

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/00

A61K 39/395 C12Q 1/68

G01N 33/53 C12N 15/00

C12N 15/64 C07K 16/00

C07H 21/04



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02813015.4

[43] 公开日 2004 年 10 月 20 日

[11] 公开号 CN 1538853A

[22] 申请日 2002.7.1 [21] 申请号 02813015.4

[30] 优先权

[32] 2001. 6. 29 [33] US [31] 60/302,344

[86] 国际申请 PCT/US2002/020890 2002.7.1

[87] 国际公布 WO2003/002722 英 2003.1.9

[85] 进入国家阶段日期 2003.12.29

[71] 申请人 利兰·斯坦福青年大学托管委员会

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 J·J·麦因太尔

R·H·德克鲁耶夫

D·T·尤梅祖 G·J·弗里曼

V·库奇罗

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

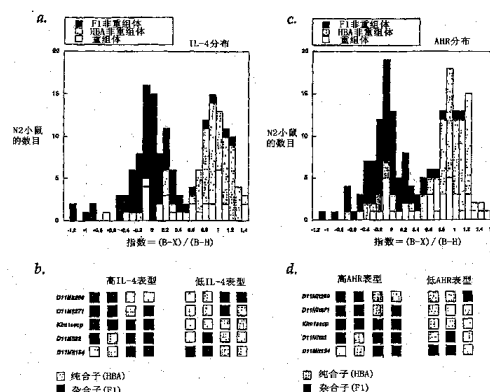
代理人 陈文青

权利要求书 3 页 说明书 45 页 序列表 31 页
附图 10 页

[54] 发明名称 T 细胞调节基因及其使用方法

[57] 摘要

本发明提供了与免疫功能和细胞存活的调节相关的基因座和相应的蛋白质家族。这些基因编码带有保守性 IgV 和粘蛋白功能域的细胞表面分子。这些包含 TIM 家族的基因座与免疫机能障碍(包括哮喘)遗传学上相关。此外, TIM 基因家族位于人第 5 条染色体的一个区域(在恶性肿瘤和骨髓异常增生综合征中通常缺失)内。此基因序列的多态性与气道高反应性和过敏性炎症的发生以及 T 细胞产生 IL-4 和 IL-13 相关。这些蛋白质包括人甲型肝炎细胞受体, hHAVcr-1。



1. 一种含有哺乳类 TIM 基因序列的分离的核酸分子。
2. 如权利要求 1 所述的分离的核酸分子, 其特征在于, 所述哺乳类 TIM 基因
5 序列是选自 TIM-1、TIM-3 和 TIM-4 的等位基因 2、3、4、5 和 6 的人序列。
3. 如权利要求 1 所述的分离的核酸分子, 其特征在于, 所述哺乳类 TIM 基因
序列是选自 TIM-1、TIM-2、TIM-3 和 TIM-4 的小鼠序列。
4. 一种含有 SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、
28、30、32、34 或 36 所列任一序列中至少 20 个核苷酸毗连序列的分离的核酸。
- 10 5. 一种含有 SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、
28、30、32、34 或 36 所列任一序列的分离的核酸。
6. 如权利要求 1 所述的分离的核酸分子, 其特征在于, 所述核酸分子含有供
检测 TIM 基因多态性的探针。
7. 一种寡核苷酸阵列, 其特征在于, 该阵列含有两个或多个权利要求 6 所述
15 的探针。
8. 一种细胞, 其特征在于它含有权利要求 1 所述的核酸组分。
9. 一种纯化的多肽组合物, 其特征在于所述组合物含有至少 50 重%的, 作为
权利要求 1 所述核酸的产物的蛋白质或其片段。
10. 如权利要求 9 所述的纯化的多肽, 其特征在于, 所述多肽含有 SEQ ID NO:1、
20 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33 和 35 所列的序
列。
11. 一种哺乳类 TIM 多肽的特异性抗体。
12. 一种测定个体哮喘易感性的方法, 其特征在于, 该方法包括:
分析所述个体是否存在至少一种易感的 TIM 多态性; 其中, 所述易感多态性
25 的存在表明个体对哮喘的易感性提高。
13. 如权利要求 12 所述的方法, 其特征在于, 所述分析步骤包括测定所述个
体的基因组 DNA 或 mRNA 与权利要求 6 所述的一个探针或多个探针之间的特异性结
合。
14. 如权利要求 12 所述的方法, 其特征在于, 所述分析步骤包括测定所述个
30 体的细胞和蛋白质与权利要求 11 所述抗体之间的特异性结合。
15. 一种用于分析 TIM 基因功能的非人转基因动物模型, 其特征在于, 它包括

敲除 TIM 基因。

16. 一种筛选可调节 TIM 功能的生物活性制剂的方法，其特征在于，该方法包括：

将候选的生物活性制剂与以下任一结合：

- 5 (a) 哺乳动物 TIM 多肽；
(b) 含有编码哺乳动物 TIM 多肽的核酸的细胞；
(c) 用来分析 TIM 基因功能的非人转基因动物模型；以及
测定所述制剂对 TIM 功能的作用。

10 17. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述生物活性试剂可下调或上调 TIM 的表达。

18. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述生物活性试剂可抑制或提高所述 TIM 多肽的活性。

19. 一种诊断或分级个体免疫机能不全的方法，其特征在于，该方法包括：

15 分析所述个体是否存在至少一种易感的 TIM 多态性；其中，易感多态性的存在表明个体对所述免疫机能不全的易感性提高。

20. 一种诊断或分级个体癌症的方法，其特征在于，该方法包括：

分析所述个体是否存在至少一种易感的 TIM 多态性；其中，易感多态性的存在表明个体对癌症治疗的抗性提高。

21. 一种诊断或分级个体癌症的方法，其特征在于，该方法包括：

20 分析所述个体是否存在至少一种易感 TIM-1 表达特征；其中，TIM-1 表达特征表明个体对癌症治疗的抗性提高。

22. 一种诊断或分级个体癌症的方法，其特征在于，该方法包括：

分析所述个体是否存在至少一种易感性 TIM-4 表达特征；其中，TIM-4 表达特征表明个体对癌症治疗的抗性提高。

25 23. 一种治疗个体免疫性疾病的方法，其特征在于，该方法包括：
给予所述个体调节 TIM 多肽功能的试剂。

24. 如权利要求 23 所述的方法，其特征在于，所述 TIM 多肽是 TIM-1 或 TIM-4。

30 25. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述制剂是 TIM-1 的特异性抗体或抗体片段。

26. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述制剂是抑制 TIM-1 功能的

化合物。

27. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述免疫性疾病是哮喘。

28. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述免疫性疾病是过敏反应。

29. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述免疫性疾病是湿疹。

5 30. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述免疫性疾病是自身免疫性疾病。

31. 如权利要求 23 所述的方法，其特征在于，所述制剂是 TIM-4 的特异性抗体或抗体片段。

10 32. 如权利要求 30 所述的方法，其特征在于，所述制剂是抑制 TIM-4 功能的化合物。

33. 一种治疗个体恶性肿瘤的方法，其特征在于，该方法包括：给予所述个体调节 TIM 多肽功能的制剂。

34. 如权利要求 33 所述的方法，其特征在于，所述 TIM 多肽是 TIM-1。

15 35. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述制剂是 TIM-1 的特异性抗体或抗体片段。

36. 如权利要求 35 所述的方法，其特征在于，所述制剂是抑制 TIM-1 功能并强化化学治疗制剂或放射治疗效果的化合物。

37. 如权利要求 33 所述的方法，其特征在于，所述 TIM 多肽是 TIM-4。

20 38. 如权利要求 37 所述的方法，其特征在于，所述制剂是 TIM-4 的特异性抗体或抗体片段。

39. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于，所述制剂是抑制 TIM-4 功能并强化化学治疗制剂或放射治疗效果的化合物。

T 细胞调节基因及其使用方法

5 发明背景

免疫系统令人惊讶的复杂性是其最大力量所在。 10^{12} – 10^{14} 个可能的抗体专一性、各种调节和效应细胞之间精细的相互关系、T 细胞对 MHC 抗原的应答；所有这些都赋予宿主有效抵抗感染因子和其它外源抗原的能力。但这种多样性也有其缺点。错误发生：应答目标结果可能是正常的自身蛋白；炎症反应受到错误调控；以及正常的应答被错误的导向移植物和移植的细胞。这些情况下，免疫系统的复杂性使得诊断和治疗非常困难。

免疫应答中 $CD4^+$ T 细胞产生的细胞因子决定了免疫应答反应的发展和调控结果的效应器功能的性质。Th1 占优的应答反应中 IL-2 和 IFN- γ 的产生与强力细胞介导免疫力、IgG2a 的诱导和 IgE 合成的抑制、以及对胞内病原体的抵抗力相关。相反，Th2 占优的应答反应中 IL-4、IL-5 和 IL-10 的产生与体液免疫和免遭自身免疫病相关。过敏原特异的 $CD4^+$ T 细胞过量产生 Th2 细胞因子，可能导致发生过敏性疾病和哮喘，而 Th1 细胞与各种促炎症疾病相关。

免疫相关疾病的一个进展是免疫治疗。当使用恰当时，免疫治疗证明是有效的，且人们希望免疫干预的进展将进一步增强其功效。其它的研究试图用细胞因子来改变免疫应答反应。IL-12，一种由巨噬细胞和树突状细胞产生的异二聚体细胞因子，可有效促进原初和记忆性 $CD4^+$ T 细胞合成 Th1 细胞因子。其它的细胞因子，如 IL-13 和 IL-4，与 T 细胞分化成 Th2 型有关。

特应性，包括哮喘、过敏性鼻炎和特异性皮炎，是一种复杂的症状，它发生遗传易感个体中，是环境诱导的免疫应答反应的结果。过去二十多年，发达国家中各种特应性疾病的发病急剧增长。哮喘是儿童最常见的慢性疾病，在美国有 1,500 万以上的人患有此病，每年直接用于治疗的费用超过 110 亿美元。流行病学研究提出，哮喘发病率上升的原因是由于工业化社会卫生状况的改善和感染(例如，肺结核或甲型肝炎)频率的降低。然而，对导致哮喘发病率上升的特殊分子途径和赋予哮喘易感性的基因多态性还知之甚少。

哮喘的表现受到以非累加性方式相互反应的多种环境和遗传因子的影响，这

使得鉴定哮喘易感基因复杂化。哮喘易感性与几个染色体区域都有联系，但分辨率为 5-10cM，其中通常有数百个候选基因。此外，由于任一基因中遗传变异的作用可能对整个哮喘致病原因仅仅有最轻微的影响，且基因-基因和基因-环境之间的相互作用混淆了这一分析，因此，服从于定位克隆的假定的易感性基因在区域中的位置很难精细确定。尽管如此，哮喘易感性与第 5、6、11、14 和 12 号染色体有联系。其中，染色体 5q23-35 倍受关注，因为它含有大量候选基因(11、12、13、14、15、16、17、18)，包括 IL-9、IL-12p40、 β -肾上腺素受体和 IL-4 细胞因子簇(它含有 IL-4、IL-5 和 IL-13 的基因)。然而，5q 相关区域之大使其分析复杂化，同时此位点的哮喘基因还未最终鉴定。

10

相关出版物

人甲型肝炎病毒细胞受体的基因序列可在 Genbank 中找到登录号 XM_011327。Genbank 提供了相关序列，登录号为 BAB55044。Monney 等，(2002)Nature 415:436 描述了在 Th1 细胞上表达的细胞表面分子。美国专利 5721351、6204371 和 6288218 号涉及与小鼠 TIM-3 等位基因相对应的序列。

15

发明概要

本发明提供了编码与免疫功能和细胞存活相关的多肽基因家族的基因序列。这些基因编码带有保守性 IgV 和粘蛋白功能域的细胞表面分子，这里是指 T 细胞免疫球蛋白功能域和粘蛋白功能域(TIM)蛋白。这些包括 TIM 家族的基因座与免疫机能障碍(包括哮喘)在遗传上相关。此外，TIM 基因家族位于人第 5 条染色体(在恶性肿瘤和骨髓异常增生综合征中通常缺失)区域内。在 TIM-1、TIM-3 和 TIM-4 中鉴定到多态性，这可能与 Th1/Th2 的分化和气道高反应性(AHR)相关。

20

核酸组合物已被用来制造编码蛋白，这些蛋白可用于功能性研究(作为治疗)并用于研究相关生理途径。TIM 特异性结合试剂，包括核酸、抗体等，可用于论断以测定对特应性和哮喘的遗传易感性，和评估肿瘤对癌症治疗的抗性。TIM 抑制剂被用来治疗免疫机能障碍和细胞存活疾病，包括恶性肿瘤。

25

附图简述

图 1a，HBA 小鼠产生的 IL-4 明显少于 BALB/c 小鼠。获得用 150 μ g KLH 免疫的小鼠的淋巴结细胞，除去 B 细胞，培养在含有 10 μ g/ml KLH 的 cDME 中。96 小

30

时后收获上清并用 ELISA 估计 IL-4 的水平。以方框表示的 IL-4 水平(每组 $n=10$)代表了数据的完整范围,盒子包括上弦和下弦,并在各个盒子中列出了数据的中值。BALB/c 细胞和 (BALB/c $\times$ HBA)F1 细胞产生的 IL-4 明显高于 HBA 的 IL-4 水平, $P<0.0001$ (student t-检验)。b, HBA 小鼠产生的 IL-13 和 IL-10 明显低于 BALB/c 小鼠。每个实验组中显示的数据是由十只小鼠淋巴结细胞培养物产生的细胞因子的平均值, $\pm$ S. D. HBA IL-13 和 IL-10 水平低于 BALB/c 或 (BALB/c $\times$ HBA)F1 值, $P<0.0001$ 。HBA IL-5 对 BALB/c 的 $P<0.05$ 。HBA IFN- γ 对 BALB/c 的 $P<0.001$ 。c, BALB/c 中过敏原诱导的气道高反应性明显高于 HBA 小鼠。测量了肺部气流阻塞,显示的数据代表在不同乙酰甲胆碱浓度时各组致敏小鼠中的峰升高停止 (Penh) 的平均值 $\pm$ S. E. M. (BALB $\times$ HBA)F1 显示 BALB/c 表型,而 (BALB $\times$ DBA)F1 小鼠显示 DBA/2 样表型。

图 2。HBA 染色体 11 的区域遗传自 DBA/2。如 SSLP 标志所描绘, HBA 染色体 11 在 hba- α 2 和 es-3 之间会有两个来自 DBA 的区域。左边的图中,带有 DBA/2 基因型的 HBA 染色体 11 的区域是高亮的(蓝色)。这种标志(左边)提供了 D11Mit230 远侧 2-5cM 的分辨率。小鼠染色体 11 具有与 5q23-35 同线的高保守性区域,在 BALB/c 和 DBA/2 之间用提供信息的多态性鉴定到其它标志,在这一区域提供了 0.01-2cM 的分辨率(右边的柱标记)。绿色表示单链构象多态性 (SSCP) 标志以区别于 SSLP 标志,红色显示感兴趣的特定基因的位置。我们的标志图与染色体委员会报告 (Chromosome Committee Reports) 和 MIT 连锁图不同,我们的图与以前的连锁图和物理图谱相一致。

图 3a。N2 小鼠产生的 IL-4 是双峰的,分别对应于 F1 和 HBA 表型。作为多个实验中对重组体 N2 小鼠相关表型评价的平均值,我们采用了指数函数,这使得我们能够综合多个实验的数据。柱状图显示了带有 (BALB $\times$ HBA)F1、HBA 纯合子和重组性单倍型的 N2 小鼠的 IL-4 指数值的双峰分布。与 F1 和 HBA 单倍型有关的分布是独特的 ($P<0.0001$, 配对 student t-检验)。b. IL-4 的调控与 Kim1sscp 相隔离。按 IL-4 指数值将重组性 N2 单倍型分成与高 IL-4 表型 (指数 <0.35) 和低 IL-4 表型 (指数 >0.65) 相关的组。每一纵向方格代表一种重组单倍体。根据基因型用阴影表示这些单倍体在 D11Mit269 至 D11Mit154 之间基因座上的等位基因 (深色=F1; 浅色=HBA)。高 IL-4 产生与四个单倍形隔离(左),低 IL-4 产生也与四个单倍型(右)隔离。IL-4 表型与 Kim1sscp 有关。c. N2 小鼠的 AHR 是双峰的,对应于 F1 和 HBA 表型。显示了自 Penh 算出的指数值。柱状图显示 N2 小鼠 AHR 指数值的双峰分布。

标明了(BALB×HBA)F1、HBA 纯合子和重组单倍型。与 F1 和 HBA 单倍型相关的分布是独特的($P < 0.0001$, 配对 student t-检验)。d. AHR 调控基因座与 D11Mit22 和 D11Mit271 之间的 IL-4 调控基因座共隔离。按 AHR 指数值将重组 N2 单倍型分成与高 IL-4 表型(指数 < 0.35)和低 IL-4 表型(指数 > 0.65)相关的组。每一纵向方格代表一种重组单倍型。根据基因型用阴影表示这些单倍型在 D11Mit269 至 D11Mit154 之间基因座上的等位基因(深色=F1; 浅色=HBA)。高 IL-4 与四个单倍型隔离(左), 低 IL-4 与三个单倍型隔离(右)。AHR 调控基因座与 D11Mit271 和 D11Mit22 之间的 Kim1sscp 有相联系。

图 4 间隔区含有 Tapr 的小鼠染色体 11 与 5q33 是高度同源的。为构建围绕 Tapr 基因座的复合图谱, 我们将可得到的小鼠连锁图、回交图和辐射杂交图信息整合并鉴定了目前的人类基因组图谱(Human Genome Browser, 第三板, UCSC, 2001 年 3 月)中一个高度保守的同线性区域。以登录号标出位于小鼠染色体 11(左)物理图谱上的 EST, 并与人染色体 5(右)上的 EST 相应的基因(中)作同源性排列比。显示了 KIAA0171 和 Sgd 之间所有已知的基因。

图 5a、b、c。新 TIM 基因家族和 TIM-1 和 TIM-3 中主要多态性的鉴定。小鼠 TIM-1 和小鼠 TIM-2 的克隆。基因家族的成员。显示了小鼠 TIM 基因家族成员的序列。阴影部分指出了两种小鼠 TIM 基因之间的相同性。用 Gibco Superscript II 反转录 conA-刺激的脾细胞中所有的 RNA。扩增全长 Tim-3cDNA 的 PCR 产物, 用 Qiagen QIAquick PCR 纯化试剂纯化并用 Biotech Core(Mountain View, 加利福尼亚州)直接测序。用 TOPO-XL 克隆试剂(Invitrogen)将 Tim-1 和 Tim-2 cDNA 的 PCR 产物克隆入电感受态 TOP10 细胞中。用标准碱性裂解法纯化质粒。按所述方法测序 BALB/c 和 HBA 质粒。小鼠 TIM-1、大鼠 KIM-1 和 HAVcr-1 有同源性。用阴影指出与小鼠 TIM-1 的相同性。空心倒三角表示出大致的信号位点实心菱形表示 Ig 功能域/粘蛋白功能域。边界划线部分是预测的跨膜域。显示了在 BALB/c 和 HBA TIM-1 及 TIM-3 之间带有主要多态性的 TIM-1 和 TIM-3 序列。

图 6. Tapr 调节 CD4 T 细胞 IL-4 和 IL-13 应答反应。BALB/c DO11.10 小鼠的 T 细胞对抗原的应答中产生的 IL-4 和 IL-13 水平高于 HBA DO11.10 小鼠的 T 细胞。用抗 CD-4 磁珠正选择分离得到脾 CD4⁺细胞, 然后将其和骨髓衍生的 DC 和 OVA 共培养。7 天后, 再刺激这些细胞。第二次培养 18-24 小时后收获上清。数据代表了在递增浓度的 OVA 下测得的平均细胞因子水平 $\pm$ S.D. 在引发和分化过程中检测 TIM-1 mRNA 在纯化的 CD4 T 细胞中的表达。

图 7. 人和小鼠 TIM 蛋白质序列的序列排列对比。

图 8. 人 TIM-1 的多态性。

图 9. 人 TIM-1 的 SSCP 多态性分析。

5 实施方案的详细描述

提供了与免疫机能(包括对哮喘的易感性)相关的遗传序列。本文提供了小鼠 Tim-1、Tim-2、Tim-3 和 Tim-4 的序列以及人相应的序列。还提供了主要多态性的序列。基因组序列显示, 这些多态性(包括缺失)是真正的多态性, 而不是剪接变体。TIM-1 和 TIM-3 序列的变体与对气道高反应性和过敏性 T 细胞应答的易感性相关, 其它变体与对抗这些反应的保护作用相关。

TIM 基因家族成员的胞外功能域包括两个功能域, 一个 IgV 功能域和一个粘蛋白功能域。在 MadCam(粘膜地址素细胞粘附分子)中也发现了这种 Ig/粘蛋白结构, 它包括两个 Ig 功能域和一个粘蛋白功能域; 然而, TIM 和 MadCam 之间只有低水平的同源性。TIM-1 和 TOSO(NP_005440.1 GI:4885641), 一种类似于活性 T 细胞上表达的 TIM-1 的蛋白质, 它保护 T 细胞免于 Fas 介导的调亡, 之间也有类似程度的同源性。

T 细胞表达关键性调节 CD4 T 细胞分化的 TIM 家族基因。Th1 细胞优先表达 TIM-3 蛋白, 而 Th2 细胞优先表达 TIM-1 蛋白。TIM-1 与气道高反应性有关而 TIM-3 与自身免疫性疾病有关, 因此, 分化的淋巴样细胞的表达模式和淋巴样细胞上 TIM-1 的表达的动力学反映了这些分子的功能。

在本发明的另一方面, 提供了通过测定 Tim 基因座的基因型确定个体发生哮喘和特应性疾病易感性的方法。筛选可以分析, 例如, 本文提供的 TIM-1、TIM-3 或 TIM-4 等位基因中任一的多态性, 或者测定之。提供了筛选这种多态性的方法, 如 SSCP 分析、大小多态性等。

本发明的另一方面, 提供了筛选可调节 Tim 基因或多肽功能的生物活性制剂的方法, 该方法包括将候选的生物活性制剂与以下任一物质结合: (a)Tim 多肽; (b)含有编码 Tim 多肽核酸的细胞; 或(c)Tim 基因功能的非人转基因动物模型, 它包括以下之一: (i)敲除 Tim 基因; (ii)外源性稳定递送的 Tim 基因序列; 或(iii)操作性连接于一报告基因的 Tim 启动子序列; 和确定所述制剂对 Tim 功能的作用。

可以调节 TIM 多肽的活性以指导免疫功能。TIM-1 优先在 Th2 细胞上表达, 能调节 TIM-1 活性的制剂可用来治疗与 Th2 有关的疾病, 包括过敏、哮喘等。TIM-3

优先在 Th1 细胞上表达,能调节 TIM-1 活性的制剂可用来治疗促炎性免疫疾病,包括自身免疫性疾病、移植排斥等。

有关条件

- 5 特应性疾病有复杂的遗传性状,它发生在有遗传倾向的个体是由于环境(诱导的)免疫应答反应的结果。将特应性和非特应性个体暴露在同样的环境因素中,但是使特应性个体与非特应性个体相区别的遗传差异,导致一些个体中发生特异性疾病,表现为呼吸道、皮肤或肠胃道的过敏性炎症,以及血清 IgE 升高、嗜伊红细胞增多和哮喘、打喷嚏或荨麻疹等症状。此外,过敏性炎症反应的特征是存在产生高
- 10 水平 IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13 的 Th2 淋巴细胞,这些细胞因子增强了嗜伊红细胞、肥大细胞、嗜碱细胞以及产生 IgE 的 B 细胞的生长、分化和/或补充,。

有关的过敏原包括在食物,如草莓、花生、牛奶蛋白质、鸡蛋白等中发现的抗原。其它的有关过敏原包括各种以空气为载体的抗原,如菁草花粉、动物鳞屑、屋尘螨的粪便等。分子克隆的抗原包括 *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der P1);黑麦草花粉的 Lol p1-V;许多昆虫的毒液,包括 jumper 蚂蚁 *Myrmecia pilosula* 的毒液; *Apis mellifera* 蜂的毒液磷脂酶 A2 (PLA₂ 和抗原 5S; 黄色胡蜂 *Vespula maculifrons* 和白面胡蜂 *Dolichovespula maculata* 的磷脂酶;许多花粉的蛋白质,包括桦树花粉、豚草花粉、ParoI (*Parietaria officinalis* 的主要过敏原)和交叉反应性过敏原 ParjI (来自 *Parietaria judaica*), 以及其它空气中的花粉,包括油

15 橄榄、蒿属,禾本科等。其它有关的过敏原是那些造成因吸血节肢动物,如双翅目,包括蚊子(疟蚊属,伊蚊属、Culiseta、库蚊属);苍蝇(白蛉属、库蠓属),尤其是黑蝇、鹿虻和蠓;蜱 (*Dermacentor* sp.、*ornithodoros* sp.、残喙蜱属);蚤,如 order siphonaptera, 包括 *Xenopsylla Pulex* 和 *Ctenocephalides felis felis* 属,引起的过敏性皮炎的过敏原。具体的过敏原可能是多糖、脂肪酸分子、蛋白质

20 等。

25 等。

许多相互作用/上位特应性基因的多态性被认为会导致对过敏性疾病的易感性增强。通过将过敏和哮喘的各种参数与特定基因(通常是 DNA (含有两个、三个或四个核苷酸重复的微卫星)的重复序列)的多态性 DNA 标志连接,对基因组进行了广泛扫描以鉴定负责基因。这些研究已经鉴定到几个可能参与特应性发病机理的染色体区域,但分辨率不超过 5-10cM,这当中通常有几百个候选基因。尽管如此,通

30 过对这些基因组中的两个或多个基因的广泛扫描研究得知,哮喘易感性与染色体

5q23-31、染色体 6p21、染色体 11q13 和染色体 12q(9-13)有关。

本文定义的哮喘是个体在一定时期内发生的可逆的气流阻塞。哮喘的特征是在气道壁中存在嗜伊红细胞、肥大细胞、嗜碱细胞和 CD25⁺T 淋巴细胞等细胞。由于细胞因子(有各种联系和生物效应器特性)的活性,这些细胞之间有近距离的相互作用。趋化因子吸引细胞到发炎部位而细胞因子将它们活化,导致粘膜炎症和损伤。随着炎症的慢性化,发生继发性变化,比如基底膜增厚和纤维变性。这种疾病的特征是气道对各种刺激的高反应性增加和气道炎症。随着时间推移,诊断为哮喘的患者通常会发生多种症状,包括气喘、哮喘发作、以及对乙酰胆碱攻击的阳性应答,即对低约 4mg/ml 的乙酰胆碱攻击 PC20。有关诊断的综述可以参见,例如,National Asthma Education Program Expert Panel Guidelines for Diagnosis and Management of Asthma, 国家卫生研究院, 1991, Pub.NO.91-3042。

哮喘、过敏性鼻炎(干草热)、特应性皮炎(湿疹)和食物过敏都是同一家族中发生的疾病,这意味着有共同的遗传机制。这些特应性疾病非常普遍,整个人群中有 20-40%患病,成为主要的公众健康问题。治疗这些疾病的经济花费十分巨大。仅仅对哮喘而言,估计 1996 年中用于卫生保健的费用就有 140 亿美元。此外,过去二十年中,工业化国家所有特应性疾病的发病率显著增长,原因不清楚。工业化国家哮喘发病率的提高最为急剧,自 1982 年以来增加了一倍,并有可能在 2020 年以前再增加一倍。

与 Th1 型 T 细胞有关的促炎性疾病包括自身免疫性疾病,如多发性硬化后、类风湿性关节炎、I 型糖尿病等。(RA)是影响世界人口 0.8%的慢性自身免疫性炎性关节膜炎。目前对 RA 的治疗采用非特应性抑制或调节免疫功能的药物。此类药物,包括最近开发的 TNF α 拮抗剂,不能根治,且在停止治疗后疾病迅速复发。临床上迫切需要可以根治且不会造成全身性免疫抑制或调节的治疗剂。

能够分泌 IFN- γ 的髓磷脂自身反应性 T 细胞数量的增加与 MS 和 EAE 的发病机理有关,提示 MS 患者外周血中自身免疫性诱导/辅助 T 淋巴细胞可能引起和/或调节 MS 患者的脱髓鞘过程。明显的疾病伴有肌无力、腹部反射消失、视觉缺陷和副交感神经病。前兆期,有白细胞渗入脑脊液、炎症和脱髓鞘现象。

细胞介导的自身免疫性疾病, IDDM 是导致胰岛素分泌性 β 细胞破坏和显著高血糖症。T 淋巴细胞侵入胰岛,并特异性破坏胰岛素产生 β 细胞。 β 细胞减少导致无法控制血液中葡萄糖的水平。可在通过家族史和遗传分析诊断为易感性的个体中监测这种疾病的发展。用主要组织相容性基因座(IDDM1)基因观察到了最重要的遗

传效应, 尽管其它基因座, 包括胰岛素基因区 (IDDM2) 也显示和这一疾病有关 (参见 Davies 等, 同上, 和 Kennedy 等, (1995) Nature Genetics 9:293-298)。

基因家族

5 本发明所提供的 TIM 家族基因及其片段, 编码的蛋白质、基因调节区域和特异性抗体可用鉴定易于发生或抵抗哮喘的个体, 并用于体内基因活性调节以达到预防和治疗的目的。编码的蛋白质可用作免疫原来诱导特异性抗体, 用于对能模拟或调节这些基因和其编码蛋白的活性或表达的组合物 (包括这些蛋白质的改变形式) 进行药物筛选, 以及作为治疗剂。

10 在人染色体 5 上, TIM 家族基因以 TIM-4、TIM-1、TIM-3 的顺序没有间插基因彼此紧密毗连。人染色体 5 的这一区段在恶性肿瘤和发育异常的细胞群体中通常缺失, 比如在骨髓异常增生综合征中 (见 Boulton 等, (1997) Genomics 45: 88-96)。染色体 5、12 和 19 上存在 TIM 假基因。每个 TIM 蛋白, 除 TIM-4 外, 都含有一个预计的独特的酪氨酸信号基序。TIM-1 的胞质区含有两个酪氨酸残基并包括一个高
15 度保守的酪氨酸激酶磷酸化基序, READNIY。扩展区, SRAEDNIYIVEDRP, 含有预言的 Itk 磷酸化和 EGF 受体磷酸化位点。

小鼠 Tim1 基因编码一 305 个氨基酸的膜蛋白。TIM-1 的胞质区含有两个酪氨酸残基并包括一个高度保守的酪氨酸激酶磷酸化基序, READNIY。TIM-1 的粘蛋白功能域有多个 O-连接糖基化位点, 并在免疫球蛋白功能域中发现了两个 N-连接的
20 糖基化位点。

小鼠 TIM-2, 一种类似 305 个氨基酸的膜蛋白, 与小鼠 TIM-1 有 64% 的相同性, 与大鼠 KIM-1 有 60% 的相同性, 与 hHAVcr-1 有 32% 的相同性。和 TIM-1 一样, TIM-2 有两个胞外 N-连接的糖基化位点, 和一个富含丝氨酸和苏氨酸并有许多 O-连接的糖基化位点的粘蛋白功能域。TIM-2 还有一个胞内酪氨酸激酶磷酸化基序,
25 RTRCEDQVY。

TIM3 编码小鼠的一种 281 个氨基酸的膜蛋白, 在编码人类的一种 301 个氨基酸的蛋白质, 具有类似的完整的带有多个胞外糖基化位点和胞内酪氨酸磷酸化基序的膜糖蛋白结构。尽管 TIM-3 中的粘蛋白功能域没有 TIM-1 和 TIM-2 那么显著, 但 T 细胞上表达的 TIM-3 能与 APC 的配体反应并改变 APC 的活性。TIM-3 有四个 N-连
30 接的和五个 O-连接的糖基化位点, 提示 TIM-3 和 TIM-1 和 TIM-2 一样, 是高度糖基化的, 并可能和其它细胞 (如抗原呈递细胞) 中存在的配体反应。

TIM4 编码小鼠的一种 344 个氨基酸的膜蛋白, 编码人类的一种 378 个氨基酸的蛋白质。预测的 TIM-4 还含有其它 TIM 蛋白的普通膜糖蛋白结构基序、一个具有高度保守半胱氨酸残基的 IgV 样功能域、一个富含苏氨酸的粘蛋白样功能域和一个短的胞内尾巴。

- 5 在序列表中提供了 BALB/c 和 HBA/DBA 品系小鼠序列的多态性。TIM-1 中, 这些多态性在 HBA/DBA 中造成了三个氨基酸差异和 15 个氨基酸缺失。在 TIM-3 中鉴定到 7 个预计的氨基酸差异。TIM-1 和 TIM-4 的多态性位于信号域和粘蛋白样功能域中, 而在 TIM-3 中鉴定的多态性集中在 Ig 功能域中。

- 序列表和图 8 中提供了人 Tim1 编码区域的改变。改变包括插入(标记为多态性 1), 157insMtttvp, 在 65%的染色体中观察到了这一现象, 和缺失(多态性 5), 187 Δ Thr, 在在 65%的染色体中观察到了这一现象。其它的多态性是 T140A(多态性 7); V161A(多态性 2); V167I(多态性 3)、T172A(多态性 4); N258D(多态性 6)。在 40%的染色体中观察到了多态性 4, 并在 $\leq$ 5%的染色体中观察到了其它的多态性。这些变化中的大部分(2-6)位于外显子 3(第一个编码粘蛋白的外显子)中, 所有的变体都发生在基因组水平且不是剪接变体。有关哮喘敏感性儿童哮喘与 D5S820(平均 LOD 值=4.8), (一个大约含 0.5 兆 Tim1 碱基的标记), 有明显联系报道进一步支持 Tim1 和哮喘易感性之间的关系。
- 10 性 1), 157insMtttvp, 在 65%的染色体中观察到了这一现象, 和缺失(多态性 5), 187 Δ Thr, 在在 65%的染色体中观察到了这一现象。其它的多态性是 T140A(多态性 7); V161A(多态性 2); V167I(多态性 3)、T172A(多态性 4); N258D(多态性 6)。在 40%的染色体中观察到了多态性 4, 并在 $\leq$ 5%的染色体中观察到了其它的多态性。这些变化中的大部分(2-6)位于外显子 3(第一个编码粘蛋白的外显子)中, 所有的变体都发生在基因组水平且不是剪接变体。有关哮喘敏感性儿童哮喘与 D5S820(平均 LOD 值=4.8), (一个大约含 0.5 兆 Tim1 碱基的标记), 有明显联系报道进一步支持 Tim1 和哮喘易感性之间的关系。

- 人类组织中, 几乎所有组织中都存在 4.4kb 的 TIM-1 的 mRNA, 尽管在大多数组织中很微弱。在结肠和肝脏中观察到 5.5kb 的条带。脾脏、胸腺和外周血白细胞中观察到 7.5kb 的条带, 在一些器官中观察到小于 4.4kb 的条带。在不同的细胞群中, TIM-1 mRNA 的表达带有交替的 5' 非翻译区。缺氧和局部缺血诱导上皮细胞表达 TIM-1, 辐射诱导 TIM 基因家族 mRNA 表达。肿瘤中也有 TIM 基因表达。人 TIM-4 mRNA 在成胶质细胞瘤组织有表达, 也在有丝分裂素激活的或照射过的外周血单核细胞中检测到。
- 20 中观察到 7.5kb 的条带, 在一些器官中观察到小于 4.4kb 的条带。在不同的细胞群中, TIM-1 mRNA 的表达带有交替的 5' 非翻译区。缺氧和局部缺血诱导上皮细胞表达 TIM-1, 辐射诱导 TIM 基因家族 mRNA 表达。肿瘤中也有 TIM 基因表达。人 TIM-4 mRNA 在成胶质细胞瘤组织有表达, 也在有丝分裂素激活的或照射过的外周血单核细胞中检测到。

- 25 一方面, 除了自然发生的含有编码 TIM-1、TIM-2、TIM-3 或 TIM-4 蛋白的序列的染色体外, 本发明还提供了一种分离的核酸分子, 或其同系物或变体, 这种变体可能与气道高反应性和过敏性 T 细胞应答反应的易感性有关。这种核酸可以操作性连接于载体和/或控制序列在同源或异源的宿主细胞中表达。这种宿主细胞可以用来制造编码的蛋白。在本发明的另一方面, 提供了 TIM-1、TIM-2、TIM-3 或 TIM-4 蛋白的纯化多肽, 或其类似物或变体, 这种变体可能与气道高反应性和过敏性 T 细胞应答反应的易感性有关。另一方面, 本发明提供了能结合 TIM-1、TIM-2、TIM-3 或 TIM-4 多肽的抗体或其它特异性结合元件。
- 30 蛋白的纯化多肽, 或其类似物或变体, 这种变体可能与气道高反应性和过敏性 T 细胞应答反应的易感性有关。另一方面, 本发明提供了能结合 TIM-1、TIM-2、TIM-3 或 TIM-4 多肽的抗体或其它特异性结合元件。

在序列表中列出了人和小鼠的 TIM 序列，如下所示：

序列号	名称	长度	类型
1	BALB/c TIM-1	305	蛋白质
2	BALB/c TIM-1	918	DNA
3	ES-HBA TIM-1	282	蛋白质
4	ES-HBA TIM-1	849	DNA
5	BALB/c TIM-2	305	蛋白质
6	BALB/c TIM-1	958	DNA
7	ES-HBA TIM-2	305	蛋白质
8	ES-HBA TIM-2	958	DNA
9	BALB/c TIM-3	281	蛋白质
10	BALB/c TIM-3	2725	DNA
11	ES-HBA TIM-3	281	蛋白质
12	ES-HBA TIM-3	862	DNA
13	BALB/c TIM-4	345	蛋白质
14	BALB/c TIM-4	1032	DNA
15	ES-HBA TIM-4	345	蛋白质
16	ES-HBA TIM-4	1032	DNA
17	hTIM-1 等位基因 1	359	蛋白质
18	hTIM-1 等位基因 1	1080	DNA
19	hTIM-1 等位基因 2	359	蛋白质
20	hTIM-1 等位基因 2	1080	DNA
21	hTIM-1 等位基因 3	365	蛋白质
22	hTIM-1 等位基因 3	1098	DNA
23	hTIM-1 等位基因 4	359	蛋白质
24	hTIM-1 等位基因 4	1079	DNA
25	hTIM-1 等位基因 5	364	蛋白质
26	hTIM-1 等位基因 5	1095	DNA
27	hTIM-1 等位基因 6	364	蛋白质
28	hTIM-1 等位基因 6	1099	DNA
29	hTIM-3 等位基因 1	301	蛋白质
30	hTIM-3 等位基因 1	1116	DNA
31	hTIM-3 等位基因 2	301	蛋白质
32	hTIM-3 等位基因 2	1116	DNA
33	hTIM-4 等位基因 1	378	蛋白质
34	hTIM-4 等位基因 1	1156	DNA
35	hTIM-4 等位基因 2	378	蛋白质
36	hTIM-4 等位基因 2	1156	DNA

编码 Tim 多肽的 DNA 序列可以是 cDNA 或基因组 DNA 或是其片段。用于探针、制造多肽等的有关片段可以包括一个或多个多态性残基。术语 Tim 基因指，编码特定的 Tim 多肽、内含子、以及参与表达调节的毗邻 5' 和 3' 端非编码核酸序列(高至超出编码区 1kb，但可能在某一端更长)中任一开放性阅读框。可将该基因引入一合适的载体中以便在染色体外保持或整合到宿主中。

一些实施例中，Tim 基因序列不是序列表中列出的人 TIM-1 等位基因 1；和/或不是小鼠 TIM-3 DBA 等位基因。

本文使用的术语“cDNA”包括与天然成熟的 mRNA 中发现的重有共同序列元件排列的所有核酸，其中的序列元件是外显子和 3' 和 5' 非编码区域。正常的 mRNA 有毗连的外显子，并通过核 RNA 剪接除去了间插内含子，以产生连续的编码 Tim 蛋白的开放性阅读框。

有关基因组序列包括如列出的序列中所定义的起始密码子和终止密码子之间的核酸，包括所有天然染色体正常存在的内含子。它还可以包括成熟 mRNA 中发现的 3' 和 5' 非翻译区域。它还可以包括特定的转录和转录调控序列，比如启动子、增强子等，包括转录区 5' 或 3' 末端的长约 1kb(也可能在更长)的侧接基因组 DNA。可将基因组 DNA 分离成 100kbp 或更小的片段；且基本上没有侧接的染色体序列。

5' 区序列以及 5' 上游序列和 3' 下游序列可用于启动子元件，包括增强子结合位点，以供在表达 Tim 基因的组织中进行表达。组织特异性表达可用于确定表达模式和提供模拟天然表达模式的启动子。启动子区域中天然发生的多态性可用来确定表达的天然变化，尤其是那些可能与疾病有关的变化。或者，可以在启动子区域引入突变以确定改变表达在实验系统中的影响。涉及转录因子结合的鉴定特定 DNA 基序的方法是该领域已知的，例如对已知结合基序的序列相似性，凝胶阻滞研究等。例如，可参见 Blackwell 等，(1995) *Mol Med* 1:194-205; Mortlock 等，(1996) *Genome Res.* 6:327-33; 以及 Joulin 和 Richard-Foy(1995) *Eur J Biochem* 232:620-626。

调控序列可用来鉴定 TIM 表达的转录或翻译调控所需的顺式作用序列，尤其是在不同组织或发育的不同阶段，并可用来鉴定调节或介导 TIM 表达的顺式作用序列和反式作用因子。这种转录或翻译控制区可以操作性连接于一 TIM 基因以促进野生型或改变的 TIM 或其它有关蛋白在培养细胞中，或胚胎、胎儿或成人组织中的表达，并可用于基因治疗。

本发明的核酸组合物可以编码整个对象多肽或其一部分。按照常规方法通过化学合成寡核苷酸、经限制性酶消化、PCR 扩增等可获得该 DNA 序列的片段。很大

程度上, DNA 片段至少为 15nt, 通常至少为 18nt, 更常至少约为 50nt。这种小 DNA 片段可用作 PCR、杂交筛选等的引物。较大的 DNA 片段, 即大于 100nt 的 DNA 片段可用于制造编码的多肽。为用于扩增反应, 比如 PCR, 要使用一对引物。对于本发明, 引物序列的精确组成不是严格的, 但如该领域所知, 对于大多数应用, 引物将在严谨条件下和对象序列杂交。宜选择一对将产生至少约 50nt 扩增产物的引物, 更好的是至少约 100nt。选择引物序列的算法是众所周知的, 并在商品软件包中可得到。扩增引物与 DNA 的互补链杂交, 并相互引导。

分离并得到的 TIM 基因是足够纯的, 通常是完整的哺乳动物染色体。通常, 将得到的 DNA 基本上没有 TIM 序列或其片段以外的其它核酸序列, 至少约 50%, 通常至少约 90% 纯, 且一般是“重组体”, 即, 其侧面连接有一个或多个在天然染色体中不与其正常相连的核苷酸。

此 DNA 序列可用于各种途径。它们可用作鉴定 TIM 相关基因的探针。哺乳类同源生物有与对象序列基本相似的序列, 即, 至少有 75%, 通常至少有 90%, 更通常至少有 95% 的核苷酸序列与对象 DNA 序列相同。序列相同性是基于参考序列计算的, 参考序列可以是较大序列的亚序列, 比如保守性基序、编码区域、侧接区等。参考序列一般至少约有 18nt 长, 更通常至少约 30nt 长, 并可以延伸至被比较的完全序列。序列分析的算法是该领域已知的, 如 BLAST, 见 Altschul 等描述, (1990) *J Mol Biol* 215:403-10。

在低严谨条件, 例如, 在 50℃ 和 10×SSC (0.9 M 盐水/0.09M 柠檬酸钠) 下通过杂交检测具有序列类似性的核酸, 并在 55℃ 用 1×SSC 冲洗以保持结合。在严谨条件, 例如, 在 50℃ 或更高温度和 0.1SSC (9 M 盐水/0.9M 柠檬酸钠) 下通过杂交测定序列相同性。通过使用探针, 尤其是 DNA 序列的标记探针, 我们可以分离出同源或相关基因。同源基因的来源可以是任何物种, 例如, 灵长类, 尤其是人类; 啮齿类, 如大鼠和小鼠, 犬, 猫, 牛, 绵羊, 马, 酵母, 果蝇、Caenorhabditis 等。

该 DNA 可用来鉴定基因在生物样品中的表达。文献中已经建立了探测细胞中特定核苷酸序列 (如基因组 DNA 或 RNA) 存在情况的方法, 本文无需赘述。从细胞样品中分离 mRNA, 可用反转录酶经 RT-PCR 扩增 mRNA 形成互补 DNA 链, 然后用对象 DNA 序列的特异性引物进行聚合酶链反应扩增。或者, 通过凝胶电泳分离 mRNA 样品, 将其转移到合适的支撑物上, 如硝酸纤维素、尼龙等, 然后用对象 DNA 的片段作为探针进行探测。也可以使用其它的技术, 如寡核苷酸连接试验、原位杂交、和与排列在固体芯片上的 DNA 探针进行杂交。检测到 mRNA 与对象序列的杂交表明

了样品中有 TIM 基因的表达。

出于各种目的可以修饰对象核酸序列,尤其是细胞内使用它们时,例如,将其与核酸切割试剂(例如螯合的金属离子,如铁或铬)结合进行基因切割等等。

可以用该领域已知的各种方法使 TIM 基因座的序列,包括侧接启动子区和编码域突变,以在启动子强度、编码蛋白质的序列等中产生靶的改变。此类突变的 DNA 序列或产物与本文提供的序列基本上类似,即,分别至少有一个核苷酸或氨基酸的差异,并可以有至少两个但不超过 10 个核苷酸或氨基酸的差异。序列的变化可以是取代、插入或缺失。缺失可以进一步包括较大的变化,如一个功能域或外显子缺失。其它有关的修饰包括表位加尾,例如,带有 FLAG 系统,HA,等。为研究亚细胞定位,可采用带有绿色荧光蛋白(GFP)的融合蛋白。此类突变基因可用来研究 TIM 多肽的结构-功能关系,或用来能改变影响其功能或调节的蛋白质的特性。例如,用这种方法可以产生组成型活性转录因子,或能与 TIM DNA 目标位点结合而不激活转录的显性阴性活性蛋白。

克隆基因的体外诱变技术是已知的。扫描突变方法的例子可以在 Gustin 等, Biotechniques 14:22(1993); Barany, Gene 37:111-23(1985); Colicelli 等, Mol Gen Genet 199:537-9(1985); 和 Prentki 等, Gene 29:303-13(1984)中找到。位点专一诱变的方法可以在 Sambrook 等, Molecular Cloning:A Laboratory Manual, CSH 出版社 1989, 第 15.3-15.108 页, Weiner 等, Gene 126:35-41(1993); Sayer 等, Biotechniques 13:592-6(1992); Jones and Winistorfer, Biotechniques 12:528-30(1992); Barton 等, Nucleic Acids Res 18:7349-55(1990); Marotti 和 Tomich, Gene Anal Tech 6:67-70(1989); 以及 Zhu Anal Biochem 177_120-4(1989)中找到。

阵列提供了一种高处理量的技术,它可以测定一个样品中的许许多多核苷酸。本发明的另一方面,构建了含有一个或多个 TIM 基因、蛋白或抗体的阵列,较好的是该阵列含有所有这些序列,这种阵列还可以包括已知在 T 细胞、单核细胞等中受到上调或下调的其它序列。这种技术可用作检测差异性表达或检测基因型的工具。可以将多核苷酸探针点到结合了探针的二维基质的底层(如,玻璃、硝酸纤维素等)或阵列中上以制得阵列。这些探针可以通过共价键或非共价反应,如疏水反应与基质结合。构建阵列的技术和使用阵列的方法参见,例如, Schena 等(1996) Proc Natl Acad Sci U S A. 93(20):10614-9; Schena 等, (1995) Science 270(5235):467-70; Shalon 等, (1996) Genome Res. 6(6):639-45, 美国专利 (USPN) 5,807,522,

欧洲专利 (EP) 799 897; 民办专利 (WO) 97/29212; WO 97/29317; EP 785 280; WO 97/02357; USPN 5,593,839; USPN 5,578,832; EP 728 520; USPN 5,599,695; EP 721 016; USPN 5,556,752; WO 95/22058; 和 USPN 5,631,734 中所述。

阵列中使用的探针可以有各种类型,可包括,例如,相对长度较短的合成探针(如,20-mer 或 25-mer)、cDNA(全长基因或基因片段)、扩增的 DNA、DNA 片段(例如,通过限制性酶切产生)和反转录 DNA。定制的阵列和通用阵列都可以用来检测差异性表达水平。采用能与 mRNA 基因序列的特异性预选亚序列或用它们制备的扩增产物杂交的探针,可以制备定制阵列。

阵列可以用来,例如,检测基因的差异性表达和用于测定基因功能。例如,阵列可以用来检测 TIM 基因的差异性表达或多态性序列的表达。阵列用途的例子进一步描述参见,例如, Pappalarado 等(1998) Sem. Radiation Oncol. 8:217; 以及 Ramsay(1998) Nature Biotechnol 16:40。此外,使用阵列的检测方法的许多变化是该领域技术人员熟知的并在本发明的范围之内。例如,与其将探针固定在固体支撑物上,不如待测样品固定在固体支撑物上,然后再使其与探针接触。还可以发现其它关于在表达分析中使用微阵列的论述,例如, Duggan 等, Nature Genetics Supplement 21:10-14(1999); Bowtell, Nature Genetics Supplement 21:25-32(1999); Brown 和 Botstein, Nature Genetics Supplement 21:33-37(1999); Cole 等, Nature Genetics Supplement 21:38-41(1999); Debouck 和 Goodfellow, Nature Genetics Supplement 21:48-50(1999); Bassett, Jr. 等, Nature Genetics Supplement 21:51-55(1999); 以及 Chakravarti, Nature Genetics Supplement 21:56-60(1999)。

药物遗传学是个体基因型和个体对治疗药物代谢或反应能力之间的联接学科。通过改变药物的生物活性剂量和血液浓度之间的关系,代谢作用或寻靶灵敏度的差异可能导致严重的中毒或治疗失败。在过去几年中,许多研究已经建立了代谢酶或药物靶标的多态性和反应与毒性之间的良好关系。这些关系可用于给药治疗剂量的个体化。

多态性等位基因的基因型可用来估计个体是否会对特定的治疗方案产生良好反应。多态性序列还可用于药物筛选试验,以确定候选治疗制剂的剂量和特异性。通过靶向治疗筛选候选的 TIM 多态性,以确定是否会对治疗哮喘的效果产生影响。药物筛选试验按照上诉方法进行。为了知道对治疗的反应通常需要检测两个或多个不同的序列多态性。

对象基因可用来合成完整的 TIM 蛋白, 或其多肽片段, 尤其是与功能域相对应的片段, 结合位点等等; 并包括对象多肽与其它蛋白质或其一部分的融合。为了表达, 可以对转录和翻译起始区(可以是可诱导或组成型的)使用表达盒, 这里, 在对转录起始区以及转录和翻译终止区进行转录控制下, 编码区操作性相连接。可以
5 使用各种在表达宿主中有功能的转录起始区。

特别感兴趣的多肽是包括 TIM 多肽特定功能域的 TIM 多肽的片段, 功能域可以包括, 例如胞外域, 或是胞外域中的功能域: 粘蛋白域和/或 Ig 功能域。功能域还可以包括胞质域, 如, 含有酪氨酸激酶磷酸化基序 RAEDNIY, 或延伸域 SRAEDNIYIVEDRP 的片段。可溶性剪接变体编码的多肽也是感兴趣的。Ig 功能域的
10 序列如下所示: 人 TIM-1 Ig 功能域, SEQ ID NO:17、19、21、23、25、27, 残基 21-126; 人 TIM-3 Ig 功能域, SEQ ID NO:29 和 31, 残基 22-131; 人 TIM-4 Ig 功能域, SEQ ID NO:33 和 35, 残基 21-129; 小鼠 TIM-2 Ig 功能域, SEQ ID NO:7, 残基 22-128; 小鼠 TIM-3 Ig 功能域, BALB/c 等位基因, SEQ ID NO:9, 残基 22-132; 小鼠 TIM-3 Ig 功能域, DBA/2 等位基因, SEQ ID NO:11, 残基 22-132; 小鼠
15 TIM-4 Ig 功能域, SEQ ID NO:13 和 15, 残基 25-135。

可以使用功能相等的多肽, 这里的等价多肽包括导致沉默变化的氨基酸残基的缺失、加入或取代, 因此产生了功能相同的基因产物。可以在极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或有关残基的两亲性性质相似的基础上进行氨基酸取代。

“功能相等”指能够显示与 TIM 基因编码的多肽基本类似的体内活性的蛋白质。

按照常规方法, 根据表达的目的, 多肽可以在原核细胞或真核细胞中表达。
20 为大量生产这种蛋白质, 可以用单细胞生物, 如大肠杆菌枯草杆菌啤酒酵母菌, 或高等生物如脊椎动物, 尤其是哺乳动物细胞, 如 COS 7 细胞, 所为表达的宿主细胞。许多情况下, 可能需要在哺乳动物的细胞中表达 TIM 基因, 此时, TIM 基因将获益于天然折叠和翻译后加工。也可以在实验室合成小肽, 包括特定的肽表位、结构域
25 等, 肽通常至少约 8 个氨基酸长, 更通常至少约 20 个氨基酸长, 以至整个功能域和全长蛋白质。肽可以含有蛋白质的多态性区域。还包括融合蛋白, 整个 TIM 蛋白或其部分融合于一异源多肽, 如, 绿色荧光蛋白、抗体 Fc 区域、聚组氨酸等。

在哺乳类宿主细胞中, 可以使用许多以病毒为基础的表达系统, 包括反转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺伴随病毒等。如果用腺病毒作为表达载体, 可将有关编
30 码序列连接于腺病毒转录/翻译控制复合体上, 例如, 晚期启动子和三联引导序列。然后可以通过体外或体内重组技术在腺病毒基因组中插入该嵌合基因。插入病毒基

因组的非必需区域(如, E1 或 E3 区域)将产生生活的能在受感染的宿主中表达差异性表达的蛋白或通路基因蛋白的重组体病毒。

为有效翻译基因可能需要特殊的启动信号。这些信号包括 ATG 起始密码子和毗邻序列。如果将完整的基因, 包括其自身的起始密码子和毗邻序列, 插入合适的表达载体中, 可能不需要额外的翻译控制信号。然而, 如果之插入部分基因编码序列, 必需提供外源翻译控制信号。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是各种来源的, 天然或合成的。加入合适的转录增强子元件、转录终止子等可以提高表达的效率。

通过使用表达宿主可以得到大量多肽, 可根据常规方法分离并纯化这些多肽。可以制造表达宿主的裂解物并用 HPLC、排阻层析、凝胶电泳、亲和层析或其它纯化技术纯化裂解物。纯化的多肽通常至少约 80% 纯, 较好的约 90% 纯, 可高达 100% 纯。纯指没有其它蛋白质以及细胞碎屑。

多肽可以直接或间接标记。可以使用任何合适的标记系统, 包括但不限于放射性同位素, 如 ^{125}I ; 当接触底物时会产生可检测的颜色信号或光的酶标记系统; 以及荧光标记。间接标记包括使用蛋白质, 例如能与有关多肽特异性结合的标记的抗体。此类抗体包括但不限于多克隆、单克隆、嵌合、单链抗体、其 Fab 片段和由 Fab 表达文库产生的片段。

特异性结合元件

本文使用的术语“特异性结合成员”或“结合成员”是指特异性结合对的成员, 即两个分子, 通常是两个不同的分子, 其中一个分子(即, 第一特异性结合成员)通过化学或物理手段与另一个分子(即, 第二特异性结合成员)特异性结合。特异性结合对的互补成员有时被称为配体和受体; 或受体和反受体。对于本发明的目的, 已知这两个结合成员是相互结合的, 例如, 在一个测定能干扰已知结合对结合的化合物的试验中。或者, 可以使用怀疑为某有关化合物的结合伴侣的候选化合物。

有关的特异性结合对, 包括碳水化合物和外源凝集素; 互补的核苷酸序列; 肽配体和受体; 效应器和受体分子; 激素和激素结合蛋白; 酶辅助因子和酶; 酶抑制剂和酶; 脂类和脂类结合蛋白等。特异性结合对可包括最初的特异性结合成员的类似物、衍生物和片段。例如, 受体和配体对, 可以包括肽片段, 化学合成的肽模拟物, 标记的蛋白质, 衍生的蛋白质等。

在优选的实施例中, 特异性结合成员是抗体。术语“抗体”或“抗体部分”

包括适合和识别其抗原表位的有特定形状的任何含有多肽链的分子结构, 其中一个或多个非共价结合反应稳定了该分子结构和此表位之间的复合物。能与一种 TIM 蛋白特异性结合的抗体称为抗 TIM 抗体。原始型的抗体分子是免疫球蛋白, 所有来源, 如人、鼠、兔、牛、羊、猪、狗、其它哺乳动物、鸡、其它鸟类等, 的所有类型的免疫球蛋白, IgG、IgM、IgA、IgE、IgD 等, 都被认为是“抗体”。用于本发

5 明的抗体可以是多克隆抗体, 尽管单克隆抗体是优选的, 因为它们可通过细胞培养或重组而产生, 并可以被修饰以减弱它们的抗原性。

可以用标准方法, 通过给生产动物注射抗原性组合物(可以是多肽或在体内表达的 cDNA) 以产生多克隆抗体。参见, 例如, Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 冷泉港实验室, 1988。当使用整个蛋白质或蛋白质较大的片段

10 时, 用蛋白质或合适的佐剂(如, 弗氏佐剂、弗氏完全佐剂、水包油型乳剂等)免疫生产动物以产生抗体。当用较小的肽时, 将肽与大分子偶联制备免疫刺激性偶联物是有利的。通常采用的偶联蛋白可从商业上获得, 包括牛血清白蛋白(BSA)和匙孔

15 蛾血蓝蛋白(KLH)。为了产生特定表位如多态性残基的抗体, 可以使用全长序列衍生的肽。给动物宿主注射免疫原, 最好是按照预先确定的包括一次或多次加强免疫的流程, 并定期给动物放血。然后通过, 例如, 亲和层析(用与合适的固体支持物交联的多肽)从这种抗血清中纯化得到多克隆抗体。

或者, 对于单克隆抗体, 可以形成杂交瘤, 方法是分离激活的免疫细胞(比如来自接种动物脾脏的细胞)。然后将这些细胞与能够在细胞培养物中无限复制的永生细胞, 如骨髓瘤细胞或转化细胞融合, 如此产生永生的分泌免疫球蛋白的细胞系。

20 优选使用的永生细胞系在利用某种营养素所必需的酶上有缺陷。许多此类细胞系(比如骨髓瘤)是该领域熟练技术人员已知的, 其中包括, 例如: 胸腺嘧啶核苷激酶(TK)或次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)。这些缺陷使得能够按照在(例如)次黄嘌呤氨甲喋呤和胸苷培养基(HAT)上生长的能力对融合细胞进行选择。

25 较好地, 所用永生的融合伙伴来自不分泌免疫球蛋白的系细胞系。将所得融合细胞, 或杂交瘤培养在可使融合细胞存活(但非融合细胞不能存活)的条件下, 并筛选能产生所需单克隆抗体的克隆。将产生单克隆抗体的群落克隆、扩增并培养以得到大量的抗体, 见 Kohler 和 Milstern, 1975 *Nature* 256:495(在此将其并入以供参考)。

30 然后将克隆细胞注射入小鼠的腹膜腔并收获其中产生的腹水以制造大量杂交瘤分泌的单克隆抗体。小鼠宜用降植烷或其它肿瘤启动子处理并通过化学手段或照

射免疫抑制,可以是该领域已知的任何合适品系。收集小鼠腹水液然后通过,例如,CM 琼脂糖凝胶柱或其它层析法从中纯化得到单克隆抗体。或者,可以在体外培养杂交瘤或作悬浮培养。可以采用分批培养、连续培养或其它合适的培养方法。然后从培养液或上清液中回收单克隆抗体。

- 5 此外,可通过基因工程生产抗体或抗原结合片段。这一技术中,如标准杂交瘤程序那样,使抗体产生细胞对所需的抗体或免疫原致敏。分离免疫脾细胞或杂交瘤中的信使 RNA,用作 PCR 扩增的模板制造 cDNA。将扩增的免疫球蛋白 cDNA 的合适片段插入表达载体,产生各自含有保留了最初抗原特异性的一个重链基因和一个轻链基因的载体文库。将重链基因文库和轻链基因文库合并构建组合文库。得到一个克隆文库可共表达重链和轻链(类似于抗体分子的 Fab 片段抗原结合片段)。将带有这些基因的载体共转染入一宿主(如细菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞或其它合适的产生蛋白质的宿主细胞)。当在转染的宿主细胞中诱导抗体基因合成时,重链和轻链蛋白自身组装产生活性抗体,可用抗原或免疫原筛选检测。
- 10

- 以重组方法将小鼠(或来自其它动物)杂交瘤克隆获得的小鼠轻链和重链可变区(VK 和 VH)与人轻链和重链恒定区相结合制备嵌合抗体,以产生带有优势的人结构域的抗体。制造此类嵌合抗体的方法是该领域熟知的,并可用标准方法(如美国专利 5,624,659 中所描述的,在此将其并入以供参考)实现。基因工程改造人源化抗体以含有更多的人免疫球蛋白结构域,并只加入动物衍生抗体的互补决定域。这可通过仔细检查单克隆抗体可变区的超变环序列,并使它们适合人抗体链的结构而实现。尽管看起来很复杂,但此方法已付诸实施。参见,例如,美国专利 6,187,287 号,全文并入以供参考。
- 15
- 20

或者,可以用遗传性改变的动物生产多克隆或单克隆抗体以生产人免疫球蛋白。产生此类动物的技术以及从中分离抗体的方法在美国专利 6,162,963 和 6,150,584 中有描述,全文并入以供参考。

- 25 或者,可以用含有人可变区的噬菌体文库生产单链抗体(Fv,如下所述)。参见美国专利 6,174,708 号。已证明在大鼠模型中鞘内给予单链免疫毒素, LMB-7[B3(Fv)-PE38],可以治疗癌性脑膜炎。Proc Natl Acad Sci USA 92,2765-9,在此将其全文并入以供参考。

- 除了完整的免疫球蛋白(或它们的重组体对应物),含有表位结合位点的免疫球蛋白片段(如, Fab'、F(ab')₂ 或其它片段)在本发明中也可用作抗体部分。此类抗体片段可以通过胃蛋白酶、木瓜蛋白酶或其它蛋白酶切割由完整的免疫球蛋白产
- 30

生。可以用重组免疫球蛋白技术设计“片段”或最小的免疫球蛋白。例如，可以通过肽接头(例如，聚甘氨酸或其它不形成 α 螺旋或 β 片层的序列)将轻链的可变区与重链可变区连接以产生供本发明使用的“Fv”免疫球蛋白。

Fv片段是重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)的异二聚体。在整个IgG中发生的重链和轻链域的异二聚体，例如，通过二硫键连接。重组Fvs(其中， V_H 和 V_L 被肽接头连接)一般是稳定的。已发现这些单链Fvs保留了特异性和亲和力，且证明可用于肿瘤摄影以及制造重组体免疫毒素作肿瘤治疗。然而，研究者已发现某些单链Fvs的抗原亲和力降低而且肽接头可能干扰结合。也已制得了改进的Fv's，如美国专利6,147,203所述(在此全文并入以供参考)，它在 V_H 和 V_L 区之间含有稳定的二硫键。任何这些最小的抗体都可用于本发明，宜将它们人源化以避免HAMA反应，在本发明的实施方案中是优选使用的。

此外，带有附加的化学接头、可测部分(如荧光染料、酶、底物、化学发光部分等)或特异性结合部分(如链霉亲和素、半和素、或生物素等)的衍生的免疫球蛋白可用在本发明的方法和组合物中。为了简便，术语“抗体”或“抗体部分”将用于全文，它通常是指能与脑肿瘤蛋白靶位的表位特异性结合的分子，尽管如上所述，这一术语包括所有的免疫球蛋白、衍生物、片段、重组体或基因工程改造的免疫球蛋白以及修饰过的免疫球蛋白。

可以用任何合适的标准方法测试候选抗体的活性。第一次筛选时，可以检查抗体对免疫原的结合。第二次筛选时，可以筛选抗体对等位基因和TIM家族成员之间的交叉反应，并测定抑制TIM功能的活性。进行这些筛选时，可以标记候选抗体以供检测。可以测定能改变功能形式的TIM蛋白生物活性的抗体。

诊断

通过对患者的任何方便的样品(如，活检组织材料、血样、面颊碎屑等)进行蛋白质、DNA或RNA序列和/或杂交分析进行Tim多态性相关的哮喘或特应性的诊断。分析TIM相关哮喘患者的核酸样品中，是否存在TIM易感多态性。典型患者的基因型中至少在一个染色体上有至少一个易感性突变。多态性TIM序列的存在会影响基因产物的活性或表达，并会增加对哮喘的易感性，故被认为是易感多态性。通过分析个体DNA或mRNA中是否存在易感多态性与哮喘中性序列比较，对个体进行筛检。所关注的特殊序列包括导致慢性支气管高反应性或是哮喘相关症状的任何多态性，包括但不限于，编码区序列中影响剪接的内含子序列中、或影响蛋白质活性

和表达的启动子或增强子序列中发生的插入、取代和缺失。实施例提供了特殊TIM多态性的例子。

筛选可以根据蛋白质的功能或抗原特性。在筛选中可以采用设计好免疫试验来测定TIM蛋白中的易感多态性。如果存在许多导致特殊的疾病表型的各种突变，
5 则功能性蛋白试验证明是有效的筛选工具。

可以进行生化研究以确定TIM编码区域或控制区域中的候选序列多态性是否与疾病相关。例如，影响TIM表达的启动子或增强子序列中的变化可能导致对哮喘的易感性。用该领域已知的各种方法将候选变体等位基因的表达水平与正常等位基因的表达水平进行比较。确定启动子或增强子强度的方法包括对表达的天然蛋白质
10 进行定量测定；将变体控制元件插入带有报告基因（如， β -半乳糖苷酶、萤光素酶、氯霉素乙酰转移酶等）的载体中以供用于方便的定量测定；等等。可以通过与野生型蛋白质进行比较以确定编码的TIM蛋白的活性。

有许多方法可分析核酸中是否存在特殊序列。如果可得到大量的DNA，则可以直接使用基因组DNA。或者，将有关区域克隆入一合适的载体中并使其生长至足够
15 量以供分析。表达TIM基因的细胞，比如气管细胞，可作为mRNA的来源，可以对它进行直接测定或反转录成cDNA以供分析。可以通过常规的方法扩增核酸，比如聚合酶链式反应(PCR)，以提供足够的量以供分析。聚合酶链式反应的用法在Saiki等，(1985) Science 239:487 中有描述，并可以在Sambrook等(1985) Molecular Cloning: A Laboratory Manual，CSH出版社1989，第14.2-14.33页中找到现有
20 技术的综述。通过采用多态性的特异引物扩增，可以用来确定是否存在多态性。或者，该领域已知各种应用寡核苷酸连接作为检测多态性的手段的方法，例子可以参见，Riley等，(1990) N. A. R. 18:2887-2890；以及Delahunty等，(1996) Am. J. Hum. Genet. 58:1239-1246。

在扩增反应中可以使用可检测标记。合适的标记包括荧光色素，如异硫氰酸
25 荧光素(FITC)、罗丹明、得克萨斯红、藻红素、别藻蓝素、6-羧基荧光素(6-FAM)，2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基荧光素(JOE)、6-羧基-X-罗丹明(ROX)、6-羧基-2',4',7',4,7-六氯荧光素(HEX)、5-羧基荧光素(5-FAM)或N,N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA)；放射性标记，如 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H ；等。标记也可以是两个阶段系统的，其中扩增的DNA与具有高亲和力结合伴侣(如，亲合素、特异性
30 抗体等)的生物素、半抗原等偶联，而结合伴侣则与可检测标记偶联。标记可偶联于一个或两个引物。或者，标记扩增时使用核苷酸池，以便在扩增产物中掺入标记。

用该领域已知的许多方法之一分析样品核酸，例如扩增或克隆的片段。可以用双脱氧法或其它的方法测定核酸的序列并将碱基序列与天然 TIM 序列相比较。通过 Southern 印迹、斑点印迹等，与变体序列的杂交也可用来确定它的存在。固定于固体支持物，（如 US 5, 445, 934 或 W095/35505 所述），的寡核苷酸探针阵列的对照和变体序列的杂交模式也可用来测定变体序列的存在。单链构象多态性 (SSCP) 分析、变性梯度凝胶电泳 (DGGE)、错配切割检测和凝胶基质中的异质双链体分析可用来测定电泳迁移中因 DNA 序列变化而产生的构象改变。或者，当多态性产生或破坏了限制性内切酶的识别位点（限制性片段长度多态性，RFLP）时，将样品用内切酶消化，并且将产物大小分级以确定片段是否被消化。通过凝胶电泳或毛细管电泳进行分级，尤其是丙烯酰胺或琼脂糖凝胶。

固定于固体支持物（如 US 5, 445, 934 或 W095/35505 中所描述的）上的寡核苷酸探针阵列的对照和变体序列的杂交模式，可用作检测变体序列是否存在的工具。在本发明的一个实施方案中，提供了寡核苷酸的阵列，该阵列上的分隔部位至少与 TIM 基因座的 mRNA 或基因组 DNA 的一部分互补。此类阵列可以含有一系列寡核苷酸，它们各自能与核酸（如 TIM 基因座的 mRNA、cDNA、基因组 DNA 等）特异性杂交。

TIM 多态性的特异性抗体可用于筛选性免疫试验。天然 TIM 和/或哮喘相关多态性的降低或升高表明哮喘是 TIM 相关的。采取怀疑患有 TIM 相关哮喘患者的样品。本文所用的样品包括生物液体，如气管灌洗液、血液、脑脊液、眼泪、唾液、淋巴液、透析液等；器官或组织培养物产生的液体；以及此类液体的组分。活检组织样品受到了特别的关注，如器官刮削物。样品中细胞的数目一般至少约为 10^3 ，通常至少为 10^4 ，更通常至少约为 10^5 。如果是固体组织，则可以将细胞分离，或分析组织切片。或者可以制备细胞裂解物。

可以用许多方法进行诊断。不同的方法都要确定怀疑具有 TIM 易感多态性的患者细胞中是否存在正常或异常的 TIM 或其数量的改变。例如，可按照常规方法，采用细胞或组织切片染色进行检测。在细胞样品中加入有关抗体，并培育一段时间使其足以与表位结合，通常至少约为 10 分钟。抗体标记可以用放射性同位素、酶、荧光素、化学发光物质或其它用于直接测定的标记。或者，可以用第二抗体或试剂来放大信号。此类试剂是该领域熟知的。例如，可将第一抗体和生物素交联，加入辣根过氧化物酶交联的亲合素作为第二试剂。最后检测采用在过氧化物酶存在时颜色会改变的底物。可以用各种方法确定抗体结合的存在与否，这些方法包括分离细

胞的流式细胞计数, 显微镜法、射线照相术、闪烁计数法等。

另一种诊断方法取决于对裂解物中抗体和 TIM 之间的结合进行体外测定。可以通过各种专用试验测量样品或其组分中结合的 TIM 的浓度。可以使用常规的夹心类型试验。例如, 一种夹心试验首先使 TIM 特异性抗体吸附到不可溶的表面或支持物上。结合的具体方式并不重要, 只要它与本发明的试剂或整个方法相容即可。它们可以共价或非共价结合到平板上, 优选非共价结合。

其它的免疫试验法是该领域已知的并可用于诊断。Ouchterlony 平板提供了测定抗体结合的简单方法。采用所述的对 TIM 特异的检测系统, 可在蛋白质凝胶上或滤纸蛋白质斑点上进行 Western 印迹, 常规采用的是如夹心试验所描述的标记方法。

TIM 基因可用于分析 TIM 表达, 例如用来确定表达的发育或组织特异性模式, 以及用于调节体外和体内表达。用于引入基因的载体包括质粒和病毒载体。倍受关注的是以逆转录病毒为基础的载体, 如莫落尼鼠白血病病毒和经修饰的人免疫缺陷病毒; 能在哺乳动物细胞中暂时或长期保持的腺病毒载体等。各种不同载体都可用于将基因转染和/或整合入细胞的基因组中。或者, 可以使用显微注射、融合等方法将基因引入合适的宿主细胞。参见, 例如, Dhawan 等 (1991) Science 254:1509-1512 和 Smith 等 (1990) Molecular and Cellular Biology 3268-3271。

表达载体含有可产生功能性 mRNA 的转录起始区。可以使用天然的转录起始区或外源性转录起始区。可以通过体外重组方法, 或将序列同源整合入染色体, 以引入启动子。许多强启动子是该领域已知的, 包括 β -肌动蛋白启动子、SV40 早期和晚期启动子、人巨细胞病毒启动子、逆转录病毒 LTR, 金属硫蛋白反应元件 (MRE)、四环素可诱导启动子构建物等。

表达载体在启动子序列附近一般有常规的限制性位点以共插入核酸序列。可以制备含有转录起始区、靶基因或其片段以及转录终止区的转录盒。可将转录盒引入各种载体, 例如质粒; 逆转录病毒 (如慢病毒); 腺病毒等, 其中载体能够暂时或稳定保持在细胞中, 通常至少约为一天, 更通常至少为几天或几周。

用反义分子下调 TIM 在细胞中的表达。反义制剂可以是反义寡核苷酸 (ODN), 特别是具有天然核酸化学修饰的合成 ODN, 或表达 RNA 之类反义分子的核酸构建物。反义序列与靶基因的 mRNA 互补, 并可抑制靶基因产物的表达。反义分子可通过各种机制抑制基因表达, 如通过活化 RNA 酶或空间妨碍减少翻译所需的 mRNA 的量。可以给予一种反义分子或反义分子的组合, 这种组合中可以含有多种不同的序

列。

可以通过在合适的载体中表达所有或部分靶基因序列以制造反义分子，其中使转录起始正确取向以便产生像 RNA 分子一样的反义链。或者，反义分子是合成的寡核苷酸。反义寡核苷酸通常至少约有 7 个，一般至少约为 12 个，更通常的是约有 20 个核苷酸的长度，不超过约 500 个，通常不超过约 50 个，更通常不超过 35 个核苷酸长度，这里的长度受抑制效率、特异性，（包括无交叉反应性）的控制等等。已发现 7-8 个碱基长度的短寡核苷酸是基因表达的强效和选择性抑制剂（参见 Wagner 等，（1996）Nature Biotechnology 14:840-844）。

10 转基因动物

对象核酸可用于产生基因修饰的非人动物或在细胞系中产生位点特异的基因修饰。“转基因”一词指具有基因修饰的动物，包括 TIM 基因活性的缺失或其它的敲除，具有在宿主细胞中稳定传递的外源 TIM 基因，或具有与报告基因操作性连接的外源 TIM 启动子。可以通过同源重组制造转基因动物，其中 TIM 基因座被改变了。或者，将核酸构建物随机整合入基因组中。供稳定整合的载体包括质粒、逆转录病毒和它们的动物病毒、YAC 等。有关的转基因动物，如牛、猪、羊、马等，特别是啮齿动物，如大鼠、小鼠等。

“敲除”动物是经基因操作实质上减少或消除了内源性 TIM 功能。可以用不同的方法实现“敲除”。可包括全部或部分天然 TIM 同系物的染色体缺失。非编码区，尤其是启动子区域、3' 控制序列、增强子的缺失，或激活 TIM 基因表达的基因缺失。通过引入能阻断天然 TIM 基因表达的反义构建物可实现功能性敲除（例如，参见 Li 和 Cohen（1996）Cell 85:319-329）。

可以制造含有外源 TIM 基因的转基因动物。外源基因通常来自动物宿主以外的不同种类动物，或是其编码区或非编码区内发生改变。引入的基因可以是野生型、天然产生的多态性、或是经基因操作的序列，例如前面描述过的编码或非编码区域的缺失、取代或插入。引入的序列可以编码 TIM 多肽，或可以利用操作性连接于一报告基因的 TIM 启动子。当引入的基因是编码序列时，它通常操作性连接于一启动子，可以是组成型或可诱导性的，或是在宿主动物中表达所需的其它调节序列。

有关的特殊构建物包括（但不限于）反义 TIM，它会阻抑 TIM 表达、负显性 TIM 突变的表达、以及 TIM 基因的过表达。可在 TIM 基因座中引入 lac Z 等可检测标志，上调 TIM 表达将导致表型出现易检测的变化。

经修饰的细胞或动物可用于 TIM 功能和调控的研究。动物可用于功能研究、药物筛选等,如,用来确定候选药物对哮喘的作用。在 TIM 基因中可以制造一系列小的缺失和/或取代以确定不同外显子在 DNA 结合、转录调节等中的作用。通过提供 TIM 蛋白质在细胞中的表达(其中它没有正常产生),人们可以诱导细胞行为的变化。这些动物也可用于探究哮喘遗传性的模式,如,显性和隐性;不同等位基因的相对作用,以及基因组中 TIM 和其它哮喘基因之间的协同效应。

供同源重组的 DNA 构建物包括带有所需遗传修饰的 TIM 基因的至少一部分,并包括靶基因座的同源区域。供随机整合的 DNA 构建物不需要包括介导重组的同源区域。可方便地,包括正选择和负选择标志。通过同源重组产生具有靶基因修饰的细胞的方法是该领域已知的。为了解各种转染哺乳动物细胞的技术可以参见 Keown 等,(1990) Methods in Enzymology 185:527-537。

可与动物模型相结合进行药物筛选。许多哺乳动物基因在酵母和低等动物中都有同系物。对此类同系物生理作用和它们与其它蛋白质的相互反应的研究可能有助于理解它们的生物学功能。除了以遗传互补为基础的模型系统,已知酵母是通过 Chien 等(1991) P. N. A. S. 88:9578-9582 中所描述的双杂交系统研究蛋白质-蛋白质相互的有力工具。为探究 TIM 蛋白的转录活性,双杂交系统分析倍受关注。

化合物筛选

人们可以鉴定与 TIM 结合、调节或模拟 TIM 活性的配体或底物。研究领域是开发对免疫疾病、哮喘、癌症、局部缺血-重灌注性损伤、以及其它与细胞对应急的应答反应有关疾病的治疗方法。药物筛选可鉴定了在受感染细胞中使 TIM 功能受到抑制、替代或增强的药剂。例如,逆转或抑制 TIM 功能的制剂可以通过降低 Th2 细胞因子的水平而低哮喘中支气管反应性,TIM 抑制剂可以通过增强诱导凋亡的放疗或化疗效果从而提高肿瘤对癌症治疗的敏感性。倍受关注的是对人类细胞低毒性药剂的筛选试验。各种试验都可用于这一目的,包括体外标记的蛋白质-蛋白质结合试验、蛋白质-DNA 结合试验、电泳移动转变试验、蛋白质结合的免疫试验等。纯化的蛋白质也可用于确定三维晶体结构,可用于模拟分子间相互反应、转录调控等。

本文使用的术语“制剂”描述了能够改变或模拟 TIM 生理功能(如信号传导酪氨酸激酶抑制剂或整联蛋白结合位点的肽抑制剂)的任何分子,如蛋白质或药物。通常,对多个试验混合物与不同制剂浓度平行进行,以获得对各种浓度的不同应答。

典型的，以其中一种浓度作为阴性对照，即零浓度或低于检测水平的浓度。

候选制剂包括许多化学物质，尽管它们一般都是有机分子，较好的是分子量高于 50 和低于 2,500 道尔顿的较小的有机化合物。候选制剂包括与蛋白质发生结构性反应(尤其是氢键)所必需的功能性基团，典型的包括至少一种氨基、羟基或羧基基团，较好的至少两种功能性化学基团。候选制剂通常包括碳环或杂环结构和/或被一个或多个上述功能基团取代的芳香性或聚芳香性结构。在生物分子中发现的候选制剂包括但不限于：肽、糖类、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、它们的衍生物、结构类似物或组合物。

候选制剂可从各种来源获得，包括合成或天然化合物库。例如，有许多随机和定向合成各种有机化合物和生物分子，包括随机的寡核苷酸和寡肽的表达。或者，可得到或不难制备细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物库。或者，通过常规的化学、物理和生化手段不难修饰天然或合成的库和化合物，并可用来制造组合性库。已知药物制剂可用来进行定向或随机化学修饰，比如酰化、烷化、酯化、氨化等，以产生结构类似物。

当筛选试验是一种结合试验时，可将一种或多种分子加入标记中，其中的标记可以直接或间接地提供可测信号。各种标记包括放射性同位素、荧光素、化学发光物质、酶、特异性结合分子、颗粒(如磁性粒子)等。特异性结合分子包括配对物质，如生物素和亲和素，异羟基毛地黄毒苷原和抗异羟基毛地黄毒苷原等。对于特异性结合成员，可按照已知方法，互补成员通常用一种可检测的分子标记。

筛选试验中可以包括各种其它试剂。这包括盐类、中性蛋白质(如白蛋白)、去污剂等试剂，它们用来促进最佳蛋白质-蛋白质结合和/或降低非特异性或背景反应。可以使用可促进试验效果的试剂，比如蛋白酶抑制剂、核酶抑制剂、抗微生物试剂等。为了提供所需要的结合，以任何顺序加入成分的混合物。在任何合适的温度下进行培育，通常在 4-40℃ 之间。选择培育时间以达到最佳活性，但也可优化培育条件以达到快速高通量筛选。通常 0.1-1 小时就足够了。

其它有关试验可检测模拟 TIM 功能的制剂。例如，在细胞中加入缺乏功能性 TIM 的候选试剂，并在功能性试验中对复制 TIM 的能力进行筛选。

治疗方法

调节 TIM 基因或蛋白质活性的制剂提供了治疗或预防的介入点，特别是抑制或下调该多肽活性或基因表达的制剂。许多制剂都可用于调节这种活性，包括直接

调节表达的制剂,如表达载体,靶多肽的特异性反义物;以及作用于蛋白质的制剂,如特异性抗体及其类似物,阻抑催化活性的小有机分子等。

可以设计向某些细胞选择性输送核酸的方法。此类细胞的例子包括T细胞等。设计了某些治疗方法以选择性表达有关细胞的表达载体。一种在神经细胞中实现选择性表达的技术是将该编码序列操作性连接于主要在免疫系统细胞中起作用的启动子(如,IL-2启动子、T细胞抗原受体启动子等)。或者,或此外,可以将核酸与能将该核酸靶向有关细胞的制剂一起使用。例如,可以将核酸和能特异性结合细胞表面抗原的抗体一起施用。当采用脂质体时,可将能结合胞吞作用相关的细胞表面膜蛋白的底物吸附在脂质体上,以将脂质体靶向神经细胞促进其摄取。

反义分子可用于下调细胞中的表达。反义制剂可以是反义寡核苷酸(ODN),尤其是具有天然核酸化学修饰的合成性ODN,或是表达RNA之类反义分子的核酸构建物。该反义序列与靶基因的mRNA互补,并抑制靶基因产物的表达。反义分子抑制基因表达可通过各种机制,例如通过活化RNA酶H或空间阻碍减少用于翻译的mRNA的量。可给予反义分子或其组合物,其中组合物含有多种不同序列。

可以通过在合适的载体中表达所有或部分靶基因序列以制造反义分子,其中使转录起始取向以产生像RNA分子一样的反义链。或者,反义分子是合成的寡核苷酸。反义寡核苷酸通常至少约有7个,一般至少约为12个,更通常的是约有20个核苷酸长度,且不超过约500个,通常不超过约50个,更通常不超过35个核苷酸长度,其中长度受到抑制效率,特异性(包括无交叉反应)的控制等等。已发现7-8个碱基长度的短寡核苷酸是基因表达的强效和选择性抑制剂(参见Wagner等,(1996) *Nature Biotechnology* 14:840-844)。

选出内源性有义链mRNA序列的一个特定区域或几个区域与反义序列互补。可以凭经验方法选择寡核苷酸的特定序列,其中对几个候选序列抑制靶基因在体外或在动物模型中的表达情况进行了测定。也可以使用几个序列的组合,其中选择了mRNA序列的几个区域供反义互补。

可以用该领域已知的方法化学合成反义寡核苷酸(参见Wagner等(1993)同上,和Milligan等,同上)。优选的寡核苷酸是由天然磷酸二酯结构经化学修饰的,以增加它们的胞内稳定性和结合亲和力。文献中已经描述了许多此类修饰,它们改变了主链、糖或杂环碱基的化学性质。

主链化学性质的有用变化是硫代磷酸酯;二硫代磷酸酯(其中两个非桥连的氧都被硫取代);氨基磷酸酯;烷基磷酸三酯和硼代磷酸酯。非手性的磷酸盐衍生

物包括 3'-O'-5'-S-硫代磷酸酯、3'-S-5'-O-硫代磷酸酯、3'-CH₂-5'-O-磷酸酯和 3'-NH-5'-O 氨基磷酸酯。肽核酸通过肽键取代整个核糖磷酸二酯主链。糖修饰也被用来提高稳定性和亲和力。可采用脱氧核糖的 α 端基异构体，其中的碱基被转变成天然的 β 端基异构体核糖的 2'-OH 可以改变形成 2'-O-甲基或 2'-O-烷基糖，它
5 提供了对降解的抗性但没有亲和力。对杂环碱基的修饰必需保留合适的碱基对。一些有用的取代包括用脱氧尿苷取代脱氧胸苷；用 5-甲基-2'-脱氧胞苷和 5-溴-2'-脱氧胞苷取代脱氧胞苷。已证明当 5-丙基-2'-脱氧尿苷和 5-丙基-2'-脱氧胞苷分别取代脱氧胸苷和脱氧胞苷时可以增加亲和力和生物学活性。

可经生理上可接受的载体给予宿主具有所需药理学活性的化合物以治疗因
10 TIM 功能缺陷造成的哮喘。这种化合物也可用来增强 TIM 功能。可经各种途径给予治疗制剂：口服、局部施用、肠道外施用(如皮下施用)、腹膜内施用、病毒感染、静脉注射等。吸入治疗特别受关注。根据用药方式，可以用各种方法配制这种化合物。制剂中，治疗性活性化合物的浓度在 0.1-100 wt.%之间。

药物组合物可被制成各种形式，比如颗粒剂、片剂、药丸、栓剂、胶囊、悬
15 浮剂、软膏剂、洗剂等。可以用适合口服和局部施用的药物级有机或无机运载体和/或稀释剂制造含有治疗活性化合物的组合物。该领域已知的稀释剂包括含水介质、植物和动物油和脂肪。可将稳定剂、保湿剂和乳化剂、改变渗透压的盐或保持合适 pH 值的缓冲剂、以及皮肤渗透增强剂用作辅助剂。

应该理解，本发明并不限于所述的具体方法学、规程、细胞系、动物种或属、
20 和试剂，它们是可以改变的。还应该理解，本文使用的术语仅仅是为了描述具体的实施方案，而不是要限制本发明的范围，本发明的范围仅仅由附加权利要求所限制。

除非有明确的说明，本文使用的单数形式“一个”、“和”以及“这个”包括其复数形式。因此，例如，提到“一种细胞”包括此类细胞的复数，同时提到的“该阵列”包括该领域熟练技术人员已知的与其等价的多个阵列，等等。除非有明确的
25 说明，本文使用的所有的技术和科学术语与本发明所属领域的一般技术人员的理解有着同样的含义。

出于描述和揭示的目的，在此并入本文提到的所有出版物以供参考，例如，出版物中所描述的可能与本发明结合使用的细胞系、结构和方法。以上以及全文仅仅提供了出版日期先于本发明提交日的出版物。文中，所有一切都不能理解为由于
30 在先发明而允许发明者将这一公布提前。

以下实施例为此领域的一般技术人员提供了完整的揭示和描述了如何制造和

使用本发明，它们不是要限制本发明的范围。我们已经做了努力以确保所用数据（如，含量、温度、浓度等）的准确性，但一些实验误差和偏差是允许的。除非另有说明，份数是重量份数，分子量是平均分子量，温度是摄氏温度，压力为大气压或接近大气压。

5

实验

为分析人 5q23-35 区域的哮喘易感性基因，我们采用了小鼠模型，它有一些潜在的优点。可以控制环境变化，可以同种检测多个表型，且近交品系可用过敏原致敏以产生人哮喘的主要特征——气道高反应性(AHR)。我们采用了只有一小段与人染色体 5q 同源的染色体区域不同的同类系近交小鼠品系，这使得要研究的这一区域在此区域外没有遗传性变异。定位克隆揭示存在编码 T 细胞膜蛋白(TIM)的一个新基因家族，TIM-1、TIM-2、TIM-3、TIM-4、TIM-5、TIM-6 和 TIM-7，其中，TIM-1、TIM-3 和 TIM-4 的主要序列变体与 Tapr 完全共隔离。

降低 HBA 小鼠 IL-4 的产生和气道高反应性。我们检查了在 BALB/c 基因组背景上产生的同类系小鼠具有继承自 DBA/2 各个染色体的不连续的基因间隔。BALB/c 小鼠发育成 Th2 偏向性的与特异性类似的免疫应答体有增强的 AHR，而 DBA/2 小鼠发育成降低的 IL-4 反应性可保护小鼠不发生 AHR。通过对 Th2 反应性降低的若干这些同类系小鼠品系的筛选，我们鉴定到一个同类系，C. D2 Es-Hba(HBA)，它含有继承自 DBA/2 小鼠的第 11 条染色体(人 5q23-35 的同系物)的片段。图 1a 显示，正如所料，免疫的对照 BALB/c 小鼠的淋巴结细胞产生了高水平的 IL-4，这证实了 BALB/c 小鼠发育成 Th2-偏向性免疫应答反应的倾向。相反，HBA 小鼠的淋巴结细胞产生了显著较低水平的 IL-4，这与在 DBA/2 小鼠中观察到的情况类似。此外，如图 1b 所示，与 BALB/c 小鼠相比，HBA 小鼠产生了明显少的 IL-13 和 IL-10，以及较低水平的 IL-5，而 IFN- γ 的产量增加了。这些结果表明，HBA 染色体 11 的 DBA/2 衍生区(含有与人 5q23-35 同线的保守性大区域)含有可降低抗原特异性 IL-4、IL-13 和 IL-10 产生，增加 IFN- γ 产生，并将 BALB/c 细胞因子表型转变为 DBA/2 细胞因子表型的基因。

检查了 HBA 小鼠发育成抗原诱导的气道高反应性(AHR)(与 Th2 偏向性免疫应答反应相关)的能力。当用过敏原致敏和攻击时，对照 BALB/c 小鼠发生了高 AHR，而同样免疫的 HBA 同类系小鼠，像 DBA/2 小鼠一样，在对乙酰甲胆碱的应答反应中表达了正常的气道反应性(图 1c)。总之，这些结果强烈提示，染色体 11 上的一个

基因座中发生的基因变异调节了 Th2 细胞因子和 AHR 的产生; 因此, 我们尝试性地
的将 HBA 小鼠的有关基因决定簇称为一基因座: T 细胞和气道表型调节基因 (Tapr)。

我们还检测了 (BALB/c × HBA) F1 小鼠, 它和 BALB/c 小鼠一样, 产生了高水平的
IL-4、IL-13 和 IL-10 (图 1a 和 1b) 并发生了提高的抗原诱导的 AHR (图 1c)。这
些结果表明, 染色体 11 上的 DBA/2 等位基因, 与调节 IL-4 合成的其它基因是隔离
的, 以隐性方式降低了 IL-4 的产生和 AHR。相反, (BALB/c × DBA/2) F1 小鼠产生了
低水平的 IL-4 并对免疫接种有正常的气道反应性 (图 1), 表明 DBA 基因组的其它
区域基因座也调节 IL-4 产生和抗原诱导的 AHR, DBA/2 等位基因, 总体上, 以显性
方式起作用限制 IL-4 产生和 AHR。这些结果强调了特应性症状的多基因性和复杂
性, 并证明了用同类系品系小鼠分离和特性分析单一基因座不受多个上位基因
(它也影响哮喘表型) 干扰的潜在优点。

制作控制 AHR 和 IL-4 应答性的基因座 Tapr 的基因图。以前, HBA 小鼠中的同
类系区域是用 36 个分布泛基因组标志, 包括两个染色体 11 标志, 血红蛋白- α
2 (hba- α 2) 和酯酶-3 (es-3) 基因座描述的。染色体 11 以外的 HBA 基因组继承自
BALB/c。用已知为 DBA/2 和 BALB/c 小鼠之间有多态性的 25 单一序列长度多态性
(SSLP) 标志进行更加精细的分析显示, HBA 小鼠继承了 DBA/2 染色体 11 的两个节
段 (图 2, 左栏)。近端区域含有一 20cM 的与染色体 5q23-35 同源的节段, 这提供
了一种可能性, 即可以在哮喘小鼠模型中鉴定涉及人类哮喘连续研究的遗传基因
座。

为了以高分辨率制作 T_H2 -AHR 控制基因座 Tapr 的图谱, 将 (BALB/c × HBA) F1
小鼠与 HBA 小鼠回交以产生 N2 动物。通过回交, HBA 亲代提供的一组等位基因被
预先确定了, 同时 F1 亲代提供的一组等位基因可以通过基因分型评估。因此, 可
以在 N2 小鼠中检测同类系区域中产生提供信息的单倍体的重组过程, 并可用来评
估 Tapr 与同类系间隔中的基因座的连锁情况。由于 Tapr 的隐性性质, 我们检测了
这些回交 N2 小鼠以鉴定 HBA 衍生基因的足以使 HBA 具有 Tapr 表型的最小纯合区。
产生了 2,000 多个 N2 动物并进行基因分型。采用 SSLP 标志, 我们选出了那些带有
可提供信息重组活动的 N2 小鼠, 并按照对匙孔蛾血蓝蛋白 (KLH) 免疫接种的应答反
应中产生 IL-4 的能力确定它们的表型。在这一主要的分析中, 我们确定了有关基
因座位位于 D11Mit135 和 D11Mit260 之间的近端同类系区域中。为了以更高分辨率制
作 Tapr 图谱, 鉴定到 22 个其他标志并用于在有关区域中提供 0.1-1cM 的分辨率。

为精确比较几个月时间内进行的 IL-4 细胞因子分析的结果, 对各个 N2 小鼠

产生了各个实验的 IL-4 指数, ($\frac{B-x}{B-H}$), 其中 B=BALB/c 小鼠细胞产生的 IL-4, H=HBA 小鼠的细胞产生的 IL-4, x=N2 小鼠细胞产生的 IL-4。指数值接近 0 代表了高浓度的 IL-4 (像 BALB/c), 指数值接近 1.0 代表了低浓度的 IL-4 (像 HBA)。在 3-5 个对照小鼠中建立了“B”和“H”值, 每组测试 3-6 携带可提供信息的重组 N2 小鼠。

- 5 指数值呈双峰分布(图 3a), 其中具有非重组 HBA 基因型的 N2 小鼠相关的表型指数, 明显高于 ($P < 0.0001$, 配对 Student t-检验) 与具有非重组 (BALB/c $\times$ HBA) F1 基因型的 N2 小鼠相关的表型指数。

对于具有独特基因型的小鼠, 我们用几种方法确保对细胞因子的产生和 AHR 进行充分的单一测量, 因为这在连锁分析中是关键性的。首先, 我们测试了各个携

10 带着有关重组体的 N2 小鼠, 同时还测试了各个“重组 N2”的“非重组”同胞, 它们在基因型上是严格的 HBA 或 F1 (BALB/c $\times$ HBA)。此外, 我们通过将携带着有关重组体的某些 N2 小鼠与 HBA 小鼠杂交繁殖了另一种 N3 小鼠, 以得到更多的带有特殊 N2 基因型的个体小鼠。所有的值都是用所给定基因型测定的个体小鼠值的平均值。用这种方法, 我们肯定了对细胞因子产生和 AHR 的测定 (是正确的), 并且我们克

15 服了因生物系统固有的变异造成的试验变异。

由于 IL-4 值与 N2 小鼠相关, 而 N₂ 小鼠继承了双峰分布 (如 3a) 隔离的重组单倍型, 故能够证明, 控制高 IL-4 应答的遗传基因座位于标志 D11Mit271 和 D11Mit22 之间 (图 3b)。此外, 在 Kimlsscp 上存在等位基因的所有 BALB/c 小鼠中都观察到了高水平的 IL-4 产生, 并且在 Kimlsscp 上存在纯合性 HBA 基因型的所有小鼠中都

20 观察到了低水平的 IL-4 产生。因此, Tapr 具 Kimlsscp (Rattus Norvegicus, 肾损伤分子 (Kim-1) 的小鼠同系物中的一种内含子标记) 的非重组体。相反, Tapr 与所有的其它标志至少隔开一个重组体。Tapr 和 Kimlsscp 一起隔开的事实表明, Tapr 基因座位置与 Kimlsscp 非常接近或无法与 Kimlsscp 分辨。根据 D11Mit271 和 D11Mit22 之间单倍体的重组频率, 我们计算出重组频率为 0.0039, 这表明 Tapr

25 基因座位于在一个小的, 0.3-0.5cM 的区域内。我们还计算出 Tapr 和 IL-4 之间的重组频率为 0.08。因此, Tapr 位于距离 IL-4 细胞因子簇 5-10cM 的地方, 但位于与 5q23-35 区域 (与人特应性和哮喘有关) 高度保守同线的小鼠染色体区域内。

采用一种分析方法, 我们检测了具有可提供信息的重组单倍体的小鼠中过敏原诱导的 AHR 表型的分离情况。通过将 AHR 值指数化, N2 小鼠清楚地显示了亲代的表型, 在致敏 N2 小鼠组 AHR 指数值的柱状图中产生了双峰分布 (图 3c)。通过分析

30 分析与 1,000 多只 N2 小鼠相关的 AHR 表型分离情况, 我们证明, 控制 AHR 应答反应

的遗传基因座也位于标志 D11Mit271 和 D11Mit22 之间(图 3d), 以及 AHR 表型与 Kimlsscp 是非重组的。因此, 我们证明, IL-4 应答反应和 AHR 都和 Tapr 基因座共分离, 提示相同的基因座调节了 IL-4 应答反应和 AHR(图 3)。

5 这些发现进一步证实, Tapr 基因座朝着丝粒方向距离 IL-4 细胞因子簇 5cM 以上, 该簇中的细胞因子基因以前认为是‘候选’的特应性或哮喘易感性基因。我们的作图结果还说明, Tapr 与 IL-20p40 基因和小鼠染色体 11 的区域(包括 T_H1 -IL12 调控基因座 Tpm)都是遗传可分离的。

小鼠和人同系物将 Tapr 锚定到人 5q33 上。为构建 Tapr 基因座周围的组成图, 我们融合了得自小鼠基因组数据库(MGD)的连锁、回交和放射杂交图的信息, 并鉴定了人类基因组图谱中一个保守同线性区域。现有的放射杂交图将 D11Mit271 和 D11Mit22 附近的标志(包括几个与已知基因或单基因簇有广泛同源性的已表达序列标记(EST))放在小鼠基因组的物理图谱上。我们进一步检测了这些标志以及与他们相关的 EST 以了解以前没有鉴定的与已知基因簇的类似性。我们将这些标志组装在一个支架上以将它们与人类基因组比较。采用这种方法, 我们发现特定的放射杂交标志和以下人类基因: KIAA0171、Adam-19、Sox-30、Pir-121、Crsp9(Crsp33)和 hHAVcr-1(hHAVcr-1)之间有显著的类似性。图 4 证明, 一旦我们将这些基因锚定到位于我们的旁侧标志之间的小鼠基因组物理图谱上, 我们就能够将那些基因定位到人类基因组浏览器(Human Genome Browser)中。

小鼠和人类基因组之间在这一区域内高度保守, 表明 Tapr 基因座与人 5q33.2 连锁。如图 4 所示, 我们鉴定了人类图谱这一区域中所有的已知基因和 EST。已知人 hHAV-cr 和 Kim-1 的小鼠同系物附近倍受关注的基因, 包括 IL-2 可诱导的 T 细胞激酶(Itk)和 SP-1 转录因子的共调节基因(Crsp9), 都涉及 T 细胞分化。我们给这些候选基因的编码区测序, 在 ITK 或 CRSP-9 中都没有发现多态性。

一个新的 T 细胞表面蛋白家族位于到 Tapr 区域。由于大鼠 Kim1 的小鼠类似物位于 Tapr 的 0.4cM 区域内并与 Tapr 紧密连锁, 我们检测了公众可以获得的数据库并发现 EST 簇具有仅提供部分覆盖的某些序列类似性以及含有大的变异节段。Kim-1 最接近的人类类似物是人甲型肝炎病毒细胞受体 hHAV-cr, 人类基因组的 tBLAST 检索提示, 另外两个 Kim-1 类似物, 可能是某基因家族的成员, 也位于人染色体 5 和小鼠染色体 11 上。

30 用 conA-激活脾细胞的 cDNA, 我们鉴定并克隆了两个 Kim-1 的小鼠直向同源基因, 我们称其为 Tim1 和 Tim2, 如图 5A 所示, 它们定位在 Tapr 区域。Tim-3 是

KIM-1 的第三个关系更远的直向同源基因。

这一基因家族的所有三个成员激活 T 细胞都有表达,且都组成小鼠染色体 11/人染色体 5 的 Tapr 区域图谱,其中它们编码具有共同结构基序的细胞表面糖蛋白,包括免疫球蛋白(Ig)功能域、粘蛋白功能域和带有磷酸化位点的胞内尾巴。因为这些蛋白质的细胞功能未知,我们将这些基因称为 T 细胞、免疫球蛋白功能域、粘蛋白功能域(Tim)基因家族的成员。小鼠 Tim1 是大鼠 Kim1 和在非洲绿猴及人中发现的 HAVcr-1 的小鼠同系物。Tim2 是以前未知的基因,本研究之前,它没有在任何生物中鉴定到。

小鼠 Tim 基因编码一 305 个氨基酸的膜蛋白,它和大鼠 KIM-1 有 78%的相同性,与人 HAVcr-1 有 35%的相同性。如图 5B 所示,将有缺口的多个序列与小鼠 TIM-1、大鼠 KIM-1、人 HAVcr-1 和非洲绿猴 HAVcr-1 排列对比,显示了这些动物中 TIM-1/KIM-1/HAVER-1 蛋白之间的同源程度。TIM-1 的胞质区含有两个酪氨酸残基并包括一个高度保守的酪氨酸激酶磷酸化基序 RAEDNIY,它整合于 TIM-1 预计的 Itk 和 EGFR 激酶位点, SRAEDNIYIVEDRP。TIM-1 的粘蛋白功能域有多个 O-连接糖蛋白位点,并在免疫球蛋白功能域中发现了两个 N-连接糖蛋白位点。

TIM-2,一种类似的含有 305 个氨基酸的膜蛋白,和小鼠 TIM-1 有 64%的相同性,与大鼠 KIM-1 有 60%的相同性,与 hHAVcr-1 有 32%的相同性(图 5A、B)。像 TIM-1 一样, TIM-2 有两个胞外 N 连接的糖蛋白位点,和一个富含丝氨酸、苏氨酸的带有许多 O-连接糖蛋白位点的粘蛋白功能域。TIM-2 也含有胞内酪氨酸激酶磷酸化基序, RTRCEDQVY。

Tim3 编码一 281 个氨基酸的膜蛋白,它有类似的带有多个胞外糖蛋白位点和一个胞内酪氨酸磷酸化基序的膜内在糖蛋白结构。尽管 TIM-3 的粘蛋白功能域不如 TIM-1 和 TIM-2 那么显著(图 5A), T 细胞上表达的 TIM-3 可能和 APC 的配体反应并改变 APC 的活性。TIM-3 有四个 N-连接的和五个 O-连接的糖基化位点,提示 TIM-3 象 TIM-1 和 TIM-2 一样,是高度糖基化的,并可能与其它细胞(如抗原呈递细胞)中存在的配体反应。

Tim4 编码小鼠一 344 个氨基酸的膜蛋白,在编码人的 378 个氨基酸的蛋白质。预测的 TIM-4 含有其它 TIM 蛋白的普通膜糖蛋白结构基序、一个具有高度保守的半胱氨酸残基的 IgV 样功能域、一个富含苏氨酸的粘蛋白样功能域和一个短的胞内尾巴。然而, TIM-4 缺乏存在于其它 TIM 蛋白质中的磷酸酪氨酸基序,因此可能调节其它 TIM 蛋白质的功能。

每个 TIM Ig 功能域都有一个预计与骨桥蛋白中发现的 SVVYGLR 基序类似的整联蛋白-结合基序, 骨桥蛋白是一种像 TIM 一样的跨膜蛋白, 它参与细胞粘附、存活和瘤形成的调节, 以及辅助 T 细胞分化的调节。这种整联蛋白基序显示了 α (9) 和 α (4) 的特异性。

5 比较了三种 Tim 基因的 BALB/c 和 HBA/DBA 编码区的序列, 揭示 TIM-1、TIM-3 和 TIM-4 中的主要多态性, 但 TIM-2 中无多态性。在 TIM-1 中, 这些多态性编码 HBA/DBA 中的三个氨基酸差异和 15 个氨基酸缺失。在 TIM-3 中鉴定到 7 个预计的氨基酸差异(图 5c)。基因组序列证实这些多态性, 包括缺失, 是直正的多态性, 而不是剪接变体。在其它的小鼠品系中进一步测定 TIM-1 和 TIM3 基因组节段的序列, 我们发现 C57/BL6(倾向发生减弱的 T_H2 和 AHR 应答反应, 与 DBA/2 相类似的品系)也有 Tim1 和 Tim3 的 HBA/DBA 等位基因。TIM-1 和 TIM-4 中的多态性位于信号域和粘蛋白样功能域中, 而在 TIM-3 中鉴定到的多态性集中在 Ig 功能域(图 5c)。如 MAdCAM-1 所示, 在带有 Ig 和粘蛋白功能域的糖蛋白中, 任一功能域中发生的变化都可能影响受体-配体相互反应。尽管预计的 TIM-1 和 TIM-4 的切割位点不会用
10 信号序列的多态性而改变, 但这种多态性可能会影响切割的效率和/或受体向细胞表面的移动。这些 Tim 序列和多态性对于人类免疫应答反应和 HAV 病毒的发病机理是重要的。

分析我们的 N2 回交小鼠的 DNA 样品(图 3), 证明, TIM-1 和 TIM-3 多态性与 Tapr 完全共分离。虽然这些观察没能区 TIM-1、TIM-3 或这两者(都负责 AHR 和 T_H2 介导的炎症的变化)变化的程度, 但我们认为人 TIM-1(hHAVcr-1)和/或 TIM-3 的多态性支持哮喘易感性和人染色体 5q 之间强烈相关。在检测人基因组和 EST 数据库时, 证明了人 TIM1 编码区中的主要变异, 这个事实支持这一想法。将这些人 cDNA 变体(且有以前描述过的猴 HAVcr-1 的变体)和本文鉴定到的鼠 cDNA 变体进行比较证实, 在预计的 TIM-1 蛋白质序列中存在广泛的差异(图 5b、c)。这种高度差异将
25 TIM-1 及其家族成员与许多其它的候选基因(如曾经作为哮喘易感性候选基因而仔细研究过的细胞因子和细胞因子受体)区分开。此外, 有关螨过敏性儿童哮喘与 D5S820(平均 LOD 评分=4.8), 一种距离 Tim1 和 Tim3 大约 0.5Mb 的标志(图 4), 之间显著相关联的报道, 也进一步支持了 Tim1 和哮喘易感性之间的关系。

除了上述遗传多态性, 由于交替剪接在 TIM 基因中产生了几种表达多态性。
30 TIM-1、TIM-2 和 TIM-4 mRNA 的交替剪接产生了几种 TIM 变体, 其中有一些是 TIM 受体的可溶性分泌形式。这些剪接变体, 与具有可变 5' 非翻译区的 TIM 剪接变体

一起,可能会造成 TIM 蛋白质的细胞特异性和条件特异性表达模式。

T 细胞赋予 Tapr 效应。为更好了解 Tapr 基因座的功能,我们测定了 Tapr 的等位变异是否会影响 T 细胞或抗原呈递细胞(APC)的功能。对于这些实验,我们制造了具有 HBA 背景(HBA DO11.10)的卵清蛋白(OVA)特异的 T 细胞受体(TCR)转基因小鼠(Tg),我们将其与具有 BALB/c 背景(BALB/c DO11.10)的 TCR-Tg 小鼠进行比较。将这二种品系之一的纯化的 CD4⁺ T 细胞和 OVA 以及 BALB/c 或 HBA 骨髓衍生的树突状细胞(DC)共培养,并评价产生的细胞因子。经过照射的脾细胞不用作这一实验的 APC,因为据发现,经过照射的脾细胞和其它组织表达高水平的 TIM 基因。

与 HBA DO11.10 T 细胞相比, BALB/c DO11.10 T 细胞以不依赖于抗原呈递细胞来源的方式产生了较高水平的 IL-4 和 IL-13(图 6A)。此外, CD4⁺ T 细胞来源决定了在各个抗原浓度下产生的 IL-4/IL-13 的量,而不论第一次刺激或第二次刺激时 APC 的来源。在各种细胞类型组合的培养上清液中测得了同等水平的 IL-12,这进一步证明, BALB/c 和 HBA DC 的功能是可比的。此外, BALB DO11.10 和 HBA DO11.10 T 细胞产生了相等水平的 IL-2,并证明次级培养物对 OVA 的应答反应时有可比水平的增殖,表明 HBA 和 BALB/c T 细胞被类似地激活,尽管它们产生的 Th2 细胞因子的水平截然不同。

我们在图 6B 中显示,我们的 DO11.10/DC 系统在初级培养的前 12 小时中,我们发现 BALB/c 和 HBA CD4⁺ T 细胞的表达了 TIM-1 的 mRNA。第一次刺激 4 天内,我们发现 BALB/c DO11.10 的上清液中有显著水平的 IL-13,而在 HBA DO11.10 上清液中没有检出 IL-13。这种差异在 36 小时时可检测到 mRNA 水平(图 6B)。在 12-36 小时之间, HBA CD4⁺ T 细胞 IL-13 mRNA 的表达降低了,而 BALB/c CD4⁺ T 细胞保持了 IL-13 的表达水平。因此,在对抗原的初次应答反应中, BALB/c CD4⁺ T 细胞产生了较 HBA CD4⁺ T 细胞更强的 Th2 应答。我们的发现证实,在初次抗原特异应答反应中 Tapr 调节了辅助 T 细胞的分化,而且我们在这些应答的最早阶段中检测到 CD4⁺ T 细胞的 TIM-1 表达。

在分化为成熟 Th1 和 Th2 亚群后, RT-PCR 显示辅助 T 细胞继续表达 TIM,即 Th1 细胞表达 TIM-3,而 Th2 细胞优先表达 TIM-1。所有的 T 细胞群显示弱的 TIM-4 表达。虽然 Itk 信号通过 TIM-1 可能促进 Th2 分化,但 EGFR 信号通过 TIM 蛋白可能提高效应器中细胞的存在尤其是记忆性 T 细胞群的存活。由于 Itk 仅在 T 细胞和肥大细胞中表达, TIM-1 上的 Itk 激酶活性局限于免疫细胞,特别是参与哮喘和特应性的细胞。然而,其它的蛋白酪氨酸激酶,如 EGFR,涉及到其它组织(包括局

部缺血的上皮细胞、经照射的脾细胞和肿瘤细胞)表达的 TIM 蛋白功能。

在这些研究中,我们绘制了 Tapr(调节 Th2 细胞因子产生的发育和抗原诱导的 AHR,哮喘的主要特征的基因座)图谱。我们利用携带有与人染色体 5q 同源的一个染色体节段的间隔特异性同系小鼠(HBA)将 Tapr 定位于(与特应性和哮喘反复关联的人类基因组的一个区域)。这一区域还与脊髓发育不良和致瘤性细胞形成异常相关的 5q 综合征反复关联。采用这种同系小鼠的策略(它可以将复杂的症状转变成比较简单的,可能是单基因的症状),我们将 Tapr 的间隔缩小到 0.4cM,并测定了此区域中几个候选基因的序列,并原位克隆了 TIM 基因家族。

前面已经描述了 TIM 基因家族。我们鉴定并克隆了整个 cDNA 序列,与 HBA 小鼠相比,发现 BALB/c 小鼠 TIM-1 蛋白中存在显著的多态性。我们发现 BALB/c 的 TIM-1 和 TIM-3 序列与 AHR 易感性和过敏性 T 细胞应答相关,而 HBA 序列与对这些应答的保护力相关。分化的 T_H1 优先表达 TIM-3。多态性 Tim3 变体与 Tapr 相关提示,TIM-3 可能调节 T_H1 和 T_H2 细胞的功能。然而,Tim3 的差异也可能归因于与 Tim4 或 Tim1 紧密连锁的单倍型。

我们认为 TIM-1 在免疫系统的调节(尤其是哮喘和特应性疾病)和在对应激(缺氧、营养不良、辐射、化学治疗等)的反应中上皮细胞和造血细胞存活的调节起着非常重要的作用,有几点原因。首先,像 Tim3 一样 Tim1,在第一次抗原刺激中在 CD4 T 细胞中表达,这很可能是 Tapr 作用发生的时候。T 细胞在 AHR 发展和哮喘的发病机理中起着重要作用,我们的结果提示,Tapr 通过增加早期 CD4 细胞投入 Th2 应答反应(通过控制 IL-13 的产生和随后的 T 细胞分化)而影响哮喘。其次,婴儿或儿童时期的 HAV 感染与哮喘和过敏性的发展负相关。我们认为,HAV 与 TIM-1/HAVcr-1 相反反应可能会改变 T 细胞因子的产生,可能会在倾向发生特应性和哮喘的个体中,逆转或防止偏离的 Th1/Th2 平衡。SLAM(麻疹病毒受体)是另一种(以可能被病毒反应改变的方式)调节 Th1/Th2 平衡的 T 细胞表面糖蛋白的例子。因为一些病毒受体(如麻疹病毒的 SLAM 或 CD4、CCR5 和 HIV 的 CXCR4)是宿主自身免疫系统的受体,甚至当感染不成功时,病毒受体介导的信号传导也能导致细胞因子的释放和疾病的发展。

第三,TIM-1 中的多态性与我们观察到的不同类型的辅助 T 细胞应答反应相关。因此,TIM-1 的变体本身可能造成遗传性 Th1/Th2 倾向,这种倾向在缺乏任何已知的造成免疫偏差的环境因素时也可发生。已知灵长类动物中的 HAV 受体是高度可变的,同时,我们提出,人 TIM-1/hHAVcr-1 的多态性等位基因,如我们已经在

小鼠中鉴定到的那些一样,可能与 Th2 偏向和哮喘易感性的差异相关。对作为病毒受体的细胞表面分子和对感染的易感性改变而言该基因中的突变是不常见的,因此, TIM-1 和 TIM 基因家族的其它成员中显著的遗传性差异较之在其它基因中(如细胞因子基因中)发生的变化更可能被观察到。还不清楚为什么哮喘易感性等位基因在人类基因库中是普遍的,但 Tapr 与 HAVcr 相关为哮喘易感性等位基因的持续存在提供了令人感到兴趣的解释。在人类进化过程中, Tim 基因家族的某些等位基因可能使人类能够抵抗特应性疾病和其它的免疫疾病,但对那些抗性等位基因的选择可能被赋予抗病毒致病抵抗力的替代等位基因的选择所抵消。

总之,我们的研究代表了第一次地利用同类系小鼠策略来定位候选的强哮喘易感性基因,和克服这种复杂的遗传性症状检查中遇到的固有困难。我们在人类染色体 5q 同源的区域中鉴定到一个以前未知的基因家族,它在 Th 细胞发育和哮喘易感性中起着主要作用。虽然以前人类研究鉴定了人染色体 5q 上的几个候选基因,但我们的研究鉴定的 Tim1 基因产物也为 HAV 感染和哮喘易感性降低之间的相反关系提供了解释。

CD4⁺T 细胞(Th)亚群产生了不同模式的细胞因子,这导致 Th 细胞功能不均一的概念。1 型 Th 细胞(Th1)产生白细胞介素 2(IL-2)和/或干扰素 γ , 诱发迟发型超敏(DTH)反应和激活巨噬细胞。另一方面,2 型 Th 细胞(Th2)产生了 IL-4、IL-5 和 IL-10,特别重要的是产生 IgE 和嗜嗜红细胞性炎症,并可能抑制细胞介导免疫力。认为 Th2 细胞在特应性的发病机理中起着关键作用。几个因素决定了在具体免疫应答中 T 辅助细胞是分化成 Th1 还是 Th2,因素包括但不限于,细胞因子微环境、TCR 信号的强度和/或抗原密度、和协同刺激途径。CD4⁺T 辅助细胞分化成 Th1 或 Th2 亚群对特应性、自身免疫性疾病、传染病和移植排斥等的结局有深远的影响。

对保护非特应性个体免遭过敏性疾病和抑制特异性个体过敏反应的免疫应答的具体特征了解得很少。因为一些研究系统中 Th1 细胞交叉调节 Th2 细胞,过敏原特异的 Th1 细胞被认为能够调节过敏性疾病和哮喘。Th1 细胞抑制 Th2 细胞的发育和增殖,而 IgE 的产生受到 IL-4 和 IFN- γ 的交互调节。这提示保护个体免遭过敏是由于产生了过敏原特异性抑制 Th1 细胞。已证明过敏原特异性 T 细胞克隆衍生自能产生 Th1 细胞因子的非过敏性个体的外周血。这些观察结果还支持哮喘的卫生学假设,该假设认为,改善公共健康设施和使用疫苗及抗菌素降低了西方社会传染病的流行,特别是能诱导 Th1 应答的传染病的流行。其结果是,在缺乏 Th1 介导的应答时, Th2 应答和特应性发展得更加剧烈和迅速。

本文鉴定的 TIM 基因也是候选的致癌基因。用 TIM 基因转染细胞系可以抵抗细胞死亡。在 TIM-1 中预计的 EGFR 激酶基序提供了一种可能的机制, 这一机制控制下细胞的存活。此外, TIM-1 证明与 TOSO 有显著程度的序列相同性(大约 20%)和结构相似性(一种具有 IgV 域、粘蛋白/多配体蛋白聚糖域、跨膜域、和带有类似的磷酸酪氨酸基序的胞内域的跨膜糖蛋白), TOSO 是一种保护细胞免遭 Fas 介导的细胞凋亡的蛋白质。像 TIM 基因一样, TOSO 也可能是致癌基因, 它位于在血液恶性肿瘤和实体瘤频繁变化的基因组区域中。

方法

10 动物 将 DBA/2N 渐渗回交进 BALB/cAnPt 背景中以产生同类系, 包括 C. D2 Es-HBA。从 Jackson 实验室(Bar Harbn, 缅因州)获得 BALB/cBy、DBA/2J 和 (BALB/c × DBA/2) F1 小鼠 (CByD2F1/J), 并从 Taconic 实验室得到了 BALB/cAn 和 DBA/2N。 (BALB/c × DBA/2) F1 小鼠是将 BALB/cByJ 和 HBA 杂交产生的。N2 小鼠通过 (BALB/c × HBA) F1 与 HBA 回交产生。在我们对重组 N2 动物的分析中, 每当可能时, 只用非重组同胞测试重组小鼠。为在多种试验中检测个体的 N2 基因型, 我们将选出的 N2 小鼠与 HBA 回交以产生 N3 小鼠, 分析其基因型以选出携带重组 N2 单倍型的小鼠, 从而保留了所选的重组单倍型。Dennis Loh 博士友好的提供了 D011.10 小鼠, 它是转基因小鼠供 TCR 识别 OVA 肽 323-339 (pOVA³²³⁻³³⁹) 并与 BALB/c (43) 回交, 这种小鼠饲养在我们的设施中。HBA D011.10 小鼠是将 D011.10 与 HBA 回交而产生。

15 D011.10 小鼠是通过对 TCR-Tg 进行 FACS 分析而选出的, 并分析其基因型以对 D11Mit135 和 D11Mit168 之间的 HBa 等位基因进行选择。斯坦福大学动物保护委员会 (Stanford University Committee on Animal Welfare) 批准了所有的动物方案。

确定基因型。测试出现在 D11Mit140 和 D11Mit269 之间的所有存在的 “D11Mit-” 标志和 D11Mit271 和 D11Mit22 附近所有的放射杂交标记, 以了解 DBA/c 和 BALB/c 之间的多态性, 这样可鉴定 Tapr 基因座周围的其它标志。由 Research Genetics (亨茨维尔, 阿拉巴马州) 得到了 MIT MapPair 引物, 并在蛋白质和核酸设施 (斯坦福, 加利福尼亚州) 中合成了所有其它的引物。按前述方法进行 PCR, 并用 4-5% 的 Metaphor 琼脂糖 (Biowhittaker, Walkersville, 马里兰州) 分辨 SSCP 多态性。用 ³³P-dCTP 扩增供 SSCP 分析的产物并在 40W 和 4°C 下用 Sequi-Gen GT 系统

25 (Bio-Rad, Hercules, 加利福尼亚州) 将其在变性丙烯酰胺凝胶上分离。

免疫方法。用在完全弗氏佐剂 (CFA) 中的 KLH (Calbiochem, 拉霍亚, 加利福尼亚州)。

5 亚州)免疫在细胞因子产生试验中研究的小鼠(DeKruyff 等, J Immunol 149, 3468-76(1992))。为测定气道高反应性,在第 0 天用混有硫酸铝钾(alum)的 OVA 腹膜内(i. p., 50 μ g)免疫接种小鼠,并于第 7、8 和 9 天轻度麻醉后鼻内接种(i. n. 50 μ gOVA, 溶于 50 μ lPBS)。对照小鼠单用 alum i. p. 注射和鼻内施用的 PBS。在最后一次 OVA 鼻内剂量 24 小时后(第 10 天)测量吸入乙酰甲胆碱的气道高反应性。

测量道反应性。如前所述,通过测量放在体积描记仪(Buxco Electronics 有限公司, 特洛伊, 纽约州)中的有知觉小鼠因乙酰甲胆碱诱导造成的气流阻塞评估气道反应(Hansen 等, J Chin Invest 103, 175-83(1999))。

10 细胞培养。按前述方法由制备用 KLH 免疫接种小鼠的淋巴结细胞(Yeung 等, J Immunol 161, 4146-52(1998))。与抗 CD4 的磁珠(Miltenyi Biotech, 德国)一起培育后用 MACS 柱正选择转基因的 DO11. 10 CD4 T 细胞。在 96 孔圆底板上与 250 μ g/ml OVA 和 1×10^4 骨髓衍生的树突状细胞/孔一起培养 2×10^4 细胞/孔。7 天后,洗涤 DO11. 10 T 细胞并用新鲜的抗原呈递细胞和所示浓度的抗原再次刺激。再次刺激时,对原初 DO11. 10 培养物的抗原浓度进行滴定。用前述方法产生了一些修饰的骨髓衍生的树突状细胞;在直径为 9 厘米的组织培养皿上用 10ml 含有 20-25U/ml GM-CSF 的培养基培养 5×10^6 骨髓细胞。在培养的第六天将松散粘附的细胞转移到第二个平皿上;四天内,以这些转移的细胞作为树突状细胞的来源。

细胞因子 ELISA。按 Macaulay 等, J Immunol 160, 1694-700(1998);和 Macaulay 等, J Immunol 158, 4171-9(1997)描述的方法进行 ELISA。

20 单克隆抗体。通过硫酸铵沉淀和离子交换层析从腹水液中纯化得到供 ELISA 和 FACS 分析的单克隆抗体。Philippa Marrack, National Jewish Medical Center 慷慨的提供了抗克隆型抗体 KJ1-26.1, 并且,在 FACS 之前按标准方法将这种抗体交联 FITC。

25 实施例 2

鉴定人 Tim 序列

在基因座内原位克隆 TIM 基因家族产生抵抗 Th2 应答发展的保护力,而且抗原诱导的气道高反应性为促进我们了解 Th2 驱动的应答反应和特应性疾病的调控提供了机会。此外, TIM-3 在小鼠 Th1 细胞上特异性表达和抗 TIM-3mAb 导致了实验性自身免疫脑脊髓炎(EAE)严重程度加深。这强调了此基因家族在 T 辅助细胞亚群调控中的重要性。

通过 PCR 克隆了人 Tim cDNA, 它是小鼠 Tim-3 和 Tim-4 的直向同源基因。克隆了 TIM-1 的人直向同源基因, 称其为 HAVcr-1, 它是甲型肝炎病毒的细胞受体。人染色体 5 上, TIM 家族的基因以 TIM-4、TIM-1、TIM-3 的顺序相互紧密毗邻, 没有间隔基因。染色体 12 和 19 上有 TIM 假基因。此基因家族的成员仅仅是中等相关的。图 7 显示了 Tim 基因家族中的蛋白质序列和相互关系。

TIM 基因家族成员的胞质结构域是小鼠和人直向同源基因之间最保守的结构域, 例如, 人和小鼠 TIM-3 胞质结构域之间有 77% 的相同性。相反, 整个 TIM-3 在人和小鼠之间的相同性只有 63%。每个 TIM 基因含有不同的预计酪氨酸信号基序。TIM-1 的胞质域含有两个酪氨酸残基并包括一个高度保守的酪氨酸激酶磷酸化基序, RAEDNIY。扩展域, SRAEDNIYIVEDRP, 含有一个预计的 Itk 和 EGF 受体磷酸化位点。已知 Itk 能磷酸化磷脂酶 C- γ (PLC- γ) 并因此触发涉及 T 细胞活化和辅助 T 细胞分化的信号传递级联反应。此外, Itk 信号还影响 Th1/Th2 分化, 且 Itk^{-/-}小鼠不产生强 Th2 应答。EGF 受体激酶的活性与细胞存活和对细胞死亡的抗性相关。类似的, TIM-3 在胞质域中含有不同的、保守的酪氨酸磷酸化和 SH2 结合基序, 这提示 TIM 与其配体的相互反应会启动胞内信号传递途径, 且各个 TIM 在信号传递上是不同的。

TIM 蛋白的胞外 IgV 功能域也含有与骨桥蛋白的 SVVYGIR 基序相类似的预计的整联蛋白结合基序, 它通过 α (9) β (1)、 α (4) β (1) 和 α (4) β (7) 整联蛋白参与粘附。与未转染的 300.19 细胞相比, TIM-1 转染的 300.19 细胞系的前 B 细胞显示高度粘附性和在细胞培养中存活率增加。与未转染的 CHO 相比, TIM-1 和 TIM-2 转染的 CHO 细胞也显示存活率提高。这些结果证明, TIM 蛋白调节细胞粘附和死亡。

人 Tim1 和 Tim3 基因的遗传多态性。鉴定了 SNP 或核苷酸多态性以及人 Tim1 基因中的缺失/插入。因为 SNP 在基因组中极常见, 每 300-600 个碱基对就会发生一次, 故只分析了 Tim1 的编码区。此外, 常见的遗传性变异可能也是重要的。先测定了来自 30-40 名个体 (60-80 条染色体) 的 T 细胞的 cDNA 序列。累计算显示, 60 条染色体编码区中靶序列的调查将以高于 1% 的人口频率容易地检测出 SNP, 并有 90% 以上的机会以 5% 或更高的人口频率检测到等位基因。因此, 筛选 30-40 名个体的序列变异就捕捉到大部分在人群中常见的、功能相关的、非保守性的 DNA 变异。

由于 DNA 变异/SNP 在物理上紧密相邻常常显示强的依赖关系 (即, 连锁不平衡), 它决定了一组 DNA 变异 (SNP 单倍体) 是否是一起遗传, 并决定了只对这些 SNP 的一部分筛选是否足以鉴定单倍型。对各种染色体大区域的分析表明, 不连续的单

倍型模块(数百个 kb 中约有 10 个)通常是存在的,每个都具有被重组出现的位点所打断的有限的多样性。为发现单倍型,对 cDNA 测序和检索是否有在许多个体中反复观察到的序列变异的组合。

获得 38 名献血员的外周血单个核细胞(PBMC),并在体外用 PHA(7.5 μ g/ml)刺激 24-72 小时,或用伴刀豆球蛋白 A(2 μ g/ml)刺激 24 小时。在刺激的最后 6 个小时中加入 PMA(20ng/ml)和洛诺霉素(1 μ M)。然后收获细胞并用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取总 RNA。为获得测序用的 cDNA 模板,用 Superscript II 反转录酶(Invitrogen)按照制造商的方法反转录 RNA。cDNA 用于 PCR 扩增全长的 Tim cDNA。采用 Herculase Hot Start™ 高保真度聚合酶(Stratagene) PCR 引物是:(SEQ ID NO:37) GTGTCTGACAGTGGCGTA(正向), (SEQ ID NO:38) TTTGCCAGGCAGAACCA(正向), CCACCCAAGGTCACGACT(反向), (SEQ ID NO:39) ATGCCACGGACTAAGACC(反向)。用 Qiagen QIAquick 凝胶提取试剂纯化 PCR 产物,并用四个内部测序引物测序有无 Tim1,用两个内部测序引物测序有无 Tim3。

取得活化 T 细胞的总 RNA 并用 Superscript II 和寡 dT 转录以克隆这些个体全长 Tim1 RT-PCR 产物。用 Expand 高保真度聚合酶(Roche)扩增 Tim1 cDNA 产生横跨 Tim1 编码区的 1kb 产物,用 PCR 纯化试剂盒(Invitrogen)将其纯化。然后将纯化的产物克隆入 TOP0 pEF6 载体(Invitrogen),然后转化 TOP10 感受态细菌。使细菌菌落生长在氨基苄青霉素选择的 LB 平板上。挑选出单个菌落并用 Qiagen mini prep 预备试剂盒制造质粒制品。用 Hind III 消化的限制性图谱用于挑选含有正确取向插入物的质粒。然后用三个不同的引物,正向(T7)、内部和反向(BGH),给这些质粒测序,并以 SeqMan 程序将这些序列与 NCBI 人类 TIM 参考序列排列对比。

测定 35 名个体染色体(70 条染色体)的 Tim 序列后,鉴定了 Tim1 中的几种多态性,显示在图 8 中。这些多态性编号为 1-7(左栏)。图 8 中提供了作为参考点的 NCBI 数据库(NM_012206)列出的人 TIM-1 的全长序列。由于该编码区中存在多个常规的序列多态性,我们测定了不到 20%的染色体中存在的序列。鉴定到 6 个额外的序列变异(显示在图 8 中),并在粘蛋白胞外域中观察到了所有的多态性,这对小鼠是直的,尽管具体的变异不同于小鼠中观察到的。重要的是,这些变异之间以各种组合方式的相关程度有限。最显著的变异是标记为多态性 1 的插入,157insMTTVP,见于 65%的染色体中。以及多态性 5 中的缺失,187 Δ Thr,见于 65%的染色体中。在 40%的染色体中观察到了多态性 4,并在 $\leq$ 5%的染色体中观察到了其它的多态性。值得注意的是,这些变异中的大多数(2-6)位于外显子 3(第一个编码粘蛋白的外显

子)中,且所有的变异都发生在基因组水平且不是剪接变体。

根据 mRNA 的这种序列分析,已开发了更加快速地分析大量患者/对照者的基因组 DNA 的方法。为筛选个体是否有图 8 所示序列中所见的变异,先检测该 DNA 在 150 个 PCR 产物中是否有单一序列长度多态性(SSLP),此法可以检测主要的插入(多态性 1)和缺失(多态性 5)。

此外,为确定其它多态性(2-4、6 和 7)的基因型并鉴定新的多态性,开发了用单链构象多态性(SSCP)分析 PCR 产物的相对简单的试验方法。在最优化条件下,SSCP 分析检查到了多于 90%的单个核苷酸取代和所有长度的多态性。在这一分析中,鉴定了扩增 Tim 基因各个外显子的 PCR 引物,并可以用标准非变性 SSCP 凝胶电泳法区分变体(图 9)。采用了非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳与 ABI 377 DNA 序列对各个外显子进行高分辨率 SSCP 分析。合成并纯化了末端荧光素标记的引物。在高通量基因型测定过程中检出的新的 SSCP 模式可以鉴定新的变体。用这种方法,快速分析了患者和对照者的基因型。

用基本上相同的方法分析了 Tim3 基因。测定了活化 T 细胞的 mRNA 序列以鉴定 Tim3 多态性,以及 Tim1 和 Tim3 之间的长范围单倍型。测定代表 60 条染色体的 Tim3 cDNA 序列后,发现 Tim3 是多态性的,如同小鼠基因组中那样。然而,只有一个多态性,Leu140Arg,是常见的,见于大约 12%的代表性染色体中。

实施例 3

Tim 序列的表达

小鼠 TIM-3 蛋白在 Th1 克隆上表达,但不在原初 T 细胞或 Th2 细胞上表达。采用 TCR 转基因 T 细胞,在一或两轮 Th1 定向分化后,TIM-3 蛋白不在 Th1 细胞上表达,但在三轮或更多轮次的 Th1 刺激后表达。TIM-3 mRNA 的表达检出略早。为确定 TIM-3 基因表达在人中是否是一样的,采用 IL-12 和抗 IL-4 mAb 存在时抗原刺激产生的破伤风类毒素特异性 T 细胞,检测了 TIM-3 和 TIM-1 mRNA 在人 Th1 细胞中的表达。鉴于 TIM-1 与哮喘相关,测定了 TIM-1 和 TIM-3 mRNA 在人 Th2 细胞中的表达。通过体外用过敏原、IL-4 和抗 IL-12 mAb 刺激,从过敏性献向只产生了 Th2 细胞系。用 PCR 分析了 RNA 的 TIM 基因。

TIM-3 一般在 Th1 分化后表达,而 TIM-1 却丢失了。相反,TIM-3 在任何 Th2 中都不表达,但 TIM-1 在所有的 Th2 细胞中都表达。TIM-1 和 TIM-3 在单核细胞缺失(monocyte-depleted)的未受刺激的外周血单个核细胞(这种细胞得自用来产生

Th1 和 Th2 细胞系的献血员)中表达, 假定这是因为这细胞混合的种群含有 Th1 和 Th2 记忆细胞。这些结果提示 Th2 表达的 TIM-1 和 Th1 表达的 TIM-3 之间存在着相互关系。在小鼠中也观察到了 TIM-1 和 TIM-3 之间的这种关系。

在人组织中, 4.4kb 的 TIM-1 mRNA 在肾脏和睾丸中有非常强烈的表达。这种 4.4kb 的 mRNA 出现在几乎所有的组织中, 尽管大多数是微弱的。在结肠和肝脏中观察到了 5.5kb 的条带。在脾脏、胸腺和外周血白细胞中观察到了 7.5kb 的条带, 并在一些器官中观察到了小于 4.4kb 的条带。这些结果提示, hTIM-1 以某种水平在大多数人组织中表达, 同时, 7.5kb 的信息可能编码免疫有关组织中的 hTIM-1。然而, Kim-1(肾脏损伤分子-1, TIM-1 的大鼠类似物)的表达在肾脏局部缺血时提高了。由于在表达分析中使用的 MTN 印迹是从尸体提取的 mRNA 制备的, 重新分析了肾脏中 TIM-1 表达的提高。在由正常肾脏活检组织获得的肾脏 RNA 中没有发现 TIM-1 过度表达。因此, 在肾脏和睾丸中观察到的高水平的 TIM-1 表达可能是由于组织损伤所致的 TIM-1 表达上调造成的。受伤的肾脏可能表达的蛋白质能将渗入的炎性细胞导向更具保护性的 Th2 应答而不是破坏性的 Th1 应答。

实施例 4

TIM 配体和抗体

抗体的产生。抗鼠 TIM-1 单克隆抗体的产生使我们可以检测不同组织、细胞系和小鼠品系中 TIM-1 在细胞表面的表达。将小鼠 TIM-1 的两个等位基因克隆入一载体以得到高的蛋白质表达(Invitrogen, pEF6-TOPO)。大鼠用 Tim1 cDNA 构建物免疫接种和强化以迅速产生抗细胞表面分子的抗体。这种用 cDNA 免疫接种的方法有利于产生抗细胞表面表位的 mAb, 因为 Tim1 cDNA 会被 APC 摄取, 而 APC 将以 TIM-1 作为细胞表面分子表达。为了产生和 BALB/c 和 HBA TIM-1 都能良好结合的 mAb(通过与 TIM-1 的保守性区域, 如 TIM-1 的免疫球蛋白域, 结合), 给每只大鼠注射 BALB/c 和 HBA Tim1 cDNA(pEF6-mTIMbalb 和 pEF6-mTIMhba)。

用 pEF6-mTIM-1-GFP 表达构建物稳定转染的 CHO 细胞加强接种 Tim1 cDNA 免疫的大鼠。以 FACS 挑拣出表达高水平小鼠 TIM-1 的 CHO 转染子, 并注射到大鼠中。用 pEF6-mTIM-1 表达构建物稳定转染的前 B 细胞系 300.19, 产生了另一种表达 mTIM-1 的细胞。用该细胞株以流式细胞法筛检融合后大鼠血清和杂交瘤有无抗 TIM-1 的抗体。与未免疫大鼠的对照血清相比, 大鼠产生了抗 TIM-1 高效价多克隆抗体, 这是通过将大鼠血清(以及次级 FITC-羊抗大鼠 Ig)与 pEF6-mTIM1 稳定转染

的 300.19 细胞结合而测定的。这种染色是对 TIM-1 特异的，因为未转染细胞或 TIM-2 转染细胞没有反应性。

取出大鼠脾脏并将脾细胞与骨髓瘤细胞系 (SP/2) 融合以产生杂交瘤。用 TIM-1 转染的 300.19 细胞系筛选杂交瘤上清以鉴定可产生单克隆抗 TIM-1 抗体的杂交瘤克隆。用 TIM-2 转染的细胞和 mTIM-3 转染的细胞或 TIM-3 融合蛋白证实 mAb 对 TIM-1 (而不是其它的 TIM 代表性) 的特异性。

抗体染色。从 BALB/c 和 HBA D011.10 脾细胞产生了 Th1 和 Th2 细胞系。TIM-1 mRNA 表达的 RT-PCR 证实，在标准极化条件下用抗原再刺激两轮后，TIM-1 在 Th2 细胞系中表达，但不在 Th1 系中表达。在 Th2 极化条件下用抗原/APC 刺激两轮后，用多克隆大鼠抗 TIM-1 抗血清染色 D011.10 T 细胞。这些 Th2 细胞表达了高水平的 TIM-1。

这些实验显示，TIM-1 在 Th2 系中的优先表达是用抗 Tim-1mAb 和 Northern 印迹法定量测定和证实的。BALB 和 HBA 的 D011.10 细胞与抗原和 APC 一起培养，并在标准极化条件下再刺激 1、2 和 3 周 (抗 IL-12 加 IL-4，或抗 IL-4 加 IL-12)。每周刺激后都用抗 TIM-1 mAb 染色细胞。在不同的时间点收获激活的细胞，测定在分化成 Th1 或 Th2 亚群的 T 细胞上 TIM-1 表达的动力学。为了确定 T 细胞活化后 Tim-1 表面表达是否有变化，我们还用 PMA 和离子霉素刺激一些细胞，比较每轮抗原刺激一周后，休眠 T 细胞和活化 T 细胞上 TIM-1 的表达。或者，每轮刺激后，采用定量 RT-PCR 或 northern 印迹法 (使用由 PMA 加离子霉素活化的 T 细胞所得的 mRNA) 来确定 mRNA 产生的相对水平。

TIM-1-Ig 融合蛋白 制备了 BALB/c TIM-1-mIgG2a，这是 TIM-1 多肽和小鼠免疫球蛋白 Fc 区的融合蛋白。基因工程发行其载体使其在小鼠 FcG2aFc 区中含有一突变从而使其与 Fc 受体的结合最小。利用 TIM-1 融合蛋白对 TIM-1 的功能作特性分析。希望 TIM-1 Ig 融合蛋白通过与 TIM-1 配体的结合能够阻抑 TIM-1 的功能并阻碍 TIM-1/TIM-1 配体相互反应。

将纯化的 D1muc-Fc 融合蛋白跑凝胶，这种融合蛋白含有富含半胱氨酸的免疫球蛋白域和融合于人 IgG1 (IgVmuc-hIg) 绞链区和 Fc 片段的 TIM-1 的 2/3 粘蛋白域。这种蛋白质在 CHO 细胞中表达，并用蛋白质 A 琼脂糖柱从 CHO 上清中纯化得到 IgVmuc-hIg 蛋白。纯化的 IgVmuc-hIg 融合蛋白中和了约 2 log 的 HAV 传染性。此外，用 IgVmuc-hIg 处理 HAV 在 HAV 颗粒的沉淀中造成了主要的变化，这表明 IgVmuc-hIg 诱导了病毒基因组脱壳，而仅仅含有 Ig 样域而没有粘蛋白功能域的融

合蛋白(IgV-hlg)则不能。这种 HAV 中和的系统和 IgVmuc-hIg 融合蛋白将用来分析 TIM-1/HA V 受体等位基因的功能。

根据抗 TIM-3 mAb 对巨噬细胞扩展和活化的体内效应,我们假定 TIM-3 配体将在髓谱系的细胞上表达。按照已有方法,用 1000U/ml IL-4 和 800U/ml GM-CSF 从血液单核细胞中制备了树突状细胞(DC)。将细胞置入添加有 IL-1 β (10ng/ml)、TNF- α (10ng/ml)、IL-6(1000U/ml)和 PGE₂(1 μ g/ml)的 IL-4(1000U/ml)和 GM-CSF(800U/ml)中 2 天以使 DC 成熟。尽管献血员不断变动,但成熟的 DC 为 hTIM-3-Ig 阳性染色,这提示成熟的 DC 表达了 TIM-3 IgV 功能域的配体。用 TIM-3-Ig 每周能染色骨髓衍生的内皮细胞,但不能染色 B 细胞系。

虽然 Tim1/huhavcr-1 的胞质内尾巴较短,但它含有在 小鼠、大鼠、人和猴之间高度保守的序列(RAEDNIYI),这一序列可以被磷酸化,并通过与其它的信号转导分子反应而产生信号。T 细胞中,可结合 RAEDNIYI 基序的最可能的候选分子是酪氨酸激酶 Itk。白细胞介素-2 可诱导的酪氨酸激酶、Itk,是 Tec 家族的非受体蛋白酪氨酸激酶,它参与导致 T 细胞活化的胞内信号活动。Tec 家族成员含有许多激酶家族共同的保守的 SH3、SH2 和催化功能域,但可以通过这一区域以外的独特序列将其区别。已知 Itk 可使磷脂酶 C- γ (PLC- γ)磷酸化,并引发涉及 T 细胞活化和辅助 T 细胞分化的信号传递级联反应。当缺乏 Itk 信号时,Th2 细胞不发育。这些结果说明,TIM-1/huhavcr-1 可以通过 Itk 产生信号,因此可以改变 CD4 T 细胞中细胞因子的产生。

实施例 5

TIM 敲除小鼠

敲除结构可用来产生 Tim1 缺的小鼠,使得我们能够分析缺乏 TIM-1 分子时免疫应答反应的发展。在另一个方法中,采用 TIM-1-Ig 融合蛋白或抗 TIM-1 单克隆抗体来阻抑 TIM1^{+/+}(野生型)小鼠中 TIM-1 的功能。敲除 Tim1 的小鼠和抗 TIM-1 mAb 方法是评价 TIM-1 在 T 细胞分化和哮喘发病机理中的作用的补充。

与 BALB/c 序列相比, Tim1 的 HBA 小鼠基因组序列中外显子 4 缺失,这是由于在外显子 4 上整合了 L1 逆转录病毒元件。如果截短一个外显子降低了 TIM-1 的功能,则因产生 Tim1 敲除小鼠而使 TIM-1 功能完全丧失,这会严重限制此类小鼠产生 Th2 应答反应的能力。用 cre-lox 技术和 BALB/c ES 细胞使 TIM-1 外显子 1 和 2 缺失可产生 TIM-1 KO 小鼠,这将消除 TIM-1 的细胞表面表达,由此证明 TIM-1 功

能在 Th2 细胞和 AHR 发展中的重要性。

为产生合适的靶构建物,用高密度过滤装置筛选 C57/B16 BAC 文库(RPCI-23),鉴定到含有 TIM 基因家族成员的特定的 BAC。这些 BAC 克隆用来构建 500kB 的重叠群和覆盖了大约 350kb 基因组区域(包含 Tim 基因家族)的物理图谱。选出一种含有完整 Tim1 基因的特殊 BAC, RPCI-23-222F8,以产生 TIM 靶向构建物。通过与这一区域 5' 和 3' 旁侧臂的同源重组,这种靶向构建物缺失了包括启动子区、信号外显子和 IgV 外显子(外显子 1 和 2)的一段 4kb 区域。这种靶向载体可用在 C57BI/6 或 BALB/c ES 细胞中,因为此靶向构建物的同源臂与 BALB/c 和 HBA(C57BI/6)的 DNA 是同源的。将这种构建物引入 ES 细胞,通过 PCR 和 Southern 印迹法筛选 ES 细胞有无靶的等位基因。

靶向载体, pLOX, 含有三个 loxP 位点, 并通过在靶的 ES 细胞中表达 cre 重组酶, 重组将产生三种形式的靶区域, 其中两个等位基因, A 和 B, 可用来产生 Tim1 KO 小鼠。将选出的 ES 细胞克隆引入胚胎以产生嵌合小鼠, 并饲养以进行敲除的种系传递。分析了尾巴 DNA 的 CD4 T 细胞中。先使用等位基因 A, 其中 cre/lox 重组使用了最外的 loxP 位点以除去 TK 和新霉素选择盒, 除了 TIM-1 外显子 1 和 2。去除 TIM-1 基因组靶区域的整个 neo 和 TK 盒防止与人工制品混淆, 这种人工制品可以引发同一家族其它基因附近的 neo 的二次转录。或者, 如果等位基因 A 产生了致死表型或混淆的表型, 就用靶的等位基因 B 产生小鼠, 等位基因 B 中 neo 和 TK 盒缺失, 且 TIM-1 区侧接有 lox-p 位点。使用这种条件性靶向方法, 应在 T 细胞特异性启动子控制下表达 cre-重组酶的小鼠中 T 细胞特异性缺失 Tim-1。

<110> J. J. 麦金太尔 (McIntire, Jennifer Jones)

D. T. 尤梅祖 (Umetsu, Dale T.)

R. 德克鲁耶夫 (Dekruyff, Rosemarie)

V. 库奇罗 (Kuchroo, Vijay)

G. J. 弗里曼 (Freeman, Gordon J.)

<120> T细胞调节基因及其使用方法

<130> STAN-235W0

<140> Unassigned

<141> 2002-07-01

<150> 60/302, 344

<151> 2001-06-29

<160> 36

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 305

<212> PRT

<213> 小家鼠 (M. musculus)

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)... (305)

<223> TIM-1 BALB/c等位基因

<400> 1

```

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

```

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

<210> 2
 <211> 918
 <212> DNA
 <213> 小家鼠(*Mus musculus*)

<400> 2
 atgaatcaga ttcaagtctt catttcaggc ctcatactgc ttctcccagg cactgtggat 60
 tcttatgtgg aagtaaaggg ggtagtgggt caccctgtca cacttccatg tacttactca 120
 acatatcgtg gaatcacacac gacatgttgg ggccgagggc aatgcccatc ttctgcttgt 180
 caaaatacac ttatttggac caatggacat cgtgtcacct atcagaagag cagtcggtac 240
 aacttaaagg ggcataattc agaaggagat gtgtccttga cgatagagaa ctctgttgag 300
 agtgacagtg gtctgtattg ttgtcgagtg gagattcctg gatggtttaa tgatcagaaa 360
 gtgacctttt cattgcaagt taaaccagag attccacac gtcctccaac aagaccaca 420
 actacaaggc ccacagctac aggaagaccc acgactattt caacaagatc cacacatgta 480
 ccaacatcaa tcagagtctc tacctccact cctccaacat ctacacacac atggactcac 540
 aaaccagaac ccactacatt ttgtcccat gagacaacag ctgaggtgac aggaatccca 600
 tcccatactc ctacagactg gaatggcact gtgacatcct caggagatac ctggagtaat 660
 cacactgaag caatccctcc agggaagccg cagaaaaacc ctactaaggg cttctatgtt 720
 ggcactctgca tcgcagccct gctgctactg ctcttgtga gcaccgtggc taccaccagg 780
 tacatactta tgaaaaggaa gtcagcatct ctaagcgtgg ttgccttcg tgctcttaag 840
 attgaagctt tgcagaacgc agcggttggt cattcccag ctgaagacaa catctacatt 900
 gttgaagata gaccttga 918

<210> 3
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)... (282)
 <223> TIM-1, C. D2 ES-HBA和DBA/2J等位基因

<400> 3
 Met Asn Gln Ile Gln Val Phe Ile Ser Gly Leu Ile Leu Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Val Asp Ser Tyr Val Glu Val Lys Gly Val Val Gly His Pro
 20 25 30
 Val Thr Leu Pro Cys Thr Tyr Ser Thr Tyr Arg Gly Ile Thr Thr Thr
 35 40 45
 Cys Trp Gly Arg Gly Gln Cys Pro Ser Ser Ala Cys Gln Asn Thr Leu
 50 55 60
 Ile Trp Thr Asn Gly His Arg Val Thr Tyr Gln Lys Ser Ser Arg Tyr
 65 70 75 80
 Asn Leu Lys Gly His Ile Ser Glu Gly Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu
 85 90 95
 Asn Ser Val Glu Ser Asp Ser Gly Leu Tyr Cys Cys Arg Val Glu Ile
 100 105 110
 Pro Gly Trp Phe Asn Asp Gln Lys Val Thr Phe Ser Leu Gln Val Lys
 115 120 125
 Pro Glu Ile Pro Thr Arg Pro Pro Arg Arg Pro Thr Thr Arg Pro
 130 135 140
 Thr Ala Thr Gly Arg Pro Thr Thr Ile Ser Thr Arg Ser Thr His Val
 145 150 155 160
 Pro Thr Ser Thr Arg Val Ser Thr Ser Thr Pro Pro Thr Ser Thr His
 165 170 175
 Thr Trp Thr His Lys Pro Asp Trp Asn Gly Thr Val Thr Ser Ser Gly
 180 185 190
 Asp Thr Trp Ser Asn His Thr Glu Ala Ile Pro Pro Gly Lys Pro Gln
 195 200 205
 Lys Asn Pro Thr Lys Gly Phe Tyr Val Gly Ile Cys Ile Ala Ala Leu
 210 215 220
 Leu Leu Leu Leu Leu Val Ser Thr Val Ala Ile Thr Arg Tyr Ile Leu
 225 230 235 240
 Met Lys Arg Lys Ser Ala Ser Leu Ser Val Val Ala Phe Arg Val Ser
 245 250 255
 Lys Ile Glu Ala Leu Gln Asn Ala Ala Val Val His Ser Arg Ala Glu
 260 265 270
 Asp Asn Ile Tyr Ile Val Glu Asp Arg Pro
 275 280

<210> 4
 <211> 849
 <212> DNA
 <213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 4
 atgaatcaga ttcaagtctt catttcaggc ctcatactgc ttctcccagg cgctgtggat 60
 tcttatgtgg aagtaaaggg ggtggtgggt caccctgtca cacttccatg tacttactca 120
 acatatcgtg gaatcacaac gacatgttgg ggccgagggc aatgcccatc ttctgcttgt 180
 caaaatacac ttatttggac caatggacat cgtgtcacct atcagaagag cagtcggtac 240
 aacttaaagg ggcataattc agaaggagat gtgtccttga cgatagagaa ctctgttgag 300
 agtgacagtg gtctgtattg ttgtcgagtg gagattcctg gatggtttaa tgatcagaaa 360
 gtgacctttt cattgcaagt taaaccagag attcccacac gtcctccaag aagaccacaca 420
 actacaaggc ccacagctac aggaagaccc acgactattt caacaagatc cacacatgta 480
 ccaacatcaa ccagagtctc tacctccact cctccaacat ctacacacac atggactcac 540
 aaaccagact ggaatggcac tgtgacatcc tcaggagata cctggagtaa tcacactgaa 600
 gcaatccctc caggaagcc gcagaaaaac cctactaagg gcttctatgt tggcatctgc 660
 atcgagcccc tgctgctact gtccttgtg agcacctggg ctatcaccag gtacatactt 720
 atgaaaagga agtcagcatc tctaagcgtg gttgccttcc gtgtctctaa gattgaagct 780
 ttgcagaacg cagcggttgt gcattcccga getgaagaca acatctacat tgttgaagat 840
 agaccttga 849

<210> 5
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)... (305)
 <223> TIM-2 BALB/c等位基因

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

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

<210> 6

<211> 958

<212> DNA

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 6

aagctacggc tctctcctaa ctggctcgta catgaatcag attcaagtct tcatttcagg 60
 cctcatactg cttctcccag gtgccgtgga gtctcataca gcagtgcagg ggctggcggg 120
 tcacctgtc acacttccat gtatttatc gacacacctt ggtggaatcg ttcctatgtg 180
 ttggggccta ggggaatgcc gccattctta ttgtatacgg tcacttatct ggaccaatgg 240
 atatacggtc acacatcaga ggaacagtcg ataccagcta aagggaata tttcagaagg 300
 aaatgtgtcc ttgaccatag agaacactgt tgtgggtgat ggtggtccct attgctgtgt 360
 agtggagata cctggagcgt tccattttgt ggactatatg ttggaagtta aaccagaaat 420
 ttccacgagt ccaccaaca ggcccacagc tacaggaaga ccacaacta tttcaacaag 480
 atccacacat gtaccaacat caaccagagt ctctacctct acttctccaa caccagcaca 540
 cacagagacc tacaaccag aggccactac attttatcca gatcagacta cagctgaggt 600
 gacagaaacc ttacctcta ctctgcaga ctggcataac actgtgacat cctcagatga 660
 cccttgggat gataacactg aagtaatccc tccacagaag ccacagaaaa acctgaataa 720
 gggcttctat gtggcatct ccatcgagc cctgctgata ttgatgcttc tgagcaccat 780
 ggttatcacc aggtacgtgg ttatgaaaag gaagtcagaa tctctgagct ttgttgcctt 840
 ccctatctct aagattggag cttcccccaa aaaagtggc gaacggacca gatgtgaaga 900
 ccaggtctac attattgaag acactcctta ccctgaagaa gagtccctagt gcctctac 958

<210> 7
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> 小家鼠(*Mus musculus*)

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)... (305)
 <223> TIM-2, C. D2 ES-HBA和DBA/2J等位基因

<400> 7
 Met Asn Gln Ile Gln Val Phe Ile Ser Gly Leu Ile Leu Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Val Glu Ser His Thr Ala Val Gln Gly Leu Ala Gly His Pro
 20 25 30
 Val Thr Leu Pro Cys Ile Tyr Ser Thr His Leu Gly Gly Ile Val Pro
 35 40 45
 Met Cys Trp Gly Leu Gly Glu Cys Arg His Ser Tyr Cys Ile Arg Ser
 50 55 60
 Leu Ile Trp Thr Asn Gly Tyr Thr Val Thr His Gln Arg Asn Ser Arg
 65 70 75 80
 Tyr Gln Leu Lys Gly Asn Ile Ser Glu Gly Asn Val Ser Leu Thr Ile
 85 90 95
 Glu Asn Thr Val Val Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Cys Cys Val Val Glu
 100 105 110
 Ile Pro Gly Ala Phe His Phe Val Asp Tyr Met Leu Glu Val Lys Pro
 115 120 125
 Glu Ile Ser Thr Ser Pro Pro Thr Arg Pro Thr Ala Thr Gly Arg Pro
 130 135 140
 Thr Thr Ile Ser Thr Arg Ser Thr His Val Pro Thr Ser Thr Arg Val
 145 150 155 160
 Ser Thr Ser Thr Ser Pro Thr Pro Ala His Thr Glu Thr Tyr Lys Pro
 165 170 175
 Glu Ala Thr Thr Phe Tyr Pro Asp Gln Thr Thr Ala Glu Val Thr Glu
 180 185 190
 Thr Leu Pro Ser Thr Pro Ala Asp Trp His Asn Thr Val Thr Ser Ser
 195 200 205
 Asp Asp Pro Trp Asp Asp Asn Thr Glu Val Ile Pro Pro Gln Lys Pro
 210 215 220
 Gln Lys Asn Leu Asn Lys Gly Phe Tyr Val Gly Ile Ser Ile Ala Ala
 225 230 235 240
 Leu Leu Ile Leu Met Leu Leu Ser Thr Met Val Ile Thr Arg Tyr Val
 245 250 255
 Val Met Lys Arg Lys Ser Glu Ser Leu Ser Phe Val Ala Phe Pro Ile
 260 265 270
 Ser Lys Ile Gly Ala Ser Pro Lys Lys Val Val Glu Arg Thr Arg Cys
 275 280 285
 Glu Asp Gln Val Tyr Ile Ile Glu Asp Thr Pro Tyr Pro Glu Glu Glu
 290 295 300

Ser
305

<210> 8
<211> 958
<212> DNA
<213> 小家鼠(*Mus musculus*)

<400> 8
aagctacggc tctctcctaa ctggctgtac catgaatcag attcaagtct tcatttcagg 60
cctcatactg cttctcccag gtgccgtgga gtctcataca gcagtgcagg ggctggcggg 120
tcacctgtc acacttccat gtattttattc gacacacctt ggtggaatcg ttcctatgtg 180
ttggggccta ggggaatgcc gccattctta ttgtatacgg tcacttatct ggaccaatgg 240
atatacggtc acacatcaga ggaacagtcg ataccagcta aaggggaata tttcagaagg 300
aaatgtgtcc ttgaccatag agaacactgt tgtgggtgat ggtggtcctt attgctgtgt 360
agtggagata cctggagcgt tccattttgt ggactatatg ttggaagtta aaccagaaat 420
ttccacgagt ccaccaacaa ggcccacagc tacaggaaga cccacaacta tttcaacaag 480
atccacacat gtaccaacat caaccagagt ctctacctct acttctccaa caccagcaca 540
cacagagacc tacaaccagc agggccactac attttatcca gatcagacta cagctgaggt 600
gacagaaacc ttaccctcta ctctgcaga ctggcataac actgtgacat cctcagatga 660
cccttgggat gataacactg aagtaatccc tccacagaag ccacagaaaa acctgaataa 720
gggcttctat gttggcatct ccattgcagc cctgctgata ttgatgcttc tgagcaccat 780
ggttatcacc aggtacgtgg ttatgaaaag gaagtcagaa tctctgagct tcgttgctt 840
ccctatctct aagattggag cttcccccaa aaaagtggc gaacggacca gatgtgaaga 900
ccaggtctac attattgaag acactcctta ccccgaagaa gagtcctagt gcctctac 958

<210> 9
<211> 281
<212> PRT
<213> 小家鼠(*Mus musculus*)

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)... (281)
<223> TIM-3 BALB/c等位基因

<400> 9
Met Phe Ser Gly Leu Thr Leu Asn Cys Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu
1 5 10 15
Leu Leu Ala Arg Ser Leu Glu Asp Gly Tyr Lys Val Glu Val Gly Lys
20 25 30
Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Ser Tyr Thr Leu Pro Thr Ser Gly Thr Leu
35 40 45
Val Pro Met Cys Trp Gly Lys Gly Phe Cys Pro Trp Ser Gln Cys Thr
50 55 60
Asn Glu Leu Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asn Val Thr Tyr Gln Lys Ser
65 70 75 80
Ser Arg Tyr Gln Leu Lys Gly Asp Leu Asn Lys Gly Asp Val Ser Leu

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

<210> 10

<211> 2725

<212> DNA

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 10

```

ttttaaccga ggagctaaag ctatccctac acagagctgt ccttggattt cccctgccaa 60
gtactcatgt ttccaggtct taccctcaac tgtgtcctgc tgctgtgca actactactt 120
gcaaggtcat tggaagatgg ttataagggt gaggttggtt aaaatgccta tctgccctgc 180
agttacactc tacctacatc tgggacactt gtgcctatgt gctggggcaa gggattctgt 240
ccttggtcac agtgtacca tgagttgctc agaactgatg aaagaaatgt gacatatcag 300
aaatccagca gataccagct aaagggcgat ctcaacaaag gagatgtgtc tctgatcata 360
aagaatgtga ctctggatga ccatgggacc tactgtctgca ggatacagtt ccttgggtctt 420
atgaatgata aaaaattaga actgaaatta gacatcaaag cagccaaggt cactccagct 480
cagactgccc atggggactc tactacagct tctccaagaa ccctaaccac ggagagaaat 540
ggttcagaga cacagacact ggtgaccctc cataataaca atggaacaaa aattccaca 600
tggtctgatg aaattaagga ctctggagaa acgatcagaa ctgctatcca cattggagtg 660
ggagtctctg ctgggttgac cctggcactt atcatgtgtg tcttaatcct taaatgggtat 720
tcctgtaaga aaaagaagtt atcgagtttg agccttatta cactggccaa cttgcctcca 780
ggaggggttg caaatgcagg agcagtcagg attcgctctg aggaaaatat ctacaccatc 840
gaggagaacg tatatgaagt ggagaattca aatgagtact actgctacgt caacagccag 900
cagccatcct gaccgcctct ggactgccac ttttaaaggc tcgccttcatt ttctgacttt 960

```

```

ggtatttccc tttttgaaaa ctatgtgata tgtcacttgg caacctcatt ggaggttctg 1020
accacagcca ctgagaaaaag agttccagtt tcttggggat aattaactca caaggggatt 1080
cgactgtaac tcatgctaca ttgaaatgct ccattttatc cctgagtttc agggatcgga 1140
tctcccactc cagagacttc aatcatgcgt gttgaagctc actcgtgctt tcatacatta 1200
ggaatggtta gtgtgatgtc tttgagacat agaggtttgt ggtatatccg caaagctcct 1260
gaacaggtag ggggaataaaa gggctaagat aggaagggtgc ggttctttgt tgatgttgaa 1320
aatctaaaga agttggtagc ttttctagag atttctgacc ttgaaagatt aagaaaaagc 1380
caggtaggcat atgcttaaca cgatataact tgggaacctt aggcaggagg gtgataagtt 1440
caaggtcagc cagggtatg ctggttaagac tgtctcaaaa tccaaagacg aaaataaaca 1500
tagagacagc agggagctgg agatgaggct cggacagtga ggtgcatitt gtacaagcac 1560
gaggaatcta tatttgatcg tagacccac atgaaaaagc taggcctggt agagcatgct 1620
tgtagactca agagatggag aggtaaaggc acaacagatc cccggggctt gcgtgcagtc 1680
agcttagcct aggtgtgtag ttccaagtcc acaagagtcc ctgtctcaaa gtaagatgga 1740
ctgagtatct ggcaatgtc catgggggtt gtcctctgct ctcagaagag acatgcacat 1800
gaacctgcac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acacatgaaa 1860
tgaaggttct ctctgtgcct gctacctctc tataacatgt atctctacag gactctctc 1920
tgctctggtt aagacatgag tgggagcatg gcagagcagt ccagtaatta attccagcac 1980
tcagaaggct ggagcagaag cgtggagagt tcaggagcac tgtgccaac actgccagac 2040
tcttcttaca caagaaaaag gttacccgca agcagcctgc tgtctgtaaa aggaaaccct 2100
gcgaaaggca aactttgact gttgtgtgct caaggggaac tgactcagac aacttctcca 2160
ttcttgagg aaactggagc tgtttctgac agaagaacaa ccggtgactg ggacatacga 2220
aggcagagct cttgcagcaa tctatatagt cagcaaaata ttctttggga ggacagtcgt 2280
caccaaattg atttccaagc cgggtggacct cagtttcatc tggcttacag ctgcctgccc 2340
agtgcccttg atctgtgctg gctcccatct ataacagaat caaattaaat agaccccgag 2400
tgaaaatatt aagtgagcag aaaggtagct ttgttcaaag attttttgc attggggagc 2460
aactgtgtac atcagaggac atctgttagt gaggacacca aaacctgtgg taccgttttt 2520
tcatgtatga attttgtgt ttaggttgct tctagctagc tgtggaggtc ctggctttct 2580
taggtgggta tggaaggag accatctaac aaaatccatt agagataaca gctctcatgc 2640
agaaggga aaactaatca aatgttttaa agtaataaaa ctgtactggc aaagtacttt 2700
gagcatattt aaaaaaaaaa aaaaa 2725

```

<210> 11

<211> 281

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)... (281)

<223> TIM-3, C. D2 ES-HBA和DBA/2J等位基因

<400> 11

```

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

```

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

<210> 12

<211> 862

<212> DNA

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 12

```

ccctcccaa gtactcatgt tttcaggtct taccctcaac tgtgtcctgc tgctgctgca 60
actactactt gcaaggtcat tggaaaatgc ttatgtgttt gaggttggta agaatgccta 120
tctgccctgc agttacactc tatctacacc tggggcactt gtgcctatgt gctggggcaa 180
gggattctgt ccttggtcac agtgtaccaa cgagttgctc agaactgatg aaagaaatgt 240
gacatatcag aaatccagca gataccagct aaagggcgat ctcaacaaag gagacgtgtc 300
tctgatcata aagaatgtga ctctggatga ccatgggacc tactgtctgca ggatacagtt 360
ccctggtctt atgaatgata aaaaattaga actgaaatta gacatcaaag cagccaaggt 420
cactccagct cagactgccc atggggactc tactacagct tctccaagaa ccctaaccac 480
ggagagaaat ggttcagaga cacagacact ggtgaccctc cataataaca atggaacaaa 540
aatttcaca tgggctgatg aaattaagga ctctggagaa acgatcagaa ctgctatcca 600
cattggagtg ggagtctctg ctgggttgac cctggcactt atcattggtg tcttaatcct 660
taaatggtat tcctgtaaga aaaagaagtt atcgagtttg agccttatta cactggccaa 720

```

cttgctcca ggagggttg caaatgcagg agcagtcagg attcgctctg aggaaaatat 780
 ctacaccatc gaggagaacg tatatgaagt ggagaattca aatgagtact actgctacgt 840
 caacagccag cagccatcct ga 862

<210> 13

<211> 345

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)... (345)

<223> TIM-4, BALB/c等位基因

<400> 13

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

Ser His Gln Ile Asn Ser Arg Gln Thr Ile Leu Ile Ile Ala Cys Cys
 275 280 285
 Val Gly Phe Val Leu Met Val Leu Leu Phe Leu Ala Phe Leu Leu Arg
 290 295 300
 Gly Lys Val Thr Gly Ala Asn Cys Leu Gln Arg His Lys Arg Pro Asp
 305 310 315 320
 Asn Thr Glu Val Ser Asp Ser Phe Leu Asn Asp Ile Ser His Gly Arg
 325 330 335
 Asp Asp Glu Asp Gly Ile Phe Thr Leu
 340 345

<210> 14

<211> 1032

<212> DNA

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 14

```
atgtccaagg ggcttctcct cctctggctg gtgacggagc tctggtggct ttatctgaca 60
ccagctgcct cagaggatac aataataggg tttttgggcc agccgggtgac tttgccttgt 120
cattacctct cgtgggtcca gagccgcaac agtatgtgct ggggcaaagg ttcattgtccc 180
aattccaagt gcaatgcaga gcttctccgt acagatggaa caagaatcat ctccaggaag 240
tcaacaaaat atacactttt ggggaaggtc cagtttggtg aagtgtcctt gaccatctca 300
aacaccaatc gaggtgacag tggggtgtac tgctgccgta tagagggtgc tggctgggtc 360
aatgatgtca agaagaatgt gcgcttgagg ctgaggagag ccacaacaac caaaaaacca 420
acaacaacca cccggccaac caccaccctt tatgtaacca ccaccacccc agagctgctt 480
ccaacaacag tcatgaccac atctgttctt ccaaccacca caccacccc gacactagcc 540
accactgcct tcagtacagc agtgaccacg tgcccctcaa caacacctgg ctctttctca 600
caagaaacca caaaagggtc cgccatcact acagaatcag aaactctgcc tgcattcaat 660
cactctcaaa gaagcatgat gaccatatct acagacatag ccgtactcag gccacaggc 720
tctaaccctg ggattctccc atccacttca cagctgacga cacagaaaac aacattaaca 780
acaagtgagt ctttgcagaa gacaactaaa tcacatcaga tcaacagcag acagaccatc 840
ttgatcattg cctgctgtgt gggatttggt ctaatgggtg tattgtttct ggcttttctc 900
cttcgaggga aagtcacagg agccaactgt ttgcagagac acaagaggcc agacaacact 960
gaagatagtg acagcgtcct caatgacatg tcacacggga gggatgatga agacgggatc 1020
ttcactctct ga 1032
```

<210> 15

<211> 345

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)... (345)

<223> C.D2 ES-HBA和DBA/2J等位基因

<400> 15

Met Ser Lys Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Val Met Glu Leu Trp Trp

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

<210> 16

<211> 1032

<212> DNA

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 16

```

atgtccaagg ggcttctcct cctctggctg gtgatggagc tctgggtgct ttatctgaca 60
ccagctgcct cagaggatac aataataggg tttttgggcc agccggtgac ttgccttgt 120
cattacctct cgtgggtcca gagccgcaac agtatgtgct ggggcaaagg ttcatgtccc 180
aattccaagt gcaatgcaga gcttctccgt acagatggaa caagaatcat ctccaggaag 240
tcaacaaaat atacactttt ggggaaggtc cagtttggtg aagtgtcctt gaccatctca 300
aacaccaatc gaggtgacag tggggtgtac tgctgccgta tagagggtgcc tggctggttc 360
aatgatgtca agaagaatgt gcgcttgag ctgaggagag ccacaacaac caaaaaacca 420
acaacaacca cccggccaac caccaccct tatgtaacca ccaccacccc agagctgctt 480
ccaacaacag tcatgaccac atctgttctt ccaaccacca caccaccca gacactagcc 540
accactgcct tcagtacagc agtgaccagc tgcccctcaa caacacctgg ctcttctca 600
caagaaacca caaaagggtc gccttctact acagaatcag aaactctgcc tgcattcaat 660
cactctcaaa gaagcatgat gaccatatct acagacatag ccgtactcag gccacaggc 720
tctaaccctg ggattctccc atccacttca cagctgacga cacagaaaac aacattaaca 780
acaagtgagt ctttgcagaa gacaactaaa tcacatcaga tcaacagcag acagaccatc 840
ttgatcattg cctgctgtgt gggatttgtg ctaatggtgt tattgtttct ggcgtttctc 900
cttcgaggga aagtcacagg agccaactgt ttgcagagac acaagaggcc agacaacact 960
gaagatagtg acagcgtcct caatgacatg tcacacggga gggatgatga agacgggatc 1020
ttcactctct ga

```

1032

<210> 17

<211> 359

<212> PRT

<213> 智人(H. sapiens)

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)... (360)

<223> TIM-1等位基因 1

<400> 17

```

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

```

```

      130              135              140
Arg Thr Ser Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr
145              150              155              160
Val Pro Thr Thr Met Ser Ile Pro Thr Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr
      165              170              175
Met Thr Val Ser Thr Thr Thr Ser Val Pro Thr Thr Thr Ser Ile Pro
      180              185              190
Thr Thr Thr Ser Val Pro Val Thr Thr Thr Val Ser Thr Phe Val Pro
      195              200              205
Pro Met Pro Leu Pro Arg Gln Asn His Glu Pro Val Ala Thr Ser Pro
      210              215              220
Ser Ser Pro Gln Pro Ala Glu Thr His Pro Thr Thr Leu Gln Gly Ala
225              230              235              240
Ile Arg Arg Glu Pro Thr Ser Ser Pro Leu Tyr Ser Tyr Thr Thr Asp
      245              250              255
Gly Asn Asp Thr Val Thr Glu Ser Ser Asp Gly Leu Trp Asn Asn Asn
      260              265              270
Gln Thr Gln Leu Phe Leu Glu His Ser Leu Leu Thr Ala Asn Thr Thr
      275              280              285
Lys Gly Ile Tyr Ala Gly Val Cys Ile Ser Val Leu Val Leu Leu Ala
      290              295              300
Leu Leu Gly Val Ile Ile Ala Lys Lys Tyr Phe Phe Lys Lys Glu Val
305              310              315              320
Gln Gln Leu Ser Val Ser Phe Ser Ser Leu Gln Ile Lys Ala Leu Gln
      325              330              335
Asn Ala Val Glu Lys Glu Val Gln Ala Glu Asp Asn Ile Tyr Ile Glu
      340              345              350
Asn Ser Leu Tyr Ala Thr Asp
      355

```

<210> 18

<211> 1080

<212> DNA

<213> 智人(H. sapiens)

<400> 18

```

atgcacccctc aagtggatcat ctttaagcctc atcctacatc tggcagattc tgtagctggt 60
tctgtaaagg ttggtggaga ggcaggtcca tctgtcacac taccctgcca ctacagtgga 120
gctgtcacat caatgtgctg gaatagaggc tcatgttctc tattcacatg ccaaaatggc 180
attgtctgga ccaatggaac ccacgtcacc tatcggaagg acacacgcta taagctattg 240
ggggaccttt caagaaggga tgtctctttg accatagaaa atacagctgt gtctgacagt 300
ggcgtatatt gttgccgtgt tgagcaccgt ggggtggttca atgacatgaa aatcacgta 360
tcattggaga ttgtgccacc caaggtcacg actactccaa ttgtcacaac tgttccaacc 420
gtcacgactg ttcgaacgag caccactgtt ccaacgacaa cgactgttcc aacgacaact 480
gttccaacaa caatgagcat tccaacgaca acgactgttc cgacgacaat gactgtttca 540
acgacaacga gcgttccaac gacaacgagc attccaacaa caacaagtgt tccagtga 600
acaacggtct ctacctttgt tcttccaatg cctttgccca ggcagaacca tgaaccagta 660
gccacttcac catcttcacc tcagccagca gaaacccacc ctacgacact gcagggagca 720

```

ataaggagag aaccaccag ctcaccattg tactcttaca caacagatgg gaatgacacc 780
 gtgacagagt cttcagatgg cctttggaat aacaatcaaa ctcaactgtt cctagaacat 840
 agtctactga cggccaatac cactaaagga atctatgctg gagtctgtat ttctgtcttg 900
 gtgcttcttg ctcttttggg tgtcatcatt gccaaaaagt atttcttcaa aaaggaggtt 960
 caacaactaa gtgtttcatt tagcagcctt caaattaaag ctttgcaaaa tgcagttgaa 1020
 aaggaagtcc aagcagaaga caatatctac attgagaata gtctttatgc cacggactaa 1080

<210> 19

<211> 359

<212> PRT

<213> 智人(H. sapiens)

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)... (359)

<223> TIM-1, 等位基因 2

<400> 19

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

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)... (365)

<223> TIM-1, 等位基因 3

<400> 21

```

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

```

340 345 350
 Asp Asn Ile Tyr Ile Glu Asn Ser Leu Tyr Ala Thr Asp
 355 360 365

<210> 22
 <211> 1098
 <212> DNA
 <213> 智人(H. sapiens)

<400> 22
 atgcacctc aagtggtcat ctttagcctc atcctacatc tggcagattc tgtagctggt 60
 tctgtaaagg ttggtggaga ggcaggtcca tctgtcacac taccctgcca ctacagtga 120
 gctgtcacat caatgtgctg gaatagaggc tcatgttctc tattcacatg ccaaaatggc 180
 attgtctgga ccaatggaac ccacgtcacc tatcggaagg acacacgcta taagctattg 240
 ggggaccttt caagaaggga tgtctctttg accatagaaa atacagctgt gtctgacagt 300
 ggcgtatatt gttgccgtgt tgagcaccgt ggggtggttca atgacatgaa aatcaccgta 360
 tcattggaga ttgtgccacc caaggtcacg actactccaa ttgtcacaac tgttccaacc 420
 gtcacgactg ttcgaacgag caccactgtt ccaacgacaa cgactgttcc aatgacaacg 480
 actgttccaa cgacaactgt tccaacaaca atgagcattc caacgacaac gactgttccg 540
 acgacaatga ctgtttcaac gacaacgagc gttccaacga caacgagcat tccaacaaca 600
 acaagtgttc cagtgacaac arcggtctct acctttgttc ctccaatgcc ttgcccagg 660
 cagaaccatg aaccagtagc cacttcacca tcttcacctc agccagcaga aaccaccct 720
 acgacactgc agggagcaat aaggagagaa cccaccagct caccattgta ctcttacaca 780
 acagatggga atgacaccgt gacagagtct tcagatggcc tttggaataa caatcaaact 840
 caactgttcc tagaacatag tctactgacg gccaatacca ctaaaggaat ctatgctgga 900
 gtctgtatatt ctgtcttggg gcttcttgct cttttgggtg tcatcattgc caaaaagtat 960
 ttcttcaaaa aggaggttca acaactaagt gtttcattta gcagccttca aattaaagct 1020
 ttgcaaatg cagttgaaaa ggaagtccaa gcagaagaca atatctacat tgagaatagt 1080
 ctttatgcca cggactaa 1098

<210> 23
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> 智人(H. sapiens)

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)... (359)
 <223> TIM-1, 等位基因 4

<400> 23
 Met His Pro Gln Val Val Ile Leu Ser Leu Ile Leu His Leu Ala Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Ala Gly Ser Val Lys Val Gly Gly Glu Ala Gly Pro Ser Val
 20 25 30
 Thr Leu Pro Cys His Tyr Ser Gly Ala Val Thr Ser Met Cys Trp Asn
 35 40 45
 Arg Gly Ser Cys Ser Leu Phe Thr Cys Gln Asn Gly Ile Val Trp Thr

```

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

```

<210> 24

<211> 1079

<212> DNA

<213> 智人(H. sapiens)

<400> 24

```

atgcatacctc aagtgggtcat cttaagcctc atcctacatc tggcagattc tgtagctggt 60
tctgtaaagg ttggtggaga ggcaggtcca tctgtcacac taccctgccca ctacagtgga 120

```

```

gctgtcacat caatgtgctg gaatagaggc tcatgttctc tattcacatg ccaaaatggc 180
attgtctgga ccaatggaac ccacgtcacc tatcggaagg acacacgcta taagctattg 240
ggggaccttt caagaaggga tgtctctttg accatagaaa atacagctgt gtctgacagt 300
ggcgtatatt gttgccgtgt tgagcacctg ggggtggttca atgacatgaa aatcacctga 360
tcattggaga ttgtgccacc caaggtcacg actactccaa ttgtcacaac tgttccaacc 420
gtcacgactg ttcgaacgag caccactgtt ccaacgacaa cgactgttcc aacgacaact 480
gttccaacaa caatgagcat tccaacgaca acggactgtt ccgacgacaa tgactgtttc 540
aacgacaacg agcgttccaa cgacaacgag cattccaaca acaacaagtg ttccagtgc 600
aacatgtctc tacctttgtt cctccaatgc ctttggccag gcagaacct gaaccagtag 660
ccacttcacc atcttcacct cagccagcag aaaccaccc tacgacactg caggagcaa 720
taaggagaga acccaccagc tcaccattgt actcttacac aacagatggg aatgacaccg 780
tgacagagtc ttcagatggc ctttgarta acaatcaaac tcaactgttc ctagaacata 840
gtctactgac ggccaatacc actaaaggaa tctatgctgg agtctgtatt tctgtcttgg 900
tgcttcttgc tcttttgggt gtcattcttg ccaaaaagta tttcttcaaa aaggaggttc 960
aacaactaag tgtttcattt agcagccttc aaattaaagc tttgcaaat gcagttgaaa 1020
aggaagtcca agcagaagac aatatctaca ttgagaatag tctttatgcc acggactaa 1079

```

<210> 25

<211> 364

<212> PRT

<213> 智人(H. sapiens)

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)... (364)

<223> TIM-1等位基因 5

<400> 25

```

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

```

<210> 26
<211> 1095
<212> DNA
<213> 智人(*H. sapiens*)

71

```

ttcaaaaagg aggttcaaca actaagtgtt tcatttagca gccttcaaat taaagctttg 1020
caaaatgcag ttgaaaagga agtccaagca gaagacaata tctacattga gaatagtctt 1080
tatgccacgg actaa 1095

```

<210> 27
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> 智人(H. sapiens)

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)... (364)
 <223> TIM-1, 等位基因 6

<400> 27
 Met His Pro Gln Val Val Ile Leu Ser Leu Ile Leu His Leu Ala Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Ala Gly Ser Val Lys Val Gly Gly Glu Ala Gly Pro Ser Val
 20 25 30
 Thr Leu Pro Cys His Tyr Ser Gly Ala Val Thr Ser Met Cys Trp Asn
 35 40 45
 Arg Gly Ser Cys Ser Leu Phe Thr Cys Gln Asn Gly Ile Val Trp Thr
 50 55 60
 Asn Gly Thr His Val Thr Tyr Arg Lys Asp Thr Arg Tyr Lys Leu Leu
 65 70 75 80
 Gly Asp Leu Ser Arg Arg Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Thr Ala
 85 90 95
 Val Ser Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys Arg Val Glu His Arg Gly Trp
 100 105 110
 Phe Asn Asp Met Lys Ile Thr Val Ser Leu Gly Ile Val Pro Pro Lys
 115 120 125
 Val Thr Thr Thr Pro Ile Val Thr Thr Val Pro Thr Val Thr Thr Val
 130 135 140
 Arg Thr Ser Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr Thr Val Pro Met Thr Thr
 145 150 155 160
 Thr Val Pro Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr Met Ser Ile Pro Thr Thr
 165 170 175
 Thr Thr Val Pro Thr Thr Met Thr Val Ser Thr Thr Thr Ser Val Pro
 180 185 190
 Thr Thr Thr Ser Ile Pro Thr Thr Ser Val Pro Val Thr Thr Thr Val
 195 200 205
 Ser Thr Phe Val Pro Pro Met Pro Leu Pro Arg Gln Asn His Glu Pro
 210 215 220
 Val Ala Thr Ser Pro Ser Ser Pro Gln Pro Ala Glu Thr His Pro Thr
 225 230 235 240
 Thr Leu Gln Gly Ala Ile Arg Arg Glu Pro Thr Ser Ser Pro Leu Tyr
 245 250 255
 Ser Tyr Thr Thr Asp Gly Asp Asp Thr Val Thr Glu Ser Ser Asp Gly
 260 265 270

Leu Trp Asn Asn Asn Gln Thr Gln Leu Phe Leu Glu His Ser Leu Leu
 275 280 285
 Thr Ala Asn Thr Thr Lys Gly Ile Tyr Ala Gly Val Cys Ile Ser Val
 290 295 300
 Leu Val Leu Leu Ala Leu Leu Gly Val Ile Ile Ala Lys Lys Tyr Phe
 305 310 315 320
 Phe Lys Lys Glu Val Gln Gln Leu Ser Val Ser Phe Ser Ser Leu Gln
 325 330 335
 Ile Lys Ala Leu Gln Asn Ala Val Glu Lys Glu Val Gln Ala Glu Asp
 340 345 350
 Asn Ile Tyr Ile Glu Asn Ser Leu Tyr Ala Thr Asp
 355 360

<210> 28
 <211> 1099
 <212> DNA
 <213> 智人(H. sapiens)

<400> 28
 atgcacccctc aagtgggtcat ctttaagcctc atcctacatc tggcagattc tgtagctggt 60
 tctgtaaagg ttggtggaga ggcaggtcca tctgtcacac taccctgcca ctacagtgga 120
 gctgtcacat caatgtgctg gaatagaggc tcatgttctc tattcacatg ccaaaatggc 180
 attgtctgga ccaatggaac ccacgtcacc tatcggaagg acacacgcta taagctattg 240
 ggggaccttt caagaaggga tgtctctttg accatagaaa atacagctgt gtctgacagt 300
 ggcgtatatt gttgccgtgt tgagcaccgt ggggtggttca atgacatgaa aatcacctga 360
 tcattggaga ttgtgccacc caaggtcacg actactccaa ttgtcacaac tgttccaacc 420
 gtcacgactg ttogaacgag caccactgtt ccaacgacaa cgactgttcc aatgacaacc 480
 gactgttcca acgacaactg ttccaacaac aatgagcatt ccaacgacaa cgactgttcc 540
 gacgacaatg actgtttcaa cgacaacgag cgttccaacg acaacgagca ttccaacaac 600
 aacaagtgtt ccagtgacaa caacggtctc tacctttgtt cctccaatgc ctttgcccag 660
 gcagaacat gaaccagtag ccacttcacc atcttcacct cagccagcag aaacccaccc 720
 tacgacactg caggaggcaa taaggagaga acccaccagc tcaccattgt actcttacac 780
 aacagatggg gatgacaccg tgacagagtc ttcagatggc ctttggaata acaatcaaac 840
 tcaactgttc ctagaacata gtctactgac ggccaatacc actaaaggaa tctatgctgg 900
 agtctgtatt tctgtcttgg tgcttcttgc tcttttgggt gtcattcattg ccaaaaagta 960
 tttcttcaaa aaggaggttc aacaactaag tgtttcattt agcagccttc aaattaaagc 1020
 ttgcaaaat gcagttgaaa aggaagtcca agcagaagac aatatctaca ttgagaatag 1080
 tctttatgcc acggactaa 1099

<210> 29
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> 智人(H. sapiens)

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)... (301)
 <223> TIM-3, 等位基因 1

<400> 29

```

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

```

<210> 30

<211> 1116

<212> DNA

<213> 智人(H. sapiens)

<400> 30

```

ggagagttaa aactgtgcct aacagaggtg tcctctgact tttcttctgc aagctccatg 60

```

```

ttttcacatc ttccctttga ctgtgtcctg ctgctgctgc tgctactact tacaaggtcc 120
tcagaagtgg aatacagagc ggaggtcggt cagaatgcct atctgccctg cttctacacc 180
ccagccgccc caggggaacct cgtgcccgtc tgctggggca aaggagcctg tcctgtgttt 240
gaatgtggca acgtgggtgct caggactgat gaaagggatg tgaattattg gacatccaga 300
tactggctaa atggggattt ccgcaaagga gatgtgtccc tgaccataga gaatgtgact 360
ctagcagaca gtgggatcta ctgtgccgg atccaaatcc caggcataat gaatgatgaa 420
aaattttaacc tgaagttggt catcaaacca gccaaagtca ccctgcacc gactctgcag 480
agagacttca ctgcagcctt tccaaggatg cttaccacca ggggacatgg cccagcagag 540
acacagacac tggggagcct ccctgatata aatctaacac aaatatccac attggccaat 600
gagttacggg actctagatt ggccaatgac ttacgggact ctggagcaac catcagaata 660
ggcatctaca tcggagcagg gatctgtgct gggctggctc tggctcttat cttcggcgct 720
ttaattttca aatggtattc tcatagcaaa gagaagatac agaatttaag cctcatctct 780
ttggccaacc tccctccctc aggattggca aatgcagtag cagagggaat tcgctcagaa 840
gaaaacatct atacattga agagaacgta tatgaagtgg aggagcccaa tgagtattat 900
tgctatgtca gcagcaggca gcaacctca caacctttgg gttgtcgctt tgcaatgcca 960
tagatccaac caccttattt ttgagcttgg tgttttgtct ttttcagaaa ctatgagctg 1020
tgtcacctga ctggttttgg aggtttctgtc cactgctatg gacgagagtt ttccatttt 1080
cagaagataa tgactcacat gggaattgaa ctggga 1116

```

<210> 31

<211> 301

<212> PRT

<213> 智人(H. sapiens)

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)... (301)

<223> TIM-3, 等位基因 2

<400> 31

```

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

```

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

<210> 32

<211> 1116

<212> DNA

<213> 智人(H. sapiens)

<400> 32

```

ggagagttaa aactgtgcct aacagaggtg tcctctgact tttcttctgc aagctccatg 60
ttttcacatc ttccctttga ctgtgtcctg ctgctgctgc tgctactact tacaagggtcc 120
tcagaagtgg aatacagagc ggaggtcggc cagaatgcct atctgccctg cttctacacc 180
ccagccgccc cagggaaacct cgtgcccgtc tgcctggggca aaggagcctg tcctgtgttt 240
gaatgtggca acgtggtgct caggactgat gaaagggatg tgaattattg gacatccaga 300
tactggctaa atggggattt ccgcaaagga gatgtgtccc tgaccataga gaatgtgact 360
ctagcagaca gtgggatcta ctgctgccgg atccaaatcc caggcataat gaatgatgaa 420
aaatttaacc tgaagtttgt catcaaacca gccaaagtca cccctgcacc gactcggcag 480
agagacttca ctgcagcctt tccaaggatg cttaccacca ggggacatgg cccagcagag 540
acacagacac tggggagcct ccctgatata aatctaacac aaatatccac attggccaat 600
gagttacggg actctagatt ggccaatgac ttacgggact ctggagcaac catcagaata 660
ggcatctaca tcggagcagg gatctgtgct gggctggctc tggctcttat cttcggcgct 720
ttaattttca aatggtattc tcatagcaaa gagaagatac agaatttaag cctcatctct 780
ttggccaacc tccctcectc aggattggca aatgcagtag cagaggggaat tcgctcagaa 840
gaaaacatct ataccattga agagaacgta tatgaagtgg aggagcccaa tgagtattat 900
tgctatgtca gcagcaggca gcaacctca caacctttgg gttgtcgctt tgcaatgcca 960
tagatccaac caccttattt ttgagcttgg tgttttgtct ttttcagaaa ctatgagctg 1020
tgtcacctga ctggttttgg aggttctgtc cactgctatg gagcagagtt ttcccathtt 1080
cagaagataa tgactcacat gggaattgaa ctggga 1116

```

<210> 33

<211> 378

<212> PRT

<213> 智人(*H. sapiens*)

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)... (378)

<223> TIM-4, 等位基因 1

<400> 33

```

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

```

Pro Ser Leu Gly Phe Val Leu Phe Ala Leu Phe Val Ala Phe Leu Leu
 325 330 335
 Arg Gly Lys Leu Met Glu Thr Tyr Cys Ser Gln Lys His Thr Arg Leu
 340 345 350
 Asp Tyr Ile Gly Asp Ser Lys Asn Val Leu Asn Asp Val Gln His Gly
 355 360 365
 Arg Glu Asp Glu Asp Gly Leu Phe Thr Leu
 370 375

<210> 34

<211> 1156

<212> DNA

<213> 智人(H. sapiens)

<400> 34

```
atgtccaaag aacctctcat tctctggctg atgattgagt tttggtggct ttacctgaca 60
ccagtcactt cagagactgt tgtgacggag gttttgggtc accgggtgac tttgccctgt 120
ctgtactcat cctggtctca caacagcaac agcatgtgct gggggaaaga ccagtgtccc 180
tactccggtt gcaaggaggc gctcatccgc actgatggaa tgagggtgac ctcaagaaag 240
tcagcaaaat atagacttca ggggactatc ccgagagggtg atgtctcctt gaccatctta 300
aaccacagtg aaagtgacag cgggtgtgtac tgtgccgca tagaagtgcc tggctggttc 360
aacgatgtaa agataaacgt gcgcctgaat ctacagagag cctcaacaac cagcacaga 420
acagcaacca ccaccacacg cagaacaaca acaacaagcc ccaccaccac ccgacaaatg 480
acaacaaccc cagctgcact tccaacaaca gtcgtgacca caccgatctt cacaaccgga 540
acaccactcc agatgacaac cattgccgtc ttcacaacag caaacacgtg ctttacta 600
acccaagca cccttcgga ggaagccaca ggtcttctga ctcccgagcc ttctaaggaa 660
gggcccaccc tactgcaga atcagaaact gtcctcccca gtgattcctg gagtagtgct 720
gagtctactt ctgtgacac tgtcctgctg acatccaaag agtccaaagt ttgggatctc 780
ccatcaacat ccacgtgtc aatgtggaaa acgagtgatt ctgtgtcttc tctcagcct 840
ggagcatctg atacagcagt tcctgagcag aacaaaacaa caaaaacagg acagatggat 900
ggaataacca tgtcaatgaa gaatgaaatg cccatctccc aactactgat gatcatcgcc 960
ccctccttgg gatttgtgct cttcgcatg tttgtggcgt ttctcctgag agggaaactc 1020
atggaaacct attgttcgca gaaacacaca aggctagact acattggaga tagtaaaaat 1080
gtctcaatg acgtgcagca tggaaggga gacgaagacg gcctttttac cctctaaca 1140
cgcagtagca tgttag                                     1156
```

<210> 35

<211> 378

<212> PRT

<213> 智人(H. sapiens)

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)... (378)

<223> TIM-4, 等位基因 2

<400> 35

Met Ser Lys Glu Pro Leu Ile Leu Trp Leu Met Ile Glu Phe Trp Trp

1	5	10	15
Leu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Ser Glu Thr Val Val Thr Glu Val Leu			
20	25	30	
Gly His Arg Val Thr Leu Pro Cys Leu Tyr Ser Ser Trp Ser His Asn			
35	40	45	
Ser Asn Ser Met Cys Trp Gly Lys Asp Gln Cys Pro Tyr Ser Gly Cys			
50	55	60	
Lys Glu Ala Leu Ile Arg Thr Asp Gly Met Arg Val Thr Ser Arg Lys			
65	70	75	80
Ser Ala Lys Tyr Arg Leu Gln Gly Thr Ile Pro Arg Gly Asp Val Ser			
85	90	95	
Leu Thr Ile Leu Asn Pro Ser Glu Ser Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys			
100	105	110	
Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Ile Asn Val Arg			
115	120	125	
Leu Asn Leu Gln Arg Ala Ser Thr Thr Thr His Arg Thr Ala Thr Thr			
130	135	140	
Thr Thr Arg Arg Thr Thr Thr Thr Ser Pro Thr Thr Thr Arg Gln Met			
145	150	155	160
Thr Thr Thr Pro Ala Ala Leu Pro Thr Thr Val Val Thr Thr Pro Asp			
165	170	175	
Leu Thr Thr Gly Thr Pro Leu Gln Met Thr Thr Ile Ala Val Phe Thr			
180	185	190	
Thr Ala Asn Thr Cys Leu Ser Leu Thr Pro Ser Thr Leu Pro Glu Glu			
195	200	205	
Ala Thr Gly Leu Leu Thr Pro Glu Pro Ser Lys Glu Gly Pro Ile Leu			
210	215	220	
Thr Ala Glu Ser Glu Thr Val Leu Pro Ser Asp Ser Trp Ser Ser Val			
225	230	235	240
Glu Ser Thr Ser Ala Asp Thr Val Leu Leu Thr Ser Lys Glu Ser Lys			
245	250	255	
Val Trp Asp Leu Pro Ser Thr Ser His Val Ser Met Trp Lys Thr Ser			
260	265	270	
Asp Ser Val Ser Ser Pro Gln Pro Gly Ala Ser Asp Thr Ala Val Pro			
275	280	285	
Glu Gln Asn Lys Thr Thr Lys Thr Gly Gln Met Asp Gly Ile Pro Met			
290	295	300	
Ser Met Lys Asn Glu Met Pro Ile Ser Gln Leu Leu Met Ile Ile Ala			
305	310	315	320
Pro Ser Leu Gly Phe Val Leu Phe Ala Leu Phe Val Ala Phe Leu Leu			
325	330	335	
Arg Gly Lys Leu Met Glu Thr Tyr Cys Ser Gln Lys His Thr Arg Leu			
340	345	350	
Asp Tyr Ile Gly Asp Ser Lys Asn Val Leu Asn Asp Val Gln His Gly			
355	360	365	
Arg Glu Asp Glu Asp Gly Leu Phe Thr Leu			
370	375		

<210> 36
 <211> 1156
 <212> DNA
 <213> 智人(H. sapiens)

<400> 36
 atgtccaaag aacctctcat tctctggctg atgattgagt tttggtggct ttacctgaca 60
 ccagtcactt cagagactgt tgtgacggag gttttgggtc accgggtgac tttgccctgt 120
 ctgtactcat cctggtctca caacagcaac agcatgtgct gggggaaaga ccagtgcgcc 180
 tactccggtt gcaaggagcg gctcatccgc actgatggaa tgagggtgac ctcaagaaag 240
 tcagcaaaat atagacttca ggggactatc ccgagagggtg atgtctcctt gaccatctta 300
 aaccccgagt aaagtgcag cggtgtgtac tgctgccgca tagaagtgc ttgctggttc 360
 aacgatgtaa agataaacgt gcgcctgaat ctacagagag cctcaacaac cacgcacaga 420
 acagcaacca ccaccacacg cagaacaaca acaacaagcc ccaccaccac ccgacaaatg 480
 acaacaaccc cagctgcaact tccaacaaca gtcgtgacca caccgatct cacaaccgga 540
 acaccactcc agatgacaac cattgccgtc ttcacaacag caaacacgtg cctttcacta 600
 accccaagca cccttcgga ggaagccaca ggtcttctga ctcccgagcc ttctaaggaa 660
 gggcccatcc tcaactgcaga atcagaaact gtcctccca gtgattcctg gagtagtgtt 720
 gagtctactt ctgctgacac tgtcctgtg acatccaaag agtccaaagt ttgggatctc 780
 ccatcaacat ccacgtgtc aatgtggaaa acgagtgatt ctgtgtcttc tcctcagcct 840
 ggagcatctg atacagcagt tcctgagcag aacaaaacaa caaaaacagg acagatggat 900
 ggaataccca tgtcaatgaa gaatgaaatg cccatctccc aactactgat gatcatcgcc 960
 ccctccttgg gatttgtgct cttcgattg tttgtggcgt ttctcctgag agggaaactc 1020
 atggaaacct attgttcgca gaaacacaca aggctagact acattggaga tagtaaaaat 1080
 gtccatcaatg acgtgcagca tggaagggaa gacgaagac gcctttttac cctctaacaa 1140
 cgtagtagca tgtag 1156

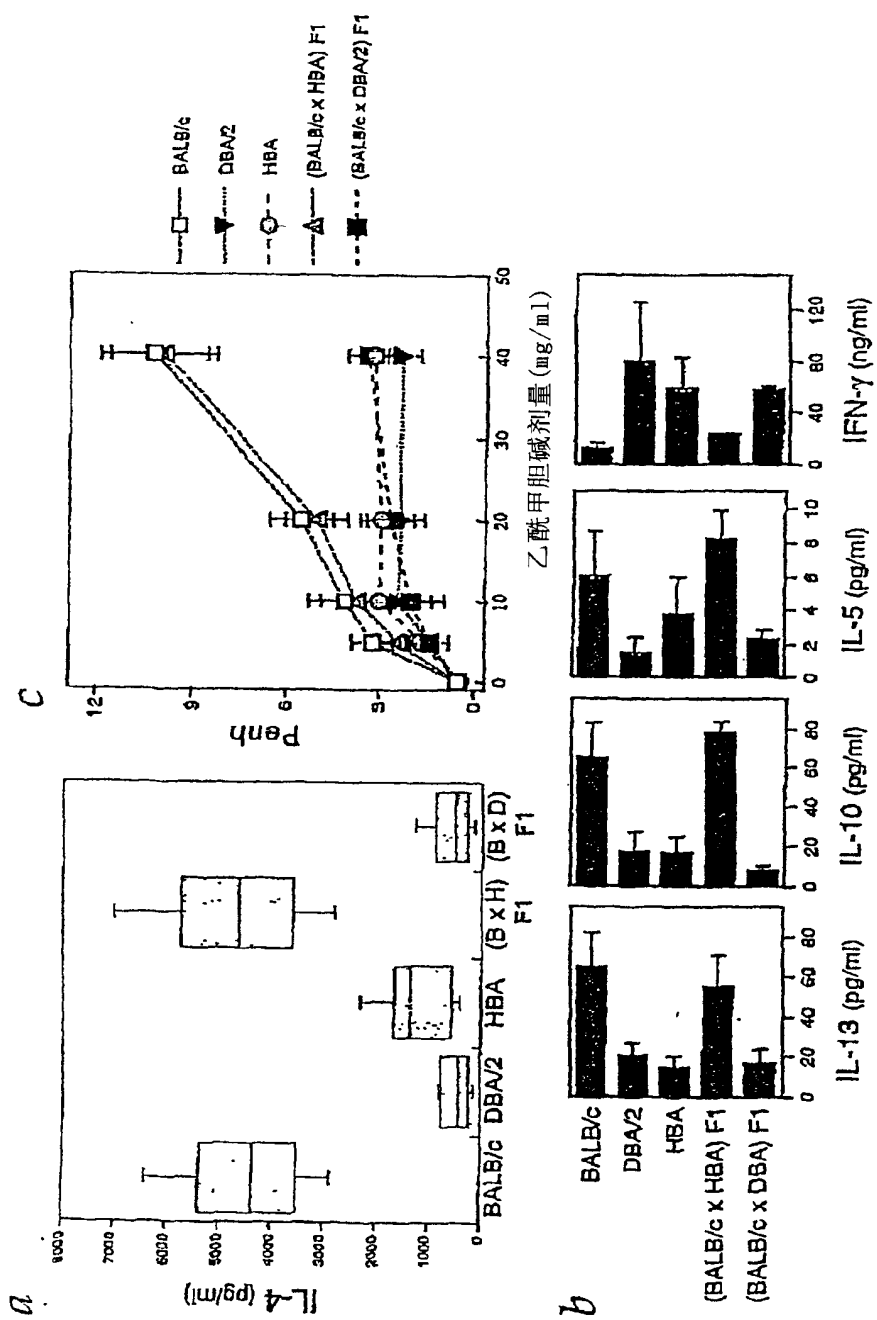


图 1

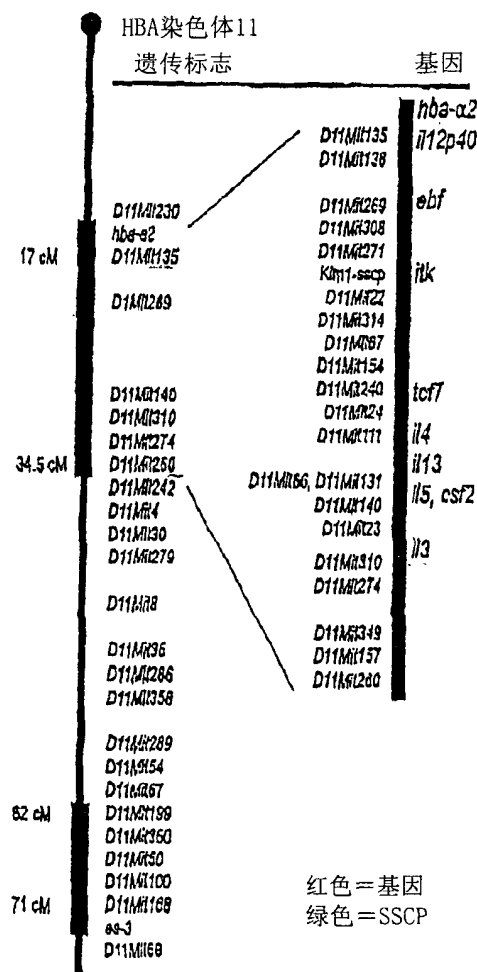
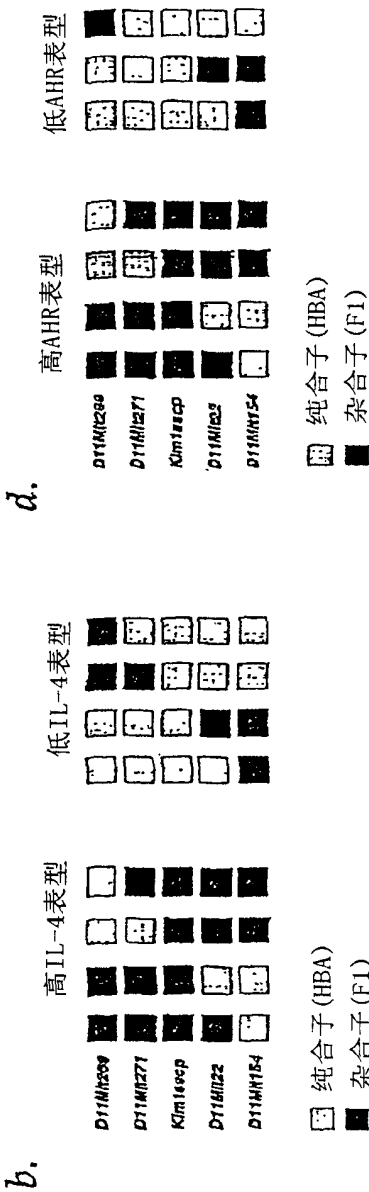
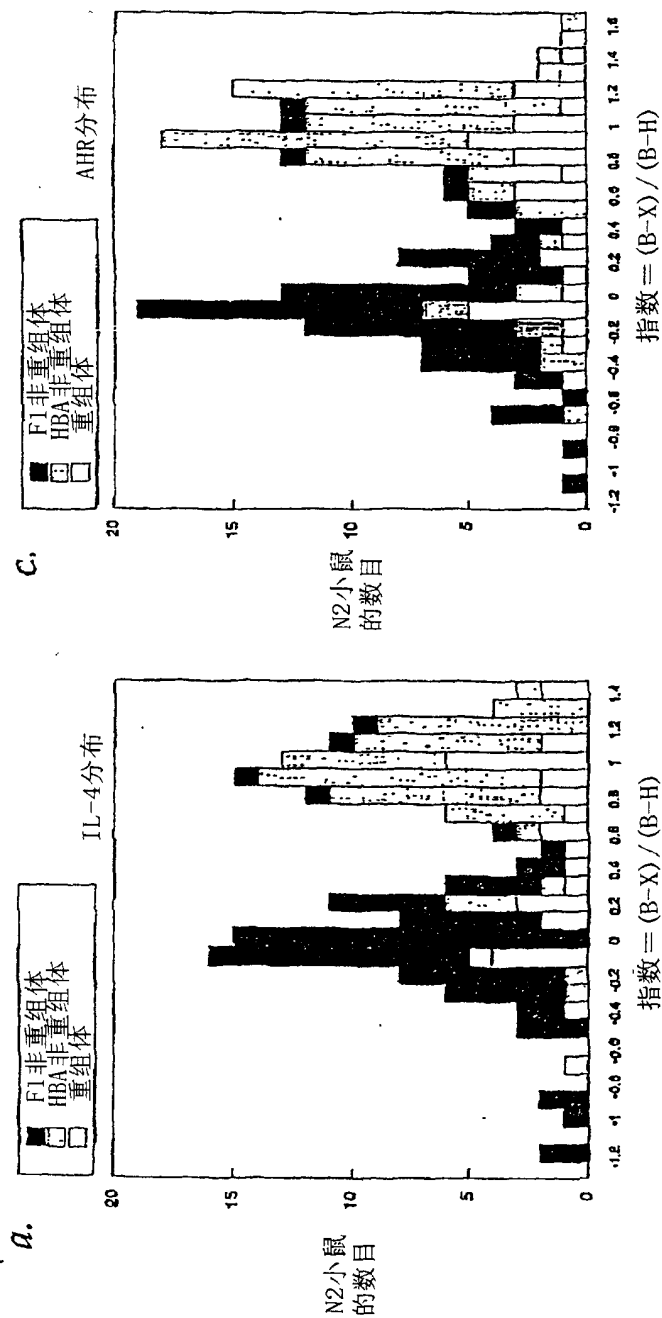


图 2



3

冬

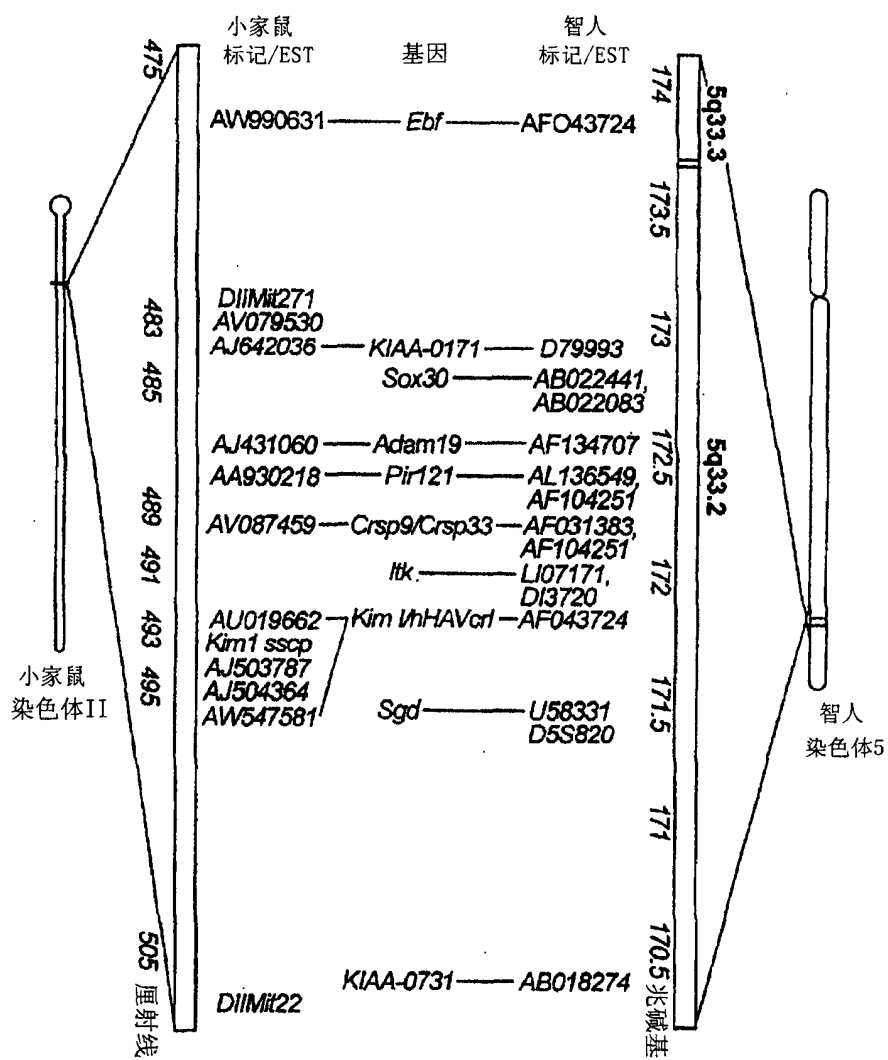


图 4

TIM-1 变体

1	1	MNQIQVFIISGLILLPGAVDSYVEKGVVGHVPTLPCTYSTYRGITTCWGRGQCPSSACQNTLIMTNGHRVTVYQKSSRYNLKGHISEGDVSLTIENSVE	HBA BALB/c
100	100	SDSGLYCCRVETPCWFFNDQKVTFSLOVKPEIPTRPPRRPTTTRPTATGRPTTISTRSTHVPTSTRVSTSTPPTSTHTWTHKPEPTTFC	HBA BALB/c
200	200	PTDMNGTIVTSSGDTWSNHTAIPPGKPKQKPTKGFFVVGICIAALLLLLVSTVAITRYILMKRKSASLSVVAFRVSKTEALQNAAVVHSEADNIYI	HBA BALB/c
300	300	VEDRP HBA	
		VEDRP BALB/c	

5c

A2-11/TIM-3 变体

1	1	MFSGLTLNCVLLLLQLLLARSLENAVYFEVGNKAYLPCSYTTLSTPGALVPMCMGKGFPCMSQCTNELLRTDERNVTVYQKSSRYQLKGDNLKGDVSLIIKN	HBA BALB/c
100	100	VTLDHGTGCCRIQFPGLMNDKKLELKLDI KAAKVTPAQTAHGDSTTASPRTLTTERNGSETQTLVTLHNNNGTKISTWADEIKDSGETINTAIHIGVGV	HBA BALB/c
200	200	SAGLTALIIIGVLIILKWSCKKKKLSLSLITLANLPGLANAGAVRIRSEENIYTIENNVYEVENSENEYCYVNSQQPS	HBA BALB/c

5d

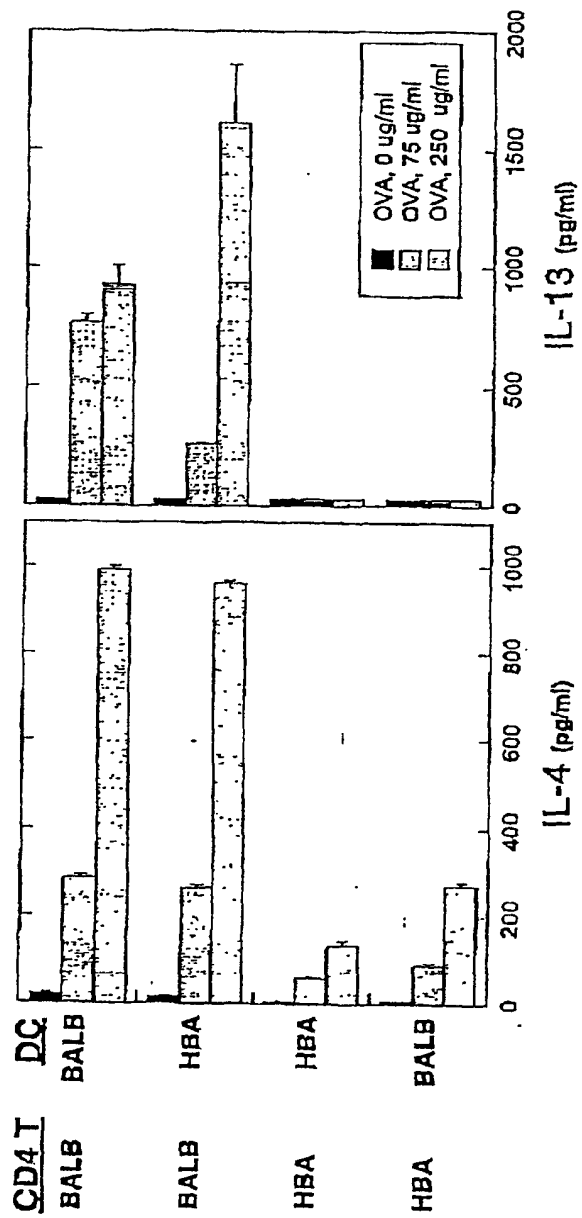
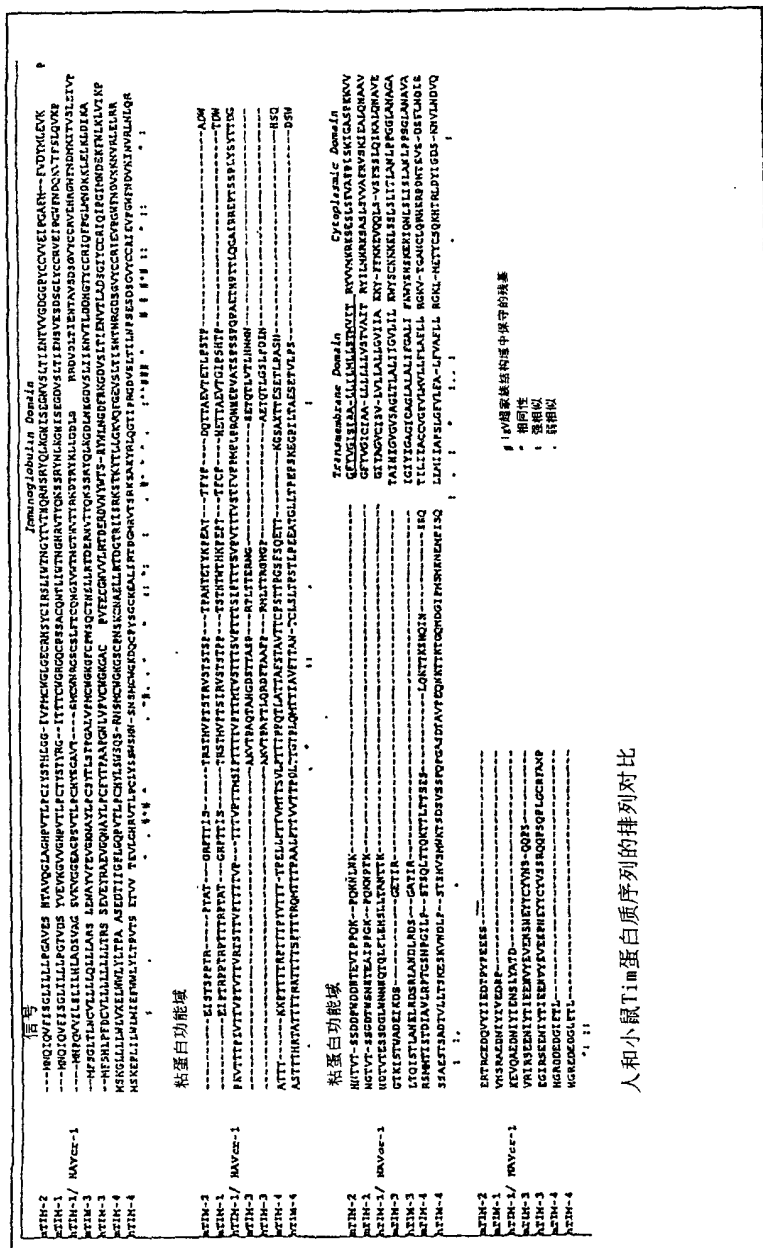


图 6



人和小鼠Tim蛋白序列的排列对比

五

7

		频率
NM_012206	MRPQVILSPILHLADSVAGSKVGGGAGPSVTLPCHYSGAVTSXCANRGCSLFTCQNGIWTNGTHVYBKDTRY	
NM_012206	KLLGDLRRDVSILTIENTAVSDSGVYCCCRVHRGNFNDMKITVSLEIVP	.05
7		A
NM_012206	MTTIVP	.65
1		.05
2		.05
3		.40
4		.65
5		
NM_012206	KGIVAGVCISLVLT	.02
6		

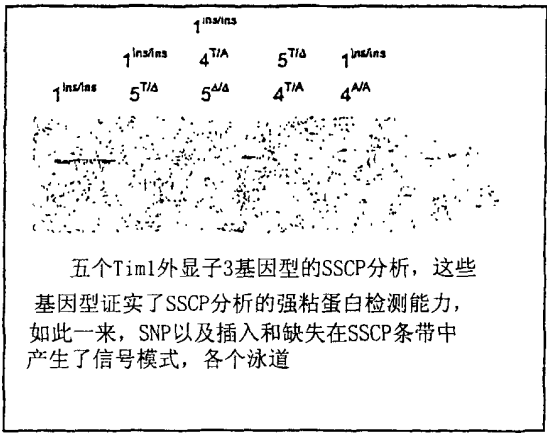


图 9