



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102037017 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 09

(21) 申请号 200980115731. 8

US 2003180255 A1, 2003. 09. 25, 全文.

(22) 申请日 2009. 02. 20

Yao. Z. Molecular characterization of the human interleukin(IL)-17 receptor.

(30) 优先权数据

《Cytokine》. 1997, 第 9 卷 (第 11 期), 794-800.

61/066, 538 2008. 02. 21 US

Yao. Z 等. Herpesvirus Saimiri encodes a

61/145, 901 2009. 01. 20 US

new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. 《Immunity》. 1995, 第 3 卷 (第 6 期), 811-821.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 10. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

审查员 钟辉

PCT/US2009/001085 2009. 02. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/136976 EN 2009. 11. 12

(73) 专利权人 麒麟-安姆根有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 A·L·布德尔德斯基 M·R·科莫

J·E·托克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李波 李连涛

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2007027761 A2, 2007. 03. 08,

权利要求书1页 说明书58页

序列表27页 附图16页

(54) 发明名称

IL-17RA-IL-17RB 拮抗物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及白介素-17配体和受体家族成员,以及IL-17受体A和IL-17受体C形成有生物活性的异聚受体复合体的发现。公开了IL-17RA-IL-17RB异聚受体复合体的拮抗物以及各种使用方法。

1. IL-17RA-IL-17RB 拮抗物在制备用于抑制 IL-25 的生物活性的药物中的用途,其中所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物为包含由 SEQ ID NO :40 组成的轻链可变域和由 SEQ ID NO :14 组成的重链可变域的抗体。

2. 权利要求 1 的用途,其中至少一种促炎介质的释放被抑制,其中所述促炎介质为 IL-5。

3. IL-17RA-IL-17RB 拮抗物在制备用于在体内抑制 IL-25 的生物活性的药物中的用途,其中所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物为包含由 SEQ ID NO :40 组成的轻链可变域和由 SEQ ID NO :14 组成的重链可变域的抗体。

4. 权利要求 3 的用途,其中至少一种促炎介质的释放被抑制,其中所述促炎介质为 IL-5。

5. IL-17RA-IL-17RB 拮抗物在制备用于在体外抑制 IL-25 的生物活性的药物中的用途,其中所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物为包含由 SEQ ID NO :40 组成的轻链可变域和由 SEQ ID NO :14 组成的重链可变域的抗体。

6. 权利要求 5 的用途,其中至少一种促炎介质的释放被抑制,其中所述促炎介质为 IL-5。

IL-17RA-IL-17RB 拮抗物及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2009 年 1 月 20 日提出的美国临时申请第 61/145,901 号和于 2008 年 2 月 21 日提出的美国临时申请第 61/066,538 号的 35U. S. C. § 119 的权益,所述申请案通过引用结合到本文中。

发明领域

[0003] 本发明涉及白介素 -17 配体和受体家族成员,以及 IL-17 受体 A 和 IL-17 受体 B 形成有生物活性的异聚复合体的发现。公开了所述 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的拮抗物和使用方法。

[0004] 发明背景

[0005] 白介素 -17 家族为一群 6 种结构相关的细胞因子,命名为 IL-17A 至 IL-17F,该细胞因子在免疫应答的调节中为重要的。一级结构水平下,最类似处看来是 C 端区,该区包含 4 个保守的半胱氨酸残基(综述于 Kawaguchi 等, J. Allergy Clin Immunol 114 :1265, 2004 ;Kolls 和 Linden, Immunity 21 :467, 2004)。已确定了 IL-17F 的晶体结构,发现其与胱氨酸结家族生长因子共享结构特征(Hymowitz 等, 2001, EMBO J. 20 :5532-5341),胱氨酸结家族生长因子为一群通过同二聚和异聚的反构(counterstructure)结合和发信号的同二聚配体(Lu 等, 2005, Nat. Rev. Neurosci. 6 :603-614 ;Barker, 2004, Neuron 42 : 529-533)。

[0006] IL-17 受体(IL-17R)还形成相关的 I 型跨膜蛋白家族。已鉴别出该家族的 5 个不同成员(IL-1RA 至 IL-1RE),该家族其中几个还表现出可选剪接,包括可作为诱饵受体的可溶类型(Kolls和Linden, 见上 ;Moseley 等, Cytokine Growth Factor Rev. 14 :155, 2003)。尽管 IL-17RA 能独立于配体多聚化,并已表现出与 IL-17RC 形成生物活性的异聚受体复合体(Toy 等, JImmunol. 177 :36 ;2007),但形成其它异聚 IL-17R 复合体(跨膜或可溶类型)的可能性和所得到的生物活性(如果有的话)先前为未知。提供本发明各种实施方案的该方面和其它方面。

[0007] 附图简述

[0008] 图 1 为阐述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物对气道高反应性的作用的图。空心圆表示在给予 MSA 和 MuFc 的小鼠(N = 4)中得到的结果;空心正方形表示在给予 IL-25 和 MuFc 的小鼠(N = 3)中得到的结果;实心三角表示在给予 IL-25 和 M751 的小鼠(N = 3)中得到的结果。

[0009] 图 2 呈现了 Western 印迹,基本如实施例 11 中所述制备。泳道 1 和 4 包含分子量标记。板 A 为用抗 -IL-17RA 印迹的,板 B 为用抗 -HIS 印迹的。泳道 2 呈现了 IL-17RA:HIS 阳性对照,泳道 3 表示了用 IL-17RB:Fc 沉淀 IL-17RA:HIS 的结果。泳道 5 呈现了 IL-17RD:HIS 阳性对照,泳道 6 表明 IL-17RD:HIS 不能用 IL-17RB:Fc 沉淀。

[0010] 图 3 为阐述来自实施例 14 实验 1 的 OVA 哮喘模型中小鼠的气道高反应性(AHR)图。用渐增浓度的乙酰甲胆碱攻击小鼠,计算 PENH 中高于基线 ± SEM 的变化。

[0011] 图 4 阐述小鼠在如实施例 14 中所述的 OVA 哮喘模型中的肺阻力 (RL)。对各处理组 $\pm$ SEM 显示了在曲线 (AUC) 下的均值气道阻力 (R) 面积。图 4a 呈现了来自实验 2 的结果, 4b 则来自实验 3。

[0012] 图 5 呈现了如实施例 14 实验 1 中所述的支气管肺泡灌洗液 (BALF) 细胞含量的分析。结果显示为总 BALF (4a) 白细胞、(4b) 嗜酸性粒细胞、(4c) 嗜中性粒细胞、(4d) 淋巴细胞和 (4e) 巨噬细胞。各实心圆表示来自一只小鼠的 BALF 细胞含量。使用非参数单向 ANOVA 与 Dunn 氏多重比较检验 ($*p < 0.05$) 进行统计分析对比。

[0013] 图 6 类似于图 5, 但呈现来自实施例 14 实验 2 的结果。结果显示为总 BALF (4a) 白细胞、(4b) 嗜酸性粒细胞、(4c) 嗜中性粒细胞、(4d) 淋巴细胞和 (4e) 巨噬细胞。使用单向 ANOVA 与 Bonferroni 氏多重比较检验 ($*p < 0.05$) 进行统计分析对比。

[0014] 图 7 呈现来自实施例 14 实验 3 的结果。结果显示为总 BALF (4a) 白细胞、(4b) 嗜酸性粒细胞、(4c) 嗜中性粒细胞、(4d) 淋巴细胞和 (4e) 巨噬细胞。各实心圆表示来自一只小鼠的 BALF 细胞含量。使用非参数单向 ANOVA 与 Dunn 氏多重比较检验 ($*p < 0.05$) 进行统计分析对比。

[0015] 图 8 阐述了来自 OVA 哮喘模型中小鼠的 BALF IL-13 浓度。将来自如实施例 14 : (a) 实验 1、(b) 实验 2、(c) 实验 3 中所述 3 个独立实验中各个小鼠的 BALF 样品通过 ELISA 测定 IL-13 浓度。各实心圆表示来自一只小鼠的值。水平线表示组均值。使用单向 ANOVA 进行组间对比。 $*p < 0.05$ 。

[0016] 图 9 呈现来自 OVA 哮喘模型中小鼠的 BALF IL-5 浓度。将来自如实施例 14 : (a) 实验 1、(b) 实验 2、(c) 实验 3 中所述 3 个独立实验中各个小鼠的 BALF 样品通过 ELISA 测定 IL-5 浓度。各实心圆表示来自一只小鼠的值。水平线表示组均值。使用单向 ANOVA 进行组间对比。 $*p < 0.05$ 。

[0017] 图 10 阐述了通过 ELISA 测定如实施例 14 : (a) 实验 1、(b) 实验 2、(c) 实验 3 中所述 OVA 哮喘模型中的各个小鼠中的血清 IgE 浓度。各小鼠的血清 IgE 浓度以实心圆表示。水平线表示组均值。使用单向 ANOVA 进行组间对比。 $*p < 0.05$ 。

[0018] 图 11 呈现来自如实施例 14 实验 3 中所述的 OVA 哮喘模型中小鼠群的肺组织学分数。统计对比使用非配对 t- 检验 $*p < 0.0001$ 。

[0019] 发明详述

[0020] 本文所用的节标题仅因组织上的目的, 并不应把其理解为限制所述主题。

[0021] 可将标准技术用于重组 DNA、寡核苷酸合成、组织培养和转化、蛋白纯化等。可按照制造商的说明书或如本领域通常实行的或如本文所述的进行酶促反应和纯化技术。可按照本领域熟知的传统方法和如本说明书整篇所引用和所讨论的各种一般和更具体参考中所述的一般地进行以下方法和技术。例如参见 Sambrook 等, 2001, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 其通过引用结合到本文中用于任何目的。除非提供具体定义, 本文所述的分析化学、有机化学和医药学化学方面用到的术语及实验方法和技术为本领域熟知和通常使用的。可将标准技术用于化学合成、化学分析、药物的制备、配方和递送及患者的治疗。

[0022] 授权于 2000 年 6 月 6 日的 USPN 6,072,033 中的实例已描述 IL-17RA 的鉴定、克隆和制备, 该专利通过整体引用结合于本文中。人 IL-17RA 的氨基酸序列示于 USPN

6,072,033 的 SEQ ID NO:10 (GenBank 登记号 NM_014339)。人 IL-17RA 有 N 端信号肽,该信号肽的预测切割位点约在第 27 和 28 个氨基酸之间。该信号肽后接 293 个氨基酸的胞外域、21 个氨基酸的跨膜域和 525 个氨基酸的胞质尾部。本发明的方法中有用的人 IL-17RA (huIL-17RA) 的可溶形式包括胞外域 (残基 1-320 或除信号肽外的残基 28-320) 或保留结合 IL-17A 能力的胞外域片段。如 USPN 6,072,033 中所更详细描述,本发明的方法中有用的 IL-17RA 其它形式包括与保留结合 IL-17A 能力的天然 IL-17RA 至少 70% 至 99% 间的氨基酸同一性的突变蛋白和变异。

[0023] IL-17 受体 B (IL-17RB) 和其很多同种型为本领域已知,例如 Tian 等, *Oncogene* 19:2098 (2000) 中公开和描述的那些。另外的实例包括公共数据库可得到的序列,例如但不限于 GenBank 登记号 NM_018725。此外,如下所述,IL-17RB 还可包括生物活性的片段和 / 或变体。

[0024] IL-17RA 缔合 IL-17RB 形成异聚受体复合体,该复合体为生物活性的 (即一旦结合配体,所述受体复合体就被活化并转导信号进入表达其的细胞,导致生物活性例如 mRNA 的诱导、细胞因子的分泌、细胞形态或活化状态的改变等)。异聚受体复合体的各成员称为其“组分”或“亚基”。如本文所使用的,“IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体” (或“异聚受体复合体”) 指的是包含至少 IL-17RA 和 IL-17RB 的复合体;另外的亚基或组分也可形成异聚受体复合体的部分。

[0025] 因此,本发明的某些方面涉及以下物质 (例如如下所述的抗原结合蛋白) 和方法,其用于阻断 IL-17RA 与 IL-17RB (和 / 或与另外的受体亚基) 缔合,从而防止有功能受体复合体 (能被活化的受体复合体) 的形成。本发明的其它方面涉及以下拮抗物,其结合 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体,或其亚基或组分,并抑制配体 (即 IL-25) 的结合及随后的受体复合体的活化。本发明另外的方面涉及结合 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体或其亚基,并防止活化发生的拮抗物。防止有功能的复合体形成和 / 或活化将减少或防止信号转导和减少 IL-17RA/IL-17RB 活化的下游促炎作用。这种方法和拮抗物将有助于受 IL-17/IL-17R 途径影响的各种炎症和自身免疫性病症的治疗。本发明的实施方案有助于体外测定,以筛选 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的拮抗物或激动剂和 / 或鉴定表达 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的细胞。

[0026] 此外,IL-17RA 和 IL-17RB 都对形成有功能的 IL-25 受体复合体是必需的认识,引出另外的有助于抑制或拮抗 IL-25 生物活性的物质 (例如抗原结合蛋白)。例如,结合至受体复合体的一个或更多个亚基 (例如结合 IL-17RA 的抗体或结合 IL-17RB 的抗体) 并抑制 IL-25 结合或活化受体复合体的抗原结合蛋白,将是有效的 IL-25 拮抗物。

[0027] 在某些实施方案中,本发明的拮抗物为“分离的”或“基本纯的” (或“基本同源的”) 分子。术语“分离的分子” (其中分子例如多肽、肽或抗体) 为以下分子,根据其来源或衍生源,为 (1) 不伴随天然伴随的组分 (在其天然状态是伴随其的)、(2) 基本没有来自同种的其它分子、(3) 从不同种的细胞表达的或 (4) 天然不存在的。因此,化学合成的或在不同于其天然起源细胞的细胞系统中合成的分子,将为与其天然伴随的组分“分离的”。

[0028] 利用本领域熟知的纯化技术,通过分离也可使得分子基本无天然伴随的组分 (即“纯化的”蛋白)。可通过许多本领域熟知的方法测定分子纯度或同质性。例如,可使用聚丙烯酰胺凝胶电泳和使用本领域熟知的技术染色凝胶以呈现多肽,测定多肽样品的纯度。出

于某些目的,可通过将 HPLC 或本领域熟知的其它用于纯化的方法,提供更高的分辨率。

[0029] “分离的”拮抗物(即蛋白、多肽、肽或抗体)非伴随至少一些在其天然状态下通常伴随的物质,在一个实施方案中构成给予样品总蛋白重量的至少约 5%,在另一个实施方案中至少约 50%。“基本纯”蛋白占总蛋白重量的至少约 75%,具体为至少约 80%,尤其具体为至少约 90%。所述定义包括在不同有机体或宿主细胞中产生来自一种有机体的蛋白。或者,通过使用诱导启动子或高表达启动子(使得在增加的浓度水平下制得所述蛋白),可在显著高于通常见到的浓度下制得所述蛋白。

[0030] 这些仅为本文所述发明的各种实施方案许多方面的少数几个方面。

[0031] 1. IL-17RA-IL-17RB 拮抗物

[0032] IL-17RA 缔合 IL-17RB 形成异聚受体复合体,其为生物活性的(即当通过结合配体活化时,转导信号进入细胞,导致细胞生物活性的变化,例如 mRNA 的诱导、细胞因子的分泌、细胞形态或激活状态的改变等)。将 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体定义为至少 IL-17RA 和 IL-17RB 蛋白的缔合(例如但不限于蛋白间相互作用),在细胞的胞外膜上显示为异聚受体复合体。该异聚受体复合体至少对 IL-25 信号传导(即 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 的活化)是必需的。应该理解的是所述 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体还可包含另外的蛋白(即“辅助”蛋白)。例如,称为 Act-1 的信号分子为 IL-17A 信号级联的部分,最近的证据表明其也可涉及 IL-25 信号传导(Claudio 等, J. Immunol. 182 :1617, 2009; Swaidani 等, J. Immunol. 182 :1631, 2009)。通过结合 IL-17 配体家族成员,例如但不限于 IL-25(IL-17E),实现 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的活化。IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的活化包括但不限于胞内信号级联和下游事件(例如基因转录和翻译)的启动。

[0033] 实施方案涉及抑制亚基(即 IL-17RA 和 IL-17RB 和 / 或辅助蛋白)缔合形成 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的拮抗物(包括抗原结合蛋白),以及抑制配体(即 IL-25)结合至 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体或其亚基的拮抗物(即抗原结合蛋白)。另外的实施方案涉及以下拮抗物(包括抗原结合蛋白),其结合至 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的一个或更多个亚基并导致构象改变,该构象改变防止复合体亚基的缔合、配体结合至此或其激活。

[0034] 本文使用的“抗原结合蛋白”为特异结合鉴定的靶蛋白(例如 17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的亚基或异聚受体复合体本身)的蛋白。“特异结合”指的是抗原结合蛋白对鉴定的靶蛋白比对其它蛋白具有更高的亲和力。典型的是,“特异结合”指的是平衡解离常数为 $< 10^{-7}$ - 10^{-11} M, 或 $< 10^{-8}$ - $< 10^{-10}$ M, 或 $< 10^{-9}$ - $< 10^{-10}$ M。

[0035] 抗原结合蛋白包括特异结合鉴定的靶蛋白(如本文多处定义的)的抗体或其片段,以及特异结合鉴定的靶蛋白的肽或多肽。抑制形成 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体,或抑制配体结合至此或由此信号传导的抗原结合蛋白本文称为 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物。因此,IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的实施方案可结合至 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的任何部分(即结合至复合体本身或其亚基),并抑制受体活化。IL-17RA-IL-17RB 拮抗物属的亚属包括抗体(如本文多处定义的),以及肽和多肽。

[0036] 受体的活化或活化作用在本文定义为应答于结合至膜结合受体的分子一个或更多个胞内信号传导途径的参与和胞内信号的转导(即信号转导),例如但不限于受体:配体相互作用。本文使用的信号转导为通过从一种物理或化学形式至另一种形式的转化分程传

递信号；例如，在细胞生物学中，细胞通过其将胞外信号转换为应答（例如分泌细胞因子、细胞的增殖或激活状态的改变）的过程。

[0037] “抑制”可以 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体活性的减少来衡量，例如异聚受体复合体的形成、配体（即，IL-17A/IL-17F 和 / 或 IL-25）至异聚受体复合体（或至少其一个亚基）的结合或应答于配体（例如 IL-17A、IL-17F 和 / 或 IL-25）的生物活性（即细胞因子分泌的刺激、细胞数量或活性状态的改变或其它生物效应）减少了至少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100%。在一个实施方案中，本发明的拮抗物将 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的活性减少了至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 100%；在另一个实施方案中，本发明的拮抗物抑制至少 35%、45%、55%、65%、75%、85%、95% 或更多的活性。

[0038] 可用本领域已知的任何方法衡量异聚受体复合体形成的抑制，例如但不限于本文所述的共免疫沉淀法。其它实例包括 Forster 共振能量转移 (FRET) 分析法和其它本领域已知和可用于定量或定性分析配体 / 受体相互作用的方法。配体结合的抑制也可用本领域已知的任何方法衡量，例如 FACS、EIA、RIA、上述测定法和本领域已知用于评价两个或更多个分子间相互作用的方法，包括本文描述的那些和 USSN 11/906,094 中的。

[0039] 此外，可以 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体 IL-25 活化的损失来衡量“抑制”，该损失以生物相关读出来衡量，例如但不限于增量调节的基因转录（例如，IL-5、IL-13、嗜酸细胞活化趋化因子、MCP-1 和 / 或 IL-17RB mRNA 水平的上升）和 / 或基因翻译，和 / 或与 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体活化有关的各种因子的释放（该因子包括 IL-5 和 / 或 IL-13），以及本领域已知的由表达 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 的任何细胞释放的任何其它促炎介质。另外的生物相关读出包括生物样品中的细胞数量和 / 或外观的改变（例如支气管肺泡灌洗样品中细胞含量的增加、肺组织样品中杯状细胞增生和 / 或血管 / 血管周围的炎症）。

[0040] IL-17RA-IL-17RB 拮抗物另外的实施方案涉及结合至 IL-17RA 的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物。在一个实施方案中，所述拮抗物部分抑制或完全抑制 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体亚基的缔合，从而防止异聚受体复合体形成。在某些实施方案中，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物无需阻断 IL-25 结合至 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体。在替代实施方案中，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可阻断 IL-25 结合至 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体（或其亚基）。

[0041] IL-17RA-IL-17RB 拮抗物另外的实施方案涉及结合至 IL-17RB 的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物。在一个实施方案中，所述拮抗物部分抑制或完全抑制 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体亚基的缔合，从而防止异聚受体复合体形成。在某些实施方案中，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物无需阻断 IL-25 结合至 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体。在替代实施方案中，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可阻断 IL-25 结合至 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体（或其亚基）。

[0042] IL-17RA-IL-17RB 拮抗物另外的实施方案涉及结合至 IL-17RA 和 IL-17RB 两者的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物，包括结合异聚受体复合体的那些。在一个实施方案中，所述拮抗物部分抑制或完全抑制 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体亚基的缔合，从而防止异聚受体复合体形成。在某些实施方案中，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物无需阻断 IL-25 结合至

IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体。在替代实施方案中,所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可阻断 IL-25 结合至 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体(或其亚基)。

[0043] 上述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的各种实施方案包括以下 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物,其结合至 IL-17RA、或 IL-17RB 或所述异聚受体复合体,并空间上抑制或阻碍所述异聚受体复合体亚基的缔合,从而防止 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的形成。在所述异聚受体复合体亚基缔合的位阻的一个实例中,拮抗物结合至亚基发生在以下位点上,该位点对该亚基与受体复合体的其它亚基缔合是必需的,或足够接近于该位点,使得所述拮抗物的空间排布防止所述异聚受体复合体亚基的缔合。或者,上述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的各种实施方案包括以下 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物,其结合至 IL-17RA、或 IL-17RB 或所述异聚受体复合体,并诱导(或防止)所述异聚受体复合体的一个或更多个亚基构象改变,从而抑制 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的形成。在构象改变防止所述异聚受体复合体亚基的缔合的一个实例中,拮抗物结合至亚基发生在以下位点上,该位点可远离对该亚基与受体复合体的其它亚基缔合必需的位点,引起防止其与其它亚基缔合的该亚基构象改变,或防止对亚基缔合所必需的构象改变。类似的,上述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的各种实施方案包括以下 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物,其结合至 IL-17RA、或 IL-17RB 或所述异聚受体复合体,并诱导(或防止)以下构象改变,其抑制信号转导或空间上阻碍所述异聚受体复合体的信号转导。

[0044] 在另一个替代实施方案中,上述各种 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物包括以下 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物,其结合至 IL-17RA、或 IL-17RB 或所述异聚受体复合体,并诱导所述异聚受体复合体(或其亚基)构象改变,从而抑制 IL-25(或另一个配体)结合至所述 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体。所述实施方案还包括以下 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物,其结合至 IL-17RA、或 IL-17RB 或 IL-17RA 和 IL-17RB 两者,并空间上阻碍或抑制配体(例如 IL-25)结合至所述 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体。本发明的实施方案也包括以下拮抗物,其结合至 IL-17RA、或 IL-17RB 或 IL-17RA 和 IL-17RB 两者,并抑制(部分地或完全地)所述受体复合体的信号传导途径,从而抑制通过 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的信号传导。

[0045] 在另一个替代实施方案中,IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合至配体(即 IL-17A、IL-25 等),并抑制通过 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的信号传导。这种拮抗物可通过抑制至 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体一个亚基或至多于一个这种亚基的结合而起作用。因此,例如拮抗物可允许配体结合第一个受体亚基,但防止第二个受体亚基与配体或第一个受体亚基的相互作用。这种抑制可如上述发生,例如通过结合的位阻、构象改变的诱导等,如此以抑制(部分地或完全地)通过 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的信号传导。

[0046] 1.1 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物:抗体

[0047] 如本文多处定义,IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的实施方案包括抗体或其片段。因此,所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物包括多克隆抗体、单克隆抗体、双特异性抗体、双抗体、微抗体、域抗体、合成抗体(有时本文称为“抗体模拟物”)、嵌合抗体、人源化抗体、完全人抗体、抗体融合物(有时称为“抗体缀合物(antibody conjugates)”),以及其片段。

[0048] IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体也可包括单域抗体,该单域抗体包含两条重链的二聚体,并没有轻链,例如发现于骆驼和美洲驼的那些(例如,参见 Muldermans 等,2001,

J. Biotechnol. 74 :277-302 ;Desmyter 等, 2001, J. Biol. Chem. 276 :26285-26290)。

[0049] IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体可包括四聚体或其片段。各四聚体典型地由两对相同的多肽链组成, 每一对具有一条“轻”链(典型地具有约 25kDa 的分子量)和一条“重”链(典型地具有约 50-70kDa 的分子量)。各链的氨基端部分包括主要担负抗原识别的可变区。各链的羧基端部分界定了主要担负效应子功能的恒定区。人的轻链分为 κ 和 λ 轻链。重链分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ 重链, 并将抗体的同种型分别定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。IgG 有几个亚类, 包括但不限于 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。IgM 有亚类, 包括但不限于 IgM1 和 IgM2。IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体包括所有这种同种型。为了示范性的目的, 抗体片段包括但不限于 F(ab)、F(ab')、F(ab')₂、Fv 和单链 Fv 片断(scfv), 以及单链抗体。IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体可包括任何前述的实例。

[0050] 抗体的结构为本领域所熟知, 无需在此复述, 但作为实例, 重链和轻链的可变区通常显示相同的一般结构, 由三个高变区(也叫互补决定区或 CDR) 连接相对保守的框架区(FR)。所述 CDR 为抗体(或抗原结合蛋白, 如本文概述)的高变区, 该高变区担负抗原识别和结合。来自各对两条链的 CDR 由框架区定位, 实现结合至特异表位。从 N 端至 C 端, 轻链和重链都包括 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 域。在某些实施方案中, 至各域的氨基酸分配可与 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest 中定义的一致。参见, Chothia 等, 1987, J. Mol. Biol. 196 :901-917 ;Chothia 等, 1989, Nature 342 :878-883。

[0051] 本文所用的“互补决定区”或“CDR”指结合蛋白区, 该区组成用于抗原结合的主要表面接触点。本发明的结合蛋白可具有六个 CDR, 例如一条重链 CDR1 (“CDRH1”)、一条重链 CDR2 (“CDRH2”)、一条重链 CDR3 (“CDRH3”)、一条轻链 CDR1 (“CDRL1”)、一条轻链 CDR2 (“CDRL2”)、一条轻链 CDR3 (“CDRL3”)。CDRH1 典型地包含约 5 个至约 7 个氨基酸, CDRH2 典型地包含约 16 个至约 19 个氨基酸, 而 CDRH3 典型地包含约 3 个至约 25 个氨基酸。CDRL1 典型地包含约 10 个至约 17 个氨基酸, CDRL2 典型地包含约 7 个氨基酸, 而 CDRL3 典型地包含约 7 个至约 10 个氨基酸。

[0052] IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体至少包括轻链或重链可变区的全部或部分, 或轻链和重链两者可变区的全部或部分, 该可变区的全部或部分特异结合至 IL-17RA、或 IL-17RB、或 IL-17RA 和 IL-17RB 两者。可变区的片段(即“部分”)的实例包括 CDR。换句话说, IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体至少包括可变区的至少一个 CDR, 其中所述 CDR 特异结合 IL-17RA、或 IL-17RB、或 IL-17RA 和 IL-17RB 两者。在替代实施方案中, IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体包括可变区的至少两个、或至少三个、或至少四个、或至少五个、或至少所有六个 CDR, 其中至少一个 CDR 特异结合 IL-17RA、或 IL-17RB、或 IL-17RA 和 IL-17RB 两者。所述 CDR 可来自重链或轻链, 可为各链中三个 CDR 的任一个, 即所述 CDR 各自独立选自 CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 和 CDRL3。

[0053] 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体的实施方案可包括有用的 CDR 移植到其中的支架结构。某些实施方案包括用于人源化抗体的人支架组分。在一个实施方案中, 所述支架结构为传统的、四聚抗体结构。因此, 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体的实施方案可包括组成重链或轻链的另外组分例如框架、J 和 D 区、恒定区等。所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体的实施方案可包括具有修饰的 Fc 结构域(称作 Fc 变体)的抗体。“Fc 变体”指以下

分子或序列,其修饰自天然 Fc 但仍包含补救受体 (FcRn) 的结合位点。“Fc 变体”的另外实例包括人化自非人类天然 Fc 的分子或序列。此外,天然 Fc 包含可移去的位点,因为这些位点提供的结构特征或生物活性对本发明的融合分子是非必需的。因此,术语“Fc 变体”包含缺少一个或更多个以下天然 Fc 位点或残基的分子或序列,该位点或残基影响或涉及 (1) 二硫键形成、(2) 与选定宿主细胞的不相容性、(3) 在选定宿主细胞中表达时的 N 端异质性、(4) 糖基化、(5) 与补体的相互作用、(6) 结合至补救受体之外的 Fc 受体或 (7) 依赖抗体的细胞毒性 (ADCC)。

[0054] IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体的实施方案包括人单克隆抗体。定向抗人 IL-17RA、或 IL-17RB 或 IL-17RA 和 IL-17RB 两者的人单克隆抗体,可用本领域已知的任何方法制得,例如但不限于 XenoMouse™ 技术 (例如,参见美国专利第 6,114,598、6,162,963、6,833,268、7,049,426、7,064,244 号;Green 等,1994, *Nature Genetics* 7:13-21;Mendez 等,1997, *Nature Genetics* 15:146-156;Green 和 Jakobovitis,1998, *J. Ex. Med.* 188:483-495)。制得完全人抗体的另外实例包括 UltiMab Human Antibody Development System™ 和 Trans-Phage Technology™ (Medarex Corp., Princeton, NJ)、噬菌体展示技术、核糖体展示技术 (例如参见 Cambridge Antibody Technology, Cambridge, UK),以及本领域已知的任何其它方法。

[0055] IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体的某些实施方案包括嵌合和人源化抗体或其片段。通常,嵌合抗体和人源化抗体都指结合来自多于一种物种的区的抗体。例如,嵌合抗体通常包含来自非人类的可变区和来自人类的恒定区。人源化抗体通常指非人类抗体,其已将可变域框架区交换人抗体中发现的序列。通常,在人源化抗体中,整个抗体除 CDR 外由人源多核苷酸编码,或除其 CDR 内的外与这种抗体相同。所述 CDR,其中一些或全部由源自非人类有机体的核酸编码,被移植进入抗体可变区的 β 折叠片框架以制造一种抗体,该抗体的特异性由移植的 CDR 决定。这种抗体的制造为本领域所熟知 (例如,参见 Jones,1986, *Nature* 321:522-525;Verhoeyen 等,1988, *Science* 239:1534-1536)。人源化抗体也可用具有基因工程化免疫系统的小鼠或用本领域已知的任何其它方法或技术产生 (例如参见 Roque 等,2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654)。在某些实施方案中,所述 CDR 为人类的,因而在本文中的人源化抗体和嵌合抗体都可包含一些非人类 CDR;例如,可产生以下人源化抗体,其包含 CDRH3 和 CDRL3 区,而其它 CDR 区中的一个或更多个为不同特定来源。

[0056] 在一个实施方案中,所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体包括多特异性抗体。这些为结合至两个 (或更多个) 不同抗原的抗体。本领域已知的双特异性抗体实例为“双抗体 (diabody)”。双抗体可以本领域已知的各种方法产生,例如以化学法或从杂种杂交瘤制备 (Holliger 和 Winter,1993, *Current Opinion Biotechnol.* 4:446-449)。多特异性 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体的具体实施方案为具有结合 IL-17RA 和 IL-17RB 两者能力的抗体。

[0057] 在替代实施方案中,所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体包括微抗体。微抗体为极小化的抗体样蛋白,包含连接至 CH3 结构域的单链 Fv (scFv;描述于下面) (例如,参见 Hu 等,1996, *Cancer Res.* 56:3055-3061)。

[0058] 在替代实施方案中,所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体包括域抗体;例如描述于美国专利第 6,248,516 号的那些。域抗体 (dAbs) 为抗体的有功能的结合结构域,相当于人

抗体的重链 (VH) 或轻链 (VL) 的可变区。dAbs 具有约 13kDa 的分子量,或不到完整抗体大小的 1/10。dAbs 在各种宿主中良好表达,该宿主包括细菌、酵母和哺乳动物的细胞系统。此外,dAbs 高度稳定,甚至经受严酷条件(例如冷冻干燥或热变性)后仍保留活性。例如,参见美国专利 6,291,158 ;6,582,915 ;6,593,081 ;6,172,197 ;美国序号 2004/0110941 ;欧洲专利 0368684 ;美国专利 6,696,245、W004/058821、W004/003019 和 W003/002609。

[0059] 如前所述,所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体可包括抗体片段,即本文任何所述抗体的片段,该片段保留结合至 IL-17RA、或 IL-17RB 或 IL-17RA 和 IL-17RB 两者的特异性。具体抗体片段包括但不限于 (i) 由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的 Fab 片段、(ii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段、(iii) 由单个抗体的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段、(iv) 由单可变域组成的 dAb 片段(例如参见 Ward 等,1989, *Nature* 341 :544-546)、(v) 分离出的 CDR 区、(vi) F(ab')₂ 片段,包含两个连接着的 Fab 片段的二价片段、(vii) 单链 Fv 分子 (scFv),其中 VH 结构域和 VL 结构域由肽接头连接,该肽接头允许两个结构域缔合形成抗原结合位点(例如参见 Bird 等,1988 *Science* 242 :423-426 ;Huston 等,1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 :5879-5883)、(viii) 双特异性单链 Fv 二聚体和 (ix) “双抗体”或“三链抗体 (triabody)”,通过基因融合构建的多价或多特异性片段(例如,参见 Tomlinson 等,2000, *Methods Enzymol.* 326 :461-479 ;W094/13804 ;Holliger 等,1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 :6444-6448)。可修饰所述抗体片段。例如,可通过掺入连接 VH 和 VL 结构域的二硫桥而稳定所述分子(例如,参见 Reiter 等,1996, *Nature Biotech.* 14 :1239-1245)。再次,如本文概述,这些片段的非 CDR 成分优选人序列。

[0060] 在另外的实施方案中,所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体包括抗体融合蛋白(有时本文称为“抗体缀合物”)。所述缀合配偶体可为蛋白类的或非蛋白类的;后者通常使用抗原结合蛋白(参见关于抗原结合蛋白的共价修饰的讨论)和缀合配偶体上的官能团产生。例如本领域已知接头;例如本领域熟知的同双功能或异双功能接头(例如,参见通过引用结合到本文的 1994 年 Pierce Chemical Company 目录,关于交联剂的技术部分,页码 155-200)。合适的缀合物包括但不限于如下述的标记、药物或细胞毒类物质(包括但不限于细胞毒类药物(例如化疗剂)或毒素或这种毒素的活性片段)。合适的毒素和其相应的片段包括白喉毒素 A 链、外毒素 A 链、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、酚霉素、伊诺霉素等。细胞毒类物质还包括放射化学物质,其通过将放射性同位素缀合至抗原结合蛋白,或将放射性核素结合至已共价连接至抗原结合蛋白的螯合剂制得。另外的实施方案利用刺孢霉素、auristatin、格尔德霉素和美登素。

[0061] 在一个实施方案中,所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体包括抗体类似物,有时称为“合成抗体”。例如可用来自 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体的 CDR 移植各种替代蛋白支架或人工支架。这种支架包括但不限于为稳定结合蛋白的三维结构所引入的突变,以及由例如生物相容聚合物组成的完全合成的支架。例如,参见 Korndorfer 等,2003, *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics*, 卷 53, 第 1 期 :121-129 ;Roque 等,2004, *Biotechnol. Prog.* 20 :639-654。在替代实施方案中,所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抗体可包括肽抗体模拟物或“PAMs”,以及利用纤连蛋白成分作为支架的抗体模拟物。

[0062] 1. 2IL-17RA-IL-17RB 拮抗物:肽 / 多肽

[0063] IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的实施方案包括以肽和多肽形式的蛋白,该肽和多肽特

异结合至 IL-17RA、或 IL-17RB 或 IL-17RA 和 IL-17RB 两者,并抑制 IL-17A、IL-17F 和 / 或 IL-25 的活性。在某些实施方案中,IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抑制所述 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体亚基的缔合;诱导(或防止)受体亚基的构象改变,从而抑制其相互作用;抑制配体(即 IL-25)至所述异聚受体复合体(或其亚基)的结合,或诱导所述异聚受体复合体(或其亚基)的构象改变,该构象改变抑制配体结合至此。

[0064] 实施方案包括重组的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物。“重组蛋白”为利用重组技术制得的蛋白,即通过利用本领域已知的方法表达重组核酸。

[0065] 本文所使用的“肽”指 1-100 个氨基酸的分子。示范性的肽可包括产生自随机库的那些,该示范性的肽结合至 IL-17RA、或 IL-17RB 或 IL-17RA 和 IL-17RB 两者,抑制 IL-17RA 和 IL-17RB 缔合形成 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体或抑制 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体信号传导。例如以下肽序列,其来自完全随机序列(例如由噬菌体展示法或 RNA-肽筛选法选出的),和序列中天然存在分子的一个或多个残基被天然存在分子中该位置不存在的氨基酸残基取代的序列。鉴定肽序列的示范性方法包括噬菌体展示、大肠杆菌展示、核糖体展示、RNA-肽筛选、化学筛选等。

[0066] 本文所用的“蛋白”指至少两个共价连接的氨基酸,所述蛋白包括蛋白、多肽、寡肽和肽。在某些实施方案中,所述两个或多个共价连接的氨基酸通过肽键连接。所述蛋白可由天然存在的氨基酸和肽键组成,例如如下面概述的当利用表达系统和宿主细胞重组地制得蛋白时。或者,在某些实施方案中(例如当筛选蛋白类候选物的抑制 IL-17RA 和 IL-17RB 缔合的能力时),所述蛋白可包含合成氨基酸(例如高苯丙氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸和正亮氨酸)或拟肽类结构,即“肽或蛋白类似物”,例如类肽(参见,Simon 等,1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 :9367,通过引用结合到本文中),该蛋白能抗蛋白酶或其它生理和 / 或贮藏条件。特别在蛋白通过本领域熟知的常规方法体外合成时,可掺入这种合成氨基酸。此外,可使用拟肽、合成和天然存在的残基 / 结构的任何组合。“氨基酸”也包括亚氨基酸残基,例如脯氨酸和羟脯氨酸。该氨基酸“R 基团”或“侧链”可为 (L)- 或 (S)- 构型。在一个具体的实施方案中,该氨基酸处于 (L)- 或 (S)- 构型。

[0067] 拮抗蛋白的一个实例为可溶的 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体。制备这种可溶异聚受体的方法为本领域已知,例如通过引用结合到本文的授权于 2003 年 7 月 8 号的美国专利 6,589,764 中所述。IL-17A-IL-17B 受体复合体包括以下 IL-17RA 和 IL-17RB(和 / 或另外的亚基),其作为共表达于相同细胞中的蛋白,或作为互相连接(例如,通过任何合适的方法(例如通过交联剂或多肽接头)共价连接)的受体亚基。在一个实施方案中,异聚受体形成自各受体成分与抗体分子的一部分(例如 Fc 区)的融合蛋白。或者,所述异聚 IL-17A-IL-17B 受体可通过非共价相互作用形成,例如生物素与抗生物素蛋白的非共价相互作用。

[0068] 2.0 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物

[0069] 如上所述,IL-17RA-IL-17RB 拮抗物包括 IL-17RA-IL-17RB 抗原结合蛋白,该抗原结合蛋白包括但不限于抗体、肽和多肽,以及其它拮抗物(包括其它多肽或蛋白)。IL-17RA-IL-17RB 拮抗物(例如 IL-17RA-IL-17RB 抗原结合蛋白)的替代实施方案包括 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的共价修饰。这种修饰可在翻译后完成。例如,通过使所述拮抗物的特定氨基酸残基与以下有机衍生剂反应,将所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的数种共价

修饰引入分子中,该有机衍生剂能与选定的侧链或 N- 或 C- 端残基反应。以下表示这种对 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物修饰的实例。

[0070] 最常将半胱氨酰残基与 α - 卤代乙酸酯 (及相应的胺) (例如氯乙酸或氯乙酰胺) 反应,以得到羧甲基或羧基酰氨基甲基衍生物。也通过与一溴三氟丙酮、 α - 溴 - β - (5- 咪唑基) 丙酸、磷酸氯乙酰胺、N- 烷基马来酰亚胺、3- 硝基 - 2- 吡啶基二硫化物、甲基 2- 吡啶基二硫化物、对氯汞苯甲酸、2- 氯汞基 - 4- 硝基酚或氯 - 7- 硝基苯并 - 2- 噁 - 1,3- 二唑反应衍生半胱氨酰残基。通过与焦碳酸二乙酯在 pH 5.5-7.0 反应衍生组氨酰残基,因为该试剂相对专一于组氨酰侧链。对溴代苯甲酰甲基溴也为有用的;反应优选在 pH 6.0 0.1M 二甲胂酸钠中进行。将赖氨酰 (lysiny) 和氨基末端残基与琥珀酸酐或其它羧酸酐反应。与这些试剂的衍生具有反转赖氨酰残基电荷的作用。其它适用于衍生含 α 氨基残基的试剂包括亚氨酸酯,例如甲基吡啶亚胺甲酯;磷酸吡哆醛;吡哆醛;chloroborohydride;三硝基苯磺酸;邻甲基异脲;2,4- 戊二酮;及转氨酶催化的与乙醛酸的反应。通过与一种或几种常规试剂反应修饰精氨酰残基,例如苯甲酰甲醛、2,3- 丁二酮、1,2- 环己二酮和茚三酮。因为胍官能团的高 pK_a ,精氨酸残基的衍生反应需要在碱性条件下进行。此外,这些试剂可与赖氨酸的基团以及精氨酸 ϵ 氨基反应。

[0071] 酪氨酰残基的特异修饰,尤其有兴趣于引入光谱标记进酪氨酰残基,可通过与芳香族重氮化合物或四硝基甲烷反应得到。最通常的是,将 N- 乙酰基咪唑 (N-acetylimidazole) 和四硝基甲烷分别用于形成 O- 乙酰酪氨酰类和 3- 硝基衍生物。使用 ^{125}I 或 ^{131}I 碘化酪氨酰残基以制备用于 IL-17RA 放射免疫测定的标记蛋白,上述的氯胺 T 法为适用的。通过与碳二亚胺 ($\text{R}' - \text{N} = \text{C} = \text{N} - \text{R}'$) 反应选择性地修饰羧基侧基 (天冬氨酰基或谷氨酰基),其中 R 和 R' 任选为不同烷基,例如 1- 环己基 - 3- (2- 吗啉基 - 4- 乙基) 碳二亚胺或 1- 乙基 - 3- (4- 氮阳离子 - 4,4- 二甲基戊基) 碳二亚胺。此外,通过与铵离子反应将天冬氨酰基和谷氨酰基残基转化为天冬酰胺酰基和谷氨酰胺酰基残基。

[0072] 双功能物质的衍生有用于交联 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物至水不溶性载体的基质或表面,以用于各种方法中。通常使用的交联剂包括,例如 1,1- 双 (重氮乙酰基) - 2- 苯乙醇、戊二醛、N- 羟琥珀酰亚胺酯,例如具有 4- 叠氮基水杨酸的酯类、同双功能亚氨酸酯 (包括双琥珀酰胺酯 (例如 3,3' - 二硫代双 (琥珀酰亚胺丙酸酯)) 和双功能马来酰亚胺 (例如双 - N- 马来酰亚胺基 - 1,8 辛烷)。衍生物,例如甲基 - 3- [(对 - 叠氮基苯基) 二硫代] 丙亚氨酸酯,产生光可活化中间体,该中间体在存在光时能形成交联。或者,使用水不溶性反应性基质例如溴化氰活化的碳水化合物和描述于美国专利第 3,969,287、3,691,016、4,195,128、4,247,642、4,229,537 和 4,330,440 号的反应性底物用于蛋白固定化。

[0073] 谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基常常分别脱去酰胺基成为相应的谷氨酰基和天冬氨酰基残基。或者,这些残基在温和的酸性条件下脱去酰胺基。这些残基的任一种形式都落入本发明的范围内。其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酰或苏氨酰残基羟基的磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链 α 氨基的甲基化 (T.E.Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H.Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983])、N 端氨基的乙酰化和任何 C 端羧基的酰胺化。

[0074] 本发明范围内的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的另一种共价修饰包括改变蛋白的糖基化模式。如本领域已知,糖基化模式可取决于蛋白的序列 (例如特定糖基化氨基酸残

基的存在或不存在,在下面讨论),或产生蛋白的宿主细胞或有机体。多肽的糖基化通常为 N 连接或 O 连接。N 连接指碳水化合物部分连接至天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸,其中 X 为除脯氨酸外的任何氨基酸,为碳水化合物部分酶促连接至天冬酰胺侧链的识别序列。因此,多肽中存在这些三肽序列中的任一种则产生潜在的糖基化位点。O 连接的糖基化指糖类 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一个连接至羟基氨基酸,最通常为丝氨酸或苏氨酸,尽管 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸也可用到。通过改变氨基酸序列容易实现将糖基化位点加至 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物,使得其包含一个或更多个上述的三肽序列(用于 N 连接的糖基化位点)。所述改变也可通过一个或更多个丝氨酸或苏氨酸残基的加入或取代起始序列得到(用于 O 连接的糖基化位点)。简言之,所述抗原结合蛋白氨基酸序列优选通过以下改变,其为在 DNA 水平的变化,尤其通过编码目标多肽的 DNA 在预选碱基上的突变,使得产生将翻译成所需氨基酸的密码子。

[0075] 在 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物上增加碳水化合物部分的数量的一种方法为通过化学或酶促偶联糖苷至蛋白。这些方法的优势在于其无需在具有用于 N-或 O-连接糖基化的糖基化能力的宿主细胞中生产所述蛋白。取决于所用的偶联方式,所述糖类可连接至(a)精氨酸和组氨酸、(b)自由羧基、(c)自由巯基(例如半胱氨酸的那些)、(d)自由羟基(例如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的那些)、(e)芳族残基(例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的那些)或(f)谷氨酰胺的酰胺基。这些方法在 1987 年 9 月 11 日公开的 WO 87/05330 和 Aplin 和 Wriston,1981,CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 中所述。

[0076] 可以化学或酶促地实现存在于起始 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的碳水化合物部分的去除。化学去糖基化要求蛋白暴露至化合物三氟甲烷磺酸或等同的化合物中。该处理导致除连接糖类(N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺)外的多数或全部糖类的裂解,而完整地留下多肽。化学去糖基化由 Hakimuddin 等,1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 和 Edge 等,1981, Anal. Biochem. 118:131 所述。在多肽上的碳水化合物部分的酶促裂解可通过利用各种内切和外切糖苷酶实现,如 Thotakura 等,1987, Meth. Enzymol. 138:350 所述。可通过利用化合物衣霉素防止在潜在糖基化位点的糖基化,如 Duskin 等,1982, J. Biol. Chem. 257:3105 所述。衣霉素阻断蛋白-N-糖苷连接的形成。

[0077] 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的另一种共价修饰包括以美国专利第 4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192 或 4,179,337 号中阐述的方式将抗原结合蛋白连接至各种非蛋白类聚合物,包括但不限于各种多羟基化合物,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯。此外,如本领域已知,氨基酸取代可在抗原结合蛋白内的各个位置完成,以促进聚合物例如 PEG 的加入。

[0078] IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的共价修饰包括在本发明的范围内,且通常但不总是在翻译后实现。例如,通过使 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的特定氨基酸残基与能跟选定侧链或 N-或 C 末端残基反应的有机衍生试剂反应,将 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的数种共价修饰引入所述分子中。

[0079] 在某些实施方案中,本发明的抗原结合蛋白的共价修饰包括加入一种或更多种标记。通常,取决于检测标记的方法,标记分为多种类别 a) 同位素标记,其可为放射性同位素或重同位素;b) 磁性标记(例如磁性粒子);c) 氧化还原活性部分;d) 光学染料;酶促基团(例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、荧光酶、碱性磷酸酶);e) 生物素化的基团;和 f) 由

次级报道分子识别的预定多肽表位（例如亮氨酸拉链序列对、第二抗体的结合位点、金属结合域、表位标记等）。在某些实施方案中，所述标记基团通过各种长度的间隔臂偶联至所述抗原结合蛋白以减少潜在位阻。用于标记蛋白的各种方法为本领域已知，可在进行本发明中使用。

[0080] 具体标记包括光学染料，包括但不限于发色团、磷光体和荧光团，后者在很多例子中将具体化。荧光团可为“小分子”荧光剂或蛋白类荧光剂。“荧光标记”指可通过其固有荧光特性检测的任何分子。合适的荧光标记包括但不限于荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、伊红、藻红、香豆素、甲基香豆素、芘、孔雀石绿、芪、萤光黄、Cascade BlueJ、Texas Red、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LC Red 640、Cy 5、Cy 5.5、LC Red 705、俄勒冈绿 (Oregon green)、Alexa-Fluor 染料 (Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor633、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680)、Cascade Blue、Cascade Yellow 和 R-藻红蛋白 (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR)、FITC、罗丹明、及 Texas Red (Pierce, Rockford, IL)、Cy5、Cy5.5、Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA)。合适的光学染料，包括荧光团，描述于 Richard P. Haugland 的 Molecular Probes Handbook，通过引用明确地结合至此。

[0081] 合适的蛋白类荧光标记也包括但不限于绿色荧光蛋白（包括海肾 (Renilla)、Ptilosarcus 或 Aequorea 种的 GFP (Chalfie 等, 1994, Science 263 :802-805))、EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Genbank 登记号 U55762)、蓝色荧光蛋白 (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9 ; Stauber, 1998, Biotechniques 24 :462-471 ; Heim 等, 1996, Curr. Biol. 6 :178-182)、增强的黄色荧光蛋白 (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.)、萤光素酶 (Ichiki 等, 1993, J. Immunol. 150 :5408-5417)、 β 半乳糖苷酶 (Nolan 等, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85 :2603-2607) 和海肾 (W092/15673、W095/07463、W098/14605、W098/26277、W099/49019, 美国专利第 5292658、5418155、5683888、5741668、5777079、5804387、5874304、5876995、5925558 号)。所有上面引用的参考通过引用明确地结合到本文中。

[0082] 还可对任何其它蛋白类 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物进行抗原结合蛋白的所有上述修饰，例如异聚 IL-17RA-IL-17RB 复合体或如本文描述的多肽或肽类拮抗物。

[0083] 3.0 使用方法

[0084] 本发明还提供使用 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的方法，包括例如使用 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物用于诊断目的或用于治疗目的。应该理解的是，用于治疗，IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的使用通常用于减少或改善所给予治疗的疾病或状况的病征和 / 或症状。本发明提供如遍及本说明书所述的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物，该拮抗物可在制备或生产用于治疗本文所述的各种状况或疾病的药物中使用。此外，IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的有效量和一种或更多种如本文所述的附加活性物质的治疗有效量，可用于制备或生产有用所述治疗的药物。某些实施方案包括部分包含 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的试剂盒；任选的是，这种试剂盒可包含至少一种附加的用于分开、同时或随后给予需要其的受试者的活性成分。

[0085] 另外的实施方案包括使用一种或更多种本文所述的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物，在

表达 IL-17RA 和 IL-17RB 的细胞中抑制 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 活化作用的方法。例如, 在表达 IL-17RA 和 IL-17RB 的细胞中抑制 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 活化作用的方法, 包括暴露该细胞至 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物, 其中所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体的至少一个亚基或组分, 并部分抑制或完全抑制其与所述异聚受体复合体的另一个亚基或组分的缔合 (通过位阻或构象改变), 从而防止 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体形成。在某些实施方案中, 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体的一个亚基。在替代实施方案中, 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体的多于一个亚基或结合所述异聚受体复合体本身。在某些实施方案中, 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物无需抑制配体 (例如 IL-25) 至所述异聚受体复合体一个或更多个组分的结合, 以抑制 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 活化作用。在替代实施方案中, 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抑制配体 (即 IL-25) 至 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 的结合, 并抑制 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 活化作用。另外的实施方案包括一种方法, 其中该 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物为如本文中定义的抗原结合蛋白; 所述抗原结合蛋白任选为以药物组合物的形式。

[0086] 另外的实施方案包括使用一种或更多种本文所述的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物, 在体内表达至少 IL-17RA 和 IL-17RB 的细胞中抑制 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 活化作用的方法。例如, 在体内表达 IL-17RA 和 IL-17RB 的细胞中抑制 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 活化作用的方法包括暴露该细胞至 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物, 其中所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体的至少一个亚基或组分, 并部分抑制或完全抑制其与所述异聚受体复合体的另一个亚基或组分的缔合 (通过位阻或构象改变), 从而抑制 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体活化。在某些实施方案中, 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体的一个亚基。在替代实施方案中, 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体的多于一个亚基, 或结合所述异聚受体复合体本身。在某些实施方案中, 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物无需阻断配体 (例如 IL-25) 至所述异聚受体复合体一个或更多个组分的结合, 以抑制 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 激活。在替代实施方案中, 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抑制配体 (即 IL-25) 至 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 的结合, 并抑制 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 活化作用。另外的实施方案包括一种方法, 其中该 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物为如本文中定义的抗原结合蛋白; 所述抗原结合蛋白任选为以药物组合物的形式。

[0087] 另外的实施方案包括使用一种或更多种本文所述的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物, 在体内表达 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的细胞中减少该复合体活化后释放的促炎介质的方法。例如, 在体内表达 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的细胞中减少该复合体激活后促炎介质的释放的方法, 包括暴露该细胞至 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物, 其中所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体至少一个亚基或组分, 并部分抑制或完全抑制 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的形成或活化 (通过位阻或构象改变), 从而减少促炎介质的释放。在某些实施方案中, 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体的一个亚基。在替代实施方案中, 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体的多于一个亚基, 或结合所述异聚受体复合体本身。在某些实施方案中, 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物无需抑制配体 (例如 IL-25) 至所述异聚受体复合体一个或更多个组分的结合, 以减少促炎介质的释放。在替代实施方案中, 所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抑

制配体（即 IL-25）至 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 的结合，并减少促炎介质的释放。另外的实施方案包括一种方法，其中该 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物为如本文定义的抗原结合蛋白；所述抗原结合蛋白任选为以药物组合物的形式。

[0088] 另外的实施方案包括如上所述的方法，其中所述促炎介质为下列中的至少一种：IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、IL-13、CXCL1、CXCL2、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、IL-1 β 、TNF α 、RANK-L、LIF、PGE2、MMP3、MMP9、GRO α 、NO、嗜酸细胞活化趋化因子、MCP-1 和 IL-17RB，以及本领域已知的任何其它促炎介质，该促炎介质通过 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 的活化作用释放自任何细胞。

[0089] 另外的实施方案包括用所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物，治疗与 IL-17 家族成员有关病症（例如但不限于炎症和自身免疫病症）的如上述的方法。

[0090] 另外的实施方案包括治疗炎症的方法，其中通过给予本文所述的一种或更多种 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物，部分或完全阻断所述 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体被活化。例如，在需要其的患者中治疗炎症的方法包括将 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物给予该患者，其中所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体的至少一个亚基或组分，并部分抑制或完全抑制所述异聚受体复合体的形成或活化（通过位阻或构象改变），从而促进炎症的治疗。在某些实施方案中，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体的一个亚基。在替代实施方案中，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体的多于一个亚基，或结合所述异聚受体复合体本身。在某些实施方案中，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物无需阻断配体（例如 IL-25）至所述异聚受体复合体一个或更多个组分的结合，以有用于治疗炎症。在替代实施方案中，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抑制配体（即 IL-25）至 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 的结合，并有用于治疗炎症。另外的实施方案包括一种方法，其中该 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物为如本文定义的抗体；所述抗体任选为以药物组合物的形式。

[0091] 另外的实施方案包括治疗自身免疫病症的方法，其中通过给予本文所述的一种或更多种 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物，部分或完全阻断所述 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体被活化。例如，在有此需要的患者中治疗自身免疫病症的方法包括将 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物给予该患者，其中所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体的至少一个亚基或组分，并部分抑制或完全抑制所述异聚受体复合体的形成或活化，从而促进自身免疫病症的治疗。在某些实施方案中，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体的一个亚基。在替代实施方案中，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物结合所述异聚受体复合体的多于一个亚基，或结合所述异聚受体复合体本身。在某些实施方案中，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物无需阻断配体（例如 IL-25）至所述异聚受体复合体一个或更多个组分的结合，以有用于治疗自身免疫病症。在替代实施方案中，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物抑制配体（即 IL-25）至 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB 的结合，并有用于治疗自身免疫病症。另外的实施方案包括一种方法，其中该 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物为如本文定义的抗体；所述抗体任选为以药物组合物的形式。

[0092] 另外的实施方案包括如上述的治疗炎症和 / 或自身免疫病症的方法，其中所述病症包括但不限于软骨炎症和 / 或骨退化、关节炎、类风湿性关节炎、幼年型关节炎、幼年型类风湿性关节炎、少关节的幼年型类风湿性关节炎、多关节的幼年型类风湿性关节炎、全身

发病型幼年型类风湿性关节炎、幼年型强直性脊柱炎、幼年型肠病性关节炎、幼年型反应性关节炎、幼年型莱特氏综合征 (Reter's Syndrome)、SEA 综合征 (血清阴性、起止点病、关节病综合征)、幼年型皮炎、幼年型银屑病关节炎、幼年型硬皮病、幼年型全身性红斑狼疮、幼年型血管炎、少关节的类风湿性关节炎、多关节的类风湿性关节炎、全身发病型类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、肠病性关节炎、反应性关节炎、莱特氏综合征、SEA 综合征 (血清阴性、起止点病、关节病综合征)、皮炎、银屑病关节炎、硬皮病、全身性红斑狼疮、血管炎、肌炎、多发性肌炎、皮炎、骨关节炎、结节性多动脉炎 (polyarteritis nodosa)、韦格纳氏 (Wegener's) 肉芽肿病、动脉炎、风湿性多肌痛、结节病、硬皮病、硬化、原发性胆管纤维化、硬化性胆管炎、斯耶格伦氏 (Sjogren's) 综合征、银屑病、斑块状银屑病、滴状干癣、皮褶银屑病、脓疱性银屑病、红皮性银屑病、皮炎、特应性皮炎、动脉粥样硬化、狼疮、斯提耳氏病 (Still's disease)、全身性红斑狼疮 (SLE)、重症肌无力、炎性肠病 (IBD)、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、乳糜泻、多发性硬化 (MS)、哮喘 (包括外源性哮喘和內源性哮喘以及相关的慢性炎症状况,或气道高反应性)、慢性阻塞性肺病 (COPD,即慢性支气管炎、肺气肿)、急性呼吸病症综合征 (ARDS)、呼吸窘迫综合征、囊性纤维化病、肺动脉高压、肺血管收缩、急性肺损伤、变应性支气管肺曲菌病、过敏性肺炎、嗜酸细胞性肺炎、支气管炎、过敏性支气管炎支气管扩张症、结核病、过敏性肺炎、职业性哮喘、哮喘样病症、肉样瘤、反应性气道病 (或功能障碍) 综合征、棉尘肺、间质性肺病、嗜酸细胞增多综合征、鼻炎、鼻窦炎和肺寄生虫病、与病毒 (例如呼吸道合胞病毒 (RSV)、副流感病毒 (PIV)、鼻病毒 (RV) 和腺病毒) 诱导状况有关的气道高反应性、格林-巴利病 (Guillain-Barre disease)、I 型糖尿病、格雷夫斯氏病 (Graves' disease)、阿狄森氏综合征 (Addison's disease)、雷诺氏现象 (Raynaud's phenomenon)、自身免疫性肝炎、GVHD 等。

[0093] 另外的实施方案包括药学组合物,所述药学组合物包含治疗有效量的一种或更多种 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物和药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和 / 或佐剂。此外,本发明提供通过给予这种药学组合物治疗患者的方法,以及制备或生产用于治疗上述状况的药物的方法。

[0094] 可接受的配方材料为在采用的剂量和浓度下对受试者无毒的。在某些实施方案中,所述药学组合物可包含用于改变、维持或保存组合物的例如 pH、渗透性、粘度、澄清度、色泽、等渗性、气味、无菌度、稳定性、溶解或释放速率、吸收或渗透的配方材料。在这种实施方案中,合适的配方材料包括但不限于氨基酸 (例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗菌剂;抗氧化剂 (例如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂 (例如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其它有机酸);膨胀剂 (例如甘露醇或甘氨酸);螯合剂 (例如乙二胺四乙酸 (EDTA));络合剂 (例如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精);填充剂;单糖;二糖;及其它碳水化合物 (例如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白 (例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、矫味剂和稀释剂;乳化剂;亲水聚合物 (例如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;形成盐的平衡离子 (例如钠);防腐剂 (例如苯扎氯铵、安息香酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢);溶剂 (例如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇 (例如甘露醇或山梨醇);悬浮剂;表面活性剂或润湿剂 (例如泊洛沙姆、PEG、山梨坦酯、聚山梨醇酯类例如聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯、triton、氨基丁三醇、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊);

稳定性强化剂（例如蔗糖或山梨醇）；张力强化剂（例如碱金属卤化物，优选氯化钠或氯化钾，甘露醇山梨醇）；递送载体；稀释剂；赋形剂和 / 或药学佐剂。参见，REMINGTON' S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company。

[0095] 在某些实施方案中，最佳药学组合物将由本领域技术人员根据例如给药的计划途径、递送形式和所需剂量确定。例如，参见 REMINGTON' S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 见上。在某些实施方案中，这种组合物可影响所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。在某些实施方案中，药学组合物中的主要媒介物或载体性质上可为水的或非水的。例如，合适的媒介物或载体可为注射用水、生理盐水或人工脑脊液，可附加组合物中其它常见的用于肠胃外给药的物质。中性缓冲盐水或混合着血清白蛋白的盐水为另外的示范性载体。在具体实施方案中，药学组合物包含 pH 约 7.0-8.5 的 Tris 缓冲液或 pH 约 4.0-5.5 的醋酸盐缓冲液，还可包含山梨醇或合适的替代品。在某些实施方案中，可通过将具有所需纯度的选定组合物与任选的配方物质（REMINGTON' S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 见上）混合，制备以冻干饼或水溶液形式用于贮藏的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物组合物。此外，在某些实施方案中，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物制品可利用合适的赋形剂例如蔗糖配成冻干物。

[0096] 可选择本发明的药学组合物用于肠胃外递送。或者，可选择所述组合物用于吸入或通过消化道（例如口服）递送。这种药学可接受组合物的制备在本领域技术范围内。所述配方组分优选在给药位点可接受的浓度内存在。在某些实施方案中，使用缓冲液维持组合物在生理 pH 或稍低 pH，典型地在 pH 约 5 至约 8 范围内。

[0097] 当打算肠胃外给药时，所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可以无热源、肠胃外可接受的水溶液形式提供，该水溶液包含在药学可接受载体中的所需 IL-17 受体抗原结合蛋白。尤其适用于肠胃外注射的载体为无菌蒸馏水，其中所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物配置为无菌、等渗的溶液且良好保存着。在某些实施方案中，所述制备可涉及所需分子与物质例如可注射微球、可生物蚀解粒子、聚合物（例如聚乳酸或聚乙醇酸），珠子或脂质体的配制，该配制可带来可通过积存注射递送的产品的控释或缓释。在某些实施方案中，可使用透明质酸，具有促进在循环中缓释持续时间的作用。在某些实施方案中，可使用可植入药物递送装置以引入所需抗原结合蛋白。

[0098] 本发明的药学组合物可配制用于吸入。在这些实施方案中，IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可配成干的、可吸入粉末。吸入溶液也可与推进剂一起配制用于气溶胶递送。在某些实施方案中，溶液可备喷雾。肺部给药和为此的配制方法进一步在国际专利申请号 PCT/US94/001875 中描述，该申请通过引用结合并描述了化学改性蛋白的肺部给药。

[0099] 也设想了配方可口服给药。以这种方式给予的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可与或不与通常用于固体剂型（例如片剂和胶囊）配方中的载体一起配制。在某些实施方案中，可设计胶囊在胃肠道的当生物利用度最大化且系统前降解最小化的点上释放配方的活性部分。可包含附加物质以促进所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的吸收。还可使用稀释剂、矫味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、助悬剂、片剂崩解剂和粘合剂。

[0100] 优选提供包含有效量的一种或更多种 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的本发明的药学组合物，该拮抗物与适于制备片剂的无毒赋形剂混合。通过在无菌水或其它合适媒介物中

溶解所述片剂,溶液可制成单位剂量形式。合适的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂,例如碳酸钙、碳酸钠或碳酸氢钠、乳糖或磷酸钙;或粘合剂,例如淀粉、明胶或阿拉伯胶;或润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。

[0101] 另外的药学组合物对本领域技术人员是显而易见的,该组合物包括使 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物包含在缓释或控释给药配方中的配方。用于配制各种其它缓释或控释递送工具(例如脂质体载体、可生物降解的微粒或多孔珠和积存注射剂)的技术同样为本领域技术人员已知。例如,参见国际专利申请号 PCT/US93/00829,其通过引用结合并描述了用于递送药学组合物的多孔聚合微粒的控释。缓释制剂可包含以定形物形式的半透性聚合基质,例如薄膜或微胶囊。缓释基质可包含聚酯、水凝胶、聚交酯(如美国专利第 3,773,919 号和欧洲专利申请公开号 EP 058481 中公开的,各自通过引用结合)、L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ -乙酯的共聚物(Sidman 等,1983,Biopolymers 2:547-556)、聚(甲基丙烯酸 2-羟乙酯)(Langer 等,1981,J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 和 Langer,1982,Chem. Tech. 12:98-105)、乙烯醋酸乙烯酯(Langer 等,1981,见上)或聚-D(-)-3-羟丁酸(欧洲专利申请公开号 EP 133,988)。缓释组合物也可包含脂质体,该脂质体可通过本领域已知几种方法的任一种制备。例如,参见 Eppstein 等,1985,Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82:3688-3692;欧洲专利申请公开号 EP 036,676、EP 088,046 和 EP 143,949,其通过引用结合。

[0102] 用于体内给予的药学组合物通常提供为无菌制剂。可通过无菌滤膜过滤实现除菌。当所述组合物为冻干的时,可在冻干和重构前或后使用该方法进行除菌。用于肠胃外给药的组合物可以冻干形式或在水溶液中存储。肠胃外组合物通常放置在具有无菌入口的容器中,例如具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉注射溶液袋或小瓶。

[0103] 一旦配制成所述药学组合物,其可作为溶液、悬浮液、凝胶体、乳液、固体、晶体或以脱水的或冻干的粉存储于无菌小瓶中。这种配方可以随时可用的形式或以给药前重构的形式(例如冻干品)存储。本发明还提供用于制备单剂量给药单位的试剂盒。本发明的试剂盒每个可包含具有干蛋白的第一个容器和具有液态配方的第二个容器。在本发明的某些实施方案中,提供包含单室和多室预装填注射器(例如液体注射器和 lyosyringe)的试剂盒。

[0104] 使用的包含 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的药学组合物的治疗有效量将取决于例如治疗背景和对象。本领域的技术人员会认可,用于治疗的合适剂量水平将部分地根据所给药的分子、正在使用所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的适应症、给药途径和患者的尺寸(体重、体表或器官大小)和/或状态(年龄和大致健康状态)而变化。在某些实施方案中,临床医生可滴定剂量并改变给药途径以获得最佳治疗效果。根据上述因素,典型的剂量可从约 0.1 μ g/kg 至最高约 30mg/kg 或更高间变化。在具体实施方案中,所述剂量可从 0.1 μ g/kg 至最高约 30mg/kg 间变化,任选地从 1 μ g/kg 至最高约 30mg/kg 间或从 10 μ g/kg 至最高约 5mg/kg 间变化。当然,应该理解的是,这该由有资格的医师决定及这些剂量仅为示范性的。给药频率将取决于所使用配方中具体 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的药物动力学参数。通常,临床医生给予所述组合物直至达到实现所需效果时的剂量。因此,所述组合物可随着时间以单剂、或双剂或更多剂(其可包含所需分子相同或不同的量)给予,或通过植入装置或导管连续灌输给予。进一步精细化合适的剂量由本领域普通技术人员常规地进行,也

是在其常规执行的任务范围内的。合适的剂量可通过利用合适的剂量响应数据确定。在某些实施方案中,所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可在整个长时间周期内给予患者。慢性给予 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可将通常伴随着非完全人 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的有害免疫或变应性应答降至最低,该非完全人 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物为例如在非人类动物中产生的抗人抗原的抗体,例如在非人种中产生的非完全人抗体或非人类抗体。

[0105] 所述药学组合物的给予途径与已知方法一致,例如口服、通过静脉、腹膜内、脑内(脑实质内)、脑室内、肌肉、眼内、动脉内、门静脉内或损害内途径注射;通过缓释系统或植入装置。在某些实施方案中,所述组合物可通过推注或连续灌输或植入装置给予。

[0106] 所述组合物还可通过植入膜、海绵或其它合适的已吸收或胶囊化所需分子的物质而局部给予。在使用植入装置的某些实施方案中,该装置可植入任何适宜的组织或器官,并可通过扩散、定时释药推注或连续给予递送所需分子。

[0107] 本文所述的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可与用于治疗本文所述的疾病和状况的药学物质联合(治疗前、治疗后或同时治疗)使用。在一个实施方案中,本文所述的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可与任一种或更多种用于治疗或预防本文所述的疾病和病症的 TNF 抑制剂联合(治疗前、治疗后或同时治疗)使用,例如但不限于所有类型的可溶 TNF 受体,其包括依那西普(例如 **ENBREL[®]**),以及所有类型的单体或多聚 p75 和 / 或 p55TNF 受体分子和其片段;抗人 TNF 抗体,例如但不限于英夫利昔单抗(例如 **REMICADE[®]**)和 D2E7(例如 **HUMIRA[®]**)等。这种 TNF 抑制剂包括阻断 TNF 的体内合成或胞外释放的化合物和蛋白。在具体实施方案中,本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物与下列 TNF 抑制剂的任一种或更多种的联合(治疗前、治疗后或同时治疗)使用:TNF 结合蛋白(如本文中定义的 I 型可溶 TNF 受体和 II 型可溶 TNF 受体("sTNFRs"))、抗 TNF 抗体、粒细胞集落刺激因子、沙利度胺、BN 50730、替尼达普、E 5531、tiapafant PCA 4248、尼美舒利、panavir、咯利普兰、RP 73401、肽 T、MDL 201,449A、盐酸(1R,3S)-顺式-1-[9-(2,6-二氢嘌呤基)]-3-羟-4-环戊烯、(1R,3R)-反式-1-[9-(2,6-二氢)嘌呤]-3-乙酰氧环戊烷、盐酸(1R,3R)-反式-1-(9-腺嘌呤基)-3-叠氮环戊烷和(1R,3R)-反式-1-(6-羟-嘌呤-9-基)-3-叠氮环戊烷。TNF 结合蛋白公开于本领域(EP 308 378、EP 422 339、GB 2 218 101、EP 393 438、WO 90/13575、EP 398 327、EP 412 486、WO 91/03553、EP 418 014、JP 127,800/1991、EP 433 900、美国专利第 5,136,021 号、GB 2 246 569、EP 464 533、W092/01002、WO 92/13095、WO 92/16221、EP 512 528、EP 526 905、WO 93/07863、EP 568 928、WO 93/21946、WO 93/19777、EP 417 563、WO 94/06476 和 PCT 国际申请号 PCT/US97/12244)。例如,EP 393 438 和 EP 422 339 指出 I 型可溶 TNF 受体(也称为"sTNFR-I"或"30kDa TNF 抑制剂")和 II 型可溶 TNF 受体(也称为"sTNFR-II"或"40kDa TNF 抑制剂")(一起称为"sTNFRs")以及其改良型(例如片段、有功能的衍生物和变体)的氨基酸和核酸序列。EP 393 438 和 EP 422 339 也公开了分离负责编码该抑制剂的基因、克隆该基因到合适的载体和细胞型中以及表达该基因以生产该抑制剂的方法。此外,也已公开了 sTNFR-I 和 sTNFR-II 的多价型(即包含多于一个活性部分的分子)。在一个实施方案中,可通过化学方法将至少一种 TNF 抑制剂和另一部分与任何临床可接受的接头(例如聚乙二醇(W092/16221 和 WO 95/34326))偶联、通过肽接头(Neve 等.(1996),Cytokine,8(5):365-370)、通过化学方法偶联至生物素然后结合至抗生物素蛋白(W091/03553)及最后通

过结合嵌合抗体分子（美国专利 5,116,964、W089/09622、W0 91/16437 和 EP 315062）构建所述多价型。抗-TNF 抗体包括 MAK 195F Fab 抗体（Holler 等（1993），1st International Symposium on Cytokines in Bone Marrow Transplantation, 147）、CDP 571 抗-TNF 单克隆抗体（Rankin 等（1995），British Journal of Rheumatology, 34:334-342）、BAY X1351 鼠抗-肿瘤坏死因子单克隆抗体（Kieft 等（1995），7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 第 9 页）、CentTNF cA2 抗-TNF 单克隆抗体（Elliott 等（1994），Lancet, 344:1125-1127 和 Elliott 等（1994），Lancet, 344:1105-1110）。

[0108] 本文所述的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可与所有类型的 IL-1 抑制剂，例如但不限于 kiniret（例如 **ANAKINRA[®]**），联合使用（治疗前、治疗后或同时治疗）。白介素-1 受体拮抗物（IL-1ra）为作为白介素-1 的天然抑制剂的人蛋白。白介素-1 受体拮抗物及其制造方法和使用方法描述于美国专利第 5,075,222 号、W0 91/08285、W0 91/17184、AU 9173636、W0 92/16221、W0 93/21946、W0 94/06457、W0 94/21275、FR 2706772、W0 94/21235、DE 4219626、W0 94/20517、W0 96/22793 和 W0 97/28828。所述蛋白包括糖基化以及非糖基化的 IL-1 受体拮抗物。具体的是，三种类型的 IL-1ra（IL-1ra α 、IL-1ra β 和 IL-1rax），每种都由相同的 DNA 编码序列和其变体编码，公开和描述于美国专利第 5,075,222 号。制备 IL-1 抑制剂尤其是 IL-1ras 的方法，也公开于专利 5,075,222。白介素-1 抑制剂的另外种类包括能特异地防止 IL-1 细胞受体活化作用的化合物。这种化合物包括 IL-1 结合蛋白，例如可溶受体和单克隆抗体。这种化合物还包括所述受体的单克隆抗体。白介素-1 抑制剂的另一种类包括阻断 IL-1 的体内合成和/或胞外释放的化合物和蛋白。这种化合物包括影响 IL-1 基因转录或 IL-1 前蛋白加工的物质。

[0109] 本文所述的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可与所有类型的 CD28 抑制剂，例如但不限于阿巴西普（abatacept）（例如 **ORENCIA[®]**），联合使用（治疗前、治疗后或同时治疗）。所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可与一种或更多种细胞因子、淋巴因子、造血因子和/或抗炎药联合使用（治疗前、治疗后或同时治疗）。

[0110] 本文所述的疾病和病症的治疗可包括控制疼痛和/或炎症的一线药物的使用与一种或更多种本文提供的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的治疗的联合（治疗前、治疗后或同时治疗）。这些药物分类为非甾体类抗炎药物（NSAIDs）。第二类治疗药包括皮质类固醇长效抗风湿药（SAARDs）或疾病调修（DM）药。关于下列化合物的信息可在 The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 第十八版, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, N. J. (2006) 和 Pharmaprojects, PJB Publications Ltd 中查到。

[0111] 在具体实施方案中，本发明涉及使用 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物和任一种或更多种 NSAIDs 治疗本文所述的疾病和病症（治疗前、治疗后或同时治疗）。NSAIDs 的抗炎作用至少部分归因于前列腺素合成的抑制（Goodman 和 Gilman 的“The Pharmacological Basis of Therapeutics,” MacMillan 第 7 版（1985））。NSAIDs 可表征为至少九组：(1) 水杨酸类衍生物、(2) 丙酸类衍生物、(3) 乙酸类衍生物、(4) 芬那酸（fenamic acid）类衍生物、(5) 羧酸类衍生物、(6) 丁酸类衍生物、(7) 昔康类（oxicams）、(8) 吡唑类和 (9) 吡唑啉酮类。

[0112] 在另一具体实施方案中，本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物与任一种或更多种水杨酸类衍生物、其前药酯类或药学可接受盐的联合（治疗前、治疗后或同时治疗）使用。

这种水杨酸类衍生物、其前药酯类和药学可接受盐包括：醋氨沙罗、阿洛普令、阿斯匹林、贝诺酯、溴水杨醇、乙酰水杨酸钙、三水杨酸胆碱镁、水杨酸镁、水杨酸胆碱、diflusal、依特柳酯、芬度柳、龙胆酸、乙二醇单水杨酸酯、水杨酸咪唑、赖氨酸乙酰水杨酸、5-氨基水杨酸、水杨吗啉、水杨酸 1-萘酯、奥沙拉秦、帕沙米特、乙酰水杨酸苯酯、水杨酸苯酯、醋水杨胺、乙酰水杨酰胺 0-乙酸、双水杨酯、水杨酸钠和柳氮磺胺吡啶。这组也意图涵盖具有类似镇痛和抗炎特性的结构相关的水杨酸类衍生物。

[0113] 在又一具体实施方案中，本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物与任一种或更多种丙酸类衍生物、其前药酯类或药学可接受盐的联合（治疗前、治疗后或同时治疗）使用。所述丙酸类衍生物、其前药酯类和药学可接受盐包括：阿明洛芬、苯噁洛芬、布氯酸、卡洛芬、右吲哚洛芬、非诺洛芬、氟诺洛芬、氟洛芬、氟比洛芬、呋洛芬、布洛芬、布洛芬铝、异丁普生、吲哚洛芬、异洛芬、酮洛芬、洛索洛芬、咪洛芬、萘普生、萘普生钠、奥沙普秦、吡酮洛芬、匹美洛芬、吡洛芬、普拉洛芬、丙替嗪酸、吡多咯芬、舒洛芬、噻洛芬酸和硫噁洛芬。这组也意图涵盖具有类似镇痛和抗炎特性的结构相关的丙酸类衍生物。

[0114] 在又另一具体实施方案中，本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物与任一种或更多种乙酸类衍生物、其前药酯类或药学可接受盐的联合（治疗前、治疗后或同时治疗）使用。所述乙酸类衍生物、其前药酯类和药学可接受盐包括：阿西美辛、阿氯芬酸、氨芬酸、丁苯羟酸、桂美辛、氯吡酸、地美辛、双氯芬酸钾、双氯酚酸钠、依托度酸、联苯乙酸、芬氯酸、苯克洛酸、芬克洛酸、芬替酸、呋罗芬酸、葡美辛、异丁芬酸、吲哚美辛、三苯唑酸、伊索克酸、氯那唑酸、甲嗪酸、奥沙美辛、oxpinac、吡美辛、丙谷美辛、舒林酸、他美辛、噻拉米特、硫平酸、托美丁、托美丁钠、齐多美辛和佐美酸。这组也意图涵盖具有类似镇痛和抗炎特性的结构相关的乙酸类衍生物。

[0115] 在另一具体实施方案中，本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物与任一种或更多种芬那酸类衍生物、其前药酯类或药学可接受盐的联合（治疗前、治疗后或同时治疗）使用。所述芬那酸类衍生物、其前药酯类和药学可接受盐包括：苯乙氨茴酸、依托芬那酯、氟芬那酸、异尼辛、甲氯芬那酸、甲氯芬那酸钠、medofenamic acid、甲芬那酸、尼氟酸、他尼氟酯、特罗芬那酯、托芬那酸和乌芬那酯。这组也意图涵盖具有类似镇痛和抗炎特性的结构相关的芬那酸类衍生物。

[0116] 在另一具体实施方案中，本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物与任一种或更多种羧酸类衍生物、其前药酯类或药学可接受盐的联合（治疗前、治疗后或同时治疗）使用。可使用的所述羧酸类衍生物、其前药酯类和药学可接受盐包括：环氯茛酸、二氟尼柳、氟苯柳、inoridine、酮咯酸和替诺立定。这组也意图涵盖具有类似镇痛和抗炎特性的结构相关的羧酸类衍生物。

[0117] 在又另一具体实施方案中，本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物与任一种或更多种丁酸类衍生物、其前药酯类或药学可接受盐的联合（治疗前、治疗后或同时治疗）使用。所述丁酸类衍生物、其前药酯类和药学可接受盐包括：丁丙二苯肼、布替布芬、芬布芬和联苯丁酸。这组也意图涵盖具有类似镇痛和抗炎特性的结构相关的丁酸类衍生物。

[0118] 在另一具体实施方案中，本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物与任一种或更多种昔康类、其前药酯类或药学可接受盐的联合（治疗前、治疗后或同时治疗）使用。所述昔康类、其前药酯类和药学可接受盐包括：屈噁昔康、依诺利康、伊索昔康、吡罗昔康、舒多昔

康、替诺昔康和 4-羟基-1,2-苯并噻嗪 1,1-二氧化 4-(N-苯基)-氨甲酰。这组也意图涵盖具有类似镇痛和抗炎特性的结构相关的昔康类。

[0119] 在又另一具体实施方案中,本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物与任一种或更多种吡唑类、其前药酯类或药学可接受盐的联合(治疗前、治疗后或同时治疗)使用。可使用的所述吡唑类、其前药酯类和药学可接受盐包括:二苯米唑和依匹唑。这组也意图涵盖具有类似镇痛和抗炎特性的结构相关的吡唑类。

[0120] 在另一具体实施方案中,本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物与任一种或更多种吡唑啉酮类、其前药酯类或药学可接受盐的联合(治疗前、治疗后或同时治疗)使用。可使用的所述吡唑啉酮类、其前药酯类和药学可接受盐包括:阿扎丙宗(apazone)、阿扎丙酮(azapropazone)、苄哌吡酮、非普拉宗、莫非布宗、吗拉宗、羟布宗、保泰松、哌布宗、异丙安替比林、雷米那酮、琥布宗和噻唑丁炎酮(thiazolinobutazone)。这组也意图涵盖具有类似镇痛和抗炎特性的结构相关的吡唑啉酮类。

[0121] 在另一具体实施方案中,本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物与任一种或更多种下列 NSAIDs 的联合(治疗前、治疗后或同时治疗)使用: ϵ -乙酰氨基己酸、S-腺苷甲硫氨酸、3-氨基-4-羟丁酸、阿米西群、阿尼扎芬、安曲非宁、苄达酸、苄达赖氨酸(bendazac lysinate)、苄达明、beprozine、溴哌莫、布可隆、丁苯唑酸、环丙喹宗、氯苄叉胺酯、达齐胺、地波沙美、地托咪定、联苯吡胺(difenpiramide)、difenpyramide、difisalamine、地他唑、依莫法宗、甲磺法奈替唑(fanetizole mesylate)、芬氟咪唑、夫洛非宁、氟咪唑、氟尼辛、氟丙喹宗、福吡托林、磷柳酸、胍美柳、guaiazolene、isonixirine、盐酸来苯胺、来氟米特、洛非咪唑、氯替法唑、赖氨酸氯尼辛(lysine clonixinate)、美西拉宗、萘丁美酮、尼克吡啶、尼美舒利、奥古蛋白、奥帕诺辛、奥沙西罗、奥沙帕朵、瑞尼托林、哌立索唑、枸橼酸哌立索唑、哌福肱、piproxene、吡拉唑酸、吡非尼酮、普罗喹宗、普罗沙唑、thielavine B、替氟咪唑、替美加定、托来汀、托帕朵、tryptamine 和用公司代号命名的那些,例如 480156S、AA861、AD1590、AFP802、AFP860、AI77B、AP504、AU8001、BPPC、BW540C、CHINOIN 127、CN100、EB382、EL508、F1044、FK-506、GV3658、ITF182、KCNTI6090、KME4、LA2851、MR714、MR897、MY309、ON03144、PR823、PV102、PV108、R830、RS2131、SCR152、SH440、SIR133、SPAS510、SQ27239、ST281、SY6001、TA60、TAI-901(4-苯甲酰-1-茛菪酸)、TVX2706、U60257、UR2301 和 WY41770。这组也意图涵盖具有与所述 NSAIDs 类似镇痛和抗炎特性的结构相关的 NSAIDs。

[0122] 在又另一具体实施方案中,本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物与任一种或更多种皮质类固醇、其前药酯类或药学可接受盐的联合(治疗前、治疗后或同时治疗)用于治疗本文所述的疾病和病症。皮质类固醇、其前药酯类和药学可接受盐包括氢化可的松和衍生自氢化可的松的化合物,例如 21-乙酰氧基孕烯醇酮、alclomerasone、阿尔孕酮、安西奈德、倍氯米松、倍他米松、戊酸倍他米松、布地奈德、氯泼尼松、氯倍他索、丙酸氯倍他索、氯倍他松、丁氯倍他松、氯可托龙、氯泼尼醇、皮质酮、可的松、可的伐唑、deflazacort、地奈德、desoximetasone、地塞米松、二氟拉松、二氟可龙、二氟泼尼酯、甘草次酸、氟扎可特、氟二氯松、氟米松、特戊酸氟米松、flucinolone acetonide、氟尼缩松、氟新诺龙酯、氟西奈德(flucocinolone acetonide)、氟考丁酯、氟可龙、己酸氟可龙、戊酸二氟可龙、氟米龙、醋酸氟培龙、醋酸氟泼尼定、氟泼尼龙、flurandrenolide、福莫可他、哈西奈德、卤米松、醋酸卤泼尼松、氢可他酯、氢化可的松、醋酸氢可的松、氢化可的松丁酸酯、磷酸氢化可的松、氢化

可的松 21-琥珀酸钠、叔丁醋酸氢化可的松、马泼尼酮、甲羟松、甲泼尼龙、甲泼尼龙、糠酸莫米松、帕拉米松、泼尼卡酯、泼尼松龙、泼尼松龙 21-diedryaminoacetate、泼尼松龙磷酸钠、泼尼松龙琥珀酸钠、泼尼松龙 21-间磺基苯甲酸钠、泼尼松龙 21-硬脂酰乙醇酸钠、泼尼松龙叔丁乙酯、泼尼松龙 21-三甲基乙酸酯、泼尼松、强的松龙戊酸酯、泼尼立定、泼尼立定 21-二乙氧乙酯、替可的松、曲安西龙、曲安奈德、苯曲安奈德和己曲安奈德。这组也意图涵盖具有类似镇痛和抗炎特性的结构相关的皮质类固醇。

[0123] 在另一具体实施方案中,本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物与任一种或更多种长效抗风湿药 (SAARDs) 或疾病调修抗风湿药 (DMARDS)、其前药酯类或药学可接受盐联合 (治疗前、治疗后或同时治疗) 用于治疗本文所述的疾病和病症。SAARDs 或 DMARDS、其前药酯类和药学可接受盐包括:阿洛酮钠、金诺芬、金硫葡萄糖、金硫醋苯胺、硫唑嘌呤、布喹那钠、布西拉明、3-金硫-2-丙醇-1-磺酸钙、苯丁酸氮芥、氯喹、氯丁扎利、铜克索林、环磷酰胺、环孢菌素、氨苯砒、15-脱氧精脒菌素、双醋瑞因、氨基葡萄糖、金盐类 (例如,环喹金盐、金硫丁二钠、硫代硫酸金钠)、羟氯喹、硫酸羟氯喹、羟基脲、凯布宗、左旋咪唑、氯苯扎利、蜂毒肽、6-巯基嘌呤、甲氨蝶呤、咪唑立宾、麦考酚酸莫酯、金硫乙酸钙、氮芥、D-青霉胺、吡啶酚咪唑 (pyridinolimidazole) (例如 SKNF86002 和 SB203580)、雷帕霉素、硫醇类、胸腺生成素和长春新碱。这组也意图涵盖具有类似镇痛和抗炎特性的结构相关的 SAARDs 或 DMARDS。

[0124] 在另一个具体实施方案中,本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物 (治疗前、治疗后或同时治疗) 与任一种或更多种 COX2 抑制剂、其前药酯类或药学可接受盐用于治疗本文所述的疾病和病症。COX2 抑制剂、其前药酯类或药学可接受盐的实例包括例如塞来考昔。这组也意图涵盖具有类似镇痛和抗炎特性的结构相关的 COX2 抑制剂。COX-2 选择性抑制剂的实例包括但不限于艾托考昔、伐地考昔、塞来考昔、利克飞龙 (licofelone)、罗美昔布 (lumiracoxib)、罗非考昔等。

[0125] 本文所述的疾病和病症的治疗包括控制炎症反应 (例如染病个体气道中的高反应性) 的一线药物的使用与一种或更多种本文提供的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的治疗的联合 (治疗前、治疗后或同时治疗)。常用于治疗这种疾病或病症的药物包括 β 2-激动剂、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤类、抗炎药、抗胆碱药、支气管扩张药、皮质类固醇和这些物质的联合。关于下列化合物的信息可在 The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 第十八版, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, N. J. (2006) 和 Pharmaprojects, PJB Publications Ltd 中查到。

[0126] 在另一具体实施方案中,本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物 (治疗前、治疗后或同时治疗) 与任一种或更多种 β 2-激动剂、其前药酯类或药学可接受盐用于治疗本文所述的疾病和病症。 β 2-激动剂、其前药酯类或药学可接受盐的实例包括例如沙丁胺醇 (Accuneb®, Proair HFA®, Proventil® HFA, Ventolin HFA®)、奥西那林 (Alupent®, Alupent®吸入溶液、Alupent®糖浆)、醋酸吡布特罗 (Maxair Autohaler®) 和硫酸特布他林 (Brethair®, Brethine®)。长效 β 2-激动剂 (其中一些与其它物质 (例如 Advair®, Symbicort®, Serevent® 和 Foradil®) 联合) 为已知, 且有助于与 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的联合。

[0127] 本发明的另一实施方案涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物 (治疗前、治疗后或同时治疗) 与任一种或更多种白三烯抑制剂、其前药酯类或药学可接受盐用于治疗本文所述的疾

病和病症。白三烯抑制剂、其前药酯类或药学可接受盐的实例包括例如齐留通 (**Zyflo®**)、扎鲁司特 (**Accolate®**)和孟鲁司特 (**Singulair®**)。

[0128] 在又一具体实施方案中,本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物(治疗前、治疗后或同时治疗)与任一种或更多种甲基黄嘌呤类、其前药酯类或药学可接受盐用于治疗本文所述的疾病和病症。甲基黄嘌呤类、其前药酯类或药学可接受盐的实例包括例如茶碱(例如 **Bronkodyl®**、**Elixophyllin®**、**Slo- bid®**、**Slo- Phyllin®**、**Theo- 24®**、**Theo- Dur®**、**Theolair®**、**Uniphyll®**)和氨茶碱(例如 **Phyllocontin®**、**Truphylline®**)。

[0129] 在另一具体实施方案中,本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物(治疗前、治疗后或同时治疗)与任一种或更多种抗炎药、其前药酯类或药学可接受盐用于治疗本文所述的疾病和病症。这种抗炎药实例包括但不限于色甘酸(**Cromolyn®**)、**(Nasalcrom®**、**Intal®**、**Opticrom®**)和奈多罗米(**Tilade®**)。

[0130] 本发明的另一实施方案涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物(治疗前、治疗后或同时治疗)与任一种或更多种抗胆碱能药、其前药酯类或药学可接受盐用于治疗本文所述的疾病和病症。这种抗胆碱能药、前药酯类或其药学可接受盐的实例包括但不限于异丙托溴铵(**Atrovent®**)和噻托溴铵(tiotropium) (**Spiriva®**)。

[0131] 在另一具体实施方案中,本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物(治疗前、治疗后或同时治疗)与任一种或更多种皮质类固醇、其前药酯类或药学可接受盐用于治疗本文所述的疾病和病症。吸入型皮质类固醇实例包括二丙酸倍氯美松(**Beclovent®**、**Beconase®**、**Vancenase®**和 **Vanceril®**)、曲安奈德(**Azmacort®**、**Nasacort®**、**Tri- Nasal®**)和氟尼缩松(**Aerobid®**、**Nasalide®**)。有用于本发明的其它皮质类固醇的实例包括泼尼松(**Prednisone Intensol®**、**Sterapred®**)和泼尼松龙(**Orapred®**、**Pediapred®**、**Prelone®**)。

[0132] 本发明的又一实施方案涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物(治疗前、治疗后或同时治疗)与任一种或更多种吸入型 β -2 激动剂、其前药酯类或药学可接受盐用于治疗本文所述的疾病和病症。皮质类固醇、其前药酯类或药学可接受盐的实例包括例如沙丁胺醇(**Ventolin®**、**Proventil®**)、奥西那林(**Alupent®**)、醋酸吡布特罗(**Maxair®**)、特布他林(**Brethine®**、**Brethaire®**)、异他林(**Bronkosol®**)和左沙丁胺醇(levsalbutamol) (**Xopenex®**)。

[0133] 在又一具体实施方案中,本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物(治疗前、治疗后或同时治疗)与任一种或更多种支气管扩张药(或抗胆碱能药)、其前药酯类或药学可接受盐用于治疗本文所述的疾病和病症。支气管扩张药的实例包括异丙托铵(**Atrovent®**)和噻托溴铵(**Spiriva®**)。

[0134] 治疗本文所述的疾病和病症可包括治疗或控制传染病一线药物的使用与一种或更多种本文提供的 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的治疗的联合(治疗前、治疗后或同时治疗)。常用于治疗这种疾病或状况的药物包括抗生素、抗菌剂、抗病毒剂和其联合。关于下列化合物的信息可在 The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,第十八版,Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories,Merck & Co.,Rahway,N. J. (2006) 和 Pharmaprojects,PJB Publications Ltd 中查到。

[0135] 在又另一具体实施方案中,本发明涉及 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物联合(治疗前、治疗后或同时治疗)任一种或更多种抗菌剂、其前药酯类或药学可接受盐用于治疗本文所述的疾病和病症。抗菌剂包括例如广谱的青霉素类、头孢菌素类和其它 β -内酰胺类、氨基糖苷类、吡咯类、喹诺酮类、大环内酯类、利福霉素类、四环素类、磺胺类药、林肯酰胺类抗生素和多粘菌素类。所述青霉素类包括但不限于青霉素 G、青霉素 V、甲氧西林、萘夫西林、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、氟氯西林、氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林、阿莫西林/克拉维酸钾(clavulanate)、海他西林、环青霉素、巴氨西林、羧苄西林、卡茛西林、替卡西林、替卡西林/克拉维酸钾、阿洛西林、美洛西林、哌拉西林(peperacilli)和美西林。所述头孢菌素类以及其它 β -内酰胺类包括但不限于头孢噻吩、头孢匹林、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑林、头孢羟氨苄、头孢克洛、头孢孟多、头孢替坦、头孢西丁、ceruroxime、头孢尼西、ceforadine、头孢克肟、头孢噻肟、拉氧头孢、头孢唑肟、头孢曲松、cephoperazone、头孢他啶、亚胺培南和氨曲南。所述氨基糖苷类包括但不限于链霉素、庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星、奈替米星、卡那霉素和新霉素。所述吡咯类包括但不限于氟康唑。所述喹诺酮类包括但不限于萘啶酸、诺氟沙星、依诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、司帕沙星和替马沙星。所述大环内酯类包括但不限于红霉素、螺旋霉素和阿奇霉素。所述利福霉素类包括但不限于利福平。所述四环素类包括但不限于 spicycline、金霉素、氯莫环素、地美环素、脱氧土霉素、胍甲环素、赖甲环素、甲氯环素、甲烯氧四环素、米诺环素、土霉素、青环素、匹环素、罗利环素、山环素、琥氯霉素吡甲四环素和四环素。所述磺胺类药包括但不限于对氨基苯磺酰胺、磺胺甲基异噁唑、磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺异噁唑和复方新诺明(甲氧苄啶/磺胺甲基异噁唑)。所述林肯酰胺类抗生素包括但不限于克林霉素和林可霉素。所述多粘菌素类(多肽类)包括但不限于多粘菌素 B 和多粘菌素 E。

[0136] 4.0 筛选测定

[0137] 另外的实施方案包括筛选所述 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体拮抗物的方法。设想本领域已知的且适合于鉴定 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体拮抗物的筛选测定形式。例如:一种筛选 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体拮抗剂的方法,该方法包括提供 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体中的 IL-17RA 和 IL-17RB;将候选物质暴露至该受体复合体;及测定相对于未暴露于候选物质的受体复合体形成的量。将候选物质暴露于受体复合体的步骤可在 IL-17RA 和 IL-17RB 形成 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体之前、期间或之后。

[0138] 另外的实施方案包括筛选 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体活化的拮抗物的方法,该方法包括提供 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体中的 IL-17RA 和 IL-17RB;将候选物质暴露至该受体复合体;加入一种或更多种 IL-17 配体;及测定相对于未暴露于候选物质的 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体活化的量。认为以下候选物质是阳性的,其在存在一种或更多种 IL-17 配体时减少 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体活化,这通过生物相关读出(见下文)测定。所述 IL-17 配体可为 IL-17A、IL-17F、IL-25 或任何其它结合并活化 IL-17RA、IL-17RB 或 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的 IL-17 配体。活化作用在说明书其它地方定义。相关生物读出包括 IL-5、IL-6、IL-8、IL-13、CXCL1、CXCL2、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、IL-1 β 、TNF α 、RANK-L、LIF、PGE2、IL-12、MMP3、MMP9、GRO α 、NO 以及本领域已知任何其它分子,该分子释放自表达 IL-17RA 和/或 IL-17RB 的任何细胞。将候选物质暴露于

所述受体复合物的步骤可在 IL-17RA 和 IL-17RB 形成 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体之前、期间或之后。应该理解的是,候选物质可部分抑制 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体,即低于 100%抑制。在某些测定条件下,候选物质可完全抑制 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体。

[0139] 在一方面,本发明提供基于细胞的测定,以检测候选物质对 IL-17RA 和 IL-17RB 的缔合、所述 17RA-IL-17RB 异聚受体复合体以及所述 17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的活化的影响。因此,本发明提供将候选物质加入至细胞,以筛选 17RA-IL-17RB 异聚受体复合体拮抗物。

[0140] 本文所用的“候选物质”或“候选药物”描述可被筛选如本文概述的活性的任何分子,例如但不限于肽类、肽的融合蛋白(例如结合共价或非共价结合至其它蛋白的 IL-17RA、IL-17RB 或所述 17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的肽,例如本领域已知的抗体片段或蛋白基支架)、蛋白、抗体、小有机分子(包括已知药物和药物候选者)、多糖、脂肪酸、疫苗、核酸等。

[0141] 候选物质包括众多化学种类。在一个实施方案中,所述候选物质为有机分子,优选具有分子量大于 100 而小于约 2500 道尔顿的小有机化合物。包括具有分子量大于 100 而小于约 2000 道尔顿、更优选小于约 1500 道尔顿、更优选小于约 1000 道尔顿、更优选小于 500 道尔顿的小有机化合物。候选物质包含对与蛋白结构相互作用尤其是氢键合必需的官能团,并通常包含至少一个胺基、羰基、羟基或羧基,优选至少两个所述化学官能团。所述候选物质常常包含被上述官能团中的一个或多个取代的环碳或杂环结构和/或芳族或聚芳族结构。也在生物分子中发现候选物质,该生物分子包括肽类、糖类、脂肪酸类、甾类、嘌呤类、嘧啶类、衍生物、结构类似物或其组合。

[0142] 候选物质得自多种的来源,包括合成或天然化合物的库。例如,现有众多方法可用于随机和定向合成多种有机化合物和生物分子,该方法包括表达和/或合成随机的寡核苷酸和肽。或者,以细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物的库为现有的或容易制得。此外,通过常规的化学方法、物理方法和生物化学方法容易修饰天然或合成制得的库和化合物。已知的药理学物质可受到定向或随机的化学修饰例如酰化作用、烷化作用、酯化作用、酰胺化作用(amidification),以生产结构类似物。

[0143] 在替代实施方案中,所述候选生物活性物质可为蛋白或蛋白片段。因此,例如可使用包含蛋白的细胞提取物,或蛋白类细胞提取物的随机或定向消化物。这样可制得用于在本文所述的系统中筛选的原核和真核蛋白的库。该实施方案包括细菌蛋白库、真菌蛋白库、病毒蛋白库和哺乳动物蛋白(包括人蛋白)库。

[0144] 在某些实施方案中,所述候选物质为肽类。在该实施方案中,使用包含展示结构的肽类构建物可为有用的。“展示结构”或语法上等同物本文中指一种序列,当其融合于候选生物活性物质时,引起所述候选物质呈现构象限制形式。蛋白主要通过构象限制域各自相互作用。尽管如本领域已知的具有自由旋转氨基和羧基末端的小肽类可具有强大的功能,但是由于不能预测拟肽合成的侧链位置,将这种肽结构转化成药理物质是困难的。因此,构象限制结构中肽的展示将有益于下一代药物,也将很可能导致所述肽与目标蛋白更高的亲和作用。该事实已在组合库产生系统中认可,该系统使用在细菌噬菌体系统中生物产生的短肽。很多工作者已构建了小域分子,其中可展示随机肽结构。特定的展示结构通过在外

环展示肽,使对该肽的可接近性达到最大程度。因此,合适的展示结构包括但不限于微抗体结构、 β 折叠转角上的环和卷曲螺旋茎结构(其中对结构无关紧要的残基为随机的)、锌指结构域、半胱氨酸连接的(二硫化物)结构、谷氨酰胺转移酶连接的结构、环肽、B 环结构、螺旋的桶或束、亮氨酸拉链基序等。参见通过引用结合的美国专利第 6,153,380 号。

[0145] 在筛选测定中有具体用途的为噬菌体展示库;例如,参见美国专利第 5,223,409、5,403,484、5,571,698 和 5,837,500 号,为了噬菌体展示方法和构建物,它们所有都通过引用其整体而明确地结合。通常,噬菌体展示库可利用合成蛋白(例如肽)插入片段,或可利用基因组、cDNA 等的消化物。

[0146] 取决于测定和所需结果,可使用多种细胞型,包括真核细胞和原核细胞;发现哺乳动物细胞和人细胞尤其有用于本发明。在一个实施方案中,所述细胞可为遗传改造的,例如其可包含外源核酸,例如编码 IL-17RA 和 IL-17RB 的那些。在某些情况下,将本发明的 IL-17RA 和 IL-17RB 蛋白改造为包含标记(例如表位标记),例如但不限于用于免疫沉淀测试或其它用途的那些。

[0147] 将所述候选物质加到细胞中,并允许温育适宜的时期。将候选物质暴露至所述受体复合体的步骤可在 IL-17RA 和 IL-17RB 形成 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体之前、期间或之后。在一个实施方案中,在存在和不存在所述候选物质时评估 IL-17RA 和 IL-17RB 的缔合。例如通过使用标记的构建物和抗体,可完成免疫沉淀试验。然后,对干扰 IL-17RA 和 IL-17RB 缔合的候选物质,测试 IL-17 配体家族成员(例如 IL-17A 和 IL-17F)信号传导活性,例如通过测试由如上述的 IL-17 配体家族成员活化的基因表达。

[0148] 在某些实施方案中,所述 IL-17RA 和/或 IL-17RB 蛋白为融合蛋白。例如可以某种方式修饰受体蛋白以形成嵌合分子,该嵌合分子包含融合至另一个异源多肽或氨基酸序列的脱辅基蛋白(即嵌合分子或复合体的蛋白部分)。在一个实施方案中,这种嵌合分子包含一种或更多种受体与标记多肽的融合体,该标记多肽提供抗-标记抗体可选择性结合的表位。该表位标记通常位于所述受体蛋白的氨基或羧基末端。可使用抗该标记多肽的抗体检测这种表位标记形式的受体的存在。此外,提供这种表位标记使受体多肽能易于通过亲和纯化法纯化,该亲和纯化法使用抗-标记抗体或其它类型的结合表位标记的亲和基质。这些表位标记可用于固定到如本文中概述的固体支持物。

[0149] 各种标记多肽和其各自的抗体为本领域所熟知。实例包括聚组氨酸(聚 his)或聚组氨酸-甘氨酸(聚 his-gly)标记;流感 HA 标记多肽和其抗体 12CA5[Field 等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165(1988)];c-myc 标记和其 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 抗体[Evan 等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616(1985)];以及单纯疱疹病毒糖蛋白 D(gD) 标记和其抗体[Paborsky 等, Protein Engineering, 3(6):547-553(1990)]。其它标记多肽包括 FLAGGTM-肽[Hopp 等, BioTechnology, 6:1204-1210(1988)];KT3 表位肽[Martin 等, Science, 255:192-194(1992)];微管蛋白表位肽[Skinner 等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166(1991)];以及 T7 基因 10 蛋白肽标记[Lutz-Freyermuth 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397(1990)]。

[0150] 可制得多种表达载体。所述表达载体可为自复制型染色体外载体或整合至宿主基因组的载体。通常,这些表达载体包括可操作地连接至编码金属蛋白的核酸的转录和翻译调节核酸。术语“控制序列”指在特定宿主生物体中对表达可操作连接的编码序列必需的

DNA 序列。适合于原核生物的控制序列包括例如启动子、任选操纵基因序列和核糖体结合位点。真核细胞已知利用启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。

[0151] 在某些实施方案中,在体外进行抑制至 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的结合的测定。例如,将测定混合物(候选物质、IL-17RA 和 IL-17RB)的成分固定在一个表面上,再加入其它成分(在某些实施方案中其中一种为标记的)。例如,可将 IL-17RA 或 IL-17RB 连到一个表面,再加入候选物质和标记的 IL-17RA 和 / 或 IL-17RB。洗涤后,评估标记的存在。在该实施方案中,如本领域已知的分离所述 IL-17RA 和 IL-17RB 蛋白。

[0152] 总的来说,通常如本领域已知的实现连接,而且连接取决于将被连接两种物质的组成。通常,通过利用各成分上可用于连接的官能团使用连接接头。用于连接的官能团为氨基、羧基、桥氧基、羟基和硫醇基。然后这些官能团可通过利用接头直接或间接连接。接头为本领域所熟知;例如熟知同双功能或异双功能接头(参见通过引用结合到本文的 1994Pierce Chemical Company 目录,关于交联剂的技术部分,第 155-200 页)。连接接头包括但不限于烷基(包括取代烷基和包含杂原子部分的烷基),包括短烷基、酯类、酰胺、胺、环氧基及乙二醇和衍生物。或者,使用融合配偶体;合适的融合配偶体包括其它固定成分,例如用于与具有镍的表面连接的组氨酸标记、用于接头和标记等连接的功能成分和蛋白类标记。

[0153] 在一个实施方案中,尤其当候选物质固定在固体支持物时,合适的融合配偶体为自荧光蛋白标记。合适的蛋白类荧光标记还包括但不限于绿色荧光蛋白(GFP)(包括海肾、Ptilosarcus 或 Aequorea 种的 GFP(Chalfie 等,1994, Science 263:802-805))、EGFP(Clontech Laboratories, Inc., Genbank 登记号 U55762)、蓝色荧光蛋白(BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801deMaisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9, Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim 等, 1996, Curr. Biol. 6:178-182)、增强的黄色荧光蛋白(EYFP, Clontech Laboratories, Inc.)、萤光酶(Ichiki 等, 1993, J. Immunol. 150:5408-5417)、 β 半乳糖苷酶(Nolan 等, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:2603-2607)和海肾(W092/15673、W095/07463、W098/14605、W098/26277、W099/49019, 美国专利第 5292658、5418155、5683888、5741668、5777079、5804387、5874304、5876995、5925558)。所有上面引用的参考通过引用明确地结合到本文中。

[0154] 所述不溶性支持物可由任何组分构成,所述组合物可结合至该组分,该不溶支持物易于从可溶物质中分离,并另外的与全部筛选方法相容。这种支持物的表面可为实心或多孔的及任何适宜形状。合适的支持物实例包括微量滴定板、阵列、膜类和珠子,并包括但不限于玻璃和改性或官能化的玻璃、塑料(包括丙烯酸树脂、聚苯乙烯及苯乙烯和其它物质的共聚物、聚丙烯、聚乙烯、聚丁烯、聚氨酯、聚四氟乙烯等)、多糖、尼龙或硝化纤维、树脂、硅石或包括硅和改性硅的硅石基材料、碳、金属、无机玻璃、塑料、陶瓷和各种其它聚合物。在某些实施方案中,所述实心支持物允许光学检测且其自身不明显发荧光。此外,如本领域已知,所述实心支持物可涂上许多的物质,包括聚合物,例如葡聚糖、丙烯酰胺、明胶、琼脂糖等。示范性的实心支持物包括硅、玻璃、聚苯乙烯及其它塑料和丙烯酸树脂类。由于使用小量的试剂和样品就可同时进行大量测定,微量滴定板和阵列尤其便利。所述组合物结合的具体方式并不重要,只要其与试剂及本发明的全部方法相容、保持所述组合物的活

性并为非可扩散的。

[0155] 在有利于物质靶向性相互作用的反应条件下,所述候选物质与测定的其它成分接触。通常,该条件为生理条件。温育可在任何利于最佳活性的温度下进行,典型为 4-40℃ 间。选择最适活性的温育周期,但也可优化温育周期利于快速高通量筛选。典型地 0.1-1 小时时间为足够的。在固相测定的情况下,过量试剂通常清除掉或洗走。在下面讨论测定形式。

[0156] 可将各种其它试剂包含进测定中。这些包括试剂如盐、中性蛋白,例如白蛋白、去污剂等,该试剂可用于促进最适宜脱辅蛋白-物质结合和/或减少非特异性或背景相互作用。此外,还可使用另外地改进测定效率的试剂,例如蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂、抗菌剂等。成分的混合可以任何提供必需结合的顺序加入。

[0157] 在一个实施方案中,本文概述的任何测定可利用用于高通量筛选的机器人系统。很多系统通常涉及 96(或更多)孔微量滴定板的使用,但如本领域那些人员会认可的,可使用任何数量的不同板或配置。此外,本文概述的任何或全部步骤可为自动化的;因此,例如该系统可为完全或部分自动化的。

[0158] 如本领域那些人员会认可的,有多种可使用的组件,包括但不限于一个或更多个机器臂;用于微板位置控制的板操作器(plate handler);用于给无交叉污染板上的孔移去和替换盖的自动化盖操作器(lid handler);用于样品分发的带有一次性尖端的尖端集合体(tip assemblies);用于样品分发的可洗尖端集合体;96孔装载块;冷却试剂架;微量滴定板移液管位置(任意冷却);平板和尖端的堆料塔(stacking tower);及计算机系统。

[0159] 完全机器人或微流体系统包括自动化的液体处理、颗粒处理、细胞处理和有机体处理,该处理包括高通量的移液操作以执行筛选应用的所有步骤。这包括液体、颗粒、细胞和有机体操作,例如抽入、分配、混合、稀释、洗涤、精确容积转移;移液管吸头的回收和丢弃;及用于自单个样品抽入液多次递送的等体积重复移液。这些操作为无交叉污染液体、颗粒、细胞和有机体的转移。该设备执行将微板样品自动化复制至滤器、膜和/或子板、高密度转移、全板连续稀释和高容量操作。

[0160] 在一个实施方案中,可使用化学衍生的颗粒、板、管、磁性粒子或其它对测定成分具有特异性的固态基质。微板、管或任何固相基质的结合表面包括非极性表面、高极性表面、促进共价结合的改性葡聚糖涂层、抗体涂层、结合融合蛋白或肽的亲介质、表面固定的蛋白(例如重组蛋白 A 或 G)、核苷酸树脂或涂层及其它有用于本发明的亲和基质。

[0161] 在一个实施方案中,为了额外的容量,用于多孔板、复式管、小管、深孔板、微量离心管、冷冻管、方孔板、滤器、芯片、光纤、珠子和其它固相基质的平台或具有多种体积的平台,容纳在可升级组合式平台。该组合式平台包括变速定轨振荡器、电穿孔仪、及用于源样、样品和试剂稀释的多工位工作板、测定板、样品和试剂储存器、移液管吸头和活动洗涤站。

[0162] 在一个实施方案中,循环变温器和温度调节系统用于稳定热交换器(例如受控块或平台)的温度,以提供从 4℃ 至 100℃ 间准确温度控制温育样品。

[0163] 在某些实施方案中,所述仪器化将包括检测器,取决于标记和测定,该检测器可为各种不同的检测器。在一个实施方案中,有用的检测器包括具有多通道荧光的显微镜;提供荧光、紫外光和可见光分光光度检测的具有单波长和双波长端点及动力学性能、荧光共振能量转移(FRET)、SPR 系统、发光、猝灭、两光子激发和强度再分配的平板读数器;捕捉和变

换数据和图像成可计量形式的 CCD 照相机 ; 及计算机工作站。这些将实现以下的监测 : 在细胞、组织和有机体中的特异性标记的大小、增长和表型表达 ; 靶的验证 ; 先导物优化 ; 数据分析、开采、组织以及高通量筛选与公众和专有数据库的整合。

[0164] 所述 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体为所述受体的生物活性形式, 在本文已显示了通过促炎介质的释放应答配体特异性活化作用。本领域已知多种疾病状态 (如本文中示例的) 与 IL-17 配体家族成员的生理水平上升有关。在一个实施方案中, 所述 IL-17RA-IL-17RB 抗原结合蛋白有助于检测生物样品中的 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体, 和鉴定表达该复合体的细胞或组织。这对研究团体具有重要的价值。

[0165] 本发明的抗原结合蛋白可用于诊断目的, 以检测、诊断或监测与 IL-17 或所述 IL-17RA 或 IL-17RB 受体有关的疾病和 / 或状况。本发明提供应用本领域技术人员已知的经典免疫组织学方法检测样品中 IL-17 受体的存在 (例如 Tijssen, 1993, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, vol 15 (Eds R. H. Burdon and P. H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam); Zola, 1987, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc.); Jalkanen 等, 1985, *J. Cell Biol.* 101 : 976-985; Jalkanen 等, 1987, *J. Cell Biol.* 105 : 3087-3096)。所述 IL-17 受体的检测可在体内或体外进行。

[0166] 本文提供的诊断应用包括使用所述抗原结合蛋白去检测所述 IL-17RA 和 IL-17RB 蛋白的表达, 及配体至所述 IL-17 受体的结合。有助于检测所述 IL-17 受体存在的方法的实例包括免疫测定, 例如酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和放射免疫测定 (RIA)。如上文概述, 使用共免疫沉淀反应法对检测所述 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体非常有用。为了诊断应用, 所述抗原结合蛋白通常可用如本文中定义的可检测标记基团标记。

[0167] 本发明的一个方面提供鉴定表达所述 IL-17RA-IL-17RB 异聚受体复合体的单个或复数个细胞。在一具体实施方案中, 将所述抗原结合蛋白用标记基团标记, 检测该标记抗原结合蛋白至所述 IL-17 受体的结合。在另一具体实施方案中, 在体内检测所述抗原结合蛋白至所述 IL-17 受体的结合。在另一具体实施方案中, 所述抗原结合蛋白-IL-17 受体为分离的, 利用本领域已知的技术测量。例如, 参见 Harlow 和 Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor (1991 年版, 周期性增刊); John E. Coligan, 1993 年版, *Current Protocols In Immunology* New York: John Wiley & Sons。

[0168] 5.0 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的制备

[0169] 适宜表达 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的宿主细胞包括原核生物、酵母或高等真核生物细胞。与细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞的宿主一起使用的适宜克隆和表达载体在例如 Pouwels 等. *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, (1985) 中描述。利用得自本文公开 DNA 构建体的 RNA, 也可采用无细胞翻译系统生产 LDCAM 多肽。

[0170] 原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性有机体, 例如大肠杆菌或芽孢杆菌属 (*Bacilli*)。用于转化的适合原核宿主细胞包括例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 和各种其它属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 之内的种。在原核宿主细胞例如大肠杆菌中, IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可包含 N 末端甲硫氨酸残基, 以促进重组多肽在原核宿主细胞中的表达。该 N 末端 Met 可切割自所表达的重组 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物。

[0171] IL-17RA-IL-17RB 拮抗物可在酵母宿主细胞中表达,该酵母宿主细胞优选来自酵母属 (*Saccharomyces*) (例如啤酒酵母 (*S. cerevisiae*))。也可采用其它酵母属,例如毕赤酵母属 (*Pichia*)、乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*) 或克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)。酵母载体常常包含来自 2 μ 酵母质粒的复制起始序列、自主复制序列 (ARS)、启动子区、多聚腺苷酸化序列、转录终止序列和选择标记基因。酵母载体的适合启动子序列尤其包括以下的启动子:金属硫蛋白、3- 磷酸甘油酸激酶 (Hitzeman 等, *J. Biol. Chem.* 255 :2073,1980) 或其它糖酵解酶 (Hess 等, *J. Adv. Enzyme Reg.* 7 :149,1968 ;及 Holland 等, *Biochem.* 17 :4900,1978), 例如烯醇化酶、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、己糖激 酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖 -6- 磷酸异构酶、3- 磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、丙糖磷酸异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶。其它用于酵母中表达的适合载体和启动子进一步描述于 Hitzeman, EPA-73,657 或 Fleer 等, *Gene*, 107 :285-195(1991) ;及 van den Berg 等, *Bio/Technology*, 8 :135-139(1990) 中。另一个替代性启动子为葡萄糖阻遏型 ADH2 启动子,由 Russell 等 (*J. Biol. Chem.* 258 :2674,1982) 和 Beier 等 (*Nature* 300 :724,1982) 描述。在酵母和大肠杆菌中都可复制的穿梭载体可通过将来自 pBR322 的 DNA 序列插入到上述酵母载体中构建,该 DNA 序列用于在大肠杆菌中选择和复制 (Amp^r 基因和复制起点)。

[0172] 可使用酵母 α 因子前导序列引导所述 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物的分泌。所述 α 因子前导序列常常插入到启动子序列和结构基因序列之间。例如,参见 Kurjan 等, *Cell* 30 :933,1982 ;Bitter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 :5330,1984 ;美国专利第 4,546,082 号 ;及 EP 324,274。适于促进酵母宿主分泌重组多肽的其它前导序列为本领域技术人员所知。可在接近前导序列的 3' 末端修饰前导序列,以使其包含一个或更多个限制位点。这将促进前导序列融合至结构基因。

[0173] 酵母的转化方法为本领域技术人员所知。一种这种方法由 Hinnen 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 :1929,1978 描述。Hinnen 等的方法在选择性培养基中挑选 Trp⁺ 转化体,其中所述选择性培养基由 0.67% 酵母氮源、0.5% 酪蛋白氨基酸、2% 葡萄糖、10 μ g/ml 腺嘌呤和 20 μ g/ml 尿嘧啶组成。由包含 ADH2 启动子序列的载体转化的酵母宿主细胞可在“丰富”培养基中诱导表达培养。一种丰富培养基的实例为由 1% 酵母提取物、2% 蛋白胨和 1% 葡萄糖、并添加 80 μ g/ml 腺嘌呤和 80 μ g/ml 尿嘧啶组成的培养基。所述 ADH2 启动子的去阻遏发生在培养基中的葡萄糖耗尽时。

[0174] 也可采用哺乳动物或昆虫宿主细胞培养系统表达重组 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物。Luckow 和 Summers, *Bio/Technology* 6 :47(1988) 综述了用于在昆虫细胞中生产异源蛋白的杆状病毒系统。也可采用哺乳动物源的已建立细胞系。适宜的哺乳动物宿主细胞系的实例包括猴肾细胞 (ATCC CRL 1651) 的 COS-7 系 (Gluzman 等, *Cell* 23 :175,1981)、L 细胞、C127 细胞、3T3 细胞 (ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、HeLa 细胞和 BHK (ATCC CRL 10) 细胞系及如 McMahan 等 (*EMBO J.* 10 :2821,1991) 描述的源自非洲青猴肾细胞系 CV1 (ATCC CCL 70) 的 CV-1/EBNA-1 细胞系。

[0175] 哺乳动物宿主细胞表达载体的转录和翻译的控制序列可切自病毒基因组。常用的启动子序列和增强子序列源自多瘤病毒、腺病毒 2、猿猴病毒 40 (SV40) 和人巨细胞病毒。可使用源自 SV40 病毒基因组的 DNA 序列例如 SV40 起始点、早期和后期启动子、增强子、剪接和多聚腺苷酸化位点,以提供用于在哺乳动物宿主细胞中表达结构基因序列的其它遗传成

分。病毒的早期启动子和后期启动子尤其有用,因为两者容易作为片段从病毒基因组中得到,该片段还可包含病毒的复制起点(Fiers等,Nature273:113,1978)。只要位于SV40病毒复制起始点的从Hind III位点延伸至Bgl I位点的大约250bp序列是包含在内的,也可使用较小的或较大的SV40片段。

[0176] 在哺乳动物宿主细胞中使用的示范性表达载体可如Okayama和Berg(Mol. Cell. Biol. 3:280,1983)所公开的构建。用于在C127鼠乳腺上皮细胞中稳定地高水平表达哺乳动物cDNA的实用系统,可基本如Cosman等(Mol. Immunol. 23:935,1986)所述的构建。由Cosman等,Nature 312:768,1984所述的一种有用的高表达载体,PMLSV N1/N4,已保存为ATCC39890。另外有用的哺乳动物表达载体在本文通过引用结合的EP-A-0367566和申请于1991年5月16日的美国专利申请序号第07/701,415号中描述。所述载体可从反转录病毒中得到。为代替天然的信号序列,和除了起始密码子甲硫氨酸,可加入异源的信号序列,例如美国专利4,965,195中所述的IL-7的信号序列、Cosman等,Nature 312:768(1984)描述的IL-2受体的信号序列、EP 367,566中描述的IL-4信号肽、美国专利4,968,607中描述的I型IL-1受体信号肽和EP 460,846中描述的II型IL-1受体信号肽。

[0177] 本发明的作为分离、纯化或同源蛋白的IL-17RA-IL-17RB拮抗物可通过如上述的重组表达系统生产或纯化自天然存在的细胞。

[0178] 一种生产IL-17RA-IL-17RB拮抗物的方法,包括在足以启动所述IL-17RA-IL-17RB拮抗物表达的条件下培养宿主细胞,该宿主细胞为用包含编码至少一种IL-17RA-IL-17RB拮抗物的DNA序列的表达载体转化的。然后根据采用的表达系统,从培养基或细胞提取物中回收IL-17RA-IL-17RB拮抗物。如技术人员已知,纯化重组蛋白的方法将根据如下因素而变化,例如所用的宿主细胞型和重组蛋白是否分泌到培养基中。例如,当使用分泌重组蛋白的表达系统时,首先可用市售的蛋白浓缩过滤器浓缩培养基,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元。浓缩步骤之后,可将所述浓缩物施加至纯化基质例如凝胶过滤介质中。或者,可使用离子交换树脂,例如具有二乙氨乙基(DEAE)侧基的基质或基体。所述基质可为丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或其它常用于蛋白纯化的种类。或者,可采用阳离子交换步骤。合适的阳离子交换剂包括含磺丙基或羧甲基的各种不溶性基质。最后,可一次或更多次采用使用疏水RP-HPLC介质(例如具有甲基或其它脂族基团侧基的硅胶)的反相高效液相色谱(RP-HPLC)步骤,以进一步纯化IL-17RA-IL-17RB拮抗物。前述纯化步骤中一些或全部(以各种组合)为熟知的,可用于提供基本同质的重组蛋白。

[0179] 有可能利用包含IL-17RA、或IL-17RB、或IL-17RA和IL-17RB两者或IL-17RA-IL-17RB异聚受体复合体蛋白的亲合柱,亲和纯化表达的IL-17RA-IL-17RB拮抗物。可利用常规技术例如在高盐洗脱缓冲液中,然后在较低盐缓冲液中透析备用,或通过改变pH或其它成分(取决于使用的亲和基质),从亲和柱中分离IL-17RA-IL-17RB拮抗物。或者,所述亲和柱可包含结合IL-17RA-IL-17RB拮抗物的抗体。

[0180] 可通过以下分离细菌培养物中产生的重组蛋白,首先破碎宿主细胞、离心、从细胞团中提取(如果是不溶的多肽)或从上清液中提取(如果是可溶的多肽),然后为进一步或更多步浓缩、盐析、离子交换、亲和纯化或尺寸排阻色谱步骤。最后,可在最后纯化步骤使用RP-HPLC。微生物细胞可通过任何常规方法破碎,例如冻融循环、超声、机械破碎或使用细胞

溶解物质。

[0181] 可使用转化的酵母宿主细胞,以分泌型多肽的形式表达 IL-17RA-IL-17RB 拮抗物以简化纯化。来自酵母宿主细胞发酵的分泌型重组多肽可通过类似于 Urdal 等, 1984, J. Chromatog. 296 :171 公开的方法纯化。Urdal 等描述了两个连续的反相 HPLC 步骤,用于在制备型 HPLC 柱中纯化重组人 IL-2。

[0182] 本说明书主体内引用的所有参考都通过引用其整体而明确地结合到本文中。下列实际的和预言性实施例都以阐明本发明的具体实施方案或特征的目的提供,并且不限制其范围。

实施例

[0183] 人 IL-17RD. HIS、山羊抗 -hIL-17RA 多克隆抗体、山羊抗 -hIL-17RB 多克隆抗体、山羊抗 -hIL-17RC 多克隆抗体和所有的 ELISA 试剂盒得自 R& D Systems (Minneapolis, MN) 且根据制造商的说明书使用。鼠 IL-13 得自 Invitrogen Biosource (Carlsbad, CA)。鼠血清白蛋白 (MSA) 得自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。抗人和小鼠 IL-25、IL-17RA 和 IL-17RB 的单克隆抗体基本如 Yao 等描述的制得 (Yao 等, 1995, Immunity 3 :811-821 ;Yao 等, 1995, J. Immunol. 155 :5483-5486 ;Yao, 1997, Cytokine 9 :794-800)。编码人和小鼠 IL-17RA 的 cDNA 先前已有描述 (参见上文三篇 Yao 的参考)。人和小鼠 IL-17RB 编码的开放阅读框与先前描述的相同 (Tian 等, 2000, Oncogene 19 (17) :2098-2109)。编码鼠 IL-25 的 cDNA 先前已有描述 (Hurst 等, 2002, J Immunol. 169 (1) :443-453.)。如 (Hurst 等, 上文) 所述, 在大肠杆菌中表达和纯化鼠 IL-25。基本如 Yao 等, 1995, Immunity (上文) 所述, 将人 IL-17RA 的胞外区融合至聚 HIS 或人 Fc IgG1 (IL-17RA:HIS 或 IL-17RA:Fc, 分别地); 将人 IL-17RB 的胞外区融合至聚 HIS (IL-17RB. HIS) 或人 Fc IgG1 (IL-17RB. Fc)。在某些实验中, 使用市售鼠和人 IL-25、IL-17RAFc 和 IL-17RB Fc (R&D Systems)。

[0184] 实施例 1

[0185] 本实施例在体内表明 IL-17RB 对 IL-25 的应答为必需的。IL-17RB^{-/-} 小鼠使用本领域已知的方法产生。简言之, 通过用 PGKneo 盒替换包含鼠 IL-17RB 外显子 3 的基因组序列, 构建基因靶向载体。将胸苷激酶盒 (MC-TK) 插入至载体的 5' 末端。如 (Kolls, J 等, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91 :215-219) 所述, 用靶向载体电穿孔 129 源胚胎干细胞 (ES) 细胞, 在存在 G418 和更昔洛韦中选择。通过结合 PCR 和基因组 Southern 印迹分析鉴定携带 IL-17RB 的目标突变的 ES 克隆, 并将该克隆注入 Swiss Black 胚胎中。将雄性嵌合体杂交至雌性 Swiss Black, 以产生 IL-17RB 突变的杂合小鼠, 该杂合小鼠随后互交以产生 IL-17RB⁻ 缺陷型小鼠。使用标记辅助加速回交 (Marker-Assisted Accelerated Backcrossing) (MAX-BAXSM) 技术 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) 通过 5 次连续回交至 C57BL/6 小鼠, 将这些小鼠迁移至 C57BL/6 背景。鉴定为 99.5% C57BL/6 的小鼠用于建立繁殖群, 以产生实验用途的小鼠。

[0186] 基本如 Hurst 等 (J. Immunol. 169 :443, 2002) 所述, 鼻内 (IN) 给予对照 C57BL/6 小鼠 (WT) 或 IL-17RB^{-/-} 小鼠 (KO) 50 微升的 MSA (Sigma-Aldrich, St. Louis MO ;10 微克 /mL) 或小鼠 IL-25 (Amgen ;10 微克 /mL), 每天一次, 共四天。在第 5 天, 从该小鼠采集支气管肺泡灌洗液 (BALF) 和肺组织并分析。

[0187] 通过把管子插进用 300 微升 2.5%阿佛丁 (2-2-2- 三溴乙醇, Sigma) 的 IP 注射液麻醉的小鼠, 随后用两个 600 微升体积的冰冷的杜尔贝科氏 (Dulbecco's) PBS (Gibco) 冲洗肺进行支气管肺泡灌洗 (BAL)。该 BAL 液细胞通过在 1000rpm 离心 10 分钟成球状, 随后用 PBS+5%胎牛血清 (FBS ;HyClone ;Logan, UT) 重悬, 以用 **ADVIA®** 120 血液机器 (用于处理和分析血液样品的台式分析器 ;Siemens Diagnostics, Tarrytown, NY) 计算和分析总白细胞含量及各种细胞型的数量的变化。还通过 ELISA (R&D Systems ;检测限 :IL-531pg/mL ; IL-13 62pg/mL) 测定该 BALF 的 IL-5 和 IL-13 蛋白浓度。

[0188] 基本如 (Hartel, C. 等, 1999Scand. J. Immunol. 49(6) :649-654) 先前所述, 使用 Assays-On-Demand **TaqMan®** 引物 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 通过 **TaqMan®** (一种快速实时基于荧光团聚合酶链式反应方法) 表达, 确定肺组织中各种炎症介质的 mRNA 水平。在 ABI Prism 7900HT FastRT-PCR System (Applied Biosystems) 上进行该 **TaqMan®** 分析。各治疗组中各基因对 β -肌动蛋白、HPRT 或 GAPDH 基因表达的相对表达用 Sequence Detection System 2.2.3 (Applied Biosystems) 确定。两个独立实验的结果示于下表 1-4。

[0189] 表 1 :鼻内给予 IL-25 的 IL-17RB KO 和 WT 小鼠中, BALF 细胞含量、IL-5 浓度和 IL-13 浓度的分析

[0190]

基因型, IN 处理	细胞含量	嗜酸性粒细胞	嗜中性粒细胞	淋巴细胞	巨噬细胞	IL-5 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)
WT, MSA	59000±21622	220±491	520±483	980±828	57280±21493	31	63±1
IL-17RB KO, MSA	48750±24958	187±375	537±485	750±501	47275±24110	31	65±7
WT, IL-25	261000±61482	99850±20802	67320±20230	10020±6376	83810±39933	206±48	296±85
IL-17RB KO, IL-25	90000±15411	700±416	7470±8945	2790±2707	79040±13483	31	64±4

[0191] N = 5/ 组 ;所示值为 (平均值 ±SD) ;指定低于 IL-5ELISA 检测范围的样品的值为 31pg/mL。

[0192] 表 2 :应答于 IN IL-25 攻击的 IL-17RB KO 和 WT 小鼠肺中, IL-5、IL-13 和 IL-17RA mRNA 的分析

[0193]

基因型, IN 处理	IL-5	IL-13	IL-17RA
WT, MSA	0.0001524±0.0002235	0.004738±0.005697	0.03015±0.01009
IL-17RB KO, MSA	0.0004190±0.0003338	0.006084±0.007098	0.02895±0.009634
WT, IL-25	0.001011±0.0002767	0.02066±0.005046	N/A
IL-17RB KO, IL-25	2.310e-005±1.173e-005	3.146e-005±2.068e-005	N/A

[0194] N = 5/ 组 ;所示值为 (平均值 ±SD) ;所示的 IL-5 和 IL-13 值为相对于 β -肌动

蛋白的基因表达 ($2E-\Delta Ct$) (平均值 $\pm$ SD)。所示的 IL-17RA 值为相对于 HPRT 的基因表达 ($2E-\Delta Ct$) (平均值 $\pm$ SD)。N/A = 未分析

[0195] 以基本相同的方式重复用 IN IL-25 攻击该 IL-17RB KO 小鼠的实验:加入小鼠白介素-13 攻击臂 (IL-13; Invitrogen Biosource™, Carlsbad, CA; 每天给药一次, 每次 50 微升 (10 微克/mL), 共四天); 结果示于下表 3-4。

[0196] 表 3: 应答于 IN IL-13 或 IL-25 攻击的 IL-17RB KO 和 WT 小鼠中, BALF 细胞含量的分析

[0197]

基因型, IN 处理	细胞含量	嗜酸性粒 细胞	嗜中性粒细 胞	淋巴细胞	巨噬细胞
WT, MSA	41625 $\pm$ 12479	0	9500 $\pm$ 4143	5378 $\pm$ 3772	26750 $\pm$ 7309
IL-17RB KO, MSA	15875 $\pm$ 9578	0	2625 $\pm$ 3351	1125 $\pm$ 2250	12125 $\pm$ 4366
WT, IL-13	49700 $\pm$ 38836	12600 $\pm$ 8459	20000 $\pm$ 27611	6300 $\pm$ 1037	10800 $\pm$ 4192
IL-17RB KO, IL-13	27100 $\pm$ 11475	8200 $\pm$ 3328	4200 $\pm$ 5586	6200 $\pm$ 2168	8500 $\pm$ 5948
WT, IL-25	185400 $\pm$ 103332	55600 $\pm$ 31053	70200 $\pm$ 74492	14600 $\pm$ 5355	45000 $\pm$ 6255
IL-17RB KO, IL-25	23800 $\pm$ 4550	0	4600 $\pm$ 3070	2500 $\pm$ 2318	16700 $\pm$ 2683

[0198] N = 5/ 组; 所示值为 (平均值 $\pm$ SD)

[0199] 表 4: 应答于 IN IL-25 攻击的 IL-17RB KO 和 WT 小鼠肺中, IL-5、IL-13、嗜酸细胞活化趋化因子、MCP-1、IL-9、IL-10、IL-17A 和 IL-17RA mRNA 的分析

[0200]

基因型, IN 处理	IL-13	IL-5	嗜酸细胞活化 趋化因子	MCP-1
WT, MSA	1.404e-02± 1.159e-02	1.111e-03± 8.247e-04	5.558e-02± 4.341e-02	1.777e-03± 1.056e-03
IL-17RB KO, MSA	1.546e-02± 1.523e-02	1.237e-03± 1.142e-03	5.541e-02± 4.541e-02	1.621e-03± 1.039e-03
表 4, 连续的。				
基因型, IN 处理	IL-9	IL-10	IL-17A	IL-17RA
WT, IL-25	7.523e-01± 2.561e-01	5.668e-02± 2.070e-02	5.795e-01± 1.474e-01	1.138e-02± 3.890e-03
IL-17RB KO, IL-25	8.828e-04± 4.888e-04	5.335e-04± 1.725e-04	1.091e-02± 3.142e-03	1.485e-03± 6.347e-04
WT, MSA	5.098e-04± 4.573e-04	1.240e-04± 5.739e-05	2.735e-04± 2.080e-04	1.208e-02± 1.615e-03
IL-17RB KO, MSA	6.091e-04± 5.795e-04	1.624e-04± 8.018e-05	2.551e-04± 2.221e-04	9.86e-03± 1.599e-03
WT, IL-25	4.820e-03± 1.108e-03	6.0688e-03± 2.235e-03	2.310e-03± 1.588e-03	3.255e-02± 1.287e-02
IL-17RB KO, IL-25	1.385e-05± 2.399e-05	5.868e-04± 1.391e-04	2.725e-04± 4.720e-04	1.748e-02± 8.050e-03

[0201] N = 4 个来自个体小鼠的肺 ; 所示值为相对于 HPRT 的基因表达 ($2E - \Delta Ct$) (平均值 $\pm$ SD)

[0202] 为了肺组织病理学实验, 将小鼠用 CO₂ 窒息无痛致死。基本如 (Harkema, J. R., 和 J. A. Hotchkiss, Am. J. Pathol. 141 :307 ;1992) 所述, 将肺采集、固定于 10% 中性缓冲的福尔马林 (NBF) 中、加工、以 6 微米切片并用苏木精和伊红 (H&E) 染色或过碘酸希夫 (PAS) 染色 ; 用于分析组织切片的分级量表, 示为下面四种不同的类别。各组平均总炎症分数报告于表 5 中。

[0203] 表 5 : 用 IN IL-25 攻击的 IL-17RB KO 和 WT 小鼠中, 肺组织炎症和杯状细胞增生的组织学分析

[0204]

	IL-17RB KO, IL-25 (N = 5)	IL-17RB KO, MSA (N = 4)	WT, IL-25 (N = 5)	WT, MSA (N = 5)
杯状细胞增生	0	0	2.2 $\pm$ 1.3	0
支气管周的炎症	0.6 $\pm$ 0.5	0	1.6 $\pm$ 0.9	0
支气管肺炎	0.8 $\pm$ 0.4	0	1 $\pm$ 0	0
肺部血管周炎/血管炎	0	0	0.6 $\pm$ 1.3	0
总分数	2.2 $\pm$ 1.1	0	7.4 $\pm$ 1.9	0

[0205] 报告的平均分 $\pm$ SD。

[0206] 杯状细胞增生 (PAS 染色)

- [0207] 0 = 正常
- [0208] 1 = 极微的, 杯状细胞在大的细支气管中增生
- [0209] 2 = 轻微的, 杯状细胞在大和中的细支气管中增生
- [0210] 3 = 中等的, 杯状细胞在大、中和一些小的细支气管中增生
- [0211] 4 = 显著的, 杯状细胞在整个气道增生
- [0212] 支气管周的炎症
- [0213] 0 = 正常
- [0214] 1 = 极微的嗜酸性粒细胞 / 巨噬细胞 / 淋巴细胞套状 (不连续至单层), 无水肿
- [0215] 2 = 轻微的嗜酸性粒细胞 / 巨噬细胞 / 淋巴细胞套状 (2-5 个细胞); 极微的水肿, 纤维组织形成
- [0216] 3 = 中等的嗜酸性粒细胞 / 巨噬细胞 / 淋巴细胞套状 (5-10 个细胞); 存在水肿和纤维组织形成
- [0217] 4 = 显著的嗜酸性粒细胞 / 巨噬细胞 / 淋巴细胞套状 (> 10 个细胞); 显著的水肿和纤维组织形成
- [0218] 支气管肺炎
- [0219] 0 = 正常
- [0220] 1 = 极微的巨噬细胞 / 嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞 / MNGC 的局部积聚
- [0221] 2 = 轻微的巨噬细胞 / 嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞 / MNGC 的局部积聚
- [0222] 3 = 中等的巨噬细胞 / 嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞 / MNGC 的多局部积聚
- [0223] 4 = 显著的巨噬细胞 / 嗜中性粒细胞 / 嗜酸性粒细胞 / MNGC 的多局部积聚
- [0224] 肺部血管周炎 / 血管炎
- [0225] 0 = 正常
- [0226] 1 = 极微的嗜酸性粒细胞 / 淋巴细胞 / 巨噬细胞套状 (不连续至单层), 无内膜浸润 / 增生
- [0227] 2 = 轻微的嗜酸性粒细胞 / 淋巴细胞 / 巨噬细胞套状 (2-5 个细胞); 局部嗜酸性粒细胞内膜浸润和内皮增生
- [0228] 3 = 中等的嗜酸性粒细胞 / 淋巴细胞 / 巨噬细胞套状 (5-10 个细胞); 局部广泛的内膜嗜酸性粒细胞浸润和内皮增生, 带有少数 MNGC
- [0229] 4 = 显著的嗜酸性粒细胞 / 淋巴细胞 / 巨噬细胞套状 (> 10 个细胞); 导管壁有时消失且 MNGC 显著; 存在稀疏 (discreet) 血管炎
- [0230] 在野生型 C57BL/6 小鼠中, 鼻内给予 IL-25 的影响包括 (1) 总 BALF 白细胞数量增加, 包括 BALF 嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞的数量增加, 以及 BALF IL-5 和 IL-13 浓度增加 (表 1 和 3); (2) IL-5、IL-13、嗜酸细胞活化趋化因子和 MCP-1 的肺 mRNA 水平增加 (表 2 和 4); 和 (3) 杯状细胞在大和中的气道中增生, 以及强烈的血管周围 / 血管的炎症, 该炎症涉及动脉和静脉, 但肺泡的毛细血管除外 (表 5)。当将 IL-25 鼻内给予 IL-17RB KO 小鼠时, 未观测到这些影响 (表 1-5)。IL-17RA mRNA 存在于 IL-17RB KO 小鼠中 (表 2 和 4)。这些数据表明 IL-17RB 对至今在肺中已测量的所有 IL-25 活性是必需的。
- [0231] 实施例 2
- [0232] 本实施例在体内表明 IL-17RA 对 IL-25 的应答是必需的。先前已有描述

C57BL/6IL-17RA^{-/-}小鼠的产生 (Ye, P. 等, 2001J. Exp. Med. 194 :519-527)。基本如实施例 1 对 IL-17RB^{-/-}小鼠所述的处理对照 C57BL/6 小鼠 (WT) 或 IL-17RA^{-/-}小鼠 (KO); 结果示于下表 6 和表 7。

[0233] 表 6 :IL-17RA KO 与 C57BL/6WT 小鼠中 BALF 的比较分析 :细胞含量和蛋白
[0234]

	细胞含量	嗜酸性粒细胞	嗜中性粒细胞	淋巴细胞	巨噬细胞	IL-5 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)
WT, MSA	44900±9283	5300±5718	6400±4022	4700±1304	28500±5420	31	76.39±26.88
KO, MSA	43300±10634	1800±1643	8400±8422	7300±4778	25800±4056	31	94.74±30.19
WT, IL-13	191600±54874	69100±25297	74000±49050	22400±10268	26100±10096	31	N/A
KO, IL-13	161900±56720	40300 ±25250	62100±19064	38400±27869	21100±9134	31	N/A
WT, IL-25	520500±129960	206100±36906	220000±97248	27300±15470	67100±21355	213.6±115.2	2413±1206
KO, IL-25	30300±15123	0	10300±7621	4700±3309	15300±6048	31	85.06±12.65

[0235] N = 5 ;所示值为 (平均值 ±SD)。N/A = 未试验的。指定低于 IL-5ELISA 检测范围的样品为检测下限的值, 即 31pg/mL。

[0236] 表 7 :IL-17RA KO 与 C57BL/6WT 小鼠中肺组织的比较分析 :mRNA 水平
[0237]

	IL-5	IL-13	嗜酸细胞活化趋化因子	MCP-1	IL-17RB
WT, MSA	4.347e-005 ±1.198e-005	2.105e-005±8.093e-006	0.001674±0.0004063	0.0001465±2.076e-005	0.0001526±6.955e-005
KO, MSA	7.767e-005±5.119e-005	0.0001564±0.0002616	0.003062±0.0008565	0.0002408±4.665e-005	0.0005272±0.0004737
WT, IL-25	0.004601±0.002347	0.005463±0.003147	0.06500±0.01270	0.001429±0.0005115	0.01030±0.009463
KO, IL-25	0.0001166±7.309e-005/-	9.084e-006±6.040e-006	0.002149±0.0009068	0.0005612±0.0003233	0.001637±0.0006343

[0238] N = 4 ;所示值为相对于 β-肌动蛋白的基因表达 (2E-ΔCt) (平均值 ±SD)。在本实验中未分析来自 IL-13 处理的小鼠肺组织。

[0239] 基本如实施例 1 中所述, 将肺组织切片、准备用于组织学分析、染色和分析。各组的平均总炎症分数报告于表 8 中。

[0240] 表 8 :IL-17RA KO 与 WT 小鼠中肺组织的组织学分析比较
[0241]

	KO, IL-25	KO, MSA	WT, IL-25	WT, MSA
杯状细胞增生	0.6±0.5	0	2.8±0.4	0
支气管周的炎症	0.8±0.4	0.8±0.9	3.2±.5	0
支气管肺炎	1.0±0	1.0±0	1.2±0.5	0.6±0.5

肺部的血管周炎 / 血管炎	1.6±0.5	1.2±0.5	3.4±0.5	0.8±0.4
总分数	4.0±1	3.0±1.4	10.6±1.3	1.4±0.9

[0242] 除用 MSA 处理的 IL-17RA KO 小鼠外所有的组 N = 5, MSA 处理的 IL-17RA KO 小鼠组 N = 4。报告的平均分数 ±SD。

[0243] 基本以相同的方式重复该实验 ; 结果示于下表 9 和 10。本实验中未进行肺的组织学分析。

[0244] 表 9 :KO 与 WT 小鼠中 BALF 的比较分析

[0245]

	细胞含量	嗜酸性粒细胞	嗜中性粒细胞	淋巴细胞	巨噬细胞
WT, MSA	32200±11066	1400±1949	3800±2225	2700±2490	24300±8983
KO, MSA	44167±4252	0	7333±763	5333 ± 3175	31500±1323
WT, IL-13	126300±52821	60500±39019	37300±19110	12500±5160	16000 ±4138
KO, IL-13	87000±20788	19800±9358	38000±12525	19200±5563	10000±3606
WT, IL-25	327600±144145	129100±63800	136900±65040	18400±8828	43200±16799
KO, IL-25	65800±80169	1300±1789	30100±58729	4700±4894	29700±17946

[0246] N = 5 ; 所示值为 (平均值 ±SD)

[0247] 表 10 :KO 与 WT 小鼠中肺组织的比较分析 :mRNA 的水平

[0248]

	IL-13	IL-5	IL-17RB	嗜酸细胞活化趋化因子	MCP-1
WT, MSA	3.200e-011± 9.360e-012	8.280e-005± 2.122e-005	4.290e-010± 2.512e-011	3.377e-009± 7.773e-010	7.743e-010± 1.499e-010
KO, MSA	5.768e-011± 7.292e-011	0.0001578± 6.837e-005	4.373e-010± 4.755e-011	2.755e-009± 9.058e-010	8.060e-010± 3.463e-010
WT, IL-13	3.953e-011± 1.572e-011	9.838e-005± 5.447e-006	3.205e-010± 5.943e-011	9.333e-009± 1.588e-009	4.378e-009± 1.612e-009
KO, IL-13	2.353e-009± 3.857e-009	0.0003726± 0.0004745	6.198e-010± 6.295e-010	2.308e-008± 7.232e-009	9.863e-009± 3.469e-009
WT, IL-25	6.675e-008± 1.662e-008	0.008895± 0.0008927	1.436e-008± 4.626e-009	1.181e-007± 1.734e-008	8.005e-009± 1.252e-009
KO, IL-25	5.135e-011± 2.720e-011	0.000196± 6.249e-005	3.865e-010± 7.159e-011	2.690e-009± 1.547e-010	1.157e-009± 4.762e-010

[0249] N = 4 ; 所示值为相对于 GAPDH 的基因表达 (2E-ΔCt) (平均值 ±SD)

[0250] 在野生型 C57BL/6 小鼠中, IN 给予 IL-25 的影响包括 : (1) 总 BALF 白细胞数量增加, BALF 嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞的数量增加, 以及 BALF IL-5 和 IL-13 浓度增加 (表 1 和 4) ; (2) 杯状细胞在大和中的气道中增生, 以及强烈的血管周围 / 血管的炎症, 该炎症涉及动脉和静脉, 但肺泡的毛细管除外 (表 3) ; 和 (3) IL-5、IL-13、

嗜酸细胞活化趋化因子、MCP-1 和 IL-17RB 的肺 mRNA 水平上升 (表 2 和 5)。尽管 IL-17RB mRNA 存在于 IL-17RA KO 小鼠中,但是当将 IL-25 鼻内给予 IL-17RA KO 小鼠,未观测到这些效果 (表 1-5)。这些数据表明 IL-17RA 对 IL-25 在肺中的活性是必需的。

[0251] 实施例 3

[0252] 本实施例在体外表明 IL-17RA 和 IL-17RB 对 IL-25 的应答是必需的。先前已有描述脾细胞的产生 (Hamilton 等,1978, J Clin Invest. 62(6):1303-12)。简言之,将来自 C57BL/6WT、C57BL/6IL-17RB KO 和 C57BL/6IL-17RA KO 小鼠的个体脾无菌地取出,并用在 RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) 中的 0.4mg/mL 胶原酶 D (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) 和 0.1% DNase-I (Roche Applied Science) 处理,以产生单细胞悬浮液。脾细胞在完全 DMEM 培养基 (Gibco-Invitrogen) 单独、或外加 1 微克/mL 伴刀豆球蛋白 A (Con A; Sigma-Aldrich) 或以所示最终浓度外加 IL-25 (Amgen) 的完全 DMEM 培养基 (Gibco-Invitrogen) 中,以 2.0×10^7 个细胞/mL 培养。在 5% CO₂ 加湿培养箱中于 37°C 培养该细胞 72 小时。通过 ELISA (R&D Systems) 检测上清液的 IL-5 和 IL-13 浓度。对各基因型使用不同窝的 IL-17RA KO、IL-17RB KO 和 WT 动物重复两次脾细胞测定;来自两个独立实验的数据表示于下面 (表 11-14)。

[0253] 表 11: IL-25 刺激的 IL-17RA KO 和 WT 脾细胞产生的 IL-5 和 IL-13

[0254]

IL-25, ng/mL	IL-17RA KO, IL-5 pg/mL	WT, IL-5 pg/mL	IL-17RA KO, IL-13 pg/mL	WT, IL-13 pg/mL
500.0	31	1044 ± 423	62	1581 ± 389
250.0	31	1435 ± 580	85 ± 43	2363 ± 459
125.0	31	1481 ± 542	119 ± 87	2442 ± 103
62.0	32 ± 14	1721 ± 641	141 ± 87	3133 ± 239
31.0	33 ± 19	1737 ± 634	122 ± 40	2520 ± 185
15.0	31	1405 ± 624	97 ± 55	1897 ± 479
0.1	36 ± 6	41 ± 16	80 ± 38	103 ± 82
0.0	31	31	62	62

[0255] N = 2 个个体脾;所示值为 (平均值 ± SD)。指定低于 IL-5 ELISA 检测范围的样品的值为 31 pg/mL。指定低于 IL-13 ELISA 检测范围的样品的值为 62 pg/mL。

[0256] 表 12: IL-25 刺激的 WT 和 IL-17RA KO 脾细胞产生的 IL-5 和 IL-13

[0257]

IL-25, ng/mL	IL-17RA KO, IL-5 pg/mL	WT, IL-5 pg/mL	IL-17RA KO, IL-13 pg/mL	WT, IL-13 pg/mL
60	31	538 ± 200	109 ± 7	864 ± 335
20	31	491 ± 181	188 ± 6	892 ± 424
6.66	31	364 ± 219	129 ± 1	657 ± 316
2.22	31	191 ± 105	113 ± 4	367 ± 214
0.7	31	115 ± 82	143 ± 14	212 ± 133
0.2	31	46 ± 16	138 ± 29	112 ± 44
0	31	31	161 ± 13	68 ± 27
Con A	168 ± 64	116 ± 28	1730 ± 118	674 ± 151

[0258] 表 13 :IL-25 刺激的 IL-17RB KO 和 WT 脾细胞产生的 IL-5 和 IL-13

[0259]

IL-25, ng/mL	IL-17RB KO, IL-5 pg/mL	WT, IL-5 pg/mL	IL-17RB KO, IL-13 pg/mL	WT, IL-13 pg/mL
60	31	358 ± 181	62	990 ± 470
20	31	228 ± 120	71 ± 33	875 ± 441
6.66	31	217 ± 110	95 ± 27	680 ± 361
2.22	31	223 ± 170	80 ± 51	528 ± 254
0.7	31	82 ± 41	95 ± 32	369 ± 131
0.2	31	43 ± 19	104 ± 59	265 ± 116
0	31	31	110 ± 30	197 ± 66
Con A	31	130 ± 57	342 ± 97	628 ± 241

[0260] N = 3 个个体脾 ;所示值为 (平均值 ±SD) ;指定低于 IL-5ELISA 检测范围的样品的值为 31pg/mL。指定低于 IL-13ELISA 检测范围的样品的值为 62pg/ml。

[0261] 表 14 :IL-25 刺激的 IL-17RB KO 和 WT 脾细胞产生的 IL-5 和 IL-13

[0262]

IL-25, ng/mL	IL-17RB KO, IL-5 pg/mL	WT, IL-5 pg/mL	IL-17RB KO, IL-13 pg/mL	WT, IL-13 pg/mL
60	31	114 ± 88	61	250 ± 151
20	31	99 ± 62	61	181 ± 90
6.66	31	62 ± 33	61	140 ± 63
2.22	31	36 ± 13	67 ± 32	108 ± 38
0.7	31	32 ± 27	61	77 ± 22
0.2	31	31	61	61
0	31	31	61	61
Con A	80 ± 47	113 ± 17	460 ± 104	744 ± 61

[0263] N = 3 个个体脾 ;所示值为 (平均值 ±SD) ;指定低于 IL-5ELISA 检测范围的样品的值为 31pg/mL。指定低于 IL-13ELISA 检测范围的样品的值为 62pg/ml。

[0264] IL-25 的刺激作用诱导培养的野生型 C57BL/6 脾细胞产生 IL-5 和 IL-13。该细胞

因子产生不是由 IL-25 刺激 IL-17RB KO 或 IL-17RA KO 脾细胞诱导 (表 11-14)。Con A, 脾细胞活化的阳性对照, 诱导 IL-17RB KO 脾细胞产生 IL-13, IL-17RA KO 脾细胞产生 IL-5 和 IL-13。在一个实验中 Con A 的刺激作用并不诱导 IL-17RB KO 脾细胞产生 IL-5, 但在第二个实验中却诱导 IL-17RB KO 脾细胞产生 IL-5。这些体外细胞培养数据对以下提供进一步支持: IL-17RB 和 IL-17RA 都对 IL-25 信号传导是必需的。

[0265] 实施例 4

[0266] 本实施例在体外表征抗 -IL-17RB-M735 和抗 -IL-25-M819 抗体抑制 IL-25 应答的能力。利用来自首次用于实验的 BALB/C 小鼠的脾制备脾细胞的单细胞悬浮液, 随后在完全 DMEM 培养基 (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) 中稀释至 4×10^7 个细胞 / mL。将细胞 (100 微升) 加至 96 孔板, 用下列条件达到终浓度 4×10^6 个细胞 / 孔:

[0267] 仅培养基

[0268] 10ng/mL muIL-25 (刺激对照)

[0269] 10ng/mL muIL-25+100ng/mL muIL-17RB. muFc (阻断对照)

[0270] 10ng/mL muIL-25+463、154、51、17、5.7、1.9、0.64、0.21、0.07、0.023、0.007、0.003ng/mL 抗 muIL-17RB M735

[0271] 10ng/mL muIL-25+1000、100、10、1.0 或 0.1ng/mL 抗 -muIL-25M819。

[0272] 用三种独立生物样品 (各样品由来自两只首次用于实验的 BALB/c 小鼠脾的脾细胞组成) 测试上面所列的每个条件, 且该测试在三个独立实验中重复三次。培养物在 37° 和 10% CO_2 下温育 72 小时, 72 小时采集上清液, 并用 ELISA 测定 IL-5 浓度。M735 和 M819 都抑制小鼠脾细胞 IL-5 的 IL-25 诱导性分泌; 各抗体在 3 个独立脾细胞实验中计算出的 IC50 值示于下表 15-16 中, 该 IC50 值为对培养的 BALB/c 脾细胞的 IL-25 诱导性 IL-5 生成的抑制作用。

[0273] 表 15: 抗 -IL-17RB M735 的 IC50 值

[0274]

抗体描述	IC50
mAb M735, 实验 1	1.32ng/mL
mAb M735, 实验 2	0.166ng/mL
mAb M735, 实验 3	2.15ng/mL

[0275] 表 16: 抗 -IL-25M819 的 IC50 值

[0276]

抗体描述	IC50
mAb M819, 实验 1	0.24ng/mL
mAb M819, 实验 2	4.2ng/mL
mAb M819, 实验 2	1.12ng/mL

[0277] 抗 -IL-17RB M735 和抗 -IL-25-M819 都抑制 IL-25 诱导的 IL-5 生成。这些数据对以下提供进一步支持: 在脾细胞中 IL-17RB 对 IL-25 信号传导是必需的。

[0278] 实施例 5

[0279] 本实施例在体外表征各种抗 -IL-17RA 抗体抑制 IL-25 应答的能力。基本如上面实施例 4 所述的制备脾细胞单细胞悬浮液。将细胞 (100 微升) 加至 96 孔板, 用下列条件达到终浓度 4×10^6 个细胞 / 孔:

[0280] 仅培养基

[0281] 10ng/mL muIL-25 (刺激对照)

[0282] 10ng/mL muIL-25+100ng/mL muIL-17RB.muFc (阻断对照)

[0283] 10ng/mL muIL-25+1000、100、10、1.0 或 0.1ng/mL 抗-muIL-17RA 单克隆抗体。

[0284] 用三个独立生物样品 (各样品由来自两只小鼠的脾细胞组成) 测试每个条件。培养物在 37° 和 10% CO₂ 下温育 72 小时, 72 小时时收集上清液, 并用 ELISA 测定 IL-5 浓度。试验了一组八种不同的大鼠抗-小鼠 IL-17RA 单克隆抗体。它们中无一显著抑制小鼠脾细胞 IL-5 的 IL-25 诱导性分泌。

[0285] 除这些大鼠抗-小鼠抗体外, 在该脾细胞测定中两次评估了一种小鼠抗-小鼠 IL-17RA 单克隆抗体 M751。M751 抑制小鼠脾细胞 IL-5 的 IL-25 诱导性分泌。2 个独立脾细胞实验中抗-mIL-17RA M751 的计算出的 IC₅₀ 示于下表 17 中。因此, 抗-IL-17RA-M751 在这次脾细胞测定中为 IL-25 诱导性 IL-5 生产的最佳抗-IL-17RA 抑制剂, 但与抗-IL-17RB-M735 (表 15) 相比, 其抑制能力不如抗-IL-17RB-M735 强。

[0286] 表 17: 抗-IL-17RA-M751 的 IC₅₀ 值

[0287]

抗体描述	IC ₅₀
mAb M751, 实验 1	4.03ng/mL
mAb M751, 实验 2	2.79ng/mL

[0288] 实施例 6

[0289] 本实施例用抗-IL-17RA 抗体 M751 在体内表明 IL-25 应答的抑制作用, 该 M751 在体外生物测定中抑制 IL-25 活性 (先前已描述)。将鼠血清白蛋白 (MSA; Sigma, 10 μg/mL) 或小鼠 IL-25 (Amgen, T0; 10 μg/mL) 鼻内给予 BALB/c 小鼠, 每天一次, 共四天。在第 1-4 天, 鼻内滴注 MSA 或 IL-25 四小时前, 向小鼠腹膜内注射 200 微克中和抗-IL-17RA 抗体 (M751)、中和抗-IL-17A 抗体 (M210) 或同种型对照抗体 (鼠 Fc; Amgen)。在第 5 天, 如先前描述的采集并分析支气管肺泡灌洗液 (BALF) 和肺组织。两个独立实验的结果示于下表 18-21。

[0290] 表 18: 存在或不存在小鼠 IL-17RA 封闭性抗体 M751 时, 在用 IN IL-25 处理的 BALB/c 小鼠中 BALF 细胞含量、IL-5 和 IL-13 浓度的分析——实验 1

[0291]

处理	细胞含量	嗜酸性粒细胞	嗜中性粒细胞	淋巴细胞	巨噬细胞	IL-5 (pg/mL,)	IL-13 (pg/mL,)
鼠 Fc, MSA	38400±16850	0	16000±10828	2900±4278	19500±3482	31	62
M751, MSA	48000±15320	0	21300±9991	2900±2748	23800±7059	31	62
M210, MSA	44300±16965	0	19600±9443	3600±3362	21100±7805	31	62
鼠 Fc, IL-25	156400±37662	18300±7571	62600±32190	15200±3564	60300±14025	200±131	271 ± 291
M751, IL-25	28800±16832	0	14800±12122	600±1342	13400±5889	31	62
M210, IL-25	138900±94677	25200±15291	52100±51574	16100±8799	45500±22453	303±64	428±112

[0292] N = 5 ;所示值为 (平均值 $\pm$ SD)

[0293] 指定低于 IL-5ELISA 检测范围的样品的值为 31pg/mL。指定低于 IL-13ELISA 检测范围的样品的值为 62pg/mL。

[0294] 表 19 :存在或不存在小鼠 IL-17RA 封闭性抗体 M751 时,在用 IN IL-25 处理的 BALB/c 小鼠中 BALF 细胞含量、IL-5 和 IL-13 浓度的分析——实验 2

[0295]

处理	细胞含量	嗜酸性粒细胞	嗜中性粒细胞	淋巴细胞	巨噬细胞	IL-5 (pg/mL,)	IL-13 (pg/mL,)
鼠 Fc, MSA	68800 $\pm$ 18527	1300 $\pm$ 1600	12900 $\pm$ 4789	2800 $\pm$ 3428	51800 $\pm$ 14176	57 $\pm$ 3	82 $\pm$ 9
M751, MSA	40600 $\pm$ 26640	0	14400 $\pm$ 18372	1500 $\pm$ 3000	24700 $\pm$ 7406	96 $\pm$ 30	117 $\pm$ 56
M210, MSA	37200 $\pm$ 15455	700 $\pm$ 1400	7300 $\pm$ 1860	2000 $\pm$ 1643	27200 $\pm$ 13588	83 $\pm$ 36	119 $\pm$ 47
鼠 Fc, IL-25	235900 $\pm$ 76855	23800 $\pm$ 12476	119500 $\pm$ 61007	16600 $\pm$ 4872	76000 $\pm$ 11811	290 $\pm$ 123	298 $\pm$ 127
M751, IL-25	38100 $\pm$ 11778	0	5200 $\pm$ 3295	3200 $\pm$ 2993	29700 $\pm$ 8755	58 $\pm$ 17	122 $\pm$ 40
M210, IL-25	99500 $\pm$ 41105	16700 $\pm$ 8121	26900 $\pm$ 18169	10100 $\pm$ 3916	45800 $\pm$ 16067	281 $\pm$ 104	233 $\pm$ 87

[0296] N = 5 ;所示值为 (平均值 $\pm$ SD)

[0297] 表 20 :不存在或存在小鼠 IL-17RA 封闭性抗体 M751 时,来自 IN IL-25 攻击小鼠的肺组织中 IL-13、IL-5、IL-17RB、嗜酸细胞活化趋化因子和 MCP-1mRNA 的分析——实验 1

[0298]

	IL-13	IL-5	IL-17RB	嗜酸细胞活化趋化因子	MCP-1
muFc, MSA,	1.518e-04 $\pm$ 2.387e-05	2.893e-04 $\pm$ 4.011e-05	9.885e-04 $\pm$ 6.524e-05	9.488e-03 $\pm$ 1.219e-03	5.430e-03 $\pm$ 1.798e-03
M751, MSA,	1.478e-02 $\pm$ 2.354e-02	2.286e-03 $\pm$ 3.47e-03	4.241e-03 $\pm$ 5.528e-03	3.937e-02 $\pm$ 5.416e-02	8.210e-03 $\pm$ 7.656e-03
M210, MSA,	1.320e-04 $\pm$ 2.501e-05	2.895e-04 $\pm$ 1.507e-05	1.109e-03 $\pm$ 1.209e-04	8.155e-03 $\pm$ 1.668e-04	3.178e-03 $\pm$ 5.785e-04
muFc, IL-25,	3.845e-02 $\pm$ 1.147e-02	6.348e-03 $\pm$ 1.959e-03	1.570e-02 $\pm$ 3.551e-03	1.638e-01 $\pm$ 1.281e-02	1.534e-02 $\pm$ 4.643e-03
M751, IL-25,	7.518e-05 $\pm$ 1.225e-05	2.165e-04 $\pm$ 2.145e-05	1.330e-03 $\pm$ 1.869e-04	6.430e-03 $\pm$ 2.422e-03	2.983e-03 $\pm$ 3.795e-04
M210, IL-25,	1.100e-01 $\pm$ 2.483e-02	1.123e-02 $\pm$ 3.066e-03	2.063e-02 $\pm$ 8.663e-03	2.108e-01 $\pm$ 1.601e-02	1.468e-02 $\pm$ 1.734e-03

[0299] N = 4 ;所示值为相对于 GAPDH 的基因表达 ($2E^{-\Delta Ct}$) (平均值 $\pm$ SD)

[0300] 表 21 :不存在或存在小鼠 IL-17RA 封闭性抗体 M751 时,来自 IN IL-25 攻击小鼠的肺组织中 IL-13、IL-5、IL-17RB、嗜酸细胞活化趋化因子和 MCP-1mRNA 的分析——实验 2

[0301]

	IL-13	IL-5	IL-17RB	嗜酸细胞活化 趋化因子	MCP-1
muFc, MSA,	1.420e-04± 5.510e-05	2.173e-04± 3.291e-05	N/D	6.673e-03± 7.293e-05	1.715e-03± 2.458e-04
M751, MSA,	2.205e-04± 1.286e-04	2.465e-04± 5.150e-05	N/D	7.040e-03± 7.584e-04	1.703e-03± 4.502e-04
M210, MSA,	1.073e-04± 1.891e-05	2.583e-04± 4.472e-05	N/D	8.983e-03± 8.737e-04	2.185e-03± 4.961e-04
MuFc, IL-25,	1.749e-01± 7.166e-02	90993e-03± 3.952e-03	N/D	1.953e-01± 7.327e-03	1.509e-02± 5.096e-03
M751, IL-25,	4.120e-04± 1.738e-04	3.755e-04± 1.014e-04	N/D	7.440e-03± 7.159e-04	2.130e-03± 2.238e-04
M210, IL-25,	1.412e-01± 4.586e-02	7.845e-03± 1.617e-03	N/D	2.348e-01± 5.629e-02	6.760e-03± 6.823e-04

[0302] N = 4 ;所示值为相对于 GAPDH 的基因表达 ($2E^{-\Delta Ct}$) (平均值 $\pm$ SD) ;N/D = 未测定

[0303] 抗-IL-17RA 单克隆抗体 M751 的处理抑制 IL-25 诱导的 BALF 细胞含量,以及 IL-25 诱导的 BALF IL-5 和 IL-13 浓度及肺转录诱导。相反,抗-IL-17A 单克隆抗体 M210 的处理并不显著影响 IL-25 诱导的 BALF 细胞含量(尽管数据显示该抗体可能影响 IL-25 诱导的 BALF 嗜中性粒细胞水平)。这些数据连同先前在 IL-17RA KO 小鼠中描述的那些,表明 IL-17RA 对 IL-25 诱导的 BALF 细胞含量及 IL-5 和 IL-13 浓度的增加是必需的。如抗-IL-17A 处理显著减少了 IL-25 诱导的嗜中性粒细胞流入 BALF 中所显示,除 IL-25 诱导的嗜中性粒细胞募集之外,IL-25 在体内的影响看来并不是通过 IL-17A 介导的。

[0304] 实施例 7

[0305] 本实施例阐明由 IL-25 诱导的气道高反应性(AHR)及抗-IL-17RA-M751 和抗-IL-17A-M210 对其的影响。基本如先前所述,在四天时间内每天将 MSA 或小鼠 IL-25IN 给予 BALB/c 小鼠。在第 5 天,用全身体积描记器(Buxco Electronics,Troy,NY)首次非损伤地测量有知觉、未束缚小鼠对乙酰甲胆碱(MCh)攻击的气道高反应性(AHR)。基于体积描记器中响应渐增浓度的 MCh 攻击的压力波形,测量增强停顿(enhanced pause)(PENH),并以相对于 MChS 暴露前显示的基线读数的百分比变化报告增强停顿。PC200 为诱导 PENH 200% 高于基线时所需的 MCh 浓度,并在此报告于下表 22 和 23。

[0306] 表 22 :存在或不存在小鼠 IL-17RA 或 IL-17A 封闭性抗体时,用 IN IL-25 处理的 BALB/c 小鼠对 MCh 攻击的 AHR

[0307]

处理	PC200, MCh, mg/mL
muFc, MSA	19.3 $\pm$ 5.3
M751, MSA	20.7 $\pm$ 7.6
M210, MSA	25.8 $\pm$ 10.6
muFc, IL-25	4 $\pm$ 4.7
M751, IL-25	15.9 $\pm$ 1.5
M210, IL-25,	2 $\pm$ 2.2

[0308] N = 5/组 ;所示值为(平均值 $\pm$ SD)

[0309] 表 23 :存在或不存在小鼠 IL-17RA 封闭性抗体 M751 时,用 IN IL-25 处理的 BALB/c 小鼠对乙酰甲胆碱攻击的 AHR

[0310]

处理	PC200, MCh, mg/mL
muFc, MSA	12.5±2.6
M751, MSA	17.5±3.4
M210, MSA	21.5±3.4
MuFc, IL-25	4.3±0.5
M751, IL-25	9.0±1.7
M210, IL-25	5.3±1.3

[0311] N = 4/ 组 ;所示值为 (平均值 ±SD)

[0312] 还测量了在麻醉的和机械通气的小鼠 (鼻内给予 IL-25 和用抗 -IL-17RA-M751 处理) 中的气道高反应性。基本如先前所述,在四天时间内,每天将 MSA 或小鼠 IL-25IN 给予 BALB/c 小鼠。在第 5 天,用盐酸赛拉嗪 (20mg/kg, 腹膜内给予) 镇静小鼠,并用戊巴比妥钠 (100mg/kg, 腹膜内给予) 麻醉。用金属针将导管插入气管,随后将小鼠连接到小动物呼吸器 (flexiVent, SCIREQ :Scientific Respiratory Equipment, Montreal, Canada)。以 150 次呼吸 / 分钟的速率和 10mL/kg 小鼠重量的振幅,正弦吸气和被动呼气通气各小鼠。通过连接小鼠至水柱建立 3.0cmH₂O 的呼气末正压 (PEEP)。

[0313] 小鼠通气一分钟后,两次将肺扩张至总肺容量 (TLC, 30cmH₂O 的幅压)。将盐水的气雾剂或渐增浓度的乙酰 -β - 甲基胆碱 (MCh, Sigma-Aldrich) 递送至肺部 15s,随后通气 15s。接着气雾剂和通气,将 2.5Hz 体积驱动型 (VD) 振荡施加于气道口。每个 10-2.5Hz VD 振荡具有 0.20mL 振幅并持续 1.25s。在下一剂 MCh 前,两次将肺扩张至 TLC。用小动物呼吸器记录在呼吸系统中压力和体积随着时间的测量结果,并通过拟合数据至呼吸系统的单室模型中计算呼吸系统阻力 (R),该单室模型中 $P_{tr} = RV + EV + P_0$ (P_{tr} = 气管压力, V = 体积 / 时间, E = 弹性 = 压力 / 体积, V = 体积, P_0 = 基线压力)。在不同浓度的 MCh 下测量到的肺阻力示于图 2 中。

[0314] 这些结果表明,除在体外抑制 IL-25 的活性以及在体内抑制 IL-25 诱导的 BALF 细胞含量及 IL-5 和 IL-13 浓度的增加外, M751 还抑制 IL-25 诱导的 AHR,表明结合 IL-17RA 并抑制 IL-25 活性的抗体有用于治疗或改善 IL-25 介导的涉及 AHR 的状况。

[0315] 实施例 8

[0316] 本实施例用抗 IL-17RB 抗体 (M735) 或抗 IL-25 抗体 (M819) 在体内表明 IL-25 应答的抑制作用,在体外生物测定中这两种抗体都抑制 IL-25 活性 (上文已描述)。将 PBS 或小鼠 IL-25 鼻内给予 BALB/c 小鼠,随后腹膜内注射 250 微克中和小鼠抗 - 小鼠 IL-17RB 抗体 (M735)、中和大鼠抗 - 小鼠 IL-25 抗体 (M819)、无关的对照鼠 IgG1 抗体 (muIgG1 ; Amgen)、鼠 Fc 蛋白 (muFc ;Amgen) 或完整大鼠 IgG (Pierce, Rockford IL)。在第 5 天,如先前所述,采集并分析支气管肺泡灌洗液 (BALF)。实行独立重复实验 ;在第二个中,未测定 BALF IL-5 和 IL-13 蛋白浓度。结果示于下表 24-26。

[0317] 表 24 :不存在或存在 IL-17RB 封闭性抗体 (M735) 时,来自 IN IL-25 攻击小鼠的 BALF 细胞含量、IL-5 浓度和 IL-13 浓度的分析

[0318]

处理	细胞含量	嗜酸性粒细胞	嗜中性粒细胞	淋巴细胞	巨噬细胞	IL-5 (pg/mL,)	IL-13 (pg/mL,)
PBS	57300± 61940	600± 1200	21000± 34625	3100± 6200	32600± 23484	543 ± 155	79 ± 21
MuIgG1, IL-25	187300± 96994	28300± 13492	84100± 54232	16600± 8157	58300± 23770	2680± 792	754± 501
M735, IL-25	63500 ± 16646	5700 ± 6063	17100 ± 5633	8600 ± 4127	32100± 8404	909 ± 433	82 ± 22

[0319] N = 5 ;所示值为 (平均值 ±SD)

[0320] 表 25 :不存在或存在 IL-17RB 封闭性抗体 (M735) 或 IL-25 封闭性抗体 (M819) 时, 来自 IN IL-25 攻击小鼠的 BALF 细胞含量、IL-5 浓度和 IL-13 浓度的分析

[0321]

处理	细胞含量	嗜酸性粒细胞	嗜中性粒细胞	淋巴细胞	巨噬细胞
PBS	80400± 13488	0 ± 0	17000 ±7503	5400 ±1364	58000± 7893
muFc, IL-25	277400± 38077	10400 ± 1363	106200 ±14981	29000 ±2768	106200±14981
M735, IL-25	50800 ± 8720	0 ± 0	10400 ±3501	4000 ±1673	50800± 8720
rIgG, IL-25,	144000 ± 43192	5400 ± 2293	53600 ±24669	20600±4297	64400± 16157
M819, IL-25	99250 ± 29122	20600 ± 4261	79000 ± 67941	23400 ± 9277	51260 ± 13668

[0322] N = 5 ;所示值为 (平均值 ±SD)

[0323] 表 26 :不存在或存在 IL-17RB 封闭性抗体 (M735) 或 IL-25 封闭性抗体 (M819) 时, 来自 IN IL-25 攻击小鼠的 BALF 细胞含量、IL-5 浓度和 IL-13 浓度的分析

[0324]

处理	细胞含量	嗜酸性粒细胞	嗜中性粒细胞	淋巴细胞	巨噬细胞	IL-5 (pg/mL,)	IL-13 (pg/mL,)
PBS	101300± 30899	8400 ± 1145	85900± 13106	200± 200	6800 ± 3887	68 ± 24	90 ± 28
muIgG1, IL-25	769400± 258902	616300± 237391	50200± 10755	65800± 25649	37100± 10105	230 ± 33	598 ± 68
M735, IL-25	29800± 3774	1800±1114	23300± 2931	900± 458	3800± 1007	94 ± 16	303 ± 125
rIgG, IL-25	575700± 180123	428200± 143432	48900± 10656	61300± 18219	37300± 13338	230 ± 33	598 ± 68
M819, IL-25	321400± 14445	231800± 109952	30900± 11884	31400± 15182	27300± 10100	121 ± 50	476 ± 220

[0325] N = 5 ;所示值为 (平均值 ±SD)

[0326] 实施例 9

[0327] 本实施例阐明由 IL-25 诱导的气道高敏感性反应 (AHR) 及抗 IL-17RB 抗体 (M735) 或抗 IL-25 抗体 (M819) 对其的影响。基本如先前所述,进行一序列实验;用全身体积描记器非损伤地测量有知觉、未束缚小鼠的 AHR。三个独立实验的结果示于下表 27-29 中。

[0328] 表 27:不存在或存在抗 -IL-17RB 封闭性抗体 (M735) 时,来自 IN IL-25 攻击小鼠的 AHR 值

[0329]

处理	PC200, MCh, mg/mL
PBS	37.6 ± 15
μ IgG1, IL-25	5.5 ± 3.2
M735, IL-25,	16.5 ± 5.7

[0330] N = 5;所示值为 (平均值 $\pm$ SD)

[0331] 表 28:不存在或存在抗 -IL-17RB 封闭性抗体 (M735) 或 IL-25 封闭性抗体 (M819) 时,来自 IN IL-25 攻击小鼠的 AHR 值

[0332]

处理	PC200, MCh, mg/mL
PBS	42 ± 13
μ Fc, IL-25	0.5 ± 0.8
M735, IL-25	19.7 ± 6.2
rIgG, IL-25	6.1 ± 4.3
M819, IL-25	18.4 ± 2.8

[0333] N = 5;所示值为 (平均值 $\pm$ SD)

[0334] 表 29:不存在或存在抗 -IL-17RB 封闭性抗体 (M735) 或 IL-25 封闭性抗体 (M819) 时,来自 IN IL-25 攻击小鼠的 AHR 值

[0335]

处理	PC200, MCh, mg/mL
PBS	29.9 ± 3.3
μ IgG1, IL-25	6.38 ± 1.2
M735, IL-25	16.8 ± 1.6
rIgG, IL-25	10.9 ± 1.2
M819, IL-25	15.6 ± 1.9

[0336] 这些结果表明 IL-25 提高 AHR,该影响可由抗 -IL-17RB 或抗 -IL-25 缓和。

[0337] 实施例 10

[0338] 本实施例对用以下抗体的处理阻断 IL-25 体内应答提供组织学确证,该抗体为抗 IL-17RB 抗体 (M735)、抗 IL-25 抗体 (M819) 或抗 IL-17RA 抗体 (M751)。基本如先前所述,将 PBS 或小鼠 IL-25 鼻内给予 BALB/c 小鼠,腹膜内注射 200 微克中和抗 -IL-17RB 抗体 (M735)、200 微克中和抗 -IL-25 抗体 (M819)、200 微克中和抗 -IL-17RA 抗体 (M751)、200 微克中和抗 -IL17A 抗体 (M210) 或同种型对照抗体。在研究的第 5 天,通过 CO₂ 窒息将该小鼠无痛致死。如所述的,将肺采集、固定、处理、切片、染色并评估。组织病理学结果的总结示于下表 30 中。

[0339] 表 30:用 IN IL-25 攻击并用抗 -IL-17RA、抗 -IL-17A、抗 -IL-25、抗 -IL-17RB 或对照处理的小鼠中肺组织炎症和杯状细胞增生的组织学分析

[0340]

	IL-25 + M751	IL-25 + M210	IL-25 + M819	IL-25 + M735	IL-25 + muFc	MSA + muFc
杯状细胞增生	0	2.0±1	0	0.2±0.4	2.0±1.4	0.0
支气管周的炎症	0	1.0±1.0	0	0.0	1.8±0.4	0.0
支气管肺炎	1.0±0.7	1.8±0.4	1.0±1.0	0.8±0.8	2.0±0	1.4±0.5
肺部的血管周炎/血管炎	0	2.0±0	0.4±0.5	0.8±0.4	1.8±0.4	0.4±0.5
总分数	1.0±0.7	6.8±1.3	1.4±1.1	1.8±1.5	7.6±2.2	1.8±0.8

[0341] N = 5/ 组 ; 报告的平均分 ± SD。

[0342] 相比于用 MSA 攻击并用同种型对照处理的小鼠, 该小鼠具有 1.8 ± 0.8 平均分 ; 用 IL-25 攻击并用同种型对照处理的小鼠具有最深的损伤, 平均分为 7.6 ± 2.2 。如 6.8 ± 1.3 的平均分所表明, 抗 IL-17A 抗体对小鼠的处理基本上对肺损伤没有影响。相反, 抗 -IL-17RA (分数 1.0 ± 0.7)、抗 -IL-25 (分数 1.4 ± 1.1) 或抗 -IL-17RB (分数 1.8 ± 1.5) 的处理都有效地抑制 IL-25 诱导的炎症至本底水平, 表明 IL-25 或任一个涉及所述受体复合体的蛋白的封闭为同等有效的处理。

[0343] 实施例 11

[0344] 本实施例表明 IL-17RA 和 IL-17RB 间的缔合。利用融合至人 IgG Fc 区 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 或聚组氨酸标记 (Amgen) 的人 IL-17RA 和人 IL-17RB 的胞外域, 进行一连串的免疫沉淀反应。将 50 微升蛋白 G 浆液加入 Eppendorf 管, 用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤, 随后与 2 微克 IL-17RA:Fc 或 IL-17RB:Fc 蛋白在 4°C 旋转温育 1 小时。在该温育末, 加入 2 微克相反可溶受体蛋白 (即, 将 IL-17RA-HIS 加到 IL-17RB:Fc 而将 IL-17RB-HIS 加到 IL-17RA:Fc), 将这最终组合在 4°C 旋转温育过夜。

[0345] 次日上午, 将所述管在 12,000rpm 离心 1 分钟, 随后用 PBS 洗涤蛋白 G 珠子, 再用 RIPA 缓冲液 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) 洗涤。该珠子重悬浮于 60 微升含有 10% β -巯基乙醇的 2×Tris- 甘氨酸 SDS 样品缓冲液 (Invitrogen, Carlsbad CA) 中, 随后储存于冰上或 -20°C。在 4-20% Tris- 甘氨酸 10 孔小型丙烯酰胺凝胶 (**Novex**® -Invitrogen, Carlsbad CA) 上分析样品, 随后转移至硝酸纤维膜 (Invitrogen, Carlsbad CA)。轻微摇晃下, 于室温 1 小时或 4°C 过夜用 **Odyssey**® 封闭缓冲液封闭膜, 该封闭缓冲液为为红外测定 (Li- **cor**® Biosciences, Lincoln, NE) 而优化的 Western 印迹封闭缓冲液。随后膜与第一抗体 (在含 0.1% Tween-20 的 **Odyssey**® 封闭缓冲液中稀释为 1 : 1000 至 1 : 5000) 于 4°C 在轻微摇晃下温育 60 分钟。在 PBS+0.1% Tween-20 中洗涤膜 4 次, 随后该膜于第二抗体 (在含 0.1% Tween-20 的 **Odyssey**® 封闭缓冲液中稀释为 1 : 10,000) 中于 4°C 轻微摇晃下温育 60 分钟。在 PBS+0.1% Tween-20 中洗涤膜四次, 随后用 Li- **Cor**® **Odyssey**® 红外成像系统呈现该蛋白。使用到下列抗体 :

[0346] 第一抗体 :

第二抗体 :

[0347] 山羊抗 -hIL-17RA, 亲和纯化的多 **IRDye**® 800CW 驴抗 - 山羊

[0348] 克隆抗体 (R&D Systems, IgG (H+L), 高度吸附 (Li- **Cor**®

[0349] Minneapolis, MN)

Biosciences, Lincoln, NE ; **IRDye**®

[0350]

红外染料 :US06027709)

- [0351] 山羊抗 -hIL-17RB,亲和纯化的多 His•Tag[®]单克隆抗体 (定向抗
- [0352] 克隆抗体 (R&D Systems, His • Tag 序列的小鼠单克隆抗体
- [0353] Minneapolis, MN) (IgG₁) ;Novagen, EMD Chemicals,
- [0354] Inc., San Diego, CA)
- [0355] 山羊抗 -hIL-17RC,亲和纯化的多
- [0356] 克隆抗体 (R&D Systems,
- [0357] Minneapolis, MN)
- [0358] Alexa **Fluor**[®] 680 兔抗 - 小鼠
- [0359] IgG (H+L) (Invitrogen, Carlsbad,
- [0360] CA ;Alexa Fluor680 ;Berlier JE 等,
- [0361] J Histochem Cytochem 51,
- [0362] 1699-712 (2003))
- [0363] 代表性的印迹示于图 2。在数个实验中, IL-17RB. Fc 能免疫沉淀 IL-17RA. HIS。在本实验系统中, IL-17RA. Fc 也能免疫沉淀 IL-17RC. HIS,表明本系统能重现蛋白间的生物化学相互作用,该相互作用之前已在其它系统中展示 (Toy, D. 等, JI, 2006, 177 :36)。IL-17RA. Fc 或 IL-17RB. Fc 都不能免疫沉淀 IL-17RD. HIS (R&D Systems, Minneapolis, MN), 表明 IL-17RA 和 IL-17RB 相互作用对这些蛋白是特有的,并不是所有 IL-17R 家族成员固有的。这是首次描述 IL-17RA 和 IL-17RB 间的生物化学相互作用。
- [0364] 实施例 12
- [0365] 如 USSN 11/906, 094 (通过引用结合到本文中) 中所述,利用 Abgenix (现为 Amgen Fremont Inc.) **XenoMouse**[®] 技术 (美国专利第 6, 114, 598、6, 162, 963、6, 833, 268、7, 049, 426、7, 064, 244 号,这些专利通过整体引用结合到本文 ;Green 等, 1994, Nature Genetics 7 :13-21 ;Mendez 等, 1997, Nature Genetics 15 :146-156 ;Green 和 Jakobovitis, 1998, J. Ex. Med. 188 :483-495) 进行定向抗人 IL-17RA 的完全人单克隆抗体的开发。如其中所述,根据抑制人 IL-17A 结合至人 IL-17RA (及至猕猴 IL-17RA) 的能力筛选完全人抗 -IL-17RA 抗体。鉴定和挑选了一组抗体用于进一步扩散和分析 ;可变重链和轻链的氨基酸序列示于序列表中,而总结各种序列的表格示于下面。一种抗体 3. 454. 1 显示了可变轻链两种形式的证据。
- [0366] 表 31 :抗 -huIL-17A 抗体的总结
- [0367]

标识符	SEQ ID NO:	说明	SEQ ID NO:	说明
2.133.1	SEQ ID NO:1	AM _H 1 Vh	SEQ ID NO:27	AM _L 1 VI
1.98.1	SEQ ID NO:2	AM _H 2 Vh	SEQ ID NO:28	AM _L 2 VI
1.235.1	SEQ ID NO:3	AM _H 3 Vh	SEQ ID NO:29	AM _L 3 VI
1.185.1	SEQ ID NO:4	AM _H 4 Vh	SEQ ID NO:30	AM _L 4 VI
1.166.1	SEQ ID NO:5	AM _H 5 Vh	SEQ ID NO:31	AM _L 5 VI
2.98.1	SEQ ID NO:6	AM _H 6 Vh	SEQ ID NO:32	AM _L 6 VI
2.67.1	SEQ ID NO:7	AM _H 7 Vh	SEQ ID NO:33	AM _L 7 VI
2.46.1	SEQ ID NO:8	AM _H 8 Vh	SEQ ID NO:34	AM _L 8 VI
2.225.1	SEQ ID NO:9	AM _H 9 Vh	SEQ ID NO:35	AM _L 9 VI
2.159.1	SEQ ID NO:10	AM _H 10 Vh	SEQ ID NO:36	AM _L 10 VI
1.124.1	SEQ ID NO:11	AM _H 11 Vh	SEQ ID NO:37	AM _L 11 VI
4.357.1	SEQ ID NO:12	AM _H 12 Vh	SEQ ID NO:38	AM _L 12 VI
4.180.1	SEQ ID NO:13	AM _H 13 Vh	SEQ ID NO:39	AM _L 13 VI
3.1404.1	SEQ ID NO:14	AM _H 14 Vh	SEQ ID NO:40	AM _L 14 VI

[0368]

标识符	SEQ ID NO:	说明	SEQ ID NO:	说明
3.1338.1	SEQ ID NO:15	AM _H 15 Vh	SEQ ID NO:41	AM _L 15 VI
4.393.1	SEQ ID NO:16	AM _H 16 Vh	SEQ ID NO:42	AM _L 16 VI
4.361.1	SEQ ID NO:17	AM _H 17 Vh	SEQ ID NO:43	AM _L 17 VI
4.224.1	SEQ ID NO:18	AM _H 18 Vh	SEQ ID NO:44	AM _L 18 VI
4.16.1	SEQ ID NO:19	AM _H 19 Vh	SEQ ID NO:45	AM _L 19 VI
3.211.1	SEQ ID NO:20	AM _H 20 Vh	SEQ ID NO:46	AM _L 20 VI
3.1545.1	SEQ ID NO:21	AM _H 21 Vh	SEQ ID NO:47	AM _L 21 VI
3.381.1.1	SEQ ID NO:22	AM _H 22 Vh	SEQ ID NO:48	AM _L 22 VI
3.454.1	SEQ ID NO:23	AM _H 23 Vh	SEQ ID NO:49	AM _L 23 VI v 1
			SEQ ID NO:50	AM _L 23 VI v 2
3.454.1.1	SEQ ID NO:24	AM _H 24 Vh	SEQ ID NO:51	AM _L 24 VI
3.891.1	SEQ ID NO:25	AM _H 25 Vh	SEQ ID NO:52	AM _L 25 VI
2.23.1	SEQ ID NO:26	AM _H 26 Vh	SEQ ID NO:53	AM _L 26 VI

[0369] 进一步关于以下表征了所述抗体：其抑制 IL-17A 和 / 或 IL-17F 生物活性的能力，以及 IL-17RA 哪些结构域对抗体结合是重要的。

[0370] IL-17A/IL-17F 诱导的细胞因子 / 趋化因子分泌的测定

[0371] 本测定使用人包皮成纤维细胞 (HFF) 细胞系。抗 -IL-17RA 抗体在 36℃ 与 HFF 细胞 (96 孔板中 5000 个细胞 / 孔) 温育 30 分钟；随后将培养物用 IL-17A (5ng/ml) 单独或 IL-17F (20ng/ml) 和 TNF- α (5ng/ml) 刺激过夜。通过 ELISA 分析成纤维细胞培养物上清液中存在的 IL-6 或 GRO- α 。按本测定中产生的 IL-6 和 / 或 GRO- α 量的减少所示，所述抗体能抑制 IL-17A 和 IL-17F 的生物活性。

[0372] 交叉竞争测定

[0373] 如 USSN 11/906,094 中所述,进行交叉竞争研究以确定某些抗体的 IL-17RA 结合特性。使用改良的 Jia 等描述的多元框并法 (multiplexed binning method) (参见 Jia 等, J. Immun. Meth., 2004, 288 :91-98), 方法中使用 Bio-Plex 工作站和软件 (BioRad, Hercules, CA) 以及 **Luminex**[®] 公司的试剂 (Austin, TX)。一般地遵循制造商的基本方案。以成对组合的方式测试抗体;如果两种抗体互相交叉竞争,将其分组或“框”在一起。一般而言,分到不同框的抗体结合 IL-17RA 的不同部位,而分到相同框的抗体结合 IL-17RA 的相似部位。

[0374] 中和决定簇的评估:Hu/Mu 嵌合体

[0375] 使用大量嵌合人/小鼠 IL-17RA,进行研究以确定各种 IL-17RA 拮抗物(以人抗体的形式)在哪里结合至人 IL-17RA。该方法利用各种 IL-17RA 抗体与小鼠 IL-17RA 的非交叉反应性。对各嵌合体,将人 IL-17RA 胞外域的一个或两个区用小鼠 IL-17RA 的相应区代替。构建了 6 个单区和 8 个双区的嵌合体;进行使用 Bio-Plex 工作站和软件 (BioRad, Hercules, CA) 的多元分析,以通过分析示范性的人 IL-17RA mAbs 对嵌合和野生型 IL-17RA 蛋白的差异结合,确定人 IL-17RA 的中和决定簇。

[0376] 中和决定簇的评估:精氨酸扫描

[0377] 使用大量突变 IL-17RA 蛋白进行进一步研究,该蛋白在人 IL-17RA 的选定氨基酸残基具有精氨酸取代。精氨酸扫描为评估抗体或其它蛋白在哪里结合至另一个蛋白的本领域公认方法,参见,例如 Nanevich, T. 等, 1995, J. Biol. Chem., 270 :37, 21619-21625 和 Zupnick, A. 等, 2006, J. Biol. Chem., 281 :29, 20464-20473。一般而言,与其它氨基酸相比,精氨酸侧链带正电荷且相对体积庞大,这将破坏抗体结合至抗原的突变引入区。精氨酸扫描为确定残基是否为中和决定簇和/或表位的部分的方法。挑选分布在遍及人 IL-17RA 胞外域的 95 个氨基酸用于突变为精氨酸。该选择偏向于带电荷或极性氨基酸,以使该残基最大可能地在表面上并减小突变导致蛋白错误折叠的可能性。

[0378] 使用本领域已知的标准技术,基于 Stratagene **Quickchange**[®] II 方案试剂盒 (Stratagene/Agilent, Santa Clara, CA) 提供的标准设计含突变残基的正义和反义寡核苷酸。使用 **Quickchange**[®] II 试剂盒 (Stratagene) 进行野生型 (WT) HuIL-17RA-Flag-pHis 的诱变。将所有嵌合构建体构建在胞外域的羧基末端上编码 FLAG-组氨酸标记 (6 个组氨酸),以借助于聚 His 标记促进纯化。进行使用 Bio-Plex 工作站和软件 (BioRad, Hercules, CA) 的多元分析,以通过分析某些人 IL-17RA mAbs 对精氨酸突变体和野生型 IL-17RA 蛋白的差异结合,确定人 IL-17RA 的中和决定簇。

[0379] 这些研究的结果总结于下表 32 中。

[0380] 表 32:某些 IL-17RA 抗体特性的总结

[0381]

框	标识符	Hu/Mu 嵌合体	精氨酸突变体
1	4.224.2	F: 229-319	S220R, E226R, T228R, S236R, L270R, Q284R
2	2.133.1	B: 75-96 D: 176-197	D152R
3	3.381.1	C: 128-154 D: 176-197	D152R, D154R, E156R, D184R, E186R, S198R
	3.1404.1	D: 176-197	D152R, D154R, E156R, D184R, E186R, H297R
	4.16.1	D: 176-197	D152R, D154R, E156R, D184R, E186R
	3.454.1	B: 75-96 C: 128-154 D: 176-197	E97R, D152R, D154R, E156R, Q176R, D184R, E186R, S198R, T235R, H297R
4	2.23.1	F: 229-319	H138R, K166R, H215R, S220R, E226R, T228R, S236R, E241R, H243R, L270R
5	3.1545.1	D: 176-197	E113R, S115R, D152R, D154R, E156R, S177R, S198R
6	3.211.2	D: 176-197	D152R, D154R, E156R, S177R, L270R

[0382] 实施例 13

[0383] 本实施例描述 IL-25 再刺激测定,该测定有助于评估 L-17RA-IL-17RB 拮抗物对 IL-25 生物活性的影响。将人外周血单核细胞 (PBMC) 从正常供体分离,以 5×10^6 个细胞 /ml 在胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP (Quentmeier 等, Leukemia. 2001Aug ;15 (8) :1286) ;100 纳克 /ml ;购自 R&D Systems,Minneapolis,MN) 存在下刺激 24 小时。随后将该 PBMC 收集,并在存在或不存在被测试抑制活性的物质时,置于存在 IL-2 (10 纳克 /ml, R&D Systems, Minneapolis, MN) 和 IL-25 (10 纳克 /ml ;R&D Systems, Minneapolis, MN) 的再刺激培养物中。将再刺激培养物制备为单细胞悬浮液并稀释至 4×10^7 个细胞 /ml ;将 100 微升的细胞加至 48 孔板达到终浓度 4×10^6 个细胞 /孔。3 天后,收集上清液并用 ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) 检测 IL-5。测试的物质包括可溶形式的 IL-17RB (先前已描述) 和总结于下面的多克隆和单克隆抗体组:

[0384] • MAB 1771 :抗 -HuIL-17RA MuIgG2b (R&D Systems)

[0385] • MAB 1207 :抗 -HuIL-17RB MuIgG2b (R&D Systems)

[0386] • AF177 :抗 -HuIL-17RA 山羊多克隆 IgG (R&D Systems)

[0387] • 几种全人抗 -HuIL-17RA HuIgG2 (描述于实施例 12)

[0388] 在使用不同供体的 PBMC 的数个不同再刺激测定中,测试各种物质的结果示于下表 33。

[0389] 表 33 :在存在或不存在各种 IL-17RB 和 IL-17RA 抑制剂时,用 IL-2+IL-25 刺激的人 PBMC (TSLP 处理) 的 IL-5 生产

[0390]

抑制剂描述	[抑制剂], 微克 /mL	[IL-5], pg/mL	%抑制
无	无	93.9 ± 9.7	0%
HuIL-17RB:Fc	10	42.0 ± 10.8	55%
HuIL-17RB:HIS	10	31.2 ± 11.5	67%

3. 1404	10	35.9 ± 5.3	62%
3. 1404	1. 0	42.9 ± 5.1	54%
3. 1404	0. 1	83.4 ± 4.6	12%
无	无	576 ± 6.8	0%
HuIL-17RB:Fc	10	72.7 ± 3.8	87%
MAB1771	10	437.7 ± 7.8	24%
MAB1207	10	499.4 ± 6.3	13%
AF177	10	105.8 ± 4.0	82%
3. 1404	10	100.5 ± 5.1	83%
无	无	191.6 ± 4.9	0%
HuIL-17RB:Fc	10	24.5 ± 4.2	88%
MAB1771	10	127.9 ± 3.6	33%
AF177	10	26.0 ± 4.0	86%
3. 1404	10	19.2 ± 3.4	90%
4. 16	10	22.2 ± 3.4	88%
3. 381	10	0.0 ± 0.0	100%

[0391] 在不同天数和用抗体的不同制品,在使用不同 PBMC 供体的 3 个独立再刺激测定中,测试了一组结合 IL-17RA 的人抗体。结果示于下表 34.

[0392] 表 34 :在存在或不存在各种 IL-17RA 抗体时,用 IL-2+IL-25 刺激的人 PBMC(TSLP 处理)的 IL-5 生产

[0393]

抗体	框	%抑制, 实验 1	%抑制, 实验 2	%抑制, 实验 3
3.1404	3	68%	76%	nd
4.16	3	76%	77%	nd
3.381	3	90%	75%	nd
1.243.3	1	0%	43%	0%
1.185.1	1	0%	41%	9%
2.46.1	1	0%	6%	0%
2.67.1	1	0%	13%	3%
2.98.1	1	0%	79%	0%
2.159.2	1	0%	86%	0%
4.224.2	1	13%	86%	53%
2.133.1	2	0%	16%	28%
3.381.1	3	69%	82%	74%
3.454.2	3	75%	nd	70%
3.1404.1	3	77%	100%	69%
4.16.1	3	85%	nd	100%
4.357.1	3	0%	nd	11%
4.361.3	3	60%	nd	0%
4.393.1	3	28%	72%	45%
2.23.1	4	0%	nd	0%
3.1545.1	5	0%	43%	0%
3.211.2	6	0%	47%	7%
2.225.1	*	0%	nd	0%
4.180.3	*	0%	0%	0%

[0394] * 这些抗体的框分析的结果为不明确的。

[0395] 用这些抗体的另外的制品获得基本类似的结果。该结果表明结合 IL-17RA 并抑制 IL-17A 的某些抗体也抑制 IL-25。

[0396] 实施例 14

[0397] 本实施例描述哮喘的小鼠模型。通过腹膜内注射在明矾或别的佐剂中的抗原（例如卵清蛋白 [OVA]），用该抗原致敏小鼠（例如，BALB/c）。几种致敏方案为本领域已知；一种方案为以一周的间隔三次注入 10 微克 OVA（明矾中）（即第 -21 天、第 -14 天和第 -7 天）。随后通过气溶胶暴露（5% OVA）或鼻内给予（0.1mg OVA）用抗原攻击该小鼠。该攻击时间表可从更短期（即在第 1、2 和 3 天每天攻击）或更长期（即每周攻击，共两至三周）间选择。要测量的终点可包括 AHR、BAL 液细胞数量和组成、体外引流肺淋巴结细胞因子水平、血清 IgE 水平和肺组织的组织病理学评价。哮喘的其它动物模型为已知，该模型包括使用其它动物（例如 C57BL/6 小鼠）、致敏方案（例如，鼻内接种、使用其它佐剂或无佐剂等）和/或抗原（包括肽类（例如来源于 OVA 或其它蛋白类抗原的肽类）、蟑螂提取物、豚草提取物或其它提取物（例如用于脱敏疗法的提取物等））。使用如下所示的小鼠组，在这个模型中

评估抗体对 IL-17RA、IL-17RB、IL-17 和 IL-25 的影响。

[0398] 在第 -21、-14 和 -7 天用明矾中的 OVA IP 免疫雌性 BALB/c 小鼠,在第 1-3 天将其暴露至用 OVA(PBS 中)的气溶胶攻击。在实验 1 和 2 中,将小鼠在 OVA 气溶胶攻击前一天(第 -1 天)IV 注入抗体;或在实验 3 中,将小鼠在首次 OVA 气溶胶攻击当天(第 1 天)、OVA 攻击前 30 分钟 IP 注入抗体;或在实验 1 和 3 中,将小鼠在每次气溶胶暴露至 OVA 前 30 分钟(第 1-3 天),IP 注入地塞米松(Dex)(阳性对照)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)(阴性对照)。将年龄匹配、仅接触过抗原 OVA 的组包括在内,用于比较。在最后的 OVA 攻击 48 小时后,测量对 MCh 攻击的气道高反应性(AHR)。在最后的 OVA 攻击 72 小时后,杀死小鼠并采集血清、BAL 液、引流肺淋巴结和肺用于分析。进行一系列的三个实验。

[0399] 实验 1 包括下列处理组:

- [0400] • 组 1:接触过抗原但未攻击的小鼠, n = 10
- [0401] • 组 2:PBS, IP, n = 10
- [0402] • 组 3:1mg/kg Dex, IP, n = 10
- [0403] • 组 4:500 微克 mIgG1 同种型对照 ab, IV, n = 10
- [0404] • 组 5:500 微克抗 -IL-17RB M735mAb, IV, n = 10
- [0405] • 组 6:500 微克嵌合抗 -mIL-17RA mAb M751, IV, n = 10
- [0406] • 组 7:500 微克大鼠 IgG 对照 ab, IV, n = 10
- [0407] • 组 8:500 微克抗 -mIL-25M819, IV, n = 10
- [0408] • 组 9:500 微克抗 -mIL-17mAb M210, IV, n = 10

[0409] 实验 2 包括下列处理组:

- [0410] • 组 1:接触过抗原但未攻击的小鼠, n = 10
- [0411] • 组 2:500 微克 mIgG1 同种型对照 ab, IV, n = 10
- [0412] • 组 3:500 微克嵌合抗 -mIL-17RA mAb M751, IV, n = 10

[0413] 实验 3 包括下列处理组:

- [0414] • 组 1:接触过抗原但未攻击的小鼠, n = 10
- [0415] • 组 2:PBS, IP, n = 10
- [0416] • 组 3:1mg/kg Dex, IP, n = 10
- [0417] • 组 4:500 微克 mIgG1 同种型对照 ab, IP, n = 10
- [0418] • 组 5:500 微克抗 -IL-17RB M735mAb, IP, n = 10
- [0419] • 组 6:500 微克嵌合抗 -mIL-17RA mAb M751, IP, n = 10
- [0420] • 组 7:500 微克大鼠 IgG 对照 ab, IP, n = 10
- [0421] • 组 8:500 微克抗 -mIL-25M819, IP, n = 10
- [0422] • 组 9:500 微克抗 -mIL-17mAb M210, IP, n = 10
- [0423] • 组 10:500 微克抗 -mIL-17F mAb M850, IP, n = 10

[0424] IL-17RB、IL-17RA 或 IL-25 而不是 IL-17A 的中和抗体在小鼠 OVA 哮喘模型中降低了 AHR;结果示于图 1-3。对来自实验 1 的各处理组 $\pm$ SE 报告了相对于基线的 PENH 平均值百分比变化(图 1)。基本如先前在实施例 7 中所述,测量了气道高反应性。支气管收缩的程度以相对于基线的 PENH 百分比变化表示。与用 PBS 或对照抗体处理的小鼠相比,IL-17RB、IL-17RA 或 IL-25 而不是 IL-17A 的中和抗体的处理降低了应答于 MCh 攻击的 AHR(图 3)。

[0425] 在实验 2 和 3 中,测量了机械通气小鼠应答于乙酰甲胆碱攻击的肺阻力 (R_L)。用小型动物通气机记录了在呼吸系统中压力和体积随着时间的测量结果,并通过拟合数据至呼吸系统的单室模型计算呼吸系统阻力 ($R = \text{cmH}_2\text{O}/\text{mL}$),该单室模型中 $P_{\text{tr}} = RV + EV + P_0$ (P_{tr} = 气管压力, V = 体积 / 时间, E = 弹性 = 压力 / 体积, V = 体积, P_0 = 基线压力)。通过对各小鼠在各浓度乙酰甲胆碱下的所有 R 测量结果取总和计算曲线下的气道阻力 (R) 面积 (AUC)。在实验 2 中,与用对照抗体处理的小鼠相比,IL-17RA 中和抗体的处理降低了应答于乙酰甲胆碱攻击的肺阻力 (图 4a)。在实验 3 中,与对照抗体处理的小鼠相比,IL-17RB、IL-17RA 或 IL-25 而不是 IL-17A 的中和抗体的处理降低了乙酰甲胆碱攻击的肺阻力 (图 4b)。

[0426] 还测定了抗体对 BALF 细胞数量和组成的影响;结果示于图 5-7。在实验 1 中,与适当对照抗体的处理相比,IL-17RB、IL-17RA 或 IL-25 而不是 IL-17A 的中和抗体在本小鼠 OVA 哮喘模型中显著减少了 BALF 总的白细胞数 (图 5a)、嗜酸性粒细胞数 (图 5b) 和淋巴细胞数 (图 5d)。IL-17RB 或 IL-17RA 而不是 IL-17A 的中和抗体显著减少了 BALF 总嗜中性粒细胞数 (图 5c)。IL-25 的中和抗体减少了 BALF 总嗜中性粒细胞数,但并不显著 (图 5c)。

[0427] 在实验 2 中,与适当对照抗体的处理相比,IL-25、IL-17RB 和 IL-17RA 的中和抗体在本小鼠 OVA 哮喘模型中显著减少了 BALF 总的白细胞数 (图 6a)、嗜酸性粒细胞数 (图 6b) 和淋巴细胞数 (图 6d)。这些抗体对总 BALF 嗜中性粒细胞 (图 6c) 或巨噬细胞 (图 6e) 数量没有显著影响。

[0428] 在实验 3 中,IL-17RB、IL-17RA 或 IL-25 而不是 IL-17A 或 IL-17F 的中和抗体在本小鼠 OVA 哮喘模型中显著减少了 BALF 总的白细胞数 (图 7a)、嗜酸性粒细胞数 (图 7b) 和淋巴细胞数 (图 7d)。IL-17RB、IL-17RA、或 IL-25 而不是 IL-17A 或 IL-17F 的中和抗体减少了 BALF 总嗜中性粒细胞数 (图 7c),但仅 IL-17RB 和 IL-25 抗体具有显著影响。IL-17RB 或 IL-17RA 而不是 IL-25、IL-17A 或 IL-17F 的中和抗体减少了 BALF 总巨噬细胞数 (图 7e),但仅 IL-17RA 抗体具有显著影响。

[0429] 如图 8a (实验 1) 和图 8c (实验 3) 中所示,IL-17RB、IL-17RA 或 IL-25 而不是 IL-17A 或 IL-17F 的中和抗体显著降低了 BALF IL-13 浓度。在实验 2 中,用 IL-17RB、IL-17RA 或 IL-25 的中和抗体处理的小鼠中的 BALF IL-13 浓度较低但并不显著,可能是由于总体较低的 IL-13 诱导水平 (与本小鼠模型中典型观测到的相比) (图 8b)。

[0430] IL-17RB、IL-17RA 或 IL-25 而不是 IL-17A 或 IL-17F 的中和抗体在本小鼠 OVA 哮喘模型中还降低了 BALF IL-5 浓度,但与同种型对照抗体处理的小鼠相比,在实验 1 中仅抗 -IL-25mAb 处理的组为显著较低 (图 9a),而在实验 3 中,抗 -IL-17RB、抗 -IL-17RA 和抗 -IL-25mAb 处理的组都显著降低了 (图 9c)。此外,在实验 2 中,通过用 IL-17RB、IL-17RA 和 IL-25 的中和抗体处理,显著降低了 BALF IL-5 浓度 (图 9b)。

[0431] 类似的,IL-17RB、IL-17RA 或 IL-25 而不是 IL-17A 或 IL-17F 的中和抗体在本小鼠 OVA 哮喘模型中降低了总血清 IgE 浓度。在实验 1 中,与适当同种型对照抗体处理的组相比,IL-17RB、IL-17RA 或 IL-25 的中和抗体降低了总血清 IgE 浓度,但仅 IL-25 中和抗体处理的组显著降低了总血清 IgE 浓度 (图 10a)。在实验 2 中,与对照抗体处理的组相比,IL-25、IL-17RB 或 IL-17RA 的中和抗体降低了总血清 IgE 浓度,但并不显著 (图 10b)。在

实验 3 中,与各自适当对照抗体处理的组相比,IL-17RB、IL-17RA 或 IL-25 而不是 IL-17A 或 IL-17F 的中和抗体显著降低了总血清 IgE 浓度(图 10c)。

[0432] 组织学上分析了来自实验 3 中各处理组的 8 只小鼠的肺。肺组织切片用 H&E 或 PAS 染色,随后经病理学家按先前实施例 1 所述打分。IL-17RB、IL-17RA 或 IL-25 而不是 IL-17A 或 IL-17F 的中和抗体的处理在本小鼠 OVA 哮喘模型中显著降低了炎症分数(图 11)。

[0433] 这些结果表明抗-IL-17RB mAb M735、抗-IL-17RA mAb M751 或抗-IL-25mAb M819 的处理在本小鼠 OVA 诱导的哮喘模型中显著减少了炎症的多种参量,小鼠 OVA 诱导的哮喘模型被认为是人肺部炎性状况(例如哮喘)的模型。相反,抗-IL-17A mAb 或抗-IL-17F mAb 的处理在本模型中并不显著减少炎症。因此,IL-25 和其受体 IL-17RB 和 IL-17RA 在本小鼠 OVA 哮喘模型中起介导炎症的作用。

[0001]

序列表

<110> AMGEN INC.
Budelsky, Alison L.
Comeau, Michael R.
Tocker, Joel E.

<120> IL-17RA-IL-17RB 拮抗物及其用途

<130> A-1371-WO-PCT

<140> --待指定--
<141> 2009-02-20

<150> 61/066,538
<151> 2008-02-21

<150> 61/145,901
<151> 2009-01-20

<160> 53

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 131
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Thr Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Glu Leu Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Gln Phe
100 105 110

Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
115 120 125

Val Ser Ser
130

<210> 2
<211> 127
<212> PRT

[0002]

<213> 智人

<400> 2

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

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

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

<210> 4

[0003]

<211> 114
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4

```

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

<210> 5
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5

```

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

[0004]

<210> 6
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Arg Tyr
          20          25          30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Arg Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Asn Gly Phe Asp
          100          105          110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 7

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Arg Tyr
          20          25          30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Arg Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Asn Gly Phe Asp
          100          105          110

```

[0005]

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asn Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Asn Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Asn Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Arg Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0006]

Ala Arg Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Asn Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 124

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Phe Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Ala Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Pro Asp Ala Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11

<211> 114

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0007]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Thr Lys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 12
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 12

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

<210> 13
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 13

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

[0008]

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Gly	Arg	Val	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

<210> 14
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 14

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

<210> 15
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 15

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			

[0009]

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Arg Val Arg Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 16

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Lys Gln Leu Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 17
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ala Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

[0010]

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Gln Leu Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 18
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 18

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

<210> 19
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

[0011]

```

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
      20                      25                      30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35                      40                      45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
      50                      55                      60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65                      70                      75                      80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95

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

Thr Val Ser Ser
      115

```

```

<210> 20
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

```

```

<400> 20

```

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5                      10                      15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20                      25                      30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                      40                      45

Ser Phe Ile Ser Ala Arg Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50                      55                      60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
      65                      70                      75                      80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95

Ala Arg Pro Lys Val Gly Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
      100                     105                     110

Thr Val Thr Val Ser Ser
      115

```

```

<210> 21
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

```

```

<400> 21

```

[0012]

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

<210> 22
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 22

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

<210> 23
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 智人

[0013]

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Ala Tyr Glu Leu Gln Leu Gly Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 24

<211> 125

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ala Ala Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Ala Tyr Glu Leu Gln Leu Gly Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 25

<211> 124

<212> PRT

[0014]

<213> 智人

<400> 25

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

<210> 26

<211> 125

<212> PRT

<213> 智人

<400> 26

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

<210> 27

[0015]

<211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 27

```

Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
          20           25           30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
          35           40           45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Asn Pro Phe
          85           90           95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
          100           105

```

<210> 28
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 28

```

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn
          20           25           30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Asn Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Trp Arg Thr
          85           90           95

Phe Gly Gln Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 29
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 29

[0016]

```

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

```

```

<210> 30
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

```

```

<400> 30

```

```

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

```

```

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

```

```

<400> 31

```

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

```

[0017]

```

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
      20                      25                      30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
      35                      40                      45

Tyr Ala Ala Ser Ser Phe Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50                      55                      60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65                      70                      75                      80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Pro
      85                      90                      95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100                      105

```

<210> 32
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 32

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5                      10                      15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
      20                      25                      30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
      35                      40                      45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50                      55                      60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65                      70                      75                      80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Lys Ser Tyr Pro Leu
      85                      90                      95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100                      105

```

<210> 33
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 33

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5                      10                      15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
      20                      25                      30

```

[0018]

```

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
   35                                40                                45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
   50                                55                                60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
  65                                70                                75                                80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Lys Ser Tyr Pro Leu
                        85                                90                                95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
                100                                105

```

<210> 34
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 34

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1                                5                                10                                15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
                20                                25                                30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
   35                                40                                45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
   50                                55                                60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
  65                                70                                75                                80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Lys Ser Tyr Pro Leu
                        85                                90                                95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
                100                                105

```

<210> 35
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 35

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1                                5                                10                                15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
                20                                25                                30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
   35                                40                                45

```

[0019]

```

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50          55          60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Lys Ser Tyr Pro Leu
          85          90          95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

```

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

```

```

<400> 36

```

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1          5          10          15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Trp
          20          25          30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45

Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Arg
          85          90          95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

```

<210> 37
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

```

```

<400> 37

```

```

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1          5          10          15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
          20          25          30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
          35          40          45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ala Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
          50          55          60

```

[0020]

Gly Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ile Asn Trp Pro Lys
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 38
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asn Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 39
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ala Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Thr Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

[0021]

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Phe	Tyr	Cys	Met	Gln	Ser
				85					90					95	
Ile	Gln	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 40
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 40

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

<210> 41
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 41

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

[0022]

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Ser
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Thr Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Ile Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 43
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Ser Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

[0023]

<210> 44
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 44

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Thr Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

Ser Lys Asn Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          35           40           45

Pro Leu Asn Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
          100          105          110

```

Lys

<210> 45
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 45

```

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Asn
          20           25           30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Asp
          50           55           60

Asn Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Thr Trp Pro Leu
          85           90           95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 46

[0024]

<211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Phe Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 47
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Phe Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 48
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

[0025]

<400> 48

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

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 49

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

<210> 50

<211> 113

<212> PRT

<213> 智人

<400> 50

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

[0026]

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

Lys

<210> 51
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 51

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

Lys

<210> 52
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 52

[0027]

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

<210> 53
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 53

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

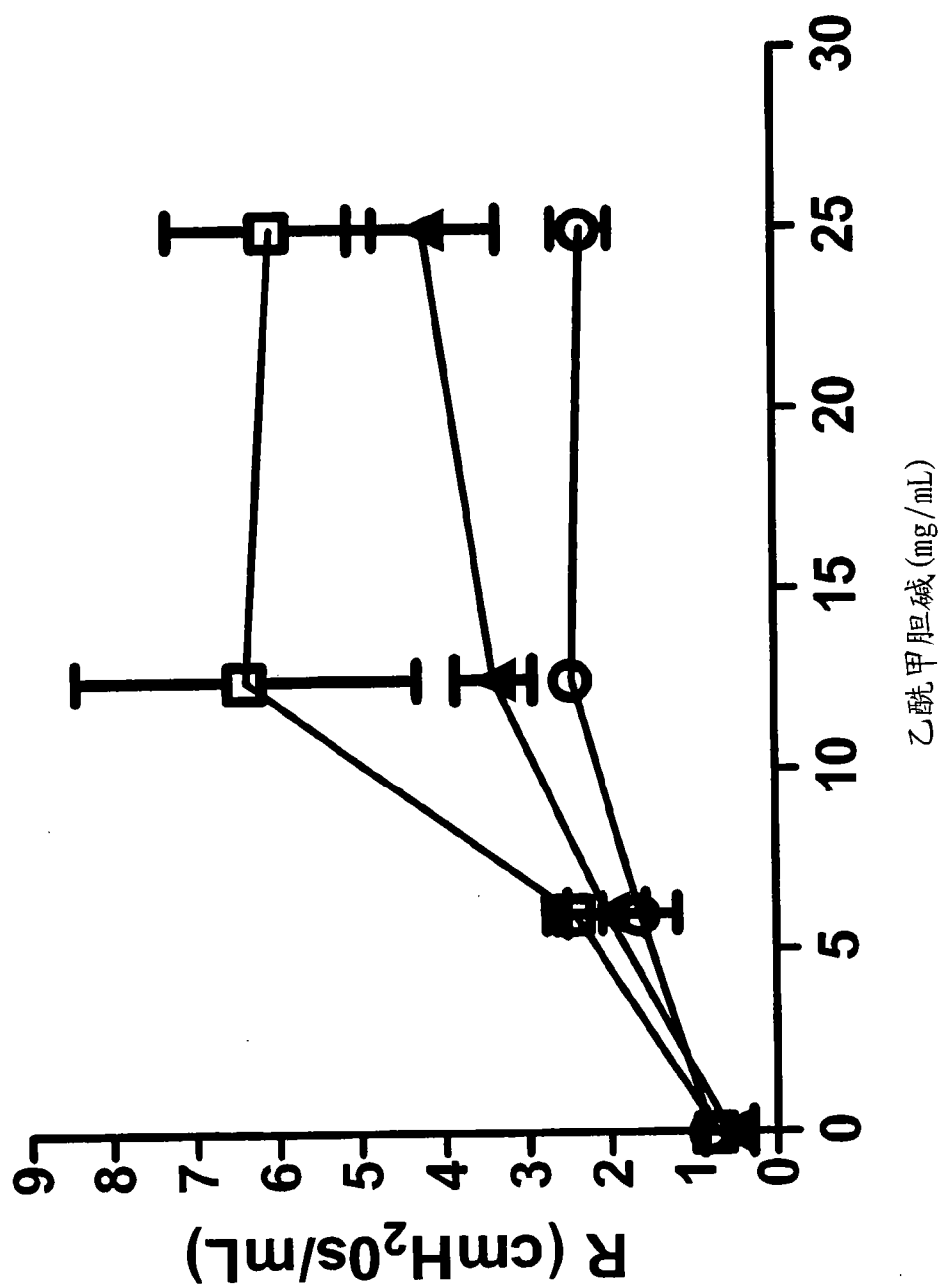


图 1

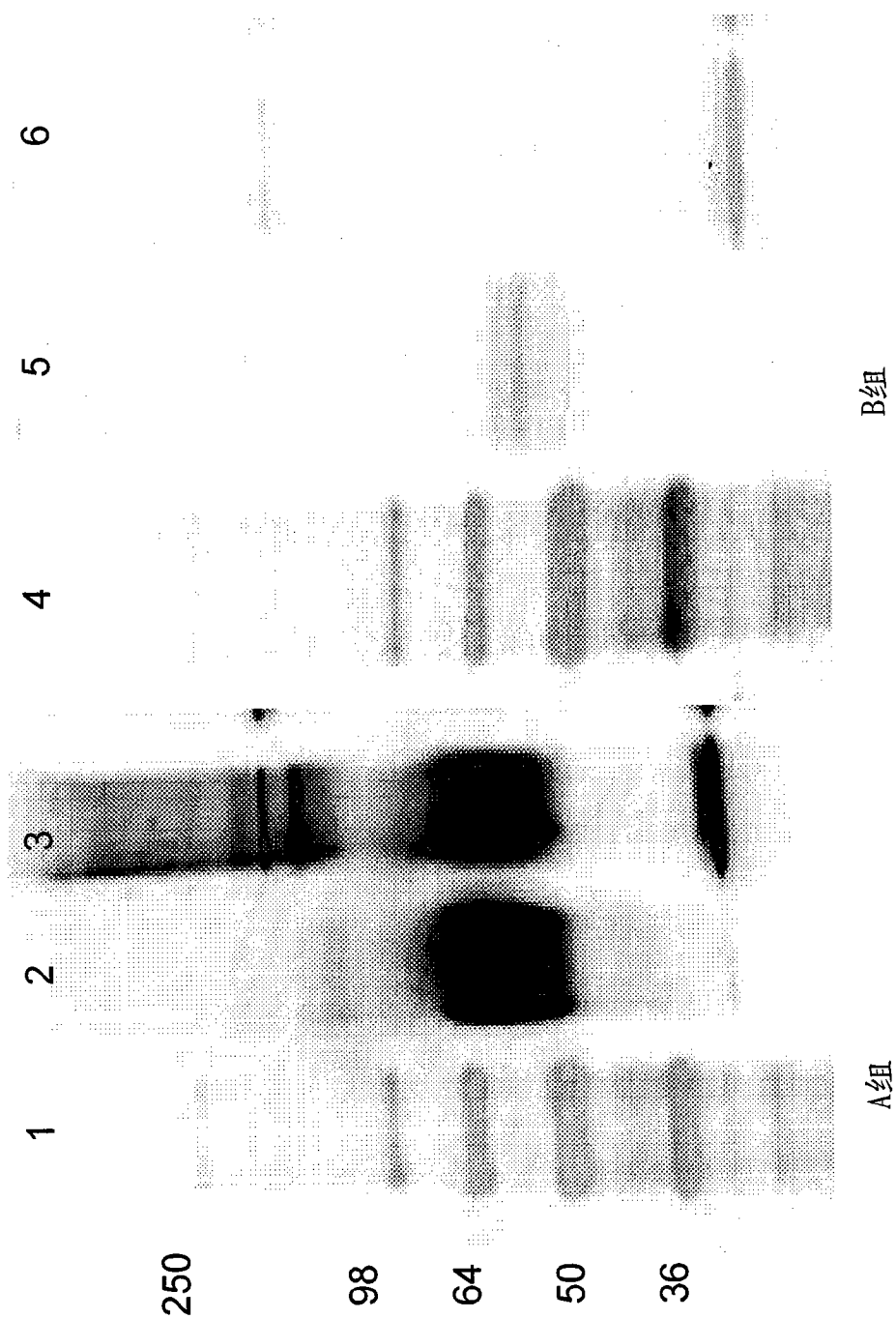


图 2

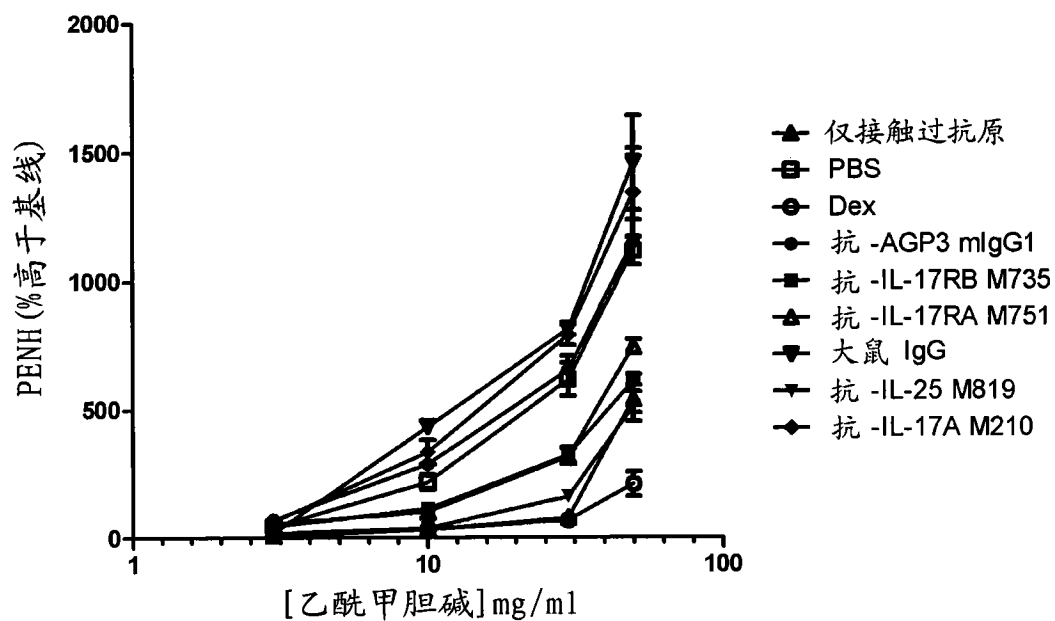


图 3

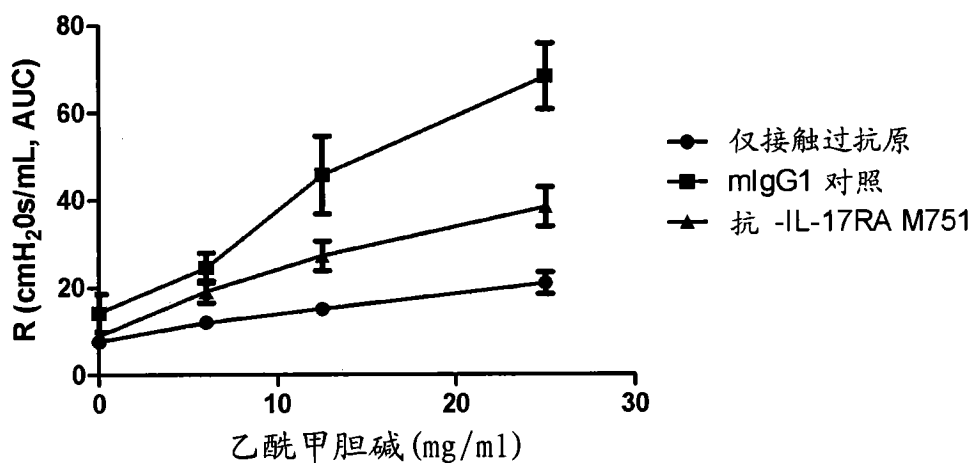


图 4a

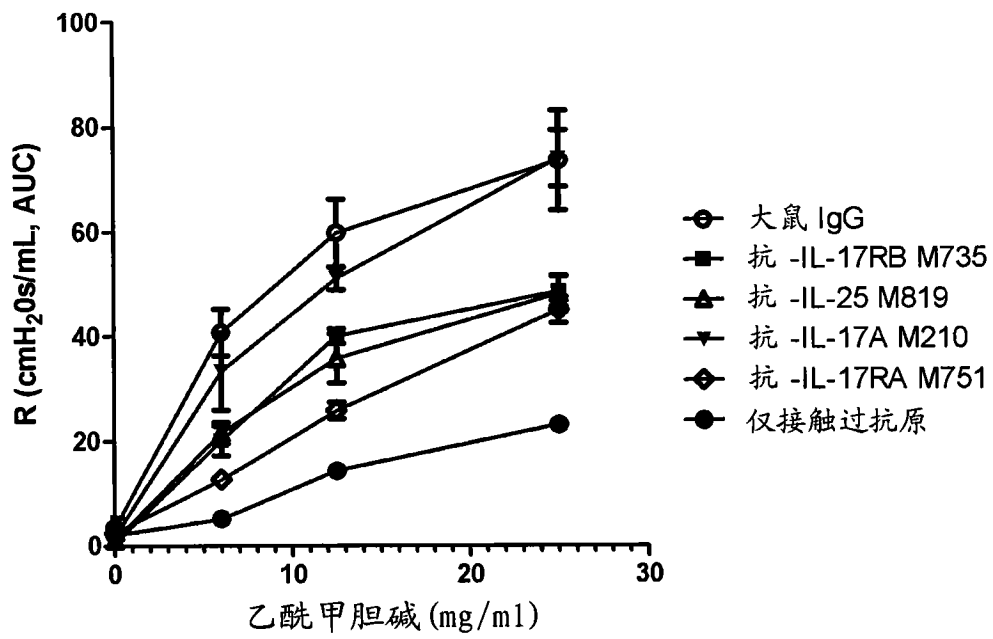


图 4b

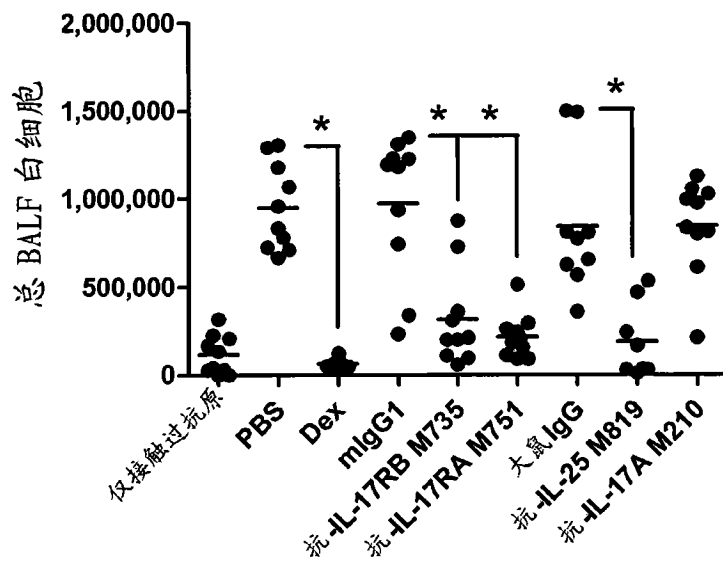


图 5a

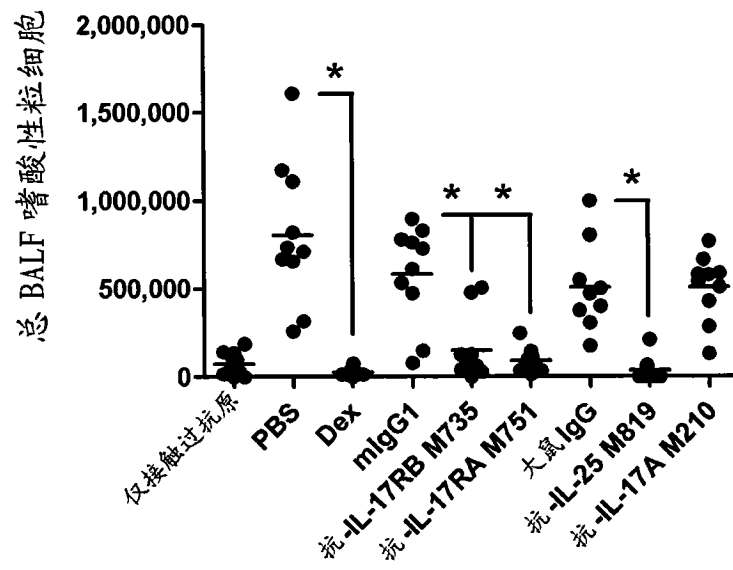


图 5b

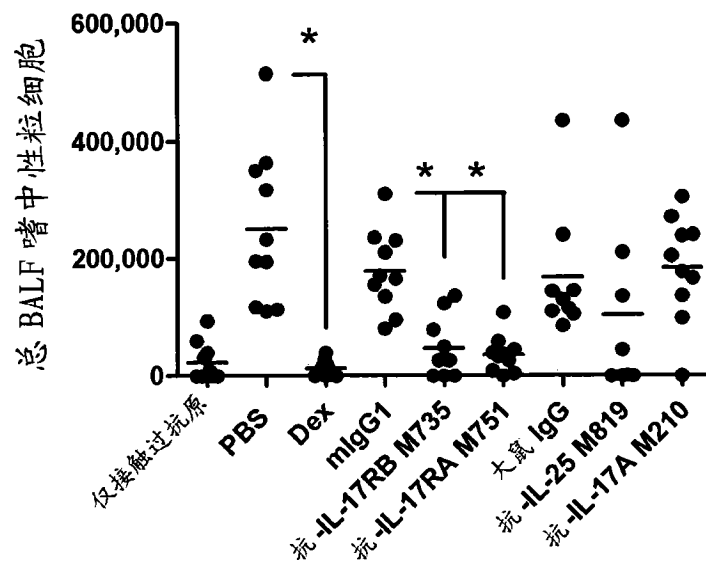


图 5c

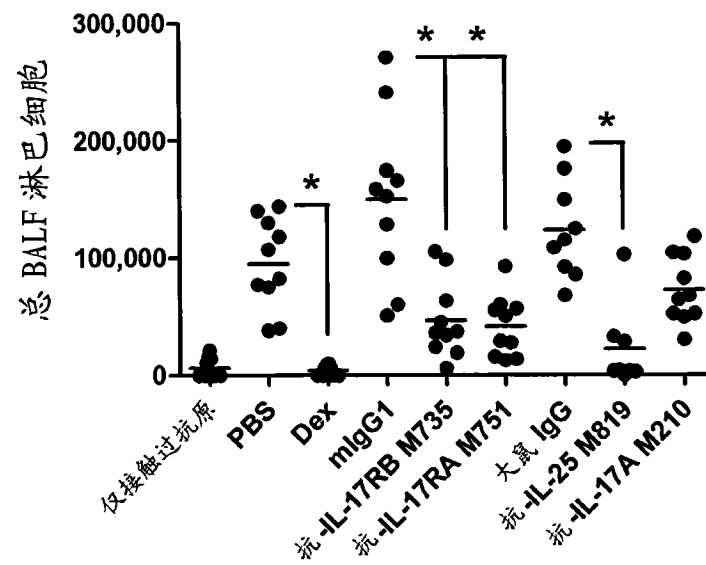


图 5d

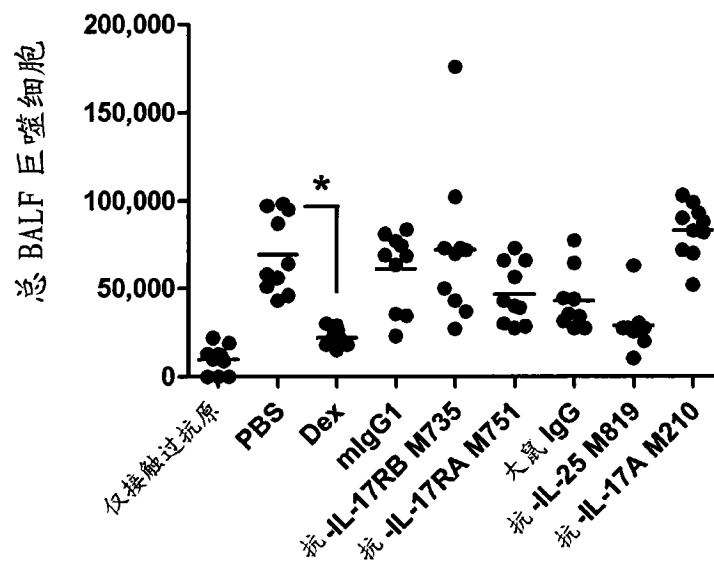


图 5e

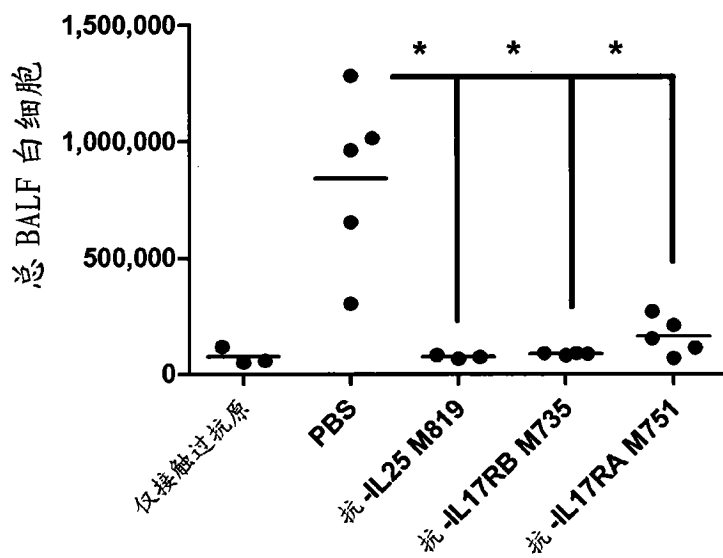


图 6a

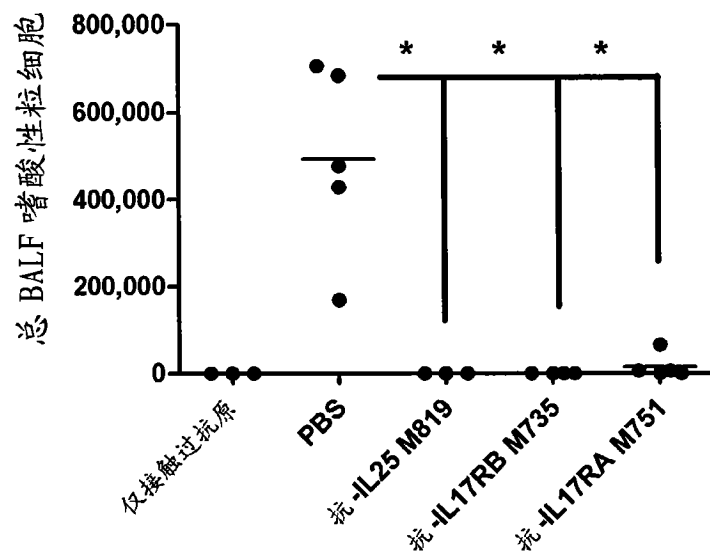


图 6b

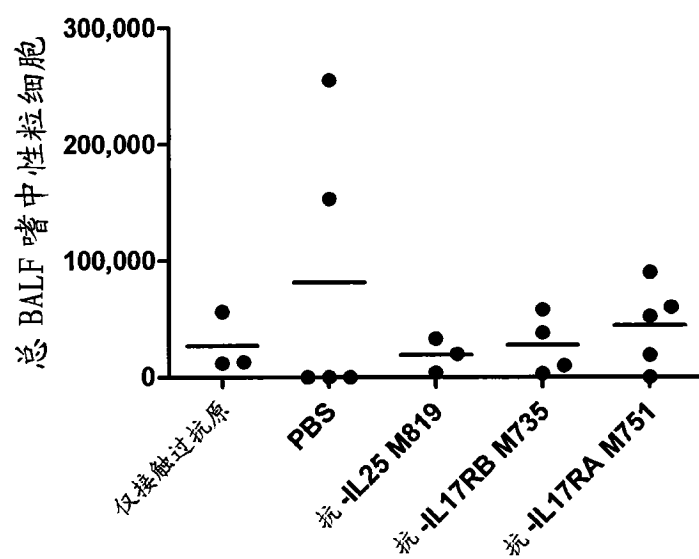


图 6c

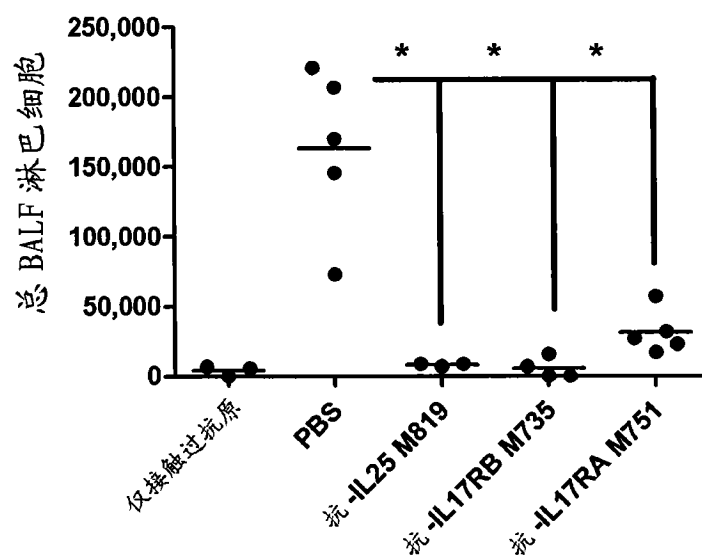


图 6d

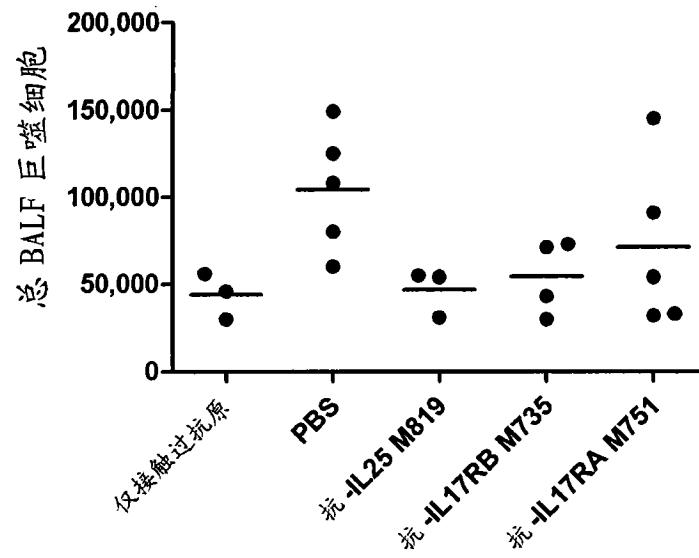


图 6e

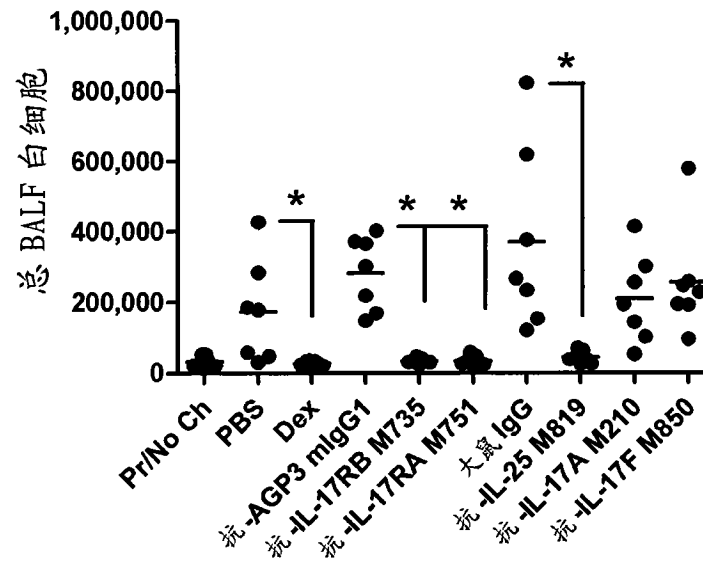


图 7a

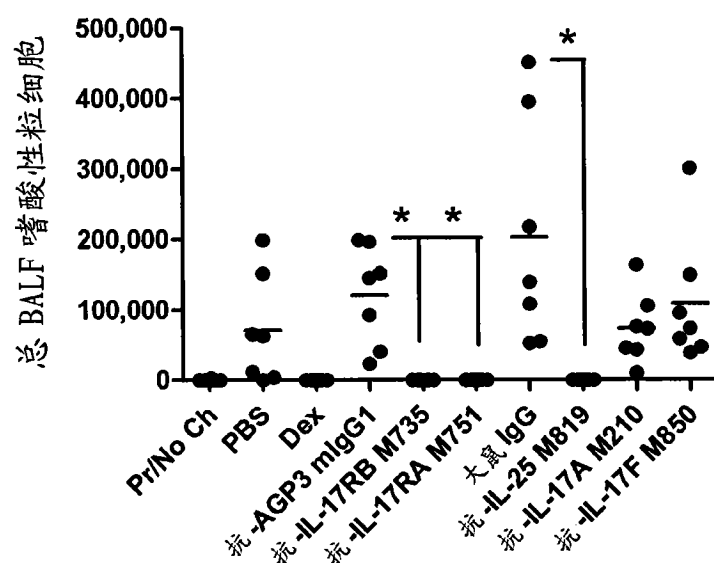


图 7b

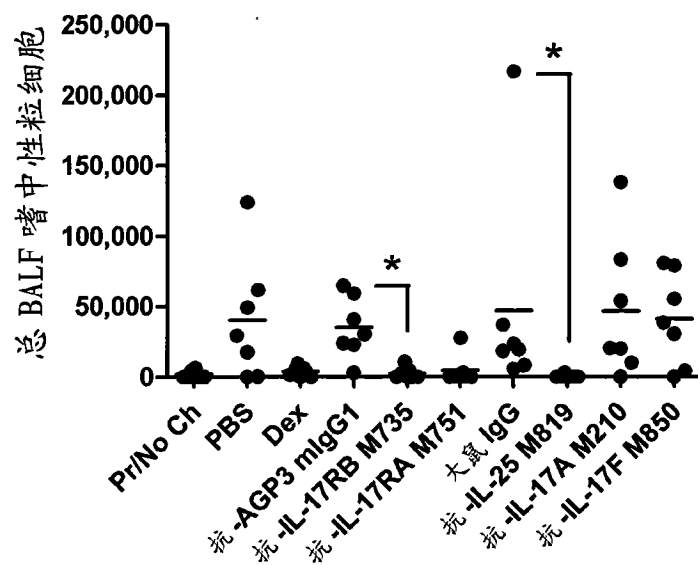


图 7c

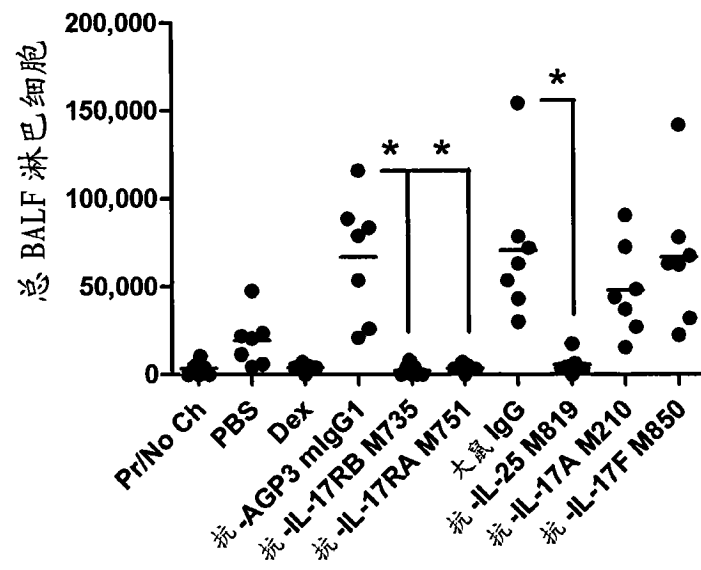


图 7d

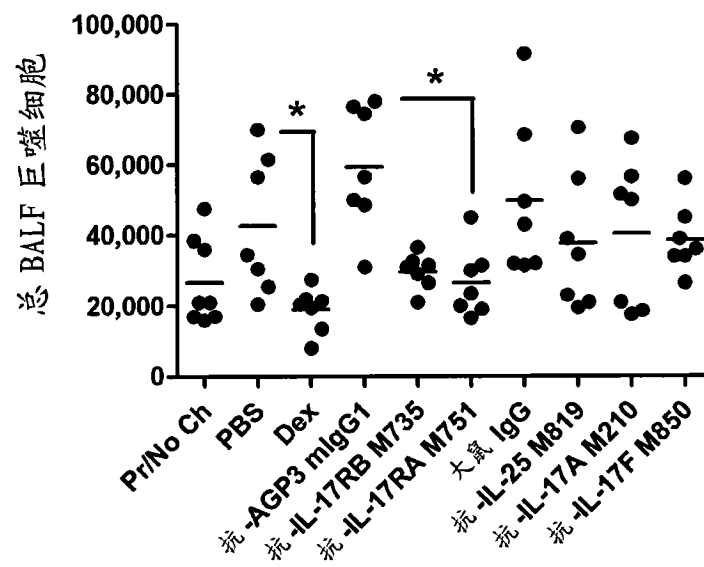


图 7e

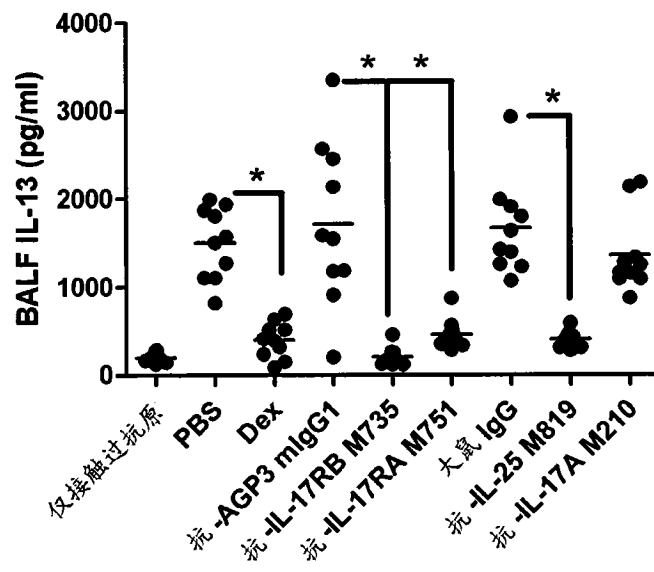


图 8a

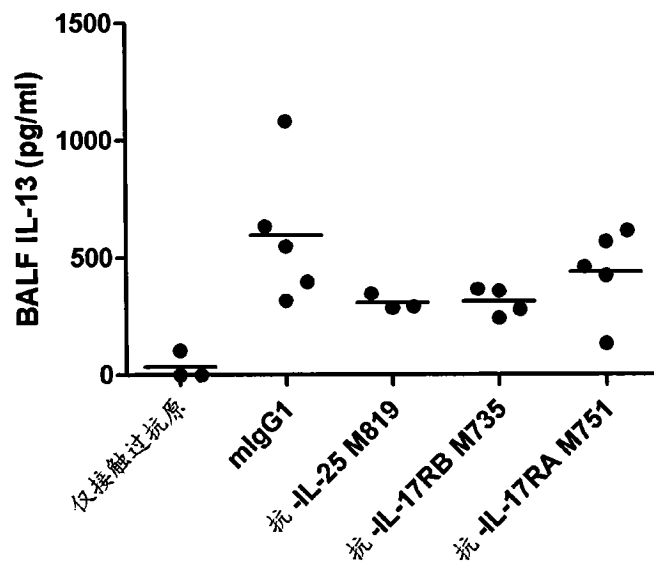


图 8b

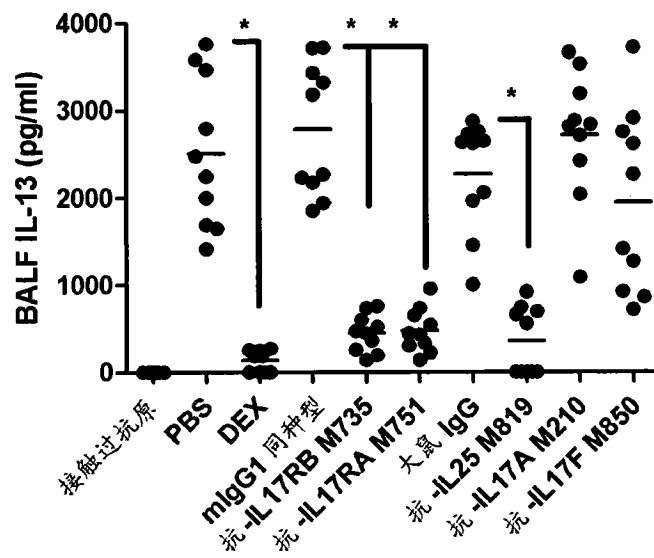


图 8c

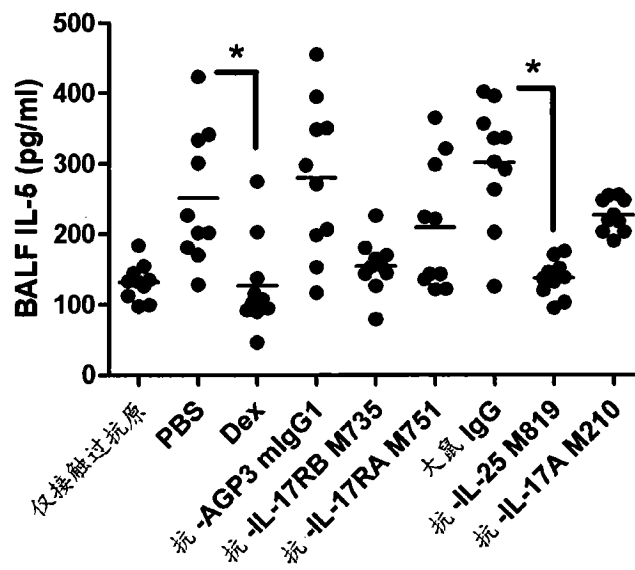


图 9a

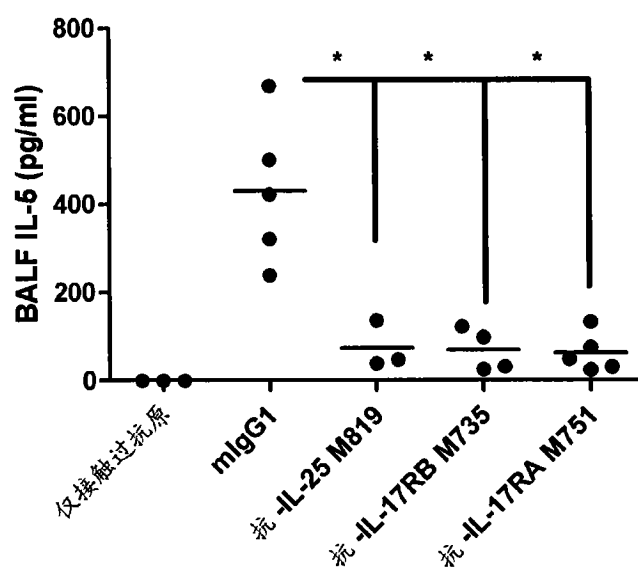


图 9b

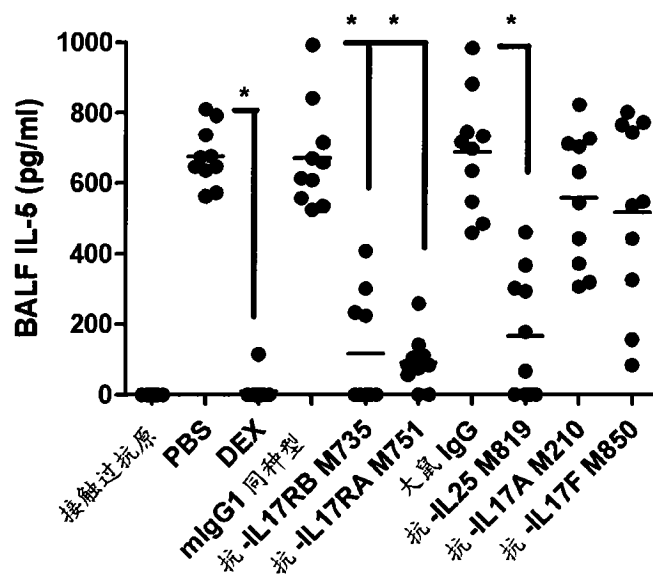


图 9c

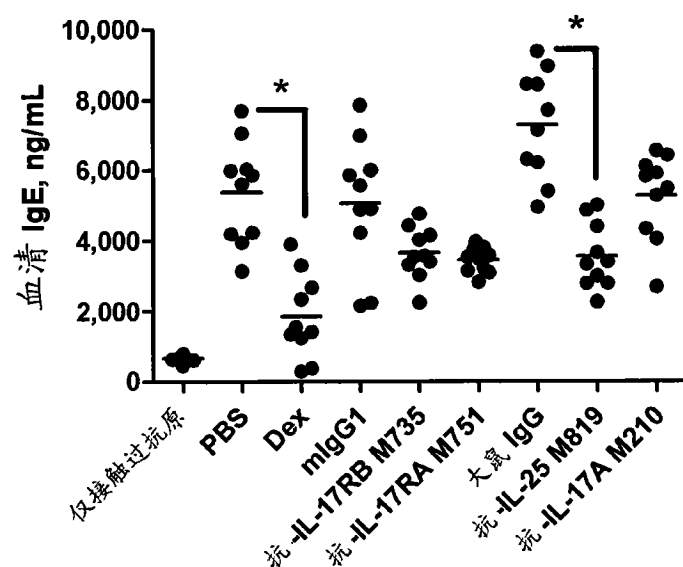


图 10a

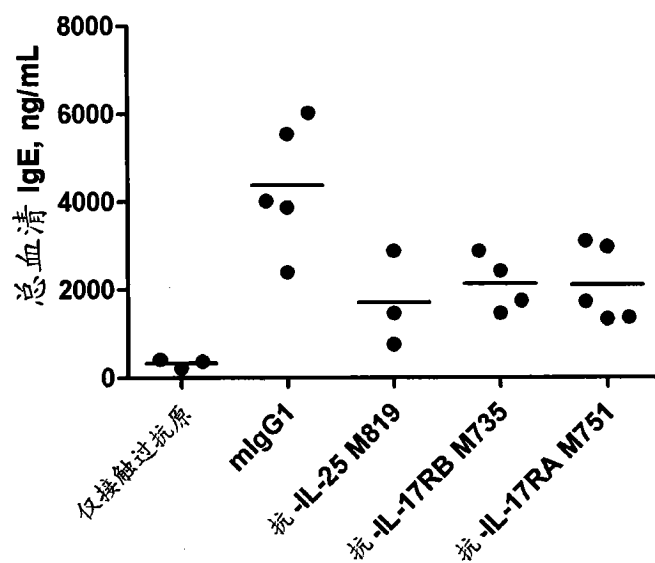


图 10b

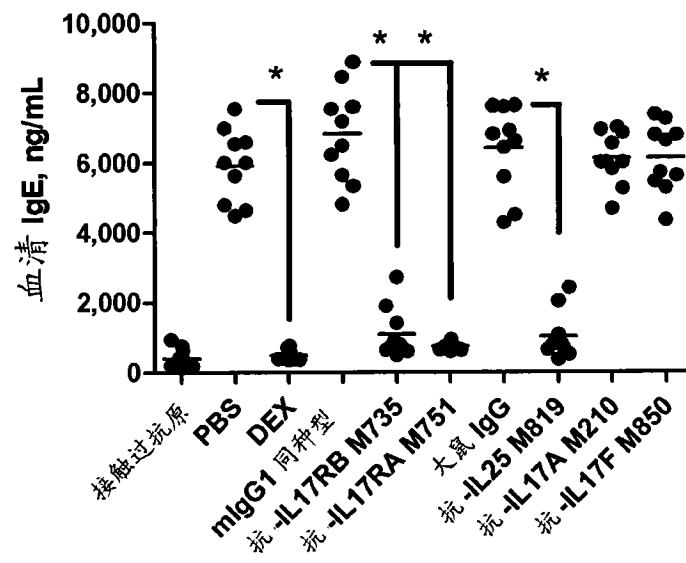


图 10c

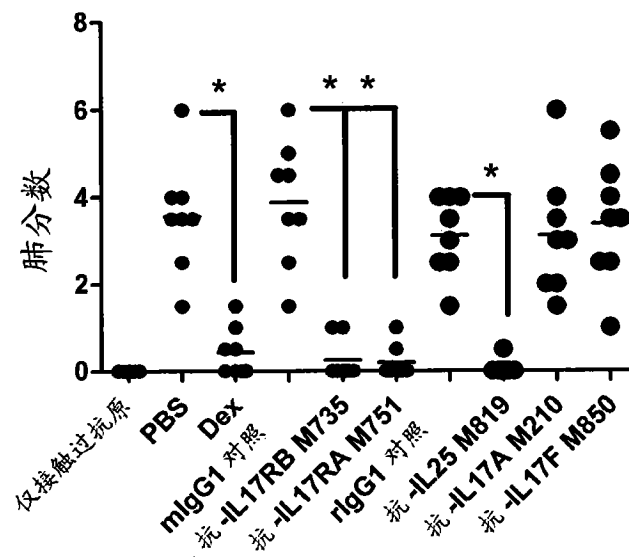


图 11