



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102209557 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 05

(21) 申请号 200980144618. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 09. 14

A61K 39/395 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12P 21/08 (2006. 01)

61/096, 563 2008. 09. 12 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 05. 09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/056809 2009. 09. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02010/030979 EN 2010. 03. 18

(71) 申请人 埃克斯生物科技公司

地址 加拿大温哥华

(72) 发明人 J·西马德

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 申基成 郑霞

权利要求书 1 页 说明书 11 页

序列表 10 页

(54) 发明名称

靶向病原性单核细胞

(57) 摘要

本发明基于白细胞介素-1 α (IL-1 α) 在促炎性 CD14+CD16+ 单核细胞亚群上表达的发现。重要地, 由于 IL-1 α 表现为几乎仅在这种单核细胞亚群而不在其他白细胞上表达, IL-1 α 代表着靶向 CD14+CD16+ 单核细胞亚群的理想标记。消除这种病原性细胞或在这种细胞类型中调节 IL-1 α 的功能的剂的有效性可通过评估 CD14+CD16+ 单核细胞的水平或功能性来进行监测。

1. 一种方法,该方法包括以下步骤:
 - (a) 向人类受试者施用调节 IL-1 α 的功能或表达的剂;和
 - (b) 确定这种施用是否调节受试者中 CD14+CD16+ 单核细胞的量或功能。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述调节 IL-1 α 的功能或表达的剂是干扰 IL-1 α 结合 IL-1 α 受体的剂。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述剂是与 IL-1 α 特异性结合的抗体。
4. 如权利要求 3 所述的方法,其中所述抗体是与 IL-1 α 特异性结合的单克隆抗体。
5. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述单克隆抗体是人类抗体。
6. 如权利要求 5 所述的方法,其中所述人类抗体是 IgG1。
7. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述人类抗体具有含有 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的重链和含有 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列的轻链。
8. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述人类受试者具有与 CD14+CD16+ 单核细胞的异常功能或水平相关的病状。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述病状是炎性病征。
10. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述病状是自身免疫性病征。
11. 如权利要求 1 所述的方法,其中在所述剂施用前所述人类受试者的外周血白细胞的至少 1.5% 是 CD14+CD16+ 单核细胞,且在所述剂施用后所述人类受试者的外周血白细胞的低于 1.5% 是 CD14+CD16+ 单核细胞。
12. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述剂的施用导致全血分类计数中 CD14+CD16+ 单核细胞百分比至少 10% 的降低。
13. 如权利要求 1 所述的方法,其中确定这种施用是否调节所述受试者中 CD14+CD16+ 单核细胞的量或功能的所述步骤包括在所述剂施用前和施用后评估所述受试者的 CD14+CD16+ 单核细胞的功能。
14. 如权利要求 13 所述的方法,其中所述剂的施用导致 CD14+CD16+ 单核细胞的功能至少 10% 的降低。
15. 一种方法,该方法包括以下步骤:
 - (a) 确定患有疾病或病理性疾患的人类受试者具有促成所述疾病或病理性疾患的 CD14+/CD16+ 单核细胞;
 - (b) 向所述人类受试者施用调节 IL-1 α 功能或表达的剂;和
 - (c) 确定这种施用是否调节所述受试者中 CD14+CD16+ 单核细胞的量。
16. 与 IL-1 α 特异性结合的抗体用于制备调节受试者中 CD14+CD16+ 单核细胞的量或功能的药物的应用。

靶向病原性单核细胞

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2008 年 9 月 12 日提交的美国临时专利申请第 61/096,563 号的优先权。

[0003] 关于联邦政府资助的研究的声明

[0004] 不适用。

发明领域

[0005] 本发明总体涉及免疫学、白细胞生物学、炎症、癌症、血管疾患和医药领域。更具体地,本发明涉及决定治疗选择的方法、评估治疗效力的方法,和靶向疾病相关白细胞而不导致高发病率或全身性免疫抑制的方法。背景

[0006] 白细胞 (leukocytes), 或白细胞 (white blood cells), 是保护机体免受炎性疾病和毒素侵害的免疫系统的细胞。人类中有几种不同的且功能各异的白细胞的种类, 但所有白细胞都来源于共同的骨髓源性多能干细胞。在健康人中每毫升血液中有大约 8×10^6 个白细胞。这些白细胞由嗜碱性粒细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞和单核细胞组成。单核细胞级分仅占有所有白细胞的大约 2-8%。

[0007] 在十九世纪中期医师首次观察到巨噬细胞, 当时这些细胞在战场伤口中被描述且与慢性炎症领域相关。此后这些细胞的大量研究揭示了单核细胞 - 巨噬细胞系统发挥一些关键的功能: 在组织的维持和修复中; 免疫调节; 和在病原体的控制和消除中。

[0008] 单核细胞仅在血液中暂时停留。在骨髓中发育后, 单核细胞在血流中循环, 在那里它们的半衰期为几天。在急性炎症反应期间, 半衰期可能仅为几个小时。单核细胞由血液迁出进入到组织中与细胞体积的增大和表明 RNA 强表达的较大、较浅染色的细胞核有关。这些组织渗入型的细胞被称作巨噬细胞 (或组织细胞)。这些细胞是吞噬性的和移动的。

[0009] 当单核细胞在不同的组织中定居时, 它们可在那里持续数年。在脾中, 巨噬细胞参与衰老红细胞的再循环; 在皮肤中 (朗氏细胞 (Langerhans cells)), 它们参与表皮的角质化; 在肝中 (Kupfer 细胞), 它们管理着毒素的降解; 在动脉的内膜中 (泡沫细胞), 它们参与动脉粥样硬化斑块的形成; 在关节中, 它们分化成参与关节的维持的细胞 (A 型滑膜细胞); 在淋巴结中, 它们作为抗原呈递细胞行使功能 (树突细胞), 刺激适应性免疫应答; 在骨中, 它们调节骨量的再吸收 (破骨细胞); 而在中枢神经系统中 (神经胶质细胞), 它们作为岗哨细胞发挥作用并参与神经内分泌稳态。单核细胞和它们分化的细胞过去普遍被称为网状内皮系统。虽然这种叫法不再普遍, 但这种命名法强调了单核细胞在组织和器官系统的稳态中的多种作用。

[0010] 单核细胞为在组织中行使其众多功能, 首先必须从血管中离开并进入组织。为实现该目的, 单核细胞一旦被激活后, 黏着在血管壁的内皮细胞上并外渗、或渗透形成血管壁的细胞基质。这种外渗过程并不是单核细胞独有的。黏着的分子机制涉及黏着分子 CD11a、CD11b、CD11c/CD18, 对几乎所有单核细胞以及淋巴细胞和嗜中性粒细胞是共同的。因为白细胞外渗到组织中是许多疾病过程中的第一步, 所以利用抗体进行了阻止该过程的尝试。

但需要特别注意的是不能造成该过程的全身性阻碍。被称为白细胞黏附缺陷 (LAD) 的人类遗传病,是 CD11/CD18 系统的缺陷,导致了严重的免疫抑制。患有 LAD 的个体如果不受保护免受病原体的侵害会死于机会性感染。因此对该过程非常有选择性的阻碍是可接受的。一种这样的治疗涉及抗体依法利珠单抗 (Efalizumab) 的使用,该抗体靶向 CD11c,CD11c 在诸如 T 淋巴细胞的某些白细胞亚群上以 CD11c/CD18 表达。但是,还未设计出选择性阻碍单核细胞功能的方法。

[0011] 与其他白细胞相区别的是,单核细胞代表着独特的细胞划分。单核细胞本身是功能上多样的细胞群体。在人类中,这些群体基于细胞表面标记的表达可通常分为两组:(1) 定义为 CD14 高表达的主要群体 (CD14++) 和 (2) 定义为 CD14 和 CD16 共表达的次要群体 (CD14+CD16+)。后者称为单核细胞的促炎性亚群且与包括动脉粥样硬化、癌症、类风湿性关节炎和阿尔茨海默病的大量炎症相关疾病有关。

[0012] 已尝试了从患者中去除促炎性 CD14+CD16+ 单核细胞的涉及白细胞去除 (leukocytapheresis) 的治疗策略。例如,CD14+CD16+ 单核细胞的体外消除成功治疗了溃疡性结肠炎 (Kanai 等人, *Inflamm. Bowel Dis.* 2007 Mar ;13(3) :284-90)。然而,该方法对患者导致了高发病率和风险,并不适宜于慢性病的治疗。并且,白细胞去除并不是 CD14+CD16+ 单核细胞高度选择性的,而是消除绝大部分的单核细胞群体。因此,白细胞去除并不适宜于治疗需要持续的、长期的消除的疾病,因为这预期会导致危险的免疫抑制。而需要靶向 CD14+CD16+ 的高度选择性方法。

[0013] 优选的方法将是利用特异性下调 CD14+CD16+ 促炎性单核细胞亚群功能的剂选择性地靶向该亚群。迄今为止,还未鉴定出任何精确靶向这些细胞的实用方法。虽然这些细胞的特征是 CD14 和 CD16 表面蛋白的表达,但是这些并不适于靶向治疗。因为 CD14 由所有的单核细胞以及诸如嗜中性粒细胞的其他细胞群体所表达,所以它不是合适的靶标。对 CD14 表达细胞的整个群体的功能进行调节将导致不可接受的严重免疫抑制的风险。靶向 CD16 (FcγRIII) 也并不合适,因为它除在单核细胞上表达外,还在包括 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的其他大量重要的免疫细胞上表达。因此,缺乏靶向这些 CD14+CD16+ 单核细胞的良好标记。

[0014] 概述

[0015] 本发明基于白细胞介素 -1α (IL- 1α) 在人类中在促炎性的、疾病相关的 CD14+CD16+ 单核细胞亚群上表达的发现。重要地,因为 IL- 1α 表现为几乎仅在这种单核细胞亚群上表达,IL- 1α 代表着靶向 CD14+CD16+ 单核细胞亚群的理想标记。并且,这个发现允许通过评估 CD14+CD16+ 单核细胞的水平或功能性而对消除这种病原性细胞或在这种细胞类型中调节 IL- 1α 的功能的剂的有效性进行监测。

[0016] 因此,本发明以包括以下步骤的方法为特征:(a) 向人类受试者施用调节 IL- 1α 的功能或表达的剂;和 (b) 确定这种施用是否调节受试者中 CD14+/CD16+ 的量或功能。该方法还可包括首先确定受试者是否具有促成疾病或病理性疾患的量的 CD14+/CD16+ 单核细胞和/或是否受试者的 CD14+/CD16+ 单核细胞的功能属性促成疾病或病理性疾患的步骤。

[0017] 本发明还以包括以下步骤的方法为特征:(a) 确定人类受试者是否具有促成疾病或病理性疾患的量的 CD14+/CD16+ 单核细胞;和 (b) 向人类受试者施用调节 IL- 1α 的功能或表达的剂。这种方法还可包括步骤 (c) 确定这种施用是否调节受试者中 CD14+CD16+ 单

核细胞的量。

[0018] 还在本发明内的是包括以下步骤的方法：(a) 确定人类受试者的 CD14+/CD16+ 单核细胞的功能属性是否促成疾病或病理性疾患；和 (b) 向人类受试者施用调节 IL-1 α 的功能或表达的剂。这种方法还可包括步骤 (c) 确定这种施用是否调节受试者中 CD14+CD16+ 单核细胞的功能。

[0019] 在这些方法中，调节 IL-1 α 的功能或表达的剂可以是干扰 IL-1 α 结合 IL-1 α 受体的剂或调节编码 IL-1 α 的核酸的转录或翻译的水平剂。例如，剂可以是特异性结合 IL-1 α 或 IL-1 α 受体的抗体 (Ab)。Ab 可以是当向受试者施用降低受试者中 CD14+CD16+ 单核细胞的量或功能的抗体。

[0020] Ab 可以是单克隆抗体 (mAb)，例如，特异性结合 IL-1 α 的 mAb。抗体可以是人类 Ab，比如特异性结合 IL-1 α 的单克隆人类 IgG1 (例如，具有包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的重链和包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的轻链的抗体；或具有包括 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的重链和包括 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的轻链的抗体)。

[0021] 在这些方法中，调节 IL-1 α 的功能或表达的剂还可以是提高受试者中与 IL-1 α 或 IL-1 α 受体特异性结合的 Ab 的浓度的疫苗，或降低或调节受试者中 IL-1 α 表达的核酸。

[0022] 人类受试者可以是患有与 CD14+CD16+ 单核细胞的异常功能或水平相关的病状的人。例如，病状可以是炎性病或自身免疫性病，诸如癌症、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎或炎性肠病。人类受试者还可以是在剂施用之前外周血中具有异常高水平的 CD14+CD16+ 单核细胞白细胞 (例如，在全血分类计数中为白细胞总数的至少 1.5%) 的人，或在剂施用后外周血白细胞中具有正常或低于正常水平的 CD14+CD16+ 单核细胞 (例如，在全血分类计数中低于白细胞总数的 1.5%) 的人。人类受试者还可以是在剂施用之前外周血单核细胞中具有异常高水平的 CD14+CD16+ 单核细胞 (例如，单核细胞的至少 10% 是 CD14+CD16+) 的人。

[0023] 在这些方法中，确定这种施用是否调节受试者中 CD14+CD16+ 单核细胞的量或功能的步骤可包括在施用前和施用后确定受试者的 CD14+CD16+ 单核细胞的量 (例如，数量、全血分类计数中白细胞总数的百分比、浓度和 / 或与诸如 CD14++ 单核细胞的其他血细胞的比例) 和 / 或在施用前和施用后评估受试者的 CD14+CD16+ 单核细胞的功能 (例如，评估与诸如人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 等内皮细胞的结合)。

[0024] 除非另外指定，否则本文所用的所有技术术语具有与本发明所属领域中一般技术人员所通常理解的相同的含义。生物学术语的常规理解定义可见于 Rieger 等人, Glossary of Genetics: Classical and Molecular (遗传学词汇表: 经典的和分子的), 第 5 版, Springer-Verlag: New York, 1991; 和 Lewin, Genes V (基因 V), Oxford University Press: New York, 1994。

[0025] 术语“抗体”的意思是免疫球蛋白以及通过完整的免疫球蛋白的酶促消化制备的或通过分子生物学中的技术制备的免疫球蛋白的任何部分或片段。该术语还指含有免疫球蛋白 (或其部分或片段) 的混合物比如抗血清。

[0026] 如本文所用的，术语“人类抗体”或“人类 Ab”通常指在人类中为基本上非免疫原性的免疫球蛋白 (Ig)。

[0027] 如本文所用的术语“特异性结合”，当涉及多肽（包括 Ab）或受体时，指在蛋白和其他生物制品的混杂群体中确定蛋白或多肽或受体的存在的结合反应。因此，在指定条件下（例如，就抗体而言的免疫分析条件），具体的配体或 Ab 结合其特定的“靶标”并且不以大量与样品中存在的其他蛋白或在生物体中可能与配体或抗体接触的其他蛋白相结合。通常，与第二种分子“特异性结合”的第一种分子对于第二种分子具有大于大约 10^5 （例如， 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 和 10^{12} 或以上）升 / 摩尔的平衡亲和常数。

[0028] 当提到诸如 Ab 的蛋白分子时，“纯化的”意思是与天然伴随这些分子的组分分离。典型地，当 Ab 或蛋白为以重量计至少约 10%（例如，9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.9% 和 100%）地不含非 Ab 蛋白或与之天然缔合的其他天然存在的有机分子时，Ab 或蛋白是纯化的。纯度可通过任何适合的方法测量，例如，柱色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳、HPLC 分析或其他适宜的方法。在除其天然存在的细胞类型以外的细胞类型中产生的化学合成的蛋白或其他重组蛋白为“纯化的”。

[0029] 以下描述了适宜的方法和材料，虽然与本文所描述的相似或相同的方法和材料可用于本发明的实践或检验。本文所提到的所有出版物以其整体通过引用并入。如有冲突，将以本说明书包括定义为准。此外，以下所讨论的特定实施方案仅为例证性的而非限制性的。

[0030] 详述

[0031] 本发明包括用于评估向人类受试者施用 IL-1 α 靶向剂是否调节受试者中 CD14+CD16+ 单核细胞的功能或量的方法。以下所描述的优选的实施方案示出了这些方法的适应性改变。但是，从这些实施方案的描述，本发明的其他方面可基于以下提供的描述来制备和 / 或实践。

[0032] 一般方法

[0033] 本文描述了涉及常规免疫学和分子生物学技术的方法。免疫学方法（例如，用于抗原 - Ab 复合物的检测和定位的分析、免疫沉淀、免疫印迹及类似方法）是本领域公知的并且在诸如 Current Protocols in Immunology（现代免疫学实验方案），Coligan 等人，编辑，John Wiley & Sons, New York 的方法学论著中描述。分子生物学的技术在诸如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual（分子克隆：实验室手册），第 2 版，第 1-3 卷，Sambrook 等人，编辑，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001；Current Protocols in Molecular Biology（现代分子生物学实验方案），Ausubel 等人，编辑，Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York 的论著中详细描述。Ab 方法在 Handbook of Therapeutic Antibodies（治疗性抗体手册），Dubel, S., 编辑，Wiley-VCH, 2007 中描述。血细胞分析的方法在 Flow Cytometry（流式细胞术），David Keren, American Society for Clinical Pathology（美国临床病理学会）；第 4 版，2007 和 Lichtman 等人，Williams Hematology（威廉姆斯血液学），McGraw-Hill Professional；第 7 版，2005 中描述。

[0034] 调节 IL-1 α 的功能和 / 或表达的剂

[0035] 本发明的多种方法以向人类受试者施用调节 IL-1 α 的功能或表达的剂的步骤为特征。可以使用调节 IL-1 α 的功能或表达的任何适宜的剂。所述剂，举例来说，可以是结合 IL-1 α 的剂、干扰 IL-1 α 结合 IL-1 α 受体的剂，或调节编码 IL-1 α 的核酸的转录或翻

译水平的剂。为数众多的这种剂是公知的,或可通过有经验的技术人员利用本文的教导或本领域中的知识而制备。这些包括特异性结合 IL-1 α 或 IL-1 α 受体的抗体(由此其阻碍了与 IL-1 α 的结合)、提高受试者中这种抗体的浓度的疫苗、IL-1 α 结合蛋白比如 IL-1 α 受体和其变体(例如,片段或氨基酸取代突变体)、结合 IL-1 α 的核酸(例如,适体)、特异性结合 IL-1 α 的小的有机分子、降低或调节 IL-1 α 表达的核酸,和以上的两种或更多(例如,2、3、4、5 或更多)种的组合。

[0036] 抗体

[0037] 在本发明的方法中有用的抗体包括那些,当将其施用给受试者时,调节(例如,降低)受试者中 CD14+CD16+ 单核细胞的量或功能的抗体。因为 CD14+CD16+ 单核细胞也表达 IL-1 α ,可使用特异性结合 IL-1 α 或 IL-1 α 受体的 Ab 来调节这种单核细胞的功能或量。抗 IL-1 α 抗体或抗 IL-1 α 受体 Ab 可以是多克隆的或是单克隆的。为避免非预期反应,在本发明的方法中使用的 Ab 优选地是人源化的或更优选地是人类的。

[0038] 本发明的方法优选地使用人类 mAb,该人类 mAb 包括(i)对人类 IL-1 α 表现出非常高结合亲和力的抗原结合可变区和(ii)通过 C1q 结合有效激活补体系统并且与几种不同的 Fc 受体有效结合的恒定区。人类 Ab 优选地为 IgG1。抗体的 Ka 优选地为至少 $1 \times 10^9 M^{-1}$ 或更高(例如,高于 $1 \times 10^{10} M^{-1}$)。人类 Ab 可包括包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的重链和包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的轻链;或具有包括 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的重链和包括 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的轻链的抗体。

[0039] 虽然一般较不优选,嵌合的抗 IL-1 α mAb(例如,“人源化的”mAb),即具有来源于不同动物种类的不同部分的抗原结合分子(例如,小鼠 Ig 的可变区与人类 Ig 的恒定区融合),也可用于本发明。这种嵌合抗体可通过本领域公知的方法来制备。例如, Morrison 等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:6851, 1984; Neuberger 等人, Nature, 312:604, 1984; Takeda 等人, Nature, 314:452, 1984。同样地,可通过本领域公知的方法对抗体进行人源化。例如,具有所需结合特异性的单克隆抗体可以是商业上人源化的,或如美国专利第 5,693,762 号;第 5,530,101 号;或第 5,585,089 号中所描述的。

[0040] 优选地,为保证高滴度的 Ab 可以最小的副作用施用给受试者,可用于本发明的 mAb 组合物为至少 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、95、96、97、98、99、99.9 或更高的重量百分比纯的(排除任何赋形剂)。Ab 组合物可仅包括 mAb 的单一类型(即,由单一克隆的 B 淋巴细胞系产生的 mAb)或可包括 mAb 的两种或更多种(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多)不同类型的混合物。

[0041] 为改进或增强它们的功能,可将 Ab 与诸如细胞毒素的另一种分子轭合。IL-1 α 特异性 Ab 可以与一种或多种细胞毒素轭合以更有效地杀伤表达 IL-1 α 的细胞。用于本发明的细胞毒素可以是能够轭合 mAb 的任何细胞毒性剂(例如,在与细胞接触后能够杀伤细胞的分子)。细胞毒素的例子包括,但不局限于,放射性核素(例如, ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{201}Tl 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{57}Cu 、 ^{213}Bi 和 ^{211}At),轭合放射性核素和化疗剂。细胞毒素的另外的例子包括,但不局限于,抗代谢物(例如,5-氟尿嘧啶(5-FU)、氨甲喋呤(MTX)、氟达拉滨(fludarabine)等)、抗微管剂(例如,长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicine)、紫杉烷类(taxanes)(比如紫杉酚(paclitaxel)和紫杉萜(docetaxel))等)、烷化剂(例如,环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥、双氯乙亚硝脲(BCNU)等)、铂

剂(例如,顺铂(也称作 cDDP)、碳铂、奥沙利铂(oxaliplatin)、JM-216、CI-973 等)、葱环类(例如,阿霉素(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)等)、抗生素剂(例如,丝裂霉素-C)、拓扑异构酶抑制剂(例如,依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)和喜树碱(camptothecins)或其他细胞毒性剂比如蓖麻毒素(ricin)、白喉毒素(diphtheria toxin(DT))、假单胞菌外毒素(Pseudomonas exotoxin(PE))A、PE40、相思豆毒蛋白(abrin)、皂草毒蛋白(saporin)、美国商陆病毒蛋白(pokeweed viral protein)、溴化乙锭、糖皮质激素、炭疽毒素(anthrax toxin)和其他。参见,例如,美国专利第 5,932,188 号。

[0042] 疫苗

[0043] 在所述方法中,调节(例如,抑制)IL-1 α 的功能或表达的剂还可以是提高受试者中与 IL-1 α 特异性结合的抗体的浓度的疫苗。适宜的疫苗可包括药学上可接受的载体中的 IL-1 α 的免疫原性形式。还可包括佐剂比如铝盐。IL-1 α 的免疫原性形式可包括完整的蛋白或这种蛋白的肽片段。为增强免疫反应,IL-1 α 的免疫原性形式可以与诸如匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)或假单胞菌外毒素的载体蛋白相轭合。可以收集疫苗施用而产生的 Ab 并按以上所描述的进行使用。

[0044] 调节 IL-1 α 的蛋白和模拟物

[0045] 通过直接靶向而调节 IL-1 α 表达和/或功能的蛋白的例子包括 IL-1 受体(IL-1R),比如 IL-1RI、IL-1RII 和其 IL-1 α 结合变体(例如,其重组形式、片段、模拟物、突变体和轭合物)。IL-1R 的可溶形式因其易于施用而是优选的。能够间接调节 IL-1 α 表达和/或功能的蛋白的例子包括能够与单核细胞相关的 IL-1 α 竞争诸如 IL-1R 的结合配体的蛋白(例如,不转导激活信号的那些蛋白)。这些可包括修饰的非激活的 IL-1 α (包括原 IL-1 α 、膜相关 IL-1 α 和重组 IL-1 α)、修饰的非激活的 IL-1 β (包括原 IL-1 β 和成熟 IL-1 β)、IL-1 受体拮抗物(IL-1Ra;包括可溶 IL-1Ra、icIL-1RaI 和 icIL-1RaII),和它们的变体。

[0046] 蛋白(包括 Ab)变体可通过本领域公知的多种技术来生成。例如,IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra 和 IL-1R 变体可通过诱变来制备,比如通过导入离散点突变、或通过平截。突变能够生成与这些蛋白的功能活性基本相同的蛋白变体,或仅具有这些蛋白的功能活性的亚群的蛋白变体。其他可生成的蛋白变体包括抗蛋白酶剪切的那些蛋白,例如,由于突变改变了蛋白酶靶标序列。肽的氨基酸序列中的改变是否产生了具有天然蛋白的一种或多种功能活性的蛋白变体,可易于通过检验变体的天然蛋白功能活性而确定。调节 IL-1 α 表达或功能的以上这些的非肽模拟物或化学修饰形式也可以被使用。参见,例如,Freidinger 等人的 Peptides:Chemistry and Biology(肽:化学和生物学),G. R. Marshall 编辑,ESCOM Publisher:Leiden, Netherlands, (1988);Ewenson 等人(1986)J. Med. Chem. 29:295;Ewenson 等人的 Peptides:Structure and Function(肽:结构和功能)(Proceedings of the 9th American Peptide Symposium(第 9 届美国肽专题讨论会会议录));Nagai 等人(1985)Tetrahedron Lett 26:647;Sato 等人(1986)J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1:1231);Gordon 等人(1985)Biochem. Biophys. Res. Commun. 126:419;和 Dann 等人(1986)Biochem. Biophys. Res. Commun. 134:71。前述这些也可通过与诸如糖基基团、脂质、磷酸盐、乙酰基基团及类似的其他化学基团形成共价键或聚集轭合物从而被化学修饰以生成衍生物。蛋白的共价衍生物可通过将化学基团连接到蛋白的氨基酸侧链上的官能团或多肽的 N-末端的或

C-末端的官能团上而制备。为改进或增强它们的功能,前述的剂还可与诸如以上所列的细胞毒素中的一种或多种的另外的分子相耦合。

[0047] 调节 IL-1 α 的核酸

[0048] 调节 IL-1 α 的表达/活性的剂还可以是核酸。例如,核酸可以是编码 IL-1 α 蛋白的有义核酸(例如,导入到细胞中可提高细胞 IL-1 α 活性)。核酸还可以是与编码 IL-1 α 的 mRNA 杂交从而抑制翻译并降低蛋白表达的反义核酸。在本发明中使用的反义核酸分子是在细胞条件下以抑制 IL-1 α 蛋白表达的方式,例如,通过抑制转录和/或翻译,与编码 IL-1 α 蛋白的细胞 mRNA 和/或基因组 DNA 特异性杂交(例如,结合)的那些。结合可以通过常规碱基对互补,或,例如,在与 DNA 双链体结合的情况下,通过在双螺旋的大沟中的特异性相互作用来进行。

[0049] 反义构建物可作为表达质粒来递送,当其在细胞中被转录时,产生与编码 IL-1 α 蛋白的细胞 mRNA 的至少一个独特的部分互补的 RNA。可选地,反义构建物可采用离体生成的寡核苷酸探针的形式,当将其导入到表达 IL-1 α 蛋白的细胞中时,通过与编码 IL-1 α 蛋白的 mRNA 和/或基因组序列杂交而导致 IL-1 α 蛋白表达的抑制。这种寡核苷酸探针优选地是对诸如核酸外切酶和/或核酸内切酶的内源性核酸酶具有抗性的修饰的寡核苷酸,因此在体内是稳定的。用作反义寡核苷酸的示例性的核酸分子是 DNA 的氨基磷酸酯、硫代磷酸酯和甲基膦酸酯类似物(参见,例如,美国专利第 5,176,996 号;第 5,264,564 号和第 5,256,775 号)。

[0050] 可在体内将核酸分子递送到表达 IL-1 α 的细胞中。已开发出用于将 DNA 或 RNA 递送到细胞中的大量方法。例如,可通过诸如电穿孔、脂质体介导的转染、CaCl₂ 介导的转染的标准技术或通过基因枪的使用将这种分子直接导入到靶位点。可选地,可使用设计为靶向目的细胞的修饰的反义分子(例如,与特异性结合靶标细胞表面表达的受体或抗原的肽或抗体连接的反义分子)。因为经常难以达到足以抑制内源性 mRNA 翻译的反义分子的细胞内浓度,优选的方法利用重组的 DNA 构建物,其中将反义寡核苷酸置于强启动子(例如,CMV 启动子)的调控之下。利用这样的构建物转化细胞会导致足量的单链 RNA 的转录,该单链 RNA 将与内源性 IL-1 α 转录物形成互补碱基对且因此阻止 IL-1 α mRNA 的翻译。

[0051] 还可使用设计为催化裂解 IL-1 α mRNA 转录物的核酶分子以阻止 IL-1 α mRNA 的翻译和 IL-1 α 蛋白的表达(参见,例如,PCT 专利公开第 WO 90/11364 号,1990 年 10 月 4 日公开;Sarver 等人,Science 247:1222-1225,1990 和美国专利第 5,093,246 号)。优选地对核酶进行工程改造以使裂解识别位点位于 IL-1 α mRNA 的 5' 端;即,提高效率并使非功能性的 mRNA 转录物的胞内积聚最小化。可利用载体将本发明的核酶递送到细胞。

[0052] 利用定向的同源重组可通过使 IL-1 α 基因或其启动子失活或“敲除”IL-1 α 基因或其启动子而降低内源性的 IL-1 α 基因表达。参见,例如,Kempin 等人,Nature 389:802(1997);Smithies 等人,Nature 317:230-234,1985;Thomas 和 Capecchi,Cell 51:503-512,1987;和 Thompson 等人,Cell 5:313-321,1989。例如,可使用突变体,即侧翼具有内源性 IL-1 α 基因(IL-1 α 基因的编码区或调控区)同源 DNA 的非功能性的 IL-1 α 基因变体(或完整的无关 DNA 序列),且具有或不具有选择性标记物和/或负向选择性标记物,来转染细胞以在体内表达 IL-1 α 蛋白。

[0053] 可选地,可通过靶向与 IL-1 α 基因的调控区(即,IL-1 α 启动子和/或增强子)互

补的脱氧核糖核苷酸序列以形成在靶标细胞中阻止 IL-1 α 基因转录的三螺旋结构从而降低内源性的 IL-1 α 基因表达。(通常参见, Helene, C, *Anticancer Drug Des.* 6(6) :569-84, 1991 ; Helene, C, 等人, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660 :27-36, 1992 ; 和 Maher, L. J., *Bioassays* 14(12) :807-15, 1992)。还可利用 RNA 干扰 (RNAi) 技术进行 IL-1 α 基因表达的抑制。

[0054] 结合 IL-1 α 的核酸 (适体)

[0055] 本发明中还可使用通过重复几轮选择而被工程改造 (例如, 通过 SELEX ; 通过指数富集的配体系统进化) 为结合 IL-1 α 的适体或核酸物质来调节 IL-1 α 的功能。抗特异性标记物的适体的制备和使用的方法在例如以下中描述, 美国专利第 5, 670, 637 号 ; 第 6, 331, 398 号和第 5, 270, 163 号 ; 第 5, 567, 588 号。

[0056] 调节 IL-1 α 表达 / 功能的小分子

[0057] 小分子 (通常是有机小分子) 也可调节 IL-1 α 表达或功能。可使用已知具有抗炎作用的小分子诸如皮质甾类、环氧合酶抑制物、利诺胺 (linomide (roquinimex (罗喹美克)))、沙利度胺 (thalidomide)、己酮可可碱 (pentoxifylline) 和金雀异黄素 (genistein)。其他分子可通过筛选小分子库来鉴定以鉴定出在单核细胞中调节 (上调或下调) IL-1 α 表达的那些分子。

[0058] 确定剂的施用是否调节受试者中 CD14+CD16+ 单核细胞的量

[0059] 本发明的一种方法以确定调节 IL-1 α 表达和 / 或功能的剂的施用是否调节受试者中 CD14+CD16+ 单核细胞的量的步骤为特征, 该方法可包括在施用前和施用后确定受试者的 CD14+CD16+ 单核细胞的量 (例如, 数量、全血分类计数中白细胞的百分比、浓度、与诸如 CD14++ 单核细胞的其他血细胞的比例)。可通过任何适宜的方法确定施用前和施用后受试者的 CD14+CD16+ 单核细胞的量。例如, 可从人类受试者中分离外周血单核细胞 (PBMC) 且然后利用对 CD14 和 CD16 特异性的抗体对其进行流式细胞术处理。还可对外周血细胞离心以浓缩细胞, 并且可用免疫组织化学技术来鉴定和定量 CD14+CD16+ 群体。

[0060] 确定剂的施用是否调节受试者中 CD14+CD16+ 单核细胞的功能

[0061] 本发明的一种方法以确定 IL-1 α 靶向剂的施用是否调节受试者中 CD14+CD16+ 单核细胞的功能的步骤为特征, 该方法可包括在施用前和施用后评估受试者的 CD14+CD16+ 单核细胞的功能。可通过任何适宜的方法确定施用前和施用后受试者的 CD14+CD16+ 单核细胞的功能。例如, 可从人类受试者中收集的外周血单核细胞中分离 CD14+CD16+ 单核细胞。可利用黏附在人造膜基质上的人脐静脉内皮细胞将分离的单核细胞进行体外的结合和跨内皮迁移分析。参见, 例如, Etingin 等人, (1991) *Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA*, 88 : 7200-7203。

[0062] 可进行许多不同的分析以确定 CD14+CD16+ 单核细胞的功能特性。可对从患者中分离的白细胞在体外诱导促炎级联反应的能力进行检验。刺激滑膜细胞以上调 MCP-1 表达的能力、或刺激由 EL-4T 淋巴细胞系产生 IL-2 的能力就是两种这样的分析。这些细胞因子的诱导依赖于 CD14+CD16+ 单核细胞, 因此这些方法提供了确定目的为降低外周血中这些细胞的促炎活性的治疗的有效性的手段。

[0063] 为建立循环单核细胞的生物学和其从血液迁移到组织中的模型, 在体外利用已建立的细胞培养技术联合使用聚碳酸酯过滤器分析 (transwell 分析) 对这种迁移进行研究是本领域的标准技术。将原代内皮细胞源 (例如, HUVEC) 接种在聚碳酸酯过滤器 (支持基质)

上进行培养直到其形成汇合的单细胞层。像这样,这种方法模拟了血管维管结构的内皮。从人类血液中分离感兴趣的输入细胞(白细胞),并然后将其施加到 transwell 装置的上部室中。孵育阶段之后,除去 transwell 插入物并从下部室中收集迁移的细胞以进行分析。可使用流式细胞术分析计算迁移细胞的百分比并按照细胞表面蛋白标记物确定它们的分化表型。跨越诸如 HUVEC 的内皮障碍的白细胞的体外迁移可足以引发细胞分化。在白细胞中,已证明单核细胞穿越内皮细胞单细胞层的迁移足以诱导它们分化成巨噬细胞或不成熟的树突细胞。

[0064] 将在 Medium 200(Cascade Biologics)中培养的原代人脐静脉内皮细胞(HUVEC; BD Biosciences)接种在含有预覆盖纤连蛋白的微孔聚碳酸酯膜(孔径 $5\mu\text{m}$)的 transwell 装置(Corning)的上部室中。将多孔膜顶部的 HUVEC 内皮细胞培养至汇合(由相差光学显微镜所确定)并对其紧密缝隙连接的形成和随之生理学屏障的形成(由被动染色扩散所确定)进行分析。将不同种类的输入细胞加到上部室中。输入细胞可以通过红细胞的简单裂解从正常外周血中分离的全白细胞(淋巴细胞、单核细胞、粒细胞和嗜中性粒细胞);或利用 Histopaque-1077 通过单一步骤密度离心分离的外周血单核细胞(PBMC;淋巴细胞和单核细胞);或仅为单核细胞,利用 46% Percoll 通过第二步密度离心分离,或可选地按照本领域(MiltenyiBiotec)通过免疫磁珠消除非单核细胞而分离。简言之,在单核细胞的情况下,将 PBMC 以 1.0×10^6 个细胞接种在 transwell 装置的上部室中的 HUVEC 单细胞层上,并在 37°C 下在标准 CO_2 孵育箱中使之结合 1-2 小时。未结合的 PBMC 通过 PBS 温和洗涤而除去。使剩余的细胞迁移 2-3 天,然后移除 transwell 上部室(含有 HUVEC 单细胞层和未迁移的细胞),并收集下部室中的迁移细胞以进行分析。通过离心沉淀细胞,并且此时可用单克隆抗体对细胞染色以确定细胞表型和亚型(例如, $\text{CD14}+\text{CD16}+$ 单核细胞/巨噬细胞对比 $\text{CD19}+\text{B}$ 淋巴细胞)。在含 2% 热灭活的胎牛血清的 $500\mu\text{l}$ PBS 中重悬细胞,并利用 FACSCalibur 流式细胞仪进行分析。除表型分析外,流式细胞术可通过在高流速下收集 1 分钟的来自每种样品的数据来确定迁移细胞的数量,表示为接种到 HUVEC 单细胞层上的输入 PBMC 数量的百分比。这种方法的改变形式包括用 X92 抗 $\text{IL-1}\alpha$ Ab 与输入细胞预孵育以确定 X92 抗 $\text{IL-1}\alpha$ Ab 对膜上的 $\text{IL-1}\alpha$ 白细胞迁移的潜在中和作用。膜相关 $\text{IL-1}\alpha$ 阳性的白细胞将预期与其余的 HUVEC 细胞上表达的 IL-1RI 受体连接。根据实验,在单独用 $\text{IL-1}\alpha$ 刺激或用 X92 Ab 与 $\text{IL-1}\alpha$ 预孵育后,利用非酶促试剂(例如, EDTA 或 Cellstripper[Cellgro])可将黏附的 HUVEC 从培养孔除去,用 PBS 洗涤,然后通过流式细胞术分析 CD54 、 CD62E 和 CD106 黏着分子的表达。

[0065] 还可将诸如单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的趋化因子加入到 transwell 装置的下部室以研究在 X92Ab 存在或不存在下白细胞的自发迁移和趋化迁移。

[0066] 人类受试者

[0067] 本发明的方法可在任何适宜的人类受试者中进行。然而优选地,受试者是患有与 $\text{CD14}+\text{CD16}+$ 单核细胞的异常水平或功能相关的病症的个体。这样的受试者的例子包括患有与 $\text{CD14}+\text{CD16}+$ 单核细胞的异常功能或水平相关的病状的那些,所述病状比如炎症病症、自身免疫性病症、癌症(例如,乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、卵巢癌、白血病、肺癌、子宫内膜癌或肝癌)、动脉粥样硬化、关节炎(例如,骨关节炎或类风湿性关节炎)、炎症肠病(例如,溃疡性结肠炎或克罗恩氏病(Crohn's disease))、外周血管病、脑血管意外(中风)、其中出

现慢性炎症的病状、以单核细胞 / 巨噬细胞浸润的损害为特征的病状、在脑中存在淀粉样蛋白斑的病状（例如，阿耳茨海默氏病）、骨质疏松症、肌萎缩性侧索硬化症或多发性硬化症。

实施例

[0068] 实施例 1- 流式细胞术实验

[0069] 方法：在无菌条件下从健康供体中收集全血。在裂解缓冲液（150mM 醋酸铵，0.1mM EDTA）中将 2.5ml 的全血稀释 10 倍。将细胞在缓冲液中置于冰上 10 分钟，然后在 1000G 下离心 5 分钟。在冰冷的 FACS 缓冲液（通过 0.2 μ m 滤器过滤的含 1% 奶粉的 PBS）中重悬细胞。在 FACS 缓冲液中洗涤细胞两次。沉淀的细胞在 2.8ml 的 FACS 缓冲液中重悬，用血细胞计数器计数，并按照以下的流程在暗光下加入荧光标记的抗体：

[0070] 1) PerCP-Cy5.5 轭合的抗 CD 14 (eBioscience™ 亲和纯化的，小鼠抗人类 IgG, κ , no. 45-109)

[0071] 2) PE 轭合的抗 CD 16 (eBioscience™ 亲和纯化的，小鼠抗人类 IgG1, no. 12-0168)

[0072] 3) FITC 轭合的抗 IL-1 α (eBioscience™ 亲和纯化的，小鼠 IgG1, 抗人类 IL-1 α No. 11-718)

[0073] 4) FITC 轭合的抗 KLH (eBioscience™ 亲和纯化的，小鼠 IgG1, κ , no. 11-4714)

[0074] 5) 抗 CD 14, 抗 CD 16

[0075] 6) 抗 CD 14, 抗 CD 16, 抗 IL-1 α

[0076] 7) 抗 CD 14, 抗 CD 16, 抗 IL-1 α , 抗 KLH

[0077] 将在 400 μ l FACS 缓冲液中悬浮的细胞（约 1.5×10^6 个细胞）转移到 1.5ml eppendorf 管中并避光放置在冰上。加入抗体（50 μ l）并与细胞反应 45 分钟。然后将细胞进行 1000G 5 分钟的离心并在 1.5ml 的 FACS 缓冲液中重悬，重复三次从而对细胞进行洗涤，将细胞置于冰上直至用 BD FACS 分析仪进行分析。

[0078] 结果：用抗 CD14 和抗 CD16 对全外周血细胞 (WPBC) 染色以鉴定单核细胞的小亚群。利用流式细胞术使用 FITC 标记的抗 IL-1 α 的特异性单克隆抗体进一步分析 CD14+CD16+WPBC 的白细胞介素 -1 α 的表达。引人注意地，三色 FACS 分析揭示了几乎所有 IL-1 α + 染色都实际上与 CD14+CD16+ 群体相关。因此，确定血液中的 CD14+CD16+ 细胞和细胞的 IL-1 α + 群体在很大程度上是相同的群体。

[0079] 实施例 2- 细胞相关 IL1A 的中和：MABP1 阻碍 E- 选择蛋白在 IL1- 刺激的 HUVEC 细胞中的表达

[0080] MABp1 能够抑制内皮细胞表面上细胞黏着分子的诱导表达。利用人脐静脉血管内皮细胞 (HUVEC) 作为模型系统已观察到 MABP1 介导的两种关键黏着分子，CD54 (ICAM-1) 和 CD62E (E- 选择蛋白) 的抑制。当 HUVEC 不是被可溶的重组人类 IL1 α 刺激而是被通过糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定在工程改造的 DG44CHO 细胞 (GPI-IL1A 细胞) 上的膜 IL1 α 刺激时，MABp1 的效应是最显著的。在代表性的实验中，在单独的 M-200 培养基中，或是存在 10 μ g/mL MABP1 的 M-200 培养基中，或是存在 10 μ g/mL D5 人类 IgG1 同种型对照抗体的 M-200 培养基中，将 6 孔板中的 HUVEC 细胞的汇合培养物与 5×10^6 个 GPI-IL1A DG44 细胞共培养过夜。17-20 小时后，用 Dulbecco PBS 彻底洗涤 HUVEC 单细胞层，且然后通过用 CellStripper

试剂 (Cellgro Mediatech) 进行 20 分钟的非酶促处理使其离壁。利用标准流式细胞术方案立即分析细胞的 CD62E (E- 选择蛋白) 表达。染色缓冲液包含含有 2% 热灭活胎牛血清的 Dulbecco PBS。利用 PE 轭合的小鼠抗人类 CD62E 单克隆抗体 (eBioscience, 克隆 P2H3) 或 PE 轭合的小鼠 IgG1k 同种型对照 (eBioscience, 克隆 P3) 按照生产商的说明在室温下在黑暗中以 100 微升的染色体积对 HUVEC 细胞进行 20 分钟的染色。随后在染色缓冲液中进行两次洗涤, 然后在 FACSCalibur 流式细胞仪 (BD Biosciences) 上获得样品。在 $n = 3$ 的实验中, 通过 MABP1 将 HUVEC 细胞表面上由膜 GPI-IL1A 诱导的 E- 选择蛋白的上调中和至基线水平, 基线水平由未受刺激的 HUVEC 细胞呈现。

[0081] 其他实施方案

[0082] 应理解的是, 尽管已结合其详述描述了本发明, 前面的描述旨在例证而非限制本发明的范围, 本发明的范围由所附权利要求书的范围所限定。其他的方面、优点和更改形式在以下权利要求书的范围之内。

Ile Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro Leu
 115 120 125

Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

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

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

[0003]

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

[0004]

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 2

<211> 234

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 2

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

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

[0005]

Thr Ser Ser Phe Leu Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu His
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 3
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 3

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

[0006]

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Met Phe Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Ile Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Leu Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Lys Val Val Ile Pro Ala Pro Leu
 115 120 125

Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

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

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

[0007]

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 370 375 380

[0008]

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 4
<211> 236
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 4

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

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

[0009]

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Thr Ser Ser Phe Leu Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu His
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

[0010]

