



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103608030 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 26

(21) 申请号 201280030497. 0

A61K 38/19 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 06. 19

G01N 33/50 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006. 01)

61/499, 534 2011. 06. 21 US

61/547, 342 2011. 10. 14 US

61/583, 033 2012. 01. 04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 12. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/043080 2012. 06. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/177595 EN 2012. 12. 27

(71) 申请人 昂科发克特公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 莎拉·埃伦·沃伦 卡尔·外斯曼

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

A61K 38/20 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书53页

序列表28页 附图19页

(54) 发明名称

用于治疗 and 诊断癌症的组合物和方法

(57) 摘要

本申请公开了用于治疗 and 诊断癌症的组合物和方法。例如, 示例性组合物包含一种或多种癌症相关的抗体、多肽、多核苷酸、抗原呈递细胞等。所公开的组合物例如在疾病, 尤其是癌症的诊断、预防和 / 或治疗中是有用的。

1. 用于治疗癌症的分离的抗体或抗原结合片段,其能够与 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示的序列特异性结合。

2. 用于治疗癌症的分离的多肽或其片段或变体,所述多肽包含 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示的序列,所述变体与所述多肽具有至少 90% 的同一性。

3. 用于治疗癌症的分离的多核苷酸,其编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示的氨基酸序列,或编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示序列的片段或变体,所述变体与 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示序列具有至少 90% 的同一性。

4. 用于治疗癌症的与多核苷酸互补的寡核苷酸,所述多核苷酸编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示的氨基酸序列,或编码 SEQ ID NOs:1-24 所示序列的片段或变体,所述变体与 SEQ ID NOs:1-24 所示序列具有至少 90% 的同一性。

5. 无内毒素的药物组合物,其包含药学可接受的载体和分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段能够与选自以下的序列特异性结合:IL1f5(SEQ ID NO:1)、CCBP2(SEQ ID NO:2)、IL1R2(SEQ ID NO:3)、IL1RAPL1(SEQ ID NO:4)、IL18BP(SEQ ID NO:5)、CLEC2B(SEQ ID NO:6)、C4BPA(SEQ ID NO:7)、C4BPB(SEQ ID NO:8)、SERPINI1(SEQ ID NO:9)、IL1RAP 同种型 1(SEQ ID NO:10)、IL1RAP 同种型 2(SEQ ID NO:11)、GPR1(SEQ ID NO:12)、GPR4(SEQ ID NO:13)、GPR15(SEQ ID NO:14)、GPR32(SEQ ID NO:15)、GPR34(SEQ ID NO:16)、GPR183(SEQ ID NO:17)、SERPINA4(SEQ ID NO:18)、SERPINB5(SEQ ID NO:19)、SEMA4B(SEQ ID NO:20)、SEMA4D(SEQ ID NO:21)、CCL14(SEQ ID NO:22)、NKTR(SEQ ID NO:23) 和 SFTPD(SEQ ID NO:24)。

6. 在患有癌症或有患癌风险的患者中使用的经配制用于静脉注射的药物组合物,所述组合物包含药学可接受的载体和分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段能够与选自以下的序列特异性结合:IL1f5(SEQ ID NO:1)、CCBP2(SEQ ID NO:2)、IL1R2(SEQ ID NO:3)、IL1RAPL1(SEQ ID NO:4)、IL18BP(SEQ ID NO:5)、CLEC2B(SEQ ID NO:6)、C4BPA(SEQ ID NO:7)、C4BPB(SEQ ID NO:8)、SERPINI1(SEQ ID NO:9)、IL1RAP 同种型 1(SEQ ID NO:10)、IL1RAP 同种型 2(SEQ ID NO:11)、GPR1(SEQ ID NO:12)、GPR4(SEQ ID NO:13)、GPR15(SEQ ID NO:14)、GPR32(SEQ ID NO:15)、GPR34(SEQ ID NO:16)、GPR183(SEQ ID NO:17)、SERPINA4(SEQ ID NO:18)、SERPINB5(SEQ ID NO:19)、SEMA4B(SEQ ID NO:20)、SEMA4D(SEQ ID NO:21)、CCL14(SEQ ID NO:22)、NKTR(SEQ ID NO:23) 和 SFTPD(SEQ ID NO:24)。

7. 如权利要求 5 或权利要求 6 所述的组合物,其中所述组合物包含一种或多种抗体或其抗原结合片段。

8. 如权利要求 5 至 7 中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含一种或多种抗体或其抗原结合片段,其中所述一种或多种抗体的每一种或其抗原结合片段都能够与选自以下的序列特异性结合:IL1f5(SEQ ID NO:1)、CCBP2(SEQ ID NO:2)、IL1R2(SEQ ID NO:3)、IL1RAPL1(SEQ ID NO:4)、IL18BP(SEQ ID NO:5)、CLEC2B(SEQ ID NO:6)、C4BPA(SEQ ID NO:7)、C4BPB(SEQ ID NO:8)、SERPINI1(SEQ ID NO:9)、IL1RAP 同种型 1(SEQ ID NO:10)、IL1RAP 同种型 2(SEQ ID NO:11)、GPR1(SEQ ID NO:12)、GPR4(SEQ ID NO:13)、GPR15(SEQ ID NO:14)、GPR32(SEQ ID NO:15)、GPR34(SEQ ID NO:16)、GPR183(SEQ ID NO:17)、SERPINA4(SEQ ID NO:18)、SERPINB5(SEQ ID NO:19)、SEMA4B(SEQ ID NO:20)、SEMA4D(SEQ

ID NO:21)、CCL14(SEQ ID NO:22)、NKTR(SEQ ID NO:23) 和 SFTPD(SEQ ID NO:24)。

9. 如权利要求 5 所述的组合物,其中所述组合物是 95% 无内毒素的。

10. 如权利要求 5 所述的组合物,其中所述组合物是 98% 无内毒素的。

11. 如权利要求 5 或权利要求 6 所述的组合物,其中所述分离的抗体或抗原结合片段是单克隆抗体或抗原结合片段。

12. 如权利要求 5 或权利要求 6 所述的组合物,其中所述分离的抗体或抗原结合片段是人源化抗体或抗原结合片段。

13. 如权利要求 5 或权利要求 6 所述的组合物,其中所述抗体或抗原结合片段与毒素缀合。

14. 如权利要求 13 所述的组合物,其中所述毒素选自:蓖麻毒素、相思子毒素、白喉毒素、霍乱毒素、白树毒素、假单胞菌外毒素、志贺毒素和美洲商陆抗病毒蛋白。

15. 如权利要求 5 或权利要求 6 所述的组合物,其中所述抗体或抗原结合片段是与放射性核素缀合的单克隆抗体或抗原结合片段。

16. 如权利要求 15 所述的组合物,其中所述放射性核素选自: ^{90}Y 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 和 ^{212}Bi 。

17. 药物组合物,其包含药学可接受的载体和一种或多种分离的 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的多肽,或 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的多肽的片段或变体,或分离的编码任一种前述多肽的多核苷酸,所述变体与 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的多肽具有至少 90% 的同一性。

18. 如权利要求 17 所述的药物组合物,其中所述组合物还包含免疫刺激剂。

19. 治疗有需要的个体内的癌症的方法,其包括给予所述个体权利要求 1-14 中任一项所述的药物组合物。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述癌症选自:肝癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、肾癌、皮肤癌和血液癌症。

21. 检测患者体内是否存在癌症的方法,其包括以下步骤:

(a) 获得来自所述患者的生物样品;

(b) 将所述生物样品接触能够与 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的多肽特异性结合的抗体或抗原结合片段;

(c) 检测所述样品中能够与所述抗体或抗原结合片段结合的多肽的量;以及

(d) 将多肽的所述量与预定的阈值比较,并从中确定所述患者体内是否存在癌症。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其中所述癌症选自:肝癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、肾癌、皮肤癌和血液癌症。

23. 检测患者体内是否存在癌症的方法,其包括以下步骤:

(a) 获得来自所述患者的生物样品;

(b) 将所述生物样品接触能与多核苷酸杂交的寡核苷酸,其中所述多核苷酸编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的多肽,或编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示多肽的片段或变体,所述变体与 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示多肽具有至少 90% 的同一性;

(c) 检测所述样品中能与所述寡核苷酸杂交的多核苷酸的量;以及

(d) 将能与所述寡核苷酸杂交的多核苷酸的量与预定的阈值比较,并从中确定所述患

者体内是否存在癌症。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述癌症选自:肝癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、肾癌、皮肤癌和血液癌症。

25. 诊断试剂盒,其包含至少一种分离的抗体或其抗原结合片段以及检测试剂,所述抗体或其抗原结合片段能与 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示的序列特异性结合,其中所述检测试剂包含报告基团。

26. 诊断试剂盒,其包含至少一种能与多核苷酸杂交的寡核苷酸,其中所述多核苷酸编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示的多肽,或编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示序列的片段或变体,所述变体与 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示序列具有至少 90% 的同一性。

27. 治疗患者体内癌症的方法,其包括以下步骤:

(a) 检测患者的生物样品中 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示的多肽的量;

(b) 将所述多肽的量与预定的阈值比较,并从中确定所述患者体内是否存在癌症;以及

(c) 将权利要求 1-14 中任一项所述的组合物给予步骤 (b) 中确定患有癌症的个体。

28. 如权利要求 27 所述的方法,其中所述癌症选自:肝癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、肾癌、皮肤癌和血液癌症。

29. 治疗患者体内癌症的方法,其包括以下步骤:

(a) 从所述患者获得生物样品;

(b) 将所述生物样品接触能与多核苷酸杂交的寡核苷酸,其中所述多核苷酸编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示的多肽,或编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示序列的片段或变体,所述变体与 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示序列具有至少 90% 的同一性;

(c) 检测所述样品中能与所述寡核苷酸杂交的多核苷酸的量;

(d) 将能与所述寡核苷酸杂交的多核苷酸的量与预定的阈值比较,并从中确定所述患者体内是否存在癌症;以及

(e) 将权利要求 1-14 中任一项所述的组合物给予步骤 (d) 中确定患有癌症的个体。

30. 如权利要求 29 所述的方法,其中所述癌症选自:肝癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、肾癌、皮肤癌和血液癌症。

用于治疗 and 诊断癌症的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据 35U.S.C. § 119(e) 要求 2012 年 1 月 4 日提交的美国临时申请第 61/583,033 号、2011 年 10 月 14 日提交的美国临时申请第 61/547,342 号和 2011 年 6 月 21 日提交的美国临时申请第 61/499,534 号的权益,每一篇专利申请都通过引用全文并入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表以文本格式提供来替代纸印本,并在此通过引用并入本说明书中。含有序列表的文本文档的名称为 ONCF_001_03W0_ST25.txt。该文本文档创建于 2012 年 6 月 19 日,大小为 88KB,并通过 EFS-Web 以电子方式提交。

[0005] 发明背景

发明领域

[0006] 本发明通常涉及癌症的治疗和诊断。更具体而言,本发明涉及包含抗体和抗原结合片段的药物和诊断组合物,所述抗体和抗原结合片段能与癌症相关蛋白(例如,癌因子(oncofactor))特异性结合。本发明还涉及包含癌症相关多核苷酸、多肽、表达载体、宿主细胞等的药物和诊断组合物。

[0007] 相关技术的描述

[0008] 癌症在世界范围内都是一个重大的健康问题。尽管在癌症的检测和治疗上已取得进展,但是目前还没有普遍有效的预防和/或治疗方法。目前的通常基于联合化疗、外科手术和/或放射疗法的治疗方法,为相对非选择性的,并且一直在很多患者中被证实存在不足。具体来说,化疗会产生很多副作用,这在某些情况下是如此严重以至于限制可被给予的剂量,并因此阻碍了可能有效的药物的使用。而且,癌症常常会发展出对化疗药的抗性。

[0009] 尽管进行了相当多的研究,但在很多人类癌症类型的有效诊断和治疗中仍存在巨大的障碍。因此,本领域内仍然有对检测和治疗这类癌症的备选方法和改进方法的需求。本发明满足了这些需求并进一步提供了其它相关的优点。

[0010] 发明概述

[0011] 根据本发明的一方面,提供了包含药学可接受的载体和分离的抗体或其抗原结合片段的药物组合物,所述抗体或其抗原结合片段能与选自以下的序列特异性结合: IL1f5(SEQ ID NO:1)、CCBP2(SEQ ID NO:2)、IL1R2(SEQ ID NO:3)、IL1RAPL1(SEQ ID NO:4)、IL18BP(SEQ ID NO:5)、CLEC2B(SEQ ID NO:6)、C4BPA(SEQ ID NO:7)、C4BPB(SEQ ID NO:8)、SERPINI1(SEQ ID NO:9)、IL1RAP 同种型 1(SEQ ID NO:10)、IL1RAP 同种型 2(SEQ ID NO:11)、GPR1(SEQ ID NO:12)、GPR4(SEQ ID NO:13)、GPR15(SEQ ID NO:14)、GPR32(SEQ ID NO:15)、GPR34(SEQ ID NO:16)、GPR183(SEQ ID NO:17)、SERPINA4(SEQ ID NO:18)、SERPINB5(SEQ ID NO:19)、SEMA4B(SEQ ID NO:20)、SEMA4D(SEQ ID NO:21)、CCL14(SEQ ID NO:22)、NKTR(SEQ ID NO:23) 和 SFTPD(SEQ ID NO:24)。在另一方面,提供了包含药学可接受的载体和分离的抗体或其抗原结合片段的无内毒素的药物组合物,所述抗体或其抗原

结合片段能与选自以下的序列特异性结合: IL1f5(SEQ ID NO:1)、CCBP2(SEQ ID NO:2)、IL1R2(SEQ ID NO:3)、IL1RAPL1(SEQ ID NO:4)、IL18BP(SEQ ID NO:5)、CLEC2B(SEQ ID NO:6)、C4BPA(SEQ ID NO:7)、C4BPB(SEQ ID NO:8)、SERPINI1(SEQ ID NO:9)、IL1RAP 同种型 1(SEQ ID NO:10)、IL1RAP 同种型 2(SEQ ID NO:11)、GPR1(SEQ ID NO:12)、GPR4(SEQ ID NO:13)、GPR15(SEQ ID NO:14)、GPR32(SEQ ID NO:15)、GPR34(SEQ ID NO:16)、GPR183(SEQ ID NO:17)、SERPINA4(SEQ ID NO:18)、SERPINB5(SEQ ID NO:19)、SEMA4B(SEQ ID NO:20)、SEMA4D(SEQ ID NO:21)、CCL14(SEQ ID NO:22)、NKTR(SEQ ID NO:23) 和 SFTPD(SEQ ID NO:24)。

[0012] 在另外的方面,提供了在患有癌症或有患癌风险的患者中使用的经配制用于静脉注射的药物组合物,所述组合物包含药学可接受的载体和分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段能与选自以下的序列特异性结合: IL1f5(SEQ ID NO:1)、CCBP2(SEQ ID NO:2)、IL1R2(SEQ ID NO:3)、IL1RAPL1(SEQ ID NO:4)、IL18BP(SEQ ID NO:5)、CLEC2B(SEQ ID NO:6)、C4BPA(SEQ ID NO:7)、C4BPB(SEQ ID NO:8)、SERPINI1(SEQ ID NO:9)、IL1RAP 同种型 1(SEQ ID NO:10)、IL1RAP 同种型 2(SEQ ID NO:11)、GPR1(SEQ ID NO:12)、GPR4(SEQ ID NO:13)、GPR15(SEQ ID NO:14)、GPR32(SEQ ID NO:15)、GPR34(SEQ ID NO:16)、GPR183(SEQ ID NO:17)、SERPINA4(SEQ ID NO:18)、SERPINB5(SEQ ID NO:19)、SEMA4B(SEQ ID NO:20)、SEMA4D(SEQ ID NO:21)、CCL14(SEQ ID NO:22)、NKTR(SEQ ID NO:23) 和 SFTPD(SEQ ID NO:24)。

[0013] 在具体的方面,组合物包含一种或多种抗体或其抗原结合片段,其中所述一种或多种抗体中的每一种或其抗原结合片段都能与选自以下的序列特异性结合: IL1f5(SEQ ID NO:1)、CCBP2(SEQ ID NO:2)、IL1R2(SEQ ID NO:3)、IL1RAPL1(SEQ ID NO:4)、IL18BP(SEQ ID NO:5)、CLEC2B(SEQ ID NO:6)、C4BPA(SEQ ID NO:7)、C4BPB(SEQ ID NO:8)、SERPINI1(SEQ ID NO:9)、IL1RAP 同种型 1(SEQ ID NO:10)、IL1RAP 同种型 2(SEQ ID NO:11)、GPR1(SEQ ID NO:12)、GPR4(SEQ ID NO:13)、GPR15(SEQ ID NO:14)、GPR32(SEQ ID NO:15)、GPR34(SEQ ID NO:16)、GPR183(SEQ ID NO:17)、SERPINA4(SEQ ID NO:18)、SERPINB5(SEQ ID NO:19)、SEMA4B(SEQ ID NO:20)、SEMA4D(SEQ ID NO:21)、CCL14(SEQ ID NO:22)、NKTR(SEQ ID NO:23) 和 SFTPD(SEQ ID NO:24)。

[0014] 在某些方面,组合物是 95%、96%、97%、98% 或 99% 无内毒素的。

[0015] 在本发明的更具体的实施方案中,本发明的分离的抗体或抗原结合片段是单克隆抗体或抗原结合片段。

[0016] 在本发明的另一具体的实施方案中,本发明的分离的抗体或抗原结合片段是人源化的抗体或抗原结合片段。

[0017] 在又一具体的实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段与毒素缀合,所述毒素包括但不限于:蓖麻毒素、相思子毒素、白喉毒素、霍乱毒素、白树毒素、假单胞菌外毒素、志贺毒素和美洲商陆抗病毒蛋白。

[0018] 在另一具体的实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段与放射性核素缀合,所述放射性核素包括但不限于: ^{90}Y 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 和 ^{212}Bi 。

[0019] 根据本发明的另一方面,提供了这样的药物组合物,其包含药学可接受的载体和分离的 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的多肽,或 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的多肽

的片段或变体,或编码任一种前述多肽的分离的多核苷酸,所述变体与 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的多肽具有至少 70%、80%、90% 或 95% 的同一性。当然,应当认识到的是,其它成分,诸如免疫刺激剂等,可以存在于本发明的药物组合物中。还应当认识到的是,在利用本发明的多核苷酸的实施方案的情况下,多核苷酸可以存在于,例如,表达载体、宿主细胞等中。

[0020] 根据本发明的另一方面,提供了治疗有需要的个体内的癌症的方法,其包括给予所述个体本发明所述的药物组合物。待治疗的癌症本质上可以为与本发明的序列相关的任何癌症类型,包括但不限于:肝癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、肾癌、和皮肤癌(例如,黑色素瘤),以及血液癌症(例如,白血病、淋巴瘤等)。

[0021] 在另一方面,本发明提供了这样的方法,其涉及能与 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的序列特异性结合的分离的抗体或抗原结合片段在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0022] 在另一方面,本发明提供了这样的方法,其涉及包含 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的序列的分离的多肽或其片段或变体在制备用于治疗癌症的药物中的用途,所述变体与 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的序列具有至少 90% 的同一性。

[0023] 在另一方面,本发明提供了这样的方法,其涉及分离的多核苷酸在制备用于治疗癌症的药物中的用途,所述多核苷酸编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的氨基酸序列,或编码 SEQ ID NOs:1-24 所示序列的片段或变体,所述变体与 SEQ ID NOs:1-24 所示序列具有至少 90% 的同一性。

[0024] 在另一方面,本发明提供了这样的方法,其涉及与多核苷酸互补的寡核苷酸在制备用于治疗癌症的药物中的用途,所述多核苷酸编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的氨基酸序列,或编码 SEQ ID NOs:1-24 所示序列的片段或变体,所述变体与 SEQ ID NOs:1-24 所示序列具有至少 90% 的同一性。在某些实施方案中,所述寡核苷酸是反义寡核苷酸、RNAi 分子、核酶或另一抑制性核酸分子。

[0025] 根据本发明的另一方面,提供了检测患者体内癌症的存在与否的方法,其包括以下步骤:(a) 从所述患者获得生物样品;(b) 将所述生物样品接触能够与 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的多肽特异性结合的抗体或抗原结合片段;(c) 检测所述样品中能与所述抗体或抗原结合片段结合的多肽的量;以及(d) 将多肽的所述量与预定的阈值比较,并从中确定所述患者体内癌症的存在与否。

[0026] 根据本发明的另一方面,提供了检测患者体内癌症的存在与否的方法,其包括以下步骤:(a) 从所述患者获得生物样品;(b) 将所述生物样品接触能与多核苷酸杂交的寡核苷酸,其中所述多核苷酸编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的多肽,或编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示多肽的片段或变体,所述变体与 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示多肽具有至少 90% 的同一性;(c) 检测所述样品中能与所述寡核苷酸杂交的多核苷酸的量;以及(d) 将能与所述寡核苷酸杂交的多核苷酸的量与预定的阈值比较,并从中确定所述患者体内癌症的存在与否。

[0027] 在另一方面,本发明提供了包含至少一种分离的抗体或其抗原结合片段和检测试剂的诊断试剂盒,所述抗体或其抗原结合片段能与 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的序列特异性地结合,其中所述检测试剂包含报告基团。

[0028] 在另一方面,本发明提供了包含至少一种能与多核苷酸杂交的寡核苷酸的诊断

试剂盒,其中所述多核苷酸编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的多肽,或编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示序列的片段或变体,所述变体与 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示多肽具有至少 90% 的同一性。在一个方面,提供了治疗患者体内癌症的方法,其包括以下步骤:(a) 检测患者的生物样品中 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的多肽的量;(b) 将所述多肽的量与预定的阈值比较,并从中确定所述患者体内癌症的存在与否;以及(c) 将权利要求 1-14 中任一项所述的组合物给予步骤(b)中确定患有癌症的个体。

[0029] 在某些方面,提供了治疗患者体内癌症的方法,其包括以下步骤:(a) 从所述患者获得生物样品;(b) 将所述生物样品接触能与多核苷酸杂交的寡核苷酸,其中所述多核苷酸编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的多肽,或编码 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示序列的片段或变体,所述变体与 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示多肽具有至少 90% 的同一性;(c) 检测所述样品中能与所述寡核苷酸杂交的多核苷酸的量;(d) 将能与所述寡核苷酸杂交的多核苷酸的量与预定的阈值比较,并从中确定所述患者体内癌症的存在与否;以及(e) 将权利要求 1-14 中任一项所述的组合物给予步骤(d)中确定患有癌症的个体。

[0030] 在另一方面,所述癌症选自肝癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、肾癌、皮肤癌和血液癌症。通过参照以下的详细描述和附图,本发明的这些方面和其它方面将会变得显而易见。本文中公开的所有参考文献在此都通过引用全文并入,如同每一篇参考文献都单独并入一样。

附图说明

[0031] 图 1 显示了来自代表性的混合肿瘤淋巴细胞培养(MTLC)测定的结果。RajiB 淋巴瘤细胞用 PBMCs 共培养,并用不同浓度的重组 IL1f5 多肽处理。

[0032] 图 2 显示了来自代表性 MTLC 测定的结果。Raji B 淋巴瘤细胞用 PBMCs 共培养,并用不同浓度的重组 IL1RAP2 多肽处理。

[0033] 图 3 显示了来自代表性 MTLC 测定的结果。Raji B 淋巴瘤细胞用 PBMCs 共培养,并用不同浓度的重组 CCL14 多肽处理。

[0034] 图 4 显示了来自代表性免疫组织化学(IHC)测定的结果。与正常的导管上皮、血管和基质中的 IL1f5 表达相比,浸润性导管癌乳腺癌细胞中的 IL1f5 表达增加。

[0035] 图 5 显示了来自代表性 IHC 测定的结果。与正常的结肠组织中的 IL1f5 表达相比,腺癌结肠癌细胞中的 IL1f5 表达增加。

[0036] 图 6 显示了来自代表性 IHC 测定的结果。与正常的前列腺和基质中的 IL1f5 表达相比,腺癌前列腺癌细胞中的 IL1f5 表达增加。

[0037] 图 7 显示了来自代表性 IHC 测定的结果。与正常的肺泡组织中的 IL1f5 表达相比,鳞状细胞癌、腺癌和乳头状腺癌肺癌细胞中的 IL1f5 表达增加。

[0038] 图 8 显示了来自代表性 IHC 测定的结果。与正常的导管上皮、血管和基质中的 GPR183 表达相比,浸润性导管癌乳腺癌细胞中的 GPR183 表达增加。

[0039] 图 9 显示了来自代表性 IHC 测定的结果。与正常的结肠组织中的 GPR183 表达相比,腺癌结肠癌细胞中的 GPR183 表达增加。

[0040] 图 10 显示了来自代表性 IHC 测定的结果。与正常的肺泡组织中的 GPR183 表达相比,鳞状细胞癌和腺癌肺癌细胞中的 GPR183 表达增加。

[0041] 图 11 显示了来自代表性 IHC 测定的结果。与正常的乳腺导管上皮、血管和基质中的 IL1RAP 表达相比,浸润性导管癌乳腺癌细胞中的 IL1RAP 表达增加。

[0042] 图 12 显示了来自代表性 IHC 测定的结果。与正常的肺泡中的 IL1RAP 表达相比,肺癌细胞中的 IL1RAP 表达增加。

[0043] 图 13 显示了来自代表性 IHC 测定的结果。与正常的乳腺导管上皮、血管和基质中的 CCL14 表达相比,浸润性导管癌乳腺癌细胞中的 CCL14 表达增加。

[0044] 图 14 显示了来自代表性 IHC 测定的结果。与正常的前列腺和基质中的 CCL14 表达相比,前列腺腺癌中的 CCL14 表达增加。

[0045] 图 15 显示了来自代表性 IHC 测定的结果。与正常的肺泡中的 CCL14 表达相比,肺癌细胞中的 CCL14 表达增加。

[0046] 图 16 显示了来自代表性 IHC 测定的结果。与正常的乳腺导管上皮、血管和基质中的 SEMA4D 表达相比,浸润性导管癌乳腺癌细胞中的 SEMA4D 表达增加。

[0047] 图 17 显示了来自代表性 IHC 测定的结果。与正常的乳腺导管上皮、血管和基质中的 IL1R2 表达相比,浸润性导管癌乳腺癌细胞中的 IL1R2 表达增加。

[0048] 图 18 显示了来自代表性 MTLT 测定的结果。RajiB 淋巴瘤细胞用 PBMCs 共培养,并用不同浓度的重组 IL1R2 多肽处理。

[0049] 图 19 显示了来自代表性 T 细胞增殖测定的结果。Raji B 淋巴瘤细胞用 PBMCs 共培养,并用不同浓度的重组 IL1f5 多肽处理。测量了 IL1f5 对 T 细胞增殖的影响。

[0050] 序列标识符的概述

[0051] SEQ ID NO:1 是蛋白 IL1f5 的氨基酸序列 (NP_036407.1)。

[0052] SEQ ID NO:2 是蛋白 CCBP2 的氨基酸序列 (NP_001287.2)。

[0053] SEQ ID NO:3 是蛋白 IL1R2 的氨基酸序列 (NP_004624.1)。

[0054] SEQ ID NO:4 是蛋白 IL1RAPL1 的氨基酸序列 (NP_055086.1)。

[0055] SEQ ID NO:5 是蛋白 IL18BP 的氨基酸序列 (NP_766630.2)。

[0056] SEQ ID NO:6 是蛋白 CLEC2B 的氨基酸序列 (NP_005118.2)。

[0057] SEQ ID NO:7 是蛋白 C4BPA 的氨基酸序列 (NP_000706.1)。

[0058] SEQ ID NO:8 是蛋白 C4BPB 的氨基酸序列 (NP_000707.1)。

[0059] SEQ ID NO:9 是蛋白 SERPINI1 的氨基酸序列 (NP_005016.1)。

[0060] SEQ ID NO:10 是蛋白 IL1RAP 同种型 1 的氨基酸序列 (NP_002173.1)。

[0061] SEQ ID NO:11 是蛋白 IL1RAP 同种型 2 的氨基酸序列 (NP_608273.1)。

[0062] SEQ ID NO:12 是蛋白 GPR1 的氨基酸序列 (NP_005270.2)。

[0063] SEQ ID NO:13 是蛋白 GPR4 的氨基酸序列 (NP_005273.1)。

[0064] SEQ ID NO:14 是蛋白 GPR15 的氨基酸序列 (NP_005281.1)。

[0065] SEQ ID NO:15 是蛋白 GPR32 的氨基酸序列 (NP_001497.1)。

[0066] SEQ ID NO:16 是蛋白 GPR34 的氨基酸序列 (NP_005291.1)。

[0067] SEQ ID NO:17 是蛋白 GPR183 的氨基酸序列 (NP_004942.1)。

[0068] SEQ ID NO:18 是蛋白 SERPINA4 的氨基酸序列 (NP_006206.2)。

[0069] SEQ ID NO:19 是蛋白 SERPINB5 的氨基酸序列 (NP_002630.2)。

[0070] SEQ ID NO:20 是蛋白 SEMA4B 的氨基酸序列 (NP_064595.2)。

[0071] SEQ ID NO:21 是蛋白 SEMA4D 的氨基酸序列 (NP_006369.3)。

[0072] SEQ ID NO:22 是蛋白 CCL14 的氨基酸序列 (NP_116739.1)。

[0073] SEQ ID NO:23 是蛋白 NKTR 的氨基酸序列 (NP_005376.2)。

[0074] SEQ ID NO:24 是蛋白 SFTPD 的氨基酸序列 (NP_003010.4)。

[0075] 发明的详细描述

[0076] 本发明通常涉及装载于药学可接受的载体中,用于单独或与一种或多种其它治疗形式相结合给予细胞或动物的药物组合物和/或本文公开的其它组合物,所述药物组合物包含一种或多种癌因子抗体、多核苷酸、多肽、T细胞。更具体而言,如本文所公开的,本发明的多核苷酸和多肽序列表示癌因子序列,并且在癌症的检测和治疗中是有用的重要靶标。因此,本发明的示例性方面包括但不限于,所描述的癌因子序列和相关的结合剂(例如,抗体)在癌症的检测和/或治疗中的多种用途。

[0077] 除非有明确相反指示,本发明的实施可采用本技术领域内常规的病毒学、免疫学、微生物学、分子生物学方法和重组 DNA 技术,为了说明的目的,下文中描述了其中很多方法和技术。这些技术在文献中有充分的讲解。参见,例如, Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆: 实验手册) (第2版, 1989); Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆: 实验手册) (1982); DNA Cloning: A Practical Approach (DNA 克隆: 操作方法), vol. I&II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (寡核苷酸合成) (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (核酸杂交) (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (转录和翻译) (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (动物细胞培养) (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (分子克隆操作指南) (1984)。

[0078] 本文中引用的所有出版物、专利、专利申请(无论是上文还是下文提到的)在此都通过引用全文并入本文。

[0079] 本说明书和所附权利要求中所用的单数形式“a(一)”、“an(一个)”和“the(该)”包括复数形式,除非文中明确指示不包括复数。

[0080] 抗体、其片段及其它结合剂

[0081] 如同所指出的,根据一个方面,本发明提供了包含结合剂(如抗体及其抗原结合片段)的药物组合物,所述结合剂展现出对本文中公开的癌症相关序列(例如,癌因子)或其一部分、变体或衍生物的免疫结合。

[0082] 更具体而言,在某些优选的实施方案中,本发明的药物组合物包含能与选自以下的癌症相关多肽序列特异性结合的抗体和/或抗原结合片段: IL1f5 (SEQ ID NO:1)、CCBP2 (SEQ ID NO:2)、IL1R2 (SEQ ID NO:3)、IL1RAPL1 (SEQ ID NO:4)、IL18BP (SEQ ID NO:5)、CLEC2B (SEQ ID NO:6)、C4BPA (SEQ ID NO:7)、C4BPB (SEQ ID NO:8)、SERPINI1 (SEQ ID NO:9)、IL1RAP 同种型 1 (SEQ ID NO:10)、IL1RAP 同种型 2 (SEQ ID NO:11)、GPR1 (SEQ ID NO:12)、GPR4 (SEQ ID NO:13)、GPR15 (SEQ ID NO:14)、GPR32 (SEQ ID NO:15)、GPR34 (SEQ ID NO:16)、GPR183 (SEQ ID NO:17)、SERPINA4 (SEQ ID NO:18)、SERPINB5 (SEQ ID NO:19)、SEMA4B (SEQ ID NO:20)、SEMA4D (SEQ ID NO:21)、CCL14 (SEQ ID NO:22)、NKTR (SEQ ID NO:23) 和 SFTPD (SEQ ID NO:24)。

[0083] 如果抗体或其抗原结合片段能与本发明的多肽在可检测的水平上（例如，在 ELISA 测定中）起反应，并且在相似的条件不与之无关的多肽可检测地起反应，则将该抗体或其抗原结合片段说成能与该多肽“特异性结合”、“免疫结合”和 / 或“发生免疫反应”。本文中所述的免疫结合通常是指免疫球蛋白分子和该免疫球蛋白特异性针对的抗原之间发生的非共价相互作用类型。可以用相互作用的解离常数 (K_d) 来表示免疫结合相互作用的强度或亲和力，其中 K_d 越小表示亲和力越高。可以用本领域内公知的方法对所选多肽的免疫结合特性进行定量。一种这类方法需要测量抗原结合位点 / 抗原复合物形成和解离的速率，其中那些速率取决于复合物伴侣的浓度、相互作用的亲和性和等同影响双向速率的几何参数。因此，可以通过计算浓度和结合与解离的实际速率来确定“结合速率常数” (k_{on}) 和“解离速率常数” (k_{off})。 k_{off}/k_{on} 的比值使得能够消去与亲和力无关的所有参数，并且因此等于解离常数 K_d 。通常，参见，Davies et al. (1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473。

[0084] 抗体的“抗原结合位点”或“结合部分”是指免疫球蛋白分子参与抗原结合的部分。抗原结合位点由重链（“H”）和轻链（“L”）的 N 末端可变区（“V”）的氨基酸残基形成。重链和轻链的 V 区内的三个高度不同的节段被称为“高变区”，其插在称为“骨架区”或“FR”的较保守的侧翼节段之间。因此，术语“FR”是指天然见于免疫球蛋白高变区之间并邻近高变区的氨基酸序列。在抗体分子中，轻链的三个高变区和重链的三个高变区在三维空间中彼此相对排布形成抗原结合表面。所述抗原结合表面与结合的抗原的三维表面互补，并且每条重链和轻链的三个高变区被称为“互补决定区”或“CDR”。

[0085] 在优选的实施方案中，结合剂是抗体或其抗原结合片段。可以通过本领域技术人员已知的多种技术中的任何技术来制备抗体。参见，例如，Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (抗体：实验手册)，Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。通常，可以通过细胞培养技术产生抗体，包括如本文所述产生单克隆抗体，或通过将抗体基因转染入合适的细菌或哺乳动物细胞宿主，以允许产生重组抗体。在一种技术中，首先将包含多肽的免疫原注射入多种哺乳动物（例如，小鼠、大鼠、兔、绵羊或山羊）的任何一种体内。在该步骤中，本发明的多肽可以不经修饰作为免疫原。可选择地，尤其是对于相对短的多肽而言，如果将多肽连接至诸如牛血清白蛋白或钥孔虫凝集素的载体蛋白，则可以引起较强的免疫应答。优选按照合并了一次或多次加强免疫的预定安排将免疫原注射进动物宿主内，并定期地对动物取血。然后，例如，通过使用与适合的固相载体偶联的多肽的亲和层析从该抗血清中纯化所述多肽的特异性多克隆抗体。

[0086] 例如，使用 Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976 的技术和其改进可以制备目的抗原性多肽的特异性单克隆抗体。简单而言，这些方法涉及制备能产生具有所需特异性（即，与目的多肽的反应性）的抗体的永生化细胞系。例如，可以由从如上所述免疫过的动物获得的脾细胞产生这类细胞系。然后，例如，通过与骨髓瘤细胞融合伴侣，优选与和免疫过的动物同基因的骨髓瘤细胞融合伴侣进行融合而使所述脾细胞永生化。可以利用多种融合技术。例如，可以用非离子去垢剂使脾细胞和骨髓瘤细胞结合几分钟，然后以低密度接种于可支持杂交细胞生长而不支持骨髓瘤细胞生长的选择培养基上。优选的选择技术利用 HAT（次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶脱氧核苷）选择。足够的时间后，通常约 1-2 周后，观察杂交细胞的集落。选择单一集落，并测试它们的培养物上清液对多肽的结合活性。优选具有高反应性和特异性的杂交瘤细胞。

[0087] 可以从生长的杂交瘤集落的上清液中分离单克隆抗体。此外,可以利用多种技术提高产量,例如将杂交瘤细胞系注射进诸如小鼠的合适的脊椎动物宿主的腹腔中。随后,可以从腹水或血液中收获单克隆抗体。通过诸如层析法、凝胶过滤法、沉淀法和提取法的常规技术可以从抗体中除去污染物。本发明的多肽可以用于例如亲和层析步骤的纯化过程中。

[0088] 多种包含抗原结合位点的、能表现出抗体分子的免疫结合特性的、治疗上有用的分子在本领域内是已知的。蛋白水解酶木瓜蛋白酶优先切割 IgG 分子,产生数个片段,所述片段中的 2 个 (“F(ab)” 片段) 各包含共价异二聚体,所述共价异二聚体包含完整的抗原结合位点。胃蛋白酶能切割 IgG 分子,提供数个片段,所述片段包括含有两个抗原结合位点的 “F(ab')₂” 片段。通过优选蛋白水解切割 IgM, 和极少情况下的 IgG 或 IgA 免疫球蛋白分子,可以产生 “Fv” 片段。然而,更通常情况下,使用本领域内已知的重组技术获得 Fv 片段。Fv 片段包括非共价 V_H:V_L 异二聚体,该异二聚体包含保留了天然抗体分子的许多抗原识别和结合能力的抗原结合位点。Inbar et al. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2659-2662; Hochman et al. (1976) Biochem 15:2706-2710; 和 Ehrlich et al. (1980) Biochem 19:4091-4096。

[0089] 单链 Fv (“sFv”) 多肽是从融合基因表达的共价连接的 V_H:V_L 异二聚体,所述融合基因包含通过肽编码接头连接的 V_H 和 V_L 编码基因。Huston et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85(16):5879-5883。已经描述了多种识别用于将来自抗体 V 区的天然聚集但化学上分离的轻多肽链和重多肽链转化为 sFv 分子的化学结构的方法,所述 sFv 分子会折叠成基本上类似于抗原结合位点的结构的三维结构。参见,例如, Huston 等的美国专利第 5,091,513 号和第 5,132,405 号;和 Ladner 等的美国专利第 4,946,778 号。

[0090] 每个上述分子都包含分别插在重链和轻链 FR 组之间的重链和轻链 CDR 组,所述 FR 组为 CDR 提供支持并且限定了 CDR 相对于彼此的空间关系。如本文所用的术语 “CDR 组” 是指重链或轻链 V 区的三个高变区。从重链或轻链的 N 末端开始,将这些区分别表示为 “CDR1”、“CDR2” 和 “CDR3”。因此,抗原结合位点包括 6 个 CDR,包含来自每条重链和轻链 V 区的 CDR 组。在本文中,包含单一 CDR (例如, CDR1、CDR2 或 CDR3) 的多肽在本文中被称作 “分子识别单元”。多个抗原-抗体复合物的晶体学分析已经证实, CDR 的氨基酸残基与结合的抗原形成广泛接触,其中最广泛的抗原接触是与重链 CDR3 的接触。因此,所述分子识别单元主要负责抗原结合位点的特异性。

[0091] 如本文所用的术语 “FR 组” 是指为重链或轻链 V 区的 CDR 组的 CDR 提供骨架的四条侧翼氨基酸序列。一些 FR 残基可以接触结合的抗原;然而, FR 主要负责将 V 区折叠为抗原结合位点,尤其是直接邻近 CDR 的 FR 残基。在 FR 中,某些氨基酸残基和某些结构特征是高度保守的。在这点上,所有的 V 区序列都包含约 90 个氨基酸残基的内部二硫环。当 V 区折叠成结合位点时, CDR 表现为突出的环状基序,该环状基序形成抗原结合表面。普遍公认存在 FR 的保守结构区,其影响 CDR 环到某些 “典范” 结构的折叠形状,与具体的 CDR 氨基酸序列无关。而且,已知某些 FR 残基参与非共价的结构域间接触,该结构域间接触使抗体重链和轻链的相互作用稳定。

[0092] 很多包含来自非人免疫球蛋白的抗原结合位点的 “人源化” 抗体分子已有描述,包括具有以下成分的嵌合抗体:与人恒定结构域融合的啮齿动物 V 区及其相关 CDR (Winter et al. (1991) Nature 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci.

USA86:4220-4224; Shaw et al. (1987) J Immunol. 138:4534-4538; 和 Brown et al. (1987) Cancer Res. 47:3577-3583)、在与合适的人抗体恒定结构域融合之前接枝到人支持 FR 内的啮齿动物 CDR (Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536; 和 Jones et al. (1986) Nature 321:522-525) 以及由重组镶饰的 (veneered) 啮齿动物 FR 支持的啮齿动物 CDR (欧洲专利公开第 519,596 号, 于 1992 年 12 月 23 日公布)。这些“人源化”分子被设计为将对啮齿动物抗人抗体分子的不希望的免疫应答降至最低, 该免疫应答限制了那些部分在人接受体中的治疗应用的持续时间和功效。

[0093] 如本文所用的术语“镶饰的 FR”和“重组镶饰的 FR”是指用人 FR 残基选择性地取代来自例如啮齿动物重链或轻链 V 区的 FR 残基, 目的是提供包含基本上保留了所有天然 FR 多肽折叠结构的抗原结合位点的异基因分子。镶饰技术基于下述理解, 抗原结合位点的配体结合特性主要由抗原结合表面内的重链和轻链 CDR 组的结构和相对排布决定。Davies et al. (1990) Ann. Rev. Biochem. 59:439-473。因此, 只有仔细保持 CDR 结构、它们彼此间的相互作用和它们与其余的 V 区结构域的相互作用, 才可以在人源化抗体中保留抗原结合特异性。通过使用镶饰技术, 用人残基选择性地取代了容易被免疫系统遇到的外部 (例如, 溶剂可及的) FR 残基, 从而提供包含弱免疫原性或基本上无免疫原性的镶饰表面的杂合分子。

[0094] 镶饰的方法利用 Kabat 等人在第 4 版的 Sequences of Proteins of Immunological Interest (U.S. Dept. of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, 1987) 中编辑的人抗体可变结构域的可获得的序列数据、对 Kabat 数据库的更新, 以及其它可进入的美国数据库和外国数据库 (核酸和蛋白质)。V 区氨基酸的溶剂可及性可从人和鼠抗体片段的已知的三维结构推断出。在镶饰鼠抗原结合位点中有两个通用的步骤。首先, 将目的抗体分子可变结构域的 FR 与从上述来源获得的对应的人可变结构域的 FR 序列比较。然后将最同源的人 V 区逐个残基地与对应的鼠氨基酸比较。利用本领域内公知的重组技术将鼠 FR 中与人对应部分不同的残基取代为人部分中存在的残基。仅对至少部分暴露的 (溶剂可及的) 部分进行残基转换, 并且应当当心对 V 区结构域的三级结构可能具有重大影响的氨基酸残基的取代, 例如脯氨酸、甘氨酸和带电荷的氨基酸。

[0095] 以这种方式, 得到的“镶饰”鼠抗原结合位点因而被设计成保留了鼠 CDR 残基、实质上邻近 CDR 的残基、被认定为是包埋的或大部分包埋的 (溶剂不可及的) 残基、据信参与重链和轻链结构域之间的非共价 (例如, 静电或疏水) 接触的残基, 以及来自 FR 的保守结构区、据信可影响 CDR 环的“典范”三级结构的残基。然后, 这些设计标准被用于制备将鼠抗原结合位点的重链和轻链的 CDR 都整合到存在于人类中的 FR 中的重组核苷酸序列, 该重组核苷酸序列能被用来转染哺乳动物细胞, 用于表达展现出所述鼠抗体分子的抗原特异性的重组人抗体。

[0096] 在本发明的另一实施方案中, 本发明的单克隆抗体可以与一种或多种治疗剂偶联。就这一点而言, 合适的药剂包括放射性核素、分化诱导物、药物、毒素以及以上的衍生物。优选的放射性核素包括 ^{90}Y 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 和 ^{212}Bi 。优选的药物包括氮甲蝶呤以及嘧啶和嘌呤类似物。优选的分化诱导物包括佛波酯和丁酸。优选的毒素包括蓖麻毒素、相思子毒素、白喉毒素、霍乱毒素、白树毒素、假单胞菌外毒素、志贺毒素和美洲商陆抗病毒蛋白。

[0097] 可以将治疗剂直接地或间接地 (例如, 通过接头基团) 与合适的单克隆抗体偶联

(例如,共价键合)。当试剂和抗体中的每一个都具有能与另一个反应的取代基时,试剂和抗体之间的直接反应是可能的。例如,一个上的诸如氨基或巯基的亲核基团可能能与另一个上的诸如酞或酰卤的含羰基基团反应或与含有良好离去基团(例如,卤化物)的烃基反应。

[0098] 可选择地,通过接头基团将治疗剂和抗体偶联是可取的。接头基团的功能可以是间隔物来使抗体与试剂保持距离,从而避免结合能力的干扰。接头基团也可以增加试剂或抗体上的取代基的化学反应性,并因此增强偶联效率。化学反应性的增加也可以促进试剂或试剂上的官能团的使用,否则将无法实现。

[0099] 对本领域技术人员显而易见的是,包括同功能的和异功能的在内的多种双功能或多功能试剂(例如描述于Pierce Chemical Co., Rockford, IL 目录中的那些)可以用作接头基团。例如,可以通过氨基、羧基、巯基或氧化的碳水化合物残基实现偶联。有多篇参考文献描述了这类方法,例如,Rodwell 等的美国专利第 4,671,958 号。

[0100] 如果当治疗剂脱离本发明的免疫缀合物的抗体部分时更有效,则可能需要使用在细胞内化过程中或细胞内化后可切割的接头基团。多种不同的可切割的接头基团已有描述。试剂从这些接头基团的细胞内释放机制包括通过以下机制切割:二硫键的还原(例如,Spitler 的美国专利第 4,489,710 号)、对光不稳定的键的照射(例如,Senter 等的美国专利第 4,625,014 号)、衍生氨基酸侧链的水解(例如,Kohn 等的美国专利第 4,638,045 号)、血清补体介导的水解(例如,Rodwell 等的美国专利第 4,671,958 号)和酸催化的水解(例如,Blattler 等的美国专利第 4,569,789 号)。

[0101] 将多于一种试剂与抗体偶联是可取的。在一个实施方案中,将多个试剂分子与一个抗体分子偶联,在另一个实施方案中,可以将多于一类试剂与一种抗体偶联。不考虑特定实施方案,可以用很多方法制备具有多于一种的试剂的免疫缀合物。例如,可以将多于一种的试剂直接与抗体分子偶联,或可以使用提供多个连接位点的接头。可选择地,可以使用载体。

[0102] 载体可以以多种方式携带试剂,包括直接或通过接头基团共价键合。合适的载体包括诸如白蛋白(例如,Kato 等人的美国专利第 4,507,234 号)的蛋白、肽和诸如氨基葡聚糖(例如,Shih 等人的美国专利第 4,699,784 号)的多糖。载体还可以通过非共价键合或通过包封,如在脂质体囊泡(例如,美国专利第 4,429,008 号和第 4,873,088 号)中携带试剂。放射性核素试剂特异的载体包括放射性卤化小分子和螯合化合物。例如,美国专利第 4,735,792 号公开了代表性的放射性卤化小分子及其合成。放射性核素螯合物可以从螯合化合物形成,所述螯合化合物包括含有氮和硫原子作为用于结合金属或金属氧化物、放射性核素的配位原子的化合物。例如,Davison 等人的美国专利第 4,673,562 号公开了代表性的螯合化合物及其合成。

[0103] 提供上述抗体类型和用于制备相同抗体的方案是为了说明目的而非以限制方式提供。应当理解,这些方法和很多其它方法在本领域内是已知的,且是为了生产和表征抗体和其它结合剂而被建立,并且这些方法可被用于本发明的背景下。

[0104] 多肽组合物

[0105] 本发明的另一方面提供了癌症相关的多肽。在某些相关的实施方案中,例如,在用于治疗癌症的药物和/或疫苗组合物中使用该多肽。

[0106] 本文所用的术语“多肽”以其常规意义使用,即氨基酸的序列。多肽并不受限于产物的具体长度;因此,肽、寡肽和蛋白均包括在多肽的定义中,并且此类术语在本文中可互换使用,除非明确指出并非如此。该术语也非指或排除多肽的表达后修饰,例如,糖基化、乙酰化、磷酸化等修饰以及本领域内已知的其它修饰,包括天然存在的或非天然存在的修饰。多肽可以是整个蛋白或其子序列。本发明背景下的具体的目的多肽是包含表位,即基本上负责多肽的免疫原性且能够引起免疫应答的抗原决定簇的氨基酸子序列。

[0107] 在本发明的某些组合物和方法中,优选的多肽包括 SEQ ID NOs:1-24 中任一所示的多肽,或其中任一的变体或片段,如与 SEQ ID NOs:1-24 中任一具有至少 70%、80%、90% 或 95% 同一性的变体。

[0108] 本发明的多肽在本文中有时称为癌症相关的蛋白或肿瘤多肽或癌因子多肽,例如其在肿瘤样品中表达和 / 或活性水平的增加作为其癌症关联的指征。因此,在某些实施方案中,术语“癌因子”、“肿瘤多肽”或“癌症相关的多肽”通常可交换使用,并且是指本发明的多肽序列,或编码这类多肽的多核苷酸序列,如利用本文提供的代表性试验所测定的,其以超过正常组织中表达水平的至少两倍、优选至少五倍的水平,在很大比例的肿瘤样品中表达和 / 或有活性,例如优选大于所测试肿瘤样品的约 20%,更有选大于约 30%,且最优选大于约 50% 或更高。本发明的在肿瘤细胞中表达和 / 或活性水平增加的癌因子多肽具有作为诊断标志物以及治疗靶标的特定功效,如下文进一步描述。

[0109] 在某些实施方案中,本发明组合物和 / 或方法中使用的多肽是免疫原性的,即,它们在免疫测定(诸如 ELISA 或 T 细胞刺激测定)中与来自癌症患者的抗血清和 / 或 T 细胞可检测地起反应。免疫原活性的筛查可以利用本领域技术人员熟知的技术进行。例如,此类筛查可以利用诸如 Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 中描述的方法的技术进行。在一个示例性的实例中,可将多肽固定在固相载体上并使其与患者血清接触,从而允许血清内的抗体与固定的多肽结合。随后去除未结合的血清,并利用例如,经 125I 标记的蛋白 A 检测结合的抗体。

[0110] 如本领域技术人员公认的,本文所公开的多肽的免疫原性部分也包括在本发明内。本文所用的“免疫原性部分”是本发明免疫原性多肽的片段,其自身能与识别该多肽的 B 细胞和 / 或 T 细胞表面抗原受体发生免疫学反应(即,特异性结合)。免疫原性部分通常可以利用公知的技术,例如 Paul, *Fundamental Immunology*, 3rd ed., 243-247 (Raven Press, 1993) 及其中所引用的参考文献中总结的技术鉴定。此类技术包括筛查能与抗原特异性抗体、抗血清和 / 或 T 细胞系或克隆起反应的多肽。如本文所用的,如果抗血清和抗体与抗原特异性结合(即,它们在 ELISA 或其它免疫测定中与蛋白起反应,但不与不相关的蛋白可检测地起反应),则它们是“抗原特异性的”。可以按本文所述,以及利用公知的技术制备此类抗血清和抗体。

[0111] 在一个示例性的实施方案中,本发明多肽的免疫原性部分是这样的部分,其以本质上不低于全长多肽的反应性的水平与抗血清和 / 或 T 细胞起反应(例如,在 ELISA 和 / 或 T 细胞反应性测定中)。优选地,免疫原性部分的免疫原性活性水平是全长多肽的免疫原性的至少约 50%,优选至少约 70% 且最优选大于约 90%。在一些情况下,优选的免疫原性部分将被鉴定为具有大于对应的全长多肽免疫原性活性的免疫原性活性水平,例如,具有大于约 100% 或 150% 或更高的免疫原性活性。

[0112] 在其它实施方案中,本发明利用本文所示的多肽组合物(例如SEQ ID NOs:1-24中所示的多肽)的多肽片段,该多肽片段包含至少约5、10、15、20、25、50或100个连续的氨基酸或更多的氨基酸(包括所有中间长度)。

[0113] 在其它实施方案中,本发明利用本文所描述的组合物和方法当中的本文所描述的多肽组合物的变体。本发明通常包括的多肽变体通常沿其长度与本文所示的多肽序列展现至少约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更高的同一性(按下文描述所测定的)。

[0114] 当术语多肽“变体”在本文使用时,是指这样的多肽,其通常通过一个或多个取代、缺失、添加和/或插入而不同于本文具体公开的多肽。这些变体可以是天然存在的或可以是合成产生的,例如,通过利用本文所述和/或本领域内公知的多种技术中的任何一种修饰一个或多个本发明的上述多肽序列并评估其免疫原活性。

[0115] 在很多情况下,变体包含保守取代。“保守取代”是指氨基酸被具有相似性质的另一个氨基酸取代,这样肽化学领域技术人员会预测到多肽的二级结构和亲水性基本上不会被改变。如上文所描述的,可以在本发明的多核苷酸和多肽的结构内进行修饰,并且仍可获得编码具有所需特性(例如,免疫原性)的变体或衍生多肽的功能分子。当希望改变多肽的氨基酸序列来产生等同的或甚至改进的本发明的多肽的免疫原性变体或多肽部分时,本领域技术人员通常会根据表1改变一个或多个编码DNA序列的密码子。

[0116] 例如,在蛋白结构中,某些氨基酸可以被其它的氨基酸取代,而不会造成与诸如,例如抗体的抗原结合区或底物分子上的结合位点的结构的交互式结合能力的明显损失。因为是蛋白的相互作用能力和性质限定了该蛋白的生物功能活性,所以可以在蛋白序列中进行某些氨基酸序列取代,也当然可以在其基本的DNA编码序列中进行取代,而仍然获得具有相似性质的蛋白。因此,已考虑到可以在所公开的组合物的肽序列或编码所述肽的相应DNA序列中进行各种改变,而不会造成其生物功效或活性的明显损失。

[0117] 表1

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			
[0118] 亮氨酸	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG CUU
蛋氨酸	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			

[0119] 在进行这些改变时,可以考虑氨基酸的亲水指数。本领域内普遍理解亲水氨基酸指数在赋予蛋白相互作用的生物学功能中的重要性 (Kyte and Doolittle, 1982, 通过引用并入本文)。公认的是,氨基酸的相对亲水特性与得到的蛋白的二级结构有关,而该二级结构随之限定了该蛋白与诸如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等其它分子的相互作用。基于氨基酸的疏水性和电荷特性,每种氨基酸都被指派了一个亲水指数 (Kyte and Doolittle, 1982)。这些值是:异亮氨酸 (+4.5)、缬氨酸 (+4.2)、亮氨酸 (+3.8)、苯丙氨酸 (+2.8)、半胱氨酸/胱氨酸 (+2.5)、蛋氨酸 (+1.9)、丙氨酸 (+1.8)、甘氨酸 (-0.4)、苏氨酸 (-0.7)、丝氨酸 (-0.8)、色氨酸 (-0.9)、酪氨酸 (-1.3)、脯氨酸 (-1.6)、组氨酸 (-3.2)、谷氨酸 (-3.5)、谷氨酰胺 (-3.5)、天冬氨酸 (-3.5)、天冬酰胺 (-3.5)、赖氨酸 (-3.9) 和精氨酸 (-4.5)。

[0120] 本领域内已知,某些氨基酸可以被具有相似亲水指数或评分的其它氨基酸取代,并且仍然产生具有相似生物活性的蛋白,即仍获得生物功能等同的蛋白。在进行这些改变时,亲水指数在 ± 2 以内的氨基酸的取代是优选的,特别优选的是在 ± 1 以内的氨基酸的取代,并且更特别优选的是在 ± 0.5 以内的那些氨基酸的取代。本领域内还应当理解,可以基于亲水性有效地进行相似氨基酸的取代。美国专利 4,554,101 (通过引用全文明确并入本文) 声称,蛋白的最大局部平均亲水性 (受其邻近的氨基酸的亲水性支配) 与该蛋白的生物学性质相关。

[0121] 如美国专利第 4,554,101 号详述,已将下述亲水性值指定给氨基酸残基:精氨酸 (+3.0)、赖氨酸 (+3.0)、天冬氨酸 (+3.0 $\pm$ 1)、谷氨酸 (+3.0 $\pm$ 1)、丝氨酸 (+0.3)、天冬酰胺 (+0.2)、谷氨酰胺 (+0.2)、甘氨酸 (0)、苏氨酸 (-0.4)、脯氨酸 (-0.5 $\pm$ 1)、丙氨酸 (-0.5)、

组氨酸 (-0.5)、半胱氨酸 (-1.0)、蛋氨酸 (-1.3)、缬氨酸 (-1.5)、亮氨酸 (-1.8)、异亮氨酸 (-1.8)、酪氨酸 (-2.3)、苯丙氨酸 (-2.5)、色氨酸 (-3.4)。应当理解,氨基酸可以被具有相似亲水性值的另一氨基酸取代,并且仍获得生物学上等同的且尤其是免疫学上等同的蛋白。在这类改变中,亲水性值在 ± 2 以内的氨基酸的取代是优选的,特别优选的是在 ± 1 以内的氨基酸的取代,并且更特别优选的是在 ± 0.5 以内的那些氨基酸的取代。

[0122] 如上文所述,氨基酸取代因此通常基于氨基酸侧链取代基的相对的相似性,例如,它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。综合考虑了上述各种特性的示例性取代是本领域技术人员公知的,并且包括:精氨酸与赖氨酸、谷氨酸与天冬氨酸、丝氨酸与苏氨酸、谷氨酰胺与天冬酰胺,以及缬氨酸、亮氨酸与异亮氨酸。

[0123] 此外,可以被进一步修饰任何多核苷酸以增加体内稳定性。可能的修饰包括但不限于,在 5' 和 / 或 3' 端添加侧翼序列;在主链中使用硫代磷酸酯或 2' O- 甲基而不是磷酸二酯酶连接;和 / 或包含非传统碱基,例如次黄嘌呤核苷、Q 核苷 (queosine) 和怀丁苷,以及乙酰基 -、甲基 -、硫代 - 和其它修饰形式的腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶。

[0124] 还可以基于残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和 / 或两亲性质的相似性进行氨基酸取代。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;并且带有具有相似亲水性值的、不带电荷的极性头基团的氨基酸包括:亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸;甘氨酸和丙氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;以及丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。可以代表保守改变的其它氨基酸组包括:(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr;(2) cys、ser、tyr、thr;(3) val、ile、leu、met、ala、phe;(4) lys、arg、his;和 (5) phe、tyr、trp、his。变体还可以含有非保守型改变或可选择地含有非保守改变。在优选的实施方案中,变体多肽与天然序列的区别在于 5 个或更少氨基酸的取代、缺失或添加。还可以(或可选择地)通过例如对多肽的免疫原性、二级结构和亲水性质具有最小影响的氨基酸的缺失或添加来修饰变体。

[0125] 多肽在蛋白的 N 末端可以包含信号(或前导)序列,其在翻译的同时或在翻译后指导蛋白的转移。多肽还可以与接头或其它序列缀合,以便于多肽的合成、纯化或鉴定(例如,多聚组氨酸),或用于增强多肽与固相载体的结合。例如,多肽可以与免疫球蛋白 Fc 区缀合。

[0126] 当比较多肽序列时,如果两条序列中的氨基酸序列在如下文所述进行最大对应比对时是相同的,则将所述两条序列说成是“同一的”。通常通过在比较窗口中鉴定和比较局部区域的序列相似性来完成两条序列间的比较。本文所用的“比较窗口”是指至少约 20 个连续位置,通常 30 至约 75 个、40 至约 50 个连续位置的区段,其中在将序列与具有相同数量连续位置的参照序列最优比对后,可以将所述序列与参照序列进行比较。

[0127] 可以使用 Lasergene 生物信息学软件套装中的 Megalign 程序(DNASTAR, Inc., Madison, WI),使用默认参数,进行用于比较的序列的最优比对。该程序包含以下参考文献中描述的数种比对方案:Dayhoff, M. O., (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships(蛋白质的进化改变模型 - 用于检验远距离关系的矩阵);Dayhoff, M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure(蛋白质序列和结构图谱), National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358;Hein J. (1990)

Unified Approach to Alignment and Phylogenesis(比对和系统发生的标准方法), pp.626-645Methods in Enzymology vol.183, Academic Press, Inc., San Diego, CA;Higgins, D. G. and Sharp, P. M., CABIOS5:151-153(1989);Myers, E. W. and Muller W., CABIOS4:11-17(1988);Robinson, E. D., Comb. Theor11:105(1971);Saitou, N. Nei, M., Mol. Biol. Evol. 4:406-425(1987);Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R., Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy(数值分类法 - 数值分类法的原理和实践), Freeman Press, San Francisco, CA(1973);Wilbur, W. J. and Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad. , Sci. USA80:726-730(1983)。

[0128] 可选择地,可以通过以下进行用于比较的序列的最优比对:Smith and Waterman Add. APL. Math2:482(1981) 的局部同一性算法、Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48:443(1970) 的同一性比对算法、Pearson and Lipman Proc. Nat'l Acad. Sci. USA85:2444(1988) 的相似性方法搜索、这些算法的计算机实现 (WisconsinGenetics Software Package 中的 GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group (GCG), 575Science Dr., Madison, WI) 或检查。

[0129] 适于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的一个优选实例是 BLAST 和 BLAST2.0 算法,其分别描述于 Altschul et al. Nucl. Acids Res. 25:3389-3402(1977) 和 Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410(1990) 中。例如,可以利用本文所述的参数使用 BLAST 和 BLAST2.0,从而确定本发明多核苷酸和多肽的序列同一性百分比。通过美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 可以公开获得进行 BLAST 分析的软件。对于氨基酸序列而言,可以将评分矩阵用于计算累积评分。在以下情况时停止每个方向的字符命中延伸:当累积比对评分从其最大获取值下降量 X 时;由于一个或多个负评分残基比对的累积而使累积评分达到 0 或低于 0 时;或达到任一序列的末端时。BLAST 算法参数 W、T 和 X 决定了比对的灵敏度和速度。

[0130] 在一个优选的方法中,通过在至少 20 个位置的比较窗口中比较两个最优比对的序列来确定“序列同一性百分比”,其中,与用于两条序列最优比对的参照序列(其不包含添加或缺失)相比,比较窗口中的多肽序列部分可以包含 20% 或更少的,通常为 5%-15%、或 10%-12% 的添加或缺失(即,空位)。通过以下计算百分比:确定两条序列中存在相同氨基酸残基的位置数量来产生配对位置数,将配对位置数除以参照序列中(即窗口大小)的位置总数,并且将结果乘以 100 以产生序列同一性的百分比。

[0131] 融合多肽

[0132] 在其它示例性实施方案中,本发明的癌因子多肽可以为融合多肽的形式,该融合多肽包含多种本文所述的癌症相关的多肽,或包含至少一种本文所述的癌症相关的多肽和不相关的序列,如已知的肿瘤蛋白或其它目的异源序列。例如,融合伴侣可以协助提供 T 助表位(一种免疫融合伴侣),优选人识别的 T 助表位,或者可以协助以高于天然重组蛋白的产量表达所述蛋白(表达增强子)。某些优选的融合伴侣同时为免疫和表达增强融合伴侣。可以选择另外的融合伴侣以增加多肽的溶解性或使多肽能被靶向所需的细胞内区室。其它融合伴侣包括促进多肽纯化的亲和性标签。

[0133] 通常可以用标准技术制备融合多肽,包括化学缀合。优选地,融合多肽作为重组多肽来表达,从而允许其在表达系统中以相对于非融合多肽增加的水平产生。简单而言,可以

分别组装编码多肽组分的 DNA 序列,并将其连入合适的表达载体中。使用或不使用肽接头将编码一种多肽组分的 DNA 序列的 3' 端与编码第二多肽组分的 DNA 序列的 5' 端连接,使得序列的阅读框是同相的。这允许翻译为同时保留两个组分多肽的生物活性的单个融合多肽。

[0134] 可以用肽接头序列将第一和第二多肽组分隔开足以确保每种多肽都能折叠成其二级和三级结构的距离。用本领域内公知的标准技术将这类肽接头序列并入融合多肽。可以基于下述因素选择合适的肽接头序列:(1) 它们采用柔韧的、伸展的构型的能力;(2) 它们不采用与第一和第二多肽上的功能表位相互作用的二级结构的能力;和(3) 可以与多肽功能表位反应的疏水或带电残基的缺乏。优选的肽接头序列包含 Gly、Asn 和 Ser 残基。诸如 Thr 和 Ala 的其它接近中性的氨基酸也可以用于接头序列中。可以有效地用作接头的氨基酸序列包括公开于 Maratea et al., Gene 40:3946 1985; Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262 1986; 美国专利第 4,935,233 号和美国专利第 4,751,180 号中的那些氨基酸序列。通常,接头序列的长度可以为 1 至约 50 个氨基酸。当第一和第二多肽具有可以用来隔开功能结构域并防止空间干扰的非必需 N 末端氨基酸区时,不需要接头序列。

[0135] 将连接的 DNA 序列可操作地连接于合适的转录或翻译调节元件。负责 DNA 表达的调节元件仅位于编码第一多肽的 DNA 序列的 5' 端。类似地,结束翻译所需的终止密码子和转录终止信号仅存在于编码第二多肽的 DNA 序列的 3' 。

[0136] 利用多种公知的合成和/或重组技术中的任何一种制备本发明的癌症相关的多肽(例如,癌因子),所述重组技术在下文有进一步描述。可以通过合成手段,利用本领域技术人员公知的技术产生通常短于约 150 个氨基酸的多肽、部分和其它变体。在一个示例性的实例中,利用市售的固相技术中的任何一种合成此类多肽,例如 Merrifield 固相合成方法,在该方法中氨基酸被相继添加到生长的氨基酸链上。参见 Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146, 1963。用于多肽自动化合成的设备可从诸如 Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA) 的供应商商购,并且可以按照生产说明书操作。

[0137] 通常,本发明的多肽组合物(包括融合多肽)是分离的。“分离的”多肽是从其原始环境中移出的多肽。例如,如果将天然存在的蛋白或多肽与天然系统中的部分或所有的共存物质分开,则该天然存在的蛋白或多肽是分离的。优选地,这类多肽还是纯化的,例如是至少约 90% 纯的,更优选为至少约 95% 纯的,并且最优选为至少约 99% 纯的。

[0138] 多肽组合物

[0139] 如上文所指出的,本发明的另一方面涉及编码本文所述的癌因子多肽的多核苷酸,及其在用于治疗和检测癌症的药物和诊断组合物中的用途。

[0140] 术语“DNA”和“多核苷酸”本质上在本文可互换,是指已经从特定物种的总基因组 DNA 分离出来的 DNA 分子。本文所用的“分离的”意指多核苷酸基本上远离其它编码序列,以及 DNA 分子不含大部分不相关的编码 DNA,如大的染色体片段或其它功能基因或多肽编码区。当然,这是指最初分离的 DNA 分子,并且不排除通过人为操纵随后添加到该区段上的基因或编码区。

[0141] 如本领域技术人员所理解的,本发明的多核苷酸组合物可以包括基因组序列、基因组外序列和质粒编码的序列以及表达或被改造来表达蛋白、多肽、肽等的较小的工程基

因区段。这类区段可以是天然分离的,或经人工合成修饰的。

[0142] 还如本领域技术人员所公认的,本发明的多核苷酸可以是单链的(编码或反义)或双链的,并且可以是 DNA(基因组、cDNA 或合成物)或 RNA 分子。RNA 分子可以包括 HnRNA 分子(其含有内含子且以一对一的方式对应于 DNA 分子)和 mRNA 分子(其不含内含子)。其它编码或非编码序列可以,但不必,存在于本发明的多核苷酸中,并且多核苷酸可以,但不必,与其它的分子和 / 或支持物质连接。

[0143] 多核苷酸可以包含天然序列(即,编码本发明的多肽 / 蛋白或其部分的内源序列),或可以包含编码此类序列的变体或衍生物,并且优选免疫原性变体或衍生物的序列。

[0144] 在某些实施方案中,本发明利用这样的多核苷酸变体,其与编码本文以 SEQ ID NOs:1-24 公开的癌症相关多肽序列的序列具有大量的同一性,例如利用本文所述的方法(例如,下文描述的利用标准参数的 BLAST 分析),与本发明的多核苷酸序列相比,包含至少 70% 序列同一性,优选至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 或更高序列同一性的变体。本领域技术人员应当认识到,通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等,可以将这些值可以适当调整以确定两条核苷酸序列编码的蛋白的对应的同一性。

[0145] 通常,多核苷酸变体将含有一个或多个取代、添加、缺失和 / 或插入,优选使得该变体多核苷酸编码的多肽的免疫原性相对于本文具体列出的多核苷酸序列编码的多肽基本上没有降低。术语“变体”还应当被理解为包括异基因来源的同源基因。

[0146] 在其它实施方案中,本发明提供了这样的多核苷酸片段,其包含与本文所述的一种或多种序列相同或互补的序列的不同长度的连续节段,或由与本文所述的一种或多种序列相同或互补的序列的不同长度的连续节段组成。例如,本发明提供了这样的多核苷酸,其包含编码本文公开的多肽的序列的至少约 10、15、20、30、40、50、75、100、150、200、300、400、500 或 1000 个或更多个以及这些长度之间的所有中间长度的连续核苷酸,或由编码本文公开的多肽的序列的至少约 10、15、20、30、40、50、75、100、150、200、300、400、500 或 1000 个或更多个以及这些长度之间的所有中间长度的连续核苷酸组成。应当容易理解,该背景下的“中间长度”意为所引用的数值之间的任何长度,例如 16、17、18、19 等;21、22、23 等;30、31、32 等;50、51、52、53 等;100、101、102、103 等;150、151、152、153 等;包括 200-500、500-1,000 等之间的所有整数。此处所述的多核苷酸序列可以在一端或两端延伸天然序列中不存在的另外的核苷酸。该另外的序列可以由所公开的序列的任一端或所公开的序列的两端的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个核苷酸组成。

[0147] 在本发明的另一个实施方案中,提供了在中至高严格条件下能与编码本文提供的多肽序列的多核苷酸序列或其片段或其互补序列杂交的多核苷酸组合物。杂交技术是分子生物学领域内公知的。为了说明的目的,适于测试本发明的多核苷酸与其它多核苷酸杂交的中度严格条件包括:在 $5\times$ SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH8.0) 的溶液中预洗;在 $5\times$ SSC 中、于 50°C - 65°C 杂交过夜;然后,用含有 0.1% SDS 的 $2\times$ SSC、 $0.5\times$ SSC 和 $0.2\times$ SSC 中的每一种、于 65°C 洗涤 20 分钟,洗涤两次。本领域技术人员应当理解,杂交的严格性容易操纵,例如通过改变杂交溶液的盐含量和 / 或进行杂交的温度来操纵。例如,在另一个实施方案中,合适的高严格杂交条件包括上文所述的那些条件,除了杂交的温度被升高,例如至 $60-65^{\circ}\text{C}$ 或 $65-70^{\circ}\text{C}$ 。

[0148] 本发明的多核苷酸或其片段,不管其编码序列自身的长度,可以与其它 DNA 序列

组合,诸如启动子、聚腺苷化信号、其它限制酶位点、多克隆位点、其它编码区段等,使得它们的总长度可以显著不同。因此考虑到,可以利用几乎任意长度的核酸片段,其中所述总长度优选受预期的重组 DNA 方案中的制备和使用便利性限制。例如,总长度为约 10,000、约 5000、约 3000、约 2,000、约 1,000、约 500、约 200、约 100、约 50 个碱基对等(包括所有中间长度)的示例性的多核苷酸区段被认为在本发明的多种实施中 useful。

[0149] 当比较多核苷酸序列时,如果两条序列中的核苷酸序列在如下文所述进行最大对应比对时是相同的,则所述两条序列被说成是“同一的”。通常通过在比较窗口中鉴定和比较局部区域的序列相似性来完成两条序列间的比较。本文所用的“比较窗口”是指至少约 20 个连续位置,通常 30 至约 75 个、40 至约 50 个连续位置的区段,其中在将序列与具有相同数量连续位置的参照序列最优比对后,可以将所述序列与参照序列进行比较。

[0150] 可以使用 Lasergene 生物信息学软件套装中的 Megalign 程序(DNASTAR, Inc., Madison, WI),使用默认参数,进行用于比较的序列的最优比对。该程序包括以下参考文献中描述的数种比对方案:Dayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in Proteins—Matrices for detecting distant relationships(蛋白质的进化改变模型—用于检验远距离关系的矩阵);In Dayhoff, M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure(蛋白质序列和结构图谱), National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345–358;Hein J., Unified Approach to Alignment and Phylogenesis(比对和系统发生的标准方法) pp. 626–645 (1990); Methods in Enzymology(酶学方法) vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. and Sharp, P. M., CABIOS5:151–153 (1989); Myers, E. W. and Muller W., CABIOS4:11–17 (1988); Robinson, E. D., Comb. Theor 11:105 (1971); Santou, N. Nes, M. Mol. Biol. Evol. 4:406–425 (1987); Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R., Numerical Taxonomy—the Principles and Practice of Numerical Taxonomy(数值分类法—数值分类法的原理和实践), Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur, W. J. and Lipman, D. J., Proc. Nat’l Acad., Sci. USA 80:726–730 (1983)。

[0151] 可选择地,可以通过以下进行用于比较的序列的最优比对:Smith and Waterman, Add. APL. Math 2:482 (1981) 的局部同一性算法、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970) 的同一性比对算法、Pearson and Lipman, Proc. Nat’l Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) 的相似性方法搜索、这些算法的计算机实现 (Wisconsin Genetics Software Package 中的 GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) 或检查。

[0152] 适于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的一个优选实例是 BLAST 和 BLAST2.0 算法,其分别描述于 Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389–3402 (1977) 和 Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403–410 (1990) 中。例如,可以利用本文所述的参数使用 BLAST 和 BLAST2.0,从而确定本发明多核苷酸和多肽的序列同一性百分比。通过美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 可以公开获得进行 BLAST 分析的软件。在一个示例性实例中,对于核苷酸序列,可以利用参数 M(一对配对残基的奖励分;总是 >0) 和 N(错配残基的罚分;总是 <0) 计算累积评分。在以下情况时停止每个方向的字符命中延伸:当累积比对评分从其最大获取值下降量 X 时;由于一个或

多个负评分残基比对的累积而使累积评分达到 0 或低于 0 时;或达到任一序列的末端时。BLAST 算法参数 W、T 和 X 决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN 程序(核苷酸序列的)使用以下作为默认值:字长(W)为 11、期望值(E)为 10、BLOSUM62 评分矩阵(参见 Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA89:10915(1989)) 比对、(B) 为 50、期望值(E)为 10、M=5、N=-4,以及两条链的比较。

[0153] 在某些实施方案中,通过在至少 20 个位置的比较窗口中比较两个最优比对的序列来确定“序列同一性百分比”,其中,与用于两条序列最优比对的参照序列(其不包含添加或缺失)相比,比较窗口中的多核苷酸序列部分可以包含 20% 或更少的,通常为 5%-15% 或 10%-12% 的添加或缺失(即,空位)。通过以下来计算百分比:确定两条序列中存在相同核酸碱基的位置数量来产生配对位置数,将配对位置数除以参照序列中(即窗口的大小)的位置总数,并且将结果乘以 100 以产生序列同一性的百分比。

[0154] 本领域技术人员应当理解,由于遗传密码的简并性,有很多核苷酸序列编码本文所述的多肽。这些多核苷酸中的一些与任何天然基因的核苷酸序列具有最小的同源性。虽然如此,本发明特别考虑到由于密码子使用中的差异而不同的多核苷酸。此外,包含本文提供的多核苷酸序列的基因的等位基因包括在本发明范围内。等位基因是由于一个或多个诸如核苷酸的缺失、添加和/或取代的突变而改变的内源基因。所得到的 mRNA 和蛋白可以,但不必,具有改变的结构或功能。可以用标准技术鉴定等位基因(例如杂交、扩增和/或数据库序列比较)。

[0155] 因此,在本发明的另一实施方案中,诸如定点诱变的诱变方法用于制备本文所述的多肽的变体和/或衍生物。通过该方法,可以通过诱变编码多肽序列的内在多核苷酸来在该多肽序列内产生特定的修饰。这些技术提供了制备和测试序列变体的直接方法,例如,通过在多核苷酸内引入一个或多个核苷酸序列改变来并入一种或多种上述情况。

[0156] 定点诱变允许通过使用编码所需突变的 DNA 序列的特定寡核苷酸序列以及足够数量的邻近核苷酸来产生突变体,该邻近核苷酸用于提供足够大小和序列复杂性从而在被跨越的缺失接合处的两侧形成稳定双螺旋的引物序列。可将突变用在选出的多核苷酸序列中以改善、改变、降低、修饰或以其它方式改变多核苷酸自身的性质,和/或改变所编码的多肽的性质、活性、组成、稳定性或一级序列。

[0157] 在本发明的某些实施方案中,本发明发明人考虑诱变所公开的多核苷酸序列以改变所编码多肽的一种或多种性质,如多肽疫苗的免疫原性。定点诱变技术是本领域内公知的,且广泛用于产生多肽和多核苷酸的变体。例如,定点诱变通常用于改变 DNA 分子的特定部分。在这样的实施方案中,使用通常包含长度为约 14 至约 25 个核苷酸左右的引物,其在待改变的序列的接合处的两侧均有约 5 至约 10 个残基。

[0158] 利用定点诱变制备编码所选肽的 DNA 区段的序列变体提供了产生可能有用的种类的方式,并且并不意欲具有限制意义,因为还有可以获得肽和编码肽的 DNA 序列的序列变体的其它方式。例如,可以用诸如羟胺的诱变剂处理编码所需肽序列的重组载体,从而获得序列变体。关于这些方法和方案的具体详情参见 Maloy et al., 1994; Segal, 1976; Prokop and Bajpai, 1991; Kuby, 1994; 以及 Maniatis et al., 1982 的教导,每一篇都通过引用并入本文用于该目的。

[0159] 在本发明的其它实施方案中,本文提供的多核苷酸序列可以有利地用作核酸杂交

的探针或引物,例如,用于诊断和 / 或监测个体中的癌症。由此,预期包含至少约 15 个核苷酸长度的连续序列的序列区,或由至少约 15 个核苷酸长度的连续序列的序列区组成的核酸区段将具有特定的功效,所述至少约 15 个核苷酸长度的连续序列与本文描述的 15 个核苷酸长度的连续序列具有相同的序列或互补。更长的连续的相同或互补序列,例如,约 20、30、40、50、100、200、500、1000 (包括所有中间长度) 的序列,甚至长达全长序列也被用在某些实施方案中。

[0160] 这样的核酸探针与目的序列特异性杂交的能力使得它们能够用于检测给定样品中互补序列的存在。然而,还能想象到其它用途,例如用于制备突变种类引物或在制备其它遗传构建体中使用的引物的序列信息的用途。

[0161] 具有由 10-14、15-20、30、50 个或者甚至为 100-200 个核苷酸左右 (也包括所有中间长度) 的连续核苷酸节段组成的序列区的多核苷酸分子特别预期用于例如在 Southern 和 Northern 印迹中使用的杂交探针,所述连续核苷酸节段与本文所述的多核苷酸序列相同或互补。这允许分析不同的细胞类型以及不同的细菌细胞中的基因产物或其片段。片段的总的大小,以及互补节段的大小将最终取决于特定核酸区段的预期用途或应用。较小的片段通常可用于杂交实施方案中,其中连续互补区的长度可以不同,例如为约 15 至约 100 个核苷酸,但是根据想要检测的互补序列的长度可以使用较大的连续互补节段。

[0162] 长度为约 15-25 个核苷酸的杂交探针的使用允许形成稳定并具有选择性的双螺旋分子。然而,在长度超过 15 个碱基的节段内具有连续互补序列的分子通常是优选的,以便增加杂合体的稳定性和选择性,从而改善所获得的特定杂合分子的质量和程度。通常偏爱设计具有 15 至 25 个连续核苷酸(或如果需要甚至更长)的基因互补节段的核酸分子。

[0163] 杂交探针可以从本文所述的任何序列的任何部分进行挑选。所需要的是审查想要作为探针或引物的、从约 15-25 个核苷酸长度直到包括全长序列的序列。探针和引物序列的选择受本领域内已知的和确立的多种因素的影响。

[0164] 小的多核苷酸区段或片段可以通过,例如利用化学方法直接合成片段来方便地制备,该方法通常用自动化的寡核苷酸合成仪实施。同样,片段可以通过以下来获得:应用核酸复制技术,如美国专利 4,683,202 (通过引用并入本文) 的 PCR™ 技术、将选出的序列引入用于重组制造的重组载体中,以及分子生物学领域技术人员通常已知的其它重组 DNA 技术。

[0165] 可以使用本发明的核苷酸序列与目的基因或基因片段的互补节段选择性形成双螺旋分子的能力。取决于预期应用,通常希望利用不同的杂交条件来实现探针对靶序列的不同程度的选择性。对于需要高选择性的应用,通常希望利用相对严格的条件来形成杂合体,例如,将选择相对低盐和 / 或高温的条件,诸如约 50°C 至约 70°C 温度下约 0.02M 至约 0.15M 盐的盐浓度所提供的条件。这样的选择性条件容忍探针和模板或靶链之间很少的(如果有的话)错配,并且将特别适合于分离相关的序列。

[0166] 当然,对于一些应用,例如,如果希望利用与潜在的模板杂交的突变引物链来制备突变体,通常需要较少严格性(减少的严格性)的杂交条件以便允许异源双螺旋的形成。在这些情况下,可能希望利用诸如约 20°C 至约 55°C 的温度下约 0.15M 至约 0.9M 盐的盐条件。交叉杂交种类进而可被容易地鉴定为相对于对照杂交的阳性杂交信号。在任何情况下,通常应当理解,可以通过加入越来越多量的甲酰胺而使条件更严格,甲酰胺用来以与升高温度

度相同的方式破坏杂合双螺旋的稳定性。因此,可容易地操纵杂交条件,并且其通常是依赖所需的结果进行选择的方法。

[0167] 按照本发明的另一实施方案,提供包含反义寡核苷酸的多核苷酸组合物,用于本文的组合物和方法。反义寡核苷酸已被证实是蛋白合成的有效和靶向抑制剂,并因而提供了通过抑制影响疾病的蛋白的合成来治疗该疾病的一种方法。反义寡核苷酸抑制蛋白合成的效力早已确立。例如,多聚半乳糖醛酸酶和 2 型蕈毒碱乙酰胆碱受体的合成受到针对其各自 mRNA 序列的反义寡核苷酸的抑制(美国专利 5,739,119 和美国专利 5,759,829)。此外,反义抑制的实例已用核蛋白细胞周期蛋白、多药耐药基因(MDG1)、ICAM-1、E-选择蛋白、STK-1、纹状体 GABAA 受体和人 EGF 证实(Jaskulski et al., Science 1988 Jun 10; 240(4858):1544-6; Vasanthakumar and Ahmed, Cancer Commun. 1989; 1(4):225-32; Peris et al., Brain Res Mol Brain Res. 1998 Jun 15; 57(2):310-20; 美国专利 5,801,154; 美国专利 5,789,573; 美国专利 5,718,709 和美国专利 5,610,288)。还描述了抑制且能够用于治疗多种异常的细胞增殖,例如癌症的反义构建体(美国专利 5,747,470; 美国专利 5,591,317 和美国专利 5,783,683)。

[0168] 因此,在某些实施方案中,本发明提供了这样的寡核苷酸序列,其包含能特异性结合本文所述的多核苷酸的任何序列或其互补物的全部或一部分。在一个实施方案中,反义寡核苷酸包含 DNA 或其衍生物。在另一个实施方案中,寡核苷酸包含 RNA 或其衍生物。在另一个实施方案中,寡核苷酸是包含经硫代磷酸修饰的主链的修饰的 DNA。在另一个实施方案中,寡核苷酸序列包含肽核酸或其衍生物。在每种情况中,示例性的组合物包含与本文所述的多核苷酸的一个部分或多个部分互补的,更优选基本上互补的,甚至更优选完全互补的序列区。给定基因序列特异的反义组合物的选择基于所选的靶序列的分析以及二级结构、 T_m 、结合能和相对稳定性的测定。反义组合物可以基于其相对的不能在宿主细胞内形成以下的能力进行选择:二聚体、发夹或将降低或阻止与靶 mRNA 特异性结合的其它二级结构。高度优选的 mRNA 靶区是位于 AUG 翻译起始密码子处或附近的序列,以及与 mRNA 的 5' 区基本上互补的那些序列。例如,利用 OLIGO v. 4 引物分析软件和 / 或 BLASTN2.0.5 算法软件(Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997, 25(17):3389-402)进行这些二级结构分析和靶位点选择考虑。

[0169] 根据本发明的另一实施方案,本文所述的多核苷酸组合物在设计和制备核酶分子中使用,所述核酶分子在用于抑制本发明的肿瘤多肽和蛋白在肿瘤细胞中表达的组合物和方法中使用。核酶是以位点特异性方式切割核酸的 RNA-蛋白复合物。核酶具有特异的催化结构域,该结构域具有核酸内切酶活性(Kim and Cech, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987 Dec; 84(24):8788-92; Forster and Symons, Cell. 1987 Apr 24; 49(2):211-20)。例如,大量的核酶加速具有高度特异性的磷酸酯转移反应,通常仅切割寡核苷酸底物中数个磷酸酯中的一个(Cech et al., Cell. 1981 Dec; 27(3Pt2):487-96; Michel and Westhof, J Mol Biol. 1990 Dec 5; 216(3):585-610; Reinhold-Hurek and Shub, Nature. 1992 May 14; 357(6374):173-6)。该特异性归因于底物必须在化学反应之前通过与核酶的内部前导序列(“IGS”)的特异性碱基配对相互作用进行结合。

[0170] 酶促 RNA 能够在生理条件下反式催化 RNA 磷酸二酯键的水解(并因此能够切割其它 RNA 分子)。通常,酶促核酸通过首先结合靶 RNA 起作用。这样的结合通过酶促核酸的靶

标结合部分发生,所述靶标结合部分被容纳于极为贴近该分子的起切割靶 RNA 作用的酶促部分的位置。因此,酶促核酸首先识别,然后通过互补的碱基配对结合靶 RNA,并且一旦结合到正确的位点,即酶促切割该靶 RNA。这样的靶 RNA 的巧妙切割将破坏其指导编码蛋白合成的能力。在酶促核酸结合并切割其 RNA 靶标之后,该酶促核酸从该 RNA 释放以搜寻另一靶标,并能够重复结合和切割新的靶标。

[0171] 核酶的酶促性质相比很多技术如反义技术(其中核酸分子简单地结合核酸靶标以阻止其翻译)是有优势的,因为影响治疗性处理所需的核酶的浓度低于反义寡核苷酸的浓度。该优势反映核酶起酶促作用的能力。因此,单个核酶分子能够切割很多靶 RNA 分子,此外,核酶是高度特异的抑制剂,抑制的特异性不仅取决于结合靶 RNA 的碱基配对机制,还取决于靶 RNA 切割的机制。切割位点附近的单个错配或碱基取代能够完全消除核酶的催化活性。反义分子中相似的错配不妨碍其作用(Woolf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992Aug15;89(16):7305-9)。因此,核酶作用的特异性大于反义寡核苷酸结合相同 RNA 位点的特异性。

[0172] 酶促核酸分子可以在锤头、发夹、丁型肝炎病毒、I 组内含子或 RNaseP RNA(与 RNA 前导序列相关)或脉孢菌 VS RNA 基序内形成。锤头基序的实例由 Rossi et al. Nucleic Acids Res. 1992Sep11;20(17):4559-65 描述;发夹基序的实例由 Hampel et al. (Eur. Pat. Appl. Publ. No. EP0360257), Hampel and Tritz, Biochemistry 1989Jun13;28(12):4929-33;Hampel et al., Nucleic Acids Res. 1990Jan25;18(2):299-304 和美国专利 5,631,359 描述;丁型肝炎病毒基序的实例由 Perrotta and Been, Biochemistry. 1992Dec1;31(47):11843-52 描述;RNaseP 基序的实例由 Guerrier-Takada et al., Cell. 1983Dec;35(3Pt2):849-57 描述;脉孢菌 VS RNA 核酶基序由 Collins(Saville and Collins, Cell. 1990May18;61(4):685-96;Saville and Collins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88(19):8826-30(Oct11991);Collins and Olive, Biochemistry 32(11):2795-9(Mar231993) 描述;并且 I 组内含子的实例描述于(美国专利 4,987,071)中。在本发明的酶促核酸分子中重要的是,其具有与一个或多个靶基因 RNA 区互补的特异性的底物结合位点,以及其在该底物结合位点内或附近具有赋予该分子 RNA 切割活性的核苷酸序列。因此,核酶构建体不必受限于本文提到的具体基序。

[0173] 核酶可以按如国际专利申请公开第 W093/23569 号和国际专利申请公开第 W094/02595 号(每一篇都通过引用具体并入本文)中所描述的进行设计,并合成用来如所述进行体外和体内测试。还可以优化此类核酶用于递送。尽管提供了具体的实例,但本领域技术人员应当认识到,当需要的时候可以使用其它物种中等同的 RNA 靶标。

[0174] 在本发明的另一个实施方案中,提供了肽核酸(PNA)组合物。PNA 是其中核碱基与伪肽主链连结的 DNA 模拟物(Good and Nielsen, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 19977(4)431-37)。PNA 能够用于传统上使用 RNA 或 DNA 的很多方法中。通常,PNA 序列在技术上比对应的 RNA 或 DNA 序列表现更好,并且具有非 RNA 或 DNA 固有的功效。一篇包括制备方法、表征和使用方法的 PNA 的综述由 Corey(Trends Biotechnol 15(6):224-9(Jun1997)) 提供。由此,在某些实施方案中,可以制备与 ACE mRNA 序列的一个部分或多个部分互补的 PNA 序列,并且这样的 PNA 组合物可以用于调控、改变、减少或降低 ACE 特异性 mRNA 的翻译,并由此改变已给予这样的 PNA 组合物的宿主细胞中

ACE 活性的水平。

[0175] PNA 具有替代 DNA 正常磷酸二酯主链的 2-氨基-甘氨酸连接 (Nielsen et al., Science 254(5037):1497-500 (Dec 6 1991); Hanvey et al., Science 258(5087):1481-5 (Nov 27 1992); Hyrup and Nielsen, Bioorg. Med. Chem. 4(1):5-23 (Jan 1996)。该化学性质具有三个重要的影响:第一,与 DNA 或硫代磷酸寡核苷酸相比, PNA 是中性分子;第二, PNA 是非手性的,这避免了开发立体选择性合成的需求;以及第三, PNA 合成使用固相肽合成的标准 Boc 或 Fmoc 方案,尽管可以使用其它方法,包括改良的 Merrifield 方法。

[0176] PNA 单体或现成的寡聚体可从 PerSeptive Biosystems (Framingham, MA) 商购获得。通过 Boc 或 Fmoc 方案的 PNA 合成利用手动或自动方案是明确的 (Norton et al., Bioorg. Med. Chem. 3(4):437-45 (Apr 1995))。手动方案适合制造经化学修饰的 PNA 或同时合成密切相关的 PNA 家族。

[0177] 与肽合成一样,特定 PNA 合成的成功将取决于所选序列的性质。例如,尽管理论上, PNA 能够并入核苷酸碱基的任何组合,但是邻近的嘌呤的存在可导致产物中一个或多个残基的缺失。预期到这种困难,建议在产生具有邻近嘌呤的 PNA 的过程中,应当重复偶联可能被低效添加的残基。这之后应该通过反相高压液相色谱法纯化 PNA,这提供了与肽合成过程中所观察到的相似的产品产量和纯度。

[0178] 对于给定的应用, PNA 的修饰可以通过在固相合成过程中偶联氨基酸或通过含羧基的化合物连接至暴露的 N-端胺来实现。可选择地, PNA 可以在合成之后通过偶联至引入的赖氨酸或半胱氨酸来修饰。PNA 能被修饰的便利性促进了为更好的溶解性或特定的功能需求而进行的优化。一旦合成, PNA 及其衍生物的身份可以通过质谱法确认。数项研究已进行和利用了 PNA 的修饰 (例如, Norton et al., Bioorg Med Chem 3(4):437-45 (Apr 1995); Petersen et al., J Pept Sci 1(3):175-83 (May-Jun 1995); Orum et al., Biotechniques 19(3):472-80 (Sep 1995); Footer et al., Biochemistry. 1996 Aug 20; 35(33):10673-9; Griffith et al., Nucleic Acids Res 23(15):3003-8 (Aug 11 1995); Pardridge et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92(12):5592-6 (Jun 6 1995); Boffa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92(6):1901-5 (Mar 14 1995); Gambacorti-Passerini et al., Blood 88(4):1411-7 (Aug 15 1996); Armitage et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94(23):12320-5 (Nov 11 1997); Seeger et al., Biotechniques 23(3):512-7 (Sep 1997))。美国专利第 5,700,922 号论述了 PNA-DNA-PNA 嵌合分子及其在诊断、调控有机体中的蛋白和治疗对疗法敏感的疾病状况中的用途。

[0179] 表征 PNA 的反义结合性质的方法在 Rose (Anal Chem 65(24):3545-9 (Dec 15 1993) 和 Jensen et al. (Biochemistry. 1997 Apr 22; 36(16):5072-7) 中有论述。Rose 使用毛细管凝胶电泳来测定 PNA 与其互补寡核苷酸的结合,测量了相对结合动力学和化学计量学。类似的测量类型由 Jensen 等人利用 BIAcore™ 技术进行。

[0180] PNA 的已描述的且是本领域技术人员显而易见的其它应用包括用于:DNA 链侵入、反义抑制、突变分析、转录增强子、核酸纯化、转录活性基因的分离、转录因子结合的阻断、基因组切割、生物传感器、原位杂交等。

[0181] 多核苷酸鉴定、表征和表达

[0182] 可以利用多种早已建立的技术中的任何一种进行本发明的多核苷酸 (和多肽)

组合物的鉴定、制备和 / 或操纵 (通常参见, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989 以及其它类似的参考文献)。

[0183] 很多模板依赖的方法可用于扩增样品中存在的目的靶序列。一种最知名的扩增方法是聚合酶链式反应 (PCRTM), 其在美国专利第 4, 683, 195 号、第 4, 683, 202 号和第 4, 800, 159 号中有详细描述, 每一篇都通过引用全文并入本文。简单而言, 在 PCRTM 中, 制备两种引物序列, 该引物序列与靶序列的相对的互补链上的区域互补。将过量的脱氧核苷三磷酸连同 DNA 聚合酶 (例如, Taq 聚合酶) 一起加入到反应混合物中。如果样品中存在靶序列, 引物将与该靶标结合, 并且聚合酶将促使引物通过增加核苷酸而沿着靶序列延伸。通过升高和降低反应混合物的温度, 延长的引物将从靶标解离, 从而形成反应产物, 过量的引物将结合靶标和反应产物, 并重复该过程。优选地, 为了对所扩增的 mRNA 的量进行定量, 可以进行逆转录和 PCRTM 扩增方案。聚合酶链式反应方法是本领域内公知的。

[0184] 多种其它模板依赖性的方法 (当中的很多是 PCRTM 扩增技术的变型) 中的任何一种都是容易了解且是本领域内可获取的。举例来说, 一些这样的方法包括, 例如描述于欧洲专利申请公开第 320, 308 号和美国专利第 4, 883, 750 号中的连接酶链式反应 (称为 LCR); PCT 国际专利申请公开第 PCT/US87/00880 号中描述的 Q β 复制酶链式反应; 链置换扩增 (SDA) 和修复链反应 (RCR)。其它扩增方法描述于英国专利申请第 2202328 号和 PCT 国际专利申请公开第 PCT/US89/01025 号中。其它核酸扩增方案包括基于转录的扩增系统 (TAS) (PCT 国际专利申请公开第 W088/10315 号), 包括基于核酸序列的扩增 (NASBA) 和 3SR。欧洲专利申请公开第 329, 822 号描述了涉及循环合成单链 RNA (“ssRNA”)、ssDNA 和双链 DNA (dsDNA) 的核酸扩增方法。PCT 国际专利申请公开第 W089/06700 号描述了基于启动子 / 引物序列与目标单链 DNA (“ssDNA”) 杂交, 随后转录出序列的很多 RNA 拷贝的核酸序列扩增方案。其它扩增方法如 “RACE” (Frohman, 1990) 和 “单边 PCR” (Ohara, 1989) 也是本领域技术人员公知的。

[0185] 利用公知的技术, 本发明多核苷酸的扩增的部分可以用于从合适的文库 (例如, 肿瘤 cDNA 文库) 分离全长基因。在这类技术中, 利用适合于扩增的一种或多种多核苷酸探针或引物筛查文库 (cDNA 或基因组)。优选地, 对文库进行大小选择以包括较大的分子。随机引物文库也是鉴定基因的 5' 区和上游区所优选的。基因组文库是获得内含子和延伸 5' 序列所优选的。

[0186] 对于杂交技术, 可以利用公知的技术标记 (例如, 通过利用 ³²P 缺口平移或末端标记) 部分序列。然后, 通过用标记的探针杂交含有变性细菌集落的滤膜 (或含有噬菌斑的菌苔 (lawn)) 来筛查细菌或噬菌体文库 (参见 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。选择并扩增杂交的集落或噬菌斑, 并分离 DNA 用于进一步的分析。可以分析 cDNA 克隆以通过, 例如利用来自部分序列的引物和来自载体的引物的 PCR 测定其余序列的量。可以生成限制性谱图和部分序列, 以鉴定一个或多个重叠的克隆。然后, 可以利用标准技术测定完整的序列, 其可包括产生一系列缺失的克隆。得到的重叠的序列随后可以被组装成单个连续的序列。全长 cDNA 分子可以通过利用公知的技术连接合适的片段来产生。

[0187] 如本领域技术人员所理解的, 在一些情况下, 产生具有非天然存在的密码子的编

码多肽的核苷酸序列是有利的。例如,可以选择特定原核或真核宿主优选的密码子以增加蛋白表达速率或产生具有所需特性的重组 RNA 转录本,所述所需特性例如半衰期长于从天然存在序列产生的转录本的半衰期。

[0188] 而且,可以使用本领域内公知的方法改造本发明的多核苷酸序列,从而为了多种原因改变多肽编码序列的多核苷酸,包括但不限于修饰基因产物的克隆、加工和 / 或表达的改变。例如,通过基因片段和合成的寡核苷酸的随机片段化和 PCR 组装进行的 DNA 改组 (DNA shuffling) 可以用于改造核苷酸序列。此外,定点诱变可用于插入新的限制位点、改变糖基化模式、改变密码子偏爱性、产生剪接变体或引入突变等。

[0189] 利用本领域内公知的化学方法可以全部或部分合成编码所需多肽的序列 (参见 Caruthers, M. H. et al. (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-223, Horn, T. et al. (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232)。可选择地,蛋白自身可以利用合成多肽或其一部分的氨基酸序列的化学方法来产生。例如,肽合成可以利用多种固相技术进行 (Roberge, J. Y. et al. (1995) Science 269:202-204), 并且自动化合成可以例如利用 ABI431A 肽合成仪 (Perkin Elmer, Palo Alto, CA) 来实现。

[0190] 新合成的肽通过以下方法可以基本上得到纯化:制备性高效液相色谱法 (例如, Creighton, T. (1983) Proteins, Structures and Molecular Principles, WH Freeman and Co., New York, N. Y.) 或本领域内可用的其它相当的技术。合成的肽的组成可以通过氨基酸分析或测序 (例如, Edman 降解方案) 来确认。此外,多肽或其任何部分的氨基酸序列可以在直接合成过程中改变,和 / 或利用化学方法与来自其它蛋白或其任何部分的序列组合以产生变体多肽。

[0191] 为了表达所需的多肽,可以将编码多肽的核苷酸序列或功能等同物插入合适的表达载体中,即包含插入的编码序列转录和翻译所必需的元件的载体。可以用本领域技术人员公知的方法构建含有编码目的多肽的序列和合适的转录和翻译控制元件的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、合成技术,以及体内遗传重组。这些技术描述于例如, Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y., 和 Ausubel, F. M. et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N. Y.

[0192] 多种表达载体 / 宿主系统可以用来包含和表达多核苷酸序列。这些表达载体 / 宿主系统包括但不限于,诸如用重组噬菌体、质粒或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌的微生物;用酵母表达载体转化的酵母;用病毒表达载体 (例如,杆状病毒) 感染的昆虫细胞系统;用病毒表达载体 (例如,花椰菜花叶病毒, CaMV; 烟草花叶病毒, TMV) 或用细菌表达载体 (例如, Ti 或 pBR322 质粒) 转化的植物细胞系统;或动物细胞系统。

[0193] 表达载体中存在的“控制元件”或“调节序列”是与宿主细胞蛋白相互作用来进行转录和翻译的载体的那些非翻译区 (增强子、启动子、5' 和 3' 非翻译区)。这些元件在它们的强度和特异性上可以不同。根据所用的载体系统和宿主,可以使用任何数量的合适的转录和翻译元件,包括组成型启动子和诱导型启动子。例如,当在细菌系统内克隆时,可以使用诱导型启动子,例如 pBLUESCRIPT 噬菌粒 (Stratagene, La Jolla, Calif.) 或 pSPORT1 质粒 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 的杂合 lacZ 启动子等。在哺乳动物细胞系统中,通常优选来自哺乳动物基因或来自哺乳动物病毒的启动子。如果生成包含编码多肽的序列的多

个拷贝的细胞系是必需的,则基于 SV40 或 EBV 的载体可以有利地与适当的选择标志物一起使用。

[0194] 在哺乳动物宿主细胞中,通常可利用多种基于病毒的表达系统。例如,在腺病毒用作表达载体的情况下,可以将编码目的多肽的序列连接入由晚期启动子和三联体前导序列组成的腺病毒转录/翻译复合物中。插入到病毒基因组的非必需 E1 或 E3 区中可以用于获得能够在感染的宿主细胞中表达多肽的活病毒 (Logan, J. and Shenk, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659)。此外,转录增强子,如劳斯肉瘤病毒 (RSV) 增强子可用于增加在哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0195] 也可以使用特定的起始信号来实现编码目的多肽的序列的更高效的翻译。这些信号包括 ATG 起始密码子和邻近的序列。如果将编码多肽的序列、其起始密码子和上游序列插入合适的表达载体中,则不需要其它的转录或翻译控制信号。然而,如果仅将编码序列或其一部分插入,则应该提供包括 ATG 起始密码子在内的外源翻译控制信号。此外,起始密码子应该在正确的读码框中以确保全部插入物的翻译。外源翻译元件和起始密码子可以是不同来源的,可以是天然的或合成的。可以通过包含适于所用的特定细胞系统的增强子来增加表达效率,诸如文献 (Scharf, D. et al. (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162) 中描述的那些增强子。

[0196] 此外,可以基于宿主细胞株调节插入的序列的表达或以所需的方式加工所表达的蛋白的能力来选择宿主细胞株。多肽的这些修饰包括但不限于,乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂质化和酰基化。切割“前原 (prepro)”形式的蛋白的翻译后加工也可以被用来促进正确的插入、折叠和/或功能。可以选择诸如 CHO、COS、HeLa、MDCK、HEK293 和 WI38 的、对这类翻译后活性具有特异性的细胞体系和特征机制的不同宿主细胞,以确保外来蛋白的正确修饰和加工。

[0197] 为了长期、高产量化地产生重组蛋白,通常优选稳定的表达。例如,可以用表达载体转化稳定表达目的多核苷酸的细胞系,所述表达载体可以在同一载体或分别的载体上含有病毒复制起点和/或内源表达元件以及选择标记基因。引入载体后,在将细胞转至选择培养基之前,可以允许细胞在富集培养基中生长 1-2 天。选择标记的目的是赋予对选择的抗性,并且选择标记的存在允许成功表达引入的序列的细胞生长和恢复。可以用适合该细胞类型的组织培养技术增殖稳定转化的细胞的抗性克隆。

[0198] 可以用任何数目的选择系统来恢复转化的细胞系。这些选择系统包括,但不限于,可以分别用于 tk. sup. - 或 aprt. sup. - 细胞中的单纯疱疹病毒胸苷激酶 (Wigler, M. et al. (1977) *Cell* 11:223-32) 和腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (Lowy, I. et al. (1990) *Cell* 122:817-23)。另外,抗代谢物、抗生素或除草剂抗性可以用作选择的基础;例如,提供甲氨蝶呤抗性的 dhfr (Wigler, M. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3567-70);提供对氨基糖苷类、新霉素和 G-418 抗性的 npt (Colbere-Garapin, F. et al (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14);以及分别提供对氯磺隆和草丁膦 (phosphinotricin) 乙酰转移酶的抗性的 als 或 pat (Murry, 同上)。还描述了其它选择基因,例如 trpB (其允许细胞利用吡啶来替代色氨酸) 或 hisD (其允许细胞利用组氨醇来替代组氨酸) (Hartman, S. C. and R. C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:8047-51)。使用可见的标志物已获得普及,这样的标志物如花青素、 β -葡萄糖苷酸酶及其底物 GUS,以及荧光素酶及其底物荧光素已广

泛使用,不仅用来鉴定转化子,还用于对可归因于特定载体系统的瞬时或稳定的蛋白表达的量进行定量 (Rhodes, C. A. et al. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131)。

[0199] 可选择地,含有并表达所需多核苷酸序列的宿主细胞可以通过本领域技术人员已知的多种方案来鉴定。这些方案包括但不限于 DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交以及蛋白生物测定或免疫测定技术,其包括例如用于检测和 / 或定量核酸或蛋白的基于膜、溶液或芯片的技术。

[0200] 用于检测和测量多核苷酸编码的产物的表达的多种方案是本领域已知的,所述方案利用对所述产物具有特异性的多克隆或单克隆抗体。实例包括酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射免疫测定 (RIA) 和荧光活化的细胞分选 (FACS)。双位点的、基于单克隆的免疫测定 (其利用与给定多肽上的两个非干扰表位起反应的单克隆抗体) 对于一些应用可以是优选的,但是也可以利用竞争结合测定。这些测定和其它测定被描述于包括 Hampton, R. et al. (1990; *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, Minn.) 和 Maddox, D. E. et al. (1983; *J. Exp. Med.* 158:1211-1216) 在内的其他地方。

[0201] 多种标记和缀合技术是本领域技术人员已知的,并且可以用于各种核酸和氨基酸测定中。制备用于检测多核苷酸相关序列的有标记的杂交或 PCR 探针的方法包括寡核苷酸 (oligolabeling) 标记、缺口平移、末端标记或利用标记的核苷酸的 PCR 扩增。可选择地,可以将序列或其任何部分克隆入载体中,用于产生 mRNA 探针。这类载体在本领域是已知的,并且可以商购,并且可以通过添加诸如 T7、T3 或 SP6 的合适的 RNA 聚合酶和标记的核苷酸来体外合成 RNA 探针。可以使用多种可商购的试剂盒进行这些步骤。可以使用的合适的报告分子或标记物包括放射性核素、酶、荧光剂、化学发光剂或显色剂以及底物、辅因子、抑制剂、磁性颗粒等。

[0202] 可以在适合从细胞培养物中表达和回收蛋白的条件下,培养用目的多核苷酸序列转化的宿主细胞。根据所用的序列和 / 或载体,重组细胞产生的蛋白可以是分泌的或包含在细胞内。如本领域技术人员所理解的,可以将包含本发明多核苷酸的表达载体设计为包含指导编码的多肽穿过原核生物或真核生物细胞膜分泌的信号序列。可以用其它的重组构造将编码目的多肽的序列连接至编码促进可溶蛋白纯化的多肽结构域的核苷酸序列。这样的纯化促进结构域包括但不限于,金属螯合肽如允许在固定的金属上纯化的组氨酸-色氨酸模块、允许在固定的免疫球蛋白上纯化的蛋白 A 结构域,以及在 FLAGS 延伸 / 亲和纯化系统 (Immunex Corp., Seattle, Wash.) 中使用的结构域。在纯化结构域和编码多肽之间并入可切割的接头序列如 XA 因子或肠激酶特异性的接头序列 (Invitrogen, San Diego, Calif.) 可用于促进纯化。一种这样的表达载体提供了含有目的多肽和编码 6 个组氨酸残基 (其位于硫氧还蛋白或肠激酶切割位点之前) 的核酸的融合蛋白的表达。组氨酸残基促进在 Porath, J. et al. (1992, *Prot. Exp. Purif.* 3:263-281) 中描述的 IMIAC (固定化金属离子亲和层析) 上的纯化,而肠激酶切割位点提供了从融合蛋白纯化所需多肽的方式。含有融合蛋白的载体的探讨在 Kroll, D. J. et al. (1993; *DNA Cell Biol.* 12:441-453) 中有提供。

[0203] 除了重组制造方法,还可以通过使用固相技术的直接肽合成来制造本发明的多肽及其片段 (Merrifield J. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154)。可以用手动技术或通过自动化来进行蛋白合成。例如,可以用 Applied Biosystems 的 431A 肽合成仪 (Perkin Elmer) 实现自动化合成。可选择地,不同的片段可以分别通过化学方式合成并利用化学方

法进行组合以制备全长分子。

[0204] T 细胞组合物

[0205] 在另一方面,本发明提供了本文公开的癌症相关的多肽(例如,癌因子)或其变体或衍生物或片段特异性的 T 细胞。这样的细胞通常可以利用标准方案体外或离体制备。例如,利用可商购的细胞分离系统,如可从 Nexell Therapeutics, Inc. (Irvine, CA; 还参见美国专利第 5,240,856 号;美国专利第 5,215,926 号;W089/06280;W091/16116 以及 W092/07243) 购得的 Isolex™ 系统,可以从患者的骨髓、外周血或骨髓或外周血的一部分分离 T 细胞。可选择地, T 细胞可来源于相关的或不相关的人、非人哺乳动物、细胞系或培养物。

[0206] 可以用癌症相关的多肽、编码多肽的多核苷酸和 / 或表达此类多肽的抗原呈递细胞 (APC) 刺激 T 细胞。此类刺激在一定的条件下进行并持续足以允许目的多肽特异性的 T 细胞产生的时间。优选地,本发明的肿瘤多肽或多核苷酸存在于递送介质如微球体中,以促进特异性 T 细胞的产生。

[0207] 如果 T 细胞特异性地增殖、分泌细胞因子或杀伤包被有本发明多肽或表达编码所述多肽的基因的靶细胞,则认为 T 细胞是所述多肽特异性的。T 细胞特异性可以利用多种标准技术中的任何一种评估。例如,在铬释放分析或增殖分析中,与阴性对照相比,裂解和 / 或增殖增加超过两倍的刺激指数指示 T 细胞特异性。此类测定可以,例如按如 Chen et al., Cancer Res. 54:1065-1070, 1994 中所述进行。可选择地, T 细胞增殖的检测可以通过多种已知的技术完成。例如, T 细胞增殖可以通过测量增加的 DNA 合成速率来检测(例如,通过脉冲标记的具有氟化胸腺嘧啶的 T 细胞培养物,并测量并入 DNA 中的氟化胸腺嘧啶的量)。用肿瘤多肽 (100ng/ml - 100 μg/ml, 优选 200ng/ml - 25 μg/ml) 接触 3-7 天通常将导致 T 细胞增殖增加至少两倍。按如上所述接触 2-3 小时应当导致 T 细胞活化(如利用标准细胞因子测定所测量的),其中细胞因子(例如, TNF 或 IFN-γ) 释放水平增加两倍指示 T 细胞活化(参见 Coligan et al., Current Protocols in Immunology, vol.1, Wiley Interscience (Green 1998))。响应肿瘤多肽、多核苷酸或表达多肽的 APC 而活化的 T 细胞可以是 CD4⁺ 和 / 或 CD8⁺。肿瘤多肽特异性 T 细胞可以利用标准技术扩增。在某些实施方案中, T 细胞来源于患者(相关的供体或不相关的供体),并在刺激和扩增之后给予该患者。

[0208] 为了治疗目的,响应肿瘤多肽、多核苷酸或 APC 而增殖的 CD4⁺ 或 CD8⁺ T 细胞能够在体外或体内实现数量上的扩增。此类 T 细胞的体外增殖可以以多种方式实现。例如,可以在加入或未加入 T 细胞生长因子如白介素 -2 和 / 或合成肿瘤多肽的刺激细胞的情况下,将 T 细胞再次暴露于肿瘤多肽,或对应于该类多肽的免疫原性部分的短肽。可选择地,一种或多种在存在肿瘤多肽的情况下能够增殖的 T 细胞通过克隆可以在数量上扩增。克隆细胞的方法是本领域内公知的,且包括有限稀释法。

[0209] T 细胞受体 (TCR) 由两个不同的、高度变异的多肽链组成,这两条链称为多肽 T-细胞受体 α 链和 β 链,通过二硫键连接 (Janeway, Travers, Walport. Immunobiology. Fourth Ed., 148-159. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing. 1999)。α / β 异二聚体以不变的 CD3 链复合于细胞膜上。该复合物识别与 MHC 分子结合的特异性抗原肽。TCR 特异性的高度多样化很类似免疫球蛋白的多样化,通过体细胞基因重排产生。β 链基因含有超过 50 个可变区段 (V)、2 个多变区段 (D)、超过 10 个连接区段 (J) 和 2 个恒定区段 (C)。α

链基因含有超过 70 个 V 区段和超过 60 个 J 区段但无 D 区段, 以及一个 C 区段。在胸腺内 T 细胞发育的过程中, 发生 β 链的 D 至 J 的基因重排, 随后为 V 基因区段至 DJ 的重排。该功能性的 VDJ β 外显子被转录并剪接, 从而连接至 C β 。对于 α 链, V α 基因区段重排至 J α 基因区段以产生功能性外显子, 该外显子随后被转录并剪接至 C α 。在重组过程中通过在 b 链的 V、D 和 J 区段之间以及 α 链的 V 和 J 区段之间随机添加 P 和 N- 核苷酸, 多样性被进一步增加 (Janeway, Travers, Walport. Immunobiology. Fourth Ed., 98 and 150. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing. 1999)。

[0210] 在另一方面, 本发明提供了本文公开的癌症相关的多肽或其变体或衍生物特异性的 TCR。根据本发明, 提供了 T 细胞受体的 α 和 β 链的 V-J 或 V-D-J 接合区或其一部分的多核苷酸和氨基酸序列, 所述 T 细胞受体能够识别本文所述的肿瘤多肽。通常, 本发明的这一方面涉及能够识别或结合存在于 MHC 环境中的肿瘤多肽的 T 细胞受体。在优选的实施方案中, 由 T 细胞受体识别的肿瘤抗原包含本发明的多肽。例如, 可以利用标准分子生物学和重组 DNA 技术, 从肿瘤多肽特异性的 T 细胞分离编码肿瘤肽特异性的 TCR 的 cDNA。

[0211] 本发明还包括与本发明的识别或结合肿瘤多肽的 T 细胞受体具有基本相同的功能或活性的 T 细胞受体或其类似物。此类受体包括但不限于, 所述受体的片段, 或本文提供的 T 细胞受体的取代、添加或缺失突变体。本发明还包括与本文提供的 T 细胞受体基本上同源的或保留基本相同的活性的多肽或肽。术语“类似物”包括具有与本文提供的 T 细胞受体基本相同的氨基酸残基序列的任何蛋白或多肽, 其中一个或多个残基, 优选不超过 5 个残基, 更优选不超过 25 个残基已被功能相似的残基保守取代, 并且所述蛋白或多肽展现出本文所述的 T 细胞受体的功能方面。

[0212] 本发明还提供了合适的哺乳动物宿主细胞, 例如非特异性的 T 细胞, 其用编码本文所述的多肽特异性的 TCR 的多核苷酸转染, 从而致使该宿主细胞对于所述多肽具有特异性。TCR 的 α 和 β 链可以包含在单独的表达载体中, 或可选择地, 包含在还含有内部核糖体进入位点 (IRES) 的单个表达载体中, 所述内部核糖体进入位点 (IRES) 用于 IRES 下游基因的非帽依赖性翻译。所述表达多肽特异性的 TCR 的宿主细胞可以用于, 例如癌症的过继性免疫治疗, 如下文进一步论述的。

[0213] 在本发明的其它方面, 本文记载的多肽特异性的克隆 TCR 可以用于诊断癌症的试剂盒中。例如, 肿瘤特异性 TCR 的核酸序列或其一部分可以用作检测生物样品中编码特异性 TCR 的重排基因的表达的探针或引物。在该方面中, 本发明还提供了用于检测编码多肽特异性的 TCR 的信使 RNA 或 DNA 的测定。

[0214] 药物组合物和其它组合物

[0215] 本发明的药物组合物通常包含处于药学可接受的载体中的一种或多种癌症相关的抗体、多核苷酸、多肽、T 细胞或本文公开的 TCR 组合物, 其用于单独或与一种或多种其它其它治疗形式联合给予细胞或动物。

[0216] 应当理解的是, 如果需要, 本文公开的组合物还可以与其它试剂如其它蛋白或多肽或多种药物活性剂联合给予。事实上, 对还可以包含的其它组分几乎没有限制, 只要另外的试剂在与靶细胞或宿主组织接触时不引起明显的不良反应即可。因此, 在特定的情况下, 组合物可以按需要与多种其它试剂一起递送。此类组合物可以从宿主细胞或其它生物来源纯化, 或可选择地, 可以如本文所述通过化学方法合成。同样, 此类组合物还可以包含取代

的或衍生的 RNA 或 DNA 组分。

[0217] 因此,在本发明的另一方面,提供了这样的药物组合物,其包含与生理可接受的载体组合的一种或多种多核苷酸、多肽、抗体、TCR 和 / 或本文公开的 TCR 组合物。

[0218] 在一个实施方案中,本发明部分涉及包含针对本文公开的癌症相关的多肽或癌因子的一种或多种抗体的组合物。在本发明的具体实施方案中,组合物包含一种或多种纯化的癌因子抗体,并且组合物基本上不含内毒素,具有很少或没有聚集体形成,并且组合物的纯化分离的多肽在药学可接受的制剂中是可溶的。

[0219] 在一个实施方案中,本发明涉及包含具有至少一种纯化分离的针对癌因子的抗体的至少一种片段的组合物,其中所述抗体和组合物基本上不含内毒素,其中所述抗体具有很少或没有聚集体形成,其中所述抗体在治疗可接受的制剂中是可溶的,并且其中所述组合物基本上不含哺乳动物促炎剂。

[0220] 内毒素是与某些细菌,通常为革兰氏阴性细菌相关的毒素,尽管内毒素可以存在于革兰氏阳性细菌,如李斯特单核增生菌 (*Listeria monocytogenes*)。最普遍的内毒素为存在于多种革兰氏阴性细菌的外膜中的脂多糖类 (LPS) 或脂寡糖类 (LOS),并且其代表这些细菌能引起疾病的主要病原性特征。人体中少量的内毒素能引起发烧、血压降低、炎症和凝集的活化以及其它不良的生理反应。因此,从药物和药品容器中去掉大多数或所有痕量的内毒素通常是可取的,因为即使少量都可能在人体内引起不良反应。制备无内毒素的制剂可能需要特定的设备、专业人员,并且可能比制备不是无内毒素的制剂明显更贵。

[0221] 可以利用本领域内已知的常规技术检测内毒素。例如,利用鲎 (horseshoe crab) 血的鲎变形细胞裂解物 (*Limulus Ameobocyte Lysate*) 测定,是一种用于检测内毒素存在的非常灵敏的测定。在该测试中,非常低水平的 LPS 能够导致鲎裂解物的可检测的凝集,这由放大该反应的强大的酶促级联引起。内毒素还可以通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 定量。本文所用的术语“无内毒素”指组合物至多含有痕量 (即,对受试者没有不良生理反应的量) 的内毒素,并且优选含有检测不到的内毒素量。在一个实施方案中,术语“无内毒素”指组合物是至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 无内毒素的。在一个实施方案中,术语“无内毒素”指内毒素水平或内毒素概况可以小于约 0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.08、0.09、0.1、0.5、1.0、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9 或 10 内毒素单位 (EU)/ml 或 EU/mg。通常,1ng 脂多糖 (LPS) 对应于约 1-10EU。

[0222] 为了是基本上无内毒素的,内毒素水平或内毒素概况可以小于约 0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.08、0.09、0.1、0.5、1.0、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9 或 10EU/ml。

[0223] 在某些实施方案中,本发明部分涉及癌因子抗体,其包含的内毒素概况为每 mg 纯化的 CT-1 多肽小于约 50EU/mg、小于约 30EU/mg、小于约 25EU/mg、小于约 20EU/mg、小于约 15EU/mg、小于约 10EU/mg、小于约 8EU/mg、小于约 7EU/mg、小于约 6EU/mg、小于约 5EU/mg、小于约 4EU/mg、小于约 3EU/mg 小于约 2EU/mg、小于约 1.5EU/mg、小于约 1.4EU/mg、小于约 1.3EU/mg、小于约 1.2EU/mg、小于约 1.1EU/mg、小于约 1.0EU/mg、小于约 0.9EU/mg、小于约 0.8EU/mg、小于约 0.7EU/mg、小于约 0.6EU/mg、小于约 0.5EU/mg、小于约 0.4EU/mg、小于约 0.3EU/mg、小于约 0.2EU/mg、小于约 0.1EU/mg 或更少的内毒素单位。内毒素水平或概况可以在室温 (20°C -25°C) 或体温 (37°C) 下评估。

[0224] 本发明还提供了与现存抗体相比具有改善的稳定性的癌因子抗体。稳定性通常可以被定义为分子保持其折叠和活性状态的倾向。天然存在的分子通常具有有限的稳定性，因为其代谢，通常其快速的代谢是其在体内固有的作用机制的关键特征。

[0225] 通常，处于其折叠和天然结构的稳定的蛋白不能被蛋白酶或其它机制降解。这是由于稳定状态的两个切断通路，蛋白通常通过该通路在体内被清除。这两个通路就是去折叠和聚集。它们通常是相关联的。去折叠是使折叠的活性分子回复至更低折叠状态的通路。聚集是错误折叠的结果，从而使得分子不可逆地转变成非活性状态。去折叠和聚集大大增加了蛋白对蛋白水解或其它降解作用的敏感性。本发明提供了癌因子抗体的修饰的折叠和去折叠通路，从而使得产生的实体比并非通过本发明方法产生的癌因子抗体更加稳定。

[0226] 在具体的实施方案中，本发明提供了针对不可溶的蛋白聚集形成具有增加的稳定性的抗体组合物。本文所用的“蛋白聚集体”或“蛋白聚集”是指不再处于溶解状态的蛋白。尽管蛋白聚集体可以指两个或更多个单个蛋白分子的凝聚或寡聚，但是其不限于这样的定义。如本领域内所使用的，蛋白聚集体可以是可溶的或不可溶的。然而，为了本发明具体实施方案的目的，蛋白聚集体通常被认为是不可溶的，除非明确指出并非如此。不可溶的聚集体（根据本发明其形成应当在过程中被阻止），本质上被理解为大小为至少 $1\ \mu\text{m}$ ，但是还可以为超过 $10\ \mu\text{m}$ 的蛋白聚集体。可以利用商业粒子计数仪，诸如，例如来自 PSS 的粒子计数仪 AccuSizer700 (Particle Sizing Systems, USA) 或配备了 LD400 激光计数器的 Pacific Scientific HIAC Royco 液体粒子计数系统，型号 9703，通过合适的粒子计数方法测定粒子。根据 USP (美国药典)，每注射剂量的药物制剂允许大于 $10\ \mu\text{m}$ 的最多 6000 个粒子和大于 $25\ \mu\text{m}$ 的最多 600 个粒子。这可以根据本发明来实现，从而提供癌因子抗体的治疗组合物。

[0227] 在一个具体的实施方案中，包含一种或多种癌因子抗体的组合物针对通过以下诱导的聚集体形成具有增加的稳定性：一个或多个冷冻 / 解冻循环、搅动应力或一种或多种外部物理或化学应力，包括热应力、化学应力（例如，pH、低 / 高盐等）、流体应力（例如，压缩应力，诸如由通过收缩的开口的流体运动引起的应力）的非限制性实例。本文所用的“搅动应力”用来指被动或主动施加于组合物的任何物理运动。搅动应力的非限制性实例包括，碰撞、滴落、震动、打旋、涡旋、倾注、注入、取出（如从容器或器皿进入注射器）等。本发明的组合物对于航运和运输的力是特别稳定的。

[0228] 具有改善的稳定性的癌因子抗体在高于现存抗体 2-10 度的温度时可以保留 90% 的残留活性。可以通过常规的生化技术如 HPLC、SDS PAGE 或通过活性测定如结合测定或引发细胞应答，对残留（即，折叠的、具有活性的）蛋白的百分比进行测量。

[0229] 在具体的实施方案中，本发明涉及包含癌症相关的抗体的组合物，其中与并非根据本发明方法配制的现存抗体相比，所述抗体在约 37°C 时可稳定至少 6 小时、至少 7 小时、至少 8 小时、至少 9 小时、至少 10 小时、至少 11 小时、至少 12 小时、至少 15 小时、至少 18 小时、至少 21 小时、至少 24 小时、至少 48 小时或更久。

[0230] 术语“溶解性”指本文提供的试剂溶入液体溶剂并形成均质溶液的性质。溶解性通常通过每单位体积溶剂中溶质的质量（每 kg 溶剂中溶质的 g 数，g/dL (100mL)、mg/mL 等）、摩尔浓度、质量摩尔浓度、摩尔分数或其它类似的浓度描述表示为浓度。能够溶入每单位量溶剂中的溶质的最大平衡量为在特定的条件下该溶质在该溶剂中的溶解度，所述特定条件

包括温度、压力、pH 和溶剂的属性。在某些实施方案中,溶解度在生理 pH 下测量。在某些实施方案中,溶解度在水或诸如 PBS 的生理缓冲液中测量。在某些实施方案中,溶解度在诸如血液或血清的生物流体(溶剂)中测量。在某些实施方案中,温度可以为约室温(例如,约 20、21、22、23、24、25℃)或约体温(37℃)。在某些实施方案中,诸如本发明 CT-1 多肽的试剂在室温时(20℃-25℃)或 37℃时具有至少约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25 或 30mg/mL 的溶解度。

[0231] 蛋白包括纯度、溶解度和聚集程度的特性可以利用基于蛋白的分析测定和方法来评估。蛋白纯度可以以多种方式评估。例如,纯度可以基于一级结构、高级结构、大小、电荷、疏水性和糖基化进行评估。用于评估一级结构的方法的实例包括 N 末端和 C 末端测序以及肽图谱分析(参见例如,Allen et al., *Biologicals*. 24:255-275,1996))。用于评估高级结构的方法的实例包括圆二色性法(参见例如, Kelly et al., *Biochim Biophys Acta*. 1751:119-139,2005)、荧光光谱法(参见例如, Meagher et al., *J. Biol. Chem.* 273:23283-89,1998)、FT-IR、酰胺氢/氘交换动力学法、差示扫描量热法、NMR 光谱法、与构象敏感抗体的免疫反应法。高级结构还可以被评估为多种参数如 pH、温度或加入的盐的函数。

[0232] 用于评估蛋白特性诸如大小的方法的实例包括分析超速离心法和尺寸排阻 HPLC(SEC-HPLC,或可选择地, HPLC-SEC),并且用于测量电荷的示例性方法包括离子交换层析法和等电聚焦法。疏水性可以通过例如反相 HPLC 和疏水相互作用层析 HPLC 来评估。糖基化能够影响药代动力学(例如,清除)、构象或稳定性、受体结合以及蛋白功能,并且可以通过例如质谱法和核磁共振(NMR)光谱法来评估。

[0233] 某些实施方案包括使用 SEC-HPLC 来评估诸如纯度、大小(例如,大小均一性)或聚集程度的蛋白特性,和/或来纯化蛋白等其它用途。SEC,还包括凝胶过滤层析法(GFC)和凝胶渗透层析法(GPC),是指这样的层析方法,其中溶液中的分子基于其大小或更具体而言其流体力学体积、扩散系数和/或表面性质在多孔材料中分离。该过程通常用于分离生物分子和测定多聚物的分子量和分子量分布。通常,将生物或蛋白样品(诸如根据本文提供的和本领域内已知的蛋白表达方法制造的蛋白提取物)加载至具有确定的固定相(多孔材料),优选不与样品中的蛋白相互作用的相的选择的尺寸排阻柱中。在某些方面,固定相由玻璃或钢柱内的包装成稠三维基质的惰性粒子组成。流动相可以是纯水、水性缓冲液、有机溶剂或其混合物。固定相粒子通常具有仅允许某尺寸以下的分子进入的小孔和/或通道。大粒子因此排阻在这些孔和通道之外,并且其与固定相有限的相互作用导致其在实验开始时就被洗脱为“完全排阻的”峰。适合进入孔中的较小的粒子从流动的流动相去除,并且它们固定在固定相孔中的时间部分取决于它们渗透入孔中有多远。它们从流动相流中的去除促使它们花费更长的时间从柱子中洗脱,并基于其尺寸的差别导致粒子间的分离。给定的尺寸排阻柱具有可以分离的分子量范围。总之,大于上限的分子将不会被固定相捕获,小于下限的分子将完全进入固定相并被洗脱为单条条带,并且在该范围内的分子将以不同的速率洗脱,这由其诸如流体力学体积的性质决定。对于用药物蛋白实施这些方法的实例,参见 Bruner et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 15:1929-1935, 1997。

[0234] 临床应用的蛋白纯度还在例如 Anicetti et al. (*Trends in*

Biotechnology. 7:342-349, 1989) 中论述。最新的用于分析蛋白纯度的技术包括但不限于, LabChip GXII, 即用于快速分析蛋白和核酸的自动化平台, 其提供了蛋白滴度、定型和纯度分析的高通量分析。在某些非限制性实施方案中, 临床级蛋白如蛋白片段和抗体可以通过利用层析材料在至少两个正交步骤中的组合以及其它方法获得 (参见例如, Therapeutic Proteins: Methods and Protocols. Vol. 308, Eds., Smales and James, Humana Press Inc., 2005)。

[0235] 在某些实施方案中, 包含一种或多种癌因子抗体的组合物具有相对于所述抗体的至少约 90% 的纯度, 并且根据本领域内的常规技术测量纯度。在某些实施方案中, 例如诊断性组合物或某些治疗性组合物, 本发明的抗体组合物具有至少约 95% 的纯度。在具体的实施方案中, 例如治疗性组合物或药物组合物, 本发明的抗体组合物具有至少约 97% 或 98% 或 99% 的纯度。在其它实施方案中, 例如当用作参照试剂或研究试剂时, 本发明的抗体可以具有更低的纯度, 且可以具有至少约 70%、75%、80% 或 85% 的纯度。可以测量总的或相对于选择的成分如其它蛋白的纯度, 例如, 基于蛋白的纯度。

[0236] 还包括蛋白溶解性测定。此类测定可用于例如确定重组制造的最佳生长和纯化条件, 从而优化缓冲液的选择并优化抗体的选择。溶解性或聚集度可以根据多种参数评估, 所述参数包括温度、pH、盐和其它添加剂的存在与否。溶解性筛查测定的实例包括但不限于, 利用浊度或其它度量作为目的的测量蛋白溶解性的基于微板的方法、用于分析纯化的重组蛋白的溶解性的高通量测定 (参见例如, Stenvall et al., Biochim Biophys Acta. 1752:6-10, 2005)、使用遗传标志物蛋白的结构互补性监测和测量体内蛋白折叠和溶解性的测定 (参见例如, Wigley et al., Nature Biotechnology. 19:131-136, 2001), 以及利用扫描电化学显微镜 (SECM) 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中进行的重组蛋白溶解性的电化学筛查 (参见例如, Nagamine et al., Biotechnology and Bioengineering. 96:1008-1013, 2006) 等。

[0237] 在具体的实施方案中, 提供了人用治疗性组合物, 其包含本发明的修饰的多肽或本文其它地方所述的该多肽的片段以及药代动力学 (PK) 调节剂。本文所用的术语“药代动力学调节剂”通常指能增加抗体的药代动力学参数的抗体修饰物, 包括但不限于, 相比缺少 PK 调节剂的抗体的半衰期、溶解性、稳定性、活性。在一个实施方案中, PK 调节剂包括与抗体缀合的生物相容的聚合物, 包括例如, 聚乙二醇 (PEG)。

[0238] 在某些优选的实施方案中, 本发明的药物组合物包含分离的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段能够特异性结合本发明的至少一种癌症相关的多肽, 例如 SEQ ID NOs:1-24 中任一个所示的癌症相关的多肽。

[0239] 在某些其它的实施方案中, 用于预防或治疗性疫苗应用的本发明的药物组合物可以包含本发明的免疫原性多核苷酸和 / 或多肽组合物。疫苗制备通常描述于例如, M. F. Powell and M. J. Newman, eds., “Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach),” Plenum Press (NY, 1995) 中。通常, 此类组合物将包含本发明的一种或多种多核苷酸和 / 或多肽组合物以及一种或多种免疫刺激剂。

[0240] 在一个实施方案中, 药物组合物包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 种或更多种癌因子抗体或其抗原结合片段。抗体可以针对相同或不同的癌因子。

[0241] 在其它的实施方案中, 本发明的药物组合物可以包含对抑制本发明的一种或多种

癌症相关的多核苷酸序列的表达有效的多核苷酸（例如，反义序列、核酶序列、RNAi 序列或 siRNA 序列）。

[0242] 显而易见的是，本文所述的任何一种药物组合物都可以含有本发明的多核苷酸和多肽的药学可接受的盐。此类盐可以从以下制备：例如，药学可接受的无毒碱，包括有机碱（例如，伯胺、仲胺和叔胺的盐，以及碱性氨基酸）和无机碱（例如，钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐和镁盐）。

[0243] 在其它实施方案中，本发明的示例性的免疫原性组合物，例如疫苗组合物，包含编码上文所述的一种或多种癌症相关的多肽的 DNA，使得所述多肽能原位产生。如同上文所指出的，多核苷酸可以在本领域技术人员已知的多种递送系统的任何一种内递送。的确，很多基因递送技术是本领域内公知的，例如 Rolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems15:143-198,1998 以及其中所引用的参考文献中描述的那些。合适的多核苷酸表达系统当然将含有用于在患者体内表达的必需的调控性 DNA 调控序列（例如合适的启动子和终止信号）。可选择地，细菌递送系统可以涉及给予细菌（例如 Bacillus-Calmette-Guerrin），所述细菌在其细胞表面表达多肽的免疫原性部分或分泌这样的表位。

[0244] 因此，在某些实施方案中，利用多种已知的基于病毒的系统中的任何一种，将编码本文所述的免疫原性多肽的多核苷酸导入合适的用于表达的哺乳动物宿主细胞中。在一个示例性的实施方案中，逆转录病毒提供了基因递送系统的方便且有效的平台。可以利用本领域内已知的技术，将选择的编码本发明多肽的核苷酸序列插入载体中，并包装入逆转录病毒粒子中。重组病毒随后被分离并递送给受试者。多种示例性的逆转录病毒系统已被描述（例如，美国专利第 5,219,740 号；Miller and Rosman(1989) BioTechniques7:980-990；Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy1:5-14；Scarpa et al. (1991) Virology180:849-852；Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:8033-8037；以及 Boris-Lawrie and Temin(1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109）。

[0245] 此外，多种示例性的基于腺病毒的系统也已被描述。同整合入宿主基因组中的逆转录病毒不同，腺病毒维持在染色体外，从而使得与插入突变有关的风险降至最低（Haj-Ahmad and Graham(1986) J. Virol. 57:267-274；Bett et al. (1993) J. Virol. 67:5911-5921；Mittereder et al. (1994) Human Gene Therapy5:717-729；Seth et al. (1994) J. Virol. 68:933-940；Barr et al. (1994) Gene Therapy1:51-58；Berkner, K. L. (1988) BioTechniques6:616-629；以及 Rich et al. (1993) Human Gene Therapy4:461-476）。

[0246] 多种腺相关病毒 (AAV) 载体系统也被开发用于多核苷酸递送。AAV 载体可以利用本领域内公知的技术方便地构建。参见例如，美国专利第 5,173,414 号和第 5,139,941 号；国际公开第 W092/01070 号和第 W093/03769 号；Lebkowski et al. (1988) Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996；Vincent et al. (1990) Vaccines90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)；Carter, B. J. (1992) Current Opinion in Biotechnology3:533-539；Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129；Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy5:793-801；Shelling and Smith(1994) Gene Therapy1:165-169；以及

Zhou et al. (1994) J. Exp. Med. 179:1867-1875。

[0247] 用于通过基因转移递送编码本发明多肽的多核苷酸的其它病毒载体包括来源于痘病毒家族如牛痘病毒和禽痘病毒的载体。举例来说,表达新分子的牛痘病毒重组体可以按如下构建。首先将编码多肽的 DNA 插入合适的载体中,使其邻近牛痘启动子和侧翼的牛痘 DNA 序列如编码胸苷激酶 (TK) 的序列。然后用该载体转染同时已用牛痘感染的细胞。同源重组用于将牛痘启动子加编码目的多肽的基因插入病毒基因组中。得到的 TK. sup. (-) 重组体可以通过在存在 5- 溴脱氧尿苷的情况下培养细胞并挑选对其有抗性的病毒噬菌斑进行选择。

[0248] 基于牛痘的感染 / 转染系统能够方便地用于提供本文所述的一种或多种多肽在有机体的宿主细胞内的可诱导的、瞬时表达或共表达。在该特定的系统中,首先用编码噬菌体 T7RNA 聚合酶的牛痘病毒重组体体外感染细胞。该聚合酶展现出精确的特异性,这在于其仅转录携带 T7 启动子的模板。感染之后,用目的多核苷酸或多肽转染细胞,其受到 T7 启动子驱动。在牛痘病毒重组体的细胞质内表达的聚合酶将转染的 DNA 转录成 RNA,该 RNA 随后由宿主翻译机构翻译成多肽。该方法提供了大量 RNA 及其翻译产物在细胞质内高水平、瞬时的产生。参见例如,Elroy-Stein and Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA87:6743-6747 (1990); Fuerst et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA83:8122-8126 (1986)。

[0249] 可选择地,诸如鸡痘病毒和金丝雀痘病毒的禽痘病毒还可用于递送目的编码序列。已知当给予表达来自哺乳动物病原体的免疫原的重组禽痘病毒到非禽类物种时,赋予保护性免疫。禽痘病毒在人和其它哺乳动物物种中使用是特别可取的,因为禽痘病毒属的成员仅在易感染的禽类物种中有效复制,并因此在哺乳动物中是不具传染性的。产生重组禽痘病毒的方法是本领域内已知的,并且利用如上文所述的关于牛痘病毒的产生的遗传重组。参见例如,W091/12882;W089/03429;以及 W092/03545。

[0250] 多种甲病毒载体中的任何一种也都可以用于递送本发明的多核苷酸组合物,例如美国专利第 5,843,723 号、第 6,015,686 号、第 6,008,035 号和第 6,015,694 号中描述的那些载体。还可以使用某些基于委内瑞拉马脑炎病毒 (VEE) 的病毒,其示例性的实例可参见美国专利第 5,505,947 号和第 5,643,576 号。

[0251] 而且,分子缀合物载体,例如 Michael et al. J. Biol. Chem. 268:6866-6869 (1993) 和 Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA89:6099-6103 (1992) 中描述的腺病毒嵌合载体,也可以用于本发明下的基因递送。

[0252] 关于这些和其它已知的基于病毒的递送系统的其它示例性信息可参见例如, Fisher-Hoch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA86:317-321, 1989; Flexner et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 569:86-103, 1989; Flexner et al., Vaccine8:17-21, 1990; 美国专利第 4,603,112 号、第 4,769,330 号和第 5,017,487 号; W089/01973; 美国专利第 4,777,127 号; GB2, 200, 651; EP0, 345, 242; W091/02805; Berkner, Biotechniques6:616-627, 1988; Rosenfeld et al., Science252:431-434, 1991; Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA91:215-219, 1994; Kass-Eisler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:11498-11502, 1993; Guzman et al., Circulation88:2838-2848, 1993; 以及 Guzman et al., Cir. Res. 73:1202-1207, 1993。

[0253] 在某些实施方案中,多核苷酸可以整合入靶细胞的基因组中。该整合通过同源重

组（基因替代）可以处于特定的位置和方向，或者其可以整合入随机的、非特异性的位置（基因增强）。在其它的实施方案中，多核苷酸可以作为单独的、附加的 DNA 区段稳定地维持在细胞中。此类多核苷酸区段或“附加体”编码足以允许维持并独立于或与宿主细胞周期同步复制的序列。表达构建体被递送至细胞和细胞中多核苷酸维持所在的地方的方式依赖于所用的表达构建体的类型。

[0254] 在本发明的另一个实施方案中，多核苷酸作为“裸露的”DNA 被给予 / 递送，例如如 Ulmer et al., Science259:1745-1749, 1993 所描述以及 Cohen, Science259:1691-1692, 1993 所评述的。裸露的 DNA 的摄取可以通过将 DNA 包被在生物可降解的珠子上增强，所述生物可降解的珠子可被有效地运送至细胞内。

[0255] 在另一个实施方案中，本发明的组合物可通过粒子轰击法递送，这些方法中的很多已有描述。在一个示例性的实例中，气体驱动的粒子加速可以用诸如 Powderject Pharmaceuticals PLC(Oxford,UK) 和 Powderject Vaccines Inc. (Madison,WI) 制造的装置来实现，其中的一些实例描述于美国专利第 5,846,796 号、第 6,010,478 号、第 5,865,796 号、第 5,584,807 号以及欧洲专利第 0500 799 号中。该方法提供了无需针头的递送法，其中微观粒子如多核苷酸或多肽粒子的干粉制剂在手握装置产生的氦气喷流内被加速至高速，由此推动粒子进入感兴趣的目标组织。

[0256] 在相关的实施方案中，可用于气体驱动的、无需针头注射本发明组合物的其它装置和方法包括 Bioject, Inc. (Portland, OR) 提供的那些，其中一些实例描述于美国专利第 4,790,824 号、第 5,064,413 号、第 5,312,335 号、第 5,383,851 号、第 5,399,163 号、第 5,520,639 号和第 5,993,412 号。

[0257] 根据另一实施方案，本文所述的药物组合物除了包含本发明的免疫原性多核苷酸、多肽、抗体、T 细胞、TCR 和 / 或 APC 组合物之外，还包含一种或多种免疫刺激剂。免疫刺激剂本质上指能提高或增强对外源抗原的免疫应答（抗体和 / 或细胞介导的）的任何物质。一类优选的免疫刺激剂包括佐剂。很多佐剂含有经设计用来保护抗原免于快速分解代谢的物质（例如氢氧化铝或矿物油），和免疫应答的刺激剂如脂质 A、百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 或结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 来源的蛋白。某些佐剂是可商购得到的，例如，弗氏不完全佐剂和完全佐剂 (Difco Laboratories, Detroit, MI); Merck Adjuvant65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); 铝盐如氢氧化铝凝胶（明矾）或磷酸铝；钙盐、铁盐或锌盐；酰化酪氨酸的不可溶的悬浮液；酰化的糖类；阳离子或阴离子衍生的多糖类；聚磷脂类；生物可降解的微球体；单磷酸脂 A 和 quil A。诸如 GM-CSF、白介素 -2、白介素 -7、白介素 -12 的细胞因子及其它类似的生长因子也可以用作佐剂。

[0258] 某些优选的用于激发主导的 Th1 型应答的佐剂包括，例如，单磷酸脂 A（优选 3-脱 O-酰化单磷酸脂 A）以及铝盐的组合。MPL[®]佐剂可从 Corixa Corporation (Seattle, WA; 参见例如，美国专利第 4,436,727 号、第 4,877,611 号、第 4,866,034 号和第 4,912,094 号) 获得。含有 CpG 的寡核苷酸（其中 CpG 二核苷酸是未甲基化的）也诱导主导的 Th1 应答。此类寡核苷酸是公知的且描述于例如 W096/02555、W099/33488 以及美国专利第 6,008,200 号和第 5,856,462 号中。免疫刺激性 DNA 序列还由例如 Sato et al., Science273:352, 1996 描述。另一种优选的佐剂包括皂苷如 Quil A 或其衍生物，包括 QS21 和 QS7 (Aquila

Bio Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); 七叶素; 洋地黄皂苷; 或石头花 (Gypsophila) 或藜麦 (Chenopodium quinoa) 皂苷。其它优选的制剂包括本发明的佐剂组合中的一种以上的皂苷, 例如以下组中至少两种的组合: 包括 QS21、QS7、QuilA、 β -七叶素或洋地黄皂苷。

[0259] 可选择地, 皂苷制剂可与以下物质组合: 壳聚糖或其它聚阳离子聚合物组成的疫苗载体、聚交酯和聚交酯-共-乙交酯颗粒、聚-N-乙酰葡萄糖胺基聚合物基质、多糖或化学修饰多糖组成的颗粒、脂质体和脂质基颗粒、甘油一酯组成的颗粒等。也可以在存在胆固醇情况下配制皂苷成颗粒结构, 例如脂质体或 ISCOM。此外, 皂苷可与聚氧乙烯醚或聚氧乙烯酯配制为非颗粒性溶液或悬浮液, 或者配制为颗粒结构, 例如薄层 (paucilamellar) 脂质体或 ISCOM。皂苷也可以用诸如 Carbopol^R 的赋形剂配制, 以提高粘度, 或者可以用粉型赋形剂如乳糖配制成干粉。

[0260] 在一个实施方案中, 佐剂系统包括单磷酸脂 A 和皂苷衍生物的组合, 例如 W094/00153 中所描述的 QS21 和 3D-MPL[®] 佐剂的组合, 或者 W096/33739 中所描述的 QS21 被胆固醇终止的较低反应原性的组合物。其它优选的制剂包含水包油型乳剂和生育酚。利用 QS21、3D-MPL[®] 佐剂和处于水包油型乳剂中的生育酚的另一种特别优选的佐剂制剂描述于 W095/17210 中。

[0261] 另一种增强的佐剂系统涉及含 CpG 的寡核苷酸和皂苷衍生物的组合, 具体而言, CpG 和 QS21 的组合描述于 W000/09159 中。优选地, 制剂还包含水包油型乳剂和生育酚。

[0262] 其它在本发明药物组合物中使用的示例性佐剂包括 Montanide ISA720 (Seppic, France)、SAF (Chiron, California, United States)、ISCOMS (CSL)、MF-59 (Chiron)、SBAS 系列佐剂 (例如, SBAS-2 或 SBAS-4, 购自 SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium)、Detox (Enhanzyn[®]) (Corixa, Hamilton, MT)、RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) 和其它氨基烷基氨基葡萄糖苷 4-磷酸 (AGP), 如待审的美国专利申请系列第 08/853,826 号和第 09/074,720 号 (其公开通过引用全文并入本文) 中描述的那些, 以及聚氧乙烯醚佐剂, 如 W099/52549A1 中所描述的那些。

[0263] 其它优选的佐剂包括以下通式的佐剂分子:

[0264] (I): $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-A-R}$,

[0265] 其中 n 为 1-50, A 为键或 $-\text{C}(\text{O})-$, R 为 C_{1-50} 烷基或苯基 C_{1-50} 烷基。

[0266] 本发明的一个实施方案由包含通式 (I) 的聚氧乙烯醚的疫苗制剂组成, 其中 n 为 1 至 50, 优选 4-24, 最优选 9; R 组分为 C_{1-50} , 优选 $\text{C}_4\text{-C}_{20}$ 烷基, 最优选 C_{12} 烷基; 并且 A 为键。聚氧乙烯醚的浓度应为 0.1%-20%, 优选 0.1%-10%, 最优选 0.1%-1%。优选的聚氧乙烯醚选自以下组: 聚氧乙烯-9-月桂醚、聚氧乙烯-9-固醇醚、聚氧乙烯-8-固醇醚、聚氧乙烯-4-月桂醚、聚氧乙烯-35-月桂醚和聚氧乙烯-23-月桂醚。聚氧乙烯醚如聚氧乙烯月桂醚描述于 Merck 索引 (第 12 版: 条目 7717) 中。这些佐剂分子描述于 W099/52549 中。

[0267] 如果需要的话, 根据上述通式 (I) 的聚氧乙烯醚可以与另一种佐剂组合。例如, 优选的佐剂组合优选与 CpG 组合, 如待审的英国专利申请 GB9820956.2 中所描述的。

[0268] 根据本发明的另一个实施方案, 通过抗原呈递细胞 (APC), 例如树突细胞、巨噬细胞、B 细胞、单核细胞和可以工程改造成有效的 APC 的其它细胞, 将本文所述的免疫原性组

合物递送至宿主。此类细胞可以（但不必）经遗传改造，从而增加呈递抗原的能力、提高 T 细胞应答的激活和 / 或维持、自身具有抗肿瘤作用和 / 或成为与接受者免疫相容的（即，匹配的 HLA 单倍型）。APC 通常可以从多种生物流体或器官（包括肿瘤和肿瘤周围的组织）的任何一种中分离，并且可以是自体同源的、同种异体的、同基因的或异基因的细胞。

[0269] 尽管本领域技术人员已知的任何合适的载体都可以用于本发明的药物组合物中，但是载体的类型通常随给予方式不同而发生改变。本发明的组合物可以配制用于任何合适的给予方式，包括例如，局部给予、经口给予、经鼻给予、经粘膜给予、静脉内给予、颅内给予、腹膜内给予、皮下给予和肌肉内给予。

[0270] 在此类药物组合物中使用的载体是生物相容的，并且也可以是生物可降解的。在某些实施方案中，制剂优选提供相对恒定的活性组分释放水平。然而，在其它实施方案中，给予后立即释放的更快的速率可能是可取的。此类组合物的配制完全处于本领域技术人员利用已知技术的水平内。在此使用的示例性载体包括聚（交酯 - 共 - 乙交酯）、聚丙烯酸酯、乳胶、淀粉、纤维素、葡聚糖等的微粒。其它示例性的延迟释放的载体包括超分子生物载体，其包含非液体亲水性核心（例如，交联的多糖或寡糖）以及任选地包含两性化合物如磷脂的外层（参见例如，美国专利第 5, 151, 254 号以及 PCT 申请 W094/20078、W0/94/23701 和 W096/06638）。缓释制剂中含有的活性化合物的量取决于注入的部位、释放的速率和预期持续时间以及待治疗或预防的疾病状况的性质。

[0271] 在另一示例性实施方案中，生物可降解的微球体（例如，聚乳酸 (polylactate)、聚甘醇酸 (polyglycolate)）被用作本发明组合物的载体。合适的生物可降解的微球体描述于例如，美国专利第 4, 897, 268 号、第 075, 109 号、第 5, 928, 647 号、第 5, 811, 128 号、第 5, 820, 883 号、第 5, 853, 763 号、第 5, 814, 344 号、第 5, 407, 609 号和第 5, 942, 252 号中。修饰的乙型肝炎核心蛋白载体系统（如 W0/9940934 和其中所引用的参考文献所描述的）也可用于很多应用。另一种示例性的载体 / 递送系统利用含有微粒 - 蛋白复合物的载体，例如美国专利第 5, 928, 647 号中所描述的那些，该载体能够在宿主内诱导 I 类限制性细胞毒性 T 淋巴细胞应答。

[0272] 在另一个示例性的实施方案中，磷酸钙核心颗粒被用作本发明组合物的载体、疫苗佐剂或控释基质。示例性的磷酸钙颗粒在例如发布的专利申请第 W0/0046147 号中公开。

[0273] 本发明的药物组合物通常还包含一种或多种缓冲液（例如，中性缓冲盐水或磷酸盐缓冲盐水）、碳水化合物类（例如，葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖）、甘露醇、蛋白、多肽或诸如甘氨酸的氨基酸、抗氧化剂、抑菌剂、诸如 EDTA 或谷胱甘肽的螯合剂、佐剂（例如，氢氧化铝）、使制剂与接受体的血液等渗、低渗或弱低渗的溶质、悬浮剂、增稠剂和 / 或防腐剂。可选择地，本发明的组合物可被配制成冷冻干产物。

[0274] 本文所述的药物组合物可以提供在单剂量或多剂量的容器中，例如密封的安瓿瓶或小瓶。此类容器通常以保持制剂无菌和稳定直至使用的方式密封。通常，制剂可以作为在油性或水性介质中的悬浮液、溶液或乳液的形式保存。可选择地，药物组合物可以在冻干的条件下保存，其仅需要在使用前直接加入无菌液态载体。

[0275] 在多个治疗方案中使用本文所描述的具体组合物的合适的剂量和治疗方案的开发也是本领域内所公知的，包括例如，经口、胃肠外、静脉内、鼻内以及肌肉内给予和制剂，其中的一些为了说明的一般目的而简单地在下文中论述。

[0276] 在某些应用中,可以将本文所公开的药物组合物经口给予递送至动物。因此,可以将这些组合物与惰性稀释液或与可吸收可食用的载体一起配制,或可以将它们封装于硬壳或软壳的明胶胶囊中,或可以将它们压成片剂,或可以将它们直接合并到饮食食物中。

[0277] 活性化合物甚至可以与赋形剂合并,并以可摄取的片剂、口含片、锭剂、胶囊剂、酏剂、悬浮液、糖浆、糯米纸囊剂的形式使用(参见例如,Mathiowitz et al., Nature 1997 Mar 27; 386 (6623): 410-4; Hwang et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1998; 15 (3): 243-84; 美国专利 5,641,515; 美国专利 5,580,579 和美国专利 5,792,451)。片剂、锭剂、丸剂、胶囊剂等还可以含有多种其它组分的任何一种,例如,粘合剂,例如黄蓍胶、阿拉伯树胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂,例如磷酸氢二钙;崩解剂,例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、褐藻酸等;润滑剂,例如硬脂酸镁;以及甜味剂,例如蔗糖、乳糖或糖精或增味剂,例如薄荷、冬青油或樱桃香精。当剂量单元形式是胶囊时,其除了上述类型的物质之外还可以含有液态载体。多种其它物质可以作为包被提供或以其它方式改变剂量单元的物理形式。例如,片剂、丸剂或胶囊剂可以用虫胶,糖或二者包被。当然,用于制备任何剂量单元形式的任何物质都应该是药学上纯的,并且以所用的量给予时是基本上无毒的。此外,活性化合物可以并入缓释配制剂和制剂中。

[0278] 通常,这些制剂将含有至少约 0.1% 的活性化合物或更多,尽管活性成分的百分比当然可以不同,并且可以适宜地为总制剂重量或体积的约 1% 或 2% 至约 60% 或 70% 或更高。天然地,每种治疗有用的组合物中的活性化合物的量都可以以这种方式准备,即合适的剂量将以所述化合物的任何给定单位剂量获得。诸如溶解性、生物利用度、生物半衰期、给予途径、产品保质期以及其它药理学考量的因素,应为制备这样的药物制剂领域内的技术人员所考虑,并且由此,多种剂量和治疗方案可能是可取的。

[0279] 在某些情况下,将本文所公开的药物组合物经胃肠外、静脉内、肌肉内或者甚至腹膜内递送是可取的。此类方法是本领域技术人员公知的,其中的一些被进一步描述于,例如美国专利第 5,543,158 号、美国专利第 5,641,515 号和美国专利第 5,399,363 号中。在某些实施方案中,可以在适当混合了诸如羟丙纤维素的表面活性剂的水中制备作为游离碱或药学可接受的盐的活性化合物的溶液。也可以在甘油、液态聚乙二醇及其混合物中和在油中制备分散液。在常规的保存和使用条件下,这些制剂通常含有防腐剂以防止微生物生长。

[0280] 适于注射使用的示例性的药物形式包括无菌水溶液或分散液和用于无菌注射溶液或分散液的即时制备的无菌粉末(例如,参见美国专利第 5,466,468 号)。

[0281] 在一个实施方案中,对于水溶液的胃肠外给予,如果需要,应当使溶液适当缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂成为等渗的。这些特定的水溶液尤其适于静脉内给予、肌肉内给予、皮下给予和腹膜内给予。在该方面,根据本公开,可以利用的无菌水性介质是本领域技术人员已知的。例如,可将 1 个剂量溶于 1ml 等渗 NaCl 溶液中,并且加至 1000ml 的皮下输注液或者在计划的输注部位进行注射(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿制药科学),第 15 版,pp. 1035-1038 和 1570-1580)。根据待治疗个体的疾病状态,剂量必然会发生某些变化。而且,对于人类给药,制剂当然优选满足 FDA 生物制剂办公室标准所要求的无菌、致热原性,以及一般的安全和纯度标准。

[0282] 在本发明的另一实施方案中,可以将本文所公开的组合物配制为中性形式或盐形式。示例性的药学可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白的游离氨基基团形成的)以及与诸如

盐酸或磷酸的无机酸或与诸如醋酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等的有机酸形成的盐。与游离羧基基团形成的盐也可以来源于诸如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁的无机碱和诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等的有机碱。通过配制后,按照与剂型相容的方式和治疗有效量给予溶液。

[0283] 载体可以进一步包括任何和所有的溶剂、分散介质、媒介、包被、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲液、载体溶液、悬浮液、胶体等。这样的介质和试剂用于药物活性物质的用途在本领域是众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容,否则考虑在治疗组合物中使用它。补充的活性成分也能合并入组合物中。短语“药学可接受的”是指这样的分子实体和组合物,当将其给予人时,不会产生过敏性或相似的不良反应。

[0284] 在某些实施方案中,可以通过鼻内喷雾、吸入和/或其它气溶胶递送媒介递送药物组合物。通过鼻内气溶胶喷雾将基因、核酸和肽组合物直接递送至肺的方法已有描述,例如,美国专利第 5,756,353 号和美国专利第 5,804,212 号。同样,使用鼻内微粒树脂(Takenaga et al., J Controlled Release 1998 Mar 2; 52(1-2): 81-7) 和溶血磷脂酰甘油化合物(美国专利第 5,725,871 号)的药物递送在制药领域内也是公知的。同样,聚四氟乙烯支持基质的形式的示例性跨粘膜的药物递送描述于美国专利第 5,780,045 号中。

[0285] 在某些实施方案中,脂质体、纳米胶囊、微颗粒、脂质颗粒、囊泡等用于将本发明组合物引入合适的宿主细胞/生物体中。特别是,可以配制本发明组合物用于封装在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球或纳米颗粒等中的递送。可选择地,本发明的组合物可共价地或非共价地与此类载体介质的表面结合。

[0286] 作为可能的药物载体的脂质体和脂质体样制剂的形成和使用通常是本领域技术人员已知的(参见例如, Lasic, Trends Biotechnol 1998 Jul; 16(7): 307-21; Takakura, Nippon Rinsho 1998 Mar; 56(3): 691-5; Chandran et al., Indian J Exp Biol. 1997 Aug; 35(8): 801-9; Margalit, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1995; 12(2-3): 233-61; 美国专利 5,567,434; 美国专利 5,552,157; 美国专利 5,565,213; 美国专利 5,738,868 和美国专利 5,795,587,每一篇都具体地通过引用全文并入本文)。

[0287] 脂质体已成功用于多种正常情况下难以通过其它方案转染的细胞类型,包括 T 细胞悬浮液、原代肝细胞培养物和 PC12 细胞(Renneisen et al., J Biol Chem. 1990 Sep 25; 265(27): 16337-42; Muller et al., DNA Cell Biol. 1990 Apr; 9(3): 221-9)。此外,脂质体没有基于病毒的递送系统特有的 DNA 长度的限制。脂质体已被有效地用于将基因、多种药物、放射治疗剂、酶、病毒、转录因子、变构效应物等引入到多种培养的细胞系和动物中。此外,脂质体的使用似乎与全身递送后的自身免疫性应答或不可接受的毒性不相关。

[0288] 在某些实施方案中,脂质体由磷脂形成,该磷脂被分散在水性媒介物中并自发形成多层的同心双层囊泡(也称为多层囊泡(MLV))。

[0289] 可选择地,在其它实施方案中,本发明提供了本发明组合物的药学可接受的纳米胶囊制剂。纳米胶囊通常能够以稳定且可重复的方式捕获化合物(参见例如, Quintanar-Guerrero et al., Drug Dev Ind Pharm. 1998 Dec; 24(12): 1113-28)。为了避免由于细胞内聚合物超载而造成的副作用,可以利用能够在体内降解的聚合物设计这样的超小的粒子(大小为约 0.1 μm)。这样的粒子可以按如以下所述来制备:例如,

Couvreur et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988;5(1):1-20; zur Muhlen et al., Eur J Pharm Biopharm. 1998Mar;45(2):149-55; Zambaux et al. J Controlled Release. 1998Jan2;50(1-3):31-40; 以及美国专利 5, 145, 684。

[0290] 癌症治疗方法

[0291] 癌症治疗的免疫学方法基于以下认识：癌细胞通常能避开机体对异常或外来细胞和分子的防御，以及可以治疗性刺激这些防御以重获丧失的范围，例如，Klein, Immunology(Wiley-Interscience, New York, 1982) 的第 623-648 页。许多最新的研究成果，即多种免疫效应物能直接或间接地抑制肿瘤的生长，已经导致更新了对该癌症治疗方法的关注，例如，Jager, et al., Oncology 2001;60(1):1-7; Renner, et al., Ann Hematol 2000Dec;79(12):651-9。

[0292] 其功能与抗肿瘤细胞免疫和从机体清除肿瘤细胞相关的四种基本的细胞类型是：i) B 淋巴细胞，其分泌免疫球蛋白进入血浆中用于识别和标记非己的侵入细胞；ii) 单核细胞，其分泌负责裂解和加工免疫球蛋白包被的目标侵入细胞的补体蛋白；iii) 自然杀伤淋巴细胞，其具有两种破坏肿瘤细胞的机制，即抗体依赖的细胞毒性和自然杀伤；以及 iv) T 淋巴细胞，其拥有抗原特异性受体，并具有识别携带互补标志物分子的肿瘤细胞的能力 (Schreiber, H., 1989, in Fundamental Immunology (ed). W. E. Paul, pp. 923-955)。

[0293] 癌症免疫疗法通常注重诱导体液免疫应答、细胞免疫应答或二者兼有。而且，早已确立了，CD4⁺T 助细胞的诱导是二次诱导抗体或细胞毒性 CD8⁺T 细胞所必需的。对癌细胞具有选择性或理想地具有特异性的多肽抗原为诱导针对癌症的免疫应答提供有力的方法，并且是本发明的一个重要方面。

[0294] 因此，在本发明的其它方面中，可以将本文所述的药物组合物给予有需要的受试者，例如患有癌症或倾向于发展为癌症的受试者。在此类方法中，将本文所述的药物组合物给予患者，通常为温血动物，优选人。

[0295] 本发明的药物组合物和疫苗可以在手术摘除原发性肿瘤和 / 或诸如给予放疗或常规的化疗药物的治疗之前或之后给予。如上文所论述的，药物组合物的给予可以通过任何合适的方法，包括通过静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、鼻内、皮肤内、肛门、阴道、局部和经口的途径给予。

[0296] 按照本发明方法治疗的癌症类型本质上可以为与本发明多肽有关的任何类型。在某些示例性的实施方案中，例如，利用本发明组合物治疗的癌症类型是肝癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、肾癌、皮肤癌和血液癌症。

[0297] 在某些实施方案中，免疫疗法可以是主动的免疫疗法，其中治疗依赖于通过给予免疫应答改性剂（例如本文提供的多肽和多核苷酸）来体内刺激内源宿主免疫系统，使其针对肿瘤作出反应。

[0298] 在某些其它的实施方案中，免疫疗法可以是被动的免疫疗法，其中治疗涉及具有已建立的肿瘤免疫反应性的试剂（例如抗体或效应细胞）的递送，所述已建立的肿瘤免疫反应性能够直接或间接介导抗肿瘤作用，并且并不必然依赖于完整的宿主免疫系统。

[0299] 效应细胞的实例包括上文论述的 T 细胞、T 淋巴细胞（如 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞和 CD4⁺ 辅助性 T 肿瘤浸润淋巴细胞）、杀伤细胞（如自然杀伤细胞和淋巴因子活化的杀伤细胞）、B 细胞和表达本文提供的多肽的抗原呈递细胞（如树突细胞和巨噬细胞）。本文

记载的多肽特异性的 T 细胞受体和抗体受体可以被克隆、表达并转移至其它载体或用于过继性免疫治疗的效应细胞中。利用标准方法,本文提供的多肽还可以用于产生用于被动免疫疗法的抗体或抗独特型抗体(例如,如上文和美国专利第 4,918,164 号中所描述的)。

[0300] 对于在检测、诊断测定或治疗应用中期望的选择性使用,单克隆抗体可以用多种标记物的任何一种进行标记(如美国专利第 6,090,365 号、第 6,015,542 号、第 5,843,398 号、第 5,595,721 号和第 4,708,930 号,在此通过引用全文并入,如同每一篇单独并入一样)。在每种情况下,标记的单克隆抗体与抗原决定位点的结合将示意特定治疗剂对非正常细胞上的抗原决定簇的察觉或递送。本发明的另一目的是提供恰当标记的用于实现特异性单克隆抗体的此类期望的选择性用途的特异性单克隆抗体。

[0301] 本文所述的治疗性组合物的给予途径和频率以及剂量将因人而异,并且可以容易地利用标准技术建立。通常,药物组合物和疫苗可以通过注射(例如,皮内、肌肉内、静脉内或皮下)、鼻内(例如,通过吸入)或经口给予。优选地,可以在 52 周的期间内给予 1 至 10 次剂量。优选地,以 1 个月的间隔给予 6 次剂量,并且可以在之后定期给予加强疫苗接种。可选的方案可能适合于个别患者。合适的剂量为,当如上所述给予时,能促进抗肿瘤免疫应答且至少高于基础(即,未处理的)水平 10-50% 的化合物量。这样的应答可以通过测量患者体内的抗肿瘤抗体或通过能够体外杀伤患者肿瘤细胞的溶细胞的效应细胞的疫苗依赖性产生来监测。与未接种的患者相比,此类疫苗还应该能够引起导致接种疫苗的患者体内改善的临床结果(例如,更为频繁的缓解、完全或部分或更久的无病生存)的免疫应答。通常,对于包含一种或多种多肽的药物组合物和疫苗,剂量中存在的每种多肽的量的范围为每千克宿主约 25 μ g 至 5mg。合适的剂量大小将随患者的大小而不同,但范围通常为约 0.1mL 至约 5mL。

[0302] 通常,合适的给药和治疗方案提供了足以提供治疗和/或预防益处的量的活性化合物。此类反应可以通过与未治疗的患者相对比在治疗的患者中建立改善的临床结果(例如,更为频繁的缓解、完全或部分或更久的无病生存)来监测。对肿瘤蛋白的现存免疫应答的增加通常与改善的临床结果相关。此类免疫应答通常可以利用标准增殖、细胞毒性或细胞因子测定进行评估,这些测定可以利用从治疗前和治疗后的患者获得的样品进行。

[0303] 癌症检测以及诊断性组合物、方法和试剂盒

[0304] 本发明的癌症相关的序列和结合剂也可以用在癌症诊断组合物、方法和试剂盒的情况下。

[0305] 通常,可以基于从患者获得的生物样品(例如,血液、血清、唾液、尿液和/或肿瘤活检组织)中一种或多种癌症相关的多肽和/或编码此类多肽的多核苷酸的存在,检测患者体内的癌症。换句话说,这种蛋白可以用作指示是否存在癌症的标志物。

[0306] 在一些实施方案中,多核苷酸引物和探针可以用于检测编码癌症相关蛋白的 mRNA 的水平,其也指示是否患有癌症。通常,肿瘤组织中癌症相关的序列以高于出现肿瘤的同一种类型的正常组织的至少两倍,优选三倍,且更优选五倍或更高的水平存在。在某些诊断实施方案中,与出现肿瘤的组织类型不同的组织类型中特定肿瘤序列的表达水平是不相关的,因为肿瘤细胞的存在可以通过以下来确认:观察与同一种类型的正常组织中的表达水平相比,预定的差异表达水平,例如,2 倍、5 倍等。

[0307] 其它差异表达模式可以有利地用于诊断目的。例如,在本发明的一方面,肿瘤组织

和同一类型的正常组织（而不是其它的正常组织类型，例如 PBMC）中肿瘤序列的过表达可以被开发用于诊断目的。在这种情况下，例如，取自循环组织或与出现肿瘤的组织不同的一些其它的组织部位的样品中转移性肿瘤细胞的存在可以例如利用 RT-PCR 分析，通过检测样品中肿瘤序列的表达来鉴定和 / 或确认。在很多情况下，利用细胞捕获或其它类似的技术来富集目的样品（例如，PBMC）中的肿瘤细胞是可取的。

[0308] 对于利用结合剂来检测样品中的多肽标志物，有很多种本领域技术人员已知的测定模式。参见例如，Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。通常，患者体内是否存在癌症可以通过以下步骤来确定：(a) 将获自患者的生物样品与结合剂接触；(b) 检测样品中能与所述结合剂结合的多肽的水平；以及 (c) 将多肽的水平与预定的阈值比较。

[0309] 在示例性的实施方案中，测定涉及使用固定于固体支持物上的结合剂从样品的残余部分结合并去除多肽。然后结合的多肽可以利用检测试剂进行检测，所述检测试剂含有报告基团并能够与结合剂 / 多肽复合物特异性结合。此类检测试剂可以包括，例如，能与多肽或抗体特异性结合的结合剂或能与该结合剂特异性结合的其它试剂，例如抗免疫球蛋白、蛋白 G、蛋白 A 或凝集素。可选择地，可以利用竞争测定，其中多肽用报告基团标记，并在结合剂与样品孵育之后允许该多肽结合于固定的结合剂上。样品的组分抑制标记的多肽与结合剂结合的程度指示样品与固定的结合剂的反应性。在此类测定中使用的合适的多肽包括全长癌症相关的蛋白和如上文所述的结合剂能结合的癌症相关蛋白的多肽部分。

[0310] 固体支持物可以是本领域技术人员已知的肿瘤蛋白可以连接的任何材料。例如，固体支持物可以是微量滴定板或硝化纤维或其它合适的膜中的测试孔。可选择地，支持物可以是珠或盘，例如玻璃、纤维玻璃、乳胶或诸如聚苯乙烯或聚氯乙烯的塑料材料。支持物还可以是磁性粒子或光纤传感器，诸如，例如美国专利第 5,359,681 中公开的那些材料。可以利用本领域技术人员已知的多种技术，将结合剂固定于固体支持物上，这在专利和科学文献中有大量的描述。在本发明的背景下，术语“固定”指非共价结合如吸附，和共价连接（其可以是试剂和支持物上官能团的直接连接，或者可以为通过交联剂的连接）。优选通过吸附于微量滴定板或膜中的孔得到的固定。在这种情况下，吸附可以通过在合适的缓冲液中将结合剂与固体支持物接触合适的时间来实现。接触时间随温度变化，但通常为约 1 小时至约 1 天。通常，将塑料微量滴定板（如聚苯乙烯或聚氯乙烯）的孔与约 10ng 至约 10 μ g，且优选约 100ng 至约 1 μ g 的结合剂接触，足以固定适量的结合剂。

[0311] 结合剂与固体支持物的共价连接通常可以通过首先使支持物与双官能团试剂反应来实现，所述双官能团试剂将与支持物和结合剂上的官能团如羟基或氨基起反应。例如，利用苯醌或通过支持物上的醛基与结合伴侣上的胺和活性氢的缩合，结合剂可以被共价连接至具有合适的聚合物涂层的支持物上（参见例如，Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, at A12-A13）。

[0312] 在某些实施方案中，测定是二抗体夹心测定。该测定可以通过以下来进行：首先将固定于固体支持物（通常为微量滴定板的孔）上的抗体与样品接触，从而允许样品内的多肽与固定的抗体结合。然后从固定的多肽 - 抗体复合物去除未结合的样品，并加入含有报告基团的检测试剂（优选能够与多肽上的不同位点结合的二抗）。然后利用适合特定报告基团的方法测定保持与固体支持物结合的检测试剂的量。

[0313] 更具体而言,一旦按如上所述将抗体固定于支持物上,支持物上的残余蛋白结合位点通常被封闭。任何合适的封闭剂都是本领域技术人员已知的,例如牛血清白蛋白或 Tween20™(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)。然后将固定的抗体与样品孵育,并允许多肽与抗体结合。在孵育之前样品可以用合适的稀释剂如磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 稀释。通常,合适的接触时间(即,孵育时间)是足以检测到获自癌症个体的样品内多肽的存在的时间段,其中至少约 95% 的多肽达到了结合的多肽和未结合的多肽之间的平衡。本领域技术人员应当认识到,达到平衡所需的时间可以容易地通过测定一段时间内发生的结合水平来确定。在室温时,约 30 分钟的孵育时间通常就足够了。

[0314] 然后可以通过用合适的缓冲液,例如含有 0.1% Tween20™ 的 PBS,洗涤固体支持物来去除未结合的样品。然后可以将含有报告基团的二抗加入到固体支持物上。优选的报告基团包括上文记载的那些基团。

[0315] 然后,将检测试剂与固定的抗体-多肽复合物孵育足以检测到结合的多肽的时间。合适的时间通常可以通过测定一段时间内发生的结合水平来确定。然后去除未结合的检测试剂,并利用报告基团检测结合的检测试剂。用于检测报告基团的方法取决于报告基团的性质。对于放射性基团,闪烁计数或放射自显影方法通常是合适的。光谱学方法可以用于检测染料、发光基团和荧光基团。生物素可以利用与不同报告基团(通常为放射性基团或荧光基团或酶)偶联的抗生物素蛋白来检测。酶报告基团通常可以通过加入底物(通常持续特定的时间段),随后通过对反应产物的光谱学或其它分析来检测。

[0316] 为了确定是否存在癌症,通常将从与固体支持物保持结合的报告基团检测的信号与对应于预定阈值的信号比较。在一个实施方案中,检测癌症的阈值是将固定的抗体与来自未患癌症的患者的样品孵育时所获得的平均信号。通常,产生超过预定阈值三个标准偏差的信号样品被认为是癌症阳性的。在备选的实施方案中,根据 Sackett et al., *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, p. 106-7 的方法,利用受试者工作曲线 (Receiver Operator Curve) 确定阈值。简单而言,在该实施方案中,阈值可以从对应于诊断测试结果的每个可能的阈值的成对真阳性率(即,敏感性)和假阳性率(100% 特异性)的图中确定。图上最接近左上角的阈值(即,包围最大面积的数值)是最精确的阈值,并且产生比通过该方法确定的阈值高的信号的样品被可以认为是阳性的。可选择地,阈值可以沿着图向左移,以最小化假阳性率,或者向右移,以最小化假阴性率。通常,产生比通过该方法确定的阈值高的信号的样品被认为是癌症阳性的。

[0317] 在相关的实施方案中,测定在流过式 (flow-through) 测试模式或条带测试模式中进行,其中结合剂被固定于膜如硝化纤维上。在流过式测试中,当样品通过膜时,样品内的多肽与固定的结合剂结合。随后,当含有第二结合剂的溶液通过膜时,该第二种标记的结合剂与结合剂-多肽复合物结合。然后可以按如上所述进行结合的第二结合剂的检测。在条带测试模式中,将结合剂所结合的膜的一端浸入含有样品的溶液中。样品沿着膜移动通过含有第二结合剂的区域,并到达固定结合剂的区域。第二结合剂在固定抗体所在区域处的聚集指示癌症的存在。通常,第二结合剂在该位置处的聚集产生了一种图案如线形,其可通过目测读取。不存在这种图案指示阴性结果。通常,选择固定于膜上的结合剂的量,从而当生物样品含有足以以上文论述的图案在二抗体夹心测定中产生阳性信号的多肽水平时,

能够产生视觉可辨别的图案。在这类测定中使用的优选的结合剂是抗体及其抗原结合片段。优选地,固定于膜上的抗体的量为约 25ng 至约 1 μ g,且更优选约 50ng 至约 500ng。此类测定通常用很少量的生物样品进行。

[0318] 当然,存在很多其它的适用于本发明肿瘤蛋白或结合剂的测定方案。上文的描述仅试图为示例性的。例如,对本领域技术人员显而易见的是,上述方案可以被简单地修改为使用肿瘤多肽,以检测能与生物样品中的此类多肽结合的抗体。此类肿瘤蛋白特异性抗体的检测可以与癌症的存在相关联。

[0319] 癌症还可以,或可选择地,基于 T 细胞的存在进行检测,该 T 细胞能与生物样品中本发明的癌症相关蛋白特异性反应。在某些方法中,将从患者分离的含有 CD4⁺和 / 或 CD8⁺T 细胞的生物样品与肿瘤多肽、编码此类多肽的多核苷酸和 / 或至少表达此类多肽的免疫原性部分的 APC 一起孵育,并检测是否存在 T 细胞的特异性活化。合适的生物样品包括但不限于分离的 T 细胞。例如,可以通过常规技术(例如通过外周血淋巴细胞的聚蔗糖 / 泛影葡胺密度梯度离心)从患者分离 T 细胞。T 细胞可以在 37°C 下与多肽(例如,5–25 μ g/ml)体外孵育 2–9 天(通常 4 天)。在不存在肿瘤多肽作为对照的情况下,孵育另一等分的 T 细胞样品是可取的。对于 CD4⁺T 细胞,活化优选通过评估 T 细胞的增殖来检测。对于 CD8⁺T 细胞,活化优选通过评估溶细胞活性来检测。增殖水平大于无病患者的至少两倍和 / 或溶细胞活性水平大于无病患者的至少 20% 指示患者患有癌症。

[0320] 如同上文所指出的,癌症还可以,或可选择地,基于生物样品中编码本发明癌症相关蛋白的 mRNA 的水平进行检测。例如,至少两种寡核苷酸引物可以用于基于聚合酶链式反应(PCR)的测定中,以扩增源自生物样品的肿瘤 cDNA 的一部分,其中至少一种寡核苷酸引物对编码肿瘤蛋白的多核苷酸是特异性的(即,与其杂交)。然后分离扩增的 cDNA,并利用本领域内公知的技术如凝胶电泳进行检测。

[0321] 同样,与编码癌症相关蛋白的多核苷酸特异性杂交的寡核苷酸探针可以用于杂交测定中,以检测生物样品中编码癌症相关蛋白的多核苷酸的存在。

[0322] 为了允许在测定条件下杂交,寡核苷酸引物和探针应当包含这样的寡核苷酸序列,其与编码本发明癌症相关蛋白的多核苷酸的长度为至少 10 个核苷酸,优选至少 20 个核苷酸的部分具有至少约 60%,优选至少约 75%,且更优选至少约 90% 的同一性。优选地,寡核苷酸引物和 / 或探针在如上所述的中度严格的条件下能与编码本文所述的多肽的多核苷酸杂交。可有效用于本文所述的诊断方法中的寡核苷酸引物和 / 或探针优选长度为至少 10–40 个核苷酸。在一个实施方案中,寡核苷酸引物包含具有本文所公开的序列的 DNA 分子的至少 10 个连续的核苷酸,更优选至少 15 个连续的核苷酸。基于 PCR 的测定和杂交测定的技术是本领域内公知的(参见例如,Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263, 1987; Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989)。

[0323] 一种测定利用 RT-PCR,其中 PCR 与逆转录联合应用。通常,从诸如活检组织的生物样品提取 RNA,并逆转录以产生 cDNA 分子。利用至少一条特异性引物的 PCR 扩增产生 cDNA 分子,可以分离并利用例如凝胶电泳成像该 cDNA 分子。可以在取自测试患者和未患癌症的个体的生物样品上进行扩增。扩增反应可以在跨越两个数量级的数个 cDNA 稀释物上进行。与非癌样品的相同稀释物相比,测试患者样品的数个稀释物中表达增加两倍或更高通常被认为是阳性的。

[0324] 在本发明的另一方面中,细胞捕获技术可以与例如实时 PCR 结合使用,以提供用于检测表达肿瘤抗原的转移性细胞的更加敏感的工具。生物样品(例如,骨髓样品、外周血和细针吸取样品)中癌细胞的检测对于癌症患者的诊断和预后是可取的。

[0325] 用表面细胞标志物特异性的单克隆抗体,或四聚抗体复合物包被的免疫磁珠,可用于初次富集或主动选择样品中的癌细胞。可以使用多种商购的试剂盒,包括 **Dynabeads® Epithelial Enrich**(DynaL Biotech, Oslo, Norway)、**StemSep™**(StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC) 和 **RosetteSep**(StemCell Technologies)。本领域技术人员应当认识到,其它方法和试剂盒也可以用于富集或主动选择需要的细胞群。**Dynabeads® Epithelial Enrich** 含有 mAb 包被的磁珠,所述 mAb 是正常上皮组织和瘤变的上皮组织上表达的两种糖蛋白膜抗原特异性的。可以将包被的珠子加入到样品中,然后将样品应用于磁体,从而捕获与珠子结合的细胞。将不需要的细胞洗掉,并将磁分离的细胞从珠子洗脱,用于进一步的分析中。

[0326] **RosetteSep** 可用于直接从血液样品富集细胞,并且 **RosetteSep** 由四聚抗体的混合物组成,所述四聚抗体的混合物靶向多种不需要的细胞并将这些细胞与样品中存在的血红细胞(RBC)上的血型糖蛋白 A 交联,形成玫瑰形物。当在聚蔗糖上离心时,靶向细胞沿游离的 RBC 形成小团。消耗混合物中抗体的组合决定了哪些细胞被去除,以及因此哪些细胞被回收。可用的抗体包括但不限于:CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD24、CD25、CD29、CD33、CD34、CD36、CD38、CD41、CD45、CD45RA、CD45RO、CD56、CD66B、CD66e、HLA-DR、IgE 和 TCR $\alpha \beta$ 。

[0327] 此外,本发明还包括,肿瘤抗原特异性的 mAb 可以以相似的方式产生和使用。例如,能与肿瘤特异性细胞表面抗原结合的 mAb 可以与磁珠缀合,或配制在四聚抗体复合物中,并用于从样品富集或主动选择转移性的肿瘤细胞。一旦样品被富集或主动选择,可以裂解细胞并分离 RNA。然后可以在本文所述的实时 PCR 测定中,利用肿瘤特异性引物,用 RNA 进行 RT-PCR 分析。本领域技术人员应当认识到,可以通过其它方法(例如,原位杂交或流式细胞术)分析富集或选择的细胞群。

[0328] 在另一个实施方案中,本文所述的组合物可以用作癌症进展的标志物。在该实施方案中,可以随时间进行上文所述的用于诊断癌症的测定,并评估反应性多肽或多核苷酸水平的变化。例如,可以每 24-72 小时进行所述测定,持续 6 个月至 1 年,随后根据需要进行测定。通常,在检测的多肽或多核苷酸水平随时间增加的那些患者中,癌症正在发展。相比之下,当反应性多肽或多核苷酸的水平保持恒定或随时间降低时,癌症没有发展。

[0329] 某些体内诊断性测定可以直接在肿瘤上进行。一种这样的测定涉及将肿瘤细胞与结合剂接触。然后可以直接或通过报告基团间接检测结合的结合剂。此类结合剂还可以用在组织学应用中。可选择地,多核苷酸探针可以用在此类应用中。

[0330] 如同上文所指出的,为提高灵敏度,可以在给定的样品中测定多种肿瘤蛋白标志物。显而易见的是,本文提供的不同蛋白特异性的结合剂可以组合用于单次测定中。此外,可以同时使用多种引物或探针。可以基于常规实验进行肿瘤蛋白标志物的选择,以确定导致最佳灵敏度的组合。此外或可选择地,本文提供的肿瘤蛋白的测定可以与其它已知肿瘤抗原的测定组合。

[0331] 本发明还提供了用于上述任何一种诊断方法中的试剂盒。此类试剂盒通常包含进行诊断测定所需的两种或更多种组分。组分可以是化合物、试剂、容器和 / 或设备。例如, 试剂盒内的一个容器可以含有能特异性结合肿瘤蛋白的单克隆抗体或其片段。提供的此类抗体或片段可连接至如上所述的支持材料。一个或多个另外的容器可以装有将在测定中使用的元件如试剂或缓冲液。此类试剂盒还可以或可选择地含有上文所述的检测试剂, 所述检测试剂含有适合于直接或间接检测抗体结合的报告基团。

[0332] 可选择地, 可以设计试剂盒以检测生物样品中编码肿瘤蛋白的 mRNA 的水平。此类试剂盒通常包含至少一种如上文所述的、能与编码肿瘤蛋白的多核苷酸杂交的寡核苷酸探针或引物。此类寡核苷酸可以用于, 例如 PCR 或杂交测定中。此类试剂盒内可以存在的其它组分包括第二寡核苷酸和 / 或诊断试剂或容器, 以促进编码肿瘤蛋白的多核苷酸的检测。

[0333] 候选药物的筛查测定

[0334] 可以设计候选药物的筛查测定以鉴定能与本发明癌症相关的多肽结合或复合或以其它方式干扰该多肽与其它细胞蛋白相互作用的化合物。此类筛查测定将包括这样的测定, 其顺应化学文库的高通量筛查, 使得这些测定特别适合于鉴定小分子候选药物。涉及的小分子包括合成的有机或无机化合物, 包括肽, 优选可溶性肽、(多)肽-免疫球蛋白融合体, 且尤其是抗体, 所述抗体包括但不限于, 多克隆抗体、单克隆抗体和抗体片段、单链抗体、抗独特型抗体和嵌合版或人源化版的此类抗体或片段, 以及人抗体和抗体片段。测定可以以多种模式进行, 包括蛋白-蛋白结合测定、生化筛查测定、免疫测定和基于细胞的测定, 这些在本领域内都已得到良好表征。所有的测定在这点上都是通用的, 它们都需要在一定条件下将候选药物与本发明的多肽接触, 并持续足以允许这两种组分发生相互作用的时间。

[0335] 在结合测定中, 相互作用是结合, 并且所形成的复合物能在反应混合物中分离或检测到。在具体的实施方案中, 通过共价或非共价结合, 将本发明的多肽或候选药物固定于固相, 例如, 微量滴定板上。非共价结合通常通过用多肽溶液包被固体表面并干燥来实现。可选择地, 待固定的多肽特异性的固定的抗体, 例如单克隆抗体, 可以用于将该多肽锚定于固体表面。通过将未固定的组分 (其可以用可检测的标记物标记) 加入到固定的组分 (例如, 含有锚定组分的包被表面) 进行测定。当反应完成时, 例如通过洗涤去除未反应的组分, 并检测锚定于固体表面上的复合物。当原来未固定的组分携带可检测的标记物时, 检测到固定于表面上的标记物指示发生了复合。如果原来未固定的组分不携带标记物, 则可以通过, 例如使用特异性结合固定复合物的标记抗体来检测复合。

[0336] 以下实施例通过说明而非限制的方式提供。

实施例

[0337] 实施例 1

[0338] 针对癌因子的抗体的产生和表征

[0339] 如同所指出的, 在某些方面, 本发明涉及包含分离的抗体或其抗原结合片段的药物组合物, 该抗体或其抗原结合片段能与选自以下的癌因子序列特异性地结合: IL1f5 (SEQ ID NO:1)、CCBP2 (SEQ ID NO:2)、IL1R2 (SEQ ID NO:3)、IL1RAPL1 (SEQ ID NO:4)、IL18BP (SEQ ID NO:5)、CLEC2B (SEQ ID NO:6)、C4BPA (SEQ ID NO:7)、C4BPB (SEQ ID NO:8)、SERPINI1 (SEQ

ID NO:9)、IL1RAP 同种型 1 (SEQ ID NO:10)、IL1RAP 同种型 2 (SEQ ID NO:11)、GPR1 (SEQ ID NO:12)、GPR4 (SEQ ID NO:13)、GPR15 (SEQ ID NO:14)、GPR32 (SEQ ID NO:15)、GPR34 (SEQ ID NO:16)、GPR183 (SEQ ID NO:17)、SERPINA4 (SEQ ID NO:18)、SERPINB5 (SEQ ID NO:19)、SEMA4B (SEQ ID NO:20)、SEMA4D (SEQ ID NO:21)、CCL14 (SEQ ID NO:22)、NKTR (SEQ ID NO:23) 和 SFTPD (SEQ ID NO:24)。此类组合物可以根据本文的一般公开并进一步结合以下陈述的示例性实施例制备和使用。

[0340] a. 细胞系中表达的表征

[0341] 癌因子序列的基线表达在以下的代表性细胞系中通过 RT-PCR 来表征:包括细胞系 IM-9 (B 细胞淋巴瘤)、4T1 (乳腺癌)、C1498 (急性髓性白血病) 和 TRAMP-C2 (前列腺癌)。

[0342] 实时 PCR (参见 Gibson et al., Genome Research 6:995-1001, 1996; Heid et al., Genome Research 6:986-994, 1996) 是在扩增过程中评估 PCR 产物积累水平的技术。该项技术允许定量评估多个样品中的 mRNA 水平。简单而言,在一种示例性方法中,从肿瘤和正常组织中提取 mRNA,并利用标准技术制备 cDNA。例如,利用 Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, CA) 7700Prism 仪器进行实时 PCR。例如,利用 Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, CA) 提供的 primer express 程序设计目的基因的匹配引物和荧光探针。引物和探针的最优浓度最初由本领域技术人员决定,并且对照 (例如, β -肌动蛋白) 引物和探针从例如 Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, CA) 购买得到。为了对样品中的特定 RNA 的量进行定量,通常利用含有目的基因的质粒生成标准曲线。标准曲线利用实时 PCR 中测定的 Ct 值来生成,该 Ct 值与测定中使用的初始 cDNA 浓度相关。范围为 $10-10^6$ 拷贝的目的基因的标准稀释通常是足够的。此外,生成对照序列的标准曲线。这允许组织样品的初始 RNA 含量相对于用于比较目的的对照的量标准化。

[0343] 可以按如下进行可选的实时 PCR 程序:将在定量实时 PCR 中使用的第一链 cDNA,利用 Superscript 逆转录酶 (RT) (例如, Gibco BRL Life Technology, Gaithersburg, MD), 从首先用 DNase I (例如, Amplification Grade, Gibco BRL Life Technology, Gaithersburg, MD) 处理的 $20 \mu\text{g}$ 总 RNA 合成。例如,利用 GeneAmpTM5700 序列检测系统 (PE Biosystems, Foster City, CA) 进行实时 PCR。5700 系统使用 SYBRTM green (一种仅插入双链 DNA 中的荧光染料) 和一组基因特异性的正向和反向引物。在整个扩增过程中监测荧光的增加。引物的最优浓度利用棋盘法确定,且在该方法中使用来自肿瘤的 cDNA 库。PCR 反应在包含 $2.5 \mu\text{l}$ SYBR green 缓冲液、 $2 \mu\text{l}$ cDNA 模板以及目的基因的正向和反向引物每种 $2.5 \mu\text{l}$ 的 $25 \mu\text{l}$ 体积中进行。用于 RT 反应的 cDNA 对于每种目的基因以约 1:10 稀释,对于 β -肌动蛋白对照以 1:100 稀释。为了对样品中的特定 cDNA (以及因此的初始 mRNA) 的量进行定量,利用含有目的基因的质粒 DNA 生成了每次运行的标准曲线。标准曲线利用实时 PCR 中测定的 Ct 值生成,该 Ct 值与测定中使用的初始 cDNA 浓度相关。 $20-2 \times 10^6$ 拷贝的目的基因的标准稀释被用于该目的。此外,对于 β -肌动蛋白,生成的标准曲线范围为 $200\text{fg}-2000\text{fg}$ 。这使得组织样品的初始 RNA 含量能够相对于用于比较目的的 β -肌动蛋白的量标准化。将每一组所测试的组织平均拷贝数相对于 β -肌动蛋白的常量标准化,从而允许评估看到的每一种基因的过表达水平。

[0344] b. 随表达变化的细胞系的产生

[0345] 对于基线较低 / 阴性的细胞系,通过将编码序列克隆入合适的载体如逆转录病毒

表达载体 pMXs-IP, 并利用该载体转导该细胞系来异位过表达癌因子多肽。用嘌呤霉素选择阳性转导的细胞系 (因为载体编码嘌呤霉素抗性盒), 并通过 RT-PCR 确认过表达。

[0346] 对于基线为阳性的细胞系, 癌症相关多肽的表达用 RNAi 敲低。将靶向癌因子序列的 shRNA 构建体克隆入 HuSH 载体中 (Origene, Rockville, MD), 并将其通过 shRNA 转导递送至靶细胞。癌症相关序列的敲低通过 RT-PCR 确认。

[0347] c. 对细胞增殖和形态影响的表征

[0348] 将癌因子序列表达为阳性或阴性的细胞系以相等的密度铺板, 并每天计数, 持续 7 天。同时, 观察细胞随癌因子蛋白表达发生的形态变化。

d. 抗体结合的表征

[0349] 靶向癌因子蛋白序列的抗体通过 western 印迹来表征结合。将表达为阳性或阴性的细胞的裂解物在 SDS-PAGE 凝胶上运行, 并用抗体印迹。在癌因子蛋白为分泌蛋白的情况下, 从表达该蛋白的细胞收集上清液, 用三氯乙酸沉淀该蛋白, 在 SDS-PAGE 上运行, 并用抗体进行 western 印迹。在该蛋白与细胞表面结合的情况下, 抗体结合还可以通过流式细胞术确认。用抗体染色靶标表达为阳性的细胞, 然后用相关的二抗 (其对一抗的恒定区具有特异性且与荧光蛋白缀合) 复染。然后在细胞仪的荧光通道中成像抗体结合。

[0350] e. 抗体依赖的细胞毒性 (ADCC) 测定

[0351] 对癌因子序列表达为阳性或阴性的靶细胞系装载钙黄绿素 -AM 试剂 (Beckton Dickinson, Sparks, MD), 该试剂能被细胞内的酯酶切割并保留在细胞胞质中。细胞用癌因子蛋白或同种型对照特异性的抗体孵育。然后将细胞与已通过聚蔗糖梯度分离的来自健康成年志愿者的人 PBMC 以不同的比例混合。孵育 4 小时以后, 收集上清液, 并测量时间分辨荧光, 作为细胞裂解以及因此的 ADCC 的读数。

[0352] f. 补体依赖的细胞毒性 (CDC) 测定

[0353] 对癌因子蛋白表达为阳性或阴性的靶细胞系装载钙黄绿素 -AM 试剂, 该试剂能被细胞内的酯酶切割并保留在细胞胞质中。细胞用癌因子蛋白或同种型对照特异性的抗体孵育。然后将细胞与来自健康成年志愿者的新鲜人血清的不同稀释物混合。孵育 4 小时以后, 收集上清液, 并测量时间分辨荧光, 作为细胞裂解以及因此的 CDC 的读数。

[0354] g. 混合淋巴细胞反应

[0355] 将癌因子蛋白表达为阳性或阴性的 Raji B 淋巴瘤细胞用丝裂霉素 C 处理以抑制增殖和活化。然后用通过聚蔗糖密度梯度从成年健康志愿者的全血分离的外周血单核细胞 (PBMC) 孵育 Raji B 细胞。将混合的细胞培养物一起以不同的细胞比例孵育, 持续不同的时间段。

[0356] 细胞因子分析: 收集来自混合培养物的上清液, 并通过市售的 ELISA 试剂评价大量混合淋巴细胞培养物的细胞因子释放。检测的细胞因子包括 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN γ 、TNF 和 TGF β 。此外, 通过细胞内细胞因子染色结合谱系标志物染色评价特定细胞群释放的细胞因子, 并通过流式细胞术评价。特定的细胞群被限定为 Th1T 细胞: CD3+、CD4+、Tbet+、CD8-、CD19-、CD11b-; Th2T 细胞: CD3+、CD4+、GATA3+、CD19-、CD11b-; Treg T 细胞: CD3+、CD4+、Foxp3+、CD19-、CD11b-; Th17T 细胞: CD3+、CD4+、CD8-、ROR γ T+、CD19-、CD11b-; CD8T 细胞: CD3+、CD4-、CD8+、CD19-、CD11b-; B 细胞: CD3-、CD19+、CD11b-; 树突细胞: CD3-、CD19-、CD11b+、CD11c+; 巨噬细胞: CD3-、CD19-、CD11b+、CD11c-; NK 细胞: 无唾液酸 -GM1+、CD3-、CD19- 和 CD11b-。

[0357] 活化标志物表达：此外，在相同的时间点，从混合的培养物收集细胞，对谱系标志物进行染色，并通过流式细胞术评估免疫活化标志物的上调。活化标志物包括（对于 T 细胞）：CD25、CD44、CD69 和 CD154；（对于抗原呈递细胞包括 B 细胞）：CD40、CD80、CD86、MHCII；以及（对于 NK 细胞）：CD69 和 CD161。

[0358] 响应 PBMC 的增殖：在与 Raji B 细胞孵育之前，通过用 CFSE 对 PBMC 进行染色来评价 PBMC 群。在共培养之后的不同时间点，通过在表面标志物所描绘的特定群体中稀释 CFSE 来评价 PBMC 的增殖。没有与 Raji B 细胞共培养的染色的 PBMC 用作阴性对照。

[0359] 细胞毒活性测定：将癌因子蛋白表达为阳性或阴性的 Raji B 细胞用 PBMC 孵育 6 天。接下来，将 PBMC/Raji B 共培养物加入到新鲜的已装载了钙黄绿素 -AM 试剂的 Raji B 细胞中。孵育 4 小时以后，收集上清液，并测量时间分辨荧光，作为 Raji B 细胞裂解的读数。

[0360] 这与 ADCC 测定类似，但是对于这些测定，表达癌因子蛋白的 Raji B 细胞被允许在无抗体的情况下活化 PBMC 几天，其中在 ADCC 测定中，将新鲜的 PBMC 与抗体一起加入到表达癌因子蛋白的细胞（Raji B、4T1、C1498 或 TRAMP-C2）中，并在仅几小时后测量细胞裂解。

[0361] 混合的淋巴细胞与抗体的反应：混合的淋巴细胞反应的测定在存在能与癌因子蛋白特异性结合的抗体的情况下重复。评价抗体逆转癌因子蛋白介导的表型的能力。

[0362] h. 在原发肿瘤中表达的表征

[0363] 通过 western 印迹（如上文所述）与癌因子蛋白结合的抗体用于表征癌因子蛋白在原发人肿瘤上的表达。用抗体染色来自肿瘤谱（包括但不限于肝、胰腺、乳腺、肺、膀胱、前列腺）和匹配的正常组织的核心样品。优选由许可的病理学专家评价抗体染色的程度。

[0364] 实施例 2

[0365] 用癌因子活化 PBMC 增加了肿瘤细胞的特异性裂解

[0366] 肿瘤细胞裂解方法

[0367] 外周血单核细胞（PBMC）通过聚蔗糖泛影葡胺梯度分离法从对健康供体静脉穿刺获得的全血分离。用丝裂霉素 C 处理 Raji B 淋巴瘤细胞以交联 DNA 并防止复制。进行肿瘤淋巴细胞的混合培养（MTLC）。用不同浓度的重组癌因子共培养比值为 10:1 的 PBMC 和 Raji 细胞 6 天（参见表 2）。PBMC 在 6 天共培养期间内被活化以特异性地识别 Raji 细胞，并且 PBMC CD8+T 淋巴细胞群被刺激以特异性地裂解 Raji 细胞。

[0368] 在第 6 天，用荧光钙黄绿素染料——钙黄绿素 AM 标记新鲜的 Raji 细胞，并将其与预活化的 PBMC 孵育 4.5 小时。CD8+T 细胞裂解 Raji 细胞通过释放入上清液中的钙黄绿素 AM 来检测，利用荧光计定量钙黄绿素 AM。特异性的裂解被计算为，在校正自发的钙黄绿素 AM 释放之后，从混合的肿瘤淋巴细胞培养物释放的钙黄绿素 AM 与从用 Triton X-100 处理以达到总裂解的 Raji 细胞释放的钙黄绿素 AM 的比值。

[0369] 特异性的裂解 = (单独的 MTLC-PBMC) / (单独的 Triton-PBMC)

[0370] 为了控制钙黄绿素 AM 的自发释放，Raji 细胞被装载钙黄绿素 AM，但没有用 PBMC 孵育用于 4.5 小时的裂解阶段。为了控制非特异性的裂解，PBMC 没有用 Raji 细胞，而是平行地用植物凝血素（PHA）培养最初的 6 天，所述植物凝血素诱导非特异性的活化。将这些 PBMC 加入到装载了钙黄绿素的 Raji 细胞中，用于 4.5 小时的裂解阶段。

[0371] 表 2

[0372]

癌因子	重组的癌因子浓度
IL1f5	0.1 μg/ml, 1 μg/ml, 3 μg/ml
IL1RAP2	0.2 μg/ml, 2 μg/ml, 5 μg/ml
CCL14	0.5 μg/ml, 3 μg/ml, 10 μg/ml
IL1R2	0.5 μg/ml, 1 μg/ml, 3 μg/ml

[0373] IL1f5 肿瘤细胞裂解实验的结果

[0374] 图 1 表明,包含用 Raji B 淋巴瘤细胞和重组 IL1f5 多肽培养的 PBMC 的 MTLC 与未用 IL1f5 培养的 MTLC 相比,展现出剂量依赖地降低 Raji B 淋巴瘤细胞裂解。这些结果表明,IL1f5 能够抑制免疫应答。为了控制非特异性的裂解,PBMC 在不存在 Raji B 淋巴瘤细胞的情况下被用 IL1f5 培养最初的 6 天,然后将其加入到装载了钙黄绿素的 Raji 细胞中,用于 4.5 小时的裂解阶段。

[0375] IL1RAP2 肿瘤细胞裂解实验的结果

[0376] 图 2 表明,包含用 Raji B 淋巴瘤细胞和重组 IL1RAP2 多肽培养的 PBMC 的 MTLC 与未用 IL1RAP2 培养的 MTLC 相比,展现出剂量依赖地降低 Raji B 淋巴瘤细胞裂解。这些结果表明,IL1RAP2 能够抑制免疫应答。

[0377] CCL14 肿瘤细胞裂解实验的结果

[0378] 图 3 表明,包含用 Raji B 淋巴瘤细胞和重组 CCL14 多肽培养的 PBMC 的 MTLC 与未用 CCL14 培养的 MTLC 相比,展现出剂量依赖地降低 Raji B 淋巴瘤细胞裂解。这些结果表明,CCL14 能够抑制免疫应答。

[0379] IL1R2 肿瘤细胞裂解实验的结果

[0380] 图 18 表明,包含用 Raji B 淋巴瘤细胞和重组 IL1R2 多肽培养的 PBMC 的 MTLC 与未用 IL1R2 培养的 MTLC 相比,展现出剂量依赖地降低 Raji B 淋巴瘤细胞裂解。这些结果表明,IL1R2 能够抑制免疫应答。

[0381] 实施例 3

[0382] 癌因子免疫组织化学

[0383] 免疫组织化学方法

[0384] 通过免疫组织化学染色评估肿瘤和匹配的正常对照组织中个别癌因子的表达。测试了不同滴度的个别癌因子特异性的抗体,以鉴定将导致最小背景和最大信号检测的稀释度或浓度。通过对不表达个别癌因子的阴性细胞系(例如,HEK293T 细胞),以及瞬时转染癌因子的阳性细胞系(例如,转染了 IL1f5 或 GPR183 的 HEK293T 细胞)进行染色来验证抗体特异性。通过 qPCR 和 western 印迹验证转染的 HEK293T 细胞中的癌因子表达。最终的抗体染色稀释度或浓度显示在表 3 中。

[0385] 所用的一抗显示在表 3 中。主要的检测系统由 Vector 抗兔二抗 (BA-1000) 和 Vector ABC-AP 试剂盒 (AK-5000) 以及 Vector Red 底物试剂盒 (SK-5100) 组成,其产生紫红色的沉淀。阴性对照由在不存在一抗的情况下在邻近的切片上进行完整的免疫组织化学方案组成。组织还用阳性对照抗体 (CD31 和波形蛋白) 染色,以确保组织抗原被保存并

可用于免疫组织化学分析。玻片由病理学医师解释,并评估每种抗体的特异性信号的存在和背景的水平。染色强度被记录成 0-4 个等级 (0= 阴性,1= 红色,2= 微弱的,3= 中等的,4= 强烈的)。染色的玻片用配备了 Nikon 显微镜的 DVC1310C 数码相机成像。图像用 Adobe Photoshop 保存成 TIF 文件。

[0386] 染色的生物样品由来自以下五种癌症中的每一种的 40 份肿瘤组织和 10 份正常对照组织组成:乳腺癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌和前列腺癌。样品被装成组织微阵列,其由来自肿瘤活检的 1mm 核心样品以及来自同一器官的 10 份正常对照组织组成。

[0387] 表 3

[0388]

癌因子	一抗	最终的抗体浓度/稀释度
IL1f5	Sigma Aldrich #HPA034542	1:50 的最终稀释度
GPR183	Lifespan #LS-A46	10 µg/mL 的终浓度
IL1RAP	Genetex #GTX-104513	20 µg/mL 的终浓度
CCL14	Santa Cruz #28388	2 µg/mL 的终浓度
SEMA4D	Sigma Aldrich #HPA015662	1:100 的最终稀释度
IL1R2	Sigma Aldrich #HPA027598	1:50 的最终稀释度

[0389] IL1f5IHC 的结果

[0390] 与对照相比,在来自乳腺癌、结肠癌、肺癌和前列腺癌的肿瘤样品中观察到增加的 IL1f5 抗体染色。代表性的图像显示在图 4-7 中。IL1f5 染色在乳腺癌中是最强的,但在结肠癌、肺癌和前列腺癌中也强。此外,平均病理学得分的比较表明,具有更高临床等级(表明与正常细胞形态差异更大)的乳腺肿瘤样品与 IL1f5 过表达相关。3 级癌症的平均得分为 3.45,而 2 级癌症得分为 2.31,非癌组织得分为 1.12。

[0391] GPR183IHC 的结果

[0392] 与对照相比,在来自乳腺癌、结肠癌和肺癌的肿瘤样品中观察到增加的 GPR183 抗体染色。代表性的图像显示在图 8-10 中。GPR183 染色在乳腺癌中是最强的,但在结肠癌和肺癌中也强。此外,平均病理学得分的比较表明,具有更高临床等级(表明与正常细胞形态差异更大)的乳腺肿瘤样品与 GPR183 过表达相关。3 级癌症的平均得分为 2.32,而 2 级癌症得分为 1.65,非癌组织得分为 1.17。

[0393] IL1RAP IHC 的结果

[0394] 与对照相比,在来自乳腺癌和肺癌的肿瘤样品中观察到增加的 IL1RAP 抗体染色。代表性的图像显示在图 11-12 中。IL1f5 染色在乳腺癌中是最强的,但在肺癌中也强。与非癌细胞的 1.22 相比,恶性乳腺细胞的平均 IHC 得分为 3.44。与非癌细胞的 1.88 相比,肺肿瘤的平均 IHC 得分为 2.89。

[0395] CCL14IHC 的结果

[0396] 与对照相比,在来自乳腺癌、前列腺癌和肺癌的肿瘤样品中观察到增加的 CCL14

抗体染色。代表性的图像显示在图 13-15 中。CCL14 染色在乳腺癌中是最强的,但在前列腺癌和肺癌中也强。与非癌细胞的 1.25 相比,恶性乳腺细胞的平均 IHC 得分为 2.61。与非癌细胞的 0.60 相比,肺肿瘤的平均 IHC 得分为 1.86。

[0397] SEMA4D IHC 的结果

[0398] 与对照相比,在来自乳腺癌的肿瘤样品中观察到增加的 SEMA4D 抗体染色。代表性的图像显示在图 16 中。SEMA4D 染色在乳腺癌中是强的。与非癌细胞的 2.29 相比,恶性乳腺细胞的平均 IHC 得分为 2.92。

[0399] IL1R2IHC 的结果

[0400] 与对照相比,在来自乳腺癌的肿瘤样品中观察到增加的 IL1R2 抗体染色。代表性的图像显示在图 17 中。IL1R2 染色在乳腺癌中是强的。与非癌细胞的 1.5 相比,恶性乳腺细胞的平均 IHC 得分为 2.25。

[0401] 实施例 4

[0402] 在存在癌因子情况下的 T 细胞增殖

[0403] 方法

[0404] 通过聚蔗糖泛影葡胺梯度分离法从对健康供体静脉穿刺获得的全血分离外周血单核细胞 (PBMC),并用二醋酸羧基荧光素 (CFSE) 标记。用丝裂霉素 C 处理 Raji B 淋巴瘤细胞以交联 DNA 并防止复制。然后通过用不同浓度的重组 IL1f5 共培养比值为 10:1 的 BMC 和 Raji6 天,建立肿瘤淋巴细胞的混合培养 (MTLC)。在这段时间内,来自 PBMC 群的 T 淋巴细胞被活化并通过无性繁殖分裂。

[0405] CFSE 是膜不透染料。随着每次连续的细胞分裂,每个细胞中 CFSE 的量减半,并可以通过流式细胞术监测 CFSE 染色的强度来追踪细胞分裂的次数。通过用抗 CD3-PE (E Bioscience 抗 CD3-PE Catalog#17-0036-42) 阳性染色来鉴定 T 细胞。通过将 CFSE 染色的强度与静止 T 细胞进行比较来分析细胞分裂的次数。当 CFSE 染色的水平低于检测极限时, T 细胞被界定为完全分裂。数据被收集在 Accuri C6 流式细胞仪上并用 FCSExpress 分析。为了控制 IL1f5 的非特异性活性, PBMC 在不存在 Raji 细胞的情况下与 IL1f5 一起培养。

[0406] IL1f5IHC 的结果

[0407] 包含用 Raji B 淋巴瘤细胞和重组 IL1f5 多肽培养的 PBMC 的 MTLC 与未用 IL1f5 培养的 MTLC 和 PBMC 对照相比,导致剂量依赖地降低 T 细胞增殖。这些结果 (图 19) 表明, IL1f5 能够通过降低 T 细胞增殖来抑制免疫应答。

[0408] 从上述内容应当了解到,尽管由于说明的目的已在本文对本发明的具体实施方案进行了描述,但是可以进行不同的修改,而不脱离本发明的精神和范围。因此,本发明不受除所附权利要求范围之外内容的限制。

[0001]

序列表

<110> 昂科发克特公司
 莎拉·埃伦·沃伦
 卡尔·外斯曼

<120> 用于治疗 and 诊断癌症的组合物和方法

<130> ONCE-001/03WO 315752-2004

<150> US 61/583,033

<151> 2012-01-04

<150> US 61/547,342

<151> 2011-10-14

<150> US 61/499,534

<151> 2011-06-21

<160> 24

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 155

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

<210> 2

<211> 384

<212> PRT

<213> 智人

[0002]

<400> 2
 Met Ala Ala Thr Ala Ser Pro Gln Pro Leu Ala Thr Glu Asp Ala Asp
 1 5 10 15
 Ser Glu Asn Ser Ser Phe Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Leu Asp Glu Val Ala
 20 25 30
 Phe Met Leu Cys Arg Lys Asp Ala Val Val Ser Phe Gly Lys Val Phe
 35 40 45
 Leu Pro Val Phe Tyr Ser Leu Ile Phe Val Leu Gly Leu Ser Gly Asn
 50 55 60
 Leu Leu Leu Leu Met Val Leu Leu Arg Tyr Val Pro Arg Arg Arg Met
 65 70 75 80
 Val Glu Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asn Leu Leu Phe Leu
 85 90 95
 Val Thr Leu Pro Phe Trp Gly Ile Ser Val Ala Trp His Trp Val Phe
 100 105 110
 Gly Ser Phe Leu Cys Lys Met Val Ser Thr Leu Tyr Thr Ile Asn Phe
 115 120 125
 Tyr Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ser Cys Met Ser Leu Asp Lys Tyr Leu
 130 135 140
 Glu Ile Val His Ala Gln Pro Tyr His Arg Leu Arg Thr Arg Ala Lys
 145 150 155 160
 Ser Leu Leu Leu Ala Thr Ile Val Trp Ala Val Ser Leu Ala Val Ser
 165 170 175
 Ile Pro Asp Met Val Phe Val Gln Thr His Glu Asn Pro Lys Gly Val
 180 185 190
 Trp Asn Cys His Ala Asp Phe Gly Gly His Gly Thr Ile Trp Lys Leu
 195 200 205
 Phe Leu Arg Phe Gln Gln Asn Leu Leu Gly Phe Leu Leu Pro Leu Leu
 210 215 220
 Ala Met Ile Phe Phe Tyr Ser Arg Ile Gly Cys Val Leu Val Arg Leu
 225 230 235 240
 Arg Pro Ala Gly Gln Gly Arg Ala Leu Lys Ile Ala Ala Ala Leu Val
 245 250 255
 Val Ala Phe Phe Val Leu Trp Phe Pro Tyr Asn Leu Thr Leu Phe Leu
 260 265 270
 His Thr Leu Leu Asp Leu Gln Val Phe Gly Asn Cys Glu Val Ser Gln
 275 280 285
 His Leu Asp Tyr Ala Leu Gln Val Thr Glu Ser Ile Ala Phe Leu His
 290 295 300
 Cys Cys Phe Ser Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Ser Ser His Arg Phe Arg
 305 310 315 320
 Gln Tyr Leu Lys Ala Phe Leu Ala Ala Val Leu Gly Trp His Leu Ala
 325 330 335
 Pro Gly Thr Ala Gln Ala Ser Leu Ser Ser Cys Ser Glu Ser Ser Ile
 340 345 350
 Leu Thr Ala Gln Glu Glu Met Thr Gly Met Asn Asp Leu Gly Glu Arg
 355 360 365
 Gln Ser Glu Asn Tyr Pro Asn Lys Glu Asp Val Gly Asn Lys Ser Ala
 370 375 380

<210> 3
 <211> 398
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

[0003]

Met	Leu	Arg	Leu	Tyr	Val	Leu	Val	Met	Gly	Val	Ser	Ala	Phe	Thr	Leu
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ala	His	Thr	Gly	Ala	Ala	Arg	Ser	Cys	Arg	Phe	Arg	Gly
			20					25					30		
Arg	His	Tyr	Lys	Arg	Glu	Phe	Arg	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Val	Ala	Leu
		35					40					45			
Arg	Cys	Pro	Gln	Val	Pro	Tyr	Trp	Leu	Trp	Ala	Ser	Val	Ser	Pro	Arg
	50					55					60				
Ile	Asn	Leu	Thr	Trp	His	Lys	Asn	Asp	Ser	Ala	Arg	Thr	Val	Pro	Gly
65					70					75				80	
Glu	Glu	Glu	Thr	Arg	Met	Trp	Ala	Gln	Asp	Gly	Ala	Leu	Trp	Leu	Leu
				85					90					95	
Pro	Ala	Leu	Gln	Glu	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Val	Cys	Thr	Thr	Arg	Asn
			100					105						110	
Ala	Ser	Tyr	Cys	Asp	Lys	Met	Ser	Ile	Glu	Leu	Arg	Val	Phe	Glu	Asn
		115					120					125			
Thr	Asp	Ala	Phe	Leu	Pro	Phe	Ile	Ser	Tyr	Pro	Gln	Ile	Leu	Thr	Leu
		130				135						140			
Ser	Thr	Ser	Gly	Val	Leu	Val	Cys	Pro	Asp	Leu	Ser	Glu	Phe	Thr	Arg
145					150					155				160	
Asp	Lys	Thr	Asp	Val	Lys	Ile	Gln	Trp	Tyr	Lys	Asp	Ser	Leu	Leu	Leu
				165					170					175	
Asp	Lys	Asp	Asn	Glu	Lys	Phe	Leu	Ser	Val	Arg	Gly	Thr	Thr	His	Leu
			180					185						190	
Leu	Val	His	Asp	Val	Ala	Leu	Glu	Asp	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Arg	Cys	Val
		195					200					205			
Leu	Thr	Phe	Ala	His	Glu	Gly	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ile	Thr	Arg	Ser	Ile
	210					215						220			
Glu	Leu	Arg	Ile	Lys	Lys	Lys	Lys	Glu	Glu	Thr	Ile	Pro	Val	Ile	Ile
225					230					235				240	
Ser	Pro	Leu	Lys	Thr	Ile	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile
			245						250					255	
Pro	Cys	Lys	Val	Phe	Leu	Gly	Thr	Gly	Thr	Pro	Leu	Thr	Thr	Met	Leu
			260					265						270	
Trp	Trp	Thr	Ala	Asn	Asp	Thr	His	Ile	Glu	Ser	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gly
		275					280					285			
Arg	Val	Thr	Glu	Gly	Pro	Arg	Gln	Glu	Tyr	Ser	Glu	Asn	Asn	Glu	Asn
	290					295					300				
Tyr	Ile	Glu	Val	Pro	Leu	Ile	Phe	Asp	Pro	Val	Thr	Arg	Glu	Asp	Leu
305					310					315				320	
His	Met	Asp	Phe	Lys	Cys	Val	Val	His	Asn	Thr	Leu	Ser	Phe	Gln	Thr
				325					330					335	
Leu	Arg	Thr	Thr	Val	Lys	Glu	Ala	Ser	Ser	Thr	Phe	Ser	Trp	Gly	Ile
			340					345						350	
Val	Leu	Ala	Pro	Leu	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Val	Leu	Gly	Gly	Ile	Trp
		355					360					365			
Met	His	Arg	Arg	Cys	Lys	His	Arg	Thr	Gly	Lys	Ala	Asp	Gly	Leu	Thr
	370					375					380				
Val	Leu	Trp	Pro	His	His	Gln	Asp	Phe	Gln	Ser	Tyr	Pro	Lys		
385					390					395					

<210> 4

<211> 696

<212> PRT

<213> 智人

[0004]

```

<400> 4
Met Lys Ala Pro Ile Pro His Leu Ile Leu Leu Tyr Ala Thr Phe Thr
1      5      10      15
Gln Ser Leu Lys Val Val Thr Lys Arg Gly Ser Ala Asp Gly Cys Thr
20     25     30
Asp Trp Ser Ile Asp Ile Lys Lys Tyr Gln Val Leu Val Gly Glu Pro
35     40     45
Val Arg Ile Lys Cys Ala Leu Phe Tyr Gly Tyr Ile Arg Thr Asn Tyr
50     55     60
Ser Leu Ala Gln Ser Ala Gly Leu Ser Leu Met Trp Tyr Lys Ser Ser
65     70     75     80
Gly Pro Gly Asp Phe Glu Glu Pro Ile Ala Phe Asp Gly Ser Arg Met
85     90     95
Ser Lys Glu Glu Asp Ser Ile Trp Phe Arg Pro Thr Leu Leu Gln Asp
100    105    110
Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Val Ile Arg Asn Ser Thr Tyr Cys Met Lys
115    120    125
Val Ser Ile Ser Leu Thr Val Gly Glu Asn Asp Thr Gly Leu Cys Tyr
130    135    140
Asn Ser Lys Met Lys Tyr Phe Glu Lys Ala Glu Leu Ser Lys Ser Lys
145    150    155    160
Glu Ile Ser Cys Arg Asp Ile Glu Asp Phe Leu Leu Pro Thr Arg Glu
165    170    175
Pro Glu Ile Leu Trp Tyr Lys Glu Cys Arg Thr Lys Thr Trp Arg Pro
180    185    190
Ser Ile Val Phe Lys Arg Asp Thr Leu Leu Ile Arg Glu Val Arg Glu
195    200    205
Asp Asp Ile Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Leu Lys Tyr Gly Gly Phe Val
210    215    220
Val Arg Arg Thr Thr Glu Leu Thr Val Thr Ala Pro Leu Thr Asp Lys
225    230    235    240
Pro Pro Lys Leu Leu Tyr Pro Met Glu Ser Lys Leu Thr Ile Gln Glu
245    250    255
Thr Gln Leu Gly Asp Ser Ala Asn Leu Thr Cys Arg Ala Phe Phe Gly
260    265    270
Tyr Ser Gly Asp Val Ser Pro Leu Ile Tyr Trp Met Lys Gly Glu Lys
275    280    285
Phe Ile Glu Asp Leu Asp Glu Asn Arg Val Trp Glu Ser Asp Ile Arg
290    295    300
Ile Leu Lys Glu His Leu Gly Glu Gln Glu Val Ser Ile Ser Leu Ile
305    310    315    320
Val Asp Ser Val Glu Gly Asp Leu Gly Asn Tyr Ser Cys Tyr Val
325    330    335
Glu Asn Gly Asn Gly Arg Arg His Ala Ser Val Leu Leu His Lys Arg
340    345    350
Glu Leu Met Tyr Thr Val Glu Leu Ala Gly Gly Leu Gly Ala Ile Leu
355    360    365
Leu Leu Leu Val Cys Leu Val Thr Ile Tyr Lys Cys Tyr Lys Ile Glu
370    375    380
Ile Met Leu Phe Tyr Arg Asn His Phe Gly Ala Glu Glu Leu Asp Gly
385    390    395    400
Asp Asn Lys Asp Tyr Asp Ala Tyr Leu Ser Tyr Thr Lys Val Asp Pro
405    410    415
Asp Gln Trp Asn Gln Glu Thr Gly Glu Glu Glu Arg Phe Ala Leu Glu
420    425    430
Ile Leu Pro Asp Met Leu Glu Lys His Tyr Gly Tyr Lys Leu Phe Ile
435    440    445

```

[0005]

```

Pro Asp Arg Asp Leu Ile Pro Thr Gly Thr Tyr Ile Glu Asp Val Ala
450                               455                               460
Arg Cys Val Asp Gln Ser Lys Arg Leu Ile Ile Val Met Thr Pro Asn
465                               470                               475                               480
Tyr Val Val Arg Arg Gly Trp Ser Ile Phe Glu Leu Glu Thr Arg Leu
                               485                               490                               495
Arg Asn Met Leu Val Thr Gly Glu Ile Lys Val Ile Leu Ile Glu Cys
                               500                               505                               510
Ser Glu Leu Arg Gly Ile Met Asn Tyr Gln Glu Val Glu Ala Leu Lys
                               515                               520                               525
His Thr Ile Lys Leu Leu Thr Val Ile Lys Trp His Gly Pro Lys Cys
                               530                               535                               540
Asn Lys Leu Asn Ser Lys Phe Trp Lys Arg Leu Gln Tyr Glu Met Pro
545                               550                               555                               560
Phe Lys Arg Ile Glu Pro Ile Thr His Glu Gln Ala Leu Asp Val Ser
                               565                               570                               575
Glu Gln Gly Pro Phe Gly Glu Leu Gln Thr Val Ser Ala Ile Ser Met
                               580                               585                               590
Ala Ala Ala Thr Ser Thr Ala Leu Ala Thr Ala His Pro Asp Leu Arg
                               595                               600                               605
Ser Thr Phe His Asn Thr Tyr His Ser Gln Met Arg Gln Lys His Tyr
610                               615                               620
Tyr Arg Ser Tyr Glu Tyr Asp Val Pro Pro Thr Gly Thr Leu Pro Leu
625                               630                               635                               640
Thr Ser Ile Gly Asn Gln His Thr Tyr Cys Asn Ile Pro Met Thr Leu
                               645                               650                               655
Ile Asn Gly Gln Arg Pro Gln Thr Lys Ser Ser Arg Glu Gln Asn Pro
                               660                               665                               670
Asp Glu Ala His Thr Asn Ser Ala Ile Leu Pro Leu Leu Pro Arg Glu
                               675                               680                               685
Thr Ser Ile Ser Ser Val Ile Trp
690                               695

```

<210> 5
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5

```

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

```

[0006]

130 135 140
 Ser Thr Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln
 145 150 155 160
 Arg His Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala Thr Leu
 165 170 175
 Pro Pro Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro Gln Gln
 180 185 190
 Gln Gly

<210> 6
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6
 Met Met Thr Lys His Lys Lys Cys Phe Ile Ile Val Gly Val Leu Ile
 1 5 10 15
 Thr Thr Asn Ile Ile Thr Leu Ile Val Lys Leu Thr Arg Asp Ser Gln
 20 25 30
 Ser Leu Cys Pro Tyr Asp Trp Ile Gly Phe Gln Asn Lys Cys Tyr Tyr
 35 40 45
 Phe Ser Lys Glu Glu Gly Asp Trp Asn Ser Ser Lys Tyr Asn Cys Ser
 50 55 60
 Thr Gln His Ala Asp Leu Thr Ile Ile Asp Asn Ile Glu Glu Met Asn
 65 70 75 80
 Phe Leu Arg Arg Tyr Lys Cys Ser Ser Asp His Trp Ile Gly Leu Lys
 85 90 95
 Met Ala Lys Asn Arg Thr Gly Gln Trp Val Asp Gly Ala Thr Phe Thr
 100 105 110
 Lys Ser Phe Gly Met Arg Gly Ser Glu Gly Cys Ala Tyr Leu Ser Asp
 115 120 125
 Asp Gly Ala Ala Thr Ala Arg Cys Tyr Thr Glu Arg Lys Trp Ile Cys
 130 135 140
 Arg Lys Arg Ile His
 145

<210> 7
 <211> 597
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 7
 Met His Pro Pro Lys Thr Pro Ser Gly Ala Leu His Arg Lys Arg Lys
 1 5 10 15
 Met Ala Ala Trp Pro Phe Ser Arg Leu Trp Lys Val Ser Asp Pro Ile
 20 25 30
 Leu Phe Gln Met Thr Leu Ile Ala Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Gly
 35 40 45
 Asn Cys Gly Pro Pro Pro Thr Leu Ser Phe Ala Ala Pro Met Asp Ile
 50 55 60
 Thr Leu Thr Glu Thr Arg Phe Lys Thr Gly Thr Thr Leu Lys Tyr Thr
 65 70 75 80
 Cys Leu Pro Gly Tyr Val Arg Ser His Ser Thr Gln Thr Leu Thr Cys
 85 90 95

[0007]

Asn	Ser	Asp	Gly	Glu	Trp	Val	Tyr	Asn	Thr	Phe	Cys	Ile	Tyr	Lys	Arg	100	105	110
Cys	Arg	His	Pro	Gly	Glu	Leu	Arg	Asn	Gly	Gln	Val	Glu	Ile	Lys	Thr	115	120	125
Asp	Leu	Ser	Phe	Gly	Ser	Gln	Ile	Glu	Phe	Ser	Cys	Ser	Glu	Gly	Phe	130	135	140
Phe	Leu	Ile	Gly	Ser	Thr	Thr	Ser	Arg	Cys	Glu	Val	Gln	Asp	Arg	Gly	145	150	155
Val	Gly	Trp	Ser	His	Pro	Leu	Pro	Gln	Cys	Glu	Ile	Val	Lys	Cys	Lys	165	170	175
Pro	Pro	Pro	Asp	Ile	Arg	Asn	Gly	Arg	His	Ser	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	180	185	190
Tyr	Ala	Tyr	Gly	Phe	Ser	Val	Thr	Tyr	Ser	Cys	Asp	Pro	Arg	Phe	Ser	195	200	205
Leu	Leu	Gly	His	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Thr	Val	Glu	Asn	Glu	Thr	Ile	210	215	220
Gly	Val	Trp	Arg	Pro	Ser	Pro	Pro	Thr	Cys	Glu	Lys	Ile	Thr	Cys	Arg	225	230	235
Lys	Pro	Asp	Val	Ser	His	Gly	Glu	Met	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Pro	Ile	245	250	255
Tyr	Asn	Tyr	Lys	Asp	Thr	Ile	Val	Phe	Lys	Cys	Gln	Lys	Gly	Phe	Val	260	265	270
Leu	Arg	Gly	Ser	Ser	Val	Ile	His	Cys	Asp	Ala	Asp	Ser	Lys	Trp	Asn	275	280	285
Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Cys	Glu	Pro	Asn	Ser	Cys	Ile	Asn	Leu	Pro	Asp	290	295	300
Ile	Pro	His	Ala	Ser	Trp	Glu	Thr	Tyr	Pro	Arg	Pro	Thr	Lys	Glu	Asp	305	310	315
Val	Tyr	Val	Val	Gly	Thr	Val	Leu	Arg	Tyr	Arg	Cys	His	Pro	Gly	Tyr	325	330	335
Lys	Pro	Thr	Thr	Asp	Glu	Pro	Thr	Thr	Val	Ile	Cys	Gln	Lys	Asn	Leu	340	345	350
Arg	Trp	Thr	Pro	Tyr	Gln	Gly	Cys	Glu	Ala	Leu	Cys	Cys	Pro	Glu	Pro	355	360	365
Lys	Leu	Asn	Asn	Gly	Glu	Ile	Thr	Gln	His	Arg	Lys	Ser	Arg	Pro	Ala	370	375	380
Asn	His	Cys	Val	Tyr	Phe	Tyr	Gly	Asp	Glu	Ile	Ser	Phe	Ser	Cys	His	385	390	395
Glu	Thr	Ser	Arg	Phe	Ser	Ala	Ile	Cys	Gln	Gly	Asp	Gly	Thr	Trp	Ser	405	410	415
Pro	Arg	Thr	Pro	Ser	Cys	Gly	Asp	Ile	Cys	Asn	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	420	425	430
Ala	His	Gly	His	Tyr	Lys	Gln	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ser	Phe	Phe	Lys	Glu	435	440	445
Glu	Ile	Ile	Tyr	Glu	Cys	Asp	Lys	Gly	Tyr	Ile	Leu	Val	Gly	Gln	Ala	450	455	460
Lys	Leu	Ser	Cys	Ser	Tyr	Ser	His	Trp	Ser	Ala	Pro	Ala	Pro	Gln	Cys	465	470	475
Lys	Ala	Leu	Cys	Arg	Lys	Pro	Glu	Leu	Val	Asn	Gly	Arg	Leu	Ser	Val	485	490	495
Asp	Lys	Asp	Gln	Tyr	Val	Glu	Pro	Glu	Asn	Val	Thr	Ile	Gln	Cys	Asp	500	505	510
Ser	Gly	Tyr	Gly	Val	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asn	515	520	525
Arg	Thr	Trp	Tyr	Pro	Glu	Val	Pro	Lys	Cys	Glu	Trp	Glu	Thr	Pro	Glu	530	535	540
Gly	Cys	Glu	Gln	Val	Leu	Thr	Gly	Lys	Arg	Leu	Met	Gln	Cys	Leu	Pro			

[0008]

〈210〉	8
〈211〉	252
〈212〉	PRT
〈213〉	智人

〈210〉	9
〈211〉	410
〈212〉	PRT
〈213〉	智人

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

65

$\langle 400 \rangle$ 10

66

Met	Thr	Leu	Leu	Trp	Cys	Val	Val	Ser	Leu	Tyr	Phe	Tyr	Gly	Ile	Leu
1				5					10					15	
Gln	Ser	Asp	Ala	Ser	Glu	Arg	Cys	Asp	Asp	Trp	Gly	Leu	Asp	Thr	Met
			20					25					30		
Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Phe	Glu	Asp	Glu	Pro	Ala	Arg	Ile	Lys	Cys	Pro
		35					40					45			
Leu	Phe	Glu	His	Phe	Leu	Lys	Phe	Asn	Tyr	Ser	Thr	Ala	His	Ser	Ala
	50					55					60				
Gly	Leu	Thr	Leu	Ile	Trp	Tyr	Trp	Thr	Arg	Gln	Asp	Arg	Asp	Leu	Glu
65					70				75					80	
Glu	Pro	Ile	Asn	Phe	Arg	Leu	Pro	Glu	Asn	Arg	Ile	Ser	Lys	Glu	Lys
				85					90					95	
Asp	Val	Leu	Trp	Phe	Arg	Pro	Thr	Leu	Leu	Asn	Asp	Thr	Gly	Asn	Tyr
			100					105					110		
Thr	Cys	Met	Leu	Arg	Asn	Thr	Thr	Tyr	Cys	Ser	Lys	Val	Ala	Phe	Pro
	115					120						125			
Leu	Glu	Val	Val	Gln	Lys	Asp	Ser	Cys	Phe	Asn	Ser	Pro	Met	Lys	Leu
	130					135					140				
Pro	Val	His	Lys	Leu	Tyr	Ile	Glu	Tyr	Gly	Ile	Gln	Arg	Ile	Thr	Cys
145					150					155					160
Pro	Asn	Val	Asp	Gly	Tyr	Phe	Pro	Ser	Ser	Val	Lys	Pro	Thr	Ile	Thr
			165						170					175	
Trp	Tyr	Met	Gly	Cys	Tyr	Lys	Ile	Gln	Asn	Phe	Asn	Asn	Val	Ile	Pro
		180						185					190		
Glu	Gly	Met	Asn	Leu	Ser	Phe	Leu	Ile	Ala	Leu	Ile	Ser	Asn	Asn	Gly
	195						200					205			
Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Thr	Tyr	Pro	Glu	Asn	Gly	Arg	Thr	Phe	His
	210					215					220				
Leu	Thr	Arg	Thr	Leu	Thr	Val	Lys	Val	Val	Gly	Ser	Pro	Lys	Asn	Ala
225					230					235					240
Val	Pro	Pro	Val	Ile	His	Ser	Pro	Asn	Asp	His	Val	Val	Tyr	Glu	Lys
			245						250					255	
Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Leu	Leu	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Phe	Ser	Phe
			260					265					270		
Leu	Met	Asp	Ser	Arg	Asn	Glu	Val	Trp	Trp	Thr	Ile	Asp	Gly	Lys	Lys
		275				280						285			
Pro	Asp	Asp	Ile	Thr	Ile	Asp	Val	Thr	Ile	Asn	Glu	Ser	Ile	Ser	His
	290					295					300				
Ser	Arg	Thr	Glu	Asp	Glu	Thr	Arg	Thr	Gln	Ile	Leu	Ser	Ile	Lys	Lys
305					310					315					320
Val	Thr	Ser	Glu	Asp	Leu	Lys	Arg	Ser	Tyr	Val	Cys	His	Ala	Arg	Ser
			325						330					335	
Ala	Lys	Gly	Glu	Val	Ala	Lys	Ala	Ala	Lys	Val	Lys	Gln	Lys	Val	Pro
			340					345					350		
Ala	Pro	Arg	Tyr	Thr	Val	Glu	Leu	Ala	Cys	Gly	Phe	Gly	Ala	Thr	Val
		355				360					365				
Leu	Leu	Val	Val	Ile	Leu	Ile	Val	Val	Tyr	His	Val	Tyr	Trp	Leu	Glu
	370					375					380				
Met	Val	Leu	Phe	Tyr	Arg	Ala	His	Phe	Gly	Thr	Asp	Glu	Thr	Ile	Leu
385					390					395					400
Asp	Gly	Lys	Glu	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Val	Ser	Tyr	Ala	Arg	Asn	Ala	Glu
			405						410					415	
Glu	Glu	Glu	Phe	Val	Leu	Leu	Thr	Leu	Arg	Gly	Val	Leu	Glu	Asn	Glu
			420					425				430			
Phe	Gly	Tyr	Lys	Leu	Cys	Ile	Phe	Asp	Arg	Asp	Ser	Leu	Pro	Gly	Gly
		435				440					445				
Ile	Val	Thr	Asp	Glu	Thr	Leu	Ser	Phe	Ile	Gln	Lys	Ser	Arg	Arg	Leu

[0011]

450	455	460
Leu Val Val Leu Ser Pro Asn Tyr Val Leu Gln Gly Thr Gln Ala Leu		
465	470	475
Leu Glu Leu Lys Ala Gly Leu Glu Asn Met Ala Ser Arg Gly Asn Ile		480
	485	490
Asn Val Ile Leu Val Gln Tyr Lys Ala Val Lys Glu Thr Lys Val Lys		495
	500	505
Glu Leu Lys Arg Ala Lys Thr Val Leu Thr Val Ile Lys Trp Lys Gly		510
	515	520
Glu Lys Ser Lys Tyr Pro Gln Gly Arg Phe Trp Lys Gln Leu Gln Val		525
	530	535
Ala Met Pro Val Lys Lys Ser Pro Arg Arg Ser Ser Ser Asp Glu Gln		540
545	550	555
Gly Leu Ser Tyr Ser Ser Leu Lys Asn Val		560
	565	570

<210> 11
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 11

Met Thr Leu Leu Trp Cys Val Val Ser Leu Tyr Phe Tyr Gly Ile Leu	
1	5
Gln Ser Asp Ala Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met	
	20
Arg Gln Ile Gln Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro	
	35
Leu Phe Glu His Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala	
	50
Gly Leu Thr Leu Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu	
65	70
Glu Pro Ile Asn Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys	
	85
Asp Val Leu Trp Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr	
	100
Thr Cys Met Leu Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro	
	115
Leu Glu Val Val Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu	
	130
Pro Val His Lys Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys	
145	150
Pro Asn Val Asp Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr	
	165
Trp Tyr Met Gly Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro	
	180
Glu Gly Met Asn Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly	
	195
Asn Tyr Thr Cys Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr Phe His	
	210
Leu Thr Arg Thr Leu Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asn Ala	
225	230
Val Pro Pro Val Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr Glu Lys	
	245
Glu Pro Gly Glu Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe Ser Phe	
	260
Leu Met Asp Ser Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys	
	265
	270

[0012]

```

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

```

<210> 12
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 12
Met Glu Asp Leu Glu Glu Thr Leu Phe Glu Glu Phe Glu Asn Tyr Ser
 1                5                10                15
Tyr Asp Leu Asp Tyr Tyr Ser Leu Glu Ser Asp Leu Glu Glu Lys Val
 20                25                30
Gln Leu Gly Val Val His Trp Val Ser Leu Val Leu Tyr Cys Leu Ala
 35                40                45
Phe Val Leu Gly Ile Pro Gly Asn Ala Ile Val Ile Trp Phe Thr Gly
 50                55                60
Phe Lys Trp Lys Lys Thr Val Thr Thr Leu Trp Phe Leu Asn Leu Ala
65                70                75                80
Ile Ala Asp Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Tyr
                85                90                95
Val Ala Met Asn Phe His Trp Pro Phe Gly Ile Trp Leu Cys Lys Ala
                100                105                110
Asn Ser Phe Thr Ala Gln Leu Asn Met Phe Ala Ser Val Phe Phe Leu
                115                120                125
Thr Val Ile Ser Leu Asp His Tyr Ile His Leu Ile His Pro Val Leu
                130                135                140
Ser His Arg His Arg Thr Leu Lys Asn Ser Leu Ile Val Ile Ile Phe
145                150                155                160
Ile Trp Leu Leu Ala Ser Leu Ile Gly Gly Pro Ala Leu Tyr Phe Arg
                165                170                175
Asp Thr Val Glu Phe Asn Asn His Thr Leu Cys Tyr Asn Asn Phe Gln
                180                185                190
Lys His Asp Pro Asp Leu Thr Leu Ile Arg His His Val Leu Thr Trp
                195                200                205
Val Lys Phe Ile Ile Gly Tyr Leu Phe Pro Leu Leu Thr Met Ser Ile
                210                215                220
Cys Tyr Leu Cys Leu Ile Phe Lys Val Lys Lys Arg Ser Ile Leu Ile
225                230                235                240
Ser Ser Arg His Phe Trp Thr Ile Leu Val Val Val Val Ala Phe Val
                245                250                255
Val Cys Trp Thr Pro Tyr His Leu Phe Ser Ile Trp Glu Leu Thr Ile
                260                265                270
His His Asn Ser Tyr Ser His His Val Met Gln Ala Gly Ile Pro Leu
                275                280                285
Ser Thr Gly Leu Ala Phe Leu Asn Ser Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr
                290                295                300

```

[0013]

Val Leu Ile Ser Lys Lys Phe Gln Ala Arg Phe Arg Ser Ser Val Ala
 305 310 315 320
 Glu Ile Leu Lys Tyr Thr Leu Trp Glu Val Ser Cys Ser Gly Thr Val
 325 330 335
 Ser Glu Gln Leu Arg Asn Ser Glu Thr Lys Asn Leu Cys Leu Leu Glu
 340 345 350
 Thr Ala Gln
 355

<210> 13
 <211> 362
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 13
 Met Gly Asn His Thr Trp Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg Val Asp
 1 5 10 15
 His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val Gly Leu
 20 25 30
 Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val Gln Gln
 35 40 45
 Arg Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala Asp Leu
 50 55 60
 Leu Tyr Ile Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu His His
 65 70 75 80
 Asp Asn Trp Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly Phe Ile
 85 90 95
 Phe Tyr Thr Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys Ile Ser
 100 105 110
 Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala Arg Leu
 115 120 125
 Arg Arg Val Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp Ala Thr
 130 135 140
 Glu Leu Gly Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu Phe Arg
 145 150 155 160
 Asp Arg Tyr Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met Glu Gly
 165 170 175
 Trp Val Ala Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe Leu Phe
 180 185 190
 Pro Trp Ala Leu Met Leu Leu Ser Tyr Arg Gly Ile Leu Arg Ala Val
 195 200 205
 Arg Gly Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Ala Lys Ile Lys Arg
 210 215 220
 Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala Pro Tyr
 225 230 235 240
 His Val Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Ile Tyr Leu Gly Arg Pro Trp
 245 250 255
 Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser Ser Leu
 260 265 270
 Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr Cys Leu
 275 280 285
 Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His Asn Leu
 290 295 300
 Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asp Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn Ala Ser
 305 310 315 320
 Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Asn Ser Thr Ala Lys

[0014]

Ala	Met	Thr	Gly	325	Ser	Trp	Ala	Ala	Thr	330	Pro	Pro	Ser	Gln	Gly	335	Asp	Gln
			340							345						350		
Val	Gln	Leu	Lys	Met	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln									
			355						360									

<210> 14
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 14
 Met Asp Pro Glu Glu Thr Ser Val Tyr Leu Asp Tyr Tyr Tyr Ala Thr
 1 5 10 15
 Ser Pro Asn Ser Asp Ile Arg Glu Thr His Ser His Val Pro Tyr Thr
 20 25 30
 Ser Val Phe Leu Pro Val Phe Tyr Thr Ala Val Phe Leu Thr Gly Val
 35 40 45
 Leu Gly Asn Leu Val Leu Met Gly Ala Leu His Phe Lys Pro Gly Ser
 50 55 60
 Arg Arg Leu Ile Asp Ile Phe Ile Ile Asn Leu Ala Ala Ser Asp Phe
 65 70 75 80
 Ile Phe Leu Val Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Lys Glu Ala Ser Leu
 85 90 95
 Gly Leu Trp Arg Thr Gly Ser Phe Leu Cys Lys Gly Ser Ser Tyr Met
 100 105 110
 Ile Ser Val Asn Met His Cys Ser Val Leu Leu Leu Thr Cys Met Ser
 115 120 125
 Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val Trp Pro Val Val Ser Arg Lys Phe
 130 135 140
 Arg Arg Thr Asp Cys Ala Tyr Val Val Cys Ala Ser Ile Trp Phe Ile
 145 150 155 160
 Ser Cys Leu Leu Gly Leu Pro Thr Leu Leu Ser Arg Glu Leu Thr Leu
 165 170 175
 Ile Asp Asp Lys Pro Tyr Cys Ala Glu Lys Lys Ala Thr Pro Ile Lys
 180 185 190
 Leu Ile Trp Ser Leu Val Ala Leu Ile Phe Thr Phe Phe Val Pro Leu
 195 200 205
 Leu Ser Ile Val Thr Cys Tyr Cys Cys Ile Ala Arg Lys Leu Cys Ala
 210 215 220
 His Tyr Gln Gln Ser Gly Lys His Asn Lys Lys Leu Lys Lys Ser Ile
 225 230 235 240
 Lys Ile Ile Phe Ile Val Val Ala Ala Phe Leu Val Ser Trp Leu Pro
 245 250 255
 Phe Asn Thr Phe Lys Phe Leu Ala Ile Val Ser Gly Leu Arg Gln Glu
 260 265 270
 His Tyr Leu Pro Ser Ala Ile Leu Gln Leu Gly Met Glu Val Ser Gly
 275 280 285
 Pro Leu Ala Phe Ala Asn Ser Cys Val Asn Pro Phe Ile Tyr Tyr Ile
 290 295 300
 Phe Asp Ser Tyr Ile Arg Arg Ala Ile Val His Cys Leu Cys Pro Cys
 305 310 315 320
 Leu Lys Asn Tyr Asp Phe Gly Ser Ser Thr Glu Thr Ser Asp Ser His
 325 330 335
 Leu Thr Lys Ala Leu Ser Thr Phe Ile His Ala Glu Asp Phe Ala Arg
 340 345 350

[0015]

Arg Arg Lys Arg Ser Val Ser Leu
355 360

<210> 15

<211> 356

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

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

[0016]

<210> 16
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 16
 Met Arg Ser His Thr Ile Thr Met Thr Thr Thr Ser Val Ser Ser Trp
 1 5 10 15
 Pro Tyr Ser Ser His Arg Met Arg Phe Ile Thr Asn His Ser Asp Gln
 20 25 30
 Pro Pro Gln Asn Phe Ser Ala Thr Pro Asn Val Thr Thr Cys Pro Met
 35 40 45
 Asp Glu Lys Leu Leu Ser Thr Val Leu Thr Thr Ser Tyr Ser Val Ile
 50 55 60
 Phe Ile Val Gly Leu Val Gly Asn Ile Ile Ala Leu Tyr Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gly Ile His Arg Lys Arg Asn Ser Ile Gln Ile Tyr Leu Leu Asn Val
 85 90 95
 Ala Ile Ala Asp Leu Leu Leu Ile Phe Cys Leu Pro Phe Arg Ile Met
 100 105 110
 Tyr His Ile Asn Gln Asn Lys Trp Thr Leu Gly Val Ile Leu Cys Lys
 115 120 125
 Val Val Gly Thr Leu Phe Tyr Met Asn Met Tyr Ile Ser Ile Ile Leu
 130 135 140
 Leu Gly Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Ile Lys Ile Asn Arg Ser Ile
 145 150 155 160
 Gln Gln Arg Lys Ala Ile Thr Thr Lys Gln Ser Ile Tyr Val Cys Cys
 165 170 175
 Ile Val Trp Met Leu Ala Leu Gly Gly Phe Leu Thr Met Ile Ile Leu
 180 185 190
 Thr Leu Lys Lys Gly Gly His Asn Ser Thr Met Cys Phe His Tyr Arg
 195 200 205
 Asp Lys His Asn Ala Lys Gly Glu Ala Ile Phe Asn Phe Ile Leu Val
 210 215 220
 Val Met Phe Trp Leu Ile Phe Leu Leu Ile Ile Leu Ser Tyr Ile Lys
 225 230 235 240
 Ile Gly Lys Asn Leu Leu Arg Ile Ser Lys Arg Arg Ser Lys Phe Pro
 245 250 255
 Asn Ser Gly Lys Tyr Ala Thr Thr Ala Arg Asn Ser Phe Ile Val Leu
 260 265 270
 Ile Ile Phe Thr Ile Cys Phe Val Pro Tyr His Ala Phe Arg Phe Ile
 275 280 285
 Tyr Ile Ser Ser Gln Leu Asn Val Ser Ser Cys Tyr Trp Lys Glu Ile
 290 295 300
 Val His Lys Thr Asn Glu Ile Met Leu Val Leu Ser Ser Phe Asn Ser
 305 310 315 320
 Cys Leu Asp Pro Val Met Tyr Phe Leu Met Ser Ser Asn Ile Arg Lys
 325 330 335
 Ile Met Cys Gln Leu Leu Phe Arg Arg Phe Gln Gly Glu Pro Ser Arg
 340 345 350
 Ser Glu Ser Thr Ser Glu Phe Lys Pro Gly Tyr Ser Leu His Asp Thr
 355 360 365
 Ser Val Ala Val Lys Ile Gln Ser Ser Ser Lys Ser Thr
 370 375 380

[0017]

<210> 17

<211> 361

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

```

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

```

<210> 18

<211> 427

<212> PRT

[0018]

<213> 智人

<400> 18

```

Met His Leu Ile Asp Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Val Gly Leu Leu Ala
 1           5           10           15
Leu Ser His Gly Gln Leu His Val Glu His Asp Gly Glu Ser Cys Ser
           20           25           30
Asn Ser Ser His Gln Gln Ile Leu Glu Thr Gly Glu Gly Ser Pro Ser
           35           40           45
Leu Lys Ile Ala Pro Ala Asn Ala Asp Phe Ala Phe Arg Phe Tyr Tyr
           50           55           60
Leu Ile Ala Ser Glu Thr Pro Gly Lys Asn Ile Phe Phe Ser Pro Leu
65           70           75           80
Ser Ile Ser Ala Ala Tyr Ala Met Leu Ser Leu Gly Ala Cys Ser His
           85           90           95
Ser Arg Ser Gln Ile Leu Glu Gly Leu Gly Phe Asn Leu Thr Glu Leu
           100          105          110
Ser Glu Ser Asp Val His Arg Gly Phe Gln His Leu Leu His Thr Leu
           115          120          125
Asn Leu Pro Gly His Gly Leu Glu Thr Arg Val Gly Ser Ala Leu Phe
130          135          140
Leu Ser His Asn Leu Lys Phe Leu Ala Lys Phe Leu Asn Asp Thr Met
145          150          155          160
Ala Val Tyr Glu Ala Lys Leu Phe His Thr Asn Phe Tyr Asp Thr Val
           165          170          175
Gly Thr Ile Gln Leu Ile Asn Asp His Val Lys Lys Glu Thr Arg Gly
           180          185          190
Lys Ile Val Asp Leu Val Ser Glu Leu Lys Lys Asp Val Leu Met Val
           195          200          205
Leu Val Asn Tyr Ile Tyr Phe Lys Ala Leu Trp Glu Lys Pro Phe Ile
210          215          220
Ser Ser Arg Thr Thr Pro Lys Asp Phe Tyr Val Asp Glu Asn Thr Thr
225          230          235          240
Val Arg Val Pro Met Met Leu Gln Asp Gln Glu His His Trp Tyr Leu
           245          250          255
His Asp Arg Tyr Leu Pro Cys Ser Val Leu Arg Met Asp Tyr Lys Gly
           260          265          270
Asp Ala Thr Val Phe Phe Ile Leu Pro Asn Gln Gly Lys Met Arg Glu
           275          280          285
Ile Glu Glu Val Leu Thr Pro Glu Met Leu Met Arg Trp Asn Asn Leu
290          295          300
Leu Arg Lys Arg Asn Phe Tyr Lys Lys Leu Glu Leu His Leu Pro Lys
305          310          315          320
Phe Ser Ile Ser Gly Ser Tyr Val Leu Asp Gln Ile Leu Pro Arg Leu
           325          330          335
Gly Phe Thr Asp Leu Phe Ser Lys Trp Ala Asp Leu Ser Gly Ile Thr
           340          345          350
Lys Gln Gln Lys Leu Glu Ala Ser Lys Ser Phe His Lys Ala Thr Leu
           355          360          365
Asp Val Asp Glu Ala Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala Thr Ser Phe Ala
370          375          380
Ile Lys Phe Phe Ser Ala Gln Thr Asn Arg His Ile Leu Arg Phe Asn
385          390          395          400
Arg Pro Phe Leu Val Val Ile Phe Ser Thr Ser Thr Gln Ser Val Leu
           405          410          415
Phe Leu Gly Lys Val Val Asp Pro Thr Lys Pro
           420          425

```

[0019]

<210> 19
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 19

```

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

```

[0020]

<210> 20

<211> 837

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Met	Leu	Arg	Thr	Ala	Met	Gly	Leu	Arg	Ser	Trp	Leu	Ala	Ala	Pro	Trp
1				5					10					15	
Gly	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Pro	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
			20					25					30		
Leu	Leu	Leu	Gln	Pro	Pro	Pro	Pro	Thr	Trp	Ala	Leu	Ser	Pro	Arg	Ile
		35					40					45			
Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Glu	Glu	Arg	Pro	Phe	Leu	Arg	Phe	Glu	Ala
	50					55					60				
Glu	His	Ile	Ser	Asn	Tyr	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Ser	Arg	Asp	Gly	Arg
65					70					75					80
Thr	Leu	Tyr	Val	Gly	Ala	Arg	Glu	Ala	Leu	Phe	Ala	Leu	Ser	Ser	Asn
				85					90					95	
Leu	Ser	Phe	Leu	Pro	Gly	Gly	Glu	Tyr	Gln	Glu	Leu	Leu	Trp	Gly	Ala
			100					105					110		
Asp	Ala	Glu	Lys	Lys	Gln	Gln	Cys	Ser	Phe	Lys	Gly	Lys	Asp	Pro	Gln
		115					120					125			
Arg	Asp	Cys	Gln	Asn	Tyr	Ile	Lys	Ile	Leu	Leu	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser
	130					135						140			
His	Leu	Phe	Thr	Cys	Gly	Thr	Ala	Ala	Phe	Ser	Pro	Met	Cys	Thr	Tyr
145					150					155					160
Ile	Asn	Met	Glu	Asn	Phe	Thr	Leu	Ala	Arg	Asp	Glu	Lys	Gly	Asn	Val
				165					170					175	
Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Lys	Gly	Arg	Cys	Pro	Phe	Asp	Pro	Asn	Phe	Lys
		180						185					190		
Ser	Thr	Ala	Leu	Val	Val	Asp	Gly	Glu	Leu	Tyr	Thr	Gly	Thr	Val	Ser
		195					200					205			
Ser	Phe	Gln	Gly	Asn	Asp	Pro	Ala	Ile	Ser	Arg	Ser	Gln	Ser	Leu	Arg
	210					215					220				
Pro	Thr	Lys	Thr	Glu	Ser	Ser	Leu	Asn	Trp	Leu	Gln	Asp	Pro	Ala	Phe
225					230					235					240
Val	Ala	Ser	Ala	Tyr	Ile	Pro	Glu	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Gln	Gly	Asp
				245					250					255	
Asp	Asp	Lys	Ile	Tyr	Phe	Phe	Phe	Ser	Glu	Thr	Gly	Gln	Glu	Phe	Glu
			260					265					270		
Phe	Phe	Glu	Asn	Thr	Ile	Val	Ser	Arg	Ile	Ala	Arg	Ile	Cys	Lys	Gly
		275					280					285			
Asp	Glu	Gly	Gly	Glu	Arg	Val	Leu	Gln	Gln	Arg	Trp	Thr	Ser	Phe	Leu
	290					295					300				
Lys	Ala	Gln	Leu	Leu	Cys	Ser	Arg	Pro	Asp	Asp	Gly	Phe	Pro	Phe	Asn
305					310					315					320
Val	Leu	Gln	Asp	Val	Phe	Thr	Leu	Ser	Pro	Ser	Pro	Gln	Asp	Trp	Arg
				325					330					335	
Asp	Thr	Leu	Phe	Tyr	Gly	Val	Phe	Thr	Ser	Gln	Trp	His	Arg	Gly	Thr
			340					345					350		
Thr	Glu	Gly	Ser	Ala	Val	Cys	Val	Phe	Thr	Met	Lys	Asp	Val	Gln	Arg
		355					360					365			
Val	Phe	Ser	Gly	Leu	Tyr	Lys	Glu	Val	Asn	Arg	Glu	Thr	Gln	Gln	Trp
	370					375					380				
Tyr	Thr	Val	Thr	His	Pro	Val	Pro	Thr	Pro	Arg	Pro	Gly	Ala	Cys	Ile
385					390					395					400

[0021]

[0022]

<210> 21

<211> 862

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

```

Met Arg Met Cys Thr Pro Ile Arg Gly Leu Leu Met Ala Leu Ala Val
 1           5           10           15
Met Phe Gly Thr Ala Met Ala Phe Ala Pro Ile Pro Arg Ile Thr Trp
           20           25           30
Glu His Arg Glu Val His Leu Val Gln Phe His Glu Pro Asp Ile Tyr
           35           40           45
Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Leu Ser Glu Asp Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
           50           55           60
Gly Ala Arg Glu Ala Val Phe Ala Val Asn Ala Leu Asn Ile Ser Glu
65           70           75           80
Lys Gln His Glu Val Tyr Trp Lys Val Ser Glu Asp Lys Lys Ala Lys
           85           90           95
Cys Ala Glu Lys Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Cys Leu Asn Tyr Ile
           100          105          110
Arg Val Leu Gln Pro Leu Ser Ala Thr Ser Leu Tyr Val Cys Gly Thr
           115          120          125
Asn Ala Phe Gln Pro Ala Cys Asp His Leu Asn Leu Thr Ser Phe Lys
130          135          140
Phe Leu Gly Lys Asn Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro
145          150          155          160
Ala His Ser Tyr Thr Ser Val Met Val Asp Gly Glu Leu Tyr Ser Gly
           165          170          175
Thr Ser Tyr Asn Phe Leu Gly Ser Glu Pro Ile Ile Ser Arg Asn Ser
           180          185          190
Ser His Ser Pro Leu Arg Thr Glu Tyr Ala Ile Pro Trp Leu Asn Glu
           195          200          205
Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Arg Lys Ser Pro Asp Ser Pro
210          215          220
Asp Gly Glu Asp Asp Arg Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Val Ser Val
225          230          235          240
Glu Tyr Glu Phe Val Phe Arg Val Leu Ile Pro Arg Ile Ala Arg Val
           245          250          255
Cys Lys Gly Asp Gln Gly Gly Leu Arg Thr Leu Gln Lys Lys Trp Thr
           260          265          270
Ser Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Arg Pro Asp Ser Gly Leu
           275          280          285
Val Phe Asn Val Leu Arg Asp Val Phe Val Leu Arg Ser Pro Gly Leu
290          295          300
Lys Val Pro Val Phe Tyr Ala Leu Phe Thr Pro Gln Leu Asn Asn Val
305          310          315          320
Gly Leu Ser Ala Val Cys Ala Tyr Asn Leu Ser Thr Ala Glu Glu Val
           325          330          335
Phe Ser His Gly Lys Tyr Met Gln Ser Thr Thr Val Glu Gln Ser His
           340          345          350
Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Lys Pro Arg Pro Gly
           355          360          365
Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu
370          375          380
Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met
385          390          395          400

```

[0023]

Asp	Asp	Ser	Val	Thr	Pro	Ile	Asp	Asn	Arg	Pro	Arg	Leu	Ile	Lys	Lys
				405					410					415	
Asp	Val	Asn	Tyr	Thr	Gln	Ile	Val	Val	Asp	Arg	Thr	Gln	Ala	Leu	Asp
			420					425						430	
Gly	Thr	Val	Tyr	Asp	Val	Met	Phe	Val	Ser	Thr	Asp	Arg	Gly	Ala	Leu
		435					440					445			
His	Lys	Ala	Ile	Ser	Leu	Glu	His	Ala	Val	His	Ile	Ile	Glu	Glu	Thr
	450					455					460				
Gln	Leu	Phe	Gln	Asp	Phe	Glu	Pro	Val	Gln	Thr	Leu	Leu	Leu	Ser	Ser
465					470					475					480
Lys	Lys	Gly	Asn	Arg	Phe	Val	Tyr	Ala	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Val	Val
			485						490					495	
Gln	Ala	Pro	Leu	Ala	Phe	Cys	Gly	Lys	His	Gly	Thr	Cys	Glu	Asp	Cys
			500					505					510		
Val	Leu	Ala	Arg	Asp	Pro	Tyr	Cys	Ala	Trp	Ser	Pro	Pro	Thr	Ala	Thr
	515						520					525			
Cys	Val	Ala	Leu	His	Gln	Thr	Glu	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Leu	Ile	Gln
	530					535					540				
Glu	Met	Ser	Gly	Asp	Ala	Ser	Val	Cys	Pro	Asp	Lys	Ser	Lys	Gly	Ser
545					550					555					560
Tyr	Arg	Gln	His	Phe	Lys	His	Gly	Gly	Thr	Ala	Glu	Leu	Lys	Cys	
			565					570					575		
Ser	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Trp	Lys	Phe	Gln	Asn	Gly
			580					585					590		
Val	Leu	Lys	Ala	Glu	Ser	Pro	Lys	Tyr	Gly	Leu	Met	Gly	Arg	Lys	Asn
	595						600					605			
Leu	Leu	Ile	Phe	Asn	Leu	Ser	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Val	Tyr	Gln	Cys
	610					615					620				
Leu	Ser	Glu	Glu	Arg	Val	Lys	Asn	Lys	Thr	Val	Phe	Gln	Val	Val	Ala
625					630					635					640
Lys	His	Val	Leu	Glu	Val	Lys	Val	Val	Pro	Lys	Pro	Val	Val	Ala	Pro
			645						650					655	
Thr	Leu	Ser	Val	Val	Gln	Thr	Glu	Gly	Ser	Arg	Ile	Ala	Thr	Lys	Val
			660					665					670		
Leu	Val	Ala	Ser	Thr	Gln	Gly	Ser	Ser	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Val	Gln
	675						680					685			
Ala	Thr	Ser	Ser	Gly	Ala	Ile	Thr	Leu	Pro	Pro	Lys	Pro	Ala	Pro	Thr
	690					695					700				
Gly	Thr	Ser	Cys	Glu	Pro	Lys	Ile	Val	Ile	Asn	Thr	Val	Pro	Gln	Leu
705					710					715					720
His	Ser	Glu	Lys	Thr	Met	Tyr	Leu	Lys	Ser	Ser	Asp	Asn	Arg	Leu	Leu
			725						730					735	
Met	Ser	Leu	Phe	Leu	Phe	Phe	Phe	Val	Leu	Phe	Leu	Cys	Leu	Phe	Phe
			740					745					750		
Tyr	Asn	Cys	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Leu	Pro	Arg	Gln	Cys	Leu	Lys	Phe	Arg
	755						760					765			
Ser	Ala	Leu	Leu	Ile	Gly	Lys	Lys	Lys	Pro	Lys	Ser	Asp	Phe	Cys	Asp
	770					775					780				
Arg	Glu	Gln	Ser	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Val	Glu	Pro	Gly	Ser	Phe	Ser
785					790					795					800
Gln	Gln	Asn	Gly	Glu	His	Pro	Lys	Pro	Ala	Leu	Asp	Thr	Gly	Tyr	Glu
			805						810					815	
Thr	Glu	Gln	Asp	Thr	Ile	Thr	Ser	Lys	Val	Pro	Thr	Asp	Arg	Glu	Asp
			820					825					830		
Ser	Gln	Arg	Ile	Asp	Asp	Leu	Ser	Ala	Arg	Asp	Lys	Pro	Phe	Asp	Val
	835						840					845			
Lys	Cys	Glu	Leu	Lys	Phe	Ala	Asp	Ser	Asp	Ala	Asp	Gly	Asp		

[0024]

850	855	860
<210> 22 <211> 93 <212> PRT <213> 智人		
<400> 22 Met Lys Ile Ser Val Ala Ala Ile Pro Phe Phe Leu Leu Ile Thr Ile 1 5 10 15 Ala Leu Gly Thr Lys Thr Glu Ser Ser Ser Arg Gly Pro Tyr His Pro 20 25 30 Ser Glu Cys Cys Phe Thr Tyr Thr Thr Tyr Lys Ile Pro Arg Gln Arg 35 40 45 Ile Met Asp Tyr Tyr Glu Thr Asn Ser Gln Cys Ser Lys Pro Gly Ile 50 55 60 Val Phe Ile Thr Lys Arg Gly His Ser Val Cys Thr Asn Pro Ser Asp 65 70 75 80 Lys Trp Val Gln Asp Tyr Ile Lys Asp Met Lys Glu Asn 85 90		
<210> 23 <211> 1462 <212> PRT <213> 智人		
<400> 23 Met Gly Ala Gln Asp Arg Pro Gln Cys His Phe Asp Ile Glu Ile Asn 1 5 10 15 Arg Glu Pro Val Gly Arg Ile Met Phe Gln Leu Phe Ser Asp Ile Cys 20 25 30 Pro Lys Thr Cys Lys Asn Phe Leu Cys Leu Cys Ser Gly Glu Lys Gly 35 40 45 Leu Gly Lys Thr Thr Gly Lys Lys Leu Cys Tyr Lys Gly Ser Thr Phe 50 55 60 His Arg Val Val Lys Asn Phe Met Ile Gln Gly Gly Asp Phe Ser Glu 65 70 75 80 Gly Asn Gly Lys Gly Gly Glu Ser Ile Tyr Gly Gly Tyr Phe Lys Asp 85 90 95 Glu Asn Phe Ile Leu Lys His Asp Arg Ala Phe Leu Leu Ser Met Ala 100 105 110 Asn Arg Gly Lys His Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe Ile Thr Thr Lys 115 120 125 Pro Ala Pro His Leu Asp Gly Val His Val Val Phe Gly Leu Val Ile 130 135 140 Ser Gly Phe Glu Val Ile Glu Gln Ile Glu Asn Leu Lys Thr Asp Ala 145 150 155 160 Ala Ser Arg Pro Tyr Ala Asp Val Arg Val Ile Asp Cys Gly Val Leu 165 170 175 Ala Thr Lys Ser Ile Lys Asp Val Phe Glu Lys Lys Arg Lys Lys Pro 180 185 190 Thr His Ser Glu Gly Ser Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ser Ser Ser Ser 195 200 205 Glu Ser Ser Ser Glu Ser Glu Leu Glu His Glu Arg Ser Arg Arg Arg 210 215 220		

[0025]

Lys	His	Lys	Arg	Arg	Pro	Lys	Val	Lys	Arg	Ser	Lys	Lys	Arg	Arg	Lys
225					230					235					240
Glu	Ala	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Pro	Arg	Asn	Lys	His	Ala	Met	Asn	Pro
				245					250					255	
Lys	Gly	His	Ser	Glu	Arg	Ser	Asp	Thr	Asn	Glu	Lys	Arg	Ser	Val	Asp
			260					265					270		
Ser	Ser	Ala	Lys	Arg	Glu	Lys	Pro	Val	Val	Arg	Pro	Glu	Glu	Ile	Pro
		275					280					285			
Pro	Val	Pro	Glu	Asn	Arg	Phe	Leu	Leu	Arg	Arg	Asp	Met	Pro	Val	Val
	290					295					300				
Thr	Ala	Glu	Pro	Glu	Pro	Lys	Ile	Pro	Asp	Val	Ala	Pro	Ile	Val	Ser
305					310					315					320
Asp	Gln	Lys	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Ser	Gly	Arg	Lys	Ile	Lys	Gly	Arg
				325					330					335	
Gly	Thr	Ile	Arg	Tyr	His	Thr	Pro	Pro	Arg	Ser	Arg	Ser	Cys	Ser	Glu
			340					345					350		
Ser	Asp	Asp	Asp	Asp	Ser	Ser	Glu	Thr	Pro	Pro	His	Trp	Lys	Glu	Glu
		355					360					365			
Met	Gln	Arg	Leu	Arg	Ala	Tyr	Arg	Pro	Pro	Ser	Gly	Glu	Lys	Trp	Ser
	370					375					380				
Lys	Gly	Asp	Lys	Leu	Ser	Asp	Pro	Cys	Ser	Ser	Arg	Trp	Asp	Glu	Arg
385					390					395					400
Ser	Leu	Ser	Gln	Arg	Ser	Arg	Ser	Trp	Ser	Tyr	Asn	Gly	Tyr	Tyr	Ser
				405					410					415	
Asp	Leu	Ser	Thr	Ala	Arg	His	Ser	Gly	His	His	Lys	Lys	Arg	Arg	Lys
			420					425					430		
Glu	Lys	Lys	Val	Lys	His	Lys	Lys	Lys	Gly	Lys	Lys	Gln	Lys	His	Cys
		435					440					445			
Arg	Arg	His	Lys	Gln	Thr	Lys	Lys	Arg	Arg	Ile	Leu	Ile	Pro	Ser	Asp
	450					455					460				
Ile	Glu	Ser	Ser	Lys	Ser	Ser	Thr	Arg	Arg	Met	Lys	Ser	Ser	Cys	Asp
465				470						475					480
Arg	Glu	Arg	Ser	Ser	Arg	Ser	Ser	Ser	Leu	Ser	Ser	His	His	Ser	Ser
				485					490					495	
Lys	Arg	Asp	Trp	Ser	Lys	Ser	Asp	Lys	Asp	Val	Gln	Ser	Ser	Leu	Thr
			500					505					510		
His	Ser	Ser	Arg	Asp	Ser	Tyr	Arg	Ser	Lys	Ser	His	Ser	Gln	Ser	Tyr
		515					520					525			
Ser	Arg	Gly	Ser	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Ala	Ser	Lys	Ser	Ser	Ser	His
	530					535					540				
Ser	Arg	Ser	Arg	Ser	Lys	Ser	Arg	Ser	Ser	Ser	Lys	Ser	Gly	His	Arg
545					550					555					560
Lys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Pro	Arg	Lys	Thr	Ala	Ser	Gln	Leu	Ser	Glu
				565					570					575	
Asn	Lys	Pro	Val	Lys	Thr	Glu	Pro	Leu	Arg	Ala	Thr	Met	Ala	Gln	Asn
			580					585					590		
Glu	Asn	Val	Val	Val	Gln	Pro	Val	Val	Ala	Glu	Asn	Ile	Pro	Val	Ile
		595					600					605			
Pro	Leu	Ser	Asp	Ser	Pro	Pro	Pro	Ser	Arg	Trp	Lys	Pro	Gly	Gln	Lys
	610					615					620				
Pro	Trp	Lys	Pro	Ser	Tyr	Glu	Arg	Ile	Gln	Glu	Met	Lys	Ala	Lys	Thr
625					630					635					640
Thr	His	Leu	Leu	Pro	Ile	Gln	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ala	Asn	Ile	Lys
				645					650					655	
Glu	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Tyr	His	Lys	Arg	Glu	Lys	Asn	Ser	Glu
			660					665					670		
Ser	Asp	Gln	Ser	Thr	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Ser	Asp	Arg	Ser	Ser	Glu	Ser

[0026]

675	680	685
Ser Pro Arg Ser Arg Ser Arg	Ser Ser Arg Ser Arg	Ser Tyr Ser Arg
690	695	700
Ser Tyr Thr Arg Ser Arg Ser	Leu Ala Ser Ser His Ser Arg Ser Arg	
705	710	715
Ser Pro Ser Ser Arg Ser His	Ser Arg Asn Lys Tyr Ser Asp His Ser	
725	730	735
Gln Cys Ser Arg Ser Ser Ser	Tyr Thr Ser Ile Ser Ser Asp Asp Gly	
740	745	750
Arg Arg Ala Lys Arg Arg Leu	Arg Ser Ser Gly Lys Lys Asn Ser Val	
755	760	765
Ser His Lys Lys His Ser Ser	Ser Ser Glu Lys Thr Leu His Ser Lys	
770	775	780
Tyr Val Lys Gly Arg Asp Arg	Ser Ser Cys Val Arg Lys Tyr Ser Glu	
785	790	795
Ser Arg Ser Ser Leu Asp Tyr	Ser Ser Asp Ser Glu Gln Ser Ser Val	
805	810	815
Gln Ala Thr Gln Ser Ala Gln	Glu Lys Glu Lys Gln Gly Gln Met Glu	
820	825	830
Arg Thr His Asn Lys Gln Glu	Lys Asn Arg Gly Glu Glu Lys Ser Lys	
835	840	845
Ser Glu Arg Glu Cys Pro His	Ser Lys Lys Arg Thr Leu Lys Glu Asn	
850	855	860
Leu Ser Asp His Leu Arg Asn	Gly Ser Lys Pro Lys Arg Lys Asn Tyr	
865	870	875
Ala Gly Ser Lys Trp Asp Ser	Glu Ser Asn Ser Glu Arg Asp Val Thr	
885	890	895
Lys Asn Ser Lys Asn Asp Ser	His Pro Ser Ser Asp Lys Glu Glu Gly	
900	905	910
Glu Ala Thr Ser Asp Ser Glu	Ser Glu Val Ser Glu Ile His Ile Lys	
915	920	925
Val Lys Pro Thr Thr Lys Ser	Ser Thr Asn Thr Ser Leu Pro Asp Asp	
930	935	940
Asn Gly Ala Trp Lys Ser Ser	Lys Gln Arg Thr Ser Thr Ser Asp Ser	
945	950	955
Glu Gly Ser Cys Ser Asn Ser	Glu Asn Asn Arg Gly Lys Pro Gln Lys	
965	970	975
His Lys His Gly Ser Lys Glu	Asn Leu Lys Arg Glu His Thr Lys Lys	
980	985	990
Val Lys Glu Lys Leu Lys Gly	Lys Lys Asp Lys Lys His Lys Ala Pro	
995	1000	1005
Lys Arg Lys Gln Ala Phe His	Trp Gln Pro Pro Leu Glu Phe Gly Glu	
1010	1015	1020
Glu Glu Glu Glu Glu Ile Asp	Asp Lys Gln Val Thr Gln Glu Ser Lys	
1025	1030	1035
Glu Lys Lys Val Ser Glu Asn	Asn Glu Thr Ile Lys Asp Asn Ile Leu	
1045	1050	1055
Lys Thr Glu Lys Ser Ser Glu	Glu Asp Leu Ser Gly Lys His Asp Thr	
1060	1065	1070
Val Thr Val Ser Ser Asp Leu	Asp Gln Phe Thr Lys Asp Asp Ser Lys	
1075	1080	1085
Leu Ser Ile Ser Pro Thr Ala	Leu Asn Thr Glu Glu Asn Val Ala Cys	
1090	1095	1100
Leu Gln Asn Ile Gln His Val	Glu Glu Ser Val Pro Asn Gly Val Glu	
1105	1110	1115
Asp Val Leu Gln Thr Asp Asp	Asn Met Glu Ile Cys Thr Pro Asp Arg	
1125	1130	1135

[0027]

Ser Ser Pro Ala Lys Val Glu Glu Thr Ser Pro Leu Gly Asn Ala Arg
 1140 1145 1150
 Leu Asp Thr Pro Asp Ile Asn Ile Val Leu Lys Gln Asp Met Ala Thr
 1155 1160 1165
 Glu His Pro Gln Ala Glu Val Val Lys Gln Glu Ser Ser Met Ser Glu
 1170 1175 1180
 Ser Lys Val Leu Gly Glu Val Gly Lys Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ser
 1185 1190 1195 1200
 Leu Ala Ser Ala Gly Glu Ser Thr Gly Lys Lys Glu Val Ala Glu Lys
 1205 1210 1215
 Ser Gln Ile Asn Leu Ile Asp Lys Lys Trp Lys Pro Leu Gln Gly Val
 1220 1225 1230
 Gly Asn Leu Ala Ala Pro Asn Ala Ala Thr Ser Ser Ala Val Glu Val
 1235 1240 1245
 Lys Val Leu Thr Thr Val Pro Glu Met Lys Pro Gln Gly Leu Arg Ile
 1250 1255 1260
 Glu Ile Lys Ser Lys Asn Lys Val Arg Pro Gly Ser Leu Phe Asp Glu
 1265 1270 1275 1280
 Val Arg Lys Thr Ala Arg Leu Asn Arg Arg Pro Arg Asn Gln Glu Ser
 1285 1290 1295
 Ser Ser Asp Glu Gln Thr Pro Ser Arg Asp Asp Asp Ser Gln Ser Arg
 1300 1305 1310
 Ser Pro Ser Arg Ser Arg Ser Lys Ser Glu Thr Lys Ser Arg His Arg
 1315 1320 1325
 Thr Arg Ser Val Ser Tyr Ser His Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Ser
 1330 1335 1340
 Thr Ser Ser Tyr Arg Ser Arg Ser Tyr Ser Arg Ser Arg Ser Arg Gly
 1345 1350 1355 1360
 Trp Tyr Ser Arg Gly Arg Thr Arg Ser Arg Ser Ser Ser Tyr Arg Ser
 1365 1370 1375
 Tyr Lys Ser His Arg Thr Ser Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Ser Ser
 1380 1385 1390
 Tyr Asp Pro His Ser Arg Ser Arg Ser Tyr Thr Tyr Asp Ser Tyr Tyr
 1395 1400 1405
 Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Arg Ser Gln Arg Ser Asp Ser Tyr His
 1410 1415 1420
 Arg Gly Arg Ser Tyr Asn Arg Arg Ser Arg Ser Cys Arg Ser Tyr Gly
 1425 1430 1435 1440
 Ser Asp Ser Glu Ser Asp Arg Ser Tyr Ser His His Arg Ser Pro Ser
 1445 1450 1455
 Glu Ser Ser Arg Tyr Ser
 1460

<210> 24

<211> 375

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

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

[0028]

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

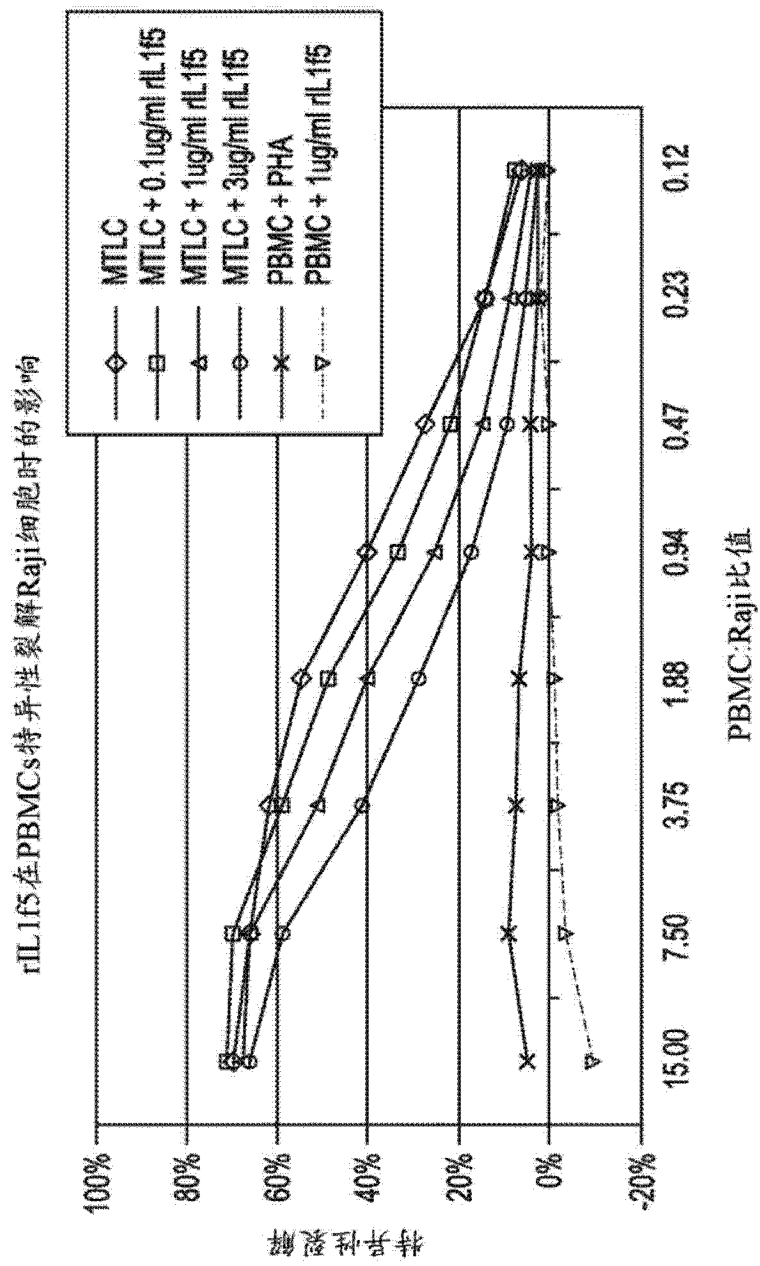


图 1

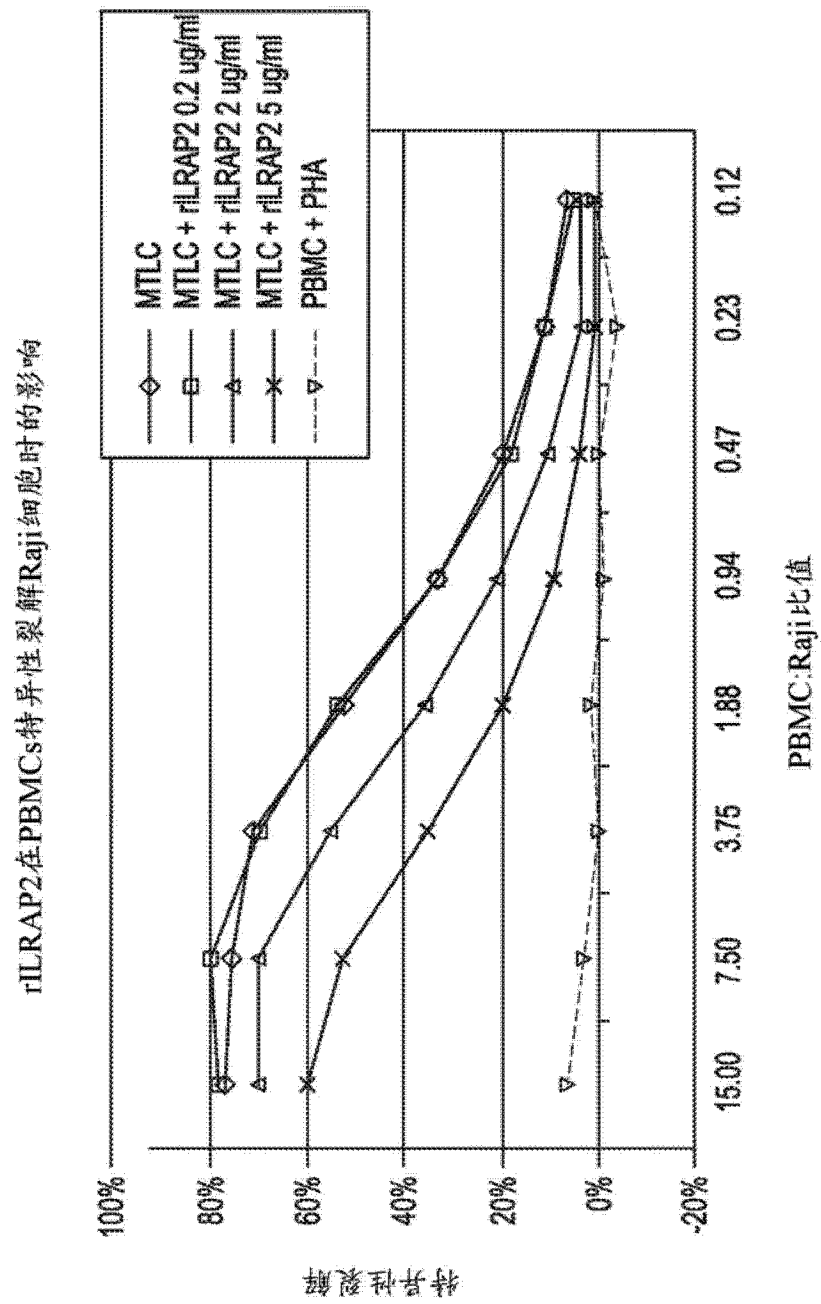


图 2

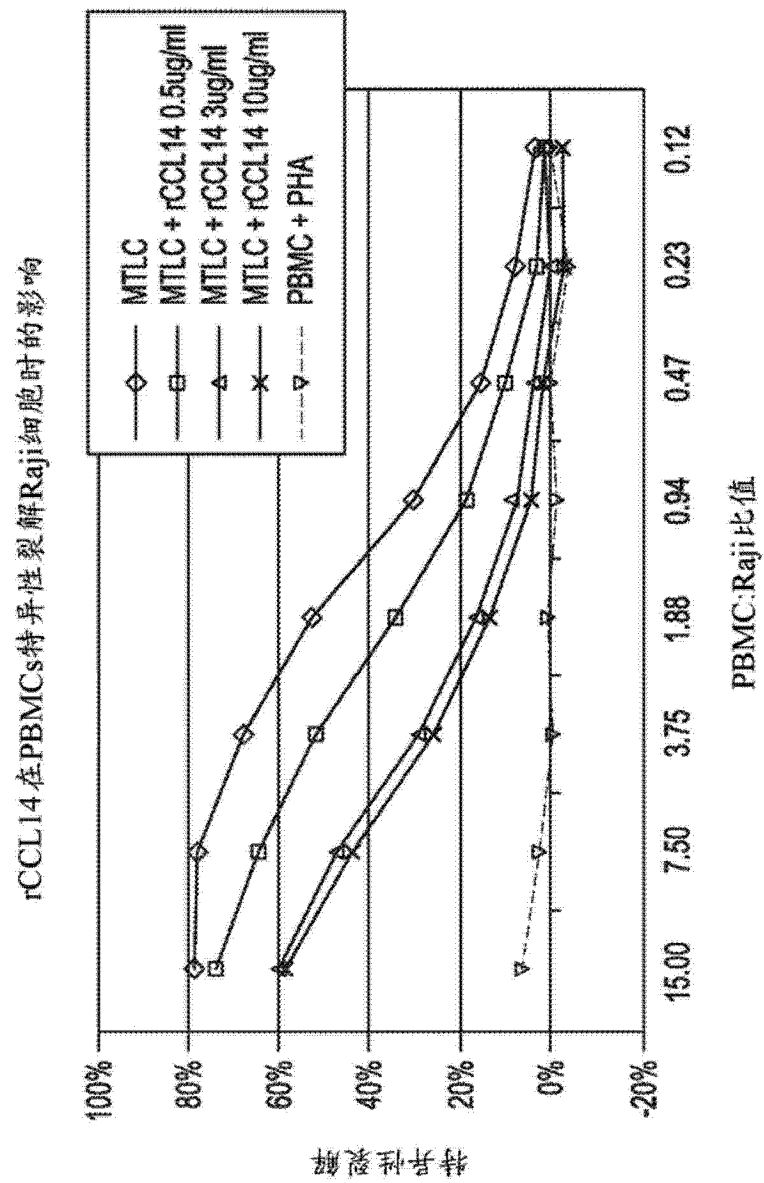


图 3

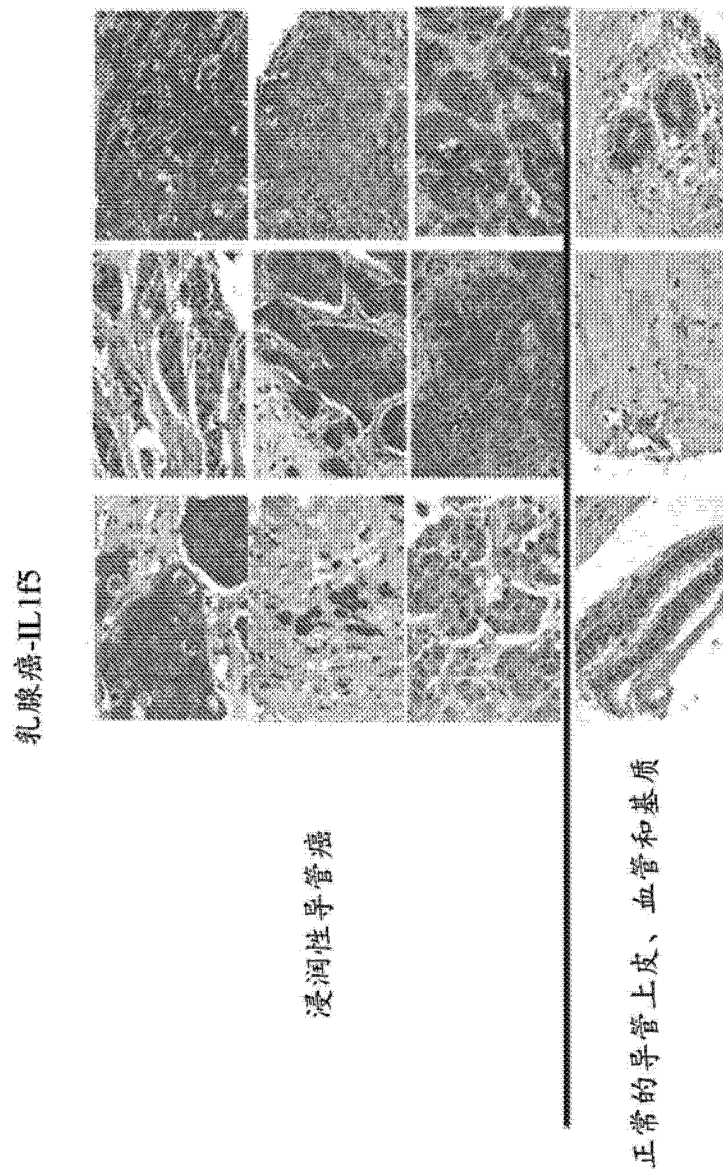


图 4

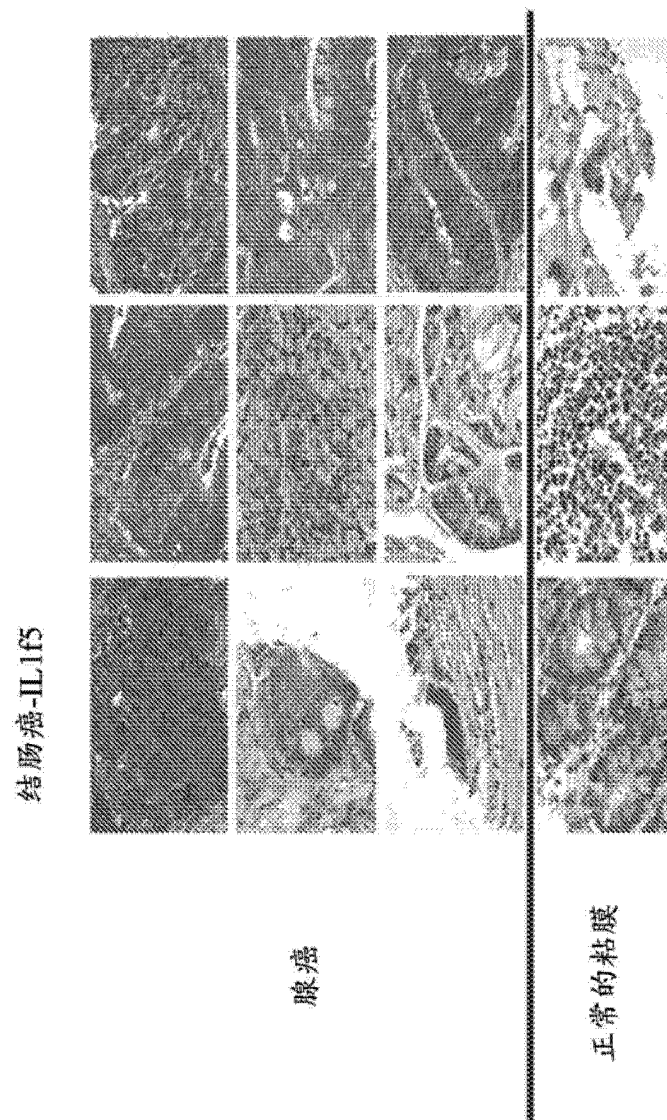


图 5

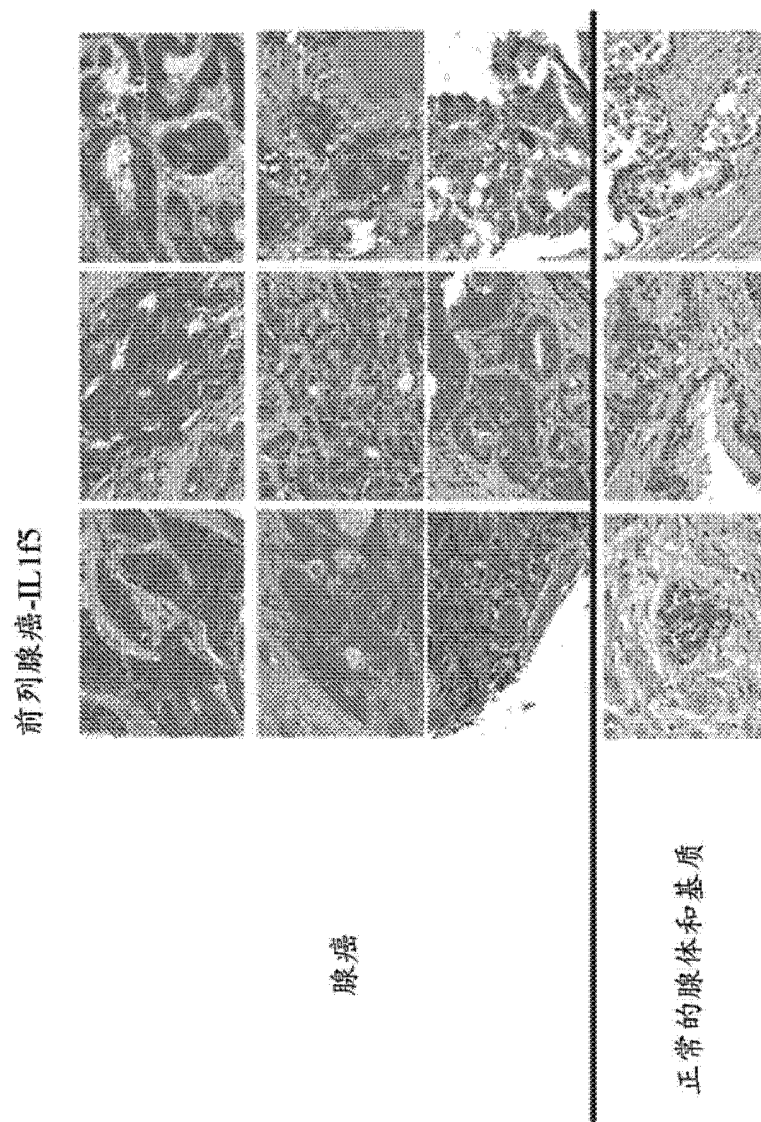


图 6

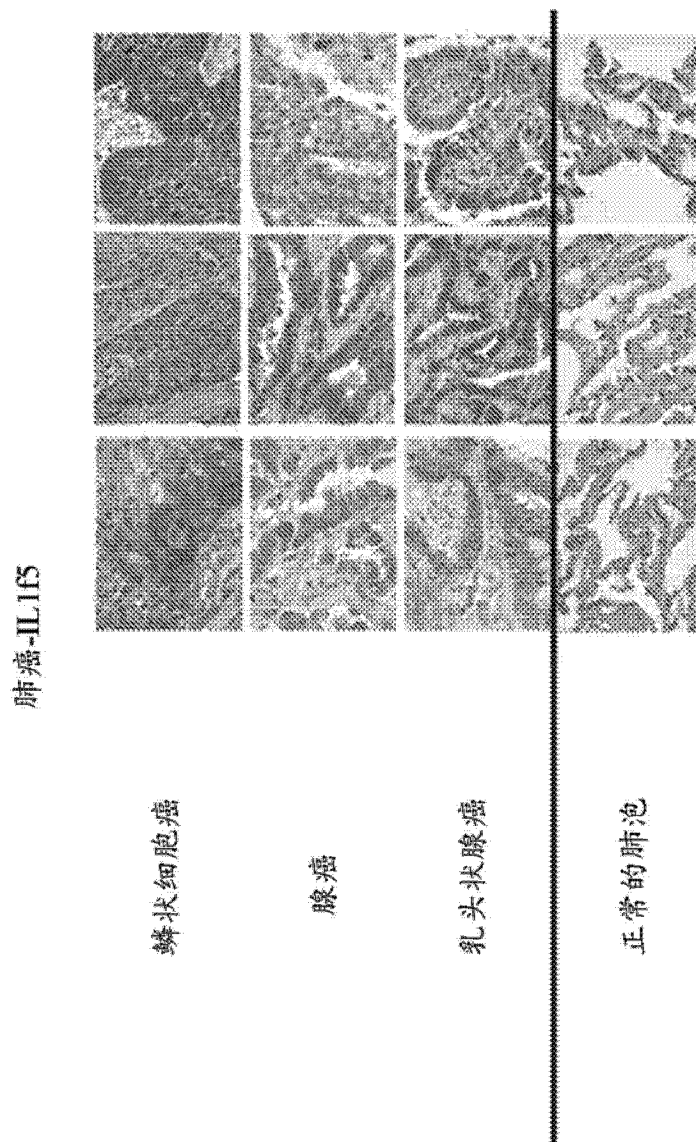


图 7

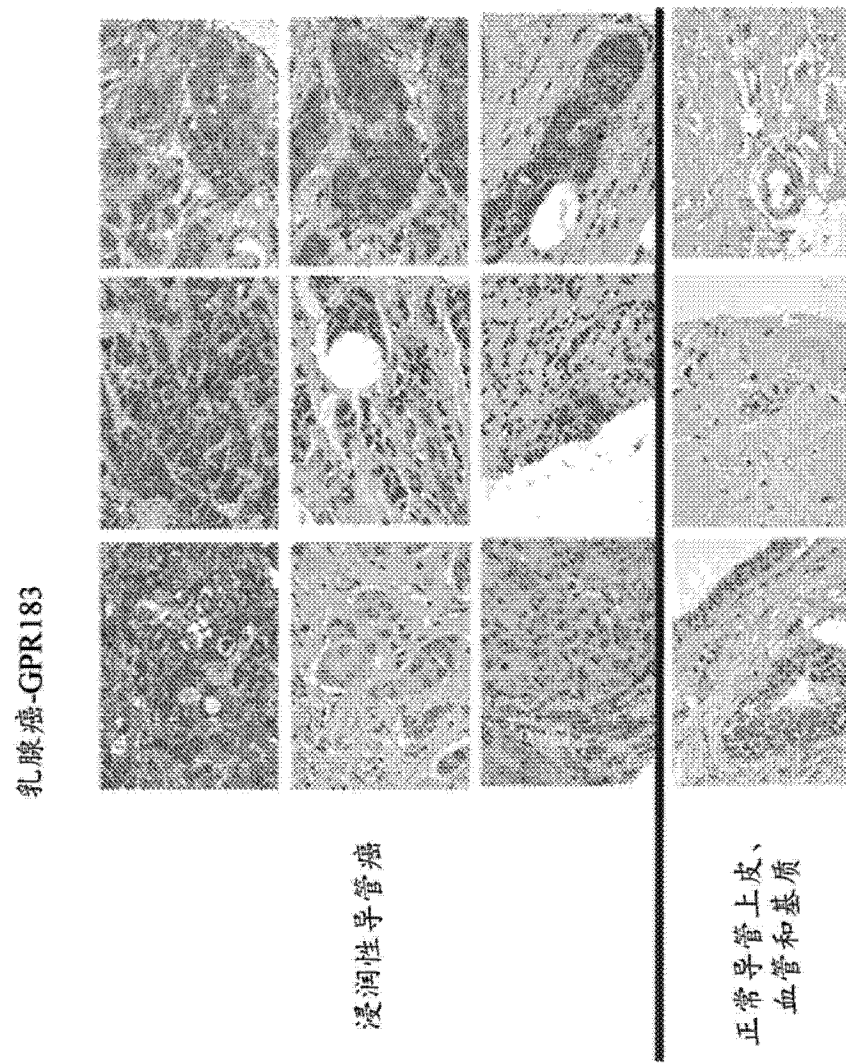


图 8

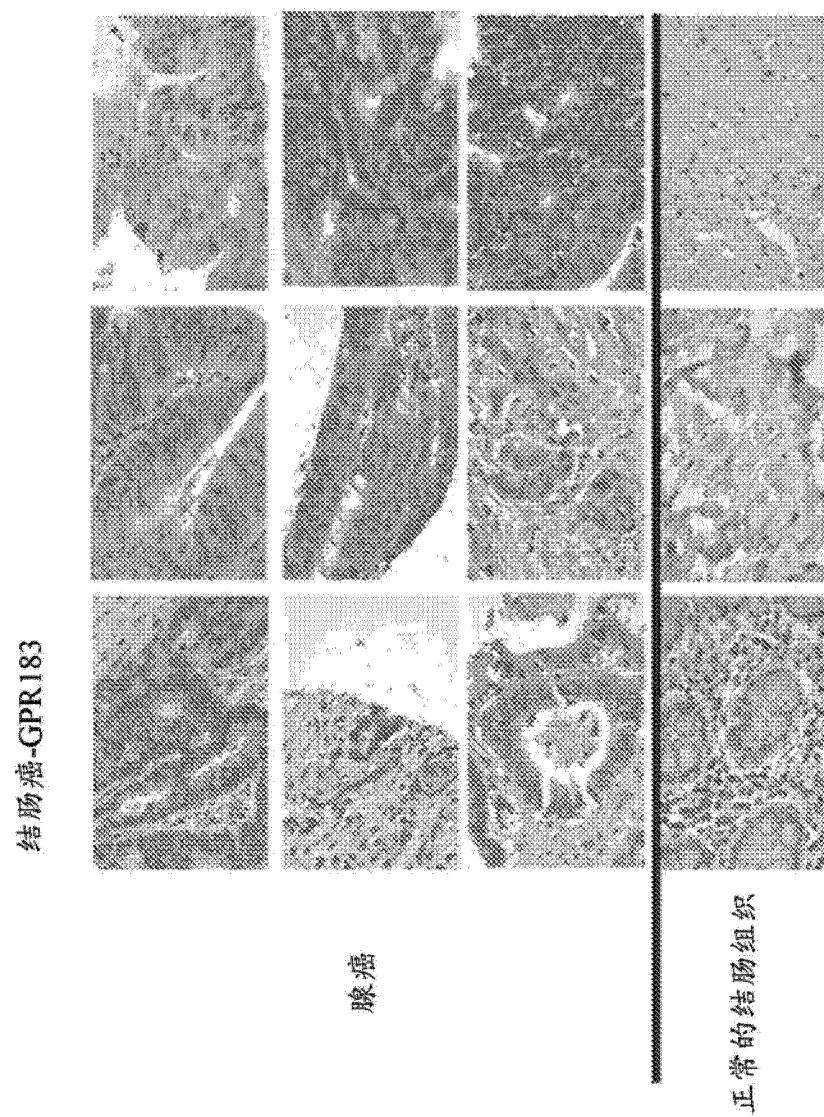


图 9

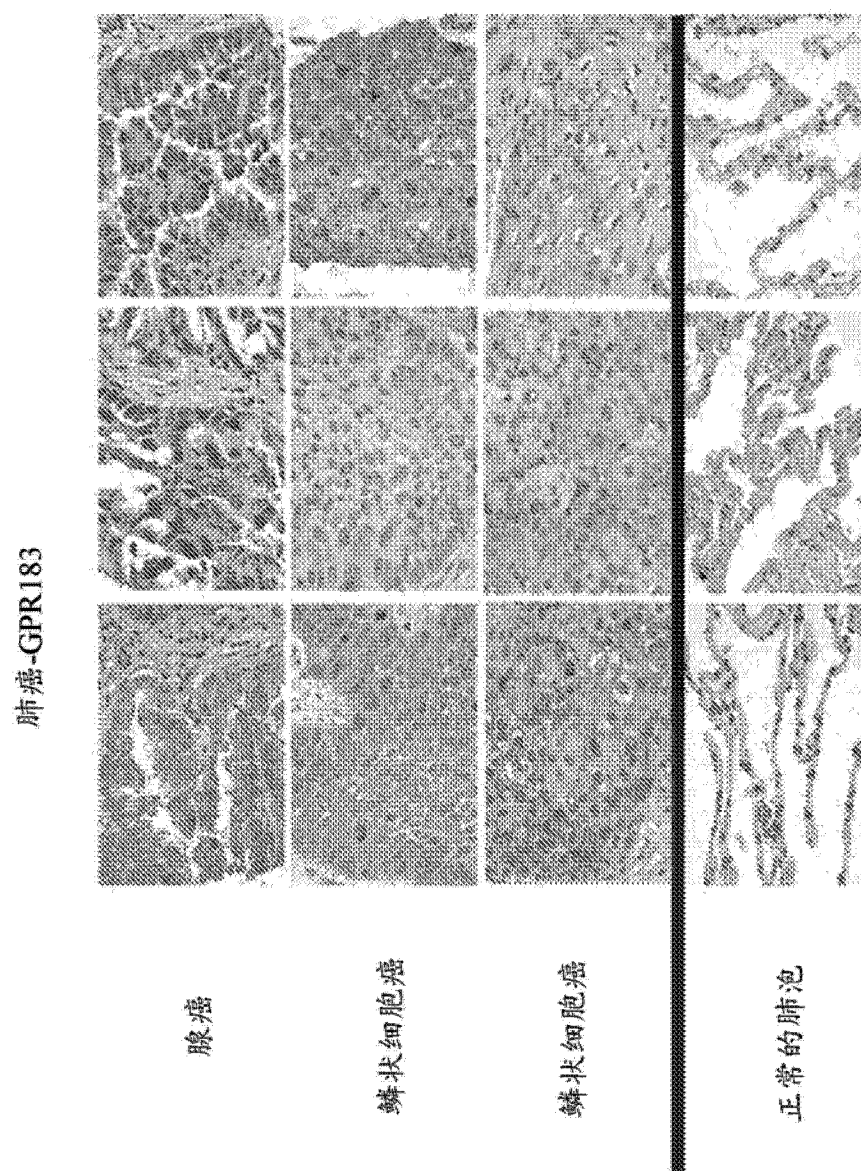


图 10

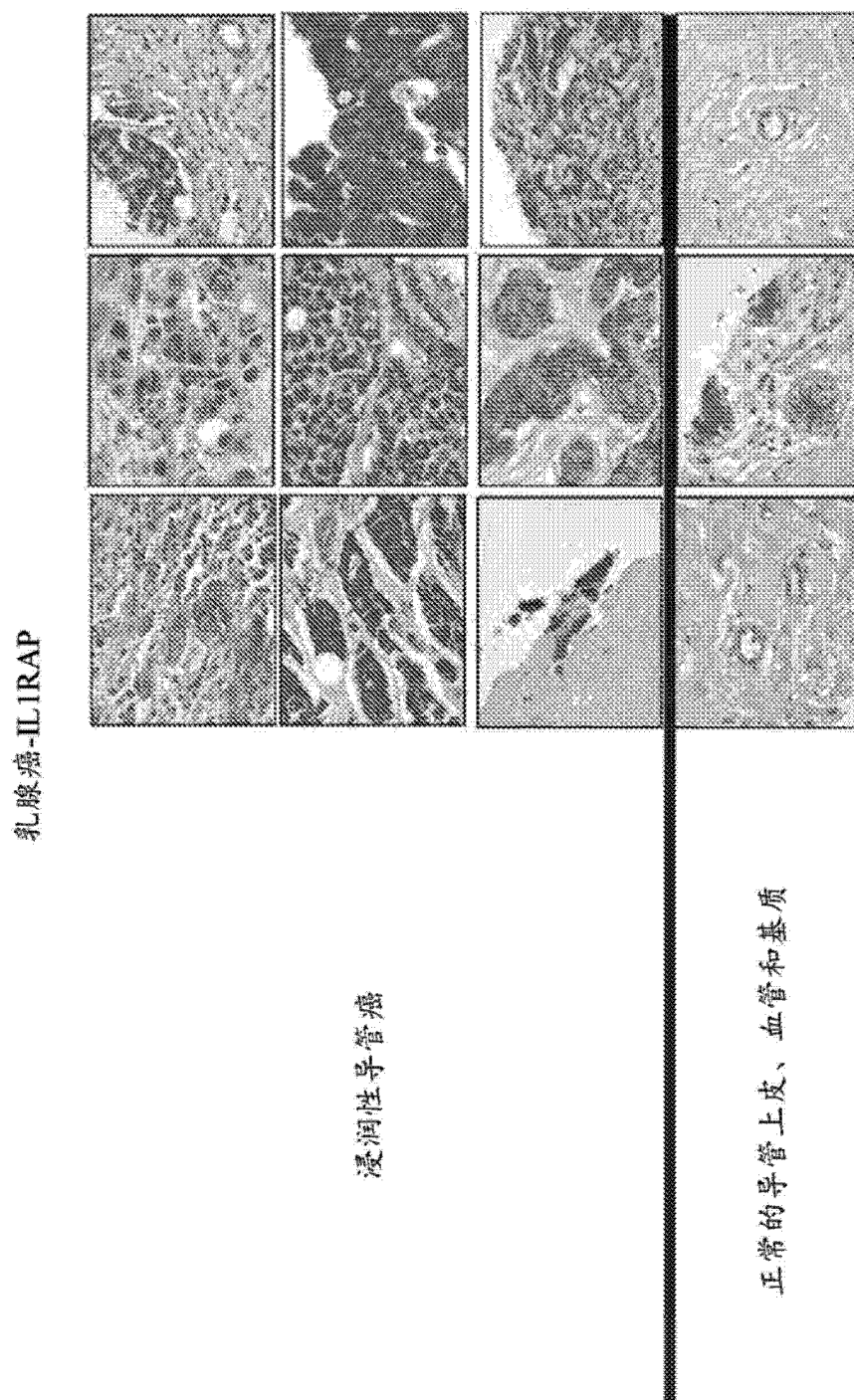


图 11

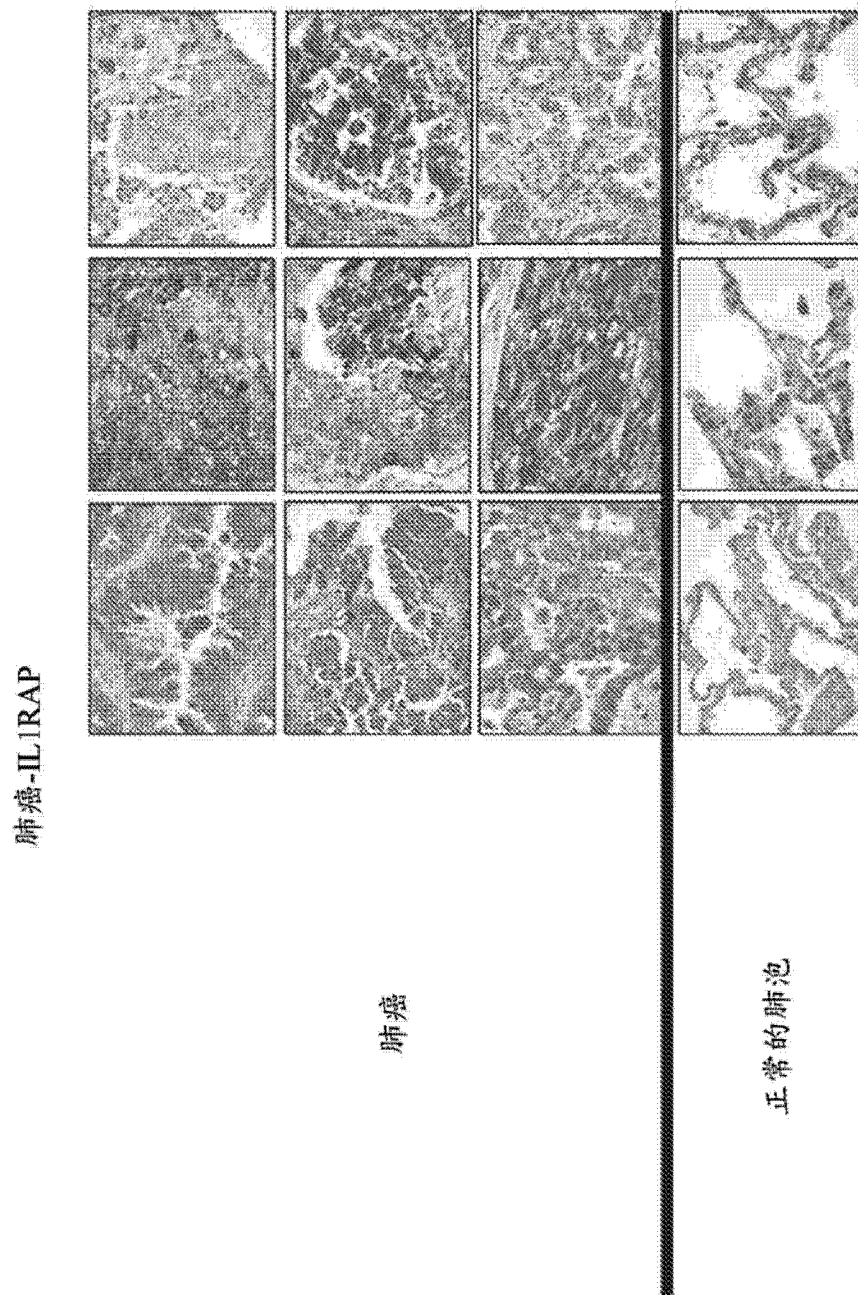


图 12

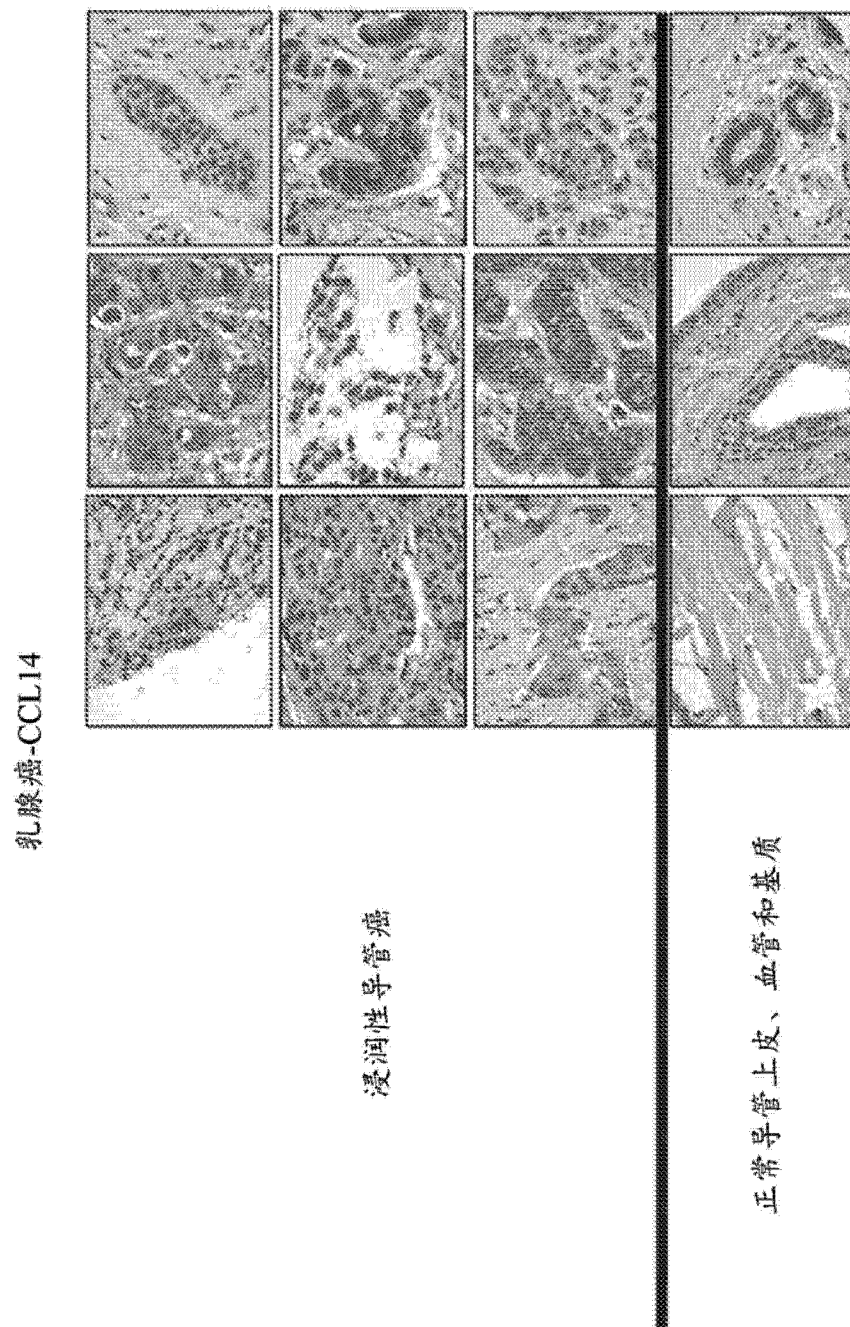


图 13

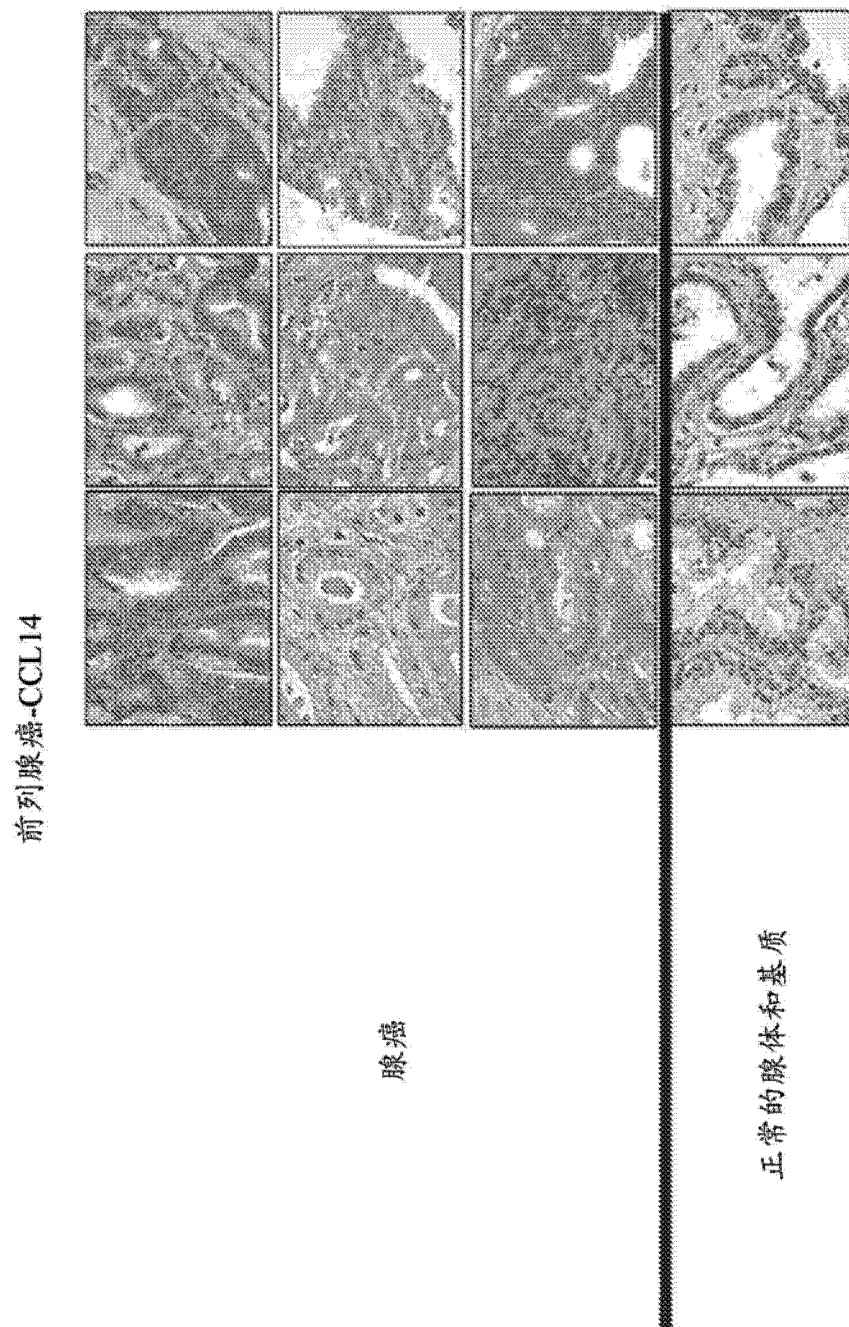


图 14

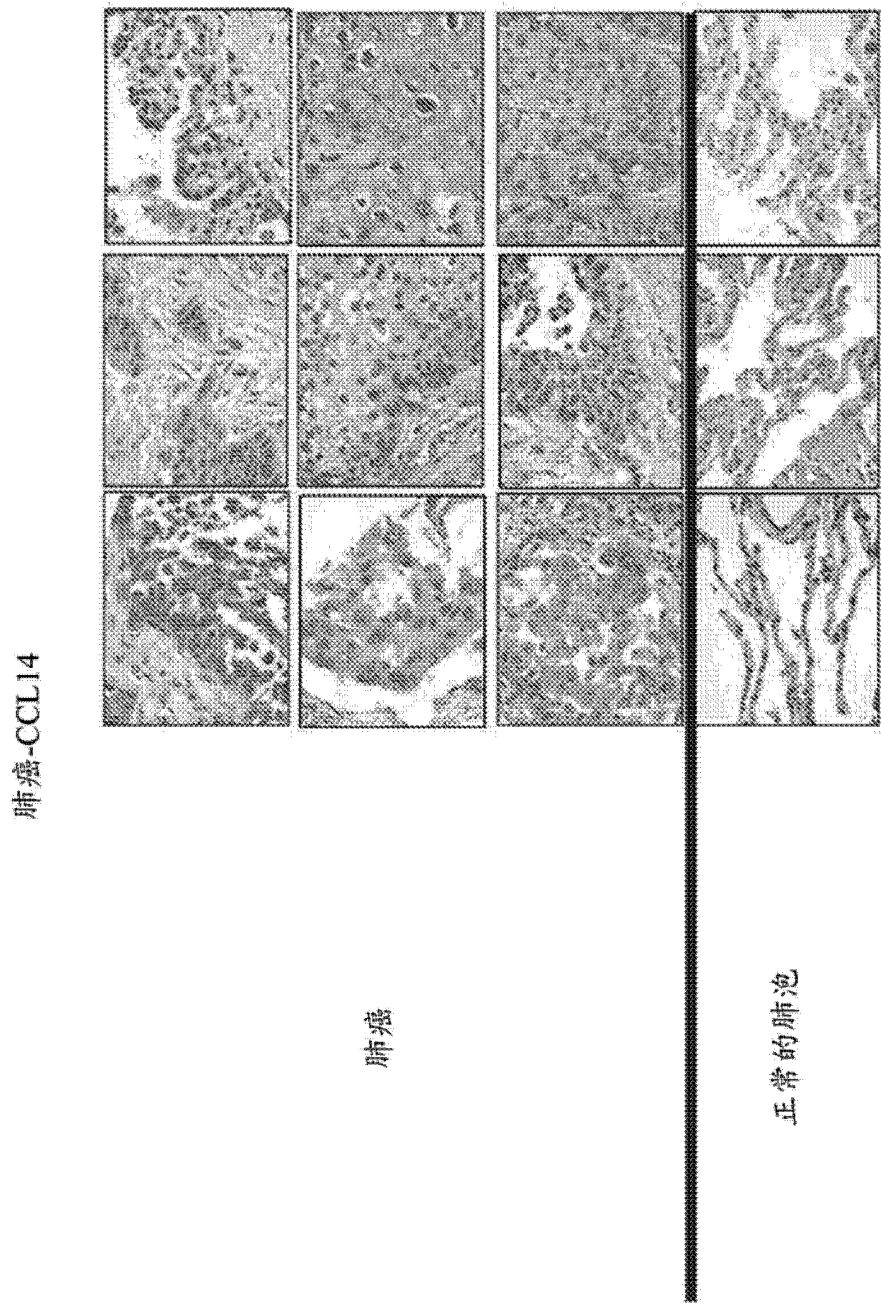


图 15

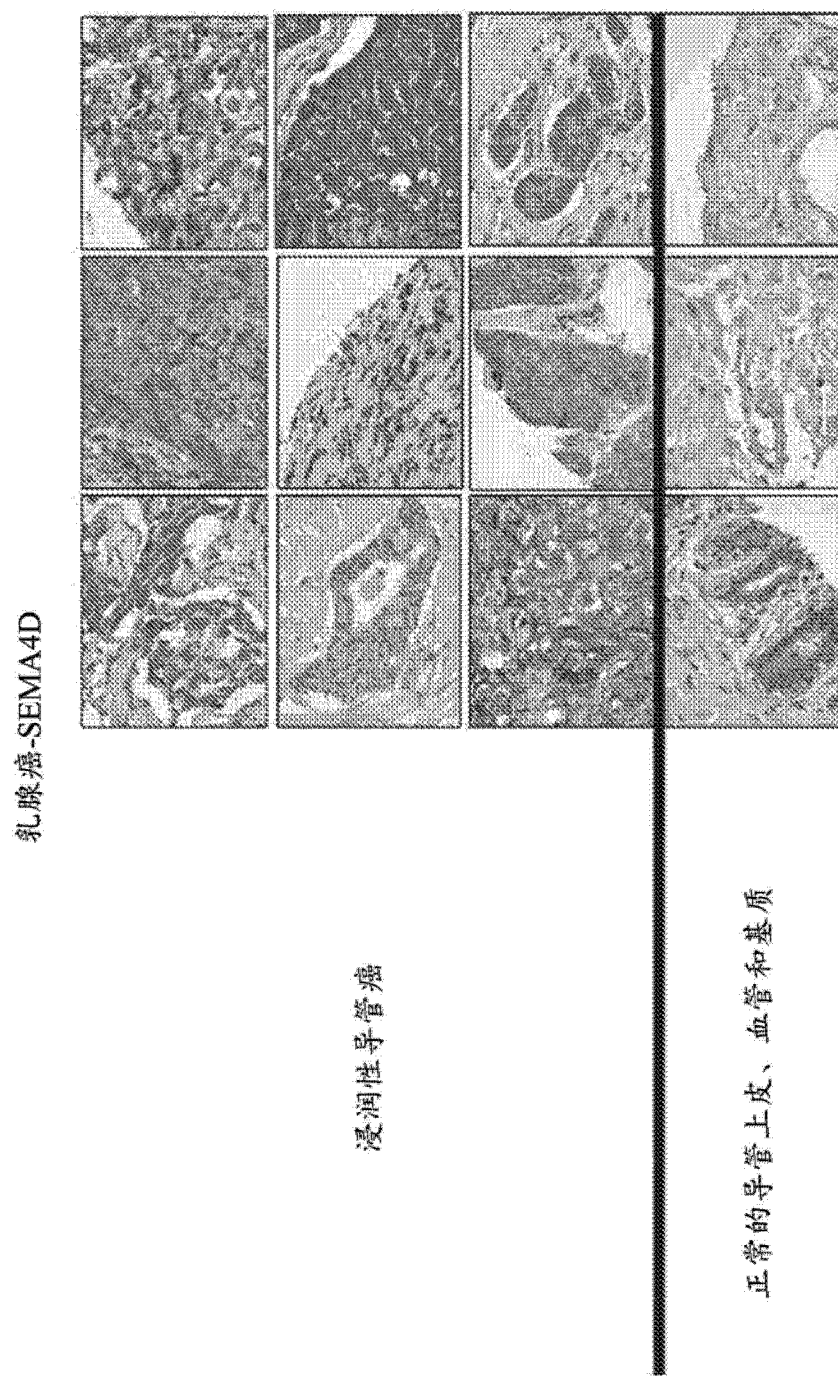


图 16

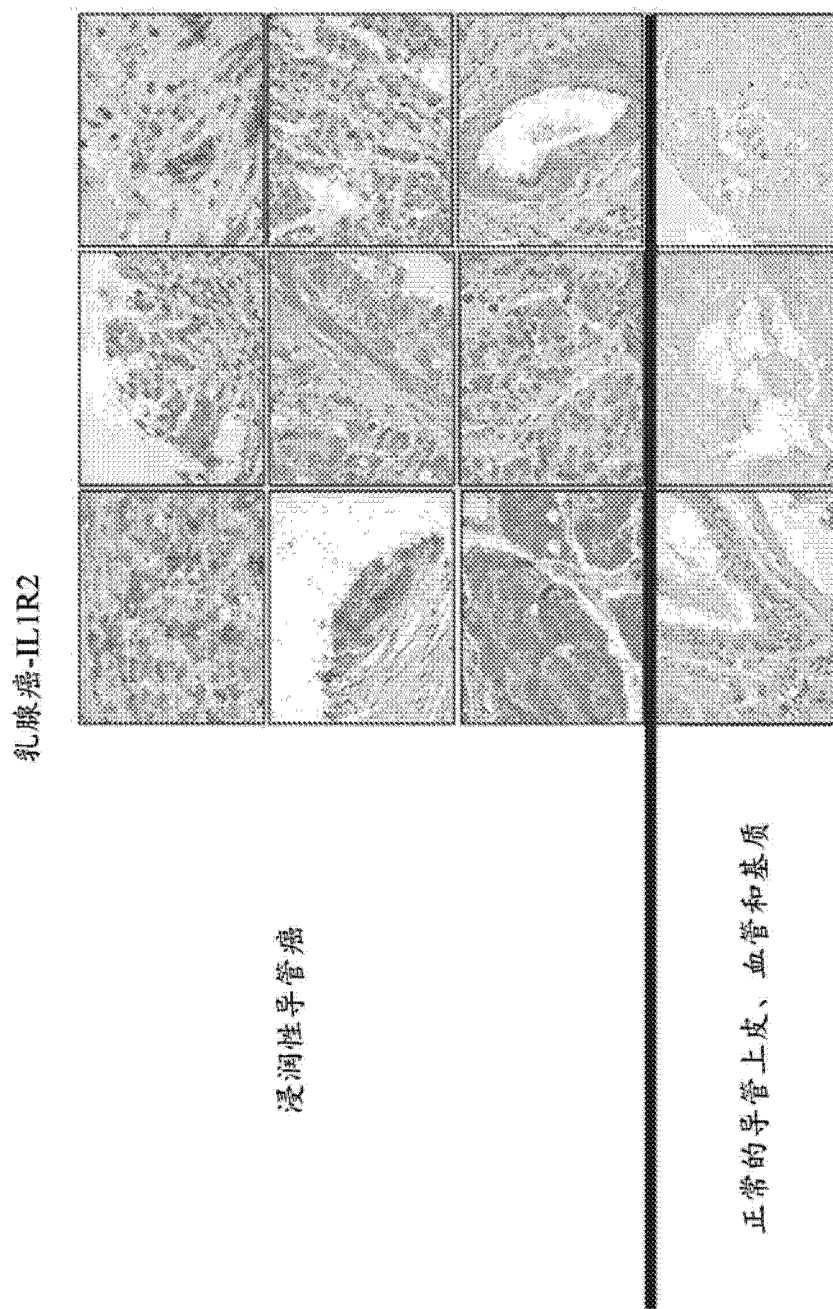


图 17

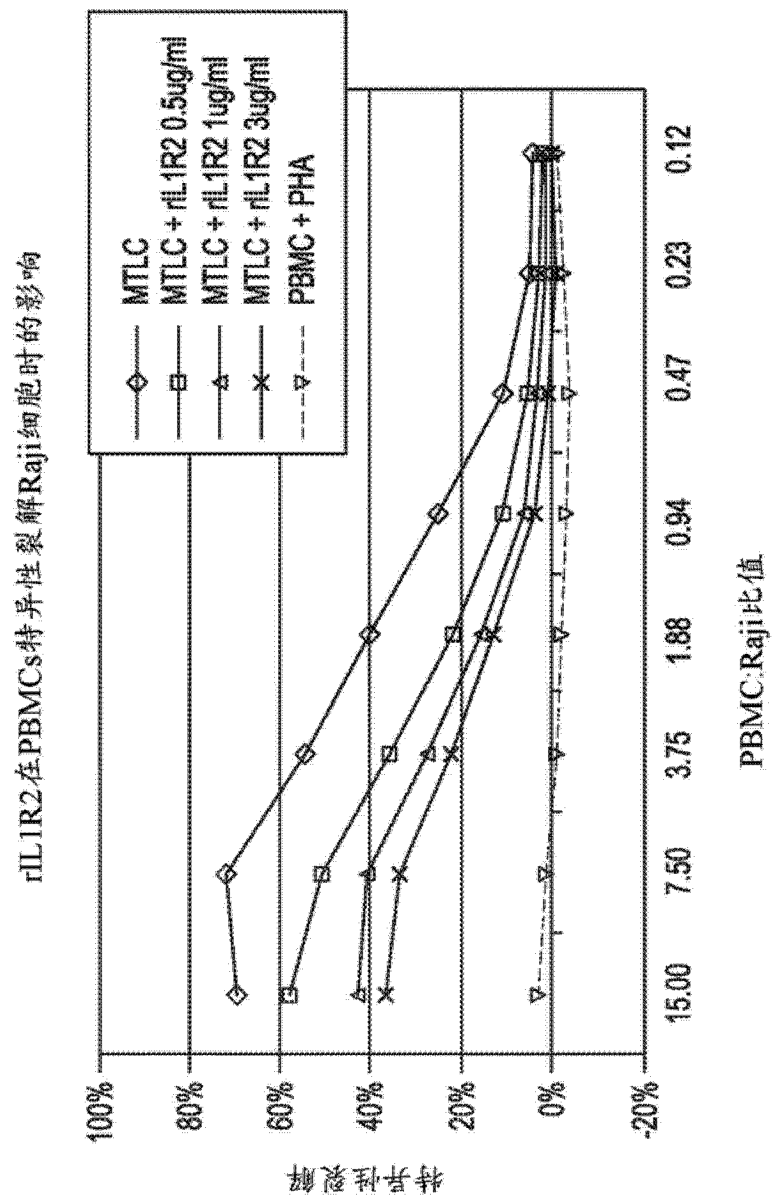


图 18

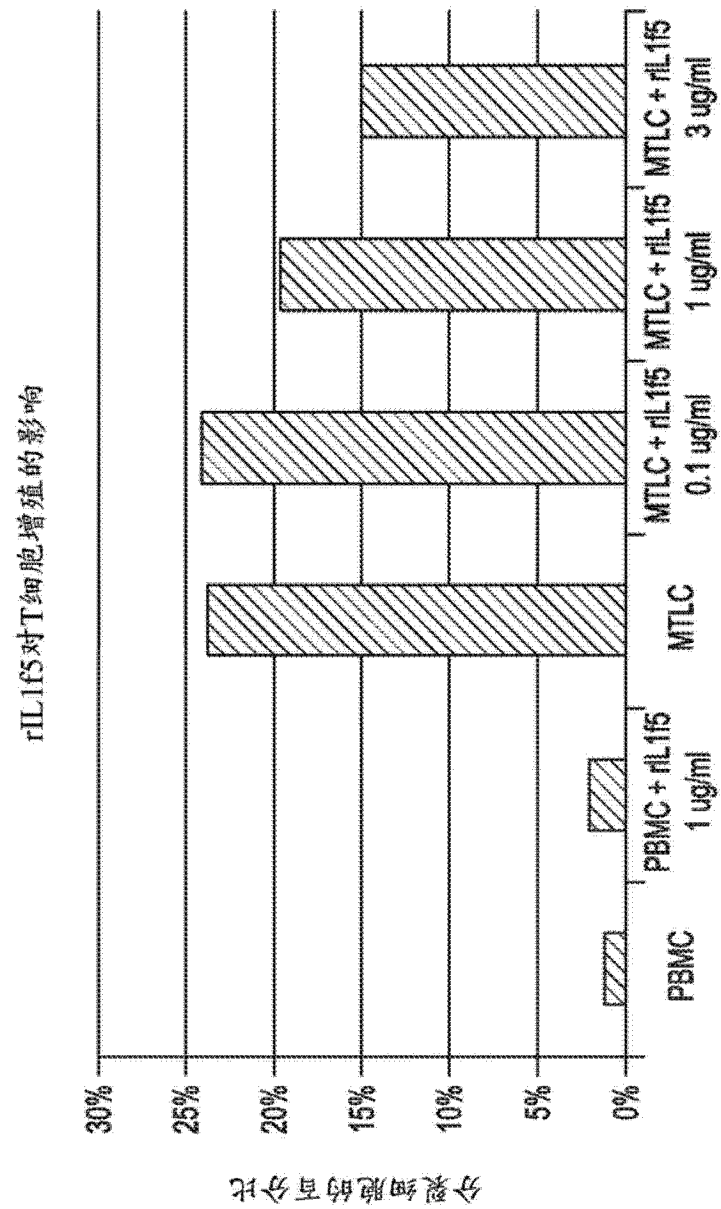


图 19