

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580038526.8

[51] Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

G01N 33/537 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 11 月 21 日

[11] 公开号 CN 101076351A

[22] 申请日 2005.9.9

[21] 申请号 200580038526.8

[30] 优先权

[32] 2004.9.10 [33] US [31] 10/937,658

[86] 国际申请 PCT/US2005/032357 2005.9.9

[87] 国际公布 WO2006/031703 英 2006.3.23

[85] 进入国家阶段日期 2007.5.10

[71] 申请人 细胞基因系统有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 刘坡成 寇亨·安东尼·吴

乔安娜·斯 伏拉娃·博若利尼

[74] 专利代理机构 北京金之桥知识产权代理有限公司

代理人 梁朝玉

权利要求书 3 页 说明书 56 页 序列表 11 页
附图 12 页

[54] 发明名称

用于治疗前列腺癌的细胞因子表达细胞疫苗

[57] 摘要

经遗传修饰的细胞因子表达细胞作为治疗前列腺癌的疫苗。更具体地说，描述了一种用经过遗传修饰，表达粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的细胞作为产生针对 β -细丝蛋白的增强的免疫应答的手段，以及相应的在治疗前列腺癌中的应用。

1. 一种在目标中处理前列腺癌的方法，包括：
 - (a)遗传修饰第一组肿瘤细胞以产生粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子；
 - (b)将所述肿瘤细胞施予给一个目标；
 - (c)通过 SDS-PAGE 测定一个大约 278KD 的抗原免疫应答，其中所述的免疫应答在所述的施予之前没有被检测到。
- 2.根据权利要求 1 所述的方法，其中所述的大约 278KD 的抗原是 β -细丝蛋白。
- 3.根据权利要求 2 所述的方法，其中所述的免疫应答是体液免疫应答。
- 4.根据权利要求 2 所述的方法，其中所述的第一组肿瘤细胞是增殖无能力的。
- 5.根据权利要求 4 所述的方法，其中所述的第一组肿瘤细胞是异体的。
- 6.根据权利要求 4 所述的方法，其中所述的第一组肿瘤细胞是自体的。
- 7.根据权利要求 4 所述的方法，其中所述的第一组肿瘤细胞是旁观者细胞。
- 8.根据权利要求 5 所述的方法，其中所述的第一组肿瘤细胞是 PC-3 细胞或 LNCaP 细胞。
- 9.根据权利要求 8 所述的方法，其中所述的免疫应答是体液免疫应答。
- 10.根据权利要求 4 所述的方法，其中一个第二组肿瘤细胞是被遗传修饰以产生粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子并与所述的第一组肿瘤细胞联合施予。
- 11.根据权利要求 8 所述的方法，其中第二组肿瘤细胞是 PC-3 细胞或 LNCaP 细胞。

12.根据权利要求 11 所述的方法,其中所述的免疫应答是体液免疫应答。

13.根据权利要求 11 所述的方法,其中所述的第二组肿瘤细胞是增殖无能力的。

14.根据权利要求 13 所述的方法,其中所述的第一组肿瘤细胞是异体的。

15.根据权利要求 13 所述的方法,其中所述的第一组肿瘤细胞是自体的。

16.根据权利要求 13 所述的方法,其中所述的第一组肿瘤细胞是旁观者细胞。

17.根据权利要求 5 所述的方法,其中所述的第二组肿瘤细胞是异体的。

18.根据权利要求 5 所述的方法,其中所述的第二组肿瘤细胞是自体的。

19.根据权利要求 5 所述的方法,其中所述的第二组肿瘤细胞是旁观者细胞。

20.根据权利要求 6 所述的方法,其中所述的第二组肿瘤细胞是异体的。

21.根据权利要求 6 所述的方法,其中所述的第二组肿瘤细胞是自体的。

22.根据权利要求 6 所述的方法,其中所述的第二组肿瘤细胞是旁观者细胞。

23.根据权利要求 14 所述的方法,其中所述的第一组肿瘤细胞是 PC-3 细胞,且第二组肿瘤细胞是 LNCaP 细胞。

24.根据权利要求 23 所述的方法,其中所述的免疫应答是体液免疫应答。

25.一种降低前列腺癌病人的前列腺特异性抗原水平的方法,包括:
遗传修饰第一组肿瘤细胞以产生粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子;

将所述细胞施予给一个目标；

通过 SDS-PAGE 测定一个大约 278KD 的抗原免疫应答，其中所述的免疫应答在所述的施予之前没有被检测到。

26.根据权利要求 25 所述的方法，其中所述的大约 278KD 的抗原是 β -细丝蛋白。

27.根据权利要求 25 所述的方法，其中所述的免疫应答是体液免疫应答。

28.根据权利要求 25 所述的方法，其中所述的第一组肿瘤细胞是增殖无能力的。

29.根据权利要求 25 所述的方法，其中所述的第一组肿瘤细胞是异体的。

30.根据权利要求 25 所述的方法，其中所述的第一组肿瘤细胞是自体的。

31.根据权利要求 25 所述的方法，其中所述的第一组肿瘤细胞是旁观者细胞。

32.根据权利要求 25 所述的方法，其中所述的第一组肿瘤细胞从由 PC-3 细胞、LNCaP 细胞、以及 PC-3 细胞加 LNCaP 细胞组成的细胞群中选出。

用于治疗前列腺癌的细胞因子表达细胞疫苗

技术领域:

本发明涉及用作治疗前列腺癌的疫苗的经遗传修饰的细胞因子表达细胞。更具体地说,本发明涉及发现一个针对抗原(β -细丝蛋白(β -Filamin))的增强的免疫应答,所述免疫应答在给患前列腺癌的病人施予经遗传修饰的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子表达细胞时检测到。

背景技术:

免疫系统在多种癌症的发病机理中起着关键作用。当癌症发生的时候,通常认为免疫系统不能充分或恰当地应答,致使癌细胞生长。当前治疗癌症的标准医疗方法包括化疗,手术,放疗和细胞诊疗在功效和毒性上有着明显的局限性。迄今为止,基于癌症的种类、病人的总体健康状况、诊断时的病情阶段等等,这些手段取得的不同程度的成功。改进的方法将针对癌症的免疫应答的特定操控和标准的医疗方法联合起来,也许提供一种高功效低毒性的方法。

在一个发挥功效的免疫系统中,抗原在主要组织相容性复合体(MHC)I类分子和II类分子的环境中被加工和表达于细胞表面。一旦与抗原形成复合体,MHC I类分子和II类分子分别被CD8⁺和CD4⁺T细胞识别。这种识别产生了一系列二级细胞信号,并且旁分泌释放特定的细胞因子,迅速与细胞交互作用,刺激宿主防御以击退疾病。细胞因子的释放导致了抗原特异性免疫细胞的增殖。

众多的细胞因子被发现在针对癌症的免疫应答的调节中发挥作用。例如,美国专利 NO.5,098,702 记述了联合使用 TNF, IL-2 和 IFN- β 的协同效应的总和来抗击已经存在的肿瘤;美国专利 NO.5,078,996 和

NO.5,904,920 记述了使用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)治疗肿瘤。然而, 将细胞因子用于癌症治疗中直接给药并不可行, 因为它们经常有系统毒性。(详见, 例如, Asher et al., J. Immunol. 146:3227-3234, 1991 and Havell et al., J. Exp. Med. 167:1067-1085, 1988.)

这种方法的一个延伸涉及使用经遗传修饰的在疫苗部位局部细胞因子表达肿瘤细胞。通过在肿瘤模型中使用免疫调节细胞因子, 包括 IL-4, IL-2, TNF- α , G-CSF, IL-7, IL-6 和 GS-CSF, 效果得到展示。分别详见 Golumbeck PT et al., Science 254:13-716, 1991; Gansbacher B et al., J. Exp. Med. 172:1217-1224, 1990; Fearon ER et al., cell 60:397-403, 1990; Gansbacher B et al., Cancer Res. 50:7820-25, 1990; Teng M et al., PNAS 88:3535-3539, 1991; Columbo MP et al., J. Exp. Med. 174:1291-1298, 1991; Aoki et al., Proc Natl Acad sci USA. 89(9):3850-4, 1992; Porgador A, et al., Nat Immun. 13(2-3):113-30, 1994; Dranoff G et al., PNAS 90:3539-3543, 1993; Lee CT et al., Human Gene Therapy 8:187-193, 1997; Nagai E et al., Cancer Immunil. Immonther. 47:2-80, 1998 以及 Chang A et al., Human Gene Therapy 11:839-850, 2000。使用自体癌细胞作为疫苗来增强肿瘤免疫已经有一段时间的探索。详见, 例如, Oettgen et al., "The History of Cancer Immunotherapy", In: Biologic Therapy of Cancer, Devita et al., (eds.) I. Lippincot Co., pp87-199, 1991; Armstrong TD and Jaffee Em, Surg Oncol Clin N Am. 11(3):681-96, 2002; 以及 Bodey B et al., Anticancer Res 20(4):2665-76, 2000。

一些使用分泌粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的自体或异体肿瘤细胞疫苗的一期二期人体试验已经进行(Simons et al. Cancer Res 1999 59:5160-8; Soiffer et al. Proc Natl Acad Sci USA 1998 95:13141-6; Simons et al. Cancer Res 1997 57:1537-46; Jaffee et al. J Clin Oncol 2001 19:145-56; Salgia et al. J Clin Oncol 2003 21:624-30; Soiffer et al. J Clin Oncol 2003 21:3343-50; Nemunaitis et al. J Natl Cancer Inst. 2004 Feb 18 96(4):326-31; Borello and

Pardoll, Growth Factor Rev. 13(2):185-93, 2002;以及 Thomas et al., J. Exp. Med. 200(3)297-306, 2004)。

随着施予给病人经遗传修饰的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子表达癌细胞, 结果显示免疫应答提高了, 并且在一期二期临床试验中针对前列腺癌以及其它癌症的临床功效已经得到证实。尽管如此, 应用细胞疫苗治疗前列腺癌的策略然而有待改进。

发明内容:

本发明提供了治疗目标的前列腺癌的成分和方法, 包含遗传修饰的细胞因子表达细胞。其中一个方面, 发明包括一种在目标中治疗前列腺癌的方法, 该方法通过施予目标经遗传修饰的细胞因子表达细胞以治疗前列腺癌。

这种方法通过遗传修饰(转导)第一组肿瘤细胞以产生一种细胞因子, 例如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子, 并且将第一组肿瘤细胞或连同第二组肿瘤细胞施予目标。随着施予遗传修饰的细胞因子表达细胞, 针对一个大约 278KD 的抗原的免疫应答通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳被检测到, 其中在施予细胞因子表达细胞之前, 免疫应答没有被检测到。大约 278KD 的抗原被发现是 β -细丝蛋白。

肿瘤细胞可以是来自同一个人(自体)或不同的人(异体), 或旁观者细胞, 其特点是给药之前都使之失去增殖能力。其特点是, 肿瘤细胞与被治疗的肿瘤或癌症是同种细胞, 例如, 遗传修饰的细胞因子表达细胞是前列腺或前列腺癌细胞(如 PC-3 细胞或 LNCaP 细胞), 并且目标患有前列腺癌。免疫应答可以是体液或细胞免疫应答。

如所期待的, 随着施予一位前列腺癌病人细胞因子表达细胞, 对病人的一个更好的治疗效果显现出来。

附图说明:

结合相应的附图阅读下面的记述，将能更加充分地理解本发明中前述的和其它的内容，及其不同特征，以及发明自身。

图 1A-D 示出了在本发明的方法和成分中使用的 MGF 载体示意图。

图 1E 示出了在本发明的方法和疫苗中使用的含粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子编码的腺病毒载体(AV-MG-CSF)的示意图。

图 1F 示出了在本发明的方法和疫苗中使用的重组腺病毒伴随病毒(AAV)载体质粒(SSV9/MD2-hGM)的示意图。

图 1G 示出了在本发明的方法和疫苗中使用的含粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子表达框并且侧翼有人类免疫缺陷病毒长末端重复序列的重组慢病毒载体的示意图。

图 1H 示出了在本发明的方法和疫苗中使用的含取代 ICP22 HSV 基因的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子表达框的 I 型单纯疱疹病毒表达载体的示意图。

图 1I 示出了在本发明的方法和疫苗中使用的含粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子表达框，SV-40 复制起始点以及病毒晚期基因的 SV-40 表达质粒(pSV MD GM-CSFII)的示意图。

图 1J 示出了在本发明的方法和疫苗中使用的含疫苗病毒启动子，终止序列，含粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的 cDNA 序列的疫苗病毒表达框的示意图。

图 2 示出了在 804 号病人在异体前列腺(GVAX®)临床试验中完全前列腺特异性抗原应答。第 0 天给药为疫苗治疗的起始剂量。

图 3 示出了免疫印迹分析的结果，显示在 PC-3 细胞而非 LNCaP 细胞中，804 号病人免疫接种后的血清在大约 278KD 处识别抗原。

图 4 示出了使用免疫接种之前(第 0 周)和之后(第 24 周)804 号病人的血清做的免疫印迹分析，结果显示 804 号病人免疫接种后的血清识别一个大约 278KD 的抗原，这在原代的正常前列腺上皮细胞系，前列腺基质以及前列腺平滑肌的细胞系(PrEC, PrSC, 以及 PrSmC)同样可以分别检测到，只是相比 PC-3 细胞处在一个较低的水平上。

图 5 示出了使用免疫接种之前(第 0 周)和之后(第 24 周)804 号病人的血清做的免疫印迹分析, 结果显示 804 号病人免疫接种后的血清识别一个大约 278KD 的抗原, 这个抗原在非小肺腺癌细胞(NSCLC)H157 中过表达, 但在 H1395NSCLC 腺癌细胞系中没有表达。

图 6 示出了使用购自 chemicon international(Temecula, CA)的兔抗人细丝蛋白的单克隆抗体做的免疫印迹分析, 结果显示在 PC-3 细胞中有一个大约 278KD 的蛋白表达, 但在 LNCaP 细胞中没有。

具体实施方式:

除非有特别注明, 本发明的实施利用的传统的化学、分子生物学、微生物学、重组 DNA、遗传学、免疫学、细胞生物学、细胞培养以及转基因的技术, 都属于技术人员掌握的技术范畴。详见, 例如, Maniatis et al., 1982, *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning*, 2nd, ED. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook and Russel, 2001, *Molecular Cloning*, 3rd, ED. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Ausubel et al., 1992, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, including periodic updates); Glover, 1985, *DNA Cloning* (IRL Press, Oxford); Anand, 1992, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, Academic Press, New York; Guthrie and fink, 1991, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Academic Press, New York; Harlow and Lane, 1988, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Jakoby and Pastan, 1979; *Nucleic Acid Hybrization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription and translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan r. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic

Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Immunochemical Methods In And Molecular Biology* (Mayer and walker, eds., Academic Press, Landon, 1987); *Handbook of Experimental Immunology*, volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Riott, *Essential Immunology*, 6th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)。

定义

除非有特别注明，在此所有用到的术语对所属领域中的技术人员具有相同的涵义。

出版物及其它材料包括全部专利、专利申请、公开出版物(包括公开的专利申请)、以及本说明书的数据库登录号，都用来在此阐释本发明的背景，特别是阐释一些情形以便为实施发明提供额外的细节。

在对本发明的记述中，下面的术语被定义成如下的涵义。

术语“核酸”，指以单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合体(多核苷酸)。除非特别限定，该术语包括的核酸含有与提及的核酸有类似结合特性的已知的类似的非人工核酸，并且其新陈代谢方式类似于自然地生成的核苷酸。除非有特别注明，一个特定的核酸分子/多核苷酸其中还暗含保守修饰的变异(如简并密码子替换)和互补序列以及明确注明的序列。特别的，简并密码子替换可以通过产生一个或多个(或全部)第三个位置的密码子用混和碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来完成(Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081(1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608(1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98(1994))。核苷酸用他们的碱基的标准缩写注明，如下：腺嘌呤(A)，胞嘧啶(C)，胸腺嘧啶(T)，以及鸟嘌呤(G)。

术语“编码序列”和“编码区”指可以转录成 RNA 如 mRNA, rRNA, tRNA, snRNA, 正义 RNA 或反义 RNA 的一段核酸序列。在一个实施例中, RNA 在细胞内被翻译, 产生一个蛋白质。

术语“ORF”指开放阅读框。

术语“基因”指基因组内的特定区域, 除了前面提到的编码序列, 还包括其它控制表达即编码区域的转录和翻译的核酸序列, 主要起调控作用。一个基因还可能包含其它 5'及 3'端非翻译序列和终止序列。根据基因的来源, 也许有更进一步的元件如内含子。

术语“异源的”和“外源的”在此涉及核酸分子例如启动子, 基因编码序列, 指相对一个特定的载体或宿主细胞, 来自外部来源的序列, 或者如果来自同一来源, 则最初的形式被修饰。因此, 病毒或细胞内的一个异源基因包括特定病毒或细胞内的内源基因, 但是经过了修饰, 如密码子最佳化。术语“异源的”和“外源的”还涉及自然发生的核酸序列的人工产生的多拷贝。因此, 这两个术语指病毒或细胞的外源或异源的核酸片段, 或尽管与病毒或细胞同源, 却以不同于原来的形式处于病毒或细胞的基因组内。

术语“同源的”在此指核酸分子与一个同宿主病毒或细胞的自然相关的核酸序列。

术语“互补”和“互补的”指两条反向的核酸序列, 能够在反向序列中互补碱基之间形成氢键而配对。

术语“天然的”指存在于野生型病毒或细胞基因组内的基因或蛋白。

术语“自然发生的”或“野生型”指与人工制造相区别的能在自然界中发现的物体。例如, 生物体(包括病毒)中的一个蛋白或核酸序列, 可以从自然界中的某来源中分离得到, 并且没有被人类在实验室中有意修饰过, 这就叫自然发生的。

术语“重组的”涉及的核酸分子, 指用 DNA 重组技术将一组核酸分子拼接起来, 从而产生子代核酸分子。这里关于病毒、细胞和生物体, 术语“重组体的”、“转导的”、“转基因的”指一个异源基因被介导进入宿主病毒、细胞或生物体。核酸分子能够稳定整合到宿主的基因组内, 或以染色

体外分子的形式存在。这样的染色体外分子可以自动复制。这里理解的重组病毒，细胞和生物体不仅包括转导过程的终产物，还包括重组的子代。一个“非转导的”、“非转基因的”或“非重组的”宿主指不含异源核酸分子的野生型病毒，细胞，或生物体。

“调控元件”是涉及控制基因序列的表达序列。调控元件包括启动子，增强子和终止信号。它们通常包括核酸的准确翻译所必需的序列。

术语“启动子”指通常位于编码区上游的一段非翻译的 DNA 序列，它含有 RNA 聚合酶 II 的结合位点，启动 DNA 的转录。启动子区还可以包含其它元件，它们扮演着基因表达的调节器的角色。术语“最小启动子”指一个启动子元件，特别是一个 TATA 元件，当它缺少上游的激活元件时，使启动子的活性失去或大大降低。

术语“增强子”在本发明中可以是任何的遗传元件，例如：当一段核酸序列有效地连接到编码序列上时，相比只有启动子，提高了有效地连接到启动子上的编码序列的转录。

术语“表达”指细胞中内源基因，转基因或编码区的转录和/或翻译。在反义结构的情形，表达可以仅仅指反义 DNA 的转录。

术语“上调”在此意思是：与其它细胞相比，在目标细胞中，能够检测到一个特定基因的更大的 RNA 的量。例如：与一个非肿瘤细胞相比，如果一个肿瘤细胞产生更多的端粒酶 RNA，就是肿瘤细胞上调了端粒酶的表达。当特定 RNA 在一个目标细胞(如肿瘤细胞)中的表达量比在其它细胞(非肿瘤细胞)中高出至少 3 倍时，表达被认为是上调了。在另一个实施例中，特定 RNA 的量至少高出了 5 倍。在另一个实施例中，通过所属领域中的技术人员的常规技术(如 Northern 印迹法)检测到特定 RNA 的量至少高出了 10 倍。

术语“载体”，“多核苷酸载体”，“多核苷酸载体构建”，“核酸载体构建”以及“载体构建”在此被交替使用，如所属领域中的技术人员所理解的那样，指用于转基因的任一核酸构建。本发明中使用的载体可以随意编码一个可用来筛选的标记。

在此术语“病毒载体”沿用它在技术上被公认的涵义。它指一个核酸载体构建，包含有至少一个病毒复制起点，并且可以被包装成一个病毒载体颗粒。病毒载体颗粒可用来在体外或体内将 DNA，RNA 或其它核酸导入细胞内。病毒载体包括，但并不限于，逆转录病毒载体，痘苗病毒载体，慢病毒载体，疱疹病毒载体(例如 HSV)，杆状病毒载体，巨细胞病毒(CMV)载体，乳头瘤病毒载体，猿猴空泡病毒(SV40)载体，辛德毕斯病毒载体，闪姆利基森林病毒载体，噬菌体载体，腺病毒载体，腺相关病毒(AAV)载体。适宜的载体在美国专利 Nos.6,057,155，5,543,328 和 5,756,086 中有记述，在这里的引用中有清楚的记录。

交替使用的术语“病毒”，“病毒颗粒”，“载体颗粒”，“病毒载体颗粒”以及“病毒体”广义上理解为具有感染性的病毒颗粒，它们是在例如一个目标病毒载体被导入一个适宜的细胞或细胞系，以产生具感染性的颗粒时病毒颗粒形成的。本发明中的病毒颗粒可用来在体外或体内将 DNA 导入细胞。

当一段核酸被置于与另一段核酸序列的功能关系中时，称之为“有效连接”。例如：如果两条序列是有效连接，或启动子或 DNA 调控序列被置于影响编码的表达水平或影响 DNA 序列的结构的位置，则一个启动子或 DNA 调控序列被称为“有效连接”到一段编码一个 RNA 或蛋白质的 DNA 序列。有效连接通常是邻近的，但这并不是必需的。

“可筛选标记”是一个在细胞中的表达给予细胞选择优势的蛋白。与没有转导的细胞相比，用可筛选标记基因转导的细胞的选择优势可能是由于它们在负筛选试剂如抗生素中生长的能力。与没有转导的细胞相比，转导的细胞的选择优势可能是由于增强的或新的利用添加的化合物作为营养物，生长元素，或能量来源的能力。可筛选标记蛋白包括那些可以使被转导的细胞被检测到并且可能使之与没有转导的细胞分离开的蛋白。例如，绿色荧光蛋白(GFP)可用作一个可筛选标记。在一个实施例，细胞被导入一个编码有一个 β -细丝蛋白或其免疫原性片段以及一个绿色荧光蛋白。被转导的表达绿色荧光蛋白的细胞通过流式细胞仪(FACS)得到分

离。可筛选标记蛋白能够使大部分被转导的细胞与未转导的细胞分离开来。一个所属领域中的技术人员发现筛选和分离技术通常并不是百分之百的效果；本发明中，一组细胞中有一小部分未能筛选到是可以接受的。

在此术语“主要包含”或“主要包含的”涉及一个特定的核苷酸序列，该序列可能在 5'和 3'的一端或两端有额外的残基，其中这额外的残基实质上并不影响所列举的序列的基本和新的特征。

术语“转导”指用物理方法将外源核酸导入细胞。例如，转导包括将外源核酸用本发明中的病毒颗粒导入细胞。关于各种操作哺乳动物细胞的技术，详见 Keown et al., *Methods of Enzymology* 185:527-537 (1990)。

在此提到的“包装细胞”指一个能够包装病毒基因组或修饰基因组以产生病毒颗粒的细胞。它能够提供一个丢失基因产物或其等价物。因此，包装的细胞能够为病毒基因组中删除的基因提供补足功能并且能够将病毒基因组包装成病毒颗粒。这样的颗粒的产生需要基因组被复制以及组装一个感染性病毒所必需的蛋白的产生。这些颗粒还需要病毒颗粒成熟所必需的某种蛋白。这种蛋白可以由载体或包装的细胞提供。

在此提到的“逆转录病毒转移载体”指一个含有一段编码一个转基因的核酸序列的表达载体，并且该表达载体进一步含有载体包装所必需的核酸序列。更可取的，该逆转录病毒转移载体还含有在细胞中表达基因的必需序列。

在此提到的“第二代”慢病毒载体系统指缺失功能附属基因的一个慢病毒包装系统，例如，它的附属基因 *vif*, *vpr*, *vpu* 以及 *nef* 被删除或失活。详见，例如，Zufferey et al., 1997, *Nat. Biotechnol.* 15:871-875。

在此提到的“第三代”慢病毒载体系统指含有第二代慢病毒载体系统特征的慢病毒包装系统，并且进一步缺失了 *tat* 基因，例如，它的 *tat* 被删除或失活。通常的，编码 *rev* 的基因由单独一个表达构建提供。

在此提到的“假型的”，指用一个外源的或功能被修饰的包膜蛋白替换天然的包膜蛋白。

在此提到的术语“暴露”指将一个转基因编码载体与目标细胞接触。这种“暴露”可以发生在体外，间接体内或体内。

在此提到的术语“稳定转导”，“稳定转染”和“转基因”指细胞中有一个整合到基因组上的非天然的(异源的)核酸序列。稳定转染由含有转染DNA的一组子代细胞的细胞系或克隆证实。在一下情况下，转导是不稳定的，亦即瞬时的。在瞬时转染的情况下，外源或异源的DNA被表达，然而被导入的序列并不整合到基因组上。

术语“细胞因子”或其语法上的同义词，在此指免疫系统细胞的各种激素，包括淋巴因子、单核因子及其它。如果没有限定，这个定义包括在局部发挥作用但并不在血液中循环的激素，并且当遵循本发明使用时，会导致个体免疫应答的改变。在此提到的“细胞因子”或“细胞因子们”指影响免疫系统细胞的各种生物分子。该定义包括，但并不限于，在局部或血液循环发挥作用的生物分子，并且当遵循本发明中的成分或方法使用时，可以用来控制或调节个体对癌症的免疫应答。实施本发明使用的典型细胞影响包括，但并不限于，IFN- α ，IFN- β ，IFN- γ ，白细胞介素(如 IL-1 到 IL-29，特别是 IL-2，IL-7，IL-12，IL-15 以及 IL-18)，肿瘤坏死因子(TFN)(如 TFN- α ，TFN- β)，促红细胞生成素(EPO)，MIP3a，胞间粘附分子，巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)，粒细胞集落刺激因子(G-CSF)以及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。

“严格的杂交条件”和“严格的洗脱条件”在核酸杂交实验(如 Southern 印迹法和 Northern 印迹法)中取决于序列本身，并且因环境参数的不同而不同。较长的序列杂交温度也较高。核酸杂交的详细操作手册见 Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes* part 1 chapter 2 “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays” Elsevier, New York。对于特定序列和确定的离子强度和 pH 值，高度严格的杂交和洗脱条件通常选择低于熔点 5°C-20°C(倾向于 5°C)。通常地，在严格条件下，探针会与其目标序列杂交，而不是其它无关的序列。

T_m 是在确定的离子强度和 pH 值下, 50%的目标序列与精确匹配的探针杂交的温度。对于一个特定的探针, 选择的高度严格的条件等同于 T_m 。在 Southern 或 Northern 印迹中, 对于滤膜上的一个超过 100 个互补残基的互补的核酸的杂交, 典型的严格杂交条件是 50%的甲酰胺和 1mg 的肝素, 42℃杂交过夜。高度严格的洗脱条件的一个范例是 0.1M NaCl 在 72℃下进行 15 分钟。高度严格的洗脱条件的一个范例是 0.2xSSC, 65℃洗脱 15 分钟(详见 Sambrook, *infra*, for a description of SSC buffer)。通常, 在一个高度严格的洗脱之前, 有一个低严格度的洗脱以除去背景探针信号。对于一个例如超过 100 个核苷酸的双链, 中度洗脱的范例是 1xSSC, 45℃进行 15 分钟。对于一个例如超过 100 个核苷酸的双链, 低严格度的洗脱是 4-6xSSC, 40℃进行 15 分钟。对于短探针(例如大约 10-50 个核苷酸), 严格的洗脱条件通常涉及 Na 离子浓度低于 1.0M 的盐, 通常 Na 离子(或其它盐)浓度大约是 0.01 至 1.0M, pH 值 7.0 值至 8.3, 并且温度是一般不低于大约 30℃。一般而言, 2 倍(或更高)的信噪比而不是观察到特定杂交分析中的无关探针, 说明检测到特定的杂交。

在上下文关于两段或更多核酸或蛋白序列中, 术语“相似的”或“相似度”是指当与对应的最大量比较和比对, 并且用在此记述的序列比较算法测量或用视觉检测时, 两段或更多序列或子序列相同或有特定百分比的氨基酸残基或核苷酸相同。

关于序列比对, 通常是一段序列作为参考序列, 被检测序列与它比对。当使用序列比对算法时, 被检测序列和参考序列被输入计算机, 必要的话子序列坐标会被指定, 并且序列算法程序的参数会被指定。基于指定的程序参数, 序列比对算法会计算出被检测序列相对于参考序列的序列相似度的百分比。

比较序列的最佳比对可以参考, 例如, the local homology algorithm, Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981), the homology alignment algorithm, Needleman & Wunsch, *J. Mol. Boil.* 48:443(1970), the search for similarity method, Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

85:2444(1988), computerized implementations of these algorithms (威斯康星遗传学软件包中的 GAP, BESTFIT, FASTA, 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), the BLAST algorithm, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), 国家生物技术信息中心网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上的软件是可以公开使用的, 或通过视觉检测(参见 Ausubel et al., *infra*)。对本发明而言, 比较序列的最佳比对最适用的是遵循 the local homology algorithm, Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981)。

“正常的细胞状态”或“正常的生理状态”指细胞处于正常的生理条件下, 不分裂或以一种可控的方式分裂, 即一个细胞处于正常的生理状态。“异常的细胞状态”定义为相同类型的细胞, 在正常的生理条件下, 处于分裂不可控的分裂状态。由此得出结论, 处于“异常的细胞状态”的细胞表现出不受控制的细胞分裂。

在此提到的术语“癌症”, “癌细胞(cancer cells)”, “癌细胞(neoplastic cells)”, “肿瘤(neoplasia)”, “肿瘤(tumor)”, “肿瘤细胞”指表现为相对的自主性生长, 因此它们表现出细胞增殖显著失去控制为特征的异常的生长表现型或异常的细胞状态。肿瘤细胞可以是增生的细胞, 体外或体内表现出失去接触抑制的细胞, 不能够在体内转移的细胞, 或能够在体内转移的细胞。癌细胞可以是恶性的或良性的。由此得出结论, 癌细胞被认为是处于异常的细胞状态。“肿瘤细胞”可以是源自源发性肿瘤或肿瘤转移。“肿瘤细胞”可以是新近从一个病人身上分离得到(原代肿瘤细胞)或长期体外培养得到。

在此提到的术语“原代肿瘤细胞”与所属领域中的涵义一致。原代肿瘤细胞是从一个哺乳动物的肿瘤分离出并且没有大量在体外培养的癌细胞。

在此交替提到的术语“来自肿瘤细胞的抗原”, “肿瘤抗原”和“肿瘤细胞抗原”指能够引起免疫应答的肿瘤细胞产生或表达的任何蛋白、多肽、糖类或其它成分。该定义包括, 但并不限于, 整个肿瘤细胞、肿瘤细胞碎

片、肿瘤细胞的细胞质膜、肿瘤细胞表面的特异糖基或细胞内载体表达的抗原。该定义还包括需要经过特殊处理才能进入细胞的细胞表面的抗原。

在此提到的“遗传修饰的肿瘤细胞”指包含经过遗传修饰的表达一个转基因的一组细胞的成分，并且该成分被作为癌症疗法的一部分施予给病人。对于正在接受治疗的病人来说，遗传修饰的肿瘤细胞疫苗包括“自体的”或“异体的”，或与取自病人的肿瘤细胞混合的“旁观者细胞”。一个在此提到的遗传修饰的 GM-CSF 表达肿瘤细胞是 GVAX®。遗传修饰的自体或异体的癌细胞细胞因子表达如 GM-CSF，随后被在此施予给病人以治疗癌症，详见美国专利 No.5,637,483, No.5,904,920, No.6,277,368 和 No.6,350,445。用于治疗胰腺癌的一种遗传修饰的 GM-CSF 表达癌细胞或“细胞因子表达细胞疫苗”详见美国专利 Nos. 6,033,674 和 No.5,985,290，所述两个专利在这里作为参考。一个通用的表达免疫调控因子的旁观者细胞系在美国专利 No.6,464,973 中有记述，在这里作为参考。

在此提到的“增强的表达”是指与自然产生或来自亲代细胞的细胞相比，细胞特定蛋白的产生水平更高。细胞可以通过遗传修饰来提高细胞因子的表达，如 GM-CSF，或随着施予细胞因子表达细胞疫苗，如 GVAX®，免疫应答得到增强的抗原。内源性抗原的表达可以通过所属领域内的任何方法来增强，如遗传修饰基因组序列的启动子区，或遗传改变细胞信号通路来提高抗原的产生。此外，细胞还可以导入一个编码抗原或其免疫原性片段的载体。

在此术语“系统的免疫应答”或其语法上的同义词，是指影响整个个体而非局部的免疫应答，因此对于同一刺激产生次级应答。

在此提到的术语“细胞增殖无能力”或“失活的”指细胞不能够进行多次有丝分裂，但仍保持表达诸如细胞因子或肿瘤抗原的蛋白的能力。这个可以通过所属领域中的技术人员熟知的很多方法实现。本发明的实施例包括，但不限于，至少 95%，99%或 100%充分地抑制细胞进一步增殖的治疗。在一个实施例中，在施予给哺乳动物之前，细胞用辐射处理的剂量是大约 50-200rads/min，或大约 120-140 rads/min。通常的，当用辐射处理

时，需要的水平是 2,500 rads, 5,000 rads, 10,000 rads, 15,000 rads 或 20,000 rads。在几个实施例中，经过两天的辐射处理，以存活的细胞数为标准，产生 β -细丝蛋白或其免疫原性片段的水平至少是未被辐射处理的细胞的大约 10%，20%，50%或 100%。在本发明的一个实施例中，细胞在施予给目标之前，通过辐射处理使其增殖被无能力。

术语“个体”，“目标”或其语法上的同义词均指任何哺乳动物个体。

在此提到的术语“逆转已确定的肿瘤”或其语法上的同义词指抑制，使退化，或部分或完全清除一个已经存在的肿瘤。该定义包括任何一个预先存在的肿瘤的体积，潜力或生长速率的减小或降低。

在此提到的术语“治疗”，“治疗用”或“医用”指任何及全部能够减轻或治愈一种疾病或病症的已公开的成分，或另一方面能够预防，阻止，延迟或逆转疾病或其它令人讨厌的征状的任何方式和方法。

本发明中术语“施予给的”指任何将细胞(如癌症疫苗)引入一个哺乳动物的方法。这包括，但并不限于，皮内的、肠胃外的、肌肉的、皮下的、腹膜内的、鼻内的、静脉内的(包括通过一根内置的导管)、瘤内的(通过一根导入分淋巴管)或其它根据病人病情适宜的途径。本发明中的成分可以施予到目标的任何部位。例如，它们可以被递送到距原发肿瘤“远侧的”或“远的”部位。

术语“增强的免疫应答”在此指可以检测到增强的一个特定的免疫应答激活(例如 B 细胞或 T 细胞的应答增多)。一个增强的免疫应答的范例是结合抗原的抗体的数量增多，并且这在施予本发明中的细胞因子表达细胞疫苗之前是检测不到或检测到处在一个较低的水平上。另一个范例是增强的细胞免疫应答。细胞免疫应答涉及 T 细胞，能够在体外(例如用铬释放分析测量)或体内被观察到。增强的免疫应答通常伴有一个特定群体的免疫细胞的增多。

术语“延迟肿瘤的生长”指减缓肿瘤的生长速率，抑制肿瘤尺寸或肿瘤细胞数目的增长，或减少肿瘤细胞数目或肿瘤数目。

术语“抑制肿瘤生长”指肿瘤重量，肿瘤体积，肿瘤细胞数量或肿瘤生长速率的任何可以测量到的减少。肿瘤重量的可以测量到的减少可以通过所属领域中的技术人员熟知的很多方法检测到。这包括可以接近的肿瘤的直接测量，肿瘤细胞计数(例如血液中存在的)，肿瘤抗原的测量(例如前列腺特异性抗原(PSA)，甲胎蛋白(AFP))以及各种成像技术(例如核磁共振成像，断层扫描和 X-射线)。肿瘤生长速率的降低通常和患癌的哺乳动物的较长生存时间相关。

在此术语“有效治疗的用量”或其语法上的同义词，指抗原的数量，例如，本发明中细胞因子表达细胞疫苗足够来调节(刺激或抑制)一个个体的免疫应答。这个用量因个体，肿瘤类型，配制品的不同而不同。“有效治疗的用量”由所属领域中的技术人员例行使用的程序决定，如此会产生“改善的治疗效果”。

在此提到的关于癌症的术语“改善的治疗效果”和“提高的治疗功效”，指癌细胞或实体肿瘤的生长的延缓或缩减，或者癌细胞总数或总肿瘤负荷的减少。“改善的治疗效果”或“提高的治疗功效”因此指在遵循任何临床上可以的准则下，病人条件的改进，包括预期寿命的增加或生命质量的提高(如在此进一步描述的)。

在此术语“失活的细胞”和“增殖无能力的细胞”或其语法上的同义词指细胞被使它们增殖无能力的处理而失活。这种处理导致细胞不能够进行多次有丝分裂，但仍保持表达诸如细胞因子和/或肿瘤抗原的蛋白的能力。这个可以通过所属领域中的技术人员熟知的很多方法实现。辐射处理的细胞就是这类失活细胞的一个例子。这种辐射处理的细胞被暴露在辐射下以使它们发生增殖无能力。

本发明的细胞疫苗的成分

本发明涉及一种治疗目标的前列腺癌的方法，将施予目标遗传修饰的细胞因子表达细胞作为治疗方案的一部分。该方法通过遗传修饰(转导)第一组肿瘤细胞以产生一种细胞因子，例如 GM-CSF，并且将第一组肿

瘤细胞或连同第二组肿瘤细胞施予目标。随着施予遗传修饰的细胞因子表达细胞，针对一个大约 278KD 的抗原的免疫应答通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳被检测到，其中在施予细胞因子表达细胞之前，免疫应答没有被检测到。肿瘤细胞可以是来自同一个人(自体)或不同的人(异体)，或旁观者细胞(下文中有进一步的记述)。通常，肿瘤细胞源自一个肿瘤细胞系，与正在治疗的肿瘤或癌症是同种类型，例如，被修饰的细胞是前列腺或前列腺癌细胞，并且病人患有前列腺癌。大约 278KD 的抗原被发现是 β -细丝蛋白。

在本发明的一个方面中，免疫应答是体液免疫应答。通常遗传修饰的肿瘤细胞在作为药物施予之前处理成增殖无能力。在一个实施例中，哺乳动物是人，其患有的前列腺癌的肿瘤细胞与遗传修饰的细胞因子表达的肿瘤细胞是同一类型。在一个较佳的实施例中，随着施予给目标遗传修饰的细胞因子表达的肿瘤细胞，一个改善的治疗效果是显而易见的。对于所属领域中的技术人员，关于前列腺癌患者的改善的治疗效果各种参数中的任何一个，都可用来评估遗传修饰的细胞因子表达的肿瘤细胞的治疗功效，例如，血清中前列腺特异性抗原(PSA)的水平降低。

还是另一个方面，本发明通过施予给目标有效治疗的用量的增殖无能力的遗传修饰的细胞因子表达细胞，从而刺激前列腺癌患者系统的免疫应答的方法。

本发明的一个较佳实施，在间接体内疗法中，利用一个病毒或非病毒载体将一段人类表达 GM-CSF 转基因(编码序列)转移至人类的肿瘤细胞。转导之后，细胞用辐射处理来使其增殖无能力。然后这些增殖无能力的 GM-CSF 表达肿瘤细胞被在此施予给病人(例如通过皮内的或皮下的途径)从而起癌症疫苗的作用。人类的肿瘤细胞可以是原代肿瘤细胞或源自一个肿瘤细胞系。

一般而言，在实施本发明中用到的遗传修饰的肿瘤细胞包括一种或多种自体肿瘤细胞，异体肿瘤细胞和肿瘤细胞系(即旁观者细胞)。肿瘤细胞的转导可以是体外，间接体内或体内。自体 and 异体的癌细胞被遗传修饰

以细胞因子表达如 GM-CSF, 然后被再次施予给病人以治疗癌症, 详见美国治疗 No.5,637,483, No.5,904,920 和 No.6,350,445。用于治疗胰腺癌的一种遗传修饰的表达 GM-CSF 或“细胞因子表达细胞疫苗”(GVAX®)详见美国专利 No.6,033,674 和 No.5,985,290。一个通用的表达免疫调控因子的旁观者细胞系在美国专利 No. 6,464,973 中有记述。

其中的细胞疫苗包含一个或多个从由 DU-145, PC-3 和 LNCaP 组成的细胞群中筛选出的前列腺肿瘤细胞系的一个异体的 GVAX®在 WO/0026676 中有记述。LNCaP 是一个产生前列腺特异性抗原的前列腺肿瘤细胞系, 而 PC-3 和 DU-145 是不产生前列腺特异性抗原的前列腺肿瘤细胞系。

临床使用的 GM-CSF 表达细胞疫苗(GVAX®)已经被用于治疗前列腺癌、恶性黑素瘤、肺癌、胰腺癌、肾癌和多发性骨髓瘤。许多 GVAX®细胞疫苗的临床试验被记述下来, 最引人注目的是关于恶性黑素瘤、前列腺癌、肾癌和胰腺癌(Simons JW et al. Cancer Res. 1999;59:5160-5168; Simons JW et al. Cancer Res. 1997; 57:1537-1546; Soiffer R et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998;95:13141-13146; Jaffee, et al. J Clin Oncol 2001; 19:145-156; Salgia et al. J Clin Oncol 2003 21:624-30; Soiffer R et al. J Clin Oncol 2003 21:3343-50; Nemunaitis et al. J Natl Cancer Inst. 2004 Feb 18 96(4):326-31)。

举个例子, 在一个步骤中, 遗传修饰的 GM-CSF 表达肿瘤细胞被作为异源的或旁观者细胞系与一种或多种另外的癌症治疗药剂一起包括在治疗方案中。在另一步骤中, 一种或多种另外的转基因被异源的或旁观者细胞系表达, 同时细胞因子(即 GM-CSF)被自体的或异源的细胞表达。首选的 GM-CSF 编码序列是 Huebner K. et al., Science 230(4731):1282-5, 1985 中记述的基因组序列。尽管如此, 在一些情况下, cDNA 形式的 GM-CSF 在实施本发明时是有用的(Cantrell et al., Proc Natl. Acad. Sci., 82, 6250-6254, 1985)。

一般而言，遗传修饰的肿瘤细胞在使用之前低温保存。比较可取的是，在施予给病人之前，遗传修饰的肿瘤细胞辐射处理的剂量是大约 50-200rads/min，更可取的是大约 120-140 rads/min。比较适宜的是，细胞辐射处理的总剂量足够 100%充分地抑制细胞的进一步增殖。因此，恰当的细胞辐射处理的总剂量是大约 10,000 至 20,000rads，最理想的是大约 15,000rads。

通常在一个疗程里，产生细胞因子(例如 GM-CSF)的细胞被递送给目标的给药次数大于一次。根据具体的治疗过程，在一个时间点可以进行多次注射，并且在各个时间间隔可以重复。例如，一次初次的或“首次的”治疗可以紧跟着一次或多次“强化”治疗。此类“首次的”和“强化的”治疗通常都沿用同一途径和/或大体同一部位给药。当进行多次给药时，首次免疫的剂量可以比高于后续免疫的剂量。例如， 5×10^6 的首次剂量可以紧跟着几次 10^6 至 3×10^6 的产生 GM-CSF 的细胞。

单次产生细胞因子的细胞的注射量通常在 10^6 至 10^8 之间，例如， 1×10^6 ， 2×10^6 ， 3×10^6 ， 4×10^6 ， 5×10^6 ， 6×10^6 ， 7×10^6 ， 8×10^6 ， 9×10^6 ， 10^7 ， 2×10^7 ， 5×10^7 ，或多至 10^8 。在一个实施例中，每单位剂量的产生细胞因子的细胞数目在 10^6 至 10^8 之间。对于一个特定的产生细胞因子的细胞疫苗，产生细胞因子的细胞的数目可以根据细胞因子的产生水平来调整。

本发明的实施例包括，但并不限于，每剂量中的产生细胞因子的细胞，能够每百万个细胞在每 24 小时产生至少 500ng GM-CSF。如后文中的示例所描述，并且根据在此提供的公开信息，最佳细胞剂量的确定是遵循常规来决定，这在普通执业者的能力之内。

在使用本发明中的成分和方法治疗前列腺病人时，主治内科医师可以施予较低剂量的细胞因子表达的肿瘤细胞并且观察病人的反应。较大剂量的细胞因子表达的肿瘤细胞可以施予直至有明显改善的治疗效果。

本发明中的产生细胞因子的细胞被加工处理以除去细胞制备时的大多数的额外成分。特别是去除胎牛血清，牛血清成分，或其它培养基中的

生物添加物质。在一个实施例中，细胞被清洗，例如通过重复的轻微离心，进入药理学上不产生排斥的赋形剂。不产生排斥的赋形剂包括各种细胞培养基，等渗盐水，有或没有生理上不排斥的缓冲液如磷酸盐或 N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸钠以及营养物如葡萄糖，生理适应性的离子，或氨基酸，其它特定的没有免疫原性的成分。运载介质，例如白蛋白，血浆组分和非活性的增稠剂，也可以使用。

使用自体细胞的

使用自体的遗传修饰的 GM-CSF 表达细胞的优势是因为每一个病人的肿瘤表达独一无二的一组肿瘤抗原，可以使其与另一个病人的组织相似，主要组织相容性复合体匹配的肿瘤细胞区别开来。参见如 Kawakami et al., J. Immunol., 148, 638-643 (1992); Darrow et al., J. Immunol., 142, 3329-3335 (1989); 和 Hom et al., J. Immunother., 10, 153-164 (1991).相反，主要组织相容性复合体匹配的肿瘤细胞的优势是病人不需要动手术来获取他们肿瘤的取样来生产遗传修饰的肿瘤细胞。

在一个较佳方面，本发明包含的治疗前列腺癌的方法的实施步骤是：(a)从一个哺乳动物对象获取前列腺癌的肿瘤细胞；(b)通过遗传修饰使这些肿瘤细胞比没有修饰的肿瘤细胞能够产生更高水平的 GM-CSF；(c)使这些被修饰的肿瘤细胞增殖无能力；(d)将遗传修饰的肿瘤细胞再施予给肿瘤细胞被获取的哺乳动物对象，或与获得的肿瘤细胞主要组织相容性复合体相同的哺乳动物。被施予的肿瘤细胞与宿主是同源的或主要组织相容性复合体匹配的。更可取地，成分是通过皮内，皮下或瘤内施予给哺乳动物对象的。

在一些情况下，单个自体肿瘤细胞可以只表达 GM-CSF，或再附加一个或多个另外的转基因。在另外的情况下，GM-CSF 和一个或多个另外的转基因可以被不同的自体肿瘤细胞表达。在本发明的一个方面，自体肿瘤细胞通过导入一个包含编码 GM-CSF 的核酸序列的载体被修饰，其中 GM-CSF 的核酸序列被有效连接到一个其表达所必需的启动子和表达/控

制序列。在另一个方面，同一个或另外一个自体肿瘤细胞通过导入一个包含编码至少一个另外的转基因的核酸序列的载体被修饰，其中该转基因核酸序列被有效连接到一个其表达所必需的启动子和表达/控制序列。编码一个或多个转基因的核酸序列通过相同或不同的载体被导入相同或不同的自体肿瘤细胞。编码转基因的核酸序列可以也可以不进一步包含一个有效连接到一个启动子上的筛选标记。值得要的是，自体肿瘤细胞高水平地表达 GM-CSF。

使用异体细胞的

研究人员正努力寻找自体的和主要组织相容性复合体匹配的细胞的替代物作为肿瘤疫苗，见 Jaffee et al., *Seminars in Oncology*, 22, 81-91 (1995)上的评论。早先的肿瘤疫苗策略建立在这样的理念上：接种的细胞作用如同抗原呈递细胞(APCs)，将肿瘤抗原呈递到它们的主要组织相容性复合体(MHC)I 类分子和 II 类分子，并且直接激活免疫系统的 T 细胞分支。Huang et al. (*Science*, 264, 961-965, 1994) 的结果说明，宿主的专业的 APCs 而非接种的细胞通过分泌细胞因子例如 GM-CSF 因而将源自骨髓的 APCs 征募到肿瘤区域，使免疫系统的 T 细胞分支做好准备。源自骨髓的 APCs 摄取整个肿瘤细胞的蛋白用于加工，然后将将抗原蛋白呈递给它们的主要组织相容性复合体 I 类分子和 II 类分子，从而使免疫系统的 CD4+ 和 CD8+T 细胞分支做好准备，产生了系统的肿瘤特异性的抗肿瘤免疫应答。假如没有理论上的限制，这些结果显示，为引发抗癌的免疫应答，使用自体的或 MHC 匹配的细胞可能并非是必不可少的或最理想的，并且转移异体的 MHC 基因(来自同一物种而又遗传上不同的个体)能够提高肿瘤的免疫原性。特别是在某些情况下，注射肿瘤表达的异体的 MHCI 类分子会导致增强的针对随后的未修饰的亲代肿瘤激发的系统免疫应答。参见如 Jaffee et al., *supra* 和 Huang et al., *supra*。

在此记述的“肿瘤细胞系”包含最初源自肿瘤细胞。这类细胞通常是被改造过的(即培养时表现出无限期的生长)。在一个较佳方面，本发明提

供的治疗前列腺癌的方法的实施步骤是：(a)获取一个肿瘤细胞系；(b)通过遗传修饰使这些肿瘤细胞比没有修饰的肿瘤细胞能够产生更高水平的细胞因子如 GM-CSF；(c)使这些被修饰的肿瘤细胞增殖无能力；(d)将肿瘤细胞系施予给一个至少患一种与肿瘤细胞系的来源同种类型的癌症的哺乳动物对象(目标)。被施予的肿瘤细胞系是异体的并且与目标的 MHC 不匹配。这种异体细胞系的优点是可以提前制备，鉴定，收集在装有已知数目的表达转基因(例如 GM-CSF)的细胞的小瓶子中并储存(冷冻)，因而这些经过良好处理的细胞可以被施予给病人。生产遗传修饰的异体细胞的方法参见 WO 00/72686 中的例子。

在一个制备遗传修饰的 GM-CSF 表达异体细胞的步骤中，一段单独编码 GM-CSF 的核酸序列(转基因)或联合编码一个或多个另外的转基因的核酸序列被导入一个异体的肿瘤细胞系(即源自一个不是正在接受治疗的个体)。在另一个步骤中，一段单独编码 GM-CSF 的核酸序列(转基因)或联合编码一个或多个另外的转基因的核酸序列被导入不同的异体肿瘤细胞系。另外在另一个步骤中，两个或多个不同的遗传修饰的 GM-CSF 表达异体细胞系(如 LNCaP 和 PC-3)被联合施予，典型比例是 1:1。一般而言，细胞或细胞群源自与正被肿瘤的肿瘤或癌症(如前列腺癌)是同种类型的细胞系。编码转基因的核酸序列可以通过相同或不同的自体被导入相同或不同的异体肿瘤细胞。编码转基因的核酸序列可以也可以不进一步包含一个有效连接到一个启动子上的筛选标记序列。值得要的是，异体肿瘤细胞高水平地表达 GM-CSF。

在本发明的另一个方面，一个或多个遗传修饰的 GM-CSF 表达异体细胞与抗原接触，这样在 GM-CSF 存在的情况下，病人对抗原的免疫应答会增强，例如，遗传修饰的 GM-CSF 表达异体或旁观者细胞。这种接触可以发生在间接体内或体内。在一个较佳的实施例，通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测到抗原大约是 278KD。 β -细丝蛋白由施予给目标的细胞或病人本身的细胞提供。在这种情况下，通常通过辐射处理使成分成为增殖无能力，其中异体细胞被铺在一个组织培养板上，在室温下用铯放

射源处理，如在此进一步记述的。本发明的异体细胞成分可以包含异体细胞加上其它细胞，即不同类型的可以也可以不被遗传修饰的异体细胞，自体细胞，或旁观者细胞。如若被遗传修饰，不同类型的异体细胞，自体细胞，或旁观者细胞可以表达 GM-CSF 或别的转基因。给药时异体细胞和其它细胞的比例随其联合而变化。

任何合适的途径都可以用来将异体细胞系导入病人，更可取的是，成分通过皮内，皮下或瘤内的途径施予。

实施本发明时使用异体细胞的治疗优势是：将遗传修饰的 GM-CSF 表达细胞系联合自体的癌抗原施予给病人，旁分泌产生 GM-CSF 导致对肿瘤的有效的免疫应答。这避免了为每个病人培养和转导自体的肿瘤细胞。

使用旁观者细胞的

在一个进一步的方面，本发明提供了遗传修饰的至少表达一种转基因的通用的调节免疫的旁观者细胞。同一个通用的旁观者细胞系可以表达多种转基因或一种转基因可以被不同的通用的旁观者细胞系表达。通用的旁观者细胞系包含的细胞或者自然地缺失主要组织相容性复合体 I(MHC-I) 抗原和主要组织相容性复合体 II(MHC-II) 抗原，或被修饰因而缺失 MHC-I 和 MHC-II 抗原。在发明的一个方面，通用的旁观者细胞系通过导入一个包含编码转基因(如细胞因子 GM-CSF)的核酸序列的载体被修饰，其中 GM-CSF 的核酸序列被有效连接到一个其表达所必需的启动子和表达控制序列。在另一个方面，同一个或另一个旁观者细胞系通过导入一个包含编码至少一个另外的转基因的核酸序列的载体被修饰，其中至少一个另外的转基因的核酸序列被有效连接到一个其表达所必需的启动子和表达控制序列。编码转基因的核酸序列可以通过相同或不同的自体被导入相同或不同的旁观者细胞系。编码转基因的核酸序列可以也可以不进一步包含一个有效连接到一个启动子上的筛选标记序列。任何刺激抗肿瘤免疫应答的转基因

因的联合在本发明的实施中都是有效用的。通用的旁观者细胞系更适宜在明确规定的即无血清的培养基中生长和悬浮。

一个首选的通用的旁观者细胞系范例是 K562(ATCC CCL-243; Lozzio et al., Blood 45(3): 321-334 (1975); Klein et al., Int. J. Cancer 18: 421-431 (1976))。生产人类旁观者细胞系的详细记述参见例如美国专利 No. 6,464,973。

值得要的是，通用的旁观者细胞系高水平地表达转基因例如细胞因子 GM-CSF。

在本发明的实施中，一个或多个通用的旁观者细胞系与自体的癌抗原(例如，由同时包含通用的旁观者细胞系成分的自体肿瘤细胞提供)孵育，然后该通用的旁观者细胞系被施予给病人。任何合适的途径都可以用来将通用的旁观者细胞系导入病人，更可取的是，成分通过皮内，皮下或瘤内的途径施予。

通常的，自体的癌抗原由被治疗的癌症的细胞提供，即自体的癌细胞。在这种情况下，成分通过辐射处理而增殖无能力，其中的旁观者细胞和癌细胞被铺在一个组织培养板上，在室温下用铯放射源辐射处理，这在前文中有详细记述。

在特定的给药中，旁观者细胞与自体癌细胞的比例随联合而变化。对于产生 GM-CSF 的旁观者细胞，在特定的给药中，旁观者细胞与自体癌细胞的比例应为有效治疗水平的 GM-CSF 得以产生。除了 GM-CSF 的下限之外，旁观者细胞与自体癌细胞的比例部应高于 1:1。恰当的旁观者细胞与肿瘤细胞或肿瘤抗原的比例可以通过所属领域中或普遍认可的方法来确定。

实施本发明时使用旁观者细胞的治疗优势是：通过施予给癌症病人细胞因子表达的旁观者细胞系和至少一个另外的癌症治疗药剂(由相同或不同的细胞表达)，以及自体的癌抗原，旁分泌产生的免疫调节细胞因子，产生对肿瘤的有效的免疫应答。这避免了为每个病人培养和转导自体的肿瘤细胞。

通常最低 3500rads 的辐射剂量就足以使细胞失活并使其增殖无能力, 尽管高至 30,000rads 的剂量也是可以接受的。在一个实施例中, 在施予给哺乳动物之前, 细胞用辐射处理的剂量是大约 50-200rads/min, 或大约 120-140 rads/min。通常的, 当用辐射处理时, 需要的水平是 2,500rads, 5,000 rads, 10,000 rads, 15,000 rads 或 20,000 rads。在一个实施例中, 15,000 rads 的剂量被用来使细胞失活并使其增殖无能力。不言而喻, 辐射只是使细胞增殖无能力的一个方法, 并且本发明还包含其它的导致细胞不能多次分裂但仍保持着表达转基因(如细胞因子)的能力的失活方法(例如, 用丝裂霉素 C, 放线菌酮和概念上的同功试剂处理, 或导入自杀基因)。

细胞因子

“细胞因子”或语法上的同义词, 包括但不限于, 局部作用但并不在血液中循环的激素, 并且按照本发明使用时, 会导致个体免疫应答的改变。同时包括细胞因子的定义中的还有能够导致个体免疫应答的改变黏附分子, 辅助分子。因此, 细胞因子的例子包括但不限于, IL-1(一个或多个), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, GM-CSF, G-CSF, LIF, LT, TGF-P, γ -IFN, α -IFN, P-IFN, TNF- α , BCGF, CD2, 或 ICAM。关于所述的细胞因子及其它适用的免疫调节试剂可以参见“Cytokine and Cytokine Receptors” A. S. Hamblin, D. Male (ed.), Oxford University Press, New York, NY (1993), 或“Guidebook to Cytokine and Their Receptors” N. A. Nicola (ed.), Oxford University Press, New York, NY (1995)。当仔细考虑治疗应用在人体的哪个部位时, 细胞因子最好与人类的这个蛋白十分相似, 或源自人类序列(即人源的)。在一个较佳实施例中, 转基因是一个细胞因子, 例如 GM-CSF。

另外, 与特定的人类细胞因子结构高度同源的和/或氨基酸序列一致的其它哺乳动物的细胞因子, 若对人类免疫系统展示出相似的活性, 则在本发明中是有用的。同样的, 与某一特定的细胞因子高度同功的, 但蛋白

序列保守地变化的蛋白，则在本发明中也是有用的。因此，蛋白序列中的保守的替换可能不会扰乱蛋白分子的功能，并且因此在本发明中，蛋白可以被处理成功能与细胞因子一样，但氨基酸序列却与目前已知的序列稍有不同。这类保守的替换一般包括如下的替换：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸；天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺；丝氨酸、苏氨酸；赖氨酸、精氨酸；以及苯丙氨酸、酪氨酸。

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)是成纤维细胞、内皮细胞、T 细胞和巨噬细胞产生的细胞因子。该细胞因子已被证实能够诱导粒细胞和巨噬细胞系的造血细胞的生长。此外，它还激活免疫系统中的主要抗原呈递细胞(APC)的树突状细胞的抗原加工和呈递功能。动物模型试验的结果令人信服地证实，与没有转导的亲代细胞相比，产生 GM-CSF 的细胞(即 GVAX®)能够引起免疫应答。

GM-CSF 增强了能够激起强烈的抗肿瘤应答的树突状细胞亚群的抗原呈递能力(Gasson et al. Blood 1991 Mar 15; 77(6): 1131-45; Mach et al. Cancer Res. 2000 Jun 15;60(12): 3239-46; reviewed in Mach and Dranoff, Curr Opin Immunol. 2000 Oct; 12(5):571-5)。参见，如 Boon and Old, Curr Opin Immunol. 1997 Oct 1;9(5):681-3)。在引流区淋巴结，肿瘤抗原表位呈递到 T 细胞被认为会导致对肿瘤转移的系统免疫应答。此外，辐射处理的 GM-CSF 表达肿瘤细胞被证明是对肿瘤攻击的有效疫苗(在后文的标题为“GVAX®”的部分有进一步的阐述)。已经有发现，由遗传修饰的细胞递送的局部高浓度的某些细胞因子，能够导致肿瘤消退(Abe et al., J. Canc. Res. Clin. Oncol. 121:587-592(1995); Gansbacher et al., Cancer Res. 50:7820-7825 (1990); Forni et al., Cancer and Met. Reviews 7:289-309(1988))。PCT 出版物 WO200072686 中记述了表达各种细胞因子的肿瘤细胞。

在本发明的一个实施例中，细胞疫苗包含一段 GM-CSF 的编码序列，并且该序列有效连接到用于在疫苗细胞中表达的调控元件。GM-CSF 的编码序列可以是鼠源的或人源的 GM-CSF，并且形式可以是基因组 DNA(SEQ ID NO: 1)或 cDNA(SEQ ID NO: 2)。对于 cDNA，GM-CSF 的

编码序列并不含有需要在翻译之前剪接的内含子序列。相反，对于基因组 GM-CSF，编码序列包含至少一个需要在翻译之前剪接的天然的 GM-CSF 内含子。在一个实施例中，GM-CSF 编码序列编码 SEQ ID NO: 3。GM-CSF 编码序列的其它例子在 Genbank 中的登录号是：AF373868、AC034228、AC034216、M10663 和 NM000758。

依照本发明，GM-CSF 编码序列是可以在严格条件下跟 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 序列杂交的全长的互补序列。词语“与之杂交的”指当序列是一个在复杂的混和体(如全细胞)中的 DNA 或 RNA 时，一个分子与这个特定的核酸序列结合，成为双链，杂交。“显著结合”指一个探针核酸与目标核酸的互补杂交，并且能够对于包含的较小的错误配对能够通过降低杂交介质的严格性来适应，以期检测到目标核酸序列。

由此得出结论，依照本发明，细胞因子如 GM-CSF 的编码序列的全长与天然的 GM-CSF 编码序列相比，有着至少 80，85，87，90，91，92，93，94，95，96，97，98，99%或更高百分比的相似性。例如，当与对应的最大量比较和比对，并且序列比较算法(如前文所述)测量或用视觉检测时，依照本发明，GM-CSF 编码序列与序列如 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 有着至少 80，85，87，90，91，92，93，94，95，96，97，98，99%或更高的相似性。在一个实施例中，特定百分比的序列相似性存在于长度至少是大约 50 个核苷酸的序列的一个区域。在另一个实施例中，特定百分比的序列相似性存在于长度至少是大约 100 个核苷酸的一个区域。在另一个实施例中，特定百分比的序列相似性存在于长度至少是大约 200 个核苷酸的一个区域。在另一个实施例中，特定百分比的序列相似性存在于序列的全长。

另外，依照本发明，当与对应的最大量比较和比对时，细胞因子如 GM-CSF 氨基酸序列与序列如 SEQ ID NO: 3 有着至少 80，85，87，90，91，92，93，94，95，96，97，98，99%或更高的相似性。

在一个实施例中，随便被改变(遗传修饰)以提高与针对前列腺癌的免疫应答关联的抗原(如 β -细丝蛋白)的表达，并且被进一步改变以提高针对

前列腺癌的免疫应答的一个或多个蛋白例如细胞因子如 GM-CSF 的表达，或与进一步改变以提高针对前列腺癌的免疫应答的一个或多个蛋白例如细胞因子如 GM-CSF 的表达的不同的细胞联合给药。

β-细丝蛋白

本发明的一个实施例是一种治疗前列腺癌的方法，所用方式导致了针对抗原如 β-细丝蛋白的增强的免疫应答，其中增强的免疫应答与目标的改善的治疗效果是关联的，例如，病人血清中 PSA 的降低，癌症引起的疼痛的降低或依照临床上可接受的标准病人状况的改善，包括但不限于转移的减少，预期寿命的增加或生命质量的改进。β-细丝蛋白可以由病人的天然的细胞内源性表达或可以由提供给目标(病人)细胞外源性表达。

哺乳动物有三种细丝蛋白基因，Filamin-A，Filamin-B(β-Filamin; Filamin-3)和 Filamin-C。人类的细丝蛋白是 N 末端为结合肌动蛋白的结构域并且其后是 24 个典型的重复。它们还与一些其它的细胞蛋白相互作用。细丝蛋白经常与其它细丝蛋白形成大约 560KDA 的同形或异形二聚体。β-Filamin 还被认为是 ABP-278/276(Xu et al. 1998 Blood 92:1268-1276)。参见，例如，Takafuta et al. 1998 J Biol Chem 273:17531-17538; Flier et al., J. Cell Biol., 156(2)361-376, 2002。β-Filamin 蛋白序列的 2620 个氨基酸可以查找 Genbank 登录号 NP_001448。Filamin-B 和 Filamin-A 的表达模式参见 Sheen et al., Human Mol. Gen. 11(23)2845-2854, 2002 中记述的例子。Leedman et al., Prol Natl Acad Sci U S A. 90(13):5994-8, 1993 中记述了一个涉及结合肌动蛋白的蛋白，之后命名为 β-Filamin。

在依照本发明的一个实施例中，与针对前列腺癌的免疫应答关联的抗原(如 β-Filamin)的编码序列，其全长的互补序列在严格条件下能够与 SEQ ID NO: 4 的序列杂交。词语“与之杂交的”指当序列是一个在复杂的混和体(如全细胞)中的 DNA 或 RNA 时，一个分子与这个特定的核酸序列结合，成为双链，杂交。“显著结合”指一个探针核酸与目标核酸的互补杂

交，并且能够对于包含的较小的错误配对能够通过降低杂交介质的严格性来适应，以期检测到目标核酸序列。

由此得出结论，依照本发明，与针对前列腺癌的免疫应答关联的抗原(如 β -Filamin)的编码序列的全长与其天然的编码序列相比，有着至少 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%或更高百分比的相似性。例如，当与对应的最大量比较和比对，并且序列比较算法(如前文所述)测量或用视觉检测时，依照本发明， β -Filamin 编码序列与序列如 SEQ ID NO: 4 有着至少 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%或更高的序列相似性。在一个实施例中，特定百分比的序列相似性存在于长度至少是大约 50 个核苷酸的序列的一个区域。在另一个实施例中，特定百分比的序列相似性存在于长度至少是大约 100 个核苷酸的一个区域。在另一个实施例中，特定百分比的序列相似性存在于长度至少是大约 200 个核苷酸的一个区域。在另一个实施例中，特定百分比的序列相似性存在于序列的全长。

另外，依照本发明，当与对应的最大量比较和比对时，与针对前列腺癌的免疫应答关联的抗原(如 β -Filamin)氨基酸序列与序列如 SEQ ID NO: 5 有着至少 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%或更高的序列相似性。

在本发明的实施中，在施予给病人细胞因子表达细胞疫苗如 GM-CSF 表达肿瘤细胞(如 GVAX®)之后，针对 β -Filamin 的免疫应答得到增强。

在本发明的一个实施例中，一组表达 β -Filamin 的细胞被作为细胞疫苗的一部分施予给病人。表达 β -Filamin 的细胞与细胞因子(如 GM-CSF)表达细胞可以相同或不同。在本发明的另一个实施例中，细胞疫苗包含纯化的 β -Filamin 蛋白或其免疫原性片段。该细胞疫苗可以进一步包含免疫增强剂(例如细胞因子如 GM-CSF，起辅助或类似的作用)。在本发明的实施中，全长的 β -Filamin 可以作为抗原。不管用何种方法，当施予给目标 β -Filamin 的片段或在缺少外源提供的 β -Filamin 的同时施予细胞

疫苗, 如 GVAX®, 所属领域中的技术人员将会意识到针对 β -Filamin 的免疫应答的检测是显著的。 β -Filamin 的片段可以包含全长氨基酸序列线性片段或等价剪接变异体、缺失突变体或其它突变体。为了在本发明中使用, β -Filamin 的片段应该是免疫原性片段, 即能够引发免疫应答。

细胞可以通过所属领域中的技术人员熟知的各种方法来提高 β -Filamin 的表达。例如, 细胞可以导入一个有效连接到 β -Filamin 编码序列上的编码 β -Filamin 的载体。所属领域中的技术人员熟知可以利用的合适的启动子。任何能有效提高 β -Filamin 表达的载体都可以用于导入细胞。在一个实施例中, 载体可以是病毒载体, 例如, 逆转录病毒载体如慢病毒载体, 腺病毒载体或腺相关病毒载体。用于导入细胞的载体可以是能够提高针对目标癌症的免疫应答的编码区域, 例如, 细胞因子如 GM-CSF。在导入相同或不同的细胞时, 该编码区域和 β -Filamin 编码区域可以在同一个或不同的载体上。若在不同的载体上, 这些不同的载体可以是相同或不同的起始点(例如逆转录病毒)。在一个实施例中, 细胞先是被导入一个编码 β -Filamin 的载体之后被导入一个编码 GM-CSF 的载体。在另一个实施例中, 细胞先是被导入一个编码至少一个能够增强针对前列腺癌的免疫应答的蛋白的载体, 之后被导入一个编码 β -Filamin 的载体。

在本发明的一个实施例中, 载体中编码 β -Filamin 的序列是一个天然的序列(Genbank NM_001457; SEQ ID NO: 4)或重新编码的序列。一个重新编码的基因指被用如下方式改变的编码序列: 核酸序列编码的多肽保持与没有改变的序列一致, 但是编码多肽的核酸序列改变了。在所属领域中众所周知, 由于遗传密码的简并性, 存在能够编码同一氨基酸翻译产物的多种 DNA 和 RNA 密码子。更进一步讲, 同样众所周知的是不同的生物体在合成氨基酸序列时对于使用特定的密码子有不同的优先选择。因此, 在本发明的一个实施例中, 载体包含了一段经过用在人体中优先选的择密码子重新编码的 β -Filamin 编码序列。 β -Filamin 的等价剪接形式参见 Genbank 登录号 AF353666 和 AF353667 以及 Van der Flier 等人(的文章)。

本发明的另一个实施例是提高对肿瘤细胞和/或 β -Filamin 的免疫应答的方法, 包括: 将本发明中的遗传修饰的细胞因子表达细胞施予给患前列腺癌的病人, 其中产生了改善的治疗效果。本发明的另一个实施例是提高对肿瘤细胞和/或 β -Filamin 的免疫应答的方法, 包括: 将显示出提高 β -Filamin 表达的遗传修饰的细胞因子表达细胞施予给患前列腺癌的病人, 其中在所述的给药之后, 病人的针对前列腺癌的免疫应答增强了。另外本发明的另一个实施例是提高对肿瘤细胞和/或 β -Filamin 的免疫应答的方法, 包括: 将显示出提高 GM-CSF 表达的遗传修饰的细胞因子表达细胞施予给患前列腺癌的病人, 其中在所述的给药之后, 病人的针对前列腺癌的免疫应答增强了。在一个实施例中, 增强的是体液免疫应答。另外在另一个实施例中, 增强的是细胞免疫应答。还是在另一个实施例中, 增强的是细胞和体液的免疫应答。在本发明的一个较佳方面, 在施予遗传修饰的细胞因子表达细胞之后, 前列腺癌细胞的生长被抑制。

用于确定是否细胞表达了可检测水平的 β -Filamin 和/或在施予细胞因子表达细胞疫苗后对 β -Filamin 的免疫应答是否改变的检测方法包括, 但不限于, 酶联接免疫吸附剂测定, 免疫印迹法, 免疫荧光法(IFA), 流式细胞技术或电化学发光技术(ECL)。

用于用作癌症疫苗的细胞的遗传修饰

在此, 本发明的方法和成分通过特定的载体系统来详细举例, 另一方面, 所属领域中的技术人员将很容易认识到, 在前列腺癌治疗中使用的相同的方法和成分, 独立于基因载体系统。

本发明仔细考虑使用将转基因如 GM-CSF 和 β -Filamin 导入哺乳动物细胞的任何载体。典型的载体包括但不限于, 病毒和非病毒载体, 例如逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒(Ad)载体及其增殖型、复制缺陷型和空壳型、腺相关病毒(AAV)载体、猿猴空泡病毒(SV40)载体、牛乳头瘤病毒载体、人疱疹病毒第四型病毒载体、单纯疱疹病毒载体、痘苗病毒载体、小鼠白血病病毒载体、哈维氏鼠科肉瘤病毒载体、鼠类乳腺肿瘤病毒载体、

劳斯肉瘤病毒载体以及非病毒质粒载体。在一个优先选择的方法中，载体是病毒载体。病毒能够有效转导细胞并将它们的自体 DNA 导入宿主细胞。在产生重组病毒载体时，非必需基因被一个异源(或非天然)蛋白的基因或编码序列取代。

在构建病毒载体时，非必需基因被编码一个或多个治疗用的化合物或因子的基因取代。通常的，载体包含一个复制起点，并且可以也可以不包含一个用于载体识别和筛选的“标记物”或“筛选标记”。当使用任何一种筛选标记时，在这种表达载体中的筛选标记通常为所属领域中的技术人员所熟知，并且适当的筛选标记的选择取决于宿主细胞。筛选标记的基因编码的蛋白赋予对抗生素和毒素包括氨苄青霉素、氨甲蝶呤、四环素、新霉素(Southern et al., J., J Mol Appl Genet. 1982;1(4):327-41(1982))、霉酚酸(Mulligan et al., Science 209:1422-7(1980))，嘌呤霉素、zeomycin，潮霉素(Sugden et al., Mol Cell Biol. 5(2):410-3 (1985))或 G418 的抗性。

腺病毒基因治疗载体以其在体外展示出的强烈表达和出色的滴定度，以及在体外转染分裂和非分裂细胞的能力而众所周知(Hitt et al., Adv in virus Res 55:479-505 (2000))。由于载体骨架引起的免疫应答，体内使用这些载体时，导致强烈的然而瞬时的基因表达。本发明中使用的重组腺病毒载体包含：(1)使载体被并入复制缺陷的腺病毒病毒体的包装位点；(2)治疗用化合物的编码序列。其它必需的或有用的被并入感染性的病毒体的元件，包括 5'和 3'端的腺病毒末端反向重复序列(ITRs)，E2 和 E3 基因，等等。

本发明中包含重组腺病毒载体的复制缺陷的腺病毒病毒体是使用腺病毒包装细胞和包装技术的所属领域熟知的标准技术制作的。这些方法的示例可以参见美国专利 No. 5,872,005，在此结合整体引用。一个治疗的编码化合物的基因通常插入到腺病毒的病毒基因组中 E1A，E1B 或 E3 被删除的区域。实施本发明时优先选择的载体不表达一个或多个野生型的腺病毒基因产物，例如，E1a，E2b，E2，E3，E4。较佳的实施例是通常与补足 E1，E2A，E4 和 E3(任选的)区域的功能的包装细胞联合使用的病毒体。

参见，例如，美国专利 No. 5,872,005, No.5,994,106, No.6,133,028 和 No.6,127,175。腺病毒载体的纯化和构建使用所属领域中熟知的标准技术。重组的 AAV 载体的特征是它们能够在目标细胞中指导被选择的转基因产物的表达和产生。因此，包含至少所有衣壳化和感染目标细胞的物理结构必不可少的序列。

实施本发明使用的重组 AAV(rAAV)病毒体可以用所属领域中的技术人员熟知的标准技术生产，并且其构建包括，有效连接的指导转录的组件，治疗用化合物或其生物活性片段的编码序列。这些组件通过有功能的 AAV ITR 序列结合到 5'和 3'端。通过“有功能的 AAV ITR 序列”指 ITR 序列的功能用于拯救，复制和包装 AAV 病毒体。因此，本发明中的载体所使用的 AAV ITR 不必有一个野生型的核苷酸序列，并且可以通过核苷酸的插入，删除或替换来改变或 AAV ITR 可以来自几个血清型 AAV 中的任何一个。一个 AAV 载体是来自血清型腺相关病毒的载体，包括但不限于，AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8，等等。首选的 AAV 载体的野生型的 REP 和 CAP 基因全部或部分被删除，但有功能的 ITR 侧翼序列。表 1 举例说明基因转移中使用的 AAV 血清型。

表 1 基因转移中使用的 AAV 血清型

血清型	来源	基因组大小	与 AAV2 的同源性	在人群中的免疫性
AAV-1	人类标本	4718	NT: 80% AA: 83%	NAB: 20%
AAV-2	人类堕胎组织羊水	4681	NT: 100% AA: 100%	NAB: 27-53%
AAV-3	人类腺病毒标本	4726	NT: 82% AA: 88%	与 AAV2 NAB 交互作用
AAV-4	非洲绿猴	4774	NT: 66% AA: 60%	未知

AAV-5	人类生殖机能障碍	4625	NT: 65% AA: 56%	ELISA: 45% NAB: 0%
AAV-6	实验室分离	4683	NT: 80% AA: 83%	20%
AAV-7	分离自恒河猴心脏 DNA	4721	NT: 78% AA: 82%	NAB: <1:20 (~5%)
AAV-8	分离自恒河猴心脏 DNA	4393	NT: 79% AA: 83%	NAB: <1:20 (~5%)

通常的, AAV 表达载体被导入生产细胞, 之后导入一个 AAV 辅助建构, 该 AAV 辅助建构包含能够在生产细胞中被表达和补足 AAV 载体中 AAV 辅助功能缺失的 AAV 编码区。辅助建构可以被设计用来下调大 REP 蛋白(REP78 和 REP68)的表达, 通常通过突变起始密码子后的第五个点从 ATG 变为 ACG, 参见美国专利 No. 6,548,286。之后将辅助病毒和/或另外的载体导入生产细胞, 其中辅助病毒和/或另外的载体起能够支持 rAAV 病毒产生的辅助功能。这些步骤按照标准方法实施。本发明中复制缺陷的 AAV 病毒体包装重组的 AAV 载体是通过 AAV 包装细胞和包装技术领域熟知的标准技术完成的。这些方法的示例可以参见, 例如美国专利 Nos. 5,436,146; 5,753,500; 6,040,183; 6,093,570 和 6,548,286。包装 AAV 的进一步的成分和方法参见 Wang et al. (US 2002/0168342), 并且这些技术在所属领域技术人员的知识范围之内。

目前已知的 AAV 的血清型有很多种, 尽管如此, 在今天还有新的血清型及其变异体被发现, 这在本发明的考虑范围之内。参见 Gao et al (2002), PNAS 99(18):11854-6; Gao et al (2003), PNAS 100(10): 6081-6; Bossis and Chiorini (2003), J. Virol. 77(12): 6799-810。不同的 AAV 血清型被用来优化特定目标细胞或特定目标组织(如脑)范围内的特定的目标细胞的转导。不同 AAV 血清型的使用可以有助于恶性组织的针对性。AAV 的血清型 1, 2, 4, 5 和 6 已被证明能够导入脑组织。参见, 例如,

Davidson et al (2000), PNAS 97(7)3428-32; Passini et al (2003), J. Virol 77(12): 7034-40。特定的 AAV 血清型可以在目标组织或细胞内更有效的针对和复制。为了提高转导效率和产生更快起始的转基因的表达,在本发明的实施中使用了一个单独的自身互补的 AAV 载体(McCarty et al., Gene Ther. 2001 Aug; 8(16): 1248-54)。

在本发明的实施中用来产生 rAAV 病毒体的宿主细胞包括哺乳动物细胞,昆虫细胞,微生物和酵母。宿主细胞可以是 AAV REP 和 CAP 在宿主细胞或等价宿主细胞内稳定保持的包装细胞,宿主细胞或等价宿主细胞可以是 AAV 载体基因组稳定保持的生产细胞。典型的包装和生产细胞来自 293, A549 或 HeLa 细胞。AAV 载体的纯化和构建使用所属领域中熟知的标准技术。

逆转录病毒是基因转移的常用工具(Miller, 1992, Nature 357: 455-460)。在本发明的实施中可以使用逆转录病毒尤其是慢病毒。逆转录病毒已被证实和发现是将各种目标基因稳定导入很多类目标细胞的基因组 DNA 的适宜的运载工具。由于将未经重排的单拷贝的转基因转移到细胞中的能力,逆转录病毒适用于将基因转移至细胞。更进一步地,逆转录病毒通过逆转录病毒包膜糖蛋白与宿主细胞表面的特异受体的结合进入宿主细胞。因此,在本发明的实施中也会使用到被编码的天然的包膜蛋白被异源的包膜蛋白取代的有着与天然包膜蛋白不同的细胞特异性(例如,与天然的包膜蛋白相比,结合到不同的细胞表面受体)的假型逆转录病毒载体。在基因治疗的应用中,指导将编码转基因的逆转录病毒载体转移到特定类型的目标细胞的能力是十分需要的。

本发明提供的逆转录病毒载体包括例如,含有一个或多个转基因序列的逆转录转移载体和包含一个或多个包装元件的逆转录病毒包装载体。特别的,本发明提供了用于产生假型逆转录病毒的编码一个异源的或功能被修饰的包膜蛋白的假型逆转录病毒载体。

本发明中逆转录病毒的核心序列可以容易地得自各种各样的逆转录病毒,包括例如 B, C, 和 D 型逆转录病毒以及泡沫病毒和慢病毒(参见

RNA Tumor Virus, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985)。

本发明的成分和方法适用的逆转录病毒的范例包括,但不限于,慢病毒。本发明的成分和方法适用的其它逆转录病毒包括,但不限于,禽类白血病病毒,牛白血病病毒,小鼠白血病病毒,水貂细胞病灶形成病毒,小鼠肉瘤病毒,禽网状内皮组织增生症病毒和劳斯病毒。特别有先选择的小鼠白血病病毒包括 4070A 和 1504A (Hartley and Rowe, J. Virol. 19: 19-25, 1976), Abelson (ATCC No. VR-999), Friend (ATCC No. VR-245), Graffi, Gross (ATCC No. VR-590), Kirsten, Harvey Saccoma Virus and Rauscher (ATCC no. VR-993), 和 Moloney Murine Leukemia Virus (ATCC No. VR-190)。这些逆转录病毒可以很容易从储藏和收集例如美国模式菌种收集中心(“ATCC”; Rockville, Md)获得,或用常规可行的技术从已知的来源中分离。

本发明的逆转录病毒载体序列优先取自慢病毒。优先选择的慢病毒是人类免疫缺陷病毒,例如,1型和2型(即 HIV-1 或 HIV-2, 其中 HIV-1 以前被称为淋巴腺病综合征相关病毒 3(HTLV-III)和艾滋病(AIDS)相关逆转录病毒(ARV)),或其它已发现的与艾滋病及其类似病症相关的 HIV-1 或 HIV-2 相关的病毒。其它的慢病毒载体包括,绵羊脱髓鞘脑白质炎病毒,猫免疫缺陷病毒(FIV),牛慢病毒,猴免疫缺陷病毒(SIV),马传染性贫血病毒(ELAV),和山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)。

在适和在本发明的成分和方法中使用的各种种类和品系的逆转录病毒在所属领域中众所周知(参见,例如,Fields Virology, Third Edition, edited by B.N. Fields et al., Lippincott-Raven Publishers (1996); Chapter 58, Retroviridae: The Viruses and Their Replication, Classification, pages 1768-1771,), 包括表 1, 结合在此的参考书目。

本发明提供用于产生能够产生逆转录病毒的生产者细胞和生产者细胞系的逆转录病毒包装系统,以及制作此类包装系统的方法。相应的,本发明还提供通过将逆转录病毒转移载体导入此类包装系统(例如,通过转

染或感染)产生的生产者细胞和细胞系,以及制作此类包装细胞和细胞系的方法。

在实施本发明中使用的逆转录病毒包装系统至少包含两种包装载体:包含一段含有 gag, pol 或 gag 和 pol 的基因的一条核酸序列的第一个包装载体;和包含一段含有异源的或功能修饰的包膜蛋白基因的另外一条核酸序列的第二个包装载体。在一个较佳的实施例中,逆转录病毒元件来自慢病毒,例如 HIV。优先地,载体缺失一个功能基因 tat 和/或功能辅助基因(vif, vpr, vpu, vpx, nef)。在另一个较佳实施例中,系统进一步包含一个含有 rev 基因的核苷酸序列的第三个包装载体。包装系统可以以含有第一,第二,和第三(任选的)的核苷酸序列的包装细胞的形式提供。

本发明适用于多种逆转录病毒系统,并且所属领域中的技术人员会意识到不同种群逆转录病毒所共用的共同元件。在此的记述将慢病毒系统作为一个有代表性的范例。不管用何种方法,所有逆转录病毒的共同特征是:包膜的病毒体有表面突起,含有一条线性正义单链的 RNA 分子,又二聚体构成的基因组,以及共同的蛋白 gag, pol 和 env。

慢病毒具有共同的病毒体结构蛋白,包括 env 基因编码的包膜糖蛋白 SU(gp120)和 TM(gp41); gag 基因编码的 CA(p24), MA(p17)和 NC(p7-11);以及 pol 基因编码的 RT, PR 和 IN。HIV-1 和 HIV-2 包含涉及病毒 RNA 的合成和加工以及其它复制功能的调节的辅助蛋白和其它蛋白。vif, vpr, vpu/vpx 编码的辅助蛋白在重组系统中可以被忽略(或失活)。另外,通过突变或删除, tat 和 rev 基因可以被忽略或失活。

第一代慢病毒载体包装系统提供了 gag/pol 和 env 基因的包装建构,并且处于安全考虑,一般都利用了异源的或功能修饰的包膜蛋白。在第二代慢病毒载体系统中,辅助基因 vif, vpr, vpu 和 nef 被删除或失活。第三代慢病毒载体系统中 tat 基因已经被删除或失活(例如,通过突变)。

正常情况下由 tat 提供的转录调节的代偿作用可以通过使用重组的强启动子,如人巨细胞病毒立早增强子/启动子提供。其它的启动子/增强子可以根据重组启动子的活力,目标组织的特异性(例如,肝脏特异的启动

子)或所属领域熟悉的表达控制的需要有关的其它因子来选择。例如。在一些实施例中,需要使用可诱导的启动子如 tet 来实现对表达的控制。编码 rev 的基因优先用单独的表达建构提供,因此典型的第三代慢病毒载体系统会涉及四个质粒:用于 gagpol, rev, envelope 各一个以及转移载体。不管使用哪一代的包装系统, gap 和 pol 可以用同一个或分离的建构提供。

通常的,包装载体包含在包装细胞中,并且通过转染,转导或感染被导入细胞。用于转染,转导或感染的方法为所属领域中的技术人员所熟知。本发明中的逆转录病毒载体可以通过转染,转导或感染被导入包装细胞系以产生生产者细胞或细胞系。本发明中的包装载体可以通过标准方法包括,例如,磷酸钙转染,脂质体转染或电穿孔导入人类细胞或细胞系。在一些实施例中,包装载体和显性的筛选标记如 neo, DHFR, 谷氨酰氨合成酶或 ADA 被共转染至细胞,之后用合适的药物筛选或分离克隆。筛选标记可以被物理地连接到包装载体编码的基因。众所周知,在稳定的细胞系中,其表现的配置的包装功能是由合适的包装细胞提供的。例如,参见美国专利 No. 5,686,279; 和 Ory et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1996)93:11400-11406, 其中记述了包装细胞。生产稳定细胞系的进一步记述参见 Dull et al., 1998, J. Virology 72(11): 8463-8471; 和 zfferey et al., 1998, J. Virology 72(12): 9873-9880; ; zfferey et al., 1997, Nature Biotechnology 15: 871-875, 其中讲述了一个 pol 3'端序列包括 HIV-1 包膜基因被删除的慢病毒包装质粒。建构包含 tat 和 rev 序列并且 3' LTR 被 poly A 序列取代。5' LTR 和 psi 序列被另一个启动子如可以诱导的启动子所取代。例如,可以使用 CMV 启动子或其衍生物。

目标包装载体可以包含包装功能的额外改变以提高慢病毒蛋白表达和提高安全性。例如,上调 gag 的所有 HIV 序列可以被移除。同样的,下调包膜蛋白的序列可以被移除。此外,为增强 RNA 的剪接和翻译,可以采取步骤来修饰载体。

任选的, 使用有条件的包装系统, 参见 Dull et al., 1998, J. Virology 72(11): 8463-8471 中的记述。同样地, 优先使用的是通过删除 HIV-1 长末端重复序列(LTR)以提高载体生物安全性的自我失活型载体(SIN), 参见 zfferey et al., 1998, J. Virology 72(12): 9873-9880 中的记述。还可使用可以诱导的载体, 例如通过一个 tet 诱导的 LTR。

调节元件

本发明中的基因治疗载体通常包含异源的控制序列, 包括, 但不限于, 重组的启动子, 可以诱导的启动子, 肿瘤选择性的启动子和增强子, 包括但不限于 E2F 启动子和端粒酶(hTERI)启动子; 细胞巨化病毒增强子/鸡, β -肌动蛋白/兔, β -球蛋白启动子(CAG 启动子; Niwa H. et al. 1991. Gene 108(2): 193-9); 延伸因子 1- α (EF1- α)启动子(Kim DW et al. 1990. Gene. 91(2): 217-23 和 Guo ZS et al. 1996. Gene Ther. 3(9): 802-10); 神经胶质特异性的启动子(例如胶质纤维酸性蛋白启动子)和神经元特异性的启动子(例如神经元特异性烯醇化酶启动子或突触蛋白启动子)。

在一些情形下, 可以使用例如巨细胞病毒(CMV)立早启动子, RSV LTR, MoMLV LTR, CAG 启动子, 磷酸甘油酸激酶-1 启动子(PKG)或 SV-40 启动子。本发明中的基因治疗载体还包括增强子和信号肽的编码序列。载体建构可以也可以不包含内含子。很显然, 本发明中的基因治疗载体可以包含然后数目的转基因, 转基因的联合以及转基因/调节元件的联合。

本发明的方法和成分

本发明提供了一种可以单独使用或与传统的治疗形式联合使用的治疗前列腺癌的另一途径。

本发明的一个实施例是一种由遗传修饰的细胞组成的癌症疫苗, 其中细胞通常细胞因子表达如 GM-CSF, 并且随着施予给患前列腺癌的病人, 可以检测到针对 β -Filamin 的增强的免疫应答。在另一个实施例中, 细胞与哺乳动物中的肿瘤细胞是同一类型。一般而言, 癌症疫苗由遗传修饰的肿瘤细胞组成, 尽管如此, 在实施本发明中非肿瘤细胞也是有用的。

细胞可以是在体外生长和维持的已建立的细胞系。本发明中使用的已建立的肿瘤细胞系包括，但不限于，PC-3 (ATCC#CRL-1435)、Hela (ATCC#CCL-2)、A549 (ATCC#CCL-185)、LNCaP (ATCC#CRL-1740)、H157 (ATCC#CRL-5802)或 H1359 细胞。在一个步骤中，遗传修饰的细胞来自目标分离出的细胞并且被导入引起细胞因子如 GM-CSF 表达的载体。然后遗传修饰的细胞作为癌症疫苗的一部分，施予给相同或不同的目标。不言而喻，子代细胞可能与亲代细胞完全一致(或者形态、基因型或表现型)。此外，细胞可以是未筛选的细胞组或特定的细胞克隆。例如细胞可以是遗传修饰的或筛选到的高水平细胞因子表达如 GM-CSF 或抗原如 β -Filamin。细胞一般是人类细胞，通常在施予给目标之前冷冻存储。通常细胞是增殖无能力的。在一个实施例中，细胞是已经建立在间接体内培养的原代前列腺癌肿瘤的后代。

前列腺癌的严重程度基于各种规律，其中一个为疾病阶段，示例如下：

阶段 1：肿瘤很小，完全在前列腺内，直肠检查时感觉正常。

阶段 2：肿瘤仍然在前列腺内，但在直肠检查时感觉到变大和肿块或硬的区域。

阶段 3：肿瘤已经扩展到覆盖前列腺，可能已经生长到膀胱颈部或输精管。

阶段 4：癌症已经扩散到身体的其它部分，其中前列腺癌最常见的扩散部位是骨骼。前列腺癌扩散到其它身体器官并不常见。

另一个评价前列腺癌疾病严重程度的标准是格里森分数，一个程度描述的不同方式。当进行活组织切片检查时，根据细胞外观，显示癌细胞的每个区域分级的数值范围是 1 分到 5 分，1 分是最低程度或看起来最正常，5 分是最高程度，看起来最不正常。格里森分数的产生基于最高分数细胞的两个区域的平均水平，将它们的分数加起来产生格里森分数。

分级/格里森分数只是给了医生一个前列腺癌发展和/或对治疗的反应的一个概念。

依照本发明，药物成分包含可以用于治疗病人任意阶段的前列腺癌的细胞因子表达腺细胞疫苗，并且在治疗病人的前列腺癌时，可以用在其它疗法的之后或之前或代替或联合其它疗法。例如，病人可能在之前或同时接受化疗，外照射放疗，和其它形式的免疫疗法/细胞疗法，如下文中的进一步描述。

前列腺癌的治疗方案变化多样并且包括众多选择，包括但不限于，一次或多次手术(即根治性前列腺切除术)；放疗(即外照射放疗或短距离放射治疗)；激素疗法，像“雄激素剥夺疗法”，例如施予抗雄激素物质；以及化疗。

在治疗前列腺癌中最经常使用的抗雄激素物质包括，但不限于：亮丙瑞林，一种用于治疗前列腺癌的可注射的人造激素。亮丙瑞林(Lupron)是促性腺激素释放激素的类似物，可以被安排用于治疗晚期的前列腺癌。亮丙瑞林可以与戈舍瑞林(Zoladex®)和康士德(比卡鲁胺)中的一种或两种联合使用。戈舍瑞林(Zoladex®)含有人造的黄体素释放激素(LHRH)的十肽类似物，同样以促性腺激素释放激素(GnRH)激动剂的类似物闻名。康士德(比卡鲁胺)是一种含有活性的比卡鲁胺成份的口服的类固醇抗雄激素物质。它通过阻断雄性激素如睾丸激素的效果起作用。

在治疗晚期前列腺癌中，氟他胺也被使用。它通过阻止在前列腺中睾丸激素与雄激素受体结合起作用。它还作用于脑部的下丘脑，最终导致身体产生的睾丸激素的数量的减少。在前列腺癌的治疗中，氟他胺与LHRH的类似物联合使用。LHRH类似物是前列腺癌的标准疗法之一，包括的药物有布舍瑞林，戈舍瑞林，亮丙瑞林和曲普瑞林。

治疗前列腺癌用到的另一个药物是尼鲁米特(Anandron®)，一个与雄激素受体(除了孕激素，雌激素，或糖皮质激素受体)有亲合力的类固醇抗雄激素物质。

依照美国临床肿瘤学会第38和第40届年会的结论，包含Texotere®(多西紫杉醇)，雌莫司汀(Emcyt®)和泼尼松的治疗方案对治疗激素难治性前列腺癌(HRPC)非常有效。

依照本发明，包含细胞因子表达细胞疫苗的药物成分可以与正在使用的前列腺癌疗法先后或同时联合施予给前列腺癌病人，参见前文中的一些举例。

目标的前列腺癌的病情监视的常用手段在所属领域中广为人知，并且与针对抗原的免疫应答的评价协同进行，依照本发明，随着细胞因子表达(如 GM-CSF)的细胞疫苗的施予，检测到增强的免疫应答。病人的监视可以采取多种方法如肿瘤重量，肿瘤体积，肿瘤细胞数量或肿瘤生长速率评价中的任意一种。可用于评价的参数包括但不限于，可及肿瘤的直接测量，肿瘤细胞计数(例如在血液中)，肿瘤抗原的测量(例如前列腺特异性抗原(PSA)，甲胎蛋白(AFP)，等等)，各种成像技术(例如核磁共振成像，断层扫描和 X-射线)，骨密度测定或骨转移评价。这些分析中获得的信息用于调整细胞疫苗的给药剂量和时间表，以期优化病人的反应和实现关于前列腺癌的改善的治疗效果。可以适当施予额外的剂量，通常以两周为基础，直至获得期望的效果。之后，追加的强化剂量和维持剂量的施予是必不可少的。在一个典型的治疗方案中，细胞因子表达(如 GM-CSF)的细胞疫苗通过皮内注射(置于皮下的下注射针头)到手臂，腿部或腹部。

本发明的一个方面包括，通过在首次施予前列腺癌病人细胞因子表达(如 GM-CSF)的细胞疫苗之前和首次给药之后各个时间点获取的血清样品检测针对 β -Filamin 的免疫应答的检测系统。然后比较每个时间点的结合 β -Filamin 的抗体数量。任何确定样品中结合 β -Filamin 的抗体的数量的检测系统可以用于分析血清中结合 β -Filamin 的抗体。用来分析血清中结合 β -Filamin 的抗体的检测系统包括，但不限于，酶联接免疫吸附剂测定，免疫印迹法，免疫荧光法(IFA)，流式细胞技术或电化学发光技术(ECL)。在一个实施例中，免疫印迹法使用 PC-3 细胞的细胞裂解液作为 β -Filamin 抗原的来源。

在本发明的实施中，针对 β -Filamin 的免疫应答的评价在首次施予前列腺癌病人细胞因子表达(如 GM-CSF)的细胞疫苗之前和首次给药之后各个时间点，使用抗原特异性细胞分析，增殖分析，细胞裂解分析，和使用

重组肿瘤相关抗原或抗原的免疫原性片段或多肽的延迟型超敏性检验。当前使用更多的测量增强的免疫应答的检测手段以测量 T 细胞的应答，例如迟发性超敏反应检验，使用主要组织相容性复合体多肽四聚体的流式细胞仪，淋巴细胞增殖试验，酶联免疫吸附测定，酶联免疫斑点法，细胞因子流式细胞仪，直接细胞毒杀试验，通过定量反转录聚合酶链反应测定细胞因子 mRNA，以及有限稀释法。参见，例如，Lyerly, HK, Semin Oncol. 2003 June; 30(3 Suppl 8):9-16。

本发明通过引用如下的实施例被描述，例子通过图解的方式提供，并且并不是意图以任何方式来限制本发明。使用的是所属领域中众所周知的标准技术和下文中明确描述的技术。

应了解，本发明中的方法和成分可以结合多个实施例，在此仅仅展示了一部分。对技术人员来说，很显然，存在其它的实施方式，这并不偏离本发明的主旨。因此，描述的实施例是说明性的而不应被认为是限制性的。

实施例

实施例 1：用于制备 GVAX®疫苗的重组病毒载体的产生

下文中的构建的编码细胞因子的病毒载体用于导入肿瘤细胞系或取自切除的人类肿瘤的原代细胞。

(1) 逆转录病毒载体

逆转录病毒载体的构建使用了所属领域熟知的标准的连接和限制性酶切技术。使用了含有编码一个或多个目标细胞因子的基因的多种逆转录病毒。MFG 载体的描述参见美国专利 No.6,544,771 和 No.5,637,483。它们还通过下文中对编码细胞因子的基因的结合和表达的详细引用被描述。此外，ATCC 储藏有数种 MFG 载体：未被修饰的 MFG 载体储藏在 ATCC 的登录号是 No. 68754；有 VIII 因子插入的 MFG 载体储藏在 ATCC 的登录号是 No. 68726；有 tPA 插入的 MFG 载体储藏在 ATCC 的登录号是 No. 68727。MFG 载体与下文和专利 No.6,544,771 和 No.5,637,483 中描述的

pEm 载体相似, 但是为了增强重组基因组在包装细胞系中的衣壳化, 含有用于莫洛尼小鼠白血病病毒的 gag 序列的 1038 个碱基对, 以及来自包含剪切受体序列的 MOV-9 的 350 个碱基对。一个包含 Nco I 和 Bam HI 酶切位点的 18 个碱基对的寡聚核苷酸直接依照 MOV-9 的序列, 并且容许带有兼容酶切位点的基因的便捷插入。基因的编码区被连接到 MFG 载体骨架的 Nco I 和 Bam HI 酶切位点之间。担氨酸的起始密码子 ATG 被亚克隆至框架的 Nco I 和 Bam HI 酶切位点之间, 即便要包括终止密码子之外的序列, 也是为了避免使产物不稳定和引入保护位点。结果, 插入的 ATG 出现在载体的野生型病毒的 ATG 出现的位点。因此, 这个接合与莫洛尼小鼠白血病病毒中的出现的实质上一样, 并且接合后的病毒运转良好。莫洛尼小鼠白血病病毒的 LTR 控制转录和产生包含天然 gag 转录本的原来的 5'端非翻译区和紧随其后的插入基因的阅读框的 mRNA。在此载体中, 莫洛尼小鼠白血病病毒(Mo-MuLV)的长末端重复序列被用来产生病毒的全长 RNA(以便衣壳化产生病毒颗粒), 和负责插入基因表达的亚基因组 mRNA(与 Mo-MuLV 的 env mRNA 相似)。载体在病毒的 gag 区域保持的两段序列用于提高病毒 RNA 的衣壳化和提供 env mRNA 产生所必需的正常的 5'和 3'剪切位点。所有的寡核苷酸的连接点用双脱氧终止法和 T7 DNA 聚合酶测序。由于没有含有一个显性的筛选标记(尽管可以任意的插入一个), 病毒是无标记的, 并且, 由于高水平的转导效率和载体结构的固有表达, MFG 衍生物的一般不涉及或需要一个筛选的步骤。

构建的 MFG 载体包含以下蛋白的基因: 小鼠的 IL-2, GM-CSF, IL-4, IL-5, gamma-IFN, IL-6, ICAM, CD2, TNF-alpha 和 IL-1-RA(白细胞介素-1受体拮抗剂)。另外, 利用可以公开得到的序列信息, 构建了编码人类 TNF-alpha, GM-CSF, 和 IL-2 的序列。被亚克隆至 MFG 载体的精确的 cDNA 序列如下: 小鼠 IL-2 的 49-564 碱基对; 小鼠 IL-4 的 56-479 碱基对; 小鼠 IL-5 的 44-462 碱基对; 小鼠 GM-CSF(29)的 70-561 碱基对; 小鼠 ICAM-1 的 30-1657 碱基对; 小鼠 CD2 的 48-1079 碱基对; 小鼠白细胞介素-1受体拮抗剂的 15-563 碱基对; 人类 TNF-alpha 的 86-788 碱基对。

(2)腺病毒载体

用于将人类的 GM-CSF 编码序列导入细胞(人类 GM-CSF; AV-GM-CSF)的腺病毒载体含有一个替换 5 型腺病毒的 E1 基因的 GM-CSF 表达框,并且在病毒基因组的 E3 区域有一个额外的删除。根据 Genbank 中的 Ad5 的完全序列(登录号 no. M73260), E1 区域删除的是 455-3327 碱基。编号从左侧末端反向重复序列的第一个碱基开始。

腺病毒载体的构建使用了所属领域熟知的标准的连接和限制性酶切技术。E3 基因的删除是通过野生型 300(来自 H. Ginsberg)(0-27330)和 dl324(Thimmappaya et al. (1982) Cell 31: 543-551)(21561 至右侧末端)之间的重叠重组。GM-CSF 的表达框通过 cre/lox 介导的 pAdlox MC hGM 和 CRE8 细胞内的 E3 基因被删除的腺病毒(Hardy et al. (1997) J. Virol. 71: 1842-1949)之间的重组添加到 E1 区域。pAdlox MC hGM 源自 pAdlox(Hardy et al. (1997))和 pMD. G(Naldini et al., (1996) Science 272: 263-267)并且含有如下序列: Ad5 的 0-455, pBC12/CMV/IL-2(Cullen(1986) Cell 46: 973-982)的巨细胞病毒(CMV)立早启动子/增强子(核苷酸位点-670 至+72, Genbank 登录号 NO. X03922), 人类 α -球蛋白外显子 2 的一个小的区域和缩短的第二插入序列(ISV2)(核苷酸位点 62613-62720 加上 63088-63532, Genbank 登录号 no. J00179), 外显子 3 和人类 α -球蛋白的多聚腺苷酸信号(核苷酸位点 63532-64297), 插入到外显子 3 的 GM-CSF 的 cDNA(位点 63530), 来自 SV-40 的第二个多聚腺苷酸位点(位点 2681-2534), (Genbank 登录号 No. J02400)和连有一段来自 Bluescript 的细菌的序列的 loxP 位点。GM-CSF 的 cDNA 序列的获得来自于一个质粒(DNAX 分子和细胞生物研究所(Palo Alto,CA))。DNA 序列是通过在哺乳动物细胞中的功能表达从一个由伴刀豆球蛋白活化的人类 T 细胞克隆制备的文库分离出的。cDNA 的分离和功能研究,包括基因的全部序列,已经在科研文献中有报导。(Lee et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 4360-4364)。克隆的确认通过其限制性内切酶消化来验证。MD 的表达框通过 PCR 修饰,包含 PmlI, EcoRI 和 BglII 的限制性酶切位点,用于转基因下

游的 ISV2 的插入。GM-CSF 的 cDNA 用 PmlI 和 BamHI 从 pMFG-S hGM 上切下来(Dranoff et al. (1997) Human Gene Ther. 7: 111-123), 插入到 MD 表达框的 PmlI 和 BglII 位点。插入到腺病毒(Ad GM 病毒)中的 pAdlox MD hGM 质粒的区域进行双链测序。最初的病毒建构的正确结构通过限制性酶切技术和用于检测被感染的 HeLa 细胞中的 GM-CSF 的产生的 ELISA 来验证。然后将重组的病毒进行两轮斑点纯化。将取自一个斑点的重组病毒进行限制性作图并且在 293 细胞(来自微生物学会的已被鉴定的细胞)中扩增 2 代以产生研究用的病毒储存库。病毒中的 GM-CSF 基因通过以研究用的病毒储存库制备的病毒 DNA 的直接测序来确定。最后, 对取自研究用的病毒储存库的重组病毒进行支原体和无菌状态的检测, 如果检测结果是阴性的, 则用于感染细胞以建立种子细胞储存库。

实施例 2: 自体前列腺的 GVAX®疫苗试验

9 个病人参加了自体前列腺的 GVAX®疫苗试验。每位病人年龄都大于 18 岁, 并且手术之后通过两次连续的 PSA 水平的异常评价确定为愈来愈严重的, 有微小转移的前列腺癌, 没有证据表明有可以检测到转移的疾病或之前有过激素治疗, 并且在治疗的开始 PSA 的最小的基线浓度大于 1.0ng/ml。术后的病人伴随着合适的药物治疗。病理诊断和疾病的分期在手术期间完成。

切除的肿瘤的一部分用于原代培养扩增, 用携带 GM-CSF 基因的 MFG 病毒载体转导, 通过辐射处理使细胞增殖无能力, 并且在液氮中储存直至用于制备载体的 GVAX®疫苗。大约术后 60 天, 疫苗便可以用于临床部位。对于每一次接种, 用于注射的 GVAX®疫苗的准备和制造通过: 解冻, 洗涤, 用 0.9%的氯化钠溶液或含 2.5%人血清白蛋白的氯化钠溶液再悬浮。

大约术后 60 天, 安排一次再接种检查以获取基线值并且开始第一次自体非转导的细胞的迟发性变态反应评价。血清取样并且通过 RT-PCR 检测 PSA 水平。再接种检查后两天, 每位病人被安排 3 个接种周期, 每个

周期 14 天。如果 3 次接种后没有证据表明有累积毒性，并且如果还有存留的疫苗细胞，病人可以接受另外的 3 次接种，总共 6 次接种。

间隔和接种部位的定位如下面的表 2 所示。每一剂依照不需住院而在医院或门诊部接受诊断治疗的原则给药，之后在病人离开之前在门诊部进行临床观察。

表 2：接种时间表

剂量水平	注射剂量	细胞数/ml	注射体积	注射次数
1	1×10^7	1×10^7	0.5cc	2
2	5×10^7	2.5×10^7	0.5cc	5

注射以网格式皮内注射至病人的肢体。每一个注射的针头进入位点与相邻最近的注射位点至少 5cm。对于剂量水平 1，注射被施予给 3 位病人，每一个连续的周期注射到不同的肢体。对于剂量水平 2，被注射的 6 位病人在一个周期注射两个肢体，在每一个连续的周期等分注射不同的两个肢体。第一次接种为第 0 天，随后的是第 14、28、42、56 和 70 天。对局部和系统的毒性和随后的引发的抗肿瘤免疫应答进行评价。自身免疫性的迹象也被评估。

在总共接受了 41 次完全可评价的接种的 8 位接种病人中，没有观察到美国癌症研究所常见毒性判定标准的剂量限制性毒性。皮下位点的活组织切片检查显示出独特的由巨噬细胞，树突状细胞，嗜曙红细胞和 T 细胞组成的与临床前效果模型类似的炎症浸出物。对未转导的自体的 PCA 目标细胞，100%的病人显示出 DTH 反应。术前血清 PSA 的中值是 28.85(浮动范围 6.7-7.5)并且在第一次接种后血清 PSA 的中值是 0.65(浮动范围 0.1-30.4)。通过超灵敏的血清 PSA 检测，手术和接种后的 8 人中有 6 人病情稳定地改善：平均追踪调查时间 24 个月。该研究证实了体内 GM-CSF 基因转导的 PCA 疫苗的可行性，门诊安全性和生物活性。

实施例 3：异体前列腺的 GVAX®疫苗试验

30 个病人参加了第二次自体前列腺的 GVAX®疫苗试验。每位病人年龄都大于 18 岁，并且手术之后通过两次连续的 PSA 水平的异常评价确

定为愈来愈严重的，有微小转移的前列腺癌，没有证据表明有可以检测到转移的疾病或之前有过激素治疗，并且在治疗的开始 PSA 的最小的基线浓度大于 1.0ng/ml。异体的前列腺癌细胞系由两种相同细胞剂量的异体前列腺癌细胞系(LNCaP 和 PC-3)组成，它们被遗传修饰，每 10^6 个细胞每 24 小时分泌 148-639ng 的 GM-CSF。或者，疫苗由 3 种不同的经辐射处理的自体的前列腺癌细胞系(LNCaP, PC-3 和 DU145)组成，它们被遗传修饰，每 10^6 个细胞每 24 小时分泌 200-300ng 的 GM-CSF。每一小瓶制备的疫苗都在甘油和人血清白蛋白中，可以直接用于注射。每种细胞系的接种剂量如下面的表 3 所示。

表 3：接种时间表

细胞系	注射剂量	细胞数/ml	注射体积	注射量
LNCaP-1740	6×10^7	3×10^7	2x1.0cc	2 次每次 3×10^7 个细胞
PC-3	6×10^7	3×10^7	2x1.0cc	2 次每次 3×10^7 个细胞

在指定的接种日，病人接受注射总共 1.2×10^8 个细胞(每个细胞系 6×10^7 个细胞)，分 4 次皮内注射，每次 1.0cc(每个细胞系注射 2 次)。每次注射都是皮内的。第 0 天后的接种日，注射位点被轮流。总剂量 1.2×10^8 个细胞，分成 4 次，每隔一周注射一次，共 8 周。

在治疗周期内，对局部和系统反应的评价在接种日进行(第 1、2、3、4、5、6、7、8 周)。从第一次接种开始，PSA 的测量在 4 个月内每月进行一次，在研究的第二部分，两年内每 4 个月进行一次。如果临床需要，PSA 水平评价频率则高于每 4 个月一次。用于 PCR 检测的血液样品的采集在第一次接种之前。第一部分最后一次检查在最后一次疫苗接种之后(第 8 周)。对接受至少一次接种的登记的病人进行长期的 PSA 检查的跟踪调查。从那时以后，他们进行每年一次的体检和临床评价，如果临床需要，频率可以更高，直至病人死亡或异体前列腺癌细胞系疫苗被 FDA 批准。

实施例 4: 前列腺肿瘤相关抗原的鉴定

A. 血清的制备

研究用的血清由在自体或异体前列腺疫苗 GVAX®试验中接种前 2 小时和最后一次接种后 2 周取病人的血液制备。

B. 细胞裂解液的制备

源自前列腺基质、前列腺上皮细胞、前列腺平滑肌以及肺成纤维细胞的原代细胞系购自 Clontenics(San Diego, CA)并且培养在 SCGM、PrEGM、SmGM 和 GGM-2 培养基中(Clontenics, San Diego, CA)。细胞被培养在含 10%的胎牛血清, 青霉素/链霉素和谷氨酰胺的 DMEM+F12 培养基中(JHR bioscience, Lenexa, KS)。当细胞密度至覆盖 T-175 培养瓶(Becton, Dickinson&Company, Franklin Lakes, NJ)的 80%时, 细胞用 PBS 冲洗 2 遍后加入维尔烯(Gibco BRL, Grand Island, NY)孵育 10-30 分钟以使细胞与培养瓶分离。然后收集细胞, 用台式离心机(CS-6R, Beckman, Palo Alto, CA)1,000 rpm 离心 10 分钟。细胞用 PBS 洗涤 3 遍。对于非贴壁细胞(Jurkat and 外周血细胞), 细胞被收集, 离心, 并且用 PBS 洗涤 3 次。洗涤之后, 2×10^7 个细胞加入 1 ml 裂解缓冲液(10 mM Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 10%甘油, 1% NP40, 1 mM PMSF, 和 1%的 cocktail set III 蛋白酶抑制剂(Cat. 539134, Calbiochem, San Diego, CA)), 冰孵育 1 小时。不溶的细胞碎片用台式离心机 4℃离心 30 分钟除去。取上清液, 用 BCA 法(Pierce, Rockford, IL)测量蛋白浓度。

C. 免疫印迹法

细胞裂解液中的指明数量的蛋白(25-35μg/泳道)或纯化的 PSA(Calbiochem, San Diego, CA)或癌症相关标志物通过 4-20%的梯度 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Norvex, San Diego, CA)分离, 然后在 25mV 恒压, 2-3 小时条件下, 通过电转移至印迹转移仪器(Xcell II Blot Module, Norvex, San Diego, CA)中的硝化纤维素膜(Norvex, San Diego, CA)。转膜后, 硝化纤维素膜在封闭溶液(含 10%的脱脂牛奶, 0.05%Tween 20 的 PBS)中 4℃封闭过夜。封闭过夜之后, 膜用病人的血清(1: 1000 稀释在含

0.1%的 Tween 20 的 PBS 中)室温下孵育 2 小时,然后用含 0.1%的 Tween 20 的 PBS 洗涤 5 次。次黄嘌呤磷酸核糖转移酶偶联(HPRT-conjugated)的山羊抗人 IgM+G+A(Zymed, South San Francisco, CA, 1: 3000 稀释在含 0.1%的 Tween 20 的 PBS 中)带膜孵育 1 小时,然后用含 0.1%的 Tween 20 的 PBS 洗涤 6 次。结果是通过化学发光法(例如,使用 ECL Western Blotting System, Amersham Life Science, Arlington Heights, IL)得到。

实施例 5: 在自体的 GVAX®的临床试验中的前列腺肿瘤相关抗原的鉴定

在一项研究中,肿瘤相关抗原的鉴定如下。为制备自体的前列腺 GVAX®疫苗,从 8 位病人身上取下前列腺肿瘤以产生原代前列腺癌细胞系。含有人类 GM-CSF 的逆转录病毒载体被导入这些原代细胞系以产生分泌 GM-CSF 的细胞。病人被每 2 周通过皮内注射这些以 GM-CSF 表达自体的原代前列腺癌细胞为形式的疫苗。1-3 号病人接受注射 6 次,每次 10^7 个细胞;4 号接受注射 5 次;每次 10^7 个细胞;5 号和 7 号病人接受注射 6 次,每次 5×10^7 个细胞;7 号病人接受注射 3 次,每次 10^7 个细胞;8 号病人接受注射 3 次, 5×10^7 个细胞。后面的研究用的血清在接种前 2 小时(作为接种前)和最后一次接种后 2 周(作为接种后)取病人的血液制备。

在自体的前列腺 GVAX®疫苗试验中,最后一次接种完成后,通过 LNCaP 前列腺癌细胞系的免疫印迹分析,特异性抗原被病人血清中的抗体识别。25 μ g 的 LNCaP 裂解液在 4-20%的梯度 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,之后转移到硝化纤维素膜。1: 1000 至 1: 3000 范围内稀释在含 0.05%的 Tween 20 的 PBS 中的病人的血清被作为免疫印迹分析中的一抗。1: 3000 稀释的过氧化物酶偶联的多克隆的羊抗人 IgG+M+A 被作为二抗。结果用 ELC 化学发光试剂盒得到。在自体的 GVAX®疫苗试验中,通过比较源自接种前和接种后的血清,新发现了多种 LNCaP 细胞表达的与 PSA 无关的抗原,包括一个“泛”肿瘤相关抗原,这在 WO/0026676 中有进一步的描述。

实施例 6: 在异体的 GVAX®的临床试验中的前列腺肿瘤相关抗原的鉴定

在接受异体的 GVAX®疫苗治疗的病人的血清中也发现了新的抗原。在异体的前列腺 GVAX®疫苗试验中, 21 位病人被接种 1.2×10^7 个细胞的 GM-CSF 表达 LNCaP(LNCaP-GM)细胞和 1.2×10^7 个细胞的 GM-CSF 表达(PC-3/GM)细胞, 每周一次, 共 8 周。血清由在接种 GVAX®前 2 小时(作为“接种前”)和最后一次接种 GVAX®后 2 周(作为“接种后”)取病人的血液制备。选择来自几位接受异体的 GVAX®疫苗治疗的病人的血清用于进一步的研究。这些数据被概括在下面的表 4 中:

表 4

病人编号	PC3 抗原	LNcaP 抗原
301	p14, p18, p27	
302		
303		
304		
305	p14, p160, p278, p300	
306	p12, p32, p45, p80, p105	
307	p32, p43	
308	p18	p40, p55, p68
309	p19, p27	p19
310	p278, p300	
311		
312		p42, p112
313	p70	
314	p14, p60, p130	
315	p14, p23, p27	
316	p278, p300	

317		
318		
319	p29, p43, p60	
320		p150
321	p78, p300	

在大多数病例中观察到针对 LNCaP 和/或 PC3 细胞的体液免疫应答。抗 PC3 和抗 LNCaP 的抗体应答的产生, 和观察到接受异体的 GVAX®疫苗治疗的 21 位病人中的 15 人的 PSA 水平下降, 显示出体液免疫应答在异体的 GVAX®疫苗的背景下, 对前列腺癌发挥了治疗的作用。接受完异体的 GVAX®疫苗治疗的病人的血清被用于对 PSA 的抗体检测。3 μ g 的 PSA 被用 4-20%的梯度 SDS-聚丙烯酰胺凝胶检测, 然后用 301, 305, 314, 307 和 312 号病人的血清进行免疫印迹分析。结果显示 PSA 不能识别这些血清, 意味着 PSA 不是引起针对抑制肿瘤生长的相应的免疫应答的原因。为了进一步分析这些新的抗原, 使用来自许多病人的接种前和接种后的血清, 进行了免疫印迹分析。下列一组肿瘤细胞系被检测: LNCaP(前列腺); PC-3(前列腺); A549(肺); LS-174T(结肠); MCF7(乳腺); DU-145(前列腺); KLEB(卵巢); Jurkat(白血病)以及 MDA-MB-435S(乳腺)。组织/细胞特异性表达的大约 278KD 的抗原和大约 160KD 的抗原被通过 SDS-PAGE 测定, 然后用这组肿瘤细胞系和正常的原代前列腺细胞系分析。结果显示, 大约 160KD 的抗原在 PC-3 癌细胞和正常的前列腺上皮细胞有表达, 在 A549(肺肿瘤)和 MCF7(乳腺肿瘤)细胞有弱表达, 但在其它种类的肿瘤细胞以及前列腺基质和平滑肌细胞都没有表达。这些结果显示, 大约 160KD 的抗原(p160)是前列腺特异性抗原(数据省略)。在相同的试验中, 分子量大约 278 KD 的肿瘤相关抗原被通过 SDS-PAGE 测定(p278), 结果发现在前列腺癌细胞系, PC-3 和 DU-145, 以及 A549 肺肿瘤细胞有表达。P278 还显示在正常的前列腺上皮细胞有表达, 但在前列腺基质和平滑肌中没有表达。这些结果有力地显示, p278 至少是一个前列腺特异性的抗原和肿瘤相关抗原。事实是, 存在针对正常前列

腺特异性的抗原，如 p278 和 p160 的抗体应答，说明异体的 GVAX®疫苗能够打破免疫耐受性，并且引起免疫系统通过识别肿瘤相关抗原建立起抗击肿瘤的反应。

实施例 7: 在异体的 GVAX®临床试验的第二阶段的前列腺肿瘤相关抗原的鉴定

在进一步的临床试验中，其它新的抗原通过异体的 GVAX®疫苗治疗的病人的血清被发现。在这个前列腺 GVAX®疫苗试验中，24 名患有转移性骨肿瘤的激素难治性病人接受了首量 5 亿个细胞的 GM-CSF 表达 LNCaP 细胞和 GM-CSF 表达 PC-3 细胞，之后注射 12 次强化剂量(每次 1 亿个细胞)，间隔 2 周一次，并且有 10 位病人接受了相同的首量，强化剂量则更高，每次 3 亿个细胞。血清由在接种 GVAX®前 2 小时(作为“接种前”)和最后一次接种 GVAX®后 2 周(作为“接种后”)取病人的血液制备。来自病人的血清被进一步研究。通过 SDS-PAGE 和免疫印迹法在接种后识别的抗原被概括在下面的表 5 中：

表 5. 通过 SDS-PAGE 和免疫印迹法在接种后识别的抗原

病人编号	PC3 抗原	LNCaP 抗原
G03-009-307T	p20	p70
G03-009-315HH		
G03-009-322W	p50	p50, p70
G03-012-401D	p278	p40
G03-012-402E	p278, p180, p150, p10	
G03-012-406H	p70	p20
G03-012-407G	p40	
G03-012-414L	p180, p160, p150, p60, p10	p60
G03-012-417R		
G03-012-418W	p200, p180, p160	
G03-012-421Y		p50, p20

G03-012-422V	p278, p110, p10	
G03-014-423S	p100, p90	p120, p150
G03-012-428RR		
G03-012-429GG		
G03-012-431QQ	p70	
G03-012-436TT		
G03-014-101D		
G03-014-102JJ	p160	p130
G03-014-103MM	p30, p20	
G03-014-104VV		
G03-018-802EE	p30, p20	
G03-018-803II	p110, p100	
G03-018-804SS	p278	
G03-018-806NN		
G03-009-310BB		p20
G03-009-314LL	p10	p50, p30, p20
G03-009-320OO		

在大多数病例中观察到对 LNCaP 和/或 PC3 的体液免疫。接种后的血清不含任何抗 PSA 的抗体。804 号病人的全部的 PSA 反应被观察到(图 2)。804 号病人和 PC-3 或 LNCaP 的细胞类型没有 HLA I 类型别匹配。

为分析 804 号病人对 GVAX®治疗的体液反应，该病人的接种前和接种后的血清被用于免疫印迹分析。结果发现接种后的血清识别一个在电泳迁移的大约 278KD 处的存在于 PC-3 细胞但在 LNCaP 细胞中没有的抗原(图 3)。这个大约 278KD 的抗原在原代的正常的前列腺上皮细胞，前列腺基质，和前列腺平滑肌(PrEC, PrSC, 和 PrSmC)细胞系中也被检测到，但是与在 PC-3 细胞中相比水平较低(图 4)。该抗原在非小肺腺癌细胞系，H157 中过表达(图 5)。

将 PC-3 细胞裂解液进行二维凝胶电泳，水平尺度上的 pH 梯度是 3.5-10。大约 278KD 的抗原的电泳迁移由印迹分析确定。相应的条带被切下进行基体辅助激光解吸电离质谱法蛋白测序。大约 278KD 的抗原的蛋白序列与 Genbank 中登录号是 NP_001448 的一个肌动蛋白结合蛋白 β -Filamin 的序列相吻合。

用购自 Chemicon International (Temecula, CA) 的兔抗人 β -Filamin 的单克隆抗体做免疫印迹分析，结果显示在 PC-3 细胞中有一个大约 278KD 的蛋白表达，但在 LNCaP 细胞中没有(图 6)。

实施例 8: 用表达 β -Filamin 和 GM-CSF 的异体细胞接种

逆转录病毒载体是用 WO/0026676 中描述的标准技术，通过插入 GM-CSF 的编码序列和 Genbank 中登录号 NM_001457 中显示的 β -Filamin 的编码区制备的。PC-3 和 LNCaP 细胞被转导和遗传修饰以表达 β -Filamin，并且 PC-3 细胞被遗传改变从而比未转导的 PC-3 细胞表达更高水平的 β -Filamin。被转导的 PC-3 和 LNCaP 细胞以 1: 1 比例混合以组成细胞疫苗并且细胞被辐射处理以使之增殖无能力。疫苗中每种细胞 2 亿个，每 10^6 个细胞每天分泌大约 100 ng 的 GM-CSF。

被选出的病人患有前列腺癌，上升的 PSA，美国东岸癌症临床研究合作组织行为能力状况得分 0-1，肝脏正常，肾脏及骨髓发挥作用，以前没有做过化疗或基因治疗，没有活跃的自体免疫疾病，没有伴随的前列腺癌治疗，并且骨质扫描时肿瘤迁移为阳性，但没有需要麻醉止痛剂的骨疼痛。A 组病人用疫苗 A 治疗，B 组病人用疫苗 B 治疗。对于每一组，首量是 5 亿个细胞，之后是 12 次强化剂量，每次 1 亿或 2 亿个细胞，每次间隔 2 周。血清由首次接种前 2 小时和最后一次接种后 2 周从每一位病人的取血制备。

通过记录骨质扫描，骨密度评价，全身断层扫描，PSA 水平的测量，以及存活对治疗的应答进行监控。

序列简要说明

表 6. 序列简表(以列表方式提供)

序列标识编号	序列
1	编码 GM-CSF 的核酸序列(基因组的)
2	编码 GM-CSF 的核酸序列(cDNA)
3	GM-CSF 的氨基酸序列
4	包括编码区的 Filamin B 的 9432 bp 的 mRNA 序列: Genbank 登录号 NM_001457
5	Filamin B 的 2602 个氨基酸的序列: Genbank 登录号 NP_001448

为了明晰和便于理解, 尽管在前文的发明已经通过图解和举例的方式阐述一些细节, 对于所属领域的技术人员, 很显然, 可以进行一些变通和修改。通过一系列的试验, 本发明的各个发明都已涉及, 其中一些通过依照非限制的实施例进行描述。因此, 这些描述和例子不应被视为对本发明范围的限制, 本发明的范围见所附的权利要求。

<110> 细胞基因系统有限公司

<120> 用于治疗前列腺癌的细胞因子表达细胞疫苗

<130> 3802-104-27 PCT

<140>

<141>

<150> 10 / 937, 658

<151> 2004-09-10

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 3. 3

<210> 1

<211> 2027

<212> DNA

<213> 人类

```

<400> 1
tgtggctgca gagcctgctg ctcttgggca ctgtggcctg cagcatctct gcacccgccc 60
gctcgcccag cccagcacg cagccctggg agcatgtgaa tgccatccag gaggcccgcc 120
gtctcctgaa cctgagtaga gacactgctg ctgagatggg aagttagaga atgtgggcct 180
gtgcctaggc caccagctg gcccctgact ggccacgcct gtcagcttga taacatgaca 240
ttttcctttt ctacagaatg aaacagtaga agtcatctca gaaatgtttg acctccaggt 300
aagatgcttc tctctgacat agctttccag aagccctgc cctggggtgg aggtggggac 360
tccatttttag atggcaccac acagggttgt ccactttctc tccagttagc tggctgcagg 420
aggagggggg agcaactggg tgctcaagag gctgctggcc gtgcccctat ggcagtcaca 480
tgagctcctt tatcagctga gcggccatgg gcagacctag cattcaatgg ccaggagtca 540
ccaggggaca ggtggtaaag tgggggtcac ttcatgagac aggagctgtg gggttggggc 600
gctcactgtg ccccgagacc aagtctgtt gagacagtgc tgactacaga gaggcacaga 660
ggggtttcag gaacaaccct tgcccaccca gcaggtccag gtgaggcccc acccccctct 720
ccctgaatga tgggggtgaga gtcacctcct tccctaaggc tgggctcctc tccaggtgcc 780
gctgagggtg gctgggcccg ggagtgaga agggcaggtt cgtgcctgcc atggacaggg 840
cagggtctat gactggaccc agcctgtgcc cctccaagc cctactcctg ggggctgggg 900
gcagcagcaa aaaggagtgg tggagagttc ttgtaccact gtgggcactt ggccactgct 960
caccgacgaa cgacattttc cacaggagcc gacctgccta cagaccgcc tggagctgta 1020
caagcagggc ctgcggggca gcctcaccaa gctcaaggcc cccttgacca tgatggccag 1080
ccactacaag cagcactgcc ctccaacccc ggtgagtgcc tacggcaggc cctccagcag 1140
gaatgtctta atctaggggg tggggtcgac atggggagag atctatggct gtggctgttc 1200
aggaccccag ggggtttctg tgccaacagt tatgtaatga ttagccctcc agagaggagg 1260
cagacagccc atttcatccc aaggagttag agccacagag cgctgaagcc cacagtgtc 1320
cccagcagga gctgctccta tctgggtcat tattgtcatt atggttaatg aggtcagagg 1380
tgagggcaaa cccaaggaaa cttggggcct gcccaaggcc cagaggaagt gcccaggccc 1440
aagtgccacc ttctggcagg actttcctct ggcccacat ggggtgcttg aattgcagag 1500
gatcaaggaa gggggggtac ttggaatgga caaggacctc aggcactcct tcctgcggga 1560
aggagcaaa gtttgtggcc ttgactccac tccttctggg tgcccagaga cgacctcagc 1620
ccagctgccc tgctctgccc tgggaccaa aaggcaggcg tttgactgcc cagaaggcca 1680
acctcaggct ggcacttaag tcaggccctt gactctggct gccactggca gagctatgca 1740
ctccttgggg aacacgtggg tggcagcagc gtcacctgac ccaggtcagt ggggtgtgtc 1800
tggagtgggc ctctggcct ctgagttcta agaggcagta gagaaacatg ctgggtgcttc 1860
cttccccac gttaccact tgcctggact caagtgtttt ttatttttct ttttttaaa 1920

```

gaaacttcct gtgcaaccca gattatcacc tttgaaagtt tcaaagagaa cctgaaggac 1980
 tttctgcttg tcatccccctt tgactgctgg gagccagtcc aggagtg 2027

<210> 2
 <211> 435
 <212> DNA
 <213> 人类

<400> 2
 atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcacccgcc 60
 cgctcgccca gccccagcac gcagccctgg gagcatgtga atgccatcca ggaggcccg 120
 cgtctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcac 180
 tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgcctacaga cccgcctgga gctgtacaag 240
 cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggcccct tgaccatgat ggccagccac 300
 tacaagcagc actgccctcc aaccccgaa acttcctgtg caaccagac tatcaccttt 360
 gaaagtttca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgta tccccttga ctgctgggag 420
 ccagtcagg agtaa 435

<210> 3
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 3
 Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
 1 5 10 15
 Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
 20 25 30
 Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp
 35 40 45
 Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe
 50 55 60
 Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys
 65 70 75 80
 Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met
 85 90 95
 Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
 100 105 110
 Cys Ala Thr Gln Thr Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys
 115 120 125
 Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 130 135 140

<210> 4
 <211> 9432
 <212> DNA
 <213> 人类

<400> 4
 gccgtggctc cggtagcagc aagttcgaac cccgctcccg ctccgcttcg gttctcgctc 60
 cttcggccct tgggcctcca aacaccagtc cccggcagct cgttgcgcat tgcgctctcc 120
 ccgccaccag gatgccggta accgagaagg atctagctga ggacgcgcct tggaagaaga 180
 tccagcagaa cacgttcaca cgctggtgca acgagcacct caagtgcgtg aacaaacgca 240
 tcggcaacct gcagaccgac ctgagcgacg ggctgcggct catcgcgctg ctcgaggtgc 300
 tcagccagaa gcgcatgtac cgcaagtacc atcagcggcc cacctttcgc cagatgcagc 360
 tcgagaatgt gtccgtggcg ctcgagttcc tggaccgtga gagcatcaag ctcggtgtcc 420
 tcgatagcaa agccattgtg gatgggaacc tgaagctcat cttgggtctg gtgtggacgc 480

tgatcctcca	ctactccatc	tccatgcccg	tgtgggagga	tgaaggggat	gatgatgcca	540
agaagcagac	gccaaagcag	aggctgctgg	ggtggattca	gaacaagatc	ccctacttgc	600
ccatcaccaa	ctttaaccag	aactggcaag	acggcaaacg	cctgggagcc	ctggtagaca	660
gctgtgctcc	aggctctgtc	ccagactggg	aatcctggga	cccgcagaag	cctgtggata	720
atgcacgaga	agccatgcag	caggcagatg	actggctggg	tgtcccacag	gtcatcactc	780
ctgaagaaat	cattcacccg	gatgtggacg	agcactcagt	tatgacttac	ctgtcccagt	840
tcccaaaagc	caagctcaag	ccgggggctc	ctctcaaacc	caaactcaac	ccgaagaaag	900
ccagggccta	tggcagagga	atcgagccca	ctggaaacat	ggtgaagcag	ccagccaagt	960
tcactgtgga	caccatcagc	gccgggcaag	gagacgtgat	ggtgtttgtt	gaggaccagg	1020
aagggaacaa	agaggaggca	caagtgaccc	ctgacagcga	caagaacaag	acatactctg	1080
tggagtatct	gccccaggtc	accgggctac	acaaagtcac	agtcctcttt	gcaggacagc	1140
acatctccaa	gagcccatct	gaagtgaagt	ttgacaaggc	ccagggagat	gccagtaaa	1200
tcactgcaaa	aggctccagg	ttggaagctg	tagggaacat	cgccaataag	cccacctact	1260
ttgacatcta	tacggcagga	gctggtgtgg	gtgacattgg	tgtggagggtg	gaagatcccc	1320
aggggaagaa	caccgtggag	ttgctcgtgg	aagacaaagg	aaaccagggtg	tatcgatgtg	1380
tgtacaaaacc	catgcagcct	ggccctcacg	tggtaagat	cttctttgct	ggggacacta	1440
ttcctaagag	tcccttcggt	gtgcagggtg	gggaagcctg	caatccaaat	gcctgccggg	1500
ccagtggccg	agggctacaa	cccaaaggcg	tccgtatccg	ggagaccaca	gatttcaagg	1560
ttgacaccaa	agctgtcaga	tcgggggagc	tcaaggtaac	catgaagggt	cctaagggtc	1620
tggaggagct	ggtgaagcag	aaagactttc	tggatggggg	ctacgcattc	gagtattacc	1680
ccagcaccoc	ggggagatac	agcattgcca	tcacatgggg	gggacaccac	attccaaaga	1740
gcccttttga	agttcaagtt	ggccctgaag	cgggtatgca	gaaagtccgt	gcttggggcc	1800
ctgggctcca	tgggtgggatt	gtcgggcggg	cagcggactt	cgtggtagaa	tccattggct	1860
ctgaagtggg	gtctctgggg	tttgccattg	aaggccctc	tcaggcaaa	attgagtaca	1920
acgaccagaa	tgatggatcg	tgtgatgtca	aatactggcc	caaggagcct	ggcgaatatg	1980
ctgttcacat	catgtgtgac	gacgaagaca	tcaaggacag	cccgtacatg	gccttcaccc	2040
accagccac	gggaggctac	aaccctgata	tggttcgagc	atacgggcca	ggtttggaga	2100
aatctggatg	cattgtcaac	aacctggccg	agttcactgt	ggatcctaag	gatgctggaa	2160
aagctccctt	aaagatattt	gctcaggatg	gggaaggcca	acgcattgac	atccagatga	2220
agaaccggat	ggacggcaca	tatgcatgct	catacacccc	ggtgaaggcc	atcaagcaca	2280
ccattgctgt	ggtctgggga	ggcgtgaaca	tcccgcacag	cccctacagg	gtcaacatcg	2340
tgcaaggtag	ccatcctcag	aaggtcaaag	tgtttgggcc	aggtgtggag	agaagtggtc	2400
tgaaggcaaa	tgaacctaga	cactctcaca	tcgactgtac	tgaaggctggg	gaaggtgatg	2460
tcagtgttgg	cattaagtgt	gatgcccggg	tgttaagtga	agatgaggaa	gacgtggatt	2520
ttgacattat	tcacaatgcc	aatgatacgt	tcacagtcaa	atatgtgcct	cctgctgctg	2580
ggcgatacac	tatcaaagtt	ctctttgcat	ctcaggaaat	ccccgccagc	cctttcagag	2640
tcaaagttga	cccttcccac	gatgccagca	aagtgaaggc	agaaggccca	gggctcagca	2700
aagcagggtg	ggaaaatggg	aaaccgaccc	acttcaactgt	ctacaccaag	ggggctggga	2760
aagccccgct	caacgtgcag	ttcaacagcc	ctcttccctg	cgatgcagtg	aaggatttgg	2820
atatcatcga	taattatgac	tactctcaca	cgggttaaata	tacacccacc	caacagggca	2880
acatgcaggt	tctggtgact	tacgggtggc	atcccatccc	taaaagccct	ttcactgtgg	2940
gtgttgctgc	accgctggat	ctgagcaaga	taaaactcaa	tgggctggaa	aacagggtgg	3000
aagttgggaa	ggatcaggag	ttcacctgtg	ataccagggg	ggcaggaggc	caggggaagc	3060
tggacgtgac	aatcctcagc	ccctctcgga	aggtcgtgcc	atgcctagtg	acacctgtga	3120
caggccggga	gaacagcacg	gccaagttca	tccctcggga	ggaggggctg	tatgctgtag	3180
acgtgacctc	cgatggacac	cctgtgcccc	ggagccccta	cacagtggag	gcctcgctgc	3240
caccagatcc	cagcaagggtg	aaggcccacg	gtcccggcct	cgaagggtgt	ctcgtgggca	3300
agcctgccga	gttcaccatc	gataccaaag	gagctggtac	tggagggtctg	ggcttaacgg	3360
tggaaaggtc	gtgcgaggcc	aaaatcgagt	gctccgacaa	tggatgatggg	acctgctccg	3420
tctcttacct	tcccacaaaa	cccggggagt	acttcgtcaa	catcctcttt	gaagaagtcc	3480
acatacctgg	gtctcccttc	aaagctgaca	ttgaaatgcc	ctttgacccc	tctaaagtcc	3540
tggcatcggg	gccagggtctc	gagcacggga	aggtgggtga	agctggcctc	cttagcgtca	3600
actgctcgga	agcgggaccg	ggggccctgg	gcctggaagc	tgtctcgga	tcgggaacaa	3660
aagccgaagt	cagtattcag	aacaacaaag	atggcaccta	cgcggtgacc	tacgtgcccc	3720
tgacggccgg	catgtacacg	ttgacctaga	agtatggtgg	cgaactcggtg	ccacacttcc	3780
ccgcccgggg	caaggtggag	cccgccgtgg	acaccagcag	gatcaaagtc	tttggaccag	3840
gaatagaagg	gaaagatgtg	ttccgggaag	ctaccaccga	ctttacagtt	gactctcggc	3900
cgctgaccca	ggttgggggt	gaccacatca	aggccacat	tgccaacccc	tcaggggcct	3960

ccaccgagtg	ctttgtcaca	gacaatgcgg	atgggaccta	ccaggtggaa	tacacaccct	4020
ttgagaaagg	tctccatgta	gtggaggtga	catatgatga	cgtgcctatc	ccaaacagtc	4080
ccttcaagg	ggctgtcact	gaaggctgcc	agccatctag	ggtgcaagcc	caaggacctg	4140
gattgaaaga	ggcctttacc	aacaagccca	atgtcttcac	cgtggttacc	agaggcgag	4200
gaattgggtg	gcttggcata	actgttgagg	gaccatcaga	gtcgaagata	aattgcagag	4260
acaacaagga	tggcagctgc	agtgtctgag	acattccttt	cgcccgggg	gattacgatg	4320
ttaatatcac	atatggagga	gccacatcc	ctggcagccc	cttcagggtt	cctgtgaagg	4380
atgttgtgga	ccccagcaag	gtcaagattg	cggcccccgg	gctgggctca	ggcgtccgag	4440
cccggtgcct	gcagtccttc	acgggtggaca	gcagcaaggg	tggcctggct	ccgctggaag	4500
tgagggttct	gggcccacga	ggcttgggtg	agccagtga	catggtggac	aatggagatg	4560
gcacacacac	agtaacctac	accccatctc	aggagggacc	ttacatggtc	tcagttaa	4620
atgtctgatga	agagattcct	cgcagtcctt	tcaagggtcaa	ggctcctccc	acatatgatg	4680
ccagcaaagt	gactgccagt	ggccccggcc	ttagttccta	tgggtgtgcct	gccagtcctac	4740
ctgtggactt	tgcaattgat	gcccagagatg	ccgggggaagg	cctgcttgct	gttcaaataa	4800
cggaccaaga	aggaataccc	aaaagagcca	ttgtccatga	caataaagat	ggcacgtatg	4860
ctgtcaccta	catccccgac	aagactgggc	gctatatgat	tggagtccac	tcgggggtg	4920
acgacatccc	actttctcct	tatcgcatcc	gagccacaca	gacgggtgat	gccagcgatg	4980
gcctggccac	gggtcctgga	atcgctccca	ctgtgaaaac	tggcgaagaa	gtaggctttg	5040
tggttgatgc	caagactgcc	gggaagggtga	aagtgcctg	cacggttctg	accccagatg	5100
gcactgaggg	cgaggccgat	gtcattgaga	atgaagatgg	aacctatgac	atcttctaca	5160
cagctgccaa	gcggggcaca	tatgtgatct	atgtgcgctt	cgttgggtgt	gatattccta	5220
acagcccctt	cactgtcatg	gccacagatg	gggaagtcac	agccgtggag	gaggcaccgg	5280
taaatgcatg	tccccctgga	ttcaggccct	gggtgaccga	agaggccctat	gtcccagtga	5340
gtgacatgaa	cggcctggga	tttaagcctt	ttgacctggt	cattccggtt	gctgtcagga	5400
aaggagaaat	cactggagag	gtccacatgc	cttctgggaa	gacagccaca	cctgagattg	5460
tggacaacaa	ggacggcacg	gtcactgtta	gatattgccc	cactgagggtc	gggctccatg	5520
agatgcacat	caaatacatg	ggcagccaca	tccttgagag	cccactccag	ttctacgtga	5580
actaccccaa	cagtggaaat	gtttctgcat	acgggtccagg	cctcgtgtat	ggagtggcca	5640
acaaaactgc	caccttcacc	atcgtcacag	aggatgcagg	agaagggtgt	ctggacttgg	5700
ctattgaggg	cccctcaaaa	gcagaaatca	gctgcattga	caataaagat	gggacatgca	5760
cagtgcaccta	cctgcccagt	ctgcccggc	ctacagcat	tctggtcaag	tacaatgaca	5820
agcacatccc	tggcagcccc	ttcacagcca	agatcacaga	tgacagcagg	cgggtgctccc	5880
agggtgaagt	gggtcagacc	gctgacttcc	tgctcgacat	cagtgagact	gacctcagca	5940
gcctgacggc	cagcattaa	gccccatctg	gccgagacga	gccctgtctc	ctgaaggagg	6000
tgcccaacaa	ccacattggc	atctccttca	tcgcccgga	agtgggcgaa	catctggtca	6060
gcatacaagaa	aaatggcaac	catgtggcca	acagccccgt	gtctatcatg	gtggtccagt	6120
cggagattgg	tgacgcccgc	cgagccaaag	tctatggccg	cggcctgtca	gaaggccgga	6180
ctttcgagat	atcgtgacct	caagggtatg	agggttatgt	ggcatatcct	ggcatatcct	6240
tggcggtgga	aggccccagc	aaagtggaca	tcagacgga	ggacctggaa	gatggcacct	6300
gcaaagtctc	ctacttccct	accgtgcctg	gggtttatat	cgtctccacc	aaattcgctg	6360
acgagcacgt	gcctgggagc	ccatttaccg	tgaagatcag	tggggaggga	agagtcaaag	6420
agagcatcac	ccgcaccagt	cgggccccgt	ccgtggccac	tgtcgggagc	atttgtgacc	6480
tgaacctgaa	aatcccagaa	atcaacagca	gtgatatgtc	ggccccagtc	accagccccct	6540
ctggccgtgt	gactgaggca	gagattgtgc	ccatggggaa	gaactcacac	tgctgcccgt	6600
ttgtgccccta	ggagatgggc	gtgcacacgg	tcagcgtcaa	gtaccgtggg	cagcacgtca	6660
ccggcagccc	cttccagttc	accgtggggc	cacttgggtga	aggaggcgcc	cacaagggtgc	6720
gggcaggagg	ccctggcctg	gagagaggag	aagcgggagt	cccagctgag	ttcagcattt	6780
ggacccggga	agcaggcgct	ggaggcctct	ccatcgctgt	tgaggggccc	agtaaggccg	6840
agattacatt	cgatgaccat	aaaaatgggt	cgtgcggtgt	atcttatatt	gcccagagc	6900
ctggttaacta	cgagggtgtcc	atcaagttca	atgatgagca	catcccggaa	agccccctacc	6960
tgggtgcgggt	catcgacccc	tcggacgacg	cccgcgcctt	cactgttatg	agccttcagg	7020
aatcgggatt	aaaagttaac	cagccagcat	cctttgctat	aagggtgaat	ggcgcaaaag	7080
gcaagattga	tgcaaagggt	cacagcccct	ctggagccgt	ggaggagtgc	cacgtgtctg	7140
agctggagcc	agataagtat	gctgttcgct	tcacccctca	tgagaatggt	gtccacacca	7200
tcgatgtcaa	gttcaatggg	agccacgtgg	ttggaagccc	cttcaaagtg	cgcgttgggg	7260
agcctggaca	agcggggaac	cctgccttgg	tgtccgccta	tggcacggga	ctcgaagggg	7320
gcaccacagg	tatccagtcg	gaattcttta	ttaacaccac	ccgagcaggt	ccagggacat	7380
tatccgtcac	catcgaaggc	ccatccaagg	ttaaaatgga	ttgccaggaa	acacctgaag	7440

```

ggtacaaagt catgtacacc cccatggctc ctggtaacta cctgatcagt gtcaaatacg 7500
gtgggcccaa ccacatcgtg ggcagtcctt tcaaggccaa ggtgacaggc cagcgtctag 7560
ttagccctgg ctacaggaac gagacctcat ccatcctggt ggagtcagtg accagggtcgt 7620
ctacagagac ctgctatagc gccattccca aggcacctc ggacgccagc aagggtgacct 7680
ctaagggggc agggctctca aaggcctttg tgggccagaa gaggtccttc ctgggtggact 7740
gcagcaaagc tggctccaac atgctgctga tcgggggtcca tggggccacc accccctgcg 7800
aggaggctct catgaagcat gtaggcaacc agcaatacaa cgtcacatac gtcgtcaagg 7860
agagggggcg ttatgtgctg gctgtgaagt ggggggagga acacatccct ggcagccctt 7920
ttcatgtcac agtgcttaaa aacagttttc tcaaatacctg gagagagttc ttgtggttgc 7980
ttttgttgct tgtttgtaat tcattttata caaagccctc cagcctgttt gtggggctga 8040
aaccocatcc ctaaaatatt gctgttgtaa aatgccttca gaaataagtc ctagactgga 8100
ctcttgaggg acatattgga gaatcttaag aaatgcaagc ttgttcaggg ggctgagaag 8160
atcctgagta cactagggtg aaaccagaac tcttggtgga acagaccagc cactgcagca 8220
gacagaccag gaacacaatg agactgacat ttcaaaaaaa caaaactggc tagcctgagc 8280
tgctggttca ctcttcagca tttatgaaac aaggctaggg gaagatgggc agagaaaaag 8340
gggacaccta gtttggttgt catttgccaa aggagatgac ttaaaatccg cttaatctct 8400
tccagtgtcc gtgttaatgt atttggctat tagatcacta gcactgcttt accgctcctc 8460
atcgccaaca ccccatgct ctgtggcctt cttacacttc tcagagggca gagtggcagc 8520
cgggcacccct acagaaactc agagggcaga gtggcagcca ggccacatg tctctcaagt 8580
acctgtcccc tcgctctggt gattatttct tgcagaatca ccacacgaga ccatcccggc 8640
agtcagtgtt ttgctttagt tttccaagtc cgtttcagtc ccttccttgg tctgaagaaa 8700
ttctgcagtg gcgagcagtt tcccacttgc caaagatccc ttttaaccaa cactagccct 8760
tgtttttaac acacgctcca gcccttcac agcctgggca gtcttacc aaatgtttaaa 8820
gtgatctcag agggggcccat ggattaacgc cctcatccca aggtccgtcc catgacataa 8880
cactccacac ccgccccagc caacttcacg ggtcactttt tctggaaaat aatgatctgt 8940
acagacagga cagaatgaaa ctctgcggc tctttggcct gaaagtggg aatggttggg 9000
ggagagaagg gcagcagctt attggtggtc ttttcacat tggcagaaac agtgagagct 9060
gtgtggtgca gaaatccaga aatgaggtgt agggaaatgt gcctgccttc ctgcagacct 9120
gagctggctt tggaatgagg ttaaagtgtc agggacgttg cctgagccca aatgtgtagt 9180
gtggtctggg caggcagacc tttaggtttt gctgcttagt cctgaggaag tggccactct 9240
tgtggcaggt gtagtatctg gggcgagtgt tgggggtaaa agcccaccct acagaaagt 9300
gaacagcccg gacctgatgt gaaaggacca cgggtgttgt aagctgggac cggaacccaa 9360
ctggaatcaa acgcgactgt aaattgtatc ttataactta ttaataaaaa cattgctccg 9420
taaaaaaaaa aa

```

<210> 5

<211> 2602

<212> PRT

<213> 人类

<400> 5

```

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

```

```

Glu Asp Glu Gly Asp Asp Asp Ala Lys Lys Gln Thr Pro Lys Gln Arg
130 135 140
Leu Leu Gly Trp Ile Gln Asn Lys Ile Pro Tyr Leu Pro Ile Thr Asn
145 150 155 160
Phe Asn Gln Asn Trp Gln Asp Gly Lys Ala Leu Gly Ala Leu Val Asp
165 170 175
Ser Cys Ala Pro Gly Leu Cys Pro Asp Trp Glu Ser Trp Asp Pro Gln
180 185 190
Lys Pro Val Asp Asn Ala Arg Glu Ala Met Gln Gln Ala Asp Asp Trp
195 200 205
Leu Gly Val Pro Gln Val Ile Thr Pro Glu Glu Ile Ile His Pro Asp
210 215 220
Val Asp Glu His Ser Val Met Thr Tyr Leu Ser Gln Phe Pro Lys Ala
225 230 235 240
Lys Leu Lys Pro Gly Ala Pro Leu Lys Pro Lys Leu Asn Pro Lys Lys
245 250 255
Ala Arg Ala Tyr Gly Arg Gly Ile Glu Pro Thr Gly Asn Met Val Lys
260 265 270
Gln Pro Ala Lys Phe Thr Val Asp Thr Ile Ser Ala Gly Gln Gly Asp
275 280 285
Val Met Val Phe Val Glu Asp Pro Glu Gly Asn Lys Glu Glu Ala Gln
290 295 300
Val Thr Pro Asp Ser Asp Lys Asn Lys Thr Tyr Ser Val Glu Tyr Leu
305 310 315 320
Pro Lys Val Thr Gly Leu His Lys Val Thr Val Leu Phe Ala Gly Gln
325 330 335
His Ile Ser Lys Ser Pro Phe Glu Val Ser Val Asp Lys Ala Gln Gly
340 345 350
Asp Ala Ser Lys Val Thr Ala Lys Gly Pro Gly Leu Glu Ala Val Gly
355 360 365
Asn Ile Ala Asn Lys Pro Thr Tyr Phe Asp Ile Tyr Thr Ala Gly Ala
370 375 380
Gly Val Gly Asp Ile Gly Val Glu Val Glu Asp Pro Gln Gly Lys Asn
385 390 395 400
Thr Val Glu Leu Leu Val Glu Asp Lys Gly Asn Gln Val Tyr Arg Cys
405 410 415
Val Tyr Lys Pro Met Gln Pro Gly Pro His Val Val Lys Ile Phe Phe
420 425 430
Ala Gly Asp Thr Ile Pro Lys Ser Pro Phe Val Val Gln Val Gly Glu
435 440 445
Ala Cys Asn Pro Asn Ala Cys Arg Ala Ser Gly Arg Gly Leu Gln Pro
450 455 460
Lys Gly Val Arg Ile Arg Glu Thr Thr Asp Phe Lys Val Asp Thr Lys
465 470 475 480
Ala Ala Gly Ser Gly Glu Leu Gly Val Thr Met Lys Gly Pro Lys Gly
485 490 495
Leu Glu Glu Leu Val Lys Gln Lys Asp Phe Leu Asp Gly Val Tyr Ala
500 505 510
Phe Glu Tyr Tyr Pro Ser Thr Pro Gly Arg Tyr Ser Ile Ala Ile Thr
515 520 525
Trp Gly Gly His His Ile Pro Lys Ser Pro Phe Glu Val Gln Val Gly
530 535 540
Pro Glu Ala Gly Met Gln Lys Val Arg Ala Trp Gly Pro Gly Leu His
545 550 555 560
Gly Gly Ile Val Gly Arg Ser Ala Asp Phe Val Val Glu Ser Ile Gly
565 570 575
Ser Glu Val Gly Ser Leu Gly Phe Ala Ile Glu Gly Pro Ser Gln Ala
580 585 590

```

Lys Ile Glu Tyr Asn Asp Gln Asn Asp Gly Ser Cys Asp Val Lys Tyr
 595 600 605
 Trp Pro Lys Glu Pro Gly Glu Tyr Ala Val His Ile Met Cys Asp Asp
 610 615 620
 Glu Asp Ile Lys Asp Ser Pro Tyr Met Ala Phe Ile His Pro Ala Thr
 625 630 635 640
 Gly Gly Tyr Asn Pro Asp Leu Val Arg Ala Tyr Gly Pro Gly Leu Glu
 645 650 655
 Lys Ser Gly Cys Ile Val Asn Asn Leu Ala Glu Phe Thr Val Asp Pro
 660 665 670
 Lys Asp Ala Gly Lys Ala Pro Leu Lys Ile Phe Ala Gln Asp Gly Glu
 675 680 685
 Gly Gln Arg Ile Asp Ile Gln Met Lys Asn Arg Met Asp Gly Thr Tyr
 690 695 700
 Ala Cys Ser Tyr Thr Pro Val Lys Ala Ile Lys His Thr Ile Ala Val
 705 710 715 720
 Val Trp Gly Gly Val Asn Ile Pro His Ser Pro Tyr Arg Val Asn Ile
 725 730 735
 Gly Gln Gly Ser His Pro Gln Lys Val Lys Val Phe Gly Pro Gly Val
 740 745 750
 Glu Arg Ser Gly Leu Lys Ala Asn Glu Pro Thr His Phe Thr Val Asp
 755 760 765
 Cys Thr Glu Ala Gly Glu Gly Asp Val Ser Val Gly Ile Lys Cys Asp
 770 775 780
 Ala Arg Val Leu Ser Glu Asp Glu Glu Asp Val Asp Phe Asp Ile Ile
 785 790 795 800
 His Asn Ala Asn Asp Thr Phe Thr Val Lys Tyr Val Pro Pro Ala Ala
 805 810 815
 Gly Arg Tyr Thr Ile Lys Val Leu Phe Ala Ser Gln Glu Ile Pro Ala
 820 825 830
 Ser Pro Phe Arg Val Lys Val Asp Pro Ser His Asp Ala Ser Lys Val
 835 840 845
 Lys Ala Glu Gly Pro Gly Leu Ser Lys Ala Gly Val Glu Asn Gly Lys
 850 855 860
 Pro Thr His Phe Thr Val Tyr Thr Lys Gly Ala Gly Lys Ala Pro Leu
 865 870 875 880
 Asn Val Gln Phe Asn Ser Pro Leu Pro Gly Asp Ala Val Lys Asp Leu
 885 890 895
 Asp Ile Ile Asp Asn Tyr Asp Tyr Ser His Thr Val Lys Tyr Thr Pro
 900 905 910
 Thr Gln Gln Gly Asn Met Gln Val Leu Val Thr Tyr Gly Gly Asp Pro
 915 920 925
 Ile Pro Lys Ser Pro Phe Thr Val Gly Val Ala Ala Pro Leu Asp Leu
 930 935 940
 Ser Lys Ile Lys Leu Asn Gly Leu Glu Asn Arg Val Glu Val Gly Lys
 945 950 955 960
 Asp Gln Glu Phe Thr Val Asp Thr Arg Gly Ala Gly Gly Gln Gly Lys
 965 970 975
 Leu Asp Val Thr Ile Leu Ser Pro Ser Arg Lys Val Val Pro Cys Leu
 980 985 990
 Val Thr Pro Val Thr Gly Arg Glu Asn Ser Thr Ala Lys Phe Ile Pro
 995 1000 1005
 Arg Glu Glu Gly Leu Tyr Ala Val Asp Val Thr Tyr Asp Gly His Pro
 1010 1015 1020
 Val Pro Gly Ser Pro Tyr Thr Val Glu Ala Ser Leu Pro Pro Asp Pro
 1025 1030 1035 1040
 Ser Lys Val Lys Ala His Gly Pro Gly Leu Glu Gly Gly Leu Val Gly
 1045 1050 1055

Lys Pro Ala Glu Phe Thr Ile Asp Thr Lys Gly Ala Gly Thr Gly Gly
 1060 1065 1070
 Leu Gly Leu Thr Val Glu Gly Pro Cys Glu Ala Lys Ile Glu Cys Ser
 1075 1080 1085
 Asp Asn Gly Asp Gly Thr Cys Ser Val Ser Tyr Leu Pro Thr Lys Pro
 1090 1095 1100
 Gly Glu Tyr Phe Val Asn Ile Leu Phe Glu Glu Val His Ile Pro Gly
 1105 1110 1115 1120
 Ser Pro Phe Lys Ala Asp Ile Glu Met Pro Phe Asp Pro Ser Lys Val
 1125 1130 1135
 Val Ala Ser Gly Pro Gly Leu Glu His Gly Lys Val Gly Glu Ala Gly
 1140 1145 1150
 Leu Leu Ser Val Asn Cys Ser Glu Ala Gly Pro Gly Ala Leu Gly Leu
 1155 1160 1165
 Glu Ala Val Ser Asp Ser Gly Thr Lys Ala Glu Val Ser Ile Gln Asn
 1170 1175 1180
 Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Ala Val Thr Tyr Val Pro Leu Thr Ala Gly
 1185 1190 1195 1200
 Met Tyr Thr Leu Thr Met Lys Tyr Gly Gly Glu Leu Val Pro His Phe
 1205 1210 1215
 Pro Ala Arg Val Lys Val Glu Pro Ala Val Asp Thr Ser Arg Ile Lys
 1220 1225 1230
 Val Phe Gly Pro Gly Ile Glu Gly Lys Asp Val Phe Arg Glu Ala Thr
 1235 1240 1245
 Thr Asp Phe Thr Val Asp Ser Arg Pro Leu Thr Gln Val Gly Gly Asp
 1250 1255 1260
 His Ile Lys Ala His Ile Ala Asn Pro Ser Gly Ala Ser Thr Glu Cys
 1265 1270 1275 1280
 Phe Val Thr Asp Asn Ala Asp Gly Thr Tyr Gln Val Glu Tyr Thr Pro
 1285 1290 1295
 Phe Glu Lys Gly Leu His Val Val Glu Val Thr Tyr Asp Asp Val Pro
 1300 1305 1310
 Ile Pro Asn Ser Pro Phe Lys Val Ala Val Thr Glu Gly Cys Gln Pro
 1315 1320 1325
 Ser Arg Val Gln Ala Gln Gly Pro Gly Leu Lys Glu Ala Phe Thr Asn
 1330 1335 1340
 Lys Pro Asn Val Phe Thr Val Val Thr Arg Gly Ala Gly Ile Gly Gly
 1345 1350 1355 1360
 Leu Gly Ile Thr Val Glu Gly Pro Ser Glu Ser Lys Ile Asn Cys Arg
 1365 1370 1375
 Asp Asn Lys Asp Gly Ser Cys Ser Ala Glu Tyr Ile Pro Phe Ala Pro
 1380 1385 1390
 Gly Asp Tyr Asp Val Asn Ile Thr Tyr Gly Gly Ala His Ile Pro Gly
 1395 1400 1405
 Ser Pro Phe Arg Val Pro Val Lys Asp Val Val Asp Pro Ser Lys Val
 1410 1415 1420
 Lys Ile Ala Gly Pro Gly Leu Gly Ser Gly Val Arg Ala Arg Val Leu
 1425 1430 1435 1440
 Gln Ser Phe Thr Val Asp Ser Ser Lys Ala Gly Leu Ala Pro Leu Glu
 1445 1450 1455
 Val Arg Val Leu Gly Pro Arg Gly Leu Val Glu Pro Val Asn Met Val
 1460 1465 1470
 Asp Asn Gly Asp Gly Thr His Thr Val Thr Tyr Thr Pro Ser Gln Glu
 1475 1480 1485
 Gly Pro Tyr Met Val Ser Val Lys Tyr Ala Asp Glu Glu Ile Pro Arg
 1490 1495 1500
 Ser Pro Phe Lys Val Lys Val Leu Pro Thr Tyr Asp Ala Ser Lys Val
 1505 1510 1515 1520

Thr Ala Ser Gly Pro Gly Leu Ser Ser Tyr Gly Val Pro Ala Ser Leu
 1525 1530 1535
 Pro Val Asp Phe Ala Ile Asp Ala Arg Asp Ala Gly Glu Gly Leu Leu
 1540 1545 1550
 Ala Val Gln Ile Thr Asp Gln Glu Gly Lys Pro Lys Arg Ala Ile Val
 1555 1560 1565
 His Asp Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Ala Val Thr Tyr Ile Pro Asp Lys
 1570 1575 1580
 Thr Gly Arg Tyr Met Ile Gly Val Thr Tyr Gly Gly Asp Asp Ile Pro
 1585 1590 1595 1600
 Leu Ser Pro Tyr Arg Ile Arg Ala Thr Gln Thr Gly Asp Ala Ser Lys
 1605 1610 1615
 Cys Leu Ala Thr Gly Pro Gly Ile Ala Ser Thr Val Lys Thr Gly Glu
 1620 1625 1630
 Glu Val Gly Phe Val Val Asp Ala Lys Thr Ala Gly Lys Gly Lys Val
 1635 1640 1645
 Thr Cys Thr Val Leu Thr Pro Asp Gly Thr Glu Ala Glu Ala Asp Val
 1650 1655 1660
 Ile Glu Asn Glu Asp Gly Thr Tyr Asp Ile Phe Tyr Thr Ala Ala Lys
 1665 1670 1675 1680
 Pro Gly Thr Tyr Val Ile Tyr Val Arg Phe Gly Gly Val Asp Ile Pro
 1685 1690 1695
 Asn Ser Pro Phe Thr Val Met Ala Thr Asp Gly Glu Val Thr Ala Val
 1700 1705 1710
 Glu Glu Ala Pro Val Asn Ala Cys Pro Pro Gly Phe Arg Pro Trp Val
 1715 1720 1725
 Thr Glu Glu Ala Tyr Val Pro Val Ser Asp Met Asn Gly Leu Gly Phe
 1730 1735 1740
 Lys Pro Phe Asp Leu Val Ile Pro Phe Ala Val Arg Lys Gly Glu Ile
 1745 1750 1755 1760
 Thr Gly Glu Val His Met Pro Ser Gly Lys Thr Ala Thr Pro Glu Ile
 1765 1770 1775
 Val Asp Asn Lys Asp Gly Thr Val Thr Val Arg Tyr Ala Pro Thr Glu
 1780 1785 1790
 Val Gly Leu His Glu Met His Ile Lys Tyr Met Gly Ser His Ile Pro
 1795 1800 1805
 Glu Ser Pro Leu Gln Phe Tyr Val Asn Tyr Pro Asn Ser Gly Ser Val
 1810 1815 1820
 Ser Ala Tyr Gly Pro Gly Leu Val Tyr Gly Val Ala Asn Lys Thr Ala
 1825 1830 1835 1840
 Thr Phe Thr Ile Val Thr Glu Asp Ala Gly Glu Gly Gly Leu Asp Leu
 1845 1850 1855
 Ala Ile Glu Gly Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ser Cys Ile Asp Asn Lys
 1860 1865 1870
 Asp Gly Thr Cys Thr Val Thr Tyr Leu Pro Thr Leu Pro Gly Asp Tyr
 1875 1880 1885
 Ser Ile Leu Val Lys Tyr Asn Asp Lys His Ile Pro Gly Ser Pro Phe
 1890 1895 1900
 Thr Ala Lys Ile Thr Asp Asp Ser Arg Arg Cys Ser Gln Val Lys Leu
 1905 1910 1915 1920
 Gly Ser Ala Ala Asp Phe Leu Leu Asp Ile Ser Glu Thr Asp Leu Ser
 1925 1930 1935
 Ser Leu Thr Ala Ser Ile Lys Ala Pro Ser Gly Arg Asp Glu Pro Cys
 1940 1945 1950
 Leu Leu Lys Arg Leu Pro Asn Asn His Ile Gly Ile Ser Phe Ile Pro
 1955 1960 1965
 Arg Glu Val Gly Glu His Leu Val Ser Ile Lys Lys Asn Gly Asn His
 1970 1975 1980

```

Val Ala Asn Ser Pro Val Ser Ile Met Val Val Gln Ser Glu Ile Gly
1985                1990                1995                2000
Asp Ala Arg Arg Ala Lys Val Tyr Gly Arg Gly Leu Ser Glu Gly Arg
                2005                2010                2015
Thr Phe Glu Met Ser Asp Phe Ile Val Asp Thr Arg Asp Ala Gly Tyr
                2020                2025                2030
Gly Gly Ile Ser Leu Ala Val Glu Gly Pro Ser Lys Val Asp Ile Gln
                2035                2040                2045
Thr Glu Asp Leu Glu Asp Gly Thr Cys Lys Val Ser Tyr Phe Pro Thr
                2050                2055                2060
Val Pro Gly Val Tyr Ile Val Ser Thr Lys Phe Ala Asp Glu His Val
2065                2070                2075                2080
Pro Gly Ser Pro Phe Thr Val Lys Ile Ser Gly Glu Gly Arg Val Lys
                2085                2090                2095
Glu Ser Ile Thr Arg Thr Ser Arg Ala Pro Ser Val Ala Thr Val Gly
                2100                2105                2110
Ser Ile Cys Asp Leu Asn Leu Lys Ile Pro Glu Ile Asn Ser Ser Asp
                2115                2120                2125
Met Ser Ala His Val Thr Ser Pro Ser Gly Arg Val Thr Glu Ala Glu
                2130                2135                2140
Ile Val Pro Met Gly Lys Asn Ser His Cys Val Arg Phe Val Pro Gln
2145                2150                2155                2160
Glu Met Gly Val His Thr Val Ser Val Lys Tyr Arg Gly Gln His Val
                2165                2170                2175
Thr Gly Ser Pro Phe Gln Phe Thr Val Gly Pro Leu Gly Glu Gly Gly
                2180                2185                2190
Ala His Lys Val Arg Ala Gly Gly Pro Gly Leu Glu Arg Gly Glu Ala
                2195                2200                2205
Gly Val Pro Ala Glu Phe Ser Ile Trp Thr Arg Glu Ala Gly Ala Gly
                2210                2215                2220
Gly Leu Ser Ile Ala Val Glu Gly Pro Ser Lys Ala Glu Ile Thr Phe
2225                2230                2235                2240
Asp Asp His Lys Asn Gly Ser Cys Gly Val Ser Tyr Ile Ala Gln Glu
                2245                2250                2255
Pro Gly Asn Tyr Glu Val Ser Ile Lys Phe Asn Asp Glu His Ile Pro
                2260                2265                2270
Glu Ser Pro Tyr Leu Val Pro Val Ile Ala Pro Ser Asp Asp Ala Arg
                2275                2280                2285
Arg Leu Thr Val Met Ser Leu Gln Glu Ser Gly Leu Lys Val Asn Gln
                2290                2295                2300
Pro Ala Ser Phe Ala Ile Arg Leu Asn Gly Ala Lys Gly Lys Ile Asp
2305                2310                2315                2320
Ala Lys Val His Ser Pro Ser Gly Ala Val Glu Glu Cys His Val Ser
                2325                2330                2335
Glu Leu Glu Pro Asp Lys Tyr Ala Val Arg Phe Ile Pro His Glu Asn
                2340                2345                2350
Gly Val His Thr Ile Asp Val Lys Phe Asn Gly Ser His Val Val Gly
                2355                2360                2365
Ser Pro Phe Lys Val Arg Val Gly Glu Pro Gly Gln Ala Gly Asn Pro
                2370                2375                2380
Ala Leu Val Ser Ala Tyr Gly Thr Gly Leu Glu Gly Gly Thr Thr Gly
2385                2390                2395                2400
Ile Gln Ser Glu Phe Phe Ile Asn Thr Thr Arg Ala Gly Pro Gly Thr
                2405                2410                2415
Leu Ser Val Thr Ile Glu Gly Pro Ser Lys Val Lys Met Asp Cys Gln
                2420                2425                2430
Glu Thr Pro Glu Gly Tyr Lys Val Met Tyr Thr Pro Met Ala Pro Gly
                2435                2440                2445

```

```

Asn Tyr Leu Ile Ser Val Lys Tyr Gly Gly Pro Asn His Ile Val Gly
2450                2455                2460
Ser Pro Phe Lys Ala Lys Val Thr Gly Gln Arg Leu Val Ser Pro Gly
2465                2470                2475                2480
Ser Ala Asn Glu Thr Ser Ser Ile Leu Val Glu Ser Val Thr Arg Ser
                2485                2490                2495
Ser Thr Glu Thr Cys Tyr Ser Ala Ile Pro Lys Ala Ser Ser Asp Ala
                2500                2505                2510
Ser Lys Val Thr Ser Lys Gly Ala Gly Leu Ser Lys Ala Phe Val Gly
2515                2520                2525
Gln Lys Ser Ser Phe Leu Val Asp Cys Ser Lys Ala Gly Ser Asn Met
2530                2535                2540
Leu Leu Ile Gly Val His Gly Pro Thr Thr Pro Cys Glu Glu Val Ser
2545                2550                2555                2560
Met Lys His Val Gly Asn Gln Gln Tyr Asn Val Thr Tyr Val Val Lys
                2565                2570                2575
Glu Arg Gly Asp Tyr Val Leu Ala Val Lys Trp Gly Glu Glu His Ile
2580                2585                2590
Pro Gly Ser Pro Phe His Val Thr Val Pro
2595                2600

```

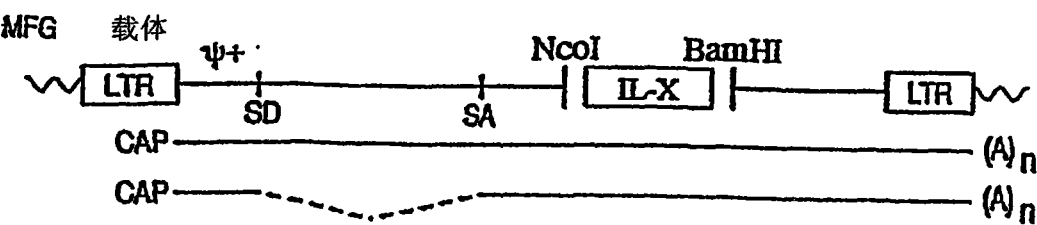


图 1A

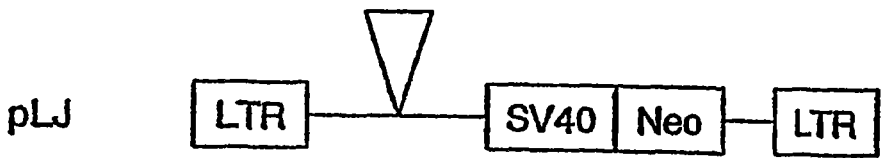


图 1B

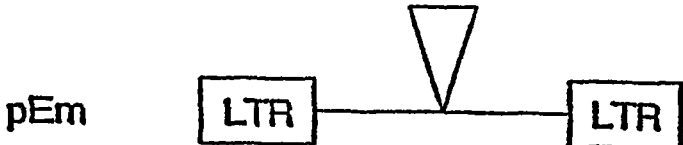


图 1C

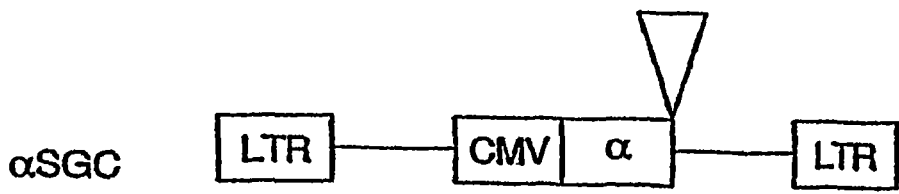


图 1D

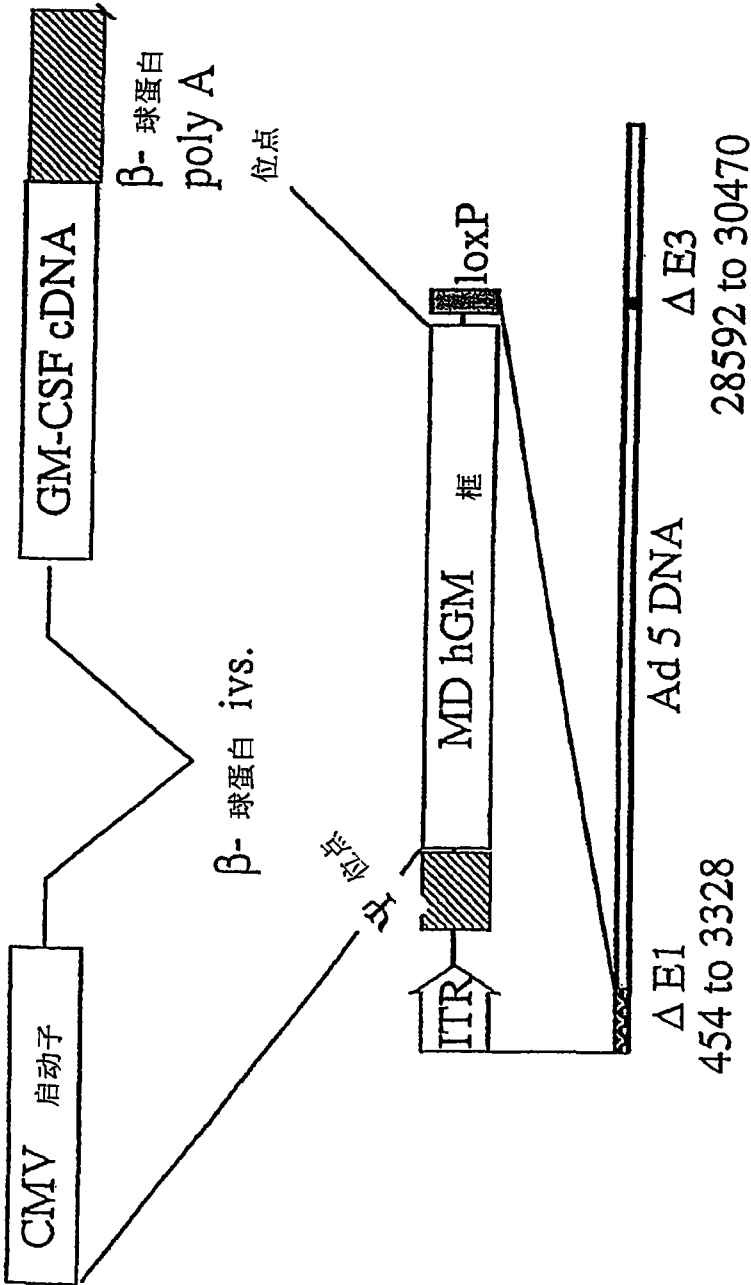


图 1E

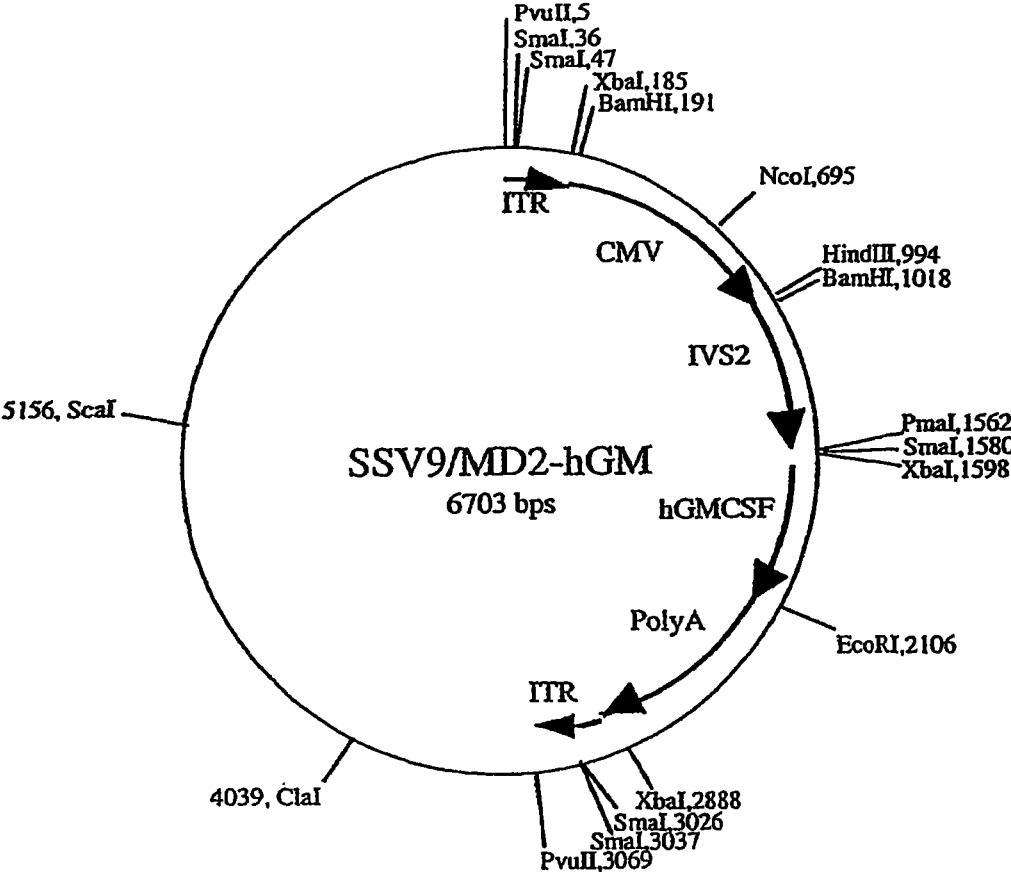


图 1F

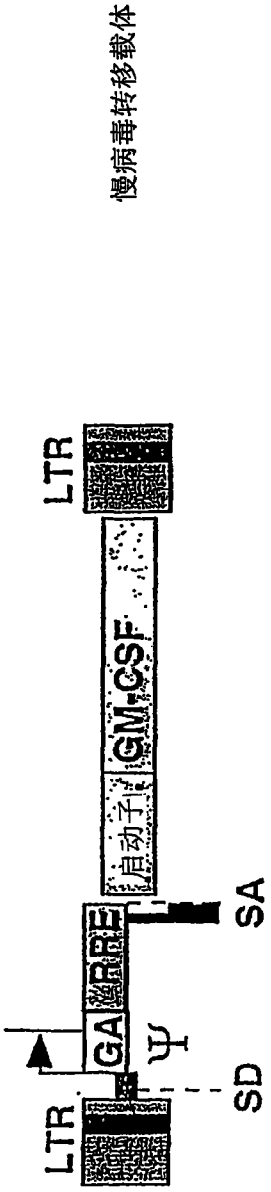


图 1G

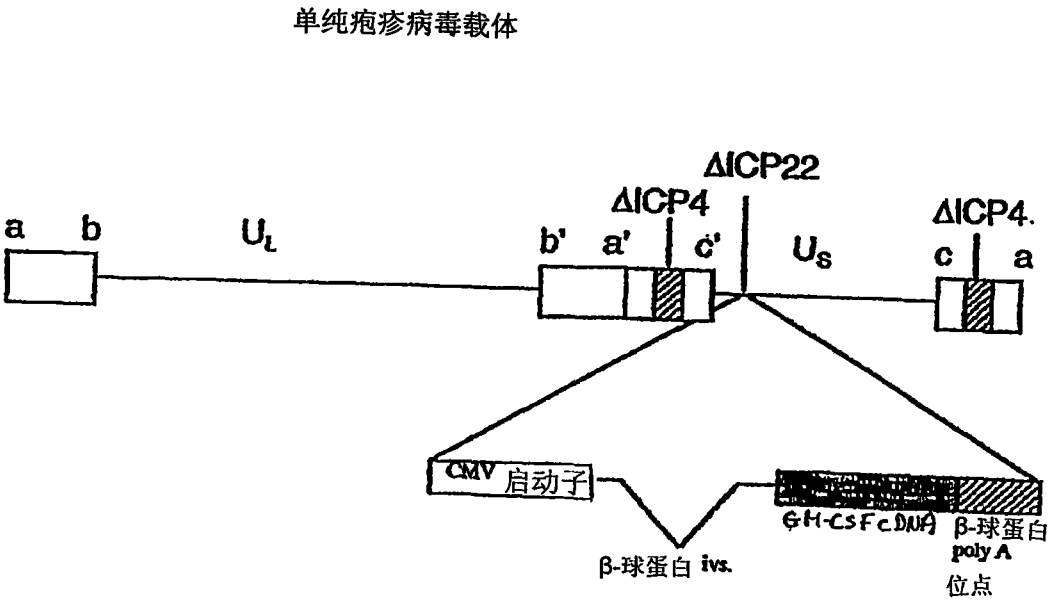


图 1H

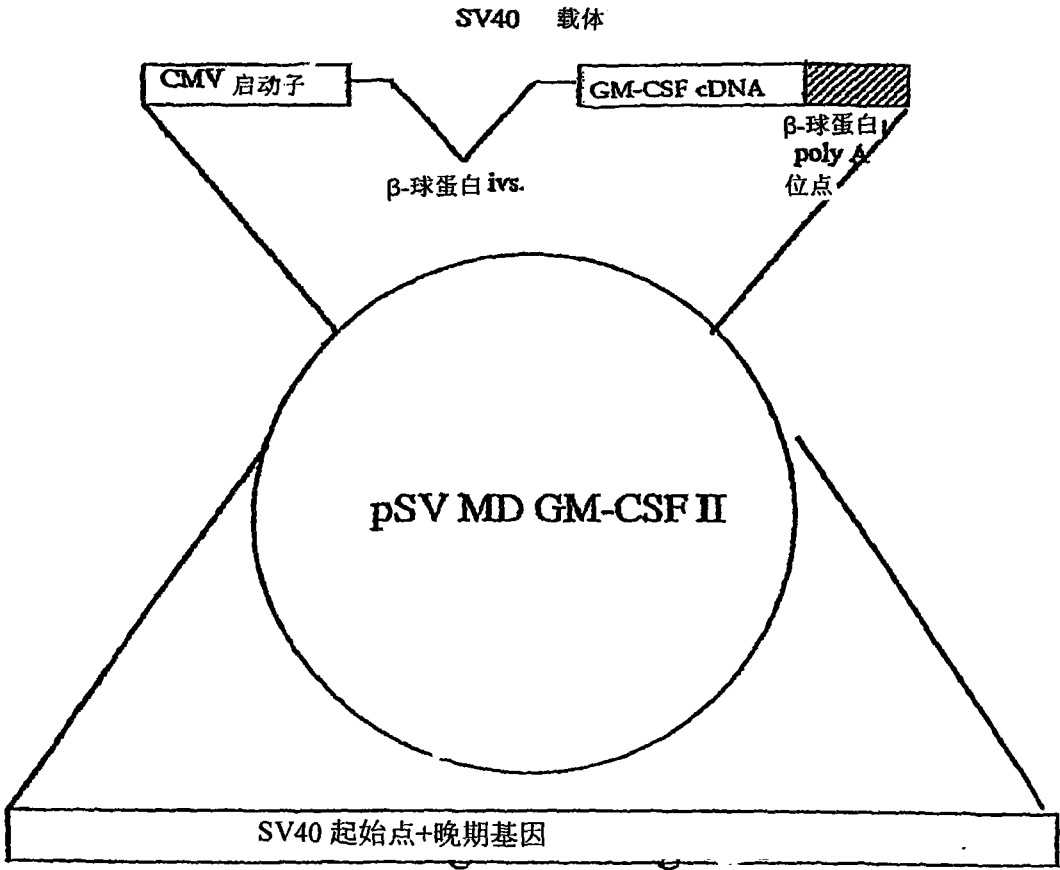


图 11

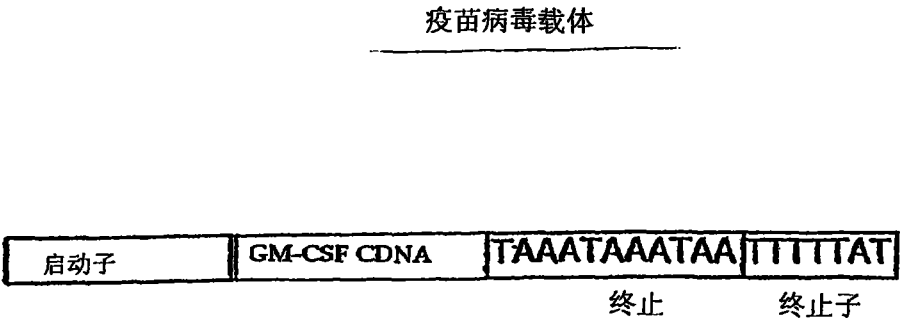


图 1J

完全前列腺特异性抗原 (PSA) 应答

异体前列腺 *GVAX*

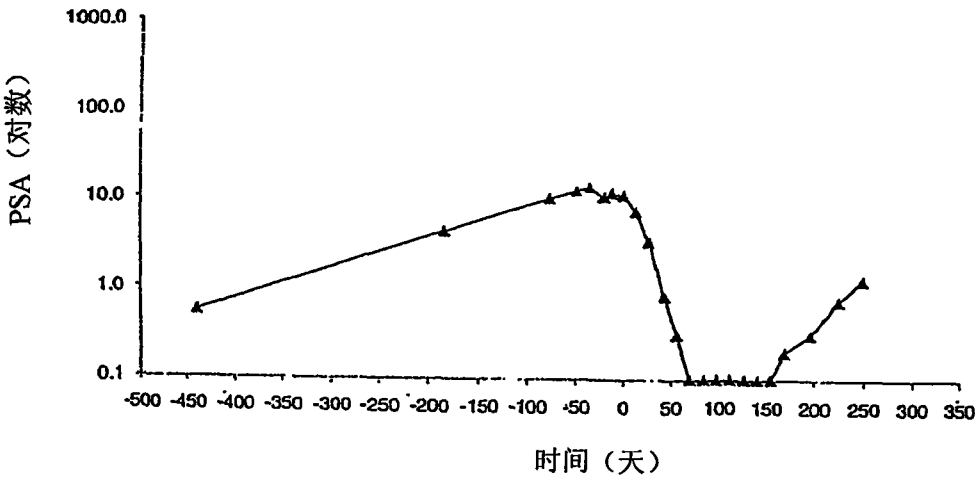
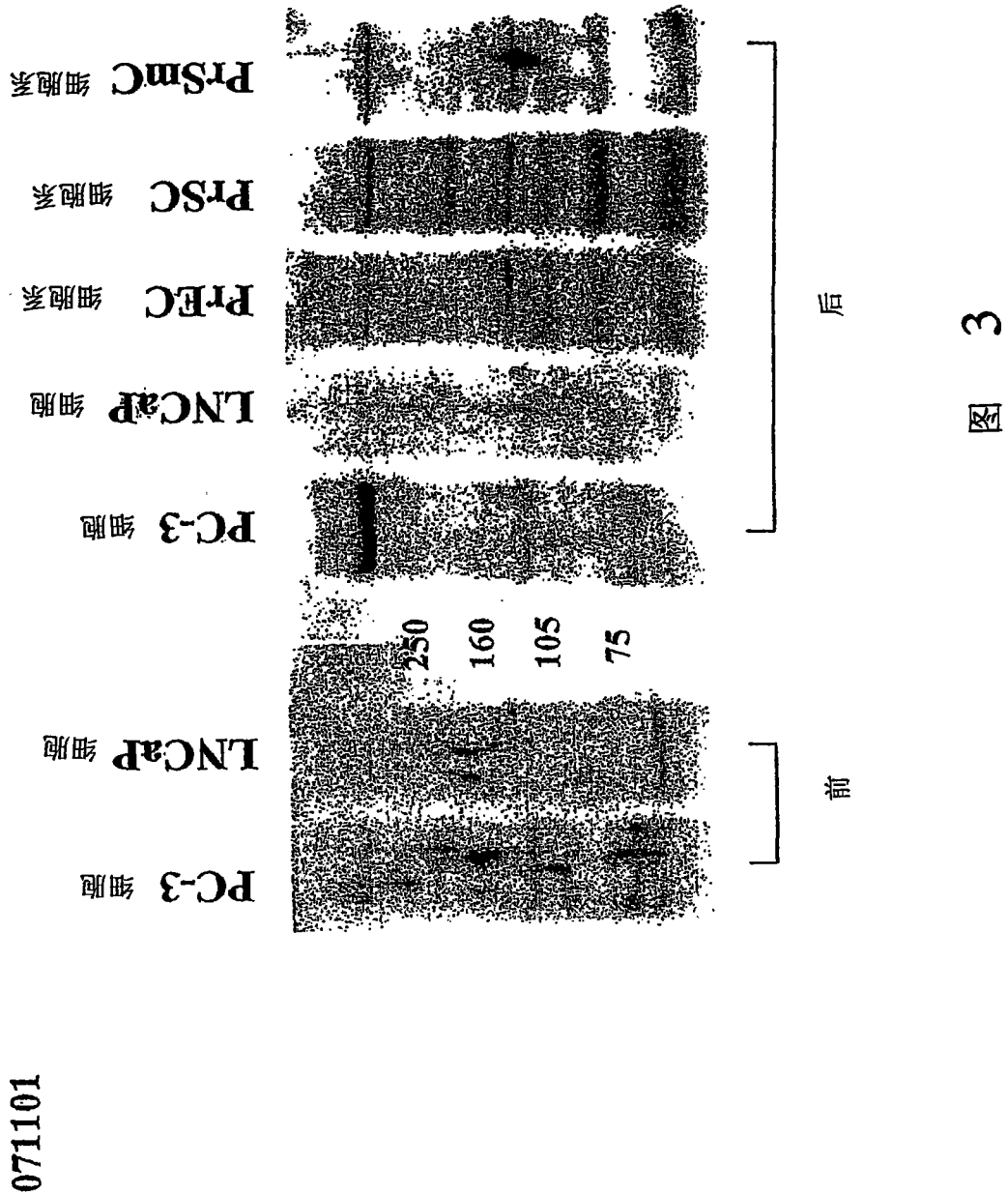


图 2



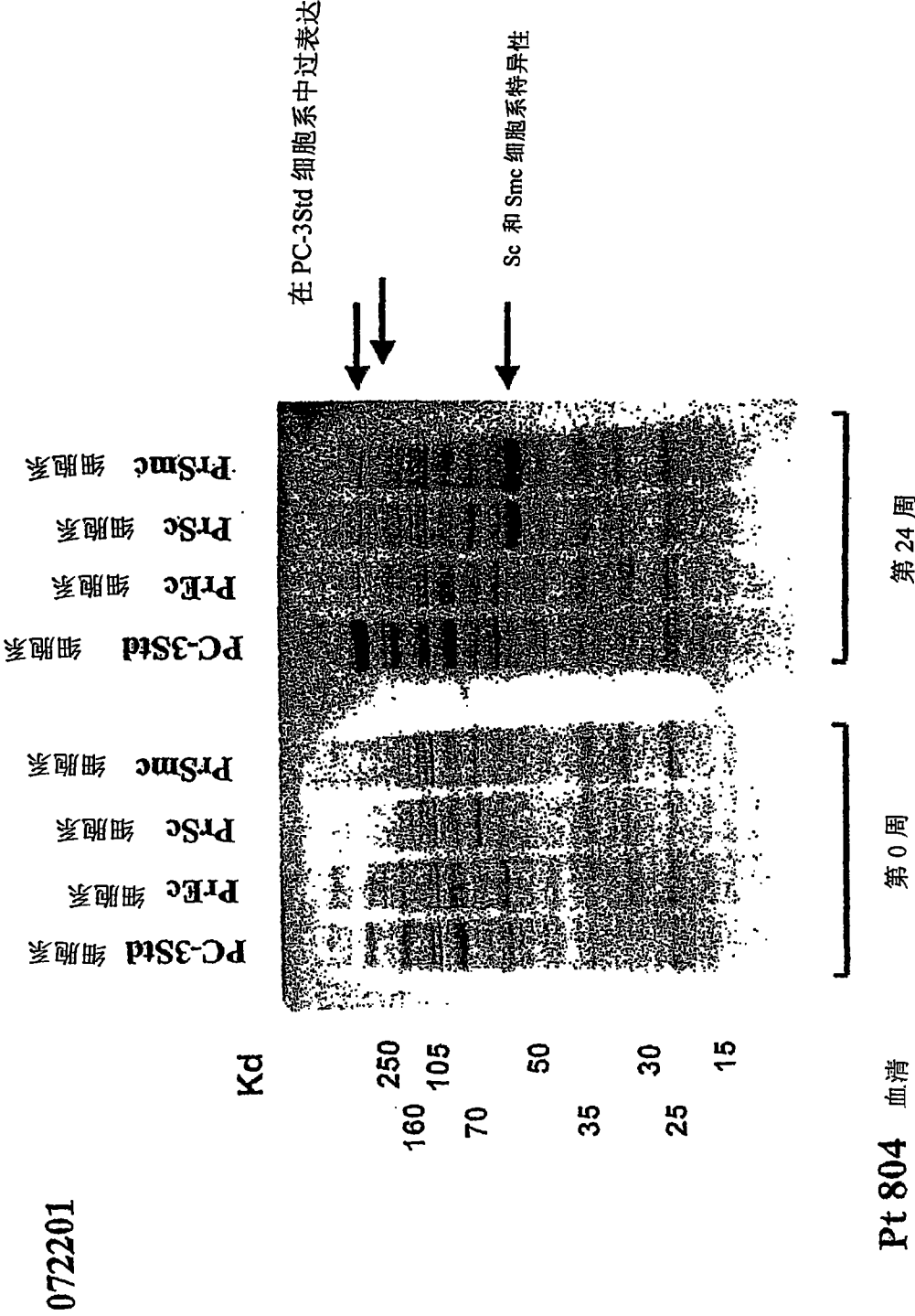


图 4

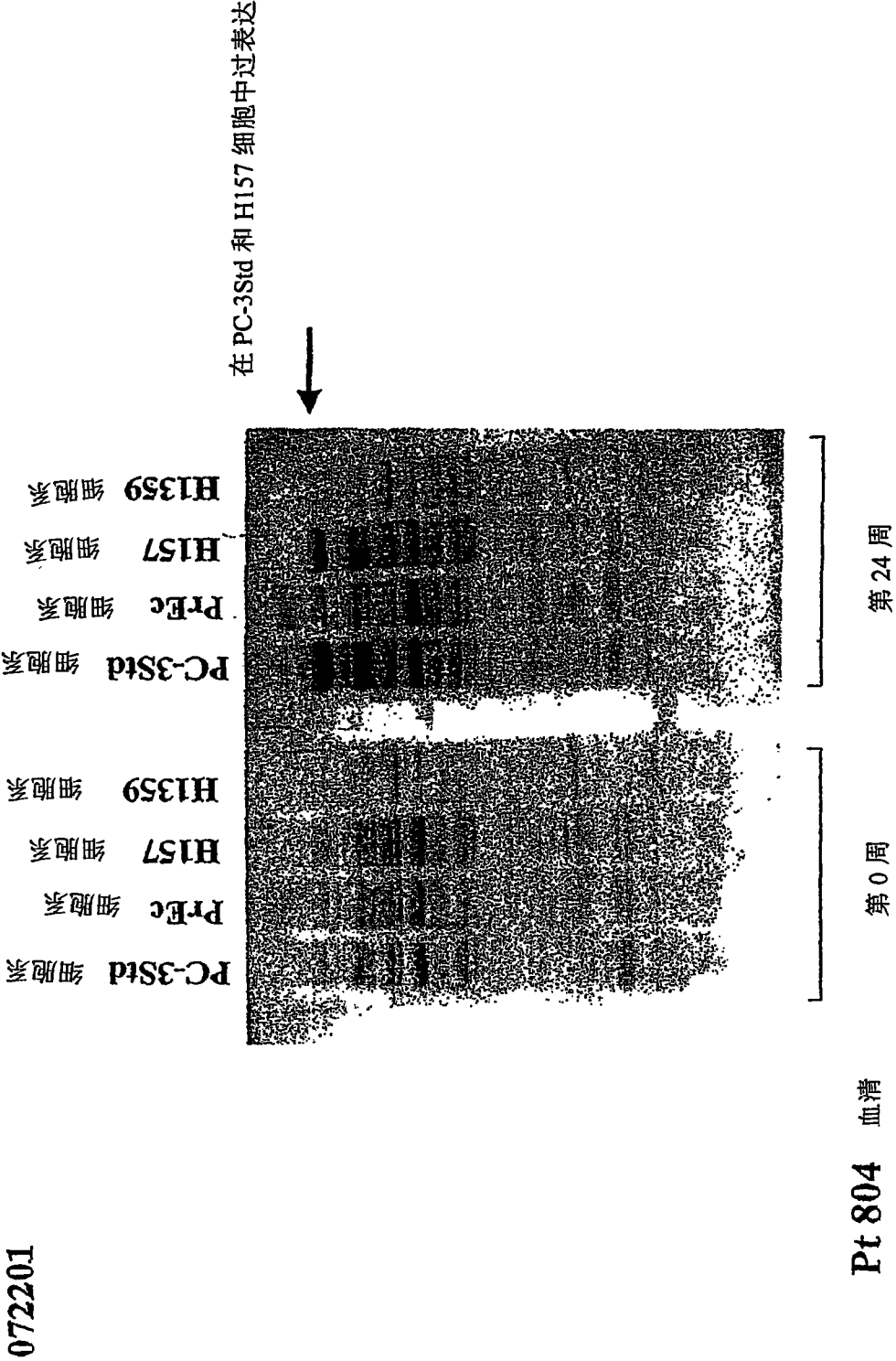


图 5

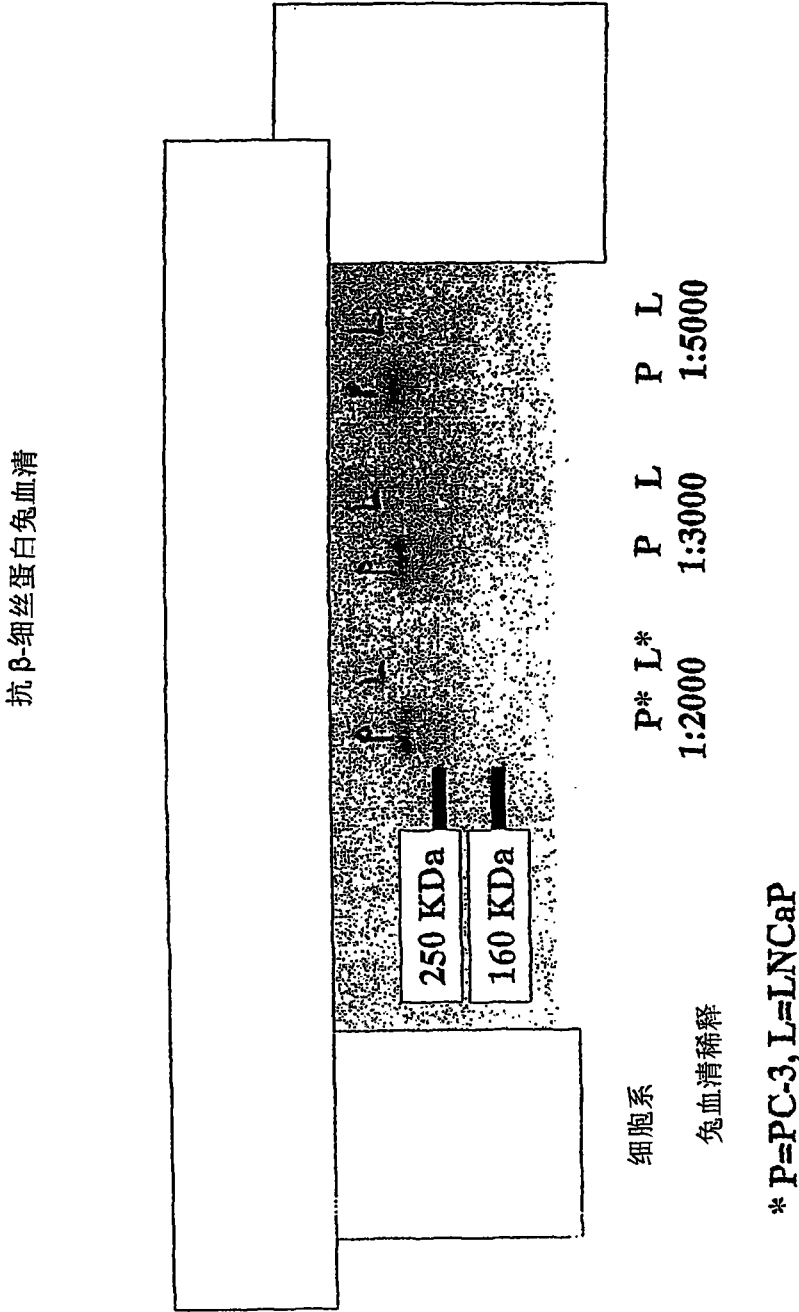


图 6