



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104105967 B

(45)授权公告日 2017.03.08

(21)申请号 201280068536.6

(22)申请日 2012.12.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104105967 A

(43)申请公布日 2014.10.15

(30)优先权数据

1121280.0 2011.12.12 GB

1214806.0 2012.08.20 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.07.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2012/053104 2012.12.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/088140 EN 2013.06.20

(73)专利权人 牛津大学科技创新有限公司

地址 英国牛津伯特利西路3号巴克斯顿庭
院

(72)发明人 金·苏姗妮·米德伍德

(74)专利代理机构 上海麦其知识产权代理事务
所(普通合伙) 31257

代理人 董红曼

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/564(2006.01)

(56)对比文件

CN 1639192 A, 2005.07.13, 权利要求28-
29, 说明书第3页第3段至第4页的第2段, 第10页
第2-3段.

CN 101836115 A, 2010.09.15, 权利要求6-
7, 说明书第[0037]、[0045]-[0047]段.

JP 2004138489 A, 2004.05.13, 权利要求5-
8, 说明书第[0007]、[0010]-[0013]、[0035]-
[0038]段, 实施例5.

审查员 许珊萍

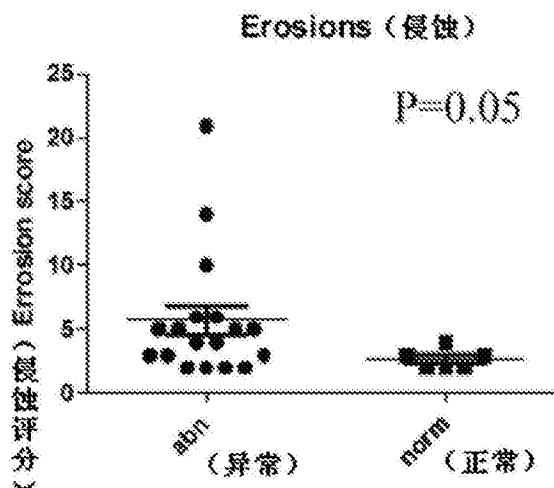
权利要求书2页 说明书8页
序列表10页 附图9页

(54)发明名称

生腱蛋白C及其在类风湿关节炎的用途

(57)摘要

本发明提供了一种确定待测个体的类风湿关节炎状态、或者类风湿关节炎进展、或者用于患有类风湿关节炎的个体的合适疗法的方法, 该方法包括下述步骤:(a)测定来自所述待测个体的样品中生腱蛋白C的水平; 以及(b)将步骤(a)中测定的生腱蛋白C水平与一个或多个参考值相比较。优选所指的类风湿关节炎是侵蚀性类风湿关节炎。当公开时, 随附有图5。



1. 生腱蛋白C的检测试剂在制备用于通过检测生腱蛋白C来确定待测个体的类风湿关节炎状态的产品中的用途,其中,通过检测生腱蛋白C来确定待测个体的类风湿关节炎状态包括下述步骤:

- (a)测定来自所述待测个体的血液样品中生腱蛋白C的水平;以及
- (b)将步骤(a)中测定的生腱蛋白C水平与一个或多个参考值相比较。

2. 生腱蛋白C的检测试剂在制备用于通过检测生腱蛋白C来确定待测个体中类风湿关节炎进展、或者类风湿关节炎对于特定治疗的反应的试剂的用途,其中,通过检测生腱蛋白C来确定待测个体中类风湿关节炎进展、或者类风湿关节炎对于特定治疗的反应包括下述步骤:

- (a)测定来自所述待测个体的血液样品中生腱蛋白C的水平;以及
- (b)将步骤(a)中测定的生腱蛋白C水平与一个或多个参考值相比较。

3. 生腱蛋白C的检测试剂在制备用于通过检测生腱蛋白C来确定用于患有类风湿关节炎的待测个体的合适治疗的试剂的用途,其中,通过检测生腱蛋白C来确定用于患有类风湿关节炎的待测个体的合适治疗包括下述步骤:

- (a)测定来自所述待测个体的血液样品中生腱蛋白C的水平;以及
- (b)将步骤(a)中测定的生腱蛋白C水平与一个或多个参考值相比较;
- (c)使用步骤(b)中的结果来确定最合适的疗法。

4. 如前述权利要求中任何一项所述的用途,其特征在于,所述类风湿关节炎是侵蚀性类风湿关节炎。

5. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,通过检测生腱蛋白C用于确定或者诊断患有类风湿关节炎的待测个体是否患有侵蚀性类风湿关节炎。

6. 如前述权利要求1~3中任何一项所述的用途,其特征在于,所述血液样品为全血样品、血浆或者血清。

7. 如前述权利要求1~3中任何一项所述的用途,其特征在于,与参考水平相比,血液样品中生腱蛋白C约50%或更多的提高即是炎症紊乱。

8. 如权利要求7所述的用途,其特征在于,所述参考水平是正常血液样品中的水平。

9. 如权利要求1~3中任一项所述的用途,其特征在于,超过33ng生腱蛋白C每毫升血清的水平即是类风湿关节炎。

10. 如权利要求1~3中任一项所述的用途,其特征在于,超过31ng生腱蛋白C每毫升血清的水平即是类风湿关节炎。

11. 如权利要求3所述的用途,其特征在于,来自待测个体的血液样品中生腱蛋白C水平相比正常个体中水平的提高,表明使用抗TNF药物是不合适的。

12. 如权利要求3所述的用途,其特征在于,来自待测个体的血液样品中生腱蛋白C水平相比正常个体中的水平的提高,表明使用抗IL 17疗法或者另一种非抗TNF疗法是合适的。

13. 如权利要求11或12所述的用途,其特征在于,血液样品中生腱蛋白C水平是至少31ng/ml血清。

14. 如权利要求11或12所述的用途,其特征在于,血液样品中生腱蛋白C水平是至少33ng/ml血清。

15. 如前述权利要求1~3中任何一项所述的用途,其特征在于,检测生腱蛋白C在体外

进行。

16. 如前述权利要求1~3中任何一项所述的用途,其特征在于,所述待测个体是哺乳动物。

17. 如权利要求15所述的用途,其特征在于,所述哺乳动物是人。

18. 血液样品中的生腱蛋白C的检测试剂在制备用于通过检测生腱蛋白C来确定个体的侵蚀性类风湿性关节炎状态的产品中的用途。

19. 血清样品中生腱蛋白C的检测试剂在制备用于通过检测生腱蛋白C来评价个体中侵蚀性类风湿性关节炎状态的产品中的应用。

20. 血液样品中生腱蛋白C的检测试剂在制备用于通过检测生腱蛋白C来评价个体中类风湿性关节炎状态的产品中的应用。

21. 血清样品中生腱蛋白C的检测试剂在制备用于通过检测生腱蛋白C来评价个体中类风湿性关节炎状态的产品中的应用。

22. 血液样品中的生腱蛋白C的检测试剂在制备用于通过检测生腱蛋白C来治疗待测个体中类风湿性关节炎的产品中的用途,通过检测生腱蛋白C来治疗待测个体中类风湿性关节炎的步骤包括:测定来自待测个体的样品中的生腱蛋白C水平和实施炎症治疗。

23. 血液样品中的生腱蛋白C的检测试剂在制备用于通过检测生腱蛋白C来治疗类风湿性关节炎的产品中的用途,通过检测生腱蛋白C来治疗类风湿性关节炎的步骤包括:测定来自待测个体的样品中生腱蛋白C水平;如果生腱蛋白C水平大于参考样品中的水平、但小于33ng/ml,则实施抗TNF疗法。

24. 血液样品中的生腱蛋白C的检测试剂在制备用于通过检测生腱蛋白C来治疗类风湿性关节炎的产品中的用途,通过检测生腱蛋白C来治疗类风湿性关节炎的步骤包括:测定来自待测个体的样品中生腱蛋白C水平;如果生腱蛋白C水平大于31ng/ml,则实施除抗TNF疗法之外的疗法。

生腱蛋白C及其在类风湿关节炎的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生腱蛋白C(韧粘素C, tenascin-C)作为用于炎症紊乱的生物标志物的用途,特别是作为用于类风湿关节炎的血清生物标志物的用途。具体地讲,本发明涉及生腱蛋白C作为用于侵蚀性类风湿关节炎的生物标志物的用途。

背景技术

[0002] 生腱蛋白C是促炎胞外基质糖蛋白(proinflammatory extracellular matrix glycoprotein)(Midwood, et al.(2009), Nat. Med., 15:774-780),其通过模式识别受体TLR4的活化而诱导在初级人类巨噬细胞和滑液成纤维细胞中的炎症细胞因子合成。生腱蛋白C是较大的六聚蛋白质,分子量为1.5百万道尔顿。已经在炎症位点例如在类风湿关节炎病人的滑液中以及在肿瘤间质中发现高水平的生腱蛋白C。

[0003] 类风湿关节炎是慢性病,其特征是多个关节的持续的炎症、肿胀和疼痛。随着时间推移,慢性炎症导致关节内的骨组织破坏,并且导致渐进性残疾。类风湿关节炎的一个突出的标志是在其临床表现中的较大的可变性。该可变性扩及至疼痛水平、肿胀关节数量和关节变形程度。类似地,患有类风湿关节炎的病人对任何具体药物治疗的反应也差异很大,一些病人的疾病迹象和征状几乎消除,而其他病人几乎完全没有反应。

[0004] 用于类风湿关节炎的现有诊断方法由美国风湿病学会(American College of Rheumatology)确立,包括以下各项内容:

[0005] 1)晨僵持续超过1小时(主要在手指上);

[0006] 2)在超过3个关节中肿胀;

[0007] 3)手关节(腕关节、掌指关节和近位指节间关节)肿胀;

[0008] 4)在对称的关节中肿胀(左右关节);

[0009] 5)手的射线照相中的反常发现;

[0010] 6)皮下结节;以及

[0011] 7)通过血液CRP(C-反应蛋白)测试或者抗CCP(抗环状瓜氨酸化肽(citrullinated peptide))测试的风湿病检测阳性。该情况中,满足超过4项即被诊断为类风湿关节炎。

[0012] 本发明的一个目的是提供一种可供选择的标记物、一种诊断试剂、以及一种检测方法,所述方法可以方便地用于鉴定类风湿关节炎、尤其是用于鉴定侵蚀性类风湿关节炎。

[0013] 侵蚀性类风湿关节炎是患有类风湿关节炎的病人中残疾的主要原因,并且特征是关节骨的骨损失和局部侵蚀。

[0014] 骨侵蚀的测定几乎仅仅基于影像学表现、超声和doplar研究(doplar studies),因为对通过活体解剖得到的这些病灶的直接评估是很不实际的。术语“骨侵蚀”描述了在近关节位点的矿化组织的损失,其通常与在皮质内层中的断裂有关。骨侵蚀在疾病早期开始,并且在第一年期间发展最快,因此,快速检测和治疗侵蚀性类风湿关节炎的能力将成为极大益处。

发明内容

[0015] 根据第一方面,本发明提供一种确定待测个体的炎性紊乱状态的方法,该方法包括下述步骤:

[0016] (a)测定来自所述待测个体的样品中生腱蛋白C的水平;以及

[0017] (b)将步骤(a)中测定的生腱蛋白C水平与一个或多个参考值相比较。

[0018] 炎性紊乱可以是一种或多种类风湿关节炎,尤其是侵蚀性类风湿关节炎、关节强直性脊椎炎、牛皮癣关节炎、狼疮和肌炎。优选地,炎性紊乱是类风湿关节炎,尤其是侵蚀性类风湿关节炎。

[0019] 在一种优选的实施方式中,该方法被用于确定待测个体的类风湿关节炎状态,优选地,待测个体的侵蚀性类风湿关节炎状态。侵蚀性类风湿关节炎被定义为在关节骨中具有至少一个侵蚀性病灶的类风湿关节炎,优选地具有至少5个病灶、优选地具有至少10个病灶、优选地具有至少20个病灶。病灶数目越多,则侵蚀性类风湿关节炎越严重。

[0020] 本发明的方法可以用于确定待测个体的侵蚀性类风湿关节炎状态,所述待测个体已经被诊断为患有类风湿关节炎。优选地,本发明的方法提供了一种容易的、非侵入性的和便宜的查看患有类风湿关节炎的病人的侵蚀性类风湿关节炎状态的方法。

[0021] 样品可以是血液样品比如全血样品、血浆或者血清。在一个可替代的实施方式中,样品可以是尿液。优选地,样品是血清样品。

[0022] 优选地,该方法被用于确定待测个体是否患有侵蚀性类风湿关节炎。

[0023] 生腱蛋白C是一种新颖的用于炎性紊乱、尤其是类风湿关节炎、更具体地讲侵蚀性风湿性关节炎的血清生物标志物。

[0024] 人类生腱蛋白C的蛋白质序列能够使用登记号码P24821在GenBank上找到,并且在图8中给出了氨基酸序列。

[0025] 在本发明的方法中,所有形式的生腱蛋白C都可以被测量。优选地,至少一种320kDa的生腱蛋白C亚型被测量到。优选地,仅仅320kDa亚型的生腱蛋白C被测量。

[0026] 术语“炎性紊乱状态”包括任何可识别的炎性紊乱的表现形式。例如,炎性紊乱状态包括、但不限于:炎性紊乱的存在或者没有,炎性紊乱发展的风险,炎性紊乱的阶段,炎性紊乱的进展,以及炎性紊乱治疗的有效性或待测个体对炎性紊乱治疗的反应。

[0027] 本发明的方法可以用于下述任何一个或多个方面,例如,诊断待测个体中的炎性紊乱;评价待测个体发展炎性紊乱的可能性;为患有炎性紊乱的待测个体提供关于预后的建议;监控疾病进展;以及监控炎性紊乱治疗的有效性或待测个体对炎性紊乱治疗的反应。

[0028] 优选地,该方法容许根据对待测个体提供的样品中生腱蛋白C水平的分析来诊断待测个体的炎性紊乱。

[0029] 术语“类风湿关节炎状态”包括任何可识别的疾病的表现形式。例如,类风湿关节炎状态包括、但不限于:类风湿关节炎的存在或者没有,类风湿关节炎发展的风险,类风湿关节炎的阶段,类风湿关节炎的进展,以及类风湿关节炎治疗的有效性或者个体对于类风湿关节炎治疗的反应。在一个优选实施方式中,类风湿关节炎状态是指没有或者存在侵蚀性类风湿关节炎。

[0030] 本发明的方法例如可以用于下述任何一个或多个方面:诊断待测个体中的类风湿

关节炎状态、尤其是侵蚀性类风湿关节炎；评价待测个体发展类风湿关节炎状态、尤其是侵蚀性类风湿关节炎的可能性；为患有类风湿关节炎状态、尤其是侵蚀性类风湿关节炎待测的个体提供关于预后的建议；监控疾病、尤其是类风湿关节炎的进展；以及监控炎性紊乱治疗的有效性或待测个体对于类风湿关节炎、尤其是侵蚀性类风湿关节炎治疗的反应。

[0031] 优选地，该方法容许根据对由待测个体提供的样品中生腱蛋白C水平的分析来诊断待测个体的类风湿关节炎、尤其是侵蚀性类风湿关节炎。

[0032] 可以通过任何合适的测试方法来测定样品中存在的生腱蛋白C水平，所述测试方法可以包括应用下组中包含的任何一项：免疫测试、光谱测定法、Western blot、ELISA、免疫沉淀法、狭缝印迹法或者点印迹测定法、等电点聚焦、SDS-PAGE、抗体微阵列免疫组织学染色、射电免疫测定(RIA)、荧光免疫分析、使用亲和素-生物素或者链霉亲和素(streptoavidin)-生物素系统的免疫测试等、或前述方法的组合。这些方法已为本领域技术人员所熟知。

[0033] 作为另一种选择，可以通过测定样品中生腱蛋白C的mRNA水平来测量生腱蛋白C水平。mRNA水平能够通过PCT或者任何其它合适技术来测量。

[0034] 优选地，用于与测定的生腱蛋白C水平相比较的参考值是在一个或多个待测个体中观察到的生腱蛋白C水平。所述待测个体未患有任何可检测到的炎性紊乱比如类风湿关节炎、或者炎性紊乱比如类风湿关节炎的任何临床症状，且具有生物标志物生腱蛋白C的所谓的“正常值”。

[0035] 优选地，与正常组织样品中的水平相比，待测样品中生腱蛋白C约50%或更多的提高即是炎性紊乱、例如类风湿关节炎、尤其是侵蚀性类风湿关节炎的症候。

[0036] 优选地，每毫升血清或血浆中生腱蛋白C超过31ng、优选超过33ng的水平，即是类风湿关节炎、尤其是侵蚀性类风湿关节炎的症候或者至少是指示。优选地，生腱蛋白C水平与其它标志物的组合容许类风湿关节炎、尤其是侵蚀性类风湿关节炎的诊断。

[0037] 作为另一种选择，参考值可以是得到的特定个体的之前的值。如果所述方法是准备用于监控疾病的进展或者监控待测个体对特定治疗的反应，可以使用此参考值。

[0038] 优选地，生腱蛋白C水平相比正常的/未患病的参考水平的提高，即是类风湿关节炎、尤其是侵蚀性类风湿关节炎的指示或征候。

[0039] 生腱蛋白C水平可以被用于将患有类风湿关节炎的病人分成患有侵蚀性类风湿关节炎的病人和非患者。

[0040] 本发明的方法也可以被用于监控类风湿关节炎进展、以及尤其是侵蚀性类风湿关节炎进展，和/或用于监控施加于个体的治疗的功效。前述方法的实现，可以通过分析在初始诊断后不同时间点取自个体的样品，监控生腱蛋白C水平的变化、并且将这些水平与正常值和/或参考值相比较。该情况下，参考水平可以包括个体中最初的生物标志物水平、或者在最后测试时个体中的生物标志物水平、或者上述两个水平。

[0041] 本发明的方法也可以被用于确定用于个体的合适治疗方案。该方法可以被用于提供个人化的医学方案。在一种实施方式中，样品中生腱蛋白C水平的提高足以导致诊断为炎性状况例如类风湿关节炎，可以被用于表明：当个体不大可能有反应时，使用抗TNF药物是不适当的。提供替代疗法或许更合适，例如，抗IL17疗法；T细胞共刺激调谐剂(比如Orencia™-阿巴西普(Abatcept))；白细胞介素-6(IL-6)抑制剂(比如Actemra™-托珠单抗

(Tocilizumab));抗CD20抗体(比如RituxanTM-美罗华(Rituxumab);或B细胞活化因子(比如抗BAFF)。其他替代疗法包括Janus激酶抑制剂(JAK)(比如TofacitinibTM)和脾酪氨酸激酶抑制剂(Syk)(比如FostamatinibTM)。

[0042] 在一个实施方式中,本发明提供一种用于确定抗TNF疗法对于患有类风湿关节炎的病人而言是否是一种合适疗法的方法。更具体地讲,如果患有类风湿关节炎的病人在其血浆或者血清中的生腱蛋白C水平为至少31ng每毫升血浆或者血清、或者至少33ng每毫升血浆或者血清的,则他们对于抗TNF疗法不太可能有反应。

[0043] 优选地,本发明的方法是体外进行。

[0044] 个体可以是哺乳动物,优选是人类,但可以可选择地是猴、猿、猫、狗、牛、马、兔或者啮齿动物。

[0045] 根据另一个方面,本发明提供一种确定患有类风湿关节炎的个体的侵蚀性类风湿关节炎状态的方法,该方法包括下述步骤:

[0046] (a)测定来自所述个体的样品中生腱蛋白C的水平;以及

[0047] (b)将步骤(a)中测定的生腱蛋白C水平与一个或多个参考值相比较。

[0048] (c)

[0049] 优选地,样品是血清样品或血浆样品。优选地,样品中生腱蛋白C水平是至少31ng每毫升样品、或者至少33ng每毫升样品。优选地,参考值是来自未患有类风湿关节炎的个体的血浆或血清样品中的生腱蛋白C数值。本领域技术人员可以理解,上述所指的所有优选的特征还可以应用于该方法和本发明的每个方面。

[0050] 根据另一个方面,本发明提供了一种用于确定个体炎性紊乱状态的试剂盒,该试剂盒包含至少一种用于测定由待测个体提供的样品中生腱蛋白C水平的试剂。

[0051] 在一种优选的实施方式中,试剂盒用于确定个体的类风湿关节炎状态、尤其是侵蚀性类风湿关节炎状态,该试剂盒包含至少一种用于测定由待测个体提供的样品中生腱蛋白C水平的试剂。

[0052] 该试剂可以是抗体。

[0053] 试剂盒可以包含以标签或者单独插页形式记载合适工作参数的说明书。说明书可以告诉消费者如何收集样品。

[0054] 试剂盒可以包含一个或多个生腱蛋白C样品,用作用于校准和对比的标准。试剂盒还可以包含用于将样品中检测到的生腱蛋白C水平与校准样品或者图表比较的说明书。试剂盒还可以包括用于显示什么样的生腱蛋白C水平是类风湿关节炎、尤其是侵蚀性类风湿关节炎的征候的说明书。

[0055] 根据另一个方面,本发明提供了血液或者血清样品中生腱蛋白C水平测定的用途,其可作为评价个体中炎性紊乱状态的手段。

[0056] 在一种优选的实施方式中,本发明提供了血液或者血清样品中生腱蛋白C水平测定的用途,其可作为评价个体中类风湿关节炎状态、尤其是侵蚀性类风湿关节炎状态的手段。

[0057] 根据另一个方面,本发明提供了一种治疗个体中炎性状况比如类风湿关节炎、尤其是侵蚀性类风湿关节炎的方法,该方法包括:测定来自个体的样品中生腱蛋白C水平以及实施炎性治疗,尤其实施针对类风湿关节炎或者侵蚀性类风湿关节炎的以观察到的生腱蛋

白C水平为基础的治疗。优选地,如果生腱蛋白C水平高于参考样品中的水平,就实施治疗。参考样品可以是来自不具有炎症状况的正常个体的样品。如果生腱蛋白C水平大于31ng/ml、优选地大于33ng/ml,就可以实施治疗。如果生腱蛋白C水平大于31ng/ml、优选大于33ng/ml,则可以实施抗TNF疗法的替代疗法。该替代疗法可以是上述疗法之一。

[0058] 根据另一个方面,本发明提供了一种治疗类风湿关节炎、尤其是侵蚀性类风湿关节炎的方法,该方法包括:测定来自待测个体的样品中的生腱蛋白C水平;如果生腱蛋白C水平大于参考样品中的水平但小于33ng/ml、优选小于31ng/ml,则实施抗TNF疗法。

[0059] 根据另一个方面,本发明提供了一种治疗类风湿关节炎、尤其是侵蚀性类风湿关节炎的方法,该方法包括:测定来自待测个体的样品中的生腱蛋白C水平;如果生腱蛋白C水平大于31ng/ml、优选大于33ng/ml,则实施除抗TNF疗法之外的疗法。

[0060] 该替代疗法可以是抗IL-17疗法、或者上述替代疗法中的任何一种。

[0061] 本领域技术人员将会理解,本发明的任何一个实施方式和/或方面的优选特征可以应用于本发明的所有其它实施方式和/或方面。

[0062] 通过给出的实施例,参照下述各图,本发明将被更详细作进一步描述。

附图说明

[0063] 图1显示了在患有类风湿关节炎的病人中生腱蛋白C水平显著升高。在该研究中考虑52个病人,类风湿关节炎患者中的86.6%显示出具有异常高的(显著升高的)生腱蛋白C水平。结果显示,类风湿关节炎病人的平均生腱蛋白C值是87.87ng/ml血清,而正常人群的平均生腱蛋白C值是20.34ng/ml血清。患有类风湿关节炎的病病人的95%置信界限是31ng/ml,因此得出如下结论:高于31ng/ml血清的生腱蛋白C水平是类风湿关节炎的征候。

[0064] 图2是Western blot,显示了在患有类风湿关节炎(RA)的病人中生腱蛋白C的循环水平(circulating level)。图2A显示了在来自RA病人的基准样品(baseline samples)中,观察到一个主要的320kDa的TNC条带(n=18)。通过ELISA检测到的相同样品中的相应TNC水平以pg/mL为单位显示在印迹下方。在健康对照血浆(N)中检测到低水平的TNC。rhTNC=0.05μg人重组TNC。图2B显示,在使用抗生腱蛋白C抗体(TNC)进行Western blotting时,除在320kDa下检测到的主要条带,还有MW219、201、190和156kDa的条带存在于一些RA病人的血浆中。对于每个RA样品,同一个膜的丽春红(Ponceau S)染色显示出相当的蛋白质加载。

[0065] 图3显示,生腱蛋白C水平与当前使用的关节炎的CRP标志物及抗CCP标志物之间没有相关性。因此显示出生腱蛋白C是可供选择的和改进的生物标志物,尤其是用于类风湿关节炎、具体地讲用于侵蚀性类风湿关节炎的生物标志物。在该研究中考虑52个病人,并且将生腱蛋白C的血清水平与CRP和抗CCP的血清水平相比较。TNC水平与CRP及抗CCP之间没有关联,表明生腱蛋白C是一种独特的类风湿关节炎生物标志物。

[0066] 图4显示,患有类风湿关节炎的病人血清中的生腱蛋白C表达水平与在病人关节中观察到的侵蚀程度之间有相关性,x轴代表观察到的骨侵蚀数目。呈现的数据显示,血清中生腱蛋白C水平表明在关节中存在骨侵蚀,并且生腱蛋白C血清水平越高,则观察到的侵蚀就越多。

[0067] 图5显示,当患有类风湿关节炎的病人被分成具有异常的血清中生腱蛋白C水平(也就是说,大于31ng/ml)的患者和具有正常的生腱蛋白C水平(血清中生腱蛋白C水平为0-

31ng/ml)患者时,具有异常的生腱蛋白C水平的病人具有统计学上提高的侵蚀评分。因而表明,血清中的生腱蛋白C水平是一种好的用于侵蚀性类风湿关节炎的生物标志物。

[0068] 图6A-6C显示,生腱蛋白C水平与触痛及肿胀关节数(通过GP计数)之间没有相关性(图6A),或者与整体评估分数(医生整体评估,医生按标度1-10来评定病人疾病活性)之间(图6B)或生物化学标志物CRP或者与红细胞沉降率(ESR)之间没有相关性(图6C)。CRP是在炎症中升高的急性期蛋白质,并且是炎症的非专一性标志物,其水平通过ELISA测量。ESR是在1小时的周期内红细胞沉积的速率,并且是炎症的非专一性测量值。为了进行测试,抗凝的血液被置于被称为Westergren试管的直立试管中,测量红细胞下落的速率并且以mm/h为单位报告。ESR取决于在促沉积因子(主要为纤维蛋白原)与阻止淀积的因子(即红血球的负电荷(动电位))之间的平衡。当炎性过程出现时,血液中高比例的纤维蛋白原会引起红细胞彼此粘附。

[0069] 图7显示了在7个患有类风湿关节炎的病人中抗TNF疗法Infliximab™(英夫利昔单抗)和氨甲蝶呤(MTX)对于生腱蛋白C水平的影响。结果显示,这些疗法对于生腱蛋白C几乎没有长期影响。

[0070] 图8详细列出了人类生腱蛋白C的氨基酸序列。

[0071] 图9表明,处于基准线的生腱蛋白C水平预示在开始Infliximab(抗TNF)治疗后16-18周和54周RA病人的将来的触痛关节数。通过ELISA分析在分组A中处于基准线的(进入试验的)来自RA病人的血清的生腱蛋白C水平。在接受Infliximab疗法后16-18周(A)和54周(B),用专业人员测定到的这些病人的触痛关节数显示生腱蛋白C水平。通过Spearman等级相关分析确定显著性。分组A包括根据ACR1987标准具有侵蚀性RA诊断的病人,具有持续0.5至3年的症状。分组B包括具有RA诊断的病人,疾病活性得分处于中等水平或更高水平。

具体实施方式

[0072] 患有类风湿关节炎的病人与正常/对照个体比较的生腱蛋白C水平的评估

[0073] 自患有类风湿关节炎的病入的血液以及正常个体获得血清,并且在-80℃下储存直到使用。在分析当天,血清在冰上解冻,以1:50的比例通常地稀释在EIA缓冲液(1%BSA, PBS中0.05%吐温20),为了用于ELISA。ELISA试剂盒购自IBL(目录编号27751),用于检测人类生腱蛋白C的高分子量变体。100μL的稀释血清在预先涂有未标记的捕获抗生腱蛋白C抗体的ELISA板上孵育,一式两份在37℃下孵育60分钟。ELISA板(在0.001%吐温20/PBS中)洗涤7次,每个孔中加入用HRP标记的抗人类生腱蛋白C抗体(100μL)。这些孔然后于4℃下孵育30分钟,并且然后用0.001%吐温20/PBS洗涤9次。然后将100μL色原(提供的TMB溶液)添加至每个孔,并且避光孵育30分钟或者直至判断变色充分。通过加入100μL1N H₂SO₄终止反应。使用MultiScan板分析器在450nm读取变色,并且使用Ascent version2.6计算出生腱蛋白C的浓度。使用由ELISA板(24-0.38ng/ml)提供的、由生腱蛋白C产生的标准曲线作为标准。

[0074] 上述ELISA是在自52个患有类风湿关节炎的病人获得的血清样品上、以及自20个没有类风湿关节炎迹象的正常对照个体获得的血清样品上进行。结果如图1所示,显示出在类风湿关节炎病人中具有显著更高的生腱蛋白C水平,得出如下结论:大于31ng/ml血清生腱蛋白C水平或大于33ng/ml血清的生腱蛋白C水平是类风湿关节炎、尤其是侵蚀性类风湿关节炎的征候。

[0075] Western blotting显示,存在于类风湿关节炎病人样品中的生腱蛋白C的主要形式具有320kDa的质量(图2A),但在一些病人中也观察到生腱蛋白C的次要的、较小的形式(图2B)。

[0076] 使用下述方法得到了图2中Western blot数据。1 μ L的血清或者血浆在4-12%Bis-Tris预先浇注的聚丙烯酰胺凝胶(Invitrogen公司,Life Technologies,帕斯力,英国)上进行电泳。蛋白质被转印到硝酸纤维素膜(Amersham公司,GE保健公司,查尔芬特,英国)上,并且使用丽春红染色(Sigma Aldrich公司,格林汉姆,英国)显像。在用TBS/0.01%吐温洗涤以除去染色剂后,膜在5%BSA/TBS-吐温中于室温下被封闭1小时,并且与初级抗体以1:1000稀释度在37℃下孵育1小时,该初级抗体可识别人类TNC的N端区域(MAB1908,Merck Millipore公司,沃特福德,英国)。被辣根过氧化物酶共轭的抗小鼠IgG(DAKO公司,伊利,英国)被用作第二抗体,稀释度为1:3000。使用增强化学发光试剂盒(Amersham公司,GE保健公司)检测被结合的抗体,并且在Super RX医用X线胶片(富士公司,日本)上显像。

[0077] 在患有类风湿关节炎的病人中的生腱蛋白C水平与骨侵蚀水平之间的相关性

[0078] 为了显示在病人血清中生腱蛋白C水平与侵蚀性类风湿关节炎之间的相关性,将类风湿关节炎病人中的侵蚀水平与血清中循环生腱蛋白C水平相比较。

[0079] 使用超声和功率多普勒成像测量侵蚀,按照TaylorPC在Rheumatology(牛津大学),2005年6月;44(6):721-8和Epub2005年1月11日综述中描述的方法。

[0080] 根据图4可以看出,当比照着生腱蛋白C水平绘制侵蚀评分时,观察到显著相关性。

[0081] 通过将具有血清中异常生腱蛋白C水平(也就是说,大于31ng/ml)的患有类风湿关节炎的病患者的侵蚀评分与具有正常生腱蛋白C水平(血清中生腱蛋白C水平为0-31ng/ml)的患有类风湿关节炎的病患者的侵蚀评分相比较,图5进一步表明与侵蚀性类风湿关节炎有更强的相关性。具有异常生腱蛋白C水平的病人显示出具有统计学上提高的侵蚀评分。因而表明,血清中的生腱蛋白C水平是一种好的侵蚀性类风湿关节炎的生物标志物。

[0082] 此外,没有观察到类风湿关节炎的其它测量值与生腱蛋白C水平之间的显著相关性(图6A-6C),这进一步表明血清中生腱蛋白C水平是一种好的用于类风湿关节炎、尤其是侵蚀性类风湿关节炎的生物标志物。

[0083] 类风湿关节炎治疗对于生腱蛋白C水平的影响

[0084] 如图7所示,当前使用的用于类风湿关节炎的治疗未表现出对生腱蛋白C水平有任何影响。

[0085] 高的血清生腱蛋白C是在Infliximab治疗的病人中未解决的关节触痛的预示

[0086] 不管采用抗TNF试剂疗法例如Infliximab的重大进步,但使用抗TNF试剂治疗的类风湿关节炎病人的大部分没有响应并且继续获得关节侵蚀和提高的DAS28评分。鉴于生腱蛋白C水平与侵蚀评分的相关性、以及Infliximab对于循环生腱蛋白C水平的影响,进行研究以便确定生腱蛋白C水平是否用作Infliximab治疗的病人的将来疾病进展的预示。在基准生腱蛋白C水平或者在疗法开始后第18或52周的生腱蛋白C水平变化与对Infliximab的反应之间没有关系。然而,在处于基准线的生腱蛋白C水平与Infliximab治疗的病人在开始治疗后第16-18周和54周的后续的TJC评分之间可见显著的相关性(图9)。因此,这些数据提示,在开始Infliximab疗法之前具有较高生腱蛋白C水平的病人很可能与未解决的关节触痛有关,尽管进行了Infliximab疗法。

[0087] 结果表明,在开始抗TNF治疗之前的血清中生腱蛋白C水平可早在提前一年时作为病人中触痛关节数的预示,并且可以将可能受益于抗TNF治疗的病人与那些不大可能有响应的病人区别开来。

[0088] 此外,图2中显示的结果表明,在患有类风湿关节炎、尤其是侵蚀性类风湿关节炎的病人的血清中生腱蛋白C的主要变体是质量为320kDa的亚型,其构成占支配地位的“大亚型”。生腱蛋白C是大的多模型分子。它包含许多不同的结构域,包括装配结构域、一系列14个半表皮生长因子样重复片段、一系列多达17个III型粘连蛋白样重复片段(TNIII)、以及纤维蛋白原样结构域。生腱蛋白C被单个基因编码,该基因被可选地拼接以便产生大小范围为190-320kDa的单体。这特别地发生在TNIII结构域中;TNIII结构域中的8个被组成性地表达(TNIII1-8),并且TNIII结构域中的9个能够被可选地拼接(A1-4、B、AD2、AD1、C和D)。

<110> ISIS 创新有限公司

<120> 生腱蛋白 C 及其在类风湿关节炎的用途

<130> PBB-140308

<140> PCT/GB2012/053104

<141> 2012-12-12

<150> GB1121280.0

<151> 2011-12-12

<150> GB1214806.0

<151> 2012-08-20

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2201

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

[0001]

<400> 1

Met Gly Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val Phe Leu Ala Phe Leu
1 5 10 15

Ala Leu Ala Thr Glu Gly Gly Val Leu Lys Lys Val Ile Arg His Lys
20 25 30

Arg Gln Ser Gly Val Asn Ala Thr Leu Pro Glu Glu Asn Gln Pro Val
35 40 45

Val Phe Asn His Val Tyr Asn Ile Lys Leu Pro Val Gly Ser Gln Cys
50 55 60

Ser Val Asp Leu Glu Ser Ala Ser Gly Glu Lys Asp Leu Ala Pro Pro
65 70 75 80

Ser Glu Pro Ser Glu Ser Phe Gln Glu His Thr Val Asp Gly Glu Asn
85 90 95

Gln Ile Val Phe Thr His Arg Ile Asn Ile Pro Arg Arg Ala Cys Gly
100 105 110

	Cys Ala Ala Ala Pro Asp Val Lys Glu Leu Leu Ser Arg Leu Glu Glu		
	115	120	125
	Leu Glu Asn Leu Val Ser Ser Leu Arg Glu Gln Cys Thr Ala Gly Ala		
	130	135	140
	Gly Cys Cys Leu Gln Pro Ala Thr Gly Arg Leu Asp Thr Arg Pro Phe		
	145	150	155 160
	Cys Ser Gly Arg Gly Asn Phe Ser Thr Glu Gly Cys Gly Cys Val Cys		
	165	170	175
	Glu Pro Gly Trp Lys Gly Pro Asn Cys Ser Glu Pro Glu Cys Pro Gly		
	180	185	190
	Asn Cys His Leu Arg Gly Arg Cys Ile Asp Gly Gln Cys Ile Cys Asp		
	195	200	205
	Asp Gly Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Gln Leu Ala Cys Pro Ser Asp		
	210	215	220
[0002]	Cys Asn Asp Gln Gly Lys Cys Val Asn Gly Val Cys Ile Cys Phe Glu		
	225	230	235 240
	Gly Tyr Ala Gly Ala Asp Cys Ser Arg Glu Ile Cys Pro Val Pro Cys		
	245	250	255
	Ser Glu Glu His Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu Cys Val Cys His Asp		
	260	265	270
	Gly Phe Ala Gly Asp Asp Cys Asn Lys Pro Leu Cys Leu Asn Asn Cys		
	275	280	285
	Tyr Asn Arg Gly Arg Cys Val Glu Asn Glu Cys Val Cys Asp Glu Gly		
	290	295	300
	Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Leu Ile Cys Pro Asn Asp Cys Phe		
	305	310	315 320
	Asp Arg Gly Arg Cys Ile Asn Gly Thr Cys Tyr Cys Glu Glu Gly Phe		
	325	330	335
	Thr Gly Glu Asp Cys Gly Lys Pro Thr Cys Pro His Ala Cys His Thr		
	340	345	350

	Gln Gly Arg Cys Glu Glu Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Ala	
	355	360 365
	Gly Val Asp Cys Ser Glu Lys Arg Cys Pro Ala Asp Cys His Asn Arg	
	370	375 380
	Gly Arg Cys Val Asp Gly Arg Cys Glu Cys Asp Asp Gly Phe Thr Gly	
	385	390 395 400
	Ala Asp Cys Gly Glu Leu Lys Cys Pro Asn Gly Cys Ser Gly His Gly	
	405	410 415
	Arg Cys Val Asn Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Thr Gly Glu	
	420	425 430
	Asp Cys Ser Gln Leu Arg Cys Pro Asn Asp Cys His Ser Arg Gly Arg	
	435	440 445
	Cys Val Glu Gly Lys Cys Val Cys Glu Gln Gly Phe Lys Gly Tyr Asp	
	450	455 460
[0003]	Cys Ser Asp Met Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gln His Gly Arg Cys	
	465	470 475 480
	Val Asn Gly Met Cys Val Cys Asp Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Asp Cys	
	485	490 495
	Arg Asp Arg Gln Cys Pro Arg Asp Cys Ser Asn Arg Gly Leu Cys Val	
	500	505 510
	Asp Gly Gln Cys Val Cys Glu Asp Gly Phe Thr Gly Pro Asp Cys Ala	
	515	520 525
	Glu Leu Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asn	
	530	535 540
	Gly Gln Cys Val Cys His Glu Gly Phe Met Gly Lys Asp Cys Lys Glu	
	545	550 555 560
	Gln Arg Cys Pro Ser Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asp Gly	
	565	570 575
	Gln Cys Ile Cys His Glu Gly Phe Thr Gly Leu Asp Cys Gly Gln His	
	580	585 590

	Ser	Cys	Pro	Ser	Asp	Cys	Asn	Asn	Leu	Gly	Gln	Cys	Val	Ser	Gly	Arg	
						595			600				605				
	Cys	Ile	Cys	Asn	Glu	Gly	Tyr	Ser	Gly	Glu	Asp	Cys	Ser	Glu	Val	Ser	
		610					615					620					
	Pro	Pro	Lys	Asp	Leu	Val	Val	Thr	Glu	Val	Thr	Glu	Glu	Thr	Val	Asn	
	625					630					635				640		
	Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	Glu	Met	Arg	Val	Thr	Glu	Tyr	Leu	Val	Val	Tyr	
					645					650					655		
	Thr	Pro	Thr	His	Glu	Gly	Gly	Leu	Glu	Met	Gln	Phe	Arg	Val	Pro	Gly	
				660					665					670			
	Asp	Gln	Thr	Ser	Thr	Ile	Ile	Gln	Glu	Leu	Glu	Pro	Gly	Val	Glu	Tyr	
		675					680						685				
	Phe	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Leu	Glu	Asn	Lys	Lys	Ser	Ile	Pro	Val	
		690					695					700					
[0004]	Ser	Ala	Arg	Val	Ala	Thr	Tyr	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Gly	Leu	Lys	Phe	
	705					710					715				720		
	Lys	Ser	Ile	Lys	Glu	Thr	Ser	Val	Glu	Val	Glu	Trp	Asp	Pro	Leu	Asp	
				725							730				735		
	Ile	Ala	Phe	Glu	Thr	Trp	Glu	Ile	Ile	Phe	Arg	Asn	Met	Asn	Lys	Glu	
				740						745					750		
	Asp	Glu	Gly	Glu	Ile	Thr	Lys	Ser	Leu	Arg	Arg	Pro	Glu	Thr	Ser	Tyr	
				755					760					765			
	Arg	Gln	Thr	Gly	Leu	Ala	Pro	Gly	Gln	Glu	Tyr	Glu	Ile	Ser	Leu	His	
		770					775						780				
	Ile	Val	Lys	Asn	Asn	Thr	Arg	Gly	Pro	Gly	Leu	Lys	Arg	Val	Thr	Thr	
	785					790					795				800		
	Thr	Arg	Leu	Asp	Ala	Pro	Ser	Gln	Ile	Glu	Val	Lys	Asp	Val	Thr	Asp	
				805						810					815		
	Thr	Thr	Ala	Leu	Ile	Thr	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Glu	Ile	Asp	Gly	
				820						825					830		

	Ile Glu Leu Thr Tyr Gly	Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr	
	835	840	845
	Ile Asp Leu Thr Glu Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys		
	850	855	860
	Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met		
	865	870	875 880
	Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Leu Asp Ala Pro		
	885	890	895
	Arg Asn Leu Arg Arg Val Ser Gln Thr Asp Asn Ser Ile Thr Leu Glu		
	900	905	910
	Trp Arg Asn Gly Lys Ala Ala Ile Asp Ser Tyr Arg Ile Lys Tyr Ala		
	915	920	925
	Pro Ile Ser Gly Gly Asp His Ala Glu Val Asp Val Pro Lys Ser Gln		
	930	935	940
[0005]	Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Leu Thr Gly Leu Arg Pro Gly Thr Glu		
	945	950	955 960
	Tyr Gly Ile Gly Val Ser Ala Val Lys Glu Asp Lys Glu Ser Asn Pro		
	965	970	975
	Ala Thr Ile Asn Ala Ala Thr Glu Leu Asp Thr Pro Lys Asp Leu Gln		
	980	985	990
	Val Ser Glu Thr Ala Glu Thr Ser Leu Thr Leu Leu Trp Lys Thr Pro		
	995	1000	1005
	Leu Ala Lys Phe Asp Arg Tyr Arg Leu Asn Tyr Ser Leu Pro Thr		
	1010	1015	1020
	Gly Gln Trp Val Gly Val Gln Leu Pro Arg Asn Thr Thr Ser Tyr		
	1025	1030	1035
	Val Leu Arg Gly Leu Glu Pro Gly Gln Glu Tyr Asn Val Leu Leu		
	1040	1045	1050
	Thr Ala Glu Lys Gly Arg His Lys Ser Lys Pro Ala Arg Val Lys		
	1055	1060	1065

	Ala Ser Thr Glu Gln Ala Pro Glu Leu Glu Asn Leu Thr Val Thr		
	1070	1075	1080
	Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr Ala Ala Asp		
	1085	1090	1095
	Gln Ala Tyr Glu His Phe Ile Ile Gln Val Gln Glu Ala Asn Lys		
	1100	1105	1110
	Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu Arg Ala		
	1115	1120	1125
	Val Asp Ile Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr Pro Tyr Thr Val Ser		
	1130	1135	1140
	Ile Tyr Gly Val Ile Gln Gly Tyr Arg Thr Pro Val Leu Ser Ala		
	1145	1150	1155
	Glu Ala Ser Thr Gly Glu Thr Pro Asn Leu Gly Glu Val Val Val		
	1160	1165	1170
[0006]	Ala Glu Val Gly Trp Asp Ala Leu Lys Leu Asn Trp Thr Ala Pro		
	1175	1180	1185
	Glu Gly Ala Tyr Glu Tyr Phe Phe Ile Gln Val Gln Glu Ala Asp		
	1190	1195	1200
	Thr Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Val Pro Gly Gly Leu Arg		
	1205	1210	1215
	Ser Thr Asp Leu Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr His Tyr Thr Ile		
	1220	1225	1230
	Thr Ile Arg Gly Val Thr Gln Asp Phe Ser Thr Thr Pro Leu Ser		
	1235	1240	1245
	Val Glu Val Leu Thr Glu Glu Val Pro Asp Met Gly Asn Leu Thr		
	1250	1255	1260
	Val Thr Glu Val Ser Trp Asp Ala Leu Arg Leu Asn Trp Thr Thr		
	1265	1270	1275
	Pro Asp Gly Thr Tyr Asp Gln Phe Thr Ile Gln Val Gln Glu Ala		
	1280	1285	1290

	Asp Gln Val Glu Glu Ala His Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu		
	1295	1300	1305
	Arg Ser Met Glu Ile Pro Gly Leu Arg Ala Gly Thr Pro Tyr Thr		
	1310	1315	1320
	Val Thr Leu His Gly Glu Val Arg Gly His Ser Thr Arg Pro Leu		
	1325	1330	1335
	Ala Val Glu Val Val Thr Glu Asp Leu Pro Gln Leu Gly Asp Leu		
	1340	1345	1350
	Ala Val Ser Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr		
	1355	1360	1365
	Ala Ala Asp Asn Ala Tyr Glu His Phe Val Ile Gln Val Gln Glu		
	1370	1375	1380
	Val Asn Lys Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Leu Pro Gly Ser		
	1385	1390	1395
[0007]	Leu Arg Ala Val Asp Ile Pro Gly Leu Glu Ala Ala Thr Pro Tyr		
	1400	1405	1410
	Arg Val Ser Ile Tyr Gly Val Ile Arg Gly Tyr Arg Thr Pro Val		
	1415	1420	1425
	Leu Ser Ala Glu Ala Ser Thr Ala Lys Glu Pro Glu Ile Gly Asn		
	1430	1435	1440
	Leu Asn Val Ser Asp Ile Thr Pro Glu Ser Phe Asn Leu Ser Trp		
	1445	1450	1455
	Met Ala Thr Asp Gly Ile Phe Glu Thr Phe Thr Ile Glu Ile Ile		
	1460	1465	1470
	Asp Ser Asn Arg Leu Leu Glu Thr Val Glu Tyr Asn Ile Ser Gly		
	1475	1480	1485
	Ala Glu Arg Thr Ala His Ile Ser Gly Leu Pro Pro Ser Thr Asp		
	1490	1495	1500
	Phe Ile Val Tyr Leu Ser Gly Leu Ala Pro Ser Ile Arg Thr Lys		
	1505	1510	1515

	Thr Ile Ser Ala Thr Ala Thr Thr Glu Ala Leu Pro Leu Leu Glu	
	1520	1525 1530
	Asn Leu Thr Ile Ser Asp Ile Asn Pro Tyr Gly Phe Thr Val Ser	
	1535	1540 1545
	Trp Met Ala Ser Glu Asn Ala Phe Asp Ser Phe Leu Val Thr Val	
	1550	1555 1560
	Val Asp Ser Gly Lys Leu Leu Asp Pro Gln Glu Phe Thr Leu Ser	
	1565	1570 1575
	Gly Thr Gln Arg Lys Leu Glu Leu Arg Gly Leu Ile Thr Gly Ile	
	1580	1585 1590
	Gly Tyr Glu Val Met Val Ser Gly Phe Thr Gln Gly His Gln Thr	
	1595	1600 1605
	Lys Pro Leu Arg Ala Glu Ile Val Thr Glu Ala Glu Pro Glu Val	
	1610	1615 1620
[0008]	Asp Asn Leu Leu Val Ser Asp Ala Thr Pro Asp Gly Phe Arg Leu	
	1625	1630 1635
	Ser Trp Thr Ala Asp Glu Gly Val Phe Asp Asn Phe Val Leu Lys	
	1640	1645 1650
	Ile Arg Asp Thr Lys Lys Gln Ser Glu Pro Leu Glu Ile Thr Leu	
	1655	1660 1665
	Leu Ala Pro Glu Arg Thr Arg Asp Ile Thr Gly Leu Arg Glu Ala	
	1670	1675 1680
	Thr Glu Tyr Glu Ile Glu Leu Tyr Gly Ile Ser Lys Gly Arg Arg	
	1685	1690 1695
	Ser Gln Thr Val Ser Ala Ile Ala Thr Thr Ala Met Gly Ser Pro	
	1700	1705 1710
	Lys Glu Val Ile Phe Ser Asp Ile Thr Glu Asn Ser Ala Thr Val	
	1715	1720 1725
	Ser Trp Arg Ala Pro Thr Ala Gln Val Glu Ser Phe Arg Ile Thr	
	1730	1735 1740

	Tyr	Val	Pro	Ile	Thr	Gly	Gly	Thr	Pro	Ser	Met	Val	Thr	Val	Asp
	1745						1750					1755			
	Gly	Thr	Lys	Thr	Gln	Thr	Arg	Leu	Val	Lys	Leu	Ile	Pro	Gly	Val
	1760						1765					1770			
	Glu	Tyr	Leu	Val	Ser	Ile	Ile	Ala	Met	Lys	Gly	Phe	Glu	Glu	Ser
	1775						1780					1785			
	Glu	Pro	Val	Ser	Gly	Ser	Phe	Thr	Thr	Ala	Leu	Asp	Gly	Pro	Ser
	1790						1795					1800			
	Gly	Leu	Val	Thr	Ala	Asn	Ile	Thr	Asp	Ser	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg
	1805						1810					1815			
	Trp	Gln	Pro	Ala	Ile	Ala	Thr	Val	Asp	Ser	Tyr	Val	Ile	Ser	Tyr
	1820						1825					1830			
	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Pro	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr	Val	Ser	Gly	Asn
	1835						1840					1845			
[0009]	Thr	Val	Glu	Tyr	Ala	Leu	Thr	Asp	Leu	Glu	Pro	Ala	Thr	Glu	Tyr
	1850						1855					1860			
	Thr	Leu	Arg	Ile	Phe	Ala	Glu	Lys	Gly	Pro	Gln	Lys	Ser	Ser	Thr
	1865						1870					1875			
	Ile	Thr	Ala	Lys	Phe	Thr	Thr	Asp	Leu	Asp	Ser	Pro	Arg	Asp	Leu
	1880						1885					1890			
	Thr	Ala	Thr	Glu	Val	Gln	Ser	Glu	Thr	Ala	Leu	Leu	Thr	Trp	Arg
	1895						1900					1905			
	Pro	Pro	Arg	Ala	Ser	Val	Thr	Gly	Tyr	Leu	Leu	Val	Tyr	Glu	Ser
	1910						1915					1920			
	Val	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Glu	Val	Ile	Val	Gly	Pro	Asp	Thr	Thr
	1925						1930					1935			
	Ser	Tyr	Ser	Leu	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro	Ser	Thr	His	Tyr	Thr	Ala
	1940						1945					1950			
	Lys	Ile	Gln	Ala	Leu	Asn	Gly	Pro	Leu	Arg	Ser	Asn	Met	Ile	Gln
	1955						1960					1965			

	Thr	Ile	Phe	Thr	Thr	Ile	Gly	Leu	Leu	Tyr	Pro	Phe	Pro	Lys	Asp
	1970						1975					1980			
	Cys	Ser	Gln	Ala	Met	Leu	Asn	Gly	Asp	Thr	Thr	Ser	Gly	Leu	Tyr
	1985						1990					1995			
	Thr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Gly	Asp	Lys	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Val	Phe
	2000						2005					2010			
	Cys	Asp	Met	Thr	Ser	Asp	Gly	Gly	Gly	Trp	Ile	Val	Phe	Leu	Arg
	2015						2020					2025			
	Arg	Lys	Asn	Gly	Arg	Glu	Asn	Phe	Tyr	Gln	Asn	Trp	Lys	Ala	Tyr
	2030						2035					2040			
	Ala	Ala	Gly	Phe	Gly	Asp	Arg	Arg	Glu	Glu	Phe	Trp	Leu	Gly	Leu
	2045						2050					2055			
	Asp	Asn	Leu	Asn	Lys	Ile	Thr	Ala	Gln	Gly	Gln	Tyr	Glu	Leu	Arg
	2060						2065					2070			
[0010]	Val	Asp	Leu	Arg	Asp	His	Gly	Glu	Thr	Ala	Phe	Ala	Val	Tyr	Asp
	2075						2080					2085			
	Lys	Phe	Ser	Val	Gly	Asp	Ala	Lys	Thr	Arg	Tyr	Lys	Leu	Lys	Val
	2090						2095					2100			
	Glu	Gly	Tyr	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Asp	Ser	Met	Ala	Tyr	His	Asn
	2105						2110					2115			
	Gly	Arg	Ser	Phe	Ser	Thr	Phe	Asp	Lys	Asp	Thr	Asp	Ser	Ala	Ile
	2120						2125					2130			
	Thr	Asn	Cys	Ala	Leu	Ser	Tyr	Lys	Gly	Ala	Phe	Trp	Tyr	Arg	Asn
	2135						2140					2145			
	Cys	His	Arg	Val	Asn	Leu	Met	Gly	Arg	Tyr	Gly	Asp	Asn	Asn	His
	2150						2155					2160			
	Ser	Gln	Gly	Val	Asn	Trp	Phe	His	Trp	Lys	Gly	His	Gln	His	Ser
	2165						2170					2175			
	Ile	Gln	Phe	Ala	Glu	Met	Lys	Leu	Arg	Pro	Ser	Asn	Phe	Arg	Asn
	2180						2185					2190			
[0011]	Leu	Glu	Gly	Arg	Arg	Lys	Arg	Ala							
	2195						2200								

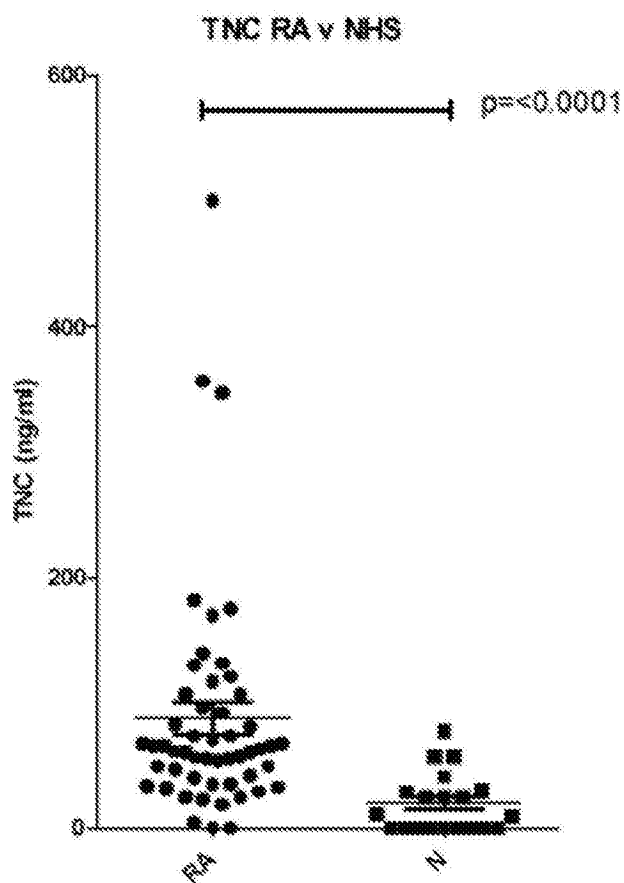


图1

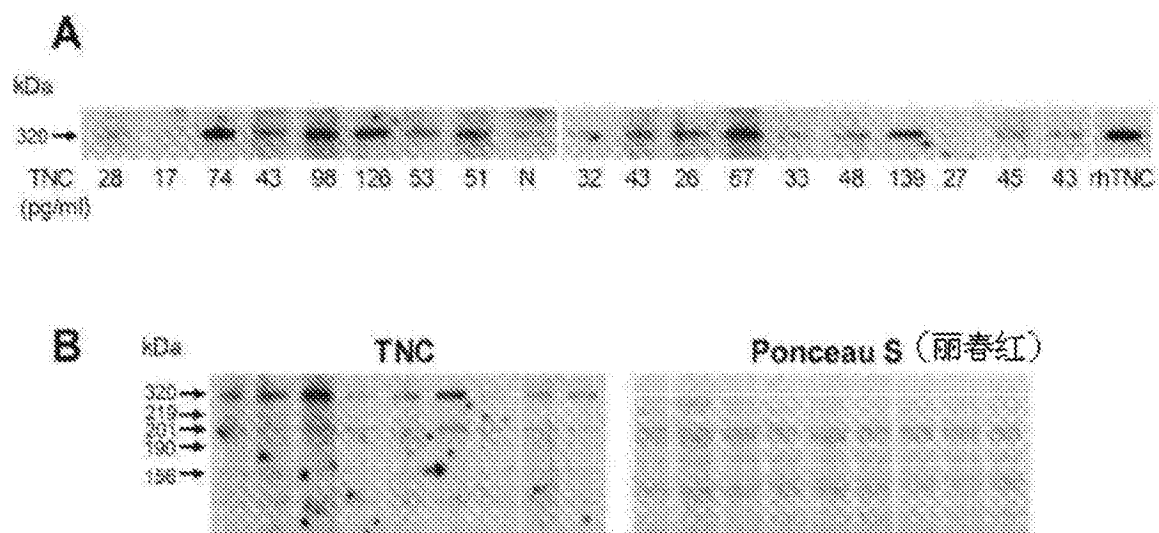


图2

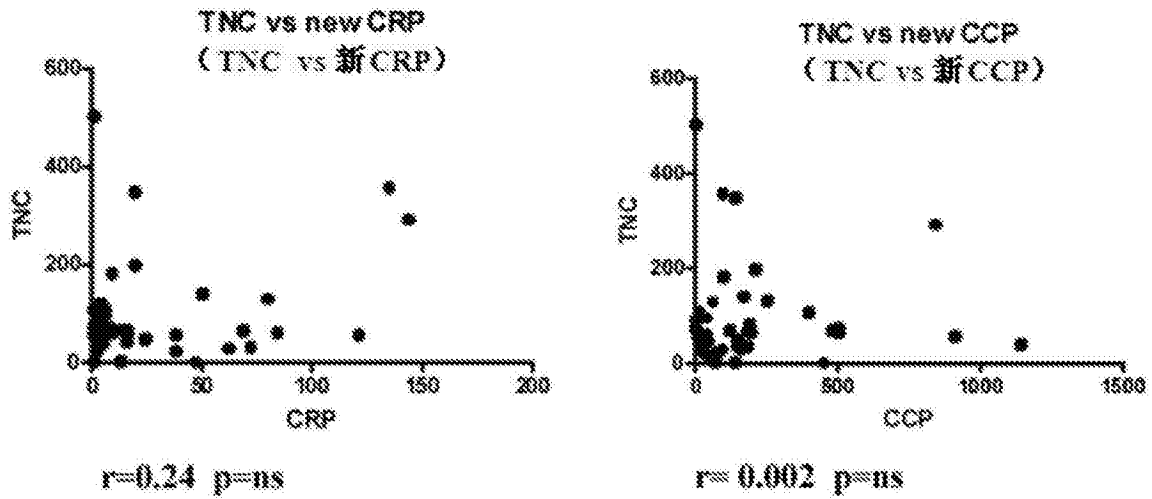


图3

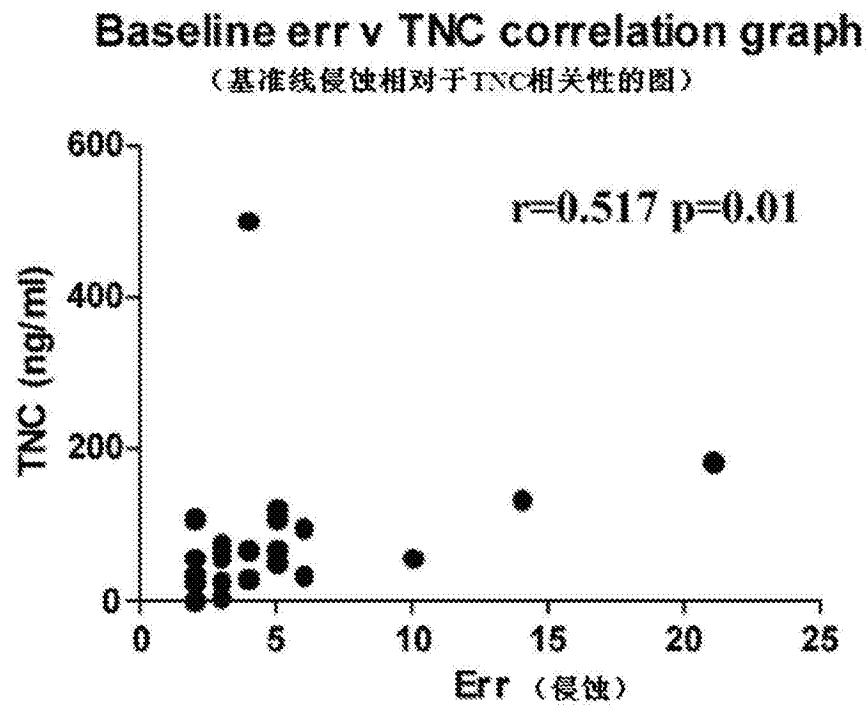


图4

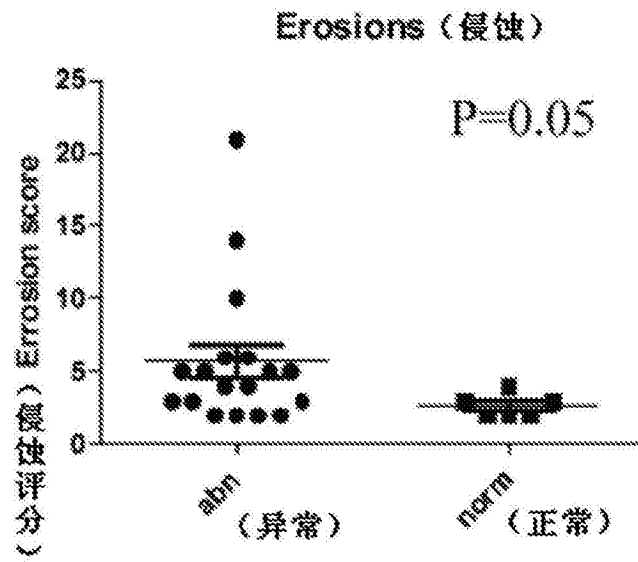


图5

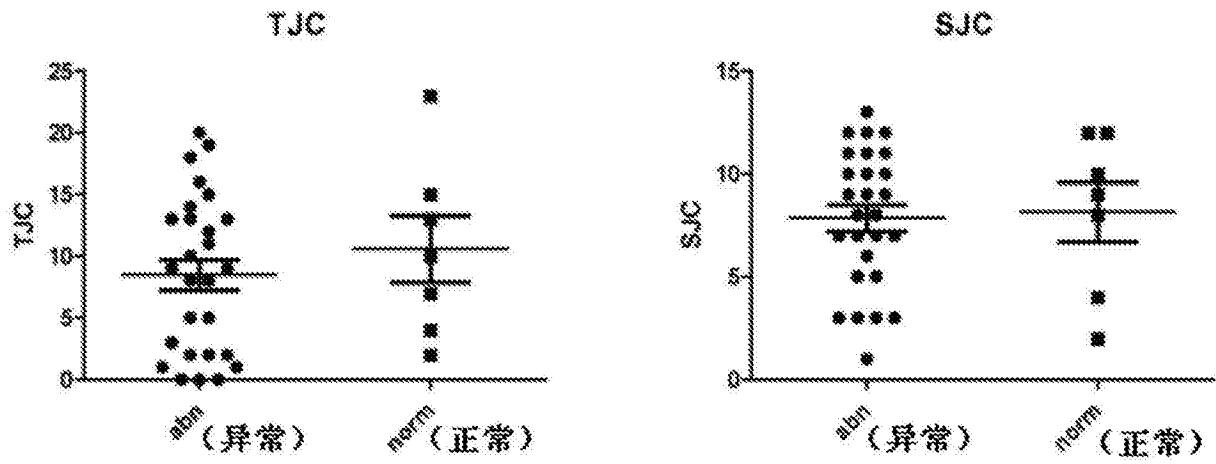


图6A

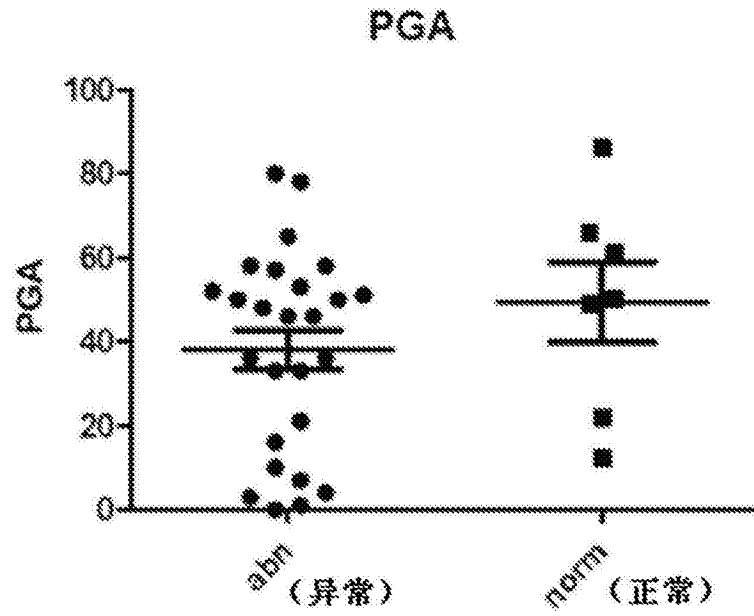


图6B

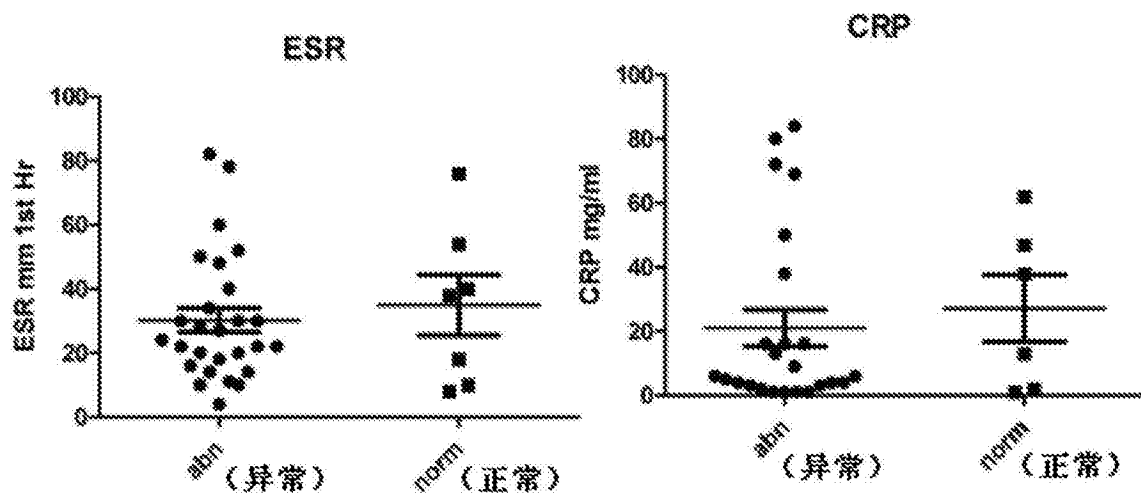


图6C

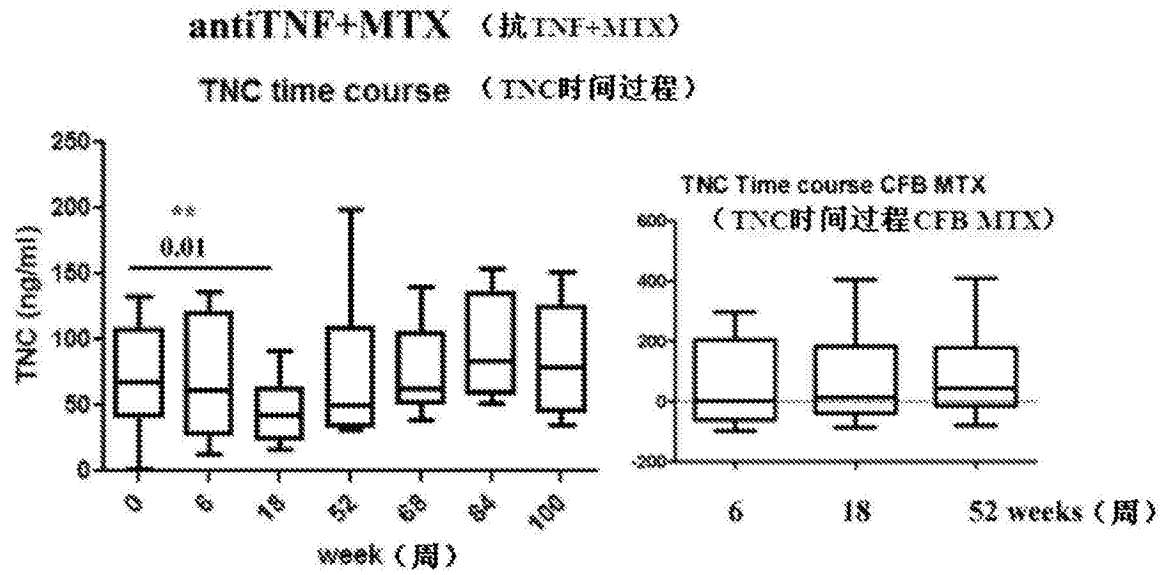


图7

```

10      20      30      40      50      60
MSAMTQLLAG VFLAFLALAF EGVIAKIVIR RKRQSGVNAF LPENQFVVF NRVYNIKLPV

70      80      90      100     110     120
GAGCPVLEES AGGKEDLAPF SEPSESPQER TVDGENQIVF YRINIFRRA CGCAAPDYK

130     140     150     160     170     180
ELLSELEELE KLVSELEEQE TAGAGCCIQF ATGALDTKFF CSKGNFETE GGCVCSEPM

190     200     210     220     230     240
KGFNCSEPEE FGNCHLRSDC IDQCICSDG PTGNCESQLA CPSCNDQOK CVMGVCICFE

250     260     270     280     290     300
GYAGADCSEK ICFVFCSEEN STCYDGLCYC EDGFASDSCN KPLCLMNCYN RGRVENEKV

310     320     330     340     350     360
CDSGPTGESC SELICPNDCF DRGSCINGTC YCESPFTGED CGKPTCFHAC NTQGRGREGQ

370     380     390     400     410     420
CYCDEGFASV DCSEKRCFAD CNHSGRCVSG RCECDGFTG ADGSELKCPN GCSGHSRCYN

430     440     450     460     470     480
GQCYDEGYT GEDCSQLRFP NUCRSPRPVY SGNVCESGF EGYDCSEMSC ENDCRQRRC

490     500     510     520     530     540
VNGMVCDSG YTSRDCNRQ CPMCLNREL CYDQCYCED SFTGFDCREL SCFNDCHQGS

550     560     570     580     590     600
RCVNDQCVCH RSPMRDCKE QRCFDCRSQ GRCYDQCIC HESFTGLCS QHSCPSDCN

610     620     630     640     650     660
LQCYVGRCI CHSYSGEDC SEVSPFDLV VTEVTISTVN LAGNRGNTV EYLVVTFTN

670     680     690     700     710     720
EGGLEKPFV FGDQTSTIQ ELEPGVEYH FVTAILEKH EIPVGRVAT YLAPESLKF

```

```

730      740      750      760      770      780
KQIKETGVGV KDWFLGIAFE TWELIPWMMN KEDSESEITKQ LRRPETSYPQ TELAPGQIVE

790      800      810      820      830      840
ISLNIYNNNT KQFSLKRVTT TRLAPPGIE VKDVTDTAL ITWFKPLAEI DGIELTYGIX

850      860      870      880      890      900
DVPQDPTTID LTXDENGYSI QNLSFDTRYK VQLISRAGIM GSHFAKETFT TELIAPNHLR

910      920      930      940      950      960
HVSQTUNSIY LEWRNGKAAI DSYRIYAPI SGGWAEVDV FESQQATTET TLTGLRDPYE

970      980      990      1000     1010     1020
YSGVSEAYKE DKESNPATIN AATELDTPED LQVETAEYS LTLLEKTELA KFDKYLWYS

1030     1040     1050     1060     1070     1080
LPTQWYGVQ LPPNTTSYVL QGLEPQGEYN VLLTAQKSH KSKFARVNAS TEQAFELNL

1090     1100     1110     1120     1130     1140
TYTEVSWDGL KLSWTAADQA YEHFIQVQR ANEVEAARNL TVFGSLRAYD IFGLKAATFY

1150     1160     1170     1180     1190     1200
TVSIYGVIGS YETTVLAEFA ETGETENLGE VVVAEVQNDL KLSWTAPEG ATEYFTIQVQ

1210     1220     1230     1240     1250     1260
EADTVBAAGN LTVFGSLRST DLFGSLAATN YTITINGVTQ DEFTTELSVE VLTEETVMSG

1270     1280     1290     1300     1310     1320
NLTVTEVSWD ALRLNWTTPD GTYDQFTIQV QEADQVEAH NLTVPSGLRS NLIFGLRAGT

1330     1340     1350     1360     1370     1380
FYTVTLRGEV RSHSTPLAY EVVTEDLPQL GDLAVGEVGM DGLRLNWTAA SHAYENFVIQ

1390     1400     1410     1420     1430     1440
VQEVNVEEAA QNLTLPSGLR AVQIFGLEAA TFYFVSIQGV LRSFTTPVLS AEAFTAKERE

```

Figure 8...continued

(继图 8)

```

1450      1460      1470      1480      1490      1500
IGNINVSQIT FESNLSNMA TQGITFTFTI EIIQNSHLE TVEYNISQAE STAHISGLPP

1510      1520      1530      1540      1550      1560
STDFIVYLSQ LAFSISHTTI SATATTEALP LLENLTISDI SFYGFVQNM ASKAFDQFL

1570      1580      1590      1600      1610      1620
VTYVDGKLL DFGFTLGGY QPKISLRLI TQISYEVNYS GFTQGNQTFE LAKIVTEAR

1630      1640      1650      1660      1670      1680
PEYDHLVED ATPDGFRLW TADRSVTDNF VLKIKDTRKQ SEPLEITLLA PIRTSITGL

1690      1700      1710      1720      1730      1740
REXTYEIEL YSISKGRSQ TVSAIAFTAM GSPREVIFED ITENIATVSW RASTAQVESF

1750      1760      1770      1780      1790      1800
NITYVPIIGS IYDMVTYGGT RTQIALVKLI FGVEYLVEII AMNGFREDSE VEGFTIALD

1810      1820      1830      1840      1850      1860
GFSGLVTANI TDSHALASQ PAIATVDSYV ISYTGSEVFE ITPTVSGHTV EVALFDLERK

1870      1880      1890      1900      1910      1920
TEYTLRIFAE NGPQCSHTIF AKFTTDLSQ KDLTATEVQS ETALLTWEEF PASVYGYLLV

1930      1940      1950      1960      1970      1980
YEPVDGTYER VIVGFUTTEY ELALDSFTN YTAIQALSS FLSENMIQTI STTISLLYFF

1990      2000      2010      2020      2030      2040
PKDCQAMLN GFTTSGLYTE YLNGDEARAL EVFCQNTAGG GGVIVFLARK NGRENFYQNW

2050      2060      2070      2080      2090      2100
KAYAGFGDR REEFWLGLDN LNKITAQQQY ELRVDLSDSG STAFAYYDRF SVEDASTRYK

2110      2120      2130      2140      2150      2160
LEVGYSGTA GDSMAYHNGK SFSTFDSUTD SAITCALSY NGAFWYFQCH FQNUMSRYGD

2170      2180      2190      2200
NHHSQGVNWF HKKSHHSIQ FAKMKLPSW FKNLEGRKK A

```

Figure 8...continued (继图 8)

```

2170      2180      2190      2200
NHHSQGVNWF HKKSHHSIQ FAKMKLPSW FKNLEGRKK A

```

Figure 8...continued. (继图 8)

图8

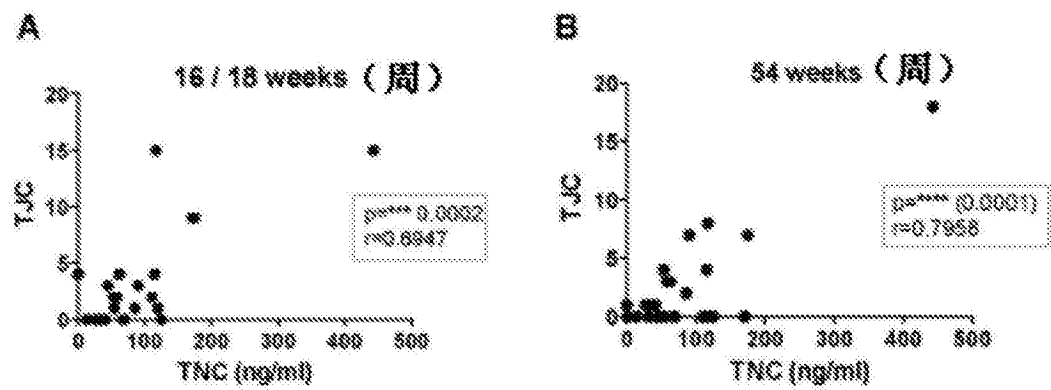


图9