体活性水平不可检测。

[0190] 因此,在依库珠单抗非响应者中,Coversin保持正常有效性。

[0191] 实施例2-病例研究

[0192] 称重13.6kg的4岁男性白种人患者在2013年10月收到慢性肉芽肿病的初步诊断,并且经受造血性干细胞移植。随后,患者由于血小板减少症而显现重度胃肠道出血,并且现时正接受每日血小板输注。诊断是移植物抗宿主疾病(GvHD)或血栓性血小板减少性紫癜(TTP)。

[0193] 用依库珠单抗、英夫利昔单抗(infliximab)和利妥昔单抗(rituximab)治疗已不成功。

[0194] 已发现患者在编码补体C5的基因中具有先前仅在日本人或汉族中国人来源的人员中被描述的罕见遗传多态性(c.2654G>A(p.Arg885His))。

[0195] 如上所述对血清补体活性的体外测定显示在用依库珠单抗治疗之后,相较于正常对照,补体活性结果是约70%溶血活性。相比之下,用30、60和120 μ g/ml Coversin外加至血清中使溶血活性降低至不可检测水平。

[0196] 在鉴定易感于用Coversin抑制补体途径之后,开始以下治疗:

[0197] Coversin,根据以下时程,通过皮下注射:

[0198] 初始负荷剂量:0.57mg/kg=7.8mg(0.7ml)

[0199] 维持剂量:此后每24小时,0.14mg/kg=1.9mg(0.2ml)

[0200] 将每日获取血清以得到补体活性,并且将调整剂量和/或频率以维持终末补体活性相较于正常对照血清处于10%或更小。

[0201] 也将监测以下结果:

[0202] a) 谷底血小板计数变化

[0203] b) 血清LDH变化

[0204] c) 通过Quidel CH₅₀溶血测定测量的终末补体活性

[0205] 实施例3-病例研究的结果

[0206] 用Coversin治疗实施例2的患者约6周。在治疗的第一天,他接受经计算以去除循环C5的剂量(0.57mg/kg),以及此后这个剂量的50%,直至第二周结束。从那时起,患者持续两周每隔一天接受相同剂量,接着再持续两周接受半数那个剂量。应注意从第三周开始的剂量可能已不足以完全控制终末补体活性。

[0207] 在临床上,患者在他接受完全剂量期间趋于稳定。他的被假定是血栓性血小板减少性紫癜(TTP)的疾病的主要后果是血小板计数严重降低,为此他已持续数月接受每天两个单位血小板。在Coversin治疗7天之后,谷底血小板计数(血小板输注后约12小时)开始升高,截至第14天达到已在他的整个患病期间记录的最高值98,000。

[0208] 在那个时点,他对血小板输注的需求降低至每天一个单位(参见图3)。

[0209] 在第三周开始时,剂量降低,并且谷底血小板计数下降至50,000以下,且在他的剩余患病期间未恢复。谷底血小板计数升高以及对血小板输注的需求降低被医学工作人员视为明确指示对Coversin起积极响应。在剂量降低之后的恶化似乎确认这一点。

[0210] 在6周之后给与最终Coversin剂量,并且患者快速恶化,且在又2周之后死于空肠穿孔。

[0211] 实施例4-病例研究

[0212] 1名年龄在45岁左右的男性患者被诊断有PNH,并且他已用依库珠单抗治疗约1年,

其中临床响应不充分。遗传分析已确认在位置c.2654处的杂合性C5多态性,但未知的是此产生哪个氨基酸变换,尽管已知它不是pArg885His。

[0213] 实施例5-来自患者的血清中的终末补体活性

[0214] 试剂和样本

[0215] 样本制备:通过将血液收集至普通玻璃管或SST真空采血管(或等效物)中,以及使它凝结1小时,随后在1500g下离心10分钟来制备血清。立刻分离血清(避免被任何血细胞污染),并且在-70℃下储存在螺旋盖低温管(约0.5ml等分试样)中。

[0216] Coversin:在-70℃下的冷冻10.9mg/ml溶液。在90uL正常对照或患者血清中稀释10uL以产生1.09mg/ml的最终浓度。在90uL自体血清中稀释10uL以产生109ug/ml的最终浓度。在自体血清中进行两倍稀释以达到最终浓度范围:0.4-54.5ug/ml。

[0217] 依库珠单抗:10mg/ml的冷冻溶液。在90uL正常对照或患者血清中稀释10uL以产生1mg/ml的最终浓度。在90uL自体血清中稀释10uL以产生100ug/ml的最终浓度。在自体血清中进行两倍稀释以达到最终浓度范围:0.4-50ug/ml。

[0218] 缓冲液:磷酸盐缓冲盐水(0.01M磷酸盐缓冲剂、0.0027M氯化钾、0.137M氯化钠,pH 7.4)。

[0219] 方法

[0220] 根据以上程序将Coversin、依库珠单抗或缓冲液(对照)外加至血清中以实现一定范围的最终浓度。接着使用Quidel CH50试剂盒,利用一式两份孔来测定这些的CH50当量活性。

[0221] 结果

[0222] 根据与试剂盒一起提供的校正曲线计算CH50值。将原始CH50值形式的结果相对于C5抑制剂浓度绘图。

[0223] 将各C5抑制剂浓度下的CH50结果计算为相关缓冲液对照的CH50浓度的百分比。将CH50结果百分比相对于抑制剂浓度绘图。

[0224] 在单独时日重复实验以获得各患者中以及单一正常对照中的3个测量结果。这提供对实验间变异性的估计。

[0225] 在单独时日在单一实验中对6个不同正常对照重复实验。这提供对受试者间响应性的估计(并且避免使用可能具有未知C5突变或多态性的单一受试者的风险)。

[0226] 向全血清中添加最高剂量的各药物,接着在全血清中进行两倍连续稀释。一个重复用于各药物剂量。

[0227] 依库珠单抗的最高剂量是50μg/ml,接着是25、12.5、6.3、3.2、1.6、0.8、0.4和0μg/ml。Coversin的最高剂量是54.5μg/ml,接着是27.3、13.1、6.6.3.3、1.7、0.9和0μg/ml。

[0228] 在连续稀释之后,根据Quidel CH50试剂盒的说明书来活化和测定血清。

[0229] 对于三个血清样本和两种药物治疗剂中的每个,相较于试剂盒标准来计算CH50U Eq/ml,并且相对于药物浓度绘图。也将它们绘制成仅相关缓冲液对照的CH50值的百分比。

[0230] 如上所述测试在依库珠单抗和Coversin存在下,正常人血清和来自病例研究中的患者的血清中的终末补体活性。

[0231] 如图6和7中所示,在不存在任一药物下,正常人血清的基线CH50值(平均78.1CH50U Eq/ml)和来自实施例2和3的病例研究所述的患者的两个患者血清样本的基

线CH50值(平均82.4和60.6CH50U Eq/ml)在>70CH50U Eq/ml的正常人范围内(正常对照和BJ 2)或略微低于所述正常人范围(BJ 1)。

[0232] Coversin同等充分抑制正常人血清与来自具有p.Arg885His多态性的患者的血清两者。在约15ug/ml的Coversin浓度下观察到小于基线CH50(U Eq/ml)的5%。

[0233] 依库珠单抗在预期剂量下抑制正常人血清,其中在约45ug/ml的浓度下观察到小于基线CH50(U Eq/ml)的5%。在高于25ug/ml的剂量下,依库珠单抗类似地抑制正常人血清和来自具有p.Arg885His多态性的患者的血清中的使用Quidel CH50试剂盒测量的补体活性。然而,它不完全抑制来自患者的血清,其中在测试的最高依库珠单抗剂量(60ug/ml)下剩余基线CH50的约20%。

[0234] 也与正常人血清并行测试来自实施例4中所述的患者的血清。如图4和5中所示,在不存在任一药物下,正常人血清和来自患者血清样本的血清的基线CH50值在>70CH50U Eq/ml的正常人范围内。

[0235] Coversin同等充分抑制正常人血清与来自在Arg885处具有氨基酸取代的患者的血清两者。在约15ug/ml的Coversin浓度下观察到小于基线CH50(U Eq/ml)的5%。

[0236] 依库珠单抗在预期剂量下抑制正常人血清,其中实现小于基线CH50(U Eq/ml)的5%。与来自实施例2的患者血清类似,在高于25ug/ml的剂量下,依库珠单抗类似地抑制正常人血清和来自实施例4患者的血清中的补体活性,但它不完全抑制来自实施例4患者的血清,其中在测试的最高依库珠单抗剂量(50ug/ml)下剩余基线CH50的约10%。

[0237] 依库珠单抗不完全抑制来自未从用依库珠单抗进行治疗性治疗得到益处的两个患者(实施例2和实施例4)的血清中的补体活性。这支持PNH治疗中的补体抑制作用需要高于这个抑制作用以观察到治疗益处的假设。

[0238] 使用重组表达,Nishimura等(2014)显示在实施例2患者中所见的C5p.Arg885His多态性完全去除依库珠单抗与C5结合。在当前研究中所示的由依库珠单抗对实施例2患者的补体血清的部分抑制(图6和7)可理解为实施例2患者和所有具有迄今为止鉴定的多态性的其它个体是具有正常C5拷贝和p.Arg885His C5拷贝的杂合子。如果两个拷贝均被完全表达,那么依库珠单抗将完全抑制这些个体中存在的C5蛋白的50%。仅观察到20%残余CH50活性的事实可能反映以下事实:实施例2患者正每天接受新鲜血液产品,此可能增加正常C5与p.Arg885His C5的比率,由此降低未由依库珠单抗抑制的C5p.Arg885His的相对量。

[0239] 相比于实施例2患者的血清,依库珠单抗似乎在更大程度上抑制实施例4患者的血清,但在甚至最高依库珠单抗剂量下也剩余一定残余补体活性。可能的解释是在Arg885处的氨基酸变化是对依库珠单抗结合的影响不及p.Arg885His深远的保守性氨基酸变化。

[0240] 相比来说,Coversin是正常人血清和来自两名不由依库珠单抗完全抑制的患者的血清的同等有效抑制剂。由Coversin完全抑制可理解为它可能与依库珠单抗结合C5上不同位点。此外,已显示Coversin是广泛范围的哺乳动物物种中的C5的同等有效抑制剂,所述物种包括人、食蟹猴、猪、大鼠、小鼠、兔和豚鼠。这指示相比于仅能够抑制人C5的依库珠单抗,Coversin与C5结合远远更加耐受C5氨基酸序列差异。Coversin应被考虑用于治疗以下患者,其受益于C5抑制,但由于C5中的妨碍或降低依库珠单抗与C5之间的结合相互作用的亲和力的多态性而从施用依库珠单抗获得少许或未获得治疗性治疗。

[0241] 参考文献:

- [0242] [1]Pfarr N,et al.J Immunol.174(7):4172-7.(2005)Erratum in:J Immunol.; 182(8):5152
- [0243] [2]Delgado-Cerviño E,Fontán G,López-Trascasa M.Mol Immunol.42(1):105-11.(2005)
- [0244] [3]Halangk J,et al.,J Hepatol.49(3):339-45(2008)
- [0245] [4]Nishimura,J et a;.,New EnglJ.Med.,30;7:632-639(2014)
- [0246] [5]Wang X,Fleischer DT,Whitehead WT,Haviland DL,Rosenfeld SI,Leddy JP,Snyderman R,Wetsel RA.J Immunol.154(10):5464-71.(1995)
- [0247] [6]Jakowski et al.,Clin Diagn Lab Immunol.6(1):137-139(1999)
- [0248] [7]Freslund et al.,Nature Immunology 9,753-760(2008)
- [0249] [8]Zuber et al.Nature Reviews Nephrology 8,643-657
- [0250] [9]Hobart,M.J.,et al.,Annals of Human Genetics 45.1(1981):1-4.
- [0251] [10]Jakowski et al.,Clin Diagn Lab Immunol.6(1):137-139(1999)
- [0252] [11]Sahu et al.,Immunopharmacology,49:133-148(2000) .
- [0253] [12]Ricklin D&Lambris J,Nature Biotechnology,25:1265-1275(2007)
- [0254] [13]WO 2007/028968
- [0255] [14]WO 2008/029169
- [0256] [15]WO 2008/029167
- [0257] [16]WO 2011/083317
- [0258] [17]Guo,R.F.and P.A.Ward,Annu Rev Immunol,2005,23:p.821-52
- [0259] [18]Neumann,E.,et al.,Arthritis Rheum,2002.46(4):p.93445
- [0260] [19]Williams,A.S.,et al.,Arthritis Rheum,2004,50(9):p.3035-44
- [0261] [20]Quigg,R.J.,Curr Dir Autoimmun,2004.7:p.165-80
- [0262] [21]Papagianni,A.A.,et al.,Nephrol Dial Transplant,2002,17(1):p.57-63
- [0263] [22]He,C.,et al.,J Immunol,2005.174(9):p.5750-7
- [0264] [23]Mead,R.J.,et al.,J Immunol,2002.168(I):p.458-65
- [0265] [24]Nakashima,S.,et al.,J Immunol,2002.169(8):p.4620-7
- [0266] [25]WO 2004/106369
- [0267] [26]WO 2009/098454
- [0268] [27]Terpe K,Appl Microbiol Biotechnol,60:523-33,2003
- [0269] [28]Sambrook et al(2000)
- [0270] [29]Fernandez&Hoeffler(1998)
- [0271] [30]Ausubel et al.(1991)
- [0272] [31]Remington's Pharmaceutical Sciences;Mack Pub.Co.,N.J.1991

序列表

<110> 沃卢申伊缪诺制药公司

<120> 治疗方法

<130> P064032W0

<141> 2015-05-28

<160> 14

<170> SeqWin2010, version 1.0

<210> 1

<211> 507

<212> DNA

<213> 毛白钝缘蚬

<400> 1

[0001] atgctggttt tggtagacct gattttctcc ttttctgcga acatcgcata tgctgacagc 60
 gaaagcgact gcactggaag cgaacctgtt gacgccttcc aagctttcag tgagggcaaa 120
 gaggcataatg tcctggtgag gtccacggat cccaaagcga gggactgctt gaaaggagaa 180
 ccagccggag aaaagcagga caacacgttg ccggtgatga tgacgtttaa gaatggcaca 240
 gactgggctt caaccgattg gacgtttact ttggacggcg caaaggtaac ggcaaccctt 300
 ggtaacctaa cccaaaatag ggaagtggtc tacgactcgc aaagtcata ctgccacgtt 360
 gacaaggctc agaaggaagt tccagattat gagatgtgga tgctcgatgc gggagggctt 420
 gaagtggaag tcgagtgtg ccgtcaaaag cttgaagagt tggcgtctgg caggaaccaa 480
 atgtatcccc atctcaagga ctgctag 507

<210> 2

<211> 168

<212> PRT

<213> 毛白钝缘蚬

<400> 2

Met Leu Val Leu Val Thr Leu Ile Phe Ser Phe Ser Ala Asn Ile Ala
 1 5 10 15

Tyr Ala Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala
 20 25 30

Phe Gln Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser
 35 40 45

Thr Asp Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu
 50 55 60

Lys Gln Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr
 65 70 75 80

Asp Trp Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val
 85 90 95

Thr Ala Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp
 100 105 110

Ser Gln Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro
 115 120 125
 Asp Tyr Glu Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val
 130 135 140
 Glu Cys Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln
 145 150 155 160
 Met Tyr Pro His Leu Lys Asp Cys
 165

<210> 3
 <211> 453
 <212> DNA
 <213> 毛白钝缘蜚

<400> 3
 gacagcgaaa ggcactgcac tggaagegaa cctgttgacg ccttccaagc tttcagttag 60
 ggcaaagagg catatgtcct ggtgaggtcc acggatccca aagegaggga ctgcttgaaa 120
 ggagaaccag cgggagaaaa gcaggacaac acgttgccgg tgatgatgac gttaaagaat 180
 ggcacagact gggcttcaac cgattggacg tttactttgg acggcgcaaa ggtaacggca 240
 acccttggtg acctaaccga aaatagggaa gtggtctacg actcgcaag tcactactgc 300
 cactgtgaca aggtcgagaa ggaagttcca gattatgaga tgtggatgct cgatgcggga 360
 gggcttgaag tggaagtcga gtgctgccgt caaaagcttg aagagttggc gtctggcagg 420
 aaccaaattgt atccccatct caaggaactgc tag 453

[0002] <210> 4
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> 毛白钝缘蜚

<400> 4
 Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln
 1 5 10 15
 Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp
 20 25 30
 Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln
 35 40 45
 Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp
 50 55 60
 Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala
 65 70 75 80
 Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln
 85 90 95
 Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr
 100 105 110
 Glu Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val Glu Cys

	115	120	125	
	Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr			
	130	135	140	
	Pro His Leu Lys Asp Cys			
	145	150		
<210>	5			
<211>	450			
<212>	DNA			
<213>	毛白钝缘蜚			
<400>	5			
	agcgaaagcg actgcactgg aagcgaacct gttgacgcct tccaagcttt cagtgagggc			60
	aaagaggcat atgtcctggt gaggtccacg gatcccaaag cgagggactg cttgaaagga			120
	gaaccagccg gagaaaagca ggacaacacg ttgccggtga tgatgacgtt taagaatggc			180
	acagactggg cttcaaccga ttggacgttt actttggacg gcgcaaaggt aacggcaacc			240
	cttggttaacc taacccaaaa tagggaagtg gtctacgact cgcaaagtca tcaactgccac			300
	gttgacaagg tcgagaagga agttccagat tatgagatgt ggatgctcga tgcgggaggg			360
	cttgaagtgg aagtcgagtg ctgccgtcaa aagcttgaag agttggcgctc tggcaggaac			420
	caaatgtatc cccatctcaa ggactgctag			450
<210>	6			
<211>	149			
<212>	PRT			
<213>	毛白钝缘蜚			
[0003]				
<400>	6			
	Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln Ala			
	1	5	10	15
	Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp Pro			
		20	25	30
	Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln Asp			
		35	40	45
	Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp Ala			
		50	55	60
	Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala Thr			
		65	70	75
	Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln Ser			
		85	90	95
	His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr Glu			
		100	105	110
	Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val Glu Cys Cys			
		115	120	125
	Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr Pro			
		130	135	140

His Leu Lys Asp Cys
145

<210> 7
<211> 447
<212> DNA
<213> 毛白钝缘蜚

<400> 7
gaaagcgact gcactggaag cgaacctgtt gacgccttcc aagctttcag tgagggcaaa 60
gaggcatatg tcctggtgag gtccacggat cccaaagcga gggactgctt gaaaggagaa 120
ccagccggag aaaagcagga caacacgttg ccggtgatga tgacgtttaa gaatggcaca 180
gactgggctt caaccgattg gacgtttact ttggacggcg caaaggtaac ggcaaccctt 240
ggtaacctaa cccaaaatag ggaagtggtc tacgactcgc aaagtcatca ctgccacgtt 300
gacaaggtcg agaaggaagt tccagattat gagatgtgga tgctcgatgc gggagggctt 360
gaagtggaag tcgagtgtg cegtcaaaag cttgaagagt tggcgtctgg caggaaccaa 420
atgtatcccc atctcaagga ctgctag 447

<210> 8
<211> 148
<212> PRT
<213> 毛白钝缘蜚

<400> 8
Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln Ala Phe
1 5 10 15

[0004] Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp Pro Lys
20 25 30

Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln Asp Asn
35 40 45

Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp Ala Ser
50 55 60

Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala Thr Leu
65 70 75 80

Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln Ser His
85 90 95

His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr Glu Met
100 105 110

Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val Glu Cys Cys Arg
115 120 125

Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr Pro His
130 135 140

Leu Lys Asp Cys
145

<210> 9
<211> 444

<212> DNA
<213> 毛白钝缘蜉

<400> 9
agcgactgca ctggaagcga acctgttgac gccttccaag ctttcagtga gggcaaagag 60
gcatatgtcc tggtagagtc cacggatccc aaagcgaggg actgcttgaa aggagaacca 120
gccggagaaa agcaggacaa cacgttgccg gtgatgatga cgtttaagaa tggcacagac 180
tgggcttcaa ccgattggac gtttactttg gacggcgcaa aggtaacggc aacccttggt 240
aacctaaccc aaaataggga agtggtctac gactcgcaaa gtcatactg ccacgttgac 300
aaggtcgaga aggaagtcc agattatgag atgtggatgc tcgatgcggg agggcttgaa 360
gtggaagtcg agtgctgccg tcaaaagctt gaagagttgg cgtctggcag gaaccaaattg 420
tatccccatc tcaaggactg ctag 444

<210> 10
<211> 147
<212> PRT
<213> 毛白钝缘蜉

<400> 10
Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln Ala Phe Ser
1 5 10 15

Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp Pro Lys Ala
20 25 30

Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln Asp Asn Thr
35 40 45

[0005]

Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp Ala Ser Thr
50 55 60

Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala Thr Leu Gly
65 70 75 80

Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln Ser His His
85 90 95

Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr Glu Met Trp
100 105 110

Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val Glu Cys Cys Arg Gln
115 120 125

Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr Pro His Leu
130 135 140

Lys Asp Cys
145

<210> 11
<211> 441
<212> DNA
<213> 毛白钝缘蜉

<400> 11
gactgcactg gaagcgaacc tgttgacgcc ttccaagctt tcagtgaggg caaagaggca 60

```

tatgtcctgg ttaggtccac ggatcccaaa gcgagggact gcttgaaagg agaaccagcc 120
ggagaaaagc aggacaacac gttgccggtg atgatgacgt ttaagaatgg cacagactgg 180
gcttcaaccg attggacgtt tactttggac ggcgcaaagg taacggcaac ccttggtaac 240
ctaaccctaaa atagggaagt ggtctacgac tcgcaaagtc atcactgcca cgttgacaag 300
gtcgagaagg aagttccaga ttatgagatg tggatgctcg atgcgggagg gcttgaagtg 360
gaagtcgagt gctgccgtca aaagcttgaa gagttggcgt ctggcaggaa ccaaattgat 420
ccccatctca aggactgcta g 441

```

<210> 12
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> 毛白钝缘蝉

<400> 12
 Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln Ala Phe Ser Glu
 1 5 10 15
 Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp Pro Lys Ala Arg
 20 25 30
 Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln Asp Asn Thr Leu
 35 40 45
 Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp Ala Ser Thr Asp
 50 55 60
 Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala Thr Leu Gly Asn
 65 70 75 80
 Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln Ser His His Cys
 85 90 95
 His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr Glu Met Trp Met
 100 105 110
 Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val Glu Cys Cys Arg Gln Lys
 115 120 125
 Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr Pro His Leu Lys
 130 135 140
 Asp Cys
 145

[0006]

<210> 13
 <211> 438
 <212> DNA
 <213> 毛白钝缘蝉

<400> 13
 tgcactggaa gcgaacctgt tgacgccttc caagctttca gtgagggcaa agaggcatat 60
 gtccctggtga ggtccacgga tcccaaagcg agggactgct tgaaaggaga accagccgga 120
 gaaaagcagg acaacacgtt gccggtgatg atgacgttta agaatggcac agactgggct 180
 tcaaccgatt ggacgtttac ttggacggc gcaaaggtaa cggcaaccct tggtaaccta 240
 acccaaaaata gggaagtggc ctacgactcg caaagtcac actgccacgt tgacaaggtc 300
 gagaaggaag ttccagatta tgagatgtgg atgctcgatg cgggagggct tgaagtggaa 360

	gtcgagtgtc	gccgtcaaaa	gcttgaagag	ttggcgtctg	gcaggaacca	aatgtatccc	420
	catctcaagg	actgctag					438
<210>	14						
<211>	145						
<212>	PRT						
<213>	毛白钝缘蜉						
<400>	14						
	Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln Ala Phe Ser Glu Gly						
	1	5	10	15			
	Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp Pro Lys Ala Arg Asp						
	20	25	30				
	Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln Asp Asn Thr Leu Pro						
	35	40	45				
[0007]	Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp Ala Ser Thr Asp Trp						
	50	55	60				
	Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala Thr Leu Gly Asn Leu						
	65	70	75	80			
	Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln Ser His His Cys His						
	85	90	95				
	Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr Glu Met Trp Met Leu						
	100	105	110				
	Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val Glu Cys Cys Arg Gln Lys Leu						
	115	120	125				
	Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr Pro His Leu Lys Asp						
	130	135	140				
	Cys						
	145						

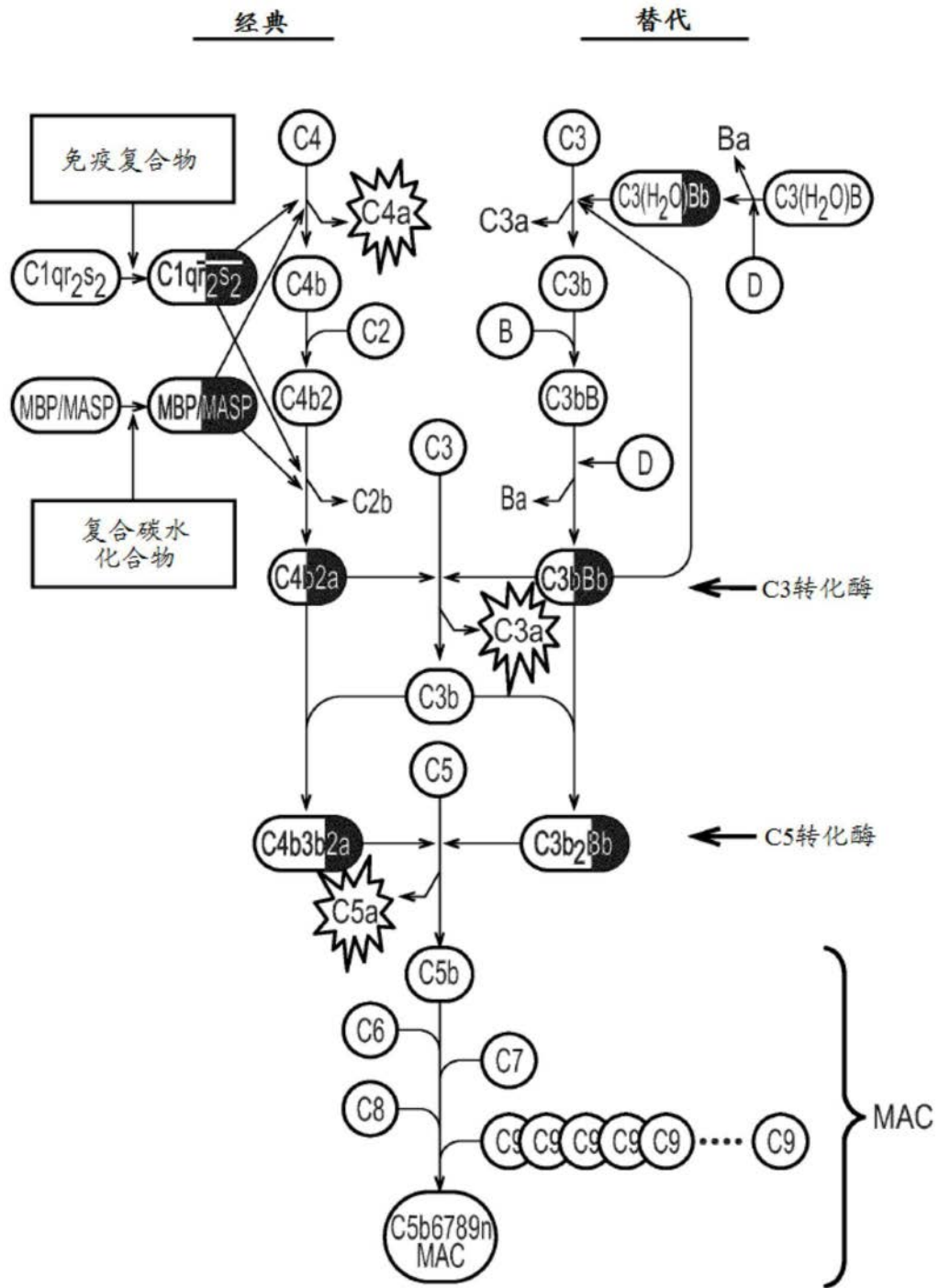


图1


```

ATGCTGGTTTGGTGACCCCTGATTTTCTCCTTTCTGCGAACATCGCATATGCTGACAGC 60
M L V L V T L I F S F S A N I A Y A D S 20
GAAAGCGACTGCACTGGAAGCGAACCTGTTGACGCCCTTCCAAAGCTTTCAGTGAGGGCAA 120
E S D C T G S E P V D A F Q A F S E G K 40
GAGGCATATGTCCTGCTGAGGTCCACGGATCCCAAAGCGAGGACTGCTTGAAGGAGAA 180
E A Y V L V R S T D P K A R D C L K G E 60
CCAGCCGGAGAAAAGCAGGACAAACACGTTGCCGGTGATGATGACGTTTAAGAATGGCACA 240
P A G E K Q D N T L P V M M T F K N G T 80
GACTGGGCTTCAACCGATTGGACGTTTACTTTGGACGGCGCAAGGTAACGGCAACCCCTT 300
D W A S T D W T F T L D G A K V T A T L 100
GGTAACCTAACCCAAAATAGGGAAGTGGTCTACGACTCGCAAGTCATCAGTCCACGTT 360
G N L T Q N R E V V Y D S Q S H H C H V 120
GACAAAGGTCGAGAAGGAAGTTCAGATTATGAGATGTGGATGCTCGATGCGGGAGGGCTT 420
D K V E K E V P D Y E M W M L D A G G L 140
GAAGTGGAAGTCGAGTGCTGCCGTCAAAAGCTTGAAGAGTTGGCGTCTGGCAGGAACCAA 480
E V E V E C C R Q K L E E L A S G R N Q 160
ATGTATCCCCATCTCAAGGACTGCTAG
M Y P H L X D C *
507
168

```

图2

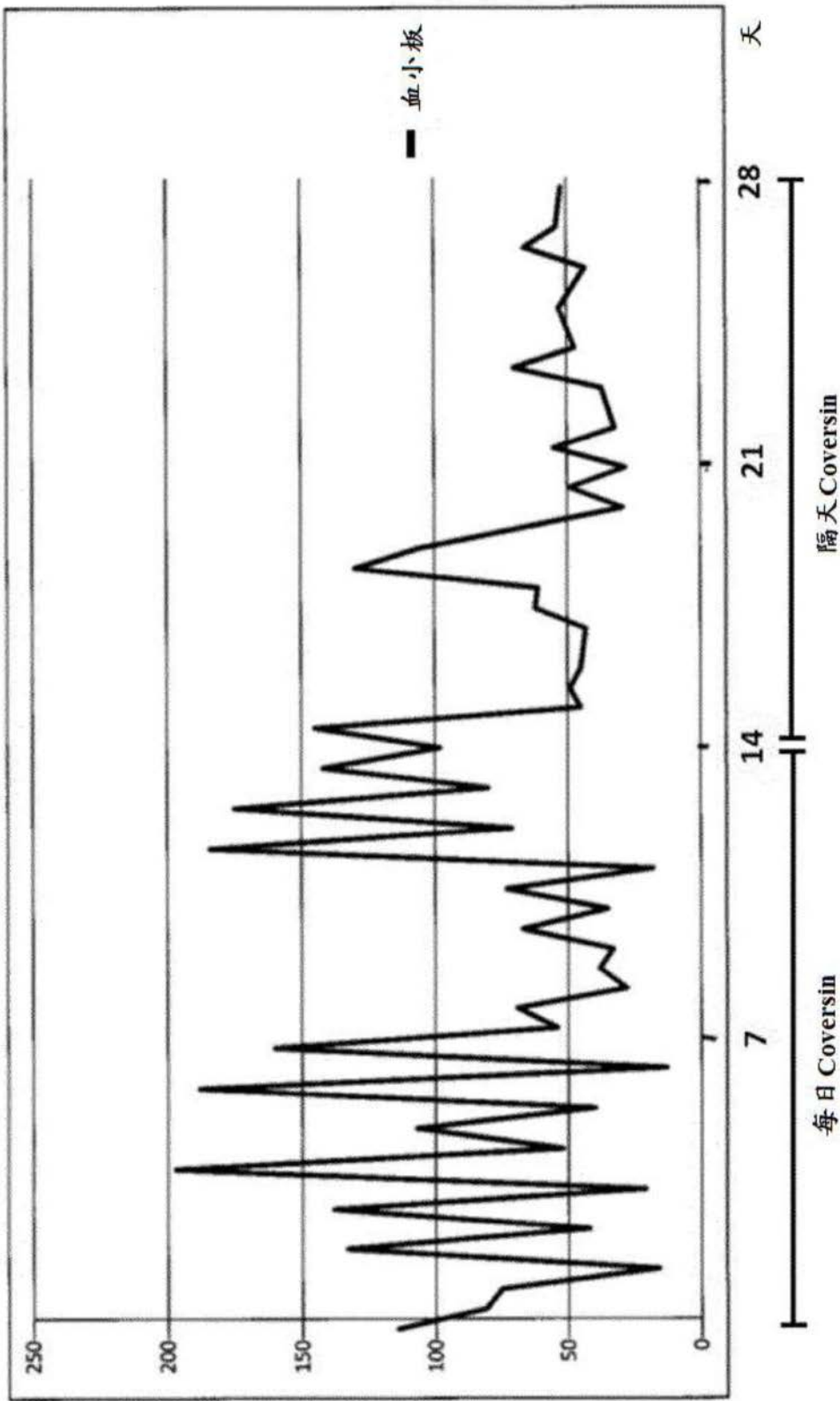


图3

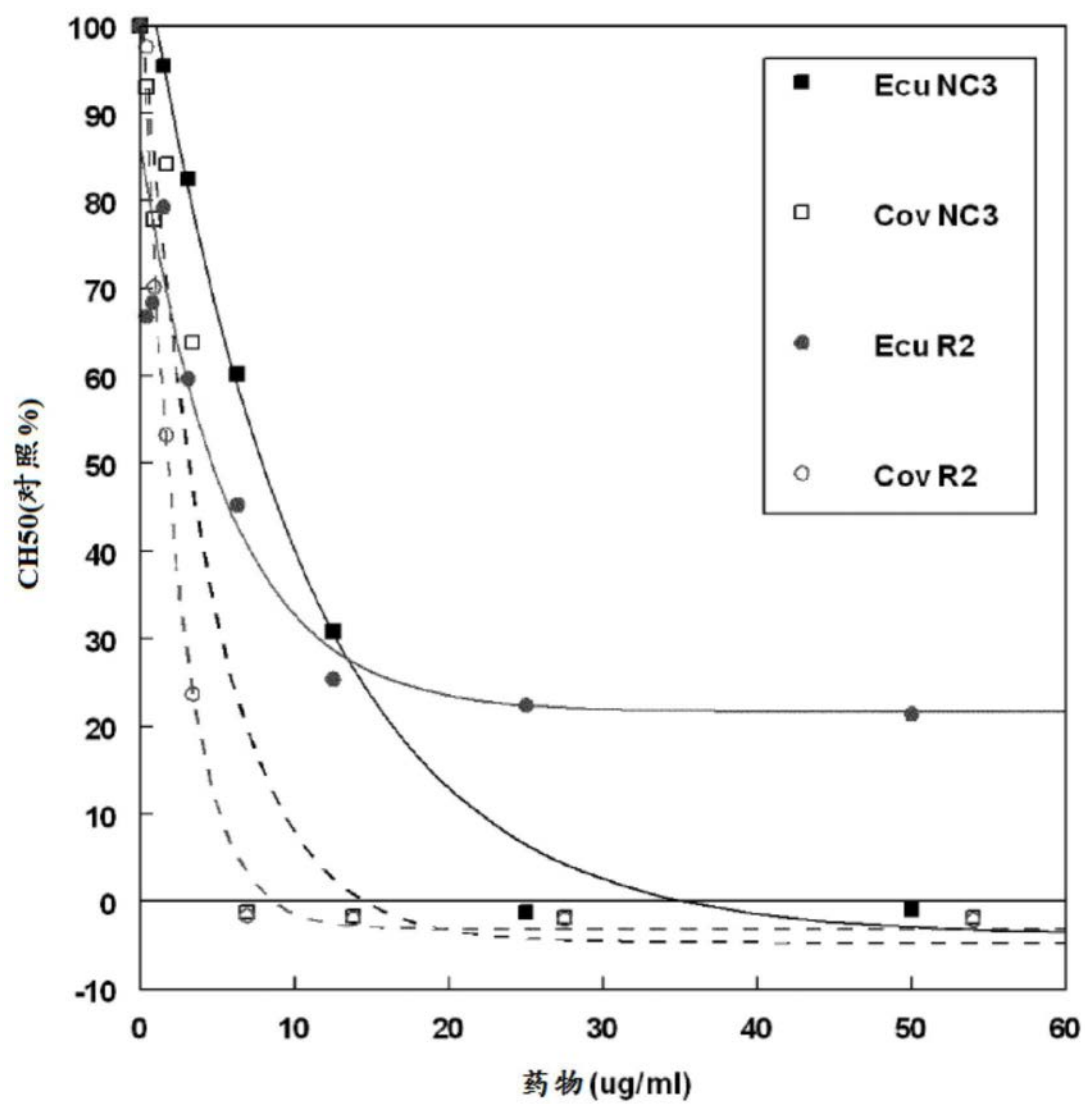


图4

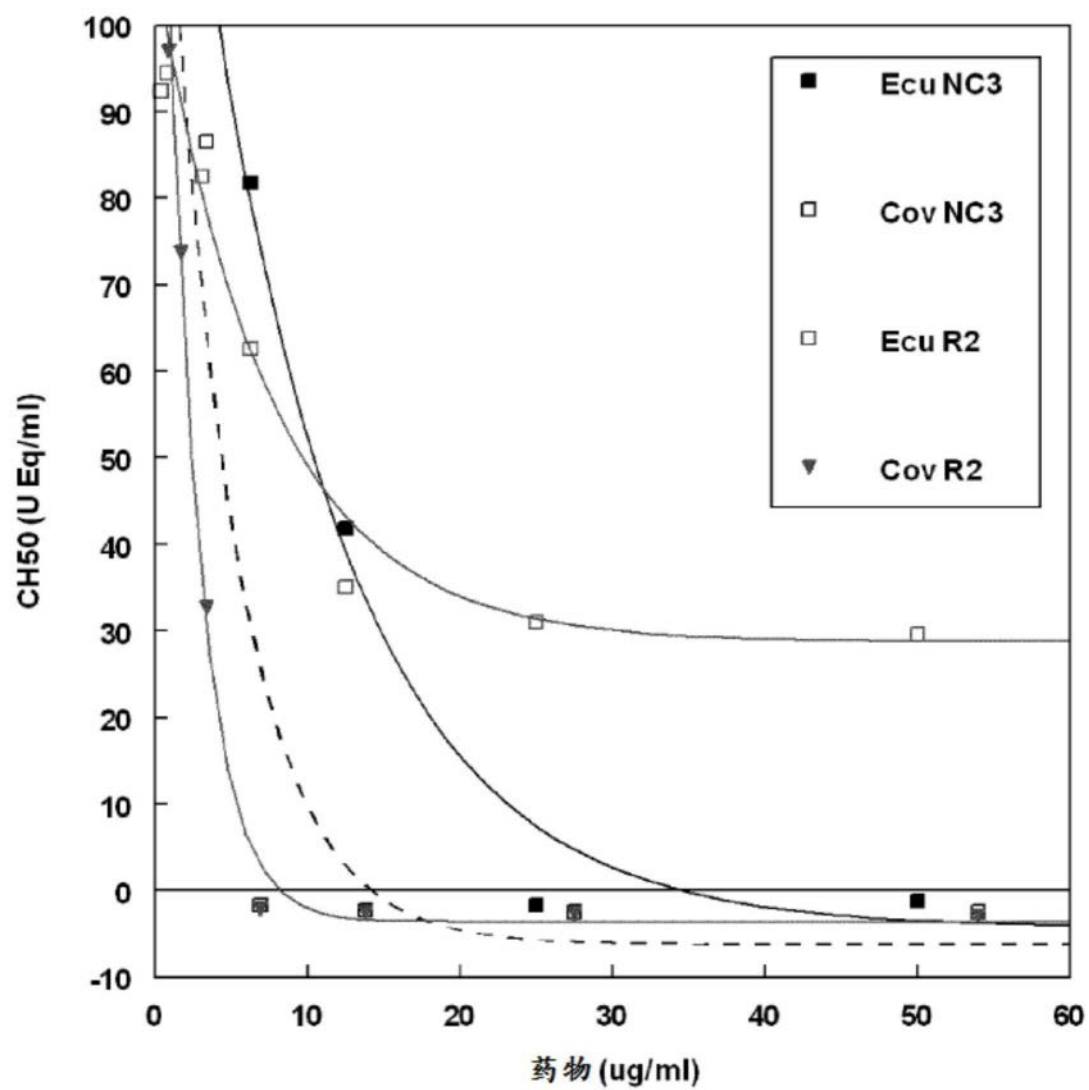


图5

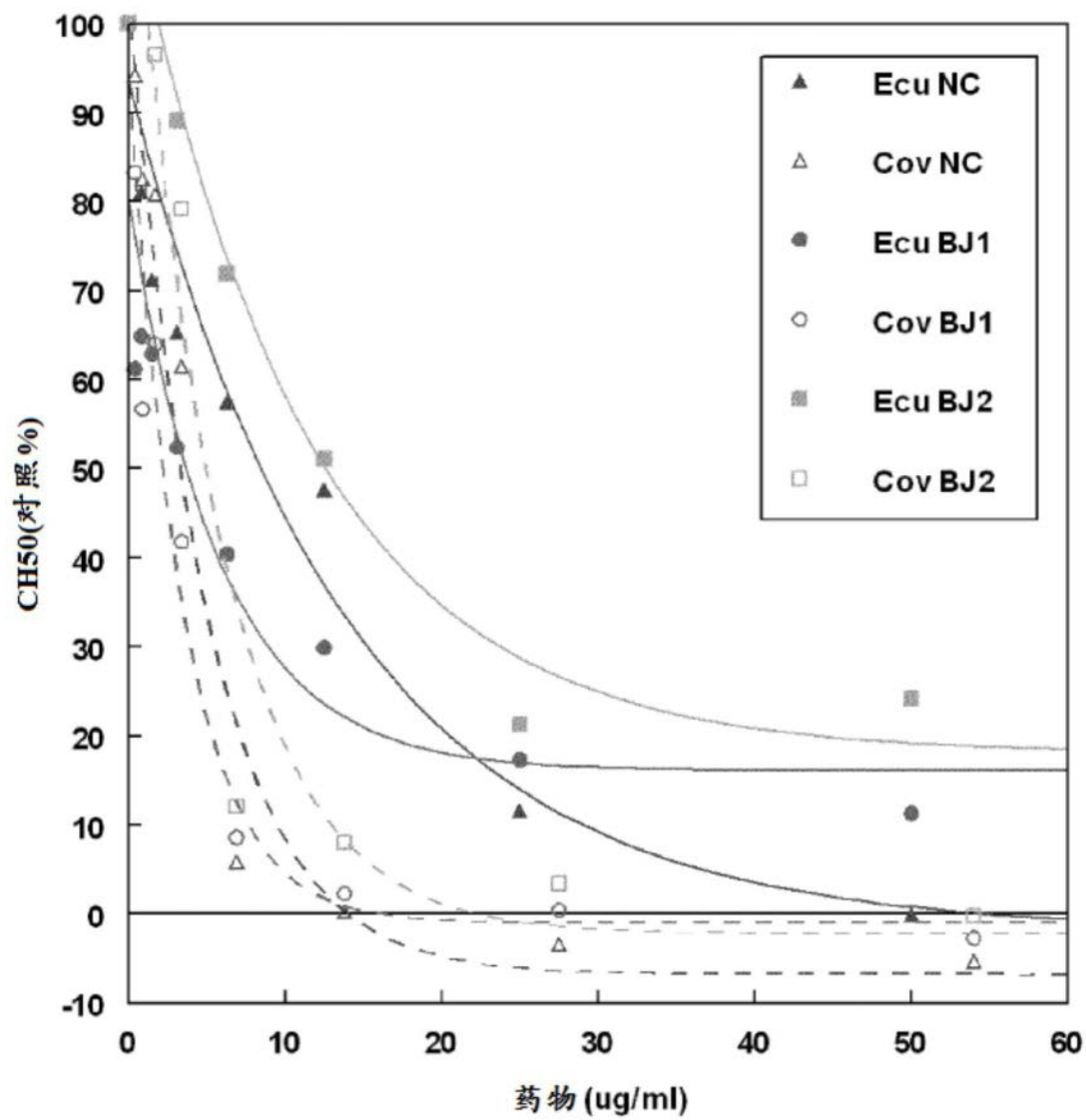


图6

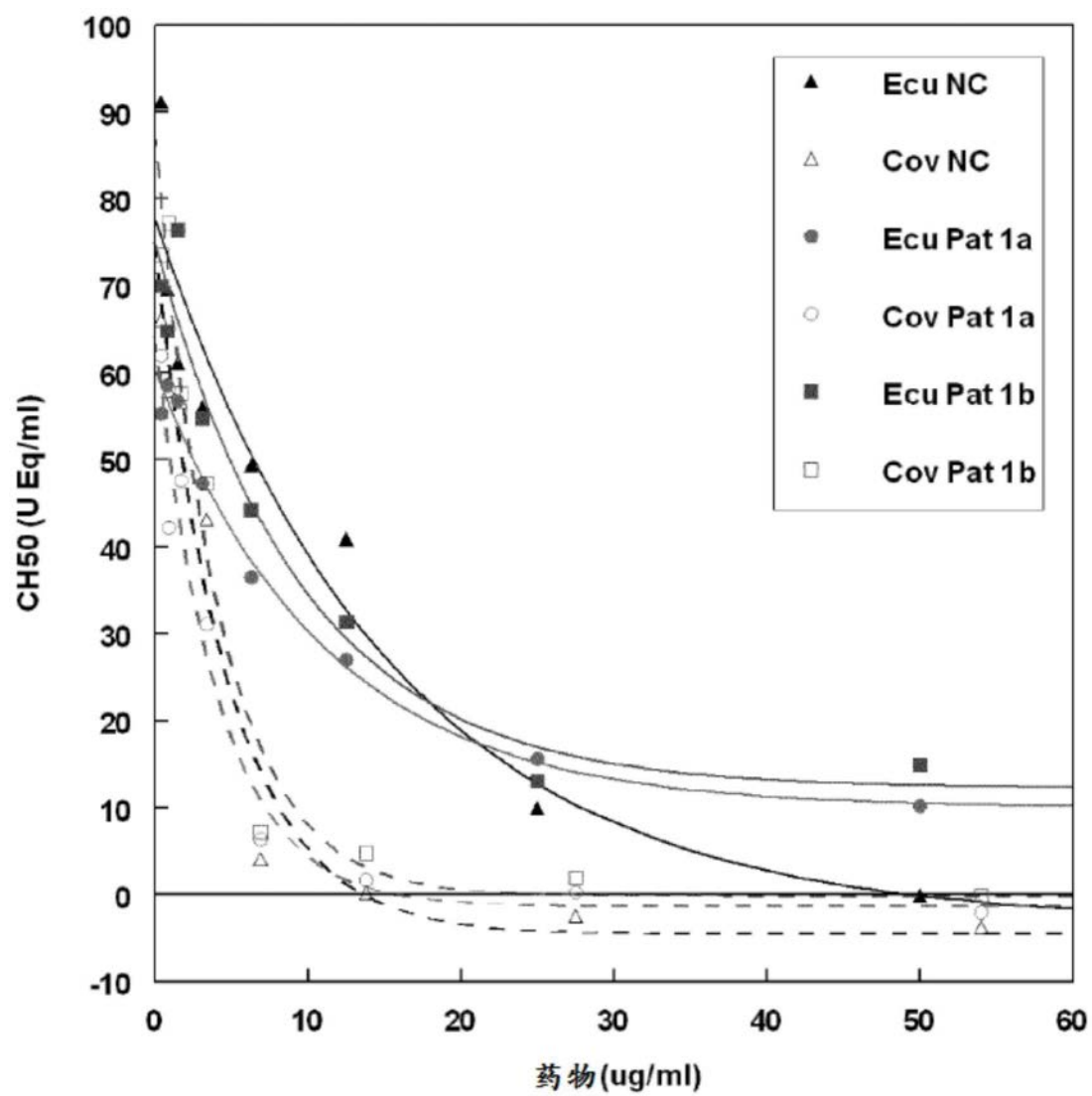


图7

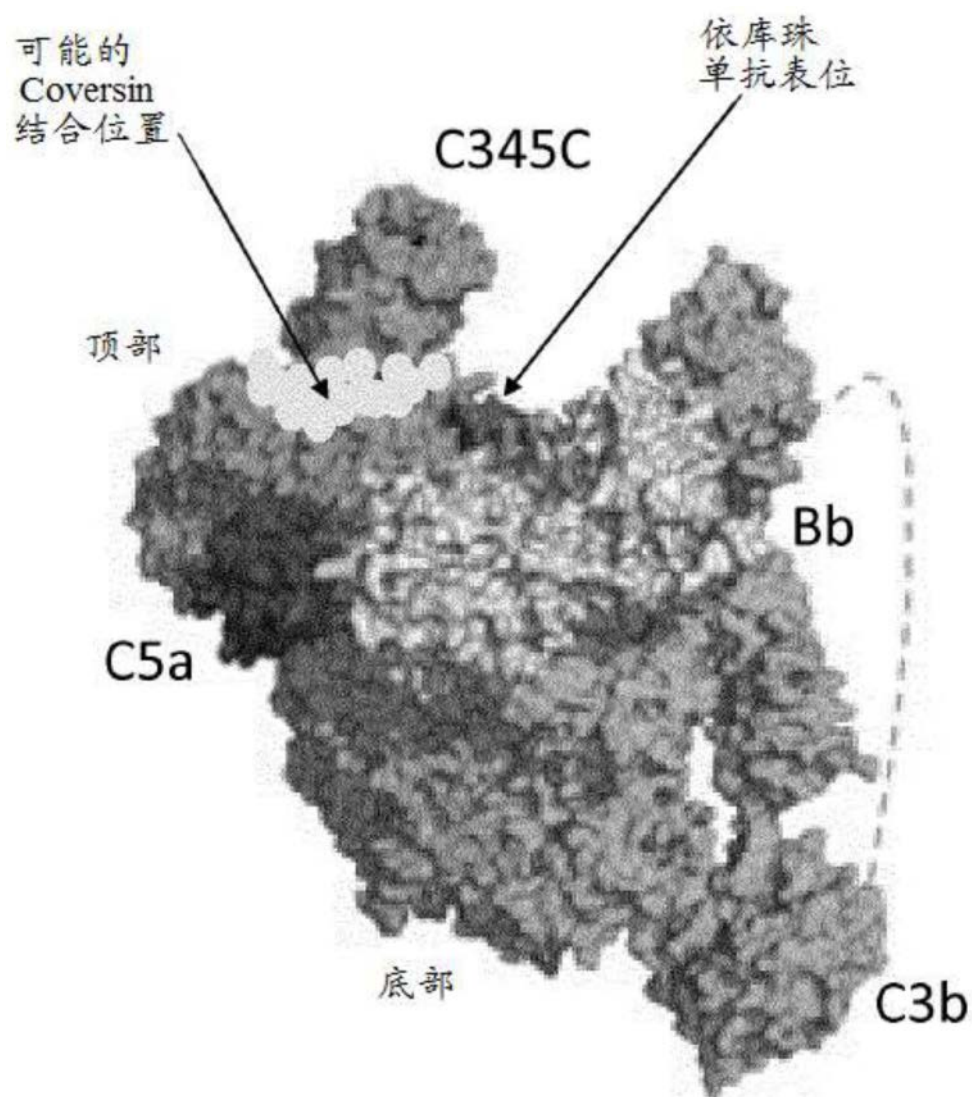


图8