



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101282995 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 01

(21) 申请号 200680037813. 1

(22) 申请日 2006. 08. 09

(30) 优先权数据

0516527. 9 2005. 08. 11 GB

0609920. 4 2006. 05. 18 GB

0609921. 2 2006. 05. 18 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008. 04. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2006/002977 2006. 08. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/017686 EN 2007. 02. 15

(73) 专利权人 阿皮·马托西安-罗杰斯

地址 英国伦敦

(72) 发明人 阿皮·马托西安-罗杰斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘健 梁谋

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

C07K 16/30(2006. 01)

(56) 对比文件

W0 99/05175 A2, 1999. 02. 04, 全文.

W0 2004/029093 A2, 2004. 04. 08, 全文.

Kretschmer, K. 等. Immunoglobulin heavy chain variable region[Mus musculus].

《NCBI-AA018848. 1》. 2003, 全文.

Diaw, L. 等. Immunoglobulin heavy chain variable region[Mus musculus].

《NCBI-AAD44877. 2》. 2000, 全文.

Haines, B. B. 等. Immunoglobulin heavy chain variable region[Mus musculus].

《NCBI-AAG39152. 1》. 2001, 全文.

审查员 钟辉

权利要求书1页 说明书72页

序列表41页 附图19页

(54) 发明名称

用于自身免疫性疾病治疗和诊断的 TCR-V-β 相关肽

(57) 摘要

提供了衍生自具有针对 GPI 链表位的反应性的抗体的肽和功能等价配体。这些肽可用于治疗或诊断多种疾病, 所有的这些疾病都被认为是由与 GPI 链表位反应的自身抗体的体内不当存在所引起。还描述了这些自身抗体危害生物体进而引起疾病的作用机制, 以及一种预防疾病和检测自身抗体的方法。

1. 一种肽或其同型二聚体,所述肽由氨基酸序列NIYPSDSYTNYNQKFD(SEQ ID NO:8) 或 CNIYPSDSYTNYNQKFD(SEQ ID NO:159) 组成,其中所述肽以 N 到 C 末端方向显示。
2. 根据权利要求 1 的肽,其是同型二聚体。
3. 根据权利要求 2 的肽,其中所述单体肽通过额外的半胱氨酸残基连接在一起。
4. 根据权利要求 3 的肽,其为单体肽的同型二聚体,该单体肽由示于 SEQ ID NO:159 中的氨基酸序列组成。
5. 根据前述权利要求任一项的肽,其是化学修饰的、结合生物或合成物质的或其缀合至酶、指示化合物、药物、毒素或放射性标记物上。
6. 一种编码根据权利要求 1 的肽的核酸分子。
7. 一种编码根据权利要求 2-4 的任一项的肽的核酸分子。
8. 一种掺入根据权利要求 6 的核酸分子的载体。
9. 一种掺入根据权利要求 7 的核酸分子的载体。
10. 一种掺入根据权利要求 6 的核酸分子或根据权利要求 8 的载体的宿主细胞。
11. 一种掺入根据权利要求 7 的核酸分子或根据权利要求 9 的载体的宿主细胞。
12. 一种表达根据权利要求 1-4 任一项的肽的方法,所述方法包括在宿主细胞中表达根据权利要求 6 或 7 的核酸分子或根据权利要求 8 或 9 的载体。
13. 一种药物组合物,其包含根据权利要求 2-4 任一项的肽、根据权利要求 7 的核酸分子、根据权利要求 9 的载体或根据权利要求 11 的宿主细胞,以及药学上可接受的载体。
14. 一种药物组合物,其包含根据权利要求 2-4 任一项的肽的组合,以及药学上可接受的载体。
15. 一种药物组合物,其含有由 SEQ ID NO:8 组成的肽的同型二聚体、由 SEQ ID NO:10 组成的肽的同型二聚体和由 SEQ ID NO:16 组成的肽的同型二聚体的组合,以及药学上可接受的载体。
16. 一种药物组合物,其含有由 SEQ ID NO:159 组成的肽的同型二聚体、由 SEQ ID NO:160 组成的肽的同型二聚体和由 SEQ ID NO:161 组成的肽的同型二聚体的组合,以及药学上可接受的载体。
17. 一种包含根据权利要求 2-4 任一项的肽的疫苗组合物。
18. 根据权利要求 17 的疫苗组合物,其包含佐剂。
19. 根据权利要求 2-4 任一项的肽、根据权利要求 7 的核酸分子、根据权利要求 9 的载体或根据权利要求 11 的宿主细胞或根据权利要求 13-16 的任一项的组合物在制备用于治疗高胰岛素血症、高血糖素血症、胰岛素抗性和 / 或葡萄糖不耐症的药物中的应用。
20. 根据权利要求 19 的应用,其中所述药物用于治疗胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM) 或非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM)。
21. 一种肽阵列,其中至少一种肽是根据权利要求 1-4 任一项的肽。

用于自身免疫性疾病治疗和诊断的 TCR-V- β 相关肽

[0001] 本发明提供了衍生自具有针对 GPI 链表位的反应性的抗体的肽和功能等价配体。这些肽能用于治疗 and 诊断多种被认为是由与 GPI 链表位反应的自身抗体的体内不当存在所引起的疾病。本发明还描述了这些自身抗体危害生物体进而引起疾病的作用机制,以及描述了预防疾病和检测上述自身抗体的方法。

[0002] 所有在此引用的出版物、专利和专利申请全文并入作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 本发明涉及有关自身免疫性疾病以及其他当前未被认为是自身免疫性疾病的疾病病因的新观点。该观点最初描述于国际专利申请 W099/05175 中,在该文中具有特异反应性的天然存在的自身抗体的出现与多种自身免疫性疾病如糖尿病相关。该观点即由于多特异性自身抗体的出现,而导致大多数具有或不具有遗传易感性或与老化过程有关状况的传染性或非传染性起源的疾病变得明显或加剧。大比例的人群中产生了这样的自身抗体,其危害受血糖水平、胰岛素水平、受控于胰岛素和 / 或 GPI- 连接的分子或影响其的其他激素水平、自身抗体和磷脂所识别的其他调节分子影响的所有系统和器官。这些自身抗体具有加速老化和老化伴随病、促进癌症、介导与否基于遗传易感性的疾病表现以及干扰针对传染物第一线防御的能力。更确切地说,依赖于个体易感性的自身抗体的产生就是根本的致病问题,引起了一种或多种难以解决的病症或疾病。类似的情况是对于任何给定的药物,可能会有一种或多种副作用,而在没有这种药物的情况下这些副作用就不会存在。因此,这些抗体被认为是表现为相同机制的多种不同病症的病因。

[0005] 该致病的自身抗体是一种识别抗-TCR V β 抗体、具有信号传导能力的分子、包括磷脂酰肌醇的磷脂、胰岛素作用的第二信使、单链和双链 DNA 以及 GPI- 链元件的单克隆抗体。

[0006] 尽管存在着针对本文中讨论的疾病和病症的某些疗法,但大多数的这些疾病仍难以解决,并且成为发病率和死亡率的主要原因。因此,非常需要获得能有效地预防、治疗并诊断这些病症的新疗法。当然,鉴于本文中讨论的疾病类型非常广泛,因此尽可能地获得能有效地针对所有这些疾病的单一疗法应当是非常有益的。

[0007] 申请人现已确定某些肽或称为肽反作用抗体 (peptide-counteracting antibodies) 的抗体可用于预防、治疗和诊断多种疾病和病症。

[0008] 发明概述

[0009] 根据本发明,提供了一种衍生自具有针对 GPI 链表位的反应性的抗体的肽或功能等价配体。

[0010] 根据申请人的研究,该观点逐渐显露,即某种自身抗体的出现导致许多疾病变得明显或加剧。这种抗体具有针对 GPI 链表位的反应性,但在其还具有针对抗-TCR V β 抗体、具有信号传导能力的分子、包括磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸和心磷脂 (二酰基甘油) 的磷脂、及磷脂聚糖、胰岛素作用的第二信使、单链和双链 DNA 以及 GPI- 链元件中的表位的反应性的意义上,其是多特异性的。该发现的基础首次报道于国际专利申请 W0 99/05175 (A. Matossian-Rogers), 其全文在此并入作为参考。

[0011] 一种与这些自身抗体的存在有关的疾病是糖尿病。目前涉及糖尿病病因的思索并没有使感染和 β 细胞的自身免疫 T 细胞破坏（其随后引起多种已知自身抗体的出现）理论之间产生任何机制上的联系。对于糖尿病患者中初期胰岛素排出量增加以及胰高血糖素分泌失调的关键性观察也没有提供本发明的理论。

[0012] 应用本发明所基于的理论于产生单克隆或多克隆 T 细胞增殖并增加 T 细胞数量的特定的糖尿病、感染的病例中，所增加的 T 细胞数量随后能自我平衡地调节。这包括释放 T 细胞受体 (TCR) 片段的 T 细胞死亡，所述死亡产生了识别不同 T 细胞的抗体（抗-TCR $V\beta$ ）⁽¹⁾。这样的抗体又能刺激产生抗-抗-TCR $V\beta$ 抗体。在体外研究中，这些单克隆抗-抗-TCR $V\beta$ 抗体不仅与抗-TCR $V\beta$ 抗体结合，还与胰腺 α 细胞结合（参见 W099/05175）。这些抗-抗-TCR $V\beta$ 抗体还反应性针对磷脂如心磷脂、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇。

[0013] 可以设想由于抗-抗-TCR $V\beta$ 抗体对磷脂酰肌醇（一种 GPI 链元件）的交叉反应识别，从而识别 α 细胞上的 GPI- 连接的分子。已证实磷脂酰肌醇显著抑制抗-GPI 抗体与 GPI- 连接的靶分子的结合⁽²⁾。GPI 链对经由胰岛素激活的磷脂酶的胰岛素作用敏感^(3, 4)。已显示为磷脂酶所快速水解的 GPI- 连接的分子在培养的垂体催乳激素细胞中产生第二信使⁽⁵⁾。因此可能会去设想抗体如何结合 α 细胞上的 GPI- 连接的分子才能破坏通过这些细胞分泌的胰高血糖素对胰岛素的正常负反馈，由此增加胰高血糖素排出。

[0014] 通过刺激胰岛 β 细胞中 cAMP 产生，胰高血糖素参与通过刺激营养物诱导的胰岛素分泌；在添加胰高血糖素或 α 细胞后明显增加了来自纯化的 β 细胞的胰岛素产生⁽⁶⁾。也已显示胰高血糖素能增加应答于葡萄糖的脉冲式 (pulsatile) 胰岛素释放幅度⁽⁷⁾。因此，上述抗体对胰岛细胞的作用应当是过量产生胰岛素。

[0015] 事实上，W099/05175 中所显示的例子和数据已支持了该观点。当分离自尸体器官供者的人胰岛细胞暴露于单克隆抗-抗-TCR $V\beta$ 抗体时，发现与对照细胞相比其胰岛素分泌失调。因此，在体外抗-抗-TCR $V\beta$ 抗体与胰腺 α 细胞结合导致胰岛素分泌失调。此外，在新诊断的糖尿病儿童患者中，发现自身抗体与单克隆抗-TCR $V\beta$ 抗体结合（参见表 2）。这些自身抗体类似于抗-抗-TCR $V\beta$ 抗体。这些自身抗体可能是造成糖尿病患者中 α 细胞缺少对正常生理刺激物反应性从而导致高血糖症和反调节缺陷 (counter-regulatory defects) 的原因。毫无疑问通过单克隆抗-抗-TCR $V\beta$ 抗体不与确定为 I 型糖尿病患者的胰岛结合的事实暗示了这些分子的作用，推测起来原因在于靶分子为这些自身抗体所下调节或业已为之所饱和。

[0016] 肽

[0017] 基于代表上述多特异性自身抗体的单克隆抗体的结构，现已设计了肽。已显示在兔中这样的肽具有免疫原性并能导致与广谱人血清起反应的抗体产生。还已显示在人患者中这样的肽能提供有用的疗效。因此，提出产生针对这些肽或等价配体的多克隆或单克隆抗体，并且这些肽及其等价配体既可用于治疗也可用于分析技术以定性或定量检测自身抗体或所产生的针对自身抗体的反作用抗体的存在。

[0018] 如本文中所使用的，术语“肽”包括任何包含彼此通过肽键连接的氨基酸的部分或修饰的肽键连接的氨基酸的部分（即肽等构物）。该术语既指短链（5-20 个氨基酸）又指较长链寡肽（20-500 个氨基酸）。所述肽优选包含彼此通过肽键或修饰的肽键连接的至少 5 个、至少 10 个、至少 15 个、至少 20 个、至少 25 个、至少 30 个、至少 35 个、至少 40 个或至

少 45 个氨基酸。

[0019] 根据本发明的肽优选包含具有针对 GPI 链表位以及一个或多个下列部分：抗-TCR V β 抗体、具有信号传导能力的分子、磷脂（包括磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸和心磷脂（二酰基甘油）或磷脂聚糖）、胰岛素作用的第二信使以及单链或双链 DNA 反应性的抗体的氨基酸序列。所述抗体还可显示针对一种或多种细胞类型的反应性，作为例子给出的细胞类型包括人胰腺 α 细胞、甲状腺滤泡细胞、肾上腺髓质细胞、胃和肠道细胞、唾液腺细胞、卵巢细胞、横纹肌细胞和结缔组织细胞，并非穷举。术语“反应性”意思是与针对其它不具有特异性结合的抗原的亲和力相比，抗体针对所述抗原具有实质上更强的亲和力。该实质上更强的亲和力优选为至少 1.5 倍、更优选至少 2 倍、更优选至少 5 倍、10 倍、100 倍、1000 倍、10,000 倍、100,000 倍、 10^6 倍或更多。本领域技术人员应当明白，尽管抗体是高度特异的，但特定抗体可能高度特异于超过一种的抗原。在本领域中已使用不同的术语来描述这种现象，包括术语“交叉反应性”。抗体交叉反应的抗原可以是结构上相似的或不相似的。这些具有针对 GPI 链表位以及上述一种或多种部分或细胞类型反应性的抗体是这样的“交叉反应性”的例子。

[0020] 因此，根据本发明的肽可以是具有上述特性的抗体的片段。例如，这样的片段可衍生自适合的抗体的可变区，Fab、F(ab')₂、Fv 和 ScFv 部分是具有有利特性的抗体片段的例子。用于构建上述抗体片段的方法是本领域众所周知的（Molecular Immunology, Hames, B. D. 和 Glover D. M. 编，IRL Press, New York, 1996；Practical Immunology, Hay, F. 和 Westwood, O. Blackwell Science Ltd., 2002）。优选的衍生上述片段的抗体描述于国际专利申请 W099/05175 中。

[0021] 在某些实施方案中，披露于 W099/05175 的抗体、等价配体及其应用都明确地从本发明的范围中排除。

[0022] 特别优选的根据本发明的肽可衍生自的可变区是其序列如本文中 SEQ ID NOs : 2（重链）和 4（轻链）所示的那些可变区。编码这些可变区的基因分离自分泌识别抗-TCR V β 抗体的鼠单克隆细胞。相应的 DNA 序列示于 SEQ ID NOs : 1 和 3。

[0023] 其他优选的根据本发明的肽可衍生自的可变区是其序列如本文中 SEQ ID Nos : 18、20、34、36、50、52、66、68、82 和 84 所示的那些可变区。编码这些可变区的基因也分离自分泌识别抗-TCR V β 抗体的鼠单克隆细胞。相应的 DNA 序列示于 SEQ ID NOs : 17、19、33、35、49、51、65、67、81 和 83。

[0024] 根据本发明的肽可优选为具有上述特性的抗体高变区的片段。所述抗体高变区为直接接触抗原表面一部分的区域。为此，高变区有时也称为互补决定区或 CDR。重链和轻链分别具有 3 个 CDR，在此称为 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3。

[0025] 特别优选的根据本发明的肽可衍生自的高变区是其序列如本文中 SEQ ID NOs : 6、8、10、12、14 和 16 所示的那些高变区。

[0026] 已构建了某些证实为这些高变区序列的肽并测试了作为能与抗-TCR V β 抗体结合的抗原的有效性。这些肽具有示于 SEQ ID NOs : 8、10 和 16 中的氨基酸序列，并且是根据本发明特别优选的肽。

[0027] 其他优选的根据本发明的肽可衍生自的高变区是其序列如本文中 SEQ ID NOs : 22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、

88、90、92、94 和 96 所示的那些高变区。

[0028] 本发明还提供了可连接在一起形成二聚体或多聚体的这样的肽。二聚体或多聚体可以是同型二聚体或同型多聚体,或可以是异二聚体或异多聚体。与使用以分离形式存在的单个肽相比,这样连接的分子能更有效,因为基于更多可利用的结合位点和/或更大的所展示的表位区域,能增加结合有效性。肽可直接连接,或可通过接头分子如氨基酸(特别是甘氨酸)、肽或化学连接基团连接在一起。优选的多聚体包括包含氨基酸序列示于 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:16 的同型二聚体。在人患者中已显示包含氨基酸序列示于 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:16 以及一个额外的 N 末端半胱氨酸残基的同型二聚体能提供有用的疗效(参见本文中的实施例 6 和 7)。这些肽还可包括其氨基酸序列示于 SEQ ID NOs:6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94 和 96 的肽的组合。优选的肽的组合包括那些包括其氨基酸序列示于 SEQ ID NOs:8、10 和 16 的肽的肽的组合(例如,SEQ ID NOs:8 和 10, SEQ ID NOs:8 和 16, SEQ ID NOs:10 和 16 以及 SEQ ID NOs:8、10 和 16)。

[0029] 根据本发明的上述方面的肽可含有除 20 种基因编码的氨基酸之外的通过天然加工如翻译后加工或通过本领域众所周知的化学修饰技术修饰的氨基酸。可常见于本发明多肽中的已知修饰为糖基化,脂质连接,硫化, γ -羧化,例如谷氨酸残基,羟基化和 ADP-核糖基化。其他可能的修饰包括乙酰化、酰化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素(haeme)部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联(如在半胱氨酸残基之间)、环化、二硫键形成、脱甲基化、共价交联形成、半胱氨酸形成、焦谷氨酸形成、甲酰化、GPI 锚形成、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白酶解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化、转移 RNA 介导的蛋白质的氨基酸添加如精氨酰化以及遍在蛋白化。修饰可发生在肽中的任何位置,包括肽主链、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。

[0030] 根据本发明的肽可以是与上述 SEQ ID NOs:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94 和 96 中所明确鉴定的肽同源的。如本文中所使用的术语,如果一条多肽的序列与另一条多肽的序列具有足够高水平的同一性或相似性,则认为这两条多肽是“同源的”。“同一性”指在进行比对的序列中的任何特定位置,序列之间的氨基酸残基是相同的。“相似性”指在进行比对的序列中的任何特定位置,序列之间的氨基酸残基是相似类型的。可容易地计算同一性和相似性水平(Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., 编, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., 编, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., 和 Griffin, H. G., 编, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 以及 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J., 编, M Stockton Press, New York, 1991)。

[0031] 一般而言,在两条肽(优选地,在整个指定的区域如高变区)之间大于 25% 的同一性就被认为是功能等价的指标。优选地,本发明第一方面的功能等价多肽与 SEQ ID NOs:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94 和 96 任一所示的肽

或其活性片段具有大于 25% 的序列同一性水平。更优选的多肽与这些肽或其活性片段分别具有大于 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或 99% 的同一性水平。

[0032] 使用 NCBI (美国国立生物技术信息中心 ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 规定的缺省参数 [Blosum 62 矩阵 ; 空位开放罚分 = 11 和空位延伸罚分 = 1], 通过 BLAST 2.1.3 版确定本文中所提及的同一性百分数。

[0033] 因此, 同源肽包括天然生物学变体 (例如, 肽所衍生自的物种中的等位变体或地理变体) 以及上述 SEQ ID NOs : 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94 和 96 中所明确鉴定的肽的突变体 (如含有氨基酸取代、插入、修饰或缺失的突变体)。这样的突变体可包括其中一个或多个氨基酸残基位保守的或非保守的氨基酸残基 (优选保守的氨基酸残基) 所取代的肽, 并且上述取代的氨基酸残基可以是或可以不是为遗传密码所编码的氨基酸残基。典型的这样的取代为在组 Ala、Val、Leu 和 Ile 之中 ; 在 Ser 和 Thr 之间 ; 在酸性残基 Asp 和 Glu 之间 ; 在 Asn 和 Gln 之间 ; 在碱性残基 Lys 和 Arg 之间 ; 或在芳香族残基 Phe 和 Tyr 之间的取代。特别优选的是其中几个即 1-5 个、1-3 个、1 和 2 个或仅有 1 个氨基酸以任何组合被取代、缺失或添加的变体。尤其优选的是不改变蛋白特性和活性的沉默取代、添加和缺失。这样的突变体还包括其中一个或多个氨基酸残基包含如上所述取代基团的。

[0034] 这样的变体包括本文 SEQ ID NOs : 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94 和 96 中所明确鉴定的肽的延伸或截短形式。对于延伸的变体, 如果序列 C 末端和 / 或 N 末端额外的残基包括于肽片段中, 认为极有可能这些肽的抗原区正确折叠并显示抗原活性。例如, 来自本文 SEQ ID NOs : 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94 和 96 中所明确鉴定的肽或来自同源序列的额外的 5、10、20、30、40、50、100 个或甚至多达 200 个氨基酸残基可包括在肽边界的 C 末端和 / 或 N 末端的任一边或两边, 而不损害多肽片段正确折叠的能力。

[0035] 对于这些肽的截短变体, 通常可在肽的 C 末端或 N 末端的任一边或两边缺失一个或多个氨基酸残基, 而不损害这些肽正确折叠的能力。

[0036] 使用修饰的、突变的或取代的肽的理由可在于例如产生与野生型肽相比具有类似或改善的治疗和 / 或药物代谢动力学特性的肽。这样的肽应当在例如与其生物学靶结合中保持野生型肽的功效。例如, 当在注射入受试者后肽对肽酶切割的敏感性成为问题时, 用不能切割的肽模拟物取代特别敏感的肽键可提供更稳定的肽, 并因此更能用作治疗剂。类似地, 对 L-氨基酸残基的取代是一种使肽对蛋白水解较不敏感的标准方法, 并且最终更类似于不同于肽的有机化合物。还有用的是氨基末端封闭基团如叔丁氧羰基、乙酰基、theyl、琥珀酰基、甲氧基琥珀酰基、环庚基、己二酰基、壬二酰基、丹酰基、苄氧羰基、苄氧羰基、甲氧基壬二酰基、甲氧基己二酰基、甲氧基环庚基和 2,4,-二硝基苯基。封闭肽的荷电 N- 和 C- 末端会具有增强肽通过疏水细胞膜进入细胞的额外益处。用于合成及开发肽模拟物和其他非肽模拟物的技术是本领域众所周知的 (参见例如 Hruby VJ 和 Balse PM, Curr MedChem 2000, 7 : 945-70 ; Golebiowski A 等, Curr Opin Drug Discov Devel 2001, 4 :

428-34 ;Kim H0 和 Kahn M, Comb Chem High ThroughputScreen 2000 ;3 :167-8)。例如,已描述了能破坏蛋白-蛋白相互作用并抑制蛋白复合物形成的小蛋白(miniproteins)和合成模拟物(CochranAG, Curr Opin Chem Biol 2001, 5(6) :654-659)。文献中也披露了用于将非天然氨基酸掺入蛋白中、使用体外和体内翻译系统探查和/或改善蛋白结构和功能的多种方法(参见例如 Dougherty DA, Curr Opin Chem Biol 2000, 4 :645-52)。

[0037] 文献提供了许多基于对天然蛋白序列和/或结构的统计学和物理化学研究可进行保守氨基酸取代选择的模型(例如参见 Bordo 和 Argos, J Mol Biol 1991, 217 :721-9; Rogov 和 Nekrasov, Protein Eng 2001, 14 :459-463)。蛋白质设计试验已显示使用特定的氨基酸子集能产生可折叠且具有活性的蛋白,有助于能更易于适合蛋白结构的氨基酸取代的分类,并且能用于检测功能和结构同系物及种内类似物(paralogs)(MurphyLR 等, Protein Eng. 2000, 13 :149-52)。

[0038] 本发明的肽可组成融合蛋白的一部分。例如,包括一个或多个额外的氨基酸序列通常是有利的,所述氨基酸序列可包含分泌或前导序列、前序列(pro-sequences)、帮助纯化的序列或赋予更高的蛋白稳定性的序列,例如在重组生产过程中。或者,成熟的肽可与另一种化合物如增加多肽半衰期的化合物(例如聚乙二醇)融合。肽也可与生物学或合成物质融合,可与诸如酶、指示物化合物、药物、毒素或标记(放射性、荧光或其他)的部分缀合。

[0039] 可以任何适合的方法制备本发明的肽。具体来说,这样的制备方法包括重组生产、合成生产或这些方法的组合。对于合成生产,t-Boc 或基于 Fmoc 的化学反应可用于固相肽合成法中(参见"Solid Phase Peptide Synthesis",编辑.Stewart & Young,可获得自 Pierce Chem. Co)。或者,可应用液相合成(参见"Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins",Lloyd-Williams, P., Albericio, F. 和 Giralt, E., CRC Press, 1997)。

[0040] 根据本发明的肽可与上述 SEQ ID NOs :6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94 和 96 中所明确鉴定的肽享有显著的结构同源性。具体来说,根据本发明的肽可与 SEQ ID NOs :6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94 和 96 中所鉴定的高变序列享有某些重要的高变区残基。已通过比较高变区序列鉴定了 SEQ ID NOs :6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94 和 96 中存在的重要的高变区残基。

[0041] 克隆并测序了交叉反应的鼠抗-抗-TCR V β IgM 和 IgG 单克隆抗体的 6 个高变区(参见本文实施例 1 和 5)。对那些抗体高变区序列的分析揭示了交叉反应的抗-TCR V β 结合(即本文中所述的针对 GPI 链表位的多特异性反应性)必需的残基相关的重要信息。

[0042] 首先,序列分析认为在每个 CDR 中的某些位置处特定的氨基酸可能是必需的(参见实施例 5)。因此,本发明的肽可包含下列序列之一或由其组成,其中'x'指任意氨基酸残基,其中 '-' 指肽键,并且其中肽以 N 到 C 末端方向显示:

[0043] 共有序列 1 G-Y-x-F-T-x-x-x-x-x-W (SEQ ID NO :162)

[0044] 共有序列 2 x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x (SEQ ID NO :163)

[0045] 共有序列 3 x-A-S-x-x-x-x-x-x-x-x (SEQ ID NO :164)

[0046] 共有序列 4 x-x-S-x-x-x-S (SEQ ID NO :165)

[0047] 共有序列 5 Q-Q-x-x-x-x-P-x-x (SEQ ID NO :166)

[0048] 其次,基于所克隆序列的序列分析能产生每个 CDR 的‘通式’(参见实施例 5)。因此,本发明的肽可包含满足下列‘通式’之一要求的氨基酸序列或由其组成,其中在每个有关位置处选择示于括号中的氨基酸之一,其中‘-’指肽键,并且其中肽以 N 到 C 末端方向显示:

[0049] 通式 1 G-Y-[TA]-F-T-[RNS]-[YN]-[WGN]-[IM]-[NF]-W

[0050] 通式 2 [NWX]-I-[YND]-[PT]-[SY]-[DNT]-[SG]-[YDE]-[TP]-[NRT]-Y-[NSA]-

[0051] [QD]-[KD]-F-K-[DG]

[0052] 通式 3 [LKE]-[RG]-[GML]-[LTY]-[LTG]-[PGN]-[DY]-[YAF]

[0053] 通式 4 [KR]-A-S-[QS]-[NDS]-[VI]-[DSG]-[TNS]-[NY]-[VLY]-[ANL]

[0054] 通式 5 [SYR]-[AT]-S-[YRI]-[RL]-[YHA]-S

[0055] 通式 6 Q-Q-[YG]-[NS]-[TS]-[YFS]-P-[LTP]-[TF]

[0056] 上述‘通式’包括了已为本发明人所克隆并测序的交叉反应抗体的所有 CDR 序列。

[0057] 第三,在 CDR 的每个位置上不仅考虑到完全保守的氨基酸,还考虑到最常见的(占优的)氨基酸的序列分析能产生每个 CDR 的氨基酸通式(参见实施例 5)。因此,本发明的肽可包含满足下列通式之一要求的氨基酸序列或由其组成,其中在每个有关位置处选择示于括号中的氨基酸之一,其中‘-’指肽键,并且其中肽以 N 到 C 末端方向显示:

[0058] 通式 7 G-Y-T-F-T-R-[YN]-W-[IM]-N-W

[0059] 通式 8 N-I-Y-P-[SY]-D-[SG]-Y-T-N-Y-N-Q-K-F-K-[DG]

[0060] 通式 9 L-[RG]-G-L-L-P-[DY]-Y

[0061] 通式 10 K-A-S-Q-N-V-[DSG]-T-N-V-A

[0062] 通式 11 S-A-S-Y-R-Y-S

[0063] 通式 12 Q-Q-Y-N-S-Y-P-L-T

[0064] 相信包含满足一个或多个上述共有序列和通式要求的氨基酸序列或由其组成的肽会具有与本文实施例 6 和 7 中体内测试的肽相当的生物活性,并且根据本发明会是有用的。

[0065] 实施例 1 和 5 中鉴定的高变区序列也用于鉴定与本发明人所鉴定的序列具有高水平的序列同一性并具有有关结合特性的已知高变区序列(参见本文实施例 8 和图 12A-12E)。比较已知高变区序列与实施例 1 和 5 中鉴定的高变区序列,以进一步分析对于交叉反应的抗-TCR V β 结合(即本文中所述的针对 GPI 链表位的多特异性反应性)重要的高变区残基。使用与实施例 5 中所用的相同类型的分析鉴定了更多系列的共有序列和通式(参见图 12A-12E)。

[0066] 因此,本发明的肽可包含下列序列之一或由其组成,其中‘x’指任意氨基酸残基,其中‘-’指肽键,并且其中肽以 N 到 C 末端方向显示:

[0067] 共有序列 6 G-Y-T-F-T-x-x-x-x-x-W (SEQ ID NO :167)

[0068] 共有序列 7 G-Y-x-F-x-x-Y-x-M-x-W (SEQ ID NO :168)

[0069] 共有序列 8 x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x (SEQ ID NO :169)

[0070] 共有序列 9 x-I-x-P-x-x-x-x-T-x-Y-x-x-K-F-x-G (SEQ ID NO :170)

[0071] 共有序列 10 x-A-S-x-x-x-x-x-x-x (SEQ ID NO :171)

[0072] 共有序列 11 x-A-S-x-x-x-x-x-x-L-x (SEQ ID NO :172)

[0073] 共有序列 12 x-x-S-x-x-x-S (SEQ ID NO :173)

[0074] 共有序列 13 x-T-S-x-L-x-x (SEQ ID NO :174)

[0075] 共有序列 14 Q-Q-x-x-S-x-P-x-T (SEQ ID NO :175)

[0076] 共有序列 15 Q-Q-x-N-x-x-P-x-x (SEQ ID NO :176)

[0077] 本发明的肽还可包含满足下列‘通式’之一要求的氨基酸序列或由其组成,其中在每个有关位置处选择示于括号中的氨基酸之一,其中‘-’指肽键,并且其中肽以 N 到 C 末端方向显示:

[0078] 通式 13 G-Y-T-F-T-[RNYSTDEG]-[NYF]-[WGAY]-[IMV]-[NGQH]-W

[0079] 通式 14 G-Y-[ATS]-F-[T/S]-[SDG]-Y-[NWV]-M-[FQHN]-W

[0080] 通式 15 [NWEAY]-I-[YND]-[PT]-[SYG]-[DTGY]-[SGD]-[YEGS]-[TP]-[NTYGS]-

[0081] Y-[NAI]-[QDE]-[KD]-F-K-[DGN]

[0082] 通式 16 [YWKNLR]-I-[DN]-P-[YAEFS]-[NYS]-[GD]-[DSG]-T-[RESKN]-Y-[SAN]-

[0083] [QSEP]-K-F-[KQT]-G

[0084] 通式 17 [KR]-A-S-[QS]-[NSDT]-[VI]-[DGSR]-[TSYNK]-[NADY]-[VYGL]-[ALD]

[0085] 通式 18 [RK]-A-S-[QR]-[DSG]-[IV]-[SN]-[NSG]-[YW]-L-[NHA]

[0086] 通式 19 [SRW]-[AT]-S-[YIT]-[RL]-[YAE]-S

[0087] 通式 20 [YLDTK]-T-S-[RNKV]-L-[HAG]-[SP]

[0088] 通式 21 Q-Q-[YGWR]-[NSAG]-S-[YSDW]-P-[LPYI]-T

[0089] 通式 22 Q-Q-[GNSTY]-N-[TES]-[FDWY]-P-[TYRF]-[FT]

[0090] 本发明的肽还可包含满足下列通式之一要求的氨基酸序列或由其组成,其中在每个有关位置处选择示于括号中的氨基酸之一,其中‘-’指肽键,并且其中肽以 N 到 C 末端方向显示:

[0091] 通式 23 G-Y-T-F-T-[RNS]-Y-W-[IM]-N-W

[0092] 通式 24 G-Y-T-F-T-S-Y-W-M-H-W

[0093] 通式 25 N-I-Y-P-S-D-S-Y-T-N-Y-N-Q-K-F-K-G

[0094] 通式 26 [YW]-I-N-P-Y-N-G-D-T-[ES]-Y-N-Q-K-F-K-G

[0095] 通式 27 K-A-S-Q-N-V-S-T-N-V-A

[0096] 通式 28 R-A-S-Q-S-I-S-N-Y-L-[NA]

[0097] 通式 29 S-A-S-Y-R-Y-S

[0098] 通式 30 Y-T-S-N-L-A-S

[0099] 通式 31 Q-Q-Y-N-S-Y-P-L-T

[0100] 通式 32 Q-Q-N-N-E-D-P-[YR]-T

[0101] 本发明的肽还可包含满足下列通式之一要求的氨基酸序列或由其组成,其中在每个有关位置处选择示于括号中的氨基酸之一,其中‘x’指任意氨基酸残基,其中‘-’指肽键,并且其中肽以 N 到 C 末端方向显示:

[0102] 通式 33 [EYWSL]-I-[YSND]-[PSH]-[SGNY]-[GSNTD]-[SGD]-[YTGS]-[TIA]-

[0103] [NY]-[YN]-[NAP]-[QDSEP]-[KSL]-[FVK]-[KQS]-[GR]

[0104] 通式 34 E-I-[YSN]-[PS]-[SGN]-[GS]-[SG]-[TGS]-T-[NY]-Y-[NAP]-[QDS]-
[0105] [KS]-[FVK]-[KQ]-[GR]

[0106] 通式 35 x-I-x-P-S-G-G-x-T-Y-x-A-D-[KS]-[FV]-K-G

[0107] 相信包含满足一个或多个上述共有序列和通式要求的氨基酸序列或由其组成的肽也会具有与本文实施例 6 和 7 中体内测试的肽相当的生物活性,并且根据本发明会是有用的。

[0108] 如本文中别处所提到的,本发明的肽可连接在一起形成二聚体或多聚体。因此,本发明还提供了包含满足一个或多个上述共有序列和通式要求的氨基酸序列或由其组成的肽的二聚体或多聚体。例如,本发明提供了包含满足两个不同的本文所述的共有序列和通式要求的氨基酸序列的两个多肽的异二聚体。例如,本发明提供了包含满足相同的共有序列和通式要求的氨基酸序列的两个多肽的同型二聚体。

[0109] 本发明还提供了包含满足本文中披露的共有序列或通式要求的氨基酸序列或由其组成的肽,并且所述氨基酸序列与 SEQ ID NOs :6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94 和 96 的任一还具有大于 25% 的序列同一性水平。优选地,这样的肽与 SEQ ID NOs :6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94 和 96 的任一分别具有大于 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或 99% 的同一性水平。

[0110] 本发明的肽还包括包含满足上述共有序列之一要求的氨基酸序列或由其组成的那些肽,所述共有序列包括在一个或多个可变位置(即非完全保守的‘x’位置)处,任意氨基酸披露于在本文相应的通式中(即在相应于相同 CDR 的通式中)的该位置处。

[0111] 例如,来自于克隆的 CDR-H2 序列(参见实施例 5)的本文中鉴定的共有序列和‘通式’为:

[0112] 共有序列 2 x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0113] 通式 2 [NWy]-I-[YND]-[PT]-[SY]-[DNT]-[SG]-[YDE]-[TP]-[NRT]-Y-
[0114] [NSA]-[QD]-[KD]-F-K-[DG]

[0115] 因此,本发明的肽包括那些序列的组合,例如包含下列序列或由其组成的肽:

[0116] 组合 1 [NWy]-I-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0117] 组合 2 x-I-[YND]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0118] 组合 3 x-I-x-[PT]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0119] 组合 4 x-I-x-x-[SY]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0120] 组合 5 x-I-x-x-x-[DNT]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0121] 组合 6 x-I-x-x-x-x-[SG]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0122] 组合 7 x-I-x-x-x-x-x-[YDE]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0123] 组合 8 x-I-x-x-x-x-x-x-[TP]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0124] 组合 9 x-I-x-x-x-x-x-x-x-[NRT]-Y-x-x-x-x-x-x-x-x-F-K-x

[0125] 组合 10 x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-[NSA]-x-x-x-x-x-x-x-x-F-K-x

[0126] 组合 11 x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-[QD]-x-x-x-x-x-x-x-x-F-K-x

[0127] 组合 12 x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-[KD]-F-K-x

[0128] 组合 13 x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-[DG]

[0129] 本发明的肽还包括本文中披露的共有序列和通式的更复杂组合。因此,本发明还提供包含下列序列或由其组成的肽,例如:

[0130] 组合 14 [NWY]-I-[YND]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0131] 组合 15 [NWY]-I-x-[PT]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0132] 组合 16 [NWY]-I-x-x-[SY]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0133] 组合 17 [NWY]-I-x-x-x-[DNT]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0134] 组合 18 [NWY]-I-x-x-x-x-[SG]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0135] 组合 19 [NWY]-I-x-x-x-x-x-x-[YDE]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0136] 组合 20 [NWY]-I-x-x-x-x-x-x-x-[TP]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0137] 组合 21 [NWY]-I-x-x-x-x-x-x-x-x-[NRT]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0138] 组合 22 [NWY]-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-[NSA]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0139] 组合 23 [NWY]-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-[QD]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0140] 组合 24 [NWY]-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-[KD]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0141] 组合 25 [NWY]-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-x-x-x-x-x-F-K-[DG]

[0142] 本文实施例 8 和 9 描述了具有有关结合特异性的已知高变区序列的分析。该分析是基于公共数据库可获得的重链和轻链可变区序列。在某些实施方案中,一个或多个在登录号 1921302A、1921302B、A39276、B39276、AAA20444.1、AAA20447.1、AAB32203.1、AAB32202.1、AAB46758.1、AAB46763.1、AAB46759.1、AAB46764.1、AAB46760.1、AAB46765.1、AAB46761.1、AAB46766.1、AAB46762.1、AAB46767.1、AAB58061.1、AAB58062.1、AAC53642.1、AAC53642.1、AAD00604.1、AAD00605.1、AAD00606.1、AAD00607.1、AAE72083.1、AAE72082.1、AAG30427.1、AAG30432.1、AAG30428.1、AAG30433.1、AAG30429.1、AAG30434.1、AAG30430.1、AAG30435.1、AAG33839.1、AAG40815.1、AAK11244.1、AAL59364.1、AAL59381.1、AAL59365.1、AAL59380.1、AAL59366.1、AAL59379.1、AAL59367.1、AAL59378.1、AAL59368.1、AAL59377.1、AAL59369.1、AAL59376.1、AAL59370.1、AAL59375.1、AAL59371.1、AAL59374.1、AAL59372.1、AAL59373.1、AAL67507.1、AAL67508.1、AAL67509.1、AAL67510.1、AAL67511.1、AAP19642.1、AAP19641.1、AAR90997.1、AAS01840.1、AAR90998.1、AAS01841.1、AAR90999.1、AAR91002.1、AAS01843.1、AAR91003.1、AAS01844.1、AAR91004.1、AAR91005.1、AAR91007.1、AAS01847.1、AAT68292.1、AAT76236.1、AAT76271.1、AAT76245.1、AAT76280.1、AAT76246.1、AAT76281.1、B30502、C30502、CAA46142.1、CAA51998.1、CAA52929.1、CAA56180.1、CAA52930.1、CAA56181.1、CAA52931.1、CAA56178.1、CAA52932.1、CAA56179.1、CAA63586.1、CAA63587.1、CAA63589.1、CAA63590.1、CAA84376.1、CAA84375.1、CAB45250.1、CAB45251.1、CAB45252.1、CAB45253.1、CAB46481.1、CAB46447.1、CAB46482.1、CAB46448.1、CAC22102.1、CAC22102.1、F30502、G30502、PC4280、PC4283、PC4281、PC4282、S67941、S67940、S69897 和 S69898 下存放的序列都明确地从本发明的范围中排除。

[0143] 本发明第一方面还包括了本文中明确鉴定的肽的功能等价配体。功能等价配体可以是能执行与自身抗体或其典型的单克隆抗体及其衍生物相同的功能或结合与之相同的靶结构的生物学衍生的或可合成或选自文库(如化合物的随机或组合文库)的结构。例如,这样的化合物可与本文 SEQ ID NOs:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、

34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94 和 96 中所明确鉴定的肽序列享有显著的结构同源性。这样的化合物可通过诸如穿针引线法 (threading) (参见例如 Jones, D. T. (1997). Progress in protein structure prediction. Curr. Opin. Struct. Biol. 7(3), 377-387) 的技术进行鉴定。还可在利用肽反作用抗体或本发明第一方面的功能等价配体的筛选法中鉴定这样的化合物。

[0144] 根据本发明,可以预计任何在抗原结合所需位置能保留这些肽的氨基酸侧链的分子骨架都是适用的。在这方面特别适用的可以是通过其连接基团和连接键保持正确骨架的环肽。氨基酸侧链可保持在与野生型肽中它们的位置基本上相同的位置中。优选地,环肽包含 5-30 个氨基酸,优选 7-20 个氨基酸。

[0145] 可使用噬菌体文库产生带有模拟根据本发明的那些的抗原结合位点的生物活性肽。编码鉴定为抗原位点组成部分的氨基酸残基的核酸以及编码周围构架残基的核酸可融合在一起以给出 10-1000 个残基、优选 25-100 个残基的多肽单元。通过将该核酸片段与编码噬菌体蛋白如细菌噬菌体 fd 的 pIII 的核酸的融合,融合分子可展示在噬菌体的表面上。然后,用抗原筛选噬菌体文库鉴定那些目标克隆。可接着对这些克隆进行多次重复诱变并筛选对抗原具有改善的亲合力的所产生的分子。

[0146] 除基于肽的化合物之外,合成或有机分子可功能等价于本文中明确鉴定的肽。近年来,组合化学的概念以及组合文库的产生发展迅速,促进了具有期望特性的分子的合理设计和改进。这些技术可用于产生具有相同于或类似于本文中鉴定的肽的那些的结合位点的分子。

[0147] 使用例如标准合成技术以及分子模建和计算机可视化程序,可通过合理设计产生这样的化合物。在这些技术下,通过组合不同的支架结构与取代基部件,优化与基本肽具有类似骨架的“前导”化合物。

[0148] 或者,作为分子实体结构指导的设计中的一个步骤,通过产生骨架支架结构周围的同种组合阵列,组合化学可用于产生或精修 (refine) 模拟这些肽的抗原位点的化合物的结构。这些步骤可包括具有固相拆分和重新结合过程的标准肽或有机分子合成或使用固相或溶液技术的平行组合单元合成 (参见例如 Hogan, 1997 以及其中所引用的文献)。

[0149] 包含肽的抗体

[0150] 根据本发明第一方面的另一个实施方案,提供了一种包含具有示于 SEQ ID NOs : 2、18、34、50、66 或 82 中的氨基酸序列的重链可变区的抗体。还提供了一种包含具有示于 SEQ ID NOs : 4、20、36、52、68 或 84 中的氨基酸序列的轻链可变区的抗体。

[0151] 因此,本发明提供了一种包含具有示于 SEQ ID NO : 2 中的氨基酸序列的重链可变区和具有示于 SEQ ID NO : 4 中的氨基酸序列的轻链可变区的抗体。本发明还提供了一种包含具有示于 SEQ ID NO : 18 中的氨基酸序列的重链可变区和具有示于 SEQ ID NO : 20 中的氨基酸序列的轻链可变区的抗体。本发明还提供了一种包含具有示于 SEQ ID NO : 34 中的氨基酸序列的重链可变区和具有示于 SEQ ID NO : 36 中的氨基酸序列的轻链可变区的抗体。本发明还提供了一种包含具有示于 SEQ ID NO : 52 中的氨基酸序列的重链可变区和具有示于 SEQ ID NO : 54 中的氨基酸序列的轻链可变区的抗体。本发明还提供了一种包含具有示于 SEQ ID NO : 66 中的氨基酸序列的重链可变区和具有示于 SEQ ID NO : 68 中的氨基酸序列的轻链可变区的抗体。本发明还提供了一种包含具有示于 SEQ ID NO : 82 中的氨基酸序

列的重链可变区和具有示于 SEQ ID NO :84 中的氨基酸序列的轻链可变区的抗体。

[0152] 本发明还提供了一种包含 1、2、3、4、5 或 6 个示于 SEQ ID NOs :6、8、10、12、14 和 16 中的 CDR 序列的抗体。本发明还提供了一种包含 1、2、3、4、5 或 6 个示于 SEQ ID NOs :22、24、26、28、30 和 32 中的 CDR 序列的抗体。本发明还提供了一种包含 1、2、3、4、5 或 6 个示于 SEQ ID NOs :38、40、42、44、46 和 48 中的 CDR 序列的抗体。本发明还提供了一种包含 1、2、3、4、5 或 6 个示于 SEQ ID NOs :54、56、58、60、62 和 64 中的 CDR 序列的抗体。本发明还提供了一种包含 1、2、3、4、5 或 6 个示于 SEQ ID NOs :70、72、74、76、78 和 80 中的 CDR 序列的抗体。本发明还提供了一种包含 1、2、3、4、5 或 6 个示于 SEQ ID NOs :86、88、90、92、94 和 96 中的 CDR 序列的抗体。

[0153] 本发明还提供了一种包含与示于 SEQ ID NOs :2、18、34、50、66 或 82 中的氨基酸序列具有大于 25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或 99% 的同一性的重链可变区序列的抗体。本发明还提供了一种包含与示于 SEQ ID NOs :4、20、36、52、68 或 84 中的氨基酸序列具有大于 25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或 99% 的同一性的轻链可变区序列的抗体。

[0154] 本发明还提供了包含与示于 SEQ ID NOs :6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94 和 96 中的氨基酸序列具有大于 25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或 99% 的同一性的 1、2、3、4、5 或 6 个 CDR 的抗体。

[0155] 本发明还提供了一种包含满足本文中披露的共有序列和通式要求的 1、2、3、4、5 或 6 个氨基酸序列的抗体。

[0156] 本发明还提供了这些抗体的片段,例如在本文中别处所提到的 Fab、F(ab')₂、Fv 和 ScFv 片段。

[0157] 肽反作用抗体

[0158] 根据本发明第一方面的另一个实施方案,提供了一种具有针对本发明第一方面的肽反应性的抗体或功能等价配体。这样的抗体或功能等价配体被用于治疗及诊断疾病,具体来说,因为它们能通过被动传递而被用于治疗。

[0159] 如果所需的是多克隆抗体,则可用本发明第一方面的肽免疫所选择的哺乳动物如小鼠、兔、山羊或马。用于免疫动物的肽可来源于重组 DNA 技术或可化学合成。如果需要的话,肽可与载体蛋白缀合。通常使用的肽可化学偶联的载体包括牛血清白蛋白、甲状腺球蛋白和匙孔血蓝蛋白。然后,将偶联的肽用于免疫动物。根据已知方法如免疫亲和层析收集并处理来自经免疫动物的血清。

[0160] 本领域技术人员也可容易地产生针对本发明第一方面的肽的单克隆抗体。使用杂交瘤技术的用于制备单克隆抗体的一般方法是众所周知的(参见例如 Kohler, G. 和 Milstein, C, Nature 256 :495-497(1975); Kozbor 等, Immunology Today 4 :72(1983); Cole 等, 77-96 在 Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985) 中)。

[0161] 可通过多种特性即同种型、表位、亲和力等筛选所产生的针对本发明第一方面的肽的一组单克隆抗体。单克隆抗体在它们所针对的特有肽的纯化中是特别有用的。或者,例如可通过本领域已知的 PCR 技术由杂交瘤分离编码目的单克隆抗体的基因,并在适合的

载体中克隆表达。

[0162] 也可使用其中非人可变区与人恒定区连接或融合的嵌合抗体（参见例如 Liu 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3439 (1987)）。

[0163] 例如通过人源化可对抗体进行修饰以使其在个体中的免疫原性更低（参见 Jones 等，Nature, 321, 522 (1986) ; Verhoeyen 等，Science, 239 :1534 (1988) ; Kabat 等，J. Immunol, 147 :1709 (1991) ; Queen 等，Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86, 10029 (1989) ; Gorman 等，Proc. Natl Acad. Sci. USA, 88 :34181 (1991) ; 和 Hodgson 等，Bio/Technology 9 : 421 (1991)）。如本文中所使用的，术语“人源化抗体”指其中非人供体的抗体重链和 / 或轻链可变域中的 CDR 氨基酸和所选择的其他氨基酸已取代替换人抗体中相应的氨基酸的抗体分子。因此，人源化抗体接近类似于人抗体但具有供体抗体的结合能力。

[0164] 在进一步的选择方案中，抗体可以是“双特异性”抗体，即一种具有两个不同的抗原结合域、每个结合域针对不同表位的抗体。

[0165] 噬菌体展示技术可用于从 PCR 扩增的来自经筛选具有相关抗体的人的淋巴细胞 V- 基因的所有组成成分中，或从天然文库中，选择编码具有结合本发明的肽的活性的抗体的基因 (McCafferty, J. 等, (1990), Nature 348, 552-554 ; Marks, J. 等, (1992) Biotechnology 10, 779-783)。还可通过链改组改良这些抗体的亲和力 (Clackson, T. 等, (1991) Nature 352, 624-628)。

[0166] 通过上述技术产生的抗体，无论是多克隆抗体还是单克隆抗体，都具有额外的效用，因为在免疫测定、放射免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA) 中它们可用作为试剂。在这些应用中，抗体可用分析上可检测的试剂如放射性同位素、荧光分子或酶来标记。

[0167] 核酸分子

[0168] 根据本发明第二方面，提供了一种编码根据上述本发明任一实施方案的肽、抗体或功能等价配体的核酸分子。编码这样的肽的核酸分子可与示于 SEQ ID NOs :1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93 或 95 中任一核酸分子的编码序列相一致。由于遗传密码简并性，这些分子还可具有不同的序列，分别编码示于 SEQ ID NOs :2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94 或 96 中的肽。优选地，纯化的核酸分子具有示于 SEQ ID NOs :1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93 或 95 中任一核酸序列，或为这些序列任一的冗余等价物或片段。

[0169] 本发明的核酸分子可以 RNA 如 mRNA 的形式存在，或以 DNA 包括如 cDNA、合成的 DNA 或基因组 DNA 的形式存在。可通过克隆、化学合成技术或它们的组合获得这样的核酸分子。例如可通过使用诸如固相亚磷酸胺化学合成的技术的化学合成、由基因组或 cDNA 文库或通过从生物体中分离来制备核酸分子。RNA 分子通常可通过体外或体内 DNA 序列转录来产生。核酸分子可以是双链或单链的。单链 DNA 可以是编码链，也称为有义链，或可以是非编码链，也称为反义链。

[0170] 术语“核酸分子”还包括 DNA 和 RNA 的类似物，例如含有修饰的主链的那些类似物

以及肽核酸 (PNA)。如本文中所使用的,术语“PNA”指包含至少 5 个核苷酸长的寡核苷酸的反义分子或抗基因剂,所述寡核苷酸与优选末端为赖氨酸的氨基酸残基肽主链连接。末端的赖氨酸赋予该组合物溶解性。PNA 可被聚乙二醇化以延长其在细胞中的存在时间,在细胞中它们优先与互补的单链 DNA 和 RNA 结合并终止转录产物延伸 (Nielsen, P. E. 等 (1993) *Anticancer Drug Des.* 8 :53-63)。

[0171] 本发明的核酸分子可包括但不限于成熟肽或抗体自身的编码序列;成熟肽或抗体的编码序列以及额外的编码序列如编码前导序列或分泌序列如原多肽、前多肽或前多肽原序列的那些编码序列;成熟肽或抗体的编码序列,带有或不带有上述额外的编码序列,以及更多的额外的非编码序列,包括非编码 5' 和 3' 序列如在转录、核糖体结合和 mRNA 稳定性中起作用的转录的、非翻译序列(包括终止信号)。核酸分子还可包括编码额外的氨基酸如提供额外的功能性的那些氨基酸的额外的序列。

[0172] 包括在本发明范围中的是编码上述变体肽的变体核酸分子。于此之中的变体是通过核苷酸取代、缺失或插入而不同于本文中明确鉴定的核酸分子的变体。取代、缺失或插入可涉及一个或多个核苷酸。变体可以是编码区或非编码区或两者都改变的变体。编码区中的改变可产生保守或非保守的氨基酸取代、缺失或插入。

[0173] 由于种种原因,还可使用本领域通常所知的方法工程化本发明的核酸分子,包括修饰克隆、加工和/或基因产物(多肽)的表达。通过随机片段化以及基因片段和合成的寡核苷酸 PCR 重装配的 DNA 改组作为可用于工程化核苷酸序列的特定技术而被提到。位点定向诱变可用于插入新的限制酶切位点、改变糖基化型、改变密码子偏爱、产生剪接变体、导入突变等等。

[0174] 本发明该方面优选的实施方案是在它们的全长上与示于 SEQ IDN0s :1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93 或 95 任一中的核酸分子具有至少 25% 同一性的核酸分子。优选地,根据本发明该方面的核酸分子包含在其全长上与具有任一这些序列的核酸分子具有至少 30% 同一性的区域,更优选具有至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、99% 或更多的同一性。

[0175] 根据本发明第三方面,提供了一种在高严格条件下与本发明第二方面的核酸分子杂交的纯化的核酸分子。这样的与本发明第二方面的核酸分子部分或完全互补的分子可用于反义或探针用途。如本领域技术人员所知道的,这样的反义分子如寡核苷酸可被设计来识别、特异性结合并阻止编码本发明多肽的靶核酸的转录(参见例如 Cohen, J. S., *Trends in Pharm. Sci.*, 10, 435 (1989); Okano, J. *Neurochem.* 56, 560 (1991); Connor, J. *Neurochem.* 56, 560 (1991); Lee 等, *Nucleic Acids Res.* 6, 3073 (1979); Cooney 等, *Science* 241, 456 (1988); Dervan 等, *Science* 251, 1360 (1991)。本文中使用的术语“杂交”指两个核酸分子通过氢键结合而彼此缔合。一般而言,可将一个分子固定在载体上,而另一个分子游离于溶液中。然后,可在有利于氢键结合的条件下将这两个分子以彼此接触的方式放置。可使用本领域已知的杂交测定法(参见例如 Sambrook 等 [同上]) 检测完全互补分子与靶分子杂交的抑制。之后,如 Wahl, G. M. 和 S. L. Berger (1987; *Methods Enzymol.* 152 : 399-407) 以及 Kimmel, A. R. (1987; *Methods Enzymol.* 152 : 507-511) 中所教导的,在不同的严格条件下,基本上同源的分子会竞争并抑制完全同源的分子与靶分子的结合。

[0176] “严格”指有利于非常相似的分子缔合而不利与不相同的分子缔合的杂交反应的条件。高严格杂交条件规定为于包含 50% 甲酰胺、5XSSC(150mM NaCl, 15mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠 (pH7.6)、5x 登哈特 (Denhardt's) 溶液、10% 硫酸葡聚糖和 20 μ g/ml 变性的、切断的鲑精 DNA 的溶液在 42°C 下温育过夜, 之后在大约 65°C 下于 0.1X SSC 中洗涤滤膜 (filters)。低严格条件包括在 35°C 下进行的杂交反应 (参见 Sambrook 等 [同上])。优选地, 用于杂交的条件为高严格杂交条件。

[0177] 载体

[0178] 在第四方面, 本发明提供了一种载体如掺入本发明第二或第三方面的核酸分子的表达载体。本发明的载体包含本发明的核酸分子, 并且可以是克隆或表达载体。因此, 本发明的肽可通过表达包含于宿主细胞中的载体中编码它们的核酸分子以重组形式制备。这样的表达方法是本领域技术人员众所周知的, 大多详述于 Sambrook 等 (同上) 和 Fernandez & Hoeffler(1998, 编. " Gene expression systems. Using nature for the art of expression " . Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto) 中。

[0179] 一般而言, 可以使用任何适于在所要求的宿主中维持、繁殖或表达核酸分子以产生多肽的系统或载体。可通过任何一种众所周知的常规技术如 Sambrook 等 (同上) 中所描述的那些技术, 将适当的核苷酸序列插入表达系统中。一般来说, 可将编码基因置于控制元件如启动子、核糖体结合位点 (对于细菌表达) 以及任选的操纵子的控制之下, 使得在转化的宿主细胞中编码所需多肽的 DNA 序列转录为 RNA。

[0180] 特别适合的表达系统包括微生物如用重组细菌噬菌体、质粒或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌; 用酵母表达载体转化的酵母菌; 用病毒表达载体 (如杆状病毒) 感染的昆虫细胞系统; 用病毒表达载体 (例如花椰菜花叶病毒, CaMV; 烟草花叶病毒, TMV) 或用细菌表达载体 (如 Ti 或 pBR322 质粒) 转化的植物细胞系统; 或动物细胞系统。无细胞翻译系统也可用于产生本发明的肽。

[0181] 可通过许多标准实验室手册如 Davis 等, Basic Methods in Molecular Biology(1986) 和 Sambrook 等 [同上] 中所描述的方法将编码本发明的肽的核酸分子导入宿主细胞中。在真核细胞中, 根据系统需要表达系统可以是瞬时的 (如附加型) 或长期的 (染色体整合)。

[0182] 编码载体可包括编码控制序列的序列, 所述控制序列如信号肽或前导序列, 视需要, 例如用于将翻译的多肽分泌入内质网腔、细胞周质间隙或胞外环境中的信号肽或前导序列。这些信号可以是肽内源性的或可以是异源信号。可通过细菌宿主翻译后加工除去前导序列。

[0183] 除控制序列之外, 添加供相对于宿主细胞生长调节多肽表达之用的调节序列可能是合乎需要的。调节序列是载体的那些非翻译区, 如增强子、启动子以及 5' 和 3' 非翻译区。这些非翻译区与宿主细胞蛋白相互作用以执行转录和翻译。调节序列的例子是响应于化学或物理刺激包括调节化合物的存在或不同的温度或代谢条件而导致基因表达增加或减少的那些序列。在插入载体之前可将控制序列和其他调节序列与核酸编码序列连接。或者, 可将编码序列直接克隆入已包含控制序列和适合的限制酶切位点的表达载体中。

[0184] 根据本发明的核酸分子还可用于创建转基因动物, 尤其是啮齿动物。这样的转基因

因动物构成了本发明的另一方面。其可通过对体细胞修饰或通过种系治疗掺入可遗传的修饰而局部地进行。这样的转基因动物可特别用于产生供能有效作为本发明的肽的调节物的药物分子使用的动物模型。

[0185] 宿主细胞

[0186] 在第五方面,本发明提供了一种用本发明第四方面的载体转化的宿主细胞。可用本发明的载体转化、转染或转导的本发明的宿主细胞可以是原核或真核的。

[0187] 为了长期、高产量地产生重组肽,优选稳定的表达。适合于作为用于表达的宿主的可获得哺乳动物细胞系的例子是本领域已知的,包括许多可获得自美国典型培养物保藏中心(ATCC)的永生化细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)、HeLa、幼仓鼠肾(BHK)、猴肾(COS)、C127、3T3、BHK、HEK 293、Bowes 黑素瘤和人肝细胞癌(如 Hep G2)细胞。

[0188] 更优选的系统为杆状病毒系统(以试剂盒形式尤其市售自 Invitrogen, San Diego CA)。这些技术是本领域技术人员通常知道的,并且完整地描述于 Summers 和 Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987)中。特别适用于该系统的宿主细胞包括昆虫细胞如果蝇 S2 和夜蛾 Sf9 细胞。

[0189] 本领域中已知许多植物细胞培养物和全植物遗传表达系统。适合的植物细胞遗传表达系统的例子包括描述于 US 5,693,506;US5,659,122 和 US 5,608,143 中的那些表达系统。在植物细胞培养物中遗传表达的另外的例子已为 Zenk, (1991) Phytochemistry 30, 3861-3863 所描述。

[0190] 特别优选的细菌宿主细胞的例子包括链球菌、葡萄球菌、大肠杆菌、链霉菌和枯草杆菌细胞。特别适合于真菌表达的宿主细胞的例子包括酵母细胞(如酿酒酵母(*S. cerevisiae*))和曲霉细胞。

[0191] 表达方法

[0192] 根据本发明第六方面,提供了一种表达根据本发明第一方面的任何一个实施方案的肽、抗体或等价配体的方法,所述方法包括在宿主细胞中表达根据本发明第二或第三方面的核酸分子或根据本发明第四方面的载体。

[0193] 疾病治疗

[0194] 在第七方面,本发明提供了一种治疗患者中疾病的方法,包括给予患者本发明第一方面的肽、抗体或等价配体,或本发明第二或第三方面的核酸分子,或本发明第四方面的载体,或本发明第五方面的宿主细胞。本发明的该方面还提供了本发明第一方面的肽、抗体或等价配体,或本发明第二或第三方面的核酸分子,或本发明第四方面的载体,或本发明第五方面的宿主细胞在疾病治疗或诊断中的应用。

[0195] 适于以该方式治疗或诊断的疾病的特征在于存在具有针对 GPI 链表位的反应性的自身抗体,该抗体还优选反应性针对抗-TCR $\gamma\beta$ 抗体、具有信号传导能力的分子、包括磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸和心磷脂(二酰基甘油)的磷脂、及磷脂聚糖、胰岛素作用的第二信使、单链和双链 DNA 以及 GPI-链元件中的表位。这些自身抗体已为本申请人所鉴定,并且认为体内存在这样的抗体能加速老化和老化伴随病、促进癌症、无论是否基于遗传易感性都介导疾病表现并干扰针对感染物的一线防御。因此,这样的抗体的存在就成为了所有适合于根据本发明的治疗或诊断的疾病的共同因素。许多这些病症归入胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)、非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)、器官或非器官特异性自身免疫性疾病、心血管

疾病、癌恶病质和癌或任何其他存在抗磷脂抗体和 / 或高胰岛素血症和 / 或高血糖素血症和 / 或葡萄糖不耐症和 / 或胰岛素抗性的疾病的一般定义中。一些这些病症描述于下 ; 然而, 应当指出地是所列的这些疾病仅作为举例而不在于穷举。

[0196] 适于以该方式治疗或诊断的疾病包括但不限于 I 型糖尿病、II 型糖尿病、牛皮癣、湿疹、白癜风、黑棘皮症、斑秃、阿尔茨海默病、精神分裂症、抑郁症、帕金森病、偏头痛, 多发性硬化、重症肌无力、肌萎缩性脊髓侧索硬化症和其他运动神经元病症、进行性核上性麻痹、皮克病及其他神经变性病、甲状腺病、2A 和 B 型多发性内分泌瘤、柯兴氏综合征 (Cushing's syndrome)、阿狄森氏病 (Addison's disease)、多囊卵巢综合征、性腺机能减退、男性早年脱发、肥胖症、X 综合征、复发性流产 (recurrent foetal wastage)、复发性自发流产、复发性血栓形成、全身性红斑狼疮、腹腔病、自身免疫性胃病、炎性肠病、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、哮喘、囊性纤维化、骨质疏松和骨质减少、扁平苔藓、粘膜白斑病、再生障碍性贫血和其他贫血、阵发性夜间血红蛋白尿、睡眠呼吸暂停、失眠、癌症、人免疫缺陷病毒 (HIV)、感染和免疫调节疾病。

[0197] 对人患者的试验已显示根据本发明的肽能成功地用于改善口服葡萄糖耐量 (参见实施例 6) 和糖尿病患者中的自发血糖调节 (参见实施例 7)。因此, 适于根据本发明治疗或诊断的疾病包括但不限于, 与葡萄糖不耐症有关的疾病 (即与口服葡萄糖耐量测试中的异常应答有关) 和与自发血糖调节丧失或退化有关的疾病。

[0198] 合适的治疗方法可包括使用能主动或被动地除去有问题的自身抗体或破坏靶自身抗体产生细胞的上述肽或具有相同构型或三维结构的功能等价配体。根据本发明的该方面, 可单独或以具有或不具有接头元件和载体的单、双或多链形式与用来促进它们功效的试剂组合来使用肽。一种治疗方法是通过产生针对这些自身抗体的反作用抗体, 使得所产生的抗体与自身抗体结合, 并因此阻止自身抗体识别它们的靶细胞或分子或复合物, 从而有助于除去自身抗体或切断这些自身抗体的产生。

[0199] 或者, 反作用抗体或等价配体可用于被动治疗并可来源于导致多克隆或单克隆抗体产生的动物免疫接种, 或来源于人 B 细胞的无限增殖化, 人单克隆抗体, 或通过筛选文库获得。这样的抗体和等价配体的产生描述如上。

[0200] 其他治疗方法可利用耐受诱导的原理如克隆排除、无反应性、产生抑制或反抑细胞, 使用与自身抗体以会产生抑制细胞、反抑细胞、克隆排除或其他导致阻止相关自身抗体形成或释放的机制的方式反应的本发明的肽或这样的肽的最小反应单位或肽反作用抗体以阻止自身抗体形成和 / 或分泌。这些方法可包括使用为自身抗体或代表这些自身抗体及其序列的单克隆抗体及其片段所识别的肽。还可通过包括本发明的肽的竞争性或非竞争性抑制剂阻止自身抗体与它们的靶相结合。此外, 在血浆除去类型的操作中, 靶分子或这样的分子的最小反应单位可用于与基质连接以选择性除去相关的自身抗体。

[0201] 还通过用来阻止本发明的肽或等价配体与细胞或分子上有关靶位点结合的竞争性或非竞争性抑制剂阻止自身抗体与它们的靶相结合。

[0202] 所述肽或保留功效的其 RNA 和 cDNA 衍生物或变体或其产物利用了与本文所述相同的作用机制的其他序列可用于在此教导的上下文中, 并可用适合的载体来包装作为疫苗。

[0203] 适于根据本发明治疗或诊断的疾病详述如下。

[0204] I 和 II 型糖尿病

[0205] I 型糖尿病与位于人白细胞抗原 HLA-DQ 基因座中的遗传易感性非常相关。尽管超过 90% 的 I 型糖尿病患者携带有发病诱因 DQ8 和 / 或 DQ2 等位基因^(8,9), 但仅有少数易感个体发展为临床疾病。即使在同卵双生中, 同病率也仅为 50%⁽¹⁰⁾。在 I 型糖尿病的发病机制中环境因素起着重要的作用⁽¹¹⁾。

[0206] 临床前期对胰岛中 β 细胞损害的特征在于出现糖尿病有关的自身抗体。大多数研究的抗体是针对胰岛素 (IAA)⁽¹²⁾ 的抗体, 针对谷氨酸脱羧酶 (GADA)⁽¹³⁾ 的抗体, 针对蛋白酪氨酸磷酸酶相关 IA-2 分子的抗体⁽¹⁴⁾ 和细胞质胰岛细胞抗体⁽¹⁵⁾。

[0207] 近来报道的对芬兰人的研究, 即对在具有遗传易感性的 3 个月到 2 岁儿童中上述命名的糖尿病相关抗体的出现的研究揭示了从 6 个月起血清转化就稳步增加, 并且与春夏相比在秋冬月份出现明显更高比例的血清转化。这种自身抗体增加和糖尿病诊断的季节变化已被认为可归因于在这些月份中感染严重⁽⁹⁾。在该研究中, 儿童中检测到的第一个自身抗体是针对胰岛素 (IAA) 的抗体, 由于作者推断在大多数自身免疫 I 型糖尿病病例中, 胰岛素可能是主要的自身抗原。所提出的支持该设想的观察资料是胰岛素是所真正知道的唯一 β 细胞特异性自身抗原, 其次 IAA 在新诊断为 I 型糖尿病的儿童中非常常见, 再次可通过胰岛素反应性 T 细胞在实验上转移 I 型糖尿病^(16,17)。

[0208] 业已认为抗胰岛素反应性的发生是基于抗原模拟; 然而, 迄今为止并不存在与将传染物与胰岛素反应性抗原性相联系的实验数据。在系统阐述关于该疾病病因的观点中, 在 I 型糖尿病诊断之前或在新诊断 I 型糖尿病患者中所记录的关键的观察资料却被忽视了。这样的观察资料是在诊断显示在新诊断的 I 型糖尿病患者中对 β 细胞应激、外周胰岛素抗性和反调节激素如胰高血糖素分泌障碍之前增加的胰岛素原对免疫反应性胰岛素比率⁽¹⁸⁻²⁰⁾。这些观察资料证实 I 型糖尿病患者前进中的疾病过程在 β 细胞死亡中达到了顶点。相同的升高的胰岛素原对胰岛素比率、胰岛素抗性和受损的胰高血糖素分泌分布图的异常性也适用于 II 型糖尿病^(21,22)。此外, 这两种疾病都具有类似的并发症分布。

[0209] 已基于新鉴定的具有广谱交叉反应特异性的自身抗体, 提出了涵盖前驱糖尿病患者和后期糖尿病患者现象的对于诱导 I 和 II 型糖尿病的统一假设。表明指示该自身抗体来源的其关键特异性是针对抗 TCRV β 链抗体的反应性。产生的针对单克隆抗 TCR V β 抗体的单克隆抗体被用作为类似特异性的自身抗体可能的作用的指示物。这样的针对抗-TCR V β 试剂的单克隆抗体具有体外失调人胰岛的胰岛素分泌的能力, 造成分泌过多继之以分泌不足的循环直至胰岛细胞停止分泌。

[0210] 这些针对抗-TCR V β 抗体的单克隆抗体被用于筛选人 λ gt11 cDNA 文库以及鉴定的尤其编码 GP-2 蛋白 (糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 连接的分子)、分泌粒蛋白 I (一种黏着蛋白, 丝氨酸磷酸化的、酪氨酸硫酸化的、O-糖基化的双联体, 其通过 N-末端二硫键合的环肽与细胞膜结合)、层粘连蛋白结合蛋白 (转移有关的 67kD、脂肪酸酰化的黏着蛋白)、ESRPI (一种新鉴定的 N-末端二硫键合的分子) 的克隆。这些分子具有信号传导特性。

[0211] 所述单克隆抗体强烈地染色了人胰岛 α 细胞, 许多其他内分泌器官包括甲状腺、肾上腺、胃、肠和其他组织如肌肉和结缔组织中的细胞。通过筛选针对抗-TCR V β 单克隆试剂和心磷脂 (用作为磷脂的指示物), 选择产生单克隆抗体的克隆。来自具有上述交叉反应特异性的克隆的上清液还显示能与其他阴离子磷脂如磷脂酰肌醇和磷脂酰丝氨酸反应;

它们还与单链和双链 DNA 反应。

[0212] 认为与抗-TCR-V β 试剂反应的自身抗体也具有相同的如上交叉反应性,并因此造成与证实的单克隆抗体类似特异性一样的胰岛素分泌失调。这些抗体失调胰岛素分泌的机制被认为归因于由导致了增加的胰高血糖素分泌的 α 细胞失调所引起的增加的对 β 细胞分泌胰岛素的压力。胰高血糖素对胰岛素分泌的加强效应是众所周知的。通过添加胰高血糖素、 α 细胞或 cAMP 增加了单独的 β 细胞的胰岛素分泌⁽⁶⁾。自身抗体通过与 GPI- 链的肌醇磷酸聚糖部分结合能阻止通过胰岛素激活的磷脂酶对其的切割以及因此对其信号传导特性的影响。业已充分地描述了这样的分子的信号传导特性^(5,23)。通过与磷酸肌醇聚糖相同容量的结合,自身抗体能全程介导胰岛素作用并因此造成胰岛素抗性或受损的胰岛素作用。在胰岛素抵抗人群中已证实肌醇磷酸聚糖的不足产生 / 释放⁽²⁴⁾。

[0213] 牛皮癣

[0214] 牛皮癣是一种与糖尿病有关的疾病^(25,26);具有正常体重或过重以及没有遗传的糖尿病素因的牛皮癣患者是胰岛素抵抗的⁽²⁷⁾。在 2 小时 OGTT 期间,与对照相比具有正常血浆葡萄糖的牛皮癣患者具有明显更高的胰岛素水平⁽²⁸⁾。在同一研究中,与对照相比,在 15 分钟静脉胰岛素耐量试验期间的葡萄糖消失率证实了牛皮癣患者的胰岛素抗性状态。牛皮癣中高位值的胆固醇、甘油三酯和降低的 HDL- 胆固醇被证实与伴有高胰岛素血症和胰岛素抗性的血脂障碍一致⁽²⁹⁾。还已报道在导致牛皮癣患者皮肤中 GPI- 连接的分子预期减少并在牛皮癣患者皮损中实际上消失的牛皮癣中磷脂酶 C/ 蛋白激酶信号传导系统的活动过度⁽³⁰⁾。

[0215] 湿疹

[0216] 在湿疹患者中葡萄糖耐量受损。通过静脉葡萄糖耐量试验研究了 39 位患者,显示显著水平的葡萄糖不耐症⁽³¹⁾。

[0217] 白癜风

[0218] 白癜风是一种获得性黑素减少病,在大多数病例中相应地具有黑素细胞损失。尽管位于表皮基底层中的黑素细胞产生称为黑素体的包含黑色素的细胞器,但角质化细胞也涉及提供抗氧化分子给黑素细胞以及提供黑色素合成中的辅因子⁽³²⁾。

[0219] 虽然只在 1% 的人群中出现白癜风,但白癜风却在 9% 的 IDDM 患者中出现⁽³³⁾。白癜风还与其他自身免疫性疾病如自身免疫性甲状腺炎、恶性贫血、血小板减少等同时存在。

[0220] 一种影响皮肤色素沉着的因子是 α - 促黑素细胞激素 (α -MSH)。 α -MSH 与其受体的结合增加了酪氨酸酶活性和真黑素产生⁽³⁴⁾。 α -MSH 产生受胰岛素水平影响并与胰岛素抗性、空腹胰岛素水平以及体重指数直接相关⁽³⁵⁾。在 α -MSH 影响下黑素体由黑素细胞中外排并通过丝足转移到角质化细胞中^(36,37)。然而,已显示白斑皮肤中存活的黑素细胞异位外排前黑素体⁽³⁸⁾,表明白癜风中黑素体成熟和细胞外排的调节异常。前黑素体外排与前 IDDM⁽¹⁸⁾ 和 NIDDM⁽²¹⁾ 的高前胰岛素血症相类似,并类似于糖尿病中的 β - 细胞应激。

[0221] 转化生长因子 β 1 (TGF β 1) 通过下调节酪氨酸酶也在黑素生成中起作用,并因此导致色素沉着不足⁽³⁹⁾。 TGF β 还阻断了 α -MSH 引起的黑素体数量增加。在流行于致糖尿病状态中的高葡萄糖环境下 TGF β 上调⁽⁴⁰⁾。 TGF β 1 还深深地影响了提供辅因子给黑素细胞的角质化细胞。角质化细胞在其表面上具有 TGF β 结合受体,并且 TGF β 结合蛋白是一种 150kDa GPI- 连接的分子。已显示针对该分子的抗体能结合所有 TGF β 结合蛋白,表

明该 150kDa GPI- 连接的受体与其他 TGF β 受体形成异聚复合物。角质化细胞通过下调其受体并抑制 DNA 合成而响应 TGF β ⁽⁴¹⁾。因此,针对这样的信号传导分子的 GPI- 链的自身抗体能破坏角质化细胞正常运行所需的信号传导事件。

[0222] 在白斑皮肤的表皮中,在皮损和皮损周围膜辅蛋白衰变加速因子 CD59 的表达低于非皮损皮肤。CD59 是一种保护以免自体补体溶胞的 GPI- 连接的分子,其缺乏或下调(归因于本文中所述的自身抗体)可能与白癜风中抗黑素细胞和补体介导的黑素细胞破坏有关 ⁽⁴²⁾。

[0223] 黑棘皮症

[0224] 白癜风和黑棘皮症类似于 IDDM 和 NIDDM,黑棘皮症为色素沉着过多状态(类似于 NIDDM 的高胰岛素血症),而白癜风则为色素沉着不足状态(类似于 IDDM 的血内胰岛素不足)。遗传因素解释了这两种呈现状态,它们都是由导致高胰岛素血症和胰岛素抗性的基本因素所引起的。黑素细胞通常易感于应激因素如由于增加的胰岛素而增加的 α -MSH 而能取消或减少黑素形成,而该易感性的遗传缺乏则能导致色素沉着过多。

[0225] 黑棘皮症患者具有高发病率异常葡萄糖耐量和高胰岛素血症 ⁽⁴³⁾。肥胖青少年中黑棘皮症也常伴随由高胰岛素血症和胰岛素抗性 ⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾。对 102,733 位经筛选的 8-15 岁儿童的数据报道显示 14.4% 患有黑棘皮症。对于改善该疾病,减少胰岛素抗性和高胰岛素血症的措施被认为是重要的 ⁽⁴⁷⁾。

[0226] 皮肤

[0227] 老化皮肤与增加的弹性蛋白酶活性、增加的基质金属蛋白酶表达以及胆固醇酯酶合成异常相关 ⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾。GPI- 连接的蛋白聚糖存在于角质化细胞的细胞外周区域,调节生长因子可用性并作为基质受体 ⁽⁵¹⁾。GPI- 连接的尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂受体 (uPAR) 也存在于角质化细胞上并结合角质化细胞分泌的 uPA。在伤口愈合期间以及在自身免疫起疱皮肤疾病一天疱疮中已观察到尿激酶系统的激活。紫外线 B 激活该系统,效果能持续长达 36 小时 ⁽⁵²⁾。当 uPAR 为针对在关节炎和相关疾病中已描述的 GPI- 链元件的抗体所损害时,能引起伤害。胰岛素对弹性蛋白酶和基质金属蛋白酶表达的作用是众所周知的 ^(53,54)。可以设想本发明的抗体能在促进老化、UV 和自身免疫有关的皮肤疾病以及延迟伤口愈合中起作用。

[0228] 斑秃

[0229] 其是一种可疑的自身免疫性疾病,影响着大约 1% 的 50 岁人群。在儿童和青壮年中发病率达到最高点 ⁽⁵⁵⁾。斑秃与多种特应性和自身免疫性疾病有关。在斑秃患者中糖尿病没有增加,但在亲属中却大大增加 ⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾。在早发性脱发男性中进行的研究揭示与胰岛素抗性有关 ⁽⁵⁹⁾。

[0230] 提出遗传易感个体中各种形式的脱发是胰岛素抗性的另一种表现形式,并且还是为本发明所覆盖的疾病范围中的一部分。

[0231] 阿尔茨海默氏病

[0232] 阿尔茨海默氏病与胰岛素抗性及相关葡萄糖耐量的特征有关。在 532 位没有载脂蛋白 E4 等位基因的非糖尿病受试者中,在高胰岛素血症患者中阿尔茨海默氏病的发病率为 7.5%,与之相比在正常胰岛素血症患者中为 1.4% ⁽⁶⁰⁾。

[0233] 由于还原糖与在老化期间以及在糖尿病中加速出现的游离氨基的非酶共价连接

形成了晚期糖基化终末化产物 (AGEs)。AGEs 改变了受累分子的理化性质,并且还诱导有助于糖尿病并发症和阿尔茨海默氏病的细胞信号传导和基因表达⁽⁶¹⁾。

[0234] 阿尔茨海默氏病和 II 型糖尿病都与淀粉样蛋白 (胰岛中的胰岛淀粉样多肽 (支链淀粉 (amylin)) 和阿尔茨海默氏病人大脑中的淀粉样 β -蛋白) 的沉淀有关。正常情况下胰岛素降解酶 (IDE) 降解支链淀粉和淀粉样 β -蛋白。这两种淀粉样蛋白的 IDE 缺陷降解显示具有共同的发病机制^(62,63)。通过 GPI- 链连接的蛋白也有助于阿尔茨海默氏病中的神经变性。与无痴呆老年患者相比,在阿尔茨海默氏病患者的额皮质和海马中补体防御蛋白 CD59 显著减少。与无痴呆患者相比,来自阿尔茨海默氏病患者大脑皮质切片的 PIPLC 所释放的 CD59 明显更少。发现淀粉样 β -蛋白下调 CD59⁽⁶⁴⁾。针对 GPI- 链的自身抗体可导致该下调并增加神经元对补体裂解的易感性。

[0235] 另一种 GPI- 连接的蛋白是在体细胞和与边缘结构有关的大脑成熟神经元亚群的树突中表达的边缘相关的膜蛋白 (LAMP)。在大脑皮层中, lamp 转录物在与学习和记忆有关的区域中丰度更高,并在传统地认为是边缘的前脑和间脑区域中高表达,而在非边缘的中脑和后脑区域中低表达。通过原位杂交技术,已显示该现象存在于成人大脑中⁽⁶⁵⁾。基于抗-GPI 自身抗体的这些 LAMP 分子的下调或失调可能与阿尔茨海默氏病或其他涉及学习和记忆的衰老有关的精神机能不全中认知功能的丧失有关。

[0236] 组织蛋白酶 D (一种 GPI- 连接的 (天冬氨酸蛋白酶) 溶酶体酶⁽⁶⁶⁾) 在阿尔茨海默氏病中也起作用。与非阿尔茨海默氏病对照相比,在阿尔茨海默氏病患者的额皮质中组织蛋白酶 D 似乎是下调的⁽⁶⁷⁾。在该酶缺陷的小鼠中,组织蛋白酶 D 缺陷的某些效应是神经元蜡样脂褐素的大量累积、肠粘膜和淋巴样器官萎缩,因此认为组织蛋白酶 D 对组织稳态是不可缺少的⁽⁶⁸⁾。

[0237] 作为 GPI- 连接的分子的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPG) 遍布于基底膜和细胞膜上,并已显示与阿尔茨海默氏病有关。一种这样的 HSPG, 磷脂酰肌醇聚糖 -1, 在大脑淀粉样血管病和阿尔茨海默氏病中富表达⁽⁶⁹⁾。在阿尔茨海默氏病患者大脑中, HSPG 已定位于存在于神经斑块和嗜刚果红样 (congoophilic) 血管病的淀粉样原纤维处。在原始斑块中还证实存在 HSPG, 因此认为它们在斑块发生早期中起作用⁽⁷⁰⁾。在从大脑中除去过量的胆固醇中, HSPG 与 HDL 和 Apo E 相互作用⁽⁷¹⁾, 有助于大脑中血管的完整性。老年斑常见于毛细血管附近, 因此认为血脑屏障的破裂可能是斑块形成的先决条件⁽⁷²⁾。血管损伤是阿尔茨海默氏病的重要致病因素, 并与本发明中所描述的病原性抗体的作用相一致。

[0238] 最后, 在老化的大脑中改变的葡萄糖 / 能量代谢和如在 II 型糖尿病中神经元胰岛素受体 (胰岛素抗性) 的脱敏以及信号传导和亲神经分子的失调一起促进了阿尔茨海默氏病受累神经元中淀粉样蛋白产生级联和高度磷酸化的微管相关蛋白以及神经原纤维缠结的发生。

[0239] 精神分裂症和抑郁症

[0240] 由于脑内葡萄糖代谢异常以及胰岛素抗性, 因此业已将精神分裂症描述为 ‘脑性糖尿病’^(73,74)。与正常人群相比, 在该组疾病人群中葡萄糖不耐症和 II 型糖尿病更为常见 (The British Journal of Psychiatry (2004) 184 :s112-S114) (Diabetes Care 28 : 1063-1067, 2005)。躁狂症和阳性精神分裂症与高血糖、高多巴胺能和高 5-羟色胺能有关, 而抑郁症和阴性精神分裂症则与低血糖、低多巴胺能和低 5-羟色胺能有关。这两种状态是

相对立的疾病类型⁽⁷⁴⁾。在大约 50% 的内源性抑郁症患者中,胰岛素抗性和疾病持续时间之间存在着正相关。这样的患者也分泌过多的皮质醇⁽⁷⁵⁾。

[0241] 帕金森病

[0242] 帕金森病 (PD) 表现为在黑质中进行性损失 70-80% 的多巴胺能神经元的特征⁽⁷⁶⁾。神经元变性被认为归因于高水平多巴胺所致的氧化应激⁽⁷⁶⁾。对 PD 患者死后脑组织的研究提供了在神经元群中增加的氧化应激和受损的葡萄糖摄取的证据⁽⁷⁷⁾。

[0243] 已报道 50% -80% 的 PD 患者具有异常葡萄糖耐量⁽⁷⁸⁾。该结果导致高血糖和因此所致的高胰岛素血症。已知胰岛素在神经元代谢和信号传递中起重要的调节作用。注射渐增量的胰岛素到大鼠中,显示导致增加的多巴胺分泌⁽⁷⁹⁾。此外,已证明胰岛素调节多巴胺转运蛋白的合成和活性⁽⁸⁰⁾,并且发现来自胰岛素 β 链 C 末端的九肽强烈抑制通过大鼠多巴胺转运蛋白的多巴胺摄取⁽⁸¹⁾。这样的转运蛋白分子通过清除突触间隙神经递质终止多巴胺能信号传导。已知多巴胺自身通过直接释放肝细胞葡萄糖产生高血糖⁽⁸²⁾。这能有助于 PD 患者中的异常葡萄糖耐量。

[0244] 业已显示脑和神经胶质细胞系来源的神经营养因子是一种 PD 中变性的多巴胺能神经元以及在包括肌萎缩性脊髓侧索硬化、睡眠障碍、精神分裂症和阿尔茨海默氏病的其他神经系统疾病中变性的其他交感神经、感觉和中枢神经系统神经元的有效存活因子。在体外系统中,神经胶质细胞衍生的神经营养因子 (GDNF) 将多巴胺诱导的细胞死亡减少了 60-70%⁽⁸³⁾。

[0245] 还已显示一种称为 neurturin (NTN) 的在结构上有关的多肽是多巴胺能、运动、交感神经和感觉神经元的有效存活因子。GDNF 受体 (GDNFR- α) 和 NTN 受体 (NTNR- α) 都是享有跨膜酪氨酸激酶受体 Ret 的 GPI- 连接的蛋白⁽⁸⁴⁾。针对这些受体蛋白的 GPI- 链元件的自身抗体能失活它们的信号传导活性,并因此消除它们的神经营养能力。

[0246] 偏头痛

[0247] 在偏头痛中已注意到抗磷脂抗体和异常葡萄糖调节^(85,86)。

[0248] 多发性硬化

[0249] 在对 357 位 MS 患者从 MS 临床到确定 MS 与其他自身免疫性疾病关系的连续研究中,发现 15.4% 的患者的 MS 和其他自身免疫性疾病具有一度相关。格雷夫症、类风湿性关节炎、白癜风、1 型胰岛素依赖型糖尿病和葡萄膜炎是最常见的与 MS 相关的自身免疫性疾病⁽⁸⁷⁾。

[0250] 来自糖尿病和 MS 患者的自身反应性 T 细胞应答于经典的胰岛和 CNS 自身抗原。在 T 细胞增殖测试中,38 位 MS 患者的大约 90% 应答于髓鞘碱性蛋白 (MPB)。对前胰岛素和 IA-2 胰岛细胞自身抗原的应答几乎与糖尿病中的一样常见,并且与 MPB 应答具有相同的量级⁽⁸⁸⁾。这些应答在对照中非常少。对 54 位新诊断的糖尿病儿童患者的 T 细胞应答研究显示 53% 的应答于 MPB⁽⁸⁸⁾。尽管这些重叠的 T 细胞应答并不指示另一种临床疾病,但是它们强烈暗示这两种疾病具有相同的机制。

[0251] MS 患者具有显示涉及胰高血糖素和皮质醇的受损葡萄糖反调节应答的增加到空腹低血糖的易感性⁽⁸⁹⁾。业已描述的血胰岛素原过多的机制和 MS 患者具有针对胰岛素原的 T 细胞应答的事实显示 MS 患者中普遍存在亚临床 β 细胞受损。相同的识别抗-TCR $V\beta$ 和 GPI- 连接的分子的自身抗体能通过细胞膜 α 细胞失调引起 β 细胞受损,并通过在少

突神经胶质细胞成熟过程中被分选到髓鞘的 GPI- 锚定蛋白损伤髓鞘⁽⁹⁰⁾。

[0252] 重症肌无力

[0253] 已报道重症肌无力 (MG) 是一种 I 型和 II 型自身免疫性多内分泌腺综合征的构成疾病^(91,92)。认为针对乙酰胆碱受体 (ACHR) 和乙酰胆碱酯酶的抗体在 MG 发病中起作用^(93,94)。然而,存在着对这些抗体血清反应阴性的全身性 MG 患者,因此显示有其他自身抗体或因子涉及疾病诱发。在全身性 MG 中,业已报道了增加的 DNA 自身抗体水平⁽⁹⁵⁾,并且还已注意到在 MG 患者中高水平的狼疮抗凝物抗体⁽⁹⁶⁾。

[0254] MG 是一种涉及乙酰胆碱 (ACH) 结合至 ACHR 的神经肌肉接头疾病。乙酰胆碱酯酶分解乙酰胆碱,从而释放受体用于重新占位和信号传递。ACH 和乙酰胆碱酯酶都易感于通过胰岛素和葡萄糖水平的调节。已报道了在大鼠脑中胰岛素诱导的低血糖导致乙酰胆碱酯酶活性显著降低⁽⁹⁷⁾。在高血糖大鼠脑中,乙酰胆碱水平降低;而胰岛素增加了这些水平⁽⁹⁸⁾。在糖尿病大鼠中,还存在增强的乙酰胆碱受体脱敏⁽⁹⁹⁾。

[0255] 从本发明的观点来看,识别信号传导分子、DNA 和磷脂的自身抗体通过失调葡萄糖代谢和信号传导分子是造成 MG 中神经肌肉异常的原因。乙酰胆碱酯酶是 GPI- 连接的⁽¹⁰⁰⁾并且可由于这些分子而失调,导致增加的 ACH 水平,从而损害了 ACH 受体。已显示亲胆碱能神经元因子受体 (其也是 GPI- 连接的) 的表达与糖尿病神经病变有关⁽¹⁰¹⁾。在血清阳性的 MG 患者肌肉中该受体减少⁽¹⁰²⁾,表明在 MG 和糖尿病神经病变之间存在相似的病因。

[0256] 肌萎缩性脊髓侧索硬化、运动神经元及相关疾病

[0257] 显著比例的肌萎缩性脊髓侧索硬化 (ALS) 患者是不耐葡萄糖。然而,争论在于其是代谢异常为主还肌肉萎缩为次。对于疾病和体重的 ALS 患者及两个对照组中的正常血胰岛素钳夹研究揭示了与这两个对照组相比,在 ALS 中胰岛素敏感性降低⁽¹⁰³⁾。还已证实与对照相比,在 ALS 患者中异常的血浆胰高血糖素水平。与对照相比,1 周间隔给予两种试验餐的患者显示在空腹及餐 1/2 和 2 小时具有高血糖素血症⁽¹⁰⁴⁾。已报道许多 ALS 患者具有 II 型糖尿病的特征⁽¹⁰⁵⁾。

[0258] 还已报道了与糖尿病慢性并发症相关的晚期糖基化终末化产物 (AGEs) 在神经变性疾病如进行性核上性麻痹、皮克病、关岛人 (Guamanian) 肌萎缩性脊髓侧索硬化 / 帕金森氏痴呆复合症发病中起作用⁽¹⁰⁶⁾。已知运动神经元的存活和生长依赖于神经营养因子。对于运动神经元,胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 和神经胶质细胞衍生的神经营养因子 (GDNF) 是有效的神经营养 / 存活因子⁽¹⁰⁷⁾。缺少营养因子被认为导致了成熟神经元的变性。尽管发现在 ALS 患者中一些 IGF- 结合蛋白增加,但是血清 IGF-1 和胰岛素水平显著减少⁽¹⁰⁸⁾。因此,对于运动神经元的存活和生长而言,改善葡萄糖 / 胰岛素 / 胰高血糖素代谢会有着重重要的意义。

[0259] 除胰岛素和 IGF-1 之外, GDNF 和 neurturin 对神经元存活还具有有效的作用。GDNF 促进体内和体外运动神经元存活并将它们从细胞死亡中拯救出来。在人骨骼肌,特别是在神经肌肉接头中 GDNF 最高表达。还在末梢神经的轴突和周围许旺细胞中检测到了 GDNF⁽¹⁰⁹⁾。已通过免疫组织学将 GDNF 受体 -GFR α -1 定位于有髓末梢神经和神经肌肉接头处。RT-PCR 分析也显示 GFR α -1 的 mRNA 存在于脊髓前角中,但不存在于骨骼肌中,暗示在神经肌肉接头处该分子在 GDNF 摄取和内在化中起重要作用⁽¹¹⁰⁾。Neurturin (一种与 GDNF 有关的神经营养因子) 与其受体 GFR α -2 结合,还支持了神经元存活⁽¹¹¹⁾。迄今为止所有

鉴定的结合 GDNF 家族配体的 GFR α 1- α 4 受体都是通过 Ret 与 Src 家族激酶成员相互作用而 GPI- 连接及发信号的,且为轴突向外生长和存活所必需的⁽¹¹²⁾。

[0260] 已暗示遗传因素与神经变性和非-MHC 基因有关⁽¹¹³⁾。因此,可以预料在遗传危害的个体中,抗 GPI- 链元件抗体能足以改变 GPI- 连接的分子的信号传导以阻止神经细胞存活。

[0261] 甲状腺疾病

[0262] 甲状腺疾病覆盖了从格雷夫症中发现的分泌过多到在桥本甲状腺炎中的分泌不足的疾病范围。在糖尿病患者中甲状腺疾病发病明显增加。在随机选择的 1310 位糖尿病成人患者组中,通过测定游离的甲状腺素和促甲状腺激素 (TSH) 浓度评估甲状腺疾病。在 I 型糖尿病女性患者中总发病率为 13.4%,最高水平达 31.4%⁽¹¹⁴⁾。

[0263] 甲状腺激素合成步骤和分泌受 TSH 调节。该调节功能包括经肌醇磷酸聚糖 (IPG) 第二信使的信号传导。TSH 刺激 IPG 极性首基的释放。已显示该可溶性 IPG 调节甲状腺细胞中的碘代谢⁽¹¹⁵⁾。分离自猪甲状腺细胞的 IPG 诱导成纤维细胞和猪甲状腺细胞增殖⁽¹¹⁶⁾。

[0264] 甲状腺细胞富含顶端和基底外侧分布的 GPI- 连接的分子⁽¹¹⁷⁾。某些 GPI- 连接的分子如 HSPGs 与从甲状腺细胞的滤泡内腔到基底外侧膜的甲状腺球蛋白 (Tg) 转运有关,该转运使得 Tg 被释放到血流中。甲状腺球蛋白通过与巨蛋白结合位点功能性相关的位点与表面 HSPG 相互作用。巨蛋白是一种通过上皮细胞转运 HSPG 结合的 Tg 的低密度脂蛋白胞吞受体^(118,119)。

[0265] 涉及 HSPG 和其他基底膜成分的免疫组织化学研究揭示了桥本甲状腺炎、透明样化柱状腺瘤、乳头状癌和未分化癌以及其他甲状腺病的组织病理学变型中的病理基底膜改变⁽¹²⁰⁾。一个 GPI- 连接的分子 (GFR α 1-4) 家族是针对神经胶质细胞系衍生的神经营养因子 (GDNF) 的受体。这些分子存在于常见的和甲状腺肿瘤中,存在于甲状腺髓样瘤 (GFR α 4)、嗜铬细胞瘤、甲状旁腺增生、肠神经节瘤、骨骼异常 (skeletal abnormalities) 和粘膜神经瘤中,统称为多发性内分泌瘤病 2A 和 B 型⁽¹²¹⁾。

[0266] 柯兴氏综合征和阿狄森氏病

[0267] 柯兴氏病通常与葡萄糖不耐症、糖尿病、向心性肥胖、多毛症 (hirsutism) 以及升高的动脉血压有关。主要的诊断特征是皮质醇增多症,在 20-40% 的患者中该疾病可能是由长期 ACTH 分泌过多所引起的⁽¹²²⁾;其可在垂体腺瘤不存在下发生,并且增加的皮质醇分泌可能归因于具有或不具有自主分泌的小结节或大结节的单侧或两侧肾上腺增生⁽¹²³⁾。

[0268] 在近来对 90 位肥胖症和糖尿病患者的横向研究中,报道的柯兴氏综合征发病率为 3.3%⁽¹²⁴⁾。存在不良控制糖尿病的柯兴氏病的临床前和亚临床病例显著地增加了该数值。以类似的方式,已报道在 I 型糖尿病中升高的空腹皮质醇和尿游离皮质醇以及增加的对羊促皮质素释放激素的应答显示出轻度慢性皮质醇增多症⁽¹²⁵⁾。

[0269] 在垂体腺瘤不存在下,但在皮质醇增多症存在下,可出现 ACTH 分泌过多⁽¹²⁶⁾,暗示正常的负反馈控制失调。一些报道指出了在垂体激素分泌和刺激肾上腺、甲状腺、生殖腺等的激素分泌调节中通过激活磷脂酶 C 所释放的 GPI- 连接的分子和肌醇磷酸聚糖的作用⁽¹²⁷⁻¹²⁹⁾。因此,可以预料本文所述的自身抗体会具有从破坏激素脉冲式分泌到抑制或增加分泌并甚至形成肿瘤的致病效应,如同业已显示的针对 GPI- 连接的分子的抗体通过导致对激活信号抑制输入的丧失而诱导的细胞增殖^(130,131)。

[0270] 阿狄森氏病也是具有增加的发展为胰岛素依赖型糖尿病、白癜风、脱发、恶性贫血、腹腔病、重症肌无力和原发性性腺机能减退的危险性的 II 型自身免疫性多腺体综合征的组成疾病⁽⁹¹⁾。柯兴氏综合征和阿狄森氏病一起提供了另一个由自身抗体引起的内分泌过度刺激后果的例子。健康的内分泌腺会持续地过度分泌,而遗传危害的腺体则无法分泌,结果是分泌不足。

[0271] PCOS、性腺机能减退和男性早年脱发

[0272] 多囊卵巢综合征 (PCOS) 占 95% 的女性雄激素过多症,通常表现为多毛症、痤疮、向心性肥胖、男性型秃发和其他身体雄性化改变。除 PCOS 之外的鉴别诊断包括柯兴氏综合征和雄激素产生的卵巢和肾上腺赘生物。产生雄性征病症是最常见的内分泌病,影响 10-20% 的女性⁽¹³²⁾。

[0273] 雄激素过多症源于全身性类固醇生成失调,其可能是卵巢或肾上腺类固醇生成失调。该失调似乎源于控制激素作用的中枢和外周因素的调节。增加的 GnRH 和 LH 以及不足的 FSH 是导致 PCOS 中持续无排卵的诱发因素⁽¹³³⁾。然而,在遗传危害的个体中,高胰岛素血症似乎在触发类固醇生成调节的潜伏异常性中具有重要的作用。在男性型秃发中,在受危害的女性和男性中,胰岛素与雄激素相互作用以调节毛囊和有关的皮脂腺发育⁽¹³⁴⁾。

[0274] 在对 5 个家庭的研究中,检查了具有 PCOS 的受试者男性和女性家庭成员的胰岛素分泌疾病,发现在 24 位女性家庭成员中 69% 患高胰岛素血症,79% 具有 PCOS。在 8 位男性成员中,88% 具有早年脱发⁽¹³⁵⁾。

[0275] PCOS 中的高胰岛素血症与葡萄糖不耐症、增加的空腹胰岛素水平及胰岛素抗性有关。还存在致动脉粥样硬化脂质分布图。PCOS 患者显示具有增加的 II 型糖尿病和心血管疾病的发病率⁽¹³⁶⁾。

[0276] 胰岛素抵抗的妇女中雄激素过多症被认为归因于胰岛素对卵巢类固醇激素产生的刺激效应。胰岛素和胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 可通过增加卵巢细胞中关键的固醇调节基因的表达从而扩大绒毛膜促性腺激素刺激的一类固醇生成⁽¹³⁷⁾。胰岛素和 IGF-1 也与黄体激素协同作用以增加肾上腺中细胞色素 P450c17 的活性。胰岛素诱导对产生自培养的人粒层细胞的 IGF-1 结合蛋白 (IGFBP-1) 的抑制⁽¹³⁸⁾。IGF-1 水平和粒层细胞上 IGF-1 受体的减少降低了类固醇芳构化⁽¹³⁹⁾。雄烯二酮和睾酮至雌酮和雌二醇效率低的芳构化连同包括由于高胰岛素血症而在卵泡膜细胞中增加的一类固醇生成的其他因素一起导致了循环中过量的游离雄激素。此外,在与胰岛素一起培养的卵巢细胞中,与对照相比,孕酮浓度从 $2.5 \pm 0.2 \text{ ng/ml}$ 显著地增加到 $5.4 \pm 0.3 \text{ mg/ml}$ ⁽¹³⁸⁾。该激素与下丘脑脉冲发生器具有对刺激垂体前叶 LH 和 FSH 分泌的促性腺激素释放激素 (GnRH) 的反馈关系。相反地,促性腺激素分泌不足的性腺机能减退患者具有受损的胰岛素敏感性⁽¹⁴⁰⁾。

[0277] 除其中胰岛素发挥其调节作用的多个通路之外,GPI- 连接的分子也与排卵过程有关。粒层细胞富含 GPI- 连接的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPG)。标记试验证实细胞表面上 20-30% 的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖为 GPI- 连接的,且能通过磷脂酰肌醇特异性磷酸化酶 C 除去⁽¹⁴¹⁾。促卵泡激素 (FSH) 和人绒毛膜促性腺激素诱导的 GPI 浓度改变显示这些分子是激素敏感的⁽¹⁴²⁾。

[0278] 还显示促乳激素存在下粒层细胞上促乳激素受体的信号转导效应是借助于可溶性糖基磷脂酰肌醇部分的产生。在 FSH- 引发的粒层细胞中,促乳激素和 GPI- 部分阻止了

促性腺激素刺激的 3β -HSD 活性⁽¹⁴³⁾。 3β -HSD 将胆固醇转变到甾酮途径,因此负反馈机制受控于 GPI 部分。

[0279] HSPG 还具有抗凝效应并在排卵前表达于卵泡中,以及在排卵后于卵泡中短暂减少。它们与蛋白酶抑制剂相互作用,暗示它们涉及卵泡中纤维素沉积的控制⁽¹⁴⁴⁾。由于排卵需要组织重构和蛋白质水解,因此 HSPG 的破坏可能与排卵停止有关。

[0280] HSPG 还可在卵泡发育中起作用。对肝癌细胞系进行的研究证实外源性添加的 HSPG 被内在化并在细胞核中以游离链出现。这导致细胞停滞在 G1 期⁽¹⁴⁵⁾。由于针对这样的 GPI- 连接的分子的抗体,类似的生长发育失调可出现在卵泡细胞中。

[0281] 肥胖症

[0282] 胰岛素和来普汀向调节能量平衡和体重的下丘脑提供了协同信号。已显示增加的胰岛素水平刺激来普汀产生⁽¹⁴⁶⁾。来普汀受体位于也表达神经肽-Y(NPY) 和阿片-促黑素细胞皮质素原(POMC)的下丘脑神经元上。已显示增加的血浆来普汀抑制 NPY 产生,导致减少的食物摄入⁽¹⁴⁷⁾。来普汀还增加 α -促黑素细胞激素(α MSH)的 POMC 前体表达⁽¹⁴⁸⁾。 α -MSH 在下丘脑中起作用以减少食物摄入并调节饱腹感⁽¹⁴⁹⁾。

[0283] 在肥胖症中,高胰岛素血症和高来普汀血症(hyperleptinaemia)与胰岛素和来普汀抵抗力共存⁽¹⁵⁰⁾。增加的胰岛素抗性减少了胰岛素对来普汀产生的作用⁽¹⁵¹⁾。在动物研究中还已证实用胰岛素预处理 3 天能消除来普汀诱导的应答⁽¹⁵⁰⁾。很明显高胰岛素血症和胰岛素抗性是用来普汀诱导的食物摄入和体重控制调节的关键因素。此外,在生理性高胰岛素血症期间游离脂肪酸的血浆水平受抑制⁽¹⁵²⁾。因此,根据本发明该病症的治疗应改善与胰岛素抵抗状态有关的肥胖症问题。

[0284] X 综合征

[0285] 其是一种具有高胰岛素血症、高胆固醇血症、高血压和冠状动脉疾病特征的代谢失调⁽¹⁵³⁾。在粥样硬化病变中, GPI- 连接的分子如 T 钙粘蛋白牵涉于其中⁽¹⁵⁴⁾。主要缺点被认为是高胰岛素血症接着发生的导致有关异常的胰岛素抗性⁽¹⁵⁵⁾。从对该综合征的原始记载以来,愈发明显的是该疾病的范围较最初所认识的扩宽了。与健康对照相比,发现存在心绞痛而无冠状动脉病的男性不肥胖患者具有胰岛素抵抗、高胰岛素血症并具有较高的甘油三酯和较低的高密度脂蛋白;因此心肌缺血也是 X 综合征的一部分⁽¹⁵⁶⁾。高尿酸血症⁽¹⁵⁷⁾和原发性非酒精性脂肪肝炎(steatohepatitis)⁽¹⁵⁸⁾似乎与高胰岛素血症和胰岛素抗性相关,并因此可被视为代谢综合征的组成部分。

[0286] 业已在 70% 的具有先天性高血压的不肥胖、非糖尿病患者中观察到胰岛素抗性和高胰岛素血症。血压与胰岛素抗性相关,也与盐敏感性和血管紧张肽 II 相关⁽¹⁵⁹⁾。已显示体外试验中胰岛素浓度和体内胰岛素敏感性改变影响 Li^+/Na^+ 和 Na^+/H^+ 逆转运(CT)。高 CT 与高血压、IDDM 和肥厚型心肌病中心脏和血管重构有关⁽¹⁶⁰⁾。通常在糖尿病母亲婴儿中识别出良性和暂时性肥厚型心肌病。已报道了由于该疾病所致的胎儿死亡⁽¹⁶¹⁾。尽管,一般而言与 X 综合征相关的事件是年龄相关的,有证据表明该疾病可开始于儿童和青春期⁽¹⁶²⁻¹⁶⁴⁾。

[0287] 与抗磷脂和狼疮抗凝物抗体有关的疾病

[0288] 抗磷脂和狼疮抗凝物抗体与复发性流产、自发性流产和血栓形成有关。在用抗磷脂抗体对 51 位患者的研究中,53 例妊娠贯彻始终。在 33 例妊娠的攻击性治疗中成功率为 90.0%;然而在 48.6% 的这些成功病例中,发展为妊娠性糖尿病⁽¹⁶⁵⁾。这表明抗磷脂抗体可

能是糖尿病易感性的易感因素,其为增加的持续妊娠应激所揭示。在 1698 例无选择的受孕年龄在 16-37 岁的妊娠检查中,在妊娠诱发高血压、先兆子痫、妊娠糖尿病、I 型糖尿病、静脉血栓形成、血小板减少和风湿病患者中发现超过正常范围的抗心磷脂水平⁽¹⁶⁶⁾。

[0289] 在 29 位糖尿病儿童和青少年的研究中,与对照相比,发现 IDDM 患者中抗心磷脂抗体更常见。与患糖尿病超过 5 年的组相比,在小于 6 个月诊断的患者中抗体更为流行。这被视为是糖尿病早期的异常免疫应答⁽¹⁶⁷⁾。在另一糖尿病患者研究中,与无并发症的糖尿病患者相比在有并发症的糖尿病患者中心磷脂抗体的流行率更高⁽¹⁶⁸⁾,暗示这些抗体在糖尿病并发症中可能起作用。

[0290] 已知血管内皮机能障碍是糖尿病并发症发展的早期步骤。在对 45 位无临床上明显血管并发症的 IDDM 患者的研究中,1/3 具有高于对照的与内皮素-1 水平直接相关的抗心磷脂抗体水平⁽¹⁶⁹⁾。

[0291] 心磷脂通常用作作为一种指示多种相关磷脂如磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酸和磷脂酰胆碱存在的靶。在 70 例样本的研究中,证实心磷脂反应性是一单独观测和研究的实体。抗心磷脂和抗凝血两者都不与其他磷脂水平相关⁽¹⁷⁰⁾。在来自病理妊娠的大量血清中,28.6%的对抗心磷脂阳性的那些血清对抗磷脂酰丝氨酸和抗磷脂酰肌醇也是阳性的,23.8%的对抗磷脂酰胆碱阳性以及 19%的对抗磷脂酰乙醇胺阳性。该百分比高于具有 IgM 抗-心磷脂抗体的那些⁽¹⁷¹⁾。

[0292] 在使用 SLE 患者类似的研究中,患者最高的%反应性是抗心磷脂的,之后是抗磷脂酰丝氨酸、抗磷脂酸和抗磷脂酰肌醇⁽¹⁷²⁾。发现在具有未确定病因的脑血管疾病的 51 岁以下的 77 位非 SLE 患者组中,存在着最高流行率的针对最后一种磷脂即磷脂酰肌醇的反应性⁽¹⁷³⁾。

[0293] 对 39 位无 SLE 或其他结缔组织疾病的原发性抗磷脂综合征患者进行超过 10 年的研究,揭示了在 10 年随访后有 15 位患者显示器官损害。8 位患者发展为轻偏瘫,同时有 3 位患者显示痴呆;四肢瘫痪、扩张性心肌病、心肌梗塞、肺梗塞和肾终末期疾病⁽¹⁷⁴⁾。

[0294] 腹腔病

[0295] 具有和不具有临床症状的腹腔病通常与 I 型糖尿病有关。在最近的研究中,发现糖尿病患者中腹腔病的发病率位 5.7%,在它们的亲属为 1.9%⁽¹⁷⁵⁾。

[0296] 也已注意到了在具有涉及肠胃病学临床的不清楚或无反应性疾病的患者中高水平的亚临床或无症状腹腔病;108 位这样的患者中的 42.8%显示具有亚临床/无症状腹腔病⁽¹⁷⁶⁾。亚临床腹腔病的肠外标志是缺铁性贫血(27%)、脱发和疱疹样皮炎(11.3%)以及 IDDM(20%)。业已报道在糖尿病患者或它们的第一近亲中与腹腔病有关的抗体出现频率增加⁽¹⁷⁷⁾。在不存在腹腔病情况下,糖尿病患者中谷氨酰胺转移酶抗体的流行率为 13.4%,在它们的非糖尿病亲属中为 7%;913 位亲属的 3.5%具有 IgG 谷氨酰胺转移酶抗体,44%的这些亲属具有 IgA 肌内膜抗体⁽¹⁷⁷⁾。类似地,在腹腔病患者中糖尿病有关的抗体增加了。15 位诊断为腹腔病的儿童中的 27%存在抗胰岛素抗体,在无谷蛋白饮食后其中的 20%存在抗胰岛素抗体⁽¹⁷⁸⁾。针对谷氨酸脱羧酶的抗体也存在于 23%的腹腔病患者中⁽¹⁷⁹⁾。

[0297] 吸收不良是一种常见的腹腔病病征。在腹腔病中一种能缺铁症的分子为黑素转铁蛋白(melanotransferrin)(p97),其是一种与转铁蛋白具有 40%同源性的铁结合膜糖蛋白。该分子是 GPI-连接的,且在肠上皮细胞中具有顶端分布⁽¹⁸⁰⁾。另一种 GPI-连接的分子

一粘蛋白结合蛋白是一种构成保护屏障的胃肠粘膜顶端上皮细胞的组成部分⁽¹⁸¹⁾。在遗传易感个体中,由于识别 GPI- 链表位抗体所致的该分子和类似分子的失调能影响粘蛋白的结合并突破保护屏障,导致胃肠粘膜受损以及对麦醇溶蛋白肽的不耐受。

[0298] 胃炎

[0299] 伴发自身免疫性胃病的 I 型糖尿病中很普遍存在胃壁细胞抗体 (PCA)^(182,183)。壁细胞 (Parietal cells) 在其表面上具有 GPI- 连接的分子⁽¹⁸⁴⁾,因此识别 GPI- 链表位的抗体可能与该病症有关。

[0300] 炎性肠病

[0301] 慢性炎性肠病是一种反常的病症,在过量生长激素储备而非受损的分泌下具有生长障碍,可在出现腹部症状之前持续数年⁽¹⁸⁵⁾。与不活跃的克罗恩 (Crohn' s) 病患者相比,在活动性克罗恩病患者中空腹和食后脂质氧化明显更高⁽¹⁸⁶⁾。患者中的酮体产生也明显更多⁽¹⁸⁷⁾。通过高胰岛素血正常血糖钳研究评估,与正常对照相比,克罗恩病患者中显示更高的全身葡萄糖摄取⁽¹⁸⁸⁾。然而,与对照相比患者中动脉葡萄糖浓度低 10%,原因是葡萄糖氧化^(186,187)。

[0302] 增加的脂肪氧化和酮体产生的代谢图似乎是胰高血糖素驱动的。也有文献详细记载了与低血浆 LDL 胆固醇和高甘油三酯有关的血脂障碍⁽¹⁸⁹⁾并具有与高胰岛素血症和胰岛素抵抗状态的相似性。在 BB 大鼠糖尿病动物模型和腹腔病狗模型中,增加的肠渗透性也存在于发病前⁽¹⁹⁰⁾。增加的肠渗透性还存在于克罗恩病患者及它们未患病的亲属中⁽¹⁹¹⁾。同样,处于发展为克罗恩病的高危个体也具有增加的基线渗透性或具有增加的响应于损害剂的肠渗透性⁽¹⁹²⁾。

[0303] 肠胃组织中富含具有维持组织完整性和结构功能的 GPI- 连接的分子。其为用抗 - 抗 -TCR V β 单克隆抗体所产生的非常高程度的肠切片染色所证实。肠上皮⁽¹⁹³⁾和平滑肌细胞中的 GPI- 连接的分子是 T- 钙粘蛋白,其是一种 LDL 结合粘附分子⁽¹⁹⁴⁾。T- 钙粘蛋白还是一种平滑肌细胞生长的负调节物⁽¹⁹⁵⁾。含有 T- 钙粘蛋白基因的染色体节段的丢失与癌症发生相关,用 T- 钙粘蛋白 cDNA 转染肿瘤细胞导致减少的增殖活性和损失的对生长因子的细胞敏感性⁽¹⁹⁶⁾。另一种 GPI- 连接的分子 OCI-5 是一种与磷脂酰肌醇聚糖和大脑聚糖有关的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖⁽¹⁹⁷⁾。硫酸乙酰肝素蛋白聚糖结合层粘连蛋白。大脑聚糖的部分蛋白水解导致大于 400 倍的层粘连蛋白结合亲和力损失⁽¹⁹⁸⁾。自身抗体与这样的分子的 GPI- 元件的结合能可预知地破坏上皮细胞屏障并增加肠渗透性,其可能是疾病发展的先决条件。

[0304] 在克罗恩病中,肠壁特别是粘膜肌层的增厚是疾病活性的征兆⁽¹⁹⁹⁾。除在肠中表达之外,上述 GPI- 连接的分子的失调可解释该增加的渗透性、平滑肌增殖和肠壁增厚以及增加的平滑肌细胞胶原合成⁽²⁰⁰⁾。

[0305] 炎性肠病、溃疡性结肠炎和克罗恩病都具有相关的静脉和动脉血栓形成危险性。在与 100 位对照相比的对 83 位溃疡性结肠炎患者和 45 位克罗恩病患者的研究中,与健康对照相比,在患者中观察到更高的抗心磷脂抗体流行率⁽²⁰¹⁾。在类似的 137 位患者和 137 位对照的研究中,与对照相比,在克罗恩病和溃疡性结肠炎中抗心磷脂滴度明显升高⁽²⁰²⁾。

[0306] 关节炎和相关疾病

[0307] 类风湿性关节炎 (RA) 是一种影响滑膜关节导致关节破坏的慢性进行性炎性疾

病。由通常仅 2-3 个细胞层巨噬细胞和成纤维细胞样细胞组成的滑膜衬里发生具有伴随的血管生成的增生,并在滑膜与软骨及骨界面处得到局部侵入能力。RA 患者中增加的死亡率与加速的动脉粥样硬化和心血管疾病有关。已暗示许多传染物是 RA 的病原体⁽⁵⁴⁾。

[0308] RA 和相关疾病如全身性红斑狼疮、全身性硬化和痛风的患者是胰岛素抵抗的,并具有异常葡萄糖耐量^(203,204)。与对照相比,在血糖钳技术研究中,正常体重的、之前未经治疗的关节炎患者显示增加的胰岛素反应和减少的葡萄糖利用率⁽²⁰⁵⁾。因此,高胰岛素血症和胰岛素抗性是该疾病组的致病特征。

[0309] 在 45 位未经治疗的活动性 RA 患者中,与对照相比,在静脉葡萄糖耐量试验期间血浆胰高血糖素水平明显更低,显示反调节激素异常⁽²⁰⁶⁾。

[0310] 对 14 位活动性强直性脊柱炎 (AS) 患者的口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 揭示了与对照相比,他们具有在 OGTT 曲线下所测量的显著增加的胰岛素水平⁽²⁰⁷⁾。在 RA 和脊椎关节病中,胰岛素抗性都与血脂障碍有关⁽²⁰⁸⁾。

[0311] 通过与健康供血者中 6% 的针对胰岛细胞抗原 69 (ICA69) 抗体的存在相比,在 RA 患者中 31% 存在针对胰岛细胞抗原 69 (ICA69) 抗体⁽²⁰⁹⁾,以及在大量的儿童与青少年慢性关节炎和 SLE 中存在抗甲状腺球蛋白抗体⁽²¹⁰⁾,也证实了 RA 和其他自身免疫性疾病共同致病机制的存在。

[0312] 伴随血管生成的滑液膜衬里细胞的增殖是关节炎中血管翳形成和骨质侵蚀的关键因素。在基质降解和组织重构中,尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂 (uPA) 及其表面结合的 uPA 受体 uPAR 起重要的作用。结合其受体 uPAR 的 uPA 催化来自血纤维蛋白溶酶原的蛋白水解酶纤溶酶形成,并将该蛋白水解酶纤溶酶集中于细胞表面⁽²¹¹⁾。血纤维蛋白溶酶原介导细胞外基质蛋白的蛋白水解,利于细胞侵入。尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂受体是一种 GPI- 连接的分子以及整联蛋白的配体。刚与 uPA 结合, uPAR- 整联蛋白相互作用就转导增殖或迁移信号给细胞⁽²¹²⁾。尿激酶具有切割其受体的能力,由此失活其与 uPA 和玻璃体结合蛋白的结合能力。然而,虽然该切割位点位于该分子的第一和第二结构域之间以及 GPI- 链位于第三结构域上,但该切割仅发生在当 uPAR 的 GPI- 链完整时⁽²¹³⁾。完整的尿激酶受体也是有效结合整联蛋白玻璃体结合蛋白所需要的⁽²¹⁴⁾。 $\alpha_v\beta_3$ 和其他玻璃体结合蛋白受体涉及血管生成、细胞粘附和迁移以及因此的血管翳形成⁽²¹⁵⁾。在正常的情况下, uPA 切割 uPAR 会失调 uPA 与其受体的结合以及 uPAR 与玻璃体结合蛋白和 PAI-1 的结合,从而减少了通过 uPA 的纤溶酶产生以及经由玻璃体结合蛋白受体和 PAI-1 的增殖和血管生成信号。GPI 锚的去脂作用可引起这些 uPA 对 uPAR 亲和力的改变。针对 GPI 锚的接头区中 uPAR 肽的抗体仅识别 GPI- 连接的 uPAR,而不识别可溶性 uPAR。该改变以及其他 GPI- 连接的分子如 Thy-1, Ly-6 和癌胚抗原的抗原特性的类似改变已被归于构象改变⁽²¹³⁾。本发明提出针对 GPI- 连接的元件的抗体能足以改变这样的分子的构象,以改变它们与以顺式和反式同时起作用的特异性配体的反应性,如 uPAR 与 uPA 和玻璃体结合蛋白相互作用以及由此所引起的自身免疫性疾病、癌症和血管生成疾病如子宫内膜异位中所见的。

[0313] UPAR 通过与玻璃体结合蛋白相互作用促进细胞粘附并通过将 uPA 定位到细胞表面而有利于细胞迁移和侵入⁽²¹³⁾。粘附和迁移之间的平衡受控于与玻璃体结合蛋白和 uPAR 上相同位点结合的 PAI-1⁽²¹⁶⁾。除其具有蛋白酶抑制剂作用之外, PAI-1 在血管生成期间的毛细血管发生中起必不可少的作用⁽²¹⁷⁾。

[0314] 处于胰岛素抵抗和葡萄糖耐量状态中的高胰岛素血症和高血糖在该体系中起作用,已显示胰岛素和高血糖都增加了 PAI-1 基因转录;胰岛素还刺激基质金属蛋白酶如 MMP-1。这些基质金属蛋白酶是成纤维细胞样滑膜细胞产生的并与胞外基质的重构和破坏有关⁽⁵⁴⁾。

[0315] 哮喘

[0316] 在最近的对芬兰人的研究中,在生命的头 7 年期间,在患腹腔病、类风湿性关节炎(RA) 和 IDDM 的儿童中进行了哮喘累积发病率的比较。与没有这些疾病的儿童相比,在患腹腔病、RA 和 IDDM 的儿童中哮喘明显趋向于更常见⁽²¹⁸⁾。最近公布的对来自 23 份公布的自身免疫基因组研究或免疫介导的研究的观测数据进行整理所得的研究证实大约 65% 的疾病相关基因的阳性连锁非随机地映入 18 个分离的簇中⁽²¹⁹⁾。大量的喘、IDDM 和腹腔病基因落入也包括其他自身免疫性疾病基因的该小簇中⁽²²⁰⁾。

[0317] 与正常对照相比,哮喘患者遭受环境刺激物导致的过度支气管收缩并且静息气道伸缩性更高。静息气道伸缩性和支气管收缩受释放自肺迷走神经的乙酰胆碱的控制,该乙酰胆碱的释放引起对气道平滑肌细胞上毒蕈碱 M3 受体的刺激以及随后的收缩。乙酰胆碱还经由神经节后神经上的 M2 毒蕈碱受体刺激负反馈回路,阻止进一步的乙酰胆碱释放⁽²²¹⁾。

[0318] 已证实哮喘患者中增加的迷走神经介导的支气管收缩是由 M2 毒蕈碱受体功能受损所致。通过在糖尿病患者和胰岛素处理的糖尿病动物中检查支气管收缩反应,已经严谨地研究了在导致该受损中胰岛素的作用⁽²²²⁾。一旦用胰岛素处理,对支气管收缩刺激物低反应性的未处理的糖尿病动物就会变得高反应性。低反应性与减少的支气管中炎性细胞(嗜酸性粒细胞) 积聚水平以及糖尿病动物的神经有关。用胰岛素处理恢复了嗜酸性粒细胞内流并产生高反应性。神经元 M2 毒蕈碱受体功能损失归因于嗜曙红细胞主要碱性蛋白通过静电相互作用与 M2 受体结合。因此,胰岛素似乎在气道炎症发生中起重要作用。高胰岛素血症还可能是哮喘个体中较高的静息气道伸缩性的原因,如同将胰岛素注射入大鼠脑中导致的明显增加的乙酰胆碱水平一样,其可能是由于较高的静息乙酰胆碱水平所致⁽⁹⁸⁾。

[0319] 气道平滑肌增生是久喘中重要的组织病理学发现⁽²²³⁾。其伴随有平滑肌细胞分泌的胶原过度增生并非常类似于克罗恩病中的平滑肌细胞过度增生和肠壁增厚⁽²⁰⁰⁾。因此,平滑肌细胞上的 GPI- 连接的粘附和细胞增殖抑制分子 T- 钙粘蛋白就如同对克罗恩病所讨论的一样牵涉于其中。

[0320] 与克罗恩病一样,IGF 和 IGFBP 轴(axis) 也牵涉于其中,并包括 IGFBP 的下调节。胰岛素诱导对培养的人卵巢细胞中 IGFBP-1 产生的抑制⁽¹³⁸⁾。因此,胰岛素分泌失调能类似地下调气道平滑肌细胞中的 IGFBP 水平,由此增加游离的 IGF 生物利用度,从而促进平滑肌细胞增殖。

[0321] 囊性纤维化

[0322] 囊性纤维化(CF) 是一种影响呼吸、消化、内分泌和生殖系统的疾病。许多可能的突变促成包括原发性肺慢性阻塞性疾病、肝纤维化、糖尿病、胆石病和关节炎的疾病表现。原发性 CF 缺陷是经由囊性纤维化跨膜转导调节因子(CFTR) 失调的离子迁移,该囊性纤维化跨膜转导调节因子是一种环 AMP 介导的位于分泌性上皮细胞顶膜的氯化物跨上皮转运蛋白⁽²²⁴⁾。经由连接着 CFTR 通道和 MUC 1 基因过表达的酪氨酸激酶 -Src 途径,CF 中 CFTR

机能障碍导致粘蛋白过表达⁽²²⁵⁾。该受损的氯化物释放导致呼吸器官粘膜（和肠粘膜）脱水，从而产生阻塞气道的粘液。

[0323] 对 CFTR 分子的功能而言，肌动蛋白细胞骨架的机体形成至关重要。用细胞松弛素 D 部分破坏肌动蛋白细胞骨架诱导了 CFTR 活化⁽²²⁶⁾。通过原子力显微镜检查，显示肌动蛋白丝与 CFTR 分子直接相联⁽²²⁷⁾。

[0324] 涉及细胞运动和细胞粘附的肌动蛋白细胞骨架的生理调节似乎受尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂受体（uPAR）表达的强烈影响。其需要 uPAR 结合玻璃体结合蛋白以启动 p130Cas/Rac- 依赖的信号传导途径⁽²²⁸⁾。uPAR 与细胞骨架有关结构如整联蛋白和 Rho 家族 Rho、Rac 和 Cdc42 的小 GTP 酶的相互作用涉及肌动蛋白细胞骨架对弹性纤维、层形足板、皱褶（ruffles）和丝足装配的调节。

[0325] 虽然 uPAR 通过玻璃体结合蛋白的 D1 域与其结合，但是 uPAR 与 uPA 和玻璃体结合蛋白的结合需要完整的全长受体，特别是其的 GPI- 链⁽²¹³⁾。

[0326] uPAR 和其他已显示与肌动蛋白网络⁽²²⁹⁾有关的 GPI- 连接的分子可能是负责保持为了最优的 CFTR 功能的细胞骨架的。本发明抗体与 GPI- 链表位的结合是可以瓦解细胞骨架，导致遗传危害的 CFTR 分子进一步的功能退化。

[0327] 已报道了 uPAR 在肺上皮细胞中的表达和其通过 uPA 的上调节、以及在损伤或肿瘤形成后该系统涉及肺炎症组织重构⁽²³⁰⁾。此外，在应答铜绿假单胞菌中，uPAR 似乎在嗜中性粒细胞的募集中起作用。在 CF 中铜绿假单胞菌缓慢地移居于肺中并引起肺功能降低导致死亡。近来已证实与野生型小鼠相比，uPAR 缺陷型小鼠（uPAR^{-/-}）在应答铜绿假单胞菌中嗜中性粒细胞募集急剧减少。野生型小鼠中嗜中性粒细胞募集依赖于 $\beta 2$ 整联蛋白依赖机制⁽²³¹⁾。因此，可以设想在 $\beta 2$ 整联蛋白依赖的嗜中性粒细胞募集的该功能中抗 -GPI 抗体修饰的 uPAR 会充分受累。

[0328] 由于无法除去凋亡的炎症细胞，囊性纤维化中肺病理加重。来自 CF 和非 CF 支气管扩张患者的痰含有大量的凋亡细胞，暗示正常的凋亡细胞去除机制受损⁽²³²⁾。

[0329] 巨噬细胞表面上 GPI- 连接的糖蛋白 CD14 介导了凋亡细胞的识别和清除⁽²³³⁾。对于正常组织结构和功能而言，导致炎症消退的凋亡细胞清除是关键性的。凋亡细胞经历了导致磷脂酰丝氨酸暴露的表面改变，该磷脂酰丝氨酸是一种为吞噬性巨噬细胞所识别的关键性表面标记⁽²³⁴⁾。凋亡细胞上磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇的识别导致它们经由 CD14 的 GPI- 链内在化。细菌脂多糖（LPS）也结合相同的磷脂结合位点或邻近位点⁽²³⁵⁾。巨噬细胞自身能经历凋亡，结果之后是 CD14 下调⁽²³⁶⁾。因此，针对 GPI- 链元件的抗体经由封闭识别位点和凋亡细胞的内在化可失调对凋亡细胞的吞噬作用，并还可导致 CD14 的下调。这些机制严重地危害吞噬系统的非常重要的组成部分。在应答趋化性刺激物中，嗜中性粒细胞也涉及吞噬作用并移动到炎症部位。一种 GPI- 连接的分子 - 单 ADP- 核糖基转移酶已被鉴定位于嗜中性粒细胞表面上并涉及信号传导途径。该分子涉及趋化性过程中的细胞骨架重排⁽²³⁷⁾。GPI- 链涉及 GPI- 连接的分子与肌动蛋白的缔合。因此，抗体妥协的 GPI- 连接的分子无法有效地起趋化性调节物的作用。

[0330] 囊性纤维化与胰腺外分泌及内分泌机能障碍有关。CFTR^(-/-) 小鼠中外分泌腺腺泡细胞机能障碍与受损的胰腺腺泡细胞的顶端细胞膜的胞吞作用有关。这与通过导管将碳酸氢盐分泌到腔中相偶联。胞吞作用与 GP-2（一种与胞吞作用激活密切相关的腺泡细胞上

的 GPI- 锚定蛋白) 的切割有关。在 CFTR(-/-) 小鼠中 GP-2 的切割减少了⁽²³⁸⁾。这表明如在囊性纤维化中所见的, 由于抗 -GPI 抗体和 / 或通过抗体的 GPI 切割位点的封闭导致的 GP-2 的下调节能损害胞吞作用。

[0331] 在外分泌机能不全的患者中, 对静脉内给予的葡萄糖的一期 C- 肽反应严重受损。在这些患者中, 测定为应答低血糖的胰高血糖素峰值分泌的 α 细胞功能也减弱了⁽²³⁹⁾。与对照受试者相比, 具有受损和糖尿病葡萄糖耐量的 CF 患者中胰岛素敏感性也降低了⁽²⁴⁰⁾。

[0332] 尽管肺部疾病是 CF 中发病率和死亡率的主要原因, 但该疾病的严重程度并不总是能从 CFTR 表型来预测的。在使遗传和临床数据与肺功能下降速率相关的 7 岁以上全瑞典人 CF 人群的纵向调查中, 观察到与假单胞菌集群和胰功能不全相比, 伴发糖尿病的 CF 患者与肺功能快速恶化最显著相关⁽²⁴¹⁾。还已观察到在导致不产生 CFTR 的无效或严重的突变, 其与胰腺外分泌机能不全相关, 但与肺病的严重程度较不强相关。一定比例的 CF 患者直至 10-15 岁都还没被诊断。具有包括支气管扩张的轻度肺部疾病的年长患者可能不存在 CF 型综合征, 但在调查中发现具有 CFTR 突变⁽²⁴²⁾。还变得清楚的是呼吸症状和炎症并不必定与肺感染相关⁽²⁴³⁾。通过与肺功能有关的高分辨率计算体层成像术可视的 CF 的支气管病理显示与痰细胞学和炎性标记不相关⁽²⁴⁴⁾。

[0333] 这些发现证实在 CF 中肺病理是进行性的, 尽管受肺感染加剧了, 但不取决于它们。胰腺病理特别是糖尿病是肺功能退化严重程度的最重要的预测因子。关节病也是 CF 中的伴发病, 但其中肺功能和感染与关节炎的存在无关⁽²⁴⁵⁾。本发明提出 CFTR 突变致使 CF 患者特别易感于导致 CF 中常见的肺部炎症和包括糖尿病的其他器官病理的抗 -GPI 链表位抗体效应。

[0334] 骨质疏松和骨质减少

[0335] 胰岛素和胰岛素样生长因子影响骨代谢。在糖尿病中存在减少的骨形成; 这可以解释骨质减少, 但骨组织中的微血管病也是有关的^(246, 247)。增加的破骨细胞活性是造成骨质疏松、佩吉特氏病、骨转移和恶性高钙血症中增加的骨组织破坏的原因。一种 GPI- 连接的分子, 分离自破骨细胞样多核细胞的破骨细胞抑制肽 -1 (OIP-1) 业已显示能抑制破骨细胞活性⁽²⁴⁸⁾。提出本发明的抗体失调胰岛素分泌并阻断 OIP-1 或类似分子的作用, 因此减少了骨形成并增加了破骨细胞活性。

[0336] 扁平苔藓和粘膜白斑病

[0337] 在一些研究中, 高达 42% 的无糖尿病家族史活动性扁平苔藓患者显示异常葡萄糖耐量。针对葡萄糖的胰岛素反应代表着轻度 2 型糖尿病^(249, 250)。

[0338] 口腔粘膜白斑病也与异常的葡萄糖代谢相关。与对照相比, 在糖尿病患者中患病率较高⁽²⁵¹⁾。之前未诊断为糖尿病的患者中其他较不常见的口腔表现包括口腔烧灼综合征、真菌和细菌感染、改变的味觉、涎腺肿大和流涎, 其通常通过改善血糖控制的治疗而得到改善⁽²⁵²⁾。

[0339] 贫血

[0340] 再生障碍性贫血与高胰岛素血症和胰岛素抗性有关。在所检查的 29 位患者中, 之前得到治疗的 14 例病例具有正常的葡萄糖耐量, 得到治疗的 8 例病例有异常葡萄糖耐量, 其中 6 例病例具有糖尿病, 以及 7 例新诊断的病例具有正常葡萄糖耐量。所有的都是胰岛素抵抗和高胰岛素血症的。异常葡萄糖耐量患者具有迟滞的胰岛素分泌, 表明在 β 细胞中

的胰岛素储备的损耗⁽²⁵³⁾。

[0341] 在 26 位再生障碍性贫血患者中,5 位在其血小板和红细胞上具有 GPI- 锚定蛋白缺陷,而在 10 位患者中,在单核细胞和多形核白细胞中检测到 GPI 缺陷⁽²⁵⁴⁾。

[0342] 其他类型的贫血与显性糖尿病有关。与没有重度并发症的糖尿病患者相比,15 位具有重度并发症即肾病、神经病、直立性低血压等的 1 型糖尿病患者是贫血的。除促红细胞生成素减少之外,没有可证明的贫血病因⁽²⁵⁵⁾。在没有重度肾病的糖尿病患者中,于 28 位没有可识别病因的贫血受试者中注意到类似于贫血的减少的促红细胞生成素应答性⁽²⁵⁶⁾。

[0343] 一种可能与在胰岛素抵抗个体或糖尿病患者中无法确定病因的贫血有关的 GPI- 连接的分子是叶酸盐受体。在叶酸盐转运过程中,叶酸盐受体被内在化并循环⁽²⁵⁷⁾。然而,针对其 GPI- 链元件的抗体能严重阻碍叶酸盐转运。叶酸盐与维生素 B12 一起参与了使红细胞生成需要的 DNA 合成中脱氧尿苷酸转变为脱氧胸苷酸必需的甲基基团可获得的偶联反应。在发育的红细胞中,由于叶酸盐供给不足可导致这些反应受损。

[0344] 阵发性夜间血红蛋白尿

[0345] 阵发性夜间血红蛋白尿 (PNH) 已知是由使红细胞易于裂解的 GPI- 连接的补体抑制因子 CD55 和 CD59 缺陷所引起。该存在于红细胞和白细胞上以及还存在于大部分血小板上的缺陷⁽²⁵⁸⁾是由基因突变 (PIG-A) 所致,该基因突变的产物,一种糖基转移酶参与了 GPI- 锚生物合成的第一步⁽²⁵⁹⁾。为何 GPI- 缺陷型克隆获得生长优势的原因仍不清楚。

[0346] 业已阐明 Campath-1H 选择的细胞是 GPI- 连接的 CD52 分子缺陷的⁽²⁶⁰⁾。本文提出针对 GPI 链元件抗体的存在可以类似的方式,选择 PNH 中 GPI- 缺陷型克隆。然而,PIG-A 基因缺陷却是一种获得性体细胞突变⁽²⁶¹⁾。事实上,在 3 位 PNH 患者中检测到大量的 PIG-A 基因异常,而其中 2 位患者的粒细胞和成红血球细胞异常性是不同的⁽²⁶²⁾。因此,有可能持续存在的针对 GPI- 链元件的自身抗体导致了造血干细胞水平上的体细胞突变。

[0347] 报道了具有 12 年 NIDDM 病史的 38 岁男性病例具有快速进展的溶血性贫血和血小板减少。除糖尿病之外,对于微血管病性贫血没有其他病因。患者还具有狼疮抗凝物和抗磷脂 IgG 抗体。血液透析导致溶血和血小板减少的自发改善⁽²⁶²⁾。推测血液透析除去了致病的抗 -GPI 抗体以及在该研究中所报道的自身抗体。

[0348] 睡眠呼吸暂停

[0349] 睡眠中紊乱的呼吸是一种常见的病症,其使个体易患日间功能损害和代谢异常。在对 150 位无糖尿病或心肺病的健康男性的研究中,取决于呼吸紊乱指数 (AHI) 截止值,睡眠呼吸暂停的发病率为 40-60%。该病症的严重程度与受损的或糖尿病葡萄糖耐量有关。增加的 AHI 也与恶化的胰岛素抗性有关,而不依赖于肥胖症⁽²⁶³⁾。在另一项 270 位无已知糖尿病的受试者的研究中,185 位被认为具有睡眠呼吸暂停。这些病例与肥胖和不肥胖的受试者中的胰岛素抗性明显相关。对这些受试者中胰岛素抗性和高血压之间关系的进一步分析证实了该病症是显著相关的⁽²⁶⁴⁾。

[0350] 失眠

[0351] 不分老少均常见睡眠无规律。这些睡眠无规律包括困难入睡、夜间频繁觉醒和晨间早醒。业已显示当给予夜间存在的剂量时,人体中仅在夜晚分泌的松果体激素、褪黑激素诱发日间睡眠。已知在老年人中褪黑激素减少,已显示将其修正为生理学水平能恢复睡眠⁽²⁶⁵⁾。

[0352] 褪黑激素分泌受控于来自颈上神经节神经元的信号,该信号使突触与松果体接触并由小泡释放去甲肾上腺素。去甲肾上腺素通过 cAMP 形成刺激褪黑激素合成⁽²⁶⁶⁾。在褪黑激素合成中 cAMP 作用与次末级酶-芳基烷基胺 N-乙酰转移酶 (NAT)⁽²⁶⁷⁾。其是一种多态酶,其突变型能影响药物代谢并赋予对某些癌症、食物过敏和其他病症增加的易感性⁽²⁶⁸⁻²⁷¹⁾。

[0353] 去甲肾上腺素分泌受血浆胰岛素浓度影响。与对照相比,通过在健康志愿者中输注脂质诱导的基底高胰岛素血症和加剧的对葡萄糖的胰岛素反应导致明显减少的血浆去甲肾上腺素水平⁽²⁷²⁾。

[0354] 因此,由于如胰岛素抗性的生理学原因所致的高胰岛素血症状态预计会与减少的血浆去甲肾上腺素水平相关。与非糖尿病患者相比,糖尿病患者心力衰竭代偿失调期间具有较低的去甲肾上腺素水平⁽²⁷³⁾。在诊断的第一年中,I 型糖尿病患者还具有应答于低血糖的 50%减少的去甲肾上腺素⁽²⁷⁴⁾。

[0355] 上述观察暗示由于在健康的老年人群中增加的葡萄糖不耐症和胰岛素抗性,褪黑激素分泌中年龄有关的减少可能与高胰岛素血症有关⁽²⁷⁵⁾。该年龄有关的松果体褪黑激素产生减少被认为归因于支配松果体的 5-羟色胺能和去甲肾上腺素神经元的退化性变化而非松果体组织退化⁽²⁷⁶⁾。这与由于老年人群中葡萄糖代谢改变所致的去甲肾上腺素不足是相一致的。

[0356] 另一种控制睡眠调节的因子是朊病毒蛋白 (PrP)。PrP 是一种 GPI-连接的糖蛋白⁽²⁷⁷⁾。其存在于脑和非脑组织中,具有高水平的突触分布,显示在神经细胞功能中起重要作用,其还见于伸长的轴突的表面^(278,279)。正常的朊病毒蛋白结合铜,所产生的复合物具有抗氧化剂活性⁽²⁸⁰⁾。已知朊病毒蛋白涉及神经变性疾病包括致死性家族性失眠,其中深刻地改变了睡眠和许多激素的昼夜节律⁽²⁸¹⁾。朊病毒蛋白基因敲除小鼠显示改变的褪黑激素水平和睡眠碎裂以及几乎加倍量的短觉醒事件,表明了该蛋白在睡眠调节中的作用^(282,283)。

[0357] 本发明的抗体通过改变葡萄糖代谢和其去甲肾上腺素和褪黑激素分泌的效应以及还通过经由 GPI-锚结合潜能影响朊病毒蛋白,可影响良性睡眠异常和病理性朊病毒诱导的病症。此外,该抗体识别分泌粒蛋白 1 或嗜铬粒蛋白 B(其是一种去甲肾上腺素包含小泡的组成部分)⁽²⁸⁴⁾。该抗体还失调去甲肾上腺素分泌。

[0358] 癌症

[0359] 许多癌症包括乳腺癌、结肠直肠癌、胃肠癌、肉瘤、子宫内膜癌、前列腺癌、头癌、颈癌和肺癌都已知与高胰岛素血症、葡萄糖不耐症、胰岛素抗性和增加肝葡萄糖生成率有关⁽²⁸⁵⁻²⁸⁹⁾。在 1992 年对 223 位患 1 期或 2 期乳腺癌的女性研究证实与 441 位对照受试者相比,她们具有明显更高的 C-肽血清水平。乳腺癌的对数相对危险性与 C-肽水平呈线性相关,而不依赖于体重指数或腰髋比⁽²⁹⁰⁾。在组织学上被证实患乳腺癌的 2569 位女性病例的最近研究中,与 2588 位对照女性相比,注意到乳腺癌与晚发性糖尿病有关⁽²⁹¹⁾,并有证据表明胰岛素是肿瘤形成的生长因子⁽²⁹²⁾。

[0360] 癌恶病质还具有葡萄糖不耐症、增加的全身葡萄糖周转率、导致减少的葡萄糖摄取和内在化的增加的葡萄糖异生和胰岛素抗性的特征⁽²⁹³⁾。在大鼠模型中,通过激素疗法增加的胰岛素/胰高血糖素比选择性地支持了宿主组成代谢并抑制了肿瘤生长动力学⁽²⁹⁴⁾。因此,阻止致糖尿病代谢紊乱复合物的发生会减少癌症发病率并缓解癌恶病质症状。

[0361] 愈发清楚 GPI-连接的分子牵涉血管生成、转移、癌演进以及甚至癌症抑制。一种

这样的分子是尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂受体 uPAR。在 uPAR 表达和浸润性癌细胞表型之间存在强相关⁽²⁹⁵⁾。为其配体 uPA 所占据的未切割的 GPI- 连接的 uPAR 与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPGs) 和整联蛋白玻璃体结合蛋白的缔合,使纤溶酶聚焦于细胞表面诱导蛋白水解并连接玻璃体结合蛋白与其受体 $\alpha v \beta 3$,从而促进血管生成⁽²¹¹⁻²¹⁷⁾。uPAR 还与肌动蛋白细胞骨架相互作用,导致形成层形足板、皱褶和丝足以及因此的细胞运动性⁽²²⁸⁾。

[0362] 经由需要完整的 GPI- 链的 uPA 切割 uPAR 调节 uPAR 的正常生理功能⁽²¹³⁾。早已提出 uPAR 特性所致疾病可能归因于本发明抗体对 GPI- 链的封闭。

[0363] 通过增加细胞相关的 HSPG⁽²⁹⁶⁾ 和纤溶酶原激活物抑制剂 -1 (PAI-1) 表达⁽²⁹⁷⁾,在加强 uPAR 驱动机制中高胰岛素血症起作用。除与 uPA 结合之外,PAI-1 结合玻璃体结合蛋白并促进肿瘤转移和浸润⁽²⁹⁸⁾。uPAR-uPA-PAI-1 复合物也结合低密度脂蛋白关联蛋白 (LRP),完整的复合物被内在化到转移的癌细胞中。已显示 PAI-1 增加了丝状伪足形成和癌细胞转移⁽²⁹⁹⁾。PAI-1 也涉及血管生成。在 PAI-1^{-/-} 小鼠的主动脉环中,血管生成完全不存在,但可通过添加纯化的重组 PAI-1 恢复⁽³⁰⁰⁾。

[0364] 高水平的 uPA 和 uPAR 与乳腺癌患者中增加的复发危险性有关⁽³⁰¹⁾。在甲状腺癌⁽³⁰²⁾ 和卵巢癌⁽³⁰³⁾ 中 uPAR 也强表达了。HSPG 特别是 GPI- 连接的磷脂酰肌醇聚糖的上调节与某些癌症有关。在胰腺和乳腺癌中磷脂酰肌醇聚糖 1 上调节^(304,305)。在维尔姆斯瘤、成神经细胞瘤和肝胚细胞瘤中表达磷脂酰肌醇聚糖 3^(306,307)。磷脂酰肌醇聚糖被认为是潜在的肝素结合生长因子调节物并为 IGF-I 和 IGF-II 所刺激⁽³⁰⁸⁾。胰岛素抑制了 IGF 结合蛋白,使得更多的 IGF 可以利用⁽³⁰⁹⁾。IGF 与多种癌症的进展有关⁽³¹⁰⁾。GPI- 连接的分子作为肿瘤生长的负调节物还涉及肿瘤形成的病理生理学。GPI- 连接的 T- 钙粘蛋白为包括 IGF 的生长因子所下调节⁽³¹¹⁾。T- 钙粘蛋白基因的丢失与胰腺、肺、胃和卵巢癌的发生有关,与此同时用 T- 钙粘蛋白 cDNA 转染肿瘤细胞则导致炎性肠病的增殖及侵入活性减少⁽³⁰⁸⁾。T- 钙粘蛋白经由本发明的抗-GPI 抗体的下调节或失调能危害 T- 钙粘蛋白和有利于肿瘤生长的类似分子的负生长调节作用。

[0365] GPI- 连接的分子可涉及肿瘤细胞的天然杀伤细胞识别。UL16 结合蛋白 (ULBPs) 是在热休克、病毒、肿瘤转化、致癌物、UV 等所致的细胞不良应激时而被诱导或上调的 GPI- 连接的分子。这些分子是 NK 细胞、NKT 细胞、 $\gamma \delta$ T 细胞以及 CD8⁺ T 细胞上 NKG2-D 受体的配体。对这些 GPI- 连接的 ULBP 的掩蔽能导致转化细胞躲避 NK 或 T 细胞介导的识别⁽³¹²⁾。

[0366] HIV

[0367] 1 型人免疫缺陷病毒 (HIV-1) 具优先的单核细胞 / 巨噬细胞向性,并且在感染初期不能诱导生成合胞体 (NSI)⁽³¹³⁾。该 NSI 病毒利用 β -趋化因子受体 5 (CCR5) 作为共受体并只感染 CCR5⁺ T 细胞⁽³¹³⁾。在 50% 的病例中,疾病进展与诱导生成合胞体 (SI) 的变体出现有关,并感染耗尽所有的 CD4⁺ T 细胞包括未致敏的 T 细胞⁽³¹³⁾。其是基于 SI 病毒利用在 T- 细胞前体和未成熟的胸腺细胞上高表达的 CCR5 和 CXCR4 受体的能力⁽³¹⁴⁾。业已显示 NSI 表型病毒为 CCR5- 结合的 β -趋化因子 RANTES、MIP-1 α 和 MIP-1 β 所抑制;NSI 毒株的感染与增加的这些 β -趋化因子的产生有关⁽³¹⁵⁾。结合主要的 HIV 共受体 CCR5 和 CXCR4 的趋化因子是有效的 HIV 天然抑制剂。近来数据表明趋化因子阻断 HIV 感染的能力与它们的受体结合容量无关⁽³¹⁶⁾。

[0368] 在葡萄糖胺聚糖如在内皮细胞和其他细胞表面上以及组织基质中所见的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的维持中,通过连接和聚合趋化因子建立了跨越细胞外基质的梯度^(317, 318)。硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)还与 HIV 糖蛋白 gp41_{FD}的细胞膜融合域相互作用。该相互作用是与 T 细胞表面上的特异性硫酸乙酰肝素蛋白聚糖结合域进行的,并且是空间异质的,定位于细胞膜上优选的位点⁽³¹⁹⁾。通过物理除去或用 IL-8 封闭除去硫酸乙酰肝素结合位点消除了 gp41_{FD}与 T 细胞细胞膜的相互作用。可溶性硫酸乙酰肝素结合 gp41_{FD},但不增强细胞膜定位作用。因此,细胞膜结合的 HSPG 需要 gp41_{FD}结合到细胞膜上。由于细胞失活需要病毒复制及细胞膜相互作用处于定位位点,因此 GPI-连接的磷脂酰肌醇聚糖是最有可能的 gp41_{FD}-HSPG 相互作用的候选物。

[0369] HIV 和趋化因子与 HSPG 优先结合必须集中该趋化因子的抑制效应于病毒颗粒聚集的部位。本发明提出针对结合 GPI-链元件的抗体可足以改变 GPI-连接的 HSPG 的构象,使它们无法有效地连接抑制性趋化因子并将该抑制性趋化因子的效应聚焦于病毒。此外,GPI-连接的尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂受体(uPAR)及其配体(uPA)均明显地与 HIV 进展有关。业已显示在 AIDS 患者中高水平的血清 uPAR(suPAR)能作为不良生存的指示物⁽³²⁰⁾。业已显示尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂 uPA 结合 HIV-1gp120 并促进巨噬细胞的 HIV-1 感染⁽³²¹⁾。uPA 与 gp120 的相互作用涉及功能上重要的 gp120 的 V-3 环以及 uPA 的催化域,使得其配体结合域能与 uPAR 相互作用⁽³²¹⁾。gp120 经由 UPA 与 uPAR 的桥接可归因于 uPAR 的 HIV 共受体功能。

[0370] gp120 的细胞受体是 CD4⁽³²²⁾,并且 gp120 和 CD4 都经由与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的相互作用从而结合玻璃体结合蛋白⁽³²³⁾。UPAR 还结合玻璃体结合蛋白⁽²¹⁴⁾。玻璃体结合蛋白的 $\alpha v \beta 3$ 受体是一种决定 T 细胞受体(TCR)衔接结果的共刺激分子。结合 $\alpha v \beta 3$ 的玻璃体结合蛋白有效地诱导了 T 细胞细胞凋亡⁽³²⁴⁾。这提供了一种经由整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 能发送细胞凋亡信号给 T 细胞的 uPA 通过 gp120 结合其受体 uPAR 的 HIV 病毒衔接机制。

[0371] 如早些时候所描述的,uPA 一旦与 uPAR 结合就具有切割其的能力。被切割的 uPAR 无法结合玻璃体结合蛋白⁽²¹⁴⁾。未结合的玻璃体结合蛋白之后也不能结合其受体 $\alpha v \beta 3$ 。然而,即使切割位点位于 GPI 锚远侧,uPA 也仅切割完整的 uPAR 分子,完整的锚是该过程所必需的。磷脂酶 C-处理的 uPAR 显示 uPA 切割抗性⁽³²³⁾。因此,本发明提出针对 GPI-链元件的抗体会改变 uPAR 构象并诱导 uPA 切割抗性。uPA 与 uPAR 的结合正调节了 uPAR 表达,其与增加的特异性 uPAR mRNA 有关⁽³²⁵⁾。

[0372] uPA 切割构象改变的 uPAR 的无能可导致能结合玻璃体结合蛋白的 uPAR 的上调节并提供结合位点供 HIV 病毒附着和通过细胞凋亡诱导的 $\alpha v \beta 3$ 受体的信号传导。增加的 T 细胞细胞凋亡是 HIV 感染的公认但远未解释清楚的特征⁽³²⁶⁾。

[0373] GPI-连接的分子牵涉 HIV 感染的另一方面是处释放病毒颗粒的水平。已阐明感染的 T 细胞产生的 HIV 病毒优先获取已知结合细胞膜上脂筏的 T 细胞表面 GPI-连接的蛋白⁽³²⁷⁾。在体外测试中,这些分子如 CD55 和 CD59 等等赋予了对补体介导的破坏的抗性^(328, 329)。感染的 T 细胞表面上 GPI-包被的病毒会与抗体相互作用并连接其他感染的 T 细胞,从而帮助通过 SI 病毒的合胞体形成。

[0374] 最后, HIV-1 感染与血脂障碍、升高的葡萄糖水平以及降低的胰岛素敏感性有关。使用高效抗逆转录病毒治疗(HAART)加剧了这些代谢微扰⁽³³⁰⁾。由此,HIV 患者中高水平的

抗磷脂抗体就并不那么令人惊讶了⁽³³¹⁾。

[0375] 感染

[0376] 包括细菌、真菌和原生动物的有传染性的生物体在其表面上表达 GPI- 连接的分子。这些生物体包括分枝杆菌、念珠菌、利什曼虫、裂体吸虫、贾第鞭毛虫、弓形体、锥虫、变形体等⁽³³²⁻³³⁹⁾。

[0377] 近来已证实克氏锥虫锥鞭毛体 GPI- 粘蛋白体外激活巨噬细胞产生细胞因子、趋化因子和氮氧化物⁽³³⁷⁾。

[0378] 添加内源性 β - 趋化因子 MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES 诱导了增加的克氏锥虫摄取，导致增加的 NO 产生并以剂量依赖的方式控制寄生虫复制⁽³⁴⁰⁾。

[0379] 趋化因子在宿主针对其他微生物如病毒、支原体、真菌和蠕虫的抗性中起着重要的作用⁽³⁴¹⁻³⁴⁵⁾。通过连接硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPGs) 并聚合以增加在细胞表面处和组织基质中的可用性，趋化因子建立了跨越细胞外基质的梯度^(317,318)。HSPG 是跨膜的如共结合聚糖或 GPI- 锚定的如磷脂酰肌醇聚糖。传染物的表面蛋白与通过集中炎性趋化因子和细胞因子以控制感染的提供第一线防御的宿主 HSPG 相互作用^(346,347)。

[0380] 由相当多的证据表明传染物能经由附着脂筏中 GPI- 连接的分子而非调理素地内在化。业已显示一种大肠杆菌的致病菌株附着于肠上皮细胞上的 GPI- 连接的 CD55 分子并诱导细胞骨架重排和细胞感染⁽³⁴⁸⁾。可通过用已知切割 GPI 锚的磷脂酶 C 处理细胞阻断其⁽³⁴⁷⁾。可以看到由于大肠杆菌结合并感染所致的弹性纤维重排，导致细胞从汇合的单层肠细胞上脱离。

[0381] 本发明提出识别 HSPG 上 GPI- 链元件的抗体能失调趋化因子聚焦于传染物上，由此减弱了宿主第一线防御。生物体的非调理素内在化作用也是第一线防御的组成部分，籍此生物体能内在化并降解或感染细胞经由 GPI- 信号传导招致的肌动蛋白重排而能从腔体表面解开。GPI 的封闭会阻止这样的生物体摄取和消除。

[0382] 来自传染物的毒素也结合 GPI- 连接的分子。已知与 GPI- 锚定蛋白结合的气单胞菌溶素（一种来自气单胞菌的通道形成蛋白）在结构上和功能上与败血梭状芽胞杆菌 (*Clostridium septicum*) α 毒素相关。无法合成 GPI- 锚的突变细胞系并不敏感于气单胞菌溶素和 α 毒素⁽³⁴⁹⁾。幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) vac A 毒素和破伤风杆菌 (*Clostridium tetani*) 产生的破伤风神经毒素 (TeNT) 也结合 GPI- 锚并通过网格蛋白依赖的 GPI- 锚 - 失活的胞吞途径内在化^(350,351)。

[0383] GPI- 连接的分子不仅与胞吞途径有关，它们还形成例如在胆小管肝细胞中的细胞内小泡的一部分⁽³⁵²⁾。据报道磷脂酰肌醇 3- 磷酸酯是影响与涉及内体成熟的 GTP 酶相互作用的早期内体自身抗原 EEA1 结合的内体膜的一部分。结核分枝杆菌中含有的吞噬体并不熟化为吞噬溶酶体，并且具有未成熟中间型的组织蛋白酶 D⁽³⁵³⁾。

[0384] 本文提出经由 GPI- 链的毒素摄取是一种用于除去来自血液和组织间隙的毒素的保护机制，并且本发明的抗体可干扰该过程，容许毒素到达靶器官。此外，抗体包被的 GPI 部分的内在化能让抗体与吞噬体成熟和胞吞途径的胞内机制接触，由此干扰生物体的胞内控制及毒素解毒。

[0385] 抗 - 抗 - TCR V β 和抗 - GPI 元件抗体出现归因于应答感染或直接应答生物体表面的 GPI- 连接的分子的多克隆或单克隆 T 细胞增殖的假设可得到特别是在 GPI- 具有的寄生

虫感染中宿主葡萄糖代谢受损的事实所支持。在之前未治疗的无并发症的恶性疟原虫致疟疾男性中,与恢复期相比在急性疾病期间空腹血浆葡萄糖和胰岛素水平较高。在 2 小时葡萄糖液输注研究期间,与恢复期相比在疾病期间血浆葡萄糖和胰岛素浓度明显更高⁽³⁵⁴⁾。在血吸虫病儿童中,与糖尿病患者兄弟姐妹相比 ICA 抗体流行率较高,在静脉注射葡萄糖耐量试验期间,一期胰岛素反应受抑制⁽³⁵⁵⁾。与健康对照相比,空腹血浆胰岛素和葡萄糖输注 60 分钟后胰岛素水平也更高。还存在受损的葡萄糖耐量⁽³⁵⁶⁾。

[0386] 与对照相比,在查加斯病患者中高血糖和糖尿病更加流行⁽³⁵⁷⁾。

[0387] 在念珠菌相关的口炎中也盛行血糖疾病。所有已检查的超过 50 岁的患者 35% 患有先前未诊断的 2 型糖尿病,36% 具有受损的葡萄糖耐量⁽³⁵⁸⁾。

[0388] 在结核分枝杆菌感染中,已注意到增加的胰岛素分泌、持续的高血糖以及在长期疾病中重度糖尿病的发生⁽³⁵⁹⁾。类似地,在持续时间超过 2 年的麻风病中,通常观察到了糖尿病葡萄糖耐量曲线⁽³⁶⁰⁾。

[0389] 免疫调节

[0390] 许多 GPI- 连接的分子涉及免疫应答的调节。这些分子包括嗜中性粒细胞和单核细胞的 GPI-80⁽³⁶¹⁾、嗜中性粒细胞上的 CD16⁽³⁶²⁾、肠上皮内淋巴细胞以及包括 NK 细胞的循环淋巴细胞亚型上的 CD160⁽³⁶³⁾、LFA-3、淋巴细胞功能抗原⁽³⁶⁴⁾、调节 IL-2 诱导的信号 CD48⁽³⁶⁵⁾ 和上的血管内皮细胞上的 CDw109⁽³⁶⁶⁾ 等等。免疫应答随年龄增长而受损⁽³⁶⁷⁾,且针对 GPI- 链元件的抗体能有助于此。

[0391] 结论

[0392] 根据上述公开内容,出现了统一的观点,即通过上述多特异性自身抗体的出现,大多数具有或不具有遗传易感或与老化过程有关疾病的传染性或非传染性起源的疾病变得明显或加剧。大比例的人群中产生了这样的自身抗体,其危害受血糖水平、胰岛素水平、受控于胰岛素和 / 或 GPI- 连接的分子或影响其的其他激素水平、自身抗体和磷脂所识别的其他调节分子影响的所有系统和器官。这些自身抗体潜在地加速老化和老化伴随病、促进癌症、介导与否基于遗传易感性的疾病表现以及干扰针对传染物第一线防御。更确切地说,依赖于个体易感性的自身抗体的产生就是根本的致病问题,引起了一种或多种某些描述于上的病症。类似的情况是对于任何给定的药物,可能会有一种或多种副作用,而在没有这种药物的情况下这些副作用不会存在。

[0393] 以下表格概述了适于根据本发明治疗或诊断的疾病,并进一步提供了在每种疾病和本文及 W099/05175 中披露的集中的疾病机制之间的联系指示。在该表中,列 A 中得分 (+) 表示该疾病与异常口服葡萄糖耐量 (在 OGTT 中) 有关,列 B 中得分表示该疾病是一种其中存在抗磷脂抗体的疾病,列 C 中的得分表示该疾病是一种其中涉及 GPI- 连接的分子的疾病,列 D 中的得分表示该疾病与异常胰岛素水平或胰岛素抗性有关,列 E 中的得分表示该疾病更常见于糖尿病患者中,以及列 F 中的得分表示该疾病与增加的发展为 I 型或 II 型糖尿病的危险性有关。

[0394] 应当注意在下列表格不存在得分 (+) 并不表示该有关联系没有报道或不存在,仅仅是本发明人目前尚未察觉到文献中存在这样的联系的任何报道。

[0395]

疾病	A	B	C	D	E	F
牛皮癣	+		+	+		+
湿疹	+					
白癜风			+	+	+	
黑棘皮症	+			+		
斑秃				+		
阿尔茨海默氏病	+		+	+		
精神分裂症	+			+		+
抑郁症				+		+
帕金森病	+		+	+		
偏头痛	+	+				
多发性硬化	+	+	+		+	
重症肌无力		+	+	+		
肌萎缩性脊髓侧索硬化 和其他运动神经元病症	+		+	+		+
进行性核上性麻痹、皮 克病及其他神经变性病			+			
甲状腺病			+		+	+
2A 和 B 型多发性内分 泌瘤			+			
柯兴氏综合征	+		+			+
阿狄森氏病			+			+
PCOS 性腺机能减退	+		+	+		+
男性早年脱发				+		
肥胖症				+		

X 综合征			+	+		
复发性流产		+			+	+
复发性自发流产		+			+	+
复发性血栓形成		+			+	
全身性红斑狼疮		+				+

[0396]

腹腔病			+		+	+
自身免疫性胃病			+		+	
炎性肠病		+	+			
类风湿性关节炎	+		+	+		
强直性脊柱炎	+			+		
哮喘			+	+	+	
囊性纤维化			+			+
骨质疏松和骨质减少			+		+	
扁平苔藓	+			+		
粘膜白斑病	+				+	
再生障碍性贫血和其他贫血	+		+	+	+	
阵发性夜间血红蛋白尿			+			
睡眠呼吸暂停	+			+		
失眠	+		+	+		+
癌症	+		+	+	+	+
HIV	+	+	+	+		
感染			+		+	
免疫调节疾病			+			

[0397] 药物组合物

[0398] 在第八方面,本发明提供了一种包含本发明第一方面的肽、抗体或等价配体,或本发明第二或第三方面的核酸分子,或本发明第四方面的载体,或本发明第五方面的宿主细胞以及药学上可接受的载体的药物组合物。如以下所详述的,这些组合物可用作治疗或诊断用药,作为疫苗、或作为其他免疫原性组合物。

[0399] 药物组合物可包括根据本发明的肽的组合(例如参见本文实施例 6 和 7)。这样的肽可作为单体掺入组合物中,或可连接以致形成双链或多链。这样的链可包括或可不包括位于单体组成分子之间的接头元件。

[0400] 药物组合物应优选包含治疗有效量的本发明的肽、抗体或等价配体、核酸分子、载体或宿主细胞。如本文中所使用的,术语“治疗有效量”指治疗、改善、或预防目标疾病或病症或显示可检测的治疗或预防效果所需要的治疗剂的量。对于任何化合物,可最初在细胞培养试验如赘生性细胞培养试验或动物模型通常为小鼠、兔、狗或猪中估计该治疗有效量。动物模型还可用于确定合适的浓度范围和给药途径。然后,可将这样的信息用于确定在人中有效的剂量和给药途径。

[0401] 对于人受试者,精确的有效量可取决于疾病的严重程度,受试者的一般健康,受试者的年龄、体重以及性别、饮食、给药时间和频率、药物并用、反应灵敏度以及对治疗的耐受性/反应。该量可通过例行试验确定并处于临床医师的判断范围之内。一般来说,有效剂量可以是 0.0001mg/kg-50mg/kg,优选 0.001mg/kg-10mg/kg,更优选 0.05mg/kg-10mg/kg,甚至更优选 0.1mg/kg-10mg/kg。组合物可单独施用于患者,或可与其他试剂、药物或激素一同施用。

[0402] 业已显示在人患者中包含处于 0.005mg/kg-0.05mg/kg 剂量的根据本发明的肽的组合物提供了有用的治疗效果(参见本文实施例 6 和 7),而无明显不良副作用。因此,本发明人展望更少剂量、相当剂量或更大剂量的肽都可用于本发明的组合物中。因此,优选的剂量可包含至少 0.001mg/kg、至少 0.002mg/kg、至少 0.003mg/kg、至少 0.004mg/kg、至少 0.005mg/kg、至少 0.006mg/kg、至少 0.007mg/kg、至少 0.008mg/kg、至少 0.009mg/kg、至少 0.01mg/kg、至少 0.015mg/kg、至少 0.02mg/kg、至少 0.03mg/kg、至少 0.04mg/kg 或至少 0.05mg/kg 的根据本发明的肽。优选的剂量还可包含小于 1mg/kg、小于 0.9mg/kg、小于 0.08mg/kg、小于 0.07mg/kg、小于 0.06mg/kg 或小于 0.05mg/kg 的根据本发明的肽。优选的剂量可包含 0.001mg/kg-1.0mg/kg、0.0025mg/kg-0.075mg/kg 或 0.005mg/kg-0.05mg/kg 的根据本发明的肽。

[0403] 药物组合物还可包含用于施用治疗剂的药学上可接受的载体。这样的载体包括抗体和其他多肽、基因和其他治疗剂如脂质体,只要载体自身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体即可,并且其可被施用而无异常毒性。适合的载体可以是大的、缓慢代谢的大分子如蛋白、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸、氨基酸共聚物以及灭活病毒颗粒。

[0404] 其中可以使用的药学上可接受的盐例如无机酸盐如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等等;和有机酸盐如醋酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等等。对于药学上可接受的载体的详尽讨论可得自 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub.Co., NJ, 1991)。

[0405] 治疗组合物中药学上可接受的载体可额外地含有液体如水、盐水、甘油和乙醇。此

外,辅助物质如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等等可存在于这样的组合物中。这样的载体能使药物组合物配制为用于患者摄入的片剂、丸剂、糖锭剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、糖浆剂、膏剂、混悬液等等。

[0406] 一旦配制,本发明的组合物就可直接施用于受试者。待治疗的受试者可以是动物;具体来说,可以治疗人受试者。

[0407] 用于本发明中的药物组合物可通过任何途径施用,包括但不限于经口、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、鞘内、心室内、透过表皮、经皮、皮下、腹膜内、鼻内、肠内、局部、舌下、阴道内或直肠途径。基因枪或无针注射器也可用于施用本发明的药物组合物(参见例如 www.powderject.com)。典型地,治疗组合物可制备为可注射的液体溶液或混悬液;也可制备为适合于在注射前溶解于或混悬于液体载体中的固体形式。

[0408] 一般通过皮下、腹膜内、静脉内或肌肉内注射或递送至组织的细胞间隙从而实现组合物的直接递送。剂量用法可以是单剂量用药法或多剂量用药法。

[0409] 在一种方法中,可使用表达封闭技术抑制编码上述有问题的自身抗体的基因的表达,例如使用内在产生或单独施用的反义核酸分子(如上所述)。可通过设计编码自身抗体基因调控区、5' 区或调节区(信号序列、启动子、增强子和内含子)的互补序列或反义分子(DNA、RNA 或 PNA)以获得基因表达的改变。类似地,可通过使用“三股螺旋”碱基配对方法实现抑制(参见 Gee, J. E. 等(1994)在 Huber, B. E. 和 B. I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY 中)。互补序列或反义分子还可被设计成通过阻止转录产物与核糖体的结合而能阻断 mRNA 的翻译。这样的寡核苷酸可被施用或通过体内表达原位产生。

[0410] 基因治疗可用于实现受试者中相关细胞的本发明的肽的内源产生。基因治疗可体内或离体进行。离体基因治疗需要分离纯化患者细胞、导入治疗基因并将遗传改变的细胞导回患者中。与此相反,体内基因治疗不需要分离纯化患者细胞。

[0411] 治疗基因通常被“包装”用于递送给患者。基因递送载体可以是非病毒的,如脂质体,或复制缺陷型病毒如腺病毒(参见 Berkner, K. L., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158, 39-66(1992))或腺伴随病毒(AAV)载体(参见 Muzyczka, N., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158, 97-129(1992)和美国专利号 5, 252, 479)。例如,编码本发明的肽的核酸分子可被工程化用于在复制缺陷型逆转录病毒载体中表达。然后,可分离该表达构建体并导入用包含编码该肽的 RNA 的逆转录病毒质粒载体转导的包装细胞中,使得该包装细胞马上产生含有目的基因的感染性病毒颗粒。可将这些生产细胞施用于受试者用于体内工程化细胞及体内表达多肽(参见 *Human Molecular Genetics*(1996), T Strachan 和 A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd 中的第 20 章,基因治疗和其他基于分子遗传的治疗方法(*Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches*)(以及其中所引用的文献))。

[0412] 另一种方法是施用“裸 DNA”,其中治疗基因被直接注射入肌肉组织血流中。

[0413] 本发明还提供了本发明的肽、核酸分子、载体和宿主细胞可用于疫苗以产生针对引起自身抗体疾病的抗体。因此,本发明的该方面提供了一种包含根据上述本发明实施方案任一的肽、核酸分子、载体或宿主细胞的疫苗组合物。根据本发明的疫苗可以是预防性的(即阻止疾病)或治疗性的(即发病后治疗疾病)。这样的疫苗包含赋予免疫性的肽或核

酸,以及通常的上述药学上可接受的载体,其包括任何自身不诱导产生对接受该组合个体有害抗体的载体。这样的载体可起免疫刺激剂(“佐剂”)作用。可用于本发明疫苗组合物中的佐剂包括但不限于含矿物佐剂(包括矿物盐类如铝盐和钙盐,可包括氢氧化物、磷酸盐、硫酸盐等)、油乳剂、皂苷配方、病毒体(virosomes)和病毒样颗粒、细菌和微生物衍生物、人免疫调节剂、生物粘着剂(bioadhesives)和粘膜粘着剂、微粒、脂质体、聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯配方、聚磷腈(PCPP)、胞壁酰肽、咪唑喹诺酮化合物、缩氨基硫脲化合物和色胺酮(tryptanthrin)化合物或它们的组合。

[0414] 此外,所述肽可缀合细菌类毒素,如来自白喉、破伤风、霍乱、H、幽门和其他病菌的类毒素。根据本发明的肽可单种或组合使用,独自使用或与设计用来促进其有效性的试剂一起使用,以具有或不具有连接元件和载体的单、双或多链使用。

[0415] 因为在胃中肽能被裂解,所以包含肽的疫苗优选肠胃外施用(如皮下、肌内、静脉内或皮内注射)。适于肠胃外施用的配方包括含水和非水的无菌注射溶液,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使配方与受者血液等渗的溶质,和含水和非水的无菌混悬液,其可包括助悬剂或增稠剂。

[0416] 本发明的疫苗配方可存在于单位剂量或多个剂量容器中。例如,密封的安瓿和管形瓶,并可在冻干条件中贮藏,只需在使用前一刻添加无菌液体载体即可。剂量可随疫苗的比活性而改变并能容易地通过例行试验确定。

[0417] 本发明的该方面还包括一种接种个体抗疾病或病症的方法,包括施用根据上述本发明实施方案任一的肽或疫苗组合物于个体。

[0418] 期望在一段长时间内例如在一天、一周、一个月或几个月内通过单次给药将本发明的组合物递送给患者。不同的缓释、长效或植入剂型为本发明人所冀望的。例如,剂型可含有在体液中具有低溶解度的所述肽的药学上可接受的无毒盐。此外,所述肽可配制于凝胶中,例如可将肽与适合于注射的如芝麻油配制于凝胶中如单硬脂酸铝凝胶。另一种类型的供注射的缓释长效剂型可含有分散或包囊于缓慢降解的、无毒的、非抗原性聚合物如聚乳酸/聚乙醇酸聚合物中的肽或盐,例如描述于US 3,773,919中的。本领域技术人员可鉴定适合的缓释、长效或植入配方。

[0419] 根据本发明又一方面,提供了一种诊断个体存在自身免疫抗体水平的方法,该方法包括在针对自身免疫抗体的靶存在下,将血液、血浆或血清样品或其他体液与根据上述本发明实施方案任一的肽接触,并评估特异性结合靶的天然存在的自身抗体的量。这样的方法包括其中能与自身免疫抗体结合的靶分子与所述肽特异性竞争结合的竞争性结合测定法。在该方法中,所述肽可用于检测存在于个体中的自身抗体的存在和数量。这样的测定可基于放射免疫测定、蛋白质印迹分析、荧光激活细胞分选术(FACS)或ELISA技术)。受试者、对照和来自活组织检查的疾病样品中表达的自身抗体的数量可因此与标准值比较。标准值和受试者值之间的偏差建立了用于诊断疾病的参数。诊断测定法可用于区分自身免疫抗体的不存在、存在和过量表达,并用于在治疗干预期间监测多肽水平的调节。这样的测定法还可用于在动物研究、临床试验或监测个体患者治疗中评估特定治疗方案的有效性。

[0420] 上述方法可利用标记的肽,使得该标记的肽与自身抗体竞争靶分子以形成复合物。在这样的测定中,结合于复合物中的标记的量与存在于样品中的自身抗体的浓度成反比。可用酶标记肽,使得复合物的形成抑制或失活了该酶的活性。或者,肽可以是放射性或

荧光标记的。在可供选择的方案中,靶分子可结合连接有底物的酶,使得自身免疫抗体与靶分子的结合激活了该酶并导致可用分光光度计测量的颜色改变。靶分子可以结合连接有底物的酶并存在于能与样品接触的浸渍片上。

[0421] 在所有这些方法中,靶分子可优选为抗-TCR $V\beta$ 多克隆或单克隆免疫球蛋白分子或其鉴别人或任何动物物种中 T 细胞受体 $V\beta$ 链上至少一个表位的任何部分。

[0422] 为便于检测自身抗体,本发明提供了一种诊断试剂盒,包含根据本发明实施方案任一的肽;抗-TCR $V\beta$ 多克隆或单克隆靶免疫球蛋白分子或其鉴别 T 细胞受体 $V\beta$ 链上至少一个表位的任何部分;以及用于检测在自身免疫抗体与靶免疫球蛋白分子之间结合反应的试剂。在诊断疾病或对疾病的敏感性中,这样的试剂盒具有相当重要的应用。

[0423] 根据本发明另一方面,提供了一种掺入一种或多种根据本发明第一方面的肽的阵列。这样的阵列被用于诊断疾病或对疾病的易感性。近来肽、蛋白和抗体阵列领域的发展使得同时检测大量多肽成为可能。使用标准的 ELISA 技术和在包含 96 孔的光学平面玻璃板上的扫描电荷耦合器件 (CCD) 传感器,滤膜上的低密度蛋白阵列,如通用蛋白阵列系统 (Ge H, (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(2), e3) 可以成像所阵列的抗原。也开发了能同时检测临床分析物的免疫传感器阵列。通过使用这样的蛋白阵列,可描绘出健康或患病受试者体液如血清中以及患者药物治疗前后中的蛋白表达(如自身抗体)的分布图。

[0424] 在一可选的实施方案中,所产生的针对生物学表达或合成的本发明第一方面的肽或等价配体的多克隆或单克隆抗体可用于分析技术中,以定性或定量检测针对它们的自身抗体或反作用抗体的存在。

[0425] 现将通过举例详述本发明的不同方面和实施方案,特别是关于具体的肽。应当理解可以进行细节修饰而不背离本发明的范围。

[0426] 附图简述

[0427] 图 1A 和 1B. 克隆的抗体 VH 和 VL 区的核苷酸和氨基酸序列。

[0428] 图 2. 在对照无关的单克隆抗体存在下的人肿瘤细胞系。

[0429] 图 3A 和 3B. 在抗-抗-TCR $V\beta$ 抗体存在下的人肿瘤细胞系,显示典型的肌动蛋白细胞骨架和细胞突出的形态学。

[0430] 图 4A-4E. 克隆的抗体 VH 和 VL 区的核苷酸和氨基酸序列。

[0431] 图 5. 在第 01 天和第 43 天,于 NDX-1 处理组中摄入 75g 葡萄糖前后的血清胰高血糖素(平均值 $\pm$ SD)。

[0432] 图 6. 抗糖尿病药物停药后 2 型糖尿病患者中的 HbA1c 水平。显示了来自所有受试者的平均数据;误差棒指示平均值的标准误差。在抗糖尿病药物恢复后获得自受试者的数据被排除在外。

[0433] 图 7. 抗糖尿病药物停药后 2 型糖尿病患者中的空腹毛细血管葡萄糖水平。显示了来自所有受试者的平均数据;误差棒指示平均值的标准误差。在抗糖尿病药物恢复后获得自受试者的数据被排除在外。

[0434] 图 8. 抗糖尿病药物停药后 2 型糖尿病患者中对白蛋白校正的血清果糖胺水平。显示了来自所有受试者的平均数据;误差棒指示平均值的标准误差。在抗糖尿病药物恢复后获得自受试者的数据被排除在外。

[0435] 图 9. 抗糖尿病药物停药后男性 2 型糖尿病患者中的 HbA1c 水平。显示了受试者

的平均数据 ;误差棒指示平均值的标准误差。在抗糖尿病药物恢复后获得自受试者的数据被排除在外。

[0436] 图 10. 抗糖尿病药物停药后男性 2 型糖尿病患者中的空腹毛细血管葡萄糖水平。显示了平均数据 ;误差棒指示平均值的标准误差。在抗糖尿病药物恢复后获得自受试者的数据被排除在外。

[0437] 图 11. 抗糖尿病药物停药后男性 2 型糖尿病患者中对白蛋白校正的血清果糖胺水平。显示了平均数据 ;误差棒指示平均值的标准误差。在抗糖尿病药物恢复后获得自受试者的数据被排除在外。

[0438] 图 12A-12E. 来自已知 VH 和 VL 序列的高变区序列与本文中所鉴定的高变区序列的比对。

[0439] 实施例

[0440] 实施例 1 :抗体测序

[0441] 方法

[0442] 总 RNA 分离

[0443] 使用异硫氰酸胍法,自 10^9 个分泌识别抗 - 抗 -TCR $V\beta$ 和 GPI- 链元件的抗体的冷冻单克隆细胞提取 Poly A⁺ mRNA。使用 AmbionRNAqueous 试剂盒 (目录号 1912, 批号 019K0158) 进行总 RNA 分离。将大约 0.3mg 的冷冻的杂交瘤细胞重悬于 5ml 裂解 / 结合溶液中。裂解后添加 5ml 64% 乙醇,混合并将溶胞产物 / 乙醇混合物施加到 RNAqueous 过滤装置上并离心让 RNA 与过滤基质结合。然后用 700 μ l 的 1 号洗液洗涤滤器 1 次,用 500 μ l 的洗液 2/3 洗涤两次,在每一步洗涤完成后离心,在最后一次洗涤完成后进行最后的离心步骤。通过施加 2x 60 μ l 预热的 (95 $^{\circ}$ C) 洗脱液到滤器中心并离心,从滤器中洗脱 RNA。用 0.5x 体积氯化锂在 -20 $^{\circ}$ C 下过夜沉淀洗脱的 RNA。在于冷的 70% 乙醇中洗涤后,风干 RNA 沉淀并重悬于 20 μ l 无菌水中并贮藏于 -70 $^{\circ}$ C 下。

[0444] RNA 逆转录为第一链 cDNA

[0445] 使用 1 μ g 上述分离的 RNA 构建互补 DNA 链。

[0446] 使用 Ambion Retroscript 试剂盒 (目录号 1710, 批号 078K0262) 的逆转录反应建立如下 :

[0447] μ l

[0448] 1 RNA (1 μ g)

[0449] 4 dNTPs 混合物 (每种 2.5mM)

[0450] 2 寡 dT 第一链引物

[0451] 9 无菌水

[0452] 在 75 $^{\circ}$ C 下温育该溶液 3 分钟,然后置于冰上。接着添加下列物质 :

[0453] μ l

[0454] 2 10x 备选的 RT-PCR 缓冲液

[0455] 1 胎盘 RNA 酶抑制剂

[0456] 1 M-MLV 逆转录酶

[0457] 在 42 $^{\circ}$ C 下让反应进行 90 分钟,并通过在 92 $^{\circ}$ C 下温育 10 分钟失活。然后,将反应物贮藏在 -20 $^{\circ}$ C 下。

[0458] Ig 重链和轻链片段的聚合酶链式反应

[0459] 根据厂商说明书,将一小鼠 Ig 引物组(附录 1, Novagen, 目录号 69831-3, 批号 N14754)用于重链和轻链 Ig 片段的 PCR 中,该 PCR 使用了如上制备的第一链 cDNA。

[0460] 反应物在需要使用前贮藏于 -20℃ 下。

[0461] PCR 产物克隆

[0462] 将所有 PCR 产物克隆入平端克隆系统中以便于侧序。所使用的系统为 pSTBlue-1Perfectly Blunt™克隆(Novagen, 目录号 70191-3)和 Zero Blunt™ PCR 克隆试剂盒(Invitrogen, 25-0162)。然后通过标准方法对它们进行测序。

[0463] 结果

[0464] 获得的重链和轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列示于图 1A 和 1B 中 (SEQ ID NOs : 1-4)。推断出高变区并下划线于图 1A 和 1B 中 (SEQ ID NOs :6-16)。

[0465] 实施例 2 :同型二聚体 CDR 肽

[0466] 通过 Fmoc 肽合成法,将一 N 末端半胱氨酸添加到每条高变区序列 (CDR-L1-3 和 CDR-H1-3, SEQ ID NOs :6-16) 并二聚化形成同型二聚体。对每一同型二聚体中的某些进行生物素化 ;然后通过使用荧光素化的抗生物素蛋白作为第二步试剂,通过荧光显微镜检术测试生物素化的同型二聚体与人胰腺 α 细胞 (用作为一种人组织指示物) 结合的能力。发现来自 CDR-H2 (SEQ ID NO :8)、CDR-H3 (SEQ ID NO :10) 和 CDR-L3 (SEQ ID NO :16) 同型二聚体结合胰腺 α 细胞。接着通过 ELISA 测试非生物素化的同型二聚体肽与抗 -TCR $V\beta$ 抗体和作为磷脂指示物的心磷脂结合的能力 (表 1)。

[0467] 表 1. 显示单克隆抗 - 抗 -TCR $V\beta$ 抗体或同型二聚体肽、CDR-H2、CDR-H3 和 CDR-L3 与抗 -TCR $V\beta$ 抗体结合的 ELISA 的光密度读数

[0468]

抗原	α - α -TCR V_{β} 抗体	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L3
α -TCR V_{β} 抗体	$0.806 \pm 0.056^{\#}$	$0.307 \pm 0.018^{*}$	$0.182 \pm 0.009^{*}$	$0.243 \pm 0.008^{*}$
培养基 [#] /PBS [*]	$0.372 \pm 0.0037^{\#}$	$0.168 \pm 0.010^{*}$	$0.091 \pm 0.020^{*}$	$0.140 \pm 0.018^{*}$
比率检验法 / 对照	2.17	1.83	2.00	1.74
心磷脂 ^{**}	0.142 ± 0.070	0.151 ± 0.020	0.132 ± 0.009	0.254 ± 0.012
乙醇 ^{**}	0.038 ± 0.014	0.063 ± 0.012	0.061 ± 0.006	0.114 ± 0.021
比率检验法 / 对照	3.74	2.40	2.16	2.23

[0469] [#] 微量滴定板包被有 α -TCR V_{β} 并测试针对 α - α -TCR V_{β} 或培养基。

[0470] ^{*} 微量滴定板包被有 CDR-H2、CDR-H3 和 CDR-L3 并测试针对 α -TCR V_{β} 或培养基。

[0471] **微量滴定板包被有处于乙醇中的心磷脂或乙醇并测试针对 α - α -TCRV _{β} 或 CDR-H2、CDR-H3 和 CDR-L3。

[0472] 对 3 次观察值作出每一平均值和标准偏差。

[0473] 实施例 3:体内自身抗体的鉴定

[0474] 表 2 中显示了证明人血清中存在结合抗-TCR V β 抗体的自身抗体（表示为抗-抗-TCR V β 和本发明的肽）的证据。由于该自身抗体有可能在成年人群中普遍存在，因此无法检测的水平最有可能见于儿童中。这为表 2 中的数据所支持，其中显示与 ICA 阳性和 ICA 阴性对照相比，在新诊断的 I 型糖尿病儿童患者中高水平。

[0475] 表 2. 来自新诊断的糖尿病儿童患者和非糖尿病儿童的血清针对单克隆抗-TCR V β 抗体的反应性

[0476]

受试者类型	受试者总数	针对抗-TCR V β 的反应性数目	测试 / 对照指数范围 *	平均指数
新诊断的糖尿病患者	8	7	1.8-3.8	2.7 $\pm$ 0.8
无糖尿病 ICA 阳性	10	5	1.2-1.5	1.3 $\pm$ 0.1
无糖尿病 ICA 阴性	10	3	1.2-2.1	1.6 $\pm$ 0.5

[0477] *指数范围来自比较 1/30 稀释的测试血清和只有稀释剂（培养基）所得到的光密度测量值的比率。

[0478] • 微量滴定板用抗-TCR V β 抗体包被。

[0479] • 在培养基中将血清稀释为 1/30。

[0480] • 使用抗-人 Ig 过氧化物酶和适合的底物检测结合。

[0481] 实施例 4:癌转移

[0482] 自身抗体通过结合 GPI- 连接的分子如与肌动蛋白细胞骨架相互作用导致细胞运动性的 uPAR 还牵涉癌转移（见第 51 页）。其他其中 uPAR 或类似分子可负责维持细胞骨架的例子是对于最佳的 CFTR 功能，其是在囊性纤维化中（见第 54 页）或关节炎中受累分子，在关节炎中滑膜细胞携带这样的分子侵入软骨和骨（见第 50 页）。

[0483] 图 2 显示了在无关的抗体存在下的人肿瘤细胞系，而图 3a 和 3b 则显示抗-抗-TCR V β 单克隆抗体对相同的肿瘤细胞系的作用，证实了在 30 分钟温育后肌动蛋白细胞骨架的改变和指示运动性的细胞突出。

[0484] 实施例 5:进一步的抗体测序

[0485] 使用上述实施例 1 中描述的方法，克隆并测序编码另外 5 种交叉反应的鼠抗-抗-TCR V β 单克隆抗体的基因。本文中获得单克隆抗体序列的细胞系被命名为细胞系 13.42a、32.15、32.17、32.75 和 32.2。细胞系 32.15、32.17、32.75 和 32.2 产生的抗体为 IgM 抗体，与实施例 1 中一样进行抗体克隆和测序。细胞系 13.42a 产生的抗体为 IgG 抗

体。

[0486] 结果

[0487] 重链和轻链可变区核苷酸和氨基酸序列示于图 4A-4E 中。细胞系 13.42a 的 VH 和 VL 核苷酸和氨基酸序列示于图 4A 中 (SEQ ID NOs :17-20)。细胞系 32.15 的 VH 和 VL 核苷酸和氨基酸序列示于图 4B 中 (SEQ ID NOs :33-36)。细胞系 32.17 的 VH 和 VL 核苷酸和氨基酸序列示于图 4C 中 (SEQ ID NOs :49-52)。细胞系 32.75 的 VH 和 VL 核苷酸和氨基酸序列示于图 4D 中 (SEQ ID NOs :65-68)。细胞系 32.2 的 VH 和 VL 核苷酸和氨基酸序列示于图 4E 中 (SEQ ID NOs :81-84)。

[0488] 推断出高变区并下划线于图 4A-4E 中。细胞系 13.42a 的高变区核苷酸和氨基酸序列示于图 4A 中 (SEQ ID NOs :21-32)。细胞系 32.15 的高变区核苷酸和氨基酸序列示于图 4B 中 (SEQ ID NOs :37-48)。细胞系 32.17 的高变区核苷酸和氨基酸序列示于图 4C 中 (SEQ ID NOs :53-64)。细胞系 32.75 的高变区核苷酸和氨基酸序列示于图 4D 中 (SEQ ID NOs :69-80)。细胞系 32.2 的高变区核苷酸和氨基酸序列示于图 4E 中 (SEQ ID NOs :85-96)。

[0489] 将细胞系 13.42a、32.15、32.17、32.75 和 32.2 确定的高变区序列与实施例 1 中鉴定的高变区序列进行比较,以确定哪些高变区残基对交叉反应的抗-TCR V β 结合是重要的 (即对于针对 GPI 链表位和抗-TCRV β 抗体、具有信号传导能力的分子、包括磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸和心磷脂 (二酰基甘油) 的磷脂、磷脂聚糖、胰岛素作用的第二信使、单链 DNA 或双链 DNA 的多特异性反应性重要的高变区残基)。进行比较的高变区示于下表 3 和 4 中:

[0490] 表 3:重链高变区 (CDR) 序列

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
实施例1	GYTFTRNWINW	NIYPSDSYTNYNQKFKD	LRGLLPDY
细胞系 13.42a	GYAFTSYNMFV	YIDPYNGDTRYSQKFKG	KGMTTGVA
细胞系 32.15	GYTFTRNYGMNW	WINTYTGEPTYADDFKG	EGLYGNFY
细胞系 32.17	GYTFTRNWINW	NIYPSDSYTNYNQKFKD	LRGLLPDY
细胞系 32.75	GYTFTRNWINW	NIYPSDSYTNYNQKFKD	LRGLLPDY
细胞系 32.2	GYTFTRNYGMNW	WINTYTGEPTYADDFKG	EGLYGNFY
保守残基	GY-FT-----W	-I-----Y---FK-	-----

[0492] 表 4:轻链高变区 (CDR) 序列

	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
实施例1	KASQNVDTNVA	SASYRYS	QQYNSYPLT
细胞系 13.42a	RASQDISNYLN	YTSRLHS	QQGNTFPTF
细胞系 32.15	KASQNVGTNVA	SASYRYS	QQYNSYPLT
细胞系 32.17	RASSSISNYL	RTSILAS	QQGSSSPLT
细胞系 32.75	KASQNVDTNVA	SASYRYS	QQYNSYPPT
细胞系 32.2	KASQNVGTNVA	SASYRYS	QQYNSYPLT
保守残基	-AS-----	--S---S	QQ----P--

[0494] 对这些高变区序列的分析揭示了关于交叉反应的抗-TCR V β 结合 (即本文中所述的针对 GPI 链表位的多特异性反应性) 所必需的残基的重要信息。

[0495] 首先,序列分析暗示特异性氨基酸可能主要位于每个 CDR 中的某些位置。对每个

CDR 产生共有序列,其包括在本发明人已克隆和测序的所有 6 种抗体中完全保守的氨基酸。在下列共有序列中,‘x’可以是任意氨基酸,以及‘-’指肽键。

[0496] CDR-H1 G-Y-x-F-T-x-x-x-x-x-W

[0497] CDR-H2 x-I-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0498] cDR-H3 无完全保守的残基

[0499] CDR-L1 x-A-S-x-x-x-x-x-x-x-x

[0500] CDR-L2 x-x-S-x-x-x-S

[0501] CDR-L3 Q-Q-x-x-x-x-P-x-x

[0502] 其次,序列分析能产生每个 CDR 的‘通式’。在下列通式中,其中发现两个或更多个氨基酸残基出现在 CDR 中给定的位置处,那些残基示于括号中。

[0503] CDR-H1 G-Y-[TA]-F-T-[RNS]-[YN]-[WGN]-[IM]-[NF]-W

[0504] CDR-H2 [NWY]-I-[YND]-[PT]-[SY]-[DNT]-[SG]-[YDE]-[TP]-[NRT]-Y-

[0505] [NSA]-[QD]-[KD]-F-K-[DG]

[0506] CDR-H3 [LKE]-[RG]-[GML]-[LTY]-[LTG]-[PGN]-[DY]-[YAF]

[0507] CDR-L1 [KR]-A-S-[QS]-[NDS]-[VI]-[DSG]-[TNS],-[NY]-[VLY]-[ANL]

[0508] CDR-L2 [SYR]-[AT]-S-[YRI]-[RL]-[YHA]-S

[0509] CDR-L3 Q-Q-[YG]-[NS]-[TS]-[YFS]-P-[LTP]-[TF]

[0510] 因此,上述‘通式’包含本发明人已克隆并测序的 6 种 IgM 和 IgG 单克隆抗体的每个 CDR 序列。

[0511] 再次,在 CDR 的每个位点不仅考虑到保守的氨基酸,还考虑到最常见的(占优的)氨基酸,序列分析能产生每个 CDR 的氨基酸通式。在下列通式中,除在给定位置发现共同占优的氨基酸(即在克隆和测序的 CDR 中发现以相等次数出现的氨基酸)之外,该共同占优的氨基酸列于括号中,还列出了保守或占优的氨基酸。

[0512] CDR-H1 G-Y-T-F-T-R-[YN]-W-[IM]-N-W

[0513] CDR-H2 N-I-Y-P-[SY]-D-[SG]-Y-T-N-Y-N-Q-K-F-K-[DG]

[0514] CDR-H3 L-[RG]-G-L-L-P-[DY]-Y

[0515] CDR-L1 K-A-S--Q-N-V--[DSG]--T-N-V-A

[0516] CDR-L2 S-A-S-Y-R-Y-S

[0517] CDR-L3 Q-Q-Y-N-S-Y-P-L-T

[0518] 相信包含满足一条或多条上述共有序列和通式要求的氨基酸序列或由其组成的肽会具有与以下实施例 6 和 7 中体内测试的肽相当的生物活性,并且根据本发明会是有用。

[0519] 实施例 6 :I/IIa 期试验

[0520] 12 位男性葡萄糖不耐症受试者参与了 I/IIa 双盲安慰剂临床对照试验以评估 NDX-1 的安全性和耐受性。NDX-1 是一种 3 种根据本发明的肽的混合物(B71、C80 和 F90),以 2 : 1 : 1 的比例混合。B71 是一种 CDR-H2 衍生的单体肽的同型二聚体,每一单体包含示于 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列以及额外的一个 N 末端半胱氨酸残基。B71 单体肽的氨基酸序列在 SEQ ID NO :159 中给出。C80 是一种 CDR-H3 衍生的单体肽的同型二聚体,每一单体包含示于 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列以及额外的一个 N 末端半胱氨酸残基。C80 单体肽的氨基酸序列在 SEQ ID NO :160 中给出。F90 是一种 CDR-L3 衍生的单体肽的同型二聚

体,每一单体包含示于 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列以及额外的一个 N 末端半胱氨酸残基。F90 单体肽的氨基酸序列在 SEQ ID NO:161 中给出。患者随机分组以接受从第 01 天起间隔 1 周的总计 4 次的测试物质-NDX-1 肽混合物或安慰剂的肌肉 (IM) 注射。3 位患者接受由含 0.1% 铝胶的 1.1ml 盐水组成的安慰剂注射。9 位患者接受处于含 0.1% 铝胶的 1.1ml 盐水中的 0.99mg 的 NDX-1 肽混合物。安慰剂和测试注射是直观相同的。

[0521] NDX-1 肽混合物具有良好耐受。在处理的受试者中,与基线相比空腹血糖、胰岛素和胰高血糖素浓度没有明显改变。在第一次注射前第 01 天和在第 43 天,受试者进行口服葡萄糖耐量试验 (OGTT)。在这两种场合下,在摄入 75g 葡萄糖之前以及之后的第 30、60、90 和 120 分钟时采血样。

[0522] 与安慰剂组相比,接受 NDX-1 肽混合物的受试者显示明显减少的 2 小时血清葡萄糖浓度 ($p = 0.03$)。在 NDX-1 组中胰高血糖素到达其最低水平时需要的时间为在第 01 天 113.3 ± 13.2 分钟,在第 43 天其下降至 63.3 ± 41 分钟 ($p = 0.0027$; 参见图 5)。比较 NDX-1 和安慰剂组,在血浆肌酐 ($p = 0.0009$)、钠 ($p = 0.0344$)、氯 ($p = 0.0041$) 和血浆脲 ($p = 0.0156$) 从基线到试验结束时百分数的改变中还有着显著差异。这些改变与安慰剂组中的疾病进展相一致,但不同于处理组中的疾病进展。此外,在测试组中 OGTT 研究的 2 小时葡萄糖和胰高血糖素结果证实 NDX-1 肽混合物在自发血糖调节中的有效性。

[0523] 实施例 7:2 型糖尿病患者 IIb 期试验

[0524] 正服用一种或多种口服抗糖尿病药物的 31 位 2 型糖尿病受试者 (21 位男性和 10 位女性) 加入了随机分组的持续 16 周的双盲研究中。在第 01 天所有抗糖尿病药物都停药。患者随机分入安慰剂组 (组 C) 或称为组 A、B 或 D 的 3 个处理组之一。所有的组都接受从第 01 天起间隔 1 周的总计 4 次 IM 注射。安慰剂组 (8 位受试者) 接受含 0.1% 铝胶的 1.2ml 盐水。组 A (7 位受试者) 接受处于含 0.1% 铝胶的 1.2ml 盐水中的 1.51mg 的根据本发明的肽 (本文中称为 NDX-71)。组 B (8 位受试者) 接受处于含 0.1% 铝胶的 1.2ml 盐水中的 0.86mg NDX-71。组 D (8 位受试者) 接受处于含 0.1% 铝胶的 1.2ml 盐水中的本发明的 3 种肽的混合物 (0.92mg NDX-71、0.68mg C80 和 0.71mg F90)。安慰剂和研究给药方法是直观相同的。用于该实施例中的 NDX-71 肽是实施例 6 中所用的 B71 肽。用于该实施例中的 C80 和 F90 肽是实施例 6 中所用的 C80 和 F90 肽。

[0525] 在整个研究期间以不变的时间间隔对患者进行临床安全和血糖功效参数的验血。测试物质时良好耐受的。在所有组中临床安全参数都未从基线改变。在研究中没有归因于测试物质的不利事件报道。

[0526] 在停药 4 个月后,通过测量 HbA1c、空腹血糖和果糖胺,在安慰剂组中出现了明显的血糖控制恶化 (参见图 6-8)。HbA1c 的平均水平由基线处的 6.3% 增加到第 113 天的 8.3%。然而,在高剂量处理组中,HbA1c 水平随时间过去几乎保持不变,从基线处的 6.3 直到第 113 天的 6.9,与安慰剂组具有显著差异 ($p = 0.02$; 参见图 6)。

[0527] 21 位男性志愿者的子集分析揭示:结合所有研究的血糖参数即 HbA1c ($p = 0.004$; 参见图 9)、空腹血糖 ($p = 0.024$; 参见图 10) 和校正的果糖胺 ($p = 0.015$; 参见图 11),在安慰剂 (组 C) 和组 A、B 和 D 之间存在总显著性或高显著差异。在安慰剂 (组 C) 和高剂量组 (组 A) 之间存在统计显著的处理差异,对于不同的参数为: HbA1c $p < 0.001$, 空腹血糖 $p = 0.005$ 以及校正的果糖胺 $p = 0.001$ 。与安慰剂相比,处理组中的血糖控制证实了期望

的自发血糖调节作用。

[0528] 该实施例证实了在抗糖尿病药物停药后,接受 1.51mg 剂量的 NDX-71 的患者在没有它们的口服抗糖尿病药物情况下能保持良好的血糖控制。此外,NDX-71 的作用是持久的,即甚至在 NDX-71 最后一次服药 3 个月后,还能观察到该作用。与安慰剂相比,接受 0.86mg 的较低剂量 NDX-71 以及 3 种肽混合物的受试者也显示改善,表明 NDX-71 剂量响应效果,较高剂量或更频繁的注射可产生更有利的结果。

[0529] 实施例 8:已知序列的分析

[0530] 使用实施例 1 和 5 中鉴定的高变区序列,鉴定了具有相关结合特性的已知 VH 和 VL 区的高变区序列。然后,将已知 VH 和 VL 区的高变区序列与实施例 1 和 5 中鉴定的高变区序列中进行比较,来分析对于交叉反应的抗-TCR V β 结合重要的高变区残基(即对于如本文所述的对于针对 GPI 链表位的多特异性反应性重要的高变区残基)。通过应用与实施例 5 中所描述的相同的序列分析方法,鉴定了更多系列的共有序列和通式,图解说明于图 12A-12E 中。

[0531] 被鉴定的现有技术 VH 和 VL 区的登录号列于图 12A-12E 中。对于那些 VH 和 VL 区,现有技术中所披露的结合特异性也列于图 12A-12E 中,使用下列缩写:

[0532] 抗-RF 抗类风湿因子

[0533] 抗-CL 抗心磷脂

[0534] 抗-RNA 抗 RNA

[0535] 抗-sDNA 抗单链 DNA

[0536] 抗-NA 抗核抗体

[0537] 抗-VA 抗 α 可变区

[0538] 抗-CD8 抗 CD8

[0539] 抗-TG 抗甲状腺球蛋白

[0540] 抗-3H1 抗独特型抗体 3H1

[0541] 抗-RO 抗 Ro

[0542] 抗-TRKA 抗-TrkA(高亲和力 NGF 受体)

[0543] 在该实施例中分别分析实施例 1 和 5 中鉴定的 IgG 和 IgM 高变区序列,因为它们被作为基础用于鉴定不同的共有序列和通式。

[0544] 对于 IgM CDR-H1 序列,鉴定了下列共有序列和通式(参见图 12A):

[0545] IgM CDR-H1 G-Y-T-F-T-x-x-x-x-x-W

[0546] IgM CDR-H1 G-Y-T-F-T-[RNYSTDEG]-[NYF]-[WGAY]-[IMV]-[NGQH]-W

[0547] IgM CDR-H1 G-Y-T-F-T-[RNS]-Y-W-[IM]-N-W

[0548] 对于 IgG CDR-H1 序列,鉴定了下列共有序列和通式(参见图 12A):

[0549] IgG CDR-H1 G-Y-x-F-x-x-Y-x-M-x-W

[0550] IgG CDR-H1 G-Y-[ATS]-F-[T/S]-[SDG]-Y-[NWV]-M-[FQHN]-W

[0551] IgG CDR-H1 G-Y-T-F-T-S-Y-W-M-H-W

[0552] 对于 IgM CDR-H2 序列,鉴定了下列共有序列和通式(参见图 12B):

[0553] IgM CDR-H2 x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

[0554] IgM CDR-H2 [NWEAY]-I-[YND]-[PT]-[SYG]-[DTGY]-[SGD]-[YEGS]-[TP]-

- [0555] [NTYGS]-Y-[NAI]-[QDE]-[KD]-F-K-[DGN]
- [0556] IgM CDR-H2 N-I-Y-P-S-D-S-Y-T-N-Y-N-Q-K-F-K-G
- [0557] 对于 IgG CDR-H2 序列, 鉴定了下列共有序列和通式 (参见图 12B) :
- [0558] IgG CDR-H2 x-I-x-P-x-x-x-x-T-x-Y-x-x-K-F-x-G
- [0559] IgG CDR-H2 [YWKNLRL]-I-[DN]-P-[YAEFS]-[NYS]-[GD]-[DSG]-T-[RESKN]-Y-
- [0560] [SAN]-[QSEP]-K-F-[KQT]-G
- [0561] IgG CDR-H2 [YW]-I-N-P-Y-N-G-D-T-[ES]-Y-N-Q-K-F-K-G
- [0562] 对于 CDR-H3 没有鉴定出共有序列或通式, 因为发现在该 CDR 中存在高水平的序列和长度变化。
- [0563] 对于 IgM CDR-L1 序列, 鉴定了下列共有序列和通式 (参见图 12C) :
- [0564] IgM CDR-L1 x-A-S-x-x-x-x-x-x-x-x
- [0565] IgM CDR-L1 [KR]-A-S-[QS]-[NSDT]-[VI]-[DGSRL]-[TSYNK]-[NADY]-[VYGL]-
- [0566] [ALD]
- [0567] IgM CDR-L1 K-A-S-Q-N-V-S-T-N-V-A
- [0568] 对于 IgG CDR-L1 序列, 鉴定了下列共有序列和通式 (参见图 12C) :
- [0569] IgG CDR-L1 x-A-S-x-x-x-x-x-x-L-x
- [0570] IgG CDR-L1 [RK]-A-S-[QR]-[DSG]-[IV]-[SN]-[NSG]-[YW]-L-[NHA]
- [0571] IgG CDR-L1 R-A-S-Q-S-I-S-N-Y-L-[NA]
- [0572] 对于 IgM CDR-L2 序列, 鉴定了下列共有序列和通式 (参见图 12D) :
- [0573] IgM CDR-L2 x-x-S-x-x-x-S
- [0574] IgM CDR-L2 [SRW]-[AT]-S-[YIT]-[RL]-[YAE]-S
- [0575] IgM CDR-L2 S-A-S-Y-R-Y-S
- [0576] 对于 IgG CDR-L2 序列, 鉴定了下列共有序列和通式 (参见图 12D) :
- [0577] IgG CDR-L2 x-T-S-x-L-x-x
- [0578] IgG CDR-L2 [YLDTK]-T-S-[RNKV]-L-[HAG]-[SP]
- [0579] IgG CDR-L2 Y-T-S-N-L-A-S
- [0580] 对于 IgM CDR-L3 序列, 鉴定了下列共有序列和通式 (参见图 12E) :
- [0581] IgM CDR-L3 Q-Q-x-x-S-x-P-x-T
- [0582] IgM CDR-L3 Q-Q-[YGWR]-[NSAG]-S-[YSDW]-P-[LPYI]-T
- [0583] IgM CDR-L3 Q-Q-Y-N-S-Y-P-L-T
- [0584] 对于 IgG CDR-L3 序列, 鉴定了下列共有序列和通式 (参见图 12E) :
- [0585] IgG CDR-L3 Q-Q-x-N-x-x-P-x-x
- [0586] IgG CDR-L3 Q-Q-[GNSTY]-N-[TES]-[FDWY]-P-[TYRF]-[FT]
- [0587] IgG CDR-L3 Q-Q-N-N-E-D-P-[YR]-T
- [0588] 该实施例中的 VH 和 VL 区序列都是已知结合牵涉本文及 W099/05175 中所披露的集中的疾病机制的分子的, 如图 12A-12E 所图解说明。此外, 分析的高变区序列与本发明人在实施例 1 和 5 中鉴定的高变区序列享有显著的结构同源性。因此, 相信包含满足上述共有序列和通式之一要求的氨基酸序列或由其组成的肽也会具有与上述实施例 6 和 7 中体内测试的肽相当的生物活性, 并且根据本发明会是有用。

[0589] 实施例 9 :CDR-H2 序列的进一步分析

[0590] 在已知 VH 和 VL 区序列中进行 CDR-H2 序列的进一步分析,揭示了据信涉及交叉反应的抗-TCR V β 结合的额外的氨基酸残基。具体来说,将来自 67 条具有相关结合特异性的已知 VH 区序列的 CDR-H2 序列与本发明人鉴定的 CDR-H2 序列进行比较,以确定具有必需结合特异性的常出现在 CDR-H2 的每个位点处的残基。

[0591] 鉴定了下列通式,包括在所分析的 67 条 CDR-H2 序列中,在 CDR-H2 中的每个位点处任何被发现在该位点出现 6 次或更多次的残基:

[0592] CDR-H2 [EYWSL]-I-[YSND]-[PSH]-[SGNY]-[GSNTD]-[SGD]-[YTGS]-

[0593] [TIA]-[NY]-[YN]-[NAP]-[QDSEP]-[KSL]-[FVK]-[KQS]-[GR]

[0594] 鉴定了下列通式,包括在所分析的 67 条 CDR-H2 序列中,在 CDR-H2 中的每个位点处任何被发现在该位点出现 10 次或更多次的残基:

[0595] CDR-H2 E-I-[YSN]-[PS]-[SGN]-[GS]-[SG]-[TGS]-T-[NY]-Y-[NAP]-

[0596] [QDS]-[KS]-[FVK]-[KQ]-[GR]

[0597] 鉴定了下列通式,包括在所分析的 67 条 CDR-H2 序列中,在 CDR-H2 中的每个位点处任何被发现在该位点出现 20 次或更多次的残基。在所分析的 67 条 CDR-H2 序列中,在没有被发现出现 20 次或更多次的氨基酸的位置处标示为 'x',其意思是任意氨基酸都可以出现在该位置:

[0598] CDR-H2 x-I-x-P-S-G-G-x-T-Y-x-A-D-[KS]-[FV]-K-G

[0599] 相信包含满足一个或多个上述通式要求的氨基酸序列或由其组成的肽还会具有与上述实施例 6 和 7 中体内测试的肽相当的生物活性,并且根据本发明会是有用的。

[0600] 参考文献

[0601] 1. Payne J., Huber B. T., Cannon N. A., Schneider R., Schilham M. W., Acha-Orbea H., MacDonald H. R. and Hengartner H. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 7695-7698.

[0602] 2. Hooper N. M., Broomfield S. J. and Turner A. J. (1991). Biochem. J. 273: 301-306.

[0603] 3. Saltiel A. R. (1990). Diabetes Care 13:244-256.

[0604] 4. Romero G., Luttrell L., Rogol A., Zeller K., Hewlett E. and Larner J. (1988). Science 240:509-511.

[0605] 5. Perez F. R., Casabiel X., Camina J. P., Zugaza J. L. and Casanueva F. F. (1997). Endocrinology 138:264-272.

[0606] 6. Pipeleers D. G., Schuit F. C., in't Veld P. A., Hooghe-Peters E. L., Van de Winkel M. and Gepts W. (1985). Endocrinology 117:824-833.

[0607] 7. Marchetti P., Scharp D. W., Mclear M., Gingerich R., Finke E., Olack B., Swanson C., Giannarelli R. and Laacy P. E. (1994). Diabetes 43:827-830.

[0608] 8. Todd J., Bell J. and McDevitt H. O. (1989). Nature 329:599-604.

[0609] 9. Kimpimaki T., Kupila A., Hamamainen A-M., Kukko M., Kulama P., Savola K., Simell T., Keskinen P., Ilonen J., Simell O. and Knip M. (2001). J. Clin. Endocrin. Metab. 86:4782-4788.

- [0610] 10. Barnett A. H. , Eff C. , Leslie R. D. G. and Pyke D. A. (1981). *Diabetologia* 20 :404-409.
- [0611] 11. Tisch R. and McDevitt H. (1996). *Review Cell* 85 :291-297.
- [0612] 12. Castano L. and Eisenbarth G. S. (1990). *Ann. Rev. Immunol.* 8 :647-680.
- [0613] 13. Hagopian W. A. , Karlson A. E. , Gottsater A. , Landin-Olsson M. , Grubin C. E. , Sundkvist G. , Petersen J. S. , Boel E. , Dysberg T. and Lernmark A. (1993). *J. Clin. Invest.* 91 :368-374.
- [0614] 14. Passini N. , Larigan J. D. , Genovese S. , Apella E. , Sinigaglia F. and Rogge L. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 :9412-9416.
- [0615] 15. Rowe R. E. , Leech N. J. , Nepom G. T. and McCulloch D. K. (1994). *Diabetes* 43 :87-94.
- [0616] 16. Eisenbarth G. S. (1994). *Diabetes Care* 17 :605-607.
- [0617] 17. Daniel D. , Gill R. G. , Schloot N. and Vegmann D. (1995). *Eur. J. Immunol.* 25 :1056-1062.
- [0618] 18. Roder M. E. , Knip M. , Hartling S. G. , Karjalainen J. , Akerblom H. K. , Binder C. and the Childhood diabetes in Finland Study Group (1994). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 :1570-1575.
- [0619] 19. Dinneen S. , Alzaid A. , Turk D. and Rizza R. (1995). *Diabetologia* 38 :337-343.
- [0620] 20. Kleinbaum J. and Shamon H. (1983). *Diabetes* 32 :493-498.
- [0621] 21. Kahn S. and Halban P. (1997). *Diabetes* 46 :1725-1731.
- [0622] 22. Bolli, G. B. , Tsalikian E. , Haymond M. W. , Cryer P. E. and Gerich J. E. (1984). *J. Clin. Invest.* ,73 :1532-1541.
- [0623] 23. Low M. G. (1989). *FASEB J.* 3 :1600-1608.
- [0624] 24. Shashkin P. N. , Shashkina E. E. , Femquist-Forbes E. , Zhou Y-P. , Grill V. and Katz A. (1997). *Diabetologia* 40 :557-563.
- [0625] 25. Lindegard B. (1986). *Dermatologica* 172 :298-304.
- [0626] 26. Christophers E. (2001). *Clin. Exp. Dermatol.* 26 :314-320.
- [0627] 27. Jucci A. , Vignini M. , Pelfini C. , Criffo A. and Fratino P. (1977). *Arch. Dermatol. Res.* 257 :239-246.
- [0628] 28. Brenelli S. L. , Moraes A. M. , Monte-Alegre S. , Carvalho O. M. and Saad M. J. (1995). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28 :297-301
- [0629] 29. Ena P. , Madeddu P. , Glorioso N. , Cerimele D. and Rappelli A. (1985). *Acta Cardiol.* 40 :199-205.
- [0630] 30. Venneker G. T. , Das P. K. , Meinardi M. M. , van Marle J. , van Veen H. A. , Bos J. D. and Asghar S. S. (1994). *J. Pathol.* 172 :189-197.
- [0631] 31. Hamza S. H. , el-Mazny H. R. and Abdallah M. A. (1978). *Br. J. Dermatol.* 99 :289-292.
- [0632] 32. Taieb A. (2000). *Pigment Cell Res.* 13 Suppl 8 :41-47.

- [0633] 33. Romano G., Moretti G., Di Benedetto A., Giofre C., Di Cesare E., Russo G., Califano L. and Cucinotta D. (1998) *Diabetes Res. Clin. Pract.* 39 :101-106.
- [0634] 34. Tsatmali M., Ancans J. and Thody A. J. (2002). *J. Histochem. Cytochem.* 50 : 125-134.
- [0635] 35. Katsuki A., Sumida Y., Murashima S., Furuta M., Araki-Sasaki R., Tsuchihashi K., Hori Y., Yano Y. and Adachi Y. (2000). *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24 :1260-1264.
- [0636] 36. Scott G., Leopardi S., Printup S. and Madden B. C. (2002). *J. Cell Sci.* 115 :1441-1451.
- [0637] 37. Virador V. M., Muller J., Wu X., Abdel-Malek Z. A., Yu Z. X., Ferrans V. J., Kobayashi N., Wakamatsu K., Ito S., Hammer J. A. and Hearing V. J. (2002). *FASEBJ.* 16 : 105-107.
- [0638] 38. Tobin D. J., Swanson N. N., Pittelkow M. R., Peters E. M. and Schallreuter K. U. (2000). *J. Pathol.* 191 :407-416.
- [0639] 39. Martinez-Esparza M., Ferrer C., Castells M. T., Garcia-Borron J. C. and Zuasti A. (2001). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33 :971-983.
- [0640] 40. Grande J. P., Warner G. M., Walker H. J., Yusufi A. N., Cheng J., Gray C. E., Kopp J. B. and Nath K. A. (2002). *Exp. Biol. Med.* 227 :171-181.
- [0641] 41. Tam B. Y., Germain L. and Philip A. (1998). *J. Cell. Biochem.* 70 :573-586.
- [0642] 42. van den Wijngaard R. M., Asghar S. S., Pijnenborg A. C., Tigges A. J., Westerhof W. and Das P. K. (2002). *Br. J. Dermatol.* 146 :80-87.
- [0643] 43. Bener A., Lestringant G. G., Nyomba B. L., Frossard P. and Saardi H. (2000). *East. Mediterr. Health J.* 6 :416-424.
- [0644] 44. Hermanns-Le T., Hermanns J. F. and Pierard G. E. (2002). *Pediatr. Dermatol.* 19 :12-14
- [0645] 45. Katz A. S., Goff D. C. and Feldman S. R. (2000). *Dermatol. Online J.* 6 :1.
- [0646] 46. Nguven T. T. and Kell M. F. (2001). *J. Pediatr.* 138 :453-454.
- [0647] 47. King-Tryce K., Garza L. and Ozias J. M. (2002). *Texas Department of Health Disease Prevention News* 62(2) :1-3.
- [0648] 48. Bosset S., Barre P., Chalon A., Kurfurst R., Bonte F., Andre P., Perrier P., Disant F., Le Varlet B. and Nicolas J. F. (2002). *Eur. J. Dermatol.* 12 :247-252.
- [0649] 49. Chung J. H., Seo J. Y., Choi H. R., Lee M. K., Youn C. S., Rhie G., Cho K. H., Kim K. H., Park K. C. and Eun H. C. (2001). *J. Invest. Dermatol.* 117 :1218-1224.
- [0650] 50. Elias P. M. and Ghadially R. (2002). *Clin. Geriatr. Med.* 18 :103-120.
- [0651] 51. Lundqvist K. and Schmidtchen A. (2001). *Br. J. Dermatol.* 144 :254-259.
- [0652] 52. Marschall C., Lengyel E., Nobutoh T., Braungart E., Douwes K., Simon A., Magdolen V., Reuning U. and Degitz K. (1999). *J. Invest. Dermatol.* 113 :69-76.
- [0653] 53. Ciaria M. V., Bocciarelli A., Di Gregorio S., Tordi A., Cotroneo P., Marra G., Ghirlanda G. and Strom R. (2001). *Atherosclerosis* 158 :241-246.

- [0654] 54. Buch M. and Emery P. (2002). Hospital Pharmacist 9 :5-10.
- [0655] 55. Sahn E. E. (1995). Semin. Dermatol. 14 :9-14
- [0656] 56. Kumar B. , Sharma V. K. and Sehgal S. (1995). Int. J. Dermatol. 34 :542-545.
- [0657] 57. Shellow W. V. , Edwards J. E. and Koo J. Y. (1992). Int. J. Dermatol. 31 : 186-189.
- [0658] 58. Wang S. J. , Shohat T. , Vadheim C. , Shellow W. , Edwards J. and Rotter J. L. (1994). Am. J. Med. Genet. 51 :234-239.
- [0659] 59. Matilainen V. , Koskela P. and Keinanen-Kiukaanniemi S. (2000). Lancet 356 :1165-1166.
- [0660] 60. Kuusisto J. , Koivisto K. , Mykkanen L. , Helkala E. I. , Vanhanen M. , Hanninen T. , Kervinen K. , Kesaniemi Y. A. , Riekkinen P. J. and Laakso M. (1997). BMJ. 315 :1045-1049.
- [0661] 61. Bierhaus A. , Hofmann M. A. , Ziegler R. and Nawroth P. P. (1998). Cardiovasc. Res. 37 :586-600.
- [0662] 62. Bennett R. G. , Duckworth W. C. and Hamel F. G. (2000). J. Biol. Chem. 275 : 36621-36625.
- [0663] 63. Vekrellis K. , Ye Z. , Qiu W. Q. , Walsh D. , Hartley D. , Chesneau V. , Rosner M. R. and Selkoe D. J. (2000). J. Neurosci. 20 :1657-1665.
- [0664] 64. Yang L. B. , Li R. , Meri S. , Rogers J and Shen Y. (2000). J. Neurosci. 20 : 7505-7509.
- [0665] 65. Reinoso B. S. , Pimenta A. F. and Levitt P. (1996). J. Comp. Neurol. 375 : 274-288.
- [0666] 66. Ogier-Denis E. , Bauvy C. , Couvineau A. , De Stefanis D. , Isidoro C. and Codogno P. (1995). Biochem. Biophys. Res. Commun. 211 :935-942.
- [0667] 67. Haas U and Sparks D. L. (1996). Mol. Chem. Neuropathol. 29 :1-14.
- [0668] 68. Tsukuba T. , Okamoto K. , Yasuda y, m Morikawa W. , Nakanishi H. and Yamamoto K. (2000). Mol. Cells 10 :601-611.
- [0669] 69. van Horssen J. , Otte-Holler I. , David G. , Maat-Schieman M. L. , van den Heuvel L. P. , Wesseling P. , de Waal R. M. and Verbeek M. M. (2001). Acta Neuropathol. 102 :604-614.
- [0670] 70. Snow A. D. , Mar H. , Nochlin D. , Kimata K. , Kato M. , Suzuki S. , Hassell J. and Wight T. N. (1988). Am. J. Pathol. 133 :456-463.
- [0671] 71. Mulder M. and Terwel D. (1998). Haemostasis 28 :174-194.
- [0672] 72. Donahue J. E. , Berzin T. M. , Rafii M. S. , Glass D. J. , Yancopoulos G. D. , Fallon J. R. and Stopa E. G. (1999). Proc. Nat. Acad. Sci. 6468-6472.
- [0673] 73. Holden R. J. and Mooney P. A. (1994). Med. Hypotheses 43 :420-435.
- [0674] 74. Holden R. J. (1995). Med. Hypotheses 44 :379-391.
- [0675] 75. Nathan R. S. , Sachar E. J. , Asnis G. M. , Halbreich U. and Halpern F. S. (1981). Psychiatry Res. 4 :291-300.

- [0676] 76. Offen D., Shtaif B., Hadad D., Weizman A., Melamed E. and Gil-Ad I. (2001). *Neurosci. Lett.* 316 :129-132.
- [0677] 77. Mattson M. P., Pedersen W. A., Duan W., Culmsee C. and Camandola S. (1999). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893 :154-175.
- [0678] 78. Sandyk R. (1993). *Int. J. Neurosci.* 69 :125-130.
- [0679] 79. Potter G. M., Moshirfar A. and Castonguay T. W. (1999). *Physiol. Behav.* 65 : 811-816.
- [0680] 80. Figlewicz D. P., Patterson T. A., Zavosh A., Brot M. D., Roitman M. and Szot P. (1999). *Horm. Metab. Res.* 31 :335-339.
- [0681] 81. Liu Z., Wang Y., Zhao W., Ding J., Mei Z., Guo L., Cui D. and Fei J. (2001). *Neuropharmacology* 41 :464-471.
- [0682] 82. Shiroyama K., Moriwaki K. and Yuge O. (1998). *In vivo* 12 :527-529.
- [0683] 83. Gong L., Wyatt R. J., Baker I. and Masserano J. M. (1999). *Neurosci. Lett.* 263 :153-156.
- [0684] 84. Klein R. D., Sherman D., Ho W. H., Stone D., Bennett G. L., Moffat B., Vandlen R., Simmons L., Gu Q., Hongo J. A., Devaux B., Poulsen K., Armanini M., Nozaki C., Asai N., Goddard A., Phillips H., Henderson C. E., Takahashi M. and Rosenthal A. (1998). *Nature* 387 :717-721.
- [0685] 85. Tietjen G. E., Day M., Norris L., Aurora S., Halvorsen A., Schultz L. R. and Levine S. R. (1998). *Neurology* 50 :1433-1440.
- [0686] 86. Jacome D. E. (2001). *Headache* 41 :895-898.
- [0687] 87. Heinzlef O., Alamowitch S., Sazdovitch V., Chillet P., Joutel A., Tournier-Lasserre E. and Rouillet E. (2000). *Acta Neurolog. Scand.* 101 :36-40.
- [0688] 88. Winer S., Astsaturov I., Cheung R. K., Gunaratnam L., Kubiak V., Cortez M. A., Moscarello M., O' Connor P. W., McKerlie C., Becker D. J. and Dosch H-M. (2001). *J. Immunol.* 166 :2831-2841.
- [0689] 89. Procacci V., Altavilla R. A., Robert, M. G., Chicco D., Antonacci N., Vendemiale G. and Altomare E. (1990). *Bollettino-Societa Italiana Biologia Sperimentale.* 66 :795-802.
- [0690] 90. Kramer E. M., Koch T., Niehaus A. and Trotter J. (1997). *J. Biol. Chem.* 272 : 8937-8945.
- [0691] 91. Siewert E., Silvestri A., Riehl J. and Mertens P. R. (2001). *Eur. J. Med. Res.* 6 :21-26.
- [0692] 92. Green S. T., Ng J. P. and Chan-Lam D. (1988). *Scott. Med. J.* 33 :213-214.
- [0693] 93. Hoch W., McConville J., Helms S., Newsom-Davis J., Melms A. and Vincent A. (2001). *Nat. Med.* 7 :365-368.
- [0694] 94. Tang J., Yuan J. and Hao H. (1997). *Chin. Med. J. (Engl.)* 110 :698-700.
- [0695] 95. Zhmurko V. A. (1999). *Lik. Sprava Mar* :67-69
- [0696] 96. Ishikawa S., Komiyama Y., Kobayashi H., Tsuyuzaki J., Tokunaga S.,

- Miyazaki A., Hanyu N. and Ikeda S. (2001). *Intern. Med.* 40 :952-955.
- [0697] 97. Kaur G. and Arora S. K. (1994). *Mol. Chem. Neuropathol.* 21 :83-93.
- [0698] 98. Bhattacharya S. K. and Saraswati M. (1991). *Indian J. Exp. Biol.* 29 : 1095-1100.
- [0699] 99. Kiss G., Somogyi J., Csermely P., Szelenyi J. and Ver A. (2001). *Diabetologia* 44 :220-223
- [0700] 100. Hooper N. M. (1997). *Clin. Chim. Acta* 266 :3-12
- [0701] 101. Mizisin A. P., Calcutt N. A., DiStefano P. S., Acheson A. and Longo F. M. (1997). *Diabetes* 46 :647-652.
- [0702] 102. Poca S., Guyon T., Levasseur P. and Berrih-Aknin S. (2001). *J. Neuroimmunol.* 120 :180-189.
- [0703] 103. Reyes E. T., Perurena O. H., Feestoff B. W., Jorgensen R. and Moore W. V. (1984). *J. Neurol. Sci.* 63 :317-324.
- [0704] 104. Hubbard R. W., Will A. D., Peterson G. W., Sanchez A., Gillan W. W. and Tan S. A. (1992). *Neurology* 42 :1532-1534.
- [0705] 105. Festoff B. W., Yang S. X., Vaught J., Bryan C. and Ma J. Y. (1995). *J. Neurol. Sci.* 129Suppl. 114-121.
- [0706] 106. Sasaki N., Fukatsu R., Tsuzuki K., Hayashi Y., Yoshida T., Fujii N., Koike T., Wakayama I., Yanagihara R., Garruto R., Amano N. and Makita Z. (1998). *Am. J. Path.* 153 :1149-1155.
- [0707] 107. Bilak M. M., Corse A. M. and Kunc1 R. W. (2001). *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Disord.* 2 :83-91.
- [0708] 108. Torres-Aleman I., Barrios V. and Berciano J. (1998). *Neurology* 50 : 772-776.
- [0709] 109. Suzuki H., Hase A., Miyata Y., Arahata K. and Akazawa C. (1998). *J. Comp. Neurol.* 402 :303-312.
- [0710] 110. Hase A., Suzuki H., Arahata K. and Akazawa C. (1999). *Neurosci. Lett.* 269 :55-57.
- [0711] 111. Hongo J. A., Tsai S. P., Moffat B., Schroeder K. A., Jung C., Chuntharapai A., Lampe P. A., Johnson E. M. Jr., de Sauvage F. J., Armanini M., Phillips H. and Devaux B. (2000). *Hybridoma* 19 :303-315.
- [0712] 112. Encinas M., Tansey M. G., Tsui-Pierchala B. A., Comella J. X., Milbrandt J. and Johnson E. M. Jr. (2001). *J. Neurosci.* 21 :1464-1472.
- [0713] 113. Lundberg C., Lidman O., Holmdahl R., Olsson T. and Piehl F. (2001). *J. Comp. Neurol.* 431 :75-87.
- [0714] 114. Perros P., McCrimmon R. J., Shaw G. and Frier B. M. (1995). *Diabet. Med.* 12 :622-627.
- [0715] 115. Jacquemin C. (1991). *Biochimie* 73 :37-40
- [0716] 116. Petitfrere E., Sartelet H., Vivien D., Varela-Nieto I., Elbtaouri H.,

Martiny L. and HayeB. (1998). *Biochimie*. 80 :1106-1067.

[0717] 117. Zurzolo C. , Lisanti M. P. , Caras I. W. , Nitsch L. and Rodriguez-Boulan E. (1993). *J. Cell Biol.* 121 :1031-9.

[0718] 118. Marino M. , Pichera A. , McCluskey R. T and Chiovato L. (2001). *Thyroid* 11 :47-56.

[0719] 119. Marino M. , AndrewsD. and McCluskey R. T. (2000). *Thyroid* 10 :551-559.

[0720] 120. Katoh R. , Muramatsu A. , Kawaoi A. , Komiyama A. , Suzuki K. , Hemmi A. andKatayama S. (1993). 423 :417-424.

[0721] 121. Lindahl M. , PoteryaevD. , Yu L. , Arumae U. , Timmusk T. , Bongarzone I. , Aiello A. , Pierotti M. A. , Airaksinen M. S. and Saarma M. (2001). *J. Biol. Chem.* 276 : 9344-9351.

[0722] 122. Doppman J. L. , Miller D. L. , Dwyer A. J. , Loughlin T. , Nieman L. , Cutler G. B. , Chrousos G. P. , Oldfield E. and Loriaux D. L. (1988). *Radiology* 166 :347-352.

[0723] 123. Hermus A. R. , Pieters G. F. , Smals A. G. , Pesman G. J. , Lamberts S. W. , Benraad T. J. , van Haelst U. J. and Kloppenborg P. W. (1988). *N. Engl. J. Med.* 318 : 966-970.

[0724] 124. Leibowitz G. , Tsur A. , Chayen S. D. , Salameh M. , Raz I. , Cerasi E. and Gross D. J. (1996). *Clin. Endocrinol.* 44 :717-722.

[0725] 125. Roy M. S. , Roy A. , Gallucci W. T. , Collier B. , Young K. , Kamilaris T. C. andChrousos G. P. (1993). *Metabolism* 42 :696-700

[0726] 126. Grant W. and Liddle M. D. (1960). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 20 : 1539-1560.

[0727] 127. Fanjul L. F. , Marrero I. , Estevez F. , Gonzalez J. , Quintana J. , Santana P. and Ruiz deGalarreta C. M. (1993). *J. Cell Physiol.* 155 :273-281.

[0728] 128. Shaver J. K. , Tezelman S. , Siperstein A. E. , Duh Q. Y. and Clark O. H. (1993). *Surgery*114 :1064-1069.

[0729] 129. Vila M. C. , Cozza E. N. , Lima C. , Ramirez M. I. and De Lederkremer R. M. (1995). *Cell. Signal.* 7 :331-339.

[0730] 130. Robinson P. and Hederer R. (1994). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27 :263-267.

[0731] 131. Benitez L. , Fanjul L. F. , Ruiz de Galarreta C. M. , Quintana Aguiar J. , Gonzalez ReyesJ. , Hernandez I. , Santana Delgado P. , Cabrera Oliva J. , Alonso Solis R. and EstevezRosas F. (1995). *Neurosci. Lett.* 187 :37-40.

[0732] 132. Redmond G. P. (1998). *Int. J. Fertil. Womens Med.* 43 :91-97.

[0733] 133. Kalro B. N. , Loucks T. L and Berga S. L. (2001). *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 28 :35-62.

[0734] 134. Rosenfield R. L. (2001). *J. Am. Acad. Dermatol.* 45 (3Suppl.) :S95-104.

[0735] 135. Norman R. J. , Masters S. and Hague W. (1996). *Fertil. Steril.* 66 :942-947.

[0736] 136. Pugeat M. , Ducluzeau P. H. and Mallion-DonadieuM. (2000). *Horm. Res.* 54 : 322-326.

- [0737] 137. Sekar N. and Veldhuis J. D. (2001). *Endocrinology* 142 :2921-2928.
- [0738] 138. Poretsky L. , Seto-Young D. , Shrestha A. , Dhillon S. , Mirjany M. , Liu H. C. , Yih M. C. and Rosenwaks Z. (2001). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 :3115-3119.
- [0739] 139. Kreze A. Jr. , Hrniciar J. , Dobakova M. and Pekarova E. (1997). *Bratisl. Lek. Listy* 98 :555-558.
- [0740] 140. Marsden P. J. , Murdoch A. P. and Taylor R. (2000). *Hum. Reprod.* 15 :1672-1678.
- [0741] 141. Yanagishita M. (1992). *J. Biol. Chem.* 267 :9499-9504.
- [0742] 142. Fanjul L. F. , Marrero I. , Estevez F. , Gonzalez J. , Quintana J. , Santana P. and Ruiz de Galarreta C. M. (1993). *J. Cell. Physiol.* 155 :273-281.
- [0743] 143. Fanjul L. F. , Marrero I. , Gonzalez J. , Quintana J. , Santana P. , Estevez F. , Mato J. M. and Ruiz de Galarreta C. M. (1993). *Eur. J. Biochem.* 216 :747-755.
- [0744] 144. Hasan S. , Hosseini G. , Princivalle M. , Dong J. C. , Birsan D. , Cagide C. and deAgostini A. I. (2002). *Biol. Reprod.* 66 :144-158.
- [0745] 145. Fedarko N. S. , Ishihara M. and Conrad H. E. (1989). *J. Cell. Physiol.* 139 :287-294.
- [0746] 146. Saad M. F. , Khan A. , Sharma A. , Michael R. , Riad-Gabriel M. G. , Boyadjian R. , Jingagouda S. D. , Steil G. M. and Kamdar V. (1998). *Diabetes* 47 :544-549.
- [0747] 147. Stephens T. W. , Basinski M. , Bristow P. K. , Bue-Valleskey J. M. , Burgett S. G. , Craft L. , Hale J. , Hoffman J. , Hsiung H. M. and Kriauciunas A. (1995). *Nature* 377 :530-532.
- [0748] 148. Baskin D. G. , Figlewicz Lattemann D. , Seeley R. J. , Woods S. C. , Porte D. Jr. and Schwartz M. W. (1999). *Brain Res.* 848 :114-123.
- [0749] 149. Olszewski P. K. , Wirth M. M. , Shaw T. J. , Grace M. K. , Billington C. J. , Giraudo S. Q. and Levine A. S. (2001). *Am. J. Physiol.* 281 :R673-680.
- [0750] 150. Dunbar J. C. and Lu H. (2000). *Brain Res. Bull.* 52 :123-126.
- [0751] 151. Maffei M. , Halaas J. , Ravussin E. , Pratley R. E. , Lee G. H. , Zhang Y. , Fei H. , Kim S. , Lallone R. , Ranganathan S. , Kern P. A. and Friedman J. M. (1995). *Nat. Med.* 1 :1155-1161.
- [0752] 152. Fedarko N. S. , Ishihara M. and Conrad H. E. (1989). *J. Cell. Physiol.* 139 :287-294.
- [0753] 153. Reaven G. M. (1988). *Diabetes Metab. Rev.* 37 :1595-1597.
- [0754] 154. Ivanov D. , Philippova M. , Antopova J. , Gubaeva F. , Iljinskaya O. , Tararak E. , Bochoy V. , Erne P. , Resink T. and Tkachuk V. (2001). *Histochem. Cell. Biol.* 115 :231-242.
- [0755] 155. Reaven G. M. (1991). *Am. Heart J.* 121 :1283-1288.
- [0756] 156. Swan J. W. , Walton C. , Godsland I. F. , Crook D. , Oliver M. F. and Stevenson J. C. (1994). *Br. Heart J.* 71 :41-44.
- [0757] 157. Vuorinen-Markkola H. and Yki-Jarvinen H. (1994). *J. Clin. Endocrinol.*

Metab. 78 :25-29.

[0758] 158. Pagano G., Pacini G., Musso G., Gambino R., Mecca F., Depetris N., Cassader M., David E., Cavallo-Perin P. and Rizzetto M. (2002). Hepatology 35 : 367-372.

[0759] 159. Harano Y., Suzuki M., Koyama Y., Kanda M., Yasuda S., Suzuki K. and Takamizawa I. (2002). J. Diabetes Complications 16 :19-23.

[0760] 160. Semplicini A., Ceolotto G., Massimino M., Valle R., Serena L., De Toni R., Pessina A. C. and Dal Palu C. (1994). Am. J. Med. Sci. 307 Suppl. 1 :S43-46.

[0761] 161. Sardesai M. G., Gray A. A., McGrath M. M. and Ford S. E. (2001). Obstet. Gynecol. 98 :925-927.

[0762] 162. Hardin D. S., Hebert J. D., Bayden T., Dehart M. and Mazur L. (1997). Pediatrics 100(2) :E5.

[0763] 163. Bergstrom E., Hernell O., Persson L. A. and Vessby B. (1996). Metabolism 45 :908-914.

[0764] 164. Facchini F. S., Hua N., Abbasi F. and Reaven G. M. (2001). J. Clin. Endocrinol. Metab. 86 :3574-3578.

[0765] 165. Landy H. J., Kessler C., Kelly W. K. and Weingold A. B. (1992). Am. J. Perinatol. 9 :146-151.

[0766] 166. Andelova K., Sula K. and Velebil P. (1998). Ceska Gynekol. 63 :446-449.

[0767] 167. Lorini R., d'Annunzio G., Montecucco C., Caporali R., Vitali L., Pessino P. and Severi F. (1995). Eur. J. Pediatr. 154 :105-108.

[0768] 168. Galtier-Dereure F., Biron C., Vies M., Bourgeois V., Schved J. F. and Bringer J. (1998). Lupus 7 :469-474.

[0769] 169. Ciarla M. V., Bocciarelli A., Di Gregorio S., Tordi A., Cotroneo P., Marra G., Ghirlanda G. and Strom R. (2001). Atherosclerosis 158 :241-246.

[0770] 170. de Maistre E., Gobert B., Bene M. C., Briquel M. E., Lecompte T. and Faure G. C. (1996). J. Clin. Lab. Anal. 10 :6-12.

[0771] 171. Fialova L., Mikulikova L., Matous-Malbohan I., Benesova O. and Zwinger A. (2000). Physiol. Res. 49 :299-305.

[0772] 172. Lopez-Soto A., Cervera R., Font J., Bove A., Reverter J. C., Munoz F. J., Miret C., Espinosa G., Ordinas A. and Ingelmo M. (1997). Clin. Exp. Rheumatol. 15 : 143-149.

[0773] 173. Toschi V., Motta A., Castelli C., Paracchini M. L., Zerbi D. and Gibelli A. (1998). Stroke 29 :1759-1764.

[0774] 174. Erkan D., Yazici Y., Sobel R. and Lockshin M. D. (2000). J. Rheumatol. 27 : 2817-2821.

[0775] 175. Not T., Tommasini A., Tonini G., Buratti E., Pocecco M., Tortu J. C., Valussi M., Crichiutti G., Berti I., Trevisiol C., Azzoni E., Neri E., Torre G., Martellosi S., Soban M., Lenhardt A., Cattin L. and Ventura A. (2001).

Diabetologia. 44 :151-155.

[0776] 176. Tursi A. , Giogetti G. , Brandimarte G. , Rubino E. , Lombardi D. and Gasbarrini G. (2001). Hepato-Gastroenterol. 48 :462-464

[0777] 177. Williams A. J. , Norcross A. J. , Lock R. J. , Unsworth D. J. , Gale E. A. and Bingley P. J. (2001). Diabetes Care 24 :504-509.

[0778] 178. Di Mario U. , Anastasi E. , Mariani P. , Ballati G. , Perfetti R. , Triglione P. , Motellini M. and Bonamico M. (1992). Acta Pediatr. 81 :593-597.

[0779] 179. Galli-Tsinopoulo, A. , Nousia-Arvanitakis S. , Dracoulacos D. , Xefteri M. and Karamouzis M. (1999). Hormone Res. 52 :119-124.

[0780] 180. Alemany R. , Vila M. R. , Franci C. , Egea G. , Real F. X. and Thomson T. M. (1993). J. Cell Sci. 104 :1155-1162.

[0781] 181. Slomiany A. , Grabska M. and Slomiany B. L. (2001). Mol. Med. 7 :1-10.

[0782] 182. Riley W. J. , Winer A. and Goldstein D. (1983). Diabetologia 24 :418-421.

[0783] 183. Landin-Olsson M. , Karlsson F. A. , Lernmark A. and Sundkvist G. (1992). Diabetes 41 :1022-1027.

[0784] 184. Koike S. , Takeda Y. , Hozumi Y. , Okazaki S. , Aoyagi M. and Sendo F. (2002). Cell Tissue Res. 307 :91-99.

[0785] 185. Tenore A. , Berman W. F. , Parks J. S. and Bongiovanni A. M. (1977). J. Clin. Endocrinol. Metab. 44 :622-628.

[0786] 186. Al-Jaouni R. , Hebutterne X. , Pouget I. and Rampal P. (2000). Nutrition 16 :173-178.

[0787] 187. Eriksson L. S. (1983). Gut 24 :1161-1168.

[0788] 188. Mingrone G. , DeGaetano A. , Pugeat M. , Capristo E. , Greco A. V. and Gasbarrini G. (1999). J. Investig. Med. 47 :319-325.

[0789] 189. Levy E. , Rizwan Y. , Thibault L. , Lepage G. , Brunet S. , Bouthillier L. and Seidman E. (2000). Am. J. Clin. Nutr. 71 :807-815.

[0790] 190. Meddings J. B. , Jarand J. , Urbanski S. J. , Hardin J. and Gall D. G. (1999). Am. J. Physiol. 276 :G951-957.

[0791] 191. Hollander D. , Vadheim C. M. , Brettholz E. , Petersen G. M. , Delahunty T. and Rotter J. I. (1986). Ann. Intern. Med. 105 :883-885.

[0792] 192. Hilsden R. J. , Meddings J. B. and Sutherland L. R. (1996). Gastroenterology 110 :1395-1403.

[0793] 193. Koller E. and Ranscht B. (1996). J. Biol. Chem. 271 :30061-30067.

[0794] 194. Resink T. J. , Kuzmenko Y. S. , Kern F. , Stambolsky D. , Bochkov V. N. , Tkachuk V. A. , Erne P. and Niermann T. (1999). FEBS Lett. 463 :29-34.

[0795] 195. Kuzmenko Y. S. , Kern F. , Bochkov V. N. , Tkachuk V. A. and Resink T. J. (1998). FEBS Lett. 434 :183-187.

[0796] 196. Ivanov D. B. , Philippova M. P. and Tkachuk V. A. (2001). Biochemistry (Mosc.) 66 :1174-1186.

- [0797] 197. Filmus J., Shi W., Wong Z.M. and Wong M.J. (1995). *Biochem. J.* 311 : 561-565.
- [0798] 198. Herndon M.E., Stipp C.S. and Lander A.D. (1999). *Glycobiology* 9 : 143-155.
- [0799] 199. Koh D.M., Miao Y., Chinn R.J., Amin Z., Zeegen R., Westaby D. and Healy J.C. (2001). *Am. J. Roentgenol.* 177 :1325-1332.
- [0800] 200. Graham M.F., Diegelmann R.F., Elson C.O., Lindblad W.J., Gotschalk N., Gay S. and Gay R. (1988). *Gastroenterology* 94 :257-265.
- [0801] 201. Koutroubakis I.E., Petinaki E., Anagnostopoulou E., Kritikos h., Mouzas I.A., Kouroumalis E.A. and Manousos O.N. (1998). *Dig. Dis. Sci.* 43 :2507-2512.
- [0802] 202. Aichbichler B.W., Petritisch W., Reicht G.A., Wenzl H.H., Eherer A.J., Hinterleitner T.A., Auer-Grumbach P. and Krejs G.J. (1999). *Dig. Dis. Sci.* 44 : 852-856.
- [0803] 203. Paolisso G., Valentini G., Giugliano D., Marrazzo G., Tirri R., Gallo M., Tirri G., Varricchio M. and D'Onofrio F. (1991). *Metabolism* 40 :902-907.
- [0804] 204. Takahashi S., Moriwaki Y., Tsutsumi Z., Yamakita J., Yamamoto T. and Hada T. (2001). *Metabolism* 50 :393-398.
- [0805] 205. Svenson K.L., Pollare T., Lithell H. and Hallgren R. (1988). *Metabolism* 37 :125-130.
- [0806] 206. Svenson K.L., Lundqvist G., Wide L. and Hallgren R. (1987). *Metabolism* 36 :940-943.
- [0807] 207. Jimenez-Balderas F.J., Solis J.L. and Mintz G. (1991). *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 22 :121-125.
- [0808] 208. Dessein P.H., Joffe B.I., Stanwix A., Botha A.S. and Moomal Z. (2002). *J. Rheumatol.* 29 :462-466.
- [0809] 209. Martin S., Kardorf J., Schulte B., Lampeter E.F., Gries F.A., Melchera I., Wagner R., Bertrams J., Roep B.O. and Pfutzner A. (1995). *Diabetologia* 38 : 351-355.
- [0810] 210. Mihailova D., Grigorova R., Vassileva B., Mladenova G., Ivanova N., Stephanov S., Lissitchky K. and Dimova E. (1999). *Adv. Exp. Med. Biol.* 455 :55-60.
- [0811] 211. Slot O., Brunner N., Loch H., Oxholm P. and Stephens R.W. (1999). *Ann. Rheum. Dis.* 58 :488-492.
- [0812] 212. Tarui T., Mazar A.P., Cines D.B. and Takada Y. (2001). *J. Biol. Chem.* 276 : 3983-3990.
- [0813] 213. Hoyer-Hansen G., Pessara U., Holm A., Pass J., Weidle U., Dano K. and Behrendt N. (2001). *Biochem. J.* 358 :673-679.
- [0814] 214. Hoyer-Hansen G., Behrendt N., Ploug M., Dano K. and Preissner K.T. (1997). *FEBS Lett.* 420 :79-85.
- [0815] 215. McKeown-Longo P.J. and Panetti T.S. (1996). *Trends Glycosci.*

Glycotechnol. 8 :327-340.

[0816] 216. Deng G. , Curriden S.A. , Wang s. , Rosenberg S. and Loskutoff D. J. (1996). J. Cell Biol. 134 :1563-1571.

[0817] 217. Bajou K. , Devy L. , Masson V. , Albert V. , Frankenne F. , Noel A. and Foidart J. M. (2001). Therapie. 56 :465-472.

[0818] 218. Kero J. , Gisler M. , Hemminki E. and Isolauri E. (2001). J. Allergy Clin. Immunol. 108 :781-783.

[0819] 219. Becker K. G. , Simon R. M. , Bailey-Wilson J. E. , Freidlin B. , Biddison W. E. , McFarland H. F. and Trent J. M. (1998). Proc. Nat. Acad. Sci. 95 :9979-9984.

[0820] 220. Becker K. G. (1999). Diabetes 48 :1353-1358.

[0821] 221. Costello R. W. , Jacoby D. B. and Fryer A. D. (1998). Thorax 53 :613-618.

[0822] 222. Belmonte K. E. , Fryer A. D. and Costello R. W. (1998). J. Appl. Physiol. 85 : 1708-1718.

[0823] 223. Rajah R. , Nachajon R. V. , Collins M. H. , Hakonarson H. , Grunstein M. M. and Cohen P. (1999). Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 20 :199-208.

[0824] 224. Bufi P. L. (1997). Alt. Med. Rev. 2 :104-115.

[0825] 225. Gonzaez-Guerrico A. M. , Cafferata E. G. , Radrizzani m. , Marcucci F. , Gruenert D. , Pivetta O. H. , Favaloro R. R. , Laguens R. , Perrone S. V. , Gallo G. C. and Santa-Coloma T. A. (2002). J. Biol. Chem. 277 :17239-17247.

[0826] 226. Cantiello H. F. (2001). Pflugers Arch. 443 :S75-80.

[0827] 227. Chasan B. , Geisse N. A. , Pedatella K. , Wooster D. G. , Teintze M. , Carattino M. D. , Goldmann W. H. and Cantiello H. F. (2002). Eur. Biophys. J. 30 :617-624.

[0828] 228. Koller L. and Hall. A. (2001). J. Cell Biol. 152 :1145-1157.

[0829] 229. Suzuki K. and Sheetz M. P. (2001). Biophys. J. 81 :2181-2189.

[0830] 230. Shetty. S. and Idell S. (2001). J. Biol. Chem. 276 :24549-24556.

[0831] 231. Gyetko M. R. , Sud S. , Kendall T. , Fuller J. A. , Newstead M. W. and Standiford T. J. (2000). J. Immunol. 165 :1513-1519.

[0832] 232. Letham M. I. , James S. L. , Marriot C. and Burke J. F. (1990). Eur. Respir. J. 3 :19-23

[0833] 233. Devitt A. , Moffatt O. D. , Raykundalia C. , Capra J. D. , Simmons D. L. and Gregory C. D. (1998). Nature 392 :442-443.

[0834] 234. Fadok V. A. , deCathelineau A. , Daleke D. L. , Henson P. M. and Bratton D. L. (2001). J. Biol. Chem. 276 :1071-1077.

[0835] 235. Wang P. , Kitchens R. L. and Munford R. S. (1998). J. Biol. Chem. 273 : 24309-24313.

[0836] 236. Heidenreich S. (1999). J. Leukoc. Biol. 65 :737-743.

[0837] 237. Allport J. R. , Donnelly L. E. , Kefalas P. , Lo G. , Nunn A. , Yadollahi-Farsani M. , Rendall N. B. , Murray S. , Taylor G. W. and MacDermot J. (1996). Br. J. Clin. Pharmacol. 42 :99-106.

- [0838] 238. Freedman S. D. , Kern H. F. and Scheele G. A. (2001). *Gastroenterology* 121 :950-957.
- [0839] 239. Moran A. , Diem P. , Klein D. J. , Levitt M. D. and Robertson R. P. (1991). *J. Pediatr.* 118 :715-723.
- [0840] 240. Lanng S. , Thorsteinsson B. , Roder M. E. , Orskov C. , Holst J. J. , Nerup J. and Koch C. (1993). *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 128 :207-214.
- [0841] 241. Schaedel C. , De Monestrol I. , Hjelte L. , Johannesson M. , Kornfalt R. , Lindblad A. , Strandvik B. , Wahlgren L. and Holmberg L. (2002). *Pediatr. Pulmonol.* 33 : 483-491.
- [0842] 242. Noone P. G. and Knowles M. R. (2001). *Respir. Res.* 2 :328-332.
- [0843] 243. Armstrong D. S. , Grimwood K. , Carzino R. , Carlin J. B. , Olinsky A. and Phelan P. D. (1995). *BMJ* 310 :1571-1572.
- [0844] 244. Dakin C. J. , Pereira J. K. , Henry R. L. , Wang H. and Morton J. R. (2002). *Pediatr. Pulmonol.* 33 :475-482.
- [0845] 245. Wulffraat N. M. , de Graeff-Meeder E. R. , Rijkers G. T. , van der Laag H. and Kuis W. (1994). *J. Pediatr.* 125 :374-378.
- [0846] 246. Leidig-Bruckner G. and Ziegler R. (2001). *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109 Suppl. 2 :S493-514.
- [0847] 247. Lopez-Ibarra P. J. , Pastor M. M. , Escobar-Jimenez F. , Pardo M. D. , Gonzalez A. G. , Luna J. D. , Requena M. E. and Diosdado M. A. (2001). *Endocr. Pract.* 7 : 346-351.
- [0848] 248. Choi S. J. , Devlin R. D. , Menaa C. , Chung H. , Roodman G. D. and Reddy S. V. (1998). *J. Clin. Invest.* 102 :1360-1368.
- [0849] 249. Lowe N. J. , Cudworth A. G. , Clough S. A. and Bullen M. F. (1976). *Br. J. Dermatol.* 95 :9-12.
- [0850] 250. Nigam P. K. , Sharma L. , Agrawal J. K. , Singh G. and Khurana S. K. (1987). *Dermatologica* 175 :284-289.
- [0851] 251. Albrecht M. , Banoczy J. , Dinya E. and Tamas G. Jr. (1992). *J. Oral Pathol. Med.* 21 :364-366.
- [0852] 252. Gibson J. , Lamey P. J. , Lewis M. and Frier B. (1990). *J. Oral Pathol. Med.* 19 :284-287.
- [0853] 253. Issaraagrisil S. , Vannasaeng S. and Piakijagum A. (1989). *Metabolism* 38 :204-207.
- [0854] 254. Vu T. , Griscelli-Bennaceur A. , Gluckman E. , Sigaux F. , Carosella E. D. , Menier C. , Scrobohaci M. L. and Socie G. (1996). *Br. J. Haematol.* 93 :586-589.
- [0855] 255. Winkler A. S. , Marsden J. , Chaudhuri K. R. , Hambley H. and Watkins P. J. (2000). *Diabet. Med.* 17 :410.
- [0856] 256. Yun Y. S. , Lee H. C. , Yoo N. C. , Song Y. D. , Lim S. K. , Kim K. R. , Hahn J. S. and Huh K. B. (1999). *Diabetes Res. Clin. Pract.* 46 :223-229.

- [0857] 257. Wu M., Fan J., Gunning W. and Ratnam M. (1997). *J. Membr. Biol.* 159 : 137-147.
- [0858] 258. Jarva H. and Merj S. (1999). *Scand. J. Immunol.* 49 :119-125.
- [0859] 259. Maciejewski J. P., Young N. S., Yu M., Anderson S. M. and Sloan E. M. (1996). *Thromb. Res.* 83 :433-447.
- [0860] 260. Rawstron A. C., Rollinson S. J., Richards S., Short M. A., English A., Morgan G. J., Hale G. and Hillmen P. (1999). *Br. J. Haematol.* 107 :148-153.
- [0861] 261. Pakdeesuwan K., Muangsup W., Praty Y. U., Issaragrisil S. and Wanachiwanawin W. (2001). *Int. J. Haematol.* 73 :64-70.
- [0862] 262. Noji H., Shichishima T., Saitoh Y., Kai T., Yamamoto T., Ogawa K., Okamoto M., Ikeda K. and Maruyama Y. (2001). *Exp. Hematol.* 29 :391-400.
- [0863] 263. Punjabi N. M., Sorkin J. D., Katzel L. I., Goldberg A. P., Schwartz A. R. and Smith P. L. (2002). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165 :677-682.
- [0864] 264. Ip M. S., Lam B., Ng M. M., Lam W. K., Tsang K. W. and Lam K. S. (2002). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165 :670-676.
- [0865] 265. Zhdanova I. V., Wurtman R. J., Regan M. M., Taylor J. A., Shi J. P. and Leclair O. U. (2001). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 :4727-4730.
- [0866] 266. Bruls E., Crasson M. and Legros J. J. (2000). *Rev. Med. Liege* 55 :785-792.
- [0867] 267. Ganguly S., Gastel J. A., Weller J. L., Schwartz C., Jaffe H., Namboodiri M. A. A., Coon S. L., Hickman A. B., Rollag M., Obsil T., Beauverger P., Ferry G., Boutin J. A. and Klein D. C. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 :8083-8088.
- [0868] 268. Meisel P., Arndt D., Scheuch E., Klebingat K. J. and Siegmund W. (2001). *Ther. Drug Monit.* 23 :9-14
- [0869] 269. Ladero J. M., Agundez J. A., Olivera M., Lozano L., Rodriguez-Lescure A., Diaz-Rubio M. and Benitez J. (2002). *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 58 :115-118.
- [0870] 270. Varzim G., Monteiro E., Silva R., Pinheiro C. and Lopes C. (2002). *J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 64 :206-212.
- [0871] 271. Gawronska-Szklaarz B., Pawlik A., Czaja-Bulsa G., Gornik W., Luszczawska-Kutrzeba T. and Wrzesniewska J. (2001). *Clin. Pharmacol. Ther.* 69 :372-378.
- [0872] 272. Magnan C., Cruciani C., Clement L., Adnot P., Vincent M., Kergoat M., Girard A., Elghozi J. L., Velho G., Beressi N., Bresson J. L. and Ktorza A. (2001). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 :4901-4907.
- [0873] 273. Burger A. J. and Aronson D. (2001). *Int. J. Cardiol.* 81 :243-249.
- [0874] 274. Damholt M. B., Christensen N. J. and Hilsted J. (2001). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* (2001). 61 :531-537.
- [0875] 275. Elahi D. and Muller D. C. (2000). *Eur. J. Clin. Nutr.* 54Suppl. 3 :S112-120.
- [0876] 276. Ruzsas C. and Mess B. (2000). *Neuroendocrinol. Lett.* 21 :17-23.
- [0877] 277. Rudd P. M., Wormald M. R., Wing D. R., Prusiner S. B. and Dwek R. A. (2001). *Biochemistry* 40 :3759-3766.

- [0878] 278. Moya K. L., Sales N., Hassig R., Creminon C., Grassi J. and Di Giamberardino L. (2000). *Microsc. Res. Tech.* 50 :58-65.
- [0879] 279. Sales N., Hassig R., Rodolfo K., Di Giamberardino L., Traiffort E., Ruat M., Fretier P. and Moya K. L. (2002). *Eur. J. Neurosci.* 15 :1163-1167.
- [0880] 280. Brown D. R. (2001). *Trends Neurosci.* 24 :85-90.
- [0881] 281. Tobler I., Gaus S. E., Deboer T., Achermann P., Fischer M., Rulicke T., Moser M., Oesch B., McBride P. A. and Manson J. C. (1996). *Nature* 380 :639-642.
- [0882] 282. Brown D. R., Nicholas R. S. and Canevari L. (2002). *J. Neurosci. Res.* 67 : 211-224.
- [0883] 283. Tobler I., Deboer T. and Fischer M. (1997). *J. Neurosci.* 17 :1869-1879.
- [0884] 284. Bartlett S. F., Lagercrantz H. and Smith A. D. (1976). *Neuroscience* 1 : 339-344.
- [0885] 285. Tayek J. A. (1992). *J. Am. Coll. Nutr.* 11 :445-456.
- [0886] 286. Copeland G. P., Leinster S. J., Davis J. C. and Hipkin L. J. (1987). *Br. J. Surg.* 74 :1031-1035.
- [0887] 287. Copeland G. P., Al-Sumidaie A. M., Leinster S. J., Davis J. C. and Hipkin L. H. (1987). *Eur. J. Surg. Oncol.* 13 :11-16.
- [0888] 288. Tayek J. A. (1995). *J. Am. Coll. Nutr.* 14 :341-348.
- [0889] 289. Nagamani M., Hannigan E. V., Dinh T. V. and Stuart C. A. (1988). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67 :144-148.
- [0890] 290. Bruning P. F., Boonfrer J. M., van Noord P. A., Hart A. A., de Jong-Bakkar M. and Nooijen W. J. (1992). *Int. J. Cancer* 52 :511-516.
- [0891] 291. Talamini R., Franceschi S., Favero A., Negri E., Parazzini F. and La Vecchia C. (1997). *Br. J. Cancer* 75 :1699-1703.
- [0892] 292. Tran T. T., Medline a. and Bruce W. R. (1996). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5 :1013-1015.
- [0893] 293. Heber D., Byerley L. O. and Tchekmedyan N. S. (1992). *J. Parenter. Enteral Nutr.* 16 :60S-64S.
- [0894] 294. Bartlett D. L., Charland S. L. and Torosian M. H. (1995). *Surgery* 118 : 87-97.
- [0895] 295. Wang Y. (2001). *Med. Res. Rev.* 21 :146-170.
- [0896] 296. Thogersen V. B., Heickendorff L. and Ledet T. (1996). *Eur. J. Endocrinol.* 134 :326-330.
- [0897] 297. Anfosso F., Chomiki N., Alessi M. C., Vague P. and Juhan-Vague I. (1993). *J. Clin. Invest.* 91 :2185-2193.
- [0898] 298. Arroyo De Prada N., Schroeck F., Sinner E. K., Muehlenweg B., Twellmeyer J., Sperl S., Wilhelm O. G., Schmitt M. and Magdolen V. (2002). *Eur. J. Biochem.* 269 :184-192.
- [0899] 299. Chazaud B., Ricoux R., Christov C., Plonquet A., Gherardi R. K. and

Barlovatz-Meimon G. (2002). *Am. J. Pathol.* 160 :237-246.

[0900] 300. Devy L., Blacher S., Grignet-Debrus C., Bajou K., Masson V., Gerard R. D., Gils A., Carmeliet P., Declerck P. J., Noel A. and Foidart J. M. (2002). *FASEB J.* 16 :147-154.

[0901] 301. Harbeck N., Kates R. E. and Schmitt M. (2002). *J. Clin. Oncol.* 20 : 1000-1007.

[0902] 302. Kim S. J., Shiba E., Taguchi T., Tsukamoto F., Miyoshi Y., Tanji Y., Takai S. and Noguchi S. (2002). *Anticancer Res.* 22 :387-393.

[0903] 303. Wilhelm O. G., Wilhelm S., Escott G. M., Lutz V., Magdolen V., schmitt., M., Rifkin D. B., Wilson E. L., Graeff H. and Brunner G. (1999). *J. Cell. Physiol.* 180 : 225-235.

[0904] 304. Kleeff J., Wildi S., Kumbasar A., Friess H., Lander A. D. and Korc M. (1999). *Pancreas* 19 :281-288.

[0905] 305. Matsuda K., Maruyama H., Guo F., Kleeff J., Itakura J., Matsumoto Y., Lander A. D. and Korc M. (2001). *Cancer Res.* 61 :5562-5569.

[0906] 306. Saikali Z. and Sinnett D. (2000). *Int. J. Cancer* 89 :418-422.

[0907] 307. Toretsky J. A., Zitomersky N. L., Eskenazi A. E., Voigt R. W., Strauch E. D., Sun C. C., Huber R., Meltzer S. J. and Schlessinger D. (2001). *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 23 :496-499.

[0908] 308. Bar R. S., Dake B. L. and Stueck S. (1987). *Am. J. Physiol.* 253 :E21-27.

[0909] 309. Kaaks R. (2001). *Gynecol. Obstet. Fertil.* 29 :185-191.

[0910] 310. Yu H., Levesque M. A., Khosravi M. J., Papanastasiou-Diamandi A., Clark G. M. and Diamandis E. P. (1996). *Br. J. Cancer* 74 :1242-1247.

[0911] 311. Kuzmenko Y. S., Stambolsky D., Kern F., Bochkov V. N., Tkachuk V. A. and Resink T. J. (1998). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 :489-494.

[0912] 312. Vivier E., Tomasello E. and Paul P. (2002). *Curr. Opin. Immunol.* 14 : 306-311.

[0913] 313. Kwa D., Vingerhoed J., Boeser-Nunnink B., Broersen S. and Schuttemaker H. (2001). *J. Virol.* 75 :10455-10459.

[0914] 314. Correa R. and Munoz-Fernandez M. A. (2001). *AIDS* 15 :1959-1963.

[0915] 315. Mackewicz C. E., Barker E., Greco G., Reyes-Teran G. and Levy J. A. (1997). *J. Clin. Invest.* 100 :921-930.

[0916] 316. Lusso P. (2002). *Vaccine* 20 :1964-1967.

[0917] 317. Laurence J. S., Blanpain C., De Leener A., Parmentier M. and Li Wang P. J. (2001). *Biochemistry* 40 :4990-4999.

[0918] 318. Hoogwerf A. J., Kuschert G. S., Proudfoot A. E., Borlat F., Clark-Lewis I., Power C. A. and Wells T. N. (1997). *Biochemistry* 36 :13570-13578.

[0919] 319. Cladera J., Martin I. and O' Shea P. (2001). *EMBO J.* 20 :19-26.

[0920] 320. Sidenius, N., Sier C. F. C., Ullum H., Pedersen B. K., Lepri A. C., Blasi

F. and Eugen-Olsen J. (2000). Blood 96 :4091-4095.

[0921] 321. Handley M. A. , Steigbigel R. T. and Morrison S. A. (1996). J. Virol. 70 : 4451-4456.

[0922] 322. Schreier H. , Moran P. and Caras I. W. (1994). J. Biol. Chem. 269 : 9090-9098.

[0923] 323. Su H. R. and Boackle R. J. (1994). Int. Arch. Allergy Immunol. 105 : 238-244.

[0924] 324. Adler B. , Ashkar S. , Cantor H. and Weber G. F. (2001). Cell. Immunol. 210 : 30-40.

[0925] 325. Montouri N. , Salzano S. , Rossi G. and Ragno P. (2000). FEBS Lett. 476 : 166-170.

[0926] 326. Pinto L. M. , Lecoeur H. , Ledru E. , Rapp C. , Patey O. and Gougeon M. L. (2002). AIDS 16 :329-339.

[0927] 327. Raulin J. (2002). Prog. Lipid Res. 41 :27-65.

[0928] 328. Nguyen D. H. and Hildreth J. E. (2000). J. Virol. 74 :3264-3272.

[0929] 329. Saifuddin M. , Hedayati T. , Atkinson J. P. , Holguin M. H. , Parker C. J. and Spear G. T. (1997). J. Gen. Virol. 78 :1907-1911.

[0930] 330. Ware L. J. , Wooton S. A. , Morlese J. M. , Gazzard B. G. and Jackson A. A. (2002). Proc. Nutr. Soc. 61 :131-136.

[0931] 331. Constans J. , Guerin V. , Couchouren a. , Seigneur M. , Ryman A. , Blann A. D. , Amiral J. , Amara A. , Peuchant E. , Moreau J. F. , Pellegrin I. , Pellegrin J. L. , Fleury H. , Leng B. and Conri C. (1998). Eur. J. Clin. Invest. 28 :115-122.

[0932] 332. Ilangumaran S. , Arni S. , Poincelet M. , Theler J. M. , Brennan P. J. , Nasir-ud-Din and Hoessli D. C. (1995). J. Immunol. 155 :1334-1342.

[0933] 333. Richard M. , Ibata-Ombetta S. , dromer F. , Bordon-Pallier F. , Jouault T. and Gaillardin C. (2002). Mol. Microbiol. 44 :841-853.

[0934] 334. Ralton J. E. , Mullin K. A. and McConville M. J. (2002). Biochem. J. 363 : 365-375.

[0935] 335. Sauma S. Y. , Tanaka T. M. and Strand M. (1991). Mol. Biochem. Parasitol. 46 :73-80.

[0936] 336. Das S. , Traynor-Kaplan A. , Kachintorn U. , Aley S. B. and Gillin F. D. (1994). Braz. J. Med. Biol. Res. 27 :463-469.

[0937] 337. Tomavo S. , Dubremetz J. F. and Schwarz R. T. (1992). J. Biol. Chem. 267 : 21446-21458.

[0938] 338. Coelho P. S. , Klein A. , Talvani A. , Coutinho S. F. , Takeuchi O. , Akira S. , Silva J. S. , Canizzaro H. , Gazzinelli R. T. and Teixeira M. M. (2002). J. Leukoc. Biol. 71 :837 :844.

[0939] 339. Black C. G. , Barnwell J. W. , Huber C. S. , Galinsski M. R. and Coppel R. L. (2002). Mol. Biochem. Parasitol. 120 :215-224

- [0940] 340. Aliberti J. C. , Machado F. S. , Souto J. P. , Campanelli A. P. , Teixeira M. M. , Gazzinelli R. T. and Silva J. S. (1999). *Infect. Immun.* 67 :4819-4826.
- [0941] 341. Noe K. H. , Cenciarelli C. , Moyer S. A. , Rota P. A. and Shin M. L. (1999). *J. Virol.* 73 :3117-3124.
- [0942] 342. Kazachkov M. Y. , Hu P. C. , Carson J. L. , Murphy P. C. , Henderson F. W. and Noah T. L. (2002). *Exp. Biol. Med.* 227 :330-335.
- [0943] 343. Cook D. N. , Beck M. A. , Coffmann T. M. , Kirby S. L. , Sheridan J. F. , Pragnell I. B. and Smithies O. (1995). *Science* 269 :1583-1585.
- [0944] 344. Doyle H. A. and Murphy J. W. (1997). *J. Leukoc Biol.* 61 :147-155.
- [0945] 345. Gao J. -L. , Wynn T. A. , Chang Y. , Lee E. J. , Broxmeyer H. E. , Cooper S. , Tiffany H. L. , Westphal H. , Kwon-Chung J. and Murphy P. M. (1997). *J. Exp. Med.* 185 :1959-1968.
- [0946] 346. Wadstrom T and Ljungh A. (1999). *J. Med. Microbiol.* 48 :223-233.
- [0947] 347. Guibinga G. H. , Miyanohara A. , Esko J. D. and Friedmann T. (2002). *Mol. Ther.* 5 :538-546.
- [0948] 348. Peiffer I. , Servin A. L. and Bernet-Camard M. F. (1998). *Infect. Immun.* 66 :4036-4042.
- [0949] 349. Gordon V. M. , Nelson K. L. , Buckley J. T. , Stevens V. L. , Tweten R. K. , Elwood P. C. and Leppla S. H. (1999). *J. Biol. Chem.* 274 :27274-27280.
- [0950] 350. Ricci V. , Galmiche A. , Doye A. , Necchi V. , Solcia E. and Boquet P. (2000). *Mol. Biol. Cell* 11 :3897-3909.
- [0951] 351. Munro P. , Kojima H. , Dupont J. L. , Bossu J. L. , Poulain B. and Boquet P. (2001). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 :623-629.
- [0952] 352. Ali N. and Evans W. H. (1990). *Biochem. J.* 271 :193-199.
- [0953] 353. Fratti R. A. , Backer J. M. , Gruenberg J. , Corvera S. and Deretic V. (2001). *J. Cell Biol.* 154 :631-644.
- [0954] 354. Davis T. M. , Pukrittayakamee S. , Supanaranond W. , Looareesuwan S. , Krishna S. , Nagachinta B. , Turner R. C. and White N. J. (1990). *Clin. Endocrinol.* 33 :739-749.
- [0955] 355. Soliman A. T. , El-Nawawy A. A. , El-Azzouni O. F. , Amer E. A. , Demian S. R. and El-Sayed M. H. (1996). *J. Trop. Pediatr.* 42 :46-49.
- [0956] 356. Zaki K. , Kantoosh M. , Hamam M. A. , Shoheib S. , Mikhail N. , Nour H. and Zaki F. (1980). *Hepatogastroenterology* 27 :417-422.
- [0957] 357. dos Santos V. M. , da Cunha S. F. , Teixeira V. de P. , Monteiro J. P. , dos Santos J. A. , dos Santos T. A. , dos Santos L. A. and da Cunha D. F. (1999). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32 :489-496.
- [0958] 358. Vitkov L. , Weitgasser R. , Lugstein A. , Noack M. J. , Fuchs K. and Krautgartner W. D. (1999). *J. Oral Pathol. Med.* 28 :406-409.
- [0959] 359. Karachunskii M. A. , Balabolkin M. I. and Beglarian N. R. (1995). *Vestn.*

Ross. Akad. Med. Nauk. (7) :18-21.

[0960] 360. Garg R. , Agrawal J. K. , Bajpai H. S. , Singh G. and Srivastava P. K. (1990). Indian J. Lepr. 62 :50-54.

[0961] 361. Yoshitake H. , Takeda Y. , Nitto T. and Sendo F. (2002). J. Leukoc. Biol. 71 :205-211.

[0962] 362. Middelhoven P. J. , van Buul J. D. , Kleijer M. , Roos D. and Hordijk P. L. (1999). Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 :568-574.

[0963] 363. Nikolova M. , Marie-Cardine A. , Boussell L. and Bensussan A. (2002). Int. Immunol. 14 :445-451.

[0964] 364. Kirby A. C. , Hill V. , Olsen I. and Porter S. R. (1995). Biochem. Biophys. Res. Commun. 214 :200-205.

[0965] 365. Matko J. , Bodnar A. , Vereb G. , Bene L. , Vaamosi G. , Szentesi G. , Szollosi J. , Gaspar R. , Horejsi V. , Waldmann T. A. and Damjanovich S. (2002). Eur. J. Biochem. 269 :1199-1208.

[0966] 366. Haregewoin A. , Solomon K. , Hom R. C. , Soman G. , Bergelson J. M. , Bhan A. K. and Finberg R. W. (1994). Cell. Immunol. 156 :357-370.

[0967] 367. Schinowski K. , Frohlich L. , Maurer K. , Muller W. E. and Eckert A. (2002). Mech. Ageing Dev. 123 :375-390.

[0001]

序列表

<110> ARPI MATOSSIAN-ROGERS

<120> 用于自身免疫性疾病治疗和诊断的 TCR-V- β 相关肽

<130> P044578WO

<150> GB 0516527.9

<151> 2005-08-11

<150> GB 0609920.4

<151> 2006-05-18

<150> GB 0609921.2

<151> 2006-05-18

<160> 176

<170> SeqWin99, version 1.02

<210> 1

<211> 448

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> DNA 编码的重链可变区

<400> 1

aatggagctg	ggttattctc	ttcttggtag	caacagctac	aggtgtccac	tcccaggtcc	60
aactgcagca	gcctggggct	gagctggtga	ggcctggggc	ttcagtgaag	ctgtcctgca	120
aggcttcttg	ctacaccttc	accaggaact	ggataaactg	ggtgaagcag	aggcctggac	180
aaggccttga	gtggatcgga	aatattttatc	cttctgatag	ttatactaac	tacaatcaaa	240
agttcaagga	caaggccaca	gtgactgtag	acaaatcctc	cagcacagcc	tacatgcagc	300
tcagcagccc	gacatctgag	gactctgcgg	tctattattg	tacaagattg	aggggtttat	360
tacctgacta	ctggggccaa	ggcaccattc	tcacagtctc	ctcagagagt	cagtccttcc	420
caaatgtctt	ccccctcgta	agcttggg				448

<210> 2

<211> 131

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 蛋白重链可变区

<400> 2

Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln
1				5					10					15	

Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys
			20					25					30		

Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Asn	Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Lys
			35				40					45			

Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Asn	Ile	Tyr	Pro	Ser
			50			55					60				

[0002]

```

Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Val
65                               70                               75                               80

Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro
                               85                               90                               95

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Arg Gly Leu
                               100                               105                               110

Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ile Leu Thr Val Ser Ser Glu
                               115                               120                               125

Ser Gln Ser
130

```

```

<210> 3
<211> 440
<212> DNA
<213> 小家鼠

```

```

<220>
<221> DNA 编码轻链可变区

```

```

<400> 3
gggaattcat ggagtcacag acccaggtct ttgtatacat gttgctgtgg ttgtctggtg 60
ttgatggaga cattgtgatg acccagtcctc aaaaattcat gtccacatca gtaggagaca 120
gggtcagcgt cacctgcaag gccagtcaga atgtggatac taatgtagcc tggatatcaac 180
agaaaccagg gcaatctcct aaagcactga ttactcggc atcctaccgg tacagtggag 240
tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc atcagcaatg 300
tgcagtctga agacttggca gagtatttct gtcagcaata taacagctat cctctcacgt 360
tcgggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct 420
tcccaccatc cagtaagctt 440

```

```

<210> 4
<211> 127
<212> PRT
<213> 小家鼠

```

```

<220>
<221> 蛋白轻链可变区

```

```

<400> 4
Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met
1                               5                               10                               15

Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser
                               20                               25                               30

Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala Trp Tyr
                               35                               40                               45

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser
50                               55                               60

Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly
65                               70                               75                               80

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala
                               85                               90                               95

```

[0003]

Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
115 120 125

<210> 5
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> DNA 重链 HV1

<400> 5
ggctacacct tcaccaggaa ctggataaac tgg 33

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 蛋白重链 HV1

<400> 6
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Asn Trp Ile Asn Trp
1 5 10

<210> 7
<211> 51
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> DNA 重链 HV2

<400> 7
aatatttatc cttctgatag ttataactaac tacaatcaaa agttcaagga c 51

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 蛋白重链 HV2

<400> 8
Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> 小家鼠

[0004]

<220>
<221> DNA 重链 HV3

<400> 9
ttgagggggtt tattacctga ctac 24

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 蛋白重链 HV3

<400> 10
Leu Arg Gly Leu Leu Pro Asp Tyr
1 5

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> DNA 轻链 HV1

<400> 11
aaggccagtc agaattgtgga tactaatgta gcc 33

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 蛋白轻链 HV1

<400> 12
Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala
5 10

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> DNA 轻链 HV2

<400> 13
tcggcatcct accggtacag t 21

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>

[0005]

<221> 蛋白轻链 HV2

<400> 14

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> DNA 轻链 HV3

<400> 15

cagcaatata acagctatcc tctcacg

27

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 蛋白轻链 HV3

<400> 16

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 17

<211> 359

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> 细胞系 13.42a VH-1 DNA 序列

<400> 17

agggtcaagct gcaggaggtca ggacctgagc tgggtgaagcc tggggcttca gtgaagggtat 60
cctgcaaggc ttctgggttat gcattcacta gctacaacat gttctgggtg aagcagagcc 120
tggaaagag ccttgagtggt attggatata ttgatcctta caatggtgat actagatata 180
gccagaagtt caagggaag gccacattga ctggtgacaa gtcctccagc acagcctaca 240
tgcattctcaa cagcctgaca tctgaagact ctgcagtcta ttactgtgca agaaagggga 300
tgacgacggg ctatgctatg gactactggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctca 359

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 细胞系 13.42a VH-1 氨基酸序列

<400> 18

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr Asn
20 25 30

[0006]

```

Met Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
   35                               40                   45

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
   50                               55                   60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
   65                               70                   75                   80

His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
   85                               90                   95

Arg Lys Gly Met Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
  100                               105                   110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
  115

```

```

<210> 19
<211> 321
<212> DNA
<213> 小家鼠

```

```

<220>
<221> 细胞系 13.42a VL DNA 序列

```

```

<400> 19
gacatccaga tgactcagtc tccatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
atcagttgta gggcaagtcg ggacattagt aattatttaa actgggtatca gcagaaacca 120
gatggaactg ttaaactcct gctctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggggc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggaacaa 240
gaagatgttg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgt ttccgacgtt cgggtggaggc 300
accaagctgg aaatcaaacg g 321

```

```

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

```

```

<220>
<221> 细胞系 13.42a VL 氨基酸序列

```

```

<400> 20
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1                               5                   10                   15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20                               25                   30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Leu
35                               40                   45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50                               55                   60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65                               70                   75                   80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Thr
85                               90                   95

```

[0007]

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 21
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 13.42a DNA 重链 HV1

<400> 21
ggttatgcat tcactagcta caacatgttc tgg 33

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 13.42a 蛋白重链 HV1

<400> 22
Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr Asn Met Phe Trp
1 5 10

<210> 23
<211> 51
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 13.42a DNA 重链 HV2

<400> 23
tatattgatc cttacaatgg tgatactaga tacagccaga agttcaaggg c 51

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 13.42a 蛋白重链 HV2

<400> 24
Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 13.42a DNA 重链 HV3

[0008]

<400> 25
aaggggatga cgacgggcta tgct 24

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 13.42a 蛋白重链 HV3

<400> 26
Lys Gly Met Thr Thr Gly Tyr Ala
1 5

<210> 27
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 13.42a DNA 轻链 HV1

<400> 27
agggcaagtc aggacattag taattattta aac 33

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 13.42a 蛋白轻链 HV1

<400> 28
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 13.42a DNA 轻链 HV2

<400> 29
tacacatcaa gattacactc a 21

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 13.42a 蛋白轻链 HV2

<400> 30
Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

[0009]

1	5		
<210>	31		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	小家鼠		
<220>			
<221>	细胞系 13.42a DNA 轻链 HV3		
<400>	31		
caacagggta atacgtttcc gacgttc			27
<210>	32		
<211>	9		
<212>	PRT		
<213>	小家鼠		
<220>			
<221>	细胞系 13.42a 蛋白轻链 HV3		
<400>	32		
Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Thr Phe			
1 5			
<210>	33		
<211>	356		
<212>	DNA		
<213>	小家鼠		
<220>			
<221>	细胞系 32.15 VH DNA 序列		
<400>	33		
agggtgcaact gcaggagtct ggacctgagc tgaagaagcc tggagagaca gtcaagatct			60
cctgcaaggc ttctgggtat accttcacaa actatggaat gaactgggtg aagcaggctc			120
caggaaaggg tttaaagtgg atgggctgga taaacaccta cactggagag ccaacatatg			180
ctgatgactt caagggacgg ttgtccttct ctttggaaac ctctgccagc actgcctatt			240
tgcagatcaa caacctcaaa aatgaggaca cggctacata tttctgtgca agggaagggt			300
tgtatggtaa ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctca			356
<210>	34		
<211>	118		
<212>	PRT		
<213>	小家鼠		
<220>			
<221>	细胞系 32.15 VH 氨基酸序列		
<400>	34		
Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr			
1 5 10 15			
Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly			
20 25 30			
Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly			
35 40 45			
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys			

[0010]

50	55	60	
Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu			
65	70	75	80
Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala			
	85	90	95
Arg Glu Gly Leu Tyr Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	35		
<211>	324		
<212>	DNA		
<213>	小家鼠		
<220>			
<221>	细胞系 32.15 VL DNA 序列		
<400>	35		
gacatccaga tgacacagtc tccaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc			60
gtcacctgca aggccagtc gaatgtgggt actaatgtag cctggatatca acagaaacca			120
gggcaatctc cttaaagcact gatttactcg gcacccctacc ggtacagtgg agtcctgat			180
cgcttcacag gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtc			240
gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atcctctcac gttcgggtgct			300
gggaccaagc tggagctgaa acgg			324
<210>	36		
<211>	108		
<212>	PRT		
<213>	小家鼠		
<220>			
<221>	细胞系 32.15 VL 氨基酸序列		
<400>	36		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly			
	5	10	15
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn			
	20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser			
	65	70	75
Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu			
	85	90	95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg			
	100	105	

[0011]

<210> 37
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.15 DNA 重链 HV1

<400> 37
gggtatacct tcacaaacta tggaatgaac tgg 33

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.15 蛋白重链 HV1

<400> 38
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp
1 5 10

<210> 39
<211> 51
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.15 DNA 重链 HV2

<400> 39
tggataaaca cctacactgg agagccaaca tatgctgatg acttcaaggg a 51

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.15 蛋白重链 HV2

<400> 40
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 41
<211> 24
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.15 DNA 重链 HV3

<400> 41
gaagggttgt atggtaacta cttt 24

[0012]

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.15 蛋白重链 HV3

<400> 42
Glu Gly Leu Tyr Gly Asn Tyr Phe
1 5

<210> 43
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.15 DNA 轻链 HV1

<400> 43
aaggccagtc agaatgtggg tactaatgta gcc

33

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.15 蛋白轻链 HV1

<400> 44
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.15 DNA 轻链 HV2

<400> 45
tcggcatcct accggtacag t

21

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.15 蛋白轻链 HV2

<400> 46
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 47
<211> 27

[0013]

<212> DNA
 <213> 小家鼠

 <220>
 <221> 细胞系 32.15 DNA 轻链 HV3

 <400> 47
 cagcaatata acagctatcc tctcacg 27

 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

 <220>
 <221> 细胞系 32.15 蛋白轻链 HV3

 <400> 48
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 49
 <211> 350
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

 <220>
 <221> 细胞系 32.17 VH DNA 序列

 <400> 49
 aggtcaaaact gcaggagtca ggggctgagc tgggtgaggcc tggggccttca gtgaagctgt 60
 cctgcaaggc ttctggctac accttcacca ggaactggat aaactgggtg aagcagaggc 120
 ctggacaagg ccttgagtgg atcggaataa tttatccttc tgatagttat actaactaca 180
 atcaaaagtt caaggacaag gccacagtga ctgtagacaa atcctccagc acagcctaca 240
 tgcagctcag cagcccgaca tctgaggact ctgcggtcta ttattgtaca agattgaggg 300
 gtttattacc tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 350

 <210> 50
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

 <220>
 <221> 细胞系 32.17 VH 氨基酸序列

 <400> 50
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Asn Trp
 20 25 30
 Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 50 55 60
 Asp Lys Ala Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80

[0014]

Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Leu Arg Gly Leu Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 51
<211> 327
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.17 VL DNA 序列

<400> 51
gacattgtgc taacccaatc tccagtatcc ataactgcat ctcgagggga gaaggtcacc 60
tcacctgcc gtgccagctc aagtataagt tccaattact tacactgtta ccagcagaag 120
ccaggatcct cccctaaact tttgatttat aggacatcca tcctggcatc tggagtccta 180
gacagcttca gtggcagtggt gtctgagagc tcttacactc tgacaatcag ctgcatgcag 240
gacgaagttg ctgccactta ctattgtcag caggggagta gtagccccct cacgttcggt 300
gctgggacca agctggagct gaaacgg 327

<210> 52
<211> 109
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.17 VL 氨基酸序列

<400> 52
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Ser Ile Thr Ala Ser Arg Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30

Tyr Leu His Cys Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Arg Thr Ser Ile Leu Ala Ser Gly Val Leu Asp Ser Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Glu Ser Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Cys Met Gln
65 70 75 80

Asp Glu Val Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ser Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 53
<211> 30
<212> DNA
<213> 小家鼠

[0015]

<220>
<221> 细胞系 32.17 DNA 重链 HV1

<400> 53
ggctacacct tcaccaggaa ctggataaac 30

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.17 蛋白重链 HV1

<400> 54
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Asn Trp Ile Asn Trp
1 5 10

<210> 55
<211> 51
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.17 DNA 重链 HV2

<400> 55
aatatttatc cttctgatag ttatactaac tacaatcaaa agttcaagga c 51

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.17 蛋白重链 HV2

<400> 56
Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
5 10 15
Asp

<210> 57
<211> 24
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.17 DNA 重链 HV3

<400> 57
ttgagggggtt tattacctga ctac 24

<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

[0016]

<220>

<221> 细胞系 32.17 蛋白重链 HV3

<400> 58

Leu Arg Gly Leu Leu Pro Asp Tyr
1 5

<210> 59

<211> 42

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> 细胞系 32.17 DNA 轻链 HV1

<400> 59

atcacctgcc gtgccagctc aagtataagt tccaattact ta

42

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 细胞系 32.17 蛋白轻链 HV1

<400> 60

Arg Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Leu
1 5 10

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> 细胞系 32.17 DNA 轻链 HV2

<400> 61

aggacatcca tcctggcatc t

21

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 细胞系 32.17 蛋白轻链 HV2

<400> 62

Arg Thr Ser Ile Leu Ala Ser
1 5

<210> 63

<211> 27

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

[0017]

<221> 细胞系 32.17 DNA 轻链 HV3

<400> 63

cagcagggga gtagtagccc cctcacg

27

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 细胞系 32.17 蛋白轻链 HV3

<400> 64

Gln Gln Gly Ser Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 65

<211> 350

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> 细胞系 32.75 VH DNA 序列

<400> 65

aggtcaaact	gcaggagtca	ggggctgagc	tggtgaggcc	tggggcttca	gtgaagctgt	60
cctgcaaggc	ttctggctac	accttcacca	ggaactggat	aaactgggtg	aagcagagggc	120
ctggacaagg	ccttgagtgg	atcggaata	tttatecttc	tgatagttat	actaactaca	180
atcaaaaagt	caaggacaag	gccacagtga	ctgtagacaa	atcctccagc	acagcctaca	240
tgcagctcag	cagcccgaca	tctgaggact	ctgcggtcta	ttattgtaca	agattgaggg	300
gtttattacc	tgactactgg	ggccaaggga	ccacggtcac	cgtctcctca		350

<210> 66

<211> 116

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 细胞系 32.75 VH 氨基酸序列

<400> 66

Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser
1			5					10					15		

Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Asn	Trp
		20						25					30		

Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly
	35					40					45				

Asn	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
50						55					60				

Asp	Lys	Ala	Thr	Val	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met
65					70				75					80	

Gln	Leu	Ser	Ser	Pro	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr
				85					90					95	

[0018]

Arg Leu Arg Gly Leu Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 67
<211> 324
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>

<221> 细胞系 32.75 VL DNA 序列

<400> 67
gacatccaga tgacacagtc tccaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
gtcacctgca aggccagtca gaatgtggat actaatgtag cctgggtatca acagaaacca 120
gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtc 240
gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atcctcctac gttcgggtgct 300
ggaccaagc tggagctgaa acgg 324

<210> 68
<211> 108
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>

<221> 细胞系 32.75 VL 氨基酸序列

<400> 68
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 69
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>

<221> 细胞系 32.75 DNA 重链 HV1

[0019]

<400> 69
ggctacacct tcaccaggaa ctggataaac tgg 33

<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.75 蛋白重链 HV1

<400> 70
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Asn Trp Ile Asn Trp
1 5 10

<210> 71
<211> 51
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.75 DNA 重链 HV2

<400> 71
aatatttatc cttctgatag ttatactaac tacaatcaaa agttcaagga c 51

<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.75 蛋白重链 HV2

<400> 72
Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 73
<211> 24
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.75 DNA 重链 HV3

<400> 73
ttgaggggtt tattacctga ctac 24

<210> 74
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.75 蛋白重链 HV3

[0020]

<400> 74
Leu Arg Gly Leu Leu Pro Asp Tyr
1 5

<210> 75
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.75 DNA 轻链 HV1

<400> 75
aaggccagtc agaatgtgga tactaatgta gcc 33

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.75 蛋白轻链 HV1

<400> 76
Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 77
<211> 21
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.75 DNA 轻链 HV2

<400> 77
tcggcctcct accggtacag t 21

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.75 蛋白轻链 HV2

<400> 78
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 79
<211> 27
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.75 DNA 轻链 HV3

<400> 79
cagcaatata acagctatcc tcctacg 27

[0021]

<210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 细胞系 32.75 蛋白轻链 HV3

<400> 80
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 81
 <211> 356
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 细胞系 32.2 VH-1 DNA 序列

<400> 81
 aggtgaagct gcaggagtca ggacctgagc tgaagaagcc tggagagaca gtcaagatct 60
 cctgcaaggc ttctgggtat accttcacaa actatggaat gaactgggtg aagcaggctc 120
 caggaaagggt tttaaagtgg atgggctgga taaacaccta cactggagag ccaacatatg 180
 ctgatgactt caagggacgg ttgaccttct ctttggaaac ctctgccagc actgcctatt 240
 tgcagatcaa caacctcaaa aatgaggaca cggctacata tttctgtgca agggaagggt 300
 tgtatggtaa ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcacccgtc tcctca 356

<210> 82
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 细胞系 32.2 VH-1 氨基酸序列

<400> 82
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
 20 25 30
 Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly
 35 40 45
 Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Gly Leu Tyr Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser

[0022]

115

<210> 83
<211> 324
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.2 VL DNA 序列

<400> 83
gacatccaga tgaccagtc tccaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
gtcacctgca aggccagtc gaatgtgggt actaatgtag cctggatatca acagaaacca 120
gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcacccctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240
gaagacttgg cagagtatct ctgtcagcaa tataacagct atcctctcac gttcggtgct 300
gggaccaagc tggaaataaa acgg 324

<210> 84
<211> 108
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.2 VL 氨基酸序列

<400> 84
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 85
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.2 DNA 重链 HV1

<400> 85
gggtatacct tcacaaacta tggaatgaac tgg 33

<210> 86

[0023]

<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.2 蛋白重链 HV1

<400> 86
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp
1 5 10

<210> 87
<211> 51
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.2 DNA 重链 HV2

<400> 87
ggataaaca cctacactgg agagccaaca tatgctgatg acttcaaggg a 51

<210> 88
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.2 蛋白重链 HV2

<400> 88
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 89
<211> 24
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.2 DNA 重链 HV3

<400> 89
gaagggttgt atggtaacta cttt 24

<210> 90
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.2 蛋白重链 HV3

<400> 90
Glu Gly Leu Tyr Gly Asn Tyr Phe
1 5

[0024]

<210> 91
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.2 DNA 轻链 HV1

<400> 91
aaggccagtc agaatgtggg tactaatgta gcc

33

<210> 92
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.2 蛋白轻链 HV1

<400> 92
ys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 93
<211> 21
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.2 DNA 轻链 HV2

<400> 93
tcggcatcct accggtacag t

21

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.2 蛋白轻链 HV2

<400> 94
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 95
<211> 27
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> 细胞系 32.2 DNA 轻链 HV3

<400> 95
cagcaatata acagctatcc tctcacg

27

<210> 96
<211> 9
<212> PRT

[0025]

<213> 小家鼠

<220>

<221> 细胞系 32.2 蛋白轻链 HV3

<400> 96
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 97
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>

<221> A39276 CDR-H1

<400> 97
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe Trp Ile Gly Trp
1 5 10

<210> 98
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>

<221> AAL59371.1 CDR-H1

<400> 98
Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Asn Ala Ile Gln Trp
1 5 10

<210> 99
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>

<221> AAB32203.1 CDR-H1

<400> 99
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp
1 5 10

<210> 100
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>

<221> AAT76246.1 CDR-H1

<400> 100
Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met His Trp
1 5 10

<210> 101
<211> 11
<212> PRT

[0026]

<213> 小家鼠

<220>

<221> AAR90999.1 CDR-H1

<400> 101
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp
1 5 10

<210> 102
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>

<221> AAB46762.1 CDR-H1

<400> 102
Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Tyr Val Asn Trp
1 5 10

<210> 103
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>

<221> AAG33839.1 CDR-H1

<400> 103
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile His Trp
1 5 10

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>

<221> AAT76245.1 CDR-H1

<400> 104
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His Trp
1 5 10

<210> 105
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>

<221> CAA84376.1 CDR-H1

<400> 105
Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Ile His Trp
1 5 10

<210> 106
<211> 11
<212> PRT

[0027]

<213> 小家鼠

<220>
<221> AAB46761.1 CDR-H1

<400> 106
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His Trp
1 5 10

<210> 107
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAB58061.1 CDR-H1

<400> 107
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met His Trp
1 5 10

<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> F30502 CDR-H1

<400> 108
Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp
1 5 10

<210> 109
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAR91003.1 CDR-H1

<400> 109
Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp
1 5 10

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAT76236.1 CDR-H1

<400> 110
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp
1 5 10

<210> 111
<211> 17
<212> PRT

[0028]

<213> 小家鼠

<220>

<221> AAB32203.1 CDR-H2

<400> 111

Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 112

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> AAT68292.1 CDR-H2

<400> 112

Glu Ile Asp Thr Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 113

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> A39276 CDR-H2

<400> 113

Asn Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 114

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> AAB58061 CDR-H2

<400> 114

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asn

<210> 115

<211> 17

<212> PRT

[0029]

<213> 小家鼠

<220>

<221> 1921302A CDR-H2

<400> 115

Asn	Ile	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 116

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> AAR91004.1 CDR-H2

<400> 116

Trp	Ile	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Ser	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 117

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> F30502 CDR-H2

<400> 117

Lys	Ile	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 118

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> AAT76236.1 CDR-H2

<400> 118

Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 119

<211> 17

<212> PRT

[0030]

<213> 小家鼠

<220>

<221> AAB46758 CDR-H2

<400> 119

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 120

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> AAE72083 CDR-H2

<400> 120

Leu Ile Asn Pro Phe Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gln Lys Phe Thr
1 5 10 15

Gly

<210> 121

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> B30502 CDR-H2

<400> 121

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 122

<400> 122

000

<210> 123

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> AAR91007.1 CDR-H2

<400> 123

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

[0031]

<210> 124
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAS01840.1 CDR-L1

<400> 124
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 125
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAS01841.1 CDR-L1

<400> 125
Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 126
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAT76271.1 CDR-L1

<400> 126
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 127
<211> 15
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAB46763.1 CDR-L1

<400> 127
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 128
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> AAA20447.1 CDR-L1

<400> 128
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

[0032]

<210> 129
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> PC4282 CDR-L1

<400> 129
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 130
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> CAA56180.1 CDR-L1

<400> 130
Arg Ala Ser Gln Thr Val Arg Lys Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 131
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 1921302B CDR-L1

<400> 131
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu His
1 5 10

<210> 132
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> AAL59380.1 CDR-L1

<400> 132
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 133
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> AAL59377.1 CDR-L1

<400> 133
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

[0033]

<210> 134
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> CAA63587.1 CDR-L1

<400> 134
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 135
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> AAG30434.1 CDR-L1

<400> 135
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 136
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> CAA56181.1 CDR-L1

<400> 136
Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 137
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAE72082.1 CDR-L1

<400> 137
Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Gly Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 138
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAS01840.1 CDR-L2

<400> 138
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

[0034]

<210> 139
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> G30502 CDR-L2

<400> 139
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 140
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> AAL59376.1 CDR-L2

<400> 140
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 141
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAL59379.1 CDR-L2

<400> 141
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 142
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAT76280.1 CDR-L2

<400> 142
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 143
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAB46767.1 CDR-L2

<400> 143
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

[0035]

<210> 144
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAB46765.1 CDR-L2

<400> 144
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 145
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAB46766.1 CDR-L2

<400> 145
Tyr Thr Ser Asn Leu Ala Pro
1 5

<210> 146
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAB46764.1 CDR-L2

<400> 146
Tyr Thr Ser Asn Leu Ala Pro
1 5

<210> 147
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAS01843.1 CDR-L2

<400> 147
Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 148
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> AAG30433.1 CDR-L2

<400> 148
Lys Thr Ser Val Leu Gly Ser
1 5

[0036]

<210> 149
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> CAC22102.1 CDR-L2

<400> 149
Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 150
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAS01840.1 CDR-L3

<400> 150
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 151
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAB46766.1 CDR-L3

<400> 151
Gln Gln Trp Ser Ser Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 152
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> PC4282 CDR-L3

<400> 152
Gln Gln Arg Ala Ser Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> S67940 CDR-L3

<400> 153
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

[0037]

<210> 154
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> CAA56180.1 CDR-L3

<400> 154
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Thr
1 5

<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAB58062.1 CDR-L3

<400> 155
Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 156
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAS01844.1 CDR-L3

<400> 156
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr
1 5

<210> 157
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> C30502 CDR-L3

<400> 157
Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> AAB46763.1 CDR-L3

<400> 158
Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Phe Thr
1 5

[0038]

<210> 159
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成单体肽

<220>
<221> B71 单体肽

<400> 159
Cys Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Asp

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成单体肽

<220>
<221> c80 单体肽

<400> 160
Cys Leu Arg Gly Leu Leu Pro Asp Tyr
1 5

<210> 161
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成单体肽

<220>
<221> F90 单体肽

<400> 161
Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5 10

<210> 162
<211> 11
<212> PRT
<213> 共有序列

<220>
<221> 共有序列 1

<400> 162
Gly Tyr Xaa Phe Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp

[0039]

1	5	10
<210>	163	
<211>	17	
<212>	PRT	
<213>	共有序列	
<220>		
<221>	共有序列 2	
<400>	163	
Xaa Ile	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Phe Lys	
1	5	10 15
Xaa		
<210>	164	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	共有序列	
<220>		
<221>	共有序列 3	
<400>	164	
Xaa Ala	Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	
1	5	10
<210>	165	
<211>	7	
<212>	PRT	
<213>	共有序列	
<220>		
<221>	共有序列 4	
<400>	165	
Xaa Xaa	Ser Xaa Xaa Xaa Ser	
1	5	
<210>	166	
<211>	9	
<212>	PRT	
<213>	共有序列	
<220>		
<221>	共有序列 5	
<400>	166	
Gln Gln	Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa	
1	5	
<210>	167	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	共有序列	
<220>		
<221>	共有序列 6	

[0040]

<400> 167
Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp
1 5 10

<210> 168
<211> 11
<212> PRT
<213> 共有序列

<220>
<221> 共有序列 7

<400> 168
Gly Tyr Xaa Phe Xaa Xaa Tyr Xaa Met Xaa Trp
1 5 10

<210> 169
<211> 17
<212> PRT
<213> 共有序列

<220>
<221> 共有序列 8

<400> 169
Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Phe Lys
1 5 10 15

Xaa

<210> 170
<211> 17
<212> PRT
<213> 共有序列

<220>
<221> 共有序列 9

<400> 170
Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Xaa Xaa Lys Phe Xaa
1 5 10 15

Gly

<210> 171
<211> 11
<212> PRT
<213> 共有序列

<220>
<221> 共有序列 10

<400> 171
Xaa Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 172

[0041]

<211> 11
<212> PRT
<213> 共有序列

<220>
<221> 共有序列 11

<400> 172
Xaa Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
1 5 10

<210> 173
<211> 7
<212> PRT
<213> 共有序列

<220>
<221> 共有序列 12

<400> 173
Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Ser
1 5

<210> 174
<211> 7
<212> PRT
<213> 共有序列

<220>
<221> 共有序列 13

<400> 174
Xaa Thr Ser Xaa Leu Xaa Xaa
1 5

<210> 175
<211> 9
<212> PRT
<213> 共有序列

<220>
<221> 共有序列 14

<400> 175
Gln Gln Xaa Xaa Ser Xaa Pro Xaa Thr
1 5

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> 共有序列

<220>
<221> 共有序列 15

<400> 176
Gln Gln Xaa Asn Xaa Xaa Pro Xaa Xaa
1 5

重链

MuIgV_H5'-B L V A T A T G V H
AATGGAGCTG GGTATTCTC TTCTTGGTAG CAACAGCTAC AGGTGTCCAC
S Q V Q L Q Q P G A E L V R P G A
TCCCAGGTCC AACTGCAGCA GCCTGGGGCT GAGCTGGTGA GGCCTGGGGC
S V K L S C K A S G Y T F T R N
TTCAGTGAAG CTGTCCTGCA AGGCTTCTGG CTACACCTTC ACCAGGAACT
W I N W V K Q R P G Q G L E W I G
GGATAAACTG GGTGAAGCAG AGGCCTGGAC AAGGCCTTGA GTGGATCGGA
N I Y P S D S Y T N Y N Q K F K D
AATATTTATC CTTCTGATAG TTATACTAAC TACAATCAAA AGTTCAAGGA
K A T V T V D K S S S T A Y M Q
CAAGGCCACA GTGACTGTAG ACAAATCCTC CAGCACAGCC TACATGCAGC
L S S P T S E D S A V Y Y C T R L
TCAGCAGCCC GACATCTGAG GACTCTGCGG TCTATTATTG TACAAGATTG
R G L L P D Y W G Q G T I L T V S
AGGGGTTTAT TACCTGACTA CTGGGGCCAA GGCACCATTC TCACAGTCTC
S E S Q S **MuIgMV_H3'-1**
CTCAGAGAGT CAGTCCTTCC CAAATGTCTT CCCCCTCGTA AGCTTGGG

图 1A

轻链

MuIgkV_L5'-A V Y M L L W

GGGAATTCAT GGAGTCACAG ACCCAGGTCT TTGTATACAT GTTGCTGTGG
L S G V D G D I V M T Q S Q K F M
TTGTCTGGTG TTGATGGAGA CATTGTGATG ACCCAGTCTC AAAAATTCAT
S T S V G D R V S V T C K A S Q
GTCCACATCA GTAGGAGACA GGGTCAGCGT CACCTGCAAG GCCAGTCAGA
N V D T N V A W Y Q Q K P G Q S P
ATGTGGATAC TAATGTAGCC TGGTATCAAC AGAAACCAGG GCAATCTCCT
K A L I Y S A S Y R Y S G V P D R
AAAGCACTGA TTTACTCGGC ATCCTACCGG TACAGTGGAG TCCCTGATCG
F T G S G S G T D F T L T I S N
CTTCACAGGC AGTGGATCTG GGACAGATTT CACTCTCACC ATCAGCAATG
V Q S E D L A E Y F C Q Q Y N S Y
TGCAGTCTGA AGACTTGGCA GAGTATTTCT GTCAGCAATA TAACAGCTAT
P L T F G A G T K L E L K R A D A
CCTCTCACGT TCGGTGCTGG GACCAAGCTG GAGCTGAAAC GGGCTGATGC
A P T V **MuIgkV_L3'-1**

TGCACCAACT GTA TCCATCT TCCCACCATC CAGTAAGCTT

图 1B

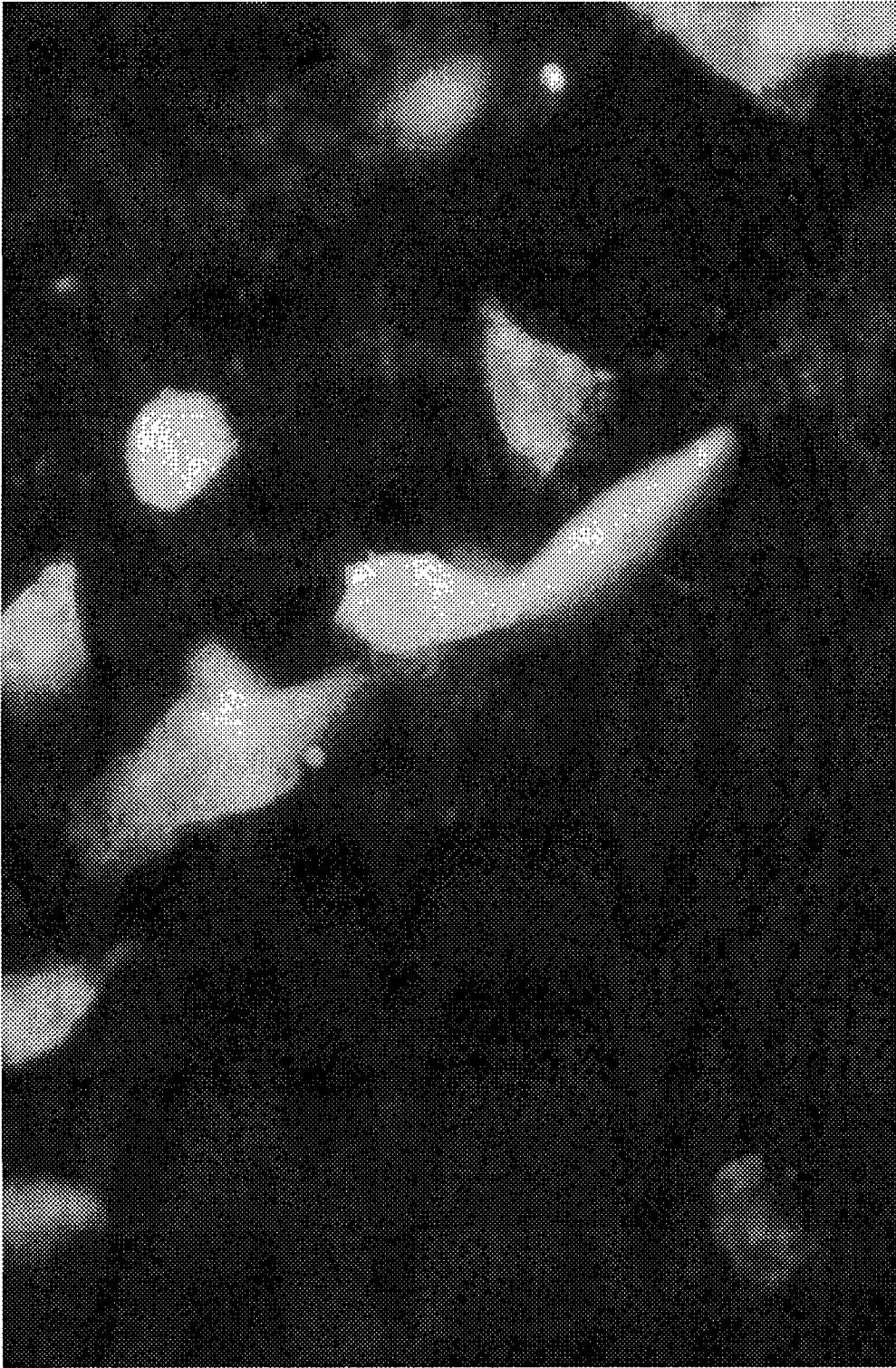


图 2

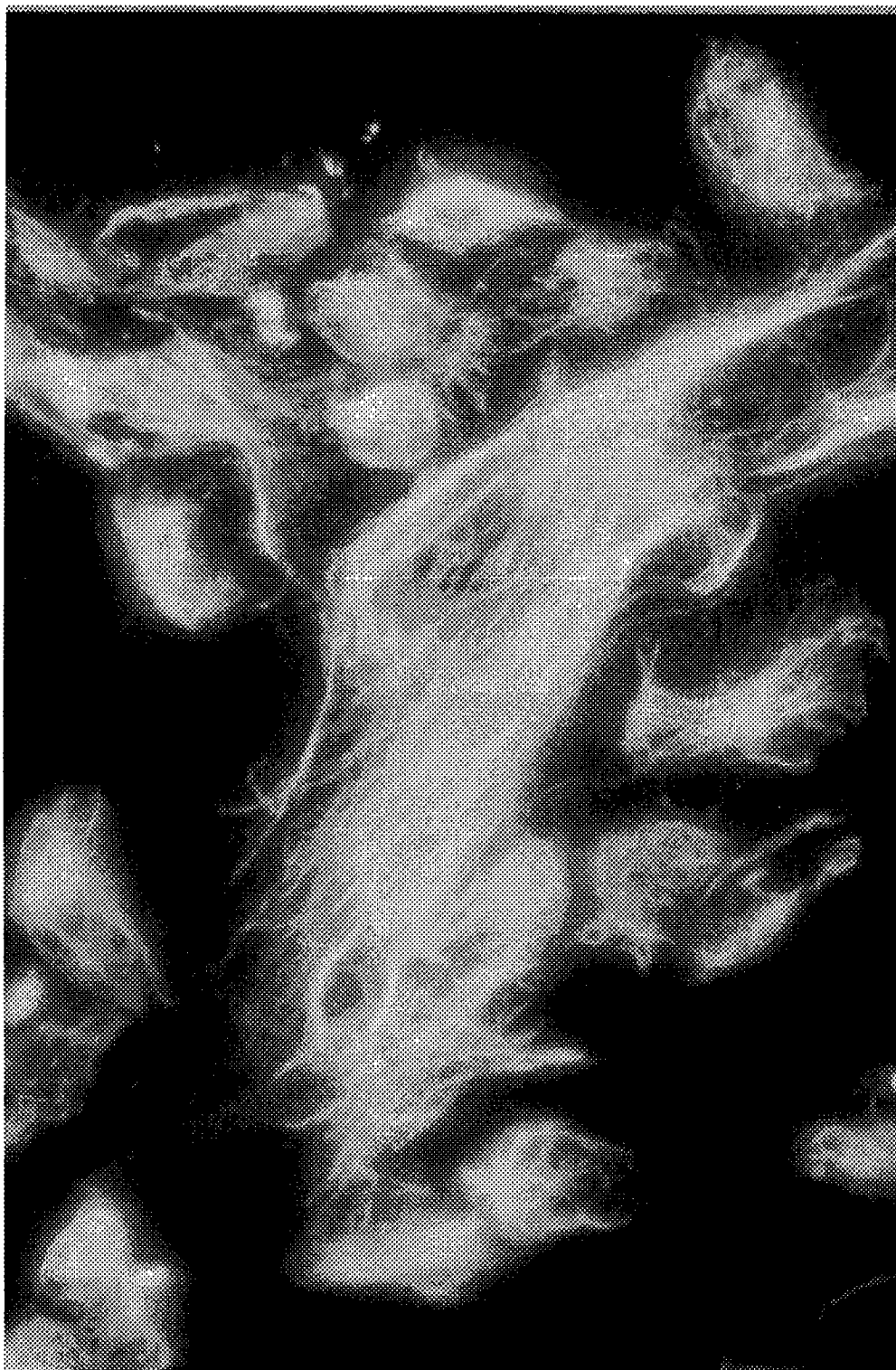


图 3a

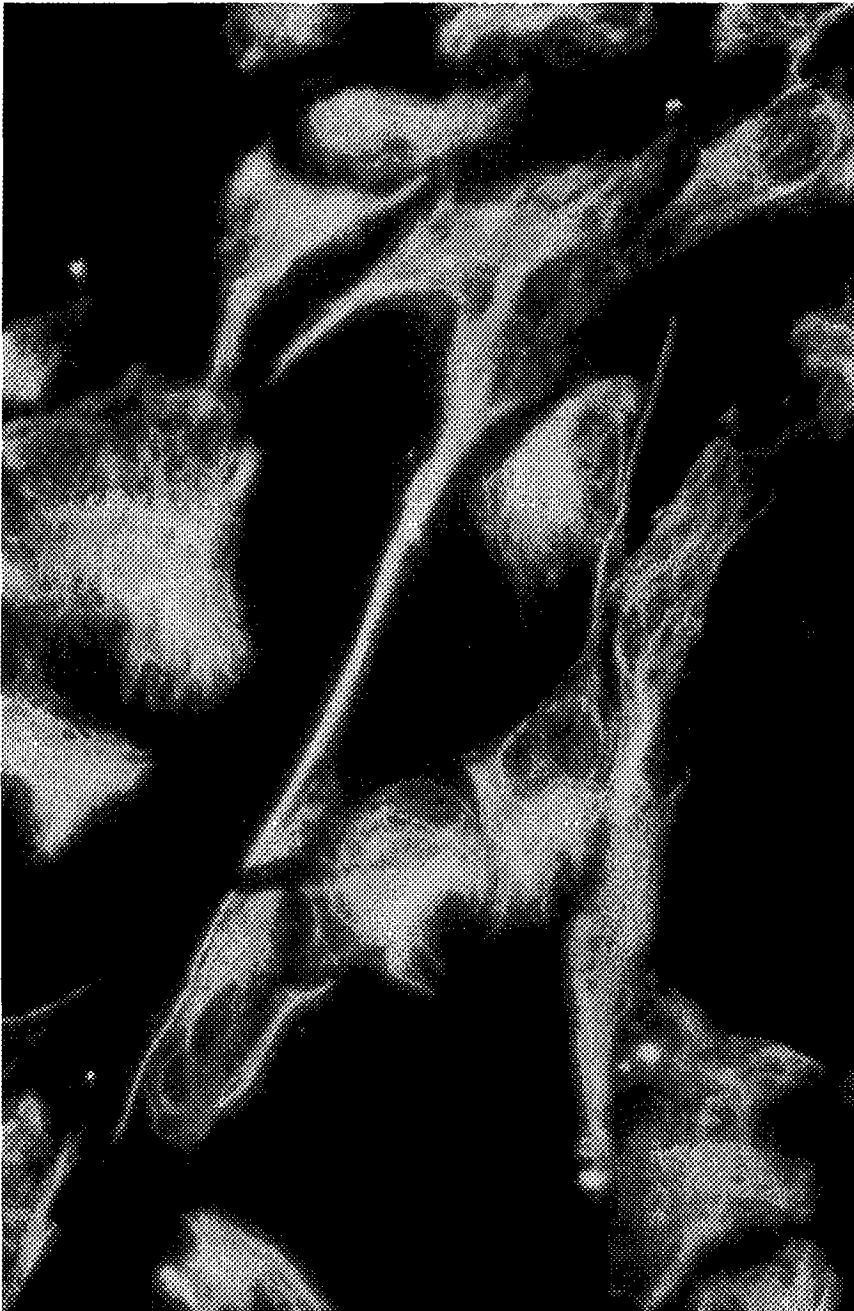


图 3b

细胞系 13.42a VH-1 DNA 序列 (SEQ ID NO:17)

AGGTCAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTATC
CTGCAAGGCTTCTGGTTATGCATTCAGTCTACAACATGTTCTGGGTGAAGCAGAGCCAT
GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTGATCCTTACAATGGTGATACTAGATACAGCC
AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTTGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGCA
TCTCAACAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAAAGGGGATGACG
ACGGGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

细胞系 13.42a VH-1 氨基酸序列 (SEQ ID NO:18)

VKLQESGPVLVKPGASVKVSCKASGYAFTSYNMFVVKQSHGKSLEWIGYIDPYNGDTRYSQ
KFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCARKGMTTGYAMDYWGQGTTVTVSS

细胞系 13.42a VL DNA 序列 (SEQ ID NO:19)

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCA
TCAGTTGTAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGA
TGGAAGTGTAAACTCCTGCTCTACTACACATCAAGATTAACTCAGGAGTCCCATCAAGG
TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAACAAGAAG
ATGTTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGTTTCCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAA
GCTGGAAATCAAACGG

细胞系 13.42a VL 氨基酸序列 (SEQ ID NO:20)

DIQMTQSPSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLLYYTSRLHSGVPSR
FSGSGSGTDYSLTISNLEQEDVATYFCQQGNTFPTFGGGTKLEIKR

图 4A

细胞系 32.15 VH DNA序列 (SEQ ID NO: 33)

AGGTGCAACTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTC
CTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCA
GGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTTACACTGGAGAGCCAACATATGCTG
ATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCA
GATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGGGAAGGGTTGTAT
GGTAACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

细胞系 32.15 VH氨基酸序列 (SEQ ID NO: 34)

VQLQESGP~~ELKKPGETVKISCKAS~~**GYTFTNYGMNV**KQAPGKGLKWMG**WINTYTGEPTYAD**
DFKGRFAFSLETSASTAYLQINN~~LKNEDTATYFCAR~~**EGLYGN**YFDYWGQGTTVTVSS

细胞系 32.15 VL DNA序列 (SEQ ID NO: 35)

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCG
TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGG
GCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGC
TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG
ACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACGTTCCGGTGCTGGGAC
CAAGCTGGAGCTGAAACGG

细胞系 32.15 VL氨基酸序列 (SEQ ID NO: 36)

DIQMTQSPKFMSTSVGDRVSVTC**KASQNVGTN**VAWYQQKPGQSPKALIY**SASYRYS**GVPDR
FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC**QQYNSYPLT**FGAGTKLELKR

图 4B

细胞系 32.17 VH DNA序列 (SEQ ID NO: 49)

AGGTCAAAGTGCAGGAGTCAGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTC
CTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGGAACTGGATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCT
GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAATC
AAAAGTTCAAGGACAAGGCCACAGTGAAGTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCA
GCTCAGCAGCCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTACAAGATTGAGGGGTTTA
TTACCTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

细胞系 32.17 VH氨基酸序列 (SEQ ID NO: 50)

VKLQESGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTRNWINWVKQRPQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQ
KFKDKATVTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRLRGLLPDYWGQGTITVTVSS

细胞系 32.17 VL DNA序列 (SEQ ID NO: 51)

GACATTGTGCTAACCCAATCTCCAGTATCCATAACTGCATCTCGAGGGGAGAAGGTCACCA
TCACCTGCCGTGCCAGCTCAAGTATAAGTTCCAATTACTTACACTGTTACCAGCAGAAGCC
AGGATCCTCCCCTAACTTTTGATTTATAGGACATCCATCCTGGCATCTGGAGTCCTAGAC
AGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGAGAGCTCTTACACTCTGACAATCAGCTGCATGCAGGACG
AAGTTGCTGCCACTTACTATTGTCAGCAGGGGAGTAGTAGCCCCCTCACGTTTCGGTGCTGG
GACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

细胞系 32.17 VL氨基酸序列 (SEQ ID NO: 52)

DIVLTQSPVSIASRGEKVTITCCRASSISSNYLHQYQQKPGSSPKLLIYRTSILASGVLD
SFSGSGSESYTLTISCMQDEVAATYYCQQGSSSPLTFGAGTKLELKR

图 4C

细胞系 32.75 VH DNA序列 (SEQ ID NO: 65)

AGGTCAAAGTGCAGGAGTCAGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTC
CTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGGAAGTGGATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCT
GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAATC
AAAAGTTCAAGGACAAGGCCACAGTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCA
GCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTACAAGATTGAGGGGTTTA
TTACCTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

细胞系 32.75 VH氨基酸序列 (SEQ ID NO: 66)

VKLQESGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTRNWINWVKQRPQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQ
KFKDKATVTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRLRGLLPDYWGQGTTVTVSS

细胞系 32.75 VL DNA序列 (SEQ ID NO: 67)

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCG
TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGATACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGG
GCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGC
TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG
ACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCTCCTACGTTTCGGTGCTGGGAC
CAAGCTGGAGCTGAAACGG

细胞系 32.75 VL氨基酸序列 (SEQ ID NO: 68)

DIQMTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVDTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVFPDR
FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPPTFGAGTKLELKR

图 4D

细胞系 32.2 VH-1 DNA 序列 (SEQ ID NO: 81)

AGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTC
CTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCA
GGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTTACACTGGAGAGCCAACATATGCTG
ATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCA
GATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGGGAAGGGTTGTAT
GGTAACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

细胞系 32.2 VH-1 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 82)

VKLQESGPPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYAD
DFKGREAFSLETSASTAYLQINNLIKNE DTATYFCAREGLYGNYFDYWGQGT TVTVSS

细胞系 32.2 VL DNA 序列 (SEQ ID NO: 83)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCG
TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGG
GCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGC
TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG
ACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACGTTCCGGTGCTGGGAC
CAAGCTGGAAATAAAACGG

细胞系 32.2 VL 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 84)

DIQMTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVDPDR
FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLEIKR

图 4E

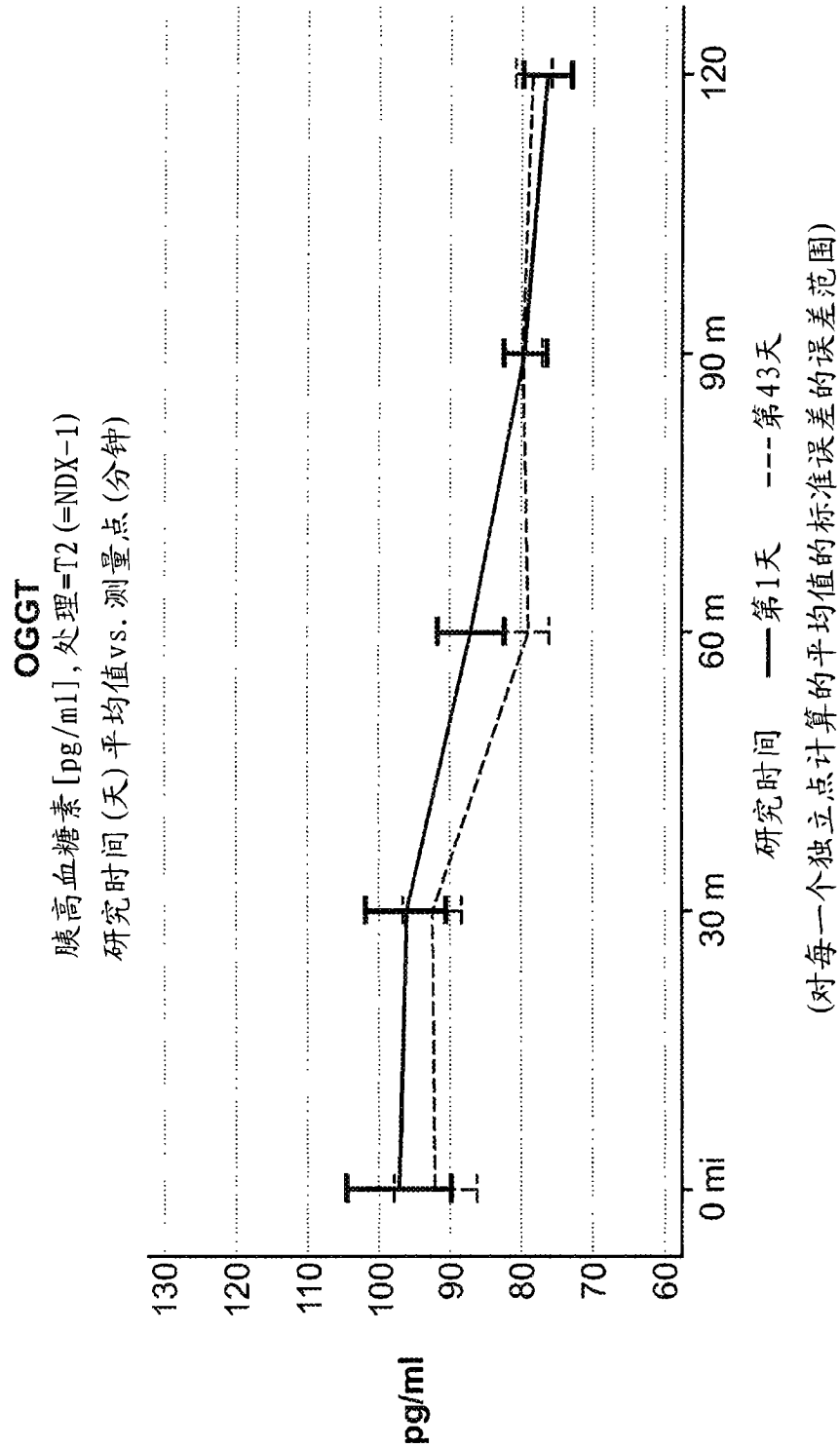


图 5

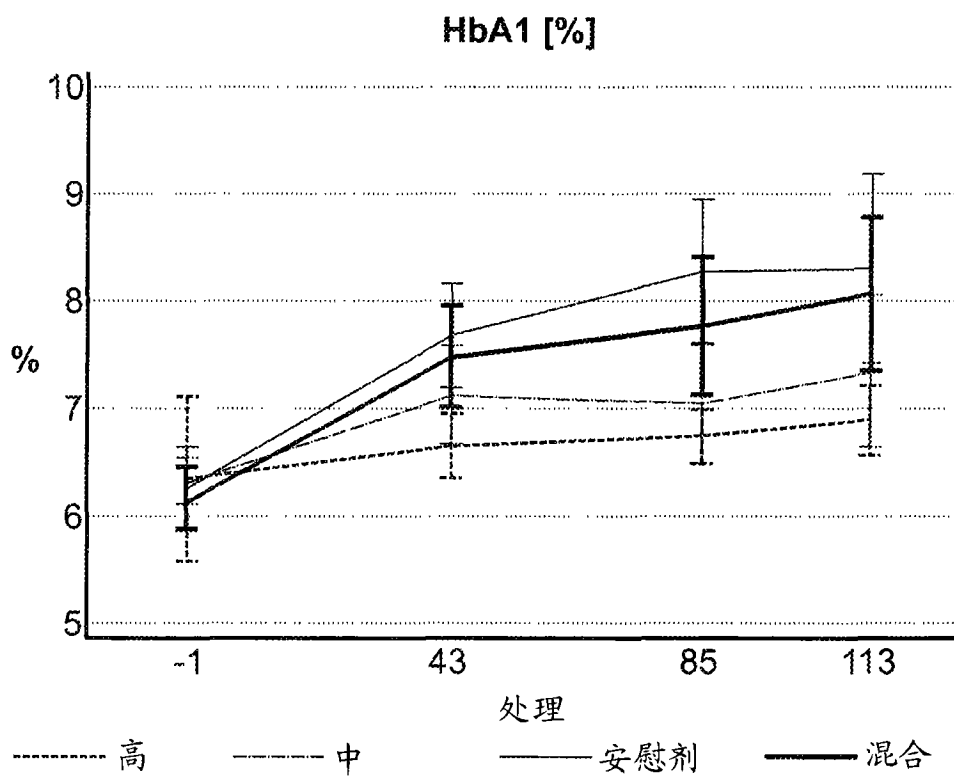


图 6

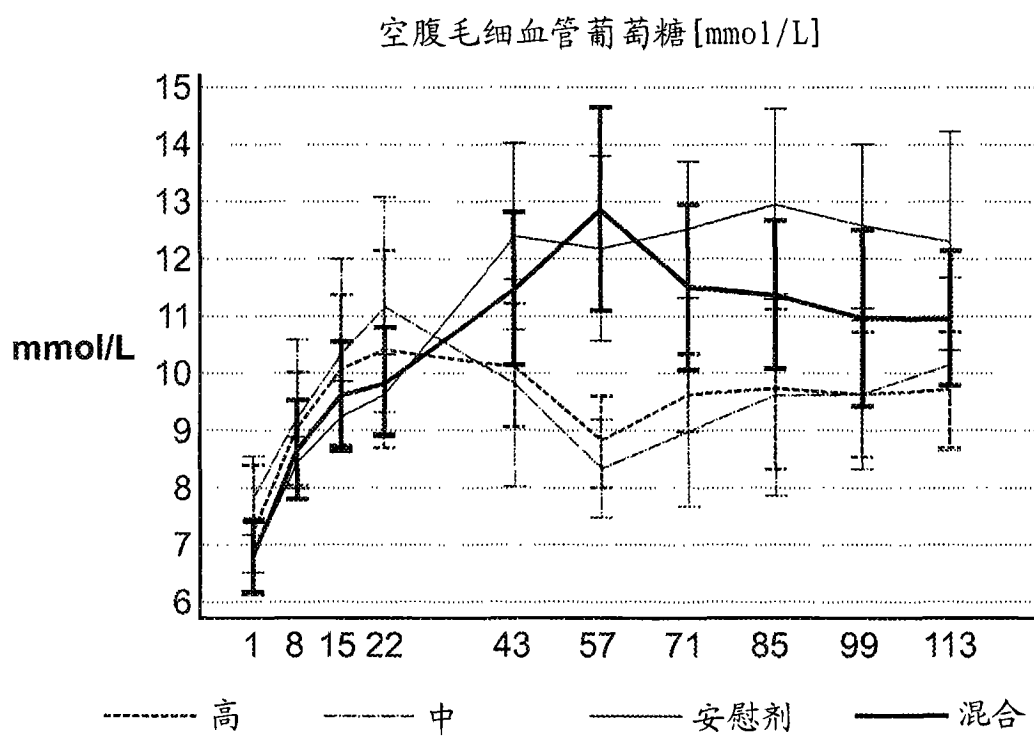


图 7

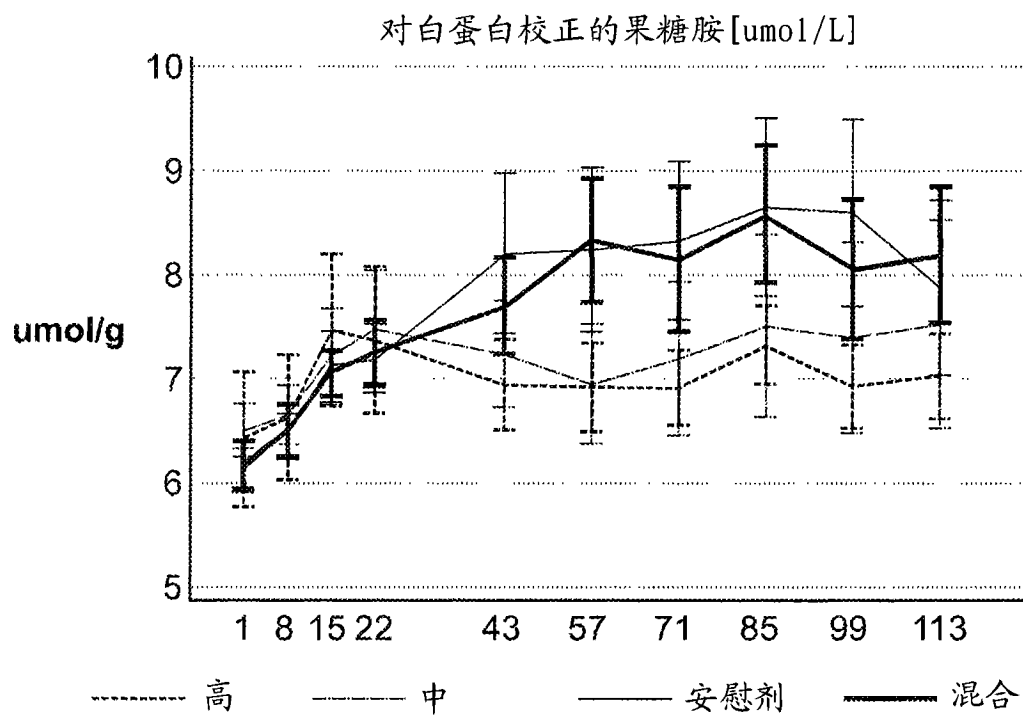


图 8

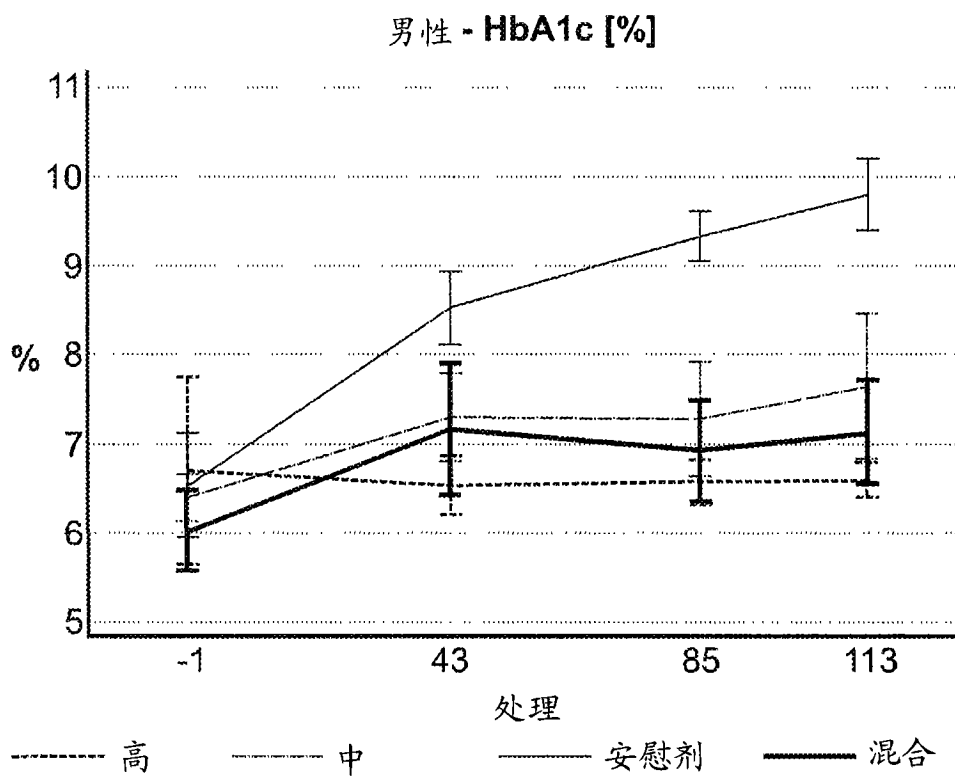


图 9

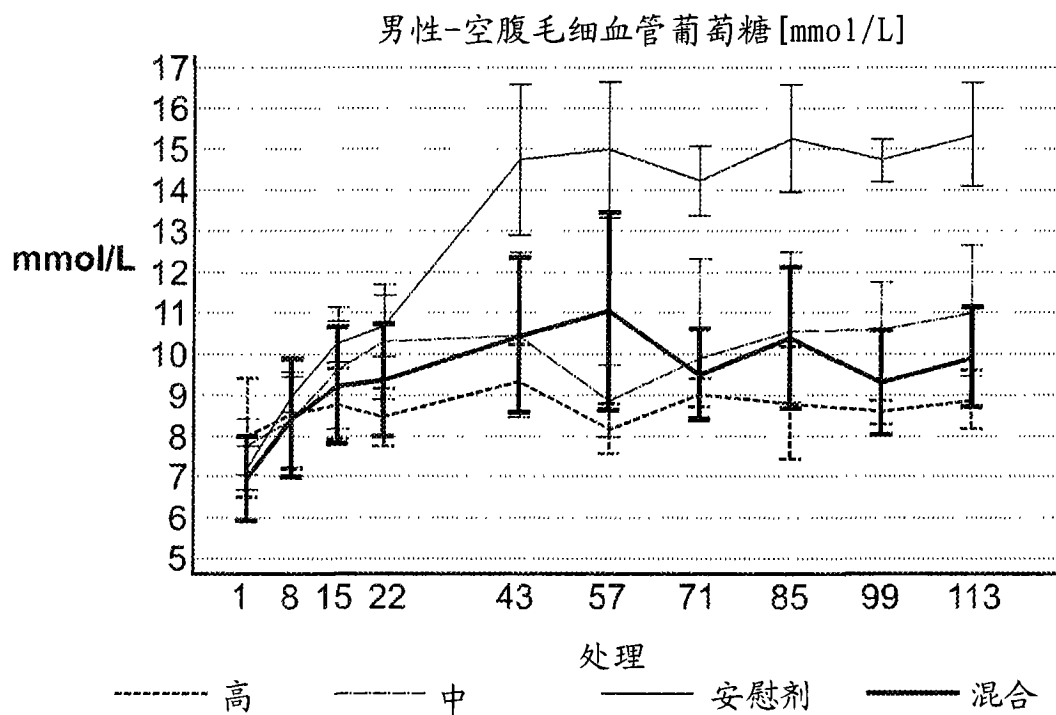


图 10

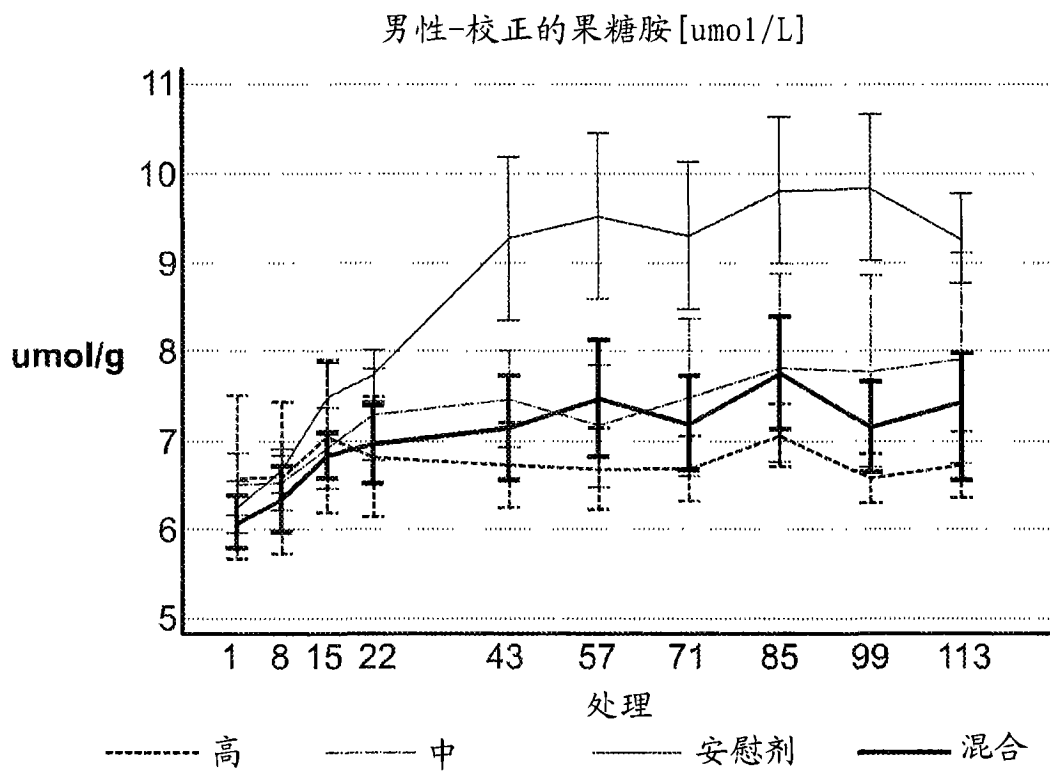


图 11

	<i>IgM CDR-H1</i>	反应性
SEQ ID NO:6 (实施例1)	GYTFTRNWINW	-
SEQ ID NO:31 (实施例5)	GYTFNTYGMNW	-
SEQ ID NO:41 (实施例5)	GYTFTRNWINW	-
SEQ ID NO:51 (实施例5)	GYTFTRNWINW	-
SEQ ID NO:61 (实施例5)	GYTFNTYGMNW	-
SEQ ID NO:97 (A39276)	GYTFNTFWIGW	抗-RF
SEQ ID NO:98 (AAL59371.1)	GYTFNTYNAIQW	抗-CL
SEQ ID NO:99 (AAB32203.1)	GYTFTSYWMQW	抗-RNA
SEQ ID NO:100 (AAT76246.1)	GYTFTTYWMHW	抗-sDNA
SEQ ID NO:101 (AAR90999.1)	GYTFTDYYMNW	抗-NA
SEQ ID NO:102 (AAB46762.1)	GYTFTEYYVNW	抗-VA
SEQ ID NO:103 (AAG33839.1)	GYTFTDYYIHW	抗-RF
SEQ ID NO:104 (AAT76245.1)	GYTFTSYWMHW	抗-sDNA
SEQ ID NO:105 (CAA84376.1)	GYTFTGYYIHW	抗-RF
SEQ ID NO:106 (AAB46761.1)	GYTFTSYWMHW	抗-VA
保守残基 SEQ ID NO:162	GYTFT-----W	-

共有序列

IgM CDR-H1 G-Y-T-F-T-x-x-x-x-x-W

通式

IgM CDR-H1 G-Y-T-F-T-[RNYSTDEG]-[NYF]-[WGAY]-[IMV]-[NGQH]-W

保守和占优的残基

IgM CDR-H1 G-Y-T-F-T-[RNS]-Y-W-[IM]-N-W

	<i>IgG CDR-H1</i>	反应性
SEQ ID NO:21 (实施例5)	GYAFTSYNMFV	-
SEQ ID NO:99 (AAB32203.1)	GYTFTSYWMQW	抗-RNA
SEQ ID NO:107 (AAB58061.1)	GYTFTDYNMHW	抗-CD8
SEQ ID NO:108 (F30502)	GYSETGYNMNW	抗-RNA
SEQ ID NO:109 (AAR91003.1)	GYAFSSYWMNW	抗-NA
SEQ ID NO:110 (AAT76236.1)	GYTFTSYVMHW	抗-sDNA
SEQ ID NO:104 (AAT76245.1)	GYTFTSYWMHW	抗-sDNA
SEQ ID NO:106 (AAB46761.1)	GYTFTSYWMHW	抗-VA
保守残基 SEQ ID NO:163	GY-F--Y-M-W	-

共有序列

IgG CDR-H1 G-Y-x-F-x-x-Y-x-M-x-W

通式

IgG CDR-H1 G-Y-[ATS]-F-[T/S]-[SDG]-Y-[NWV]-M-[FQHN]-W

保守和占优的残基

IgG CDR-H1 G-Y-T-F-T-S-Y-W-M-H-W

图 12A

	IgM CDR-H2	反应性
SEQ ID NO:8 (实施例1)	NIYPSDSYTNYNQKFKD	-
SEQ ID NO:32 (实施例5)	WINTYTGEPTYADDFKG	-
SEQ ID NO:42 (实施例5)	NIYPSDSYTNYNQKFKD	-
SEQ ID NO:52 (实施例5)	NIYPSDSYTNYNQKFKD	-
SEQ ID NO:62 (实施例5)	WINTYTGEPTYADDFKG	-
SEQ ID NO:111 (AAB32203.1)	EIDPSDSYTNYNQKFKG	抗-RNA
SEQ ID NO:112 (AAT68292.1)	AIDTSDSYTYYNQKFKG	抗-TG
SEQ ID NO:113 (A39276)	NIYPGGDYTNIEKFKG	抗-RF
SEQ ID NO:114 (AAB58061.1)	YIYPYTG GTGYNQKFKN	抗-CD8
SEQ ID NO:115 (1921302A)	NINPYYGSTSYNQKFKG	抗-CL
保守残基 SEQ ID NO:164	-I-----Y---FK-	-

共有序列

IgM CDR-H2 x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

通式

IgM CDR-H2 [NWEAY]-I-[YND]-[PT]-[SYG]-[DTGY]-[SGD]-[YEGS]-[TP]-[NTYGS]-Y-[NAI]-[QDE]-[KD]-F-K-[DGN]

保守和占优的残基

IgM CDR-H2 N-I-Y-P-S-D-S-Y-T-N-Y-N-Q-K-F-K-G

	IgG CDR-H2	反应性
SEQ ID NO:22 (实施例5)	YIDPYNGDTRYSQKFKG	-
SEQ ID NO:116 (AAR91004.1)	WIDPANGDTEYASKFQG	抗-NA
SEQ ID NO:117 (F30502)	KINPYYGSTSYNQKFKG	抗-RNA
SEQ ID NO:118 (AAT76236.1)	YINPYNDGTYNEKFKG	抗-sDNA
SEQ ID NO:119 (AAB46758.1)	WIDPENG DTEYAPKFQG	抗-VA
SEQ ID NO:115 (1921302A)	NINPYYGSTSYNQKFKG	抗-CL
SEQ ID NO:120 (AAE72083.1)	LINPFSGDTNYSQKFTG	抗-3H1
SEQ ID NO:121 (B30502)	YINPYNDGTYNEKFKG	抗-RNA
SEQ ID NO:123 (AAR91007.1)	WIDPENG DTEYASKFQG	抗-NA
保守残基 SEQ ID NO:165	-I-P----T-Y--KF-G	-

共有序列

IgG CDR-H2 x-I-x-P-x-x-x-x-T-x-Y-x-x-K-F-x-G

通式

IgG CDR-H2 [YWKNL R]-I-[DN]-P-[YAEFS]-[NYS]-[GD]-[DSG]-T-[RESKN]-Y-[SAN]-[QSEP]-K-F-[KQT]-G

保守和占优的残基

IgG CDR-H2 [YW]-I-N-P-Y-N-G-D-T-[ES]-Y-N-Q-K-F-K-G

图 12B

	IgM CDR-L1	反应性
SEQ ID NO:12 (实施例1)	KASQNVDTNVA	-
SEQ ID NO:34 (实施例5)	KASQNVGTNVA	-
SEQ ID NO:44 (实施例5)	RASSSISSNYL	-
SEQ ID NO:54 (实施例5)	KASQNVDTNVA	-
SEQ ID NO:64 (实施例5)	KASQNVGTNVA	-
SEQ ID NO:124 (AAS01840.1)	KASQNVGTNVA	抗-NA
SEQ ID NO:125 (AAS01841.1)	KASQNVRTAVA	抗-NA
SEQ ID NO:126 (AAT76271.1)	KASQDVSTAVA	抗-sDNA
SEQ ID NO:127 (AAB46763.1)	KASQSVDDYDGD SYMN	抗-VA
SEQ ID NO:128 (AAA20447.1)	RASQSVSSYLA	抗-RF
SEQ ID NO:129 (PC4282)	RASQSVSNYLA	抗-RO
SEQ ID NO:130 (CAA56180.1)	RASQTVRKNYLA	抗-TG
保守残基	-AS-----	-
SEQ ID NO:166		

共有序列

IgM CDR-L1 x-A-S-x-x-x-x-x-x-x-x

通式

IgM CDR-L1 [KR]-A-S-[QS]-[NSDT]-[VI]-[DGSR]-[TSYNK]-[NADY]-[VYGL]-[ALD]

保守和占优的残基

IgM CDR-L1 K-A-S-Q-N-V-S-T-N-V-A

	IgG CDR-L1	反应性
SEQ ID NO:24 (实施例5)	RASQDISNYLN	-
SEQ ID NO:131 (1921302B)	RASQSISNYLH	抗-CL
SEQ ID NO:132 (AAL59380.1)	RASQSISSYLN	抗-CL
SEQ ID NO:133 (AAL59377.1)	RASQSISSYLN	抗-CL
SEQ ID NO:134 (CAA63587.1)	RASQGISNWLA	抗-TG
SEQ ID NO:135 (AAG30434.1)	RASQGISSYLA	抗-CL
SEQ ID NO:129 (PC4282)	RASQSVSNYLA	抗-RO
SEQ ID NO:136 (CAA56181.1)	RASRGISNYLA	抗-TG
SEQ ID NO:137 (AAE72082.1)	KASQDINGYLN	抗-3H1
保守残基	-AS-----L-	-
SEQ ID NO:167		

共有序列

IgG CDR-L1 x-A-S-x-x-x-x-x-L-x

通式

IgG CDR-L1 [RK]-A-S-[QR]-[DSG]-[IV]-[SN]-[NSG]-[YW]-L-[NHA]

保守和占优的残基

IgG CDR-L1 R-A-S-Q-S-I-S-N-Y-L-[NA]

图 12C

	IgM CDR-L2	反应性
SEQ ID NO:14 (实施例1)	SASYRYS	-
SEQ ID NO:35 (实施例5)	SASYRYS	-
SEQ ID NO:45 (实施例5)	RTSILAS	-
SEQ ID NO:55 (实施例5)	SASYRYS	-
SEQ ID NO:65 (实施例5)	SASYRYS	-
SEQ ID NO:138 (AAS01840.1)	SASYRYS	抗-NA
SEQ ID NO:139 (G30502)	WASTRES	抗-RNA
SEQ ID NO:140 (AAL59376.1)	WASTRES	抗-CL
SEQ ID NO:141 (AAL59379.1)	WASTRES	抗-CL
保守残基 SEQ ID NO:168	--S---S	-

共有序列

IgM CDR-L2 x-x-S-x-x-x-S

通式

IgM CDR-L2 [SRW]-[AT]-S-[YIT]-[RL]-[YAE]-S

保守和占优的残基

IgM CDR-L2 S-A-S-Y-R-Y-S

	IgG CDR-L2	反应性
SEQ ID NO:25 (实施例5)	YTSRLHS	-
SEQ ID NO:142 (AAT76280.1)	LTSNLAS	抗-sDNA
SEQ ID NO:143 (AAB46767.1)	DTSKLAS	抗-VA
SEQ ID NO:144 (AAB46765.1)	DTSNLAS	抗-VA
SEQ ID NO:145 (AAB46766.1)	YTSNLAP	抗-VA
SEQ ID NO:146 (AAB46764.1)	YTSNLAP	抗-VA
SEQ ID NO:147 (AAS01843.1)	TTSNLAS	抗-NA
SEQ ID NO:148 (AAG30433.1)	KTSVLGS	抗-CL
SEQ ID NO:149 (CAC22102.1)	TTSNLAS	抗-TRKA
保守残基 SEQ ID NO:169	-TS-L--	-

共有序列

IgG CDR-L2 x-T-S-x-L-x-x

通式

IgG CDR-L2 [YLDTK]-T-S-[RNKV]-L-[HAG]-[SP]

保守和占优的残基

IgG CDR-L2 Y-T-S-N-L-A-S

图 12D

	IgM CDR-L3	反应性
SEQ ID NO:16 (实施例1)	QQYNSYPLT	-
SEQ ID NO:36 (实施例5)	QQYNSYPLT	-
SEQ ID NO:46 (实施例5)	QQGSSSPLT	-
SEQ ID NO:56 (实施例5)	QQYNSYPPT	-
SEQ ID NO:66 (实施例5)	QQYNSYPLT	-
SEQ ID NO:150 (AAS01840.1)	QQYNSYPYT	抗-NA
SEQ ID NO:151 (AAB46766.1)	QQWSSDPLT	抗-VA
SEQ ID NO:152 (PC4282)	QQRASWPLT	抗-RO
SEQ ID NO:153 (S67940)	QQYGSSPYT	抗-TG
SEQ ID NO:154 (CAA56180.1)	QQYGSSPIT	抗-TG
保守残基 SEQ ID NO:170	QQ--S-P-T	-

共有序列

IgM CDR-L3 Q-Q-x-x-S-x-P-x-T

通式

IgM CDR-L3 Q-Q-[YGWR]-[NSAG]-S-[YSDW]-P-[LPYI]-T

保守和占优的残基

IgM CDR-L3 Q-Q-Y-N-S-Y-P-L-T

	IgG CDR-L3	反应性
SEQ ID NO:26 (实施例5)	QQGNTFPTF	-
SEQ ID NO:155 (AAB58062.1)	QQNNEDPYT	抗-CD8
SEQ ID NO:156 (AAS01844.1)	QQSNEDPRT	抗-NA
SEQ ID NO:157 (C30502)	QQTNSWPRT	抗-RNA
SEQ ID NO:158 (AAB46763.1)	QQNNEDPFT	抗-VA
SEQ ID NO:150 (AAS01840.1)	QQYNSYPYT	抗-NA
保守残基 SEQ ID NO:171	QQ-N--P--	-

共有序列

IgG CDR-L3 Q-Q-x-N-x-x-P-x-x

通式

IgG CDR-L3 Q-Q-[GNSTY]-N-[TES]-[FDWY]-P-[TYRF]-[FT]

保守和占优的残基

IgG CDR-L3 Q-Q-N-N-E-D-P-[YR]-T

图 12E