



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107921112 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201680050415.7

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

(22)申请日 2016.08.30

代理人 余颖

(30)优先权数据

62/212,163 2015.08.31 US

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.28

C07K 16/28(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/049378 2016.08.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/040464 EN 2017.03.09

(71)申请人 默克专利有限公司

地址 德国达姆施塔特

(72)发明人 J·德马蒂诺 J·德里

J·弗拉奇 N·刘易斯

M·吉内斯特 S·奥吉兹

权利要求书1页 说明书11页

序列表3页 附图30页

(54)发明名称

调节LGALS3BP以治疗系统性红斑狼疮的方法

(57)摘要

本发明的实施方式描述了调节LGALS3BP的方法及其抗体治疗包括系统性红斑狼疮和狼疮性肾炎的自身免疫疾病的用途。

1. 在表现出免疫失调、炎性反应或自身免疫疾病症状的对象中调节LGALS3BP的方法, 包括在各种条件下给予所述对象抗LGALS3BP抗体以致至少一种所述免疫失调、炎性反应或疾病症状得到改善。

2. 如权利要求所述1的方法, 所述免疫失调、炎性反应或自身免疫疾病选自主要由以下各项组成的集合: 格氏病, 重症肌无力, 脉管炎和韦格纳肉芽肿, 视神经脊髓炎, 原发性硬化性胆管炎, 干燥综合征, 狼疮性肾炎和类风湿性关节炎。

3. 治疗SLE患者的方法, 包括给予患者治疗有效量的抗LGALS3BP抗体。

4. 如权利要求3所述的方法, 其中抗LGALS3BP抗体的量在患者中有效 (a) 抑制肾炎的进展, (b) 稳定肾炎, 或 (c) 逆转肾炎。

5. 如权利要求3所述的方法, 其中抗LGALS3BP抗体的量在患者中有效 (a) 抑制蛋白尿的进展, (b) 稳定蛋白尿, 或 (c) 逆转蛋白尿。

6. 如权利要求3所述的方法, 其中抗LGALS3BP抗体的量在患者中有效稳定或降低选自以下所述的临床参数: (a) 患者的血液中尿素、肌酸酐或蛋白质浓度; (b) 患者的尿液中蛋白质或血细胞浓度; (c) 患者的尿比重; (d) 患者的尿量; (e) 患者的菊粉、肌酸酐、尿素或对氨马尿酸清除率; (f) 患者的高血压; (g) 患者的水肿; 和 (h) 患者的循环自身抗体水平。

7. 使用重组LGALS3BP作为佐剂来增强病毒导向疫苗的活性的方法。

调节LGALS3BP以治疗系统性红斑狼疮的方法

[0001] 优先权声明

[0002] 本PCT专利申请要求2015年8月31日提交的第62/212,163号美国临时专利申请的优先权,该临时申请经援引全部纳入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含以ASCII格式电子提交的序列表,经援引全部纳入。所述ASCII文件制作于2016年8月23日,原名“P15167WO_SEQ_LISTING.txt”,共5,320字节。

发明领域

[0005] 本发明主要涉及在各种条件下调节(包括但不限于降低、减少、抑制、阻遏、限制或控制) LGALS3BP活性致多种自身免疫病相关自身抗体产生减少的方法,或者,通过补充重组LGALS3BP放大和增强针对致病感染原的天然抗体分泌或疫苗应答的方法。

背景技术

[0006] 免疫系统失调即可表现为无法保护宿主抵抗感染原,也可相反地表现为误将自身识别为排斥对象而引起自身免疫病。自身免疫病一般由多种遗传和环境因素共同造成,可大致分为T细胞介导型或B细胞介导型。自身反应性致病性T细胞通过T细胞受体结合相应的MHC-I分子与自体抗原衍生肽组合来识别靶细胞,通过多种不同的机制直接杀死靶细胞。I型糖尿病和原发性胆汁性肝硬化的形成是自身反应性T细胞介导疾病的代表例。

[0007] B细胞相关自身免疫的共同特征是存在针对细胞功能性结构(核酸、核蛋白、受体、离子通道)的自身抗体。通过结合各自靶标,自身抗体能够通过补体激活作用和/或抗体依赖性细胞介导细胞毒效应(ADCC)或通过阻抑靶标的功能来介导细胞毒性细胞破坏。致病性自身抗体介导多种疾病的发生发展,包括:格氏(Graves')病(抗促甲状腺激素抗体),重症肌无力(抗乙酰胆碱受体抗体),脉管炎和韦格纳(Wegener's)肉芽肿(抗ANCA抗体),视神经脊髓炎(抗水通道蛋白-4抗体),原发性硬化性胆管炎(抗中性粒细胞胞浆抗体,抗SM抗体)。其他自身免疫疾病是由自身抗体与其靶分子的免疫复合物的致病作用引起的,例如SLE、干燥综合征(Sjogren's syndrome)和狼疮性肾炎(抗DNA、抗RNA、抗组蛋白、抗Ro、抗La、抗磷脂抗体)、类风湿性关节炎亚类(抗瓜氨酸化蛋白、抗RF、抗CarP抗体)。

[0008] 自身免疫疾病治疗方法的疗效相当有限。传统治疗方法依赖于类固醇和各种细胞毒性和细胞抑制性免疫抑制剂的作用,它们应迅速清除扩增性自身反应性免疫细胞从而延缓自身免疫进程的发展。最常用的自身免疫疾病治疗药物,如可的松/泼尼松、氨甲喋呤、霉酚酸酯、氯喹和硫唑嘌呤,疗效有限,并伴有多种副作用。

[0009] 更高靶向性的方法侧重消除自身抗体的产生,因而具有更好的治疗前景。贝利单抗(Belimumab)(商品名“Benlysta”,曾被称为“LymphoStat-B”),一种人单克隆抗体,其抑制B细胞激活因子(BAFF),又称B-淋巴细胞刺激因子(BlyS),是B细胞分化和存活的重要细胞因子之一,是已获批的活动期自身抗体阳性SLE成人患者的疗法,疗效中等。其他几种生物疗法试图消灭B细胞,继而消灭聚焦于人B细胞上的细胞表面受体和分子的相关致病性自

身抗体。抗CD20靶向性抗体利妥昔单抗 (Rituximab) (和类似的其他生物制剂如奥克雷珠单抗 (ocrelizumab)、奥妥珠单抗 (obinutuzumab) 和奥伐单抗 (ofatumumab)) 被设计为识别产抗体B细胞并通过ADCC消灭它们。虽然还没有抗CD20抗体获批用于治疗SLE,但它们经常超说明书地被处方用于治疗SLE及其他自身免疫疾病。此外,靶向人B细胞上其他表面分子(例如CD19和CD22)的生物制剂(如依帕珠单抗 epratuzumab)正在或已在临床开发之中,尽管迄今临床效果有限或尚未见临床效果。B细胞靶向策略共同的弱点被认为是长寿浆细胞表面上没有他们的靶标。CD19⁻/CD38^{hi}/CD138⁺浆细胞处于骨髓中,是大多数长寿抗体反应的源头。迄今还没有能够抑制它们的活性或导致其消亡从而抑制致病性自身抗体产生的治疗手段。

[0010] 系统性红斑狼疮 (SLE) 是一种代表性的自身免疫失调,特征为形成含自身抗体-的免疫复合物 (IC),这些复合物触发炎症、组织破坏或过早死亡。SLE IC常含有多种先天免疫受体识别的核酸,这些受体会引发病理机制,引起细胞因子、干扰素的产生以及最终导致器官伤害的免疫反应。由于SLE的显著临床差异及其特发性,特发性SLE的处理主要根据其具体临床表现和严重程度。所以,SLE的建议用药通常不一定对SLE的各种临床表现或SLE引起的并发症都有效,例如LN。LN通常发生于病程早期起,确诊后5年内。LN的发病被认为是源于免疫复合物在肾小球内沉积引起炎性反应。估计30-50%的SLE患者患上肾炎,需要医学鉴定和治疗。LN是进行性疾病,会经历反复加重和缓解。

[0011] 虽然以上所述标准治疗对许多患者无效或仅部分有效,长期使用高剂量皮质类固醇和细胞毒性治疗药会有严重的副作用,例如骨髓抑制、条件致病性生物体感染增加、不可逆性卵巢衰竭、脱发和恶性疾病风险增加。与活动期SLE重合的感染性并发症和用免疫抑制药物治疗是SLE患者最常见的死因。所以需要更多治疗药物选择来治疗SLE尤其是LN,这些治疗药物比当前标准治疗更少副作用。

发明概要

[0012] 本发明的主题LGALS3BP是一个B-细胞相关靶标,它的功能性阻断导致活化B细胞和长寿浆细胞消亡。虽然本发明的方法不受任何具体机制的局限,B细胞活化和抗体产生受到了多个水平的调控。例子之一,B细胞被各种T细胞依赖性刺激(如CD40配基化)和T细胞-非依赖性刺激(各种TLR配体、多糖等)活化。如本申请实验部分所示,TLR7激动剂提供了B细胞刺激因子的例子,作为能够诱导抗体生产的B细胞活化剂的代表例。

[0013] 临床上可广泛观察到自身抗体的产生,但产生自身抗体的群体中仅很小百分比会发展为SLE。而且,SLE的自身抗体库是限制性的,似乎仅富集识别与核酸相结合蛋白质上自体抗原的抗体。大多数SLE患者被记录曾产生抗DNA、RNP或两者的抗体。与核酸结合的自体抗原激活自身反应性B细胞,并使他们得以逃脱外周耐受检查点,分化为自身抗体分泌细胞。

[0014] 抗原识别和核酸-细胞碎片复合物吞噬之后,核酸部分地被内体类铯受体(如TLR3、TLR7、TLR8和TLR9)识别。B细胞内的TLR刺激引起B细胞活化和成熟以及抗体和多种细胞因子生产增加。在许多小鼠模型研究中观察到单个TLR在SLE发展的相对贡献。而且,TLR7 (RNA受体)的活性起主要作用,基因敲除和使用TLR7抑制剂显著缓解疾病进程。并且,TLR7基因过表达或系统性服用小分子TLR7激动剂所致TLR7活性升高引起SLE样症状诱导。

[0015] SLE免疫复合物内的核酸还被树突细胞的TLR所识别。浆细胞样树突细胞内的TLR7刺激引起I型干扰素大量产生。I型IFN是一种细胞因子,通过激活参与控制病毒扩散和维持宿主完整性的一组基因(干扰素靶基因)来参与抗病毒防御。SLE患者中常可见这些基因被激活。I型IFN参与B细胞活化、扩增和分化为Ig-生产细胞。

[0016] 鉴于TLR7刺激在B细胞活化中的关键作用,本发明的实施方式描述了鉴定能够调节抗体产生的蛋白质的筛选方法。这些筛选方法鉴定能够在SLE治疗中用于药理调节自身抗体产生的蛋白质和路径。采用编码分泌蛋白质的质粒文库瞬态生产细胞培养上清液并从中富集所述蛋白质,然后,在细胞系统中检测这些蛋白质的活性,其中,用小分子TLR7配体刺激原代B细胞,以IgG生产作为读数来评定效果得分。该筛选方法鉴定了一批或者提高或者降低IgG生产的蛋白质。本发明实施方式描述了此前未与B细胞生物学关联的蛋白质,这包括优选实施方式中的LGALS3BP。

[0017] LGALS3BP (Mac2-BP, p90) 是泛表达基因,属于清道夫受体家族,原先被认为是某类肿瘤细胞分泌的蛋白质。LGALS3BP表达水平与肿瘤的进展密切相关。除了直接作用于肿瘤细胞繁殖/存活, LGALS3BP还会上调血管内皮生长因子的表达和促进血管生成。HIV-1感染期间,其水平升高,据信其活性通过干扰包膜蛋白质成熟和纳入病毒粒子来降低HIV-1的感染性。丙型肝炎患者的肝脏活组织切片分析提示LGALS3BP直接参与丙型肝炎相关性纤维化。此外, SLE患者中也观察到血浆LGALS3BP水平升高。LGALS3BP可能与SLE中的心血管并发症增加有关,因为它促进血栓形成和血栓向内皮细胞的附着。白塞病患者中也可见LGALS3BP血清水平升高,且与疾病活跃性相关。

[0018] 已知多种与LGALS3BP相互作用并介导其功能的蛋白质,包括半乳凝素、凝集素、整联蛋白等。LGALS3BP含有多个蛋白质-蛋白质相互作用结构域(SRCR、BTB、POZ),它们可能以细胞特异性方式参与多种与细胞蛋白质之间的相互作用。

[0019] 本发明实施方式之一中描述的方法中, LGALS3BP在各种条件下促进经TLR7配体刺激的原代B细胞中IgG的生产, LGALS3BP-中和抗体因此显著减少经TLR7配体刺激或BCR-配基化作用下B细胞的IgG生产。对SLE中多种免疫细胞的转录组分析揭示, LGALS3BP mRNA相比健康志愿者水平升高,并与受干扰素调节基因的表达水平相关联。

[0020] 虽然无意于将本发明的实施方式局限于任何具体机制(尤其任何关于TLR7一定发挥了唯一性刺激作用的提示), LGALS3BP在B细胞IgG生产中的作用为LGALS3BP中和抗体能够用于治疗SLE、LN、可能还有其他自身免疫疾病提供了验证,所述疾病例如类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、屑病性关节炎、糖尿病、重症肌无力、脉管炎、原发性硬化性胆管炎、自身免疫性甲状腺炎、干燥综合症、韦格纳氏肉芽肿病、格氏病、桥本氏甲状腺炎、自身免疫性血小板减少性紫癜、抗磷脂综合征、视神经脊髓炎和原发性硬化性胆管炎。

[0021] 然而,自身免疫之外,为了在感染性疾病中提供抗细菌、寄生虫或病毒的保护性免疫,放大天然存在或疫苗诱导的病原导向的体液免疫反应可能是有利的而且实际上可能是必需。就此而言,例如,增强重组蛋白亚基疫苗的效力而不牺牲安全性的策略备受关注,因为相比更强的活减毒或重组载体,它们引发的免疫反应(即抗疟疾)通常程度和持久性都较弱。此类情形中,补充重组LGALS3BP来增强体液免疫和抗病原反应将有利于支持宿主防御。

[0022] 本发明实施方式之一中描述了在表现出免疫失调、炎性反应或自身免疫疾病症状的对象中调节LGALS3BP的方法,包括在各种条件下给予所述对象抗LGALS3BP抗体以致所述

免疫失调、炎性反应或疾病的至少一种症状得到改善。

[0023] 实施方式之一中本发明描述了在表现出以下集合中疾病的症状的对象中调节LGALS3BP的方法,包括在各种条件下给予所述对象抗LGALS3BP抗体以致所述疾病的至少一种症状得到改善,所述集合主要由以下疾病构成:格氏病、重症肌无力、脉管炎和韦格纳(Wegener's)肉芽肿、视神经脊髓炎、原发性硬化性胆管炎、干燥综合征、狼疮性肾炎和类风湿性关节炎。

[0024] 优选实施方式之一中,本发明描述了对SLE患者的治疗,包括给予患者治疗有效量的抗LGALS3BP抗体。实施方式之一中,抗LGALS3BP抗体能够在患者中有效地:(a)抑制肾炎的进展,(b)稳定肾炎,或(c)逆转肾炎。

[0025] 另一实施方式中,抗LGALS3BP抗体的量能够在患者中有效地:(a)抑制蛋白尿的进展,(b)稳定蛋白尿,或(c)逆转蛋白尿。

[0026] 实施方式之一中,本发明描述了对SLE患者的治疗,包括给予患者治疗有效量的抗LGALS3BP抗体,给药剂量能够在患者中有效地稳定或降低选自以下所述的临床参数:(a)患者的血液中尿素、肌酸酐或蛋白质浓度,(b)患者的尿液中蛋白质或血细胞浓度,(c)患者的尿比重,(d)患者的尿量,(e)患者的菊粉、肌酸酐、尿素或对氨马尿酸清除率,(f)患者的高血压,(g)患者的水肿,和(h)患者的循环自身抗体水平。

[0027] 实施方式之一中,本发明描述给予重组LGALS3BP作为佐剂通过放大保护性抗体反应来增强病毒导向疫苗的活性。

附图说明

[0028] 图1A显示原代人B细胞的数据,所述细胞分离后用小分子TLR7激动剂刺激并培养5天。加入含分泌蛋白质的条件细胞培养物上清液库,在培养终点测定IgG分泌和细胞活力(CTG,CellTiter-Glo)。

[0029] 图1B显示不同细胞亚组的数据,所述细胞亚组用FACS分离自健康对照(每个细胞亚组的第一个数据点)和I型IFN水平升高的狼疮性肾炎患者(数据点2-4)。RNA表达用RNA-seq来分析。图上所示为标准化后的FPKM表达值。

[0030] 图1C显示纯化重组LGALS3BP加入受小分子TLR7激动剂CpG(ODN2006)或抗IgM/CD40L/CpG(ODN2006)刺激的纯化人B细胞。刺激后5天用Alpha-LISA测定IgG。

[0031] 图1D显示人PBMC用小分子TLR7激动剂刺激,并于5小时后分离RNA。基因表达分析用RNA-seq进行,分析表达水平并标准化为FPKM值。

[0032] 图2A-1和图2A-2显示递增浓度纯化重组LGALS3BP存在下用小分子TLR7激动剂刺激的B细胞数据。16小时后通过流式细胞术定量测定CD69表达来测定B细胞活化。

[0033] 图2B为以下实验的数据:用重组LGALS3BP(recLGALS3BP)和人血浆进行蛋白质印迹来测定抗LGALS3BP抗体的特异性。

[0034] 图2C显示用抗LGALS3BP抗体测定的LGALS3BP定位,与CD19B细胞和DAPI核染色比较。

[0035] 图3A-1和图3A-2显示分离的原代人B细胞的数据,所述细胞在可能的LGALS3BP抑制剂和对照(左)存在下用小分子TLR7激动剂刺激。将抗LGALS3BP抗体加入CpG或抗IgM/CD40L/CpG(右)活化的原代人B细胞。5天后用Alpha-LISA测定IgG分泌。

[0036] 图3B-1显示原代人B细胞数据,所述细胞在可能的LGALS3BP抑制剂和对照存在下用小分子TLR7激动剂活化。5天后用Alpha-LISA测定IgG分泌。

[0037] 图3B-2显示原代人B细胞数据,所述细胞在可能的LGALS3BP抑制剂和对照存在下用小分子TLR7激动剂活化。5天后用CellTiter-Glo测定B细胞活力。

[0038] 图3B-3显示原代人B细胞数据,所述细胞在可能的LGALS3BP抑制剂和对照存在下用小分子TLR7激动剂活化。刺激后2天,用Alpha-LISA测定IL-6分泌。

[0039] 图3C-1显示在可能的LGALS3BP抑制剂和对照存在下,活化后16小时,通过流式细胞术定量检测CD69表达测定的B细胞活化数据。

[0040] 图3C-2显示在可能的LGALS3BP抑制剂和对照存在下,活化后16小时,通过定量检测CD69表达测定的B细胞活化数据,显示的是CD69上调细胞百分比。

[0041] 图3C-3显示在可能的LGALS3BP抑制剂和对照存在下,活化后16小时,通过定量检测CD69表达来测定的B细胞活化数据,显示的是全体B细胞上CD69检测平均荧光强度(MFI)。

[0042] 图3D-1和图3D-2显示以下实验所得数据:将抗LGALS3BP抗体加入无刺激原代人B细胞,2天后用CellTiter-Glo检测这些B细胞的活力。

[0043] 图4A显示以下实验所得数据:采集14周龄雌性MRL/lp小鼠(早期疾病)的肾脏和脾脏。对组织匀浆进行NanoString分析,测定LGALS3BP表达,并与C57BL/6健康对照小鼠进行比较。或者,从经降植烷或PBS处理小鼠的血液或脾脏样品、或从BXSb-Yaa老年患病小鼠或年轻对照小鼠的血液、脾脏或肾脏分离RNA。显示的LGALS3BP基因表达水平用QPCR测定并相对于Hprt标准化。

[0044] 图4B显示以下实验所得数据:用蛋白脂蛋白(PLP)免疫SjL小鼠以诱导实验性自身免疫性脑脊髓炎("EAE")。第7天和第14天,SjL-PLP EAE患病小鼠被人道处死,采集腰椎脊髓。纯化RNA,用NanoString分析测定LGALS3BP表达,并与空白非免疫健康对照小鼠进行比较。图4A和4B所述实验中,各实验组包含至少5只小鼠,用非配对斯氏t检验进行患病小鼠与健康对照的比较。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。

[0045] 图4C显示"IFN基因签名得分"。这些得分是根据5个已知受干扰素调节的基因(USP18、IRF7、IFIT1、OAS3、BST2)的表达计算的。然后根据以上得分对小鼠进行四分位分组,并对LGALS3BP表达制图,所述LGALS3BP表达为相对于健康对照小鼠的表达。

[0046] 图5A显示QPCR测定的LGALS3BP表达,采用提取自用所示刺激因子活化了6小时的体外分化后原代人巨噬细胞的RNA。各样本的表达用HPRT1作为管家基因进行标准化。

[0047] 图5B显示ELISA测得的用所示刺激因子活化了20小时的体外分化后原代人巨噬细胞上清液中的LGALS3BP。

[0048] 图6A显示分离自健康对照(HC)和SLE患者血液的原代B细胞在有(刺激+抗体)或无抗LGALS3BP抗体(仅刺激)条件下用TLR7激动剂刺激。刺激5天后,测定培养物中的IgM。 $*P<0.05$; $**P<0.01$ 双尾配对斯氏t检验。

[0049] 图6B显示分离自健康对照(HC)和SLE患者血液的原代B细胞在有(刺激+抗体)或无抗LGALS3BP抗体(仅刺激)条件下用TLR7激动剂刺激。刺激5天后,测定培养物中的IgG。 $*P<0.05$; $**P<0.01$ 双尾配对斯氏t检验。

[0050] 图7A-1和图7A-2显示验证抗LGALS3BP抗体处理能够降低抗体(不论特异性)滴度的数据。健康对照(HC)和SLE患者的B细胞用TLR7激动剂刺激5天,用培养物上清液分析128

种自身抗体特异性 (IgM和IgG)。计算特异性信噪比 >3 的被识别自体抗原数量。过滤掉非刺激B细胞+抗LGALS3BP抗体中信号阳性的特异性。

[0051] 图7B显示z值(样本-平均值_{全体})/标准差_{全体}表示的抗体滴度的热图。每个柱代表一个用TLR7激动剂刺激且有(+抗体)或没有(-)抗LGALS3BP抗体的样本。 $*P<0.05$ 双尾配对斯氏t检验。

[0052] 图8A-1、图8A-2和图8A-3的数据显示:抗LGALS3BP抗体处理降低浆细胞活力。新鲜分离自健康志愿者的B细胞按7天方案分两步,在促进B细胞活化(第1步)和B细胞分化(第2步)的细胞因子存在下分化为浆细胞。体外分化的人抗体分泌细胞(ASC)、浆母细胞(PB)浆细胞(PC)的流式细胞计数。细胞预先经CD19⁺B细胞门控。

[0053] 图8B显示第7天的分化后浆细胞,细胞培养在有或无抗LGALS3BP抗体条件下。4天后,CellTiter-Glo测定细胞活力(ATP生产)。 $*P<0.05$ 双尾配对斯氏t检验。

[0054] 图9A-1和图9A-2显示抗LGALS3BP抗体处理如何优先诱导B细胞凋亡。新鲜分离自健康供体的PBMC在有或无抗LGALS3BP抗体(aLGALS3BP)、同种型对照(兔IgG)、甘油对照或羟氯喹类似物(HCQ类似物)条件下培养3天。图9A-1中,用流式细胞术测定膜联蛋白V和7-AAD,同时测定B细胞标志(CD19)和T细胞标志(CD3)。

[0055] 图9B-1和图9B-2显示4个供体的膜联蛋白V-阳性凋亡细胞的平均频率。总PBMC中B细胞和T细胞的相对频率。这些频率相对于无处理对照进行标准化。

[0056] 图10A-1、图10A-2和图10A-3确认:抗LGALS3BP抗体SP-2不降低B细胞活力和抗体生产。新鲜分离自健康志愿者的B细胞在有或无抗LGALS3BP抗体SP-2或PBS对照条件下用TLR7激动剂刺激5天。

[0057] 图10B显示Alpha-LISA测定的细胞培养上清液中的IgM和IgG,以及CellTiter-Glo(CTG)测定的细胞活力。

[0058] 详细描述

[0059] 本发明的实施方式是基于LGALS3BP在IgG产生中的作用及其在治疗SLE尤其LN中的意义。本发明的这些治疗性实施方式得到后文数据的支持。LGALS3BP是狼疮性肾炎患者与健康对照之间在多种细胞类型中差异调控最显著的基因之一。LGALS3BP与IFN-诱导性基因密切相关,并且在受TLR7刺激后的人PBMC中上调。LGALS3BP在离体受激原代人B细胞中增强IgG分泌。LGALS3BP存在于B细胞及其他所有PBMC表面。抗体或乳糖造成的LGALS3BP阻断会消除IgG产生。LGALS3BP抗体阻断不需要B细胞上的抑制性Fc γ RIIb。LGALS3BP阻断特异性降低培养的原代人B细胞的活力,但对原代单核细胞或总PBMC只有弱效,并且,SLE和EAE小鼠模型中的LGALS3BP上调。

[0060] LGALS3BP多肽指全长多肽序列以及亚序列、片段或部分,还有LGALS3BP多肽的修饰形式和变体,除非文中另作说明。所述LGALS3BP亚序列、片段、修饰形式和变体至少具有参照LGALS3BP蛋白的一部分、功能或活性。具体实施方式中,修饰形式或变体保留非修饰或参照蛋白的至少一部分、功能或活性。”功能性多肽”或”活性多肽”指它们的修饰多肽或亚序列。例如,功能性或活性LGALS3BP多肽或其亚序列具有天然野生型或全长对应多肽(如LGALS3BP)的至少一项部分特征性功能或活性(如生物活性),如后文所述,该功能或活性可通过实验鉴定。所以,本发明实施方式包括LGALS3BP多肽序列和亚序列的修饰形式和变体,所述修饰形式或变体一般保留非修饰或参照LGALS3BP多肽序列的至少一部分、一项或多项

功能或活性。

[0061] 如本文所述, LGALS3BP多肽功能或活性的非限定性例子是调节异常免疫反应, 免疫失调, 炎性反应, 或炎症, 或自身免疫反应、失调或疾病。实施方式之一中, 所述自身免疫疾病是SLE。优选实施方式之一中, 所述自身免疫疾病是LN。尽管无意于将本发明局限于任何具体机制, LGALS3BP多肽功能或活性的其他非限定性例子是调节IgG的表达。

[0062] 一例全长人LGALS3BP多肽序列 (SEQ ID NO:1) 如下所述:

[0063] MTPPRLFVWVLLVAGTQGVNDGDMRLADGGATNQGRVEIFYRGQWGTVCNDLWDLTDASVVCRALGFEN
ATQALGRAAFGQSGPIMLDEVQCTGTEASLADCKSLGWLKSNCRHERDAGVVCTNETRSTHTLDLSRELSEALGQI
FDSQRGCDLSISVNVQGEDALGFCGHTVILTANLEAQUALWKEPGSNVTMSVDAECVPMVRDLLRYFYSSRRIDITLSS
VKCFHKLASAYGARQLQGYCASLFAILLPQDPSFQMPLDLYAYAVATGDALLEKLCLQLAWNFEALTQAEAWPSVP
TDLLQLLLPRSDLAVPSELALLKAVDTWISWGERASHEEVEGLVEKIRFPMMLPEELFELQFNLSLYWSHEALFQKKT
LQALEFHTVPFQLLARYKGLNLTEDTYKPRIYTSPTWSAFVTDSSWSARKSQLVYQSRRGPLVKYSSDYFQAPSDYR
YYPYQSFQTPQHPSFLFQDKRVSWSLVYLPTIQSCWNYGFCSSDELPLVGLTKSGGSDRTIAYENKALMLCEGLFV
ADVTFEGWKAAPISALDTNSSKSTSSFPAGHFNGFRTVIRPFYLTNSSGVD

[0064] 定义

[0065] “多肽”指通过酰胺键或与之相当的键相连的两个或更多个氨基酸。本文中, 多肽也指蛋白质、肽或氨基酸序列等。多肽包括通过酰胺键或与之相当的键相连的至少两个或更多个氨基酸。多肽可形成分子内或分子间二硫键。多肽还可形成高级结构, 例如与相同或不同多肽或其他分子形成多聚体或寡聚体。

[0066] “患者”和“对象”在本文中指接受针对某状况 (如SLE或LN) 处理或治疗的哺乳动物。这包括人患者和志愿者, 非人哺乳动物, 如非人灵长类动物、大型动物模型和啮齿类动物。

[0067] “给予”患者药物或“给药”指直接给药, 即由医疗工作者或患者自己施用药物, 和/或间接给药, 例如开具药物处方。例如, 医师或临床工作者指导患者自行施用药物或向患者提供药物处方, 这些都是向患者给药。

[0068] “剂”和“剂量”指活性或治疗性物质一次给药的具体量。“剂型”是一个物理上独立的单位, 它呈包装形式或以整体剂量形式给予接受治疗的对象。它包含预定量的活性物质, 所述预定量经计算能够提供所需的起效、耐受和治疗效果。

[0069] “治疗有效量”的药物指一定量的药物, 给予患者来治疗某状况如SLE和LN会产生有益效果, 例如缓解, 改善, 缓和或消除与该状况的活跃度或病理状态相关的一种或多种症状、表现或实验室指标。

实施例

[0070] 以下实施例仅用于说明, 不应理解为对权利要求所述本发明的限定。

[0071] 实施例1: LGALS3BP增强TLR7激动剂活化的B细胞中的IgG分泌

[0072] 为了鉴定影响B细胞IgG生产的分泌蛋白, 对选自IgG分泌试验中人分泌蛋白组的蛋白质用原代人B细胞进行筛选。将健康志愿者的B细胞暴露于1400重组表达的分泌蛋白, 然后用TLR7小分子激动剂活化。5天后, 通过测定IgG来鉴定增强或抑制IgG分泌的蛋白质。B细胞刺激性细胞因子如IL-2和IL10之外, 该实验表明, LGALS3BP令IgG分泌增强4.1倍, 细胞

活力和代谢活性(据CellTiter-Glo实验检测的ATP)提高一倍(图1a)。LGALS3BP被独立鉴定为狼疮性肾炎患者血液中相比健康志愿者差异调节最显著的基因。LGALS3BP在全部接受分析的细胞类型中都上调,并且与患者的干扰素签名相关(图1b)。

[0073] 对另外6名人健康志愿者对象的B细胞使用纯化重组LGALS3BP证实了IgG生产增强(1.6倍)(图1c)。用TLR9激动剂CpG(1.9倍)或含抗IgM、CD40L和CpG的活化混合物(1.2倍)激活B细胞时,观察到相似的IgG升高。用小分子激动剂刺激健康志愿者的PBMC,用以检验该活化方案能否体外增强LGALS3BP表达(图1b)。基线表达值与直接离体细胞中的相当。TLR7刺激的确使表达水平提高超过3倍。这一发现为添加外源LGALS3BP对不同供体来源B细胞的效果差异提供了解释。LGALS3BP被认为是LN患者不同免疫细胞类型中与健康志愿者相比差异表达最显著的基因之一,并发现该分泌蛋白在抗体生产中有增强作用。

[0074] LGALS3BP有一个IRF结合位点,这与受I型干扰素调节是一致的。为了确定哪条路径能够诱导LGALS3BP表达,令原代人单核细胞体外分化为巨噬细胞,然后用IFN- α 、IFN- γ 、TLR4激动剂(LPS)、TLR7/8激动剂(瑞喹莫德)和TLR9激动剂(CpG)刺激。IFN- α 、IFN- γ 和LPS诱导LGALS3BP mRNA表达(图5A)并提高该蛋白分泌(图5B)。全部刺激因子都诱导IL-6分泌。这提示,不仅I型干扰素能够促进LGALS3BP表达,IFN- γ 和其他先天因子也有激发作用。

[0075] 根据组蛋白乙酰化位点,LGALS3BP表达受结合LGALS3BP基因4个不同区域的因子调节:启动子启动位点,上游增强子内(5K上游区),内含子位点内,或3' UTR内。3种不同方法的基序(Motif)筛选鉴定到了可能免疫相关的转录调节因子。LGALS3BP基因座内和基因座周围发现了IRF、AP-1和STAT以及其他重要因子如NF- κ B。关于转录因子的预测提示LGALS3BP表达通过干扰素调节因子(IRF)和活化STAT、NF- κ B和AP-1的其他免疫刺激因子受干扰素调节。

[0076] 实施例2:LGALS3BP位于B细胞表面但不增强B细胞活化

[0077] 为了研究添加LGALS3BP是否影响空白B细胞的活化,TLR7激动剂刺激后16小时测定CD69表达。全部B细胞的CD69表达相比无刺激细胞都升高,但添加不同浓度的重组LGALS3BP未见变化(图2A-1和图2A-2)。然后,用LGALS3BP特异性抗体评测内源LGALS3BP在原代人B细胞中的位置(图2b)。结果证实LGALS3BP位于B细胞表面,且存在于PBMC中所有其他细胞类型上(图2c)。

[0078] 实施例3:抗LGALS3BP通过诱导B细胞和浆细胞凋亡抑制IgG分泌

[0079] 就抗LGALS3BP抗体对原代人B细胞IgG分泌的作用进行了评测。TLR7活化B细胞的IgG分泌在抗-LGALS3BP抗体存在下抑制几乎达90%,抗LGALS3BP F(ab')₂(74%)存在下也抑制,说明不是通过B细胞上Fc γ RIIb的抑制(图3A-1和3A-2)。LGALS3BP的已知配体之一乳糖可见同样的抑制但较弱(59%抑制),但蔗糖对IgG分泌没有抑制。当B细胞用CpG(94%)或抗IgM/CD40L/CpG(77%)活化时可以看到与LGALS3BP抗体相同的抑制效果。IgM分泌同样因抗体阻断而被抑制,说明LGALS3BP不参与同种型转换(图3B-1、图3B-2和图3B-3)。测定ATP作为细胞数量和活力的数据,可见与IgG分泌密切相关,这提示LGALS3BP影响B细胞存活和/或繁殖。通过测定IL-6分泌来检查LGALS3BP阻断是否干扰TLR7活化及信号传导并因此降低B细胞繁殖。抗LGALS3BP抗体存在下刺激B细胞,48小时后测得IL-6生产降低37%。这一IL-6生产降低是LGALS3BP特异性的而不是Fc γ RIIb介导的,因为在Fc阻抑条件下或抗LGALS3BP F(ab')₂存在下测得相同结果。乳糖也有同样效果,由此说明不是抗体通过交联表面结合蛋

白质的直接结果。在体外,无刺激原代人B细胞不繁殖,且存活能力有限。为了检测抗LGALS3BP抗体是否通过抑制B细胞活化降低B细胞存活,TLR7激动剂活化后16小时,测定CD69上调(图3C-1,图3C-2和图3C-3)。加入抗LGALS3BP抗体时,CD69⁺活化细胞百分比和CD69表达水平未见改变。LGALS3BP阻断抑制IgG分泌不依赖于具体使用的刺激方案。进一步实验确定无刺激时LGALS3BP阻断是否对B细胞存活有作用。将抗体加入无刺激B细胞令活力降低66%(图3D-1和图3D-2)。这一结果在B细胞中最显著。对总PBMC或单核细胞进行抗LGALS3BP处理显示37.5%和39%的活力下降。综合以上结果确认LGALS3BP在B细胞的自身稳定、活化、繁殖和分化过程中有抗凋亡作用。

[0080] B细胞耐受失调是SLE发病中的关键驱动因素之一。为了确定抗LGALS3BP处理对SLE B细胞是否有如同健康供体B细胞中所见相同的效果,在SLE供体的B细胞中重复B细胞刺激实验。抗LGALS3BP抗体存在下用TLR7激动剂刺激细胞时可见IgM生产显著降低(图6A和图6B)。IgG分泌也有下降,但不显著,因为SLE供体的B细胞应TLR7刺激产生的IgG不多。这些实验证明,抗LGALS3BP处理抑制性效果在SLE B细胞中得以保留。

[0081] 对TLR7-刺激B细胞的上清液在128个自体抗原蛋白的微阵(表1)上进行了分析。抗LGALS3BP处理减少被IgM抗体识别的自体抗原数量(图7B),一致性地降低全部自体抗原的IgM滴度,这证明抗LGALS3BP处理下没有特异性逃逸(图7B)。以上数据证明抗LGALS3BP处理一致性地降低健康者和SLE患者B细胞的抗体生产,与特异性无关。

[0082] SLE患者在确诊时通常具有预存长寿浆细胞。去B细胞治疗能够根据特异性降低抗体滴度。例如,去B细胞降低dsDNA-特异性抗体,但其他抗体例如RNP-特异性抗体仍然升高。另一方面,长寿浆细胞未被去除而持续分泌抗体。设计了一个健康志愿者原代人B细胞中浆细胞的体外分化系统,用来测试抗LGALS3BP处理是否对浆细胞活力有作用(图8A-1、图8A-2和图8A-3)。然后,将分化后的浆细胞暴露于抗LGALS3BP抗体共4天,通过测定ATP生产间接评价活力。观察到浆细胞活力明显下降,由此证实抗LGALS3BP处理对长寿浆细胞有治疗效果(图8B)。

[0083] 为了确定这一活力下降是否是因为靶细胞坏死或凋亡,健康志愿者PBMC与抗LGALS3BP抗体一起培养4天,然后通过流式细胞术测定膜联蛋白V表面表达和细胞透性(7-AAD)。抗LGALS3BP处理诱导膜联蛋白V表达,这与细胞因凋亡所致死亡一致(图9A-1、图9A-2、图9B-1和图9B-2)。甘油和对照兔IgG无此效果,高剂量羟氯喹类似物也诱导凋亡。比较B细胞和T细胞的频率,处理对B细胞的影响大于对T细胞的影响,这与之前的观察结果即PBMC和单核细胞不像B细胞那样对处理易感一致。

[0084] 以上结果确认LGALS3BP在B细胞的自身稳定、活化、繁殖和分化过程中有抗凋亡作用。

[0085] 表1:自体抗原阵列上的抗原表

[0086]

聚集蛋白聚糖	dsRNA	La/SSB	Ro/SSA(60KDa)
α 胞衬蛋白(Sptan1)	dsDNA	层粘蛋白	S100
α -辅肌动蛋白	EBNA1	LC1	Sc1-70
淀粉样蛋白	弹力蛋白	LKM1	Sm
AQP4 重组	巢蛋白 EDTA	M2 抗原	Sm/RNP
BP1	因子 I	基质胶	SmD
C1q	因子 P	MDA5	SmD1
心磷脂	因子 B	Mi-2	SmD2
CENP-A	因子 D	线粒体抗原	SmD3
CENP-B	因子 H	MPO	SP100

[0087]

硫酸软骨素 C	纤维蛋白原 IV	毒蕈碱受体	鞘磷脂
染色质	纤维蛋白原 S	髓鞘碱性蛋白(MBP)	SPR54
胶原 I	纤连蛋白	髓鞘碱相关糖蛋白-FC	ssDNA
胶原 II	GBM (disso)	肌球蛋白	T1F1 γ 胶原
胶原 III	基因组 DNA	核仁素	甲状腺球蛋白
胶原 IV	醇溶蛋白(IgG)	核小体抗原	TNF α
胶原 V	糖化白蛋白	Nup62	拓扑异构酶 I
胶原 VI	GP2	PCNA	TPO
补体 C1q	gP210	过氧化物氧化还原酶 1	TTG
补体 C3	组蛋白 H1	磷脂酰肌醇	U1-snRNP-68
补体 C3a	组蛋白 H2A	PL-12	U1-snRNP-A
补体 C3b	组蛋白 H2B	PL-7	U1-snRNP-BB'
补体 C4	组蛋白 H3	PM/Sc1-100	U1-snRNP-C
补体 C5	组蛋白 H4	PM/Sc1-75	波形蛋白
补体 C6	血蓝蛋白	POLB	玻连蛋白
补体 C7	乙酰肝素 HSPG	PR3	β 2- 糖蛋白 I
补体 C8	肝素	蛋白多糖	β 2- 微球蛋白
补体 C9	硫酸乙酰肝素	凝血素蛋白	IgA - 人和鼠
CPR 抗原(人)	组蛋白 (总)	核糖(Ribo)磷蛋白 P1	IgE- 人
细胞色素 C	内因子	核糖磷蛋白 P2	IgG - 人和鼠
核心蛋白聚糖-牛	Jo-1	核糖磷蛋白 P0	IgM - 人和鼠
DGPS	KU (P70/P80)	Ro/SSA (52KDa)	抗 IgG、IgA 和抗 IgM

[0088] 实施例4:小鼠SLE模型和EAE模型中LGALS3BP表达升高

[0089] 以下实验检验狼疮性肾炎患者中的LGALS3BP表达升高是否在小鼠SLE模型中保守。MRL/lpr小鼠具有Fas内突变,造成淋巴细胞凋亡缺陷,最终表现为SLE-样自身免疫疾病。MRL/lpr与野生型C57/BL6动物比较显示患病动物的肾脏和脾脏中LGALS3BP表达显著升高(图4A)。腹腔内注射降植烷诱导自身抗体、蛋白尿和肾炎的小鼠诱导SLE模型中可见相同结果。这些小鼠还形成了于血液和脾脏测到的IFN签名,与SLE人患者中所见IFN-诱导基因相似。BXSb/Yaa小鼠具有双倍重复的跨RNA传感器TLR7基因区,形成了SLE-样症状。已知TLR7在SLE中起重要作用,TLR7活化引起I型IFN分泌。知道LGALS3BP表达是TLR7刺激诱导的而且该表达与狼疮性肾炎人患者的IFN签名相关,于是测定了BXSb/Yaa小鼠多种器官内的LGALS3BP表达。LGALS3BP mRNA显著升高只见于肾炎小鼠的肾脏样本。两个小鼠肾炎得分低,未显示LGALS3BP表达升高。为了评价LGALS3BP表达是否与IFN-调节基因同踪,根据五基因(usp18、irf7、ifit1、oas3、bst2)表达计算“IFN基因签名得分”。所得分值证实LN患者中LGALS3BP表达与IFN得分之间存在同样的关联。IFN-诱导型基因同样限于肾脏,进一步确认LGALS3BP与IFN反应相关。还发现LGALS3BP在多发性硬化症(MS)人患者与EAE小鼠之间差异表达(Raddatz等, PLUS ONE 2014)。蛋白脂蛋白(PLP)免疫SJL小鼠诱导EAE证实了这一发

现。疾病诱导后14天, LGALS3BP表达显著升高(图4C)。

[0090] 实施例5:半乳凝素-3抑制不降低B细胞活力和抗体生产

[0091] 健康人供体的原代B细胞在半乳凝素-3抑制剂存在下接受刺激, 目的在于确定半乳凝素-3是否参与LGALS3BP在B细胞生物学中的功能。具体地说, 自健康志愿者新鲜分离的B细胞与半乳凝素-3 (Gal-3) 抑制剂预培养30分钟, 然后用TLR7激动剂刺激5天。收集上清液, 用AlphaLISA测定IgG。用CellTiter-Glo测定细胞活力(ATP生产)。抑制剂都对B细胞活力和抗体生产没有作用, 提示半乳凝素-3不直接参与B细胞的抗体生产(表2)。

[0092] 表2:半乳凝素-1和半乳凝素-3抑制剂不诱导B细胞凋亡和抗体分泌减少

[0093]

化合物	抑制	IgG 生产	活力
LacNAc, N-乙酰-D-氨基乳糖苷	Gal-3	> 10 μ M	> 10 μ M
果胶 (Pienta KJ 等. <i>J Natl Cancer Inst.</i> 1995)	Gal-3	> 10 μ M	> 10 μ M
β 正-丙二醇乳糖苷 (β n-propal lactoside)	Gal-3	> 10 μ M	> 10 μ M

[0094] 实施例6:抗LGALS3BP肿瘤抑制抗体SP-2不影响B细胞活力和抗体生产

[0095] 有报道称LGALS3BP参与癌症而抗LGALS3BP抗体SP-2抑制肿瘤生长和血管生成。在B细胞刺激系统中进行了SP-2试验, 未见对B细胞活力和抗体生产的影响(图10A-1、图10A-2、图10A-3和10B-1)。而且, SP-2靶向的是LGALS3BP的C末端结构域, 而抑制B细胞活力和抗体生产的抗体则是针对结构域2产生的, 这提示该蛋白质的不同结构域各有不同的功能。

[0096] 出于在美国的任何目的, 本文中援引的所有和每一篇公开文献和专利文献均被纳入用于所有目的, 如同被针对性地、各自通过援引纳入。

[0097] 以上结合具体实施方式对本发明进行了描述, 然而, 根据实际情况或用途可以进行改变和等同替换从而实现本发明的有益效果, 这些都在权利要求范围之内。

序列表

<110> 默克专利有限公司(MERCK PATENT GMBH)

<120> 调节LGALS3BP以治疗系统性红斑狼疮的方法

<130> P 15/167 WO

<140>

<141>

<150> 62/212,163

<151> 2015-08-31

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Thr Pro Pro Arg Leu Phe Trp Val Trp Leu Leu Val Ala Gly Thr
1           5           10           15
Gln Gly Val Asn Asp Gly Asp Met Arg Leu Ala Asp Gly Gly Ala Thr
           20           25           30
Asn Gln Gly Arg Val Glu Ile Phe Tyr Arg Gly Gln Trp Gly Thr Val
           35           40           45
Cys Asp Asn Leu Trp Asp Leu Thr Asp Ala Ser Val Val Cys Arg Ala
           50           55           60
Leu Gly Phe Glu Asn Ala Thr Gln Ala Leu Gly Arg Ala Ala Phe Gly
65           70           75           80
Gln Gly Ser Gly Pro Ile Met Leu Asp Glu Val Gln Cys Thr Gly Thr
           85           90           95
Glu Ala Ser Leu Ala Asp Cys Lys Ser Leu Gly Trp Leu Lys Ser Asn
           100          105          110
Cys Arg His Glu Arg Asp Ala Gly Val Val Cys Thr Asn Glu Thr Arg
           115          120          125
Ser Thr His Thr Leu Asp Leu Ser Arg Glu Leu Ser Glu Ala Leu Gly
           130          135          140
Gln Ile Phe Asp Ser Gln Arg Gly Cys Asp Leu Ser Ile Ser Val Asn
145          150          155          160
Val Gln Gly Glu Asp Ala Leu Gly Phe Cys Gly His Thr Val Ile Leu
           165          170          175
Thr Ala Asn Leu Glu Ala Gln Ala Leu Trp Lys Glu Pro Gly Ser Asn

```

180	185	190
Val Thr Met Ser Val Asp Ala Glu Cys Val Pro Met Val Arg Asp Leu		
195	200	205
Leu Arg Tyr Phe Tyr Ser Arg Arg Ile Asp Ile Thr Leu Ser Ser Val		
210	215	220
Lys Cys Phe His Lys Leu Ala Ser Ala Tyr Gly Ala Arg Gln Leu Gln		
225	230	235
Gly Tyr Cys Ala Ser Leu Phe Ala Ile Leu Leu Pro Gln Asp Pro Ser		
245	250	255
Phe Gln Met Pro Leu Asp Leu Tyr Ala Tyr Ala Val Ala Thr Gly Asp		
260	265	270
Ala Leu Leu Glu Lys Leu Cys Leu Gln Phe Leu Ala Trp Asn Phe Glu		
275	280	285
Ala Leu Thr Gln Ala Glu Ala Trp Pro Ser Val Pro Thr Asp Leu Leu		
290	295	300
Gln Leu Leu Leu Pro Arg Ser Asp Leu Ala Val Pro Ser Glu Leu Ala		
305	310	315
Leu Leu Lys Ala Val Asp Thr Trp Ser Trp Gly Glu Arg Ala Ser His		
325	330	335
Glu Glu Val Glu Gly Leu Val Glu Lys Ile Arg Phe Pro Met Met Leu		
340	345	350
Pro Glu Glu Leu Phe Glu Leu Gln Phe Asn Leu Ser Leu Tyr Trp Ser		
355	360	365
His Glu Ala Leu Phe Gln Lys Lys Thr Leu Gln Ala Leu Glu Phe His		
370	375	380
Thr Val Pro Phe Gln Leu Leu Ala Arg Tyr Lys Gly Leu Asn Leu Thr		
385	390	395
Glu Asp Thr Tyr Lys Pro Arg Ile Tyr Thr Ser Pro Thr Trp Ser Ala		
405	410	415
Phe Val Thr Asp Ser Ser Trp Ser Ala Arg Lys Ser Gln Leu Val Tyr		
420	425	430
Gln Ser Arg Arg Gly Pro Leu Val Lys Tyr Ser Ser Asp Tyr Phe Gln		
435	440	445
Ala Pro Ser Asp Tyr Arg Tyr Tyr Pro Tyr Gln Ser Phe Gln Thr Pro		
450	455	460
Gln His Pro Ser Phe Leu Phe Gln Asp Lys Arg Val Ser Trp Ser Leu		
465	470	475
Val Tyr Leu Pro Thr Ile Gln Ser Cys Trp Asn Tyr Gly Phe Ser Cys		
485	490	495

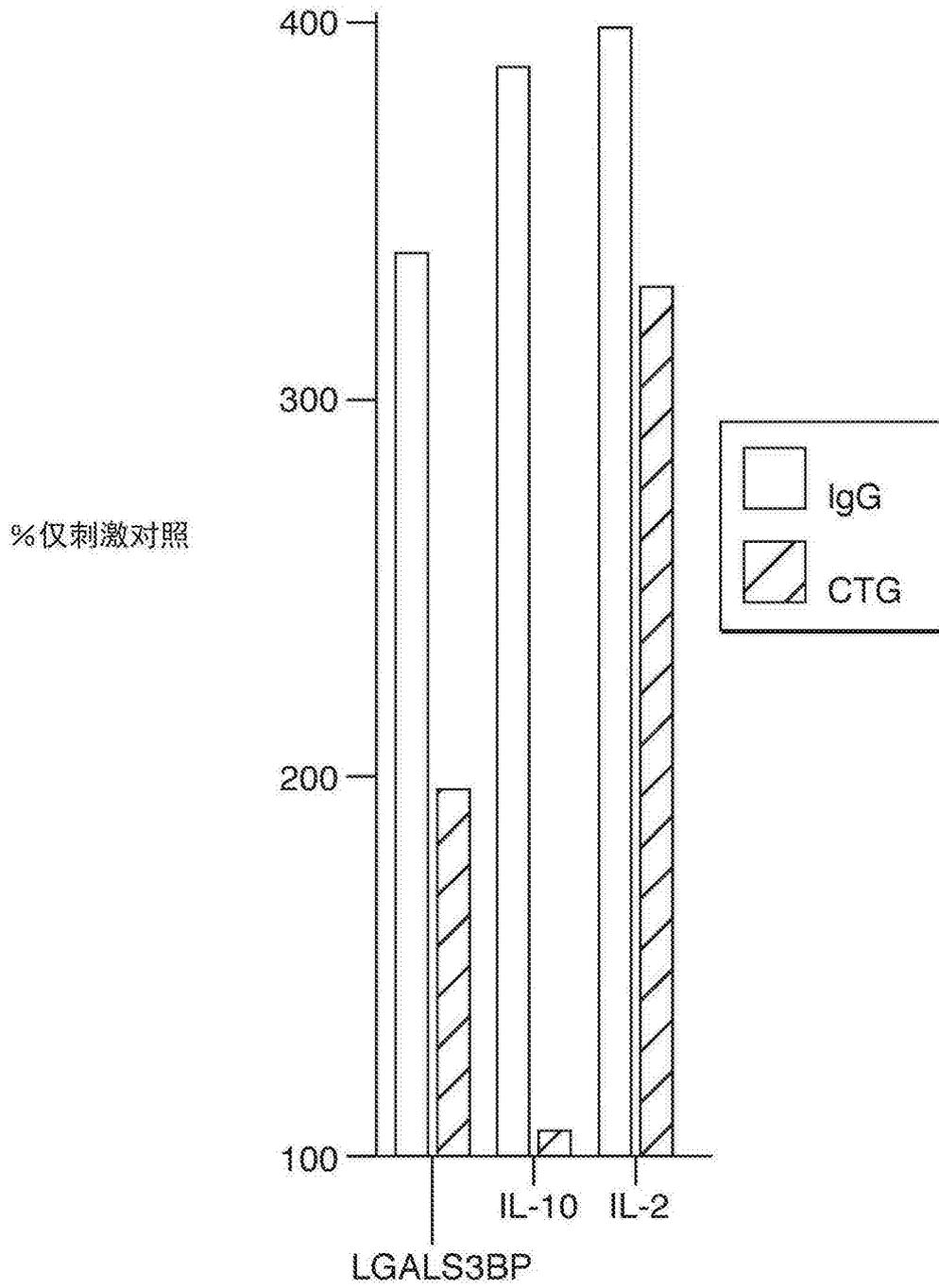


图1A

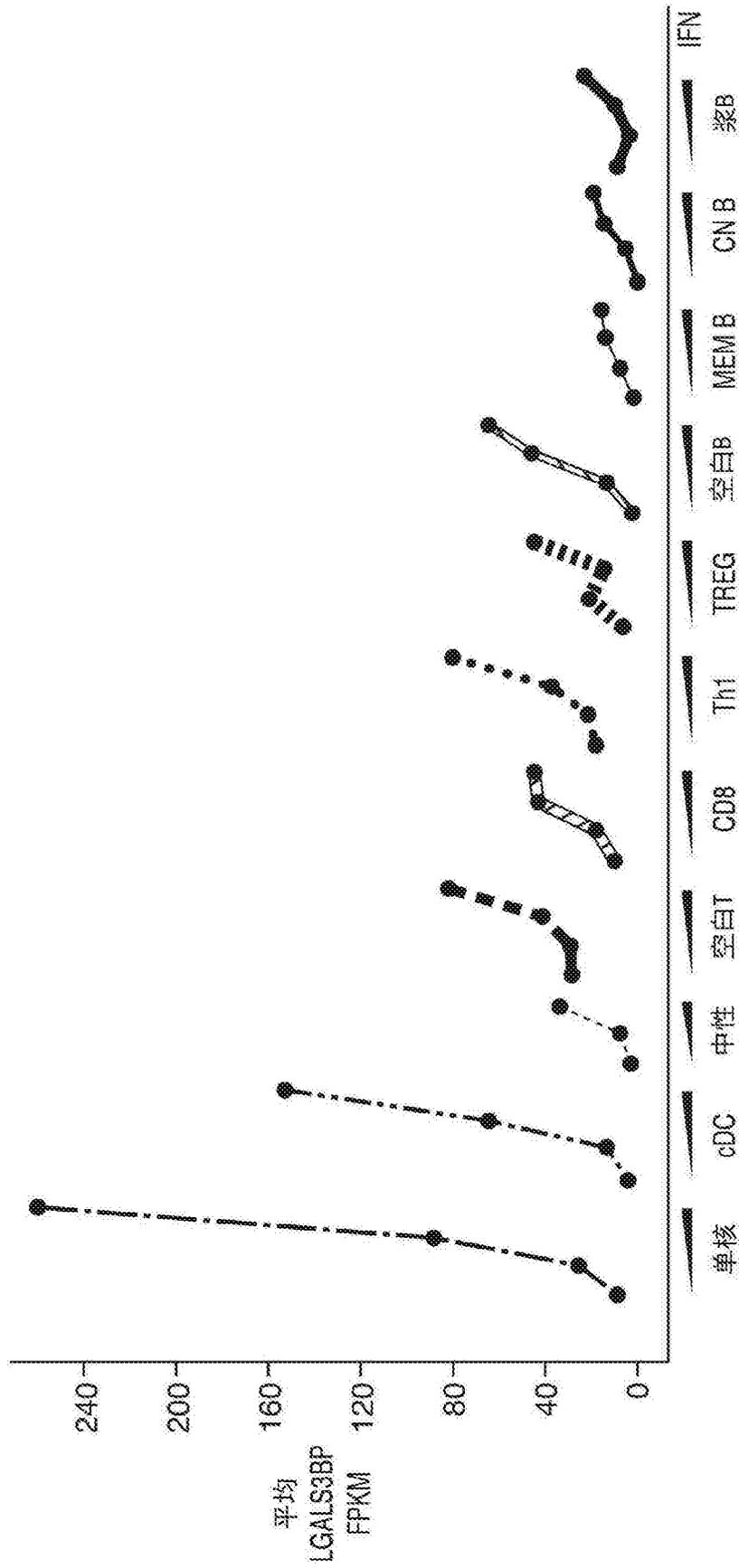


图1B

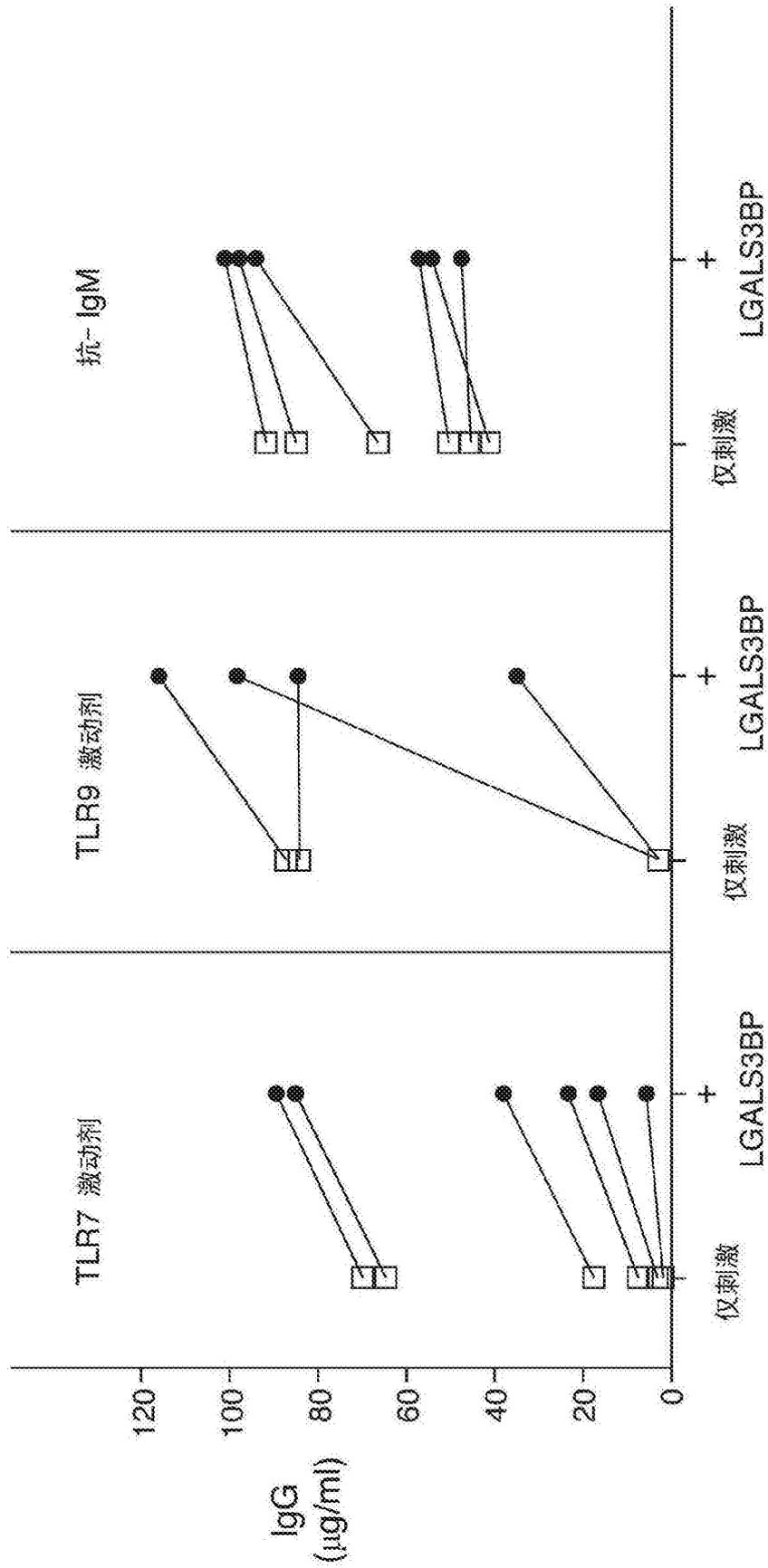


图1C

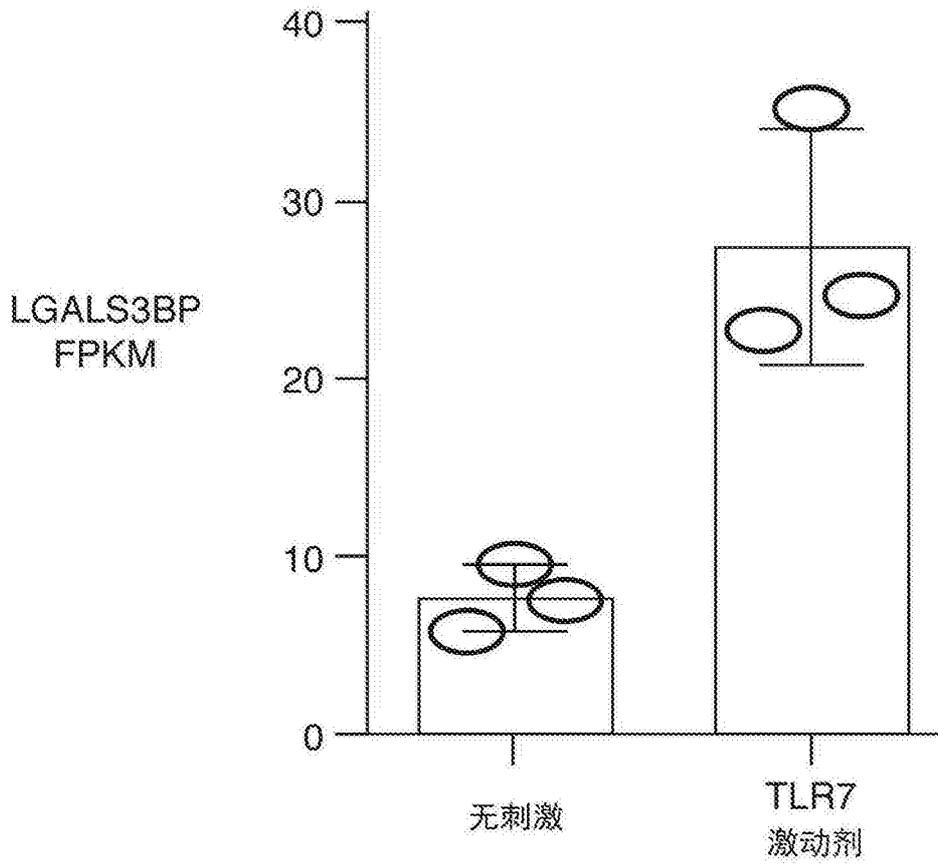


图1D

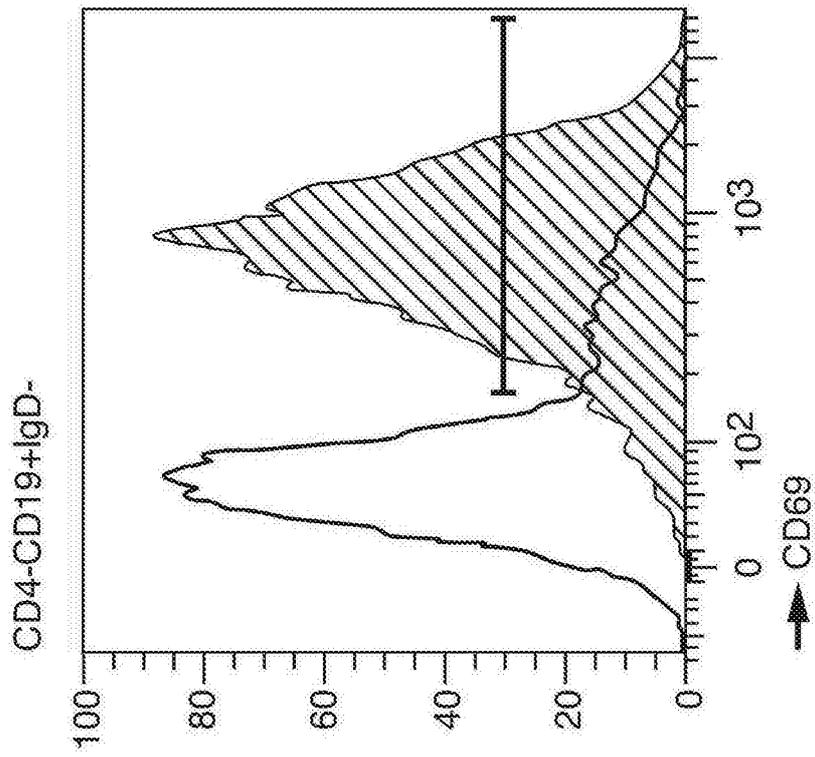


图2A-1

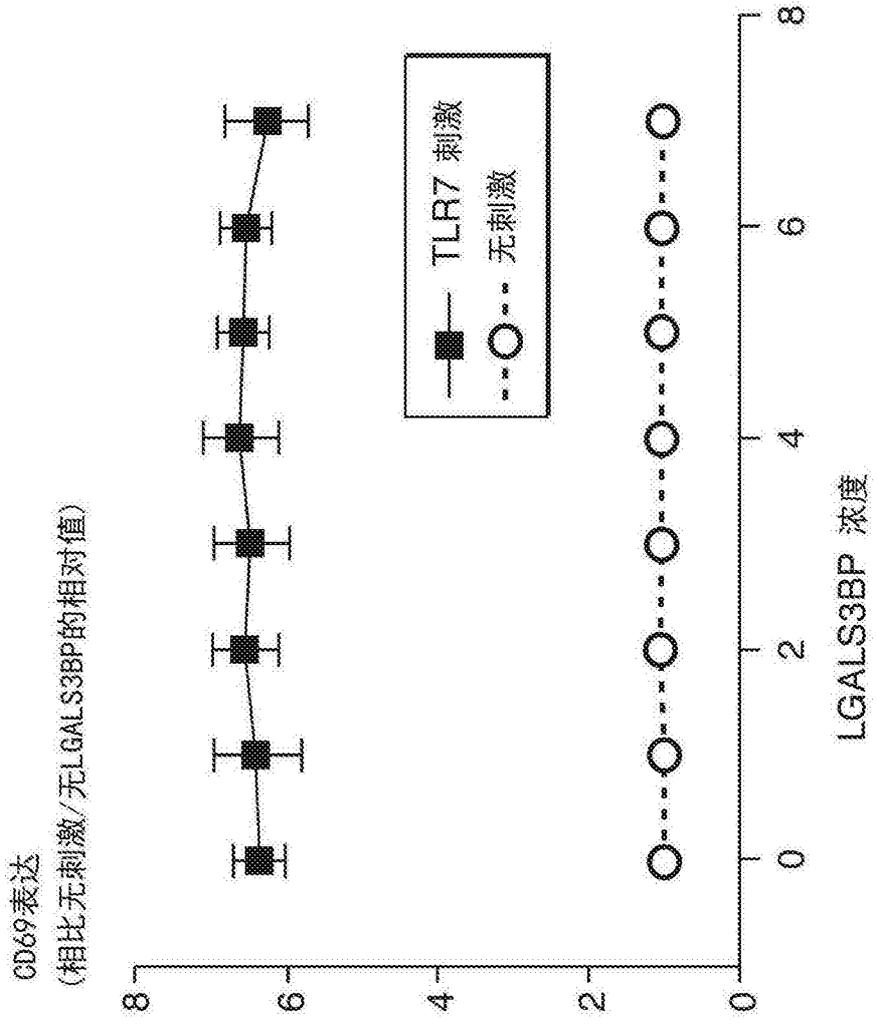


图2A-2

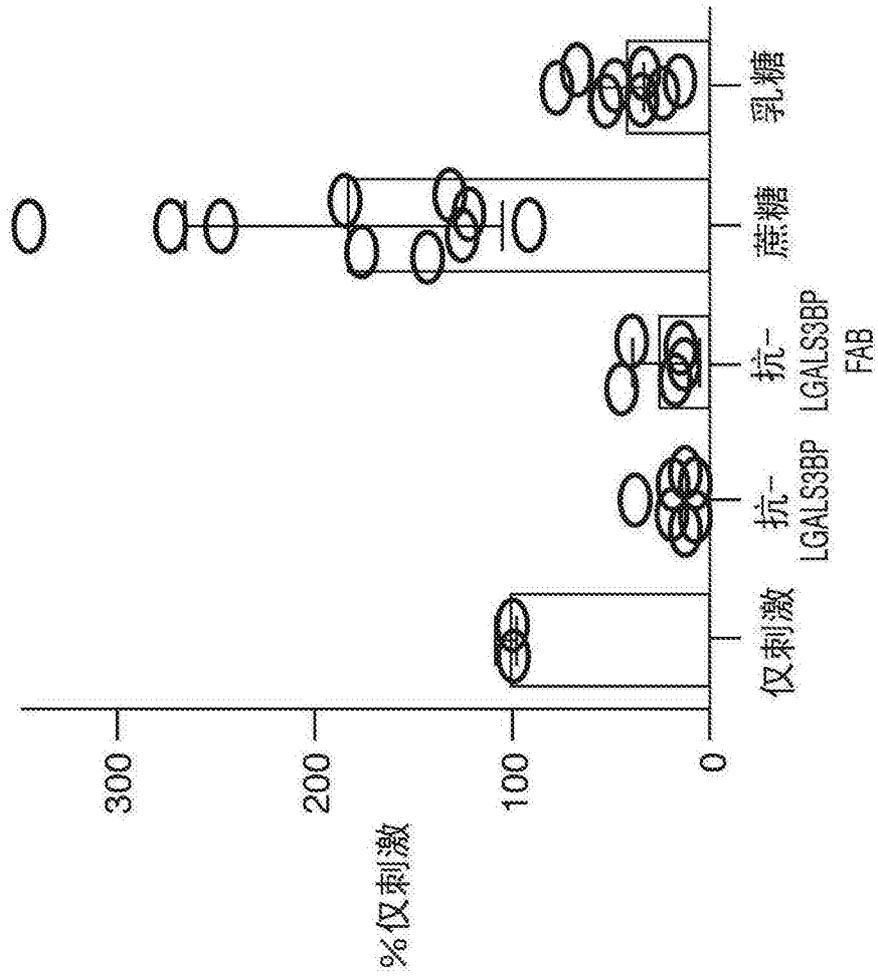


图3A-1

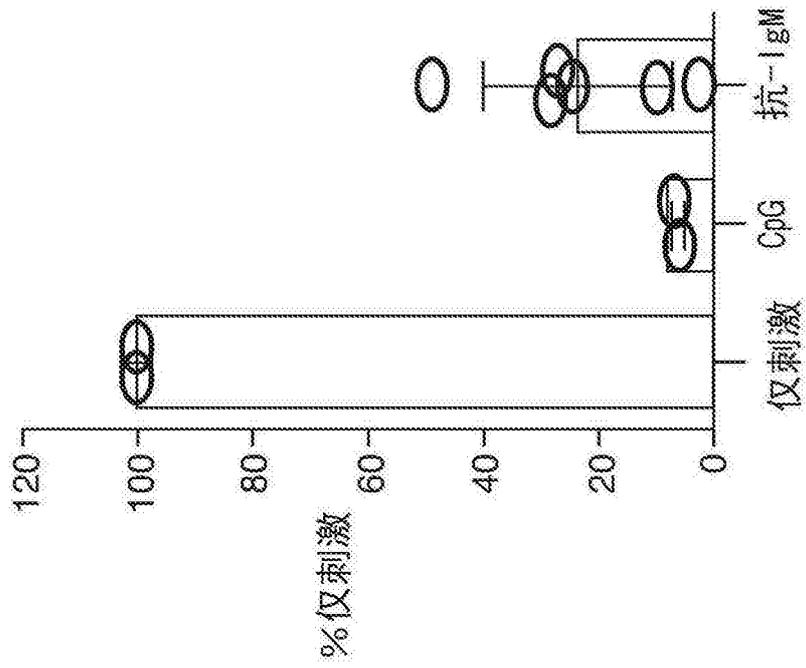


图3A-2

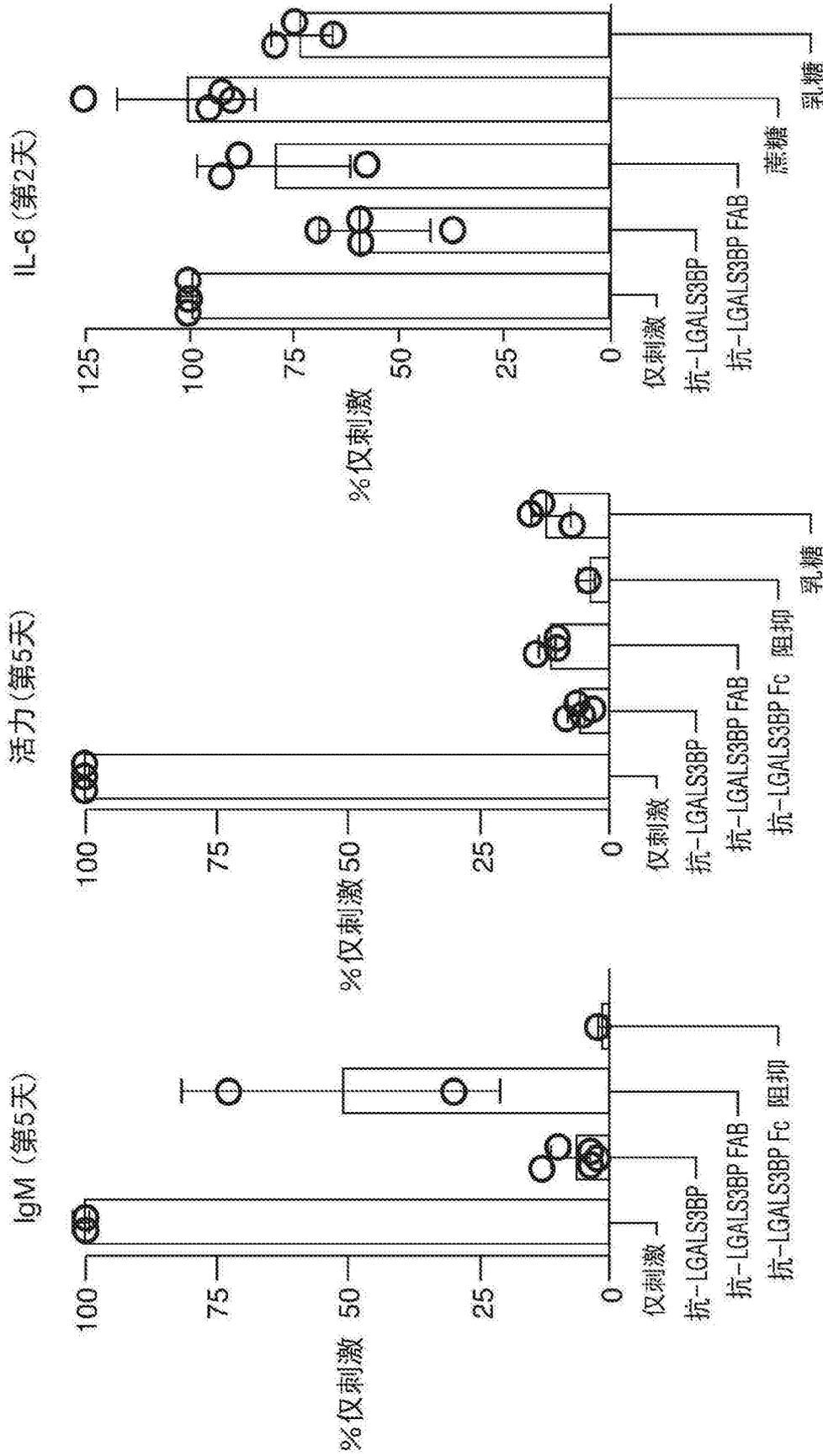


图 3B-1

图 3B-2

图 3B-3

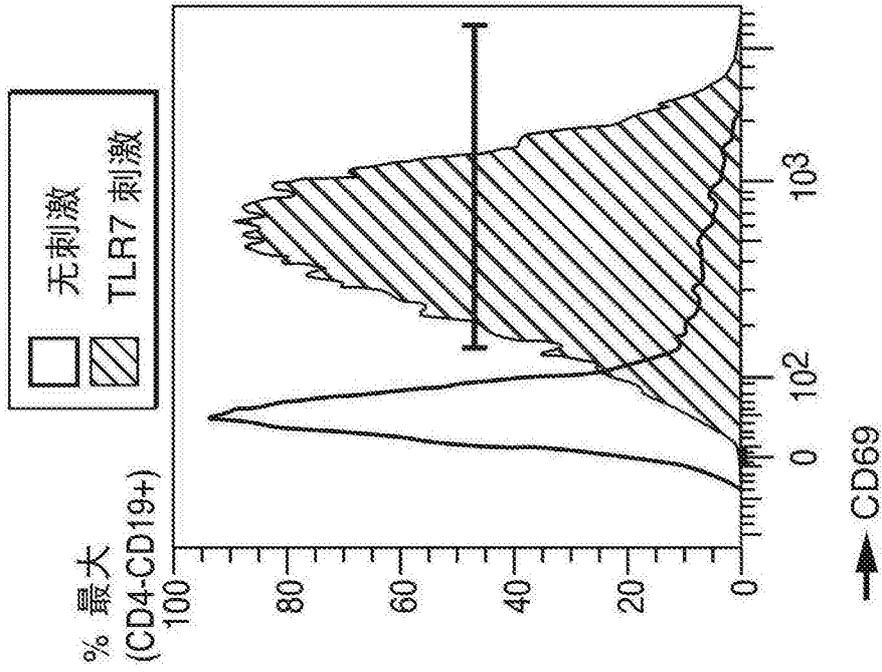


图3C-1

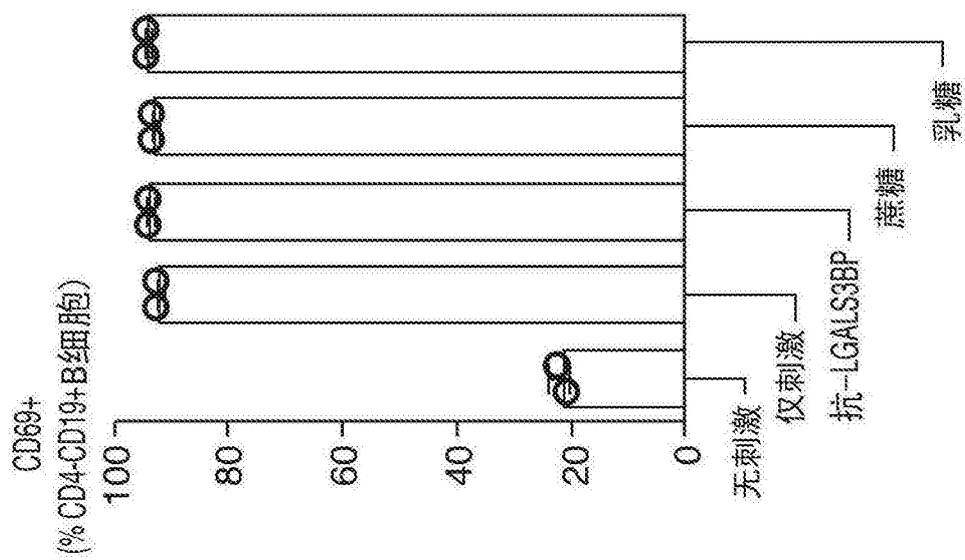


图3C-2

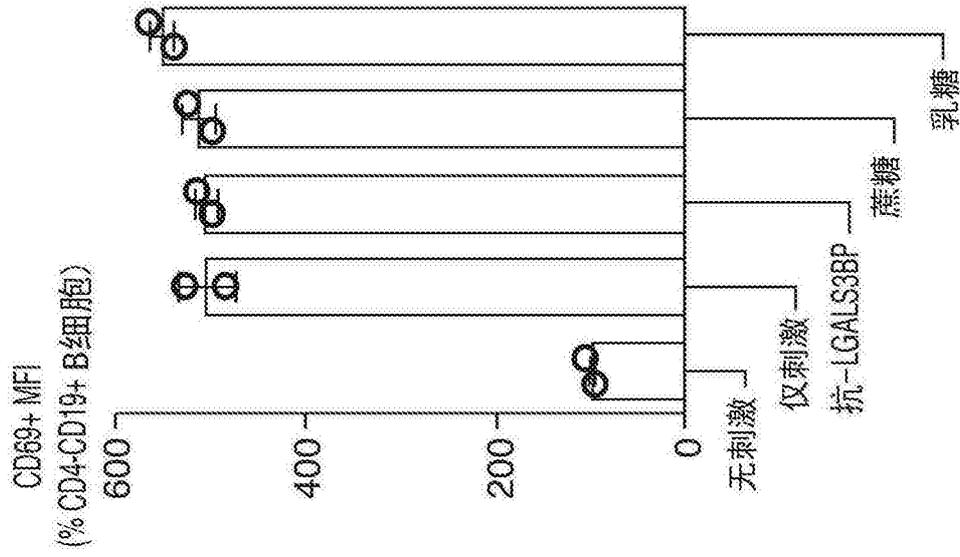


图3C-3

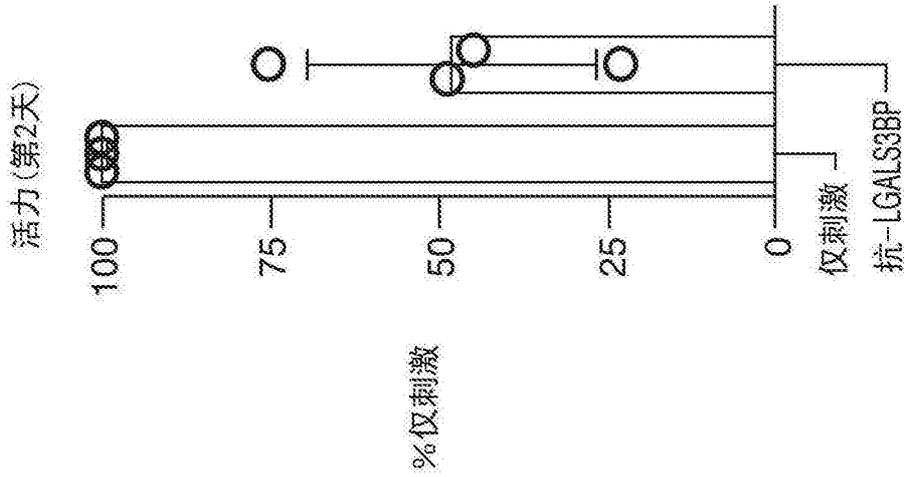


图3D-1

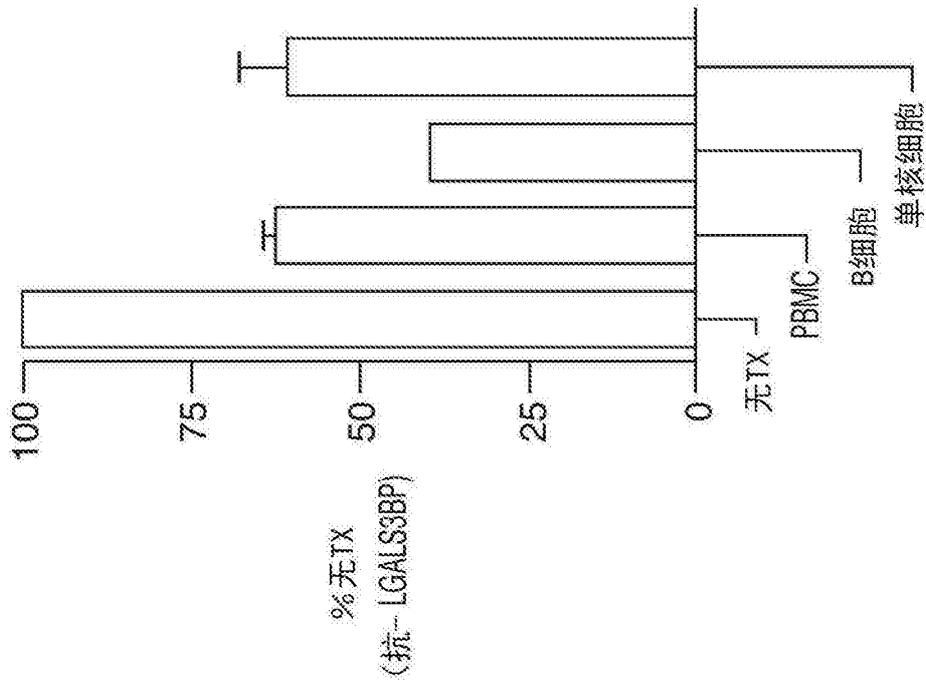


图3D-2

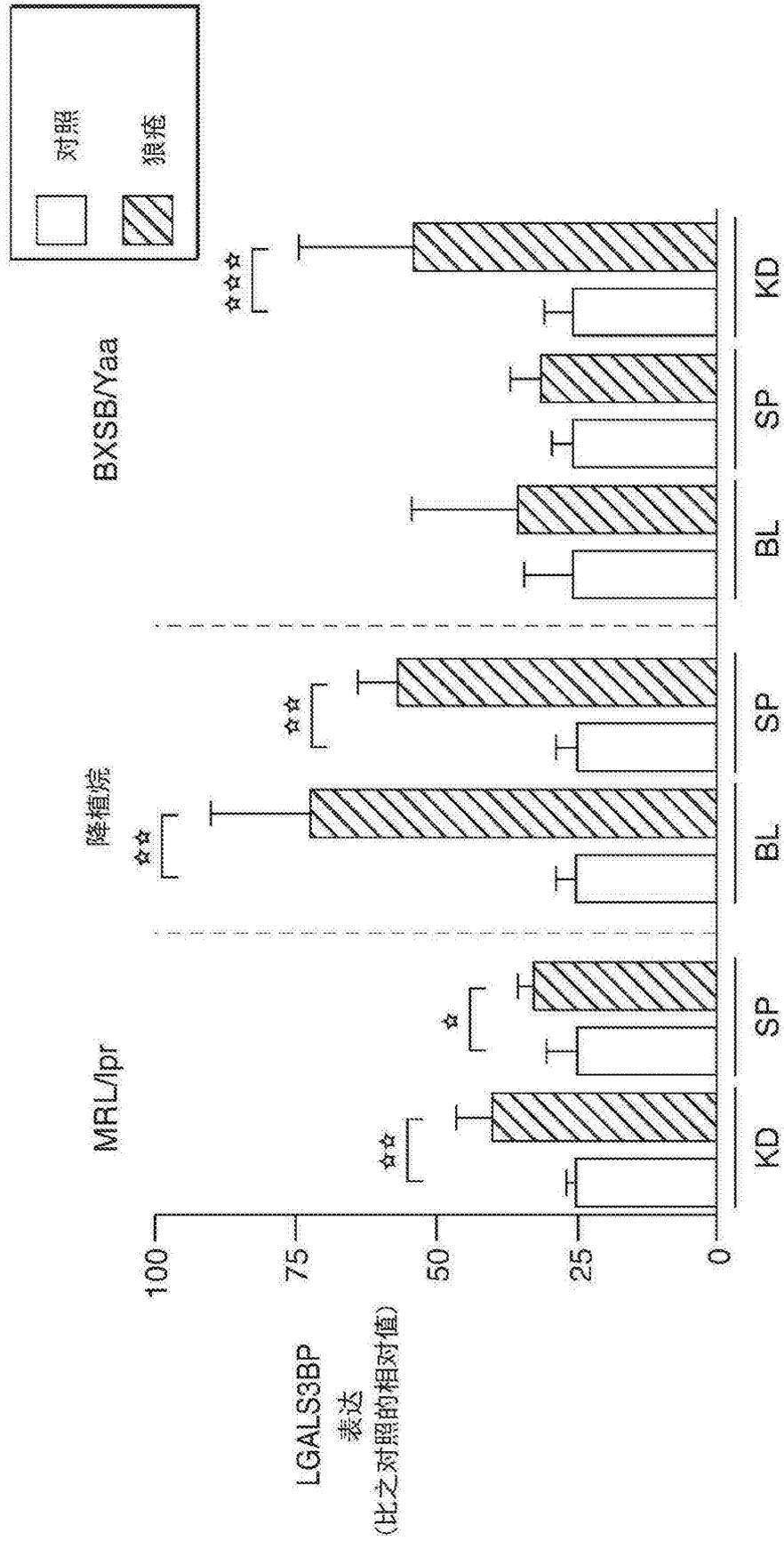


图4A

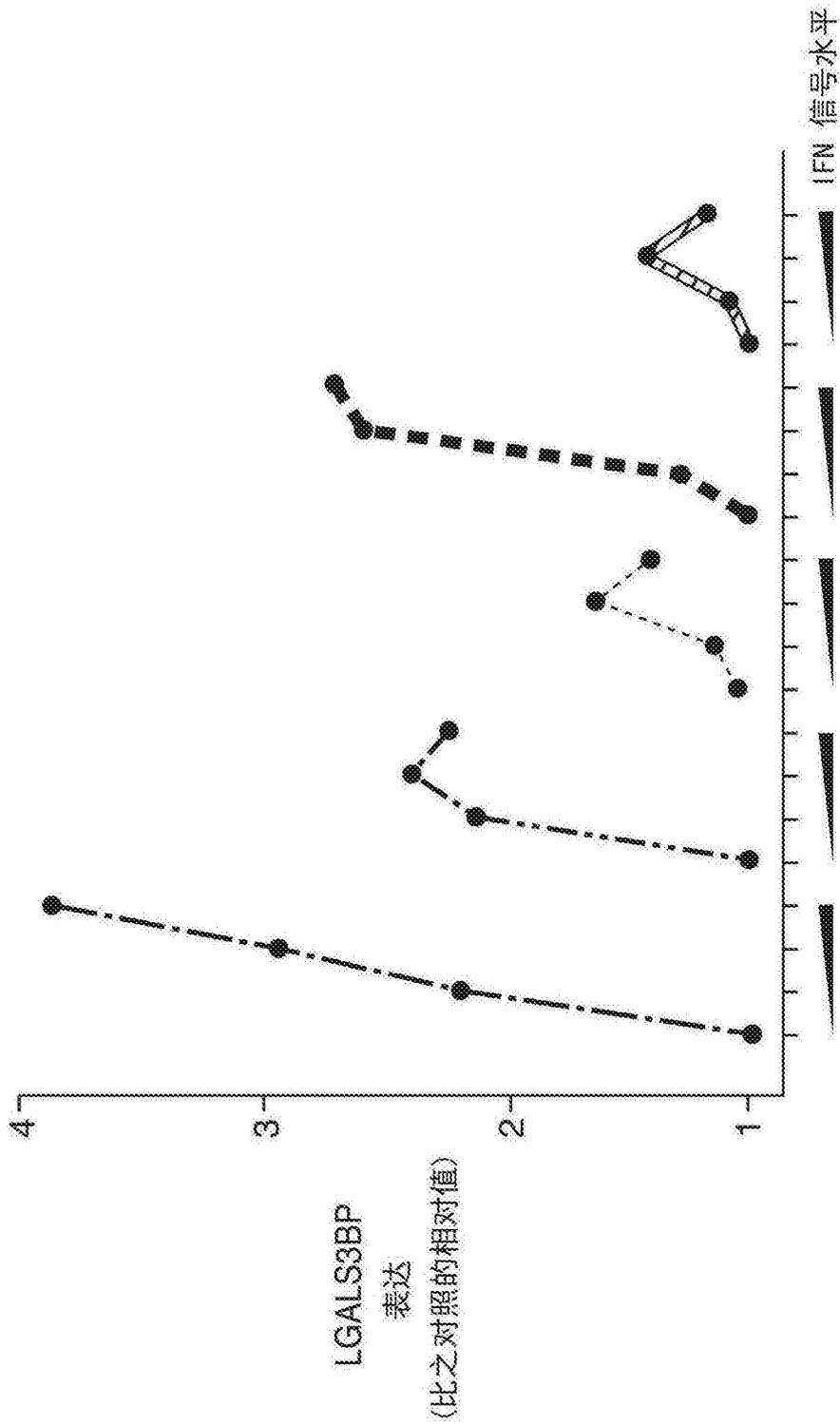


图4C

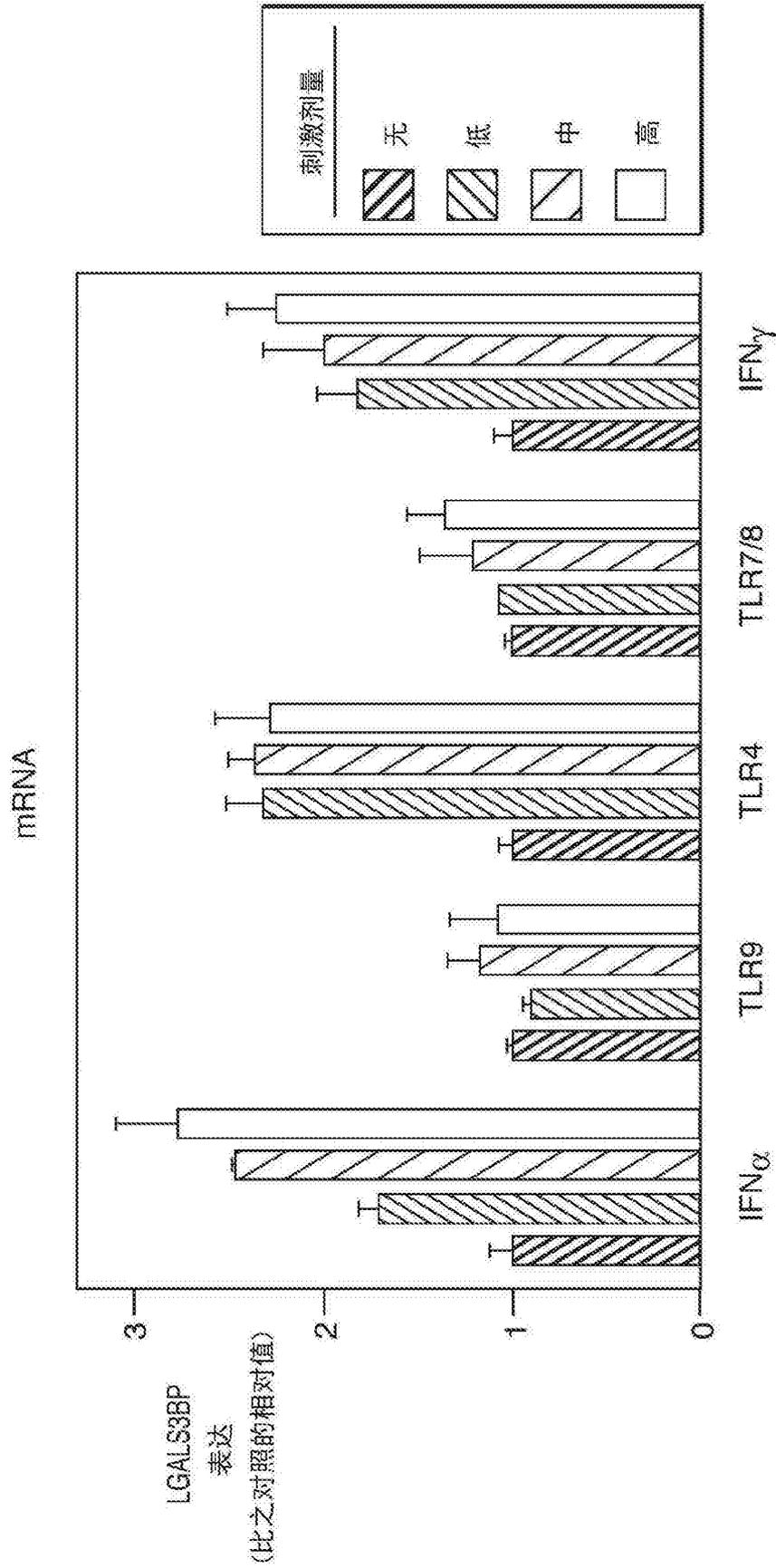


图5A

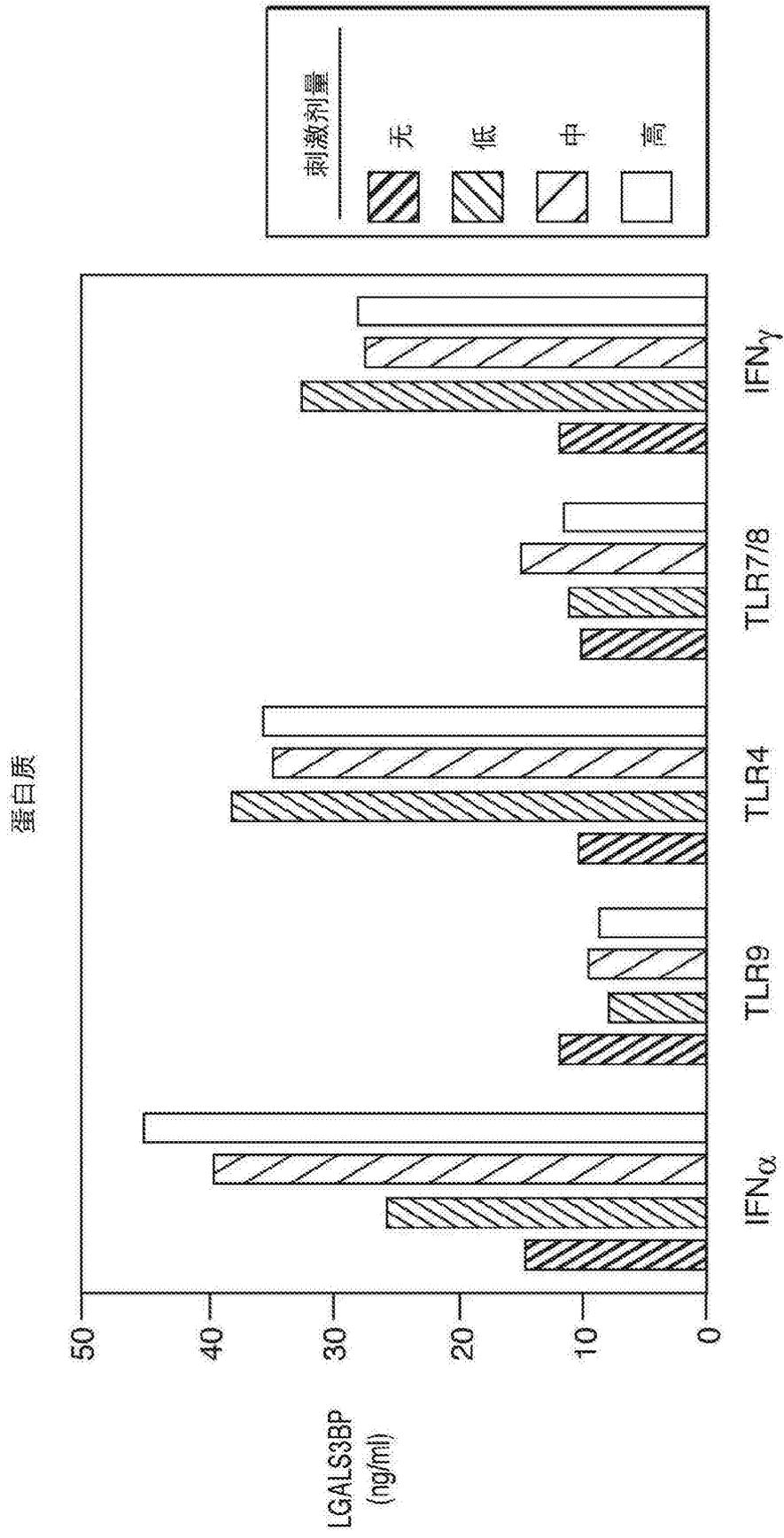


图5B

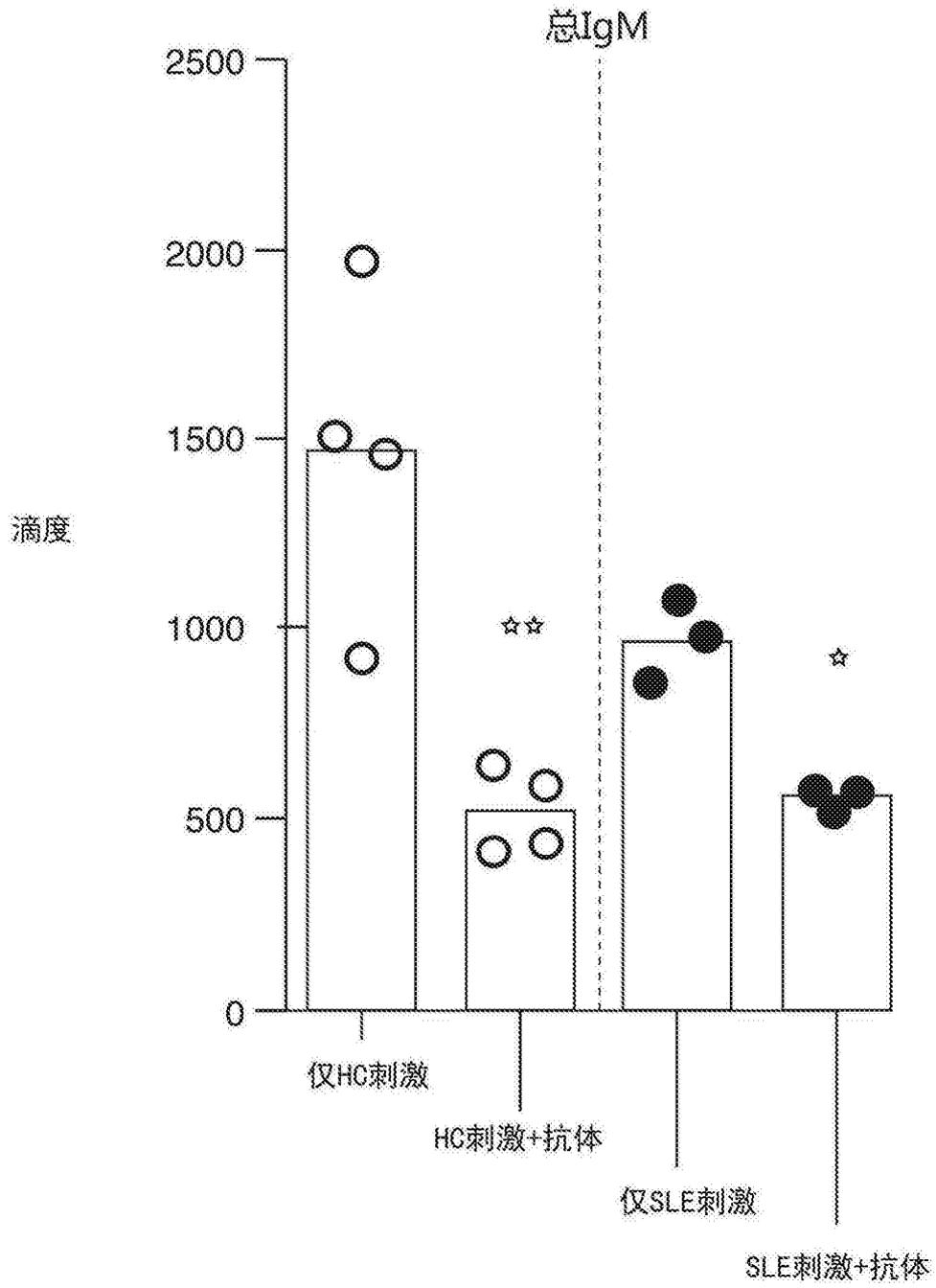


图6A

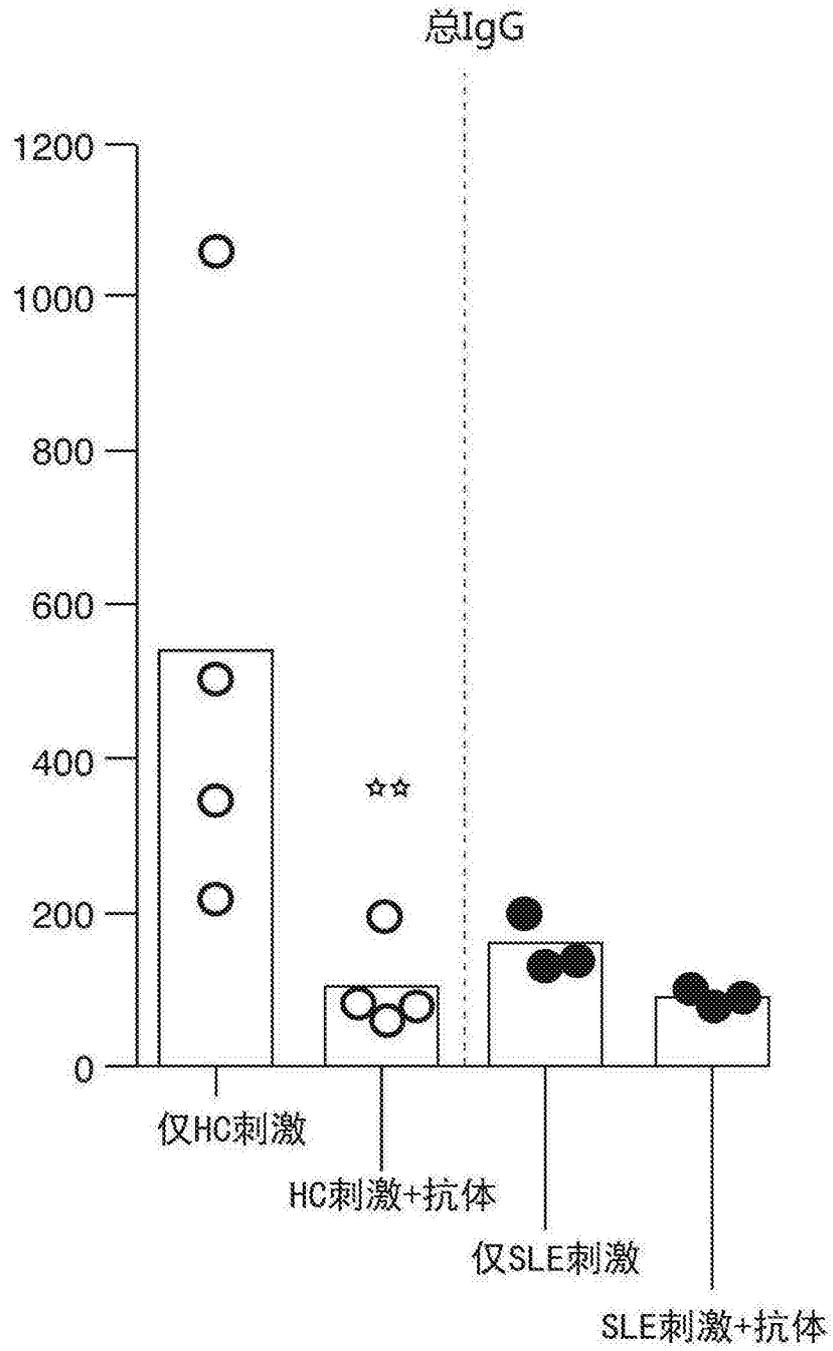


图6B

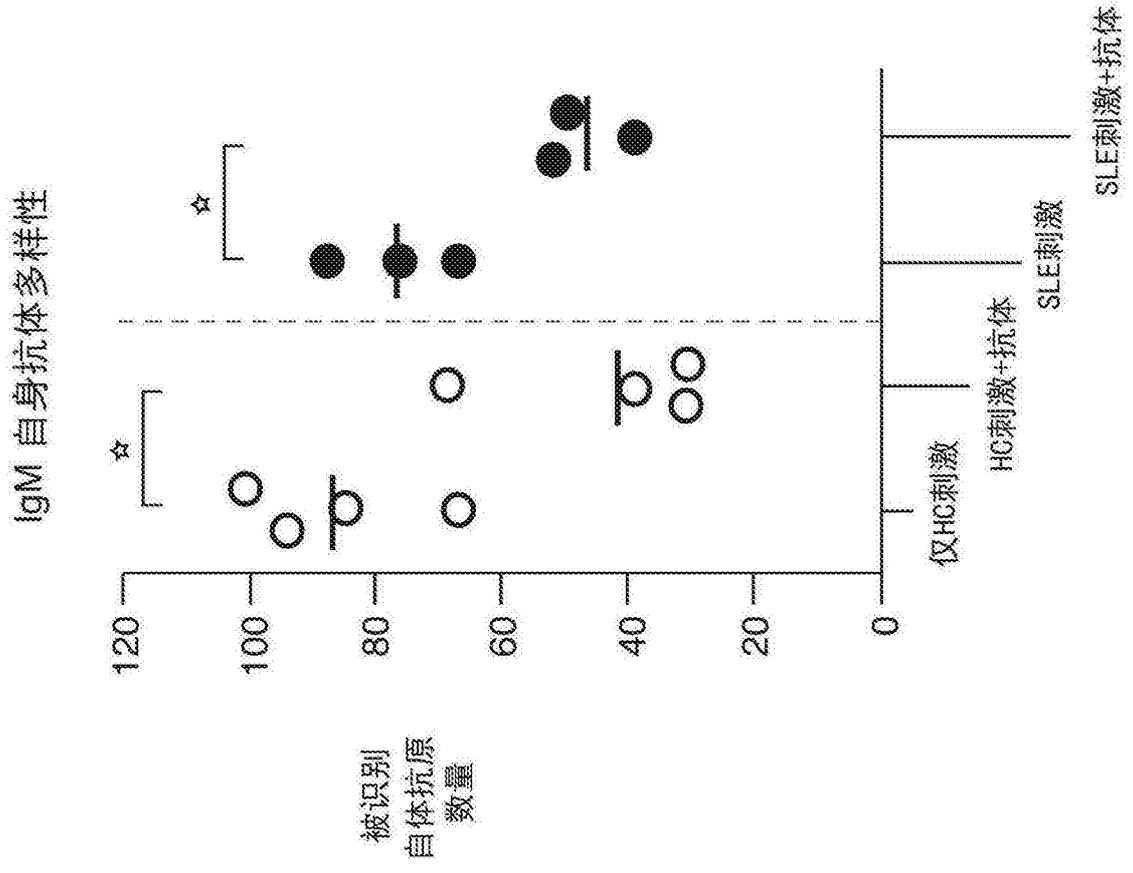


图7A-1

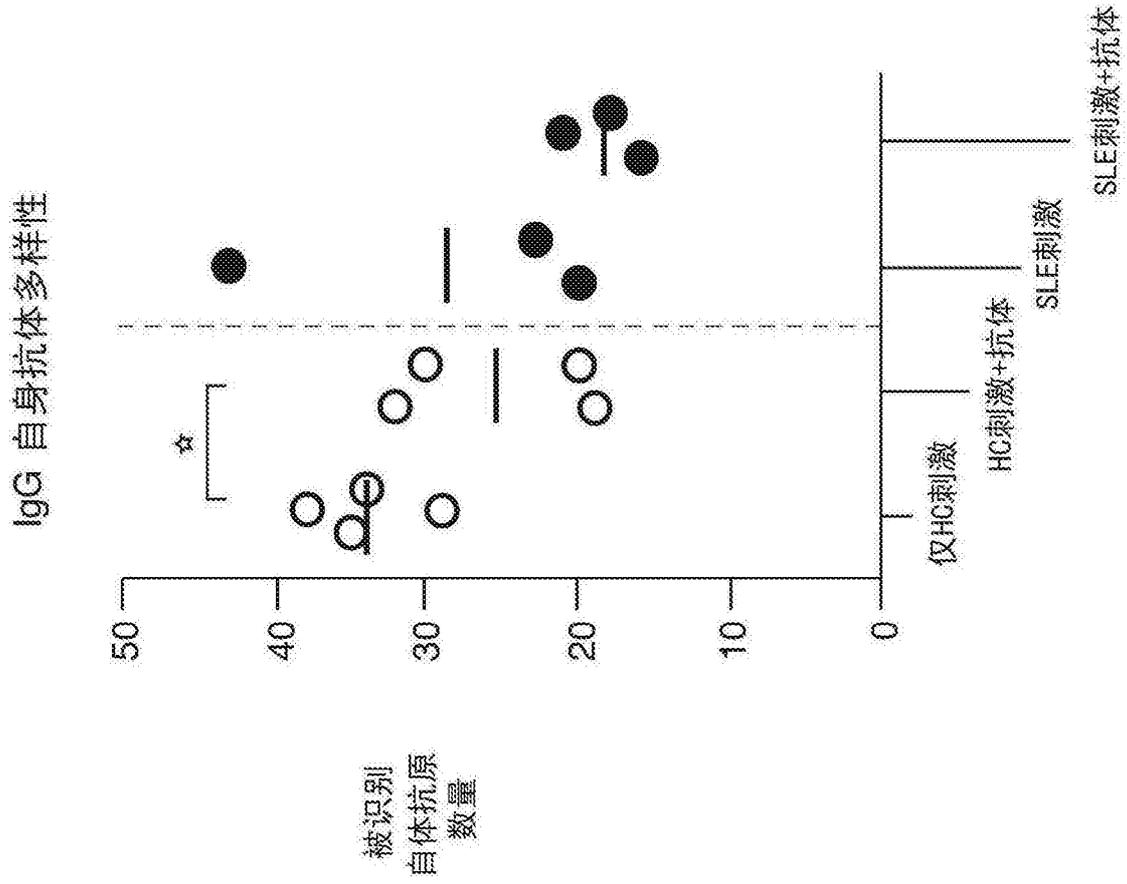


图7A-2

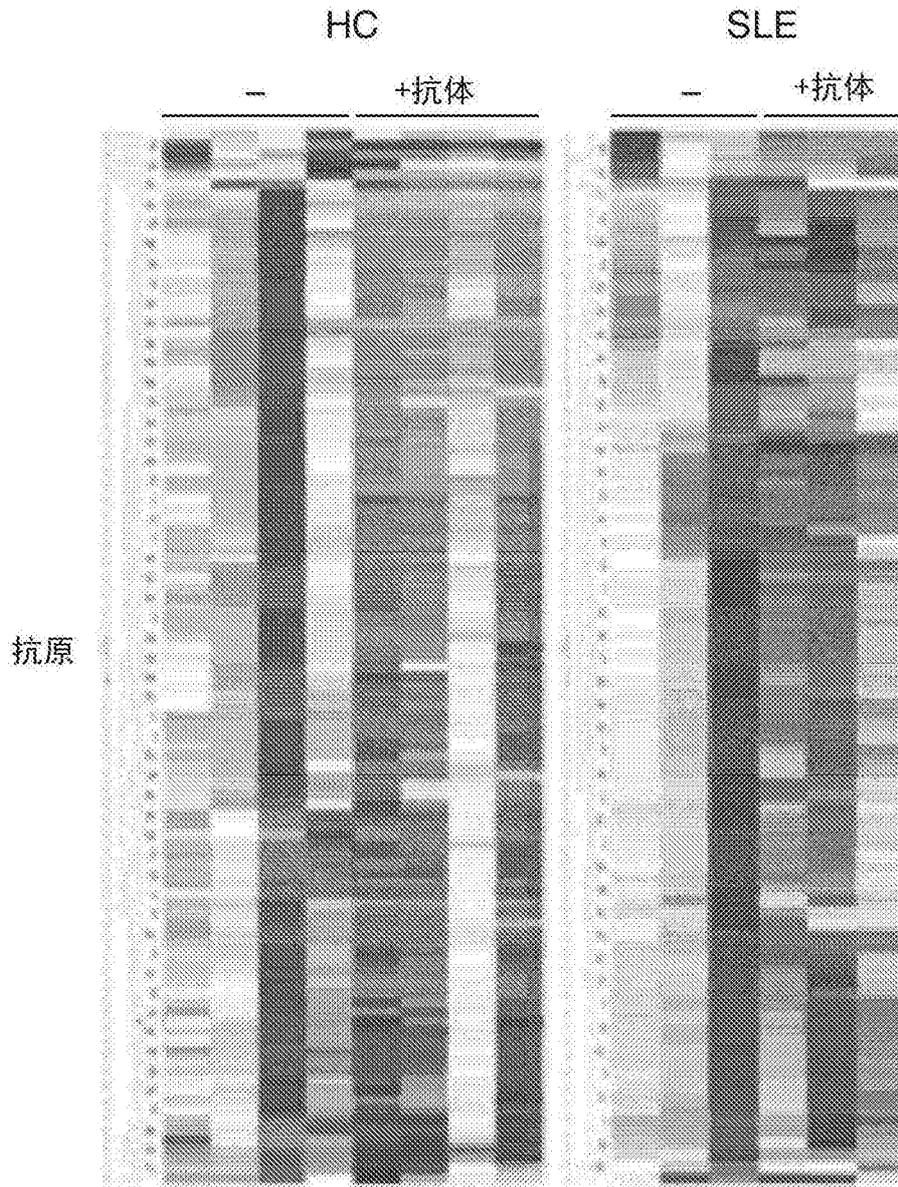


图7B

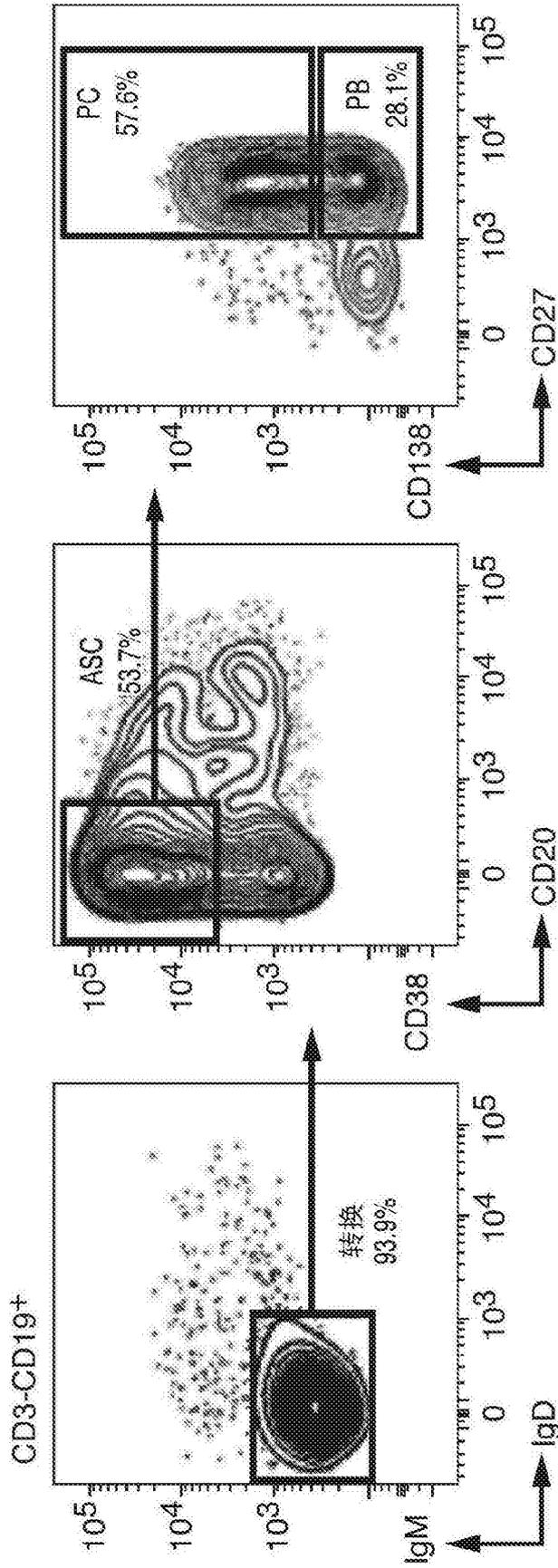


图 8A-1

图 8A-2

图 8A-3

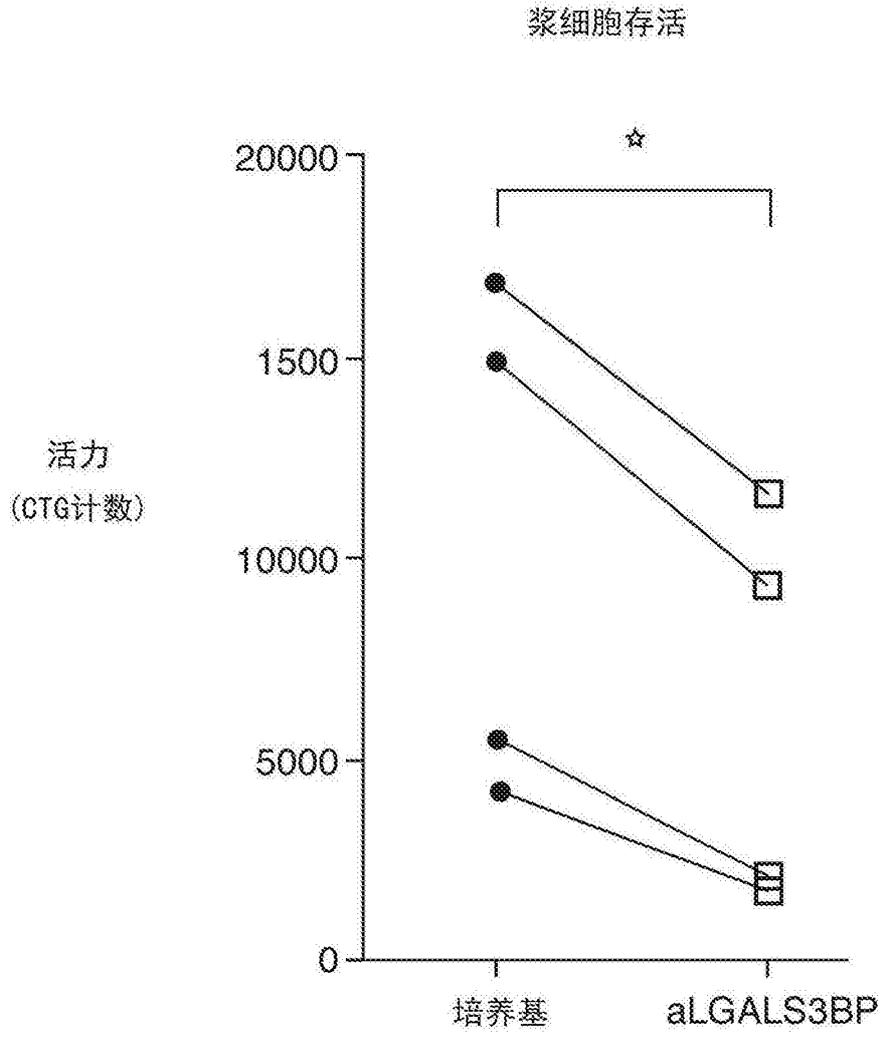


图8B

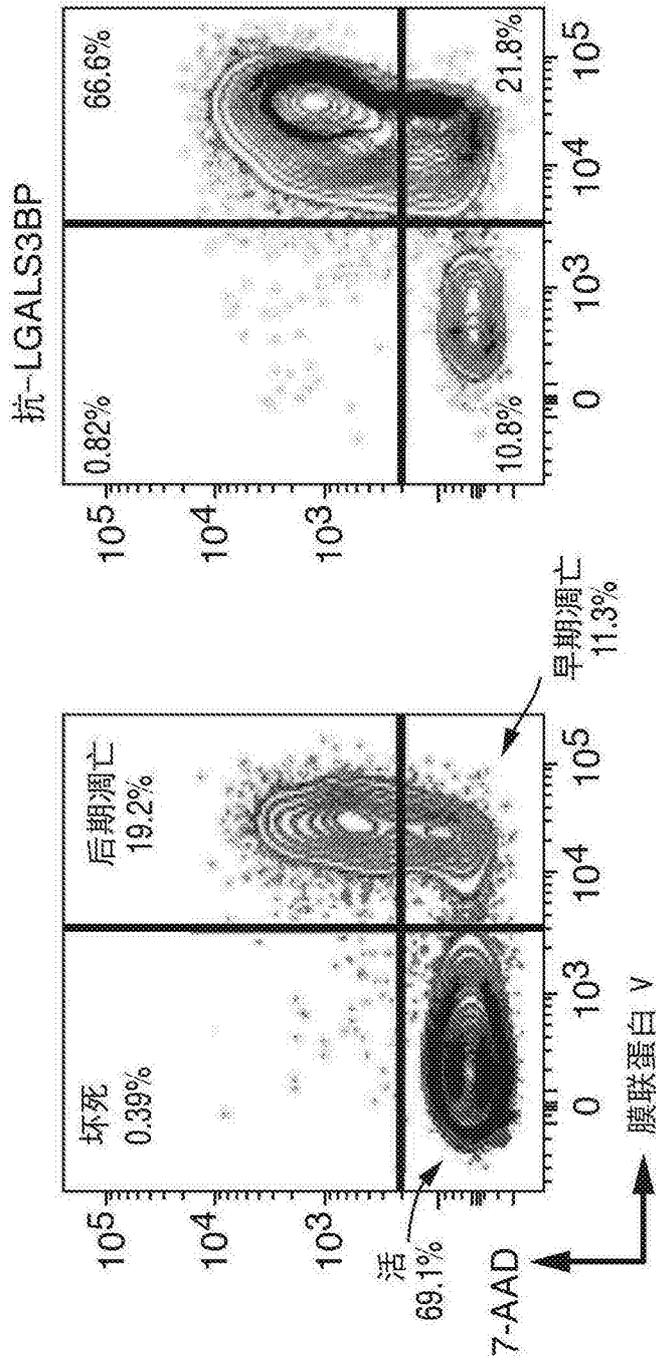


图 9A-1

图 9A-2

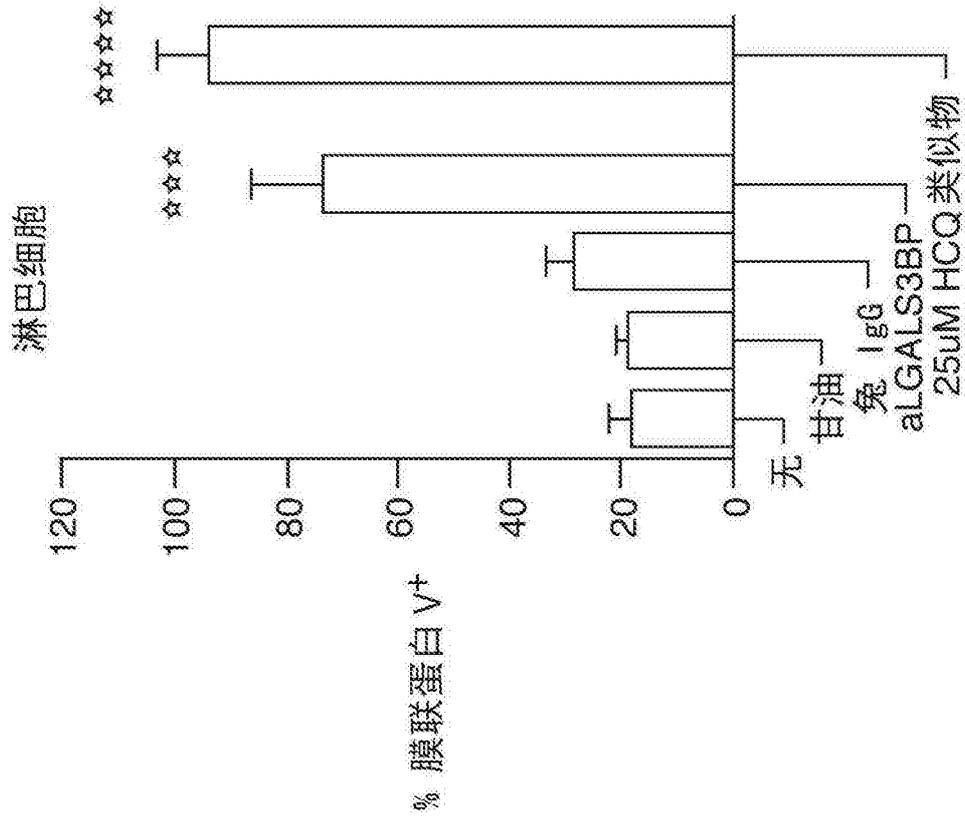


图9B-1

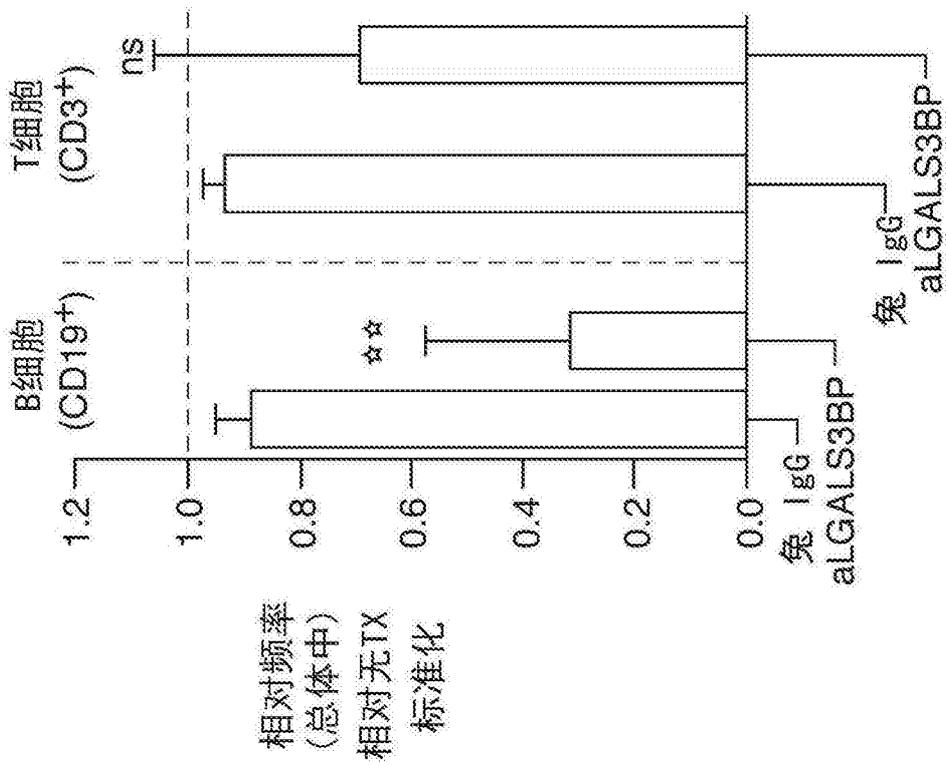


图9B-2

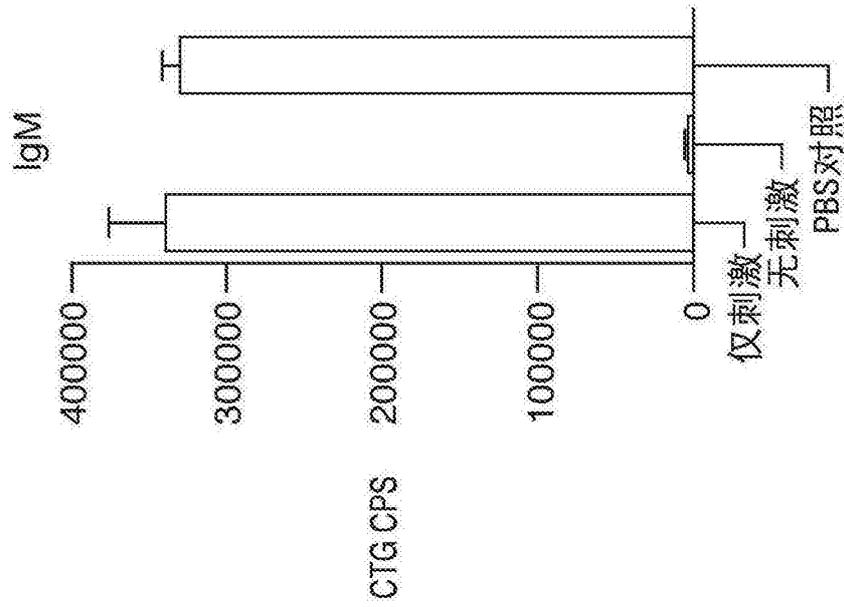


图10A-1

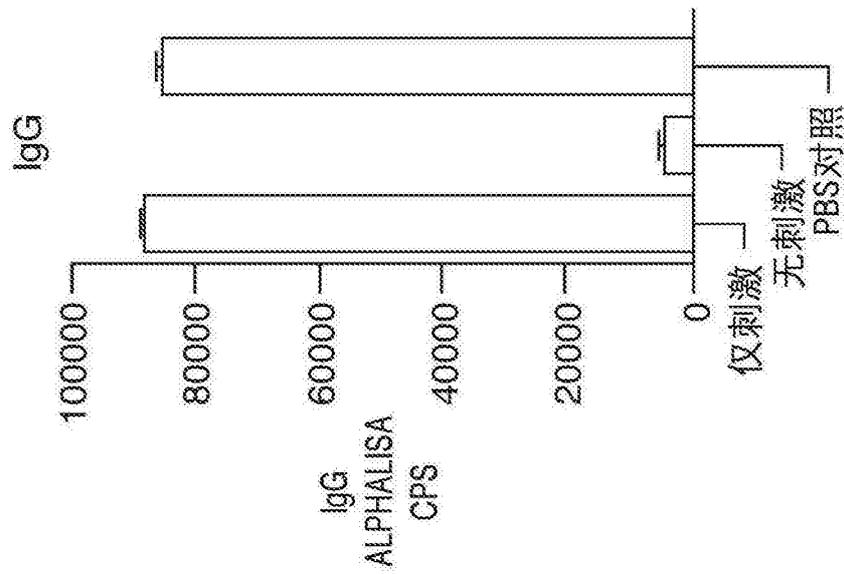


图10A-2

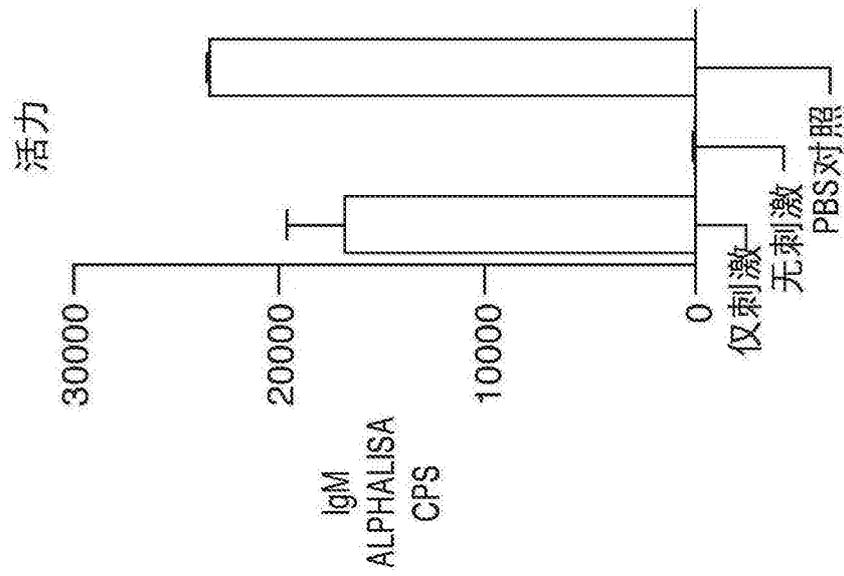


图10A-3

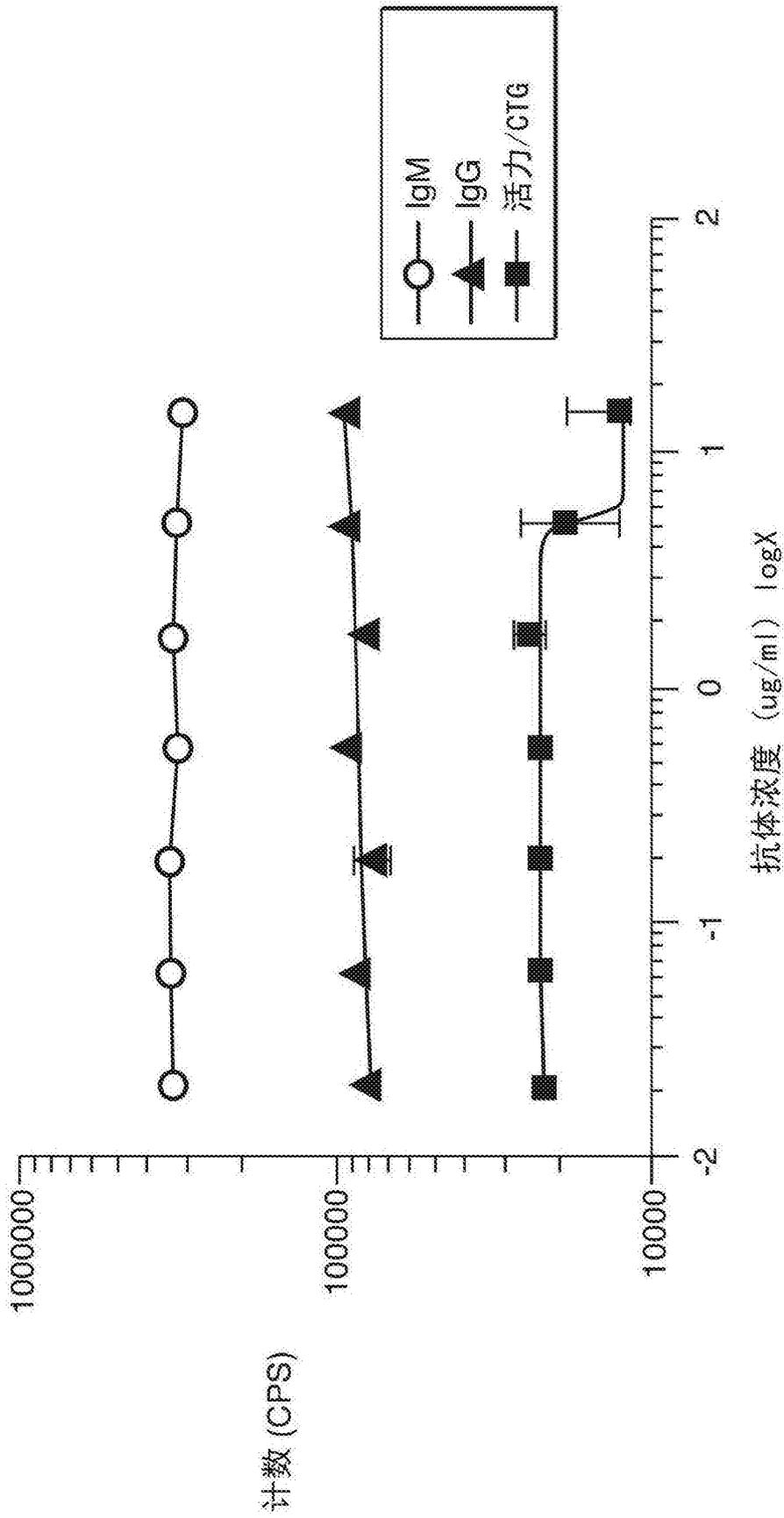


图10B