

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680012523.1

[51] Int. Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 7 月 9 日

[11] 公开号 CN 101218254A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

[22] 申请日 2006.2.14

[21] 申请号 200680012523.1

[30] 优先权

[32] 2005.2.14 [33] US [31] 60/653,260

[32] 2005.4.1 [33] US [31] 60/667,492

[86] 国际申请 PCT/US2006/005111 2006.2.14

[87] 国际公布 WO2006/088833 英 2006.8.24

[85] 进入国家阶段日期 2007.10.15

[71] 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 B·M·卡雷尼奥 M·科林斯

J·F·赖特 N·M·沃尔夫曼

M·阿赖 K·雅各布斯 卢志坚

郭永金 邱永成

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 梁谋

权利要求书 8 页 说明书 75 页 序列表 50 页

附图 33 页

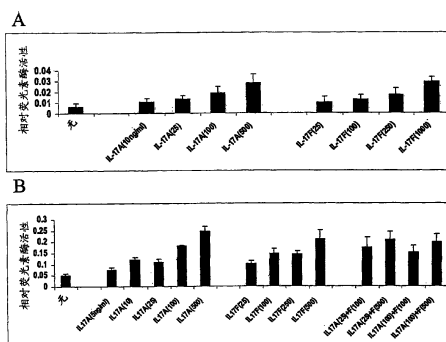
[54] 发明名称

白介素-17F 抗体及其它 IL-17F 信号传递拮抗剂和它们的用途

[57] 摘要

本发明提供了分离的和纯化的与 IL-17F 信号传递途径相关的多核苷酸和多肽。本发明还提供了 IL-17F 同二聚体和 IL-17A/IL-17F 异二聚体的抗体,和从天然来源分离和纯化 IL-17 家族成员(包括 IL-17A/IL-17F 异二聚体)的方法。本发明还涉及用于诊断、预后、监测与 IL-17F 信号传递相关的病症(即 IL-17F 相关病症)的进展、和治疗和/或预防所述病症的新方法,所述病症包括但不限于,炎症病症,例如自身免疫病(例如,关节炎(包括类风湿关节炎)、银屑病,系统性红斑狼疮和多发性硬化)、呼吸系统疾病(例如, COPD, 囊性纤维化,哮喘,变态反应)、移植排斥(包括实体器官移植排斥)和炎症肠病或病症(IBD, 例如, 溃疡性结肠炎, 克隆氏病)。本发明还涉及新的治疗剂和

治疗靶,和筛选和评估用于干预(治疗)和预防与 IL-17F 信号传递相关的病症的测试化合物的方法。



1. 筛选能拮抗 IL-17F 信号传递的测试化合物的方法，其包含下述步骤：

使含有 IL-17F 和 IL-17R 的样品接触化合物；和

确定样品中 IL-17F 与 IL-17R 的相互作用相对于未接触该化合物的样品中 IL-17F 与 IL-17R 的相互作用是否降低，

由此，接触该化合物的样品中 IL-17F 与 IL-17R 的相互作用的降低，将该化合物鉴别为能抑制 IL-17F 与 IL-17R 的相互作用且能拮抗 IL-17F 信号传递的化合物。

2. 筛选能拮抗 IL-17F 信号传递的测试化合物的方法，其包含下述步骤：

使含有 IL-17F 和 IL-17RC 的样品接触化合物；和

确定样品中 IL-17F 与 IL-17RC 的相互作用相对于未接触该化合物的样品中 IL-17F 与 IL-17RC 的相互作用是否降低，

由此，接触该化合物的样品中 IL-17F 与 IL-17RC 的相互作用的降低，将该化合物鉴别为能抑制 IL-17F 与 IL-17RC 的相互作用且能拮抗 IL-17F 信号传递的化合物。

3. 诊断受试者中与增强的 IL-17F 信号传递相关的病症的方法，其包含下述步骤：

检测受试者样品中 IL-17F 信号传递基因产物的测试量；和

对比该测试量与对照样品中相同 IL-17F 信号传递基因产物的正常量，

由此明显超过正常量的测试量提供了诊断与增强的 IL-17F 信号传递相关的病症的阳性指示。

4. 权利要求 3 的方法，其中所述病症选自：自身免疫病，呼吸系统疾病和炎性肠病。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述 IL-17F 信号传递基因产物是 IL-17F 基因产物。

6. 权利要求 4 的方法，其中所述 IL-17F 信号传递基因产物是 IL-17R 基因产物。

7. 权利要求 4 的方法，其中所述 IL-17F 信号传递基因产物是 IL-17RC 基因产物。

8. 治疗具有患与增强的 IL-17F 信号传递相关的病症的危险或诊断出患有这样的病症的受试者的方法，其包含给该受试者施用治疗有效量的 IL-17F 信号传递拮抗剂。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述 IL-17F 信号传递拮抗剂选自：IL-17F 抑制性多核苷酸，IL-17R 抑制性多核苷酸，IL-17RC 抑制性多核苷酸，包含 IL-17R 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽，包含 IL-17RC 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽，抑制性抗 IL-17F 抗体，抑制性抗 IL-17R 抗体，抑制性抗 IL-17RC 抗体和拮抗性小分子。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述 IL-17F 信号传递拮抗剂是 IL-17R 抑制性多核苷酸。

11. 权利要求 9 的方法，其中所述 IL-17F 信号传递拮抗剂是 IL-17RC 抑制性多核苷酸。

12. 权利要求 10 的方法，其中所述抑制性多核苷酸是选自 SEQ ID NO:17-24 所述的核苷酸序列的 siRNA。

13. 权利要求 11 的方法，其中所述抑制性多核苷酸是选自 SEQ ID NO:25-32 所述的核苷酸序列的 siRNA。

14. 权利要求 9 的方法，其中所述 IL-17F 信号传递拮抗剂是包含 IL-17R 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽。

15. 权利要求 9 的方法，其中所述 IL-17F 信号传递拮抗剂是包含 IL-17RC 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽。

16. 权利要求 14 的方法，其中所述可溶多肽具有 SEQ ID NO:34 所述的氨基酸序列。

17. 权利要求 15 的方法，其中所述可溶多肽具有 SEQ ID NO:35 所述的氨基酸序列。

18. 权利要求 9 的方法，其中所述 IL-17F 抑制性多核苷酸包含 SEQ ID NO:1 所述的核苷酸序列、或与 SEQ ID NO:1 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列，或 SEQ ID NO:1 的片段，或其 RNA 等同物，且其中所述抑制性多核苷酸在细胞中的表达，导致 IL-17F 的表达降低。

19. 权利要求 9 的方法，其中所述 IL-17R 抑制性多核苷酸包含 SEQ ID NO:5 所述的核苷酸序列、或与 SEQ ID NO:5 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列，或 SEQ ID NO:5 的片段，或其 RNA 等同物，且其中所述抑制性多核苷酸在细胞中的表达，导致降低的 IL-17R 表达。

20. 权利要求 9 的方法，其中所述 IL-17RC 抑制性多核苷酸包含选自 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:15 所述的核苷酸序列，或与选自 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:15 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列，或选自 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:15 所述的核苷酸序列的片段，或其 RNA 等同物，且其中所述抑制性多核苷酸在细胞中的表达，导致降低的 IL-17RC 表达。

21. 权利要求 8 的方法，其中与增强的 IL-17F 信号传递相关的病症是炎性病症。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述炎性病症选自：自身免疫病，呼吸系统疾病和炎性肠病。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述炎性病症是自身免疫病，所述自身免疫病选自：关节炎，银屑病，系统性红斑狼疮和多发性硬化。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述自身免疫病是类风湿关节炎。

25. 权利要求 22 的方法，其中所述炎性病症是呼吸系统疾病，所述呼吸系统疾病是囊性纤维化。

26. 权利要求 22 的方法，其中所述炎性病症是炎性肠病。

27. 权利要求 8 的方法，其还包含给该受试者施用治疗有效量的至少一种其它治疗剂。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述至少一种其它治疗剂选自：细胞因子抑制剂，生长因子抑制剂，免疫抑制剂，抗炎剂，代谢抑制剂，酶抑制剂，细胞毒性剂和细胞抑制剂。

29. 权利要求 27 的方法，其中所述至少一种其它治疗剂选自：TNF 拮抗剂，抗 TNF 剂，IL-12 拮抗剂，IL-15 拮抗剂，IL-17 拮抗剂，IL-18 拮抗剂，IL-22 拮抗剂，T 细胞消除剂，B 细胞消除剂，环孢菌素，FK-506，CCI-779，依那西普，英夫单抗，利妥希玛，阿达木单抗，泼尼松龙，硫唑嘌呤，金，柳氮磺胺吡啶，氯喹，羟氯喹，米诺环素，阿那白滞素，阿巴他塞，甲氨蝶呤，来氟米特，雷帕霉素，雷帕霉素类似物，Cox-2 抑制剂，cPLA2 抑制剂，NSAIDs，p38 抑制剂，B7.1、B7.2、ICOSL、ICOS 和/或 CD28 的拮抗剂和 CTLA4 激动剂。

30. 抑制细胞群体或受试者中 NF- κ B 的激活 NF- κ B 反应性启动子的

能力的方法，其包含给所述细胞群体或受试者施用 IL-17F 信号传递拮抗剂。

31. 权利要求 30 的方法，其中所述 IL-17F 信号传递拮抗剂选自：IL-17F 抑制性多核苷酸，IL-17R 抑制性多核苷酸，IL-17RC 抑制性多核苷酸，包含 IL-17R 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽，包含 IL-17RC 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽，抑制性抗 IL-17F 抗体，抑制性抗 IL-17R 抗体，抑制性抗 IL-17RC 抗体和拮抗性小分子。

32. 抑制细胞群体或受试者中 IL-17F 生物活性的方法，该方法包含给所述细胞群体或受试者施用 IL-17F 信号传递拮抗剂。

33. 权利要求 32 的方法，其中所述 IL-17F 信号传递拮抗剂选自：IL-17F 抑制性多核苷酸，IL-17R 抑制性多核苷酸，IL-17RC 抑制性多核苷酸，包含 IL-17R 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽，包含 IL-17RC 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽，抑制性抗 IL-17F 抗体，抑制性抗 IL-17R 抗体，抑制性抗 IL-17RC 抗体和拮抗性小分子。

34. 权利要求 32 的方法，其中所述 IL-17F 生物活性选自：中性粒细胞分化、中性粒细胞募集和细胞因子诱导。

35. 药物组合物，其包含 IL-17F 信号传递拮抗剂和药学上可接受的载体。

36. 权利要求 35 的药物组合物，其中所述 IL-17F 信号传递拮抗剂选自：IL-17F 抑制性多核苷酸，IL-17R 抑制性多核苷酸，IL-17RC 抑制性多核苷酸，包含 IL-17R 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽，包含 IL-17RC 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽，抑制性抗 IL-17F 抗体，抑制性抗 IL-17R 抗体，抑制性抗 IL-17RC 抗体和拮抗性小分子。

37. 疫苗佐剂，其包含 IL-17F 信号传递拮抗剂和选自下述的抗原：自身抗原，变应原，同种异体抗原及其片段。

38. 权利要求 37 的疫苗佐剂，其中所述 IL-17F 信号传递拮抗剂选自：IL-17F 抑制性多核苷酸，IL-17R 抑制性多核苷酸，IL-17RC 抑制性多核苷酸，包含 IL-17R 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽，包含 IL-17RC 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽，抑制性抗 IL-17F 抗体，抑制性抗 IL-17R 抗体，抑制性抗 IL-17RC 抗体和拮抗性小分子。

39. 分离的抗体，其能特异性地结合 SEQ ID NO:6 所述的氨基酸序列。

40. 分离的抗体，其能特异性地结合选自 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、和 SEQ ID NO:15 所述氨基酸序列的氨基酸序列。

41. 权利要求 39 的抗体，其中所述抗体拮抗 IL-17F 信号传递。

42. 权利要求 40 的抗体，其中所述抗体拮抗 IL-17F 信号传递。

43. 分离的抗体，其能特异性地结合 IL-17F 蛋白。

44. 权利要求 43 的抗体，其中所述 IL-17F 蛋白源自人或灵长类动物。

45. 权利要求 43 的抗体，其中所述 IL-17F 蛋白是多聚体。

46. 权利要求 45 的抗体，其中所述 IL-17F 蛋白是 IL-17F 同二聚体或 IL-17F 异二聚体。

47. 权利要求 46 的抗体，其中所述 IL-17F 蛋白是异二聚体，且其中所述 IL-17F 异二聚体是 IL-17A/IL-17F。

48. 权利要求 43 的抗体，其中所述抗体抑制 IL-17F 生物活性。

49. 权利要求 1-3 和 8 中的任一项的方法，其中 IL-17F 信号传递是由 IL-17F 同二聚体、IL-17F 异二聚体、或 IL-17F 同二聚体和 IL-17F 异二聚体两者介导。

50. 权利要求 49 的方法，其中 IL-17F 信号传递至少部分地是由 IL-17F 异二聚体介导，且其中所述 IL-17F 异二聚体是 IL-17A/IL-17F。

51. 权利要求 32 的方法，其中所述 IL-17F 生物活性是由 IL-17F 同二聚体、IL-17F 异二聚体、或 IL-17F 同二聚体和 IL-17F 异二聚体两者介导。

52. 权利要求 51 的方法，其中所述 IL-17F 生物活性至少部分地是由 IL-17F 异二聚体介导，且其中所述 IL-17F 异二聚体是 IL-17A/IL-17F。

53. 权利要求 35 的药物组合物，其中所述 IL-17F 信号传递拮抗剂拮抗 IL-17F 同二聚体、IL-17F 异二聚体、或 IL-17F 同二聚体和 IL-17F 异二聚体两者。

54. 权利要求 37 的疫苗佐剂，其中所述 IL-17F 信号传递拮抗剂拮抗 IL-17F 同二聚体、IL-17F 异二聚体、或 IL-17F 同二聚体和 IL-17F 异二聚体两者。

55. 抑制至少一种与 IL-21 信号传递相关的活性的方法，其包含拮抗 IL-17F 信号传递。

56. 抑制至少一种与 IL-23 信号传递相关的活性的方法，其包含拮抗 IL-17F 信号传递。

57. 权利要求 55 的方法，其中 IL-17F 信号传递是由 IL-17F 同二聚体、IL-17F 异二聚体、或 IL-17F 同二聚体和 IL-17F 异二聚体两者介导。

58. 权利要求 57 的方法，其中 IL-17F 信号传递至少部分地是由 IL-17F 异二聚体介导，且其中所述 IL-17F 异二聚体是 IL-17A/IL-17F。

59. 纯化天然 IL-17A 蛋白的方法，其包含：

- a) 激活培养基中的 T 细胞；和
- b) 从培养基中免疫沉淀 IL-17A 蛋白。

60. 纯化天然 IL-17F 蛋白的方法，其包含：

- a) 激活培养基中的 T 细胞；和
- b) 从培养基中免疫沉淀 IL-17F 蛋白。

61. 权利要求 59 的方法，其中所述 IL-17A 蛋白是 IL-17A 同二聚体、IL-17A 异二聚体、或 IL-17A 同二聚体和 IL-17A 异二聚体两者。

62. 权利要求 60 的方法，其中所述 IL-17F 蛋白是 IL-17F 同二聚体、IL-17F 异二聚体、或 IL-17F 同二聚体和 IL-17F 异二聚体两者。

63. 权利要求 61 的方法，其中所述 IL-17A 蛋白是异二聚体，且其中所述 IL-17A 异二聚体是 IL-17A/IL-17F。

64. 权利要求 62 的方法，其中所述 IL-17F 蛋白是异二聚体，且其中所述 IL-17F 异二聚体是 IL-17A/IL-17F。

65. 权利要求 59 或 60 的方法，其中所述培养基包含 IL-21。

66. 分离的 IL-17F 蛋白，其中所述 IL-17F 蛋白是 IL-17F 同二聚体或 IL-17F 异二聚体。

67. 权利要求 66 的 IL-17F 蛋白，其中所述 IL-17F 蛋白分离自天然来源。

68. 权利要求 67 的 IL-17F 蛋白，其中所述天然来源是至少一个 T 细胞。

69. 分离的 IL-17A 蛋白，其中所述 IL-17A 蛋白是 IL-17A 同二聚体或 IL-17A 异二聚体。

70. 权利要求 69 的 IL-17A 蛋白，其中所述 IL-17A 蛋白分离自天然来源。

71. 权利要求 70 的 IL-17A 蛋白，其中所述天然来源是至少一个 T

细胞。

72. 抑制至少一种与 IL-17A 信号传递相关的活性的方法, 其包含施用 IL-17F 拮抗剂。

73. 分离基本上不含有 IL-17A 同二聚体和 IL-17F 同二聚体的 IL-17A/IL-17F 异二聚体的方法, 其包含:

a) 在培养基培养的宿主细胞中表达 IL-17A 融合蛋白和 IL-17F 融合蛋白, 其中所述 IL-17A 融合蛋白包含融合到第一亲和标记物上的 IL-17A 蛋白或其片段, 且其中所述 IL-17F 融合蛋白包含融合到第二亲和标记物上的 IL-17F 蛋白或其片段;

b) 使宿主细胞将 IL-17A 融合蛋白和 IL-17F 融合蛋白分泌进培养基中;

c) 在非还原条件下, 将培养基加入第一亲和层析柱, 以便所述 IL-17A 融合蛋白结合第一亲和层析柱;

d) 在非还原条件下, 从第一亲和层析柱洗脱结合的蛋白;

e) 在非还原条件下, 将从步骤 d) 得到的洗脱液加入第二亲和层析柱, 以便所述 IL-17F 融合蛋白结合第二亲和层析柱; 和

f) 在非还原条件下, 从第二亲和层析柱洗脱结合的蛋白,

其中从步骤 f) 得到的洗脱液含有 IL-17A/IL-17F 异二聚体形式的 IL-17A 融合蛋白和 IL-17F 融合蛋白。

74. 分离基本上不含有 IL-17A 同二聚体和 IL-17F 同二聚体的 IL-17A/IL-17F 异二聚体的方法, 其包含:

a) 在培养基培养的宿主细胞中表达 IL-17A 融合蛋白和 IL-17F 融合蛋白, 其中所述 IL-17F 融合蛋白包含融合到第一亲和标记物上的 IL-17F 蛋白或其片段, 且其中所述 IL-17A 融合蛋白包含融合到第二亲和标记物上的 IL-17A 蛋白或其片段;

b) 使宿主细胞将 IL-17A 融合蛋白和 IL-17F 融合蛋白分泌进培养基中;

c) 在非还原条件下, 将培养基加入第一亲和层析柱, 以便所述 IL-17F 融合蛋白结合第一亲和层析柱;

d) 在非还原条件下, 从第一亲和层析柱洗脱结合的蛋白;

e) 在非还原条件下, 将从步骤 d) 得到的洗脱液加入第二亲和层析柱, 以便所述 IL-17A 融合蛋白结合第二亲和层析柱; 和

f) 在非还原条件下, 从第二亲和层析柱洗脱结合的蛋白,
其中从步骤 f) 得到的洗脱液含有 IL-17A/IL-17F 异二聚体形式的
IL-17A 融合蛋白和 IL-17F 融合蛋白。

75. 根据权利要求 73 或 74 的方法分离的 IL-17A/IL-17F 异二聚体。

白介素-17F 抗体及其它 IL-17F 信号传递拮抗剂和它们的用途

相关申请

本申请要求 2005 年 2 月 14 日提交的美国临时专利申请号 60/653,260 和 2005 年 4 月 1 日提交的美国临时专利申请号 60/667,492 的优先权，两者在这里整体引作参考。

发明背景

发明领域

本发明涉及抗体，例如，完整抗体及其抗原结合片段，及其它 IL-17F 信号传递拮抗剂，例如，可溶的 IL-17F 受体，其干扰白介素-17F (IL-17F) 信号传递，更具体地，涉及人 IL-17F 和它们在调节 IL-17F 相关活性中的应用。本文公开的抗体和相关的 IL-17F 分子可以用于诊断、预后、监测、预防、和/或治疗 IL-17F 相关病症，例如，炎症病症（例如，自身免疫病（例如，关节炎（包括类风湿关节炎），银屑病，系统性红斑狼疮（SLE），多发性硬化），呼吸系统疾病（例如，COPD，囊性纤维化，哮喘，变态反应），移植排斥（包括实体器官移植排斥）和炎症肠疾病或病症（IBD，例如，溃疡性结肠炎，克隆氏病））。

相关背景技术

细胞因子是具有参与免疫和炎症反应的多效活性的分泌型可溶蛋白，例如，细胞因子可以造成靶细胞的分化、募集或其它生理反应，例如，分泌炎症的特征蛋白。细胞因子结合特定的细胞表面受体，这会触发信号转导途径，导致细胞激活、增殖和分化。从鼠杂交瘤分离和克隆了一种这样的细胞因子，即白介素-17 (IL-17)，它最初称作 CTLA-8，并证实它与 T 淋巴亲嗜性猴疱疹病毒的开放读码框 13 具有同源性（Rouvier 等（1993）J. Immunol. 150:5445-56；Yao 等（1996）Gene 168:223-25；Golstein 等，公开的国际专利申请号 WO95/01826）。此后，已经鉴别出 5 种相关的细胞因子，它们与 IL-17 具有 20-50%同源性（参见 Moseley 等（2003）Cytokine & Growth Factor Reviews 14: 155-74）。为了将 IL-17 标记为 IL-17 细胞因子家族的已知成员，已经将它命名为

IL-17A (Moseley, 同上); 已经将其它成员命名为 IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E 和 IL-17F。IL-17 细胞因子家族成员具有保守的半胱氨酸残基。感兴趣的是 IL-17A, 尤其是 IL-17F, 它们具有 50% 同一性; 这两种细胞因子由 IL-23 诱导, 由 T 细胞共表达, 且被视作 T 细胞-介导的自身免疫病的潜在靶。类似于 IL-17A, IL-17F 中的保守半胱氨酸残基表现出存在于骨形态发生蛋白 (BMP)、转化生长因子- β (TGF- β), 神经生长因子 (NGF) 和血小板衍生因子 BB (PDGF-BB) 中的经典半胱氨酸结基序的特征 (Hymowitz 等 (2001) EMBO J. 20:5332-41; McDonald 等 (1993) Cell 73:421-24)。

IL-17F 是一种 17kD 分泌型蛋白, 它克隆自激活的人 PBMC 文库 (SST) (美国专利号 6,043,344 和 6,074,849)。它形成 30-35kD 二硫键连接的同二聚体 (Hymowitz, 同上), 且类似于 IL-17A, 主要由激活的 T 细胞表达 (Moseley, 同上)。但是, 还已经证实了激活的单核细胞、激活的嗜碱粒细胞和肥大细胞会表达 IL-17F (Kawaguchi 等 (2002) J. Immunol. 167:4430-35)。IL-17F 诱导巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞和成纤维细胞表达许多细胞因子和趋化因子 (Moseley, 同上)。

通过诱导炎性细胞因子的生成和中性粒细胞增多, IL-17F 在炎症反应中起部分作用。它与几种自身免疫病的发展相关, 例如, 关节炎 (包括类风湿关节炎和莱姆关节炎), 系统性红斑狼疮 (SLE) 和哮喘 (Bettelli 和 Kuchroo (2005) J. Exp. Med. 201:169-71)。例如, 最近已经证实, IL-23 是 T 细胞群体的扩展所必需的, 所述扩展的特征在于, 尤其是, IL-17F 的生成, 该 T 细胞群体的被动转移是建立与中枢神经系统自身免疫相关的器官特异性的炎症所必需的 (Langrish 等 (2005) J. Exp. Med. 201:233-40), IL-17-缺陷型小鼠能抗实验性自身免疫脑脊髓炎 (EAE; 多发性硬化的动物模型) (Nakae 等 (2003) J. Immunol. 171:6173-77)。IL-17F 在已知的炎性细胞因子中是独特的, 因为它会增加蛋白聚糖分解和减少关节软骨的蛋白聚糖合成 (Hymowitz, 同上)。另外, 已经证实了从变应原攻击后的哮喘患者采集的支气管肺泡灌洗 (BAL) 中比从对照患者采集的 BAL 中的 IL-17F 表达有所增强 (Kawaguchi, 同上)。并且, 溃疡性结肠炎和克隆氏病患者中的 IL-17F mRNA 表达增加 (Gurney 等 (2003) GTCBIO Conf: Cytokines and Beyond)。这些发现暗示着, IL-17F 信号传递的阻断会减少促炎细胞因子生产, 并减少骨侵蚀。因此, IL-17F

信号传递途径是治疗和/或预防炎症疾病的有吸引力的目标,所述炎症疾病例如其中募集的中性粒细胞是组织病变的关键介质,例如,在自身免疫病(例如,关节炎(包括类风湿关节炎)、银屑病,系统性红斑狼疮,多发性硬化)、呼吸系统疾病(例如,COPD,囊性纤维化,哮喘,变态反应)、移植排斥(包括实体器官移植排斥)、和炎症肠病症或疾病(IBD,例如,溃疡性结肠炎,克隆氏病)的发展过程中。

目前,关于 IL-17 家族成员的受体知之甚少。已经证实,IL-17R(即 IL-17A 的受体)在迄今检查的所有组织中都表达,IL-17A 与 IL-17R 的结合通常会通过激活 NF- κ B,导致促炎细胞因子的诱导(Moseley,同上)。已经鉴别出另外 4 种与 IL-17R 具有部分序列同源性的受体:1) IL-17RH1(也称作 IL-17RB),2) IL-17-受体样蛋白(也称作 IL-17RL 或 IL-17RC),3) IL-17RD(也称作 SEF 或 IL-17RLM)和 4) IL-17RE(Moseley,同上)。在这另外 4 种受体中,仅证实了 IL-17RH1 会结合 IL-17 细胞因子,即 IL-17B 和 IL-17E;但是,尚未证实结合 IL-17RH1 的 IL-17B 和 IL-17E 的功能(Shi 等(2000) J. Biol. Chem. 275:19167-76; Lee 等(2001) J. Biol. Chem. 276:1660-64)。迄今为止,尚未报道 IL-17F 的受体。因而,还不能为预防和/或治疗疾病而靶定 IL-17F 信号传递,尽管它可能在组织(例如,关节组织)的体内稳态和各种疾病(例如,关节炎,哮喘,变态反应,COPD,囊性纤维化,溃疡性结肠炎,克隆氏病,等)的进展中起重要作用。通过鉴别和靶定参与 IL-17F 蛋白的信号转导途径的关键参与物,本发明解决了该问题。

发明简述

本发明的一个目的是,鉴别 IL-17F 信号传递途径的组分,例如,IL-17F 和它的受体,和在治疗与 IL-17F 信号传递相关的病症的方法中靶定这些组分。这样的 IL-17F 相关病症和与增强的 IL-17F 信号传递相关的病症包括但不限于,炎症病症,例如,自身免疫病(例如,关节炎(包括类风湿关节炎),银屑病,系统性红斑狼疮,多发性硬化),呼吸系统疾病(例如,COPD,囊性纤维化,哮喘,变态反应),移植排斥(包括实体器官移植排斥)和炎症肠病(例如,溃疡性结肠炎,克隆氏病)。

这样,作为本发明基础的研究提供了证据表明,IL-17F 通过它与 IL-17R 和/或 IL-17RC 的结合,介导蛋白聚糖分解和炎症反应。作为 IL-

IL-17F 受体的 IL-17R 和 IL-17RC 的测定, 揭示这些分子是治疗与 IL-17F 信号传递相关的病症的靶。

本文提供了 IL-17F 信号传递拮抗剂, 包括但不限于, IL-17F 抑制性多核苷酸, IL-17R 抑制性多核苷酸, IL-17RC 抑制性多核苷酸, 包含 IL-17R 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽, 包含 IL-17RC 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽, 抑制性抗 IL-17F 抗体, 抑制性抗 IL-17R 抗体, 抑制性抗 IL-17RC 抗体和拮抗性小分子。IL-17F 信号传递拮抗剂的优选实例包括, 针对 IL-17R 和 IL-17RC 的 siRNA, 包含 IL-17R 和 IL-17RC (或其 IL-17F 结合片段) 的可溶融合蛋白和抑制性 (即拮抗性) IL-17F 抗体。在本发明的另一个优选的实施方案中, IL-17F 信号传递拮抗剂, 例如, 针对 IL-17R 或 IL-17RC 的 siRNA、包含 IL-17R 或 IL-17RC (或其 IL-17F 结合片段) 的可溶融合蛋白、或抑制性 IL-17F 抗体, 会降低 IL-17F 生物活性和/或 NF- κ B 的激活 NF- κ B 反应基因的能力。

另外, 基于 IL-17A 和 IL-17F 之间的结构和序列相似性, 发明人假设并证实了新的 IL-17A/IL-17F 异二聚体的形成。在证实存在 IL-17A/IL-17F 异二聚体时, 发明人首先证实了, IL-21 会导致 IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体和 IL-17A/IL-17F 异二聚体的增加生产, 并暗示着与 IL-21 结合并激活 IL-21R 相关的作用可能归因于、至少部分地归因于 IL-17 信号传递。发明人还从这些细胞因子的天然来源 (例如, 激活的 T 细胞) 中首次分离了 IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体和 IL-17A/IL-17F 异二聚体。因而, 本发明还提供了减轻与 IL-21 结合并激活 IL-21R 相关的效应的方法, 例如, 通过抑制 IL-17A 和/或 IL-17F 信号传递。另外, 本发明提供了天然的 (即非重组的) IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体、和 IL-17A/IL-17F 异二聚体, 以及分离和靶定它们的方法, 例如, 在治疗与增强的 IL-17F 信号传递相关的病症和/或与 IL-21 结合并激活 IL-21R 相关的病症的方法中。另外, 本文公开了重组 IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体、和 IL-17A/IL-17F 异二聚体, 和分离基本上不含有 IL-17A 同二聚体和 IL-17F 同二聚体的 IL-17A/IL-17F 异二聚体 (重组的或天然的) 的方法。

靶定 IL-17F 信号传递的方法可以包含 IL-17F, IL-17R 和/或 IL-17RC 多核苷酸 (包括抑制性多核苷酸, 例如反义, siRNA 和适体), 多肽及其片段, 作为 IL-17F 信号传递拮抗剂。另外, 也可以使用能抑制 IL-17F

蛋白（作为 IL-17F 同二聚体或 IL-17A/IL-17F 异二聚体）与它的受体的相互作用的抗体。

本发明还涉及，在筛选能靶定 IL-17F 信号传递途径的测试化合物的方法中，和在诊断、预后、监测和/或治疗与 IL-17F 信号传递相关的病症的方法中，使用本文公开的分子。

在一个实施方案中，本发明提供了筛选能拮抗 IL-17F 信号传递的测试化合物的方法，其包含下述步骤：使含有 IL-17F 和 IL-17R 的样品接触化合物；和确定样品中 IL-17F 与 IL-17R 的相互作用相对于未接触该化合物的样品中 IL-17F 与 IL-17R 的相互作用是否降低，由此，接触该化合物的样品中 IL-17F 与 IL-17R 的相互作用的降低，将该化合物鉴别为能抑制 IL-17F 与 IL-17R 的相互作用且能拮抗 IL-17F 信号传递的化合物。在另一个实施方案中，本发明提供了一种类似的与 IL-17RC 相关的筛选方法。

在另一个实施方案中，本发明提供了诊断受试者中与增强的 IL-17F 信号传递相关的病症的方法，其包含下述步骤：检测受试者样品中 IL-17F 信号传递基因产物的测试量；和对比该测试量与对照样品中相同 IL-17F 信号传递基因产物的正常量，由此，明显超过正常量的测试量提供了诊断与增强的 IL-17F 信号传递相关的病症的阳性指示。在另一个实施方案中，所述病症选自：自身免疫病，呼吸系统疾病和炎症肠病。在其它实施方案中，IL-17F 信号传递基因产物是 IL-17F 基因产物，IL-17R 基因产物，或 IL-17RC 基因产物。

在另一个实施方案中，本发明提供了治疗具有患与增强的 IL-17F 信号传递相关的病症的危险或诊断出患有这样的病症的受试者的方法，其包含给该受试者施用治疗有效量的 IL-17F 信号传递拮抗剂。在另一个实施方案中，IL-17F 信号传递拮抗剂选自：IL-17F 抑制性多核苷酸，IL-17R 抑制性多核苷酸，IL-17RC 抑制性多核苷酸，包含 IL-17R 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽，包含 IL-17RC 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽，抑制性抗 IL-17F 抗体，抑制性抗 IL-17R 抗体，抑制性抗 IL-17RC 抗体和拮抗性小分子。在有些实施方案中，IL-17F 信号传递拮抗剂是 IL-17R 抑制性多核苷酸或 IL-17RC 抑制性多核苷酸。在有些其它实施方案中，抑制性多核苷酸是选自 SEQ ID NO:17-32 所述的核苷酸序列的 siRNA。在有些实施方案中，IL-17F 信号传递拮抗剂是包含 IL-17R 或其 IL-17F

结合片段的可溶多肽，或包含 IL-17RC 或其 IL-17F 结合片段的可溶多肽。在有些其它实施方案中，可溶多肽具有 SEQ ID NO:34 或 SEQ ID NO:35 所述的氨基酸序列。在有些其它实施方案中，（1）IL-17F 抑制性多核苷酸包含 SEQ ID NO:1 所述的核苷酸序列、或与 SEQ ID NO:1 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列，或 SEQ ID NO:1 的片段，或其 RNA 等同物，且其中所述抑制性多核苷酸在细胞中的表达，导致 IL-17F 的表达降低；（2）IL-17R 抑制性多核苷酸包含 SEQ ID NO:5 所述的核苷酸序列、或与 SEQ ID NO:5 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列，或 SEQ ID NO:5 的片段，或其 RNA 等同物，且其中所述抑制性多核苷酸在细胞中的表达，导致降低的 IL-17R 表达；和（3）IL-17RC 抑制性多核苷酸包含选自 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、和 SEQ ID NO:15 所述的核苷酸序列，或与选自 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、和 SEQ ID NO:15 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列，或选自 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、和 SEQ ID NO:15 所述的核苷酸序列的片段，或其 RNA 等同物，且其中所述抑制性多核苷酸在细胞中的表达，导致降低的 IL-17RC 表达。在有些实施方案中，与增强的 IL-17F 信号传递相关的病症是炎性病症。在有些其它实施方案中，所述炎性病症选自：自身免疫病，呼吸系统疾病和炎性肠病。在有些其它实施方案中，所述炎性病症是自身免疫病，所述自身免疫病选自：关节炎（包括类风湿关节炎），银屑病，系统性红斑狼疮和多发性硬化。在有些其它实施方案中，所述炎性病症是呼吸系统疾病，所述呼吸系统疾病是囊性纤维化；或所述炎性病症是炎性肠病。

在另一个实施方案中，本发明还包含，给受试者施用治疗有效量的至少一种其它治疗剂。在另一个实施方案中，所述至少一种其它治疗剂选自：细胞因子抑制剂，生长因子抑制剂，免疫抑制剂，抗炎剂，代谢抑制剂，酶抑制剂，细胞毒性剂和细胞抑制剂。在另一个实施方案中，所述至少一种其它治疗剂选自：TNF 拮抗剂，抗 TNF 剂，IL-12 拮抗剂，IL-15 拮抗剂，IL-17 拮抗剂，IL-18 拮抗剂，IL-22 拮抗剂，T 细胞消除剂，B 细胞消除剂，环孢菌素，FK-506，CCI-779，依那西普，英夫单抗，利妥希玛，阿达木单抗（adalimumab），泼尼松龙，硫唑嘌呤，金，柳氮磺胺吡啶，氟喹，羟氟喹，米诺环素，阿那白滞素（anakinra），

阿巴他塞 (abatacept), 甲氨蝶呤, 来氟米特, 雷帕霉素, 雷帕霉素类似物, Cox-2 抑制剂, cPLA2 抑制剂, NSAIDs, p38 抑制剂, B7.1、B7.2、ICOSL、ICOS 和/或 CD28 的拮抗剂和 CTLA4 激动剂。

在另一个实施方案中, 本发明提供了抑制细胞群体或受试者中 NF- κ B 的激活 NF- κ B 反应性启动子的能力的方法, 其包含给所述细胞群体或受试者施用 IL-17F 信号传递拮抗剂。在另一个实施方案中, 本发明提供了抑制细胞群体或受试者中 IL-17F 生物活性的方法, 该方法包含给所述细胞群体或受试者施用 IL-17F 信号传递拮抗剂。在另一个实施方案中, 所述 IL-17F 生物活性选自: 中性粒细胞分化、中性粒细胞募集和细胞因子诱导。

在另一个实施方案中, 本发明提供了一种药物组合物, 其包含 IL-17F 信号传递拮抗剂和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中, 本发明提供了一种疫苗佐剂, 其包含 IL-17F 信号传递拮抗剂和选自下述的抗原: 自身抗原, 变应原, 同种异体抗原及其片段。在另一个实施方案中, 本发明提供了分离的抗体, 其能特异性地结合本发明的氨基酸序列, 包括 SEQ ID NO:6, 7, 9, 11, 13 和 15 所述的那些; 在有些实施方案中, 所述抗体拮抗 IL-17F 信号传递。

在另一个实施方案中, 本发明提供了分离的抗体, 其能特异性地结合 IL-17F 蛋白, 还提供了其它实施方案, 其中所述 IL-17F 蛋白源自人或灵长类动物; 其中所述 IL-17F 蛋白是多聚体; 其中所述 IL-17F 蛋白是 IL-17F 同二聚体或 IL-17F 异二聚体; 其中所述 IL-17F 异二聚体是 IL-17A/IL-17F; 且其中所述抗体抑制 IL-17F 生物活性。

在另一个实施方案中, 本发明提供了上述方法, 其中 IL-17F 信号传递和/或 IL-17F 生物活性是由 IL-17F 同二聚体、IL-17F 异二聚体、或 IL-17F 同二聚体和 IL-17F 异二聚体两者介导, 包括其中所述 IL-17F 异二聚体是 IL-17A/IL-17F。

在另一个实施方案中, 本发明提供了上述药物组合物和/或上述疫苗佐剂, 其中所述 IL-17F 信号传递拮抗剂拮抗 IL-17F 同二聚体、IL-17F 异二聚体、或 IL-17F 同二聚体和 IL-17F 异二聚体两者。

在另一个实施方案中, 本发明提供了抑制至少一种与 IL-21 信号传递相关的活性的方法, 其包含, 拮抗 IL-17F 信号传递。在另一个实施方案中, 本发明提供了抑制至少一种与 IL-23 信号传递相关的活性的方

法，其包含，拮抗 IL-17F 信号传递。在有些其它实施方案中，所述 IL-17F 信号传递是由 IL-17F 同二聚体、IL-17F 异二聚体、或 IL-17F 同二聚体和 IL-17F 异二聚体两者介导，包括其中所述 IL-17F 异二聚体是 IL-17A/IL-17F。

在另一个实施方案中，本发明提供了纯化天然 IL-17A 蛋白的方法，其包含：激活培养基中的 T 细胞；和从培养基中免疫沉淀 IL-17A 蛋白。在另一个实施方案中，本发明提供了纯化天然 IL-17F 蛋白的方法，其包含：激活培养基中的 T 细胞；和从培养基中免疫沉淀 IL-17F 蛋白。在有些其它实施方案中，提供了这样的方法，其中所述 IL-17A 蛋白是 IL-17A 同二聚体、IL-17A 异二聚体、或 IL-17A 同二聚体和 IL-17A 异二聚体两者，且/或其中所述 IL-17F 蛋白是 IL-17F 同二聚体、IL-17F 异二聚体、或 IL-17F 同二聚体和 IL-17F 异二聚体两者；且其中所述 IL-17A 或 IL-17F 异二聚体是 IL-17A/IL-17F。在另一个实施方案中，所述培养基包含 IL-21 和/或 IL-23。

在另一个实施方案中，本发明提供了分离的 IL-17F 蛋白，其中所述 IL-17F 蛋白是 IL-17F 同二聚体或 IL-17F 异二聚体；其中所述 IL-17F 蛋白分离自天然来源；其中所述天然来源是至少一个 T 细胞。在另一个实施方案中，本发明提供了分离的 IL-17A 蛋白，其中所述 IL-17A 蛋白是 IL-17A 同二聚体或 IL-17A 异二聚体；其中所述 IL-17A 蛋白分离自天然来源；其中所述天然来源是至少一个 T 细胞。

在另一个实施方案中，本发明提供了抑制至少一种与 IL-17A 信号传递相关的活性的方法，其包含施用 IL-17F 拮抗剂。

在另一个实施方案中，本发明提供了分离基本上不含有 IL-17A 同二聚体和 IL-17F 同二聚体的 IL-17A/IL-17F 异二聚体的方法，其包含：

(a) 在培养基培养的宿主细胞中表达 IL-17A 融合蛋白和 IL-17F 融合蛋白，其中所述 IL-17A 融合蛋白包含融合到第一亲和标记物上的 IL-17A 蛋白或其片段，且其中所述 IL-17F 融合蛋白包含融合到第二亲和标记物上的 IL-17F 蛋白或其片段；(b) 使宿主细胞将 IL-17A 融合蛋白和 IL-17F 融合蛋白分泌进培养基中；(c) 在非还原条件下，将培养基加入第一亲和层析柱，以便所述 IL-17A 融合蛋白结合第一亲和层析柱；(d) 在非还原条件下，从第一亲和层析柱洗脱结合的蛋白；(e) 在非还原条件下，将从步骤 (d) 得到的洗脱液加入第二亲和层析柱，以便所述

IL-17F 融合蛋白结合第二亲和层析柱；和 (f) 在非还原条件下，从第二亲和层析柱洗脱结合的蛋白，其中从步骤 (f) 得到的洗脱液含有 IL-17A/IL-17F 异二聚体形式的 IL-17A 融合蛋白和 IL-17F 融合蛋白。在其它实施方案中，提供了该方法的变体。在另一个实施方案中，本发明提供了根据这些不同方法分离的 IL-17A/IL-17F 异二聚体。

附图简述

图 1 显示了在不同浓度 (ng/ml) 的 IL-17A 和/或 IL-17F (x-轴) 中培养的 (A) 原代人软骨细胞或 (B) 原代猪软骨细胞中的 NF- κ B-介导的报道物反式激活 (相对萤光素酶活性; y-轴)。

图 2 显示了从在培养基中 (对照; $\square$) 或在有 20 ng/ml IL-17F 存在下 (IL-17F; $\blacksquare$) 培养的人成纤维细胞样滑膜细胞收集的上清液中来自 2 位患者中的每一位 (P1, P2; x-轴) 的细胞因子 (IL-6, IL-8, MCP-1 或 GRO- α ; x-轴) 的浓度 (pg/ml; y-轴)。

图 3 显示了从在培养基中 (0 ng/ml IL-17F; $\square$)，或含有 1 ng/ml ($\blacksquare$)、3.3 ng/ml ($\blacksquare$)、10 ng/ml ($\blacksquare$)、或 30 ng/ml ($\blacksquare$) IL-17F 培养的原代鼠肺成纤维细胞培养物收集的上清液中炎性细胞因子 (IL-6, JE (CCL2), KC; x-轴) 的浓度 (pg/ml; y-轴)。

图 4 显示了通过 ELISA 测得的递增浓度的人 IL-17F (左图) 或人 IL-17A (右图) (x-轴) 与 (A) IL-17R-IgG (上图) 或 (B) IL-17RC-IgG (下图) 的结合 (OD 450 nm; y-轴)。还标注了每对受体/细胞因子相互作用的 EC₅₀ 值。

图 5 显示了在有 (A) 0.5 ng/ml IL-17A (左图) 或 (B) 20 ng/ml IL-17F (右图) 存在下，从单独地 (培养基; -) 或含有递增浓度 (μ g/ml; x-轴) 的 IL-17R-IgG 融合蛋白 (h17R.Fc; $\bullet$)、IL-17RC-IgG 融合蛋白 (h17RH2.Fc; $\blacksquare$)、对照 IgG 蛋白 (hIgG1; $\blacktriangle$)、抗 IL-17R 抗体 (ahIL17R; $\square$) 或对照抗体 (山羊 IgG; $\triangle$) 培养的人成纤维细胞收集的上清液中 GRO- α 的浓度 (pg/ml; y-轴)。

图 6 显示了在有递增浓度 (μ g/ml; x-轴) 的下述 6 种抗 IL-17F 抗体之一存在下，抗-人 IL-17F 抗体的抑制 IL-17F 结合 IL-17R 的能力 (OD 450 nm; y-轴): 抗 IL-17F-01 ($\square$)，抗 IL-17F-02 (—)，抗 IL-17F-03 ($\blacktriangle$)，抗 IL-17F-05 ($\blacklozenge$)，抗 IL-17F-06 ($\bullet$) 和抗 IL-17F-07 ($\triangle$)。

图 7 显示了在有递增浓度 ($\mu\text{g/ml}$; x-轴) 的下述 6 种抗 IL-17F 抗体之一存在下, 抗-人 IL-17F 抗体的抑制 IL-17F 结合 IL-17RC 的能力 (OD 450 nm; y-轴): 抗 IL-17F-01 ($\square$), 抗 IL-17F-02 (—), 抗 IL-17F-03 ($\blacktriangle$), 抗 IL-17F-05 ($\blacklozenge$), 抗 IL-17F-06 ($\bullet$) 和抗 IL-17F-07 ($\triangle$)。

图 8 显示了从在 20 ng/ml IL-17F 和递增浓度 ($\mu\text{g/ml}$; x-轴) 的 (左图) 抗 IL-17F-01 (aIL-17F-01), 抗 IL-17F-02 (aIL-17F-02), 或抗 IL-17F-03 (aIL-17F-03) 和 (右图) 抗 IL-17F-05 (aIL-17F-05), 抗 IL-17F-06 (aIL-17F-06), 或抗 IL-17F-07 (aIL-17F-07), 或对照 mIgG1 抗体中培养的人成纤维细胞收集的上清液中 GRO- α 的浓度 (pg/ml; y-轴)。

图 9 显示了在下述条件下培养的猪原代软骨细胞中的 NF- κ B-介导的报道物反式激活 (相对萤光素酶活性; y-轴): 仅培养基 (空白) 中, 在 100 ng/ml IL-17A (IL-17A (100 ng/ml)) 中, 在 100 ng/ml IL-17A 中且存在 IL-17R-IgG 融合蛋白 (IL-17A+IL17R/Fc), 在 100 ng/ml IL-17A 中且存在抗 IL-17F 抗体 (IL17A+抗 IL17F), 在 100 ng/ml IL-17A 中且存在对照小鼠 IgG (IL-17A+小鼠 IgG), 在 500 ng/ml IL-17F (IL-17F (500 ng/ml)) 中, 在 500 ng/ml IL-17F 中且存在 IL-17R-IgG 融合蛋白 (IL-17F+IL17R/Fc), 在 500 ng/ml IL-17F 中且存在抗 IL-17F 抗体 (IL-17F+抗 IL17F), 或在 500 ng/ml IL-17F 中且存在对照小鼠 IgG (IL-17F+小鼠 IgG)。

图 10 显示了从在有 20 ng/ml IL-17F (IL-17F; $\square$)、同种型对照抗体 (同种型 Ab; $\boxplus$), 抗 IL-17F-01 抗体 ($\boxminus$), 或抗 IL-17F-07 抗体 ($\blacksquare$) 存在下培养的人成纤维细胞样滑膜细胞收集的上清液中来自 2 位患者中的每一位 (P1, P2; x-轴) 的细胞因子 (IL-6, IL-8, 或 GRO- α ; x-轴) 的浓度 (pg/ml; y-轴)。

图 11 显示了使用对 (A) IL-17A 蛋白 (包括 IL-17A 同二聚体和 IL-17A 异二聚体)、(B) IL-17F 蛋白 (包括 IL-17F 同二聚体和 IL-17F 异二聚体) 或 (C) IL-17A/IL-17F 异二聚体的检测特异性的 ELISA 测定, 对 IL-17A 同二聚体 (IL-17A/A; x-轴), IL-17F 同二聚体 (IL-17F/F; x-轴), 或 IL-17A/IL-17F 异二聚体 (IL-17A/F; x-轴) 的检测 (OD 450 nm; y-轴)。

图 12 显示了在有珠子结合的抗-CD3 抗体、递增浓度的抗-CD28 抗体 (抗-CD28 (ng/ml); x-轴) 存在下、和缺少 ($\square$) 或存在 IL-21 ($\blacksquare$) 或 IL-23 ($\boxplus$), 从经历初始激活的 T 细胞分离的培养基中 (A) IL-17A

或 (B) IL-17F 的浓度 (生成的细胞因子 (pg/ml); y-轴)。

图 13 显示了在下述刺激条件下 (x-轴), 从经历二次激活的 T 细胞分离的培养基中 IL-17A (■) 或 IL-17F (□) 的浓度 (生成的细胞因子 (pg/ml); y-轴): 仅 IL-23 (IL-23); 仅 IL-21 (IL-21); 珠子结合的抗-CD3 抗体和抗-CD28 抗体 (CD3/CD28); IL-23, 珠子结合的抗-CD3 抗体和抗-CD28 抗体 (IL-23/CD3/CD28); IL-21, 珠子结合的抗-CD3 抗体和抗-CD28 抗体 (IL-21/CD3/CD28); 或培养基。

图 14 显示了使用对 (A) IL-17A 蛋白 (包括 IL-17A 同二聚体和 IL-17A 异二聚体)、(B) IL-17F 蛋白 (包括 IL-17F 同二聚体和 IL-17F 异二聚体), 或 (C) IL-17A/IL-17F 异二聚体的检测特异性的 ELISA 测定, 对从经历初始激活 (CM1) 或再次激活 (CM2) 的 T 细胞得到的未稀释的 (纯净的) 或稀释的 (1:10) 培养基 (x-轴) 中的 IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体、或 IL-17A/IL-17F 异二聚体的检测 (OD 450 nm; y-轴)。

图 15 显示了用多克隆兔抗-人 IL-17F 抗体进行的蛋白印迹分析, 用于检测来自从经历二次激活的 T 细胞得到的 500 μ l 条件培养基的抗-人 IL-17F-01 免疫沉淀物。对照由如实施例 5.3 所述制备的 IL-17F 同二聚体 (第 2 泳道) 或购自 R&D Systems (Minneapolis, MN) 的 IL-17A 同二聚体 (第 5 泳道) 组成。第 1 泳道显示了分子量标准。用箭头指示了 IL-17A 和 IL-17F 同二聚体和 IL-17F/IL-17A 异二聚体的位置。

图 16 是用生物素-缀合的山羊抗-人 IL-17A 抗体进行蛋白印迹分析结果, 用于检测来自从经历二次激活的 T 细胞得到的 500 μ l 条件培养基的抗-人 IL-17F-02 免疫沉淀物。对照 (泳道 2) 由如实施例 5.3 所述制备的 IL-17F 同二聚体组成。第 1 泳道显示了分子量标准。用箭头指示了 IL-17A 和 IL-17F 同二聚体和 IL-17F/IL-17A 异二聚体的位置。

图 17A 显示了用抗 IL-17F 抗体免疫探测的抗 IL-17F 免疫沉淀物 (泳道 2-7) 或抗 IL-17A 免疫沉淀物 (泳道 8-10)。免疫沉淀物来自过表达 IL-17A (泳道 2 和 8)、IL-17F (泳道 3 和 10)、IL-17A 和 IL-17F (泳道 4 和 9)、纯化的 IL-17A 同二聚体 (泳道 5)、或纯化的 IL-17F 同二聚体 (泳道 6 和 7) 的 COS 细胞的条件培养基 (CM)。对照 (“A/A 纯化的,” 泳道 5 和 “F/F 纯化的,” 泳道 6-7) 由实施例 5.4 所述纯化的重组 IL-17A 和 IL-17F 同二聚体组成。分子量标准显示在泳道 1。用箭头指示了 IL-17A 和 IL-17F 同二聚体和 IL-17F/IL-17A 异二聚体的位置。

图 17B 显示用抗 IL-17A 抗体免疫探测的抗 IL-17A 免疫沉淀物（泳道 2-4）或抗 IL-17F 免疫沉淀物（泳道 5-7）。免疫沉淀物来自过表达 IL-17A（泳道 3 和 5）、IL-17F（泳道 2 和 7），或 IL-17A 和 IL-17F（泳道 4 和 6）的 COS 细胞的条件培养基（CM）。分子量标准显示在泳道 1。用箭头指示了 IL-17A 和 IL-17F 同二聚体和 IL-17F/IL-17A 异二聚体的位置。

图 18 是显示纯化基本上不含有 IL-17A 和 IL-17F 同二聚体的重组 IL-17F/IL-17A 异二聚体的方法的简图。该方法采用具有 2 种不同亲和标记物的 IL-17A 和 IL-17F，并使用 2 个分开的且连续的亲和层析柱来分离 IL-17F/IL-17A 异二聚体。

图 19A 表明，类似于 IL-17A（◆）和 IL-17F（□）同二聚体，重组的纯化的 IL-17F/IL-17A 异二聚体（X）会刺激 BJ 细胞培养物的培养基中的 GRO- α 水平（pg/ml）。图 19B 表明，用抗 IL-17A 抗体（■）或抗 IL-17A 与抗 IL-17F 抗体的组合（▲）共处理 BJ 培养物，会消除 IL-17F/IL-17A 异二聚体对 GRO- α 水平的刺激，但是单独的 IL-17F 抗体（□）不能。对照由缺少 IL-17F 和 IL-17A 抗体的培养基提供的培养物组成（X）。

图 20 的表总结了通过消化 IL-17F 同二聚体、IL-17A 同二聚体、和 IL-17F/IL-17A 异二聚体制备的胰蛋白酶消化的肽质量的 MALDI-TOF 质谱数据。该表的第 1 列显示了分析的肽片段的来源，第 2 列（结构）显示了肽片段序列，第 3 列（MW Cal）显示了片段的计算分子量，第 4 列显示了片段的计算质荷比（m/z 值）（计算值），第 5 列显示了通过质谱测得的实际质荷比（m/z 值）（实测值）。

图 21 表明，抗-人 IL-17F 抗体可以部分地抑制灵长类动物 IL-17F 的生物活性。图 21A 和 21B 表明，用人或灵长类动物（猕猴）IL-17F 刺激的 BJ 细胞会反应于递增水平的 IL-17F，表现出提高水平的 GRO- α 。图 21A 表明，抗 IL-17F-01（□）和抗 IL-17F-07（X）抗体会降低人 IL-17F（◆）的刺激 GRO- α 水平的能力。类似地，图 21B 表明，抗 IL-17F-01（□）和抗 IL-17F-07（X）抗体会降低灵长类动物 IL-17F（◆）的刺激 GRO- α 水平的能力，尽管达到比该抗体减少人 IL-17F 生物活性更低的程度。

图 22 表明，IL-17F 处理会增加 ADAMTS-4（聚集蛋白聚糖酶 1）

在从人供体得到的软骨细胞中的表达，抗 IL-17F 抗体处理会消除该刺激。用 250 ng/ml IL-17F, 250 ng/ml IL-17F 和 25 μ g/ml 抗 IL-17F, 25 μ g/ml 抗 IL-17F, 250 ng/ml IL-17F 和 25 μ g/ml 对照 IgG1, 或 25 μ g/ml 对照 IgG1 (x-轴) 处理培养的软骨细胞，通过实时 PCR 测量聚集蛋白聚糖酶 1 的转录物水平 (表达为 TAQMAN®单位; y-轴)。GAPDH 表达水平用作标准。

图 23 表明，用针对 IL-17R 和 IL-17RC 的转录物的 siRNA 处理 BJ 细胞，会减少 IL-17F 和 IL-17A 的增加 GRO- α 水平的能力。图 23A: Taqman=用 IL-17R 的 siRNA 处理的细胞中，IL-17R 转录物水平的%减少; IL-17F=用 IL-17R 的 siRNA 处理的细胞中，IL-17F 刺激 GRO- α 水平的能力的%减少; IL-17A=用 IL-17R 的 siRNA 处理的细胞中，IL-17A 刺激 GRO- α 水平的能力的%减少。图 23B 表明，用针对 IL-17RC 的转录物的 siRNA 处理 BJ 细胞，会减少 IL-17F 和 IL-17A 的增加 GRO- α 水平的能力。Taqman=用 IL-17RC 的 siRNA 处理的细胞中，IL-17RC 转录物水平的%减少; IL-17F=用 IL-17RC 的 siRNA 处理的细胞中，IL-17F 刺激 GRO- α 水平的能力的%减少; IL-17A=用 IL-17RC 的 siRNA 处理的细胞中，IL-17A 刺激 GRO- α 水平的能力的%减少。图 23C 公开了本发明的几种 siRNA 分子 (SEQ ID NO:17-32)，它们靶定本发明的 mRNA 多核苷酸 (即 IL-17R 和 IL-17RC)。

图 24 显示了来自银屑病患者 48 对组织活检样品中 IL-17F 和 IL-17A 转录物表达的平均倍数变化 (有病变的/无病变的 (不受影响的) 组织)。银屑病病变组织中 IL-17A 和 IL-17F 转录物水平都比不受影响的组织增加。配对 t 检验的 P-值如下: IL-17A $p=2.8 \times 10^{-13}$, IL-17F $p=1.1 \times 10^{-9}$ 。

图 25 显示了来自溃疡性结肠炎 (UC) 患者 (□) (12 对) 或克隆氏病 (CD) 患者 (■) (16 对) 的成对组织活检样品中 IL-17F 和 IL-17A 转录物表达的平均倍数变化 (受影响的/不受影响的组织)。在 2 组 IBD 样品中，受影响的组织中 IL-17A 和 IL-17F 转录物水平都比不受影响的组织增加。配对 t 检验的 P-值如下: IL-17A (UC), $p=0.309$; IL-17A (CD), $p=0.069$; IL-17F (UC), $p=0.406$; IL-17F (CD), $p=0.206$ 。

图 26 显示了 IL-17F 的细胞内细胞因子染色。在用完全弗氏佐剂乳化的 100 μ g 卵白蛋白免疫的 C57BL/6 小鼠的 (淋巴结) LN 细胞上，进

行 IL-17F 染色。对细胞进行 CD4 表面，固定，透化，并用抗-IgG1 同种型对照或大鼠抗-鼠 IL-17F (克隆 15-1) 染色。数字指明了阳性细胞的百分比。

发明详述

白介素-17F (IL-17F) 是一种细胞因子，它属于 IL-17 家族蛋白，并诱导炎性细胞因子和趋化因子的表达，例如，IL-6，IL-8，GM-CSF，G-CSF，GRO- α ，MCP-1，IL-1 β ，TNF- α ，TGF- β ，等。IL-17F 的表达与中性粒细胞增多和多种自身免疫病相关联 (Bettelli 和 Kuchroo, 同上)。例如，IL-17F 与关节软骨的增加的蛋白聚糖分解和减少的蛋白聚糖合成 (Hymowitz, 同上)、中枢神经系统自身免疫 (Langrish, 同上)、变态反应和哮喘反应 (Kawaguchi, 同上) 和炎性肠病 (Gurney, 同上) 相关。因而，认为 IL-17F 信号传递参与病症，包括但不限于，炎性病症，例如自身免疫病 (例如，关节炎 (包括类风湿关节炎)、银屑病，系统性红斑狼疮 (SLE)，多发性硬化)、呼吸系统疾病 (例如，COPD，囊性纤维化，哮喘，变态反应)、移植排斥 (包括实体器官移植排斥)、和炎性肠病 (例如，溃疡性结肠炎，克隆氏病)。

作为本发明的一部分，发明人已经通过证实对施用 IL-17F 的下述反应，证实了 IL-17F 参与炎性病症：例如，中性粒细胞流入腹膜 (实施例 1.1)，炎性细胞因子的起始转录因子的激活与原代软骨细胞增加分泌炎性细胞因子相关联 (实施例 1.2)，与肺成纤维细胞增加分泌炎性细胞因子相关联 (实施例 1.3)，与原代人软骨细胞增加的聚集蛋白聚糖酶水平相关联 (实施例 7)。发明人还已经确认，IL-17F 和 IL-17A 两者都可以参与自身免疫关节炎 (实施例 7)、银屑病 (实施例 9) 和炎性肠病 (IBD) (实施例 9)。发明人还已经将 IL-17R 和 IL-17RC 鉴别为 IL-17F 的受体 (实施例 2)，从而提供了抑制 IL-17F 信号传递途径的新靶。发明人还已经制备了抗 IL-17F 抗体，并表征了每种抗体的结合特异性、亲和力和抑制 IL-17F 信号传递的能力，即 IL-17F 生物活性 (实施例 3 和 5)。在一个实施方案中，抗体有助于表征 IL-17R 和/或 IL-17RC 识别可能需要的 IL-17F 表位；即 5/6 的鼠抗-人 IL-17F 抗体能干扰 IL-17F 与 IL-17R 的结合，2/5 还能干扰 IL-17F 与 IL-17RC 的结合。发明人还已经证实了有些这样的抗体的抑制 (即降低、限制、阻断或减少) IL-17F 生物活性

的能力,例如,IL-17F-介导的炎性细胞因子的起始转录因子的激活,和随后的原代成纤维细胞样滑膜细胞分泌IL-17F-介导的细胞因子(实施例4)。本文还公开了抑制性多核苷酸,其通过IL-17R和IL-17RC降低IL-17A和IL-17F信号传递(实施例8)。发明人还已经证实了IL-21和IL-17F之间的直接关系,即IL-21通过激活的T细胞增强IL-17A和IL-17F的生产的能力。因而,推理出,IL-17F信号传递的抑制还可能抑制至少一种与IL-21结合并激活IL-21R相关的作用,例如,抑制IL-17F信号传递的方法可以用于治疗IL-17F相关病症和/或与IL-21结合并激活IL-21R相关的病症的方法中。发明人还从细胞因子的天然来源中首次分离了IL-17A和IL-17F。发明人还已经证实和纯化了新的IL-17A/IL-17F异二聚体(例如,分别在T细胞和HEK-293和COS细胞中),并已经证实,异二聚体会转导IL-17F信号传递,例如,通过诱导GRO- α 水平的表达(实施例5)。因而,发明人已经提供了异二聚体,作为抑制IL-17F-信号传递途径和/或治疗炎性病症和/或与IL-21结合并激活IL-21R相关的病症的新靶。

这样,本发明提供了IL-17F信号传递拮抗剂(例如,IL-17F,IL-17R、和/或IL-17RC抑制性多核苷酸;可溶的IL-17R和/或IL-17RC多肽(包括片段(例如,IL-17F结合片段)和/或其融合蛋白);抑制性抗IL-17F、抗IL-17R、或IL-17RC抗体;和/或拮抗性小分子),它们可以用于体内抑制IL-17F-介导的(包括IL-17F同二聚体-和IL-17A/IL-17F异二聚体介导的)炎症反应,因此,它们可以用于诊断、预后、监测和/或治疗与增强的IL-17F信号传递相关的病症,即IL-17F相关病症和/或与IL-21结合并激活IL-21R相关的病症。新的IL-17A/IL-17F异二聚体的鉴别和分离表明,与IL-17F信号传递相关的病症可能由IL-17F同二聚体和/或IL-17F异二聚体介导。因而,本文使用的术语“IL-17F”在适当时指IL-17F同二聚体或IL-17A/IL-17F异二聚体,例如,IL-17F信号传递途径包括可能包含IL-17F同二聚体和IL-17A/IL-17F异二聚体中的任一种或两种的信号传递途径。

因此,本申请提供了IL-17F信号传递相关的多核苷酸和多肽,包括IL-17R和IL-17RC多核苷酸和多肽。本发明还提供了抗体,即完整抗体及其抗原结合片段,它们结合IL-17F,更具体地人IL-17F,包括但不限于,IL-17F同二聚体和IL-17A/IL-17F异二聚体。在一个实施方案中,抗

IL-17F 抗体抑制或拮抗至少一种 IL-17F 相关的（例如，IL-17F 同二聚体和/或 IL-17A/IL-17F 异二聚体）活性。例如，抗 IL-17F 抗体可以结合 IL-17F 和干扰，例如阻断，IL-17F 和 IL-17F 受体复合物之间的相互作用，例如，包含 IL-17R 和/或 IL-17RC 的复合物。因而，本发明的抗体可以用于检测和任选地抑制（例如，降低、限制、阻断或减少）IL-17F 生物活性，例如，IL-17F 和 IL-17F 受体复合物或其亚基之间的结合。因而，本发明的抗 IL-17F 抗体可以用于诊断、预后、监测和/或治疗或预防与 IL-17F 信号传递相关的病症和/或与 IL-21 结合并激活 IL-21R 相关的病症。

IL-17F, IL-17R 和 IL-17RC 的多核苷酸和多肽

本发明提供了 IL-17F 信号传递途径的其它表征，即确定 IL-17R 和/或 IL-17RC 作为 IL-17F 受体，说明了使用抑制性分子（例如，抗体，受体融合蛋白和 siRNA）干扰 IL-17F 结合 IL-17R 和/或 IL-17RC 的作用，并纯化了 IL-17A/IL-17F 异二聚体。这样，本发明涉及 IL-17F, IL-17R 和 IL-17RC 多核苷酸和多肽，包括抑制性 IL-17F, IL-17R 和 IL-17RC 多核苷酸和多肽。

IL-17F 核苷酸和氨基酸序列是本领域已知的，并已经提供。人 IL-17F 的核苷酸序列显示为 SEQ ID NO:1。该核苷酸序列编码的全长 IL-17F 蛋白的氨基酸序列显示为 SEQ ID NO:2。成熟 IL-17F 的氨基酸序列对应着从 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 31 处开始的蛋白（参见，例如，美国专利申请号 10/102,080，在本文中整体引作参考）。

IL-17A 核苷酸和氨基酸序列是本领域已知的，并已经提供。人 IL-17A 的核苷酸序列显示为 SEQ ID NO:3，它包含一个聚（A）尾。与该核苷酸序列相对应的全长 IL-17A 蛋白的氨基酸序列显示为 SEQ ID NO:4。

IL-17R 核苷酸和氨基酸序列是本领域已知的，并已经提供。人 IL-17R 的核苷酸序列显示为 SEQ ID NO:5，它包含一个聚（A）尾。与该核苷酸序列相对应的全长 IL-17R 蛋白的氨基酸序列显示为 SEQ ID NO:6。

IL-17RC 核苷酸和氨基酸序列是本领域已知的，并已经提供。包含聚（A）尾的几种人 IL-17RC 多核苷酸的核苷酸序列显示为 SEQ ID NO:7, 9, 11, 13 和 15。与这些核苷酸序列相对应的几种全长人 IL-17RC 蛋白的氨基酸序列显示为 SEQ ID NO:8, 10, 12, 14 和 16。

本发明的核酸可以包含 DNA 或 RNA，且可以是完全或部分地合成的。本文所述的核苷酸序列包括具有指定序列的 DNA 分子(或其补体)，且包括具有指定序列的 RNA 分子，其中 U 替换为 T，除非上下文另有要求。

本发明的分离的多核苷酸可以用作杂交探针和引物，用于鉴别和分离具有与本文公开的多核苷酸的编码序列相同或类似的序列的核酸。用于鉴别和分离核酸的杂交方法包括聚合酶链式反应(PCR)、DNA 印迹杂交、原位杂交和 RNA 印迹杂交，且是本领域技术人员众所周知的。

杂交反应可以在不同严格性条件下进行。杂交反应的严格性包括任意两种核酸分子彼此杂交的难度。优选地在降低的严格条件，更优选严格条件，最优选高度严格的条件下，每个杂交多核苷酸与它的对应多核苷酸杂交。严格条件的实例显示在下面的表 1 中：高度严格的条件是至少像例如条件 A-F 一样严格的那些；严格的条件至少像例如条件 G-L 一样严格；降低的严格条件至少象例如条件 M-R 一样严格。

表 1. 严格条件

严格条件	多核苷酸杂交体	杂交体长度 (bp) ¹	杂交温度和缓冲液 ²	洗涤温度和缓冲液 ²
A	DNA:DNA	>50	65℃; 1xSSC-或- 42℃; 1xSSC, 50%甲酰胺	65℃; 0.3xSSC
B	DNA:DNA	<50	T _B *; 1xSSC	T _B *; 1xSSC
C	DNA:RNA	>50	67℃; 1xSSC-或- 45℃; 1xSSC, 50%甲酰胺	67℃; 0.3xSSC
D	DNA:RNA	<50	T _D *; 1xSSC	T _D *; 1xSSC
E	RNA:RNA	>50	70℃; 1xSSC-或- 50℃; 1xSSC, 50%甲酰胺	70℃; 0.3xSSC
F	RNA:RNA	<50	T _F *; 1xSSC	T _F *; 1xSSC
G	DNA:DNA	>50	65℃; 4xSSC-或- 42℃; 4xSSC, 50%甲酰胺	65℃; 1xSSC
H	DNA:DNA	<50	T _H *; 4xSSC	T _H *; 4xSSC
I	DNA:RNA	>50	67℃; 4xSSC-或- 45℃; 4xSSC, 50%甲酰胺	67℃; 1xSSC
J	DNA:RNA	<50	T _J *; 4xSSC	T _J *; 4xSSC
K	RNA:RNA	>50	70℃; 4xSSC-或- 50℃; 4xSSC, 50%甲酰胺	67℃; 1xSSC
L	RNA:RNA	<50	T _L *; 2xSSC	T _L *; 2xSSC
M	DNA:DNA	>50	50℃; 4xSSC-或- 40℃; 6xSSC, 50%甲酰胺	50℃; 2xSSC
N	DNA:DNA	<50	T _N *; 6xSSC	T _N *; 6xSSC
O	DNA:RNA	>50	55℃; 4xSSC-或- 42℃; 6xSSC, 50%甲酰胺	55℃; 2xSSC
P	DNA:RNA	<50	T _P *; 6xSSC	T _P *; 6xSSC
Q	RNA:RNA	>50	60℃; 4xSSC-或- 45℃; 6xSSC, 50%甲酰胺	60℃; 2xSSC
R	RNA:RNA	<50	T _R *; 4xSSC	T _R *; 4xSSC

1: 杂交体长度是杂交多核苷酸的杂交区域的预期长度。当多核苷酸与未知序列的靶多核苷酸杂交时, 假定杂交体长度是杂交多核苷酸的长度。当已知序列的多核苷酸杂交时, 可以通过比对多核苷酸序列和鉴别最佳序列互补性的一个或多个区域, 确定杂交体长度。

2: SSPE (1xSSPE 是 0.15 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 和 1.25 mM EDTA, pH 7.4) 可以替代杂交和洗涤缓冲液中的 SSC (1xSSC 是 0.15 M NaCl 和 15 mM 柠檬酸钠); 在杂交结束后, 洗涤 15 分钟。

$T_B^* - T_R^*$: 预期长度小于 50 碱基对的杂交体的杂交温度应当比杂交体的解链温度 (T_m) 低 5-10°C, 其中 T_m 根据下述方程确定。对于长度小于 18 碱基对的杂交体, T_m (°C) = 2 (A+T 碱基数) + 4 (G+C 碱基数)。对于长度为 18-49 碱基对的杂交体, T_m (°C) = 81.5 + 16.6 ($\log_{10} Na^+$) + 0.41 (%G+C) - (600/N), 其中 N 是杂交体中的碱基数, Na^+ 是杂交缓冲液中钠离子的浓度 (1xSSC 的 $Na^+ = 0.165M$)。

多核苷酸杂交的严格条件的其它实例参见 Sambrook, J., E.F. Fritsch, 和 T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, chapters 9 和 11, 和 *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F.M. Ausubel 等, 编, John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 和 6.3-6.4, 在本文中引作参考。

本发明的分离的多核苷酸可以用作杂交探针和引物, 用于鉴别和分离具有公开的多核苷酸的等位基因变体的编码序列的 DNA。等位基因变体是公开的多核苷酸的天然存在的替代形式, 它们编码与公开的多核苷酸编码的多肽相同或具有显著相似性的多肽。优选地, 等位基因变体与公开的多核苷酸具有至少 90% 序列同一性 (更优选地, 至少 95% 同一性; 最优选地, 至少 99% 同一性)。或者, 当核酸区段在选择性杂交条件 (例如, 高度严格的杂交条件) 下与公开的多核苷酸杂交时, 存在显著相似性。

本发明的分离的多核苷酸还可以用作杂交探针和引物, 用于鉴别和分离具有与公开的多核苷酸同源的多肽的编码序列的 DNA。这些同源物是从与公开的多肽和多核苷酸不同的物种或相同的物种内分离的多核苷酸和多肽, 但是与公开的多核苷酸和多肽具有显著的序列相似性。优选地, 多核苷酸同源物与公开的多核苷酸具有至少 50% 序列同一性 (更优选地, 至少 75% 同一性; 最优选地, 至少 90% 同一性), 而多肽同源

物与公开的多肽具有至少 30%序列同一性（更优选地，至少 45%同一性；最优选地，至少 60%同一性）。优选地，公开的多核苷酸和多肽的同源物是从哺乳动物物种分离的那些。

如下计算 2 个序列之间的“同源性”或“序列同一性”（这 2 个术语在本文中互换使用）。为了最佳比较目的，比对序列（例如，为了最佳比对，可以在第 1 个和第 2 个氨基酸或核酸序列中的一个或两个中导入空位，为了比较目的，可以忽略非同源序列）。在一个优选的实施方案中，用于比较目的而进行比对的参照序列的长度是参照序列长度的至少 30%，优选至少 40%，更优选至少 50%，更优选至少 60%，更优选至少 70%，80%，90%，100%。然后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第 1 个序列中的位置被与第 2 个序列中的对应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时，则分子在该位置是相同的（本文使用的氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”）。2 个序列之间的同一性百分比，随序列共有的相同位置数而变化，并考虑空位数和每个空位的长度，所述空位在 2 个序列的最佳比对中需要导入。

使用数学算法，可以实现 2 个序列之间的序列对比和序列同一性百分比的确定。在一个优选的实施方案中，使用 Needleman 和 Wunsch（（1970）J. Mol. Biol. 48:444-53）算法，确定 2 个氨基酸序列之间的同一性百分比，该算法已经整合进 GCG 软件包的 GAP 程序（下载地址 www.gcg.com），其中使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵，空位权重为 16, 14, 12, 10, 8, 6, 或 4，长度权重为 1, 2, 3, 4, 5, 或 6。在另一个优选的实施方案中，使用 GCG 软件包中的 GAP 程序（下载地址 www.gcg.com），确定 2 个核苷酸序列之间的同一性百分比，其中使用 NWSgapdna.CMP 矩阵，空位权重为 40, 50, 60, 70, 或 80，长度权重为 1, 2, 3, 4, 5, 或 6。一个特别优选的参数集合（如果操作人员不确定应当使用哪个参数来确定分子是否在本发明的序列同一性或同源性界限内，应当使用该参数集合）是，Blossum 62 评分矩阵，其空位罚分为 12，空位延伸罚分为 4，并且移码空位罚分为 5。还可以使用 Meyers 和 Miller（（1989）CABIOS 4:11-17）的算法，确定 2 个氨基酸或核苷酸序列之间的同一性百分比，该算法已经整合进 ALIGN 程序（2.0 版），其中使用 PAM120 加权余数表，空位长度罚分为 12，并且空位罚

分为 4。

本发明的分离的多核苷酸还可以用作杂交探针和引物，用于鉴别表达本发明多肽的细胞和组织，和它们的表达条件。

另外，通过使用编码多肽的多核苷酸，改变（即增强、减少、或修饰）细胞或生物体中本发明的多核苷酸的对应基因的表达，可以直接检查本发明的多肽的功能。这些“对应基因”是本发明涉及的基因组 DNA 序列，它们转录生成 mRNA，从这些 mRNA 得到本发明的多核苷酸。

通过使用不同的抑制性多核苷酸，例如反义多核苷酸，siRNA 和结合和/或切割从本发明相关基因转录的 mRNA 的核酶，可以改变细胞或生物体中本发明相关基因的表达（参见，例如，Galderisi 等（1999）*J. Cell Physiol.* 181:251-57；Sioud（2001）*Curr. Mol. Med.* 1:575-88）。例如，IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 的抑制性多核苷酸，可以用作 IL-17F 信号传递拮抗剂，这样，还可以用于预防或治疗与 IL-17F 信号传递相关的病症。抑制性多核苷酸还可以由适体，即结合和调节蛋白活性的多核苷酸组成，所述蛋白活性例如，IL-17F，IL-17A，IL-17R、和/或 IL-17RC 的活性。适体记载在文献中，参见，例如，Nimjee 等（2005）*Annu. Rev. Med.* 56:555-83 和 Patel（1997）*Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:32-46。

本发明涉及的反义多核苷酸或核酶可以与本发明相关基因的整个编码链互补，或仅与其一部分互补。或者，反义多核苷酸或核酶可以与本发明相关基因的编码链的非编码区互补。使用本领域众所周知的规程，可以使用化学合成和酶连接反应，构建反义多核苷酸或核酶。可以修饰化学合成的多核苷酸的核苷键，以增强它们抗核酸酶-介导的降解的能力，以及增加它们的序列特异性。这样的键修饰包括、但不限于，硫代磷酸酯，甲基膦酸酯，磷酸酰胺，硼酸磷酸酯，吗啉代，和肽核酸（PNA）键（Galderisi 等，同上；Heasman（2002）*Dev. Biol.* 243:209-14；Micklefield（2001）*Curr. Med. Chem.* 8:1157-79）。或者，使用其中已经以反义（即，反）方向亚克隆进本发明多核苷酸的表达载体，可以生物生产这些分子。

本发明的抑制性多核苷酸还包括形成三链体的寡核苷酸（TFO），它们以高特异性和亲和力结合在双链 DNA 的大沟中（Knauert 和 Glazer（2001）*Hum. Mol. Genet.* 10:2243-51）。通过靶定与本发明相关基因的调控区（即启动子和/或增强子序列）互补的 TFO，形成阻止这些基因的

转录的三螺旋结构，可以抑制本发明相关基因的表达。

在本发明的一个实施方案中，本发明的抑制性多核苷酸是短干扰 RNA (siRNA) 分子。这些 siRNA 分子是较短的（优选 19-25 个核苷酸；最优选 19 或 21 个核苷酸）、双链 RNA 分子，它们会造成目标 mRNA 的序列特异性的降解。该降解称作 RNA 干扰 (RNAi)（参见，例如，Bass (2001) *Nature* 411:428-29）。最初在低等生物中鉴别出的 RNAi 已经有效地应用于哺乳动物细胞，最近已经证实在用靶定 Fas mRNA 的 siRNA 分子处理的小鼠中预防暴发性肝炎 (Song 等 (2003) *Nature Med.* 9:347-51)。另外，最近已经报道，鞘内递送的 siRNA 在 2 个大鼠模型（激动剂诱导的疼痛模型和神经性疼痛模型）中阻断疼痛反应 (Dorn 等 (2004) *Nucleic Acids Res.* 32 (5) :e49)。

通过将 2 个互补的单链 RNA 分子退火在一起（其中的一个与目标 mRNA 的一部分匹配）(Fire 等，美国专利号 6,506,559)，或通过使用折叠回自身、形成必要的双链部分的单个发夹 RNA 分子 (Yu 等 (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6047-52)，可以制备本发明的 siRNA 分子。siRNA 分子可以化学合成 (Elbashir 等 (2001) *Nature* 411:494-98)，或使用单链 DNA 模板，通过体外转录生成 (Yu 等，同上)。或者，siRNA 分子可以使用含有有义和反义 siRNA 序列的表达载体，短暂地 (Yu 等，同上；Sui 等 (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5515-20) 或稳定地 (Paddison 等 (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1443-48) 生物生成。最近，使用表达发夹 RNA（它被进一步加工成 siRNA）的腺病毒载体，证实了原代人细胞中目标 mRNA 水平的有效的且序列特异性方式的减少 (Arts 等 (2003) *Genome Res.* 13:2325-32)。

可以基于本领域众所周知的标准，设计靶定本发明的多核苷酸的 siRNA 分子（例如，Elbashir 等 (2001) *EMBO J.* 20:6877-88）。例如，目标 mRNA 的目标区段优选地应当从 AA（最优选的），TA，GA，或 CA 开始；siRNA 分子的 GC 比优选地应当是 45-55%；siRNA 分子优选地不应当在一行中含有 3 个相同的核苷酸；siRNA 分子优选地不应当在一行中含有 7 个混合的 G/C；目标区段优选地应当在目标 mRNA 的 ORF 区中，且优选地应当在起始 ATG 之后至少 75 bp 和终止密码子之前至少 75 bp。基于这些标准或其它已知标准（例如，Reynolds 等 (2004) *Nature Biotechnol.* 22:326-30），本领域普通技术人员可以设计靶定本发明的

mRNA 多核苷酸的本发明的 siRNA 分子。用于公开的方法中的 siRNA 的优选实例显示为 SEQ ID NO:17-32, 并对应着用于靶定 IL-17R 的 siRNA (SEQ ID NO:17-24) 和靶定 IL-17RC 的 siRNA (SEQ ID NO:25-32)。

还可以通过制备基因组中已经导入了本发明多核苷酸的非人转基因动物, 实现本发明相关基因在生物体中的改变表达。这样的转基因动物包括具有多个拷贝的本发明基因(即转基因)的动物。可以将组织特异性的调节序列可操作地连接到转基因上, 以指导本发明的多肽在特定细胞或特定发育阶段的表达。通过胚胎操作和显微注射制备转基因动物(更具体地, 小鼠等动物)的方法, 已经成为常规技术, 且是本领域众所周知的(例如, Bockamp 等, *Physiol. Genomics* 11:115-32 (2002))。

还可以通过制备动物, 该动物与本发明多核苷酸相对应的内源基因已经通过插入外来多核苷酸序列而破坏(即敲除的动物), 实现本发明相关基因在生物体中的改变表达。可以破坏内源基因的编码区, 从而制备无功能的蛋白。或者, 可以破坏或用不同的调控元件替换内源基因的上游调控区, 导致仍然有功能的蛋白的改变表达。制备敲除的动物的方法包括同源重组, 且是本领域众所周知的(例如, Wolfer 等, *Trends Neurosci.* 25:336-40 (2002))。

本发明的分离的多核苷酸还可以可操作地连接到表达控制序列上, 和/或连接进用于重组生产本发明多肽(包括其活性片段和/或融合多肽)的表达载体中。表达重组蛋白的一般方法是本领域众所周知的。

本文使用的表达载体意在指核酸分子, 其能运送已经与之连接的另一个核酸。一类载体是质粒, 它指环状双链 DNA 环, 其中可以连接额外的 DNA 区段。另一类载体是病毒载体, 其中可以将额外的 DNA 区段连接进病毒基因组中。某些载体能在它们导入的宿主细胞中自主复制(例如, 具有细菌复制起点的细菌载体, 和附加的哺乳动物载体)。其它载体(例如, 非附加的哺乳动物载体)可以在导入宿主细胞后整合进宿主细胞的基因组中, 从而随着宿主基因组一起复制。此外, 某些载体能指导它们可操作地连接的基因的表达。这样的载体在本文中称作重组表达载体(或简称为表达载体)。一般而言, 在重组 DNA 技术中使用的表达载体经常是质粒形式。在本说明书中, 质粒和载体可以互换地使用, 因为质粒是最常用的载体形式。但是, 本发明意在包括起相同功能

的其它形式的表达载体，例如病毒载体（例如，复制缺陷型逆转录病毒，腺病毒和腺伴随病毒）。

在一个实施方案中，本发明的多核苷酸用于制备重组 IL-17F 激动剂，例如，基于至少一个“IL-17F 受体结合基序”的存在可以鉴别出的那些。本文使用的术语“IL-17F 受体结合基序”包括对于 IL-17F 与它的必要受体的结合而言重要的氨基酸序列或残基。IL-17F 激动剂的实例包括 IL-17F 同二聚体、IL-17A/IL-17F 异二聚体、其片段，例如，IL-17R 或 IL-17RC 结合片段和/或小分子（如下文所述）。这样的激动剂可以用于调节造血，因此，可以用于治疗骨髓样或淋巴样细胞缺陷。在另一个实施方案中，本发明的多核苷酸用于制备 IL-17F 信号传递拮抗剂（例如，IL-17F，IL-17R、和/或 IL-17RC 抑制性多核苷酸；可溶的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽（包括片段（例如，IL-17F 结合片段）和/或其融合蛋白）；抑制性抗 IL-17F、抗 IL-17R、或 IL-17RC 抗体，它们可以抑制 IL-17F 同二聚体、和/或 IL-17A/IL-17F 异二聚体；和/或拮抗性小分子等的生物活性。

本领域众所周知制备融合多肽的方法，即将第一个多肽部分连接到第二个多肽部分。例如，IL-17F 多肽或 IL-17F 受体多肽（例如，IL-17R 和/或 IL-17RC，包括其片段）可以融合到第二个多肽部分，例如，免疫球蛋白或其片段（例如，其 Fc 结合片段）。在有些实施方案中，第一个多肽部分包括，例如，全长 IL-17RC 多肽。或者，第一个多肽可以包含小于全长的 IL-17RC 多肽。另外，例如 IL-17RC 的可溶形式可以通过“接头”序列融合到免疫球蛋白的 Fc 部分上。还可以使用其它融合蛋白，例如含有谷胱甘肽-S-转移酶（GST）、Lex-A、硫氧还蛋白（TRX）或麦芽糖结合蛋白（MBP）的那些。

第二个多肽部分优选地是可溶的。在有些实施方案中，第二个多肽部分会增加连接的多肽的半衰期（例如，血清半衰期）。在有些实施方案中，第二个多肽部分包括促进融合多肽与第二种 IL-17F 或 IL-17R 多肽的缔合的序列。在优选的实施方案中，第二个多肽至少包括免疫球蛋白多肽的一个区域。免疫球蛋白融合多肽是本领域已知的，且记载在，例如，美国专利号 5,516,964；5,225,538；5,428,130；5,514,582；5,714,147；和 5,455,165，它们都在本文引作参考。融合蛋白可以另外包含接头序列，后者将第一个多肽部分（例如，IL-17F 或 IL-17R，包括其片段）连

接到第二个部分上。这样的连接序列的应用是本领域众所周知的。例如，融合蛋白可以包含肽接头，例如，长度为约 2-20、更优选小于 10 个氨基酸的肽接头。在一个实施方案中，肽接头的长度可以是 2 个氨基酸。

在另一个实施方案中，重组蛋白在它的 N-末端包括异源信号序列（即不存在于 IL-17F、IL-17R 或 IL-17RC 核酸编码的多肽中的多肽序列）。例如，来自另一种蛋白的信号序列可以与 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽（包括其片段和/或融合蛋白）相融合。在某些宿主细胞（例如，哺乳动物宿主细胞）中，通过使用异源信号序列，可以增加重组蛋白的表达和/或分泌。可以包含在融合蛋白中的信号肽是蜂毒肽信号肽 MKFLVNVALVFMVYISYIYA（SEQ ID NO:33）。

本发明的融合蛋白可以通过标准的重组 DNA 技术来生产。例如，根据常规技术，使用例如平端的或突出端的末端进行连接、限制酶消化，以提供适宜末端，根据需要补平粘端，碱性磷酸酶处理，以避免不希望的连接和酶连接，可以将编码不同多肽序列的 DNA 片段符合读框地连接到一起。在另一个实施方案中，通过常规技术，包括自动化 DNA 合成仪，可以合成融合基因。或者，可以使用锚定引物，对基因片段进行 PCR 扩增，所述锚定引物产生 2 个相邻基因片段之间的互补突出物，它们可以随后退火和再扩增，以制备嵌合基因序列（参见，例如，Ausubel 等（编）Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1992）。此外，可商业上得到许多编码融合部分（例如，免疫球蛋白重链的 Fc 区）的表达载体。IL-17F 或 IL-17R 编码核酸可以克隆进这样的表达载体，从而将融合部分符合读框地连接到免疫球蛋白上。在有些实施方案中，IL-17F、IL-17R 和/或 IL-17RC 融合多肽作为寡聚体（例如二聚体或三聚体）存在。

本发明的重组表达载体可以携带额外的序列，例如调节载体在宿主细胞中的复制的序列（例如，复制起点）和选择标记基因。选择标记基因有助于选择已经导入了该载体的宿主细胞。例如，通常选择标记基因会赋予已经导入了该载体的宿主细胞对药物（例如 G418，潮霉素或甲氨蝶呤）的抗性。优选的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶（DHFR）基因（用于甲氨蝶呤选择/扩增 dhfr⁻宿主细胞）和 neo 基因（用于 G418 选择）。

可以选择或构建合适的载体，其含有适当的调控序列，包括启动子序列，终止子序列，聚腺苷酸化序列，增强子序列，标记基因和其它序列，例如，在适当时调控载体在宿主细胞中的复制（例如，复制起始）的序列。根据需要，载体可以是质粒或病毒的，例如，噬菌体或噬菌粒。其它细节参见，例如，Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 第2版，Sambrook 等，Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989。操纵核酸的许多已知技术和方法，例如，在核酸构建体的制备、诱变、测序、DNA向细胞中的导入和基因表达、以及蛋白的分析中，详细记载在 Current protocols in Molecular Biology, 第2版，Ausubel 等编，John Wiley & Sons, 1992。

因而，本发明的另一个方面提供了宿主细胞，其包含本文公开的核酸。另一个方面提供了一种方法，其包含将这样的核酸导入宿主细胞中。所述导入可以采用任何可用的技术。对于真核细胞，合适的技术可以包括磷酸钙转染，DEAE-葡聚糖，电穿孔，脂质体-介导的转染，和使用逆转录病毒或其它病毒（例如，痘苗病毒，或对于昆虫细胞而言的杆状病毒）的转导。就细菌细胞而言，合适的技术可以包括氯化钙转化，电穿孔和使用噬菌体的转染。导入之后可以造成或允许核酸的表达，例如，通过在基因表达条件下培养宿主细胞。

许多细胞系可以作为适用于重组表达本发明多肽的宿主细胞。哺乳动物宿主细胞系包括，例如，COS 细胞，CHO 细胞，293 细胞，A431 细胞，3T3 细胞，CV-1 细胞，HeLa 细胞，L 细胞，BHK21 细胞，HL-60 细胞，U937 细胞，HaK 细胞，Jurkat 细胞，以及源自原代组织和原代外植体的体外培养物的细胞株。

或者，可以在低等真核生物（例如酵母）或原核生物中重组生产本发明的多肽。可能合适的酵母菌株包括啤酒糖酵母，裂殖酵母，克鲁维酵母菌株，和假丝酵母菌株。可能合适的细菌菌株包括大肠杆菌，枯草芽孢杆菌和鼠伤寒沙门菌。如果在酵母或细菌中制备本发明的多肽，可能必须修饰它们，例如，通过适当位点的磷酸化或糖基化，以便得到功能性。这样的共价结合可以使用众所周知的化学方法或酶方法来实现。

在细菌中的表达可能导致掺入重组蛋白的包涵体的形成。因而，可能需要重新折叠重组蛋白，以便生产有活性的或更高活性的物质。几种从细菌包涵体得到正确折叠的异源蛋白的方法，是本领域已知的。这些

方法通常包含，溶解来自包涵体的蛋白，然后使用离液剂使蛋白完全变性。当蛋白的一级氨基酸序列中存在半胱氨酸残基时，经常需要在允许正确形成二硫键的环境（氧化还原系统）中实现重新折叠。重新折叠的一般方法公开在 Kohno (1990) Meth. Enzymol. 185:187-95。EP 0433225，和美国专利号 5,399,677 描述了其它适当的方法。

通过将本发明的分离的多核苷酸可操作地连接到一种或多种昆虫表达载体（例如杆状病毒载体）的合适控制序列上，并使用昆虫细胞表达系统，还可以重组生产本发明的多肽。用于杆状病毒/Sf9 表达系统的材料核方法，可以试剂盒形式商购（例如，MaxBac[®]试剂盒，Invitrogen, Carlsbad, CA）。

在适当宿主细胞中重组表达后，然后可以使用已知的纯化方法，例如凝胶过滤和离子交换层析，从培养基或细胞提取物中纯化本发明的重组多肽。例如，IL-17F 或 IL-17R 蛋白（包括其片段和/或融合蛋白）可以从条件培养基中纯化。膜结合形式的例如 IL-17R，可以如下纯化：从表达细胞制备全膜级分，并且用非离子去污剂（例如 Triton X-100）提取膜。使用可商业上得到的蛋白浓缩过滤器，例如，AMICON[®]或 Millipore PELLICON[®]超滤设备，可以浓缩本发明的多肽。浓缩步骤之后，可以将浓缩物应用于纯化基质，例如凝胶过滤介质上。或者，可以使用阴离子交换树脂，例如，具有悬垂的二乙基氨基乙基（DEAE）或聚乙烯亚胺（PEI）基团的基质或底物。基质可以是丙烯酰胺，琼脂糖，葡聚糖，纤维素或常用于蛋白纯化中的其它类型。或者，可以使用阳离子交换步骤。合适的阳离子交换剂包括各种包含磺丙基或羧甲基的不溶基质。磺丙基是优选的（例如，S-Sepharose[®]柱）。从培养上清液纯化重组蛋白还可以包括一个或多个柱步骤，后者是在伴刀豆球蛋白 A-琼脂糖、肝素-TOYOPEARL[®]（Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd., Japan）或 Cibacrom blue 3GA Sepharose[®]（Tosoh Biosciences, San Francisco, CA）等亲和树脂上进行；或通过疏水相互作用层析，使用苯基醚、丁基醚或丙基醚等树脂；或通过免疫亲和层析。最后，可以使用一个或多个反相高效液相层析（RP-HPLC）步骤，使用疏水 RP-HPLC 培养基，例如，具有悬垂的甲基或其它脂族基团的硅胶，进一步纯化重组蛋白。还可以在根据已知方法的纯化中，使用包含抗体（例如，使用本文方法描述的那些）的亲和层析柱。有些或全部前述纯化步骤，以不同组合或与

其它已知方法一起，还可以用于提供基本上纯化的分离的重组蛋白。优选地，纯化分离的重组蛋白，使它基本上不含有其它哺乳动物蛋白。另外，这些纯化操作还可以用于纯化来自其它来源（包括天然来源）的本发明多肽。例如，可以如上所述纯化本发明的多肽，例如，IL-17F或IL-17R多肽（包括其片段和/或融合蛋白），它们表达为转基因动物的产物，例如，作为转基因母牛、山羊、猪或绵羊的乳汁的组分。

或者，还可以以有利于纯化的方式重组表达多肽。例如，多肽可以表达为与麦芽糖结合蛋白（MBP）、谷胱甘肽-S-转移酶（GST）或硫氧还蛋白（TRX）等蛋白的融合体。用于表达和纯化这样的融合蛋白的试剂盒可分别从 New England BioLabs（Beverly, MA）、Pharmacia（Piscataway, NJ）、和 Invitrogen 购得。还可以用小表位标记重组蛋白，随后使用该表位的特异性抗体鉴别或纯化。优选的表位是 FLAG 表位，它可从 Eastman Kodak（New Haven, CT）购得。

或者，可以用不同表位标记重组的 IL-17F 和 IL-17A 融合蛋白，以允许纯化 IL-17A/IL-17F 异二聚体。不同标记在 IL-17F 和 IL-17A 上的存在，允许分离基本上不含有 IL-17A 和 IL-17F 同二聚体的 IL-17A/IL-17F 异二聚体。例如，可以用 FLAG 或 myc 等表位标记 IL-17A，同时用 His 或 GST 等表位标记 IL-17F，将两种蛋白同时在细胞中表达。可以得到来自重组宿主细胞或培养宿主细胞的培养基的提取物，并在非还原条件下进行两步亲和层析纯化。第一亲和层析柱结合两种不同标记之一，例如，融合到 IL-17A（或 IL-17A 片段）上的 FLAG 表位，因此来自第一柱的洗涤物（主要）含有 IL-17F 同二聚体，来自第一柱的洗脱液含有 IL-17A/IL-17F 异二聚体和 IL-17A 同二聚体两者。然后将来自第一柱的洗脱液置于第二亲和层析柱上，后者特异性地结合两种不同标记中的另一种，例如，融合到 IL-17F 上的 His 标记。因而，来自第二柱的洗涤物含有 IL-17A 同二聚体，来自第二柱的洗脱液主要地或排它地含有 IL-17A/IL-17F 异二聚体（即基本上不含有 IL-17A 和 IL-17F 同二聚体）。在非还原条件下，可以得到来自重组的宿主细胞或宿主细胞培养基的提取物，使得蛋白-蛋白相互作用不被中断，或可以在还原条件下得到，然后处理，以允许其中含有的 IL-17F 和 IL-17A 单体的适当重新折叠和相互作用。本领域技术人员会容易地认识到，宿主细胞不需要表达 IL-17F 和 IL-17A 融合蛋白；在允许 IL-17A 和 IL-17F 单体二聚化的条件下，可

以得到并且组合来自单一转染子的细胞或培养基提取物，所述转染子例如表达 IL-17A 或 IL-17F 融合蛋白的宿主细胞。

本发明的多肽，包括 IL-17F 信号传递拮抗剂，还可以通过已知的常规化学合成来制备。化学合成这样的多肽的方法，是本领域技术人员众所周知的。这样的化学合成的多肽可能具有与天然的纯化多肽共有的生物学性质，因而可以用作天然多肽的生物学活性的或免疫学的替代品。

发明人还能分离“天然的”（即非重组形式的）本发明的多肽，包括天然形式的 IL-17A（参见，例如，实施例 5）。因而，本发明的多肽包括天然 IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体、IL-17A/IL-17F 异二聚体，等。

本发明的多肽，包括 IL-17F 信号传递拮抗剂，还包括结构上与公开的多肽不同（例如，具有轻微改变的序列）、但是基本上具有与公开的多肽相同的生化性质的分子（例如，变化仅在于功能非必需的氨基酸残基）。这样的分子包括天然存在的等位基因变体和有意工程化的含有改变、置换、替换、插入或缺失的变体。这样的改变、置换、替换、插入或缺失的技术，是本领域技术人员众所周知的。在有些实施方案中，多肽部分提供为变体多肽，其具有在天然存在的序列（野生型）中的突变，产生更抗蛋白水解的序列（相对于未突变的序列）。

IL-17F（包括 IL-17F 同二聚体和 IL-17A/IL-17F 异二聚体）、IL-17R、IL-17RC 多肽、其片段和/或融合多肽、其重组和天然形式、和/或天然的 IL-17A，可以用于筛选能结合 IL-17F 和/或抑制 IL-17F 生物活性的试剂（例如，其它 IL-17F 信号传递拮抗剂，例如，抗 IL-17F 抗体）。使用固定的或未固定的目标结合蛋白的结合测定，是本领域众所周知的，可以用于本发明多肽的该目的，所述多肽包括本发明的 IL-17F 信号传递拮抗剂，例如，IL-17R 和/或 IL-17RC。基于纯化的细胞或基于蛋白的（无细胞的）筛选测定可以用于鉴别这样的试剂。例如，IL-17F 蛋白可以以纯化形式固定到载体上，且可以测量潜在配体与纯化的 IL-17F 的结合。

抗体

在其它实施方案中，本发明提供了 IL-17F 信号传递拮抗剂作为抗体，即完整抗体及其抗原结合片段，其特异性地结合 IL-17F（包括 IL-17F 同二聚体和/或 IL-17A/IL-17F 异二聚体）、优选哺乳动物（例如，人）IL-17F 或 IL-17F 受体，例如，IL-17R 和/或 IL-17RC。在一个实施方

案中，抗体是抑制性抗体，即它们抑制至少一种 IL-17F 生物活性（例如，结合 IL-17F 和它的受体，IL-17F-介导的信号传递组分（例如，NF- κ B）的激活，IL-17F-介导的细胞因子生产的诱导，IL-17F-介导的聚集蛋白聚糖酶的增加等），且可以用于诊断、预后、监测和/或治疗与 IL-17F 信号传递相关的病症。IL-21 对 IL-17A 和 IL-17F 生产的上调（参见实施例 5）表明，与 IL-21 结合并激活 IL-21R（例如，IL-21 信号传递）相关的促炎作用，由 IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体、和/或 IL-17A/IL-17F 异二聚体介导。因此，本发明的抑制 IL-17F 信号传递的抗体还可以是与 IL-21 信号传递相关的至少一种活性（例如，调控细胞因子生产，炎症疾病/自身免疫病（例如炎性肠病症或疾病（IBD）、类风湿关节炎，移植排斥和银屑病）中的炎症等；参见美国专利专利申请号 60/599,086 和 60/639,176）的抑制性抗体，且可以用于诊断、预后、监测和/或治疗与 IL-21 信号传递相关的病症。

另外，本发明提供了特异性地结合、但是不抑制 IL-17F 信号传递的抗 IL-17F 抗体（即检测抗体）；这样的抗体可以用于检测 IL-17F 蛋白的存在（例如，作为同二聚体和/或异二聚体），例如，作为用于诊断、预后、和/或监测与 IL-17F 信号传递相关的病症的试剂盒的一部分。在一个实施方案中，所述抗体针对 IL-17F。在另一个实施方案中，所述抗体是单克隆抗体或单特异性抗体。抗体还可以是人的、人源化的、嵌合的或体外制备的抗人 IL-17F 抗体。

本领域技术人员会认识到，本文使用的术语“抗体”指包含至少 1 个、优选 2 个重（H）链可变区（在本文中缩写为 VH），和至少 1 个、优选 2 个轻（L）链可变区（在本文中缩写为 VL）的蛋白。VH 和 VL 区可以进一步细分成称作“互补决定区”（“CDR”）的超变区，其中散布着称作“构架区”（“FR”）的更保守的区域。已经精确地定义了 FR 和 CDR 的范围（参见，Kabat 等（1991）*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第 5 版，U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242；和 Chothia 等（1987）*J. Mol. Biol.* 196:901-917，它们在本文引作参考）。每个 VH 和 VL 由 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成，从氨基端至羧基端的排列次序是：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。

抗体还可以包括重链和轻链恒定区，从而分别形成重和轻免疫球蛋白

白链。在一个实施方案中，抗体是2个重免疫球蛋白链和2个轻免疫球蛋白链的四聚体，其中所述重和轻免疫球蛋白链通过例如二硫键相连接。重链恒定区包含3个结构域，CH1，CH2和CH3。轻链恒定区包含1个结构域，CL。重轻和链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区通常介导抗体与宿主组织或因子的结合，包括免疫系统的各种细胞（例如，效应细胞）和经典补体的第一组分（C1q）。

免疫球蛋白指由基本上由免疫球蛋白基因编码的一种或多种多肽组成的蛋白。公知的人免疫球蛋白基因包括 κ ， λ ， α （IgA1和IgA2）、 γ （IgG1，IgG2，IgG3，IgG4）、 δ ， ϵ 和 μ 恒定区基因，以及众多的免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白“轻链”（约25 Kd，或214个氨基酸）由在NH₂-末端的可变区基因（约110个氨基酸）和在COOH-末端的 κ 或 λ 恒定区基因编码。全长免疫球蛋白“重链”（约50 Kd，或446个氨基酸）类似地由可变区基因（约116个氨基酸）和其它前述恒定区基因之一（例如 γ （编码约330氨基酸））编码。免疫球蛋白重链恒定区基因编码抗体类别，即同种型（例如，IgM或IgG1）。本文使用的抗体的抗原结合片段（或简称为“抗体部分”或“片段”）指全长抗体的一个或多个片段，其保留特异性地结合抗原（例如，CD3）的能力。包含在术语抗体的“抗原结合片段”中的结合片段的实例包括但不限于，（i）Fab片段，即由VL，VH，CL和CH1结构域组成的单价片段；（ii）F（ab'）₂片段，即包含2个在铰链区通过二硫键连接的Fab片段的二价片段；（iii）由VH和CH1结构域组成的Fd片段；（iv）由抗体单个臂的VL和VH结构域组成的Fv片段，（v）dAb片段，它由VH结构域组成；和（vi）分离的互补决定区（CDR）。此外，尽管Fv片段的2个结构域（VL和VH）由分开的基因编码，它们可以使用重组方法，通过合成的接头连接到一起，所述接头能使它们成为单个蛋白链，其中VL和VH区配对形成单价分子（称作单链Fv（scFv））。这样的单链抗体也包含在术语抗体的“抗原结合片段”中。可以使用本领域技术人员已知的常规技术得到这些抗体片段，并以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。

通过本领域技术人员众所周知的方法，可以制备本发明多肽的抗体分子，例如，IL-17F或IL-17R的抗体。例如，通过根据已知方法制备杂交瘤，可以生产单克隆抗体。然后使用标准方法，例如酶联免疫吸附测

定 (ELISA), 筛选以该方式形成的杂交瘤, 以鉴别产生特异性地结合本发明多肽的抗体的一个或多个杂交瘤。例如, 本发明的 IL-17F 蛋白还可以用于免疫动物, 以得到多克隆和单克隆抗体, 它们可以与 IL-17F 蛋白反应。类似地, IL-17R 蛋白可以用于得到多克隆和单克隆抗体, 它们与 IL-17R 特异性地反应。肽免疫原另外可以含有在羧基端的半胱氨酸残基, 且可以缀合到半抗原上, 例如匙孔血蓝蛋白 (KLH)。通过用硫酸化的酪氨酸残基替代酪氨酸残基, 可以制备其它的肽免疫原。合成这样的肽的方法是本领域众所周知的, 例如, 参见 Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54; Krstenansky 等 (1987) FEBS Lett. 211:10。本发明的全长多肽可以用作免疫原, 或者, 可以使用多肽的抗原性肽片段。本发明多肽的抗原性肽包含至少 7 个连续氨基酸残基, 且包括表位, 以便针对该肽产生的抗体与该多肽形成特定免疫复合物。优选地, 抗原性肽包含至少 10 个氨基酸残基, 更优选至少 15 个氨基酸残基, 更优选至少 20 个氨基酸残基, 最优选至少 30 个氨基酸残基。

通过重组 DNA 技术领域的人员已知的其它方法, 可以制备单克隆抗体。作为制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的替代方案, 通过用本发明多肽 (例如, IL-17F、IL-17R, IL-17RC) 筛选重组的组合的免疫球蛋白文库 (例如, 抗体噬菌体展示文库), 分离结合本发明多肽 (例如, 分别 IL-17F、IL-17R, IL-17RC) 的免疫球蛋白文库成员, 可以鉴别和分离本发明多肽的单克隆抗体。用于制备和筛选噬菌体展示文库的技术和可商业上得到的试剂盒是本领域技术人员众所周知的。另外, 可以在文献中找到特别适用于制备和筛选抗体展示文库的方法和试剂的实例。例如, “组合抗体展示”方法是众所周知的, 并被用于鉴别和分离具有特定抗原特异性的抗体片段, 且可以用于制备单克隆抗体。用本文所述免疫原免疫动物后, 克隆得到的 B 细胞库的抗体所有组成成分。使用寡聚体引物的混合物和 PCR, 得到不同免疫球蛋白分子群体的可变区 DNA 序列的方法, 是普遍已知的。例如, 混合的与 5' 先导 (信号肽) 序列和/或构架 1 (FR1) 序列相对应的寡核苷酸引物, 以及保守的 3' 恒定区的引物, 可以用于 PCR 扩增来自许多鼠抗体的重轻和链可变区; 类似的策略还已经用于扩增来自人抗体的人重轻和链可变区。

通过用本发明多肽免疫合适的受试者, 可以制备多克隆血清和抗体。通过标准技术, 例如使用固定的蛋白的 ELISA, 可以随时间监测免

疫的受试者的抗体效价。如果需要，可以从受试者或培养基分离本发明多肽的抗体分子，并通过众所周知的技术（例如蛋白 A 层析）进一步纯化，以得到 IgG 级分。

根据本领域众所周知的方法，通过切割抗体，可以制备本发明多肽的抗体的片段。例如，通过用酶例如胃蛋白酶处理蛋白，可以制备免疫活性的 Fab 和 $F(ab')_2$ 片段。

另外，使用标准的重组 DNA 技术和/或重组组合免疫球蛋白文库，可以制备包含人和非人部分的本发明多肽的嵌合的、人源化的、和单链抗体。使用不能表达内源免疫球蛋白重链和轻链基因、但是可以表达人重链和轻链基因的转基因小鼠，还可以制备人源化的抗体。例如，使用携带人免疫球蛋白基因（而不是鼠免疫球蛋白基因）的转基因小鼠，可以制备抗例如 IL-17F 的人单克隆抗体（mAb）。来自用目标抗原免疫的这些转基因小鼠的脾细胞，然后可以用于生产杂交瘤，后者会分泌对人蛋白表位具有特异性亲和力的人 mAb。

通过本领域已知的重组 DNA 技术，可以制备嵌合抗体，包括嵌合免疫球蛋白链。例如，用限制酶消化编码鼠（或其它物种）单克隆抗体分子的 Fc 恒定区的基因，以去除编码鼠 Fc 的区域，并取代编码人 Fc 恒定区的基因的等同部分。

通过本领域已知的方法，可以人源化抗体或免疫球蛋白链。通过用人 Fv 可变区的等同序列替换不直接参与抗原结合的 Fv 可变区序列，可以制备人源化的抗体，包括人源化的免疫球蛋白链。制备人源化的抗体的一般方法，参见 Morrison (1985) Science 229:1202-07; Oi 等 (1986) BioTechniques 4:214; Queen 等，美国专利号 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762，它们的内容都在本文引作参考。这些方法包括分离、操作和表达核酸序列，该核酸序列编码来自重链或轻链中的至少一个的全部或一部分免疫球蛋白 Fv 可变区。这样的核酸序列的来源是本领域技术人员众所周知的，例如，可以从生产抗预定目标的抗体的杂交瘤得到。然后，可以将编码人源化的抗体或其片段的重组 DNA 克隆进适当表达载体。

通过 CDR 移植或 CDR 取代，其中可以替换免疫球蛋白链的 1、2 或所有 CDR，可以制备人源化的或 CDR-移植的抗体分子或免疫球蛋白。参见，例如，美国专利号 5,225,539; Jones 等 (1986) Nature

321:552-25; Verhoeyan 等 (1988) Science 239:1534; Beidler 等 (1988) J. Immunol. 141:4053-60; Winter, 美国专利号 5,225,539, 它们的内容都在本文引作参考。Winter 描述了一种 CDR-移植方法, 其可以用于制备本发明的人源化的抗体 (英国专利申请 GB 2188638A; Winter, 美国专利号 5,225,539), 它们的内容都在本文引作参考。可以用非人 CDR 的至少一部分, 替换特定人抗体的所有 CDR, 或者可以用非人 CDR 替换仅仅一部分 CDR。只需要替换人源化抗体与预定抗原的结合所需的 CDR 数量。

另外, 使用修饰成反应于抗原攻击而生产全人抗体 (而不是动物内源抗体) 的转基因非人动物, 可以制备人抗体 (参见, 例如, PCT 公开 WO 94/02602)。已经使在非人宿主中编码重和轻免疫球蛋白链的内源基因丧失能力, 并将有活性的编码人重轻和链免疫球蛋白的基因座插入宿主基因组。使用例如含有必要人 DNA 区段的酵母人工染色体, 整合人基因。然后, 通过使含有比修饰的完全互补序列少的中间转基因动物杂交, 得到提供所有需要的修饰的动物后代。这样的非动物的优选实施方案是小鼠, 并称作 XENOMOUSETM, 如在 PCT 公开 WO 96/33735 和 WO 96/34096 中披露的。该动物生产分泌全人免疫球蛋白的 B 细胞。可以在用目标免疫原免疫后从动物直接得到抗体, 例如, 在多克隆抗体的制备中, 或者从源自动物的永生化 B 细胞 (例如生产单克隆抗体的杂交瘤) 得到抗体。另外, 可以回收编码含有人可变区的免疫球蛋白的基因, 并表达, 以直接得到抗体, 或可以进一步修饰, 以得到抗体类似物, 例如单链 Fv 分子。

已经通过例如缺失、添加或取代抗体的其它部分 (例如, 恒定区) 修饰的单克隆的、嵌合的和人源化的抗体, 也在本发明范围内。作为非限制性实例, 可以如下修饰抗体: 通过缺失恒定区, 通过用另一个恒定区 (例如, 用于增加抗体的半衰期、稳定性或亲和力的恒定区, 或来自另一物种或抗体类别的恒定区) 替代恒定区, 和通过修饰恒定区中的一个或多个氨基酸, 以改变例如糖基化位点的数目、效应细胞功能、Fc 受体 (FcR) 结合、补体固定等。

改变抗体恒定区的方法是本领域已知的。通过用不同残基替换抗体恒定部分的至少 1 个氨基酸残基 (参见, 例如, EP 388,151 A1, 美国 5,624,821 和美国 5,648,260, 它们的内容都在本文引作参考), 可以制

备具有改变的功能（例如，改变的对效应配体（例如细胞上的 FcR 或补体的 C1 组分）的亲和力）的抗体。可以应用鼠（或其它物种）免疫球蛋白的类似类型的改变，以减少或消除这些功能，且是本领域已知的。

例如，通过用在侧链上具有适当功能性的残基替代指定的残基，或通过导入带电荷的官能团（例如谷氨酸或天冬氨酸）或芳族非极性残基（例如苯丙氨酸，酪氨酸，色氨酸或丙氨酸）（参见，例如，美国 5,624,821），可以改变抗体（例如，IgG，例如人 IgG）的 Fc 区对 FcR（例如，Fc γ R1）或 C1q 的结合亲和力。

本发明的抗 IL-17F、抗 IL-17R 或抗 IL-17RC 抗体可以用于分别分离、纯化、和/或检测在上清液、细胞裂解物中或在细胞表面上的 IL-17F 蛋白（例如，单体、同二聚体、或异二聚体形式）、IL-17R、或 IL-17RC 多肽。本发明公开的抗体还可以在诊断上用于监测例如 IL-17F 蛋白水平，作为临床测试过程的一部分，或在临床上用于将治疗调控剂靶定包含该抗体的抗原的细胞或组织。例如，可以将治疗剂（例如小分子）或本发明的其它治疗剂连接到抗 IL-17F、抗 IL-17R、或抗 IL-17RC 抗体上，以便将治疗剂靶定分别表达 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 的细胞或组织。结合 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 蛋白的拮抗性抗体（优选单克隆抗体）还可以用于治疗与 IL-17F 信号传递相关的疾病和/或与 IL-21 信号传递（例如，IL-21 结合和 IL-21R 的激活）相关的疾病，这是由于 IL-21 和 IL-17F 生产之间的关系。因而，本发明还提供了组合物，其包含特异性地结合 IL-17F（单体和/或二聚体形式）、IL-17R、或 IL-17RC 的抑制性抗体，其降低、限制、阻断或减少 IL-17F 信号传递。类似地，抗 IL-17F、抗 IL-17R、或抗 IL-17RC 抗体可以分别用于分离、纯化、检测和/或在诊断上监测 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC，和/或分别在临床上将治疗调控剂靶定包含 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 的细胞或组织。

除了用于本发明的抗体以外，基于抗体的分子还可以用于调控 IL-17F 同二聚体、IL-17A 同二聚体、和/或 IL-17F/IL-17A 同二聚体的活性。这样的基于抗体的分子包括小模块免疫药物（SMIPTM）（Trubion Pharmaceuticals, Seattle, WA）。SMIP 是一种单链多肽，由相关结构（例如抗原，反受体等）的结合结构域、具有 1 个或没有半胱氨酸残基的铰链区多肽、和免疫球蛋白 CH2 和 CH3 结构域组成（也参见 www.trubion.com）。SMIP 会表现出单克隆抗体的结合特异性和活性，

但是是常规治疗性单克隆抗体大小的约 1/3 至 1/2, 且具有延长的体内半衰期。SMIP 和它们的用法和用途, 公开在例如, 美国公开专利申请号 2003/0118592, 2003/0133939, 2004/0058445, 2005/0136049, 2005/0175614, 2005/0180970, 2005/0186216, 2005/0202012, 2005/0202023, 2005/0202028, 2005/0202534 和 2005/0238646 及其相关专利家族成员中, 它们都在本文中整体引作参考。

筛选测定

与 IL-17F 信号传递相关的多核苷酸和多肽可以用于鉴别药理学试剂或试剂的先导化合物的筛选测定中, 所述试剂能调控细胞或生物体中 IL-17F 活性, 因而是炎症反应的潜在调节剂。例如, 可以使含有 IL-17F (天然的或重组的) 的样品接触许多种测试化合物 (生物试剂或小有机分子) 中的一种, 并将每种测试样品中的 IL-17F 的生物活性与未处理样品或接触不同测试化合物的样品中的 IL-17F 的生物活性相对比。这样的对比会确定任一种测试化合物是否会导致: 1) IL-17F 表达或生物活性的水平显著降低, 从而指示着 IL-17F 的拮抗剂, 或 2) IL-17F 表达或生物活性的水平显著增加, 从而指示着 IL-17F 的激动剂。在一个实施方案中, 使用高通量筛选测定, 例如 BIACORE® (Biacore International AB, Uppsala, Sweden)、BRET (生物发光共振能转移)、和 FRET (荧光共振能转移) 测定, 以及 ELISA 和基于细胞的测定, 鉴别能调控 IL-17F 活性的测试化合物。

小分子

还可以通过使用拮抗 (即抑制) IL-17F 活性的小分子 (通常是有机小分子), 在与经受 (或处于危险中) 与 IL-17F 信号传递相关的病症 (和/或与 IL-21 结合和 IL-21R 的激活相关的病症) 的生物体 (或受试者) 中、或来自经受这样的病症的生物体 (或受试者) 的细胞中, 实现降低的 IL-17F 活性 (和/或至少一种与 IL-21 结合和 IL-21R 的激活相关的活性), 所述病症例如, 炎症肠病, 类风湿关节炎, 移植排斥, 银屑病, 等。通过上述的筛选方法, 可以鉴别出新的拮抗性小分子, 并可以用于本文所述的本发明的治疗方法中。

相反地, 还可以通过使用激动 (即增强) IL-17F 活性的小分子 (通常是有机小分子), 在与经受 (或处于危险中) 免疫缺陷的生物体 (或受试者) 中、或来自经受这样的病症的生物体 (或受试者) 的细胞中,

实现 IL-17F 活性 (和/或 IL-21 相关的活性) 的增强, 所述免疫缺陷例如, 中性粒细胞减少症。通过上述的筛选方法, 可以鉴别出新的激动性小分子, 并可以用于治疗免疫缺陷的方法中, 例如, 如美国专利号 5,707,829; 6,043,344; 6,074,849 和美国专利申请号 10/102,080 所述, 它们都整体引作参考。

术语小分子指不是大分子的化合物 (参见, 例如, Karp (2000) *Bioinformatics Ontology* 16:269-85; Verkman (2004) *AJP-Cell Physiol.* 286:465-74)。因而, 小分子经常视作例如小于 1000 道尔顿的那些化合物 (例如, Voet 和 Voet, *Biochemistry*, 第 2 版, 编者 N. Rose, Wiley 和 Sons, New York, 14 (1995))。例如, Davis 等 (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5981-86 使用短语小分子来指代叶酸盐、甲氨蝶呤和神经肽, 而 Halpin 和 Harbury (2004) *PLoS Biology* 2:1022-30 使用该短语来指代小分子基因产物, 例如, DNA, RNA 和肽。天然小分子的实例包括但不限于, 胆固醇, 神经递质, 适体, 和 siRNA; 合成的小分子包括、但不限于, 在许多可商业上得到的小分子数据库中列出的各种化学物质, 例如, FCD (精细化学物质数据库)、SMID (小分子相互作用数据库)、ChEBI (生物利益的化学实体)、和 CSD (Cambridge 结构数据库) (参见, 例如, Alfarano 等 (2005) *Nuc. Acids Res. Database Issue* 33:D416-24)。

诊断、预后、和监测与 IL-17F 信号传递相关的病症的进展的方法

本领域众所周知, 在动物模型、尤其鼠模型中研究的免疫机理, 可以且经常移用到人免疫系统。这样, 鉴于许多本文公开的实施例证实了 IL-17F 信号传递拮抗剂在动物模型 (除了人样品以外) 中抑制 IL-17F 生物活性的能力, 公开的诊断、预后、和监测与 IL-17F 信号传递相关的病症的方法, 特别适用于诊断、预后和监测人的这样的病症。

本发明提供了通过检测 IL-17F 活性的上调, 例如, 通过检测 IL-17F 的上调, 包括但不限于在人受试者中使用这样的方法, 诊断、预后、和监测受试者中与 IL-17F 信号传递相关的病症 (例如, 其直接或间接涉及 IL-17F 生物活性的增加) 的进展的方法。由于 IL-21 和 IL-17F 之间的直接关系, 本发明还提供了通过检测 IL-17F 活性的上调, 例如, 通过检测 IL-17F 的上调, 包括但不限于在人受试者中使用这样的方法, 诊断、预后、和监测受试者中与 IL-21 结合和 IL-21R 的激活相关的病症的进展的

方法（例如，其直接或间接涉及 IL-21 生物活性的增加）。这些方法可以使用预包装的试剂盒来实现，所述试剂盒包含下述的至少一种：IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 多核苷酸或其片段，IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 多肽或其片段（包括其融合蛋白），或 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 多肽或其衍生物的抗体，或 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 多核苷酸和/或本文所述多肽的调控剂，它们可以方便地用于例如临床环境中。熟练的技术人员会认识到，其它间接方法可以用于证实例如 IL-17F 的上调，例如计数免疫细胞（例如，中性粒细胞）的数目。

“诊断的”或“诊断”指鉴别病理学状况的存在与否。诊断方法包括，通过确定来自受试者（人或非人哺乳动物）的生物样品中 IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 的基因产物（例如，mRNA，cDNA，或多肽，包括其片段）的测试量，和对比该测试量和正常量或范围（即来自已知没有经受与 IL-17F 信号传递相关的病症的个体的量或范围），检测 IL-17F 信号传递（和/或 IL-21 信号传递）的上调。尽管特定诊断方法可能没有提供与 IL-17F 信号传递相关的病症的确切诊断，如果该方法能提供辅助诊断的阳性指示就足够了。

本发明还提供了通过检测 IL-17F 活性的上调，例如，通过检测 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 的上调，预后这样的病症的方法。“预后的”或“预后”指预测病理学状况的可能发展和/或严重性。预后方法包括，确定来自受试者的生物样品中 IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 的基因产物的测试量，和对比该测试量与 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 各自基因产物的预后量或范围（即来自已知没有经受与 IL-17F 信号传递相关的病症和/或与 IL-21 信号传递相关的病症的个体的量或范围）。测试样品中 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 基因产物的不同量，与 IL-17F 信号传递相关病症和/或 IL-21 信号传递相关病症的某些预后相一致。在特定预后水平的量的 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 基因产物的检测，提供了受试者的预后。

本发明还提供了通过检测 IL-17F 活性的上调，例如，通过检测 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 的上调，监测这样的与 IL-17F 信号传递相关的病症（和/或与 IL-21 信号传递相关的病症）的进展或过程的方法。监测方法包括，确定在第一个和第二个时间从受试者采集的生物样品中 IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 的基因产物的测试量，和对比这些测试

量。第一个和第二个时间之间 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 基因产物的量的变化，指示着 IL-17F 信号传递-相关病症（和/或 IL-21 信号传递-相关病症）的过程的变化，其中量的降低指示着这样的病症的缓解，量的增加指示着这样的病症的发展。这样的监测测定还可以用于评价特定治疗干预在待治疗自身免疫病的患者中的功效。

可以在许多种生物样品中检测上述方法中的增强的 IL-17F 信号传递，所述生物样品包括体液（例如，全血，血浆和尿），细胞（例如，全细胞，细胞级分和细胞提取物），及其它组织。生物样品还包括组织切片，例如活检物和为组织学目的制备的冷冻切片。优选的生物样品包括血液，血浆，淋巴，组织活检，尿，CSF（脑脊液）、滑液和 BAL（支气管肺泡灌洗液）。应当明白，生物样品的分析不一定需要从受试者取出细胞或组织。例如，可以将适当标记的、结合 IL-17F 信号传递基因产物（例如，抗体，核酸）的试剂施用给受试者，并使用标准的成像技术（例如，CAT，NMR（MRI）、和 PET）观察（当结合到靶上时）。

在本发明的诊断和预后测定中，检测和定量 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 基因产物，以生成测试量。然后将测试量与正常量或范围相对比。明显超过正常量或范围的量，是诊断与 IL-17F 信号传递相关的病症（和/或与 IL-21 结合和 IL-21R 激活相关的病症）的阳性指征。下面描述了检测和定量 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 基因产物的具体方法。

对于任何特定样品类型和群体，可以确定 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 基因产物的正常量或基线水平。通常，通过测量来自正常（即健康）受试者的生物样品类型中 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 蛋白或 mRNA 各自的量，确定 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 蛋白或 mRNA 的基线（正常）水平。或者，通过测量从与采集患病的（或可能患病的）测试细胞或组织相同的受试者采集的健康细胞或组织中的量，可以确定 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 基因产物的正常值。可以以细胞、总蛋白或体积为基础，确定或表达 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 基因产物的量（正常量或测试量）。为了确定样品的细胞量，可以测量在采集生物样品的细胞类型中组成型表达的基因产物或以已知水平表达的其它基因产物的水平。

应当明白，本发明的测定方法不一定需要测量 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 基因产物的绝对值，因为相对值对于这些方法的许多用途是足

够的。还应当明白，除了 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 基因产物的量或丰度以外，通过对比正常基因产物和表达模式，可以鉴别变体或异常 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 基因产物或它们的表达模式（例如，突变的转录物，截短的多肽）。

两种样品中的特定基因的表达是否显著类似或显著不同，例如，显著超过或显著低于给定水平，取决于基因本身，尤其是它在不同个体或不同样品中表达的变异性。确定表达水平是否显著类似或不同，属于本领域常识。当确定两种样品之间例如 IL-17F 和/或 IL-17A 的表达水平是否显著类似或显著不同、例如显著超过给定水平时，可以考虑例如个体、物种、器官、组织、或细胞之间 IL-17F 和/或 IL-17A 表达水平的遗传变异等因素（在必要的时间和场合）。作为个体、物种、器官、组织、或细胞之间基因表达的天然异质性的结果，“显著类似”或“显著超过”等短语不能定义为精确百分比或值，然而可以由本领域技术人员在实施本发明后判定。

本发明的诊断、预后和监测测定包含，检测和定量生物样品中的 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 基因产物。IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 基因产物包括 mRNA 和多肽，两者可以使用本领域技术人员众所周知的方法测量。

例如，使用基于杂交的测定，例如 RNA 印迹杂交、原位杂交、点和狭线印迹，和寡核苷酸阵列，可以直接检测 mRNA。基于杂交的测定是指使探针核酸与靶核酸杂交的测定。在有些形式中，将靶、探针或两者固定。固定的核酸可以是 DNA，RNA，或另一种寡核苷酸或多核苷酸，且可以包含天然或非天然存在的核苷酸、核苷酸类似物或主链。选择用于本发明的核酸探针序列的方法，是基于 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 的核酸序列，且是本领域众所周知的。

或者，可以在检测和定量之前扩增 mRNA。这样的基于扩增的测定是本领域众所周知的，包括聚合酶链式反应（PCR）、反转录-PCR（RT-PCR）、PCR-酶联免疫吸附测定（PCR-ELISA）、和连接酶链式反应（LCR）。本领域技术人员基于 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 各自的核酸序列，无需过度试验，可以容易地设计和制备出用于制备和检测扩增的 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 基因产物（例如，mRNA 或 cDNA）的引物和探针。作为一个非限制性实例，可以直接分析扩增的 IL-17F 基

因产物，例如，通过凝胶电泳；通过与探针核酸的杂交；通过测序；通过检测荧光信号、磷光信号或放射性信号；或通过许多众所周知的方法中的任一种。另外，本领域技术人员已知用于增加扩增靶核酸序列产生的信号的方法。本领域技术人员会认识到，无论使用哪种扩增方法，如果需要定量基因产物，可以使用本领域已知的许多定量方法（例如，定量 PCR）。

使用各种众所周知的免疫测定，采用各种如上制备的抗 IL-17F、抗 IL-17R、或抗 IL-17RC 抗体，可以检测 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 多肽（或其片段）。免疫测定指利用特异性地结合例如 IL-17F 多肽（或其片段）的抗体（例如，多克隆的，单克隆的，嵌合的，人源化的，scFv 和/或其片段）的测定。适用于实践本发明的这种众所周知的免疫测定包括 ELISA，放射免疫测定（RIA），免疫沉淀，免疫荧光，荧光激活的细胞分选（FACS），和蛋白印迹。还可以使用标记的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽，检测 IL-17F 多肽。相反地，可以使用标记的 IL-17F 多肽，检测 IL-17R 或 IL-17RC。

本领域技术人员会明白，前述方法可以应用于与 IL-17F 信号传递相关的病症。

与 IL-17F 信号传递相关的分子在治疗中的应用

发明人首次证实了尤其是下面的内容：1）IL-17F 或其它 IL-17F 激动剂对 IL-17R 和/或 IL-17RC 的结合，与增加的中性粒细胞浸润、软骨破坏等相关；2）针对 IL-17F 的抗体可以用于检测 IL-17F 蛋白和抑制至少一种 IL-17F 生物活性；3）针对 IL-17R 和 IL-17RC 的 siRNA 可以用于降低 IL-17A 和 IL-17F 生物活性；4）IL-17F 蛋白可以形成 IL-17F 同二聚体和 IL-17A/IL-17F 异二聚体，因而针对 IL-17F 的抑制性抗体还可以抑制由 IL-17A/IL-17F 异二聚体介导的 IL-17A 生物活性；5）IL-21 与 CD28 协同地起作用，上调 IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体、和 IL-17A/IL-17F 异二聚体，因而抑制 IL-17F 活性（例如，IL-17F 同二聚体活性和/或 IL-17A/IL-17F 异二聚体活性）的抗体可以调节 IL-21 信号；6）可以分离和纯化天然的和重组的 IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体、和 IL-17A/IL-17F 异二聚体；7）IL-17F 异二聚体具有 IL-17F 生物活性；8）抗人 IL-17F 的抗体与灵长类动物 IL-17F 交叉反应，并部分地中和后者；和 9）在银屑病人患者的病变组织和克隆氏病和溃疡性结肠炎人患者的

涉及组织中，IL-17F 和 IL-17A 都增加。尽管有些动物模型已经用于鉴别有些上述的关联，本领域众所周知，在动物模型中研究的免疫机理，可以且经常移用到人免疫系统。另外，本发明的抗体被用于从原代人 T 细胞分离同二聚体和异二聚体形式的天然 IL-17F，同时在人细胞和组织中进行涉及 IL-17F 调节聚集蛋白聚糖酶和描绘银屑病病变和炎性肠病涉病组织中 IL-17A 和 IL-17F 的表达水平的试验。这样，公开的使用与 IL-17F 信号传递相关的分子（例如，IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂）治疗与 IL-17F 信号传递相关的病症和/或与 IL-21 信号传递相关的病症的方法，特别适用于治疗人的这种病症。

可以体外、离体地使用本文公开的 IL-17F 信号传递-相关分子，包括使用上述方法鉴别出的 IL-17F、IL-17R、或 IL-17RC 多核苷酸和/或多肽活性的调控剂，或掺入药物组合物中并体内施用给个体，以治疗例如与 IL-17F 信号传递和/或 IL-21 信号传递相关的病症，其中施用 IL-17F 信号传递拮抗剂（例如，IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 抑制性多核苷酸；可溶的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽（包括其片段和/或融合蛋白）；抑制性抗 IL-17F、抗 IL-17R、或抗 IL-17RC 抗体；和/或拮抗性小分子，等）。在确定是否施用 IL-17F 信号传递-相关的分子时要考虑的几种药物基因组学方案是本领域技术人员众所周知的，包括基因组范围的关联，候选基因方案和基因表达图谱绘制。将本发明的药物组合物配制与它们的预期给药途径相容（例如，口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体）。给药途径的其它非限制性实例包括肠胃外的（例如，静脉内的）、皮内的、皮下的、口服的（例如，吸入）、透皮的（局部的）、透粘膜的和直肠的给药。与每种预期途径相容的药物组合物是本领域众所周知的。

当与药学上可接受的载体相组合时，IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂可以用作药物组合物。除了 IL-17F 信号传递-相关的分子（例如，IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂）之外，这样的组合物可以含有载体、各种稀释剂、填充剂、盐、缓冲液、稳定剂、增溶剂和本领域众所周知的其它材料。术语“药学上可接受的”指不会妨碍活性成分的生物活性的有效性的无毒材料。载体的特征取决于给药途径。

本发明的药物组合物还可以含有细胞因子、淋巴因子或其它血细胞生成因子，例如 M-CSF，GM-CSF，IL-1，IL-2，IL-3，IL-4，IL-5，IL-6，

IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, G-CSF, 干细胞因子和促红细胞生成素。药物组合物还可以包括下面更详细地描述的抗细胞因子抗体。药物组合物可以含有溶血栓的或抗血栓形成的因子, 例如纤溶酶原活化因子和因子 VIII。药物组合物还可以含有下面更详细地描述的其它抗炎剂。这样的其它的因子和/或试剂可以包含在药物组合物中, 以与 IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂产生协同作用, 或使 IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂造成的副作用最小化。相反地, IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂可以包含在特定细胞因子、淋巴因子、其它血细胞生成因子、溶血栓的或抗血栓形成的因子、或抗炎剂的制剂中, 以使细胞因子、淋巴因子、其它血细胞生成因子、溶血栓的或抗血栓形成的因子、或抗炎剂的副作用最小化。

本发明的药物组合物可以是脂质体形式, 其中 IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂与其它药学上可接受的载体以及两亲试剂相组合, 所述两亲试剂例如以微粒、不溶单层、液晶或在含水溶液中的片层存在。适用于脂质体制剂的脂类包括但不限于, 甘油一酯, 甘油二酯, 磷脂, 溶血卵磷脂, 磷脂, 皂苷, 胆酸, 等。

本文使用的术语“治疗有效量”指药物组合物或方法中每种活性组分的总量, 其足以表现出有意义的患者益处, 例如, 这样的状况的症状的缓解、愈合或愈合速率的提高。当应用于单独施用的单一活性成分时, 该术语指单独的成分。当应用于组合时, 该术语指产生治疗作用的活性成分的组合量, 无论组合地、先后地还是同时地施用。

在实践本发明的治疗方法或用途时, 将治疗有效量的 IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂施用给受试者, 例如, 哺乳动物(例如, 人)。可以根据本发明的方法单独地或与其它治疗组合地施用 IL-17F 信号传递-相关的分子, 所述其它治疗例如采用细胞因子、淋巴因子或其它血细胞生成因子、或抗炎剂的治疗。当与一种或多种试剂共同施用时, 可以与第二种试剂同时或先后施用 IL-17F 信号传递拮抗剂。如果先后施用, 主治医师会决定施用例如 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽(或其融合蛋白)和/或抑制性抗体与其它试剂的组合的适当次序。

当口服施用治疗有效量的 IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂时, 粘合剂是片剂、胶囊、粉剂、溶液或酞剂的形式。当以片剂形式施用时, 本发明的药物组合物可以另外含有固体载体, 例如明胶或佐剂。

片剂、胶囊和粉剂含有约 5-95%的粘合剂，优选约 25-90%粘合剂。当以液体形式施用时，可以加入液体载体，例如水，石油，动物或植物来源的油，例如花生油，矿物油，大豆油，或芝麻油，或合成油。液体形式的药物组合物还可以含有生理盐水溶液，葡萄糖或其它糖溶液，或甘油，例如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。当以液体形式施用时，药物组合物含有约 0.5-90 重量%的粘合剂和优选约 1-50 重量%的粘合剂。

当通过静脉内、表皮或皮下注射施用治疗有效量的 IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂时，IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂是无热原的肠胃外可接受的含水溶液形式。这样的肠胃外可接受的具有适当 pH、等渗性、稳定性等的蛋白溶液的制备，属于本领域普通常识。用于静脉内、表皮或皮下注射的优选药物组合物应当含有 IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂以及等渗介质，例如氯化钠注射液、林格注射液、葡萄糖注射液、葡萄糖和氯化钠注射液、乳酸林格注射液或本领域已知的其它介质。本发明的药物组合物还可以含有稳定剂、防腐剂、缓冲剂、抗氧化剂或本领域技术人员已知的其它添加剂。

IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂在本发明药物组合物中的量，取决于待治疗的状况的性质和严重性，和患者已经接受的先前治疗的性质。最后，主治医师会决定治疗每位单个患者的 IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂的量。开始时，主治医师会施用低剂量的 IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂，并观察患者的反应。可以施用更大剂量的 IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂，直到观察到患者的最佳治疗效果，此时剂量通常不再进一步增加。预见到用于实践本发明方法的不同药物组合物含有每 kg 体重约 0.1 μ g-约 100 mg 的 IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂，例如，IL-17R 和/或 IL-17RC(包括其融合蛋白)。

使用本发明药物组合物静脉内 (i.v.) 治疗的持续时间可以随待治疗的疾病的严重性、每位单个患者的状况和潜在特应性反应而变化。预见到，连续静脉内施用 IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂的每次应用的持续时间可以是在 12-24 小时的范围内。还预见到使用本发明药物组合物的皮下 (s.c.) 治疗。这些治疗可以每天、每周或更优选每 2 周或每月地施用。还预见到，当 IL-17F 激动剂或 IL-17F 信号传递拮抗剂是小分子 (例如，口服递送) 时，治疗可以每天 1 次、每天 2 次、每天 3 次等地施用。最后，主治医师会决定使用本发明的药物组合物，静脉内

或皮下治疗、或使用小分子治疗的适当持续时间，和施用治疗的时机。

预期本发明的多核苷酸和蛋白会表现出下面鉴别出的一种或多种用途或生物活性（包括与本文引用的测定相关的那些）。通过施用或使用这样的蛋白，或通过施用或使用编码这样的蛋白的多核苷酸（例如，在基因治疗中，或适用于导入 DNA 的载体），可以提供本发明蛋白的所述用途或活性。

IL-17F 信号传递拮抗剂的减少炎症的用途

在一个方面，本发明表征了减少炎症反应的方法，所述炎症反应例如由 IL-21 信号传递引起。该方法可以包含，使细胞群体接触 IL-17F 信号传递拮抗剂（例如，IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 抑制性多核苷酸；可溶的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽（包括其片段和/或融合蛋白）；抑制性抗 IL-17F、抗 IL-17R、或 IL-17RC 抗体；和/或拮抗性小分子，等），其量足以抑制细胞或群体的 IL-17F 活性。还可以将 IL-17F 信号传递的拮抗剂施用给需要抑制 IL-17F 信号传递（和/或 IL-21 信号传递）的受试者。这些状况包括但不限于，炎性病症，例如，自身免疫病（例如，关节炎（包括类风湿关节炎）、银屑病，系统性红斑狼疮，多发性硬化）、呼吸系统疾病（例如，COPD，囊性纤维化，哮喘，变态反应）、移植排斥（包括实体器官移植排斥）、和炎性肠病（例如，溃疡性结肠炎，克隆氏病）。

这些方法至少部分地基于下述发现，即干扰 IL-17F 信号传递（例如，通过使用干扰性抗 IL-17F 抗体）会减少 IL-17F 相关的炎症反应，例如，原代成纤维细胞样滑膜细胞的细胞因子生产（实施例 4.2）。因此，IL-17F 信号传递拮抗剂，即抑制 IL-17F 活性的分子（例如，抗 IL-17F 抗体），可以用于体内减少炎症，例如，用于治疗或预防与 IL-17F 信号传递相关的病症和/或与 IL-21 信号传递相关的病症。

使用 IL-17F 信号传递拮抗剂的方法还可以用于抑制 IL-17F 炎性活性，因而可以用于治疗或预防许多免疫病症。可以治疗或预防的病症的非限制性实例包括但不限于，移植排斥，自身免疫病（包括，例如，糖尿病，关节炎（包括类风湿关节炎，青少年类风湿关节炎，骨关节炎，银屑病关节炎，反应性关节炎）、多发性硬化，脑脊髓炎，重症肌无力，系统性红斑狼疮（SLE）、自身免疫性甲状腺炎，皮炎（包括特应性皮炎和湿疹性皮炎）、莱特尔综合征，银屑病，干燥综合征，克隆氏病，

口疮性溃疡，虹膜炎，结膜炎，角结膜炎，溃疡性结肠炎，脊柱关节病，强制性脊柱炎，内源性哮喘，变应性哮喘，皮肤红斑狼疮，硬皮病，阴道炎，直肠炎，药疹，麻风病逆转反应，麻风结节性红斑，自身免疫性葡萄膜炎，变应性脑脊髓炎，急性坏死性出血性脑病，特发性双侧进展性感觉神经性耳聋，再生障碍性贫血，单纯红细胞性贫血，特发性血小板减少症，多软骨炎，韦格纳肉芽肿病，慢性活动性肝炎，史蒂文斯-约翰逊综合征，特发性口炎性腹泻，扁平苔藓，格雷夫斯病，结节病，原发性胆汁性肝硬变，后葡萄膜炎，和间质性肺纤维化）、移植物抗宿主病，以及变态反应，例如特应性变态反应。使用包含施用 IL-17F 信号传递拮抗剂（例如，抑制性 IL-17F 抗体）的方法可以治疗的优选病症包括但不限于，炎性病症，例如，自身免疫病（例如，关节炎（包括类风湿关节炎）、银屑病，系统性红斑狼疮，多发性硬化）、呼吸系统疾病（例如，COPD，囊性纤维化，哮喘，变态反应）、移植排斥（包括实体器官移植排斥）、和炎性肠病（例如，溃疡性结肠炎，克隆氏病）。

使用 IL-17F 信号传递拮抗剂（例如，IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 抑制性多核苷酸；可溶的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽（包括其片段和/或融合蛋白）；抑制性抗 IL-17F、抗 IL-17R、或 IL-17RC 抗体；和/或拮抗性小分子，等），可以以许多方式调控免疫应答。下调可以是抑制或阻断已经在发展的炎症反应的形式，或可以包含预防炎症反应的诱发。

在一个实施方案中，在组合疗法中施用 IL-17F 信号传递拮抗剂，包括其药物组合物，即与可以用于治疗病理性状况或病症（例如免疫病症和炎性疾病）的其它试剂相组合，例如治疗剂。本上下文中的术语“相组合”指，所述试剂基本上同时、同时或先后施用。如果先后施用，在开始施用第二种化合物时，两种化合物中的第一种优选地在治疗部位仍然可以以有效浓度检测到。

例如，组合治疗可以包括一种或多种 IL-17F 信号传递拮抗剂（例如，IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 抑制性多核苷酸；可溶的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽（包括其片段和/或融合蛋白）；抑制性抗 IL-17F、抗 IL-17R、或 IL-17RC 抗体；和/或拮抗性小分子，等），它们与一种或多种其它治疗剂共同配制和/或共同施用，所述其它治疗剂例如，一种或多种细胞因子和生长因子抑制剂，免疫抑制剂，抗炎剂，代谢抑制剂，酶抑制剂和/或细胞毒性剂或细胞抑制剂，如下面详述。此外，一种或多种

本文所述的 IL-17F 信号传递拮抗剂可以与 2 种或多种本文所述的治疗剂组合使用。这样的组合治疗可以有利地使用更低剂量的给药治疗剂，从而避免与各种单一疗法相关的可能的毒性或并发症。此外，本文公开的治疗剂可以作用于与 IL-17F 受体信号传递途径不同的途径，因而预期会增强和/或协同 IL-17F 信号传递拮抗剂的作用。

与 IL-17F 信号传递拮抗剂组合使用的优选治疗剂是干扰炎症反应的不同阶段的那些试剂。在一个实施方案中，可以将一种或多种本文公开的 IL-17F 信号传递拮抗剂与一种或多种其它试剂共同配制和/或共同施用，所述其它试剂例如其它细胞因子或生长因子拮抗剂（例如，可溶的受体，肽抑制剂，小分子，配体融合体）；或结合其它靶的抗体或其抗原结合片段（例如，结合其它细胞因子或生长因子、它们的受体、或其它细胞表面分子的抗体）；和抗炎细胞因子或其激动剂。可以与本文所述 IL-17F 信号传递拮抗剂组合使用的试剂的非限制性实例包括但不限于，一种或多种白介素（IL）或它们的受体的拮抗剂，例如，IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-21 和 IL-22 的拮抗剂；细胞因子或生长因子或它们的受体，例如肿瘤坏死因子（TNF）、LT、EMAP-II、GM-CSF、FGF 和 PDGF 的拮抗剂。IL-17F 信号传递拮抗剂还可以与抑制剂相组合，例如，细胞表面分子的抗体，所述细胞表面分子例如 CD2、CD3、CD4、CD8、CD20（例如，CD20 抑制剂利妥希玛（RITUXAN[®]）），CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80（B7.1）、CD86（B7.2）、CD90、或它们的配体，包括 CD154（gp39 或 CD40L），或 LFA-1/ICAM-1 和 VLA-4/VCAM-1（Yusuf-Makagiansar 等（2002）Med. Res. Rev. 22:146-67）。可以与本文所述 IL-17F 信号传递拮抗剂组合使用的优选拮抗剂包括 IL-1、IL-12、TNF α 、IL-15、IL-18、和 IL-22 的拮抗剂。

那些试剂的实例包括：IL-12 拮抗剂，例如嵌合的、人源化的、人的或体外产生的抗体（或其抗原结合片段），它们结合 IL-12（优选人 IL-12），例如，在 WO 00/56772 中公开的抗体；IL-12 受体抑制剂，例如，人 IL-12 受体的抗体；和 IL-12 受体（例如，人 IL-12 受体）的可溶片段。IL-15 拮抗剂的实例包括抗 IL-15 或其受体的抗体（或其抗原结合片段），例如，人 IL-15 或其受体的嵌合的、人源化的、人的或体外产生的抗体，IL-15 受体的可溶片段和 IL-15 结合蛋白。IL-18 拮抗剂的实

例包括人 IL-18 的抗体，例如，嵌合的、人源化的、人的或体外产生的抗体（或其抗原结合片段），IL-18 受体的可溶片段和 IL-18 结合蛋白（IL-18BP）。IL-1 拮抗剂的实例包括白介素-1-转化酶（ICE）抑制剂，例如 Vx740，IL-1 拮抗剂，例如，IL-1RA（阿那白滞素，KINERETTM，Amgen）、sIL1RII（Immunex）、和抗 IL-1 受体抗体（或其抗原结合片段）。

TNF 拮抗剂的实例包括 TNF（例如，人 TNF α ）的嵌合的、人源化的、人的或体外产生的抗体（或其抗原结合片段），例如（HUMIRATM，D2E7，人 TNF α 抗体）、CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356（人源化的抗 TNF α 抗体；Celltech/Pharmacia）、cA2（嵌合的抗 TNF α 抗体；REMICADE[®]，Centocor）；抗 TNF 抗体片段（例如，CPD870）；TNF 受体的可溶片段，例如，p55 或 p75 人 TNF 受体或其衍生物，例如，75 kDTNFR-IgG（75 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白，ENBREXTM；Immunex）、p55 kDTNFR-IgG（55 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白（LENERCEPT[®]））；酶拮抗剂，例如，TNF α 转化酶（TACE）抑制剂（例如， α -磺酰基异羟肟酸衍生物和 N-羧基甲酰胺 TACE 抑制剂 GW 3333，-005，或-022）；和 TNF-bp/s-TNFR（可溶的 TNF 结合蛋白）。优选的 TNF 拮抗剂是 TNF 受体的可溶片段，例如，p55 或 p75 人 TNF 受体或其衍生物，例如，75 kDTNFR-IgG 和 TNF α 转化酶（TACE）抑制剂。

在其它实施方案中，本文所述 IL-17F 信号传递拮抗剂可以与下述的一种或多种物质组合施用：IL-13 拮抗剂，例如，可溶的 IL-13 受体（sIL-13）和/或抗 IL-13 的抗体；IL-2 拮抗剂，例如，DAB 486-IL-2 和/或 DAB 389-IL-2（IL-2 融合蛋白，Seragen），和/或 IL-2R 的抗体，例如，抗-Tac（人源化的抗 IL-2R，Protein Design Labs）。另一种组合包括 IL-17F 信号传递拮抗剂（例如，IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 抑制性多核苷酸；可溶的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽（包括其片段和/或融合蛋白）；抑制性抗 IL-17F、抗 IL-17R、或 IL-17RC 抗体；和/或拮抗性小分子，等）、拮抗性小分子、和/或抑制性抗体与下述试剂的组合：非消除性抗-CD4 抑制剂（IDEC-CE9.1/SB 210396；非消除性灵长类动物化的抗-CD4 抗体；IDEC/SmithKline）。其它优选的组合包括共刺激途径 CD80（B7.1）或 CD86（B7.2）的拮抗剂，包括抗体，可溶的受体或拮抗性配体；以及 p-选择蛋白糖蛋白配体（PSGL），抗炎细胞因子，例如，IL-4

(DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; 重组 IL-10 DNAX/Schering); IL-13 和 TGF- β 及其激动剂(例如, 激动剂抗体)。

在其它实施方案中, 一种或多种 IL-17F 信号传递拮抗剂可以与一种或多种抗炎药物、免疫抑制剂、或代谢或酶抑制剂共同配制和/或共同施用。可以与本文所述 IL-17F 信号传递拮抗剂(例如, IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 抑制性多核苷酸; 可溶的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽(包括其片段和/或融合蛋白); 抑制性抗 IL-17F、抗 IL-17R、或 IL-17RC 抗体; 和/或拮抗性小分子, 等)组合施用的药物或抑制剂的非限制性实例包括但不限于, 下述的一种或多种: 非甾体类抗炎药(NSAIDs)、例如, 布洛芬, 替尼达普, 萘普生, 美洛昔康, 吡罗昔康, 双氯芬酸, 和茚甲新; 柳氮磺胺吡啶; 皮质类固醇, 例如泼尼松龙; 细胞因子抑制性抗炎药(CSAIDs); 核苷酸生物合成抑制剂, 例如, 嘌呤生物合成抑制剂, 叶酸拮抗剂(例如, 甲氨蝶呤(N-[4-[(2,4-二氨基-6-蝶啶基)甲基]甲基氨基]苯甲酰基]-L-谷氨酸); 和嘧啶生物合成抑制剂, 例如, 二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)抑制剂(例如, 来氟米特)。与 IL-17F 拮抗剂组合施用的优选治疗剂包括 NSAIDs, CSAIDs, (DHODH)抑制剂(例如, 来氟米特), 和叶酸拮抗剂(例如, 甲氨蝶呤)。

其它抑制剂的实例包括下述的一种或多种: 皮质类固醇(口服的、吸入的和局部注射剂); 免疫抑制剂, 例如, 环孢菌素, 他克莫司(FK-506); 和 mTOR 抑制剂, 例如, 西罗莫司(雷帕霉素-RAPAMUNE™或雷帕霉素衍生物, 例如, 可溶的雷帕霉素衍生物(例如, 酯雷帕霉素衍生物, 例如, CCI-779); 干扰促炎细胞因子的信号传递的试剂, 例如 TNF α 或 IL-1(例如 IRAK, NIK, IKK, p38 或 MAP 激酶抑制剂); COX2 抑制剂, 例如, 塞来考昔, 罗非考昔及其变体; 磷酸二酯酶抑制剂, 例如, R973401(磷酸二酯酶类型 IV 抑制剂); 磷脂酶抑制剂, 例如, 胞质溶胶磷脂酶 2(cPLA2)的抑制剂(例如, 三氟甲酮类似物); 血管内皮细胞生长因子抑制剂或生长因子受体, 例如, VEGF 抑制剂和/或 VEGF-R 抑制剂; 和血管发生抑制剂。与 IL-17F 信号传递拮抗剂(例如, IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 抑制性多核苷酸; 可溶的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽(包括其片段和/或融合蛋白); 抑制性抗 IL-17F、抗 IL-17R、或 IL-17RC 抗体; 和/或拮抗性小分子, 等)组合使用的优选治疗剂是: 免疫抑制剂, 例如, 环孢菌素, 他克莫司(FK-506); mTOR

抑制剂,例如,西罗莫司(雷帕霉素)或雷帕霉素衍生物,例如,可溶的雷帕霉素衍生物(例如,酯雷帕霉素衍生物,例如,CCI-779);COX2抑制剂,例如,塞来考昔及其变体;和磷脂酶抑制剂,例如,胞质溶胶磷脂酶2(cPLA2)的抑制剂,例如,三氟甲酮类似物。

可以与IL-17F拮抗剂相组合的治疗剂的其它实例包括下述物质的一种或多种:6-巯基嘌呤(6-MP);硫唑嘌呤;柳氮磺胺吡啶;美沙拉秦;奥沙拉秦;氯喹/羟氯喹(PLAQUENIL®);青霉胺;aurothiornalate(肌肉内和口服);硫唑嘌呤;秋水仙素; β -2肾上腺素受体激动剂(柳丁氨醇,特布他林,沙美特罗);黄嘌呤(茶碱,氨茶碱);色甘酸酯;奈多罗米;酮替芬;异丙托铵和oxitropium;麦考酚酸莫酯;腺苷激动剂;抗血栓形成剂;补体抑制剂;和肾上腺素能药。

在下面进一步详细讨论了本文公开的IL-17F信号传递拮抗剂与其它治疗剂的组合用于治疗或预防与IL-17F信号传递相关的特定病症的用途。

可以与IL-17F信号传递拮抗剂相组合的用于治疗或预防关节炎病症(例如,类风湿关节炎,炎性关节炎,类风湿关节炎,青少年类风湿关节炎,骨关节炎和银屑病关节炎)的试剂的非限制性实例包括下述的一种或多种:本文所述的IL-12拮抗剂;NSAIDs;CSAIDs;TNF,例如,TNF α ,本文所述的拮抗剂;本文所述的非消除性的抗-CD4抗体;本文所述的IL-2拮抗剂;抗炎细胞因子,例如,IL-4,IL-10,IL-13和TGF α ,或其激动剂;本文所述的IL-1或IL-1受体拮抗剂;本文所述的磷酸二酯酶抑制剂;本文所述的Cox-2抑制剂;伊洛前列素:甲氨蝶呤;沙利度胺和沙利度胺相关药物(例如,Celgen);来氟米特;纤溶酶原激活抑制剂,例如,氨甲环酸;细胞因子抑制剂,例如,T-614;前列腺素E1;硫唑嘌呤;白介素-1转化酶(ICE)的抑制剂;zap-70和/或lck抑制剂(酪氨酸激酶zap-70或lck的抑制剂);本文所述的血管内皮细胞生长因子或血管内皮细胞生长因子受体的抑制剂;本文所述的血管发生抑制剂;皮质类固醇抗炎药(例如,SB203580);TNF-转化酶抑制剂;IL-11;IL-13;IL-17抑制剂;金;青霉胺;氯喹;羟氯喹;苯丁酸氮芥;环磷酰胺;环孢菌素;全淋巴辐照;抗胸腺细胞球蛋白;CD5-毒素;口服肽和胶原;氯苯扎利二钠;细胞因子调节剂(CRA)HP228和HP466(Houghten Pharmaceuticals, Inc.);ICAM-1反义硫代磷酸酯寡脱氧核

昔酸 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); 可溶的补体受体 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); 泼尼松; 奥古蛋白; 糖胺聚糖多硫酸盐; 米诺环素 (MINOCIN[®]); 抗 IL2R 抗体; 海洋生物和植物脂类 (鱼和植物种子脂肪酸); 金诺芬; 保泰松; 甲氯芬那酸; 氟芬那酸; 静脉内免疫球蛋白; 弃白通; 麦考酚酸 (RS-61443); 他克莫司 (FK-506); 西罗莫司 (雷帕霉素); 阿普劳特 (therafectin); 克拉屈滨 (2-氯脱氧腺苷); 和阿扎立平。优选的组合包括一种或多种 IL-17F 信号传递拮抗剂 (例如, IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 抑制性多核苷酸; 可溶的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽 (包括其片段和/或融合蛋白); 抑制性抗 IL-17F、抗 IL-17R、或 IL-17RC 抗体; 和/或拮抗性小分子, 等) 与甲氨蝶呤或来氟米特的组合, 且在中等或严重类风湿关节炎情况下, 与环孢菌素相组合。

可与 IL-17F 信号传递拮抗剂组合治疗关节炎病症的抑制剂的优选实例包括 TNF 拮抗剂 (例如, 嵌合的、人源化的、人的或体外产生的抗体, 或其抗原结合片段, 它们会结合 TNF; TNF 受体的可溶片段, 例如, p55 或 p75 人 TNF 受体或其衍生物, 例如, 75 kD TNFR-IgG (75 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白, ENBREL[™]), p55 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白; TNF 酶拮抗剂, 例如, TNF α 转化酶 (TACE) 抑制剂); IL-12, IL-15, IL-18, IL-22 的拮抗剂; T 细胞和 B 细胞消除剂 (例如, 抗-CD4 或抗-CD22 抗体); 小分子抑制剂, 例如, 甲氨蝶呤和来氟米特; 西罗莫司 (雷帕霉素) 及其类似物, 例如, CCI-779; cox-2 和 cPLA2 抑制剂; NSAIDs; p38 抑制剂, TPL-2, Mk-2 和 NF κ b 抑制剂; RAGE 或可溶的 RAGE; P-选择蛋白或 PSGL-1 抑制剂 (例如, 小分子抑制剂, 其抗体, 例如, P-选择蛋白的抗体); 雌激素受体 β (ERB) 激动剂或 ERB-NF κ b 拮抗剂。可以与一种或多种 IL-17F 信号传递拮抗剂 (例如, IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 抑制性多核苷酸; 可溶的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽 (包括其片段和/或融合蛋白); 抑制性抗 IL-17F、抗 IL-17R、或 IL-17RC 抗体; 和/或拮抗性小分子, 等) 共同施用和/或共同配制的最优选其它治疗剂包括下述的一种或多种: TNF 受体的可溶片段, 例如, p55 或 p75 人 TNF 受体或其衍生物, 例如, 75 kD TNFR-IgG (75 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白, ENBREL[™]); 甲氨蝶呤, 来氟米特, 或西罗莫司 (雷帕霉素) 或其类似物, 例如, CCI-779。

可以与 IL-17F 信号传递拮抗剂相组合的用于治疗或预防多发性硬化的试剂的非限制性实例包括下述：干扰素，例如，干扰素- α （例如，AVONEX™；Biogen）和干扰素-1b（BETASERON™ Chiron/Berlex）；共聚物 1（Cop-1；COPAXONE™ Teva Pharmaceutical Industries, Inc.）；高压氧；静脉内免疫球蛋白；克拉屈滨；本文所述的 TNF 拮抗剂；皮质类固醇；泼尼松龙；甲基泼尼松龙；硫唑嘌呤；环磷酰胺；环孢菌素；环孢菌素 A，甲氨蝶呤；4-氨基吡啶；和替扎尼定。可以与 IL-17F 信号传递拮抗剂相组合的其它拮抗剂包括：其它人细胞因子或生长因子的抗体或拮抗剂，所述人细胞因子或生长因子例如，TNF，LT，IL-1，IL-2，IL-6，IL-7，IL-8，IL-12 IL-15，IL-16，IL-18，EMAP-11，GM-CSF，FGF 和 PDGF。本文所述的 IL-17F 信号传递拮抗剂可以与细胞表面分子的抗体相组合，所述细胞表面分子例如 CD2，CD3，CD4，CD8，CD25，CD28，CD30，CD40，CD45，CD69，CD80，CD86，CD90 或它们的配体。IL-17F 信号传递拮抗剂还可以与下述试剂相组合：例如甲氨蝶呤，环孢菌素，FK506，雷帕霉素，麦考酚酸莫酯，来氟米特，NSAIDs，例如，布洛芬，皮质类固醇，例如泼尼松龙，磷酸二酯酶抑制剂，腺苷激动剂，抗血栓形成剂，补体抑制剂，肾上腺素能药，干扰本文所述促炎细胞因子的信号传递的试剂，IL-1b 转化酶抑制剂（例如，Vx740）、抗-P7s，PSGL，TACE 抑制剂，T-细胞信号传递抑制剂，例如激酶抑制剂，金属蛋白酶抑制剂，柳氮磺吡啶，氮胸苷，6-巯基嘌呤，血管紧张素转化酶抑制剂，可溶的细胞因子受体及其衍生物，如本文所述和抗炎细胞因子（例如 IL-4，IL-10，IL-13 和 TGF）。

可以与 IL-17F 信号传递拮抗剂相组合的用于多发性硬化的治疗剂的优选实例包括：干扰素- β ，例如，IFN β -1a 和 IFN β -1b；copaxone，皮质类固醇，IL-I 抑制剂，TNF 抑制剂，CD40 配体和 CD80 两者的抗体，IL-12 拮抗剂。

可以与 IL-17F 信号传递拮抗剂（例如，IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 抑制性多核苷酸；可溶的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽（包括其片段和/或融合蛋白）；抑制性抗 IL-17F、抗 IL-17R、或 IL-17RC 抗体；和/或拮抗性小分子，等）相组合的用于治疗或预防炎性肠病（例如，克隆氏病，溃疡性结肠炎）的非限制性实例包括：布地奈德；表皮生长因子；皮质类固醇；环孢菌素；柳氮磺吡啶；氨基水杨酸盐；6-巯基嘌呤；硫

唑嘌呤；甲硝哒唑；脂肪氧化酶抑制剂；美沙拉嗪；奥沙拉嗪；巴柳氮；抗氧化剂；血栓素抑制剂；IL-1 受体拮抗剂；抗 IL-1 单克隆抗体；抗 IL-6 单克隆抗体；生长因子；弹性酶抑制剂；吡啶基-咪唑化合物；本文所述的 TNF 拮抗剂；IL-4, IL-10, IL-13 和/或 TGF β 细胞因子或其激动剂（例如，激动剂抗体）；IL-11；葡萄糖醛酸苷-或葡聚糖-缀合的泼尼松龙、地塞米松或布地奈德的前药；ICAM-1 反义硫代磷酸化寡脱氧核苷酸（ISIS 2302；Isis Pharmaceuticals, Inc.）；可溶的补体受体 1（TP10；T Cell Sciences, Inc.）；缓释美沙拉嗪；甲氨蝶呤；血小板激活因子（PAF）的拮抗剂；环丙沙星；和利多卡因。

在一个实施方案中，IL-17F 信号传递拮抗剂（例如，IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 抑制性多核苷酸；可溶的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽（包括其片段和/或融合蛋白）；抑制性抗 IL-17F、抗 IL-17R、或 IL-17RC 抗体；和/或拮抗性小分子，等）可以与一种或多种靶定其它靶的抗体组合使用，所述其它靶参与调节免疫应答，例如，移植排斥。可以与本发明的 IL-17F 信号传递拮抗剂相组合的用于治疗或预防免疫应答的试剂的非限制性实例包括：其它细胞表面分子的抗体，所述其它细胞表面分子包括但不限于 CD25（白介素-2 受体-a）、CD11a（LFA-1）、CD54（ICAM-1）、CD4、CD45、CD28/CTLA4（CD80（B7.1），例如，CTLA4 Ig-阿巴他塞（ORENCIA[®]）），ICOSL，ICOS 和/或 CD86（B7.2）。在另一个实施方案中，IL-17F 信号传递拮抗剂与一种或多种普通免疫抑制剂（例如环孢菌素 A 或 FK506）组合使用。

在其它实施方案中，IL-17F 信号传递拮抗剂（例如，IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 抑制性多核苷酸；可溶的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽（包括其片段和/或融合蛋白）；抑制性抗 IL-17F、抗 IL-17R、或 IL-17RC 抗体；和/或拮抗性小分子，等）用作抗自身免疫病症、炎性疾病等的疫苗佐剂。用于治疗这些类型的病症的佐剂的组合，适用于与许多抗原相组合，所述抗原来自参与自身免疫的被靶定的自身抗原（即自体抗原），例如，髓磷脂碱性蛋白；炎性自身抗原，例如，淀粉样蛋白肽蛋白，或移植物抗原，例如，同种异体抗原。抗原可以包含源自蛋白的肽或多肽，以及下述任一种物质的片段：糖，蛋白，多核苷酸或寡核苷酸，自身抗原，淀粉样蛋白肽蛋白，移植物抗原，变应原，或其它大分子组分。在有些情况下，在抗原组合物中包含超过一种抗原。

例如，需要的含有本发明的佐剂组合、用于调控脊椎动物宿主中对变应原的反应的疫苗，包括含有变应原或其片段的那些。这样的变应原的实例记载在美国专利号 5,830,877 和公开的国际专利申请号 WO 99/51259，它们在本文中整体引作参考，其包括花粉，昆虫毒液，动物皮屑，真菌孢子和药物（例如青霉素）。疫苗会干扰 IgE 抗体的生产，这是变态反应的一个已知原因。在另一个实例中，需要的含有本发明的佐剂组合、用于预防或治疗脊椎动物宿主的特征在于淀粉样蛋白沉积的疾病的疫苗，包括含有淀粉样蛋白肽蛋白（APP）的部分的那些。该疾病分别称作阿尔茨海默病，淀粉样变性病或产生淀粉样蛋白的疾病。因而，本发明的疫苗包括本发明的佐剂组合+A β 肽，以及 A β 肽的片段、和 A β 肽或其片段的抗体。

本领域众所周知：1）下调抗原呈递细胞功能的方法；和 2）控制免疫抑制的组合治疗的方法（参见，例如，Xiao 等（2003）BioDrugs 17:103-11；Kuwana（2002）Hum. Immunol. 63:1156-63；Lu 等（2002）Transplantation 73:S19-S22；Rifle 等（2002）Transplantation 73:S1-S2；Mancini 等（2004）Crit. Care. Nurs. Q. 27:61-64）。

因此，本发明的另一个方面涉及试剂盒，其用于施用 IL-17F 信号传递拮抗剂（例如，IL-17F、IL-17R、和/或 IL-17RC 抑制性多核苷酸；可溶的 IL-17R 和/或 IL-17RC 多肽（包括其片段和/或融合蛋白）；抑制性抗 IL-17F、抗 IL-17R、或 IL-17RC 抗体；和/或拮抗性小分子，等）及其它治疗性化合物。在一个实施方案中，所述试剂盒包含一种或多种配制在药用载体中的粘合剂、和至少一种根据需要配制在一种或多种分开的药物制剂中的试剂（例如，治疗剂）。

在本申请中引用的所有参考文献、专利、和公开的专利申请的完整内容，都在本文引作参考。

实施例

下面的实施例提供了本发明的解释性实施方案，但是不以任意方式限制本发明。本领域普通技术人员会认识到，在本发明的范围内包括许多其它的实施方案。

实施例不包括常规方法的详细描述，这样的方法用于构建载体，将编码多肽的基因插入载体和质粒，将载体和质粒导入宿主细胞和在宿主

细胞中从载体和质粒表达多肽。这样的方法是本领域技术人员众所周知的。

实施例 1: IL-17F-介导的炎症反应, 及其参与炎性病症, 例如, 类风湿关节炎, 炎性呼吸系统病症和炎性肠病

实施例 1.1: 给未接触过抗原的小鼠施用人 IL-17F 会诱导中性粒细胞流入腹膜

观察到 IL-17F 处理会导致增加的蛋白聚糖分解和关节软骨降低的蛋白聚糖合成(Hymowitz 等(2001)EMBO J. 20:5332-41), 这提示 IL-17F 信号传递在关节组织的炎性疾病发展中的一种作用。实际上, 类风湿关节炎和骨关节炎患者的滑液样品表现出蛋白聚糖(包括, 例如, 聚集蛋白聚糖, 角蛋白和胶原)的降解(参见, 例如, Witter 等(1987) Arth. Rheum. 30:519-29 和 Yagi 等(2005) J. Orthop. Res. 23(5):1128-38), 体外关节炎模型通过展示基质和蛋白聚糖降解, 模仿该现象(Neidhart 等(2000) Arth. Rheum. 43:1719-28)。

另外, 在从哮喘患者分离的 BAL 样品(Kawaguchi 等(2002) J. Immunol.167:4430-35)和在从炎性肠病(例如, 溃疡性结肠炎或克隆氏病)患者分离的结肠样品中观察到的增加的 IL-17F 表达(Gurney 等(2003) GTCBIO Conference: Cytokines 和 Beyond), 提示 IL-17F 信号传递在肺和肠组织炎性病症中的另一种作用。为了研究 IL-17F 信号传递在炎症反应中的作用, 给未接触过抗原的小鼠腹膜内注射 PBS(作为对照)或 100 μ g 人 IL-17F (SEQ ID NO:2)。处理后数小时, 从外周血(PB; 1, 2, 4, 6, 8 和 10 h)和腹膜腔(PEC; 2, 4, 6, 8 和 10 h)取样, 测定每份样品中的绝对中性粒细胞数(ANC)。表 2 中的数据反映了 IL-17F 增加血和腹膜中的中性粒细胞数的能力。该作用可以解释在类风湿关节炎和慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者中观察到到的中性粒细胞增多。

表 2. 从注射了 PBS (n=5) 或 IL-17F (n=5) 的小鼠分离的外周血 (PB) 和腹膜腔 (PEC) 样品中的绝对中性粒细胞数 (ANC; 平均值 $\pm$ SEM)。星号表示相对于对照样品 p-值<0.05。

注射后小时	PB ANC x 10 ³ /uL		PEC ANC x 10 ⁵ /mL	
	PBS	IL-17F	PBS	IL-17F
1	1.24 $\pm$ 0.59	1.97 $\pm$ 0.45	-	-
2	0.15 $\pm$ 0.10	1.07 $\pm$ 0.25*	0.08 $\pm$ 0.05	2.28 $\pm$ 2.52
4	0.15 $\pm$ 0.08	0.75 $\pm$ 0.13*	0.00 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.15*
6	0.25 $\pm$ 0.13	0.93 $\pm$ 0.4*	0.04 $\pm$ 0.06	2.03 $\pm$ 1.35*
8	0.22 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.08	0.02 $\pm$ 0.02	1.20 $\pm$ 2.11
10	0.11 $\pm$ 0.09	0.48 $\pm$ 0.36	0.02 $\pm$ 0.03	2.06 $\pm$ 1.53*

实施例 1.2: IL-17F 信号传递在炎性关节病症中起作用

为了进一步评估 IL-17F 信号传递在炎症（尤其涉入关节疾病（例如，关节炎）的炎症反应）中的涉入，测定了 IL-17F 激活参与炎性细胞因子（即 NF- κ B）在原代软骨细胞中的转录的基本因子的能力。用表达 NF- κ B 报告基因系统的腺病毒感染（100 MOI）原代人或猪软骨细胞，所述 NF- κ B 报告基因系统会通过测量由 NF- κ B-反应性启动子控制的萤光素酶基因的表达，检测内源 NF- κ B 的激活（即 NF- κ B 从胞质向核中的移位）（BD Mercury Pathway Profiling systems, BD Biosciences, Palo Alto, CA）。48-72 小时后，用不同浓度的 IL-17A（SEQ ID NO:4）或 IL-17F，培养感染的软骨细胞。与 IL-17A 或 IL-17F 一起温育 4 小时后，在 25 μ l 裂解缓冲液（Promega, Madison, WI）中于室温裂解细胞 20 min，使用自动化光度计测量 NF- κ B 的激活。数据表明，IL-17F 会以剂量依赖性的方式激活原代人软骨细胞（图 1A）和原代猪软骨细胞（图 1B）中的 NF- κ B。最后，激活 NF- κ B 到超过背景水平所需的 IL-17F 量类似于激活 NF- κ B 到超过背景水平所需的 IL-17A 量（图 1A）。

IL-17F 激活原代软骨细胞中细胞因子转录因子 NF- κ B 的能力，提示 IL-17F 在关节组织炎症中（例如，在关节炎的发展过程中）所起的作用包含诱导炎性细胞因子。为了测试 IL-17F 对关节组织的炎性细胞因子生产的作用，将从 2 位确诊类风湿关节炎（RA）的患者分离出的人成纤维

细胞样滑膜细胞涂布到 24 孔平板中的半汇合层上，在有或没有 150 ng/ml IL-17F 存在下培养。在 48 h 时收获上清液，使用多路细胞因子系统（Pierce-Bio, Rockford, IL）评估细胞因子生产。如图 2 所示，IL-17F 会诱导从 RA 患者分离的人成纤维细胞样滑膜细胞生产炎症细胞因子（例如 IL-6 和 IL-8）和趋化因子（例如 MCP-1 和 GRO- α ）。

IL-17F 激活原代软骨细胞中 NF- κ B 的能力和诱导来自 RA 患者的人成纤维细胞样滑膜细胞生产炎症细胞因子和趋化因子（尤其是参与中性粒细胞募集的趋化因子）的能力，支持了 IL-17F 在介导关节组织的炎症反应中的作用。这些数据与证实经受胶原诱导的关节炎的小鼠的爪子中与对照动物相比增强的 IL-17F 表达的数据（数据未显示）和在变性的关节软骨和关节间隙内存在中性粒细胞的数据（数据未显示）一起，提示 IL-17F 会通过诱导细胞因子和趋化因子生产，介导炎症关节疾病（例如，类风湿关节炎），这随后将免疫细胞（例如，中性粒细胞）募集到发炎部位，造成对周围组织的损害。

实施例 1.3：通过上调炎症趋化因子和细胞因子的生产，原代小鼠肺成纤维细胞对 IL-17F 作出反应

为了测试 IL-17F 在炎症呼吸系统疾病的发展中的作用，使鼠肺成纤维细胞（MFL）在 24 孔平板上生长至半汇合，并用 IL-17F（50 ng/ml）处理。在 48 h 时收获上清液，使用多路细胞因子系统（Pierce-Bio, Rockford, IL）评估细胞因子生产。图 3 表明，IL-17F 会诱导 MFL 生产炎症细胞因子（例如 IL-6）和趋化因子（例如 JE（CCL2）和 KC）。这些结果提示，IL-17F 通过诱导炎症细胞因子和白细胞化学引诱物的的生产，促进涉入肺炎性病征（例如，COPD，哮喘，变态反应，囊性纤维化）的炎症反应。

实施例 2：IL-17F 受体的表征

实施例 2.1：IL-17F 结合 IL-17R 和 IL-17RC

由于 IL-17F 与 IL-17 家族内的 IL-17A 具有同源性，也已经发现 IL-17A 和 IL-17F 通过 IL-17 受体发出信号，测定了 IL-17F 的结合 IL-17A 受体（即 IL-17R；SEQ ID NO:6）的能力。还测试了 IL-17F 的结合 IL-17RC（迄今尚未鉴别出它的配体的 IL-17 受体）的能力。

将 ELISA 平板与 1.5 μ g/ml 人 IL-17R-Ig（SEQ ID NO:34）或 1.5 μ g/ml

入 IL-17RC-Ig (SEQ ID NO:35) 一起温育过夜。用 PBS/1% BSA 洗涤平板, 并在室温 (RT) 与生物素-缀合的 IL-17A 或生物素-缀合的 IL-17F 的系列稀释液温育 2 小时。洗涤后, 加入饱和浓度的抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶 (HRP), 在室温另外温育平板 1 小时。使用 PBS/1% BSA 洗涤未结合的抗生物素蛋白-HRP, 使用 TBM 将 ELISA 显色。通过测量在 405 nm 的吸光度, 检测结合的 IL-17A 或 IL-17F。

图 4A 和 4B 分别证实了 IL-17F 与 IL-17R 和 IL-17RC 的结合, IL-17F 对 IL-17R 的亲和力大于对 IL-17RC 的亲和力 (IL-17R:IL-17F 的 EC_{50} 值 = 1.23 $\mu\text{g/ml}$; IL-17RC:IL-17F 的 EC_{50} 值 = 15 $\mu\text{g/ml}$)。但是, 尽管 IL-17F 会结合 IL-17R, 它对受体的亲和力小于 IL-17A 对相同受体的亲和力 (IL-17R: IL-17F 的 EC_{50} 值 = 1.23 $\mu\text{g/ml}$, IL-17R:IL-17A 的 EC_{50} 值 = 0.35 $\mu\text{g/ml}$; 图 4A)。

实施例 2.2: 抗 IL-17R 抗体和 IL-17RC-Ig 融合蛋白抑制 IL-17F 活性, 但是 IL-17R-Ig 融合蛋白不能

为了进一步表征 IL-17F 受体结合, 在有递增浓度的 IL-17R-Ig 融合蛋白、IL-17RC-Ig 融合蛋白或抗 IL-17R 抗体存在下, 用 0.5 ng/ml IL-17A 或 20 ng/ml IL-17F 刺激人成纤维细胞细胞 (10^4 细胞/孔)。24 h 后, 使用可商业上得到的 ELISA (R&D, Minneapolis, MN), 测定收集的上清液中的 GRO- α 浓度。基于标准曲线, 测定 GRO- α 的浓度。

图 5 证实了当与 IL-17A (A) 或 IL-17F (B) 一起温育时, 人成纤维细胞细胞增加 GRO- α 生产, 并进一步确证了实施例 1.2 的发现 (证实用 IL-17F 培养的人成纤维细胞样滑膜细胞增加生产炎性细胞因子)。图 5A 另外表明, 所有 3 种受体拮抗剂, 即 IL-17R-Ig (h17R.Fc)、IL-17RC-Ig (h17RH2.Fc) 和抗 IL-17R 抗体 (ahIL17R), 都抑制 IL-17A 的诱导 GRO- α 的能力。这些数据提示, IL-17A 会结合且需要 IL-17R 和 IL-17RC 两种受体, 以进行 IL-17A 信号传递。相反地, 仅仅抗 IL-17R 抗体和 IL-17RC-Ig 融合蛋白会显著抑制 IL-17F 活性, 但是 IL-17R-Ig 融合蛋白不能 (图 5B)。图 5B 所示的数据提示, IL-17F 会结合 IL-17R (参见图 4), 但是 IL-17F 介导的信号传递不需要该受体。总之, 这些数据提示 IL-17A 和 IL-17F 可以使用不同的受体来介导它们对人成纤维细胞的活性。

实施例 3: 抗 IL-17F 抗体的制备和表征

实施例 3.1: 抗 IL-17F 抗体的制备

给一组 5 只小鼠 (Jackson Labs, Maine) 注射 2 μg 编码人 IL-17F 的 cDNA。在金珠上沉淀纯化的质粒 cDNA 至浓度 1 μg cDNA/0.5 mg 金。使用 Helios 负载的基因, 每月在 2 个不重叠注射中皮内递送金珠和沉淀的 cDNA 到 11-周龄雌性 Balb/c 小鼠的腹部。每 4 周免疫这些动物, 在该阶段结束时取出脾。纯化的 IL-17F 蛋白以及 IL-17F cDNA, 再次免疫。加工脾, 以得到淋巴细胞悬浮液, 使用 50% (w/v) 聚乙二醇 1500, 将得到的悬浮液与骨髓瘤细胞系 653/P3 融合。

通过确定的方法 (Oi 和 Herzenberg (1980) in Selected Methods in Cellular Immunology, Mishel 和 Schigi, 编. W. J. Freeman Co., San Francisco, CA, p. 351)。将融合细胞以 2×10^5 细胞/孔的密度涂布在 96-孔微量滴定板上, 在 24 小时后进行 HAT 选择。通过固相和液相 ELISA, 鉴别分泌推定的抗 IL-17F 抗体的杂交瘤细胞。扩增含有在上述测定中阳性的杂交瘤的孔, 通过有限稀释进行克隆, 并冷冻保存。使用固相 ELISA, 测定抗体的同种型。使用纯化的人 IL-17F-Ig 包被 96-孔微量滴定板, 并用不同的同种型-特异性的生物素-缀合的山羊抗-小鼠 Ig 进行 G 检测 (Zymed, South San Francisco, CA)。加入缀合了辣根过氧化物酶 (HRP) 的抗生物素蛋白链菌素, 使用比色底物测量特异性结合的酶。

实施例 3.2: 有些抗 IL-17F 抗体抑制 IL-17F 结合 IL-17R

为了评价抗 IL-17F 抗体的抑制 IL-17F 结合 IL-17R 的能力, 通过改进实施例 2.1 所述的 ELISA, 进行抑制测定。简而言之, 将抗 IL-17F 抗体的系列稀释液与 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IL-17F 一起在室温预温育 1 h。然后, 将每种细胞因子: 抗体混合物加入 ELISA 平板的单独的孔中, 所述孔预先用 100 μl /孔的 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IL-17R-Ig 包被。将孔中的混合物在室温温育 1 h。用 PBS/1% BSA 洗涤平板后, 加入饱和浓度的抗生物素蛋白-HRP, 将平板在室温另外温育 1 h。使用 PBS/1% BSA 洗掉未结合的抗生物素蛋白-HRP。使用 TMB, 使测定显色。图 6 证实, 测试的 6 种抗体中的 5 种, 即抗 IL-17F-01, 抗 IL-17F-02, 抗 IL-17F-06, 抗 IL-17F-07 和 (尽管是以更少的程度) 抗 IL-17F-05, 能抑制 IL-17F 结合 IL-17R。相反地, 抗 IL-17F-03 抗体不能抑制 IL-17F 结合 IL-17R (图 6)。

实施例 3.3: 有些抗 IL-17F 抗体抑制 IL-17F 结合 IL-17RC

为了评估抗 IL-17F 抗体抑制 IL-17F 结合 IL-17RC 的能力, 使用预先包被了浓度为 1.5 $\mu\text{g/ml}$ IL-17RC-Ig 和 20 $\mu\text{g/ml}$ IL-17F 的平板, 进行使用如上所述改进的 ELISA 的抑制测定。图 7 表明, 测试的 6 种抗体中的 2 种 (抗 IL-17F-01 和抗 IL-17F-07) 能抑制 IL-17F 结合 IL-17RC。相反地, 抗 IL-17F-02, 抗 IL-17F-03, 抗 IL-17F-05 和抗 IL-17F-06 抗体不能抑制 IL-17F 结合 IL-17RC (图 7)。综合图 6 和 7, 数据不但提示抗 IL-17F 抗体会结合 IL-17F 上的不同位点, 而且还提示抗 IL-17F-02 和抗 IL-17F-06 抗体会结合和/或抑制结合 IL-17F:IL-17R 相互作用独有的 IL-17F 位点, 而抗 IL-17F-01 和抗 IL-17F-07 抗体会结合和/或抑制结合 IL-17R 和 IL-17RC 之间共有的 IL-17F 位点。结果, 这 6 种抗体可以用于定义 IL-17F 上的不同位点, 即表位。

实施例 4: 抗 IL-17F 抗体抑制 IL-17F 生物活性

实施例 4.1: 抗 IL-17F 抗体抑制 IL-17F-介导的细胞因子生产

为了确定实施例 3 所述的任意抗 IL-17F 抗体是否抑制 IL-17F 生物活性, 在有递增浓度的对照抗体 (mIgG1) 或 IL-17F 的抗体 (即抗 IL-17F-01, 抗 IL-17F-02, 抗 IL-17F-03, 抗 IL-17F-05, 抗 IL-17F-06, 或抗 IL-17F-07) 存在下, 用人 20 ng/ml IL-17F 刺激人成纤维细胞细胞 (10^4 细胞/孔)。24 h 后, 收集上清液, 使用可商业上得到的 ELISA 测定 GRO- α 浓度。基于标准曲线, 测定生成的 GRO- α 的浓度。

图 8 表明, 抗 IL-17F-01, 抗 IL-17F-02 和抗 IL-17F-07 抗体抑制人 IL-17F-介导的人成纤维细胞生产 GRO- α 。图 6, 7 和 8 所示的结果提示了一种模型, 通过该模型, IL-17F 结合 IL-17R 会启动 IL-17F 信号传递, 这导致随后的募集和需要的通过 IL-17RC 的信号传递。

实施例 4.2: 抗 IL-17F 抗体在治疗炎症病症中的潜在用途

为了确定抗 IL-17F 抗体、更具体地抗 IL-17F-07 抗体作为治疗与 IL-17F 信号传递相关的病症 (例如, 自身免疫病, 呼吸系统疾病, 炎症肠病, 等) 的治疗剂的潜力, 在有或没有下述物质之一存在下, 将用 NF- κB 报告载体感染的猪原代软骨细胞与 100 ng/ml IL-17A 或 500 ng/ml IL-17F (它们在室温预温育 1 h) 一起温育 48 h: 20 $\mu\text{g/ml}$ IL-17R-Ig 融合蛋白 (IL17R/Fc), 10 $\mu\text{g/ml}$ 抗 IL-17F-07 抗体 (抗 IL17F), 或 10 $\mu\text{g/ml}$ 对照抗体 (小鼠 IgG)。图 9 表明, 尽管温育 IL-17R-Ig 融合蛋白抑制

IL-17A-介导的 NF- κ B 激活，它对 IL-17F-介导的 NF- κ B 激活没有作用。相反地，抗 IL-17F-07 抗体能抑制 IL-17F-介导的 NF- κ B 激活，但是对 IL-17A-介导的 NF- κ B 激活没有作用（图 9）。

为了评估在抗 IL-17F 抗体存在下抑制的 NF- κ B 激活是否与抑制的细胞因子生产相关，将如实施例 1.2 所述用 IL-17F 温育的人成纤维细胞样滑膜细胞与同种型对照抗体、抗 IL-17F-01 抗体、或抗 IL-17F-07 抗体一起温育。如实施例 1.2 所述，评估 IL-6，IL-8，或 GRO- α 的浓度。图 10 表明，抗 IL-17F 抗体的抑制 IL-17F 激活 NF- κ B 的能力，与从类风湿关节炎患者分离的原代成纤维细胞样滑膜细胞对 IL-6，IL-8 和 GRO- α 的降低生产相关。这些数据提示，IL-17F 信号传递的拮抗剂，包括但不限于，针对 IL-17F 的抑制性抗体，可以用于减少炎症反应。更具体地，IL-17F 的抑制剂可以用于治疗与 IL-17F 信号传递相关病症（即 IL-17F 相关病症）相关的炎症反应。

实施例 5: 针对 IL-17F 和 IL-17A 的抗体可以用于检测和纯化重组的和天然的 IL-17F 同二聚体、IL-17A 同二聚体、和 IL-17A/IL-17F 异二聚体

实施例 5.1: 通过 ELISA 检测重组 IL-17A/IL-17A，IL-17F/IL-17F 和 IL-17A/IL-17F

使用编码人 IL-17A、人 IL-17F 或人 IL-17A 和人 IL-17F 两者的 cDNA，改良 293 细胞。这些 cDNA 的表达，导致 IL-17A/IL-17A、IL-17F/IL-17F 或 IL-17A/IL-17F 二聚体的生产。使用源自这些细胞的条件培养基（即重组的细胞因子）和可商业得到的抗体或如上所述的抗体，来开发用于检测 IL-17A 蛋白、IL-17F 蛋白、或 IL-17A/IL-17F 异二聚体的 ELISA 测定。为了检测 IL-17A 蛋白，即作为 IL-17A 同二聚体或 IL-17A/IL-17F 异二聚体，使用抗 IL-17A 抗体作为捕获抗体，并使用生物素标记的抗 IL-17A 抗体作为检测抗体（两种抗体都购自 R&D Systems, Minneapolis, MN）。为了检测 IL-17F 蛋白，即作为 IL-17F 同二聚体或 IL-17A/IL-17F 异二聚体，使用抗 IL-17F-01 抗体（如上所述）和生物素标记的抗 IL-17F-07 抗体（如上所述）分别作为捕获和检测抗体。为了检测 IL-17A/IL-17F 异二聚体，使用抗 IL-17A 抗体（R&D Systems）作为捕获抗体，使用生物素标记的抗 IL-17F-07 抗体作为检测抗体。IL-17A

和 IL-17F 抗体不交叉反应（数据未显示）。

根据众所周知的方法，进行 ELISA。简而言之，用 2 $\mu\text{g/ml}$ 捕获抗体温育 ELISA 平板过夜。用 PBS/1% BSA 洗涤平板，以去除多余的捕获抗体，并用条件培养基（即重组 IL-17A/IL-17A，IL-17F/IL-17F，IL-17A/IL-17F 细胞因子）的系列稀释液在室温温育 2 h。洗涤未结合的细胞因子后，加入 0.07-0.5 $\mu\text{g/ml}$ 生物素-缀合的显色抗体，在室温温育平板 2 小时。洗涤平板，以去除未结合的显色抗体。加入饱和浓度的抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶 (HRP)，在室温温育平板 1 小时。使用 PBS/1% BSA，洗掉未结合的抗生物素蛋白-HRP。使用 TBM，使测定显色。

图 11 显示了重组 IL-17A 和 IL-17F 同二聚体的检测、以及重组 IL-17A/IL-17F 异二聚体的检测。当捕获和检测抗体两者都针对一种细胞因子（即 IL-17A 或 IL-17F）时，会检测到该细胞因子的同二聚体和异二聚体（图 11A 和 11B）。相反地，当抗 IL-17A 抗体和抗 IL-17F 抗体分别用作捕获和检测抗体时，仅会检测到 IL-17A/IL-17F 异二聚体（图 11C）。这些数据提示，IL-17A/IL-17F 抗体对可以用于检测和潜在地纯化源自原代细胞的条件培养基中的天然的（即非重组的）IL-17A/IL-17F 异二聚体。另外，这些结果提示，本文所述的抗 IL-17F-07 抗体、和可能的抗 IL-17F-01 抗体及其它抗 IL-17F 抗体，还可以针对 IL-17A/IL-17F 异二聚体。

实施例 5.2: 检测天然 IL-17A 同二聚体、天然 IL-17F 同二聚体、和天然 IL-17A/IL-17F 异二聚体

在有或没有 IL-21 (60 ng/ml) 或 IL-23 (0.5 ng/ml) 存在下，用抗-CD3-偶联的珠子 (5 $\mu\text{g}/10^7$ 珠子)、和递增浓度的抗-CD28 抗体 (R&D, Minneapolis, MN) 激活人 CD4^+ T 细胞 (5 $\times 10^5$ 细胞/ml)。初始激活后 72 小时，收集上清液，通过 ELISA 测定 IL-17A 或 IL-17F 分别作为 IL-17A 蛋白或 IL-17F 蛋白的浓度，如上所述（实施例 5.1）。图 12 表明，IL-21 或 IL-23 可以用于增强初始激活后 T 细胞的 IL-17A 或 IL-17F 生产。IL-2，IL-7 和 IL-15 还会在 CD3/CD28 刺激后诱导 IL-17A 和 IL-17F 生产（数据未显示）。

用抗-CD3-偶联的珠子 (5 $\mu\text{g}/10^7$ beads) 和可溶抗-CD28 抗体激活人 CD4^+ T 细胞 (5 $\times 10^5$ 细胞/ml) 48 小时。收获激活的 T 细胞，静置过夜，在有珠子结合的抗-CD3、抗-CD28 抗体、IL-21 (60 ng/ml) 或 IL-23

(0.5 ng/ml)存在下再次激活。二次激活和产后 72 小时,收集上清液,通过 ELISA 测定 IL-17A 或 IL-17F 分别作为 IL-17A 蛋白或 IL-17F 蛋白的浓度,如上所述。图 13 表明,IL-21 或 IL-23 可以用于增强初始激活后 T 细胞的 IL-17A 或 IL-17F 生产。IL-2,IL-7 和 IL-15 还会在 CD3/CD28 刺激后诱导 IL-17A 和 IL-17F 生产(数据未显示)。图 13 表明,IL-21 或 IL-23 会与 CD28 共刺激协同增强二次激活后 T 细胞的 IL-17A 或 IL-17F 生产。

用抗-CD3-偶联的珠子($5\text{ }\mu\text{g}/10^7$ 珠子)和可溶抗-CD28 抗体($0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$),对人 CD4^+ T 细胞(2×10^6 细胞/ml)进行初始激活。初始激活 48 h 后,收集条件培养基(CM1),将细胞静置过夜。次日,计数细胞,如上面初始激活所述并在有 $60\text{ ng}/\text{ml}$ IL-21 存在下,再次刺激 2×10^6 细胞/ml。再次激活 72 小时后,收集条件培养基(CM2)。使用实施例 5.1 所述的 ELISA 测定,评估在纯净的和 1:10 稀释的 CM1 和 CM2 中是否存在 IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体、和 IL-17A/IL-17F 异二聚体。

数据表明,在 CM1 培养基中,即在经历初始激活的 T 细胞培养基中,没有检测到或检测到微量 IL-17A 同二聚体或 IL-17A/IL-17F 异二聚体(图 14A 和 14C)。相反地,再次刺激的 T 细胞的条件培养基(CM2)不仅包含 IL-17A 和 IL-17F 同二聚体,而且还包含 IL-17A/IL-17F 异二聚体(图 14A, 14B 和 14C)。这些数据表明,T 细胞(即 IL-17 细胞因子的“天然”来源)会表达 IL-17A 和 IL-17F 的同二聚体和异二聚体。这些结果还表明,针对 IL-17F 的抗体可以识别 IL-17F 同二聚体和 IL-17A/IL-17F 异二聚体,并与之反应,且这样的抗体可以用于分离和抑制 IL-17F 同二聚体和/或 IL-17A/IL-17F 异二聚体的生物活性。

实施例 5.3: 免疫沉淀来自 T 细胞的天然 IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体、和 IL-17A/IL-17F 异二聚体

在 4°C ,在轻柔旋转下,将如实施例 5.2 所述在有 IL-21 存在下经历二次激活的 T 细胞的条件培养基(CM2)与 $20\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 鼠抗-人 IL-17A-02 (Wyeth)或鼠抗-人 IL-17F-01 (Wyeth)单克隆抗体混合 1 h。在 4°C ,在轻柔旋转下,用 $50\text{ }\mu\text{l}$ 水合的蛋白 A-琼脂糖分别免疫沉淀来自每种混合物的抗体复合物过夜。然后,依次用 PBS/1%吐温 20、PBS/0.1%吐温 20、和 PBS/0.05%吐温 20 洗涤免疫沉淀的颗粒。将免疫沉淀的颗粒重新悬浮于非还原性样品缓冲液中,并装载 10%两性离子缓冲剂凝胶,用于

使用抗-人 IL-17A 生物素缀合 (R&D, Minneapolis, MN) 或兔抗-人 IL-17F 抗体 (Wyeth) 的蛋白印迹分析。

使用鼠抗-人 IL-17F-01 抗体免疫沉淀 IL-17F 同二聚体 (35 kDa), 并通过使用来自 500 μ l CM2 的兔抗-人 IL-17F 多克隆抗体的蛋白印迹分析进行检测。使用鼠抗-人 IL-17A-02 抗体免疫沉淀 IL-17F/IL-17A 异二聚体 (32 kDa), 并通过使用来自 500 μ l CM2 的兔抗-人 IL-17F 多克隆抗体的蛋白印迹分析进行检测 (图 15)。单克隆和多克隆抗体都不与 IL-17A 交叉反应 (数据未显示)。类似地, 使用鼠抗-人 IL-17A-02 抗体免疫沉淀 IL-17A 同二聚体 (31 kDa) 和 IL-17F/A 异二聚体, 并通过使用来自 700 μ l CM2 的多克隆山羊抗 IL-17A 生物素化的抗体的蛋白印迹分析进行检测。使用鼠抗-人 IL-17F-01 抗体免疫沉淀 IL-17F/IL-17A 异二聚体, 并通过使用来自 700 μ l CM2 的多克隆山羊抗 IL-17A 生物素化的抗体的蛋白印迹分析进行检测 (图 16)。多克隆抗体会与高蛋白浓度的 IL-17F 同二聚体交叉反应 (数据未显示)。

作为对照 (图 15 和 16 的泳道 2), 从过表达 His 标记的人 IL-17F 的浓缩条件培养基中纯化 IL-17F 同二聚体。简而言之, 用 100 mM Tris pH 8/1M NaCl/10 mM 咪唑 1:1 稀释浓缩的条件培养基, 并装载镍-NTA 快速流柱 (Qiagen, Valencia, CA)。用 250 mM 咪唑缓冲液分步洗脱同二聚体。在 PBS-NSO 中透析蛋白。然后, 在室温用 EK (肠激酶) 消化同二聚体 4 小时, 去除 His₆ 标记。用 50 mM 磷酸钠 pH 8/20 mM 咪唑/300 mM NaCl 1:1 稀释消化的蛋白, 并结合镍-NTA 柱 (Qiagen, Valencia, CA)。用 40 mM 咪唑缓冲液洗脱去除标记的蛋白, 在 PBS NSO 中透析。用作对照 (图 15 的泳道 5) 的纯化的 IL-17A 同二聚体购自 R&D Systems (Minneapolis, MN)。

实施例 5.4: 免疫沉淀来自转染的 COS 细胞的重组 IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体、和 IL-17F/IL-17A 异二聚体

进行这些试验来确定重组的人 IL-17F 和 IL-17A 是否会在 COS 细胞中表达后形成异二聚体, 并确定抗 IL-17F 和抗 IL-17A 抗体是否能免疫沉淀和检测 IL-17F/IL-17A 异二聚体。用 IL-17F cDNA、IL-17A cDNA、或 IL-17F 和 IL-17A cDNA 两者转染 COS 细胞培养物, 并使转染的细胞培养物分泌得到的蛋白到培养基中。在 4°C, 在轻柔旋转下, 将源自 IL-17F 或 IL-17A 的表达、或 IL-17F 和 IL-17A 的共表达的条件培养基

(CM2) 与 20 µg/ml 鼠抗-人 IL-17A-02 (Wyeth) 或鼠抗-人 IL-17F-01 (Wyeth) 单克隆抗体混合 1 h。在 4℃, 在轻柔旋转下, 用 50 µl 水合的蛋白 A-琼脂糖分别免疫沉淀来自每种混合物的抗体复合物过夜。然后, 依次用 PBS/1%吐温 20、PBS/0.1%吐温 20、和 PBS/0.05%吐温 20 洗涤免疫沉淀的颗粒。将免疫沉淀的颗粒重新悬浮于非还原性样品缓冲液中, 并装载 10%两性离子缓冲剂凝胶, 用于使用山羊抗-人 IL-17A (R&D, Minneapolis, MN) 或兔抗-人 IL-17F 抗体 (Wyeth) 的蛋白印迹分析。

使用鼠抗-人 IL-17F-01 抗体免疫沉淀 IL-17F 同二聚体 (35 kDa) 和 IL-17F/IL-17A 异二聚体, 并通过使用来自 50 µl CM2 的兔抗-人 IL-17F 多克隆抗体的蛋白印迹分析进行检测 (图 17A; 分别是泳道 3 和 4)。还使用鼠抗-人 IL-17A-02 抗体免疫沉淀 IL-17F/IL-17A 异二聚体 (32 kDa), 并通过使用来自 500 µl CM2 的兔抗-人 IL-17F 多克隆抗体的蛋白印迹分析进行检测 (图 17A; 泳道 9)。用于图 17A 中泳道 8-10 的免疫沉淀的 IL-17A 抗体似乎会与高蛋白浓度的 IL-17F 交叉反应, 因此通过泳道 10 的抗 IL-17F 抗体探针, 检测到与 IL-17F 同二聚体相对应的条带。如图 17B 所示, 使用鼠抗-人 IL-17A-02 抗体, 免疫沉淀 IL-17A 同二聚体 (31 kDa) 和 IL-17F/IL-17A 异二聚体, 并通过使用来自 50 µl CM2 的多克隆山羊抗-人 IL-17A 抗体的蛋白印迹分析进行检测 (图 17B; 分别是泳道 3 和 4)。并且, 使用鼠抗-人 IL-17F-01 抗体, 免疫沉淀 IL-17F/IL-17A 异二聚体, 并通过使用来自 50 µl CM2 的多克隆山羊抗-人 IL-17A 抗体的蛋白印迹分析进行检测 (图 17B; 泳道 6)。与用于图 17A 的免疫沉淀的 IL-17A 抗体不同, 用于图 17B 中泳道 5-7 的免疫沉淀的 IL-17F 抗体没有与 IL-17A 明显的交叉反应, 因为泳道 5 的抗 IL-17A 抗体探针几乎没有检测到与 IL-17A 同二聚体相对应的条带。

作为对照 (图 17A 的泳道 6-7), 如实施例 5.3 所述纯化 IL-17F 同二聚体。用作对照 (图 17A 的泳道 5) 的纯化的 IL-17A 同二聚体购自 R&D Systems (Minneapolis, MN)。对照纯化的 IL-17F 同二聚体比从条件培养基中免疫沉淀的 IL-17F 同二聚体迁移得略快。这可能是由于纯化的样品中 IL-17F 蛋白的糖基化差异和/或缺少表位标记。

实施例 5.5: 重组 IL-17A/IL-17F 异二聚体的纯化

本文提供了 2 种纯化 IL-17A/IL-17F 异二聚体的方法。在第一种方法中, 用 His₆-标记的 IL-17F (SEQ ID NO:36) 和未标记的 IL-17A 共转染 COS 细胞。将氯化钠和咪唑加入条件培养基, 至终浓度分别为 500 mM 和 6 mM。然后, 将条件培养基装载镍 NTA 柱 (Qiagen, Valencia, CA)。因而, 仅仅含有 His 标记的 IL-17F 同二聚体和 IL-17F/IL-17A 异二聚体会被捕获到镍柱上。然后, 用咪唑梯度分离 IL-17F 同二聚体和 IL-17F/IL-17A 异二聚体, 再用 EK 消化 IL-17F/IL-17A 异二聚体, 以去除 His₆ 标记。在 PBS 中透析蛋白。进行 Edman 测序, 以证实 IL-17F/A 异二聚体样品中检测到 IL-17F 和 IL-17A 蛋白。N-末端序列结果证实了异二聚体的存在, 即证实了 IL-17F 的前 5 个氨基酸是 RKIPK (SEQ ID NO:37), IL-17A 的前 5 个氨基酸是 IVKAG (SEQ ID NO:38)。

第二种方法使用双柱纯化方案, 它显示在图 18 所述的流程图中。将 Flag-标记的人 IL-17A (SEQ ID NO:39) 和 His₆-标记的人 IL-17F (SEQ ID NO:36) 克隆进分开的 pSMED2 载体 (Wyeth) 中, 并通过脂转染, 在 HEK293 细胞中共表达。简而言之, 在转染前 24 h, 将细胞接种进 2 个 175-cm² 烧瓶中。对于每个烧瓶, 在 2 ml 无血清的培养基中混合 24 μg pSMED2/Flag-IL-17A+24 μg pSMED2/His6-IL-17F 和 120 μl TRANSIT® 试剂-LT1 (Mirus, Madison, WI), 并加入装有细胞 (90%汇合) 和 25 ml 含有 10%热灭活的胎牛血清的 DMEM 培养基的烧瓶中。转染后 1 天, 去除培养基, 用无血清的培养基冲洗细胞 1 次, 加入新鲜的无血清的培养基 (40 ml/烧瓶)。48 h 后收获条件培养基, 过滤 (0.45 μ) 去除细胞, 在 -20℃ 冷藏。通过使用特异性抗体的蛋白印迹分析, 证实蛋白表达。

在 4℃, 将条件培养基分批结合到抗-Flag M2 亲和树脂 (Sigma, St. Louis, MO) 上 2 小时。使用 50 mM Tris pH 8/500 mM NaCl/200 μg/ml Flag 肽 (Sigma, St. Louis, MO), 洗脱结合的蛋白、IL-17A 同二聚体和 IL-17F/IL-17A 异二聚体。然后, 在 4℃, 将 flag 洗脱液分批结合到镍-NTA 树脂 (Qiagen, Valencia, CA) 上过夜。使用 50 mM Tris pH 8/1 M NaCl/500 mM 咪唑, 洗脱结合的蛋白、IL-17F/IL-17A 异二聚体。

纯化出基本上不含有 IL-17F 和 IL-17A 同二聚体的重组 IL-17F/IL-17A 异二聚体后, 通过测量异二聚体的刺激 BJ 细胞培养基中 GRO-α 水平的能力, 在 BJ 细胞上测试异二聚体的活性。因而, 用不同浓度的 IL-17F 同二聚体、IL-17A 同二聚体、或纯化的重组 IL-17F/IL-17A 异二聚体,

刺激 BJ 培养物。24 h 后，从 BJ 培养物收集上清液，使用可商业上得到的 ELISA 测定 GRO- α 浓度。简而言之，将 BJ 细胞以 5×10^3 细胞/孔接种进平底 96-孔平板，加入 15 μ l 含有 IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体、或 IL-17F/IL-17A 异二聚体的培养基。在 37°C 温育平板 16-24 小时，此后去除上清液，使用含有 GRO- α 的抗体的标准夹心 ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN)，测定 GRO- α 的浓度。基于标准曲线，测定生产的 GRO- α 的浓度。结果如图 19A 所示。类似于 IL-17F 和 IL-17A 同二聚体，IL-17A/IL-17F 异二聚体能刺激 BJ 细胞中的 IL-17 GRO- α 浓度。此外，如图 19B 所示，用抗 IL-17A 抗体或抗 IL-17A 与抗 IL-17F 抗体的组合处理 BJ 培养物，会消除 IL-17F/IL-17A 异二聚体的刺激 GRO- α 水平的能力。

实施例 5.6: IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体、和 IL-17A/IL-17F 异二聚体的质谱分析

为了提供 2 种 IL-17 单体之间的二硫键的直接证据，证实了二硫键的存在，并通过串联质谱分析，鉴别出了分子间二硫键连接的肽 (IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体、和 IL-17A/IL-17F 异二聚体)。使用胰蛋白酶切割和反相高效液相层析 (rpHPLC)，分离二硫键连接的肽，然后通过 nanoLC-MS/MS 进行分析。简而言之，将 1-2 μ g 纯化的、未还原的重组 IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体和 IL-17A/IL-17F 异二聚体上 10% Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen, Carlsbad, CA)，并用 IMPERIAL™ 蛋白染色溶液 (Pierce, Rockford, IL) 染色。切离正染色的条带，并用胰蛋白酶手工消化 (Promega, Madison, WI)，用于质谱分析。就消化而言，在乙腈 (ACN) 中将切离的凝胶切片脱水，重新水合，在 25 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中洗涤，在 CAN 中再次脱水。加入蛋白酶胰蛋白酶 (0.5 μ g 胰蛋白酶，溶于 25 mM 磷酸钠缓冲液中)，通过再次水合进入凝胶切片中，在 37°C 温育 4 h。使用 60% ACN/1% 甲酸 (FA) 和 90% ACN/5% FA 的等分试样连续洗涤 3 次，从凝胶中进一步提取得到的肽。合并这些提取物，并蒸发，将最终样品重配于 2% ACN 和 0.1% FA 中。

将消化的样品压力装载到填充了 Magic C18 珠子 (5 μ m, 75 μ m x 11 cm, Michrom BioResources, Auburn, CA) 的 C18 PICOFRIT® 微细管柱 (New Objective, Woburn, MA) 上。然后，将柱连接到线性离子阱质谱仪 (LTQ, ThermoFinnigan, San Jose, CA)。使用溶剂 B 作为调节

物，使 HPLC 梯度从 4 至 60% CAN 线性递增 70 min（溶剂 A，2% ACN 和 0.1% FA；溶剂 B，90% ACN 和 0.1% FA），流速为 250 nl/min。使用串联质谱模式的 LTQ（称作 MS/MS），收集质谱图，其中每个 MS 采集之后是在前面 MD 图谱中前 6 个最强肽离子的 6 个 MS/MS 采集。在有些情况下，MS/MS 采集之后是在前面 MS/MS 采集中前 2 个最强肽离子的 2 个 MS/MS/MS 采集。通过扫描 375 至 1500 的 m/z （质荷比）范围，记录肽质量。还采用生产商提供的采集软件中的动态排除，增加待分析的目标肽离子的数目。手工演算 MS/MS 数据。

在 MS 水平，观察到的肽片段的 m/z （IL-17A 同二聚体的 $[M+3H]^{3+}=919.7$ ；IL-17F 同二聚体的 $[M+3H]^{3+}=1196.9$ ；[IL-17F/IL-17A 异二聚体的 $M+3H]^{3+}=1138.1$ 或 807.9）匹配计算的候选二硫键连接的肽。此外，得到根据这些目标质量的 MS/MS 数据的肽序列，证实了它们是预期的源自 IL-17A 和/或 IL-17F 的含有半胱氨酸（C）的二硫键形成肽，如图 20 所示。另外，由于在 MS/MS 水平的较差分离，为 IL-17A 同二聚体肽采集 MS^3 数据（ $[M+3H]^{3+}=907.7$ 和 $[M+3H]^{3+}=843.3$ ）。这证实，IL-17A 同二聚体、IL-17F 同二聚体、和 IL-17F/IL-17A 异二聚体通过二硫键连接作为二聚体存在。总之，分辨了两种同二聚体和异二聚体的二硫键图谱，它们一致地是每个单体之间的 C1 和 C4。在该研究中使用类似的方案，以证实其它半胱氨酸（C2/C3 和 C5/C6）参与分子内二硫键形成。

实施例 6：抗人 IL-17F 抗体抑制灵长类动物 IL-17F 生物活性

为了确定抗 IL-17F 抗体是否能与灵长类动物 IL-17F 交叉反应，在有或没有 100 $\mu\text{g/ml}$ 抗 IL-17F-01 或抗 IL-17F-07 抗体存在下，使用不同浓度的猕猴 IL-17F 条件培养基或纯化的人 IL-17F 来刺激 BJ 细胞。通过在 HEK293 细胞中表达亚克隆进 pCRII 的猕猴 IL-17F cDNA（SEQ ID NO:40），并收获含有猕猴 IL-17F 同二聚体的条件培养基，制备用于该试验的猕猴 IL-17F 条件培养基。用人或猕猴 IL-17F 处理 16-24 小时后，如实施例 5.5 所述，使用可商业上得到的 ELISA（R&D, Minneapolis, MN），测定从处理的培养物收集的上清液的 GRO- α 浓度。基于标准曲线，测定 GRO- α 浓度。

图 21 显示了用猕猴 IL-17F 条件培养基或人 IL-17F 蛋白温育的 BJ

细胞增加的 GRO- α 生产。如前所述（参见图 2 和图 8），人 IL-17F 会刺激 GRO- α 水平，且该刺激会受到抗 IL-17F-01 和抗 IL-17F-07 抗体的抑制（图 21A）。如图 21B 所示，猕猴 IL-17F 还会刺激 BJ 细胞生产 GRO- α 。抗 IL-17F-01 和抗 IL-17F-07 抗体都能抑制猕猴 IL-17F 条件培养基的刺激 GRO- α 细胞因子水平的能力。因而，人 IL-17F 的拮抗剂抗体可以与灵长类动物 IL-17F 交叉反应，抑制灵长类动物 IL-17F 生物活性。

实施例 7：通过用 IL-17F 抗体共处理，减少人软骨细胞中聚集蛋白聚糖酶 1 水平的 IL-17F 刺激

为了确定 IL-17F 是否参与伴随例如类风湿关节炎的炎症反应，从 National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA) 获取非关节人软骨，通过在死后 48 小时内用链霉蛋白酶 (1 mg/ml, 37°C 30 min) 和胶原酶 P (1 mg/ml, 37°C 过夜) 进行系列酶消化，分离软骨细胞。分离后，将细胞重新悬浮于 Dulbecco 氏改良的伊格尔培养基 (DMEM) /含有 2 μ M L-谷氨酰胺、和 100 U/ml 青霉素/100 μ g/ml 链霉素以及 10% 胎牛血清 (FBS) 的 F-12 培养基。将细胞以 1×10^6 细胞/孔涂布 24-孔平板。72 h 后，将培养基换成无血清的培养基，在有或没有抗 IL-17F-07 或它的同种型对照 (IgG) 存在下，在 37°C 用人 IL-17F 刺激软骨细胞 6 h。立即将细胞收获进含有 β -巯基乙醇的 RLT 缓冲液 (Qiagen, Valencia, CA, RNEASY[®] 试剂盒)，在 -80°C 保存，准备用于 RNA 分离。使用 RNEASY[®] 小试剂盒制备 RNA，按照生产商的规程，在室温，在 RNEASY[®] 柱上进行 DNA 酶处理 15 min。通过 TAQMAN[®] PCR 分析 (Applied Biosystems, Foster City, CA)，监测 ADAMTS-4 (聚集蛋白聚糖酶-1) mRNA 表达水平。简而言之，将 100 ng 分离的 RNA 用于 QPCR 反应，使用从 Applied Biosystems 得到的 ADAMTS-4 探针/引物。对于每份样品，将 ADAMTS-4 的表达标准化成 GAPDH 的表达 (10 ng 分离的 RNA 与从 Applied Biosystems 得到的 GAPDH 引物一起使用)。使用 0.16 ng-100 ng 由不同组织库组成的通用参照总 RNA (Clontech, Palo Alto, CA)，制备用于样品外推的标准曲线。

在图 22 中显示了结果，表达为 TAQMAN[®] 单位。因而，IL-17F 处理会增加人软骨细胞对聚集蛋白聚糖酶 1 的表达，用抗 IL-17F-07 抗体处理会消除该刺激。这些数据提示，通过用抗 IL-17F 抗体处理，可以减

轻与 IL-17F 在炎症和关节降解中的参与，例如发生在自身免疫关节炎（例如，反应性和类风湿关节炎）的过程中。

实施例 8: 通过 siRNA 敲除 (knockdown) BJ 细胞的受体 IL-17R 和 IL-17RC, 调节 IL-17F 和 IL-17A 生物活性

设计这些试验来确定 IL-17R 和/或 IL-17RC 转录物水平的降低是否会减少 IL-17F 和/或 IL-17A 的生物活性。在转染前 24 小时，将 BJ 细胞以 9×10^3 细胞/100 μ l 培养基/孔接种进 96-孔平板。使用 0.3 μ l/孔的 DHARMAFECT[®] 1 (Dharmacon, Lafayette, CO)，和单独的或混合的 10 nM 或更低浓度的 siRNA（参见 SEQ ID NO:17-32），用化学合成的 RNAi 试剂 (Dharmacon, Lafayette, CO) 转染细胞。siRNA 转染后，用转染复合物温育细胞 18 h。然后，将转染培养基替换为常规培养基，另外温育 6 h。然后，将常规培养基替换为 150 μ l 含有 1 ng/ml 的 IL-17A 或 50 ng/ml 的 IL-17Fd 的培养基。用指定的细胞因子温育 16 h 后，收集培养上清液，用于标准夹心 ELISA 分析 IL-17F 和/或 IL-17A 的诱导 IL-6、IL-8、和 GRO- α 水平的能力（参见图 2）。hGRO- α 、hIL-6 和 hIL-8 的匹配的抗体对购自 R&D Systems (Minneapolis, MN)。

为了测量 siRNA 处理之后 IL-17R 和 IL-17RC 受体水平的降低，根据生产商的说明书，使用 TURBO 捕获[®] mRNA 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 从 BJ 成纤维细胞分离 mRNA。使用一步 RT qPCR MASTERMIX PLUS[®] (Eurogentec, San Diego, CA) TAQMAN[®] (Applied Biosystems) 方案，从而将每份样品 10 μ l mRNA 用于 25 μ l TAQMAN[®] PCR 反应，后者在 ABI PRISM[®] 7700 DNA 序列检测仪 (Applied Biosystems) 上进行。TAQMAN[®] PCR 的条件如下：在 48 $^{\circ}$ C 30 min，在 95 $^{\circ}$ C 10 min，然后 40 个循环，每个循环在 95 $^{\circ}$ C 15 s 且在 60 $^{\circ}$ C 1 min，在覆盖 MICROAMP OPTICAL[®] 帽子的 MICROAMP OPTICAL[®] (Applied Biosystems) 96-孔平板上进行。每个平板含有一式三份的测试 cDNA 模板或每种反应混合物的无模板对照。将每个小鼠基因的表达标准化为人 β 2 微球蛋白基因表达。从 Applied Biosystems 获取 IL-17R 和 IL-17RC 的 TAQMAN[®] 基因表达测定探针-引物集合。

图 23 所示的结果描绘了在 siRNA 处理 BJ 培养物后，GRO- α 水平的减少百分比（标准化成 β 2-微球蛋白）。siRNA 处理 BJ 培养物使 IL-17R

和 IL-17RC 转录物水平降低了约 80% (图 23A 和图 23B- “Taqman”)。而 IL-17R 和 IL-17RC 水平的降低减少了 IL-17A 和 IL-17F 的刺激 GRO- α 水平的能力 (图 23A 和图 23B), IL-17RC 水平的降低 (图 23B) 对 IL-17A 和 IL-17F 生物活性的作用显著高于 IL-17R 水平的降低 (图 23A)。令人感兴趣地, IL-17RC 的减少对 IL-17A 的刺激 GRO- α 水平的能力具有更大的作用 (图 23B)。在图 23C 中公开了靶定 IL-17R 和 IL-17RC 的 siRNA 的优选实例 (也参见 SEQ ID NO:17-32)。这些数据提示, IL-17A 和 IL-17F 都可以通过 IL-17R 和 IL-17RC 发出信号, IL-17RC 可能是两种分子关联 GRO- α 刺激的优选受体。

实施例 9: 来自银屑病、克隆氏病和溃疡性结肠炎患者的患病组织中 IL-17A 和 IL-17F 的上调

从在 Wyeth-赞助的临床研究#3067K6-207 (在活跃的银屑病患者中进行的重组人白介素 11 (rhIL-11) 的随机化的、双盲的、安慰剂-对照的、探测性的药物基因组学研究) 中登记的患者, 收集银屑病组织活检样品。在收集后, 立即将来自 48 位患者的基线 (第 2 次出诊) 银屑病病变的和无病变的皮肤活检快速冷冻在液氮中, 并运送到在 Andover, MA 的 Wyeth 临床药物基因组学实验室。

从在 Wyeth-赞助的临床研究#3067K6-204 (用于治疗活跃的克隆氏病患者的口服重组人白介素 11 (RhIL-11) 的多中心的、随机化的、双盲的、安慰剂-对照的、安全性的和探测性的药物基因组学研究) 中登记的患者, 收集克隆氏病样品, 从在临床研究#3067K5-114 (在轻度至中度左侧溃疡性结肠炎患者中进行的口服重组人白介素 11 (RhIL-11) 的多中心的、随机化的、双盲的、安慰剂-对照的、剂量递增的、安全性的和探测性的药物基因组学研究) 中登记的患者, 收集溃疡性结肠炎样品。在收集后, 立即将基线 (出诊 2) 配对的来自#3067K6-204 患者 (16 位患者) 的相关和无关组织活检、和基线 (出诊 1) 配对的来自#3067K5-114 患者 (12 位患者) 的 S 形左结肠相同解剖区域的组织活检快速冷冻在液氮中, 并运送到在 Andover, MA 的 Wyeth 临床药物基因组学实验室。

使用 polytron 将组织匀浆化, 使用 RNEASY®小试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 从裂解物上清液分离 RNA, 并用 DNA 酶 (Qiagen 不含

RNA 酶的 DNA 酶试剂盒) 处理。使用 Phase Lock Gel 柱 (Brinkman, Westbury NY) 进一步纯化 DNA 酶-处理的 RNA 制品, 使用苯酚: 氯仿: IAA (异戊醇) 萃取 (Ambion, Austin, TX), 并使用 RNEASY[®] 小柱浓缩。使用 SPECTRAMAX[®] (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 定量 RNA, 通过 Agilent Bioanalyzer 凝胶 (Model 2100; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 评估 RNA 质量。按照生产商的说明书, 使用 Applied Biosystems High Capacity cDNA Archive 试剂盒 (Applied Biosystems), 将 2 µg 来自上述制品的总 RNA 转化成 cDNA。将含有完成的反应物的平板保存在 -20°C (短期) 或 -80°C (长期) 的温度。

预评价 Applied Biosystem 的定制测定 (AOD) 基因-特异性的引物-探针对, 进行 QC 测试, 并优化用于任意 ABI PRISM[®] 序列检测系统 (都来自 Applied Biosystems)。根据生产商的 AOD 方案, 使用含有 IL-17F 或 IL-17A 引物的 TAQMAN[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 制备主混合物, 等量分入 96-孔平板, 至 50 µl/孔的终体积。使用下述通用热循环条件, 在 ABI PRISM[®] 7700 序列检测仪 (序列检测仪 Software v1.7) 上, 测定系列稀释的标准品和 cDNA 样品 (50 ng/孔) 的一式两份孔: 50°C 2 min, 95°C 10 min, 95°C 15 s (40 个循环), 在 60°C 延伸 1 min。

根据为 ABI PRISM[®] 7700 序列检测系统 (Applied Biosystems) 所述的生产商指南, 进行 IL-17F 和 IL-17A 的 RNA 转录物水平的相对定量。具体地, 计算靶标准品和内源对照的标准曲线, 使用标准曲线的斜率和 y-截距确定靶和内源对照的输入值, 将靶输入值标准化为内源对照。使用 50 ng 标准品作为校正因子, 计算 IL-17F 和 IL-17A 表达的变化倍数, 通过乘以校正因子的变化倍数, 然后取平均值, 得到样品的相对浓度。

为了使用标准曲线方法, 使用 TAQMAN[®] AOD (Applied Biosystems) 根据经验确定组织表达靶基因。从 Wyeth (Cambridge/Andover) 和外部卖主, 得到来自超过 10 份候选靶-阳性组织的总 RNA。将来自单个 RNA 制品的多份 2 µg 等分试样转化成 cDNA (如上所述), 合并, 在 -80°C 保存为等分试样, 通过 TAQMAN[®] (Applied Biosystems) 测定靶基因的表达。认为 ≥ 35 的循环阈值 (Ct) 值低于检测限。关于标准曲线形成, 目标是为 100 ng cDNA 达到 18 至 25 的 Ct 值;

这允许适当的标准曲线动态范围。使用满足这样要求的阳性对照组织的制品，制备每个测定的标准曲线。标准曲线由 100 ng/孔至 1.5 ng/孔的总 cDNA 的 2 倍系列稀释液组成。在每个测定的每个平板上，制备标准曲线，并用于样品定量和测定性能监测。由于 96-孔平板空间限制，在运行样品时，省略了标准曲线稀释点 25 ng 和 3 ng。银屑病样品的平板间 % CV<3%，克隆氏病和溃疡性结肠炎样品的平板间 % CV<5%。

选自在所有样品（即处理的和未处理的，病变的和无病变的，等）中以类似水平表达的基因，用作相对标准曲线方法的内源对照。从一系列候选内源对照中，确定命名为 ZNF592（GenBank Accession No. NM_014630）的基因产生可接受的标准曲线，且在病变的和无病变的组织、和相关和无关组织中没有显著差异（银屑病的 $p<0.05$ ，克隆氏病和溃疡性结肠炎样品的 $p<0.09$ ）。在测定相对浓度值时，将所有研究样品标准化成 ZNF592 水平。

使用配对的 t 检验（配对来自每位患者的病变的和无病变的样品，或相关和无关的组织），评估 IL-17F 和 IL-17A 表达水平和有病变的（银屑病）或炎性表型（克隆氏病或溃疡性结肠炎）之间关联的限制性。通过用有病变的相对浓度值除以无病变的相对浓度值，计算银屑病研究的变化倍数。通过用相关的相对浓度值除以无关的相对浓度值，得到克隆氏病和溃疡性结肠炎（IBD）研究的变化倍数。通过取所有患者 IL-17F 或 IL-17A 水平的变化变数的平均值，计算总变化变数。

在图 24 和图 25 中显示了这些研究的结果。如图 24 所示，来自患病患者的病变组织中 IL-17F 和 IL-17A 表达水平都显著增加，提示 IL-17F 和 IL-17A 都体内涉入银屑病。如图 25 所示，来自克隆氏病患者以及来自溃疡性结肠炎患者的相关组织中 IL-17F 和 IL-17A 都增加。在克隆氏病和溃疡性结肠炎患者中显著的异质性，伴有相对较小的样品大小，减轻了鉴别 IL-17A 和 IL-17F 与相关表型统计上显著的关联的难度。但是，成簇工具证实，IL-17A 和 IL-17F 与克隆氏病样品集合中的相关表型密切相关（ $r=0.65$ ）（数据未显示）。这些数据提示，在相关组织中升高水平的 IL-17A 和 IL-17F 可能在体内 IBD 相关炎性状况中起作用。

实施例 10：来自卵白蛋白免疫的小鼠的 LN 细胞会生产 IL-17F

用在完全弗氏佐剂中乳化的 100 μ g 卵白蛋白免疫 8-周龄 C57BL/6

小鼠侧腹。7天后,收获腹股沟淋巴结。解离淋巴结,用50 ng 佛波醇酯 12-十四烷酰法波醇-13 醋酸酯、1 µg/ml 伊屋诺霉素、和 1 µg/ml GOLGIPLUG™再次刺激细胞 12 小时。然后收获细胞,使用抗-小鼠 CD4 PerCP Cy5.5 (Pharmagen, San Diego, CA) 进行表面 CD4 染色。固定细胞,并用 CYTOFIX/CYTOPERM™ (BD Biosciences, San. Diego, CA) 透化处理,此后用 4 µg/ml 大鼠 IgG1 ALEXA FLUOR® 647 缀合物 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 或 4 µg/ml 大鼠抗 IL-17F(克隆 15-1) ALEXA FLUOR® 647 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 对细胞染色 30 min。然后,用 PERM/洗涤™ (BD Biosciences, San. Diego, CA) 洗涤细胞 2 次,并使用 FACSCALIBUR™ (BD Biosciences, San. Diego, CA) 进行分析。使用来自 Invitrogen 的 ALEXA FLUOR® 647 缀合试剂盒,制备大鼠抗 IL-17F (克隆 15-1) ALEXA FLUOR® 647 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。结果如图 26 所示。因而,来自卵白蛋白-免疫的小鼠淋巴结的体内 CD4+T 细胞会生产 IL-17F 蛋白。

实施例 11: 结论和讨论

在几项发现中,这些数据表明,在 TCR/CD28 共刺激后,IL-21 和 IL-23 会诱导 IL-17A 和 IL-17F,且 IL-23 和 IL-21 与共刺激协作用于 IL-17A 和 IL-17F 生产。IL-23 和 IL-21 在 IL-17 诱导中同样有效。这些数据提示,IL-17A、尤其是 IL-17F (因为它的生产水平是 IL-17A 的 10-20 倍) 可以介导有些归因于 IL-21 的促炎作用,抑制 IL-17F (作为 IL-17F 同二聚体或 IL-17F 异二聚体) 可能具有与阻断 IL-21 信号传递类似的治疗效果(参见,例如,美国专利专利申请号 60/599,086 和 60/639,176)。IL-17F 信号传递和 IL-21 信号传递的作用之间的相似性,导致下述坚定结论,即抑制 IL-17F 信号传递可以象抑制 IL-21 信号传递一样有治疗价值。另外,结果首次证实,T 细胞会表达 IL-17A/IL-17F 异二聚体、以及 IL-17A 和 IL-17F 同二聚体;结果还证实,这样的细胞因子可以以它们的天然和重组形式分离和纯化。本文所示数据还证实,抗 IL-17F 抗体、包含 IL-17F 的融合蛋白、和靶定 IL-17R 和 IL-17RC 的 siRNA,可以降低 IL-17F 生物活性。此外,结果表明,IL-17F 处理会增加人软骨细胞的聚集蛋白聚糖酶表达,后者可以被抗 IL-17F 抗体减少,还表明银屑病病变和涉入来自人活检的 IBD 的组织中的 IL-17F 和 IL-17A 升高。

IL-17A 和 IL-17F 是由激活的 T 细胞生成的新的促炎细胞因子。这些细胞因子具有高度的氨基酸同一性，包括表现出半胱氨酸结基序的结构特征的保守半胱氨酸。已经提出两种细胞因子共有受体链，且表现出类似的生物功能。IL-17 细胞因子家族的成员已经涉入异常免疫应答介导的疾病，例如类风湿关节炎，炎性肠病（IBD）和哮喘。由于上述的相似性，表征了激活的人 T 细胞生成的 IL-17A 和 IL-17F。在有或没有 CD28 共刺激、 γ -普通细胞因子（IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, IL-21）或 IL-23 存在下，用抗-CD3 激活 CD4⁺T 细胞。IL-17A 和 IL-17F 的最佳生产需要 TCR 以及 CD28 共刺激。另外，CD28 和 IL-21 协同作用于 IL-17A 和 IL-17F 生产，提示 IL-17A 和 IL-17F 可以介导归因于 IL-21 信号传递的促炎作用。在所有激活条件下，IL-17F 的蛋白水平是 IL-17A 的 10-20 倍。令人感兴趣地，除了 IL-17A 同二聚体和 IL-17F 同二聚体以外，T 细胞还生产 IL-17A/IL-17F 异二聚体。这些发现提示，体内存在这些细胞因子的多种形式，每种形式起不同的生物功能，例如，IL-17A/IL-17F 异二聚体可以构成治疗炎症性疾病的新细胞因子靶。

<110> Wyeth

<120> 白介素-17F 抗体及其它 IL-17F 信号传递拮抗剂和它们的用途

<130> 01997.039301

<150> 60/653,260

<151> 2005-02-14

<150> 60/667,492

<151> 2005-04-01

<160> 40

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 492

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(492)

<400> 1

```
atg aca gtg aag acc ctg cat ggc cca gcc atg gtc aag tac ttg ctg      48
Met Thr Val Lys Thr Leu His Gly Pro Ala Met Val Lys Tyr Leu Leu
1              5              10              15
```

```
ctg tcg ata ttg ggg ctt gcc ttt ctg agt gag gcg gca gct cgg aaa      96
Leu Ser Ile Leu Gly Leu Ala Phe Leu Ser Glu Ala Ala Ala Arg Lys
20              25              30
```

```
atc ccc aaa gta gga cat act ttt ttc caa aag cct gag agt tgc ccg      144
Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu Ser Cys Pro
35              40              45
```

```
cct gtg cca gga ggt agt atg aag ctt gac att ggc atc atc aat gaa      192
Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly Ile Ile Asn Glu
50              55              60
```

```
aac cag cgc gtt tcc atg tca cgt aac atc gag agc cgc tcc acc tcc      240
Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg Ser Thr Ser
65              70              75              80
```

```
ccc tgg aat tac act gtc act tgg gac ccc aac cgg tac ccc tcg gaa      288
Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr Pro Ser Glu
85              90              95
```

```
gtt gta cag gcc cag tgt agg aac ttg ggc tgc atc aat gct caa gga      336
Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly
100              105              110
```

```
aag gaa gac atc tcc atg aat tcc gtt ccc atc cag caa gag acc ctg      384
```

Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Thr Leu
 115 120 125

gtc gtc cgg agg aag cac caa ggc tgc tct gtt tct ttc cag ttg gag 432
 Val Val Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln Leu Glu
 130 135 140

aag gtg ctg gtg act gtt ggc tgc acc tgc gtc acc cct gtc atc cac 480
 Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Val Ile His
 145 150 155 160

cat gtg cag taa 492
 His Val Gln

<210> 2
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

Met Thr Val Lys Thr Leu His Gly Pro Ala Met Val Lys Tyr Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Ile Leu Gly Leu Ala Phe Leu Ser Glu Ala Ala Ala Arg Lys
 20 25 30

Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu Ser Cys Pro
 35 40 45

Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly Ile Ile Asn Glu
 50 55 60

Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg Ser Thr Ser
 65 70 75 80

Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr Pro Ser Glu
 85 90 95

Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly
 100 105 110

Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Thr Leu
 115 120 125

Val Val Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln Leu Glu
 130 135 140

Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Val Ile His
145 150 155 160

His Val Gln

<210> 3
<211> 1883
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (54)..(521)

<400> 3
gaattccggc aggcacaaac tcatccatcc ccagttgatt ggaagaaaca acg atg 56
Met
1

act cct ggg aag acc tca ttg gtg tca ctg cta ctg ctg ctg agc ctg 104
Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu
5 10 15

gag gcc ata gtg aag gca gga atc aca atc cca cga aat cca gga tgc 152
Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys
20 25 30

cca aat tct gag gac aag aac ttc ccc cgg act gtg atg gtc aac ctg 200
Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu
35 40 45

aac atc cat aac cgg aat acc aat acc aat ccc aaa agg tcc tca gat 248
Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp
50 55 60 65

tac tac aac cga tcc acc tca cct tgg aat ctc cac cgc aat gag gac 296
Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp
70 75 80

cct gag aga tat ccc tct gtg atc tgg gag gca aag tgc cgc cac ttg 344
Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu
85 90 95

ggc tgc atc aac gct gat ggg aac gtg gac tac cac atg aac tct gtc 392
Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val
100 105 110

ccc atc cag caa gag atc ctg gtc ctg cgc agg gag cct cca cac tgc 440
Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys
115 120 125

ccc aac tcc ttc cgg ctg gag aag ata ctg gtg tcc gtg ggc tgc acc 488
Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr

130	135	140	145	
tgt gtc acc ceg att gtc cac cat gtg gcc taa gagctctggg gagccacac				541
Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala				
	150	155		
tccccaaagc agttagacta tggagagccg acccagcccc tcaggaaccc tcatccttca				601
aagacagcct cattteggac taaactcatt agagttctta aggcagtttg tccaattaaa				661
gcttcagagg taacacttgg ccaagatatg agatctgaat tacctttccc tctttccaag				721
aaggaagggt tgactgagta ccaatttgct tcttgtttac ttttttaagg gctttaagtt				781
atztatgtat ttaatatgcc ctgagataac ttgggggtat aagattccat tttaatgaat				841
tacctacttt attitgtttg tctttttaaa gaagataaga ttctgggctt gggaatttta				901
ttatttaaaa ggtaaacct gtatttattt gagctattta aggatctatt tatgtttaag				961
tatttagaaa aagtgaaaa agcactatta tcagttctgc ctaggtaaat gtaagataga				1021
attaaatggc agtgcaaaat ttctgagtct ttacaacata cggatatagt atttctcct				1081
ctttgttttt aaaagttata acatggctga aaagaaagat taaacctact ttcatatgta				1141
ttaattttaa ttttgcatt tgttgagggt ttacaagaga tacagcaagt ctaactctct				1201
gttcatttaa accettataa taaaatcctt ctgtaataat aaagtttcaa aagaaaatgt				1261
ttatttggtc tcattaaatg tattttagca aactcagctc ttccctattg ggaagagtta				1321
tgcaaatctc ctataagca aaacaaagca tgtctttgag taacaatgac ctggaaatac				1381
ccaaaattcc aagttctega ttccacatgc cttcaagact gaacaccgac taaggttttc				1441
atactattag ccaatgctgt agacagaagc attttgatag gaatagagca aataagataa				1501
tgccctgag gaatggcatg tcattattaa agatcatatg gggaaaatga aaccctcccc				1561
aaaatacaag aagttctggg aggagacatt gtcttcagac tacaatgtcc agtttctccc				1621
ctagactcag gcttcctttg gagattaagg cccctcagag atcaacagac caacattttt				1681
ctcttctca agcaacactc ctagggcctg gcttctgtct gatcaaggca ccacacaacc				1741
cagaaaggag ctgatggggc agaatgaact ttaagtatga gaaaagttca gccaagtaa				1801
aataaaaact caatcacatt caattccaga gtagtttcaa gtttcacatc gtaaccattt				1861
tcgccggaa ttcaaaaaaa aa				1883

<210> 4
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 4

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ser
1 5 10 15

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

Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn
35 40 45

Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser
50 55 60

Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu
65 70 75 80

Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His
85 90 95

Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser
100 105 110

Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His
115 120 125

Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys
130 135 140

Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
145 150 155

<210> 5

<211> 3420

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (134).. (2734)

<400> 5

ggctggaagc cggaagcgag caaagtggag ccgactcgaa ctccaccggc acgagggcgg 60

aaaagaaagc ctcagaacgt tcgctcgctg cgtccccagc cggggccgag ccctccgcga 120

cgccaccgg gcc atg ggg gcc gca cgc agc ccg ccg tcc gct gtc ccg 169

Met Gly Ala Ala Arg Ser Pro Pro Ser Ala Val Pro															
1				5				10							
ggg	ccc	ctg	ctg	ggg	ctg	ctc	ctg	ctg	ctc	ctg	ggc	gtg	ctg	gcc	cgg
Gly	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Val	Leu	Ala	Pro
15				20				25							
ggt	ggc	gcc	tcc	ctg	cga	ctc	ctg	gac	cac	cgg	gcg	ctg	gtc	tgc	tcc
Gly	Gly	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Leu	Asp	His	Arg	Ala	Leu	Val	Cys	Ser
30				35				40							
cag	cgg	ggg	cta	aac	tgc	acg	gtc	aag	aat	agt	acc	tgc	ctg	gat	gac
Gln	Pro	Gly	Leu	Asn	Cys	Thr	Val	Lys	Asn	Ser	Thr	Cys	Leu	Asp	Asp
45				50				55				60			
agc	tgg	att	cac	cct	cga	aac	ctg	acc	ccc	tcc	tcc	cca	aag	gac	ctg
Ser	Trp	Ile	His	Pro	Arg	Asn	Leu	Thr	Pro	Ser	Ser	Pro	Lys	Asp	Leu
65				70				75							
cag	atc	cag	ctg	cac	ttt	gcc	cac	acc	caa	caa	gga	gac	ctg	ttc	ccc
Gln	Ile	Gln	Leu	His	Phe	Ala	His	Thr	Gln	Gln	Gly	Asp	Leu	Phe	Pro
80				85				90							
gtg	gct	cac	atc	gaa	tgg	aca	ctg	cag	aca	gac	gcc	agc	atc	ctg	tac
Val	Ala	His	Ile	Glu	Trp	Thr	Leu	Gln	Thr	Asp	Ala	Ser	Ile	Leu	Tyr
95				100				105							
ctc	gag	ggt	gca	gag	tta	tct	gtc	ctg	cag	ctg	aac	acc	aat	gaa	cgt
Leu	Glu	Gly	Ala	Glu	Leu	Ser	Val	Leu	Gln	Leu	Asn	Thr	Asn	Glu	Arg
110				115				120							
ttg	tgc	gtc	agg	ttt	gag	ttt	ctg	tcc	aaa	ctg	agg	cat	cac	cac	agg
Leu	Cys	Val	Arg	Phe	Glu	Phe	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg	His	His	His	Arg
125				130				135				140			
cgg	tgg	cgt	ttt	acc	ttc	agc	cac	ttt	gtg	gtt	gac	cct	gac	cag	gaa
Arg	Trp	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	His	Phe	Val	Val	Asp	Pro	Asp	Gln	Glu
145				150				155							
tat	gag	gtg	acc	gtt	cac	cac	ctg	ccc	aag	ccc	atc	cct	gat	ggg	gac
Tyr	Glu	Val	Thr	Val	His	His	Leu	Pro	Lys	Pro	Ile	Pro	Asp	Gly	Asp
160				165				170							
cca	aac	cac	cag	tcc	aag	aat	ttc	ctt	gtg	cct	gac	tgt	gag	cac	gcc
Pro	Asn	His	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	Leu	Val	Pro	Asp	Cys	Glu	His	Ala
175				180				185							
agg	atg	aag	gta	acc	acg	cca	tgc	atg	agc	tca	ggc	agc	ctg	tgg	gac
Arg	Met	Lys	Val	Thr	Thr	Pro	Cys	Met	Ser	Ser	Gly	Ser	Leu	Trp	Asp
190				195				200							
ccc	aac	atc	acc	gtg	gag	acc	ctg	gag	gcc	cac	cag	ctg	cgt	gtg	agc
Pro	Asn	Ile	Thr	Val	Glu	Thr	Leu	Glu	Ala	His	Gln	Leu	Arg	Val	Ser
205				210				215				220			
ttc	acc	ctg	tgg	aac	gaa	tct	acc	cat	tac	cag	atc	ctg	ctg	acc	agt
Phe	Thr	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser	Thr	His	Tyr	Gln	Ile	Leu	Leu	Thr	Ser
225				230				235							

ttt ccg cac atg gag aac cac agt tgc ttt gag cac atg cac cac ata Phe Pro His Met Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile 240 245 250	889
cct gcg ccc aga cca gaa gag ttc cac cag cga tcc aac gtc aca ctc Pro Ala Pro Arg Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu 255 260 265	937
act cta cgc aac ctt aaa ggg tgc tgt cgc cac caa gtg cag atc cag Thr Leu Arg Asn Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln 270 275 280	985
ccc ttc ttc agc agc tgc ctc aat gac tgc ctc aga cac tcc gcg act Pro Phe Phe Ser Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr 285 290 295 300	1033
gtt tcc tgc cca gaa atg cca gac act cca gaa cca att ccg gac tac Val Ser Cys Pro Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp Tyr 305 310 315	1081
atg ccc ctg tgg gtg tac tgg ttc atc acg ggc atc tcc atc ctg ctg Met Pro Leu Trp Val Tyr Trp Phe Ile Thr Gly Ile Ser Ile Leu Leu 320 325 330	1129
gtg ggc tcc gtc atc ctg ctc atc gtc tgc atg acc tgg agg cta gct Val Gly Ser Val Ile Leu Leu Ile Val Cys Met Thr Trp Arg Leu Ala 335 340 345	1177
ggg cct gga agt gaa aaa tac agt gat gac acc aaa tac acc gat ggc Gly Pro Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp Asp Thr Lys Tyr Thr Asp Gly 350 355 360	1225
ctg cct gcg gct gac ctg atc ccc cca ccg ctg aag ccc agg aag gtc Leu Pro Ala Ala Asp Leu Ile Pro Pro Pro Leu Lys Pro Arg Lys Val 365 370 375 380	1273
tgg atc atc tac tea gcc gac cac ccc ctc tac gtg gac gtg gtc ctg Trp Ile Ile Tyr Ser Ala Asp His Pro Leu Tyr Val Asp Val Val Leu 385 390 395	1321
aaa ttc gcc cag ttc ctg ctc acc gcc tgc ggc acg gaa gtg gcc ctg Lys Phe Ala Gln Phe Leu Leu Thr Ala Cys Gly Thr Glu Val Ala Leu 400 405 410	1369
gac ctg ctg gaa gag cag gcc atc tgc gag gca gga gtc atg acc tgg Asp Leu Leu Glu Glu Gln Ala Ile Ser Glu Ala Gly Val Met Thr Trp 415 420 425	1417
gtg ggc cgt cag aag cag gag atg gtg gag agc aac tct aag atc atc Val Gly Arg Gln Lys Gln Glu Met Val Glu Ser Asn Ser Lys Ile Ile 430 435 440	1465
gtc ctg tgc tcc cgc ggc acg cgc gcc aag tgg cag gcg ctc ctg ggc Val Leu Cys Ser Arg Gly Thr Arg Ala Lys Trp Gln Ala Leu Leu Gly 445 450 455 460	1513
cgg ggg gcg cct gtg cgg ctg cgc tgc gac cac gga aag ccc gtg ggg	1561

Arg Gly Ala Pro Val Arg Leu Arg Cys Asp His Gly Lys Pro Val Gly	
465 470 475	
gac ctg ttc act gca gcc atg aac atg atc ctc ccg gac ttc aag agg	1609
Asp Leu Phe Thr Ala Ala Met Asn Met Ile Leu Pro Asp Phe Lys Arg	
480 485 490	
cca gcc tgc ttc ggc acc tac gta gtc tgc tac ttc agc gag gtc agc	1657
Pro Ala Cys Phe Gly Thr Tyr Val Val Cys Tyr Phe Ser Glu Val Ser	
495 500 505	
tgt gac ggc gac gtc ccc gac ctg ttc ggc gcg gcg ccg cgg tac ccg	1705
Cys Asp Gly Asp Val Pro Asp Leu Phe Gly Ala Ala Pro Arg Tyr Pro	
510 515 520	
ctc atg gac agg ttc gag gag gtg tac ttc cgc atc cag gac ctg gag	1753
Leu Met Asp Arg Phe Glu Glu Val Tyr Phe Arg Ile Gln Asp Leu Glu	
525 530 535 540	
atg ttc cag ccg ggc cgc atg cac cgc gta ggg gag ctg tcg ggg gac	1801
Met Phe Gln Pro Gly Arg Met His Arg Val Gly Glu Leu Ser Gly Asp	
545 550 555	
aac tac ctg cgg agc ccg ggc ggc agg cag ctc cgc gcc gcc ctg gac	1849
Asn Tyr Leu Arg Ser Pro Gly Gly Arg Gln Leu Arg Ala Ala Leu Asp	
560 565 570	
agg ttc cgg gac tgg cag gtc cgc tgt ccc gac tgg ttc gaa tgt gag	1897
Arg Phe Arg Asp Trp Gln Val Arg Cys Pro Asp Trp Phe Glu Cys Glu	
575 580 585	
aac ctc tac tca gca gat gac cag gat gcc ccg tcc ctg gac gaa gag	1945
Asn Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Gln Asp Ala Pro Ser Leu Asp Glu Glu	
590 595 600	
gtg ttt gag gag cca ctg ctg cct ccg gga acc ggc atc gtg aag cgg	1993
Val Phe Glu Glu Pro Leu Leu Pro Pro Gly Thr Gly Ile Val Lys Arg	
605 610 615 620	
gcg ccc ctg gtg cgc gag cct ggc tcc cag gcc tgc ctg gcc ata gac	2041
Ala Pro Leu Val Arg Glu Pro Gly Ser Gln Ala Cys Leu Ala Ile Asp	
625 630 635	
ccg ctg gtc ggg gag gaa gga gga gca gca gtg gca aag ctg gaa cct	2089
Pro Leu Val Gly Glu Glu Gly Gly Ala Ala Val Ala Lys Leu Glu Pro	
640 645 650	
cac ctg cag ccc cgg ggt cag cca gcg ccg cag ccc ctc cac acc ctg	2137
His Leu Gln Pro Arg Gly Gln Pro Ala Pro Gln Pro Leu His Thr Leu	
655 660 665	
gtg ctc gcc gca gag gag ggg gcc ctg gtg gcc gcg gtg gag cct ggg	2185
Val Leu Ala Ala Glu Glu Gly Ala Leu Val Ala Ala Val Glu Pro Gly	
670 675 680	
ccc ctg gct gac ggt gcc gca gtc cgg ctg gca ctg gcg ggg gag ggc	2233
Pro Leu Ala Asp Gly Ala Ala Val Arg Leu Ala Leu Ala Gly Glu Gly	
685 690 695 700	

gag gcc tgc ccg ctg ctg ggc agc ccg ggc gct ggg cga aat agc gtc Glu Ala Cys Pro Leu Leu Gly Ser Pro Gly Ala Gly Arg Asn Ser Val 705 710 715	2281
ctc ttc ctc ccc gtg gac ccc gag gac tcg ccc ctt ggc agc agc acc Leu Phe Leu Pro Val Asp Pro Glu Asp Ser Pro Leu Gly Ser Ser Thr 720 725 730	2329
ccc atg ggc tct cct gac ctc ctt cca gag gac gtg agg gag cac ctc Pro Met Ala Ser Pro Asp Leu Leu Pro Glu Asp Val Arg Glu His Leu 735 740 745	2377
gaa ggc ttg atg ctc tcg ctc ttc gag cag agt ctg agc tgc cag gcc Glu Gly Leu Met Leu Ser Leu Phe Glu Gln Ser Leu Ser Cys Gln Ala 750 755 760	2425
cag ggg ggc tgc agt aga ccc gcc atg gtc ctc aca gac cca cac acg Gln Gly Gly Cys Ser Arg Pro Ala Met Val Leu Thr Asp Pro His Thr 765 770 775 780	2473
ccc tac gag gag gag cag cgg cag tca gtg cag tct gac cag ggc tac Pro Tyr Glu Glu Glu Gln Arg Gln Ser Val Gln Ser Asp Gln Gly Tyr 785 790 795	2521
atc tcc agg agc tcc ccg cag ccc ccc gag gga ctc acg gaa atg gag Ile Ser Arg Ser Ser Pro Gln Pro Pro Glu Gly Leu Thr Glu Met Glu 800 805 810	2569
gaa gag gag gaa gag gag cag gac cca ggg aag ccg gcc ctg cca ctc Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gln Asp Pro Gly Lys Pro Ala Leu Pro Leu 815 820 825	2617
tct ccc gag gac ctg gag agc ctg agg agc ctc cag cgg cag ctg ctt Ser Pro Glu Asp Leu Glu Ser Leu Arg Ser Leu Gln Arg Gln Leu Leu 830 835 840	2665
ttc cgc cag ctg cag aag aac tcg ggc tgg gac acg atg ggg tca gag Phe Arg Gln Leu Gln Lys Asn Ser Gly Trp Asp Thr Met Gly Ser Glu 845 850 855 860	2713
tca gag ggg ccc agt gca tga gggcggtccc ccagggaccg cccagatccc Ser Glu Gly Pro Ser Ala 865	2764
agctttgaga gaggagtgtg tgtgcaegta ttcattctgtg tgtacatgtc tgcattgtga	2824
tatgttcgtg tgtgaaatgt aggccttaaa atgtaaatgt ctggatttta atcccaggca	2884
tcctctctaa cttttctttg tgcagcggtc tggttatcgt ctatccccag gggaatccac	2944
acagcccgcct cccaggagct aatggtagag cgtccttgag gctccattat tcgttcattc	3004
agcattttatt gtgcacctac tatgtggcgg gcatttgga taccaagata aattgcatgc	3064
ggcatggccc cagccatgaa ggaacttaac cgctagtgcc gaggacacgt taaacgaaca	3124
ggatgggccc ggcacggtgg ctcacgcctg taatcccagc aactgggag gccgaggcag	3184

gtggatcact ctgaggtcag gagtttgagc cagcctggcc aacatggtga aaccccatct 3244
 ccactaaaaa tagaaaaatt agccgggcat ggtgacacat gcctgtagtc ctagctactt 3304
 gggaggctga ggcaggagaa ttgcttgaat ctgggaggca gaggttgcag tgagccgaga 3364
 ttgtgccatt gcactgcagc ctggatgaca gagegagact ctatctcaaa aaaaaa 3420

<210> 6
 <211> 866
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 6

Met Gly Ala Ala Arg Ser Pro Pro Ser Ala Val Pro Gly Pro Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Pro Gly Gly Ala Ser
 20 25 30

Leu Arg Leu Leu Asp His Arg Ala Leu Val Cys Ser Gln Pro Gly Leu
 35 40 45

Asn Cys Thr Val Lys Asn Ser Thr Cys Leu Asp Asp Ser Trp Ile His
 50 55 60

Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser Ser Pro Lys Asp Leu Gln Ile Gln Leu
 65 70 75 80

His Phe Ala His Thr Gln Gln Gly Asp Leu Phe Pro Val Ala His Ile
 85 90 95

Glu Trp Thr Leu Gln Thr Asp Ala Ser Ile Leu Tyr Leu Glu Gly Ala
 100 105 110

Glu Leu Ser Val Leu Gln Leu Asn Thr Asn Glu Arg Leu Cys Val Arg
 115 120 125

Phe Glu Phe Leu Ser Lys Leu Arg His His His Arg Arg Trp Arg Phe
 130 135 140

Thr Phe Ser His Phe Val Val Asp Pro Asp Gln Glu Tyr Glu Val Thr
 145 150 155 160

Val His His Leu Pro Lys Pro Ile Pro Asp Gly Asp Pro Asn His Gln

	165		170		175
Ser Lys Asn Phe Leu Val Pro Asp Cys Glu His Ala Arg Met Lys Val					
	180		185		190
Thr Thr Pro Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile Thr					
	195		200		205
Val Glu Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser Phe Thr Leu Trp					
	210		215		220
Asn Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser Phe Pro His Met					
225		230		235	240
Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile Pro Ala Pro Arg					
	245		250		255
Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu Arg Asn					
	260		265		270
Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln Pro Phe Phe Ser					
	275		280		285
Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr Val Ser Cys Pro					
	290		295		300
Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp Tyr Met Pro Leu Trp					
305		310		315	320
Val Tyr Trp Phe Ile Thr Gly Ile Ser Ile Leu Leu Val Gly Ser Val					
	325		330		335
Ile Leu Leu Ile Val Cys Met Thr Trp Arg Leu Ala Gly Pro Gly Ser					
	340		345		350
Glu Lys Tyr Ser Asp Asp Thr Lys Tyr Thr Asp Gly Leu Pro Ala Ala					
	355		360		365
Asp Leu Ile Pro Pro Pro Leu Lys Pro Arg Lys Val Trp Ile Ile Tyr					
	370		375		380
Ser Ala Asp His Pro Leu Tyr Val Asp Val Val Leu Lys Phe Ala Gln					
385		390		395	400

Phe Leu Leu Thr Ala Cys Gly Thr Glu Val Ala Leu Asp Leu Leu Glu
405 410 415

Glu Gln Ala Ile Ser Glu Ala Gly Val Met Thr Trp Val Gly Arg Gln
420 425 430

Lys Gln Glu Met Val Glu Ser Asn Ser Lys Ile Ile Val Leu Cys Ser
435 440 445

Arg Gly Thr Arg Ala Lys Trp Gln Ala Leu Leu Gly Arg Gly Ala Pro
450 455 460

Val Arg Leu Arg Cys Asp His Gly Lys Pro Val Gly Asp Leu Phe Thr
465 470 475 480

Ala Ala Met Asn Met Ile Leu Pro Asp Phe Lys Arg Pro Ala Cys Phe
485 490 495

Gly Thr Tyr Val Val Cys Tyr Phe Ser Glu Val Ser Cys Asp Gly Asp
500 505 510

Val Pro Asp Leu Phe Gly Ala Ala Pro Arg Tyr Pro Leu Met Asp Arg
515 520 525

Phe Glu Glu Val Tyr Phe Arg Ile Gln Asp Leu Glu Met Phe Gln Pro
530 535 540

Gly Arg Met His Arg Val Gly Glu Leu Ser Gly Asp Asn Tyr Leu Arg
545 550 555 560

Ser Pro Gly Gly Arg Gln Leu Arg Ala Ala Leu Asp Arg Phe Arg Asp
565 570 575

Trp Gln Val Arg Cys Pro Asp Trp Phe Glu Cys Glu Asn Leu Tyr Ser
580 585 590

Ala Asp Asp Gln Asp Ala Pro Ser Leu Asp Glu Glu Val Phe Glu Glu
595 600 605

Pro Leu Leu Pro Pro Gly Thr Gly Ile Val Lys Arg Ala Pro Leu Val
610 615 620

Arg Glu Pro Gly Ser Gln Ala Cys Leu Ala Ile Asp Pro Leu Val Gly

625	630	635	640
Glu Glu Gly Gly Ala Ala Val Ala Lys Leu Glu Pro His Leu Gln Pro	645	650	655
Arg Gly Gln Pro Ala Pro Gln Pro Leu His Thr Leu Val Leu Ala Ala	660	665	670
Glu Glu Gly Ala Leu Val Ala Ala Val Glu Pro Gly Pro Leu Ala Asp	675	680	685
Gly Ala Ala Val Arg Leu Ala Leu Ala Gly Glu Gly Glu Ala Cys Pro	690	695	700
Leu Leu Gly Ser Pro Gly Ala Gly Arg Asn Ser Val Leu Phe Leu Pro	705	710	715
Val Asp Pro Glu Asp Ser Pro Leu Gly Ser Ser Thr Pro Met Ala Ser	725	730	735
Pro Asp Leu Leu Pro Glu Asp Val Arg Glu His Leu Glu Gly Leu Met	740	745	750
Leu Ser Leu Phe Glu Gln Ser Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Gly Cys	755	760	765
Ser Arg Pro Ala Met Val Leu Thr Asp Pro His Thr Pro Tyr Glu Glu	770	775	780
Glu Gln Arg Gln Ser Val Gln Ser Asp Gln Gly Tyr Ile Ser Arg Ser	785	790	795
Ser Pro Gln Pro Pro Glu Gly Leu Thr Glu Met Glu Glu Glu Glu Glu	805	810	815
Glu Glu Gln Asp Pro Gly Lys Pro Ala Leu Pro Leu Ser Pro Glu Asp	820	825	830
Leu Glu Ser Leu Arg Ser Leu Gln Arg Gln Leu Leu Phe Arg Gln Leu	835	840	845
Gln Lys Asn Ser Gly Trp Asp Thr Met Gly Ser Glu Ser Glu Gly Pro	850	855	860

Ser Ala
865

<210> 7
<211> 2691
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (219).. (2594)

<400> 7
aaaacgaaag cactccgtgc tggaagtagg aggagagtca ggactcccag gacagagagt 60
gcacaaacta cccagcacag cccctccgc cccctctgga ggctgaagag ggattccagc 120
ccctgccacc cacagacacg ggctgactgg ggtgtctgcc ccccttgggg gggggcagca 180
cagggcctca ggctgggtg ccacctggca cctagaag atg cct gtg ccc tgg ttc 236
Met Pro Val Pro Trp Phe
1 5
ttg ctg tcc ttg gca ctg ggc cga agc cca gtg gtc ctt tct ctg gag 284
Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro Val Val Leu Ser Leu Glu
10 15 20
agg ctt gtg ggg cct cag gac gct acc cac tgc tct ccg gtg agt ctg 332
Arg Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His Cys Ser Pro Val Ser Leu
25 30 35
gaa ccc tgg gga gac gag gaa agg ctc agg gtt cag ttt ttg gct cag 380
Glu Pro Trp Gly Asp Glu Glu Arg Leu Arg Val Gln Phe Leu Ala Gln
40 45 50
caa agc ctt agc ctg gct cct gtc act gct gcc act gcc aga act gcc 428
Gln Ser Leu Ser Leu Ala Pro Val Thr Ala Ala Thr Ala Arg Thr Ala
55 60 65 70
ctg tct ggt ctg tct ggt gct gat ggt aga aga gaa gaa cgg gga agg 476
Leu Ser Gly Leu Ser Gly Ala Asp Gly Arg Arg Glu Glu Arg Gly Arg
75 80 85
ggc aag agc tgg gtc tgt ctt tct ctg gga ggg tct ggg aat acg gag 524
Gly Lys Ser Trp Val Cys Leu Ser Leu Gly Gly Ser Gly Asn Thr Glu
90 95 100
ccc cag aaa aag ggc ctc tcc tgc cgc ctc tgg gac agt gac ata ctc 572
Pro Gln Lys Lys Gly Leu Ser Cys Arg Leu Trp Asp Ser Asp Ile Leu
105 110 115
tgc ctg cct ggg gac atc gtg cct gct ccg ggc ccc gtg ctg gcg cct 620
Cys Leu Pro Gly Asp Ile Val Pro Ala Pro Gly Pro Val Leu Ala Pro
120 125 130

acg cac ctg cag aca gag ctg gtg ctg agg tgc cag aag gag acc gac Thr His Leu Gln Thr Glu Leu Val Leu Arg Cys Gln Lys Glu Thr Asp 135 140 145 150	668
tgt gac ctc tgt ctg cgt gtg gct gtc cac ttg gcc gtg cat ggg cac Cys Asp Leu Cys Leu Arg Val Ala Val His Leu Ala Val His Gly His 155 160 165	716
tgg gaa gag cct gaa gat gag gaa aag ttt gga gga gca gct gac tca Trp Glu Glu Pro Glu Asp Glu Glu Lys Phe Gly Gly Ala Ala Asp Ser 170 175 180	764
ggg gtg gag gag cct agg aat gcc tct ctc cag gcc caa gtc gtg ctc Gly Val Glu Glu Pro Arg Asn Ala Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu 185 190 195	812
tcc ttc cag gcc tac cct act gcc cgc tgc gtc ctg ctg gag gtg caa Ser Phe Gln Ala Tyr Pro Thr Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln 200 205 210	860
gtg cct gct gcc ctt gtg cag ttt ggt cag tct gtg ggc tct gtg gta Val Pro Ala Ala Leu Val Gln Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val 215 220 225 230	908
tat gac tgc ttc gag gct gcc cta ggg agt gag gta cga atc tgg tcc Tyr Asp Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser 235 240 245	956
tat act cag ccc agg tac gag aag gaa ctc aac cac aca cag cag ctg Tyr Thr Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu 250 255 260	1004
cct gac tgc agg ggg ctc gaa gtc tgg aac agc atc ccg agc tgc tgg Pro Asp Cys Arg Gly Leu Glu Val Trp Asn Ser Ile Pro Ser Cys Trp 265 270 275	1052
gcc ctg ccc tgg ctc aac gtg tca gca gat ggt gac aac gtg cat ctg Ala Leu Pro Trp Leu Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu 280 285 290	1100
gtt ctg aat gtc tct gag gag cag cac ttc ggc ctc tcc ctg tac tgg Val Leu Asn Val Ser Glu Glu Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp 295 300 305 310	1148
aat cag gtc cag ggc ccc cca aaa ccc cgg tgg cac aaa aac ctg act Asn Gln Val Gln Gly Pro Pro Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr 315 320 325	1196
gga ccg cag atc att acc ttg aac cac aca gac ctg gtt ccc tgc ctc Gly Pro Gln Ile Ile Thr Leu Asn His Thr Asp Leu Val Pro Cys Leu 330 335 340	1244
tgt att cag gtg tgg cct ctg gaa cct gac tcc gtt agg acg aac atc Cys Ile Gln Val Trp Pro Leu Glu Pro Asp Ser Val Arg Thr Asn Ile 345 350 355	1292
tgc ccc ttc agg gag gac ccc cgc gca cac cag aac ctc tgg caa gcc Cys Pro Phe Arg Glu Asp Pro Arg Ala His Gln Asn Leu Trp Gln Ala	1340

360	365	370	
gcc cga ctg cga ctg ctg acc ctg cag agc tgg ctg ctg gac gca ccg Ala Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro 375 380 385 390			1388
tgc tcg ctg ccc gca gaa gcg gca ctg tgc tgg cgg gct ccg ggt ggg Cys Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly 395 400 405			1436
gac ccc tgc cag cca ctg gtc cca ccg ctt tcc tgg gag aac gtc act Asp Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr 410 415 420			1484
gtg gac aag gtt ctc gag ttc cca ttg ctg aaa ggc cac cct aac ctc Val Asp Lys Val Leu Glu Phe Pro Leu Leu Lys Gly His Pro Asn Leu 425 430 435			1532
tgt gtt cag gtg aac agc tcg gag aag ctg cag ctg cag gag tgc ttg Cys Val Gln Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu 440 445 450			1580
tgg get gac tcc ctg ggg cct ctc aaa gac gat gtg cta ctg ttg gag Trp Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu 455 460 465 470			1628
aca cga ggc ccc cag gac aac aga tcc ctc tgt gcc ttg gaa ccc agt Thr Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser 475 480 485			1676
ggc tgt act tca cta ccc agc aaa gcc tcc acg agg gca gct cgc ctt Gly Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu 490 495 500			1724
gga gag tac tta cta caa gac ctg cag tca ggc cag tgt ctg cag cta Gly Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu 505 510 515			1772
tgg gac gat gac ttg gga gcg cta tgg gcc tgc ccc atg gac aaa tac Trp Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr 520 525 530			1820
atc cac aag cgc tgg gcc ctc gtg tgg ctg gcc tgc cta ctc ttt gcc Ile His Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala 535 540 545 550			1868
gct gcg ctt tcc ctc atc ctc ctt ctc aaa aag gat cac gcg aaa ggg Ala Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Gly 555 560 565			1916
tgg ctg agg ctc ttg aaa cag gac gtc cgc tcg ggg gcg gcc gcc agg Trp Leu Arg Leu Leu Lys Gln Asp Val Arg Ser Gly Ala Ala Ala Arg 570 575 580			1964
ggc cgc gcg gct ctg ctc ctc tac tca gcc gat gac tcg ggt ttc gag Gly Arg Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu 585 590 595			2012

cgc ctg gtg ggc gcc ctg gcg tgc gcc ctg tgc cag ctg ccg ctg cgc Arg Leu Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro Leu Arg 600 605 610	2060
gtg gcc gta gac ctg tgg agc cgt cgt gaa ctg agc gcg cag ggg ccc Val Ala Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro 615 620 625 630	2108
gtg gct tgg ttt cac gcg cag cgg cgc cag acc ctg cag gag ggc ggc Val Ala Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly 635 640 645	2156
gtg gtg gtc ttg ctc ttc tct ccc ggt gcg gtg gcg ctg tgc agc gag Val Val Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu Cys Ser Glu 650 655 660	2204
tgg cta cag gat ggg gtg tcc ggg ccc ggg gcg cac ggc ccg cac gac Trp Leu Gln Asp Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly Pro His Asp 665 670 675	2252
gcc ttc cgc gcc tgc ctc agc tgc gtg ctg ccc gac ttc ttg cag ggc Ala Phe Arg Ala Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu Gln Gly 680 685 690	2300
cgg gcg ccc ggc agc tac gtg ggg gcc tgc ttc gac agg ctg ctc cac Arg Ala Pro Gly Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu Leu His 695 700 705 710	2348
ccg gac gcc gta ccc gcc ctt ttc cgc acc gtg ccc gtc ttc aca ctg Pro Asp Ala Val Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val Phe Thr Leu 715 720 725	2396
ccc tcc caa ctg cca gac ttc ctg ggg gcc ctg cag cag cct cgc gcc Pro Ser Gln Leu Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro Arg Ala 730 735 740	2444
ccg cgt tcc ggg cgg ctc caa gag aga gcg gag caa gtg tcc cgg gcc Pro Arg Ser Gly Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val Ser Arg Ala 745 750 755	2492
ctt cag cca gcc ctg gat agc tac ttc cat ccc ccg ggg act ccc gcg Leu Gln Pro Ala Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr Pro Ala 760 765 770	2540
ccg gga cgc ggg gtg gga cca ggg gcg gga cct ggg gcg ggg gac ggg Pro Gly Arg Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly Asp Gly 775 780 785 790	2588
act taa ataaaggcag acgctgtttt tctacccatg tgccccaaaa aaaaaaaaaa Thr	2644
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	2691

<210> 8
<211> 791
<212> PRT

<213> 人

<400> 8

Met Pro Val Pro Trp Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro
1 5 10 15

Val Val Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His
20 25 30

Cys Ser Pro Val Ser Leu Glu Pro Trp Gly Asp Glu Glu Arg Leu Arg
35 40 45

Val Gln Phe Leu Ala Gln Gln Ser Leu Ser Leu Ala Pro Val Thr Ala
50 55 60

Ala Thr Ala Arg Thr Ala Leu Ser Gly Leu Ser Gly Ala Asp Gly Arg
65 70 75 80

Arg Glu Glu Arg Gly Arg Gly Lys Ser Trp Val Cys Leu Ser Leu Gly
85 90 95

Gly Ser Gly Asn Thr Glu Pro Gln Lys Lys Gly Leu Ser Cys Arg Leu
100 105 110

Trp Asp Ser Asp Ile Leu Cys Leu Pro Gly Asp Ile Val Pro Ala Pro
115 120 125

Gly Pro Val Leu Ala Pro Thr His Leu Gln Thr Glu Leu Val Leu Arg
130 135 140

Cys Gln Lys Glu Thr Asp Cys Asp Leu Cys Leu Arg Val Ala Val His
145 150 155 160

Leu Ala Val His Gly His Trp Glu Glu Pro Glu Asp Glu Glu Lys Phe
165 170 175

Gly Gly Ala Ala Asp Ser Gly Val Glu Glu Pro Arg Asn Ala Ser Leu
180 185 190

Gln Ala Gln Val Val Leu Ser Phe Gln Ala Tyr Pro Thr Ala Arg Cys
195 200 205

Val Leu Leu Glu Val Gln Val Pro Ala Ala Leu Val Gln Phe Gly Gln
210 215 220

Ser Val Gly Ser Val Val Tyr Asp Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser
225 230 235 240

Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr Thr Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu
245 250 255

Asn His Thr Gln Gln Leu Pro Asp Cys Arg Gly Leu Glu Val Trp Asn
260 265 270

Ser Ile Pro Ser Cys Trp Ala Leu Pro Trp Leu Asn Val Ser Ala Asp
275 280 285

Gly Asp Asn Val His Leu Val Leu Asn Val Ser Glu Glu Gln His Phe
290 295 300

Gly Leu Ser Leu Tyr Trp Asn Gln Val Gln Gly Pro Pro Lys Pro Arg
305 310 315 320

Trp His Lys Asn Leu Thr Gly Pro Gln Ile Ile Thr Leu Asn His Thr
325 330 335

Asp Leu Val Pro Cys Leu Cys Ile Gln Val Trp Pro Leu Glu Pro Asp
340 345 350

Ser Val Arg Thr Asn Ile Cys Pro Phe Arg Glu Asp Pro Arg Ala His
355 360 365

Gln Asn Leu Trp Gln Ala Ala Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser
370 375 380

Trp Leu Leu Asp Ala Pro Cys Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys
385 390 395 400

Trp Arg Ala Pro Gly Gly Asp Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu
405 410 415

Ser Trp Glu Asn Val Thr Val Asp Lys Val Leu Glu Phe Pro Leu Leu
420 425 430

Lys Gly His Pro Asn Leu Cys Val Gln Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu
435 440 445

Gln Leu Gln Glu Cys Leu Trp Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp
450 455 460

Asp Val Leu Leu Leu Glu Thr Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu
465 470 475 480

Cys Ala Leu Glu Pro Ser Gly Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser
485 490 495

Thr Arg Ala Ala Arg Leu Gly Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser
500 505 510

Gly Gln Cys Leu Gln Leu Trp Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala
515 520 525

Cys Pro Met Asp Lys Tyr Ile His Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu
530 535 540

Ala Cys Leu Leu Phe Ala Ala Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys
545 550 555 560

Lys Asp His Ala Lys Gly Trp Leu Arg Leu Leu Lys Gln Asp Val Arg
565 570 575

Ser Gly Ala Ala Ala Arg Gly Arg Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala
580 585 590

Asp Asp Ser Gly Phe Glu Arg Leu Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu
595 600 605

Cys Gln Leu Pro Leu Arg Val Ala Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu
610 615 620

Leu Ser Ala Gln Gly Pro Val Ala Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln
625 630 635 640

Thr Leu Gln Glu Gly Gly Val Val Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly Ala
645 650 655

Val Ala Leu Cys Ser Glu Trp Leu Gln Asp Gly Val Ser Gly Pro Gly
660 665 670

Ala His Gly Pro His Asp Ala Phe Arg Ala Ser Leu Ser Cys Val Leu
675 680 685

Pro Asp Phe Leu Gln Gly Arg Ala Pro Gly Ser Tyr Val Gly Ala Cys
690 695 700

Phe Asp Arg Leu Leu His Pro Asp Ala Val Pro Ala Leu Phe Arg Thr
705 710 715 720

Val Pro Val Phe Thr Leu Pro Ser Gln Leu Pro Asp Phe Leu Gly Ala
725 730 735

Leu Gln Gln Pro Arg Ala Pro Arg Ser Gly Arg Leu Gln Glu Arg Ala
740 745 750

Glu Gln Val Ser Arg Ala Leu Gln Pro Ala Leu Asp Ser Tyr Phe His
755 760 765

Pro Pro Gly Thr Pro Ala Pro Gly Arg Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly
770 775 780

Pro Gly Ala Gly Asp Gly Thr
785 790

<210> 9
<211> 2478
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (219).. (2381)

<400> 9
aaaacgaaag cactccgtgc tggaagtagg aggagagtca ggactcccag gacagagagt 60
gcacaaacta cccagcacag cccctccgc cccctctgga ggctgaagag ggattccagc 120
cctgccacc cacagacacg ggctgactgg ggtgtctgcc ccccttgggg gggggcagca 180
cagggcctca ggctgggtg ccacctggca cctagaag atg cct gtg ccc tgg ttc 236
Met Pro Val Pro Trp Phe
1 5
ttg ctg tcc ttg gca ctg ggc cga agc cca gtg gtc ctt tct ctg gag 284
Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro Val Val Leu Ser Leu Glu
10 15 20
agg ctt gtg ggg cct cag gac gct acc cac tgc tct ccg ggc ctc tcc 332
Arg Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His Cys Ser Pro Gly Leu Ser
25 30 35

tgc cgc ctc tgg gac agt gac ata ctc tgc ctg cct ggg gac atc gtg Cys Arg Leu Trp Asp Ser Asp Ile Leu Cys Leu Pro Gly Asp Ile Val 40 45 50	380
cct gct ccg ggc ccc gtg ctg gcg cct acg cac ctg cag aca gag ctg Pro Ala Pro Gly Pro Val Leu Ala Pro Thr His Leu Gln Thr Glu Leu 55 60 65 70	428
gtg ctg agg tgc cag aag gag acc gac tgt gac ctc tgt ctg cgt gtg Val Leu Arg Cys Gln Lys Glu Thr Asp Cys Asp Leu Cys Leu Arg Val 75 80 85	476
gct gtc cac ttg gcc gtg cat ggg cac tgg gaa gag cct gaa gat gag Ala Val His Leu Ala Val His Gly His Trp Glu Glu Pro Glu Asp Glu 90 95 100	524
gaa aag ttt gga gga gca gct gac tca ggg gtg gag gag cct agg aat Glu Lys Phe Gly Gly Ala Ala Asp Ser Gly Val Glu Glu Pro Arg Asn 105 110 115	572
gcc tct ctc cag gcc caa gtc gtg ctc tcc ttc cag gcc tac cct act Ala Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu Ser Phe Gln Ala Tyr Pro Thr 120 125 130	620
gcc cgc tgc gtc ctg ctg gag gtg caa gtg cct gct gcc ctt gtg cag Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val Pro Ala Ala Leu Val Gln 135 140 145 150	668
ttt ggt cag tct gtg ggc tct gtg gta tat gac tgc ttc gag gct gcc Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr Asp Cys Phe Glu Ala Ala 155 160 165	716
cta ggg agt gag gta cga atc tgg tcc tat act cag ccc agg tac gag Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr Thr Gln Pro Arg Tyr Glu 170 175 180	764
aag gaa ctc aac cac aca cag cag ctg cct gac tgc agg ggg ctc gaa Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro Asp Cys Arg Gly Leu Glu 185 190 195	812
gtc tgg aac agc atc ccg agc tgc tgg gcc ctg ccc tgg ctc aac gtg Val Trp Asn Ser Ile Pro Ser Cys Trp Ala Leu Pro Trp Leu Asn Val 200 205 210	860
tca gca gat ggt gac aac gtg cat ctg gtt ctg aat gtc tct gag gag Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu Val Leu Asn Val Ser Glu Glu 215 220 225 230	908
cag cac ttc ggc ctc tcc ctg tac tgg aat cag gtc cag ggc ccc cca Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp Asn Gln Val Gln Gly Pro Pro 235 240 245	956
aaa ccc cgg tgg cac aaa aac ctg act gga ccg cag atc att acc ttg Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr Gly Pro Gln Ile Ile Thr Leu 250 255 260	1004
aac cac aca gac ctg gtt ccc tgc ctc tgt att cag gtg tgg cct ctg	1052

Asn	His	Thr	Asp	Leu	Val	Pro	Cys	Leu	Cys	Ile	Gln	Val	Trp	Pro	Leu	
		265					270					275				
gaa	cct	gac	tcc	gtt	agg	acg	aac	atc	tgc	ccc	ttc	agg	gag	gac	ccc	1100
Glu	Pro	Asp	Ser	Val	Arg	Thr	Asn	Ile	Cys	Pro	Phe	Arg	Glu	Asp	Pro	
		280					285					290				
cgc	gca	cac	cag	aac	ctc	tgg	caa	gcc	gcc	cga	ctg	cga	ctg	ctg	acc	1148
Arg	Ala	His	Gln	Asn	Leu	Trp	Gln	Ala	Ala	Arg	Leu	Arg	Leu	Leu	Thr	
		295			300					305					310	
ctg	cag	agc	tgg	ctg	ctg	gac	gca	ccg	tgc	tgc	ctg	ccc	gca	gaa	gcg	1196
Leu	Gln	Ser	Trp	Leu	Leu	Asp	Ala	Pro	Cys	Ser	Leu	Pro	Ala	Glu	Ala	
				315					320					325		
gca	ctg	tgc	tgg	egg	gct	ccg	ggt	ggg	gac	ccc	tgc	cag	cca	ctg	gtc	1244
Ala	Leu	Cys	Trp	Arg	Ala	Pro	Gly	Gly	Asp	Pro	Cys	Gln	Pro	Leu	Val	
			330					335					340			
cca	ccg	ctt	tcc	tgg	gag	aac	gtc	act	gtg	gac	aag	gtt	ctc	gag	ttc	1292
Pro	Pro	Leu	Ser	Trp	Glu	Asn	Val	Thr	Val	Asp	Lys	Val	Leu	Glu	Phe	
		345					350					355				
cca	ttg	ctg	aaa	ggc	cac	cct	aac	ctc	tgt	gtt	cag	gtg	aac	agc	tgc	1340
Pro	Leu	Leu	Lys	Gly	His	Pro	Asn	Leu	Cys	Val	Gln	Val	Asn	Ser	Ser	
		360					365					370				
gag	aag	ctg	cag	ctg	cag	gag	tgc	ttg	tgg	gct	gac	tcc	ctg	ggg	cct	1388
Glu	Lys	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Cys	Leu	Trp	Ala	Asp	Ser	Leu	Gly	Pro	
		375			380					385					390	
ctc	aaa	gac	gat	gtg	cta	ctg	ttg	gag	aca	cga	ggc	ccc	cag	gac	aac	1436
Leu	Lys	Asp	Asp	Val	Leu	Leu	Leu	Glu	Thr	Arg	Gly	Pro	Gln	Asp	Asn	
				395					400					405		
aga	tcc	ctc	tgt	gcc	ttg	gaa	ccc	agt	ggc	tgt	act	tca	cta	ccc	agc	1484
Arg	Ser	Leu	Cys	Ala	Leu	Glu	Pro	Ser	Gly	Cys	Thr	Ser	Leu	Pro	Ser	
			410					415					420			
aaa	gcc	tcc	acg	agg	gca	gct	cgc	ctt	gga	gag	tac	tta	cta	caa	gac	1532
Lys	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Ala	Arg	Leu	Gly	Glu	Tyr	Leu	Leu	Gln	Asp	
		425					430					435				
ctg	cag	tca	ggc	cag	tgt	ctg	cag	cta	tgg	gac	gat	gac	ttg	gga	gcg	1580
Leu	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Leu	Gln	Leu	Trp	Asp	Asp	Asp	Leu	Gly	Ala	
		440					445				450					
cta	tgg	gcc	tgc	ccc	atg	gac	aaa	tac	atc	cac	aag	cgc	tgg	gcc	ctc	1628
Leu	Trp	Ala	Cys	Pro	Met	Asp	Lys	Tyr	Ile	His	Lys	Arg	Trp	Ala	Leu	
		455			460					465					470	
gtg	tgg	ctg	gcc	tgc	cta	ctc	ttt	gcc	gct	gcg	ctt	tcc	ctc	atc	ctc	1676
Val	Trp	Leu	Ala	Cys	Leu	Leu	Phe	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Leu	Ile	Leu	
			475					480						485		
ctt	ctc	aaa	aag	gat	cac	gcg	aaa	ggg	tgg	ctg	agg	ctc	ttg	aaa	cag	1724
Leu	Leu	Lys	Lys	Asp	His	Ala	Lys	Gly	Trp	Leu	Arg	Leu	Leu	Lys	Gln	
		490						495					500			

gac gtc cgc tgc ggg gcg gcc gcc agg ggc cgc gcg gct ctg ctc ctc Asp Val Arg Ser Gly Ala Ala Ala Arg Gly Arg Ala Ala Leu Leu Leu 505 510 515	1772
tac tca gcc gat gac tgc ggt ttc gag cgc ctg gtg ggc gcc ctg gcg Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu Arg Leu Val Gly Ala Leu Ala 520 525 530	1820
tgc gcc ctg tgc cag ctg ccg ctg cgc gtg gcc gta gac ctg tgg agc Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro Leu Arg Val Ala Val Asp Leu Trp Ser 535 540 545 550	1868
cgt cgt gaa ctg agc gcg cag ggg ccc gtg gct tgg ttt cac gcg cag Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro Val Ala Trp Phe His Ala Gln 555 560 565	1916
cgg cgc cag acc ctg cag gag ggc ggc gtg gtg gtc ttg ctc ttc tct Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly Val Val Val Leu Leu Phe Ser 570 575 580	1964
ccc ggt gcg gtg gcg ctg tgc agc gag tgg cta cag gat ggg gtg tcc Pro Gly Ala Val Ala Leu Cys Ser Glu Trp Leu Gln Asp Gly Val Ser 585 590 595	2012
ggg ccc ggg gcg cac ggc ccg cac gac gcc ttc cgc gcc tgc ctc agc Gly Pro Gly Ala His Gly Pro His Asp Ala Phe Arg Ala Ser Leu Ser 600 605 610	2060
tgc gtg ctg ccc gac ttc ttg cag ggc cgg gcg ccc ggc agc tac gtg Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu Gln Gly Arg Ala Pro Gly Ser Tyr Val 615 620 625 630	2108
ggg gcc tgc ttc gac agg ctg ctc cac ccg gac gcc gta ccc gcc ctt Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu Leu His Pro Asp Ala Val Pro Ala Leu 635 640 645	2156
ttc cgc acc gtg ccc gtc ttc aca ctg ccc tcc caa ctg cca gac ttc Phe Arg Thr Val Pro Val Phe Thr Leu Pro Ser Gln Leu Pro Asp Phe 650 655 660	2204
ctg ggg gcc ctg cag cag cct cgc gcc ccg cgt tcc ggg cgg ctc caa Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro Arg Ala Pro Arg Ser Gly Arg Leu Gln 665 670 675	2252
gag aga gcg gag caa gtg tcc cgg gcc ctt cag cca gcc ctg gat agc Glu Arg Ala Glu Gln Val Ser Arg Ala Leu Gln Pro Ala Leu Asp Ser 680 685 690	2300
tac ttc cat ccc ccg ggg act ccc gcg ccg gga cgc ggg gtg gga cca Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr Pro Ala Pro Gly Arg Gly Val Gly Pro 695 700 705 710	2348
ggg gcg gga cct ggg gcg ggg gac ggg act taa ataaaggcag acgctgtttt Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly Asp Gly Thr 715 720	2401
tctacccatg tggeccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2461

aaaaaaaaa aaaaaaa

2478

<210> 10

<211> 720

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

Met Pro Val Pro Trp Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro
1 5 10 15

Val Val Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His
20 25 30

Cys Ser Pro Gly Leu Ser Cys Arg Leu Trp Asp Ser Asp Ile Leu Cys
35 40 45

Leu Pro Gly Asp Ile Val Pro Ala Pro Gly Pro Val Leu Ala Pro Thr
50 55 60

His Leu Gln Thr Glu Leu Val Leu Arg Cys Gln Lys Glu Thr Asp Cys
65 70 75 80

Asp Leu Cys Leu Arg Val Ala Val His Leu Ala Val His Gly His Trp
85 90 95

Glu Glu Pro Glu Asp Glu Glu Lys Phe Gly Gly Ala Ala Asp Ser Gly
100 105 110

Val Glu Glu Pro Arg Asn Ala Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu Ser
115 120 125

Phe Gln Ala Tyr Pro Thr Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val
130 135 140

Pro Ala Ala Leu Val Gln Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr
145 150 155 160

Asp Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr
165 170 175

Thr Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro
180 185 190

Asp Cys Arg Gly Leu Glu Val Trp Asn Ser Ile Pro Ser Cys Trp Ala
195 200 205

Leu Pro Trp Leu Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu Val
210 215 220

Leu Asn Val Ser Glu Glu Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp Asn
225 230 235 240

Gln Val Gln Gly Pro Pro Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr Gly
245 250 255

Pro Gln Ile Ile Thr Leu Asn His Thr Asp Leu Val Pro Cys Leu Cys
260 265 270

Ile Gln Val Trp Pro Leu Glu Pro Asp Ser Val Arg Thr Asn Ile Cys
275 280 285

Pro Phe Arg Glu Asp Pro Arg Ala His Gln Asn Leu Trp Gln Ala Ala
290 295 300

Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro Cys
305 310 315 320

Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly Asp
325 330 335

Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr Val
340 345 350

Asp Lys Val Leu Glu Phe Pro Leu Leu Lys Gly His Pro Asn Leu Cys
355 360 365

Val Gln Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu Trp
370 375 380

Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu Thr
385 390 395 400

Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser Gly
405 410 415

Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu Gly

420	425	430
Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu Trp		
435	440	445
Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr Ile		
450	455	460
His Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala Ala		
465	470	475
Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Gly Trp		
485	490	495
Leu Arg Leu Leu Lys Gln Asp Val Arg Ser Gly Ala Ala Ala Arg Gly		
500	505	510
Arg Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu Arg		
515	520	525
Leu Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro Leu Arg Val		
530	535	540
Ala Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro Val		
545	550	555
Ala Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly Val		
565	570	575
Val Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu Cys Ser Glu Trp		
580	585	590
Leu Gln Asp Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly Pro His Asp Ala		
595	600	605
Phe Arg Ala Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu Gln Gly Arg		
610	615	620
Ala Pro Gly Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu Leu His Pro		
625	630	635
Asp Ala Val Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val Phe Thr Leu Pro		
645	650	655

Ser Gln Leu Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro Arg Ala Pro
660 665 670

Arg Ser Gly Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val Ser Arg Ala Leu
675 680 685

Gln Pro Ala Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr Pro Ala Pro
690 695 700

Gly Arg Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly Asp Gly Thr
705 710 715 720

<210> 11
<211> 2527
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (219)..(1835)

<400> 11
aaaacgaaag cactccgtgc tggaagtagg aggagagtca ggactcccag gacagagagt 60
gcacaaacta cccagcacag cccctccgc cccctctgga ggctgaagag ggattccagc 120
cctgccacc cacagacacg ggctgactgg ggtgtctgcc cccctgggg gggggcagca 180
cagggcctca ggctgggtg ccacctggca cctagaag atg cct gtg ccc tgg ttc 236
Met Pro Val Pro Trp Phe
1 5
ttg ctg tcc ttg gca ctg ggc cga agc cca gtg gtc ctt tct ctg gag 284
Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro Val Val Leu Ser Leu Glu
10 15 20
agg ctt gtg ggg cct cag gac gct acc cac tgc tct ccg ggc ctc tcc 332
Arg Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His Cys Ser Pro Gly Leu Ser
25 30 35
tgc cgc ctc tgg gac agt gac ata ctc tgc ctg cct ggg gac atc gtg 380
Cys Arg Leu Trp Asp Ser Asp Ile Leu Cys Leu Pro Gly Asp Ile Val
40 45 50
cct gct ccg ggc ccc gtg ctg gcg cct acg cac ctg cag aca gag ctg 428
Pro Ala Pro Gly Pro Val Leu Ala Pro Thr His Leu Gln Thr Glu Leu
55 60 65 70
gtg ctg agg tgc cag aag gag acc gac tgt gac ctc tgt ctg cgt gtg 476
Val Leu Arg Cys Gln Lys Glu Thr Asp Cys Asp Leu Cys Leu Arg Val
75 80 85

gct gtc cac ttg gcc gtg cat ggg cac tgg gaa gag cct gaa gat gag Ala Val His Leu Ala Val His Gly His Trp Glu Glu Pro Glu Asp Glu 90 95 100	524
gaa aag ttt gga gga gca gct gac tca ggg gtg gag gag cct agg aat Glu Lys Phe Gly Gly Ala Ala Asp Ser Gly Val Glu Glu Pro Arg Asn 105 110 115	572
gcc tct ctc cag gcc caa gtc gtg ctc tcc ttc cag gcc tac cct act Ala Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu Ser Phe Gln Ala Tyr Pro Thr 120 125 130	620
gcc cgc tgc gtc ctg ctg gag gtg caa gtg cct gct gcc ctt gtg cag Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val Pro Ala Ala Leu Val Gln 135 140 145 150	668
ttt ggt cag tct gtg ggc tct gtg gta tat gac tgc ttc gag gct gcc Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr Asp Cys Phe Glu Ala Ala 155 160 165	716
cta ggg agt gag gta cga atc tgg tcc tat act cag ccc agg tac gag Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr Thr Gln Pro Arg Tyr Glu 170 175 180	764
aag gaa ctc aac cac aca cag cag ctg cct gcc ctg ccc tgg ctc aac Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro Ala Leu Pro Trp Leu Asn 185 190 195	812
gtg tca gca gat ggt gac aac gtg cat ctg gtt ctg aat gtc tct gag Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu Val Leu Asn Val Ser Glu 200 205 210	860
gag cag cac ttc ggc ctc tcc ctg tac tgg aat cag gtc cag ggc ccc Glu Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp Asn Gln Val Gln Gly Pro 215 220 225 230	908
cca aaa ccc cgg tgg cac aaa aac ctg act gga ccg cag atc att acc Pro Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr Gly Pro Gln Ile Ile Thr 235 240 245	956
ttg aac cac aca gac ctg gtt ccc tgc ctc tgt att cag gtg tgg cct Leu Asn His Thr Asp Leu Val Pro Cys Leu Cys Ile Gln Val Trp Pro 250 255 260	1004
ctg gaa cct gac tcc gtt agg acg aac atc tgc ccc ttc agg gag gac Leu Glu Pro Asp Ser Val Arg Thr Asn Ile Cys Pro Phe Arg Glu Asp 265 270 275	1052
ccc cgc gca cac cag aac ctc tgg caa gcc gcc cga ctg cga ctg ctg Pro Arg Ala His Gln Asn Leu Trp Gln Ala Ala Arg Leu Arg Leu Leu 280 285 290	1100
acc ctg cag agc tgg ctg ctg gac gca ccg tgc tcg ctg ccc gca gaa Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro Cys Ser Leu Pro Ala Glu 295 300 305 310	1148
gcg gca ctg tgc tgg cgg gct ccg ggt ggg gac ccc tgc cag cca ctg Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly Asp Pro Cys Gln Pro Leu	1196

315	320	325	
gtc cca ccg ctt tcc tgg gag aac	gtc act gtg gac aag gtt ctc gag		1244
Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn	Val Thr Val Asp Lys Val Leu Glu		
330	335	340	
ttc cca ttg ctg aaa ggc cac cct aac ctc tgt gtt cag gtg aac agc			1292
Phe Pro Leu Leu Lys Gly His Pro Asn Leu Cys Val Gln Val Asn Ser			
345	350	355	
tcg gag aag ctg cag ctg cag gag tgc ttg tgg gct gac tcc ctg ggg			1340
Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu Trp Ala Asp Ser Leu Gly			
360	365	370	
cct ctc aaa gac gat gtg cta ctg ttg gag aca cga ggc ccc cag gac			1388
Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu Thr Arg Gly Pro Gln Asp			
375	380	385	390
aac aga tcc ctc tgt gcc ttg gaa ccc agt ggc tgt act tca cta ccc			1436
Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser Gly Cys Thr Ser Leu Pro			
395	400	405	
agc aaa gcc tcc acg agg gca gct cgc ctt gga gag tac tta cta caa			1484
Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu Gly Glu Tyr Leu Leu Gln			
410	415	420	
gac ctg cag tca ggc cag tgt ctg cag cta tgg gac gat gac ttg gga			1532
Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu Trp Asp Asp Asp Leu Gly			
425	430	435	
gcg cta tgg gcc tgc ccc atg gac aaa tac atc cac aag cgc tgg gcc			1580
Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr Ile His Lys Arg Trp Ala			
440	445	450	
ctc gtg tgg ctg gcc tgc cta ctc ttt gcc gct gcg ctt tcc ctc atc			1628
Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala Ala Ala Leu Ser Leu Ile			
455	460	465	470
ctc ctt ctc aaa aag gat cac gcg aaa ggg tgg ctg agg ctc ttg aaa			1676
Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Gly Trp Leu Arg Leu Leu Lys			
475	480	485	
cag gac gtc cgc tcg ggg ggt gag tgg gag caa gcg ctg ggc gga ggg			1724
Gln Asp Val Arg Ser Gly Gly Glu Trp Glu Gln Ala Leu Gly Gly Gly			
490	495	500	
ccg ccc ccg ggg agc cag gcc tgt gcc agc tca cct ctt ccc tcc cca			1772
Pro Pro Pro Gly Ser Gln Ala Cys Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ser Pro			
505	510	515	
tct gtt ttc tcc ggc agc ggc cgc cag ggg ccg cgc ggc tct gct cct			1820
Ser Val Phe Ser Gly Ser Gly Arg Gln Gly Pro Arg Gly Ser Ala Pro			
520	525	530	
cta ctc agc cga tga ctcggtttc gagegcctgg tgggcgccct ggcgtcggcc			1875
Leu Leu Ser Arg			
535			

```

ctgtgccagc tgcgctgcg cgtggccgta gacctgtgga gccgtcgtga actgagcgcg 1935
caggggcccc tggtttggtt tcacgcgcag cggcgccaga ccctgcagga gggcggcgtg 1995
gtggtcttgc ttttctctcc cgggtgcgtg gcgctgtgca gcgagtggct acaggatggg 2055
gtgtccgggc ccggggcgca cggccgcac gacgccttcc gcgcctcgt cagctgcgtg 2115
ctgcccgaact ttttgcaggg ccggggcgcc ggcagctacg tgggggcctg cttegacagg 2175
ctgctccacc cggacgcgt acccgccctt ttccgcaccg tgcctgttt cactgtccc 2235
tcccaactgc cagacttctt gggggccctg cagcagctc gcgcgccgcg ttccggggcg 2295
ctccaagaga gagcggagca agtgtcccg gcccttcagc cagccctgga tagctaattc 2355
cateccccgg ggactccgc gccgggacgc ggggtgggac caggggcggg acctggggcg 2415
ggggacggga cttaaataaa ggcagacgt gtttttctac ccatgtggcc caaaaaaaaa 2475
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2527

```

```

<210> 12
<211> 538
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 12

```

```

Met Pro Val Pro Trp Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro
1           5           10          15

```

```

Val Val Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His
          20          25          30

```

```

Cys Ser Pro Gly Leu Ser Cys Arg Leu Trp Asp Ser Asp Ile Leu Cys
          35          40          45

```

```

Leu Pro Gly Asp Ile Val Pro Ala Pro Gly Pro Val Leu Ala Pro Thr
          50          55          60

```

```

His Leu Gln Thr Glu Leu Val Leu Arg Cys Gln Lys Glu Thr Asp Cys
65           70           75          80

```

```

Asp Leu Cys Leu Arg Val Ala Val His Leu Ala Val His Gly His Trp
          85          90          95

```

```

Glu Glu Pro Glu Asp Glu Glu Lys Phe Gly Gly Ala Ala Asp Ser Gly
          100          105          110

```

Val Glu Glu Pro Arg Asn Ala Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu Ser
115 120 125

Phe Gln Ala Tyr Pro Thr Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val
130 135 140

Pro Ala Ala Leu Val Gln Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr
145 150 155 160

Asp Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr
165 170 175

Thr Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro
180 185 190

Ala Leu Pro Trp Leu Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu
195 200 205

Val Leu Asn Val Ser Glu Glu Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp
210 215 220

Asn Gln Val Gln Gly Pro Pro Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr
225 230 235 240

Gly Pro Gln Ile Ile Thr Leu Asn His Thr Asp Leu Val Pro Cys Leu
245 250 255

Cys Ile Gln Val Trp Pro Leu Glu Pro Asp Ser Val Arg Thr Asn Ile
260 265 270

Cys Pro Phe Arg Glu Asp Pro Arg Ala His Gln Asn Leu Trp Gln Ala
275 280 285

Ala Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro
290 295 300

Cys Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly
305 310 315 320

Asp Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr
325 330 335

Val Asp Lys Val Leu Glu Phe Pro Leu Leu Lys Gly His Pro Asn Leu
340 345 350

Cys Val Gln Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu
355 360 365

Trp Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu
370 375 380

Thr Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser
385 390 395 400

Gly Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu
405 410 415

Gly Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu
420 425 430

Trp Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr
435 440 445

Ile His Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala
450 455 460

Ala Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Gly
465 470 475 480

Trp Leu Arg Leu Leu Lys Gln Asp Val Arg Ser Gly Gly Glu Trp Glu
485 490 495

Gln Ala Leu Gly Gly Gly Pro Pro Pro Gly Ser Gln Ala Cys Ala Ser
500 505 510

Ser Pro Leu Pro Ser Pro Ser Val Phe Ser Gly Ser Gly Arg Gln Gly
515 520 525

Pro Arg Gly Ser Ala Pro Leu Leu Ser Arg
530 535

<210> 13
<211> 2584
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS

<222> (219)..(1022)

<400> 13

```

aaaacgaaag cactccgtgc tggaagtagg aggagagtca ggactcccag gacagagagt      60

gcacaaacta cccagcacag cccctccgc cccctctgga ggetgaagag ggattccagc      120

ccctgccacc cacagacacg ggetgactgg ggtgtctgcc ccccttgggg gggggcagca      180

cagggcctca ggctgggtg ccacctggca cctagaag atg cct gtg ccc tgg ttc      236
                               Met Pro Val Pro Trp Phe
                               1               5

ttg ctg tcc ttg gca ctg ggc cga agc cca gtg gtc ctt tct ctg gag      284
Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro Val Val Leu Ser Leu Glu
                10                15                20

agg ctt gtg ggg cct cag gac gct acc cac tgc tct ccg ggc ctc tcc      332
Arg Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His Cys Ser Pro Gly Leu Ser
                25                30                35

tgc cgc ctc tgg gac agt gac ata ctc tgc ctg cct ggg gac atc gtg      380
Cys Arg Leu Trp Asp Ser Asp Ile Leu Cys Leu Pro Gly Asp Ile Val
                40                45                50

cct gct ccg ggc ccc gtg ctg gcg cct acg cac ctg cag aca gag ctg      428
Pro Ala Pro Gly Pro Val Leu Ala Pro Thr His Leu Gln Thr Glu Leu
                55                60                65                70

gtg ctg agg tgc cag aag gag acc gac tgt gac ctc tgt ctg cgt gtg      476
Val Leu Arg Cys Gln Lys Glu Thr Asp Cys Asp Leu Cys Leu Arg Val
                75                80                85

gct gtc cac ttg gcc gtg cat ggg cac tgg gaa gag cct gaa gat gag      524
Ala Val His Leu Ala Val His Gly His Trp Glu Glu Pro Glu Asp Glu
                90                95                100

gaa aag ttt gga gga gca gct gac tca ggg gtg gag gag cct agg aat      572
Glu Lys Phe Gly Gly Ala Ala Asp Ser Gly Val Glu Glu Pro Arg Asn
                105                110                115

gcc tct ctc cag gcc caa gtc gtg ctc tcc ttc cag gcc tac cct act      620
Ala Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu Ser Phe Gln Ala Tyr Pro Thr
                120                125                130

gcc cgc tgc gtc ctg ctg gag gtg caa gtg cct gct gcc ctt gtg cag      668
Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val Pro Ala Ala Leu Val Gln
                135                140                145                150

ttt ggt cag tct gtg ggc tct gtg gta tat gac tgc ttc gag gct gcc      716
Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr Asp Cys Phe Glu Ala Ala
                155                160                165

cta ggg agt gag gta cga atc tgg tcc tat act cag ccc agg tac gag      764
Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr Thr Gln Pro Arg Tyr Glu
                170                175                180

aag gaa ctc aac cac aca cag cag ctg cct gcc ctg ccc tgg ctc aac      812

```

Lys	Glu	Leu	Asn	His	Thr	Gln	Gln	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Trp	Leu	Asn	
185						190						195				
gtg	tca	gca	gat	ggt	gac	aac	gtg	cat	ctg	gtt	ctg	aat	gtc	tct	gag	860
Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Asp	Asn	Val	His	Leu	Val	Leu	Asn	Val	Ser	Glu	
200						205						210				
gag	cag	cac	ttc	ggc	ctc	tcc	ctg	tac	tgg	aat	cag	gtc	cag	ggc	ccc	908
Glu	Gln	His	Phe	Gly	Leu	Ser	Leu	Tyr	Trp	Asn	Gln	Val	Gln	Gly	Pro	
215						220						225			230	
cca	aaa	ccc	cgg	tgg	cac	aaa	aac	ctg	gtg	agg	cct	ccc	cct	tcc	caa	956
Pro	Lys	Pro	Arg	Trp	His	Lys	Asn	Leu	Val	Arg	Pro	Pro	Pro	Ser	Gln	
			235						240						245	
gtc	cat	tcc	cac	tgt	agg	ccg	atg	cct	gtg	caa	agg	acg	cag	tgc	cat	1004
Val	His	Ser	His	Cys	Arg	Pro	Met	Pro	Val	Gln	Arg	Thr	Gln	Cys	His	
			250						255						260	
atc	aga	gag	gat	cct	tga	agaggactca					ccccaagcaa		gggaaaattg			1052
Ile	Arg	Glu	Asp	Pro												
265																
gtgggggaac ttctgccttc ctggtttcct tgactttggc ctctctctct tctccttat																1112
cttctccaac ctcttcctt tatttgttcc acagactgga ccgcagatca ttaccttgaa																1172
ccacacagac ctggttcctt gcctctgtat tcaggtgtgg cctctggaac ctgactccgt																1232
taggacgaac atctgcccct tcagggagga ccccgcgca caccagaacc tctggcaage																1292
cgcccgactg cgactgtga ccctgcagag ctggtgtgtg gacgcaccgt gctcgtgtcc																1352
cgcagaagcg gcactgtgtt ggccgggtcc ggggtggggac ccctgccage cactgggtccc																1412
accgctttcc tgggagaacg tcaactgtgga caaggttctc gagttcccat tgctgaaagg																1472
ccaccctaac ctctgtgttc aggtgaacag ctcggagaag ctgcagctgc aggagtgttt																1532
gtgggtgtac tccctggggc ctctcaaaga cgatgtgcta ctgttgagaga caagaggccc																1592
ccaggacaac agatccctct gtgccttgga acccagtggc tgtacttcac taccagcaa																1652
agcctccacg ctatgggacg atgaactggg agcgtatgg gcctgcccc tggacaaata																1712
catccacaag cgctggggcc tcgtgtggct ggctgtccta ctctttgccg ctgcgctttc																1772
cctcactctc cttctcaaaa aggatcacgc gaaagggttg ctgaggtctt tgaacagga																1832
cgtecgctcg gggcgggccg ccaggggccc cgcggtcttg ctctctact cagccgatga																1892
ctcgggtttc gagcgcttg tgggcgcctt ggctgtggcc ctgtgccage tgccgtgtcg																1952
cgtggccgta gacctgtgga gccgtcgtga actgagcgcg caggggcccg tggettgttt																2012
tcacgcgcag cggcgccaga ccctgcagga gggcggcgtg gtggtcttgc tcttctctcc																2072
cgggtgcggtg gcgctgtgca gcgagtggct acaggatggg gtgtccgggc ccggggcgca																2132

cggccccgac gacgccttcc gcgcctcgct cagctgcgtg ctgcccgact tcttgcaggg 2192
 ccggggcgcgc ggcagctacg tgggggcctg cttcgacagg ctgtccacc cggacgccgt 2252
 acccgccctt ttcgcaccg tgcccgctt cactctgcc tcccaactgc cagacttctt 2312
 gggggccctg cagcagcctc gcgcgccgcg ttccgggcgg ctccaagaga gaggcgagca 2372
 agtgtcccg ggccttcagc cagccctgga tagctacttc catccccgg ggactccgc 2432
 gccgggacgc ggggtgggac caggggcggg acctggggcg ggggacggga cttaaataaa 2492
 ggcagacgt gtttttctac ccatgtggcc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2552
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2584

<210> 14
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 14

Met Pro Val Pro Trp Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro
1 5 10 15

Val Val Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His
20 25 30

Cys Ser Pro Gly Leu Ser Cys Arg Leu Trp Asp Ser Asp Ile Leu Cys
35 40 45

Leu Pro Gly Asp Ile Val Pro Ala Pro Gly Pro Val Leu Ala Pro Thr
50 55 60

His Leu Gln Thr Glu Leu Val Leu Arg Cys Gln Lys Glu Thr Asp Cys
65 70 75 80

Asp Leu Cys Leu Arg Val Ala Val His Leu Ala Val His Gly His Trp
85 90 95

Glu Glu Pro Glu Asp Glu Glu Lys Phe Gly Gly Ala Ala Asp Ser Gly
100 105 110

Val Glu Glu Pro Arg Asn Ala Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu Ser
115 120 125

Phe Gln Ala Tyr Pro Thr Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val

130	135	140	
Pro Ala Ala Leu Val Gln Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr			
145	150	155	160
Asp Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr			
	165	170	175
Thr Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro			
	180	185	190
Ala Leu Pro Trp Leu Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu			
	195	200	205
Val Leu Asn Val Ser Glu Glu Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp			
	210	215	220
Asn Gln Val Gln Gly Pro Pro Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Val			
225	230	235	240
Arg Pro Pro Pro Ser Gln Val His Ser His Cys Arg Pro Met Pro Val			
	245	250	255
Gln Arg Thr Gln Cys His Ile Arg Glu Asp Pro			
	260	265	
<210> 15			
<211> 2427			
<212> DNA			
<213> 人			
<220>			
<221> CDS			
<222> (219).. (494)			
<400> 15			
aaaacgaaag cactccgtgc tggaagtagg aggagagtca ggactcccag gacagagagt			60
gcacaaacta cccagcacag cccctccgc cccctctgga ggetgaagag ggattccagc			120
ccctgccacc cacagacaog ggctgactgg ggtgtctgcc ccccttgggg gggggcagca			180
cagggcctca ggctgggtg ccacctggca cctagaag atg cct gtg ccc tgg ttc			236
	Met Pro Val Pro Trp Phe		
	1 5		
ttg ctg tcc ttg gca ctg ggc cga agc cca gtg gtc ctt tct ctg gag			284
Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro Val Val Leu Ser Leu Glu			

10	15	20	
agg ctt gtg ggg cct cag gac gct acc cac tgc tct ccg ggc ctc tcc			332
Arg Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His Cys Ser Pro Gly Leu Ser			
25	30	35	
tgc cgc ctc tgg ggt gcc acc aaa ttc tgg gct tgg aac agc ttc agc			380
Cys Arg Leu Trp Gly Ala Thr Lys Phe Trp Ala Trp Asn Ser Phe Ser			
40	45	50	
tcc cac ccg ctc ctc cac aca cag aca gtg aca tac tct gcc tgc ctg			428
Ser His Pro Leu Leu His Thr Gln Thr Val Thr Tyr Ser Ala Cys Leu			
55	60	65	70
ggg aca tcg tgc ctg ctc egg gcc ccg tgc tgg cgc cta cgc acc tgc			476
Gly Thr Ser Cys Leu Leu Arg Ala Pro Cys Trp Arg Leu Arg Thr Cys			
75	80	85	
aga cag agc tgg tgc tga ggtgccagaa ggagaccgac tgtgacctct			524
Arg Gln Ser Trp Cys			
90			
gtctgcgtgt ggetgtccac ttggccgtgc atgggcactg ggaagagcct gaagatgagg			584
aaaagtttgg aggagcagct gactcagggg tggaggagcc taggaatgcc tctctccagg			644
cccaagtctg gctctccttc caggcctacc ctactgcccg ctgcgtcctg ctggagggtgc			704
aagtgcctgc tgccttgtg cagtttggtc agtctgtggg ctctgtggta tatgactgct			764
tcagagctgc ctagggaggt gaggtacgaa tctggtccta tactcagccc aggtacgaga			824
aggaactcaa ccacacacag cagctgcctg cctgcctg gctcaacgtg tcagcagatg			884
gtgacaacgt gcatctggtt ctgaatgtct ctgaggagca gcacttcggc ctctccctgt			944
actggaatca ggtccagggc cccccaaaac ccggtggca caaaaacctg gtgaggcctc			1004
cccttccca agtccattec cactgtaggc cgatgcctgt gcaaaggacg cagtgccata			1064
tcagagagga tccttgaaga ggactacccc caagcaaggg aaaattgact ggaccgcaga			1124
tcattacett gaaccacaca gacctggttc cctgcctctg tattcaggtg tggcctctgg			1184
aacctgactc cgttaggaog aacatctgcc ccttcaggga ggacccccgc gcacaccaga			1244
acctctggca agccgcccga ctgcgactgc tgacctgca gagctggctg ctggacgcac			1304
cgtgctcgtt gccgcagaa gcggcactgt gctggcgggc tcgggtggg gacctctgcc			1364
agccactggt ccaccgctt tcctgggaga acgtcactgt ggacaagggt ctcgagttcc			1424
cattgctgaa aggccacctt aacctctgtg ttcaggtgaa cagctcggag aagctgcagc			1484
tgcaggagtg cttgtgggct gctatgggac gatgacttgg gacgctatg ggctgcccc			1544
atggacaaat acatccacaa gcgctgggcc ctctgtggc tggcctgcct actctttgcc			1604

gctgcgcttt cctcctcct ccttctcaaa aaggatcacg cgaaagggtg gctgaggctc 1664
 ttgaaacagg acgtccgctc gggggcggcc gccaggggcc gcgcggctct gctcctctac 1724
 tcagccgatg actcgggttt cgagcgctg gtgggcgccc tggcgctggc cctgtgccag 1784
 ctgcgcgtgc gcgtggcgt agacctgtgg agcgcgtgtg aactgagcgc gcaggggccc 1844
 gtggcttggg ttacgcgca gggcgccag accctgcagg agggcgcggt ggtggtcttg 1904
 ctcttctctc ccggtgcggt ggcgtgtgc agcgagtggc tacaggatgg ggtgtccggg 1964
 cccggggcgc acggcccgca cgacgccttc cgcgcctcgc tcagctcgt gctgcccgac 2024
 ttcttgcagg gccggggccc cggcagctac gtgggggcct gcttcgacag gctgtccac 2084
 ccgagcgcg taccggcct ttccgcacc gtgccgtct tcacactgcc ctcccaactg 2144
 ccagaattcc tgggggcct gcagcagcct cgcgcgccgc gttccggcg gctccaagag 2204
 agagcggagc aagtgtccg ggccttcag ccagcctgg atagctactt ccatccccc 2264
 gggactcccg cgcgggacg cggggtggga ccaggggcgg gacctggggc gggggacggg 2324
 acttaataa aggcagacgc tgttttcta cccatgtggc ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2384
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaa 2427

<210> 16
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 16

Met Pro Val Pro Trp Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro
1 5 10 15

Val Val Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His
20 25 30

Cys Ser Pro Gly Leu Ser Cys Arg Leu Trp Gly Ala Thr Lys Phe Trp
35 40 45

Ala Trp Asn Ser Phe Ser Ser His Pro Leu Leu His Thr Gln Thr Val
50 55 60

Thr Tyr Ser Ala Cys Leu Gly Thr Ser Cys Leu Leu Arg Ala Pro Cys
65 70 75 80

Trp Arg Leu Arg Thr Cys Arg Gln Ser Trp Cys
85 90

<210>	17	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	siRNA IL-17R	
<400>	17	
	gaacaccaau gaacguuugu u	21
<210>	18	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	siRNA IL-17R	
<400>	18	
	caaacguuca uugguguucu u	21
<210>	19	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	siRNA IL-17R	
<400>	19	
	gcaccuacgu agucugcuau u	21
<210>	20	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	siRNA IL-17R	
<400>	20	
	uagcagacua cguaggugcu u	21
<210>	21	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	siRNA IL-17R	

<400> 21	
cagaaccaau uccggacuau u	21
<210> 22	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> siRNA IL-17R	
<400> 22	
uaguccggaa uugguucugu u	21
<210> 23	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> siRNA IL-17R	
<400> 23	
aaauagaggu gaccguucau u	21
<210> 24	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> siRNA IL-17R	
<400> 24	
ugaacgguca ccucauauuu u	21
<210> 25	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> siRNA IL-17RC	
<400> 25	
guacgaau cu gguccuauau u	21
<210> 26	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> siRNA IL-17RC

<400> 26

uauaggacca gauucguacu u

21

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> siRNA IL-17RC

<400> 27

gaaccugacu ccguuaggau u

21

<210> 28

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> siRNA IL-17RC

<400> 28

uccuaacgga gucagguucu u

21

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> siRNA IL-17RC

<400> 29

gcuaugggac gaugacuugu u

21

<210> 30

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> siRNA IL-17RC

<400> 30

caagucaucg ucccuaugcu u

21

<210> 31

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>		
<223>	siRNA IL-17RC	
<400>	31	
	gaccgcagau cauuaccuuu u	21
<210>	32	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	siRNA IL-17RC	
<400>	32	
	aagguaauga ucugcggucu u	21
<210>	33	
<211>	21	
<212>	PRT	
<213>	Apis mellifera	
<400>	33	
	Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile	
	1 5 10 15	
	Ser Tyr Ile Tyr Ala	
	20	
<210>	34	
<211>	527	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	融合蛋白: 人 IL-17R - 人 IgG1	
<400>	34	
	Leu Arg Leu Leu Asp His Arg Ala Leu Val Cys Ser Gln Pro Gly Leu	
	1 5 10 15	
	Asn Cys Thr Val Lys Asn Ser Thr Cys Leu Asp Asp Ser Trp Ile His	
	20 25 30	
	Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser Ser Pro Lys Asp Leu Gln Ile Gln Leu	
	35 40 45	
	His Phe Ala His Thr Gln Gln Gly Asp Leu Phe Pro Val Ala His Ile	

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

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
290 295 300

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val
305 310 315 320

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
325 330 335

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
340 345 350

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
355 360 365

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
370 375 380

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
385 390 395 400

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
405 410 415

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
420 425 430

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
435 440 445

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
450 455 460

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
465 470 475 480

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
485 490 495

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
500 505 510

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

515	520	525
<210> 35		
<211> 660		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 融合蛋白: 人 IL-17RC - 人 IgG1		
<400> 35		
Met Pro Val Pro Trp Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro		
1 5 10 15		
Val Val Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His		
20 25 30		
Cys Ser Pro Gly Leu Ser Cys Arg Leu Trp Asp Ser Asp Ile Leu Cys		
35 40 45		
Leu Pro Gly Asp Ile Val Pro Ala Pro Gly Pro Val Leu Ala Pro Thr		
50 55 60		
His Leu Gln Thr Glu Leu Val Leu Arg Cys Gln Lys Glu Thr Asp Cys		
65 70 75 80		
Asp Leu Cys Leu Arg Val Ala Val His Leu Ala Val His Gly His Trp		
85 90 95		
Glu Glu Pro Glu Asp Glu Glu Lys Phe Gly Gly Ala Ala Asp Ser Gly		
100 105 110		
Val Glu Glu Pro Arg Asn Ala Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu Ser		
115 120 125		
Phe Gln Ala Tyr Pro Thr Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val		
130 135 140		
Pro Ala Ala Leu Val Gln Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr		
145 150 155 160		
Asp Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr		
165 170 175		
Thr Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro		

180	185	190
Ala Leu Pro Trp Leu Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu		
195	200	205
Val Leu Asn Val Ser Glu Glu Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp		
210	215	220
Asn Gln Val Gln Gly Pro Pro Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr		
225	230	235
Gly Pro Gln Ile Ile Thr Leu Asn His Thr Asp Leu Val Pro Cys Leu		
245	250	255
Cys Ile Gln Val Trp Pro Leu Glu Pro Asp Ser Val Arg Thr Asn Ile		
260	265	270
Cys Pro Phe Arg Glu Asp Pro Arg Ala His Gln Asn Leu Trp Gln Ala		
275	280	285
Ala Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro		
290	295	300
Cys Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly		
305	310	315
Asp Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr		
325	330	335
Val Asp Lys Val Leu Glu Phe Pro Leu Leu Lys Gly His Pro Asn Leu		
340	345	350
Cys Val Gln Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu		
355	360	365
Trp Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu		
370	375	380
Thr Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser		
385	390	395
Gly Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu		
405	410	415

Gly Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu
420 425 430

Trp Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr
435 440 445

Ile His Lys Arg Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Glu Pro Lys Ser
450 455 460

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu
465 470 475 480

Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
485 490 495

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
500 505 510

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
515 520 525

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
530 535 540

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
545 550 555 560

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
565 570 575

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
580 585 590

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
595 600 605

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
610 615 620

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
625 630 635 640

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

645	650	655
Val Asp Lys Ser		
660		
<210> 36		
<211> 510		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> His-标记的人 IL-17F		
<400> 36		
atgaaattct tagtcaacgt tgcccttggt tttatggctg tgtacatttc ttacatctat	60	
gcgggatctg gtcaccacca tcatcaccac ggtgacgatg acgataagcg gaaaatcccc	120	
aaagtaggac ataactttttt ccaaagcct gagagttgcc cgcctgtgcc aggaggtagt	180	
atgaagcttg acattggcat catcaatgaa aaccagcgcg tttccatgtc acgtaacatc	240	
gagagcgcgt ccacctcccc ctggaattac actgtcactt gggaccccaa ccggtacccc	300	
tcggaagtgtg tacaggccca gtgtaggaac ttgggctgca tcaatgctca aggaaaggaa	360	
gacatctcca tgaattccgt tcccatecag caagagaccc tggtcgtccg gaggaagcac	420	
caaggtctgt ctgtttcttt ccagttggag aaggtgctgg tgactgttgg ctgcacctgc	480	
gtcacccctg tcatccacca tgtgcagtaa	510	
<210> 37		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> 人		
<400> 37		
Arg Lys Ile Pro Lys		
1 5		
<210> 38		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> 人		
<400> 38		
Ile Val Lys Ala Gly		
1 5		
<210> 39		

<211> 507
 <212> DNA
 <213> 人工序列

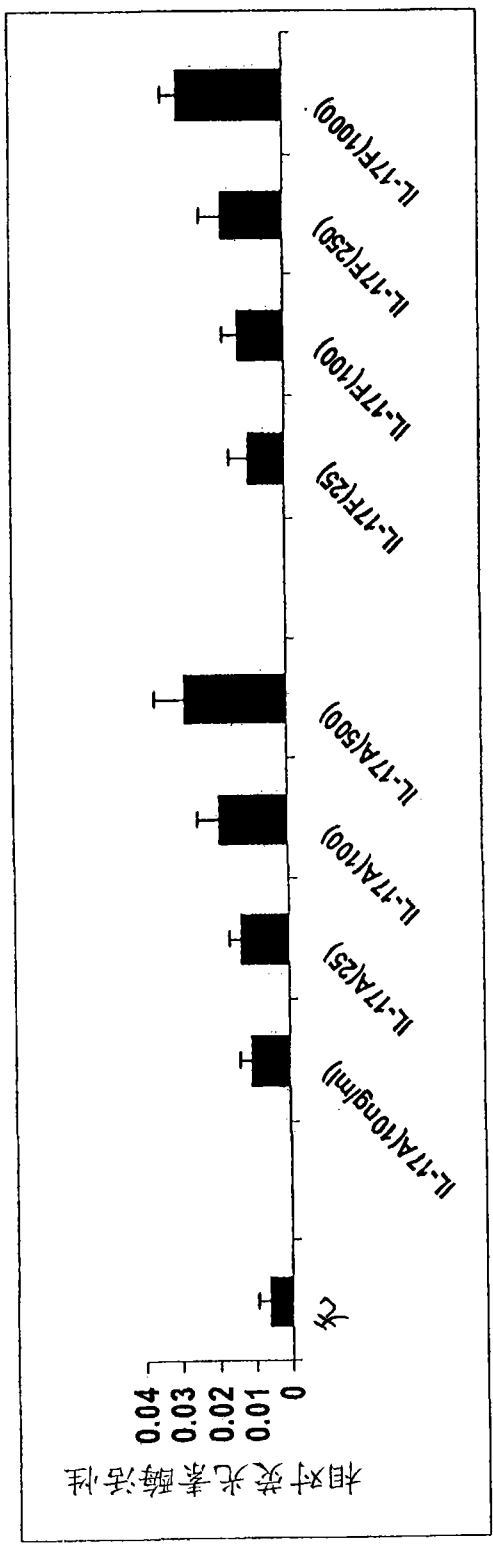
<220>
 <223> Flag-标记的人 IL-17A

<400> 39
 atgaaattct tagtcaacgt tgccttgtt tttatggtcg tgtacatttc ttacatctat 60
 gcgggatctc ctgactataa agacgatgac gataagatag tgaaggcagg aatcacaatc 120
 ccacgaaatc caggatgccc aaattctgag gacaagaact tccccggac tgtgatggtc 180
 aacctgaaca tccataaccg gaataccaat accaatccca aaaggtcctc agattactac 240
 aaccgatcca cctcaccttg gaatctccac cgcaatgagg accctgagag atatccctct 300
 gtgatctggg aggcaaagtg ccgccacttg ggctgcatca acgctgatgg gaacgtggac 360
 taccacatga actctgtccc catccagcaa gagatcctgg tectgcgcag ggagcctcca 420
 cactgcccga actccttcgg gctggagaag atactggtgt ccgtgggctg cacctgtgtc 480
 accccgattg tccaccatgt ggcctaa 507

<210> 40
 <211> 492
 <212> DNA
 <213> Macaca sp.

<400> 40
 atgacagtga agacctgca tgcccagtc atggtcaagt acttctgct gttgatattg 60
 ggacttgcc ttttgaatga ggtggcagct aggaaaatcc ccaaagtagg acatactttt 120
 ttccaaaagc ctgagagttg cccacctgtg ccagaaggta gtatgaagct tgacactggc 180
 atcatcaatg aaaaccagcg tgtttccatg tcacgtaaca tcgagagccg ctccacctec 240
 ccttggaatt aactgtcac ttgggacccc aaccggtatc cctcggaagt tgtacaggcc 300
 cagtgtgaagc acttgggctg catcaatgct caaggaaagg aagacatctc catgaattcc 360
 gttcccatcc agcaagagac cctggtcctc cggaggaagc accaaggctg ctctgtttct 420
 ttccagttgg agaaggtgct ggtgactgtt ggctgcacct gcgtcacccc cgctgtccac 480
 catgtgcagt aa 492

A



B

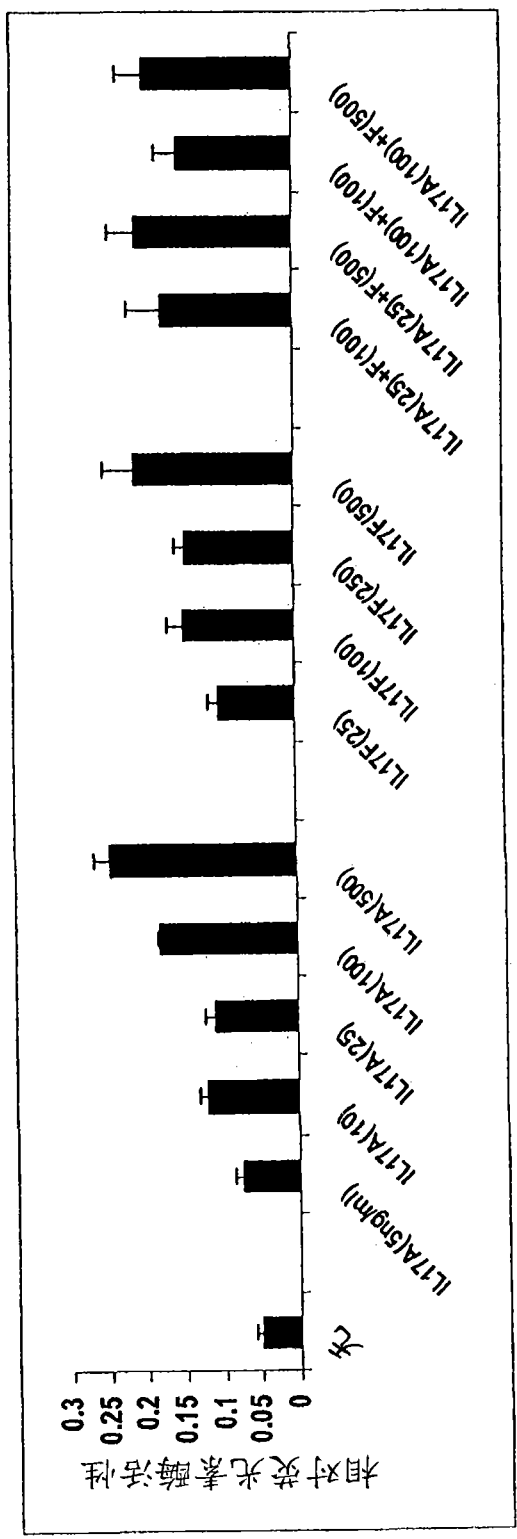


图 1

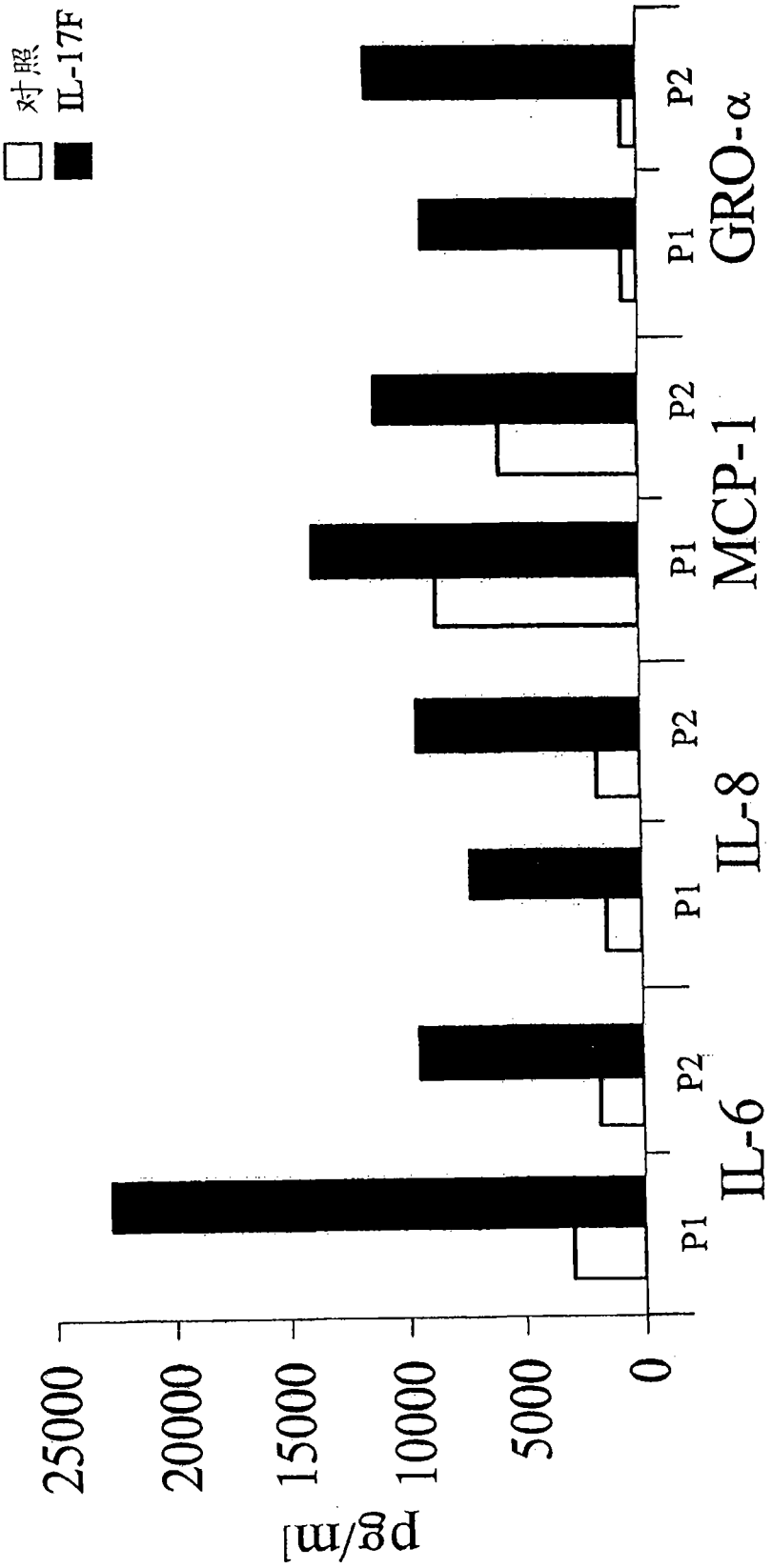


图 2

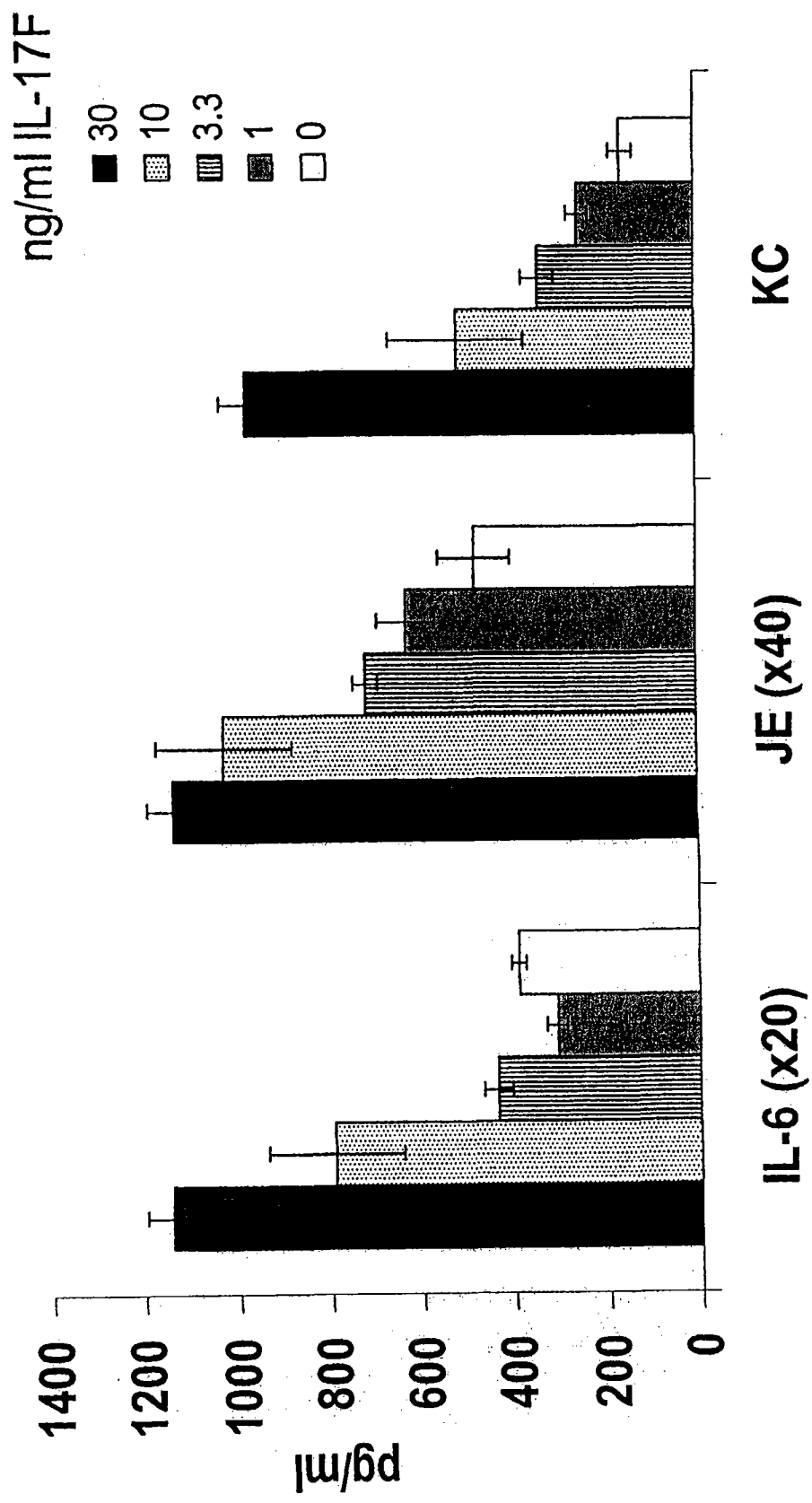


图 3

(A) 细胞因子结合IL-17R-IgG

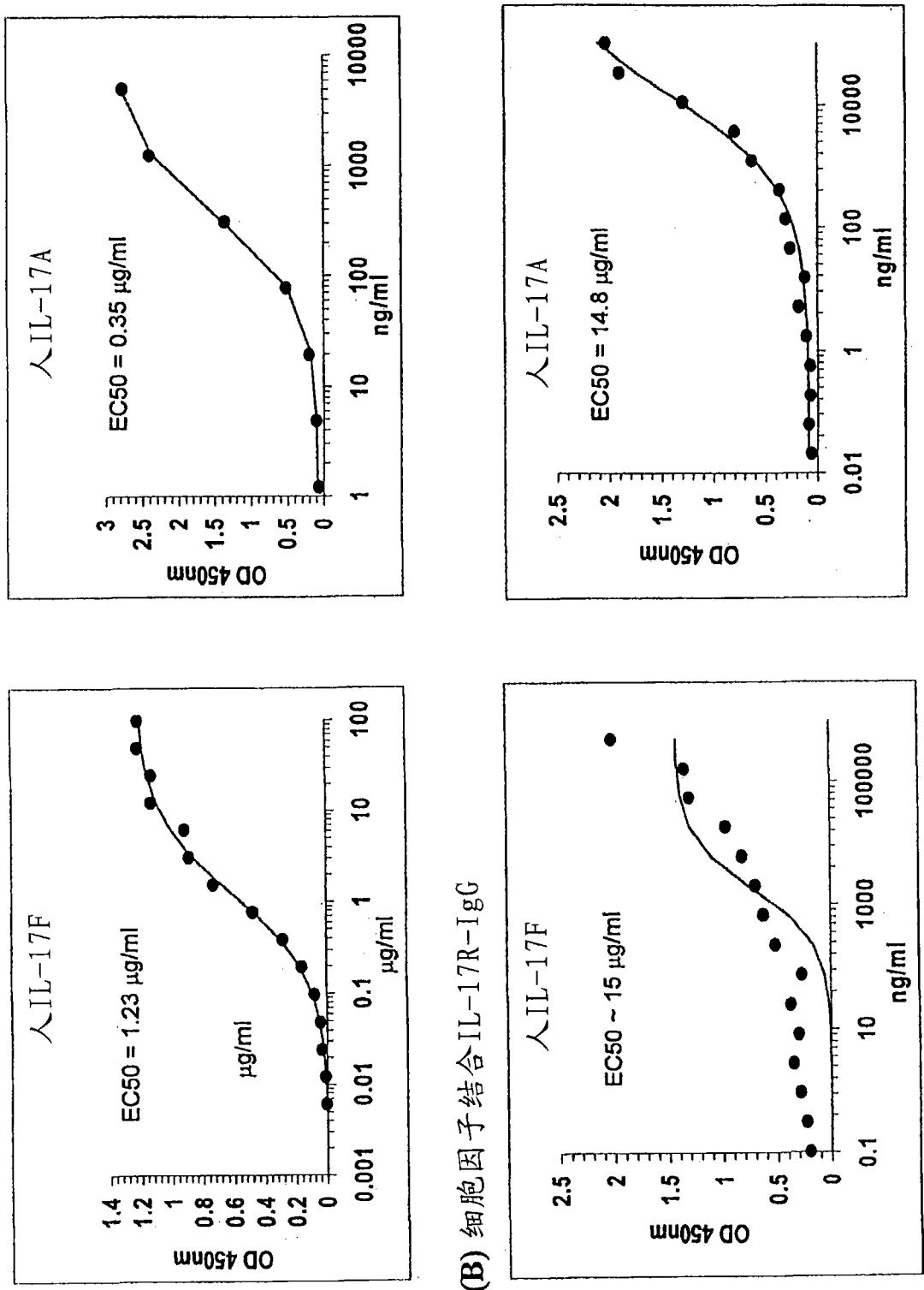


图 4

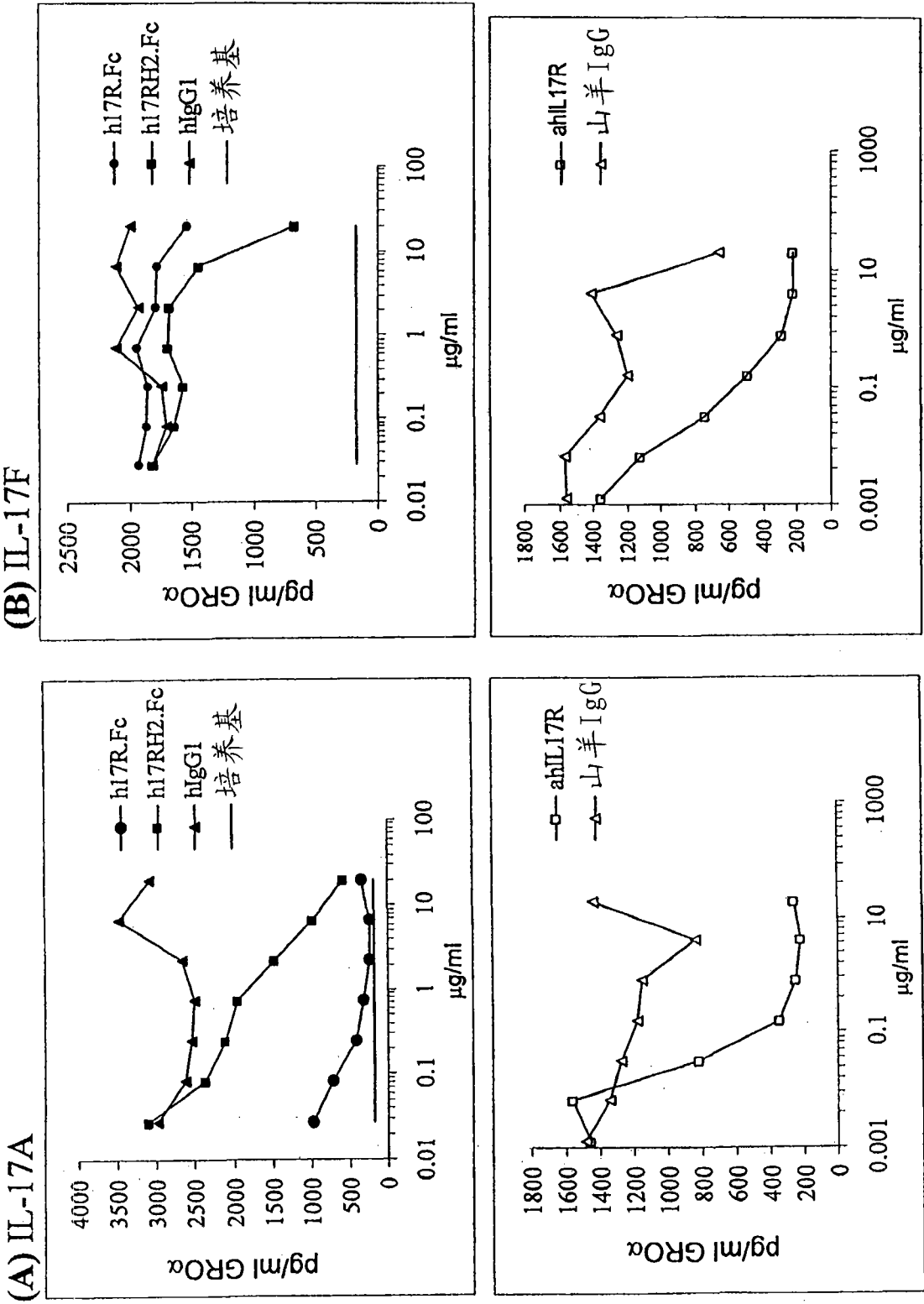


图 5

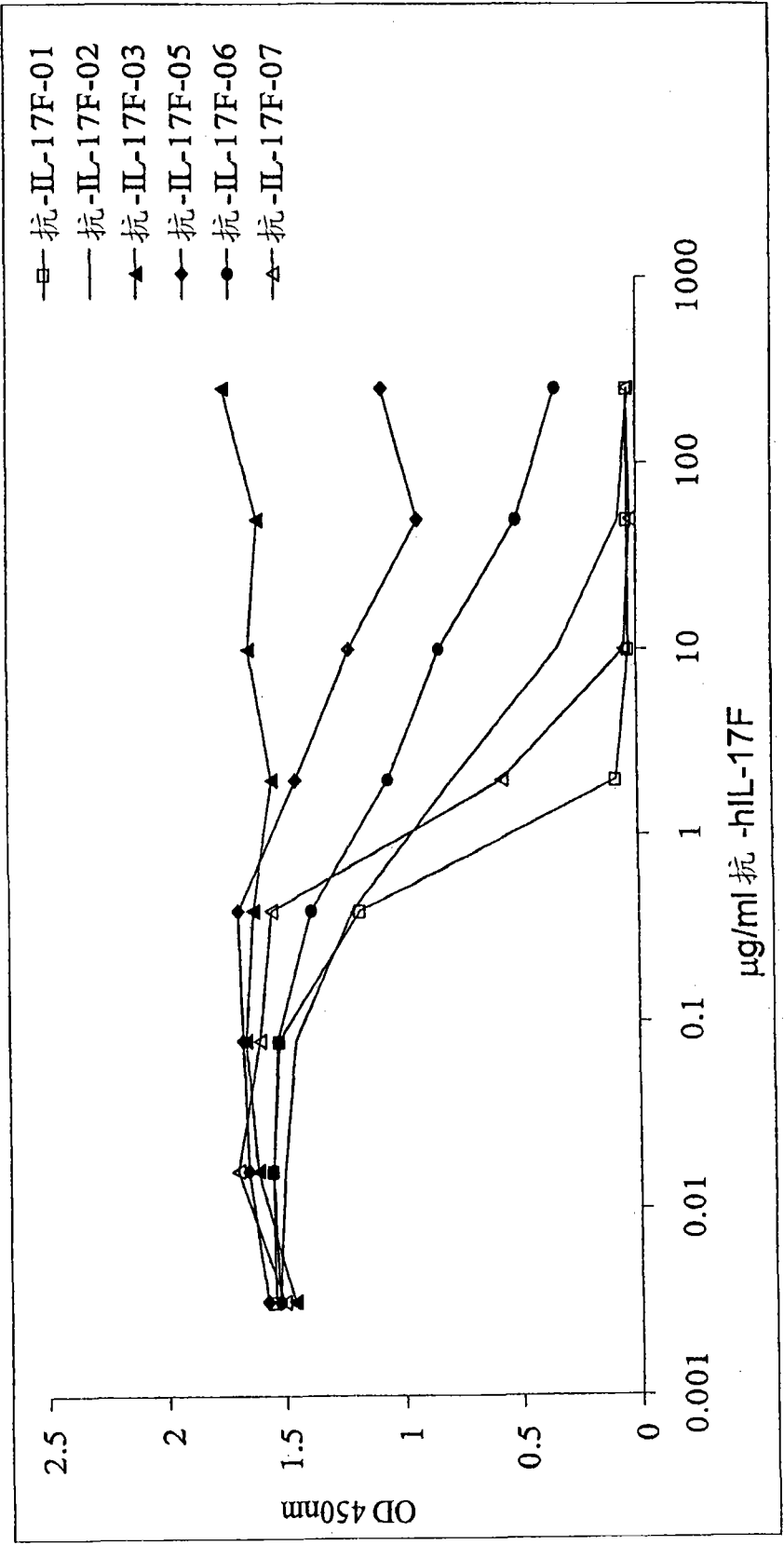


图 6

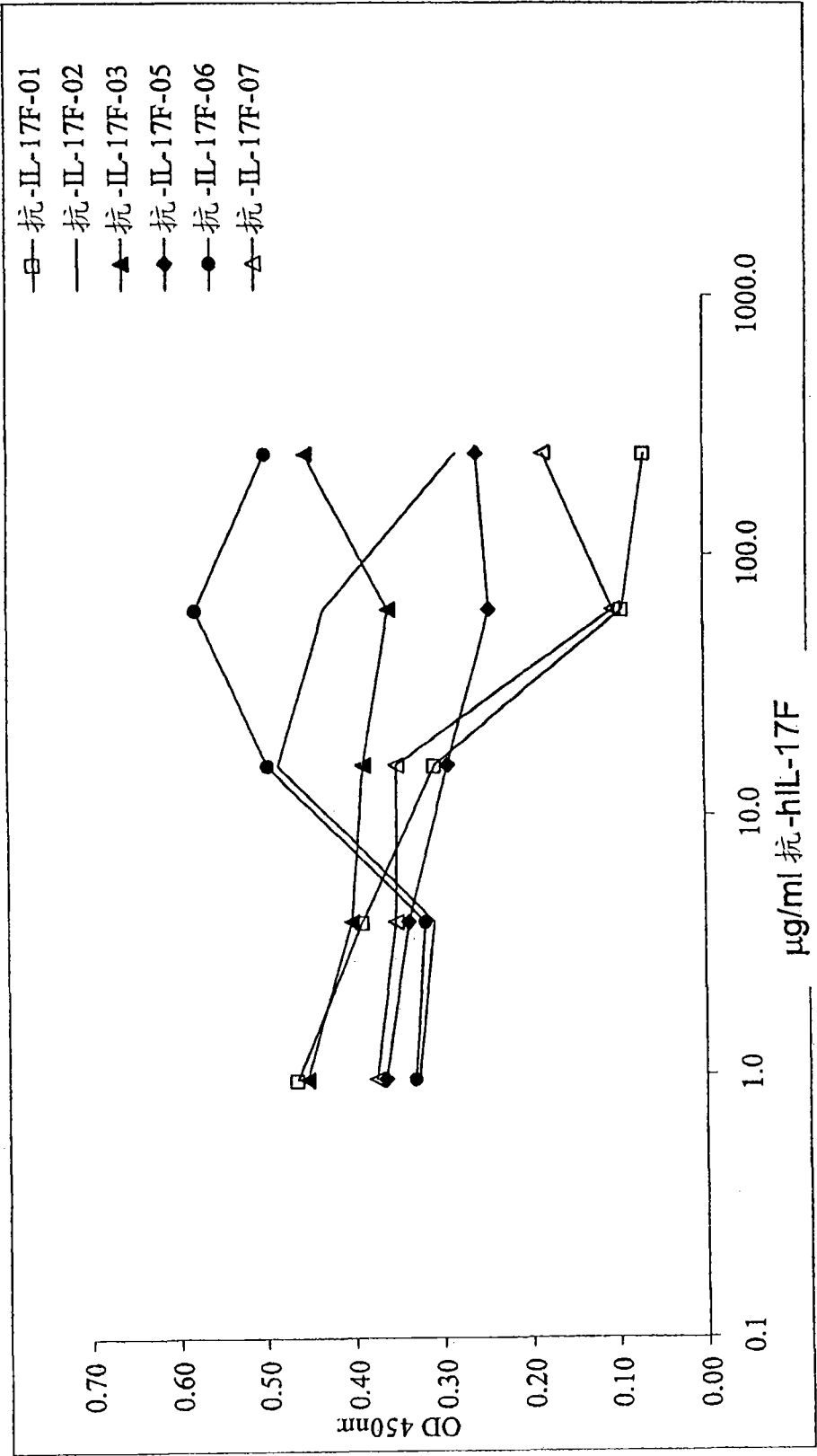


图 7

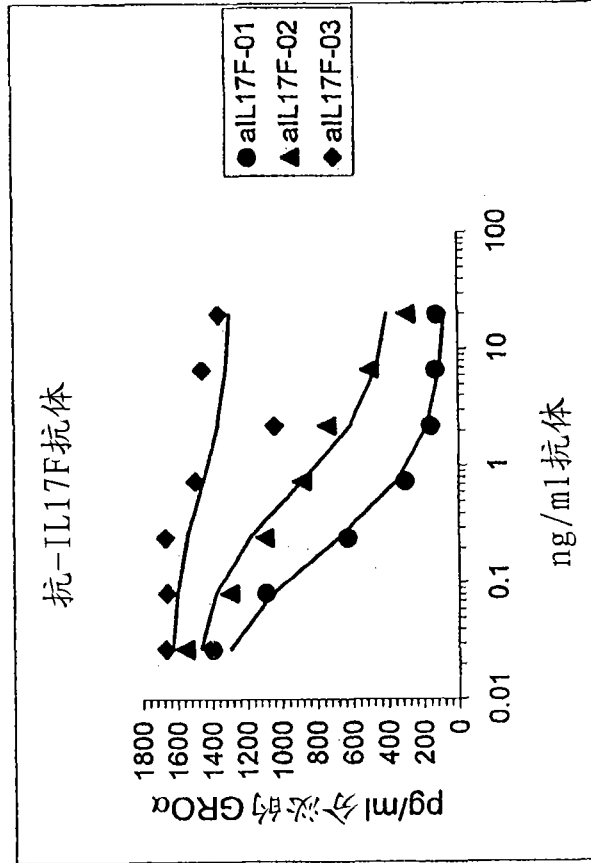
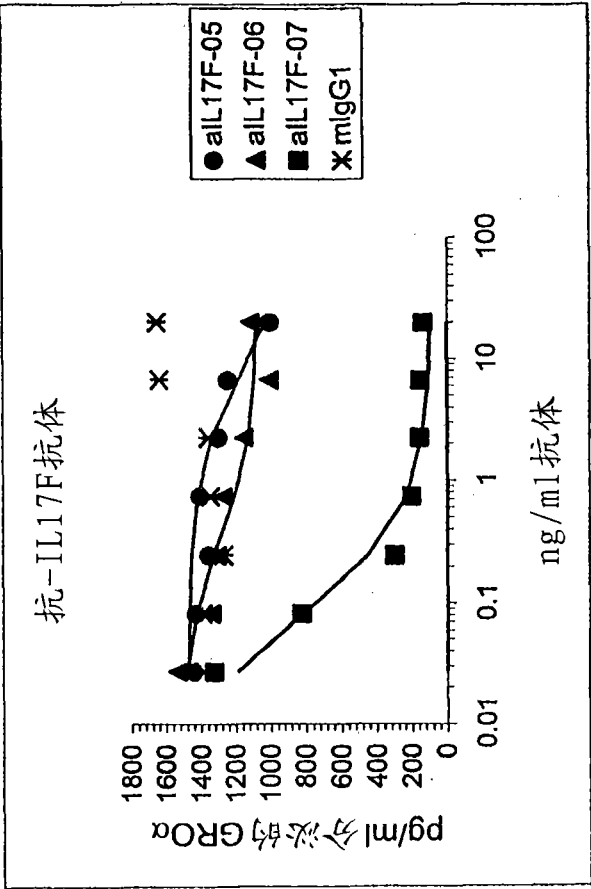


图 8

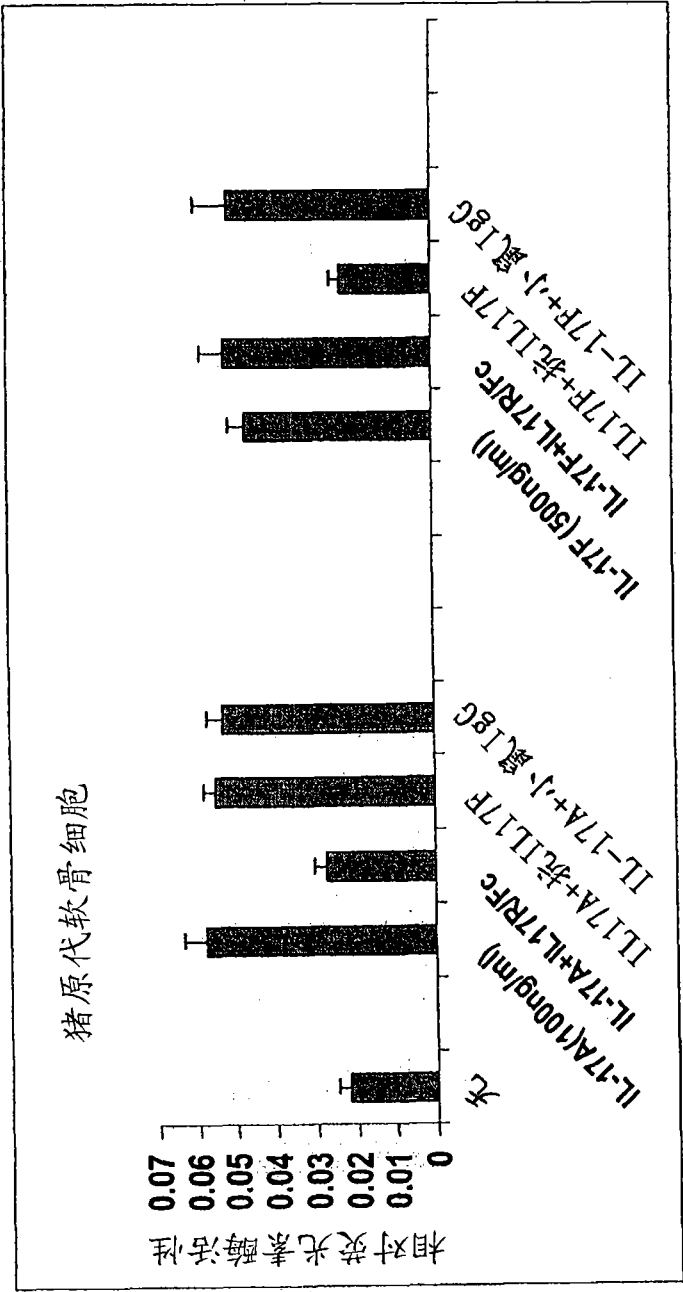


图 6

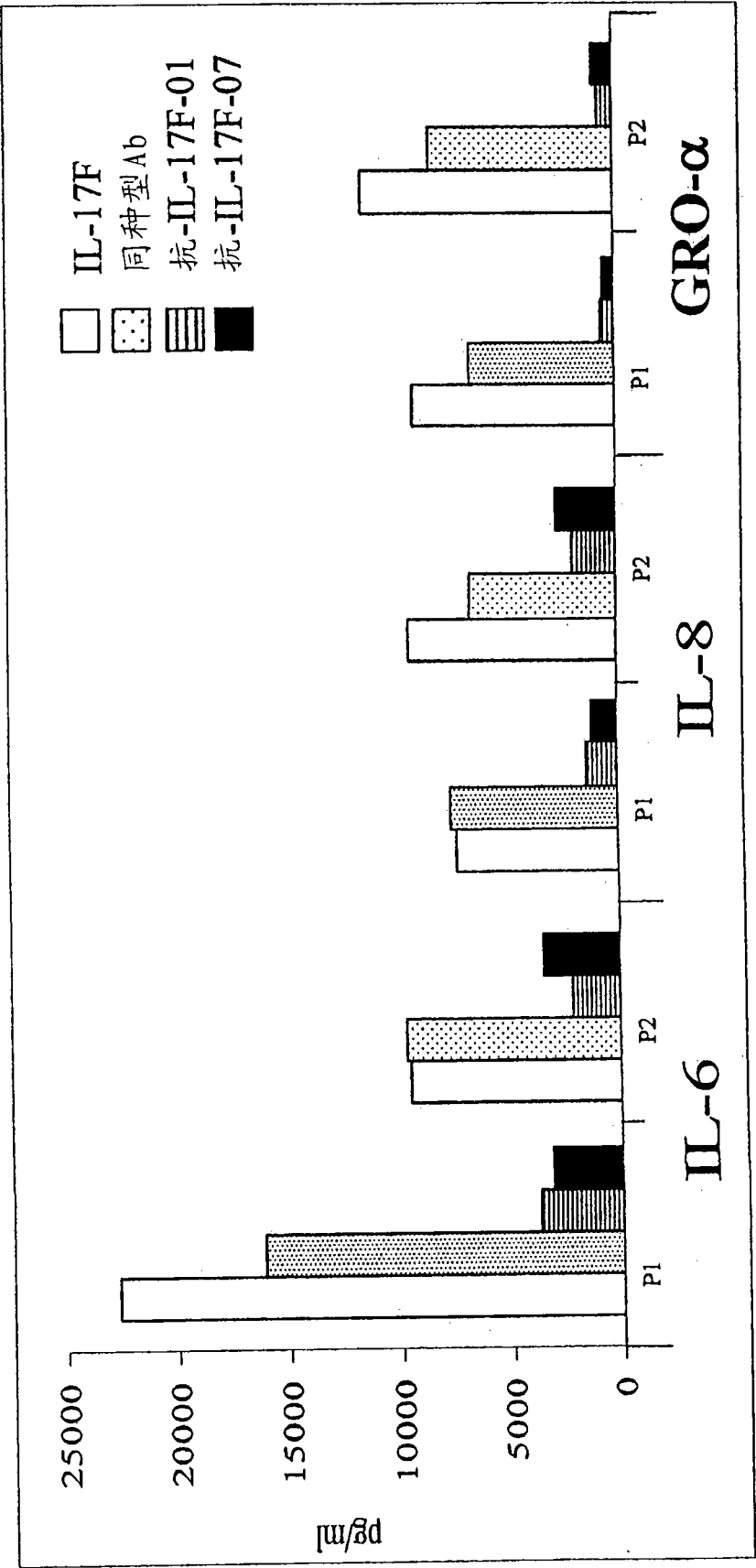


图 10

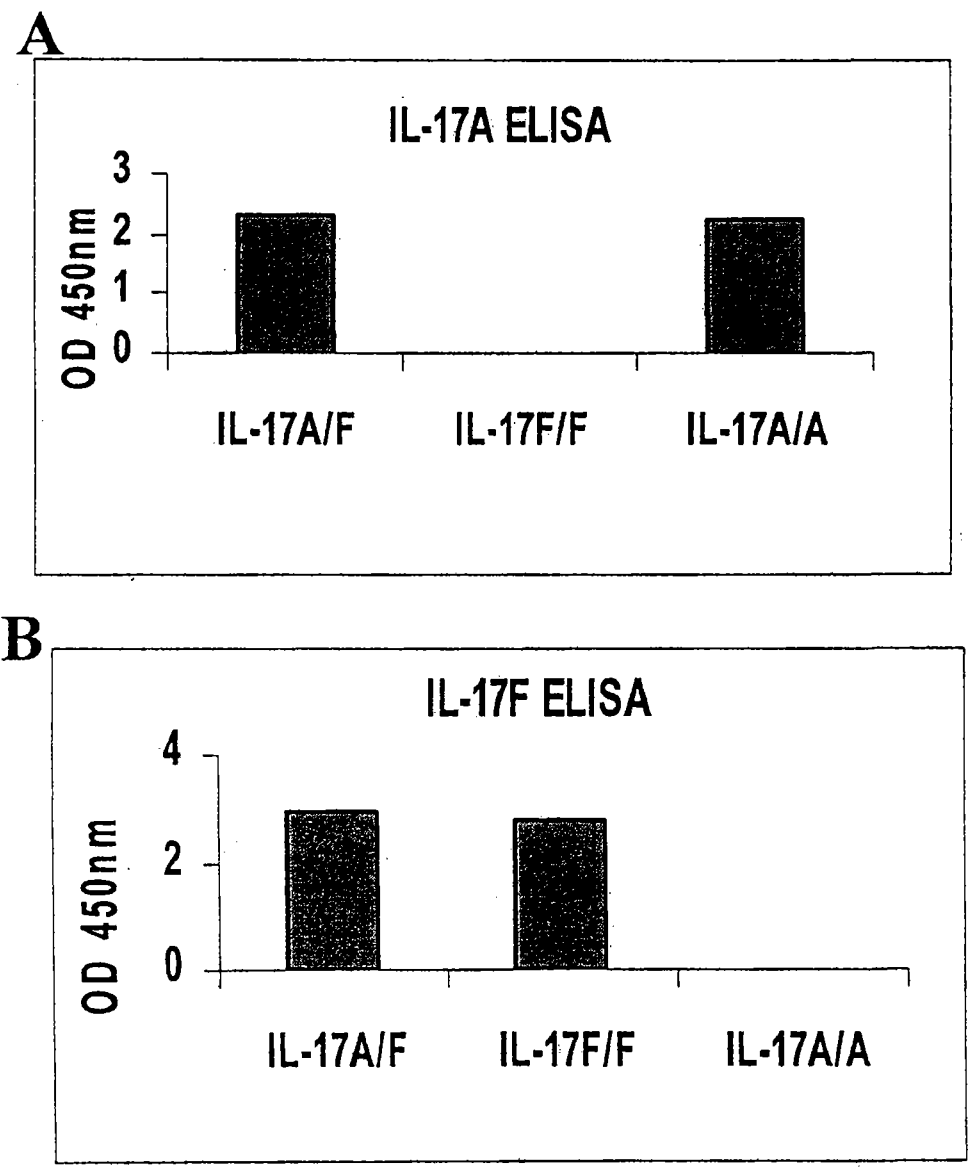


图 11

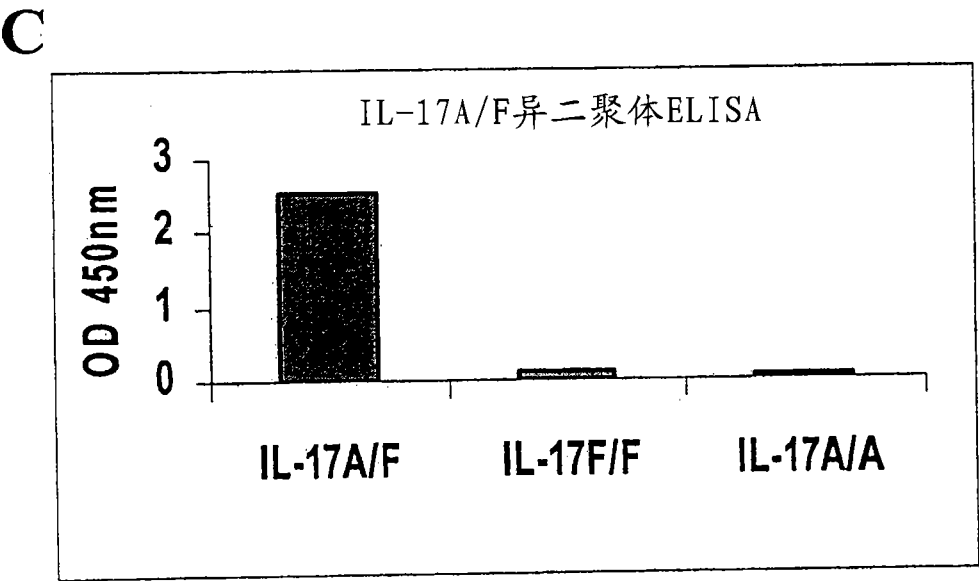


图 11

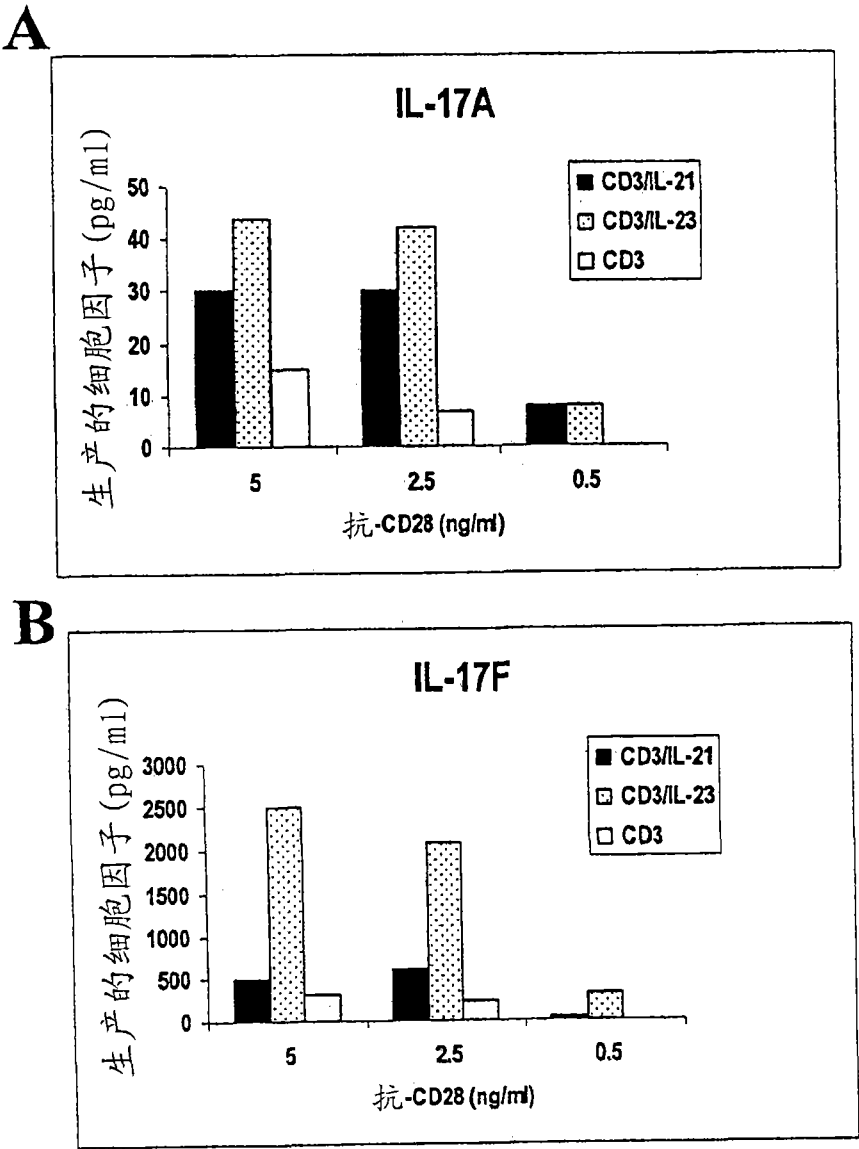


图 12

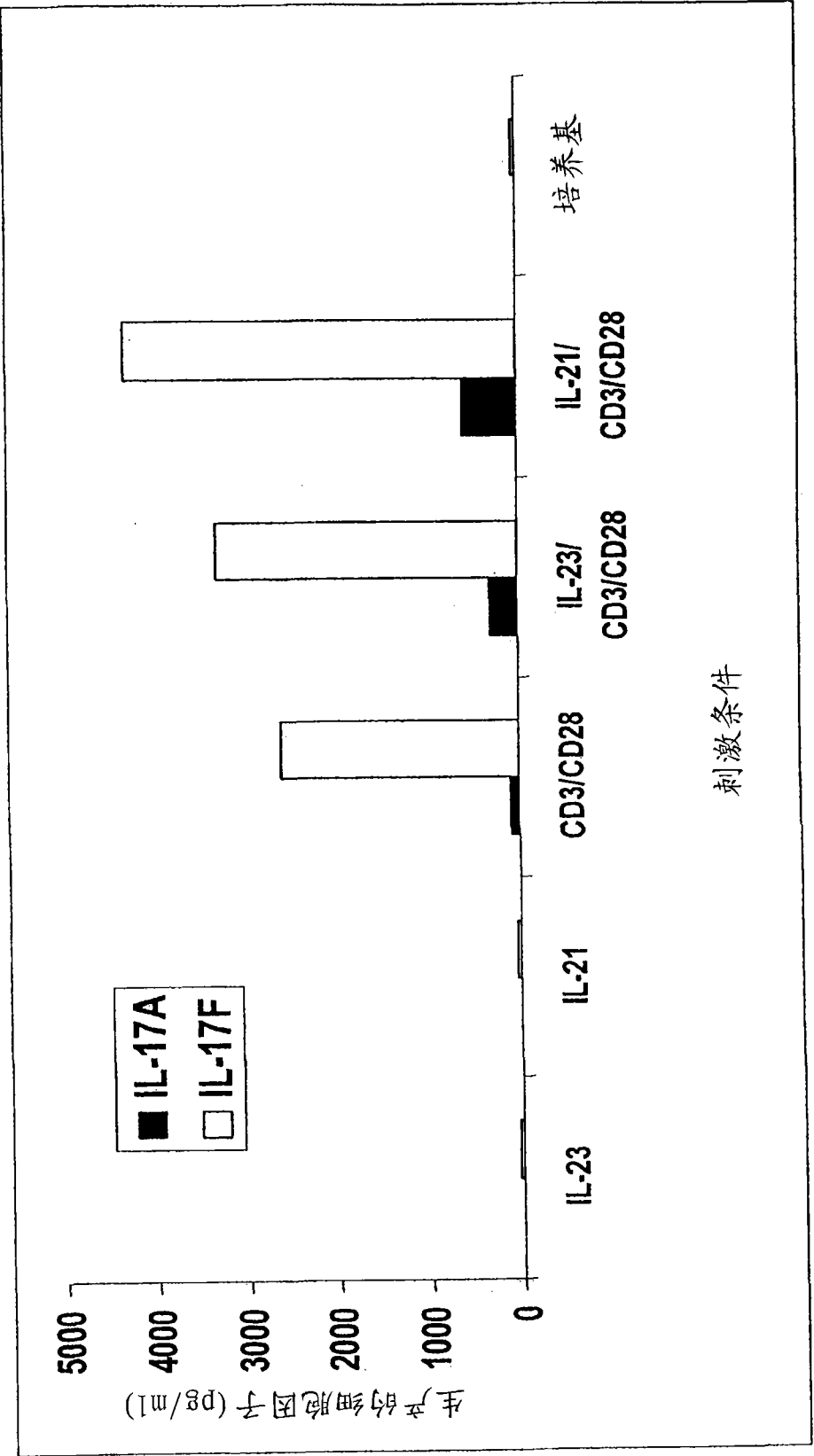


图 13

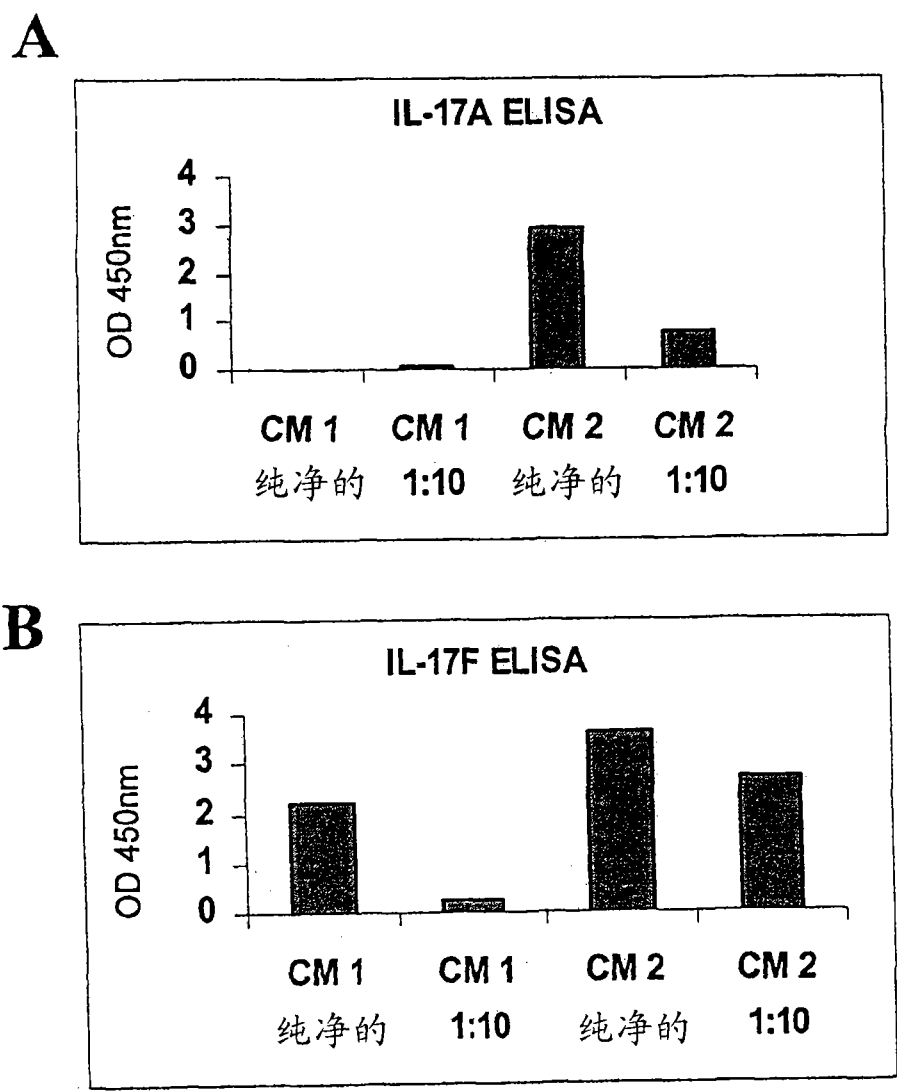


图 14

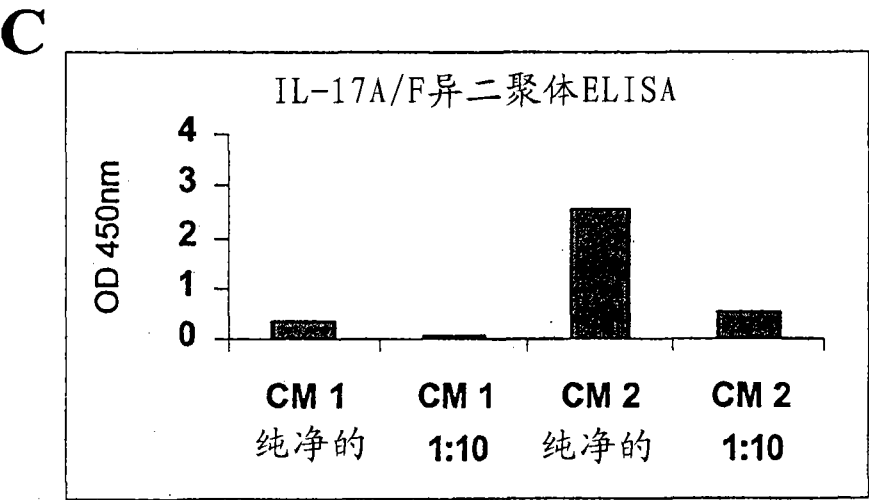


图 14

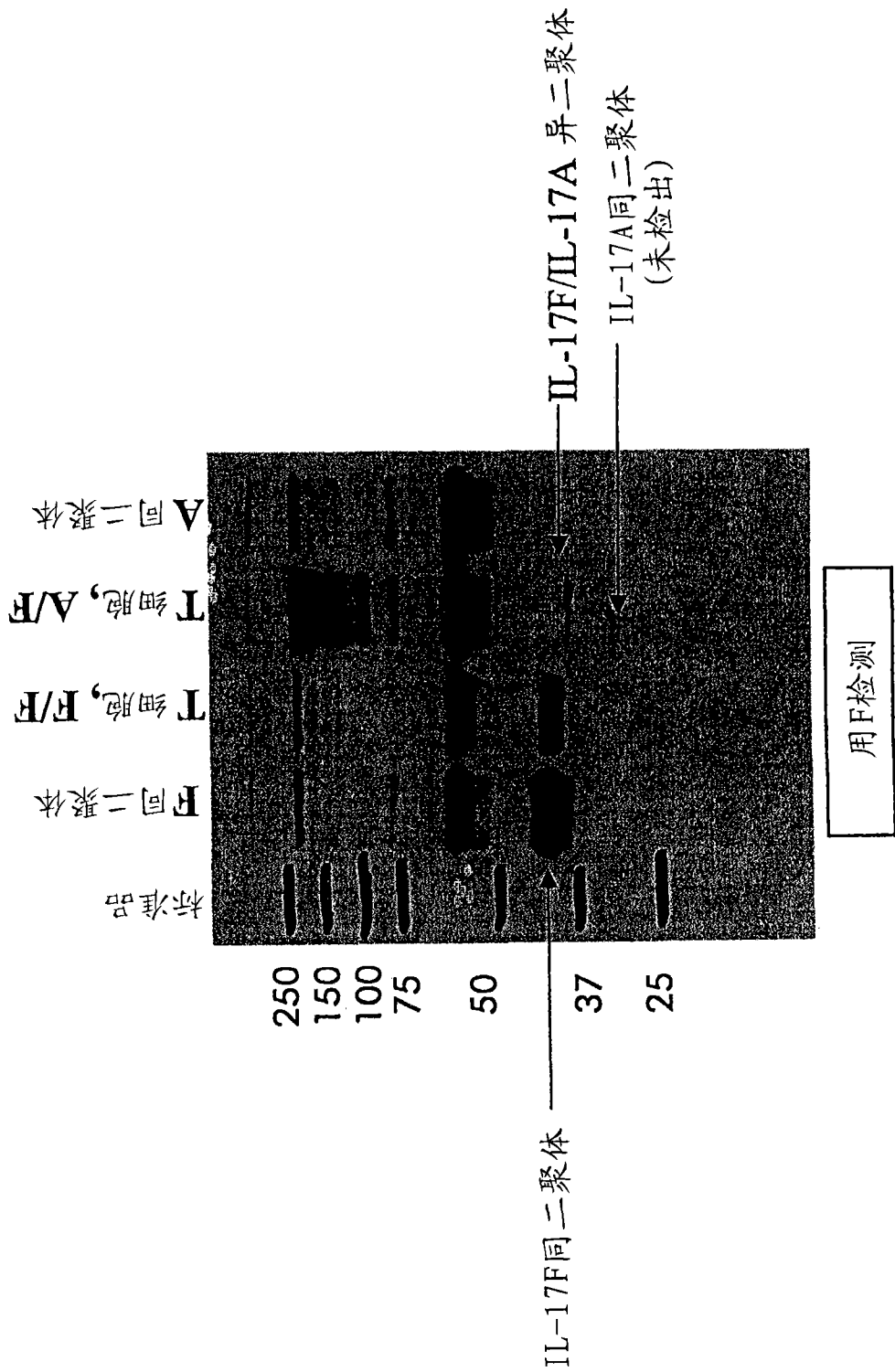


图 15

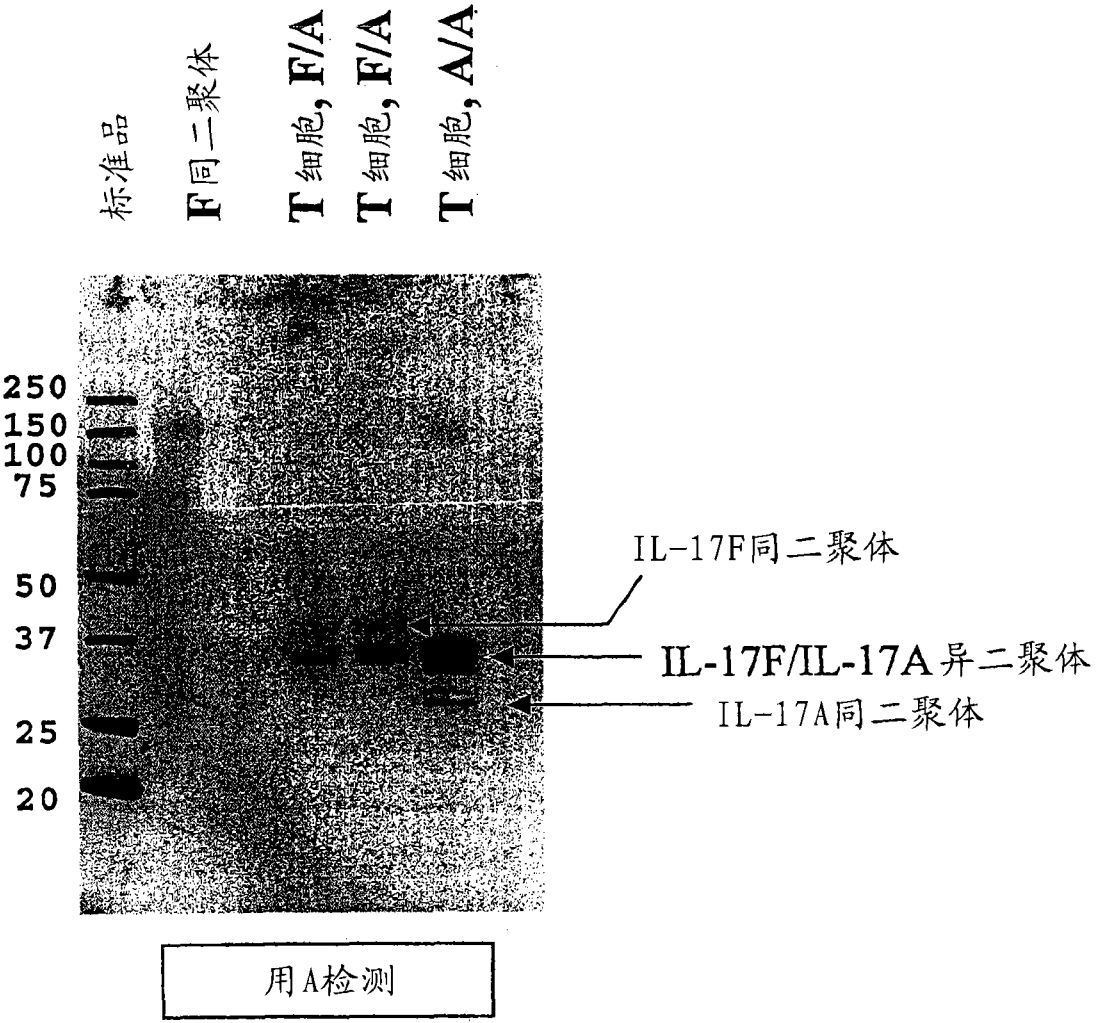


图 16

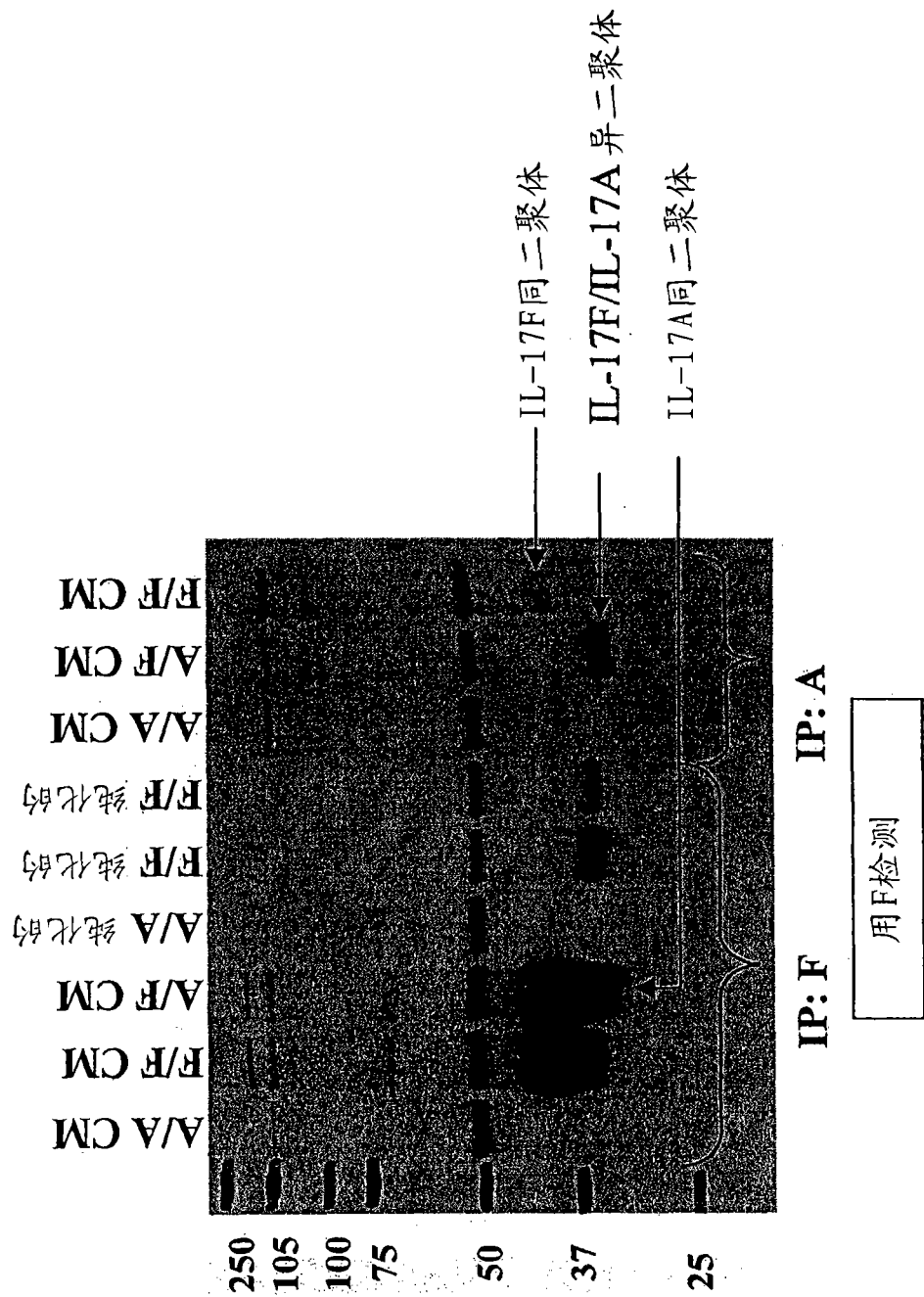


图 17A

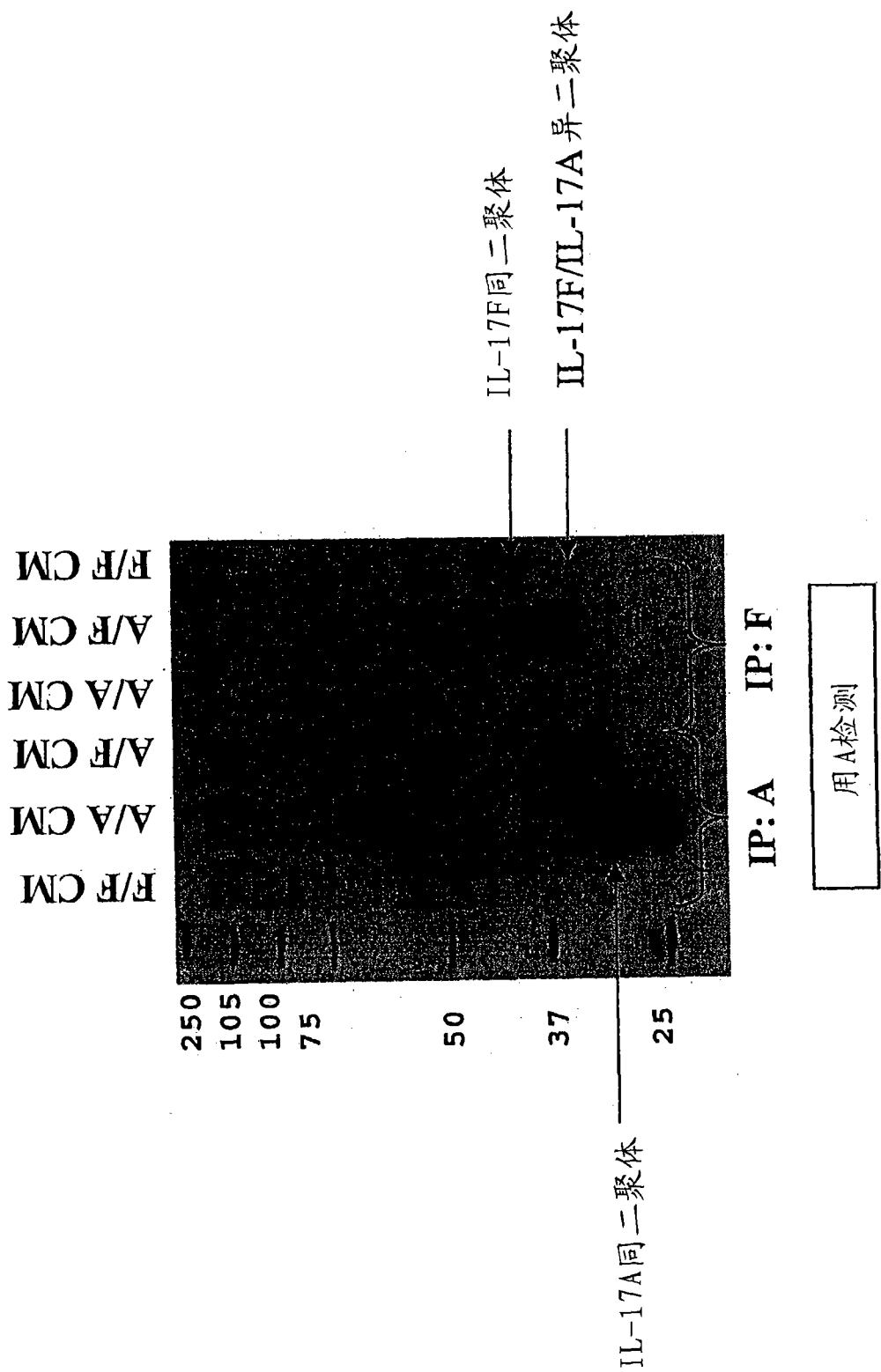


图 17B

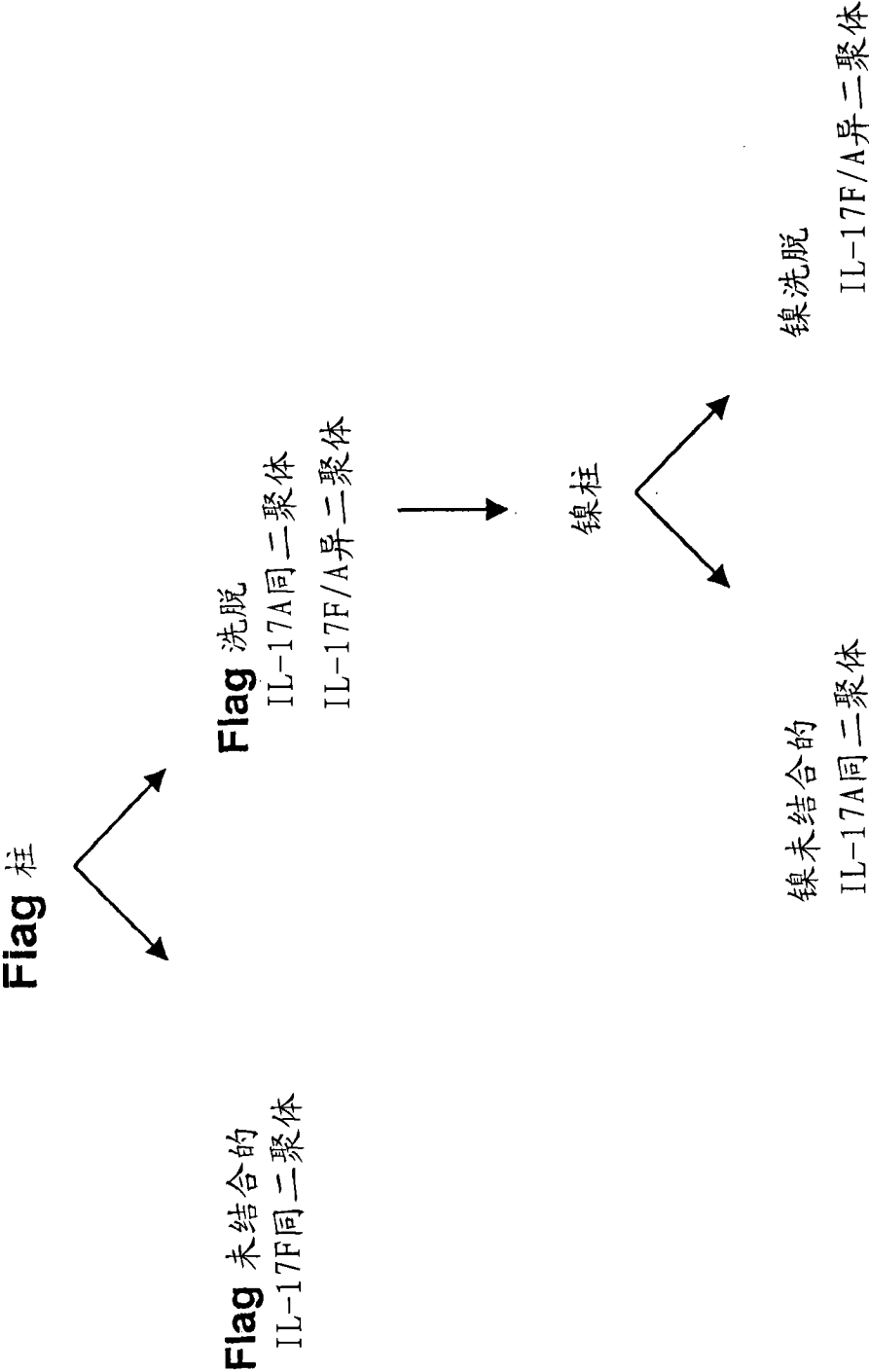


图 18

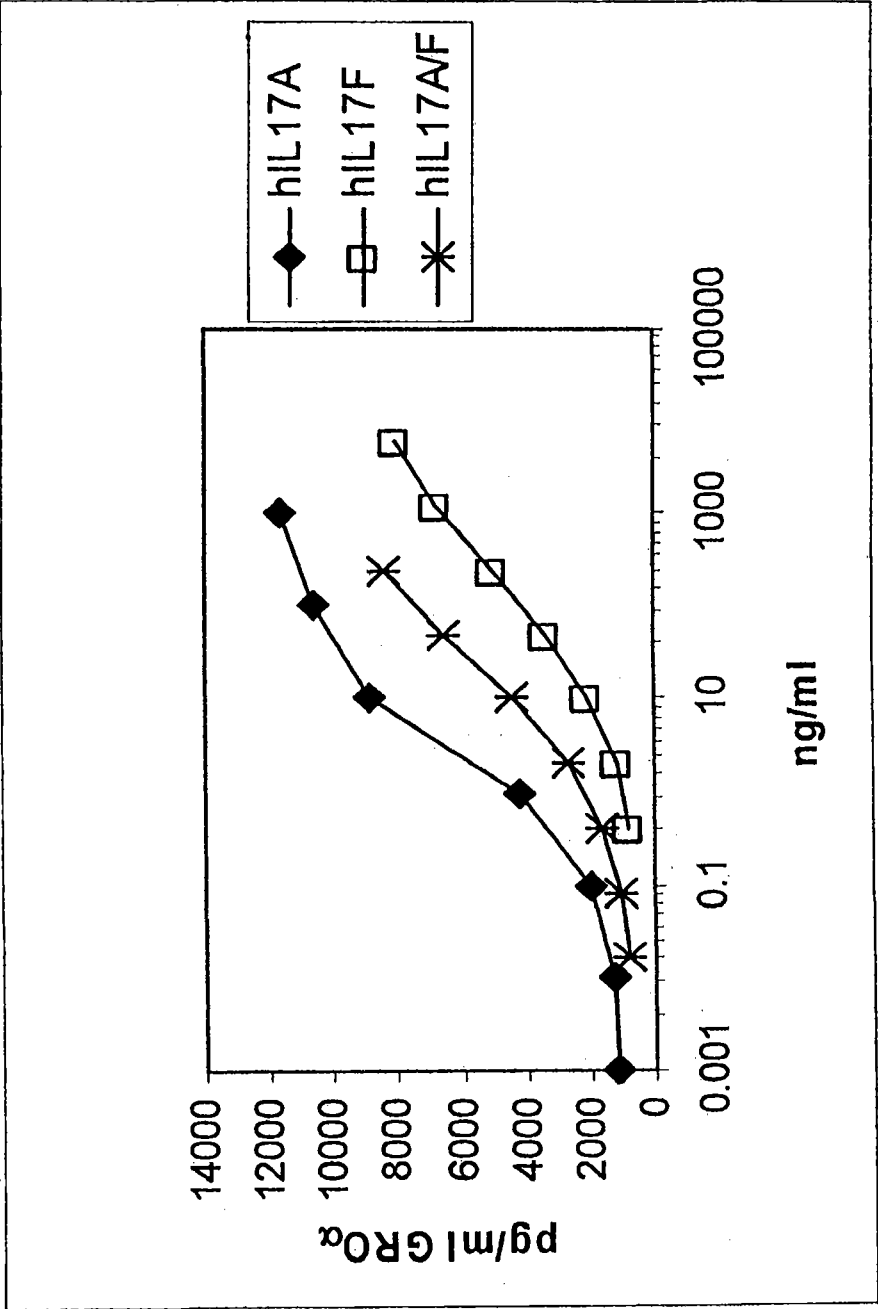


图 19A

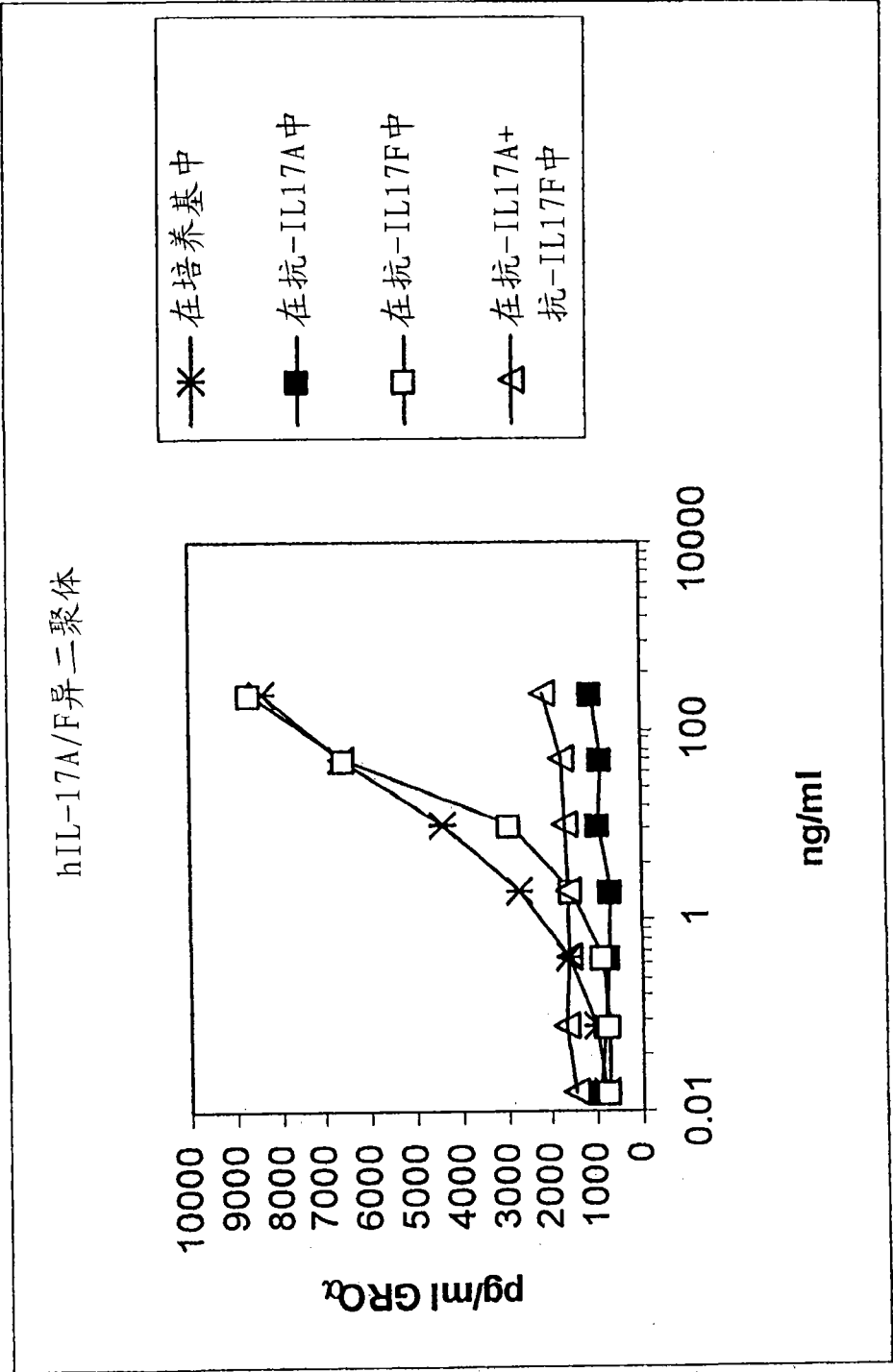


图 19B

来自IL-17AF, IL-17AA和IL-17FF二聚体的二硫键连接的肽的质谱鉴别

	结构	计算分子量	m/z [M+3H] ⁺	
			计算值	观测值
IL17-AA	NPGCPNSEDKNFPR EPPHCPNSFR	2754.2	919.1	919.7
IL17-AF	VGHTFFQKPESCPPVPGGSMK EPPHCPNSFR	3409.6	1137.5	1138.1
IL17-AA	NPGCPNSEDK HQQCSVSFQLEK	2419.1	807.4	807.9
IL17-AA	VGHTFFQKPESCPPVPGGSMK HQQCSVSFQLEK	3588.7	1197.2	1196.9

图 20

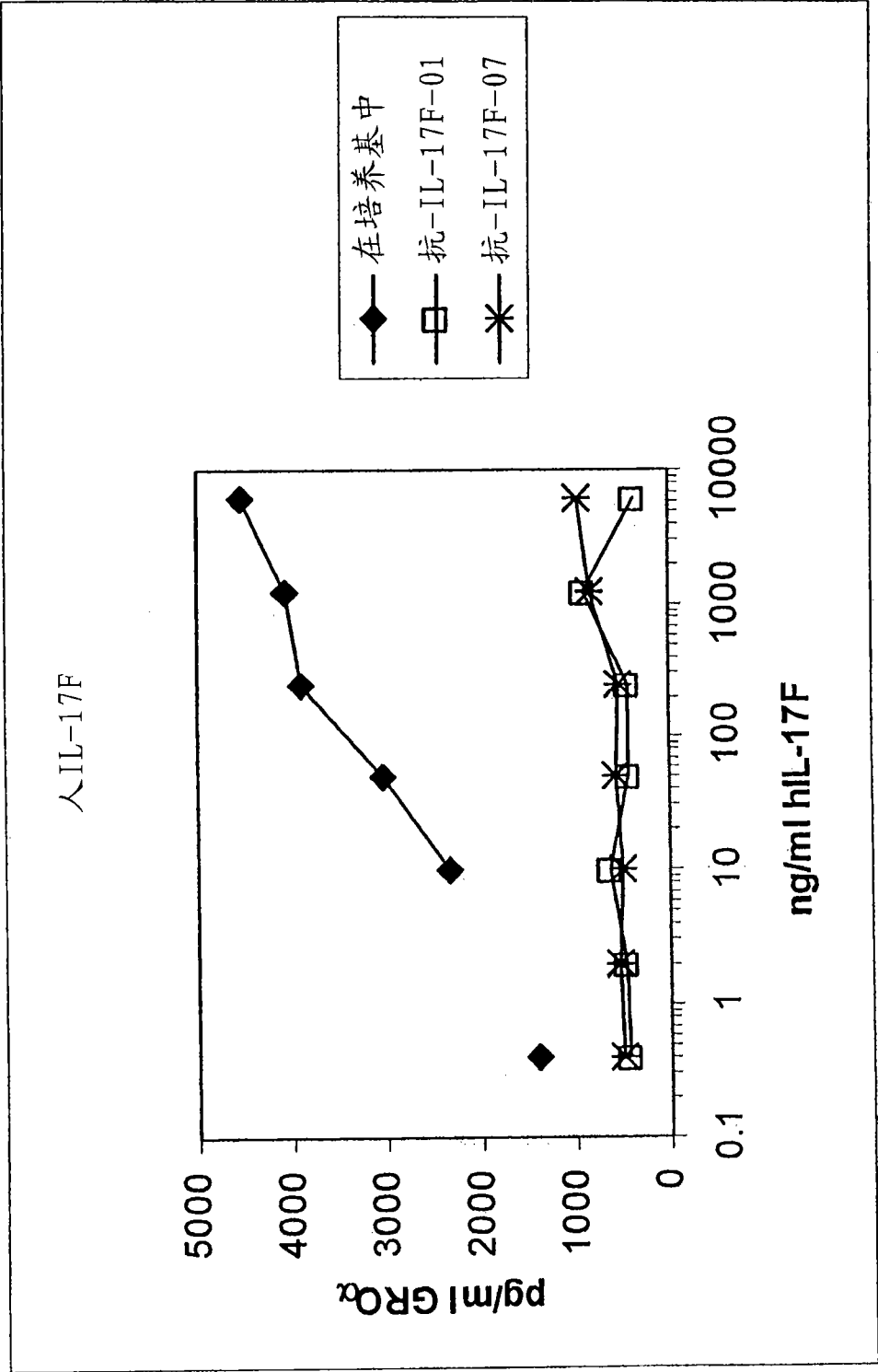


图 21A

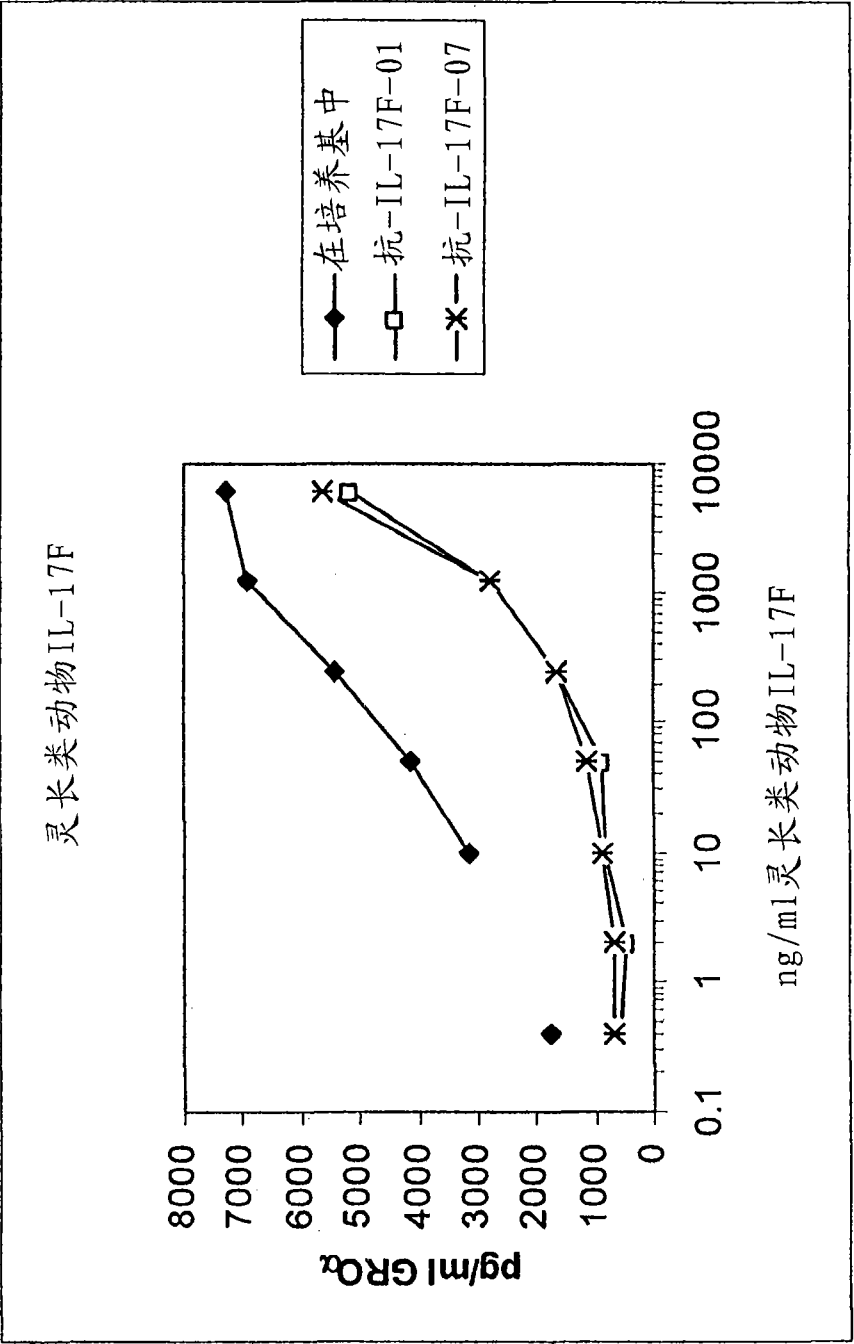


图 21B

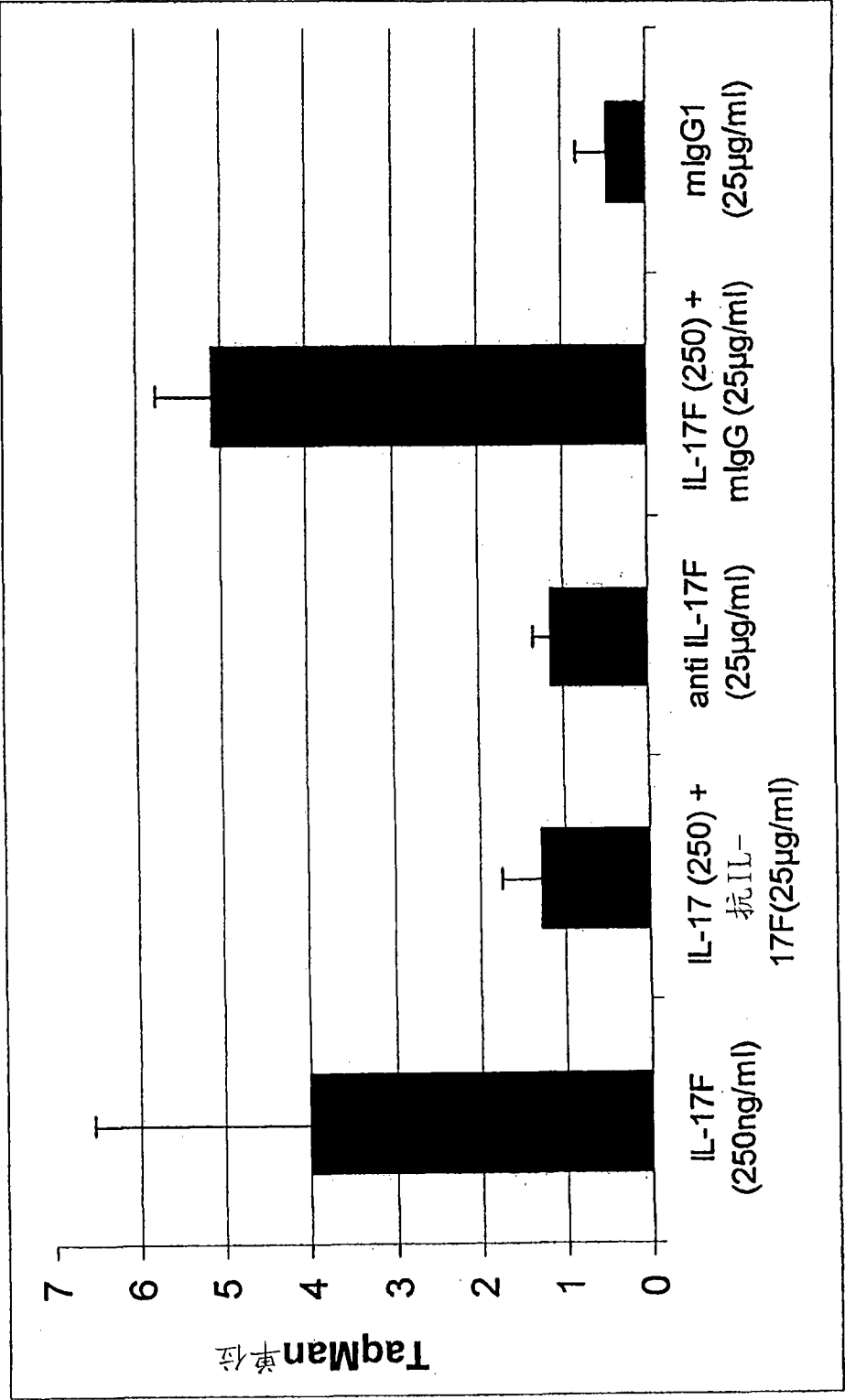


图 22

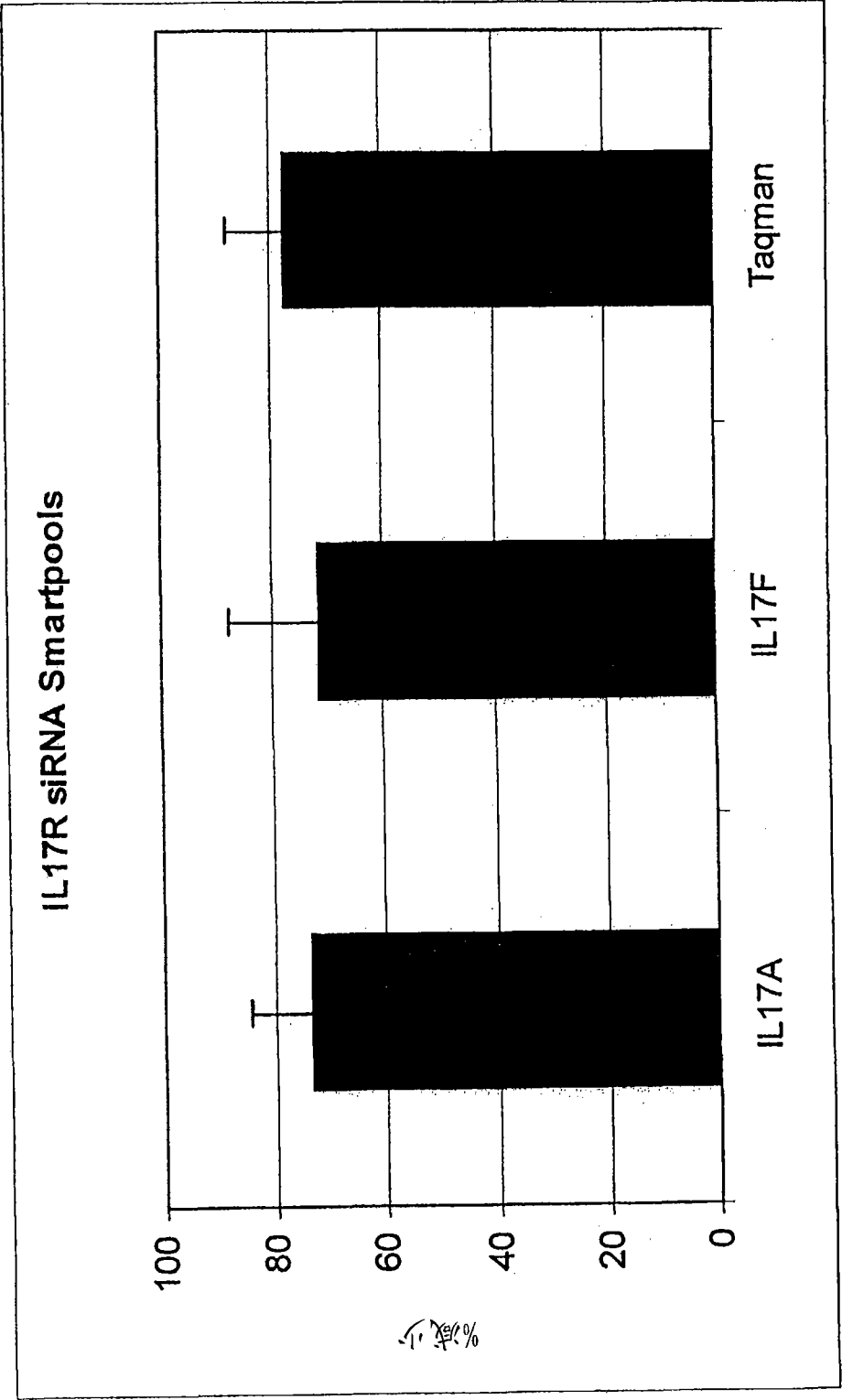


图 23A

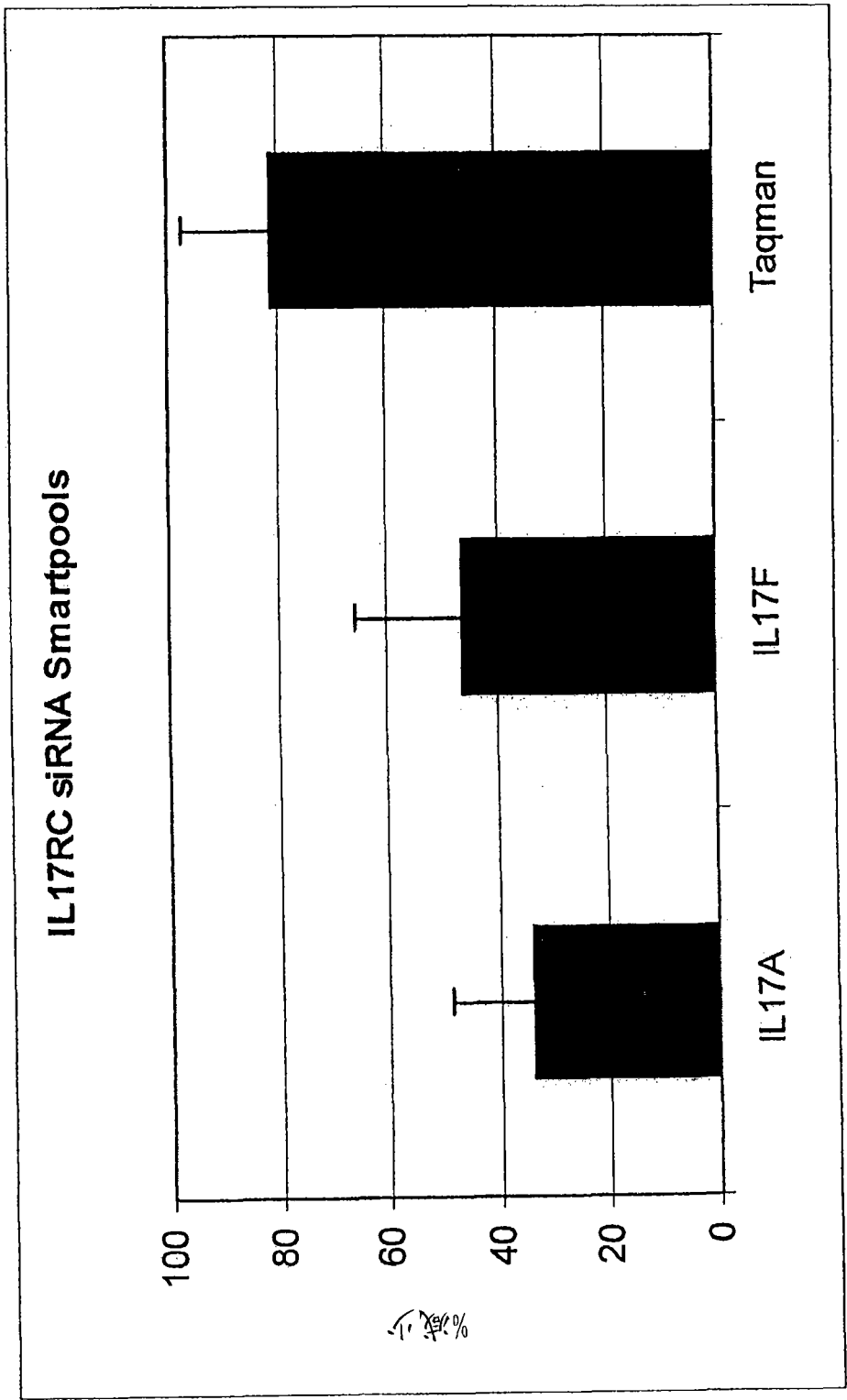


图 23B

基因	siRNA 序列: 有义链: 5' -> 3' 反义链: 5' -> 3'	SEQ ID NO:
IL-17R	GAACACCAAUGAACGUUUGUU	17
	CAAACGUUCAUUGGUGUUCUU	18
	GCACCUACGUAGUCUGCUAUU	19
	UAGCAGACUACGUAGGUGCUU	20
	CAGAACCAAUUCGGACUAUU	21
	UAGUCCGGAAUUGGUUCUGUU	22
	AAUAUGAGGUGACCGUUCAUU	23
	UGAACGGUCACCUCAUAUUUU	24
IL-17RC	GUACGAAUCUGGUCCUAUAUU	25
	UAUAGGACCAGAUUCGUACUU	26
	GAACCUGACUCCGUUAGGAUU	27
	UCCUAACGGAGUCAGGUUCUU	28
	GCUAUGGGACGAUGACUUGUU	29
	CAAGUCAUCGUCCCAUAGCUU	30
	GACCGCAGAUCAUUACCUUUU	31
	AAGGUAAUGAUCUGCGGUCUU	32

图 23C

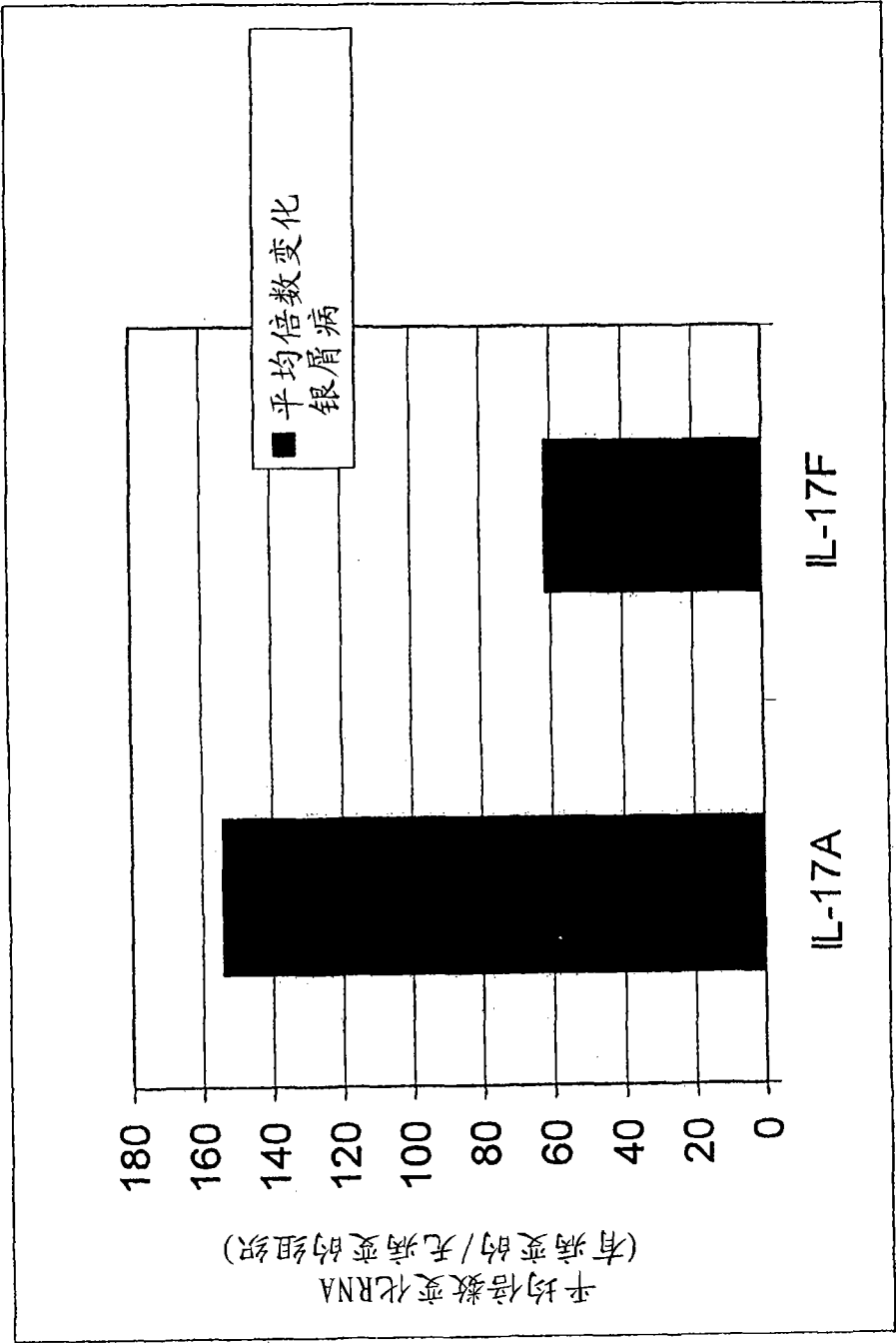


图 24

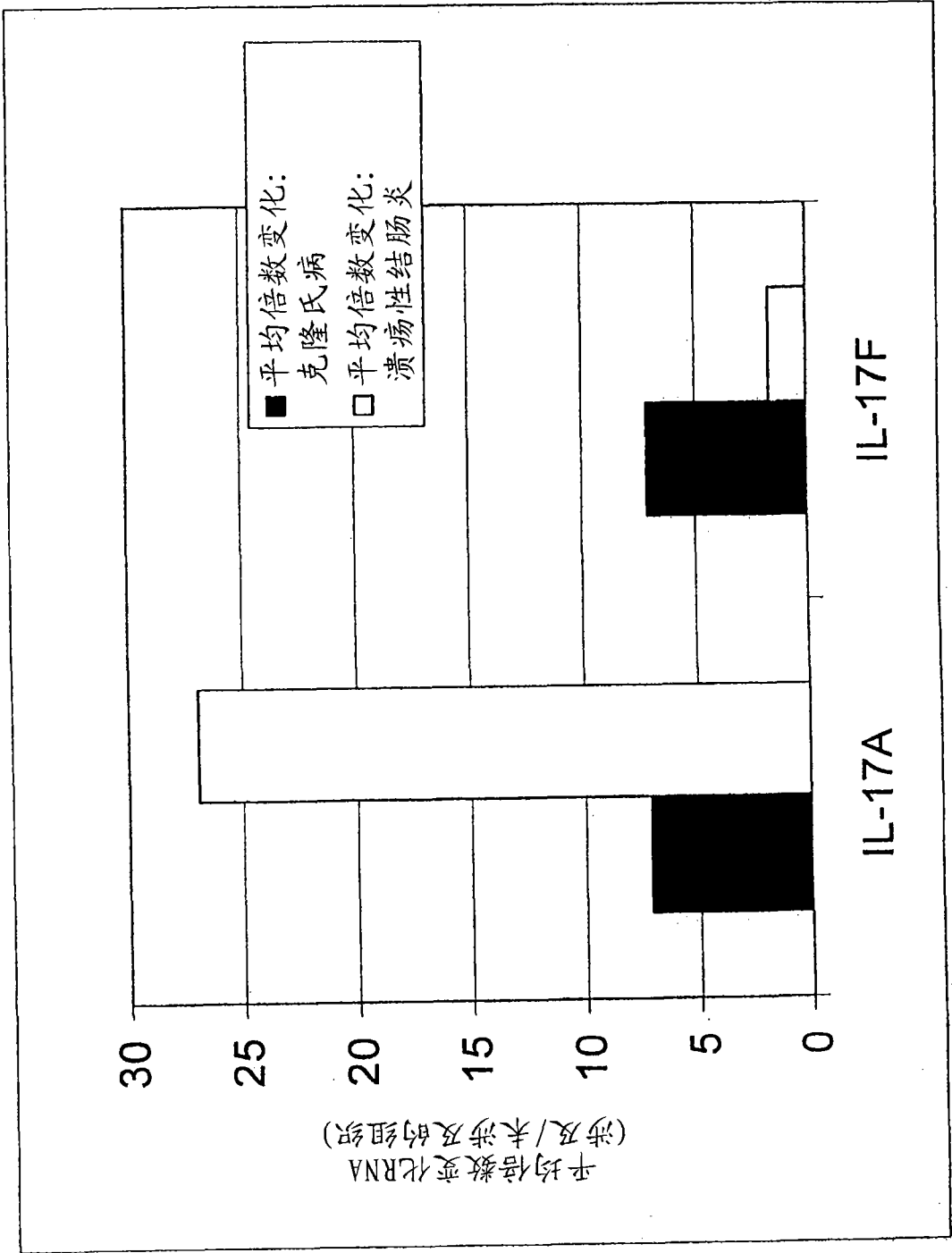


图 25

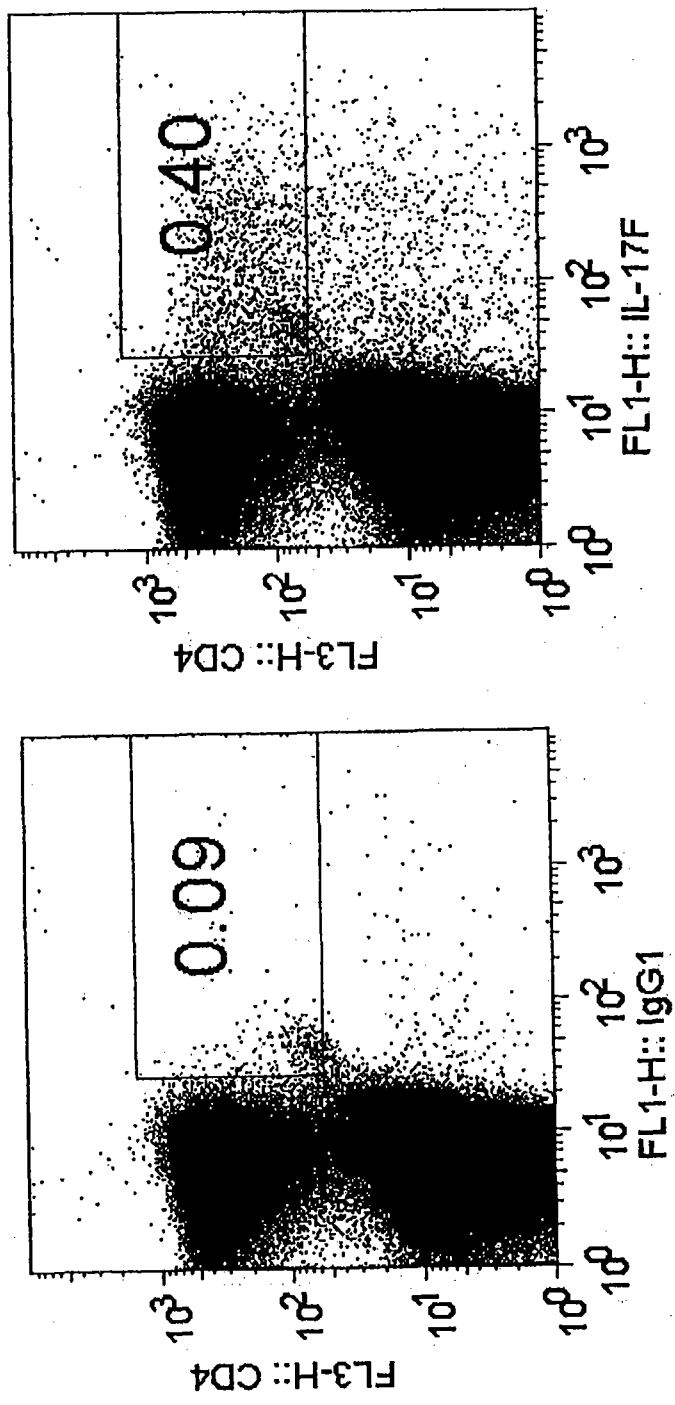


图 26