



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102762223 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 03

(21) 申请号 201180005464. 6

(22) 申请日 2011. 01. 10

(30) 优先权数据

1000318. 4 2010. 01. 08 GB

1005071. 4 2010. 03. 25 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 07. 05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2011/000022 2011. 01. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/083317 EN 2011. 07. 14

(73) 专利权人 沃卢申伊谬诺制药公司

地址 瑞士日内瓦

(72) 发明人 维恩·维斯顿-戴维斯

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 谢顺星 张晶

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006. 01)

A61P 31/16 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2008029169 A1, 2008. 03. 13,

W0 2009098454 A2, 2009. 08. 13,

审查员 江涵

权利要求书1页 说明书13页

序列表1页 附图12页

(54) 发明名称

用于治疗呼吸道病毒性感染的 EV576

(57) 摘要

本发明涉及治疗和预防上和下呼吸道病毒性感染的炎症效应的方法,所述感染包括 SARS 冠状病毒 (SARS)、大流行性流感 AH5N1 (禽流感) 和大流行性流感 A H1N1 (猪流感) 的感染。

1. 一种治疗有效量的制剂在制备用于治疗呼吸道病毒性感染的炎症效应的药物中的应用,所述制剂:

- a) 抑制补体经典途径、补体替代途径和补体凝集素途径 ;和 / 或
- b) 抑制类花生酸活性 ;

其中所述制剂是:

蛋白,其由序列 2 所示的氨基酸序列的氨基酸 1-168 或氨基酸 19-168 组成。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其中所述制剂结合补体 C5。

3. 根据权利要求 2 所述的应用,其中所述制剂抑制补体 C5 通过 C5 转化酶而裂解为补体 C5a 和补体 C5b-9。

4. 根据权利要求 1 所述的应用,其中所述制剂结合 LTB₄。

5. 根据权利要求 1 所述的应用,其中所述制剂源自吸血性节肢动物。

6. 根据权利要求 1 所述的应用,其中治疗对象为哺乳动物。

7. 根据权利要求 6 所述的应用,其中所述哺乳动物为人类。

8. 根据权利要求 2 所述的应用,其中所述制剂的施用剂量足以结合全部的可用 C5。

9. 根据权利要求 1 所述的应用,其中所述呼吸道病毒性感染的炎症效应为呼吸衰竭,或呼吸衰竭的后遗症。

10. 根据权利要求 9 所述的应用,所述呼吸衰竭由急性肺损伤或急性呼吸窘迫综合症引起。

11. 根据权利要求 9 所述的应用,所述呼吸衰竭的后遗症是多器官衰竭。

12. 根据权利要求 1 所述的应用,其中所述病毒性感染为上或下呼吸道感染。

13. 根据权利要求 12 所述的应用,其中所述病毒性感染是大流行性流感病毒。

14. 根据权利要求 13 所述的应用,其中所述大流行性流感病毒是流感 A H5N1、流感 A H1N1。

用于治疗呼吸道病毒性感染的 EV576

技术领域

[0001] 本发明涉及治疗和预防上和下呼吸道病毒性感染的炎症效应的方法,所述感染包括 SARS 冠状病毒 (SARS)、大流行性流感 AH5N1 (禽流感) 和流感 AH1N1 (猪流感) 的感染。

[0002] 本文中提及的和在说明书最后所列的全部文献以参阅的方式并入于此。

背景技术

[0003] 与 SARS 和大流行性流感有关的死亡率与快速进展的呼吸衰竭有关,其引起急性肺损伤 (ALI) 或急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)。在某些情况下,多器官衰竭也是一个特征。在大流行性 H5N1 流感的情况下,由于呼吸衰竭和多器官衰竭引起的死亡率大约为 60%。最近已经描述了致死的 H1N1 流感的主要肺部病理,并且通过坏死性肺炎和密集的嗜中性粒细胞浸润来表征 [1]。

[0004] 最初,假定与 SARS 和大流行性流感有关的呼吸衰竭归因于快速的病毒复制,其导致了呼吸道靶细胞例如肺泡上皮细胞的细胞溶解破坏,或导致了病毒逸出到远离呼吸系统的组织和器官中,例如中枢神经系统。但是,最近的证据已经表明呼吸衰竭的发展实际上与高病毒滴度无关。而研究人员已经发现呼吸衰竭与前炎症细胞因子如 $\text{TNF}\alpha$ 和 $\text{IFN}\beta$ 的明显升高有关。这导致专家提出,这些并发症的发病机理是对先天免疫系统不恰当的刺激触发了所谓的“细胞因子风暴” [2, 3]。

[0005] 目前对呼吸衰竭的治疗包括使用氧气面罩来提高患者的氧水平,使用通风机进行机械氧合,或在最严重的情况下,进行体外膜式氧合 (ECMO),其包括将患者的血液在体外进行循环并向其中人工加氧。

[0006] 人们亟需一种制剂,用于改进目前能够使用的对于呼吸道病毒性感染的炎症效应引起的呼吸衰竭的治疗。

发明内容

[0007] 因此,本发明提供一种治疗或预防呼吸道病毒性感染的炎症效应的方法,其包括给需要其的对象施用治疗或预防有效量的制剂,该制剂能抑制补体经典途径、补体替代途径和补体凝集素途径。

[0008] 本发明还提供一种用于治疗或预防呼吸道病毒性感染的炎症效应的治疗或预防有效量的制剂,其能抑制补体经典途径、补体替代途径和补体凝集素途径。

[0009] 补体系统是身体自然防御外来入侵机制的主要部分,并且还与炎症过程有关。在血清中和细胞表面有 30 多种蛋白与补体系统功能和调节有关。最近已经变得更清楚:与补体系统的约 35 种可能与有益过程和病理过程均有关的已知成分一样,补体系统本身与至少 85 种生物途径相互作用并具有如血管新生、血小板活化、葡萄糖新陈代谢和精子生成的多种功能。

[0010] 补体系统通过外来抗原活化。存在三种活化途径:(1) 经典途径,其通过 IgM 和 IgG 复合物或通过碳水化合物的识别来活化;(2) 替代途径,其通过非自表面 (缺乏特异性调节

分子)和通过细菌内毒素来活化;和(3)凝集素途径,其通过将甘露聚糖结合凝集素(MBL)结合到病原体表面上的甘露糖残基上来活化。这三种途径包含平行级联的事件,其通过在细胞表面上形成类似的C3和C5转化酶导致急性炎症调节因子(C3a和C5a)的释放和形成膜攻击复合物(MAC),而导致补体活化的产生。图1所示为经典途径和替代途径中所包括的平行级联。

[0011] 补体系统被认为是先天免疫应答的早期活化剂,其引发许多炎症级联反应。但是,以前没有暗示其为引起呼吸系统病毒性感染的呼吸并发症的原因。令人惊讶的是,本申请所给出的数据第一次表明,抑制补体替代途径、补体经典途径和补体凝集素途径的制剂降低了呼吸道病毒性感染的炎症效应。

[0012] 呼吸道病毒性感染炎症效应的降低可以通过遭受这种病毒性感染的对象的炎症细胞因子和/或嗜中性粒细胞的降低来评价。在本发明的一个方面中,与未治疗的对象相比,施用抑制补体替代途径、补体经典途径和补体凝集素途径的制剂可因此降低遭受呼吸道病毒性感染的对象中的炎症细胞因子如CXCL2、IL-1 β 和/或IL-6的水平。与未治疗的对象相比,将抑制补体替代途径、补体经典途径和补体凝集素途径的制剂施用于遭受呼吸道病毒性感染的对象还可降低嗜中性粒细胞的水平。细胞因子水平和嗜中性粒细胞水平例如可以在来自该对象的支气管肺泡灌洗(BAL)液中进行评价。

[0013] 在本发明的一个方面中,该制剂可以结合补体C5。该制剂可以用于阻止补体C5通过C5转化酶而裂解成补体C5a和补体C5b-9。与未治疗的对象相比,该制剂可以用于降低遭受呼吸道病毒性感染的对象中的C5a水平,例如在来自这样的对象的BAL液中进行。令人惊讶的是,本申请所给出的数据首次表明,在呼吸道病毒性感染之后,BAL液中的C5a明显升高。

[0014] 补体C5蛋白(在此也称作C5)通过C5转化酶来裂解,它本身由C3a形成,其是替代途径的早期产物(图1)。这种裂解的产物包括过敏毒素C5a和裂解复合物C5b-9(也称作膜攻击复合物(MAC))。C5a是一种高反应性肽,与许多病理炎症过程有关,包括嗜中性粒细胞和嗜曙红细胞趋化性、嗜中性粒细胞活化、毛细血管渗透性增加和嗜中性粒细胞凋亡的抑制[4]。

[0015] MAC与其他重要的病理过程有关,包括风湿性关节炎[5;6]、增生性血管球性肾炎[7]、原发性膜性肾病[8]、蛋白尿[9]、急性轴索损伤后的脱髓鞘[10],以及导致异种器官移植后的急性移植排斥[11]。

[0016] C5a已经成为与补体有关的病症领域中的一种特别令人感兴趣的靶标[12]。尽管C5a具有许多公知的病理关联,但它在人体中的消耗产生的影响似乎是有限的。已经开发了结合和抑制C5a或C5a受体的单克隆抗体和小分子以治疗各种自体免疫疾病。但是,这些分子不能阻止MAC的释放。

[0017] 相反,本发明所用的制剂抑制C5a肽和MAC二者的形成。因为C5是补体经典途径和补体替代途径的后产物,C5的抑制不太可能与当靶向级联中早期产物时存在的伴随感染风险有关[13]。

[0018] 制剂结合C5的能力可通过本领域已知的标准体外检测来确定,例如将蛋白和标记的C5在凝胶上孵育后,通过蛋白免疫印迹技术来确定。优选地,本发明的制剂与C5结合的IC₅₀值小于0.2mg/ml,优选小于0.1mg/ml,优选小于0.05mg/ml,优选小于0.04mg/ml,优

选小于 0.03mg/ml, 优选 0.02mg/ml, 优选小于 1 μ g/ml, 优选小于 100ng/ml, 优选小于 10ng/ml, 仍然更优选小于 1ng/ml。

[0019] 根据本发明的一个实施方案, 结合 C5 的制剂不是抗 -C5 单克隆抗体。

[0020] 本发明还提供一种治疗或预防呼吸道病毒性感染的炎症效应的方法, 其包括给需要其的对象施用治疗或预防有效量的能抑制类花生酸活性的制剂。

[0021] 本发明还提供一种用于治疗或预防呼吸道病毒性感染的炎症效应的治疗或预防有效量的制剂, 其能抑制类花生酸活性。

[0022] 根据本发明的这个方面, 所述制剂可抑制白三烯 B₄ (LTB₄) 活性。具体地, 根据本发明的这个方面, 该制剂能够结合 LTB₄。该制剂结合 LTB₄ 的能力可以通过本领域已知的标准体外检测来确定, 例如将该蛋白和标记的 LTB₄ 在凝胶上孵育后, 使用蛋白免疫印迹技术来确定。本发明的制剂可与 LTB₄ 结合, 其 IC₅₀ 值小于 0.2mg/ml, 优选小于 0.1mg/ml, 优选小于 0.05mg/ml, 优选小于 0.04mg/ml, 优选小于 0.03mg/ml, 优选 0.02mg/ml, 优选小于 1 μ g/ml, 优选小于 100ng/ml, 优选小于 10ng/ml, 仍然更优选小于 1ng/ml。

[0023] 在一个方面中, 本发明提供一种治疗或预防呼吸道病毒性感染的炎症效应的方法, 其包括给需要其的对象施用治疗或预防有效量的制剂, 该制剂:

[0024] a) 抑制补体经典途径、补体替代途径和补体凝集素途径; 和

[0025] b) 抑制类花生酸活性。

[0026] 本发明还提供一种治疗或预防有效量的制剂, 其抑制:

[0027] a) 补体经典途径、补体替代途径和补体凝集素途径; 和

[0028] b) 类花生酸活性,

[0029] 该制剂用于治疗或预防呼吸道病毒性感染的炎症效应。

[0030] 根据本发明该方面的一个实施方案, 该制剂结合 C5 和 LTB₄ 二者。该实施方案的制剂因此能够用于阻止补体 C5 通过 C5 转化酶而裂解成补体 C5a 和补体 C5b-9 (MAC), 以及抑制 LTB₄ 活性。

[0031] 这里所描述的本发明的方法和用途可以用于治疗或预防上或下呼吸道病毒性感染的炎症效应。具体地, 此处所描述的本发明的方法和用途可以用于治疗或预防病毒感染引起的呼吸衰竭, 包括急性肺损伤或急性呼吸窘迫综合征。本发明的方法和用途还可以用于治疗或预防病毒感染引起的呼吸衰竭后遗症, 包括多器官衰竭。

[0032] 炎症可以是由于上或下呼吸道的任何病毒感染引起的。具体地, 本发明的方法和用途可治疗或预防大流行性流感病毒感染引起的炎症效应, 例如流感 A H5N1 (禽流感) 和流感 A H1N1 (猪流感)。本发明的方法和用途还可以用于治疗或预防 SARS 冠状病毒感染引起的炎症效应。

[0033] 优选地, 本发明的制剂源自吸血性节肢动物。术语“吸血性节肢动物”包括所有从合适的宿主上取食血液的节肢动物, 如昆虫、蜱虫、虱子、跳蚤和螨虫。优选地, 该制剂源自蜱虫, 优选源自非洲毛白钝缘蜱 (*Ornithodoros moubata*)。

[0034] 根据本发明的一个实施方案, 该制剂是包含如图 2 所示的氨基酸序列中氨基酸 19-168 的蛋白或这种蛋白的功能性等价物。该制剂可以是由如图 2 所示氨基酸序列中氨基酸 19-168 组成的蛋白或是这种蛋白的功能性等价物。

[0035] 根据一个替代性实施方案, 本发明该实施方案所用的蛋白可以包含或由如图 2 所

示氨基酸序列中氨基酸 1-168 组成,或是其功能性等价物。图 2 给出的蛋白序列中第一批 18 个氨基酸形成了信号序列,其不需要 C5 结合或 LTB4 结合活性,因此例如为了提高重组蛋白生成的效率,可以任选地省掉这些氨基酸。

[0036] 具有图 2 给出的氨基酸序列的蛋白(在此也称作 EV576 蛋白)是从非洲毛白钝缘蜱 (*Ornithodoros moubata*) 的唾液腺中分离的。EV576 是脂质运载蛋白 (lipocalin) 家族的远亲成员,并且是第一种显示出抑制补体活化的脂质运载蛋白家族成员。EV576 蛋白通过结合 C5 并阻止其通过 C5 转化酶而裂解成补体 C5a 和补体 C5b-9 来抑制补体替代途径、补体经典途径和补体凝集素途径,从而抑制 C5a 肽和 MAC 二者的作用。EV576 蛋白还结合 LTB4。如本文所用,术语“EV576 蛋白”是指图 2 给出的序列,其具有或不具有信号序列。

[0037] EV576 蛋白和这种蛋白抑制补体活化的能力已经公开在 [14] 中,这里 EV576 蛋白被称作“OmCI 蛋白”。EV576 蛋白也还显示出可有效治疗重症肌无力 [15],呼吸紊乱 [16] 和末梢神经紊乱 [17]。EV576 蛋白结合类花生酸(包括 LTB4)的能力和它在治疗由白三烯 (leukotriene) 或羟基类花生酸调节的疾病中的作用已经在 [18] 中提到。这些公开文献都没有提出 EV576 蛋白能够用于治疗或预防病毒性感染,特别是治疗或预防呼吸道病毒性感染的炎症效应。

[0038] 现在已经发现 EV576 蛋白在治疗和预防呼吸道病毒性感染的炎症效应方面令人惊讶地有效。这里所提供的数据表明,在人类呼吸道 H1N1 流感感染的鼠科模型中,与载体治疗的小鼠相比,用 EV576 治疗的小鼠具有明显更低水平的蛋白和总细胞,更低水平的补体 C5a,更低水平的炎症细胞因子 IL-6、IL-1 β 和 CXCL2,明显低得多的嗜中性粒细胞。因此 EV576 代表了一种潜在的人类治疗,用于治疗 and 预防呼吸道病毒性感染的炎症效应。EV576 在治疗呼吸疾病方面令人惊讶的效果可以归因于这样的事实,即,它通过结合 C5 起作用而抑制 C5a 和 MAC 的形成,或归因于它的 LTB4 结合活性。

[0039] 根据本发明的另一实施方案,该制剂可以是编码 EV576 蛋白或其功能性等价物的核酸分子。例如,可在体内或体外实施基因治疗,通过对对象的相关细胞影响 EV576 蛋白的内源性生成。另一方案是施用“裸 DNA”,其中将治疗基因直接注入到血流中或肌肉组织中。

[0040] 优选地,这样的核酸分子包含或由如图 2 所示核苷酸序列中的碱基 53-507 组成。该核苷酸序列编码如图 2 所示的 EV576 蛋白,其无信号序列。如图 2 所示核苷酸序列中第一批 54 个碱基编码了该信号序列,其不需要补体抑制活性或 LTB4 结合活性。或者,该核酸分子可包含或由如图 2 所示核苷酸序列中的碱基 1-507 组成,其编码具有信号序列的蛋白。

[0041] EV576 蛋白已经被证实能够结合到 C5 上并阻止它通过 C5 转化酶而裂解,在大鼠、小鼠和人类血清中其 IC₅₀ 值为约 0.02mg/ml。优选地,保持结合 C5 能力的 EV576 蛋白的功能性等价物的 IC₅₀ 值小于 0.2mg/ml,优选小于 0.1mg/ml,优选小于 0.05mg/ml,优选小于 0.02mg/ml,优选小于 1 μ g/ml,优选小于 100ng/ml,优选小于 10ng/ml,仍然更优选小于 1ng/ml。

[0042] 此外,已经证实 EV576 蛋白结合 LTB4。该 EV576 蛋白的功能性等价物同样也可以保持结合 LTB4 的能力,具有类似于 EV576 蛋白的亲合力。

[0043] 在一个方面中,术语“功能性等价物”在此用于描述 EV576 蛋白的同源物和片段,其:a) 保持了它结合 C5 的能力并阻止补体 C5 通过 C5 转化酶而裂解成补体 C5a 和补体 C5b-9;和/或 b) 保持了它结合 LTB4 的能力。

[0044] 术语“功能性等价物”还指结构类似于 EV576 蛋白的分子或包含类似或相同的三级结构的分子,特别是在 EV576 蛋白结合到 C5 和 / 或 LTB4 的一个或多个活性位点的环境中,如合成分子。在 [18] 中描述了 EV576 中很可能是 LTB4 结合所需的氨基酸。

[0045] 术语“同源物”表示包括所指的图 2 中明确确认的 EV576 序列的旁系同源物和直系同源物,包括例如来自其他蜱虫物种的 EV576 蛋白序列,包括具尾扇头蜱 (*Rhipicephalus appendiculatus*)、血红扇头蜱 (*R. Sanguineus*)、囊形扇头蜱 (*R. bursa*)、美洲花蜱 (*A. americanum*)、卡宴花蜱 (*A. cajennense*)、希伯来花蜱 (*A. hebraeum*)、微小牛蜱 (*Boophilus microplus*)、环形牛蜱 (*B. annulatus*)、消色牛蜱 (*B. decoloratus*)、网纹革蜱 (*Dermacentor reticulatus*)、安氏革蜱 (*D. andersoni*)、边缘革蜱 (*D. marginatus*)、变异革蜱 (*D. variabilis*)、无角血蜱 (*Haemaphysalis inermis*)、犬血蜱 (*Ha. Leachii*)、长棘血蜱 (*Ha. Punctata*)、小亚璃眼蜱 (*Hyalomma anatolicum anatolicum*)、嗜驼璃眼蜱 (*Hy. Dromedarii*)、边缘璃眼蜱 (*Hy. marginatum marginatum*)、蓖子硬蜱 (*Ixodes ricinus*)、全沟硬蜱 (*I. persulcatus*)、肩突硬蜱 (*I. scapularis*)、六角硬蜱 (*I. hexagonus*)、波斯隐喙蜱 (*Argas persicus*)、翘缘锐缘蜱 (*A. reflexus*)、游走鸟壁虱 (*Ornithodoros erraticus*)、非洲毛白钝缘蜱 (*O. moubata moubata*)、非洲嗜猪钝缘蜱 (*O. m. porcinus*) 和萨氏钝缘蜱 (*O. savignyi*)。术语“同源物”还表示包括源自蚊子物种的 EV576 蛋白序列等价物,包括库蚊属、按蚊属和伊蚊属的蚊子,特别是致倦库蚊 (*Culex quinquefasciatus*)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 和冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) ;跳蚤物种例如猫栉首蚤 (*Ctenocephalides felis*) (猫跳蚤) ;马蝇 ;白蛉 ;黑蝇 ;采采蝇 ;虱子 ;螨虫 ;水蛭和扁形虫。天然 EV576 蛋白被认为以另外三种大约 18kDa 的形式存在于非洲钝缘蜱 (*O. moubata*) 中,并且术语“同源物”表示包括这些替代形式的 EV576。

[0046] 鉴别图 2 给出的 EV576 序列同源物的方法对本领域技术人员来说是显而易见的。例如,同源物可以通过对公共和私人的序列数据库进行同族检索来鉴别。尽管私人的或商业的数据库同样是有用的,特别是在它们包含公共数据库不具有的数据时更是如此,但可便利地使用公众能够利用的数据库。主要的数据库是主核苷酸或氨基酸序列数据存放的位置,并且可以是公共的或商业的。公共可用的主数据库的实例包括 :

[0047] GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),

[0048] EMBL 数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/>),

[0049] DDBJ 数据库 (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>),

[0050] SWISS-PROT 蛋白质数据库 (<http://expasy.hcuge.ch/>), PIR

[0051] (<http://pir.georgetown.edu/>),

[0052] TrEMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>),

[0053] TIGR 数据库 (参见 <http://www.tigr.org/tdb/index.html>),

[0054] NRL-3D 数据库 (<http://www.nbrfa.georgetown.edu/>),

[0055] 蛋白质数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb/>),

[0056] NRDB 数据库 (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/nrdb/README>), OWL 数据库 (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/dbbrowser/OWL/>) 和次要数据库 :PROSITE (<http://expasy.hcuge.ch/sprot/prosite.html>),

[0057] PRINTS (<http://iupab.leeds.ac.uk/bmb5dp/prints.html>),

[0058] Profiles ([http://ulrec3.unil.ch/software/PFSCAN form.html](http://ulrec3.unil.ch/software/PFSCAN_form.html)),

[0059] Pfam(<http://www.sanger.ac.uk/software/pfam>),

[0060] Identify(<http://dna.stanford.edu/identify/>) 和

[0061] Blocks(<http://www.blocks.fhcrc.org>) 数据库。商业可用的数据库或私人数据库的实例包括 PathoGenome(基因组治疗公司 (Genome Therapeutics Inc.)) 和 PathoSeq(之前属英赛特制药公司 (Incyte Pharmaceuticals Inc.))。

[0062] 通常,两种多肽之间大于 30% 的同一性(优选在特定区域如活性位点)被认为是功能性等价的指示,因此是两种蛋白同源的指示。优选地,作为同源物的蛋白与图 2 所示的 EV576 蛋白序列所具有的同一性大于 60%。更优选地,同源物分别与图 2 给出的 EV576 蛋白序列所具有的同一性大于 70%、80%、90%、95%、98% 或 99%。此处所述的同一性百分比是使用 BLAST2.1.3 版,并使用通过 NCBI(the National Center for Biotechnology Information

; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosum 62 矩阵;缺口出现罚分 =11 和缺口延伸罚分 =1] 系统设定的默认参数来确定的。

[0064] 图 2 给出的 EV576 蛋白序列的同源物包括来自野生型序列的含有氨基酸替换、插入或缺失的突变体,其涉及例如 1、2、3、4、5、7、10 或更多氨基酸,前提是这些突变体保持了结合 C5 的能力。因此,突变体包括含有保守氨基酸替换的蛋白,该替换不以不利的方式影响蛋白的功能或活性。该术语也旨在包括天然生物变体(例如在 EV576 蛋白源自的物种中的等位基因变体或地理变体)。具有增强的结合 C5 和 / 或 LTB4 能力的突变体也可以通过在蛋白序列中对特定残基进行系统或定向的变异来设计。

[0065] EV576 蛋白的片段和 EV576 蛋白同源物的片段也包括在术语“功能性等价物”中,前提是这样的片段保留了结合 C5 和 / 或 LTB4 的能力。片段可以包括例如衍生自 EV576 蛋白序列的多肽,其小于 150 个氨基酸,小于 125 个氨基酸,小于 100 个氨基酸,小于 75 个氨基酸,小于 50 个氨基酸,或甚至 25 个氨基酸或更少,前提是这些片段保留了结合到补体 C5 上的能力。

[0066] 作为这样的片段不仅包括本文图 2 中明确确认的非洲钝缘蜉 (O. moubata) EV576 蛋白的片段,而且还包括如上所述的该蛋白的同源物的片段。这样的同源物的片段通常与图 2 的 EV576 蛋白序列片段具有大于 60% 的同一性,尽管更优选同源物的片段将表现出分别与图 2 的 EV576 蛋白序列片段具有大于 70%、80%、90%、95%、98% 或 99% 的同一性。改进的片段当然可以对野生型序列进行系统的突变或片段化来合理地设计,随后进行适当的活性检验。片段可以表现出对于 C5 和 / 或 LTB4 具有类似于 EV576 或更大的亲和力。

[0067] 本发明所用的功能性等价物可以是融合蛋白,其例如通过在编码异源蛋白序列的框架中克隆编码 EV576 蛋白的多核苷酸来获得。术语“异源的”用于本文旨在表示除了 EV576 蛋白或其功能性等价物以外的任何多肽。可包含在可溶性融合蛋白的 N- 或 C- 末端的异源序列的实例如下:膜结合蛋白的胞外区、免疫球蛋白恒定区 (Fc 区)、多聚化区、胞外蛋白区、信号序列、输出序列,或允许通过亲和层析来纯化的序列。这些异源序列中多数是在表达质粒中市售的,因为这些序列通常包括在融合蛋白中以提供另外的性能,而不明显地削弱与之融合的蛋白的特定生物活性 [19]。这类另外性能的实例是,在体液中更长的持续半衰期、胞外定位,或允许通过标记例如组氨酸或 HA 标记的更简易纯化方法。

[0068] EV576 蛋白及其功能性等价物可以以重组形式通过在宿主细胞中表达来制备。这样的表达方法是本领域技术人员公知的,在 [20] 和 [21] 中有详细描述。重组形式的 EV576 蛋白及其功能性等价物优选非糖基化的。

[0069] 本发明的蛋白和片段还可以使用常规的蛋白化学技术来制备。例如,蛋白片段可以通过化学合成来制备。产生融合蛋白的方法是本领域常规的,并且是本领域技术人员已知的。例如,大部分的普通分子生物学、微生物重组 DNA 技术和免疫技术可以在 [20] 或 [22] 中找到。

[0070] 在本发明的方法或用途中施用所述制剂的对象优选是哺乳动物,优选人类。施用所述制剂的对象还会是患有上或下呼吸道病毒性感染,如大流行性流感病毒,包括流感 A H5N1 (禽流感) 和流感 AH1N1 (猪流感),或 SARS 冠状病毒。

[0071] 该制剂是以治疗或预防有效量来施用的。术语“治疗有效量”指的是治疗或改善与病毒性感染有关的炎症所需的制剂量。本文所用术语“预防有效量”是指预防与本发明的病毒性有关的炎症所需的制剂量。

[0072] 优选该制剂的剂量足以在对象体内结合尽可能多的可利用的 C5,更优选全部可利用的 C5。或者,该制剂的剂量可为足以在对象体内结合尽可能多的可利用的 LTB₄,更优选全部的可利用的 LTB₄。在一些方面中,该制剂的剂量足以结合尽可能多的可利用的 C5 和 LTB₄,例如全部可利用的 C5 和 LTB₄。所提供的该制剂的剂量至少是在对象体内结合全部可利用的 C5 和 / 或 LTB₄ 所需的摩尔剂量的两倍。所提供的该制剂的剂量可以是在对象体内结合全部可利用的 C5 和 / 或 LTB₄ 所需的摩尔剂量的 2.5 倍、3 倍或 4 倍。优选该剂量是 0.0001mg/kg (药物质量比患者体重)–20mg/kg, 优选 0.001mg/kg–10mg/kg, 更优选 0.2mg/kg–2mg/kg。

[0073] 施用所需剂量的频率将取决于所涉及的制剂的半衰期。在制剂是 EV576 蛋白或其功能性等价物的情况下,该剂量可以作为连续输入施用,以单次剂量或基于每日一次,每日两次,或每 2、3、4 天,5、6、7、10、15 或 20 天或更多天一次施用。

[0074] 精确的剂量和剂量频率还可以取决于施用时患者的状态。在确定剂量时要考虑的因素包括患者病情的严重程度、患者一般健康状况、年龄、体重、性别、膳食、施用时间和频率、药物组合、反应敏感性和患者对于治疗的耐受度或反应。精确的量可以通过常规试验来确定,但是最终取决于临床医生的判断。

[0075] 该制剂通常将作为药用载体的一部分来施用。如本文所用,术语“药用载体”包括基因、多肽、抗体、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸和失活病毒粒子或甚至任何其他制剂,前提是该载体本身不诱导毒性效应或导致对接受该药组合物个体有害的抗体产生。药用载体可以另外地包含液体如水、盐水、甘油、乙醇或辅助物质如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物等。因此所用的药用载体将根据施用途径而变化。载体能够将药物组合物配制成片剂、丸剂、糖衣丸剂、胶囊剂、液体剂、凝胶剂、糖浆剂、糖浆剂、混悬剂来帮助患者摄入。关于药用载体的详细讨论在 [23] 中可以找到。

[0076] 该制剂可以通过任何已知的施用途径来递送。该制剂可以通过经鼻吸入递送,例如使用计量吸入器、喷雾器、干粉吸入器,或经鼻吸入器。该制剂可以通过非胃肠途径来递送 (例如通过皮下、腹膜内、静脉内或肌肉内注射,或递送到组织的细胞间隙)。该组合物也可以施用到伤口。其他施用模式包括口服和肺部施用、栓剂和透皮或经皮应用,针和无针注

射。

[0077] 该制剂可以单独施用或作为治疗方案的一部分施用,同时还包括施用目前治疗呼吸疾病患者所用的其他药物。例如,该制剂可以与另外的抗病毒药的输注和 / 或氧气治疗组合来施用。

[0078] 该制剂可以与其他药物同时、依次或分别施用。例如,该制剂可以在其他药物施用之前或之后施用。

[0079] 本发明因此提供一种结合 C5 和 / 或 LTB4 的制剂,优选是 EV576 蛋白或其功能性等价物,用于治疗或预防对象的呼吸道病毒性感染的炎症效应,其中所述的对象已经用抗病毒药进行了预治疗。能够用于本发明这个方面中的抗病毒药的实例包括扎那米韦 (zanamivir) (瑞乐沙 (Relenza)) 和奥司他韦 (oseltamivir) (克流感 (Tamiflu))。

[0080] 本发明不同的方面和实施方案现将以实施例的形式来更详细地描述。应当理解,在不脱离本发明的范围下可以进行细节上的修改。

附图说明

[0081] 图 1 :补体活化经典途径和替代途径的示意图。酶成分,黑灰色。过敏毒素包括在星形符中。

[0082] 图 2 :EV576 的主序列。信号序列下划线。半胱氨酸残基处于粗体类型中。核苷酸和氨基酸数目表示在右边。

[0083] 图 3 :将 EV576 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用 EV131 或载体相比,在 10^4 空斑形成单位 (PFU) 时嗜中性粒细胞降低。

[0084] 图 4 :将 EV576 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用 EV131 或载体相比,在 10^4 空斑形成单位 (PFU) 时总细胞降低。

[0085] 图 5 :将 EV576 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用 EV131 或载体相比,在 10^4 空斑形成单位 (PFU) 时总蛋白降低。

[0086] 图 6 :将 EV576 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用载体相比,在 10^6 空斑形成单位 (PFU) 时嗜中性粒细胞降低。

[0087] 图 7 :将 EV576 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用载体相比,在 10^6 空斑形成单位 (PFU) 时总细胞降低。

[0088] 图 8 :将 EV576 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用载体相比,在 10^6 空斑形成单位 (PFU) 时总蛋白降低。

[0089] 图 9 :将 EV576 (OmCI) 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用 EV131 或载体相比,在 10^4 空斑形成单位 (PFU) 时 IL-6 水平降低。

[0090] 图 10 :将 EV576 (OmCI) 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用 EV131 或载体相比,在 10^4 空斑形成单位 (PFU) 时 CXCL2 水平降低。

[0091] 图 11 :将 EV576 (OmCI) 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用 EV131 或载体相比,在 10^4 空斑形成单位 (PFU) 时 IL-1 β 降低。

[0092] 图 12 :将 EV576 (OmCI) 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用载体相比,在 10^6 空斑形成单位 (PFU) 时 IL-6 水平降低。

[0093] 图 13 :将 EV576 (OmCI) 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用

载体相比,在 10^6 空斑形成单位 (PFU) 时 CXCL2 水平降低。

[0094] 图 14:将 EV576 (OmCI) 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用载体相比,在 10^6 空斑形成单位 (PFU) 时 IL-1 β 水平降低。

[0095] 图 15:将 EV576 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用 EV131 或载体相比,在 10^4 空斑形成单位 (PFU) 时嗜中性粒细胞 /100mg 肺组织相对降低。

[0096] 图 16:将 EV576 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用 EV131 或载体相比,在 10^6 空斑形成单位 (PFU) 时嗜中性粒细胞 /100mg 肺组织相对降低。

[0097] 图 17:将 EV576 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用 EV131 或载体相比,在 10^4 空斑形成单位 (PFU) 时总的组织病理学分数。

[0098] 图 18:将 EV576 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用载体相比,在 10^6 空斑形成单位 (PFU) 时总的组织病理学分数。

[0099] 图 19:与模拟接种 (mock inoculation) 相比,在 10^4 空斑形成单位 (PFU) 的接种体水平时,在猪流感感染的鼠科模型中支气管肺泡灌洗液 (BALF) 的 C5a 水平。

[0100] 图 20:与模拟接种相比,在 10^6 空斑形成单位 (PFU) 的接种体水平时,在猪流感感染的鼠科模型中支气管肺泡灌洗液 (BALF) 的 C5a 水平。

[0101] 图 21:将 EV576 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用 EV131 或载体相比,在 10^4 空斑形成单位 (PFU) 时 C5a 水平降低。

[0102] 图 22:将 EV576 施用于猪流感感染的鼠科模型之后,与在相同模型中施用载体相比,在 10^6 空斑形成单位 (PFU) 时 C5a 水平降低。

具体实施方式

[0103] 实施例 1

[0104] 将具有如图 2 所示氨基酸序列的 EV576 蛋白在人呼吸道 H1N1 流感感染的鼠科模型中进行测试。

[0105] 方法

[0106] 将 BalbC 小鼠用亚致死剂量 (10^4 PFU) 或致死剂量 (10^6 PFU) 源自法国巴斯德研究所 (Institut Pasteur) 的人 H1N1 病毒经鼻感染或使用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 进行假感染。

[0107] 下呼吸道感染的信号 (重量下降和呼吸堵塞) 在低接种体动物中是在 4 天内形成的,而在高接种体组中更快,其全部在第 3 天受到病毒侵袭致死。

[0108] 具有如图 2 所示氨基酸序列的 EV576 蛋白按如下来给予:第一天通过腹膜注射 250 μ g 30 分钟预感染,第 2、3 和 4 天注射 200 μ g,第 5 天注射 170 μ g。使用 rEV131 (一种类似于 EV576 大小的脂质运载蛋白,但是已知其不会抑制补体系统) 和 PBS 作为对照。

[0109] 高接种体的小鼠仅仅接受了起初的两个剂量,因为它们全部在第 3 天死亡了。支气管肺泡灌洗 (BAL) 是在第 3 天用于高接种体小鼠的。支气管肺泡灌洗 (BAL) 是在第 6 天用于低接种体小鼠的,在最后给药 24 小时后和即将处死之前进行。检测灌洗液的总细胞、嗜中性粒细胞、总蛋白和细胞因子 (IL-1 β 、IL-6 和 CXCL2)。

[0110] 结果如图 3-16 中所示。

[0111] 与模拟 (假) 治疗小鼠相比,发现载体治疗的小鼠全部参数非常明显地升高。

[0112] 结果

[0113] 与在 10^4 空斑形成单位 (PFU) 时载体治疗的小鼠相比, 用 EV576 治疗的小鼠具有明显更低的蛋白水平 (图 5) 和总细胞 (图 4) 和明显更低的嗜中性粒细胞 (图 3 和 15)。与载体治疗相比, 用 EV576 治疗的小鼠在 10^6 PFU 时也具有明显更低的嗜中性粒细胞。

[0114] 与假 (模拟) 治疗动物相比, 在 10^4 PFU 时载体治疗的和 rEV131 小鼠具有非常明显 ($p < 0.001$) 升高的总细胞、嗜中性粒细胞和蛋白。与载体治疗的动物相比, 用 EV576 治疗的动物具有明显较小升高的总细胞 ($p < 0.05$) 和嗜中性粒细胞 ($p < 0.01$) (图 3 和 4)。在 10^6 PFU 时仅仅总细胞 ($p < 0.05$) 和嗜中性粒细胞 ($p < 0.001$) 比假治疗的动物升高, 并且与载体治疗相比用 EV576 治疗的小鼠体内嗜中性粒细胞的升高明显更小 ($p < 0.05$) (图 6-8 和 16), 但是由于 BAL 是在第 3 天而非第 6 天对垂死的动物进行的, 因此很可能 H1N1 流感的呼吸并发症效应还没有时间来完全发展, 所以补体抑制的任何可能的保护效应并不明显。

[0115] 与假 (模拟) 治疗的动物 (图 9-11) 相比, 已发现在载体和 rEV131 治疗的组中, 低接种体组的 BAL 液中炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 CXCL2 的水平明显 ($p < 0.05$) 或非常明显地 ($p < 0.01$) 升高, 然而尽管升高了, 但是 EV576 治疗的动物并非明显不同。按照细胞结果, 在高接种体组中的差异不太明显 (图 12-14)。

[0116] 图 17 和 18 分别表示了低和高接种体小鼠的肺炎的全部组织病理学分数的总和。该组织病理学分数之和是采用气道炎症、血管炎症、间质炎症、嗜中性粒细胞炎症和上皮损伤的分数来计算的。EV576 降低了低接种体组中的上皮损伤和炎症。这种组氨清除蛋白 EV131 不太有效。

[0117] 这些数据证明 EV576 明显抑制了 H1N1 感染的炎症效应。已知 EV576 通过结合 C5 和抑制类花生酸活性而抑制补体系统。这些数据表明 EV576 和其他具有类似 C5 结合特性的制剂能够有效地降低病毒性感染的肺炎效应。

[0118] 实施例 2

[0119] 将具有如图 2 所示氨基酸序列的 EV576 蛋白在人呼吸道 H1N1 流感感染的鼠科模型中进行测试, 测试它对于补体 C5a 水平的作用。

[0120] 方法

[0121] BalbC 小鼠是如上述实施例 1¹ 那样进行感染和治疗的。

[0122] BALF 中的 C5a 水平基于天数在模拟接种的动物中测量, 暴露于人 H1N1 病毒亚致死剂量 (10^4 PFU) 的动物的第 1、4、7 和 10 天, 和暴露于人 H1N1 病毒致死剂量 (10^6 PFU) 的动物的第 1、3 和 5 天。

[0123] 在第 6 天, 测量已经用载体、EV131 或 EV576 进行治疗的低接种体动物的 BALF 中的 C5a 水平。在第 3 天, 测量已经用载体或 EV576 进行治疗的高接种体动物的 BALF 中的 C5a 水平。

[0124] 结果如图 19-22 所示。

[0125] 结果

[0126] 在高和低接种体水平二者感染后多达 10 天, BAL 液中的 C5a 明显升高 (图 19 和 20)。用 EV576 治疗的小鼠 C5a 水平的增加明显减弱。载体和 EV131 没有削弱 C5a 水平的增加 (图 21 和 22)。

[0127] 这是第一次, 即在由 H1N1 流感感染引起的炎症中证实了补体的直接作用。补体中的这种升高可以使用补体抑制剂 EV576 来阻止。EV576 阻止补体和相关炎症的能力表明

它治疗 H1N1 流感感染中是有效的。

[0128] 实施例 3

[0129] H5N1 感染之后,也存在 H1N1 感染之后的细胞因子风暴和相关的炎症。因此可以预期 H1N1 感染之后,EV576 阻止补体升高和相关炎症的能力在 H5N1 感染之后也将得到再现。具有如图 2 所示氨基酸序列的 EV576 蛋白可以使用上面和参考文献 24 中报道的试验方案,在人 H5N1 流感感染呼吸道的鼠科模型中进行测试。在 H5N1 或 H1N1 流感感染之后,还可确定奥司他韦 (oseltamivir) (克流感 (Tamiflu)) 与 EV576 组合的作用。

[0130] 方法

[0131] 该试验方案类似于参考文献 24 所报道的方案。

[0132] 将 20-23g 标准体重、无病原体的 8 周龄雌性小鼠 (例如 FVB/J 品系) 用获自法国巴斯德研究所 (Institut Pasteur) 的人 H5N1 病毒或 H1N1 病毒经鼻感染或使用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 进行假感染。

[0133] 具有如图 2 所示氨基酸序列的 EV576 蛋白通过腹膜注射施用。小鼠也可以接受奥司他韦 (oseltamivir)。使用 PBS 作为对照。在每个感染模型中可以分为四组:(1) 病毒+PBS, (2) 病毒+EV576, (3) 病毒+EV576+ 奥司他韦,以及 (4) 病毒+ 奥司他韦。感染和治疗日程如下表所示:

[0134]

试验 活动	组	时间点					
		第 2 天 pi	第 3 天 pi	第 4 天 pi	第 6 天 pi	第 7 天 pi	第 8 天 pi
H5N1	病毒+PBS+PBS	5	5	5			
	病毒+CVS+PBS	5	5	5			
	病毒+CVS+OSTMV	5	5	5			
	病毒+PBS+OSTMV	5	5	5			

[0135]

H1N1	病毒+ PBS +PBS	5		5	5	5	5
	病毒+CVS+PBS	5		5	5	5	5
	病毒+CVS+OSTMV	5		5	5	5	5
	病毒+PBS+OSTMV	5		5	5	5	5
总小鼠		40	20	40	20	20	20

- [0136] CVS 代表 coversin (EV576), OSTMV 代表奥司他韦。数字可以是两倍。
- [0137] 可以测量下面的感染标记和治疗效应读数：
- [0138] - 体重, 每日
- [0139] - 具体组的存活率 %
- [0140] - 每个肺从背腹观察的照片, 每个时间点
- [0141] - 肺重量, 每个时间点
- [0142] - 肺本体病毒滴度, 每个时间点
- [0143] - 肺本体髓过氧化物酶活性, 每个时间点
- [0144] - 选项 1 : 组织病理学检测, 每个时间点
- [0145] - 选项 2 : 肺本体嗜中性粒细胞趋化因子 (KC 和 MIP-2)
- [0146] - 选项 3 : 肺本体单核细胞 /NK/T 细胞趋化因子 (MCP1, MIP1 α)
- [0147] - 选项 4 : 肺本体细胞因子 (IL-6, TNF α , IFN α , IFN γ , IL-1 β)
- [0148] - 选项 5 : 肺中的全局病毒分布, 如果适用
- [0149] - 选项 6 : 通过流式细胞测量法在 BALF 中的细胞计数
- [0150] 收集读数的时间点将是 H5N1 后感染之后第 2 天、第 3 天和第 4 天或是 H1N1 后感染之后第 2 天、第 4 天、第 6 天、第 7 天、第 8 天。还测量预感染值。
- [0151] 参考文献
- [0152] [1] Mastellos, D., 等人, Clin Immunol, 2005. 115(3) : p. 225-35
- [0153] [2] Peiris JSM, Cheung CY, Leung CYH, Nicholls JM. 对 A H5N1 流感的先天免疫应答 : 朋友或敌人? 免疫学动态 (Innate immune responses to influenza A H5N1 : friend or foe? Trends in Immunology) 2009 ; 30, 12 : 574-584.
- [0154] [3] Lee SMY, Gardy JL, Cheung CY 等人. H5N1 禽流感引起的宿主应答和原代人巨噬细胞中季节性 H1N1 流感病毒的系统层次比较 (Systems-level comparison of host-responses elicited by avian H5N1 and seasonal H1N1 influenza viruses in primary human macrophages). PLoS One, 2009. 12 ; 4, 12 : 1-11.
- [0155] [4] Guo, R. F. 和 P. A. Ward, Annu Rev Immunol, 2005, 23 : p. 821-52
- [0156] [5] Neumann, E., 等人, Arthritis Rheum, 2002. 46(4) : p. 934-45
- [0157] [6] Williams, A. S., 等人, Arthritis Rheum, 2004, 50(9) : p. 3035-44
- [0158] [7] Quigg, R. J., Curr Dir Autoimmun, 2004. 7 : p. 165-80
- [0159] [8] Papagianni, A. A., 等人, Nephrol Dial Transplant, 2002, 17(1) : p. 57-63
- [0160] [9] He, C, 等人, JImmunol, 2005. 174(9) : p. 5750-7
- [0161] [10] Mead, R. J., 等人, JImmunol, 2002. 168(1) : p. 458-65
- [0162] [11] Nakashima, S., 等人, JImmunol, 2002. 169(8) : p. 4620-7
- [0163] [12] Mizuno, M. 和 D. S. Cole, Expert Opin Investig Drugs, 2005. 14(7) : p. 807-21
- [0164] [13] Allegrerti, M., 等人, Curr Med Chem, 2005. 12(2) : p. 217-36
- [0165] [14] W02004/106369
- [0166] [15] W0/2007/028968
- [0167] [16] W0/2008/029169

-
- [0168] [17]W0/2008/029167
- [0169] [18]W02009/098454
- [0170] [19]Terpe K, Appl Microbiol Biotechnol, 60 :523-33, 2003
- [0171] [20]Sambrook 等人 (2000)
- [0172] [21]Fernandez&Hoeffler(1998)
- [0173] [22]Ausubel 等人 (1991)
- [0174] [23] 雷明顿医学科学 (Remington' s Pharmaceutical Sciences) ;Mack Pub. Co. , N. J. 1991
- [0175] [24]Garigliany 等人, (2010)Emerg Infect Dis 16 :595-603

[0001]

序列表

<110> VARLEIGH IMMUNOPHARMACEUTICALS LIMITED
 <120> METHOD OF TREATMENT
 <130> P054003W0
 <150> GB1000318.4
 <151> 2010-01-08
 <150> GB1005071.4
 <151> 2010-03-25
 <160> 2
 <170> SeqWin99, version 1.02
 <210> 1
 <211> 507
 <212> DNA
 <213> Ornithodoros moubata
 <400> 1
 atgctgggtt ttgtgacct gatitctctc tttctgcca acatcgcata tgctgacagc 60
 gaaagcgact gcactggaag cgaacctgtt gacgccttcc aagctttcag tgaggggcaaa 120
 gaggcataig tcttggtgag gtccacggat cccaaagcga gggactgett gaaaggagaa 180
 ccagccggag aaaagcagga caacacgttg ccggtgatga tgacgtttaa gaaiggcaca 240
 gactgggctt caaccgattg gacgtttact ttggacggcg caaaggtaac ggcaaccctt 300
 ggtaacctaa cccaaaatag ggaagtggte tacgactcgc aaagtcatca ctgccacgtt 360
 gacaaggctg agaaggaagt tccagattat gagatgtgga tgctcgatgc gggagggctt 420
 gaagtgggaag tcgagtgtg ccgtcaaaag ctgaagagt tggcgtctgg caggaaacca 480
 atgtatcccc atctcaagga ctgctag 507
 <210> 2
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Ornithodoros moubata
 <400> 2
 Met Leu Val Leu Val Thr Leu Ile Phe Ser Phe Ser Ala Asn Ile Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ala Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala
 20 25 30
 Phe Gln Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser
 35 40 45
 Thr Asp Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu
 50 55 60
 Lys Gln Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr
 65 70 75 80
 Asp Trp Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val
 85 90 95
 Thr Ala Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp
 100 105 110
 Ser Gln Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro
 115 120 125
 Asp Tyr Glu Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val
 130 135 140
 Glu Cys Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln
 145 150 155 160
 Met Tyr Pro His Leu Lys Asp Cys
 165

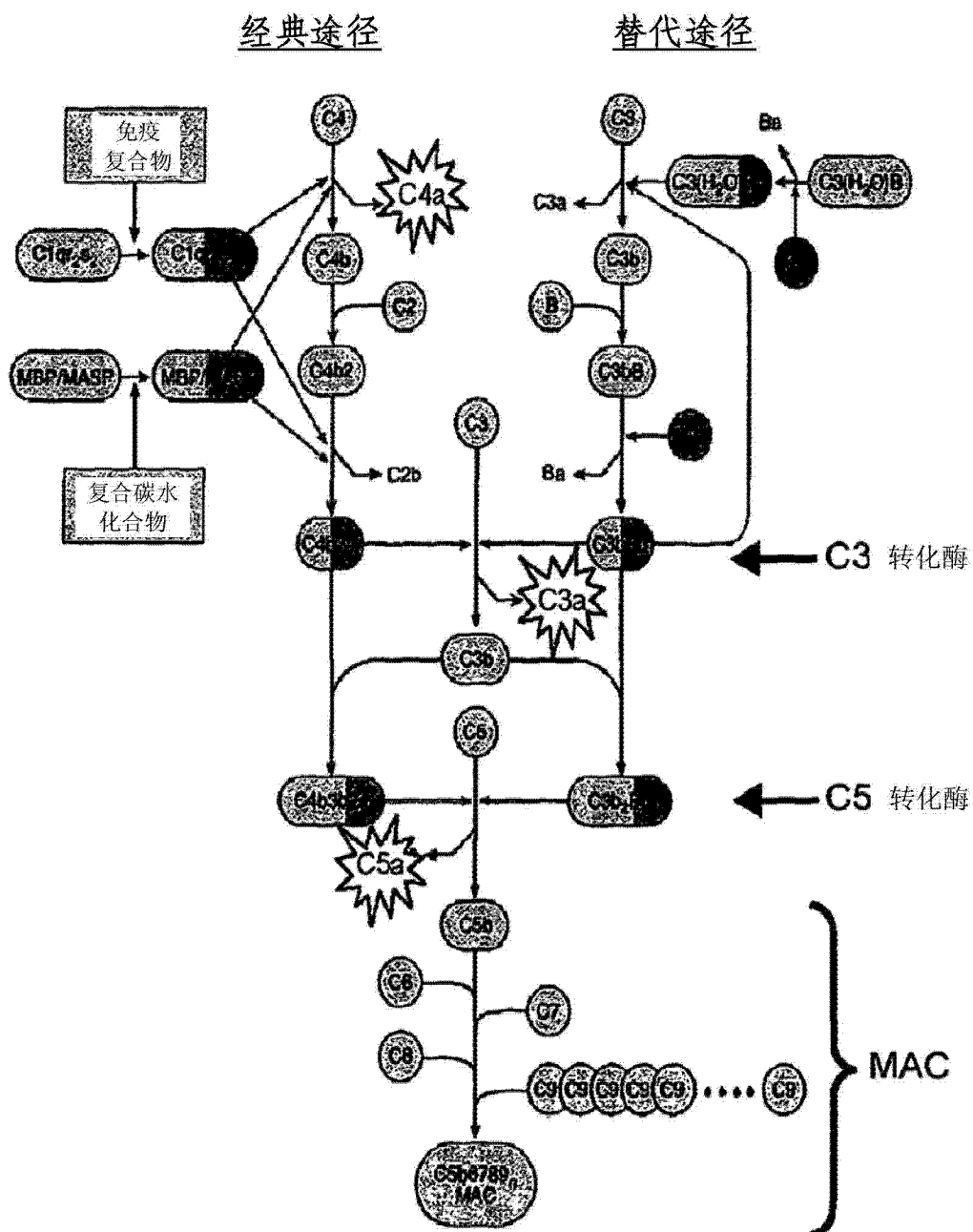


图 1

```

ATGCTGGTTTGGTGACCCCTGATTTTCTCCTTTTCTGCGAACATCGCATATGCTGACAGC 60
M L V L V T L I F S F S A N I A Y A D S 20
GAAAGCGACTGCCTGGAAGCGAACCTGTGACGCCCTTCCAAGCTTTCAGTGAGGGCAA 120
E S D C T G S E P V D A F Q A F S E G K 40
GAGGCATATGCTCCTGGTGAGGTCCACGGATCCCAAGCGAGGACTGCTTGAAAGGAGAA 180
E A Y V L V R S T D P K A R D C L K G E 60
CCAGCCGGAGAAAGCAGGACAACACGTTGCCGGTGATGATGACGTTTAAAGATGGCACA 240
P A G E K Q D N T L P V M M T F K N G T 80
GACTGGGCTTCAACCGATTGGACGTTTACTTTGGACGGCGCAAGGTAACGGCAACCCCTT 300
D W A S T D W T F T L D G A K V T A T L 100
GGTAACCTAACCCAAATAGGGAAGTGGTCTACGACTCGCAAGTCAATCCTGCCACGTT 360
G N L T Q N R E V V Y D S Q S H H C H V 120
GACAAGGTCGAGAAGGAAGTTCAGATTATGAGATGTGATGCTCGATCGGGAGGGCTT 420
D K V E K E V P D Y E M W M L D A G G L 140
GAAGTGGAAGTCGAGTGCTGCCGTCAAAGCTTGAAGAGTTGGCGTCTGGCAGGAACCAA 480
E V E V E C C R Q K L E E L A S G R N Q 160
ATGTATCCCATCTCAAGGACTGCTAG
M Y P H L K D C *
507
168

```

图 2

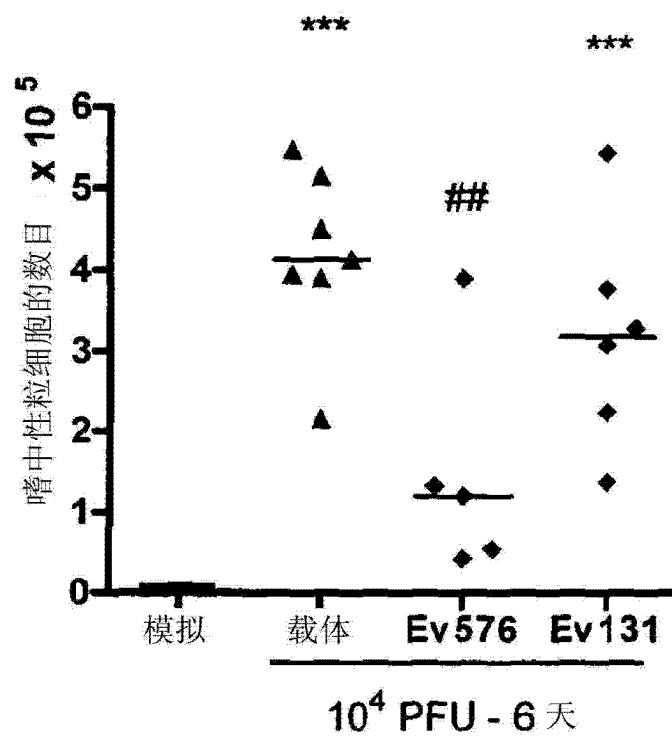


图 3

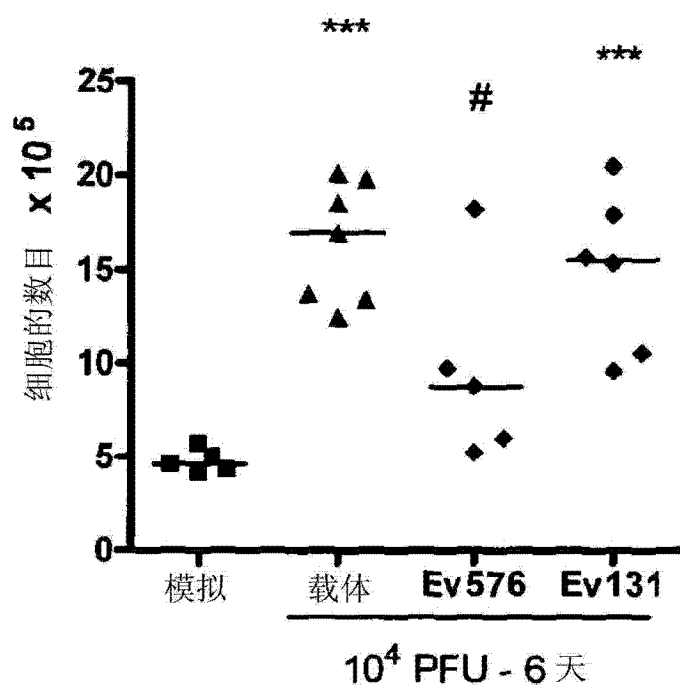


图 4

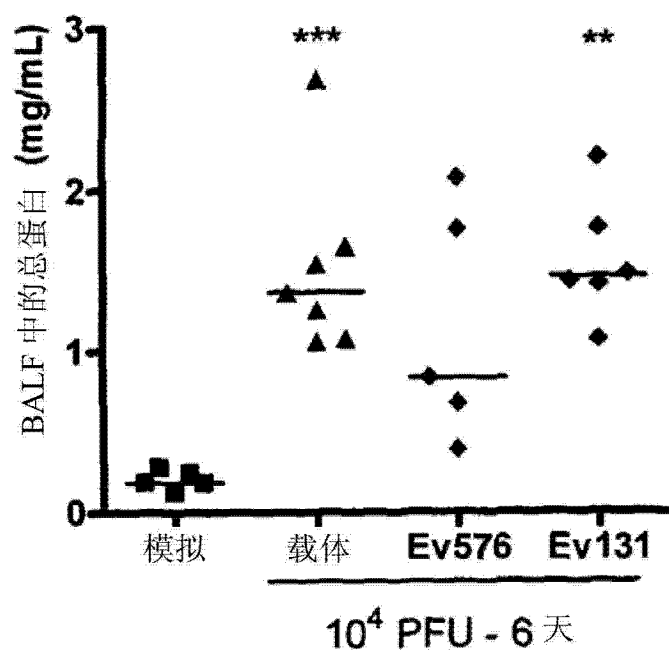


图 5

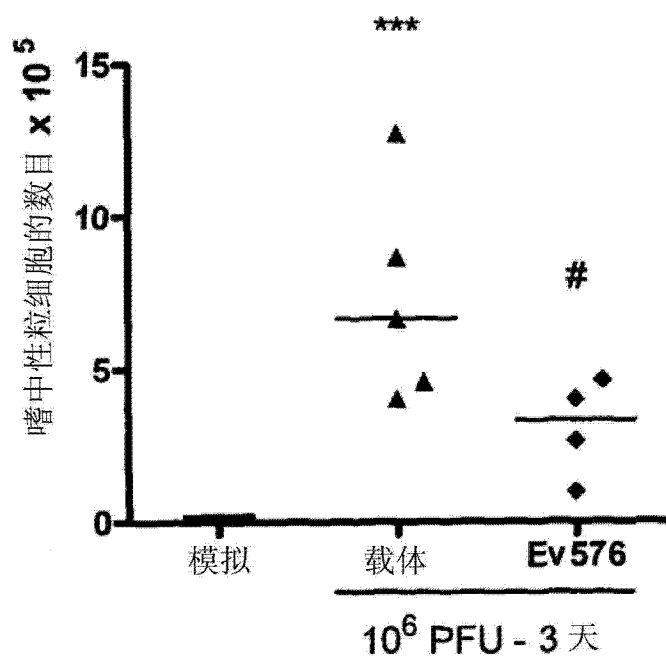


图 6

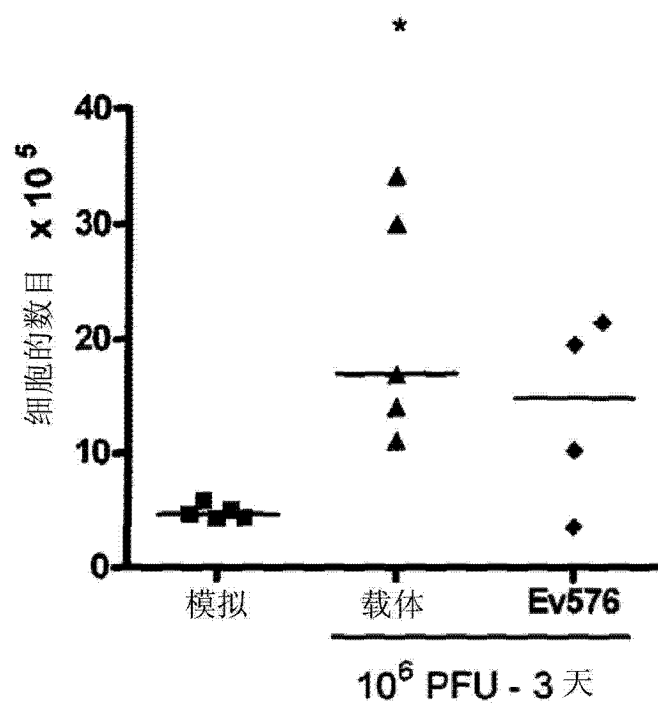


图 7

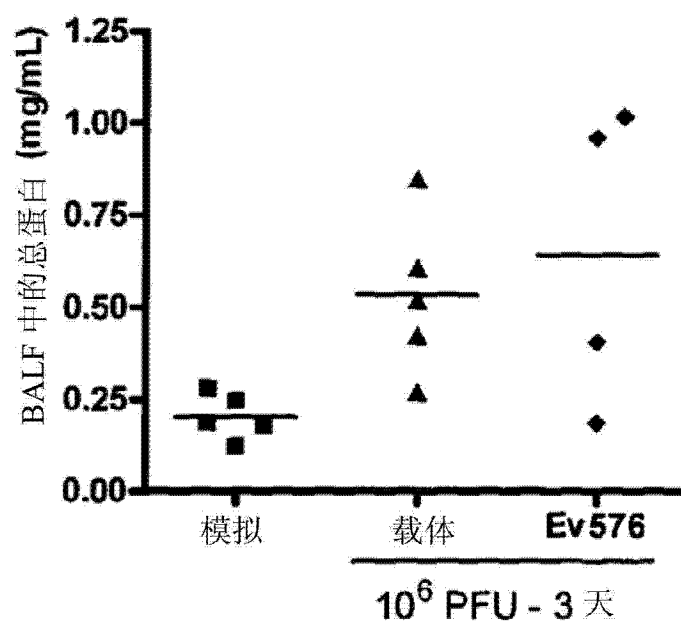


图 8

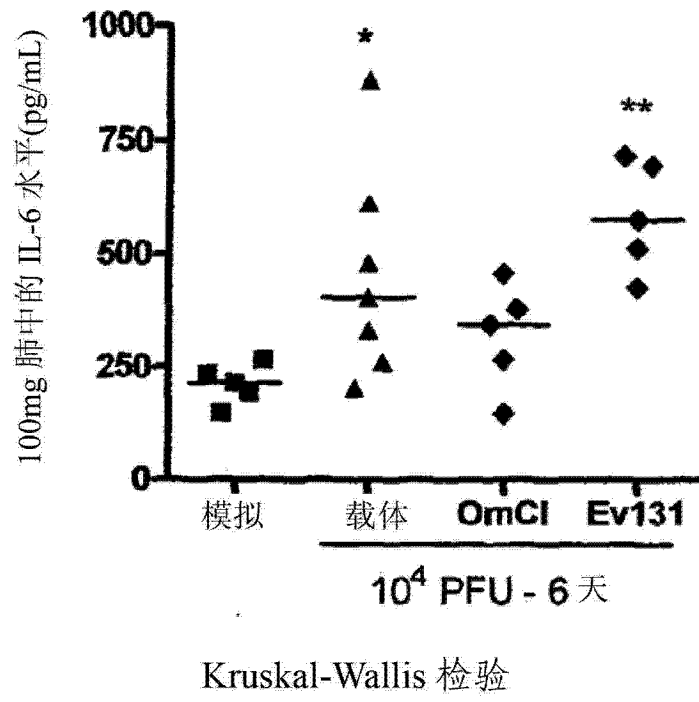


图 9

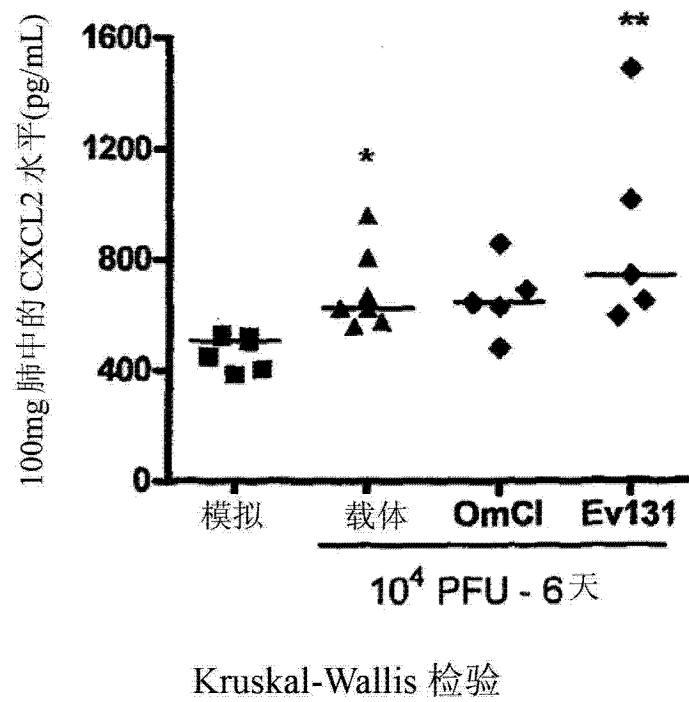


图 10

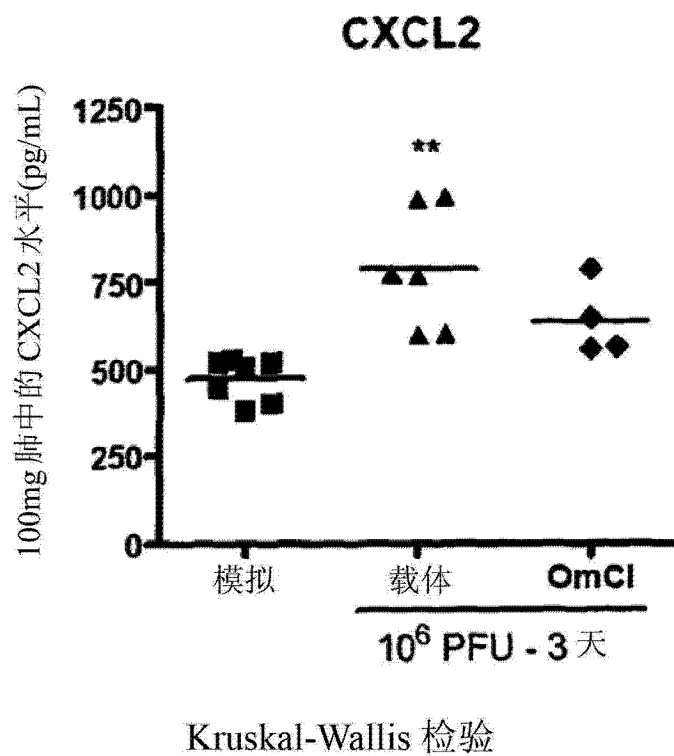


图 13

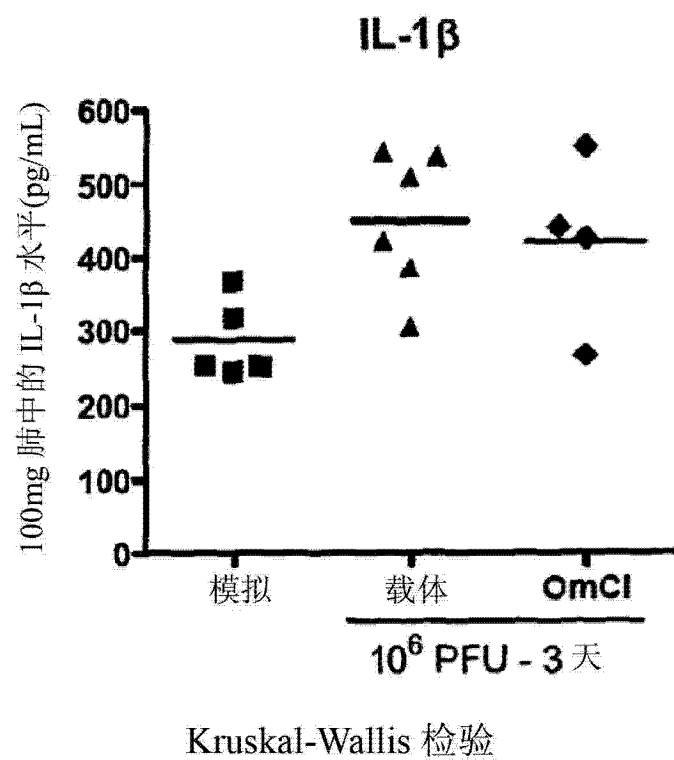
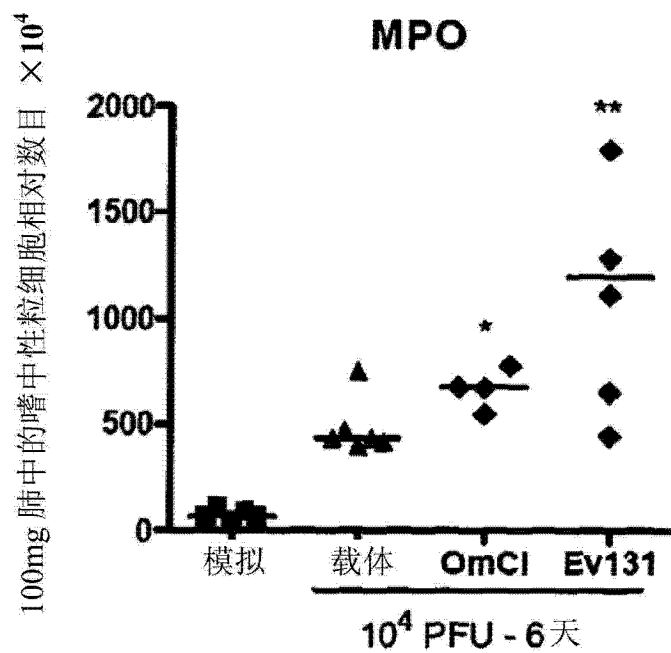
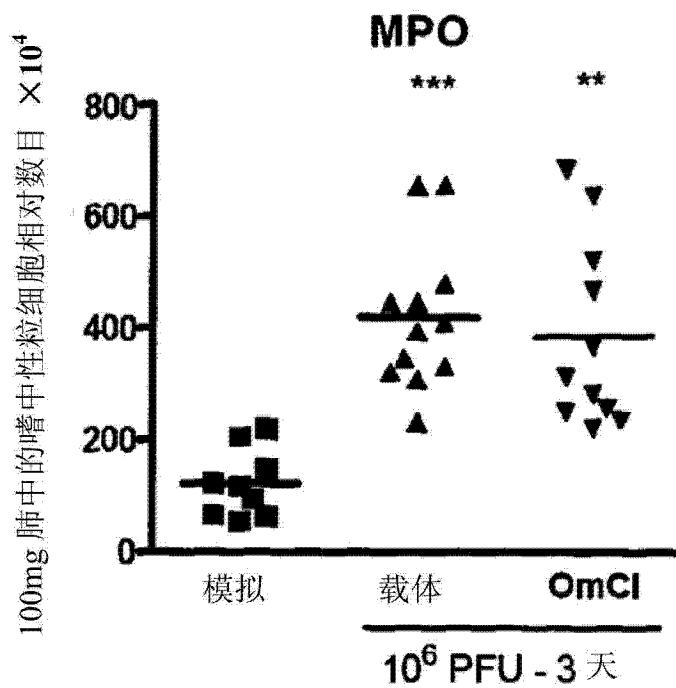


图 14



Kruskal-Wallis 检验

图 15



Kruskal-Wallis 检验

图 16

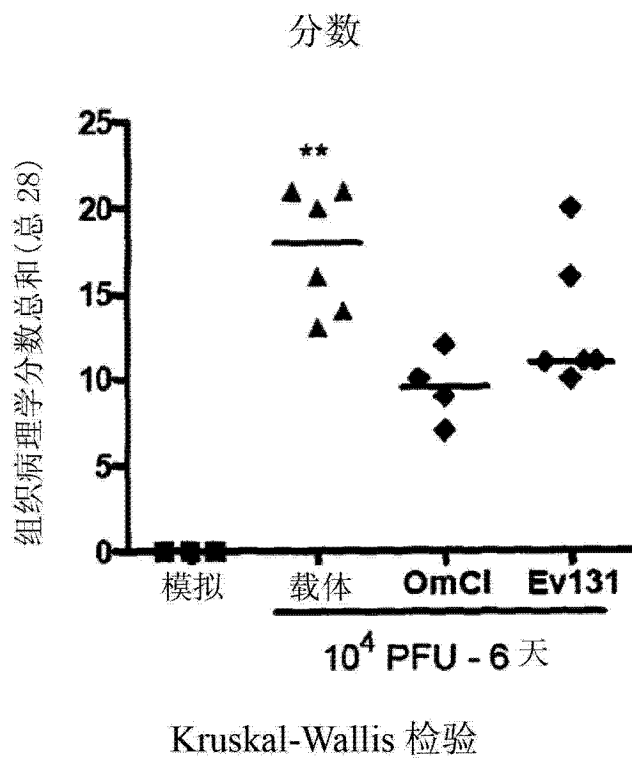


图 17

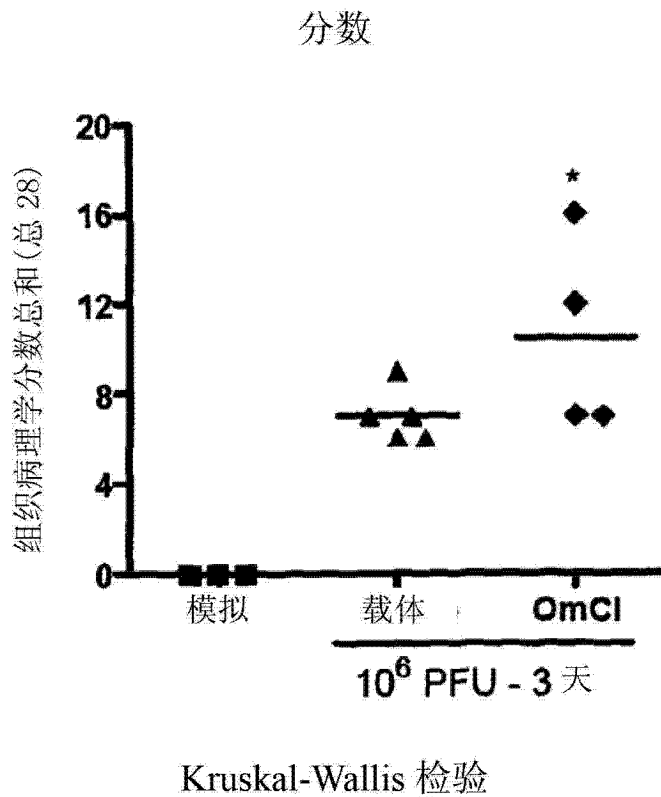


图 18

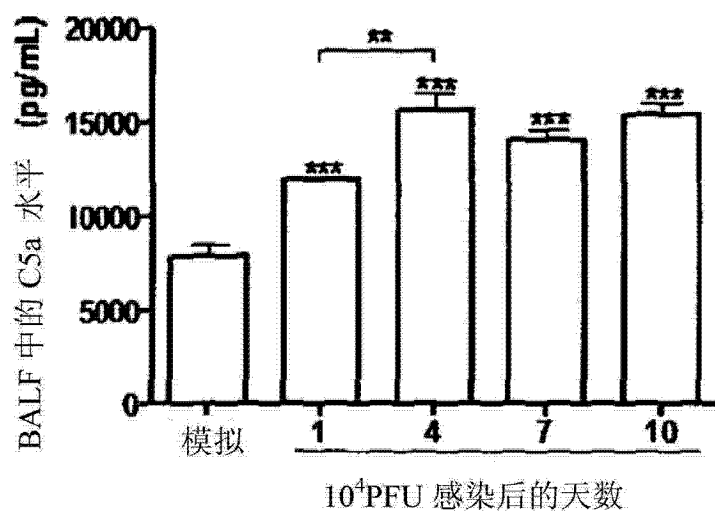


图 19

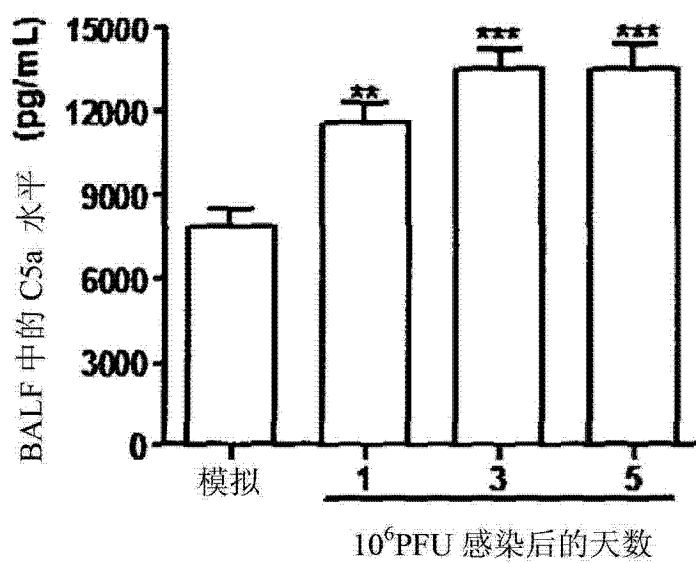


图 20

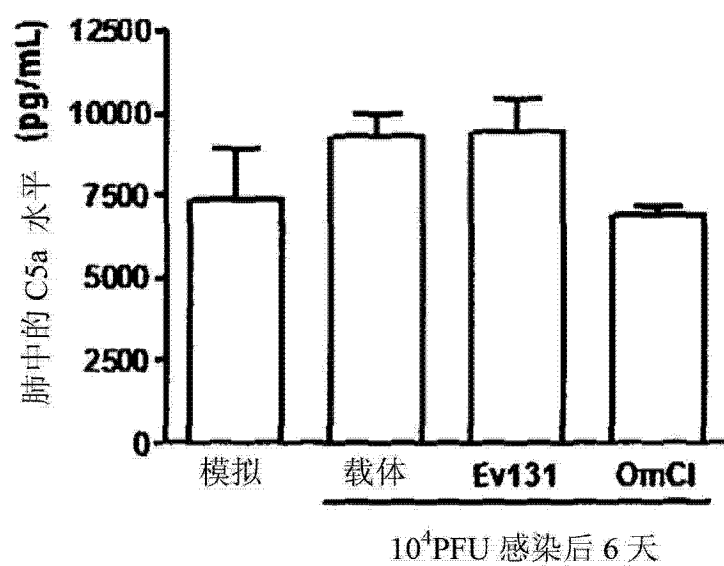


图 21

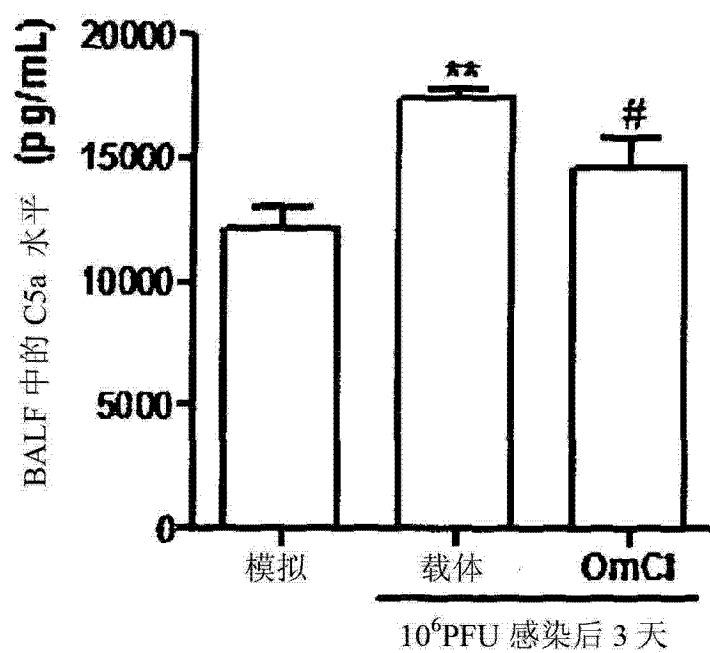


图 22