



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110051836 B

(45) 授权公告日 2023. 05. 26

(21) 申请号 201910160451.4

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2015.07.31

A61P 35/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110051836 A

(43) 申请公布日 2019.07.26

(30) 优先权数据

14290232.9 2014.08.06 EP

(62) 分案原申请数据

201580042267.X 2015.07.31

(73) 专利权人 西布列塔尼大学

地址 法国布雷斯特

专利权人 法国国家健康与医学研究院

布雷斯特大学医疗中心

(72) 发明人 伊夫·勒诺迪诺

奥利维耶·米尼昂

米格尔·比尔戈斯

雅克·奥利维耶·佩斯

廷希南·法利

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

专利代理师 李小爽

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102433383 A, 2012.05.02

卢根娣等. 第八章 风湿性疾病患者的护理. 《内科护理学》. 第二军医大学出版社, 2013,

Maria A. Spassova等. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{2+} channels. 《PNAS》. 2006, 第103卷(第11期),

Maria A. Spassova等. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{2+} channels. 《PNAS》. 2006, 第103卷(第11期),

Hartmann J等. stromal interaction molecule 1 isoform 2 precursor [Homo sapiens], NP_003147.2. 《NCBI》. 2014,

Yves Renaudineau等. Abnormal Calcium Influx in T and B Lymphocytes from Systemic Lupus Erythematosus Patients is Related to STIM-1 Over-Expression. 《Ann Rheum Dis》. 2013, 第72卷(第Suppl 1期),

审查员 李峥

权利要求书1页 说明书8页

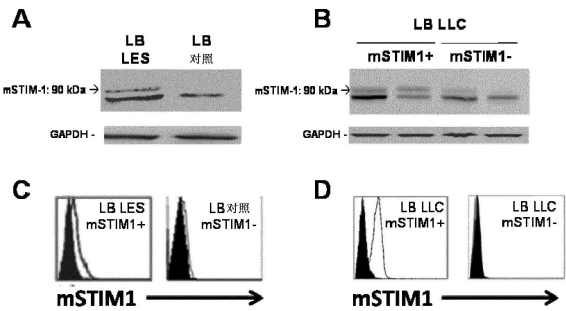
序列表5页 附图4页

(54) 发明名称

使用膜STIM1筛选化合物的方法

(57) 摘要

本发明涉及使用膜STIM1筛选化合物的方法。本发明还涉及位于细胞的质膜的STIM1蛋白的部分在以下方法中的用途, 该方法用于筛选用于治疗慢性淋巴细胞白血病和/或系统性红斑狼疮的候选分子。本发明还涉及与位于细胞的质膜的STIM1蛋白的部分相互作用的物质, 用于在治疗慢性淋巴细胞白血病和/或系统性红斑狼疮中作为药用产品使用, 以及涉及包含至少一种根据本发明的物质的药物组合物。



1. 一种与位于细胞的质膜的STIM1蛋白的部分相互作用的物质在制备治疗慢性淋巴细胞白血病和/或系统性红斑狼疮的药物中的用途,其中所述物质是针对序列如SEQ ID NO: 3所示的STIM1蛋白片段的抗体。

2. 根据权利要求1所述的用途,所述物质是不进入所述细胞的物质。

使用膜STIM1筛选化合物的方法

[0001] 本申请是申请日为2015年7月31日的题为“使用膜STIM1筛选化合物的方法”的中国专利申请号201580042267.X的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及STIM1 (基质相互作用分子1或GOK) 蛋白的膜部分在筛选的方法中的用途,以及涉及与位于质膜的STIM1蛋白的部分相互作用的物质用于治疗用途,和包含至少这种物质的药物组合物。

[0003] 在下面给出的描述中,在方括号([])中的参考文献是指在文本的结尾处给出的参考文献。

背景技术

[0004] 系统性红斑狼疮(SLE)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)仍然无法治愈。

[0005] SLE是自身免疫性起源的异质性疾病,特征在于存在自身反应性淋巴细胞以及存在抗核自身抗体(ANA)。它是具有非常不同的临床表现的多系统疾病。患病率在不同的族群中是不同的,但估计为约1/10000,其中男/女比例为10:1。这种疾病的临床异质性反映了它的致病复杂性,这包括遗传和环境因素。SLE可能影响所有器官。最常见的表现是皮疹、关节炎和疲劳。最严重的表现包括肾炎、神经病症、贫血和血小板减少。90%以上的患者具有ANA,其被认为是高于1/160阳性的。SLE是具有发作性进展的疾病。目前治疗的目的是:治疗急性发作,其可能会影响重要的预后,最小化在相对稳定的时期爆发的风险,以及监测症状,这些症状虽然不危害重要的预后,但影响日常生活质量。

[0006] 羟氯喹和非甾体类抗炎药适用于SLE的温和形式;皮质激素类和免疫抑制剂被保留用于最严重的形式;靶向B淋巴细胞(B细胞)的抗CD20单克隆抗体(利妥昔单抗(rituximab), **Mabthera®**)目前适用于受到更严重影响并且对通常治疗没有响应的患者([1])。尽管在引入皮质激素类和免疫抑制剂以后预后改善,但SLE继续对患者发病率和死亡率有显著的影响。

[0007] CLL是慢性恶性血液病,其还影响B细胞。这些细胞在免疫系统水平上发挥重要作用。在CLL过程中,在它们的生命周期中当CLL的B细胞达到成熟时,它们被阻断,然而它们继续产生。因此,这些B细胞最终积累在血液、神经节、脾、肝和骨髓中,这导致次级淋巴器官的容积的增加。目前可用的针对CLL的治疗是当疾病处于晚期阶段时最常用的。在CLL的强化治疗中使用的化疗产品是单独使用的苯丁酸氮芥、单独使用的氟达拉滨、CHOP型的每月化疗(四种药剂的组合:环磷酰胺-(H)阿霉素(adryamycin)-硫酸长春新碱(长春新碱)-泼尼松)。就靶向治疗而言,因为白血病B细胞是CD20+,特异性地识别此靶点的单克隆抗体可以用于治疗(利妥昔单抗, **Mabthera®**)。另一个靶点对于B细胞具有特异性的Bruton的酪氨酸激酶,其在白血病细胞中的表达增加。依鲁替尼(Ibrutinib) (其是此酶的抑制剂)导致白血病细胞的凋亡(死亡),从而甚至在难治性或反复发作的形式中也给予更长的缓解。然而,上述治疗可能暴露于不良效应。

[0008] 在SLE和CLL的病理特征中,描述了在B细胞抗原受体(BCR)的刺激以后,在SLE和CLL中B细胞的钙信号通路收到干扰([2,3])。

[0009] 除钙信号通路的这些缺陷之外,SLE的B细胞特征还在于白细胞介素10(IL-10)的产生不足,其影响调节B淋巴细胞(Breg)的活性([4,5])。在SLE中Breg的活性的这种不足导致T淋巴细胞(T细胞)增殖的较少调节,其可能会再次有利于放大自身免疫过程([5])。

[0010] CLL和SLE的诊断和预后是基于汇编的不完善的临床和生物学标准,因此需要开发新的、更有效的标准。

[0011] 在上述两种疾病中,B细胞是主要治疗靶。然而,一些患者并不响应现有治疗。

[0012] 因此,真正需要提供新的治疗解决方案,其克服现有技术的这些缺陷、缺点和障碍,并且尤其涉及治疗靶,其对于待治疗的疾病的受影响的细胞是易接近的,特异性的和选择性的。

发明内容

[0013] 本发明通过使用STIM1蛋白(涉及钙通道的激活和调节的蛋白)的位于质膜的部分作为SLE和CLL的治疗靶,使得可以响应这些需求。

[0014] 令人惊讶地,本申请人还证明了用于直接或间接控制位于质膜的STIM1蛋白的活性的任何方式可以用于调节B细胞的细胞反应,从而提供SLE和CLL的新的治疗解决方案。本发明因此提出,在这种情况下,使用调节以下各项的任何工具:(i)位于质膜的STIM1蛋白的表达,(ii)这种蛋白的膜寻址(membrane addressing),或(iii)在淋巴细胞质膜处这种蛋白的生物活性。

[0015] 在本发明的上下文中,在狼疮患者的B细胞中令人惊讶地观测到:

[0016] (1) STIM1蛋白的整体表达的增加,以及位于质膜的STIM1的部分的诱导,这在对照的B细胞中保持较低或甚至为零,

[0017] (2) 在具有位于质膜的STIM1的部分的SLE的B细胞(在静止时)中,尤其是在处于不成熟/过渡期的SLE的B细胞中,借助于Erk1/2激酶(细胞外信号调节激酶)的磷酸化,MAPK通路(促分裂原活化蛋白激酶)的激活,

[0018] (3) 细胞外Ca²⁺的增加的组成型进入,以及

[0019] (4) 在STIM1的表达的增加、细胞外Ca²⁺的组成型进入(持续进入,constitutive entry)和MAPK ERK1/2途径的激活的失调之间的相关性,其可以解释细胞的一般激活,自身反应性B细胞的存活,因而可以解释自身免疫过程。

[0020] 在本发明的上下文中,关于SLE的Breg的活性,首次令人惊讶地观测到:

[0021] (x1) Breg的缺乏调节活性与在SLE的B细胞中的STIM1分子的表达的增加相关,

[0022] (x2) 位于质膜的STIM1分子的阻断(通过阻断抗体特异性地进行或者通过靶向在SLE的B细胞中STIM1的siRNA非特异性地进行的)恢复(i)通过SLE的Breg的IL-10的生产,(ii) T细胞的增殖的抑制,以及(iii) 调节性T细胞的诱导。在健康的对照中,位于质膜的STIM1的阻断没有影响。

[0023] 对于CLL的B细胞,申请人还令人惊讶地观测到:

[0024] (a) 胞浆内钙的基线水平的增加与CLL的B细胞的存活的增加、MAPK Erk1/2途径的激活、转录因子NFAT2(活化的T细胞的核因子)和STAT3(信号转导物和转录激活子3)的核转

位、以及IL-10的合成的增加([5])相关,

[0025] (b) 通过位于质膜的STIM1蛋白的增加来调节细胞外 Ca^{2+} 的组成型进入的增加。

[0026] (c) STIM1蛋白在膜上存在(组I)或不存在(组II)允许区分两组患者。

[0027] (d) 针对在质膜处存在的STIM1分子的抗STIM1抗体能够极大减少细胞外 Ca^{2+} 组成型进入组I的CLL的B细胞以及更弱进入组II的CLL的B细胞,

[0028] (e) 特异性靶向位于质膜的STIM1蛋白的部分的抗STIM1抗体和抗CD20抗体(利妥昔单抗:RTX)的组合能够恢复由组I患者的B细胞(在质膜处存在STIM1蛋白)中的RTX所诱导的凋亡效应。抗STIM1抗体的添加对组II患者(在膜处不存在STIM1蛋白)的抗CD20的凋亡效应没有影响。

[0029] 本发明提出,使用位于质膜的STIM1的部分作为在SLE和CLL中的新的治疗靶。

[0030] 本发明还提出,在这些疾病中使用位于质膜的STIM1的部分的调节物。

[0031] 本发明涉及位于质膜的STIM1的部分作为治疗靶通过调节它的存在或它的活性,在SLE和CLL中的用途。因此,本发明涉及(除了别的之外) (i) 在细胞的质膜处,STIM1分子的表达的抑制, (ii) 这种蛋白的膜寻址的抑制,以及 (iii) 在质膜处存在的STIM1蛋白的生物活性的抑制。

[0032] 提出了,特别是在耐RTX治疗的CLL患者中,通过特异性靶向位于质膜的STIM1蛋白的部分的抗STIM1抗体,来阻断位于质膜的STIM1的活性。事实上,提出了,通过STIM1的调节物(如抗STIM1Ac)的 Ca^{2+} 的流入的调节(其取决于位于质膜的STIM1的部分)将使细胞对由RTX诱导的凋亡敏感。

[0033] 本发明在多个方面是有利的,特别是,标记物仅存在于受影响的细胞上,而不存在在健康细胞上,其允许获得特异性和选择性。此外,在质膜的水平上,通过免疫细胞的STIM1蛋白的表达会促进此靶的可接近性。

[0034] 因此,本发明的第一个目的涉及位于细胞质膜的STIM1蛋白的部分在以下方法中的用途,该方法用于筛选用于治疗SLE和/或CLL的候选分子。

[0035] 在本发明的意义上,“位于细胞质膜的STIM1蛋白的部分”是指位于细胞质膜的STIM1蛋白的糖基化部分。STIM1蛋白具有两个糖基化位点,在位置131处的天冬酰胺以及在位置171处的另一个。STIM1分子的糖基化是用于寻址在细胞的表面上的STIM1分子的必要和必须的过程([7])。此部分具有约 $90 \pm 2\text{kDa}$ 的分子量,这使得有可能将它与STIM1的非糖基化形式($84 \pm 2\text{kDa}$)相区分。可以通过蛋白印迹来检测上述两种形式。人STIM1分子(基质相互作用分子;也被称为GOK)是具有序列ID NO:1的蛋白,该序列对应于Uniprot序列:Q13586或NCBI:NP_003147.2。这种蛋白由序列ID NO:2编码,该序列对应于NCBI序列:NM_003156.3 (mRNA转录物)。优选地,上述部分位于完整细胞的质膜上,这意味着,质膜是非破碎的和/或非透化的,并且有利地不允许非渗透性分子穿透细胞。

[0036] “位于质膜的STIM1蛋白的部分”是指来自位于细胞质膜的STIM1蛋白的分离的任何生物产物。可以通过本领域技术人员已知的所有方式来进行分离,例如,但不限于,通过在差速离心以后使用洗涤剂(例如,非离子型或离子型表面活性剂,如Triton X-100或Triton N1 01;或聚氧乙烯脱水山梨醇酯),或通过使用靶向膜蛋白(抗体,Thermo scientific磺基-NHS-SS-生物素)的免疫化学或蛋白化学技术的步骤。

[0037] 在本发明的意义上,“细胞”是指在质膜的水平上表达STIM1的任何细胞。有利地,

上述细胞是免疫细胞。它们可以是,例如,B细胞和T细胞。有利地,上述细胞是来自SLE或CLL患者的B细胞。可替换地,可以用序列ID NO:2来转染上述细胞以在它们的质膜上表达STIM1蛋白。优选地,上述细胞是整个细胞,换句话说,完整和/或非破碎的细胞。因此,这样的细胞是不透化的。有利地,在本发明的筛选方法中使用的细胞是完整的以严格筛选这样的分子,该分子调节STIM1的膜表达和/或调节细胞外 Ca^{2+} 的组成型进入(constitutive entry)。有利地,在本发明的筛选方法中使用的细胞是完整的以选择这样的分子,由于它们与位于质膜的STIM1蛋白的部分的特异性相互作用,其不穿透进入细胞并且其留在质膜处。换句话说,筛选方法允许选择非渗透分子,即,不穿过质膜的分子。上述细胞是分离的细胞,并且可以以样品的形式提供用于本发明的筛选方法。

[0038] 在本发明的意义上,“筛选方法”是指任何方法,该方法允许鉴定与STIM1蛋白的膜部分相互作用的物质,或者调节STIM1蛋白的膜部分的膜表达的物质。它可以是本领域技术人员已知的任何方法,例如生物筛选,例如,选自包括免疫荧光、蛋白印迹、免疫沉淀、表面等离子共振(SPR)、流式细胞术、视频显微、钙流的研究、酶联免疫吸附测试(ELISA)、和共焦显微镜术的组的技术,或者生物物理筛选,例如通过借助于荧光来测量细胞内钙浓度的变化。有利地,筛选方法允许确定这样的物质,其选择性地与位于细胞质膜的STIM1蛋白的部分相互作用,而没有渗透细胞。换句话说,筛选方法允许确定不渗透物质,其选择性地与位于细胞质膜的STIM1蛋白的部分相互作用。可以在体外,在含有完整细胞(在它们的质膜上表达STIM1蛋白)的样品上来实施筛选方法。

[0039] 在本发明的意义上,“候选分子”是指与位于细胞质膜的STIM1蛋白的部分相互作用的任何分子。相互作用可以是候选分子在位于细胞质膜的STIM1蛋白上固定的类型。可替换地,相互作用可以是这种蛋白的活性或表达的调节。位于质膜的STIM1蛋白的部分的活性的调节可以起因于在质膜中STIM1的插入的修饰,或起因于质膜的STIM1蛋白与关联于它的蛋白的相互作用的修饰。蛋白的活性的调节可反映于钙流的变化,如细胞内钙的组成型进入的变化,或在受体的刺激期间激活的钙流入的变化,如取决于储备的释放(SOCE,钙库操纵性钙离子内流)的钙流入。相对于在应用候选分子以前对相同细胞或者可比较的细胞测得的水平,表达的调节可以是位于质膜的STIM1蛋白的表达的增加或减小。STIM1蛋白的表达的调节可以,例如与转录修饰、表遗传修饰、或为STIM1蛋白的膜寻址不可缺少的糖基化过程的调节相关联。有利地,所选的候选分子特异性地与位于细胞质膜的STIM1蛋白的部分相互作用。在本发明的筛选方法中,因为所选的候选分子不穿过质膜,所以它们并不与位于内质网的STIM1蛋白相互作用。

[0040] 因此,本发明的目的是,分离的完整细胞(在细胞的质膜上表达STIM1蛋白)在体外筛选候选分子的方法中的用途,其中上述候选分子可用于治疗慢性淋巴细胞白血病和/或系统性红斑狼疮。

[0041] 本发明的另一目的涉及体外确定可用于治疗慢性淋巴细胞白血病和/或系统性红斑狼疮的物质的方法,包括以下步骤:

[0042] (a) 提供含有分离的整个细胞的样品,其中上述细胞在它们的表面上表达位于细胞质膜的STIM1蛋白的部分,

[0043] (b) 通过细胞与候选分子的相互作用来筛选候选分子,

[0044] (c) 选择候选分子,其结合位于细胞质膜的STIM1蛋白的部分而没有透过细胞,

[0045] 从而确定可用于治疗慢性淋巴细胞白血病和/或系统性红斑狼疮的物质。

[0046] 本发明的第二个目的涉及这样的物质,其与位于细胞质膜的STIM1蛋白的部分相互作用,用作治疗SLE和/或CLL的药用产品。

[0047] 在本发明的意义上,“物质”是指任何分子,其表现出:固定于位于质膜的STIM1蛋白的相互作用,或者STIM1蛋白的这种膜部分的活性或表达的调节的相互作用(如上所定义的)。上述物质可以具有天然或合成来源。它可以是通过化学方法产生的蛋白,或者通过生物工程的任何方法,如纯化所产生的蛋白。尤其可以通过应用,如上所定义的筛选方法来确定上述物质。有利地,上述物质不能穿过质膜并且特异性地与位于细胞质膜的STIM1蛋白的部分相互作用而没有渗透细胞。有利地,上述物质可以减小或阻断位于细胞质膜的STIM1蛋白的活性。

[0048] 上述物质可以是,例如一种抗体,其针对序列SEQ ID NO:3的位于质膜的STIM1蛋白的细胞外片段。此序列对应于STIM1的氨基酸23-213。它可以是抗GOK/STIM1抗体(克隆:44,BD Biosciences参考910954)。

[0049] 本发明还涉及药物组合物,其包含至少一种如上所定义的物质。这样的组合物可以包含任何适宜的药用载体,其包含,例如赋形剂和添加剂,其促进在药学上可以使用的制备的物质的形成药剂。措辞“药学上可接受的”包括任何载体,其并不负面干扰用于治疗SLE或CLL的物质的功效,以及其对于它所给予的宿主是无毒的。尤其是,用于根据本发明的组合物的适宜的药学上可接受的载体是尤其适用于全身施加的载体。适宜的药学上可接受的载体在现有技术中是众所周知的,并且例如描述于此领域中的标准参考文本Remington Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, Easton, USA, 1985)。它可以是,例如一种或多种组分,其选自柠檬酸钠、聚山梨酯80、氯化钠、氢氧化钠、盐酸和注射用水。

[0050] 有利地,根据本发明的组合物可以用作药用产品。特别有利地,本发明的组合物可以用作用于治疗SLE或癌症,如CLL的药用产品。

[0051] 本发明的药物组合物可以包含任何有效成分,其增强如上所定义的效果。

[0052] 此外,本发明的药物组合物可以是抗CD20抗体或任何其它分子,其与蛋白复合物关联,该蛋白复合物调节与STIM1蛋白(如蛋白Orai和TRPC)关联的钙通道。在这种情况下,它可以是在人或动物疗法中已知的任何抗CD20,例如,但不限于IDEC-C2B8抗体(利妥昔单抗,由Hoffman-La Roche in Europe销售)、Drugbank DB00073 (BIOD00014, BTD00014)、奥法木单抗(Arzera, GlaxoSmithKline)、托西莫单抗(GSK, DB00081, BIOD00085, BTD00085)、阿托珠单抗(Gazyva, Roche, DB08935, GA101)、替伊莫单抗(Tiuxetan, IDEC Pharmaceuticals, DB00078, BIOD00069, BTD00069)、ublrituximab (LFB) 或AME-133v (Lilly, LY2469298)。

[0053] 对于本领域技术人员而言,在阅读下文给出的附图所示的,用于说明而给出的实施例以后,其它优点也可能变得明显的。

附图说明

[0054] -图1通过蛋白印迹(A/B)和流式细胞术(C/D)示出在系统性红斑狼疮(SLE)的B淋巴细胞(B细胞)中的膜STIM1,以及在慢性淋巴细胞白血病(CLL)的B细胞中的膜STIM1。图1-A通过蛋白印迹示出在90kDa处在SLE的B细胞与健康对照的对照B细胞中STIM1的糖基化部

分的条带。对于其在质膜中的插入而言,STIM1蛋白的这种糖基化是不可缺少的。图1-B通过蛋白印迹示出,相对于不表达膜STIM1 (mSTIM1-) 的对照CLL B细胞,在90kDa处在表达膜STIM1 (mSTIM1+) 的CLL的B细胞中位于膜的STIM1的部分的条带。图1-C通过流式细胞术示出,相对于不表达膜STIM1 (mSTIM1-) 的健康对照的对照B细胞,在表达膜STIM1 (mSTIM1+) 的SLE的B细胞中位于膜的STIM1的部分。图1-D通过流式细胞术示出,相对于与不表达膜STIM1 (mSTIM1-) 的对照CLL B细胞,在表达膜STIM1 (mSTIM1+) 的CLL的B细胞中位于膜的STIM1的部分。

[0055] -图2A-图2D示出通过抗STIM1抗体(克隆Gok/44,BD Biosciences)的组成型钙流入的抑制,该抗体针对STIM1蛋白的细胞外表位,其中上述STIM1蛋白位于人JOK PLP的B细胞质膜([6])、系JOK CD5的B细胞质膜([6])、和慢性淋巴细胞白血病(CLL)的B淋巴细胞。图2A和图2B示出组成型流入和抗STIM1抗体对这种组成型流入的影响的测量结果(以dF/Fo a.u.为单位表示,任意单位),其是在多孔板中利用用于预处理细胞(5μg/ml抗体60分钟)的板式计数器,并借助于对照抗体(CTRL,IgG2a同种型,Beckman Coulter)或借助于抗STIM1/GOK抗体,在人JOK PLP(A)和JOK CD5(B)的B淋巴细胞中所测得。图2C示出在借助于对照抗体(CTRL,IgG2a同种型)或借助于抗STIM1/GOK抗体的用于预处理细胞的单细胞成像(5μg/ml抗体,60分钟)中,在CLL的B细胞上,组成型流入和抗STIM1抗体对这种流入量的影响(作为比率dF/Fo a.u.)的测量结果。图2D示出缺乏抗STIM1抗体对钙流入的影响,其取决于由毒胡萝卜素(1μM,Sigma-Aldrich)诱导的并在CLL的B细胞中测得的储备SOCE(钙库操纵性钙离子内流)的释放。

[0056] -图3示出,在根据在质膜处表达STIM1蛋白(mSTIM1+)或不表达STIM1蛋白(mSTIM1-)而分为两组的患者中,抗STIM1抗体(克隆Gok/44)(A)单独或(B)与抗CD20抗体(利妥昔单抗)协同对细胞活力的影响,(C)对在慢性淋巴细胞白血病(CLL)的B细胞中的组成型钙进入(Ca²⁺)的影响,以及(D)通过系统性红斑狼疮(SLE)的B细胞,对抑制T淋巴细胞的增殖(Breg活性)的影响。图3-A示出,在10μg/ml同种型对照抗体(同种型抗体,IgG2a同种型,Beckman Coulter)的存在下或在10μg/ml抗STIM1/GOK抗体的存在下,在两组mSTIM1+或mSTIM1-中,对于CLL的B细胞,在培养48小时以后,活细胞的百分比。图3-B示出,在10μg/ml同种型对照抗体(同种型抗体,IgG2a同种型,Beckman Coulter)的存在下,在10μg/ml利妥昔单抗(抗CD20)的存在下,或者在利妥昔单抗(10μg/ml)和抗STIM1/GOK(10μg/ml)的组合存在下,在两组mSTIM1+或mSTIM1-中,对于CLL的B细胞,在培养48小时以后,CLL的活细胞的百分比。图3-C示出,在用5μg/ml抗STIM1/GOK抗体来预治疗,或者未预治疗(没有添加的对照)细胞以后,在质膜处表达STIM1(mSTIM1+)的组的CLL的B细胞中Ca²⁺的组成型进入的减小(表示为比率dF/Fo a.u.,任意单位)。图3-D示出,在抗STIM1/GOK抗体或无添加对照的存在下,在4天以后,在自体共培养1:1的模型中,以SLE的B细胞的百分比表示的细胞增殖的抑制。

具体实施方式

[0057] 实施例

[0058] 实施例1:用于检测膜STIM1的方法

[0059] 在去除T淋巴细胞(玫瑰花结技术,利用经神经氨酸酶预处理的绵羊红细胞)和单

核细胞(负向消耗(negative depletion)技术,没有CD43的B细胞试剂盒,Stem Cell Technologies)以后,从在Ficoll梯度上获得的外周血单核细胞(PBMC)纯化B淋巴细胞。通过流式细胞术来证实CD19阳性B细胞的纯度,其显示为高于95%的纯度。

[0060] 通过用SDS-PAGE的蛋白印迹进行的B细胞的A/B-蛋白分析使得除STIM1的网状部分(84 ± 2 kDa)之外,能够区分SLE(a)和一些CLL患者(B,mSTIM1+组)的B细胞的STIM1(90 ± 2 kDa)的糖基化膜形式。这种蛋白分析首先使用抗STIM1克隆Gok/44抗体(BD Biosciences),然后使用过氧化物酶连接的小鼠抗IgG抗体(GE Healthcare),并且最后通过化学发光(试剂盒ECL advance,GE Healthcare)加以检测。

[0061] 通过流式细胞术的C/D分析包括在4℃下用抗STIM1克隆Gok/44抗体(BD Biosciences)来温育纯化的B细胞15分钟,然后,在洗涤以后,使用荧光素连接的F(ab')₂小鼠抗IgG抗体(Jackson Laboratories)来显示抗STIM1抗体的固定。相对于同种型对照(IgG2a,Beckman Coulter)来确定在活细胞中STIM1的膜标记。

[0062] 实施例2:筛选抗-膜STIM1分子的方法

[0063] 在人B细胞系JOK(在质膜处表达STIM1蛋白)上进行分子(调节位于质膜的STIM1部分)的筛选至第一近似(first approximation)。使用两种类型的细胞:用空载体(JOK PLP)稳定转染的或用CD5蛋白稳定转染的JOK细胞([6])。这些细胞表现出可测量的组成型钙进入。筛选由测量靶向位于细胞质膜的STIM1的部分的分子,对细胞外钙的组成型进入的影响组成。还评估了这些分子对钙进入的影响,这取决于储备SOCE(钙库操作性钙进入)的释放,以确定上述分子对作用于组成型钙进入的分子的流入SOCE的影响。通过利用荧光探针(Calcium 6,Molecular Devices)来监测细胞内钙浓度的变化以测量两个钙流的幅度(振幅,amplitude)。以100000个细胞/孔的比率,使细胞附着在经CellTak(BD Biosciences)处理的96孔板中45分钟。然后,在利用Flexstation类型的多孔板读取器(Molecular Devices)来测量细胞内钙浓度的变化之前,通过在上述探针存在下,温育60分钟,借助于荧光探针(Calcium 6,Molecular Devices)来加载细胞。在借助于荧光探针来加载细胞时以及在细胞内钙浓度的变化的整个测量中,使细胞接触测试化合物。

[0064] 在缺少细胞的任何刺激之下,通过去除并然后添加细胞外基质的钙来估计组成型钙进入的测量结果。通过用毒胡萝卜素(SERCA泵抑制剂)来处理细胞,以激活流入SOCE。

[0065] 然后在纯化的B细胞(其获自对照个体或CLL患者的外周血单核细胞(PBMC),该B细胞在细胞的表面上的STIM1分子的表达水平是已知的以及通过流式细胞术测得)来测试确定为对JOK细胞的感兴趣的钙流具有影响的分子。如上所述,通过单细胞荧光成像来测量测试分子对组成型钙流入和流入SOCE的影响。以500000个细胞/条的比率,使细胞附着于涂布有CellTAK(BD Biosciences)的玻璃条45分钟,然后在利用单细胞荧光成像系统来测量细胞内钙浓度的变化以前,在普朗尼克酸(pluronic acid)(Sigma Aldrich)的存在下,借助于荧光探针(Fura2,Molecular probes)加载45分钟。在细胞的整个加载中以及在细胞内钙浓度的变化的整个测量中,使细胞接触测试化合物。在缺少细胞的任何刺激之下,通过去除以及然后添加细胞外基质的钙来估计组成型钙进入的测量结果。通过用毒胡萝卜素(SERCA泵抑制剂)处理细胞,以激活流入SOCE。

[0066] 从而证明,抗STIM1抗体(克隆Gok/44,BD Biosciences)对组成型钙流入的抑制,该抗体针对位于细胞质膜的STIM1蛋白的细胞外表位。用在多孔板中的JOK细胞系和板式读

数器(图2A/图2B)或用在单细胞成像中的B淋巴细胞(图2C/图2D)来测量组成型流入以及抗STIM1抗体对上述流入的影响。

[0067] 实施例3:用于证明抗-膜STIM1分子的生物活性和抗淋巴细胞B活性的方法(图3)

[0068] 图3-A以10 μ g/ml使用的抗STIM1抗体(克隆Gok/44,BD Biosciences)能够降低CLL的B细胞的存活,对于mSTIM1+组(在质膜处存在STIM1蛋白)的CLL,存活增加。对于此实验,培养细胞48小时,然后确定活细胞(缺乏膜联蛋白V/碘化丙啶标记,Beckman Coulter)的百分比。

[0069] 图3-B抗STIM1抗体(克隆Gok/44)增强抗CD20抗体(利妥昔单抗,10 μ g/ml)对mSTIM1+组的CLL的B细胞的死亡的作用。

[0070] 图3-C抗STIM1抗体(克隆Gok/44)的影响涉及在CLL mSTIM1+的B细胞中抗体对Ca²⁺的组成型进入的影响。

[0071] 图3-D在CpG和抗CD3/CD28的刺激的存在下,在自体培养4天后,抗STIM1抗体(克隆Gok/44)恢复SLE的B细胞抑制细胞增殖的能力。

[0072] 参考文献

[0073] [1]Seret G,Hanrotel C,Bendaoud B,Le Meur Y and Renaudineau Y.Homozygous FCGR3A-158F mutation is associated with delayed B-cell depletion following rituximab but with preserved efficacy in a patient with refractory Iupus nephritis.Clin Kidney J(2012)doi:10.1093/ckj/sfs162.

[0074] [2]Nédellec S,Renaudineau Y,Bordron A,Berthou C,Porakishvili N,Lydyard PM,Pers JO,Youinou P.B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients.J Immunol.(2005)174:3749-56.

[0075] [3]Liossis SN,Kovacs B,Dennis G,Kammer GM,Tsokos GC.B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events.J Clin Invest.(1996)98:2549-57.

[0076] [4]Blair PA,Noreña LY,Flores-Borja F,Rawlings DJ,Isenberg DA,Ehrenstein MR,Mauri C.CD19(+)CD24(hi)CD38(hi)B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients.Immunity.(2010)32:129-40.

[0077] [5]Lemoine S,Morva A,Youinou P,Jamin C.Human T cells induce their own regulation through activation of B cells.J Autoimmun.(2011)36:228-38.

[0078] [6]Garaud S,Morva A,Lemoine S,Hillion S,Bordron A,Pers JO,Berthou C,Mageed RA,Renaudineau Y,Youinou P.CD5 promotes IL-10 production in chronic Lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation.J Immunol.(2011)186:4835-44.

[0079] [7]Mignen O,Thompson JL,Shuttleworth TJ.STIM1 regulates Ca²⁺ entry via arachidonate-regulated Ca²⁺-selective(ARC)channels without store depletion or translocation to the plasma membrane.J Physiol.(2007)579:703-15.

[0001]	序列表															
[0002]	<110> 西布列塔尼大学															
[0003]	法国国家健康与医学研究院															
[0004]	布雷斯特大学医疗中心															
[0005]	<120> 使用膜STIM1筛选化合物的方法															
[0006]	<130> BNT218446PC00															
[0007]	<150> EP14290232.9															
[0008]	<151> 2014-08-06															
[0009]	<160> 3															
[0010]	<170> PatentIn version 3.5															
[0011]	<210> 1															
[0012]	<211> 685															
[0013]	<212> PRT															
[0014]	<213> 智人															
[0015]	<400> 1															
[0016]	Met	Asp	Val	Cys	Val	Arg	Leu	Ala	Leu	Trp	Leu	Leu	Trp	Gly	Leu	Leu
[0017]	1				5					10					15	
[0018]	Leu	His	Gln	Gly	Gln	Ser	Leu	Ser	His	Ser	His	Ser	Glu	Lys	Ala	Thr
[0019]					20					25					30	
[0020]	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Ala	Asn	Ser	Glu	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Glu	Phe
[0021]					35					40					45	
[0022]	Cys	Arg	Ile	Asp	Lys	Pro	Leu	Cys	His	Ser	Glu	Asp	Glu	Lys	Leu	Ser
[0023]					50					55					60	
[0024]	Phe	Glu	Ala	Val	Arg	Asn	Ile	His	Lys	Leu	Met	Asp	Asp	Asp	Ala	Asn
[0025]	65					70					75					80
[0026]	Gly	Asp	Val	Asp	Val	Glu	Glu	Ser	Asp	Glu	Phe	Leu	Arg	Glu	Asp	Leu
[0027]					85					90						95
[0028]	Asn	Tyr	His	Asp	Pro	Thr	Val	Lys	His	Ser	Thr	Phe	His	Gly	Glu	Asp
[0029]					100					105					110	
[0030]	Lys	Leu	Ile	Ser	Val	Glu	Asp	Leu	Trp	Lys	Ala	Trp	Lys	Ser	Ser	Glu
[0031]					115					120					125	
[0032]	Val	Tyr	Asn	Trp	Thr	Val	Asp	Glu	Val	Val	Gln	Trp	Leu	Ile	Thr	Tyr
[0033]					130					135					140	
[0034]	Val	Glu	Leu	Pro	Gln	Tyr	Glu	Glu	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Gln	Leu	Ser
[0035]	145					150					155					160
[0036]	Gly	His	Ala	Met	Pro	Arg	Leu	Ala	Val	Thr	Asn	Thr	Thr	Met	Thr	Gly
[0037]					165					170					175	
[0038]	Thr	Val	Leu	Lys	Met	Thr	Asp	Arg	Ser	His	Arg	Gln	Lys	Leu	Gln	Leu
[0039]					180					185					190	
[0040]	Lys	Ala	Leu	Asp	Thr	Val	Leu	Phe	Gly	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	His
[0041]					195					200					205	

[0042]	Asn His Leu Lys Asp Phe Met Leu Val Val Ser Ile Val Ile Gly Val
[0043]	210 215 220
[0044]	Gly Gly Cys Trp Phe Ala Tyr Ile Gln Asn Arg Tyr Ser Lys Glu His
[0045]	225 230 235 240
[0046]	Met Lys Lys Met Met Lys Asp Leu Glu Gly Leu His Arg Ala Glu Gln
[0047]	245 250 255
[0048]	Ser Leu His Asp Leu Gln Glu Arg Leu His Lys Ala Gln Glu Glu His
[0049]	260 265 270
[0050]	Arg Thr Val Glu Val Glu Lys Val His Leu Glu Lys Lys Leu Arg Asp
[0051]	275 280 285
[0052]	Glu Ile Asn Leu Ala Lys Gln Glu Ala Gln Arg Leu Lys Glu Leu Arg
[0053]	290 295 300
[0054]	Glu Gly Thr Glu Asn Glu Arg Ser Arg Gln Lys Tyr Ala Glu Glu Glu
[0055]	305 310 315 320
[0056]	Leu Glu Gln Val Arg Glu Ala Leu Arg Lys Ala Glu Lys Glu Leu Glu
[0057]	325 330 335
[0058]	Ser His Ser Ser Trp Tyr Ala Pro Glu Ala Leu Gln Lys Trp Leu Gln
[0059]	340 345 350
[0060]	Leu Thr His Glu Val Glu Val Gln Tyr Tyr Asn Ile Lys Lys Gln Asn
[0061]	355 360 365
[0062]	Ala Glu Lys Gln Leu Leu Val Ala Lys Glu Gly Ala Glu Lys Ile Lys
[0063]	370 375 380
[0064]	Lys Lys Arg Asn Thr Leu Phe Gly Thr Phe His Val Ala His Ser Ser
[0065]	385 390 395 400
[0066]	Ser Leu Asp Asp Val Asp His Lys Ile Leu Thr Ala Lys Gln Ala Leu
[0067]	405 410 415
[0068]	Ser Glu Val Thr Ala Ala Leu Arg Glu Arg Leu His Arg Trp Gln Gln
[0069]	420 425 430
[0070]	Ile Glu Ile Leu Cys Gly Phe Gln Ile Val Asn Asn Pro Gly Ile His
[0071]	435 440 445
[0072]	Ser Leu Val Ala Ala Leu Asn Ile Asp Pro Ser Trp Met Gly Ser Thr
[0073]	450 455 460
[0074]	Arg Pro Asn Pro Ala His Phe Ile Met Thr Asp Asp Val Asp Asp Met
[0075]	465 470 475 480
[0076]	Asp Glu Glu Ile Val Ser Pro Leu Ser Met Gln Ser Pro Ser Leu Gln
[0077]	485 490 495
[0078]	Ser Ser Val Arg Gln Arg Leu Thr Glu Pro Gln His Gly Leu Gly Ser
[0079]	500 505 510
[0080]	Gln Arg Asp Leu Thr His Ser Asp Ser Glu Ser Ser Leu His Met Ser
[0081]	515 520 525
[0082]	Asp Arg Gln Arg Val Ala Pro Lys Pro Pro Gln Met Ser Arg Ala Ala
[0083]	530 535 540

[0084]	Asp Glu Ala Leu Asn Ala Met Thr Ser Asn Gly Ser His Arg Leu Ile
[0085]	545 550 555 560
[0086]	Glu Gly Val His Pro Gly Ser Leu Val Glu Lys Leu Pro Asp Ser Pro
[0087]	565 570 575
[0088]	Ala Leu Ala Lys Lys Ala Leu Leu Ala Leu Asn His Gly Leu Asp Lys
[0089]	580 585 590
[0090]	Ala His Ser Leu Met Glu Leu Ser Pro Ser Ala Pro Pro Gly Gly Ser
[0091]	595 600 605
[0092]	Pro His Leu Asp Ser Ser Arg Ser His Ser Pro Ser Ser Pro Asp Pro
[0093]	610 615 620
[0094]	Asp Thr Pro Ser Pro Val Gly Asp Ser Arg Ala Leu Gln Ala Ser Arg
[0095]	625 630 635 640
[0096]	Asn Thr Arg Ile Pro His Leu Ala Gly Lys Lys Ala Val Ala Glu Glu
[0097]	645 650 655
[0098]	Asp Asn Gly Ser Ile Gly Glu Glu Thr Asp Ser Ser Pro Gly Arg Lys
[0099]	660 665 670
[0100]	Lys Phe Pro Leu Lys Ile Phe Lys Lys Pro Leu Lys Lys
[0101]	675 680 685
[0102]	<210> 2
[0103]	<211> 4062
[0104]	<212> DNA
[0105]	<213> 智人
[0106]	<400> 2
[0107]	ctggacctgg gcaccgccag ccgcctgggc acgggactgg gcgggggagc tgacctgggc 60
[0108]	ctaggaggcc caggatcccg gagacgccg cgccctcagg accctgcggg tcgcacgccc 120
[0109]	tccccagctt ctgctgctcg ccgctcttcg gcagggcgag gtcagggtcc cccttctcgc 180
[0110]	ctctcttctc ttctcttctc ttctctctcc acttctgtgc ccgcggagac tccggccgcc 240
[0111]	cccttccgca ggggtgtagt aatctgcgga gctgacagca gccccgcagc caccctgccc 300
[0112]	gaagtctccg gaagcggcac gagctcaggc cgccgcagcc ccggcggacc cactgttgga 360
[0113]	cctgaggagc cagccctcct cccgcaccca aacttggagc acttgacctt tggctgttgg 420
[0114]	agggggcagg ctgcgggtg gctggacagc tgcggagccg cgagggcacg ttgcctggag 480
[0115]	accgtcggct gactcccgg gctcctggct ttgcctctgg gatcccgagg tgtccacatc 540
[0116]	agacgcatgt tgactgagac ctagagtcag ggatgtatgc gtccgtcttg ccctgtggct 600
[0117]	cctctgggga ctctctctgc accagggccg gacccctcag catagtcaca gtgagaaggc 660
[0118]	gacaggaacc agctcggggg ccaactctga ggagtccact gcagcagagt tttgccgaat 720
[0119]	tgacaagccc ctgtgtcaca gtgaggatga gaaactcagc ttcgaggcag tccgtaacat 780
[0120]	ccacaaactg atggacgatg atgccaatgg tgatgtggat gtggaagaaa gtgatgagtt 840
[0121]	cctgagggaa gacctcaatt accatgaccc aacagtgaac cacagcacct tccatggtga 900
[0122]	ggataagctc atcagcgtgg aggacctgtg gaaggcatgg aagtcacag aagtatacaa 960
[0123]	ttggaccgtg gatgaggtgg tacagtggct gatcacatat gtggagctgc ctgagtatga 1020
[0124]	ggagaccttc cggaagctgc agctcagtgg ccatgccatg ccaaggctgg ctgtcaccaa 1080
[0125]	caccacatg acagggactg tgctgaagat gacagaccgg agtcacggc agaagctgca 1140

[0126]	gctgaaggct ctggatacag tgctctttgg gcctcctctc ttgactcgcc ataatcacct	1200
[0127]	caaggacttc atgctggtgg tgtctatcgt tattggtgtg ggcggtgct ggtttgccta	1260
[0128]	tatccagaac cgttactcca aggagcacat gaagaagatg atgaaggact tggaggggtt	1320
[0129]	acaccgagct gagcagagtc tgcatgacct tcaggaaaagg ctgcacaagg cccaggagga	1380
[0130]	gcaccgcaca gtggaggtgg agaaggtcca tctggaaaag aagctgcgcg atgagatcaa	1440
[0131]	ccttgctaag caggaagccc agcggctgaa ggagctgcgg gaggtactg agaattgagcg	1500
[0132]	gagccgccaa aaatatgctg aggaggagtt ggagcaggtt cgggaggcct tgaggaaagc	1560
[0133]	agagaaggag ctagaatctc acagctcatg gtatgtctca gaggcccttc agaagtggct	1620
[0134]	gcagctgaca catgaggtgg aggtgcaata ttacaacatc aagaagcaaa atgctgagaa	1680
[0135]	gcagctgctg gtggccaagg agggggctga gaagataaaa aagaagagaa acacactctt	1740
[0136]	tggcaccttc cacgtggccc acagctcttc cctggatgat gtagatcata aaattctaac	1800
[0137]	agctaagcaa gcactgagcg aggtgacagc agcattgcgg gagcgctgc accgctggca	1860
[0138]	acagatcgag atcctctgtg gcttcagat tgtcaacaac cctggcatcc actcactggt	1920
[0139]	ggctgcccctc aacatagacc ccagctggat gggcagtaca cggcccaacc ctgctcactt	1980
[0140]	catcatgact gacgacgtgg atgacatgga tgaggagatt gtgtctccct tgtccatgca	2040
[0141]	gtccccctagc ctgcagagca gtgttcggca ggcctgacg gagccacagc atggcctggg	2100
[0142]	atctcagagg gatttgaccc attccgattc ggagtcctcc ctccacatga gtgaccgcca	2160
[0143]	gcgtgtggcc cccaaacctc ctcatagtag ccgtgctgca gacgaggctc tcaatgcat	2220
[0144]	gacttccaat ggcagccacc ggctgatcga gggggtccac ccagggtctc tgggtggagaa	2280
[0145]	actgcctgac agccctgccc tggccaagaa ggcattactg gcgctgaacc atgggctgga	2340
[0146]	caaggcccac agcctgatgg agctgagccc ctacagccca cctggtggct ctccacattt	2400
[0147]	ggattcttcc cgttctcaca gcccagctc cccagaccca gacacaccat ctccagttgg	2460
[0148]	ggacagccga gccctgcaag ccagccgaaa cacacgcatt cccacactgg ctggcaagaa	2520
[0149]	ggctgtggct gaggaggata atggctctat tggcgaggaa acagactcca gccaggccg	2580
[0150]	gaagaagttt cccctcaaaa tctttaagaa gcctcttaag aagtaggcag gatggggtgg	2640
[0151]	cagtaaaggg acagcttgct cttccctggg tgttctgtct ctcttccct ccttctctc	2700
[0152]	aagataactg gcccgaagag tggggcatgg gaagggtgg tccaggggtc tgggactgt	2760
[0153]	acatacctgc cccctcatcc ttgggtcctt cattattatt tattaactga ccacatggc	2820
[0154]	ctgcctgccc tgctccgctc ccaaccatgg gtgctgctg tcactccctc tccacttcag	2880
[0155]	tgcatgtctt agttgctgtt cctcagctc ccagctccac ctctggggtt cagcttctgt	2940
[0156]	ctctgctgtc ccagttttga ggtttggtt cttgtttctg tctcttgctt tcgggctcct	3000
[0157]	ccctcccacc actcccacac ttcccctagc agttgcaggg aagataggac gagtagcttc	3060
[0158]	tgacatgtgt gcctcagatc tgttccaccc cactcacagt ggttctgttt gctccagact	3120
[0159]	ggggctaggg cctaactctt gaagtttgtt ctttggtatt gatgtgggtc agaaggagcc	3180
[0160]	tcacctaata ctactcagg cctccaggga tccatggggg agtgaaacca attctcagag	3240
[0161]	aacaaccac cagagacttt taaagagagg ccaggcttg gaatgggttg ggagaggcat	3300
[0162]	ctgttcattg gagcatgagt ggatgccaga actgtaggtt ataaggcagt cactttttct	3360
[0163]	cttactccc acccacacct gcctccctct taccctgct ccccacact gcaggaggat	3420
[0164]	ttgtctctaa gaggtgctgc cccaaagctc cccaagcatc aatactccta gggctcagga	3480
[0165]	caagtggctc ccctggccag gagagccaca gccatgatac agggctctta tggagccctg	3540
[0166]	gagttgttgg gcaaggatgc tgtcatTTTT tgaacaaaa gacaaacagg ttaaaaggaa	3600
[0167]	aaaaagtaat ctgaatttcc caagtgccta cgctgcata tccccttggt agatccatt	3660

[0168]	ttcatgttac tttgtagcct tggccagagg ctcaaaaagg acacaaccag tttggggaag	3720
[0169]	gggtggctaa ggaagatggt ataggatgaag gcggctgtgt gaccactttc cccaccctt	3780
[0170]	cccaccctct agacaactct ctcccttacc tgtttttgcct atggctgtaa aggtattttt	3840
[0171]	cctctgcccc actccctgcc atacctttat cctgggatcc tattttgggc ctgggggtggg	3900
[0172]	tatacctggg gctggtctta ggagggtgct aggctgcaga ctgccttgta ctccctggac	3960
[0173]	accctcaa at ggggttttct gtgtttatttc ataaaattct ttgaagtcca ataaagcatg	4020
[0174]	taggagattt taaccactaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa	4062
[0175]	<210>	3
[0176]	<211>	191
[0177]	<212>	PRT
[0178]	<213>	智人
[0179]	<400>	3
[0180]	Leu Ser His Ser His Ser Glu Lys Ala Thr Gly Thr Ser Ser Gly Ala	
[0181]	1 5 10 15	
[0182]	Asn Ser Glu Glu Ser Thr Ala Ala Glu Phe Cys Arg Ile Asp Lys Pro	
[0183]	20 25 30	
[0184]	Leu Cys His Ser Glu Asp Glu Lys Leu Ser Phe Glu Ala Val Arg Asn	
[0185]	35 40 45	
[0186]	Ile His Lys Leu Met Asp Asp Asp Ala Asn Gly Asp Val Asp Val Glu	
[0187]	50 55 60	
[0188]	Glu Ser Asp Glu Phe Leu Arg Glu Asp Leu Asn Tyr His Asp Pro Thr	
[0189]	65 70 75 80	
[0190]	Val Lys His Ser Thr Phe His Gly Glu Asp Lys Leu Ile Ser Val Glu	
[0191]	85 90 95	
[0192]	Asp Leu Trp Lys Ala Trp Lys Ser Ser Glu Val Tyr Asn Trp Thr Val	
[0193]	100 105 110	
[0194]	Asp Glu Val Val Gln Trp Leu Ile Thr Tyr Val Glu Leu Pro Gln Tyr	
[0195]	115 120 125	
[0196]	Glu Glu Thr Phe Arg Lys Leu Gln Leu Ser Gly His Ala Met Pro Arg	
[0197]	130 135 140	
[0198]	Leu Ala Val Thr Asn Thr Thr Met Thr Gly Thr Val Leu Lys Met Thr	
[0199]	145 150 155 160	
[0200]	Asp Arg Ser His Arg Gln Lys Leu Gln Leu Lys Ala Leu Asp Thr Val	
[0201]	165 170 175	
[0202]	Leu Phe Gly Pro Pro Leu Leu Thr Arg His Asn His Leu Lys Asp	
[0203]	180 185 190	

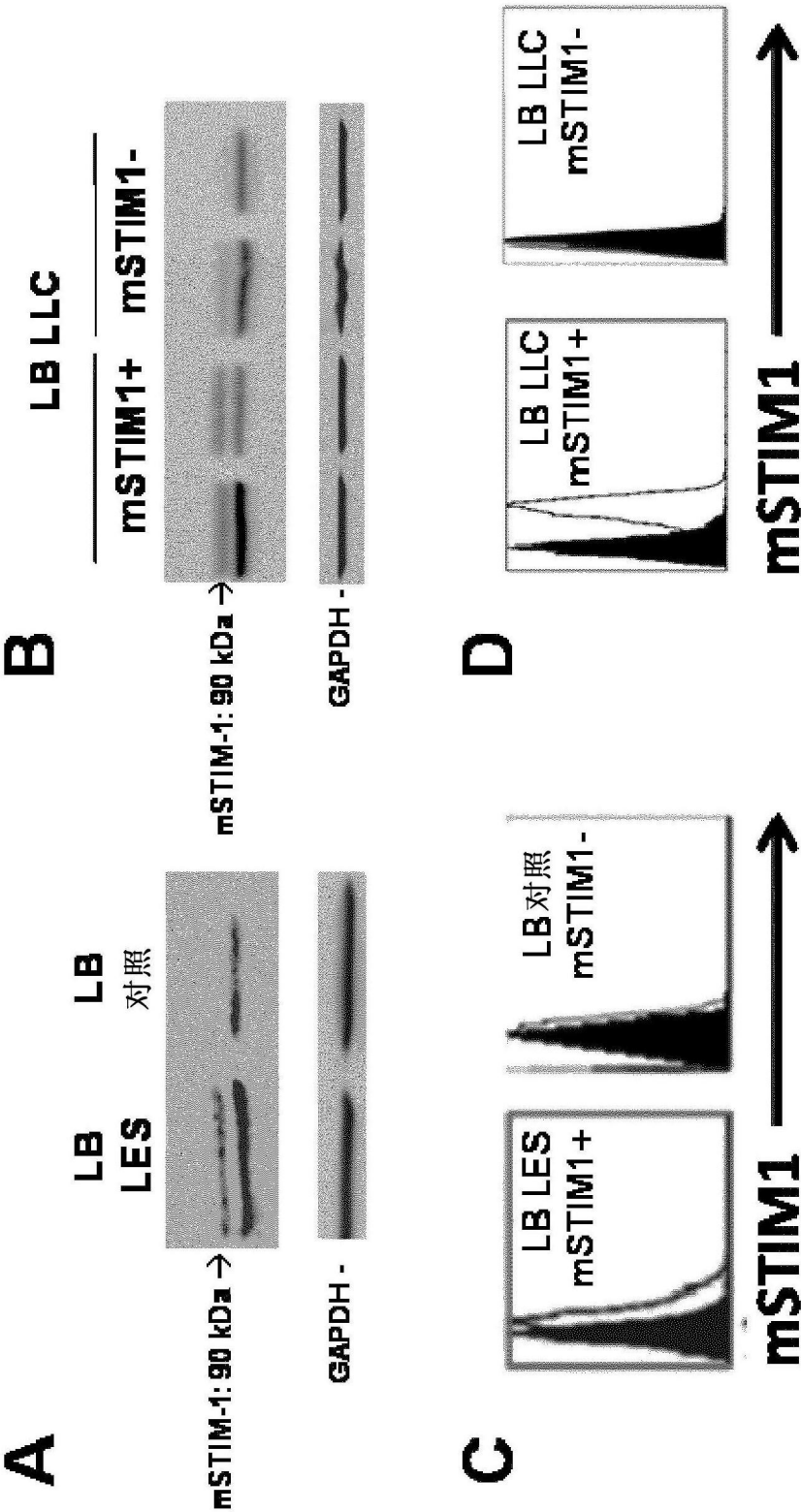


图1

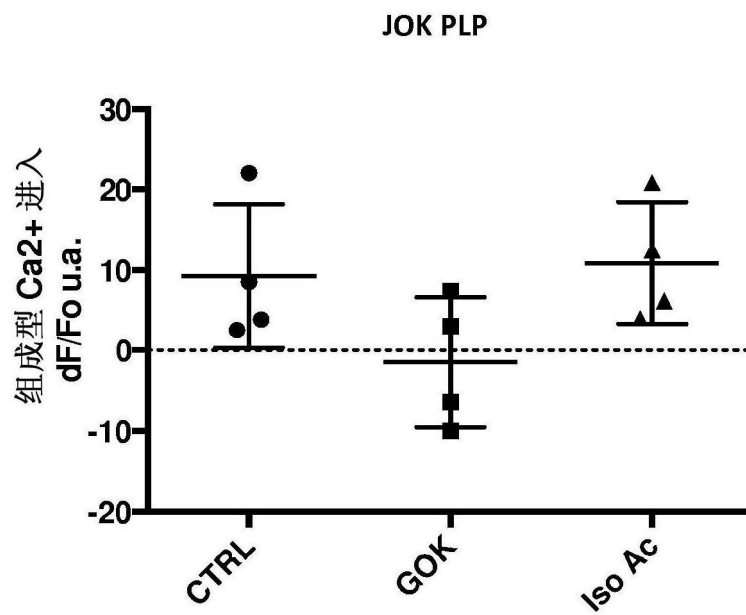


图2A

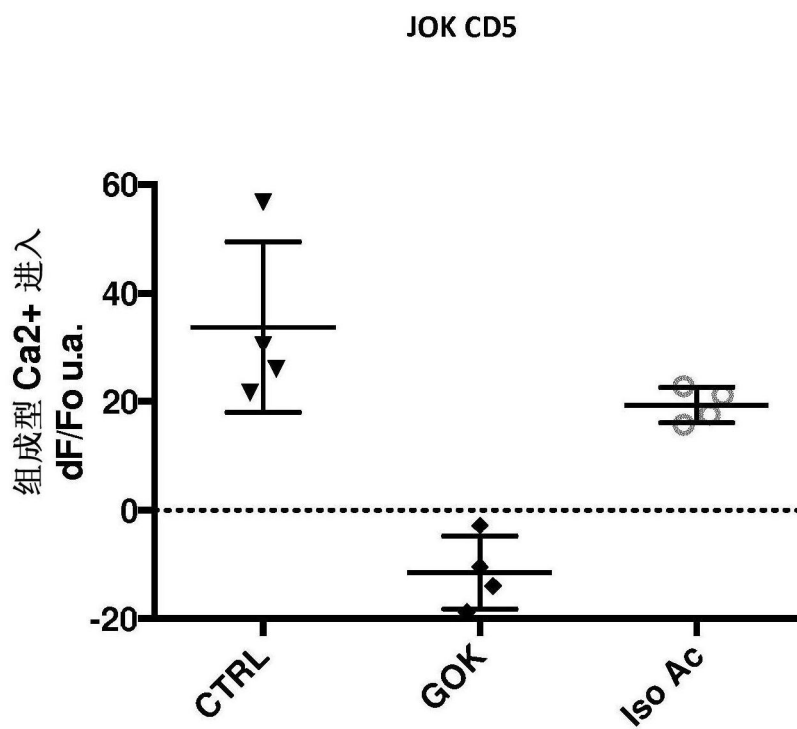


图2B

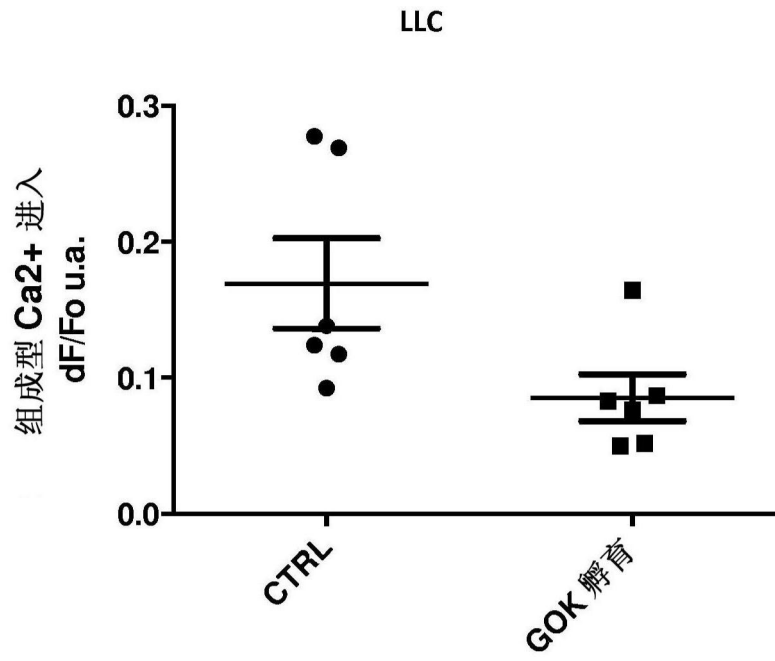


图2C

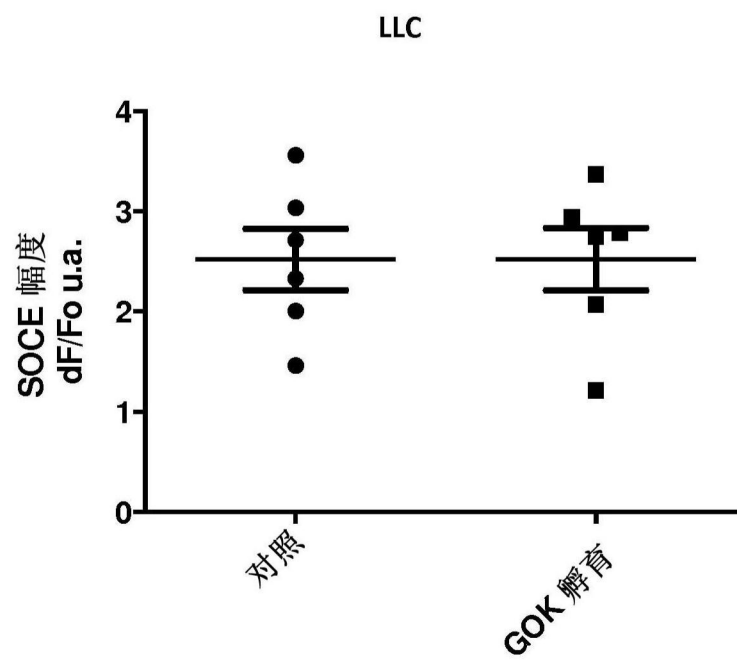


图2D

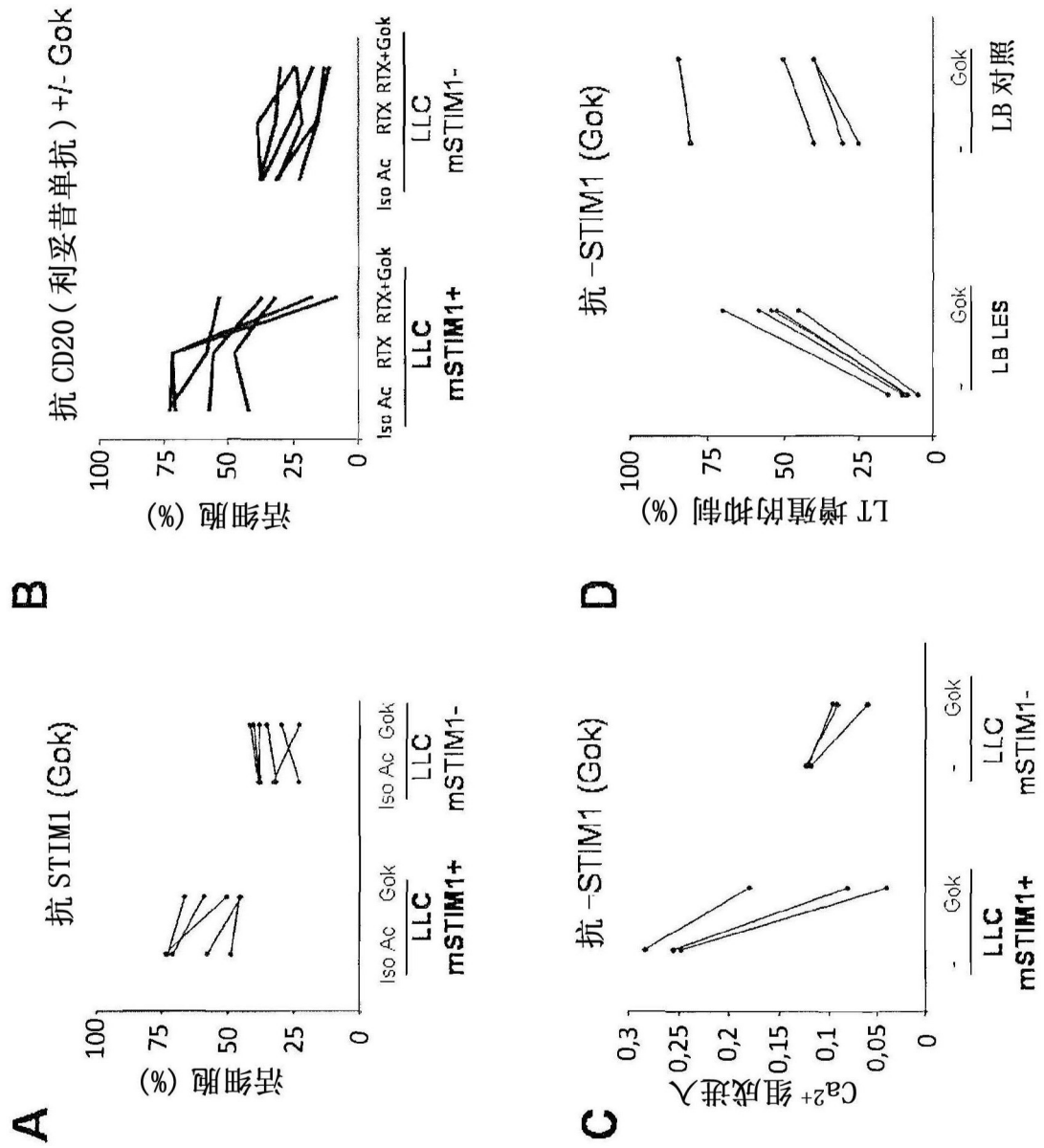


图3