



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110536691 A

(43)申请公布日 2019.12.03

(21)申请号 201880026102.7

(22)申请日 2018.04.20

(30)优先权数据

62/488,515 2017.04.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.10.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/028637 2018.04.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/195472 EN 2018.10.25

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 A·德里森 D·B·伊亚

M·H·A·伊斯梅利

J·K·杰克曼 R·A·拉扎勒斯

K·洛耶 H·R·马恩

B·L·雅斯潘 易唐盛

J·R·阿罗恩

H·Y·赫尔南德斯-巴里

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 胡志君 黄革生

(51)Int.Cl.

A61K 38/00(2006.01)

C07K 14/81(2006.01)

权利要求书3页 说明书49页

序列表37页 附图22页

(54)发明名称

KLK5拮抗剂治疗疾病的用途

(57)摘要

本文提供治疗受试者的方法、预测受试者的反应的方法和选择患有KLK5相关疾病如哮喘或内瑟顿综合征的受试者的方法。特别地,本文提供KLK5拮抗剂如抗体或Fc融合多肽以及包含其的药物制剂用于治疗或诊断哮喘或内瑟顿综合征的用途。

1. 一种用于治疗受试者中哮喘的方法,包括向受试者施用有效量的KLK5拮抗剂。
2. 预测患有哮喘的受试者对包含KLK5拮抗剂的治疗的响应的方法,所述方法包括:
 - (a) 测量来自受试者的生物样品中的KLK5水平,
 - (b) 将样品中检测到的KLK5水平与参比水平比较,和
 - (c) 当样品中测量的KLK5水平与参比水平相比升高时,预测受试者将对所述治疗有反应,并且当样品中测量的该KLK水平与参比水平相比降低时,预测受试者将对治疗无反应。
3. 为包含KLK5拮抗剂的治疗选择患有哮喘的受试者的方法,包括确定来自受试者的生物样品中位于KLK5基因组序列中的遗传性变异的存在或不存在,其中遗传性变异的存在表示该受试者适于KLK5拮抗剂治疗。
4. 检测KLK5基因组序列中存在或不存在遗传性变异的方法,所述遗传性变异表明患有哮喘的受试者适于KLK5拮抗剂治疗,所述方法包括:
 - (a) 使来自受试者的样品与能够检测位于KLK5基因组序列中的遗传性变异存在或不存在的试剂接触;和
 - (b) 确定遗传性变异的存在或不存在,其中遗传性变异的存在表示受试者适于KLK5拮抗剂治疗。
5. 根据权利要求1或2所述的方法,其中哮喘与位于KLK5基因组序列中的遗传性变异相关。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中哮喘与升高的KLK5水平相关。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中哮喘与升高的中性粒细胞水平相关。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中哮喘选自低2型性哮喘、低骨膜蛋白性哮喘和低嗜酸性粒细胞性哮喘。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中哮喘与内瑟顿综合征不相关。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中哮喘与降低的SPINK5活性相关。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中哮喘与编码SPINK5的基因或其基因产物中的一个或多个遗传性变异不相关。
12. 根据权利要求3-11中任一项所述的方法,其中基于遗传性变异的存在或不存在治疗受试者的哮喘。
13. 根据权利要求3-12中任一项所述的方法,其中遗传性变异是SNP。
14. 根据权利要求3-13中任一项所述的方法,其中遗传性变异是SNP rs117639512。
15. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中KLK5拮抗剂通过与KLK5的活性部位结合抑制KLK5。
16. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法,其中KLK5拮抗剂通过与包含一个或多个KLK5氨基酸残基的结合区结合来抑制KLK5,所述氨基酸残基选自全长未加工的KLK5的位置108、147、150、153、168和245处的氨基酸残基。
17. 根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中KLK5拮抗剂抑制KLK5的丝氨酸蛋白酶活性。
18. 根据权利要求1-17中任一项所述的方法,其中KLK5拮抗剂选自抗体、结合性多肽、多核苷酸和小分子。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中KLK5拮抗剂是抗体。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中抗体是单克隆抗体。
21. 根据权利要求19或20所述的方法, 其中抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。
22. 根据权利要求19-21所述的方法, 其中抗体是全长IgG1抗体。
23. 根据权利要求18所述的方法, 其中结合性多肽是Fc融合多肽。
24. 根据权利要求23所述的方法, 其中Fc融合多肽包含SPINK5的一个或多个结构域。
25. 根据权利要求23所述的方法, 其中Fc融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:21。
26. 根据权利要求23所述的方法, 其中Fc融合多肽包含SPINK9的一个结构域。
27. 根据权利要求23所述的方法, 其中Fc融合多肽包含选自SEQ ID NO:27的氨基酸序列。
28. 根据权利要求18所述的方法, 其中小分子是蛋白酶抑制剂。
29. 根据权利要求28所述的方法, 其中蛋白酶抑制剂是亮抑酶肽。
30. 根据权利要求2-29中任一项所述的方法, 其中样品选自支气管肺泡灌洗液、肺实质、支气管上皮下层、脑脊液、血液、血清、痰、唾液、粘膜刮取物、组织活检样品、泪腺分泌物、精液或汗。
31. KLK5拮抗剂, 用于医学治疗或诊断, 包括治疗和/或处理哮喘。
32. SPINK Fc融合多肽, 其中SPINK Fc融合多肽抑制KLK5的活性。
33. 根据权利要求32所述的SPINK Fc融合多肽, 其中SPINK Fc融合多肽包含来自SPINK5或SPINK9的一个或多个结构域。
34. 根据权利要求33所述的SPINK Fc融合多肽, 其中来自SPINK5的一个或多个结构域包含选自SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:22的序列。
35. 根据权利要求33所述的SPINK Fc融合多肽, 其中来自SPINK9的一个或多个结构域包含SEQ ID NO:28。
36. 根据权利要求33-35中任一项所述的SPINK Fc融合多肽, 其中一个或多个结构域来自小鼠源或人源。
37. 根据权利要求33-36中任一项所述的SPINK Fc融合多肽, 其中SPINK Fc融合多肽抑制KLK5达至少约50%。
38. 药物制剂, 其包含药学有效量的根据权利要求32-37中任一项所述的Fc融合多肽和可药用载体。
39. 根据权利要求32-37中任一项所述的SPINK Fc融合多肽, 用于医学治疗或诊断, 包括治疗和/或处理与KLK5相关的疾病。
40. 治疗受试者中与KLK5相关的疾病的方法, 包括向受试者施用有效量的根据权利要求32-37中任一项所述的Fc融合多肽。
41. 根据权利要求40所述的方法, 其中与KLK5相关的疾病与受试者的样品中升高的KLK5水平相关。
42. 根据权利要求40所述的方法, 其中与KLK5相关的疾病与受试者的样品中升高的中性粒细胞数目相关。
43. 根据权利要求41-42中任一项所述的方法, 其中与KLK5相关的疾病是内瑟顿综合征。

44. 根据权利要求41-43中任一项所述的方法, 其中样品选自支气管肺泡灌洗液、肺实质和支气管上皮下层。

45. 根据权利要求1-30和40-42中任一项所述的方法, 其中受试者是人。

KLK5拮抗剂治疗疾病的用途

相关申请的交叉引用

本发明要求2017年4月21日提交的美国临时专利申请系列号62/488,515的权益,所述文献的完整内容通过引用方式并入本文。

序列表

本申请含有已经通过电子方式以ASCII格式提交并因而通过引用方式完整并入的序列表。在2018年4月11日创建的所述ASCII副本命名为P34247-WO_SL.txt并且大小是93千比特。

技术领域

本文提供治疗受试者的方法、预测受试者的反应并且选择患有KLK5相关疾病(如哮喘或内瑟顿综合征)的受试者的方法。具体地,本文提供KLK5拮抗剂(如抗体或结合性多肽以及包含前者的药物制剂)治疗或诊断哮喘或内瑟顿综合征的用途。

背景

哮喘是与遗传风险因子和环境风险因子相关的临床上异质性病症。来自哮喘双生研究的遗传率(heritability)评估值从35%至80%变动,表明了遗传风险的重要作用。参见,例如Ullemar等人,Allergy 71,230-238(2016)。已经对哮喘和哮喘相关表型实施了几个大规模GWAS,并且已经鉴定许多基因座,如已经在多个研究群体中确认ORMDL3、IL13、IL1RL1和TSLP基因附近的那些基因座。参见,例如,Bonnelykke等人,Nat Genet 46,51-55(2014)。这些研究已经加入疾病的遗传基础和哮喘的病理生理学,但是借助已发表的GWAS所鉴定的常见变体占总体遗传风险的小部分。已经深度讨论和争论这个“遗失遗传率(missing heritability)”概念并且已经假设它归因于几个因素,包括检测基因-基因相互作用的把握度低、结构性变异分析有限和罕见变异的潜在贡献。参见Manolio等人,Nature 461,747-753(2009)。另一种揭示常见疾病遗传素质的策略是通过选择表型相似的亚组,并且已经提出这种策略将在我们努力更全面理解哮喘遗传结构时可用。参见Bonnelykke和Ober,J Allergy Clin Immunol 137,667-679(2016)。影响哮喘者中总体风险的基因可能有助于各自和独立的生物过程,这些过程共同影响疾病结果。减少样本量的同时,依据亚表型使分型研究群体均匀化,可能揭示这个患者子集中富集的变体。

已经显示2型炎症的几种生物标志物有效界定其中病情受2型炎症驱动的那些哮喘者。参见Wan和Woodruff,Immunol Allergy Clin North Am 36,547-557(2016)。从这些生物标志物获得的知识已经导致新型治疗的确定,所述治疗在2型炎症驱动疾病的哮喘患者中显示疗效改进。参见Corren等人,N Engl J Med 365,1088-1098(2011)。但是,缺乏涉及低2型性哮喘者的了解并且这些患者将可能包含重度哮喘发展时大量尚未满足的医疗需求。参见例如Arron等人,Clin Immunol 161,11-22(2015)。

下游2型生物标志物之一,骨膜蛋白(peripontin),由支气管上皮细胞和肺成纤维细胞分泌并且是Th2细胞因子(包括IL-13)可诱导的。参见Takayama等人,J Allergy Clin Immunol 118,98-104(2006)。骨膜蛋白是具有高水平治疗前血清骨膜蛋白的患者的富集型

抗IL-13(来金珠单抗(lebrikizumab))临床反应的预测性生物标志物;相反,推断具有低水平治疗前血清骨膜蛋白的患者明显地较少临床获益。参见Corren等人,N Engl J Med 365, 1088-1098 (2011)。由于外周骨膜蛋白水平有效界定治疗反应有差异的哮喘亚群,我们假设这种生物标志物还可以使异质性哮喘研究群体分层以增加遗传研究中的把握度。大部分哮喘GWAS聚焦于哮喘群体,未顾及2型炎症状态。

哮喘显示广谱的呼吸道相关症状,特征为可逆性气流阻塞、支气管高反应性和气道炎症。哮喘严重程度在患者之间大幅度变动并且已经充分记录患者之间疾病的分子异质性。需要改进对哮喘、尤其伴有低水平2型气道炎症的中度-重度哮喘的治疗。

发明概述

本文提供用于治疗受试者中哮喘的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的KLK5拮抗剂。

本文还提供预测患有哮喘的受试者对包含KLK5拮抗剂的治疗反应的方法,所述方法包括(a)测量来自受试者的生物样品中的KLK5水平,(b)将样品中检测到的KLK5水平与参比水平比较,并且(c)当样品中测量的KLK5水平与参比水平相比升高时,预测受试者将对治疗有反应,并且当样品中测量的KLK5水平与参比水平相比降低时,预测受试者将对治疗无反应。

本文还提供为包含KLK5拮抗剂的治疗选择患有哮喘的受试者的方法,包括确定来自受试者的生物样品中位于KLK5基因组序列中的遗传性变异的存在或不存在,其中遗传性变异的存在表示受试者适于KLK5拮抗剂治疗。

另外本文提供用于检测KLK5基因组序列中存在或不存在遗传性变异的方法,所述遗传性变异表明患有哮喘的受试者适于KLK5拮抗剂治疗,所述方法包括(a)使来自受试者的样品与能够检测位于KLK5基因组序列中的遗传性变异存在或不存在的试剂接触;和(b)确定遗传性变异的存在或不存在,其中遗传性变异的存在表示受试者适于KLK5拮抗剂治疗。

在任意方法的一些实施方案中,哮喘与升高的KLK5水平相关。在任意方法的一些实施方案中,哮喘与升高的中性粒细胞水平相关。在任何方法的一些实施方案中,哮喘选自低2型性哮喘、低骨膜蛋白性哮喘和低嗜酸性粒细胞性哮喘。在任意方法的一些实施方案中,哮喘与内瑟顿综合征(Netherton Syndrome)不相关。在任意方法的一些实施方案中,哮喘与降低的SPINK5活性相关。在任意方法的一些实施方案中,哮喘与编码SPINK5的基因或其基因产物中的一个或多个遗传性变异不相关。在任意方法的一些实施方案中,基于遗传性变异的存在或不存在治疗受试者的哮喘。在任意方法的一些实施方案中,哮喘与位于KLK5基因组序列中的遗传性变异相关。在一些实施方案中,遗传性变异是SNP。在一些实施方案中,遗传性变异是SNP rs117639512。

在任意方法的一些实施方案中,KLK5拮抗剂通过与KLK5的活性部位结合抑制KLK5。在任意方法的一些实施方案中,KLK5拮抗剂通过与包含一个或多个KLK5氨基酸残基的结合区结合来结合抑制KLK5,所述氨基酸残基选自全长未加工的(即,包含信号肽的)KLK5位置108、147、150、153、168和245处的氨基酸残基。在任意方法的一些实施方案中,KLK5拮抗剂抑制KLK5的丝氨酸蛋白酶活性。

在任意方法的一些实施方案中,KLK5拮抗剂选自抗体、结合性多肽、多核苷酸和小分子。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中,抗体是全长IgG1抗体。在一些实施方案中,抗体具有小于

约50 μ M-1 μ M、小于约1 μ M-500nM、小于约500nM-100nM、小于约100nM-10nM、小于约10nM-1nM或小于约1000pM-100pM的IC₅₀。在一些实施方案中,抗体具有小于约10nM-1nM的IC₅₀。在一些实施方案中,抗体具有小于约2nM-1nM的IC₅₀。在一些实施方案中,通过如本文所述的直接测定法或偶联测定法测定IC₅₀。

在一些实施方案中,结合性多肽是KLK5结合性多肽。在一些实施方案中,KLK5结合性多肽是融合多肽。在一些实施方案中,融合多肽是SPINK融合多肽。在一些实施方案中,融合多肽是SPINK Fc融合多肽。在一些实施方案中,融合多肽是SPINK Fc融合多肽。在一些实施方案中,SPINK Fc融合多肽包含SPINK5的一个或多个结构域。在一些实施方案中,SPINK5的一个或多个结构域包含SEQ ID NO:17 (E421-A695)。在一些实施方案中,来自SPINK5的一个或多个结构域包含SEQ ID NO:22 (M293-R355)。在一些实施方案中,来自SPINK5的一个或多个结构域为小鼠来源。在一些实施方案中,SPINK5的一个或多个结构域包含SEQ ID NO:15 (E490-Y757)。在一些实施方案中,来自SPINK5的一个或多个结构域包含SEQ ID NO:20 (R291-R352)。在一些实施方案中,来自SPINK5的一个或多个结构域是人源的。在一些实施方案中,SPINK Fc融合多肽包含SPINK9的一个结构域。在一些实施方案中,SPINK9的该一个结构域包含SEQ ID NO:28 (I20-C86.C22S.H48R.M49E)。在一些实施方案中,SPINK9的该一个结构域为人源的。

在一些实施方案中,小分子是蛋白酶抑制剂。在一些实施方案中,蛋白酶抑制剂是亮抑酶肽。

在任意方法的一些实施方案中,样品选自支气管肺泡灌洗液、肺实质、支气管上皮下层(sub-epithelium)、脑脊液、血液、血清、痰、唾液、粘膜刮取物、组织活检样品、泪腺分泌物、精液或汗。

本文还提供KLK5拮抗剂用于医学治疗或诊断,包括治疗和/或处理哮喘。

本文还提供SPINK融合多肽。在一些实施方案中,SPINK融合多肽是SPINK Fc融合多肽。在一些实施方案中,SPINK Fc融合多肽抑制KLK5的活性。在一些实施方案中,SPINK Fc融合多肽包含SPINK5的一个或多个结构域。在一些实施方案中,SPINK5的一个或多个结构域包含SEQ ID NO:17 (E421-A695)。在一些实施方案中,来自SPINK5的一个或多个结构域包含SEQ ID NO:22 (M293-R355)。在一些实施方案中,来自SPINK5的一个或多个结构域为小鼠来源。在一些实施方案中,SPINK5的一个或多个结构域包含SEQ ID NO:15 (E490-Y757)。在一些实施方案中,来自SPINK5的一个或多个结构域包含SEQ ID NO:20 (R291-R352)。在一些实施方案中,来自SPINK5的一个或多个结构域是人源的。在一些实施方案中,SPINK Fc融合多肽包含SPINK9的一个结构域。在一些实施方案中,SPINK9的该一个结构域包含SEQ ID NO:28 (I20-C86.C22S.H48R.M49E)。在一些实施方案中,SPINK9的该一个结构域为人源的。

在一些实施方案中,SPINK融合多肽具有小于约50 μ M-1 μ M、小于约1 μ M-500nM、小于约500nM-100nM、小于约100nM-10nM、小于约10nM-1nM或小于约1000pM-100pM的IC₅₀。在一些实施方案中,SPINK融合多肽具有小于约10nM-1nM的IC₅₀。在一些实施方案中,SPINK融合多肽具有小于约3nM-1nM的IC₅₀。在一些实施方案中,通过如本文所述的直接测定法或偶联测定法测定IC₅₀。

本文还提供如本文所述的SPINK融合多肽用于医学治疗或诊断,包括治疗和/或处理与KLK5相关的疾病。

本文还提供一种药物制剂,其包含药学有效量的如本文所述的SPINK融合多肽和可药用载体。

本文还提供的是一种治疗受试者中与KLK5相关的疾病的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的如本文所述的SPINK融合多肽。

在任何SPINK融合多肽的一些实施方案中,与KLK5相关的疾病与受试者的样品中升高的KLK5水平相关。在一些实施方案中,与KLK5相关的疾病与受试者的样品中升高的中性粒细胞数目相关。在一些实施方案中,与KLK5相关的疾病是内瑟顿综合征。在一些实施方案中,样品选自支气管肺泡灌洗液、肺实质和支气管上皮下层。在一些实施方案中,受试者是人。

附图简述

图1A和图1B:高骨膜蛋白性亚群(图1A)和低骨膜蛋白亚群(图1B)与对照的比较。将基因座依据富集组作图。八个基因座显示无可察觉的差异并且未显示。对于每个基因座,将OR作图并且相对于对照比较列出病例中的P值。

图2以Manhattan图的形式显示荟萃分析(meta-analysis)的全基因组关联结果总结。在667位成年非2型炎症性哮喘者和1,887位对照中进行全基因组单一变体分析。通过顶线指示 $P < 5 \times 10^{-8}$ 的全基因组显著性水平(用“X”标记),并且提示显著性($P < 1 \times 10^{-5}$)由底线指示(用“XX”标记)。

图3:LocusZoom39图总结染色体19上KLK基因座的结果。依据变体和rs117639512(区域中最强关联的SNP)之间连锁不平衡的程度,对变体用颜色编码。

图4A和图4B:哮喘者支气管肺泡灌洗液中升高的KLK5与骨膜蛋白水平无关。图4A)健康志愿者或重度哮喘患者的支气管肺泡灌洗液中KLK5结合性多肽的水平;图4B)重度哮喘患者中KLK5水平和预测FEV1值的关联。

图5A和图5B:重组KLK5诱导肺嗜中性粒细胞外渗和肺上皮细胞因子产生。图5A) WT或SA突变体KLK5(2 μ g/小鼠)按鼻内方式递送至小鼠中并且通过流式细胞术分析定量嗜中性粒细胞的细胞数目(依据Ly6G+CD11b+细胞定量)。图5B)将肺上皮细胞用2 μ g/ml SA突变体或WT或者在10 μ g SPINK5Fc融合多肽存在下处理。通过实时RT-PCR定量Tslp、Tnfa、IL-8和Icam1的转录物。

图6A、6B和6C:重组KLK5活性在直接测定法中被SPINK Fc融合多肽抑制。将KLK5与SPINK5M293-R355(图6A)、SPINK5E421-A695(图6B)或SPINK9(I20-C86.C22S.H48R.M49E)-Fc(本文中也可称作SPINK9.SRE.Fc)(图6C)预温育30分钟,之后添加荧光底物Boc-VPR-AMC。使用**PHERAstar®**Plus读数仪监测反应。通过线性范围内读数的线性回归计算RFU/s反应速率。从它们各自曲线的四参数拟合确定IC₅₀参数。

图7A、7B和7C:重组KLK5活性在前KLK7偶联测定法中被SPINK Fc融合多肽抑制。将KLK5与SPINK5M293-R355(图7A)、SPINK5E421-A695(图7B)或SPINK9.SRE.Fc(图7C)预温育30分钟,之后添加前KLK7和荧光底物Suc-LLVY-AMC(SEQ ID NO:29)。使用**PHERAstar®**Plus读数仪监测反应。通过线性范围内读数的线性回归计算RFU/s反应速率。从它们各自曲线的四参数拟合确定IC₅₀参数。

图8A、8B、8C和8D:重组KLK7活性部分地受SPINK Fc融合多肽抑制,但不受SPINK9.SRE.Fc或mAb1108抑制。将KLK5与SPINK5M293-R355(图8A)、SPINK5E421-A695(图

8B) 或SPINK9.SRE.Fc (图8C) 或mAb1108 (图8D) 预温育50分钟, 之后添加前KLK7和荧光底物Suc-LLVY-AMC (SEQ ID NO:29)。使用**IPHERAstar®** Plus读数仪监测反应。通过线性范围内读数的线性回归计算RFU/s反应速率。从它们各自曲线的四参数拟合确定IC₅₀参数。

图9A、9B、9C和9D: 商业抗体mAb1108是人KLK5的部分抑制剂。将20nM (图9A)、10nM (图9B)、5nM (图9C) 和2.5nM (图9D) KLK5与mAb1108温育30分钟, 之后添加荧光底物Boc-VPR-AMC。使用**IPHERAstar®** Plus读数仪监测反应。通过线性范围内读数的线性回归计算RFU/s反应速率。从各自曲线的四参数拟合确定IC₅₀参数。

图10A和图10B: 在直接测定法中SPINK9.SRE.Fc融合蛋白是KLK5的强力抑制剂。将KLK5与SPINK9.SRE.Fc融合物 (图10A) 或mAb1108 (图10B) 温育30分钟, 之后添加荧光底物Boc-VPR-AMC。使用**IPHERAstar®** Plus读数仪监测反应。通过线性范围内读数的线性回归计算RFU/s反应速率。从它们各自曲线的四参数拟合确定IC₅₀参数。

图11A和图11B: 在前KLK7偶联测定法中SPINK9.SRE.Fc融合蛋白是KLK5的强力抑制剂。在前KLK7偶联测定法中, 将KLK5与SPINK9.SRE.Fc融合物 (图11A) 或mAb1108 (图11B) 温育30分钟, 之后添加前KLK7和荧光底物Suc-LLVY-AMC (SEQ ID NO:29)。使用**IPHERAstar®** Plus读数仪监测反应。通过线性范围内读数的线性回归计算RFU/s反应速率。从各自曲线的四参数拟合确定IC₅₀值。

图12A、12B、12C和12D: SPINK9.SRE.Fc (图12A和图12C) 和mAb1108 (图12B和图12D) 以剂量依赖性方式抑制重组KLK5从前KLK7 (图12A和图12B) 和前KLK1 (图12C和图12D) 剪切信号肽。通过LC/MS检测KLK7信号肽和KLK1信号肽。预温育SPINK9.SRE.Fc或mAb1108和KLK5先于5nM KLK5与15nM前KLK7的两小时温育或0.5nM KLK5与300nM (图12C) 或355nM (图12D) 前KLK1的20分钟温育。

发明详述

本文提供使用KLK5拮抗剂的治疗方法。在一些实施方案中, 本文提供了使用KLK5拮抗剂治疗哮喘的方法。特别地, 本文提供通过向受试者施用有效量的KLK5拮抗剂, 治疗受试者中哮喘的方法, 本文中还提供基于检测KLK5中遗传性变异的存在或不存在, 预测受试者的反应或为KLK5拮抗剂治疗选择患有哮喘的受试者的方法。在一些实施方案中, 本文提供了使用KLK5拮抗剂治疗内瑟顿综合征的方法。特别地, 本文提供了使用KLK5拮抗剂治疗内瑟顿综合征的方法, 其中KLK5拮抗剂是SPINK融合多肽 (例如, SPINK Fc融合多肽)。本文也提供用于治疗或诊断哮喘的KLK5拮抗剂以及包含其的药物制剂。

I. 定义

如本文所用, 术语“KLK5”和“激肽释放酶-5”指来自任何脊椎动物来源的任何天然KLK5, 其中除非另外说明, 否则所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类 (例如, 人类) 和啮齿类 (例如, 小鼠和大鼠)。本术语涵盖“全长”、未加工的KLK5以及因细胞中加工而产生的任何形式的KLK5。本术语还涵盖天然存在的KLK5变体, 例如, 剪接变体或等位变体。在一些实施方案中, 示例性人KLK5的氨基酸序列是UNIPROT Q9Y337。在一些实施方案中, 示例性人KLK5的氨基酸序列选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 (N153D变体)、SEQ ID NO:5 (G55R变体)、和SEQ ID NO:7 (G55R、N153D变体)。在一些实施方案中, 示例性人KLK5的氨基酸序列是UNIPROT Q9Y337的氨基酸残基23-293 (扣除信号肽) 并且在SEQ ID NO:2中显示。在一些实

实施方案中,示例性人KLK5的氨基酸序列是N153D变体的氨基酸残基23-293(扣除信号肽)并且在SEQ ID NO:4中显示。在一些实施方案中,示例性人KLK5的氨基酸序列是G55R变体的氨基酸残基23-293(扣除信号肽)并且在SEQ ID NO:6中显示。在一些实施方案中,示例性人KLK5的氨基酸序列是G55R,N153D变体的氨基酸残基23-293(扣除信号肽)并且在SEQ ID NO:8中显示。

以下这个段落中的编号涉及全长未加工的KLK5。在一些实施方案中,人KLK5的氨基酸序列包含位置153处的氨基酸N。在一些实施方案中,人KLK5的氨基酸序列包含位置153处的氨基酸D。在一些实施方案中,人KLK5的氨基酸序列包含位置55处的氨基酸G。在一些实施方案中,人KLK5的氨基酸序列包含位置55处的氨基酸R。在一些实施方案中,人KLK5的氨基酸序列包含位置55处的氨基酸G和位置153处的氨基酸N。在一些实施方案中,人KLK5的氨基酸序列包含位置55处的氨基酸G和位置153处的氨基酸D。在一些实施方案中,人KLK5的氨基酸序列包含位置55处的氨基酸R和位置153处的氨基酸N。在一些实施方案中,人KLK5的氨基酸序列包含位置55处的氨基酸R和位置153处的氨基酸D。

以下这个段落中的编号涉及全长未加工的KLK5。在一些实施方案中,核酸序列人KLK5包含在位置153编码N的序列。在一些实施方案中,核酸序列人KLK5包含在位置153编码D的序列。在一些实施方案中,核酸序列人KLK5包含在位置55编码G的序列。在一些实施方案中,核酸序列人KLK5包含在位置55编码R的序列。在一些实施方案中,核酸序列人KLK5包含在位置55编码G和在位置153编码N的序列。在一些实施方案中,核酸序列人KLK5包含在位置55编码G和在位置153编码D的序列。在一些实施方案中,核酸序列人KLK5包含在位置55编码R和在位置153编码N的序列。在一些实施方案中,核酸序列人KLK5包含在位置55编码R和在位置153编码D的序列。

如本文所用,术语“SPINK5”和“丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal 5型”指来自任何脊椎动物来源的任何天然SPINK5,其中除非另外说明,否则所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类(例如,人类)和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。本术语涵盖“全长”、未加工的SPINK5以及因细胞中加工而产生的任何形式的SPINK5。本术语还涵盖天然存在的SPINK5变体,例如,剪接变体或等位变体。在一些实施方案中,示例性人SPINK5的氨基酸序列是UNIPROT Q9NQ38并且在SEQ ID NO:9中显示。在一些实施方案中,示例性人SPINK5的氨基酸序列是UNIPROT Q9NQ38的氨基酸残基23-1064(扣除信号肽)并且在SEQ ID NO:10中显示。在一些实施方案中,示例性小鼠SPINK5的氨基酸序列是UNIPROT Q5K5D4并且在SEQ ID NO:11中显示。在一些实施方案中,示例性小鼠SPINK5的氨基酸序列是UNIPROT Q5K5D4的氨基酸残基23-1064(扣除信号肽)并且在SEQ ID NO:12中显示。

如本文所用,术语“SPINK9”和“丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal 9型”指来自任何脊椎动物来源的任何天然SPINK9,其中除非另外说明,否则所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类(例如,人类)和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。本术语涵盖“全长”、未加工的SPINK9以及因细胞中加工而产生的任何形式的SPINK9。本术语还涵盖天然存在的SPINK9变体,例如,剪接变体或等位变体。在一些实施方案中,示例性人SPINK9的氨基酸序列是UNIPROT Q5DT21并且在SEQ ID NO:23中显示。在一些实施方案中,示例性人SPINK9的氨基酸序列是UNIPROT Q5DT21的氨基酸残基20-86(扣除信号肽)并且在SEQ ID NO:24中显示。

“KLK5的拮抗剂”、“KLK5拮抗剂”、“KLK5的抑制剂”或“KLK5抑制剂”是这样的物质,其干

扰KLK5的激活或功能,例如,部分或完全阻断、抑制或抵消由KLK5介导的生物学活性。例如,KLK5的拮抗剂可以指这样的任何分子,其部分或完全阻断、抑制或抵消由KLK5介导的生物学活性。KLK5拮抗剂的例子包括抗体(例如,抗-KLK5抗体)、结合多肽(例如,KLK5结合性多肽,如SPINK Fc融合多肽),多核苷酸(例如,KLK5多核苷酸拮抗剂,如短干扰性RNA(siRNA)或成簇规律间隔的短回文重复序列RNA(CRISPR-RNA或crRNA,包括具有acrRNA和tracrRNA序列的单一向导RNA(sgRNA))和小分子(例如,KLK5小分子拮抗剂,如小分子蛋白酶抑制剂)。在一些实施方案中,拮抗剂是与KLK5结合的抗体或小分子。

如本文中可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”指任何长度的核苷酸聚合物,并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或它们的类似物,或可以由DNA或RNA聚合酶或通过合成反应掺入聚合物的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,如甲基化核苷酸及它们的类似物。如果存在,可以在聚合物装配之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分打断。可以在合成后进一步修饰多核苷酸,如通过与标记物缀合。其他类型的修饰例如包括“加帽”、用类似物置换一个或多个天然存在的核苷酸,核苷酸间修饰,例如,具有不带电荷键(例如,甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酸胺化物、氨基甲酸酯等)和具有带电荷键(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些、含有侧挂部分(例如,蛋白质(例如,核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等))的那些,具有嵌入剂(例如,吡啶、补骨脂素等)的那些、含有螯合剂(例如,金属、放射性金属、硼、氧化的金属,等)的那些、含有烷基化剂的那些、具有修饰键的那些(例如, α 异头核苷酸等),以及未修饰形式的多核苷酸。另外,可以将通常存在于糖中的任何羟基取代(例如,用磷酸酯基团、磷酸酯基团取代)、用标准保护基保护、或激活以制备与额外核苷酸的额外键,或可以使其与固态或半固态支持物缀合。5'端和3'端OH可以磷酸化或用1至20个碳原子的胺或有机加帽基团部分取代。其他羟基也可以衍生化为标准的保护基。多核苷酸还可以含有本领域通常已知的类似形式的核糖或脱氧核糖的糖类,例如,包括2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基、2'-氟-或2'-叠氮基-核糖、碳环状糖类似物、 α -异头糖、差向异构糖如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖的糖类、景天庚酮糖、无环类似物和无碱基核苷类似物如甲基核糖苷。一个或多个磷酸二酯键可以被备选的连接基团替换。这些备选的连接基团包括但不限于这样的实施方案,其中磷酸酯由P(O)S(“硫酯”)、P(S)S(“二硫酯”)、(O)NR₂(“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(“甲缩醛”)替换,其中每个R或R'独立地是H或取代或未取代的烷基(1-20个C),所述烷基任选含有醚(-O-)键、芳基、链烯基、环烷基、环烯基或芳醛基(araldyl)。多核苷酸中的全部键并不需要是相同的。前述说明适用于本文提及的全部多核苷酸,包括RNA和DNA。

如本文所用的术语“多肽”指来自任何脊椎动物来源的任何天然目的多肽(例如,KLK5、SPINK5或SPINK9),其中除非另外说明,否则所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类(例如,人类)和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。本术语涵盖“全长”、未加工的多肽以及因细胞中加工而产生的任何形式的多肽。本术语还涵盖天然存在的多肽,例如,剪接变体或等位变体。

如本文所用的术语“SPINK融合多肽”指其中SPINK多肽或其片段(例如,SPINK多肽的某些结构域(例如,SPINK5和/或SPINK9)直接或间接与另一种多肽(例如,非SPINK多肽)连接的融合多肽。

如本文所用的术语“SPINK Fc融合多肽”指其中SPINK多肽或其片段(例如,SPINK多肽

的某些结构域(例如,SPINK5和/或SPINK9)直接或间接与Fc区连接的融合多肽。在一些实施方案中,Fc区选自IgG1Fc区、IgG2a Fc区和IgG4Fc区。在一些实施方案中,Fc区是IgG2a Fc区。在一些实施方案中,IgG2a Fc区是小鼠IgG2a Fc区。在一些实施方案中,Fc区是IgG1Fc区。在一些实施方案中,IgG1Fc区是人IgG1Fc区。在一些实施方案中,Fc区是IgG4Fc区。在一些实施方案中,IgG4Fc区是人IgG4Fc区。在一些实施方案中,SPINK多肽或其片段是人SPINK多肽或其片段。在一些实施方案中,SPINK多肽或其片段是小鼠SPINK多肽或其片段。可以理解,本文中提供不影响SPINK多肽、SPINK结构域或SPINK Fc融合多肽的功能和/或活性的SPINK多肽、SPINK结构域或Fc的微小序列变异,如插入、缺失、置换、尤其保守性氨基酸置换。在一些实施方案中,本文提供的SPINK Fc融合多肽可以与KLK5结合,这可以导致抑制KLK5。在一些实施方案中,SPINK多肽或其片段是SPINK5。在一些实施方案中,SPINK多肽或其片段是SPINK9。可以通过本领域已知的方法测定SPINK Fc融合多肽的功能和/或活性,所述方法包括但不限于ELISA、配体-受体结合测定法和Stat3荧光素酶测定法。

在一些实施方案中,SPINK Fc融合多肽的Fc区不拥有效应子活性(例如,不与Fc γ IIIR结合)或显示比完整IgG抗体明显更低的效应子活性。在一些实施方案中,SPINK Fc融合多肽的Fc区不触发细胞毒性,如抗体依赖的细胞毒性(ADCC)或补体依赖细胞毒性(CDC)。除非另外说明,否则“SPINK Fc融合物”、“SPINK Ig融合多肽”、“SPINK Fc融合多肽”或“SPINK Fc”在本申请全文中互换使用。

术语“小分子”指具有约2000道尔顿或更小,优选地约500道尔顿或更小的分子量的任何分子。

“亲和力”或“结合亲和力”指分子(例如,抗体,结合性多肽、多核苷酸、小分子)的单一结合位点及其结合配偶体(例如,抗原)之间总计非共价相互作用的强度。除非另外指出,否则如本文所用,“结合亲和力”指反映结合对子的成员(例如,抗体、结合性多肽、多核苷酸,小分子中任一者和抗原)之间1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶物Y的亲和力可以通常由解离常数(Kd)代表。亲和力可以通过本领域已知的常见方法测量,包括本文所述的那些方法(例如,肽底物测定法、直接测定法或偶联测定法)。

术语“抗体”在本文中以最广意义使用并且涵盖多种抗体结构物,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们显示出所需的抗原结合活性即可。

“抗体片段”指不同于完整抗体的分子,所述分子包括完整抗体的一部分,该部分结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双体抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和从抗体片段形成的多特异性抗体。

“与参考抗体结合相同表位的抗体”或“与参考抗体相同结合区结合的抗体”指在竞争测定法中阻断参考抗体与其结合配偶体(例如,抗原)结合达50%或更多的抗体,并且反过来,参考抗体在竞争测定法中阻断该抗体与其结合配偶体原结合达50%或更多。

如本文所用的术语“抗KLK5抗体”和“与KLK5结合的抗体”指这样的抗体,所述抗体能够以足够亲和力结合KLK5,从而抗体可用作靶向KLK5中的诊断药和/或治疗药。在一些实施方案中,抗KLK5抗体与不相关多肽(除KLK5之外的多肽)结合的程度小于该抗体与KLK5结合的程度约10%,如通过放射免疫测定(RIA)所测量。在一些实施方案中,与KLK5结合的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 、或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小、例如

从 10^{-8}M 至 10^{-13}M 、例如从 10^{-9}M 至 10^{-13}M 的解离常数(Kd)。在一些实施方案中,抗KLK5抗体与来自不同物种的KLK多肽之间保守的KLK5结合区(例如,表位)结合。

“阻断性抗体”或“拮抗剂抗体”是抑制或减少与之结合的抗原的生物学活性的一种抗体。优选的阻断性抗体或拮抗剂抗体基本上或彻底地抑制抗原的生物学活性。

术语“嵌合”抗体指一种这样的抗体,其中重链和/或轻链的一部分衍生自特定来源或物种,而重链和/或轻链的剩余部分衍生自不同来源或物种。

抗体的“类”指由其重链拥有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五个大类的抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些类别中的几种可以进一步划分成亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

“结合区”是与KLK5拮抗剂(例如,抗体、结合性多肽、多核苷酸、小分子)选择性结合的结合配偶体(例如,抗原)的部分。对于结合性多肽的结合配偶体,线性结合区可以是约4-15(例如,4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15)个氨基酸残基的肽部分。非线性构象结合区可以包含多肽序列的在结合性多肽结合配偶体的三维的(3D)结构中使其密切靠近的残基。

术语“全长抗体”、“完好抗体”和“完整抗体”在本文中可互换地用来指一种抗体(例如,抗KLK5抗体),所述抗体具有基本上与天然抗体结构相似的结构或具有含有Fc区的重链。

“人抗体”是这样一种抗体,其拥有对应于人或人细胞产生的抗体的氨基酸序列或从利用人抗体库或其他编码人抗体的序列的非人来源衍生。人抗体的这种定义特别排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

“人源化”抗体指包含来自非人类HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在一些实施方案中,人源化抗体将包含基本上全部的或至少1个和一般2个可变结构域,其中全部或基本上全部HVR(例如,CDR)与非人抗体的那些对应并且全部或基本上全部FR区与人抗体的那些对应。人源化抗体任选地可以包含从人抗体衍生的抗体恒定区的至少一部分。抗体的“人源化形式”例如,非人抗体,指已经历过人源化的抗体。

如本文所用,术语“高变区”或“HVR”指抗体可变结构域的下述每个区域,所述区域在序列上高变(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构上确定的环(“高变环”),和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)。通常,抗体包含六个HVR:VH中三个(H1、H2、H3)和VL中三个(L1、L2、L3)。本文中的示例性HVR包括:

(a) 出现在第26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)氨基酸残基处的高变环(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987));

(b) 出现在第24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)氨基酸残基处的CDR(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991));

(c) 出现在第27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)和93-101(H3)氨基酸残基处的抗原接触点(MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996));和

(d) (a)、(b)和/或(c)的组合,包括HVR氨基酸残基46-56(L2)、47-56(L2)、48-56(L2)、49-56(L2)、26-35(H1)、26-35b(H1)、49-65(H2)、93-102(H3)和94-102(H3)。

除非另外说明,否则本文中HVR残基和可变结构域中的其他残基(例如,FR残基)根据上文Kabat等人编号。

当谈及抗体、结合性多肽、多核苷酸或小分子时使用的术语“分离”是已经与其自然环境的组分相分离的那种。在一些实施方案中,将抗体、结合性多肽、多核苷酸或小分子纯化至大于95%或99%纯度,如通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳法)或色谱(例如,离子交换或反相HPLC)所确定。

如本文中所述的术语“单克隆抗体”指从基本上均一的抗体群体获得的抗体,即,构成该群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的结合区(例如,表位),除了可能的变体抗体之外(例如,含有天然存在突变或在产生单克隆抗体制备物期间出现),这类变体通常以微小的量存在。另外,与一般包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物相反,单克隆抗体制备物的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此,修饰语“单克隆的”指示该抗体的特征为从基本上均一的抗体群体获得,并且不得解释为要求通过任何特定方法产生该抗体。例如,可以通过多种技术产生本文所述的单克隆抗体,所述技术包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有全部或部分的人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法、用于制备单克隆抗体的这类方法和其他示例性方法。

术语“可变区”或“可变结构域”指抗体重链或轻链的参与抗体结合抗原的结构域。天然抗体重链和轻链的可变结构域(分别是VH和VL)通常具有相似的结构,每种结构域包含四个保守的构架区(FR)和三个高变区(HVR)。(参见,例如,Kindt等人,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单个VH结构域或VL结构域可能足以赋予抗原结合特异性。另外,结合特定抗原的抗体可以利用来自结合该抗原的抗体的VH或VL结构域进行分离以分别筛选互补的VL结构域或VH结构域的文库。参见,例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628

(1991)。

“相关”或“相关的”意指以任何方式将第一分析或方案的性能和/或结果与第二分析或方案的性能和/或结果比较。例如,可以在实施第二方案时使用第一分析或方案的结果和/或可以使用第一分析或方案的结果以决定是否应当进行第二分析或方案。就多核苷酸分析或方案的实施方案而言,可以使用多核苷酸表达分析或方案的结果以决定是否应当进行具体治疗方案。

“升高的表达”、“升高的表达水平”或“升高的水平”指相对于对照(如未患疾病或病症(例如,哮喘)的一名受试者或多名受试者)或内对照(例如,持家生物标志物),个体中生物标志物的表达增加或水平升高。

术语“持家生物标志物”指一般在全部细胞类型中相似存在的一个生物标志物或一组生物标志物(例如,多核苷酸和/或多肽)。在一些实施方案中,持家生物标志物是“持家基因”。“持家基因”在本文中指编码蛋白质的一个基因或一组基因,所述蛋白质的活性对维持细胞功能为必需并且一般相似地存在于全部细胞类型中。

如本文所用的术语“KLK5基因组序列”指cDNA和/或其基因组形式的KLK5基因,其可以包括内含子以及上游和下游调节序列。

术语“表达的水平”或“表达水平”通常互换使用并且通常指生物样品中生物标志物的量。“表达”通常指(例如,基因编码的和/或表观遗传的)信息借以转换成在细胞中存在和运行的结构物的过程。因此,如本文所用,“表达”可以指转录成多核苷酸、翻译成多肽,或甚至多核苷酸和/或多肽修饰(例如,翻译后修饰多肽)。转录的多核苷酸的片段、翻译的多肽的

片段或多核苷酸和/或多肽修饰(例如,翻译后修饰多肽)也应当视作表达,无论它们是否源自可变剪接或降解的转录物产生的转录物,或源自翻译后加工多肽,例如,通过蛋白酶解。“表达的基因”包括那些转录成多核苷酸作为mRNA并且随后翻译成多肽的基因,并且还包括那些转录成RNA但不翻译成多肽(例如,转运和核糖体RNA)的基因。

与受试者临床获益增加相关的生物标志物的“存在”、“量”或“水平”是生物样品中的可检测水平。这些可以通过本领域技术人员已知并且还在本文中公开的方法测量。评估的生物标志物的表达水平或量可以用来确定对治疗的反应。

“减少的表达”、“降低的表达水平”或“降低的水平”指相对于对照(如未患疾病或病症(例如,哮喘)的一名受试者)或内对照(例如,持家生物标志物),个体中生物标志物的表达减少或水平降低。

如本文所用,“参比样品”、“参比细胞”、“参比组织”、“对照样品”、“对照细胞”或“对照组织”指用于比较目的样品、细胞、组织、标准品或水平。在一个实施方案中,从相同受试者的身体的健康和/或不患病部分(例如,组织或细胞)获得参比样品、参比细胞、参比组织、对照样品、对照细胞或对照组织。例如,与患病细胞或组织毗邻的健康和/或不患病细胞或组织(例如,与肿瘤毗邻的细胞或组织)。在另一个实施方案中,从相同受试者的身体的未治疗组织和/或细胞获得参比样品。在一个实施方案中,从另一名受试者的身体的健康和/或不患病部分(例如,组织或细胞)获得参比样品、参比细胞、参比组织、对照样品、对照细胞或对照组织。在一个实施方案中,从另一名受试者的身体的未治疗的组织和/或细胞获得参比样品、参比细胞、参比组织、对照样品、对照细胞或对照组织。

如本文所用,术语“样品”指从目的受试者获得或衍生的制剂,所述制剂含有例如基于物理特征、生物化学特征、化学特征和/或生理特征待表征和/或鉴定的细胞实体和/或其他分子实体。例如,短语“疾病样品”及其变型指从目的受试者获得的任何样品,所述的目的受试者本来预期或已知含有待表征的细胞实体和/或分子实体。样品包括但不限于原代或培养的细胞或细胞系、细胞上清液、细胞裂解物、血小板、血清、血浆、玻璃体液、淋巴液、滑液、滤泡液、精液、羊水、乳、全血、血液衍生的细胞、尿、脑脊液、唾液、痰、泪、出汗、黏液、肿瘤裂解物和组织培养基、组织提取物如均化的组织、肿瘤组织、细胞提取物及其组合。

“组织样品”或“细胞样品”意指一组从受试者的组织获得的相似细胞。组织或细胞样品的来源可以是来自新鲜、冷冻和/或保存的器官、组织样品、活检样品的固体组织和/或抽吸物;血液或任何血液成分(如血清、血浆);体液如脑脊液、羊水、腹膜液或间质液;来自受试者任何妊娠或发育时间的细胞。组织样品也可以是原代或培养的细胞或细胞系。任选地,从疾病组织/器官获得组织或细胞样品。组织样品可以含有在自然界中不天然与组织混合的化合物如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素等。

试剂(例如,药物制剂)的“有效量”指按照实现所需治疗结果必需的剂量和时间段,有效实现前述结果的量。

“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如,奶牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类(例如,人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。在一些实施方案中,受试者是人。

如本文所用,术语“患者”指动物,如哺乳动物。在一个实施方案中,患者指人。

术语“药物制剂”指一种制备物,所述制备物处于这类形式从而允许其中所含的有效成

分的生物学活性有效,并且不含有对于将会施用该制剂的受试者不可接受地有毒的额外组分。

“可药用载体”指药物制剂中除有效成分之外的对受试者无毒的成分。可药用载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

如本文所用,术语“高Th2哮喘”指显示高水平的一种或多种Th2细胞相关的细胞因子(例如,IL13、IL4、IL9、IL5)或显示Th2细胞因子相关炎症的哮喘。在一些实施方案中,术语“高Th2性哮喘”可以与高嗜酸性粒细胞性哮喘互换使用。在一些实施方案中,高Th2性哮喘是Th2驱动的哮喘。在一些实施方案中,已经确定哮喘患者为嗜酸粒细胞性炎症阳性(EIP)。参见,例如,国际专利申请公开号W0 2015/061441,所述文献通过引用方式完整并入本文作为参考。在一些实施方案中,已经确定如与对照或参比水平相比,受试者具有升高水平的至少一个嗜酸粒细胞性特征标识基因。参见W02015/061441。在一些实施方案中,高Th2性哮喘是高骨膜蛋白性哮喘。在一些实施方案中,受试者具有高的血清骨膜蛋白。在一些实施方案中,受试者为十八岁或以上。在一些实施方案中,已经确定如与对照或参比水平相比,受试者具有升高水平的血清骨膜蛋白。在一些实施方案中,对照水平或参比水平是群体中骨膜蛋白的中位水平。在一些实施方案中,已经确定受试者具有20ng/ml或更高的血清骨膜蛋白。在一些实施方案中,已经确定受试者具有25ng/ml或更高的血清骨膜蛋白。在一些实施方案中,已经确定受试者具有50ng/ml或更高的血清骨膜蛋白。在一些实施方案中,血清骨膜蛋白的对照或参比水平是20ng/ml、25ng/ml或50ng/ml。在一些实施方案中,哮喘是高嗜酸性粒细胞性哮喘。在一些实施方案中,已经确定如与对照或参比水平相比,受试者具有升高的嗜酸性粒细胞计数。在一些实施方案中,对照或参比水平是群体的中位水平。在一些实施方案中,已经确定受试者具有150个或更高的嗜酸性粒细胞计数/ μ l血液。在一些实施方案中,已经确定受试者具有200个或更高的嗜酸性粒细胞计数/ μ l血液。在一些实施方案中,已经确定受试者具有250个或更高的嗜酸性粒细胞计数/ μ l血液。在一些实施方案中,已经确定受试者具有300个或更高的嗜酸性粒细胞计数/ μ l血液。在一些实施方案中,已经确定受试者具有350个或更高的嗜酸性粒细胞计数/ μ l血液。在一些实施方案中,已经确定受试者具有400个或更高的嗜酸性粒细胞计数/ μ l血液。在一些实施方案中,已经确定受试者具有450个或更高的嗜酸性粒细胞计数/ μ l血液。在一些实施方案中,已经确定受试者具有500个或更高的嗜酸性粒细胞计数/ μ l血液。在一些优选的实施方案中,已经确定受试者具有300个或更高的嗜酸性粒细胞计数/ μ l血液。在一些实施方案中,嗜酸性粒细胞是外周血嗜酸性粒细胞。在一些实施方案中,嗜酸性粒细胞是痰嗜酸性粒细胞。在一些实施方案中,受试者显示升高的FeNO水平(呼出气一氧化氮(fractional exhaled nitric oxide))和/或升高的IgE水平。例如,在一些情况下,受试者显示高于以下任意者的FeNO水平:约5ppb(每十亿份)、10ppb、15ppb、20ppb、25ppb、30ppb、35ppb、40ppb、45ppb、50ppb、60ppb、70ppb、80ppb、90ppb和100ppb。在一些情况下,受试者具有高于50IU/ml的IgE水平。

如本文所用,术语“低Th2性哮喘”、“非高Th2性哮喘”、“低2型性哮喘”、“低T2性哮喘”、“非嗜酸粒细胞性哮喘”、“粒细胞缺乏性哮喘(pauci-granulocytic asthma)”或“炎症细胞缺乏性哮喘(pauci-inflammatory asthma)”指显示低水平的一种或多种Th2细胞相关细胞因子(例如,IL13、IL4、IL9、IL5)或显示非Th2细胞因子相关炎症的哮喘。在一些实施方案中,术语低Th2性哮喘可以与低嗜酸性粒细胞性哮喘可互换使用。在一些实施方案中,已经

确定哮喘患者为嗜酸粒细胞性炎症阴性 (EIN)。参见,例如,WO 2015/061441。在一些实施方案中,低Th2性哮喘是Th17驱动的哮喘。在一些实施方案中,低Th2性哮喘是低骨膜蛋白性哮喘。在一些实施方案中,受试者为十八岁或以上。在一些实施方案中,已经确定如与对照或参比水平相比,受试者具有降低水平的血清骨膜蛋白。在一些实施方案中,对照水平或参比水平是群体中骨膜蛋白的中位水平。在一些实施方案中,已经确定受试者具有小于20ng/ml的血清骨膜蛋白。在一些实施方案中,哮喘是低嗜酸性粒细胞性哮喘。在一些实施方案中,已经确定如与对照或参比水平相比,受试者具有降低的嗜酸性粒细胞计数。在一些实施方案中,对照或参比水平是群体的中等水平。在一些实施方案中,已经确定受试者具有小于150个嗜酸性粒细胞计数/ μ l血液。在一些实施方案中,已经确定受试者具有小于100个嗜酸性粒细胞计数/ μ l血液。在某些实施方案中,已经确定受试者具有小于300个嗜酸性粒细胞计数/ μ l血液。

如本文所用,术语“治疗”(及语法变型如“治疗”或“治疗着”)指意欲改变正在接受治疗的受试者或细胞的天然过程的临床干预。想要的治疗效果包括以下一者或多者:防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、使疾病状态稳定(即,不恶化)、降低病情进展速率、或缓和疾病状态,如与未接受治疗时预期的生存期相比延长生存期和预后改善。

除非本文另外说明或明确与语境矛盾,否则将术语“一个”和“一种”和“该”及相似术语的用途在描述本文实施方案的语境下解释为涵盖单数和复数。除非另外指出,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应解释为开放式术语(即,意指“包括但不限于”)。可以理解,本文提供的方面和实施方案包括“由方面和实施方案组成”和/或“基本上由方面和实施方案组成”。

如本领域技术人员理解,对“约”某个值或参数的提及包括(并且描述)涉及该值或参数本身的实施方案。例如,提及“约X”的描述包括对“X”的描述。

术语“基本上不同”指两个数值之间程度足够高的差异,从而本领域技术人员将认定两个值(通常,一个数值与分子相关并且另一个数值与参比/对比分子相关)之间的差异在用所述值测量的生物学特征(例如,Kd值)的背景范围内有统计显著性。所述两个值之间的差异作为参比/比较分子的值的函数可以例如大于约10%、大于约20%、大于约30%、大于约40%、和/或大于约50%。

如本文所用,指术语“基本上相似”指两个数值之间程度足够高的相似性,从而本领域技术人员将认定两个值(通常,一个数值与分子相关并且另一个数值与参比/对比分子相关)之间的差异在用所述值测量的生物学特征(例如,Kd值)的背景范围内并无统计显著性。所述两个值之间的差异作为参比/比较分子的值的函数可以例如小于约20%,小于约10%,和/或小于约5%。短语“基本上正常”指基本上类似于参比(例如,正常参比)。

II. 使用KLK5拮抗剂的方法

本文提供使用KLK5拮抗剂抑制KLK5的方法。例如,本文提供用于治疗受试者中哮喘的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的KLK5拮抗剂。在一些实施方案中,KLK5拮抗剂抑制KLK5的丝氨酸蛋白酶活性。在一些实施方案中,KLK5拮抗剂选自抗体(例如,抗-KLK5抗体)、结合性多肽(例如,KLK5结合性多肽,如SPINK Fc融合多肽)、多核苷酸(例如,KLK5多核苷酸拮抗剂,如siRNA或CRISPR-RNA,包括具有CRISPR-RNA和tracrRNA序列的sgRNA),和小

分子(例如, KLK5小分子拮抗剂, 如小分子蛋白酶抑制剂)。在一些实施方案中, KLK5拮抗剂是抗体(例如, 单克隆抗体)。

本文还提供预测患有哮喘的受试者对包含KLK5拮抗剂的治疗反应的方法, 所述方法包括(a) 测量来自受试者的生物样品中的KLK5水平, (b) 将样品中检测到的KLK5水平与参比水平比较, 并且(c) 当样品中测量的KLK5水平与参比水平相比升高时, 预测受试者将对治疗有反应, 并且当样品中测量的该KLK水平与参比水平相比降低时, 预测受试者将对治疗无反应。在一些实施方案中, KLK5拮抗剂抑制KLK5的丝氨酸蛋白酶活性。在一些实施方案中, KLK5拮抗剂选自抗体(例如, 抗-KLK5抗体)、结合性多肽(例如, KLK5结合性多肽, 如SPINK Fc融合多肽)、多核苷酸(例如, KLK5多核苷酸拮抗剂, 如siRNA或CRISPR-RNA, 包括具有CRISPR-RNA和tracrRNA序列的sgRNA), 包括小分子(例如, KLK5小分子拮抗剂, 如小分子蛋白酶抑制剂)。在一些实施方案中, KLK5拮抗剂是抗体(例如, 单克隆抗体)。

本文还提供为包含KLK5拮抗剂的治疗选择患有哮喘的受试者的方法, 包括确定来自受试者的生物样品中位于KLK5基因组序列中的遗传性变异的存在或不存在, 其中遗传性变异的存在表示受试者适于KLK5拮抗剂治疗。在一些实施方案中, KLK5拮抗剂抑制KLK5的丝氨酸蛋白酶活性。在一些实施方案中, KLK5拮抗剂选自抗体(例如, 抗-KLK5抗体)、结合性多肽(例如, KLK5结合性多肽, 如SPINK Fc融合多肽)、多核苷酸(例如, KLK5多核苷酸拮抗剂, 如siRNA或CRISPR-RNA, 包括具有CRISPR-RNA和tracrRNA序列的sgRNA), 和小分子(例如, KLK5小分子拮抗剂, 如小分子蛋白酶抑制剂)。在一些实施方案中, KLK5拮抗剂是抗体(例如, 单克隆抗体)。

另外本文提供用于检测KLK5基因组序列中存在或不存在的遗传性变异的方法, 所述遗传性变异表明患有哮喘的受试者适于KLK5拮抗剂治疗, 所述方法包括(a) 使来自受试者的样品与能够检测位于KLK5基因组序列中的遗传性变异存在或不存在的试剂接触; 和(b) 确定遗传性变异的存在或不存在, 其中遗传性变异的存在表示受试者适于KLK5拮抗剂治疗。在一些实施方案中, KLK5拮抗剂抑制KLK5的丝氨酸蛋白酶活性。在一些实施方案中, KLK5拮抗剂选自抗体(例如, 抗-KLK5抗体)、结合性多肽(例如, KLK5结合性多肽, 如SPINK Fc融合多肽)、多核苷酸(例如, KLK5多核苷酸拮抗剂, 如siRNA或CRISPR-RNA, 包括具有CRISPR-RNA和tracrRNA序列的sgRNA), 和小分子(例如, KLK5小分子拮抗剂, 如小分子蛋白酶抑制剂)。在一些实施方案中, KLK5拮抗剂是抗体(例如, 单克隆抗体)。在一些实施方案中, 所述试剂选自寡核苷酸、DNA探针、RNA探针和核酶。在一些实施方案中, 试剂被标记。

本文还提供用于选择化合物以治疗与KLK5相关的疾病的方法, 所述方法包括确定受试化合物是否为KLK5拮抗剂, 其中作为KLK5拮抗剂的受试化合物适合作为治疗与KLK5相关的疾病的化合物。在一些实施方案中, KLK5拮抗剂抑制KLK5的丝氨酸蛋白酶活性。在一些实施方案中, KLK5拮抗剂选自抗体(例如, 抗-KLK5抗体)、结合性多肽(例如, KLK5结合性多肽, 如SPINK Fc融合多肽)、多核苷酸(例如, KLK5多核苷酸拮抗剂, 如siRNA或

CRISPR-RNA, 包括具有CRISPR-RNA和tracrRNA序列的sgRNA), 和小分子(例如, KLK5小分子拮抗剂, 如小分子蛋白酶抑制剂)。在一些实施方案中, KLK5拮抗剂是抗体(例如, 单克隆抗体)。

在任意方法的一些实施方案中, 哮喘与来自受试者的样品中升高的KLK5水平相关。在一些实施方案中, 哮喘与来自受试者的样品中降低的SPINK5活性相关。在一些实施方案中,

哮喘与来自受试者的样品中升高的中性粒细胞水平相关。在一些实施方案中,哮喘选自低2型性哮喘、低骨膜蛋白性哮喘和低嗜酸性粒细胞性哮喘。在一些实施方案中,哮喘与内瑟顿综合征不相关。在一些实施方案中,哮喘与编码SPINK5的基因或其基因产物中的一个或多个遗传性变异不相关。在一些实施方案中,哮喘与位于KLK5基因组序列中的遗传性变异相关。在一些实施方案中,该方法还包括基于遗传性变异的存在治疗受试者的哮喘。在一些实施方案中,遗传性变异是SNP。在一些实施方案中,遗传性变异是SNP rs117639512。

在任意方法的一些实施方案中,哮喘是持续性慢性重度哮喘伴随可能威胁生命的症状恶化急性事件(加重或骤发)。在一些实施方案中,哮喘是异位性(也称作过敏性)哮喘、非过敏性哮喘(例如,经常由呼吸道病毒(例如,流感、副流感、鼻病毒、人偏肺病毒和呼吸道合胞体病毒)感染或吸入的刺激物(大气污染物、烟雾、柴油粒子、挥发性化学品和室内或户外气体、或甚至因干冷空气)触发。在一些实施方案中,哮喘是间歇性或锻炼所致哮喘,原因在于急性或慢性初次或二次暴露于“烟”(一般是香烟、雪茄、烟斗)、吸入或“蒸发”(烟草、大麻或其他这类物质)或由最近摄入阿司匹林或相关NSAID触发的哮喘。在一些实施方案中,哮喘是轻度的或未用皮质类固醇治疗的哮喘(corticosteroid **naïve** asthma)、新诊断且未治疗过的哮喘、或先前不需要长期使用吸入型局部用或全身性类固醇控制症状(咳嗽、喘鸣、气短/呼吸困难、或胸痛)。在一些实施方案中,哮喘是慢性、皮质类固醇耐药性哮喘、皮质类固醇难治性哮喘、皮质类固醇或其他慢性哮喘控制药物无法控制的哮喘。在一些实施方案中,哮喘是中度至重度哮喘。在一些实施方案中,哮喘是高Th2性哮喘。在一些实施方案中,哮喘是重度哮喘。在一些实施方案中,哮喘是异位性哮喘、过敏性哮喘、非过敏性哮喘(例如,归因感染和/或呼吸道合胞体病毒(RSV))、锻炼所致哮喘、阿司匹林敏感/加重型哮喘、轻度哮喘、中度至重度哮喘、未用过皮质类固醇的哮喘、慢性哮喘、皮质类固醇耐药性哮喘、皮质类固醇难治性哮喘、新诊断且未治疗过的哮喘、因吸烟所致的哮喘、皮质类固醇无法控制的哮喘。在一些实施方案中,哮喘是辅助T细胞淋巴细胞2型(Th2)或2型(Th2)高、或2型(T2)驱动的哮喘。在一些实施方案中,哮喘是嗜酸粒细胞性哮喘。在一些实施方案中,哮喘是过敏性哮喘。在一些实施方案中,已经确定受试者为嗜酸粒细胞性炎症阳性(EIP)。参见W02015/061441。在一些实施方案中,哮喘是高骨膜蛋白型哮喘(例如,具有至少约任何20ng/mL、25ng/mL或50ng/mL血清的骨膜蛋白水平)。在一些实施方案中,哮喘是高嗜酸性粒细胞型哮喘(例如,至少约任何150、200、250、300、350、400个嗜酸性粒细胞计数/mL血液)。在一些实施方案中,哮喘是低Th2性哮喘或非Th2驱动的哮喘。在一些实施方案中,已经确定受试者为嗜酸粒细胞性炎症阴性(EIN)。参见W02015/061441。在一些实施方案中,哮喘是低骨膜蛋白性哮喘(例如,具有小于约20ng/mL血清的骨膜蛋白水平)。在一些实施方案中,哮喘是低嗜酸性粒细胞性哮喘(例如,小于约150个嗜酸性粒细胞计数/ μ L血液或小于约100个嗜酸性粒细胞计数/ μ L血液)。

在任意方法的一些实施方案中,样品选自脑脊液、血液、血清、痰、唾液、粘膜刮取物、组织活检样品、泪腺分泌物、精液和汗。在一些实施方案中,样品选自支气管肺泡灌洗液、肺实质和支气管上皮层。

可以基于本领域已知的任何合适标准品,定性和/或定量确定生物标志物的存在和/或表达水平/量,所述的标准品包括但不限于DNA、mRNA、cDNA、多肽、多肽片段和/或基因拷贝数。在一些实施方案中,第一样品中生物标志物的存在和/或表达水平/量如与第二样品中

存在/不存在和/或表达水平/量相比增加。在一些实施方案中,第一样品中存在/不存在和/或表达水平/量如与第二样品中生物标志物的存在和/或表达水平/量相比减少。在一些实施方案中,第二样品是参比样品、参比细胞、参比组织、对照样品、对照细胞或对照组织。本文中描述了确定基因的存在/不存在和/或表达水平/量的额外公开。在一些实施方案中,KLK5可以用作生物标志物。在一些实施方案中,SPINK5可以用作生物标志物。

在任意方法的一些实施方案中,将KLK5拮抗剂与额外的治疗剂组合施用至受试者。在一些实施方案中,额外的治疗剂是IL-13轴结合拮抗剂、IL-5轴结合拮抗剂、IL-33轴结合拮抗剂、M1prime拮抗剂、IgE拮抗剂、TRPA1拮抗剂、CRTH2拮抗剂、气管扩张剂或哮喘症状控制药物、免疫调节剂、皮质类固醇、Th2途径抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂或磷酸二酯酶抑制剂。在一些实施方案中,IL-13轴结合拮抗剂是抗IL-13抗体。在一些实施方案中,抗IL-13抗体是来金珠单抗。在一些实施方案中,IL-5轴结合拮抗剂是IL-5结合拮抗剂或IL-5受体结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-33轴结合拮抗剂是IL-33结合拮抗剂或ST2结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-33结合拮抗剂是抗IL-33抗体。在一些实施方案中,M1prime拮抗剂是quilizumab。

在任意方法的一些实施方案中,KLK5拮抗剂用于皮下、静脉内、肌肉内、局部、经口、经皮、腹腔内、眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、心室内或鼻内施用。在一些实施方案中,皮下施用KLK5拮抗剂。在一些实施方案中,KLK5拮抗剂用于人类受试者中。

在任意方法的一些实施方案中,升高的表达指如与参比样品、参比细胞、参比组织、对照样品、对照细胞或对照组织相比,通过现有已知的标准方法(如本文所述的那些方法)所检测,生物标志物(例如,多肽或核酸(例如,基因或mRNA))的水平总体增加约以下任一者:10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大。在一些实施方案中,升高的表达指样品中生物标志物的表达水平/量增加,其中增加是参比样品、参比细胞、参比组织、对照样品、对照细胞或对照组织中各自生物标志物的表达水平/量的至少约以下任一者:1.5X、1.75X、2X、3X、4X、5X、6X、7X、8X、9X、10X、25X、50X、75X或100X。在一些实施方案中,升高的表达指如与参比样品、参比细胞、参比组织、对照样品、对照细胞、对照组织或内对照(例如,持家基因)相比总体增加大于约1.5倍、约1.75倍、约2倍、约2.25倍、约2.5倍、约2.75倍、约3.0倍或约3.25倍。在一些实施方案中,生物标志物是参与KLK5途径的分子。在一些实施方案中,分子是SPINK5。在一些实施方案中,分子是KLK5。在一些实施方案中,分子是KLK5的生物学底物。在一些实施方案中,生物学底物选自KLK7、KLK8、KLK14、PAR2和整联蛋白/组织基质蛋白。

在任意方法的一些实施方案中,减少的表达指如与参比样品、参比细胞、参比组织、对照样品、对照细胞或对照组织相比,通过现有已知的标准方法(如本文所述的那些方法)所检测,生物标志物(例如,多肽或核酸(例如,基因或mRNA))的水平总体减少约以下任一者:10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大。在一些实施方案中,减少的表达指样品中生物标志物的表达水平/量减少,其中减少是参比样品、参比细胞、参比组织、对照样品、对照细胞或对照组织中各自生物标志物的表达水平/量的至少约以下任一者:0.9X、0.8X、0.7X、0.6X、0.5X、0.4X、0.3X、0.2X、0.1X、0.05X或0.01X。

可以通过众多方法分析样品中多种生物标志物的存在和/或表达水平/量,其中所述方

法许多是本领域已知的并且为技术人员所理解,包括但不限于免疫组织化学(“IHC”)、蛋白质印迹分析、免疫沉淀法、分子结合测定法、ELISA、ELIFA、荧光激活细胞分选法(“FACS”)、MassARRAY、蛋白质组学、基于血液的定量性测定法(例如,血清-ELISA)、生物化学酶活性测定法、原位杂交、DNA印迹分析、RNA印迹分析、全基因组测序、聚合酶链反应(“PCR”)包含定量实时PCR(“qRT-PCR”)和其他扩增型检测方法,例如,分支的DNA、SISBA、TMA等),RNA-Seq、FISH、微阵列分析、基因表达谱分析,和/或基因表达连续分析(“SAGE”),以及可以通过蛋白、基因和/或组织阵列分析实施的多种类型测定法的任一者。例如Ausubel等人编著,1995,Current Protocols In Molecular Biology,单元2(RNA印迹法)、单元4(DNA印迹法)、单元15(免疫印迹法)和单元18(PCR分析)中存在评价基因和基因产物的状态的常见方案。也可以使用多重免疫测定法,如从Rules Based Medicine或Meso Scale Discovery(“MSD”)可获得的那些方法。

III. KLK5拮抗剂

本文提供用于本文所述的任何方法(例如,治疗或诊断哮喘或内瑟顿综合征的方法)中的KLK5拮抗剂。在一些实施方案中,KLK5拮抗剂选自抗体(例如,抗-KLK5抗体)、结合性多肽(例如,KLK5结合性多肽,如SPINK Fc融合多肽)、多核苷酸(例如,KLK5多核苷酸拮抗剂,如siRNA或CRISPR-RNA,包括具有CRISPR-RNA和tracrRNA序列的sgRNA),和小分子(例如,KLK5小分子拮抗剂,如小分子蛋白酶抑制剂)。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中,抗体是全长IgG1抗体。可以在下文的A.-E.部分中找到对KLK5拮抗剂的详细描述。

例如,根据以上实施方案中任一项的KLK5拮抗剂与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的任意氨基酸序列的一个或多个残基结合。在任何KLK5拮抗剂的一些实施方案中,KLK5拮抗剂与选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的任意氨基酸序列的一个或多个残基结合。在一些实施方案中,KLK5拮抗剂与氨基酸序列SEQ ID NO:1(UniProt No.Q9Y337的氨基酸残基1-293)的一个或多个残基结合。在一些实施方案中,KLK5拮抗剂与氨基酸序列SEQ ID NO:1(UniProt No.Q9Y337的氨基酸残基1-293)结合。在一些实施方案中,KLK5拮抗剂与KLK5上的特异性结合区域结合。在一些实施方案中,结合区位于KLK5的活性部位内部。在一些实施方案中,结合区约包含KLK5氨基酸残基中的1、2、3、4、5、6、7、8、9和/或10个任意氨基酸残基。在一些实施方案中,结合区包含一个或多个KLK5氨基酸残基,所述氨基酸残基选自全长未加工的KLK5(即,包含信号肽)的位置108、147、150、153、168和245处的氨基酸残基。

在一些实施方案中,结合区包含在KLK5拮抗剂的任何原子的约10、9、8、7、6、5、4、3、2和/或1埃(Å)中任意者范围内的氨基酸残基。在一些实施方案中,结合区包含在KLK5拮抗剂的任何原子的小于10、9、8、7、6、5、4、3、2和/或1 Å中任意者范围内的氨基酸残基。在一些实施方案中,结合区包含在KLK5拮抗剂的任何原子的于10-9、9-8、8-7、7-6、6-5、5-4、4-3、3-2和/或2-1 Å中任意者之间范围内的氨基酸残基。在一些实施方案中,结合区包含在KLK5拮抗剂的任何原子的约**9.5 Å、9 Å、8.5 Å、8 Å、7.5 Å、7 Å、6.5 Å、6 Å、5.5 Å、5 Å、4.5 Å、4 Å、3.5 Å、3 Å、2.5 Å、2 Å、1.5 Å**和/或**1 Å**中

任意者范围内的氨基酸残基。可以例如,通过测定与结合区复合的KLK5拮抗剂的晶体结构或通过进行氢/氘交换,确定KLK5拮抗剂的接触结合区的氨基酸残基(即,互补位)。

另外,根据以上实施方案中任一项的KLK5拮抗剂基本上或彻底地抑制KLK5的生物学活性。在一些实施方案中,KLK5的生物学活性是丝氨酸蛋白酶活性。在一些实施方案中,KLK5的生物学活性是胰蛋白酶解样(tryptic-like)丝氨酸蛋白酶活性。在一些实施方案中,KLK5的生物学活性是KLK5促进的人平滑肌细胞增殖和收缩。在一些实施方案中,KLK5的生物学活性是KLK5诱导的炎性细胞因子、趋化因子和黏附分子的上皮表达。在一些实施方案中,KLK5的生物学活性是KLK5诱导的上皮产生嗜中性粒细胞趋化性细胞因子和嗜中性粒细胞内流入肺组织。在一些实施方案中,抑制KLK5的生物学活性至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%中任意者和/或更多。在一些实施方案中,抑制KLK5的生物学活性约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%中任意者和/或更多。在一些实施方案中,抑制KLK5的生物学活性在20-30%、30-40%、40-50%、50-60%、60-70%、70-80%、80-90%和/或90-100%中任意者之间。

在任何KLK5拮抗剂的一些实施方案中,KLK5拮抗剂基本上或彻底地抑制SPINK5与KLK5结合。在一些实施方案中,抑制SPINK5与KLK5的结合至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%中任意者和/或更多。在一些实施方案中,抑制SPINK5与KLK5的结合约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%中任意者和/或更多。在一些实施方案中,抑制SPINK5与KLK5的结合在20-30%、30-40%、40-50%、50-60%、60-70%、70-80%、80-90%和/或90-100%中任意者之间。

在任何KLK5拮抗剂的一些实施方案中,KLK5拮抗剂对KLK5具有小于约 10^{-7} nM、 10^{-8} nM、 10^{-9} nM、 10^{-10} nM、 10^{-11} nM、 10^{-12} nM和/或 10^{-13} nM中任意者的结合亲和力(解离常数)。在一些实施方案中,KLK5拮抗剂对KLK5具有小于 10^{-7} nM、 10^{-8} nM、 10^{-9} nM、 10^{-10} nM、 10^{-11} nM、 10^{-12} nM和/或 10^{-13} nM中任意者的结合亲和力。

在任何KLK5拮抗剂的一些实施方案中,KLK5拮抗剂具有小于约1000nM、500nM、100nM、50nM、10nM、5nM、1nM、500pM、100pM、50pM、10pM、5pM和/或1pM中任何者的 IC_{50} 。在一些实施方案中,KLK5拮抗剂具有小于1000nM、500nM、100nM、50nM、10nM、5nM、1nM、500pM、100pM、50pM、10pM、5pM和/或1pM中任何者的 IC_{50} 。在一些实施方案中,KLK5拮抗剂具有在约50 μ M-1 μ M、1 μ M-500nM、500nM-100nM、100nM-10nM、10nM-1nM、1000pM-500pM、500pM-200pM、200pM-150pM、150pM-100pM、100pM-10pM和/或10pM-1pM中任何者的 IC_{50} 。

A. 抗体

本文提供分离的用于本文所述方法中的抗KLK5抗体。在以上实施方案的任一项中,抗KLK5抗体是人源化的。另外,根据以上实施方案中任一项的抗KLK5抗体是单克隆抗体,包括嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在一些实施方案中,抗KLK5抗体是抗体片段,例如,Fv、Fab、Fab'、scFv、双体抗体或F(ab')₂片段。在一些实施方案中,抗KLK5抗体是全长IgG1抗体。在一些实施方案中,抗KLK5抗体是小鼠单克隆IgG2B抗体。在一些实施方案中,小鼠单克隆IgG2B抗体是mAb1108(克隆#193318,R&D Systems,明尼阿波利斯,MN)。

在又一个方面,根据以上实施方案中任一项的抗KLK5抗体可以并入单独或组合的如下部分中所述的任何特征:

1. 亲和力

在一些实施方案中,本文提供的抗KLK5抗体具 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 和/或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如, 10^{-8}M 或更小,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如, 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(Kd)。在一个实施方案中,通过放射标记抗原结合测定法(RIA)测量Kd。在一个实施方案中,用KLK5抗体的Fab形式及其抗原进行RIA。例如,通过以下方式测量Fab对抗原的溶液结合亲和力:在未标记抗原的滴定系列存在下用最低浓度的(^{125}I)的标记抗原平衡Fab,随后用抗Fab抗体包被的平板捕获结合的抗原(参见,例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了建立该测定法的条件,将**MICROTITER®**多孔板(Thermo Scientific)用50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗Fab捕获抗体(Cappel Labs)包被过夜并随后用PBS中的2% (w/v) 牛血清白蛋白在室温(大约23 $^{\circ}\text{C}$)封闭二至五小时。在不吸附性平板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM [^{125}I]-抗原与目的Fab的连续稀释物混合(例如,与Presta等人,Cancer Res.57:4593-4599(1997)中评估抗VEGF抗体Fab-12一致)。随后将目的Fab温育过夜;然而,温育可以持续较长时间(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获平板用于在室温温育(例如,1小时)。随后移除溶液并将平板用PBS中的0.1% 聚山梨醇酯20(**TWEEN-20®**)洗涤8次。当平板干燥后,添加150 μl /孔闪烁体(MICROSCINT-20™;Packard),并且将平板在TOPCOUNT™ γ 计数器(Packard)上计数10分钟。选择产生小于或等于20%最大结合作用的每种Fab的浓度用于竞争性结合测定法中。

根据另一个实施方案,使用**BIACORE®**表面等离子体共振测定法测量Kd。例如,使用**BIACORE®-2000**或**BIACORE®-3000**(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)的测定法在25 $^{\circ}\text{C}$ 采用固定化抗原CM5芯片以约10个响应单位(RU)进行。在一个实施方案中,根据供应商说明书,以盐酸N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore, Inc.)。将抗原用10mM乙酸钠, pH 4.8稀释至5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (约0.2 μM),随后以5 μl /分钟的流速注射以实现偶联多肽的大约10个响应单位(RU)。注射抗原后,注入1M乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量,在25 $^{\circ}\text{C}$ 以大约25 μl /分钟的流速注入含0.05% 聚山梨醇酯20(TWEEN-20™)表面活性剂的PBS(PBST)中Fab的二倍连续稀释物(例如,0.78nM至500nM)。使用简单一对一Langmuir结合模型(**BIACORE®** 评价软件3.2版),通过同时拟合结合和解离传感图(sensorgram),计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。将平衡解离常数(Kd)计算为比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。参见,例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果通过以上表面等离子体共振测定法显示结合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,则可以使用荧光猝灭技术测定结合速率,其中在如光谱仪(如配备止流(stop-flow)的光谱仪(Aviv Instruments)或具有搅拌型比色皿的8000-系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic))中所测量的增加浓度的抗原存在下,所述荧光猝灭技术在25 $^{\circ}\text{C}$ 测量在PBS, pH 7.2中的20nM抗抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)增加或减少。

2. 抗体片段

在一些实施方案中,本文提供的抗KLK5抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段和下文描述的其他片段。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见例如Pluckthün,引自The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编著,

(Springer-Verlag, New York, 第269-315页(1994));还参见WO 93/16185;和美国专利号5,571,894和5,587,458。关于包含救援受体(salvage receptor)结合表位残基和具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利号5,869,046。

双体抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,所述两个抗原结合位点可以是双价或双特异性的。参见例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003);和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。三体抗体和四体抗体也在Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)中描述。

单结构域抗体是包含抗体的全部或一部分重链可变结构域或全部或一部分轻链可变结构域的抗体片段。在一些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA;参见,例如,美国专利号6,248,516)。

抗体片段可以通过多种技术产生,所述多种技术包括但不限于蛋白酶解消化完整抗体以及由重组宿主细胞产生(例如,大肠杆菌或噬菌体),如本文所述。

3. 嵌合和人源化抗体

在一些实施方案中,本文提供的抗KLK5抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体例如在美国专利号4,816,567;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)中描述。在一个例子中,嵌合抗体包含非人类可变区(例如,源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类如猴的可变区)和人类恒定区。在又一个例子中,嵌合抗体是“类转换”抗体,其中类或亚类已经相对亲本抗体发生改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

在一些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。一般,将非人抗体人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含其中HVR(例如,CDR)(或其部分)衍生自非人类抗体并且FR(或其部分)衍生自人抗体序列的一个或多个可变结构域。人源化抗体任选地也将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,将人源化抗体中的一些FR残基置换为来自非人类抗体(例如,从中衍生HVR残基的抗体)的相应残基,例如,以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

人源化抗体和制造它们的方法在例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中,并且例如还在Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);Queen等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利号5,821,337,7,527,791,6,982,321,和7,087,409;Kashmiri等人,Methods36:25-34(2005)(描述特异性决定区(SDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述“表面重塑”);Dall'Acqua等人,Methods 36:43-60(2005)(描述“FR改组”);和Osbourne等人,Methods 36:61-68(2005)和Klimka等人,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述针对FR改组的“导向选择”方案)中综述。

可以用于人源化的人构架区包括但不限于:使用“最佳配合”法选择的构架区(参见,例如,Sims等人,J.Immunol.151:2296(1993));从具有特定亚组的轻链可变区或重链可变区的人抗体的共有序列衍生的构架区(参见,例如,Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);和Presta等人,J.Immunol.,151:2623(1993));人成熟(体细胞突变)构架区或人种系构架区(参见,例如,Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));和从筛选FR文库衍生的构架区(参见,例如,Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

4. 人抗体

在一些实施方案中,本文提供的抗KLK5抗体是人抗体。可以使用本领域已知的多种技术产生人抗体。人抗体总体上在van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74 (2001) 和Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459 (2008) 中描述。

可以通过施用免疫原至转基因动物制备人抗体,其中所述转基因动物已经被修饰成响应于抗原攻击而产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。这类动物一般含有替换内源免疫球蛋白基因座或在染色体外存在或随机整合入动物染色体的全部或部分人免疫球蛋白基因座。在这类转基因小鼠中,内源免疫球蛋白基因座通常已经失活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125 (2005)。还参见,例如,描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584;描述**HuMab®**技术的美国专利号5,770,429;描述**K-MOUSE®**技术的美国专利号7,041,870,和描述**VelociMouse®**技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900。可以进一步修饰来自这类动物产生的完整抗体的人可变区,例如,通过与不同的人类恒定区组合。

也可以通过基于杂交瘤的方法产生人抗体。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤细胞系和小鼠-人杂合骨髓瘤细胞系。(参见,例如,Kozbor J.Immunol.,133:3001 (1984);Brodeur等人,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页 (Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);和Boerner等人,J.Immunol.,147:86 (1991))。借助人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体还在Li等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562 (2006) 中描述。额外的方法包括例如在美国专利号7,189,826 (描述从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体) 和Ni,Xiandai Mianyixue,26 (4):265-268 (2006) (描述人-人杂交瘤) 中描述的那些。人杂交瘤技术(三体瘤技术)还在Vollmers和Brandlein,Hist.&Histopath.,20 (3):927-937 (2005) 及Vollmers和Brandlein,Methods Find Exp.Clin.Pharmacol.,27 (3):185-91 (2005) 中描述。

也可以通过分离从人衍生的噬菌体展示文库中选择的Fv克隆可变结构域序列产生人抗体。这类可变结构域序列随后可以与所需的人恒定结构域组合。下文描述用于从抗体文库选出人抗体的技术。

5. 文库衍生的抗体

可以通过对组合文库筛选具有所需活性或活性的抗体,分离抗KLK5抗体。例如,本领域已知用于产生噬菌体展示文库并对这类文库筛选拥有所需结合特征的抗体的多种方法。这类方法例如综述于Hoogenboom等人Methods Mol.Biol.178:1-37 (O'Brien等人编著,Human Press,Totowa,NJ,2001) 中描述并且还例如在McCafferty等人,Nature 348:552-554;Clackson等人,Nature 352:624-628 (1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597 (1992);Marks和Bradbury,Methods Mol.Biol.248:161-175 (Lo编著,Human Press,Totowa,NJ,2003);Sidhu等人,J.Mol.Biol.338 (2):299-310 (2004);Lee等人,J.Mol.Biol.340 (5):1073-1093 (2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101 (34):12467-12472 (2004);和Lee等人,J.Immunol.Methods 284 (1-2):119-132 (2004) 中描述。

在某些噬菌体展示法中,VH基因和VL基因库分别由聚合酶链反应 (PCR) 克隆并且在噬菌体文库中随机重组,其中随后可以对所述噬菌体文库筛选结合抗原的噬菌体,如Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455 (1994) 中所述。噬菌体一般将抗体片段展示为单链Fv

(scFv) 片段或展示为 Fab 片段。来自自己免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体, 无需构建杂交瘤。备选地, 可以 (例如, 从人) 克隆天然库以在不进行任何免疫的情况下, 提供针对广泛类型非自身抗原的抗体和还针对自身抗原的抗体的单一来源, 如 Griffiths 等人, EMBO J, 12:725-734 (1993) 所述。最后, 也可以通过从干细胞克隆未重排的 V-基因区段并使用含有随机序列以编码高度可变的 CDR3 区并实现体外重排的 PCR 引物, 合成地产生原初文库, 如 Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992) 所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公布例如包括: 美国专利号 5,750,373 和美国专利公开号 2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936 和 2009/0002360。

将从人抗体文库分离的抗体或抗体片段视为本文中的人抗体或人抗体片段。

6. 多特异性抗体

在一些实施方案中, 本文提供的抗 KLK5 抗体是多特异性抗体, 例如, 双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在一些实施方案中, 所述结合特异性之一针对 KLK5, 并且另一种特异性针对任何其他抗原。在一些实施方案中, 双特异性抗体可以与 KLK5 的两个不同表位结合。也可以利用双特异性抗体使细胞毒药物局限于表达 KLK5 的细胞。双特异性抗体可以制备为全长抗体或抗体片段。

用于产生多特异性抗体的技术包括但不限于重组共表达具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对 (参见 Milstein 和 Cuello, Nature 305:537 (1983))、WO 93/08829 和 Traunecker 等人, EMBO J. 10:3655 (1991)) 和“结入扣”工程化 (例如, 参见美国专利号 5,731,168)。也可以通过以下方式产生多特异性抗体: 工程化静电转向效应用于产生抗体 Fc-异二聚体分子 (WO 2009/089004A1); 交联两个或更多个抗体或片段 (例如, 参见美国专利号 4,676,980, 和 Brennan 等人, Science, 229:81 (1985)); 使用亮氨酸拉链以产生双特异性抗体 (例如, 参见 J. Immunol., 148 (5):1547-1553 (1992)); 使用“双体抗体 (diabody)”技术以产生双特异性抗体片段 (例如, 参见 Hollinger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); 和使用单链 Fv (sFv) 二聚体 (例如, 参见 Gruber 等人, J. Immunol., 152:5368 (1994)); 以及制备三特异性抗体, 如在例如 Tutt 等人, J. Immunol. 147:60 (1991) 中所述那样。

本文中还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化抗体, 包括“章鱼抗体 (Octopus antibody)” (参见, 例如 US 2006/0025576A1)。

本文的抗体或片段还包括“双重功能 Fab (Dual Acting FAb)”或“DAF”, 其包含与目的多肽 (如 KLK5) 以及另一种不同抗原结合的抗原结合位点 (例如参见, US 2008/0069820)。

B. KLK5 结合性多肽

还提供结合 KLK5 的结合性多肽 (KLK5 结合性多肽) 用于本文所述方法中。在一些实施方案中, KLK5 结合性多肽是 KLK5 拮抗剂。在一些实施方案中, KLK5 结合性多肽是融合多肽。在一些实施方案中, 融合多肽是 SPINK 融合多肽。在一些实施方案中, SPINK 融合多肽是 SPINK Fc 融合多肽。在一些实施方案中, SPINK Fc 融合多肽包含 2 条 SPINK 多肽或其片段。在任何结合性多肽的一些实施方案中, 2 条 SPINK 多肽或其片段各自包含 SPINK5 的一个或多个结构域。在一些实施方案中, 2 条 SPINK5 多肽或其片段各自包含 1、2、3、4、5、6、7 和/或 8 个 Kazal 结构域。在一些实施方案中, 2 条 SPINK5 多肽或其片段各自包含 1 个 Kazal 结构域 (即, 2 个 Kazal

结构域/SPINK5Fc融合多肽)。在一些实施方案中,2条SPINK5多肽或其片段各自包含4个Kazal结构域(即,8个Kazal结构域/SPINK5Fc融合多肽)。在一些实施方案中,4个Kazal结构域是Kazal结构域6、7、8和/或9。在一些实施方案中,Kazal结构域6、7、8和/或9来自小鼠SPINK5 (UNIPROT Q5K5D4)。在一些实施方案中,Kazal结构域6、7、8和/或9包含来自小鼠SPINK5 (UNIPROT Q5K5D4) 的氨基酸残基E421-A695。在一些实施方案中,SPINK5Fc融合多肽包含SEQ ID NO:17的SPINK5氨基酸序列。在一些实施方案中,SPINK5Fc融合多肽的Fc区选自IgG1Fc区、IgG2a Fc区和IgG4Fc区。在一些实施方案中,Fc区是IgG2a Fc区。在一些实施方案中,IgG2a Fc区是小鼠IgG2a Fc区。在一些实施方案中,SPINK5Fc融合多肽包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,2条SPINK5多肽或其片段各自包含1个Kazal结构域(即,2个Kazal结构域/SPINK5Fc融合多肽)。在一些实施方案中,1个Kazal结构域是Kazal结构域4。在一些实施方案中,Kazal结构域4来自小鼠SPINK5 (UNIPROT Q5K5D4)。在一些实施方案中,Kazal结构域4包含来自小鼠SPINK5 (UNIPROT Q5K5D4) 的氨基酸残基M293-R355。在一些实施方案中,SPINK5Fc融合多肽的Fc区选自IgG1Fc区、IgG2a Fc区和IgG4Fc区。在一些实施方案中,Fc区是IgG2a Fc区。在一些实施方案中,IgG2a Fc区是小鼠IgG2a Fc区。在一些实施方案中,SPINK5Fc融合多肽包含SEQ ID NO:22的SPINK5氨基酸序列。在一些实施方案中,SPINK5Fc融合多肽包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在一些实施方案中,4个Kazal结构域是Kazal结构域8、9、10和/或11。在一些实施方案中,Kazal结构域8、9、10和/或11来自人SPINK5 (UNIPROT Q9NQ38)。在一些实施方案中,Kazal结构域8、9、10和/或11包含来自人SPINK5 (UNIPROT Q9NQ38) 的氨基酸残基E490-Y757。在一些实施方案中,SPINK5Fc融合多肽包含SEQ ID NO:15的SPINK5氨基酸序列。在一些实施方案中,SPINK5Fc融合多肽的Fc区选自IgG1Fc区、IgG2a Fc区和IgG4Fc区。在一些实施方案中,Fc区是IgG1Fc区。在一些实施方案中,IgG1Fc区是人IgG1Fc区。在一些实施方案中,人IgG1Fc区在位置356处具有氨基酸E。在一些实施方案中,人IgG1Fc区在位置358处具有氨基酸M。在一些实施方案中,SPINK5Fc融合多肽包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc区是IgG4Fc区。在一些实施方案中,IgG4Fc区是人IgG4Fc区。在一些实施方案中,人IgG4Fc区在位置228处具有氨基酸S。在一些实施方案中,人IgG4Fc区在位置228处具有氨基酸P。在一些实施方案中,SPINK5Fc融合多肽包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在一些实施方案中,2条SPINK5多肽或其片段各自包含1个Kazal结构域(即,2个Kazal结构域/SPINK5Fc融合多肽)。在一些实施方案中,1个Kazal结构域是Kazal结构域5。在一些实施方案中,Kazal结构域5来自人SPINK5 (UNIPROT Q9NQ38)。在一些实施方案中,Kazal结构域5包含来自人SPINK5 (UNIPROT Q9NQ38) 的氨基酸残基R291-R352。在一些实施方案中,SPINK5Fc融合多肽的Fc区选自IgG1Fc区、IgG2a Fc区和IgG4Fc区。在一些实施方案中,Fc区是IgG1Fc区。在一些实施方案中,IgG1Fc区是人IgG1Fc区。在一些实施方案中,人IgG1Fc区在位置356处具有氨基酸E。在一些实施方案中,人IgG1Fc区在位置358处具有氨基酸M。在一些实施方案中,SPINK5Fc融合多肽包含SEQ ID NO:20的SPINK5氨基酸序列。在一些实施方案中,SPINK5Fc融合多肽包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc区是IgG4Fc区。在一些实施方案中,IgG4Fc区是人IgG4Fc区。在一些实施方案中,人IgG4Fc区在位置228处具有氨基酸S。在一些实施方案中,人IgG4Fc区在位置228处具有氨基酸P。在一些实施方案中,SPINK5Fc融合多肽包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

在任何结合性多肽的一些实施方案中,2条SPINK多肽或其片段各自包含SPINK9的1个结构域。在一些实施方案中,2条SPINK9多肽或其片段各自包含1个Kazal结构域(即,2个Kazal结构域/SPINK9Fc融合多肽)。在一些实施方案中,1个Kazal结构域是Kazal结构域1。在一些实施方案中,Kazal结构域1来自人SPINK9 (UNIPROT Q5DT21)。在一些实施方案中,Kazal结构域1包含来自人SPINK9 (UNIPROT Q5DT21)的氨基酸残基I20-C86。在一些实施方案中,来自人SPINK9的I20-C86包含位置22处的氨基酸C。在一些实施方案中,来自人SPINK9的I20-C86包含位置22处的氨基酸S。在一些实施方案中,来自人SPINK9的I20-C86包含位置48处的氨基酸H。在一些实施方案中,来自人SPINK9的I20-C86包含位置48处的氨基酸R。在一些实施方案中,来自人SPINK9的I20-C86包含位置49处的氨基酸M。在一些实施方案中,来自人SPINK9的I20-C86包含位置49处的氨基酸E。在一些实施方案中,来自人SPINK9的I20-C86包含SEQ ID NO:28的SPINK9氨基酸序列。在一些实施方案中,SPINK9Fc融合多肽的人Fc区选自IgG1Fc区、IgG2a Fc区和IgG4Fc区。在一些实施方案中,Fc区是IgG1Fc区。在一些实施方案中,IgG1Fc区是人IgG1Fc区。在一些实施方案中,人IgG1Fc区在位置356处具有氨基酸E。在一些实施方案中,人IgG1Fc区在位置358处具有氨基酸M。在一些实施方案中,SPINK9Fc融合多肽包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc区是IgG2a Fc区。在一些实施方案中,IgG2a Fc区是人IgG2a Fc区。在一些实施方案中,SPINK9Fc融合多肽包含SEQ ID NO:27氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc区是IgG4Fc区。在一些实施方案中,IgG4Fc区是人IgG4Fc区。在一些实施方案中,人IgG4Fc区在位置228处具有氨基酸S。在一些实施方案中,人IgG4Fc区在位置228处具有氨基酸P。在一些实施方案中,SPINK9Fc融合多肽包含SEQ ID NO:26氨基酸序列。

可以使用已知的多肽合成方法化学合成或可以使用重组技术制备和纯化KLK5结合性多肽。KLK5结合性多肽通常具有至少约5个氨基酸长度,备选地至少约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、和/或100个氨基酸长度和/或更大长度,其中这类KLK5结合性多肽能够结合至、优选地特异性结合至KLK5。

可以在无需过多实验的情况下使用熟知的技术鉴定KLK5结合性多肽。在这个方面,应当指出用于筛查多肽文库中能够与KLK5特异性结合的结合性多肽的技术是本领域熟知的(参见,例如,美国专利号5,556,762、5,750,373、4,708,871、4,833,092、5,223,409、5,403,484、5,571,689、5,663,143;PCT公开号0 84/03506和W084/03564;Geysen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,81:3998-4002(1984);Geysen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,82:178-182(1985);Geysen等人,引自Synthetic Peptides as Antigens,130-149(1986);Geysen等人,J.Immunol.Meth.,102:259-274(1987);Schoofs等人,J.Immunol.,140:611-616(1988),Cwirla,S.E.等人(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:6378;Lowman,H.B.等人(1991)Biochemistry,30:10832;Clackson,T.等人(1991)Nature,352:624;Marks,J.D.等人(1991),J.Mol.Biol.,222:581;Kang,A.S.等人(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:8363;和Smith,G.P.(1991)Current Opin.Biotechnol.,2:668)。

美国专利号5,723,286、5,432,018、5,580,717、5,427,908、5,498,530、5,770,434、5,734,018、5,698,426、5,763,192和5,723,323中还公开了产生肽文库和筛选这些文库的方法。

C. KLK5小分子拮抗剂

本文提供作为KLK5小分子拮抗剂用于上文所述方法的小分子。在一些实施方案中,小分子拮抗剂基本上或彻底地抑制KLK5生物学活性。在一些实施方案中,生物学活性是丝氨酸蛋白酶活性。在一些实施方案中,生物学活性是胰蛋白酶解样丝氨酸蛋白酶活性。在一些实施方案中,KLK5小分子拮抗剂是蛋白酶抑制剂。在一些实施方案中,蛋白酶抑制剂是亮抑酶肽。

小分子优选地是除如本文定义的结合性多肽或抗体之外的有机分子,所述有机分子优选地与如本文所述的KLK5特异性结合。可以使用已知的方法(参见,例如,PCT公开号W000/00823和W000/39585),鉴定和化学合成结合性有机小分子。结合性有机小分子通常在大小方面小于约2000道尔顿,备选地在大小方面小于约1500、750、500、250或200道尔顿,其中可以在无需过多实验的情况下使用熟知的技术鉴定能够与如本文所述的多肽结合、优选地特异性结合的这类有机小分子。在这个方面,应当指出,本领域熟知筛选能够与目的多肽靶结合的有机小分子文库分子的技术(参见,例如,PCT公开号W000/00823和W000/39585)。结合性有机小分子可以例如是醛、酮、肟、腈、半卡巴腈类、卡巴肟、伯胺、仲胺、叔胺、N-取代的肟、酰肟、醇、醚、硫醇、硫醚、二硫化物、羧酸、酯、酰胺、尿素、氨基甲酸酯、碳酸酯、缩酮、缩硫酮、乙缩醛、缩硫醛、芳基卤化物、芳基磺酸酯、烷基卤、烷基磺酸酯类、芳族化合物、杂环化合物、苯胺、烯、炔、二醇、氨基醇类、噁唑烷、噁唑啉、噻唑烷、噻唑啉、烯胺、磺胺类、环氧化物、氮丙啶、异氰酸酯、磺酰氯、重氮基化合物、酰基氯等。

D. KLK5拮抗剂多核苷酸

本文提供分离的用于本文所述方法中的KLK5多核苷酸拮抗剂。KLK5多核苷酸拮抗剂可以是反义核酸和/或核酶。反义核酸包含与KLK5的RNA转录物的至少一部分互补的序列。虽然绝对互补性是优选的,但不需要绝对互补性。

KLK5多核苷酸拮抗剂可以是严格条件下与KLK5核酸序列杂交的核酸(例如,siRNA和CRISPR-RNA,包括具有CRISPR-RNA和tracrRNA序列的sgRNA)。参见Mali等人,Science.339:823-26, (2013)。

如本文提到,“与RNA的至少一部分互补”的序列意指具有足够互补性以便能够与RNA杂交,形成稳定双链体的序列;在双链反义核酸的情况下,可以因此测试双链体DNA的单条链,或可以分析三链体形成。杂交的能力将取决于反义核酸的互补性程度和长度。通常,发生杂交的核酸越大,它可能含有并且仍与RNA形成稳定双链体的碱基错配越多(或三链体,根据具体情况而定)。通过使用标准程序确定已杂交复合体的熔点,本领域技术人员可以确定可忍受错配程度。

与信使的5'末端互补的多核苷酸,例如,直至并且包含AUG起始密码子的5'非翻译序列,应当在抑制翻译方面最高效地发挥作用。但是,已经显示与mRNA的3'非翻译序列互补的序列也有效抑制mRNA的翻译。通常参见,Wagner, R., 1994, Nature 372:333-335。因此,与基因的5'-或3'-非翻译、非编码区互补的寡核苷酸,可以用于抑制内源mRNA翻译的反义方法中。与RNA的5'非翻译区互补的多核苷酸应当包括AUG起始密码子的互补物。与mRNA编码区互补的反义多核苷酸是较低效的翻译过程抑制剂。无论设计成与mRNA的5'区、3'区或编码区杂交,反义核酸均应当具有至少六个核苷酸长度,并且优选地是长度从6至约50个核苷酸的寡核苷酸。在具体方面,寡核苷酸是至少10个核苷酸、至少17个核苷酸,至少25个核苷酸

或至少50个核苷酸。

E. 本文所述的变体抗体和结合性多肽

1. 糖基化变体

在一些实施方案中,改变本文提供的抗体(例如,抗KLK5抗体)或结合性多肽(例如, KLK5结合性多肽)以增加或下降使抗体或结合性多肽糖基化的程度。可以通过改变氨基酸序列从而创造或移除一个或多个糖基化位点,便利地实现对多肽添加或删除糖基化位点。

在抗体或结合性多肽包含Fc区的情况下,可以改变与之连接的糖。哺乳动物细胞产生的天然抗体一般包含分枝的双天线状低聚糖,所述低聚糖通常借助N联连接至Fc区的CH2结构域的Asn297。例如参见,Wright等人,TIBTECH15:26-32(1997)。低聚糖可以包括各种糖,例如,甘露糖、N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及与双天线状低聚糖结构的“茎部”中GlcNAc连接的岩藻糖。在一些实施方案中,可以修饰如本文所述的抗体或结合性多肽中的低聚糖以产生某些特性被改进的变体。

在一个实施方案中,提供具有糖结构的抗体变体或结合性多肽变体,所述糖结构缺少与Fc区(直接或间接)连接的岩藻糖。例如,这种抗体或Fc融合多肽中岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。通过以下方式确定岩藻糖的量:相对于如通过MALDI-TOF质谱法所测量的与Asn297连接的全部糖结构(例如复杂结构、杂合结构和高甘露糖结构)的总和,计算糖链内部Asn 297处岩藻糖的平均量,例如,如WO 2008/077546中所述。Asn297指位于Fc区内约位置297处的天冬酰胺残基(Fc区残基的Eu编号);然而,Asn297也可以位于位置297的上游或下游±3个氨基酸附近,即,位置294和位置300之间,原因在于抗体或结合性多肽中的微小序列变异。这类岩藻糖化变体可以具有改善的ADCC功能。参见,例如,美国专利公开号US2003/0157108(Presta,L.);US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。与“去岩藻糖化”或“缺乏岩藻糖的”抗体变体相关的公开的例子包括:US2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生去岩藻糖化抗体的细胞系的例子包括在多肽岩藻糖化方面缺陷的Lec13CHO细胞(Ripka等人,Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US2003/0157108A1,Presta,L;和WO 2004/056312A1,Adams等人,尤其实施例11)中,和敲除细胞系,如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除的CHO细胞(参见,例如,Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO2003/085107)。

还可以为抗体变体提供双分低聚糖,例如,其中与抗体Fc区连接的双天线状低聚糖由GlcNAc对分。这类抗体变体可以具有减少的岩藻糖化和/或改善的ADCC功能。这类抗体变体的例子例如在WO 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684(Umana等人);和US 2005/0123546(Umana等人)中描述。也提供低聚糖中至少一个半乳糖残基与Fc区连接的抗体变体。这类抗体变体可以具有改善的CDC功能。这类抗体变体例如在WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.);和WO 1999/22764(Raju,S)中描述。

2. Fc区变体

在一些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入抗体(例如,抗KLK5抗体)或结合性多肽(例如,KLK5结合性多肽)的Fc区。Fc区变体可以包含这样的人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区),所述的人Fc区序列在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如,置换)。

在一些实施方案中,提供了拥有一些但非全部效应子功能的抗体变体或结合性多肽变体,这使所述变体成为下述应用的有利候选物,其中抗体或结合性多肽的体内半衰期重要,而某些效应子功能(如补体和ADCC)是不必要或有害的。可以实施体外和/或体内细胞毒性测定法以证实CDC和/或ADCC活性降低/耗尽。例如,可以实施Fc受体(FcR)结合测定法以确保抗体或结合性多肽缺少Fc γ R结合作用(因此可能缺少ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞—NK细胞仅表达Fc(RIII),而单核细胞表达Fc(RI)、Fc(RII)和Fc(RIII)。Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991) 的第464页上的表3中总结了造血细胞上的FcR表达。评估目的分子的ADCC活性的体外测定法的非限制性例子在美国专利号5,500,362(参见,例如, Hellstrom, I. 等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) 和 Hellstrom, I 等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337(参见 Bruggemann, M. 等人, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)) 中描述。备选地,可以使用非放射性分析方法(参见,例如,用于流式细胞术的 ACTI™ 非放射性细胞毒性测定法 (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA; 和 CytoTox 96® 非放射性细胞毒性测定法 (Promega, Madison, WI)。用于此类测定法的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地或额外地,可以在体内,例如,在动物模型中,如在 Clynes 等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998) 公开中的那种动物模型中评估目的分子的ADCC活性。也可以实施C1q结合测定法以证实抗体不能结合C1q并因此缺少CDC活性。参见,例如, WO 2006/029879 和 WO 2005/100402 中的 C1q 和 C3c 结合 ELISA。为了评估补体激活,可以进行 CDC 测定法(参见,例如, Gazzano-Santoro 等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. 等人, *Blood* 101:1045-1052 (2003); 和 Cragg, M.S. 和 M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。也可以使用本领域已知的方法确定FcRn结合作用和体内清除率/半寿期(参见,例如, Petkova, S.B. 等人, *Int' l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006))。

效应子功能减少的抗体包括置换了一个或多个Fc区残基238、265、269、270、297、327和329(美国专利号6,737,056)的那些。这类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327的两个或更多个位置处具有置换的Fc突变体,包括残基265和297置换成丙氨酸的所谓“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

描述了具有FcR结合作用改善或削弱的某些抗体或结合性多肽变体。(参见,例如,美国专利号6,737,056; WO 2004/056312, 和 Shields 等人, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001))。在一些实施方案中,抗体变体或结合性多肽变体包含具有改善ADCC的一个或多个氨基酸置换(例如,在Fc区的位置298、333和/或334处的置换)(残基的EU编号)的Fc区。在一些实施方案中,在Fc区内做出改变,所述改变导致变更(即改善或削弱)的C1q结合作用和/或补体依赖细胞毒性(CDC),例如,如美国专利号6,194,551、WO 99/51642 和 Idusogie 等人, *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000) 中所述。

在 US 2005/0014934A1 (Hinton 等人) 中描述了半寿期增加和新生儿Fc受体(FcRn)结合作用改善的抗体,所述新生儿Fc受体负责转移母源IgG至胎儿(Guyer 等人, *J. Immunol.* 117:

587 (1976) 和Kim等人, J. Immunol. 24:249 (1994))。这些抗体包含其中具有一个或多个置换的Fc区, 其中所述置换改善Fc区与FcRn的结合。这类Fc变体包括在一个或多个Fc区残基: 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434处具有置换(例如, Fc区残基434处的置换)的那些(美国专利号7,371,826)。还见涉及Fc区变体其他例子的Duncan和Winter, Nature 322:738-40 (1988); 美国专利号5,648,260; 美国专利号5,624,821; 和WO 94/29351。

3. 半胱氨酸工程化的变体

在一些实施方案中, 可能想要产生半胱氨酸工程化的抗体(例如, 抗KLK5抗体)或结合性多肽(例如, KLK5结合性多肽), 其中一个或多个残基用半胱氨酸残基置换。在具体的实施方案中, 置换的残基出现在抗体或结合性多肽的可及位点处。通过用半胱氨酸置换这些残基, 因而将反应性巯基安置在抗体的可及位点处并且可以用来使抗体或结合性多肽缀合至其他部分, 如药物部分或接头-药物部分以产生免疫缀合物, 如本文中进一步所述。在一些实施方案中, 可以用半胱氨酸置换以下残基的任何一个或多个: 轻链的V205 (Kabat编号); 重链的A118 (EU编号); 和重链Fc区的S400 (EU编号)。可以例如美国专利号7,521,541中所述那样产生半胱氨酸工程化的抗体或Fc融合多肽。

4. 氨基酸变体抗体变体

在一些实施方案中, 构思了本文提供的抗体(例如, 抗KLK5抗体)或结合性多肽(例如, KLK5结合性多肽)的氨基酸序列变体。例如, 可能想要改善抗体或结合性多肽的结合亲和力和/或其他生物学特性。可以通过向编码抗体或结合性多肽的核苷酸序列引入适宜修饰或通过肽合成, 制备该抗体或结合性多肽的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如, 从抗体或结合性多肽的氨基酸序列内部缺失残基和/或将残基插入前述氨基酸序列中和/或置换前述氨基酸序列中的残基。可以产生缺失、插入和置换的任意组合以获得最终构建体, 只要所述最终构建体拥有想要的特征, 例如抗原结合作用。

在一些实施方案中, 提供具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体或结合性多肽变体。用于置换诱变的目的位点包括HVR和FR。表1中在“优选的置换”的标题下显示保守性置换。表1中在“示例性置换”标题下显示更明显的变化并且参考下文进一步描述的氨基酸侧链类别。可以将氨基酸置换引入抗体或结合性多肽并且筛选产物的所需活性, 例如, 保留/改善的抗原结合作用、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC。

表1

原始残基	示例性置换	优选的置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp、Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr

原始残基	示例性置换	优选的置换
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

氨基酸可以根据常见的侧链特性分组：

- (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性亲水的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 碱性：His、Lys、Arg；
- (5) 影响链方向的残基：Gly、Pro

(6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

非保守性置换将使这些类别之一的成员交换为另一个类别的成员。

5. 衍生物

在一些实施方案中,可以进一步修饰本文提供的抗体(例如,抗KLK5抗体)或结合性多肽(例如,KLK5结合性多肽),以含有本领域已知并轻易可获得的额外的非蛋白质部分。适于使抗体或结合性多肽衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚1,3-二氧戊环、聚1,3,6-三噁烷、亚乙基/马来酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)和葡聚糖或聚(N-乙基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如,丙三醇)、聚乙烯醇和它们的混合物。聚乙二醇丙醛可以具有制造方面的优点,原因在于其在水中的稳定性。这种聚合物可以具有任何分子量,并可以是分枝或不分枝的。与抗体和/或结合性多肽连接的聚合物的数目可以变动,并且如果连接多于一个聚合物,它们可以是相同或不同的分子。通常,用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可以基于以下考虑事项确定,包括但不限于待改善的抗体和/或结合性多肽的具体特性或功能、抗体衍生物和/或结合性多肽是否将用于限定情况下的疗法中等。

在另一个实施方案中,提供了抗体和/或结合性多肽与非蛋白质部分的缀合物,其中所述非蛋白质部分可以通过暴露于辐射而选择性加热。在一个实施方案中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605(2005))。辐射可以具有任何波长,并包括但不限于这样的波长,所述波长不伤害普通细胞,但是使非蛋白质部加热至杀伤与抗体和/或结合性多肽-非蛋白质部分近临的细胞的温度。

IV. 药物制剂和施用方法

如本文所述的KLK5拮抗剂的药物制剂通过以下方式按照冻干制剂或水溶液剂的形式制备:将具有所需纯度的这类拮抗剂与一种或多种任选的可药用载体混合。参见Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编著(1980)。在一些实施方案中,本文提供的KLK5拮抗剂是抗体(例如,抗KLK5抗体)、结合性多肽(例如,KLK5结合性多肽)、多核苷酸(例如,KLK5多核苷酸拮抗剂,如siRNA或CRISPR-RNA,包括具有CRISPR-RNA和tracrRNA序列的sgRNA)和小分子(例如,小分子蛋白酶抑制剂)。

可药用载体总体上在所用的剂量和浓度对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂(包括抗坏血酸和甲硫氨酸);防腐剂(如十八烷基苄基二甲基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵、苯扎溴铵;苯酚、丁醇或苄醇;烷基尼泊金酯如尼泊金甲酯或丙酯;儿茶酚;雷琐辛;环己醇;3-戊醇和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖、甘露糖、海藻糖或山梨糖;成盐反离子如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物)和/或非离子表面活性剂如聚乙二醇(PEG)。本文中的示例性可药用载体还包括间质药物分散剂如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如,人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,如rHuPH20 (**HYLENEX[®]**,Baxter International, Inc.)。在美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中描述了某些示例性sHASEGP和使

用方法,包括rHuPH20。在一个方面,sHASEGP与一种或多种额外的糖胺聚糖酶如软骨素酶组合。

美国专利号6,267,958中描述了示例性冻干制剂。水质抗体制剂包括在美国专利号6,171,586和W02006/044908中描述的那些制剂,后一类制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲剂。

本文中的制剂也可以根据正在治疗的特定适应症需要而含有多于一种有效成分,优选地是具有并未相互不利影响的互补活性的那些有效成分。这种有效成分以有效用于预期目的的量适当地存在。

有效成分可以包埋于例如分别通过凝聚技术或界面聚合制备的微胶囊(例如,羟甲基纤维素微胶囊或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、胶态药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)或乳浊液中。参见Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编著(1980)。

可以制备持续释放制品。持续释放制品的合适例子包括含有KLK5拮抗剂的固态疏水性聚合物半通透性基质,所述基质处于成型制品(例如,薄膜或微胶囊)形式。

待用于体内施用的制剂通常是无菌的。可以例如通过借助无菌滤膜过滤轻易地实现无菌性。

本文提供包含KLK5拮抗剂的用于本文所述方法中的药物制剂。在一些实施方案中,制剂包含可药用载体、辅助剂或溶媒。在一些实施方案中,制剂包含数量有效地可度量地抑制KLK5蛋白酶活性的化合物。在一些实施方案中,为施用至有需求的受试者配制制剂。

包含KLK5拮抗剂的制剂可以经口、肠胃外、通过吸入型喷雾剂、局部、经皮、直肠、经鼻、经颊、舌下、阴道、腹膜内、肺内、皮内、硬膜外或通过植入储库施用。如本文所用,术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内和颅内注射或输注技术。

用于任何具体受试者的具体剂量和治疗方案将取决于多种因素,所述因素包括年龄、体重、总体健康状况、性别、膳食、施用时间、排泄速率、药物组合、正在治疗的医生的判断和正在接受治疗的具体疾病的严重程度。制剂中所提供KLK5拮抗剂的量也将取决于制剂中的具体化合物。

在一个实施方案中,每剂施用的KLK5拮抗剂的有效量将处于每日约0.01-100mg/kg、备选地约0.1至20mg/kg受试者体重的范围内,其中所述化合物的常见初始范围是0.3至15mg/kg/日。

KLK5拮抗剂可以单独或与如上文所述的其他药剂组合使用。药物联合制剂或给药方案的第二药剂可以具有与KLK5拮抗剂互补的活性,从而它们没有彼此不利地影响。所述化合物可以在一体化药物制剂中一起施用或分别施用。

术语“共施用”指同时施用或任何方式的分立依次施用KLK5拮抗剂和一种其他有效药用成分或诸成分。如果施用并非同时,则化合物在彼此接近的时间施用。另外,化合物是否按相同剂型施用不重要,例如,一个化合物可以局部施用并且另一个化合物可以口服施用。

一般,可以共施用对正在接受治疗的疾病或病状具有活性的任何药剂。可以在V.T.Devita和S.Hellman(编者)的Cancer Principles and Practice of Oncology,第6版(2001年2月15日),Lippincott Williams&Wilkins Publishers中找到这类药剂的例子。基于药物具体特征和所涉疾病,本领域普通技术人员将能够分辨哪种药剂组合将有用。

V. 筛选和/或鉴定具有目的功能的KLK5拮抗剂的方法

可以通过本领域已知的多种测定法鉴定、筛选用于本文所述方法中的额外KLK5拮抗剂(包括抗体(例如,抗KLK5抗体)、结合性多肽(例如,KLK5结合性多肽)、多核苷酸(例如,KLK5多核苷酸拮抗剂,如siRNA或CRISPR-RNA,包括具有CRISPR-RNA和tracrRNA序列的sgRNA)和小分子(例如,KLK5小分子拮抗剂,如小分子蛋白酶抑制剂))或表征它们的物理/化学特性和/或生物学活性。

可以借助一系列步骤按计算方式评价并设计候选KLK5拮抗剂,所述步骤中筛选化学实体或片段并对其与KLK5上独立结合靶位点结合的能力选择。本领域技术人员可以使用几种方法之一对化学实体或片段筛选它们与KLK5结合和更具体地与KLK5上靶位点结合的能力。该方法可以始于例如基于KLK5坐标或本领域已知的那些坐标的子集,在计算机屏幕上视检靶位点。

在任一筛选和/或鉴定方法的一些实施方案中,候选KLK5拮抗剂是抗KLK5抗体、KLK5结合性多肽(例如,SPINK5Fc融合多肽或SPINK9Fc融合多肽)、KLK5多核苷酸拮抗剂或KLK5小分子拮抗剂。在一些实施方案中,

KLK5拮抗剂基本上或彻底地抑制KLK5的生物学活性。在一些实施方案中,生物学活性是丝氨酸蛋白酶活性。在一些实施方案中,生物学活性是胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶活性。在一些实施方案中,KLK5拮抗剂与KLK5上的特异性结合区域结合。在一些实施方案中,KLK5拮抗剂与KLK5的活性部位结合。

可以通过本领域已知的多种测定法,鉴定、筛选或表征本文提供的抗KLK5抗体、KLK5结合性多肽、KLK5多核苷酸拮抗剂和/或KLK5小分子拮抗剂的物理/化学特性和/或生物学活性。

在一个方面,对本文提供的抗KLK5抗体、KLK5结合性多肽、KLK5多核苷酸拮抗剂和/或KLK5小分子拮抗剂测试其KLK5结合活性,例如,通过已知方法如ELISA、蛋白质印迹分析、依据Scatchardd的细胞表面结合或表面等离子体共振法。在另一个方面,竞争测定法可以用来鉴定与本文提供的抗KLK5抗体或KLK5结合性多肽竞争结合KLK5的抗体。在又一个方面,本文提供的抗KLK5抗体或KLK5结合性多肽可以用于检测生物样品中存在的KLK5的存在情况或量。在一些实施方案中,首先将生物样品用非特异性同种型对照抗体封闭以饱和样品中的任何Fc受体。

在一个方面,提供了鉴定本文提供的抗KLK5抗体或KLK5结合性多肽的生物学活性的测定法。在一些实施方案中,此类鉴定生物学活性的测定法例如是肽底物测定法或偶联测定法。抗KLK5抗体或KLK5结合性多肽的生物学活性可以例如包括与KLK5结合并因而减少KLK5的生物学活性。在一些实施方案中,抗KLK5抗体或KLK5结合性多肽的生物学活性可以包括与其他物种的KLK多肽(例如,KLK7、KLK8和KLK14)结合并且因而减少它们的生物学活性。

VI. 制造品

另一个方面,提供一种制造品,所述制造品含有上文描述的可用于治疗、预防和/或诊断病症的物质。该制造品包括容器和或在该容器上或与之结合的标签或药品说明书。合适的容器包括例如瓶、小药瓶、注射器、静脉内输液袋等。容器可以从多种材料如玻璃或塑料中形成。该容器容纳了本身或与另一种制剂组合时有效治疗、预防和/或诊断病症的制剂并且可以具有无菌接入口(例如该容器可以是静脉内输液袋或是具有皮下注射针头可穿透的

瓶塞的小药瓶)。制剂中的至少一种活性物质是如本文所述的KLK5拮抗剂。标签或包装插页说明该制剂用于治疗选择的病状。另外,制造物可以包含(a)其中含有制剂的第一容器,其中所述制剂包含KLK5拮抗剂;和(b)其中含有制剂的第二容器,其中所述制剂包含哮喘治疗药。

在一些实施方案中,该制造品包含容器、所述容器上的标签和包含于所述容器内部的制剂;其中制剂包括一种或多种试剂(例如,与一种或多种生物标记结合的第一抗体或针对本文所述的一种或多种生物标志物的探针和/或引物)、容器上表明该制剂可以用来评价样品中一种或多种生物标记存在的标签和使用试剂评价样品中一种或多种生物标记存在的说明。制造品还可以包含一套用于制备样品和利用试剂的指令和资料。在一些实施方案中,制造品可以包括试剂如第一和第二抗体,其中第二抗体与标记(例如,酶标记)缀合。在一些实施方案中,制造品包含一种或多种针对本文所述的生物标志物中一者或多者的探针和/或引物。

在任何制造品的一些实施方案中,KLK5拮抗剂是如本文提供的抗KLK5抗体、KLK5结合性多肽、KLK5多核苷酸拮抗剂和/或KLK5小分子拮抗剂。

在这个实施方案中,制造品还可以包含指示制剂可以用来治疗具体病状的药品说明书。在一些实施方案中,药品说明书包含了施用KLK5拮抗剂作为哮喘治疗药的说明。备选地或额外地,该制造品可以还包含第二(或第三)容器,其包含可药用缓冲剂,如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、Ringer溶液和葡萄糖溶液。它可以还包括从商业和用户观点看受欢迎的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

制造品中的其他任选组分包括一种或多种缓冲液(例如,封闭缓冲液、洗涤缓冲液、底物缓冲液等)、其他试剂如通过酶标记化学改变的底物(例如,生色原)、表位修复溶液、对照样品(阳性和/或阴性对照)、对照切片等。

实施例

以下是方法和制剂的实施例。应当理解,鉴于上文提供的一般性描述,可以实施多种其他实施方案。除非权利要求中专门指出,否则本文中提供的任何和全部实施例或示例性语言(例如,“如”)的使用仅意在更好地说明实施方案并且不必然地带来任何限制。通过引用的方式完整并入本文中援引的全部文献作为参考。

实施例1

材料和方法

全部机构性研究均由本地机构审查委员会审查并批准。此外,在基因分型之前,全部受试者均出具知情同意书。在表2中总结的多种不同平台上进行基因分型。

表2

数据集_名称	基因组宽度_SNP_阵列_ID
A1	未知
A2	未知
A3	HumanOmni25M-8v1-1_B.bpm
C1	未知
C2	HumanOmni2.5M-8v1-1_B.bpm
C3	未知
E	HumanOmni2.5-8v1-Multi_A.bpm
B	HumanOmni2.5-8v1-Multi_A.bpm
MI	HumanOmni2.5-8v1-Multi_A.bpm
V	HumanOmni2.5-8v1-Multi_A.bpm
MO	HumanOmni2.5-8v1-Multi_A.bpm
L	HumanOmni2.5-8v1-Multi_A.bpm
CG	HumanHap550v3
NY	HumanHap550v3

样品QC按照这种顺序进行：(1) 判读率(Call rate) < 95% (N=84, 移除的) (2) 杂合性(N=82, 移除的) (3) 相关性/重复/IBD (N=22, 移除的) (4) 祖先离群值(Ancestry outliers) (N=262, 移除的)。对于每个分别的数据集, 用HapMap样品进行EIGENSTRAT分析并且如果相对于欧洲(CEPH和TSI) 组(N=383), 样品是离群着, 则排除样品。

进行SNP QC, 如果SNP (1) 具有<95%的判读率、(2) 为单一形式并且 (3) 强烈偏离哈迪-温伯格平衡($P < 1 \times 10^{-7}$), 则排除它们。对没有与这个构建(build) 比上的数据集进行针对hg19的转换(liftover)。此外, 插补流程(imputation pipeline) 要求全部数据集均相对于正链比对, 原因是HapMap数据在正链上。将Shapeit用来检查链问题并且在能够做到时翻转至正链。最后, 选择chr1-chr22中的SNP用于归因。合并的发现数据集具有299,784个SNP, 它们重叠哮喘病例数据集和基于群体的数据集。存在230,853个SNP, 它们重叠8个不同的病例数据集和构成重复数据集的对照数据集。

使用HapMap参比单体型和通过了质量控制的基因型数据作为推断, 进行全基因组插补。在SNPTESTv2中, 将插补后基因型概率用于逻辑回归模型中。此外, 将发现数据集针对群体分层修正并且通过调节显著性主组分修正重复数据集; 选择解释>1%方差的PC (参见下文)。从分析中排除插补信息<0.6的SNP。额外的分析后QC包括移除对照中MAF<2%的任何SNP并且合并病例和对照中HWE p -值< 1×10^{-10} 的SNP。PLINK随后用来对发现结果和重复结果执

行荟萃分析。异质性p-值临界值0.1用来确定是否应当用固定效应或随机效应模型来荟萃分析。

这项分析中使用的GTEx数据从联机GTEx端口 (<http://www.gtexportal.org/home/testyourown>) 获得。在2016年11月11日实施检索;并且对KLK5输入的命令是:rs117639512, KLK5, Esophagus_Gastroesophageal_Junction;rs117639512, KLK5, Esophagus_Muscularis;rs117639512, KLK5, Skin_Not_Sun_Exposed_Suprapubic;rs117639512, KLK5, Skin_Sun_Exposed_Lower_leg。对KLK4输入的命令是:rs117639512, KLK4, Prostate; rs117639512, KLK4, Uterus。

使用BIAcore™-T200仪,通过表面等离子体共振法(SRP)测量SPINK9对KLK5的结合亲和力和。通过蛋白A生物传感器芯片(GE Healthcare,目录号29127557)捕获机构内表达的带有鼠IgG2a片段可结晶区域(Fc)的SPINK9,以实现大约100个响应单位(RU)。对于动力学测量,在25℃以流速30μl/min注射HBS-T缓冲液中人KLK5结合性多肽的四倍连续稀释物(200nM至0.1953nM)。使用简单一对朗格缪尔结合模型(BIAcore评估T200软件2.0版)计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。将平衡解离常数(KD)计算为 k_{off}/k_{on} 比。

荟萃分析中所用的受试者

荟萃分析中使用总计1,350位成人哮喘者和3,690位对照。这些受试者中,在质量控制措施后,667名哮喘者处于低2型性(称作低骨膜蛋白性)哮喘组中并且626名处于低2型性炎症(称作高骨膜蛋白性)哮喘组。病例的平均年龄是45岁(SD=15),并且对照的平均年龄是41岁(SD=15)。全部受试者均为欧洲高加索人后裔。大部分受试者(57.8%)为女性。病例中,预测的平均FEV1%是72.9(SD=17),并且对照中,为101.6(SD=8)。病例和对照分成两个组。组1包括从Genentech的来金珠单抗(lebrikizumab)(抗IL-13)和Xolair(抗IgE)观察性和临床试验获得的哮喘DNA样品(总数N=520)。组2包含从Genentech的来金珠单抗临床试验(N=234)获得和从昆士兰医学研究研究院(N=774)和芝加哥大学(N=226)处确定的成年哮喘患者获得的完全独立的DNA样品集合。将样品与基于遗传决定的血统所选择的对照(组1;N=3,120)比较并且经胸腔内科医师筛查(组2;N=1,146)为哮喘阴性。对全部病例和来自组2的对照测定血清骨膜蛋白水平,并且中位蛋白质水平用来将受试者分成低骨膜蛋白亚群和高骨膜蛋白亚群。表3中显示每个组的特征。该表仅包括QC合格并纳入分析的样品。

表3

	组1		组2	
	病例	对照	病例	对照
N	468	2808	882	882
平均年龄(SD)	43.95 (13.1)	*	46.08 (15.2)	40.20 (14.9)
性别, N(%)女性	299 (63.9%)	1437 (47.9%)	585 (66.3%)	580 (65.7%)
预测的平均 FEV1 % (SD)	70.8 (13.4)	-	75.1 (20.4)	101.6 (7.7)

*) 年龄数据处于以下范围:69个人≤54岁,489个人=55-59岁,761个人=60-64岁,810

个人=65-69岁,503个人=70-74岁,153个人 \geq 75岁。

已知的哮喘风险等位基因分析

目前,未知2型炎症和低2型性哮喘者之间遗传异质性的程度。如所述,将研究群体基于骨膜蛋白水平分层。参见Corren等人,N Engl J Med 365,1088-1098 (2011)。首先在高骨膜蛋白病例(N=626个人)和对照(N=1,696个人)以及低骨膜蛋白病例(N=667个人)和对照(N=1,887个人)之间比较已知哮喘风险等位基因的等位基因频率。与对照相比,对高骨膜蛋白亚群和低骨膜蛋白亚群确定效应大小的富集。图1和表4中显示结果。亚群之间几个已知哮喘基因(例如,TSLP、IL4、IL4R、IL6R)未显示差异。高骨膜蛋白亚群中,几个Th2相关基因座(例如,GATA3和IL33)的比值比(odds ratios,OR)富集。在高骨膜蛋白亚群中,PDE4D基因座基本上显示无效OR(OR=0.96),并且在低骨膜蛋白亚群中显示强烈富集($P=6.0 \times 10^{-4}$; OR=1.3)。这是在低骨膜蛋白病例和高骨膜蛋白病例之间直接显示等位基因频率统计不同的唯一基因座($p=0.02$)。因此,观察到的许多已公开的哮喘基因座是泛哮喘基因座,鉴于这些研究并未基于2型炎症状态区分受试者,这直观易用。但是,其他基因座在亚群之间不同,显示依据骨膜蛋白状态划分哮喘群体时,将揭示新基因座。鉴于前述缺乏了解及预测涉及低骨膜蛋白性哮喘亚群的医疗需求尚未满足,重点关注这个患者群体。

表4

SNP	基因	CHR	BP	ALLE-LES	风险 等位基因	骨膜蛋白高		骨膜蛋白低	
						OR	P	OR	P
rs1800629	TNF	6	31543031	G/A	A	1.246	0.021	0.937	0.485
rs1775551	GATA3	10	9053043	C/A	C	1.471	2.75E-05	1.189	0.051
rs2073643	SLC22A5	5	131723288	T/C	C	0.946	0.752	0.800	0.002
rs72699186	IL33	9	6175855	A/T	T	1.212	0.048	1.078	0.412
rs3771166	IL18R1/IL1A1	2	102986222	G/A	A	0.883	0.098	0.764	0.031
rs2305480	GDSMB	17	38062196	G/A	A	0.906	0.169	0.791	0.001
rs2378383	TLE4	9	82039362	A/G	G	0.972	0.795	0.859	0.185
rs1540339	VDR	12	48257326	C/T	C	1.059	0.452	0.954	0.511
rs17294280	SMAD3	15	67468285	A/G	G	1.265	0.009	1.190	0.047
rs2284033	IL2RB	22	37534034	G/A	A	0.948	0.470	0.884	0.092
rs1837253	TSLP	5	110401872	T/C	C	1.310	0.001	1.265	0.004
rs1295686	IL13	5	131995843	T/C	T	1.153	0.410	1.116	0.209
rs2057768	IL4R	16	27322095	C/T	T	1.127	0.139	1.122	0.140
rs11071557	RORA	15	61068954	T/C	C	0.892	0.296	0.902	0.327
rs2243300	IL4	5	132004086	G/T	T	1.095	0.523	1.109	0.719
rs1063355	HLA-DQ	6	32627714	T/G	T	0.738	3.42E-05	0.810	0.003
rs4129267	IL6R	1	154426264	C/T	T	0.934	0.347	1.054	0.447
rs2786098	DENND1B	1	197325908	T/G	T	0.953	0.576	1.080	0.366
rs4795405	ORMDL3	17	38088417	T/C	T	1.096	0.207	1.243	0.002
rs1588265	PDE4D	5	59369794	A/G	G	0.956	0.566	1.292	0.001

低骨膜蛋白型哮喘与对照GWAS

使用具有血清骨膜蛋白水平量值的健康对照 (N=790), 实施使用骨膜蛋白作为连续性状的GWAS, 并且未发现达到全基因组显著性的基因座。这表明正常对照中骨膜蛋白水平未处于强烈的遗传影响下。因此, 相对于对照 (N=1,887) GWAS, 使用患有低骨膜蛋白性哮喘的完整对照群体 (N=667)。测试了这项与对照内骨膜蛋白水平关联的分析中达到全基因组显著性的全部感兴趣SNP, 旨在确定SNP与2型低炎症性哮喘特异性相关并且不单纯与外周骨膜蛋白水平相关。总之, 观察到对SNP rs117639512的一个关联超过全基因组显著性的阈值 ($P=2.75 \times 10^{-8}$, OR=0.33, 图2)。表5中显示 $P < 1 \times 10^{-5}$ 的SNP (LD精简) 的完整列表。表6中显示SNP rs117639512的详细信息。rs117639512SNP与具有骨膜蛋白量值的对照子集中的外周骨膜蛋白水平不相关 ($P=0.99$)。此外, 该群体还针对嗜酸性粒细胞 (EOS) 水平 (EOS低的水

平<300ng/mL) 分层,以观察低骨膜蛋白哮喘者中的关联是否还在低EOS哮喘者中观察到。二者均为2型活动性的指标,但并非完美相关($\rho=0.23$)。参见Arron等人,Ann Am Thorac Soc 10Suppl, S206-213 (2013)。与对照(N=1,768)相比,在EOS低的哮喘病例(N=390)中检验 SNP rs117639512的相关,发现如低骨膜蛋白分析中所见的相似方向的影响($P=0.008$;OR=0.51)。SNP rs117639512位于一个500kb DNA区段范围内含有11个KLK的大的激肽释放酶(KLK)基因簇基因座里(图3)。这个SNP位于KLK5基因组序列中。该关联似乎为低2型性哮喘特有,因为2型炎症高的患者中P值不显著(表6:rs117639512的详细关联分析, $P=0.63$,OR=1.11)。

表5

C H R	BP	SNP	发现				重复				Meta		基因
			病例 MAF	对照 MAF	OR	P	病例 MAF	对照 MAF	OR	P	OR	P	
19	51423524	rs117639512	0.014	0.032	0.44	2.82E-02	0.014	0.054	0.25	4.64E-06	0.33	2.75E-08	KLK4, KLK5
5	167534930	rs34004678	0.004	0.021	0.19	9.40E-03	0.013	0.036	0.36	1.23E-03	0.27	1.39E-07	ODZ2
15	46672108	rs114540406	0.889	0.818	1.79	1.15E-04	0.857	0.807	1.43	2.29E-03	1.60	3.00E-07	SNORD11
13	105897823	rs16966163	0.009	0.033	0.26	3.58E-03	0.017	0.035	0.49	2.83E-02	0.35	8.60E-07	DAOA
11	118068100	rs1793161	0.802	0.717	1.59	8.99E-05	0.773	0.719	1.33	1.24E-02	1.46	1.95E-06	AMICA1
22	33315675	rs13053593	0.027	0.064	0.40	1.29E-03	0.039	0.062	0.62	2.65E-02	0.49	3.66E-06	SYN3
1	218103570	rs72732806	0.028	0.063	0.43	1.94E-03	0.042	0.068	0.60	1.66E-02	0.50	4.55E-06	IQCH
4	2799465	rs114353093	0.006	0.027	0.22	2.96E-03	0.013	0.027	0.47	1.17E-02	0.30	5.24E-06	SH3BP2
3	13330622	rs749573	0.084	0.129	0.62	3.55E-03	0.094	0.149	0.60	3.48E-04	0.61	6.56E-06	IQSEC1; NUP210; HDAC11
14	25140803	rs150036235	0.005	0.021	0.25	1.32E-02	0.009	0.027	0.32	2.96E-03	0.28	7.13E-06	GZMH; GZMB; CTSG; CMAL; STXBP6
9	16529849	rs7862214	0.033	0.062	0.52	1.06E-02	0.032	0.065	0.48	3.52E-03	0.50	7.27E-06	MGC24103; BNC2
4	100902653	rs7680070	0.965	0.936	1.92	1.14E-02	0.956	0.918	1.94	5.01E-04	1.93	7.50E-06	RP11- 15B17.1
5	159183482	rs5004535	0.216	0.164	1.41	4.22E-03	0.200	0.135	1.60	3.99E-04	1.50	8.54E-06	AC008691.1
3	56916581	rs113804724	0.076	0.128	0.56	9.28E-04	0.105	0.142	0.71	2.19E-02	0.63	8.79E-06	ARHGEF3
5	110503301	rs654354	0.559	0.633	0.73	1.87E-03	0.563	0.638	0.73	1.81E-03	0.73	9.07E-06	TSLP
13	73030348	rs10507803	0.009	0.021	0.41	5.74E-02	0.011	0.035	0.29	2.53E-04	0.34	9.92E-06	SNORD37; SNORA68; RPL18AP17

表6

表型	发现				重复				Meta	
	病例MAF	对照MAF	OR	P	病例MAF	对照MAF	OR	P	OR	P
PERI-LO_CTRL	0.014	0.032	0.44	0.03	0.014	0.054	0.25	4.64×10^{-6}	0.33	2.75×10^{-8}
PERI-HI_CTRL	0.031	0.029	1.05	0.86	0.038	0.033	1.15	0.60	1.11	0.6328
ALL_CTRL	0.022	0.031	0.69	0.11	0.026	0.043	0.59	3.94×10^{-3}	0.63	1.17×10^{-3}
	Peri高	Peri低	OR	P	Peri高	Peri低	OR	P	OR	P
PERI-HI_PERI-LO	0.031	0.014	2.16	0.07	0.038	0.014	2.76	1.58×10^{-3}	2.57	3.72×10^{-4}

KLK5是这个基因座处的候选基因

为了鉴定这个基因座中的有关基因,首先研究mRNA表达模式。使用可公开获得的数据库,KLK4优势地在前列腺和子宫内膜中表达而KLK5优势地在食道和皮肤中表达。参见Wu等人,Nucleic Acids Res 44,D313-316(2016)。查询GTEx门户数据库(参见Consortium, Science 348,648-660(2015)),以研究rs117639512对优势表达的组织中KLK4mRNA水平及

KLK5mRNA水平的可能功能性影响。不能在前列腺或子宫中评估rs117639512对KLK4的影响,原因是它在GTEx数据库中的两种组织内为单一形态。GTEx总计含有食道和皮肤的四种组织(食道-胃食管结合部和肌层;皮肤-阳光暴晒和非阳光暴晒)。在任何的这些组织中KLK5eQTL未达到统计显著性(阳光暴晒的皮肤中最低 $P=0.051$),这至少部分地归因于SNP的次要等位基因频率低(欧洲高加索人群中0.01–0.05,参见Genomes Project, Auton等人, Nature 526, 68–74 (2015))。人类遗传性变异的总体参比。与主要等位基因纯合体相比,除食道-GE结合部之外的全部组织均显示杂合子中KLK5的mRNA水平较低。用于比较的数据库中不存在次要等位基因纯合体。因此,rs117639512的次要等位基因似乎与较低的KLK5mRNA水平关联,然而,归因于rs117639512的次要等位基因频率,需要更大的数据库确认这个假设。令人感兴趣地,内瑟顿综合征由基因SPINK5中的突变引起。参见Descargues等人, Nat Genet 37, 56–65 (2005)。SPINK5编码LEKTI, 后者是KLK5和KLK7的丝氨酸蛋白酶抑制剂。参见Schechter等人, Biol Chem 386, 1173–1184 (2005)。SPINK5中的突变导致KLK5表达高度上调,这接下来通过PAR2(蛋白酶激活的受体2)依赖性途径和非依赖性途径诱导炎症。参见Hovnanian, A., Cell Tissue Res 351, 289–300 (2013)。尽管内瑟顿综合征最常见地与皮肤病相关,但一些情况下并存哮喘。参见Judge等人, Br J Dermatol 131, 615–621 (1994)。因此,基于连锁不平衡、表达模式和有症状的并存疾病, KLK5是这个基因座处的最相关候选基因。另外,来自eQTL分析的影响的方向与这个SNP的保护性OR一致,从而较低的KLK5水平似乎可防范哮喘风险。

确定KLK5抑制的测定法

重组KLK5直接活性测定法用来测量KLK5抑制剂如SPINK Fc融合多肽和mAb1108对人激肽释放酶5 (KLK5) 的抑制。将重组人KLK5 (Genentech) 在直接分析缓冲液(75mM Tris (pH8.0), 150mM NaCl和0.01% Tween 20) 中稀释至5nM并且在384孔分析平板中(384孔小体积, 黑色, 圆底, Corning, 目录号4514) 与抗KLK5抗体合并。在磷酸盐样品缓冲液(70mM磷酸钠(pH 6), 200mM NaCl和0.01% Tween-20) 或柠檬酸盐/Tris样品缓冲液(10mM柠檬酸, 30mM Tris (pH 6) 和0.01% Tween 20) 供应抗体。在适宜的样品缓冲液中或在直接分析缓冲液中制得抗体稀释物。将平板在环境温度温育30分钟。将荧光肽底物Boc-VPR-AMC (Bachem, 货号I-1120) 直接添加至分析平板。孔内终浓度是50 μ M Boc-VPR-AMC, 5nM重组人KLK5, 和0.19–100nM抗KLK5抗体。使用**IPHERAstar®** Plus读数仪, 使用340nm激发/460nm发射模块, 每102秒检查平板, 持续30–60分钟。通过线性范围内读数的线性回归计算RFU/s反应速率, 一般始于204秒并持续直至测定法结束为止。分别使用仅有缓冲液和100nM最终SPINK9.SRE.Fc (Genentech) 作为100%和0%活性对照。从抗KLK5抗体的各自曲线的四参数拟合确定其IC₅₀。

偶联的前KLK7荧光肽测定法用来测量抗KLK5抗体对人激肽释放酶5 (KLK5) 的抑制。如果抗体样品在柠檬酸盐/Tris样品缓冲液或前KLK7磷酸偶联的缓冲液(50mM Tris (pH 8.0), 150mM NaCl和0.01% Tween 20) 中, 或如果抗体样品在磷酸盐样品缓冲液中, 则在前KLK7柠檬酸盐/Tris偶联的缓冲液(50mM Tris (pH 7.5), 150mM NaCl和0.01% Tween 20) 中稀释重组人KLK5 (Genentech) 至5nM。稀释的KLK5随后在384孔分析平板中(384孔小体积, 黑色, 圆底, Corning, 目录号4514) 与抗KLK5抗体合并。如对KLK5直接测定法所述那样制得抗体稀释物。将平板在环境温度温育30分钟。将荧光肽底物suc-LLVY-AMC (Bachem, 货号I-

1395) 和前KLK7 (Genentech) 直接添加至分析平板并且在环境温度温育。孔内终浓度是100 μ M suc-LLVY-AMC、125nM前KLK7、5nM重组人KLK5和0.19–100nM抗KLK5抗体。在24小时后,每102秒进行荧光读数,持续30–60分钟,并且通过平均最后5个读数,计算RFU终点值。分别使用仅有缓冲液和100nM最终SPINK9.SRE.Fc (Genentech) 作为100%和0%活性对照。从抗KLK5抗体的各自曲线的四参数拟合确定其IC₅₀。

重组KLK7荧光肽测定法用来确定KLK5抑制剂的选择性。在前KLK7柠檬酸盐/Tris偶联的缓冲液(50mM Tris (pH 8.0), 150mM NaCl和0.01% Tween20) 中,用KLK5激活重组人KLK7 (Genentech)。稀释的KLK7随后在384孔分析平板中(384孔小体积,黑色,圆底,Corning,目录号4514) 与KLK5抑制剂合并。如对KLK5直接测定法所述那样制得抑制剂稀释物。将平板在环境温度温育50分钟。将荧光肽底物suc-LLVY-AMC (Bachem, 货号I-1395) 和前KLK7 (Genentech) 直接添加至分析平板并且在环境温度温育。孔内终浓度是100 μ M suc-LLVY-AMC、125nM前KLK7、5nM重组人KLK5和0.19–100nM KLK5抑制剂。在24小时后,每102秒进行荧光读数,持续30–60分钟,并且通过平均最后5个读数,计算RFU终点值。分别使用仅有缓冲液和100nM最终SPINK9.SRE.Fc (Genentech) 作为100%和0%活性对照。从KLK5抑制剂的各自曲线的四参数拟合确定其IC₅₀。

使用剪切的KLK5衍生肽LC/MS检测法,进行前KLK7测定法以确定IC₅₀。为了进行前KLK7测定法,通过液相色谱偶联的质谱法检测来自酶KLK5和底物前KLK7之间反应的产物肽EEAQGDK (SEQ ID NO:30)。全部化合物均用50mM碳酸氢铵缓冲液(粉末/已认证,Fisher Chemical, A643–500) 稀释,测定法中的终浓度为5nM KLK5 (Genentech) 和抑制剂范围是0.01至12nM,稀释于96孔板(Biorad,硬壳96孔PCR平板,低矮型,薄壁,带裙边,蓝色/透明#HSP9631) 中。使用的抑制剂是SPINK9.SRE.Fc (Genentech) 和mAb1108(小鼠单克隆IgG2b克隆号193318,R&D Systems,明尼阿波利斯,MN)。平板在室温温育30分钟。随后,添加15nM底物前KLK7 (Genentech) 至酶+抑制剂。在2小时后,使用0.5 μ L甲酸(99.5+%,Optima™LC/MS级,Fisher Chemical, A117–10X1AMP),使反应猝灭。在QTRAP6500LC–MS/MS质谱仪(Sciex, Framingham,MA) 中,使用以下的质量组合,检测肽:Q1,388.7m/z和Q3,319.0m/z。使用合成的KLK7肽校准曲线,测量所生成肽的量。使用Prism6软件(GraphPad Software,La Jolla,CA),确定IC₅₀值。

使用剪切的KLK5衍生肽LC/MS检测法,进行前KLK1测定法以确定IC₅₀。为了进行前KLK1测定法,通过液相色谱偶联的质谱法检测来自酶KLK5和底物前KLK1之间反应的产物肽APPIQSR (SEQ ID NO:31)。全部化合物均用50mM碳酸氢铵缓冲液(粉末/已认证,Fisher Chemical, A643–500) 稀释,测定法中的终浓度为0.5nM KLK5 (Genentech) 和抑制剂范围是0.01至12nM,稀释于96孔板(Biorad,硬壳96孔PCR平板,低矮型,薄壁,带裙边,蓝色/透明#HSP9631) 中。使用的抑制剂是SPINK9.SRE.Fc (Genentech) 和mAb1108(小鼠单克隆IgG2b克隆号193318,R&D Systems,明尼阿波利斯,MN)。平板在室温温育60分钟。随后,添加300nM底物前KLK1 (Genentech) 至酶+抑制剂。在20分钟后,使用0.5 μ L甲酸(99.5+%,Optima™LC/MS级,Fisher Chemical, A117–10X1AMP),使反应猝灭。在QTRAP 6500LC–MS/MS质谱仪(Sciex, Framingham,MA) 中,使用以下的质量组合检测肽:Q1,384.7m/z和Q3,600.3m/z。使用Prism6软件(GraphPad Software,La Jolla,CA),确定IC₅₀值。

实施例2-哮喘中KLK5的表征

KLK5在哮喘肺组织中表达并升高

研究肺组织中的KLK5表达。开发一种灵敏的免疫测定法测量健康供体 (MAST-A组) 和皮质类固醇难治性哮喘患者 (BOBCAT组) 的支气管肺泡灌洗液 (BAL) 中的KLK5。参见Jia等人, *J Allergy Clin Immunol* 130,647-654e610 (2012) 和Sun等人, *Sci Signal* 8,ra122 (2015)。如与健康志愿者相比,哮喘患者中KLK5平均水平升高约四倍(图4)。此外,哮喘患者BAL中的KLK5水平与预测的用力呼气量1 (FEV1) 负相关 ($p < 0.05$), 这表明KLK5升高的患者可能患有更严重的支气管阻塞和气道病。肺中的KLK5水平与血清Th2生物标志物(骨膜蛋白和血液嗜酸性粒细胞) 不相关, 并且高骨膜蛋白性和低骨膜蛋白性哮喘患者均具有相似的BAL KLK5水平。为了理解KLK5的细胞来源, 比较多种原代肺常驻性细胞中的KLK5转录物水平。KLK5mRNA由支气管上皮细胞强烈表达, 并且在肺平滑肌、成纤维细胞、内皮细胞或单个核细胞中不可检出。为了原位研究KLK5表达, 通过使用LacZ处于KLK5启动子的可读框中的KLK5-LacZ报道分子小鼠品系, 检测其表达。LacZ阳性细胞主要限于支气管上皮细胞。总之, 这些数据提示, 支气管上皮细胞可能是肺中KLK5的主要细胞来源并且对支气管肺泡灌洗液中的KLK5有贡献。

重组KLK5诱导的肺嗜中性粒细胞外渗和肺上皮细胞因子产生。

接下来, 生成重组KLK5并表征其生物化学功能。在293细胞中表达带C末端his标签的重组全长KLK5。分泌型KLK5移除了前序列 (pro-sequence) (aa23-66) 并且始于位置67处的N端异亮氨酸。位置245处丝氨酸至丙氨酸突变 (S245A) 消除KLK5催化活性并且S245A KLK5突变体具有完整的N端前序列。结果表明自激活和信号移除可能对KLK5为自行固有的。

为了研究肺中KLK5的影响, 向小鼠鼻内施用重组KLK5。施用KLK5后二十四小时, 观察到支气管肺泡灌洗液中中性粒细胞数增加大于10倍(图5A)。嗜酸性粒细胞、巨噬细胞或淋巴细胞的数目无显著变化。在肺实质的组织切片中, 中性粒细胞的选择性募集也增加, 并且这些粒细胞定位至支气管上皮下层。鼻内施用有催化性的突变体KLK5未导致嗜中性粒细胞外渗。因此, KLK5募集中性粒细胞进入肺室的能力高度依赖于该蛋白酶的酶活性。

为了理解KLK5怎样影响中性粒细胞募集, 将重组KLK5加入A549肺上皮细胞系并且通过定量PCR检查炎症细胞因子和趋化因子表达。KLK5, 而非其催化无活性突变体, 快速诱导促炎基因转录物, 包括Tslp、Tnfa、Il8和Icam1 (图5B)。还随分离的原代支气管上皮细胞见到Tslp、Tnfa、IL-8和Icam1的诱导。另外, SPINK5Fc融合多肽抑制KLK5刺激的炎症细胞因子和趋化因子产生。

实施例3-直接测定法和偶联测定法中抑制KLK5

为了评估SPINK Fc融合多肽的抑制特征, 开发了监测KLK5对荧光肽底物剪切的体外测定法。简言之, KLK5切割在底物Boc-VPR-AMC的末端精氨酸之间的肽键, 释放7-氨基-4-甲基香豆素 (AMC), 导致荧光增加。添加荧光底物之前KLK5与SPINK5M293-R355 (图6A)、SPINK5E421-A695 (图6B) 或SPINK9.SRE.Fc (图6C) 的温育导致荧光信号减少, 原因在于KLK5失活。因此, SPINK Fc融合多肽是KLK5的强力抑制剂, 如依据对Boc-VPR-AMC的剪切所监测。

如图6中展示, SPINK Fc融合多肽是KLK5的强力抑制剂, 如依据对小肽底物的剪切所监测。为了进一步评价这些SPINK Fc融合多肽的抑制特征, 开发了利用前KLK7和特异性KLK7荧光肽底物Suc-LLVY-AMC的偶联测定法 (图7)。简言之, 将KLK5与前KLK7温育, 导致剪切和移除KLK7前结构域()。前结构域的移除激活KLK7, 后者随后能够作用于荧光底物以释放

AMC荧光团。类似于使用小肽底物的数据(图6),KLK5与SPINK5M293-R355(图7A)、SPINK5E421-A695(图7B)或SPINK9.SRE.Fc(图7C)的温育导致强力抑制前KLK7激活和后续对KLK7特异性肽底物剪切。总之,图6和图7显示,使用肽或大分子(前KLK7)底物时,SPINK Fc融合多肽是KLK5的强力抑制剂。

为了评价SPINK Fc融合多肽的特异性,针对激活的KLK7分析抑制剂,并且监测对荧光肽底物Suc-LLVY-AMC的剪切(图8)。作为KLK特异性的对照,还分析了商业抗KLK5抗体mAb1108。由于这种抗体对KLK5特异,预计它不应当抑制KLK7或对底物的剪切。如图8中所见,SPINK5M293-R355(图8A)和SPINK5E421-A695(图8B)部分地抑制KLK7,而SPINK9.SRE.Fc(图8C)和mAb1108(图8D)展示无抑制作用。这表明,SPINK9.SRE.Fc和mAb1108特异性相互作用并抑制KLK5,而SPINK5M293-R355和SPINK5E421-A695可能是杂乱性KLK抑制剂。

为了表征抗KLK5抗体mAb1108的抑制特征,在直接测定法(图6)中在各种KLK5浓度(图9)测定 IC_{50} 值。不同于SPINK Fc融合多肽,mAb1108是KLK5的部分抑制剂,导致对荧光肽底物的剪切降低约30%(图9)。另外,mAb1108的 IC_{50} 值展示依赖于KLK5浓度,显示抗体可能是KLK5的紧密结合性抑制剂。

为了进一步评价mAb1108的抑制特征,在直接测定法(图6)和前KLK7偶联测定法(图7)中针对SPINK9Fc融合多肽分析该商业抗体。在直接测定法中(图10),SPINK9Fc融合多肽是KLK5对荧光肽底物剪切的强力抑制剂,而mAb1108展示部分抑制作用。偶联测定法中使用大分子底物(前KLK7)(图11)时,SPINK9Fc融合多肽和mAb1108均是KLK5活性的强力抑制剂。总之,这些数据显示尽管mAb1108的确在直接测定法中展示部分抑制KLK5(图8和图9)并且在偶联测定法中展示完全抑制前者(图11B),但SPINK9Fc融合多肽在直接测定法(图6和图10)和偶联测定法(图7和图11)中均是KLK5的强力抑制剂。

实施例4-用于 IC_{50} 测定的剪切的KLK5衍生肽LC/MS检测法

使用监测KLK5衍生的剪切产物肽的LC/MS测定法,评估SPINK9.SRE.Fc和mAb1108通过重组KLK5抑制蛋白酶解前KLK7或前KLK1的能力。在KLK7测定法中,SPINK9.SRE.Fc和mAb1108充分抑制KLK5(5nM)对前KLK7的剪切, IC_{50} 值分别是1.13nM(图12A)或1.86nM(图12B)。而在KLK1测定法中,虽然SPINK9.SRE.Fc和mAb1108均抑制KLK5(0.5nM)对前KLK1的剪切,但仅SPINK9.SRE.Fc充分抑制KLK5, IC_{50} 为0.58nM(图12C),而mAb1108显示最大约40%的KLK5抑制作用, IC_{50} 为0.34nM(图12D)。

结论

总之,这些数据表明,KLK5诱导上皮产生嗜中性粒细胞趋化性细胞因子和嗜中性粒细胞内流入肺组织。这里,提供来自特别聚焦于低骨膜蛋白性或2型低炎症性哮喘者的第一GWAS的结果。在KLK4/5基因座处鉴定了低骨膜蛋白性哮喘群体中防范哮喘风险的SNP。还在低嗜酸性粒细胞性哮喘者中见到这个结果。19q13处的激肽释放酶基因座先前已经借助连锁研究和GWAS与哮喘关联。参见Myers等人,J Allergy Clin Immunol 130,1294-1301(2012)。借助GWAS鉴定的SNP(rs1061477)位于KLK3的内含子2中,所述内含子位于SNP rs117639512的3' 大约63kb处。这些SNP彼此并非连锁不平衡($r^2=0.004$, $D'=0.293$)。其他人已经探究嗜酸性粒细胞水平的遗传学。参见Gudbjartsson等人,Nat Genet 41,342-347(2009)。发现在IL13和IL33基因座的SNP与嗜酸性粒细胞水平关联。这些也是重复得好的哮喘风险基因座。但是,在两项研究中鉴定KLK4/5区域的1MB范围内无SNP达到提示的显著性。

这显示该基因座可能对低骨膜蛋白性哮喘或低2型性哮喘特异。

SNP rs117639512属基因内的,位于KLK4和KLK5之间。由于这个SNP的频率相对低,不能在联机数据库中检验对KLK4的功能,并且在区分KLK5mRNA水平方面,不能观察到统计显著性。但是,在受检的大部分组织中,观察到导致次要等位基因携带者的KLK5mRNA水平较低的影响的相似方向。结合针对该SNP观察的保护性OR,这表明较低的KLK5水平可防范哮喘风险。这与内瑟顿综合征患者的结果一致,其中严重上调的KLK5水平导致许多异位性表型,包括哮喘。内瑟顿综合征与KLK5调节物SPINK5中有功能的突变丧失关联。对GTEx数据库评估影响SPINK5mRNA水平的SNP。SNP rs1363727处的最强烈命中与备选的等位基因携带者的GTEx数据库中显著较低的SPINK5mRNA水平关联(10种组织中 $P < 1.2 \times 10^{-8}$)。低骨膜蛋白性哮喘群体中检验这个SNP并且它没有达到哮喘风险的统计显著性($P = 0.063$; $OR = 1.14$),但与KLK4/KLK5基因座SNP相比,具有相反的影响方向。这表明较低的SPINK5水平可能升高形成哮喘的风险。SPINK5功能降低和KLK5活性增加与来自内瑟顿综合征的结果一致。因此,遗传证据表明,降低KLK5水平可能防范内瑟顿综合征情形以外的哮喘。

重度哮喘患者的支气管肺泡灌洗液中KLK5结合性多肽水平升高,并且与预测的FEV1 ($p < 0.05$) 负相关,从而支持以下假设:KLK5可能在支气管梗阻和哮喘发病机制中发挥致病角色。仍不清楚哮喘中以及其他过敏性疾病中对KLK5的调节。在KLK5和2型炎症生物标志物(例如,骨膜蛋白、FeNO和血液嗜酸性粒细胞计数)之间不存在相关性。KLK5主要由肺上皮表达。哮喘患者具有频繁的损伤和上皮屏障损失,这与涉及诱导的生长因子、修复处理和组织重塑的再生过程相关。重度哮喘中上皮细胞活化、再生过程和组织重塑失调可以归因于患哮喘的肺室中KLK5水平异常。

通过与KLK5的催化活性部位的直接结合,SPINK5是KLK5的天然可逆性抑制剂。许多粘膜组织,包括皮肤、肺、食道和胃肠道,表达SPINK5。在Nertherton综合征中,SPINK5缺乏导致KLK5活性升高、皮肤炎症和过敏症状。参见Briot等人, *J Exp Med* 206,1135-1147 (2009)。发现SPINK5直接受炎性细胞因子、尤其白介素IL-13诱导(数据未显示)。与这个观察结果一致,与高Th2性哮喘患者相比,低Th2性哮喘患者中SPINK5转录物减少。主要受SPINK5表达减少驱动的更高KLK5/SPINK5比率可对低Th2性哮喘患者中的哮喘病理学作出贡献。

生成重组形式的KLK5并且发现少量有酶促活性的KLK5强烈诱导嗜中性粒细胞流入支气管肺泡灌洗液和肺组织。由于中性粒细胞不外渗入给予无催化活性KLK5(或热灭活KLK5,数据未显示)的动物的肺中,中性粒细胞募集必需要该催化活性。这与KLK5转基因小鼠在皮肤损害中具有大量嗜中性粒细胞浸润的报告一致。参见Furio等人, *J Exp Med* 211,499-513 (2014)。KLK5诱导上皮表达炎症细胞因子、趋化因子和黏附分子。尤其,IL-8是关键的嗜中性粒细胞趋化性细胞因子。通过其与CD11b/CD18整联蛋白相互作用,ICAM-1是嗜中性粒细胞黏附过程的关键黏附分子。TNF- α 诱导血管泄漏并且促进细胞外渗入外周组织。KLK5诱导的炎性细胞因子、趋化因子和黏附分子可以一起发挥促进嗜中性粒细胞流入局部组织的作用。快速诱导炎性趋化因子/细胞因子表明,可能存在介导细胞信号传导事件的细胞表面受体。

总之,本文提供这样的数据,其显示KLK5基因座处的SNP与低骨膜蛋白性或低2型炎症性哮喘病例特异的哮喘风险的遗传关联。另外,展示的数据描述了KLK5对哮喘症状和亚表

型的影响。本文展示的结果表明,降低KLK5活性可以对哮喘产生保护作用。

SEQ ID NO:1>sp|Q9Y337|KLK5_HUMAN激肽释放酶-5OS=智人GN=KLK5PE=1SV=2,
(包含加下划线的信号肽氨基酸1-22的全长KLK5)

MATARPPWMWVLCALITALLLGVTEHVLANNDVSCDHPSTVPSGSNQDLGAGAGEDARSDDSSSRIINGSDC
DMHTQPWQAALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGH
SNNMLIKLNRRIPTKDVRPINVSSHCPASAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFVKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDD
TMFCAGDKAGRDSCQGDSGGPVVCNGSLQGLVSWGDPYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

SEQ ID NO:2KLK5的成熟形式(扣除信号肽氨基酸1-22)

VTEHVLANNDVSCDHPSTVPSGSNQDLGAGAGEDARSDDSSSRIINGSDCDMHTQPWQAALLLRPNQLYCGA
VLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGHSNNMLIKLNRRIPTKDVRPI
NVSSHCPASAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFVKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGRDSCQGDSGGPV
VCNGSLQGLVSWGDPYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

SEQ ID NO:3|KLK5_人激肽释放酶-5(包含加下划线的信号肽氨基酸1-22的全长KLK5
的N153D变体)

MATARPPWMWVLCALITALLLGVTEHVLANNDVSCDHPSTVPSGSNQDLGAGAGEDARSDDSSSRIINGSDC
DMHTQPWQAALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGH
SNDLMLIKLNRRIPTKDVRPINVSSHCPASAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFVKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDD
TMFCAGDKAGRDSCQGDSGGPVVCNGSLQGLVSWGDPYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

SEQ ID NO:4KLK5的成熟形式(N153D变体,扣除信号肽氨基酸1-22)

VTEHVLANNDVSCDHPSTVPSGSNQDLGAGAGEDARSDDSSSRIINGSDCDMHTQPWQAALLLRPNQLYCGA
VLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGHSNDLMLIKLNRRIPTKDVRPI
NVSSHCPASAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFVKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGRDSCQGDSGGPV
VCNGSLQGLVSWGDPYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

SEQ ID NO:5|KLK5_人激肽释放酶-5(包含加下划线的信号肽氨基酸1-22的全长KLK5
的G55R变体)

MATARPPWMWVLCALITALLLGVTEHVLANNDVSCDHPSTVPSGSNQDLGAGAREDARSDDSSSRIINGSDC
DMHTQPWQAALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGH
SNNMLIKLNRRIPTKDVRPINVSSHCPASAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFVKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDD
TMFCAGDKAGRDSCQGDSGGPVVCNGSLQGLVSWGDPYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

SEQ ID NO:6KLK5的成熟形式(G55R变体,扣除信号肽氨基酸1-22)

VTEHVLANNDVSCDHPSTVPSGSNQDLGAGAREDARSDDSSSRIINGSDCDMHTQPWQAALLLRPNQLYCG
AVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGHSNNMLIKLNRRIPTKDV
RPINVSSHCPASAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFVKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGRDSCQGD
SGPVVCNGSLQGLVSWGDPYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

SEQ ID NO:7|KLK5_人激肽释放酶-5(包含加下划线的信号肽氨基酸1-22的全长KLK5
的G55R,N153D变体)

MATARPPWMWVLCALITALLLGVTEHVLANNDVSCDHPSTVPSGSNQDLGAGAREDARSDDSSSRIINGSDC
DMHTQPWQAALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGH
SNDLMLIKLNRRIPTKDVRPINVSSHCPASAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFVKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDD

TMFCAGDKAGRDSCQGDSGGPVVVCNGLQGLVSWG DYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

SEQ ID NO:8KLK5的成熟形式 (G55R,N153D变体,扣除信号肽氨基酸1-22)

VTEHVLANN DVSCDHPSNTVPSGSNQDLGAGAREDARSDDSSSRIINGSDCDMHTQPWQAALLLRPNQLYCGA
VLVHPQWLLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGHSNDLMLIKLNRRIRPTKDVRPI
NVSSHCP SAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFPKVLQCLNISVLSQKRCEDAYPRQIDDTMFCAGDKAGRDSCQGDSGGPV
VCNGLQGLVSWG DYPCARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS

SEQ ID NO:9>sp|Q9NQ38|ISK5_人丝氨酸蛋白酶抑制剂Kaza1 5型OS=智人GN=SPINK5PE=1SV=2 (包含加下划线的信号肽氨基酸1-22的人全长SPINK5)

MKIATVSVLLPLALCLIQDAASKNEDQEMCHEFQAFMKNGLFCPQDKKFFQSLDGMFINKCATCKMILEKE
AKSQKRARHLARAPKATAPTELNCDDFKKGERDGD FICPDYIEAVCGTDGKTYDNRCALCAENAKTGSQIGVKSEGE
CKSSNPEQDVCSAFRPFVRDGR LGCTRENDPVLGPDGKTHGNKCAMCAELFLKEAENAKREGETRIRRNAEKDFCKE
YEKQVRNGRLFCTRES DPVRGPDGRMHGNKCALCAE IFKQRFSEENSKTDQNLGKAEKTKVKREIVKLCSQYQNQA
KNGILFCTRENDPIRGPDGKMHGNLCSMCQAYFQAENEEKKKA EARARNKRESGKATSYAELCSEYRKLVRNGKLAC
TRENDPIQGPDGKVHGNTCSMCEVFFQAE EEEEEKKKKEGKSRNKRQSKSTASFEELCSEYRKS RKNGR L FCTRENDPI
QGPDGKMHGNTCSMCEAFFQEEERARAKAKREAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNKCAMCASV
FKLE EEEEEKNDKEEKKGKVEAEKVKREAVQELCSEYRHYVRNGRLPCTRENDPIEGLDGKIHGNTCSMCEAFFQAEAK
EKERAEPRAKVKREAEKETCDEFRRLLQNGKLFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMCKAVFQKENEERKRKEEEDQRN
AAGHGSSGGGGGNTQDECAEYREQMKNGR L SCTRES DPVRDADGKSYNNQCTMCKAKLERAERKNEYSRSRSNGTG
SESGKDT CDEF RSMKNGLICTRES DPVRGPDGKTHGNKCTMCKEKLERA EAEKKKKEDEDRSNTGERSNTGERSN
DKEDLCREFRSMQRNGKLICTREN NPVRGPYGMHINKCAMCQSIFDREANERKKKDEEKSSSKPSNNAKDECSEFR
NYIRNNELICPRENDPVHGADGKFYTNKCYMCRAVFLTEALERA KLQEKPSHVRASQEEDSPDSFSSLDSEMCKDYR
VLPRIGYLCPKDLKPVCGDDGQTYNNPCMLCHENLIRQTNTHIRSTGKCEESSTPGTTAASMPPSDE

SEQ ID NO:10人SPINK5的成熟形式 (扣除信号肽氨基酸1-22)

KNEDQEMCHEFQAFMKNGLFCPQDKKFFQSLDGMFINKCATCKMILEKEAKSQKRARHLARAPKATAPTEL
NCDDFKKGERDGD FICPDYIEAVCGTDGKTYDNRCALCAENAKTGSQIGVKSEGECKSSNPEQDVCSAFRPFVRDGR
LGCTRENDPVLGPDGKTHGNKCAMCAELFLKEAENAKREGETRIRRNAEKDFCKEYEKQVRNGRLFCTRES DPVRGP
DGRMHGNKCALCAE IFKQRFSEENSKTDQNLGKAEKTKVKREIVKLCSQYQNQA KNGILFCTRENDPIRGPDGKMH
GNLCSMCQAYFQAENEEKKKA EARARNKRESGKATSYAELCSEYRKLVRNGKLACTRENDPIQGPDGKVHGNTCSMC
EVFFQAE EEEEEKKKKEGKSRNKRQSKSTASFEELCSEYRKS RKNGR L FCTRENDPIQGPDGKMHGNTCSMCEAFFQEE
ERARAKAKREAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNKCAMCASVFKLE EEEEEKNDKEEKKGKVEAEK
VKREAVQELCSEYRHYVRNGRLPCTRENDPIEGLDGKIHGNTCSMCEAFFQEAKEKERAEPRAKVKREAEKETCDE
FRRLQNGKLFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMCKAVFQKENEERKRKEEEDQRNAAGHGSSGGGGGNTQDECAEYR
EQMKNGR L SCTRES DPVRDADGKSYNNQCTMCKAKLERAERKNEYSRSRSNGTGSESGKDT CDEF RSMKNGLICTR
ENNPVRGPYGMHINKCAMCQSIFDREANERKKKDEEKSSSKPSNNAKDECSEFRNYIRNNELICPRENDPVHGADG
KFYTNKCYMCRAVFLTEALERA KLQEKPSHVRASQEEDSPDSFSSLDSEMCKDYRVLPRIGYLCPKDLKPVCGDDGQ
TYNNPCMLCHENLIRQTNTHIRSTGKCEESSTPGTTAASMPPSDE

SEQ ID NO:11>tr|Q5K5D4|Q5K5D4_小鼠Spink5蛋白OS=小家鼠GN=Spink5PE=2SV=1 (包含加下划线的信号肽氨基酸1-22的小鼠全长SPINK5)

MKTATVPMLLTAFYLTQDAAGEKGNQDPCMKFQAQMKNGLTTCPKGNNSSQSLNDIIFQSECILCKRALEQG
APTKIMNVKVL SRANRATDPAKLNCESFKQRRKDGDGDFICPSDTSSVCGTDGKTYRGRCELCAENAKSQNHVDVKSEG
ECGSSHLETDMCSDFRANVQDGR LGCTRES DPILGPDGRTHGNRCAMCAELFLKEAKENATRNRRESRI RRDAEKELC
KEFENQVRNGRLFCTRES DPIRGPDGKMHGNCALCAEIFMRQFTEEKGA EKNQKDAEERAKAKMEIQKRCSEFQD
RARNGTLFCTRENDPIRGLDGKTHGNLCSMCQAFFKTEAEKKAEAGSRNRRGSESESETYAKLCDEYRKARKNGQLY
CTRENAPIRGPDGKIHGNTCSMCQAFFIQEDKARAKVKREAAKEMCSEFRNQARNGMLMCTRENDPVVGPDPGKRHSN
KCAMCASVFLLEEEEEKKDDKTEKVDAGKAKKEAVQELCRKYHTQLRNGPLRCTRNNPIEGLDGKMYKNACFMCWA
FFQQEAKKSGAGFRPKVKREV KVCSEYLALSKRGEIFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMCKAVFKKENEERKRKEG
ENQRITSGESSSGGNPKAKDECAQYRESMKHGQLSCTRES DPVRGVDGEHYNNKCVCKELLQKEMEETNKNSASRS
NGTGSATGKDVCDQFRSQMKNGKLLCTRES DPTRGPDGAMHGNCAMCKERLEKEAAEKKKKEDEEK RNTETNKSDK
EDKCHEYRSMQLDGR LICTRENDPVRDADGKMHVNCAMCQMMFEREANERKMREENSRSQPTNEAKDQCGEVHNSV
EDAKPRPARSSLPSIRGISKDECSEFQNL MKNEKLTCPETDDPVRGADGTFYQNKCHMCRDVLKNEAMKRSLQEKS
SDIRSTKEGDPEFSSSSRSDSMCKNYRILPRMGYLCPKNLNPVCGDDGQTYSNPCMLCHENLMRQTNTRIHNPGACE
ESSNLKTVSTGTPASEKMMQ

SEQ ID NO:12 小鼠 SPINK5 的成熟形式 (扣除信号肽氨基酸1-22)

EKGNQDPCMKFQAQMKNGLTTCPKGNNSSQSLNDIIFQSECILCKRALEQGAPTKIMNVKVL SRANRATDPAK
LNCESFKQRRKDGDGDFICPSDTSSVCGTDGKTYRGRCELCAENAKSQNHVDVKSEGECGSSHLETDMCSDFRANVQD
RLGCTRES DPILGPDGRTHGNRCAMCAELFLKEAKENATRNRRESRI RRDAEKELCKEFENQVRNGRLFCTRES DP
IRGPDGKMHGNCALCAEIFMRQFTEEKGA EKNQKDAEERAKAKMEIQKRCSEFQDRARNGTLFCTRENDPIRGLDGK
THGNLCSMCQAFFKTEAEKKAEAGSRNRRGSESESETYAKLCDEYRKARKNGQLYCTRENAPIRGPDGKIHGNTCSM
CQAFFIQEDKARAKVKREAAKEMCSEFRNQARNGMLMCTRENDPVVGPDPGKRHSNKCAMCASVFLLEEEEEKKDDKT
EKVDAGKAKKEAVQELCRKYHTQLRNGPLRCTRNNPIEGLDGKMYKNACFMCWAFFQQEAKKSGAGFRPKVKREV
KVCSEYLALSKRGEIFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMCKAVFKKENEERKRKEGENQRITSGESSSGGNPKAKDEC
AQYRESMKHGQLSCTRES DPVRGVDGEHYNNKCVCKELLQKEMEETNKNSASRSNGTGSATGKDVCDQFRSQMKNG
KLLCTRES DPTRGPDGAMHGNCAMCKERLEKEAAEKKKKEDEEK RNTETNKSDKEDKCHEYRSMQLDGR LICTREN
DPVRDADGKMHVNCAMCQMMFEREANERKMREENSRSQPTNEAKDQCGEVHNSVEDAKPRPARSSLPSIRGISKDE
CSEFQNL MKNEKLTCPETDDPVRGADGTFYQNKCHMCRDVLKNEAMKRSLQEKSSDIRSTKEGDPEFSSSSRSDSM
CKNYRILPRMGYLCPKNLNPVCGDDGQTYSNPCMLCHENLMRQTNTRIHNPGACEESSNLKTVSTGTPASEKMMQ

SEQ ID NO:13 (Hu SPINK5 (E490-Y757, Kaza1 结构域D8-D11; 加双下划线:接头; 下划线:Fc 人 IgG1E356.M358)

EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNCAMCASVFKLEEEEEKNDKEEKGVKVEAEKVKREA
VQELCSEYRHYVRNGRLPCTRENDPIEGLDGKIHGNTCSMCCEAFFQQEAKERAEPRAKVKREAEKETCDEFRRLL
QNGKLFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMCKAVFQKENEERKRKEEEDQRNAAGHGSSGGGGGNTQDECAEYREQMKN
GRLSCTRES DPVRDADGKSYNNQCTMCKAKLEREAERKNEYGNSVTDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:14 (Hu SPINK5 (E490-Y757, Kaza1 结构域D8-D11; 加双下划线:接头; 下划线:Fc 人 IgG4.S228P)

EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNCAMCASVFKLEEEKKNDKEEKGVKVEAEKVKREA
VQELCSEYRHYVRNGRLPCTRENDPIEGLDGKIHGNTCSMCEAFFQQEAKEKERAEPRAKVKREAETCDEFRRLL
QNGKLFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMCKAVFQKENEERKRKEEEDQRNAAGHGSSGGGGGNTQDECAEYREQMKN
GRLSCTRESDPVRDADGKSYNNQCTMCKAKLEREAERKNEYGNSVTSTYRVSFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:15 (Hu SPINK5 (E490-Y757, Kaza1结构域D8-D11))

EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNCAMCASVFKLEEEKKNDKEEKGVKVEAEKVKREA
VQELCSEYRHYVRNGRLPCTRENDPIEGLDGKIHGNTCSMCEAFFQQEAKEKERAEPRAKVKREAETCDEFRRLL
QNGKLFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMCKAVFQKENEERKRKEEEDQRNAAGHGSSGGGGGNTQDECAEYREQMKN
GRLSCTRESDPVRDADGKSYNNQCTMCKAKLEREAERKNEY

SEQ ID NO:16 (Mu SPINK5 (E421-A695) -Fc, (Kaza1结构域D6-D9; 加双下划线:接头; 下划线:Fc小鼠IgG2a))

EAAKEMCSEFRNQARNGMLMCTRENDPVVGPDGKRHSNKCAMCASVFLLEEEKKKDDKTEKVDAGKAKKEAV
QELCRKYHTQLRNGPLRCTRNNPIEGLDGKMYKNACFMCAFFQQEAKKSGAGFRPKVKREVKVCSEYLALSKRG
EIFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMCKAVFKKENEERKRKEGENQRITSGESSGGNPKAKDECAQYRESMKHGQLS
CTRESDPVRGVDGEHYNNKCVCKELLQKEMEETNKNASRSNGTGSAGNSRAQVTDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPA
PNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI
QHLDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNG
KTELNYKNTPEVLDSGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTKSFSRTPGK

SEQ ID NO:17 (Mu SPINK5 (E421-A695, Kaza1结构域D6-D9))

EAAKEMCSEFRNQARNGMLMCTRENDPVVGPDGKRHSNKCAMCASVFLLEEEKKKDDKTEKVDAGKAKKEAV
QELCRKYHTQLRNGPLRCTRNNPIEGLDGKMYKNACFMCAFFQQEAKKSGAGFRPKVKREVKVCSEYLALSKRG
EIFCTRENDPVRGPDGKTHGNKCAMCKAVFKKENEERKRKEGENQRITSGESSGGNPKAKDECAQYRESMKHGQLS
CTRESDPVRGVDGEHYNNKCVCKELLQKEMEETNKNASRSNGTGS

SEQ ID NO:18 (Hu SPINK5 (R291-R352; Kaza1结构域D5; 加双下划线:接头; 下划线:Fc人IgG1E356.M358))

REIVKLCSQYQNAKNGILFCTRENDPIRGPDGKMHGNLCSMCQAYFQAENEEKKKAERARGNSVTDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:19 (Hu SPINK5 (R291-R352; Kaza1结构域D5; 加双下划线:接头; 下划线:Fc人IgG4.S228P))

REIVKLCSQYQNAKNGILFCTRENDPIRGPDGKMHGNLCSMCQAYFQAENEEKKKAERARGNSVTSTYRVS
PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:20 (Hu SPINK5 (R291-R352; Kaza1结构域D5))

REIVKLCSEQYQNAKNGILFCTRENDPIRGPDKMHGNLCSMCQAYFQAENEEKKAEARAR

SEQ ID NO:21 (Mu SPINK5 (M293-R355;Kazal结构域D4;加双下划线:接头;下划线:Fc小鼠IgG2a)

[0106] MEIQKRCSEFQDRARNGTLFCTRENDPIRGLDGKTHGNLCSMCQAFFKTEAEEKKAEAGSRNRGNSRAQ
VTDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFVNNVEVH
TAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPPEEEMTKKQ
VTLTTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTK
SFSRTPGK

SEQ ID NO:22 (Mu SPINK5 (M293-R355;Kazal结构域D4)

MEIQKRCSEFQDRARNGTLFCTRENDPIRGLDGKTHGNLCSMCQAFFKTEAEEKKAEAGSRNR

SEQ ID NO:23_{sp}|Q5DT21|ISK9_人丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal 9型OS=智人GN=SPINK9PE=1SV=1(包含加下划线的信号肽氨基酸1-19的人全长SPINK9)

MRATAIVLLALTLATMFSIECAKQTKQMVDCSHYKKLPPGQQRFCHMYDPICGSDGKTYKNDCFFCSKVKK
TDGTLKFVHFGKC

SEQ ID NO:24人SPINK9的成熟形式(扣除信号肽氨基酸1-19)

IECAKQTKQMVDCSHYKKLPPGQQRFCCHMYDPICGSDGKTYKNDCFFCSKVKKTDGTLKFVHFGKC

SEQ ID NO:25 (Hu SPINK9 (I20-C86.C22S.H48R.M49E;加双下划线:接头;下划线:Fc人IgG1E356.M358)

IESAKQTKQMVDCSHYKKLPPGQQRFCHREYDPICGSDGKTYKNDCFFCSKVKKTDGTLKFVHFGKCGNSVTD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:26 (Hu SPINK9 (I20-C86.C22S.H48R.M49E;加双下划线:接头;下划线:Fc人IgG4.S228P)

IESAKQTKQMVDCSHYKKLPPGQQRFCHREYDPICGSDGKTYKNDCFFCSKVKKTDGTLKFVHFGKCGNSVTS
KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:27 (Hu SPINK9 (I20-C86.C22S.H48R.M49E;加双下划线:接头;下划线:Fc小鼠IgG2a)

IESAKQTKQMVDCSHYKKLPPGQQRFCCHREYDPICGSDGKTYKNDCFFCSKVKKTDGT

LKFVHFGKCGNSRAQVTDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDV
SEDDPDVQISWVFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSV
RAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVER
NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO:28 (Hu SPINK9 (I20-C86.C22S.H48R.M49E))

IESAKQTKQMVDCSHYKKLPPGQQRFCCHREYDPICGSDGKTYKNDCFFCSKVKKTDGTLKFVHFGKC

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司
 <120> KLK5 拮抗剂治疗疾病的用途
 <130> P34247-W0
 <140>
 <141>
 <150> 62/488,515
 <151> 2017-04-21
 <160> 31
 <170> PatentIn 版本 3.5
 <210> 1
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1

[0001]

```

Met Ala Thr Ala Arg Pro Pro Trp Met Trp Val Leu Cys Ala Leu Ile
1           5           10           15
Thr Ala Leu Leu Leu Gly Val Thr Glu His Val Leu Ala Asn Asn Asp
          20           25           30
Val Ser Cys Asp His Pro Ser Asn Thr Val Pro Ser Gly Ser Asn Gln
          35           40           45
Asp Leu Gly Ala Gly Ala Gly Glu Asp Ala Arg Ser Asp Asp Ser Ser
          50           55           60
Ser Arg Ile Ile Asn Gly Ser Asp Cys Asp Met His Thr Gln Pro Trp
65           70           75           80
Gln Ala Ala Leu Leu Leu Arg Pro Asn Gln Leu Tyr Cys Gly Ala Val
          85           90           95
Leu Val His Pro Gln Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Lys
          100          105          110
Val Phe Arg Val Arg Leu Gly His Tyr Ser Leu Ser Pro Val Tyr Glu
          115          120          125
Ser Gly Gln Gln Met Phe Gln Gly Val Lys Ser Ile Pro His Pro Gly
          130          135          140
Tyr Ser His Pro Gly His Ser Asn Asn Leu Met Leu Ile Lys Leu Asn
          145          150          155          160
Arg Arg Ile Arg Pro Thr Lys Asp Val Arg Pro Ile Asn Val Ser Ser
          165          170          175
His Cys Pro Ser Ala Gly Thr Lys Cys Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr
          180          185          190
Thr Lys Ser Pro Gln Val His Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn
          195          200          205
Ile Ser Val Leu Ser Gln Lys Arg Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Arg Gln
          210          215          220
Ile Asp Asp Thr Met Phe Cys Ala Gly Asp Lys Ala Gly Arg Asp Ser
  
```

225	230	235	240
Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln			
	245	250	255
Gly Leu Val Ser Trp Gly Asp Tyr Pro Cys Ala Arg Pro Asn Arg Pro			
	260	265	270
Gly Val Tyr Thr Asn Leu Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Gln Glu Thr			
	275	280	285
Ile Gln Ala Asn Ser			
290			
<210> 2			
<211> 271			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 2			
Val Thr Glu His Val Leu Ala Asn Asn Asp Val Ser Cys Asp His Pro			
1	5	10	15
Ser Asn Thr Val Pro Ser Gly Ser Asn Gln Asp Leu Gly Ala Gly Ala			
	20	25	30
Gly Glu Asp Ala Arg Ser Asp Asp Ser Ser Ser Arg Ile Ile Asn Gly			
	35	40	45
Ser Asp Cys Asp Met His Thr Gln Pro Trp Gln Ala Ala Leu Leu Leu			
50	55	60	
Arg Pro Asn Gln Leu Tyr Cys Gly Ala Val Leu Val His Pro Gln Trp			
65	70	75	80
Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Lys Val Phe Arg Val Arg Leu			
	85	90	95
Gly His Tyr Ser Leu Ser Pro Val Tyr Glu Ser Gly Gln Gln Met Phe			
	100	105	110
Gln Gly Val Lys Ser Ile Pro His Pro Gly Tyr Ser His Pro Gly His			
	115	120	125
Ser Asn Asn Leu Met Leu Ile Lys Leu Asn Arg Arg Ile Arg Pro Thr			
	130	135	140
Lys Asp Val Arg Pro Ile Asn Val Ser Ser His Cys Pro Ser Ala Gly			
145	150	155	160
Thr Lys Cys Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Lys Ser Pro Gln Val			
	165	170	175
His Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn Ile Ser Val Leu Ser Gln			
	180	185	190
Lys Arg Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Arg Gln Ile Asp Asp Thr Met Phe			
	195	200	205
Cys Ala Gly Asp Lys Ala Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly			
	210	215	220
Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly			
225	230	235	240

[0002]

Asp Tyr Pro Cys Ala Arg Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asn Leu
 245 250 255
 Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Gln Glu Thr Ile Gln Ala Asn Ser
 260 265 270
 <210> 3
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列说明： 合成多肽"
 <400> 3
 Met Ala Thr Ala Arg Pro Pro Trp Met Trp Val Leu Cys Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 Thr Ala Leu Leu Leu Gly Val Thr Glu His Val Leu Ala Asn Asn Asp
 20 25 30
 Val Ser Cys Asp His Pro Ser Asn Thr Val Pro Ser Gly Ser Asn Gln
 35 40 45
 Asp Leu Gly Ala Gly Ala Gly Glu Asp Ala Arg Ser Asp Asp Ser Ser
 50 55 60
 Ser Arg Ile Ile Asn Gly Ser Asp Cys Asp Met His Thr Gln Pro Trp
 65 70 75 80
 Gln Ala Ala Leu Leu Leu Arg Pro Asn Gln Leu Tyr Cys Gly Ala Val
 85 90 95
 Leu Val His Pro Gln Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Lys
 100 105 110
 Val Phe Arg Val Arg Leu Gly His Tyr Ser Leu Ser Pro Val Tyr Glu
 115 120 125
 Ser Gly Gln Gln Met Phe Gln Gly Val Lys Ser Ile Pro His Pro Gly
 130 135 140
 Tyr Ser His Pro Gly His Ser Asn Asp Leu Met Leu Ile Lys Leu Asn
 145 150 155 160
 Arg Arg Ile Arg Pro Thr Lys Asp Val Arg Pro Ile Asn Val Ser Ser
 165 170 175
 His Cys Pro Ser Ala Gly Thr Lys Cys Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr
 180 185 190
 Thr Lys Ser Pro Gln Val His Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn
 195 200 205
 Ile Ser Val Leu Ser Gln Lys Arg Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Arg Gln
 210 215 220
 Ile Asp Asp Thr Met Phe Cys Ala Gly Asp Lys Ala Gly Arg Asp Ser
 225 230 235 240
 Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln

[0003]

245 250 255
 Gly Leu Val Ser Trp Gly Asp Tyr Pro Cys Ala Arg Pro Asn Arg Pro
 260 265 270
 Gly Val Tyr Thr Asn Leu Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Gln Glu Thr
 275 280 285
 Ile Gln Ala Asn Ser
 290
 <210> 4
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列说明： 合成多肽
 "
 <400> 4
 Val Thr Glu His Val Leu Ala Asn Asn Asp Val Ser Cys Asp His Pro
 1 5 10 15
 Ser Asn Thr Val Pro Ser Gly Ser Asn Gln Asp Leu Gly Ala Gly Ala
 20 25 30
 Gly Glu Asp Ala Arg Ser Asp Asp Ser Ser Ser Arg Ile Ile Asn Gly
 35 40 45
 Ser Asp Cys Asp Met His Thr Gln Pro Trp Gln Ala Ala Leu Leu Leu
 50 55 60
 Arg Pro Asn Gln Leu Tyr Cys Gly Ala Val Leu Val His Pro Gln Trp
 65 70 75 80
 Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Lys Val Phe Arg Val Arg Leu
 85 90 95
 Gly His Tyr Ser Leu Ser Pro Val Tyr Glu Ser Gly Gln Gln Met Phe
 100 105 110
 Gln Gly Val Lys Ser Ile Pro His Pro Gly Tyr Ser His Pro Gly His
 115 120 125
 Ser Asn Asp Leu Met Leu Ile Lys Leu Asn Arg Arg Ile Arg Pro Thr
 130 135 140
 Lys Asp Val Arg Pro Ile Asn Val Ser Ser His Cys Pro Ser Ala Gly
 145 150 155 160
 Thr Lys Cys Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Lys Ser Pro Gln Val
 165 170 175
 His Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn Ile Ser Val Leu Ser Gln
 180 185 190
 Lys Arg Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Arg Gln Ile Asp Asp Thr Met Phe
 195 200 205
 Cys Ala Gly Asp Lys Ala Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly
 210 215 220

[0004]

Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly
 225 230 235 240
 Asp Tyr Pro Cys Ala Arg Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asn Leu
 245 250 255
 Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Gln Glu Thr Ile Gln Ala Asn Ser
 260 265 270
 <210> 5
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列说明： 合成多肽
 "
 <400> 5
 Met Ala Thr Ala Arg Pro Pro Trp Met Trp Val Leu Cys Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 Thr Ala Leu Leu Leu Gly Val Thr Glu His Val Leu Ala Asn Asn Asp
 20 25 30
 Val Ser Cys Asp His Pro Ser Asn Thr Val Pro Ser Gly Ser Asn Gln
 35 40 45
 Asp Leu Gly Ala Gly Ala Arg Glu Asp Ala Arg Ser Asp Asp Ser Ser
 50 55 60
 Ser Arg Ile Ile Asn Gly Ser Asp Cys Asp Met His Thr Gln Pro Trp
 65 70 75 80
 Gln Ala Ala Leu Leu Leu Arg Pro Asn Gln Leu Tyr Cys Gly Ala Val
 85 90 95
 Leu Val His Pro Gln Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Lys
 100 105 110
 Val Phe Arg Val Arg Leu Gly His Tyr Ser Leu Ser Pro Val Tyr Glu
 115 120 125
 Ser Gly Gln Gln Met Phe Gln Gly Val Lys Ser Ile Pro His Pro Gly
 130 135 140
 Tyr Ser His Pro Gly His Ser Asn Asn Leu Met Leu Ile Lys Leu Asn
 145 150 155 160
 Arg Arg Ile Arg Pro Thr Lys Asp Val Arg Pro Ile Asn Val Ser Ser
 165 170 175
 His Cys Pro Ser Ala Gly Thr Lys Cys Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr
 180 185 190
 Thr Lys Ser Pro Gln Val His Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn
 195 200 205
 Ile Ser Val Leu Ser Gln Lys Arg Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Arg Gln
 210 215 220
 Ile Asp Asp Thr Met Phe Cys Ala Gly Asp Lys Ala Gly Arg Asp Ser

[0005]

225 230 235 240
 Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln
 245 250 255
 Gly Leu Val Ser Trp Gly Asp Tyr Pro Cys Ala Arg Pro Asn Arg Pro
 260 265 270
 Gly Val Tyr Thr Asn Leu Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Gln Glu Thr
 275 280 285
 Ile Gln Ala Asn Ser
 290
 <210> 6
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列说明： 合成多肽
 "
 <400> 6
 Val Thr Glu His Val Leu Ala Asn Asn Asp Val Ser Cys Asp His Pro
 1 5 10 15
 Ser Asn Thr Val Pro Ser Gly Ser Asn Gln Asp Leu Gly Ala Gly Ala
 20 25 30
 Arg Glu Asp Ala Arg Ser Asp Asp Ser Ser Ser Arg Ile Ile Asn Gly
 35 40 45
 Ser Asp Cys Asp Met His Thr Gln Pro Trp Gln Ala Ala Leu Leu Leu
 50 55 60
 Arg Pro Asn Gln Leu Tyr Cys Gly Ala Val Leu Val His Pro Gln Trp
 65 70 75 80
 Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Lys Val Phe Arg Val Arg Leu
 85 90 95
 Gly His Tyr Ser Leu Ser Pro Val Tyr Glu Ser Gly Gln Gln Met Phe
 100 105 110
 Gln Gly Val Lys Ser Ile Pro His Pro Gly Tyr Ser His Pro Gly His
 115 120 125
 Ser Asn Asn Leu Met Leu Ile Lys Leu Asn Arg Arg Ile Arg Pro Thr
 130 135 140
 Lys Asp Val Arg Pro Ile Asn Val Ser Ser His Cys Pro Ser Ala Gly
 145 150 155 160
 Thr Lys Cys Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Lys Ser Pro Gln Val
 165 170 175
 His Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn Ile Ser Val Leu Ser Gln
 180 185 190
 Lys Arg Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Arg Gln Ile Asp Asp Thr Met Phe
 195 200 205

[0006]

Cys Ala Gly Asp Lys Ala Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly
 210 215 220
 Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly
 225 230 235 240
 Asp Tyr Pro Cys Ala Arg Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asn Leu
 245 250 255
 Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Gln Glu Thr Ile Gln Ala Asn Ser
 260 265 270

<210> 7

<211> 293

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列说明： 合成
 多肽"

<400> 7

Met Ala Thr Ala Arg Pro Pro Trp Met Trp Val Leu Cys Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 Thr Ala Leu Leu Leu Gly Val Thr Glu His Val Leu Ala Asn Asn Asp
 20 25 30
 Val Ser Cys Asp His Pro Ser Asn Thr Val Pro Ser Gly Ser Asn Gln
 35 40 45
 Asp Leu Gly Ala Gly Ala Arg Glu Asp Ala Arg Ser Asp Asp Ser Ser
 50 55 60
 Ser Arg Ile Ile Asn Gly Ser Asp Cys Asp Met His Thr Gln Pro Trp
 65 70 75 80
 Gln Ala Ala Leu Leu Leu Arg Pro Asn Gln Leu Tyr Cys Gly Ala Val
 85 90 95
 Leu Val His Pro Gln Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Lys
 100 105 110
 Val Phe Arg Val Arg Leu Gly His Tyr Ser Leu Ser Pro Val Tyr Glu
 115 120 125
 Ser Gly Gln Gln Met Phe Gln Gly Val Lys Ser Ile Pro His Pro Gly
 130 135 140
 Tyr Ser His Pro Gly His Ser Asn Asp Leu Met Leu Ile Lys Leu Asn
 145 150 155 160
 Arg Arg Ile Arg Pro Thr Lys Asp Val Arg Pro Ile Asn Val Ser Ser
 165 170 175
 His Cys Pro Ser Ala Gly Thr Lys Cys Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr
 180 185 190
 Thr Lys Ser Pro Gln Val His Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn
 195 200 205
 Ile Ser Val Leu Ser Gln Lys Arg Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Arg Gln

[0007]

210 215 220
 Ile Asp Asp Thr Met Phe Cys Ala Gly Asp Lys Ala Gly Arg Asp Ser
 225 230 235 240
 Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln
 245 250 255
 Gly Leu Val Ser Trp Gly Asp Tyr Pro Cys Ala Arg Pro Asn Arg Pro
 260 265 270
 Gly Val Tyr Thr Asn Leu Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Gln Glu Thr
 275 280 285
 Ile Gln Ala Asn Ser
 290
 <210> 8
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列说明： 合成多肽
 "
 <400> 8
 Val Thr Glu His Val Leu Ala Asn Asn Asp Val Ser Cys Asp His Pro
 1 5 10 15
 Ser Asn Thr Val Pro Ser Gly Ser Asn Gln Asp Leu Gly Ala Gly Ala
 20 25 30
 Arg Glu Asp Ala Arg Ser Asp Asp Ser Ser Ser Arg Ile Ile Asn Gly
 35 40 45
 Ser Asp Cys Asp Met His Thr Gln Pro Trp Gln Ala Ala Leu Leu Leu
 50 55 60
 Arg Pro Asn Gln Leu Tyr Cys Gly Ala Val Leu Val His Pro Gln Trp
 65 70 75 80
 Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Lys Val Phe Arg Val Arg Leu
 85 90 95
 Gly His Tyr Ser Leu Ser Pro Val Tyr Glu Ser Gly Gln Gln Met Phe
 100 105 110
 Gln Gly Val Lys Ser Ile Pro His Pro Gly Tyr Ser His Pro Gly His
 115 120 125
 Ser Asn Asp Leu Met Leu Ile Lys Leu Asn Arg Arg Ile Arg Pro Thr
 130 135 140
 Lys Asp Val Arg Pro Ile Asn Val Ser Ser His Cys Pro Ser Ala Gly
 145 150 155 160
 Thr Lys Cys Leu Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Lys Ser Pro Gln Val
 165 170 175
 His Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn Ile Ser Val Leu Ser Gln
 180 185 190

[0008]

Lys Arg Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Arg Gln Ile Asp Asp Thr Met Phe
 195 200 205
 Cys Ala Gly Asp Lys Ala Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly
 210 215 220
 Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly
 225 230 235 240
 Asp Tyr Pro Cys Ala Arg Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asn Leu
 245 250 255
 Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Gln Glu Thr Ile Gln Ala Asn Ser
 260 265 270
 <210> 9
 <211> 1064
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 9
 Met Lys Ile Ala Thr Val Ser Val Leu Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu
 1 5 10 15
 Ile Gln Asp Ala Ala Ser Lys Asn Glu Asp Gln Glu Met Cys His Glu
 20 25 30
 Phe Gln Ala Phe Met Lys Asn Gly Lys Leu Phe Cys Pro Gln Asp Lys
 35 40 45
 Lys Phe Phe Gln Ser Leu Asp Gly Ile Met Phe Ile Asn Lys Cys Ala
 [0009] 50 55 60
 Thr Cys Lys Met Ile Leu Glu Lys Glu Ala Lys Ser Gln Lys Arg Ala
 65 70 75 80
 Arg His Leu Ala Arg Ala Pro Lys Ala Thr Ala Pro Thr Glu Leu Asn
 85 90 95
 Cys Asp Asp Phe Lys Lys Gly Glu Arg Asp Gly Asp Phe Ile Cys Pro
 100 105 110
 Asp Tyr Tyr Glu Ala Val Cys Gly Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Asn
 115 120 125
 Arg Cys Ala Leu Cys Ala Glu Asn Ala Lys Thr Gly Ser Gln Ile Gly
 130 135 140
 Val Lys Ser Glu Gly Glu Cys Lys Ser Ser Asn Pro Glu Gln Asp Val
 145 150 155 160
 Cys Ser Ala Phe Arg Pro Phe Val Arg Asp Gly Arg Leu Gly Cys Thr
 165 170 175
 Arg Glu Asn Asp Pro Val Leu Gly Pro Asp Gly Lys Thr His Gly Asn
 180 185 190
 Lys Cys Ala Met Cys Ala Glu Leu Phe Leu Lys Glu Ala Glu Asn Ala
 195 200 205
 Lys Arg Glu Gly Glu Thr Arg Ile Arg Arg Asn Ala Glu Lys Asp Phe
 210 215 220
 Cys Lys Glu Tyr Glu Lys Gln Val Arg Asn Gly Arg Leu Phe Cys Thr

225	230	235	240
Arg Glu Ser Asp Pro Val Arg Gly Pro Asp Gly Arg Met His Gly Asn			
	245	250	255
Lys Cys Ala Leu Cys Ala Glu Ile Phe Lys Gln Arg Phe Ser Glu Glu			
	260	265	270
Asn Ser Lys Thr Asp Gln Asn Leu Gly Lys Ala Glu Glu Lys Thr Lys			
	275	280	285
Val Lys Arg Glu Ile Val Lys Leu Cys Ser Gln Tyr Gln Asn Gln Ala			
	290	295	300
Lys Asn Gly Ile Leu Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Arg Gly			
305	310	315	320
Pro Asp Gly Lys Met His Gly Asn Leu Cys Ser Met Cys Gln Ala Tyr			
	325	330	335
Phe Gln Ala Glu Asn Glu Glu Lys Lys Lys Ala Glu Ala Arg Ala Arg			
	340	345	350
Asn Lys Arg Glu Ser Gly Lys Ala Thr Ser Tyr Ala Glu Leu Cys Ser			
	355	360	365
Glu Tyr Arg Lys Leu Val Arg Asn Gly Lys Leu Ala Cys Thr Arg Glu			
	370	375	380
Asn Asp Pro Ile Gln Gly Pro Asp Gly Lys Val His Gly Asn Thr Cys			
385	390	395	400
Ser Met Cys Glu Val Phe Phe Gln Ala Glu Glu Glu Glu Lys Lys Lys			
	405	410	415
Lys Glu Gly Lys Ser Arg Asn Lys Arg Gln Ser Lys Ser Thr Ala Ser			
	420	425	430
Phe Glu Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg Lys Ser Arg Lys Asn Gly Arg			
	435	440	445
Leu Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Gln Gly Pro Asp Gly Lys			
	450	455	460
Met His Gly Asn Thr Cys Ser Met Cys Glu Ala Phe Phe Gln Gln Glu			
465	470	475	480
Glu Arg Ala Arg Ala Lys Ala Lys Arg Glu Ala Ala Lys Glu Ile Cys			
	485	490	495
Ser Glu Phe Arg Asp Gln Val Arg Asn Gly Thr Leu Ile Cys Thr Arg			
	500	505	510
Glu His Asn Pro Val Arg Gly Pro Asp Gly Lys Met His Gly Asn Lys			
	515	520	525
Cys Ala Met Cys Ala Ser Val Phe Lys Leu Glu Glu Glu Glu Lys Lys			
	530	535	540
Asn Asp Lys Glu Glu Lys Gly Lys Val Glu Ala Glu Lys Val Lys Arg			
545	550	555	560
Glu Ala Val Gln Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg His Tyr Val Arg Asn			
	565	570	575

[0010]

[0011]

Gly Arg Leu Pro Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Glu Gly Leu Asp		
580	585	590
Gly Lys Ile His Gly Asn Thr Cys Ser Met Cys Glu Ala Phe Phe Gln		
595	600	605
Gln Glu Ala Lys Glu Lys Glu Arg Ala Glu Pro Arg Ala Lys Val Lys		
610	615	620
Arg Glu Ala Glu Lys Glu Thr Cys Asp Glu Phe Arg Arg Leu Leu Gln		
625	630	635
Asn Gly Lys Leu Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Val Arg Gly Pro		
645	650	655
Asp Gly Lys Thr His Gly Asn Lys Cys Ala Met Cys Lys Ala Val Phe		
660	665	670
Gln Lys Glu Asn Glu Glu Arg Lys Arg Lys Glu Glu Glu Asp Gln Arg		
675	680	685
Asn Ala Ala Gly His Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Asn Thr Gln		
690	695	700
Asp Glu Cys Ala Glu Tyr Arg Glu Gln Met Lys Asn Gly Arg Leu Ser		
705	710	715
Cys Thr Arg Glu Ser Asp Pro Val Arg Asp Ala Asp Gly Lys Ser Tyr		
725	730	735
Asn Asn Gln Cys Thr Met Cys Lys Ala Lys Leu Glu Arg Glu Ala Glu		
740	745	750
Arg Lys Asn Glu Tyr Ser Arg Ser Arg Ser Asn Gly Thr Gly Ser Glu		
755	760	765
Ser Gly Lys Asp Thr Cys Asp Glu Phe Arg Ser Gln Met Lys Asn Gly		
770	775	780
Lys Leu Ile Cys Thr Arg Glu Ser Asp Pro Val Arg Gly Pro Asp Gly		
785	790	795
Lys Thr His Gly Asn Lys Cys Thr Met Cys Lys Glu Lys Leu Glu Arg		
805	810	815
Glu Ala Ala Glu Lys Lys Lys Lys Glu Asp Glu Asp Arg Ser Asn Thr		
820	825	830
Gly Glu Arg Ser Asn Thr Gly Glu Arg Ser Asn Asp Lys Glu Asp Leu		
835	840	845
Cys Arg Glu Phe Arg Ser Met Gln Arg Asn Gly Lys Leu Ile Cys Thr		
850	855	860
Arg Glu Asn Asn Pro Val Arg Gly Pro Tyr Gly Lys Met His Ile Asn		
865	870	875
Lys Cys Ala Met Cys Gln Ser Ile Phe Asp Arg Glu Ala Asn Glu Arg		
885	890	895
Lys Lys Lys Asp Glu Glu Lys Ser Ser Ser Lys Pro Ser Asn Asn Ala		
900	905	910
Lys Asp Glu Cys Ser Glu Phe Arg Asn Tyr Ile Arg Asn Asn Glu Leu		

[0012]

```

          915              920              925
Ile Cys Pro Arg Glu Asn Asp Pro Val His Gly Ala Asp Gly Lys Phe
    930              935              940
Tyr Thr Asn Lys Cys Tyr Met Cys Arg Ala Val Phe Leu Thr Glu Ala
945              950              955              960
Leu Glu Arg Ala Lys Leu Gln Glu Lys Pro Ser His Val Arg Ala Ser
          965              970              975
Gln Glu Glu Asp Ser Pro Asp Ser Phe Ser Ser Leu Asp Ser Glu Met
          980              985              990
Cys Lys Asp Tyr Arg Val Leu Pro Arg Ile Gly Tyr Leu Cys Pro Lys
    995              1000              1005
Asp Leu Lys Pro Val Cys Gly Asp Asp Gly Gln Thr Tyr Asn Asn
    1010              1015              1020
Pro Cys Met Leu Cys His Glu Asn Leu Ile Arg Gln Thr Asn Thr
    1025              1030              1035
His Ile Arg Ser Thr Gly Lys Cys Glu Glu Ser Ser Thr Pro Gly
    1040              1045              1050
Thr Thr Ala Ala Ser Met Pro Pro Ser Asp Glu
    1055              1060
<210> 10
<211> 1042
<212> PRT
<213> 智人
<400> 10
Lys Asn Glu Asp Gln Glu Met Cys His Glu Phe Gln Ala Phe Met Lys
1              5              10              15
Asn Gly Lys Leu Phe Cys Pro Gln Asp Lys Lys Phe Phe Gln Ser Leu
          20              25              30
Asp Gly Ile Met Phe Ile Asn Lys Cys Ala Thr Cys Lys Met Ile Leu
          35              40              45
Glu Lys Glu Ala Lys Ser Gln Lys Arg Ala Arg His Leu Ala Arg Ala
          50              55              60
Pro Lys Ala Thr Ala Pro Thr Glu Leu Asn Cys Asp Asp Phe Lys Lys
65              70              75              80
Gly Glu Arg Asp Gly Asp Phe Ile Cys Pro Asp Tyr Tyr Glu Ala Val
          85              90              95
Cys Gly Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Asn Arg Cys Ala Leu Cys Ala
          100              105              110
Glu Asn Ala Lys Thr Gly Ser Gln Ile Gly Val Lys Ser Glu Gly Glu
          115              120              125
Cys Lys Ser Ser Asn Pro Glu Gln Asp Val Cys Ser Ala Phe Arg Pro
          130              135              140
Phe Val Arg Asp Gly Arg Leu Gly Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Val
145              150              155              160

```

[0013]

Leu Gly Pro Asp Gly Lys Thr His Gly Asn Lys Cys Ala Met Cys Ala		
165	170	175
Glu Leu Phe Leu Lys Glu Ala Glu Asn Ala Lys Arg Glu Gly Glu Thr		
180	185	190
Arg Ile Arg Arg Asn Ala Glu Lys Asp Phe Cys Lys Glu Tyr Glu Lys		
195	200	205
Gln Val Arg Asn Gly Arg Leu Phe Cys Thr Arg Glu Ser Asp Pro Val		
210	215	220
Arg Gly Pro Asp Gly Arg Met His Gly Asn Lys Cys Ala Leu Cys Ala		
225	230	235
Glu Ile Phe Lys Gln Arg Phe Ser Glu Glu Asn Ser Lys Thr Asp Gln		
245	250	255
Asn Leu Gly Lys Ala Glu Glu Lys Thr Lys Val Lys Arg Glu Ile Val		
260	265	270
Lys Leu Cys Ser Gln Tyr Gln Asn Gln Ala Lys Asn Gly Ile Leu Phe		
275	280	285
Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Arg Gly Pro Asp Gly Lys Met His		
290	295	300
Gly Asn Leu Cys Ser Met Cys Gln Ala Tyr Phe Gln Ala Glu Asn Glu		
305	310	315
Glu Lys Lys Lys Ala Glu Ala Arg Ala Arg Asn Lys Arg Glu Ser Gly		
325	330	335
Lys Ala Thr Ser Tyr Ala Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg Lys Leu Val		
340	345	350
Arg Asn Gly Lys Leu Ala Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Gln Gly		
355	360	365
Pro Asp Gly Lys Val His Gly Asn Thr Cys Ser Met Cys Glu Val Phe		
370	375	380
Phe Gln Ala Glu Glu Glu Glu Lys Lys Lys Lys Glu Gly Lys Ser Arg		
385	390	395
Asn Lys Arg Gln Ser Lys Ser Thr Ala Ser Phe Glu Glu Leu Cys Ser		
405	410	415
Glu Tyr Arg Lys Ser Arg Lys Asn Gly Arg Leu Phe Cys Thr Arg Glu		
420	425	430
Asn Asp Pro Ile Gln Gly Pro Asp Gly Lys Met His Gly Asn Thr Cys		
435	440	445
Ser Met Cys Glu Ala Phe Phe Gln Gln Glu Glu Arg Ala Arg Ala Lys		
450	455	460
Ala Lys Arg Glu Ala Ala Lys Glu Ile Cys Ser Glu Phe Arg Asp Gln		
465	470	475
Val Arg Asn Gly Thr Leu Ile Cys Thr Arg Glu His Asn Pro Val Arg		
485	490	495
Gly Pro Asp Gly Lys Met His Gly Asn Lys Cys Ala Met Cys Ala Ser		
500	505	510

[0014]

Val Phe Lys Leu Glu Glu Glu Lys Lys Asn Asp Lys Glu Glu Lys		
515	520	525
Gly Lys Val Glu Ala Glu Lys Val Lys Arg Glu Ala Val Gln Glu Leu		
530	535	540
Cys Ser Glu Tyr Arg His Tyr Val Arg Asn Gly Arg Leu Pro Cys Thr		
545	550	555
Arg Glu Asn Asp Pro Ile Glu Gly Leu Asp Gly Lys Ile His Gly Asn		
565	570	575
Thr Cys Ser Met Cys Glu Ala Phe Phe Gln Gln Glu Ala Lys Glu Lys		
580	585	590
Glu Arg Ala Glu Pro Arg Ala Lys Val Lys Arg Glu Ala Glu Lys Glu		
595	600	605
Thr Cys Asp Glu Phe Arg Arg Leu Leu Gln Asn Gly Lys Leu Phe Cys		
610	615	620
Thr Arg Glu Asn Asp Pro Val Arg Gly Pro Asp Gly Lys Thr His Gly		
625	630	635
Asn Lys Cys Ala Met Cys Lys Ala Val Phe Gln Lys Glu Asn Glu Glu		
645	650	655
Arg Lys Arg Lys Glu Glu Glu Asp Gln Arg Asn Ala Ala Gly His Gly		
660	665	670
Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Asn Thr Gln Asp Glu Cys Ala Glu Tyr		
675	680	685
Arg Glu Gln Met Lys Asn Gly Arg Leu Ser Cys Thr Arg Glu Ser Asp		
690	695	700
Pro Val Arg Asp Ala Asp Gly Lys Ser Tyr Asn Asn Gln Cys Thr Met		
705	710	715
Cys Lys Ala Lys Leu Glu Arg Glu Ala Glu Arg Lys Asn Glu Tyr Ser		
725	730	735
Arg Ser Arg Ser Asn Gly Thr Gly Ser Glu Ser Gly Lys Asp Thr Cys		
740	745	750
Asp Glu Phe Arg Ser Gln Met Lys Asn Gly Lys Leu Ile Cys Thr Arg		
755	760	765
Glu Ser Asp Pro Val Arg Gly Pro Asp Gly Lys Thr His Gly Asn Lys		
770	775	780
Cys Thr Met Cys Lys Glu Lys Leu Glu Arg Glu Ala Ala Glu Lys Lys		
785	790	795
Lys Lys Glu Asp Glu Asp Arg Ser Asn Thr Gly Glu Arg Ser Asn Thr		
805	810	815
Gly Glu Arg Ser Asn Asp Lys Glu Asp Leu Cys Arg Glu Phe Arg Ser		
820	825	830
Met Gln Arg Asn Gly Lys Leu Ile Cys Thr Arg Glu Asn Asn Pro Val		
835	840	845
Arg Gly Pro Tyr Gly Lys Met His Ile Asn Lys Cys Ala Met Cys Gln		
850	855	860

[0015]

```

Ser Ile Phe Asp Arg Glu Ala Asn Glu Arg Lys Lys Lys Asp Glu Glu
865                870                875                880
Lys Ser Ser Ser Lys Pro Ser Asn Asn Ala Lys Asp Glu Cys Ser Glu
                885                890                895
Phe Arg Asn Tyr Ile Arg Asn Asn Glu Leu Ile Cys Pro Arg Glu Asn
                900                905                910
Asp Pro Val His Gly Ala Asp Gly Lys Phe Tyr Thr Asn Lys Cys Tyr
                915                920                925
Met Cys Arg Ala Val Phe Leu Thr Glu Ala Leu Glu Arg Ala Lys Leu
                930                935                940
Gln Glu Lys Pro Ser His Val Arg Ala Ser Gln Glu Glu Asp Ser Pro
945                950                955                960
Asp Ser Phe Ser Ser Leu Asp Ser Glu Met Cys Lys Asp Tyr Arg Val
                965                970                975
Leu Pro Arg Ile Gly Tyr Leu Cys Pro Lys Asp Leu Lys Pro Val Cys
                980                985                990
Gly Asp Asp Gly Gln Thr Tyr Asn Asn Pro Cys Met Leu Cys His Glu
                995                1000                1005
Asn Leu Ile Arg Gln Thr Asn Thr His Ile Arg Ser Thr Gly Lys
                1010                1015                1020
Cys Glu Glu Ser Ser Thr Pro Gly Thr Thr Ala Ala Ser Met Pro
                1025                1030                1035
Pro Ser Asp Glu
                1040
<210> 11
<211> 1017
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 11
Met Lys Thr Ala Thr Val Pro Met Leu Leu Thr Leu Ala Phe Tyr Leu
1                5                10                15
Thr Gln Asp Ala Ala Gly Glu Lys Gly Asn Gln Asp Pro Cys Met Lys
                20                25                30
Phe Gln Ala Gln Met Lys Asn Gly Thr Leu Thr Cys Pro Lys Gly Asn
                35                40                45
Asn Ser Ser Gln Ser Leu Asn Asp Ile Ile Phe Gln Ser Glu Cys Ile
                50                55                60
Leu Cys Lys Arg Ala Leu Glu Gln Gly Ala Pro Thr Lys Ile Met Asn
65                70                75                80
Val Lys Val Leu Ser Arg Ala Asn Arg Ala Thr Asp Pro Ala Lys Leu
                85                90                95
Asn Cys Glu Ser Phe Lys Gln Arg Arg Lys Asp Gly Asp Phe Ile Cys
                100                105                110
Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Cys Gly Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Arg

```


	115	120	125
	Gly Arg Cys Glu Leu Cys Ala Glu Asn Ala Lys Ser Gln Asn His Val		
	130	135	140
	Asp Val Lys Ser Glu Gly Glu Cys Gly Ser Ser His Leu Glu Thr Asp		
	145	150	155
	Met Cys Ser Asp Phe Arg Ala Asn Val Gln Asp Gly Arg Leu Gly Cys		
	165	170	175
	Thr Arg Glu Ser Asp Pro Ile Leu Gly Pro Asp Gly Arg Thr His Gly		
	180	185	190
	Asn Arg Cys Ala Met Cys Ala Glu Leu Phe Leu Lys Glu Ala Lys Glu		
	195	200	205
	Asn Ala Thr Arg Asn Arg Glu Ser Arg Ile Arg Arg Asp Ala Glu Lys		
	210	215	220
	Glu Leu Cys Lys Glu Phe Glu Asn Gln Val Arg Asn Gly Arg Leu Phe		
	225	230	235
	Cys Thr Arg Glu Ser Asp Pro Ile Arg Gly Pro Asp Gly Lys Met His		
	245	250	255
	Gly Asn Lys Cys Ala Leu Cys Ala Glu Ile Phe Met Arg Gln Phe Thr		
	260	265	270
	Glu Glu Lys Gly Lys Ala Glu Lys Asn Gln Lys Asp Ala Glu Glu Arg		
	275	280	285
[0016]	Ala Lys Ala Lys Met Glu Ile Gln Lys Arg Cys Ser Glu Phe Gln Asp		
	290	295	300
	Arg Ala Arg Asn Gly Thr Leu Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile		
	305	310	315
	Arg Gly Leu Asp Gly Lys Thr His Gly Asn Leu Cys Ser Met Cys Gln		
	325	330	335
	Ala Phe Phe Lys Thr Glu Ala Glu Glu Lys Lys Ala Glu Ala Gly Ser		
	340	345	350
	Arg Asn Arg Arg Gly Ser Glu Glu Ser Glu Thr Tyr Ala Lys Leu Cys		
	355	360	365
	Asp Glu Tyr Arg Lys Ala Arg Lys Asn Gly Gln Leu Tyr Cys Thr Arg		
	370	375	380
	Glu Asn Ala Pro Ile Arg Gly Pro Asp Gly Lys Ile His Gly Asn Thr		
	385	390	395
	Cys Ser Met Cys Gln Ala Phe Phe Ile Gln Glu Asp Lys Ala Arg Ala		
	405	410	415
	Lys Val Lys Arg Glu Ala Ala Lys Glu Met Cys Ser Glu Phe Arg Asn		
	420	425	430
	Gln Ala Arg Asn Gly Met Leu Met Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Val		
	435	440	445
	Val Gly Pro Asp Gly Lys Arg His Ser Asn Lys Cys Ala Met Cys Ala		
	450	455	460
	Ser Val Phe Leu Leu Glu Glu Glu Glu Lys Lys Lys Asp Asp Lys Thr		

[0017]

465	470	475	480
Glu Lys Val Asp	Ala Gly Lys Ala Lys Lys	Glu Ala Val Gln	Glu Leu
	485	490	495
Cys Arg Lys Tyr	His Thr Gln Leu Arg Asn Gly	Pro Leu Arg Cys	Thr
	500	505	510
Arg Arg Asn Asn	Pro Ile Glu Gly Leu Asp Gly	Lys Met Tyr Lys	Asn
	515	520	525
Ala Cys Phe Met	Cys Trp Ala Phe Phe Gln Gln	Glu Ala Lys Lys	Ser
	530	535	540
Gly Ala Gly Phe	Arg Pro Lys Val Lys Arg Glu	Val Lys Val Asp	Cys
	545	550	555
Ser Glu Tyr Leu	Ala Leu Ser Lys Arg Gly Glu	Ile Phe Cys Thr	Arg
	565	570	575
Glu Asn Asp Pro	Val Arg Gly Pro Asp Gly Lys Thr	His Gly Asn	Lys
	580	585	590
Cys Ala Met Cys	Lys Ala Val Phe Lys Lys Glu	Asn Glu Glu Arg	Lys
	595	600	605
Arg Lys Glu Gly	Glu Asn Gln Arg Ile Thr Ser Gly	Glu Ser Ser	Ser
	610	615	620
Gly Gly Asn Pro	Lys Ala Lys Asp Glu Cys Ala Gln	Tyr Arg Glu	Ser
	625	630	635
Met Lys His Gly	Gln Leu Ser Cys Thr Arg Glu	Ser Asp Pro Val	Arg
	645	650	655
Gly Val Asp Gly	Glu His Tyr Asn Asn Lys Cys Val	Met Cys Lys	Glu
	660	665	670
Leu Leu Gln Lys	Glu Met Glu Glu Thr Asn Lys Asn	Ser Ala Ser	Arg
	675	680	685
Ser Asn Gly Thr	Gly Ser Ala Thr Gly Lys Asp Val	Cys Asp Gln	Phe
	690	695	700
Arg Ser Gln Met	Lys Asn Gly Lys Leu Leu Cys Thr	Arg Glu Ser	Asp
	705	710	715
Pro Thr Arg Gly	Pro Asp Gly Ala Met His Gly	Asn Lys Cys Ala	Met
	725	730	735
Cys Lys Glu Arg	Leu Glu Lys Glu Ala Ala Glu	Lys Lys Lys	Glu
	740	745	750
Asp Glu Glu Lys	Arg Asn Thr Glu Thr Asn Lys Ser	Asp Lys Glu	Asp
	755	760	765
Lys Cys His Glu	Tyr Arg Ser Met Gln Leu Asp Gly	Arg Leu Ile	Cys
	770	775	780
Thr Arg Glu Asn	Asp Pro Val Arg Asp Ala Asp Gly	Lys Met His	Val
	785	790	795
Asn Lys Cys Ala	Met Cys Gln Met Met Phe Glu	Arg Glu Ala Asn	Glu
	805	810	815
Arg Lys Met Arg	Glu Glu Asn Ser Arg Ser Gln	Pro Thr Asn	Glu Ala

	820	825	830
	Lys Asp Gln Cys Gly Glu Val His Asn Ser Val Glu Asp Ala Lys Pro		
	835	840	845
	Arg Pro Ala Arg Ser Ser Leu Pro Ser Ile Arg Gly Ile Ser Lys Asp		
	850	855	860
	Glu Cys Ser Glu Phe Gln Asn Leu Met Lys Asn Glu Lys Leu Thr Cys		
	865	870	875
	Pro Glu Thr Asp Asp Pro Val Arg Gly Ala Asp Gly Thr Phe Tyr Gln		
	885	890	895
	Asn Lys Cys His Met Cys Arg Asp Val Leu Lys Asn Glu Ala Met Lys		
	900	905	910
	Arg Ser Gly Leu Gln Glu Lys Ser Ser Asp Ile Arg Ser Thr Lys Glu		
	915	920	925
	Gly Asp Pro Glu Phe Ser Ser Ser Arg Asp Ser Asp Met Cys Lys		
	930	935	940
	Asn Tyr Arg Ile Leu Pro Arg Met Gly Tyr Leu Cys Pro Lys Asn Leu		
	945	950	955
	Asn Pro Val Cys Gly Asp Asp Gly Gln Thr Tyr Ser Asn Pro Cys Met		
	965	970	975
	Leu Cys His Glu Asn Leu Met Arg Gln Thr Asn Thr Arg Ile His Asn		
	980	985	990
[0018]	Pro Gly Ala Cys Glu Glu Ser Ser Asn Leu Lys Thr Val Ser Thr Gly		
	995	1000	1005
	Thr Pro Ala Ser Glu Lys Met Met Gln		
	1010	1015	
	<210> 12		
	<211> 995		
	<212> PRT		
	<213> 小家鼠		
	<400> 12		
	Glu Lys Gly Asn Gln Asp Pro Cys Met Lys Phe Gln Ala Gln Met Lys		
	1	5	10
	Asn Gly Thr Leu Thr Cys Pro Lys Gly Asn Asn Ser Ser Gln Ser Leu		
	20	25	30
	Asn Asp Ile Ile Phe Gln Ser Glu Cys Ile Leu Cys Lys Arg Ala Leu		
	35	40	45
	Glu Gln Gly Ala Pro Thr Lys Ile Met Asn Val Lys Val Leu Ser Arg		
	50	55	60
	Ala Asn Arg Ala Thr Asp Pro Ala Lys Leu Asn Cys Glu Ser Phe Lys		
	65	70	75
	Gln Arg Arg Lys Asp Gly Asp Phe Ile Cys Pro Ser Asp Thr Ser Ser		
	85	90	95
	Val Cys Gly Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Gly Arg Cys Glu Leu Cys		
	100	105	110

[0019]

Ala Glu Asn Ala Lys Ser Gln Asn His Val Asp Val Lys Ser Glu Gly		
115	120	125
Glu Cys Gly Ser Ser His Leu Glu Thr Asp Met Cys Ser Asp Phe Arg		
130	135	140
Ala Asn Val Gln Asp Gly Arg Leu Gly Cys Thr Arg Glu Ser Asp Pro		
145	150	155
Ile Leu Gly Pro Asp Gly Arg Thr His Gly Asn Arg Cys Ala Met Cys		
165	170	175
Ala Glu Leu Phe Leu Lys Glu Ala Lys Glu Asn Ala Thr Arg Asn Arg		
180	185	190
Glu Ser Arg Ile Arg Arg Asp Ala Glu Lys Glu Leu Cys Lys Glu Phe		
195	200	205
Glu Asn Gln Val Arg Asn Gly Arg Leu Phe Cys Thr Arg Glu Ser Asp		
210	215	220
Pro Ile Arg Gly Pro Asp Gly Lys Met His Gly Asn Lys Cys Ala Leu		
225	230	235
Cys Ala Glu Ile Phe Met Arg Gln Phe Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ala		
245	250	255
Glu Lys Asn Gln Lys Asp Ala Glu Glu Arg Ala Lys Ala Lys Met Glu		
260	265	270
Ile Gln Lys Arg Cys Ser Glu Phe Gln Asp Arg Ala Arg Asn Gly Thr		
275	280	285
Leu Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Arg Gly Leu Asp Gly Lys		
290	295	300
Thr His Gly Asn Leu Cys Ser Met Cys Gln Ala Phe Phe Lys Thr Glu		
305	310	315
Ala Glu Glu Lys Lys Ala Glu Ala Gly Ser Arg Asn Arg Arg Gly Ser		
325	330	335
Glu Glu Ser Glu Thr Tyr Ala Lys Leu Cys Asp Glu Tyr Arg Lys Ala		
340	345	350
Arg Lys Asn Gly Gln Leu Tyr Cys Thr Arg Glu Asn Ala Pro Ile Arg		
355	360	365
Gly Pro Asp Gly Lys Ile His Gly Asn Thr Cys Ser Met Cys Gln Ala		
370	375	380
Phe Phe Ile Gln Glu Asp Lys Ala Arg Ala Lys Val Lys Arg Glu Ala		
385	390	395
Ala Lys Glu Met Cys Ser Glu Phe Arg Asn Gln Ala Arg Asn Gly Met		
405	410	415
Leu Met Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Val Val Gly Pro Asp Gly Lys		
420	425	430
Arg His Ser Asn Lys Cys Ala Met Cys Ala Ser Val Phe Leu Leu Glu		
435	440	445
Glu Glu Glu Lys Lys Lys Asp Asp Lys Thr Glu Lys Val Asp Ala Gly		
450	455	460

[0020]

Lys Ala Lys Lys Glu Ala Val Gln Glu Leu Cys Arg Lys Tyr His Thr			
465	470	475	480
Gln Leu Arg Asn Gly Pro Leu Arg Cys Thr Arg Arg Asn Asn Pro Ile			
	485	490	495
Glu Gly Leu Asp Gly Lys Met Tyr Lys Asn Ala Cys Phe Met Cys Trp			
	500	505	510
Ala Phe Phe Gln Gln Glu Ala Lys Lys Ser Gly Ala Gly Phe Arg Pro			
	515	520	525
Lys Val Lys Arg Glu Val Lys Val Asp Cys Ser Glu Tyr Leu Ala Leu			
	530	535	540
Ser Lys Arg Gly Glu Ile Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Val Arg			
545	550	555	560
Gly Pro Asp Gly Lys Thr His Gly Asn Lys Cys Ala Met Cys Lys Ala			
	565	570	575
Val Phe Lys Lys Glu Asn Glu Glu Arg Lys Arg Lys Glu Gly Glu Asn			
	580	585	590
Gln Arg Ile Thr Ser Gly Glu Ser Ser Ser Gly Gly Asn Pro Lys Ala			
	595	600	605
Lys Asp Glu Cys Ala Gln Tyr Arg Glu Ser Met Lys His Gly Gln Leu			
610	615	620	
Ser Cys Thr Arg Glu Ser Asp Pro Val Arg Gly Val Asp Gly Glu His			
625	630	635	640
Tyr Asn Asn Lys Cys Val Met Cys Lys Glu Leu Leu Gln Lys Glu Met			
	645	650	655
Glu Glu Thr Asn Lys Asn Ser Ala Ser Arg Ser Asn Gly Thr Gly Ser			
	660	665	670
Ala Thr Gly Lys Asp Val Cys Asp Gln Phe Arg Ser Gln Met Lys Asn			
	675	680	685
Gly Lys Leu Leu Cys Thr Arg Glu Ser Asp Pro Thr Arg Gly Pro Asp			
690	695	700	
Gly Ala Met His Gly Asn Lys Cys Ala Met Cys Lys Glu Arg Leu Glu			
705	710	715	720
Lys Glu Ala Ala Glu Lys Lys Lys Lys Glu Asp Glu Glu Lys Arg Asn			
	725	730	735
Thr Glu Thr Asn Lys Ser Asp Lys Glu Asp Lys Cys His Glu Tyr Arg			
	740	745	750
Ser Met Gln Leu Asp Gly Arg Leu Ile Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro			
	755	760	765
Val Arg Asp Ala Asp Gly Lys Met His Val Asn Lys Cys Ala Met Cys			
	770	775	780
Gln Met Met Phe Glu Arg Glu Ala Asn Glu Arg Lys Met Arg Glu Glu			
785	790	795	800
Asn Ser Arg Ser Gln Pro Thr Asn Glu Ala Lys Asp Gln Cys Gly Glu			
	805	810	815

Val His Asn Ser Val Glu Asp Ala Lys Pro Arg Pro Ala Arg Ser Ser
 820 825 830
 Leu Pro Ser Ile Arg Gly Ile Ser Lys Asp Glu Cys Ser Glu Phe Gln
 835 840 845
 Asn Leu Met Lys Asn Glu Lys Leu Thr Cys Pro Glu Thr Asp Asp Pro
 850 855 860
 Val Arg Gly Ala Asp Gly Thr Phe Tyr Gln Asn Lys Cys His Met Cys
 865 870 875 880
 Arg Asp Val Leu Lys Asn Glu Ala Met Lys Arg Ser Gly Leu Gln Glu
 885 890 895
 Lys Ser Ser Asp Ile Arg Ser Thr Lys Glu Gly Asp Pro Glu Phe Ser
 900 905 910
 Ser Ser Ser Arg Asp Ser Asp Met Cys Lys Asn Tyr Arg Ile Leu Pro
 915 920 925
 Arg Met Gly Tyr Leu Cys Pro Lys Asn Leu Asn Pro Val Cys Gly Asp
 930 935 940
 Asp Gly Gln Thr Tyr Ser Asn Pro Cys Met Leu Cys His Glu Asn Leu
 945 950 955 960
 Met Arg Gln Thr Asn Thr Arg Ile His Asn Pro Gly Ala Cys Glu Glu
 965 970 975
 Ser Ser Asn Leu Lys Thr Val Ser Thr Gly Thr Pro Ala Ser Glu Lys
 980 985 990
 [0021] Met Met Gln
 995
 <210> 13
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列说明： 合成多肽
 "
 <400> 13
 Glu Ala Ala Lys Glu Ile Cys Ser Glu Phe Arg Asp Gln Val Arg Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Leu Ile Cys Thr Arg Glu His Asn Pro Val Arg Gly Pro Asp
 20 25 30
 Gly Lys Met His Gly Asn Lys Cys Ala Met Cys Ala Ser Val Phe Lys
 35 40 45
 Leu Glu Glu Glu Glu Lys Lys Asn Asp Lys Glu Glu Lys Gly Lys Val
 50 55 60
 Glu Ala Glu Lys Val Lys Arg Glu Ala Val Gln Glu Leu Cys Ser Glu
 65 70 75 80
 Tyr Arg His Tyr Val Arg Asn Gly Arg Leu Pro Cys Thr Arg Glu Asn

	85	90	95
	Asp Pro Ile Glu Gly Leu Asp Gly Lys Ile His Gly Asn Thr Cys Ser		
	100	105	110
	Met Cys Glu Ala Phe Phe Gln Gln Glu Ala Lys Glu Lys Glu Arg Ala		
	115	120	125
	Glu Pro Arg Ala Lys Val Lys Arg Glu Ala Glu Lys Glu Thr Cys Asp		
	130	135	140
	Glu Phe Arg Arg Leu Leu Gln Asn Gly Lys Leu Phe Cys Thr Arg Glu		
	145	150	155
	Asn Asp Pro Val Arg Gly Pro Asp Gly Lys Thr His Gly Asn Lys Cys		
	165	170	175
	Ala Met Cys Lys Ala Val Phe Gln Lys Glu Asn Glu Glu Arg Lys Arg		
	180	185	190
	Lys Glu Glu Glu Asp Gln Arg Asn Ala Ala Gly His Gly Ser Ser Gly		
	195	200	205
	Gly Gly Gly Gly Asn Thr Gln Asp Glu Cys Ala Glu Tyr Arg Glu Gln		
	210	215	220
	Met Lys Asn Gly Arg Leu Ser Cys Thr Arg Glu Ser Asp Pro Val Arg		
	225	230	235
	Asp Ala Asp Gly Lys Ser Tyr Asn Asn Gln Cys Thr Met Cys Lys Ala		
	245	250	255
[0022]	Lys Leu Glu Arg Glu Ala Glu Arg Lys Asn Glu Tyr Gly Asn Ser Val		
	260	265	270
	Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
	275	280	285
	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
	290	295	300
	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
	305	310	315
	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
	325	330	335
	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
	340	345	350
	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
	355	360	365
	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
	370	375	380
	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
	385	390	395
	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
	405	410	415
	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
	420	425	430
	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		

435 440 445
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495
 Ser Pro Gly Lys
 500
 <210> 14
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列说明： 合成多肽
 "
 <400> 14
 Glu Ala Ala Lys Glu Ile Cys Ser Glu Phe Arg Asp Gln Val Arg Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Leu Ile Cys Thr Arg Glu His Asn Pro Val Arg Gly Pro Asp
 20 25 30
 [0023]
 Gly Lys Met His Gly Asn Lys Cys Ala Met Cys Ala Ser Val Phe Lys
 35 40 45
 Leu Glu Glu Glu Glu Lys Lys Asn Asp Lys Glu Glu Lys Gly Lys Val
 50 55 60
 Glu Ala Glu Lys Val Lys Arg Glu Ala Val Gln Glu Leu Cys Ser Glu
 65 70 75 80
 Tyr Arg His Tyr Val Arg Asn Gly Arg Leu Pro Cys Thr Arg Glu Asn
 85 90 95
 Asp Pro Ile Glu Gly Leu Asp Gly Lys Ile His Gly Asn Thr Cys Ser
 100 105 110
 Met Cys Glu Ala Phe Phe Gln Gln Glu Ala Lys Glu Lys Glu Arg Ala
 115 120 125
 Glu Pro Arg Ala Lys Val Lys Arg Glu Ala Glu Lys Glu Thr Cys Asp
 130 135 140
 Glu Phe Arg Arg Leu Leu Gln Asn Gly Lys Leu Phe Cys Thr Arg Glu
 145 150 155 160
 Asn Asp Pro Val Arg Gly Pro Asp Gly Lys Thr His Gly Asn Lys Cys
 165 170 175
 Ala Met Cys Lys Ala Val Phe Gln Lys Glu Asn Glu Glu Arg Lys Arg
 180 185 190
 Lys Glu Glu Glu Asp Gln Arg Asn Ala Ala Gly His Gly Ser Ser Gly

	195	200	205
	Gly Gly Gly Gly Asn Thr Gln Asp Glu Cys Ala Glu Tyr Arg Glu Gln		
	210	215	220
	Met Lys Asn Gly Arg Leu Ser Cys Thr Arg Glu Ser Asp Pro Val Arg		
	225	230	235
	Asp Ala Asp Gly Lys Ser Tyr Asn Asn Gln Cys Thr Met Cys Lys Ala		240
	245	250	255
	Lys Leu Glu Arg Glu Ala Glu Arg Lys Asn Glu Tyr Gly Asn Ser Val		
	260	265	270
	Thr Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe		
	275	280	285
	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
	290	295	300
	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
	305	310	315
	Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
	325	330	335
	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser		
	340	345	350
	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
	355	360	365
[0024]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser		
	370	375	380
	Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
	385	390	395
	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
	405	410	415
	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
	420	425	430
	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
	435	440	445
	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu		
	450	455	460
	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
	465	470	475
	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
	485	490	495
	Leu Ser Leu Gly Lys		
	500		
	<210> 15		
	<211> 268		
	<212> PRT		
	<213> 智人		
	<400> 15		

[0025]

Glu Ala Ala Lys Glu Ile Cys Ser Glu Phe Arg Asp Gln Val Arg Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Leu Ile Cys Thr Arg Glu His Asn Pro Val Arg Gly Pro Asp
 20 25 30
 Gly Lys Met His Gly Asn Lys Cys Ala Met Cys Ala Ser Val Phe Lys
 35 40 45
 Leu Glu Glu Glu Glu Lys Lys Asn Asp Lys Glu Glu Lys Gly Lys Val
 50 55 60
 Glu Ala Glu Lys Val Lys Arg Glu Ala Val Gln Glu Leu Cys Ser Glu
 65 70 75 80
 Tyr Arg His Tyr Val Arg Asn Gly Arg Leu Pro Cys Thr Arg Glu Asn
 85 90 95
 Asp Pro Ile Glu Gly Leu Asp Gly Lys Ile His Gly Asn Thr Cys Ser
 100 105 110
 Met Cys Glu Ala Phe Phe Gln Gln Glu Ala Lys Glu Lys Glu Arg Ala
 115 120 125
 Glu Pro Arg Ala Lys Val Lys Arg Glu Ala Glu Lys Glu Thr Cys Asp
 130 135 140
 Glu Phe Arg Arg Leu Leu Gln Asn Gly Lys Leu Phe Cys Thr Arg Glu
 145 150 155 160
 Asn Asp Pro Val Arg Gly Pro Asp Gly Lys Thr His Gly Asn Lys Cys
 165 170 175
 Ala Met Cys Lys Ala Val Phe Gln Lys Glu Asn Glu Glu Arg Lys Arg
 180 185 190
 Lys Glu Glu Glu Asp Gln Arg Asn Ala Ala Gly His Gly Ser Ser Gly
 195 200 205
 Gly Gly Gly Gly Asn Thr Gln Asp Glu Cys Ala Glu Tyr Arg Glu Gln
 210 215 220
 Met Lys Asn Gly Arg Leu Ser Cys Thr Arg Glu Ser Asp Pro Val Arg
 225 230 235 240
 Asp Ala Asp Gly Lys Ser Tyr Asn Asn Gln Cys Thr Met Cys Lys Ala
 245 250 255
 Lys Leu Glu Arg Glu Ala Glu Arg Lys Asn Glu Tyr
 260 265

<210> 16

<211> 520

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列说明： 合成多肽

"

<400> 16

Glu Ala Ala Lys Glu Met Cys Ser Glu Phe Arg Asn Gln Ala Arg Asn

1	5	10	15
Gly Met Leu Met Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Val Val Gly Pro Asp			
20	25	30	
Gly Lys Arg His Ser Asn Lys Cys Ala Met Cys Ala Ser Val Phe Leu			
35	40	45	
Leu Glu Glu Glu Glu Lys Lys Lys Asp Asp Lys Thr Glu Lys Val Asp			
50	55	60	
Ala Gly Lys Ala Lys Lys Glu Ala Val Gln Glu Leu Cys Arg Lys Tyr			
65	70	75	80
His Thr Gln Leu Arg Asn Gly Pro Leu Arg Cys Thr Arg Arg Asn Asn			
85	90	95	
Pro Ile Glu Gly Leu Asp Gly Lys Met Tyr Lys Asn Ala Cys Phe Met			
100	105	110	
Cys Trp Ala Phe Phe Gln Gln Glu Ala Lys Lys Ser Gly Ala Gly Phe			
115	120	125	
Arg Pro Lys Val Lys Arg Glu Val Lys Val Asp Cys Ser Glu Tyr Leu			
130	135	140	
Ala Leu Ser Lys Arg Gly Glu Ile Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro			
145	150	155	160
Val Arg Gly Pro Asp Gly Lys Thr His Gly Asn Lys Cys Ala Met Cys			
165	170	175	
Lys Ala Val Phe Lys Lys Glu Asn Glu Glu Arg Lys Arg Lys Glu Gly			
180	185	190	
Glu Asn Gln Arg Ile Thr Ser Gly Glu Ser Ser Ser Gly Gly Asn Pro			
195	200	205	
Lys Ala Lys Asp Glu Cys Ala Gln Tyr Arg Glu Ser Met Lys His Gly			
210	215	220	
Gln Leu Ser Cys Thr Arg Glu Ser Asp Pro Val Arg Gly Val Asp Gly			
225	230	235	240
Glu His Tyr Asn Asn Lys Cys Val Met Cys Lys Glu Leu Leu Gln Lys			
245	250	255	
Glu Met Glu Glu Thr Asn Lys Asn Ser Ala Ser Arg Ser Asn Gly Thr			
260	265	270	
Gly Ser Ala Gly Asn Ser Arg Ala Gln Val Thr Asp Lys Lys Ile Glu			
275	280	285	
Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala			
290	295	300	
Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile			
305	310	315	320
Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val			
325	330	335	
Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val			
340	345	350	
Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp			

[0026]

```

          355              360              365
Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln
          370              375              380
Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
385              390              395              400
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val
          405              410              415
Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr
          420              425              430
Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu
          435              440              445
Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr
          450              455              460
Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr
465              470              475              480
Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr
          485              490              495
Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
          500              505              510
Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
          515              520

```

[0027]

```

<210> 17
<211> 275
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 17
Glu Ala Ala Lys Glu Met Cys Ser Glu Phe Arg Asn Gln Ala Arg Asn
1              5              10              15
Gly Met Leu Met Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Val Val Gly Pro Asp
          20              25              30
Gly Lys Arg His Ser Asn Lys Cys Ala Met Cys Ala Ser Val Phe Leu
          35              40              45
Leu Glu Glu Glu Glu Lys Lys Lys Asp Asp Lys Thr Glu Lys Val Asp
          50              55              60
Ala Gly Lys Ala Lys Lys Glu Ala Val Gln Glu Leu Cys Arg Lys Tyr
65              70              75              80
His Thr Gln Leu Arg Asn Gly Pro Leu Arg Cys Thr Arg Arg Asn Asn
          85              90              95
Pro Ile Glu Gly Leu Asp Gly Lys Met Tyr Lys Asn Ala Cys Phe Met
          100             105             110
Cys Trp Ala Phe Phe Gln Gln Glu Ala Lys Lys Ser Gly Ala Gly Phe
          115             120             125
Arg Pro Lys Val Lys Arg Glu Val Lys Val Asp Cys Ser Glu Tyr Leu
          130             135             140

```

Ala Leu Ser Lys Arg Gly Glu Ile Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro
 145 150 155 160
 Val Arg Gly Pro Asp Gly Lys Thr His Gly Asn Lys Cys Ala Met Cys
 165 170 175
 Lys Ala Val Phe Lys Lys Glu Asn Glu Glu Arg Lys Arg Lys Glu Gly
 180 185 190
 Glu Asn Gln Arg Ile Thr Ser Gly Glu Ser Ser Ser Gly Gly Asn Pro
 195 200 205
 Lys Ala Lys Asp Glu Cys Ala Gln Tyr Arg Glu Ser Met Lys His Gly
 210 215 220
 Gln Leu Ser Cys Thr Arg Glu Ser Asp Pro Val Arg Gly Val Asp Gly
 225 230 235 240
 Glu His Tyr Asn Asn Lys Cys Val Met Cys Lys Glu Leu Leu Gln Lys
 245 250 255
 Glu Met Glu Glu Thr Asn Lys Asn Ser Ala Ser Arg Ser Asn Gly Thr
 260 265 270

Gly Ser Ala
 275

<210> 18

<211> 294

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列说明： 合成多肽

"

<400> 18

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

[0028]

130	135	140	
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
145	150	155	160
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
	165	170	175
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
	180	185	190
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn			
	195	200	205
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile			
210	215	220	
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr			
225	230	235	240
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys			
	245	250	255
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys			
	260	265	270
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu			
	275	280	285
Ser Leu Ser Pro Gly Lys			

[0029]

<210> 19

<211> 295

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列说明: 合成多肽

"

<400> 19

Arg Glu Ile Val Lys Leu Cys Ser Gln Tyr Gln Asn Gln Ala Lys Asn

1 5 10 15

Gly Ile Leu Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Arg Gly Pro Asp

20 25 30

Gly Lys Met His Gly Asn Leu Cys Ser Met Cys Gln Ala Tyr Phe Gln

35 40 45

Ala Glu Asn Glu Glu Lys Lys Lys Ala Glu Ala Arg Ala Arg Gly Asn

50 55 60

Ser Val Thr Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

65 70 75 80

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

85 90 95

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

	100	105	110
	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
	115	120	125
	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
	130	135	140
	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
	145	150	155
	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu		
	165	170	175
	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
	180	185	190
	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		
	195	200	205
	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
	210	215	220
	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
	225	230	235
	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
	245	250	255
	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser		
	260	265	270
[0030]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
	275	280	285
	Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
	290	295	
	<210> 20		
	<211> 62		
	<212> PRT		
	<213> 智人		
	<400> 20		
	Arg Glu Ile Val Lys Leu Cys Ser Gln Tyr Gln Asn Gln Ala Lys Asn		
	1	5	10
	Gly Ile Leu Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Arg Gly Pro Asp		
	20	25	30
	Gly Lys Met His Gly Asn Leu Cys Ser Met Cys Gln Ala Tyr Phe Gln		
	35	40	45
	Ala Glu Asn Glu Glu Lys Lys Lys Ala Glu Ala Arg Ala Arg		
	50	55	60
	<210> 21		
	<211> 308		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		

<223> /注="人工序列说明： 合成多肽

"

<400> 21

Met Glu Ile Gln Lys Arg Cys Ser Glu Phe Gln Asp Arg Ala Arg Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Leu Phe Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Arg Gly Leu Asp
 20 25 30
 Gly Lys Thr His Gly Asn Leu Cys Ser Met Cys Gln Ala Phe Phe Lys
 35 40 45
 Thr Glu Ala Glu Glu Lys Lys Ala Glu Ala Gly Ser Arg Asn Arg Gly
 50 55 60
 Asn Ser Arg Ala Gln Val Thr Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro
 65 70 75 80
 Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu
 85 90 95
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu
 100 105 110
 Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 115 120 125
 Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu
 130 135 140
 Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr
 145 150 155 160
 Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser
 165 170 175
 Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro
 180 185 190
 Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln
 195 200 205
 Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val
 210 215 220
 Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val
 225 230 235 240
 Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu
 245 250 255
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg
 260 265 270
 Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val
 275 280 285
 Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg
 290 295 300
 Thr Pro Gly Lys
 305
 <210> 22

[0031]

<211> 63

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 22

```

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

```

<210> 23

<211> 86

<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

```

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

```

<210> 24

<211> 67

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

```

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

```

<210> 25
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列说明: 合成多肽"
 <400> 25
 Ile Glu Ser Ala Lys Gln Thr Lys Gln Met Val Asp Cys Ser His Tyr
 1 5 10 15
 Lys Lys Leu Pro Pro Gly Gln Gln Arg Phe Cys His Arg Glu Tyr Asp
 20 25 30
 Pro Ile Cys Gly Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Lys Asn Asp Cys Phe Phe
 35 40 45
 Cys Ser Lys Val Lys Lys Thr Asp Gly Thr Leu Lys Phe Val His Phe
 50 55 60
 Gly Lys Cys Gly Asn Ser Val Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 65 70 75 80
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 85 90 95
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 100 105 110
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 115 120 125
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 130 135 140
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 145 150 155 160
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 165 170 175
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 180 185 190
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 195 200 205
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 210 215 220
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 225 230 235 240
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 245 250 255
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 260 265 270
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

	275	280	285
	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	290	295	
	<210> 26		
	<211> 300		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注="人工序列说明： 合成多肽		
	"		
	<400> 26		
	Ile Glu Ser Ala Lys Gln Thr Lys Gln Met Val Asp Cys Ser His Tyr		
	1 5 10 15		
	Lys Lys Leu Pro Pro Gly Gln Gln Arg Phe Cys His Arg Glu Tyr Asp		
	20 25 30		
	Pro Ile Cys Gly Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Lys Asn Asp Cys Phe Phe		
	35 40 45		
	Cys Ser Lys Val Lys Lys Thr Asp Gly Thr Leu Lys Phe Val His Phe		
	50 55 60		
	Gly Lys Cys Gly Asn Ser Val Thr Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro		
	65 70 75 80		
[0034]	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
	85 90 95		
	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
	100 105 110		
	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
	115 120 125		
	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
	130 135 140		
	Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
	145 150 155 160		
	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
	165 170 175		
	Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
	180 185 190		
	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln		
	195 200 205		
	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
	210 215 220		
	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
	225 230 235 240		
	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
	245 250 255		

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 260 265 270
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 275 280 285
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 290 295 300
 <210> 27
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列说明： 合成多肽
 "
 <400> 27
 Ile Glu Ser Ala Lys Gln Thr Lys Gln Met Val Asp Cys Ser His Tyr
 1 5 10 15
 Lys Lys Leu Pro Pro Gly Gln Gln Arg Phe Cys His Arg Glu Tyr Asp
 20 25 30
 Pro Ile Cys Gly Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Lys Asn Asp Cys Phe Phe
 35 40 45
 Cys Ser Lys Val Lys Lys Thr Asp Gly Thr Leu Lys Phe Val His Phe
 [0035] 50 55 60
 Gly Lys Cys Gly Asn Ser Arg Ala Gln Val Thr Asp Lys Lys Ile Glu
 65 70 75 80
 Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala
 85 90 95
 Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile
 100 105 110
 Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val
 115 120 125
 Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
 130 135 140
 Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
 145 150 155 160
 Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln
 165 170 175
 Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
 180 185 190
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val
 195 200 205
 Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr
 210 215 220
 Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu

225 230 235 240
 Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr
 245 250 255
 Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr
 260 265 270
 Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr
 275 280 285
 Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
 290 295 300
 Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 305 310
 <210> 28
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 28
 Ile Glu Ser Ala Lys Gln Thr Lys Gln Met Val Asp Cys Ser His Tyr
 1 5 10 15
 Lys Lys Leu Pro Pro Gly Gln Gln Arg Phe Cys His Arg Glu Tyr Asp
 20 25 30
 Pro Ile Cys Gly Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Lys Asn Asp Cys Phe Phe
 35 40 45
 [0036] Cys Ser Lys Val Lys Lys Thr Asp Gly Thr Leu Lys Phe Val His Phe
 50 55 60
 Gly Lys Cys
 65
 <210> 29
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列说明: 合成肽
 "
 <400> 29
 Leu Leu Val Tyr
 1
 <210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列说明: 合成肽

”
 <400> 30
 Glu Glu Ala Gln Gly Asp Lys
 1 5
 <210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
[0037] <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注=“人工序列说明： 合成肽
 ”
 <400> 31
 Ala Pro Pro Ile Gln Ser Arg
 1 5

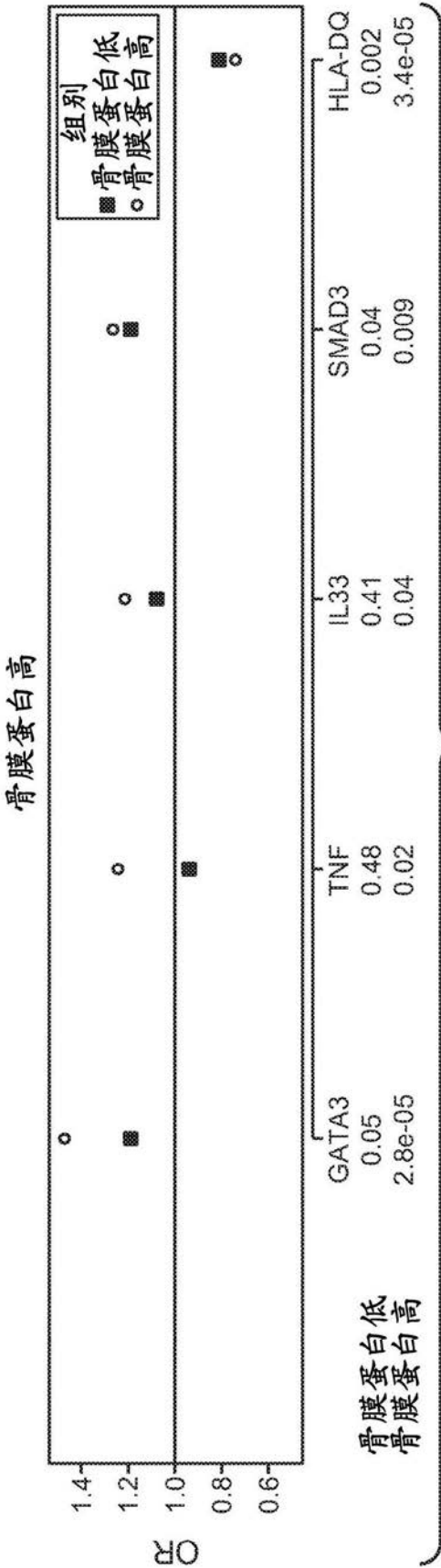


图 1A

图1A

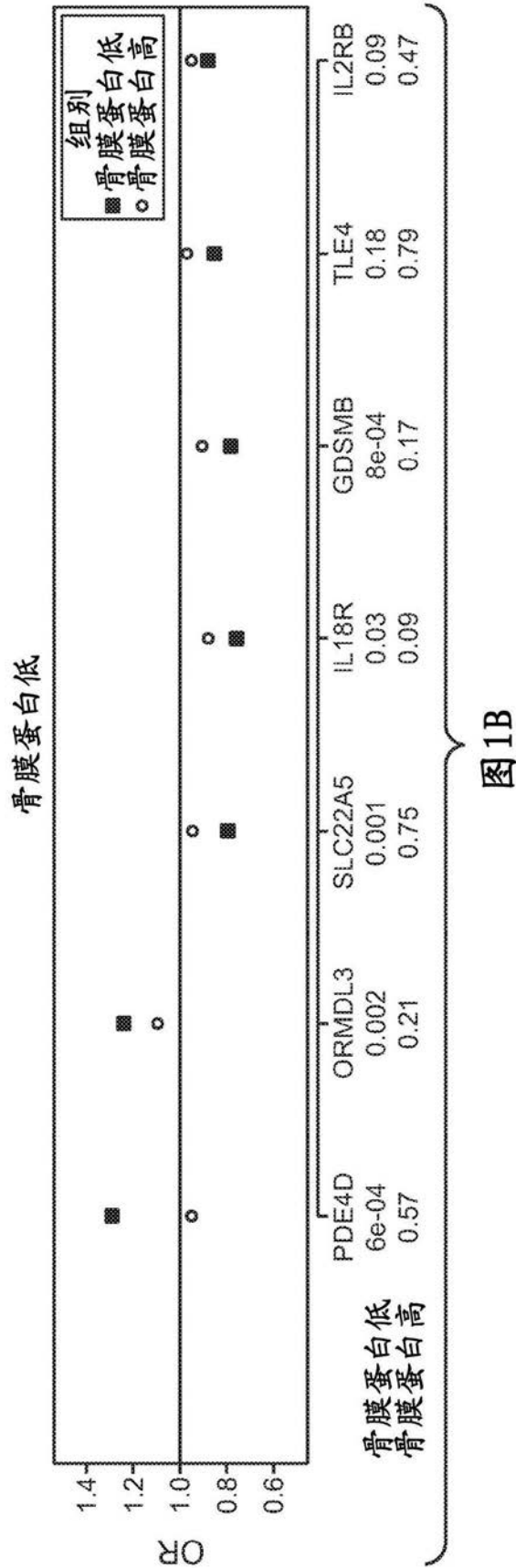


图1B

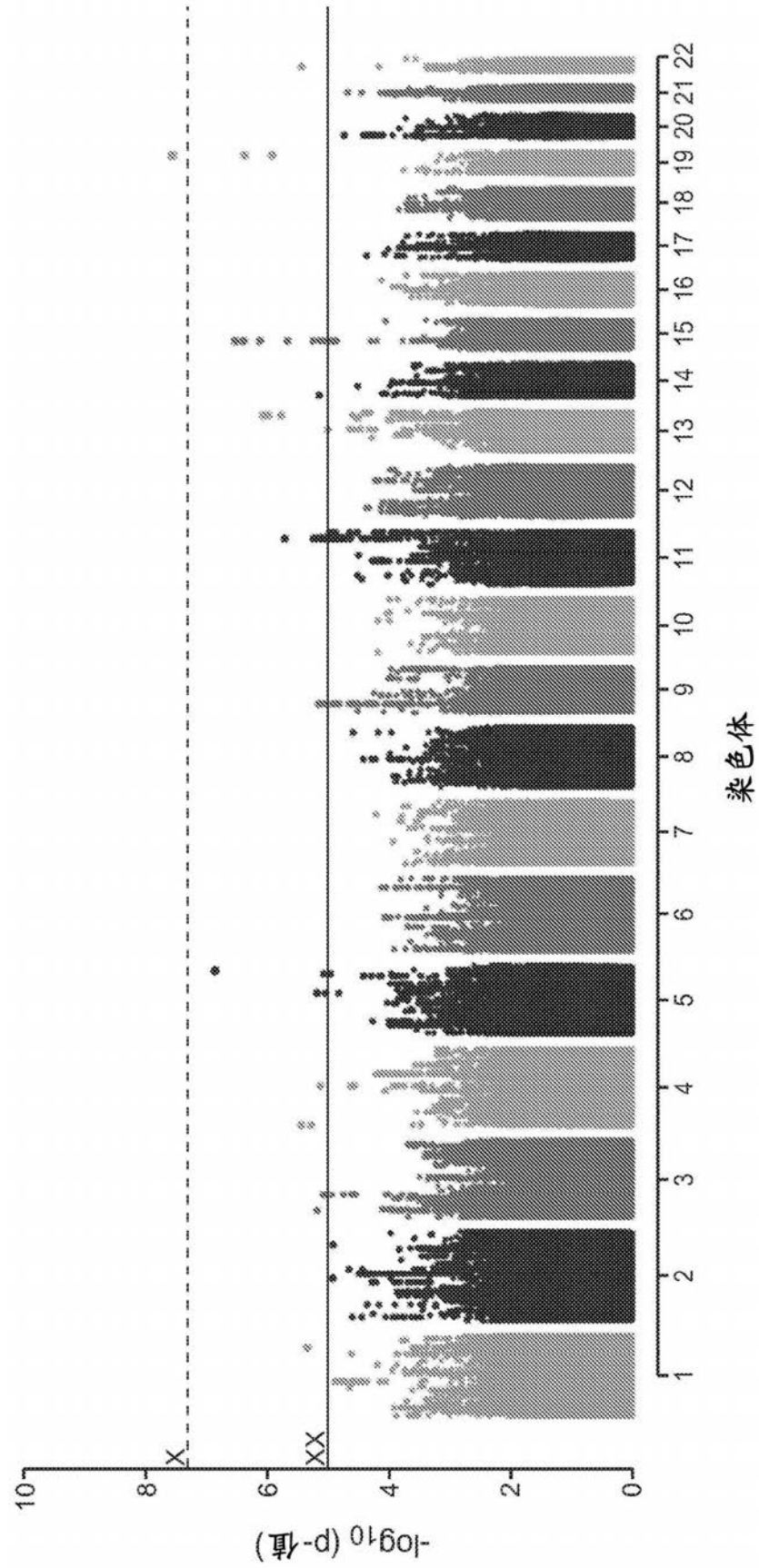


图2

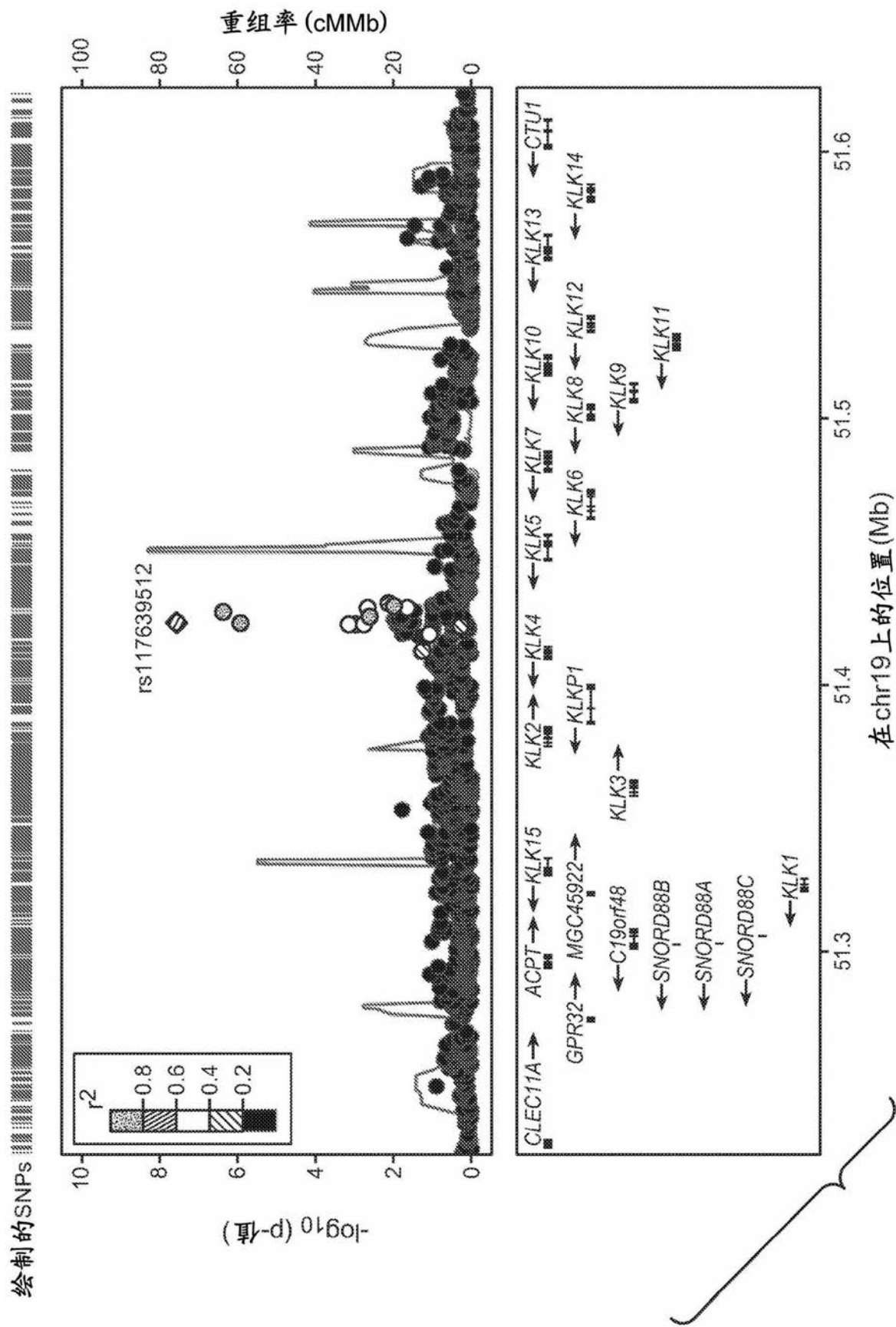


图3

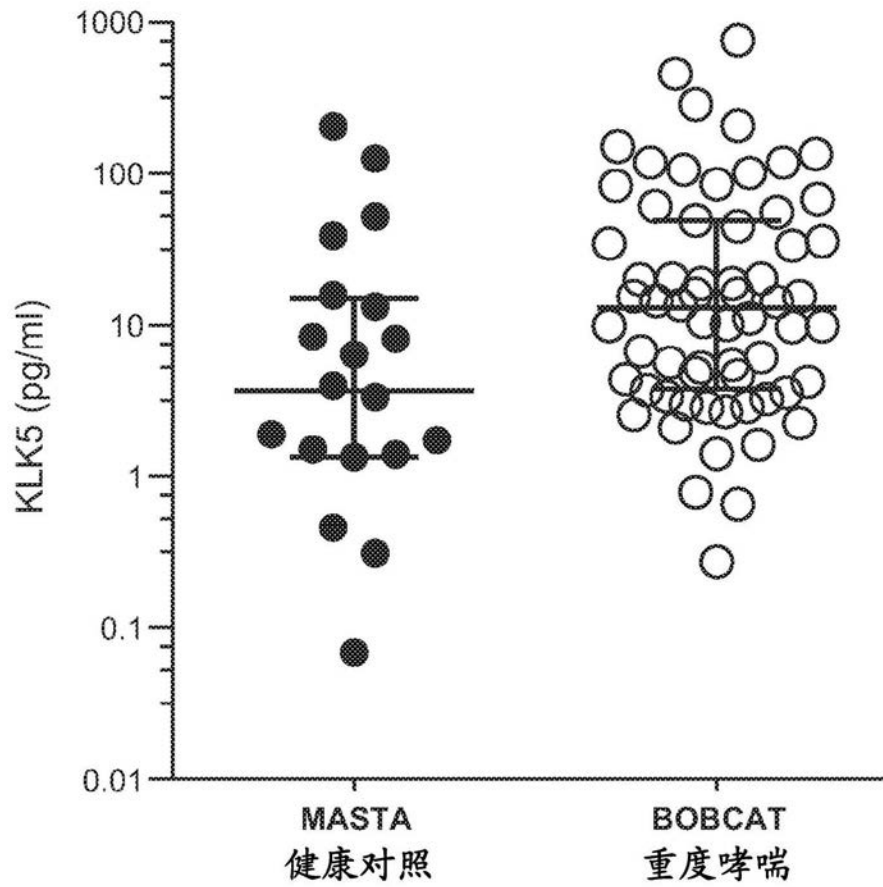


图4A

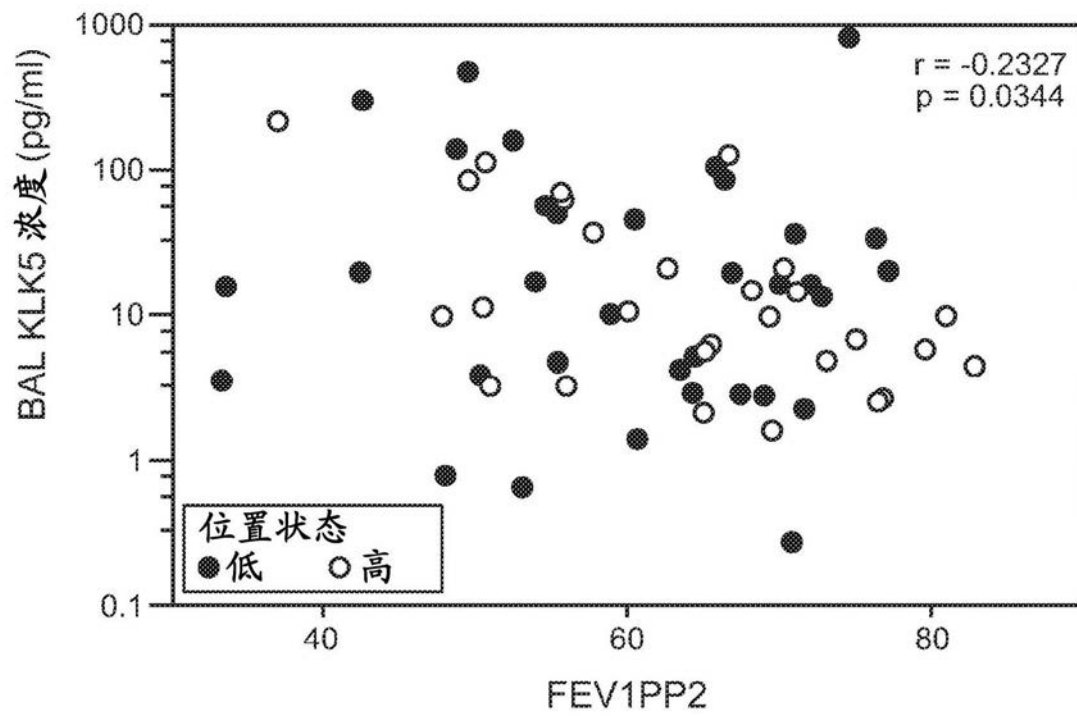


图4B

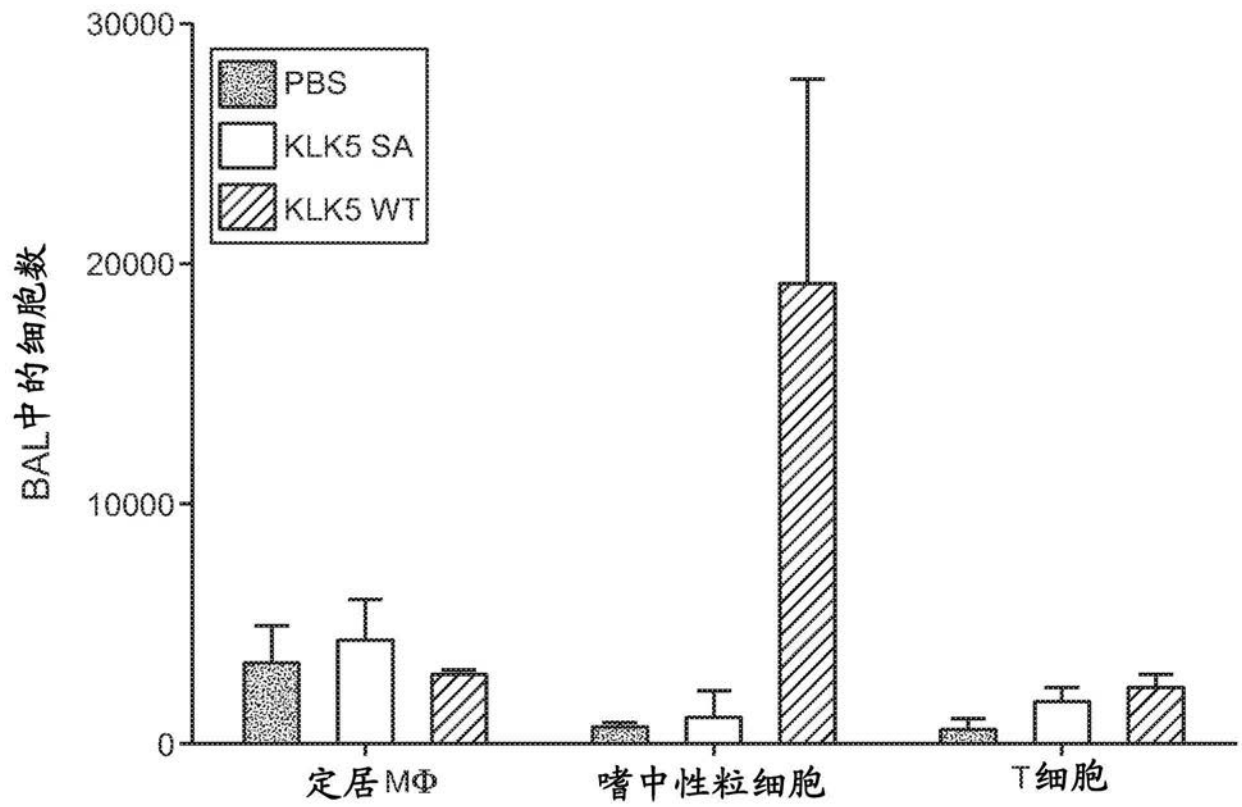


图5A

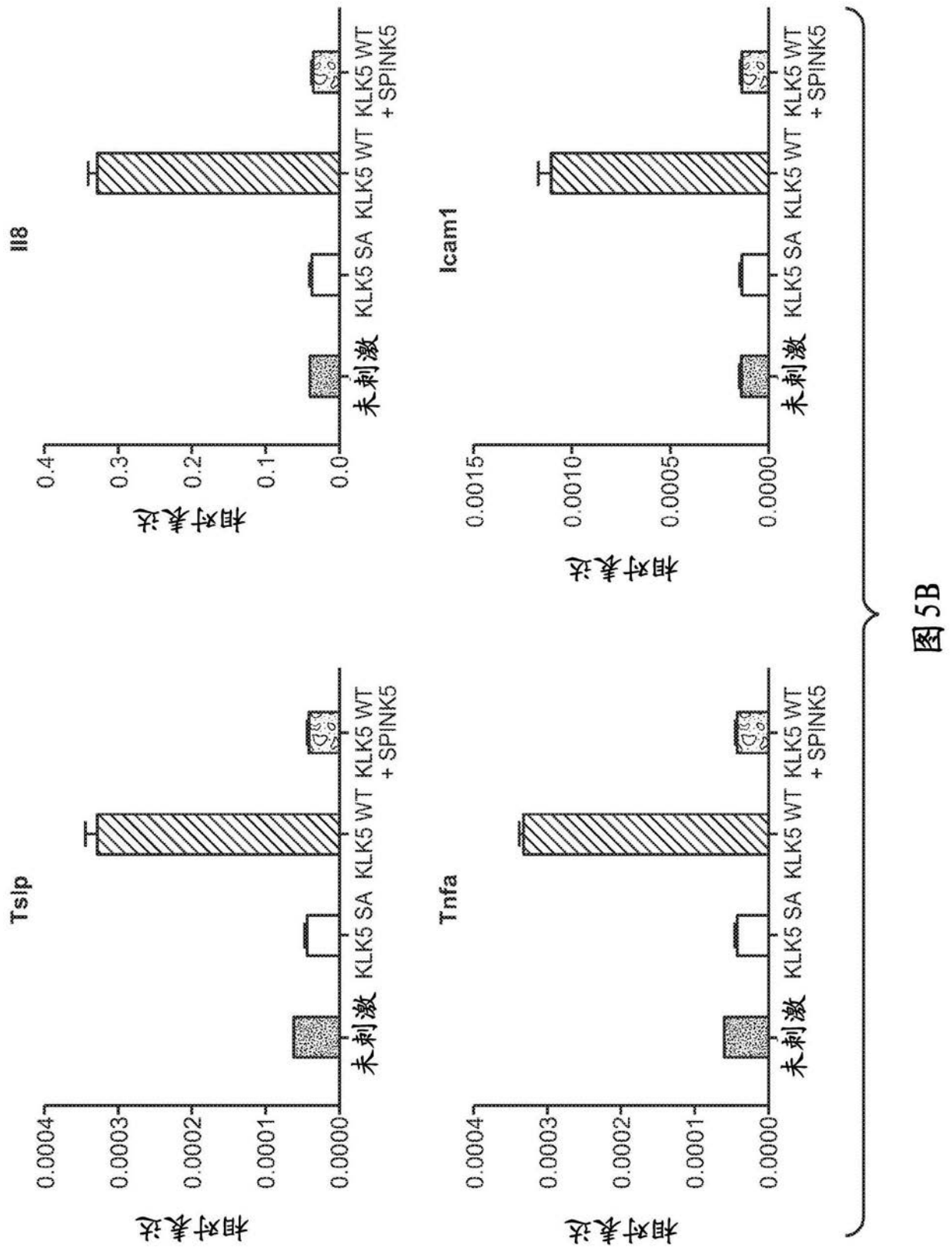


图5B

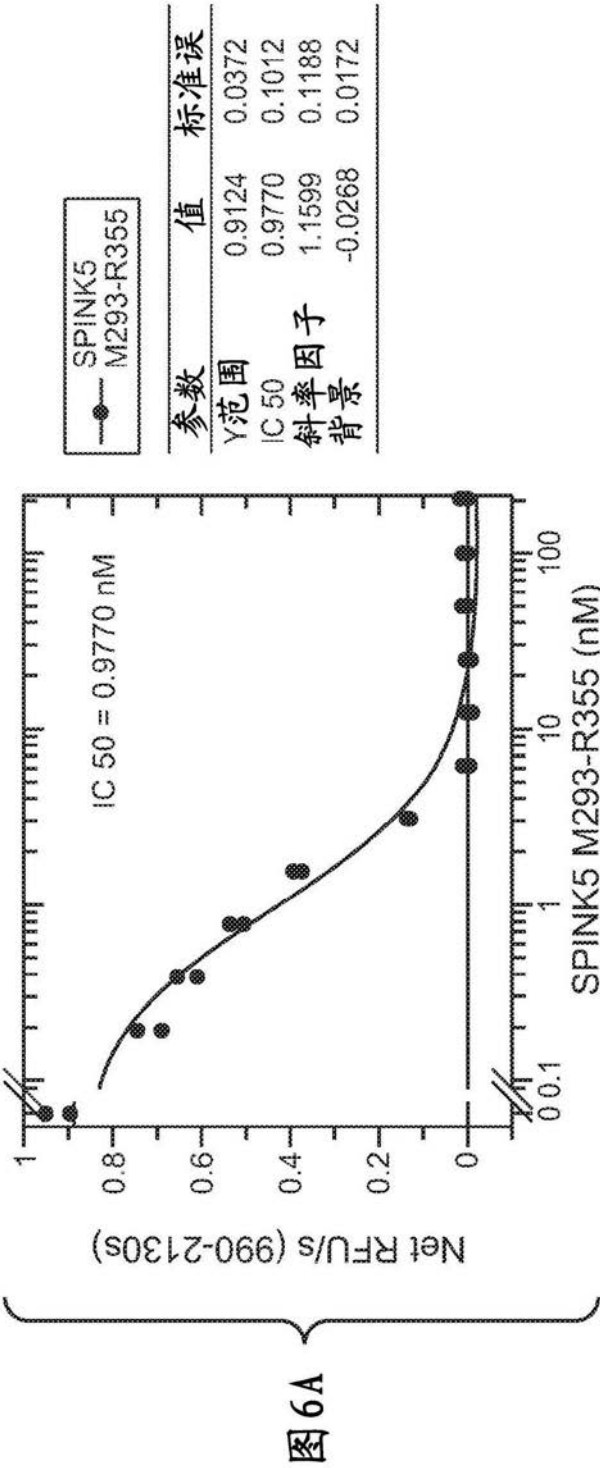


图6A

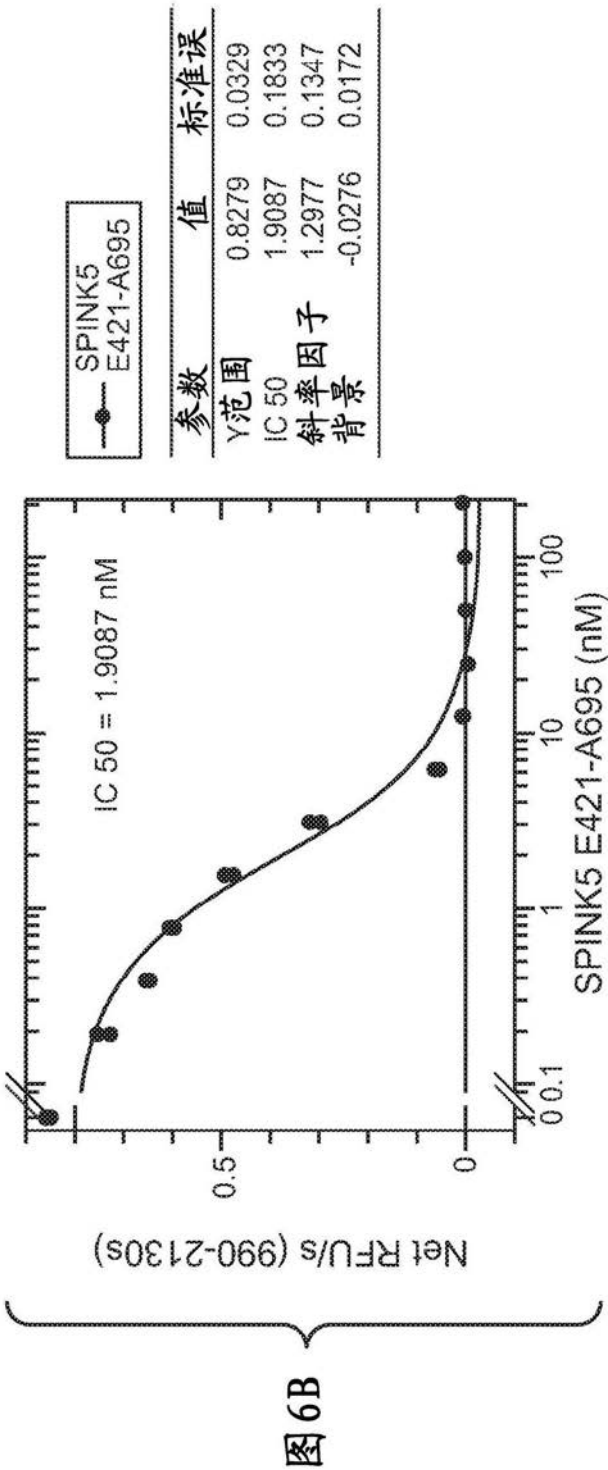


图6B

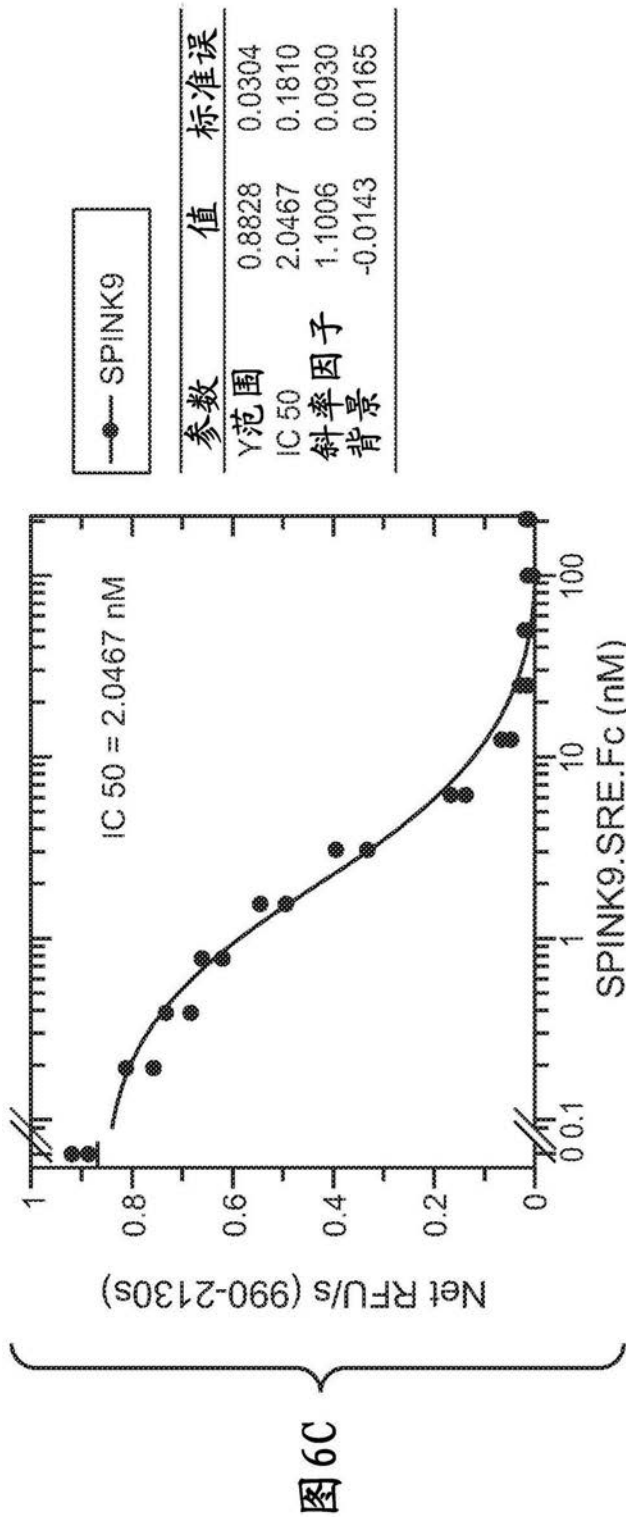


图6C

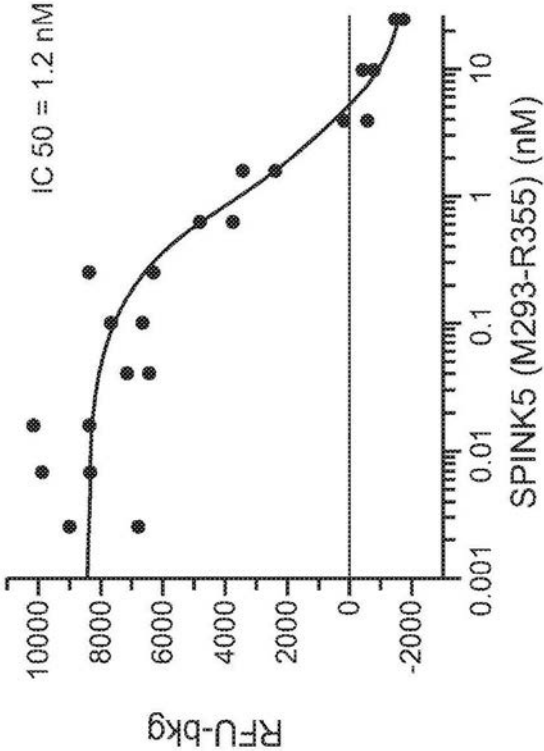


图7A

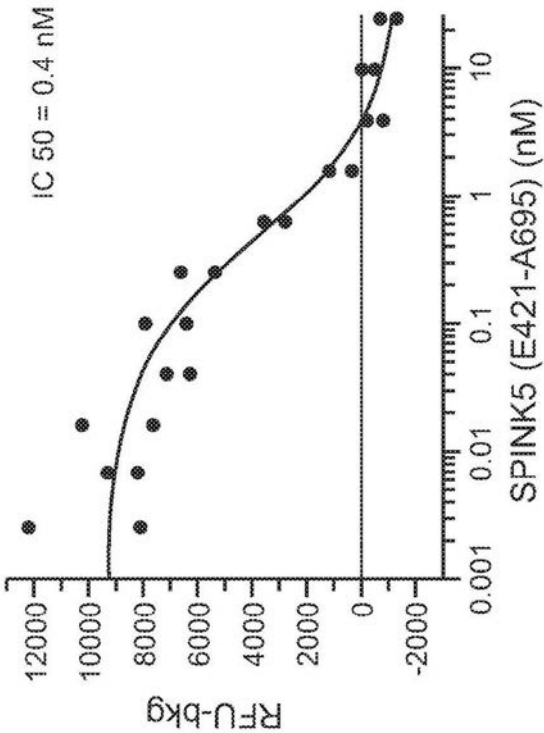


图7B

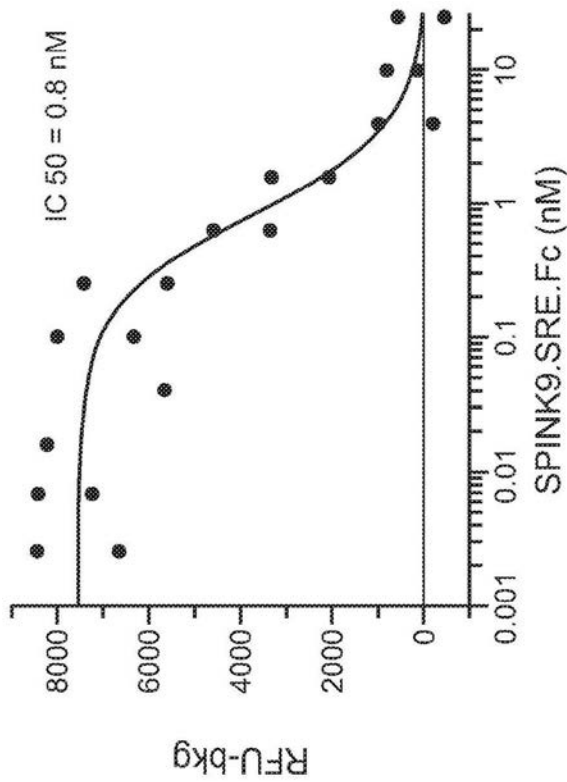


图7C

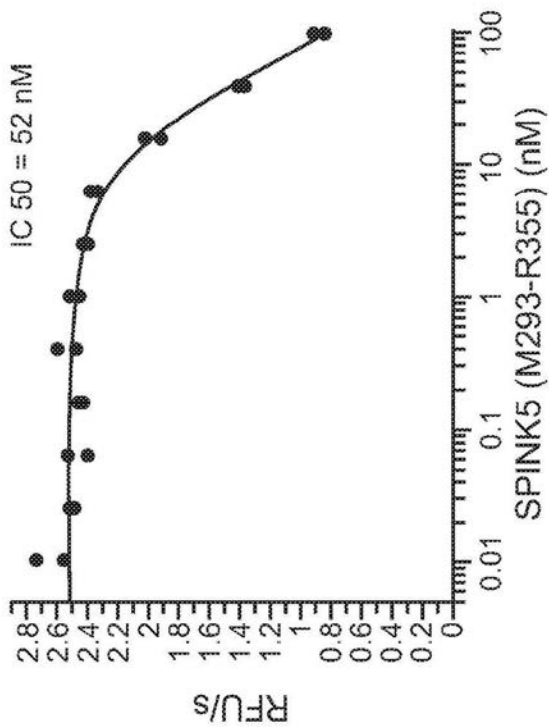


图8A

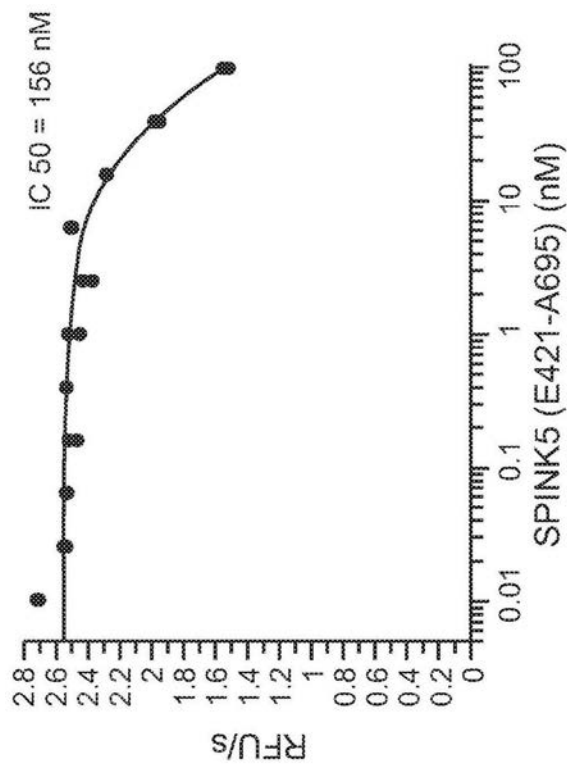


图8B

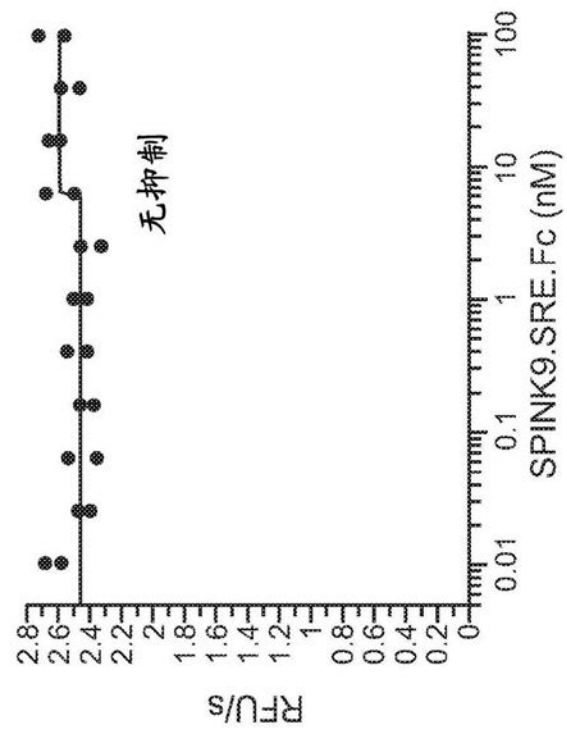


图8C

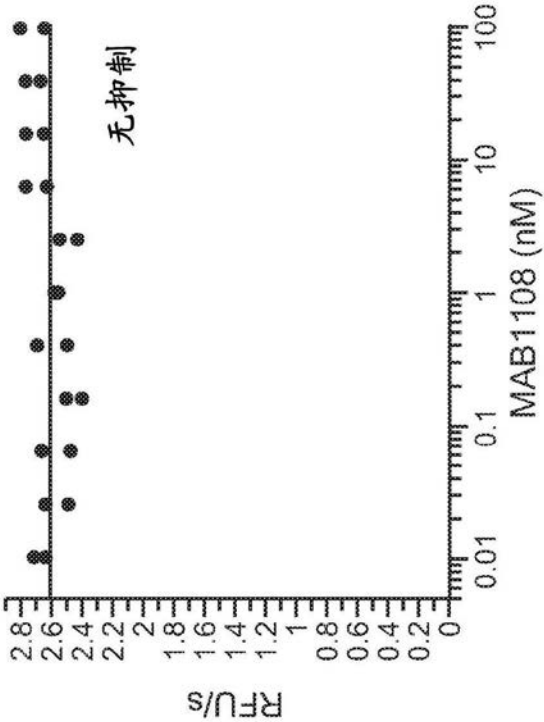


图8D

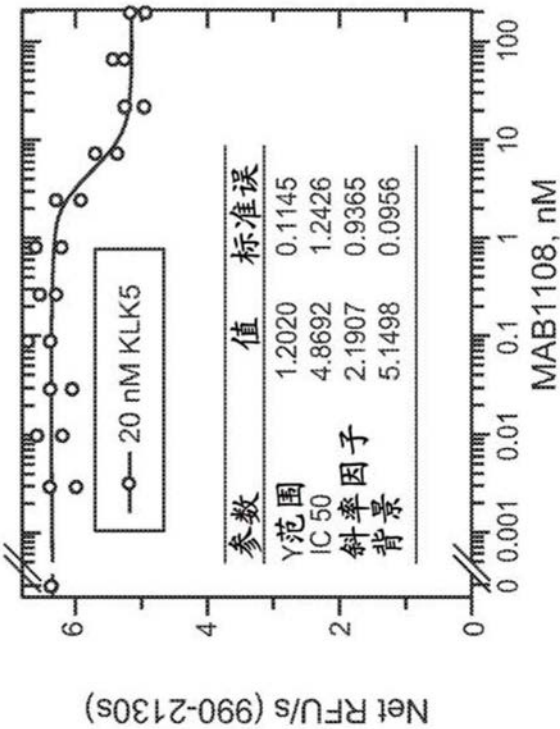


图9A

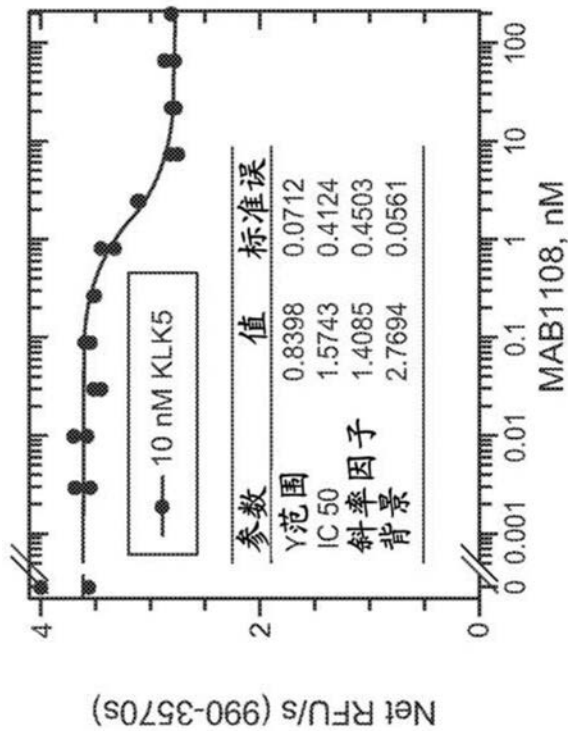


图9B

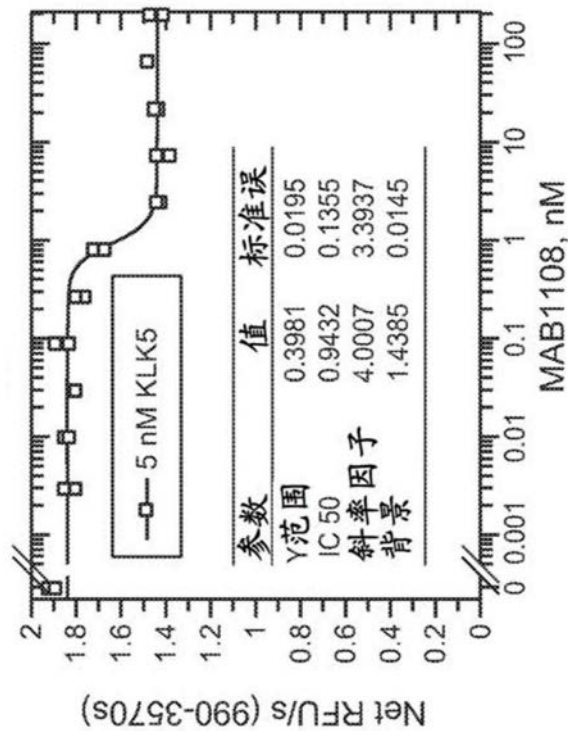


图9C

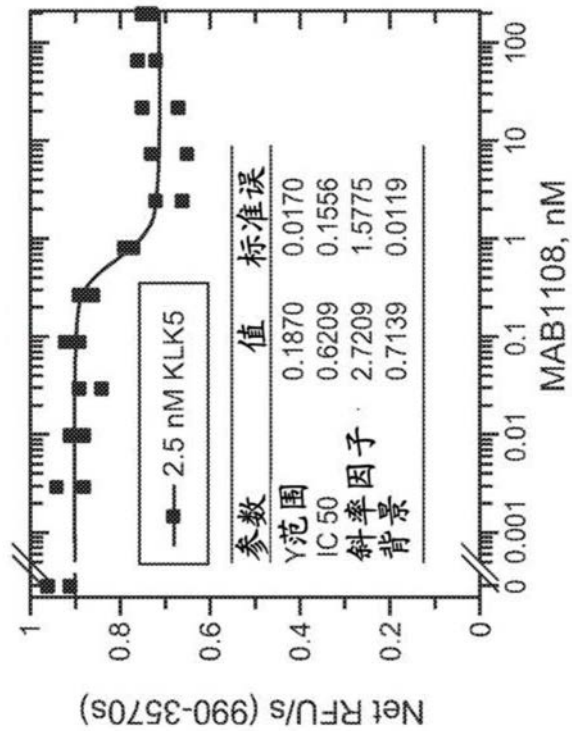


图9D

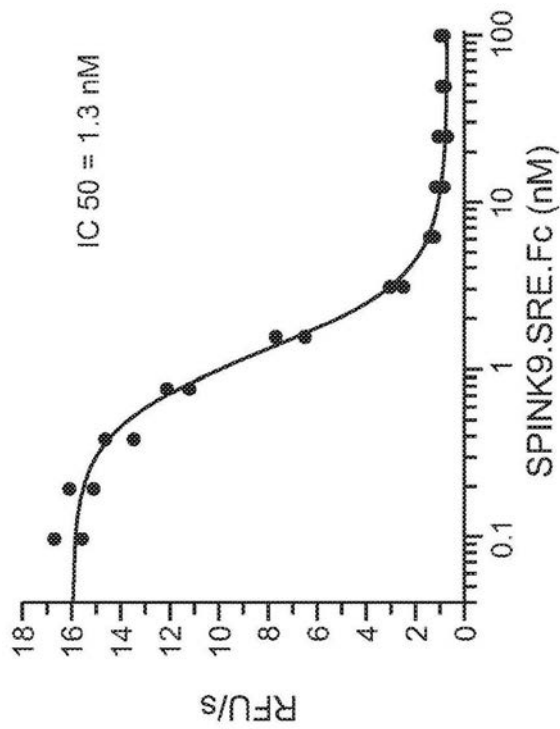


图10A

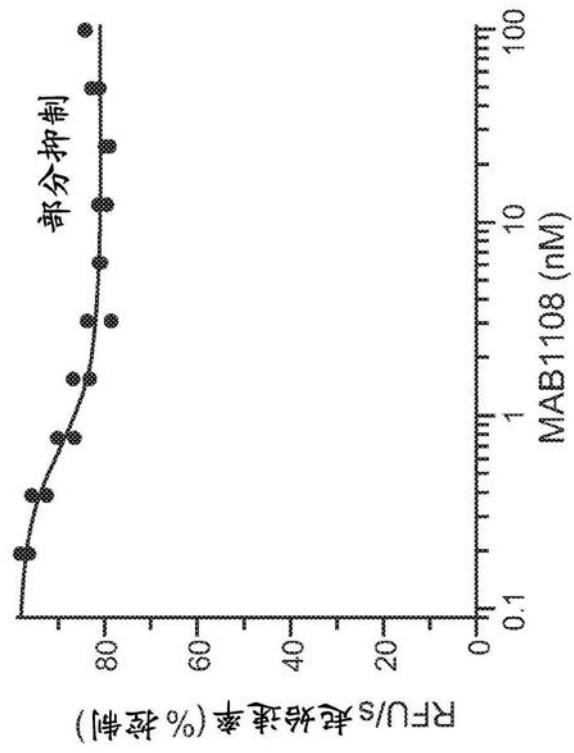


图10B

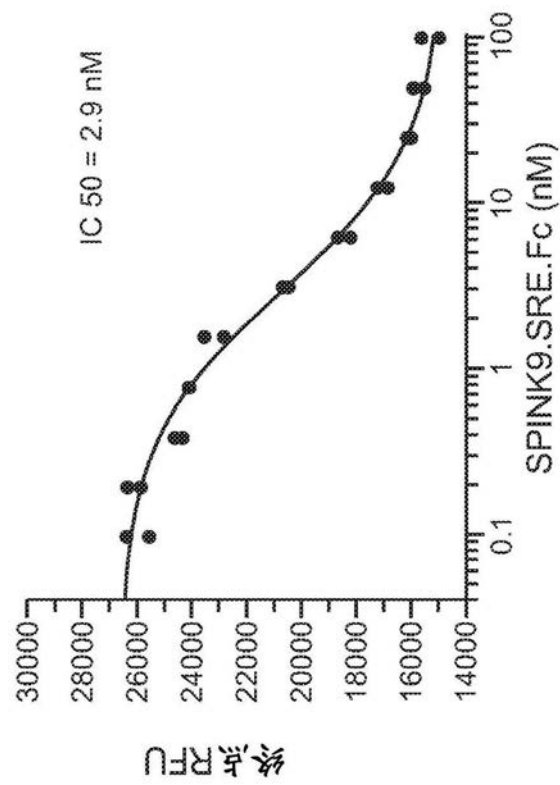


图11A

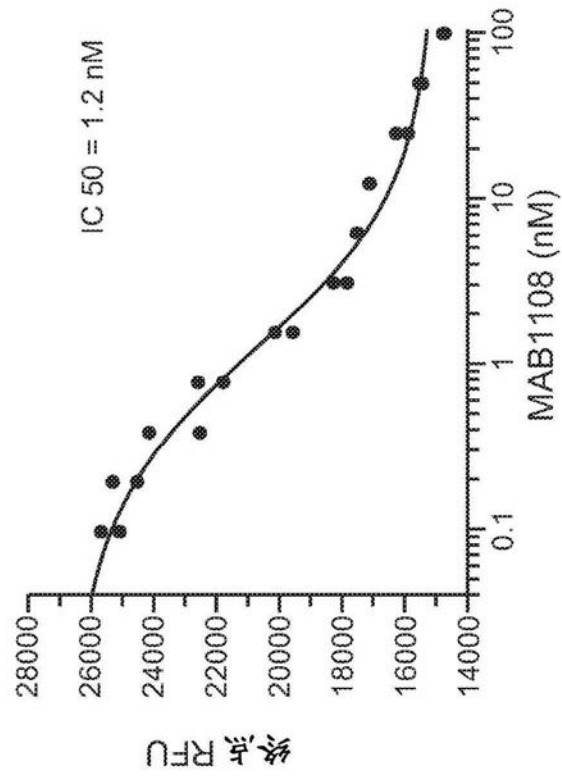


图11B

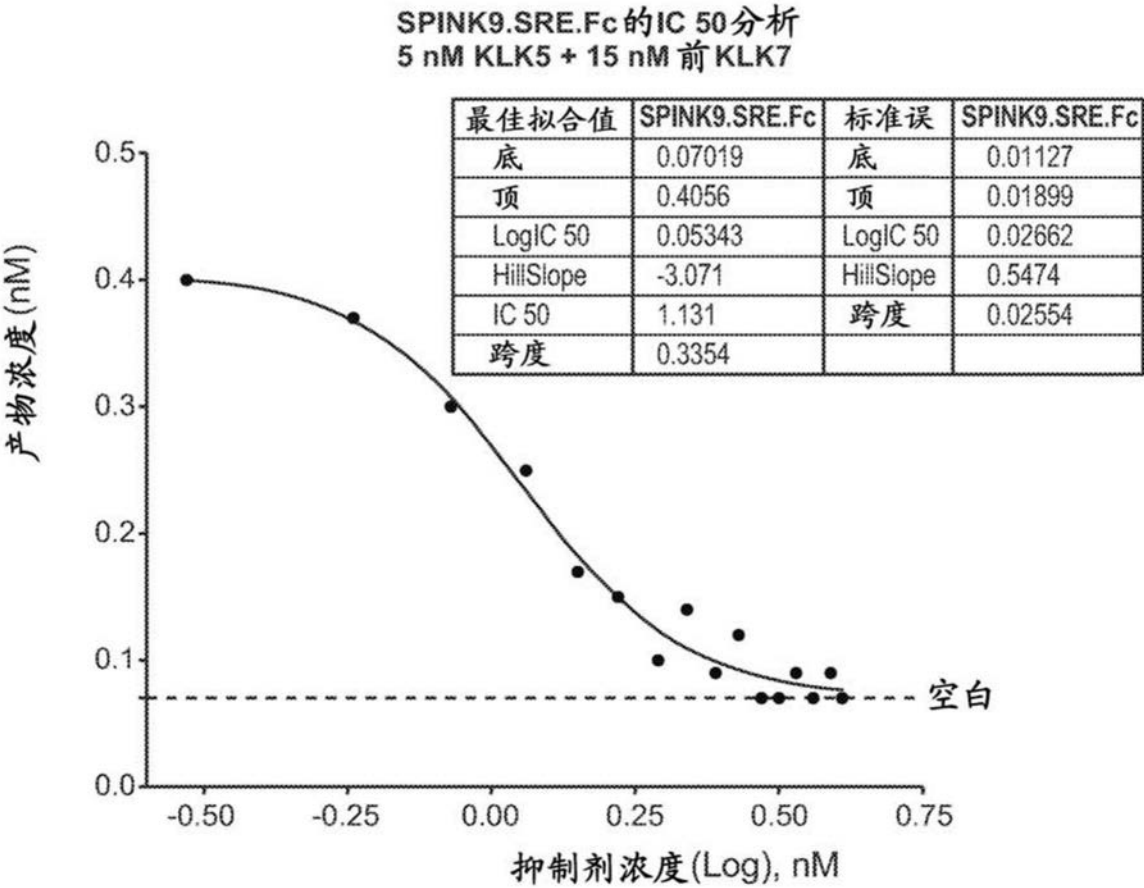


图12A

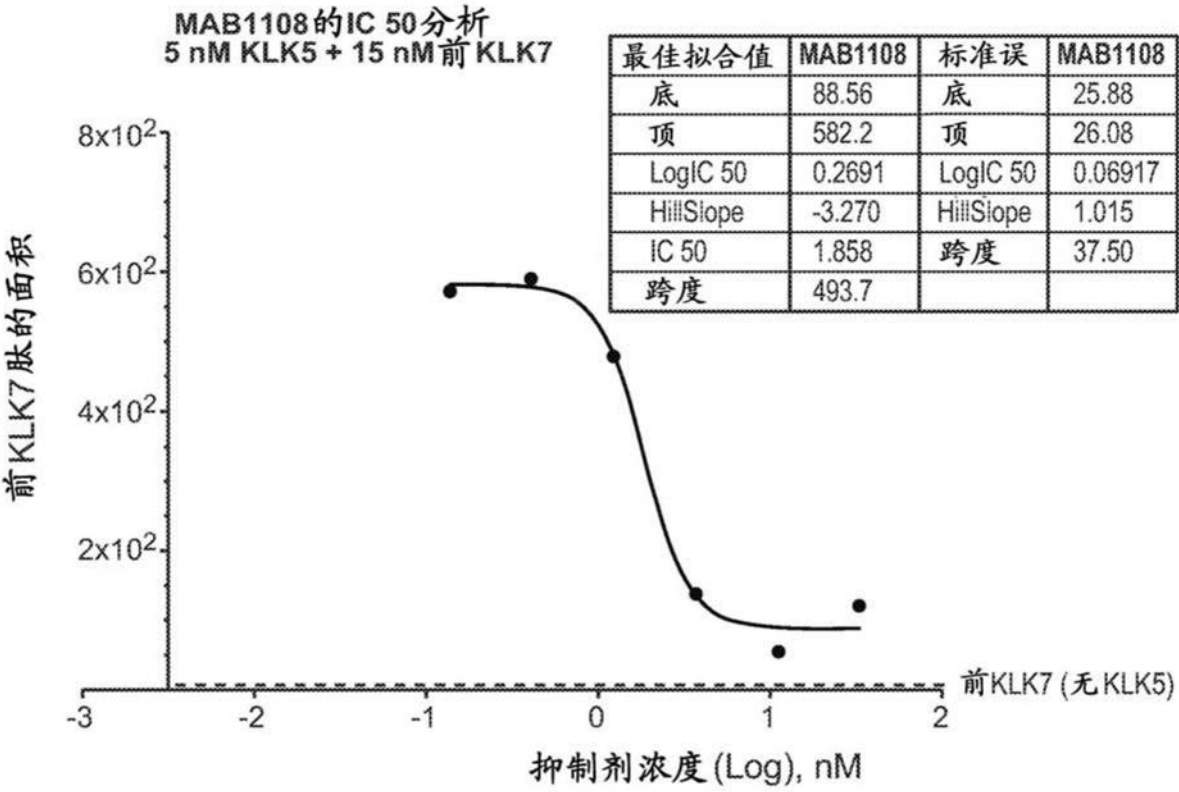


图12B

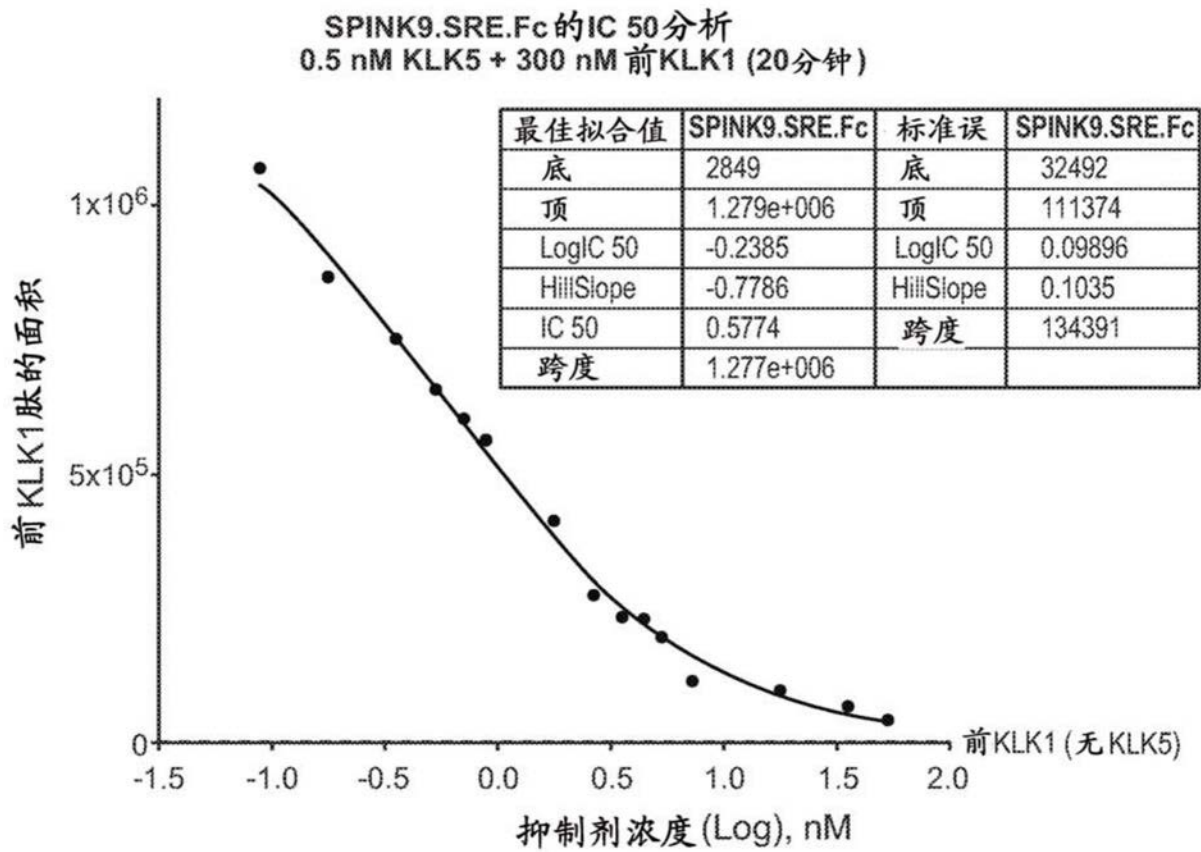


图12C

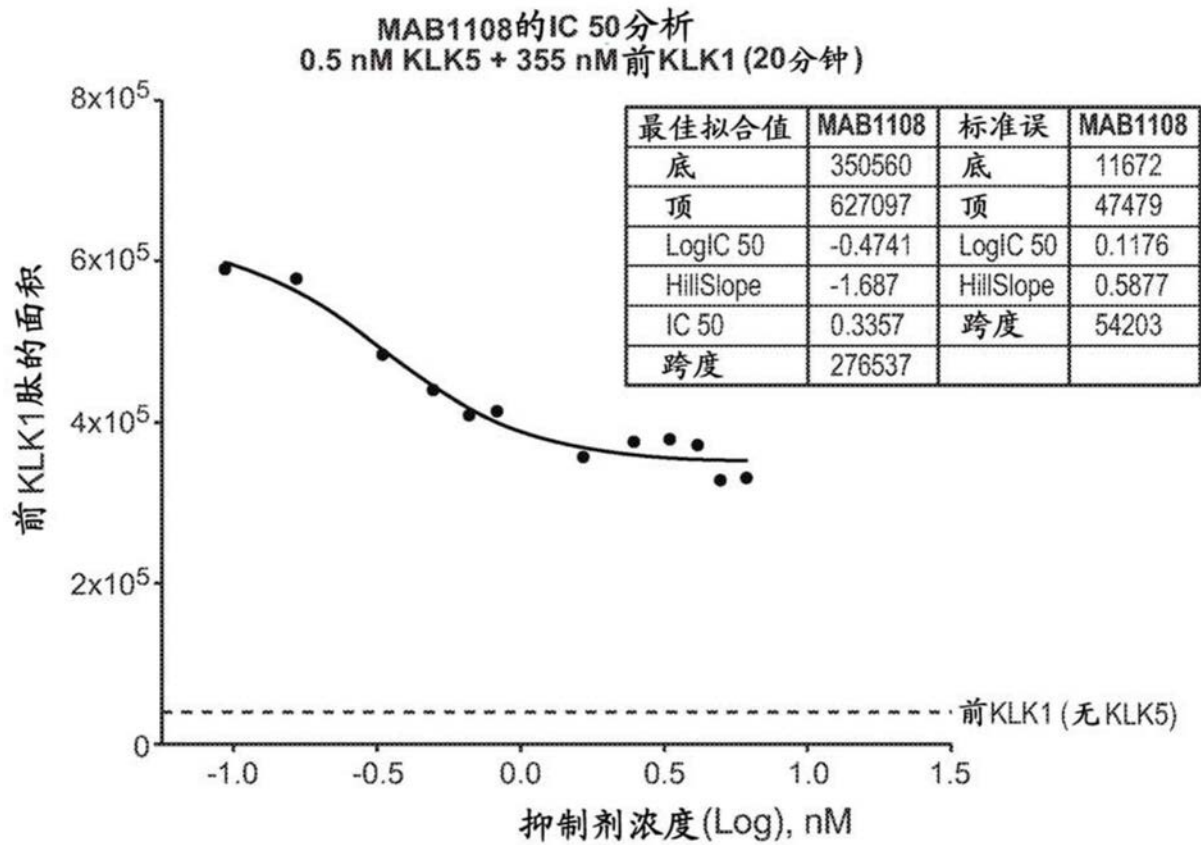


图12D