



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104540522 B

(45)授权公告日 2018.05.01

(21)申请号 201380042522.1

(22)申请日 2013.07.03

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104540522 A

(43)申请公布日 2015.04.22

(30)优先权数据

61/669,967 2012.07.10 US

61/702,916 2012.09.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.02.10

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/049368 2013.07.03

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/011489 EN 2014.01.16

(73)专利权人 得克萨斯州大学系统董事会
地址 美国得克萨斯州

(72)发明人 杰弗里·莫德雷蒙
安娜·谢尔盖耶娃

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

(56)对比文件

WO 2010/065962 A2, 2010.06.10,

审查员 刘东吉

权利要求书2页 说明书53页

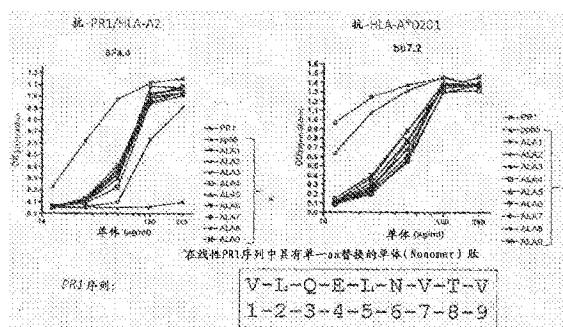
序列表26页 附图27页

(54)发明名称

用于诊断和治疗癌症以及自身免疫病的单克隆抗体

(57)摘要

本说明书描述了在癌细胞表面上HLA呈递的情况下识别HLA-A2限制肽PR-1的抗体的序列。还提供了这些抗体在诊断和治疗癌症以及免疫相关疾病中的用途。



1. 人源化抗体,其当被HLA-A2受体结合时与VLQELNVTV (SEQ ID NO:45) 结合,所述抗体包含由SEQ ID NO:16所示氨基酸序列组成的重链可变区以及由SEQ ID NO:19或20所示氨基酸序列组成的轻链可变区。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含以下重链和轻链:所述重链包含由SEQ ID NO:16所示氨基酸序列组成的重链可变区和为人 γ -1重链恒定区的重链恒定区,所述轻链包含SEQ ID NO:19所示氨基酸序列组成的轻链可变区和为人 κ 轻链恒定区的轻链恒定区。

3. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含以下重链和轻链:所述重链包含由SEQ ID NO:16所示氨基酸序列组成的重链可变区和为人 γ -1重链恒定区的重链恒定区,所述轻链包含SEQ ID NO:20所示氨基酸序列组成的轻链可变区和为人 κ 轻链恒定区的轻链恒定区。

4. 根据权利要求2或3所述的抗体,其中所述人 γ -1重链恒定区为SEQ ID NO:38所示氨基酸序列中的恒定区,并且所述人 κ 轻链恒定区为SEQ ID NO:42所示氨基酸序列中的恒定区。

5. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体与非抗体肽或多肽区段融合。

6. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体与诊断试剂连接或者所述抗体与治疗试剂连接。

7. 根据权利要求6所述的抗体,其中所述诊断试剂是染料、放射性同位素、化学发光分子、顺磁性离子或自旋捕获试剂。

8. 根据权利要求6所述的抗体,其中所述诊断试剂是荧光团。

9. 根据权利要求6所述的抗体,其中所述诊断试剂是发色团。

10. 根据权利要求6所述的抗体,其中所述治疗试剂是细胞因子、化学治疗剂、放射治疗剂、激素、抗体Fc片段、TLR激动剂、含CpG的分子或免疫共刺激分子。

11. 表达载体,其包含编码权利要求1至3任一项中所述抗体重链可变区的核酸和编码权利要求1至3任一项中所述抗体轻链可变区的核酸。

12. 宿主细胞,其选自以下的(a)和(b):

(a) 用包含以下核酸的表达载体转染的宿主细胞:包含编码权利要求1中所述抗体重链可变区之序列的核酸和包含编码权利要求1中所述抗体轻链可变区之序列的核酸;以及

(b) 用以下表达载体转染的宿主细胞:包含含有编码权利要求1中所述抗体重链可变区之序列的核酸的表达载体和包含含有编码权利要求1中所述抗体轻链可变区之序列的核酸的表达载体。

13. 一种产生人源化抗体的方法,其包括在支持人源化抗体表达的条件下培养权利要求12所述的宿主细胞,所述人源化抗体当被HLA-A2受体结合时与VLQELNVTV (SEQ ID NO:45) 结合。

14. 通过权利要求13所述的方法产生的人源化抗体,其当被HLA-A2受体结合时与VLQELNVTV (SEQ ID NO:45) 结合。

15. 根据权利要求14所述的抗体,其中所述抗体与诊断试剂连接或者所述抗体与治疗试剂连接。

16. 权利要求1-10和14-15中任一项所述的抗体在制造用于治疗患有癌症之对象的药

物中的用途。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中所述癌症是实体瘤。

18. 根据权利要求17所述的用途,其中所述实体瘤是头颈部肿瘤、脑肿瘤、食管肿瘤、乳腺肿瘤、肺肿瘤、肝肿瘤、脾肿瘤和胃肿瘤、小肠肿瘤、大肠肿瘤、直肠肿瘤、卵巢肿瘤、子宫肿瘤、宫颈肿瘤、前列腺肿瘤、睾丸肿瘤或皮肤肿瘤。

19. 根据权利要求16所述的用途,其中所述癌症是血癌。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述血癌是白血病或淋巴瘤。

21. 根据权利要求16所述的用途,其中所述癌症为复发癌或转移癌。

用于诊断和治疗癌症以及自身免疫病的单克隆抗体

[0001] 本申请要求于2012年7月10日提交的美国临时申请序列号61/669,967和于2012年9月19日提交的美国临时申请序列号61/702,916的优先权,这两个申请的全部内容通过引用并入本文。

[0002] 发明背景

[0003] 本发明在国家癌症研究所/国立卫生研究院授予的P50CA100632的政府支持下完成。政府享有本发明的某些权利。

1. 技术领域

[0004] 本发明一般性地涉及癌症和免疫疗法的领域。更特别地,其涉及用于治疗 and 预防癌症以及自身免疫病的免疫诊断和免疫治疗抗体。

2. 背景技术

[0005] 免疫系统长期以来参与癌症控制;然而仍缺少关于人癌症中特异且有效的免疫应答的证据。在慢性骨髓性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia,CML)中,异体骨髓移植(BMT)或干扰素- α 2b (IFN- α 2b)疗法已经产生了完全缓解,但是疾病控制的机制还不知道并且可涉及免疫抗白血病应答。

[0006] 基于本领域中的证据,认为淋巴细胞在介导抗白血病效应中发挥着作用。研究表明,异体供体淋巴细胞输注(DLI)已经用来治疗异体BMT后的髓性白血病复发(Giralt和Kolb,1996;Kolb和Holler,1997;Kolb等,1995;Kolb等,1996;Antin,1993)。在约70%至80%的处于慢性期(CP)的慢性髓细胞白血病(CML)患者中,来自原始骨髓(BM)供体的淋巴细胞输入诱导了血液学应答和细胞遗传学应答二者(Kolb等,1996;Kolb和Holler,1997)。对于AML,DLI后的缓解一般不如慢性期CML中所获得的缓解那么持久,这可反映出肿瘤生长超过形成免疫应答之动力学的快速动力学。另外,大多数有骨髓形式白血病的患者将死于该疾病,除非他们可通过异体骨髓移植进行治疗,其中相关的移植物抗白血病(graft versus leukemia,GVL)效应治愈患者。然而,移植物抗宿主病(GVHD)和移植相关毒性限制了该治疗。认为GVL可与GVHD分开,并且靶向针对白血病相关抗原的免疫应答将允许GVL向患者转移而无GVHD。

[0007] 因此,如果可确定更多的抗原(即,白血病抗原或针对其他癌症的抗原),并且如果可获得大量最有效的抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL),则将允许开发白血病特异性疗法、乳腺癌特异性疗法等,使用抗原作为靶标用于疫苗或用于产生用于过继免疫疗法的特异性T细胞。

[0008] PR1(来源于蛋白酶3(P3)和弹性蛋白酶的HLA2.1限制性九聚物)被鉴定为白血病相关抗原(Molldrem等,2000;Molldrem等,1996;Molldrem等,1997;Molldrem等,1999;Molldrem等,2003,各自以其整体通过引用并入本文)。Burchert等(2002)和Scheibenbogen等(2002)已经独立地证实了PR1是白血病相关抗原的发现。对PR1特异的CTL杀伤AML、CML和MDS细胞,但是不杀伤正常骨髓细胞。在最近的I/II期疫苗研究中,向AML、CML和MDS患者施

用PR1肽,并且在47%的患者中引发了PR1特异性CTL免疫,而在26%的患者中观察到临床应答。因此,该抗原为进一步研究抗癌免疫应答以及开发新治疗剂提供了有趣的平台。

发明内容

[0009] 因此,根据本发明,提供了分离并纯化的抗体,其在被HLA-A2受体结合时与VLQELNVTV (SEQ ID NO:45) 结合,所述抗体具有包含SEQ ID NO:3、60和5的重链CDR以及包含SEQ ID NO:8、9和10的轻链CDR。抗体可以是小鼠抗体、单链抗体、双特异性抗体、与非抗体肽或多肽区段融合的,与诊断试剂(例如,荧光团、发色团、染料、放射性同位素、化学发光分子、顺磁性离子或自旋捕获试剂(spin-trapping reagent))连接的、与治疗试剂(例如,细胞因子、化学治疗剂、放射治疗剂、激素、抗体Fc片段、TLR激动剂、含CpG的分子或免疫共刺激分子)连接的、人源化抗体或以上的组合。除了对SEQ ID NO:45的结合亲和力之外,双特异性抗体还可具有对B细胞(CD19、CD20)、NK细胞、吞噬细胞(CD16)或单核细胞(CD14)的结合亲和力。特别的人源化抗体可具有SEQ ID NO:40和38或者SEQ ID NO:42和38以及SEQ ID NO:42和44的轻链/重链序列。

[0010] 在另一个实施方案中,提供了编码由SEQ ID NO:8、9和10编码之轻链CDR的核酸。所述核酸可编码SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:14,或者可编码SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:27。所述核酸还可包含位于编码轻链CDR之核酸5'的启动子序列,例如,在真核细胞或原核细胞中具有活性的启动子序列。所述核酸可位于可复制载体(例如非病毒载体或病毒载体)中。所述核酸还可包含接头编码区段,其中所述接头编码区段位于所述CDR编码区段之间,例如编码螺旋-转角-螺旋基序的区段。

[0011] 在又一个实施方案中,提供了这样的人工抗体:其包含重链编码区段和轻链编码区段,所述重链编码区段包含含有SEQ ID NO:3、60和5序列的CDR;所述轻链编码区段包含含有SEQ ID NO:8、9和10序列的CDR。CDR可通过合成接头连接。重链可与非抗体肽或多肽区段融合。抗体可与诊断试剂(例如荧光团、发色团、染料、放射性同位素、化学发光分子、顺磁性离子或自旋捕获试剂)连接。抗体可与治疗试剂(例如细胞因子、毒素、化学治疗剂、放射治疗剂、激素、抗体Fc片段、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、蛋白酶3、TLR激动剂、含CpG的分子或免疫共刺激分子)连接。轻链可包含SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:27,和/或重链包含SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:44。

[0012] 在再一个实施方案中,提供了制备抗体的方法,其包括:(a)将(i)编码包含SEQ ID NO:3、60和5所示CDR之重链的核酸序列及(ii)编码包含SEQ ID NO:8、9和10所示CDR之轻链的核酸序列引入宿主细胞中;以及(b)在支持所述轻链和重链表达的条件下培养所述宿主细胞。所述方法还可包括分离所述抗体。所述方法还可包括使所述抗体与诊断剂或治疗剂连接的步骤。

[0013] 在另一个实施方案中,提供了在怀疑含有异常细胞的样品中检测异常细胞的方法,其包括使所述样品与如上所述的抗体或人工抗体相接触。所述抗体或人工抗体可与诊断剂(例如,荧光团、发色团、染料、放射性同位素、化学发光分子、顺磁性离子或自旋捕获试剂)缀合。所述抗体或人工抗体可使用第二结合剂(secondary binding agent)(例如抗Fc受体抗体)进行检测。所述样品可以是(a)来自头颈部、脑、食管、乳腺、肺、肝、脾、胃、小肠、大肠、直肠、卵巢、子宫、宫颈、前列腺、睾丸或皮肤组织的肿瘤组织,或者(b)流体如血液、淋

巴、尿、骨髓抽吸液 (aspirate) 或乳头抽吸液。所述样品可来自于经切除的肿瘤床。所述方法还可包括基于检测的存在、不存在或程度作出治疗决定,例如用基于PR-1的肽疫苗治疗所述对象的决定。所述方法可检测原发性癌细胞、转移癌细胞或骨髓发育异常细胞 (myeloid dysplastic cell)。

[0014] 在又一个实施方案中,提供了治疗患有癌症的对象的方法,其包括向所述对象施用如上所述的抗体或人工抗体。所述抗体或人工抗体可与治疗剂缀合。所述癌症可为实体瘤,例如头颈部肿瘤、脑肿瘤、食管肿瘤、乳腺肿瘤、肺肿瘤、肝肿瘤、脾肿瘤和胃肿瘤、小肠肿瘤、大肠肿瘤、直肠肿瘤、卵巢肿瘤、子宫肿瘤、宫颈肿瘤、前列腺肿瘤、睾丸肿瘤或皮肤肿瘤。所述癌症可为血癌,例如白血病或淋巴瘤。所述治疗剂可为细胞因子、毒素、化学治疗剂、放射治疗剂、激素、抗体Fc片段、TLR激动剂、含CpG的分子或免疫共刺激分子。所述方法还可包括向所述对象提供第二抗癌治疗 (second anticancer therapy),例如基因治疗、化学治疗、放射治疗、激素治疗、毒素治疗或手术。所述抗体或人工抗体可向所述对象施用多于一次。所述癌症可为复发癌或转移癌。所述抗体可向所述对象施用多于一次。

[0015] 在再一个实施方案中,提供了治疗患有自身免疫病的对象的方法,其包括向所述对象施用如上所述的抗体或人工抗体。所述自身免疫病可为韦格纳肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis)、丘-斯综合征 (Churg-Strauss Syndrome) 或系统性小血管炎 (systemic small vessel vasculitis)。所述抗体或人工抗体可与治疗剂 (例如毒素或凋亡诱导剂) 缀合。所述方法还可包括向所述对象提供第二抗自身免疫治疗。所述第二抗自身免疫治疗可为抗炎剂。所述抗体可向所述对象施用多于一次。

[0016] 还提供了诱导HLA-A2癌细胞之补体介导的细胞毒性的方法,其包括使所述癌细胞与如上所述的抗体或人工抗体相接触。

[0017] 本发明的另一个实施方案提供了在怀疑含有异常细胞的样品中检测异常细胞的方法,其包括使所述样品与如上所述的抗体或人工抗体相接触。所述抗体或人工抗体可与诊断剂 (例如荧光团、发色团、染料、放射性同位素、化学发光分子、顺磁性离子或自旋捕获试剂) 缀合。可使用第二结合剂 (例如抗Fc受体抗体) 检测所述抗体或人工抗体。所述样品可以是 (a) 来自头颈部、脑、食管、乳腺、肺、肝、脾、胃、小肠、大肠、直肠、卵巢、子宫、宫颈、前列腺、睾丸或皮肤组织的肿瘤组织,或者 (b) 流体如血液、淋巴、尿、骨髓抽吸液或乳头抽吸液。所述样品可来自于经切除的肿瘤床 (tumor bed)。所述方法还可包括基于检测的存在、不存在或程度作出治疗决定,例如用基于PR-1的肽疫苗治疗所述对象的决定。所述方法可检测原发性癌细胞、转移癌细胞或骨髓发育异常细胞。

[0018] 在再一个实施方案中,提供了治疗患有癌症的对象的方法,其包括向所述对象施用如上所述的抗体或人工抗体。所述抗体或人工抗体可与治疗剂 (例如细胞因子、毒素、化学治疗剂、放射治疗剂、激素、抗体Fc片段、TLR激动剂、含CpG的分子或免疫共刺激分子) 缀合。所述癌症可为实体瘤,例如头颈部肿瘤、脑肿瘤、食管肿瘤、乳腺肿瘤、肺肿瘤、肝肿瘤、脾肿瘤和胃肿瘤、小肠肿瘤、大肠肿瘤、直肠肿瘤、卵巢肿瘤、子宫肿瘤、宫颈肿瘤、前列腺肿瘤、睾丸肿瘤或皮肤肿瘤。或者,所述癌症可为血癌,例如白血病或淋巴瘤。所述癌症可为复发癌或转移癌。所述方法还可包括向所述对象提供第二抗癌治疗,例如基因治疗、化学治疗、放射治疗、激素治疗、毒素治疗或手术。所述抗体或人工抗体可向所述对象施用多于一次。

[0019] 在再一个实施方案中,提供了治疗患有自身免疫病的对象的方法,其包括向所述对象施用如上所述的抗体或人工抗体。所述自身免疫病可为韦格纳肉芽肿病、丘-斯综合征或系统性小血管炎。所述抗体或人工抗体可与治疗剂(例如毒素或凋亡诱导剂)缀合。所述方法还可包括向所述对象提供第二抗自身免疫治疗,例如抗炎剂。所述抗体可向所述对象施用多于一次。

[0020] 另外的方法包括:(i)治疗患有骨髓发育异常疾病的对象,其包括向所述患者施用如上所述的抗体或人工抗体;以及(ii)诱导HLA-A2癌细胞之补体介导的细胞毒性,其包括使所述癌细胞与如上所述的抗体或人工抗体相接触。

[0021] Hu1-8F4和Hu2-8F4分别是指Hu8F4-1和Hu8F4-2。此外,在此文件中术语“Hu8F4”一般是指8F4的两种人源化形式(Hu8F4-1和Hu8F4-2)。

[0022] 如本文说明书中所使用的,“一”可意指一或更多。如本文权利要求中所使用的,当与词语“包含/含有/包括”结合使用时,词语“一”可意指一或多于一。如本文使用的“另一”可意指至少又一或更多。

[0023] 从以下的详细描述中,本发明的其他目的和特征将变得明显。然而,应理解,虽然指出了本发明的一些优选实施方案,但是该描述和具体实施例仅以说明的方式给出,因为通过该详细描述,本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员将变得明显。

附图说明

[0024] 以下附图构成了本说明书的一部分并且包括在内以进一步证明本发明的某些方面。参照这些附图中的一幅或更多幅并结合本文所示的具体实施方案的详细描述,可更好地理解本发明。

[0025] 图1-8F4对PR1/HLA-A2的特异性。用加载有PR1或单氨基酸修饰的PR1类似物的重组肽/HLA-A2单体进行的ELISA。为了确定PR1序列中对于最优8F4结合必不可少的氨基酸位置,将加载有包含PR1中丙氨酸替换的肽(ALA1-ALA9)的HLA-A2单体以逐渐增加的浓度包被在微滴定孔上。然后用固定浓度的8F4或对照抗体bb7.2(HLA-A*0201等位基因特异性小鼠IgG2a单克隆抗体)孵育孔。使用过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠抗体通过ELISA测量结合。8F4与加载有PR1的HLA-A2结合并且与大多数PR1类似物结合,而显著较少地与ALA1类似物(肽1位的丙氨酸替换为缬氨酸)结合,并且不与对照肽pp65/HLA-A2结合。对照抗体bb7.2与加载有PR1和pp65的HLA-A2结合得同样好。

[0026] 图2-8F4单克隆抗体对PR1/HLA-A2的亲合力。使用BIAcore 3000通过表面等离子共振确定肽/HLA-A2与8F4和bb7.2抗体结合的亲合力测量值。测试抗体被捕获到抗小鼠抗体包被表面上。将分析物肽/HLA-A2稀释至100nM并测试其与抗体包被表面的结合,一式两份。使用PBS,0.005%吐温-20,0.1mg/ml BSA,pH7.4作为运行缓冲液在25℃进行分析。为了获得结合亲合力,将实验数据拟合成一级动力学模型(如图中橙色线所示),并且随后确定8F4和bb7.2的K_D。

[0027] 图3-8F4对HLA-A2+AML的特异性。用8F4和细胞表面抗体进行白血病和正常PBMC的多参数流式细胞术。使用aqua在活细胞上对来自AML患者和正常供体的PBMC进行设门,然后用8F4(与ALEXA Fluor 647缀合)、bb7.2(与FITC缀合)以及CD13和CD33的表面表型抗体进

行染色,并通过流式细胞术进行分析。使用以下设门策略(gating strategy):首先,分析水中活细胞的CD13和CD33表达,并分析双阳性细胞的PR1/HLA-A2 (8F4) 表达和总HLA-A2表达(bb7.2)。使用HLA-A2阴性AML对照细胞建立阴性象限设门(negative quadrant gating)。

[0028] 图4A-B-8F4抗体诱导AML的补体依赖性细胞毒性(CDC)。洗涤靶细胞并将其以 5×10^5 细胞/ml的浓度重悬于10-RPMI/HEPES中。在96孔板中将20微升(μ l)抗体与100 μ l细胞混合并升温至37℃,然后添加20 μ l冰冷的标准兔补体(Cedarlane,Ontario,Canada)并在37℃下孵育90分钟。使用Cyto-Tox Glo细胞毒性测定(Promega)来测定细胞毒性。抗体特异性CDC(AB-CDC)计算为: $AB-CDC = ((L_{C+AB} - L_{C-AB}) / (L_{max} - L_s)) \times 100\%$,其中 L_{C+AB} 是在补体加抗体存在下的靶细胞裂解; L_{T+c} 是在补体单独存在下的裂解; L_{spont} 和 L_{max} 在根据制造商说明书将细胞毒剂毛地黄皂苷添加至细胞之前和之后测量。(图4A)用20 μ g8F4孵育诱导了取自HLA-A2+AML患者的PBMC和白细胞分离术(leukapheresis,LP)细胞的补体依赖性细胞毒性,但是不裂解来自HLA-A2阴性AML的PBMC或者来自HLA-A2+正常供体的PBMC的对照样品。(图4B)HLA-A2+AML的8F4介导裂解是抗体剂量依赖性的,而同种型对照抗体(IgG2a小鼠抗KLH)和人静脉内免疫球蛋白(商用IVIG)没有显示出AML裂解。

[0029] 图5-8F4对AML具有特异性而对正常PBMC没有特异性。对于PR1和HLA-A2的AML、PBMC和T2细胞的表面染色。用抗PR1/HLA-A2抗体(8F4)-alexa-647(红色)和FITC缀合的抗HLA-A2(绿色)染色细胞,用1%低聚甲醛固定,然后使用共聚焦显微术进行研究。用作为阳性对照的PR1肽(20 μ g/ml)和作为阴性对照肽的CMV肽pp65(20 μ g/ml)脉冲(pulse)T2细胞。PR1/HLA-A2表达在AML和PR1脉冲的T2细胞的细胞表面上是明显的,而在HLA-A2+PBMC上或在经pp65脉冲的T2细胞上不明显。Dapi蓝用于核染色。

[0030] 图6-8F4抗体在体外模型中防止AML的植入(engraftment)。洗涤原代HLA-A2+白血病细胞(10^6 个),重悬于PBS(100 μ l)中,与8F4或同种型对照抗体(20 μ g)混合并静脉内注射到经200cGy辐照的HLA-A2+转基因NOD/SCID小鼠中。在两周后将小鼠处死,解剖,使组织均质化并用人和小鼠细胞表面标志物通过流式细胞术分析白血病细胞的存在。示出了分离自小鼠骨髓(BM)的细胞的流式细胞术结果。对照(经PBS处理)和接受AML细胞加8F4(AML+8F4抗体)的实验动物显示出在BM中没有白血病细胞。相比之下,接受AML细胞加对照抗体(AML+同种型对照)的动物显示出骨髓中的人CD33+CD45+细胞,其与输注的AML具有相同表型。

[0031] 图7-获得抗PR1/HLA-A2抗体的免疫策略。MHC I类分子的示意图。MHC类由重链和 β 2微球蛋白链组成。肽抗原结合到MHC-I的沟中,侧翼是链的 α 1和 α 2螺旋结构域。

[0032] 图8A-B-8F4抗体在HLA-A2Tg异种移植模型中防止人AML的植入。洗涤原代HLA-A2+AML细胞(10^6 个),重悬于PBS(250 μ l)中,与20 μ g8F4或同种型对照抗体混合并静脉内注射到经亚致死辐照(200 cGy)的HLA-A2Tg NOD/SCID小鼠中。通过组织化学(图8A)和流式细胞术(图8B)在指示时间分析外周血、骨髓和组织中白血病的存在。分别将没有AML转移和转移前AML细胞的经辐照小鼠用作阴性对照和阳性对照。(图8A)注射AML细胞加8F4(左图)、注射AML细胞加同种型对照抗体(iso,中图)后的实验小鼠,以及无AML转移对照小鼠(右图)的组织中的AML浸润。(图8B)为无转移对照小鼠和经8F4处理实验小鼠的骨髓(上面两行图)和外周血(下面两行图)中没有检测到AML细胞(示出转移前,左图)。接受与同种型匹配对照抗体(iso)混合之AML细胞的小鼠在AML转移后两周或四周显示出AML1和AML5的植入。使用延伸

图(extended panel)(包括小鼠细胞特异性标志物(mCD45)、3-6种人标志物(CD45、CD13、CD33、CD34、CD38、HLA-DR)和Live/DeadFixable Aqua(Invitrogen))对AML植入进行流式细胞术分析。所有图示出了有活力的mCD45-细胞。

[0033] 图9A-C-由于保守PR1序列在表达HLA-A2的鼠造血细胞上表达,8F4在HLA-A2转基因NOD/SCID中诱导瞬时(21天)嗜中性粒细胞减少。向HLA-A2Tg NOD/SCID小鼠注射200 μ g (10mg/kg) 8F4或同种型对照Ab。这些动物显示出呈递内源PR1。。9天后,收获骨髓细胞,用针对小鼠抗原的mAb (B220-PE、Gr-1-PB、CD11b-APC、F4/80-PE-Cy7、CD3-FITC和LIVE/DEAD Fixable Aqua)进行染色并通过流式细胞术进行检查。(图9A)粒细胞的减少在骨髓的散点图中是明显的(左图)。存在Gr-1lo不成熟嗜中性粒细胞,但是8F4处理小鼠骨髓中的Gr-1hi成熟嗜中性粒细胞少很多(中图)。另外,在8F4处理动物中单核细胞(SSC10 CD11b+;右图的右下门)减少。(图9B)静脉内注射8F4 (5mg/kg) 诱发HLA-A2Tg NOD/SCID小鼠中循环的成熟粒细胞、巨噬细胞和单核细胞的绝对数目瞬时减少。处理后三周,所有群体保持。图9A示出的门用于确定每种细胞类型作为活细胞百分比的频率。误差条是每组n=2只动物的标准偏差。示出了三个中的一个代表性实验。(图9C)在注射200 μ g (10mg/kg) 8F4后7天,在HLA-A2Tg NOD/SCID小鼠的肝、肺、脾、肾、心脏或脑中,没有明显的显著病理学变化。示出了来自2只小鼠的代表性组织的H&E切片。

[0034] 图10A-B-在将富含人CD34+细胞的脐带血转移到NOD/SCID小鼠中之后,8F4诱导已建立的人造血细胞的瞬时白细胞减少。使用Histopaque1077对新鲜HLA-A2+脐带血(CB)单元(50-150ml)进行ficoll,用PBS洗涤,然后用CliniMACS缓冲液(PBS pH 7.2/1mM EDTA中的0.5% HSA, Miltenyi)洗涤。将 10^8 个细胞重悬于300ml MACS缓冲液中,与100ml CD34微珠(Miltenyi)混合,在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟并洗涤。使用2LS柱(Miltenyi)对标记有磁珠的CD34⁺细胞进行纯化。将CD34⁺细胞从柱洗脱,计数并静脉内(iv)注射到经辐照(400rad) NOD/SCID小鼠(1×10^6 至 2.5×10^6 个细胞/小鼠)中。对照小鼠CB1-5不接受CB细胞。(图10A)移植后4周开始,每周或每隔一周取小鼠的外周血以通过使用小鼠CD45、人CD45和HLA标志物的FACS监测脐带血植入。转移后9至12周,向小鼠静脉内注射20 μ g (1mg/kg) 8F4两次,注射之间的间隔为1周(虚线箭头)。(图10B)第二次8F4注射后四周,处死小鼠。如上分析血液、脾和骨髓的人细胞植入。

[0035] 图11. pCh8F4、pHu8F4-1、pHu8F4-2和pHu8F4-2-AA(统称为表达载体)的示意性结构。从顶部SalI位点顺时针继续下去,质粒包含重链转录单元,其以人巨细胞病毒(CMV)的主要立即早期启动子和增强子(CMV启动子)开始,以起始抗体重链基因的转录。CMV启动子后是VH外显子(包含人 γ -1重链恒定区的基因组序列),包含CH1、铰链、CH2和CH3外显子以及介于其间的内含子,并且CH3外显子后面是聚腺苷酸化位点。重链基因序列之后,轻链转录单元开始于CMV启动子,然后是VL外显子和包含人 κ 链恒定区外显子的基因组序列(CL),在其之前具有一部分内含子,并且在CL外显子后面是聚腺苷酸化位点。接着,轻链基因后面是SV40早期启动子(SV40启动子)、大肠杆菌(E. coli)黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶基因(gpt)和包含SV40聚腺苷酸化位点(SV40poly(A)位点)的区段。最后,质粒包含质粒pUC19的一部分,其包含细菌来源的复制(pUC ori)和 β -内酰胺酶基因(β -内酰胺酶)。

[0036] 图12. 8F4VH、人源化8F4(Hu8F4) VH和人受体U96282VH的氨基酸序列比对。氨基酸残基以单字母代码示出。序列之上的编号指示根据Kabat等(1991)的位置。对由Kabat等

(1991) 定义的CDR序列加下划线。U96282VH中的CDR残基在该图中省略。

[0037] 图13.8F4VL、人源化8F4VL的两种形式 (Hu8F4VL1和VL2) 和人受体AY043146VL的氨基酸序列比对。氨基酸残基以单字母代码示出。序列之上的编号指示根据Kabat等(1991)的位置。对由Kabat等(1991)定义的CDR序列加下划线。预测Hu8F4VL1中加下划线的残基与CDR相接触并且对应的小鼠残基保留在Hu8F4VL1中的该位置处。AY043146VL中的CDR残基在该图中省略。

[0038] 图14.经纯化8F4抗体的SDS PAGE分析。在还原条件下使抗体(各5 μ g)在4%至20% SDS PAGE凝胶上跑胶。Invitrogen的SeeBluePlus2预染标准(Cat#LC5925)用作分子量标准(泳道1、7和8)。样品:8F4.3.3(泳道2)、8F4-4(泳道3)、Ch8F4(泳道4)、Hu8F4-1(泳道5)、Hu8F4-2 lot 9/9/10(泳道6)、Hu8F4-2lot 1/23/11(泳道9)和Hu8F4-2-AA(泳道10)。

[0039] 图15.Ch8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2和Hu8F4-2-AA与PR-1/HLA-A2结合的ELISA分析。在多个浓度下测试Ch8F4、Hu8F-1、Hu8F4-2和Hu8F-2-AA与PR-1/HLA-A2的结合,从1 μ g/ml开始并且系列稀释3倍。

[0040] 图16A-C.Hu8F4结合特异性和作用机制。(图16A)特异性测定。(图16B)亲和力测定。(图16C)CDC测定。

[0041] 图17.用Hu8F4处理消除了已建立的AML。测定测量了抗体处理前3周进行的AML移植的植入百分比。

[0042] 图18.8F4引起可逆的全血细胞减少 (pancytopenia):在SCID小鼠中对正常造血祖细胞的作用。

[0043] 图19.8F4引起可逆的全血细胞减少:在具有免疫能力的小鼠中对正常血细胞的作用。

[0044] 图20A-C.Hu8F4延迟乳腺癌肿瘤生长并延长存活。(图20A)231BrCA异种移植肿瘤中的肿瘤相关嗜中性粒细胞。(图20B)原发性肿瘤模型。(图20C)转移性肿瘤模型。

[0045] 图21A-B.实体瘤细胞系摄入NE和P3。用(图21A)NE(10mg/ml)或(图21B)P3(10mg/ml)孵育代表实体瘤的细胞系,然后透化并用抗NE或抗P3Ab进行染色。数据表示为来自两个独立实验的三个重复孔中NE或P3摄入相对于未脉冲细胞的平均6SEM倍增加。MDA-MB-231,乳腺癌;MIAPaCa-2,胰腺癌;Me1 624和Me1 526,黑素瘤;OVCAR3,卵巢腺癌;SW-620,结肠腺癌。

[0046] 图22A-D.乳腺癌不内源表达P3。从(图22A)乳腺癌细胞系和(图22B)原发性乳腺癌组织提取mRNA。使用P3引物进行PCR,其显示出在乳腺癌细胞系和原发性乳腺癌中缺少P3mRNA表达。Jurkat和HL-60白血病细胞系分别用作阴性和阳性对照。通过对在手术切除时从患者获得的肿瘤进行LCM获得来自患者组织的原发性乳腺癌细胞(样品乳腺1至3)。使用乳腺珠蛋白-1(MGB-1)确定乳腺癌细胞的分析。 β -肌动蛋白和GAPDH用作加载对照。(图22C)免疫印迹证明在来自五种不同乳腺癌细胞系的WCL中缺少P3蛋白。向凝胶加载20mg蛋白质。经纯化P3(5mg)用作阳性对照,并且GAPDH用作加载对照。(图22D)免疫组织化学显示出在患者乳腺癌组织(乳腺3)中不存在P3。左图H&E切片(原始放大率3200)显示出癌与混合嗜中性粒细胞不佳的区分。右图对P3的免疫组织化学染色显示出混合嗜中性粒细胞中P3的阳性染色(褐色),而在乳腺癌细胞中则没有。插图(原始放大率3400)显示出吞没嗜中性粒细胞的罕见肿瘤细胞。这两幅图像均取自统一患者并且代表了五种组织。箭头指示嗜中性粒细胞。

[0047] 图23A-C. P3被乳腺癌细胞系摄入并定位至溶酶体分隔。(图23A)将MDA-MB-231、MCF-7和MCF-7-HER18细胞系与可溶P3 (10mg/ml) 孵育1、4和24小时,然后用抗P3Ab进行细胞内染色。测量三个重复实验组的MFI并归一化至未脉冲细胞的MFI。将MFI相对于未脉冲细胞的倍数增加绘制在y轴上。数据是平均值 $\pm$ 6SEM并且代表两个独立实验。(图23B)用逐渐增加剂量的可溶P3或OVA (ova) 孵育MDA-MB-231细胞,并分别使用抗P3或抗OVAAb通过流式细胞术分析P3或OVA的细胞内摄入。数据为来自两个重复实验的平均值 $\pm$ 6SEM。(图23C)用可溶P3 (10mg/ml) 培养MDA-MB-231细胞,然后对于P3 (红色) 和LAMP-2 (绿色) 进行细胞内染色。共聚焦显微图像证明在摄入后4小时溶酶体分隔中P3的定位,如通过重叠图像所示(黄色)。使用DAPI显示核为蓝色。比例尺,5 μ m。

[0048] 图24A-F. P3的摄入以及P3和NE的交叉呈递增加了乳腺癌对由PR1-CTL和抗PR1/HLA-A2杀伤的易感性。(图24A)将MDA-MB-231乳腺癌细胞与可溶P3、经辐照PMN或PBMC孵育4小时。使细胞透化,用抗P3Ab染色并通过流式细胞术进行分析。对于细胞相关摄入,流式细胞术上看到的光散射提供了PBMC、PMN与MDA-MB-231细胞之间的清楚区别。单独的PBMC和PMN分别用作阴性和阳性对照。在ANOVA后使用Prism 5.0软件进行Tukey检验(* p ,0.05)。数据为两个重复实验的平均值 $\pm$ 6SEM。(图24B)用可溶P3或NE (10mg/ml) 在逐渐增加的时间点培养MDA-MB-231乳腺癌细胞,然后分析PR1/HLA-A2的表达。由两个重复实验示出PR1/HLA-A2的MFI相对于未脉冲细胞的平均 $\pm$ 6SEM倍数增加。在ANOVA后使用Prism 5.0软件进行Tukey检验(* p =0.01, ** p ,0.0001)。(图24C-D)在包含NE或P3 (10mg/ml) 以及Ag呈递抑制剂布雷菲德菌素A或乳胱素(lactacystin)的培养基中培养MDA-MB-231细胞24小时。然后分析细胞的PR1/HLA-A2表达。由代表性实验的两个重复孔示出PR1/HLA-A2之MFI的平均 $\pm$ 6SEM。在ANOVA后使用Prism5.0软件进行Tukey检验(* p ,0.01, ** p ,0.0001)。(图24E)在加载有钙荧光素(calcein)-AM的包含P3或NE (10mg/ml) 的培养基中培养MDA-MB-231细胞过夜,然后与PR1-CTL共培养4小时。通过测量释放的钙荧光素-AM确定细胞毒性。经NE脉冲或经P3脉冲的细胞显示出相对于未脉冲MDA-MB-231细胞更高的杀伤。经PR1脉冲的细胞和未经PR1脉冲的T2细胞分别用作阳性和阴性对照。数据为代表性实验的两个重复孔中的平均值 $\pm$ 6SEM。(图24F)用NE (10mg/ml) 或P3 (10mg/ml) 培养MDA-MB-231细胞24小时。然后用抗PR1/HLA-A2 (8F4) Ab与细胞孵育60分钟,然后添加补体。使用钙荧光素-AM释放测量补体依赖性细胞毒性并显示出8F4Ab对经NE或P3脉冲的MDA-MB-231细胞的特异性杀伤。细胞毒性数据为代表性实验的两个重复孔的平均值 $\pm$ 6SEM。使用Prism 5.0软件进行未配对t检验(* p ,0.05)。

[0049] 图25A-D. 在乳腺癌和黑素瘤患者中检测PR1/HLA-A2和PR1-CTL。(图25A)用抗PR1/HLA-A2 (8F4)-647 (红色) 和抗CK7-FITC (绿色) 对经切除HLA-A2+患者乳腺癌组织(乳腺1和4)进行染色,然后使用共聚焦激光显微术成像。PR1/HLA-A2似乎由乳腺癌细胞表达,如通过8F4与CK7的共染色所示出的。DAPI-蓝用于对细胞核进行染色。(图25B)用抗CD45-647 (红色) (左图) 或者抗CK7-FITC (绿色) 和8F4-647 (红色) (右图) 对经切除HLA-A2+患者乳腺癌组织的连续切片进行染色,然后使用共聚焦激光显微术成像。PR1/HLA-A2由具有最少白细胞(CD45²) 的区域中的乳腺癌细胞 (8F4⁺/CK7⁺) 来表达,从而确定了乳腺癌细胞的PR1/HLA-A2表达。DAPI-蓝用于对细胞核进行染色。(图25C)箱型图示出乳腺癌 (n=11) HLA-A2+患者、黑素瘤 (n=7) HLA-A2+患者和健康 (n=9) HLA-A2+供体外周血中的PR1-CTL。使用Prism 5.0软件进行Mann-Whitney U检验(* p ,0.05)。(图25D)用8F4-647 (红色) 和抗MITF-FITC (绿色)

对经切除HLA-A2+ (黑素瘤1) 和HLA-A22 (黑素瘤2) 患者组织进行染色, 然后使用共聚焦激光显微术成像。PR1/HLA-A2似乎在HLA-A2+黑素瘤样品 (黑素瘤1) 中表达, 如通过8F4与MITF的共染色所示出的。DAPI-蓝用于对细胞核进行染色。比例尺, 20mm。

[0050] 图26A-F. 黑素瘤细胞交叉呈递P3和NE增加了对PR1-CTL的易感性。原发性黑素瘤患者样品中 (图26A) NE (褐色) 和MITF (粉色) 或者 (图26B) P3 (褐色) 和MITF (粉色) 的双重染色示出黑素瘤中缺少NE和P3。在原始放大率3100下取得图像。原始放大率3400的插图显示出分散的NE或P3阳性细胞, 其最可能是炎性细胞。(图26C) Western印迹示出在黑素瘤细胞系中不存在NE和P3。U-937白血病细胞系用作NE和P3的阳性对照。微管蛋白用作加载对照。M = 分子量 (m.w.) 标志物。(图26D-E) 用可溶NE (10mg/ml) 或P3 (10mg/ml) 在逐渐增加的时间点培养526HLA-A2+黑素瘤细胞系, 然后分析 (图26D) NE和P3的摄入以及 (图26E) 交叉呈递 (即, PR1/HLA-A2表达)。NE或P3 (图26D) 或者PR1/HLA-A2 (图26E) 的MFI相对于未脉冲细胞的倍数增加示于y轴上。在ANOVA后使用Prism 5.0软件进行Tukey检验 (* * p=0.0001, * p, 0.05)。数据代表两个重复实验的平均值6SEM。(F) 钙荧光素-AM细胞毒性测定示出相对于未脉冲 (Unp) Me1 526, PR1-CTL对经NE (10mg/ml) 和P3 (10mg/ml) 24小时脉冲之526HLA-A2+黑素瘤细胞系的杀伤。未脉冲 (T2Unp) T2细胞和经PR1脉冲 (T2PR1) T2细胞分别用作阴性和阳性对照。数据为代表性实验的两个重复孔的平均值6SEM。使用Prism 5.0软件进行未配对t检验 (* p, 0.05)。

[0051] 说明性实施方案的描述

[0052] 已示出PR-1自身肽 (VLQELNVTV; SEQ ID NO: 45) 在白血病细胞膜表达的HLA-A * 0201上被CD8+细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 识别, 并且PR1特异性CTL特异性裂解髓性白血病细胞而不裂解正常骨髓细胞。用PR-1肽对患有AML、CML和MDS的HLA-A2+患者进行疫苗接种, 在58%的患者中诱导了PR-1-CTL免疫, 并且在66名患者的13名 (20%) 中诱导了目的临床应答。虽然这些结果是令人鼓舞的, 但是高肿瘤负荷仍然是成功疫苗接种的障碍。

[0053] 因为PR1肽仅在髓性白血病细胞的表面上而不在正常骨髓细胞上以足够量表达, 所以本发明人试图开发靶向PR1/HLA-A * 0201的抗体, 其可治疗性地用于治疗髓性白血病患者或者可用于鉴定哪些患者可能对基于PR1的免疫疗法 (如疫苗或过继T细胞转移) 易感。因为HLA-A2+是最常表达的HLA等位基因 (一般白种人群体的40%), 所以用于T细胞表位的基于抗体的疗法是新颖的, 并且其可被广泛应用。通过用重组PR1/HLA-A * 0201单体对于有免疫能力的BALB/c小鼠进行免疫, 它们获得了IgG2a- κ 单克隆抗体 (8F4), 其对组合的PR1/HLA-A * 0201表位具有特异性。8F4抗体示出对PR1/HLA-A * 0201具有高亲和力 ($K_D=9.9$ 纳摩尔), 并且其示出仅识别经PR-1脉冲的T2靶细胞而不识别经对照肽脉冲的细胞。8F4与HLA-A2+AML结合, 使用FACS和共聚焦显微术二者以标记细胞, 而不标记正常的HLA-A2+外周血细胞。

[0054] 此外, 8F4诱导HLA-A2+原发性人白血病细胞而不诱导正常骨髓细胞的剂量依赖性补体介导的细胞毒性 (CDC)。显著地, 8F4抗体特异性预防HLA-A2转基因NOD/SCID动物模型中的人AML植入, 仅在过继性转移至动物中时单次暴露于抗体。此外, 8F4延迟了乳腺癌肿瘤生长并延长了存活, 尽管事实是P3和NE在乳腺癌细胞中不表达。总之, 这些结果表明产生了对于细胞膜结合的PR1/HLA-A * 0201表位 (一种重要的T细胞靶抗原) 具有特异性的抗体, 其特异性靶向并消除人白血病和实体瘤。

[0055] I. 定义

[0056] 短语“经分离”或“生物纯”是指这样的材料,其基本上或本质上不含通常以所述材料的天然状态发现时伴随其的组分。因此,根据本发明的经分离肽优选不包含在其原位环境中通常与肽缔合的材料。

[0057] “主要组织相容性复合体”或“MHC”是在控制负责生理学免疫应答的细胞相互作用中发挥作用的一组基因。对于人,MHC复合体也被称为HLA复合体。对于MHC和HLA复合体的详细描述,参见Paul (1993)。

[0058] “人白细胞抗原”或“HLA”是人I类或II类主要组织相容性复合体(MHC)蛋白(参见例如Stites,1994)。

[0059] 本文使用的“HLA超型(supertype)或家族”描述了基于共有的肽结合特异性分组的HLA分子的集合。共有对具有某些氨基酸基序的肽具有某种程度类似结合亲和力的HLA I类分子被分组为HLA超型。术语HLA超家族、HLA超型家族、HLA家族和HLA-xx样超型分子(其中xx表示特定的HLA类型)是同义词。

[0060] 术语“基序”是指限定长度的肽(通常,对于I类HLA基序为约8至约13个氨基酸的肽,而对于II类HLA基序为约6至约25个氨基酸的肽)中残基的模式,其由特定的HLA分子识别。对于由人HLA等位基因各自编码的每种蛋白质,肽基序通常是不同的,而且不同之处在于一级和二级锚定残基(anchor residue)的模式。

[0061] “异常细胞”是被认为是具有对于该细胞类型非典型的特征(包括非典型生长、非典型位置处的典型生长或针对非典型靶标的典型作用)的任何细胞。这样的细胞包括癌细胞、良性增生细胞或发育异常细胞、炎性细胞或自身免疫细胞。

[0062] II. PR-1和HLA限制

[0063] A. PR-1

[0064] PR-1自身肽(VLQELNVTV;SEQ ID NO:45)来源于蛋白酶3(P3)和嗜中性粒细胞弹性蛋白酶(NE),二者均在白血病中异常表达。已示出其在白血病细胞膜表达的HLA-A*0201上被CD8+细胞毒性T淋巴细胞(CTL)识别。PR-1特异性CTL特异性裂解髓性白血病(包括急性骨髓性粒细胞白血病(AML)、慢性骨髓性粒细胞白血病(CML)和骨髓发育异常综合征(MDS))细胞,而不裂解正常骨髓细胞。之前,本发明人已经示出,用Montanide ISA-51和GM-CSF中的PR1肽对患有AML、CML和MDS的HLA-A2+患者进行PR-1疫苗接种,在58%的患者中诱导了PR-1-CTL免疫,并且在66名患者的13名(20%)中诱导了目的临床应答。

[0065] B. HLA-A2

[0066] 人白细胞抗原系统(HLA)是人类的主要组织相容性复合体(MHC)的名称。该超基因座含有大量与人类免疫系统功能相关的基因。该组基因位于染色体6上,并且编码细胞表面抗原呈递蛋白和许多其他基因。由某些基因编码的蛋白质也被称为抗原,是其作为器官移植中的因子的历史发现的结果。主要HLA抗原是免疫功能中的必需要素。不同类别具有不同功能。

[0067] HLA I类抗原(A、B&C)从细胞内部呈递肽(包括病毒肽,如果存在的话)。这些肽由在溶酶体中分解的经消化蛋白质产生。所述肽一般为小聚合物,长度约9个氨基酸。外来抗原吸引破坏细胞的杀手T细胞(也称为CD8⁺细胞)。HLA II类抗原(DR、DP&DQ)由细胞外部将抗原呈递至T淋巴细胞。这些特定的抗原刺激T辅助细胞繁殖并且这些T辅助细胞进而刺激

产生抗体的B细胞,自身抗原被抑制性T细胞所抑制。

[0068] HLA-A2 (A2) 是HLA-A“A”血清型组中的人白细胞抗原血清型。所述血清型鉴定许多HLA-A*02等位基因的基因产物,包括HLA-A*0201、*0202、*0203、*0206和*0207基因产物。A*02是全球常见的,而A*0201在亚洲北部和北美频率高。A2是最多样化的血清型,在东非和西南亚显示出多样性。虽然A*0201在亚洲北部的频率高,但是其多样化限于A*0201,较不常见的亚洲变体为A*0203、A*0206。

[0069] 通过HLA-A α 链 α^2 子集的抗体识别确定血清型。对于A2, α “A”链由HLA-A*02等位基因组编码并且 β 链由B2M基因座编码。A2和A*02在意思上几乎同义。A2在亚洲北部和北美比其他地方更为常见,并且其是几种长单元型(haplotype)的一部分。

[0070] III. 抗体

[0071] 本发明涉及在HLA-A2呈递情况下与PR1结合的抗体的产生和用途。抗体能够与特定靶标或一系列抗原性相关靶标“特异性结合”。如本文所使用的,如果基于与抗体可变区的结合可将抗原与抗原性不同分子区分开,则认为抗体能够与抗原“特异性结合”。这样的相互作用与非特异性结合形成对比,其涉及化合物类别而不考虑其化学结构(例如,蛋白质与硝化纤维素的结合等)。特别地,本发明的抗体可表现出“高度特异性结合”,使得其不能或基本上不能与即使密切相关的分子结合。

[0072] 单克隆抗体可通过使用公知技术容易地制备,例如通过引用并入本文的美国专利4,196,265中举例说明的那些。通常,技术包括首先用所选抗原(例如,本发明的多肽或多核苷酸)以足以提供免疫应答的方式免疫合适动物。啮齿动物(例如小鼠和大鼠)是优选的动物。然后使来自经免疫动物的脾细胞与无限增殖(immortal)骨髓瘤细胞融合。然后筛选成功的融合用于产生合适抗体。

[0073] 在一个实施方案中,抗体分子将包含例如通过蛋白水解切割mAb产生的片段(例如F(ab')₂),或者例如可通过重组手段产生的单链免疫球蛋白。这样的抗体衍生物是单价的。在一个实施方案中,这些片段可彼此组合或者与其他抗体片段或受体配体组合以形成“嵌合”结合分子。显著地,这些嵌合分子可包含能够与同一分子的不同表位结合的取代基,或者其可能能够与活化蛋白C表位和“非活化蛋白C”表位结合。

[0074] 当抗体或其片段旨在用于治疗目的时,可期望使其“人源化”以减弱任何免疫反应。这样的人源化抗体可在体外或体内情景下进行研究。人源化抗体可例如通过将抗体的免疫原性部分替换为对应的但非免疫原性的部分来产生(即,嵌合抗体)。PCT申请PCT/U.S.86/02269、EP申请184,187、EP申请171,496、EP申请173,494、PCT申请W0 86/01533、EP申请125,023、Sun等(1987)、Wood等(1985)和Shaw等(1988);全部参考文献通过引用并入本文。Morrison(1985)提供了“人源化”嵌合抗体的一般性综述;其也通过引用并入本文。或者,“人源化”抗体可通过CDR或CEA替换来产生。Jones等(1986)、Verhoeyan等(1988)、Beidler等(1988);全部参考文献通过引用并入本文。

[0075] A. 变体

[0076] 以下是基于改变蛋白质的氨基酸以产生经修饰蛋白质的讨论。在进行这些改变时,可考虑氨基酸的亲水指数。本领域中通常理解亲水氨基酸指数在赋予蛋白质相互作用的生物学功能方面的重要性(Kyte和Doolittle,1982)。认为氨基酸的相对亲水特征有助于所得蛋白质的二级结构,其进而限定蛋白质与其他分子(例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗

原等)的相互作用。

[0077] 在本领域中还应理解,可基于亲水性有效地进行相似氨基酸的替换。通过引用并入本文的美国专利4,554,101声明,蛋白质的最大局部平均亲水性(如受其相邻氨基酸的亲水性支配)与蛋白质的生物学性质相关联。如美国专利4,554,101所详细描述,以下亲水性值分配给氨基酸残基:碱性氨基酸:精氨酸(+3.0)、赖氨酸(+3.0)和组氨酸(-0.5);酸性氨基酸:天冬氨酸(+3.0±1)、谷氨酸(+3.0±1)、天冬酰胺(+0.2)和谷氨酰胺(+0.2);亲水的非离子性氨基酸:丝氨酸(+3.0)、天冬酰胺(+0.2)、谷氨酰胺(+0.2)和苏氨酸(-0.4);含硫氨基酸:半胱氨酸(-1.0)和甲硫氨酸(-1.3);疏水的非芳香性氨基酸:缬氨酸(-1.5)、亮氨酸(-1.8)、异亮氨酸(-1.8)、脯氨酸(-0.5±1)、丙氨酸(-0.5)和甘氨酸(0);疏水的芳香性氨基酸:色氨酸(-3.4)、苯丙氨酸(-2.5)和酪氨酸(-2.3)。

[0078] 应理解,氨基酸可被替换为具有类似亲水性的另一种氨基酸并产生生物学或免疫学修饰蛋白。在这样的改变中,其亲水性值在±2内的氨基酸替换是优选的,在±1内的那些是特别优选的,并且在±0.5内的那些是甚至更特别优选的。

[0079] 如上所述,氨基酸替换一般基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如其疏水性、亲水性、电荷、大小等。将各种以上特征考虑在内的示例性替换对于本领域技术人员是公知的并且包括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0080] 本发明还可采用使用肽模拟物来制备具有抗体的多个天然性质但是具有经改变和/或改善特征的多肽(参见例如Johnson,1993)。使用模拟物背后的基本原理是存在蛋白质的肽骨架,主要以这样的方式定向氨基酸侧链以便有助于分子相互作用,如抗体与抗原的那些。这些原理可与上述原理结合使用,以改造具有抗体的多个天然性质但是具有经改变和/或改善特征的第二代分子。

[0081] 预期本发明还可采用序列变体,例如插入变体或缺失变体。缺失变体缺少天然蛋白质的一个或更多个残基。插入突变体通常包括在多肽的非末端的点中添加物质。还将理解,插入序列变体可包含N端或C端氨基酸,并且本质上仍如本文所公开序列之一所示,只要该序列满足上述标准,包括维持生物学活性。

[0082] 本发明还预期了同种型修饰。如以下所讨论的,抗体8F4被确定为IgG2a-κ。通过修饰Fc区以具有不同同种型,可实现不同的功能。例如,改变为IgG1可增加抗体依赖性的细胞毒性,转变为A类可改善组织分布,而转变为M类可改善效价。

[0083] 经修饰的抗体可通过本领域技术人员已知的任意技术来制备,包括通过标准分子生物学技术表达或者多肽化学合成。本文件在其他地方还论述了用于重组表达的方法。

[0084] B. 单链抗体

[0085] 单链可变片段(scFv)是免疫球蛋白的重链和轻链的可变区通过短(通常为丝氨酸、甘氨酸)接头连接在一起的融合。尽管移除了恒定区并引入了接头肽,但是该嵌合分子保留了原始免疫球蛋白的特异性。右边的图像示出了该修饰通常如何保留特异性不改变。历史上产生这些分子以有助于非常便于将抗原结合结构域表达为单一肽的噬菌体展示。或者,可由来源于杂交瘤的亚克隆重链和轻链直接产生scFv。单链可变片段缺少完整抗体分子中存在的恒定Fc区,并因此缺少用于纯化抗体的常用结合位点(例如,蛋白A/G)。因为蛋白L与κ轻链可变区相互作用,所以这些片段常常可使用蛋白L进行纯化/固定化。

[0086] 柔性接头一般由螺旋促进氨基酸残基和转角氨基酸残基(例如丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸)构成。然而,其他残基也可起作用。Tang等(1996)使用噬菌体展示作为用于从蛋白质接头文库中快速选择用于单链抗体(scFv)的定制接头的手段。构建随机的接头文库,其中重链和轻链可变结构域的基因通过编码可变组合物之18个氨基酸多肽的区段连接。使scFv库(repertoire)(约 5×10^6 个不同成员)在丝状噬菌体上展示并经受半抗原的亲合力筛选。所选变体的群表现出结合活性的显著增加但是保留了相当大的序列多样性。筛选1054个个体变体随后产生了以可溶形式有效产生的催化活性scFv。序列分析揭示了接头中的保守脯氨酸, V_H C端后的两个残基以及其他位置处的精氨酸和脯氨酸的丰度,作为所选范围的唯一共同特征。

[0087] 本发明的重组抗体还可包含允许受体二聚化或多聚化的序列或部分。这样的序列包括来源于IgA的那些序列,其允许形成与J链结合的多聚体。另一种多聚化结构域是Ga14二聚化结构域。在另一些实施方案中,链可用物质(例如生物素/抗生物素蛋白(avidin))进行修饰,这允许两种抗体组合。

[0088] 在一个不同的实施方案中,可通过使用非肽接头或化学单元连接受体轻链和重链来产生单链抗体。一般来说,在不同细胞中产生轻链和重链,纯化,随后以适当方式(即,重链的N端与轻链的C端通过合适的化学桥连接)连接在一起。

[0089] 使用交联试剂以形成捆绑两种不同分子之官能团的分子桥,例如稳定剂和凝结剂。然而,预期可产生同一类似物或由不同类似物构成的杂聚复合体的二聚体或多聚体。为了以逐步的方式连接两种不同化合物,可使用异双功能交联剂消除不需要的均聚物形成。表1说明了几种交联剂。

[0090] 表1-异双功能交联剂

[0091]

接头	针对以下物质具有反应性	优点和应用	间隔区臂长度\交联后
SMPT	伯胺 巯基	· 稳定性更大	11.2 Å
SPDP	伯胺 巯基	· 硫醇化 · 可切割的交联	6.8 Å
LC-SPDP	伯胺 巯基	· 延长的间隔区臂	15.6 Å
Sulfo-LC-SPDP	伯胺 巯基	· 延长的间隔臂区 · 可溶于水	15.6 Å

[0092]

接头	针对以下物质具有反应性	优点和应用	间隔区臂长度\交联后
SMCC	伯胺 巯基	· 稳定的马来酰亚胺反应基团 · 酶-抗体缀合 · 半抗原-载体蛋白缀合	11.6 A
Sulfo-SMCC	伯胺 巯基	· 稳定的马来酰亚胺反应基团 · 可溶于水 · 酶-抗体缀合	11.6 A
MBS	伯胺 巯基	· 酶-抗体缀合 · 半抗原-载体蛋白缀合	9.9 A
Sulfo-MBS	伯胺 巯基	· 可溶于水	9.9 A
SIAB	伯胺 巯基	· 酶-抗体缀合	10.6 A
Sulfo-SIAB	伯胺 巯基	· 可溶于水	10.6 A
SMPB	伯胺 巯基	· 延长的间隔区臂 · 酶-抗体缀合	14.5 A
Sulfo-SMPB	伯胺 巯基	· 延长的间隔区臂 · 可溶于水	14.5 A
EDC/Sulfo-NHS	伯胺 羧基	· 半抗原-载体缀合	0
ABH	碳水化合物 非选择性	· 与糖基团反应	11.9 A

[0093] 示例性异双功能交联剂包含两个反应性基团：一个与伯胺基团反应（例如，N-羟基琥珀酰亚胺）并且另一个与硫醇基团反应（例如，吡啶二硫化物、马来酰亚胺、卤素等）。通过伯胺反应基团，交联剂可与一种蛋白（例如，所选抗体或片段）的赖氨酸残基反应，并且通过硫醇反应基团，已与第一蛋白捆绑在一起的交联剂与另一蛋白（例如，所选物质）的半胱氨酸残基（游离巯基）反应。

[0094] 优选的是，采用在血液中具有合理稳定性的交联剂。已知多种类型的含二硫键接

头可成功地用于缀合靶向剂和治疗/预防剂。可证明包含有空间位阻的二硫键的接头在体内产生更大的稳定性,从而防止靶向肽在到达作用位点之前释放。因此,这些接头是一组连接剂。

[0095] 另一种交联试剂是SMPT,其是包含为由相邻苯环和甲基产生之“空间位阻”的二硫键的双功能交联剂。认为二硫键的空间位阻起到保护键免于组织和血液中可存在的硫醇盐阴离子(例如谷胱甘肽)攻击的功能,从而帮助防止缀合物在所连接物质递送至靶位点之前解偶联。

[0096] SMPT交联试剂,与许多其他已知的交联试剂一样,能够交联官能团,例如半胱氨酸的SH或伯胺(例如,赖氨酸的 ϵ 氨基)。另一种可能类型的交联剂包括包含可切割二硫键的异双功能光反应性叠氮基苯,例如磺基琥珀酰亚胺基-2-(对-叠氮基水杨基氨基)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯/盐。N-羟基-琥珀酰亚胺基与伯胺基团反应并且叠氮基苯(光分解后)非选择性地与任意氨基酸残基反应。

[0097] 除位阻交联剂之外,根据本文也可采用非位阻交联剂。并不认为包含或产生经保护二硫化物的另一些有用的交联剂包括SATA、SPDP和2-亚氨基硫代坊(2-iminothiolane)(Wawrzynczak & Thorpe,1987)。这些交联剂的使用在本领域被很好地理解。另一个实施方案涉及柔性接头的使用。

[0098] 美国专利4,680,338描述了可用于产生配体与含胺聚合物和/或蛋白质的缀合物,尤其是可用于与螯合剂、药物、酶、可检测标记等形成抗体缀合物的双功能接头。美国专利5,141,648和5,563,250公开了包含在多种温和条件下可切割之不稳定键的可切割缀合物。该接头特别地用于使目的物质可与接头直接键合,并且切割导致活性剂释放。特别的用途包括向蛋白质(例如抗体或药物)添加游离氨基或游离巯基。

[0099] 美国专利5,856,456提供了用于连接多肽成分以制备融合蛋白(例如单链抗体)的肽接头。接头的长度多达约50个氨基酸,包含至少出现一次的带电氨基酸(优选精氨酸或赖氨酸)。随后为脯氨酸,并且特征在于稳定性更大并且聚集减少。美国专利5,880,270公开了可用于多种免疫诊断技术和分离技术的含氨氧基接头。

[0100] C.纯化

[0101] 在某些实施方案中,可纯化本发明的抗体。本文使用的术语“纯化”旨在指可分离自其他组分的组合物,其中将蛋白质纯化至相对于其可天然获得状态的任意程度。因此,经纯化的蛋白质还指从其可天然存在的环境中释放的蛋白质。当使用术语“基本上纯化”时,该名称是指其中蛋白质或肽形成成组合物的主要组分的组合物,例如组合物中蛋白质的构成为约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或更多。

[0102] 蛋白质纯化技术对于本领域技术人员是公知的。这些技术在一个水平上包括将细胞环境粗分级(crude fractionation)为多肽级分和非多肽级分。将多肽与其他蛋白质分离后,可使用色谱和电泳技术进一步纯化目的多肽以实现部分或完全纯化(或纯化至均匀)。特别适合于制备纯肽的分析方法是离子交换色谱法、排阻色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦。用于蛋白质纯化的另一些方法包括用硫酸铵、PEG、抗体等沉淀或通过热变性然后离心;凝胶过滤、反相、羟基磷灰石和亲和色谱法;以及这些技术和其他技术的组合。

[0103] 在纯化本发明的抗体时,可期望在原核表达系统或真核表达系统中表达多肽并使用变性条件提取蛋白质。可使用与多肽标签部分结合的亲和柱从其他细胞组分纯化多肽。

如本领域中一般已知的,认为可改变实施多个纯化步骤的顺序,或者可省略某些步骤,并且仍然产生用于制备基本上纯化的蛋白质或肽的合适方法。

[0104] 通常,利用与抗体Fc部分结合的试剂(即,蛋白A)对完全抗体进行分级。或者,可使用抗原同时纯化并选择适当抗体。这些方法常常利用与支持物(例如柱、过滤器或珠)结合的选择剂。使抗体与支持物结合,移除污染物(例如,洗掉),并且通过施加条件(盐、热等)释放抗体。

[0105] 依据本公开内容,用于定量蛋白质或肽的纯化程度的多种方法对于本领域技术人员将是已知的。其包括例如确定活性级分的比活性(specific activity),或者通过SDS/PAGE分析评估级分中多肽的量。另一种用于评估级分纯度的方法是计算级分的比活性,以将其与初始提取物的比活性进行比较,并由此计算纯度。当然,用于表示活性量的实际单位将依赖于纯化后所选择的特定测定技术以及所表达蛋白质或肽是否表现出可检测的活性。

[0106] 已知在SDS/PAGE的不同条件下,多肽的迁移可改变,有时是显著的(Capaldi等,1977)。因此,应理解在不同电泳条件下,纯化表达产物或部分纯化表达产物的表观分子量可不同。

[0107] D. 抗体与治疗剂或诊断剂的缀合

[0108] 在一个实施方案中,本发明的抗体可与多种用于疾病诊断和疾病治疗的试剂连接。连接可使用多种公知的化学反应和试剂来进行,其中的一些在本文件的其他地方进行了描述。

[0109] 1. 诊断试剂

[0110] 许多诊断剂/成像剂在本领域中是已知的,其与蛋白质(包括抗体)连接的方法同样是已知的(参见例如美国专利5,021,236、4,938,948和4,472,509,各自通过引用并入本文)。所使用的成像部分可以是顺磁性离子、放射性同位素、荧光染料、NMR可检测物质和X射线成像剂。

[0111] 在顺磁性离子的情况下,例如,可提及诸如铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钆(III)、钐(III)、铈(III)、钕(III)、钷(II)、铽(III)、镱(III)、铕(III)和/或铱(III)的离子,其中特别优选钆。可用于其他情景(例如X射线成像)中的离子包括但不限于镧(III)、金(III)、铅(II),并且尤其是铋(III)。

[0112] 在用于治疗 and/或诊断应用的放射性同位素的情况下,可提及砷²¹¹、¹⁴碳、⁵¹铬、³⁶氯、⁵⁷钴、⁵⁸钴、铜⁶⁷、¹⁵²Eu、镓⁶⁷、³氢、碘¹²³、碘¹²⁵、碘¹³¹、铟¹¹¹、⁵⁹铁、磷³²、铈¹⁸⁶、铈¹⁸⁸、⁷⁵硒、³⁵硫、铈^{99m}(technetium)和/或钇⁹⁰。¹²⁵I常常优选用于某些实施方案中,并且铈^{99m}和/或铟¹¹¹因其低能量和长期检测(long range detection)的适合性也常常是优选的。本发明的放射性标记受体可根据本领域的公知方法产生。例如,受体可通过与碘化钠和/或碘化钾以及化学氧化剂(例如次氯酸钠或者酶促氧化剂(如乳过氧化物酶))相接触来碘化。根据本发明的TcR可通过配体交换过程由铈^{99m}标记,例如,通过用亚锡溶液还原高铈酸盐,将还原的铈螯合到Sephadex柱上并向该柱施加抗体。或者,可使用直接标记技术,例如,通过孵育高铈酸盐、还原剂(如SNCI₂)、缓冲溶液(如邻苯二甲酸钠钾溶液)和抗体来进行。常常用于结合放射性同位素中间官能团是二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA),其作为抗体金属离子存在。

[0113] 预期用作缀合物的荧光标记是Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、

BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FAM、异硫氰酸荧光素、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、罗丹明绿、罗丹明红、Renographin、ROX、TAMRA、TET、四甲基罗丹明和/或Texas Red。

[0114] 2. 治疗试剂

[0115] 使各种各样的治疗剂与本发明的抗体连接。例如，以上讨论的放射性同位素，虽然可用于诊断情景下，但是也可用作治疗剂。化学治疗剂也可与抗体缀合，并且包括顺铂(CDDP)、卡铂、甲基苄肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑(melphalan)、苯丁酸氮芥、白消安(busulfan)、亚硝基脲(nitrosurea)、更生霉素、柔红霉素(daunorubicin)、阿霉素(doxorubicin)、博来霉素(bleomycin)、普卡霉素(plicomycin)、丝裂霉素、依托泊甙(VP16)、他莫昔芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合剂、紫杉醇、吉西他滨(gemcitabine)、诺维本(navelbine)、法尼基蛋白(farnesyl-protein)转移酶抑制剂、反铂(transplatinum)、5-氟脲嘧啶、长春新碱、长春花碱和甲氨蝶呤。

[0116] 另一类治疗剂是毒素。考虑了霍乱毒素、肉毒杆菌毒素、百日咳毒素、蓖麻毒蛋白A和B链以及其他天然毒素和合成毒素。

[0117] 细胞因子和淋巴因子是可与本发明TcR偶联的又一类治疗剂，并且包括IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、TNF α 、GM-CSF、INF α 、IFN β 和IFN γ 。

[0118] 在另一些实施方案中，考虑了抗炎剂作为可与抗体缀合的治疗剂。抗炎剂包括NSAID、类固醇类、瑞帕霉素、英夫利昔单抗和地尼白介素(ontak)。免疫抑制剂包括FK-506和环孢菌素A(cyclosporin A)。

[0119] TLR激动剂可与抗体连接，例如通过分子的Fc部分。TLR的激动剂是刺激或“打开”免疫系统的化合物。TLR9的天然激动剂是细菌和病毒中常见的DNA的组分。TLR7和TLR8的天然激动剂是病毒中发现的RNA模式。在识别其天然DNA和RNA激动剂后，TLR7、8和9各自引发不同级联的保护性免疫应答。TLR激动剂包括寡脱氧核苷酸、透明质酸片段、咪喹莫特、薰草菌素C、脂质A、loroxibine、LPS、单磷酸脂质A(monophosphoryl lipda A)、肉豆蔻醚、雷西莫特(resiquimod)、鼠伤寒沙门氏菌(S.typhimurium)鞭毛蛋白、HKLM、PAM3CSK4和聚肌胞苷酸(polyI:C)。

[0120] IV. 核酸和表达

[0121] A. 抗体编码核酸

[0122] 本发明的一个方面中，提供了编码抗体重链和轻链、可变结构域和恒定结构域之多个部分的核酸。核酸区段可来源于基因组DNA、互补DNA(cDNA)或合成DNA。当期望并入表达载体中时，核酸还可包含天然内含子或来源于另一基因的内含子，以及其他非编码区(例如调节区)和编码区(例如接头)。本文使用的术语“cDNA”旨在指使用信使RNA(mRNA)作为模板制备的DNA。与基因组DNA或由基因组的非加工或部分加工的RNA模板聚合的DNA相比，使用cDNA的优点在于cDNA主要包含对应蛋白质的编码序列。

[0123] 术语“重组”可与多肽或具体多肽的名称结合使用，并且一般是指由已在体外进行操作的核酸分子产生的多肽或者是这种分子的复制产物的多肽。重组载体和分离的核酸区段可不同地包含其自身的抗体编码区、在基础编码区中具有所选变化或修饰的编码区，或

者其可编码包含非抗体区的较大多肽。

[0124] 本文使用的“核酸”包括单链分子和双链分子,以及DNA、RNA、化学修饰核酸和核酸类似物。预期本发明范围内的核酸长度可为约10、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约110、约120、约130、约140、约150、约160、约170、约180、约190、约200、约210、约220、约230、约240、约250、约275、约300、约325、约350、约375、约400、约425、约450、约475、约500、约525、约550、约575、约600、约625、约650、约675、约700、约725、约750、约775、约800、约825、约850、约875、约900、约925、约950、约975、约1000、约1100、约1200、约1300、约1400、约1500、约1750、约2000、约2250、约2500个或更多个核苷酸残基。

[0125] 预期抗体可由编码适当氨基酸序列的任何核酸序列编码,例如SEQ ID NO:3、60、5、8、9、10(重链CDR 1、2和3;轻链CDR 1和2、3)以及SEQ ID NO:11或27中的那些,其包含重链CDR和框架区1、2和3,侧翼上游分别为重链CDR 1、2和3;以及SEQ ID NO:23,其包含轻链CDR和框架区1、2和3,侧翼上游分别为轻链CDR 1、2和3。使用标准化密码子表(表2),编码期望氨基酸序列之核酸的设计和产生对于本领域技术人员是公知的。在一些特别的实施方案中,可对选择用于编码各氨基酸的密码子进行修饰以优化核酸在目的宿主细胞中的表达。本文使用的术语“功能等价密码子”是指编码同一氨基酸的密码子,例如精氨酸或丝氨酸的六个密码子,并且还指编码生物学等价氨基酸的密码子。对于不同物种之宿主细胞中的密码子偏好在本领域是公知的。优选用于人类的密码子对于本领域技术人员是公知的(Wada等,1990)。对于其他生物体的密码子偏好对于本领域技术人员也是公知的(Wada等,1990,其整体通过引用包括在本文中)。

[0126] 表2-密码子表

[0127]

氨基酸			密码子
丙氨酸	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
半胱氨酸	Cys	C	UGC UGU
天冬氨酸	Asp	D	GAC GAU
谷氨酸	Glu	E	GAA GAG
苯丙氨酸	Phe	F	UUC UUU
甘氨酸	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
组氨酸	His	H	CAC CAU
异亮氨酸	Ile	I	AUA AUC AUU
赖氨酸	Lys	K	AAA AAG
亮氨酸	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
甲硫氨酸	Met	M	AUG
天冬酰胺	Asn	N	AAC AAU
脯氨酸	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
谷氨酰胺	Gln	Q	CAA CAG
精氨酸	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
丝氨酸	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
苏氨酸	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
缬氨酸	Val	V	GUA GUC GUG GUU
色氨酸	Trp	W	UGG
酪氨酸	Tyr	Y	UAC UAU

[0128] B. 核酸表达

[0129] 基于原核生物和/或真核生物的系统可用于产生核酸序列,或其关联(cognate)多肽、蛋白质和肽。本发明考虑了使用这样的表达系统来产生结合PR-1/HLA-A2的抗体。一种有力的表达技术采用昆虫-细胞/杆状病毒系统。所述昆虫-细胞/杆状病毒系统可产生异源核酸区段的高水平蛋白质表达,例如美国专利5,871,986、4,879,236所述,二者均通过引用并入本文,并且可例如从 **Invitrogen®** 以名称 **MaxBac® 2.0** 以及从 **Clontech®** 以 **BacPack™** 杆状病毒表达系统名称购买。

[0130] 此外,存在许多可商购并且可广泛使用的其他表达系统。这些系统的一个实例是 **Stratagene®** 的 Complete Control 诱导型哺乳动物表达系统(其包括合成的蜕皮素诱导型受体)或其 pET 表达系统(一种大肠杆菌表达系统)。诱导型表达系统的另一个实例可得自于 **Invitrogen®**, 其带有 T-Rex™ (四环素调节表达) 系统(一种使用全长 CMV 启动子的诱导型哺乳动物表达系统)。**Invitrogen®** 还提供了称为甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)表达系统的酵母表达系统,其被设计成在甲基营养酵母甲醇毕赤酵母中高水平产生重组蛋

白。本领域技术人员已知如何表达载体(例如表达构建体),以产生核酸序列或其关联多肽、蛋白质或肽。

[0131] 1. 病毒载体和递送

[0132] 存在许多方式可将表达载体引入细胞中。病毒为表达由核酸编码的蛋白质产物提供了有力的工具。因此,在本发明的某些实施方案中,表达载体包括病毒或来源于病毒基因组的改造载体。某些病毒能够通过受体介导的胞吞进入细胞以整合到宿主细胞基因组中并稳定且有效地表达病毒基因使得其成为将外来基因转移到哺乳动物细胞中的具有吸引力的候选物(Ridgeway,1988;Nicolas和Rubenstein,1988;Baichwal和Sugden,1986;Temin,1986)。首先用作基因载体的病毒是DNA病毒,包括乳多空病毒(猿猴病毒40、牛乳头瘤病毒和多瘤病毒)(Ridgeway,1988;Baichwal和Sugden,1986)和腺病毒(Ridgeway,1988;Baichwal和Sugden,1986)。

[0133] 腺病毒载体。一种用于递送核酸的特殊方法涉及使用腺病毒表达载体。虽然已知腺病毒载体整合到基因组DNA中的能力低,但是该特征被这些载体提供的高效率基因转移所抵消。“腺病毒表达载体”意指包括包含足以(a)支持构建体包装和(b)最终表达在其中克隆的组织特异性或细胞特异性构建体之腺病毒序列的那些构建体。遗传组织或腺病毒(36kb的线性双链DNA病毒)的知识允许将大片腺病毒DNA替换为多至7kb的外来序列(Grunhaus和Horwitz,1992)。

[0134] AAV载体。可使用腺病毒辅助转染将核酸引入细胞中。在使用腺病毒偶联系统的细胞系统中已经报道了增加的转染效率(Kelleher和Vos,1994;Cotten等,1992;Curiel,1994)。腺相关病毒(AAV)是用于本发明疫苗的具有吸引力的载体系统(Muzyczka,1992)。AAV具有对宽宿主范围的感染性(Tratschin等,1984;Laughlin等,1986;Lebkowski等,1988;McLaughlin等,1988)。关于rAAV载体的产生和使用的细节在美国专利5,139,941和4,797,368中进行了描述,其各自通过引用并入本文。

[0135] 逆转录病毒载体。因为逆转录病毒因能够将其基因整合到宿主基因组中,转移大量外来遗传物质,感染广谱物种和细胞类型并且能够在特殊的细胞系中包装,所以其具有作为疫苗中基因递送载体的前景(Miller,1992)。

[0136] 为了构建逆转录病毒载体,将核酸(例如,编码目的抗原的核酸)插入病毒基因组中代替某些病毒序列,以产生复制缺陷的病毒。为了产生病毒体,构建了包含gag、pol和env基因但是不含LTR和包装组分的包装细胞系(Mann等,1983)。当将包含cDNA以及逆转录病毒LTR和包装序列的重组质粒引入特殊细胞系中(例如,通过磷酸钙沉淀)时,包装序列允许重组质粒的RNA转录本包装到病毒颗粒中,然后将其分泌到培养基中(Nicolas和Rubenstein,1988;Temin,1986;Mann等,1983)。然后收集包含重组逆转录病毒的培养基,任选地浓缩,并用于基因转移。逆转录病毒能够感染各种各样的细胞类型。然而,整合和稳定表达需要宿主细胞分裂(Paskind等,1975)。

[0137] 慢病毒是复杂的逆转录病毒,除常见的逆转录病毒基因gag、pol和env之外,其还包含具有调节或结构功能的其他基因。慢病毒载体在本领域是公知的(参见,例如Naldini等,1996;Zufferey等,1997;Blomer等,1997;美国专利6,013,516和5,994,136)。慢病毒的一些实例包括人免疫缺陷病毒:HIV-1、HIV-2以及猿猴免疫缺陷病毒:SIV。通过多次减弱HIV毒力基因产生慢病毒载体,例如,基因env、vif、vpr、vpu和nef是缺失的,使得载体是生

物学安全的。

[0138] 重组慢病毒载体能够感染非分裂细胞并且可用于核酸序列的体内和离体基因转移以及表达。例如,美国专利5,994,136(其通过引用并入本文)中描述了能够感染非分裂细胞的重组慢病毒,其中用携带包装功能的两种或更多种载体(即,gag、pol和env以及rev和tat)转染合适的宿主细胞。可通过使包膜蛋白与抗体或用于靶向特殊细胞类型受体的特殊配体连接而靶向重组病毒。通过将目的序列(包括调节区)以及编码特定靶细胞上受体配体的另一种基因插入病毒载体中,例如,载体现在是靶特异性的。

[0139] 其他病毒载体。在本发明中可采用其他病毒载体作为疫苗构建体。可采用来源于病毒(例如牛痘病毒(Ridgeway,1988;Baichwal和Sugden,1986;Coupar等,1988)、辛德比斯病毒、巨细胞病毒和单纯疱疹病毒)的载体。其为多种哺乳动物细胞提供了多个具有吸引力的特征(Friedmann,1989;Ridgeway,1988;Baichwal和Sugden,1986;Coupar等,1988;Horwich等,1990)。慢病毒也可开发作为疫苗载体(VandenDriessche等,2002)。

[0140] 使用经修饰病毒递送。待递送核酸可容纳在已改造成表达特异性结合配体的感染性病毒内。因此,病毒颗粒将与靶细胞的关联受体特异性结合并且将内容物递送至细胞。基于通过将乳糖残基化学添加至病毒包膜对逆转录病毒的化学修饰,开发了设计成允许特异性靶向逆转录病毒载体的新途径。该修饰可允许通过唾液酸糖蛋白受体特异性感染肝细胞。

[0141] 设计了靶向重组逆转录病毒的另一途径,其中使用针对逆转录病毒包膜蛋白并且针对特定细胞受体的生物素化抗体。所述抗体通过使用链霉抗生物素蛋白经由生物素组分偶联(Roux等,1989)。使用针对主要组织相容性复合体I类和II类抗原的抗体,它们证明了用嗜亲性病毒体外感染多种具有那些表面抗原的人细胞(Roux等,1989)。

[0142] 2.非病毒核酸递送

[0143] 认为用于核酸递送以实现本发明组合物表达的合适非病毒方法包括如本文所述或者本领域普通技术人员已知的几乎任何方法,通过其可将核酸(例如,DNA)引入细胞器、细胞、组织或生物体中。这样的方法包括但不限于:直接递送DNA,例如通过注射(美国专利5,994,624、5,981,274、5,945,100、5,780,448、5,736,524、5,702,932、5,656,610、5,589,466和5,580,859,其各自通过引用并入本文),包括微注射(Harland和Weintraub,1985;美国专利5,789,215,通过引用并入本文);通过电穿孔(美国专利5,384,253,通过引用并入本文);通过磷酸钙沉淀(Graham和Van Der Eb,1973;Chen和Okayama,1987;Rippe等,1990);通过使用DEAE-葡聚糖然后使用聚乙二醇(Gopal,1985);通过直接声波加载(sonic loading)(Fechheimer等,1987);通过脂质体介导的转染(Nicolau和Sene,1982;Fraley等,1979;Nicolau等,1987;Wong等,1980;Kaneda等,1989;Kato等,1991);通过微粒轰击(PCT申请No.WO 94/09699和95/06128;美国专利5,610,042、5,322,783、5,563,055、5,550,318、5,538,877和5,538,880,并且其各自通过引用并入本文);通过用碳化硅纤维搅动(Kaepler等,1990;美国专利5,302,523和5,464,765,其各自通过引用并入本文);或者通过PEG介导的原生质体转化(Omirulלה等,1993;美国专利4,684,611和4,952,500,其各自通过引用并入本文);通过干燥/抑制介导的DNA摄入(Potrykus等,1985)。通过应用诸如这些的技术,细胞器、细胞、组织或生物体可进行稳定或瞬时转化。

[0144] V.用于诊断癌症或者增生性或发育异常病症的抗体

[0145] 在本发明的一个实施方案中,提供了诊断癌症(例如白血病(例如,AML、CML、MDS))以及脊髓发育异常病症的方法。脊髓发育异常症(Myelodysplasias,MDS)是指其中骨髓不正常起作用并产生不足数目的正常血细胞的一组病症。MDS影响任意类型并偶尔所有类型的血细胞(包括红细胞、血小板和白细胞)的产生(血细胞减少)。约50%的儿科脊髓发育异常症可非为五种类型的MDS:难治性贫血、难治性环形铁粒幼细胞贫血(refractory anemia with ring sideroblasts)、难治性贫血伴未成熟细胞增多(refractory anemia with excess blasts)、难治性贫血伴转化中未成熟细胞增多(refractory anemia with excess blasts in transformation)和慢性髓单核细胞白血病。剩余的50%通常存在分离或组合的血细胞减少,如贫血、白细胞减少和/或血小板减少(血小板量低)。虽然是慢性的,但是MDS在约30%的患者中变为急性髓性白血病(AML)。

[0146] 根据本发明的诊断还考虑了实体瘤癌症。这样的癌症为肺癌、头颈部癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、骨癌、睾丸癌、宫颈癌、胃肠癌、淋巴瘤、肺中的肿瘤前病变、结肠癌、黑素瘤和膀胱癌。其他增生性、赘生性(neoplastic)和发育异常疾病(包括良性超增殖性疾病)也在本文描述的诊断方法的范围内。

[0147] A. 诊断试剂的施用

[0148] 诊断试剂的施用在技术领域是公知的并且将根据待实现的诊断而变化。例如,当待对离散的肿瘤团块进行成像时,可利用局部或区域施用(例如,在肿瘤脉管系统、局部淋巴系统或者局部动脉或静脉中)。或者,可区域或全身地提供诊断试剂。当已鉴定出已知的特定肿瘤团块时,或者当怀疑有转移时,这可以是期望对整个四肢或生物体成像的选择途径。

[0149] B. 可注射组合物和制剂

[0150] 用于递送根据本发明的药物的一种方法是全身性的。然而,本文所公开的药物组合物可替代地经肠胃外、静脉内、皮内、肌内、透皮或甚至腹膜内施用,如美国专利5,543,158、美国专利5,641,515和美国专利5,399,363(各自具体地通过引用以其整体并入本文)所述。

[0151] 药物注射可通过注射器或者用于注射溶液的任何其他方法进行,只要药剂可通过注射所需针的特定规格。已经描述了新的无针注射系统(美国专利5,846,233),其具有限定了用于保存溶液之安瓿室的喷嘴和用于将溶液从喷嘴推出到递送部位的能量装置。还描述了注射器系统用于基因治疗,其允许以任意深度精确地多次注射预定量的溶液(美国专利5,846,225)。

[0152] 活性化合物作为游离碱或可药用盐的溶液可通过在水中与表面活性剂(例如羟丙基纤维素)适当混合来制备。也可在甘油、液态聚乙二醇及其混合中以及在油中制备分散体。在存储和使用的普通条件下,这些制剂包含防腐剂以防止微生物生长。适用于注射用途的药物形式包括无菌水溶液或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末(美国专利5,466,468,具体地通过引用以其整体并入本文)。在所有情况下,所述形式必须是无菌的并且必须在一定程度上是流动的,所述程度易于可注射性存在。其在制造和存储条件下必须是稳定的,并且必须对抗微生物(例如细菌和真菌)的污染作用而保藏。载体可以是包含例如水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)、其合适的混合物和/或植物油的溶剂或分散介质。可例如通过使用涂层(例如磷脂酰胆碱),在分散体情况下

通过维持所需粒径以及通过使用表面活性剂来维持合适的流动性。通过多种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、山梨酸、硫汞撒(thimerosal)等)可防止微生物作用。在许多情况下,将优选包含等张剂,例如糖类或氯化钠。通过在组合物中使用吸收延迟剂(例如单硬脂酸铝和明胶)可延长可注射组合物的吸收。

[0153] 对于水溶液的肠胃外施用,例如,必要时可对溶液进行适当缓冲并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释液等张。这些特别的水溶液尤其适合于静脉内、肌内、皮下、瘤内和腹膜内施用。在这一点上,根据本公开内容,可采用的无菌水介质对于本领域技术人员将是已知的。例如,可将1剂量溶解在1ml等张NaCl溶液中并且添加至1000ml皮下灌注流体(hypodermolysis fluid)或者注射在建议的输注部位(参见,例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”第15版,第1035-1038和1570-1580页)。根据治疗对象的状况必定出现剂量的一些变化。在任何情况下,施用负责人员将决定对个体对象的合适剂量。而且,对于人施用,制剂应满足如FDA生物标准办公室所要求的无菌性、致热性、一般安全性和纯度标准。

[0154] 无菌可注射溶液通过以下方法制备:将活性化合物以所需量根据需与多种以上列举的其他成分并入适当溶剂中,然后过滤灭菌。一般来说,通过将多种经灭菌的活性成分并入无菌载剂中来制备分散体,所述无菌载剂包含基础分散介质和需要的来自以上列举之那些的其他成分。在无菌粉末用于制备无菌可注射溶液的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其产生了活性成分加上来自其之前无菌过滤溶液的任何另外的期望成分的粉末。

[0155] 本文所公开的组合物可配制成中性或盐形式。可药用盐包括酸加成盐(与蛋白质的游离氨基形成)并且其与无机酸(例如,盐酸或磷酸)或者有机酸(例如,乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)形成。与游离羧基形成的盐也可来源于无机碱(例如,氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁)和有机碱(例如,异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等)。配制后,将以与剂型相容的方式并且以治疗有效的量施用溶液。制剂容易以多种剂型施用,例如可注射溶液、药物释放胶囊等。

[0156] 本文使用的“载体(carrier)”包括任何和所有溶剂、分散介质、载剂、涂层、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、混悬液、胶体等。这些介质和剂用于药物活性物质的用途在本领域是公知的。除了任何常规介质或剂与活性成分相容,还考虑了其在治疗组合物中的用途。还可将补充活性成分并入组合物中。

[0157] 短语“可药用”或“可药理接受”是指在施用至人时不产生过敏反应或类似的麻烦反应的分子实体和组合物。包含蛋白质作为活性成分的水性组合物的制备在本领域是很好理解的。通常,这样的组合物被制备为可注射剂,如液体溶液或混悬液;还可制备成固体形式,其适于在注射前溶解在或悬于液体中。

[0158] VI. 治疗方法

[0159] A. 癌症和增生性/发育异常/赘生性疾病

[0160] 本发明的抗体可用在治疗包括癌症的增生性/发育异常/赘生性疾病/病症的方法中。预期待用本发明肽治疗的疾病/病症的类型包括但不限于白血病(例如AML、MDS和CML)以及脊髓发育异常。癌症的其他类型可包括肺癌、头颈部癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、骨癌、睾丸癌、宫颈癌、胃肠癌、淋巴瘤、肺中的肿瘤前病变、结肠癌、黑素瘤、膀胱癌和任

何其他赘生性疾病。

[0161] 为了使用本发明的方法和组合物杀伤细胞,抑制细胞生长,抑制转移,减小肿瘤/组织大小、肿瘤细胞负荷或者逆转或减少肿瘤细胞的恶性表型,一般使增生性/赘生性/癌细胞与通常分散在可药用缓冲剂或载体(参见以上诊断剂的讨论)中的治疗化合物(例如多肽或编码本发明抗体的表达构建体)相接触。施用途随病变位置和性质而自然地变化,并且包括例如皮内、透皮、肠胃外、静脉内、肌内、鼻内、皮下、经皮、气管内、腹膜内、瘤内、灌注、灌洗、直接注射和经口施用以及制剂。对于赘生性疾病和病症,也可采用关于治疗或诊断癌症所讨论的任意施用制剂和途径。考虑了离体实施方案,其中在患者身体(具体地或作为较大细胞群的一部分)外部治疗/转导肿瘤细胞。

[0162] 对于离散的实体可及(accessible)肿瘤,具体考虑瘤内注射或注射到肿瘤脉管系统中。局部施用、区域施用或全身施用也可以是适当的。对于>4cm的肿瘤,待施用体积将为约4ml至10ml;而对于<4cm的肿瘤,将使用约1ml至3ml的体积。以单一剂量递送的多次注射剂包含约0.1ml至约0.5ml体积。通过将多次注射剂以约1cm的间隔注射到肿瘤中可有利地接触病毒颗粒。

[0163] 在手术干预的情况下,本发明可在手术时和/或在其后使用,以治疗残留或转移疾病。例如,可向经切除的肿瘤床注射或灌注包含抗体的制剂。灌注可以是切除后持续的,例如,通过在手术部位留下植入的导管。还设想了周期性的手术后治疗。

[0164] 适当时还可应用持续施用,例如,当切除肿瘤并处理肿瘤床以消除残留的微观疾病时。优选通过注射器或导管递送。开始治疗后,这样的持续灌注可进行约1至2小时到约2至6小时、到约6至12小时、到约12至24小时、到约1至2天、到约1至2天或更久的时间段。一般来说,通过持续灌注的治疗组合物的剂量与单次或多次注射给予的剂量相同,在发生灌注的时间段中进行调整。还考虑了四肢灌注可用于施用本发明的治疗组合物,特别用于治疗黑素瘤和肉瘤。

[0165] 治疗方案同样可化变,并且常取决于肿瘤类型、肿瘤位置、疾病进展以及患者的健康和年龄。明显地,某些类型的肿瘤将需要更具攻击性的治疗,而同时,某些患者不能忍受更繁重的方案。临床医生将基于治疗制剂的已知功效和毒性(如果有的话)最适合地做出这样的决定。

[0166] 在某些实施方案中,治疗的肿瘤可能至少在最初不可被切除。治疗可因边缘收缩或者通过消除某些特别具侵略性的部分而使肿瘤的可切除性增加。治疗后,可进行切除。切除后另外的治疗将用来消除肿瘤部位上的微观残留疾病(microscopic residual disease)。

[0167] 用于原发性肿瘤或切除后肿瘤床的典型疗程包括多个剂量。通常,原发性肿瘤治疗包括在两周时间中的6次剂量施加。两周方案可重复一次、两次、三次、四次、五次、六次或更多次。在疗程期间,可重估完成计划给药的需求。

[0168] B. 联合疗法

[0169] 还可证明使用其中包括第二抗癌剂的联合疗法是有利的。“抗癌”剂能够对对象的癌症产生负影响,例如通过杀伤癌细胞、诱导癌细胞凋亡、降低癌细胞生长速率、降低转移的发生率或数量、减小肿瘤大小、抑制肿瘤生长、减少向肿瘤或癌细胞的血液供应、促进针对癌细胞或肿瘤的免疫应答、防止或抑制癌症进展、或者增加患癌症对象的寿命来实现。抗

癌剂包括生物制剂(生物疗法)、化学治疗剂和放射治疗剂。更一般地,根据本发明的疗法以有效杀伤细胞或抑制细胞增殖的联合量提供这些其他组合物。该方法可包括使细胞同时与这两种药剂相接触。这可通过使细胞与包含这两种药剂的单一组合物或药物制剂相接触,或者通过使细胞同时与两种不同的组合物或制剂相接触来实现。

[0170] 或者,抗体疗法可在其他药剂治疗之前或之后进行,间隔为几分钟至几周。在其他药剂和抗体分开施加于细胞的实施方案中,一般确保在每次递送之间不间隔大的时间段,使得药剂和表达构建体仍然能够对细胞发挥有利的联合作用。在这样的情况下,考虑可使细胞与这两种形式在彼此约12至24小时内并且更优选地在彼此约6至12小时内相接触。然而,在一些情况下,可期望显著延长治疗时间段,其中在各施用之间经过几天(2、3、4、5、6或7天)至几周(1、2、3、4、5、6、7或8周)。

[0171] 可采用多种联合;例如,抗体疗法(有或没有缀合的治疗剂)为“A”,并且第二抗癌疗法为“B”:

[0172] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0173] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0174] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/AA/A/B/A

[0175] 考虑到抗体治疗的毒性(如果有的话),在向患者施用本发明的治疗剂后进行施用特定第二疗法的一般方案。期望必要时可重复治疗周期。还预期多种标准疗法以及手术干预可与所述癌症疗法联合应用。

[0176] 1. 化学疗法

[0177] 癌症疗法还包括与基于化学和放射治疗的多种联合疗法。联合化学疗法包括例如顺铂(CDDP)、卡铂、甲基苄肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基脲、更生霉素、柔红霉素、阿霉素、博来霉素、普卡霉素、丝裂霉素、依托泊甙(VP 16)、他莫昔芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合剂、紫杉醇、吉西他滨、诺维本、法尼基蛋白转移酶抑制剂、反铂、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春花碱和甲氨蝶呤、替莫唑胺(Temazolomide, DTIC的水性形式)、或者前述的任何类似物或衍生变体。化学疗法与生物学疗法的组合被称为生化疗法。本发明考虑用于治疗或预防癌症的任何可使用的或本领域已知的化学治疗剂。

[0178] 2. 放射疗法

[0179] 造成DNA损伤并且已被广泛使用的其他因素包括通常已知的 γ -射线、X-射线和/或放射性同位素向肿瘤细胞的直接递送。还考虑了其他形式的DNA损伤因素,例如微波和UV辐照。很可能的是,所有的这些因素对DNA、DNA前体、DNA复制和修复以及染色体的组装和维持产生广泛的损伤。X-射线的剂量范围为:日剂量为在延长时间段(3至4周)中的50伦琴至200伦琴,到2000伦琴至6000伦琴的单次剂量。放射性同位素的剂量范围变化很大,并且取决于同位素的半衰期、所发射辐射的强度和类型以及赘生性细胞的摄入。

[0180] 本文中使用的术语“接触”和“暴露”当应用于细胞时描述将治疗性构建体和化学治疗剂或放射治疗剂递送至靶细胞或与靶细胞直接邻接放置的过程。为了实现细胞杀伤或停滞,将这两种药剂以有效杀伤细胞或阻止细胞分裂的联合量递送至细胞。

[0181] 3. 免疫疗法

[0182] 一般来说,免疫治疗依赖于使用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏癌细胞。免疫

效应物可以是例如对肿瘤细胞表面上的一些标志物具有特异性的抗体。抗体可单独充当治疗的效应物,或者其可招募其他细胞来实际实现细胞杀伤。抗体也可与药物或毒素(化学治疗剂、放射性核素、蓖麻毒蛋白A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合并仅充当靶向剂。或者,效应物可为携带直接或间接与肿瘤细胞靶标相互作用之表面分子的淋巴细胞。多种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。治疗形式的联合,即直接细胞毒性活性以及Fortilin的抑制或降低,将提供癌症治疗方面的治疗益处。

[0183] 免疫疗法也可用作联合疗法的一部分。以下讨论了用于联合疗法的一般途径。在免疫疗法的一个方面中,肿瘤细胞必须具有负责靶向的一些标志物(即,不存在于大多数的其他细胞上)。存在许多肿瘤标志物并且其任何都可适合于在本发明的情景下靶向。常见的肿瘤标志物包括癌胚抗原、前列腺特异性抗原、泌尿肿瘤相关抗原(urinary tumor associated antigen)、胎儿抗原(fetal antigen)、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMGF、唾液酸化路易斯抗原(Sialyl Lewis Antigen)、MucA、MucB、PLAP、雌激素受体、层粘连蛋白受体、erb B和p155。免疫疗法的一个替代方面是抗癌作用与免疫刺激作用。还存在免疫刺激分子,包括:细胞因子(例如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN);趋化因子(例如MIP-1、MCP-1、IL-8)和生长因子(例如FLT3配体)。将免疫刺激分子作为蛋白质形式或使用基因递送与肿瘤抑制剂(例如mda-7)组合显示出增强抗肿瘤作用(Ju等,2000)。

[0184] 如之前所述,目前正在研究或使用的免疫疗法的实例是免疫佐剂(例如,牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、二硝基氯苯和芳香族化合物)(美国专利5,801,005;美国专利5,739,169;Hui和Hashimoto,1998;Christodoulides等,1998);细胞因子疗法(例如干扰素以及;IL-1;GM-CSF和TNF)(Bukowski等,1998;Davidson等,1998;Hellstrand等,1998);基因疗法(例如TNF、IL-1、IL-2、p53)(Qin等,1998;Austin-Ward和Villasaca,1998;美国专利5,830,880和美国专利5,846,945);以及单克隆抗体(例如抗神经节苷脂GM2、抗HER-2、抗p185)(Pietras等,1998;Hanibuchi等,1998;美国专利5,824,311)。赫赛汀(曲妥珠单抗)是嵌合(小鼠-人)单克隆抗体,其阻断HER2-neu受体。其具有抗肿瘤活性并已经被批准用于治疗恶性肿瘤(Dillman,1999)。赫赛汀与化学疗法的癌症联合疗法显示出比单独疗法更有效。因此,预期一种或更多种抗癌疗法可与本文所述的肿瘤相关HLA限制肽疗法一起使用。

[0185] 过继性免疫疗法。在过继性免疫疗法中,患者的循环淋巴细胞或肿瘤浸润淋巴细胞在体外进行分离,用淋巴因子(例如IL-2)活化或用肿瘤坏死基因转导,并重新施用(Rosenberg等,1988;1989)。为了实现该疗法,将免疫有效量的活化淋巴细胞与本文所述之并入佐剂的抗原肽组合物联合施用至动物或人患者。活化的淋巴细胞最优选是患者自己的细胞,其早前从血液或肿瘤样品中分离并在体外被活化(或“扩增”)。这种形式的免疫疗法产生了几例黑素瘤和肾癌的退化,但是与没有响应的患者数相比,响应者的百分比较小。

[0186] 被动免疫疗法。存在多种用于癌症被动免疫疗法的不同途径。其可被大体分为以下几种:单独注射抗体、注射与毒素或化学治疗剂偶联的抗体、注射与放射性同位素偶联的抗体、注射抗独特型抗体以及最后清除骨髓中的肿瘤细胞。

[0187] 优选地,在被动免疫疗法中采用人单克隆抗体,因为其在患者中产生很少或者不产生副作用。然而,它们的应用在某种程度上受限于其稀缺性并且迄今为止仅病变内施用。神经节苷脂抗原的人单克隆抗体已经病变内施用至患有皮肤复发性黑素瘤的患者(Irie&

Morton,1986)。在每日或每周病变内注射后,十个患者中有六个观察到了退化。在另一项研究中,由两种人单克隆抗体的病变内注射实现了适度的成功(Irie等,1989)。可能的治疗性抗体包括抗TNF、抗CD25、抗CD3、抗CD20、CTLA-4-IG和抗CD28。

[0188] 可有利地施用针对两种不同抗原的多于一种的单克隆抗体,或者甚至施用具有多个抗原特异性的抗体。治疗方案还可包括施用如Baiaorin等(1988)所描述的淋巴因子或其他免疫增强剂。人单克隆抗体的开发在本说明书的其他地方进行了更详细描述。

[0189] 4. 基因疗法

[0190] 在另一个实施方案中,第二治疗是基因疗法,其中治疗性多核苷酸在施用肿瘤相关HLA限制肽之前、之后或与其同时施用。编码肿瘤相关HLA限制肽的载体与编码以下一种基因产物的第二载体联合递送将对靶组织具有联合的抗超增殖性作用。或者,可使用编码两种基因的单一载体。本发明中涵盖多种蛋白质,其中一些在以下进行描述。靶向与本发明组合的某些形式之基因疗法的多种基因对本领域普通技术人员是已知的并且可包括癌症中所涉及的任何基因。

[0191] 细胞增殖诱导物。诱导细胞增殖的蛋白质根据功能进一步分为多个类别。所有这些蛋白质的共性在于其能够调节细胞增殖。例如,PDGF的一种形式——sis致癌基因是分泌的生长因子。致癌基因很少来自编码生长因子的基因,并且现在sis是唯一已知的天然存在的致癌基因生长因子。在本发明的一个实施方案中,考虑使用针对特定细胞增殖诱导物的反义mRNA来防止所述细胞增殖诱导物表达。

[0192] 蛋白质FMS、ErbA、ErbB和neu是生长因子受体。这些受体的突变导致可调节功能丧失。例如,影响Neu受体蛋白质跨膜结构域的点突变产生了neu致癌基因。erbA致癌基因来源于甲状腺激素的细胞内受体。认为经修饰的致癌ErbA受体与内源甲状腺激素受体竞争,导致了不受控的生长。

[0193] 最大一类致癌基因包括信号转导蛋白(例如,Src、Abl和Ras)。蛋白Src是胞质蛋白-酪氨酸激酶,并且在一些情况下其由原癌基因向致癌基因的转化通过酪氨酸残基527的突变产生。相比之下,在一个实例中,GTP酶蛋白质ras由原癌基因向致癌基因的转化由序列中氨基酸12处的缬氨酸至甘氨酸的突变产生,降低了ras GTP酶活性。蛋白质Jun、Fos和Myc是作为转录因子直接对核功能发挥其作用的蛋白质。

[0194] 细胞增殖抑制物。肿瘤抑制性致癌基因的功能是抑制过度的细胞增殖。这些基因的失活破坏了其抑制活性,导致了不受调节的增殖。最常见的肿瘤抑制物是Rb、p53、p21和p16。根据本发明可采用的另一些基因包括APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、zac1、p73、VHL、C-CAM、MMAC1/PTEN、DBCCR-1、FCC、rsk-3、p27、p27/p16融合和21/p27融合。

[0195] 程序性细胞死亡的调节物。凋亡或程序性细胞死亡是正常胚胎发育、维持成体组织稳态和抑制癌发生的必需过程(Kerr等,1972)。Bcl-2蛋白家族和ICE样蛋白酶在其他系统中已证明是凋亡的重要调节物和效应物。与滤泡性淋巴瘤相关发现的Bcl-2蛋白在控制凋亡和增强响应各种凋亡刺激的细胞存活方面发挥着突出作用(Bakhshi等,1985;Cleary和Sklar,1985;Cleary等,1986;Tsu.jimoto等,1985;Tsu.jimoto和Croce,1986)。进化上保守的Bcl-2蛋白现在被认为是相关蛋白家族的成员,其可被分类为死亡激动剂或死亡拮抗剂。

[0196] 发现该蛋白后,示出Bcl-2抑制由多种刺激引发的细胞死亡。另外,现在明显的是,

存在Bcl-2细胞死亡调节蛋白家族,其具有共同的结构和序列同源性。这些不同的家族成员已显示出具有与Bcl-2类似的功能(例如Bcl_{XL}、Bcl_w、Bcl_s、Mcl-1、A1、Bfl-1),或者与Bcl-2功能相反并促进细胞死亡(例如Bax、Bak、Bik、Bim、Bid、Bad、Harakiri)。

[0197] 5. 手术

[0198] 约60%的癌症患者经受某类型的手术,其包括预防性、诊断性或分期性、治愈性和姑息性手术。治愈性手术是可与其他疗法(例如,本发明的治疗、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代疗法)结合使用的癌症治疗。

[0199] 治愈性手术包括切除,其中物理性移除、切掉和/或破坏所有或部分癌组织。肿瘤切除是指物理性移除至少一部分肿瘤。除肿瘤切除之外,通过手术的治疗包括激光手术、冷冻手术、电手术和微观控制手术(Mohs手术)。还预期本发明可与浅表癌、初癌或伴随量的正常组织的移除结合使用。

[0200] 在切除部分或所有的癌细胞、组织或肿瘤后,在体内可形成腔。可通过灌注、直接注射或对该区域局部施用额外的抗癌疗法来实现治疗。这种治疗可例如每1、2、3、4、5、6或7天进行重复,或者每1、2、3、4和5周进行重复,或者每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月进行重复。这些治疗也可使用不同的剂量。

[0201] C. 自身免疫病

[0202] 本发明还预期使用本发明的抗体来治疗自身免疫病。PR-1来源于髓自身蛋白。蛋白酶3(Pr3)(其包含PR1),是韦格纳肉芽肿病的自身免疫攻击的靶标。髓过氧化物酶(MPO)是小血管炎中的靶抗原(Franssen等,1996;Brouwer等,1994;Molldrem等,1996),证据是这些疾病的患者中存在T细胞和抗体免疫二者。韦格纳肉芽肿病与对Pr3具有特异性的胞质抗嗜中性粒细胞胞质抗体(cAMCA)的产生有关(Molldrem等,1997),而显微性多血管炎和丘-斯综合征与对MPO具有特异性的核周ANCA(pANCA)有关(Molldrem等,1999;Savage等,1999)。因此,抑制PR1的免疫细胞识别可治疗自身免疫病。

[0203] 因此,将本发明抗体施用至患有自身免疫病的对象以中和其他自身抗体(例如,针对蛋白酶3的pANCA)的作用。或者,将抗体改造为“双特异性”的,即,对两种抗原具有免疫特异性,其中一种是PR1/HLA-A2,而另一种是树突细胞表面抗原(如DEC-205、LOX-1、RAGE),从而在抗原呈递中阻断树突细胞功能。

[0204] 1. 血管炎

[0205] 血管炎是由血管壁炎症造成的过程并且导致了多种病症。还没有出现对于血管炎接受的分类系统,但是其可通过所涉及血管的大小或类型分类为大血管炎、中血管炎或小血管炎。小血管炎定义为影响比动脉小的血管(即,小动脉、小静脉和毛细血管)的血管炎;然而,小血管炎也可涉及中等大小的动脉。抗嗜中性粒细胞胞质抗体(AMCA)相关血管炎是小血管炎最常见的原因,并且包括显微性多血管炎、韦格纳肉芽肿病、丘-斯综合征和某些类型的药物诱导血管炎。

[0206] 韦格纳肉芽肿病。韦格纳肉芽肿病是在上呼吸道(鼻、窦、耳)、肺和肾中引起血管炎症的罕见病症。也可影响身体的许多其他区域,其中在所有病例的几乎一半中发生关节炎(关节炎症)。还可影响眼睛和皮肤。虽然不知道原因,但是认为韦格纳肉芽肿病是一种自身免疫病症并且常被归类为风湿性疾病之一。在上下呼吸道和肾中发生破坏性病变。在肾中,这些病变引起肾小球肾炎,其可导致血尿(尿中有血)和肾衰竭。其最常在30岁至50岁之

间发生,并且男性患病通常是女性的两倍。其在儿童中是罕见的,但是在3个月大的婴儿中见到。肾病可快速进展,在最初诊断的几个内就发生了肾衰竭。如果不治疗,则所有韦格纳肉芽肿病患者中多于90%将发生肾衰竭和死亡。

[0207] 早期症状可包括疲劳、不适、发热以及鼻和窦周围的不适感。上呼吸道感染(例如鼻窦炎或耳部感染)常常在诊断出韦格纳肉芽肿病之前。其他上呼吸道症状包括鼻出血、疼痛以及鼻开口处的疮。无明显原因的持续性发热(不明原因发热——FUO)可能是最初症状。夜间盗汗可伴随发热。食欲不振和重量减轻是常见的。皮肤病变是常见的,但是不存在一个与疾病相关的特征病变。肾病对进行韦格纳肉芽肿病的明确诊断是必要的。尿可含血,这常常首先表现为红色或烟色尿(smoky urine)。虽然可能没有症状,但是通过实验室研究容易进行诊断。眼部问题在大量患者中发生并且范围可从温和的结膜炎到眼球和眼球周围组织的严重炎症。另外的症状包括虚弱、食欲不振、重量减轻、鼻子的血排出物、窦疼痛、鼻窦炎、鼻子中和开口周围的病变、咳嗽、咳血、血痰、呼吸浅促、喘鸣、胸痛、尿中有血、疹和关节疼痛。

[0208] 通过对异常组织进行组织活检进行诊断,其可包括开放肺组织活检、上气道组织活检、鼻粘膜组织活检、支气管镜检和经气管组织活检、肾组织活检、尿分析、胸x射线、骨髓抽吸、血液测试(对于自身抗体)。治疗包括皮质甾类、环磷酰胺、甲氨蝶呤或硫唑嘌呤,其可在超过90%的受影响人中产生长期缓解。

[0209] 丘-斯综合征。丘-斯综合征(CSS),也称为过敏性肉芽肿病,是系统性血管炎的一种形式。CSS与结节性多动脉炎类似,但是丰富的嗜酸性粒细胞使其区别于该疾病。大多数CSS患者是中年人,具有新的或严重度增加的气喘的历史——气喘是CSS的主要特征之一。气喘的症状可以在血管炎发作很久之前开始。其他早期症状包括鼻息肉和过敏性鼻炎。所述疾病常常转变为嗜酸性粒细胞增多症,计数高达60%。疾病的下一个阶段是明显的血管炎,其可涉及皮肤、肺、神经、肾和其他器官。外周神经参与可以是特别使人衰弱的,并且包括四肢的疼痛、麻木或麻刺感(神经病/多发性单神经炎)。在疗法出现之前,CSS常常是致死的疾病。大多数患者死于蔓延的不受控疾病。

[0210] 虽然不知道CSS的原因,但是其似乎是多因素的。虽然可存在遗传因素,但是在同一家族的两个成员中仅很少看到CSS。因此,环境因素和感染更可能是原因,但是其没有明确证据。诊断通过症状和体征(sign)、涉及器官类型以及某些异常血液测试(特别是嗜酸性粒细胞增多症)的特定组合来进行。除了详细的患者病史和身体检查、血液测试、胸X射线和其它类型的成像研究之外,可进行神经传导测试和组织的组织活检(肺、皮肤或神经)以帮助诊断。为了归类为CSS患者,患者应具有以下6个标准中的至少4个:1)气喘;2)嗜酸性粒细胞增多症[差异WBC计数中>10%];3)单神经病;4)胸X射线的瞬时肺部浸润;5)鼻侧窦异常;以及6)包含具有血管外嗜酸性粒细胞之血管的组织活检。

[0211] CSS通常响应于强的松。最初,使用高剂量的经口强的松,但是在大约第一个月之后,该高剂量的强的松在接下来的月份中逐渐减少。除强的松之外,还可使用其他免疫抑制药物,例如硫唑嘌呤、骁悉(cellcept)、甲氨蝶呤或环磷酰胺。高剂量的静脉内类固醇类可用于患有严重疾病的那些患者,或者用于不响应其他治疗的那些患者。通过合适的疗法,症状开始快速消退,并且心脏功能和肾功能逐渐改善,而且由外周神经参与造成的疼痛得到改善。根据患者响应和疾病的延续,疗法可持续1至2年。

[0212] 2. 克罗恩病(Crohn's disease)

[0213] 克罗恩病的症状包括肠炎症以及发生肠狭窄和瘻管;这些症状常常伴随着神经病。通常开抗炎药(例如5-氨基水杨酸(如美沙拉秦)或皮质甾类),但不总是有效(综述于V.A.Botoman等,1998)。用环孢菌素进行免疫抑制有时对于对皮质甾类具有抗性或不耐受的患者是有益的(Brynskov等,1989)。

[0214] 不过,90%的患者最终都需要进行手术矫正;50%进行了结肠切除(Leiper等,1998;Makowiec等,1998)。手术后的复发率高,其中50%在5年内需要再进行手术(Leiper等,1998;Besnard等,1998)。

[0215] 克罗恩病病因学的一个假设是肠粘膜屏障衰竭(其可由遗传易感性和环境因素(例如,抽烟)造成)使免疫系统暴露于来自肠腔的抗原(包括细菌和食物抗原)(例如,Soderholm等,1999;Hollander等,1986;Hollander,1992)。另一种假设是病原体(例如副结核分枝杆菌(*Mycobacterium paratuberculosis*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、异常大肠杆菌(*Escherichia coli*)或副粘病毒)的持久性肠感染刺激免疫应答;或者替代地,症状由对普遍存在的抗原(例如正常肠道微生物菌群(*microflora*)及其产生的代谢物和毒素)的失调性免疫应答造成(Sartor,1997)。发现血清中IgA和IgG抗酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)抗体(ASCA)的存在对于儿科克罗恩病具有高度诊断性(Ruemmele等,1998;Hoffenberg等,1999)。

[0216] 在克罗恩病中,失调性免疫应答向细胞介导的免疫病理学倾斜(Murch,1998)。但是免疫抑制药物(例如环孢菌素、他克莫司和美沙拉秦)已被用于治疗克罗恩病的皮质甾类抗性病例,取得一些成功(Brynskov等,1989;Fellerman等,1998)。

[0217] 最近开发针对克罗恩病的诊断和治疗工具的努力集中于细胞因子的中心作用(Schreiber,1998;van HogezaandVerspaget,1998)。细胞因子是小的分泌蛋白或因子(5kD至20kD),其对细胞与细胞相互作用、细胞间通讯或其他细胞的行为具有特定作用。细胞因子由淋巴细胞尤其是 T_H1 和 T_H2 淋巴细胞、单核细胞、肠巨噬细胞、粒细胞、上皮细胞和成纤维细胞产生(综述于Rogler&Andus,1998;Galley&Webster,1996)。一些细胞因子是促炎性的(例如, $TNF-\alpha$ 、IL-1(α 和 β)、IL-6、IL-8、IL-12或白血病抑制因子(LIF));另一些是抗炎的(例如,IL-1受体拮抗剂、IL-4、IL-10、IL-11和 $TGF-\beta$)。然而,在某些炎性条件下其作用可存在重叠和功能冗余。

[0218] 在克罗恩病的活跃病例中,升高浓度的 $TNF-\alpha$ 和IL-6分泌到血液循环中,并且 $TNF-\alpha$ 、IL-1、IL-6和IL-8通过粘膜细胞在局部过量产生(Funakoshi等,1998)。这些细胞因子可对生理学系统(包括骨发育,血细胞生成以及肝、甲状腺和神经精神病学功能)具有远程作用(far-ranging effect)。另外,在克罗恩病患者中观察到了有利于促炎性IL-1 β 的IL-1 β /IL-1ra比失衡(Rogler & Andus,1998;Saiki等,1998;Dionne等,1998;但是参见S.Kuboyama,1998)。一个研究表明,粪便样品中的细胞因子谱可作为克罗恩病的有用诊断工具(Saiki等,1998)。

[0219] 已建议用于克罗恩病的治疗包括使用多种细胞因子拮抗剂(例如IL-1 ra)、抑制剂(例如,IL-1 β 转化酶和抗氧化剂)以及抗细胞因子抗体(Rogler和Andus,1998;van HogezaandVerspaget,1998;Reimund等,1998;N.Lugering等,1998;McAlindon等,1998)。特别地,在克罗恩病治疗中已经尝试了针对 $TNF-\alpha$ 的单克隆抗体,取得了一些成功(Targan等,1997;Stack等,1997;van Dullemen等,1995)。这些化合物可用在与本发明化合物的联合疗

法中。

[0220] 治疗克罗恩病的另一种途径集中于至少部分地根除可引发炎症性应答的细菌群落并将其替换为非病原性群落。例如,美国专利5,599,795公开了一种用于预防和治疗人患者的克罗恩病的方法。该方法涉及用至少一种抗生素和至少一种抗真菌剂对肠道进行灭菌以杀死存在的菌群并将它们替换为取自正常人类之不同的选择的很好表征的细菌。Borody教导了一种治疗克罗恩病的方法,其通过灌洗至少部分移除存在的肠道微生物菌群并替换为由来自疾病筛选人供体的粪便接种物引入的新细菌群落或者替换为由包含拟杆菌(*Bacteroides*)和大肠杆菌种的组合物引入的新细菌群落(美国专利5,443,826)。然而,还不知道诊断和/或治疗可针对的克罗恩病的原因。

[0221] 3. 类风湿性关节炎

[0222] RA的准确病因学仍然不知道,但是清楚的是其具有自身免疫的方面。关节病的第一体征出现在滑膜衬里层中,其中滑膜成纤维细胞增殖并且其附着至关节边缘的关节面(Lipsky,1998)。随后,巨噬细胞、T细胞和其他炎症细胞被募集到关节中,它们在此产生大量的介质,包括以下细胞因子:有助于导致骨和软骨破坏之慢性后遗症的白细胞介素-1(IL-1)以及在炎症中发挥作用的肿瘤坏死因子(TNF- α) (Dinarello,1998;Burger & Dayer,1995;van den Berg,2001)。RA患者血浆中的IL-1浓度显著高于健康个体,并且值得注意的是,血浆IL-1水平与RA疾病活性相关(Eastgate等,1988)。而且,IL-1的滑液水平与RA的多种放射照相特征和组织学特征相关(Kahle等,1992;Rooney等,1990)。

[0223] 在正常关节中,这些和其他促炎细胞因子的作用被多种抗炎细胞因子和调节因子所平衡(Burger&Dayer,1995)。这种细胞因子平衡的显著性在整天具有发热周期增加的青少年RA患者中得到说明(Prieur等,1987)。在发热的每次峰之后,在血清和尿中发现了阻断IL-1作用的因子。分离该因子,克隆并鉴定为IL-1受体拮抗剂(IL-1ra) (IL-1基因家族的成员) (Hannum等,1990)。IL-1ra,如其名称所指示的,是这样的天然受体拮抗剂,其与结合I型IL-1受体的IL-1竞争,并因此阻断IL-1的作用(Arend等,1998)。可能需要10倍至100倍过量的IL-1ra来有效阻断IL-1;然而,分离自RA患者的滑膜细胞似乎不产生足以抵消IL-1作用的IL-1ra(Firestein等,1994;Fujikawa等,1995)。

[0224] 4. 系统性红斑狼疮

[0225] 系统性红斑狼疮(SLE)是这样的自身免疫风湿性疾病,其特征在于自身抗体和免疫复合体在组织中沉积导致组织损伤(Kotzin,1996)。与自身免疫病(例如MS和1型糖尿病)相比,SLE潜在地直接涉及多个器官系统,并且其临床表现是多样化且可变的(由Kotzin&O'Dell综述,1995)。例如,一些患者可证明主要有皮疹和关节疼痛,显示出自发缓解,并且需要很少的药物。谱的另一端是证明有严重且进展性肾受累(kidney involvement)的患者,其需要用高剂量的类固醇类和细胞毒性药物(例如环磷酰胺)进行治疗(Kotzin,1996)。

[0226] SLE的血清学特点和可用的初级诊断测试是对于细胞核组成(例如双链DNA(dsDNA)、单链DNA(ss-DNA)和染色质)的IgG抗体的血清水平升高。在这些自身抗体中,IgG抗dsDNA抗体在狼疮性肾小球肾炎(GN)发生中发挥着主要作用(Hahn&Tsao,1993;Ohnishi等,1994)。肾小球肾炎是其中肾脏血液纯化血管小球的毛细血管壁因在肾小球基底膜之上皮侧上的增积(accretion)而变厚的严重病症。该疾病常常是慢性和进展性的,并且可导致最终的肾衰竭。

[0227] 这些自身免疫病中诱导自身抗原的机制仍然不清楚。因为还不知道诊断和/或治疗可针对的SLE原因,所以治疗针对抑制免疫应答,例如用大环内酯抗生素,而不是针对根本原因(例如,美国专利4,843,092)。

[0228] 5. 幼年类风湿性关节炎

[0229] 幼年类风湿性关节炎(JRA)(儿童关节炎的最普遍形式的术语)适用于特征在于慢性炎症和滑膜肥大的疾病家族。该术语与在欧洲被称为幼年慢性关节炎和/或幼年特发性关节炎的疾病家族重叠,但是不完全同义。

[0230] Jarvis(1998)和其他人(Arend,2001)提出了成人和儿童的类风湿性疾病的发病机制涉及先天免疫与适应性免疫之间的复杂相互作用。这种复杂性位于解开疾病发病机制的困难核心。

[0231] 先天免疫系统和适应性免疫系统二者均使用多种细胞类型、大量的细胞表面和分泌蛋白以及正反馈与负反馈的互联网络(Lo等,1999)。此外,当认为可分离时,免疫系统的先天翼(wing)和适应性翼在功能上相交(Fearon&Locksley,1996),并且这些相交点发生的病理事件可能与本发明人对成人和儿童形式慢性关节炎之发病机制的理解高度相关(Warrington,等,2001)。

[0232] 多关节JRA是特征在于包括手部小关节的多个关节(四个或更多个)中炎症和滑膜增殖的不同临床亚型(Jarvis,2002)。因为其多关节参与及其随时间能够快速进展,该JRA亚型可能是严重的。虽然临床上不同的,但是多关节JRA不是均匀的,并且患者的疾病临床表现、发作年龄、预后和治疗应答不同。这些差异非常可能反映出可在该疾病中发生的免疫性质和炎性攻击的变化谱(Jarvis,1998)。

[0233] 6. 舍格伦综合征(Sjögren's syndrome)

[0234] 原发性舍格伦综合征(SS)是慢性的缓慢进展的系统性自身免疫病,其主要影响中年女性(女性与男性之比为9:1),但是在所有年龄(包括儿童在内)都可见到(Jonsson等,2002)。其特征位于淋巴细胞浸润和外分泌腺(其被包括CD4+、CD8+淋巴细胞和B细胞的单核细胞浸润)破坏(Jonsson等,2002)。此外,在三分之一患者中看到腺外(系统性)表现(Jonsson等,2001)。

[0235] 腺体淋巴细胞浸润是进展性特征(Jonsson等,1993),其在扩展时可替代器官的大部分。有趣的是,在一些患者中腺体浸润物与唾液腺中的异位淋巴样微结构很类似(称为异位生发中心)(Salomonsson等,2002;Xanthou&Polihronis,2001)。在SS中,异位GC被定义为增殖细胞的T细胞和B细胞聚集体,具有滤泡树突细胞和活化内皮细胞的网络。在靶组织中形成的这些GC样结构也描绘了产生自身抗体(抗Ro/SSA和抗La/SSB)的功能性质(Salomonsson & Jonsson,2003)。

[0236] 在另一些系统性自身免疫病(例如RA)中,鉴定了对于异位GC关键的因子。示出具有GC的类风湿性滑膜组织产生趋化因子CXCL13、CCL21和淋巴毒素(LT)- β (在滤泡中心和外套区B细胞上检测到)。这些分析物的多变量回归分析将CXCL13和LT- β 鉴定为预测类风湿性滑膜炎中GC的单独细胞因子(Weyand&Goronzy,2003)。最近,唾液腺CXCL13和CXCR5已显示出在通过募集B细胞和T细胞的炎性过程中发挥着必不可少的作用,因此有助于SS中的淋巴新生和异位GC形成(Salomonsson&Larsson,2002)。

[0237] 7. 银屑病

[0238] 银屑病是鳞屑(scaling)和炎症的慢性皮肤疾病,其影响美国人口的2%至2.6%,或影响580至750万人。虽然该疾病在所有年龄组中都发生,但是其主要影响成人。其在男性和女性中出现的频率大概相同。当皮肤细胞从其在皮肤表面之下的来源快速出现并且在其有机会成熟之前积累在表面上时,银屑病发生。通常该运动(也称为更新(turnover))需约一个月,但是在银屑病中,这可在仅几天内发生。在其典型形式中,银屑病导致了覆盖有银色鳞屑的厚的红色(发炎)皮肤的斑。这些斑(其有时被称为斑块)通常发痒或感觉疼痛。其最常发生在肘、膝盖、腿的其他部分、头皮、下背部、面部、手掌及脚底,但是其也可在身体任何地方的皮肤上发生。该疾病也可影响手指甲、脚趾甲、生殖器和口内的软组织。虽然受影响关节周围的皮肤破裂常见,但是约1百万患有银屑病的人经历关节炎,其产生关节炎的症状。这种病症称为银屑病关节炎。

[0239] 银屑病是由免疫系统驱动的皮肤病症,尤其涉及T细胞。在银屑病中,T细胞错误地发挥作用并且变得如此有活性使得它们引发其他免疫应答,从而导致炎症和皮肤细胞的快速更新。在约三分之一的病例中,存在银屑病的家族史。研究者研究了多个受银屑病影响的家族并鉴定了与疾病有关的基因。患有银屑病的人可注意到有时候他们的皮肤恶化,然后改善。可引起加剧(flareup)的状况包括感染、压力以及使皮肤干燥的气候变化。另外,为高血压开出的某些药物(包括锂和 β 阻断剂),可引发该疾病的暴发或恶化。

[0240] 8. 多发性硬化

[0241] 多发性硬化(MS)依旧是每年仅在美国就折磨成百上千人而在全世界折磨数百万人的严重健康问题。其是中枢神经系统(脑和脊髓)最常见的疾病之一。MS是与脱髓鞘或髓鞘丧失有关的炎性病症。髓鞘质(隔离神经的脂肪物质)充当隔离层使得神经能够将冲动从一个点传递至另一个点。在MS中,髓鞘质丧失伴随着神经传导电冲动往返脑部的能力破坏,并且这产生了MS的多个症状,例如视力、肌肉协同、力量、感觉、说话和吞咽、膀胱控制、性欲和认知能力受损。其中髓鞘质丧失的斑块或病变表现为变硬的瘢痕样区域。这些瘢痕在不同时间并且在脑和脊髓的不同区域出现,因此为术语“多发性”硬化,字面意思为多个瘢痕。

[0242] 目前,没有单一实验室测试、症状或物理发现提供MS的决定性诊断。更复杂的是,MS的症状可容易与各种各样的其他疾病混淆,例如急性播散性脑脊髓炎、莱姆病、HIV相关脊髓病、HTLV-I相关脊髓病、神经梅毒、进行性多灶性白质脑病、系统性红斑狼疮、结节性多动脉炎、舍格伦综合征、贝赫切特病、结节病、副肿瘤综合征、脊髓亚急性联合变性、亚急性脊髓视觉神经病(subacute myelo-optic neuropathy)、肾上腺脊髓神经病、脊髓小脑综合征、遗传性痉挛性轻截瘫/原发性侧索硬化、中风、肿瘤、动静脉畸形、蛛网膜囊肿、Arnold-Chiari畸形和颈椎关节强直。因此,MS的诊断必须通过证明与MS相一致的发现并且排除掉其他原因的过程来进行。

[0243] 一般来说,MS的诊断依赖于两个标准。第一,间隔至少一个月必须具有两次攻击。攻击(也称为加重、突发或复发)是MS症状的突然出现或恶化,其持续至少24小时。第二,必须存在多于一个的中枢神经系统髓鞘损伤区域。鞘损伤必须在多于一个时间点发生并且不是由可引起脱髓鞘或类似神经学症状的任何其他疾病造成。MRI(核磁共振成像)目前是对脑成像以检测由MS引起的斑块或瘢痕存在的优选方法。

[0244] 然而,MS的诊断也不能仅基于MRI完成。另一些疾病可在脑中引起与由MS引起的那些病变类似的相当病变。此外,通过MRI的脑部病变外观在不同患者中可为相当多样的,甚

至在一些方面类似于脑或脊髓肿瘤。此外,正常MRI扫描并不排除MS的诊断,因为具有已证实的MS的少数患者在MRI上并不表现出脑中的任何病变。这些个体常常具有脊髓病变或者MRI检测不到的病变。因此,关键是彻底的临床检查还包括病史和功能测试。这应覆盖精神、情绪和语言功能,运动和协调,视力,平衡以及五种感觉功能。当症状首先开始时,人的性别、出生地、家族史和年龄也是重要的考量。在某些情况下,还可需要另一些测试,包括诱发电位(可揭示中枢神经系统传导时间延迟的电诊断研究)、脑脊液(寻求克隆扩增的免疫球蛋白基因的存在,也称为寡克隆带)和血液(以排除其他原因)。

[0245] D. 联合疗法

[0246] 还考虑了用于以上所列免疫病症的联合疗法。这些疗法包括与本发明治疗方法结合使用的标准疗法,例如抗炎性剂和免疫抑制剂。这些标准疗法将能够对造成对象中疾病的免疫细胞产生负面影响或者减缓这些疾病的症状。该过程可涉及使细胞或对象同时与两种药剂相接触。这可以用包含这两种药剂的单一组合物或药物制剂来实现,或者同时用两种不同的组合物或制剂来实现。或者,抗体疗法可在其他药剂治疗之前或之后进行,间隔为几分钟至几周。

[0247] 可采用多种联合;例如,抗体疗法(有或没有缀合的治疗剂)为“A”,并且第二免疫疾病疗法为“B”:

[0248] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0249] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0250] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0251] 考虑到抗体治疗的毒性(如果有的话),在向患者施用本发明的治疗剂后进行施用特定第二疗法的一般方案。期望必要时可重复治疗周期。还预期多种标准疗法以及手术干预可与所述疗法联合应用。

[0252] VII. 实施例

[0253] 包括以下实施例以证明本发明的一些优选实施方案。本领域技术人员应理解,接下来的实施例中公开的技术代表本发明人发现的在本发明实践中很好起作用的技术,并因此可被认为是构成其实践的优选模式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应理解,可对所公开的具体实施方案做出许多改变并仍然获得同样或类似的结果而不偏离本发明的精神和范围。

[0254] 实施例1:方法

[0255] 抗体产生。为了获得针对组合PR1/HLA-A*0201表位的抗体,本发明人通过皮下(SQ)和腹膜内(IP)途径用重组PR1/HLA-A*0201单体免疫BALB/c小鼠,间隔两周免疫三次。将脾细胞从经免疫动物中分离并使用聚乙二醇(PEG)使B细胞与HGPRT阴性的无限增殖骨髓瘤细胞融合。然后用pp65/HLA-A*0201和PR1/HLA-A*0201单体选择杂交瘤细胞并放置在96孔板中用于单细胞克隆。

[0256] 抗体筛选和表征。通过ELISA用PR1/HLA-A*0201单体筛选单克隆细胞系(~20,000个)以鉴定阳性的分泌抗体的杂交瘤。通过ELISA鉴定8F4杂交瘤对PR1/HLA-A*0201的特异性并使用同种型特异性抗体和免疫球蛋白轻链抗体进行表征。

[0257] 抗体克隆、序列分析和结合研究。由杂交瘤cDNA克隆8F4重链并获得一级序列。通过使经改变的PR1肽与HLA-A*0201重链和 β -2微球蛋白折叠进行表位作图,所述经改变的

PR1肽包含P1至P9位每个位置上的Ala替换。8F4对PR1/HLA-A*0201的结合亲和力用固定化8F4和逐渐增加浓度的可溶PR1/HLA-A*0201通过在Biacore仪器上进行表面等离子共振来测定。利用FACS分析和共聚焦成像来研究8F4与正常细胞和异常细胞的结合。

[0258] 抗体活性。为了确定8F4与AML的结合是否引发细胞裂解,进行了抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)测定。在8F4或同种型对照存在或不存在下孵育来自显示对8F4CDC介导裂解敏感之患者材料的AML细胞,然后转移至经辐照(200cGy)的免疫缺陷型HLA-A2转基因NOD/SCID小鼠中。两周时处死动物并通过FACS分析脾细胞和骨髓。

[0259] 总RNA分离。使用具有minelut柱的Qiagen RNA easy试剂盒。如下制备RNA加载缓冲液:将1μl溴化乙锭(EtBr)(10mg/ml)添加至1X TAE,无RNase H₂O中的100μl10×DNA加载染料,1%琼脂糖(在试剂盒中)。说明书为“杂交瘤细胞或1×10⁶至5×10⁶个活细胞的冷冻瓶。如果可获得活性培养物,则在步骤4中在15ml圆锥管中沉淀1×10⁶至5×10⁶个活细胞并进行步骤5。如果仅可获得冷冻细胞,则在37℃下将1小瓶杂交瘤细胞解冻,解冻后立即从水浴中移出,轻轻混合。用70%乙醇擦小瓶并小心旋开盖以避免接触螺纹。将小瓶的内容物转移至包含15ml完全培养基的15ml圆锥管中。在100×g(对于低速Sorvall离心机为~1,000rpm)离心5分钟。旋转期间,将β-巯基乙醇添加至小等份的RLT缓冲液。用10ml移液管小心地从细胞中移除所有培养基。使用Qias shredder在缓冲液RLT中裂解细胞沉淀,随后进行Qiagen方案以进行RNA分离。根据起始细胞量,用2X 15μl无RNaseH₂O从minelut柱洗脱RNA(如果从6孔洗脱,则用1×13μl洗脱)。在整个以下的过程中RNA应保留在ICE上。倒入包含1μg/ml EtBr的1%琼脂糖微凝胶并在15分钟固化时间期间定量RNA。使用与以上相同的无RNaseH₂O作为空白,使用分光光度计定量2μlRNA。计算RNA浓度:(A₂₆₀)(40)-μg/ml。A₂₆₀/A₂₈₀比应>1.6。通过在总体积10μl的1X RNA加载缓冲液中的1%琼脂糖微凝胶上跑1μg来检查RNA的质量。跑~1英寸到凝胶中。在照片文档编制系统上分析凝胶。高质量RNA带型的特征在于不同的28s和18s核糖体RNA带的强度理想比为2:1。1:1的比也是可接受的;然而,没有条带或凝胶底部弥散指示RNA变性并且指示不应使用该RNA。”

[0260] 来自杂交瘤的重排Ig可变区(V)基因的分离和序列分析。为了由V重链(VH)和V轻链(VL)基因获得DNA序列,使用与人重链恒定区引物或轻链恒定区引物组合的cDNA末端快速克隆(RACE)PCR。用BD Smart™ RACE cDNA扩增试剂盒(BD Bioscience)并根据其提供的说明书进行5' RACE cDNA扩增。使用人IgG H&L恒定区的PFU ultra(Stratagene)、Universla引物A混合物(UPM)和基因特异性引物(GSP)。

[0261] 5' RACE PCR产物的克隆和DNA测序使用TOPO克隆试剂盒(Invitrogen)和凝胶提取试剂盒(Qiagen)。对于IgG L,分离8个集落用于小量制备并通过EcoRI消化筛选。用M13rev和T7引物对六个阳性克隆进行测序。对于IgG,分离8个集落用于小量制备并通过EcoRI消化筛选。用M13rev和T7引物对六个阳性克隆进行测序。

[0262] 实施例2:结果

[0263] 抗体产生。为了获得针对组合PR1/HLA-A*0201表位的抗体,本发明人通过皮下(SQ)和腹膜内(IP)途径用重组PR1/HLA-A*0201单体免疫BALB/c小鼠,间隔两周免疫三次。将脾细胞从经免疫动物中分离并使用聚乙二醇(PEG)使B细胞与HGPRT阴性的无限增殖骨髓瘤细胞融合。然后用pp65/HLA-A*0201和PR1/HLA-A*0201单体选择杂交瘤细胞并放置在96孔板中用于单细胞克隆。

[0264] 抗体筛选和表征。通过ELISA用PR1/HLA-A*0201单体筛选单克隆细胞系以鉴定阳性的分泌抗体的杂交瘤。筛选了近2000个杂交瘤,并通过ELISA鉴定了一个称为8F4的杂交瘤对PR1/HLA-A*0201的特异性。使用同种型特异性抗体和免疫球蛋白轻链抗体对8F4杂交瘤进行表征,并且示出分泌了单IgG2a- κ PR1/HLA-A*0201特异性抗体。

[0265] 抗体结合评价。通过使经改变的PR1肽与HLA-A*0201重链和B2微球蛋白折叠进行表位作图,所述经改变的PR1肽包含P1至P9位每个位置上的Ala替换。结果是P1对于8F4结合是最关键的,尽管所有氨基酸位置的改变都破坏结合(图1)。8F4对PR1/HLA-A*0201的结合亲和力用固定化8F4和逐渐增加浓度的可溶PR1/HLA-A*0201通过在Biacore仪器上进行表面等离子共振来测定,如图2所示。相比于识别HLA-A*0201上不同等位基因特异性位点之可商购BB7.2鼠单克隆抗体的162nM K_D ,8F4的 K_D 为9.9nM。使用共聚焦显微术,8F4的直接荧光缀合物仅与PR1肽脉冲的T2细胞(其表达HLA-A*0201)结合,而不与不相关的pp65脉冲的T2细胞或无脉冲的T2细胞结合。总之,确定了对组合PR1/HLA-A*0201的8F4特异性和高8F4结合亲和力。使用FACS分析和共聚焦成像二者(再次用8F4,FITC缀合的BB7.2抗HLA-A*0201抗体以及DAPI),显示出8F4与来自患AML的HLA-A2+患者的循环未成熟细胞(blast)结合,而不与来自HLA-A2+健康供体的PBMC结合,也不与HLA-A2阴性AML未成熟细胞结合(图3和图5)。

[0266] 小鼠8F4可变区基因的克隆和测序。在7.5%CO₂孵育器中于37℃下使小鼠8F4杂交瘤细胞在包含10%胎牛血清(FBS;HyClone)和1mM丙酮酸钠的RPMI-1640培养基(HyClone, Logan, UT)中生长。根据供应商的方案使用TRIzol试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA)从约10⁷个杂交瘤细胞提取总RNA。使用SMARTer RACE cDNA扩增试剂盒(Clontech, Mountain View, CA)按照供应商的方案合成寡dT引发的cDNA。使用分别与小鼠 γ -2a和 κ 链恒定区退火的3'引物,以及SMARTer RACE cDNA扩增试剂盒中提供的通用引物A混合物或巢式通用引物A作为5'引物,用Phusion DNA聚合酶(New England Biolabs, Beverly, MA)通过聚合酶链式反应(PCR)扩增8F4重链和轻链的可变区cDNA。对于重链可变区(VH)的PCR扩增,3'引物具有序列5'-GCCAGTGGATAGACCGATGG-3'(SEQ ID NO:46)。对于轻链可变区(VL)的PCR扩增,3'引物具有序列5'-GATGGATACAGTTGGTGCAGC-3'(SEQ ID NO:47)。将经扩增的VH和VL cDNA克隆到pCR4Blunt-TOPO载体(Invitrogen)中用于序列测定。在Tocore (MenloPark, CA)进行可变区的DNA测序。对几个重链和轻链克隆进行测序并鉴定与典型小鼠重链和轻链可变区同源的独特序列。8F4VH和VL的共有cDNA序列以及推导出的氨基酸序列分别示于图1和图2中。在成熟的8F4VH和VL氨基酸序列中没有注意到不寻常的特征。

[0267] 嵌合8F4IgG1/ κ 抗体的构建。使用8F4VH cDNA作为模板,5'-GCAACTAGTACCACCATGAACCTTCGGGCTCAGC-3'(SEQ ID NO:48;加下划线的为SpeI位点)作为5'引物,以及5'-CGAAAGCTTGAAGTTAGGACTCACCTGCAGAGAGAGTGACCAG AG-3'(SEQ ID NO:49;加下划线的为HindIII位点)作为3'引物,通过PCR生成编码8F4VH的基因作为外显子,其包含剪接供体信号和适当的侧翼限制性酶位点。同样地,使用8F4VL cDNA作为模板,5'-GCAGCTAGCACCACCATGGAGTCACAGATTTCAG-3'(SEQ ID NO:50;加下划线的为NheI位点)作为5'引物,以及5'-CGAGAATTCTTTGGATTCTACTTACGTTTGATTTCAGCTTGG TG-3'(SEQ ID NO:51;加下划线的为EcoRI位点)作为3'引物,通过PCR生成编码8F4VL的基因作为外显子,其包含剪接供体信号和适当的侧翼限制性酶位点。8F4VL和VL外显子的剪接供体信号分别来源于小

鼠生殖系JH3和J κ 1序列。使用NucleoSpin Extraction II试剂盒(Macherey-Nagel, Bethlehem, PA) 凝胶纯化PCR扩增片段并克隆到pCR4Blunt-TOP0载体(Invitrogen)中用于序列确认。用SpeI和HindIII (对于VH) 或NheI和EcoRI (对于VL) 消化正确的V片段,凝胶纯化并克隆到携带有人 γ -1和 κ 恒定区的哺乳动物表达载体中,用于产生嵌合8F4IgG1/ κ 抗体。所得表达载体pCh8F4的示意性结构示于图11中。

[0268] 人源化8F4VH和VL基因的产生。如下进行人源化8F4VH和VL氨基酸序列的设计。首先,使用JNBiosciences的专有算法构建8F4可变区的三维分子模型。然后,使用所述分子模型鉴定对于形成CDR结构重要的框架氨基酸残基。平行地,分别选择与8F4VH和VL具有高同源性的cDNA源人VH和VL氨基酸序列。最后,将CDR序列与对维持CDR结构重要的框架氨基酸残基一起由8F4VH和VL移植到对应选择的人框架序列中。

[0269] 在GenBank数据库内对与8F4VH框架同源的人VH序列进行了搜索,并且选择由人U96282cDNA (U96282VH) (GenBank登录号;Rassenti和Kipps, J. Exp. Med. 185:1435, 1997) 编码的VH序列作为人源化的受者(acceptor)。首先将8F4VH的CDR序列转移到U96282VH的对应位置。预测没有人框架氨基酸替换对维持CDR结构是必需的。所得人源化VH (Hu8F4VH) 的氨基酸序列与8F4和U96282VH序列一起示于图12中。

[0270] 基于与8F4VL框架序列进行的同源搜索,选择由AY043146cDNA (AY043146VL) (GenBank登录号;Ghiotto等, 2001年6月29日提交至GenBank) 编码的人V κ 区作为人源化的受者。首先将8F4VL的CDR序列转移至AY043146VL的对应位置。然后在框架第70位(在该位点8F4可变区的三维模型分析表明与CDR相接触),小鼠8F4VL的氨基酸残基被替换为对应的人残基。所得人源化VL (Hu8F4VL1) 的氨基酸序列与8F4和AY043146VL序列一起示于图13中。

[0271] 虽然小鼠8F4VL第70位的Val位于对形成CDR结构重要的框架位置上,但是8F4可变区分子模型的详细分析表明了Hu8F4VL1第70位的氨基酸残基可替换为AY043146VL中对应的人残基Asp而不丧失抗体结合亲和力的可能性。为了进一步降低人源化8F4抗体的潜在免疫原性,设计了第二人源化VL (Hu8F4VL2), 其中Hu8F4VL1第70位的Val被替换为Asp。Hu8F4VL2的氨基酸序列示于图13中。

[0272] 设计编码Hu8F4VH的基因作为包含信号肽、剪接供体信号和适当限制性酶位点的外显子,用于后续克隆到哺乳动物表达载体中。Hu8F4VH外显子的剪接供体信号来源于人生殖系JH3序列。人源化Hu8F4VH外显子中的信号肽序列来源于对应的小鼠8F4VH序列。

[0273] 设计了各自编码Hu8F4VL1和VL2的基因作为包含信号肽、剪接供体信号和适当限制性酶位点的外显子,用于后续克隆到哺乳动物表达载体中。Hu8F4VL1和VL2外显子的剪接供体信号来源于人生殖系J κ 4序列。人源化Hu8F4VL1和VL2外显子中的信号肽序列来源于对应的小鼠8F4 VL序列。

[0274] 在保密非公开协议下由GenScript USA (Piscataway, NJ) 构建了Hu8F4VH、VL1和VL2基因。在用SpeI和HindIII (对于VH) 或NheI和EcoRI (对于VL) 消化后,将Hu8F4VH、VL1和VL2基因亚克隆到哺乳动物表达载体的对应位点中,用于产生人IgG1/ κ 形式。所得表达载体pHu8F4-1表达包含Hu8F4VH和VL1的人源化8F4IgG1/ κ 抗体 (Hu8F4-1)。同样地, pHu8F4-2表达包含Hu8F4VH和VL2的人源化8F4IgG1/ κ 抗体 (Hu8F4-2)。pHu8F4-1和pHu8F4-2的示意性结构示于图11中。Hu8F4VH、VL1和VL2基因的核苷酸序列连同推导的氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 22/23、24/25和26/27所示。

[0275] 还将Hu8F4VH和VL2基因克隆到另一个哺乳动物表达载体中用于产生变体人IgG1/ κ 形式,称为IgG1-AA。IgG1-AA形式在 γ -1重链中带有两个氨基酸替换,第234位的Leu至Ala和第235位的Leu至Ala替换(Eu编号;Kabat等,1991),导致与Fc γ 受体的结合大大减少(美国专利6,491,916)。所得质粒pHu8F4-2-AA的示意性结构示于图11中。

[0276] 产生嵌合和人源化8F4IgG1/ κ 抗体的NS0稳定转染子的生成。为了获得稳定产生Ch8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2和Hu8F4-2-AA IgG1/ κ 抗体的细胞系,分别将表达载体pCh8F4、pHu8F4-1、pHu8F4-2和pHu8F4-2-AA引入小鼠骨髓瘤细胞系NS0(欧洲动物细胞培养协会,Salisbury,Wiltshire,UK)的染色体中。在7.5%CO₂孵育器中于37℃下使NS0细胞在包含10%FBS的DME培养基中生长。通过如Bebbington等(Bio/Technology 10:169-175,1992)所述的电穿孔进行稳定转染到NS0中。在转染前,使用FspI使各表达载体线性化。用20 μ g线性化质粒转染约10⁷个细胞,悬于包含10%FBS的DME培养基中,并铺板到几个96孔板中。48小时后,应用选择培养基(包含10%FBS、HT培养基补充物(Sigma,St.Louis,MO)、0.25mg/ml黄嘌呤和1 μ g/ml霉酚酸的DME培养基)。在起始选择后约10天,测定培养上清液的抗体产生。

[0277] 通过夹心ELISA测量嵌合和人源化8F4IgG1/ κ 抗体的表达。在典型实验中,在4℃下用100 μ l/孔的PBS中1/2,000稀释的山羊抗人IgG Fc γ 链特异性多克隆抗体(Sigma)包被ELISA板过夜,用洗涤缓冲液(包含0.05%吐温20的PBS)洗涤,并在室温下用300 μ l/孔的封闭缓冲液(包含2%脱脂乳和0.05%吐温20的PBS)封闭0.5小时。在用洗涤缓冲液洗涤后,将适当稀释在ELISA缓冲液(包含1%脱脂乳和0.025%吐温20的PBS)中的100 μ l/孔的样品施加至ELISA板。将适当的人源化IgG1/ κ 抗体用作标准。在室温下将ELISA板孵育1小时并用洗涤缓冲液洗涤之后,使用100 μ l/孔的1/2,000稀释的HRP缀合山羊抗人 κ 链多克隆抗体(SouthernBiotech)检测结合抗体。在室温下孵育0.5小时并用洗涤缓冲液洗涤之后,通过添加100 μ l/孔的ABTS底物(bioWORLD,Dublin,OH)进行显色。添加100 μ l/孔的2%草酸终止显色。在405nm下读取吸光度。使用杂交瘤-SFM(Invitrogen)使产生高水平Ch8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2和Hu8F4-2-AA抗体(分别为NS0-Ch8F4 1-G8、NS0-Hu8F4-1 1-D2、NS0-Hu8F4-2 1-F5和NS0-Hu8F4-2-AA 1D3)的NS0稳定转染子适于在无血清培养基中生长。用PCR支原体检测套组(Mycoplasma DetectionSet)(Takara Bio USA, Madison, WI)进行测试表明NS0-Ch8F4 1-G8、NS0-Hu8F4-1 1-D2、NS0-Hu8F4-2 1-F5和NS0-Hu8F4-2-AA 1D3的支原体存在为阴性。

[0278] 通过cDNA测序确定NS0-Ch8F4 1-G8、NS0-Hu8F4-1 1-D2、NS0-Hu8F4-2 1-F5和NS0-Hu8F4-2-AA 1D3中产生的重链和轻链的可靠性。使用TRIzol试剂(Invitrogen)从细胞提取总RNA,并使用用于RT-PCR的SuperScript III第一链合成系统(Invitrogen)按照供应商的方案合成寡dT引发的cDNA。使用CMV2和JNT098作为引物(图11)和Phusion DNA聚合酶通过PCR扩增 γ -1重链的编码区。对PCR片段进行凝胶纯化并用如SEQ ID NO:28和30-32所示的CMV2、JNT082、JNT097和JNT098作为引物对所述PCR片段进行测序。类似地,使用CMV2和JNT026(SEQ ID NO:28和29)扩增 κ 轻链的编码区。用CMV2和JNT026作为引物对经凝胶纯化的DNA片段进行测序。对于Ch8F4重链、Ch8F4轻链、Hu8F4-1重链、Hu8F4-1轻链、Hu8F4-2重链、Hu8F4-2轻链、Hu8F4-2-AA重链和Hu8F4-2-AA轻链中的每一个,所得编码区的核苷酸序列都与pCh8F4、pHu8F4-1、pHu8F4-2或pHu8F4-2-AA载体(SEQ ID NO:33/34、35/36、37/38、39/40、41/42和43/44)中的对应序列完美匹配。

[0279] 8F4-4、Ch8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2和Hu8F4-2-AA抗体的纯化。在包含10%FBS的RPMI培养基(Hyclone)中培养杂交瘤8F4-4(由Molldrem博士提供),并使其适于在杂交瘤-SFM中生长。使8F4-4、NS0-Ch8F41-G8、NS0-Hu8F4-11-D2、NS0-Hu8F4-21-F5和NS0-Hu8F4-2-AA 1D3细胞在滚瓶中的杂交瘤-SFM中生长至密度为约 10^6 个/ml,加入1/10体积的溶解在SFM4MAb培养基(Hyclone)中的60mg/ml超滤大豆水解液(Irvine Scientific,Santa Ana,CA),并进一步生长直至细胞生存力变得小于50%。在离心和过滤之后,将培养上清液加载到蛋白A琼脂糖柱(HiTrap MABSeIect SuRe,GE Healthcare,Piscataway,NJ)上。用PBS洗涤柱后,用0.1M甘氨酸-HCl(pH 3.0)洗脱抗体。在用1M Tris-HCl(pH 8)中和后,通过透析将经洗脱抗体的缓冲液变为PBS。通过测量280nm下的吸光度确定抗体浓度($1\text{mg/ml} = 1.40\text{D}$)。8F4-4、Ch8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2和Hu8F4-2-AA各批次的纯化和产率归纳于表3中。

[0280] 表3

[0281]	抗体	批次	产率
	8F4-4	1/27/11	1 L 培养物 30 mg
	Ch8F4	8/10/10	500 mL 培养物 7 mg
	Hu8F4-1	9/8/10	1 L 培养物 6.5 mg
	Hu8F4-2	9/9/10	1 L 培养物 11 mg
	Hu8F4-2	1/23/11	1 L 培养物 21 mg
	Hu8F4-2-AA	3/15/11	500 mL 培养物 10 mg

[0282] 8F4-4、Ch8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2和Hu8F4-2-AA的多个纯化批次和产率。

[0283] 经纯化的8F4-4、Ch8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2和Hu8F4-2-AA通过SDS-PAGE根据标准程序进行表征。在还原条件下的分析表明各抗体均由分子量为约50kDa的重链和分子量为约25kDa的轻链构成(图14)。各抗体的纯度似乎大于95%。

[0284] Ch8F4和Hu8F4抗体的表征。使用PR1肽(VLQELNVT(V) (SEQ ID NO:45))与HLA-A2(PR1/HLA-A2)的复合体通过ELISA检查Ch8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2和Hu8F4-2-AA的抗原结合。首先用PBS中的 $5\mu\text{g/ml}$ 链霉抗生物素蛋白(Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA)以 $100\mu\text{l/孔}$ 包被ELISA板。在用洗涤缓冲液(包含0.05%吐温20的PBS)洗涤孔并用封闭缓冲液封闭后,添加 $50\mu\text{l/孔}$ 的 $2\mu\text{g/ml}$ 生物素化PR1/HLA-A2,其由Molldrem博士提供。在室温下孵育30分钟后,用洗涤缓冲液洗涤ELISA板。添加Ch8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2和Hu8F4-2-AA抗体,开始为 $1\mu\text{g/ml}$ 并在ELISA缓冲液中进行系列3倍稀释,用于与PR1/HLA-A2结合。在室温下孵育ELISA板1小时并用洗涤缓冲液洗涤后,使用 $100\mu\text{l/孔}$ 的 $1/2,000$ 稀释的HRP缀合山羊抗人 κ 链多克隆抗体检测结合抗体。在室温下孵育30分钟并用洗涤缓冲液洗涤后,通过添加 $100\mu\text{l/孔}$ 的ABTS底物进行显色。通过添加 $100\mu\text{l/孔}$ 的2%草酸终止显色。在405nm下读取吸光度。数据示于图15中。使用GraphPad Prism(GraphPad Software,San Diego,CA)计算的 EC_{50} 值对于Ch8F4为 $0.054\mu\text{g/ml}$,对于Hu8F4-1为 $0.050\mu\text{g/ml}$,对于Hu8F4-2为 $0.07\mu\text{g/ml}$,并且对于Hu8F4-2-AA为 $0.07\mu\text{g/ml}$ 。该结果表明,Hu8F4-1、Hu8F4-2和Hu8F4-2-AA均保留了小鼠8F4抗体的抗原结合亲和力。

[0285] 针对靶细胞的抗体作用。为了确定8F4与AML结合是否引发细胞裂解,进行了抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)测定。8F4对HLA-A2+AML,而不对HLA-A2阴性AML或HLA-A2+健康供体对照PMBC的CDC介导裂解显示为抗体剂量依赖的(图4)。在8F4或同种型对照存在或不存在下孵育来自显示对8F4CDC介导裂解敏感之患者材料的AML细胞,然后转移到经辐照(200cGy)的免疫缺陷型HLA-A2转基因NOD/SCID小鼠中。两周时处死动物并通过FACS分析脾细胞和骨髓。在尸体剖检时,仅在经IgG2a同种型对照处理的动物中而没有在经8F4处理的动物中鉴定到AML(图6)。与经同种型处理的小鼠相比,单独接受8F4的小鼠中没有明显的毒性。总之,这些数据支持了以下结论:8F4单克隆抗体:(1)与组合PR1/HLA-A*0201表位以高亲和力特异性结合;(2)与人细胞(包括髓性白血病)表面上被PR1肽占据的HLA-A*0201分子特异性结合并可用于鉴定该分子;(3)在补体存在下引起HLA-A2+AML的特异性裂解;(4)可防止免疫缺陷型小鼠模型中的AML植入。

[0286] 肿瘤植入的防止。注射AML细胞和8F4后,测量实验小鼠组织中的AML浸润物并示于图8A-B中。在无转移对照和实验的8F4处理小鼠的骨髓和外周血中检测不到AML细胞。接受与同种型匹配对照抗体(iso)混合的AML细胞的小鼠在AML转移后两周或四周出现AML1和AML5植入。使用延伸图,包括小鼠细胞特异性标志物(mCD45)、3至6种人标志物(CD45、CD13、CD33、CD34、CD38、HLA-DR)和Live/DeadFixable Aqua(Invitrogen)进行AML植入的流式细胞术分析。所有的图示出活的mCD45细胞。

[0287] 8F4在HLA-A2转基因NOD/SCID中诱导瞬时嗜中性粒细胞减少。向显示出呈递内源PR1的HLA-A2Tg NOD/SCID注射8F4或对照Ab。收获骨髓细胞并用针对小鼠抗原的mAb进行染色。在骨髓的散点图中粒细胞减少是明显的(图9A;左图)。在经8F4处理小鼠的骨髓中存在Gr-1lo不成熟嗜中性粒细胞,但是Gr-1hi成熟嗜中性粒细胞大大减少(图9A;中图)。另外,经8F4处理动物中单核细胞(SSC1o CD11b+;FIG.9A;右图的右下门)减少。静脉内注射8F4诱导HLA-A2Tg NOD/SCID小鼠中循环成熟粒细胞、巨噬细胞和单核细胞绝对数目的瞬时减少(图9B)。处理后3周,所有群体仍存在。在注射200μg(10mg/kg)8F4后7天,HLA-A2 Tg NOD/SCID小鼠的肝、肺、脾、肾、心脏和脑中并没有明显的显著病理学变化(图9C)。

[0288] 8F4诱导已建立的人造血细胞的瞬时白细胞减少。从小鼠取外周血以监测脐带血植入,并且在转移后9至12周向小鼠注射8F4。随后处死小鼠并分析血液、脾和骨髓的人细胞植入(图10B)。如可看到的,抗体注射瞬时减少了经转移细胞的%植入(图10A)。

[0289] 人源化8F4抗体针对人AML的结合特异性、亲和力和活性。为了表征Hu8F4的结合特异性,本发明人进行了基于FACS的测定以表明Hu8F4仅与PR1脉冲T2细胞结合(图16A),而不与pp65脉冲T2细胞结合。为了表征Hu8F4的结合亲和力,本发明人使用ELISA比较了人源化抗体两种形式Hu8F4-1(Hu1)和Hu8F4-2(Hu2)与小鼠8F4和同种型对照(rhIgG1)的结合。本发明人使用重组PR1/HLA-A2单体包被的板来捕获抗体,并在比色测定中使用抗人抗体以通过光密度(OD)确定结合分数。如图16B所示,Hu1和Hu2显示出 K_D 分别为7.7nM和7.8nM,这与小鼠8F4($K_D=9.9$ nM)类似。因此,与母体小鼠抗体相比,两种人源化抗体都具有相同的配体特异性和结合亲和力。该数据为在临床前动物模型中确定活性谱的另一些实验中使用Hu8F4抗体建立了生物化学论证。

[0290] 为了解决Hu8F4作用的潜在机制,本发明人在兔补体存在下用Hu8F4或同种型对照抗体(IgG)处理了PR1脉冲T2靶细胞并使用标准测定确定了补体介导裂解。如图16C所示,

Hu8F4和嵌合Ch8F4(来自IgG1的人Fc和来自8F4的小鼠F(ab)₂)二者都不介导补体依赖性细胞毒性(CDC)。因此,与小鼠8F4(IgG2)不同,Hu8F4不通过补体固定来裂解靶细胞。本发明人正进行另外的研究来确定Hu8F4在正在进行的实验中是否介导ADCC、直接凋亡或有丝分裂和增殖的抑制。

[0291] 接着,本发明人使用Hu8F4来处理NSG小鼠中已建立的初级人AML异种移植物。首先向小鼠植入AML维持2周,然后用Hu8F4、Ch8F4或同种型IgG1 3x/周以10mg/1kg抗体处理2周。在处理分析BM和外周血嵌合状态。如图17所示,与同种型对照相比,具有3种不同AML试样的三个单独实验消除或者其生长受Hu8F4和Ch8F4显著抑制。因此,这些数据确定,Hu8F4对于来自患治疗难治性复发疾病(treatment-refractory relapsed disease)患者的原代人AML具有高生物学活性,并且Hu8F4的作用机制是不依赖于补体的,因为NSG小鼠缺少关键补体蛋白的表达。

[0292] 8F4在HLA-A2转基因能免疫的(B6)和免疫缺陷型(NOD/scid)小鼠中的生物学安全数据。本发明人建立了三种小鼠模型以进行Hu8F4的临床前研究:HLA-A2转基因B6能免疫的小鼠、HLA-A2转基因NOD/scid小鼠和NSG(缺少IL-2共用 γ 链)小鼠。为了确定潜在毒性,本发明人首先示出,PR1分别在HLA-A2转基因动物的5%和6%的造血干细胞和粒细胞上的HLA-A2上表达。接着,本发明人示出,单次IV施用高剂量8F4(10mg/kg)在两种HLA-A2转基因小鼠中诱导瞬时且完全可逆的血细胞减少(图18至19)。向NSG小鼠移植经CD34选择的人脐带血以建立长期稳定的人嵌合状态,其将用单一剂量和多剂量Hu8F4处理已确定mAb针对PR1/HLA-A2+人造造血干细胞的作用。

[0293] H8F4(抗PR1/HLA-A2mAb)延迟三阴性乳腺癌异种移植物的肿瘤生长并延长存活。除对白血病的上述工作之外,本发明人还示出,来源于造血限制性丝氨酸蛋白酶嗜中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)和蛋白酶3(P3)的PR1 9-mer肽也可交叉呈递在不表达内源P3或NE的多种非造血肿瘤的HLA-A2上,所述非造血肿瘤包括黑素瘤、非小细胞肺癌和乳腺癌(Alatrash等,2012)。三阴性乳腺癌细胞系MB-MDA-231(也称为231细胞)不表达P3和NE而表达HLA-A2。然而,这些细胞摄入可溶性P3和NE并交叉呈递PR1,随后使得231细胞对8F4介导裂解易感。重要的是,PR1/HLA-A2在来自患者组织活检的乳腺癌细胞上表达(Alatrash等,2012),包括三阴性乳腺癌(TNBC)患者。因此,PR1/HLA-A2可以是乳腺癌上的靶抗原,并且本发明人推断8F4可能具有针对HLA-A2+乳腺癌的生物学活性。

[0294] 为了测试该假设,本发明人在NSG小鼠的(a)原发性肿瘤和(b)转移肿瘤异种移植模型中研究了h8F4的作用。在原发性肿瘤模型中,将231TNBC细胞注射到NSG小鼠的乳房脂肪垫中,然后注射单一剂量的h8F4、同种型对照抗体或PBS。用ffluc基因转染231细胞使得可用生物发光成像(BLI)随时间监测肿瘤生长。移植后1至2天对肿瘤部位的活组织检查进行H & E染色显示出,嗜中性粒细胞和巨噬细胞(其是天然表达P3和NE的细胞)浸润肿瘤(图20A)。如图20B所示,与接受同种型对照或PBS的小鼠相比,接受h8F4的小鼠的肿瘤生长延迟。此外,与对照小鼠相比,h8F4延长存活($p < 0.01$)。

[0295] 在第二种模型中,将经ffluc基因修饰的231细胞(2×10^5 个)注射到NSG小鼠的尾静脉中并在第7天接受10mg/kg的h8F4或同种型对照抗体,3x/周。在未处理的NSG小鼠中,经IV注射的231细胞快速转移到肺中(用BLI确定)并随后转移至其他组织,包括脾、GI道和肝。如图20C所示,与同种型处理的小鼠相比,h8F4显著延迟了231细胞的转移肿瘤生长,并且显

著增加了存活 ($p=0.0006$)。这些结果表明,231细胞体内摄入来自肿瘤相关嗜中性粒细胞和巨噬细胞的P3和NE,并且PR1交叉呈递在HLA-A2上,这使得TNBC细胞生长受到h8F4处理的抑制。因此,h8F4针对TNBC具有生物学活性,并且我们的结果强烈地表明,h8F4mAb具有作为治疗性mAb来治疗非造血HLA-A2+肿瘤(包括乳腺癌)的潜力。

[0296] 实施例3:方法

[0297] 患者组织、细胞和细胞培养物。患者乳腺癌冷冻组织块购自Origene。在获得知情同意参与由MDAnderson癌症中心(Houston, TX)的机构审查委员会批准的研究后收集患者和健康供体样品。从美国典型培养物保藏中心获得MDA-MB-231、MCF-7、MDAMB-453和T47D乳腺癌细胞系以及SW-620(结直肠癌)、OVCAR-3(卵巢腺癌)、MIA PaCa-2(胰腺癌)、Jurkat(急性T细胞白血病)、T2(B细胞/T细胞杂交瘤)、HL-60(急性早幼粒细胞白血病)和U-937(组织细胞白血病)细胞系。MCF-HER-18细胞系由M.-C.Hung(MD Anderson癌症中心)提供。Mel 526、Mel 624、MT 2019和MT 2333黑素瘤细胞系由L.Radvanyi(MD Anderson癌症中心)提供。在实验使用6个月内在MD Anderson癌症中心通过DNA指纹图谱验证细胞系。

[0298] 使乳腺癌细胞在补充有10%FBS(Gemini Bio-Products)和100U/ml青霉素/100mg/ml链霉素(Cellgro)的含2.5mM L-谷氨酰胺DMEM(HyClone)中生长。向MCF-7-HER18细胞培养物中添加G418(Lonza)(0.5mg/ml)作为选择剂。使用含25mM HEPES和L-谷氨酰胺的RPMI 1640(HyClone)替代用于白血病细胞系培养物的DMEM。所有细胞系在37℃下于5%CO₂中培养。分别使用标准Histopaque 1077和1119(Sigma-Aldrich)梯度离心富集健康供体和患者的PBMC和多形核嗜中性粒细胞(PMN)。

[0299] RT-PCR。使用RNA Stat 60试剂盒(TelTest)从细胞系和激光捕获显微解剖(laser capture microdissection, LCM)样品提取mRNA。使用Gene Amp RNA试剂盒(PerkinElmer)进行cDNA合成。使用以下引物:P3,正向引物59-GACCCACCATGGCTCAC-39[SEQ ID NO:52]和反向引物59-ATGGGAAGGACAGACAGGAG-39[SEQ ID NO:53];乳腺珠蛋白-1,正向引物59-AGCACTGCTACGCAGGCTCT-39[SEQ ID NO:54]和反向引物59-ATAAGAAAGAGAAGGTGTGG-39[SEQ ID NO:55];肌动蛋白,正向引物59-CCAGAGCAAGAGAGCTATCC-39[SEQ ID NO:56]和反向引物59-CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG-39[SEQ ID NO:57]以及GAPDH,正向引物59-TAGACGGGAAGCTCACTGGC-39[SEQ ID NO:58]和反向引物59-AGGTCCACCACCCTGTTGCT-39[SEQ ID NO:59]。在95℃下变性5分钟后,使用iCycler(Bio-Rad)将样品扩增35个循环。样品在1.5%琼脂糖凝胶上跑胶。使用GelDoc2000(Bio-Rad)对条带成像并通过QuantityOne软件(Bio-Rad)进行分析。

[0300] Western印迹。通过将细胞沉淀悬于包含蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液(10mM/L HEPES[pH 7.9]、10mM/L KCl、0.1mM/L EGTA、0.1mM/L EDTA和1mM/L DTT)中产生全细胞裂解物(WCL),并随后进行冻融循环15分钟。在还原条件下,通过在10%SDS凝胶上进行电泳来分离WCL,转移到聚偏二氟乙烯膜上,用5%牛奶封闭,并用抗NE(Santa Cruz Biotechnology)、抗P3(NeoMarkers)、抗微管蛋白(Sigma-Aldrich)或抗GAPDH(Sigma-Aldrich)Ab进行染色。在Kodak胶片上捕获化学发光。

[0301] Ag交叉呈递。为了确定蛋白质摄入,在包含10mg/ml P3、NE(二者来自于Athens Research&Technology)、EndoGrade OVA(Hyglos)或比为1:1(乳腺癌:经辐照细胞)的经辐照(7500cGy)PMN或PBMC的还原血清培养基(0.5%FBS)中脉冲细胞。然后使细胞透化(BD

Biosciences)并用Alexa-488或647直接缀合的抗P3(克隆MCPR3-2;Thermo Scientific)或抗NE(Santa Cruz Biotechnology)染色并通过流式细胞术分析。为了确定交叉呈递,如前所述,用荧光缀合的8F4对细胞进行表面染色(Sergeeva等,2011)。使用Alexa-488或647试剂盒(Inbitrogen)直接缀合抗P3、抗NE和抗PR1/HLA-A2(8F4)Ab。使用aqua live/dead染色(Invitrogen)来评价生存力。对于所有的流式细胞术实验,使用光散射来建立初步设门,然后进行aqua live/dead染色。为了抑制交叉呈递,将细胞与内质网(ER)至高尔基体广泛性抑制剂(antegrade inhibitor)布雷菲德菌素A(Sigma-Aldrich)或蛋白酶体抑制剂乳胱素(Sigma-Aldrich)共孵育(Francois等,2009;Kovacsovics-Bankowski和Rock 1995;以及Mukai等,2009)。

[0302] 使用具有310/25空气物镜、363/1.4油物镜的Leica Microsystems SP2 SE共聚焦显微镜(Leica)进行共聚焦成像以示出胞内P3定位并使用Leica LCS软件(版本2.61)进行分析。使用FITC缀合的溶酶体相关膜蛋白-2(LAMP-2;eBioscience)对溶酶体和晚期内体进行染色(Kuronita等,2002)。使用Cytomation CyAn流式细胞仪(Dako)进行流式细胞术。使用FlowJo软件(Tree Star)分析数据。

[0303] 免疫组织化学。用福尔马林固定经冷冻保藏的乳腺肿瘤组织和黑素瘤肿瘤组织(Origene),然后进行石蜡包埋用于免疫组织化学。在染色之前,使组织切片在二甲苯中脱蜡化,再水化并淬灭内源性过氧化物酶活性。用10%普通马血清封闭切片,然后用第一WGM2抗P3mAb克隆(1:10)(Abcam)或抗NE(Santa Cruz Biotechnology)在室温下孵育30分钟。用抗小眼相关转录因子(MITF)Ab(Thermo Scientific)对黑素瘤载玻片进行共染色。然后洗涤载玻片并与第二抗小鼠IgG-生物素Ab(1:200)(Vector Laboratories)孵育,然后与抗生物素蛋白-生物素过氧化物酶(1:100)(Vector Laboratories)孵育。使用发色团(chromagen)3,3'-二氨基联苯胺(Dako)进行染色可视化。所有载玻片都用苏木精进行复染色。正常扁桃体组织的PMN染色用作阳性对照。在去除第一Ab后如上所述对阴性对照进行染色。

[0304] 肽特异性CTL系。如前所述,通过体外用PR1肽刺激来自健康HLA-A2供体的PBMC来扩增PR1特异性CTL(Molldrem等,2000和Molldrem等,1999)。简言之,用无血清PRMI1640培养基洗涤T2细胞并在37℃下用20mg/ml的PR1肽孵育90分钟。用7500cGy辐照加载肽的T2细胞,洗涤,并与新分离的PBMC以1:1的比在补充有10%人AB血清的PRMI 1640培养基中培养。在第7、14和21天用肽脉冲的T2细胞再刺激培养物,并在之后一天添加20IU/ml人rIL-2(BioSource International)。

[0305] 细胞介导的细胞毒性测定。如前所述,使用标准细胞毒性测定来测定特异性裂解(Molldrem等,1996和Molldrem等,1997)。简言之,在37℃下用钙荧光素-AM(Invitrogen)对10ml中的1000个靶细胞(1.0×10^5 个细胞/ml)染色90分钟,用RPMI1640洗涤三次,然后以改变的E:T比与10ml肽特异性CTL共孵育。在5%CO₂中于37℃下进行的4小时孵育期之后,将5ml台盼蓝添加至每个孔并使用自动化CytoFluor II板阅读器(PerSeptive Biosystems)测量荧光。如下计算特异性细胞毒性百分比:([荧光靶标+效应物荧光培养基]/[荧光单独靶标荧光培养基])×100。

[0306] 补体介导的细胞毒性测定。为了确定交叉呈递是否增加乳腺癌对8F4的易感性,如前所述进行补体介导的细胞毒性测定(Sergeeva等,2011和Prang等,2005)。在包含NE

(10mg/ml)或P3 (10mg/ml)的培养基中将MDA-MB-231细胞培养24小时。细胞与钙荧光素-AM (Invitrogen) 孵育,洗涤三次并重悬于无血清PRMI 1640中。将一百万个细胞与逐渐增加剂量的8F4Ab (0.624、1.25、2.5、5和10mg/ml) 或同种型Ab (阴性独照) 混合 (终浓度为10mg/ml) 并在37℃下孵育10分钟。然后添加标准兔补体 (5ml; Cedarlane Laboratories), 并在37℃下将细胞孵育60分钟。将来自BB7.2杂交瘤 (抗HLA-A2来源) 的上清液和毛地黄皂苷 (Promega) 作为阳性对照。测量荧光并如上所述计算特异性杀伤。

[0307] LCM和从乳腺肿瘤组织提取RNA。用具有IR二极管激光器的Arcturus PixCell激光捕获显微镜 (Life Technologies, Applied Biosystems) 进行LCM以从乳腺肿瘤组织活检组织中分离乳腺癌细胞。对组织进行切片 (5mm厚), 放置在未加料玻璃载玻片上, 并固定在75%乙醇和焦碳酸二乙酯水中。在组织水化之后使用苏木精对核进行染色。在分级醇脱水后将样品存储在二甲苯中直至准备用于L (M)。使用H&E染色鉴定用于显微解剖的区域。用功率调整在30mW与70mW之间的激光束脉冲组织以维持10mm直径。在Arcturus Capsure HS LCM收集器 (Life Technologies, Applied Biosystems) 中捕获约5000个乳腺癌细胞。使用Arcturus PicoPure RNA分离试剂盒 (Life Technologies, Applied Biosystems) 提取并纯化总RNA。用Nano Drop ND-1000分光光度计 (Thermo Scientific) 测定RNA完整性和量。使用Arcturus RiboAmp RNA扩增试剂盒, 使用两轮基于T7的扩增来扩增RNA。这产生2.5mg扩增的RNA。使用Roche转录第一链cDNA合成试剂盒 (Roche Applied Science) 按照制造商的说明书由1mg扩增的RNA合成cDNA。

[0308] 乳腺癌患者中PR1-CTL的染色。用以下的荧光Ab: CD8别藻蓝素-H7 (BD Biosciences)、CD3PE Cy7 (BD Biosciences)、CD4pacific orange (Invitrogen)、PE缀合的PR1/HLA-A2-dextramer (Immudex), 以及以下的pacific blue缀合的种系Ab: CD14 (BD Biosciences)、CD16 (BD Biosciences) 和CD19 (BioLegend) 对来自患者的PBMC进行染色。使用aqua live/dead染色 (Invitrogen) 来排除死细胞。用4%低聚甲醛固定样品。在Canto流式细胞仪 (BD Biosciences) 上获得数据并使用FlowJo软件 (Tree Star) 进行分析。将PR1-CTL的频率测定为活细胞 (种系⁻、CD4⁺、CD3⁺、CD8⁺和PR1-dextramer⁺) 的百分比。

[0309] 患者组织的共聚焦成像。用冷丙酮固定冷冻保藏的组织切片。用乳腺癌标志物Alexa-488缀合的小鼠抗细胞角蛋白-7 (CK7) Ab (Abcam) 和Alexa-647缀合的8F4Ab对乳腺癌组织进行染色 (Sergeeva等, 2011)。为了确定PR1/HLA-A2表达通过乳腺癌细胞而不通过浸润白细胞实现, 还用Alexa-647缀合的小鼠抗CD45Ab (Invitrogen) 作为白细胞标志物对连续的乳腺癌组织切片进行染色。人扁桃体组织切片 (Origene) 用作CD45的阳性染色对照。对于黑素瘤, 用冷丙酮固定组织切片, 用0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 透化15分钟, 并用5%普通山羊血清 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 封闭。然后将切片与黑素瘤标志物小鼠抗MITF (Thermo Scientific) 孵育1小时, 用PBS洗涤, 然后与Alexa-488缀合的山羊抗小鼠IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 孵育。然后洗涤载玻片, 用5%普通小鼠血清 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 封闭, 并与Alexa-647缀合的8F4Ab孵育。添加含DAPI的ProLong Gold抗淬灭试剂 (Invitrogen)。使用具有310/25空气物镜、363/1.4油物镜的Leica Microsystems SP2SE共聚焦显微镜进行共聚焦成像。使用Leica LCS软件 (版本2.61) 进行成像分析。

[0310] 实施例4: 结果

[0311] 实体瘤摄入NE和P3。为了确定NE和P3摄入是否是普遍存在的现象,本发明人将多种实体瘤细胞系与10mg/ml NE或P3共培养,然后使用流式细胞术以评价细胞内摄入。本发明人示出,不是所有的肿瘤类型都摄入NE和P3,并且摄入程度在不同肿瘤类型之间不同(图21)。此外,NE摄入似乎随时间达到平台并远低于P3摄入,表明了不同摄入机制并且表明了可参与NE摄入的受体介导过程。

[0312] 乳腺癌中不存在P3。因为本发明人之前示出,乳腺癌中不存在NE并且其被乳腺癌细胞摄入(Mittendorf等,2012)并由内源表达分化与P3摄入区分开,所以我们分析了乳腺癌细胞系和原发性肿瘤组织用于在mRNA和蛋白质水平上的P3表达。PCR示出乳腺癌细胞系MDA-MB-231、MCF-7、MCF-7-HER18 (HER18) 和MDAMB-453都缺少P3mRNA(图22A)。类似地,从三种不同乳腺肿瘤提取的乳腺癌细胞(图22B,表4)也缺少P3mRNA。来自细胞系的WCL的免疫印迹确定了乳腺癌细胞中不存在P3蛋白(图22C)。原发性乳腺癌的免疫组织化学染色检测了乳腺癌组织中的P3,但是P3受限于乳腺肿瘤内的炎性组分,而不是乳腺肿瘤细胞中的炎性组分(图22D)。这些数据与示出乳腺癌中P3的先前报道(Desmedt等,2006)相一致,但是我们的数据表明,P3的来源是肿瘤内的炎性细胞,而不是乳腺癌细胞内。

[0313] 表4-用于LCM和共聚焦显微术的乳腺肿瘤组织和黑素瘤肿瘤组织的病理学特征

[0314]

患者	组织学	ER/PR/HER2 状态	TNM 阶段	HLA-A2 状态
乳腺 1	IDC	ER2-/PR2-/HER22-	T1cNXMX	阳性
乳腺 2	IDC	ER2-/PR2-/HER2+	T2N1bMX	N/D
乳腺 3	IDC/ILC	ER+/HER2+	T2N1aMX	阴性
乳腺 4	IDC	ER2-/HER22-	T3N0MX	阳性
黑素瘤 1	结节	N/A	T3N2M1c	阳性
黑素瘤 2	N/D	N/A	T3N2M1b	阴性

[0315] ER,雌激素受体;HER2,HER2/neu;IDC,浸润性导管癌;ILC,浸润性小叶癌;N/D,未测定;PR,孕酮受体;TNM,恶性肿瘤的肿瘤/结节/转移分类。

[0316] 乳腺癌细胞摄入P3。因为我们示出乳腺癌细胞不内源表达P3,所以本发明人假设P3可被乳腺癌细胞摄入,正如之前对于NE所示的(Mittendorf等,2012)。将HLA-A2阳性细胞系MDA-MB-231、MCF-7和HER18与10mg P3共培养1、4和24小时,然后使用流式细胞术分析P3的胞内摄入(图23A)。本发明人在所有三种细胞系中都检测到P3摄入的时间依赖性增加。他们还证明了P3的剂量依赖性摄入似乎不出现平台,表明了P3摄取的非受体介导过程(图23B)。为了进一步表征P3摄入,因为其与在不同细胞区室中发生的Ag交叉呈递有关(Cresswell等,2005),所以本发明人进行了激光共聚焦显微术,并且显示出,在摄入之后,P3定位在溶酶体内,如用LAMP-2进行的P3共染色所示(图23C)。摄入溶酶体分隔中发生在早期时间点(1至4小时)并且可以是Ag降解的最初步骤,因为其被加工用于在HLA I类分子上的交叉呈递(Basha等,2008)。

[0317] 因为不同细胞通路涉及可溶蛋白和细胞相关蛋白的摄入和加工,其可确定它们是否是交叉呈递的(Burgdorf等,2006),并且因为肿瘤组织(包括乳腺癌)中报道了嗜中性粒细胞(Queen等,2005和Jensen等,2009),所以本发明人评价了乳腺癌细胞摄入可溶P3和细

胞相关P3是否有差异。为了检查这个,将MDA-MB-231细胞与可溶P3 (10mg/ml) 或与经辐照PMN或PBMNC以1:1的比共培养4小时(图24A;数据未示出)。数据证明,乳腺癌细胞可摄入可溶PE以及细胞相关P3二者。事实上,由细胞相关P3摄入似乎比可溶蛋白的摄入更有效(中值荧光强度[median fluorescence intensity,MFI]=12,292相对于1,356;p,0.05),其原因可能为P3与可促进摄入的其他蛋白质缔合。

[0318] 通过乳腺癌细胞交叉呈递P3和NE。因为本发明人已示出NE也被乳腺癌摄入(Mittendorf等,2012)并且因为PR1来源于嗜中性粒细胞嗜苯胺蓝颗粒蛋白酶NE和P3,所以他们研究了NE和P3在摄入后是否通过乳腺癌细胞交叉呈递。将HLA-A2+MDA-MB-231细胞与可溶P3或NE以逐渐增加的时间点共培养并随后使用小鼠抗PR1/HLA-A2Ab 8F4分析PR1/HLA-A2表达(Sergeeva等,2011)。这些数据示出乳腺癌细胞可交叉呈递来自NE和P3二者的PR1。在24小时时主要看到显著的PR1交叉呈递(图24B),其中与未脉冲的细胞相比,在与NE和P3培养后乳腺癌细胞表面上的PR1/HLA-A2分别增加2.5倍和3.0倍。细胞表面上的HLA-A2表达没有显著增加(数据未示出)。

[0319] 此外,为了研究NE和P3交叉呈递所涉及的细胞内机制,本发明人研究了蛋白酶和ER/高尔基体是否参与NE和P3交叉呈递,如之前对于其他Ag所示出的(Francois等,2009,Kovacsóvics-Bankowski等,1995和Mukai等,2009)。我们的数据示出ER/高尔基体和蛋白酶均参与NE和P3交叉呈递,原因是在与NE或P3共培养后细胞与抑制ER至高尔基体顺行运输的布雷菲德菌素A孵育,以及与蛋白酶抑制剂乳酰素孵育均使MDA-MB-231乳腺癌细胞的PR1/HLA-A2表达减少(图24C、24D)。这与本发明人之前证明蛋白酶体和ER/高尔基体通过APC参与NE和P3交叉呈递的结果类似(Alatrash等,2012)。

[0320] PR1交叉呈递使得乳腺癌对PR1靶向疗法易感。因为使用PR1肽疫苗(Rezvani等,2008)、PR1-CTL(Rezvani等,2007和Ma等,2010)以及抗PR1/HLA-A2Ab (8F4) (Sergeeva等,2011)已在白血病中有效地靶向PR1,所以本发明人研究了交叉呈递后乳腺癌细胞上的PR1/HLA-A2表达是否使得这些细胞对PR1-CTL和8F4Ab杀伤易感。在标准钙荧光素-AM细胞毒性测定中,将HLA-A2+MDA-MB-231细胞在包含10mg/mlNE或P3的培养基中培养24小时,然后与健康供体扩增的PR1-CTL孵育4小时(MoIldrem等,1996;Jiang等,1996)(图24E)。数据证明,与未脉冲的MDA-MB-231细胞相比,NE和P3的交叉呈递增加了MDA-MB-231细胞对NE或P3脉冲后的PR1-CTL杀伤的易感性。类似地,在补体依赖性细胞毒性测定中使用8F4Ab(图24F)(Sergeeva等,2011),与未脉冲的细胞相比,本发明人观察到在NE或P3交叉呈递后MDA-MB-231细胞的剂量依赖性杀伤。注意到最大杀伤在8F4Ab的最高剂量下发生(10mg/ml)。

[0321] 在乳腺癌患者中检测PR1/HLA-A2和PR1-CTL。因为本发明人示出培养的乳腺癌细胞系和肿瘤组织缺少内源性NE和P3,并且因为他们观察到乳腺癌细胞交叉呈递NE和P3以及随后对PR1靶向疗法之易感性的体外证据,所以本发明人研究了在原发性乳腺癌患者组织中是否可检测到PR1,以及在来自乳腺癌患者的外周血中是否可检测到PR1-CTL。两种HLA-A2阳性乳腺癌组织的激光共聚焦显微术证明这两种肿瘤组织中的8F4(图25A)。在HLA-A2阴性组织中不存在8F4染色(数据未示出)。而且,为了验证PR1/HLA-A2是由乳腺癌细胞而不是由浸润性白细胞表达的,本发明人用白细胞标志物CD45对连续的乳腺癌组织切片进行染色。本发明人示出在用8F4和CK7共染色的乳腺癌组织区域中不存在CD45染色,这进一步证实PR1/HLA-A2是由乳腺癌细胞而不是相邻炎性细胞表达的(图25B)。

[0322] 为了确定在乳腺癌患者中是否可检测到PR1-CTL,我们使用了来自早期乳腺癌患者的11个外周血样品进行PR1/HLA-A2 dextramer染色(图25C)。这些HLA-A2⁺患者中PR1-CTL的中值频率为CD8⁺T细胞的0.05%(范围,0.02%至0.2%),略高于健康供体中PR1-CTL的频率(1/15,000至1/350,000CD8⁺T细胞)(Molldrem等,1997)。总之,这些体内数据表明,肿瘤微环境中存在的丝氨酸蛋白酶NE和P3可由乳腺癌细胞摄入并交叉呈递,这可有助于针对来源于NE和P3之表位PR1的适应性免疫应答。

[0323] 黑素瘤患者中的PR1/HLA-A2和PR1-CTL。因为黑素瘤组织也显示出具有可成为NE和P3来源的炎性细胞(Jensen等,2012),并且因为已知黑素瘤对免疫疗法易感(Dudley等,2002和Schwartzentruber等,2011),所以本发明人接着研究了在黑素瘤中是否也可检测到NE和P3的交叉呈递。为了确定在黑素瘤中是否也检测到PR1-CTL,本发明人用PR1/HLA-A2dextramer对来自黑素瘤患者的PBMC进行染色并且在所有的七名患者中都检测到PR1-CTL,中值频率为CD8⁺T细胞的0.014%(范围为0.0053%至0.019%)(图25C),与在来自正常供体的血液中看到的类似。本发明人还检测到一种HLA-A2⁺(黑素瘤1)黑素瘤组织中而不是HLA-A2₂(黑素瘤2)黑素瘤组织中的PR1/HLA-A2表达(图25D)。

[0324] 黑素瘤交叉呈递NE和P3增加了对PR1-CTL的易感性。为了确定黑素瘤是否表达NE和P3,对于NE和P3,本发明人对得自患者的黑素瘤组织进行染色并示出不存在NE和P3(图26A、26B)。本发明人还在四种黑素瘤细胞系MEL526、MEL624、MT2019和MT2333中分析了NE和P3表达。Western印迹分析示出黑素瘤细胞系中不存在NE和P3(图26C)。与乳腺癌类似,本发明人证明了HLA-A2+Me1 526细胞系摄入并交叉呈递NE和P3(图26D,26E)。因为8F4Ab与构成构象PR1/HLA-A2表位之重要部分的HLA-A2分子结合(Sergeeva等,2011和Porgador等,1997),所以Me1 526细胞确实示出与在和NE或P3共培养前用8F4进行的染色(数据未示出)。然而,在与NE或P3共培养后,用8F4进行的染色增加,而HLA-A2表面染色没有增加(数据未示出),表明了细胞表面上PR1/HLA-A2表达的增加。此外,NE和P3的交叉呈递增加了HLA-A2+Me1 526细胞对PR1-CTL杀伤的易感性,并且在最高E:T比下观察到最大杀伤(图26F)。

[0325] *****

[0326] 根据本公开内容,在不进行过度实验的情况下可实现并执行本文公开和要求保护的所有组合物和/或方法。虽然关于一些优选实施方案已描述了本发明的组合物和方法,但是对于本领域技术人员明显的是,可对所述组合物和/或方法以及本文所述方法的步骤或步骤顺序进行变化而不偏离本发明的概念、精神和范围。更具体地,明显的是,化学相关和生理学相关的某些药剂可替代本文所述药剂并且实现相同或类似的结果。对本领域技术人员明显的所有这些类似替代和修改被认为在所附权利要求书所限定的本发明精神、范围和概念内。

[0327] VIII. 参考文献

[0328] 以下参考文献,以其提供补充本文所述那些内容的示例性步骤或其他细节的程度,具体通过引用并入本文。

[0329] 美国专利4,196,265

[0330] 美国专利4,472,509

[0331] 美国专利4,554,101

[0332] 美国专利4,680,338

- [0333] 美国专利4,684,611
- [0334] 美国专利4,797,368
- [0335] 美国专利4,843,092
- [0336] 美国专利4,879,236
- [0337] 美国专利4,938,948
- [0338] 美国专利4,952,500
- [0339] 美国专利5,021,236
- [0340] 美国专利5,302,523
- [0341] 美国专利5,322,783
- [0342] 美国专利5,384,253
- [0343] 美国专利5,399,363
- [0344] 美国专利5,443,826
- [0345] 美国专利5,464,765
- [0346] 美国专利5,466,468
- [0347] 美国专利5,538,877
- [0348] 美国专利5,538,880
- [0349] 美国专利5,543,158
- [0350] 美国专利5,550,318
- [0351] 美国专利5,563,055
- [0352] 美国专利5,563,250
- [0353] 美国专利5,580,859
- [0354] 美国专利5,589,466
- [0355] 美国专利5,599,795
- [0356] 美国专利5,610,042
- [0357] 美国专利5,641,515
- [0358] 美国专利5,656,610
- [0359] 美国专利5,702,932
- [0360] 美国专利5,736,524
- [0361] 美国专利5,739,169
- [0362] 美国专利5,780,448
- [0363] 美国专利5,789,215
- [0364] 美国专利5,801,005
- [0365] 美国专利5,824,311
- [0366] 美国专利5,830,880
- [0367] 美国专利5,846,233
- [0368] 美国专利5,846,945
- [0369] 美国专利5,856,456
- [0370] 美国专利5,871,986
- [0371] 美国专利5,880,270

- [0372] 美国专利5,945,100
- [0373] 美国专利5,981,274
- [0374] 美国专利5,994,136
- [0375] 美国专利5,994,624
- [0376] 美国专利6,013,516
- [0377] Alatrash et al., J. Immunol., 35:309-320, 2012
- [0378] Antin, Blood, 82:2273-2277, 1993.
- [0379] Arend et al., Annu. Rev. Immunol., 16:27-55, 1998.
- [0380] Arend, Semin. Arthritis Rheum., 30 (5):1-6, 2001.
- [0381] Austin-Ward and Villaseca, Rev. Med. Chil., 126 (7):838-45, 1998.
- [0382] Baichwal and Sugden, In: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 117-148, 1986.
- [0383] Bajorin et al., J. Clin. Oncol., 6 (5):786-92, 1988.
- [0384] Bakhshi et al., Cell, 41 (3):899-906, 1985.
- [0385] Basha et al., Plos One, 3:e3247, 2008.
- [0386] Beidler et al., J. Immunol., 141 (11):4053-4060, 1988.
- [0387] Besnard et al., Gut., 43 (5):634-638, 1998.
- [0388] Blomer et al., J. Virol., 71 (9):6641-6649, 1997.
- [0389] Brouwer et al., Clin. Exp. Immunol., 98:448-453, 1994.
- [0390] Brynskov et al., N. Engl. J. Med., 321 (13):845-850, 1989.
- [0391] Bukowski et al., Clin. Cancer Res., 4 (10):2337-47, 1998.
- [0392] Burchert et al., Blood, 02:659, 2002.
- [0393] Burgdorf et al., J. Immunol., 176:6770-6776, 2006.
- [0394] Burger and Dayer, Neurology, 45 (6S-6):S39-43, 1995.
- [0395] Capaldi et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 74 (2):425-433, 1977.
- [0396] Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7 (8):2745-2752, 1987.
- [0397] Christodoulides et al., Microbiology, 144 (Pt 11):3027-37, 1998.
- [0398] Cleary and Sklar, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (21):7439-7443, 1985.
- [0399] Cleary et al., J. Exp. Med., 164 (1):315-320, 1986.
- [0400] Cotten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 (13):6094-6098, 1992.
- [0401] Coupar et al., Gene, 68:1-10, 1988.
- [0402] Cresswell et al., Immunol. Rev., 207:145-157, 2005.
- [0403] Curiel, Nat. Immun., 13 (2-3):141-164, 1994.
- [0404] Davidson et al., J. Immunother., 21 (5):389-98, 1998.
- [0405] Desmedt et al., Int. J. Cancer, 119:2539-2545, 2006.
- [0406] Dillman, Cancer Biother. Radiopharm., 14 (1):5-10, 1999.
- [0407] Dinarello, Int. Rev. Immunol., 16:457-499, 1998.
- [0408] Dionne et al., Clin. Exp. Immunol., 112 (3):435-442, 1998.
- [0409] Dudley et al., Science, 298:850-854, 2002.

- [0410] Eastgate et al.,Lancet,2:706-709,1988.
- [0411] EP Application 125,023
- [0412] EP Application 171,496
- [0413] EP Application173,494
- [0414] EP Application184,187
- [0415] Fechheimer et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84:8463-8467,1987.
- [0416] Fellerman et al.,Am.J.Gastroenterol.,93(10):1860-1866,1998.
- [0417] Firestein et al.,Arthritis Rheum.,37:644-652,1994.
- [0418] Fraley et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,76:3348-3352,1979.
- [0419] Francois et al.,Blood, 114:2632-2638,2009.
- [0420] Franssen et al.,Lancet.,347:116,1996.
- [0421] Friedmann,Science,244:1275-1281,1989.
- [0422] Fujikawa et al.,Ann.Rheum.Dis.,54:318-320,1995.
- [0423] Funakoshi et al.,Digestion,59(1):73-78,1998.
- [0424] Giralt and Kolb,Curr.Opin.Oncol.,8:96-102,1996.
- [0425] Gopal,Mol.Cell Biol.,5:1188-1190,1985.
- [0426] Graham and Van Der Eb,Virology,52:456-467,1973.
- [0427] Grunhaus and Horwitz,Seminari Virology,3:237-252,1992.
- [0428] Hanibuchi et al.,Int.J.Cancer,78(4):480-485,1998.
- [0429] Hannum et al.,Nature,343:336-340,1990.
- [0430] Harland and Weintraub,J..CellBiol.,101:1094-1099,1985.
- [0431] Hellstrand et al.,Acta Oncol.,37(4):347-353,1998.
- [0432] Hoffenberg et al.,J.Pediatr.,134(4):447-452,1999.
- [0433] Hollander et al.,Ann.Intern.Med.,105:883-885,1986.
- [0434] Hollander,Scand..J.Gastroenterol.,27:721-726,1992.
- [0435] Horwich et al.J.Virol.,64:642-650,1990.
- [0436] Hui and Hashimoto,Infect.Immun.,66(11):5329-36,1998.
- [0437] Irie et al.,Lancet.,1(8641):786-787,1989.
- [0438] Jarvis,Curr.Opin.Rheumatol.,10(5):459-467,1998.
- [0439] Jarvis,Pediatr.Ann.,31(7):437-446,2002.
- [0440] Jensen et al.,J.Clin.Oncol.,27:4709-4717,2009.
- [0441] Jensen et al.,Cancer,118:2476-2485.2012.
- [0442] Jiang et al.,Br.J.Haematol.,93:606-612,1996.
- [0443] Johnson et al.,In:Biotechnology And Pharmacy,Pezzuto et al.(Eds.), Chapman and Hall,NY,1993.
- [0444] Jones et al.,Nature,,321:522-525,1986.
- [0445] Jonsson et al.,Br.J.Rheumatol.,32(7):578-581 1993.
- [0446] Jonsson et al.,OralDis.,8(3):130-140,2002.
- [0447] Jonsson et al.,Trends Immunol.,22(12):653-654,2001.

- [0448] Kaeppler et al., *Plant-cell Reports*, 9:415-418, 1990.
- [0449] Kahle et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 51:731-734, 1992.
- [0450] Kaneda et al., *Science*, 243:375-378, 1989.
- [0451] Kato et al., *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- [0452] Kelleher and Vos, *Biotechniques*, 17 (6):1110-7, 1994.
- [0453] Kerr et al., *Br. J. Cancer*, 26 (4):239-257, 1972.
- [0454] Kolb and Holler, *Curr. Opin. Oncol.*, 9:139-145, 1997.
- [0455] Kolb et al., *Blood*, 86:2041-2050, 1995.
- [0456] Kolb et al., *Bone Marrow Transplant*, 17:449-452, 1996.
- [0457] Kotzin, *Cell*, 85:303-306, 1996.
- [0458] Kovacsovics-Bankowski and Rock, *Science*, 267:243-246, 1995.
- [0459] Kuboyama, *Kurume Med. J.*, 45 (1):33-37, 1998.
- [0460] Kuronita, *J. Cell Sci.*, 115:4117-4131, 2002.
- [0461] Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 57 (1):105-32, 1982.
- [0462] Laughlin et al., *J. Virol.*, 60 (2):515-524, 1986.
- [0463] Lebkowski et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8 (10):3988-3996, 1988.
- [0464] Leiper et al., *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 12 (1):179-199, 1998.
- [0465] Lipsky, In: *Harrison's principles of internal medicine*, Fauci et al. (Eds.), 14th Ed., NY, McGraw-Hill, 1880-1888, 1998.
- [0466] Lugering et al., *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 30 (3):338-344, 1998.
- [0467] Makowiec et al., *Z. Gastroenterol.*, 36 (8):619-624, 1998.
- [0468] Mann et al., *Cell*, 33:153-159, 1983.
- [0469] McAlindon et al., *Gut*, 42 (2):214-219, 1998.
- [0470] McLaughlin et al., *J. Virol.*, 62 (6):1963-1973, 1988.
- [0471] Miller et al., *Am. J. Clin. Oncol.*, 15 (3):216-221, 1992.
- [0472] Mittendorf et al., *Cancer Res.*, 72:3153-3162, 2012.
- [0473] Molldrem et al., *Blood*, 88:2450-2457, 1996.
- [0474] Molldrem et al., *Blood*, 90:2529-2534, 1997.
- [0475] Molldrem et al., *Cancer Res.*, 59:2675-2681, 1999.
- [0476] Molldrem et al., *Nat. Med.*, 6:1018-1023, 2000.
- [0477] Molldrem et al., *J. Clin. Invest.*, 111:639-647, 2003.
- [0478] Morrison, *Science*, 229 (4719):1202-1207, 1985.
- [0479] Mukai, et al., *J. Immunol.*, 183:6561-6568, 2009.
- [0480] Murch, *Nutrition*, 14:780-783, 1998.
- [0481] Muzyczka, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 158:97-129, 1992.
- [0482] Naldini et al., *Science*, 272 (5259):263-267, 1996.
- [0483] Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- [0484] Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- [0485] Ohnishi et al., *Int. Immunol.*, 6:817-830, 1994.

- [0486] Omirulleh et al., *Plant Mol. Biol.*, 21 (3) :415-28, 1993.
- [0487] Paskind et al., *Virology*, 67:242-248, 1975.
- [0488] Paul, *Immunogenetics*, 37 (6) :442-448, 1993.
- [0489] Pietras et al., *Oncogene*, 17 (17) :2235-49, 1998.
- [0490] Porgador et al., *Immunity* 6:715-726, 1997.
- [0491] Potrykus et al., *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.
- [0492] Prang et al., *Br. J. Cancer*, 92:342-349, 2005.
- [0493] Prieur et al., *Lancet.*, 2:1240-1242, 1987.
- [0494] Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (24) :14411-14416, 1998.
- [0495] Queen et al., *Cancer Res.*, 65:8896-8904, 2005.
- [0496] Reimund et al., *Eur. J. Clin. Invest.*, 28 (2) :145-150, 1998.
- [0497] Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pages 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.
- [0498] Rezvani et al., *Cytotherapy* 9:245-251, 2007.
- [0499] Rezvani et al., *Blood*, 111:236-242, 2008.
- [0500] Ridgeway, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (Eds.), Stoneham: Butterworth, 467-492, 1988.
- [0501] Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- [0502] Rogler and Andus, *World J. Surg.*, 22 (4) :382-389, 1998.
- [0503] Rooney et al., *Rheumatol. Int.*, 10:217-219, 1990.
- [0504] Rosenberg et al., *Ann. Surg.* 210 (4) :474-548, 1989.
- [0505] Rosenberg et al., *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988.
- [0506] Roux et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- [0507] Ruemmele et al., *Gastroenterol.*, 115 (4) :822-829, 1998.
- [0508] Saiki et al., *Scand. J. Gastroenterol.*, 33 (6) :616-622, 1998.
- [0509] Salomonsson et al., *Scand. J. Immunol.*, 55 (4) :336-342, 2002.
- [0510] Sartor, *Am. J. Gastroenterol.*, 92 (12) :5S-11S, 1997.
- [0511] Savage et al., *Immunity*, 10:485-492, 1999.
- [0512] Scheibenbogen et al., *Blood*, 100:2132-2137, 2002.
- [0513] Schreiber, *Neth. J. Med.*, 53 (6) :S24-31, 1998.
- [0514] Schwartzentruber, et al., *N. Engl. J. Med.*, 364:2119-2127, 2011.
- [0515] Sergeeva, et al., *Blood*, 117:4262-4272, 2011.
- [0516] Shaw et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 80 (19) :1553-1559, 1988.
- [0517] Soderholm et al., *Gastroenterol.*, 117:65-72, 1999.
- [0518] Stack et al., *Lancet*, 349 (9051) :521-524, 1997.
- [0519] Stites, *J. Mol. Biol.*, 235 (1) :27-32, 1994.
- [0520] Sun et al., *J. Steroid Biochem.*, 26 (1) :83-92, 1987.
- [0521] Targan et al., *N. Engl. J. Med.*, 337 (15) :1029-1035, 1997.
- [0522] Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188,

1986.

- [0523] Tratschin et al., Mol. Cell. Biol., 4:2072-2081, 1984.
- [0524] Tsujimoto and Croce, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 (14):5214-5218, 1986.
- [0525] Tsujimoto et al., Science, 228 (4706):1440-1443, 1985.
- [0526] van den Berg, Semin. Arthritis Rheum., 30 (5S-2):7-16, 2001.
- [0527] van Dullemen et al., Gastroenterol., 109 (1):129-135, 1995.
- [0528] VandenDriessche et al., Blood, 100 (3) 813-822, 2002.
- [0529] Wada et al., Nucleic Acids Res. 18:2367-2411, 1990.
- [0530] Warrington et al., Arthritis and Rheumatism, 44:13-20, 2001.
- [0531] Wonget al., Gene, 10:87-94, 1980.
- [0532] Wood et al., J. Clin. Lab. Immunol., 17 (4):167-171, 1985.
- [0533] Xanthou et al., Arthritis Rheum., 44 (2):408-418, 2001.
- [0534] Zufferey et al., Nat. Biotechnol., 15 (9):871-875, 1997.

序列表

<110> MOLLDREM, JEFFREY
SERGEEVA, ANNA

<120> 用于诊断和治疗癌症以及自身免疫病的单克隆抗体

<130> UTFC.P1136W0

<140> PCT/US2013/049368

<141> 2013-07-03

<150> 61/669,967

<151> 2012-07-10

<150> 61/702,916

<151> 2012-09-19

<160> 60

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 429

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 1

atgaacttcg ggctcagctt gattttctcg gccctcattt taaaagggtg ccagtgtgag 60
gigcagctgg tggagctcgg gggagacila glgaagcctg gagggicctt gaaactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac tticagtga tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca 180
gacaagagcg tggagtgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctactatcca 240
gacagtgtga aggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
caaatgagca gtctgaagtc tgaagacaca gccatgtatt actgtgcaag acatgagggg 360
ggttactacg gtagtagccc tgcctgggtt gtttactggg gccaaaggac tetggtcact 420
ctctctgea 429

[0001]

<210> 2

<211> 143

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 2

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
20 25 30

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

Ser Gly Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala
115 120 125

Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Leu Ser Ala
130 135 140

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 3

Gly Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 4

Gly Tyr Gly Met Ser
1 5

[0002]

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 5

His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala Trp Phe Val Tyr
1 5 10 15

<210> 6
<211> 381
<212> DNA
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 6
atggagtcac agattcaggt etttgtattc gtgtttctct ggttgtctgg tgttgacgga 60
gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120
ateacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgtag cctggtatca acagaaacea 180
ggacaatetc ctaaaactgt gatttacteg acatcctacc ggtacactgg agtccctgat 240
cgcttcactg gcagtggtac tgggacgggt ttacatttca ccatcaacag tgtccagget 300
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattttatta ctctccgac gttcggtgga 360
ggcaccaagc tggaaatcaa a 381

<210> 7
<211> 127
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 7

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

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

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Phe Thr Ile Asn
85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe
100 105 110

Ile Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

[0003]

<400> 8
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 9

Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 10

Gln Gln His Phe Ile Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 11
<211> 463
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成引物

<400> 11
actagtacca ccaigaacct cgggetcagc ttgatittec tggccctcat tttaaaaggt 60

```

gtccagtgtg aggtgcagct ggtggagtct gggggagact tagtgaagcc tggagggtcc 120
ctgaaactct cctgtgcagc ctctggattc actttcagtg gatatggcat gtcttgggtt 180
cgccagaetc cagacaagag gctggagtgg gtcgcaacca ttagtagtgg tggtagttac 240
acctactatc cagacagtgt gaaggggcca ttaccatct ccagagacaa tgccaagaac 300
acctgtacc tgc aaatgag cagtctgaag tctgaagaca cagccatgta ttactgtgca 360
agacatgagg ggggttacta cggtagtagc cctgccctggt ttgtttactg gggccaaggg 420
actctggica ctctctctgc aggtgagtcc taacttcaag ctt 463

```

<210> 12
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 12

```

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
1          5          10          15

```

```

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
          20          25          30

```

```

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

```

[0004]

```

Ser Gly Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
50          55          60

```

```

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
65          70          75          80

```

```

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
          85          90          95

```

```

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
100          105          110

```

```

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala
115          120          125

```

```

Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Leu Ser Ala
130          135          140

```

<210> 13
 <211> 416
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成引物

<400> 13

```

gctagcaacca ccattggagtc acagattcag gtctttgtat tegtgtttct ctggttgtct 60

```

```

gggtgtgacg gagacattgt gatgaccacg tctcacaat tcatgtccac atcagtagga 120

```

gacaggggtca gcatcaccig caagccagct caggatgtga gtactgctgt agcctgggtat 180
 caacagaaac caggacaatc tcctaaactg ctgatttact cgacatccta ccggtacact 240
 ggagtccctg atcgcttcac tggcagtgga tcigggacgg ttttcacitt caccatcaac 300
 agtgtccagg cigaagacct ggcagtttat tactgtcagc aacattttat tactcctccg 360
 acgttcgggtg gaggaccaa gettgaaatc aaacgtaagt agaatccaaa gaattc 416

<210> 14
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 14

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
 1 5 10 15

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

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60

[0005]

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Phe Thr Ile Asn
 85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe
 100 105 110

Ile Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 15
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 15

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala Trp Phe Val
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Leu Ser Ala
115 120

<210> 16
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 16

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0006]

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala Trp Phe Val
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 86
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 17

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

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

Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Phe Thr Ile Ser

[0007]

35	40	45
Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg		
50	55	60
Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr		
65	70	75 80
Met Val Thr Val Ser Ser		
85		
<210> 18		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 小鼠 (Mus musculus)		
<400> 18		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly		
1	5 10	15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala		
	20 25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
	35 40	45
Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		
	50 55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Phe Thr Ile Asn Ser Val Gln Ala		
65	70 75	80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ile Thr Pro Pro		
	85 90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
	100 105	
<210> 19		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 19		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5 10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala		
	20 25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
	35 40	45
Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50 55	60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ile Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

[0008]

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ile Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 80
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
50 55 60

Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

	65	70	75	80
	<210> 22 <211> 463 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成引物 <400> 22 actagtacca ccatgaactt cgggctcagc ttgattttcc tggccctcat tttaaaagga 60 gtccagtgtg aagtgcagct ggtggagtet ggcggaggcc tcgtgcagcc tggaggatcc 120 ctgagaactct cctgtgcage ccttgatttc actttcagcg gatatggcat gtcttgggtt 180 cgccaggctc caggcaaggg gctcgaatgg gtcgcaacca ttagtagtgg tggtagttac 240 acctactatc cagacagtgt gaaggggcga ttcacctctt ccagagacaa tgccaagaac 300 tcactgtacc tgcaaatgaa cagtctgaga gccgaagaca cagccgtgta ttactgtgca 360 agacatgagg gaggtactta cggtagtagc cctgcttggt ttgtttactg gggccaaggg 420 actatggtea ctgtctcttc aggttaagatg ggttccaag ctt 463			
	<210> 23 <211> 143 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 合成肽 <400> 23 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly 1 5 10 15 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln 20 25 30 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe 35 40 45 Ser Gly Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 50 55 60 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro 65 70 75 80 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn 85 90 95 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val 100 105 110 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala 115 120 125 Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser 130 135 140			

[0009]

<210> 24
 <211> 416
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成引物

<400> 24
 gctagcacca ccatggagtc acagattcag gtctttgtat tctgtttctt ciggittgtct 60
 ggtgttgacg gagacattca gatgaccagc tctccatcct cctgttcgc atcagtagga 120
 gacagggtca ccatcacctg caaggecagt caggatgtga gtactgctgt ggcttggtac 180
 caacagaaac caggaaaagc ccctaaactg ctgatttact ccacatccta ccggtacact 240
 ggagtccttt cacgttcagc tggcagtgga tctgggaccg ttttcacttt caccatcagc 300
 agtctgcagc ctgaagacat tgcaacatat tactgtcagc aacattttat tactcctccc 360
 acattcggig gaggcaccaa agtggaaaac aaacgtaagt gcactttect gaattc 416

<210> 25
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 25

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Phe Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe
 100 105 110

Ile Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 26
 <211> 416
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成引物

<400> 26

[0010]

```

getagcacca ccatggagtc acagattcag giccttgtat tegtgtttct ctggttgtct      60
gggtgtgaag gagacattca gatgaccagc tctccatcct cctgttccgc atcagtagga      120
gacaggggtca ccatcacctg caaggccagt caggatgtga gtaactgtgt ggccctggta      180
caacagaaac cagganaagc ccctaaactg ctgatttact ccacatccta ccggtacact      240
ggagtccttt cacgcttcag tggcagtgga tctgggaccg atttcaacttt caccatcage      300
agtctgcage ctgaagacat tgcaacatat tactgtcage aacattttat tactcctccc      360
acattcgggtg gaggcaccaa agtggaaatc aaacgtaagt gcactttcct gaattc      416

```

<210> 27
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 27

```

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
1          5          10          15

```

```

Gly Val Asp Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
          20          25          30

```

```

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
          35          40          45

```

[0011]

```

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50          55          60

```

```

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
65          70          75          80

```

```

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
          85          90          95

```

```

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe
100          105          110

```

```

Ile Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115          120          125

```

<210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成引物

<400> 28

```

gaaccgtcag atcgccctgga gacg      24

```

<210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

[0012]	<223> 合成引物	
	<400> 29	
	tgaagatga gctggaggac	20
	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 30	
	ctttcttgte caecttgggtg	20
	<210> 31	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 31	
	gctgtcctac agtcctcag	19
	<210> 32	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 32	
	acgtgccaaag catcctcg	18
	<210> 33	
	<211> 1422	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 33	
	aigaacttcg ggctcagctt gattttcctg gccctcattt taaaagggtg ccagtgtgag	60
	gtgcagctgg tggagtctgg gggagactta gtgaagcctg gagggtccct gaaactctcc	120
	tgtgcagcct ctggattcac ttccagtggg tatggcatgt ctgggttcg ccagactcca	180
	gacaangagge tggagtggtt cgcacccatt agtagtggtg gtagttacac ctactatcca	240
	gacagtgtga aggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg	300
	caaatgagca gtctgaagtc tgaagacaca gccatgtatt actgtgcaag acatgagggg	360
	ggttactacg gtagtagccc tgcctgggtt gtttactggg gccaaaggac tciggtcact	420
	ctctctcgag cctccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc	480
	acctctgsgg gcacagcggc cctgggctgc ctggtaagg actacttccc cgaaccggtg	540
	acgggtgtct ggaactcagg cgccttgacc agcggcgtgc acaecttccc ggctgtccta	600
	cagtcctcag gactetacte cctcageagc gtggtagccg tgcctecag cagcttgggc	660
	accagaccti acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa	720

```

gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccacg cgtgccacg accatgaactc 780
ctggggggac cgtcagtcct cctcttcccc ccaaaaceca aggaacacct catgatctcc 840
eggacccctg aggtcacatg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaagaccg tgaggtaag 900
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctctacgg tcttgcacca ggactggctg 1020
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaa 1080
accatctcca aagccaaagg gcagcccca gaaccacagg tgtacacct gcccccatcc 1140
egggatgagc tgaccaagaa ccaggcagc ctgacctgcc tggtaaaagg ctctctatcc 1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1260
cctcccgctg tggactccga cggctctctt ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1320
agcagggtgc agcaggggaa cgtctctctc tgcctcgtga tgcattgagc totgcacaac 1380
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cgggtaaat ga 1422

```

<210> 34
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 34

[0013]

```

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
1      5      10      15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
20     25     30

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

Ser Gly Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
50     55     60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
65     70     75     80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85     90     95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
100    105    110

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala
115    120    125

Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Leu Ser Ala Ala
130    135    140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
145    150    155    160

```

	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	
					165					170						175	
	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	
				180					185					190			
	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	
			195					200					205				
	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	
		210					215					220					
	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	
	225					230					235					240	
	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
					245					250					255		
	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
			260					265						270			
	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
			275				280						285				
	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
		290					295					300					
[0014]	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
	305					310					315					320	
	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
					325					330					335		
	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
			340					345						350			
	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
			355				360						365				
	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	
		370				375						380					
	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
		385				390					395					400	
	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
				405						410					415		
	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
				420					425					430			
	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
			435					440					445				
	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	
		450					455					460					

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 35
<211> 705
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成引物

<400> 35
atggagtcac agattcaggt ctttgtatct gtgtttctct ggttgtctgg tgttgacgga 60
gacattgtga tgaccacgic tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120
atcacctgca aggccagtcn ggatgtgagt actgctgtag cctgggtatca acagaaacca 180
ggacaatctc ctaaaactgct gattfactcg acatcctacc ggtacactgg agtccctgat 240
cgcttcactg gcagtggaic tgggaagggt ttcactttca ccatcaacag gtgccaggct 300
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattttattt ctcctccgac gtccgggtga 360
ggcaccgaag tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgc tctgttgtgt gccctctgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaaagtaca gtggaagggt gataacgcc tccaatcggt taactccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gccacagcag caccctgacg 600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgect gegaagtcac ccatcagggc 660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

[0015]

<210> 36
<211> 234
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 36

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

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

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Phe Thr Ile Asn
85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe
100 105 110

Ile Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 37
 <211> 1422
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0016]

<220>
 <223> 合成引物

<400> 37
 atgaacttcg ggctcagcct gattttcctg gccctcattt taaaaggagt ccagtgtgaa 60
 gtgcagctgg tggagctctg cggaggcctc gtgcagcctg gaggatccct gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac ttccagcgga tatgcatgt ctgggttcg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tcgaatgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagitacac ctactatcca 240
 gacagtgtga aggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaactc actgtacctg 300
 caaatgaaca gtctgagagc cgaagacaca gccgtgtatt actgtgcaag acatgaggga 360
 ggetactaag gtagtagccc tgccctgttt gtttactggg gccaagggaac tatggtcact 420
 gtctcttcag cctccaccaa ggcccacatg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc 480
 acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540
 acggtgtcgt ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggetgtccta 600
 cagtctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 660
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 720
 gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccaccg acctgaactc 780
 ctggggggac cgteagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacacct catgatctcc 840
 cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtaag 900
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960

```

cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcttcaccg tcctgcacca ggactggctg      1020
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa      1080
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacctc gcccccatcc      1140
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtc aaagg cttctatccc      1200
agegacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg      1260
cctcccgctc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag      1320
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgcctccgta tgcattgaggc tctgcacaa      1380
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaata ga.                        1422

```

<210> 38
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 38

```

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
1          5          10          15

```

```

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20          25          30

```

[0017]

```

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

```

```

Ser Gly Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50          55          60

```

```

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
65          70          75          80

```

```

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
          85          90          95

```

```

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100          105          110

```

```

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala
115          120          125

```

```

Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
130          135          140

```

```

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
145          150          155          160

```

```

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
165          170          175

```

```

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
180          185          190

```

[0018]

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 195 200 205
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 210 215 220
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 225 230 235 240
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 245 250 255
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 260 265 270
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 275 280 285
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 290 295 300
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 325 330 335
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 340 345 350
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 355 360 365
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 370 375 380
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 385 390 395 400
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 405 410 415
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 420 425 430
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 435 440 445
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 450 455 460
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470
 <210> 39
 <211> 705
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 39

atggagtcac agattcaggt ctttgtatcc gtgtttctct gggtgtctgg tgttgacgga	60
gacattcaga tgaccagtc tccatctccc ctgtccgcat cagtaggaga cagggtcacc	120
atcacctgea aggccagtc ggatgtgagt actgctgtgg ccgggtacca acagaaacca	180
ggaaaagccc ctaaaatgct gatttactcc acatccctacc ggtacactgg agtcccttca	240
cgttcagtg gcagtggatc tgggaccgtt ttcaatttca ccatcagcag tctgcagcct	300
gaagacattg caacatatta ctgtcagcaa cattttatta ctctctccac attcgggtga	360
ggcaccaaa tggaatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat ctcccccca	420
tctgatgagc agttgaaate tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taactttat	480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactccag	540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	600
ctgagcaaa gagaclacga gaaacacaaa gtclacgctt gcaagtcac ccatcagggc	660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag	705

<210> 40

<211> 234

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 40

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

[0019]

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 41
<211> 705
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成引物

<400> 41
atggagtcac agattcaggt ctttgtattc gtgtttctct ggttgtctgg tgttgacgga 60
gacattcaga tgaccacgag tccatcctcc ctgtccgcat cagtaggaga cagggtcacc 120
atcacctgca aggccagtcg ggaatgtgag actgctgtgg cctggtacca acagaaacca 180
ggaaaagccc ctaaaatgct gatctacccc acatcctacc ggtacaactgg agtcctctca 240
cgcttcagtg cgagiggatc tgggaaccgat ttcaatttca ccatcagcag tctgcagcct 300
gaagacattg caacatatta ctgtcagcaa catctttatta ctctctccac attcgggtga 360
ggcaccaaaag tggaaatcaa acgaactgtg gcgcacccat ctgtcttcat ctctccgcca 420
ctctgatgagc agttgaaatc tggaaatgcc tctgttgtgt gccctgtgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataaagccc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gccctcagcag caccctgacg 600
ctgagcaaaag cagactaaga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatcagggc 660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gacttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 42
<211> 234
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 42

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

[0020]

	20	25	30
	Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp 35 40 45		
	Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 50 55 60		
	Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser 65 70 75 80		
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser 85 90 95		
	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe 100 105 110		
	Ile Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg 115 120 125		
	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln 130 135 140		
	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr 145 150 155 160		
	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser 165 170 175		
[0021]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr 180 185 190		
	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys 195 200 205		
	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro 210 215 220		
	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225 230		
	<210> 43		
	<211> 1422		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成引物		
	<400> 43		
	atgaacttcg ggctcagctt gattticctg gccctcattt taaaaggagt ccagtgtaa	60	
	gtgcagctgg tggagtctgg cggaggcctc gtgcagcctg gaggatccct gagactctcc	120	
	tgtgcagcct ctggattcac ttccagcgga tatggcatgt cttgggttcg ccaggctcca	180	
	ggcaaggggc tcgaatgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctactatcca	240	
	gacagtgtga aggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac actgtaccig	300	
	caaatgaaca gtctgagagc cgaagacaca gccgtgtatt actgtgcaag acatgaggga	360	

```

ggctactacg gtagtagccc tgectggitt gtttactggg gccnaggac tatgtcaet 420
gtctcttcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc 480
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540
acgggtgtct ggaactcagg cgccttgacc agcggcgtgc acaccttccc ggtgttcta 600
cagtcttcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 660
accagacctt acatctgcaa cgtgaatcac aagccagca acaccaaggt ggacaagaaa 720
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgccccagc acctgaagct 780
gctggaggac cgtcagtttt cctcttccce ccaaaaccca aggacacctt catgatcttc 840
cggacccctg aggtcacatg cgtggtgggt gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 900
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggcagc gtcttcaccg tcctgcacca ggactggctg 1020
aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1080
accatctcca aagccaaagg gcagcccgga gaaccacagg tgtacacctt gcccctatcc 1140
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggcagc ctgacctgce tggtaaaagg cttctatccc 1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccaag 1260
cctcccgctc tggaactcca cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1320
agcagggtgg agcaggggaa cgtcttctca tgetccgtga tgcattgagc tctgcacaac 1380
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cgggtaaat ga 1422

```

[0022]

<210> 44
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 44

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

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

Ser Gly Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

[0023]

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Glu Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Ala
 115 120 125
 Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 165 170 175
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 180 185 190
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 195 200 205
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 210 215 220
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 225 230 235 240
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 245 250 255
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 260 265 270
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 275 280 285
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 290 295 300
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 325 330 335
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 340 345 350
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 355 360 365
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 370 375 380
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 385 390 395 400
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
420 425 430

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 45

Val Leu Gln Glu Leu Asn Val Thr Val
1 5

<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

[0024]

<220>
<223> 合成引物

<400> 46
gccagtggat agaccgatgg 20

<210> 47
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成引物

<400> 47
gatggataca gttggtgcag c 21

<210> 48
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成引物

<400> 48
gcaactagta ccaccatgaa cticgggctc agc 33

<210> 49
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成引物

	<400> 49 cgaaagcttg aagttaggac tcacctgcag agagagtgac cagag	45
	<210> 50 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成引物	
	<400> 50 gcagctagca ccaccatgga gtcacagatt cag	33
	<210> 51 <211> 45 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成引物	
	<400> 51 cgagaattct ttggattcta cttaagtgtg atttcagct tgggtg	45
	<210> 52 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成引物	
[0025]	<400> 52 gacccaccca tggctcac	18
	<210> 53 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成引物	
	<400> 53 atgggaagga cagacaggag	20
	<210> 54 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成引物	
	<400> 54 agcactgcta cgcaggtctt	20
	<210> 55 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成引物	
	<400> 55 ataagaaaga gaagggtgg	20

	<210>	56	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	56	
		ccagagcaag agagctatcc	20
	<210>	57	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	57	
		ctgtggtggt gaagctgtag	20
	<210>	58	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0026]	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	58	
		tagacgggaa gctcactggc	20
	<210>	59	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	59	
		aggtccacca ccctgttget	20
	<210>	60	
	<211>	17	
	<212>	PRT	
	<213>	小鼠 (Mus musculus)	
	<400>	60	
		Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys	
		1 5 10 15	
		Gly	

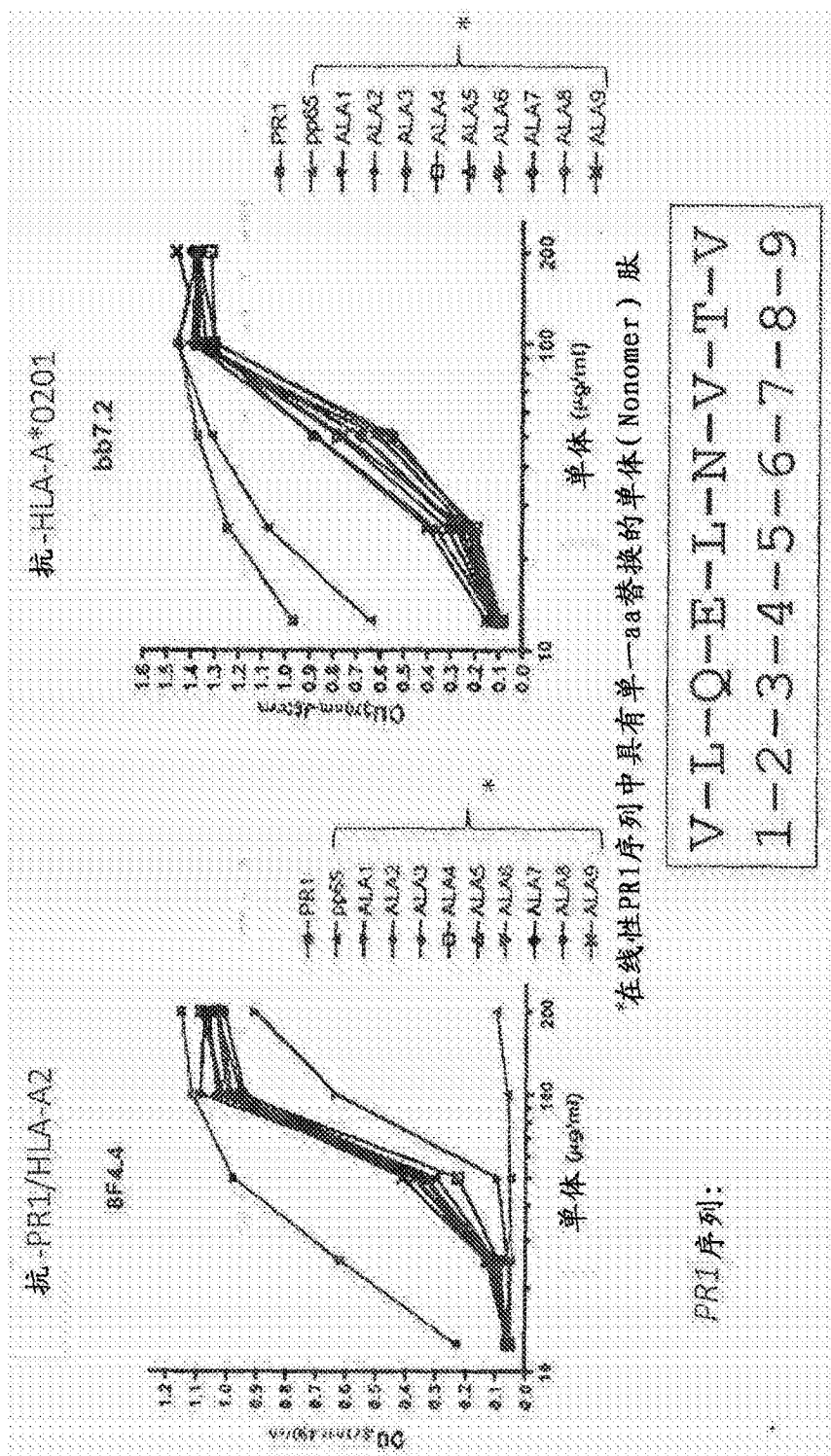


图1

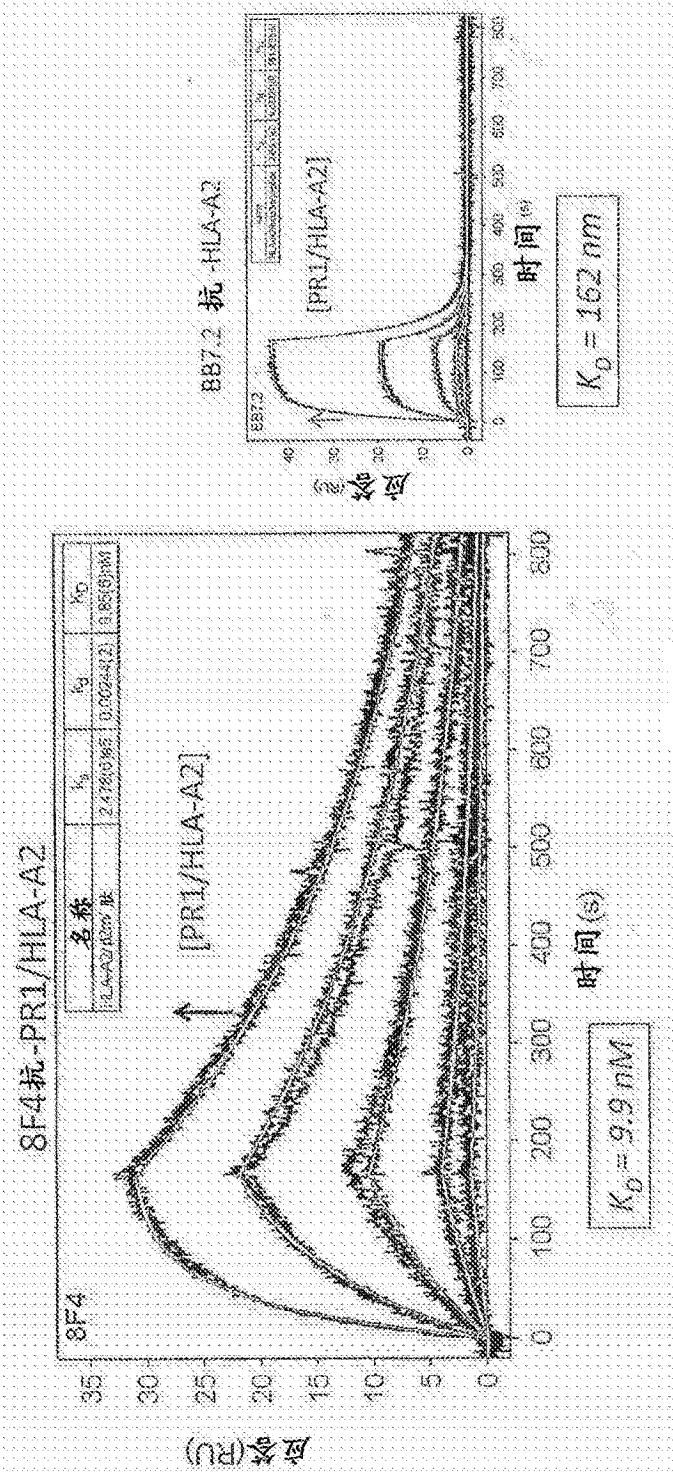


图2

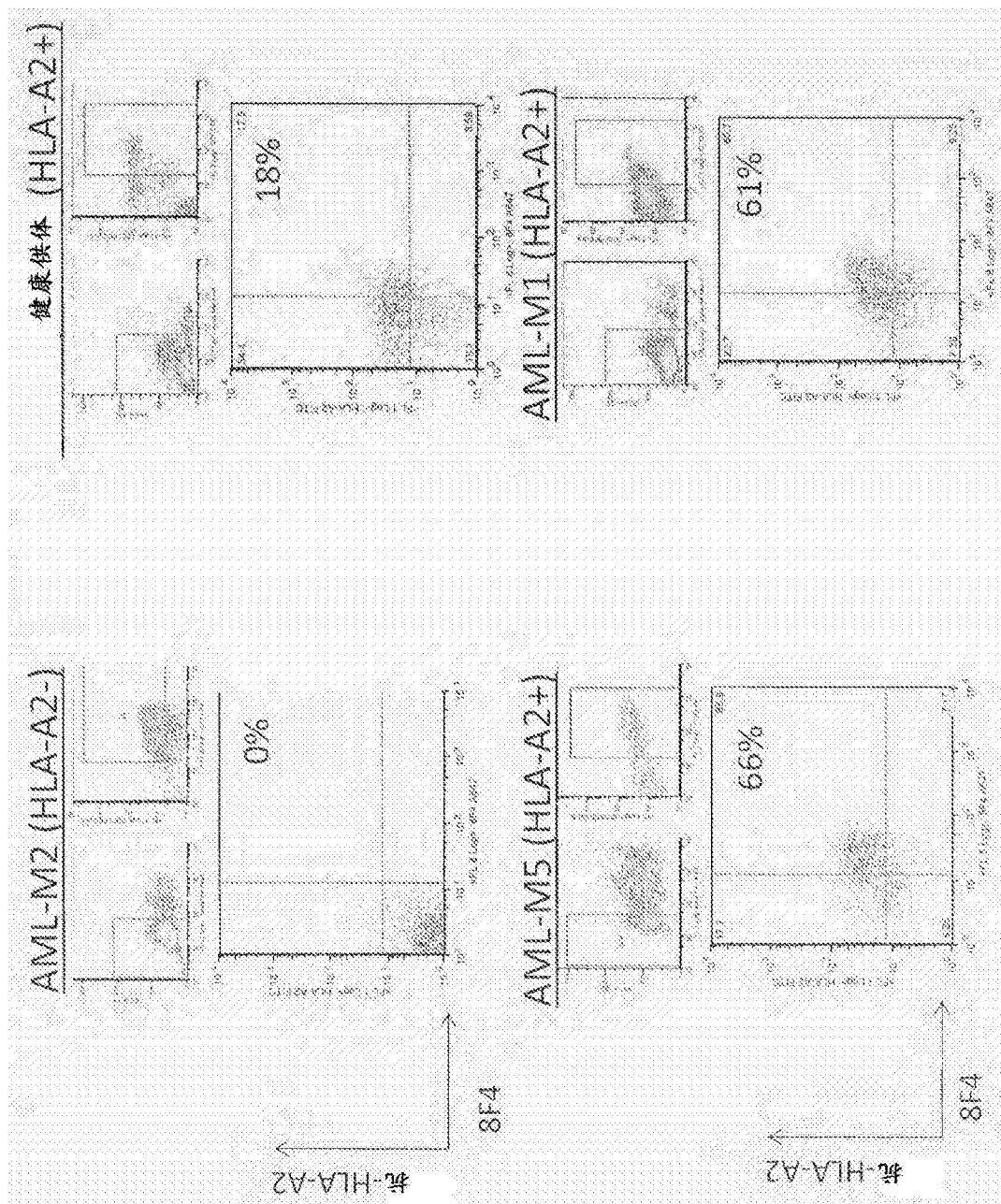


图3

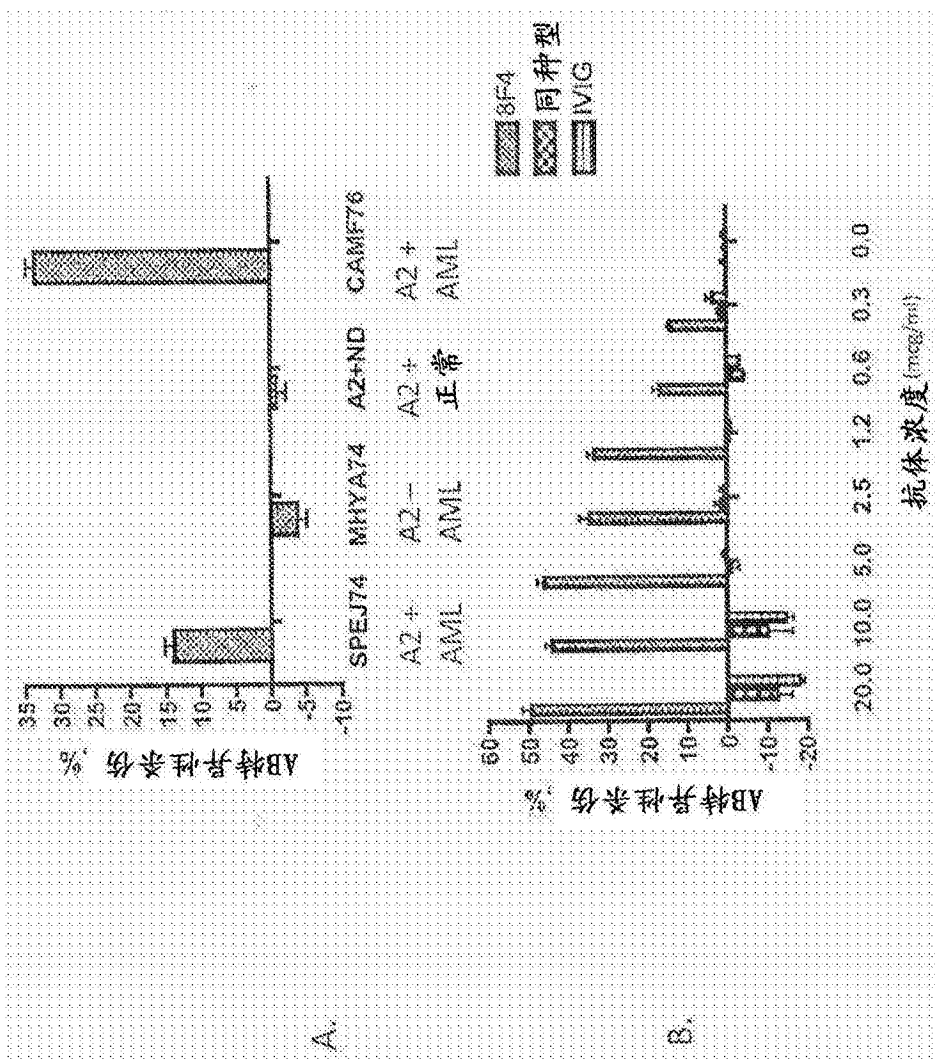


图4A-B

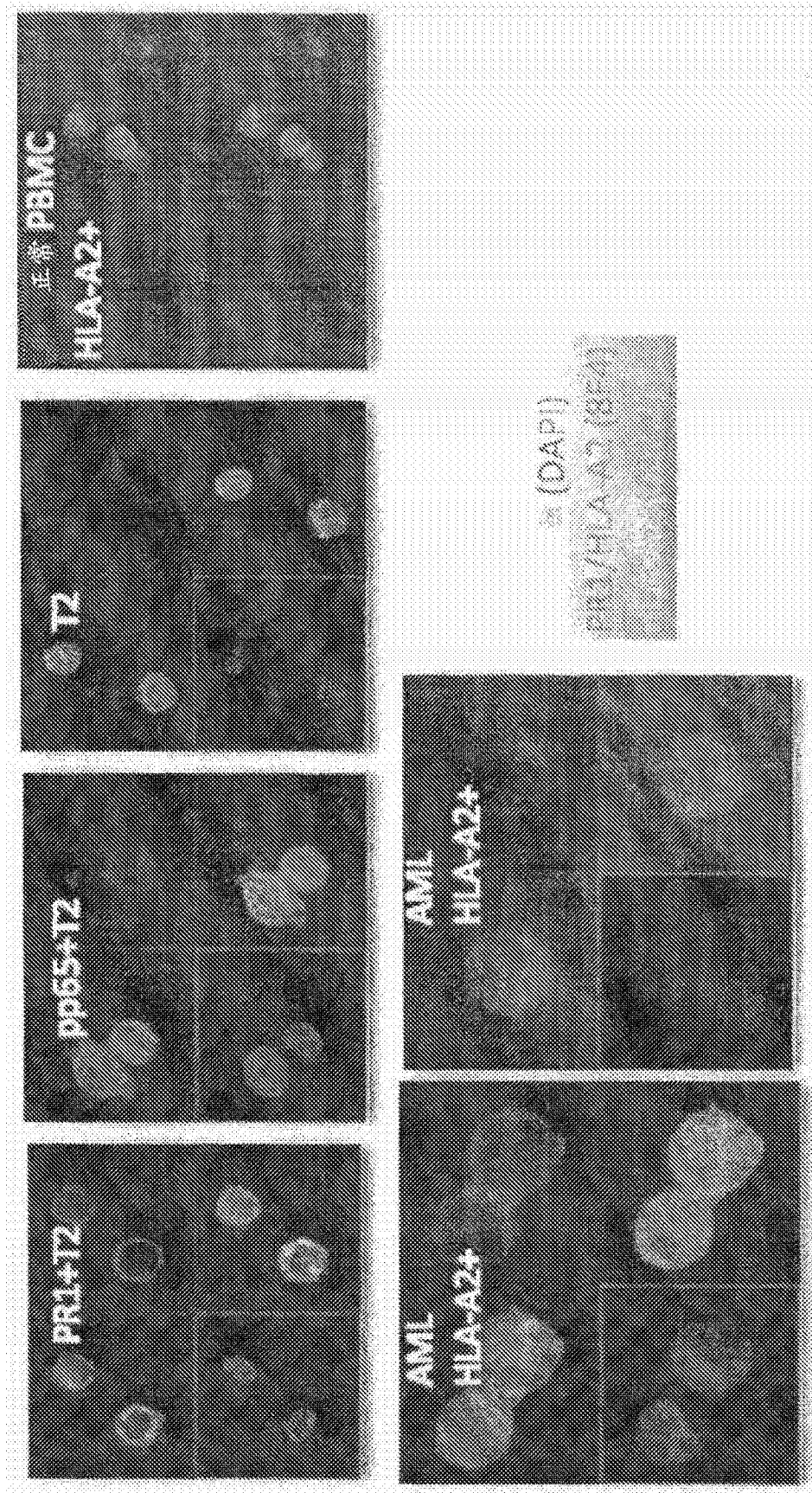


图5

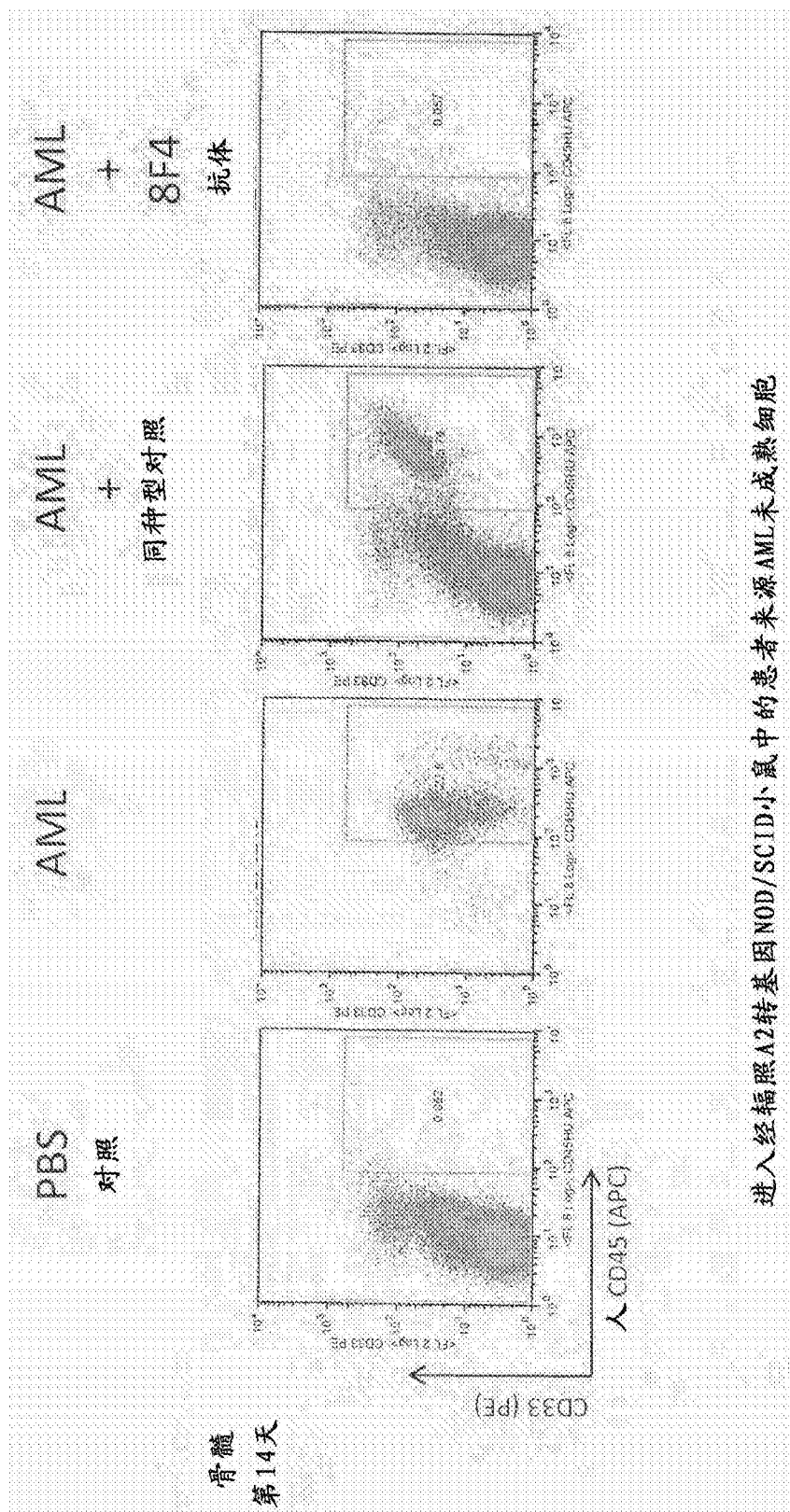


图6

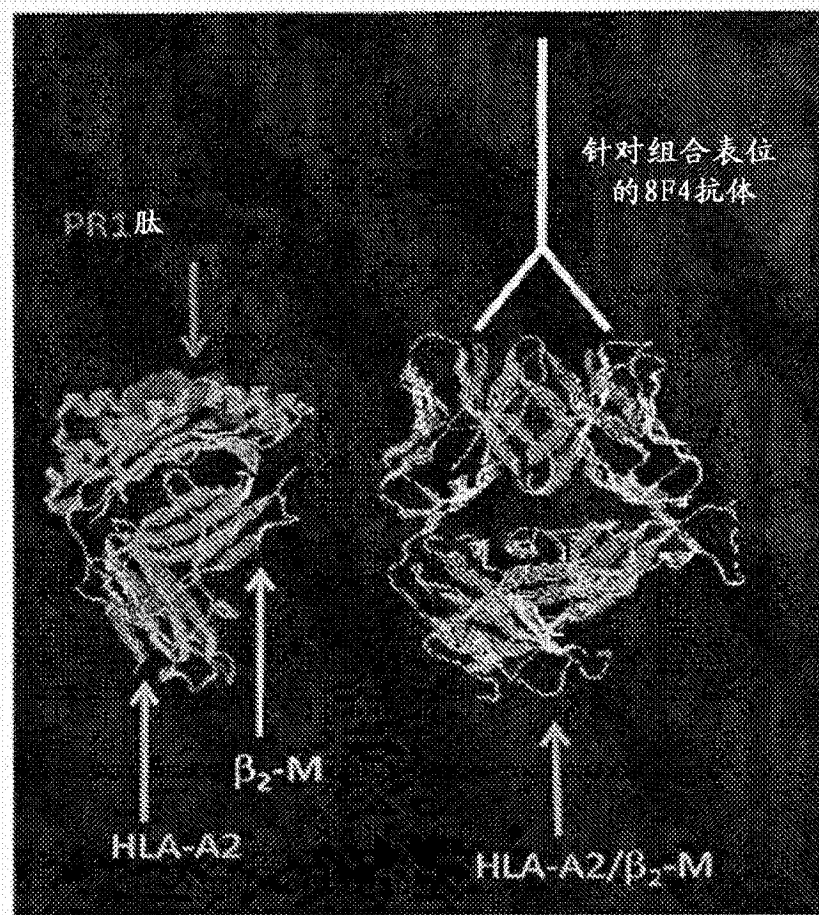


图7

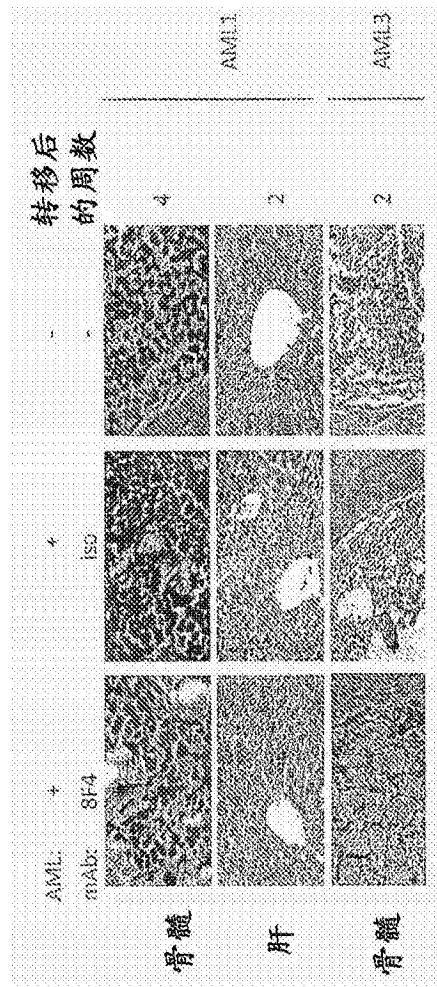


图8A

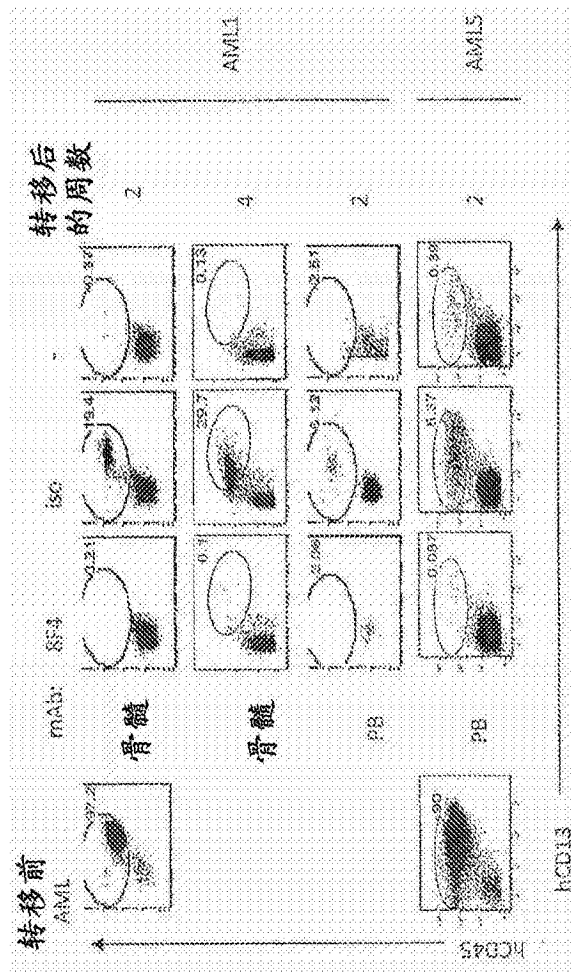


图8B

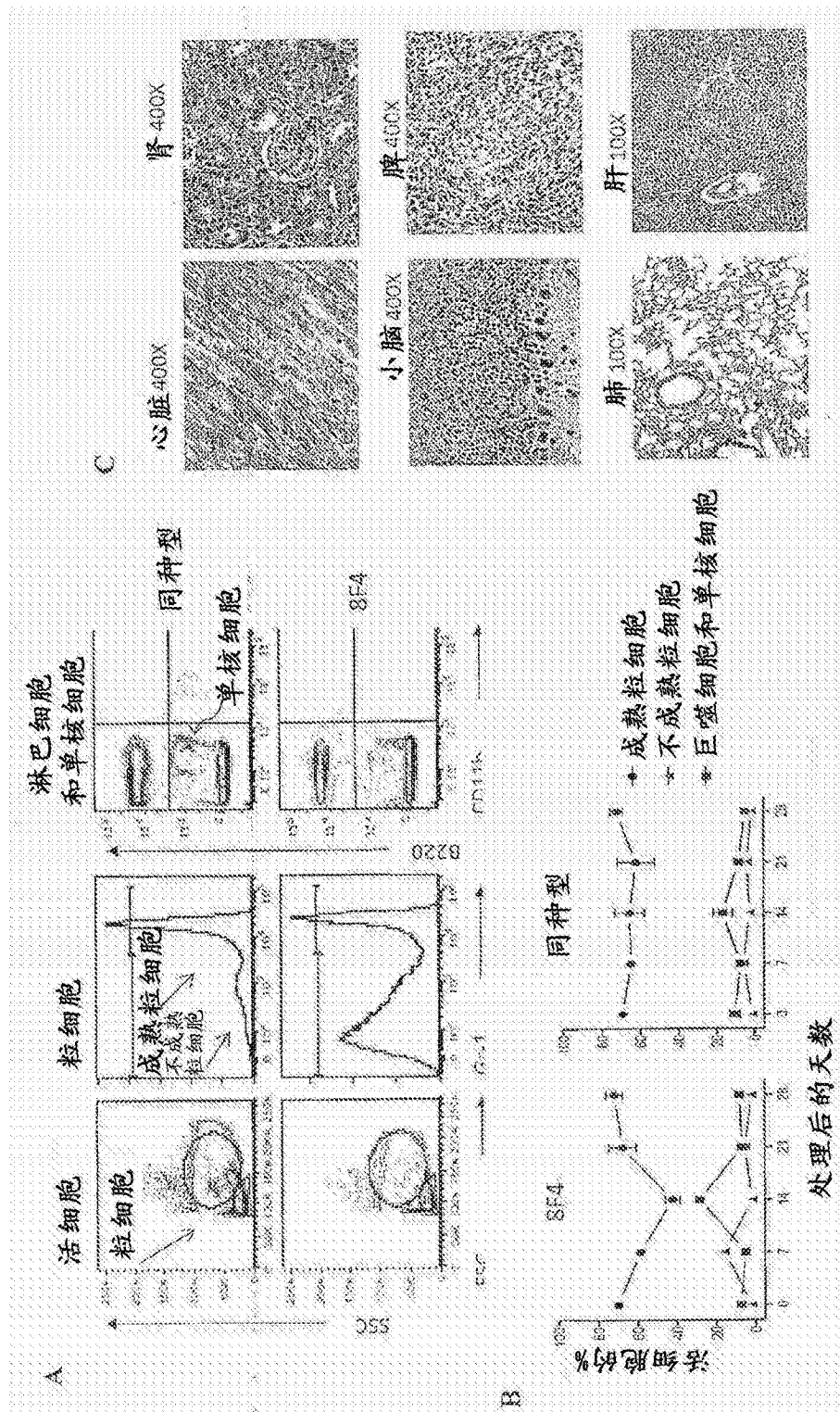


图9A-C

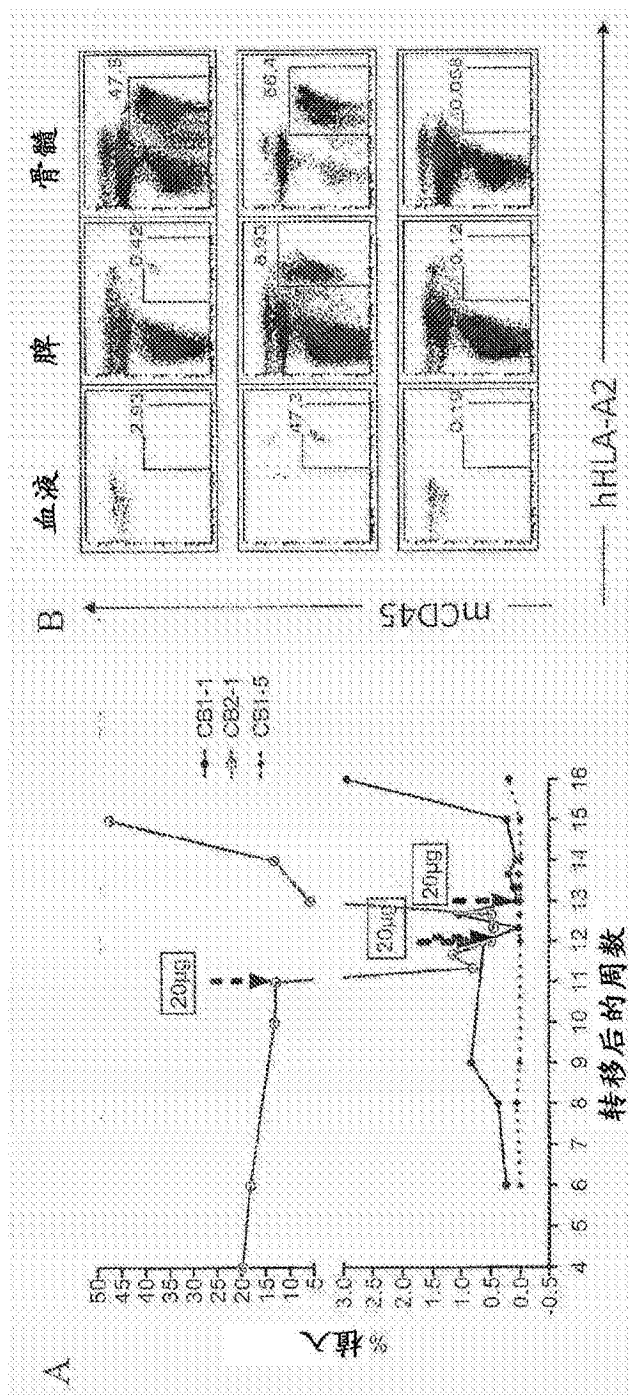


图10A-B

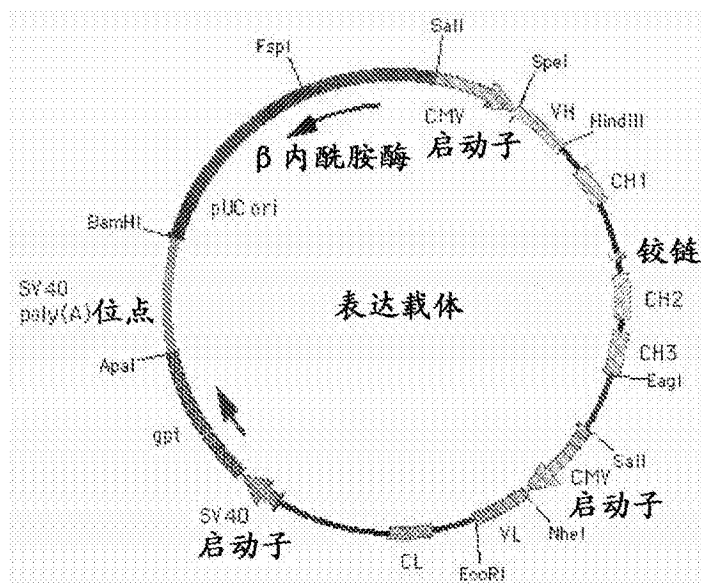


图11

	1	2	3
8F4 VH	123456789 EVQLVESGG DLVKPGGSLK LSCAASGFTF SGYGMSWVRQ	0123456789	0123456789
Hu8F4 VH	123456789 EVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF SGYGMSWVRQ	0123456789	0123456789
U96282 VH	123456789 EVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF S-----WVRQ	0123456789	0123456789
	4	5	6
8F4 VH	0123456789 TPDKLEWVA TISSGGSYTTY PDSVKGRTI SRDNAKNTLY	0123456789	0123456789
Hu8F4 VH	0123456789 TPDKLEWVA TISSGGSYTTY PDSVKGRTI SRDNAKNTLY	0123456789	0123456789
U96282 VH	0123456789 TPDKLEWVA TISSGGSYTTY PDSVKGRTI SRDNAKNTLY	0123456789	0123456789
	8	9	10
8F4 VH	0122223456789 LQMSSLKSEDTAM YYCARHEGGY YGSPAWFVYWQGTTLV TLTA	0123456789	00000000123456789 0123
Hu8F4 VH	0122223456789 LQMSSLKSEDTAM YYCARHEGGY YGSPAWFVYWQGTTLV TLTA	0123456789	00000000123456789 0123
U96282 VH	0122223456789 LQMSSLKSEDTAM YYCARHEGGY YGSPAWFVYWQGTTLV TLTA	0123456789	00000000123456789 0123

图12

	1	2	3
8F4 VL	123456789 0123456789	0123456789	0123456789
Hu8F4 VL1	DIVMTQSHK FMSTSVGDRV	SITCKASQDV	STAVAWYQOK
Hu8F4 VL2	DIQMTQSPS SLASASVGDRV	TITCKASQDV	STAVAWYQOK
AY043146 VL	DIQMTQSPS SLASASVGDRV	TITC-----	-----WYQOK

	4	5	6	7
8F4 VL	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
Hu8F4 VL1	PGQSPKLLIY STSYRYTCVP	DRFTGSGSGT	VFTFTINSVQ	
Hu8F4 VL2	PGKAPKLLIY STSYRYTCVP	SRFSGSGSGT	VFTFTISSLQ	
AY043146 VL	PGKAPKLLIY -----GVP	SRFSGSGSGT	DFTFTISSLQ	

	8	9	10
8F4 VL	0123456789	0123456789	01234567
Hu8F4 VL1	AEDLAVYYCQ QHFTTPPTFC	GGTKLEIK	
Hu8F4 VL2	PEDIATYYCQ QHFTTPPTFC	GGTKVEIK	
AY043146 VL	PEDIATYYC- -----FC	GGTKVEIK	

图13

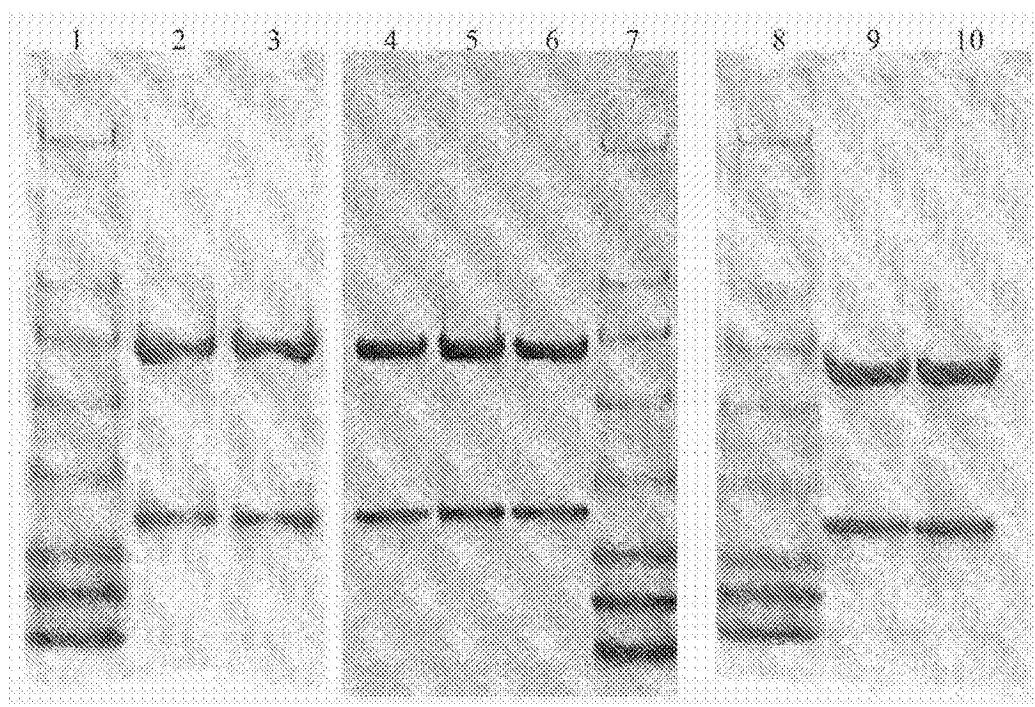


图14

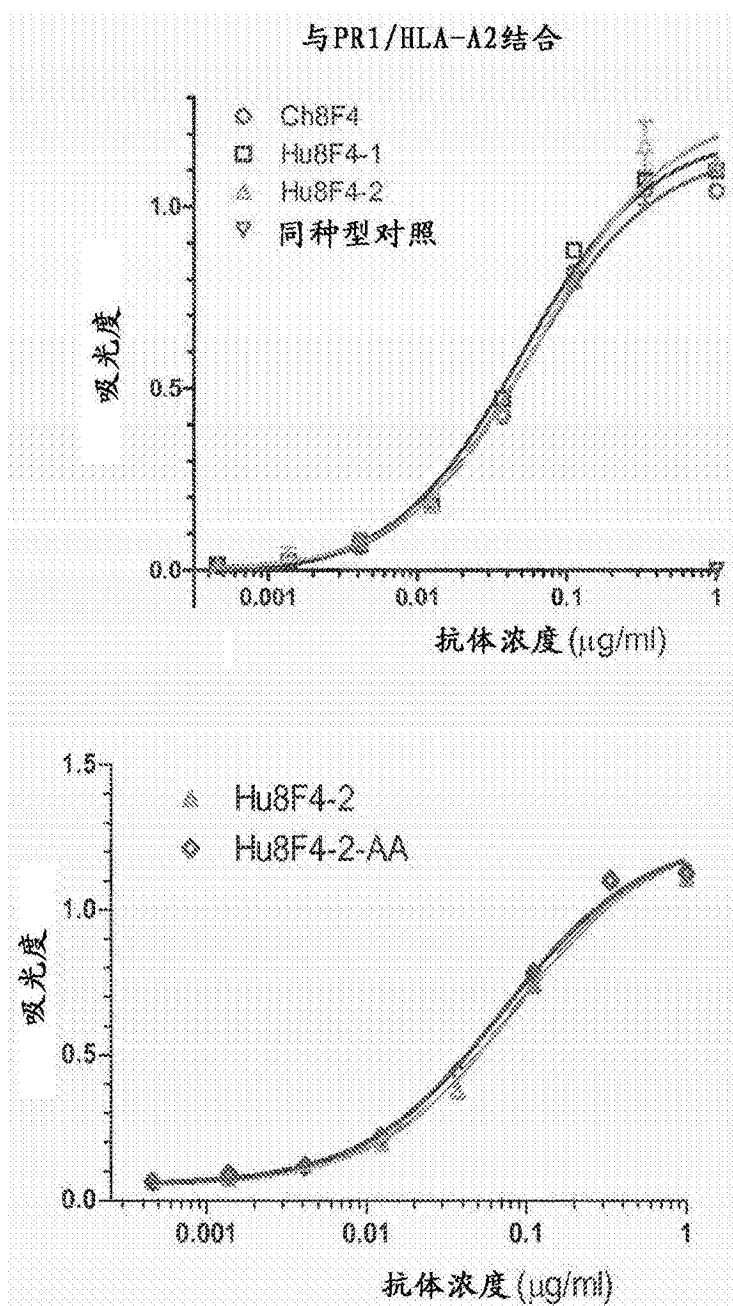


图15

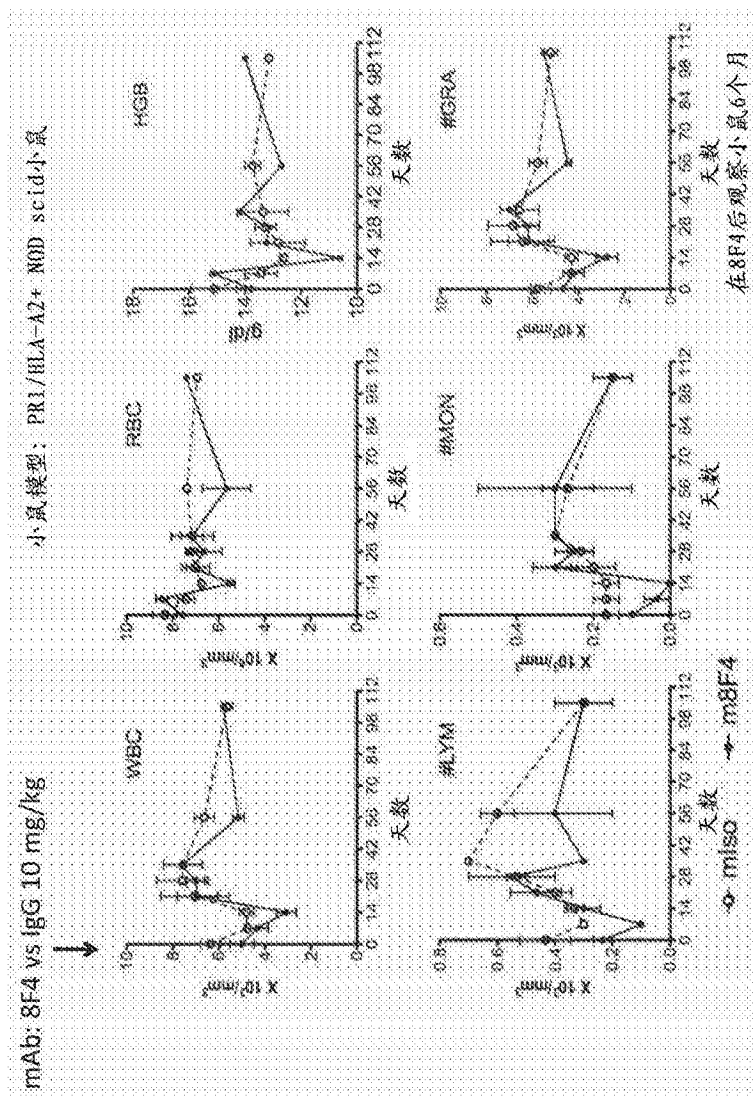


图18

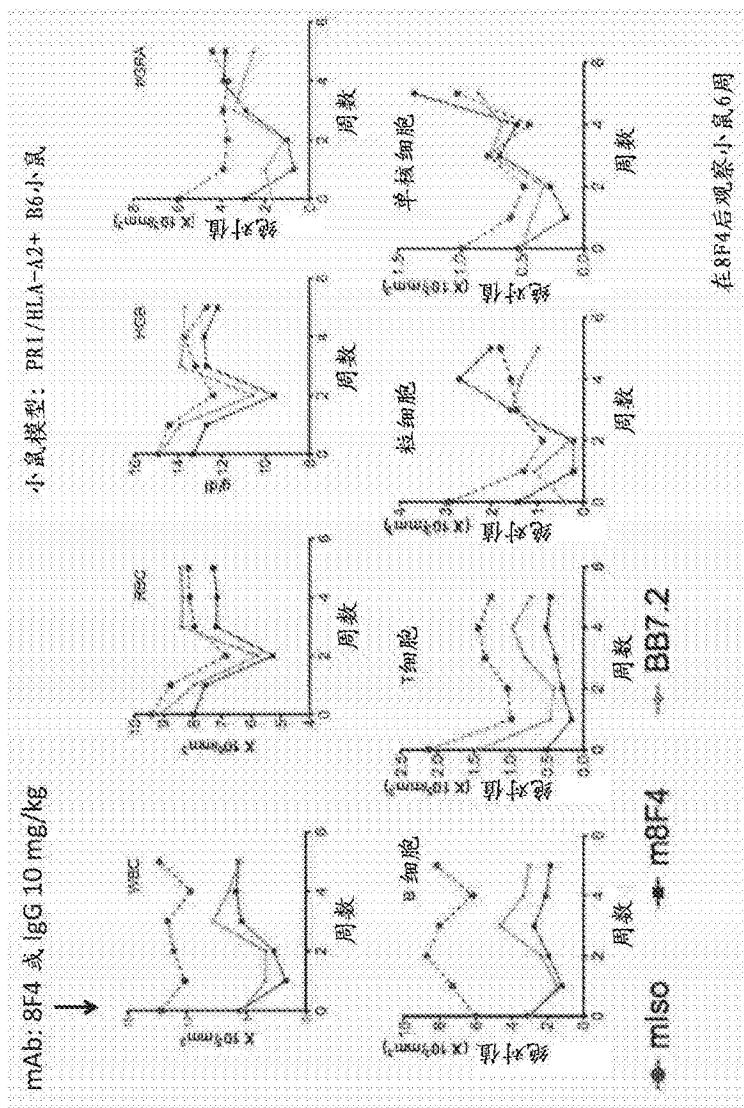
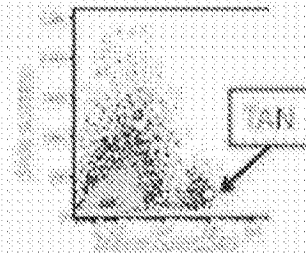
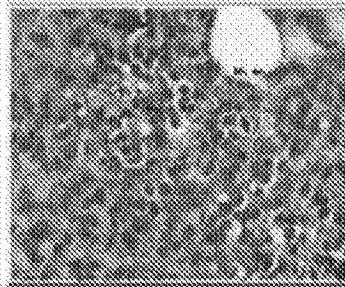


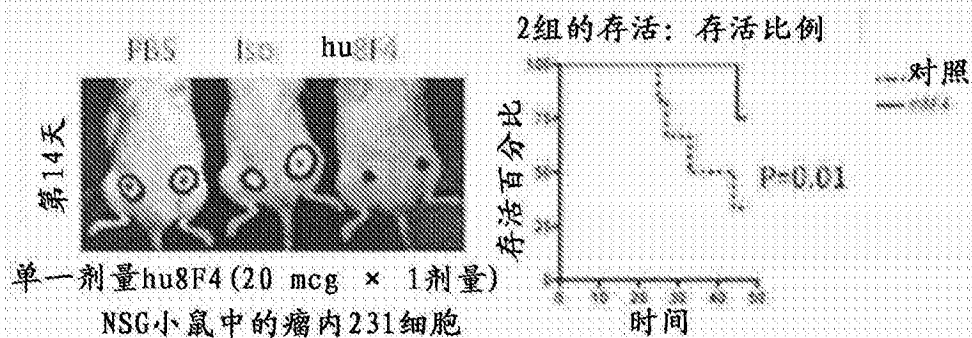
图19

hu8F4延迟乳腺癌肿瘤生长并延长存活

A. 231 BrCA异种移植肿瘤中的肿瘤相关嗜中性粒细胞



B. 原发性肿瘤模型



C. 转移性肿瘤模型

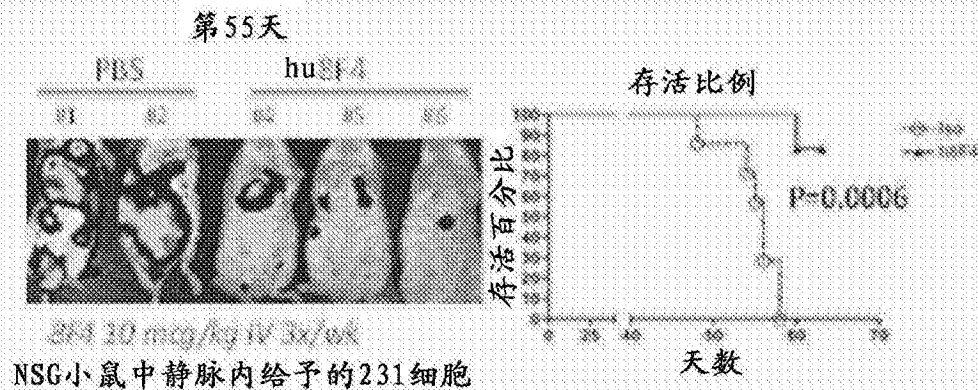


图20A-C

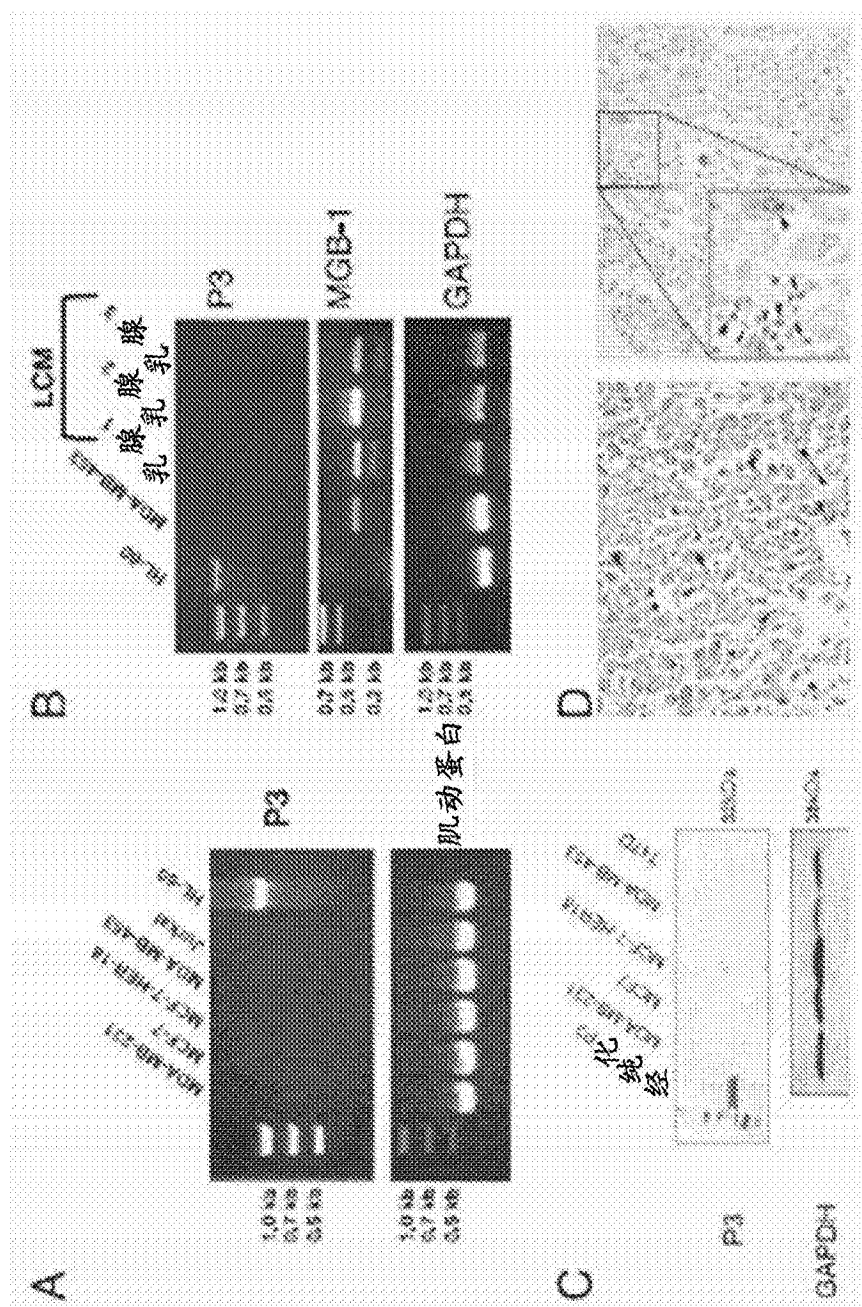


图 22A-D

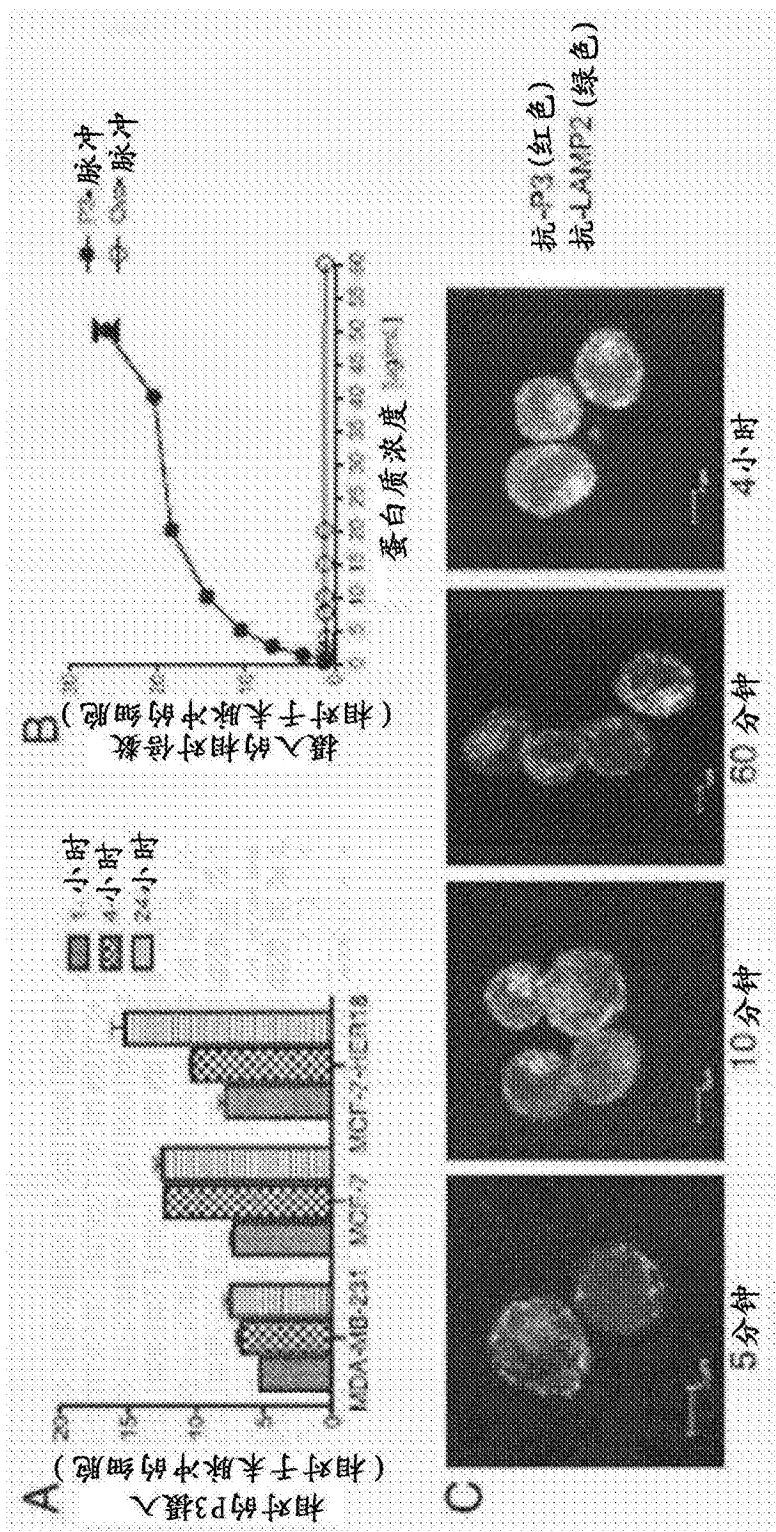


图23A-C

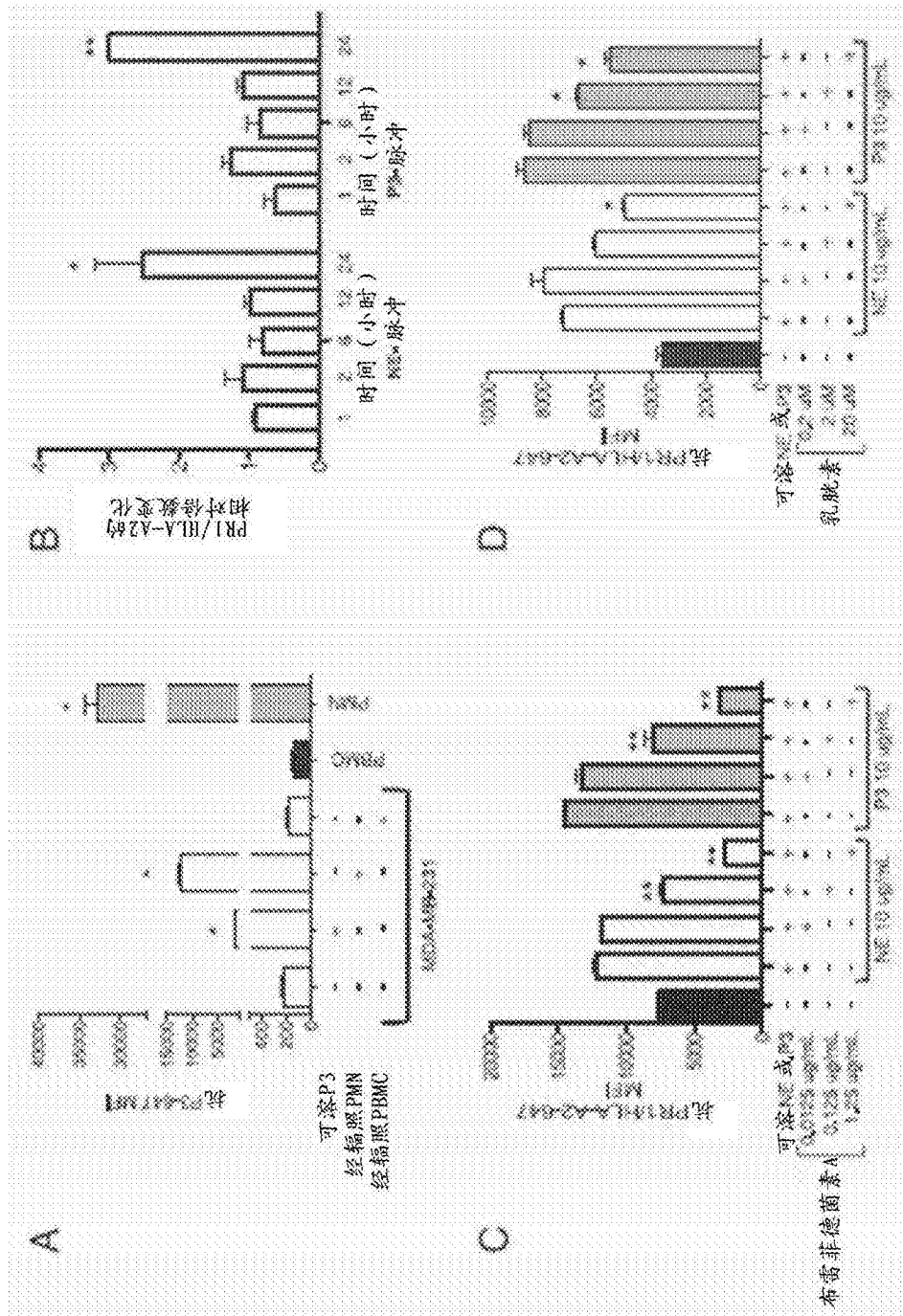


图24A-D

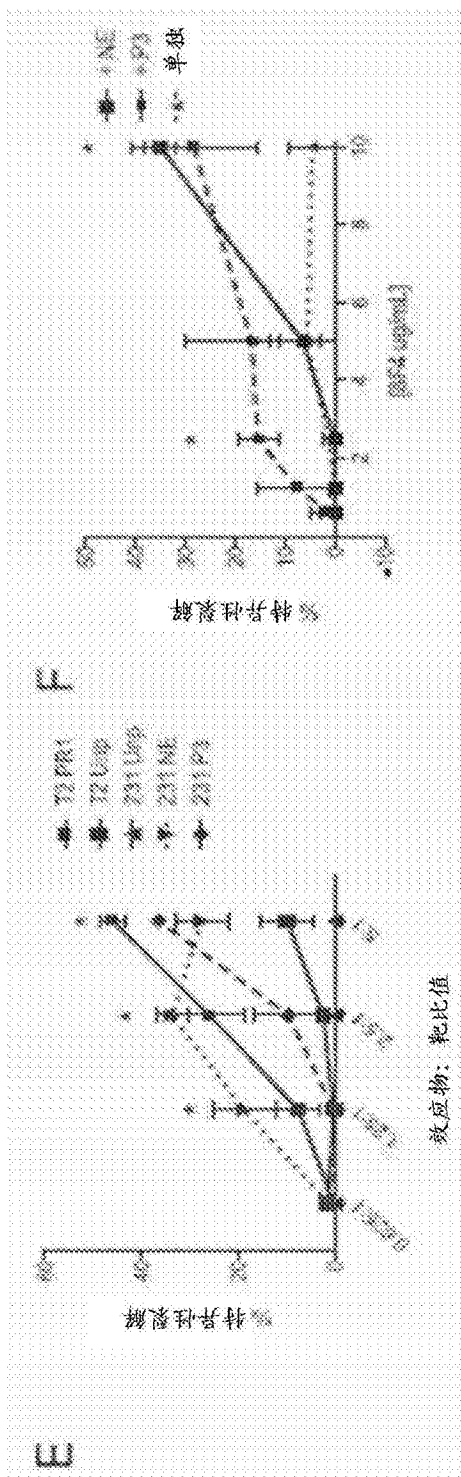


图24E-F

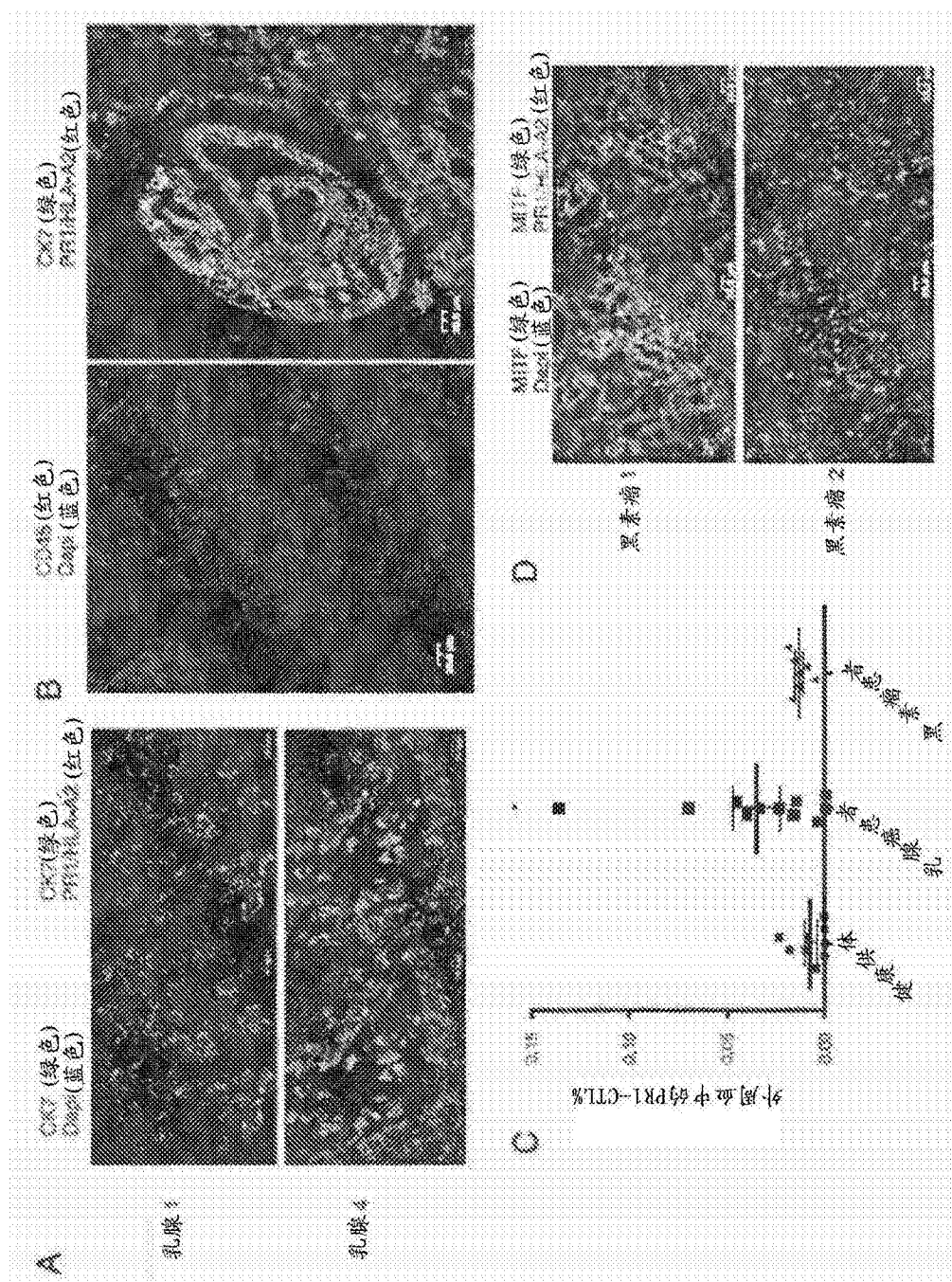


图25A-D

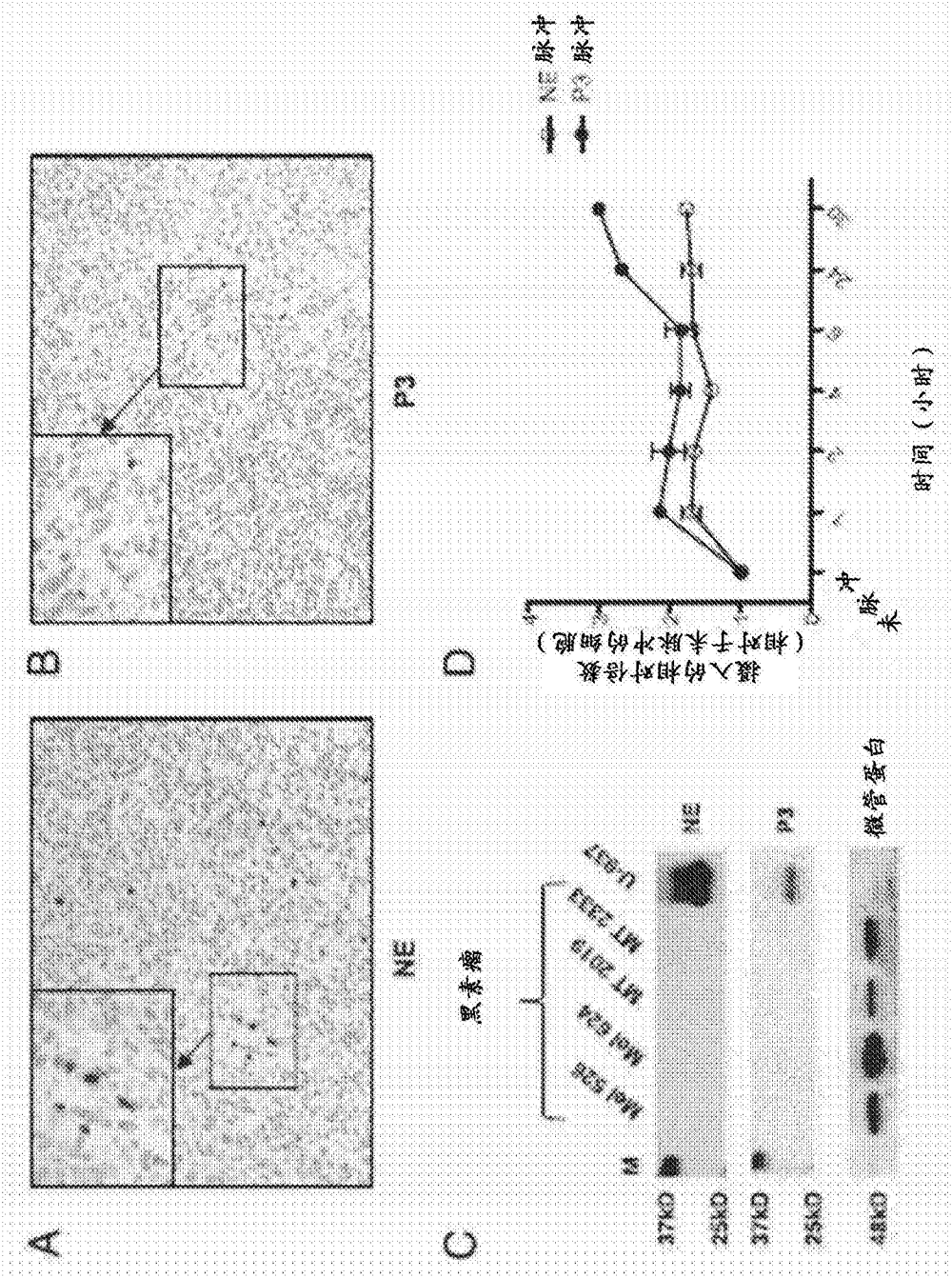


图26A-D

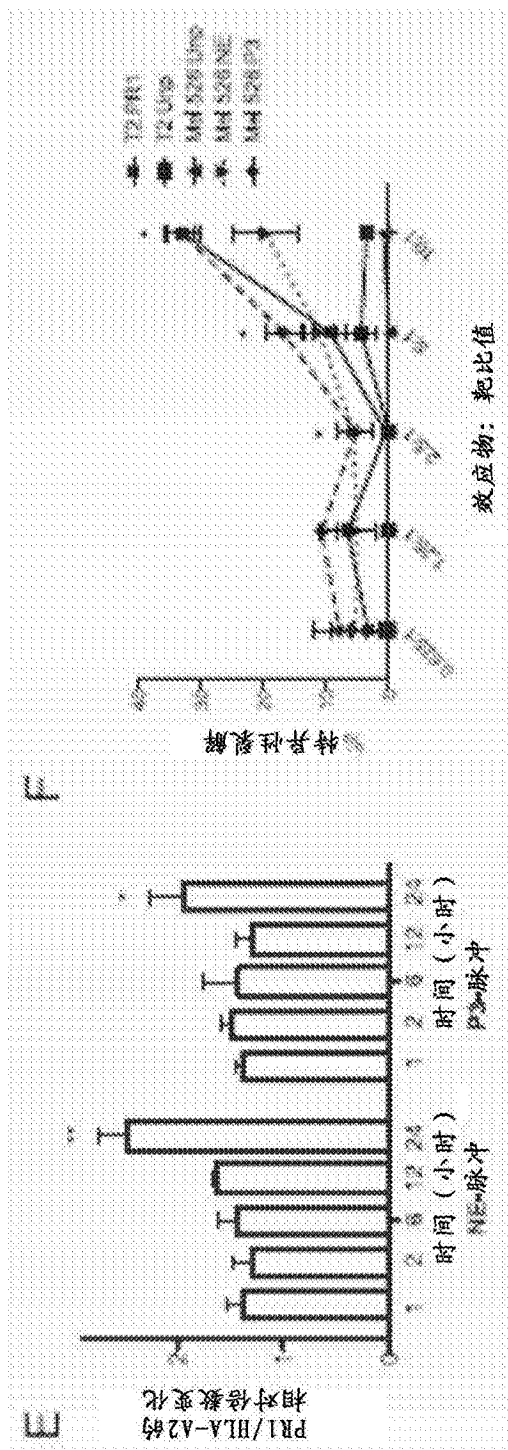


图26E-F