



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101663407 B

(45)授权公告日 2017.08.08

(21)申请号 200880012685.4

(22)申请日 2008.02.22

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 101663407 A

(43)申请公布日 2010.03.03

(30)优先权数据

60/891,196 2007.02.22 US

60/987,752 2007.11.13 US

61/024,170 2008.01.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2009.10.19

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2008/054805 2008.02.22

(87)PCT国际申请的公布数据
W02008/103962 EN 2008.08.28

(73)专利权人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 劳里·迪尔 肯尼思·弗拉纳根
莫廉

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 张红春

(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)

(56)对比文件

W0 0077026 A1,2000.12.21,全文.

W0 0061629 A,2000.10.19,全文.

罗燕军 于皆平.炎症肠病活动性的分子标志物.《世界华人消化杂志》.2001,第9卷(第6期),698-701.

审查员 高雅

权利要求书2页 说明书79页
序列表37页 附图36页

(54)发明名称

用于检测炎症肠病的方法

(57)摘要

本发明提供了通过检测LY6基因在哺乳动物的组织或细胞中相对于对照的升高的表达来检测炎症肠病在哺乳动物的胃肠组织或细胞中的存在的方法。

1. LY6检测剂制备用于检测人中的炎性肠病(IBD)的试剂盒的用途,其中所述检测包括检测LY6核酸或LY6多肽(a)在来自所述人的胃肠道的组织或细胞的测试样品中和(b)在对照样品中的表达水平,其中所述LY6核酸或LY6多肽在所述测试样品中的表达水平比所述对照样品高,指示获取所述测试样品的所述人中存在IBD。

2. 权利要求1的用途,其中所述测试样品的所述组织或细胞来自所述人的回肠末端。

3. 权利要求1的用途,其中所述测试样品的所述组织或细胞来自所述人的结肠。

4. 权利要求1的用途,其中所述对照样品是相同组织起源或类型的正常非IBD组织或细胞的一份样品,或对它们的表达水平取平均值的相同组织起源或类型的非IBD组织或细胞的多份样品,或代表相同物种的健康的、正常的组织的多份样品中的基因表达的一份通用对照。

5. 权利要求1的用途,其中所述测试样品的所述组织或细胞是有炎症的。

6. 权利要求1的用途,其中所述测试样品的所述组织或细胞是没有炎症的。

7. 权利要求1的用途,其中所述检测包括:

(a) 使所述测试样品接触特异性结合编码LY6多肽的多核苷酸的检测剂;

(b) 使所述对照样品接触所述检测剂;并

(c) 检测所述检测剂与所述测试样品和所述对照样品的所述多核苷酸之间的复合物的形成,其中所述测试样品中所形成的复合物相对于对照样品多,指示所述人中存在IBD。

8. 权利要求7的用途,其中所述检测剂包含与SEQ ID NO:8,9,1,3,4,6或其包含SEQ ID NO:8,9,1,3,4或6的至少15个连续核苷酸的片段互补的核酸序列。

9. 权利要求7的用途,其中所述测试样品的所述组织或细胞来自所述人的回肠末端。

10. 权利要求7的用途,其中所述测试样品的所述组织或细胞来自所述人的结肠。

11. 权利要求10的用途,其中所述对照样品是相同组织起源或类型的正常非IBD组织或细胞的一份样品,或对它们的表达水平取平均值的相同组织起源或类型的非IBD组织或细胞的多份样品,或代表相同物种的健康的、正常的组织的多份样品中的基因表达的一份通用对照。

12. 权利要求7的用途,其中所述检测剂是能与具有SEQ ID NO:8,9,1,3,4,6的序列或其互补序列的多核苷酸发生杂交的第二多核苷酸。

13. 权利要求12的用途,其中所述第二多核苷酸包含检测标记物或附着至固体支持物。

14. 权利要求13的用途,其中所述检测标记物是直接检测的。

15. 权利要求13的用途,其中所述检测标记物是间接检测的。

16. 权利要求13的用途,其中所述检测标记物是荧光标记物。

17. 权利要求7的用途,其中所述检测是原位杂交测定法。

18. 权利要求7的用途,其中所述检测是实时聚合酶链式反应测定法。

19. 权利要求1的用途,其中所述检测包括:

(a) 使所述测试样品接触特异性结合LY6多肽的检测剂;

(b) 使所述对照样品接触所述检测剂;并

(c) 检测所述检测剂与所述测试样品和所述对照样品的所述多肽之间复合物的形成,其中所述测试样品中所形成的复合物相对于对照样品多,指示所述人中存在IBD。

20. 权利要求19的用途,其中所述测试样品的所述组织或细胞来自所述人的回肠末端。

21. 权利要求19的用途,其中所述测试样品的所述组织或细胞来自所述人的结肠。
22. 权利要求7或19的用途,其中所述测试样品的所述组织或细胞是有炎症的。
23. 权利要求7或19的用途,其中所述测试样品的所述组织或细胞是没有炎症的。
24. 权利要求19的用途,其中所述检测剂是抗体或其结合片段。
25. 权利要求24的用途,其中所述抗体或其结合片段包含检测标记物。
26. 权利要求25的用途,其中所述检测标记物是直接检测的。
27. 权利要求26的用途,其中所述检测标记物是间接检测的。
28. 权利要求26的用途,其中所述检测标记物是荧光标记物或放射性标记物。
29. 权利要求1、权利要求7或权利要求19的用途,其中所述组织或细胞的测试样品得自怀疑正在罹患IBD的人。
30. 权利要求1、权利要求7或权利要求19的用途,其中所述组织或细胞的测试样品得自怀疑正在经历UC的人。
31. 权利要求1、权利要求7或权利要求19的用途,其中所述人的胃肠道的组织或细胞已经接触过治疗剂,且其中所述LY6表达水平指示所述人的胃肠道的组织或细胞中对所述治疗剂的应答的存在或缺失。
32. 权利要求1、权利要求7或权利要求19的用途,其中所述人的胃肠道的组织或细胞已经接触过治疗剂,其中所述检测是第二或后续检测,且其中所述LY6表达水平指示所述人的胃肠道的组织或细胞中对所述治疗剂的应答的存在或缺失。
33. 权利要求1、权利要求7或权利要求19的用途,其中所述测试样品中LY6表达的升高是比所述对照样品大至少1.5倍。
34. 权利要求1、权利要求7或权利要求19的用途,其中所述测试样品中LY6表达的升高是比所述对照样品大至少2倍。
35. 权利要求1、权利要求7或权利要求19的用途,其中所述测试样品中LY6表达的升高是比所述对照样品大至少3倍。
36. 权利要求1、权利要求7或权利要求19的用途,其中所述测试样品中LY6表达的升高是比所述对照样品大至少5倍。
37. 权利要求1、权利要求7或权利要求19的用途,其中所述测试样品中LY6表达的升高是比所述对照样品大至少6倍。
38. 权利要求1、权利要求7或权利要求19的用途,其中所述测试样品中LY6表达的升高是比所述对照样品大至少7倍。
39. 权利要求1、权利要求7或权利要求19的用途,其中所述测试样品中LY6表达的升高是比所述对照样品大至少8倍。
40. 权利要求1、权利要求7或权利要求19的用途,其中所述测试样品中LY6表达的升高是比所述对照样品大至少9倍。
41. 权利要求1、权利要求7或权利要求19的用途,其中所述测试样品中LY6表达的升高是比所述对照样品大至少10倍。
42. 权利要求1的用途,其中所述LY6检测剂是抗LY6多肽抗体或LY6结合寡肽。
43. 权利要求1的用途,其中所述LY6检测剂是LY6寡核苷酸。

用于检测炎性肠病的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及炎性肠病发病机制中的基因表达序型。此方法可用于炎性肠病的检测和诊断。

[0002] 发明背景

[0003] 炎性肠病 (IBD) (胃肠道的一种慢性炎症病症,美国由大约1百万患者患有此病)由两大疾病组构成:溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩 (Crohn) 氏病 (CD)。在IBD的这两种形式中,肠微生物可能在遗传上易感的个体中启动该疾病。UC常常局限于结肠,而CD通常在小肠的回肠中和在结肠中发生 (Podolsky, D.K., N. Engl. J. Med. 347:417-429 (2002))。对来自IBD患者的组织进行的基因表达序型分析提供了一些关于治疗和/或诊断的可能靶物的见识 (参见例如Dieckgraefe, B.K.等, Physiol. Genomics 4:1-11 (2000); Lawrance I.C.等, Hum Mol Genet. 10:445-456 (2001); Dooley T.P.等, Inflamm. Bowel Dis. 10:1-14 (2004); 及Uthoff S.M., Int J Oncol. 19:803-810 (2001))。对正在经历炎性肠病的患者中基因失调的进一步调查包括例如Lawrance, I.C.等, 它们披露了UC和CD中数种基因的区别性基因表达序型 (Lawrance, I.C.等, Human Mol. Genetics 10 (5):445-456 (2001))。Uthoff, S.M.S.等披露了使用微阵列分析对于UC和CD的候选基因的鉴定 (Uthoff, S.M.S.等, Int' l. J. Oncology 19:803-810 (2001))。Dooley, T.P.等披露了IBD中的基因表达与用于该病症的药物治疗间的相关性 (Dooley, T.P.等, Inflamm. Bowel Dis. 10 (1):1-14 (2004))。

[0004] 需要鉴定炎性肠病的别的生物学标志物,用于这种慢性疾病的诊断。本公开内容满足了该需要。

[0005] 通过述及将本文中所引用的所有参考文献的整个内容收入本文。

[0006] 发明概述

[0007] 本文中公开了LY6基因超家族的成员在鼠结肠炎模型中和在正在罹患IBM的人类患者的肠组织中在肠上皮细胞 (IEC) 的表面上上调的独特发现,这些基因在健康的IEC上不表达。LY6家族的大多数成员是GPI锚定的细胞表面糖蛋白,在造血起源的细胞上具有广泛分布,而在非造血细胞上具有更加受到限制的表达。虽然广泛用作免疫细胞分化的标志物 (Sunderkotter, C.等, J. Immunol. 172:4410-4417 (2004)),但难以阐明LY6家族所拥有的功能 (Shevach, E.M.和P.E. Korty, Immunol. Today 10:195-200 (1989))。有报告显示,LY6分子涉及一系列不同功能,包括T细胞激活 (Zhang, Z.X.等, Eur. J. Immunol. 32:1584-1592 (2002) 及Henderson, S.C.等, J. Immunol. 168:118-126 (2002))、嗅觉 (Chou, J.H.等, Genetics 157:211-224 (2001)) 和细胞粘附 (Jaakkola, I.等, J. Immunol. 170:1283-1290 (2003))。

[0008] 就最广泛的意义而言,本发明提供了检测人LY6基因家族在肠组织中在来自正在经历肠病症的第一哺乳动物的肠组织中相对于对照哺乳动物升高的表达的方法。就更加定向的意义而言,所述方法适用于涉及如下肠病症的病症的诊断,所述肠病症与人LY6H、LYPD1、LYPD3、和LYPD5表达有关,包括但不限于炎性肠病 (IBD),诸如溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩氏病 (CD)。在一个实施方案中,本发明的方法可用于检测IBD治疗方案的响应者和不

响应者。在一个实施方案中,所述IBD是溃疡性结肠炎(UC)。在一个实施方案中,所述IBD是克罗恩氏病(CD)。在一个实施方案中,所述肠组织是结肠组织。在一个实施方案中,所述结肠组织是乙状结肠。在一个实施方案中,LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5基因表达在IBD、UC或CD哺乳动物中的肠组织(诸如结肠组织)中相对于不是正在罹患IBM、CD或UC的哺乳动物的正常组织(诸如正常结肠组织)升高。在一个实施方案中,所述LY6H基因包含SEQ ID NO:1的核酸序列且编码包含SEQ ID NO:2的LY6H多肽。在一个实施方案中,所述LYPD1基因包含SEQ ID NO:3或4的核酸且编码包含SEQ ID NO:5的LYPD1多肽。在一个实施方案中,所述LYPD3基因包含SEQ ID NO:6的核酸且编码包含SEQ ID NO:7的LYPD3多肽。在一个实施方案中,所述LYPD5基因包含SEQ ID NO:8或9的核酸且编码包含SEQ ID NO:10的LYPD5多肽。

[0009] 在一个实施方案中,本发明的方法包括在怀疑正在经历肠病症的测试哺乳动物获得组织样品,使所述组织接触能与LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5蛋白或与编码LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5的核酸相互作用的检测剂,并测定相对于对照组织的LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5表达水平。在一个实施方案中,相对于对照升高的LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5表达指示所述测试哺乳动物中存在IBD。在一个实施方案中,所述测试肠组织中相对于对照肠组织中升高的LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5表达指示所述测试哺乳动物中存在UC。在一个实施方案中,所述测试肠组织中相对于对照肠组织升高的LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5表达指示所述测试哺乳动物中存在CD。在一个实施方案中,来自所述测试和对照哺乳动物的所述组织或细胞来自结肠。

[0010] 在一个实施方案中,LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5表达是通过检测组织样品或细胞中的基因表达,诸如通过检测编码LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5的mRNA来测定的。在一个实施方案中,对样品是自己知不是正在经历胃肠病症(诸如IBD、UC或CD)的哺乳动物获得的相同组织或细胞类型的组织或细胞的样品。在一个实施方案中,对样品是包含来自数个正常组织或来自多个细胞系的RNA的通用标准品。在微阵列分析中,此类通用标准品可用于监测和控制实验内和实验间变化。在一个实施方案中,通用标准品(或通用参照RNA(URR))是如Novoradovskaya, N.等,(2004) BMC Genomics 5:20所提供而制备的,在此通过述及完整收录该参考文献)。在一个实施方案中,为了在小鼠RNA的微阵列分析中用作对照,URR是来自Stratagene®(产品目录#740100, Stratagene®, La Jolla, CA)的通用小鼠参照物RNA。在一个实施方案中,为了在人RNA的微阵列分析中用作对照,URR是来自Stratagene®(产品目录#740000)的通用人参照RNA。在一个实施方案中,为了在大鼠RNA的微阵列分析中用作对照,URR是来自Stratagene®(产品目录#740200)的通用大鼠参照RNA。在一个实施方案中,其中所述RNA是小鼠RNA,用于提取总RNA的细胞系包含自胚胎、胚胎成纤维细胞、肾、肝的肝细胞、肺的肺泡巨噬细胞、B-淋巴细胞、T-淋巴细胞(胸腺)、乳腺、肌肉成肌细胞、皮肤、和睾丸衍生的细胞系。在一个实施方案中,其中所述RNA是人RNA,用于提取总RNA的细胞系包含自乳腺的腺癌、肝的成肝细胞瘤、宫颈的腺癌、胚胎的癌瘤或睾丸、脑的成胶质细胞瘤、黑素瘤、脂肪肉瘤、组织细胞的淋巴瘤(巨噬细胞、组织细胞)、T-淋巴母细胞成淋巴细胞性白血病、B-淋巴细胞浆细胞瘤黑素瘤衍生的细胞系。在一个实施方案中,其中所述RNA是大鼠RNA,用于提取总RNA的细胞系包含自血液嗜碱白血病、血液T-淋巴细胞淋巴瘤、血液B-淋巴母细胞杂交瘤、脑的神经胶质瘤、胚胎卵黄囊癌瘤、胚胎正常成纤维细胞、正常肾、肝的肉瘤(hepatoma)、肺的正常肺泡巨噬细胞、肺的正常肺泡II型、乳腺的腺癌、肌肉成肌细

胞、正常皮肤、和睾丸莱迪希 (Leydig) 细胞瘤衍生的细胞系。

[0011] 一方面,本发明涉及制品,其包含容器和装在所述容器内的组合物,其中所述组合物包含编码LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5的核酸或其互补物,和/或抗LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5抗体,或所述抗体的抗LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5结合片段,其中所述核酸和/或抗体是可检测的。在一个实施方案中,所述组合物包含这样的检测剂,该检测剂用于检测核酸结合,诸如但不限于编码LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5的核酸或其互补物与怀疑正在经历肠病症的测试哺乳动物的组织样品中的LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5核酸的核酸结合。在一个实施方案中,所述组合物包含这样的检测剂,该检测剂用于检测抗体结合,例如检测抗体对怀疑正在经历肠病症的测试哺乳动物的组织样品中的LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5的结合。在一个实施方案中,所述组合物的所述抗体是可检测标记的。在一个实施方案中,所述组合物的所述抗体是通过第二抗体而可检测的,其中所述第二抗体是可检测的或可检测标记的。所述制品可进一步任选地包含贴在所述容器上的标签,或包括在所述容器内的包装插页,其提到LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5核酸或其互补物和/或抗LY6H、抗LYPD1、抗LYPD3和/或抗LYPD5抗体,或所述抗体的LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5结合片段在检测LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5在肠组织(包括但不限于结肠组织)中的升高的表达中的用途。在一个实施方案中,所述肠病症是IBD。在一个实施方案中,所述肠病症是UC或CD。在一个实施方案中,所述LYPD1多肽和所述抗LYPD1抗体分别是US7,157,558和US7,144,990中所披露的抗体。

[0012] 一方面,本发明涉及诊断肠病症在哺乳动物中的存在的方法,包括检测编码LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5多肽的基因(a)在自所述哺乳动物获得组织或细胞的测试样品中和(b)在来自不是正在经历肠病症的哺乳动物的相同组织起源或类型的已知正常细胞的对照样品中的表达水平,其中LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5多肽在所述测试样品中的表达水平比所述对照样品高指示用于获取所述测试样品的所述哺乳动物中存在肠病症。在一个实施方案中,所述肠病症是IBD。在一个实施方案中,所述IBD是UC。在一个实施方案中,所述IBD是CD。在一个实施方案中,所述检测是通过使针对LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5多肽的抗体或所述抗体的结合片段接触所述测试和对照样品并测定抗体-多肽复合物形成的量。抗体-多肽复合物形成在所述测试样品中的水平相对于所述对照样品高指示所述测试哺乳动物中存在肠病症,诸如IBD、UC或CD。本发明的抗体是可检测标记的,或者所述抗体是通过可检测的第二抗体的后续结合来检测的。

[0013] 在又一个实施方案中,本发明涉及诊断肠病症在哺乳动物中的存在的方法,包括(a)使包含自所述测试哺乳动物获得的组织或细胞的测试样品接触能在高严格条件下与LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5核酸(或其互补物)杂交的寡核苷酸或能特异性结合LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5多肽的抗体,并(b)检测所述测试样品中所述寡核苷酸或抗体分别与LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5核酸(或其互补物)或LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5多肽之间复合物的形成,其中此类复合物在所述测试样品中的形成相对于对照样品多指示所述测试哺乳动物中存在肠病症(诸如IBD、UC或CD)。在一个实施方案中,所述肠病症是IBD。在一个实施方案中,所述病症是UC。在一个实施方案中,所述病症是CD。在一个实施方案中,所述测试和对照哺乳动物的所述组织是结肠组织。任选的是,本发明的方法所采用的LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5多肽结合片段或LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5基因杂交寡核苷酸

是可检测的、可检测标记的、附着至固体支持物的、诸如此类,和/或所述组织或细胞的测试样品是自怀疑正在经历肠病症的个体获得的,其中所述病症是IBD,诸如但不限于UC或CD。

[0014] 在又一个实施方案中,本发明涉及(a) LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5多肽,(b) 编码LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5多肽的核酸或包含(a)的核酸的载体或宿主细胞,(c) 抗LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5多肽抗体,或(d) LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5结合寡肽在制备可用于哺乳动物的肠组织(包括但不限于结肠组织)中的肠病症的诊断性检测的药物中的用途,所述肠病症包括但不限于IBD、CD或UC。

[0015] 一方面,本发明包含检测用IBD治疗剂处理的哺乳动物中的治疗性药物应答的方法,其中所述方法包括相对于对照哺乳动物的对照胃肠组织测定测试哺乳动物的胃肠组织中的LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5表达,其中LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5在测试组织中的表达水平相对于对照组织高指示疾病状态或疾病状态的继续。所述测试组织中的LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5表达不显著高于正常对照表达水平或它们之间的差异在一群哺乳动物中的LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5正常表达水平范围内表示肠病症的改善或解决,所述改善或解决可归于所述治疗剂。在一个实施方案中,当LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5在用治疗剂处理的哺乳动物的胃肠或结肠组织或细胞中的表达水平不同时(表达更类似于正常对照,即LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5水平低于所述哺乳动物在处理前的LY6H、LYPD1、LYPD3和/或LYPD5表达水平),确定治疗得到了应答。

[0016] 在阅读本说明书后,本发明的其它实施方案对于熟练技术人员会是显而易见的。

[0017] 附图简述

[0018] 图1A和1B描绘了编码人LY6H多肽的核酸序列(SEQ ID NO:1)和人LY6H多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0019] 图2A和2B描绘了编码人LYPD1多肽的核酸序列(SEQ ID NOS:3和4),而图2C显示了人LYPD1多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)。

[0020] 图3A和3B描绘了编码人LYPD3多肽的核酸序列(SEQ ID NO:6)和人LYPD3多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:7)。

[0021] 图4A和4B描绘了编码人LYPD5多肽的核酸序列(SEQ ID NOS:8和9),而图4C显示了人LYPD5多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:10)。

[0022] 图5A和5B描绘了编码人LY6D多肽的核酸序列(SEQ ID NO:11)和人LY6D多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:12)。

[0023] 图6A和6B描绘了编码人LY6E多肽的核酸序列(SEQ ID NO:13)和人LY6E多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:14)。

[0024] 图7A和7B描绘了编码人LYPD2多肽的核酸序列(SEQ ID NO:15)和人LYPD2多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:16)。

[0025] 图8A-8H描绘了GLG-1 (ESL-1) 分子的序列:(A-B) 编号U64791,编码人GLG-1 (ESL-1) 多肽(SEQ ID NO:18)的核酸序列(SEQ ID NO:17);(C-D) 编号NM_012201,编码人GLG-1 (ESL-1) 多肽(SEQ ID NO:20)的核酸序列(SEQ ID NO:19);(E-F) 编号AK172806,编码人GLG-1 (ESL-1) 多肽(SEQ ID NO:22)的核酸序列(SEQ ID NO:21);和编号AK131501,编码人GLG-1 (ESL-1) 多肽(SEQ ID NO:24)的核酸序列(SEQ ID NO:23)。

[0026] 图9A和9B描绘了编码鼠LY6A多肽的核酸序列(SEQ ID NO:25)和鼠LY6A多肽的氨

基酸序列(SEQ ID NO:26)。

[0027] 图10A和10B描绘了编码鼠LY6C多肽的核酸序列(SEQ ID NO:27)和鼠LY6C多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:28)。

[0028] 图11A和11B描绘了编码鼠LY6D多肽的核酸序列(SEQ ID NO:29)和鼠LY6D多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:30)。

[0029] 图12A和12B描绘了编码鼠LY6E多肽的核酸序列(SEQ ID NO:31)和鼠LY6E多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:32)。

[0030] 图13A和13B描绘了编码鼠LY6F多肽的核酸序列(SEQ ID NO:33)和鼠LY6F多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:34)。

[0031] 图14A和14B描绘了编码鼠LY6I多肽的核酸序列(SEQ ID NO:35)和鼠LY6I多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:36)。

[0032] 图15A和15B描绘了编码鼠LY6K多肽的核酸序列(SEQ ID NO:37)和鼠LY6K多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:38)。

[0033] 图16A和16B描绘了编码鼠LYPD3多肽的核酸序列(SEQ ID NO:45)和鼠LYPD3多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:46)。

[0034] 图17A和17B描绘了编码鼠LY6H多肽的核酸序列(SEQ ID NO:47)和鼠LY6H多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:48)。

[0035] 图18A和18B描绘了编码鼠LYPD1多肽的核酸序列(SEQ ID NO:49)和鼠LYPD1多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:50)。

[0036] 图19A和19B描绘了编码鼠LYPD2多肽的核酸序列(SEQ ID NO:51)和鼠LYPD2多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:52)。

[0037] 图20A和20B描绘了编码鼠LY6g5c多肽的核酸序列(SEQ ID NO:53)和鼠LY6g5c多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:54)。

[0038] 图21A和22B描绘了编码鼠LY6g6c多肽的核酸序列(SEQ ID NO:55)和鼠LY6g6c多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:56)。

[0039] 图22A和22B描绘了编码鼠SLURP2/LYNX1多肽的核酸序列(SEQ ID NO:57)和鼠SLURP2/LYNX1多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:58)。

[0040] 图23显示了LY6家族成员在结肠炎的鼠模型中在IEC中上调。通过LCM分离IL10^{-/-} (图23A)和CD45RB^{hi}转移结肠炎模型(图23B)二者中的IEC,并纯化RNA。如实施例中所描述地实施并分析微阵列分析。数值代表结肠炎小鼠较之健康小鼠,与通用标准品RNA相比的倍数变化的均值。热图(heatmap)下面的数值指示各只小鼠的炎症得分。

[0041] 图24A-24D显示了LY6分子的表面表达在IL10^{-/-}结肠炎模型中对IEC的上调。野生型(图24A)或IL10^{-/-}小鼠(图24B)是针对LY6A的表面表达染色的(绿色,用DAPI复染)。类似地,野生型(图24C)或IL10^{-/-}小鼠(图24D)是针对LY6C的表面表达染色。

[0042] 图25A-25I显示了LY6A和LY6C的表面表达应答炎性细胞因子(特别是IFN γ)而上调。将YAMC细胞用所示细胞因子处理15小时并针对LY6C(图25A)和LY6A(图25B)的表面表达染色。将YAMC细胞在存在递增剂量的IFN γ 的情况下培养15小时并通过流式细胞术分析LY6C(图25C)和LY6A(图25D)的表达。在所示各个时间点收集IFN γ 刺激的YAMC细胞,并通过流式细胞术分析LY6C(图25E)和LY6A(图25F)的表达。IL-22上调LY6C(图25G)和LY6A(图

25H) 二者的表达。LY6A和LY6C二者的水平在鼠IEC系CMT93中应答IFN γ 处理而上调(图25I)。

[0043] 图26A-26E, 脂筏消减导致对LY6C介导的趋化因子生成的抑制。如所示的, 将胆固醇消减的(深色柱)或未消减的(空心柱)YAMC细胞与板上结合的抗KLH或抗LY6C一起温育15小时。收集RNA并测定CXCL2、CXCL5、和CCL7的表达水平(图26A-26C)。LY6A(图26D)和LY6C(图26E)的表面水平应答胆固醇消减而降低。

[0044] 图27A-27D显示了LY6C而非LY6A交联诱导LY6A和LY6C表面表达上调。将YAMC细胞在经抗KLH对照、抗LY6A或抗LY6C包被的板上温育24小时, 并通过流式细胞术分析LY6C(图27A)或LY6A(图27B)的表达。将细胞用100U/ml IFN γ 预处理12小时, 类似地涂布在抗体包被板上, 并分析LY6C(图27C)或LY6A(图27D)的表达。

[0045] 图28A-28C显示了交联LY6C而非LY6A诱导趋化因子分泌。图28A: 如所示的, 将YAMC细胞与100U/ml IFN γ 一起预温育15小时或不进行预温育, 在经10 μ g/ml抗LY6A(黑色柱)或抗LY6C(阴影柱)或抗KLH对照(空心柱)包被的板上培养。在24小时(左)、48小时(中)和72小时(右)时分离RNA, 并分析CXCL5或CCL7的表达(A)。数据表示与未处理的同种型交联细胞相比的倍数变化(如通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法所测定的)的均值 $\pm$ SD。图28B: 如上所述, 在48小时时在用1、5或10 μ g/ml(如所示的)抗体交联的细胞中收集上清液, 并通过ELISA测定进入上清液的CXCL5分泌。 $^* < 0.05$ 。图28C: CXCL5和CXCL2二者应答LY6C交联的水平在LY6C水平用siRNA敲低时降低。

[0046] 图29A-29B显示了结肠炎中的IEC拥有相似的趋化因子基因表达样式。通过LCM分离IL10 $^{-/-}$ (图29A)和CD45RB H 转移结肠炎模型(图29B)二者中的IEC并纯化RNA。如实施例中所描述地实施并分析微阵列分析。数值代表结肠炎小鼠较之健康小鼠, 与通用标准品RNA相比的倍数变化的均值。热图下面的数值指示各只小鼠的炎症得分。

[0047] 图30A-30C显示了人LY6家族基因的表达在用细胞因子处理的结肠细胞中上调。将人Co1o-205细胞用所示细胞因子或细胞因子组合处理18或24小时。显示了人LY6H(图30A)、人LYPD3(图30B)、和人LYPD5(图30C)的表达相对于人 β -肌动蛋白对照的倍数变化。

[0048] 图31A-31B显示了克罗恩氏病患者在结肠中具有升高的LYPD1(图31A)和LYPD5(图31B)水平。自人IBD患者获得组织样品, 并测定LYPD1和LYPD5基因表达。在CD患者的炎症组织中观察到LYPD1和LYPD5的统计学显著升高。在UC患者的炎症组织中也观察到LYPD5表达的统计学显著升高。Y轴值反映了相对于通用RNA标准品的基因表达。

[0049] 图32A和32B显示了用LYPD5-Fc蛋白染色的(A)未转染的COS细胞和(B)经GLG-1(ESL-1)多肽转染的COS细胞。

[0050] 图33A描绘了GLG-1或ESL-1及各种适合于表征LYPD5结合的片段的结构, 而图33B显示了表征LYPD5和LYPD5配体结合的免疫共沉淀研究的结果。

[0051] 图34A描绘了GLG-1或ESL-1及各种适合于表征LYPD5结合的片段的结构, 而图34B显示了表征LYPD5和LYPD5配体结合的免疫共沉淀研究的结果。

[0052] 图35A描绘了GLG-1或ESL-1及各种适合于表征LYPD5结合的片段的结构, 而图35B显示了显示了表征LYPD5和LYPD5配体结合的免疫共沉淀研究的结果。

[0053] 图36A和36B描绘了编码人整联蛋白 β 7的核酸序列(SEQ ID NO:68)和人整联蛋白 β 7多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:69)。

[0054] 发明详述

[0055] 定义

[0056] “炎性肠病”或“IBD”在本文中可互换地用于指引起炎症和/或溃疡的肠疾病,而且包括但不限于克罗恩氏病和溃疡性结肠炎。

[0057] “克罗恩氏病”(CD)或“溃疡性结肠炎”(UC)是病因未知的慢性炎性肠病。与溃疡性结肠炎不同,克罗恩氏病能侵袭肠的任何部分。克罗恩氏病的最突出特征是肠壁的颗粒状、红紫色半透明(edematous)增厚。随着炎症的发生/发展,这些肉芽肿常常失去它们的局限边界并与周围组织整合。腹泻和肠梗阻是主要的临床特征。与溃疡性结肠炎一样,克罗恩氏病的病程可以是连续的或复发的,轻度的或重度的,但是与溃疡性结肠炎不同,克罗恩氏病不能通过切除所涉及的肠段来治愈。大多数克罗恩氏病患者在有些(时间)点需要手术,但是常常随后复发且通常继续医学治疗。

[0058] 克罗恩氏病可涉及消化道的任何部分,从口到肛门,尽管它通常出现在回结肠、小肠或结肠-肛门直肠区。在组织病理学上,疾病表现为不连续的肉芽肿病、隐窝脓肿、裂隙和口疮性溃疡。炎性渗入物是混合的,由淋巴细胞(T和B两种细胞)、浆细胞、巨噬细胞、和嗜中性粒细胞组成。分泌IgM和IgG的浆细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞有不成比例的升高。

[0059] 抗炎药柳氮磺吡啶(sulfasalazine)和5-氨基水杨酸(5-ASA)对于治疗轻度活动性结肠克罗恩氏病是有用的,而且常常开出处方来维持疾病的消退。Metroidazole和环丙沙星(ciprofloxacin)在功效上与柳氮磺吡啶类似,而且表现出对于治疗肛门周围的疾病特别有用。在更严重的病例中,皮质类固醇在治疗活跃的恶化中是有效的,而且甚至能维持消退。硫唑嘌呤和6-巯基嘌呤也已经显示出在需要长期施用皮质类固醇的患者是成功的。同样有可能的是,这些药物在长期预防中可能起作用。不幸的是,在一些患者中起作用之前可能有很长的延迟(可长达6个月)。

[0060] 止泻药也能在一些患者中使症状缓解。营养疗法或要素饮食能改善患者的营养状况并诱导急性病的症状改善,但它不诱导持久的临床消退。抗生素用于治疗继发性小肠细菌过度生长和治疗化脓性并发症。

[0061] “溃疡性结肠炎”(UC)侵袭大肠。该病的病程可以是连续的或复发的,轻度的或重度的。最早的损伤是炎性浸润,伴有Lieberkühn隐窝基部的脓肿形成。这些膨胀的和破裂的隐窝的聚并趋于将覆盖在上面的粘膜与其血供分开,导致溃疡。该病的症状包括痛性痉挛、小腹痛、直肠出血、和频繁的、松散的排便,主要由血液、脓液和粘液及少量粪便颗粒组成。急性、重度或慢性、持续性溃疡性结肠炎可能需要全结肠切除术。

[0062] UC的临床特征是高度易变的,而且发作可以是隐匿的或暴发的,而且可以包括腹泻、里急后重和复发性直肠出血。在暴发性涉及整个结肠时,可发生中毒性巨结肠(一种危及生命的急症)。肠外表现包括关节炎、坏疽性脓皮病(pyoderma gangrenoum)、葡萄膜炎、和结节性红斑(erythema nodosum)。

[0063] UC的治疗包括柳氮磺吡啶和相关的含水杨酸药物(用于轻度病例)和皮质类固醇药物(用于重度病例)。水杨酸或皮质类固醇的表面施用有时是有效的(特别是在疾病限于远端肠时),而且与系统使用相比与降低的副作用有关。有时指示需要支持性措施(诸如施用铁和止泻药)。有时也开出硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤和甲氨蝶呤的处方,用于顽固性皮质类固醇依赖性病例。

[0064] 如本文中所使用的,“LY6基因家族成员”或“LY6基因超家族成员”在本文中可互换地用于指与LY6基因家族具有同源性的基因,该基因家族成员大多是PGI锚定的细胞表面糖蛋白,在造血起源的细胞上有广泛分布,而在非造血细胞中有受到较为限制的表达。此基因家族的成员用作免疫细胞的分化标志物(Sunderkotter,C.等,J. Immunol. 172:4410-4417 (2004))。已经检查了LY6家族的基因(Shevach,E.M.和P.E.Korty, Immunol. Today 10:195-200 (1989)),其功能包括T细胞激活(Zhang,Z.X.等, Eur. J. Immunol. 32:1584-1592 (2002)和Henderson,S.C.等,J. Immunol. 168:118-126 (2002))、嗅觉(Chou,J.H.等, Genetics 157:211-224 (2001))和细胞粘附(Jaakkola,I.等,J. Immunol. 170:1283-1290 (2003))。LY6基因家族成员包括但不限于哺乳动物LY6基因家族,诸如小鼠或人的LY6家族基因。如本文中所使用的,“LY6基因”指LY6基因家族成员,而“LY6多肽”指由LY6基因编码的多肽。鼠LY6基因家族成员包括但不限于LY6A(NM_010738,核酸SEQ ID NO:25,其编码多肽SEQ IDNO:26)、LY6C(NM_010741,核酸SEQ ID NO:27,其编码多肽SEQ IDNO:28)、LY6D(NM_003695,核酸SEQ ID NO:29,其编码多肽SEQ IDNO:30)、LY6E(NM_002346,核酸SEQ ID NO:31,其编码多肽SEQ IDNO:32)、LY6F(NM_008530,核酸SEQ ID NO:33,其编码多肽SEQ IDNO:34)、LY6I(NM_020498,核酸SEQ ID NO:35,其编码多肽SEQ ID NO:36)、和LY6K(NM_017527,核酸SEQ ID NO:37,其编码多肽SEQ ID NO:38)。人LY6基因家族成员包括但不限于LY6H(NM_002347,核酸SEQ ID NO:1,其编码多肽SEQ ID NO:2)、LYPD1(NM_144586,核酸SEQ ID NOS:3或4,其编码多肽SEQ ID NO:5)、LYPD3(NM_014400,核酸SEQ ID NO:6,其编码多肽SEQ ID NO:7)、LYPD5(NM_182573,核酸SEQ ID NOS:8或9,其编码多肽SEQ ID NO:10)、LY6D(NM_003695,核酸SEQ ID NO:11,其编码多肽SEQ ID NO:12)、LY6E(NMNM_002346,核酸SEQ ID NO:13,其编码多肽SEQ ID NO:14)、LYPD2(NM_205545,核酸SEQ ID NO:15,其编码多肽SEQ ID NO:16)。在多个实施方案中,本文中所公开的每个LY6基因家族成员的多核苷酸包含SEQ ID NO:1,3,4,6,8,9,11,13,15,25,27,29,31,33,35,37,45,47,49,51,53,55,或57的至少15个、至少25个、至少50个、至少100个、至少250个、至少500个、至少750个、至少1000个、至少1250个、至少1500个、至少1750个、至少2000个、或至少2040个连续核苷酸,或LY6基因家族成员多核苷酸包含SEQ ID NO:1,3,4,6,8,9,11,13,15,25,27,29,31,33,35,37,45,47,49,51,53,55,或57。在一个实施方案中,与LY6基因家族成员多核苷酸(SEQ ID NO:1,3,4,6,8,9,11,13,15,25,27,29,31,33,35,37,45,47,49,51,53,55,或57)或其片段结合的多核苷酸与LY6多肽或其片段具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%序列同一性。在一个实施方案中,LY6基因家族成员多肽包含SEQ IDNO:2,5,7,10,12,14,26,28,30,32,34,36,38,46,48,50,52,54,56,或58的至少10个、至少25个、至少50个、至少75个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个、至少200个、至少225个、至少250个、至少275个、至少300、或至少325个、至少连续氨基酸,或LY6基因家族多肽包含SEQ ID NO:2,5,7,10,12,14,26,28,30,32,34,36,38,46,48,50,52,54,56,或58。

[0065] 任何LY6基因家族成员的“天然序列多肽”包括与衍生自自然界的相应LY6基因家族成员多肽具有相同氨基酸序列的多肽。此类天然序列LY6多肽可以从自然界分离,或者可以通过重组或合成手段生产。术语“天然序列LY6多肽”明确涵盖天然存在的截短或分泌形式的特定LY6多肽(例如胞外域序列)、多肽的天然存在变体形式(例如可变剪接形式)和天然存在等位变体。在一个具体的方面,本文中所公开的天然序列LY6多肽是与图1-7和SEQ

IDNO:2,5,7,10,12,14,26,28,30,32,34,36,38,46,48,50,52,54,56,或58中的序列对应的成熟或全长天然序列多肽。

[0066] 如本文中所使用的,“LY6多肽变体”意指与本文中所公开的全长天然序列LY6多肽序列具有至少约80%氨基酸序列同一性的LY6多肽,优选其生物学活性形式(如本文中所定义的),及其缺乏信号肽、胞外域、或全长天然序列LY6多肽的任何其它片段(诸如本文中所提到的那些)的变体形式。此类变体多肽包括例如在全长天然氨基酸序列的N-或C-末端添加或删除一个或多个氨基酸残基的多肽。在一个具体的方面,此类变体多肽与本文中所公开的全长天然序列LY6多肽序列多肽及其缺乏信号肽、胞外域、或全长天然序列LY6多肽的任何其它片段(诸如本文中所公开的那些)的变体形式具有至少约80%的氨基酸序列同一性,或者至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列同一性。

[0067] 关于本文所鉴定的LY6多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时,候选序列中与特定LY6多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以以本领域技术范围内的多种方式实现,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可决定用于测量对比的适宜参数,包括对所比较序列全长实现最大对比所需的任何算法。然而,为了本发明的目的,%氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生的,其中下文表1中提供了ALIGN-2程序的完整源代码。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech公司编写,下文表1所示源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局(U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559),并以美国版权注册号TXU510087注册。公众可通过Genentech公司(South San Francisco, California)得到ALIGN-2程序,或者可从下文表1中提供的源代码编译。ALIGN2程序应当编译成在UNIX操作系统,优选数码UNIX V4.0D上使用。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设定且不变。

[0068] 如本文中所使用的,“LY6变异多核苷酸”或“LY6变异核酸序列”或“LY6基因”指编码本文中所定义的LY6基因家族成员多肽(优选其生物学活性形式的多肽)且与编码本文中所鉴定的全长天然序列LY6多肽序列或相应的本文中所鉴定的全长LY6多肽序列的任何其它片段(诸如那些由只代表全长LY6多肽完整编码序列的一部分的核酸编码的)的核苷酸序列具有至少约80%核酸序列同一性的核酸分子。通常,这样的变异多核苷酸与编码相应的本文中所鉴定的全长天然序列LY6多肽序列或相应的全长LY6多肽序列的任何其它片段的核酸序列具有至少约80%的核酸序列同一性,或者至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的核酸序列同一性。这样的变异多核苷酸不涵盖天然核苷酸序列。

[0069] 通常,这样的变异多核苷酸的长度相对于天然序列多肽变化至少约50个核苷酸,或者长度变异可以是至少约50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、

810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990或1000个核苷酸,其中在此语境中,术语“约”意指所述核苷酸序列长度加上或减去该所述长度的10%。

[0070] 关于本文中所定义的LY6基因多肽编码核酸序列的“百分比(%)核酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,候选序列中与目的LY6基因核酸序列中的核苷酸相同的核苷酸的百分率。为测定百分比核酸序列同一性目的的序列对比可以本领域技术范围内的多种方式进行,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。然而,为了本发明的目的,%核酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序ALIGN-2获得的,其中下文表1中提供了ALIGN-2程序的完整源代码。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech公司编写,下文表1所示源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局(USCopyright Office, Washington D.C., 20559),并以美国版权注册号TXU510087注册。公众可通过Genentech公司(South San Francisco, California)得到ALIGN-2程序,或者可从下文表1中提供的源代码编译。ALIGN2程序应当编译成在UNIX操作系统,优选数码UNIX V4.0D上使用。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设定且不变。

[0071] 在采用ALIGN-2来比较核酸序列的情况中,给定核酸序列C相对于(to)、与(with)、或针对(against)给定氨基酸序列D的%核酸序列同一性(或者可表述为具有或包含相对于、与、或针对给定核酸序列D的某一%核酸序列同一性的给定核酸序列C)如下计算:

[0072] 分数 W/Z 乘100

[0073] 其中W是由序列对比程序ALIGN-2在该程序的C和D对比中评分为相同匹配的核苷酸数,且其中Z是D中的核苷酸总数。可以领会,若核酸序列C的长度与核酸序列D的长度不相等,则C相对于D的%核酸序列同一性将不等于D相对于C的%核酸序列同一性。作为计算%核酸序列同一性的例子,表4和5演示了如何计算指派为“比较DNA”的核酸序列相对于指派为“REF-DNA”的核酸序列的%核酸序列同一性,其中“REF-DNA”代表目的假设LY6基因编码核酸序列,“比较DNA”代表目的“REF-DNA”核酸分子针对其进行比较的核酸分子的核苷酸序列,而“N”、“L”和“V”各自代表不同假设核苷酸。除非另有具体说明,本文中所使用的所有%核酸序列同一性值都是依照上一段所述,使用ALIGN-2计算机程序获得的。

[0074] 在其它实施方案中,LY6基因变异多核苷酸是编码LY6多肽且能够与编码全长LY6多肽的核苷酸序列杂交(优选在严格杂交和清洗条件下)的核酸分子,如本文中所公开的。所述变异多肽可以是那些由所述变异多核苷酸编码的。

[0075] 在用于描述本文中所公开的各种LY6多肽时,“分离的”意指已经鉴定且与/由其天然环境的一种成分分开和/或回收的多肽。多肽的天然环境的污染性成分指通常会干扰其诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选实施方案中,将此类多肽纯化至(1)足以通过使用转杯式测序仪获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度,或(2)根据使用考马斯蓝或优选的银染色的非还原性或还原性条件下的SDS-PAGE,达到同质。既然来自其天然环境的LY6多肽的至少一种成分不会存在,那么此类分离的多肽包括重组细胞内的相应原位多肽。然而,此类分离的多肽通常通过至少一个纯化步骤来制备。

[0076] “分离的”LY6多肽编码核酸指已经鉴定且与多肽编码核酸的天然来源中通常与之

关联的至少一种污染性核酸分子分开的核酸分子。任何上述此类分离的核酸分子不同于在自然界中发现它时的形式或背景。任何此类核酸分子因此与存在于天然细胞中时的特定多肽编码核酸分子有区别。

[0077] 术语“控制序列”指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的DNA序列。例如,适于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵基因序列、和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号、和增强子。

[0078] 若一段核酸与另一段核酸序列处于功能性相互关系中,则它是“可操作连接的”。例如,若前序列(presequence)或分泌前导(secretory leader)的DNA表达成参与多肽分泌的前蛋白质(preprotein),则它与该多肽的DNA可操作连接;若启动子或增强子影响编码序列的转录,则它与该序列可操作连接;或者,若核糖体结合位点的位置促进翻译,则它与编码序列可操作连接。一般而言,“可操作连接的”意味着相连的DNA序列是相邻的,而且在分泌前导的情况中意味着相邻且处于阅读状态。然而,增强子不必相邻。连接可以通过在方便的限制性位点处的连接来实现。若没有此类位点,则依照常规实践使用合成的寡核苷酸衔接头或接头。

[0079] 如本文中所使用的,“表达”在应用于基因表达时指编码蛋白质的基因转录生成mRNA,以及该mRNA翻译生成该基因所编码的蛋白质。如此,升高的或降低的表达指基因的升高的或降低的转录和/或自转录得到的mRNA的升高的或降低的翻译。

[0080] 杂交反应的“严格性”可以由本领域普通技术人员容易地确定,而且通常根据探针长度、洗涤温度和盐浓度凭经验计算。一般而言,较长的探针要求较高的温度以正确退火,而较短的探针需要较低的温度。杂交通常依赖于当互补链存在于低于其解链温度的环境中时变性DNA重新退火的能力。探针和可杂交序列之间的期望同源性程度越高,可使用的相对温度也越高。结果是,推断出较高相对温度将趋向于使反应条件更为严格,而较低温度也就较不严格。关于杂交反应严格性的其它细节和解释,参见Ausubel等人,《Current Protocols in Molecular Biology》,Wiley Interscience Publishers,1995。

[0081] “严格条件”或“高严格条件”,如本文中所定义的,可如下鉴定:(1)采用低离子强度和高温进行清洗,例如0.015M氯化钠/0.0015M柠檬酸钠/0.1%十二烷基硫酸钠,于50℃;(2)在杂交过程中采用变性剂,诸如甲酰胺,例如50%(v/v)甲酰胺及0.1%牛血清清蛋白/0.1%Ficoll/0.1%聚乙烯吡咯烷酮/50mM磷酸钠缓冲液,pH6.5,以及750mM氯化钠,75mM柠檬酸钠,42℃;或(3)在采用50%甲酰胺,5x SSC(0.75M NaCl,0.075M柠檬酸钠),50mM磷酸钠(pH 6.8),0.1%焦磷酸钠,5x Denhardt氏溶液,超声处理的鲑鱼精DNA(50μg/ml),0.1% SDS,和10%硫酸右旋糖苷的溶液中于42℃杂交过夜,及于42℃在0.2x SSC(氯化钠/柠檬酸钠)中清洗10分钟,接着于55℃在含EDTA的0.1x SSC中进行10分钟高严格性清洗。

[0082] “中等严格条件”可以如Sambrook等人,《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》,New York, Cold Spring Harbor Press,1989中所述鉴定,包括使用比上文所述较不严格的清洗溶液和杂交条件(例如温度、离子强度和%SDS)。中等严格条件的一个例子是于37℃在含20%甲酰胺,5x SSC(150mM NaCl,15mM柠檬酸三钠),50mM磷酸钠(pH 7.6),5x Denhardt氏溶液,10%硫酸右旋糖苷,和20mg/ml变性剪切的鲑鱼精DNA的溶液中温育过夜,接着于约37-50℃在1x SSC中清洗滤膜。普通技术人员将认识到如何在必要时调整温度、离子强度等以适应诸如探针长度等因素。

[0083] 术语“表位标记的”在用于本文时指包含LY6多肽或LY6多肽结合剂且其与“标签多肽”融合的嵌合多肽。标签多肽具有足够残基以提供表位而可制备针对其的抗体,但又足够短使得其不干扰与其融合的多肽的活性。标签多肽优选还是足够独特的,使得此类抗体基本上不与其它表位发生交叉反应。合适的标签多肽通常具有至少6个氨基酸残基,通常在约8个和约50个氨基酸残基之间(优选在约10个和约20个氨基酸残基之间)。

[0084] “有活性的”或“活性”为了本发明的目的指保留了天然的或天然存在的多肽的生物学和/或免疫学活性的多肽形式,其中“生物学”活性(或是抑制性的或是刺激性的)指由天然或天然存在多肽引起的,除诱导针对天然或天然存在多肽所拥有的抗原性表位的抗体生成的能力外的生物学功能,而“免疫学”活性指诱导针对天然或天然存在多肽所拥有的抗原性表位的抗体生成的能力。如本文中所使用的,有活性的多肽指就定性或定量的观点看在IBD组织中相对于其在未患IBD的类似组织上的表达差异表达的抗原。

[0085] 术语“拮抗剂”以最广义使用,包括部分或完全阻断、抑制、或中和本文中所公开的天然多肽的生物学活性的任何分子。合适的拮抗剂分子明确包括拮抗性抗体或抗体片段、天然多肽的片段或氨基酸序列变体、肽、反义寡核苷酸、有机小分子、等。用于鉴定拮抗剂的方法可包含使这样的多肽(包括编码它的细胞)接触候选激动性或拮抗性分子,并测定通常与此类多肽有关的一项或多项生物学活性的可检测变化。

[0086] “处理”或“治疗”或“改善”或“缓和”指治疗性处理和预防性或防范性措施二者,其中目的是预防或减缓(减轻)疾病的进展。治疗还可指对IBD进展的改变。

[0087] “诊断”指鉴定或确定疾病(包括但不限于IBD、UC和/或克罗恩氏病)的区别性特征的过程。诊断过程有时也表述成基于严重程度或疾病进展以及定位(诸如例如胃肠道内或沿着胃肠道,发现炎症和/或改变的基因表达的位置)的分期或疾病分类。

[0088] 需要诊断的受试者包括那些已经异常LY6表达的,以及那些倾向于具有异常LY6表达的或那些要预防异常LY6表达的受试者。因而,本发明的一个方面是检测为了治疗IBD而用治疗剂处理的哺乳动物中的治疗性药物应答,其中所述方法包括相对于对照测定测试哺乳动物的胃肠组织中的Ih LY6表达,并确定LY6表达水平在没有显著不同于正常对照表达水平的范围内。在一个实施方案中,在用治疗剂处理的哺乳动物的LY6表达水平不同时(表达与正常对照更相似,即LY6表达水平低于治疗前哺乳动物中的LY6表达水平),确定有治疗响应。

[0089] 上述用于评估疾病的成功治疗和改善的参数易于通过内科医师所熟悉的例行规程来测量。对于IBD疗法,可通过例如评估疾病进展前时间(time to disease progression, TTP)和/或测定响应率(response rate, RR)来测量功效,并进行活检来评估基因表达和观察来自患者的胃肠组织的组织病理学。本文中所描述的,涉及预后和/或诊断过程的发明涉及LY6基因表达上调的测定和评估。

[0090] 出于IBD的治疗、症状减轻或诊断的目的,“哺乳动物”或“哺乳动物受试者”指任何归入哺乳类的动物,包括人,家畜和牲畜,及动物园中的动物、体育用动物、或宠物动物,诸如犬、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、家兔、貂(ferrets)等。优选的是,哺乳动物指人。

[0091] 与一种或多种其它治疗剂“联合”施用包括同时(共同)施用和任何次序的序贯施用。

[0092] “载体”在用于本文时包括药剂学可接受的载体、赋形剂或稳定剂,它们在所采用

的剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。通常,生理学可接受的载体是pH缓冲水溶液。生理学可接受载体的例子包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,诸如甘露醇或山梨醇;成盐反荷离子,诸如钠;和/或非离子表面活性剂,诸如TWEEN®、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS®。

[0093] “固相”或“固体支持物”意指本发明的多肽、核酸、抗体或LY6结合剂可粘着或附着其上的非水性基质。本文中所涵盖的固相的例子包括那些部分或完全由玻璃(例如可控孔径玻璃)、多糖(例如琼脂糖)、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇和聚硅氧烷(silicone)制成的固相。在某些实施方案中,根据语境,固相可包括测定板的孔;在其它实施方案中,它指纯化柱(例如亲和层析柱)。此术语还包括离散颗粒的不连续固相,诸如美国专利No.4,275,149中所记载的。

[0094] “脂质体”指由各种类型的脂质、磷脂和/或表面活性剂构成的,可用于对哺乳动物投递药物的小囊泡。脂质体的成分通常排列成双层形式,与生物膜的脂质排列相似。

[0095] “小”分子或“有机小分子”在本文中定义为具有低于约500道尔顿的分子量。

[0096] 拮抗剂的“有效量”指足以带来生理学效应的量,所述生理学效应诸如但不限于部分或完全抑制基因的或其编码的蛋白质的功能。关于此目的,可凭经验且以常规方式来确定“有效量”。

[0097] 术语“治疗有效量”指拮抗剂或其它药物有效“治疗”受试者或哺乳动物中的疾病或病症的量。就IBD而言,药物的治疗有效量会将异常LY6表达恢复成正常生理水平;减轻胃肠炎症;减少胃肠病灶数目;和/或一定程度地减轻与IBD、UC和/或CD有关的一种或多种症状。参见本文中“治疗”的定义。

[0098] 拮抗剂的“生长抑制量”指能够在体外或在体内抑制细胞,尤其是肿瘤,例如癌细胞生长的数量。为了抑制肿瘤性细胞生长的目的,可凭经验且以常规方式来确定这样的量。

[0099] 拮抗剂的“细胞毒性量”指能够在体外或在体内引起细胞,尤其是正在增殖的细胞,例如癌细胞破坏的量。为了抑制肿瘤性细胞生长的目的,可凭经验且以常规方式来确定这样的量。

[0100] 术语“抗体”以最广义使用,明确覆盖例如抗LY6单克隆抗体(包括拮抗性和中和性抗体)、具有多表位特异性的抗LY6抗体组合物、多克隆抗体、单链抗LY6抗体、多特异性抗体(例如双特异性)、及所有上文列举的抗体的抗原结合片段(见下文),只要它们展现出期望的生物学或免疫学活性。术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中与抗体可互换使用。

[0101] “分离的”抗体指已经鉴定且自其天然环境的一种成分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染性成分指将会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将抗体纯化至(1)根据Lowry法的测定,抗体重量超过95%,最优选重量超过99%,(2)足以通过使用转杯式测序仪获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度,或(3)根据还原性或非还原性条件下的SDS-PAGE及使用考马斯蓝或优选的银染色,达到同质。既然抗体天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而,分离的抗体通常将通过至少

一个纯化步骤来制备。

[0102] 基本的4链抗体单元是由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)构成的异四聚体糖蛋白(IgM抗体由5个基本的异四聚体单元及称作J链的另外多肽组成,因此包含10个抗原结合位点;而分泌型IgA抗体可聚合而形成包含2-5个基本的4链单元及J链的多价装配物)。在IgG的情况中,4链单元通常是约150,000道尔顿。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而两条重链通过一个或多个二硫键彼此相连,二硫键的数目取决于重链的同种型。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫键。每条重链在N-末端具有一个可变区(VH),接着是三个(对于 α 和 γ 链)或四个(对于 μ 和 ϵ 同种型)恒定区(CH)。每条轻链在N-末端具有一个可变区(VL),接着是其另一端的一个恒定区(CL)。VL与VH排列在一起,而CL与重链第一恒定区(CH1)排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面。一个VH和一个VL一起配对而形成一个抗原结合位点。关于不同类别抗体的结构和性质,参见例如Basic and Clinical Immunology,8th edition,Daniel P.Stites,Abba I.Terrand Tristram G.Parslow(eds.),Appleton & Lange,Norwalk,CT,1994,page 71and Chapter 6。

[0103] 根据其恒定域氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的L链可归入两种截然不同类型中的一种,称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。根据其重链恒定域(C_H)氨基酸序列,免疫球蛋白可归入不同的类别或同种型。有五类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,分别具有称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。根据 C_H 序列和功能的较小差异, γ 和 α 类可进一步分为亚类,例如人类表达下列亚类:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

[0104] 术语“可变的”指可变域中的某些区段在抗体间序列差异广泛的实情。V结构域介导抗原结合并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,变异性并非均匀分布于可变域跨越的大约110个氨基酸。事实上,V区由15-30个氨基酸,称作框架区(FR)的相对不变异的区段及将框架区分开的每个长度为9-12个氨基酸,称作“高变区”的极度变异的较短区域组成。天然重链和轻链的可变域各自包含四个FR,它们大多采取 β -折叠片构象,通过形成环状连接且在有些情况中形成 β -折叠片结构一部分的三个高变区连接。每条链中的高变区通过FR非常接近的保持在一起,并与另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991))。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应器功能,诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)中抗体的参与。

[0105] 术语“高变区”在用于本文时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区一般包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如VL中的Kabat残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)附近及VH中的Kabat残基31-35B(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)附近;Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))和/或那些来自“高变环”的残基(例如VL中的Chothia残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)及VH中的残基26-32(H1)、52A-55(H2)和96-101(H3)附近;Chothia and Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。

[0106] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成

群体的各个抗体相同和/或结合相同表位,除了生产单克隆抗体的过程中可能产生的可能变体外,此类变体一般以极小量存在。此类单克隆抗体典型的包括包含结合靶物的多肽序列的抗体,其中靶物结合多肽序列是通过包括从众多多肽序列中选择单一靶物结合多肽序列在内的过程得到的。例如,选择过程可以是从小克隆诸如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆的集合中选择独特克隆。应当理解,选定的靶物结合序列可进一步改变,例如为了提高对靶物的亲和力、将靶物结合序列人源化、提高其在细胞培养物中的产量、降低其在体内的免疫原性、创建多特异性抗体等,而且包含改变后的靶物结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与典型的包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,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。在它们的特异性以外,单克隆抗体制备物的优势在于它们一般未受到其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”指示抗体从基本上同质的抗体群获得的特征,不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如,有待依照本发明使用的单克隆抗体可通过多种技术来生成,包括例如杂交瘤法(例如Kohler et al.,*Nature* 256:495(1975);Harlow et al.,*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1988; Hammerling et al., 于: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563-681, Elsevier, N.Y., 1981)、重组DNA法(参见例如美国专利No. 4,816,567)、噬菌体展示技术(参见例如Clackson et al., *Nature* 352:624-628(1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1991); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310(2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093(2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472(2004); Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132(2004))、及用于在具有部分或整个人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物中生成人或人样抗体的技术(参见例如WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551(1993); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258(1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno.* 7:33(1993); 美国专利No. 5,545,806; 5,569,825; 5,591,669(都属于GenPharm); 5,545,807; WO 1997/17852; 美国专利No. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783(1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859(1994); Morrison, *Nature* 368:812-813(1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-851(1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826(1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93(1995))。

[0107] “嵌合”抗体(免疫球蛋白)中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性(美国专利No. 4,816,567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855(1984))。本文中所使用的人源化抗体是嵌合抗体的一个子集。

[0108] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上,人源化抗体指人免疫球蛋白(受体抗体)中的高变区残基用具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动

物的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中,将人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有找到的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能诸如结合亲和力。一般而言,人源化抗体将包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且所有或基本上所有FR是人免疫球蛋白序列的FR,尽管FR可包含一处或多处提高结合亲和力的氨基酸替代。FR中这些氨基酸替代的数目通常在重链中不超过6处,在轻链中不超过3处。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见Jones et al.,*Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al.,*Nature* 332:323-329 (1988);和Presta,*Curr.Op.Struct.Biol.*2:593-596 (1992)。

[0109] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体(参见美国专利5,641,870,实施例2;Zapata et al.,*Protein Eng.*8(10):1057-1062 (1995));单链抗体分子;及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0110] 用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称作“Fab”片段,和一个残余“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。Fab片段由一条完整轻链及一条重链的可变区(V_H)和第一恒定区(C_{H1})组成。每个Fab片段对于抗原结合是单价的,即它具有一个抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体产生一个较大F(ab')₂片段,它粗略相当于两个通过二硫键相连的Fab片段,具有二价抗原结合活性且仍能够交联抗原。Fab'片段因在C_{H1}结构域的羧基末端增加了少数残基而与Fab片段有所不同,所述残基包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中对其中恒定区半胱氨酸残基携带游离巯基的Fab'的称谓。F(ab')₂抗体片段最初是作为成对Fab'片段生成的,在Fab'片段之间具有铰链半胱氨酸。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0111] Fc片段包含通过二硫键保持在一起的两条H链的羧基末端部分。抗体的效应器功能由Fc区中的序列来决定,该区域也是受到在某些类型的细胞上找到的Fc受体(FcR)识别的部分。

[0112] “Fv”是包含完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该片段由紧密、非共价结合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。从这两个结构域的折叠结构中生出六个高变环(重链和轻链各3个环),其贡献出供结合抗原的氨基酸残基并赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变域(或是只包含对抗原特异性的三个CDR的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,只是亲和力低于完整结合位点。

[0113] “单链Fv”,也可缩写为“sFv”或“scFv”,是包含连接成一条多肽链的抗体V_H和V_L结构域的抗体片段。优选的是,sFv多肽在V_H和V_L结构域之间还包含多肽接头,使得sFv形成抗原结合期望的结构。关于sFv的综述参见Plückthun,《*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*》,vol.113,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag,New York,pp.269-315,1994;Borrebaeck 1995,见下文。

[0114] 如本文中所使用的,“LY6结合多肽”指结合,优选特异性结合LY6多肽、配体或信号传导构件的寡肽,或其LY6结合部分或片段。此类寡肽可使用已知的寡肽合成方法学而化学合成,或者可使用重组技术来制备和纯化。此类寡肽的长度通常是至少约5个氨基酸,或者

长度为至少约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100个氨基酸或更多。此类寡肽可使用众所周知的技术无需过多实验就得以鉴定。在这点上,注意到用于对寡肽文库筛选能够特异性结合多肽靶物的寡肽的技术是本领域众所周知的(参见例如美国专利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W0 84/03506和W0 84/03564;Geysen et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.81:3998-4002(1984);Geysen et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.82:178-182(1985);Geysen et al.,in Synthetic Peptides as Antigens,130-149(1986);Geysen et al.,J.Immunol.Meth.102:259-274(1987);Schoofset al.,J.Immunol.140:611-616(1988);Cwirla,S.E.et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:6378(1990);Lowman,H.B.et al.,Biochemistry 30:10832(1991);Clackson,T.et al.,Nature 352:624(1991);Marks,J.D.et al., J.Mol.Biol.222:581(1991);Kang,A.S.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:8363(1991);及Smith,G.P.,Current Opin.Biotechnol.2:668(1991))。

[0115] “结合”感兴趣靶抗原(例如LY6)的LY6拮抗剂(例如抗体、多肽、寡肽或小分子)指以足够亲和力结合靶物,从而成为靶向表达该抗原的细胞或组织的有用诊断剂、预后剂和/或治疗剂,且与其它蛋白质没有显著交叉反应的拮抗剂。对非期望的标志物多肽的结合程度将小于对特定期望靶物的结合的约10%,这通过常用技术诸如荧光激活细胞分选(FACS)或放射免疫沉淀(RIA)来测定。

[0116] 此外,术语“特异结合”或“特异性结合”特定LY6多肽或特定LY6多肽靶物上的表位或对其“特异”意味着可测量的不同于非特异相互作用的结合。特异结合可通过例如测定分子的结合并与对照分子的结合比较来测量,所述对照分子通常是结构相似但没有结合活性的分子。例如,特异结合可通过与对照分子的竞争来测定,所述对照分子与靶物相似,例如过量的未标记靶物。在这种情况下,若经标记靶物与探针的结合受到过量未标记靶物的竞争性抑制,则指示特异结合。在一个实施方案中,此类术语指这样的结合,其中分子结合特定多肽或特定多肽上的表位,而基本上不结合任何其它多肽或多肽表位。或者,此类术语可以描述为分子所具有的对靶物的Kd为至少约 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M或更大。

[0117] “过表达”LY6的胃肠细胞或组织指与同一组织类型的正常胃肠细胞或组织相比,该细胞或组织显示出在细胞中具有升高的编码LY6的核酸,或者该细胞或组织过度生成和分泌LY6蛋白质。此类过表达可以源自基因扩增或升高的转录或翻译。已知多种诊断性或预后性测定法能测量改变的表达水平,其导致升高的或降低的细胞表面水平或升高的或降低的分泌蛋白水平,包括但不限于使用抗LY6抗体的免疫组织化学测定法、FACS分析等。或者,可测量细胞中编码LY6的核酸或mRNA的水平,例如通过荧光原位杂交,使用对应于编码LY6的核酸或其互补链的基于核酸的探针(FISH;参见W098/45479,公开于1998年10月);Southern印迹;Northern印迹;或聚合酶链式反应(PCR)技术,诸如实时定量PCR(RT-PCR)。或者,通过测量生物学流体(诸如血清)中的脱落抗原来测定LY6多肽过表达,例如使用基于

抗体的测定法(还可参见例如美国专利No.4,933,294,1990年6月12日公告;W091/05264,1991年4月18日公布;美国专利No.5,401,638,1995年3月28日公告;和Sias等,J.Immunol.Methods 132:73-80(1990))。在上文测定法之外,熟练从业人员可利用各种体内测定法。例如,可将患者身体内的细胞暴露于任选用可检测标记物(例如放射性同位素)标记的抗体,并且可评估抗体对患者中细胞的结合,例如通过外部扫描放射性或通过分析取自先前暴露于治疗剂的患者活细胞的活细胞。

[0118] 在用于本文时,术语“免疫粘附素”指将异源蛋白质(“粘附素”)的结合特异性与免疫球蛋白恒定域的效应器功能联合起来的抗体样分子。在结构上,免疫粘附素包括不同于抗体的抗原识别和结合位点(即是“异源”的)、具有期望结合特异性的氨基酸序列和免疫球蛋白恒定域序列的融合物。免疫粘附素分子的粘附素部分典型的是至少包含受体或配体的结合位点的连续氨基酸序列。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定域序列可以从任何免疫球蛋白获得,诸如IgG-1、IgG-2、IgG-3或IgG-4亚型、IgA(包括IgA-1和IgA-2)、IgE、IgD或IgM。

[0119] 术语“标记物”在用于本文时指与抗体、寡肽或其它有机分子直接或间接偶联,以生成“带标记物的”或“经标记的”抗体、寡肽或其它有机分子的可检测化合物或组合物。标记物可以是自身可检测的(例如放射性同位素标记物或荧光标记物),或者在酶标记物的情况中,可催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0120] 术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语意图包括:放射性同位素,例如At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²和Lu的放射性同位素;化疗剂;酶及其片段,诸如溶核酶;抗生素;和毒素,诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素,包括其片段和/或变体;及下文披露的各种抗肿瘤药或抗癌药。下文记载了其它细胞毒剂。杀肿瘤药引起肿瘤细胞的破坏。

[0121] “化疗剂”或“治疗剂”指在病症或疾病的治疗中有用的化学化合物。用于IBD治疗的化疗剂或治疗剂的例子包括但不限于抗炎药柳氮磺吡啶(sulfasalazine)和5-氨基水杨酸(5-amino salicylic acid,5-ASA);metroidazole和环丙沙星在功效上与柳氮磺吡啶类似,而且表现出对于治疗肛门周围的疾病特别有用;在更严重的病例中,皮质类固醇在治疗活跃的恶化中是有效的,而且甚至能维持消退;硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、和甲氨蝶呤也已经显示出在需要长期施用皮质类固醇的患者中是成功的;止泻药也能在一些患者中提供症状缓解;营养疗法或要素饮食能改善患者的营养状况并诱导急性病的症状改善;抗生素用于治疗继发性小肠细菌过度生长和治疗化脓性并发症。IBD化疗剂还包括生物制品和其它药剂,如下:抗B7抗体(参见例如W02006026759)、抗α4抗体(诸如ANTEGEN®)、抗TNF抗体(REMICADE®)或非蛋白质化合物,包括但不限于5-ASA化合物ASACOL®、PENTASA™、ROWASA™、COLAZAL™,和其它化合物,诸如Purinethol和类固醇,诸如泼尼松(prednisone)。用于癌症治疗的化疗剂的例子包括羟脲紫杉烷(诸如帕利他塞(paclitaxel)和多西他塞(doxetaxel))和/或蒽环类抗生素;烷化剂类(alkylating agents),诸如塞替派(thiotepa)和CYTOXAN®环磷酰胺(cyclophosphamide);磺酸烷基酯类(alkyl sulfonates),诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类(aziridines),诸如苯佐替派(benzodepa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredepa);乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines),包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、

三乙撑磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺 (trimethylololomelamine); 番荔枝内酯类 (acetogenin) (尤其是布拉他辛 (bullatacin) 和布拉他辛酮 (bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚 (tetrahydrocannabinol) (屈大麻酚 (dronabinol), MARINOL®); β -拉帕醌 (lapachone); 拉帕醇 (lapachol); 秋水仙素类 (colchicines); 白桦脂酸 (betulinic acid); 喜树碱 (camptothecin) (包括合成类似物托泊替康 (topotecan) (HYCANTIN®)、CPT-11 (伊立替康 (irinotecan), CAMPTOSAR®)、乙酰喜树碱、东莨菪亭 (scopoletin) 和 9-氨基喜树碱); 苔藓抑素 (bryostatin); callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物); 鬼臼毒素 (podophyllotoxin); 鬼臼酸 (podophyllinic acid); 替尼泊苷 (teniposide); 隐藻素类 (cryptophycins) (特别是隐藻素 1 和隐藻素 8); 多拉司他汀 (dolastatin); duocarmycin (包括合成类似物, KW-2189 和 CB1-TM1); 艾榴塞洛素 (eleutherobin); pancratistatin; sarcodictyin; 海绵抑素 (spongistatin); 氮芥类 (nitrogen mustards), 诸如苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、胆磷酰胺 (cholophosphamide)、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamineoxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard); 亚硝脲类 (nitrosoureas), 诸如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 和雷莫司汀 (ranimustine); 抗生素类, 诸如烯二炔类抗生素 (enediynes) (如加利车霉素 (calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ 11 和加利车霉素 ω 11 (参见例如 Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994))); 蒽环类抗生素 (dynemicin), 包括 dynemicin A; 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新制癌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素 (actinomycin)、氨茴霉素 (anthramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN® 多柔比星 (doxorubicin) (包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡吡咯代多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素类 (mitomycins) 诸如丝裂霉素 C、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培洛霉素 (peplomycin)、泊非霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物类, 诸如甲氨蝶呤和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨蝶呤、蝶酰三谷氨酸 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤 (mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮

尿苷、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine);雄激素类,诸如卡鲁睾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、表硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone);抗肾上腺类,诸如氨基葡萄糖 (aminogluthetamide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane);叶酸补充剂,诸如亚叶酸 (folinic acid);醋葡萄糖内酯 (aceglatone);醛磷酸胺糖苷 (aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid);恩尿嘧啶 (eniluracil);安吡啶 (amsacrine);bestrabucil;比生群 (bisantrene);依达曲沙 (edatraxate);地磷酰胺 (defosfamide);地美可辛 (demecolcine);地吡酮 (diaziquone);elfornithine;依利醋铵 (elliptinium acetate);埃坡霉素 (epothilone);依托格鲁 (etoglucid);硝酸镓;羟脲 (hydroxyurea);香菇多糖 (lentinan);氯尼达明 (lonidamine);美登木素生物碱类 (maytansinoids),诸如美登素 (maytansine) 和美登醇 (maytansinol);安丝菌素 (ansamitocin);米托胍脲 (mitoguazone);米托蒽醌 (mitoxantrone);莫哌达醇 (mopidamol);二胺硝吡啶 (nitracrine);喷司他丁 (pentostatin);蛋氨酸芥 (phenamet);吡柔比星 (pirarubicin);洛索蒽醌 (losoxantrone);2-乙基酰肼 (ethylhydrazide);丙卡巴肼 (procarbazine);PSK®多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR);雷佐生 (razoxane);根霉素 (rhizoxin);西索菲兰 (sizofiran);螺旋锗 (spirogermanium);细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid);三亚胺醌 (triaziquone);2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢菌素类 (trichothecenes) (尤其是T-2毒素、疣孢菌素 (verrucarin) A、杆孢菌素 (roridin) A和蛇行菌素 (anguidin));乌拉坦 (urethan);长春地辛 (vindesine) (ELDISINE®, FILDESIN®);达卡巴嗪 (dacarbazine);甘露醇氮芥 (mannomustine);二溴甘露醇 (mitobronitol);二溴卫矛醇 (mitolactol);哌泊溴烷 (pipobroman);gacytosine;阿糖胞苷 (arabinoside) (“Ara-C”);塞替派 (thiotepa);类紫杉醇 (taxoids),例如TAXOL®紫杉醇 (paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE™不含克列莫佛 (Cremophor),清蛋白改造的纳米颗粒剂型紫杉醇 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 和TAXOTERE®多西他塞 (doxetaxel) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France);苯丁酸氮芥 (chlorambucil);吉西他滨 (gemcitabine) (GEMZAR®);6-硫鸟嘌呤 (thioguanine);巯基嘌呤 (mercaptopurine);甲氨蝶呤 (methotrexate);铂类似物,诸如顺铂 (cisplatin) 和卡铂 (carboplatin);长春碱 (vinblastine) (VELBAN®);铂;依托泊苷 (etoposide) (VP-16);异环磷酰胺 (ifosfamide);米托蒽醌 (mitoxantrone);长春新碱 (vincristine) (ONCOVIN®);奥沙利铂 (oxaliplatin);亚叶酸 (leucovorin);长春瑞滨 (vinorelbine) (NAVELBINE®);能灭瘤 (novantrone);依达曲沙 (edatrexate);道诺霉素 (daunomycin);氨基蝶呤 (aminopterin);伊本膦酸盐 (ibandronate);拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸 (DMFO);类维A酸 (retinoids),诸如维A酸 (retinoic acid);卡培他滨 (capecitabine) (XELODA®);任何上述物质的药学可接受盐、酸或衍生物;以及两种或多种上述物质的组合,诸如CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写) 和FOLFOX (奥沙利铂 (ELOXATIN™) 联合5-FU和亚叶酸的治疗方案的缩写)。

[0122] 术语“细胞因子”是由一种细胞群释放,作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子有淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子中包括生

长激素,诸如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素;甲状旁腺素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松驰素;松驰素原;糖蛋白激素类,诸如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体激素(LH);肝生长因子;成纤维细胞生长因子;促乳素;胎盘催乳激素;肿瘤坏死因子- α 和- β ;穆勒氏(Mullerian)抑制性物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整联蛋白;血小板生成素(TPO);神经生长因子,诸如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),诸如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和-II;红细胞生成素(EPO);骨诱导因子(osteoinductive factor);干扰素,诸如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),诸如巨噬细胞CSF(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞CSF(GM-CSF)和粒细胞CSF(G-CSF);白介素(IL),诸如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12;肿瘤坏死因子,诸如TNF- α 或TNF- β ;及其它多肽因子,包括LIF和kit配体(KL)。在用于本文时,术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质及天然序列细胞因子的生物学活性等效物。

[0123] 术语“包装插页”用于指通常包括在治疗用产品的商业包装中的说明书,它们包含有关涉及此类治疗用产品应用的适应征、用法、剂量、施用、禁忌症、和/或警告的信息。

[0124] “上皮”和“上皮的”指身体内外表面的细胞覆盖物(皮肤、粘液和浆液),包括腺体和自其衍生的其它结构,例如角膜、食管、表皮、和毛囊上皮细胞。其它例示性上皮组织包括:嗅上皮-内衬鼻腔的嗅区且含有嗅觉受体的假复层上皮;腺上皮-由分泌细胞扁平上皮构成的上皮;扁平上皮-包含一个或多个细胞层,其中最浅表那层由扁平的、鳞片状或板状细胞构成的上皮。上皮也可指变移上皮,像特征性地见于由于收缩和扩张而进行巨大机械变化的衬里中空器官的上皮,例如代表复层扁平 and 柱状上皮间转换的组织。

[0125] 细胞的“生长状态”指细胞的增殖速率和/或细胞的分化状态。“改变的生长状态”指以异常增殖速率为特征的生长状态,例如展现出相对于正常细胞升高或降低的增殖速率的细胞。

[0126] 术语“LY6”或“LY6多肽”在本文中用于一般性指哺乳动物Ly6基因家族的任何哺乳动物同系物。术语“LY6”可用于描述蛋白质或核酸。

[0127] 术语“过表达”,如本文中所使用的,指组织中高于该组织正常表达水平的细胞基因表达水平。术语“表达不足”,如本文中所使用的,指组织中低于该组织正常表达水平的细胞基因表达水平。在任一情况中,在该项研究的受控条件下,或高或低的表达显著不同于正常表达。

[0128] “对照”包括为了在测定不是正在罹患IBM的哺乳动物中的基线或正常表达或活性中使用而获得的样品。因而,可通过多种手段来获得对样品,包括未患炎症和/或IBD、UC或CD(如通过标准技术所确定的)的组织或细胞;非IBD细胞或组织,例如不是正在罹患IBM的受试者的细胞;来自没有IBD、克罗恩氏病、或溃疡性结肠炎病症的受试者;来自不怀疑有风险发生IBD、CD或UC的受试者;或来自此类受试者的细胞或细胞系。对照还包括先前已确立的标准。对于测定法,诸如mRNA测定法,包括微阵列测定法,对照可以是通用对照。此通用对照指自如下RNA获得的特定LY6基因的RNA表达信息,所述RNA分离自健康组织的混合物或分离自自各种组织衍生的细胞系的混合物,诸如但不限于本文中所公开的通用参照RNA。因而,任何依照本发明进行的测试或测定法可以与已确立的标准进行比较,而且每次获取用于比较的对照样品可能不是必须的。

```

[0129] 表1
[0130] /*
[0131] *
[0132] *C-C increased from 12 to 15
[0133] *Z is average of EQ
[0134] *B is average of ND
[0135] *match with stop is_M;stop-stop=0;J(joker)match=0
[0136] */
[0137] #define _M -8 /*value of a match with a stop*/
[0138] int _day[26][26] = {
[0139] /* A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z*/
[0140] /*A*/ {2,0,-2,0,0,-4,1,-1,-1,0,-1,-2,-1,0,_M,1,0,-2,1,1,0,0,-6,0,-3,0} ,
[0141] /*B*/ {0,3,-4,3,2,-5,0,1,-2,0,0,-3,-2,2,_M,-1,1,0,0,0,0,-2,-5,0,-3,1} ,
[0142] /*C*/ {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2,0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4,0,-2,0,-2,-8,0,0,-5} ,
[0143] /*D*/ {0,3,-5,4,3,-6,1,1,-2,0,0,-4,-3,2,_M,-1,2,-1,0,0,0,-2,-7,0,-4,2} ,
[0144] /*E*/ {0,2,-5,3,4,-5,0,1,-2,0,0,-3,-2,1,_M,-1,2,-1,0,0,0,-2,-7,0,-4,3} ,
[0145] /*F*/ {-4,-5,-4,-6,-5,9,-5,-2,1,0,-5,2,0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3,0,-1,0,0,7,-5} ,
[0146] /*G*/ {1,0,-3,1,0,-5,5,-2,-3,0,-2,-4,-3,0,_M,-1,-1,-3,1,0,0,-1,-7,0,-5,0} ,
[0147] /*H*/ {-1,1,-3,1,1,-2,-2,6,-2,0,0,-2,-2,2,_M,0,3,2,-1,-1,0,-2,-3,0,0,2} ,
[0148] /*I*/ {-1,-2,-2,-2,-2,1,-3,-2,5,0,-2,2,2,-2,_M,-2,-2,-2,-1,0,0,4,-5,0,-1,-2} ,
[0149] /*J*/ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0} ,
[0150] /*K*/ {-1,0,-5,0,0,-5,-2,0,-2,0,5,-3,0,1,_M,-1,1,3,0,0,0,-2,-3,0,-4,0} ,
[0151] /*L*/ {-2,-3,-6,-4,-3,2,-4,-2,2,0,-3,6,4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1,0,2,-2,0,-1,-2} ,
[0152] /*M*/ {-1,-2,-5,-3,-2,0,-3,-2,2,0,0,4,6,-2,_M,-2,-1,0,-2,-1,0,2,-4,0,-2,-1} ,
[0153] /*N*/ {0,2,4,2,1,-4,0,2,-2,0,1,-3,-2,2,_M,-1,1,0,1,0,0,-2,-4,0,-2,1} ,
[0154] /*O*/ {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,
[0155] 0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M} ,
[0156] /*P*/ {1,-1,-3,-1,-1,-5,-1,0,-2,0,-1,-3,-2,-1,_M,6,0,0,1,0,0,-1,-6,0,-5,0} ,
[0157] /*Q*/ {0,1,-5,2,2,-5,-1,3,-2,0,1,-2,-1,1,_M,0,4,1,-1,-1,0,-2,-5,0,-4,3} ,
[0158] /*R*/ {-2,0,-4,-1,-1,-4,-3,2,-2,0,3,-3,0,0,_M,0,1,6,0,-1,0,-2,2,0,-4,0} ,
[0159] /*S*/ {1,0,0,0,0,-3,1,-1,-1,0,0,-3,-2,1,_M,1,-1,0,2,1,0,-1,-2,0,-3,0} ,
[0160] /*T*/ {1,0,-2,0,0,-3,0,-1,0,0,0,-1,-1,0,_M,0,-1,-1,1,3,0,0,-5,0,-3,0} ,
[0161] /*U*/ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0} ,
[0162] /*V*/ {0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2,4,0,-2,2,2,-2,_M,-1,-2,-2,-1,0,0,4,-6,0,-2,-2} ,
[0163] /*W*/ {-6,-5,-8,-7,-7,0,-7,-3,-5,0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5,2,-2,-5,0,-6,17,0,0,-6} ,
[0164] /*X*/ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0} ,
[0165] /*Y*/ {-3,-3,0,-4,-4,7,-5,0,-1,0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3,0,-2,0,0,10,-4} ,
[0166] /*Z*/ {0,1,-5,2,3,-5,0,2,-2,0,0,-2,-1,1,_M,0,3,0,0,0,0,-2,-6,0,-4,4}
[0167] } ;

```

```

[0168] Page 1 of day.h
[0169]                                     Table 1 (cont.1)
[0170] /*
[0171] */
[0172] #include<stdio.h>
[0173] #include<ctype.h>
[0174] #define MAXJMP 16 /*max jumps in a diag*/
[0175] #define MAXGAP 24 /*don't continue to penalize gaps larger than this*/
[0176] #define JMPS 1024 /*max jmps in an path*/
[0177] #define MX 4 /*save if there's at least MX-1 bases since last jmp*/
[0178] #define DMAT 3 /*value of matching bases*/
[0179] #define DMIS 0 /*penalty for mismatched bases*/
[0180] #define DINS0 8 /*penalty for a gap*/
[0181] #define DINS1 1 /*penalty per base*/
[0182] #define PINS0 8 /*penalty for a gap*/
[0183] #define PINS1 4 /*penalty per residue*/
[0184] struct jmp{
[0185]     short          n[MAXJMP]; /*size of jmp(neg for dely)*/
[0186]     unsigned short x[MAXJMP]; /*base no.of jmp in seq x*/
[0187] }; /*limits seq to 2^16-1*/
[0188] struct diag{
[0189]     int          score; /*score at last jmp*/
[0190]     long         offset; /*offset of prev block*/
[0191]     short        ijmp; /*current jmp index*/
[0192]     struct jmp    jp; /*list of jmps*/
[0193] };
[0194] struct path{
[0195]     int          spc; /*number of leading spaces*/
[0196]     short        n[JMPS]; /*size of jmp(gap)*/
[0197]     int          x[JMPS]; /*loc of jmp(last elem before gap)*/
[0198] };
[0199] char          *ofile; /*output file name*/
[0200] char          *namex[2]; /*seq names:getseqs()*/
[0201] char          *prog; /*prog name for err msgs*/
[0202] char          *seqx[2]; /*seqs:getseqs()*/
[0203] int           dmax; /*best diag:nw()*/
[0204] int           dmax0; /*final diag*/
[0205] int           dna; /*set if dna:main()*/
[0206] int           endgaps; /*set if penalizing end gaps*/

```

```

[0207] int      gapx,gapy;      /*total gaps in seqs*/
[0208] int      len0,len1;      /*seq lens*/
[0209] int      ngapx,ngapy;     /*total size of gaps*/
[0210] int      smax;            /*max score:nw()*/
[0211] int      *xbm;           /*bitmap for matching*/
[0212] long      offset;         /*current offset in jmp file*/
[0213] struct diag *dx;          /*holds diagonals*/
[0214] struct path pp[2];        /*holds path for seqs*/
[0215] char      *calloc(),*malloc(),*index(),*strcpy();
[0216] char      *getseq(),*g_calloc();
[0217] Page 1 of nw.h
[0218] Table 1(cont.2)
[0219] /*Needleman-Wunsch alignment program
[0220]  *
[0221]  *usage:progs file 1 file 2
[0222]  * where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
[0223]  * The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
[0224]  * Any lines beginning with';','>'or'<'are ignored
[0225]  * Max file length is 65535(limited by unsigned short x in the jmp struct)
[0226]  * A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
[0227]  * Output is in the file"align.out"
[0228]  *
[0229]  *The program may create a tmp file in/tmp to hold info about
  traceback.
[0230]  *Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
[0231]  */
[0232] #include"nw.h"
[0233] #include"day.h"
[0234] static _dbval[26] = {
[0235]     1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
[0236] };
[0237] static _pbval[26] = {
[0238]     1,2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')),4,8,16,32,64,
[0239]     128,256,0xFFFFFFFF,1<<10,1<<11,1<<12,1<<13,1<<14,
[0240]     1<<15,1<<16,1<<17,1<<18,1<<19,1<<20,1<<21,1<<22,
[0241]     1<<23,1<<24,1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
[0242] };
[0243] main(ac,av)                                main
[0244]     int ac;

```

```

[0245]         char*av[];
[0246]     {
[0247]         prog=av[0];
[0248]         if(ac !=3) {
[0249]             fprintf(stderr,"usage:%s file1 file2\n",prog);
[0250]             fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or
two protein sequences.\n");
[0251]             fprintf(stderr,"The sequences can be in upper-or
lower-case\n");
[0252]             fprintf(stderr,"Any lines beginning with';'or'<'are
ignored\n");
[0253]             fprintf(stderr,"Output is in the file\"align.out\"\\
n");
[0254]             exit(1);
[0255]         }
[0256]         namex[0]=av[1];
[0257]         namex[1]=av[2];
[0258]         seqx[0]=getseq(namex[0],&len0);
[0259]         seqx[1]=getseq(namex[1],&len1);
[0260]         xbm=(dna)?_dbval:_pbval;
[0261]         endgaps=0; /*l to penalize endgaps*/
[0262]         ofile="align.out"; /*output file*/
[0263]         nw(); /*fill in the matrix,get the possible jmps*/
[0264]         readjmps(); /*get the actual jmps*/
[0265]         print(); /*print stats,alignment*/
[0266]         cleanup(0);/*unlink any tmp files*/
[0267]     }

```

[0268] Page 1 of nw.c

[0269] Table 1(cont.3)

```

[0270] /*do the alignment,return best score:main()
[0271]  *dna:values in Fitch and Smith,PNAS,80,1382-1386,1983
[0272]  *pro:PAM 250 values
[0273]  *When scores are equal,we prefer mismatches to any gap,prefer
[0274]  *a new gap to extending an ongoing gap,and prefer a gap in seqx
[0275]  *to a gap in seq y.
[0276]  */

```

[0277] nw() nw

```

[0278] {
[0279]     char    *px,*py; /*seqs and ptrs*/

```



```

[0280]     int      *ndely,*dely;      /*keep track of dely*/
[0281]     int      ndelx,delx; /*keep track of delx*/
[0282]     int      *tmp;      /*for swapping row0,row1*/
[0283]     int      mis;      /*score for each type*/
[0284]     int      ins0,ins1; /*insertion penalties*/
[0285]     register   id;      /*diagonal index*/
[0286]     register   ij;      /*jmp index*/
[0287]     register   *col0,*col1; /*score for curr,last row*/
[0288]     register   xx,yy;    /*index into seqs*/
[0289]     dx=(struct diag*)g_calloc("to get diags",len0+len1+1,sizeof
(struct diag));
[0290]     ndely=(int*)g_calloc("to get ndely",len1+1,sizeof(int));
[0291]     dely=(int*)g_calloc("to get dely",len1+1,sizeof(int));
[0292]     col0=(int*)g_calloc("to get col0",len1+1,sizeof(int));
[0293]     col1=(int*)g_calloc("to get col1",len1+1,sizeof(int));
[0294]     ins0=(dna)?DINS0:PINS0;
[0295]     ins1=(dna)?DINS1:PINS1;
[0296]     smax=-10000;
[0297]     if(endgaps) {
[0298]         for(col0[0]=dely[0]=-ins0,yy=1;yy<=len1;yy++) {
[0299]             col0[yy]=dely[yy]=col0[yy-1]-ins1;
[0300]             ndely[yy]=yy;
[0301]         }
[0302]         col0[0]=0;      /*Waterman Bull Math Biol 84*/
[0303]     }
[0304]     else
[0305]         for(yy=1;yy<=len1;yy++)
[0306]             dely[yy]=-ins0;
[0307]     /*fill in match matrix
[0308]     */
[0309]     for(px=seqx[0],xx=1;xx<=len0;px++,xx++) {
[0310]         /*initialize first entry in col
[0311]         */
[0312]         if(endgaps) {
[0313]             if(xx==1)
[0314]                 col1[0]=delx=-(ins0+ins1);
[0315]             else
[0316]                 col1[0]=delx=col0[0]-ins1;
[0317]             ndelx=xx;

```

```

[0318]         }
[0319]         else {
[0320]             col1[0]=0;
[0321]             delx=-ins0;
[0322]             ndelx=0;
[0323]         }
[0324] page 2 of nw.c
[0325] Table 1 (cont.4)
[0326] ...nw
[0327] for (py=seqx[1],yy=1;yy<=len1;py++,yy++) {
[0328]     mis=col0[yy-1];
[0329]     if (dna)
[0330]         mis+=(xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])?DMAT:DMIS;
[0331]     else
[0332]         mis+=_day[*px-'A'][*py-'A'];
[0333]     /*update penalty for del in x seq;
[0334]     *favor new del over ongong del
[0335]     *ignore MAXGAP if weighting endgaps
[0336]     */
[0337]     if (endgaps || ndely[yy]<MAXGAP) {
[0338]         if (col0[yy]-ins0>=dely[yy]) {
[0339]             dely[yy]=col0[yy]-(ins0+ins1);
[0340]             ndely[yy]=1;
[0341]         } else {
[0342]             dely[yy]-=ins1;
[0343]             ndely[yy]++;
[0344]         }
[0345]     } else {
[0346]         if (col0[yy]-(ins0+ins1)>=dely[yy]) {
[0347]             dely[yy]=col0[yy]-(ins0+ins1);
[0348]             ndely[yy]=1;
[0349]         } else
[0350]             ndely[yy]++;
[0351]     }
[0352]     /*update penalty for del in y seq;
[0353]     *favor new del over ongong del
[0354]     */
[0355]     if (endgaps || ndelx<MAXGAP) {
[0356]         if (col1[yy-1]-ins0>=delx) {

```

```

[0357]         delx=coll[yy-1]-(ins0+insl);
[0358]         ndelx=1;
[0359]     } else {
[0360]         delx-=insl;
[0361]         ndelx++;
[0362]     }
[0363] } else {
[0364]     if (coll[yy-1]-(ins0+insl) >= delx) {
[0365]         delx=coll[yy-1]-(ins0+insl);
[0366]         ndelx=1;
[0367]     } else
[0368]         ndelx++;
[0369] }
[0370] /*pick the maximum score;we're favoring
[0371]    *mis over any del and delx over dely
[0372]    */
[0373] Page 3 of nw.c
[0374] Table 1 (cont.5)
[0375]         id=xx-yy+lenl-1;
[0376]         if (mis>=delx && mis>=dely[yy])
[0377]             coll[yy]=mis;
[0378]         else if (delx>=dely[yy]) {
[0379]             coll[yy]=delx;
[0380]             ij=dx[id].ijmp;
[0381]             if (dx[id].jp.n[0]&&(!dna || (ndelx>=MAXJMP
[0382] &&xx>dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis>dx[id].score+DINS0)) {
[0383]                 dx[id].ijmp++;
[0384]                 if (++ij>=MAXJMP) {
[0385]                     writejumps(id);
[0386]                     ij=dx[id].ijmp=0;
[0387]                     dx[id].offset=offset;
[0388]                     offset+=sizeof(struct jmp)+sizeof(offset);
[0389]                 }
[0390]             }
[0391]             dx[id].jp.n[ij]=ndelx;
[0392]             dx[id].jp.x[ij]=xx;
[0393]             dx[id].score=delx;
[0394]         }
[0395]     else {

```

···nw

```

[0396]         coll[yy]=dely[yy];
[0397]         ij=dx[id].ijmp;
[0398]     if(dx[id].jp.n[0]&&(!dna|| (ndely[yy]>=MAXJMP
[0399]         &&xx>dx[id].jp.x[ij]+MX)||mis>dx[id].score+DINS0)) {
[0400]         dx[id].ijmp++;
[0401]         if(++ij>=MAXJMP) {
[0402]             writejumps(id);
[0403]             ij=dx[id].ijmp=0;
[0404]             dx[id].offset=offset;
[0405]             offset+=sizeof(struct jmp)+sizeof(offset);
[0406]         }
[0407]     }
[0408]     dx[id].jp.n[ij]=-ndely[yy];
[0409]     dx[id].jp.x[ij]=xx;
[0410]     dx[id].score=dely[yy];
[0411] }
[0412] if(xx==len0&&yy<len1) {
[0413]     /*last col
[0414]     */
[0415]     if(endgaps)
[0416]         coll[yy]-=ins0+insl*(len1-yy);
[0417]     if(coll[yy]>smax) {
[0418]         smax=coll[yy];
[0419]         dmax=id;
[0420]     }
[0421] }
[0422] }
[0423] if(endgaps&&xx<len0)
[0424]     coll[yy-1]-=ins0+insl*(len0-xx);
[0425] if(coll[yy-1]>smax) {
[0426]     smax=coll[yy-1];
[0427]     dmax=id;
[0428] }
[0429] tmp=col0;col0=coll;coll=tmp;
[0430] }
[0431] (void) free((char*)ndely);
[0432] (void) free((char*)dely);
[0433] (void) free((char*)col0);
[0434] (void) free((char*)coll);

```

Page 4 of nw.c

Table 1 (cont.6)

```

[0435] }
[0436]
[0437] /*
[0438] *
[0439] *print()--only routine visible outside this module
[0440] *
[0441] *static:
[0442] *getmat()--trace back best path,count matches:print()
[0443] *pr_align()--print alignment of described in array p[]:print()
[0444] *dumpblock()--dump a block of lines with numbers,stars:pr_align()
[0445] *nums()--put out a number line:dumpblock()
[0446] *putline()--put out a line(name,[num],seq,[num]):dumpblock()
[0447] *stars()--put a line of stars:dumpblock()
[0448] *stripname()--strip any path and prefix from a seqname
[0449] */
[0450] #include"nw.h"
[0451] #define SPC 3
[0452] #define P_LINE 256 /*maximum output line*/
[0453] #define P_SPC 3 /*space between name or num and seq*/
[0454] extern_day[26][26];
[0455] int olen; /*set output line length*/
[0456] FILE *fx; /*output file*/
[0457] print() print
[0458] {
[0459]     int lx,ly,firstgap,lastgap; /*overlap*/
[0460]     if((fx=fopen(ofile,"w"))==0){
[0461]         fprintf(stderr,"%s:can't write%s\n",prog,ofile);
[0462]         cleanup(1);
[0463]     }
[0464]     fprintf(fx,"<first sequence:%s(length=%d)\n",namex[0],len0);
[0465]     fprintf(fx,"<second sequence:%s(length=%d)\n",namex[1],len1);
[0466]     olen=60;
[0467]     lx=len0;
[0468]     ly=len1;
[0469]     firstgap=lastgap=0;
[0470]     if(dmax<len1-1){ /*leading gap in x*/
[0471]         pp[0].spc=firstgap=len1-dmax-1;
[0472]         ly-=pp[0].spc;
[0473]     }

```

```

[0474]     else if (dmax > len1-1) { /*leading gap in y*/
[0475]         pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1-1);
[0476]         lx -= pp[1].spc;
[0477]     }
[0478]     if (dmax0 < len0-1) { /*trailing gap in x*/
[0479]         lastgap = len0 - dmax0 - 1;
[0480]         lx -= lastgap;
[0481]     }
[0482]     else if (dmax0 > len0-1) { /*trailing gap in y*/
[0483]         lastgap = dmax0 - (len0-1);
[0484]         ly -= lastgap;
[0485]     }
[0486]     getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
[0487]     pr_align();
[0488] }
[0489] Page 1 of nwprint.c
[0490] Table 1 (cont.7)
[0491] /*
[0492]  *trace back the best path, count matches
[0493]  */
[0494] static
[0495] getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
[0496]     int lx, ly;                                /*"core" (minus endgaps)*/
[0497]     int firstgap, lastgap;                        /*leading trailing overlap*/
[0498] {
[0499]     int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
[0500]     char      outx[32];
[0501]     double      pct;
[0502]     register      n0, n1;
[0503]     register char  *p0, *p1;
[0504]     /*get total matches, score
[0505]     */
[0506]     i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
[0507]     p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
[0508]     p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
[0509]     n0 = pp[1].spc + 1;
[0510]     n1 = pp[0].spc + 1;
[0511]     nm = 0;
[0512]     while (*p0 && *p1) {

```

```

[0513]         if (siz0) {
[0514]             pl++;
[0515]             nl++;
[0516]             siz0--;
[0517]         }
[0518]         else if (siz1) {
[0519]             p0++;
[0520]             n0++;
[0521]             siz1--;
[0522]         }
[0523]         else {
[0524]             if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A'])
[0525]                 nm++;
[0526]             if (n0++ == pp[0].x[i0])
[0527]                 siz0 = pp[0].n[i0++];
[0528]             if (n1++ == pp[1].x[i1])
[0529]                 siz1 = pp[1].n[i1++];
[0530]             p0++;
[0531]             p1++;
[0532]         }
[0533]     }
[0534]     /*pct homology:
[0535]      *if penalizing endgaps, base is the shorter seq
[0536]      *else, knock off overhangs and take shorter core
[0537]      */
[0538]     if (endgaps)
[0539]         lx = (len0 < len1) ? len0 : len1;
[0540]     else
[0541]         lx = (lx < ly) ? lx : ly;
[0542]     pct = 100. * (double) nm / (double) lx;
[0543]     fprintf (fx, "\n");
[0544]     fprintf (fx, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent
similarity\n",
[0545]             nm, (nm == 1) ? "" : "es", lx, pct);
[0546]     Page 2 of nwprint.c
[0547]                                     Table 1 (cont.8)
[0548]     fprintf (fx, "< gaps in first sequence: %d", gapx);           ...getmat
[0549]     if (gapx) {
[0550]         (void) sprintf (outx, " (%d%s%s)",

```

```

[0551]         ngapx, (dna)?"base":"residue", (ngapx==1)?"":"s");
[0552]         fprintf(fx,"%s",outx);
[0553]         fprintf(fx,"gaps in second sequence:%d",gapy);
[0554]         if (gapy) {
[0555]             (void)sprintf(outx,"(%d%s%s)",
[0556]                 ngapy, (dna)?"base":"residue", (ngapy==1)?"":"s");
[0557]             fprintf(fx,"%s",outx);
[0558]         }
[0559]         if (dna)
[0560]             fprintf(fx,
[0561]                 "\n<score:%d (match=%d,mismatch=%d,gap penalty=%d+%d
per base)\n",
[0562]                 smax,DMAT,DMIS,DINS0,DINS1);
[0563]         else
[0564]             fprintf(fx,
[0565]                 "\n<score:%d (Dayhoff PAM 250 matrix,gap penalty=%d+%d
per residue)\n",
[0566]                 smax,PINS0,PINS1);
[0567]         if (endgaps)
[0568]             fprintf(fx,
[0569]                 "<endgaps penalized.left endgap:%d%s%s,right endgap:%d%
s%s\n",
[0570]                 firstgap, (dna)?"base":"residue", (firstgap==1)?"":"s",
[0571]                 lastgap, (dna)?"base":"residue", (lastgap==1)?"":"s");
[0572]         else
[0573]             fprintf(fx,"<endgaps not penalized\n");
[0574]     }
[0575]     static      nm;          /*matches in core--for checking */
[0576]     static      lmax;        /*lengths of stripped file names*/
[0577]     static      ij[2];       /*jmp index for a path*/
[0578]     static      nc[2];       /*number at start of current line*/
[0579]     static      ni[2];       /*current elem number--for gapping*/
[0580]     static      siz[2];
[0581]     static char *ps[2];      /*ptr to current element*/
[0582]     static char *po[2];      /*ptr to next output char slot*/
[0583]     static char out[2][P_LINE]; /*output line*/
[0584]     static char star[P_LINE]; /*set by stars()*/
[0585]     /*
[0586]     *print alignment of described in struct path pp[]

```



```

[0587]    */
[0588]    static
[0589]    pr_align()                                pr_align
[0590]    {
[0591]        int    nn; /*char count*/
[0592]        int    more;
[0593]        register    i;
[0594]        for (i=0,lmax=0;i<2;i++) {
[0595]            nn=stripname (namex[i]);
[0596]            if (nn>lmax)
[0597]                lmax=nn;
[0598]            nc[i]=1;
[0599]            ni[i]=1;
[0600]            siz[i]=ij[i]=0;
[0601]            ps[i]=seqx[i];
[0602]            po[i]=out[i];
[0603]        }

```

Page 3 of nwprint.c

```

[0604]                                Table 1 (cont.9)
[0605]        for (nn=nm=0,more=1;more;) {                ...pr_align
[0606]            for (i=more=0;i<2;i++) {
[0607]                /*
[0608]                 *do we have more of this sequence?
[0609]                 */
[0610]                if (!*ps[i])
[0611]                    continue;
[0612]                more++;
[0613]                if (pp[i].spc) { /*leading space*/
[0614]                    *po[i]++=' ';
[0615]                    pp[i].spc--;
[0616]                }
[0617]                elseif (siz[i]) { /*in a gap*/
[0618]                    *po[i]++='-';
[0619]                    siz[i]--;
[0620]                }
[0621]                else { /*we're putting a seq element
[0622]                    */
[0623]                    *po[i]=*ps[i];
[0624]                    if (islower(*ps[i]))
[0625]                        *ps[i]=toupper(*ps[i]);

```

```

[0626]                po[i]++;
[0627]                ps[i]++;
[0628]                /*
[0629]                *are we at next gap for this seq?
[0630]                */
[0631]                if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
[0632]                    /*
[0633]                    *we need to merge all gaps
[0634]                    *at this location
[0635]                    */
[0636]                    siz[i] = pp[i].n[ij[i]]++;
[0637]                    while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
[0638]                        siz[i] += pp[i].n[ij[i]]++;
[0639]                }
[0640]                ni[i]++;
[0641]            }
[0642]        }
[0643]        if (++nn == olen || !more && nn) {
[0644]            dumpblock();
[0645]            for (i = 0; i < 2; i++)
[0646]                po[i] = out[i];
[0647]            nn = 0;
[0648]        }
[0649]    }
[0650] }
[0651] /*
[0652]  *dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
[0653]  */
[0654] static
[0655] dumpblock()                                dumpblock
[0656] {
[0657]     register    i;
[0658]     for (i = 0; i < 2; i++)
[0659]         *po[i] -- = '\0';
[0660] Page 4 of nwprint.c
[0661]                Table 1 (cont.10)
[0662]                ...dumpblock
[0663]                (void) putc ('\n', fx);
[0664]                for (i = 0; i < 2; i++) {

```

```

[0665]         if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
[0666]             if (i == 0)
[0667]                 nums(i);
[0668]             if (i == 0 && *out[1])
[0669]                 stars();
[0670]             putline(i);
[0671]             if (i == 0 && *out[1])
[0672]                 fprintf(fx, star);
[0673]             if (i == 1)
[0674]                 nums(i);
[0675]         }
[0676]     }
[0677] }
[0678] /*
[0679]  *put out a number line:dumpblock()
[0680]  */
[0681] static
[0682] nums(ix)                                     nums
[0683]     int ix; /*index in out[] holding seq line*/
[0684] {
[0685]     char      nline[P_LINE];
[0686]     register   i, j;
[0687]     register char *pn, *px, *py;
[0688]     for (pn = nline, i = 0; i < lmax + P_SPC; i++, pn++)
[0689]         *pn = ' ';
[0690]     for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
[0691]         if (*py == ' ' || *py == '- ')
[0692]             *pn = ' ';
[0693]         else {
[0694]             if (i % 10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
[0695]                 j = (i < 0) ? -i : i;
[0696]                 for (px = pn; j; j /= 10, px--)
[0697]                     *px = j % 10 + '0';
[0698]                 if (i < 0)
[0699]                     *px = '-';
[0700]             }
[0701]             else
[0702]                 *pn = ' ';
[0703]             i++;

```

```

[0704]         }
[0705]     }
[0706]     *pn = '\0';
[0707]     nc[ix] = i;
[0708]     for (pn = nline; *pn; pn++)
[0709]         (void)putc(*pn, fx);
[0710]     (void)putc('\n', fx);
[0711] }
[0712] /*
[0713]  *put out a line (name, [num], seq, [num]):dumpblock()
[0714]  */
[0715] static
[0716] putline (ix)                                     putline
[0717]     int                                     ix;
[0718] {
[0719]                                     Table 1 (cont.11)
[0720]     int i;                                     ...putline
[0721]     register char *px;
[0722]     for (px = namex[ix], i = 0; *px &&*px != ':'; px++, i++)
[0723]         (void)putc(*px, fx);
[0724]     for (; i < lmax + P_SPC; i++)
[0725]         (void)putc(' ', fx);
[0726]     /*these count from 1:
[0727]      *ni[] is current element (from 1)
[0728]      *nc[] is number at start of current line
[0729]      */
[0730]     for (px = out[ix]; *px; px++)
[0731]         (void)putc(*px & 0x7F, fx);
[0732]     (void)putc('\n', fx);
[0733] }
[0734] /*
[0735]  *put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]):dumpblock()
[0736]  */
[0737] static
[0738] stars()                                           stars
[0739] {
[0740]     int i;
[0741]     register char *p0, *p1, cx, *px;
[0742]     if (!*out[0] || (*out[0] == '' && *out[1] == '')) ||

```

Page 5 of nwprint.c

```

[0743]         !*out[1] || (*out[1] == '' && * (po[1]) == '')
[0744]         return;
[0745]     px=star;
[0746]     for (i=lmax+P_SPC;i;i--)
[0747]         *px++='';
[0748]     for (p0=out[0],p1=out[1];*p0 &&*p1;p0++,p1++) {
[0749]         if (isalpha(*p0) &&isalpha(*p1)) {
[0750]             if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A']) {
[0751]                 cx='*';
[0752]                 nm++;
[0753]             }
[0754]             else if (!dna &&_day[*p0-'A'] [*p1-'A'] > 0)
[0755]                 cx='.';
[0756]             else
[0757]                 cx='';
[0758]         }
[0759]         else
[0760]             cx='';
[0761]         *px++=cx;
[0762]     }
[0763]     *px++='\n';
[0764]     *px='\0';
[0765] }

```

[0766] Page 6 of nwprint.c

Table 1 (cont.12)

```

[0768] /*
[0769]  *strip path or prefix from pn,return len:pr_align()
[0770]  */
[0771] static
[0772] stripname(pn)                                stripname
[0773]     char*pn; /*file name (may be path)*/
[0774] {
[0775]     register char    *px,*py;
[0776]     py=0;
[0777]     for (px=pn;*px;px++)
[0778]         if (*px=='/')
[0779]             py=px+1;
[0780]     if (py)
[0781]         (void) strcpy (pn,py);

```

```

[0782]     return(strlen(pn));
[0783] }
[0784] Page 7 of nwprint.c
[0785] Table 1 (cont.13)
[0786] /*
[0787]  *cleannp()--cleanup any tmp file
[0788]  *getseq()--read in seq,set dna,len,maxlen
[0789]  *g_calloc()--calloc()with error checkin
[0790]  *readjumps()--get the good jumps,from tmp file if necessary
[0791]  *writejumps()--write a filled array of jumps to a tmp file:nw()
[0792]  */
[0793] #include"nw.h"
[0794] #include<sys/file.h>
[0795] char*jname="/tmp/homgXXXXXX";    /*tmp file forjumps*/
[0796] FILE  *fj;
[0797] int  cleanup();                  /*cleanup tmp file*/
[0798] long lseek();
[0799] /*
[0800]  *remove any tmp file if we blow
[0801]  */
[0802] cleanup(i)                      cleanup
[0803]     int i;
[0804] {
[0805]     if(fj)
[0806]         (void)unlink(jname);
[0807]     exit(i);
[0808] }
[0809] /*
[0810]  *read,return ptr to seq,set dna,len,maxlen
[0811]  *skip lines starting with ';','<','>'
[0812]  *seq in upper or lower case
[0813]  */
[0814] char *
[0815] getseq(file,len)                getseq
[0816]     char*file;/*file name*/
[0817]     int *len;/*seq len*/
[0818] {
[0819]     char    line[1024],*pseq;
[0820]     register char    *px,*py;

```

```

[0821]     int      natgc,tlen;
[0822]     FILE      *fp;
[0823]     if ((fp=fopen(file,"r"))==0) {
[0824]         fprintf(stderr,"%s:can't read%s\n",prog,file);
[0825]         exit(1);
[0826]     }
[0827]     tlen=natgc=0;
[0828]     while (fgets(line,1024,fp)) {
[0829]         if (*line==';' || *line=='<' || *line=='>')
[0830]             continue;
[0831]         for (px=line;*px!='\n';px++)
[0832]             if (isupper(*px) || islower(*px))
[0833]                 tlen++;
[0834]     }
[0835]     if ((pseq=malloc((unsigned) (tlen+6)))==0) {
[0836]         fprintf(stderr,"%s:malloc() failed to get%d bytes for%s\n",
prog,tlen+6,file);
[0837]         exit(1);
[0838]     }
[0839]     pseq[0]=pseq[1]=pseq[2]=pseq[3]='\0';
[0840]     Page 1 of nwsubr.c
[0841]
[0842]
[0843]     py=pseq+4;
[0844]     *len=tlen;
[0845]     rewind(fp);
[0846]     while (fgets(line,1024,fp)) {
[0847]         if (*line==';' || *line=='<' || *line=='>')
[0848]             continue;
[0849]         for (px=line;*px!='\n';px++) {
[0850]             if (isupper(*px))
[0851]                 *py++=*px;
[0852]             else if (islower(*px))
[0853]                 *py++=toupper(*px);
[0854]             if (index("ATGCU",*(py-1)))
[0855]                 natgc++;
[0856]         }
[0857]     }
[0858]     *py++='\0';

```

Table 1 (cont.14)

...getseq

```

[0859]     *py = '\0';
[0860]     (void) fclose (fp);
[0861]     dna = natgc > (tlen/3);
[0862]     return (pseq+4);
[0863] }
[0864] char *
[0865] g_calloc (msg,nx,sz)                                g_calloc
[0866]     char*msg;    /*program,calling routine*/
[0867]     int nx,sz;    /*number and size of elements*/
[0868] {
[0869]     char      *px,*calloc();
[0870]     if ((px=calloc((unsigned) nx, (unsigned) sz)) == 0) {
[0871]         if (*msg) {
[0872]             fprintf(stderr,"%s:g_calloc() failed%s (n=%d,sz=%d) \
n",prog,msg,nx,sz);
[0873]             exit(1);
[0874]         }
[0875]     }
[0876]     return (px);
[0877] }
[0878] /*
[0879]  *get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax:main()
[0880]  */
[0881] readjumps()                                readjumps
[0882] {
[0883]     int      fd=-1;
[0884]     int      siz,i0,i1;
[0885]     register  i,j,xx;
[0886]     if (fj) {
[0887]         (void) fclose (fj);
[0888]         if ((fd=open (jname,0_RDONLY,0)) < 0) {
[0889]             fprintf(stderr,"%s:can't open() %s\n",prog,jname);
[0890]             cleanup(1);
[0891]         }
[0892]     }
[0893]     for (i=i0=i1=0,dmax0=dmax,xx=len0;; i++) {
[0894]         while (1) {
[0895]             for (j=dx[dmax].ijmp; j>=0&&dx[dmax].jp.x[j]>=xx; j--)
[0896]                 ;

```


[0897] Page 2 of nwsubr.c

[0898] Table 1 (cont.15)

[0899] ...readjumps

[0900] if(j<0 && dx[dmax].offset && fj) {

[0901] (void) lseek(fd,dx[dmax].offset,0);

[0902] (void) read(fd,(char*)&dx[dmax].jp,sizeof(struct
jmp));[0903] (void) read(fd,(char*)&dx[dmax].offset,sizeof(dx
[dmax].offset));

[0904] dx[dmax].ijmp=MAXJMP-1;

[0905] }

[0906] else

[0907] break;

[0908] }

[0909] if(i>=JMPS) {

[0910] fprintf(stderr,"%s:too many gaps in alignment\n",prog);

[0911] cleanup(1);

[0912] }

[0913] if(j>=0) {

[0914] siz=dx[dmax].jp.n[j];

[0915] xx=dx[dmax].jp.x[j];

[0916] dmax+=siz;

[0917] if(siz<0) { /*gapin second seq*/

[0918] pp[1].n[i1]=-siz;

[0919] xx+=siz;

[0920] /*id=xx-yy+len1-1

[0921] */

[0922] pp[1].x[i1]=xx-dmax+len1-1;

[0923] gapy++;

[0924] ngapy-=siz;

[0925] /*ignore MAXGAP when doing endgaps*/

[0926] siz=(-siz<MAXGAP||endgaps)?-siz:MAXGAP;

[0927] i1++;

[0928] }

[0929] else if(siz>0) { /*gap in first seq*/

[0930] pp[0].n[i0]=siz;

[0931] pp[0].x[i0]=xx;

[0932] gapx++;

[0933] ngapx+=siz;

```

[0934] /*ignore MAXGAP when doing endgaps*/
[0935]         siz=(siz<MAXGAP||endgaps)?siz:MAXGAP;
[0936]         i0++;
[0937]     }
[0938] }
[0939]     else
[0940]         break;
[0941] }
[0942] /*reverse the order of jmps
[0943] */
[0944] for(j=0,i0--;j<i0;j++,i0--) {
[0945]     i=pp[0].n[j];pp[0].n[j]=pp[0].n[i0];pp[0].n[i0]=i;
[0946]     i=pp[0].x[j];pp[0].x[j]=pp[0].x[i0];pp[0].x[i0]=i;
[0947] }
[0948] for(j=0,i1--;j<i1;j++,i1--) {
[0949]     i=pp[1].n[j];pp[1].n[j]=pp[1].n[i1];pp[1].n[i1]=i;
[0950]     i=pp[1].x[j];pp[1].x[j]=pp[1].x[i1];pp[1].x[i1]=i;
[0951] }
[0952] if(fd>=0)
[0953]     (void)close(fd);
[0954] if(fj){
[0955]     (void)unlink(jname);
[0956]     fj=0;
[0957]     offset=0;
[0958] }

```

Page 3 of nwsubr.c

Table 1 (cont.16)

```

[0960] /*
[0961] *write a filled jmp struct offset of the prev one(if any):nw()
[0962] */
[0963] writejumps(ix)                                writejumps
[0964]     int ix;
[0965] {
[0966]     char*mktemp();
[0967]     if(!fj){
[0968]         if(mktemp(jname)<0){
[0969]             fprintf(stderr,"%s:can't mktemp() %s\n",prog,jname);
[0970]             cleanup(1);
[0971]         }
[0972]         if((fj=fopen(jname,"w"))==0){

```

```

[0973]             fprintf(stderr,"%s:can't write %s\n",prog,jname);
[0974]             exit(1);
[0975]         }
[0976]     }
[0977]     (void) fwrite((char*)&dx[ix].jp,sizeof(struct jmp),1,fj);
[0978]     (void) fwrite((char*)&dx[ix].offset,sizeof(dx[ix].offset),1,fj);
[0979] }

```

[0980] Page 4 of nwsubr.c

[0981] 表2

[0982] 参照 XXXXXXXXXXXXXXXX (长度=15个氨基酸)
 [0983] 比较蛋白质 XXXXXYYYYYYY (长度=12个氨基酸)
 [0984] %氨基酸序列同一性=(ALIGN-2测定为两种多肽序列之间相同匹配的氨基酸残基数)÷(参照多肽的氨基酸残基总数)=5÷15=33.3%

[0985] 表3

[0986] 参照 XXXXXXXXXX (长度=10个氨基酸)
 [0987] 比较蛋白质 XXXXXYYYYYYZZYZ (长度=15个氨基酸)
 [0988] %氨基酸序列同一性=
 [0989] (ALIGN-2测定为两种多肽序列之间相同匹配的氨基酸残基数)÷(参照多肽的氨基酸残基总数)=5÷10=50%

[0990] 表4

[0991] 参照DNA NNNNNNNNNNNN (长度=14个核苷酸)
 [0992] 比较DNA NNNNNLLLLLLLLL (长度=16个核苷酸)
 [0993] %核酸序列同一性=(ALIGN-2测定为两种核酸序列之间相同匹配的核苷酸数)÷(参照DNA核酸序列的核苷酸总数)=6÷14=42.9%

[0994] 表5

[0995] 参照-DNA NNNNNNNNNNN (长度=12个核苷酸)
 [0996] 比较DNA NNNLLL VV (长度=9个核苷酸)
 [0997] %核酸序列同一性=(ALIGN-2测定为两种核酸序列之间相同匹配的核苷酸数)÷(参照DNA核酸序列的核苷酸总数)=4÷12=33.3%

[0998] 本发明的诊断方法

[0999] 本发明进一步涵盖治疗剂用于IBD的用途,该治疗剂可特异性靶向其中患病组织和/或细胞展现出相对于对照升高的LY6表达的病症。因而,本发明涵盖升高的LY6表达的检测,其可用于检测哺乳动物的胃肠组织中的IBD(诸如CD或UC),和/或鉴定会特别受益于在改善人类患者的IBD、UC和/或CD中有用的IBD治疗剂(包括化疗剂)处理的组织和病症。

[1000] 在优选的实施方案中,通过直接检测基因转录物或通过检测蛋白质水平或活性来检测LY6表达水平。可使用极其多种技术之任一来检测转录物,这些技术主要依赖于针对LY6 mRNA转录物的、针对自其合成的cDNA的、或针对存在LY6基因扩增处的DNA的探针或杂交。公知的技术包括转录物水平的Northern印迹、逆转录酶PCR和微阵列分析。用于检测LY6蛋白质水平的方法包括Western印迹、免疫沉淀、二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D SDS-PAGE,

优选针对已经测定了LY6蛋白质的位置的标准品进行比较)、和质谱。质谱可偶联一系列纯化步骤,以容许高通量地鉴定特定样品中的许多不同蛋白质水平。质谱和2D SDS-PAGE还可用于鉴定对蛋白质的转录后修饰,包括蛋白水解事件、遍在蛋白化、磷酸化、脂质修饰等。也可通过分析对底物DNA的结合或靶启动子的体外转录激活来评估LY6活性。凝胶位移测定法、DNA足迹测定法和DNA-蛋白质交联测定法都是可用于评估能够结合DNA上Gli结合位点的蛋白质的存在的方法(J Mol.Med 77(6):459-68(1999);Cell 100(4):423-34(2000);Development 127(19):4923-4301(2000))。

[1001] 在某些实施方案中,测量了LY6转录物水平,而且用IBD治疗性化合物处理显示出相对于对照显著升高的LY6水平的患有疾病或病症的组织。因而,LY6表达水平是用于确定患者是否正在罹患IBM和患者是否应当接受IBD治疗剂的有力诊断措施。

[1002] 供本发明方法中使用的抗体组合物

[1003] A. 抗LY6抗体

[1004] 在一个实施方案中,本发明提供了抗LY6抗体的用途,在本文中发现其可用作治疗、诊断和/或预后剂来确定炎性肠病诸如UC的存在、严重性和/或预测疾病进展。可用于此目的的示例性的抗体包括多克隆、单克隆、人源化、双特异性、和异源偶联抗体。术语“抗体”有时还包括抗原结合片段。抗LY6抗体是商品化的,诸如例如R & D Systems,Minneapolis,MN。与作为抗原的LY6特异性结合的抗体可通过商业途径来获得,或通过抗体和蛋白质化学领域已知的、用于在本发明的方法中使用的标准方法来制备。LYPD1的抗体披露于例如US 7,144,990,在此通过述及完整收录该专利的公开内容。

[1005] 1. 多克隆抗体

[1006] 多克隆抗体优选通过在动物中多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂来生成。将相关抗原(尤其在使用合成肽时)与在待免疫的物种中有免疫原性的蛋白质偶联可能是有用的。例如,可使用双功能或衍生化试剂,例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(经半胱氨酸残基偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺(经赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 、或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$,其中R和 R^1 是不同的烃基,将抗原与匙孔藤血蓝蛋白(KLH)、血清清蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂缀合。

[1007] 通过将例如100 μg 或5 μg (分别用于兔或小鼠的)蛋白质或偶联物与3倍体积的弗氏完全佐剂混和,并将溶液皮内注射于多个部位,由此使动物对抗原、免疫原性偶联物或衍生物免疫。一个月后,通过多个部位的皮下注射,用初始量的1/5-1/10的溶于弗氏完全佐剂中的肽或偶联物对动物进行强化免疫。7-14天后,采集动物的血液,并测定血清的抗体滴度。对动物进行强化免疫直到滴度达到稳定。偶联物还可在重组细胞培养物中作为蛋白质融合物来制备。同样,适当使用凝聚剂(诸如明矾)来增强免疫应答。

[1008] 2. 单克隆抗体

[1009] 单克隆抗体可以通过最初由Kohler等,Nature 256:495(1975)描述的杂交瘤方法来制备,或者可通过重组DNA方法来制备(美国专利No.4,816,567)。

[1010] 在杂交瘤方法中,如上所述免疫小鼠或其它合适的宿主动物(如仓鼠)以引发生成了或能够生成如下抗体的淋巴细胞,所述抗体能特异性结合用于免疫的蛋白质。或者,可以在体外免疫淋巴细胞。免疫后,分离淋巴细胞,然后使用合适的融合剂(诸如聚乙二醇)将淋巴细胞与骨髓瘤细胞系融合,形成杂交瘤细胞(Goding,Monoclonal Antibodies:

Principles and Practice, pp.59-103, Academic Press, 1986)。

[1011] 将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养,所述培养基优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞(也称作融合配偶)生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则用于杂交瘤的选择性培养基通常将含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷(HAT培养基),这些物质阻止HGPRT缺陷细胞生长。

[1012] 优选的融合配偶骨髓瘤细胞是那些高效融合的、支持所选择的抗体生成细胞稳定的、高水平的生成抗体的、并对针对未融合亲本细胞进行选择的选择性培养基敏感的骨髓瘤细胞。优选的骨髓瘤细胞系是鼠源骨髓瘤系,诸如可从Salk Institute Cell Distribution Center (San Diego, California, 美国)获得的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤所衍生的那些,以及可从American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, 美国)获得的SP-2及衍生细胞,例如X63-Ag8-653细胞。用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已有描述(Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。

[1013] 测定杂交瘤细胞所生长的培养基中针对抗原的单克隆抗体的生成。优选的是,通过免疫沉淀或通过体外结合测试,诸如放射性免疫测试(RIA)或酶联免疫吸附测试(ELISA),测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。

[1014] 例如,单克隆抗体的结合亲和力可通过Munson等, Anal. Biochem. 107:220 (1980)所述的Scatchard分析来测定。

[1015] 一旦鉴定得到生成具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞,则可通过有限稀释流程进行亚克隆,并使用标准方法培养该克隆(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103, Academic Press, 1986)。适于这一目的的培养基包括如D-MEM或RPMI-1640培养基。另外,杂交瘤细胞可在动物中作为腹水瘤进行体内培养,例如通过将细胞i.p.注射到小鼠中。

[1016] 可通过常规抗体纯化流程,例如亲和层析(例如使用蛋白A或蛋白G-Sepharose)或离子交换层析、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析等,将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水或血清适当分开。

[1017] 编码单克隆抗体的DNA易于通过常规流程分离并测序(例如使用能够特异性结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞可用作为此类DNA的优选来源。一旦分离,可将DNA置于表达载体中,然后将该表达载体转染到不另外产生抗体蛋白质的宿主细胞中,诸如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞,用以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。关于编码抗体的DNA在细菌中的重组表达的综述性论文包括Skerra等, Curr. Opin. in Immunol. 5:256-262 (1993) 和Plückthun, Immunol. Revs. 130:151-188 (1992)。

[1018] 在另一个实施方案中,可从使用McCafferty等, Nature 348:552-554 (1990)所述的技术构建的抗体噬菌体文库中分离单克隆抗体或抗体片段。Clackson等, Nature 352:624-628 (1991) 和Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) 分别描述了使用噬菌体文库分离鼠和人抗体。后续出版物描述了通过链改组(Marks等, Bio/Technology 10:779-783

(1992))、以及组合感染和体内重组来构建非常大的噬菌体文库的策略(Waterhouse等, Nuc.Acids Res.21:2265-2266 (1993)),从而生成高亲和力(nM范围)的人抗体。因此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替换方法。

[1019] 可以修饰编码抗体的DNA以生成嵌合或融合抗体多肽,例如通过用人重链和轻链恒定域(C_H 和 C_L)序列替代同源鼠序列(美国专利No.4,816,567;Morrison等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851 (1984))来进行,或通过融合免疫球蛋白编码序列和非免疫球蛋白多肽(异源多肽)的整个或部分编码序列来进行。非免疫球蛋白多肽序列可替代抗体的恒定域,或者用它们替代抗体的一个抗原结合位点的可变域,从而产生嵌合二价抗体,其包含对一种抗原具有特异性的一个抗原结合位点以及对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点。

[1020] 3. 人和人源化抗体

[1021] 本发明实施中所用的抗LY6抗体还可包括人源化抗体或人抗体。非人(例如鼠源)抗体的人源化形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(诸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它抗原结合子序列)。人源化抗体包括如下人免疫球蛋白(受体抗体),其中的互补决定区(CDR)残基被具有所期望的特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)(诸如小鼠、大鼠或兔)的CDR残基替换。在有些情况下,将人免疫球蛋白的Fv框架残基用相应的非人残基替换。人源化抗体还可包含在受体抗体或输入CDR或框架序列中没有发现的残基。通常,人源化抗体包含至少一个、通常两个基本上完整的可变域,在该可变域中,所有或基本上所有CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些CDR区,且所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些FR区。人源化抗体最好还包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区(Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-329 (1988); 和Presta, Curr.Op.Struct.Biol., 2:593-596 (1992))。

[1022] 用于将非人抗体人源化的方法在本领域是现有公知的。通常,人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基,它们通常取自“输入”可变域。人源化可基本上依照Winter及其同事的方法进行(Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988)),通过用啮齿类CDR序列替代相应的人抗体序列来进行。因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利No.4,816,567),其中用来自非人物种的相应序列替代基本少于整个人可变域。在实践中,人源化抗体通常是如下的人抗体,其中一些CDR残基和可能的一些FR残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替代。

[1023] 当抗体意图在于人类治疗性用途时,用于制备人源化抗体的人可变域(包括轻链和重链)的选择,对于降低抗原性和HAMA应答(人抗小鼠抗体)都非常重要。根据所谓的“最适”方法,用啮齿类抗体可变域序列对已知的整个人可变域序列文库进行筛选。鉴定与啮齿类最接近的人V结构域序列,并接受其中的人框架区(FR)用于人源化抗体(Sims等, J.Immunol.151:2296 (1993); Chothia等, J.Mol.Biol., 196:901 (1987))。另一种方法使用由特定轻链或重链亚类的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架区。同一框架可用于数种不同的人源化抗体(Carter等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89:4285 (1992); Presta等, J.Immunol.151:2623 (1993))。

[1024] 更为重要的是,抗体在人源化后保持对抗原的高结合亲和力以及其它有利的生物学特性。为了实现这一目的,依照一种优选的方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的,且为本领域熟练技术人员所熟悉。还可获得计算机程序,其能图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构。检查这些显示图像能够分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可从受体和输入序列中选出FR残基并进行组合,从而获得所需抗体特征,如对靶抗原的亲和力提高。通常,高变区残基直接且最实质地涉及对抗原结合的影响。

[1025] 设想了人源化抗LY6抗体的各种形式。例如,人源化抗体可以是抗体片段,诸如Fab,其任选偶联有一种或多种细胞毒剂以生成免疫偶联物。或者,人源化抗体可以是完整的抗体,如完整的IgG1抗体。

[1026] 作为人源化的替代方法,可生成人抗体。例如,现在有可能生成转基因动物(例如小鼠),其在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够由免疫而生成完全的人抗体全集。例如,已经描述了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失,其能导致内源抗体生成的完全抑制。将大量人种系免疫球蛋白基因转移到此类种系突变小鼠中将导致在抗原攻击后生成人抗体。参见如,Jakobovits等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551(1993);Jakobovits等,Nature,362:255-258(1993);Bruggemann等,Year in Immuno.7:33(1993);美国专利No.5,545,806,5,569,825,5,591,669(都是GenPharm的);5,545,807;和WO 97/17852。

[1027] 或者,噬菌体展示技术(McCafferty等,Nature 348:552-553(1990))可用于在体外从未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)域基因全集生成人抗体和抗体片段。根据这种技术,将抗体V结构域基因以符合阅读框的方式克隆到丝状噬菌体(如M13或fd)的主要或次要外壳蛋白基因中,并在噬菌体颗粒表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝,根据抗体的功能特性进行的选择也就选择了编码展示那些特性的抗体的基因。由此,噬菌体模拟B细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式进行,综述参见如Johnson,Kevin S.和Chiswell,David J.,Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)。V基因区段的数种来源可用于噬菌体展示。Clackson等,Nature 352:624-628(1991)从衍生自经免疫小鼠脾的小型V基因随机组合文库中分离得到极其多种抗噁唑酮抗体。基本依照Marks等,J.Mol.Biol.222:581-597(1991)或Griffith等,EMBO J.12:725-734(1993)所述技术,由未免疫人供体构建V基因全集,并分离针对极其多种抗原(包括自身抗原)的抗体。还可参见美国专利No.5,565,332和5,573,905。

[1028] 如上所述,还可通过体外激活的B细胞(参见美国专利No.5,567,610和5,229,275)来生成人抗体。

[1029] 4. 抗体片段

[1030] 在某些情况中,使用抗体片段而非完整抗体是有利的。较小的片段能被快速清除,而保持着与相应全长分子相似的抗原结合特异性,而且能改善对实体瘤的进入性。

[1031] 已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上,通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段(参见如Morimoto等,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992);和Brennan等,Science,229:81(1985))。然而,现在可直接由重组宿主

细胞生成这些片段。Fab、Fv和scFv抗体片段都可在大肠杆菌中表达并由大肠杆菌分泌,由此可方便生成大量的这些片段。可从上文讨论的抗体噬菌体文库中分离抗体片段。或者,可直接从大肠杆菌回收Fab'-SH片段,并通过化学方法偶联形成F(ab')₂片段(Carter等,Bio/Technology 10:163-167(1992))。依照另一种方法,可直接从重组宿主细胞培养物分离F(ab')₂片段。包含补救受体结合表位残基、具有延长的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段描述于美国专利5,869,046中。用于生成抗体片段的其它技术对熟练从业人员是显而易见的。在其他实施方案中,选择的抗体是单链Fv片段(scFv)。参见W0 93/16185;美国专利No.5,571,894;和美国专利No.5,587,458。Fv和sFv是具有完整结合位点且缺乏恒定区的唯一种类;因此,它们适合于在体内使用过程中降低非特异性结合。可构建sFv融合蛋白以在sFv氨基末端或羧基末端生成效应器蛋白的融合物。参见《AntibodyEngineering》,Borrebaeck编,同上。抗体片段还可以是“线性抗体”,例如美国专利No.5,641,870中描述的抗体。此类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[1032] 5. 双特异性抗体

[1033] 双特异性抗体对至少两种不同表位具有结合特异性。示例性的双特异性抗体可结合不同的抗原或结合本文所述的特定LY6多肽的两种不同表位。其它此类抗体可将以上LY6结合位点与针对另一种蛋白质的结合位点联合起来。在双特异性抗体在本发明的诊断方法中有用的情况中,第二抗体臂可结合可检测多肽。可将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段(例如F(ab')₂双特异性抗体)。

[1034] 用于制备双特异性抗体的方法是现有已知的。全长双特异性抗体的传统生成基于两种免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两种链具有不同的特异性(Millstein等,Nature 305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤)生成了潜在有10种不同抗体分子的混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行纯化正确分子,这相当麻烦,且产物产量低。W0 93/08829及Traunecker等,EMBO J.10:3655-3659(1991)中公开了类似的流程。

[1035] 根据不同的方法,将具有所需结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变域与免疫球蛋白恒定域序列融合。优选的是,融合使用包含至少部分铰链、CH2和CH3区的免疫球蛋白重链恒定域。优选的是,在至少一种融合物中出现有包含轻链结合所必需位点的第一重链恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物以及(如果需要的)免疫球蛋白轻链的DNA插入分开的表达载体中,并共转染到合适的宿主细胞中。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供期望双特异性抗体的最佳产量的实施方案中,这为调整三种多肽链的相互比例提供了更大的灵活性。然而,在至少两种多肽链以相同比率表达产生高产量时或在该比率对期望链组合的产量没有显著影响时,有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一个载体。

[1036] 在本方法的一个优选的实施方案中,双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链、和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半双特异性分子中的存在提供了分离的便利途径,因此发现这种不对称结构便于将所需双特异性化合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法公开于W094/04690。关于生成双特异性抗体的进一步细节参见如Suresh等,Methods inEnzymology 121:210(1986)。

[1037] 根据美国专利No.5,731,168中描述的另一种方法,可改造一对抗体分子之间的界面,从而使从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比最大化。优选的界面包含至少部分 CH_3 结构域。在该方法中,将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换。通过用较小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大氨基酸侧链,从而在第二抗体分子的界面上产生与大侧链相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了提高异二聚体产量的机制,而不是其它不想要的终产物,如同二聚体。

[1038] 双特异性抗体包括交联或“异源偶联”抗体。例如,异源偶联物中的一种抗体可与亲合素偶联,另一种抗体与生物素偶联。例如,此类抗体被建议用于使免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利No.4,676,980),及用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373和EP 03089)。通过在每一个抗体上提供(不同的或相同的)可检测标志物以实现改良的测定法检测,异源偶联抗体也可在本发明的方法中找到用途。可使用任何便利的交联方法制备异源偶联抗体。合适的交联剂是现有公知的,并且连同许多交联技术一起公开于美国专利No.4,676,980中。

[1039] 文献中还描述了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如,可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan等,Science 229:81 (1985)描述了一种方法,其通过蛋白水解切割完整抗体以生成 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下还原,以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的 Fab' 片段转变为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后将 Fab' -TNB衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成 Fab' -硫醇,并与等摩尔量的另一种 Fab' -TNB衍生物混合,以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作酶的选择性固定化试剂。

[1040] 最近的进展使得从大肠杆菌中直接回收 Fab' -SH片段变得更加容易,其可化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby等,J.Exp.Med.175:217-225 (1992)描述了完全人源化双特异性抗体 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 分子的生产。每个 Fab' 片段由大肠杆菌分开分泌,并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能够结合过表达ErbB2受体的细胞和正常人T细胞,并触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳房肿瘤靶物的溶解活性。

[1041] 从重组细胞培养物中直接制备和分离双特异性抗体片段的多种技术也被描述了。例如,已使用亮氨酸拉链来生成双特异性抗体(Kostelny等,J.Immunol.148(5):1547-1553 (1992))。将来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原而形成单体,然后重新氧化而形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。由Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448 (1993)描述的“双抗体”技术提供了制备双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的 V_H 和 V_L ,所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此,迫使一个片段上的 V_H 和 V_L 结构域与另一个片段上的互补 V_L 和 V_H 结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链 Fv (sFv)二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber等,J.Immunol.,152:5368 (1994)。

[1042] 本发明还设想了具有超过两个效价的抗体。例如,可制备三特异性抗体(Tutt等,J.Immunol.147:60 (1991))。

[1043] 6.多价抗体

[1044] 多价抗体可以比二价抗体更快地被表达该抗体所结合抗原的细胞来内在化(和/

或异化)。本发明的抗体可以是具有三个或更多抗原结合位点(例如四价抗体)的多价抗体(不同于IgM类),其可容易地通过编码抗体多肽链的核酸的重组表达而生成。多价抗体可包含二聚化结构域和三个或更多抗原结合位点。优选的二聚化结构域包含Fc区或铰链区(或由其组成)。在这种情况下,抗体将包含Fc区及Fc区氨基末端的三个或更多抗原结合位点。本文中优选的多价抗体包含三个至约八个、但优选四个抗原结合位点(或由其组成)。多价抗体包含至少一条多肽链(且优选两条多肽链),其中所述多肽链包含两个或多个可变域。例如,多肽链可包含VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc,其中VD1是第一可变域,VD2是第二可变域,Fc是Fc区的一条多肽链,X1和X2代表氨基酸或多肽,而n是0或1。例如,多肽链可包含:VH-CH1-柔性接头-VH-CH1-Fc区链;或VH-CH1-VH-CH1-Fc区链。本文中的多价抗体优选还包含至少两条(且优选四条)轻链可变域多肽。例如,本文中的多价抗体可包含约两条至约八条轻链可变域多肽。本文设想的轻链可变域多肽包含轻链可变域,且任选还包含C_L结构域。

[1045] 7. 效应器功能的工程改造

[1046] 可能希望在效应器功能方面修饰本发明的抗体,例如用以增强抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。这可通过在抗体Fc区中引入一个或多个氨基酸替代来实现。或者/另外,可在Fc区中引入半胱氨酸残基,从而使得在该区中形成链间二硫键。如此生成的同二聚体抗体可具有改善的内在化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。参见Caron等,J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992) 和Shopes, B., J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体还可使用如Wolff等,Cancer Research 53:2560-2565 (1993) 中描述的异双功能交联剂来制备。或者,抗体可工程改造成具有双重Fc区的,由此可具有增强的补体溶解和ADCC能力。参见Stevenson等,Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)。为了提高抗体的血清半衰期,人们可如美国专利No. 5,739,277中所述将补救受体结合表位掺入抗体(尤其是抗体片段)。本文所用的术语“补救受体结合表位”指IgG分子(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)Fc区中负责提高IgG分子体内血清半衰期的表位。

[1047] 8. 免疫偶联物

[1048] 本发明还涉及包含偶联有细胞毒剂的抗体的免疫偶联物,所述细胞毒剂诸如化疗剂、生长抑制剂、毒素(如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射偶联物)和/或可检测标记物。

[1049] a. 化疗剂

[1050] 上文已经描述了可用于生成此类免疫偶联物的化疗剂。可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、莨菪根毒蛋白A链、 α -帚曲霉素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、香石竹蛋白(dianthin proteins)、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、白树毒蛋白、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢菌素。多种放射性核素可用于生成放射偶联抗体。实例包括²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y和¹⁸⁶Re。抗体和细胞毒剂的偶联物可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备,诸如N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二

醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如,可如Vitetta等,Science 238:1098(1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的示例性的螯合剂。参见WO 94/11026。

[1051] 本文还设想了抗体与一种或多种小分子毒素(如加利车霉素、美登木素生物碱类、单端孢霉素和CC1065,及这些毒素具有毒素活性的衍生物)的偶联物。

[1052] B.LY6结合寡肽

[1053] 本发明的LY6结合寡肽指结合(优选特异结合)本文所述LY6多肽的寡肽。LY6结合寡肽可以使用已知的寡肽合成方法学化学合成,或者可使用重组技术制备和纯化。LY6结合寡肽的长度通常是至少约5个氨基酸,或者长度为至少约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100个氨基酸或更长,其中此类寡肽能够结合(优选特异结合)本文所述的LY6多肽。LY6结合寡肽无需过多试验就可使用公知技术来鉴定。在这方面,注意到用于对寡肽文库筛选能够特异结合多肽靶物的寡肽的技术是本领域公知的(参见例如美国专利No.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WO 84/03506和WO84/03564;Geysen等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,81:3998-4002(1984);Geysen等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,82:178-182(1985);Geysen等,于Synthetic Peptides as Antigens,130-149(1986);Geysen等,J.Immunol.Meth.,102:259-274(1987);Schoofs等,J.Immunol.,140:611-616(1988);Cwirla,S.E.等(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:6378;Lowman,H.B.等(1991)Biochemistry,30:10832;Clackson,T.等(1991)Nature,352:624;Marks,J.D.等(1991)J.Mol.Biol.,222:581;Kang,A.S.等(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:8363;和Smith,G.P.(1991)Current Opin.Biotechnol.,2:668)。

[1054] 在这方面,噬菌体展示是一种让人筛选大型寡肽文库来鉴定那些文库中能够特异结合多肽靶物的成员的公知技术。噬菌体展示是将变体多肽与外壳蛋白作为融合蛋白展示在噬菌体颗粒表面的一种技术(Scott,J.K.和Smith,G.P.(1990)Science 249:386)。噬菌体展示的效用在于,可以对选择性随机化蛋白质变体(或随机克隆cDNA)的大型文库迅速且有效地分选那些以高亲和力结合靶分子的序列。在噬菌体上展示肽(Cwirla,S.E.等(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:6378)或蛋白质(Lowman,H.B.等(1991)Biochemistry,30:10832;Clackson,T.等(1991)Nature,352:624;Marks,J.D.等(1991),J.Mol.Biol.,222:581;Kang,A.S.等(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:8363)的文库已经用于对数以百万计的多肽或寡肽筛选具有特异结合特性的多肽或寡肽(Smith,G.P.(1991)Current Opin.Biotechnol.2:668)。分选随机突变体的噬菌体文库需要构建和繁殖大量变体的策略,使用靶受体进行亲和纯化的流程,及评估结合富集结果的手段。参见美国专利No.5,223,409、5,403,484、5,571,689和5,663,143。

[1055] 尽管大多数噬菌体展示方法已经使用丝状噬菌体,但是 λ 样噬菌体展示系统(WO 95/34683;US 5,627,024)、T4噬菌体展示系统(Ren等,Gene,215:439(1998);Zhu等,Cancer Research,58(15):3209-3214(1998);Jiang等,Infection & Immunity,65(11):4770-4777(1997);Ren等,Gene,195(2):303-311(1997);Ren,Protein Sci.,5:1833(1996);Efimov等,Virus Genes,10:173(1995))和T7噬菌体展示系统(Smith和Scott,Methods in Enzymology,217:228-257(1993);U.S.5,766,905)也是已知的。

[1056] 现在已经从基础噬菌体展示概念发展出了很多其它改进和变种。这些改进增强了展示系统对肽文库筛选与选定靶分子的结合及展示功能性蛋白质的能力,所述功能性蛋白质具有筛选这些蛋白质期望特性的潜力。已经开发了用于噬菌体展示反应的组合反应装置(WO 98/14277),而且噬菌体展示文库已经用于分析和控制生物分子相互作用(WO 98/20169;WO 98/20159)和受约束螺旋肽的特性(WO 98/20036)。WO 97/35196描述了分离亲和配体的方法,其中使噬菌体展示文库接触其中配体将结合靶分子的一种溶液和其中亲和配体将不会结合靶分子的第二种溶液,以选择性分离能结合的配体。WO97/46251描述了一种方法,即用亲和纯化的抗体生物淘选随机噬菌体展示库,然后分离结合的噬菌体,随后使用微量板的孔进行淘选过程以分离高亲和力结合的噬菌体。已经报道了金黄色葡萄球菌蛋白A作为亲和标签的使用(Li等(1998)Mol Biotech.,9:187)。WO 97/47314描述了底物扣除文库用于区别酶特异性的用途,其中使用组合文库,其可以是噬菌体展示库。WO97/09446描述了使用噬菌体展示选择适用于洗涤剂的酶的方法。美国专利No.5,498,538、5,432,018和WO 98/15833中描述了选择特异结合的蛋白质的其它方法。

[1057] 产生肽文库和筛选这些文库的方法还公开于美国专利No.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5,723,32。

[1058] 一方面,本发明涉及LYPD5多肽的配体。图32演示了这个方面,其显示了未转染的COS细胞(A)和用GLG-1转染的COS细胞,用LYPD5-Fc蛋白染色。在一个实施方案中,LYPD5的配体是高尔基体复合物定位的糖蛋白1(GLG-1)或E-选择蛋白1(ESL-1)多肽,如SEQ ID NO:18,20,22,或24所示,分别由SEQ ID NO:17,19,21,或23所示核酸编码。在另一个实施方案中,编码GLG-1多肽的多核苷酸包含SEQ ID NO:17,19,21,或23的至少15个、至少25个、至少50个、至少100个、至少250个、至少500个、至少750个、至少1000个、至少1250个、至少1500个、至少1750个、至少2000个、至少2040个、至少2090个、至少2150个、至少2200个、至少2300个、至少2400个、至少2500个、至少2600个、至少2700个、至少2800个、至少2900个、至少3000个、至少3100个、至少3200个、至少3300个、至少3400个、至少3500个、至少3600个、至少3700、或至少3720个连续核苷酸,或者编码GLG-1的多核苷酸包含SEQ ID NO:17,19,21,或23。在一个实施方案中,与编码GLG-1的多核苷酸(SEQ ID NO:17,19,21,或23)或其片段结合的多核苷酸与GLG-1多肽或其片段具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%序列同一性。在一个实施方案中,GLG-1多肽包含SEQ ID NO:18,20,22,或24的至少10个、至少25个、至少50个、至少75个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个、至少200个、至少225个、至少250个、至少275个、至少300个、至少325个、至少350个、至少400个、至少450个、至少500个、至少550个、至少600个、至少650个、至少700个、至少750个、至少800个、至少850个、至少900个、至少950个、至少1000个、至少1050

个、至少1100个、至少1150、或至少1200个连续氨基酸,或者GLG-1多肽包含SEQ ID NO:18, 20, 22, 或24。GLG-1或ESL-1在嗜中性细胞上表达,相信它涉及嗜中性细胞进入组织的外渗,而且认为它在炎症中发挥重要作用(参见Hidalgo等(2007) *Immunity*, 26 (4) :477-489,通过述及完整收入本文)。GLG-1或ESL-1具有14个富含半胱氨酸的GLG1域。胞外域(ECD)较长,而且如下所述,发现GLG-1ECD的变体或片段具有结合LYPD5的能力。

[1059] 在另一个实施方案中,所述LYPD5配体是本文所述GLG-1或ESL-1分子的变体或片段。如图33A-B中所示,GLG-1或ESL-1可视为片段1、2、3、和4,而且如实施例11中所描述的,这4种片段中之任一足以进行LYPD5结合。

[1060] 在另一个实施方案中,所述LYPD5配体是GLG-1或ESL-1(作为单一GLG-1域)的变体或片段。如图34A-B中所示,GLG-1由多个GLG-1域构成,而且如实施例11中所描述的,单一GLG-1域足以进行LYPD5结合。

[1061] 在另一个实施方案中,所述LYPD5配体是GLG-1或ESL-1(对LYPD5特异性的)变体或片段。如图35A-B中所示,GLG-1包括域26-114、域115、和域150,而且如实施例11中所描述的,域115结合LYPD5但域26-114不结合LYPD5。

[1062] 以与本发明涵盖LY6家族成员的变体相同的方式,本发明涵盖GLG-1的变体。

[1063] C. 多肽变体

[1064] 除了本文所述的多肽、抗体和LY6结合多肽,本发明还设想了可制备这些分子的变体,用于本文发明中。这些变体可通过将适宜的核苷酸改变引入编码DNA和/或通过合成所期望的抗体或多肽来制备。本领域技术人员将能理解,氨基酸改变可改变这些分子的翻译后加工,诸如改变糖基化位点的数目或位置或者改变膜锚定特征。

[1065] 可在氨基酸序列中产生变异,例如使用如美国专利No. 5,364,934所述的保守和非保守突变的任何技术和指导方针。变异可以是编码氨基酸序列的一个或多个密码子的替代、删除或插入,其导致氨基酸序列相对于天然序列改变。任选的是,变异是通过感兴趣的氨基酸序列的一个或多个结构域中至少一个氨基酸为任何其它氨基酸所替代来进行。通过比较感兴趣的氨基酸序列的序列与已知同源蛋白质分子的序列,并将高同源区中进行的氨基酸序列改变的数目最少化,可发现确定哪些氨基酸残基可插入、替代或删除而不会对期望活性有不利影响的方针。氨基酸替代可以是将一种氨基酸用具有相似结构和/或化学特性的另一种氨基酸替代的结果,诸如用丝氨酸替代亮氨酸,即保守氨基酸替代。插入或删除可任选在约1个至5个氨基酸的范围内。可通过在序列中系统性地氨基酸插入、替代或删除,并对所得变体测试由全长或成熟的天然序列展示的活性,由此来确定可容许的变异。

[1066] 本文提供了各种多肽的片段。例如,在与全长天然抗体或蛋白质比较时,此类片段可在N-末端或C-末端截短,或者可缺少内部残基。这些缺少对于所期望生物学活性不是至关重要的氨基酸残基的片段也可用于所公开的方法中。

[1067] 以上多肽片段可通过多种常规技术中的任一种来制备。所期望的肽片段可化学合成。一种备选方法涉及通过酶促消化产生这些片段,例如通过用已知在由特定氨基酸残基确定的位点处切割蛋白质的酶来处理蛋白质,或者通过用合适的限制酶消化DNA,并分离所期望的片段。还有一种合适的技术涉及分离并通过聚合酶链式反应(PCR)扩增编码所期望片段的DNA片段。确定所述DNA片段期望末端的寡核苷酸在PCR中用作5'和3'引物。优选的是,这些片段与相应的全长分子共有至少一种生物学和/或免疫学活性。

[1068] 在特定实施方案中,感兴趣的保守替代见表6中标题“优选替代”之下。如果此类替代导致生物学活性的改变,那么表6中称为例示替代的更实质性改变的、或者如下文关于氨基酸类别所进一步描述的,可被引入并筛选产物,由此鉴定出所期望的变体。

[1069]

表6

[1070] 原始残基 例示替代 优选替代

[1071]

[1072]	Ala (A)	val;leu;ile	val
[1073]	Arg (R)	lys;gln;asn	lys
[1074]	Asn (N)	gln;his;asp;lys;arg	gln
[1075]	Asp (D)	glu;asn	glu
[1076]	Cys (C)	ser;ala	ser
[1077]	Gln (Q)	asn;glu	asn
[1078]	Glu (E)	asp;gln	asp
[1079]	Gly (G)	pro;ala	ala
[1080]	His (H)	asn;gln;lys;arg	arg
[1081]	Ile (I)	leu;val;met;ala;phe;正亮氨酸	leu
[1082]	Leu (L)	正亮氨酸;ile;val;met;ala;phe	ile
[1083]	Lys (K)	arg;gln;asn	arg
[1084]	Met (M)	leu;phe;ile	leu
[1085]	Phe (F)	trp;leu;val;ile;ala;tyr	leu
[1086]	Pro (P)	ala	ala
[1087]	Ser (S)	thr	thr
[1088]	Thr (T)	val;ser	ser
[1089]	Trp (W)	tyr;phe	tyr
[1090]	Tyr (Y)	trp;phe;thr;ser	phe
[1091]	Val (V)	ile;leu;met;phe;ala;正亮氨酸	leu

[1092] 对LY6多肽的功能或免疫学身份的实质修饰通过选择在保持以下方面的效果上有显著不同的替代来完成:(a)替代区域中的多肽骨架的结构,例如作为折叠或螺旋构象,(b)靶位点处分子的电荷或疏水性,或(c)侧链的体积。根据共同的侧链特性,天然存在残基可如下分组:

[1093] (1) 疏水性的:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[1094] (2) 中性、亲水性的:Cys、Ser、Thr;Asn;Gln;

[1095] (3) 酸性的:Asp、Glu;

[1096] (4) 碱性的:His、Lys、Arg;

[1097] (5) 影响链取向的残基:Gly、Pro;和

[1098] (6) 芳香族的:Trp、Tyr、Phe。

[1099] 非保守替代将需要用这些类别之一中的一个成员替换另一个类别的。还可以将此类型替代残基引入保守替代位点中,或者更优选的是,引入剩余的(非保守)位点中。

[1100] 变异可使用现有已知的方法来进行,诸如寡核苷酸介导的(定点)诱变、丙氨酸扫描

描、及PCR诱变。可对克隆的DNA进行定点诱变(Carter等,Nucl.Acids Res.,13:4331(1986);Zoller等,Nucl.Acids Res.,10:6487(1987))、盒式诱变(Wells等,Gene,34:315(1985))、限制性选择诱变(Wells等,Philos.Trans.R.Soc.London SerA,317:415(1986))或其它已知技术,以产生抗LY6分子。

[1101] 还可采用扫描氨基酸分析来鉴定沿着连续序列的一个或多个氨基酸。在优选的扫描用氨基酸中有相对较小的中性氨基酸。此类氨基酸包括丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸和半胱氨酸。丙氨酸通常是这组中的优选扫描用氨基酸,因为它消除了 β -碳上的侧链,而且不大可能改变变体的主链构象(Cunningham和Wells,Science,244:1081-1085(1989))。丙氨酸通常也是优选的,因为它是最常见的氨基酸。另外,常常在隐蔽位置和暴露位置都能发现它(Creighton,The Proteins,(W.H.Freeman & Co.,N.Y.);Chothia,J.Mol.Biol.,150:1(1976))。如果丙氨酸替代不能产生足够量的变体,那么可使用等排(isoteric)氨基酸。

[1102] 任何不涉及保持LY6多肽正确构象的半胱氨酸残基也可被替代,通常用丝氨酸替代,以改进分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反,可向分子中添加半胱氨酸键以改善其稳定性(特别是当抗体是诸如Fv片段的抗体片段时)。

[1103] 特别优选的一类替代变体涉及替代亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,选择用于进一步开发的所得的变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改进的生物学特性。产生此类替代变体的一种便利方法包括使用噬菌体展示进行的亲和力成熟。简而言之,将数个高变区位点(例如6-7个位点)突变,以在每个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此产生的抗体变体以单价形式作为与各个颗粒内包装的M13基因III产物的融合物而展示在丝状噬菌体颗粒上。然后如本文所公开的,对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性(例如结合亲和力)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合有重要贡献的高变区残基。或者/另外,分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和靶多肽之间的接触点可能是有益的。此类接触残基及邻近残基是依照本文详述技术进行替代的候选位点。一旦产生此类变体,如本文所述,对该组变体进行筛选,并可选择在一种或多种相关测试中有优良特性的抗体用于进一步的开发。

[1104] 编码LY6多肽氨基酸序列变体的核酸分子可通过现有已知的多种方法来制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然存在氨基酸序列变体的情况中),或者通过对天然序列或早期制备的变体进行寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR诱变和盒式诱变来制备。

[1105] D. 多肽的修饰

[1106] 共价修饰的多肽和/或抗体也适宜应用在本发明的范围内。一种类型的共价修饰包括使这类抗体和多肽的靶氨基酸残基与有机衍生化试剂反应,该有机衍生化试剂能够与这类抗体和多肽的选定的侧链或者N-或C-末端残基起反应。例如,用双功能试剂进行的衍生化可用于使前述分子与不溶于水的支持基质或表面交联,从而用于纯化。常用的交联剂包括如,1,1-双(重氮-乙酰基)-2-苯乙烷、戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯,例如与4-叠氮水杨酸形成的酯、同双功能亚氨酸酯,包括二琥珀酰亚胺酯,诸如3,3'-二硫代双(琥珀酰亚氨基丙酸酯)、双功能马来酰亚胺,诸如双-N-马来酰亚胺-1,8-辛烷和诸如甲基-3-[(对-叠氮苯基)二硫代]丙酰亚氨酸酯的试剂。

[1107] 其它修饰包括谷氨酰胺酰和天冬酰胺酰残基分别脱酰胺为相应的谷氨酰和天冬

氨酰残基,脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(T.E.Creighton,Proteins:Structure and Molecular Properties,W.H.Freeman & Co.,San Francisco,pp.79-86 (1983)),N-末端胺的乙酰化,及任何C-末端羧基的酰胺化。

[1108] 另一类多肽或抗体的共价修饰包括改变抗体或多肽的天然糖基化样式。“改变天然糖基化样式”在本文中意图指缺失一个或多个在天然序列中发现的碳水化合物部分(或是通过消除潜在糖基化位点,或是通过以化学和/或酶促手段删除糖基化来进行),和/或添加一个或多个在相应天然序列中不存在的糖基化位点。另外,此短语包括天然蛋白质糖基化中的定性改变,包括所存在的多种碳水化合物部分的性质和比例的改变。

[1109] 抗体和其它多肽的糖基化通常是N-连接的或是O-连接的。N-连接指碳水化合物部分附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸)是将碳水化合物部分酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。由此,多肽中这些三肽序列其中任一的存在产生潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指将糖类N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。

[1110] 添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述三肽序列而完成(用于N-连接的糖基化位点)。这种改变还可通过向这些原始抗体或多肽的序列中添加、或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行(用于O-连接的糖基化位点)。可通过DNA水平上的变化,特别是通过在预先选择的碱基处突变编码前述氨基酸序列的DNA从而产生翻译成期望氨基酸的密码子,由此来任选改变这些抗体或多肽序列。

[1111] 增加碳水化合物部分的数量的一种方法是通过使糖苷与多肽化学或酶促偶联。本领域对此类方法有描述,例如1987年9月11日公开的W087/05330,和Aplin和Wriston,CRC Crit.Rev.Biochem.,pp.259-306 (1981)。

[1112] 去除碳水化合物部分可通过化学或酶促方法来实现,或者通过编码充当糖基化靶位的氨基酸残基的密码子的诱变替代来实现。化学脱糖基技术是现有已知的,而且描述于诸如Hakimuddin等,Arch.Biochem.Biophys.,259:52 (1987) 和Edge等,Anal.Biochem.,118:131 (1981) 中。酶促切割多肽上的碳水化合物部分可通过使用多种内切和外切糖苷酶来实现,如Thotakura等,Meth.Enzymol.,138:350 (1987) 所述。

[1113] 另一类共价修饰包括以美国专利No.4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192或4,179,337所述的方式,连接多种非蛋白质性质的聚合物之一,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯。LY6多肽还可包裹于诸如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如可分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、在胶状药物投递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于诸如Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Oslo,A.编,1980。

[1114] 修饰形成嵌合分子是通过将一种多肽与另一种异源多肽或氨基酸序列融合来实现,设想应用于本发明的方法中。

[1115] 在一个实施方案中,此类嵌合分子包括带有标签多肽的多肽的融合物,所述标签多肽提供了抗标签抗体可选择性结合的表位。表位标签通常位于这种抗体或多肽的氨基或

羧基末端。可使用针对标签多肽的抗体来检测此类带表位标签形式的抗体或多肽的存在。而且,表位标签的提供使这种抗体或多肽易于通过亲和纯化使用抗标签抗体或另一类结合所述表位标签的亲和基质来纯化。多种标签多肽及其各自抗体是现有公知的。例子包括聚组氨酸(poly-his)或聚-组氨酸-甘氨酸(poly-his-gly)标签;流感HA标签多肽及其抗体12CA5(Field等,Mol.Cell.Biol.,8:2159-2165(1988));c-myc标签及其抗体8F9、3C7、6E10、G4、B7和9E10抗体(Evan等,Molecular and Cellular Biology,5:3610-3616(1985));及单纯疱疹病毒糖蛋白D(gD)标签及其抗体(Paborsky等,Protein Engineering,3(6):547-553(1990))。其它标签多肽包括Flag肽(Hopp等,BioTechnology,6:1204-1210(1988));KT3表位肽(Martin等,Science,255:192-194(1992)); α -微管蛋白表位肽(Skinner等,J.Biol.Chem.,266:15163-15166(1991));及T7基因10蛋白肽标签(Lutz-Freyermuth等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:6393-6397(1990))。

[1116] 在一个备选的实施方案中,嵌合分子可包括多肽与免疫球蛋白或免疫球蛋白特定区域的融合物。对于二价形式的嵌合分子(也称为“免疫粘附素”),此类融合物可以是与IgG分子Fc区融合的。Ig融合物优选包含替代,即用可溶(跨膜结构域删除或灭活)形式的前述抗体或多肽替换Ig分子内至少一个可变区。在一个特别优选的实施方案中,免疫球蛋白融合物包含IgG1分子的铰链、CH₂和CH₃,或者铰链、CH₁、CH₂和CH₃区。关于免疫球蛋白融合物的制备还可参见1995年6月27日公告的美国专利No.5,428,130。

[1117] E. 多肽的制备

[1118] 下面的描述主要涉及通过培养用包含编码该抗体、多肽和寡肽的核酸的载体转化或转染的细胞来制备多肽。术语“多肽”可包括抗体、多肽和寡肽。当然设想了,可采用本领域公知的备选方法来制备该抗体、多肽和寡肽。例如,可使用固相技术通过直接肽合成来生成适宜的氨基酸序列或其部分(参见如,Stewart等,Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H.Freeman Co.,San Francisco,CA(1969);Merrifield,J.Am.Chem.Soc.,85:2149-2154(1963))。体外蛋白质合成可使用人工技术或自动化来进行。例如,自动化合成可依照制造商的说明书使用Applied Biosystems肽合成仪(Foster City,CA)来完成。该抗体、多肽或寡肽的各个部分可分开化学合成,并使用化学或酶促方法组合来生成所期望的产品。

[1119] 1. 分离编码多肽的DNA

[1120] 编码多肽的DNA可以从据认为具有所述抗体、多肽或寡肽mRNA的并以可检测水平表达它的组织制备得到的cDNA文库中获得。因此,编码该多肽的DNA可从人组织制备的cDNA文库、基因组文库或通过已知的合成流程(例如自动化核酸合成)而方便地获得。

[1121] 设计用于鉴定感兴趣的基因或由其编码的蛋白质的探针(诸如至少约20-80个碱基的寡核苷酸)可以用来筛选文库。用所选的探针筛选cDNA或基因组文库可使用标准流程进行,诸如Sambrook等,Molecular Cloning: A Laboratory Manual(纽约:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)所述。或者,可用PCR方法(Sambrook等,同上;Dieffenbach等,PCR Primer: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1995))。

[1122] 用于筛选cDNA文库的技术是本领域公知的。选择作为探针的寡核苷酸序列应该足够长且足够专一,使得假阳性降到最低。寡核苷酸优选是经过标记的,使得它在与所筛选文库中的DNA杂交时可被检测出。标记方法是本领域公知的,包括使用放射性标记物,像³²P-标

记的ATP、生物素化或酶标记。Sambrook等(同上)提供了杂交条件,包括中等严格和高度严格条件。

[1123] 在此类文库筛选方法中鉴定到的序列可以与公共数据库(如GenBank)或其它私有序列数据库中可得到的和保藏的其它已知序列比较和对比。所述分子确定区域内的或跨越全长序列的序列同一性(在氨基酸水平上或在核苷酸水平上)可使用现有已知的和本文所述的方法来确定。

[1124] 具有蛋白质编码序列的核酸可通过使用本文首次公开的所推断的氨基酸序列来筛选选定的cDNA或基因组文库而获得,并且如果必要,使用Sambrook等(同上)所述的常规引物延伸流程来检测可能没有逆转录为cDNA的mRNA的前体和加工中间产物。

[1125] 2. 选择和转化宿主细胞

[1126] 宿主细胞用本文所述的用于生成LY6多肽的表达或克隆载体进行转染或转化,并在为适宜诱导启动子、选择转化子、或扩增编码所期望的序列的基因而进行的调整的常规营养培养基中培养。培养条件,如培养基、温度、pH等,可以由本领域技术人员无需过多实验就选择出。一般来说,用于使细胞培养物产量最大化的原理、方案和实用技术可在Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler编(IRL Press, 1991)和Sambrook等(同上)中找到。

[1127] 真核细胞转染和原核细胞转化的方法是普通技术人员所知的,例如有CaCl₂、CaPO₄、脂质体介导的和电穿孔。根据所用宿主细胞,使用适于此类细胞的标准技术进行转化。如Sambrook等(同上)所述,对原核细胞一般使用采用氯化钙的钙处理法或电穿孔。如Shaw等, Gene, 23: 315 (1983) 和1989年6月29日公开的W0 89/05859所述,根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)感染可用于某些植物细胞的转化。对于没有这样的细胞壁的哺乳动物细胞,可采用Graham和van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978)的磷酸钙沉淀法。哺乳动物细胞宿主系统转染的一般情况参见美国专利No. 4, 399, 216。转化入酵母通常可依照Van Solingen等, J. Bact., 130: 946 (1977)和Hsiao等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979)的方法来进行。然而,也可使用将DNA导入细胞的其它方法,如核显微注射、电穿孔、细菌原生质体与完整细胞的融合、或聚阳离子(如聚凝胺、聚鸟氨酸)。对于转化哺乳动物细胞的多种技术,可参见Keown等, Methods in Enzymology, 185: 527-537 (1990)和Mansour等, Nature, 336: 348-352 (1988)。

[1128] 适于克隆或表达本文载体中的DNA的宿主细胞包括,原核生物、酵母、或高等真核细胞。合适的原核生物包括但不限于真细菌,如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如肠杆菌,如大肠杆菌。多种大肠杆菌菌株是公众可获得的,如大肠杆菌K12菌株MM294 (ATCC 31, 446);大肠杆菌X1776 (ATCC 31, 537);大肠杆菌菌株W3110 (ATCC 27, 325)和K5772 (ATCC 53, 635)。其它合适的原核生物宿主细胞包括肠杆菌科(Enterobacteriaceae),如埃希氏菌属(*Escherichia*) (例如大肠杆菌(*E. coli*))、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、变形菌属(*Proteus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*) (例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*))、沙雷氏菌属(*Serratia*) (例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*))、和志贺氏菌属(*Shigella*),以及芽孢杆菌属(*Bacilli*) (如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) (例如1989年4月12日出版的DD 266, 710中公开的地衣芽孢杆菌41P))、假单胞菌属(*Pseudomonas*) (如铜绿假单

胞菌 (*P.aeruginosa*)、和链霉菌属 (*Streptomyces*)。这些例子是例示性的而非限制性的。W3110株是一个特别优选的宿主或亲本宿主,因为它是用于重组DNA产物发酵的常用宿主菌株。优选的是,宿主细胞分泌最小量的蛋白水解酶。例如,W3110株可以被修饰,从而在编码宿主内源性蛋白质的基因中产生遗传突变,此类宿主的例子包括大肠杆菌W3110株1A2,其具有完整基因型tonA;大肠杆菌W3110株9E4,其具有完整基因型tonA ptr3;大肠杆菌W3110株27C7 (ATCC 55,244),其具有完整基因型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kanr;大肠杆菌W3110株37D6,其具有完整基因型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degPompT rbs7 ilvG kanr;大肠杆菌W3110株40B4,其是带有非卡那霉素抗性的degP缺失突变的37D6株;及1990年8月7日颁布的美国专利No.4,946,783中公开的具有突变型周质蛋白酶的大肠杆菌菌株。或者,体外克隆方法也是合适的,例如PCR或其它核酸聚合酶反应。

[1129] 特别是在不需要糖基化和Fc效应器功能时,如当治疗性抗体与细胞毒剂(例如毒素)偶联且免疫偶联物自身能显示出对肿瘤细胞破坏的效力时,可在细菌中制备全长抗体、抗体片段及抗体融合蛋白。全长抗体在循环中具有较长半衰期。大肠杆菌中的生产更快且更加省钱。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,可参见如US 5,648,237 (Carter等)、US 5,789,199 (JoLy等)、和US 5,840,523 (Simmons等),它们描述了用于优化表达和分泌的翻译起始区 (TIR) 和信号序列,这些专利纳入本文作为参考。表达后,以可溶性级分方式从大肠杆菌细胞浆中分离出抗体,并且可根据同种型而通过诸如蛋白A或G柱来纯化。最终的纯化可以用与纯化在合适细胞(如,CHO细胞)中表达的抗体类似的方法来进行。

[1130] 除了原核生物以外,真核微生物(如丝状真菌或酵母)也是编码期望多肽的载体的合适克隆或表达宿主。酿酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是常用的低等真核宿主微生物。其它的包括粟酒裂殖糖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach和Nurse, *Nature* 290:140 (1981); EP 139,383,1985年5月2日公开);克鲁维酵母宿主 (*Kluyveromyces*) (美国专利No.4,943,529; Fleer等, *Bio/Technology* 9:968-975 (1991)), 如乳酸克鲁维酵母 (*K.lactis*) (MW98-8C、CBS683、CBS4574; Louvencourt等, *J.Bacteriol.* 154 (2):737-742 (1983))、脆壁克鲁维酵母 (*K.fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K.bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克克鲁维酵母 (*K.wickerhamii*) (ATCC 24,178)、*K.waltii* (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母 (*K.drosophilum*) (ATCC 36,906; Van denBerg等, *Bio/Technology* 8:135 (1990))、耐热克鲁维酵母 (*K.thermotolerans*)、和马克思克鲁维酵母 (*K.marxianus*); 亚罗酵母属 (*Yarrowia*) (EP 402,226); 巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sreekrishna等, *J.Basic Microbiol.* 28:265-278 (1988)); 假丝酵母属 (*Candida*); 瑞氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP244,234); 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) (Case等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76:5259-5263 (1979)); 许旺酵母属 (*Schwanniomyces*), 如许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*) (EP 394,538,1990年10月31日公开); 和丝状真菌,如脉孢菌属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*) (WO 91/00357,1991年1月10日公开)、和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主,如鸟巢曲霉 (*A.nidulans*) (Balance等, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 112:284-289 (1983); Tilburn等, *Gene* 26:205-221 (1983); Yelton等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81:1470-1474 (1984)) 和黑曲霉 (*A.niger*) (Kelly和Hynes, *EMBO J.* 4:475-479 (1985))。甲基营养型酵母适于本发明,包括但不限于能够在甲醇上生长的、选自以下属的酵母:汉逊氏酵母属

(Hansenula)、假丝酵母属(Candida)、克勒克氏酵母属(Kloeckera)、毕赤氏酵母属(Pichia)、糖酵母属(Saccharomyces)、球拟酵母属(Torulopsis)、和红酵母属(Rhodotorula)。作为这类酵母的例子的具体物种列表可在C.Anthony, The Biochemistry of Methylophilic, 269 (1982) 中找到。

[1131] 适用于表达糖基化多肽的宿主细胞衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的例子包括昆虫细胞诸如果蝇S2和夜蛾Sf9、以及植物细胞,如棉、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄、和烟草的细胞培养物。已经鉴定出了许多杆状病毒株和变体及相应能接受的昆虫宿主细胞,所述细胞来自诸如草地夜蛾(Spodoptera frugiperda)(毛虫)、埃及伊蚊(Aedes aegypti)(蚊子)、白纹伊蚊(Aedes albopictus)(蚊子)、黑腹果蝇(Drosophila melanogaster)(果蝇)、和家蚕(Bombyx mori)等宿主。公众可获得多种用于转染的病毒株,例如苜蓿尺蠖(Autographa californica)NPV的L-1变体和家蚕NPV的Bm-5株,而且此类病毒可依照本发明作为本文的病毒使用,特别是用于转染草地夜蛾细胞。

[1132] 然而,脊椎动物细胞是最感兴趣的,而且在培养(组织培养)中繁殖脊椎动物细胞已经成为常规流程了。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子是用SV40转化的猴肾CV1系(COS-7, ATCC CRL 1651);人胚肾系(293或为了在悬浮培养基中生长而亚克隆的293细胞, Graham等, 1977, J. Gen. Virol. 36:59);幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/—DHFR(CHO, Urlaub等, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216);小鼠塞托利细胞(TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251);猴肾细胞(CV1, ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);牛鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL 51);TRI细胞(Mather等, 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68);MRC5细胞;FS4细胞;和人肝瘤系(Hep G2)。

[1133] 用上述用于期望多肽生成的表达或克隆载体转化宿主细胞,并在为适宜诱导启动子、选择转化子、或扩增编码所期望的序列的基因而调整的常规营养培养基中培养。

[1134] 3. 选择和应用复制型载体

[1135] 可以将编码各LY6多肽的核酸(例如cDNA或基因组DNA)插入复制型载体,用于克隆(DNA扩增)或表达。多种载体是公众可得到的。例如,载体可以是质粒、粘粒、病毒颗粒或噬菌体的形式。可以通过多种方法将适宜的核酸序列插入载体中。通常,使用本领域已知的技术将DNA插入适宜的限制性内切核酸酶位点。载体成分通常包括但不限于一种或多种信号序列、复制起点、一种或多种标志物基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。构建包含一种或多种这些成分的合适载体可采用技术人员已知的标准连接技术。

[1136] 期望的多肽不仅可以直接重组生产,而且可以与异源多肽作为融合多肽来生产,所述异源多肽可以是在成熟蛋白质或多肽的N-末端具有特异性切割位点的信号序列或其它多肽。一般而言,信号序列可以是载体的成分,或者它可以是插入载体的编码成熟序列的DNA的一部分。信号序列可以是原核信号序列,例如选自碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp、或热稳定的肠毒素II前导序列。为了酵母分泌,信号序列可以是例如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列(包括糖酵母和克鲁维酵母的 α -因子前导序列,后者如美国专利No. 5,010,182所述)、或酸性磷酸酶前导序列、白色假丝酵母葡萄糖淀粉酶前导序列(1990年4月4日公开的EP 362,179)、或1990年11月15日公开的WO 90/13646中描述的信号。在哺乳动物细胞的表达

中,可以使用哺乳动物信号序列来指导蛋白质的分泌,如用来自相同或相关物种的分泌型多肽的信号序列、以及病毒分泌前导序列。

[1137] 表达和克隆载体都包含能够使载体在一种或多种选择的宿主细胞中复制的核酸序列。多种细菌、酵母、和病毒的此类序列是众所周知的。来自质粒pBR322的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌,2 μ 质粒起点适合于酵母,而各种病毒起点(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV、或BPV)可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。

[1138] 表达和克隆载体通常将包含选择基因,也称为选择标志物。典型的选择基因编码如下蛋白质:(a)赋予抗生素或其它毒素抗性的,例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤、或四环素;(b)弥补营养缺陷的;或(c)提供不能由复合培养基获得的关键营养物的,例如编码芽孢杆菌D-丙氨酸消旋酶的基因。

[1139] 适于哺乳动物细胞的选择标志物的例子是能够鉴定出能摄取编码所期望蛋白质的核酸的细胞的选择标志物,诸如DHFR或胸苷激酶。在采用野生型DHFR时,适宜的宿主细胞是DHFR活性缺陷的CHO细胞系,其制备和繁殖如Urlaub等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980)所述。适用于酵母的选择基因是存在于酵母质粒YRp7中的trp1基因(Stinchcomb等,Nature,282:39(1979);Kingsman等,Gene,7:141(1979);Tschemper等,Gene,10:157(1980))。trp1基因因为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株提供了选择标志物,例如ATCC No.44076或PEP4-1(Jones,Genetics,85:12(1977))。

[1140] 表达和克隆载体通常包含与编码所期望氨基酸序列的核酸序列可操作连接的启动子,用以指导mRNA合成。由多种潜在宿主细胞识别的启动子是众所周知的。适用于原核宿主的启动子包括 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统(Chang等,Nature,275:615(1978);Goeddel等,Nature,281:544(1979))、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统(Goeddel,Nucleic acids Res.8:4057(1980);EP 36,776)、和杂合启动子,如tac启动子(deBoer等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:21-25(1983))。用于细菌系统的启动子还将包含与编码所期望的蛋白质序列的DNA可操作连接的Shine-Dalgarno(S.D.)序列。

[1141] 适用于酵母宿主的启动序列的例子包括3-磷酸甘油酸激酶(Hitzeman等,J.Biol.Chem.255:2073(1980))或其它糖酵解酶(Hess等,J.Adv.Enzyme Reg.7:149(1968);Holland,Biochemistry 17:4900(1978)) (如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶、和葡糖激酶)的启动子。

[1142] 作为具有生长条件控制转录的额外优点的诱导型启动子的其它酵母启动子是醇脱氢酶2、异细胞色素C、酸性磷酸酶、与氮代谢有关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适用于酵母表达的载体和启动子进一步描述于EP 73,657中。

[1143] 在哺乳动物宿主细胞中的DNA转录是受控的,例如只要此类启动子与宿主细胞系统相容的话,可由病毒(如多瘤病毒、禽痘病毒(1989年7月5日公开的UK 2,211,504)、腺病毒(诸如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒和猿猴病毒40(SV40))基因组中获得的启动子控制,由异源哺乳动物启动子(如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子、及由热休克启动子)控制。

[1144] 可通过在载体中插入增强子序列来提高编码期望多肽的DNA的转录。增强子是DNA

的顺式作用元件,通常大约有10至300bp,其作用于启动子以增加转录。来自哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)的许多增强子序列是已知的。然而,人们通常会使用来自真核细胞病毒的增强子。例子包括复制起点晚期一侧上的SV40增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点晚期一侧上的多瘤病毒增强子、和腺病毒增强子。增强子可以剪接到载体中前述氨基酸序列的编码序列的5'或3'位置上,但是优选位于启动子的5'位点。

[1145] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人、或来自其它多细胞生物体的多核细胞)的表达载体还将包含终止转录和稳定mRNA所必需的序列。此类序列通常可以从真核或病毒DNA或cDNA的5'端(偶尔是3'端)非翻译区获得。这些区域包含在编码本节所述的各抗体、多肽或寡肽的mRNA的非翻译部分中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。

[1146] 适合在重组脊椎动物细胞培养中合成各抗体、多肽或寡肽的其它方法、载体和宿主细胞见Gething等,Nature,293:620-625(1981);Mantei等,Nature,281:40-46(1979);EP 117,060;和EP 117,058。

[1147] 4. 培养宿主细胞

[1148] 可以在多种培养基中培养用于生成LY6多肽的宿主细胞。商品化培养基,如Ham氏F10(Sigma)、极限必需培养基(MEM,Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、和Dulbecco氏改良的Eagle氏培养基(DMEM,Sigma),适于培养宿主细胞。另外,可以使用下列文献中描述的任何培养基作为宿主细胞的培养基:Ham等,Meth.Enz.58:44(1979);Barnes等,Anal.Biochem.102:255(1980);美国专利No.4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655;或5,122,469;W090/03430;W0 87/00195;或美国专利再审查号30,985。任何这些培养基可以根据需要补充激素和/或其它生长因子(如胰岛素、运铁蛋白、或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙、镁、和磷酸盐)、缓冲剂(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如GENTAMYCINTM药物)、痕量元素(其被定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以以适当浓度包括本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。培养条件(如温度、pH等)是先前为表达而选择用于宿主细胞中的条件,这对于普通技术人员而言是显然的。

[1149] 5. 检测基因扩增/表达

[1150] 基因的扩增和/或表达可以在样品中直接测量,例如根据本文提供的序列使用适宜的带标记探针,通过常规的Southern印迹、Northern印迹来定量mRNA转录(Thomas,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:5201-5205(1980))、点印迹(DNA分析)或原位杂交。或者,可采用能识别特定双链体的抗体,所述双链体包括DNA双链体、RNA双链体、及DNA-RNA杂合双链体或DNA-蛋白质双链体。继而可标记抗体,并可进行测试,其中将双链体结合到表面上,从而在表面上形成双链体后,可检测与双链体结合的抗体的存在。

[1151] 或者,为了直接对基因产物的表达定量,可通过免疫学方法测量基因表达,如通过细胞或组织切片的免疫组化染色和细胞培养物或体液测试来进行。用于免疫组化染色和/或样品液体测试的抗体可以是单克隆的或多克隆的,而且可以在任何哺乳动物中制备。可针对天然序列的多肽或寡肽或针对与DNA融合且编码该多肽或寡肽的特定抗体表位的外源序列,来便利地制备适用于本方法的抗体。

[1152] 6. 蛋白质纯化

[1153] 可以从培养液或从宿主细胞裂解物中回收多肽。如果是膜结合的,那么可使用合

适的去污剂溶液(例如Triton-X 100)或通过酶促裂解使其从膜释放。前述表达所用的细胞可通过多种物理或化学手段破裂,如通过冻融循环、超声处理、机械破裂、或细胞溶解剂。

[1154] 可期望从重组细胞蛋白质或多肽中纯化出前述物质。下面的流程是合适纯化流程的例示:在离子交换柱上的分级;乙醇沉淀;反相HPLC;在硅土或阳离子交换树脂(如DEAE)上的层析;层析聚焦;SDS-PAGE;硫酸铵沉淀;使用诸如Sephadex G-75的凝胶过滤;用蛋白A Sepharose柱以除去污染物,如IgG;及用金属螯合柱来结合所期望的分子的带表位标签形式。可采用多种蛋白质纯化方法,而且此类方法是本领域已知的并描述于诸如Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, 纽约(1982)中。选择的纯化步骤将取决于例如所用的生产方法和为所要求保护的方法生成的特定抗体、多肽或寡肽的性质。

[1155] 在使用重组技术时,可以在细胞内、在周质空间中生成LY6多肽,或者直接将其分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体,那么作为第一步,通过例如离心或超滤来清除宿主细胞或裂解片段的微粒碎片。Carter等, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) 描述了用于分离分泌到大肠杆菌周质空间的抗体的流程。简单的说,在存在乙酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)时,使细胞浆液融化超过约30分钟。可以通过离心除去细胞碎片。当抗体分泌到培养基中,则一般首先使用商品化的蛋白质浓缩滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元)浓缩来自此类表达系统的上清液。在任何上述步骤中,可以包括用蛋白酶抑制剂(如PMSF)来抑制蛋白水解,而且可以包括用抗生素来防止外来污染物的生长。

[1156] 可以使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析、和亲和层析来进行纯化,其中亲和层析是优选的纯化技术。蛋白A作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc区的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark等, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983))。蛋白G被推荐用于所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$ (Guss等, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986))。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖,但是其它基质也可用。机械稳定的基质(如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯)能够获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。对于包含 C_H3 结构域的抗体而言,可使用BakerbondABXTM树脂(J.T.Baker, Phillipsburg, NJ)进行纯化。根据待回收的抗体,也可使用其它蛋白质纯化技术,如离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、硅土上的层析、肝素SEPHAROSETM上的层析、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE、和硫酸铵沉淀。

[1157] 在任何初步的纯化步骤后,包含感兴趣的抗体和污染物的混合物可以使用pH约2.5-4.5的洗脱缓冲液进行低pH疏水相互作用层析,优选在低盐浓度(例如约0-0.25M盐)进行。

[1158] H. 药用配制剂

[1159] 可制备依照本发明使用的治疗用配制剂(“治疗剂”)供贮存,制备通过将具有期望纯度的治疗剂与任选的制药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington: *The Science of Practice of Pharmacy*, 第20版, Gennaro, A. 等, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000)) 混合成冻干剂型或水溶液的形式来进行。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,包括缓冲剂,诸如醋酸盐、Tris、磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十

八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵、苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;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,诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;渗透压调节剂,诸如海藻糖和氯化钠;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;表面活性剂,诸如聚山梨醇酯;成盐反荷离子,诸如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEEN®、PLURONICS®或聚乙二醇(PEG)。抗体优选包含浓度介于5-200mg/ml、优选介于10-100mg/ml的抗体。

[1160] 本文中的制剂还可含有超过一种治疗具体适应症所必需的活性化合物,优选它们具有补充活性且彼此没有不利影响的。例如,在所述治疗剂之外,期望在一种配制剂中含有另一种抗体,如第二种此类治疗剂,或针对一些其它靶物(诸如影响神经胶质瘤生长的生长因子)的抗体。或者/另外,所述组合物还可包含化疗剂、细胞毒剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂和/或心脏保护剂。此类分子以对于预定目的有效的量适宜地组合存在。

[1161] 活性成分还可包裹于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如可分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊,或包裹在胶状药物投递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于Remington: The Science and Practice of Pharmacy(同上)中。

[1162] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质,其是定型制品形式的,例如为薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙醇醇))、聚交酯(美国专利No. 3,773,919)、L-谷氨酸与L-谷氨酸 γ -乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物(诸如LUPRONDEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体))及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[1163] 用于体内给药的制剂必须是无菌的。这可容易地通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[1164] 用于炎症肠病的诊断和/或治疗的方法

[1165] 为了确定哺乳动物(诸如正在罹患IBD的哺乳动物)的胃肠组织或细胞中的LY6表达,可利用多种诊断测定法。在一个实施方案中,可通过RT-PCR、原位杂交、微阵列分析、和/或免疫组化(IHC)来分析LY6多肽的过表达。可对来自哺乳动物(诸如但不限于人)的胃肠活检(诸如来自结肠,或,更具体的,乙状结肠的)的新鲜的、冷冻的和/或石蜡包埋的组织切片进行RT-PCR、原位杂交、微阵列分析和/或IHC测定法。

[1166] 或者/另外,可在福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤组织上进行FISH测定法诸如INFORM®(Ventana, Arizona)或PATHVISION®(Vysis, Illinois)以确定组织样品或活检物中LY6表达和/或上调的程度(如果有的话)。

[1167] 例如施用结合待检测分子且标记有可检测标志物(例如放射性同位素或荧光标志物)的分子(诸如抗体、寡肽或有机分子)并对患者进行外部扫描以定位标志物,由此可使用体内诊断测定法来评估LY6表达。

[1168] 当前,根据IBD的阶段,治疗涉及下列疗法中的一种或组合:手术以去除患病肠组织;施用治疗剂,包括但不限于化疗;饮食改变;和生活方式管理。在IBD的治疗中有用的治

疗剂或化疗剂是本领域已知的,而且本文中公开了代表性的治疗剂和化疗剂。

[1169] 具体而言,本发明涵盖与帕利他塞及改良衍生物的联合疗法(参见例如EP0600517)。将前述抗体、多肽、寡肽或有机分子与治疗有效剂量的化疗剂一起施用。在另一个实施方案中,此类抗体、多肽、寡肽或有机分子与化疗联合施用,用以提高化疗剂(例如帕利他塞)的活性和功效。Physicians' Desk Reference (PDR) 公开了这些药剂已经在多种癌症治疗中所使用的剂量。这些前述化疗药物在治疗上有效的给药方案和剂量将取决于所治疗的具体癌症、疾病的程度及本领域内科医师所熟悉的其它因素,而且可以由内科医师确定。

[1170] 治疗剂或化疗剂依照已知方法施用于人类患者,诸如静脉内施用(如推注或一段时间的连续输注),通过颅内、脑脊髓内、关节内、鞘内、静脉内、动脉内、皮下、口服、表面或吸入路径施用。

[1171] 本发明提供了涉及诊断步骤和治疗处理步骤的方法。在一个实施方案中,本发明提供了检测哺乳动物受试者中的炎症肠病(IBD)的方法,包括以下步骤:(1) 检测编码LY6多肽的核酸或基因(a)在自所述受试者获得的组织或细胞的测试样品中和(b)在对照样品中的表达水平,其中所述LY6核酸或基因在所述测试样品中的表达水平比所述对照样品高指示用于获取所述测试样品的受试者中存在IBD;并(2)对所述受试者施用有效量的IBD治疗剂。在一个实施方案中,所述IBD治疗剂是另一种IBD相关分子的拮抗剂。本发明涵盖在IBD中差异表达的各种IBD相关分子。在一个实施方案中,所述IBD相关分子是一种在IBD中差异表达的分子。在另一个实施方案中,所述IBD相关分子在IBD中过表达。在又一个实施方案中,所述过表达的IBD相关分子是一种抗原。在另一个实施方案中,所述IBD相关分子是整联蛋白β7 (ITGB2) (参见WO 2006/026759,通过述及完整收入本文)。术语“IBD治疗剂”,如本文中所使用的,指IBD相关分子的拮抗剂。在一个实施方案中,所述IBD治疗剂是整联蛋白的拮抗剂。在另一个实施方案中,所述IBD治疗剂是ITGB7的拮抗剂。在又一个实施方案中,所述IBD治疗剂是由SEQ ID NO:68所示核酸序列编码的SEQ ID NO:69所示多肽的拮抗剂。

[1172] J. 制品和试剂盒

[1173] 为了诊断应用,制品包括容器和容器上或与容器相连的标签或包装插页,其指明用于检测LY6 (诸如但不限于LY6、LYPD1、LYPD3、和/或LYPD5) 在哺乳动物的胃肠组织和细胞中的表达的用途。在一个实施方案中,所述哺乳动物是人。在一个实施方案中,所述组织或细胞是胃肠组织或细胞。在一个实施方案中,检测包括相对于对照样品的定量。在一个实施方案中,所述容器、标签或包装插页指明了所述胃肠组织或细胞来自哺乳动物的结肠。在一个实施方案中,所述容器、标签或包装插页指明了相对于对照样品升高的LY6表达指示哺乳动物中有IBD,包括但不限于CD和/或UC。合适的容器包括例如瓶、管形瓶、注射器等。容器可用各种材料制成,诸如玻璃或塑料。另外,所述制品还可包含第二容器,其中装有缓冲剂或对于实施检测有用的其它试剂(诸如可检测标记物)。它还可包括从商业和用户立场上来看所需的其它材料,包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、和染料。

[1174] 为了分离和纯化LY6多肽,试剂盒可包含与珠子(例如sepharose珠子)偶联的LY6结合剂。可以提供包含此类分子的试剂盒,用于LY6多肽的体外检测和定量,例如用在ELISA或Western印迹中。与制品相同,试剂盒包括容器和容器上或与其相连的标签或包装插页。容器中装有包含至少一种可用于本发明的这类LY6结合抗体、寡肽或有机分子的组合物。可

包括另外的容器,其中装有例如稀释剂和缓冲剂、对照抗体。标签或包装插页可提供对组合物的描述以及用于预进行的体外用途或诊断用途的说明书。

[1175] K. 正义和反义编码LY6的核酸

[1176] 预期与编码LY6基因的核酸结合的分子包括正义和反义寡核苷酸,其包含能够结合靶LY6mRNA或DNA序列的单链核酸序列(RNA或DNA)。依照本发明,反义或正义寡核苷酸包含LY6DNA编码区或其互补物的片段。根据编码给定蛋白质的cDNA序列来衍生反义或正义寡核苷酸的能力在例如Stein和Cohen, Cancer Res. 48:2659, 1988及van der Krol等, BioTechniques 6:958, 1988中有记载。

[1177] 能与LY6基因杂交的正义和/或反义寡核苷酸对于例如依照本发明检测LY6DNA或mRNA在哺乳动物的胃肠组织或细胞的组织或细胞样品中的存在是有用的。依照本发明使用的正义和/或反义化合物可方便且常规地通过众所周知的固相合成技术来制备。有几家供应商销售用于此类合成的设备,包括例如Applied Biosystems (Foster City, Calif.)。另外/或者,可采用本领域已知的用于此类合成的任何其它手段。众所周知,可使用类似技术来制备寡核苷酸,诸如硫代磷酸酯和烃基化衍生物。本发明的化合物还可与其它分子、分子结构或化合物的混合物混合、胶囊化、偶联或以其它方式组合,形成例如脂质体、受体靶向分子、口服的、直肠的、表面的或其它配制剂,从而辅助摄取、分布和/或吸收。教导制备此类摄取、分布和/或吸收辅助制剂的专利包括但不限于美国专利No. 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,521,291; 5,543,158; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; 5,512,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; 和5,595,756,其每一个都纳入本文参考。

[1178] 正义和反义寡核苷酸包括但不限于在PCR、RT-PCR、杂交方法、原位杂交等等中有用的引物和探针。

[1179] 正义或反义寡核苷酸的其它例子包括那些与有机模块(诸如W090/10048中描述的)及能提高寡核苷酸对靶核酸序列亲和力的其它模块(诸如聚-(L-赖氨酸))共价连接的寡核苷酸。而且,嵌入剂(诸如玫瑰树碱)和烷化剂或金属络合物可附着于正义或反义寡核苷酸,以修饰反义或正义寡核苷酸对靶核苷酸序列的结合特异性。

[1180] 反义或正义RNA或DNA分子的长度一般是至少约5个核苷酸,或者长度为至少约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、或1000个核苷酸,其中该文中的术语“约”指所述核苷酸序列长度加或减该所述长度的10%。

实施例

[1181] 出于例示目的提供以下非限制性实施例,而非意图限制本发明的范围。除非另有

说明,实施例中提及的商品化试剂依照制造商的说明书使用。下文实施例和/或整篇说明书中以ATCC编号所鉴别的那些细胞系的来源是美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Manassas, VA) (ATCC)。

[1182] 实施例1:材料和方法

[1183] 试剂、细胞和小鼠:IFN γ 、TNF α 、和IL1 β 得自PeprotechTM (Rocky Hill, NJ)。IFN α 得自Hycult BiotechnologyTM (荷兰)。关于交联实验,抗KLH对照抗体,抗LY6A(克隆E13-161.7或D7)得自PharmingenTM (San Diego, CA)。抗LY6C(克隆HK1.4)得自Southern BiotechTM (Birmingham, AL)。

[1184] 如先前所述在Balb/c背景上的SCID小鼠中诱发慢性CD45RB^{high}转移结肠炎(Powrie, F.等, (1994) Immunity 1:553-562)。在11和13周龄之间处死发生了自发性结肠炎的、129背景上的IL10^{-/-}小鼠(Kuhn, R.等, (1993) Cell 75:263-274)。将结肠在OCT中急骤冷冻,直至如描述地在实验中使用。使用0-5分量表(0=正常的肠,5=重度疾病),对近端结肠、中端结肠、远端结肠和直肠评分。对每只动物将各得分相加,得到结肠炎严重程度总得分。

[1185] 年轻的成年小鼠结肠细胞(YAMC)细胞系(由Robert Whitehead (Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN)提供)衍生自ImmortomouseTM,一种含有在干扰素- γ 依赖性启动子控制下的温度敏感性T抗原(tsTag)的转基因动物,如先前所记载的(Whitehead, R.H.等, (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90:587-591)。YAMC细胞在存在5U/ml IFN- γ (PeprotechTM, New Jersey)的情况中在32°C容许性条件下增殖,但是在37°C在清除IFN- γ (非容许性条件)后不再增殖。

[1186] YAMC细胞在含有5%FBS、2mM L-谷氨酰胺、青霉素/链霉素、5U/ml IFN γ 和N-2补充物(InvitrogenTM, Carlsbad, CA)的RPMI中培养。在实验前将细胞在非容许性条件下培养24小时,而且在实验期间将细胞在非容许性条件下培养。

[1187] CMT93细胞得自ATCC (ATCC号®CCL-223TM, ATCC, Manassas, VA), 在含有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺、和青霉素/链霉素的DMEM中培养。

[1188] 激光捕捉显微术和RNA纯化:将10-12 μ m切片应用于LCM膜载玻片(Molecular MachinesTM, Glattbrugg, Switzerland)。将载玻片进行简化的H&E染色(总时间约5分钟),之后使用MMI CellcutTM显微镜(Molecular Machines, Glattbrugg, Switzerland)从组织学上鉴定并解剖隐窝上皮细胞。使用ArcturusTM PicopureTM RNA纯化试剂盒和制造商的方案(ArcturusTM, Sunnyvale, CA)自所解剖的细胞纯化RNA,并使用NanoDrop ND-1000TM分光光度计(NanoDrop TechnologiesTM, Wilmington, DE)定量。

[1189] 微阵列杂交和数据分析:分别使用ND-1000分光光度计(NanoDropTM Technologies, Montchanin, DE)和生物分析仪2100TM (AgilentTM Technologies, Palo Alto, CA)来测定输入总RNA样品的数量和质量。用于制备Cy染料标记的cRNA和阵列杂交的方法是由AgilentTM Technologies (Palo Alto, CA)提供的。简言之,将总RNA样品转化成双链cDNA,然后使用低RNA输入荧光线性扩增TM试剂盒(AgilentTM, 产品号5184-3523)转化成标记的cRNA。使用RNeasyTM迷你试剂盒(QiagenTM, San Diego, CA)纯化标记的cRNA,然后使用ND-1000TM分光光度计(NanodropTM Technologies)定量。通过在NovexTM TBE-尿素凝胶(InvitrogenTM, Carlsbad, CA)上运行标记的cRNA,接着在TyphoonTM扫描仪(GE HealthcareTM, Piscataway,

NJ) 上扫描凝胶来测定Cy染料掺入。为了测定Cy染料荧光计数的量,使用ImageQuant™软件(GE Healthcare™)分析凝胶图像。将大约500,000个计数的Cy染料标记的cRNA片段化,并杂交至Agilent的小鼠全基因组阵列,如Agilent的原位杂交试剂盒plus (Agilent™,产品号5184-3568)中所记载的。用Cy5染料标记LCM样品,并针对Cy3染料标记的通用小鼠参照物(Stratagene™,La Jolla,CA)杂交。杂交后,清洗阵列,用乙醇干燥,并在Agilent™ DNA微阵列扫描仪上扫描。使用Agilent™ s FeatureExtraction™软件7.5分析阵列图像文件,并使用Resolver™ (Merck™,Seattle,WA)实施进一步的数据分析。

[1190] 使用Rosetta Resolver™软件(Rosetta Biosoftware™,Seattle,WA)分析数据。简言之,将健康的和结肠炎的样品分组分开,并选择通过了双尾anova ($p < 0.05$) 的探针。对这些探针进一步分析用于在结肠炎样品对健康样品中展示两倍或更大变化的探针。

[1191] 实时定量RT-PCR: 使用Taqman™ Gold™ RT-PCR试剂盒和试剂(AppliedBiosystems™,Foster City,CA)对所提取的RNA实施RT-PCR。使用5'-FAM和3'-TAMRA标记的内部探针运行所有样品及基因特异性引物。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法,如文献中所记载的(Livak,K.J.,和T.D.Schmittgen (2001) Methods 25:402-408),实施分析,与持家基因SPF31特异性引物进行比较。引物和探针使用Primer3™软件(Rozen,S.,和H.Skaletsky (2000) Methods Mol Biol 132:365-386)设计或通过商业途径获得(Applied Biosystems™)。这些测定法所使用的引物和探针如下(以5'-3'方向显示):

[1192] LY6A:

[1193] 有义:CTT ACC CAT CTG CCC TCC TA (SEQ ID NO:39)

[1194] 反义:CCT CCA TTG GGA ACT GCT AC (SEQ ID NO:40)

[1195] 探针:TCC TGT TGC CAG GAA GAC CTC TGC (SEQ ID NO:41)

[1196] LY6C:

[1197] 有义:ACT TCC TGC CCA GCA GTT AC (SEQ ID NO:42)

[1198] 反义:GGC ACT GAC GGG TCT TTA GT (SEQ ID NO:43)

[1199] 探针:CTG CCG CGC CTC TGA TGG AT (SEQ ID NO:44)

[1200] 免疫荧光染色:将冷冻组织切成5μm切片并用生物素化抗LY6C (Southern Biotech™,Birmingham,AL)或抗SCA-1 (在2.5ng/ml) (R&D Systems™,Minneapolis,MN)染色。将切片清洗并用偶联有链霉亲和素的Alexa Fluor™ 488标记,使用Prolong Gold™及DAPI (Invitrogen™,Carlsbad,CA)制片,并通过共焦显微术显现。

[1201] 交联LY6分子:通过将YAMC细胞与板结合的抗LY6C或抗KLH(对照)抗体一起温育并测量趋化因子CXCL2、CXCL5、和CCL7的生成来测试交联的LY6多肽影响趋化因子生成的能力。因为细胞膜中的脂筏形成要求交联,所以在正常筏形成的条件下(没有胆固醇消减)和在胆固醇消减的条件下测试趋化因子生成。

[1202] 对于使用板结合的抗体的交联,将100μl抗LY6C或抗KLH(对照)抗体以5μg/mL浓度添加至96孔板,或者将2mL添加至60mm²皿,并容许于4℃结合板15小时。将在消减或不消减胆固醇的条件中培养的YAMC细胞(如本文中实施例5中所提供的)与板结合的抗体一起在没有胆固醇消减条件下于32℃温育15小时。收集RNA,并测定CXCL2、CXCL5、和CCL7的表达水平。本文中实施例5中进一步描述了该测定法,并显示了结果。

[1203] siRNA抑制:针对鼠LY6C的各种siRNA得自Dharmacon (Lafayette,CO)。使用

lipofectamine 2000 (Invitrogen) 和标准方案将siRNA转染入YAMC细胞。转染后72小时,收集细胞以测定敲除效率。基于卓越的敲低效率(根据定量RT-PCR为95%抑制),选择一种siRNA用于交联实验。

[1204] CXCL5分泌:在所示时间点自经过刺激的细胞收集上清液,并使用来自R&D Systems™的商品化试剂盒和制造商的方案通过ELISA测定细胞因子CXCL5浓度。检测水平是15pg/ml CXCL5。

[1205] 胆固醇消减(depletion):将YAMC细胞在存在4μM lovastatin和250μMmevalonate (Sigma) 的情况中在不含血清的培养基中于37℃培养72小时。将细胞铺板,并在整个实验期间维持在lovastatin和mevalonate中。

[1206] 统计学:使用Student氏t检验来进行各组之间的比较(*指示 $p < 0.05$)。

[1207] 实施例2:IEC的基因表达样式在结肠炎期间改变了

[1208] 研究指出IEC的基因表达样式在结肠炎的小鼠模型以及人IBD中显著改变(Fahlgren,A.,等(2004) Clin Exp Immunol 137:379-385;Brand,S.等(2006) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290:G827-838;Ruiz,P.A.等(2005) JImmunol 174:2990-2999)。在此实施例中,检查了健康的和结肠炎的小鼠的IEC中所评估的基因表达样式,以阐明在IBD中改变的新基因和途径。

[1209] 试图通过评估来自CD45RB^{hi}T细胞转移结肠炎小鼠模型以及IL1^{-/-}小鼠模型的肠上皮细胞(IEC)来鉴定IBD免疫病理学所涉及的基因,这两种小鼠模型都源自Th1失调且共享人克罗恩氏病的许多特征(Elson,C.O.等(2005) Immunol Rev 206:260-276;Bouma,G,和W.Strober(2003) Nat Rev Immunol 3:521-533)。使用激光捕捉显微切割(LCM)自健康的和结肠炎(两种鼠IBD模型中的)的小鼠的结肠分离隐窝IEC。自这些样品提取RNA,并通过微阵列技术分析,如实施例1中所描述的。转移结肠炎模型中结肠炎小鼠的IEC的基因表达序型鉴定出1770种探针有与对照小鼠相比>2倍的表达变化,而IL10^{-/-}模型鉴定出1140种探针。这两种模型交叠,有540种探针有>2倍的表达变化,对应于大约400种不同基因(数据未显示)。

[1210] 实施例3:结肠炎期间IEC中受影响的途径和基因

[1211] 在这两种模型中都受影响的大约400种基因中,抗原呈递、TLR信号传导和细胞迁移所涉及的基因占多数(表7)。在表7中,数值表示IL10^{-/-}结肠炎模型或CD45RB^{hi}结肠炎模型中结肠炎小鼠较之健康小鼠,与通用标准RNA相比的倍数变化的均值及标准偏差,如所标示的。结果指示有些IEC表达基因在IBD鼠模型中显示改变的表达样式。这些基因中许多种(包括TLR2、CCL7、CXCL5和ICAM-1)先前已经描述为在结肠炎期间具有升高的上皮表达(Breider,M.A.等(1997) Vet Pathol 34:598-604;Uguccioni,M.等(1999) AmJ Pathol 155:331-336;Z'Graggen,K.等(1997) Gastroenterology 113:808-816;Singh,J.C.等(2005) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 288:G514-524),提示在这些微阵列中得到的基因表达样式精确反映了结肠炎中IEC的生物学。

[1212] 表7

[1213] 倍数变化(p值):

[1214] 细胞迁移 IL10^{-/-}模型 CD45RB^{hi}模型

[1215]

CXCL1	+3.89 (<0.0001)	+2.09 (0.00066)
CXCL5	+21.82 (<0.0001)	+23.34 (<0.0001)
CXCL13	+3.01 (<0.0001)	+2.85 (<0.0001)
CCL6	-3.47 (<0.0001)	-2.5 (<0.0001)
CCL7	+4.2 (<0.0001)	+5.54 (0.00026)
CCL11	-3.43 (<0.0001)	-3.6 (0.00607)

[1216] TLR信号传导

[1217]

TLR2	+2.15 (<0.0001)	+2.68 (<0.0001)
Fos	+3.64 (<0.0001)	+2.03 (<0.0001)
LBP	+2.34 (<0.0001)	+2.57 (<0.0001)
NFKBIA	+2.37 (<0.0001)	+2.15 (<0.0001)

[1218] 抗原呈递

[1219]

H2-D1	+2.77 (<0.0001)	+2.23 (<0.0001)
HLA-A	+2.83 (<0.0001)	+2.40 (<0.0001)
HLA-B	+2.71 (<0.0001)	+2.44 (<0.0001)
HLA-E	+2.31 (<0.0001)	+2.34 (<0.0001)
ICAM-1	+2.51 (<0.0001)	+2.587 (<0.0001)
PSMB8	+8.10 (<0.0001)	+3.09 (<0.0001)
PSMB9	+6.61 (<0.0001)	+2.72 (<0.0001)
TAP1	+4.05 (<0.0001)	+4.10 (<0.0001)
TAP2	+2.08 (<0.0001)	+2.18 (<0.0001)

[1220] IEC能发挥非专职APC的功能 (Snoeck,V.等,(2005) *Microbes Infect* 7:997-1004; 及Shao,L等,(2005) *Immunol Rev* 206:160-176),而且在这些微阵列中得到的基因表达样式指示这些能够在结肠炎期间通过与抗原加工有关的基因(诸如LMP7和TAP1)以及I型和II型MHC基因(它们有助于增强抗原在IEC表面上的呈递)的上调而得到增强。

[1221] 微阵列数据支持结肠炎IEC经由改变的趋化因子表达将免疫细胞吸引至结肠且通过与抗原呈递有关的基因的表达上调将抗原呈递给浸润T细胞的概念。

[1222] 实施例4:LY6家族成员的表达在结肠炎IEC表面上强烈上调

[1223] 小鼠LY6分子家族的成员在数目以及上调程度方面在转移结肠炎小鼠模型和IL 10^{-/-}小鼠模型二者中都占多数(图23A和23B)。转移结肠炎模型合并的和扩增的IEC RNA的实时定量RT-PCR证实了这些结果(数据未显示)。LY6家族成员的表达对于疾病状态是独特的,因此无一健康小鼠表达明显水平的任何这些LY6家族成员。

[1224] 虽然已知鼠LY6分子在造血起源的细胞的表面上表达,但是先前没有记载在IEC上表达 (Bamezai,A.(2004) *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 52:255-266; 及Rock,K.L.等(1989) *Immunol Rev* 111:195-224)。能检测到鼠LY6A和LY6C在结肠内所存在的许多非上皮细胞上的表达,诸如T细胞和粒细胞。对健康的和结肠炎的结肠上的鼠LY6A和LY6C二者实施

了免疫荧光染色。鼠LY6A和LY6C在健康IEC表面上的水平是最低限度的或缺失(分别为图24A和24C)。能在结肠炎小鼠的整个结肠的IEC的表面上检测到鼠LY6A和LY6C二者的表达(分别为图24B和24D)。没有LY6A或LY6C极化(polarization)的证据,而且顶膜和基底外侧膜上都有染色,使得LY6分子对于任一表面上的配体是潜在可及的。这些结果指示鼠LY6A和LY6C在鼠结肠炎模型中上调的微阵列分析结果不是由于污染免疫细胞的流入。

[1225] 实施例5:LY6基因的转录受到炎症趋化因子的刺激

[1226] T细胞上的LY6表达受I型和II型这两类IFN的诱导和增强(Khodadoust,M.M., K.D.Khan,和A.L.Bothwell.1999.Complex regulation of Ly-6E genetranscription in T cells by IFNs.J Immunol 163:811-819)。另外,许多细胞因子在结肠中的表达在活动性结肠炎期间升高(Niessner,M.,和B.A.Volk.1995.Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR).Clin Exp Immunol 101:428-435)。

[1227] 为了确定结肠炎期间存在的细胞因子是否影响IEC中LY6家族成员的转录,我们用IL-1 β 、IFN α 、TNF α 、IFN γ 或TNF α +IFN γ 组合处理YAMC细胞(一种条件性永生化鼠IEC系),并通过实时定量RT-PCR分析所有所鉴定的鼠LY6基因的转录(表8)。简言之,在用所示细胞因子处理15小时后通过实时定量PCR测定IEC中所示LY6家族成员的mRNA水平。数值代表对未处理的培养基对照的倍数变化(通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法测定的)。*, $P<0.05$,相对于培养基对照。†, $p<0.05$,相对于IFN γ 处理的细胞。对以下LY6家族成员进行了测试,但是在样品中没有检测到,不管是否进行了处理:LY6K,Lypd3,Lypd4,Lypd5,LY6g5b,LY6g6d,LY6g6e,Slurp1。结果指示IEC应答炎症细胞因子而上调LY6家族成员。

[1228] 表8

	培养基	IL1 β	TNF α	IFN α	IFN γ	IFN γ & TNF α
Ly6A	1.0	1.8*	2.2*	2.8*	33.1*	65.4*†
Ly6C	1.0	1.6*	1.2*	2.4*	65.6*	63.6*
Ly6D	1.0	2.7*	2.1*	1.5*	1.0	0.9
Ly6E	1.0	1.4*	1.5*	2.1*	1.9*	2.9*†
Ly6F	1.0	2.5*	0.6*	7.1*	108.2*	169.7*†
Ly6H	1.0	1.0	1.1	1.2	3.7*	1.4†
Lypd1	1.0	1.5*	2.1*	1.3*	1.3*	2.9*†
Lypd2	1.0	0.1*	ND	0.4*	0.1*	ND
Ly6g5c	1.1	1.3	0.8	0.9	1.3	1.1
Ly6g6c	1.0	0.7	0.7	0.6	0.6*	0.3*†
Slurp2/Lynx1	1.1	0.7	0.4	0.7	1.5	0.4*

[1230] 虽然在存在或缺乏炎性细胞因子的情况中没有检测到许多LY6家族成员,但是我们检测到鼠LY6A、LY6C和LY6F的转录应答大多数所测试的细胞因子的强上调,以及鼠LY6E、LY6H和LYPD1应答一些所测试的细胞因子的较适度的上调。然而,IFN γ 是迄今在诱导LY6上调中最有力的细胞因子。另外,TNF α 增强IFN γ 对LY6A、LY6F、LY6E和LYPD1表达的效应。在另一种鼠IEC系CMT93中看到类似的LY6家族成员上调(数据未显示)。

[1231] 为了检查应答细胞因子的LY6家族成员表面表达,将YAMC细胞暴露于上述细胞因子并通过流式细胞术分析鼠LY6A和LY6C(可获得它们的商品化抗体)的表达,如本文中实施例1中所描述的。YAMC细胞上表达高水平的鼠LY6A,甚至在缺乏所添加的细胞因子的情况中也是这样(图25B,培养基)。鼠LY6C的表达(图25A,培养基)比LY6A的表达低得多。

[1232] IL-1 β 和TNF α 诱导鼠LY6A和LY6C二者表面表达的轻微升高,与RNA表达一致(图25A和25B)。在向细胞添加IFN α 时记录到较适度的表达升高,而IFN γ 诱导LY6A和LY6C二者表面表达的显著升高(图25A和25B)。表面蛋白质表达密切反映了RNA表达。Th2细胞因子,诸如IL4、IL10或IL13,对LY6A或LY6C任一的表面表达没有影响(数据未显示)。

[1233] IFN γ 对LY6A(图25D)和LY6C(图25C)的诱导是剂量依赖的。剂量低至6.25单位/ml的IFN γ 就导致通过流式细胞术可检测到的这两种LY6分子的升高。另外,LY6A(图25F)和LY6C(图25E)二者表面表达的升高在IFN γ 处理后2和4小时之间变得明显,而且在IFN γ 处理后至少24小时稳定地升高。此数据指示相对较低浓度的IFN γ 就足以在几小时内提高LY6分子的表面表达。

[1234] 有证据表明IL-22(其主要由活化的T细胞分泌)通过IEC上存在的IL-22R复合物来发挥功能,以促进细胞因子生成和炎性表型(Brand,S.F.等,Am JPhysiol Gastrointest Liver Physiol 290:G827-838(2006))。另外,IL-22涉及克罗恩氏病的免疫发病机理。为了检查IL-22是否影响鼠IEC上的LY6分子表达,在存在IL-22的情况中培养YAMC细胞,并分析LY6C(图25G)和LY6A(图25H)的表达。这两种LY6分子在存在IL-22的情况下实质性升高,所述IL-22的水平与IFN γ 处理后诱导所见的IL-22水平相当。

[1235] 为了确认LY6分子的上调不是YAMC细胞系所特有的,检查了鼠结肠上皮肿瘤细胞系CMT93中鼠LY6A和LY6C的RNA水平。鼠LY6A和鼠LY6C二者的水平在IFN γ 处理后上调(图25I)。虽然LY6分子的上调水平在CMT93细胞中是更加适度的,但流式细胞术分析指示水平是相当高的,甚至在未处理细胞中也是这样(数据未显示),这可能是由于CMT93细胞的肿瘤表型。

[1236] 此数据支持通过实时定量RT-PCR得到的数据,确认了IEC应答炎性细胞因子而上调LY6家族成员。

[1237] 实施例6:IEC的LY6刺激与脂筏形成有关

[1238] 作为GPI锚定蛋白,LY6家族成员不拥有与传统的从外向内信号传导有关的独特胞内域。更确切地说,它们存在于脂筏微域内(Bohuslav,J.等Eur JImmunol 23:825-831(1993))。然而,已经提出,细胞表面上LY家族成员的交联导致其它细胞表面分子的重新分布以及脂筏结构的重新组织,提示一种机制,LY6分子通过该机制能影响信号转导和下游细胞功能(Simons,K.等,NatRev Mol Cell Biol 1:31-39(2000))。

[1239] 迄今已经鉴定了LY6蛋白的少数配体,但当前不知道LY6A或LY6C的配体(Paret,C.等,(2005)Int J Cancer 115:724-733;Apostolopoulos,J.等,(2000)Immunity 12:223-

232;及Classon,B.J.(2001) Trends Immunol.22:126-127)。维持脂筏完整性需要胆固醇(Simons,K.,等J Clin Invest 110:597-603(2002)),而且在体外常常使用胆固醇的消减来抑制脂筏生物合成(von Tresckow,B.等J Immunol 172:4324-4331(2004))。

[1240] 为了分析在IEC中是否应答LY6交联而发生脂筏重新组织,在胆固醇消减条件(自细胞消减脂筏的条件)和没有胆固醇消减条件(容许脂筏形成的条件)下培养YAMC细胞。对于胆固醇消减条件,将YAMC细胞在缺乏血清和存在4 μ M lovastatin和0.25mM mevalonate(Sigma Chemical Co.,St.Louis,MO)的情况中于37 $^{\circ}$ C培养72小时。将相同的培养条件用于没有胆固醇消减条件下的YAMC细胞,只是不向生长培养基中添加lovastatin或mevalonate。然后取出细胞并交联LY6C,如上文实施例1中所描述的。收集RNA并测定CXCL2、CXCL5、和CCL7的表达水平。

[1241] 这些研究的结果指示脂筏消减导致对LY6C介导的趋化因子生成的抑制。图26A-26C显示了胆固醇消减的(暗色柱)YAMC细胞生成的趋化因子比不消减胆固醇的细胞(空心柱)要少。胆固醇消减影响对照抗KLH刺激组中的趋化因子生成,不管LY6C刺激,然而,响应是最低限度的,而且方向不一致。为了检查胆固醇消减是否总体上影响细胞存活力,我们测量了细胞死亡(通过7AAD排除),并且确定了胆固醇消减不显著影响YAMC细胞存活力(92%存活力对胆固醇消减细胞中的86%,数据未显示)。LY6A(图26D)和LY6C(图26E)二者的表面表达在胆固醇消减的YAMC细胞中都显著较低,提示质膜胆固醇水平和脂筏完整性影响细胞表面上的LY6表达水平。此数据提示受胆固醇生物合成影响的脂筏完整性容许LY6分子在表面上表达,而且潜在涉及LY6C介导的对趋化因子的诱导。如此,由细胞膜中LY6C多肽相互作用介导的趋化因子生成增强要求细胞表面上存在脂筏。

[1242] 实施例7:交联LY6C导致LY6分子的表面表达升高

[1243] 已有报告,交联T细胞表面上的LY6C导致LY6C脱落(Jaakkola,I.等(2003) J Immunol 170:1283-1290)。然而,与T细胞不同,在交联IEC表面上的鼠LY6C时,没有发生LY6A或LY6C任一的脱落(分别为图27A和27B)。相反,在缺乏IFN γ 时,LY6A和LY6C二者的表面表达水平在有交联的LY6C而非LY6A的IEC上升高。在将IEC与IFN γ 一起预温育时,此效应大大消除(图27C),然而仍检测到LY6A的轻微上调(图27D)。

[1244] 这些数据指示正反馈环,经由IEC上LY6C的刺激由此导致LY6分子的表面表达升高。

[1245] 实施例8:LY6A刺激导致趋化因子分泌升高

[1246] 尚未完全阐明LY6分子的功能。为了检查LY6分子在结肠炎的免疫病理学中的作用,研究LY6分子的刺激对来自IEC的趋化因子转录和分泌的影响。

[1247] 为了分析来自IEC的、应答鼠LY6分子交联的趋化因子生成,在经抗KLH对照抗体、抗LY6A或抗LY6C包被的板上培养经过或未经IFN γ 预处理的YAMC细胞。24小时后,自这些细胞获得mRNA,并通过定量RT-PCR分析CCL2、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL25、CXCL1、CXCL2、CXCL5、CXCL10、CXCL12和CX3CL1的表达,它们是已经与结肠炎联系起来的趋化因子(表9)(Papadakis,K.A.(2004) Curr Allergy Asthma Rep 4:83-89;Banks,C.等,(2003) J Pathol 199:28-35;及Papadakis,K.A.,和S.R.Targan(2000) Inflamm Bowel Dis 6:303-313)。该测定法是在非容许性生长条件下实施的(37 $^{\circ}$ C,缺乏IFN γ),以排除IEC增殖应答IFN γ 刺激而升高的可能性。

[1248] 表9

[1249]	预处理>	培养基			IFN		
	交联>	抗KLH	抗LY6A	抗LY6C	抗KLH	抗LY6A	抗LY6C
	CCL2	1.01	-1.38	8.81	3.53	2.83	16.12
[1250]		(0.14)	(0.13)	(0.72)	(0.21)	(0.21)	(0.56)
	CCL4	1.31	1.83	3.15	5.35	3.65	16.12
		(1.14)	(0.49)	(1.17)	(0.48)	(0.69)	(0.56)
	CCL5	1.00	1.09	3.31	2.73	2.76	10.13
		(0.10)	(0.02)	(0.15)	(0.13)	(0.23)	(0.27)
	CCL7	1.00	1.06	3.37	2.82	1.39	5.81
		(0.11)	(0.08)	(0.15)	(0.44)	(0.33)	(0.51)
	CCL8	1.03	2.05	12.78	74.22	74.44	110.44
		(0.30)	(0.37)	(3.14)	(8.94)	(9.81)	(3.36)
	CCL25	1.01	1.06	1.16	1.38	1.32	1.46
		(0.16)	(0.11)	(0.00)	(0.36)	(0.15)	(0.19)
[1251]	CXCL1	1.00	-3.17	11.58	-1.13	-1.64	13.36
		(0.07)	(0.11)	(0.12)	(0.10)	(0.17)	(0.35)
	CXCL2	1.33	ND	21.81	14.30	10.95	113.20
		(1.10)		(3.13)	(3.30)	(3.05)	(16.23)
	CXCL5	1.08	ND	118.45	1.70	ND	150.99
		(0.53)		(65.14)	(1.15)		(55.50)
	CXCL10	1.00	1.02	5.11	5.68	5.22	12.22
		(0.05)	(0.06)	(0.19)	(0.31)	(0.22)	(0.51)
	CXCL12	1.01	1.12	-1.99	-1.11	-1.23	-3.02
		(0.14)	(0.05)	(0.14)	(0.05)	(0.21)	(0.06)
	CX3CL1	1.00	-1.18	1.92	2.21	1.87	3.22
		(0.08)	(0.15)	(0.07)	(0.11)	(0.16)	(0.42)

[1251] 经IFN γ 预处理的细胞显示出这些趋化因子基因中有许多趋化因子基因上调(见

表9的培养基、抗KLH组对IFN γ 、抗KLH组)。然而,除了CCL8的上调和CXCL1的下调例外,抗LY6A刺激的YAMC细胞显示出与抗KLH刺激的YAMC细胞相似的基因表达样式。然而,用抗LY6C刺激的YAMC细胞显示出除了CCL25(它保持基本上不变)和CXCL12(它应答LY6C刺激而下调)以外的所有所分析的趋化因子表达升高。虽然由LY6C交联诱导的趋化因子基因表达升高不依赖于IFN γ ,但是用IFN γ 预处理的细胞显示出较之未用IFN γ 预处理的细胞升高的趋化因子表达。

[1252] 为了分析由鼠LY6C刺激诱导的趋化因子诱导的动力学,用抗KLH抗体或者抗LY6A或抗LY6C单克隆抗体包被96孔板。添加经过IFN γ 预处理的或未经IFN γ 预处理的YAMC细胞达24、48或72小时。在所示时间点,收集RNA供定量RT-PCR分析用,并收集上清液供ELISA用。

[1253] 在24小时内,在具有交联LY6C而非LY6A的细胞上检测到CXCL5和CCL7二者转录中的峰(图28A)。升高的CXCL5和CCL7表达随时间降低,但是在72小时后在培养物中仍能检测到。虽然IFN γ 不是增强趋化因子转录所要求的,但是IFN γ 与LY6C刺激在早期时间点诱导CXCL5和CCL7二者转录中起协同作用。

[1254] 与基因表达平行,LY6C而非LY6A交联细胞的上清液在48小时时含有显著较高浓度的CXCL5(图28B)。该效应是剂量依赖性的,而且在少至1 μ g/ml的包被抗LY6C时就能检测到。与转录一样,CXCL5的分泌在用IFN γ 预处理细胞时得到增强,但是IFN γ 不是该效应所要求的。在24和72小时时间点也记录到升高的CXCL5分泌。

[1255] 为了确认LY6C涉及所观察到的趋化因子上调,我们使用siRNA来敲低LY6C。根据实时定量RT-PCR,LY6C转录物在缺乏IFN γ 的情况中受到约95%抑制,而在存在IFN γ 的情况中为约90%,这符合YAMC细胞表面上显著较低水平的LY6C(数据未显示)。在表面上具有降低水平的LY6C的细胞在趋化因子转录方面显示出降低的对LY6C交联的响应(图28C)。CXCL5的分泌也受到敲低LY6C的显著抑制(数据未显示)。

[1256] 这些结果指示IEC表面上LY6C而非LY6A的交联导致趋化因子分泌升高。

[1257] 实施例9:体内IEC显示了与LY6C刺激的细胞类似的趋化因子基因表达

[1258] 上述数据确立了一种模型,经由鼠LY6C刺激的IEC由此显著上调趋化因子基因的表达。

[1259] 分析来自结肠炎鼠模型中激光捕捉显微切割的IEC的微阵列数据,检查了相同12种趋化因子基因在健康的和结肠炎(两种结肠炎鼠模型中的)的小鼠中的表达以确定在体外受LY6C交联刺激的趋化因子是否与在体内由IEC分泌的趋化因子有关联(图29A和29B)。虽然表达样式与源自LY6C刺激的趋化因子的上调不相同,但是CXCL5(在体外研究最高度上调的趋化因子基因)的表达也是在鼠结肠炎模型中最高上调的趋化因子。我们看到CXCL1、CXCL10、CCL5和CCL7在这两种结肠炎模型中的表达的显著上调。另外,我们看到CCL4和CCL8分别在转移结肠炎模型或IL10^{-/-}模型中的上调。

[1260] 有趣的是,唯一在体外因为鼠LY6C刺激而下调的趋化因子CXCL12也是这些趋化因子中唯一在体内下调的。

[1261] 实施例10:人LY6基因在结肠细胞中的表达

[1262] 检查了人LY6H、LYPD1、LYPD3、和LYPD5在人结肠细胞系Co1o 205细胞(一种自人结肠癌瘤衍生的细胞系,ATCCTM编号CCL-222TM)中的表达。将人Co1o 205细胞用细胞因子IFN- γ 、LPS、TNF α 、IFN- γ +TNF α 、IFN- γ +LPS、或LPS+TNF α (都是100ng/ml,只有LPS是1 μ g/ml)处理

18小时 (LYPD3) 或24小时 (LY6H或LYPD5)。收集并纯化RNA,使用来自Applied Biosystems™的试剂依照制造商的指示通过定量RT-PCR测定所示LY6家族成员的表达。RT-PCR分析所使用的引物和探针如下:

[1263] LYPD1:

[1264] 有义:CAT GAT CCT CCG AAT CTG GT (SEQ ID NO:59)

[1265] 反义:AGC ACA GAA CAG AGG GGC TA (SEQ ID NO:60)

[1266] 探针:ATA CGG CCAATG TCA CAA CA (SEQ ID NO:61)

[1267] LYPD3:

[1268] 有义:ACT TCC TGT TCC CAC CAC TG (SEQ ID NO:62)

[1269] 反义:AGA GGA CAA GCG GAG AGA CA (SEQ ID NO:63)

[1270] 探针:TTC TGG CAG GGG TGT TCT AG (SEQ ID NO:64)

[1271] LY6H:

[1272] 有义:AGC AGC AGC AGG AAG GAT (SEQ ID NO:65)

[1273] 反义:AAA AGT GCC GCT TAA CGA AG (SEQ ID NO:66)

[1274] 探针:CAA GAT GTG TGC TTC CTC CTG CGA (SEQ ID NO:67)

[1275] LYPD5引物和探针购自Applied Biosystems™ (产品目录号HS00289062_m1)。

[1276] 图30A-30C中绘制的结果指示这些人LY6基因表达相对于人β-肌动蛋白对照的倍数增加。在用所示细胞因子处理后观察到人LY6H、LYPD3、和LYPD5表达的显著升高。

[1277] 实施例11:人LY6基因在结肠活检组织中的表达

[1278] 为了进一步研究CD和UC患者结肠中升高的LYPD1和LYPD5表达的来源,采集了UC、CD患者和对照的一组活检。使用自结肠活检提取的RNA进行的LYPD1表达微阵列分析显示了CD患者炎症结肠组织中统计学意义上升高的表达(图31A)。在取自结肠的UC和CD活检中,在炎症UC和CD患者中观察到统计学意义上升高的LYPD5表达(图31B)。这在非炎症对照活检中没有观察到。

[1279] 使用RT-PCR (Taqman™) 分析,相对于对照(非IBD)回肠末端活检,分析了炎症IBD组织的回肠末端活检中的人LY6H表达。炎症IBD活检中的人LY6H表达比对照高,至少是1.5倍。

[1280] 炎症UC结肠活检中的人LYPD3表达上调,而且炎症IBD活检比对照高,少于2倍。

[1281] 这些实施例的结果证明了IEC表面上LY6分子的表达,而且进一步指示所述表达对于炎症背景中的IEC是独特的。另外,结肠炎小鼠IEC上LY6A和LY6C的表面表达水平是高的,而且整个结肠几乎普遍的。因为这些分子是患病状态所特有的,而且在疾病期间遍在表达,人LY6基因或多肽表达(特别是人LY6H、LYPD1、LYPD3、和LYPD5)的检测成为用于检测人体中IBD(包括UC和/或CD)的有用方法。另外,检测人LY6表达的方法对于诊断人体中的IBD、UC和/或CD和监测对IBD治疗剂的响应是有用的。

[1282] 在本文中所公开的实施例中证明了IEC中LY6表达的功能意义。YAMC细胞对于LY6A是强阳性的,而且表达较低水平的LY6C。然而,在用结肠炎期间结肠内存在的许多细胞因子(包括IL-1β、TNFα、IFNα、和特别是IL-22和IFNγ)刺激后,这两种LY6分子的表达水平大大增强。用IFNγ预处理以上调LY6分子表达的YAMC细胞是用于分析LY6表达的功能意义的有用体外模型。

[1283] YAMC细胞的条件性衍生化性质来自MHC II启动子驱动的SV40大T抗原表达;使用

低水平 (2.5–5U/ml) 的 IFN γ 来驱动这些细胞的增殖 (Whitehead, R.H. 等 (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:587–591; Whitehead, R.H., 和 J.L. Joseph. (1994) *Epithelial Cell Biol* 3:119–125)。YAMC 细胞常常用作鼠 IEC 细胞因子处理的体外模型 (Mei, J.M. 等 (2000) *Faseb J* 14:1188–1201; Yan, F., 和 D.B. Polk (2002) *J Biol Chem* 277:50959–50965)。这些细胞所含有的 SV40 大 T 抗原对温度敏感, 而且在 37°C 没有功能。本文中所实时的所有实验涉及这些非容许性条件下的 IFN γ 处理。另外, 在实验前将 YAMC 细胞于 37°C 血清饥饿 (和 IFN γ 饥饿) 24 小时。在此类条件下, 没有观察到指示残余 T 抗原表达的效应, 诸如细胞增殖。因此, IFN γ 处理的效应是由于 IFN γ 的内在效应, 而非源于驱动 T 抗原表达的效应。另外, 在第二种鼠细胞系 CMT93 中检测到 LY6 家族成员的上调, 证实了这是广泛适用于 IEC 的效应。

[1284] 另外, IFN γ 不是诱导 LY6 分子的唯一细胞因子, 因为在用 TNF α 、IL-1 β 和 IL-22 处理后记录到适度的 LY6 表达上调。IEC 上应答 IL-22 的 LY6 分子上调是有趣的, 因为最近的数据证明 IL-22 在克罗恩氏病中的潜在作用 (Wolk, K., 等 *J Immunol* 178:5973–5981 (2007))。虽然小鼠与人 LY6 分子之间的同源性常常是复杂的, 但是有证据提示 LY6 分子的上调不局限于小鼠。先前在大鼠中进行的研究已经提出结肠炎模型中小肠中 LY6 分子的上调, 而且已经提出此类表达涉及炎症、细胞/细胞相互作用以及大鼠 IEC 内的信号传导 (Baksheev, L. 等 *J Gastroenterol* 41:1041–1052 (2006))。

[1285] 上文所述数据指示存在脂筏完整性涉及 IEC 中 LY6C 介导的信号传导的可能性。这暗示破坏脂筏可能会通过下调 LY6C 表达和破坏 LY6C 信号传导的结构构件而削弱 LY6C 刺激的下游效应。最近, 已经确定了用他汀类药物对 IEC 进行胆固醇消减通过 NF- κ B 调控而抑制促炎性基因表达 (Lee, J. 等, *Int Immunopharmacol* 7:241–248 (2007))。另外, 他汀类药物是结肠炎鼠模型中的有效治疗剂 (Naito, Y. 等 *Int J Mol Med* 17:997–1004 (2006))。联系脂筏运动性与 NF- κ B 阻断的机制尚未确定, 但是我们的数据提示经由 LY6C 的活化可能是解释作用机制的一种解说。

[1286] 在此项研究中, 我们将 LY6 分子鉴定为趋化因子基因表达中的潜在上游开关。LY6C 受体与单克隆抗体的交联导致几乎所有所分析的趋化因子 (包括 CXCL5) 的显著上调。我们进一步证实了 CXCL5 分泌在 LY6C 交联的 IEC 中得到大大增强。有趣的是, 尽管 LY6A 和 LY6C 二者通过 GPI 模块而锚定至细胞表面, 而且尽管 IEC 表面上的 LY6A 表达水平高于 LY6C 的表达水平, 但对于 LY6C 交联看到了对趋化因子分泌的下游效应, 与 LY6A 交联不一致。

[1287] 实施例 12: LYPD5 的配体的鉴定

[1288] 在此项研究中, 通过本领域普通技术人员公知的技术实施对 LYPD5 的配体的搜索, 即在 CMV 启动子之下将大约 14,000 种人基因表达克隆入 COS 细胞。将 100 种基因的集合转染入在 12 孔板的 140 个孔中培养的 COS 细胞。转染后, 将细胞用 LYPD5-Fc 蛋白染色 (见图 32)。鉴定具有阳性染色的孔, 并将各个克隆转染入 COS 细胞。表达单一蛋白质 GLG-1 (ESL-1) 的单孔被鉴定为 LYPD5 的配体。GLG-1 的特征在于一个冗长的胞外域 (ECD)、一个跨膜域和一个胞质域。使用本领域普通技术人员知道的技术进行了一系列免疫共沉淀研究来评估 GLG-1 ECD 的各个区域结合 LYPD5 的能力。发现 GLG-1 ECD 的变体或片段 (见图 33–35) 能够充当 LYPD5 的配体。图 33B 显示了使用片段 1、2、3、或 4 进行的免疫共沉淀研究的结果, 如图 33A 中所描绘的, 并且证明了任一片段足以进行 LYPD5 结合。

[1289] 另外, 发现 GLG-1 ECD 域自身就能有效进行 LYPD5 结合。如图 33 中所示, GLG-1 由多

个GLG-1域构成,而且一个GLG-1域就能结合LYPD5。图34B显示了免疫共沉淀的结果,证明了片段1、2、3、和4,以及GLG-1单域115、150、215、538、609、670、729、和858 (如图34A中所示)能够结合LYPD5。

[1290] 通过另一项免疫共沉淀研究,显示出结合特异性的基于LYPD5的片段(见图35A),其中发现LYPD5不结合BAP阴性对照,发现FN14阴性对照不结合GLG-1片段2,人GLG-1域115结合LYPD5,域115并非总是以可检测的水平表达,但是仍拉下LYPD5,而且人GLG-1片段1缺乏域115 (残基26-114)的部分不结合LYPD5 (图35B)。

[1291] 图34A和35A中的“*”指示潜在岩藻糖基化位点。

[1292] 尽管为了清楚理解的目的已经通过举例说明的方式较为详细的描述了上述发明,说明书和实施例不应解释为限制发明范围。在此通过述及而明确收录本说明书中引用的所有专利和科学文献的完整公开内容。

序 列 表

<110> 健泰科生物技术公司 (Genentech Inc.)

<120> 用于检测炎症肠病的方法

<130> 39766-0296.PCT

<140> 还未指定

<141> 此处附带

<150> US 60/891,196

<151> 2007-02-22

<150> US 60/987,752

<151> 2007-11-13

<150> US 61/024,170

<151> 2008-01-28

<160> 69

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 957

<212> DNA

<213> 人 (Homo Sapiens)

<400> 1

[0001]

```

cgcgctgcg gctgcgttcc ccgaaagacg aggcctgcgcc cggattccgg tccgcaggga 60
gaccgaaggg cacagctccc cgcgccgcgc acgccgcccg agcccggagt gcggacaccc 120
ccgggatgct tgcgccccag aggaccgcgc cccaagccc ccgcgccgcc ccaggccca 180
ccggagcat gctgcctgca gccatgaagg gcctcggcct ggcgctgctg gccgtcctgc 240
tgtgctcggc gcccgcctcat ggccgtgtgt gccaggactg caccctgacc accaactcca 300
gccattgcac cccaagcag tgccagccgt ccgacacggt gtgtgccagt gtccgaatca 360
ccgatcccag cagcagcagg aaggatcact cggatgaaca gatgtgtgcc tcctcctgtg 420
acttcgttaa gcgacacttt ttctcagact atctgatggg gtttattaac tctgggatct 480
taaaaggtcga cgtggactgc tgcgagaagg atttgtgcaa tggggcggca ggggcagggc 540
acagcccctg ggcccctggc ggggggctcc tgctcagcct ggggcctgcc ctccctctgg 600
ctgggccctg atgtctctc ctccccacgg ggcttctgag cttgctcccc tgagcctgtg 660
gtgcccctct cccagcctg gcgtggctgg ggclgggggc agccttgccc cagctccgtg 720
gtgtggcct gtggctcica ctccctcccc gacgtgaagc ctccctgtct ctccgccagc 780
tgtgagtcac aggcagctgg acatctccag gaaaccaggc catctgggca ggaggcctgg 840
ggatgagggt ggggggggac cccaggtcc cggaggggaa gtgaagcaac agcccagctg 900
gaagggcgtc ttctgcggag aaataaagtc actlltgagt cctgagaaaa aaaaaa 957

```

<210> 2

<211> 140

<212> PRT

<213> 人 (Homo Sapiens)

<400> 2

```

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

```

65		70		75		80									
Lys	Arg	His	Phe	Phe	Ser	Asp	Tyr	Leu	Met	Gly	Phe	Ile	Asn	Ser	Gly
			85						90					95	
Ile	Leu	Lys	Val	Asp	Val	Asp	Cys	Cys	Glu	Lys	Asp	Leu	Cys	Asn	Gly
		100						105					110		
Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	His	Ser	Pro	Trp	Ala	Leu	Ala	Gly	Gly	Leu	Leu
		115					120					125			
Leu	Ser	Leu	Gly	Pro	Ala	Leu	Leu	Trp	Ala	Gly	Pro				
	130					135					140				

<210> 3

<211> 2683

<212> DNA

<213> 人(Homo Sapiens)

<400> 3

```

agggcggtgt caatgcaccc tccagcgggtg cgcgcaggcg ggagaaggga gggcgggccc 60
ggcaagttag acagtttaagg cagtgtcccc accacacccc caccagatt ggccacgccg 120
agctggttct tgacagaagg ccttcgcgga ggaagagggg gcacagctgc acaggacacc 180
ctacggagcc tgcgggcgtg gaactttgcc aggcgcacgg gaacgcgcgc ccttcctgtc 240
agcctcccg ggccgaggc tcccgcggcc cgcagcggga cagcctcagt tgtgtgggct 300
ggacccagtc gctggggtag cgaccagtc tggaaaggcg agaggacgtg gagggtggag 360
gttgccttcc tatgtgcgaa gggccagccg ggcacgcagt cctcagaccc tagtccgcac 420
ccggcaggtc cccacggcac ctgctgcgcc ctccctcgcc ccccccaac ctccccatct 480
cagaaaaacta ccagttctct cccgcccccc ggcccccctt tcccaggaac gtgcggaggc 540
gggagaagag gaagacagga agggggtggg gatgtgaagc gaccgtccca gccttccccg 600
cccgcacccc ccacccaac tcggcagccg tcacgtgatg cctggagtgg gagggtggga 660
gaaaaggcga gacttttgtg gggtctccc atcgccagta gtctctcag tctcagccgc 720
caactccgga ggcgcggltg tcggccccgg agcgcgagcg ggaggagcag agacccgcag 780
ccgggagccc gagcgcgggc gatgcaggct cgcgcagcgg caccgtgcgg tcctctaagc 840
tacgaccgtc gtctccgagg cagcagcgcg ggccccagca gcctcggcag ccacagccgc 900
tgacgccggg gcagcctccg ctgctgtcgc ctccctgatg gcgcttgccc tctccgggcc 960
ccgggactcc gggagaatgt ggttcttagc catcgcggca actttttgcg gattgttctt 1020
gttccaggc tttgcgtgc aaatccagt ctaccagtgt gaagaattcc agctgaacaa 1080
cgactgtctc tccccgagt tcatttgtaa ttgcacgggt aacgttcaag acatgtgtca 1140
gaaagaagt atggagcaaa gtgccgggat catgtaccgc aagtcctgtg catcatcagc 1200
ggcctgtctc atcgctctg ccgggtacca gtcttctgc tcccagggga aactgaactc 1260
agtttgcatc agctgtctga acacccctct ttgtaacggg ccaaggccca agaaaagggg 1320
aagttctgcc tcggccctca ggcagggct cgcaccacc atcctgttcc tcaaatagc 1380
cctcttctcg gcacactgct gaagctgaag gagatgccac cccctcctg attgttctc 1440
cagccctcgc ccccaacccc ccacctccc gagtgagttt cttctgggtg tcttttatt 1500
ctgggtaggg agcgggagtc cgtgttctct tttgttctg tgcaataat gaaagagctc 1560
ggtaaagcat tctgaataaa ttcagcctga ctgaattttc agtatgtact tgaagggaag 1620
agggtgagtg aaagtacacc ccatgtctg tgtaaccgga gtcaaggcca ggctggcaga 1680
gtcagtcctt agaagtcact gagggtgggca tctgctttt gtlaagcctc cagtgtccat 1740
tccatccctg atgggggcat agtttagagc tgcagagtga gagtgcgtt tcttagggc 1800
tggagggcca gtccaccac aaggctccct cgttgacat tcaaacttca tgcctctgaa 1860
aaccattctc tgcagcagaa ttggctgggt tcgcgcctga gttgggctct agtgactcga 1920
gactcaatga ctgggactta gactggggct cggcctcgct ctgaaaagtg ctttaagaaa 1980
tcttctcagt tctccttga gaggactggc gccgggacgc gaagagcaac gggcgctgca 2040
caaaaggggc gctgtcgggt gtggagtgcg catgtacgcg caggcgcttc tctgtgttg 2100
cgtgtctcag cgacaggcgg cagcacagca cctgcacgaa caccgcccga aactgtctgc 2160
aggacaccgt gtacaggagc gggttgatga ccgagctgag gtagaaaaac gtctccgaga 2220
aggggaggag gatcatgtac ccccggaagt aggacctcgt ccagtcgtgc ttgggttttg 2280
ccgcagccat gatctccga atctggttgg gcatccagca tacggccaat gtcacaacaa 2340
tcagcccttg gcagacagca gcaggaggga gagacagaga aaagaaaaac acagcatgag 2400
aacacagtaa atgaataaaa ccataaaaata tttagccct ctgttctgtg cttactggcc 2460
aggaaatggt accaattttt cagtgttggc cttgacagct tcttttgcca caagcaagag 2520
agaatttaac actgtttcaa acccggggga gttggctgtg tttaagaaag accattaaat 2580
gctttagaca gtgtatttat accagttgat gtctgttaat tttaaaaaaa tgttttcatt 2640
gggttttgtt tgcgtatcca gaaagcagtt catgttatcc ata 2683

```

[0002]

<210> 4
 <211> 1959
 <212> DNA
 <213> 人(Homo Sapiens)

<400> 4
 gatgcctgga gtgggaggtg gggagaaaag gcgagacitt tgggggtgct cccgatcgcc 60
 agtagttcct tcagttctcag ccgccaactc cggaggcgcg gtgctcggcc cgggagcgcg 120
 agcgggagga gcagagaccc gcagccggga gcccagcgcg gggcgaigca ggctccgcga 180
 gcggcacctg cggctcctct aagctacgac cgtcgtctcc gcggcagcag cgcgggcccc 240
 agcagcctcg gcagccacag ccgctgcagc cggggcagcc tccgctgctg tcgcctcctc 300
 tgatgcgctt gccctctccc ggccccggga ctccgggaga atgtgggtcc taggcatcgc 360
 ggcaactttt tgcggattgt tcttgcctcc aggttttgcg ctgcaaatcc agtgctacca 420
 gltgaagaa ttccagctga acaacgactg ctcttcccc gagttcattg tgaattgcac 480
 ggtagacgtt caagacatgt gtcagaaaga agtgaaggag caaagtgcg ggatcatgta 540
 ccgcaagtcc tgtgcatcat cagcggcctg tctatcgcc tctccgggt accagtcctt 600
 ctgctcccca gggaaactga actcagtttg catcagctgc lgcacacccc ctctttgtaa 660
 cgggccaagg cccaagaaaa ggggaagtgc tgcctcggcc ctcaggccag ggctccgcac 720
 caccatcctg ttcttcaaat tagccctctt ctccggcacac tgcgaagct gaaggagatg 780
 ccacccccct ctgcattgtt ctccagcccc tcgcccccaa cccccacct ccctgagtga 840
 gtttctctg gggtctctt tattctgggt agggagcggg agtccgtgtt ctctttgtt 900
 cctgtgcaaa taatgaaaga gctcggtaaa gatttctgaa taaattcagc ctgactgaat 960
 tticagtatg tacitgaagg aaggaggtgg agtgaagtt cacccccatt tctgtgtaac 1020
 cggagicaag gccaggctgg cagagtcagt cctagaagt cactgaggtg ggcatctgcc 1080
 tttgttaaag cctccagtgt ccattccatc cctgatgggg gcatagtttg agactgcaga 1140
 gtgagagtga cgtttcttta gggctggagg gccagttccc actcaaggct ccctcgcttg 1200
 acattcaaac ttcatgctcc tgaanaacat tctctgcagc agaattggct ggtttcgcgc 1260
 ctgagtlggg ctctagtgac lcgagactca atgactggga cttagactgg ggctcggcct 1320
 cgtctgaaa agtgcttaag aaaaatctct cagttctctt tgcagaggac tggcgccggg 1380
 acgcgaagag caacggggcg tgcacaaagc gggcgctgtc ggtggtggag tgcgcatgta 1440
 cgcgcaggcg cttctcgtgg ttggcgtgct gcagcgacag gcggcagcac agcacctgca 1500
 cgaacacccg ccgaactgc tgcgaggaca ccgtgtacag gagcgggttg atgaccgagc 1560
 tgaggtagaa aaacgtctcc gagaagggga ggaggatcat gtacgcccgg aagtaggacc 1620
 tcgtccagtc gtgcttgggt ttggccgcag ccatgatcct ccgaatctgg ttgggcatcc 1680
 agcatacggc caatgtcaca acaatcagcc ctgggcagac acgagcagga gggagagaca 1740
 gagaaaagaa aaacacagca tgagaacaca gtaaatgaat aaaaccataa aataatttagc 1800
 ccctctgttc tgtgcttact ggccaggaaa tggtagcaat tttcagtggt tggacttgac 1860
 agcttctttt gccacaagca agagagaatt taacactgtt tcaaacccgg gggagtgggc 1920
 tgtgttaaag aaagaccatt aaatgcttta gacagtga 1959

[0003]

<210> 5
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> 人(Homo Sapiens)

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

	130	135	140
<210> 6			
<211> 1745			
<212> DNA			
<213> 人(Homo Sapiens)			
<400> 6			
	aaggctgggg ttgcctgggg cgaggttact catcctgggc tcaggtaaga gggcccggagc 60		
	tcggaggcgg cacatccagg ggggacgcca agggagcagg acggagccat ggaccccggcc 120		
	aggaaagcag gtgccagggc catgatctgg actgcaggct ggctgctgct gctgctgctt 180		
	cgcggaggag cgcaggccct ggagtgctac agctgcgtgc agaaagcaga tgacggatgc 240		
	tccccgaaca agatgaagac agtgaaglgc gcgccgggcg tggacgtctg caccgaggcc 300		
	gtggggggcg tggagaccat ccacggacaa ttctcgctgg cagtgcgggg ttgcgggtcg 360		
	ggactccccg gcaagaatga ccgcggcctg gatcttcacg ggcttctggc gttcatccag 420		
	ctgcagcaal gcgclcagga tcgttgcaac gccaaagctca accctacctc gcgggcgctc 480		
	gacccggcag gtaatgagag tgcataccgg cccaacggcg tggagtgcct cagctgtgtg 540		
	ggcctgagcc gggaggcgtg ccagggtaca tcgccgccgg tcgtgagctg ctacaacgcc 600		
	agcgatcatg tctacaaggg ctgcttcgac ggcaacgtca ccttgacggc agctaatgtg 660		
	actgtgtcct tgcctgtccg gggctgtgtc caggatgaat tctgcactcg ggaatggagta 720		
	acaggcccag ggttcacgct cagtggctcc tgttgccagg ggtcccgtg taactctgag 780		
	ctccgcaaca agacctactt ctccccctga atcccacccc ttgtccggct gccccctcca 840		
	gagcccacga cigtggcctc aaccacatct gtcaccactt ctacctcggc cccagtgaga 900		
	cccacatcca ccacaaacc catgccagcg ccaaccagtc agactccgag acaggaggta 960		
	gaacacgagg cctcccgga tgaggagccc aggttgactg gaggcgccgc tggccaccag 1020		
	gaccgcagca attcagggca gtatcctgca aaaggggggc cccagcagcc ccataataaa 1080		
	ggctgtgtgg ctcccacagc lggattggca gcccttctgt tggccglggc tgcctgtgtc 1140		
	clactgtgag ctctccacc tggaaatttc cctctcacct acttctctgg ccctgggtac 1200		
	ccctcttctc atcaattcct gtccccaaca ctggactggg ctggcccagc cctgttttt 1260		
	ccaacattcc ccagtatccc cagcttctgc tgcgtgtgtt tgcggctttg ggaaataaaa 1320		
[0004]	taccgttgta tatattctgc caggggtgtt ctagcttttt gaggacagct cctgtatcct 1380		
	tctcatcctt gtctctccgc ttgtcctctt gtgatgttag gacagagtga gagaagtcag 1440		
	ctgtcacggg gaaggtgaga gagaggatgc taagcttctt actcactttc tcctagccag 1500		
	cctggacitt ggagcgtggg gtgggtggga caatggctcc ccactctaag cactgcctcc 1560		
	cctactcccc gcacttttgg ggaatcggtt ccccataatg ctctcttact agactgtgag 1620		
	ctctcgagg gcagggaccg tgccttatgt ctgtgtgtga tcagtttctg gcacataaat 1680		
	gcctcaataa agatttaatt actttgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740		
	aaaaa		1745
<210> 7			
<211> 346			
<212> PRT			
<213> 人(Homo Sapiens)			
<400> 7			
	Met Asp Pro Ala Arg Lys Ala Gly Ala Gln Ala Met Ile Trp Thr Ala		
	1 5 10 15		
	Gly Trp Leu Leu Leu Leu Leu Arg Gly Gly Ala Gln Ala Leu Glu		
	20 25 30		
	Cys Tyr Ser Cys Val Gln Lys Ala Asp Asp Gly Cys Ser Pro Asn Lys		
	35 40 45		
	Met Lys Thr Val Lys Cys Ala Pro Gly Val Asp Val Cys Thr Glu Ala		
	50 55 60		
	Val Gly Ala Val Glu Thr Ile His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Arg		
	65 70 75 80		
	Gly Cys Gly Ser Gly Leu Pro Gly Lys Asn Asp Arg Gly Leu Asp Leu		
	85 90 95		
	His Gly Leu Leu Ala Phe Ile Gln Leu Gln Gln Cys Ala Gln Asp Arg		
	100 105 110		
	Cys Asn Ala Lys Leu Asn Leu Thr Ser Arg Ala Leu Asp Pro Ala Gly		
	115 120 125		
	Asn Glu Ser Ala Tyr Pro Pro Asn Gly Val Glu Cys Tyr Ser Cys Val		

```

      130              135              140
Gly Leu Ser Arg Glu Ala Cys Gln Gly Thr Ser Pro Pro Val Val Ser
145              150              155              160
Cys Tyr Asn Ala Ser Asp His Val Tyr Lys Gly Cys Phe Asp Gly Asn
      165              170              175
Val Thr Leu Thr Ala Ala Asn Val Thr Val Ser Leu Pro Val Arg Gly
      180              185              190
Cys Val Gln Asp Glu Phe Cys Thr Arg Asp Gly Val Thr Gly Pro Gly
      195              200              205
Phe Thr Leu Ser Gly Ser Cys Cys Gln Gly Ser Arg Cys Asn Ser Asp
      210              215              220
Leu Arg Asn Lys Thr Tyr Phe Ser Pro Arg Ile Pro Pro Leu Val Arg
225              230              235              240
Leu Pro Pro Pro Glu Pro Thr Thr Val Ala Ser Thr Thr Ser Val Thr
      245              250              255
Thr Ser Thr Ser Ala Pro Val Arg Pro Thr Ser Thr Thr Lys Pro Met
      260              265              270
Pro Ala Pro Thr Ser Gln Thr Pro Arg Gln Gly Val Glu His Glu Ala
      275              280              285
Ser Arg Asp Glu Glu Pro Arg Leu Thr Gly Gly Ala Ala Gly His Gln
290              295              300
Asp Arg Ser Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Ala Lys Gly Gly Pro Gln Gln
305              310              315              320
Pro His Asn Lys Gly Cys Val Ala Pro Thr Ala Gly Leu Ala Ala Leu
      325              330              335
Leu Leu Ala Val Ala Ala Gly Val Leu Leu
      340              345

```

<210> 8

<211> 2490

[0005]

<212> DNA

<213> 人(Homo Sapiens)

<400> 8

```

gatccgccttt ggcgcatccca gtgattcttg ggttccgcgt gtagtttcgg aaggagacat 60
cgaagcaggg cgaggcgag agggcggtgc ggactcatgc ccagtcggc agtgccgggt 120
cccaagccct gcagtgctac agctttgagc acacctactt tggcccttt gacctcaggg 180
ccatgaagct gcccgcatc tctgtctctc atgagtgtt tgaggctatc ctgtctcttg 240
acaccgggta tcgcgcgccc gtgaccttg tgccgaaggg ctgctggacc gggcctctg 300
cgggccagac gcaatcgaac gcggacgcgc tgcggccaga ctactcggg gtgcgcggct 360
gcacaactga caaatgcaac gccaccctca tgactcatga cgccctcccc aacctgagcc 420
aagcaccgga cccgcccagc ctccagcggc cagagtgtc cgctgtatc ggggtccacc 480
aggatgactc cgctatcggc aggtcccagc gactccagtg tcaccaggac cagaccgcct 540
gcttccaggg caatggcaga atgacagttg gcaatttctc agtccctgtg tacatcagaa 600
cctgccaccg gccctcctgc accaccagg gcaccaccag cccctggaca gccatcgacc 660
tccagggtc ctgtgtgag ggttacctc gcaacaggaa atccatgacc cagccctca 720
ccagtgttc agccaccacc cctcccagc cactacaggt cctggccctg ctctcccag 780
tctcctgtc ggtggggtc tcagcataga ccgcccctcc aggatgttg ggacagggt 840
cacacacctc attctgtct ctccagcccc tatcacatag ctacttgaa aatgatgta 900
aagtaagaat tgcactcctg tccctctggc ctccatctc tcccgccctt gtgcccaca 960
acctggccaa cagtactgga agaaactgga cacagtcacc agcatcccc gggagggcaa 1020
aacagccatg tcgtgccccg atgaagagca attctgatca cagctgttac tcactgagca 1080
ccagccaggc accaggcacc ccataacacg gcttctgtg ctctccctcc agagcctgtc 1140
gcagctctag gagggagcta tacaatgatg tctttattag tgtcatcatg agaagccaa 1200
taagcagtat gccctaacag ttagtaggcc aggccttgga gctaagctgc atgggttcaa 1260
atcccagctc caccattcag cctgcagaga ccatgagcga gttacttaag ccaggctctg 1320
gagctaagct gcatgggttc aaatcccagc tccagcattc agcctacaga gacctgggt 1380
gagtactta agccaggctc tggagctaa gtcatgggt tcaaatccca gctccacct 1440
tcagccctga cgactgttg gtgagttact tgagctctct gtgccaatat ttctcact 1500
ataaggtgga ggtgaaaata aactctataa catgacaaga actacttcac agtagttgca 1560
gtgaggattc aacgagatga acatttagta ctggggacac agcagtgcc cagtgtaaat 1620
gggtacttgc tcataagccc taagtcacag gtcaacaaac tgagaggcaa aagcacttgg 1680

```

```

ttgagcttgt gtatctagtg agtatggatt cagggaccag attcccagcc ccacgaactg 1740
ctaagcaacc ccacctccta aacacatgag tgccgattaa ctacacagaa aaacacacaa 1800
ggcaaggttc agcaggtga aattctccaa gctataaaga tcagggaaga ctctctggag 1860
gaattcaccct ttgagcaaaa tccataagga tcaatagtag ctggcaaaaa gaagcaggag 1920
gaagcgcatc ctaggtagag gagacagcct ggacaaaggt ctgagggaag aaggagcaca 1980
aggagtgcag gacactttca tgagtgcagg acactttcat aactgcata acttcataga 2040
gatgggatcc tttagcatgt tctctgtgca calgcttgac catgttcttt cacatgcttt 2100
ttgccacttg atctttccag caactcagtg agagaagcaa aaaagtaagt tgcatcctgc 2160
tatgttctga atgtttgtgt cccccaaaa ttcatctttt gaaacctaat taccaaagtg 2220
atattactgg gaggtggggc ctllgggagg lgglgagalc atgagggtgg agcccccattg 2280
aataggatta gtgcccttat aaaagaggcc ctggagagct gccttgcccc tccaccaca 2340
tgagaacaca gccagcaggt gcctataagc aagaaagtgg gtctcacca gccatcgaat 2400
ctgctgggtgc atlgaatgca gacttcccag actccagagc tatgagacat aaatttctgt 2460
tgtgtataag ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2490

```

<210> 9

<211> 2118

<212> DNA

<213> 人(Homo Sapiens)

<400> 9

```

gattcttggg ttccgcgcgt agtttcggaa ggagacatcg aagcagggcg aggcgcagag 60
ggcgttgcgg actcatgccc cagtcggcag tgcggggtcc caagccctgc agtgcacac 120
cttlgagcac acctactttg gcccctttga cctcagggcc atgaagctgc ccagcatctc 180
ctgtcctcat gagtgccttg aggcctatct gtctctggac accgggtatc gcgcgcgggt 240
gaccttggtg cggaagggtc gctggaccgg gcctcctgcg ggccagacgc aatcgaacct 300
ggacgcgtcg ccgccagact actcgggtgt gcgcggctgc acaactgaca aatgcaacgc 360
ccacctcatg actcatgacg ccttccccaa cctgagccaa gcacccgacc cgccgacgct 420
cagcggcgcc gagtgcctac cctgtatcgg ggtccaccag galgactgcg ctatcggcag 480
gtcccagaca gtccagtgtc accaggacca gaccgcctgc ttccagggca gtggcagaat 540
gacagtggc aatttctcag tccctgtgta catcagaacc tgccaccggc cctcctgcac 600
caccgagggc accaccagcc cctggacagc catcgacctc cagggtcctt gctgtgaggg 660
glacctctgc aacaggaat ccatgaccac gcccttcacc agtgcctcag ccaccacct 720
tccccagaca ctacagggtc tggccctgct cctccagtc ctctgtctgg tgggctctc 780
agcatagacc gccccctcag gatgttggg acagggtcga cacacctcat tctgtctgt 840
tcagccctta tcacatagct cacttgaaaa tgaatgtaaa gtaagaattg cactcctgtc 900
cctctggcct tccatctctc ctgccctgt gcccacaac ctggccaaca gtactggaag 960
aaactggaca cagtaccag catcccagg gagggcaaaa cagccatgtc gtgccctgat 1020
gaagagcaal ctgatcaca gctgttact actgagcacc agccaggcac caggcacccc 1080
ataacacggc ttctgtgtct ctcttccag agcctgtcgc agctctaggg gggagctata 1140
caatgatgtc ttatttagtg tcatcatgag aagcccaata agcagtagc cctaacagti 1200
agtaggccag gctctggagc taagctgcat gggttcacat ccagctcca ccattcagcc 1260
tgagagagac atgagcgagt tacttaagcc aggtcttga gctaagctgc atgggttcaa 1320
atcccagctc cagcattcag cctacagaga ccatgggtga gttacttaag ccaggctctg 1380
gagctaagct gcatgggttc aaatcccagc tccaccattc agcctgcaga gactgtgggt 1440
gagttacttg agctctctgt gccaatatt tctcacctat aagggtggag tgaataataa 1500
ctctataaca tgacaagaac tacttcacag tagttgcagt gaggattcaa cgagatgaac 1560
atttagtact tgggacacag cagtggccca gtataaatgg gctacttgct ataagcccta 1620
agtcacaggt caacaaactg agaggtaaaa gcacttggtt gagcttgtgt atctagttag 1680
tatggattca gggaccagat tcccagcccc acgaactgct aagcaacccc acctctaaa 1740
cacatgagtg ccgattaaact tcacagaaaa acacacaagg caaagttcag cgaggtgaaa 1800
ttctccaagc tataaagatc aggggaagact tcttgaggga attcacctt gagcaaaatc 1860
ctaaaggatc aatagtagct ggcaaaaaga agcaggagga agcacattt aggtagagga 1920
gacagcctgg acaaaggctt gagggaggaa ggaacacaag gagtgcagga cactttcata 1980
actgcatgaa ctctatagag atgggatcct ttagcatgtt ctctgtgcac atgcttgacc 2040
atgttctttc acatgctttt tgccacttga tctttccagc aactcagtga gagaagcaaa 2100
aaagtaagtt gcattcctg 2118

```

<210> 10

<211> 208

<212> PRT

<213> 人(Homo Sapiens)

[0006]

```

<400> 10
Met Lys Leu Pro Ser Ile Ser Cys Pro His Glu Cys Phe Glu Ala Ile
 1           5           10          15
Leu Ser Leu Asp Thr Gly Tyr Arg Ala Pro Val Thr Leu Val Arg Lys
          20          25          30
Gly Cys Trp Thr Gly Pro Pro Ala Gly Gln Thr Gln Ser Asn Ala Asp
          35          40          45
Ala Leu Pro Pro Asp Tyr Ser Val Val Arg Gly Cys Thr Thr Asp Lys
          50          55          60
Cys Asn Ala His Leu Met Thr His Asp Ala Leu Pro Asn Leu Ser Gln
          65          70          75          80
Ala Pro Asp Pro Pro Thr Leu Ser Gly Ala Glu Cys Tyr Ala Cys Ile
          85          90          95
Gly Val His Gln Asp Asp Cys Ala Ile Gly Arg Ser Arg Arg Val Gln
          100         105         110
Cys His Gln Asp Gln Thr Ala Cys Phe Gln Gly Asn Gly Arg Met Thr
          115         120         125
Val Gly Asn Phe Ser Val Pro Val Tyr Ile Arg Thr Cys His Arg Pro
          130         135         140
Ser Cys Thr Thr Glu Gly Thr Thr Ser Pro Trp Thr Ala Ile Asp Leu
          145         150         155         160
Gln Gly Ser Cys Cys Glu Gly Tyr Leu Cys Asn Arg Lys Ser Met Thr
          165         170         175
Gln Pro Phe Thr Ser Ala Ser Ala Thr Thr Pro Pro Arg Ala Leu Gln
          180         185         190
Val Leu Ala Leu Leu Leu Pro Val Leu Leu Leu Val Gly Leu Ser Ala
          195         200         205

```

```

<210> 11
<211> 806
[0007] <212> DNA
        <213> 人(Homo Sapiens)

```

```

<400> 11
gcccaccccc gccagcccc tgcctataag gccttggcaa tgcaggggcc cgcactgctc 60
ccagacgaca tcagagatga ggacagcatt gctgctcctt gcagccctgg ctgtggctac 120
agggccagcc cttaccctgc gctgccacgt gtgcaccagc tccagcaact gcaagcattc 180
tgtggtctgc cgggccagct ctgccttcig caagaccacg aacacagtgg agcctctgag 240
ggggaatctg gtgaagaagg actgtgcgga gtctgtcaca cccagctaca ccctgcaagg 300
ccaggtcagc agcggcacca gctccaccca gtgcctccag gaggacctgt gcaatgagaa 360
gtgcacaaac gctgcaccca cccgcaccgc cctgcgccac agtgccctca gcctggggct 420
ggccctgagc ctcttgccgc tcatcttagc cccagcctg tgaccttccc cccaggggag 480
gcccctcatg cctttccttc cttttctctg gggattccac acctctcttc cccagccgca 540
acgggggtgc caggagcccc agcgtgaggg ctccccgaa agtcigggac cagggtccagg 600
tgggcatgga atgctgatga cttggagcag gcccacaga ccccacagag gatgaagcca 660
ccccacagag gatgcagccc ccagctgcat ggaagggtgga ggacagaagc cctgtggatc 720
ccgggatttc acactccttc tgttttgttg ccgtttattt ttgtactcaa atctctacat 780
ggagataaat gatttaaacc agaaaa

```

```

<210> 12
<211> 128
<212> PRT
<213> 人(Homo Sapiens)

```

```

<400> 12
Met Arg Thr Ala Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ala Val Ala Thr Gly
 1           5           10          15
Pro Ala Leu Thr Leu Arg Cys His Val Cys Thr Ser Ser Ser Asn Cys
          20          25          30
Lys His Ser Val Val Cys Pro Ala Ser Ser Arg Phe Cys Lys Thr Thr
          35          40          45
Asn Thr Val Glu Pro Leu Arg Gly Asn Leu Val Lys Lys Asp Cys Ala

```

50	55	60
Glu Ser Cys Thr Pro Ser Tyr Thr Leu Gln Gly	Gln Val Ser Ser Gly	
65	70	75
Thr Ser Ser Thr Gln Cys Cys Gln Glu Asp Leu Cys Asn Glu Lys Leu		80
	85	90
His Asn Ala Ala Pro Thr Arg Thr Ala Leu Ala His Ser Ala Leu Ser		95
	100	105
Leu Gly Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Val Ile Leu Ala Pro Ser Leu		110
	115	120
		125

<210> 13
 <211> 1145
 <212> DNA
 <213> 人(Homo Sapiens)

<400> 13

```

gtcccgccca gccgcgggtcc agagcgcgcg aggttcgggg agctccgccca ggctgctggt 60
acctgcgtcc gcccggcgag caggacaggc tgccttgggt tgtgacctcc aggcaggacg 120
gccatcctct ccagaatgaa gatcttcttg ccagtgtgtc tggctgccct tctgggtgtg 180
gagcgagcca gctcgtgat gtgcttctcc tgcctgaacc agaagagcaa tctgtactgc 240
ctgaagccga ccatctgtct cgaccaggac aactactgcg tgaactgtgtc tgcctagtgc 300
ggcatlggga aictcgtgac attlggccac agcctgagca agacctgttc cccggccctgc 360
cccatcccag aaggcgtcaa tgttgggtgt gcttccatgg gcatcagctg ctgccagagc 420
tttctgtgca atttcagtgc ggccgatggc gggctgcggg caagcgtcac cctgctgggt 480
gccgggctgc tgcctgacct gctgccggcc ctgctgcggg ttggcccctg accgccaga 540
ccctgtcccc cgatccccc gctcaggaag gaaagcccag ccctttcttg atccacagt 600
gtatgggagc cctgactcc tcacgtgcct gatctgtgcc ctgtgtccca ggtcaggccc 660
acccctgca cctccacctg cccagcccc tgcctctgcc caagtgggccc agctgccctc 720
actctgggg tggatgatgt gaccttccct gggggactgc ggaagggacg agggttccct 780
ggagtcttac ggtccaacat cagaccaagt cccatggaca tgcctgacagg gtccccaggg 840
agaccgtgtc agtagggatg tltgcctggc tltgtacgtg ggtgtgcagt gcacgtgaga 900
gcacgtggcg gcttctgggg gccatgtttg gggagggagg tltgtccagca gcctggagag 960
cctcagtcct tgtagcccc tgccttgcca cagctgcatg cacttcaagg gcagcccttg 1020
ggggttgggg tttctgccac ttccgggtct aggccttgcc caaatccagc cagtcctgcc 1080
ccagccacc cccacatigg agccctcctg ctgctttggt gcctcaaata aatacagatg 1140
tcccc 1145
  
```

[0008]

<210> 14
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 人(Homo Sapiens)

<400> 14

Met Lys Ile Phe Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gly Val Glu	
1	15
Arg Ala Ser Ser Leu Met Cys Phe Ser Cys Leu Asn Gln Lys Ser Asn	
20	30
Leu Tyr Cys Leu Lys Pro Thr Ile Cys Ser Asp Gln Asp Asn Tyr Cys	
35	45
Val Thr Val Ser Ala Ser Ala Gly Ile Gly Asn Leu Val Thr Phe Gly	
50	60
His Ser Leu Ser Lys Thr Cys Ser Pro Ala Cys Pro Ile Pro Glu Gly	
65	80
Val Asn Val Gly Val Ala Ser Met Gly Ile Ser Cys Cys Gln Ser Phe	
85	95
Leu Cys Asn Phe Ser Ala Ala Asp Gly Gly Leu Arg Ala Ser Val Thr	
100	110
Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ala Leu Leu Arg	
115	125
Phe Gly Pro	
130	

<210> 15
 <211> 550
 <212> DNA
 <213> 人(Homo Sapiens)

```
<400> 15
ccagtctgtc gccacctcac ttggtgtctg ctgtccccgc caggcaagcc tggggtgaga 60
gcacagagga gtgggcccgg accatgcggg ggacgcggct ggcgctcctg gcgctgggtg 120
tggctgcctg cggagagctg gcgccggccc tgcgtgcta cgtctgtccg gagcccacag 180
gagtgtcgga ctgtgtcacc atcgccacct gcaccaccaa cgaaaccatg tgcaagacca 240
cactctactc cggggagata gtgtaccctt tccaggggga ctccacggtg accaagtcct 300
gtgccagcaa gtgtaagccc tcggaatgtg atggcatcgg ccagaccctg cccgtgtcct 360
gctgaataac tgagctgtgc aatgtagacg gggcgcccgc tctgaacagc ctccactgcg 420
gggccctcac gctcctccca ctcttgagcc tccgactgta gattccccgc ccacccccat 480
ggccctatgc ggcccagccc cgaatgcctt gaagaagtcg cccctgcacc aggaaaaaaa 540
aaaaaaaaa 550
```

<210> 16
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人(Homo Sapiens)

```
<400> 16
Met Arg Gly Thr Arg Leu Ala Leu Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala Cys
1          5          10          15
Gly Glu Leu Ala Pro Ala Leu Arg Cys Tyr Val Cys Pro Glu Pro Thr
20          25          30
Gly Val Ser Asp Cys Val Thr Ile Ala Thr Cys Thr Thr Asn Glu Thr
35          40          45
Met Cys Lys Thr Thr Leu Tyr Ser Arg Glu Ile Val Tyr Pro Phe Gln
50          55          60
[0009] Gly Asp Ser Thr Val Thr Lys Ser Cys Ala Ser Lys Cys Lys Pro Ser
65          70          75          80
Asp Val Asp Gly Ile Gly Gln Thr Leu Pro Val Ser Cys Cys Asn Thr
85          90          95
Glu Leu Cys Asn Val Asp Gly Ala Pro Ala Leu Asn Ser Leu His Cys
100         105         110
Gly Ala Leu Thr Leu Leu Pro Leu Leu Ser Leu Arg Leu
115         120         125
```

<210> 17
 <211> 3901
 <212> DNA
 <213> 人(Homo Sapiens)

```
<400> 17
aagatggcgg cgtgtggacg tgtacggagg atgttccgct tgtcggcggc gctgcatctg 60
ctgctgctat tcgcggccgg ggccgagaaa ctccccggcc atggcgtcca cagccagggc 120
cagggtcccc gggccaactt tgtgtccttc gtagggcagg ccggaggcgg cggcccggcg 180
ggtcagcagc tgcctcagct gcttcagtca tcgcagcttc agcagcaaca gcagcagcag 240
caacagcaac agcagcttca gccgccgag ccgcctttcc cggcgggttg gcctccggcc 300
cggcggggag gagcgggggc tgggtggggc tggaagctgg cggaggaaga gtcctgcagg 360
gaggacgtga cccgcgtgtg ccctaagcac acctggagca acaacctggc ggtgtctcag 420
tgcctgcagg atgtgagga gcctgaaaat gaaatttctt cagactgcaa tcatttgttg 480
tggaattata agctgaacct aactacagat cccaaatttg aatctgtggc cagagagggt 540
tgcaaatcta ctataacaga gattaaagaa tgtgtgtgat aaccggttgg aaaagggttac 600
atggtttccct ctttagtgga tcaccgaggc aacatcactg agtatcagtg tcaccagtac 660
attaccaaga tgacggccat catitttagt gattaccgtt taatctgttg ctllcatggat 720
gactgcaaaa atgacatcaa catctgaaa tgtggcagta ttcggcttgg agaaaaggat 780
gcacattcac aaggtgaggt ggtatcatgc ttggagaaag gccttggtgaa agaagcagaa 840
gaaagagaac ccaagattca agtttctgaa ctctgcaaga aagccattct ccgggtggct 900
```

```

gagctgtcat cggatgacit tcacttagac cggcatttat attttgcttg ccgagatgat 960
cgggagcggt tttgtgaaaa tacacaagct ggtgaggcca gagtgataa gtgcctcttt 1020
aaccataaat ttgaagaatc catgagttaa aagtgtcgag aagcacttac aaccgcgcaa 1080
aagctgattg cccaggatta taaagtcagt taattcatgg ccaaatcctg taaaagtac 1140
ttgaagaaat accggtgcaa tgtggaaaac ctccgcgat cgcgtgaagc caggctctcc 1200
tacttgttaa tgtgcttgga gtcagctgta cacagagggc gacaagtcag cagtgaagtc 1260
caggggggaga tgcgtggatta ccgacgcagt ttgatggaag acttttctct gagccctgag 1320
atcatcctaa gctgtcgggg ggagattgaa caccattgtt ccgattaca tcgaaaagg 1380
cggaccctac actgtctgat gaaagtagtt cgaggggaga aggggaacct tggatgaac 1440
tgccagcagg cgcttcaaac actgattcag gagactgacc ctggtgcaga ttaccgcatt 1500
gatcgagctt tgaatgaagc ttgtgaatct gtaatccaga cagcctgcaa acataataga 1560
tctggagacc caatgatctt gtcgtgcttg atggaacatt tatacacaga gaagatggta 1620
gaagactgtg aacaccgtct cttagagctg cagtatttca tctcccgga ttggaagctg 1680
gaccctgtcc tgtaccgcaa gtgccaggga gacgcttctc gtccttgcca caccacggt 1740
tggatgaga ccagtgaaat tatgcctcag ggagctgtgt tctcttgttt atacagacac 1800
gcctaccgca ctgaaggaaa gggaaggagg ctctcacggg agtgccgagc tgaagtccaa 1860
aggatcctac accagcgtgc catggatgtc aagciggatc ctgcccctca ggataagtc 1920
ctgattgatc tgggaaaatg gtgcagtgag aaaacagaga ctggacagga gctggagtc 1980
ctcaggacc atctggatga ctgtgtgtgt gagtgtagag atatagttgg caacctcact 2040
gagttagaat cagaggatat tcaaatagaa gccttgctga tgagagcctg tgagcccata 2100
attcagaact tctgccacga tgtggcagat aaccagatag actctgggga cctgatggag 2160
tgtctgatac agaacaaca ccagaaggac atgaacgaga agtgtgcat cggagtacc 2220
cacttccagc ttgtgcagat gaaggatttt cggtttcttt acaagtttaa aatggcctgc 2280
aaggaggacg tgtgaagct ttgcccacac ataaaaaaga aggtggacgt ggtgatctgc 2340
ctgagcacga ccgtgcgcaa tgacactctg cagggaagcca aggagcacag ggtgtccctg 2400
aagtgccgca ggcagctccg tgtggaggag ctggagatga cggaggacat ccgcttgag 2460
ccagatctat acgaagcctg caagagtgac atcaaaaact tctgttccgc tgtgcaatat 2520
ggcaacgctc agallaicga algtcigaaa gaaaacaaga agcagctaac caccgcctgc 2580
caccaaaaag tatitaagct gcaggagaca gagatgatgg acccagagct agactacac 2640
ctcatgaggg tctgcaagca gatgataaag aggttctgic cggaagcaga ttctaaaacc 2700
atgttgcatg gcttgaagca aaataaaaac agtgaattga tggatcccaa atgcaaacag 2760
atgataacca agcgcagat caccagaac acagattacc gcttaaaccc catgtaaga 2820
aaagcctgta aagctgacat tcctaaattc tgtcacggtt tcttgactaa ggccaaggat 2880
gattcagaat tagaaggaca agtcatctct tgcctgaagc tgagatatgc tgaccagcgc 2940
ctgtcttcag actgtgaaga ccagatccga atcattatcc aggagtccgc cctggactac 3000
cgcttgatc ctgagctcca gctgcactgc tcagacgaga tctccagtct atgtgtgaa 3060
gaagcagcag cccaagagca gacaggtcag gtggaggagt gcctcaaggt caacctgctc 3120
aagatcaaaa cagaattgtg taaaaaggaa gtgctaaaca tgctgaagga aagcaaaagca 3180
gacatcttlt ttgacccggt actlcatlct gctltgtccc lggacallaa acaccacigc 3240
gcagccatca cccctggccg cgggcgtcaa atgtcctgic tcatggaagc actggaggat 3300
aagcgggtga ggttacagcc cgagtgcaaa aagcgcctca atgaccgat tgagatgttg 3360
agtacgcag caaagggtgg cccagcagat ggcttctctg atcttgccat gcaagtaatg 3420
acgtctccat ctaagaacta cattctctct gtgatcagtg ggagcatctg tatattgttc 3480
ctgattggcc tgaatgtgtg acggatcacc aagcagatga cacgagagct caaggacagg 3540
tagaccacc ttgaccacca aaggaaactc ctatccagtg ccagtttgt acagccctct 3600
tgtatagcat cccactcacc ctgcctcttc tcagaagtga caccaacccc gtgttagagc 3660
attagcagat gtccactgcg ttgtccatc cagcctccac tctgttccat ggtgtctctc 3720
tctctctcacc cgtgcagcag cagcagctgg tgcgtggggt tactgccttt gtttgcaaaa 3780
cttgggttta cctgcctgta gacaagtctc tctatacca acagaacttc cgttacttcc 3840
agaaccaact caccgtacct gcaactcaaa ggctttttta agaaaaccac caaaaaaaa 3900
a 3901

```

<210> 18

<211> 1179

<212> PRT

<213> 人(Homo Sapiens)

<400> 18

```

Met Ala Ala Cys Gly Arg Val Arg Arg Met Phe Arg Leu Ser Ala Ala
 1             5             10             15
Leu His Leu Leu Leu Leu Phe Ala Ala Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly
          20             25             30
His Gly Val His Ser Gln Gly Gln Gly Pro Gly Ala Asn Phe Val Ser

```


		35				40				45					
	Phe	Val	Gly	Gln	Ala	Gly	Gly	Gly	Pro	Ala	Gly	Gln	Gln	Leu	Pro
	50					55				60					
	Gln	Leu	Leu	Gln	Ser	Ser	Gln	Leu	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
	65					70				75				80	
	Gln	Gln	Gln	Gln	Leu	Gln	Pro	Pro	Gln	Pro	Phe	Pro	Ala	Gly	Gly
					85				90					95	
	Pro	Pro	Ala	Arg	Arg	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Trp	Lys
			100					105					110		Leu
	Ala	Glu	Glu	Glu	Ser	Cys	Arg	Glu	Asp	Val	Thr	Arg	Val	Cys	Pro
		115						120					125		Lys
	His	Thr	Trp	Ser	Asn	Asn	Leu	Ala	Val	Leu	Glu	Cys	Leu	Gln	Asp
		130				135						140			Val
	Arg	Glu	Pro	Glu	Asn	Glu	Ile	Ser	Ser	Asp	Cys	Asn	His	Leu	Leu
	145					150					155				Trp
	Asn	Tyr	Lys	Leu	Asn	Leu	Thr	Thr	Asp	Pro	Lys	Phe	Glu	Ser	Val
					165					170					Ala
	Arg	Glu	Val	Cys	Lys	Ser	Thr	Ile	Thr	Glu	Ile	Lys	Glu	Cys	Ala
			180						185					190	Asp
	Glu	Pro	Val	Gly	Lys	Gly	Tyr	Met	Val	Ser	Cys	Leu	Val	Asp	His
		195						200					205		Arg
	Gly	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Gln	Cys	His	Gln	Tyr	Ile	Thr	Lys	Met
		210				215						220			Thr
	Ala	Ile	Ile	Phe	Ser	Asp	Tyr	Arg	Leu	Ile	Cys	Gly	Phe	Met	Asp
	225					230					235				Asp
	Cys	Lys	Asn	Asp	Ile	Asn	Ile	Leu	Lys	Cys	Gly	Ser	Ile	Arg	Leu
					245					250					Gly
	Glu	Lys	Asp	Ala	His	Ser	Gln	Gly	Glu	Val	Val	Ser	Cys	Leu	Glu
			260						265					270	Lys
	Gly	Leu	Val	Lys	Glu	Ala	Glu	Glu	Arg	Glu	Pro	Lys	Ile	Gln	Val
		275						280					285		Ser
[0011]	Glu	Leu	Cys	Lys	Lys	Ala	Ile	Leu	Arg	Val	Ala	Glu	Leu	Ser	Ser
		290					295				300				Asp
	Asp	Phe	His	Leu	Asp	Arg	His	Leu	Tyr	Phe	Ala	Cys	Arg	Asp	Asp
	305					310					315				Arg
	Glu	Arg	Phe	Cys	Glu	Asn	Thr	Gln	Ala	Gly	Glu	Gly	Arg	Val	Tyr
					325					330					Lys
	Cys	Leu	Phe	Asn	His	Lys	Phe	Glu	Glu	Ser	Met	Ser	Glu	Lys	Cys
			340						345					350	Arg
	Glu	Ala	Leu	Thr	Thr	Arg	Gln	Lys	Leu	Ile	Ala	Gln	Asp	Tyr	Lys
		355						360					365		Val
	Ser	Tyr	Ser	Leu	Ala	Lys	Ser	Cys	Lys	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Tyr
		370				375					380				Arg
	Cys	Asn	Val	Glu	Asn	Leu	Pro	Arg	Ser	Arg	Glu	Ala	Arg	Leu	Ser
	385					390					395				Tyr
	Leu	Leu	Met	Cys	Leu	Glu	Ser	Ala	Val	His	Arg	Gly	Arg	Gln	Val
					405					410					Ser
	Ser	Glu	Cys	Gln	Gly	Glu	Met	Leu	Asp	Tyr	Arg	Arg	Met	Leu	Met
			420					425					430		Glu
	Asp	Phe	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Ile	Ile	Leu	Ser	Cys	Arg	Gly	Glu
		435					440						445		Ile
	Glu	His	Cys	Ser	Gly	Leu	His	Arg	Lys	Gly	Arg	Thr	Leu	His	Cys
		450				455					460				
	Leu	Met	Lys	Val	Val	Arg	Gly	Glu	Lys	Gly	Asn	Leu	Gly	Met	Asn
	465					470					475				Cys
	Gln	Gln	Ala	Leu	Gln	Thr	Leu	Ile	Gln	Glu	Thr	Asp	Pro	Gly	Ala
					485					490					Asp
	Tyr	Arg	Ile	Asp	Arg	Ala	Leu	Asn	Glu	Ala	Cys	Glu	Ser	Val	Ile
			500						505					510	Gln
	Thr	Ala	Cys	Lys	His	Ile	Arg	Ser	Gly	Asp	Pro	Met	Ile	Leu	Ser
		515						520					525		Cys
	Leu	Met	Glu	His	Leu	Tyr	Thr	Glu	Lys	Met	Val	Glu	Asp	Cys	Glu
		530					535					540			His

[0012]

```

Arg Leu Leu Glu Leu Gln Tyr Phe Ile Ser Arg Asp Trp Lys Leu Asp
545                    550                    555                    560
Pro Val Leu Tyr Arg Lys Cys Gln Gly Asp Ala Ser Arg Leu Cys His
                    565                    570                    575
Thr His Gly Trp Asn Glu Thr Ser Glu Phe Met Pro Gln Gly Ala Val
                    580                    585                    590
Phe Ser Cys Leu Tyr Arg His Ala Tyr Arg Thr Glu Glu Gln Gly Arg
                    595                    600                    605
Arg Leu Ser Arg Glu Cys Arg Ala Glu Val Gln Arg Ile Leu His Gln
                    610                    615                    620
Arg Ala Met Asp Val Lys Leu Asp Pro Ala Leu Gln Asp Lys Cys Leu
625                    630                    635                    640
Ile Asp Leu Gly Lys Trp Cys Ser Glu Lys Thr Glu Thr Gly Gln Glu
                    645                    650                    655
Leu Glu Cys Leu Gln Asp His Leu Asp Asp Leu Val Val Glu Cys Arg
                    660                    665                    670
Asp Ile Val Gly Asn Leu Thr Glu Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gln Ile
                    675                    680                    685
Glu Ala Leu Leu Met Arg Ala Cys Glu Pro Ile Ile Gln Asn Phe Cys
                    690                    695                    700
His Asp Val Ala Asp Asn Gln Ile Asp Ser Gly Asp Leu Met Glu Cys
705                    710                    715                    720
Leu Ile Gln Asn Lys His Gln Lys Asp Met Asn Glu Lys Cys Ala Ile
                    725                    730                    735
Gly Val Thr His Phe Gln Leu Val Gln Met Lys Asp Phe Arg Phe Ser
                    740                    745                    750
Tyr Lys Phe Lys Met Ala Cys Lys Glu Asp Val Leu Lys Leu Cys Pro
                    755                    760                    765
Asn Ile Lys Lys Lys Val Asp Val Val Ile Cys Leu Ser Thr Thr Val
                    770                    775                    780
Arg Asn Asp Thr Leu Gln Glu Ala Lys Glu His Arg Val Ser Leu Lys
785                    790                    795                    800
Cys Arg Arg Gln Leu Arg Val Glu Glu Leu Glu Met Thr Glu Asp Ile
                    805                    810                    815
Arg Leu Glu Pro Asp Leu Tyr Glu Ala Cys Lys Ser Asp Ile Lys Asn
                    820                    825                    830
Phe Cys Ser Ala Val Gln Tyr Gly Asn Ala Gln Ile Ile Glu Cys Leu
                    835                    840                    845
Lys Glu Asn Lys Lys Gln Leu Ser Thr Arg Cys His Gln Lys Val Phe
                    850                    855                    860
Lys Leu Gln Glu Thr Glu Met Met Asp Pro Glu Leu Asp Tyr Thr Leu
865                    870                    875                    880
Met Arg Val Cys Lys Gln Met Ile Lys Arg Phe Cys Pro Glu Ala Asp
                    885                    890                    895
Ser Lys Thr Met Leu Gln Cys Leu Lys Gln Asn Lys Asn Ser Glu Leu
                    900                    905                    910
Met Asp Pro Lys Cys Lys Gln Met Ile Thr Lys Arg Gln Ile Thr Gln
                    915                    920                    925
Asn Thr Asp Tyr Arg Leu Asn Pro Met Leu Arg Lys Ala Cys Lys Ala
                    930                    935                    940
Asp Ile Pro Lys Phe Cys His Gly Ile Leu Thr Lys Ala Lys Asp Asp
945                    950                    955                    960
Ser Glu Leu Glu Gly Gln Val Ile Ser Cys Leu Lys Leu Arg Tyr Ala
                    965                    970                    975
Asp Gln Arg Leu Ser Ser Asp Cys Glu Asp Gln Ile Arg Ile Ile Ile
                    980                    985                    990
Gln Glu Ser Ala Leu Asp Tyr Arg Leu Asp Pro Gln Leu Gln Leu His
                    995                    1000                    1005
Cys Ser Asp Glu Ile Ser Ser Leu Cys Ala Glu Glu Ala Ala Ala Gln
1010                    1015                    1020
Glu Gln Thr Gly Gln Val Glu Glu Cys Leu Lys Val Asn Leu Leu Lys
1025                    1030                    1035                    1040
Ile Lys Thr Glu Leu Cys Lys Lys Glu Val Leu Asn Met Leu Lys Glu

```

```

          1045          1050          1055
Ser Lys Ala Asp Ile Phe Val Asp Pro Val Leu His Thr Ala Cys Ala
          1060          1065          1070
Leu Asp Ile Lys His His Cys Ala Ala Ile Thr Pro Gly Arg Gly Arg
          1075          1080          1085
Gln Met Ser Cys Leu Met Glu Ala Leu Glu Asp Lys Arg Val Arg Leu
          1090          1095          1100
Gln Pro Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asn Asp Arg Ile Glu Met Trp Ser
          1105          1110          1115          1120
Tyr Ala Ala Lys Val Ala Pro Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Ala Met
          1125          1130          1135
Gln Val Met Thr Ser Pro Ser Lys Asn Tyr Ile Leu Ser Val Ile Ser
          1140          1145          1150
Gly Ser Ile Cys Ile Leu Phe Leu Ile Gly Leu Met Cys Gly Arg Ile
          1155          1160          1165
Thr Lys Arg Val Thr Arg Glu Leu Lys Asp Arg
          1170          1175

```

<210> 19

<211> 3779

<212> DNA

<213> 人(Homo Sapiens)

<400> 19

[0013]

```

gcgtcgagct cgccgcggac tcaagatggc ggcgtgtgga cgtgtacgga ggatgttccg 60
cttgtcgccg ggcgtgcatc tgctgctgct attcgcgccc gggggccgaga aactccccgg 120
ccaggggcgtc cacagccagg gccagggtcc cggggccaac ttgtgttcct tcgtagggca 180
ggccggaggcc ggccggcccg cgggtcagca gctgcccag ctgcctcagt catcgagct 240
tcagcagcaa cagcagcagc agcaacagca acagcagcct cagccgccgc agccgccttt 300
cccgccgggtt gggcctccgg ccggcggggg aggagcgggg gctggtgggg gctggaagct 360
ggcggaggaa gagtcttcca gggaggacgt gacccgcgtg tgccttaagc acacctggag 420
caacaacctg gcgtgtctcg agtgcctgca ggatgtgagg gagcctgaaa atgaaatttc 480
ttcagactgc aatcatattt tgtggaatta taagctgaac ctaactacag atcccaaatt 540
tgaatctgtg gccagagagg ttgtcaaatc tactataaca gagattaaag aatgtgtctga 600
tgaaccggtt ggaaaagggtt acatgggttc ctgcttgggt gatcaccgag gcaacatcac 660
tgagtatcag tgtaccaggt acattacca gatgacggcc atcattttta gtgattaccg 720
tttaatctgt tgttcatgg atgactgcaa aaatgacatc aacattctga aatgtggcag 780
tattcggcctt ggagaaaagg atgcacatc acaaggtag gtggtatcat gcttgagaa 840
aggccttggt aaagaagcag aagaagaga acccaagatt caagtctctg aactctgcaa 900
gaaagccatt ctccgggttg ctgagctgtc atcggtgac ttctacttag accggcattt 960
atatatttgc tgcagagatg atcgggagcg tttttgtgaa aatacacaag ctggtgaggg 1020
cagagtgtat aagtgcctct ttaaccataa attgaagaa tccatgagtg aaaagtgtcg 1080
agaagcactt acaaccgcc aaaagctgat tgcacaggt tataaagtca gttattcatt 1140
ggccaaatcc tgtaaaagtg acttgaagaa ataccggtgc aatgtggaaa accctccgcg 1200
atcgcgtgaa gccaggctct cctacttgtt aatgtgcctg gagtacgctg tacacagagg 1260
gcgacaagtc agcagtgagt gccaggggga gatgttggt taccgacgca tgttgatgga 1320
agacttttct ctgagccctg agatcctct aagctgtcgg ggggagattg aacaccattg 1380
ttccggatta catcgaaaag ggccggacct acactgtctg atgaaagtag ttcgagggga 1440
gaaggggaac cttggaatga actgccagca ggcgccttcaa acactgattc aggagaciga 1500
ccctggttga gattaccgca ttgacgagc ttgaaatgaa gcttgtgaat ctgtaatcca 1560
cacagcctgc aaacatataa gatctggaga cccaatgac ttgtcgtgcc tgatggaaca 1620
tttatacaca gagaagatgg tagaagactg tgaacaccgt ctcttagagc tgcagtattt 1680
catctcccg gattggaagc tggacctgtt cctgtaccgc aagtgccagg gagacgcttc 1740
tcgtctttgc cacaccacg gtggaatga gaccagtga tttatgcctc agggagctgt 1800
gttctcttgt ttatcacagc acgcctaccg cactgaggaa cagggaagga ggctctcacg 1860
ggagtgcgga gctgaagtc aaaggatcct acaccagcgt gccatggatg tcaagctgga 1920
tcttgccctc caggataagt gccigtatga tctgggaaaa tgggtgcagt agaaaacaga 1980
gactggacag gagctggagt gccctcagga ccatctggat gacttggttg tggagttag 2040
agatatagtt ggcaacctca ctgagttaga atcagaggat attcaaatag aagccttgct 2100
gatgagagcc tgtgagccca taattcagaa cttctgccac gatgtggcag ataaccagat 2160
agactctggg gacctgatgg agtgtctgat acagaacaaa caccagaagg acatgaacga 2220
gaagtgtgcc atcgagatta ccacttcca gctggtgcag atgaaggatt ttcggttttc 2280

```

```

ttacaagttt aaaatggcct gcaaggagga cgtgttgaa ctttgcccaa acataaaaaa 2340
gaaggtaggac gtggtgatct gcttgagcac gaccgtgcgc aatgacactc tgcaggaagc 2400
caaggagcac aggggtgtccc tgaagtgccg caggcagctc cgtgtggagg agctggagat 2460
gacggaggac atccgcttgg agccagatct atacgaagcc tgcaagagtg acatcaaaaa 2520
cttctgttcc gctgtgcaat atggcaacgc tcagattatc gaatgtctga aagaaaacaa 2580
gaagcagcta agcaccgcct gccacaaaaa agtatttaag ctgcaggaga cagagatgat 2640
ggaccagag ctagactaca cctcatgag ggtctgcaag cagatgataa agaggttctg 2700
tccggaagca gattctaaaa ccatgttgca gtgcttgaa caaaaataaa acagtgaatt 2760
gatggatccc aaatgcaaac agatgataac caagcgccag atcacccaga acacagatta 2820
ccgcttaaac cccatgttaa gaaaagcctg taaagctgac attcctaaat tctgtcacgg 2880
tatcctgact aaggccaagg atgattcaga attagaagga caagtcattt cttgcctgaa 2940
gctgagatat gctgaccagc gcctgtcttc agactgtgaa gaccagatcc gaatcattat 3000
ccaggagtcc gccctggact accgectgga tccicagctc cagctgcact gctcagacga 3060
gatctccagt ctatgtgctg aagaagcagc agcccaagag cagacaggtc aggtggagga 3120
gtgcctcaag gtcaacctgc tcaagatcaa aacagaattg tgtaaaaagg aagtgcataa 3180
catgctgaag gaaagcaaa cagacatctt tgttgaccog gtacttcata ctgcttgtgc 3240
cctggacatt aaacaccact gcgcagccat caccctggc cgcgggcgtc aaatgtcctg 3300
tctcatggaa gcactggagg ataagcgggt gaggttacag cccgagtgca aaaagcgctt 3360
caatgaccgg attgagatgt ggagttacgc agcaaagggt gccccagcag atggctcttc 3420
tgaicttgcc atgcaagtaa tgacgtctcc atctaagaac tacattctct ctgtgatcag 3480
tgggagcadc tgtatatgtt tctgatgtg cctgatgtgt ggacggatca ccaagcgagt 3540
gacacggagag ctcaaggaca ggctacaata caggtcagag acaatggctt ataaaggttt 3600
agtgggtcl caggatgtga caggcagctc agccigacct ttctgcacac tccagacaaa 3660
cttcccagac aagctccttt gtgcctctac gtggagaggg tgtggaaagt taccacatta 3720
aaagatggag gatttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaaaaaa aaaaaaaaaa 3779

```

<210> 20

<211> 1203

<212> PRT

<213> 人(Homo Sapiens)

[0014]

<400> 20

```

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

```

				245					250					255			
	Glu	Lys	Asp	Ala	His	Ser	Gln	Gly	Glu	Val	Val	Ser	Cys	Leu	Glu	Lys	
				260					265					270			
	Gly	Leu	Val	Lys	Glu	Ala	Glu	Glu	Arg	Glu	Pro	Lys	Ile	Gln	Val	Ser	
			275					280					285				
	Glu	Leu	Cys	Lys	Lys	Ala	Ile	Leu	Arg	Val	Ala	Glu	Leu	Ser	Ser	Asp	
			290				295					300					
	Asp	Phe	His	Leu	Asp	Arg	His	Leu	Tyr	Phe	Ala	Cys	Arg	Asp	Asp	Arg	
305					310					315						320	
	Glu	Arg	Phe	Cys	Glu	Asn	Thr	Gln	Ala	Gly	Glu	Gly	Arg	Val	Tyr	Lys	
				325					330					335			
	Cys	Leu	Phe	Asn	His	Lys	Phe	Glu	Glu	Ser	Met	Ser	Glu	Lys	Cys	Arg	
			340				345						350				
	Glu	Ala	Leu	Thr	Thr	Arg	Gln	Lys	Leu	Ile	Ala	Gln	Asp	Tyr	Lys	Val	
			355				360					365					
	Ser	Tyr	Ser	Leu	Ala	Lys	Ser	Cys	Lys	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Tyr	Arg	
			370			375					380						
	Cys	Asn	Val	Glu	Asn	Leu	Pro	Arg	Ser	Arg	Glu	Ala	Arg	Leu	Ser	Tyr	
385					390					395						400	
	Leu	Leu	Met	Cys	Leu	Glu	Ser	Ala	Val	His	Arg	Gly	Arg	Gln	Val	Ser	
			405						410					415			
	Ser	Glu	Cys	Gln	Gly	Glu	Met	Leu	Asp	Tyr	Arg	Arg	Met	Leu	Met	Glu	
			420					425					430				
	Asp	Phe	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Ile	Ile	Leu	Ser	Cys	Arg	Gly	Glu	Ile	
			435				440					445					
	Glu	His	His	Cys	Ser	Gly	Leu	His	Arg	Lys	Gly	Arg	Thr	Leu	His	Cys	
			450			455					460						
	Leu	Met	Lys	Val	Val	Arg	Gly	Glu	Lys	Gly	Asn	Leu	Gly	Met	Asn	Cys	
465					470					475						480	
	Gln	Gln	Ala	Leu	Gln	Thr	Leu	Ile	Gln	Glu	Thr	Asp	Pro	Gly	Ala	Asp	
			485						490					495			
[0015]	Tyr	Arg	Ile	Asp	Arg	Ala	Leu	Asn	Glu	Ala	Cys	Glu	Ser	Val	Ile	Gln	
			500					505					510				
	Thr	Ala	Cys	Lys	His	Ile	Arg	Ser	Gly	Asp	Pro	Met	Ile	Leu	Ser	Cys	
			515				520					525					
	Leu	Met	Glu	His	Leu	Tyr	Thr	Glu	Lys	Met	Val	Glu	Asp	Cys	Glu	His	
			530			535						540					
	Arg	Leu	Leu	Glu	Leu	Gln	Tyr	Phe	Ile	Ser	Arg	Asp	Trp	Lys	Leu	Asp	
545					550					555						560	
	Pro	Val	Leu	Tyr	Arg	Lys	Cys	Gln	Gly	Asp	Ala	Ser	Arg	Leu	Cys	His	
			565						570					575			
	Thr	His	Gly	Trp	Asn	Glu	Thr	Ser	Glu	Phe	Met	Pro	Gln	Gly	Ala	Val	
			580				585						590				
	Phe	Ser	Cys	Leu	Tyr	Arg	His	Ala	Tyr	Arg	Thr	Glu	Glu	Gln	Gly	Arg	
			595				600					605					
	Arg	Leu	Ser	Arg	Glu	Cys	Arg	Ala	Glu	Val	Gln	Arg	Ile	Leu	His	Gln	
			610			615					620						
	Arg	Ala	Met	Asp	Val	Lys	Leu	Asp	Pro	Ala	Leu	Gln	Asp	Lys	Cys	Leu	
625					630					635						640	
	Ile	Asp	Leu	Gly	Lys	Trp	Cys	Ser	Glu	Lys	Thr	Glu	Thr	Gly	Gln	Glu	
			645						650					655			
	Leu	Glu	Cys	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Asp	Leu	Val	Val	Glu	Cys	Arg		
			660				665						670				
	Asp	Ile	Val	Gly	Asn	Leu	Thr	Glu	Leu	Glu	Ser	Glu	Asp	Ile	Gln	Ile	
			675				680					685					
	Glu	Ala	Leu	Leu	Met	Arg	Ala	Cys	Glu	Pro	Ile	Ile	Gln	Asn	Phe	Cys	
			690			695						700					
	His	Asp	Val	Ala	Asp	Asn	Gln	Ile	Asp	Ser	Gly	Asp	Leu	Met	Glu	Cys	
705					710					715						720	
	Leu	Ile	Gln	Asn	Lys	His	Gln	Lys	Asp	Met	Asn	Glu	Lys	Cys	Ala	Ile	
			725						730					735			
	Gly	Val	Thr	His	Phe	Gln	Leu	Val	Gln	Met	Lys	Asp	Phe	Arg	Phe	Ser	
			740					745						750			

[0016]

```

Tyr Lys Phe Lys Met Ala Cys Lys Glu Asp Val Leu Lys Leu Cys Pro
    755              760              765
Asn Ile Lys Lys Lys Val Asp Val Val Ile Cys Leu Ser Thr Thr Val
    770              775              780
Arg Asn Asp Thr Leu Gln Glu Ala Lys Glu His Arg Val Ser Leu Lys
    785              790              795              800
Cys Arg Arg Gln Leu Arg Val Glu Glu Leu Glu Met Thr Glu Asp Ile
              805              810              815
Arg Leu Glu Pro Asp Leu Tyr Glu Ala Cys Lys Ser Asp Ile Lys Asn
              820              825              830
Phe Cys Ser Ala Val Gln Tyr Gly Asn Ala Gln Ile Ile Glu Cys Leu
    835              840              845
Lys Glu Asn Lys Lys Gln Leu Ser Thr Arg Cys His Gln Lys Val Phe
    850              855              860
Lys Leu Gln Glu Thr Glu Met Met Asp Pro Glu Leu Asp Tyr Thr Leu
    865              870              875              880
Met Arg Val Cys Lys Gln Met Ile Lys Arg Phe Cys Pro Glu Ala Asp
              885              890              895
Ser Lys Thr Met Leu Gln Cys Leu Lys Gln Asn Lys Asn Ser Glu Leu
    900              905              910
Met Asp Pro Lys Cys Lys Gln Met Ile Thr Lys Arg Gln Ile Thr Gln
    915              920              925
Asn Thr Asp Tyr Arg Leu Asn Pro Met Leu Arg Lys Ala Cys Lys Ala
    930              935              940
Asp Ile Pro Lys Phe Cys His Gly Ile Leu Thr Lys Ala Lys Asp Asp
    945              950              955              960
Ser Glu Leu Glu Gly Gln Val Ile Ser Cys Leu Lys Leu Arg Tyr Ala
              965              970              975
Asp Gln Arg Leu Ser Ser Asp Cys Glu Asp Gln Ile Arg Ile Ile Ile
    980              985              990
Gln Glu Ser Ala Leu Asp Tyr Arg Leu Asp Pro Gln Leu Gln Leu His
    995              1000              1005
Cys Ser Asp Glu Ile Ser Ser Leu Cys Ala Glu Glu Ala Ala Ala Gln
    1010              1015              1020
Glu Gln Thr Gly Gln Val Glu Glu Cys Leu Lys Val Asn Leu Leu Lys
    1025              1030              1035              1040
Ile Lys Thr Glu Leu Cys Lys Lys Glu Val Leu Asn Met Leu Lys Glu
              1045              1050              1055
Ser Lys Ala Asp Ile Phe Val Asp Pro Val Leu His Thr Ala Cys Ala
    1060              1065              1070
Leu Asp Ile Lys His His Cys Ala Ala Ile Thr Pro Gly Arg Gly Arg
    1075              1080              1085
Gln Met Ser Cys Leu Met Glu Ala Leu Glu Asp Lys Arg Val Arg Leu
    1090              1095              1100
Gln Pro Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asn Asp Arg Ile Glu Met Trp Ser
    1105              1110              1115              1120
Tyr Ala Ala Lys Val Ala Pro Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Ala Met
              1125              1130              1135
Gln Val Met Thr Ser Pro Ser Lys Asn Tyr Ile Leu Ser Val Ile Ser
    1140              1145              1150
Gly Ser Ile Cys Ile Leu Phe Leu Ile Gly Leu Met Cys Gly Arg Ile
    1155              1160              1165
Thr Lys Arg Val Thr Arg Glu Leu Lys Asp Arg Leu Gln Tyr Arg Ser
    1170              1175              1180
Glu Thr Met Ala Tyr Lys Gly Leu Val Trp Ser Gln Asp Val Thr Gly
    1185              1190              1195              1200
Ser Pro Ala

```

<210> 21
 <211> 2288
 <212> DNA

<213> 人(Homo Sapiens)

<400> 21

```

caaaaacttc tgttccgctg tgcaataatgg caacgctcag attatcgaat gtctgaaaga 60
aaacaagaag cagctaagca cccgctgccca ccaaaaagta ttttaagctgc aggagacaga 120
gatgatggac ccagagctag actacacct catgagggtc tgtaagcaga tgataaagag 180
gttctgtccg gaagcagatt ctaaaacat gttagcagtc ttgaagcaaa ataaaaacag 240
tgaattgatg gatcccaaat gcaaacagat gataaccaag cgccagatca ccagaacac 300
agattaccgc ttaaacccca tgttaagaaa agcctgtaaa gctgacattc ctaaatctg 360
tcacggtaic ctgactaagg ccaaggatga ttcagaatta gaaggacaag tcatctcttg 420
cctgaagctg agatatgctg accagcgctt gtcttcagac tgtgaagacc agatccgaat 480
cattatccag gagtccgccc tggactaccg cctggatcct cagctccagc tgcactgctc 540
agacgagatc tccagtctat gtgctgaaga agcagcagcc caagagcaga caggtcaggt 600
ggaggagtgc ctcaaggica acctgctcaa gatcaaaaca gaattgtgta aaaaaggaagt 660
gctaaacaig ctgaaggaaa gcaaacgaga catctttgtt gaccgggtac ttcaactctc 720
ttgtgccctg gacattaaac accactgcgc agccatcacc cctggccgcg ggcgctcaaat 780
gtcctgtctc atggaagcac tggaggataa gcgggtgagg ttacagcccc agtgcaaaaa 840
gcgcctcaat gaccggattg agatgtggag ttacgcagca aaggtaggcc cagcagatgg 900
cttctctgat cttgccatgc aagtaatgac gtctccatct aagaactaca ttctctctgt 960
gatcagtggg agcatctgta tattgttccct gattggcctg atgtgtggac ggatcaccaa 1020
gcgagtga caagagctca aggacaggta gagccacct gaccaccaa ggaactacct 1080
atccagtgcc cagllgtac agccctcttg tatagcatcc ccactcacct cgtctctctc 1140
agaagtga ccaaccctgt gttagagcat tagcagatgt ccactgcgtt gtcccatcca 1200
gctccactc gtgtccatgt gtctctctc ctctcaccg tgcagcagca gcagctggtc 1260
gttgggttta ctgctttgt ttggcagact tggtttacct gcctgtatgc aagtctctct 1320
cataccaaca gaacttccg tacttccaga accaactcac ctgacctgca actcaaaggc 1380
ttttttaaga aaaccaccaa aaaaaaaaaa ttttttaag aaaaaaatgt atatagtaac 1440
gcatctctc caggcttgat ttgggcaatg gggttatgtc ttcatatga ctgtgtaaaa 1500
caaagacagg acttggaggg gaagcacacc acccagtgtg ccatgactga ggtgtctcgt 1560
tcatctctc gaagcgctt ggggcctcgc caggggcgtg gtcttcaccg aggcgtgggt 1620
gggcagcgt tcccaggct gtgtggggtc ctgctttctt ctgctgagac agtgacgctt 1680
tccagtttcc acctaatca gccactgcg gtacagccc cacagccatg ggtattctg 1740
tggctctctc gcttcattga agcaaagcat gagccttctt agacaagggc agctggggag 1800
gggaaggagc cggaagtgtg tgaagtga cagtccatcc atctgactg agaggctgga 1860
tcttgagtcc cggggcagca ggatcccagg aaccttctc ctccagggca gcacaggact 1920
cagccgtgtc tggaccggcc ctgctgaggc tacagtcact ctggaagctc tgcgcttcat 1980
caggaggcag gactgtggcg ggaggggtcc ttgaagatgg gtgtggggag cagtgggtca 2040
ggaagtggga gccagagggt gactcactt tgcctttatt ttcaggctac aatacaggct 2100
agagacaatg gcttataaag gtttagtgt gtctcaggat gtgacaggca gtccagcctg 2160
acctttctgc aacttccaga caaacttccc agacaagctc ctttgtgcct ctacgtggag 2220
aggggtgtga aagttatcac attaaaagat ggaggattaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2280
aaaaaaaaa

```

[0017]

<210> 22

<211> 309

<212> PRT

<213> 人(Homo Sapiens)

<400> 22

```

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

```

```

Asp Cys Glu Asp Gln Ile Arg Ile Ile Ile Gln Glu Ser Ala Leu Asp
    115                      120                      125
Tyr Arg Leu Asp Pro Gln Leu Gln Leu His Cys Ser Asp Glu Ile Ser
    130                      135                      140
Ser Leu Cys Ala Glu Glu Ala Ala Ala Gln Glu Gln Thr Gly Gln Val
    145                      150                      155                      160
Glu Glu Cys Leu Lys Val Asn Leu Leu Lys Ile Lys Thr Glu Leu Cys
    165                      170                      175
Lys Lys Glu Val Leu Asn Met Leu Lys Glu Ser Lys Ala Asp Ile Phe
    180                      185                      190
Val Asp Pro Val Leu His Thr Ala Cys Ala Leu Asp Ile Lys His His
    195                      200                      205
Cys Ala Ala Ile Thr Pro Gly Arg Gly Arg Gln Met Ser Cys Leu Met
    210                      215                      220
Glu Ala Leu Glu Asp Lys Arg Val Arg Leu Gln Pro Glu Cys Lys Lys
    225                      230                      235                      240
Arg Leu Asn Asp Arg Ile Glu Met Trp Ser Tyr Ala Ala Lys Val Ala
    245                      250                      255
Pro Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Ala Met Gln Val Met Thr Ser Pro
    260                      265                      270
Ser Lys Asn Tyr Ile Leu Ser Val Ile Ser Gly Ser Ile Cys Ile Leu
    275                      280                      285
Phe Leu Ile Gly Leu Met Cys Gly Arg Ile Thr Lys Arg Val Thr Arg
    290                      295                      300
Glu Leu Lys Asp Arg
    305

```

<210> 23

<211> 2486

<212> DNA

[0018] <213> 人(Homo Sapiens)

<400> 23

```

aatttagcca gctgtggtgg cacataccig taatcccagc tacttgagag actgaggcag 60
gagaatcact tgaaccggga gatggagttt gcagtgaacc gagatggtgc cactgtactc 120
cagcctgggt gacagagcaa gactctgtct ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180
catttcaagc tggaaagattt gtttccctaa ctttgagcct agctctttca ttaaagtaat 240
aataaaagta gaactctaca ttatataat ggttttgact ttccaaagtg attttcacat 300
ctcagcagtc ctgtgaagga cttaaataagg tgtttcaggg tagacttggc attgtgtttt 360
gcaaagaagg tccaaggcca tgcagctatt tggtagacaga attgaaagta aagcctgatt 420
ctcttgcctg aaggcagactt tgctatctag aagccagggt cactagacaa gatgcagtc 480
acaaataagt ctccagaaca tatgacatct ccagcctaaa ccaagctcac ctttccatgc 540
tggtccctc atgcagacgg aggacatccg ctggagcca gatctatacg aagcctgcaa 600
gagtgacatc aaaaacttct gtccgcgtgt gcaatatggc aacgctcaga ttatcgaaag 660
tctgaaagaa aacaagaagc agctaagcac ccgcigccac caaaaagtat ttaagctgca 720
ggagacagag atgatggacc cagagctaga ctacaccctc atgaggtgct gcaagcagat 780
gataaagagg ttctgtccgg aagcagattc taaaaccatg ttgcagtgtc tgaagcaaaa 840
taaaaacagt gaattgatgg atcccaaatg caaacagatg ataaccaagc gccagatcac 900
ccagaacaca ggtaagatct tggtttggct ctccitggccc cgtggagtat ctgaaaagga 960
attcagtggc tgtagagtga cctgctcaaa ctcccagggc tttgttgcc tgggaatttta 1020
agggaggagt ctgagtgtta gcagggcctt cctcctttga ggagcatcca gaaaaatgga 1080
gggagagtca ggggagagag gaggccacaa gaaccagaaa actgccctaa aagaacgttc 1140
agaaggaatc aggcgggcag tccittgaaa gaaaaatcta gaaattcaat aaaacttcat 1200
gagtgigcca ggagaatgta cgggtaatct gattcggaac agaacattt cacccttgag 1260
ttggaagacc tcgttaagtta atggtcacag tgagtggat attgtatttc ttttcagtgt 1320
ttctcaaaag tgtctgttat ggggaagggt gctgatgtcc ccttgatttt tctgaggact 1380
ccttagagta ttggagtctg cacaaaaccc cgcagagtag aaagattcct gaggacctcc 1440
agaagtactc gttacaagt catattgtct attaaaaaca gtgtagttag agctcagtaa 1500
atgtttattg aatagataaaa tccatggttg tagtcatgat cattgacata atatgtctcc 1560
tttaggaagg tggatactta aaaatgtgtg aatcagggtg aatgttttgt cacatgtcta 1620
ctgttttcta ctctagatta ccgcttaaac cccatgttaa gaaaagcctg taaagctgac 1680
attcctaaat tctgtcacgg tatcctgact aaggccaagg atgattcaga attagaagga 1740

```



```

caagtcattct cttgcctgaa gctgagatat gctgaccagc gccgtgtcttc agactgtgaa 1800
gaccagatcc gaatactaat ccaggagatcc gccctggact accgacctgga tcttcagctc 1860
cagctgcact gctcagacga ggtgggatit gcgtgcaaaa ctggttacgc acagagctgc 1920
tcagagaagt ttccactgga gaaaagtigt ttactttctc tcccttcagc cgtgaatgat 1980
ctggtgaatt gaaggccatc ttctaggcic tccatggctc gcattccctgt tctttgtaac 2040
actgaattca acttggcatt agtccctgaca ctctaaagcg ttgttccata ttctctgtt 2100
gaacaagggt gttctttcat tatagctctc tgtaaatttg ttcttccctt ctctcttattc 2160
tggatggtaa acccaagacc tgcagaaag ataaaaagtc ttctcagctgg gcacgggtggc 2220
tcacgcctgt aatcccaaca ctttgggagg ccaaggaggg tggatcattc gaggtcagga 2280
gttcaagacc agcctggcta acaaggagaa atctgtctct actaaaaata caaaaaatta 2340
gccaggcgtg gtagcgtgca ccagtaatct cagctactca ggaggctgag gcaggagaat 2400
cacttgaacc cgggaggcgg tggttgcagt gagctgagat catgccactg caccaccagcc 2460
tgggcgacag aggaagactc tgtctc 2486

```

<210> 24

<211> 156

<212> PRT

<213> 人(Homo Sapiens)

<400> 24

```

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

```

[0019]

<210> 25

<211> 842

<212> DNA

<213> 鼠(Mus musculus)

<400> 25

```

ctgagaggaa gttttatctg tgcagccctt ctctgaggat ggacacttct cacactiacaa 60
agtcctgttt gctgattctt cttgtggccc tactgtgtgc agaaaagact cagggaactgg 120
agtgttacca gtgctatgga gtcccaattg agacttcttg cccatcaatt acctggccct 180
acctgatgg agtctgtgtt actcaggagg cagcagttat tgtggattct caaacaagga 240
aagtaaagaa caatctttgc ttacccatct gccctcctaa tatigaaagt atggagatcc 300
tgggtactaa ggtcaacgig aagacttctt gttgccagga agacctctgc aatgtagcag 360
ttcccaatgg aggcagcacc tggaccatgg cagggtgtct tctgttcagc ctgagctcag 420
tctcctgca gacctgtctc tgatggctct cccaatgacc tccacccttg tctttttatc 480
ctcatgtgca acaattcttc ctggagccct ctagtatga attatgagtt atagaagctc 540
caaggtagga gtagtgtgtg aaataccatg ttttgccctt atagcccttg ctgggttaggt 600
agtgctctta atcctctcta gggctttcaa gtctgtactt cctagaatgt cattttgttg 660
tggattgctg ctcatgacc tggaggcaca cagccagcac agtgaagagg cagaattcca 720
aggatttatg ctatcaccat ccacacataa gtatctgggg tccctgcaatg tttccacatg 780
tatcctgaat gtcccccgtg tgagtccaat aaaccttttg ttctcccaaa aaaaaaaaaa 840
aa 842

```

<210> 26
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 26
 Met Asp Thr Ser His Thr Thr Lys Ser Cys Leu Leu Ile Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Cys Ala Glu Arg Ala Gln Gly Leu Glu Cys Tyr Gln Cys
 20 25 30
 Tyr Gly Val Pro Phe Glu Thr Ser Cys Pro Ser Ile Thr Cys Pro Tyr
 35 40 45
 Pro Asp Gly Val Cys Val Thr Gln Glu Ala Ala Val Ile Val Asp Ser
 50 55 60
 Gln Thr Arg Lys Val Lys Asn Asn Leu Cys Leu Pro Ile Cys Pro Pro
 65 70 75 80
 Asn Ile Glu Ser Met Glu Ile Leu Gly Thr Lys Val Asn Val Lys Thr
 85 90 95
 Ser Cys Cys Gln Glu Asp Leu Cys Asn Val Ala Val Pro Asn Gly Gly
 100 105 110
 Ser Thr Trp Thr Met Ala Gly Val Leu Leu Phe Ser Leu Ser Ser Val
 115 120 125
 Leu Leu Gln Thr Leu Leu
 130

<210> 27
 <211> 862
 <212> DNA
 <213> 鼠 (Mus musculus)

[0020]

<400> 27
 atctgacaga acttgccact gtgcctgcaa ccttgtctga gaggaaccct tctctgagga 60
 tggacacttc tcacactlaca aaglcctgig lgctcaattcl tcttgiggcc clactgigtg 120
 cagaagagac tcagggaactg cagtgtctacg agtgctatgg agtgccaatt gagacttcct 180
 gccagcagt tacctgccgc gcctctgatg gattctgcat tgcacaaaac atagaattga 240
 ttgaggactc tcaaagaagg aaactaaaga cccgtcagtg cctttctttc tgccctgctg 300
 gtgtgccaat cagggatcct aacatcaggg agaggacttc cigtgcagc gaagacctct 360
 gcaatgcagc agttcccaact gcaggtagca cctggaccat ggcaggggtg cttctgttca 420
 gcctgagctc agtcgtcctg cagaccttgc tctgatggtc ctccaatga cccccacct 480
 ttctctttta tcttcatgtg caaccactct ttcctggagt cctctagtga caaattatat 540
 gtatagaag gtccaatgtg gggatagtg gtggaacacc ctgtttcacc tttatagccc 600
 ctgctgggta agtgcccgac tctctcttag ggctttcaaa tctgtacttc ttgcaatgcc 660
 atttagtgt ggatttctat tcttgccct ggaggcatgt ggccagcaca tgcaacaggc 720
 agtattccaa ggtattatag taccaccatc cacacataag tatctggggt cctgcagggt 780
 tcccatgtat gcctgtcaat gaccctgtt gagtccaata aaagctttgt tctccagcc 840
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 862

<210> 28
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 28
 Met Asp Thr Ser His Thr Thr Lys Ser Cys Val Leu Ile Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Cys Ala Glu Arg Ala Gln Gly Leu Gln Cys Tyr Glu Cys
 20 25 30
 Tyr Gly Val Pro Ile Glu Thr Ser Cys Pro Ala Val Thr Cys Arg Ala
 35 40 45
 Ser Asp Gly Phe Cys Ile Ala Gln Asn Ile Glu Leu Ile Glu Asp Ser
 50 55 60

Gln Arg Arg Lys Leu Lys Thr Arg Gln Cys Leu Ser Phe Cys Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Ile Arg Asp Pro Asn Ile Arg Glu Arg Thr Ser Cys Cys
 85 90 95
 Ser Glu Asp Leu Cys Asn Ala Ala Val Pro Thr Ala Gly Ser Thr Trp
 100 105 110
 Thr Met Ala Gly Val Leu Leu Phe Ser Leu Ser Ser Val Val Leu Gln
 115 120 125
 Thr Leu Leu
 130

<210> 29

<211> 806

<212> DNA

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 29

```

gccaccccc gccagcccc tgcctataag gccttggcaa tgcaggggcc cgcactgctc 60
ccagacgaca tcagagatga ggacagcatt gctgctcctt gcagccctgg ctgtggctac 120
agggccagcc cttaccctgc gctgccacgt gtgcaccagc tccagcaact gcaagcattc 180
tgtgtctctg ccggccagct ctgcttctg caagaccagc aacacagtgg agcctctgag 240
ggggaatctg gtgaagaagg actgtgcgga gtcgtgcaca cccagctaca ccctgcaagg 300
ccaggctagc agcggcacca gctccacca gtgctgccag gaggacctgt gcaatgagaa 360
gtgcacaac gctgcacca cccgcaccgc cctgcccac agtgccctca gctggggct 420
ggccctgagc ctccctggcg tcattctagc cccagcctg tgaccttccc cccaggaag 480
gcccctcatg cctttccttc cctttctctg gggattccac acctctcttc cccagccgca 540
acgggggtgc caggagcccc aggtctgagg ctccccgaa agtctgggac caggtccagg 600
tgggcatgga atgtgatga ctggagcag gcccacaga cccacagag gatgaagcca 660
ccccacagag gatgcagccc ccagctgcat ggaaggtgga ggacagaagc cctgtggatc 720
cccgatttc acactccttc tgtttgttg ccgtttatt ttgtactcaa atctctacat 780
ggagataaat gatttaaacc agaaaa

```

[0021]

<210> 30

<211> 128

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 30

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

<210> 31

<211> 1145

<212> DNA

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 31

```

gtcccgccca gccgcgggtc agagcgcgcg aggttcgggg agctccgcca ggctgctggt 60
acctgcgtcc gcccggcgag caggacaggc tgccttggtt tgtgacctcc aggcaggacg 120
gccatcctct ccagaatgaa gatcttcttg ccagtgtgtc tggctgccct tctgggtgtg 180
gagcgagcca gctcgtgat gtgcttctcc tgcctgaacc agaagagcaa tctgtactgc 240
ctgaagccga ccactgtctc cgaccaggac aactactgcg tgactgtgtc tgctagtgtc 300
ggcatlggga atctcgtgac atttggccac agcctgagca agacctgttc cccggcctgc 360
cccatcccag aaggcgtcaa tgttgggtgt gcttccatgg gcatcagctg ctgccagagc 420
tttctgtgtc atttcagtgc ggccgatggc gggtcgcggg caagcgtcac cctgctgggt 480
gccgggctgc tgcctagcct gcgcggggc ctcgcgggtl tggccccctg accgccaga 540
ccctgtcccc cgatccccc gctcaggaag gaaagcccag cctttcttgg atcccacagt 600
gtatgggagc cctgactcc tcacgtgctt gatctgtgtc cttggtccca ggtcaggccc 660
acccccigca cctccacctg ccccagcccc tgcctctgcc caagtgggcc agctgcccc 720
actctggggg tggatgatgt gaccttctt ggaggactgc ggaaggagc agggttccct 780
ggagcttac ggccaacat cagaccaagt cccatggaca tgcctgacag gtccccagg 840
agaccgtgtc agtagggatg tgtgcctggc tgtgtacgtg ggtgtgcagt gcacgtgaga 900
gcacgtggcg gcttctgggg gccatgtttg ggagggagg tgtgccagca gcctggagag 960
cctcagtcct tctagcccc tgccttgga cagctgcatg cacttcaagg gcagcctttg 1020
ggggtlgggg tttctgccac ttccgggtct aggccttgc caaatccagc cagtctgtcc 1080
ccagcccacc cccacattgg agccctctg ctgctttggt gcctcaaata aatacagatg 1140
tcccc 1145

```

<210> 32

<211> 131

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 32

```

[0022] Met Lys Ile Phe Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gly Val Glu
      1           5           10          15
Arg Ala Ser Ser Leu Met Cys Phe Ser Cys Leu Asn Gln Lys Ser Asn
      20          25          30
Leu Tyr Cys Leu Lys Pro Thr Ile Cys Ser Asp Gln Asp Asn Tyr Cys
      35          40          45
Val Thr Val Ser Ala Ser Ala Gly Ile Gly Asn Leu Val Thr Phe Gly
      50          55          60
His Ser Leu Ser Lys Thr Cys Ser Pro Ala Cys Pro Ile Pro Glu Gly
      65          70          75          80
Val Asn Val Gly Val Ala Ser Met Gly Ile Ser Cys Cys Gln Ser Phe
      85          90          95
Leu Cys Asn Phe Ser Ala Ala Asp Gly Gly Leu Arg Ala Ser Val Thr
      100         105         110
Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ala Leu Leu Arg
      115         120         125
Phe Gly Pro
      130

```

<210> 33

<211> 877

<212> DNA

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 33

```

actgtgcctg caacctgggtc agagaggaag taaggactgg tgtcaggagg gagctgctag 60
gtttgatctg tgcagccctt ctccaaggat ggacagtgtt cactactaca agtccgtgtg 120
actcatcctt ctttgggtcc tattgtgtgc agaaagagct caggggcttg agtgcataaa 180
ctgcctggga gtttcacttg gaattgccct caaatcaatt acctgcccc accctgatgc 240
agtctgcatt tctcagcagg tagaacttat tgtggactct caaagaagga aagtaaagaa 300
caaacctctg tttcctttct gccctgctaa tcttgaaaat atggagatcc tgggtactac 360
tgtcaacgtg aatacttctt gttgcaagga agacctctgc aatgcacat tttccactgg 420
aggcagcacc tggaccatga caagggtgct tctgttaaat ctgggctcgg tcttcttgca 480
gaccttgctg taaaagggtc ttccaaggac ctccacctt gttgttttat cctcatttgc 540
aactattcct tcctggagcc ctctagtgtat gaattatgag atatgaagc tccaagggtg 600

```

```

gagtagtggt tgggaatac gtgttttcaa cttatagcc cctgcttggt aaatgcccc 660
ctccctctta ggaatttcaa atatgtactt cctagaatgc catittgttg tggcttgcta 720
atcttggccc tggaggcccc tggctagcag agggtagagg cagaattcca aggtattaag 780
ccatcacca cccacacaaa ggtctgagg tctgcagga tctcatgta tgcggcttta 840
tgcccccttg ttgagtcгаа taaaccttt gtcttcc 877

```

<210> 34

<211> 134

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 34

```

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

```

[0023]

<210> 35

<211> 710

<212> DNA

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 35

```

ctgcagccag gctgagagg aagtaaggac tgggtgcagg agggagctgc taggtgacaa 60
aggaagaac cctcaggata gggctgtggt gggagtgaaga ttaggaaaga agagctgggt 120
gggtggtgga tgagagaagt aggcagacat gtattcctca gggaaagctg ttagagggt 180
tggaggagg gaataattgga tggctgagcc gtgagagagc ccagggtgt gatcagggt 240
clattaaact gctccaactt ccaaggttt atctgtgcag ccttcttcca aggatggaca 300
cttctcacga gataaagtcc tgtgtgtga tcttcttgt gacctactc tgtgcagaaa 360
gagctcaggg actggagtgt taccagtgt atggagtccc attgagact tcttgccat 420
catttacctg cccctacct gatggattct gtgtgtctca ggaggaagaa tttattgcaa 480
actctcaaag aaagagagta aagagccgtt ctgcatcc tttctgccct gatgaaattg 540
aaaagaagtt tatcctggat cetaacacca agatgaatat ttctgttgc cagggaagacc 600
tctgcaatgc agcagttccc actggaggca gctcctggac cacggcaggg gtgcttctgt 660
tcagcctggg ctgagtcctc ctgcagaccc tgatgtgatg gtccccaccc 710

```

<210> 36

<211> 134

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 36

```

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

```

```

Pro Asp Gly Phe Cys Val Ala Gln Glu Glu Glu Phe Ile Ala Asn Ser
 50          55          60
Gln Arg Lys Arg Val Lys Ser Arg Ser Cys His Pro Phe Cys Pro Asp
 65          70          75          80
Glu Ile Glu Lys Lys Phe Ile Leu Asp Pro Asn Thr Lys Met Asn Ile
          85          90          95
Ser Cys Cys Gln Glu Asp Leu Cys Asn Ala Ala Val Pro Thr Gly Gly
          100          105          110
Ser Ser Trp Thr Thr Ala Gly Val Leu Leu Phe Ser Leu Gly Ser Val
          115          120          125
Leu Leu Gln Thr Leu Met
          130

```

<210> 37
 <211> 1735
 <212> DNA
 <213> 鼠 (Mus musculus)

[0024]

```

<400> 37
gttatcagag gtgagcccggt gctcttcagc ggagaagatc ccctacctgg ccgcccggcca 60
ctttctgttg gccgtgggggt cctcaaggag acggcccttg ggctcagggg ctgcgtttcc 120
acacgcgcct ttccaggggc tcccgcgccc gtctctgcct ggccgcgggc cgctccaaca 180
gcagcacaag gcgggactca gaaccggcgt tcagggccgc cagcggccgc gaggccctga 240
gatgaggctc caaagacccc gacaggcccc ggccgggtggg aggcgcgcgc cccggggcgg 300
gccccgctcc ccctaccggc cagaccgggg gagaggcgcg cggaggctgc gaaggttcca 360
gaagggcggg gagggggcgc cgcgcgctga ccctccctgg gcaccgctgg ggacgatggc 420
gctgctcgcc ttgctgctgg tcgtggccct accgcgggtg tggacagacg ccaacctgac 480
tgcgagacaa cgagatccag aggaccccc gcgaacggac gaggtgaca atagagtgtg 540
gtgicagtgt tgtgagagag aaaacacttt cgagtgccag aaccaagga ggtgcaaatg 600
gacagagcca tactgcgtta tagcggccgt gaaaatattt ccacgttttt tcatggttgc 660
gaagcagttc tccgtgtgtl gtgcagcgtt ggagagaccc aagccagagg agaagcggit 720
tctcttgaa gagcccatgc cttctttta cctcaagtgt tgtaaaattc gctactgcaa 780
tttagagggg ccacctatca actcatcagt gtcaaagaa tatgctggga gcatgggtga 840
gagctgtggg gggctgtggc tggccatcct cctgctgctg gccctccattg cagccggcct 900
cagcctgtct tgagccacgg gactggccaca gactgagcct tccggagcat ggactcgctc 960
cagaccgttg tcacctgttg cattaaactt gttttctgtt gattacctct tggtttgact 1020
tcccagggtc ttgggatggg agagtgggga tcaggtgcag ttggctctta accctcaagg 1080
gtttcttaac tcacattcag aggaagtcca gatctctga gtagtgattt tggtgacaag 1140
tttttctctt tgaatcaaa ctttgaact catttatgtc tgatggccac tcttttctt 1200
gactccccct tgcctctgag ggcttcagta tlgatgggga gggaggccca agtaccactc 1260
atggagagta tgtgctgaga tgcctccgac ctctcagggt acgcaggaac actgggggag 1320
tctgaatgat tgggtgaa acatccctgg agtgaaggac tctcagcat ggggggcagt 1380
ggggcacacg ttagggctgc cccattcca gtgggtggag cgctgtggat ggctgctttt 1440
cctcaacctt tctaccaga ttccaggagg cagaagataa ctaattgtgt tgaagaaact 1500
tagacttcac ccaccagctg gcacagggtc acagattcat aaattccac acgtgtgtgt 1560
tcaacatctg aaacttaggc caagtagaga gcatcagggt aaatggcgtt catttctctg 1620
ttaagatgca gccatccatg gggagctgag aaatcagact caaagtcca ccaaaaaca 1680
atacaagggg acttcaaaag ttacagaaaa aattgaatta aaagataaaa attaa 1735

```

<210> 38
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> 鼠 (Mus musculus)

```

<400> 38
Met Arg Leu Gln Arg Pro Arg Gln Ala Pro Ala Gly Gly Arg Arg Ala
 1          5          10          15
Pro Arg Gly Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Arg Pro Asp Pro Gly Arg Gly
 20          25          30
Ala Arg Arg Leu Arg Arg Phe Gln Lys Gly Gly Glu Gly Ala Pro Arg
 35          40          45
Ala Asp Pro Pro Trp Ala Pro Leu Gly Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu

```

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

<210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

[0025]

<400> 39
 cttaccatc tgccctccta 20

<210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 40
 cctccattgg gaactgctac 20

<210> 41
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 41
 tctgttgcc aggaagacct ctgc 24

<210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

	<400> 42	
	acttccigcc cagcagttac	20
	<210> 43	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列	
	<400> 43	
	ggcactgacg ggtctttagt	20
	<210> 44	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列	
	<400> 44	
	ctgccgcgcc tctgatggat	20
	<210> 45	
	<211> 1659	
	<212> DNA	
	<213> 鼠 (Mus musculus)	
[0026]	<400> 45	
	ggagagagca ggacacagct atggatgccg ccaggagagg agatacacag ccagtgatgt 60 ggaccaccgg atggctgttg ctgctgccgc ttctgctgtg tgaaggagcg caagccctgg 120 agtgctacag ctgcgtgcag aaggcggacg atggatgctc tccgcacagg atgaagacag 180 tcaaatgtgg tcccggggtg gacgtctgta ccgaggccgt gggagcggta gagaccaicc 240 acgggcaatt ctctgtggcg gtgcggggct gcggttccgg aatcccgggc aagaacgacc 300 gcggaactgga ccttcacggg ctccctggcct tctttcagct acagcagtgc tccgaggacc 360 gatgcaacgc caaactcaac ctacatttgc gaggcctcaa ccttgcaggc aatgagagtg 420 catatgagcc taacggtgca gagtgtctaca gctgtgtggg tcigagccgc gagaagtgcc 480 agggctccat gccgccggtc tgaactgct acaacgccag tggccgtgtc tacaagggct 540 gcttcgatgg taacgtcacc ctgacggcag ccaacgtgac cgtgtcctta cctgtccgag 600 gtcgcgtcca ggacgagacc tgcacccggg atggggtagc ggggtccagga ttcacactca 660 gcggctcttg ctgtcagggc ccccgctgta acgccgacct tcgcaacaag acctatttct 720 ccccctgaat cccaccccta gtccctgctgc cccctccaac caccgcagcc ccatccactc 780 gggcccagaa ctctccagc acgacctcta cagcagcccc aaccacgacc acctccatca 840 tcaagcccac cacagcccaa gccagccaca ctctcccca tgaatggat ctcgaaagtc 900 tacaggaaga gggggcgtcg ttgagtggag gtgctgcggg ccatggagggt actgcggggc 960 atggagggtgc tgcggggccac caagaccgca gcaataatga gaagtatcca ggaaagggtg 1020 gggcccagat cccagctaaa ggaggctctg gcactctagg gtccctggtt tctgcagttc 1080 tgttgactgt ggttgcctgg gcgatgctgt gaattgtctc tctcgaaaag tccatctcac 1140 tttgittccc tggcccggtg gtaccaactc ttccatttcc tcacttgact ggactggctc 1200 cgccccatc ctacagcatt ctacagtccg actgcactgg ttgcagctt cggaaaacag 1260 tctctgtttg taaatattcc gctcgggtgg ccttacttct ttgatgcggc cacagcattc 1320 ccccgatgg tgaccaggac agagggaaga gacgtctact ggctgagaga ggcccagaga 1380 gtccacggca agcctcctct tcccgitttc ctgaccaggc tggaaagtga ccaggcaggt 1440 agacaatgga tccatcctcc gagcacigtg ctigccctgg acatttgtcg gaaatcttgt 1500 cgccgtgtct ccttaggaga ctgtgaacaa ctctacaaca gggctcttgt tctggcctct 1560 ctatgtgttc tgtctggcac aggaagggtg caataaagat ttagttactt tgtatagtga 1620 gttaactaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1659	
	<210> 46	
	<211> 363	

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 46

Met Asp Ala Ala Arg Gly Asp Thr Gln Pro Val Met Trp Thr Thr
 1 5 10 15
 Gly Trp Leu Leu Leu Pro Leu Leu Cys Glu Gly Ala Gln Ala
 20 25 30
 Leu Glu Cys Tyr Ser Cys Val Gln Lys Ala Asp Asp Gly Cys Ser Pro
 35 40 45
 His Arg Met Lys Thr Val Lys Cys Gly Pro Gly Val Asp Val Cys Thr
 50 55 60
 Glu Ala Val Gly Ala Val Glu Thr Ile His Gly Gln Phe Ser Val Ala
 65 70 75 80
 Val Arg Gly Cys Gly Ser Gly Ile Pro Gly Lys Asn Asp Arg Gly Leu
 85 90 95
 Asp Leu His Gly Leu Leu Ala Phe Phe Gln Leu Gln Gln Cys Ser Glu
 100 105 110
 Asp Arg Cys Asn Ala Lys Leu Asn Leu Thr Leu Arg Gly Leu Asn Pro
 115 120 125
 Ala Gly Asn Glu Ser Ala Tyr Glu Pro Asn Gly Ala Glu Cys Tyr Ser
 130 135 140
 Cys Val Gly Leu Ser Arg Glu Lys Cys Gln Gly Ser Met Pro Pro Val
 145 150 155 160
 Val Asn Cys Tyr Asn Ala Ser Gly Arg Val Tyr Lys Gly Cys Phe Asp
 165 170 175
 Gly Asn Val Thr Leu Thr Ala Ala Asn Val Thr Val Ser Leu Pro Val
 180 185 190
 Arg Gly Cys Val Gln Asp Glu Thr Cys Thr Arg Asp Gly Val Thr Gly
 195 200 205
 Pro Gly Phe Thr Leu Ser Gly Ser Cys Cys Gln Gly Pro Arg Cys Asn
 210 215 220
 Ala Asp Leu Arg Asn Lys Thr Tyr Phe Ser Pro Arg Ile Pro Pro Leu
 225 230 235 240
 Val Leu Leu Pro Pro Pro Thr Thr Ala Ala Pro Ser Thr Arg Ala Gln
 245 250 255
 Asn Ser Ser Ser Thr Thr Ser Thr Ala Ala Pro Thr Thr Thr Thr Ser
 260 265 270
 Ile Ile Lys Pro Thr Thr Ala Gln Ala Ser His Thr Ser Pro His Glu
 275 280 285
 Met Asp Leu Glu Val Ile Gln Glu Glu Gly Ala Ser Leu Ser Gly Gly
 290 295 300
 Ala Ala Gly His Gly Gly Thr Ala Gly His Gly Gly Ala Ala Gly His
 305 310 315 320
 Gln Asp Arg Ser Asn Met Glu Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Gly Ala Gln
 325 330 335
 Ile Pro Ala Lys Gly Gly Ser Gly Thr Leu Gly Ser Trp Leu Ser Ala
 340 345 350
 Val Leu Leu Thr Val Val Ala Gly Ala Met Leu
 355 360

[0027]

<210> 47

<211> 934

<212> DNA

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 47

tgcgtcccccg cgccgtgccc gccgctgagc ccggagtgcg gacaccccag ggatgcctgc 60
 gccccagagg accccgcct gcagcccccg cgctctttc aggcctatc ggagcatgct 120
 gccgcagcc atgaagagcc tcggcttgcc gctgctggcc ttgcttctct gccctcggc 180
 ggcccatggc ctgtggtgcc aggactgcac cctggccaat tccagccatt gcgtccgaa 240
 gcagtgccag cccaccgata ccgittgtgc cagcgtgcgg atcaccgacc ccagcagcag 300

```

caggaaggat cattctgtga acaagatgtg tgccttcctcc tgcgacttcg ttaagcggca 360
ctttttctca gactatctga tggggttcat taactctggg atcttaaaag tgcacgtgga 420
ctgctgcgag aaagatttgt gcaacggggc atcggtcgca ggacgcagcc cctgggccct 480
ggctgggggg ctcctgctca gcctggggcc tgcctctctc tgggctgggc cctaagaccc 540
ctccctccct cctgctgggc ttgggagctt gtcccctaag cctgttgctg cccctcccca 600
gccggccctg gcggggcctg ggacagcaag ggtttggcat caaggctga ggctctcaac 660
ctccctagat gtgagtgagc ctctccgtt tctccaccag ctccatatcc caagcagctg 720
aatatctcca ggagtcgaga catcctggca ggaagctggg gtagggggga gggggagggc 780
aagggaactga gacctccag gtctccaagg ggaggagggt caagccaggg acagcccaac 840
agcctggcct gaggggcatt aactacagag aaataaagtc acttctgagt cttgtgaaaa 900
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 934

```

<210> 48

<211> 160

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 48

```

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

```

[0028]

<210> 49

<211> 2047

<212> DNA

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 49

```

agaagaggcg agactttttt ggggtgctccg gatcgccagt agttcttcaa gcctcagcag 60
ccaactcctc cggaggcgct gcgctccgcc ccaggggagcg cgaatccaag gagcctggga 120
ccagcctctg ggagcccccg gcgcgggcga tgcggggcgcc gcggggcgaca cctgcggctc 180
ctctcggttg cagccgtcgc tggggcggca gcagcgcgag cctcggcagc ctccggcagc 240
actgtcgccg cggccagAAC agcctccgct gcggtcgttg tctctgatgc tcttggccgc 300
tcccgccctt gccgatccgg gaggatgttg gtctcggca tcgcagcaac ttttgcgga 360
ttgttctggc ttccagggtt ggcgctgcaa attcagtgct accagtgta agaattccag 420
ctgaacaacg attgtctatc cctgagttc atcgtaaat gcaccgtgaa cgttcaagac 480
atgtgtcaga aagaagtgat ggagcaaagt gctgggatca tgtaccgaa gtctgttgca 540
tcgtcagcag cctgtctcat tgcctcagct gggtaccagt ccttctgttc ccctgggaaa 600
ctgaactccg tgtgcatcag ctgctgcaac acccctcttt gcaatgggcc gaggccaaag 660
aagagaggca gctctgcctc ggccatcagg ccagggcctc tcaccactct cctgttcttc 720
cacitlagcc tctgcttgcc acactgctga agctaaagga gatgccaacc cctgtgcct 780
cacctgtctg gccttcgtc tctcaccttc ccgagtctct tctgggtgtc cttttattct 840
gggtagacaa gggagtcctt ttgttccctc ctccaagta acgcaagatt gccgtgcaca 900
aatacttttg taagctctga accaattcat tctgaatttc tgtgtgtagt tgaagaaaa 960
agcatggagc agaaagtcca gacctccca tccaatctg gttaccacc gccaaaggta 1020

```

```

gccitggaaga accagccctt agaagtcatt gagatacgca tctgcctttc ccaaagcctt 1080
gagcttccat tctgtcccag taggagtcac agtctattca gagactgctg ctgcgtgaag 1140
gttaactttgc ttttgcggga ggggagagcc agtttcggct caaggcttct gaacttgcca 1200
ttcatacttc ctgctcctgt aaactatttt ctgggggtgga cccagctggg ttggctctctg 1260
agccagtcctg tgggtgactca ggactcaagg gctggggcct agcctctcca ggcttggcct 1320
cagtcigaaa agtgcitaaag aaaacctgtg tagttctcct ggaggaagag ttactgcgcc 1380
gggaggctag gaagatgagg gggctgcggg ctgagctggg gctgtccttg gaggagatga 1440
agcgggcacg ctggcgtttc tcttgggttg catgctgcag agtcaggcgg cagcagagca 1500
cctgccagaa caccttccgg aactgctgag aggacacgtt giagaggaga gggttgacca 1560
cagagctgag gtagaagaag gtatcagaga agggcaggag gatcatgtat gccctgaagt 1620
acgttctggg ccagtcattgt ttgggttttg ctgcagccat gatccgtcgg atctgattgg 1680
gcattccaaca caccgccaac gtcaccacaa tcagtcctgg caggcaagaa caggagagaa 1740
aaggagacgg ggagagaaac agcatgagaa caaaaataaa taaataaaaa cccataaaat 1800
attaagcccc ttggttctgt tgccttactgg ccgagaaacg gtaccaatct ttacgtctg 1860
tgcttgtcgg tctctttttg ccacttggcaa aggagaattt aatgctgctt caagctcagg 1920
ggacttggct atgttaaaaa gcgttaaatg ctttcgacag tgtatttata cttacggctg 1980
cctgttaatt ttcaaaatgt tticattgtt gctcgtgtat ccagaaaata tctcacgttg 2040
gccaaaaa 2047

```

<210> 50

<211> 141

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 50

```

Met Trp Val Leu Gly Ile Ala Ala Thr Phe Cys Gly Leu Phe Trp Leu
1          5          10          15
Pro Gly Leu Ala Leu Gln Ile Gln Cys Tyr Gln Cys Glu Glu Phe Gln
20         25         30
Leu Asn Asn Asp Cys Ser Ser Pro Glu Phe Ile Val Asn Cys Thr Val
35         40         45
[0029] Asn Val Gln Asp Met Cys Gln Lys Glu Val Met Glu Gln Ser Ala Gly
50         55         60
Ile Met Tyr Arg Lys Ser Cys Ala Ser Ser Ala Ala Cys Leu Ile Ala
65         70         75         80
Ser Ala Gly Tyr Gln Ser Phe Cys Ser Pro Gly Lys Leu Asn Ser Val
85         90         95
Cys Ile Ser Cys Cys Asn Thr Pro Leu Cys Asn Gly Pro Arg Pro Lys
100        105        110
Lys Arg Gly Ser Ser Ala Ser Ala Ile Arg Pro Gly Leu Leu Thr Thr
115        120        125
Leu Leu Phe Phe His Leu Ala Leu Cys Leu Ala His Cys
130        135        140

```

<210> 51

<211> 516

<212> DNA

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 51

```

ggcaggcctg agtgaggacc tcgaccatgc aggggacctg gatgggtgctg ttggcactga 60
tattgggcac cttcggggag ctgtctatgg ccttacagtg ctacacctgt gcgaatcctg 120
tgagtgcata caactgtgtc accaccaccc actgccacat caatgaaacc atgtgcaaga 180
ctacgctcta ctccctggag attggtttcc ctttcttggg ggactccacg gtgaccaagt 240
cctgcgccag caagtgtgag ccttcggatg tggatggcat tgggcaaacc cggccagtgt 300
cctgctgcaa ttctgaccta tgcaacgtgg atggggcacc cagcctgggc agtcctggtg 360
gectgtcctt tgccttggca cttttcttgc tcttgggtgt cctgctgtaa agccatggcc 420
atctagctcc actcccttgt ccttgacatc ccagttccct aatgcctaga agaaatacaa 480
tggccatctg caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 516

```

<210> 52

<211> 127

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 52

```

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

```

<210> 53

<211> 450

<212> DNA

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 53

[0030]

```

atgccttllla tggcaggccc tgcagccagc tggtcctga ggccccctggg aciccatggc 60
gtcccccaag ccttgigtgc tgtcctctta acagtgtggt tcatgaagac ctgtgtcttc 120
ggtgatacca agctcgagga ccttcaccct cagtccctcc cactaaacaa gtacctgaat 180
tgctaccgat gttctgtgga gaccgaagag ctgggggtgcc tcttggggtc tgacacctgc 240
ctgacacctc tgggcagcag ctgtgtcacc ctgcacataa agaacagcag cggttttaat 300
gtcatgggtga gcgactgcta cagcaaggag cagatgggcc attgttcata tacccgtgct 360
tccccgggtgt ttggcttttg gatattctat cagtgttgct tcctggattt ctgcaacaat 420
ccggacaaca gaaagaatag catgcactag                                450

```

<210> 54

<211> 149

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 54

```

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

```

<210> 55
 <211> 960
 <212> DNA
 <213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 55
 agagctggag acctgggaat ctgctgtcaa ctgctggggc tgtggacatt ctcaggaccc 60
 tcaccatgaa acacctcctg ttgctcacc ttgctgccct actctactgc tgggtctcag 120
 ctgatactcg atgicactcc tgctacaaag tccctgtgct gggctgtgtg gatcgccagt 180
 cctgccgcct ggagccgggc cacaatgcc tgacaacaaa cgtgtacctt gggagatgt 240
 gggttttctc taacctgccc tgcggcacac cagaagagcc ttgtcgggag gtcttcaacg 300
 aaaccaacca taagctgggc ctgaactaca acaccacctg ctgtgacaag gataactgtg 360
 acagcccggc tccacggccc acaccgcac tggccctcat ctccctcacc tccitggctg 420
 gcctcggcct cigggtattg cattgagact agtcccatgg ctacaatctt accacctgct 480
 atagcctgag cctttctccc tgtgtcctca gagctccagc ttccagaat cttctctcct 540
 cccacccctt tcttctgaag atcatgtccc tagtccata ccatatttt catgggactg 600
 tacctggagt ggcttttcta gccaccgctc ctctccctca ctgtcacct tccactccat 660
 tccaccaca cacagacaca cagacacaca gacacaaaga cacacacaca cacacacaca 720
 cacacacaca cccagtccct tcccatctcc ttctagaaca ctctacctcc tccactggcc 780
 actgaaaggc tcccctcctt ggacgcacac tgcgtgacct ctgggatcta agtctggaag 840
 aactcctgtc ttgtctccag ggagtgttc caaaggcgc tggccctatt gcatgggcct 900
 ggcttaccag accctctgct tgtccccttc tatcttgaga aataaacatc agtgtcta 960

<210> 56
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 鼠 (Mus musculus)

[0031] <400> 56
 Met Lys His Leu Leu Leu Leu Thr Leu Ser Ala Leu Leu Tyr Cys Trp
 1 5 10 15
 Val Ser Ala Asp Thr Arg Cys His Ser Cys Tyr Lys Val Pro Val Leu
 20 25 30
 Gly Cys Val Asp Arg Gln Ser Cys Arg Leu Glu Pro Gly His Lys Cys
 35 40 45
 Leu Thr Thr Asn Val Tyr Leu Gly Lys Met Trp Val Phe Ser Asn Leu
 50 55 60
 Arg Cys Gly Thr Pro Glu Glu Pro Cys Arg Glu Val Phe Asn Glu Thr
 65 70 75 80
 Asn His Lys Leu Gly Leu Asn Tyr Asn Thr Thr Cys Cys Asp Lys Asp
 85 90 95
 Asn Cys Asn Ser Pro Ala Pro Arg Pro Thr Pro Ala Leu Ala Leu Ile
 100 105 110
 Ser Leu Thr Ser Leu Ala Gly Leu Gly Leu Trp Leu Leu His
 115 120 125

<210> 57
 <211> 3952
 <212> DNA
 <213> 鼠 (Mus musculus)

<400> 57
 gcctacttgg cctgcctgcg atgcggtacc aacaccgcac gaagtgtgta cagattccca 60
 gttagacagc aggagggacc tgggagcggc cagggggatg ttttatctct aagagaccaa 120
 gagctcaggc agggcttctg tgccctgctt cctccctggc ttgagctgga tccctggacca 180
 gctgctgacc tccgtttcac tctggcactg cctcacgtc tccgtcatga cccatctgct 240
 cacagtgttc ctggiggccc tgatgggctt gcctgtggcc caggctctgg agtgccacgt 300
 gtgtgcctac aatggagaca actgcttcaa acccatgcgc tgcccagcca tggccacctg 360
 ctgtaigacc acacgaactt acttcacccc ataccgatg aaggtgagga agtccctgtg 420

[0032]

```

ccccagctgc tttgaaaccg tgtacgatgg ctattccaag catgcatctg ccacctcctg 480
ttgccagtac tacctctgca acggigtctg ctttctacc cgggtgacct tggccctggt 540
cccagcactc ctagctacct tctggagctt gctgtaaagc tcggttcccc aagccagatc 600
cactcaaacg caacactctc aaaaaacaca gtllccctct ctctcccaat tcactccacc 660
caacgctctt ccttctgaca ctcctcaact accacgaggt cccatggcta cctacgaaag 720
aactgatggc atccagatac ctcactccaa ggtcattttc agaaggctga catgtggacc 780
tgtaatgtgc ccacccatgg gtggggcagg ctgggcttct cctctaccca agatcagggg 840
catctgggag aatgtttatg gaggagggtt cactactcaa gicaaggagc actgatttga 900
tagaattagt agccaaactc caccttcaga accctgcctc agtctaccca gttaggatg 960
ggctctgtag aggtgagggg aggagagcgg cggagaataa cgagctggct agaagcagag 1020
aaagactcag cagggctgtc tccgaagatc agcgcggctt gccagagcaa atgtgatgtg 1080
gaagccatgt gaggaagccc ttgtcatitt ccacttatct gaggaactct gccagacctg 1140
atgttgggat agccattggc caagggttcc tagcaacggc gtcattttcca taggccactg 1200
aaatccctcc agccccagct cagcaggccc cttgacctcc actacagtcc ttcattcaca 1260
caccagctgc tgggcccitga agttggcagg gacttgggag caggtgacct atgctatttt 1320
ttgtctggcc tgttatcttg gccatggcaa gaaggatca gacgcaggtc agagcagggc 1380
agtagggcga ctgagacagg gaaacagact tcagccagtg gcttcccagg tcccgtaggc 1440
agctctaca tcttctagtc tcttgttaca ttcccgggag acaaatatac agggagccaa 1500
gccgagtgtc aggtgatgac tgcctgtgaa gtctattgtg gccacagact gctgggtacc 1560
aagtctcagg agaaccacgc cttagatttag gagacacaga tctgcctttc atgcagtgtg 1620
gctgtccttg ggagccttac catgctctct aactagtacc tcaactcaca tgcactgag 1680
gaacccctta acactggccc agcccagggg tcgggatgtc ggccaatgtc catggagtgg 1740
gactacccct gagagctcct tgggtcatca catcacaat gtittattcc aacctcccag 1800
tggtagagac tcgggacaca aaggtccatc ctggggacct tcttccctgt tctaggcaga 1860
cctgaactct gtctgtctgt agagctgatg tggttttccg cctcagtttc ctctccggg 1920
gataggccac cggaggattt gggagggtgg ggagggcac ctgctgatgg gctcgccgag 1980
gttctcagga acaggaaacgg gcggggcttt agtacacagg tgagtgggt gggaactggc 2040
ccggagctga ggagacactg actgggcaga gggaagatga gttcaaggg agggcaggaa 2100
aaggaggggg gagcgcgcac gcacatgtgc actcagtga ggctacagag cccaaaaggc 2160
agcactggct gtgtgtgtcc ctgaggccca ggcaagatgc taggaggaag ccaatgctgc 2220
ccccacctga gctcacatgg aacatgcaca ccaccagcag cagcagcaag caitagagact 2280
gacctgtgga cgccataggg cactggcaag gaggttcaga ggccgggtccc tgaactcagt 2340
ggtgaggccc gggaacatt atcctgttac cctgcgtgtg caagatcatt gtccccagct 2400
agatggcgtc ctcaaccaa actgagagga gcccagttc aggtcctccc tctaccaca 2460
agggggtggl gtggaggagg ctltgattgcc ctggagaag caccgggtact gcagagctgg 2520
gggccagctt ctttcaictg tgtctagaca ccgaccagat agggcccaca gtggcaacac 2580
tgccacacag ccttacaaga agccctgtgc ctgctagca cagagcccca aaaggtgtc 2640
aatlaataca lggccaagcc tggcagtggg gggaatgcag attaggggaa cagaccaga 2700
tggcctgtcc tgaacccctg ctgggggtgt gtgatgagca tctgtctagc ccactcagg 2760
tggctctaca cactccaca cagtcttga aaagtgtatg aggtgggtcat tactgcgcc 2820
ctctcacagg taaaggcact gaggcacgga ggagttaggc acttcatttt cctgggccat 2880
tcaactttcc aggaccaaca catlcaacta tgggtactac tccaatagct ggggttcttt 2940
gaggctgggc cccctgaaga tgalagtggc tlcattcaacc agagaatttc agagtcagat 3000
gtttagggag cctatgaacc tgaaatgtca gaactggagg tttaggggac tgagggttag 3060
gccaggggtg tctggccctt tgtgtggaga cagagagaga gggaacatgg gatgggttag 3120
tagagagaag tgcaaaaggag cgtcagcctt tctcagggtt aatgctgtca gggacgaggg 3180
ctcaagcctg tgagtgttct cacactgtga taaacagtgg cccctcaaca cagacgggtg 3240
ccagagtggc cggcagtggt tatctagagt tgcaatctgg aagcctcttg gtagtcactg 3300
gagagaggcc gcttgatggg acagcaccaa atgtgtgtgc ttcgtggga tgtgaggaag 3360
ctgggtcagc gcatgaagcc aaagcgtcct tcagagcaga ggggtggctg gtctagtcca 3420
ccagagacaa gctatccagt gagagtata ctctgccacc gtctctgtga ttacctacc 3480
ccaaagcaga cggggacggg atgcagagca cccgtgtctt catcttctgc ggcaagcacg 3540
tgagttcaca ttctgaaact ctagaaagat ttccaggagl ggggtgtgcc ttgtcttgg 3600
tgcatggtta cttcctggca agcaccgtgg catccgcag cactgagtga cctgggctcc 3660
tcaagccaic tcattggtga aatgacagt ccagtacct ctacagtggc tcttggaggc 3720
ctgtgcatgg ggtctgcaca gaggagggcc ccaaactatg catggacgga cactgtatgc 3780
ctagcacttc ccttgggtgt gtctctgcca acccaggct ctacccagc aaggaatga 3840
aatccacttt tatgacacat ctccctcccc cagccagctc cattcaccta tatgccaggg 3900
tggctccctt caatgtctgt ccccatgttg atgaataaac aagcgaagga ca 3952

```

<210> 58
 <211> 116
 <212> PRT

<213>鼠 (Mus musculus)

<400> 58

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

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 59

catgatcctc cgaatctggt

20

[0033]

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 60

agcacagaac agaggggcta

20

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 61

atacggccaa tgtcacaaca

20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 62

	acttcctggtt cccaccactg	20
	<210> 63	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列	
	<400> 63	
	agaggacaag cggagagaca	20
	<210> 64	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列	
	<400> 64	
	tictggcagg ggtgttctag	20
	<210> 65	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列	
[0034]	<400> 65	
	agcagcagca ggaaggat	18
	<210> 66	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列	
	<400> 66	
	aaaagtgccg cttaacgaag	20
	<210> 67	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列	
	<400> 67	
	caagatgtgt gcttcctcct gcga	24
	<210> 68	
	<211> 2798	
	<212> DNA	
	<213> 人(Homo Sapiens)	
	<400> 68	


```

cgttgcgtgc gctctgcacg cacctatgtg gaaactaaag cccagagaga aagtctgact 60
tgccccacag ccagtgagtg actgcagcag caccagaatc tggctgtgtt cctgtttggc 120
tcttctacca ctacggcttg ggatctcggg catggtggct ttgccaatgg tccttgtttt 180
gctgctggtc ctgagcagag gtgagagtga attgagccg aagatcccat ccacagggga 240
tgccacagaa tggcggaatc ctacacctgc catgctgggg tcctgccagc cagcccccic 300
ctgccagaag tgcatcctct cacaccccag ctgigcatgg tgcaagcaac tgaacttcac 360
cgcgtcggga gaggcggagg cgcggcgtg cgcccgacga gaggagctgc tggctcgagg 420
ctgcccgtg gagagctgg aggagccccg cgccagcag gagggtgctgc aggaccagcc 480
gctcagccag ggcgcccgcg gagagggtgc caccagctg gcgcccagc gggiccggtt 540
cacgctgcgg cctggggagc cccagcagct ccaggctccg ttccttcgtg ctgagggata 600
cccggtaggac ctgtactacc ttatggacct gagctactcc atgaaggacg acctggaacg 660
cgtgcgccag ctggggcagc ctctgtctgt cgggctgcag gaagtcaccc attctgtgcg 720
cattggtttt ggttcctttt tggacaaaac ggtgctgccc ttgtgagca cagtaccctc 780
caaatctgcg ccccctgccc ccaccggct ggagcgctgc cagtcacat tcagcttca 840
ccatgtgctg cccctgacgg gggacgcaca agccttcgag cgggaggttg ggcgcgagg 900
tgtgtccggc aatctggact cgccgaagg ttgcttcgat gccattctgc aggtgcact 960
ctgccaggag cagattggct ggagaaatgt gtcccgctg ctggtgttca cttcagacga 1020
cacattccat acagctgggg acgggaagt gggcggcatt ttcatgcca gtgatgggca 1080
ctgccacttg gacagcaatg gcctctacag tcgcagcaca gatttgact accctctgt 1140
gggtcaggta gccaggccc tctctgcagc aaatateccag cccatctttg ctgtaccag 1200
tgccgactg cctgtctacc aggagctgag taaactgatt cctaagctg cagttgggga 1260
gctgagtgg agctccagca acgtggta ca gctcatcatg gatgcttata atagcctgtc 1320
ttccaccgtg acccttgaac actcttca ct cctcctggg gtccacattt ctacgaatc 1380
ccagtgtgag ggtcctgaga agagggaggg taaggctgag gatcgaggac agtgcacca 1440
cgtccgaatc aaccagacgg tgactttctg ggtttctctc caagccaccc actgcctccc 1500
agagcccat ctctgaggg tccgggccct tggcttctca gaggagctga ttgtggagt 1560
gcacacgctg tgtactgta attgacgtga caccagccc caggctcccc actgcagtga 1620
tggccaggga cacctacaat gtggtgtatg cagctgtgcc cctggccgcc taggtcggt 1680
ctgtgagtgc tctgtggcag agctgtctc cccagacctg gaatctgggt gccgggctcc 1740
caatggcaca gggcccctgt cagtggaag ggtcactgt caatgtggac gctgcagctg 1800
cagtgagcag agctctgggc atctgtcga gtgtgacgat gccagctgtg agcgacatga 1860
gggcatctc tgcggaggct ttggtcgtg ccaatgtgga gtatgtcact gtcagtccaa 1920
ccgcacgggc agagcatgag aatgcagtg ggacatggac agttgcatca gtcccaggg 1980
agggctctgc agtggcatg gacgtgcaa atgcaaccgc tggcagtgct tggacggcta 2040
ctatggtgct ctatgcgacc aatgccagg ctgcaagaca ccatgcgaga gacaccggga 2100
ctgtgcagag tgtggggcct tcaggactgg cccactggcc accaactgca gtacagctt 2160
tgcccatacc aatgtgacc tggcctggc cctatcttg gatgatggct ggtgcaaga 2220
gggaccctg gacaaccagc tgttctctt ctgtgtggag gatgacgcca gaggcacgt 2280
cgtgtcaga gtgagacccc aagaaaagg agcagaccac acgcaggcca ttgtgtggg 2340
ctgcgtaggg ggcatcgtg cagtggggct ggggctggtc ctggcttacc ggctctcgt 2400
ggaaatctat gaccgccggg aatagactg ctttgagaag gagcagcaac aactcaactg 2460
gaagcaggac agtaatctc tctacaaaag tgccatcacg accaccatca atcctcgtt 2520
tcaagaggca gacagtccca ctctctgaag gaggaggga cacttaccga aggtcttct 2580
ccttgaggga cagtgggaac tggagggtga gaggaagggt ggtctgttaa gaccttgta 2640
gggactaat tcaactggca ggtgcggcca ccacctact tcatittcag agtgacaccc 2700
aagagggtg ctcccatgc ctgcaacctt gcatccatct gggctacccc acccaagtat 2760
acaataaagt ctacctcag aaaaaaaaa aaaaaaaa 2798

```

[0035]

<210> 69
 <211> 798
 <212> PRT
 <213> 人(Homo Sapiens)

<400> 69
 Met Val Ala Leu Pro Met Val Leu Val Leu Leu Leu Val Leu Ser Arg
 1 5 10 15
 Gly Glu Ser Glu Leu Asp Ala Lys Ile Pro Ser Thr Gly Asp Ala Thr
 20 25 30
 Glu Trp Arg Asn Pro His Leu Ser Met Leu Gly Ser Cys Gln Pro Ala
 35 40 45
 Pro Ser Cys Gln Lys Cys Ile Leu Ser His Pro Ser Cys Ala Trp Cys
 50 55 60
 Lys Gln Leu Asn Phe Thr Ala Ser Gly Glu Ala Glu Ala Arg Arg Cys

65	70	75	80
Ala Arg Arg Glu Glu	Leu Leu Ala Arg Gly	Cys Pro Leu Glu Glu	Leu
	85	90	95
Glu Glu Pro Arg Gly	Gln Gln Glu Val	Leu Gln Asp Gln Pro	Leu Ser
	100	105	110
Gln Gly Ala Arg Gly	Glu Gly Ala Thr	Gln Leu Ala Pro	Gln Arg Val
	115	120	125
Arg Val Thr Leu Arg	Pro Gly Glu Pro	Gln Gln Leu Gln	Val Arg Phe
	130	135	140
Leu Arg Ala Glu Gly	Tyr Pro Val Asp	Leu Tyr Tyr Leu	Met Asp Leu
	145	150	155
Ser Tyr Ser Met Lys	Asp Asp Leu Glu	Arg Val Arg Gln	Leu Gly His
	165	170	175
Ala Leu Leu Val Arg	Leu Gln Glu Val	Thr His Ser Val	Arg Ile Gly
	180	185	190
Phe Gly Ser Phe Val	Asp Lys Thr Val	Leu Pro Phe Val	Ser Thr Val
	195	200	205
Pro Ser Lys Leu Arg	His Pro Cys Pro	Thr Arg Leu Glu	Arg Cys Gln
	210	215	220
Ser Pro Phe Ser Phe	His His Val Leu	Ser Leu Thr Gly	Asp Ala Gln
	225	230	235
Ala Phe Glu Arg Glu	Val Gly Arg Gln	Ser Val Ser Gly	Asn Leu Asp
	245	250	255
Ser Pro Glu Gly Gly	Phe Asp Ala Ile	Leu Gln Ala Ala	Leu Cys Gln
	260	265	270
Glu Gln Ile Gly Trp	Arg Asn Val Ser	Arg Leu Leu Val	Phe Thr Ser
	275	280	285
Asp Asp Thr Phe His	Thr Ala Gly Asp	Gly Lys Leu Gly	Gly Ile Phe
	290	295	300
Met Pro Ser Asp Gly	His Cys His Leu	Asp Ser Asn Gly	Leu Tyr Ser
	305	310	315
Arg Ser Thr Glu Phe	Asp Tyr Pro Ser	Val Gly Gln Val	Ala Gln Ala
	325	330	335
Leu Ser Ala Ala Asn	Ile Gln Pro Ile	Phe Ala Val Thr	Ser Ala Ala
	340	345	350
Leu Pro Val Tyr Gln	Glu Leu Ser Lys	Leu Ile Pro Lys	Ser Ala Val
	355	360	365
Gly Glu Leu Ser Glu	Asp Ser Ser Asn	Val Val Gln Leu	Ile Met Asp
	370	375	380
Ala Tyr Asn Ser Leu	Ser Ser Thr Val	Thr Leu Glu His	Ser Ser Leu
	385	390	395
Pro Pro Gly Val His	Ile Ser Tyr Glu	Ser Gln Cys Glu	Gly Pro Glu
	405	410	415
Lys Arg Glu Gly Lys	Ala Glu Asp Arg	Gly Gln Cys Asn	His Val Arg
	420	425	430
Ile Asn Gln Thr Val	Thr Phe Trp Val	Ser Leu Gln Ala	Thr His Cys
	435	440	445
Leu Pro Glu Pro His	Leu Leu Arg Leu	Arg Ala Leu Gly	Phe Ser Glu
	450	455	460
Glu Leu Ile Val Glu	Leu His Thr Leu	Cys Asp Cys Asn	Cys Ser Asp
	465	470	475
Thr Gln Pro Gln Ala	Pro His Cys Ser	Asp Gly Gln Gly	His Leu Gln
	485	490	495
Cys Gly Val Cys Ser	Cys Ala Pro Gly	Arg Leu Gly Arg	Leu Cys Glu
	500	505	510
Cys Ser Val Ala Glu	Leu Ser Ser Pro	Asp Leu Glu Ser	Gly Cys Arg
	515	520	525
Ala Pro Asn Gly Thr	Gly Pro Leu Cys	Ser Gly Lys Gly	His Cys Gln
	530	535	540
Cys Gly Arg Cys Ser	Cys Ser Gly Gln	Ser Ser Gly His	Leu Cys Glu
	545	550	555
Cys Asp Asp Ala Ser	Cys Glu Arg His	Glu Gly Ile Leu	Cys Gly Gly
	565	570	575

[0036]

[0037]

Phe	Gly	Arg	Cys	Gln	Cys	Gly	Val	Cys	His	Cys	His	Ala	Asn	Arg	Thr
			580					585					590		
Gly	Arg	Ala	Cys	Glu	Cys	Ser	Gly	Asp	Met	Asp	Ser	Cys	Ile	Ser	Pro
		595					600					605			
Glu	Gly	Gly	Leu	Cys	Ser	Gly	His	Gly	Arg	Cys	Lys	Cys	Asn	Arg	Cys
	610					615					620				
Gln	Cys	Leu	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ala	Leu	Cys	Asp	Gln	Cys	Pro	Gly
625					630					635					640
Cys	Lys	Thr	Pro	Cys	Glu	Arg	His	Arg	Asp	Cys	Ala	Glu	Cys	Gly	Ala
			645						650					655	
Phe	Arg	Thr	Gly	Pro	Leu	Ala	Thr	Asn	Cys	Ser	Thr	Ala	Cys	Ala	His
			660					665					670		
Thr	Asn	Val	Thr	Leu	Ala	Leu	Ala	Pro	Ile	Leu	Asp	Asp	Gly	Trp	Cys
		675					680					685			
Lys	Glu	Arg	Thr	Leu	Asp	Asn	Gln	Leu	Phe	Phe	Phe	Leu	Val	Glu	Asp
	690					695					700				
Asp	Ala	Arg	Gly	Thr	Val	Val	Leu	Arg	Val	Arg	Pro	Gln	Glu	Lys	Gly
705					710					715					720
Ala	Asp	His	Thr	Gln	Ala	Ile	Val	Leu	Gly	Cys	Val	Gly	Gly	Ile	Val
			725						730					735	
Ala	Val	Gly	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Tyr	Arg	Leu	Ser	Val	Glu	Ile
		740						745					750		
Tyr	Asp	Arg	Arg	Glu	Tyr	Ser	Arg	Phe	Glu	Lys	Glu	Gln	Gln	Gln	Leu
	755						760					765			
Asn	Trp	Lys	Gln	Asp	Ser	Asn	Pro	Leu	Tyr	Lys	Ser	Ala	Ile	Thr	Thr
	770					775					780				
Thr	Ile	Asn	Pro	Arg	Phe	Gln	Glu	Ala	Asp	Ser	Pro	Thr	Leu		
785					790					795					

cgcgctctgcggctgcgttccccgaaagacgaggctgcgcccggattccgggtccgcagggagaccgaagggcacagctccccgcgccc
cgcacgcgccccgagcccggagtgccggacacccccgggatgcttgcgcccagaggacccgcgccccaaagccccgcgcccgcgccc
aggcccacccggagcatgctgcctgcagccatgaaggccctggcctggcgctgctggccgtcctgctgtgctcggcggccgctcatgg
cctgtgggtgccaggactgcacctgaccaccaactccagccattgcacccaaagcagtgccagccgtccgacacgggtgtgcccagtg
ccgaatcacccgatcccagcagcagcaggaaggatcactcgggtgaacaagatgtgtgcctcctcctgtgacttcgttaagcgacacittttctc
agactatctgatggggtttattaactctgggatcttaaggctgcacgtggactgctgcgagaaggatttgtcaatggggcggcaggggag
ggcacagccccctgggccctggccggggggctcctgctcagcctggggcctgccctcctctgggctggggccctgatgtctcctcctccca
cggggcttctgagcttgctccccctgagcctgtggctgccctcctccagcctggcgtggctggggctgggggcagccttgcccagctcc
gtggctgtggcctgtggctcctcctccccgacgtgaagcctcctgtcctcggcagctctgagtcaggcagctggacatctcca
ggaaaccaggccatctgggagggagcctggggatgagggtggggggggacccccaggtcccggagggggaagtgaagcaacagcc
cagctggaaggcgctctcgcggag aaataaagtcacititgagtcctgagaaaaaaaaa

图1A

MLPAAMKGLGLALLAVLLCSAPAHGLWCQDCTLTTNSSHCTPKQCQPSDTVCAVRIT
DPSSSRKDHVSVMKMCASSCDFVKRHHFFSDYLMGFINSGLKVDVDCCEKDLNKAAGA
GHSPWALAGLLLLSLGPALLWAGP

图1B

agggcggtgt caatgcaccc tccagcgggtg cgcgcaggcg ggagaaggga gggcgggccg ggcaagttag acagtttaagg
cagtgtcccc accacacccc caccagatt ggccacggcg agctgtgtct tgacagaagg ccttcgcgga ggaagagggg
gcacagctgc acaggacacc ctacggagcc tgcgggcgtg gaactttgcc aggcgcacgg gaacgcgcgc ccttcctgtc
agcctccccg ggcgccaggc tccgcggcc cgcagcggga cagcctcagt tgtgtgggtt ggaccagtc gctggggtag
cgaccagtc tggaaaggcg agaggacgtg gactggggag gctgccttc tatgtcgaa gggccagccg ggcacgcagt
cctcagaccc tagtccgcac ccggcaggtc ccacggcac ctgtgcgcc ctctcgccg ccccccaac cccccatct
cagaaaaacta ccagttctct cccgcccccc ggcgccccct tccagggaac gtgcggaggc gggagaagag gaagacagga
aggggggtgg gatgtgaagc gaccgtccca gcttccccg ccgcccacc ccacccaac tcggcagccg tcacgtgatg
cctggagtgg gaggtgggga gaaaaggcga gactttgtg ggtgtctccg atcgccagta gtctctcag tctcagccgc
caactccgga ggcgcgggtgc tggccccgg agcgcgagcg ggaggagcag agaccgcag ccgggagccc gagcgcgggc
gatgcaggct ccgcgagcgg cactgtcgcc tctctaaag tacgaccgtc gtctccggc cagcagcgcg ggcgccagca
gcctcgagc ccacagccgc tgcagccggg gcagcctccg ctgtgtgc ctctctgat gcgttgccc tctccggcc
ccgggactcc gggagaatgt gggctcagg catcgcggca acttttgcg gattgtctt gcttcaggc tttgcgtgc
aatccagt ctaccagtgt gaagaattcc agctgaacaa cgactgtcc tccccgagt tcattgtgaa ttgcaggtg
aacgttcaag acatgtgtca gaaagaagt atggagcaaa gtccgggat catgtaccgc aagtctgtg catcatcagc
ggcctgtct atcctctg ccgggtacca gtctctgc tcccaggga aactgaactc agttgtac agctgtgca
acacccctct ttgaacggg ccaaggcca agaaaagggg aagtctgcc tggccctca ggcagggtt ccgaccacc
atctgttcc tcaattagc cctctctg gcacactgt gaagctgaag gagatgccac cccctctgc attgtctc cagcctcgc
cccaacccc ccactccct gactgagtt ctctgggtt tcttttatt ctggtaggg agcgggagtc cgtgtctct tttgtctg
tgcaataat gaaagagctc ggtaaagcat tctgaataa ttcagcctga ctgaatttc agtatgtact tgaaggagg
agggtggagt aaagttacc ccatgtctg tgaaccgga gtcaaggcca ggctggcaga gtcagtcctt agaagtcact
gaggtgggca tctgccttt gtaagcctc cagtgtccat tccatccctg atgggggcat agttgagac tgcagagtga
gagtgcgtt tcttagggc tggagggcca gtccaccac aaggctccct cgttgacat tcaactica tgccttgaa aacctctc
tgcagcagaa ttggctggtt tgcgcctga gtgggctct agtgactga gactcaatga ctgggactta gactggggt
cggcctcgt ctgaaaagt ctaagaaaa tctctcagt tctcttga gaggactggc gccgggacgc gaagagcaac
gggcgtgca caaagcgggc gctgtcgtg gtggagtgc catgtacgc caggcgctc tctgtgttg cgtgtgag
cgacaggcgg cagcacagca cctgcacgaa ccccccca aactgtgcg aggacaccgt gtacaggagc gggttgatga
ccgagctgag gtagaaaaac gtctccgaga aggggaggag gatcatgtac gccgggaagt aggacctgt ccagctgtc
ttgggttg ccgcagccat gatctccga atctgtgtg gcatccagca tacggccaat gtcacaacaa tcagccctgg
gcagacagca gcaggaggga gagacagaga aaagaaaaac acagcatgag aacacagtaa atgaataaaa ctaaaaaa
tttagccct ctgtctgtg ctactggcc aggaatgtt accaatttt cagtgttga ctgacagct tctttgcca caagcaagag
agaattaac actgttcaa acccggggga gttggctgt taaagaaag accatlaaat gcttagaca gtgtattat accagttgat
gtctgtaat ttaaaaaa tgttttcat ggtgtgtt tgcgtatcca gaaagcagtt catgtatcc ata

图2A

gatgcctgga gtgggaggtg gggagaaaag gcgagacttt tgtgggtgct cccgatcgcc agtagttcct tcagtctcag
 ccgccaactc cggaggcgcg gtgctcgcc cgggagcgcg agcgggagga gcagagacc gcagccggga gcccgagcgc
 gggcgatgca ggctccgga gggcacctg cggctctct aagctacgac cgtcgtctcc gcggcagcag cgcggggccc
 agcagcctcg gcagccacag ccgctgcagc cggggcagcc tccgctgctg tcgcctcctc tgaatgcctt gccctctccc
 ggccccggga ctccgggaga atgtgggtcc taggcacgc ggcaacttt tgcggattgt tcttgctcc aggccttgcg
 ctgcaaatcc agtctaccca gtgtgaagaa ttccagctga acaacgactg ctctcccc gagtcattg tgaattgac
 ggtgaacgtt caagacatgt gtcagaaaga agtgaaggag caaagtgcg ggatcatgta ccgaagtcc tgtcatcat
 cagcggcctg tctcatcgcc tctgcccgggt accagtcctt ctgctccca gggaactga actcagttg catcagctgc
 tgaacaccc ctctttaa cgggccaagg ccaagaaaa ggggaagtc tgcctcgcc ctcaggccag ggctccgcac
 caccatctg ttctcaaat tagcctctt ctggcacac tctgaagct gaaggagatg ccacccctc ctgattgt ctccagccc
 tcgccccaa cccccacct cctgagtgta gttctctg ggtgtcctt tctctgggt agggagcggg agtccgtgt ctctttgt
 cctgtgcaa laatgaaaga gctcggtaaa gcattctga taaatcagc ctgactgaat tttagtatg tactgaagg
 aaggaggtg agtgaagtt caccatg tctgtgaac cggagtcaag gccaggctg cagagtcagt cctagaagt
 cactgaggtg ggcactgccc ttgttaaag cctcagctt ccatccatc cctgatggg gcatagtgt agactgcaga
 gtgagagtga cgtttctta gggctggagg gccagttccc actcaaggct cctcgttg acattcaaac ttatgctcc
 tgaaaacct tctctcagc agaattggct ggttcgcgc ctgagttgg ctctagtac tcgagactca atgactggga
 cttagactg ggctcgcc ctgctgaaa agtgcctaa aaaatctct cagttctct tgcagaggac tggcgccggg
 acgcgaagag caacggcgcg tgcacaaagc gggcgtgtc ggtggtggag tgcgatgta cgcgaggcg ctctcgtg
 ttggcgtgct gcagcgacag gcggcagcac agcactgca cgaacaccg ccgaaactgc tgcgaggaca ccgtgtacag
 gagcgggtg atgaccgagc tgaggtaga aaacgtctc gagaaggga ggaggatcat gtaccccg aagtaggacc
 tctccagtc gtgctgggt ttggccgag ccatgatct ccgaatctg ttgggcatcc agcatagcg caatgtcaca
 acaatcagcc ctgggcagac acgagcagga gggagagaca gaaaaagaa aaacacagca tgagaacaca gtaaatgaat
 aaaaccataa aatattagc cctctgtt tctgttact ggccaggaaa tggtagaat tttagtgt tggactgac agctcttt
 gccacaagca agagagaatt taacatgt tcaaacccg gggagttggc tgtgttaaag aaagaccatt aatgtctta gacagt

图2B

MWVLGIAATFCGLFLLPGFALQICYQCEEFQLNNDCSSPEFIVNCTVNVQDMCQKEV
 MEQSAGIMYRKSCASSAACLIASAGYQSFCSGKLNNSVCISCCNTPLCNGPRPKKRSSA
 SALRPGLRTTILFLKLALFSAHC

图2C

aaggctgggg ttgcctgggg cgaggttact catcctgggc tcaggtaaga gggcccagc tcggaggcgg cacatccagg
ggggacgcca agggagcagg acggagccat ggaccccgcc aggaaagcag gtcccaggc catgatctgg actgcaggct
ggctgctgct gctgctgctt cgcggaggag cgcaggccct ggagtgtac agctgcgtgc agaaagcaga tgacggatgc
tccccgaaca agatgaagac agtgaagtgc gcgccgggcg tggacgtctg caccgaggcc gtggggggcg lggagacat
ccacggacaa ttctcgctgg cagtgcgggg ttgcggctc ggactccccg gcaagaatga ccgcgccgtg gatcttcacg
ggctctggc gtcatccag ctgcagcaat gcctcagga tcgctgcaac gccaagctca acctaccctc gcgggcgctc
gacccggcag gtaatgagag tgcatacccg cccaacggcg tggagtgtc cagctgtgtg ggcctgagcc gggaggcgtg
ccagggtaca tcgccgcgg tcgtgagctg ctacaacgcc agcgtatg tctacaaggg ctgcttcgac ggcaacgtca
ccttgacggc agctaattg actgtgtcct tgcctgtccg gggctgtgtc caggatgaat tctgactcgg ggatggagta
acaggcccag gggtcacgt cagtggctcc tgttgcagg ggtcccgtg taactctgac ctccgaaca agacctactt
ctccccga atcccaccc ttgtccggct gcccctcca gagccacga ctgtggcctc aaccacatct gtcaccactt
ctacctggc cccagtga cccacatcca ccacaaacc catgccagc ccaaccagc agactccgag acaggagta
gaacacgagg cctccgggga tgaggagccc aggttgactg gagcgccgc tggccaccag gaccgagca attcagggca
gtatctgca aaaggggggc ccagcagcc ccataataa ggctgtgtg ctcccagc tggattggca gccctctgt
tggcgtggc tctgtgtg ctactgtg cttctccac tggaaattc cctctacct acttctctg ccttgggtac cctctctc
atcacttct gttccacca ctggactggg ctggccagc cctgtttt ccaacattc ccagtatcc cagttctgc tgcgtggtt
tgcggttgg ggaataaaa taccgttga tatattctg cagggtgtt ctactttt gaggacagct cctgtatct tctatcctt
gtctctcgc ttgctctt gtgatgtg gacagagtga gagaagtcag ctgtcacggg gaagggtaga gagaggatgc
taagcttct acacattc tctagccag cctggactt ggagcgtggg gtgggtggga caatggctc ccacttaag
cactgcctc cctaccccc gcattcttg ggaatcggt cccatattg ctcttact agactgtgag ctctcgagg
gcagggaccg tgcctatgt ctgtgtga tcagttctg gcacataat gcccaataa agatttaatt actttgaaa aaaaaaaaaa
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

图3A

MDPARKAGAQAMIWTAGWLLLLLLRGGGAQALECYSCVQKADDGCSPNKMKTVKCAP
GVDVCTEAVGAVETIHGQFSLAVRGCGSLPGKNDRGLDLHGLLAFTQLQQAQDRCN
AKLNLTSRALDPAGNESAYPPNGVECYSCVGLSREACQGTSPPVVSCYNASDHVYKGC
FDGNVTLTAANVTVSLPVRGCVQDEFCTRDGVTGPFTLSGCCQGSRCNSDLRNKTYF
SPRIPLVRLPPPEPTTVASTTSVTTSTAPVRPTSTTKPMPAPTSQTPRQGVHEASRDEE
PRLTGGAAGHQDRSNSGQYPAKGGPQQPHNKGCVAPTAGLAALLLAVAAGVLL

图3B

gatccgcttt ggcacatcca gtgattcttg ggttccgcgt gtatttccgg aaggagacat cgaagcaggg cgaggcgag
agggcgltgc ggactcatgc cccagtcggc agtgcggggt cccaagccct gcagtgtac agctttgagc acacctactt
tgcccccttt gacctcaggg ccatgaagct gccagcacc tctgtctc atgagtgttt tgaggctatc ctgtctctgg
acaccgggta tcgcgcgccc gtgaccttgg tgcggaaggg ctgttgacc gggcctcctg cgggcccagac gcaatcgaac
gcggacgcgc tgcgccaga ctactcgttg gtgcgcgggt gcacaactga caaatgcaac gccacacctca tgactcatga
cgccctcccc aacctgagcc aagcaccga cccgcggacg ctacagcggc cagagtgtta cgctgtatc ggggtccacc
aggatgactg cgctatcgcc aggtcccgac gagtccagtg tcaccaggac cagaccgcct gcttccaggg caatggcaga
atgacagtig gcaatttctc agtcctgtg tacatcagaa ctgccaccg gccctcctgc accaccgagg gcaccaccag
cccctggaca gccatcgacc tccagggtc ctgtgtgag gggtaacctc gcaacaggaa atccatgacc cagcccttca
ccagtgttc agccaccacc cctccccgag cactacaggt cctggccctg ctctcccag tctcctgtct ggtggggctc
tcagcataga ccgccccctc aggatgtctg ggacagggct cacacacctc attctgtctg ctacagcccc tatcatag
ctactggaa aatgaltga aagtaagaat tgcactcctg tccctctggc ctccatctc tcccgcctt gtccccaca acctggccaa
cagtactgga agaaactgga cacagtacc agcatcccc gggaggggcaa aacagccatg tctgtcccc atgaagagca
attctgatca cagctgttcc tcatlgagca ccagccaggc accaggcacc ccataacacg gcttctgtg ctctccctcc
agagcctgtc gcagctctag gaggagagta tacaatgatg tctttattag tgcacatg agaagccaa taagcagat
gccccaccag ttatggggc aggcctctga gctaagctgc atgggttcaa atcccagctc caccattcag cctgcagaga
ccatgagcga gttacttaag ccaggctctg gagtaagct gcatgggttc aaatcccagc tccagcattc agcctacaga
gacctgggt gagttacta agccaggctc tggagctaag ctgcatgggt tcaaatccca gctccaccat tcagcctgca
gagactgttg gtgagttact tgagctctct gtgccaatat ttctcacct ataaggtgga ggtgaaaata aactctataa catgacaaga
actactcac agtagttgca gtgaggattc aacgagatga acatttagta cttgggacac agcagtggcc cagtgtaaat
gggctacttg tcataagccc taagtacag gtaacaaac tgagaggcaa aagcacttgg ttgagcttgt gtatctagt
agtatggatt cagggaccag attcccagcc ccacgaactg ctaagcaacc ccacctcta aacacatgag tgcgattaa
cttcacagaa aaacacacaa ggcaaagtc agcgaggta aattctcaa gctataaaga tcagggaaga ctctctggag
gaattcacc ttgagcaaaa tctaaagga tcaatagtag ctggcaaaaa gaagcaggag gaagcgatt ctaggtagag
gagacagcct ggacaaaggt ctgaggaggg aaggagcaca aggagtgcag gacacittca tgagtgcagg acacttcat
aactgcata acttcataga gatgggaacc tttagcatgt tctctgtgca catgcttgc catgttctt cacatgctt ttgccactg
atcttccag caactcagtg agagaagcaa aaaagtaagt tgcacctgc tattgtctga atgtttgtgt cccccaaaa ttatcttt
gaaaccta ataccaagt atattactgg gaggtggggc ctttggagg tggtagatc atgagggtgg agccccatg
aataggatta gtgcccatt aaaagaggcc ctggagagct gccttgcctc ttccaccaca tgagaacaca gccagcaggt
gcctataagc aagaaagtgg gtctcacca gccatcgaat ctgctgtgct attgattgca gacttcccag actccagagc
tatgagacat aaatttctgt tgtgtataag ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

图4A

gattcttggg ttccgcgcgt agtttcggaa ggagacatcg aagcagggcg aggcgcagag ggcgttgcgg actcatgccc
 cagtcggcag tgcgggggtcc caagccctgc agtgctacag CtttgagCaC acctactttg gccccttga ctcagggcc
 atgaagctgc ccagcatcic ctgtcctcat gagtgtttg aggctatcct gtctctggac accgggtatc gcgcgccggt
 gaccttggtg cggaagggtc gctggaccgg gcctcctgcg ggccagacgc aatcgaacce ggacgcgctg ccgccagact
 actcgggtgt gcgcggctgc acaactgaca aatgcaacgc ccacctcatg actcatgacg cctccccc aa cctgagccaa
 gcaccgacc cgccgacgct cagcggcgcc gagtgtacg cctgtatcgg ggtccaccag gatgactgcg ctatcggcag
 gtcccagcga gtccagtgc accaggacca gaccgcctgc ttccagggca gtggcagaat gacagtggc aatttctag
 tccctgtgta catcagaacc tgcaccggc cctctgcac caccgaggc accaccagcc cctggacagc catgaccic
 cagggtcct gctgtgagg gtaccttgc aacaggaaat ccatgaccca gcccttacc agtgcttcag ccaccacccc
 tccccgagca ctacaggtcc tggccctgct cctcccaglc ctctgtctg tggggctcic agcatagacc gccctccag
 gatgtgggg acagggtca cacacctcat tctgtctgt tcagccccta tcacatagct cactggaaaa tgaigtlaaa
 gtaagaattg cactcctgc ccttggcct tccatctcic ctgccctgt gcccacaac ctggccaaca gtactggaag
 aaactggaca cagtcaccag catccagggt gagggcaaaa cagccatgtc gtgccctgat gaagagcaat tctgacaca
 gctgttact actgagcacc agccaggcac caggcaccac ataacacggc ttctgtgtc ctcttccag agcctgtcgc
 agctctagg gggagctata caatgatgtc ttlatagtg tcatcatgag aagcccaata agcagtatgc ctaacagtt
 agtaggccag gctctggagc taagctgcat gggttacat cccagctcca ccattcagc tgcagagacc atgagcgagt
 tacttaagcc aggccttga gctaagctgc atgggttcaa atcccagctc cagcattcag cctacagaga ccatgggtga
 gttacttaag ccaggctctg gagctaagct gcatgggttc aaatcccagc tccaccattc agcctgcaga gactgtgggt
 gagttacttg agctctctgt gccaatatt tctacctat aagggtggag tgaataaaa ctctataaca tgacaagaac tacttcacag
 tagtgcagt gaggattcaa cgagatgaac atttagtact tgggacacag cagtggccca gtataaatgg gctactgtc
 ataagcccta agtcacaggt caacaaactg agaggtaaaa gcacttggti gagcttgtgt atctagttag tatggattca
 gggaccagat tcccagcccc acgaactgt aagcaacccc accctctaaa cacatgagtg ccgattaact tcacagaaaa
 acacacaagg caaagttcag cgagggtgaaa ttctccaagc tataaagatc aggggaagact tctggagga attcaccctt
 gagcaaaatc ctaaaggatc aatagtagct ggcaaaaaga agcaggagga agcacattt aggtagagga gacagcctgg
 acaaaggctc gagggaggaa ggaacacaag gagtgcagga cacttcata actgcatgaa ctcatagag atgggaccc
 ttgcatgtt ctctgtgcac atgctgacc atgttcttc acatgcttt tgcacttga tcttccagc aactcagtga gagaagcaaa
 aaagtaagtt gcatcctg

图4B

MKLPSISCPHECFEAILSLDTGYRAPVTLVRKGCWTGPPAGQTQSNADALPPDYSVVRG
 CTTDKCNAHLMTHDALPNLSQAPDPPTLSGAECYACIGVHQDDCAIGRSRRVQCHQDQ
 TACFQGNRMRTVGNFSPVYIRTCHRPSCCTTEGTTSPWTAIDLQGSCEGYLCNRKSMT
 QPFTSASATTPPRALQVLALLLPVLLLVGLSA

图4C

ctgagaggaa gtttatctg tgcagccct ctctgaggat ggacacttct cactactaca agtctgttt gctgattctt cttgtggccc
 tactgtgtgc agaaagagct caggggactgg agtggtacca gtgctatgga gtccatttg agacttctg cccatcaat
 acctcccci accctgatgg agtctgtgt actcaggagg cagcagttat tgtgattct caaacaagga aagtaaagaa
 caatcttgc ttacctatc gccctcctaa tattgaagt atggagatcc tgggtactaa ggtcaacgtg aagacttcti gttgccagga
 agaccttgc aatgtagcag ttccaatgg aggcagcacc tggaccatgg cagggtgtct tctgttcagc ctgagctcag
 tctcttgc aacctgtc tcatggtcct cccaalgacc tccaccttg tcttttacc ctcatgtgca acaattctc ctggagccct
 ctagtgalga attatagtt atagaagctc caagggtgga gtatgtgtg aaataccatg ttltgcttt atagccccg ctgggttagt
 aggtgtctc atctctccta gggcttcaa gctgtactt cctagaatgt catltgttg tggattgtc ctcatgacc tggaggaca
 cagccagcac agtgaagagg cagaattcca aggtattatg ctatccat ccacacataa gtatctgggg tctgcaatg
 tcccacatg tatctgaat gtccccctgt tgaagccaat aaaccttltg tctcccaaa aaaaaaaaa aa

图5A

MDTSHTTKSCLLILLVALLCAERAQGLECYQCYGVPFETSCPSITCPYPDGVCVTQEAIV
IVDSQTRKVKNNLCLPICPPNIESMEILGTKVNVKTSCCQEDLCNVAVPNGGSTWTMAG
VLLFSLSSVLLQTL

图5B

gctccggcca gccgcgggcc agagcgcgcg aggttcgggg agctccgcca ggctgctggt acctgcgtcc gcccggcgag
caggacaggc tgccttggtt tctgacctcc aggcaggacg gccatcctct ccagaatgaa gatcttcttg ccagtgtctgc
tggctgccct tctgggtgtg gagcgagcca gctcgtgat gtgcttctcc tgcctgaacc agaagagcaa tctgtactgc
ctgaagccga ccaictgtc cgaccaggac aactactgcg tgaactgtgc tgaagtgc gccattggga atctctgtac
atttgccac agcctgagca agacgtgtc cccggcctgc cccatcccag aaggcgtcaa tcttggtgtg gcttccatgg
gcatcagctg ctgccagagc ttctgtgca attcagtc ggccgatggc gggtgcggg caagcgtcac cctgtgggt
gccgggctgc tctgagcct gctgccggcc ctgctgcgtt ttggccctg accgccaga cctgtccc cgatcccca
gctcaggaag gaaagcccag cctttctgg atcccacgt gtatgggagc ccctgactcc tcactgtcct gatctgtcc
cttggtcca ggtcaggccc acccctgca cctccactg cccagcccc tgcctctgcc caagtgggc agctgccctc
actctgggg tggatgagt gacctctt gggggactgc ggaaggagc agggttccct ggagtctac ggtccaacat
cagaccaagt cccatggaca tctgacagg gtcccaggg agaccgtgc agtaggatg tctgctggc tctgtactg
gggtgtcagt gcacgtgaga gcacgtggc gcttctggg gccatgttg gggaggagg tctgccagca gccggagag
cctcagctcc tctagcccc tgcctggca cagctgcat cactcaagg gcagccttg ggggttggg ttctgccac
ttccgggtct aggcctgcc caatccagc cagctctgc ccagcccacc cccacattg agcctctg ctgcttgg
gcctcaaata aatacagatg tccc

图6A

MKIFLPVLLAALLGVERASSLMCFSLNQSNNLYCLKPTICSDQDNYCVTVSASAGIGNL
VTFGHSLSKTCSPACPIPEGVNVGVASMGISCCQSFLCNFSAADGGLRASVTLLGAGLLL
SLLPALLRFGP

图6B

ccagtctgc gccacctcac ttggtgtctg ctgtccccgc caggcaagcc tgggtgaga gcacagagga gtgggccggg
acctgcggg ggacgcggct ggcgctcctg gcgctggtgc tggctgcctg cggagagctg gcgccggccc tgcgtgcta
cgtctgtccg gagcccacag gagtgtcgga ctgtgtacc atcgccacct gcaccacaa cgaaccatg tgaagacca
cactctact ccgggagata gtgtaccct tccaggggga ctccacggtg accaagtcct gtgccagcaa gtgtaagccc
tcggatgg atggcatcg ccagaccctg cccgtgtcct gctgcaatac tgagctgtgc aatgtagacg ggccgcccgc
tctgaacagc ctccactgc gggccctcac gctcctcca ctctgagcc tccgactgta gactccccgc ccaccccat
ggccctatgc ggccagccc cgaatgcct gaagaagtgc cccctgcacc agggaaaaa aaaaaaaa

图7A

MRGTRLALLALVLAACGELAPALRCYVCPEPTGVSDCVTIATCTTNETMCKTTLYSREI
VYPFQGDSTVTKSCASKCKPSDVDGIGQTLPVSCNTELCNVDGAPALNSLHCGALTLL
PLLSLRL

图7B

aagatggcgg cgtgtggacg tgtacggagg atgttccgct tgcggcggc gctgcatctg ctgctgctat tcgcccggcg
 ggccgagaaa cccccggcc atggcgcca cagccaggcg cagggtcccg gggccaactt tgtgtcttc gtagggcagg
 ccggaggcgg cggcccgcg ggtcagcagc tgcacagct gcttcagica tgcagcttc agcagcaaca gcagcagcag
 caacagcaac agcagcttca gcccccgag ccgcttcc cggcgggtgg gctccggcc cggcggggag gagcgggggc
 tgggtggggc tggaaactgg cggaggaaga gtccgtcagg gaggacgtga cccgcgtgtg ccctaagcac acctggagca
 acaacctggc ggtgtcagc tgcctgcagg atgtgaggga gctgaaaaat gaaatttctt cagactgcaa tcatttgtt
 tggattata agctgaacct aactacagat cccaaattt aaactgtggc cagagagggt tgcatttcta ctataacaga
 gattaaagaa tgtgtgatg aaccggttgg aaaagggtac atgttttctt gcttagtgga tcaccgaggc aactcactg
 agtatcagtg tcaccagtac attaccaaga tgacggccat catcttagt gattaccgtt taactgtgtg ctcatggat gactgcaaaa
 atgacatcaa catctgaaa tgggcagta ttcggcttgg agaaaaggat gcacattcac aagggtagggt ggtatcatgc
 ttggagaag gcttgggtga agaagcagaa gaaagagaac ccaagattca agtttctgaa ctctgcaaga aagccattct
 ccgggtggct gagctgtcat cggatgactt tcacttagac cggcatctt atttgttgg ccgagatgat cgggagcgtt ttgtgaaa
 tacacaagct ggttggggca ggtgtataa gtgctctt aaccataaat tgaagaatc catgagtga aagtgtcag
 aagcacttac aaccgcca aagctgattg ccaggatta taaagtcagt tattcattgg ccaaatctg taaaagtac
 ttgaagaat accggtgcaa tgtgaaaac ctccgcgat cgcgtgaagc caggctctcc tacttgttaa tgtccttga
 gtcagctgta cacagaggcg gacaagtcag cagtgtgtgc cagggggaga tgcgtgatta ccgacgatg ttgatggaag
 acttttctt gagccctgag atcatcctaa gctgtcgggg ggagattgaa caccattgtt ccgattaca tcgaaaagg
 cggaccctac actgtctgat gaaagtagt cgaggggaga aggggaacct tggatgaac tgcagcagg cgcttcaaac
 actgattcag gagactgacc ctggtgcaga ttaccgatt gatcagctt tgaatgaagc ttgtgaatct gtaaccaga
 cagcctgcaa acatataaga tctggagacc caatgatct gtcgtgcctg atggaacatt tatacacaga gaagatggt
 gaagactgtg aacaccgtct cttagagctg cagtatttca tctccggga ttggaagctg gacctgtcc tgtaccgaa
 gtccaggga gacgtctc gctttgcca caccacggt tggatgaga ccagtgaatt tatgcctcag ggagctgtgt tcttgtt
 atacagacac gcctaccga ctgaggaaca ggaaggagg ctctcacggg agtgccgagc tgaagtcaa aggatcctac
 accagcgtgc catggtgac aagctggatc ctgccctca ggataagtc ctgattgatc tgggaaaatg gtcagtgag
 aaaacagaga ctggacagga gctggagtgc ctacaggacc atctggatga ctgggtgtg gagtgtagag atatagttg
 caacttact gagttagaat cagaggatat tcaaatagaa gccttgcga tgagagcctg tgagccata attcagaact
 tctgccaga tgggcagat aaccagatag acttgggga cctgatggag tctgtgac agaacaaca ccagaaggac
 atgaacgaga agtgtgcat cggagtacc cactccagc tggtcagat gaaggattt cgttttctt acaagttta aatggcctgc
 aaggaggacg tgtgaagct ttgcccac ataaaaaga aggtggacgt ggtgatctgc ctgagcagc ccgtgcgcaa
 tgacacttg caggagcca aggagcacag ggtgtccctg aagtgcgca ggcagctccg tglggaggag ctggagatga
 cggaggacat ccgctggag

图8A

ccagatctat acgaagcctg caagagtac atcaaaaact tctgtccg tgtgcaatat ggcaacgctc agattatcga
 atgtctgaaa gaaaacaaga agcagctaag caccgctgc caccaaaag taattaaact gcaggagaca gagatgatgg
 acccagagct agactacacc ctcatgagg tctgcaagca gatgataaag aggttctgtc cggagcaga tctaaaacc
 atgttcagt gcttgaagca aaataaaac agtgaatga tggatccaa atgcaaacag atgatacca agcgcagat
 caccagaac acagattacc gctaaaccc catgttaaga aaagcctgta aagctgacat tctaaattc tgcacggta
 tctgactaa ggccaaggat gattcagaat tagaaggaca agtacttct tgcctgaagc tgagatatgc tgaccagcgc
 ctgtctcag actgtgaaga ccagatccga atcattalc aggagtcgc cctggactac cgcctggatc ctacgtcca
 gctgactgc tcagacgaga tctcagct atgtgtgaa gaagcagcag ccaagagca gacaggcag gtggaggagt
 gcctcaagg caacctgtc aagatcaaaa cagaattgtg taaaaggaa gtgctaaaca tgcgaagca aagcaagca
 gacatcttg ttgaccggt acttatact gctgtgccc tggacattaa acaccactgc gcagccatca ccctggcgc
 cggcgctcaa atgtctgtc tcatggaagc actggaggat aagcgggtga ggttacagcc cgagtgcata aagcctca
 atgaccggat tgagatgtg agttacgag caaagggtgc ccagcagat ggcttctctg atcttccat gcaagtaag
 acgttccat ctaagaacta catctctct gtatcagtg ggagcatctg tatattgtt ctgattggcc tgatgtgtg acggatcacc
 aagcagtgta cagcagagct caaggacag tagagcacc ttgaccaca aaggaactac ctatccagt ccagttgt
 acagccctt tgtatgcat cccactcac ctgctctc tcagaagtga cacaacccc gtgttagagc attagcagat
 gtccactgc ttgtccatc cagcctcac tctgtccat ggtgtccct tctctcac cgtgcagcag cagcagctg
 tgcgtgggt tactgctt gtttgcaaa ctgggtta cctgctgtg gacaagtct tctatacca acagaactc cgtacttcc
 agaaccaact cacctgacct gcaactcaaa ggcttttta gaaaaaccac caaaaaaaa a

图8A (续)

MAACGRVRRMFRLSAAHLHLLLF AAGAEKLP GHGVHSQGGPGANFVSFVGQAGGGG
 PAGQQLPQLLQSSQLQQQQQQQQQQQLQPPQPPFPAGGPPARRGGAGAGGGGWKLAE
 EESCREDVTRVCPKHTWSNNLAVLECLQDVREPENESSDCNHLWNYKLNLTDPKFE
 SVAREVCKSTITEIKECADEPVGKGYMVSLVDHRGNITEYQCHQYITKMTAIFSDYRLI
 CGFMDDDCKNDINILKCGSIRLGEKDAHSQGEVVSCLVKGLVKEAEEREPIQVSELCKK
 AILRVAELSSDDFHLDRHLYFACRDDRERFCENTQAGEGRVYKCLFNHKKFEESMSEKCR
 EALTTRQKLIADYKVSYSKAKSCKSDLKKYRCNVENLPRSREARLSYLLMCLESAVHR
 GRQVSSECQGEMLDYRRMLMEDFSLSPHILSCRGEIEHHCGLHRKGRTLHCLMKVVR
 GEKGNLGMNCQALQTLIETDPGADYRIDRALNEACESVIQTACKHIRSGDPMILSCL
 MEHLYTEKMVEDCEHRLLELQYFISRDWKLDPVLYRKCCGDASRLCHTHGWNSETSEF
 MPQGA VFSCLYRHAYRTEEQGRRLSRECRAEVQRILHQRAMDVKLDPALQDKCLDLG
 KWCSEKTETGQLECLQDHLDDLVECRDIVGNLLESEDIQIEALLMRACEPIIQNFC
 HDVADNQIDSGDLMECLIQNKHKQDMNEKCAIGVTHFQLVQMKDFRFSYKFKMACKE
 DVLKLCPNIKKKVDVVICLSTTVRNDTLQEAKEHRVSLKCRRLRVEELEMTEDIRLEP
 DLYEACKSDIKNFCSAVQYGNAAQIECLKENKKQLSTRCHQKVFKLQETEMMDPELDYT
 LMRVCKQMIKRFCEADSKTMLQCLKQNKNSLMDPKCKQMITKRQITQNTDYRLNP
 MLRKACKADIPKFCHGILTKAKDDSELEGQVISCLKLYADQRLSSDCEDQIRIIQESAL
 DYRLDPQLQLHCSDEISSLCAEAAAQEQTGQVEECLKVNLKIKTELCKKEVLNMLKE
 SKADIFVDPVLHTACALDIKHHCAAITPGRGRQMSCLMEALEDKRVRLQPECKKRLND
 RIEMWSYAAKVAPADGFSDLAMQVMTSPSKNYILSVISGSICILFLIGLMCGRITKRVTRE
 LKDR

图8B

gcgtcgagct cgccgaggac tcaagatggc ggctgtgga cgtgtacgga ggatgttccg ctgtcgccg gcgtgcac
 tgcgtgctct attcgccgc gggccgaga aactccccg ccaggcgct cacagccagg gccagggtcc ggggccaac
 ttgtgtctct tctaggga ggcggaggc ggccggccg cgggtcagca gctgcccag ctgcctcagt catcgagct
 tcagcagca cagcagcagc agcaacagca acagcagcct cagccgccg agccgcctt cccggcgggt ggccctccg
 cccggcgggg agggagggg gctgtgggg gctggaagc ggccggaggaa gactcctga gggaggagc gaccgcgtg
 tgcctaacg acacctggag caacaacctg gcgggtgctg agtgcctga ggatgtgagg gacctgaaa atgaatttc
 ttcagactgc aatcattgt tgtggaatta taagctaac ctaactacag atcccaaatt tgaatctgt gccagagagg ttgcaaatc
 tactataca gagattaag aatgtgtga tgaaccggt ggaaaagggt acatggttc ctgcttggtg gatcaccag
 gcaacatcac tgagtacg tgcaccagt acattacca gatgacggc atcatttta gtgattaccg ttaactctg ggcttcagg
 atgactgcaa aatgacalc aacattctga aatgtggcag tattcggtt ggagaaaagg atgcacatc acaaggtag
 gtgtatcat gcttgagaa aggcctggg aaagaagcag aagaaagaga acccaagatt caagtctg aactctgcaa
 gaaagccatt ctccgggtg ctgagctgc atcgatgac ttacttag accggcatt atatttctg tccgagatg
 atcgggagc tttttgaa aatacacaag ctgtgaggg cagagtgtat aagtgcctt ttaaccataa attgaagaa
 tccatgagtg aaaagtgtc agaagcactt acaaccgcc aaaagctgat tggcaggat tataaagtca gttattcatt
 ggccaaatc tgaagagtg actgaagaa ataccggtgc aatgtgaaa acctccgcg atcgctgaa gccaggctct
 cctactgtt aatgtgctg gactcagctg tacacagagg gcgacaagtc agcagtgagt gccaggggga gatgctggat
 taccgacgca tttgatgga agactttct ctgagccctg agatcctct aagctgtcg ggggagatt aacaccattg
 ttccggatta catgaaaag ggcggacctt acactgtctg atgaagtag ttcgaggga gaagggaac cttggaatga
 actccagca ggcgttcaa acactgattc aggagactga cctgtgtga gattaccgca ttgactgagc ttggaatga
 gctgtgaat ctgtaacca gacagctgc aaacataaa gatctgaga ccaatgac ttgtctgccc tgatggaaca ttatacaca
 gagaagatg tagaagactg tgaacaccgt ctcttagagc tgcagtatt catctcccg gattggaagc tggacctgt
 cctgaccgc aagtccagg gagacgttc tctcttgc cacaccacg gttggaatga gaccagtga tttatgctc
 agggagctgt gttctctgt ttatacagac acgctaccg cactaggaa cagggaagga ggctctcac ggagtccga
 gctgaagtc aaaggatct acaccagct gccatgagc tcaagctgga tctgccc caggataagt gccigtatga
 tctgggaaaa tggtagtg agaaaacaga gactggacag gagctggagt gccttcagga ccatctgga gactgtgtg
 tggagttag agataggt ggcaacctc ctgagttaga atcagaggat attcaaatag aagcttgcct gatgagagcc
 tgtgagccca taattcagaa ctctgccac gatgtggcag ataaccagat agactctggg gacctgatg agtctgtat
 acagaacaaa caccagaagg acatgaacga gaagtgtgcc atcgagatga cccacttca gctgtgtcag atgaaggatt
 itcgcttct

图8C

ttacaagttt aaaatggcct gcaaggagga cglttgaaag ctttgcccaa acataaaaaa gaaggtggac gtggtgatct
gcctgagcac gaccgtgcgc aatgacactc tgcaggaagc caaggagcac aggggtgtccc tgaagtgcgc caggcagctc
cgtgtggagg agctggagat gacggaggac atccgcttgg agccagatct atacgaagcc tgcaagagt acatcaaaaa
cttctgttcc gctgtgcaat atggcaacgc tcagattatc gaatgtctga aagaaaacaa gaagcagcta agcaccgct
gccacaaaa agtatttaag ctgcaggaga cagagatgat ggaccagag ctgactaca ccctcatgag ggtctgcaag
cagatgataa agaggttctg tccggaagca gattctaaaa ccatgttga gtgctgaag caaaataaaa acagtgaatt
gatggatccc aaatgcaaac agatgataac caagcgccag atcaccaga acacagatta ccgcttaaac cccatgttaa
gaaaagcctg taaagctgac attcctaaat tctgtcacgg taccctgact aaggccaagg atgattcaga attagaagga
caagtcactt ctgacctgaa gctgagatat gctgaccagc gccgtgtctc agactgtgaa gaccagatcc gaatcattat
ccaggagtcc gccctggact accgctgga tctcagctc cagctgcact gctcagacga gatctccagt ctatgtgtg
aagaagcagc agcccaagag cagacaggtc aggtggagga gtgcctcaag gtcaacctgc tcaagatcaa aacagaattg
tgtaaaaagg aagtgtctaa catgtgaag gaaagcaag cagacatctt tgtgacctg gtacttata ctgctgtgc
cctggacatt aaacaccact ggcagccat caccctggc cgcgggcgtc aaatgtcctg tctcatgga gactggagg
ataagcgggt gaggttacag cccgagtga aaaagcgct caatgaccgg attgagatgt ggagtacgc agcaagggtg
gccccagcag atggtctc tcatctgcc atgcaagtaa tgactgtcc atctaagaac tacattctt ctgtgatcag tgggagcact
tgtatattgt tctgattg cctgatgtgt ggacggatca ccaagcgagt gacacgagag ctcaaggaca ggctacaata
caggctagag acaatggctt ataaaggctt agtgtgtct caggatgtga caggcagtc agcctgacct ttctgcacac
tccagacaaa ctcccagac aagctcctt gtgcctctac gtggagagg tgtggaaagt tatcacatta aaagatggag
gatttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaaaaaa aaaaaaaaaa

图8C (续)

MAACGRVRRMFRLSAAHLHLLLF AAGAELKLPQGQVHSQGQGPANFVSFVGQAGGGG
PAGQQLPQLPQSSQLQQQQQQQQQQPQPFPAGGPPARRGGAGAGGGWKLAE
EESCREDVTRVCPKHTWSNNLAVLECLQDVREPENESSDCNHLWNKLNLTDPKFE
SVAREVCKSTITEIKECADEPVGKGYMVSCLVDHRGNITEYQCHQYITKMTAIFSDYRLI
CGFMDDCNDINILKCGSIRLGEKDAHSQGEVVSCLKGLVKEAEEREKPIQVSELCKK
AILRVAELSSDDFHLDRHLYFACRDDRRFCENTQAGEGRVYKCLFNHKEESMSEKCR
EALTTRQKLIADQYKVSYSKSLKSDLLKRYCNVENLPRSREARLSYLLMCLESVHR
GRQVSSECCQGEMLDYRRMLMEDFSLSPHILSCRGEIEHHCSGLHRKGRTLHCLMKVVR
GEKGNLGMNCQALQTLIQUETDPGADYRIDRALNEACESVIQTACKHIRSGDPMILSCL
MEHLYTEKMEVEDCEHRLLELQYFISRDWKLDPVLYRKCQGDASRLCHTHGWNSETSEF
MPQGAVFSLYRHAYRTEEQGRRLSRECRAEVQRILHQRAMDVKLDPALQDKCLIDL
KWCSEKTETGQELECLQDHLDDLVECRDIVGNL TELESEDIQIEALLMRACEPIIQNFC
HDVADNQIDSGDLMECLIQNKHQKDMNEKCAIGVTHFQLVQMKDFRFSYKFKMACK
DVLKLCPNIKKKVDVVICLSTTVRNDTLQEAKHRVSLKCRRLRVEELEMEDIRLEP
DLYEACKSDIKNFCSAVQYGNAQIECLKENKKQLSTRCHQKVFKLQETEMMDPELDYT
LMRVCKQMIKRFCEADSKTMLQCLKQNKNSLMDPKCKQMITKRQITQNTDYRLNP
MLRKACKADIPKFCHGILTKAKDDSELEGQVISCLKLRYADQRLSSDCEDQIRIIQESAL
DYRLDPQLQLHCSDEISSLCAEEAAAQEQTGQVEECLKVNLLKIKTELCKKEVLNMLKE
SKADIFVDPVLHTACALDIKHHCAAITPGRGRQMSCLMEALEDKRVRLQPECKKRLND
RIEMWSYAAKVAPADGFSGLAMQVMTSPSKNYILSVISGSICILFLIGLMCGRITKRVTRE
LKDRLQYRSETMAYKGLVWSQDVTGSPA

图8D

caaaaacttc tgtccgctg tgcaatatgg caacgcicag attatcgaat gtctgaaaga aaacaagaag cagctaagca
cccgtgccca ccaaaaagta ttaagctgc aggagacaga gatgatggac ccagagctag actacaccct catgagggtc
tgtaagcaga tgataaagag gtctgtccg gaagcagatt ctaaaacat gtgcagtgcc ttgaagcaaa ataaaaacag
tgaattgatg gatcccaaat gcaaacagat gataaccaag cgccagatca ccagaaacac agattaccgc ttaaacccca
tgtaagaaa agcctgtaaa gctgacatc ctaaattctg tcacggatc ctgactaagg ccaaggatga ttcagaatta
gaaggacaag tcattctctg cctgaagctg agatatgtg accagcgct gtcttcagac tgtgaagacc agatccgaat
cattatccag gagtcgccc tggactaccg cctggatcct cagctccagc tgcactgctc agacgagatc tccagtctat
gtgctgaaga agcagcagcc caagagcaga caggtcaggt ggaggagtgc ctcaaggica acctgctcaa gatcaaaaca
gaattgtgta aaaaggaagt gctaaacatg ctgaaggaaa gcaaagcaga catctttgtt gacccggtac ttcatactgc
ttgtgccctg gacattaaac accactgcgc agccatcacc cctggccgcg ggcgtcaaat gtctgtctc atggaagcac
tggaggataa gcgggtgagg ttacagccc agtgcaaaaa gcgcctcaat gaccggattg agatgtggag ttacgcagca
aagggtggcc cagcagatgg ctctctgat ctgcatgc aagtaatgc gtctccatct aagaactaca ttctctctg gatcagtggg
agcatctgla tattgttctt gatitggcctg atgtgtggac ggatcaccaa gcgagtga caagagctca aggacaggtg
gagccacctt gaccaccaa ggaactacct atccagtgc cagtgtgtac agccctctt tatagcatcc ccactcacct
cgctctctc agaagtga ccaacccgt gttagagcat tagcagatgt ccactgcgtt gtcccatcca gcctccactc
gtgctcatgg tgcctctc ctctcaccg tgcagcaga gcagctggc gctggggta ctgccttctt ttggcagact tggttacct
gcctgtatg aagtctctc cataccaaca gaactccg tactccaga accaactcac ctgacctgca actcaaagc tttttaaga
aaaccaccaa aaaaaaaat tttttaag aaaaaatgt atatagtaac gcattctctc caggcttgat ttggcaatg gggttatgc
ttcatatga ctgtgtaaaa caaagacagg acttgagggg gaagcacacc acccagtgtg ccatgactga ggtgtctct
tcattctca gaagcgctt ggggcctcgc cagggcctg gtcttcacc aggcgtgggt gggcagccgt tcccaggct
gtgtggggtc ctgcttctt ctgctgagac agtgacgtt tccagtctc accctaatca gccactgctg gtcacagccc
cacagccatg ggtattctg ttgtctctc gctcatga agcaagcat gagccttct agacaagggc agctggggag
gggaaggagc cggaagtgtg tgaagtga cagtcaccc atctgcact agaggctgga tctgagtc cggggcagca
ggatcccagg aacctctc ctccaggga gcacaggact cagccgtgtc tggaccggcc ctgctgaggc tacagtact
ctggaagctc tgcgtctcat caggaggcag gactgtggc ggagggtcc ttgaagatgg gtgtggggag cagtgggtca
ggaagtggga gccagaggtt tgactactt tgccttatt ttacaggctc aatcacagtc agagacaatg gcttataaag gtttagtgtg
gtctcaggat gtgacaggca gtccagcctg accttctgc acactccaga caaactccc agacaagctc ctttgcct
ctacgtggag aggggttgga aagtatcac attaaaagat ggaggattaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

图8E

MMDPELDYTLMRVCKQMIKRFCEADSKTMLQCLKQNKNSLMDPKCKQMITKRQIT
QNTDYRLNPMLRKACKADIPKFCHGILTKAKDDSELEGQVISCLKLRYADQRLSSDCED
QIRIIQESALDYRLDPQLQLHCSDEISSLCAEEAAAEQGTGQVEECLKVNLLKIKTELCK
KEVLNMLKESKADIFVDPVLHTACALDIKHHCAAITPGRGRQMSCLMEALEDKRVRLQ
PECKKRLNDRIEMWSYAAKVAPADGFSDLAMQVMTSPSKNYILSVISGSICILFLIGLMC
GRITKRVRELKDR

图8F

aatttagcca gctgtggtgg cacatacctg taatcccagc tacttgagag actgagcgag gagaatcact tgaaccggga
gatggagttt gcagttagcc gagatggcgc cactgtactc cagcctgggt gacagagcaa gactctgtct ccaaaaaaaa
aaaaaaaaa aaaaaaaga catttcaagc tggaagattt ggctccctaa ctttagcct agctcttca ttaagtaat aataaaagta
gaactctaca ttatataat ggtttgact ttccaaagtg attttacat ctacagcagc ctgtgaagga ctaataagg ttttcaggg
tagacttggc attgtgtttt gcaaagaagg tccaaggcca tgcagctatt tggtagcaga attgaaagta aagcctgatt ccttctgtc
aaggcgactt tgctatctag aagccagggt cactagacaa gatgcagtca acaataaagt ctccagaaca tatgacatct
ccagcctaaa ccaagctcac ctttccatgc tggctccctc atgcagacgg aggacatccg cttggagcca gatctatacg
aagcctgcaa gactgacatc aaaaacttct gtccgctgt gcaatattggc aacgctcaga ttatcgaatg tctgaaagaa
aacaagaagc agctaagcac ccgctgccac caaaaagtat ttaagctgca ggagacagag atgatggacc cagagctaga
ctacaccctc atgagggtct gcaagcagat gataaaggagg ttctgtccgg aagcagattc taaaaccatg ttgagtgtc
tgaagcaaaa taaaacacgt gaattgatgg atcccaaatg caaacagatg ataaccaagc gccagatcac ccagaacaca
ggtaagatct tggcttggct ctcttgccc cgtggagtat ctgaaaagga attcagtggc ttagagtga cctgtcctaaa
ctccagggc ttgttgcct gggaattta agggaggagt ctgagtgtaa gcagggcctt cctccttga ggagatcca
gaaaaatgga gggagagica ggggagagag gaggccacaa gaaccagaaa actgccctaa aagaacgttc agaaggaatc
aggccggcag tcttggaaa gaaaaatcta gaaattcaat aaaaacttca gagtgtcca ggagaatgta cgggtaatct
galtcggaac agaaacattt caccctgag ttggaagac tctgaagta atggtagcag tgagtggat attgtattc ttttcagt
ttctcaaaag tcttcttat ggggaagggt gctgatgccc ccttgattt tctgaggact ccttagagta ttggagtctg cacaacccc
cgcagagttag aaagattcct gaggacctcc agaagtactc gtaacaagt catattgctg attaaaaaca gtgtagttag
agctcagtaa atgtttattg aatagataaa tccatggttg tagtcatgat cattgacata atatgctccc tttaggaagg tggatatcta
aaaatgtgtg aatcagggtg aatgtttgt cacatgtca ctgcttcta ctctagatta ccgcttaaac cccatgttaa gaaaagcctg
taaagctgac attcctaaat tctgtcacgg tatctgact aaggccaagg atgattcaga attagaagga caagtcattc cttgctgaa
gctgagatal gctgaccagc gcctgtcttc agactgtgaa gaccagatcc gaatcattat ccaggagtcc gccctggact
accgcttga tctcagctc cagctgact gtcagacga ggtgggattt gcgtgcaaaa ctggttacgc acagagctgc
tcagagaagt ttccactgga gaaaagtgt ttacttctc tccctcagc cgtgaatgat ctggtgaatt gaaggccatc ttctaggctc
tccatggtct gcattctgt tcttgaac actgaattca acttggcatt agtctgaca ctctaaagcg ttgttcata ttctctgt
gaacaagggt gtcttctat tatagctctc tgaatttg ttctccctt ctcttattc tggatggtta acccaagacc tgcagaag
ataaaagtgc tttagctgg gcacgggtggc tcacgcctgt aatcccaaca cttggggagg ccaaggaggg tggatcatct
gaggtcagga gttaagacc agcctggcta acatggagaa atctgtctc actaaaaata caaaaaatta gccaggcgtg
gtggcgtgca ccagtaatct cagctactca ggaggctgag gcaggagaat cacttgaacc cgggaggcgg tgggtgcagt
gagctgagat catgccactg caccacgccc tgggcgacag aggaagactc tgtctc

图8G

MQTEDIRLEPDL YEACKSDIKNFC SAVQYGNAQIIECLKENKKQLSTRCHQKVFKLQETE
MMDPELDYTLMRVCKQMIKRFCEADSKTMLQCLKQNKNSLMDPKCKQMITKRQIT
QNTGKILAWLSWPRGVSEKEFSGCRVTCNSQGFVAWEF

图8H

ctgagaggaa gttttatctg tgcagccctt ctctgaggat ggacacttct cacactacaa agtctgttt gctgattctt ctttggccc
tactgtgtgc agaaagagct cagggactgg agtgtacca gtgctatgga gtcccatttg agacttcttg cccatcaatt
acctgcccct acctgatgg agtctgtgtt actcaggagg cagcagttat tgtggattct caaacaagga aagtaaagaa
caatctttgc ttacctatct gccctcctaa tattgaaagt atggagatcc tgggtactaa ggtaacgtg aagacttctt gttgccagga
agacctctgc aatgtagcag ttcccaatgg aggcagcacc tggacatgg cagggtgtct tctgtcagc ctgagctcag
tctctctgca gacctgtctc ttaggttctt cccaatgacc tccaccttg tcttttctc ctatgtgca acaattctc ctggagccct
ctagtatga attatgagt atagaagctc caagggtgga glagltgtg aaataccatg tttgcttt atagcccctg ctgggttaggt
agggtctcta atctctcta gggcttcaa gtctgtactt cctagaatgt catgtgtg tggattgtg ctatgacc tggaggcaca
cagccagcac agtgaagagg cagaattcca aggtattatg ctatccat ccacacataa gtatctgggg tctgcaatg
ttccacatg tatctgaat gtcccctgt tgagtccat aaaccttg ttctccaaa aaaaaaaaaa aa

图9A

MDTSHTTKSCLLLVALLCAERAQGLECYQCYGVPFETSCPSITCPYPDGVCVTQEAIV
VDSQTRKVKNNLCLPICPPNIESMEILGTKVNVKTSCCQEDLCNVAVPNGGSTWTMAG
VLLFSLSSVLLQTL

图9B

atctgacaga acttgccact gtgcctgcaa ccttgtctga gaggaaccct tctctgagga tggacacttc tcacactaca
aagtcctgtg tgctcattct tctgtggcc ctactgtgtg cagaaagagc tcagggactg cagtgtctacg agtgctatgg
agtgccaat gagacttct gcccagcagt laccgcccgc gccctgatg gattctgcat tgctcaaac atagaattga
ttgaggactc tcaaagaagg aaactaaaga cccgtcagt ccttcttc tgcctgtg gtgtgccaat caggatcct
aacatcaggg agaggactc ctgtgcagc gaagacctt gcaatgcagc agtccact gcaggtagca cctggaccat
ggcaggggtg ctctgttca gcctgagctc agtcgtcctg cagacctgc tctgatggc ctccaatga cccaccct ttccttta
tctcatgtg caaccactct ttcctggagt cctctagtga caaattatat gttatagaag gtccaatgtg gggatagtgt gtggaacacc
ctgttcacc ttatagccc ctgtgggtg agtgccgac tctctctag ggcttcaaa tctgtactc ttgcaatgcc attagtgt
ggattctat tctggccct ggaggtatgt ggccagcaca tgaacaggc agtatccaa ggtattatag taccacatc
cacacataag tatctgggt cctgcagggt tccatgtat gcctgtcaat gaccctgtt gagtcaata aaagcttgt tctccagcc
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

图10A

MDTSHTTKSCVLILLVALLCAERAQGLQCYECYGVPIETSCPAVTCRASDGFCAQNIELI
EDSQRRLKTRQCLSFPAQVPIRDPNIRERTSCCEDLCNAAVPTAGSTWTMAGVLLFS
LSSVVLQTL

图10B

gcccaccccc gccagcccc tgcctalaag gcctggcaa tgcaggggcc cgcactgtc ccagacgaca tcagagatga
ggacagcatt gctgtcctt gcagccctgg ctgtggctac agggccagcc ctaccctgc gctgccact gtgcaccagc
tccagcaact gcaagcattc tgtgtctgc ccggccagct ctgcttctg caagaccacg aacacagtgg agcctctgag
ggggaatctg gtgaagaagg actgtgcgga gtcgtgcaca ccagctaca ccctgcaagg ccaggtcagc agcggcacca
gctccacca gtgtgccag gaggacctgt gcaatgagaa gctgcacaac gctgcacca cccgaccgc cctgcccac
agtgcctca gcctggggt ggccctgagc ctctggccg tcatcttagc cccagcctg tgacctccc cccagggaag
gcccctcatg ccttcttc ccttctctg gggattccac acctcttc cccagccga acgggggtgc caggagcccc
aggctgaggg cttccccgaa agtctgggac caggccagg tgggcatgga atgtgatga ctggagcag gcccacaga
ccccacagag gatgaagcca cccacagag gatgcagccc ccagctgcat ggaagggtga ggacagaagc cctgtggatc
cccggattc acactcttc tgtttgtt ccgttatt ttgtactca atctacat ggagataaat gatttaacc agaaaa

图11A

MRTALLLLAALAVATGPALTLRCHVCTSSSNCKHSVVCASSRFCKTTNTVEPLRGNLV
KKDCAESCTPSYTLQGQVSSGTSSTQCCQEDLCNEKLHNAAPTRTALAHSALSGLALS
LLAVILAPSL

图11B

gctccggcca gccgcggtcc agagcgcgcg aggttcgggg agctccgcca ggctgctggt acctgcgtcc gcccggcgag
caggacaggc tgcittggtt tctgacctcc aggcaggacg gccatcctct ccagaatgaa gatcttcttg ccagtctgc
tggctgccct tctgggtgtg gagcgagcca gctcgctgat gtcttctcc tcttgaacc agaagagcaa tctgtactgc
ctgaagccga ccatctgtc cgaccaggac aactactgcg tgcctgtgc tgcctgtgc ggcaattgga atctctgac
atttggccac agcctgagca agacctgtc cccggcctgc cccatccag aaggcgtaa tcttgggtgt gcttccatgg
gcatcagctg ctgccagagc ttctgtgca attcagtg gcgcgatggc gggctgcggg caagcgctac cctgctgggt
gccgggctgc tctgagcct gctgccggcc ctgctcggt ttgcccctg accgccaga cctgtcccc cgatcccca
gctcaggaag gaaagcccag cctttctgg atccacagt gtatgggagc cctgactcc tcacgtcct galctgtgc
cttggctcca ggtcaggccc acccctgca cctccactg cccagcccc tgcctctgcc caagtggcc agctgccctc
acttctgggg tggatgatg gacctcctt gggggactgc ggaaggagc agggctcct ggagtctac ggtccaacat
cagaccaagt cccatggaca tctgacagg gtccccagg agaccgtgc agtagggatg tctgcctggc tctgtactg
ggtgtcagt gcacgtgaga gcacgtggc gcttctggg gccatgttg gggaggagg tctgccaga gcttgagag
cctcagctcc tctagcccc tgcctggga cagctcatg cactcaagg gcagccttg ggggttggg ttctgccac
ttccgggtct aggccttgc caaatccagc cagctctgc ccagcccacc cccacattg agccctctg ctgcttgg
gcctcaaata aatacagatg tccc

图12A

MKIFLPVLLAALLGVERASSLMCFSLNQKSNLYCLKPTICSDQDNYCVTVSASAGIGNL
VTFGHSLSKTCSPACPIPEGVNVGVASMGISCCQSFLCNFSAADGGLRASVTLLGAGLLL
SLLPALLRFGP

图12B

actgtcctg caacctgtc agagaggaag taaggactgg tgcaggagg gagctgtag gttgatctg tgcagccct
ctccaaggat ggacagtgt cactacaa agtctctgt actatcctt ctgtgtgctc agaaagagct
caggggctgg agtgcataa ctgcctggga gttcactg gaattgcct caaatcaat acctcccc accctgatg
agtctcatt tctcagcagg tagaactat tctggactc caaagaagga aagtaaagaa caaactctg ttctcttct gccctgcta
tctlgaat atggagatcc tgggtactac tctcaactg aatactctt gttcaagga agacctctg aatgcacat ttccactgg
aggcagcacc tggacatga caagggtgt tctgttaat ctgggtcgg tcttctgca gacctgtg taaaaggctc
tccaaggac ctccacctt gttgtttat cctcattgc aactatct tctggagcc ctctagtat gaattatgag atattgaagc
tccaagggtg gagtagtgt tctggaatac gttgttcaa ctctatagc cctgcttgg aatgcccc ctctctcta ggaattcaa
atatgtact cctagaatg catctgtg tggctgcta atctggccc tggaggccc tggctagcag agggtagag
cagaattca aggtattaag ccatccat ccacacataa gtctcagg ttctcagga ttctatga tgcggctta tctccctg
ttagtcaa taaacctt gtctcc

图13A

MDSCHTTKSCVLILLVLLCAERAQGLECYNCLGVSLGIACKSITCPYPDAVCISQQVELI
VDSQRRKVKNKLCFPFCPANLENMEILGTTVNVNTSCCKEDLCNAPFSTGGSTWTMTR
VLLNLGSVFLQTL

图13B

ctgcagccag gcttgagagg aagtaaggac tgggtgcagg agggagctgc taggtgacaa agggagaac cctcaggata
 gggctgtgtt gggagtgaga ttaggaaaga agagctgggt ggggtgtgga tgagagaagt aggcagacat gtattcctca
 gggaaagctg ttagaggggt tggagggagg gaattttgga tggctgagcc gtgtgagagc ccaggggtgt gatcaggggt
 ctattaactg gctccaactt ccaagggttt atctgtgcag cccttctcca aggatggaca ctctcacga gataaagtc tgtgtctga
 tccttctgt gacctactc tgtgcagaaa gagctcaggg actggagtgt taccagtgt atggagtccc attgagact tctgtccat
 cattacctg cccctacct gatggattct gtgtgtca ggaggaagaa ttattgcaa actctcaaag aaagagagta
 aagagccgtt ctgtccatcc ttctgtccct gatgaaattg aaaagaagtt tatctggat cctaacacca agatgaatat ttctgttc
 caggaagacc tctgaatgc agcagttccc actggaggca gctctggac cacggcaggg gtgtctctgt tcagcctggg
 ctacgtctc ctgcagacc tgaatgatg gtccccacc

图14A

MDTSHEIKSCVLLVLTLLCAERAQGLECYQCYGVPFETSCPSFTCPYPDGFCAVEEEFI
 ANSRKRVRKSRCHPFCPEIEKKFILDPNTKMNISCCQEDLCNAAVPTGGSSWTTAGV
 LLFSLGSVLLQTL

图14B

gttatcagag gtgagcccgt gctcttcagc ggagaagatc cctacctgg ccgcccggca ctctctgtgg gccgtgggt
 cctcaaggag acggcccttg ggtcagggg ctgcgttcc acacgcgcct tcccagggc tcccgcccc gtctctgtct
 ggccgcccgc gctccaaca gcagcacaag gcgggactca gaaccggcgt tcagggcccgc cagcggcccgc gaggcctga
 gatgaggtc caaagacccc gacaggcccc ggcggtgtgg aggcgcgcgc ccgggggcgg gcggggctcc cctaccggc
 cagacccggg gagaggcgcg cggaggctgc gaaggttcca gaaggcggg gagggggcgc cgcgcgtga cctccctgg
 gcaccgttg ggacgatggc gctgtctgcc ttgtctgtgg tctgtggcct accgcgggtg tggacagacg ccaacctgac
 tgcgagacaa cgagatccag aggactccca gcgaacggac gaggttgaca atagagtgt gtgtcatgt tgtgagagag
 aaaacacttt cgagtgccag aaccaagga ggtgcaaatg gacagagcca tactgcgtta tagcggccgt gaaaataatt
 ccacgttttt tcatgtgtgc gaagcagtgc tccgtgtgt gtgcagcat ggagagacc aagccagagg agaagcgtt
 tctctggaa gagccatgc cttctttta cctcaagtgt tgaataatc gctactgcaa tttagagggg ccacctatca actatcagt
 gtcaaaagaa tatgtggga gcatgggtga gagctgtgtt gggtgtggc tggccatct cctgtgtgt gccctattg
 cagccggcct cagcctgtct tgagccacgg gactgccaca gactgacct tccggagcat ggactcgtc cagaccgtg
 tcacctgtg cattaaactt gtttctgtt gattacctt tggttgact tcccaggtc tgggatggg agagtggga tcaggtgcag
 ttggctctta acctcaagg gttcttaac tcacattcag aggaagtcca gatctctga gtagtgatt tggtagaag ttctctt
 tgaaatcaa cttgttaact cattattgc tgaatggcac tcttctct gactccctc tgcctctgag ggcttcagta ttgatggga
 gggaggccta agtaccactc atggagagta tgtctgaga tcttccgac cttcaggtg acgcaggaac actgggggag
 tctgaatgat tgggtgaag acatccctgg agtgaaggac tctcagcat ggggggcagt ggggcacacg ttagggtgc
 cccattcca gtgtgtggag cgtgtggat ggctgtttt cctcaactt tctaccaga ttccaggagg cagaagataa
 ctatgtgt tgaagaaact tagacttcac ccaccagctg gcacaggtgc acagattcat aaatccac acgtgtgt tcaacatc
 aaacttaggc caagtagaga gcatcagggt aaatggcgtt cattctctg ttaagatga gccatccatg gggagctgag
 aaatcagact caagttcca ccaaaaacaa atacaagggg acttcaaaag ttacgaaaa aattgaatia aaagataaaa ataa

图15A

MRLQRPRQAPAGGRRAPRGGRGSPYRDPGRGARRLRRFQKGGEGAPRADPPWAPLGT
 MALLALLLVVALPRVWTDANLTARQRPEDSQRTEGDNRVWCHVCERENTFECQNP
 RRCKWTEPYCVIAAVKIFPRFFMVAKQCSAGCAAMERPKPEEKRFLLPEMPFFYLKCC
 KIRYCNLEGPPINSSVFKEYAGSMGESCGGLWLAILLLLASIAAGLSLS

图15B

ggagagagca ggacacagct atggatgccg ccaggagagg agatacacag ccagtgatgt ggaccaccgg atggctgttg
ctgctgccgc ttctgtgtg tgaaggagcg caagccctggagtgtacag ctgctgtcag aaggcggacg atggatgctc
tccgcacagg atgaagacagtcaaatgtgg tcccggggtg gacgtctgta ccgaggccgt gggagcggta
gagaccatccacgggcaatt ctctgtggcg gtgcggggct gcggttccgg aatcccgggc aagaacgaccgcgactgga
ccttcacggg ctctggcct tcttcagct acagcagtgc tccaggaccgatgcaacgc caaactcaac ctactttgc
gaggcctcaa ccttcaggc aatgagagtgcataatgagcc taacgggtgca gactgtaca gctgtgtggg tctgagccgc
gagaagtgccagggtccat gccgccggtc gtgaactgct acaacgccag tggccgtgtc tacaagggtgcttcgatgg
taacgtacc ctgacggcag ccaacgtgac cgtgtcctta cctgtccagggtgctcca ggacgagacc tgcaccggg
atggggtgac ggggtccagga ttcacactcagcggtcttg ctgtcagggc ccccgctgta acgccgacct tgcacaag
acctatttctccctcgaat cccaccccta gtctgtgtc cccctcaac caccgcagcc ccatccactcgggccagaa
ctctccagc acgacctta cagcagcccc aaccagacc acctccatcatcaagccac cacagccaa gccagccaca
cttctccca tgaatggat ctggaagtcatacaggaaga gggggcgctc ttgagtggag gtgctgcggg ccatggaggt
actgcgggcatggaggtgc tgcgggccac caagaccgca gcaatatgga gaagtatcca ggaaagggtg gggccagat
cccagctaaa ggaggctctg gcactctagg gtctgtgtg tctgcagttc tgttgactgt ggtgtgtgc gcgatgtgt
gaatgtca tctgaaaag tccatctac ttgtttcc tggcccggtg gtaccaactc ttccattc tcaattgact ggactggctc
cgccccatc cttcagcatt ctacgtccg actgcactgg ttgcagctt cggaaaacag tctctgttg taaatattc gctcgggtg
ccctacttt ttgatgggc cacagcttc cccctgatg tgaccaggac agagggaaga gacgtctact ggctgagaga
ggcccagaga gtccacggca agcctcctt tcccgtttc ctgaccaggc tggagatga ccaggcaggt agacaatgga
tccatctcc gagcactgtg ctgctgtgc acattgtgc gaaatctgt cgcctgtct ccttaggaga ctgtgaacaa
ctclacaaca gggctgtgt tctggcctct ctatgtgtc tctctggcac aggaaggtgt caataaagat ttagtactt tgalagtga
gttaactaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

图16A

MDAARRGDTQPVMTTGWLLLLPLLLCEGAQALECYSCVQKADDGCSPHRMKTVKC
GPGVDVCTEAVGAVETIHGQFSVAVRGCSGIPGKNDRGLDLHGLLAFFQLQCSER
CNAKLNLTLRGLNPAGNESAYEPNGAECYSCVGLSREKCQGSMPVVCYNASGRVY
KGCDFGNVTLTAANVTVSLPVRGCVQDETCTRDGVTGPGFTLSGCCQGPNCADLRN
KTYFSPRIPLVLLPPTTAAPSTRAQNSSSTTSTAAPTTTTSIKPTTAQASHTSPHEMDLE
VIEEGASLSGGAAGHGGTAGHGAAGHQDRSNMEKYPGKGGAQIPAKGSGTLGSW
LSAVLLTVVAGAML

图16B

tgcctcccc cgccgtgcc gccgtgagc ccggagtgc gacacccag ggatgcctgc gcccagagg accccgcct
gcagccccg cgctcttc aggcctatc ggagcatgctgcctgcagcc atgaagagcc tgggtctggc gctgtggc
ttgtctctt gcccctgcggcccatggc ctgtgtgtc aggactgcac cctggccaat tccagccatt
gcgctccgaagcagtgccag cccaccgata ccgtttgtc cagcgtgcgg atcaccgacc ccagcagcagcaggaagat
cattctgtga acaagatgt tgcctctcc tgcgactcg ttaagcggcacttttca gactatctga tgggttcat taactctggg
atctaaaaag tgcagctggactgctgcgag aaagattgt gcaacggggc atcggtcgca ggacgcagcc
cctgggccctggctggggg ctctgtca gccgtggggc tgcctctc tgggtgggc cctaagacccctccctcct
cctgtgggc ttggagct gtcccctaag cctgtgtc cccctcccagcctggcctg gctggggctg ggacagcaag
ggtttggcat caaggctga ggctctcaacctccctagat gtgagtgc ctctccgt tctccaccag ctccatatc
caagcagctgaatatctca ggagtcaga catctggca ggaagctgg gtagggggga gggggagggaaggactga
gacctccag gtctccagg ggaggaggt caagccagg acagcccaacagcctggcct gaggggcatt aactacagag
aaataaagtc actctgagt ctgtgaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

图17A

MPAPQRTSPRASFPRYSMLPAAMKSLGLALLALLCPSPAHGLWCQDCTLANSSH
CAPKQCQPTDTCASVRITDPSSSRKDHVSNNKMCASSCDFVKRHFSDYLMGFINSGLK
SRRGLLRERFVQRGIGRRTQPLPGWGAPVQLGAWLFFGLGPKTPPSLLVGFACPLSL
LVPLPSLAWLGLGQQGFQIKV

图17B

agaagaggcg agactttttt ggggtgctccg gatcgccagt agttcttcaa gcctcagcag ccaactcctc cggaggcgct
gcgctccgcc ccaggaggcg cgaatccaag gagcctgggaccagcctctg ggagcccccg gcgcggggcga tgcggggcgcc
gcggggcgaca cctgcggctcctctcggtgg cagccctgcg tggggcgga gcagcgcgag cctgggcagc
ctgggcagctactgtcgcg cgccagaaac agcctccgct gcggctgtgg tctctgatgc tctgcccgcctccggccct
gccgatccgg gaggatgtgg gtctcggca tgcagcaac ttttgcggattgtctggc ttccagggtt ggcgctgcaa
attcagtgt accagtgtga agaattccagctgaacaacg attgctcctc cctgagttc atcgtaaatt gcaccgtgaa
cgttcaagacatgtgtcaga aagaagtgt ggagcaagt gctgggatca tgtaccggaa gtcgtgtcagctgcagcag
cctgtctcat tgcctcagct gggatccagt cctctgttc cctgggaaactgaactccg tgtgcatcag ctgctgcaac acccctctt
gcaatggggc gagggccaagaagaggga gctctgcctc ggccatcagg ccagggcctc tcaccactct
cctgtcttccacttagccc tctgttggc acactgtga agtaaaagga gatccaacc cctgctgcctcactgtctg gcccttctc
tctcacttc ccgagctct tctgggtgtc ctttattctggtagaaca gggagtctt ttttccctc ctttcaagta acgcaagatt
gccgtgcacaaatactttg taagctctga accaattcat tctgaattc tgtgtgtagt tgaagaaaaagcatggagc agaaagtcca
gacctccca tcccaatctg gtaaccacc gccaaggcta gcctggaaga accagccctt agaagtcatt gagatacgca
tctgcccttc ccaaagcctt gagcttccat tctgtccag taggagtcac agtctattca gagactgtg ctgctgtaag gtaactttgc
ttttcgggga ggggagagcc agttcggct caaggcttct gaacttgcca ttcatacttc ctgctcctgt aaactatttt ctgggttgga
cccagctggt ttggtctctg agccagtctg tggtagtca ggactcaagg gctggggctt agccctccca ggcctggcct
cagtctgaaa agtgcctaa aaaacctgt tagtttctt ggaggaagag ttactgcgcc gggaggctag gaagatgagg
gggtgcggg ctgagctggt gctgtcctt gtaggatga agcgggcacg ctggcgttc tcttggttg catgctgag
agtgcggcg cagcagagca cctgccagaa cacttccgg aactgctgag aggacacgtt gtagaggaga ggggtgacca
cagagctgag gtagaagaag gtatcagaga agggcaggag gatcatgtat gccctgaagt acgttctggt ccagtcatgt
ttgggtttg ctgcagccat gatccgtcg atctgattgg gcatccaaca cacggccaac gtcaccacaa tcatcctgg
caggcaagaa caggagagaa aaggagacgg ggagagaaac agcatgagaa caaaaataaa taaataaaaa ccataaaat
attaagcccc ttggttctgt tgcctactgg ccgagaaacg gtacaaatct ttacgtctg tgcctgtcg cttcttttg ccactggcaa
aggagaattt aatgctgctt caagctcagg ggacttggct atgttaaaaa gcgttaaatg ctttcgacag tgtatttata cttacggctg
cctgttaatt tcaaaaatgt ttcatgtt gctcgtgtat ccagaaaata tctacgttg gccaaaa

图18A

MWVLGIAATFCGLFWLPGLALQIQCYQCEEFQLNNDCSSPEFIVNCTVNVQDMCQKEV
MEQSAGIMYRKSCASSAACLIASAGYQSFCSGKLNNSVCISCCNTPLCNGPRPKRGSSA
SAIRPGLLTLLFFHLALCLAHC

图18B

ggcaggcctg agttaggacc tgcacatgc aggggacctg gatggtgtg ttggactga tattgggac cttcggggag
cttgcctagg ccttacagt ctacacctgt gcgaatcctgtgagtgatc caactgtgtc accaccacc actgccacat
caatgaaacc atgtgcaagactacgtctc cctctggag attgttttc ctttctggg ggactccacg gtgaccaagtcctgcgccag
caagtgtgag ccttcggatg tggatggcat tgggcaaac cgccagtgctctgctgcaa ttctgaccta tgcacgtgg
atggggcacc cagcctgggc agtctgtgtggcctgtcct tgcctggca ctttcttgc tctgggtgt cctgctgtaa
agccatggccatctagctcc actccctgt cctgacalc ccagttcct aatgcctaga agaaataaatggccatctg
caaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaa

图19A

MQGTWMVLLALILGTFGELAMALQCYTCANPVSASNCVTTTHCHINETMCKTTLYSLEI
VFPFLGDSTVTKSCASKCEPSDVDGIGQTRPVSCCNSDLCNVDGAPSLGSPGGLLLALAL
FLLLGVL

图19B

atgcttttta tggcaggccc tgcagccagc tggccctga ggccctggg actccatggc gtccccaag ccttgtgtgc
tgtccttta acagtgcgg tcatgaagac ctgggtctcgggtatacca agctcgagga ccttcaccct cagtcctcc cactaaaca
gtacctgaattgctaccgat gtctgctgga gaccgaagag ctgggggtgcc tcctggggtc tgacacctgctgacacctc
tgggcagcag ctgtgtcacc ctgcacataa agaacagcag cggtttaatgtcatggga gcgactgcta cagcaaggag
cagatgggcc attgtcata taccgtgcttccccgggtg ttggctttg gatattctat cagtgtgtct tcctggattt
ctgcaacaatccggacaaca gaaagaatag catgcactag

图20A

MLFMAGPAASWSLRPLGLHGVQPALCAVLLTVLVMKTLVLGDTKLEDLHPQSLPLNKY
LNCYRCLLETEELGCLLGSDTCLTPLGSSCVTLHIKNSSGFNVMVSDCYSKEQMVHCSY
TRASPVGFWIFYQCCFLDFCNPDPNRKNSMH

图20B

agagctggag acctgggaat ctgctgtcaa ctgctggggc tgtggacatt ctccaggacc tcaccatgaa acacctcctg
ttgtcacc ttgtctccct acttactgc tgggtctcagctgatactg atgtcactcc tgcataaag tcctgtgtct gggctgtgtg
gatgccagtcctgccgcct ggagccgggc cacaatgcc tgacaacaaa cgtgtacctt gggaagatgtgggtttctc
taacctgcgc tgcggcacac cagaagagcc ttgtcgggag gtcttaacgaaaccaacca taagctgggc ctgaactaca
acaccacctg ctgtgacaag gataactgtaacagcccggc tccacggccc acaccgcac tggccctcat ctccctacc
tccttggctggcctcggcct ctggttattg cattgagact agctccatgg ctacaatctt accacctgctatagcctgag ccttctccc
tgtgtctca gagctccagc ttccagaat cttctctctcccaccctt tctctgaag atcatgtccc tagtctata ccattttt
catgggactgtacctggagt ggctttcta gccaccgctc ctctccctca ctgtcacct tccactccattccaccaca cacagacaca
cagacacaca gacacaaaga cacacacaca cacacacacacacacaca ccagtcctt tccatttcc ttctagaaca
ctctacctcc tccactggccactgaaaggc tccctcctt ggacgcacac tgcgtgtcct ctgggatcta agtctggaagaactcctgtc
ttgtctccag ggagtgtatt caaaaggcgc tggcctcatt gcatgggcctggcttaccag accctctgt tgtcccttc tatcttgaga
aataaacatc agtgtctaat

图21A

MKHL LLLT L SALLYC WVSADTRCHSCYKVPVLGCVD RQSCRLEPGHKCLTTNVYL GK
MWVFSNLRCGTPEEPCREVFNETN HKLGLNYNTTCCDKDNCNSPAPRPTPALALISLTS
LAGLGLWLLH

图21B

gcctacttgg cctgcctgcg atgcggtacc aacaccgcac gaagtgtgta cagattccca gttagacagc agggaggacc
 tgggagcggc cagggggaig tttaictct aagagaccaagagctcaggc agggcttctg tggcctgctt cctccctggc
 ttgagctgga tcttgaccagctgctgacc tctgttcac tctggcactg cctcacgct tccgtcatga cccatctgctcacagtgtt
 ctggtggccc tgaatggccct gcctgtggcc caggctctgg agtgccacgtgtgtgcctac aatggagaca actgcttcaa
 acccatgcgc tggccagcca tggccacctactgtatgacc acacgaactt acttaccccc ataccggatg aaggtgagga
 agtctgtgtccccagctgc tttaaaaccg tgtacgatgg ctattccaag catgcactcg ccacctctgttggcagtac tacctctgca
 acggtgctgg ctttctacc ccggtgacct tggccctgtgtccagcactc ctactacct tctggagctt gctgtaaagc
 tgggttcccc aagccagatccactcaaacg caacactctc aaaaaacaca gtttccctct ctctcccaat tcactccaccaacgctctt
 ccttctgaca ctctcaact accacgaggt cccatggcta cctacgaaagaactgatggc atccagatac ctactccaa ggtcatttc
 agaaggctga catgtggacctgtaattgtc ccacccatgg gtggggcagg ctgggcttct cctctacca
 agatcaggggcatctgggag aatgttatg gaggaggggt catcacicaa gtcaaggagc actgattgatagaattagt
 agccaaactc cacttcaga accctgcctc agtctacca gttagaggatgggtctgctag aggtgagggg aggagagcgg
 cggagaataa cgagctggct agaagcagag aaagactcag cagggtctgc tccgaagatc agcgcggctt gccagagcaa
 atgtgatgt gaagccatgt gaggaaagccc ttgtcattt ccacttatct gaggaactct gccagacctg atgttgggat
 agccattggc caagggttcc tagcaacggc gtcatttcca tagggcactg aaatccctcc agccccagct cagcaggccc
 ctgacctcc actacagctc ttacttaca caccagctgc tgggcttga agttggcagg gacttgggag caggtgacct
 atgctatttt ttgtctggcc tgttattctg ggcatggcaa gaaggatca gacgcaggct agagcagggc agtagggcga
 ctgagacagg gaaacagact tcagccagtg gcttcccagg tccctaggc agtctctaca tcttcagct tctgttaca
 ttccgggag acaaatatc agggagccaa gccgagtgtt aggtgatgac tgcctgtgaa gtctattgtg gccacagact
 gctgggtacc aagtctcagg agaaccagc cttagattag gagacacaga tctgccttct atgcagtga gctgtcctg
 ggagccttac catgtctct aactaglac tcaacttaca tgcactgag gaaccccta acactggccc agcccagggg
 tgggatgtct ggccaatgtc catggagtgg gactacccat ggagagctct tgggtcatca catcacaaat gtttattcc
 aacctcccag tggtagagc tgggacaca aaggtccatc ctggggacct tcttctgtt tctaggcaga cctgaactct
 gtctgtct agagctgat tggtttccg cctcagttc ctctccggg gataggccac cggaggattt gggagggtgg
 ggaggggcalt ctgtgatgg gctcggcag gttctcagga acagggaacgg gcggggcttt agtacacagg tgaattgggt
 gggaactggc ccggagctga ggagacactg actgggcaga gggaagatga gtctcaaggg agggcaggaa aaggaggggg
 gagcgcgat gcacatgtgc actcagtga ggctacagag cccaaaaggc agcactggct gtggtgtccc ctgaggccca
 ggcaagatgc taggaggaag ccaatgtctc cccacctga gctcacatgg aacatgcaca ccaccagcag cagcagcaag
 cattgagact gacctgtgga cgccataggg cactggcaag gagggctcaga ggcggttccc tgactcagtg ggtgaggccc
 gggaaacatt atctgttac cctgcgtgtg caagatcatt gtccccagct

图22A

agatggcgtc ctcaaccaa actgagagga gccccagttc aggtctctcc tctaccaca aggggggtgt gtggaggagg
 ctgattggc ctggagaag caccggtact gcagagctgg gggccagctt ctltacttg tgtctagaca ccgaccagat
 agggcccaca gtggcaacac tggcacacag cctacaaga agccctgtgc ctactagca cagagcccca aaagtgtct
 aattaalaca gggccaagcc tggcagtggt ggggatgcag attaggggaa cagaccaga tggcctgtcc tgaacctgt
 ctgggggtgt gtgatgagca tctgtctagc ccactgcagg tggctctaca cactccaca cagtctgca aaagtgtatg
 aggtggctat tactgcgcc ctctacagg taaaggcact gaggcacgga ggagtgggc acttcattt cctgggcat
 tcaacttcc aggaacca caicaacta tgggtactac lccaatagct ggggttctt gaggtgggc cccctgaaga
 tgatagtggc tcatcaacc agagaattc agagtgcagt gttgtaggag cctatgaacc tgaatgtca gaactggagg
 tttagggggtc tgaggggtag gccaggggtg tctggccct tgtgtggaga cagagagaga gggaacatgg gatgggtag
 tagagagaag tcaaaaggag cgtcagcctt tctcagggt aatgtgtca gggacgagg ctcaagcctg tgagtgtct
 cacactgtga taaacagtgg cccctcaaca cagacgggtt ccagagtggc cggcagtggt tatctagatg tgaatctgg
 aagcctcttg gtatgcactg gagagaggcc gcttgatggg acagcacc aaatgtgtgc ttctgtggga tgtagggaag
 ctgggtcagc gcatgaagcc aaagcgtcct tcagagcaga ggggtggctg gtctagtcca ccagagacaa gctatccagt
 gagatcata ctctgccacc gtctgtgtga ttaccttacc ccaaagcaga cggggacggg atgcagagca cccgtgtct
 catcttctg ggcaagcag tgagttcaca ttctgaact ctgaaagat ttccaggagt ggggtgtgct ttgtcttg tcatgtta
 ctctctggca agcaccgtgg catcccgag cactgagtg cctgggctcc tcaagccatc tcatgttg aatgacagt
 ccagtacct ctactgtg tcttgaggc ctgtgatgg ggtctgca gagggagccc ccaactatg catggacgga
 cagtgatgc ctactctt ccttggtgt gtctgtcca acccaggct ctacccagc aaggaaatga aatccattt
 tatgacacat ctctctccc cagccagctc cattaccta tatgccagg tggctcctt caatgtctgt ccccatgtg atgaataac
 aaggaagga ca

图22A (续)

MTHLLTVFLVALMGLPVAQALECHVCAYNQDNCFKPMRCPAMATYCMTTRTYFTPYR
MKVRKSCVPSCFETVYDGYSKHASATSCCQYYLCNGAGFATPVTALVPALLATFWSL
L

图 22B

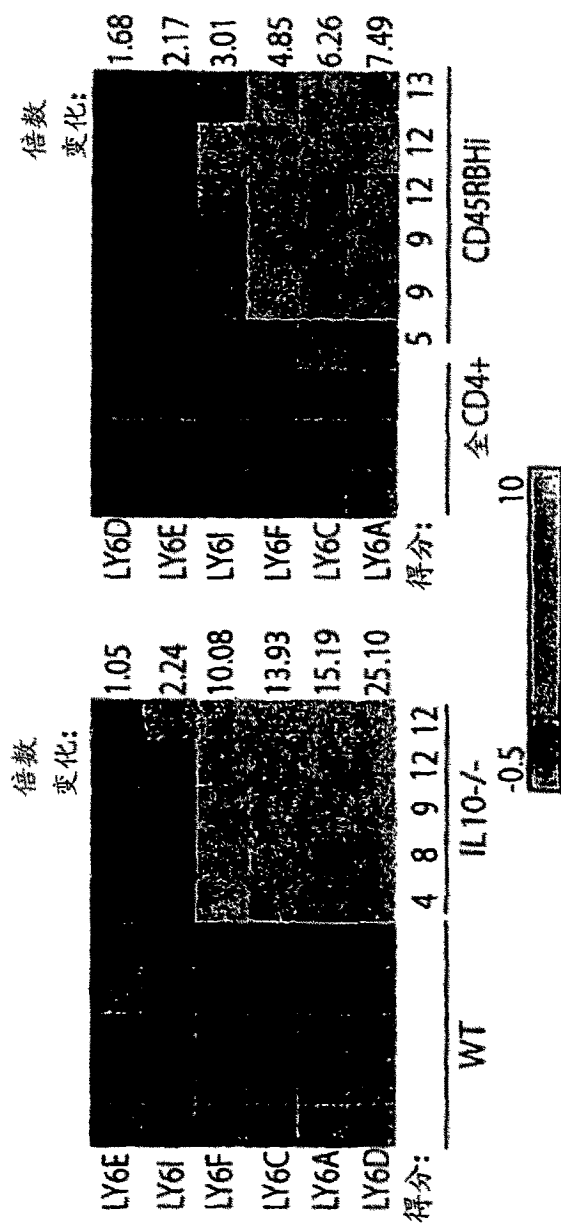


图 23A

图 23B

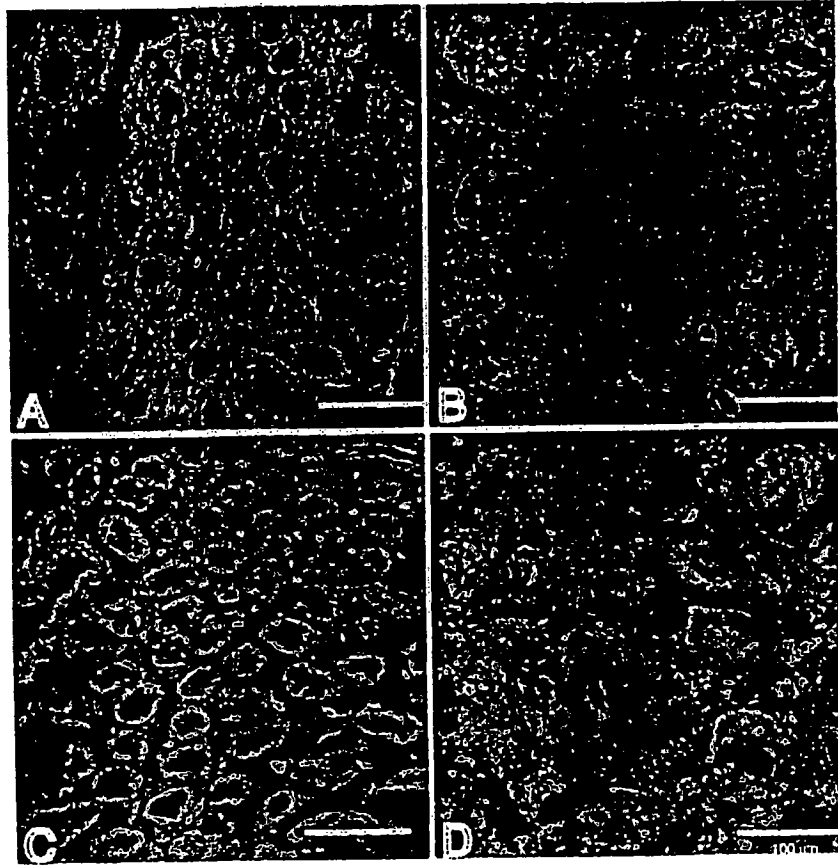


图24

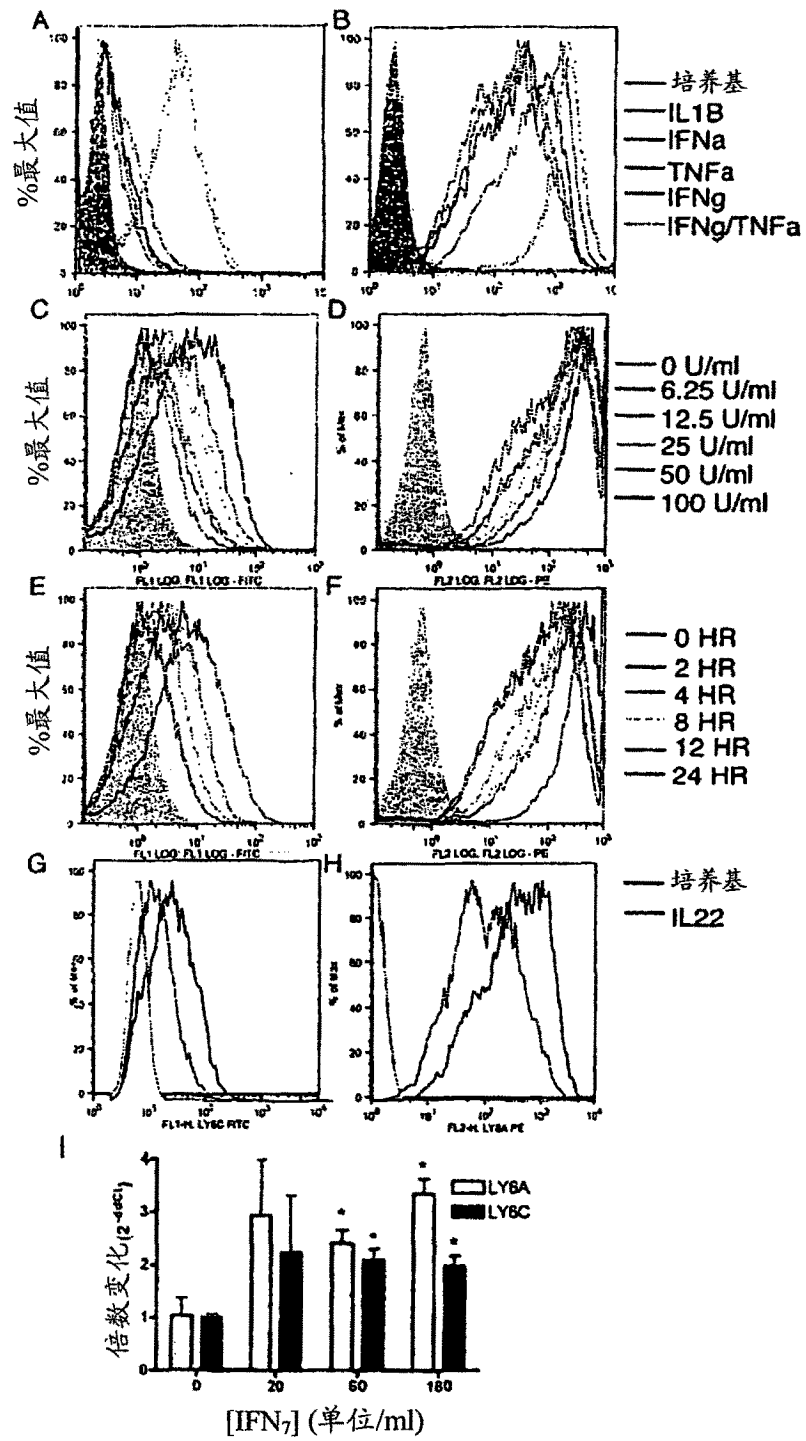
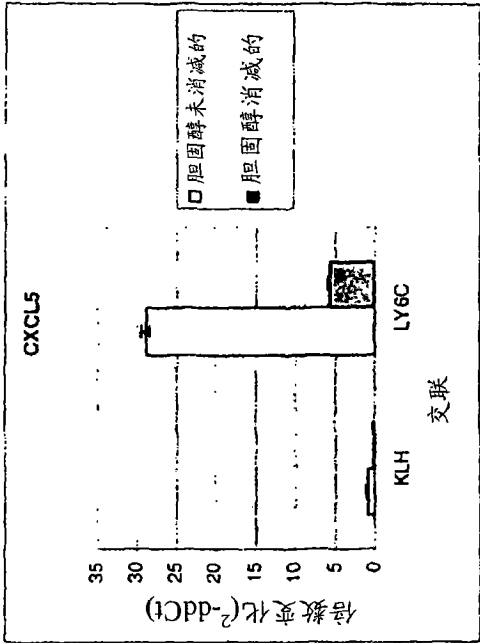
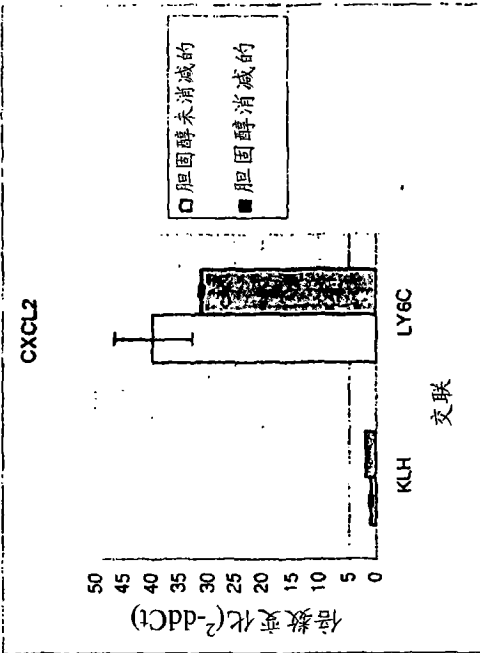


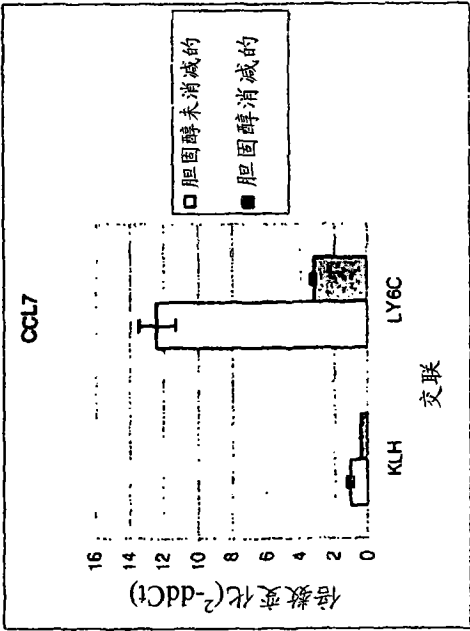
图25



B

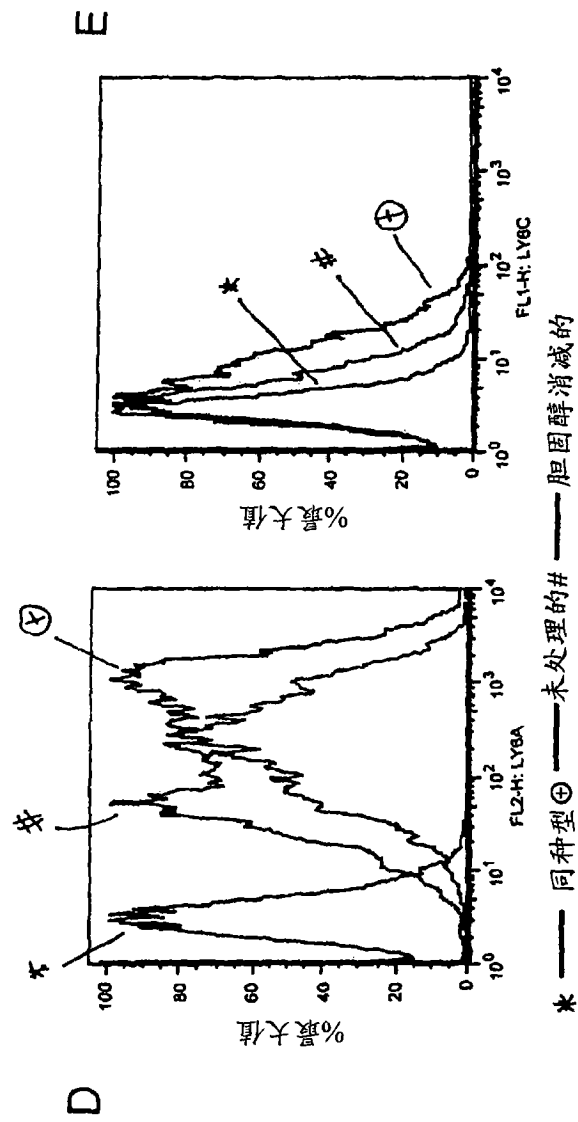


A



C

图26



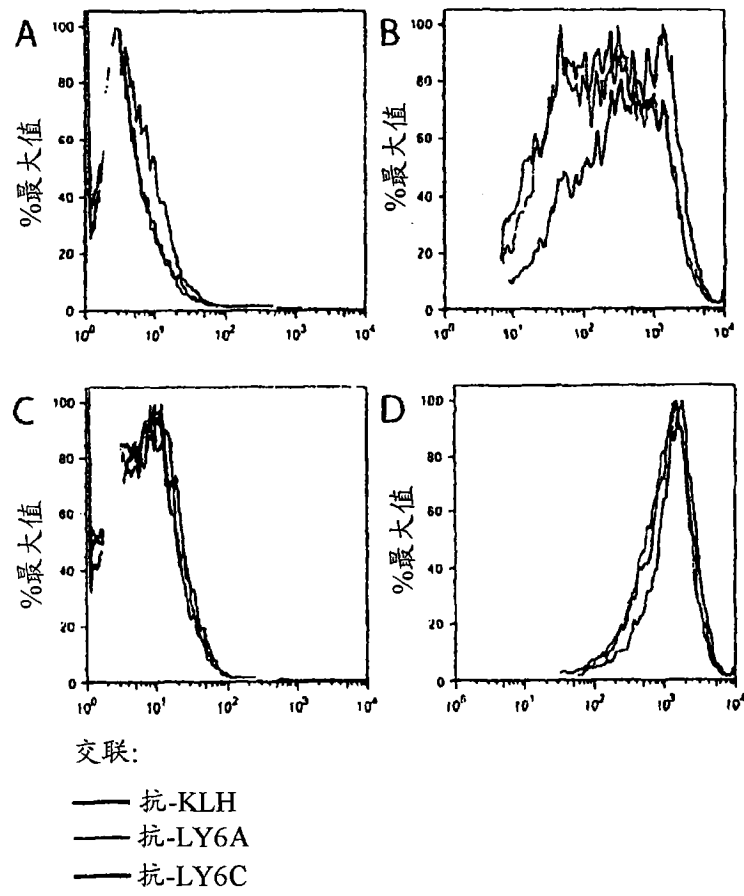


图27

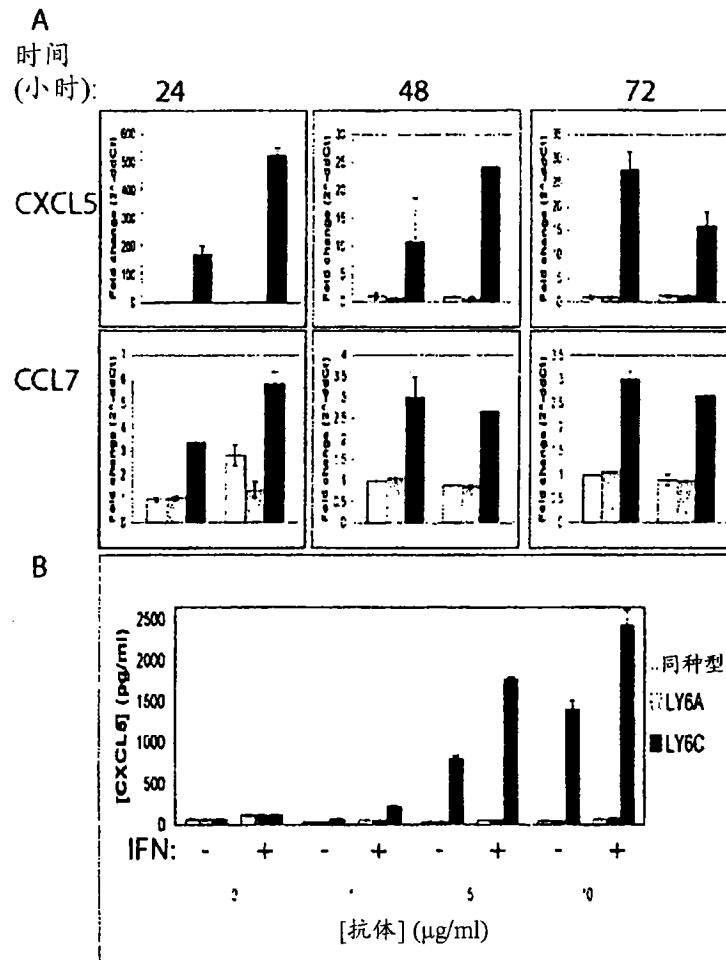


图28

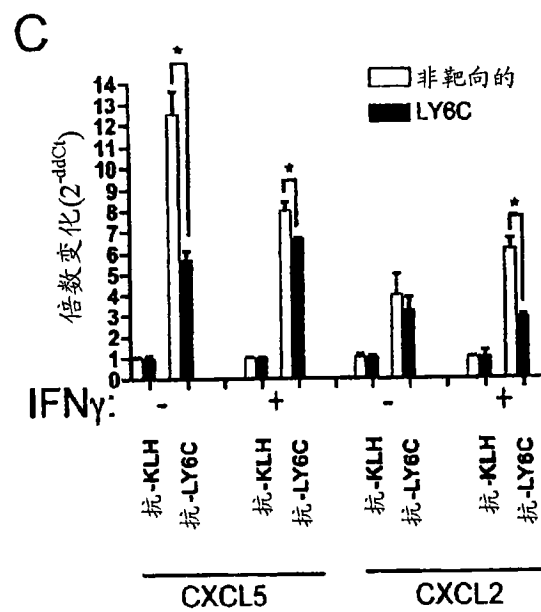


图28 (续)

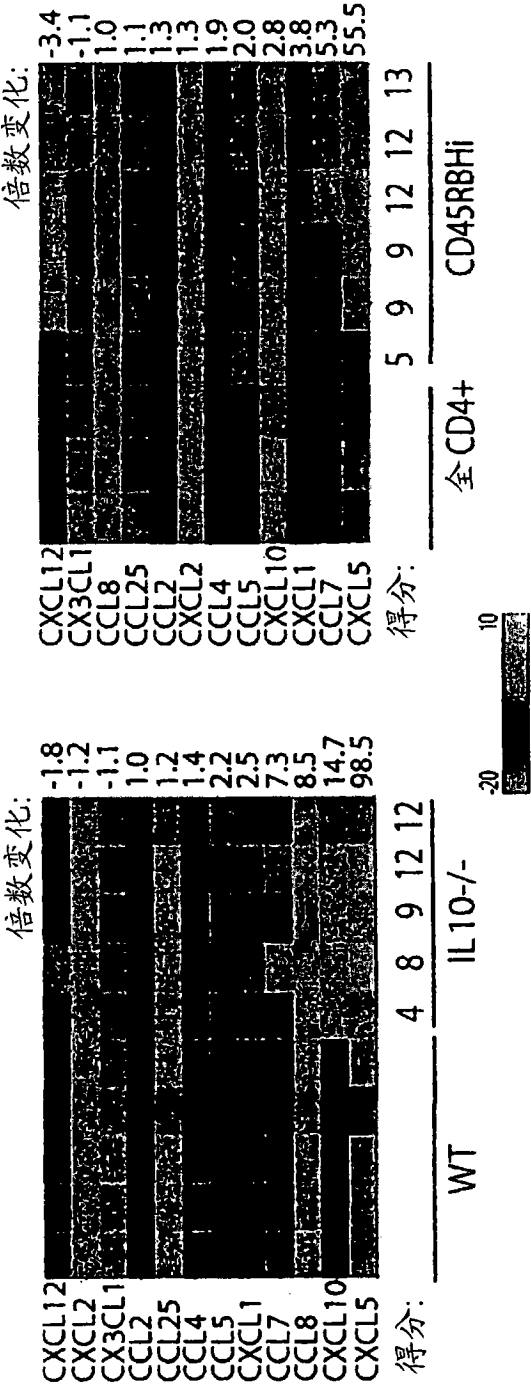


图 29A

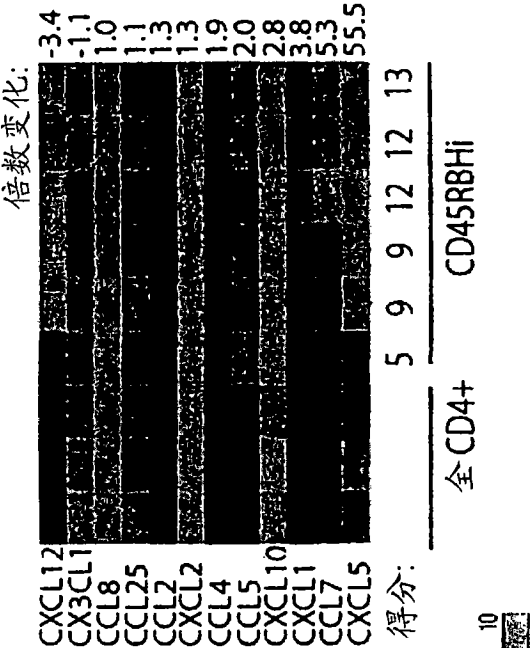


图 29B

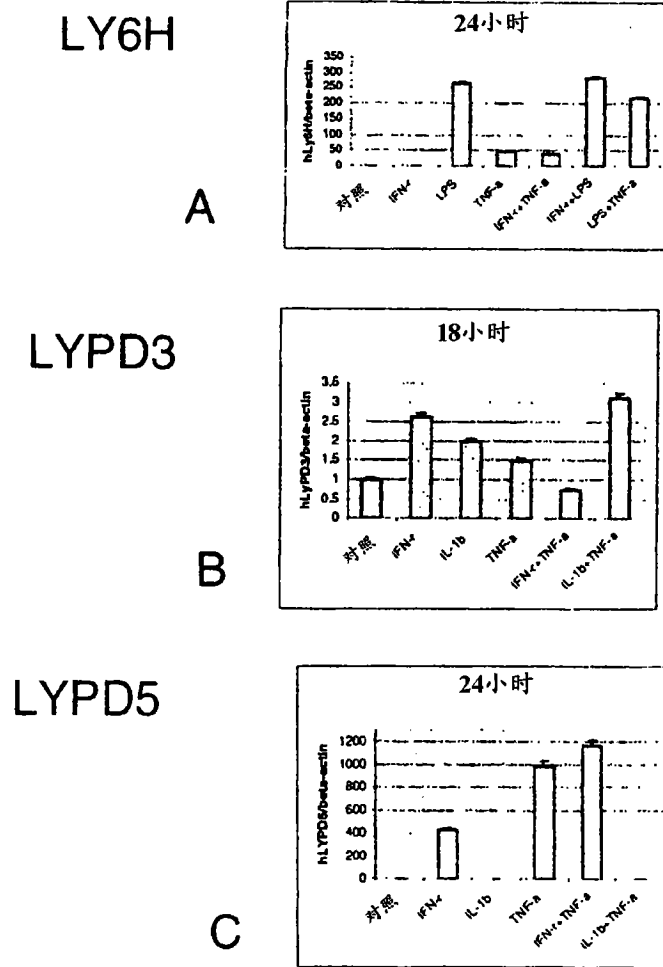


图30

LYPD1

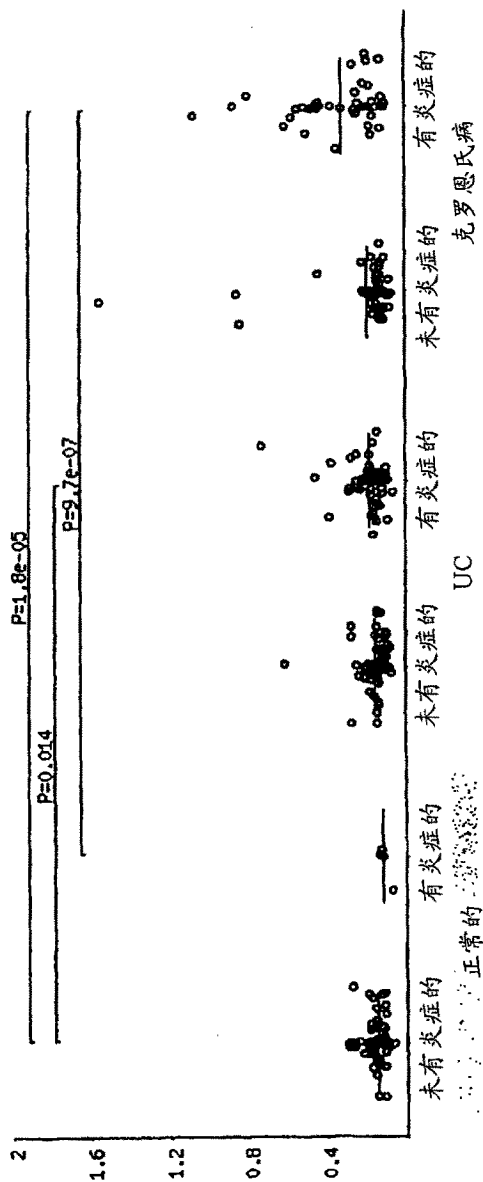


图31A

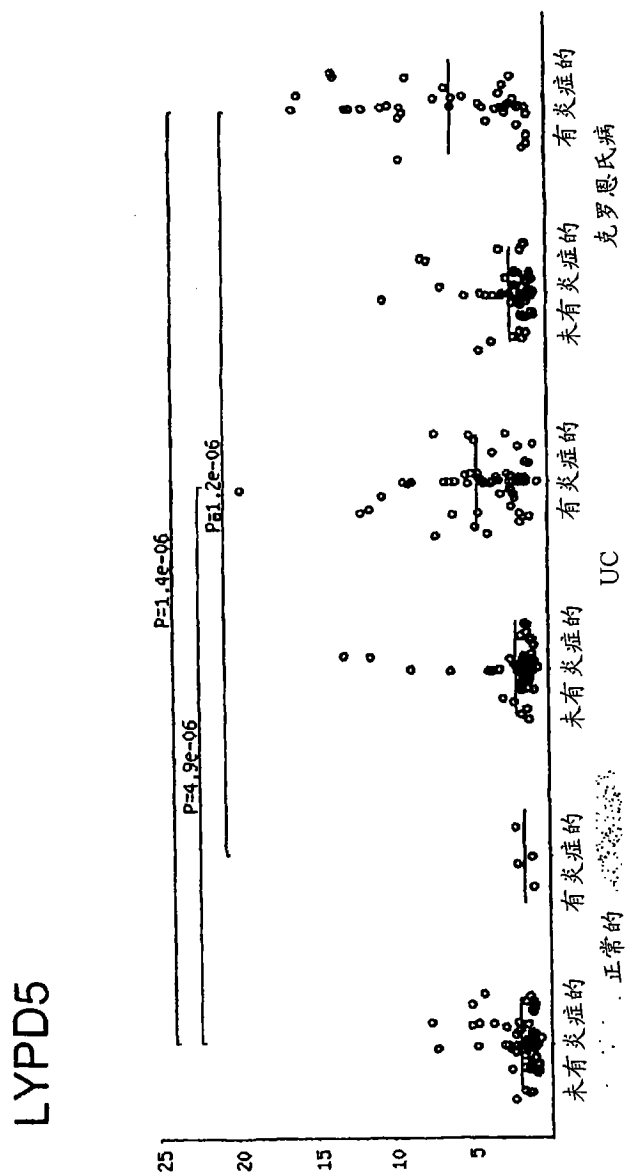


图31B

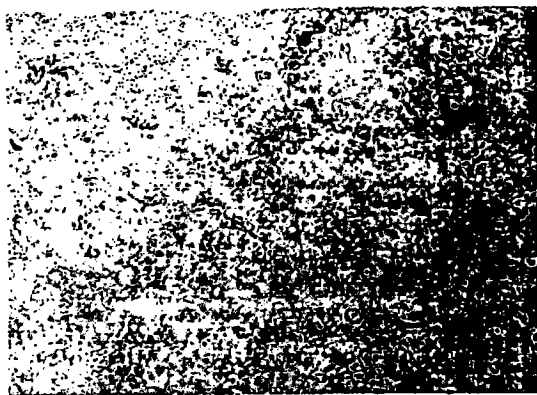


图32A



图32B

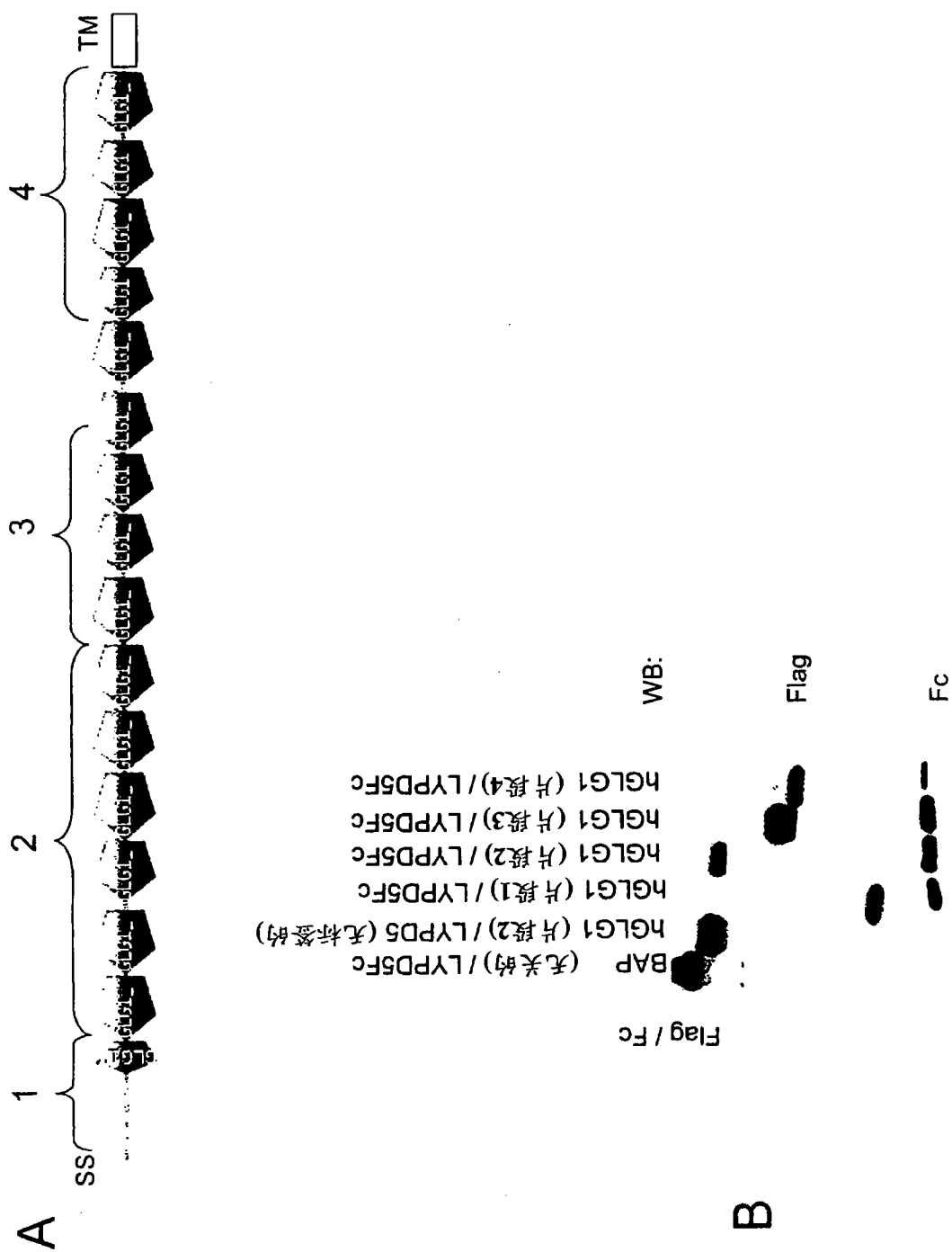


图33

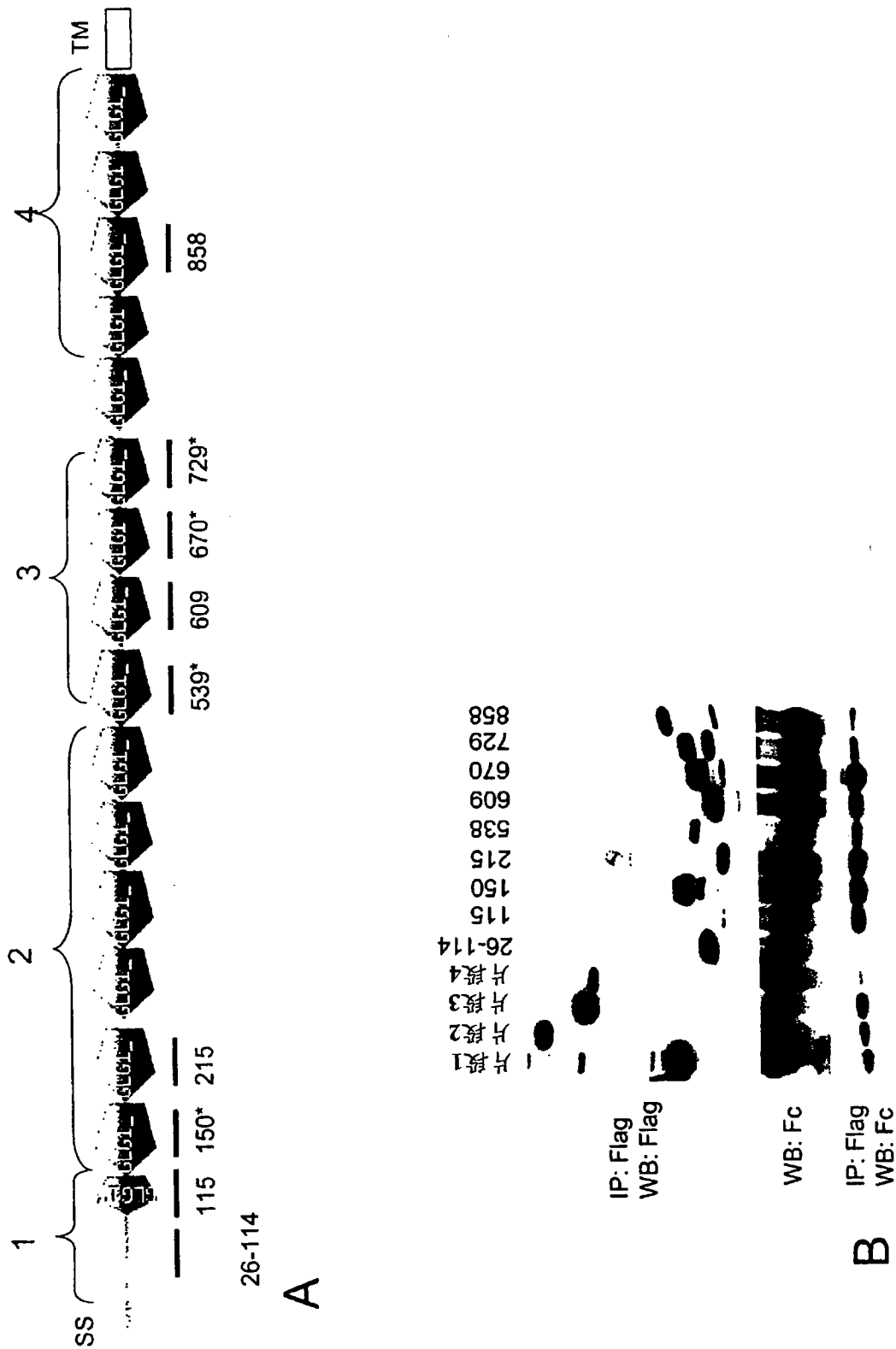


图34

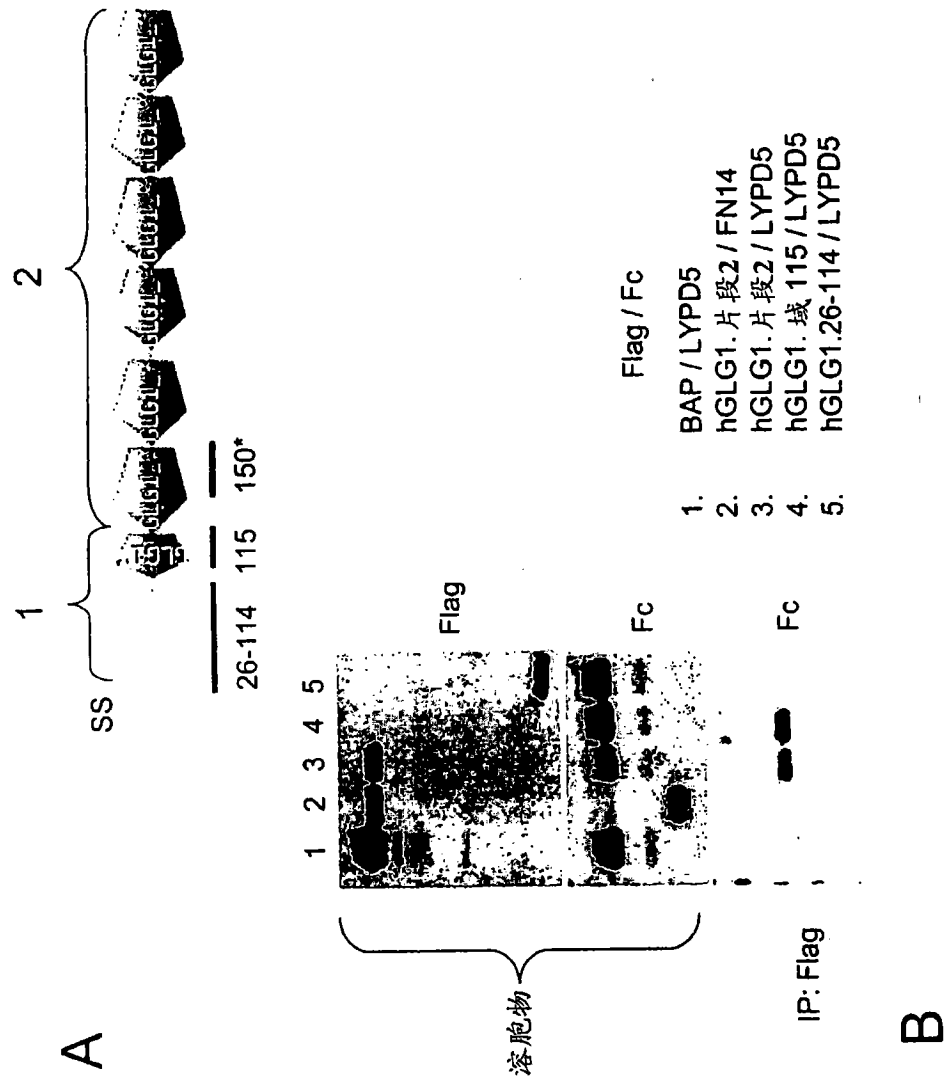


图35

cgttgcctgc gctctgcacg cacctatgtg gaaactaaag cccagagaga aagcttgact
 tgccccacag ccagttagtg actgcagcag caccagaatc tggctgttt cctgtttggc
 tctctacca ctacggcttg ggtatcggg catggtggct ttccaatgg tctgtttt
 gctgctggc ctgagcagag gtgagagtga attggacgcc aagatccat ccacagggga
 tgccacagaa tggcggaaac ctacctgtc catgctgggg tctgccagc cagccccctc
 ctgccagaag tgcattctct cacacccag ctgtcatgg tgaagcaac tgaactcac
 cgcgtcggga gaggcggagg cgcggcgctg cggccgacga gaggagctgc tggctcagg
 ctgcccgtg gaggagctgg aggagccccg cggccagcag gaggtgctgc aggaccagcc
 gctcagccag ggcggcccg gagagggtgc caccagctg gcggcgacgc gggctcgggt
 cacgtgcgg cctggggagc cccagcagct ccaggtccgc ttcctctgt ctgaggata
 cccggtgac ctgtactacc ttatggacct gagclaccc atgaaggacg acctggaacg
 cgtgcgccag ctggggcacg ctctgtgtgt cgggtgcag gaagtcacc attctgtgcg
 cattgtttt ggttccttg tggacaaaac ggtgtgccc ttgtgagca cagtaccctc
 caaactgcgc caccctgcc ccacccggct ggagcgtgc cagtcacat tcagcttca
 ccatgtctg tccctgacgg gggacgcaca agccttcag cgggaggtgg ggcgccagag
 tgttccggc aatctggact cgcctgaagg tggcttcgat gccattctg aggcctgact
 ctgccaggag cagattggct ggagaaatgt gtcccggctg ctggtgtca ctccagcga
 cacattccat acagctgggg acgggaagt gggcggcatt ttatgccca gtgatggga
 ctgccattg gacagcaatg gcctctacag tgcagcaca gatttgact accctctgt
 gggtcagga gccagggccc tctctgacg aaatatccag ccatcttg ctgtaccag
 tggcgactg cctgttacc aggagctgag taaactgatt cctaagctg cagttggga
 gctgagtga gactccagca acgtgtgaca gctcatcat galgttata atagcctgtc
 ttccaccgtg accttgaac actcttact cctcctggg gtccacatt ctacgaac
 ccagttgtg ggtcctgaga agaggaggga taaggctgag gatcgaggac agtgcaacca
 cgtccgaac aaccagacgg tgaattctg ggttctct caagccacc actgcctcc
 agagcccat ctctgaggc tccggggcct tggcttca gaggagctga ttgtggagt
 gcacacgtg tgtactga attgcagtga caccagccc caggctccc actgcagtga
 tggccaggga cactacaat gtgtgtatg cagctgtcc cctggccgc taggtggct
 ctgtagtgc tctgtggcag agctgtctc cccagacctg gaatctgggt gccgggctcc
 caatggcaca gggccccgt gcagtggaaa gggctactgt caatgtggac gctgcagctg
 cagtggacag agctctgggc atctgtgca gtgtgacgat gccagctgt agcgacatga
 gggcatcctc tgcggaggct ttgtcgtg ccaatgtga gtatgtact gtcatgcaa
 ccgcacgggc agagcatgc aatgcagtgg ggacatggac agtgcacga gtccgaggg
 agggctctg agtgggcatg gacgtgcaa atgcaaccg tgcagtgct tggacggcta
 ctatgtgt ctatcgacc aatgccagg ctgcaagaca ccatgcaga gacaccggga
 ctgtcagag tgtggggcct tcaggactgg cccactggcc accaactgca gtacagctg
 tggccatacc aatgtgacc tggcctggc cctatcttg gatgatggct ggtgcaaga
 gcggaccctg gacaaccagc tgttctct ctgtgtggag gatgaccca gaggcacgt
 cgtgtcaga gtgagacccc aagaaaagg agcagaccac acgcaggcca ttgtctggg
 ctgctaggg ggcacgtgg cagtggggct ggggtgtg ctggttacc ggtctcggg
 ggaaatctat gaccggggg aatacagtc ctttgaag gagcagcaac aactcaactg
 gaagcaggac agtaatctc tctacaaaag tgccatcac accaccatca atctcgtt

图36A

tcaaggga gacagtcca ctctgaag gagggaggga cacttacca aggtcttct
 ccttgaggga cagtgggaac tggagggtga gaggaagggt ggtctgtaa gaccttgga
 gggactaat tactggcga ggtcggcca ccacctact tcatctcag agtgacacc
 aagagggtg ctcccatgc ctgcaacct gcatcatct gggctacccc accaagat
 acaataaagt ctacctcag aaaaaaaaa aaaaaaa

图36A (续)

MVALPMVLVLLLVLSRGESELDKIPSTGDATEWRNPHLSMLGSCQPAPSCQKCILSHP
SCAWCKQLNFTASGEAEARRCARREELLARGCPLEELEPRGQQEVLDQPLSQGARG
EGATQLAPQVRVTLRPGEPPQLQVRFLRAEGYPVDLYYLMDSL SYSMKDDL ERVRQL
GHALLVRLQEVTHSVRI GFSGFVDKTVLPFVSTVPSKLRHPCPTRLERCQSPFSFHHVLSL
TGDAQAFEREVGRQSVSGNLDSPGGFDAILQAALCQEQIGWRNVSRLLVFTSDDTFHT
AGDGKLG G IFMPSDGHCHLDSNGLYSRSTEFDYPSVGQVAQALSAANIQPIFAV TSAAL
PVYQELSKLIPKSAVGELSESSNVVQLIMDAYNSLSSTVTLEHSSLPPGVHISYESQCEG
PEKREGKAEDRGQCNHVRINQTVTFWVSLQATHCLPEPHLLRLRALGFSEELIVELHTLC
DCNCSDTQPQAPHCS DGQGH LQCGVCSCAPGRLGRLCECSVAELSSPDLES GCRA PNGT
GPLCSGKGHCQCGRCSCSGQSSGHLCECDDASCERHEGILCGGFGRCCQGVCHCHANR
TGRACECSGDMDS CISP EGGLCSGHGRCKCNRCQCLDGYYGALCDQCPGCKTPCERHR
DCAECGAFRTGPLATNCSTACAHTNVTLALAPILDDGWCKERTLDNQLFFFLVEDDAR
GTVVLRVRPQEK GADHTQAIVLGCVGGIVAVGLGLVLAYRLSVEIYDRREYSRFEKEQQ
QLNWKQDSNPLYKSAITTTINPRFQEADSPTL

图36B