

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01800599.3

[51] Int. Cl.

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 7 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100400100C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01)

[22] 申请日 2001.2.2 [21] 申请号 01800599.3

[30] 优先权

[32] 2000.2.2 [33] US [31] 60/179,870

[86] 国际申请 PCT/US2001/003662 2001.2.2

[87] 国际公布 WO2001/056598 英 2001.8.9

[85] 进入国家阶段日期 2001.11.21

[73] 专利权人 范德比尔特大学

地址 美国田纳西

[72] 发明人 C·G·海勒奎斯特

[56] 参考文献

US5858991A 1999.1.12

WO0005375A 2000.2.3

审查员 王宏

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 唐伟杰

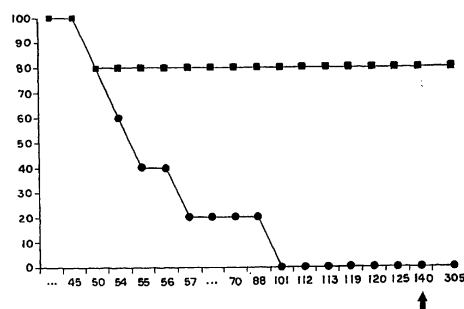
权利要求书 2 页 说明书 43 页 附图 2 页

[54] 发明名称

GBS 毒素受体的制药用途

[57] 摘要

本发明提供了通过施用至少一种 GBS 毒素受体多肽或其至少一种免疫原性片段而预防或减轻病理性血管发生状况的方法。本发明还提供了包含 GBS 毒素受体多肽的组合物及其制备方法。在本发明的另一个实施方案中,免疫动物还接受 GBS 毒素、针对 GBS 毒素受体的免疫相容性抗体、和/或针对 GBS 毒素受体的经扩增自身 T 细胞。本发明还包括鉴定其它 GBS 毒素受体的方法。



1. 一种或多种GBS毒素受体或其免疫原性片段在制备可用于预防或减轻哺乳动物中的病理性血管发生状况的药物中的用途, 其中所述GBS毒素受体具有选自以下的氨基酸序列: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, 和包含至少一处保守性氨基酸替代的在核酸水平上与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4具有至少90%同一性的氨基酸序列, 并且其中所述病理性血管发生状况是涉及病理性血管发生的癌症。

2. 权利要求1的用途, 其中所述一种或多种GBS毒素受体中的至少一种具有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列。

3. 权利要求1或2的用途, 其中所述一种或多种GBS毒素受体中的至少一种具有SEQ ID NO: 4的氨基酸序列。

4. 权利要求1的用途, 其中所述免疫原性片段包含选自以下的一种或多种氨基酸序列: SEQ ID NO: 2的第49-63位残基、SEQ ID NO: 2的第112-125位残基、SEQ ID NO: 2的第8-28位残基、SEQ ID NO: 2的第49-76位残基、SEQ ID NO: 4的第14-19位残基、SEQ ID NO: 4的第25-30位残基、SEQ ID NO: 4的第75-80位残基、SEQ ID NO: 4的第9-35位残基、SEQ ID NO: 4的第8-22位残基和SEQ ID NO: 4的第71-84位残基。

5. 权利要求1的用途, 其中所述哺乳动物的正常组织不含GBS毒素受体。

6. 权利要求1的用途, 其中所述药物为经由口服、鼻吸入、皮下注射、静脉内注射、肌肉注射、腹腔内注射、或直肠应用给药的形式。

7. 权利要求1的用途, 其中所述药物还包括其量足以诱导所述哺乳动物应答的GBS毒素。

8. 权利要求7的用途, 其中GBS毒素的量是至少 $5\mu\text{g/kg}$ 。

9. 权利要求8的用途, 其中GBS毒素的量是至少 $15\mu\text{g/kg}$ 。

10. 权利要求9的用途, 其中GBS毒素的量是至少 $20\mu\text{g/kg}$ 。

11. 权利要求1的用途, 其中所述药物还包含制药学可接受的赋形

剂。

12. 权利要求1的用途, 其中所述药物还包含佐剂。

13. 权利要求12的用途, 其中所述佐剂选自: 油包水组合物、弗氏佐剂、QS21、IL-12、和 γ -干扰素。

14. 权利要求1的用途, 其中至少一种GBS毒素受体或其片段是分离的。

15. 权利要求14的用途, 其中一种分离的GBS毒素受体或其片段缀合或连接了蛋白质载体。

16. 权利要求15的用途, 其中蛋白质载体是选自下列的分子: 匙孔 螯血蓝蛋白(KLH)、牛血清清蛋白(BSA)、卵清蛋白、人血清清蛋白、人 γ -球蛋白、鸡免疫球蛋白G、牛 γ -球蛋白、和破伤风类毒素。

17. 权利要求1的用途, 其中至少一种GBS毒素受体或其片段是糖基化的。

18. 权利要求1的用途, 其中至少一种分离的GBS毒素受体或其片段是重组的或合成的。

19. 权利要求1的用途, 其中所述癌症是肺癌或黑素瘤。

GBS 毒素受体的制药用途

技术领域

本发明提供了用于预防或改善由病理性新血管结构的形成而引起的医学状况的方法和组合物。这些状况包括癌症、创伤治愈过程中的结痂、瘢痕瘤的形成、慢性创伤、神经损伤修复过程中的神经胶质增生、再灌注损伤、类风湿性关节炎、牛皮癣、和动脉粥样硬化。

背景

在美国，癌症是仅次于心脏病（常常部分归咎于动脉粥样硬化）的第二号主要死因。在美国，自1990年起，新诊断了大约1200万例癌症，且500万名患者死于癌症。

神经损伤能够导致死亡或深度残疾，诸如运动能力丧失、感官知觉受损、认知功能丧失、发作、和情绪和人格紊乱。

类风湿性关节炎（RA）和牛皮癣是由炎症性血管发生扩散的普遍的慢性炎症性疾病。RA影响大约1-2%的世界人口。RA受害者常常经历疼痛和活动能力受损，而且作为一个组，他们的死亡率是未受影响组的两倍。大约1-3%的美国居民和甚至更高百分率的北欧居民患有牛皮癣，这种疾病的皮肤发生复发性红斑，感觉炙热和发痒。

慢性创伤或皮肤溃疡是糖尿病人和衰老老人中的主要问题。由事故或外科切口造成的急性创伤愈合较差和创伤相关瘢痕的形成严重损害由这些事件复原。再灌注损伤引起针对移植器官以及外科手术位点附近组织的损伤、中风、和心脏病发作。

存在对癌症、神经损伤修复过程中的神经胶质增生、慢性炎症性疾病（诸如类风湿性关节炎和牛皮癣）、创伤治愈过程中的结痂、瘢痕瘤的形成、慢性创伤、再灌注损伤、和动脉粥样硬化的预防方法的需要。还存在对这些医学状况的有效且安全疗法的需要。

发明概述

本发明提供了用于预防病理性血管发生状况或针对病理性血管发生状况提供保护的方法，包括对哺乳动物施用一种或多种B类 β -溶血性链球菌（GBS）毒素受体或其免疫原性片段，施用量足以诱导或维持针对至少一种GBS毒素受体的免疫应答。

本发明还提供了用于降低发病率、改善、减轻严重程度、或缓解病理性血管发生状况的方法，包括对哺乳动物施用一种或多种GBS毒素受体或其免疫原性片段，施用量足以诱导或维持针对至少一种GBS毒素受体的免疫应答。

本发明的另一个方面是与制药学可接受的赋形剂一起包含一种或多种GBS毒素受体或其免疫原性片段的疫苗。

能够由本发明的方法和组合物预防或减轻的病理性血管发生状况包括癌症、创伤治愈过程中的结痂、瘢痕瘤的形成、慢性创伤、神经损伤修复过程中的神经胶质增生、再灌注损伤、类风湿性关节炎、牛皮癣、和动脉粥样硬化。

优选的GBS毒素受体是HP59和SP55及其本质上同一的变体。用本发明的方法或组合物进行治疗的哺乳动物还可以额外用GBS毒素、针对GBS毒素受体的免疫相容性抗体、或自身激活的GBS毒素受体识别T细胞进行治疗。

本发明的还有一个方面是用于治疗和/或预防病理性血管发生状况的组合物的制备方法。该方法包括提供一种或多种GBS毒素受体或其免疫原性片段，并在制药学可接受的赋形剂中进行配制。可以任选的提供佐剂。

图的简述

图1展现了对照哺乳动物及用本发明组合物免疫的雄性和雌性哺乳动物中的Lewis肺肿瘤的生长曲线。Y轴代表肿瘤体积，X轴代表测量肿瘤体积的日期。雄性对照哺乳动物用实心菱形表示，雌性哺乳动物

对照用实心圆形表示；雄性免疫哺乳动物用空心圆形表示，雌性免疫哺乳动物用空心菱形表示。

图2展现了用本发明组合物进行免疫并用黑素瘤细胞进行静脉内激发的雌性哺乳动物和同样激发但未免疫的雌性对照哺乳动物的存活曲线。Y轴代表存活者所占百分率，X轴代表存活天数。实心圆形表示雌性对照哺乳动物，实心方形表示雌性免疫哺乳动物。

特定实施方案的描述

绪言

B类 β -溶血性链球菌(GBS)是通常对人无害的普遍存在的微生物，其一例外是感染了GBS的新生儿常常发生GBS肺炎（也称为“早期发作疾病”或“早期发作败血症”），这是一种具有高发病率和死亡率的疾病。Hellerqvist及其同事鉴定了GBS肺炎并发症中的主要因子多糖GBS毒素（C.G.Hellerqvist等人，*小儿科研究(Pediatr. Res.)*12: 892 - 898, 1981；H. Sundell等人，*小儿科杂志(J. Pediatr.)*137: 338 - 344, 2000）。

随后发现GBS毒素具有许多治疗性特性。它是抑制实体瘤血管发生的抗癌剂（美国专利号5,010,062和相当的欧洲专利号EP 0 445 280 B1；DeVore等人，*临床癌症研究(Clinical Cancer Res.)*3: 365 - 372, 1997）。另外，如美国专利号5,858,991和WO 98/32453所述，GBS毒素在哺乳动物中通过将结痂降至最小和加速治愈而有助于创伤治愈，并降低创伤相关肿瘤进展。GBS毒素还通过将神经胶质瘢痕降至最低而增强神经损伤的修复（美国专利号5,981,508和WO 98/32448），并改善某些慢性炎症性疾病（诸如类风湿性关节炎和牛皮癣）的症状（WO 98/32452）。

已经将GBS毒素的抗癌效果上溯至它快速结合肿瘤相关内皮细胞并随后通过另一（C3）途径激活补体的能力。激活的白细胞立刻浸润随后消灭内皮细胞，而且作为炎症性应答和血液供应不足的结果，肿瘤将萎缩（Yan等人，*血管发生(Angiogenesis)*2: 219 - 233, 1998；

B. D. Wamil等人, *AACR进展 (AACR Proceedings)*38: 237, 1997)。

不限于特定理论, 认为GBS毒素的其它治疗性特性归功于相似机制。神经外伤、创伤、血流中断、再灌注、动脉粥样硬化性病斑、类风湿性关节炎、和牛皮癣都诱导缺氧, 而缺氧又引起血管内皮生长因子(VEGF)的释放(Liu等人, *神经科学杂志 (J. Neuroscience)*17: 5395 - 5406, 1997)。VEGF刺激内皮细胞去分化, 并开始通过称为病理性血管发生的过程形成新的血管结构。在神经损伤患者中, 新形成的血管结构有助于神经胶质增生, 即形成在空间上妨碍神经连通性重建的神经胶质瘢痕的神经胶质细胞增殖。类风湿性关节炎患者关节中的新血管结构有助于滑膜组织的增生、血管翳的形成、和软骨的破坏。相似的, 病理性血管发生有助于牛皮癣性损伤的建立、维持、和扩大, 而且是形成在创伤附近导致慢性创伤或瘢痕形成(包括瘢痕瘤)的肉芽组织的驱动力。在动脉粥样硬化中, 病理性新血管结构向位于病斑下的平滑肌和内皮细胞提供氧和营养, 并进一步导致受影响血管变窄。由病理性血管发生引起的其它状况包括糖尿病性视网膜病、晶体后纤维增生、新血管青光眼、血管纤维瘤、免疫和非免疫性炎症、血管瘤、Kaposi(卡波西)肉瘤、和子宫内膜异位(参阅PCT发表物编号W0 91/10424, 第13页, 第14 - 21行)。由病理性血管发生引起的其它状况包括角膜移植新血管发生、眼部肿瘤、沙眼、和血友病关节(参阅欧洲专利申请编号EP 0 325 199 A2, 第2页, 第12 - 19行)。由病理性血管发生引起的其它状况包括视网膜早熟、黄斑退化、Behcet综合症、Osler-Weber-Rendu病、骨关节炎、角膜移植排斥、和眼部心血管疾病(参阅PCT发表物编号W0 94/20085, 第2页第27行 - 第6页第14行)。GBS毒素通过结合萌芽中的病理性新血管结构并将之靶向由免疫系统进行的毁灭来妨碍这些有害过程。

曾经认为GBS毒素经出生时和此后短期(足月儿大约7天, 早产儿更长)在这些组织上存在的受体攻击新生儿的肺并结合胚胎新血管结构。进一步假设相同受体以后只在病理性新血管结构上存在(即由病理性血管发生形成的新毛细血管)。最近在这些细胞上发现的特异性

结合GBS毒素的新蛋白质的鉴定已经确认了这种想法。称为HP59的人GBS毒素受体的核酸和氨基酸序列依次显示于SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2 (GenBank编号AF244578)。称为SP55 (由绵羊肺文库克隆, GenBank编号AF244578) 的绵羊GBS毒素受体的核酸和氨基酸序列依次显示于SEQ ID NO: 3和SEQ ID NO: 4。HP59和SP55都是具有多个跨膜结构域的膜内在蛋白质。每一种都具有几个由依赖cAMP的激酶、蛋白质激酶C (PKC)、和酪蛋白激酶II (CKII) 进行磷酸化的推断位点, 以及进行糖基化和十四烷基化的推断位点。虽然HP59在氨基末端具有SP55缺乏的41个氨基酸, 但是两种蛋白质仍然具有87% 的同一性。

正如期望的, GBS毒素受体在易受GBS感染的新生儿和绵羊肺上表达。它在正常的 (健康的、非新生儿的) 人卵巢、结肠、乳房、和肺组织相关血管结构中不表达, 但是在这些组织的肿瘤血管结构中存在。因此, GBS毒素受体表达与涉及病理性血管发生的医学状况有关, 而且在来自超过1个月大的人的健康组织中没有发现受体, 除了在早产儿中表达与他们的足月到期有关。

虽然不希望受限于理论, 但是认为由于在与病理性血管发生状况有关的病理性新血管结构上存在GBS毒素受体, 如果免疫系统开始识别GBS毒素受体, 那么它将攻击如此形成的血管结构, 而病理性血管发生状况将得到预防或减轻。因此, 本发明包括用于激发针对GBS毒素受体的免疫应答的方法和组合物。

定义

通常, 此处所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员的通常理解相同的含义。此处所用的术语和下文所述的免疫学、细胞培养、生物化学、和分子生物学中的实验室程序在本领域是众所周知的和常常采用的。将标准技术用于重组核酸方法、多肽合成、和单克隆及多克隆抗体生产。由制造商提供的酶反应和纯化步骤通常按照制造商的说明书进行。技术和程序通常按照本领域传统方法和贯穿本文件提供的各种常用参考文献 (通常参阅Sambrook等人, 《分子克

隆：实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)，第2版，冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约，1989)进行。此处所有的术语和下文所述的分析化学、有机合成化学、免疫学、和制药学配方中的实验室程序在本领域是众所周知的且常常采用的。可以将标准技术用于化学合成、化学分析、制药学配制及投递、和哺乳动物治疗。如贯穿公开书所用，除非特别指明，应当理解为下列术语具有下列含义：

为了本发明的目的，术语“GBS毒素”指天然GBS毒素的任何纯化部分或成分，或者由培养基或经裂解GBS细菌的蛋白酶消化物衍生的纯化部分或成分，它们的毒性可以通过下列特定测定程序来确认。分离的GBS毒素作为肿瘤生长抑制剂的潜力可以通过将肿瘤组织样品进行使用抗GBS毒素IgG的过氧化物酶-抗过氧化物酶(PAP)测定法并通过在绵羊模型中以 $2\mu\text{g}10^{-11}\text{mol/kg}$ 进行输液来确认(C. G. Hellerqvist等人，1981，上文引用；C. G. Hellerqvist等人，1981，上文引用；C. G. Hellerqvist等人，美国国家科学院进展(PNAS)84: 51 - 56, 1987)。

“GBS毒素受体”指能够结合来自B类 β -溶血性链球菌属细菌的毒素(GBS毒素)的蛋白质性质的分子。GBS毒素受体通常在自然界中在细胞表面上发现。可以通过本领域知道的实验室技术来生成膜结合的或可溶性的重组GBS毒素受体。GBS毒素受体指与此处定义的GBS毒素发生相互作用的任何受体。

如此处所用，如果对个体施用疫苗或方法导致个体不能形成某种医学状况，那么说疫苗或方法可提供针对该医学状况的“预防”或“保护”作用。

如此处所用，如果对个体施用疫苗或方法导致在个体中抑制或部分抑制某种医学状况的至少一种症状或其它临床表现，那么说该疫苗或方法可“改善”、“减轻”所述医学状况或“降低其严重程度”。

如此处所用，如果对个体施用疫苗或方法具有降低个体形成某种医学状况的概率的作用，那么说该疫苗或方法“可降低所述医学状况

的发病率”。

“病理性血管发生状况”指与诸如由缺氧诱导的、VEGF-介导的去分化内皮细胞形成新血管结构引起的病理性血管发生有关的任何医学状况。病理性血管发生发生于诸如糖尿病性视网膜病、血管瘤、癌症、牛皮癣、RA、骨关节炎、和动脉粥样硬化等疾病(Folkman等人, 科学(*Science*)235: 442, 1987; Kimball等人, 试剂和作用(*Agents&Actions*)34: 329, 1991)。它还与神经损伤附近和瘢痕瘤结构中形成神经胶质瘢痕、再灌注损伤、和创伤治愈过程中的结痂有关。病理性血管发生与生理性新血管发生不同, 后者是在正常、健康环境(诸如创伤治愈、雌性月经周期、和妊娠)下发生的基础修复机制, 而且认为后者是由接触抑制中断后存在的内皮细胞的扩增产生的(Brem和Folkman, 小儿外科杂志(*J. Ped. Surg.*)28: 445, 1993)。

“免疫应答”可以是体液或细胞介导的或者二者兼之。在体液应答中, 经免疫动物产生可识别并特异结合特定抗原的抗体。优选的是, 这些抗体的效价将至少是大约1: 200(由ELISA测量)。细胞介导的免疫应答的特征为存在识别抗原的辅助T细胞、抑制性T细胞、和/或细胞毒性T细胞。可以通过本领域知道的方法来确认这些细胞的存在, 包括在皮下施用抗原样品后72小时内形成升高至少1mm的区域。

如在对哺乳动物施用的抗体的内容中所用, 如果哺乳动物的免疫系统不将抗体作为外来蛋白质对待且不发动针对抗体的免疫应答, 那么这种抗体与这种哺乳动物是“免疫相容性的”。可以由接受者哺乳动物的相同物种的哺乳动物获得待施用的抗体。或者, 这种抗体可以经改造包含与由接受者哺乳动物天然产生的抗体类似的恒定区。当接受者哺乳动物是人时, 这种抗体通常称为“人化”抗体。

术语“免疫原性”指具有抗原性特性或能够由能够特异结合抗原的抗体特异结合。如果在本领域知道的、有助于产生抗体和/或识别表达特定抗原的细胞并引发针对该细胞的细胞毒性应答的T细胞的条件下, 对动物施用一种物质后能够产生或引发免疫应答, 那么该物质具有抗原性特性。

术语“佐剂”指用于增强经免疫哺乳动物对抗原的免疫应答的试剂。

如此处所用，术语“胃肠外”包括皮下注射、腹膜内或肌肉内注射、或输液技术。

如此处作为一般术语所用，术语“多肽”指天然蛋白质、片段、类似物、或者多肽序列糖基化的、磷酸化的、或十四烷基化的异构体。因此，天然蛋白质、片段、类似物、和糖基化、磷酸化、十四烷基化异构体是多肽属的种。

如此处在多肽的内容中所用，术语“分离的”指不再与在自然界中通常有关联的细胞以在自然界中通常有关联的相同方式有关联的多肽，诸如（1）至少不含一些来自相同来源的其它多肽的多肽，（2）由不同物种的细胞表达的多肽，（3）在自然界中不存在的多肽，和（4）由cDNA、重组RNA、或合成来源或其组合产生的肽。

术语“天然存在的”指在自然界中发现的。例如，存在于自然界中发现的、尚未在实验室中有意修饰的有机体（包括病毒）中的多肽或多核苷酸序列就是天然存在的。

正如用于多肽的，术语“本质上的同一性”指当通过BLAST电脑程序进行最佳排列后，两种肽序列共享至少大约80%的序列同一性、至少大约86%的序列同一性、优选至少大约90%的序列同一性。在最大匹配中允许有缺口（在匹配的两组序列的任一中）；缺口长度优选大约10或更低，更优选大约5或更低。不相同的残基位置可以因保守性氨基酸替代而不同。保守性氨基酸替代指具有相似侧链的残基的可交换性。例如，具有脂肪族侧链的一组氨基酸是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、和异亮氨酸；具有脂肪族羟基侧链的一组氨基酸是丝氨酸和苏氨酸；具有含酰胺侧链的一组氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺；具有芳香族侧链的一组氨基酸是苯丙氨酸、酪氨酸、和色氨酸；具有碱性侧链的一组氨基酸是赖氨酸、精氨酸、和组氨酸；具有含硫侧链的一组氨基酸是半胱氨酸和甲硫氨酸。

如此处所用，术语“片段”指具有氨基末端、内部、和/或羧基末

端删除，但是剩余氨基酸序列与天然存在的、由例如全长DNA序列推导的序列的相应位置相同的肽。片段通常长至少大约3个氨基酸，优选大约5-10个氨基酸，更优选大约10-50个氨基酸，甚至更优选大于50个氨基酸。同样优选的是包含GBS毒素受体的一个或多个细胞外结构域的片段。这些片段还可以包含足以将多肽片段以立体化学构象维持在细胞表面、脂质膜、脂质体、胶团、或其它亲脂性结构上的跨膜和细胞内结构域的部分。

单数形式包括复数指称，除非文章清楚指明。
此处所述的核酸和氨基酸序列的SEQ ID NO概述于下文表1。

表1. 核酸和氨基酸序列

SEQ ID NO:	序列类型	描述
SEQ ID NO: 1	核酸	全长人GBS毒素受体 (HP59)
SEQ ID NO: 2	氨基酸	全长人GBS毒素受体 (HP59)
SEQ ID NO: 3	核酸	绵羊GBS毒素受体 (SP55)
SEQ ID NO: 4	氨基酸	绵羊GBS毒素受体 (SP55)

此处提供的标题描述了讨论的一般主题，而非排除其它部分中讨论的信息。通常，信息、方法、组合物、和其它方面可用于超过一个的本发明实施方案，而且可以进行组合。

本发明的一个方面是用于在哺乳动物中预防病理性血管发生状况的方法：对哺乳动物施用一种或多种GBS毒素受体或其免疫原性片段，其用量足以在哺乳动物中有效诱导或维持针对至少一种GBS毒素受体的免疫应答。

本发明的另一个方面是用于在哺乳动物中减轻病理性血管发生状况的方法：对哺乳动物施用一种或多种GBS毒素受体或其免疫原性片段，其用量足以在哺乳动物中有效诱导或维持针对至少一种GBS毒素受体的免疫应答。可以在哺乳动物没有病理性血管发生状况的任何症状时进行该方法。这种施用有助于降低随后形成的病理性血管发生状况的严重程度或进展。当在患有病理性血管发生状况的哺乳动物上进行该方法时，它将改善病理性血管发生状况的一种或多种症状。

可以对在病理性新血管结构上表达GBS毒素受体的任何动物进行上述方法。优选的是，这种动物是在健康组织上不表达该受体的哺乳动物。已知人胎儿和大至大约10天的足月新生儿在其肺血管结构上具有GBS毒素受体。绵羊、牛、和猫在出生后不久和其后在其肺血管结构上表达GBS毒素受体。该方法的优选接受者是超过10天的足月的人以及狗、小鼠、猪、山羊、和马。

在本发明的其它实施方案中，经免疫动物接受针对GBS毒素受体或其免疫原性片段的抗体或者针对GBS毒素受体的经扩增自身T细胞或其组合。这些方法可用于攻击病理性血管发生状况中的血管结构。这些实施方案可以独立使用，或与此处公开的病理性血管发生疾病的治疗方案组合使用，或与在本领域中使用的病理性血管发生疾病的其它治疗方案组合使用。

例如，正如更早叙述的，曾经认为GBS毒素经出生时在这些组织上存在的受体攻击新生儿的肺并结合胚胎新血管结构。随后发现GBS毒素可抑制实体瘤的血管发生并改善其它疾病的症状。因此，在本发明的另一个实施方案中，除了接受至少一种GBS毒素受体或至少一种其免疫原性片段，经免疫动物还接受GBS毒素或其片段、针对至少一种GBS毒素受体或其免疫原性片段的抗体、或者经扩增自身T细胞或其组合。当动物高风险会患上或已经患上病理性血管发生状况时，补充治疗是优选的。GBS毒素可以由CarboMed公司（Brentwood, TN）获得，或者可以按照美国专利号5,010,062和5,811,403和WO 98/14603进行纯化，此处引入作为参考。对于人接受者，GBS毒素优选以大约5 - 大约25 μ g/kg的范围施用。用于治疗下列病理性血管发生状况的GBS毒素施用方法描述于下列专利，此处引入作为参考：

<u>状况</u>	<u>专利</u>
癌症	US 5,010,062
结痂	US 5,858,991
瘢痕瘤	US 5,858,991
再灌注损伤	US 5,858,991

动脉粥样硬化	US 5,858,991
烧伤	US 5,858,991
慢性创伤	US 5,858,991
神经胶质增生	US 5,981,508
类风湿性关节炎	WO 98/32452
牛皮癣	WO 98/32452

针对GBS毒素受体的抗体可以通过用GBS毒素受体或其免疫原性片段免疫动物（包括兔、小鼠、山羊、和鸡）而获得。可以使用单克隆抗体、多克隆抗体、及其变体。变体的范例包括但不限于单链（重组）抗体、“人化”嵌合抗体、和在免疫学上有活性的抗体片段（如Fab和Fab'片段）。非人（如鼠）单克隆抗体的生产是众所周知的（参阅例如Harlow等人，《抗体：实验室手册》（Antibodies: A Laboratory Manual），冷泉港实验室出版社，第139-240页，1989）。优选将免疫相容性抗体用于预防经免疫动物发动针对GBS毒素受体抗体的免疫应答。为了制备对人而言是免疫相容性的抗体，理想的是通过重组DNA技术将非人单克隆抗体的抗原结合区（如F(ab')₂）或鼠单克隆抗体的高变区转移至人恒定区（Fc）或框架区而产生本质上的人分子。这些方法是通常知道的，描述于如美国专利号4,816,397和4,946,778和EP发表物173,494和239,400。或者，可以按照WO 90/14430中描述的一般方案通过筛选来自人B细胞的DNA文库来分离编码特异结合受体蛋白质的人单克隆受体或其一部分的DNA序列，然后克隆并扩增编码具有期望特异性的抗体（或结合片段）的序列。可以将这些序列插入哺乳动物的DNA，插入方式使得哺乳动物将在乳汁中分泌抗体（Genzyme Transgenics, Framingham, MA）。这些抗体可以腹膜内或静脉内施用。本领域技术人员可以使用下文“施用”中讨论的基本原理来确定候选方案。

抗体还可用于发展将投递的细胞毒性剂靶向表达GBS毒素受体的细胞的方法。例如，细胞毒性剂可以与可结合GBS毒素受体的抗体偶联，从而选择性投递至生长中的肿瘤的新血管结构。这种投递系统有可能

提供针对生长中的肿瘤的高浓度定位攻击，同时将大多数化学治疗剂遭遇的不利的全身性副作用降至最低。

下面的部分更详细的讨论GBS毒素受体的免疫原性片段的选择、受体多肽的生产、其它GBS毒素受体的鉴定、组合物制剂、疫苗制剂、药物组合物、组合物或疫苗的施用、和免疫应答的监控。

GBS毒素受体的免疫原性肽

本发明的一个实施方案包括施用一种或多种GBS毒素受体的免疫原性片段。优选的受体是HP59和SP55，优选的片段包括Hab1、Hab2、和Hab3肽，如表3所示和实施例1所用。优选的是，哺乳动物接受至少两种免疫原性片段的组合，更优选所有这三种片段的组合。期望来自HP59和SP55的片段的共施用引发强烈免疫应答。免疫原性片段可以包含天然存在的翻译后修饰，诸如糖基化、十四烷基化、或磷酸化。可以在本发明中施用GBS毒素受体的其它免疫原性片段，本领域技术人员可以使用本领域知道的技术容易的鉴定适当的片段。

已经发展了大量的方法来预测在免疫原性方面重要的表位在蛋白质上的定位。组合预测的结果给出了抗原位点的好预报。可以通过如应用Hopp和Woods描述的技术（T. P. Hopp和K. R. Woods, *美国国家科学院进展* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) 78: 3824 - 3828, 1981) 来选择适当的GBS毒素受体片段，例如受体最亲水的部分。Chou和Fasman描述了适用于选择免疫原性片段的另一种方法（P. Y. Chou和G. D. Fasman, *酶学进展* (*Advances in Enzymology*) 47: 45 - 148）。多种其它算法可用于预测GBS毒素受体中在抗原性方面重要的区域，诸如预测多肽链的柔性（P. A. Karplus和G. E. Schultz, *Naturwissenschaften* 72: 212 - 213, 1985）、 β -转角概率分布（P. Y. Chou和G. D. Fasman, *生物物理学杂志* (*Biophys. J.*) 26: 367 - 385, 1979）、序列的3种构象概率分布（O. Gascuel和J. L. Golmard, *CABIOS* 4: 357 - 365, 1988）、序列的二级结构（J. Novotny和C. Auffray, *核酸研究* (*Nucleic Acids Research*) 12: 243 - 255, 1984）。使用Geysen

和 Melen 发展的 PEPSCAN 法 (H.M. Geysen、R.H. Melen、和 S.J. Barteling, 美国国家科学院进展 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) 81(13): 3998 - 4002, 1984) 可以获得有关表位处的其它信息。所有这些技术都可用于选择适当的 GBS 毒素受体片段在本发明中作为免疫原性抗原使用。

另外, 可以通过表达适当质粒中来自 GBS 毒素受体基因的 DNA 片段来鉴定 GBS 毒素受体的免疫反应性表位, 诸如 pEX 质粒 (K. Stanley 和 J.P. Luzio, 欧洲分子生物学杂志 (*EMBO J.*) 3: 1429 - 1434, 1984; 和 J.G. Kusters、E. J. Jager、和 B. A. M. Van der Zeijst, 核酸研究 (*Nucl. Acids Res.*) 17: 8007, 1989)。在该系统中, 异源表达导致 $\text{cro-}\beta$ - 半乳糖苷酶杂合蛋白 C 端延伸的合成。GBS 毒素受体 DNA 序列中的限制性内切酶位点可用于获得 GBS 毒素受体基因片段以插入 pEX 质粒中。然后将合成由 GBS 毒素受体的不同交叠区衍生的融合蛋白的 pEX 克隆用于进一步的分析。将 GBS 毒素受体片段进行纯化, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 并转印至硝酸纤维素膜。然后将这些膜与针对 GBS 毒素受体的多克隆抗体进行反应。只有包含免疫反应性表位的片段将与这些抗体发生反应。为了描绘表位的最小长度, 可以通过核酸外切酶 III 消化或通过克隆编码 GBS 毒素受体较小交叠部分的合成寡核苷酸将活性克隆的 DNA 插入片段逐渐缩短 (J.G. Kusters、E. J. Jager、G. Koch、J. A. Lenstra、W. P. A. Posthumus、R. H. Melen、和 B. A. M. Van der Zeijst, 免疫学杂志 (*J. Immunol.*) 143: 2693 - 2698, 1989)。然后可以检验表位在选定的哺乳动物中产生免疫应答的能力。可以使用本领域知道的技术以及本申请书的“监控免疫应答”部分中描述的技术来进行这种检验。

使用 Hopp 和 Woods 的方法经 PC/GENE 的“抗原”程序, Hellerqvist 及其同事已经鉴定了 SP55 的 3 个区域具有高亲水性而且有可能具有免疫原性 (显示于下文表 2)。

表2. SP55中的亲水性顶点

编号	平均亲水性	序列
1	2.05	Glu-Glu-Gly-Ser-Asp-Arg (SEQ ID NO: 4的第14 - 19位残基)
2	1.52	Lys-Asp-Asn-Arg-Thr-Ser (SEQ ID NO: 4的第75 - 80位残基)
3	1.33	Arg-Ala-Pro-Arg-Ala-Glu (SEQ ID NO: 4的第25 - 30位残基)

Hellerqvist及其同事已经成功的制备了针对表3所示HP59各部分的小鼠单克隆抗体和针对表4所示来自SP55的肽的兔多克隆抗体。兔多克隆抗体结合SP55和HP59，而且几个杂交瘤可生成识别SP55和HP59二者的单克隆抗体。

表3. 来自HP59的免疫原性肽

肽	氨基酸序列	大小	SEQ ID Ref.
Hab1	LARNDGEESTDRTPL	15aa	SEQ ID NO: 2的第49 - 63位残基
Hab2	NTTLEDNRTSKACP	14aa	SEQ ID NO: 2的第112 - 125位残基
Hab3	PPRPVQPARPGGFGLSGRRSL	21aa	SEQ ID NO: 2的第8 - 28位残基
Hab4	LARNDGEESTDRTPLLPGAPRAEAPVC	28aa	SEQ ID NO: 2的第49 - 76位残基

表4. 来自SP55的免疫原性肽

肽	氨基酸序列	大小	SEQ ID Ref.
p56a	APSDGEEGSDRTPLLRAPRAEPAPVC	27aa	SEQ ID NO: 4的第9 - 35位残基
p55a ¹	LAPSDGEEGSDRTPL	15aa	SEQ ID NO: 4的第8 - 22位残基
p57a ²	NTTAKDNRTSYECA	14aa	SEQ ID NO: 4的第71 - 84位残基

¹肽p55a是GBS毒素受体的细胞外结构域的片段。

²肽p57a是GBS毒素受体的细胞内结构域的片段。

GBS毒素受体多肽的制备

本发明的GBS毒素受体多肽可以以未修饰状态利用。或者，多肽可以在一个或多个翻译后修饰的推断位点处糖基化、十四烷基化、或磷

酸化。GBS毒素受体蛋白质或多肽可以以同聚物（相同GBS毒素受体多肽偶联形成的聚合物）或异聚物（一种或多种GBS毒素受体多肽偶联一种或多种不同的GBS毒素受体多肽）的形式制备，或者可以与一种或多种其它化合物偶联以增强免疫原性。

在本发明的一个实施方案中，GBS毒素受体蛋白质是天然存在的，而且可以通过本领域知道的蛋白质纯化技术由细胞提取物分离，诸如离子交换层析、高效液相层析（HPLC）、反相HPLC、或使用识别GBS毒素受体的抗体的亲和层析。纯化的蛋白质可以任选的进行冻干和稳定处理。

在另一个实施方案中，GBS毒素受体或其多肽片段可以通过本领域知道的技术进行化学合成，诸如固相肽合成（Stewart等人，《固相肽合成》（Solid Phase Peptide Synthesis），W.H. Freeman公司，旧金山，1963；Merrifield，*美国化学学会会刊*（*J. Am. Chem. Soc.*）85: 2149 - 2154，1963）。这些和其它肽合成方法还例示于美国专利号3,862,925、3,842,067、3,972,859、和4,105,602。合成可以使用手动合成技术或自动化采用例如Applied BioSystems 430A或431A肽合成仪（Foster City，加利福尼亚），遵照制造商提供的指令手册中提供的指示。

或者，可以使用在适用于表达（优选在哺乳动物细胞中，还有细菌、昆虫、或酵母细胞）的表达载体中与包括启动子在内的适当控制序列操作性结合的编码多肽的多核苷酸来表达多肽。优选的是，GBS毒素受体多核苷酸或其片段可以在哺乳动物系统中表达。这种表达将通常取决于哺乳动物启动子，即能够结合哺乳动物RNA聚合酶并起始编码序列（如结构基因）下游（3'）转录成mRNA的任何DNA序列。通常，启动子将具有转录起始区，通常位于并接近编码序列的5'端。这种转录起始区通常包含RNA聚合酶结合位点和转录起始位点。

适用于在哺乳动物细胞中复制的载体在本领域是知道的，而且可以包含病毒复制子或确保编码PAK65的序列整合到宿主基因组中的序列。合适的载体包括例如由猴病毒SV40、逆转录病毒、牛乳头瘤病毒、

牛痘病毒、和腺病毒衍生的那些载体。合适的载体是例如由牛痘病毒衍生的载体。在这种情况下，将异源DNA插入牛痘基因组。用于将外来DNA插入牛痘病毒基因组的技术在本领域是知道的，而且可以利用例如同源重组。异源DNA通常插入本质上不重要的基因中，例如胸苷激酶（tk）中，它还提供了选择标记。已经描述了大大有助于构建重组病毒的质粒穿梭载体（参阅例如Machett等人，1984；Chakrabarti等人，1985；Moss，1987）。然后在用活的重组牛痘病毒免疫的细胞或个体中发生异源多肽的表达。

上文实施方案的特殊情况是所谓的载体疫苗，其中在经免疫动物中经病毒载体产生重组多核苷酸。可用于该目的的病毒应当具有在所免疫的动物中进行复制的能力。此外，这些病毒应当具有适合于插入GBS毒素受体蛋白质或多肽基因的基因组区域。适合于该目的的病毒是例如肠病毒，诸如某些腺病毒。本发明的特殊应用涉及细菌载体疫苗，其中转化能够移居于哺乳动物的细菌（如沙门氏菌属的细菌），使它们能够表达GBS毒素受体多肽，并将导致针对GBS毒素受体的免疫原应答。

合适的哺乳动物表达载体通常包含一种或多种有助于在哺乳动物细胞中表达的真核转录单位。转录单位包括至少一种启动子元件以介导外来DNA序列的转录。适用于哺乳动物细胞的启动子在本领域是知道的，包括病毒启动子，诸如猴病毒40（SV40）（Subramani等人，*分子和细胞生物学* (*Mol. Cell. Biol.*)1: 854 - 864, 1981)、巨细胞病毒（CMV）（Boshart等人，*细胞* (*Cell*)41: 521 - 530, 1985)、劳氏肉瘤病毒（RSV）、腺病毒（ADV）（Kaufman和Sharp，*分子和细胞生物学* (*Mol. Cell. Biol.*)2: 1304 - 1319, 1982)、和牛乳头瘤病毒（BPV），以及细胞启动子，诸如小鼠金属硫蛋白-1启动子（美国专利号4,579,821）、小鼠VK启动子（Bergman等人，*美国国家科学院进展* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*)81: 7041 - 7045, 1993；Grant等人，*核酸研究* (*Nucl. Acids Res.*)15: 5496, 1987)、和小鼠VH启动子（Loh等人，*细胞* (*Cell*)33: 85 - 93, 1983）。

任选存在的、与此处所述启动子元件相组合使用的增强子元件(增强子)将通常增加表达水平。增强子是当与内源或异源启动子相连接时,能够刺激转录(由正常mRNA起点开始的合成)达1000倍的任何调控DNA序列。当以正常或翻转的取向置于转录起始位点的上游或下游或者距离启动子超过1000个核苷酸时,增强子也是有活性的(Maniatis等人, *科学(Science)*236: 1237, 1987; Alberts等人,《细胞的分子生物学》(Molecular Biology of the Cell), 第2版, 1989)。由病毒衍生的增强子元件是特别有用的,因为它们通常具有较广的宿主范围。可用于哺乳动物细胞的范例包括SV40早期基因增强子(Dijkema等人, *欧洲分子生物学杂志(EMBO J.)*4: 761, 1985)、由劳氏肉瘤病毒长末端重复片段(LTR)(Gorman等人, *美国国家科学院进展(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)*79: 6777, 1982b)和人巨细胞病毒(Boshart等人, *细胞(Cell)*41: 521, 1985)衍生的增强子/启动子、以及小鼠 μ 增强子(Gillies, *细胞(Cell)*33: 717-728, 1983)。另外,一些增强子是可调控的,只在存在诱导物诸如激素或金属离子时有活性(Sassone-Corsi和Borelli, *遗传学趋向(Trends Genet.)*2: 215, 1986; Maniatis等人, *科学(Science)*236: 1237, 1987)。

另外,转录单位还可以包含与GBS毒素受体编码序列操作性连接的终止序列和多聚腺苷酸化信号。多聚腺苷酸化信号包括但不限于来自SV40的早期或晚期多聚腺苷酸化信号(Kaufman和Sharp)、来自腺病毒5 E1B区的多聚腺苷酸化信号、和人生长激素基因终止子(DeNoto等人, *核酸研究(Nuc. Acids Res.)*9: 3719-3730, 1981)。

还可能期望引起基因扩增的序列,如编码选择标记的序列。用于哺乳动物细胞的选择标记在本领域是知道的,包括例如胸苷激酶、二氢叶酸还原酶(与作为DHFR扩增物的氨甲喋呤一起)、氨基糖苷磷酸转移酶、潮霉素B磷酸转移酶、天冬酰胺合成酶、腺苷脱氨酶、和抗生素(诸如新霉素)抗性基因。

GBS毒素受体或其片段可以在细胞表面上表达,或者可以以可溶性或分泌型形式表达。可以通过例如包含与编码期望受体片段和至少一

个跨膜结构域的核酸序列操作性连接的分泌型导肽来实现在细胞表面上的表达。分泌型导肽可以由GBS毒素受体基因编码的，或者可以是本领域常用的异源导肽序列，诸如粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）*pho1⁺*酸性磷酸酶的导肽序列（Braspenning等人，*生物化学与生物物理学研究通讯 (Biochem. Biophys. Res. Commun.)*245: 166 - 171, 1998）和人白介素-2（IL-2）基因的导肽序列（Sasada等人，*细胞的结构和功能 (Cell Struct. Funct.)*13: 129 - 141, 1988）。可以通过例如由基因构建物除去编码跨膜结构域的核酸序列来实现可溶性或分泌型形式的表达。在一些情况中，通过使用融和配体（诸如氯霉素乙酰转移酶（CAT）、 β -半乳糖苷酶、和易于在选定的宿主细胞中表达的其它基因）来实现溶解和/或分泌。

编码GBS毒素受体的载体可用于转化合适的哺乳动物宿主细胞。可以通过任何知道的方法进行转化将多核苷酸导入宿主细胞，包括例如在病毒中包装多核苷酸并用病毒转导宿主细胞，或者通过本领域知道的转染程序，如美国专利号4,399,216、4,912,040、4,740,461、和4,959,455例示的。所用转化程序取决于待转化的宿主。用于将异源多核苷酸导入哺乳动物细胞的方法在本领域是知道的，包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、多核苷酸在脂质体中的包囊、和将DNA直接微注射到核内。

可获得作为宿主用于表达的哺乳动物细胞系在本领域是知道的，包括可以由美国典型培养物收藏中心（ATCC）获得的许多永生细胞系，包括但不限于中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、HeLa细胞、幼体仓鼠肾（BHK）细胞、猴肾细胞（COS）、N1E-115（Liles等人，*生物化学杂志 (J. Biol. Chem.)*261: 5307 - 5313, 1986）、PC 12人肝细胞癌细胞（如Hep G2）、和大量的其它细胞系，诸如昆虫衍生细胞系IF9和IF21。特别优选的细胞系是组成型表达重组GBS毒素受体构建物的细胞系、随后形成转染细胞特征的细胞系、和更优选在细胞表面上表达GBS毒素受体或其片段的细胞系。特别优选的是ECV细胞（在科学文献中最初称为内皮细胞系的

膀胱癌细胞系)、人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、牛、绵羊、和人肾上腺髓质内皮细胞。

重组GBS毒素受体或其片段可以通过在合适的培养基中并在合适的细胞培养条件下培养表达受体或其片段的宿主细胞来生产。培养基和条件可以根据特定宿主细胞系的要求而变化,且在本领域是众所周知的。通常,于37℃在细胞温育箱中以固定量的CO₂(常用范围5-10%)培养细胞。

其它GBS毒素受体的鉴定

除了优选的GBS毒素受体HP59和SP55,在本发明的方法、组合物、和疫苗中也可以使用其它天然存在的GBS毒素受体。可以通过此处所述方法由产生这种受体的不同物种的多种组织来源和细胞培养物分离编码这些受体的核酸,诸如例如来自肿瘤内皮的细胞、类风湿性关节炎中的滑膜组织、或血流被剥夺或受限制的缺氧组织,诸如在再灌注损伤或创伤组织中。可以通过使用探针的杂交或使用寡核苷酸的聚合酶链式反应以及应用本领域知道的其它分子生物学技术来分离这些多核苷酸。这些探针和寡核苷酸通常包含序列SEQ ID NO: 1或3的各个区域,或者编码序列SEQ ID NO: 2或4的各个区域。或者,可以表达克隆CM101的其它靶蛋白。该方法描述于W0 00/05375。或者,可以使用表达或不表达GBS毒素受体的相似组织之间的扣除杂交来分离其它GBS毒素受体。这些组织的范例是创伤组织与相应的未受伤组织;肿瘤组织与没有组织病理学异常的相同组织的样品;以及GBS毒素受体表达过程中与表达结束后不久的适当哺乳动物的肺组织。发现其它受体后,探针可以包含新发现受体的各个区域。

可以通过比较同源蛋白质的氨基酸序列来确定可用于克隆各种有机体的GBS毒素受体编码基因的多核苷酸(见表5,比较了HP59的第41-536位氨基酸与SP55的第1-495位氨基酸)。例如,可以将作为探针用于杂交或核酸扩增(下文进一步讨论的技术)的寡核苷酸或简并寡核苷酸的合成靶向保守区。严谨度可以变化以实现选择性杂交条件,

由此彼此间同一性低于95%的核酸序列将发生杂交。这些条件在本领域是知道的, 而且在此处进行讨论。通常, HP59或SP55与感兴趣核酸序列之间的核酸序列同一性将至少是大约80%, 更通常的是, 优选同一性增加至至少大约85%和90%。

正如本领域知道的, 在高严谨度的清洗条件和相应的杂交条件下, 多核苷酸可以作为探针使用。小的多核苷酸, 例如长度为200个或更少碱基的多核苷酸, 在本领域常常称为寡核苷酸。使用多核苷酸作为探针来检测相同或相关核酸序列的技术在本领域是众所周知的。参阅, 例如, Sambrook等人, 尤其是第11章。通常, 可以由长度为10-200个碱基的多核苷酸生成探针。优选由长度为10-60个核苷酸的多核苷酸生成探针, 最优选长度为12-40个碱基。可以根据使用核酸同源性电脑程序获得的结果来设计特异性探针, 诸如FASTA, 使用Pearson和Lipman的方法(美国国家科学院进展(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*)85: 2444-2448, 1988)并显示所比较序列之间的同一性程度。探针的大小取决于将发生杂交的基因区域。探针的大小随与非期望核酸序列的同源性程度的增加而增加。可以使用长度为10-50个核苷酸的探针, 优选超过50个核苷酸, 更优选超过100个核苷酸, 最优选使用由GBS毒素受体的完整编码区生成的探针。为了降低假阳性的数目, 优选使用两种探针来鉴定在杂交和清洗条件下结合这两种探针的克隆。寡核苷酸可以在Applied BioSystems寡核苷酸合成仪上按照制造商提供的说明书进行合成。

通常, 按照传统杂交步骤进行杂交和清洗条件。用于筛选噬菌斑浸提物的典型条件(Benton和Davis, *科学(Science)*196: 180, 1978)可以是: 50% 甲酰胺、5xSSC(氯化钠、柠檬酸钠)或SSPE(氯化钠、磷酸钠、EDTA)、1-5xDenhardt溶液、0.1-1% SDS、100-200 μ g剪碎的异源DNA或tRNA、0-10% 硫酸葡聚糖、 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ cpm/ml变性探针(比活约 1×10^8 cpm/ μ g), 并于42℃温育大约6-36小时。预杂交条件基本上相同, 只是不包含探针且温育时间通常缩短。清洗条件通常是1-3xSSC、0.1-1% SDS, 于42-70℃温育5-30分钟, 并更换清洗溶液。

对于高严谨度的杂交条件，可以改变各种参数来增加杂交严谨度，诸如增加与标记探针的温育温度。优选的是，为了实验性设计中的更大灵活性，探针可以在较低温度发生杂交，诸如室温，然后通过改变盐浓度和清洗液温度来改变严谨度。对于高严谨度，可以在盐浓度低于3xSSC（诸如0.1xSSC）的清洗缓冲液中使用高于或等于42℃（诸如68℃）的清洗温度。在一些情况中，还可以使用TMACl来降低非特异性结合，特别是对于富含G-C碱基对的多核苷酸。可以将较低严谨度的清洗用于具有较低同一性的多核苷酸或长度少于60个碱基对的多核苷酸的杂交。对于低严谨度的清洗，可以在盐浓度高于或等于2xSSC的清洗缓冲液中使用低于或等于42℃的温度。

表5. 人与绵羊GBS毒素受体氨基酸序列的排列

SP55	MKSPVSDLAPSDGEEGSDRTPLLRAPRAEPAPVCCSARYNLAFLSFFGF	50
HP59	MRSPVRDLARNDGEESTDRTPLLPAPRAEAAPVCCSARYNLAILAFFGF	91
SP55	FVLYSLRVNLSVALVDMVDSNTTAKDNRTSYECAEHSAPIKVLHNQTGKK	100
HP59	FIVYALRVNLSVALVDMVDSNTTLEDNRTSKACPEHSAPIKVHVNQTGKK	141
SP55	YRWDAETQGWILGSFFYGYIITQIPGGYVASRSGKLLLGFGIFATAIFT	150
HP59	YQWDAETQGWILGSFFYGYIITQIPGGYVASKIGGKMLLGFGILGTAVLT	191
SP55	LFTPLAADFGVGALVALRALEGLGEGVTYPAMHAMWSSWAPPLERSKLLS	200
HP59	LFTPIAADLGVGPLIVLRALEGLGEGVTFPAMHAMWSSWAPPLERSKLLS	241
SP55	ISYAGAQLGTVVSLPLSGVICCYMNWTYVFYFFGIVGIIWFILWICLVSD	250
HP59	ISYAGAQLGTVISLPLSGIICCYMNWTYVFYFFGTIGIFWFLWLVSD	291
SP55	TPETHKTITPYEKEYILSSLKNQLSSQKSVPWIPMLKSLPLWAIIVAHFS	300
HP59	TPQKHKRISHYEKEYILSSLRNQLSSQKSVPWPILKSLPLWAIIVAHFS	341
SP55	YNWTFYTLTLLPTYMKEVLRFNQENGFLSAVPYLGWLCMILSGQAAD	350
HP59	YNWTFYTLTLLPTYMKEILRFNVQENGFLSSLPYLGWLCMILSGQAAD	391
SP55	NLRARWNFSTLWVRRVFSLIGMIGPAIFLVAAGFIGCDYSLAVAFLTIST	400
HP59	NLRAKWNFSTLCVRRIFSLIGMIGPAVFLVAAGFIGCDYSLAVAFLTIST	441

SP55	TLGGFCSSGFSINHLDIAPSYAGILLGITNTFATIPGMIGPIIARSLTPE	450
HP59	TLGGFCSSGFSINHLDIAPSYAGILLGITNTFATIPGMVGPVIAKSLTPD	491
SP55	NTIGEWQTVFCIAAAINVFGAIFFTLFAKGEVQNWAI SDHQGHRN	495
HP59	NTVGEWQTVFYIAAAINVFGAIFFTLFAKGEVQNWALNDHHGHRH	536

疫苗制剂

本发明的优选实施方案是缀合疫苗，其中GBS毒素受体或其片段共价连接了“载体”蛋白质或多肽。这种连接有助于增加GBS毒素受体多肽的抗原性。用于由抗原性分子和“载体”蛋白质或多肽形成缀合疫苗的方法在本领域是知道的(C. O. Jacob等人, *欧洲免疫学杂志 (Eur. J. Immunol.)* 16: 1057 - 1062, 1986; J. M. R. Parker等人, 在《疫苗的 现代探讨》(Modern Approaches to Vaccines)中, R. M. Chanock等人 编, 第133 - 138页, 冷泉港实验室, 冷泉港, 纽约, 1983; V. R. Zurawski 等人, *免疫学杂志 (J. Immunol.)* 121: 122 - 129, 1978; F. A. Klipstein 等人, *传染和免疫 (Infect. Immun.)* 37: 550 - 557, 1982; W. G. Bessler, *免疫生物学 (Immunobiol.)* 170: 239 - 244, 1985; D. N. Posnett等人, *生物化学杂志 (J. Biol. Chem.)* 263: 1719 - 1725, 1988; A. C. Ghose 等人, *分子免疫学 (Molec. Immunol.)* 25: 223 - 230, 1988)。已经 开发了针对流感嗜血杆菌 (*Hemophilus influenzae*) 的缀合疫苗原型 (P. Anderson, *传染和免疫 (Infec. and Immun.)* 39: 223 - 238, 1983; C. Chu等人, *传染和免疫 (Infec. Immun.)* 40: 245 - 256, 1983; M. Lepow, *小儿科传染病杂志 (Pediat. Infect. Dis. J.)* 6: 804 - 807, 1987), 而且该模型可用于构建本发明的新疫苗。用于生产这种缀合疫苗的其 它方法公开于: P. W. Anderson等人, 欧洲专利发表物 245, 045; P. W. Anderson等人, 美国专利号 4, 673, 574 和 4, 761, 283; R. Frank等 人, 美国专利号 4, 789, 735; 欧洲专利发表物 206, 852; L. K. Gordon, 美国专利号 4, 619, 828; 和 E. H. Beachey, 美国专利号 4, 284, 537。有 用的载体包括匙孔蛾血蓝蛋白 (KLH)、牛血清清蛋白 (BSA)、卵清 蛋白、人血清清蛋白、人 γ -球蛋白、鸡免疫球蛋白G、牛 γ -球蛋白、

和破伤风类毒素。或者, GBS毒素受体多肽可以缀合或连接免疫原性多糖, 诸如A类链球菌多糖、来自B类链球菌的C-多糖、或肺炎链球菌 (*Streptococci pneumoniae*) 的荚膜多糖。

本发明的另一个实施方案是全细胞疫苗, 其中在膜上表达GBS毒素受体的转染细胞或正常细胞可以是活的或者固定的和死的。

本领域普通技术人员可以理解, 当向个体提供本发明的疫苗时, 它可以存在于可以含盐、缓冲液、佐剂、或用于改进组合物功效的其它物质的组合物中。通常, 在呈递给免疫系统前混和佐剂与组合物, 或者分开呈递至免疫的哺乳动物的相同位点。明矾是注册用于人的佐剂。正在发展用于人的其它佐剂, 而且期望这些其它佐剂将适合于按照本发明用于制备用于人疫苗接种的组合物。适用于动物疫苗接种的佐剂包括但不限于油性乳剂, 诸如弗氏完全或不完全佐剂 (不适用于家禽)、Marcol 52: Montanide 888 (Marcol是Exxon的商标; Montanide是SEPPIC的商标, 巴黎)、角鲨烷或角鲨烯、佐剂65 (含花生油、甘露醇单油酸酯、和单硬脂酸铝)、矿物凝胶 (诸如氢氧化铝、磷酸铝、磷酸钙、和明矾)、表面活性剂 (诸如十六胺、十八胺、溶血性卵磷脂、双甲基双十八烷基溴化铵、N, N'-双十八烷基-N', N'-双(2-羟乙基)丙二胺、甲氧基十六烷基甘油、和普卢兰尼克(pluronic)多元醇)、聚阴离子(诸如吡喃、硫酸葡聚糖、聚丙烯酸、和聚羧乙烯(carbopol))、肽和氨基酸 (诸如胞壁酰二肽、二甲基甘氨酸、吞噬作用激素、和海藻糖二霉菌酸酯)。

本发明的多肽还可以在掺入脂质体或其它微载体后进行施用。

药物组合物

本发明的药物组合物优选包括制药学可接受的载体, 载体可以包含提供多种功能的多种成分, 包括调控药物浓度、调控溶解度、化学稳定性、调控粘度、增强吸收、调控pH、等等。例如, 在水溶性配方中, 药物组合物优选包括缓冲液, 诸如磷酸缓冲液或其它有机酸盐, 优选pH处于大约7和8之间。其它成分可以包括抗氧化剂 (诸如抗坏血

酸)、亲水聚合物(诸如单糖、二糖、和其它碳水化合物,包括纤维素或其衍生物、糊精)、螯合剂(诸如EDTA)、和制药科学领域技术人员知道的其它成分,如《雷明顿制药科学》(Remington's Pharmaceutical Science),第19版,Mack出版公司,Easton, PA.

对于胃肠外施用目的,可以采用芝麻或花生油或者水性丙二醇中的溶液,以及以前列举的相应水溶性、碱金属或碱土金属盐的无菌水性溶液。这些水性溶液应当适当的缓冲,如果需要,应当首先用足够的生理盐水或葡萄糖使液体稀释液达到等渗。可以在与表面活性剂(诸如羟丙基纤维素)适当混和的水中,制备以游离碱或制药学可接受盐形式的GBS毒素受体多肽的溶液。也可以在甘油、液体聚乙二醇、二者混和物、和油中制备分散体。在普通的储存和使用条件下,这些制剂包含防腐剂以预防微生物的生长。这些特定的水性溶液特别适用于静脉内、肌肉内、皮下、和腹膜内注射目的。在这方面,所采用的无菌水性介质均可由本领域技术人员按照众所周知的标准技术获得。

适用于注射用途的制药学形式包括无菌水性溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况中,药物必须是无菌的,而且流动性必须能够容易的进行注射。在生产和储存条件下必须是稳定的,而且必须预防微生物(诸如细菌和真菌)的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇、等等)、它们的适当混和物、和植物油。可以例如通过使用包衣(诸如卵磷脂),通过维持要求的颗粒大小(在分散体的情况中),和通过使用表面活性剂,维持适当的流动性。可以通过使用多种抗细菌和抗真菌剂(例如对羟苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞、等等)来获得对微生物作用的预防。在许多情况中,将优选包括等渗剂,例如糖或NaCl。可以通过使用延迟吸收剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来获得可注射组合物的延长吸收。

通过在含多种上文列举的其它成分的适当溶剂中掺入要求量的GBS毒素受体多肽来制备无菌可注射溶液,根据需要,可随后过滤除菌。通常,通过在含基本分散介质和要求的上文列举的其它成分的无菌载

体中掺入无菌活性成分来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况中，优选的制备方法是真空干燥和冻干技术，由以前的过滤除菌溶液产生活性成分加上任何额外期望成分的粉末。

鼻内给药配方可以包括既不引起鼻粘膜刺激又不显著妨碍纤毛功能的载体。本发明可以采用稀释剂，诸如水、水性盐水、或其它知道的物质。经鼻给药配方还可以包含防腐剂，诸如但不限于氯代丁醇和洁尔灭。可以存在表面活性剂以增强鼻粘膜对本发明蛋白质的吸收。

口服液体制剂可以是例如水性或油性悬浮液、溶液、乳剂、糖浆、或酏剂的形式，或者可以是干燥的片剂形式或在使用前用水或其它适当载体重溶的产品。这些液体制剂可以包含传统添加剂，诸如悬浮剂、乳化剂、非水性载体（可以包括食用油）、或防腐剂。

施用

施用途径

可以口服、胃肠外注射、快速输液、鼻咽吸收（鼻咽内）、真皮吸收、或经直肠施用本发明的多肽、组合物、和疫苗。也可以肌肉内或静脉内施用。用于胃肠外施用的组合物包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液、和乳剂。非水性溶剂的范例是丙二醇、聚乙二醇、植物油（诸如橄榄油）、和可注射有机酯（诸如油酸乙酯）。载体或闭合敷料可以用于增加皮肤通透性和增强抗原吸收。用于口服施用的液体药剂形式通常可以包括含液体剂型的脂质体溶液。用于悬浮脂质体的适当形式包括含本领域常用惰性稀释剂（诸如纯化水）的乳剂、悬浮液、溶液、糖浆、和酏剂。除了惰性稀释剂之外，这些组合物还可以包括佐剂、湿润剂、乳化和悬浮剂、等等。

施用剂量和频率

与载体、稀释剂、赋形剂、和/或佐剂结合以产生单一药物组合物或疫苗剂型的GBS毒素受体多肽的量将取决于接种疫苗所针对的病理性血管发生状况、哺乳动物发生这种状况的倾向性或这种状况的严重程度、待治疗的哺乳动物、和施用的特定时间和途径。同样可以理解，

任何特定哺乳动物的特定剂量水平将取决于多种因素，包括这种哺乳动物的年龄、体重、一般性健康状况、性别、和饮食。通过绘制剂量-应答曲线的常规试验，本领域普通技术人员可以容易的确定有效剂量。

采用多次施用方案时，有许多不同技术可用于确定免疫接种的时间表。有可能使用本发明的组合物超过一次以增加经免疫动物中的免疫应答的水平、多样性、和稳定性。可能需要多次剂量以维持针对GBS毒素受体的免疫状况。如此，将以适合于维持期望的免疫应答的间隔进行多次免疫。

免疫应答的监控

鉴定按照本发明的方法接受了疫苗的哺乳动物中的免疫应答也是合乎需要的。这种鉴定优选针对哺乳动物中针对GBS毒素受体的免疫应答和初始施用受体前针对各种其它标准物的免疫应答。在合理的时期内进行随后的检验，优选施用GBS毒素受体后至少6周。这种检验可以在此后以规则间隔再次进行，或根据需要（取决于哺乳动物的状况）再次进行。例如，在期望的时间点，由哺乳动物采集血样并以适当方式保存直至能够进行检验。血样的保存方法包括将血清与其它血液组分分开、冷却和冷冻、以及与各种缓冲或抗凝剂一起保存。检验还可以对尿液、粪便、和来自肺、淋巴结、脾、骨髓、溃疡、皮肤病灶、和渗出物的组织、及受所检验的病理性血管发生状况影响的其它组织进行。

可以通过ELISA、RAST、EIA、血凝抑制、其它放射性免疫测定技术、和乳胶凝集方法和通过一般性血清学鉴定法（包括白细胞计数、总的和分化的免疫球蛋白水平的测量（包括IgM、总IgG、IgG₁、IgG₂、IgG₃、和IgG₄）、或本领域技术人员知道的其它方法）测定抗体在血清中的存在（即针对GBS毒素受体的体液免疫应答）。进行ELISA测定的一种可能的方法包括将感兴趣的GBS毒素受体涂布在ELISA板上。将未结合的抗原由平板清洗掉后，用封闭缓冲液封闭平板上过量的蛋白质

反应位点。清除掉封闭缓冲液后，向封闭后的ELISA板的孔中加入于PBS中的各血清稀释液，并于37℃温育1小时。清除掉稀释液后，清洗平板，并向ELISA板的孔中加入溶于PBS的缀合抗体溶液（抗体抗被接种的种类），然后于37℃温育1小时。清除掉缀合抗体溶液后，清洗平板，并向孔中加入适当的显色底物，使得形成颜色。温育30分钟后，终止颜色形成，并在分光光度计上读取孔的吸光值读数。将每一组的每一个稀释度的吸光值读数取平均值，并对稀释度倒数作图。阳性和阴性对照是这种测定的重要部分，与免疫前（基线）检验进行比较。如果能够在1: 200或更高稀释度检测到抗体，那么该哺乳动物具有阳性免疫应答。

可以通过本领域技术人员知道的方法进行细胞免疫应答的测定，包括此处讨论的那些方法。可以如下检验可识别GBS毒素受体的T细胞的存在：皮下施用GBS毒素受体样品，并在72小时后检查哺乳动物（优选人）的皮肤，看施用位点的皮肤是否升高了1mm或更多。通常测量这些伤痕的大小，其与免疫应答的程度相关。这样的一种应答是阳性免疫应答。或者，可以通过下列方法测定细胞免疫应答：诸如测量C-反应性蛋白质血清水平、补体水平（包括正常补体和C-3检测）、红细胞沉降率、亲血球蛋白血清水平、免疫蛋白水平、和其它蛋白质血清水平。

阳性免疫应答指病理性血管发生状况得到预防或减轻。可以通过本领域知道的方法证明预防和减轻作用，包括但不限于此处讨论的那些方法。

用于证明预防作用的一种方法是对一组个体施用疫苗或实践方法，这组个体来自易患感兴趣的病理性血管发生状况的群体，并比较这种状况在这组与未接受该疫苗或方法的剩余群体中的发病率。例如，吸烟的人易患肺癌。给予统计学上匹配的、未患肺癌吸烟者的一组检验群体以本发明的疫苗或方法，而剩余检验群体将不接受任何治疗。对这两组都监控肺癌。如果当剩余检验群体中统计学显著数目的成员发生肺癌时，接受所述疫苗或方法的那一组中没有成员发生肺癌，那

么可以推断该疫苗和方法预防了肺癌。如果治疗组中发生了肺癌，但是在统计学上显著低于剩余群体，那么可以推断该疫苗和方法降低了肺癌的发病率。本领域技术人员可以通过本领域知道的相似方法证明对其它病理性血管发生状况的预防作用，包括检验由于遗传和/或环境因素易患特定疾病的群体。

本发明其它方面的支持和用于产生及使用本发明的方法公开于WO 00/05375。

实施例

实施例1. 用人GBS毒素受体的三种片段的混和物进行免疫迟滞了肿瘤生长

表3所示的肽Hab1、Hab2、Hab3是来自HP59氨基末端的片段，根据亲水性选择作为免疫原。将它们在体外合成（Sigma-Genosis, The Woodlands, 德克萨斯州），并与作为佐剂的糖蛋白匙孔蛾血蓝蛋白（KLH）缀合。通过皮下注射100 μ g于完全弗氏佐剂（CFA）中的3种肽缀合物的混和物来免疫实验用C57小鼠（n = 8, 4雄4雌）。2周、4周、和6周后，这些小鼠的每一只都接受皮下注射100 μ g于不完全弗氏佐剂（IFA）中的该混和物。8周后真皮内最后注射100 μ g于IFA中的该混和物。相同时间、相同方式只用KLH和弗氏佐剂免疫接种对照C57小鼠（n = 8）。

初始免疫后6周和其后每4周由尾静脉对实验用小鼠进行取血，并通过ELISA测定形成的针对HP59衍生肽的抗体水平。由所有实验用小鼠获得阳性抗体效价后，如下用肿瘤细胞激发对照和实验用小鼠：将50,000个小鼠黑素瘤B1-6细胞或Lewis肺肿瘤细胞悬浮于0.6%琼脂，并进行真皮下注射。注射肿瘤细胞后第6、8、10、12、和14天测量肿瘤体积。如表6所示，经免疫小鼠的黑素瘤比其对照组小45%，经免疫小鼠的Lewis肺肿瘤比其对照组小38%。两组实验的结果在统计学上都是显著的。对于黑素瘤实验，治疗-对照的配对t检验是 $t = 2.3898$ ，自由度5，单尾 $p = 0.0312$ ，认为是显著的。对于Lewis肺实验，治疗-

对照的配对t检验是 $t = 2.9899$ ，自由度5，单尾 $p = 0.0152$ ，认为是显著的。

表6. 肿瘤进展 (体积 = mm^3)

肿瘤类型	第6天	第8天	第10天	第12天	第14天
黑素瘤 (n = 4)	15.6	83.3	131.3	350.1	429.8
对照 (n = 4)	20.4	118.2	174.5	518.6	783.5
Lewis肺肿瘤 (n = 4)		36.9	70.8	144.8	194.6
对照 (n = 4)		68.8	119.4	178.8	315.1

实施例2. 用CM101处理经免疫哺乳动物

如实施例1所述用肿瘤细胞免疫和激发的小鼠可以额外接受每周一次静脉内输液 $60 \mu\text{g/kg}$ GBS毒素CM101 (CarboMed公司, Brentwood, TN) 或伪注射。比较CM101处理和对照小鼠中的肿瘤进展, 并使用标准统计学方法计算肿瘤生长迟滞或消除程度。进行不同剂量水平的额外实验来确定剂量-应答相互关系。

实施例3. 用免疫相容性抗体处理经免疫哺乳动物

如实施例1所述用肿瘤细胞免疫和激发的小鼠可以额外接受每周一次注射 $100 \mu\text{g}$ 对HP59特异的小鼠单克隆抗体混和物或伪注射。这些抗体由按照Harlow等人的方法 (《抗体: 实验室手册》(Antibodies: A Laboratory Manual), 冷泉港出版社, 第139-240页, 1989) 用100mg表3所示合成肽免疫的小鼠获得。比较抗体处理和对照小鼠中的肿瘤进展, 并使用标准统计学方法计算肿瘤生长迟滞或消除程度。进行不同剂量水平的额外实验来确定剂量-应答相互关系。

实施例4. 用自身T细胞治疗经免疫哺乳动物

由如实施例1所述用肿瘤细胞免疫和激发的小鼠获得T细胞, 并与Hab1、Hab2、和Hab3肽的混和物一起温育72小时或伪温育。通过静脉内注射将T细胞返还每一只供体小鼠。比较肽温育和对照小鼠中的肿瘤

进展，并使用标准统计学方法计算肿瘤生长迟滞或消除程度。进行不同剂量水平的额外实验来确定剂量-应答相互关系。

实施例5. 用人和绵羊GBS毒素受体的五种片段的混和物进行的免疫迟滞了肿瘤生长

用表3和4所示的5种肽p55a、p56a、p57a、Hab1、和Hab2的混和物免疫2组雄性和雌性C57小鼠和相同大小的对照。这些肽衍生自同源蛋白质HP59和SP55(87%)，与匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)(Sigma Genosys, TX)缀合，在完全弗氏佐剂(CFA)中乳化，并在尾基部的3个位置进行真皮内注射。

在第一次免疫后2周和4周对实验组重复真皮内注射抗原KLH缀合物和不完全弗氏佐剂(IFA)。仅给予对照动物以IFA。5周后对动物进行取血，显示对一种细胞外肽(基于7个跨膜结构域(7TMD)的构型)的抗体效价是1:200，光密度(O.D.)>2.0。

将于3%琼脂的Lewis肺细胞悬浮液(5×10^4 个细胞)皮下植入7只经免疫雄性小鼠和5只经免疫雌性小鼠。将用CFA和IFA免疫的4只雄性和4只雌性小鼠作为对照。观察小鼠直至对照肿瘤开始溃疡，并于此时处死小鼠，收集组织(包括肿瘤)。

C57小鼠中的Lewis肺肿瘤的生长曲线显示于图1。Y轴代表肿瘤体积，X轴代表测量肿瘤体积的日期。雄性对照哺乳动物用实心菱形表示，雌性哺乳动物对照用实心圆形表示；雄性免疫哺乳动物用空心圆形表示，雌性免疫哺乳动物用空心菱形表示。记录了不同日期的肿瘤体积的原始数据。最后5次测量的未免疫雄性和雌性小鼠的平均肿瘤体积与免疫组平均值的配对t检验显示有显著差异($p = 0.025$)。经免疫小鼠中的整体肿瘤负荷只是对照的38.3%。

实施例6. 雌性哺乳动物中的黑素瘤的迟滞

将用HP59/CFA和CFA免疫的各5只雌性C57小鼠静脉内接种1,000个黑素瘤细胞。死亡时间是终点。当呼吸窘迫明显时处死小鼠。

5只雌性对照小鼠死于第46、52、54、62、和100天。患病对照小鼠的尸体解剖显示肺由大量转移浸润。1只经免疫雌性小鼠死得较早，没有肿瘤病征。剩余4只经免疫小鼠在第140天都活着，没有疾病体征，于此时将其中2只接种额外的1,000个黑素瘤细胞（由图2中的箭头表示）。剩余4只经免疫小鼠在第305天继续显示没有疾病体征。图2显示了用1000个黑素瘤细胞进行静脉内激发的雌性小鼠的存活曲线。Y轴代表存活者所占百分率，X轴代表存活天数。实心圆形表示雌性对照哺乳动物，实心方形表示雌性经免疫哺乳动物。

此处以相同程度单独地引入本说明书中提及的所有发表物、专利、和专利申请作为参考。

在充分描述了本发明之后，对于本领域普通技术人员来说是显然的，可以进行许多变化和修饰而不偏离所附权利要求的精神或范围。

<110> Vanderbilt 大学

<120> 用于预防或减轻病理性血管发生状况的方法

<130> 22100-0100 WP 46126-252654

<150> US 60/179,870

<151> 2000-02-02

<160> 4

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 2930

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<221> CDS

<222> (263)..(1870)

```

<400> 1
gttcggtcga agccctcccc ttaattatgt gcaattcaag tccccactgc ccgcccgcga 60
gccccactc atcctcgctg cgggcagggt ggcccctgca ctttacaagg gggtgcagga 120
gcgggagacg gtcgtccgaa caccggctcc ccggcatgcg tagaccggcg ggcgagcgcg 180
gtcactttg cgccaatcct acgagaactc ccagaactcc gottccctag tccaaoccaa 240
gccagagttg cccacaccta ag atg gcg gcg ggg gcg atg aca cgg ccc cgc 292
Met Ala Ala Gly Ala Met Thr Pro Pro Arg

```

1					5					10						
ccg gtc cag cca gct cgg ccc ggg ggc ttc ggg ctg tgc ggc cgg cgc	340															
Pro Val Gln Pro Ala Arg Pro Gly Gly Phe Gly Leu Ser Gly Arg Arg																
15					20					25						
tcc ctt ctc tgc cag gtg gcg agt aca cct gct cac gta ggc gtc atg	388															
Ser Leu Leu Cys Gln Val Ala Ser Thr Pro Ala His Val Gly Val Met																
30					35					40						
agg tct ccg gtt cga gac ctg gcc cgg aac gat ggc gag gag agc acg	436															
Arg Ser Pro Val Arg Asp Leu Ala Arg Asn Asp Gly Glu Glu Ser Thr																
45					50					55						
gac cgc acg cct ctt cta ccg ggc gcc cca cgg gcc gaa gcc gct cca	484															
Asp Arg Thr Pro Leu Leu Pro Gly Ala Pro Arg Ala Glu Ala Ala Pro																
60					65					70						
gtg tgc tgc tct gct cgt tac aac tta gca att ttg gcc ttt ttt ggt	532															
Val Cys Cys Ser Ala Arg Tyr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Phe Phe Gly																
75					80					85					90	
ttc ttc att gtg tat gca tta cgt gtg aat ctg agt gtt gcg tta gtg	580															
Phe Phe Ile Val Tyr Ala Leu Arg Val Asn Leu Ser Val Ala Leu Val																
95					100					105						
gat atg gta gat tca aat aca act tta gaa gat aat aga act tcc aag	628															
Asp Met Val Asp Ser Asn Thr Thr Leu Glu Asp Asn Arg Thr Ser Lys																
110					115					120						
gcg tgt cca gag cat tct gct ccc ata aaa gtt cat cat aat caa acg	676															
Ala Cys Pro Glu His Ser Ala Pro Ile Lys Val His His Asn Gln Thr																
125					130					135						
ggt aag aag tac caa tgg gat gca gaa act caa gga tgg att ctc ggt	724															
Gly Lys Lys Tyr Gln Trp Asp Ala Glu Thr Gln Gly Trp Ile Leu Gly																
140					145					150						
tcc ttt ttt tat ggc tac atc atc aca cag att cct gga gga tat gtt	772															
Ser Phe Phe Tyr Gly Tyr Ile Ile Thr Gln Ile Pro Gly Gly Tyr Val																
155					160					165					170	
gcc agc aaa ata ggg ggg aaa atg ctg cta gga ttt ggg atc ctt ggc	820															
Ala Ser Lys Ile Gly Gly Lys Met Leu Leu Gly Phe Gly Ile Leu Gly																
175					180					185						
act gct gtc ctc acc ctg ttc act ccc att gct gca gat tta gga gtt	868															
Thr Ala Val Leu Thr Leu Phe Thr Pro Ile Ala Ala Asp Leu Gly Val																
190					195					200						
gga cca ctc att gta ctc aga gca cta gaa gga cta gga gag ggt gtt	916															
Gly Pro Leu Ile Val Leu Arg Ala Leu Glu Gly Leu Gly Glu Gly Val																
205					210					215						
aca ttt cca gcc atg cat gcc atg tgg tct tct tgg gct ccc cct ctt	964															
Thr Phe Pro Ala Met His Ala Met Trp Ser Ser Trp Ala Pro Pro Leu																
220					225					230						
gaa aga agc aaa ctt ctt agc att cgc tat gca gga gca cag ctt ggg	1012															

Glu 235	Arg	Ser	Lys	Leu	Leu 240	Ser	Ile	Ser	Tyr	Ala 245	Gly	Ala	Gln	Leu	Gly 250	
aca	gta	att	tct	ctt	cct	ctt	tct	gga	ata	att	tgc	tac	tat	atg	aat	1060
Thr	Val	Ile	Ser	Leu 255	Pro	Leu	Ser	Gly	Ile 260	Ile	Cys	Tyr	Tyr	Met	Asn 265	
tgg	act	tat	gtc	ttc	tac	ttt	ttt	ggt	act	att	gga	ata	ttt	tgg	ttt	1108
Trp	Thr	Tyr	Val 270	Phe	Tyr	Phe	Phe	Gly	Thr 275	Ile	Gly	Ile	Phe	Trp	Phe 280	
ctt	ttg	tgg	atc	tgg	tta	gtt	agt	gac	aca	cca	caa	aaa	cac	aag	aga	1156
Leu	Leu	Trp 285	Ile	Trp	Leu	Val	Ser	Asp	Thr	Pro	Gln	Lys	His	Lys	Arg 295	
att	tcc	cat	tat	gaa	aag	gaa	tac	att	ctt	tca	tca	tta	aga	aat	cag	1204
Ile	Ser	His	Tyr	Glu	Lys	Glu 305	Tyr	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Asn	Gln 310	
ctt	tct	tca	cag	aag	tca	gtg	ccg	tgg	gta	ccc	att	tta	aaa	tcc	ctg	1252
Leu	Ser	Ser	Gln	Lys	Ser	Val 320	Pro	Trp	Val	Pro	Ile	Leu	Lys	Ser	Leu 330	
cca	ctt	tgg	gct	atc	gta	gtt	gca	cac	ttt	tct	tac	aac	tgg	act	ttt	1300
Pro	Leu	Trp	Ala	Ile 335	Val	Val	Ala	His	Phe 340	Ser	Tyr	Asn	Trp	Thr	Phe 345	
tat	act	tta	ttg	aca	tta	ttg	cct	act	tat	atg	aag	gag	atc	cta	agg	1348
Tyr	Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Pro	Thr	Tyr 355	Met	Lys	Glu	Ile	Leu	Arg 360	
ttc	aat	gtt	caa	gag	aat	ggg	ttt	tta	tct	tca	ttg	cct	tat	tta	ggc	1396
Phe	Asn	Val	Gln	Glu	Asn	Gly 370	Phe	Leu	Ser	Ser	Leu	Pro	Tyr	Leu	Gly 375	
tct	tgg	tta	tgt	atg	atc	ctg	tct	ggt	caa	gct	gct	gac	aat	tta	agg	1444
Ser	Trp	Leu	Cys	Met	Ile	Leu 385	Ser	Gly	Gln	Ala	Ala	Asp	Asn	Leu	Arg 390	
gca	aaa	tgg	aat	ttt	tca	act	tta	tgt	gtt	cgc	aga	att	ttt	agc	ctt	1492
Ala	Lys	Trp	Asn	Phe	Ser	Thr 400	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	Ile	Phe	Ser	Leu 410	
ata	gga	atg	att	gga	cct	gca	gta	ttc	ctg	gta	gct	gct	ggc	ttc	att	1540
Ile	Gly	Met	Ile	Gly	Pro	Ala	Val	Phe	Leu 420	Val	Ala	Ala	Gly	Phe	Ile 425	
ggc	tgt	gat	tat	tct	ttg	gcc	gtt	gct	ttc	cta	act	ata	tca	aca	aca	1588
Gly	Cys	Asp	Tyr	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Phe 435	Leu	Thr	Ile	Ser	Thr	Thr 440	
ctg	gga	ggc	ttt	tgc	tct	tct	gga	ttt	agc	atc	aac	cat	ctg	gat	att	1636
Leu	Gly	Gly	Phe	Cys	Ser	Ser	Gly	Phe	Ser	Ile	Asn	His	Leu	Asp	Ile 455	
gct	cct	tcg	tat	gct	ggt	atc	ctc	ctg	ggc	atc	aca	aat	aca	ttt	gcc	1684
Ala	Pro	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ile 465	Leu	Leu	Gly	Ile	Thr	Asn	Thr	Phe	Ala 470	

act att cca gga atg gtt ggg ccc gtc		att gct aaa agt ctg acc cct	1732
Thr Ile Pro Gly Met Val Gly Pro Val Ile Ala Lys Ser Leu Thr Pro			
475 480 485 490			
gat aac act gtt gga gaa tgg caa acc gtg ttc tat att gct gct gct			1780
Asp Asn Thr Val Gly Glu Trp Gln Thr Val Phe Tyr Ile Ala Ala Ala			
495 500 505			
att aat gtt ttg ggt gcc att ttc ttt aca cta ttc gcc aaa ggt gaa			1828
Ile Asn Val Phe Gly Ala Ile Phe Phe Thr Leu Phe Ala Lys Gly Glu			
510 515 520			
gta caa aac tgg gct ctc aat gat cac cat gga cac aga cac			1870
Val Gln Asn Trp Ala Leu Asn Asp His His Gly His Arg His			
525 530 535			
tgaaggaacc aataaataat cctgcctcta ttaatgtatt tttatttatc atgtaacctc			1930
aaagtgcctt ctgtatttg tg taagcattct atgtcttttt ttaattgtac ttgtattaga			1990
ttttaaggc ctataatcat gaaatatcac tagttgccag aataataaaa tgaacttgtt			2050
ttaattatga ataatatgta agctaggact tctacttttag gttcacatac ctgcctgcta			2110
gtcgggcaac atgaagtagg acagttctgt tgatttttta ggGCCatact aaagggaatg			2170
agctgaaaca gacctoctga tacctttgct taattaaact agatgataat tctcaggtac			2230
tgataaacac ctgttggttg tcactttcct cataaaaaatt gtcagctctc tctgacactt			2290
agacctcaaa ctttagcata tctgtggagc tgccatccac tgtataattt cgCCTGGCAA			2350
ctggactgag gggagtgtgc ccaggcagct gccAAGCACT CCTCCCTGG CTTcagggtc			2410
agagtGCCCa gcgtttatca gaggcagcat ccaAgCCCAG AgCcagtGTC GaCTctTcgg			2470
CtggTGcctt Tcctctgagg ggctatcaat GTGTAGATAA AGCCTGAgt aggCaagagc			2530
AgtGaGaTcc ActGctAtGg CtTtgATACA TCOTcaaACT TTCoctTooc AgCACagagg			2590
aatATTggct ggCATgCaAc CTGCaaaAGA AAAATGCGAA GCggCCggggC AcgGTggGTC			2650
atgcctgtaa TcccagcAct ttgggggggct gaggtgggcg AATCatGAGA TcaggagTtc			2710
GagAccagcc TGgCCagCAT ggtGAAAcccc CATCTctAct AAaaTaACaa AAAAttAgct			2770
GggCGtggtg ACgggCGcct GTAATCCcag ATActcAGGA GGctGaggTA ggAGaATCaC			2830
Ttgaacctgg gaggtggaag ttgcagtGaa ccaagATCaC GCCActGCaC ToCagcoTgg			2890
gcgatggagc gaGactCCAa CTCaaaaaaaa AAAAAAAAAAAAA			2930

<210> 2

<211> 536

<212> PRT

<213> 人类

<400> 2

Met Ala Ala Gly Ala Met Thr Pro Pro Arg Pro Val Gln Pro Ala Arg
1 5 10 15

Pro Gly Gly Phe Gly Leu Ser Gly Arg Arg Ser Leu Leu Cys Gln Val
20 25 30

Ala Ser Thr Pro Ala His Val Gly Val Met Arg Ser Pro Val Arg Asp
35 40 45

Leu Ala Arg Asn Asp Gly Glu Glu Ser Thr Asp Arg Thr Pro Leu Leu
50 55 60

Pro Gly Ala Pro Arg Ala Glu Ala Ala Pro Val Cys Cys Ser Ala Arg
65 70 75 80

Tyr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Phe Phe Gly Phe Phe Ile Val Tyr Ala
85 90 95

Leu Arg Val Asn Leu Ser Val Ala Leu Val Asp Met Val Asp Ser Asn
100 105 110

Thr Thr Leu Glu Asp Asn Arg Thr Ser Lys Ala Cys Pro Glu His Ser
115 120 125

Ala Pro Ile Lys Val His His Asn Gln Thr Gly Lys Lys Tyr Gln Trp
130 135 140

Asp Ala Glu Thr Gln Gly Trp Ile Leu Gly Ser Phe Phe Tyr Gly Tyr
145 150 155 160

Ile Ile Thr Gln Ile Pro Gly Gly Tyr Val Ala Ser Lys Ile Gly Gly
165 170 175

Lys Met Leu Leu Gly Phe Gly Ile Leu Gly Thr Ala Val Leu Thr Leu
180 185 190

Phe Thr Pro Ile Ala Ala Asp Leu Gly Val Gly Pro Leu Ile Val Leu
195 200 205

Arg Ala Leu Glu Gly Leu Gly Glu Gly Val Thr Phe Pro Ala Met His

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

Ser Gly Phe Ser Ile Asn His Leu Asp Ile Ala Pro Ser Tyr Ala Gly
 450 455 460

Ile Leu Leu Gly Ile Thr Asn Thr Phe Ala Thr Ile Pro Gly Met Val
 465 470 475 480

Gly Pro Val Ile Ala Lys Ser Leu Thr Pro Asp Asn Thr Val Gly Glu
 485 490 495

Trp Gln Thr Val Phe Tyr Ile Ala Ala Ala Ile Asn Val Phe Gly Ala
 500 505 510

Ile Phe Phe Thr Leu Phe Ala Lys Gly Glu Val Gln Asn Trp Ala Leu
 515 520 525

Asn Asp His His Gly His Arg His
 530 535

<210> 3

<211> 2844

<212> DNA

<213> 绵羊

<220>

<221> CDS

<222> (84)..(1568)

<400> 3

cccgggggcg gggggcttcg gcgggtccgc tggagctctc ttttcgcgg agcaggtttg 60

cgccgtagct ccctgaaggc atc atg aag tcc ccg gtt tcg gac tta gcc ccg 113
 Met Lys Ser Pro Val Ser Asp Leu Ala Pro
 1 5 10

agc gac ggc gag gag ggc tcg gac cgc aca ccg ctc ctg cag cgc gcc 161
 Ser Asp Gly Glu Glu Gly Ser Asp Arg Thr Pro Leu Leu Gln Arg Ala
 15 20 25

ccg cgg gcg gaa ccc gct cca gta tgc tgc tct gct cgt tac aac cta 209
 Pro Arg Ala Glu Pro Ala Pro Val Cys Cys Ser Ala Arg Tyr Asn Leu
 30 35 40

gca ttt ttg tcc ttt ttt ggt ttc ttc gtt ctc tat tca tta cgg gtg 257
 Ala Phe Leu Ser Phe Phe Gly Phe Phe Val Leu Tyr Ser Leu Arg Val

45	50	55	
aat ctg agc gtt gca cta	gtg gac atg gtg gat tca	aac aca act gcc	305
Asn Leu Ser Val Ala Leu	Val Asp Met Val Asp Ser	Asn Thr Thr Ala	
60	65	70	
aaa gat aat aga acg tcc tac	gag tgt gca gag cat tct	gct ccc ata	353
Lys Asp Asn Arg Thr Ser	Tyr Glu Cys Ala Glu His	Ser Ala Pro Ile	
75	80	85 90	
aaa gtt ctt cac aac caa acg	ggt aaa aag tac cgg tgg	gat gca gaa	401
Lys Val Leu His Asn Gln	Thr Gly Lys Lys Tyr Arg	Trp Asp Ala Glu	
95	100	105	
act caa gga tgg att ctc gga	tct ttt ttc tat ggc tac	atc atc aca	449
Thr Gln Gly Trp Ile Leu	Gly Ser Phe Phe Tyr Gly	Tyr Ile Ile Thr	
110	115	120	
caa att cct gga gga tat gtt	gcc agc aga agt ggg ggg	aag ctg ttg	497
Gln Ile Pro Gly Gly Tyr	Val Ala Ser Arg Ser Gly	Gly Lys Leu Leu	
125	130	135	
cta gga ttc ggg atc ttt gct	aca gct atc ttc acc ctg	ttc act ccc	545
Leu Gly Phe Gly Ile Phe	Ala Thr Ala Ile Phe Thr	Leu Phe Thr Pro	
140	145	150	
ctc gct gca gat ttc gga gtc	gga gcc ctt gtt gca ctc	agg gca cta	593
Leu Ala Ala Asp Phe Gly	Val Gly Ala Leu Val Ala	Leu Arg Ala Leu	
155	160	165 170	
gaa ggg cta gga gag ggt gtc	aca tat cca gcc atg cat	gcc atg tgg	641
Glu Gly Leu Gly Glu Gly	Val Thr Tyr Pro Ala Met	His Ala Met Trp	
175	180	185	
tct tca tgg gct ccc cct ctt	gaa aga agc aag ctt ctg	agt att tca	689
Ser Ser Trp Ala Pro Pro	Leu Glu Arg Ser Lys Leu	Leu Ser Ile Ser	
190	195	200	
tat gca gga gca caa ctt ggg	aca gta gtt tct ctt cct	ctt tct gga	737
Tyr Ala Gly Ala Gln Leu	Gly Thr Val Val Ser Leu	Pro Leu Ser Gly	
205	210	215	
gta att tgc tac tat atg aat	tgg act tat gtc ttc tat	ttc ttt ggc	785
Val Ile Cys Tyr Tyr Met	Asn Trp Thr Tyr Val Phe	Tyr Phe Phe Gly	
220	225	230	
att gtt gga atc atc tgg ttt	att tta tgg atc tgc tta	ggt agt gat	833
Ile Val Gly Ile Ile Trp	Phe Ile Leu Trp Ile Cys	Leu Val Ser Asp	
235	240	245 250	
aca cca gaa act cac aag	aca atc act ccc tat gaa	aag gag tat att	881
Thr Pro Glu Thr His Lys	Thr Ile Thr Pro Tyr Glu	Lys Glu Tyr Ile	
255	260	265	
ctt tca tca tta aaa aat	cag ctc tct tca cag aag	tca gtg ccg tgg	929
Leu Ser Ser Leu Lys Asn	Gln Leu Ser Ser Gln Lys	Ser Val Pro Trp	
270	275	280	
ata cct atg ctg aaa tca	ctg cca ctt tgg gct att	gtc gtt gca cat	977

Ile Pro Met Leu Lys Ser Leu Pro Leu Trp Ala Ile Val Val Ala His	
285 290 295	
ttt tct tac aac tgg act ttt tat act ttg ttg acc tta ttg cct act	1025
Phe Ser Tyr Asn Trp Thr Phe Tyr Thr Leu Leu Thr Leu Leu Pro Thr	
300 305 310	
tac atg aag gaa gtc cta agg ttc aat att caa gag aat ggg ttt tta	1073
Tyr Met Lys Glu Val Leu Arg Phe Asn Ile Gln Glu Asn Gly Phe Leu	
315 320 325 330	
tct gca gtc cct tat tta ggt tgt tgg tta tgt atg atc ctg tcg ggt	1121
Ser Ala Val Pro Tyr Leu Gly Cys Trp Leu Cys Met Ile Leu Ser Gly	
335 340 345	
caa gct gct gac aat tta agg gca aga tgg aat ttt tca act ctg tgg	1169
Gln Ala Ala Asp Asn Leu Arg Ala Arg Trp Asn Phe Ser Thr Leu Trp	
350 355 360	
gtt cga aga gtt ttt agc ctt ata ggg atg att gga cct gcg ata ttc	1217
Val Arg Arg Val Phe Ser Leu Ile Gly Met Ile Gly Pro Ala Ile Phe	
365 370 375	
ctg gtt gcc gca gga ttt ata ggc tgt gat tat tcc ttg gct gtt gca	1265
Leu Val Ala Ala Gly Phe Ile Gly Cys Asp Tyr Ser Leu Ala Val Ala	
380 385 390	
ttc cta acc ata tca aca acc ctg gga ggc ttt tgc tct tct gga ttt	1313
Phe Leu Thr Ile Ser Thr Thr Leu Gly Gly Phe Cys Ser Ser Gly Phe	
395 400 405 410	
agc atc aac cat ctg gac att gct cct tcg tat gct ggt att ctc ctg	1361
Ser Ile Asn His Leu Asp Ile Ala Pro Ser Tyr Ala Gly Ile Leu Leu	
415 420 425	
ggc atc aca aat acc ttt gcc act att cct gga atg att ggg ccc atc	1409
Gly Ile Thr Asn Thr Phe Ala Thr Ile Pro Gly Met Ile Gly Pro Ile	
430 435 440	
att gcc aga agt ctt acc cct gag aac act att gga gaa tgg caa act	1457
Ile Ala Arg Ser Leu Thr Pro Glu Asn Thr Ile Gly Glu Trp Gln Thr	
445 450 455	
gtt ttc tgc atc gct gct gct atc aat gta ttt ggt gcc att ttc ttc	1505
Val Phe Cys Ile Ala Ala Ala Ile Asn Val Phe Gly Ala Ile Phe Phe	
460 465 470	
aca cta ttc gcc aaa ggt gaa gtg caa aac tgg gcc atc agt gat cac	1553
Thr Leu Phe Ala Lys Gly Glu Val Gln Asn Trp Ala Ile Ser Asp His	
475 480 485 490	
caa gga cac aga aac tgaaggaacc aataaataat cctgtctcta ttaatgtatc	1608
Gln Gly His Arg Asn	
495	
tttgtttatc atgtaacctt aaagtgcctt tgatatttta atgtgtaagc aatctatata	1668
caagataaaa ttgtactaga aaaattgtgt tagatttgta aggcttgtaa tcatgaaatg	1728

```

tcactagttg ccatataagc aaaattagct atttttaatt attattaacc cgtttgctgg 1788
aacttacaat tcagggtcac atatctggct gcaagtcagg caaccacaa taggggagtt 1848
ctatttattt ataagaccat acctaagag atgagctgaa atagaccctt ctataccttt 1908
gcttaattaa ggtggataat aattctcagg tcttggtaaa catctgtttt tgtacacctt 1968
cctcaaaaaa ttatttgtca tcagcaatcc ctgacatgta ggtctcaaac tttagcctct 2028
ccacggagct ggcagccact gtatcattca gcctggcaac ttcactgagg gaagcatgcc 2088
caggcagctg ccacatgtcc cctctctggc ttcagggaca gtgcccagca cttaggcagc 2148
atccaagacc agggtcagcg ccaaggcttt ggacggtatt cttcccctgg ggctgttaat 2208
gtgtggatga agcctgagc caacagggac agcgcgatcc acagtcatgg tttccatgca 2268
ccctctccct tcccttccca gcacactgga gtattgcctg gcatgtaacc tgcaaaagaa 2328
agtgtgatgc ctaattagcc acatataaca tcatccttga tgatcctacc ttcacatgga 2388
tcagagtata aatcttcaag tcctgtgttc taggagctac accagaataa ttaaaatata 2448
aaaagaaaca aaacattttt tctgtctgac acctaagtgt ctggttgagc ttcaaggtta 2508
aagtgacttc tacttcacat aacctgcaac cggtggtgta atcatcttta gtgttggttt 2568
cttaaattctt atttttccag tttttcctgg accatcttcc agtggttttg agcatgcttt 2628
gagggcattt atgtgattta gaacttgatt aatgtttcac tgtgtatgtt caacactacc 2688
tgtaatatatt taactaaagc tatttaaatgt aatatgatgt gtatacattc tgtaaatata 2748
tttttaaatac tgtaaatagc ttttaagttgc tatggtgata tttcttttac aaatcaaaat 2808
aaatcttttt ggaatgataa aaaaaaaaaa aaaaaa 2844

```

<210> 4

<211> 495

<212> PRT

<213> 绵羊

<400> 4

```

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

```

```

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

```

Pro Val Cys Cys Ser Ala Arg Tyr Asn Leu Ala Phe Leu Ser Phe Phe
 35 40 45

Gly Phe Phe Val Leu Tyr Ser Leu Arg Val Asn Leu Ser Val Ala Leu
 50 55 60

Val Asp Met Val Asp Ser Asn Thr Thr Ala Lys Asp Asn Arg Thr Ser
 65 70 75 80

Tyr Glu Cys Ala Glu His Ser Ala Pro Ile Lys Val Leu His Asn Gln
 85 90 95

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

Gly Ser Phe Phe Tyr Gly Tyr Ile Ile Thr Gln Ile Pro Gly Gly Tyr
 115 120 125

Val Ala Ser Arg Ser Gly Gly Lys Leu Leu Leu Gly Phe Gly Ile Phe
 130 135 140

Ala Thr Ala Ile Phe Thr Leu Phe Thr Pro Leu Ala Ala Asp Phe Gly
 145 150 155 160

Val Gly Ala Leu Val Ala Leu Arg Ala Leu Glu Gly Leu Gly Glu Gly
 165 170 175

Val Thr Tyr Pro Ala Met His Ala Met Trp Ser Ser Trp Ala Pro Pro
 180 185 190

Leu Glu Arg Ser Lys Leu Leu Ser Ile Ser Tyr Ala Gly Ala Gln Leu
 195 200 205

Gly Thr Val Val Ser Leu Pro Leu Ser Gly Val Ile Cys Tyr Tyr Met
 210 215 220

Asn Trp Thr Tyr Val Phe Tyr Phe Phe Gly Ile Val Gly Ile Ile Trp
 225 230 235 240

Phe Ile Leu Trp Ile Cys Leu Val Ser Asp Thr Pro Glu Thr His Lys
 245 250 255

Thr Ile Thr Pro Tyr Glu Lys Glu Tyr Ile Leu Ser Ser Leu Lys Asn
 260 265 270

Gln Leu Ser Ser Gln Lys Ser Val Pro Trp Ile Pro Met Leu Lys Ser
275 280 285

Leu Pro Leu Trp Ala Ile Val Val Ala His Phe Ser Tyr Asn Trp Thr
290 295 300

Phe Tyr Thr Leu Leu Thr Leu Leu Pro Thr Tyr Met Lys Glu Val Leu
305 310 315 320

Arg Phe Asn Ile Gln Glu Asn Gly Phe Leu Ser Ala Val Pro Tyr Leu
325 330 335

Gly Cys Trp Leu Cys Met Ile Leu Ser Gly Gln Ala Ala Asp Asn Leu
340 345 350

Arg Ala Arg Trp Asn Phe Ser Thr Leu Trp Val Arg Arg Val Phe Ser
355 360 365

Leu Ile Gly Met Ile Gly Pro Ala Ile Phe Leu Val Ala Ala Gly Phe
370 375 380

Ile Gly Cys Asp Tyr Ser Leu Ala Val Ala Phe Leu Thr Ile Ser Thr
385 390 395 400

Thr Leu Gly Gly Phe Cys Ser Ser Gly Phe Ser Ile Asn His Leu Asp
405 410 415

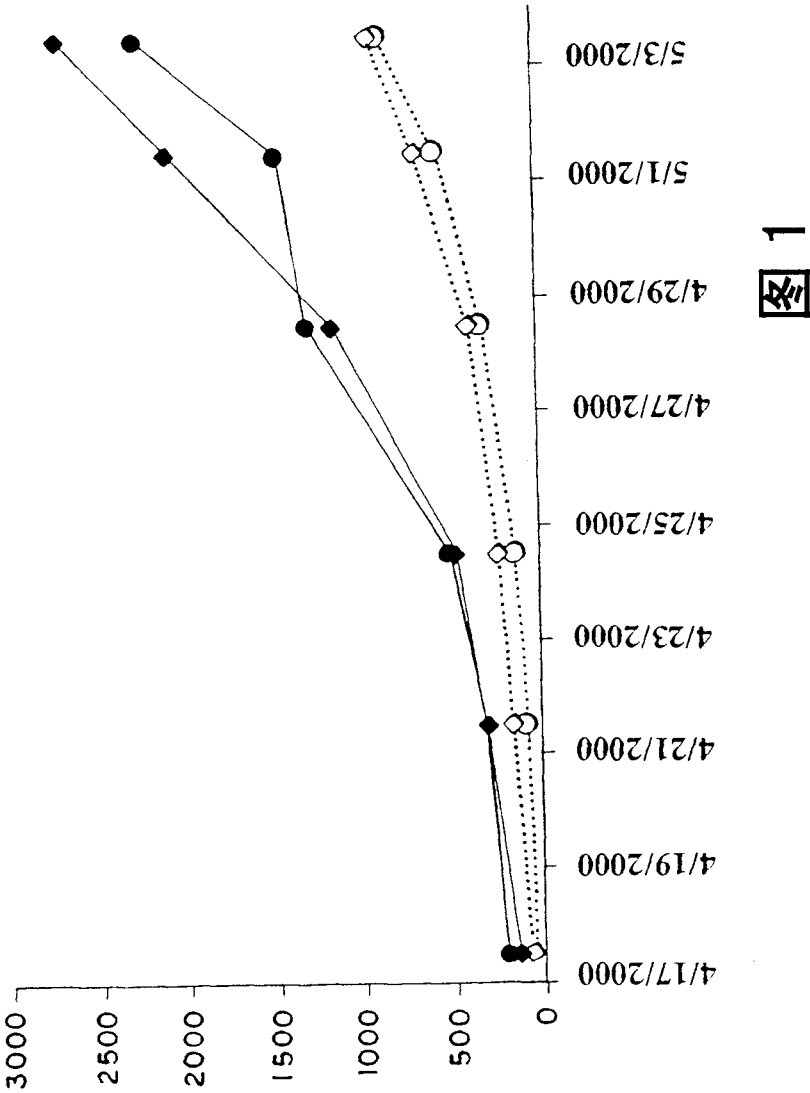
Ile Ala Pro Ser Tyr Ala Gly Ile Leu Leu Gly Ile Thr Asn Thr Phe
420 425 430

Ala Thr Ile Pro Gly Met Ile Gly Pro Ile Ile Ala Arg Ser Leu Thr
435 440 445

Pro Glu Asn Thr Ile Gly Glu Trp Gln Thr Val Phe Cys Ile Ala Ala
450 455 460

Ala Ile Asn Val Phe Gly Ala Ile Phe Phe Thr Leu Phe Ala Lys Gly
465 470 475 480

Glu Val Gln Asn Trp Ala Ile Ser Asp His Gln Gly His Arg Asn
485 490 495



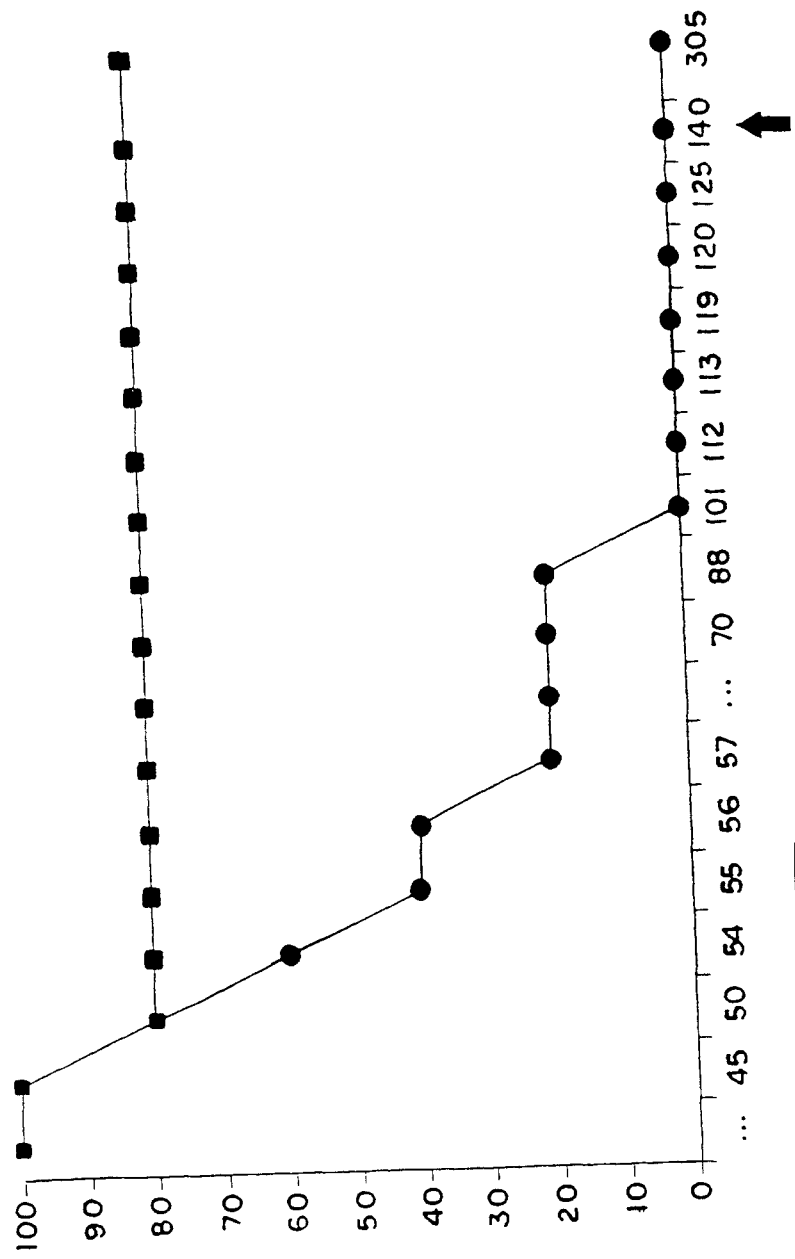


图 2