



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1643143 B

(45) 授权公告日 2013.05.22

(21) 申请号 03806580.0

C12N 5/00(2006.01)

(22) 申请日 2003.01.22

C07H 21/00(2006.01)

(30) 优先权数据

10/057,475 2002.01.22 US

(56) 对比文件

Paul J. Martin 等. A New Human T-Cell Differentiation Antigen: Unexpected Expression on Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. 《Immunogenetics》. 1980, 第 11 卷 429-439.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2004.09.21

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2003/002353 2003.01.22

Motoi Hanada 等. bcl-2 Gene Hypomethylation and High-Level Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. 《Blood》. 1993, 第 82 卷 (第 6 期), 1820-1828.

(87) PCT 申请的公布数据

W02003/062401 EN 2003.07.31

Thomas Rasmussen 等. Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay. 《Experimental Hematology》. 2000, 第 28 卷 1039-1045.

(73) 专利权人 考丽克萨有限公司

地址 美国华盛顿州

审查员 唐莉

(72) 发明人 A·盖格 P·A·阿尔盖特

J·曼尼恩 J·D·克拉普 A·王

N·奥多尼斯 L·卡特

P·D·麦克内尔

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 周承泽

(51) Int. Cl.

C12N 15/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书105页

序列表49页 附图15页

(54) 发明名称

检测、诊断和治疗血液恶性肿瘤的组合物和方法

(57) 摘要

公开了检测、诊断、预后和治疗血液恶性肿瘤疾病,具体是 B 细胞白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤的方法和组合物。公开了在动物中诱导对特异性血液恶性肿瘤相关抗原性多肽及其抗原性多肽片段的免疫和 T 细胞应答的组合物、方法和试剂盒。还公开了用于鉴定含一种或多种血液恶性肿瘤相关组合物的细胞和生物样品的组合物和方法,以及检测和诊断这类疾病和病变细胞的方法。还公开了诊断和治疗试剂盒及诊断、治疗和 / 或预防各种白血病和淋巴瘤的方法。

1. SEQ ID NO :4 在制备检测血液恶性肿瘤的诊断试剂中的应用,其中,所述血液恶性肿瘤是多发性骨髓瘤或慢性淋巴细胞白血病。
2. SEQ ID NO :3 在制备检测血液恶性肿瘤的诊断试剂中的应用,其中,所述血液恶性肿瘤是多发性骨髓瘤或慢性淋巴细胞白血病。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的应用,其中,所述血液恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。
4. 如权利要求 1 或 2 所述的应用,其中,所述血液恶性肿瘤是慢性淋巴细胞白血病。

检测、诊断和治疗血液恶性肿瘤的组合物和方法

[0001] 相关专利申请的相互参照

[0002] 本申请是 2002 年 1 月 22 日提交的美国专利申请序列号 10/057,475 的部分延续,后者是 2001 年 11 月 6 日提交的美国专利申请序列号 10/040,862 的部分延续,后者是 2001 年 3 月 1 日提交的美国专利申请序列号 09/796,692 的部分延续,它要求 2000 年 3 月 1 日提交的美国临时专利申请序列号 60/186,126;2000 年 3 月 17 日提交的序列号 60/190,479;2000 年 4 月 27 日提交的序列号 60/200,545;2000 年 4 月 28 日提交的序列号 60/200,303;2000 年 4 月 28 日提交的序列号 60/200,779;2000 年 5 月 1 日提交的序列号 60/200,999;2000 年 5 月 4 日提交的序列号 60/202,084;2000 年 5 月 22 日提交的序列号 60/206,201;2000 年 7 月 14 日提交的序列号 60/208,950;2000 年 8 月 3 日提交的序列号 60/222,903;2000 年 8 月 4 日提交的序列号 60/223,406;和 2000 年 8 月 7 日提交的序列号 60/223,378 的优先权;上述各专利申请的完整说明书、权利要求书、序列和附图都纳入本文作为参考,无需弃权且用于所有目的。

[0003] 关于在联邦政府资助下进行研究和开发获得的发明权利的声明

[0004] 不适用

[0005] 参考以光盘形式提交的“序列表”、表格或计算机程序表附孙

[0006] 无

[0007] 1 发明背景

[0008] 1.1 发明领域

[0009] 本发明一般涉及癌症诊断和治疗领域。更具体说,涉及令人惊奇地发现了检测和免疫治疗血液恶性肿瘤,具体是 B 细胞白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤的组合物和方法。本发明提供了诱导针对分离自人血液恶性肿瘤的抗原性多肽及抗原性肽片段的免疫应答和 T 细胞应答的新的有效方法、组合物和试剂盒,以及利用这类组合物诊断、检测、治疗、监测和/或预防各种类型人血液恶性肿瘤的方法。具体说,本发明提供的多肽、肽、抗体、抗原结合片段、杂交瘤、宿主细胞、载体和多核苷酸化合物及组合物,可用于鉴定和区分不同类型的血液恶性肿瘤,及检测、诊断、预后、监测和治疗患病动物的这类疾病。

[0010] 1.2 相关领域描述

[0011] 1.2.1 血液恶性肿瘤

[0012] 血液恶性肿瘤,如白血病和淋巴瘤是以造血细胞的异常生长和成熟异常为特征性疾病。白血病通常是造血干细胞的恶性疾病,包括成人和儿童的急性骨髓白血病(AML)、慢性骨髓白血病(CML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)和继发性白血病。淋巴瘤有两种不同类型:非霍奇金淋巴瘤(NHL)和霍奇金氏病。NHL 是 B 或 T 细胞的克隆性扩展,但何杰金氏病的分子病理学,包括谱系衍生和克隆能力仍不清楚。其它血液恶性肿瘤包括骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增生综合症(MPS)和多发性骨髓瘤。血液恶性肿瘤通常是严重疾病,可导致各种症状包括骨髓衰竭和器官衰竭。

[0013] NHL 是美国癌症死亡的第 6 位最常见原因。每年发病率中只有前列腺、乳腺、肺、结直肠和膀胱癌通常超过淋巴瘤。1995 年新诊断为 NHL 超过 45000 人,21000 多病人死亡。

淋巴瘤病人的平均年龄较年轻(42岁),因此病而死亡的人数使NHL成为影响美国经济的第四位癌症。过去15年,美国癌症协会报告NHL发病率增加了50%,是任何癌症中增加最大之一。大量增加主要归因于患AIDS的年轻人淋巴瘤的发生。淋巴瘤也是第三位最常见的童年期恶性肿瘤,占儿童癌症的约10%。成活率(所有年龄)73%(低危)至26%(高危)不等。

[0014] 1.3 现有技术的不足

[0015] 对许多血液恶性肿瘤包括白血病和淋巴瘤的治疗仍有困难,现有疗法不是普遍有效。虽然包括特异性免疫疗法的治疗似乎有很大潜力,但这些治疗只限于少数已知的恶性肿瘤相关抗原。况且早期检测这类血液恶性肿瘤可能相当困难取决于具体疾病。此病缺乏足够数量的特异性诊断和预后标志和鉴定可能受影响的细胞和组织的方法,极大限制了肿瘤学领域的发展。

[0016] 因此,该领域仍然需要改进的方法用于检测、筛查、诊断和治疗血液恶性肿瘤疾病,如B细胞白血病、淋巴瘤和多发性骨髓病。本发明满足了该领域中的这些和其它基本需求,在检测一种或多种这类血液恶性肿瘤中已证明为过度表达的一种或多种多肽的细胞和细胞类型上提供了显著的优越性。

[0017] 2 发明概述

[0018] 本发明通过对一种或多种血液恶性肿瘤,具体是B细胞白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤的鉴定、检测、筛查、诊断、预后、预防治疗和免疫调节,提供了一种新和有效的策略,满足了该领域中上述的长期需求和其它缺陷。

[0019] 本发明部分根据令人惊奇和出乎意料的发现,即在一种或多种类型的血液恶性肿瘤中已鉴定到过度表达的,某些以前不知道或未鉴定的人类多肽、肽和它们所产生的片段,现已鉴定了编码这些肽的基因,并得到其分离形式,并已用一系列的分子生物学方法,包括扣除文库分析,微阵列筛选、多核苷酸测序、肽和表位的鉴定,以及表达概况分析和体外全基因细胞引发,进行了特征分析。现已鉴定了这些多核苷酸及它们编码的多肽、肽和抗原片段,并与血液恶性肿瘤疾病,具体如白血病和淋巴瘤的开始,进展和/或结果等复杂过程相牵连。

[0020] 本发明还证明这些多核苷酸和它们编码的多肽,及抗体、抗原呈递细胞、T细胞和衍生自这种抗体的抗原结合片段,可用于开发特别有利的组合物和方法,以检测、诊断、预后、预防和/或治疗一种或多种这些疾病,特别是那些(a)以一种或多种多核苷酸表达的增加、改变、升高或持续表达为特征的疾病,所述多核苷酸包含至少第一序列区,该区含SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118或124中任一所示的核酸序列,或(b)以一种或多种多肽生物活性的增加、改变、升高或持续为特征的疾病,所述多肽含有至少第一序列区,该区含SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118或124中任一编码的或SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117或119-121中任一所示的氨基酸序列。

[0021] 本发明也提供一种或多种所述肽、多肽、抗体、抗原结合片段和本发明多核苷酸组合在动物中特别是在哺乳动物如人中产生免疫应答或产生 T 细胞应答的方法和用途。本发明还提供这些组合物的一种或多种用于鉴定、检测和定量测定临床样品、分离的细胞、整体组织和甚至受影响个体中血液恶性肿瘤组合物的方法和用途。本文所述组合物和方法也可用于制备一种或多种诊断试剂、测定、药物或治疗剂,进行此类疾病的诊断和治疗。

[0022] 在第一个重要实施例中,提供含有至少第一种分离的肽或多肽的组合物,此分离的肽或多肽所含的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的氨基酸序列至少有约 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或约 99% 相同。示范性优选序列是含有至少第一编码区的那些序列,该第一编码区所含的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的氨基酸序列至少约 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93% 或约 94% 相同;包含与 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的氨基酸序列至少约 95%、96%、97%、98% 或约 99% 相同的至少第一编码区的那些序列,是实施本发明特别优选序列的例子。同样,还提供含有基本上由 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的氨基酸序列组成的肽和多肽化合物及组合物。

[0023] 以类似方式,本文实施例也提供检测、诊断、预后、预防、治疗 B 细胞白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤的组合物和方法。涉及本发明此方面的示范性优选肽和多肽化合物及组合物,包括但不限于:含有至少第一种分离的肽或多肽的那些肽和多肽化合物或与 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、

82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的氨基酸序列至少约 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或约 99% 相同；和含有至少第一编码区的那些序列，该第一编码区所含的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的氨基酸序列至少约 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93% 或约 94% 相同；以及甚至含有至少第一编码区的那些序列，该第一编码区所含的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的氨基酸序列至少约 95%、96%、97%、98% 或约 99% 相同。

[0024] 本发明的示范性肽可以是任何合适的长度，取决于其具体用途；这些肽可长约 9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、或约 100 个左右氨基酸。当然，本发明的肽也可包含上述范围内中等长度或整数长度的氨基酸。

[0025] 本发明的示范性多肽和蛋白质可以是任何合适的长度，取决于其具体用途；这些多肽和蛋白质可长约 100、150、200、250、300、35 或约 400 个左右氨基酸。当然，本发明的多肽和蛋白质也可包含上述范围内中等长度或整数长度的氨基酸。

[0026] 本发明的肽、多肽、蛋白质、抗体和抗原结合片段优选含有 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的任一肽的至少约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或者 100 个毗连的氨基酸序列。

[0027] 而且，本发明的多肽、蛋白质、抗体和抗原结合片段可更优选至少含有第一分离的编码区，该编码区含有 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一所编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的任一肽的至少约 100、110、120、130、140、150、160、170、180、190 或者 200 个毗连的氨基酸序列。

[0028] 同样，本发明的多肽、蛋白质、抗体和抗原结合片段可含有第一分离的编码区，该编码区包含基本上较长的序列，例如，含有 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、

19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS :4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的任一肽的至少约 200、220、240、260、280、或者 300 个毗连的氨基酸序列。

[0029] 在说明性实施例中,特别在涉及 B 细胞白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤的方法和组合物的那些实施例中,本发明多肽所含氨基酸序列 (a) 含有, (b) 基本上包括,或 (c) 包括 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS :4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的氨基酸序列。

[0030] 本发明的多肽和蛋白质优选含有至少第一核酸区段编码的氨基酸序列,该第一核酸区段含有 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一种的至少 21、22、23、24、25、26、27、28、29、或 30 个毗连核苷酸序列。

[0031] 本发明的多肽和蛋白质还优选含有至少第一核酸区段编码的氨基酸序列,该第一核酸区段含有 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一种的至少约 31、32、33、34、35、36、37、38、39、或 40 个毗连核苷酸序列。本发明的多肽和蛋白质还优选含有一个或多个编码区,这些编码区含有第一核酸区段编码的氨基酸序列,该第一核酸区段含有 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一种的至少约 41、42、43、44、45、46、47、48、49、或 50 个毗连核苷酸序列。本发明的多肽和蛋白质还优选含有一个或多个编码区,这些编码区含有第一核酸区段编码的氨基酸序列,该第一核酸区段含有 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一种的至少约 51、52、53、54、55、56、57、58、59、或 60 个毗连核苷酸序列。本发明的多肽和蛋白质还优选含有一个或多个编码区,这些编码区含有第一核酸区段编码的氨基酸序列,该第一核酸区段含有 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一种的至少约 70、80、90、100、110、120、130、140 或 150 个毗连核苷酸序列。本发明的多肽和蛋白质还优选含有一个或多个编码区,这些编码区含有第一核酸区段编码的氨基酸序列,该第一核酸区段含有 SEQ

ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一种的至少约 175、200、225、250、275、300、325、350、375、或 4000 个毗连核苷酸序列。本发明的多肽和蛋白质还优选含有一个或多个编码区,这些编码区含有第一核酸区段编码的氨基酸序列,该第一核酸区段含有 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一种的至少约 500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400 或 1500 个毗连核苷酸序列。

[0032] 在第二个重要实施例中,提供含有至少第一种分离的多核苷酸的组合物,此第一种分离的多核苷酸所含的核酸序列至少与 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一所示的核酸序列至少约 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或约 99% 相同。示范性优选序列是含有至少与 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一所示的核酸序列至少约 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93% 或约 94% 相同;包含与 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一所示的核酸序列至少约 95%、96%、97%、98% 或约 99% 相同的至少一种核酸序列的那些序列,是实施本发明特别优选序列的例子。

[0033] 在具体涉及检测、诊断、预后、预防、治疗 B 细胞白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤的组合物和方法的实施例中,示范性优选多核苷酸组合物包括至少含有第一种分离的核酸区段的那些组合物,此第一种分离的核酸区段含有的序列与 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一所示的核酸序列至少约 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或约 99% 相同。这类多核苷酸优选含有一个或多个分离的编码区,各区可 (a) 包括, (b) 基本上包括,或 (c) 含有 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中所示的核酸序列。

[0034] 本发明的示范性多核苷酸可有任何合适的长度,取决于其具体用途;这些多核苷酸可 (a) 至少长约,或 (b) 至少含有第一种分离的核酸区段,该区段至少长约 27、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、

260、270、280、290、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、520、540、560、580、600、625、650、675、700、750、800、850、900、950 或者 1000 个左右核苷酸；以及较长的多核苷酸，该多核苷酸 (a) 至少长，或 (b) 至少含有第一种分离的核酸区段，该区段至少长约 1000、1025、1050、1075、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550、1600、1650、1700、1750、1800、1850、1900、1950、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900 或 3000 个左右核苷酸，以及大体上较大的多核苷酸。当然，本发明的多核苷酸和核酸区段也可含有上述范围内的中等长度或整数核苷酸。

[0035] 本发明的组合物可含有单一多肽或多核苷酸，或者，可含有二种或多种血液恶性肿瘤化合物，例如二种或多种多肽，二种或多种多核苷酸，或甚至一种或多种肽或多肽与一种或多种多核苷酸的组合。当具体应用考虑二种或多种多肽时，第二和 / 或第三和 / 或第四等分离的肽或多肽优选含有的氨基酸序列至少与 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一所编码的或 SEQ ID NOS :4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的氨基酸序列至少约 91%、93%、95%、97% 或 99% 相同。或者，本发明的多核苷酸可含有一个或多个编码区，其编码第一种融合蛋白或肽，例如在正确读码框中与一种或多种所述血液恶性肿瘤肽或多肽融合的佐剂编码区。或者，此融合蛋白可含有在正确读码框中与一可检测蛋白或肽，或与一免疫刺激蛋白或肽，或其它此类构建物融合的血液恶性肿瘤多肽或肽。融合蛋白如具体用于与本文所述一种或多种血液恶性肿瘤的诊断、检测和治疗有关实施例中的那些融合蛋白。

[0036] 本发明也提供含有至少第一种杂交瘤细胞系的组合物，该杂交瘤细胞系可产生对本文所述一种或多种肽或多肽有免疫特异性的单克隆抗体，或至少第一种对所述肽或多肽有免疫特异性的单克隆抗体或其抗原结合片段。该抗原结合片段可含一轻链可变区，一重链可变区，Fab 片段，F(ab)₂ 片段，Fv 片段、scEv 片段或此类抗体的抗原结合片段。

[0037] 本发明也提供含有至少第一种表达本文所述肽或多肽的分离的抗原呈递细胞，或能与所述肽或多肽起特异性反应的许多分离的 T 细胞的组合物。可通过使 T 细胞与本文所述一种或多种肽或多肽接触来刺激或扩展大多数分离的 T 细胞群。扩展前可克隆 T 细胞且可获得自健康哺乳动物或至少患有第一种血液恶性肿瘤如白血病或淋巴瘤哺乳动物的骨髓、骨髓组分、外周血或外周血组分。

[0038] 如上所述，本发明的分离的多肽可长约 9-1000 个氨基酸，或可长约 50-900 个氨基酸，长约 75-800 个氨基酸，长约 100-700 个氨基酸，长约 125-600 个氨基酸，或任何其它合适长度。

[0039] 编码此分离多肽的分离的核酸区段可长约 27-10000 个核苷酸，长约 150-800 个核苷酸，长约 250-6000 个核苷酸，长约 350-4000 个核苷酸，长约 450-2000 个核苷酸，或任何其它合适长度。

[0040] 该核酸区段可操作地置于至少一种异源重组启动子，如组织特异性、细胞特异性、可诱导性或调节启动子的控制下。这类启动子也可受到一种或多种附加的增强子或调控区的控制或调节，这取决于所需表达该多核苷酸的具体细胞类型。也可将本发明的多核苷酸

和核酸区段包含在一载体内,如质粒或病毒载体。也可将本发明的多核苷酸和核酸区段包含在宿主细胞内,如重组宿主细胞、或人宿主细胞如血细胞或骨髓细胞。

[0041] 本发明的多核苷酸可含有至少第一种操作性框内连接于至少第二种分离的核酸区段,这样该多核苷酸可编码一种融合蛋白,该融合蛋白中第一肽或多肽与第二肽或多肽连接。

[0042] 本发明的多肽可含有任何合适长度的毗连氨基酸,例如长约 2000、1900、1850、1800、1750、1700、1650、1600、1550、1500、1450、1400、1350、1300、1250、1200、1150、1100 或约 1000 个左右氨基酸。同样,本发明的多肽和肽可含有略短的毗连氨基酸编码区,例如约 950、900、850、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350、300、250、200、150 或甚至约 100 个左右氨基酸长度。

[0043] 以同样方式,本发明的多肽和肽可含有甚至更小的毗连氨基酸编码区,例如长约 95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15 或甚至约 9 个左右氨基酸。

[0044] 在所有这类实施例中,那些具有优选范围内中等长度包括所有整数长度的肽和多肽(如含有长度至少约 94、93、92、91、90、89、88、87、86、85、84、83、82、81、80、79、78、77、76、75、74、73、72、71、69、68、67、66 个左右氨基酸的那些肽和多肽)均认为属于本发明范围内。

[0045] 具体实施例中,本发明的肽和多肽可含有 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的一种或多种肽的至少约 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或约 50 个毗连氨基酸的序列。

[0046] 其它实施例中,本发明的肽和多肽可含有 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的一种或多种肽的至少约 51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100 个毗连氨基酸的序列。

[0047] 还有其它实施例中,本发明的肽和多肽可含有 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的一种或多种肽的至少约 100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375 或约 400 个毗连氨基酸的序列。

[0048] 本发明的多肽通常含有上述多核苷酸任一编码的或 SEQ ID NOS:10,471-10,474;

SEQ ID NO:10,481;SEQ ID NOS:10,599-10,819;SEQ ID NOS:10,820-10,842;SEQ ID NOS:10,849-10,908;和 SEQ ID NOS:10,909-10,968 任一所示的第一毗连氨基酸序列,但还可任选地含有 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的至少第二种,至少第三种,或甚至至少第四种或更多种毗连的氨基酸序列。单一肽可只含单一编码区,或单一肽可含有多个相同或明显不同的 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的肽毗连氨基酸序列。事实上,所述多肽可含有 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的任一肽的多个相同的毗连氨基酸序列,或它们可含有一个或多个不同的毗连氨基酸序列。例如,单一多肽可含有 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的一种或多种肽的单一毗连氨基酸序列,或者,可含有 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的一种或多种肽的两个或多个明显不同的毗连氨基酸序列。事实上,所述多肽可含有 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的任一肽的 2、3、4 或甚至 5 个不同的毗连氨基酸序列。或者,单一多肽可含有 2、3、4 或甚至 5 个不同的编码区。例如,多肽至少可含有第一编码区,该第一编码区含有 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、

59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS :4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的任一肽的第一种毗连氨基酸序列,和至少一个第二编码区,该第二编码区含有 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS :4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的任一肽的第二种毗连氨基酸序列。相反,多肽至少可含有第一编码区,该第一编码区含有 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS :4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的任一肽的第一种毗连氨基酸序列,和至少第二编码区,该第二编码区含有明显不同的第二种肽或多肽,例如佐剂或免疫刺激肽或多肽。

[0049] 在这种情况下,同一多肽上的两个编码区可以分开,或两个编码区可操作性相连,各处正确的读框中,这样产生融合蛋白其中第一编码区的第一氨基酸序列连接于第二编码区的第二氨基酸序列。

[0050] 本文公开内容中,短语“SEQ ID NO :1-SEQ ID NO :4 所述序列”指包括这些序列标志符任一所述的任何和所有毗连序列。”即“SEQ ID NO :1-SEQ ID NO :4 任一所述序列”指“SEQ ID NO :1,SEQ ID NO :2,SEQ ID NO :3 或 SEQ ID NO :4 任一所述任何序列。同样,“SEQ ID NO :25-37 所述序列”指 SEQ ID NO :25, SEQ ID NO :26, SEQ ID NO :27, SEQ ID NO :28, SEQ ID NO :29, SEQ ID NO :30, SEQ ID NO :31, SEQ ID NO :32, SEQ ID NO :33, SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, SEQ ID NO :36, 或 SEQ ID NO :37 任一所述任何序列。

[0051] 同样,短语“至少一种 SEQ ID NO :55-SEQ ID NO :62 任一的序列”指 SEQ ID NO :55, SEQ ID NO :56, SEQ ID NO :57, SEQ ID NO :58, SEQ ID NO :59, SEQ ID NO :60, SEQ ID NO :61, 或 SEQ ID NO :62 任一所述的第一种序列。

[0052] 也应理解本发明的试剂盒和组合物从整体和一般意义上说,含有至少一种或多种具体的多核苷酸、多肽和肽,它们含有本文在 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中所示的一种或多种核酸序列的一个或多个毗连序列区,或由 SEQ ID NO :1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS :4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的一种或多种氨基酸序列的

一个或多个毗连序列区,这些肽、多肽和多核苷酸组合物可用于一种或多种具体方法,和用于本文所述一种或多种血癌,具体说是各种特殊类型的淋巴瘤的诊断、检测、预防和治疗。本领域技术人员也可理解,本说明书所述益处是,所述肽和多肽组合物可用于动物中产生 T 细胞或免疫应答,也可将这类组合物施动物,然后从该动物分离得到免疫特异性抗体和抗原结合片段或鉴定其与这类肽或多肽的特异性结合。本发明所鉴定的多核苷酸可通过重组蛋白产生方法(在本领域技术人员的能力范围内),用于产生这类肽、多肽、抗体和抗原结合片段,它们具有本文提供的特异性氨基酸和核酸序列。

[0053] 同样,本领域技术人员了解,一种或多种所述组合物可用于一种或多种诊断或检测方法以鉴定生物样品、宿主细胞、或甚至动物机体或组织内的某些抗体、肽、多核苷酸或多肽。本领域技术人员了解,一种或多种所述核酸或氨基酸组合物可用于制备或制造一种或多种药物,用于诊断、检测、预后、预防或治疗动物的一种或多种血液恶性肿瘤,具体是本文和权利要求所述的恶性疾病。

[0054] 本领域技术人员不难明白,本发明的方法、试剂盒及其用途优选采用本文所述一种或多种化合物和/或组合物,它们含有本文所附序列表 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 所示的一种或多种毗连核苷酸序列。

[0055] 同样,本领域技术人员不难明白,本发明的方法、试剂盒及其用途也可采用本文所述一种或多种化合物和/或组合物,它们含有上述多核苷酸之一编码的或本文所附序列表 SEQ ID NO:1-3、5、7、9、11、13-14、16-17、19-20、22-25、27-28、30-31、33-34、36、38-39、41-42、44、46-47、49、51、53、55、57、59-60、62、64-65、67-70、72-73、75、77-81、83、85-86、88-100、102-103、105-106、108、110-113、115-116、118 或 124 中任一编码的或 SEQ ID NOS:4、6、8、10、12、15、18、21、26、29、32、35、37、40、43、45、48、50、52、54、56、58、61、63、66、71、74、76、82、84、87、101、104、107、109、114、117 或 119-121 中任一所示的任一肽的一种或多种毗连氨基酸序列。

[0056] 3. 附图和序列的简要说明

[0057] 可通过参见以下描述并结合附图了解本发明,其中,同样的参考数字鉴别同样的成分,且其中:

[0058] 图 1 为用于鉴定本发明 cDNA 靶标的微阵列芯片技术方法的示意图,见 5.1 节所述。

[0059] 图 2 为用于产生抗原特异性细胞系和鉴定感兴趣克隆的体外全基因 CD8⁺T 细胞引发方法的总方案的示意图。

[0060] 图 3 为用于产生抗原特异性细胞系和鉴定感兴趣克隆的体外全基因 CD4⁺T 细胞引发方法的总方案的示意图。

[0061] 图 4 为用于鉴定在淋巴瘤细胞中过度表达的 cDNA 的一组探针。

[0062] 图 5 列出了与已知的治疗剂 CD20 和 CD52 有类似组织表达概况的抗原。

[0063] 图 6 说明 Ly1484 长的和 Ly1484 短的 TMpred 报告的结果。

[0064] 图 7 说明 Ly1484 长 TSITES 分析的结果。

[0065] 图 8 说明 Ly1484 短的 TSITES 分析的结果。

- [0066] SEQ ID NO :1 是 Ly1728P 的全长 cDNA。
- [0067] SEQ ID NO :2 是 Ly1728P 的全长蛋白质序列。
- [0068] SEQ ID NO :3 是 Ly1732P 的全长 cDNA 序列。
- [0069] SEQ ID NO :4 是 Ly1732P 的全长蛋白质。
- [0070] SEQ ID NO :5 是 Ly1888P 的全长 cDNA 序列。
- [0071] SEQ ID NO :6 是 Ly1888P 的全长蛋白质序列。
- [0072] SEQ ID NO :7 是 Ly1452_HIS-Tag- 融合蛋白的全长 cDNA 序列。
- [0073] SEQ ID NO :8 是 Ly1452_His-tag- 融合蛋白的全长蛋白质序列。
- [0074] SEQ ID NO :9 是 Ly1452P,剪接变体 1 的全长 cDNA 序列。
- [0075] SEQ ID NO :10 是 Ly1452P,剪接变体 1 的全长蛋白质序列。
- [0076] SEQ ID NO :11 是 Ly1452P,剪接变体 2 的全长 cDNA 序列。
- [0077] SEQ ID NO :12 是 Ly1452P,剪接变体 2 的全长蛋白质序列。
- [0078] SEQ ID NO :13 是 Ly1462P 的部分 cDNA 序列。
- [0079] SEQ ID NO :14 是 Ly1462P 的全长 cDNA 序列。
- [0080] SEQ ID NO :15 是 Ly1462P 的全长蛋白质序列。
- [0081] SEQ ID NO :16 是 Ly1484P 的部分 cDNA 序列。
- [0082] SEQ ID NO :17 是 Ly1484P 的全长 cDNA 序列。
- [0083] SEQ ID NO :18 是 Ly1484P 的全长蛋白质序列。
- [0084] SEQ ID NO :19 是 Ly1486P 的部分 cDNA 序列。
- [0085] SEQ ID NO :20 是 Ly1486P 的全长 cDNA 序列。
- [0086] SEQ ID NO :21 是 Ly1486P 的全长蛋白质序列。
- [0087] SEQ ID NO :22 是 Ly1677P 的部分 cDNA 序列。
- [0088] SEQ ID NO :23 是 Ly1682P 的部分 cDNA 序列。
- [0089] SEQ ID NO :24 是 Ly1693P 的部分 cDNA 序列。
- [0090] SEQ ID NO :25 是 Ly1693P 的全长 cDNA 序列。
- [0091] SEQ ID NO :26 是 Ly1693P 的全长蛋白质序列。
- [0092] SEQ ID NO :27 是 Ly1697P 的部分 cDNA 序列。
- [0093] SEQ ID NO :28 是 Ly1715P 的全长 cDNA 序列。
- [0094] SEQ ID NO :29 是 Ly1715P 的全长蛋白质序列。
- [0095] SEQ ID NO :30 是 Ly1727P 的部分 cDNA 序列。
- [0096] SEQ ID NO :31 是 Ly1727P 的全长 cDNA 序列。
- [0097] SEQ ID NO :32 是 Ly1727P 的全长蛋白质序列。
- [0098] SEQ ID NO :33 是 Ly1885P 的部分 cDNA 序列。
- [0099] SEQ ID NO :34 是 Ly1885P 的全长 cDNA 序列。
- [0100] SEQ ID NO :35 是 Ly1885P 的全长蛋白质序列。
- [0101] SEQ ID NO :36 是 Ly1905P 的部分 cDNA 序列。
- [0102] SEQ ID NO :37 是 Ly1905P 的部分蛋白质序列。
- [0103] SEQ ID NO :38 是 Ly1905P 的部分 cDNA 序列。
- [0104] SEQ ID NO :39 是 Ly1905P 的全长 cDNA 序列。

- [0105] SEQ ID NO :40 是 Ly1905P 的全长蛋白质序列。
- [0106] SEQ ID NO :41 是 Ly663S 的部分 cDNA 序列。
- [0107] SEQ ID NO :42 是 Ly663S 的全长 cDNA 序列。
- [0108] SEQ ID NO :43 是 Ly663S 的全长蛋白质序列。
- [0109] SEQ ID NO :44 是 Ly664S 的全长 cDNA 序列。
- [0110] SEQ ID NO :45 是 Ly664S 的全长蛋白质序列。
- [0111] SEQ ID NO :46 是 Ly667S 的部分 cDNA 序列。
- [0112] SEQ ID NO :47 是 Ly667S 的全长 cDNA 序列。
- [0113] SEQ ID NO :48 是 Ly667S 的全长蛋白质序列。
- [0114] SEQ ID NO :49 是 Ly677S 的部分 cDNA 序列。
- [0115] SEQ ID NO :50 是 Ly677S 的部分蛋白质序列。
- [0116] SEQ ID NO :51 是 Ly677S 的部分 cDNA 序列。
- [0117] SEQ ID NO :52 是 Ly677S 的部分蛋白质序列。
- [0118] SEQ ID NO :53 是 Ly677S 的全长 cDNA 序列。
- [0119] SEQ ID NO :54 是 Ly677S 的全长蛋白质序列。
- [0120] SEQ ID NO :55 是 Ly1891P 的全长 cDNA 序列。
- [0121] SEQ ID NO :56 是 Ly1891P 的全长蛋白质序列。
- [0122] SEQ ID NO :57 是 CD138 的全长 cDNA 序列。
- [0123] SEQ ID NO :58 是 CD138 的全长蛋白质序列。
- [0124] SEQ ID NO :59 是 CD22 的部分 cDNA 序列。
- [0125] SEQ ID NO :60 是 CD22 的全长 cDNA 序列。
- [0126] SEQ ID NO :61 是 CD22 的全长蛋白质序列。
- [0127] SEQ ID NO :62 是 CD79 β 的部分 cDNA 序列。
- [0128] SEQ ID NO :63 是 CD79 β 的部分蛋白质序列。
- [0129] SEQ ID NO :64 是 CD79 β 的部分 cDNA 序列。
- [0130] SEQ ID NO :65 是 CD79 β 的全长 cDNA 序列。
- [0131] SEQ ID NO :66 是 CD79 β 的全长蛋白质序列。
- [0132] SEQ ID NO :67 是 Ly1450P 的部分 cDNA 序列。
- [0133] SEQ ID NO :68 是 Ly1450P 的部分 cDNA 序列。
- [0134] SEQ ID NO :69 是 Ly1451P 的部分 cDNA 序列。
- [0135] SEQ ID NO :70 是 Ly1451P 的部分 cDNA 序列。
- [0136] SEQ ID NO :71 是 Ly1451P 的部分蛋白质序列。
- [0137] SEQ ID NO :7272 > Ly1454P, OLD-SEQ-ID_3577, 部分 cDNA
- [0138] SEQ ID NO :73 是 Ly1454P 的全长 cDNA 序列。
- [0139] SEQ ID NO :74 是 Ly1454P 的全长蛋白质序列。
- [0140] SEQ ID NO :75 是 Ly1485P 的部分 cDNA 序列。
- [0141] SEQ ID NO :76 是 Ly1485P 的部分蛋白质序列。
- [0142] SEQ ID NO :77 是 Ly1485P 的部分 cDNA 序列。
- [0143] SEQ ID NO :78 是 Ly1500P 的部分 cDNA 序列。

- [0144] SEQ ID NO:79 是 Ly1500P,剪接变体 1 的全长 cDNA 序列。
- [0145] SEQ ID NO:80 是 Ly1500P,剪接变体 1 的全长蛋白质序列。
- [0146] SEQ ID NO:81 是 Ly1500P,剪接变体 2 的全长 cDNA 序列。
- [0147] SEQ ID NO:82 是 Ly1500P,剪接变体 2 的全长蛋白质序列。
- [0148] SEQ ID NO:83 是 Ly1500P,剪接变体 3 的全长 cDNA 序列。
- [0149] SEQ ID NO:84 是 Ly1500P,剪接变体 3 的全长蛋白质序列。
- [0150] SEQ ID NO:85 是 Ly1516P 的部分 cDNA 序列。
- [0151] SEQ ID NO:86 是 Ly1516P,剪接变体 1 的全长 cDNA 序列。
- [0152] SEQ ID NO:87 是 Ly1516P,剪接变体 1 的全长蛋白质序列。
- [0153] SEQ ID NO:88 是 Ly1516P,剪接变体 2 的部分 cDNA 序列。
- [0154] SEQ ID NO:89 是 Ly1516P,剪接变体 3 的部分 cDNA 序列。
- [0155] SEQ ID NO:90 是 Ly1678P 的部分 cDNA 序列。
- [0156] SEQ ID NO:91 是 Ly1678P 的部分 cDNA 序列。
- [0157] SEQ ID NO:92 是 Ly1678P 的部分 cDNA 序列。
- [0158] SEQ ID NO:93 是 Ly1678P 的部分 cDNA 序列。
- [0159] SEQ ID NO:94 是 Ly1680P 的部分 cDNA 序列。
- [0160] SEQ ID NO:95 是 Ly1686P 的部分 cDNA 序列。
- [0161] SEQ ID NO:96 是 Ly1687P 的部分 cDNA 序列。
- [0162] SEQ ID NO:97 是 Ly1706P 的部分 cDNA 序列。
- [0163] SEQ ID NO:98 是 Ly1712P 的部分 cDNA 序列。
- [0164] SEQ ID NO:99 是 Ly1729P 的部分 cDNA 序列。
- [0165] SEQ ID NO:100 是 Ly1729P 的全长 cDNA 序列。
- [0166] SEQ ID NO:101 是 Ly1729P 的全长蛋白质序列。
- [0167] SEQ ID NO:102 是 Ly1848P 的部分 cDNA 序列。
- [0168] SEQ ID NO:103 是 Ly1859P 的部分 cDNA 序列。
- [0169] SEQ ID NO:104 是 Ly1859P 的部分蛋白质序列。
- [0170] SEQ ID NO:105 是 Ly1859P 的部分 cDNA 序列。
- [0171] SEQ ID NO:106 是 Ly1859P 的全长 cDNA 序列。
- [0172] SEQ ID NO:107 是 Ly1859P 的全长蛋白质序列。
- [0173] SEQ ID NO:108 是 Ly1866P 的全长 cDNA 序列。
- [0174] SEQ ID NO:109 是 Ly1866P 的全长蛋白质序列。
- [0175] SEQ ID NO:110 是 Ly1867P 的部分 cDNA 序列。
- [0176] SEQ ID NO:111 是 Ly1868P 的部分 cDNA 序列。
- [0177] SEQ ID NO:112 是 Ly1886P 的部分 cDNA 序列。
- [0178] SEQ ID NO:113 是 Ly669S 的全长 cDNA 序列。
- [0179] SEQ ID NO:114 是 Ly669S 的全长蛋白质序列。
- [0180] SEQ ID NO:115 是 Ly672S 的部分 cDNA 序列。
- [0181] SEQ ID NO:116 是 Ly672S 的全长 cDNA 序列。
- [0182] SEQ ID NO:117 是 Ly672S 的全长 cDNA 序列。

[0183] SEQ ID NO:118 是 Ly675S 的部分 cDNA 序列。

[0184] SEQ ID NO:119 是 Ly675S 的部分蛋白质序列。

[0185] SEQ ID NO:120 是 Ly1484P 的部分蛋白质序列。

[0186] SEQ ID NO:121 是 Ly1484P 的部分蛋白质序列。

[0187] SEQ ID NO:122 是 His-Ly1452P 的 PCR 引物序列。

[0188] SEQ ID NO:123 是 His-Ly1452P 的 PCR 引物序列。

[0189] SEQ ID NO:124 是 Ly1451P 的开放阅读框序列。

[0190] 4. 说明性实施例的描述

[0191] 为了更全面地了解本文所述的本发明,以下列出各种说明性实施例的描述。

[0192] 本发明一般涉及免疫治疗和诊断血液恶性肿瘤如 B 细胞白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤的组合物和方法。

[0193] 4.1 核酸递送和 DNA 转染的方法

[0194] 某些实施例中,采用本文所述的一种或多种 RNA 或 DNA 和 / 或替代的多核苷酸组合物来转染合适的宿主细胞。本领域技术人员熟知将 RNA 和 DNA 及包含它们的载体导入合适的宿主细胞的技术。具体说,当通过编码一种或多种感兴趣的治疗性化合物的一种或多种多核苷酸构建物的表达而获得治疗性施用一种或多种活性肽、化合物或疫苗时,这种多核苷酸可用于遗传转化一种或多种宿主细胞。

[0195] 将多核苷酸和 / 或多肽导入合适的靶细胞的各种方法是本领域技术人员已知的。例如,当要将多核苷酸递送一细胞时,本领域技术人员可采用其使用的几种非病毒方法,将表达构建物转运入培养的哺乳动物细胞。这些方法包括例如磷酸钙沉淀 (Graham 和 Van Der Eb, 1973 ;Chen 和 Okayama, 1987 ;Rippe 等, 1990) ;DEAE- 葡聚糖沉淀 (Copal, 1985 ;电泳 (Wong 和 Neumann, 1982 ;Fromm 等, 1985 ;Tur-Kaspa 等, 1966 ;Potter 等, 1984 ;suzuti 等 1998 ;Vanbever 等, 1998)、直接微注射 (Capecchi, 1980 ;Harland 和 Wontraub, 1985)) ;装载 DNA 的脂质体 (Nicolau 和 Sene, 1982 ;Fraley 等, 1979 ;Takakura, 1998) 和脂质转染胺-DNA 复合物 ;细胞超声处理 (Fechherimer 等, 1987) ;采用高速微粒的基因轰击技术 (Yang 等, 1992 ;Klein 等, 1992) 和受体介导的转染 (Curiel 等, 1991 ;Wagner 等, 1992 ;Wu 和 Wu, 1987 ;Wu 和 Wu, 1988)。这些技术中的一些可成功采纳用于体内或活体外。

[0196] 用一种或多种所述表达载体转化细菌、酵母或动物细胞是本发明的重要方面。常需要将这种转化的宿主细胞用于表达本文所述各种 DNA 基因构建物。本发明某些方面常需要调制调节或控制所述基因节段的表达,这种方法对分子遗传学领域的技术人员是常规技术。通常当需要提高或过度表达一个具体基因时,可采用各种操作提高其信使 RNA 的表达,具体是采用活性启动子,如本文所述的组织特异性启动子,以及采用能提高该信使 RNA 在具体转化宿主细胞中的稳定性的序列。

[0197] 通常起始和翻译终止区含有终止密码子,和任选的一种聚腺苷酸化信号。在转录方向即编码序列或有义序列的 5' → 3' 方向,该构建物将包含转录调控区和启动子,其中的调控区可以是 5' 或 3' 启动子,核糖体结合位点,起始密码子,具有开放读框和起始密码子的结构基因,终止密码子,聚腺苷酸化信号序列和终止子区域 (如需要)。作为双链,该序列本身可用于转化微生物或真核宿主,但在 DNA 导入宿主期间将第二 DNA 序列连接于表达构建物时,通常在 DNA 序列中包含一标记。

[0198] 当不存在功能性复制系统时,该构建物还优选包括与宿主中序列同源的至少约 30、40 或 50 个碱基对的序列,优选至少约 60、70、80 或 90-100bp,通常不超过约 500-1000bp 的序列。以这种方式,可能增强合理的重组,从而该基因将整合入宿主内并被宿主稳定地保留。理想的是,该表达构建物的调控区紧靠(也可操作性相对定位于)所选的治疗性基因,以提供互补及竞争优势的基因。因此,当丧失该治疗基因时,所产生的生物也可能丧失提供此竞争优势的基因,从而不能在具有保留完整构建物的基因环境中竞争。

[0199] 可将所选治疗基因导入转录和翻译起始区和转录和翻译终止区之间,使之处于该起始区的调控下。可将此构建物包含在一质粒中,该质粒包括至少一复制系统,其中一复制系统用于克隆在开发质粒,并且在最终宿主(此例为哺乳动物宿主)中的功能需要第二个复制系统时,也可含一个以上系统。此外,可存在上述一个或多个标记。需要整合时该质粒需包括具有宿主基因组的同源序列。

[0200] 可采用该领域熟知的各种技术将上述基因或其它核酸区段插入宿主细胞。已描述了以下五种通用方法来传递核酸区段到细胞中:(1) 化学方法(Graham 和 Van Der Eb, 1973);(2) 物理方法,如微注射(Capecchi, 1980)、电穿孔(美国专利 5,472,869;Wong 和 Neumann, 1982;Fromm 等,1985)、微粒轰击(美国专利 5,874,265,其内容纳入本文作参考)、“基因枪”(Yang 等,1990);(3) 病毒载体(Eglitis 和 Anderson 1988);(4) 受体介导的机制(Curiel 等,1991;Wagner 等,1992);(5) 细菌介导的转化。

[0201] 4.2 血液恶性肿瘤相关的特异性抗体及其抗原结合片段

[0202] 本发明还提供能特异地结合(或有免疫特异性)上述至少第一种肽或肽变体的抗体及其抗原结合片段。本文中的抗体或其抗原结合片段,指能“特异地结合”肽,并与该肽发生可检测(如 ELISA)水平的反应,但与无关的肽或蛋白质在相似条件下不发生可检测反应。“结合”是指形成“复合物”的两种不同分子之间的非共价连接。结合能力可通过例如测定该复合物形成的结合常数来评价。结合常数是复合物浓度除以组分产物的浓度所得值。本发明内容中,当形成复合物的结合常数超过约 10^3L/mol 时,一般认为这两种化合物“结合”。可用本领域熟知方法测定结合常数。

[0203] 能满足上述要求的任何试剂可能是一种结合剂。在说明性实施例中,该结合剂是抗体或其抗原结合片段。可用本领域普通技术人员已知的任何各种技术制备这种抗体(Harlow 和 Lan1, 1988)。通常可用细胞培养技术生产抗体,包括产生上述单克隆抗体,或通过 将抗体基因转染入合适的细菌或哺乳动物细胞宿主以产生重组抗体。在一项技术中,将含有肽的免疫原先注射入任何各种哺乳动物(如小鼠、大鼠、家兔、山羊或绵羊)。此步骤中,本发明的肽不经修饰即可作为免疫原。另外,特别对于较短的肽,若将肽连接于一载体蛋白如牛血清白蛋白或匙孔螺蚌血蓝蛋白可引发强免疫应答。将免疫原注射动物宿主,优选按照预定的时间表进行一次或多次加强免疫接种,并定期采集动物的血。可通过例如亲和层析(采用偶联于合适的固相支持物的肽)从抗血清中纯化对肽特异的多克隆抗体。

[0204] “抗体”指由特异性结合或识别抗原的免疫球蛋白基因或其片段编码的多肽。识别的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链被分成为 κ 或 λ 。重链被分成为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,这依次决定了免疫球蛋白的类型分别为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。

[0205] 示范性的免疫球蛋白(抗体)结构单元包括一个四聚体。每个四聚体由相同的

两对多肽链构成,每对具有一条“轻”链(约 25kD)和一条“重”链(约 50-70kD)。每条链的 N-末端限定约 100-110 或更多氨基酸的可变区,它主要负责抗原识别,即抗原识别区域。“抗原识别区域”是指识别靶或其部分的本发明的抗体、重组分子、融合蛋白或免疫结合物的一部分。抗原识别区域通常包括抗体的可变区或其部分,例如一个、两个、三个、四个、五个、六个或多个超变区。术语“V_H”或“VH”是指免疫球蛋白重链的可变区,包括 Fv、scFv、dsFv 或 Fab。术语“V_L”或“VL”是指免疫球蛋白轻链的可变区,包括 Fv、scFv、dsFv 或 Fab。

[0206] 例如,作为完整免疫球蛋白或一些良好鉴定的片段存在的抗体通过用各种肽酶消化产生。因此,例如,胃蛋白酶在绞链区的二硫键以下消化抗体产生 F(ab)′₂,这是 Fab 的二聚体,它本身是通过二硫键与 VH-CH1 连接的轻链。F(ab)′₂ 可在温和条件下还原以断裂绞链区中的二硫键,从而将 F(ab)′₂ 二聚体转变成 Fab′ 单体。Fab′ 单体实质上是具有部分绞链区的 Fab(参见 Fundamental Immunology (Paul 编,第三版,1993)。因此,术语抗体在这里还包括通过修饰完整抗体产生的抗体片段。

[0207] “片段”在这里指免疫球蛋白分子的至少部分可变区,它结合其靶,即抗原识别区域或抗原结合区。还可包括免疫球蛋白的一些恒定区。抗体功能片段的例子包括但不限于完整的抗体分子、人源化抗体、抗体片段、如 Fv、单链 Fv(scFv)、超变区或互补决定区(CDR)、V_L(轻链可变区)、V_H(重链可变区)、Fab、F(ab)′₂ 以及这些成分的任何组合或能够结合靶抗原的免疫球蛋白肽的任何其它部分(参见,例如 Fundamental Immunology (Paul 编,第四版,1999)。如本领域的技术人员所知,可用多种方法获得各种抗体片段,例如,用酶如胃蛋白酶消化完整抗体;或从头合成。通常用化学方法或采用重组 DNA 法从头合成抗体片段。因此,术语抗体在这里包括通过修饰完整抗体产生的抗体片段,或用重组 DNA 法从头发合成的抗体片段(如单链 Fv)或用噬菌体展示文库鉴定的抗体片段(例如参见 McCafferty 等,(1990),Nature 348 :552)。术语抗体还包括二价或双特异性分子、双抗体、三抗体和四抗体。例如,二价和双特异性分子描述在 Kostelny 等,J. Immunol. 148 :1547(1992),Pack 和 Pluckthun, Biochemistry 31 :1579(1992),Zhu 等,Protein Sci. 6 :781(1997),Hu 等,Cancer Res. 56 :3055(1996),Adams 等,Cancer Res. 53 :4026(1993) 和 McCartney 等,Protein Eng. 8 :301(1995)。

[0208] “人源化抗体”是指其中 VH 和 VL 区域所含的抗原结合环,即互补决定区(CDR),被移植到人构架序列内的抗体。通常,人源化抗体与本文所述的非人源化抗体有着相同的结合特异性。使抗体人源化的技术是此领域熟知的并描述在例如美国专利号 4,816,567 ;5,530,101 ;5,859,205 ;5,585,089 ;5,693,761 ;5,693,762 ;5,777,085 ;6,180,370 ;6,210,671 和 6,329,511 ;W087/02671 ;欧洲专利申请 0173494 ;Jones 等,Nature 321 :522(1986) 和 Verhoyen 等,Science 239 :1534(1988)。人源化抗体还描述在例如 Winter 和 Milstein,Nature 349 :293(1991)。

[0209] 为制备单克隆或多克隆抗体,可采用此领域已知的任何技术(参见例如 Kohler 和 Milstein,Nature 256 :495-497(1975) ;Kozbor 等,Immunology Today 4 :72(1983) ;Cole 等,《单克隆抗体和癌症治疗》(MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY),77-96 页,Alan R. Liss, Inc. (1985))。

[0210] 生产多克隆抗体的方法是精通此领域的技术人员熟知的。在一个示范性方法中,采用标准佐剂(如弗氏佐剂)和标准免疫方法,用螯合物或封闭结构的类似物免疫近交品

系的小鼠（如 BALB/C 小鼠）或兔。或者，除了使用佐剂外，将螯合物与自身呈免疫原性的载体（如匙孔螯血蓝蛋白（“KLH”）偶合。通过取试验血并测定其与 β 亚基的反应性效价来监测动物对免疫原制剂的免疫应答。当得到抗体对免疫原适当的高效价时，从动物采集血液并制备抗血清。如果需要，还可以富集抗血清的其它组分以使抗体与蛋白质反应。

[0211] 单克隆抗体可用此领域的技术人员熟知的各种技术获得。简言之，来自用所需抗原免疫动物的脾细胞无限增殖，这通常是通过与骨髓瘤细胞融合（例如参见 Kohler 和 Milstein, Eur. J. Immunol. 6 :511-519(1976)）。其它无限增殖化的方法包括用 EB 病毒、癌基因或逆转录病毒转化，或用此领域熟知的其它方法。筛选产生自单个无限增殖细胞克隆以生产对抗原有所需特异性和亲和性的抗体，且可通过各种技术提高用这种细胞生产单克隆抗体的产率，包括注射到脊椎动物宿主的腹膜腔中。或者，根据 Huse 等, Science 246 :1275-1281(1989) 中概述的一般方法，通过筛选人 B 细胞的 DNA 文库分离编码单克隆抗体或其结合片段的 DNA 序列。

[0212] 收集单克隆抗体和多克隆血清并用免疫测定法确定其对免疫原的效价，例如用固定在固体支持物上的免疫原进行固相免疫测定。通常，选择效价为 10^4 或更高的多克隆抗血清，并用竞争性结合免疫测定法测试其对不同螯合物的交叉反应性。特异性多克隆抗血清和单克隆抗体的结合 Kd 一般至少约为 0.1mM、更一般至少约为 $1\mu\text{M}$ ，优选至少约为 $0.1\mu\text{M}$ 或更好，最优选为 $0.01\mu\text{M}$ 或更好。

[0213] 可采用生产单链抗体的技术（美国专利 4,946,778）来生产与螯合物和其它诊断剂、分析剂或治疗剂反应的抗体。同样，转基因小鼠或其它生物如其它哺乳动物可用来表达人源化抗体。或者，可用噬菌体展示技术来生产和鉴别特异性结合所选抗原的抗体和异聚的 Fab 片段（参见例如 McCafferty 等, Nature 348 :552-554(1990) ;Marks 等, Biotechnology 10 :779-783(1992)）。

[0214] 在一个示范性实施方案中，动物，如兔或小鼠用螯合物或免疫原性构建物免疫。优选标准方法分离通过免疫方法产生的抗体。

[0215] 再在一个优选的实施例中，所述抗体是人源化抗体。“人源化”是指已经被修饰以使在人体内的免疫反应性最小化的非人多肽序列，这通常是通过改变氨基酸序列以模拟现在的人序列，而无需改变多肽序列的功能（参见例如 Jones 等, Nature321 :522-525(1986)，和发表的英国专利申请号 8707252）。

[0216] 在另一个优选的实施例中，本发明提供了一种抗体，如上所述，该抗体上还附着选自可检测标记、生物活性剂及其组合的部分。

[0217] 当抗体与可检测标记结合时，所述标记优选选自放射性同位素、荧光剂、荧光剂前体、生色团、酶或其组合。将各种基团结合到抗体的方法是此领域熟知的。例如，经常结合到抗体的可检测标记是酶，如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶和葡萄糖氧化酶。

[0218] 生产用小分子如荧光剂标记的抗体的方法是此领域熟知的。荧光标记的抗体可用于免疫组织化学染色 (Osborn 等, Methods Cell Biol. 24 :97-132(1990) ;用于流式细胞术或细胞分选技术 (Ormerod, M. G. (编),《流式细胞术实用方法》(FLOWCYTOMETRY. A PRACTICAL APPROACH), IRL Press, New York, 1990) ;用于追踪和定位抗原,以及各种双染色方法 (小 Kawamura, A.,《荧光抗体技术及其应用》(FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUES

AND THEIR APPLICATION), Univ. Tokyo Press, Baltimore, 1977)。

[0219] 许多反应性荧光标记可通过商业获得(如 Molecular Probes, Eugene, OR) 或者可用此领域已知的技术合成。在一个示范性实施例中,本发明的抗体在温和碱性条件下被胺反应性荧光剂,如异硫氰酸荧光素标记。欲了解抗体标记技术的其它例子可参见 Goding, J. Immunol. Methods 13:215-226(1976) 和《单克隆抗体“原理和实践”(MONOCLONAL ANTIBODIES:PRINCIPLES AND PRACTICE), 6-58 页, Academic Press, Orlando(1988)。

[0220] 可采用例如 Kohler 和 Milstein(1976) 的技术及其改进,来制备对感兴趣抗原肽特异的单克隆抗体。简言之,这些方法包括制备能产生具有所需特异性(如与感兴趣肽反应)抗体的无限增殖细胞系。可从获自上述免疫接种动物的脾细胞产生这种细胞系。例如通过与骨髓瘤细胞融合伙伴(优选与该免疫动物同系)融合,使脾细胞无限增殖。可采用各种融合技术。例如,可用非离子洗涤剂使脾细胞和骨髓瘤细胞结合几分钟,然后以低密度铺在能支持杂交细胞生长但不支持骨髓瘤细胞生长的选择培养基上。优选的选择技术采用 HAT(次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸苷)。足够时间后,一般约 1-2 周,可见杂交体的集落。选出单个克隆,测试其培养物上清液对肽的结合活性。优选具有高反应性和特异性的杂交瘤。

[0221] 可从生长的杂交瘤集落的上清液中分离单克隆抗体。此外,可采用各种技术来提高产量,例如将杂交瘤细胞系注射到合适的脊椎动物宿主,如小鼠的腹腔内。然后从腹水或血液中收集单克隆抗体。用常规方法如层析、凝胶过滤、沉淀和抽提法去除抗体中的污染物。本发明的肽可用于此纯化过程,例如亲和层析步骤中。

[0222] 某些实施例中,优选采用抗体的抗原结合片段。这些片段包括用标准技术制备的 Fab 片段。简言之,可用 A 蛋白珠柱进行亲和层析(Harlow 和 Lan1, 1988) 纯化兔血清中的免疫球蛋白,再用木瓜蛋白酶消化产生 Fab 和 Fc 段。用 A 蛋白珠柱亲和层析分离 Fab 和 Fc 片段。

[0223] 可将单克隆抗体及其片段偶联于一种或多种治疗药物。在这方面,合适的试剂包括放射性追踪剂和化疗剂,它们可用于例如体外净化自身骨髓。代表性的治疗剂包括放射性核素、分化诱导剂、药物、毒素及其衍生物。优选的放射性核素包括: ^{90}Y 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 和 ^{212}Bi 。优选的药物包括氨甲嘌呤和嘧啶及嘌呤类似物。优选的分化诱导剂包括佛波醇酯和丁酸。优选的毒素包括蓖麻毒蛋白、相思豆毒蛋白、白喉毒素、霍乱毒素、白树毒蛋白、假单胞菌外毒素、志贺菌毒素和商陆抗病毒蛋白。为诊断目的,与放射活性药物偶联可用于促进转移的追踪或确定血液恶相关阳性肿瘤的位置。

[0224] 可将治疗剂与合适单克隆抗体直接或间接(通过一接头基因)偶联(如共价键合)。当药剂和抗体各自具有能相互反应的取代基时,二者之间可能直接反应。例如,一个分子上的亲核基团如氨基或巯基,能与另一分子上含羰基的基团如酸酐或酸卤化物反应,或与含有良好离去基团(如卤化物)的烷基反应。

[0225] 或者,可能需要将治疗剂和抗体通过一接头基团偶联。接头基团的功能是作为间隔使抗体与药剂隔开,以避免干扰结合能力。接头基团也可用于增加药剂或抗体上取代基的化学反应性,从而提高偶联效率。化学反应性的增加还促进药剂原本不可能的用途或其上功能基团的用途。

[0226] 该领域技术人员已证明各种双功能或多功能试剂,同质和异质功能试剂(见 Pierci Chemical Co(Rockford IL) 的产品目录上所述),可用作接头基团。例如通过氨

基、羧基、巯基或氧化的糖残基可影响偶联。有许多参考文献描述了这种方法,如美国专利 4,671,958。

[0227] 当治疗剂从本发明免疫偶联物的抗体部分游离出来时其作用更强,因此可能需要采用细胞内化期间或内化时能被切割的接头基团。已描述了许多不同的可切割的接头基团。从这些接头基团细胞内释放药剂的机制包括通过还原二硫键切割(美国专利 4,489,710);通过对光不稳定的键(美国专利 4,625,014);通过水解衍生的氨基酸侧链(美国专利 4,638,045);通过血清补体介导的水解(美国专利 4,671,958)和酸催化的水解(美国专利 4,569,789)来切割。

[0228] 可能需要将一个以上的药剂偶联于抗体。一实施例中,将药剂的多个分子偶联于一个抗体分子。另一实施例中,可将一种以上的药剂偶联于一种抗体。不论具体的实施例,含一种以上药剂的免疫偶联物可用各种方法制备,例如,可将一种以上的药剂物直接偶联于一抗体分子或可用接头提供多个附着位点。或者可采用载体。载体也可以不同方法携带药剂,包括直接,或通过接头基团共价键合。合适的载体包括蛋白质如白蛋白(美国专利 4,507,234),肽和多糖如氨基葡聚糖(美国专利 4,699,784)。载体也可通过非共价键合或包囊化如包裹在脂质体载体内(美国专利 4,429,008 和 4,873,088)而携带药剂。对放射性核素试剂特异的载体包括放射性卤化的小分子和螯合性化合物。例如美国专利 4,735,792 披露代表性放射性卤化的小分子和它们的合成方法。可从含有氮和硫原子作为结合金属或金属氧化物、放射性核素的供体原子的螯合性化合物中产生放射性核素螯合物。例如美国专利 4,673,562 披露的代表性螯合化合物及其合成方法。

[0229] 可采用各种途径施予抗体和免疫偶联物。通常给药途径是静脉内、肌肉内、皮下或肿瘤切除的床中。显然抗体/免疫偶联物的精确剂量随所用抗体,肿瘤上的抗原密度和抗体清除率而不同。

[0230] 本文还提供模拟血液恶性肿瘤相关免疫原性部分的抗独特性抗体。可用众所周知的技术产生针对能特异地结合血液恶性肿瘤相关免疫原性部分的抗体或其抗原结合片段的这种抗体。抗独特性抗体能模拟血液恶性肿瘤相关免疫原性部分,这类抗体能结合上述能特异地结合血液恶性肿瘤相关免疫原性部分的抗体或其抗原结合片段。

[0231] 不考虑最初的血液恶性肿瘤相关肽特异性抗体的来源,本发明可采用完整的抗体、抗体多聚体或该抗体的各种功能性、抗原结合区的任一种。示范性的血液恶性肿瘤相关肽特异性抗体的功能区包括 seFv、Fv、Fab' 和 F(ab')₂ 片段。制备这些构建物的技术是该领域熟知的,本文将进一步举例说明。

[0232] 各种因素可能影响抗体构建物的选择。例如由于肾脏内完整抗体的主动重吸收、免疫球蛋白 Fc 段的性能所致的半寿期延长。因此预计基于 IgG 的抗体表现出较其 Fab' 对应物具有较慢的血液清除率。然而,基于 Fab' 片段的组合物通常表现出更好的组织渗透能力。

[0233] 可用非特异性巯基蛋白酶-木瓜蛋白酶蛋白水解整个免疫球蛋白获得抗体片段。木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段称为“Fab 片段”,各具有一抗原结合位点和一个残余的“Fc 片段”。

[0234] 木瓜蛋白酶应先用半胱氨酸、2-巯基乙醇或二硫苏糖醇还原活性位点上的巯基而活化。通过用 EDTA (2mM) 螯合去除酶贮存液中的重金属以确保酶活性最高。通常以 1 : 100

重量比将此酶与底物混合在一起。温育后用碘乙酰胺不可逆地烷化巯基,或简单地透析中止反应。应通过 SDS-PAGE 监测消化的完全性,且用蛋白 A-琼脂糖或离子交换层析分离各组分。

[0235] 常规制备兔和人 IgG 的 $F(ab')_2$ 片段的方法限于用胃蛋白酶水解。提出抗体在重链内二硫键的 C 端侧要害的条件,是 37℃ 用 PH4.5 的乙酸缓冲液处理,抗体过量 100 倍(重量比)。小鼠 IgG 的消化速度随亚类而不同,可能难以获得高产量的活性 $F(ab')_2$ 片段没有未消化或完全降解的 IgG。具体讲,IgG2a 对完全降解高度敏感。而其它亚类要求不同的温育条件才能产生最佳结果,这是该领域已知的。

[0236] 胃蛋白酶处理完整抗体产生的 $F(ab')_2$ 片段具有二个抗原结合位点,仍能交联抗原。胃蛋白酶消化大鼠 IgG 的条件包括用 0.1M 醋酸缓冲液 PH4.5 透析,然后与 1%(重量比)胃蛋白酶一起温育 4 小时,若 4℃ 先用 PH2.8,0.1M 甲酸液透析 16 小时,再用醋酸缓冲液透析可改进消化。IgG2b 与链球菌 V8 蛋白酶(3%重量比)在 PH7.8,0.1M 磷酸钠缓冲液中,37℃ 温育 4 小时所得结果更一致。

[0237] Fab 片段也含有轻链恒定区和重链第一恒定区(CH1)。Fab' 片段与 Fab 片段不同处在于其重链 CH1 区的羧基端添加了几个残基,包括了抗体绞链区的一个或多个半胱氨酸。 $F(ab')_2$ 抗体片段原来作为 Fab' 片段配对产生,二者之间有绞链半胱氨酸。也知道其它化学偶联的抗体片段。

[0238] 术语“可变区”本文用于指抗体可变区的某些部分在序列中存在广泛差异,可变区用于结合和各特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,变异性不是平均分布在抗体可变区中。而是集中于轻链和重链可变区中的三个区段,称为“超变区”。

[0239] 可变区中更高度保守部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区各包含 4 个 FR(分别为 FR1、FR2、FR3 和 FR4),主要采取 β -片层构型,通过形成环连接的三个超变区相连接,在某些情况下形成 β -片层结构的一部分。

[0240] 每条链中的超变区通过 FR 与另一条链超变区紧靠在一起,有助于形成抗体的抗原结合位点(Kabat 等,1991,纳入本文作参考)。恒定区不直接参与抗体和抗原的结合,但显示各种效应功能,如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0241] 术语“超变区”本文用于指抗体中负责抗体结合的氨基酸残基。超变区包括来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基,(即轻链可变区中的残基 24-34(L1)、50-56(L2)和 89-97(L3)和重链可变区中的残基 31-35(H1)、50-56(H2)和 95-102(H3)(Kabat 等,1991,纳入本文作参考),和/或来自来自“超变环”(即轻链可变区中的残基 26-32(L1)、50-52(L2)和 91-96(L3)和重链可变区中的残基 26-32(H1)、53-55(H2)和 96-101(H3))的那些残基。“构架”或“FR”残基是除上述超变区残基以外的可变区残基。

[0242] “ F_V ”片段是含有完整的抗原识别和结合位点的最小抗体片段。此区域由一条重链和一条轻链可变区以紧密、共价连接的二聚体组成。其构型中各可变区的三个超变区相互作用限定了 V_H - V_L 二聚体表面上的抗原结合位点。6 个超变区共同赋予此抗体的抗原结合特异性。然而,甚至单一可变区(或 F_V 的一半只含有对抗原特异的三个超变区)就能识别和结合抗原,虽然其亲和力较全部结合位点低。

[0243] “单链 F_V ”或“ sF_V ”抗体片段含有抗体的 V_H 和 V_L 区,其中这些区存在于单一多肽链。通常, F_V 多肽在 V_H 和 V_L 区之间还含有一个多肽接头,使 sF_V 能形抗原结合所需的结构。

[0244] “双抗体”是具有二个抗原结合位点的小抗体片段,该片段在同一条多肽链 (V_H-V_L) 中含有重链可变区 (V_H) 连接于轻链可变区 (V_L)。所用接头太短不允许在同一链的是的二个区之间配对,而迫使二区与另一链的互补区配对并产生两个抗原结合位点。双抗体见欧洲专利申请 EP404, 097 和国际专利申请 W093/11161,各纳入本文作参考。“线性抗体”可以是双特异性或单特异性抗体,含有一对串联的 Fd 片段 ($V_H-C_H1-V_H-C_H1$),形成一对抗原结合区,如 Zapata 等 (1995) 所述,纳入本文作参考。

[0245] 其它类型的变体是生物学性较之产自其亲代抗体有所改进的抗体。这类变体或第二代化合物通常是置换性变体,包括亲代抗体的一个或多个置换的超变区残基。产生这类置换变体的方便途径是采用噬菌体展示的亲和力成熟。

[0246] 采用噬菌体展示的亲和力成熟中突变了几个超变区位点(如 6-7 个位点),在每个位点产生所有可能的氨基酸取代。由此产生的抗体变体融合于丝状噬菌体每个颗粒内包装的基因 III 产物 M13,以单价形式从噬菌体颗粒表面展示。然后如本文所述筛选噬菌体展示变体的生物学活性(如结合亲和力)。为了鉴定用于修饰的候选超变区位点,可对鉴别为非常有助于抗原结合的超变区域基进行丙氨酸扫描诱变。

[0247] 另一方面或此外,可描述和分析抗原-抗体复合物的晶体结构,以鉴定抗体与靶之间的接触点。这些接触残基或邻近残基是置换的候选残基。一旦产生了变体,可对一组变体进行筛选,在一种或多种相关测定中选出具有类似但不同或甚至优良特征的抗体作进一步开发。

[0248] 采用抗体的 Fab' 或抗原结合片段具有对组织穿透的好处,修饰此片段可产生的另一优点是增加了半衰期。可采用各种技术如操作或修饰抗体分子本身,也可将其结合于惰性载体。任何结合的唯一目的是增加半衰期而不是为了将药剂输送给靶,在所选的 Fab' 和其它穿透组织的片段中需小心地进行这种结合。然而,可考虑结合于非蛋白性聚合物如 PEG 等。

[0249] 因此修饰而非结合的依据是,修饰抗体片段的结构可使其更稳定,和 / 或降低体内的分解代谢的速度。这类修饰方法的机制是用 D- 氨基酸取代 L- 氨基酸。该领域普通技术人员知道,引入这类修饰后需要精确地测试所产生的分子,以确保它仍保留所需的生物学性能。其它稳定化修饰包括在 N- 末端或 C- 端或二端加入稳定化组成成分通常用延长生物分子的半衰期。仅作为例子,可考虑通过酰化或氨基化修饰此末端。

[0250] 本发明所用的中等结合类型修饰包括在抗体片段中掺入一补救受体结合表位。实施的技术包括突变抗体片段的适当区域或掺入的该表位(作为肽标记)使之附着于抗体片段。见国际专利申请 W096/32478,本文纳入其内容的目的是进一步阐明此技术。补救受体结合表位通常是来自 Fc 结构域的 1 个或 2 个环的 3 个或 3 个以上的氨基酸区域,将其转移到抗体片段上的类似位置。补救受体结合表位见国际专利申请 W098/45331,纳入本文作为本发明的参考。

[0251] 4.3 地血液恶性肿瘤相关肽特异的 T 细胞组合物

[0252] 免疫治疗性组合物也可或另外包含对血液恶性肿瘤相关肽特异的 T 细胞。这类 T 细胞一般用标准方法在体外或活体外制备。例如,可分离哺乳动物如病人骨髓,外周血或骨髓组分或外周血中存在的 T 细胞,采用商品化的细胞分离系统如 Isoplex™ 系统,购自 Nexell Therapeutics Inc. (Irvine, CA. 见美国专利 5,240,856、5,215,926,国际专利申请

W089/06280、W091/16116 和 W092/07243)。或者可从相关或无关的人、非人哺乳动物、细胞系或培养物中产生 T 细胞。

[0253] 可用血液恶性肿瘤相关肽、编码该肽的多核苷酸和 / 或表达该肽的抗原呈递细胞 (APC) 刺激 T 细胞。在以充足时间允许产生对血液恶性肿瘤相关肽特异的 T 细胞条件下, 进行这种刺激。优选地血液恶性肿瘤相关肽或多核苷酸存在于输送载体如微球内, 以促进抗原特异性 T 细胞的产生。简言之, 用常规技术 (如 Ficoll/Hypaque® 密度梯度离心外周血淋巴细胞) 从病人、或有关或无关供血者中分离 T 细胞, 与血液恶性肿瘤相关肽一起培育。例如, 将 T 细胞体外 37°C 与血液恶性肿瘤相关肽 (如 5-25 $\mu\text{g/ml}$) 或合成相当量此肽的细胞一起培养 2-9 天 (一般 4 天)。可能需要在缺乏血液恶性肿瘤相关肽时培养另一等份的 T 细胞样品作为对照。

[0254] 如果 T 细胞杀伤包被血液恶性肿瘤相关肽或表达编码该肽的基因的靶细胞, 就认为 T 细胞对该肽有特异性。T 细胞特异性也可用任何一种标准方法来评价。例如铬释放测定或增殖测定中, 与阴性对照相比较, 裂解和 / 或增殖的刺激指数增加二倍以上时, 表明 T 细胞特异性。可按 Chen 等 (1994) 所述进行此类测定。另外, 可用各种已知技术检测 T 细胞增殖。例如测定增加的 DNA 合成的速率 (如用氘化胸苷脉冲标记培养 T 细胞和测定掺入 DNA 中的氘化胸苷量) 可检测 T 细胞增殖。检测 T 细胞增殖的其它方法包括测定的介素 -2 (IL-2) 产生、 Ca^{2+} 流动或染料摄入, 如 3-(4,5 二甲基噻唑 -2-基) -2,5-二苯基四唑的摄入。另外, 可测定淋巴因子 (如 γ 干扰素) 或定量测定能对血液恶性肿瘤相关肽起反应的 T 细胞的相对数量。与血液恶性肿瘤相关肽 (200ng/ml-100 $\mu\text{g/ml}$, 优选 100ng/ml-25 $\mu\text{g/ml}$) 接触 3-7 天应导致 T 细胞增殖提高至少二倍, 和 / 或如上述接触 2-3 小时应导致 T 细胞激活, 后者可用标准的细胞因子试验测定, 该试验中细胞因子 (如 TNF 或 IFN- γ) 释放水平增加二倍表明 T 细胞激活 (Coligan 等, 1998)。可用标准技术扩展血液恶性肿瘤相关特异性 T 细胞。优选实施例中, 刺激和扩增后将来源于病人或有关或无关供血者的 T 细胞施予病人。

[0255] 在对血液恶性肿瘤相关肽、其多核苷酸或对表达该肽的 APC 应答中被激活的 T 细胞可以是 CD4^+ 和 / 或 CD8^+ 。可以各种方法检测特异性激活的 CD4^+ 或 CD8^+ T 细胞。检测特异性 T 细胞激活的方法包括检测 T 细胞增殖、细胞因子 (如淋巴因子) 的产生或溶细胞活性的产生 (即对血液恶性肿瘤相关肽特异的细胞毒 T 细胞的产生)。对于 CD4^+ T 细胞, 检测特异性 T 细胞激活的优选方法是检测 T 细胞增殖。对于 CD8^+ T 细胞, 检测特异性 T 细胞激活的优选方法是检测溶细胞活性的产生。

[0256] 为治疗目的, 可体内或体外扩增对血液恶性肿瘤相关肽、多核苷酸或 APC 反应而增殖的 CD4^+ 和 / 或 CD8^+ T 细胞的数量。体外 T 细胞的增殖可采用各种方法进行。例如, 使该 T 细胞再接触血液恶性肿瘤相关肽, 加或不加 T 细胞生长因子如 IL-2, 和 / 或合成血液恶性肿瘤相关肽的刺激细胞。当产生 CD8^+ T 细胞应答时优选加入刺激性细胞。在对血液恶性肿瘤相关肽间歇性再刺激的应答中, 保持特异性的 T 细胞可在体外大量生长。简言之, 对于初次体外刺激 (1VS), 可将大量淋巴细胞 (如 4×10^7 以上) 置于含人血清培养基的烧瓶中。可直接加入血液恶性肿瘤相关肽 (如 10 $\mu\text{g/ml}$ 肽) 与破伤风类毒素 (如 5 $\mu\text{g/ml}$)。然后培养该烧瓶 (如 37°C、7 天)。对于第二次 1VS, 收获 T 细胞, 置于具有 $2-3 \times 10^7$ 个照射的外周血单核细胞的新烧瓶中。直接加入血液恶性肿瘤相关肽 (如 10 $\mu\text{g/ml}$)。37°C 培养该烧瓶 7 天, 第二次 1VS 后的第 2 天和 4 天, 可加入 2-5 单位的 IL-2。对于第三次 1VS, 可

将 T 细胞置于孔中并用个体自身的 EBV 转化 B 细胞（包太的）刺激。每轮的第 2 和第 4 天加入 IL-2。一旦证明细胞为特异性细胞毒 T 细胞,就可在第 2、4 和 6 天用较高 IL-2 (20 单位) 进行 10 天刺激周期扩增这些 T 细胞。

[0257] 或者用克隆方法在数量上扩增存在血液恶性肿瘤相关肽时增殖的一种或多种 T 细胞。克隆细胞的方法是该领域熟知的,包括有限稀释法。可用密度梯度离心和羊红细胞玫瑰花结法纯化致敏病人外周血中的反应性 T 细胞,在存在照射过的自身浸润细胞时,采用命名的抗原刺激培养细胞建立细胞克隆。为了产生 CD4⁺T 细胞系,可采用血液恶性肿瘤相关肽作为抗原刺激,并用 EB 病毒感染无限增殖的自身外周血淋巴细胞 (PBL) 或成淋巴细胞样细胞系 (LCL) 作为抗原呈递细胞。为了产生 CD8⁺T 细胞系,用能产生血液恶性肿瘤相关肽的表达载体转染自身抗原呈递细胞,用作刺激细胞。可在抗原刺激后 2-4 天克隆建立的 T 细胞系,方法是在含有 1×10^6 个照射过的 PBL 或 LCL 细胞和重组 IL-2 (50U/ml) 的 96 孔平底板中,接种刺激的 T 细胞,频率为每孔 0.5 个细胞。在首次平板接种和存在自身抗原呈递细胞时用适当抗体再刺激后约 2-3 周,可鉴定具有建立的克隆生长的孔。抗原刺激后加入低剂量 rIL-2 (10U/ml) 2-3 天扩增克隆细胞。约每隔二周通过定期抗原和 IL-2 再刺激可在 24 孔板中维持 T 细胞克隆。如所述可将克隆的和 / 或扩增的 T 细胞输回给病人,见 Chang 等 (1996)。

[0258] 某些实施例中,可在体内和 / 或体外致每同种异型 T 细胞 (即对相关血液恶性肿瘤敏感)。用 T 细胞接触血液恶性肿瘤相关肽、编码该肽的多核苷酸或产生该肽的细胞在足以致敏 T 细胞的条件和时间下获得这种致敏。总之,例如通过上述标准的增殖、铬释放和 / 或细胞因子释放试验测定,如果与血液恶性肿瘤相关肽接触导致 T 细胞增殖和 / 或活化,则认为该 T 细胞是致敏的。与阴性对照相比,增殖或裂解的刺激指数增加二倍以上,细胞因子水平增加三倍以上,表明 T 细胞的特异性。可在骨髓移植中或作为供体淋巴细胞灌注,采用体外致敏的细胞。

[0259] 血液恶性肿瘤相关特异性 T 细胞可杀伤表达血液恶性肿瘤相关蛋白的细胞。在 T 细胞受体 (TCR) 链中导入编码相关血液恶性肿瘤相关的基因用作一种方法在质和量上改进对携带血液恶性肿瘤相关肽的白血病和癌细胞的免疫应答。接种能增加与血液恶性肿瘤阳性细胞反应的 T 细胞数量的疫苗,是靶向携带血液恶性肿瘤相关细胞的一种方法。采用血液恶性肿瘤相关特异性 T 细胞治疗是另一种方法。另一方法是将地相关血液恶性肿瘤特异的 TCR 链导入 T 细胞或是有裂解潜力的其它细胞。一合适的实施例中,从相关血液恶性肿瘤特异性 T 细胞系中克隆获得 TCR α 和 β 链,且用于过继性 T 细胞治疗,如 W096/30516 所述,纳入本文作参考。

[0260] 4.4 药物组合物和疫苗制剂

[0261] 本发明某些方面中,可将所述肽、多核苷酸、抗体和 / 或 T 细胞掺入药物组合物或免疫原性组合物 (如疫苗)。或者,所述药物组合物可含有转染血液恶性肿瘤相关多核苷酸的抗原呈递细胞 (如树突细胞),这样该抗原呈递细胞表达血液恶性肿瘤相关肽。该药物组合物含有一种或多种这类化合物或细胞和生理上可接受的载体或赋形剂。疫苗可含有一种或多种这类化合物或细胞和免疫刺激剂如佐剂或脂质体 (化合物掺入其中)。免疫刺激剂可以是能提高或增强对外原抗原的免疫应答 (抗体和 / 或细胞介导) 的物质。免疫刺激剂的例子包括佐剂、生物可降解微球体 (如聚乳酸半乳交酯) 和脂质体 (化合物掺入其

中)(美国专利 4,235,877)。疫苗制品一般描述于 Powell 和 Newman(1995)。本发明范围内的药物组合物和疫苗也可含有生物活性或无活性的其它化合物。例如可加入其它肿瘤抗原的一种或多种免疫原性部分或掺入融合肽中,或作为组合物或疫苗内单独的化合物。

[0262] 某些实施例中,设计药物组合物和疫苗在患者如人中诱发对血液恶性肿瘤相关肽特异的 T 细胞应答。一般通过采用较短的肽(如天然血液恶性肿瘤相关肽的 23 个以下连续氨基酸残基,优选 4-16 个连续残基,更优选 8-16 个连续残基,最优选 8-10 个连续残基)有利于 T 细胞应答。另一方面或此外,所述疫苗可含有优先增强 T 细胞应答的免疫刺激剂。换言之,该免疫刺激剂可提高 T 细胞对血液恶性肿瘤相关肽的应答水平,按比例数量>增强抗体应答的数量。例如,当与标准的油性佐剂如 CFA 相比时,优先增强 T 细胞应答的免疫刺激剂可提高的增殖性 T 细胞应答,比相关的血液恶性肿瘤阴性对照细胞系至少高二倍,提高裂解反应至少 10% 和 / 或提高 T 细胞活化至少二倍,虽然没有检测到抗体应答增强。一般可采用该领域已知的任何代表性技术如本文提供的技术,来测定增强的对血液恶性肿瘤相关肽的 T 细胞的数量或抗体应答。

[0263] 药物组合物或疫苗可含有编码上述一种或多种肽的 DNA,这样就原位产生了肽。如上所述,可将 DNA 置于该领域普通技术人员已知的任何各种传递系统中,包括核酸表达系统、细菌和病毒表达系统、哺乳动物表达系统。许多基因传递技术是本领域熟知的(Roll and, 1998, 和本文引用的参考文献)。合适的核酸表达系统含有在病人中表达所需的 DNA、cDNA 或 RNA(如合适的启动子和终止信号)。细菌传递系统包括给予能在其细胞表面表达肽的免疫原性部分或分泌表位的细菌(如 BCG)。一优选实施例中,采用病毒表达系统(如牛痘或其它痘病毒、逆转录病毒或腺病毒)导入该 DNA,此系统涉及采用非致病性(缺陷性)复制病毒(Fisher-Hoch 等,1989;Flexner 等,1989, Flexner 等,1990;美国专利 4,603,112、4,769,330;5,017,487;国际专利申请 WO 89/01973;美国专利 4,777,127;英国专利 GB 2,200,651;欧洲专利 EP0,345,242;国际专利申请 WO 91/02805;BerKner, 1988;Rosenfeld 等,1991;Kolls 等,1994;Kass-Ersler 等,1993;Guzman 等,1993a;和 Guzman 等,1993)。将 DNA 掺入这类表达系统的技术是该领域普通技术人员熟知的。DNA 也可是“裸的”,例如见 Ulmer 等(1993)所述和 Cohen(1993)的综述。可通过将该 DNA 包被在可生物降解的小珠上有效地转运入细胞,来增加裸 DNA 的摄入。显然一种疫苗可含有多核苷酸和肽组分。这种疫苗可提供增强的免疫应答。

[0264] 如上所述,药物组合物或疫苗可含有能表达血液恶性肿瘤相关肽的抗原呈递细胞。为上述治疗目的,该抗原呈递细胞优选是自身树突细胞。可用标准技术(Reeves 等,1996;Tuting 等,1998;和 Nair 等,1998)制备和转染此种细胞。可用上述体外刺激和标准的增殖以及铬释放测定验证抗原呈递细胞的表面上血液恶性肿瘤相关肽的表达。

[0265] 本领域普通技术人员懂得本文所述的好处是,疫苗可含有上述多核苷酸和肽的药学上可接受的盐。可从药学上接受的非毒性碱,包括有机碱(如伯、仲、叔胺和碱性氨基酸的盐)和无机碱(如钠、钾、锂、铵、钙和镁盐)制备此种盐。短语“药学上或药理学上可接受的”指当给予合适的动物或人时,不会产生副作用、过敏或其它明显不良反应的分子实体和组合物。术语“药学上可接受的载体”包括任何或所有的溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂、抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。用于药物活性物质的这类介质和制剂是本领域熟知的。应考虑用于治疗组合物时,除迄今已知的与活性成分不相容的任何常规介质或制剂。对

于人给药,制品应符合食品和药物管理局的生物制品标准所要求的无菌、无热源、总体安全和纯度标准。组合物中也可掺入补充的活性成分。

[0266] 虽然本发明药物组合物中可采用本领域普通技术人员已知的任何合适的载体,但载体的类型根据给药方式而不同。可将本发明组合物配制成任何合适的给药方式例如局部、口服、鼻、静脉内、颅内、腹膜内、皮下或肌肉内给药的剂型,对于胃肠道外给药如皮下注射,载体最好含有水、盐水、酒精、脂肪、蜡或缓冲剂。对于口服给药,可采用任一上述载体,或固体载体如甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、蔗糖和碳酸镁。也可采用生物可降解微球体(如聚乳酸聚羟乙酸盐)作为本发明药物组合物的载体。合适的生物可降解微球体见例如美国专利 4,897,268 ;5,075,109 ;5,928,647 ;5,811,128 ;5,820,883 ;5,853,763 ;5,814,344 和 5,942,252 中所述。对于某些局部应用,优选熟知的主分配制成霜剂或洗剂。

[0267] 这类组合物也可含有缓冲剂(如中性缓冲盐水或磷酸缓冲盐水)、碳水化合物(如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖),甘露糖醇、蛋白质、肽或氨基酸如甘氨酸、抗氧化剂、抑菌剂,螯合剂如 EDTA 或谷胱甘肽、佐剂(如氢氧化铝)、能赋予该制剂与受者血液等渗、低渗或微高渗的溶质、悬浮剂、增稠剂和/或防腐剂。或者,可将本发明组合物配制成冻干剂,或用熟知的技术配制成一种或多种脂质体、微球体、纳米颗粒或微粒化传递系统。

[0268] 在制备本发明疫苗组合物时,可采用任何各种免疫刺激剂如佐剂。大多数佐剂含有保护抗原免被快速分解的物质如氢氧化铝或矿物油、免疫应答刺激剂如脂质 A、来源于百日咳鲍特氏菌或结核分枝杆菌的蛋白质。合适的佐剂可从市场上购得,如铝基佐剂(如 Alhydrogel、Rehydragel、磷酸铝;Algammulin,氢氧化铝);油基佐剂(弗氏不完全佐剂和完全佐剂(Difco Laboratories, Detroit, MI)、Specol、RIBI、TiterMax、Montanide ISA 50 或 Seppic MONTANIDE ISA 720)、基于非离子嵌段共聚物的佐剂、细胞因子(如 GM-CSF 或 Flat3- 配体);Merck 佐剂 65(Merck and Company Inc. Rahway, NJ);AS-2(Smithkline Beecham, Philadelphia, PA);钙、铁或锌的盐;酰化酪氨酸的不溶性悬浮液;酰化糖;阳离子或阴离子衍生的多糖;聚磷腈;生物可降解微球体;单磷酸脂质 A 和 Quil A。细胞因子如 GM-CSF 或 IL-2、IL-7 或 IL-12 也可用作佐剂。

[0269] 血蓝蛋白和血红细胞素也可用于本发明。特别优选采用匙孔螯血蓝蛋白(KLH),虽然可采用其它软体动物和节肢动物的血蓝蛋白和血红细胞素。也可采用各种多糖佐剂。特别优选多糖的聚胺变体如壳多糖和脱乙酰壳多糖。

[0270] 另一组优选佐剂是细菌肽聚糖的胞壁酰二肽(MDP, N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺)。也考虑胞壁酰二肽的衍生物,如氨基酸衍生物苏氨酸-MDP 和脂肪酸衍生物 MTPPE。

[0271] 美国专利 4,950,645 描述了胞壁酰二肽的亲脂性二糖-三肽衍生物,提议可用于磷脂酰胆碱和磷脂酰甘油形成的人工脂质体。据说其能有效激活人单核细胞和破坏肿瘤细胞,但通常高剂量时无毒性。也提出美国专利 4,950,645 和国际专利申请 W091/16347 的化合物可用于本发明的具体方面。

[0272] 也可采用 BCG 和 BCG 细胞壁骨架(CWS)作为本发明的佐剂,加或不加海藻糖二霉菌酸。可采用海藻糖二霉菌酸本身。Azuma 等(1988)证明海藻糖二霉菌酸给药与小鼠对流感病毒感染的抗性增强相关。可按美国专利 4,579,945 所述制备海藻糖二霉菌酸。

[0273] 两亲性和表面活性剂如皂苷及衍生物如QS21 (Cambridge Biotech) 形成了用于本发明疫苗免疫原的另一类优选佐剂。也可使用非离子嵌段共聚物表面活性剂 (Rabinovich 等, 1994; Hunter 等, 1991)。如 Yamamoto 等 (1988) 描述的寡核苷酸是另一类有用的佐剂。Quil A 和香菇多糖也是优选佐剂。

[0274] 还考虑采用超抗原作为本发明佐剂。“超抗原”一般是细菌产物, 能刺激比肽抗原更大比例的 T 淋巴细胞而无需抗原加工 (Mooney 等, 1994)。超抗原包括葡萄球菌外蛋白如金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的 α 、 β 、 γ 和 δ 肠毒素和大肠杆菌的 α 、 β 、 γ 和 δ 外毒素。常见的葡萄球菌肠毒素称为葡萄球菌肠毒素 A (SEA) 和 B (SEB) 到肠毒素 E (SEE) (Rott 等, 1992)。酿脓葡萄球菌 B (SEB)、产气荚膜梭菌肠毒素 (Bowness 等, 1992)、酿脓葡萄球菌的胞质膜相关蛋白 (CAP) (Sato 等, 1994) 和金黄色葡萄球菌的毒性休克综合征毒素-1 (TSST-1) (Schwab 等, 1993) 也是有用的超抗原。

[0275] 一类特别优选用于本发明的佐剂是精制的去毒内毒素, 如美国专利 4, 866, 034 中所述。这些精制去毒内毒素能在哺乳动物中有效产生佐剂反应。去毒内毒素可与其它佐剂联用。考虑去毒内毒素与海藻糖二霉菌酸联用, 见美国专利 4, 435, 386 所述。还参考去毒内毒素与海藻糖二霉菌酸及内毒素糖脂联用 (美国专利 4, 505, 899), 去毒内毒素与细胞壁骨架 (CWS) 联用, 或 CWS 与海藻糖二霉菌酸联用, 见美国专利 4, 436, 727; 4, 436, 728 和 4, 505, 900。预计只联用 CWS 和海藻糖二霉菌酸而无去毒内毒素也有用, 见美国专利 4, 520, 019。

[0276] MPL 是目前的一种优选免疫增强剂, 可用于本发明。关于 MPL 用途的参考文献包括 Tomai 等 (1987), Chen 等 (1991) 和 Garg 和 Subbarao (1992), 各关于 MPL 在老龄小鼠反应中的某些作用; Ellioff 等 (1991) 报道了 D- 半乳糖胺负载小鼠及其对脂多糖和 MPL 敏感性的增强; Chase 等 (1986) 报道了与细菌感染的关系, Masihi 等 (1988) 报道了 MPL 和内毒素对小鼠的抗鼠弓体的作用。Fitzgerald (1991) 也报道用 MPL 上调梅毒疫苗的免疫原性且赋予家兔明显的抗攻击性感染的保护作用。

[0277] 如以上模型系统所证明, 已知 MPL 使用安全。I 期临床试验也显示 MPL 使用安全 (Vosika 等, 1984)。的确, 已知人用时 $100 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 是安全的, 即使门诊使用 (Vosika 等, 1984)。

[0278] MPL 一般诱导多克隆 B 细胞活化 (Baker 等, 1994), 已证明能在许多系统如免疫不成熟小鼠 (Baker 等, 1988); 老龄小鼠 (Tomai 和 Johnson, 1989) 和裸鼠及 Xid 小鼠 (Madonna 和 Vogel, 1986; Myers 等, 1955) 中增强抗体产生。显示能产生针对红细胞 (Hraba 等, 1993)、T 细胞依赖和不依赖抗原、Pnu- 免疫疫苗 (Garg 和 Subbarao, 1992)、分离的肿瘤相关抗原 (美国专利 4, 877, 611)、同系肿瘤细胞 (Livingston 等, 1985; Ravindranath 等, 1994a; b)、肿瘤相关神经节苷脂 (Ravindranath 等, 1994a; b) 的抗体。

[0279] MPL 的另一用途是增强 IgM 应答, Baker 等 (1988a) 报道 MPL 能提高幼龄小鼠的抗体应答。本发明某些实施例中显示了此佐剂的特别有用的特点。Myers 等 (1995) 最近报道通过不依赖 T 细胞抗体产生 MPL 诱导 IgM 抗体的能力。Myers 等 (1995) 的研究中, 将 MPL 与半抗原 TNP 偶联。MPL 可用作其它半抗原如肽的载体。MPL 也可激活和募集巨噬细胞 (Verma 等, 1992)。Tomai 和 Johnson (1989) 证明 MPL- 刺激的 T 细胞增强了巨噬细胞分泌 IL-1。还知道 MPL 能激活超氧化物的产生、溶菌酶活性、吞噬、和杀伤鼠腹腔巨噬细胞中

的念珠菌 (Chen 等, 1991)。

[0280] MPL 对 T 细胞的作用包括在 BCG- 致敏小鼠的血清中产生内源性细胞毒因子如 TNF (Bennett 等, 1988)。Kovach 等 (1990) 和 Elliot 等 (1991) 也证明 MPL 诱导 TNF 活性。已知 MPL 与 TNF- α 作用以诱导 NK 细胞释放 IFN- γ 。Tomai 和 Johnson (1989) 及 Odean 等 (1990) 也证明在 T 细胞对 MPL 反应中产生 IFN- γ 。

[0281] 也已知 MPL 是强的 T 细胞佐剂。例如, MPL 刺激黑色素瘤 - 抗原特异性 CTL 的增殖 (Mitchell 等, 1988, 1993)。另外, Baker 等 (1988b) 证明无毒 MPL 灭活了抑制型 T 细胞的活性。当然, 已认识到在生理环境中, 灭活 T 抑制型细胞能增加对动物的好处, 如提高抗体产量。Jonson 和 Tomai (1988) 报道了 MPL 的佐剂作用的可能的细胞和分子介体。

[0282] 也知道 MPL 能诱导血小板凝聚和磷酸化血小板蛋白, 继而诱导 5- 羟色胺分泌 (Grabarek 等, 1990)。此研究表明 MPL 参与了蛋白激酶 C 的活化和信号转导。

[0283] 许多文章关于 MPL 的结构和功能。这些文章包括 Johnson 等 (1990) 描述获自明尼苏达沙门菌 Re595 脂多糖的 MPL 同系物的结构特征。Johnson 等 (1990) 与 Grabarek 等 (1990) 共同证明, MPL 的脂肪酸部分可不同, 即使是商品化种类。用薄层层析可将 MPL 分成 8 个组分, Johnson 等 (1990) 用人血小板反应评估, 发现三个特别有活性。Johnson 等 (1990) 征了各种 MPL 的化学组分。

[0284] Baker 等 (1992) 还分析了影响脂质 A 及其类似物消除抑制型 T 细胞活性表达能力的结构特征。他们报道说, 将脂质 A 的磷酸基因从二个减少到一个 (即产生单磷酸脂质 A, MPL) 以及主要去除 3 位残基减少脂肪酰基含量, 导致毒性逐渐降低, 然而这些结构修饰不影响其消除 T_s 功能表达的能力 (Baker 等, 1992)。这些类型的 MPL 用于本发明是理想的。

[0285] Baker 等 (1992) 还证明将脂肪酰基含量从 5 减至 4 (脂质 A 前体 IVA 或 Ia) 消除了影响 T_s 功能的能力, 但不诱导 B 细胞的多克隆活化。这些研究表明为了能消除 T_s 功能的表达, 脂质 A 必须是葡糖胺二糖, 可具有一或二个磷酸基团, 且必须具有至少 5 个脂肪酰基。另外, 非羟基化脂肪酸的链长和酰氧酰基 (2' 和 3' 位) 的位置可能起重要作用 (Baker 等, 1992)。

[0286] 研究脂肪酰基的链长和位置间关系对消除脂质 a 表达抑制型 T 细胞 (T_s) 活性的能力后, Baker 等 (1994) 发现, 链长 C_{12} - C_{14} 的脂肪酰基似乎生物活性最佳。因此, 虽然它们仍可使用, 但本发明不太优选采用脂肪基链长较短 (铜绿假单胞菌和紫色色杆菌的 C_{10} - C_{12}); 或主要是长链 (幽门螺杆菌的 C_{18}) 的脂质 A 制品。

[0287] Baker 等 (1994) 还证明一些细菌多糖的脂质 A 近侧内核心区寡糖能提高 TS 活性的表达, 主要由于革兰阴性菌结构中相对保守的这类寡糖能扩大或扩增对无关微生物抗原的正常抗体应答过程中产生的 $CD8^+T_s$ 细胞群。据报道, 增加所见免疫抑制表达所需的最小结构是一个六糖, 其含有 2- 酮基 -3- 脱氧辛酸残基、二个葡萄糖残基和三个庚糖残基 (其上附着有二个焦磷酸乙醇胺基团 Baker 等 (1994))。这些信息可考虑在本发明中利用或设计另外的佐剂。

[0288] 相关研究中, Tanamoto 等 (1994a ; b ; 1995) 描述化学合成的脂质 A 前体, 在乙酰化或琥珀酰化后内毒素活性的解离。因此, 本发明也考虑采用“乙酰 406”和“琥珀酰 516”等化合物 (Tanamoto 等, 1994a ; b ; 1995)。

[0289] 合成的 MPL 形成一种特别优选的抗原。例如, Brade 等 (1993) 描述一种含脂质 A

的双磷酸化葡萄糖胺二糖骨架的人工糖缀合物能结合抗脂质 a 单抗。这是用于本发明某些方面的一个候选物。

[0290] 具体考虑本发明采用美国专利 4,987,237 所述 MPL 衍生物。该专利描述 MPL 衍生物通过脂基团连接于单磷酸脂质 A 核的伯羟基的侧链上含有一个或多个游离基团如铵基。衍生物提供了偶联脂质 A 的方便方法,即通过偶联剂将脂质 A 与各种生物活性材料偶联,并保持脂质 A 的免疫刺激剂性能。美国专利 4,987,237 中的所有 MPL 衍生物都考虑用作本发明的 MPL 佐剂掺入的细胞。

[0291] 各种佐剂,甚至于通常不用于人类的那些,仍可用于动物,例如,人们希望产生抗体或随后获得活化的 T 细胞。例如当采用未照射的肿瘤细胞时可能发生,从佐剂或细胞中产生的毒性或其它副作用在这种情况下是没关系的。

[0292] 本文所述疫苗中,佐剂组合物最好设计成能诱导 Th1 型占优势的免疫应答。高水平的 Th1 型细胞因子(如 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 和 IL-12)倾向于诱导对给与抗原的细胞介导的免疫应答。相反,高水平的 Th2 型细胞因子(如 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10)倾向于诱导体液免疫应答。应用本文所述疫苗后,病人将维持包括 Th1 和 Th2 型的免疫应答。优选实施例中,其中免疫应答以 Th1 型占优势,Th1 型细胞因子水平的增加高于 Th2 型细胞因子的水平。采用标准试验不难评估这些细胞因子的水平。细胞因子家族的综述可参见 Mosmann 和 Coffman(1989)。

[0293] 用于诱导 Th1 型占优势应答的优选佐剂包括,例如单磷酸脂质 A(优选 3-脱氧酰化单磷酸脂质 a(3D-MPL)与铝盐合用。MPL 佐剂可从 Corixa Corporation(Seattle WA;见美国专利 4,436,727;4,877,611;4,866,034 和 4,912,094,其各自纳入本文作参考)购买到。含 CpG 的寡核苷酸(其中 CpG 二核苷酸是非甲基化的)也诱导 Th1 型占优势的应答,这类寡核苷酸是熟知的,例如可参见国际专利申请 W096/02555 和 W099/33488 中所述。Sato 等(1996)也描述了免疫刺激 DNA 序列。另一种优选的佐剂是皂苷,优选是 QS21(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA),可单独或其它佐剂联用。例如,一种强化系统包括单磷酸脂质 A 和皂苷衍生物的组合,如 QS21 和 3D-MPL 的组合(见国际专利申请 W094/00153)或一种反应原性较低的组合物,其中 QS21 用胆固醇猝灭(见国际专利申请 W096/33739)。其它优选制剂包括水包油乳剂和生育酚。特别强的佐剂包括 QS21、3D-MPL 和上述水包油乳剂中的生育酚(见国际专利申请 W095/17210)。

[0294] 其它优选佐剂包括 Montanide ISA720(Seppic)、SAF(Chiron)、ISCOMS(CSL)、MF-59(Chiron)、SBA 系列佐剂(如 SBAS-2 或 SBAS-4、购自 SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium)、Detox(Corixa 公司)、RC-529(Corixa 公司)和氨烷基氨基葡萄糖苷-4-磷酸盐(AGPs)。

[0295] 本发明的任何疫苗可用熟知的方法制备,即将一种或多种抗原,一种或多种免疫刺激剂或佐剂,以及一种或多种合适的载体,赋形剂或药学上可接受的缓冲剂组合在一起。本文所述组合物可作为缓释剂型给药(即以多糖组成的胶囊、海绵或凝胶剂型、能在给药后缓慢释放其中的化合物)。可采用熟知技术(Coombes 等,1996)制备此种制剂,并通过口服、直肠或皮下植入在所需的靶位或植入)给药。缓释制剂可含有分散在载体基质和/或包含在储存器(被速率控制膜包围)中的肽、多核苷酸或抗体。

[0296] 这类制剂中所用的载体优选生物相容性,也可以是生物可降解的,优选提供较恒

定水平的活性成分释放的制剂。这类载体包括聚（丙交酯-共乙交酯）的微颗粒以及聚丙烯酸、乳胶、淀粉、纤维素和葡聚糖。其它缓释载体包括超分子生物载体，其含有非液态亲水核心（如交联的多糖或寡糖）和任选的含两亲性化合物如磷脂的外层（美国专利 5,151,254、国际专利申请 W094/20078；W094/23701 和 W096/06638）。缓释制剂中活性化合物的量取决于植入部位、释放的速度和预计持续时间，及待防治疾病的性质。

[0297] 所述药物组合物和疫苗中可采用任何各种传递载体，以促进产生靶向肿瘤细胞的抗原特异性免疫应答。传递载体包括抗原呈递细胞（APC），如树突细胞、巨噬细胞、B 细胞、单核细胞和可被基因改造成有效的 APC 的其它细胞。这类细胞可以但不需要基因修饰以提高其提呈抗原的能力，改进 T 细胞应答的活化和 / 或维持本身具有的抗肿瘤作用，和 / 或在免疫学上与接受者相容（即配对的 HLA 单倍型）。一般可从各种生物液体和器官，包括肿瘤和肿瘤外周组织中分离得到 APC，且可以是自体的、同种异体的，同种或异种细胞。

[0298] 本发明某些优选实施例采用树突细胞或其后代细胞作为抗原呈递细胞。树突细胞是很强的 APC (Banchereau 和 Steinman, 1998)，已证明其有效作为诱导预防或治疗抗肿瘤免疫性的生理性辅剂 (Timmerman 和 Levy, 1999)。通常可根据其典型形态（原位星状，显著的胞质突（树突）体外可见），摄取、加工和高效呈递抗原的能力及激活原初 T 细胞应答的能力，来鉴定树突细胞。当然可基因改造树突细胞以表达通常在体内或活体内树突细胞上没有发现特异性细胞表面受体或配体，这类修饰的树突细胞也是本发明考虑的。另一种树突细胞，分泌性载体、抗原负载的树突细胞（称为外染色体）也可用于疫苗中 (Zitvogel 等, 1998)。

[0299] 树突细胞可获自外周血、骨髓、肿瘤浸润细胞、肿瘤外周组织浸润细胞、淋巴结、脾脏、皮肤、脐带血或任何其它合适的组织或液体。例如，可通过在获自外周血单核细胞的培养物中加入组合细胞因子如 GM-CSF、IL-4、IL-13 和 / 或 TNF α 活体外分化树突细胞。或者，在培养基中加入能诱导树突细胞分化、成熟和增殖的 GM-CSF、IL-3、TNF- α 、CD40 配体、LPS、fit3 配体和 / 或其它化合物，使获自外周血、脐带血或骨髓的 CD34 阳性细胞分化为树突细胞。

[0300] 可方便地将树突细胞分成“不成熟”和“成熟”细胞，这是在两种鉴定良好的表型之间区别的简单方法。然而这种命名法不应认为排除了所有可能的分化中间期。不成熟树突细胞被称为 PAC，其抗原摄取和加工能力高，这与 Fc γ 受体和甘露糖受体的高表达相关。成熟表型的典型特征是这些标志的表达较低，但负责 T 细胞活化的细胞表面分子，如 I 类和 II 类 MHC 分子、粘附分子（如 CD54 和 CD11）和共刺激分子（如 CD40、CD80、CD86 和 4-1BB）的高表达。

[0301] 一般用编码血液恶性肿瘤相关肽的多核苷酸转染 APC，在细胞表面上表达肽或其抗原性部分。可活体外进行这种转染，含这种转染细胞的组合物或疫苗可用于上述治疗目的。或者，可将靶向树突细胞或其它抗原呈递细胞的基因传递载体给予病人，使其在体内转染。可用该领域已知的任何方法如国际专利申请 W097/24947 中所述的方法或 Mahvi 等 (1997) 所述基因枪方法进行树突状细胞的体内或活体内转染。可将树突细胞或祖细胞与血液恶性肿瘤相关肽、DNA（裸或在质粒载体中）或 RNA 一起培育，或与表达抗原的重组细菌或病毒（如牛痘、禽痘、腺病毒或慢病毒载体）一起培育，获得树突细胞的抗原负载。负载前可将此肽共价偶联于提供 T 细胞辅助的免疫伙伴（如载体分子）。或者，可单独或存在此

肽时用非偶联的免疫伙伴脉冲刺激树突细胞。

[0302] 也考虑联合治疗,可采用同一类型的所述药物组合物作单一和联合药物。所述疫苗和药物组合物可装在单位剂量或多剂量容器,如安瓿或小瓶中。这些容器最好密封保持制剂的无菌,直到使用。一般将这类制剂作为悬浮液、溶液或乳液贮存在油性和水性载体中。或者,可将所述疫苗或药物组合物冻干贮存,使用前只需加入无菌液态载体即可。

[0303] 4.5 血液恶性肿瘤疾病的诊断和预后方法

[0304] 本发明还提供检测与上述一种或多种多肽或多核苷酸组合物相关的恶性肿瘤疾病的方法,以及监测免疫接种或治疗此类疾病效果的方法。为了确定是否存在与上述一种或多种多肽或多核苷酸组合物相关的恶性肿瘤疾病,可测试病人的对一种或多种组合物特异的 T 细胞的水平。某些方法中,从病人中分离含 CD4⁺ 和 / 或 CD8⁺ T 细胞的生物样品,与上述一种或多种多肽或多核苷酸组合物一起培育,和 / 或检测表达一种或多种所述肽或多肽的 APC,以及是否存在 T 细胞的特异性激活。合适的生物样品包括但不限于分离的 T 细胞。例如,可用常规方法(如 Ficol1/Hypaque 密度梯度离心外周血淋巴细胞)从病人中分离 T 细胞。37℃ 体外将 T 细胞与上述一种或多种肽、多肽或多核苷酸组合物(如 5-25 μg/ml)一起培育 2-9 天(一般 4 天)。需要在缺乏所述组合物时培养另一等分的 T 细胞样品作为对照。对于 CD4⁺ T 细胞,最好通过评价 T 细胞增殖来检测活化。对于 CD8⁺ T 细胞,最好通过评价溶细胞活性来检测活化。增殖水平至少比无病者高两倍或溶细胞活性水平至少比无病者高 20%,表明存在与上述一种或多种多肽或多核苷酸组合物的表达相关的恶性肿瘤疾病。再采用该领域熟知的方法,进行增殖水平和 / 或溶细胞活性与对治疗预计反应之间的相关分析。具体说,可预计显示了较高抗体、增殖和 / 或裂解反应的病人对治疗显示较大的反应。

[0305] 其它方法中,测定病人的生物样品中对上述一种或多种血液恶性肿瘤相关肽或多肽特异的抗体水平。将该生物样品与血液恶性肿瘤相关肽或多肽,或编码肽或多肽的多核苷酸,和 / 或表达肽或多肽的 APC 在适当条件下一同培育足够时间,以形成免疫复合物。然后,检测所选肽或多肽与生物样品中特异性结合所述肽或多肽的抗体之间形成的免疫复合物。此方法中所用的生物样品可以是获自预计含有抗体的病人的任何样品。合适的生物样品包括血液、腹水、骨髓、胸腔积液和脑脊液。

[0306] 将反应混合物中的生物样品与所选肽或多肽在适当条件下培育足够时间,以使所选肽或多肽与对肽或多肽有免疫特异性的抗体之间形成免疫复合物。例如,将生物样品与所选肽或多肽于 4℃ 培育 24-48 小时。

[0307] 培育后检测反应混合物中存在的免疫复合物。检测所选肽或多肽与生物样品中存在的抗体之间形成的免疫复合物,可采用各种已知技术如放射免疫测定(RIA)和酶联免疫吸附测定(ELISA)进行。合适的测定是本领域熟知的,并可参见科学和专利文献的详述(Harlow 和 Lane,1988)。可用的测定包括但不限于:双单抗夹心免疫测定技术(美国专利 4,376,110),单克隆-多克隆抗体夹心测定(Wide 等,1970);“Western 印迹”法(美国专利 4,452,901);标记配体的免疫沉淀(Brown 等,1980);酶联免疫吸附测定(Raines 和 Ross,1982);包括利用荧光色素的免疫细胞化学技术(Brooks 等,1980)和活性的中和作用(Bowen Pope 等,1984)。其它免疫测定包括但不限于美国专利 3,817,827;3,850,752;3,901,654;3,935,074;3,984,533;3,996,345;4,034,074 和 4,098,876 中所述的测定。

[0308] 为了检测目的,所选肽或多肽可标记或不标记。不标记的多肽和肽可用于凝集测定或与标记的检测试剂联用,该标记的试剂能结合所述免疫复合物(如抗免疫球蛋白、蛋白 G、蛋白 A 或凝集素,和能结合第一抗体(此抗体能特异性结合所选血液恶性肿瘤相关肽或多肽)的第二抗体和/其抗原结合片段。如果标记所选肽或多肽,报道基团可以是本领域已知的任何合适的报道基团,包括放射性同位素、荧光基团、发光基团、酶、生物素和染料颗粒。

[0309] 某些测定中,将不标记的肽或多肽固定在固相支持物上。固相支持物可以是本领域普通技术人员已知的、可附着肽的任何材料。例如,固相支持物可以是微量滴定板中的测试孔,或硝酸纤维素或其它合适的膜。或者,该支持物可以是小珠或园片,如玻璃、玻璃纤维、胶乳或塑料如聚苯乙烯或聚氯乙烯。该支持物也可以是磁性颗粒或光纤传感器,见美国专利 5,359,681 所述。可用本领域技术人员已知的,专利和科学文献中详述的各种技术,将所述肽固定在固相支持物上。本文中,“固定”指非共价结合如吸附和共价结合(可以是抗原和支持物上的功能基团之间的直接连接,或可以通过交联剂连接)。优选通过吸附固定于微量滴定板的孔中或膜上。在这种情况下,可使所选肽或多肽在合适的缓冲液中与固相支持物接触适当时间来获得吸收。接触时间因温度而不同,但通常在约 1 小时至约 1 天之间。一般接触塑料(如聚苯乙烯或聚氯乙烯)微量滴定板的孔所用肽量的范围为约 10ng 至约 10 μ g,优选约 100ng 至约 1 μ g,以充分固定足够量的肽。

[0310] 固定后,通常要封闭支持物上的残留蛋白质结合位点。本领域普通技术人员知道可使用任何合适的封闭剂,如牛血清白蛋白、Tween™20(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) 热灭活的正常山羊血清(NGS)或 BLOTTO(无脂干奶粉的缓冲液,也含有防腐剂、盐和消泡剂)。然后将此支持物与怀疑含有特异性抗体的生物样品一起培育。样品可不稀释或更常用含少量(0.1-0.5%重量)蛋白如 BSA,NGS 或 BLOTTO 的缓冲液稀释后加入。通常适当的接触时间(即培育时间)是足以检测到样品中存在的抗体或其抗原结合片段的时间,所述抗体对所选肽或多肽有免疫特异性。优选接触时间是足以结合和未结合抗体或抗体片段之间达到平衡时的至少约 95%的结合水平。本领域普通技术人员知道,达到平衡所需时间不难通过测定该期间段发生的结合水平来确定。室温培育时间约 30 分钟通常足够。

[0311] 可用适当的缓冲液如含 0.1% Tween™20 的 PBS 洗涤固相支持物,去除未结合样品。然后加入能结合免疫复合物(其至少含有第一种可检测标记或“报道”分子)的检测试剂。将该检测试剂与免疫复合物一起培育足够时间以检测结合的抗体或其抗原结合片段。一般通过测定该时间段发生的结合水平确定适合的时间量。然后除去未结合标记或检测试剂,用合适的试验或分析仪器检测结合的标记或检测试剂。检测报道基团所用方法取决于报道基团的性质。对于放射性标记物,一般适用闪烁计数或放射自显影方法。分光光度法可用于检测染料、发光或化学发光部分及各种色原、荧光标记物等。偶联于不同报道基团(常为放射性或荧光基团或酶)的生物素可用亲和素检测。酶报道基团(如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶和葡萄糖氧化酶)一般可通过加入底物(通常一个特定时间段),然后用分光光度计或其它分析反应产物来检测。不论所用的具体方法,结合的检测试剂水平比本底(即获自无病者的生物样品中所观察到的水平)至少高二倍时,表明存在与表达所选肽或多肽相关的恶性疾病。

[0312] 通常,监测免疫接种或治疗效果的方法,包括监测样品中或动物如病人中对所选

肽或多肽特异的抗体或 T 细胞水平中的变化。监测抗体水平的方法包括以下步骤：(a) 将获自治疗或免疫接种前病人的第一种生物样品与所选肽或多肽一起培育，其中培育的条件和时间足以形成免疫复合物；(b) 检测所选肽或多肽与生物样品中能特异性结合所选肽或多肽的抗体或抗原结合片段之间形成的免疫复合物；(c) 用以后时间例如治疗或免疫接种后采自该病人的第二种生物样品重复步骤 (a) 和 (b)；和 (d) 比较第一和第二种生物样品中检测到的免疫复合物的量。或者，可用编码所选肽或多肽的多核苷酸，或表达所选肽或多肽的 APC 代替所选肽或多肽本身。这些方法是检测多核苷酸编码的或 APC 所表达的所选肽或多肽和生物样品中的抗体和或抗原结合片段之间的免疫复合物。

[0313] 监测 T 细胞活化和 / 或血液恶性肽特异性前体的方法，可包括以下步骤 (a) 将获自治疗或免疫接种前病人的含 CD4⁺ 和 / 或 CD8⁺T 细胞的第一种生物样品（如骨髓、外周血或其组分）与血液恶性肽或多肽一起培育，其中培育的条件和时间足以使 T 细胞特异性活化、增殖和 / 或裂解；(b) 检测 T 细胞活化、增殖和 / 或裂解的量；(c) 用治疗或免疫接种后采自同一病人的含有 CD4⁺ 和 / 或 CD8⁺T 细胞的第二种生物样品重复步骤 (a) 和 (b)；和 (d) 比较第一和第二种生物样品中的 T 细胞活化、增殖和 / 或裂解的量。或者可用编码血液恶性肿瘤相关肽的多核苷酸或表达此肽的 APC 代替血液恶性肿瘤肽本身。

[0314] 以上方法中所用生物样品可以是获自病人的、预计含有抗体、CD4⁺T 细胞和 / 或 CD8⁺T 细胞的任何样品。合适的生物样品包括血液、血清、腹水、骨髓、胸腔积液和脑脊液。第一种生物样品可获自治疗或免疫接种开始之前，或部分完成治疗或免疫接种方案时。第二种生物样品应以类似方法获得，但时间在治疗或免疫接种之后。第二种生物样品可获自治疗或免疫接种完成时或部分完成时，只要第一和第二种生物样品分离至少已进行了部分治疗或免疫接种。

[0315] 二种样品的培育和检测步骤一般按上述进行。第二种样品中的免疫复合物的量比第一种样品有统计学显著增加，反映治疗或免疫接种成功。

[0316] 4.6 药物组合物和制剂的给药

[0317] 某些实施例中，本发明涉及用药学上可接受的溶液配制上述一种或多种多核苷酸、多肽、肽、抗体或抗原结合片段组合物，单独或与抗癌治疗的一种或多种其它方式组合，或与一种或多种诊断或治疗剂组合给予细胞或动物。

[0318] 也可理解，若需要，可将上述核酸片段、RNA 或 DNA 组合物与其它制剂如蛋白质或肽或各种药物活性剂组合给药。只要该组合物至少含有一种上述基因表达构建物，事实上不限制也可包含其它组分，只要加入的制剂与靶细胞或宿主组织接触时不产生显著副作用。如需要时，RNA 或 DNA 衍生物组合物可与其它各种制剂一起传递。这类 RNA 或 DNA 组合物可从宿主细胞或其它生物来源纯化得到，或者可如上述化学合成。同样，这类组合物可含有取代或衍生的 RNA 或 DNA 组合物。这类组合物可包括一种或多种治疗性基因构建物，单用或与一种或多种修饰的肽或核酸取代衍生物和 / 或其它抗癌治疗剂组合。

[0319] 随着合适给药和治疗方案的发展，药学上可接受的赋形剂和载体溶液的配制是精通此领域的技术人员熟知的，以将本文所述的特定组合物用于各种治疗方案，包括例如口服、静脉内、鼻内、经皮、前列腺内、肿瘤内和 / 或肌肉内施用和制剂。

[0320] 4.6.1 注射输药

[0321] 本文所述药物组合物例如可通过胃肠道外、静脉内、肌肉内或甚至腹膜内给药，如

美国专利 5,543,159 ;5,641,515 和 5,399,363 所述（各自纳入本文作为参考）。可将水与表面活性剂如羟丙基纤维素适当混合，制备活性化合物的游离碱或药学上可接受盐的溶液。也可用甘油、液态聚乙二醇及其混合物和油制备分散剂。在普通的贮藏和使用条件下，这些制品应含有防腐剂以预防微生物生长。

[0322] 适合于注射的药物形式包括无菌水溶液或分散液，和无菌粉剂临时配成无菌注射液或分散液（美国专利 5,466,468，纳入本文参考）。所有情况下制剂必须无菌，必须是易用针筒装的液体。在生产和贮藏条件下必须稳定，必须防止微生物如细菌和真菌污染。载体可以是溶剂或分散介质，含有例如水、乙醇、多元醇（如甘油、丙二醇、液态聚乙二醇等），其合适的混合物和 / 或植物油。可维持合适的流动性，例如通过采用包衣如卵磷脂，可通过使用表面活性剂保持分散剂中所需的颗粒大小。可加入各种抗细菌和抗真菌剂如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等产生防止微生物的作用。许多情况下，优选包括等渗剂如糖和氯化钠。可通过在组合物中采用延缓吸收剂，如单硬脂酸铝和明胶延长可注射的组合物的吸收。

[0323] 若需要，胃肠道外给药的水溶液应适当地缓冲，可用足量的盐和糖使液体稀释液等渗。这些特定的水溶液尤其适合静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内给药。为此，本领域技术人员通过本文所述将知道可用的无菌含水介质。例如，可将一个剂量溶于 1ml 等渗 NaCl 液中，加入到 100ml 的皮下输液中或在提出的输注部位注射（见例如 Hoover, 1970）。一些剂量变化是需要的，取决于待治疗者的状况。在任何情况下，负责给药的人将决定个体对象的适合剂量。此外，对于人施用，制品应符合 FDA 生物制品标准的无菌、致热原性、总体安全和纯度标准。可将所需量的基因治疗构建物和几种其它上述成分掺入适当的溶剂中，如需要然后过滤除菌制备无菌注射液。通常将多种灭菌活性组分掺入含有基础分散介质和所需的上述其它组分的无菌载体中制成分散液。制备无菌注射液的无菌粉末时，优选的制备方法是真空干燥或冻干技术，从其预先除菌过滤液制备活性组分和其它所需成分的粉末。

[0324] 上述组合物可配制为中性或盐形式。药学上可接受的盐包括用无机酸如盐酸或磷酸或有机酸如醋酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成的酸加成盐。与游离羧基形成的盐可衍生自无机碱如钠、钾、铵、钙、氢氧化铁和有机碱如异丙胺、三甲胺、组胺、普鲁卡因等。配制时将此溶液以与剂型相配方式和治疗有效量给药。该制剂可以各种剂型如注射溶液、药物释放胶囊等易于给药。

[0325] 本文所用的“载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质、载体、包衣、稀释液、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体等。药物活性物质所用的这类介质和制剂是本领域熟知的。除了迄今已知与活性成分不相容的任何常规介质或制剂外，均可考虑用于本发明的治疗组合物。也可将辅助的活性成分掺入组合物中。

[0326] 4.6.2 鼻内输药

[0327] 可采用鼻液或喷雾、气雾甚至吸入剂来治疗与上述一种或多种肽和多核苷酸相关的血液恶性肿瘤。鼻液是通常用于滴或喷雾给予鼻通道而设计的水溶液。制备的鼻液应在许多方面类似于鼻分泌液以维持正常的纤毛活动。鼻水溶液一般是等渗和略有缓冲性以维持 PH 约 5.5-6.5。此外，若需要，可在该制剂中加入类似于眼科制剂中所用的抗微生物防腐剂和适当的药物稳定剂。各种商品化鼻制剂是已知的。

[0328] 吸入剂或吸入物是设计用于传送药物或化合物至病人呼吸树的药物制剂。给予蒸

气或湿气且到达患病区域常可缓解支气管和鼻阻塞症状。然而,也可借此途径将药物输送至全身循环。可通过鼻或口呼吸给予吸入剂。如果液滴大小足够细和均匀,这样湿气到达细支气管,施用吸入液才有效。

[0329] 另一类产品也称为吸入剂,有时称为吹入剂由细粉化的或液态药物组成,可用特殊的给药系统,如将药液或药物悬液保持为液化气体推进剂的药物气雾剂将其带入呼吸道。当通过一合适的阀门和口腔适配器释放时,可将定量的吸入剂推入病人的呼吸道。

[0330] 此类制剂给药时颗粒大小是重要的。据报道,能透入肺腔的最佳粒子大小为约 0.5–7 μm 。加压气雾剂可产生细小湿气,因此可考虑优先采用。

[0331] 4.6.3 脂质体、纳米胶囊和微粒介导的输药

[0332] 在某些实施例中,本发明人考虑采用脂质体、纳米胶囊、微球体、微粒、脂质颗粒载体等,将本发明多核苷酸组合物导入适合的宿主细胞。具体说,可将本发明多核苷酸组合物配制包裹在脂性粒子、脂质体、载体、毫微球或纳米颗粒等中来输送。

[0333] 为加入上述核酸的药上可接受制剂,这类制剂是优选的。脂质体的形成和用途通常是本领域技术人员已知的(见例如 Couvreur 等,1997;Couvreur,1988;Lasic,1998;他们报道了脂质体和纳米胶囊在抗生素靶向治疗胞内细菌感染和疾病中的应用)。最近开发的脂质体具有改进的血清稳定性和循环半寿期(Gabizon 和 Papahadjopoulos,1988;Allen 和 Choun,1987;美国专利 5,741,516,纳入本文作为参考)。另外,已综述了脂质体和脂质体样制剂用作潜在药物载体的各种方法(见 Takakura,1998;Chandran 等,1997;Margalit,1995;美国专利 5,567,434;5,552,157;5,565,213;5,738,868 和 5,795,587,各自纳入本文作为参考)。

[0334] 脂质体已成功地用于其它方法通常不能转染的一些细胞类型,包括 T 细胞悬液、原代肝细胞培养物和 PC12 细胞(Renneisen 等,1990;Muller 等,1990)。此外,脂质体对 DNA 长度没有通常基于病毒输送系统的限制。脂质体已有效用于在各种培养的细胞系和动物中导入基因、药物(Heath 和 Martin,1986;Heath 等,1986;Balazsovits 等,1989;Fresta 和 Puglisi,1996)、放射性治疗剂(Pikul 等,1987)、酶(Imaizumi 等,1990a;Imaizumi 等,1990b)、病毒(Faller 和 Baltimore,1984)、转录因子和别构剂(Nicolau 和 Gersonde,1978)。此外,已完成了检测脂质体介导药物输送效果的几项成功临床试验(Lope Berestein 等,1985a;1985b;Coune,1988;Sculier 等,1988)。此外,几项研究提示,采用脂质体全身给药后不会伴有自身免疫反应、毒性或性腺定位(Mori 和 Fukatsu,1992)。

[0335] 将磷脂分散在水介质中形成脂质体且自发形成多层同心双层载体(也称为多层载体 MLV)。MLV 一般直径 25nm–4 μm 。超声处理 MLV 导致形成直径 200–500Å 的小单层载体(SUV),核心中含水溶液。

[0336] 脂质体类似细胞膜,可考虑用于本发明作为所述肽组合物的载体。它们广泛适用于作为水溶性和脂溶性物质分别包载在水空间和双层本身内。载有药物的脂质体通过选择性修饰脂质体制剂可位点专一输送活性药物。

[0337] 除 Couvreur 等(1977,1988)所述外,以下信息可用于产生脂质体制剂。当磷脂分散在水中时形成脂质体以外的各种结构,这取决于脂质与水的摩尔比。比例低时,脂质体是优选的结构。脂质体的物理特征性依赖于 PH、离子强度和双价阳离子的存在。脂质体可显示对离子和极性物质的低通透性,但温度升高时经历相转变可显著改变其通透性。相转变

包括从包装紧密的有序结构（称为凝胶态）改变为包装松散不太有序的结构（称为流动态）。这发生在特征性的相转变温度时，且导致对离子、糖和药物的通透性增加。

[0338] 或者，本发明提供多核苷酸组合物的药学上可接受的纳米胶囊制剂。纳米胶囊一般可以稳定和可重复方式包载化合物（Henry-Michelland 等，1987；Quintanar-Guerrero 等，1988；Douglas 等，1987）。为了避免因胞内聚合物过载产生的副作用，应采用能在体内降解的聚合物设计这类超细颗粒（大小约 $0.1\ \mu\text{m}$ ）。生物可降解的聚烷基氰基丙烯酸纳米颗粒符合这些要求，可考虑用于本发明，这类颗粒不难制备，见（Couvreur 等，1980；1988；Zur Muhlen 等，1998；Zambaux 等，1998；Pinto-Alphandry 等，1995 和美国专利 5,145,684，各自纳入本文参考）所述。具体说，也特别考虑用纳米颗粒和毫微球将多核苷酸输送给靶细胞的方法用于制备所述组合物，给予动物，尤其给与人。

[0339] 4.7 治疗制剂和试剂盒

[0340] 本发明还提供含有一种或多种药学上可接受的赋形剂、载体、稀释剂、佐剂和 / 或其它组分配制的一种或多种血液恶性肿瘤相关组合物，用于制备药物或诊断试剂以及各种试剂盒，所述试剂盒含有一种或多种这类组合物、药物或制剂，以及给予需要的动物或用于一种或多种诊断试验来鉴定对上述一种或多种血液恶性肿瘤相关化合物特异的多核苷酸、多肽和 / 或抗体。除上述表位外，在配制上述具体组合物和制剂时，可采用所述抗体和抗原结合片段、编码抗体或抗原结合片段的多核苷酸或其它抗癌药物、多核苷酸、肽、抗原或其它治疗化合物，特别是在制备抗癌药物或给予患病哺乳动物的抗血液恶性肿瘤治疗。

[0341] 因此，优选给予上述药物组合物的动物包括哺乳动物，特别是人。其它优选动物包括灵长动物、绵羊、山羊、牛、马、猪、狼、犬和猫以及任何其它通常认为是哺乳动物种类的宠物、家畜或商业化相关动物种类。本发明的组合物和制剂可包括部分或明显纯化的多肽、多核苷酸或抗体或抗原结合片段组合物，单用或与一种或多种其它活性成分、抗癌药物、疫苗、佐剂或其它治疗剂组合使用，这些治疗剂可获自天然或重组来源，或是天然获得的或化学合成的，或由表达一种或多种核酸区段的重组宿主细胞体外产生的，这些核酸区段编码一种或多种其它活性成分、载体、佐剂、辅因子或其它治疗性化合物。

[0342] 4.8 诊断试剂和试剂盒

[0343] 本发明还提供诊断试剂和试剂盒，它们包含用于各种诊断试验包括免疫测定如 ELISA 和“夹心”型免疫测定的一种或多种试剂。此试剂盒优选包括本发明的至少第一种肽或第一种抗体或抗原结合片段、其功能性片段或它们的混合物和产生信号的物质。可将此试剂盒组分预先附着于固相支持物上或在使用时施加在固相支持物表面。信号产生物质可预先与本发明抗体结合或使用前需要与一种或多种组分如缓冲液、抗体 - 酶偶联物、酶底物等组合。该试剂盒也可包括其它试剂如封闭试剂用以降低与固相表面的非特异性结合、洗涤试剂、酶底物等。该固相表面可以以微量滴定板、微球体形式或其它适合固定蛋白质、肽或多肽的物质。能催化形成化学发光或生色产物或能减少化学发光或生色底物的酶是一种优选的产生信号的组分。这类酶是本领域熟知的。

[0344] 这类试剂盒用于检测、监测和诊断过度表达或不适当表达血液恶性肿瘤相关肽、多肽、抗体和 / 或多核苷酸及杂交瘤、宿主细胞和含有上述一种或多种组合物的载体为特征的疾病。

[0345] 制备的本发明治疗性和诊断性试剂盒也可包含至少一种上述抗体、肽、抗原结合

片段,杂交瘤、载体、疫苗、多核苷酸或细胞组合物,及使用该组合物作为诊断试剂或治疗剂的说明书。此试剂盒中的容器通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶、针筒和其它合适的容器,容器中装有一种或多种所述诊断和/或治疗组合物,最好适当地分成等分。当提供第二种治疗剂时,该试剂盒还包含第二个不同容器,此容器中装有第二种诊断和/或治疗组合物。或者,可以一种药物组合物制备多个化合物,将其包装在一个容器中如小瓶、烧瓶、针筒、瓶或其它合适的单一容器中。本发明的试剂盒通常还包括密封装有小药瓶供商品销售的装置,如注塑或吹塑容器中装有所需的小。该试剂盒内还装有放射标记的生色素、荧光素或其它类型的可检测标记和检测工具,可在同一容器中提供标记剂如同诊断或治疗组合物本身,或者置于装有第二种组合物并适当地分成等分的第二个不同容器中。或者,可将检测试剂和标记装在单一容器中,且在大多数情况下,该试剂盒一般还包括有密封小瓶的装置供商品销售和/或方便包装和运输。

[0346] 4.9 多核苷酸组合物

[0347] 术语“DNA 区段”和“多核苷酸”指特定物种中去除总基因组 DNA 分离得到的一种 DNA 分子。因此,编码多肽的 DNA 区段指含有一个或多个编码序列的 DNA 区段基本上分离或纯化去除了物种(获得 DNA 区段的物种)总基因组 DNA。术语“DNA 区段”和“多核苷酸”包括 DNA 区段和该区段的较小片段和重组载体如质粒、粘粒、噬粒、噬菌体、病毒等。

[0348] 本领域技术人员了解本发明的 DNA 区段可包括基因组序列、额外的基因组和质粒编码的序列和较小的经工程改造的基因区段,它们能表达或适合表达蛋白质、多肽或肽等。这种片段可天然分离或经人工合成修饰。

[0349] “分离的”本文用于指基本上没有其它编码序列的多核苷酸和不含有大部分无关编码 DNA 如染色体大片段或其它功能性基因或多肽编码区的 DNA 区段。当然,所指的 DNA 区段是最初分离的且不排除后来在该区段中人为加入的基因或编码区。

[0350] 本领域技术人员知道多核苷酸可以是单链(编码或反义)或双链,可以是 DNA(基因组、cDNA 或合成的)或 RNA 分子。RNA 分子包括 HnRNA 分子(其含有内含子并以一对一方式对应于一个 DNA 分子)和 mRNA 分子(其不含内含子)。本发明的多核苷酸中可能有其它编码或非编码序列但不需要,多核苷酸可能(但不需要)连接于其它分子和/或支持物。

[0351] 所述多核苷酸可含有天然序列(即编码血液恶性相关肿瘤蛋白或其部分的内源性序列),或可含有该序列的变体或生物学或抗原性功能等同物。多核苷酸变体含有下述一个或多个取代、添加、缺失和/或插入,优选编码的多肽与天然肿瘤蛋白相比不会免疫原性。一般可如本文所述评估对编码多肽的免疫原性的影响。术语“变体”还包含异种来源的同源基因。

[0352] 当比较多核苷酸或多肽序列时,如果两序列当排列对比其最大一致性时,核苷酸或氨基酸的序列相同则认为两个序列“相同”。两序列之间进行比较通常比较序列窗口上的序列以鉴别和比较局部区域的序列相似性。“比较窗口”本文用于指至少约 20 个毗连位置,通常约 30-75 个、40-50 个毗连位置的区段,其中在两序列最佳排到后一个序列可与相同序号毗连位置的参比序列相比较。

[0353] 比较序列的最佳排列可用 Lasergen 生物信息软件包(DNASTAR Inc. Madison WI)中的 Megalign 程序进行,采用默认参数。该程序包括几种排列方案,见以下参考文献中所述:Dayhoff MO(1978)一种蛋白质进化改变的模型-检测远亲关系的模型。Dayhoff,

M0 编《蛋白序列和结构图集》，National Biomedical Research Foundation, Washington DC, 第 5 卷, 增刊 3, 345-358 页; Hein J (1990) 《排列和种系发生的统一方法》，626-645 页, 《酶学方法》，第 183 卷, Academic Press, Inc., San Diego CA; Higgings, D. G. 和 Sharp, P. M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E. W. 和 Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E. D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-25; Sneath P. H. A 和 Sokal, R. R. (1973) 《数值分类学—数值分类学的原理和实践》，Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. 和 Lipman, DJ (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730)。

[0354] 或者, 比较的最佳序列排列可用 Smith 和 Waterman (1981) Add. APL. Math 2:482 的局部民一性算法, Needleman 和 Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443 的同一性排列算法, Pearson 和 Lipuman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 的类似方法搜索, 计算机实施的这些算法 (GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 和 TFASTA, 威斯康新遗传学软件包, 遗传学计算机小组 (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) 或察看来进行。

[0355] 适合测定序列同一性或序列相似性的优选算法的例子是 BLAST 和 BLAST2.0 算法, 分别见 Altschul 等, (1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 和 Altschul 等, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410。例如, 可用 BLAST 和 BLAST2.0 与上述参数来测定本发明多核苷酸和多肽的序列同一性百分比。进行 BLAST 分析的软件可从固定生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 获得。一个说明性实施例中, 可采用参数 M(- 对匹配残基奖分; 总是 > 0) 和 N(不匹配残基的罚分, 总是 < 0) 计算核苷酸序列的累积评分。对氨基酸序列, 可用评分矩阵计算累计分。当累计排列评分从其达到的最大值下降数量 X 时; 当累计评分由于累积一个或多个负分残基排列而下降到零或以下时; 当达到二序列之一的末端时; 停止各方向命中词的延伸。BLAST 算法参数 W, T 和 X 确定了该算法的灵敏度和速度。BLASTN 程序 (用于核苷酸序列) 用作默认值词长 (W) 为 11, 期望值 (E) 为 10, BLOSUM 62 评分矩阵 (见 Henikoff 和 Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) 排列, B 为 50, 期望值 (E) 为 10, M = 5, N = -4, 并比较两条链。

[0356] 对于两序列的最佳排列, “序列同一至少 20 个位置的比较窗口上性百分比” 的测定最好通过比较的两个最佳对比序列。其中比较窗口中的多核苷酸或多肽序列部分与参比序列 (不含有添加或缺失) 相比, 可含有 20% 或不到、通常 5-15% 或 10-12% 的添加或缺失 (即空隙)。计算此百分比可通过测定两个序列中出现的核酸碱基或氨基酸残基的位置数, 产生相匹配的位置数, 将该匹配的位置数除以参比序列中的位置总数 (即窗口大小), 再乘以 100, 得出序列同一性的百分比。

[0357] 因此, 本发明包括与本文所述序列基本相同的多核苷酸和多肽序列, 例如用本文所述方法 (如采用标准参数的 BLAST 分析, 如以下所述)。比较了本发明多核苷酸或多肽序列的同一性, 至少有 50% 序列同一性, 优选至少 55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 或更高的序列同一性。本领域技术人员知道, 可通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、读框定位等, 适当调整这些值来确定二个核苷酸序列编码的蛋白质的相应同一性。

[0358] 其它实施例中, 本发明提供分离的多核苷酸和多肽含有与本文所述一种或多种序列相同或互补的不同长度的毗连序列。例如, 本发明提供的多核苷酸含有本文所述的一种

或多种序列的至少约 15、20、30、40、50、75、100、150、200、300、400、500 或 1000 或更多的毗连核苷酸以及所有中间长度的核苷酸。不难理解本文中的“中间长度”指上述数值之间的任何长度,如 16、17、18、19 等;21、22、23 等;30、31、32 等;50、51、52、53 等;100、101、102、103 等;150、151、152、153 等,包括 200–500、500–1000 之间的所有整数等。

[0359] 本发明的多核苷酸或其片段,不论编码序列本身的长度,均可与其它 DNA 序列如启动子、聚腺苷酸化信号、附加的限制性酶位点、多克隆位点、其它编码区段等组合,这样其总长度可相当不同。因此考虑可采用几乎任何长度的核酸片段,总长度最好受到制备容易和所用重组 DNA 方案的限制。例如,考虑在本发明许多实施例中所用的说明性 DNA 区段具有约 10000、5000、3000、2000、1000、500、200、100、50 个碱基对的总长度等(包括所有中间长度)。

[0360] 其它实施例中,本发明涉及能在中等严谨条件下与本文所述多核苷酸序列或其片段或其互补序列杂交的多核苷酸。杂交技术是分子生物学领域熟知的。为了说明起见,测试本发明多核苷酸与其它多核苷酸杂交的合适中等严谨条件包括以 $5\times$ SSC、0.5% SDS、10mM EDTA (pH8.0) 溶液预洗涤,于 50–65℃, $5\times$ SS 中杂交过夜,然后于 65℃ 以含 0.1% SDS 的 $2\times$, $0.5\times$ 和 $0.2\times$ SSC 洗二次,各 20 分钟。

[0361] 然而,本领域普通技术人员懂得,由于遗传密码的简并性,编码上述多肽的核苷酸序列有许多。其中,一些多核苷酸与任何天然基因的核苷酸序列的同源性最小。因而,本发明要具体考虑由于密码子使用的差异造成的多核苷酸不同。此外,含有本文所述多核苷酸序列的等位基因也在本发明范围内。等位基因是由于核苷酸的一个或多个突变如缺失、添加和/或取代而发生改变的内分泌性基因。产生的 mRNA 和蛋白质可能(但不需要)有改变的结构或功能。可用标准技术(如杂交扩增和/或数据库序列比较)鉴定等位基因。

[0362] 4.10 探针和引物

[0363] 本发明其它实施例中,可有利地将本文所述多核苷酸序列用作核酸杂交的探针或引物。为此,考虑到核酸区段含有的序列区域至少长约 15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 或 95 个毗连核苷酸序列,与其相同或互补的序列至少长约 15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 或 95 个毗连核苷酸序列,将发现多核苷酸在各种杂交实施例中特别有用。较长的相同或互补的毗连序列如约 100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、525、550、575、600、650、700、750、800、850、900、950 甚至 1000 个核苷酸(包括所有中间长度)和所有全长序列如上述多核苷酸也可在某些实施例中用作探针、引物或扩增目标等。

[0364] 这类核酸探针能与感兴趣的序列特异性杂交,使它们用于检测给定样品中存在的互补序列。然而也考虑其它用途,如利用序列信息制备突变种引物或引物,用于制备其它基因构建物和鉴定及表征全长多核苷酸和全长或基本上全长的 cDNA, mRNA 等。

[0365] 特别考虑具有与本文所述一种或多种多核苷酸序列相同或互补的毗连核苷酸序列区的多核苷酸分子,作为杂交探针用于如 Southern 杂交分析和 Northern 印迹因此需要分析各种细胞类型和各种细菌细胞中的基因产物或其片段。片段的总体大小和互补序列的大小最终取决于所用的具体核酸区段。较小片段一般用于杂交实施例,其中毗连互补区的长度可不同,根据杂交分析的所需目的和希望检测的互补序列的具体长度,例如在约 15、20、

25、30、35、40、45、50、55、60 左右之间,包括较大的毗连互补序列,包括长约 70、80、90、100、120、140、160、180 或 200 左右的核苷酸序列也可使用。

[0366] 采用长约 20-500 个核苷酸的杂交探针能形成稳定和选择性的双链体分子。通常优选具有长 20 个左右碱基以上的毗连互补序列的分子以提高杂交体的稳定性和选择性,从而改进所得特异性杂交分子的量和程度。一般最好设计核酸分子具有长约 25-300 左右之间的连续核苷酸的基因互补序列,需要时甚至可更长。

[0367] 可从本文所述序列之一的任何部分选择杂交探针。为此需要回顾所述序列或其长约 15-30 个核苷酸序列的毗连部分,包括希望用全长序列作为探针或引物。探针或引物序列的选择受制于多种因素。例如可能希望采用从总序列末端开始的引物。

[0368] 小的多核苷酸区段或片段与通过化学方法直接合成片段制备,如通常可利用自动化寡核苷酸合成仪进行。也可应用核酸再生技术,如美国专利 4,683,262 的 PCR™ 技术(纳入本文作参考),通过在重组载体中导入所选序列,重组产生这些片段,或采用分子生物学领域技术人员已知的其它重组 DNA 技术。

[0369] 可利用本发明的核苷酸序列与感兴趣的全基因或基因片段的互补序列选择性形成双链体分子的能力。取决于所考虑的用途,通常需要采用不同的杂交条件来实现探针对于靶序列的不同程度的选择性。对于需要高选择性的应用,通常需要用较严谨条件以形成杂交变体,可选择相对低的盐和/或高温条件如盐浓度约 0.02M-0.15M,温度约 50-70℃。这类选择性条件(如果有)宽容性小,探针和模板或靶链之间错配,此种条件特别适合分离相关序列。

[0370] 当然,对于某些应用,例如需要用突变引物链与其下模板杂交制备突变体时,一般需要严谨性较低的杂交条件以便形成异源双链体。在这些情况下,可能需要采用约 0.15M-0.9M 的盐,约 50-55℃ 的温度。因而不难鉴定到交叉杂交种作为相对于对照杂交的阳性杂交信号。总之,一般认为增加加入的甲酰胺(其作用是随着温度升高使杂交双链体不稳定)量可赋予更严谨的条件。因此,不难操纵杂交条件,且选择方法一般取决于需要的结果。

[0371] 4.11 多核苷酸的鉴定和表征

[0372] 可用各种良好建立的技术鉴定、制备和/或操作多核苷酸。例如,可按以下更详细描述鉴定多核苷酸,即筛选 cDNA 的微阵列用于肿瘤相关的表达(即用本文提供的代表性测定检测肿瘤中的表达比正常组织至少高 2 倍)。可用 Synteni 微阵列(PaloAlto CA)按厂商说明书进行此种筛选(基本上如 Schena 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619, 1996 和 Heller 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155, 1997 所述)。或者,可从表达本文所述蛋白质的细胞,如血液恶性肿瘤相关肿瘤细胞制备的 cDNA 中扩增多核苷酸。可通过聚合酶链反应(PCR)扩增此种多核苷酸。可根据本文提供的序列,设计序列特异性引物且可购买或合成来实施此方法。

[0373] 可用熟知的技术将本发明多核苷酸的扩增部分用于分离合适文库(如血液恶性肿瘤相关肿瘤 cDNA 文库)中的全长基因。这些技术中,采用适合扩增的一种或多种多核苷酸探针或引物筛选文库(cDNA 或基因组)。文库的大小优选包括较大分子。对于鉴定基因的 5' 端和上游区域也优选随机引导文库。优选获得内含子和延伸 5' 序列的基因组文库。

[0374] 对于杂交技术,可用熟知的技术(如缺口翻译或 ³²P 末端标记)标记部分序列。然

后使含有变性细菌菌落（或含噬菌斑的菌苔）的杂交滤膜与标记探针杂交，筛选细菌或噬菌体文库（见 Sambrook 等，《分子克隆：实验手册》，Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989）。选择和扩增杂交的菌落或噬斑并分离 DNA 作进一步分析。用来自部分序列的引物和载体的引物进行 PCR，分析 DNA 克隆以确定加成序列的量。可产生限制性酶切图谱以鉴定一个或多个重叠克隆。可采用可能会产生一系列缺失克隆的标准技术测定该完整序列。然后将得到的重叠序列装配成单一连续序列。用熟知的技术连接合适的片段来产生全长 cDNA 分子。

[0375] 或者，有许多扩增技术可从部分 cDNA 序列获得全长编码序列。这些技术中，通常用 PCR 进行扩增。可用各种商品化试剂盒进行扩增步骤。例如，可用本领域熟知的软件或算法或公式来设计引物。

[0376] 一种扩增技术是反向 PCR（见 Triglia 等，Nucl Acids Res; 16 :8186, 1988），此法利用限制性酶在基因的已知区域中产生一片段。通过分子内连接环化此片段，且用作 PCR 的模板，所用趋异引物衍生自己知区域。另一种方法中，用接头序列的引物和对已知区域特异的引物扩增，可挽回邻近部分序列的序列。通常用相同的接头引物和对已知区域特异的第二引物对扩增的序列作第二轮扩增。此法的变动是采用二种引物，以已知序列的相反方向引导延伸，见 WO 96/38591 所述。另一种技术称为“cDNA 末端快速扩增法”或 RACE。此技术包括采用内引物和外引物与 Poly A 区或载体序列杂交，以鉴定已知序列的 5' 和 3' 端序列。其它技术包括捕捉 PCR（Lagerstrom 等，PCR Methods Applic. 1:111-19, 1991）和步行 PCR（Parker 等，Nucl. Acids Res. 19 :3055-60, 1991）。也可采用其它扩增方法以获得全长 cDNA 序列。

[0377] 某些情况下，可通过分析表达序列标签（EST）数据库如 GenBank 提供的序列来获得全长 cDNA。可用熟知的程序（如 NCBI BLAST 检索）进行重叠 EST 的检索，该 EST 可用于产生一条连续的全长序列。也可通过分析基因组片段获得全长 DNA 序列。

[0378] 4.12 多核苷酸在宿主细胞中的表达

[0379] 本发明的其它实施例中，编码本发明多肽或其融合蛋白或其功能等同物的多核苷酸序列或其片段，可用于重组 DNA 分子以指导多肽在适当宿主细胞中的表达。由于遗传密码子的固有简并性，可产生编码基本上相同或功能上相等的氨基酸序列的其它 DNA 序列，这些序列可用于克隆和表达某多肽。

[0380] 本领域技术人员了解，在某些情况下产生拥有非天然产生的密码子的多肽编码核苷酸序列可能有利。例如，可优选选择特定的原核或真核宿主的密码子以提高蛋白质表达率或产生具有所需性能的重组 RNA 转录物，如半寿期比天然发生序列产生的转录物的半更期更长。

[0381] 另外，可用本领域已知的方法工程改造本发明的多核苷酸以改变多肽编码序列，有多种理由，包括但不限于修饰该基因产物的克隆、加工和 / 或表达的改变。例如，通过基因片段的随机片段化和 PCR 重装配和合成寡核苷酸改组的 DNA，可用于工程改造该核苷酸序列。此外，定点诱变可用来插入新的限制性位点、改变糖基化模式、改变密码子偏爱、产生剪接变体或导入突变等。

[0382] 本发明另一实施例中，可将天然的、修饰的或重组的核酸序列连接于一异源序以而编码融合蛋白。例如，为筛选适合多肽活性抑制剂的肽文库，它可用于编码能为商品化抗

体所识别的嵌合蛋白。也可工程改造融合蛋白使其在多肽编码序列和异源蛋白序列之间含有一切割位点,这样就可切下此多肽并从异源部分中纯化出来。

[0383] 可用本领域熟知的化学方法,全部或部分合成编码所需多肽的序列(见 CaruthersMH 等,(1980)Nucl.Acids Res Symp Ser 215-223;Horn T. 等,(1980)Nucl AcidsRes Symp Ser 225-232)。或者,该蛋白本身可用化学方法产生,以合成多肽的氨基酸序列或其部分。例如肽合成可用各种固相技术(Roberge, JY 等,(1995)Science269: 202-204)和自动化合成进行,例如采用 ABI431A 肽合成仪(Perkin Elmer, PaloAlto CA)。

[0384] 可用制备型高效液相层析或本领域其它类似技术基本纯化新合成的肽(如 Creighton T. (1983),《蛋白质、结构和分子原理》,WH Freeman and Co., New York, NY)。合成肽的组成可通过氨基酸分析或测序(如 Edman 降解法)证实。另外,多肽或其任何部分的氨基酸序列在直接合成时可改变,和/或用化学方法与其它蛋白质或其任何部分组合,产生变体多肽。

[0385] 为了表达所需的多肽,可将编码该多肽或功能等同物的核苷酸序列插入适合的表达载体,即含有转录和翻译该插入编码序列所必需元件的载体中。可用本领域技术人员熟知的方法构建含有编码感兴趣多肽的序列和适当转录翻译控制元件的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、合成技术和体内基因重组。这些技术见 Sambrook, J 等,(1989),《分子克隆实验手册》,Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y., 和 Ausubel, F.M 等,(1989),《最新分子生物学实验指南》,JohnWiley&Sons New York N.Y.

[0386] 可利用各种表达载体/宿主系统来包含和表达多核苷酸序列。这些包括但不限于微生物,如用重组噬菌体、质粒或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌、用酵母表达载体转化的酵母、用病毒表达载体(如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用病毒表达载体(如花椰菜花叶病毒 CaMV, 烟草花叶病毒 TMV)或用细菌表达载体(如 Ti 或 pBR322 质粒)转化的植物细胞系统;或动物细胞系统。

[0387] 表达载体中存在的“控制元件”或“调节序列”是载体的非翻译区-增强子、启动子、与宿主细胞蛋白相互作用进行转录和翻译的 5' 和 3' 非翻译区。这些元件在强度和特异性上可以不同。取决于所用的载体系统和宿主,可采用任何数量的合适的转录和翻译元件,包括组成型和诱导型启动子。例如当在细胞系统中克隆时,可采用可诱导型启动子,如 PBLUESCRIPT 噬菌粒(Stratagen La Jolla, Calif.)或 PSPORTI 质粒(Gibco BRL Gaithersburg, MD) 等的杂交 lacZ 启动子。哺乳动物系统中,一般优选来自哺乳动物基因或哺乳动物病毒的启动子。如需要产生含多拷贝编码多肽序列的细胞系,采用具有适当可选择标记的 SV40 或 EBV 载体是有利的。

[0388] 细菌系统中,可根据表达的多肽选择一些表达载体。例如需要大量诱导抗体时,可采用能指导高水平表达易于纯化的融合蛋白的载体。这类载体包括但不限于多功能大肠杆菌克隆和表达载体,如 BLUESCRIPT(Stratagene),其中编码感兴趣多肽的序列框内连接入氨基末端 Met 的序列和 β -半乳糖苷酶的 7 位残基,从而产生一杂交蛋白;以及 PIN 载体(Van Heeke G. 和 SM. Schuster(1989), J. Biol Chem 264:5503-5509) 等。也可用 pGEX 载体(Promega, Madison, Wis)来表达外源多肽如与谷胱甘肽 S-转移酶(GST)的融合蛋白。通常这类融合蛋白可溶解,通过吸附于谷胱甘肽琼脂糖珠,然后在游离谷胱甘肽存在时洗脱容易从裂解细胞中纯化。在此类系统中生产蛋白质可设计包含肝素、凝血酶、因子 XA 蛋

白酶切割位点,使克隆的感兴趣多肽可任意地从 GST 部分中释放。

[0389] 可采用酿酒酵母菌中的一些含组成型或诱导型启动子如 α 因子、醇氧化酶和 PGH 的载体。综述见 Ausabel 等(同上)和 Grant 等, *Method Enzymol.* 153 :516-544。

[0390] 当采用植物表达载体时,可通过一些启动子驱动编码多肽的序列的表达。例如,可单独采用病毒启动子如 CaMV 的 35S 和 19S 启动子或与 TMV 的奥米伽前导序列组合(Takamatsu N. *EMBO J* 6 :307-311,1987)。或者,可采用植物启动子如 RUBISCO 的小亚单位或热休克启动子(Coruzzi, G. 等, *EMBO J.* 3 :1671-1680,1984 ;Broglie, R 等, *Science* 224 :838-843,1984 和 Winter, J. 等, *Results Probl Cell Differ* 17 :83-105,1991)。可通过 DNA 直接转化或病原体介导转染将这些构建物导入植物细胞。有许多可获得的综述描述了这类技术(见 Hobbs Sor. 或 Murry L.E. 在《McGrawHill 科学技术年鉴》,(1992) 中的文章, McGraw Hill, New York, NY, 第 191-196 页)。

[0391] 也可用昆虫系统表达感兴趣多肽。例如,在一系统中,用苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)作为载体,在草地夜蛾细胞或夜蛾幼虫中表达外源基因。可将编码所述多肽的序列克隆入病毒的非必需区域中如多角体蛋白基因中,且置于多角体蛋白启动子的控制下。成功插入的多肽编码序列将灭活多角体蛋白基因,产生缺少外被蛋白的重组病毒。然后用此重组病毒感染草地夜蛾细胞或幼虫,可在其中表达感兴趣多肽(Engellard, E. K 等, *Proc. Natl. Acad. Sci* 91 :3224-3227,1994)。

[0392] 一般可得到哺乳动物宿主细胞中的一些基于病毒的表达系统。例如,利用腺病毒作为表达载体,将编码感兴趣多肽的序列连接入由晚期启动子和三联前导序列组成的腺病毒转录/翻译复合体中。可利用在病毒基因组的非必需区域 E1 或 E3 区域中插入,获得能在感染宿主细胞中表达多肽的活病毒(Logan, J. 和 Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659,1984)。此外,可利用转录增强子,如罗斯肉瘤病毒(RSV)增强子来提高哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0393] 也可利用特异性起始信号来有更有效翻译编码感兴趣多肽的序列。这类信号包括 ATG 起始密码子和毗邻序列。当将编码多肽的序列其起始密码子和上游序列插入适当表达载体时,不需要其它转录或翻译控制信号。然而,当只插入编码序列或其一部分时,应提供含有 ATG 起始密码子的外源翻译控制信号。因此,起始密码子应处于正确的读以确保整个插入物的翻译。外源性翻译元件和起始密码子可以是各种来源天然或合成的。包含适合于具体细胞体系的增强子可提高表达效率,见文献描述(Scharf, D. 等, *Results Probl. Cell. Differ.* 20 :125-162,1994)。

[0394] 此外,可选用能调节插入序列的表达或能以所需方式加工表达的蛋白的宿主细胞株。所述多肽的修饰包括但不限于乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂质化和酰化。可利用切割“前原”形式蛋白的翻译后加工来促进正确插入、折叠和/或功能。可利用具有特异性细胞机制和翻译后活动特征性机制的不同宿主细胞,如 CHO、HeLa、MDCK、HEK293 和 WI38 来保证外源蛋白的正确修饰和加工。

[0395] 为了长期高产量生产重组蛋白质,一般优选稳定的表达,例如能稳定表达感兴趣多核苷酸的细胞系,可用在相同或不同载体上含有病毒复制起点和/或内源性表达元件和选择性标记基因的表达载体来转化细胞系。导入载体后,在富集培养基中培养细胞 1-2 天,然后转移到选择培养基中。可选择标记的目的是赋予对选择的抗性,此抗性的存在使成功

表达导入序列的细胞得以生长和回收。采用适合于细胞类型的组织培养技术增殖稳定转化的细胞的抗性克隆。

[0396] 一些选择系统可用于回收转化的细胞系,包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶 (Wigler, M. 等, Cell 11:223-32,1977) 和嘌呤磷酸核糖转移酶 (Lowy, I. 等, Cell 22:817-23,1990) 基因,它们可分别用于 tk. Sup. - 或 aprt. sup. - 细胞。另外,也可利用抗代谢物、抗生素和除草剂抗性作为选择的基础;例如, dhfr 赋予对氨基喋呤的抗性 (Wigler, M. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3567-70,1980); npt 赋予对氨基葡萄糖苷、新霉素和 G-418 的抗性 (Colbere-Garapin, F. 等, J. Mol. Biol. 150:1-14,1981); als 或 pat 分别赋予对氯磺隆和草丁膦乙酰转移酶的抗性 (Murry, 同上)。其它已描述的可选择基因如 trpB 使细胞利用吡啶代替色氨酸;或 hisD 使细胞利用组氨酸代替组氨酸 (Hartman, SC 和 R. C. Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5247-5251,1988)。最近,采用花色素苷、 β -葡萄糖醛酸酶及其底物 GUS 和荧光素酶及其底物荧光素等可见标记已获得普及,不仅广泛用于鉴定转化体,还用于基于特定载体系统的瞬时或稳定蛋白质表达的定量 (Rhodes, CA. 等, Methods Mol. Biol. 55:121-131,1995)。

[0397] 虽然存在 / 缺乏标记基因表达提示了感兴趣基因也存在,但仍需要证实感兴趣基因的存在与表达。例如,如果将编码多肽的序列插入标记基因序列内,通过缺乏标记基因功能可鉴定重组细胞含有这些序列。或者,可将标记基因与多肽编码基因串联置于一个启动子的控制下。随诱导或选择而表达的标记基因,通常表明串联基因也表达。

[0398] 或者,可用本领域技术人员已知的多种方法鉴定含有并表达所需多核苷酸序列的宿主细胞,这些方法包括但不限于 DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交和蛋白质生物测定或免疫测定,包括检测和 / 或定量核酸或蛋白质的膜、溶液或基于芯片的技术。

[0399] 用对产物特异的多克隆或单克隆抗体测试和测定多核苷酸编码产物的表达的各种方法是本领域已知的。例子包括酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射免疫测定 (RIA) 和荧光激活细胞分选 (FACS)。一些应用优选采用对某给定多肽上两个非干扰表位反应的单抗作双位点单抗免疫测定,但也可采用竞争结合测定。这些和其它测定已有描述 (见 Hampton, R. 等 (1990) 《血清学方法 - 实验手册》, APS Press, St Paul. Minn.) 和 Maddox, DE. 等, J. Exp. Med. 158:1211-1216,1983)。

[0400] 本领域技术人员知道各种各样标记和偶联技术,且可用于各种核酸和氨基酸测定。产生检测与多核苷酸相关序列的标记杂交或 PCR 探针的方法,包括寡聚体标记、缺口翻译、末端标记或采用标记核苷酸的 PCR 扩增。或者,可将序列或其任何部分克隆到载体中产生 mRNA 探针。这些载体是本领域已知的,可商品购买到并可用于体外合成 RNA 探针,方法是加入合适的 RNA 聚合酶如 T7、T3 或 SP6 和标记核苷酸。可采用各种商品化试剂盒进行这些程序。可采用的合适报道分子或标记物包括:放射性核素、酶、荧光剂、化学发光剂或生色剂及其底物、辅因子、抑制剂,磁粒等。

[0401] 用感兴趣多核苷酸序列转化的宿主细胞可在适合从细胞培养中表达和回收蛋白质的条件下培养。重组细胞产生的蛋白质可分泌或包含在细胞内,取决于所用的序列和 / 或载体。本领域技术人员知道,可设计含有本发明多核苷酸的表达载体含有信号序列,该信号序列可指导编码的多肽穿过原核或真核细胞膜分泌出来。可采用其它重组构建将编码感兴趣多肽的序列与编码促进可溶性蛋白纯化的多肽结构域的核苷酸序列连接起来。这种纯

化促进结构域包括但不限于金属螯合肽,如允许在固定的金属上纯化的组氨酸-色氨酸组件,允许在固定的免疫球蛋白上纯化的蛋白 A 结构域,和用于 FLAGS 延伸段/亲和纯化系统中的结构域(Immunex Corp.,Seattle,Wash.)。在纯化结构域和编码肽之间包含可切割接头序列,如对因子 XA 或肠激酶特异的切割接头序列(Invitrogen San Diego Calif)可有利于纯化。一种这样的表达载体提供了一种融合蛋白的表达,该融合蛋白含有感兴趣的肽和编码 6 个组氨酸残基的核酸,前面的硫氧还蛋白或肠激酶切割位点。组氨酸残基有利于在 IMIAC(固定的金属离子亲和层析)上纯化。见 Porath, J. 等(Prot. Exp. Purif. 3 :263-81, 1992) 所述,而肠激酶切割位点提供了从融合蛋白纯化所需肽的工具。含融合蛋白的载体的讨论见 Kroll, D. J. 等(DNA Cell Biol. 12 :441-453, 1993)。

[0402] 除了重组生产方法外,可用固相法直接合成肽生产本发明的多肽和其片段(Merrifield, J., J. Am. Chem. Soc. 85 :2149-2154, 1963)。可用手工方法或自动化进行蛋白质合成。自动化合成例如可采用 Applied Biosystems 431A 肽合成仪(PerkinElmer) 进行。或者可分别化学合成各种片段,再用化学方法组合产生全长分子。

[0403] 4.13 定点诱变

[0404] 定点诱变是一种通过特异性诱变编码肽的多核苷酸制备各种肽或生物功能等价多肽的有用技术。该技术是本领域技术人员熟知的,还能用于制备和测定序列变体,如结合一个或多个上述条件,在 DNA 中导入一个或多个核苷酸序列变化。定点诱变可通过利用特定寡核苷酸序列产生突变体,该突变体编码具有所需突变的 DNA 序列,以及足够数目的邻近核苷酸可提供足够大小和序列复杂性的引物序列,形成横跨缺失连接的两侧的稳定双链体。突变可用于选择的多核苷酸序列以改进、改变、降低、修饰或改变该多核苷酸本身的性能,和/或改变编码肽的性能、活性、组成、稳定性或一级序列。

[0405] 本发明某些实施例中,考虑对上述多核苷酸序列进行诱变以改变编码多肽的一种或多种性能,如多肽疫苗的抗原性。定点诱变技术是本领域熟知的,并广泛用于产生多肽和多核苷酸的变体。例如通常用定点诱变来改变 DNA 分子的特定部分。这类实施例中,通常采用长约 14-25 个核苷酸的引物,序列连接的两侧约 5-10 个残基被改变。

[0406] 本领域技术人员懂得,定点诱变技术常采用单链和双链形式的噬菌体载体。用于定点诱变的典型载体包括例如 M13 噬菌体。这些噬菌体不难从市场上购买到,其用途一般为本领域技术人员熟知。定点诱变也常规采用双链质粒来取消将感兴趣基因从质粒转移到噬菌体的步骤。

[0407] 通常,进行上述定点诱变的第一步是获得单链载体或使双链载体的两条链解离分开(在载体的序列内含有编码所需肽的 DNA 序列)。通常用合成法制备携带有所需突变复序列的寡核苷酸引物。然后使该引物与单链载体退火,经 DNA 聚合酶如大肠杆菌聚合酶 I Klenow 片段处理,以便完成带突变链的合成。形成的异源双链体中一条链编码原来的非突变序列,第二条链带有所需的突变。然后用此异源双链体载体转化适合的细胞如大肠杆菌细胞,并选择含有携带突变序列排列的重组载体的克隆。

[0408] 用定点诱变法制备所选肽编码 DNA 区段的序列变体,提供了一种可能产生有用物种的方法,且不意味着限于用其它方法来获得肽的序列变体及其编码 DNA 序列。例如可用诱变剂如羟胺处理编码所需肽序列的重组载体以获得序列变体。关于这些方法和方案的具体细节见 Maloy 等,1994 ;Segal, 1976 ;Prokop 和 Bajpai, 1994 ;Kuby, 1994 ;和 Maniatis

等,1982,各自纳入本文作为参考。

[0409] 术语“寡核苷酸指导的诱变方法”本文指模板依赖方法和载体介导的增殖,导致特异性核酸分子的浓度比其初始浓度升高,或可检测信号如扩增的浓度升高。术语“寡核苷酸指导的诱变方法”本文指模板依赖的引物分子的延伸。术语“模板依赖方法”指 RNA 或 DNA 分子的核酸合成,其中新合成的核酸链的序列由熟知的互补性碱基配对规律所决定(见例如 Watson,1987)。通常,载体介导的方法涉及将核酸片段导入 DNA 或 RNA 载体中,载体的克隆扩增,回收扩增的核酸片段。这些方法的例子见美国专利 4,237,224,纳入本文作为参考。

[0410] 4.14 多核苷酸扩增技术

[0411] 可利用一些模板依赖方法扩增样品中的感兴趣靶序列。一种最著名的扩增方法是聚合酶链反应 (PCRTM),其详细描述见美国专利 4,683,195 ;4,683,202 和 4,800,159,各自纳入本文作为参考。简言之,在 PCRTM 中制备与靶序列的相反互补链区域互补的两条引物序列。在反应混合物中加入过量的脱氧核苷三磷酸和 DNA 聚合酶(如 Taq 聚合酶)。如果样品中存在靶序列,引物将结合该靶,聚合酶将使引物通过加入的核苷酸沿着靶序列延伸。提高和降低反应混合物温度,延伸的引物将从靶上解离形成反应产物,剩余引物将结合靶和反应产物,且重复此过程。优选进行逆转录和 PCRTM 扩增程序以定量扩增的 mRNA 量。聚合酶链反应是本领域熟知的。

[0412] 另一扩增方法是连接酶链反应(称为 LCR),见欧洲专利申请 320、308(特别纳入本文参考)。在 LCR 中制备两对互补探针,存在靶序列时,每对探针将结合靶的互相毗邻的相反互补链。存在连接酶时,两对探针将连接形成一个单元。经过温度循环(如 PCRTM 中的循环),结合的连接单元从靶上解离,然后作为过量探针连接“靶序列”。其内容纳入本文作参考的美国专利 4,883,750 描述了另一扩增方法,类似于探针结合靶序列的 LCR。

[0413] PCT 国际专利申请 PCT/US87/00880(纳入本文参考)中所述的 Qbeta 复制酶也可用于本发明另一扩增方法中。在此方法中,将具有与靶互补区域的 RNA 的复制性序列加入存在 RNA 聚合酶的样品中。聚合酶将拷贝复制性序列,然后可被检测到。

[0414] 一种等温性扩增方法中,用限制性内切酶和连接酶扩增靶分子,该靶分子的限制性位点的一条链中含有核苷酸 5'-[α -硫代]三磷酸(Walker 等,1992,纳入本文参考)],也可在本发明中用于扩增核酸。

[0415] 链置换扩增(SDA)是实施核酸等温扩增的另一方法,此法包括多轮链置换和合成,即缺口翻译。一种类似方法称为修复链反应(PCR)是另一种可用于本发明的扩增方法,所述方法包括退火整个扩增靶区域的几个探针,然后进行四种碱基只存在 2 种的修复反应。可将其它两种碱基作为生物素化衍生物加入而易于检测。SDA 中采用了类似的方法。

[0416] 也可用循环探针反应(CPR)检测序列。在 CPR 中,使具有非靶 DNA 的 3' 和 5' 序列和靶蛋白特异性 RNA 的内部或“中间”序列的探针与样品中存在的 DNA 杂交。杂交时用 RNA 酶 H 处理反应物,通过消化后释放产生的信号可将该探针产物鉴定为特殊产物。最初的模板与另一循环探针退火并重复此反应。因此,CPR 包括扩增探针与靶基因特异性表达的核酸杂交产生的信号。

[0417] 可用于本发明的其它扩增方法,见英国专利申请 2,202,328 和 PCT 国际专利申请 PCT/US89/01025,各自纳入本文作参考。前一申请中,PCR 采用“修饰的”引物进行模板和酶

依赖的合成。可用捕捉成分（如生物素）和 / 或检测成分（如酶）标记来修饰引物。后一申请中，样品中加入过量的标记探针。存在靶序列时，该探针结合并被催化切割。切割后，靶序列被完整释放，并被过量探针结合切割的标记探针表明存在靶序列。

[0418] 包括基于转录的扩增系统 (TAS) (Kwoh 等, 1989 ;PTC 国际专利申请 W088/10315, 纳入本文作参考) 的其它核酸扩增方法, 包括基于核酸序列的扩增 (NASBA) 和 3SR。NASBA 中, 可制备用于扩增的核酸, 采用标准的苯酚 / 氯仿抽提法, 热变性样品, 用裂解液处理, 微旋转柱分离 DNA 和 RNA 或氯化胍提取 RNA。这些扩增技术涉及退火具有对靶序的特性序列的引物。聚合后, 用 RNA 酶 H 消化 DNA/RNA 杂交体, 同时再热变性双链 DNA 分子。两种情况下, 通过加入第二种靶特异性引物, 然后聚合, 将单链 DNA 制备成全双链。然后用聚合酶如 T7 或 SP6 多重转录该双链 DNA 分子。在等温循环反应中, RNA 被逆转录为 DNA, 并用聚合酶如 T7 或 SP6 再转录一次。所得产物不论是截短的或完全的均显示了靶特异性序列。

[0419] 纳入本文作参考的欧洲专利申请 329, 822 描述了一种核酸扩增方法, 包括可用于本发明的循环合成单链 RNA (“ssRNA”), ssDNA 和双链 DNA (dsDNA)。ssRNA 是用逆转录酶 (RNA 依赖的 DNA 聚合酶) 延伸的第一引物寡核苷酸的第一模板。然后经核糖核酸酶 H (RNA 酶 H, 一种具有 DNA 或 RNA 的双链体中对 RNA 特异的 RNA 酶) 作用从产生的 DNA:RNA 双链体中去除 RNA。产生的 ssDNA 是第二引物的第二模板, 该第二引物中还包含 RNA 聚合酶启动子 (由 T7RNA 聚合酶) 为例 5' 至与其模板同源的序列。然后用 DNA 聚合酶 (由大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的大“Klenow”片段为例) 延伸该引物得到双链 DNA (“dsDNA”) 分子, 该分子的序列与引物之间的最初 RNA 相同, 并在另一端有一启动子序列。此启动子序列可经适当的 RNA 聚合酶作用产生 DNA 的许多 RNA 拷贝。然后这些拷贝可再进入循环导致非常快的扩增。选用合适的酶, 可在等温下进行此扩增而不需每轮都加酶。由于该过程的循环性质, 所选的起始序列可以是 DNA 或 RNA 形式。

[0420] 纳入本文参考的国际专利申请 W089/06700 描述了一种核酸序列扩增流程, 根据启动子 / 引物序列与靶单链 DNA (“ssDNA”) 的杂交, 接着转录许多 RNA 拷贝的序列。此流程不是循环性, 即从产生的 RNA 转录物中不产生新的模板。其它扩增方法包括 “RACE” (Frohman, 1990) 和 “单面 PCR” (Ohara, 1989) 这是该领域技术人员熟知的。在扩增本发明 DNA 序列时, 也可采用以下方法, 即在具有所产生的 “双 - 寡核苷酸” 的序列的核酸存在时, 连接二个 (或多个) 寡核苷酸, 从而扩增该双 - 寡核苷酸的方法 (Wu 和 Dean, 1996, 纳入本文作参考)。

[0421] 4.15 体内多核苷酸递送技术

[0422] 其它实施例中, 将含有本发明一种或多种多核苷酸的基因构建物体内导入细胞。这可用多种熟知的方法进行, 这些方法中的几种将在下文中阐述。

[0423] 4.15.1 腺病毒

[0424] 体内递送一种或多种核酸序列的优选方法之一是采用腺病毒表达载体。“腺病毒表达载体”包括能充分: (a) 支持构建物包装和 (b) 以有义或反义取向表达其中已克隆的多核苷酸的腺病毒序列的那些构建物。当然, 反义构建物的表达不需要合成基因产物。

[0425] 表达载体含有基因工程改造的腺病毒形式。已知腺病毒的基因结构是 36kb、线性、双链 DNA 病毒, 使腺病毒 DNA 的大部分可用多达 7kb 的外源序列取代 (Grunhaus 和 Horwitz, 1992)。与逆转录病毒相反, 腺病毒感染宿主细胞不导致染色体整合, 因为腺病毒 DNA 可以

附加型方式复制而没有潜在的基因毒性。还有,腺病毒结构稳定经大量扩增后未检测到基因组重排。事实上腺病毒可感染所有的上皮细胞而不论其细胞周期。迄今,腺病毒感染似乎只与轻微疾病如人急性呼吸道疾病有关。

[0426] 腺病毒特别适合用作基因转移载体,因其基因组大小适中、易操作、高滴度、靶细胞范围广和高感染性。病毒基因组两端含 100-200 个碱基对反向重复序列 (ITR)。它是病毒 DNA 复制和包装必需的顺式元件。基因组的早期 (E) 和晚期 (L) 区域含有不同的转录单元,其通过病毒 DNA 复制的开始而分裂。E1 区 (E1A 和 E1B) 编码负责调节病毒基因组和少许细胞基因转录的蛋白质。E2 区 (E2A 和 E2B) 的表达引起病毒 DNA 复制的蛋白质的合成。这些蛋白质参与 DNA 复制、后期基因表达和宿主细胞关闭 (Renan, 1990)。后期基因的产物包括大部分的病毒衣壳蛋白,只在主要晚期启动子 (MLP) 产生的一种原代转录物的加工后才表达。MLP (位于 16.8m. u.) 在感染晚期特别有效,此启动子产生的所有 mRNA 拥有 5'-三联前导 (TPL) 序列,使它们成为翻译的优选 mRNA。

[0427] 一最新系统中,用穿梭载体和原病毒载体之间的同源重组产生的重组腺病毒由于两种原病毒载体之间可能重组,此过程可产生野生型腺病毒。因此,关键是从单个噬斑中分离病毒的单一克隆并检验其基因组结构。

[0428] 复制缺陷性的最新腺病毒载体的产生和增殖依赖于一种独特的辅助细胞系,命名为 293,是用 Ad5DNA 片段转化人胚肾细胞而得,组成性地表达 E1 蛋白 (Graham 等, 1977)。因为 E3 区与腺病毒基因组分开 (Jones 和 Shenk, 1978),最新的腺病毒载体在 293 细胞辅助下,可在 E1、D3 或两个区域中携带外源 DNA (Graham 和 Prevec, 1991)。实质上,腺病毒可包装约 105% 的野生型基因组 (Ghosh-Choudhury 等, 1987),提供了约 2 个额外 KBDNA 的容量。与约 5.5kbDNA 组合,可在 E1 和 E3 区中更换,此最新腺病毒载体的最大容量低于 7.5kb,或占约载体总长的 15%。留在载体骨架中 80% 以上的腺病毒基因组是载体携带的细胞毒性的来源。还有, E1 缺失病毒的复制缺损是不完全的。例如,在高感染复数 (MOI) 时,用最新获得的载体观察到病毒基因表达的渗漏 (Mulligan, 1993)。

[0429] 辅助细胞系可衍生自人细胞,如人胚肾细胞、肌肉细胞、造血细胞或其它人胚胎间充质细胞或上皮细胞。另外,辅助细胞可衍生自人腺病毒允许的其它哺乳动物的细胞。这些细胞包括如 Vero 细胞或其它猴胚胎间充质细胞或上皮细胞。如上所述,目前优选的辅助细胞系是 293。

[0430] 目前, Racher 等 (1995) 披露了培养 293 细胞和增殖腺病毒的改良方法。一种方式中,通过接种细胞到 1 升硅烷化旋转瓶 (Techne, Cambridge, UK) 内含 100-200ml 培养液,以培养天然的细胞聚集物。以 40rpm 搅拌后,用台盼兰估计细胞活力。另一方式中,如下采用 Fibracel 微载体 (Bibby Sterlin Stone UK) 5 克 / 升。将重悬于 5ml 培养液中的细胞接种物加入含 50ml 载体的 250ml 锥形瓶中,静置 (偶尔摇动) 1-4 小时。培养基用 50ml 新鲜培养基更换并摇动。为了产生病毒,使细胞生长到约 80% 汇合,此时更换培养基 (至最终体积的 25%),以 0.05 约 MOI 的腺病毒。培养物静置过夜,增加然后容量到 100%,并开始振摇 72 小时。

[0431] 除了要求腺病毒载体是复制缺损型或至少是条件缺损型外,据信对于成功实施本发明腺病毒的性质不是关键。该腺病毒可以是已知的 42 种不同血清型或亚组 A-F 中的任何一种。为获得用于本发明的条件性复制缺损型腺病毒载体,起始材料优选腺病毒 5 型 C

亚组,因为腺病毒 5 型是人腺病毒,其大量的生化和遗传学信息已知道,且历史上大多数构建采用腺病毒作为载体。

[0432] 如上所述,本发明的典型载体是复制缺损型,不具有腺病毒 E1 区。因此,最方便的是将编码感兴趣基因的多核苷酸导入去除了 E1 编码序列的位置上。然而,构建物插入腺病毒序列内的位置对本发明不是关键性的。也可将编码感兴趣基因的多核苷酸插入 E3 取代载体中,以代替缺失的 E3 区,见 Karlsson 等,(1986) 所述;或插入 E4 区在那里辅助细胞系或辅助病毒补充 E4 缺陷。

[0433] 腺病毒容易生长和增殖,体内和体外宿主范围宽。此组病毒可获得高滴度,如每毫升 10^9 - 10^{11} 噬斑形成单位,它们有高度感染性。腺病毒的生命周期不需要整合入宿主细胞基因组。由腺病毒载体输送的外源基因是附加型,因而对宿主细胞的基因毒性低。用野生型腺病毒接种疫苗的研究中已报道无副作用 (Couch 等,1963,Top 等,1971),证明其作为体内基因转移载体的安全性和治疗潜力。

[0434] 腺病毒已用于真核基因表达 (Levrero 等,1991,Gomez-Foix 等,1992) 和疫苗开发 (Grunhaus 和 Horwitz,1992,Graham 和 Prevec,1992)。最近,动物研究提示,重组腺病毒可用于基因治疗 (Stratford Perricaudet 和 Perricaudet,1991;Stratford Perricaudet 等,1990;Rich 等,1993)。不同组织给予重组腺病毒的研究包括气管滴注法 (Rosenfeld 等,1991;Rosenfeld 等,1992),肌肉注射 (Ragot 等,1993),外周静脉注射 (Herz 和 Gerard,1993) 和脑内立体定向接种 (Le Gal Salle 等,1993)

[0435] 4.15.2 逆转录病毒

[0436] 逆转录病毒是一组单链 RNA 病毒,特征为能在感染细胞中通过逆转录过程将其 RNA 转变成双链 DNA (Coffin,1990)。产生的 DNA 然后稳定整合入细胞染色体内作为原病毒并指导病毒蛋白的合成。整合导致病毒基因序列保留在受体细胞及其子代中。逆转录病毒基因组分别含有编码衣壳蛋白的三种基因:gag、pol 和 env,聚合酶和包膜组分。gag 基因上游的序列含有将基因组包装入病毒粒子的信号。病毒基因组的 5' 和 3' 端有二条长末端重复 (LTR) 序列。这些含强启动子和增强子序列也是在宿主细胞基因组中融合所需的 (Coffin,1990)。

[0437] 为了构建逆转录病毒载体,可将编码一种或多种感兴趣的寡核苷酸或多核苷酸的核酸插入病毒基因组中替代某些病毒序列,以产生复制缺损型病毒。为了产生病毒粒子,构建含 gag、pol 和 env 基因但无 LTR 的包装细胞系和包装组分 (Mann 等,1983)。当重组质粒含 cDNA 时,将其与逆转录病毒 LTR 和包装序列一起导入该细胞系(例如用磷酸钙沉淀),此包装序列能使重组质粒的 RNA 转录物被包装入病毒粒子中,然后分泌到培养基中 (Nicolas 和 Rubenstein,1988,Temin,1986;Mann 等,1983)。然后收集含重组逆转录病毒的培养基,任选地浓缩,用于基因转移。逆转录病毒载体能感染各种各样类型的细胞。然而,整合和稳定表达要求宿主细胞的分裂 (Paskind 等,1975)。

[0438] 最近,开发了一种使逆转录病毒载体特异性靶向的新方法,所述方法通过在病毒包膜中用化学方法加入乳糖残基而化学修饰逆转录病毒。这种修饰通过唾液糖蛋白受体允许特异性感染肝细胞。

[0439] 设计了重组逆转录病毒靶向的不同方法,其中采用抗逆转录病毒包膜蛋白和抗特异性细胞受体的生物素化抗体。采用链霉亲和素这些抗体通过生物素偶联 (Rous 等,

1989)。采用抗主要组织相容性复合物 I 类和 II 类抗原的抗体,他们证明体外用亲嗜性病毒可感染载有这些表面抗原的各种人细胞 (Roux 等,1989)。

[0440] 4.15.3 腺相关病毒

[0441] AVV(Ridgeway,1988 ;Hermonat 和 Muzycska,1984) 是作为一种污染腺病毒贮液而发现的细小病毒 (parovirus)。它是一种遍在性病毒 (85%美国人群中存在抗体),与任何疾病无关。也分类为依赖病毒,因为其复制依赖于辅助病毒如腺病毒的存在。已分离到 5 种血清型,其中 AAV-2 是最了解的。AAV 有一单链线性 DNA 包裹在衣壳蛋白 VP1、VP2 和 VP3 中,形成直径 20-24nm 的二十面体病毒粒子 (Muzyczka 和 Mclaughlin,1988)。

[0442] AAV DNA 约长 4.7kb,它含两个开放读框,侧面接二个 ITR。AAV 基因组中有两个主要基因:rep 和 cap。rep 基因编码的蛋白负责病毒复制,而 cap 编码衣壳蛋白 VP1-3。各 ITR 形成 T 形发夹环结构。这些末端重复序列是 AAV 染色体整合唯一必需的顺式组分。因此 AAV 可用作一种载体,此载体中所有的病毒编码序列被去除并用输送基因盒代替。已鉴定到三个病毒启动子按它们的图谱位置命名为 p5、p19 和 p40。P5 和 p19 的转录导致产生 rep 蛋白,p40 的转录产生衣壳蛋白 (Hermonat 和 Muzyczka,1984)。

[0443] 有几种因素促进了研究人员研究利用 rAAV 作为表达载体的可能性。一种是很少需要将基因输送整合到宿主染色体中。这需要有 145-bp ITR,仅为 AAV 基因组的 6%。这在载体中留下了可装配 4.5kbDNA 插入物的空间。虽然此携带容量可不使 AAV 输送大基因,但十分适合输送本发明的反义构建物。

[0444] AAV 由于其安全性也是输送载体的一个良好选择。需要相对复杂的拯救机制,不仅是野生型腺病毒,而且需要 AAV 基因来调动 rAAV。同样;AAV 无致病性且与任何疾病无关。去除病毒的编码序列可最大程度减少对病毒基因表达的免疫反应,因此,rAAV 不会激发炎症反应。

[0445] 4.15.4 其它病毒载体作为表达构建物

[0446] 可采用其它病毒载体作为本发明的表达构建物,将寡核苷酸或多核苷酸序列输运给宿主细胞。可采用病毒如牛痘病毒 (Ridgeway,1988 ;Coupar 等,1988)、慢病毒、脊灰病毒和疱疹病毒衍生的载体。它们对各种哺乳动物细胞有几种吸引力的特征 (Friedmann,1989 ;Ridgeway,1988 ;Coupar 等,1988 ;Horwich 等,1990)。由于最近识别的缺损性乙肝病毒,获得了对不同病毒序列的结构功能关系的新了解。体外研究表明,病毒尽管缺失了其多达 80%的基因组,仍能保持辅助依赖性包装能力和逆转录能力 (Horwich 等,1990)。这提示大部分基因组可用外源基因物质替代。嗜肝性和持久性 (整合) 是肝定向基因转运特别吸引的性能。Chang 等 (1991) 将氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 基因导入鸭乙肝病毒基因组中,取代聚合酶、表面和前表面编码序列。与野生型病毒共转染入禽肝癌细胞系。培养基中含高滴度重组病毒,用于感染原代鸭肝细胞。转染后检测到稳定的 CAT 基因表达至少 24 天 (Chang 等,1991)。

[0447] 4.15.5 非病毒载体

[0448] 为了有效表达本发明寡核苷酸或多核苷酸序列,必须将表达构建物输送到细胞内。体外进行此输送可用于实验室方法中转化细胞系,或体内或活体内输送用于治疗某些疾病。如上所述,一种优选的输送机制是通过病毒感染,将表面构建物包裹在感染性病毒颗粒中。一旦表达构建物被输送入细胞内,编码所需寡核苷酸或多核苷酸序列的核酸可定位

于不同部位并表达。某些实施例中,编码该构建物的核酸可稳定整合入细胞的基因组中。此整合可通过同源重组(基因取代),以特异性定位和取向整合或可以是随机、非特异性定位整合(基因增大)。其它实施例中,该核酸可稳定保持在细胞中作为DNA的分离的附加型节段。这类核酸节段或“附加体”编码序列,能充分不受宿主细胞周期的制约,或与其同步维持和复制。该表达构建物如何输入细胞,及该核酸保持在细胞中何处,取决于所用表达构建物的类型。

[0449] 本发明某些实施例中,含有一种或多种寡核苷酸或多核苷酸序列的表达构建物可仅由裸重组DNA或裸质粒组成。可用上述物理或化学通透细胞膜的方法之一转移该构建物。这具体可用于体外转移,但也可应用于体内转移。Dubensky等(1984)成功地将磷酸钙沉淀形式的多瘤病毒DNA注射入成年鼠和新生小鼠的肝和脾中,证明了活性病毒复制和急性感染。Benvenisty和Reshef(1986)也证明直接腹膜内注射磷酸钙沉淀质粒结果表达了转染的基因。考虑编码感兴趣基因的DNA也可以用类似方式体内转移并表达基因产物。

[0450] 转移裸DNA表达构建物到细胞中的本发明另一实施例涉及颗粒轰击技术。此方法根据加速DNA包被的微粒至高速的能力,使它们穿破细胞膜且进入细胞而不杀死细胞(Klein等,1987)。已开发了加速小粒子的几种装置。一种装置依靠施加高压产生电流,进而提供动力(Yang等,1990)。所用微粒由生物惰性物质如钨或金珠组成。

[0451] 所选器官包括大鼠和小鼠的肝、皮肤及肌肉组织,已作过体内轰击(Yang等,1990;Zelenin等,1991)。这可能需要手术暴露组织或细胞以消除枪和靶器官之间的任何干扰组织,即活体内治疗。另外,可通过此法输送编码特定基因的DNA,仍纳入本发明中。

[0452] 4.16 反义寡核苷酸

[0453] 基因信息流动的最后结果是合成蛋白质。DNA被聚合酶转录为信使RNA并在核糖体上翻译产生折叠的功能性蛋白质。沿着蛋白质合成途径的几个步骤可受到抑制。象所有哺乳动物DNA链那样,编码本文所述多肽的天然DNA区段也有两条链,一条有义链和一条反义链,由氢键连在一起。编码多肽的信使RNA具有与有义DNA链相同的核苷酸序列,除了DNA胸腺嘧啶由尿嘧啶代替外。因此,合成的反义核苷酸序列将结合mRNA,并抑制该mRNA编码的蛋白质表达。

[0454] 因此,反义寡核苷酸靶向mRNA是关闭蛋白质合成的一种机制,故代表了一种有效和靶向治疗方法。例如,多聚半乳糖醛酸酶和毒蕈碱2型乙酰胆碱受体的合成可受到针对它们各自mRNA序列的反义寡核苷酸的抑制(美国专利5,739,119和5,759,829,各自纳入本文参考)。另外,反义抑制的例子已用核蛋白细胞周期蛋白、多重抗药性基因(MDGI)、ICAM-1、E-选择素、STK-1、横纹肌GABA_A受体和人EGF得到证明(Jaskulski等,1988;Vasanthakumar和Ahmed,1989;Peris等,1998;美国专利5,801,154;5,789,573;5,718,709;5,610,288,各自纳入本文参考)。也已描述反义构建物抑制并可用于治疗各种异常细胞增殖如癌症(美国专利5,474,470;5,591,317和5,783,683,各自纳入本文参考)。

[0455] 因此,示范性实施例中,本发明提供的寡核苷酸序列含有能特异性结合本文所述寡核苷酸序列或其互补序列的所有任何序列或一部分序列。一实施例中,反义寡核苷酸含DNA或其衍生物。另一实施例中,寡核苷酸含RNA或其衍生物。第三个实施例中,寡核苷酸是修饰的DNA,含硫代磷酸酯修饰的骨架。第四个实施例中,寡核苷酸序列含肽核酸或其

衍生物。各自情况下,优选的组合含有与本文所述多核苷酸的一部分或多个部分互补,更优选基本互补,甚至更优选完全互补的序列区域。

[0456] 对某给定基因序列特异的反义组合物的选择,根据对所选靶序列(即这些说明性例子中的大鼠和人的序列)的分析和二级结构、 T_m 、结合能、相对稳定性的测定;反义组合物的选择根据其相对不能形成二聚体、发夹环或其它二级结构,从而可减少或抑制与宿主细胞中靶 mRNA 的特异性结合。

[0457] 最优选的 mRNA 的靶区域是 AUG 翻译起始密码子处或附近的那些区域,和与 mRNA 的 5' 区基本互补的那些序列。这些二级结构的分析和靶位点选择可用 OLIGO 引物分析软件第 4 版(Rychlik,1997)和 BLASTN 2.0.5 算法软件(Altschul,等,1997)进行。

[0458] 也考虑采用称为 MPG(27 个残基)的短肽载体的反义输送方法。MPG 肽含有衍生自 HIV gp41 的融合序列的疏水性结构域和 SV40T- 抗原的核定位序列的亲水性结构域(Morris,等,1997)。已证明几个 MPG 肽的分子包被反义寡核苷酸,可在不到 1 小时内被输送入培养的哺乳动物细胞中,效率相对高(90%)。另外,与 MPG 相互作用大大提高了寡核苷酸对核酸酶的稳定性和穿过质膜的能力(Morris 等,1997)。

[0459] 4.17 核酶

[0460] 虽然传统上蛋白质用来催化分解核酸,但已出现的另一类大分子可用于此目的。核酶是能以定点方式切割核酸的 RNA- 蛋白质复合物。核酶且有特异性催化结构域,该结构域具有内切核酸酶活性(Kim 和 Cech,1987;Gerlach 等,1987;Forster 和 Symons,1987)。例如,大量核酶能以高度特异性加速磷脂转移反应,常只切割寡核苷酸底物中几个磷酸脂之一(Cech 等,1981;Michel 和 Westhof,1990;Reinhold-Hurek 和 Shub,1992)。此特异性归因于化学反应前底物结合于核酶的内部指导序列(“IGS”)需要通过特异性的碱基配对相互作用。

[0461] 最初观察一核酶催化是核酸序列特异性切割/连接反应的一部分(Joyce,1989;Cech 等,1981)。例如,美国专利 5,354,855(纳入本文作参考)报道某些核酶可起内切核酸酶作用,其序列特异性比已知的核糖核酸酶还高,接近 DNA 限制性酶的特异性。因此,序列特异性核酶介导的抑制基因表达可能特别适合治疗应用(Scanlon 等,1991;Sarver 等,1990)。最近报道核酶引起了它们所应用的一些细胞系中的遗传变化;改变的基因包括癌基因 H-ras、c-fos 和 HIV 基因。此研究的大部分涉及基于特异性核酶切割的特定突变密码子的修饰靶 mRNA。

[0462] 目前知道有天然产生的酶 RNA 的六种基本变体。在生理条件下各自能反式催化 RNA 磷酸二酯键的水解(因此能切割其它 RNA 分子)。总之,酶核酸通过先与靶 RNA 结合起作用。发生这种结合是通过酶核酸的靶结合部分,其保持非常接近于该分子的酶部分而发挥切割靶 RNA 的作用。因此酶核酸通过互补碱基配对,先识别酶核酸然后结合靶 RNA,一旦结合于正确部位就酶促切割该靶 RNA。这种靶 RNA 的关键性切割将破坏其指导编码蛋白合成的能力。酶核酸结合和切割其 RNA 靶后,从 RNA 释放以搜寻另一个靶并可重复地结合和切割新的靶。

[0463] 核酶的酶特性优于许多技术如反义技术(核酸分子只结合核酸靶以阻止其翻译),因为发挥治疗作用所需的核酶浓度比反义寡核苷酸浓度低。此优点反映了核酶发挥酶促的能力。因此,一个核酶分子能切割许多靶 RNA 分子。此外,核酶是一种高度特异性抑

制剂,此抑制特异性不仅依赖于与靶 RNA 结合的碱基配对机制,而且依赖于靶 RNA 切割的机制。靠近切割位点的单个错配或碱基置换可完全去除核酶的催化活性。而反义分子中的类似错配不阻止其作用(Woolf 等,1992)。因此,核酶作用的特异性大于反义寡核苷酸结合相同 RNA 位点的特异性。

[0464] 可在锤头、发夹、 δ 肝炎病毒、I 组内含子或 RNaseP RNA(与 RNA 指导序列相连)或链孢霉 VS RNA 基序中形成酶核酸分子。锤头基序的例子见 Rossi 等(1992)所述。发夹基序的例子见 Hample 等,(欧洲专利申请专利 EP0360257)、Hample 和 Tritz(1989)、Hample 等,(1990)和美国专利 5631359(纳入本文作参考)中所述。 δ 肝炎病毒基序的例子见 Perrotta 和 Been(1992)所述;RNaseP 基序的例子见 Guerrier-Takada 等(1983)所述;链孢霉 VS RNA 核酶基序见 Collins(Saville 和 Collins,1990;Saville 和 Collins,1991;Collins 和 Olive,1993)所述;I 组内含子的例子见美国专利 4987071(纳入本文作参考)中所述。本发明酶核酸分子中重要的是其与一种或多种靶基因 RNA 区互补的特异性底物结合位点,和此底物结合位点内或周围赋予该分子的 RNA 切割活性的核苷酸序列。因此核酶构建物不需要限于上述特异性基序。

[0465] 某些实施例中,重要的是产生对所需靶 RNA(如上述序列之一)有高度特异性的酶促切割剂。优选酶核酸分子靶向靶 RNA 的高度保守序列区。若需要,这类酶核酸分子可外源输送给特定细胞。或者,可从输送给特定细胞中的 DNA 或 RNA 表达此核酶。

[0466] 小的酶核酸基序(如锤头或发夹结构的基序)也可用于外源输送。这些分子的简单结构提高了酶核酸侵入 mRNA 结构的靶区域的能力。或者,催化性 RNA 分子可在含真核启动子的细胞中表达(如 Scanlon 等,1991;Kashani-Sabet 等,1992;Dropulic 等,1992;Weerasinghe 等,1991;Ojwang 等,1992;Chen 等,1992;Sarver 等,1990)。本领域技术人员知道,任何核酶都可在真核细胞中由合适的 DNA 载体表达。这类核酶的活性可通过第二核酶释放其初级转录物而增强(国际专利申请 W093/23569 和 W0 94/02595,二者纳入作参考;Ohkawa 等,1992;Taira 等,1991;和 Ventura 等,1993)。

[0467] 可直接加入核酶,或将核酶与阳离子脂质、脂质复合物络合,包装在脂质体内或另外输送给靶细胞。可将 RNA 或 RNA 复合物局部给予活体内的有关组织,或通过注射、气雾剂吸入、灌注泵或支撑管(它们掺入或不掺入在生物聚合物中)体内给予。

[0468] 可按国际专利申请 W0 93/23569 和 W0 94/02595(各自纳入本文作参考)所述设计核酶并合成,如上所述在体内或体外进行测试。也可优选输送这类核酶。当提供具体例子时,本领域人员知道需要时可采用其它形式的等价 RNA 靶。

[0469] 可通过计算机折叠(Jaeger 等,1989)个别分析锤头或发夹核酶,以评估此核酶序列是否折叠成适当的二级结构。不考虑结合臂与催化核心之间具有不利的分子间相互作用的那些核酶。可选择不同的结合臂长度以优化活性。通常每个臂至少 5 个以上碱基才能结合或与靶 RNA 反应。可设计能与 mRNA 信使中各种位点退火的锤头或发夹基序的核酶,并化学合成。所用合成方法按照正常 RNA 合成程序,见 Usman 等(1987)和 Scaringe 等,(1990)所述,并采用共同的核酸保护和偶联基团,如 5' 端的二甲氧三苯甲基和 3' 端的亚磷酰胺。分步偶联平均得率通常 > 98%。发夹核酶可二部分合成,并退火重建活性核酶(Chowrira 和 Burke,1992)。可广泛修饰核酶提高其稳定性,修饰用的基团为核酸酶抗性基团,例如 2'-氨基、2'-C-烯丙基、2'-氟基、2'-O-甲基、2'-H(综述见 Usman 和 Cedergren,1992)。

可用一般方法凝胶电泳或高效液相层析纯化核酶并重悬于水。

[0470] 可改变核酶结合臂的长度或化学合成具有防止其被血清核糖酶降解的修饰的核酶,来优化核酶的活性(见国际专利申请 WO 92/07065;Perrault 等,1990;Pieken 等,1991;国际专利申请 WO 91/03162;欧洲专利申请 92110298.4;美国专利 5,334,711;和国际专利申请 WO 94/13688,它们描述了对酶 RNA 分子的糖部分可进行的各种化学修饰),这些修饰能增强核酶在细胞中的效果,和除去主干 II 碱基以缩短 RNA 合成时间及减少化学需求。

[0471] Sullivan 等(国际专利申请 WO 94/02595)描述了输送酶 RNA 分子的通用方法。可用本领域熟练技术人员已知的各种方法将核酶给予细胞,包括但不限于脂质体包裹、离子电渗、掺入其它载体如水凝胶、环糊精、生物可降解纳米胶囊和生物粘附性微球体中。对一些应用,可活体内将核酶物直接输送给细胞或组织,用或不用上述载体。或者,可通过直接吸入、直接注射或导管、灌注泵或支撑管局部输送 RNA/载体组合。其它输送途径包括但不限于:血管内、肌肉内、皮下或关节注射、气雾剂吸入、口服(片剂或药丸)、局部、全身、眼、腹膜内和/或鞘内输送。核酶输送和给药的更详细说明见国际专利申请 WO 94/02592 和 WO 93/23569 中所述,各自纳入本文作参考。

[0472] 细胞内积累高浓度核酶的另一种方法是将编码核酶的序列掺入 DNA 表达载体中。核酶序列的转录受真核 RNA 聚合酶 (polI)、RNA 聚合酶 II (polII) 或 RNA 聚合酶 III (polIII) 启动子的驱动。Pol II 或 pol III 启动子的转录物将在所有细胞中高水平表达;pol II 启动子在给定细胞类型中的水平将取决于附近存在的基因调节序列(增强子、沉默子等)的性质。也可采用原核 RNA 聚合酶启动子,只要该原核 RNA 聚合酶能在适当细胞中表达(Elroy-Stein 和 Moss,1990;Gao 和 Huang,1993;Lieber 等,1993;Zhou 等,1990)。这些启动子表达的核酶可在哺乳动物中起作用(Kashani-Saber 等,1992;Ojwang 等,1992;Chen 等,1992;Ye 等,1993;L' Huillier 等,1992;Liszewicz 等,1993)。为导入哺乳动物细胞,可将这类转录单位掺入各种载体中,包括但不限于质粒 DNA 载体、病毒 DNA 载体(如腺病毒、腺相关病毒载体)或病毒 RNA 载体(如逆转录病毒、生里基森林病毒、新培斯病毒载体)。

[0473] 核酶可用作诊断工具以检测患病细胞内的基因漂变和突变。它们也可用来评估靶 RNA 分子的水平。核酶活性与靶 RNA 结构之间的密切关系得以检测分子的任何区域中改变靶 RNA 的碱基配对和三维结构的突变。利用多种核酶可绘制对 RNA 结构和体外及细胞和组织中发挥功能十分重要的核苷酸变化图谱。可用核酶切割靶 RNA 来抑制基因表达和明确特定基因产物在疾病进程中的作用。以此方式可明确作为疾病重要介体的其它基因靶标。这些研究将通过可能的组合性治疗(如多种核酶靶向不同基因,核酶与已知小分子抑制剂偶联,或用核酶和/或其它化学或生物分子组合间歇性治疗)导致更好治疗疾病进展。核酶的其它体外用途是本领域熟知的,包括检测与 IL-5 相关疾病有关的 mRNA 的存在。用核酶处理后,通过用标准方法测定切割产物的存在,可检测这类 RNA。

[0474] 4.18 肽核酸

[0475] 某些实施例中,本发明人考虑利用肽核酸(PNA)来实施本发明的方法。PNA 是一种 DNA 模拟物,其中的核碱基附着于假肽骨架(Good 和 Nielsen,1997)。许多传统上采用 RNA 或 DNA 的方法可采用 PNA。这些技术中,PNA 序列常常比相应的 RNA 或 DNA 序列做得

更佳,其用途不是 RNA 或 DNA 所固有的。PNA 的综述包括制备方法、特征和和使用方法见 Corey (1997),本文纳入作参考。因此在某些实施例中,可制备与 ACEmRNA 序列的一部分或多部分互补的 PNA 序列,这类 PNA 组合物可用于调节、改变、减少或降低 ACE- 特异性 mRNA 的翻译,从而改变已给予 PNA 组合物的宿主细胞中的 ACE 活性水平。

[0476] PNA 具有 2- 氨基乙基 - 甘氨酸键替代 DNA 的正常磷酸二酯主链 (Nielsen 等, 1991 ;Hanvey 等, 1992 ;Hyrup 和 Nielsen, 1996 ;Nielsen, 1996)。这种化学性质具有三个重要的结果:第一,与 DNA 或硫代磷酸寡核苷酸相反, PNA 是中性分子;第二, PNA 无手性,不需要开发立体选择性合成;第三, PNA 合成可用固相肽合成的标准的 Boc (Dueholm 等, 1994) 或 Fmoc (Thomson 等, 1995) 方案,虽然其它方法包括改进的 Merrifield 方法也可使用 (Christensen 等, 1995)。

[0477] PNA 单体或易制备的寡聚物可从 PerSeptive Biosystems (Framingham, MA) 商业购得。Boc 或 Fmoc 方案合成 PNA 可直接用手工或自动化方案进行 (Norton 等, 1995)。手工方案本身提供产生化学修饰的 PNA 或同时合成密切相关的 PNA 家族。

[0478] 关于肽合成,具体 PNA 合成的成功取决于所选序列的性质。例如,虽然理论上 PNA 可掺入任何核苷酸碱基的组合,但相邻嘌呤的存在可能导致产物中缺失一个或多个残基。预计到这种困难,建议在生产具有相邻嘌呤的 PNA 时。应反复偶联可能无效加入的残基。然后通过反相高压液相层析纯化 PNA (Norton 等, 1995),产物的得率和纯度与肽合成时所见相似。

[0479] 为某种应用而修饰 PNA 可通过在固相合成中偶联氨基酸,或结合含有羧酸基团的化合物而暴露 N 端胺基来完成。或者,可在合成后通过偶联导入的赖氨酸或半胱氨酸来修饰 PNA。PNA 容易被修饰有利于优化更佳的溶解性或特殊功能要求。一旦合成,可用质谱验证 PNA 及其衍生物的同源性。进行的几项研究采用了 PNA 的修饰 (Norton 等, 1995 ;Haaime 等, 1996 ;Stetsenko 等, 1996 ;Petersen 等, 1995 ;Ulmann 等, 1996 ;Koch 等, 1995 ;Orum 等, 1995 ;Footer 等, 1996 ;Griffith 等, 1995 ;Kremsky 等, 1996 ;Pardridge 等, 1995 ;Boffa 等, 1995 ;L and sdorp 等, 1996 ;Gambacorti-Passerini 等, 1996 ;Armitage 等, 1997 ;Seeger 等, 1997 ;Ruskowski 等, 1997)。美国专利 5,700,922 讨论了 PNA-DNA-PNA 嵌合分子和它们在诊断学、调生物体中的蛋白质和对治疗剂敏感的疾病中的用途。

[0480] 与含有负电荷键的 DNA 或 RNA 相反, PNA 主链是中性的。尽管这种显著改变, PNA 能通过 Watson-Crick 配对识别互补性 DNA 和 RNA (Egholm 等, 1993),证实了 Nielsen 等 (1991) 提出的最初模型。PNA 缺乏 3' -5' 极性,且能以平行或反平行方式与优选的反平行模式结合 (Egholm 等, 1993)。

[0481] DNA 寡核苷酸与 DNA 和 RNA 的杂交因互补链的带负电的磷酸骨架之间的静电排斥而失去稳定性。相反, PNA-DNA 或 PNA-RNA 双链体中没有电荷排斥,提高了融化温度 (T_m) 并降低了 T_m 对单价或二价阳离子浓度的依赖性 (Nielsen 等, 1991)。杂交的速率和亲和力明显提高因为它们使 PNA 能在松开的双链 DNA 内进行互补序列的链入侵。此外,反向重复的有效杂交提示 PNA 能有效识别双链 DNA 内的二级结构。识别增强也随 PNA 固定在表面上而出现, Wang 等证明载体连接的 PNA 可用于检测杂交事件 (Wang 等, 1996)。

[0482] 人们可能希望 PNA 与互补序列的紧密结合也会增加与类似 (但不相同) 序列的结合,因而降低了 PNA 识别的序列特异性。然而,如同 DNA 杂交一样,可通过平衡寡聚物长度与

培育时间实现选择性识别。而且通过 PNA-DNA 杂交增强的 PNA 选择性杂交比 DNA-DNA 杂交更不耐受碱基错配。例如,16bp PNA-DNA 双链体内的一个错配可降低 T_m 多达 15°C (Egholm 等,1993)。这种高水平的辨别力得以开发几种以 PNA 为基础的策略来分析点突变 (Wang 等,1996;Carlsson 等,1996;Thiede 等,1996;Webb 和 Hurskainen,1996;Perry-O' Keefe 等,1996)。

[0483] 高亲和力结合为分子识别和开发 PNA 的新用途提供了明显的优点。例如,11-13 个核苷酸 PNA 能抑制端粒酶 (一种利用基本的 RNA 模板延伸端粒端酶末端的核糖核蛋白) 的活性,而类似的 DNA 寡聚物则不能 (Norton 等,1996)。

[0484] 中性 PNA 比类似的 DNA 寡聚物更疏水,这可能导致它们难于在中性 pH 时溶解,特别是如果 PNA 有高的嘌呤含量或如果它们可能形成二级结构。可通过一个或多个在电荷连接于 PNA 末端提高其溶解性 (Nielsen 等,1991)。

[0485] Allfrey 及其同事的发现提示,链入侵会自发地逐一发生于染色体 DNA 内 (Boffa 等,1995;Boffa 等,1996)。这些研究将 PNA 靶向的核苷酸 CAG 的三联体序列,并利用此识别来纯化转录与活性 DNA (Boffa 等,1995) 并抑制转录 (Boffa 等,1996)。此结果提示如果 PNA 能在细胞内输送,它们可能是通用的基因表达的序列特异性调节剂。关于 PNA 用作反义和反基因制剂的研究和综述可参见 Nielsen 等 (1993b), Hanvey 等 (1992), Good 和 Nielsen (1997)。Koppelhus 等 (1997) 利用 PNA 来抑制 HIV-1 的逆转录,表明 PNA 可用于抗病毒治疗。

[0486] 表征 PNA 的反义结合性能的方法见 Rose (1993) 和 Jensen 等 (1997) 所述。Rose 用毛细管凝胶电泳测定 PNA 与其互补寡核苷酸的结合,测定相对结合动力学和化学计量。Jensen 等用 BIAcore™ 技术进行了相似类型的测定。

[0487] PNA 的其它用途包括用于 DNA 链入侵 (Nielsen 等,1991),反义抑制 (Hanvey 等,1992),突变性分析 (Orum 等,1993),转录增强子 (Mollegaard 等,1995),核酸纯化 (Orum 等,1995),转录活性基因的分离 (Boffa 等,1995),阻断转录因子结合 (Vickers 等,1995),基因组切割 (Veselkov 等,1996),生物传感器 (Wang 等,1996),原位杂交 (Thisted 等,1996),和替代 Southern 印迹 (Perry-O' Keefe,1996)。

[0488] 4.19 多肽、肽和肽变体

[0489] 在其它方面本发明提供了多肽组合物。一般说,本发明的多肽是衍生自哺乳动物的分离的多肽 (或其表位、变体或活性片段)。优选该多肽由本文所述多核苷酸序列编码,或由在中等严谨条件下与本文所述多核苷酸序列杂交的序列编码。或者,该多肽可定义为含有本文所述氨基酸序列的毗连氨基酸序列的多肽,或该多肽含有本文所述的全部氨基酸序列。

[0490] 本发明中,多肽组合物还含有与本发明多肽产生的抗体起免疫反应的一种或多种多肽,具体是具有所述多核苷酸编码的氨基酸序列的多肽,或其活性片段、变体或生物功能等价物。

[0491] 同样,应理解本发明的多肽组合物含有能诱导抗体的一种或多种多肽 (所述抗体能与本申请书中所述一种或多种毗连核酸序列编码的一种或多种多肽起免疫反应),或其活性片段,或其变体,或能在中等到高度严谨性条件下与这些序列的一种或多种杂交的一种或多种核酸序列。

[0492] 如本文所用,多肽的活性片段包括用常规技术如诱变、或添加、缺失或置换修饰的多肽的全部或一部分,但活性片段显示与本文所述多肽基本相同的结构功能、抗原性等。

[0493] 某些说明性实施例中,本发明的多肽至少含有上述血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白或其变体的免疫原性部分。如上所述,“血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白”是由血液恶性疾病相关肿瘤细胞表达的蛋白质。在采用血液恶性肿瘤患者的抗血清作免疫测定(如ELISA)时也可检测到与血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白反应的蛋白质。上述多肽可以是任何长度。可能存在衍生自天然蛋白的其它序列和/或异源序列,这些序列也可(但不需要)具有免疫原性和抗原性。

[0494] “免疫原性部分”本文指某蛋白质中被B细胞和/或T细胞表面抗原受体识别(即特异性结合)的部分。这些免疫原性部分通常含有血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白或其变体的至少5个氨基酸残基,更优选至少10个,最优选至少20个氨基酸残基。某些优选的免疫原性部分包括缺失了N-末端前导序列和/或跨膜结构域的肽。其它优选免疫原性部分与成熟蛋白质相比较,可含有小的N-末端和/或C-端缺失(如1-30个氨基酸,优选5-15个氨基酸)。

[0495] 免疫原性部分通常可用熟知的技术鉴定,如Paul,《基础免疫学》(Fundamental Immunology),第三版,243-247(Raven Press,1993)中总结和本文参考文献引用的那些技术。这些技术包括筛选能与抗原特异性抗体、抗血清和/或T细胞系或克隆反应的多肽。如本文所用,抗血清和抗体是“抗原特异性的”,如果它们能与抗原特异性结合(即在ELISA或其它免疫测定中,它们能与蛋白反应,但与无关蛋白不发生可检测反应)。可如上所述用熟知的技术制备这些抗血清和抗体。天然血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白的免疫原性部分是上述抗血清和/或T细胞反应的部分,其反应水平基本上不低于全长多肽的反应性(如在ELISA和/或T细胞反应性测定中)。这些免疫原性部分能在这类测定中反应,反应水平类似于或高于全长多肽的反应性。可用本领域普通技术人员熟知的方法进行这种筛选,见Harlow和Lane,《抗体:实验室手册》,Cold Spring Harbor Laboratory,1988。例如,可将此多肽固定在固相载体上,并与病人血清接触,使血清中的抗体与固定的多肽结合。然后洗去未结合的血清,用例如¹²⁵I-标记蛋白A检测结合的抗体。

[0496] 如上所述,组合物可含有天然血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白的变体。多肽“变体”本文指与天然血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白不同,有一个或多个取代、缺失、添加和/或插入的多肽,这样该多肽的免疫原性基本上没有减弱。换句话说,变体与抗原特异性抗血清的反应能力与天然蛋白相比可能增强或无变化,或与天然蛋白相比减少不到50%,优选不到20%。这类变体可通过修饰上述多肽序列之一和评价修饰的演多肽与上述抗原特异性抗体或抗血清的反应性来鉴定。优选的变体包括一部分或多部分,如N末端前导序列或跨膜结构域已去除的那些变体。其它优选项变体包括从成熟蛋白的N末端和/或C末端中去除的一小部分(如1-30个氨基酸,优选5-15个氨基酸)已变体。

[0497] 本发明的多肽变体包括显示与本文所述多肽至少约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性的那些多肽变体。

[0498] 优选变体含有保守性取代。“保守性取代”是其中一个氨基酸被另一个具有类似性能的氨基酸所取代,这样肽化学领域的技术人员预计多肽的二级结构和亲水性基本上不改变。通常可要据极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性的相似性和/或残基的两亲性进行氨基

酸取代。例如,负电荷氨基酸包括门冬氨酸和谷氨酸;正电荷氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;具有无电荷极性头部基、相似疏水性值的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸;甘氨酸和丙氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;和丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。可代表保守性改变的其它氨基酸组包括:(1)ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr;(2)cys, ser, tyr, thr;(3)val, ile, leu, met, ala, phe;(4)lys, arg, his;和(5)phe, tyr, trp, his。变体也可含有非保守性改变。一优选实施例,变体多肽有5个氨基酸或更少个取代、缺失或添加而与不同于天然序列。也可例如通过缺失或添加对多肽的免疫原性、二级结构和亲水性影响最小的氨基酸来修饰(或改变)变体。

[0499] 如上所述多肽可在蛋白质的N末端含有一信号(或前导)序列,该序列共翻译或翻译后指导蛋白质的转移。可将多肽偶联于一接头或其它序列,而易于多肽(如聚组氨酸)的合成、纯化和鉴定,或增强多肽与固相载体的结合。例如,可将多肽偶联于免疫球蛋白Fc区。

[0500] 可用各种熟知的技术制备多肽。利用本领域技术人员知道的各种表达载体,不难从DNA序列制备上述DNA序列编码的重组多肽。可在用含有编码重组多肽的DNA分子的表达载体转化或转染的合适宿主细胞中实现表达。合适的宿主细胞包括原核生物、酵母和高等真核细胞如哺乳动物细胞和植物细胞。优选采用的宿主细胞是大肠杆菌、酵母或哺乳动物系如COS或CHO。可用商业购得的滤器先浓缩合适宿主/载体系统的培养基上清液(其中有分泌的重组蛋白或多肽)。浓缩后,将浓缩液加到合适的纯化基质如亲和基质或离子交换树脂上。最后,可用一种可多种反相HPLC进一步纯化重组多肽。

[0501] 也可用本领域普通技术人员熟知的技术,以合成方法产生不到约100个氨基酸,通常不到约50个氨基酸的部分和其它变体。例如,可用市场上购得的固相技术,如Merrifield固相合成方法合成多肽,合成中氨基酸被依次加到正在生长的氨基酸链中。见Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2146-2149, 1963。自动化合成多肽的仪器可从供货商如Perkin Elmer/Applied BioSystems Division(Foster City, CA)购得,并可按厂商说明书进行操作。

[0502] 某些具体实施例中,所述多肽可以是含有上述多个多肽,或含有上述至少一个多肽和一无关序列如已知的肿瘤蛋白质的一种融合蛋白。此融合伙伴可以,例如帮助提供T辅助表位(一种免疫融合伙伴),优选人可识别的T辅助表位,或帮助表达该蛋白(表达增强子),产量比天然重组蛋白高。某些优选的融合伙伴是免疫和表达增强融合伙伴。可选择其它融合伙伴来提高蛋白的溶解性或使该蛋白靶向所需的胞内区室。其它融合伙伴包括有利于蛋白纯化的亲和标记物。

[0503] 通常可用标准技术,包括化学偶联制备融合蛋白。优选融合蛋白在表达系统中作为重组蛋白表达,与非重组蛋白相比产量水平提高了。简言之,可分别装配编码多肽组分的DNA序列,并连接入适当的表达载体中。将编码一多肽组分的DNA序列的3'末端用或不用肽接头,与编码第二个多肽组分的DNA序列的5'末端连接,使该序列的读框处于相中。这允许翻译成保留二组分多肽的生物活性的一个融合蛋白。

[0504] 用一肽接头序列分开第一和第二多肽组分,分开的距离足以保证各多肽折叠成其二级和三级结构。可用本领域熟知的标准方法将这种肽接头序列掺入融合蛋白中。合适的肽接头序列可根据以下因素选择:(1)其采取可屈曲延伸构型的能力,(2)其不能采取能与

第一和第二多肽上的功能性表位相互作用的二级结构，(3) 缺少能与多肽功能性表位反应的疏水性或带电残基。优选的肽接头序列含有 Gly, Asn 和 Ser 残基。其它接近中性的氨基酸如 Thr 和 Ala 也可用于接头序列。可用作接头的氨基酸序列包括 Maratea 等, Gene 40 : 39-46, 1985 ; Murphy 等, Proc. Natl. Acad. Sci 83 : 8258-62, 1986 ; 美国专利 4, 935, 233 和 4, 751, 180 中所述。接头序列一般长 1- 约 50 个氨基酸。当第一和第二多肽含有可用于分开功能性结构域和防止空间干扰的非必需 N- 末端氨基酸区域时, 不需要接头序列。

[0505] 将该连接的 DNA 序列操作性连接于合适的转录和翻译调控元件。负责表达 DNA 的调控元件只能位于编码第一个多肽的 DNA 序列的 5' 端。类似地, 终止翻译和转录终止信号所需的终止密码子只能位于编码第二多肽的 DNA 序列的 3' 端。

[0506] 也提供融合蛋白。此种蛋白含上述多肽与无关的免疫原性蛋白。优选免疫原性蛋白能诱导回忆应答。此种蛋白的例子包括破伤风、结核和肝炎蛋白 (见例如 Stoute 等, New Engl. J. Med. , 336 : 86-91, 1997) 。

[0507] 优选实施例中, 一种免疫融合伴侣衍生自蛋白质 D, 一种革兰阴性菌流感嗜血杆菌 B (WO 91/18926) 的表面蛋白。蛋白 D 衍生物优选含蛋白质的约 1/3 (如前 N- 末端 100-110 个氨基酸), 并可脂化的蛋白 D 衍生物。某些优选实施例中, 将脂蛋白 D 融合伴侣的前 109 个残基包含在 N- 末端上以提供具有附加外源性 T- 细胞表位的多肽及提高在大肠杆菌中的表达水平 (因此起表达增强子的作用) 。脂尾可确保将抗原最适呈递给抗原呈递细胞。其它融合伴侣包括流感病毒的非结构性蛋白、NS1 (凝血素) 。通常利用 N- 末端 81 个氨基酸, 虽然可采用包括 T- 辅助表位的不同的片段。

[0508] 另一实施例中, 免疫合伴侣是称为 LYTA 的蛋白质, 或其一部分 (优选 C- 末端部分) 。LYTA 衍生自肺炎链球菌, 该细菌合成一种称为酰胺酶 LYTA 的 N- 乙酰 -L- 丙氨酸酰胺酶 (由 LytA 基因编码 ; Gene 43 : 265-292, 1986) 。LYTA 是一种能特异性降解肽聚糖骨架中某些键的自溶素。LYTA 的 C- 末端结构域负责对胆碱或对某些胆碱类似物 (如 DEAE) 的亲合力。已利用这种性能开发用于表达融合蛋白的大肠杆菌 C-LYTA 表达质粒。已描述氨基末端含 C-LYTA 片段的杂交蛋白的纯化 (见 Biotechnology 10 : 795-798, 1992) 。一优选实施例中, 可将 LYTA 的重复部分掺入一融合蛋白中。在开始于残基 178 的 C- 末端区中找到重复部分。特别优选的重复部分掺入了残基 188-305。

[0509] 通常, 需分离本文所述多肽 (包括融合蛋白) 和多核苷酸。“分离的”多肽或多核苷酸指从其原来环境中除去的。例如, 分离天然产生的蛋白质, 如果它与天然系统中共存的一些或全部物质分开的话。优选这些多肽至少约 90% 纯, 更优选至少约 95% 纯, 最优选至少约 99% 纯。如果将一多核苷酸克隆到不是天然环境一部分的载体中, 就认为该多核苷酸是分离的。

[0510] 4.20 结合剂

[0511] 本发明还采用能特异性结合血液恶性相关抗原的制剂如抗体及其抗原结合片段。如果抗体及其抗原结合片段以可检测水平 (如在 ELISA 中) 与血液恶性相关抗原反应, 但在类似条件下与无关蛋白检测不到反应, 就认为其与血液恶性相关抗原“特异性结合”。“结合”本文指两个不同分子间的非共价结合, 从而形成一种复合物。结合能力可通过测定形成复合物的结合常数来评价。复合物浓度除以组分的浓度可获得结合常数。通常本文中形成复合物的结合常数超过约 10^3 L/mol 时, 就认为两化合物“结合”了。结合常数可用本领域熟

知方法测定。

[0512] 结合剂能区分患或不患血液恶性肿瘤的病人。这类结合剂产生的信号表明此病患者至少约 20% 存在血液恶性肿瘤；且产生阴性信号表明在至少约 90% 的无此病个体中不存在此病。为确定结合剂是否能满足此要求，可测试患或不患有血液恶性肿瘤（用标准临床试验测定）病人的生物样品（如血、血清、尿、和 / 肿瘤活检）是否存在与结合剂结合的多肽。显然应测试有统计学意义数量的患或不患有疾病的样品。各结合剂应满足上述标准，然而，该领域普通技术人员懂得可联合应用结合剂以提高灵敏度。

[0513] 能满足上述要求的任何制剂可以是一种结合剂。例如，结合剂可以是有或没有肽组分、RNA 分子或多肽的核糖体。一优选实施例中，结合剂是抗体或其抗原结合片段。可用本领域普通技术人员所知的各种技术制备抗体。见例如，Harlow 和 Lane 抗体：《实验室手册》，Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。通常，可通过细胞培养技术产生抗体，包括产生上述单克隆抗体，或通过将抗体基因转染入合适的细菌或哺乳动物细胞以产生重组抗体。一种技术是将含多肽的免疫原先注射入各种各样的动物（如小鼠、大鼠、家兔、绵羊或山羊）中。在步骤中，本发明的多肽可作为免疫原而无需修饰。或者，特别对于较短的肽，如果将多肽连接于一载体蛋白如牛血清白蛋白或匙孔蛾血蓝蛋白，可诱导高免疫应答。优选按预定的时间表给动物宿主注射免疫原，加一次或多次加强免疫，动物定期采血。可将多肽偶联于合适的固相载体，如采用亲和层析从血清中纯化对多肽特异的多克隆抗体。

[0514] 可用 Kohler 和 Milstein, Eur J Immunol. 6 :511-19, 1976 的技术及其改进制备感兴趣抗原肽特异的单克隆抗体。简言之，这些方法包括制备能产生具有所需特异性（如与感兴趣多肽反应）的无限增殖的细胞系。例如，可从上述免疫动物获得的脾细胞产生这种细胞系。然后将脾细胞与骨髓瘤细胞融合伴侣（优选与免疫动物同系）融合而无限增值。可采用各种融合技术。例如，将脾细胞和骨髓瘤细胞与非离子去污剂混合几分钟，然后以低密度接种在支持杂交细胞生长而不支持骨髓瘤细胞生长的选择性培养基上中。优选的选择技术采用 HAT（次黄嘌呤、氨基喋呤、胸苷）选择。充分时间后，通常约 1-2 周可见杂交的克隆。选择单个克隆并检测其培养上清液对多肽的结合能力。优选具有高反应性和特异性的杂交瘤。

[0515] 可从生长的杂交瘤克隆的上清液中分离得到单克隆抗体。此外，可用各种技术来提高产量，如将杂交瘤细胞系注射入合适脊椎动物宿主如小鼠的腹膜腔。然后从腹水或血液中收获单抗。可用常规技术如层析、凝胶过滤、沉淀和抽提去除抗体中的污染物。本发明的多肽可用于此纯化工艺如亲和层析步骤。

[0516] 某些实施例中，优选采用抗体的抗原结合片段。这种片段包括 Fab 片段可用标准方法制备。简言之，可用蛋白 A 珠柱亲和层析 (Harlow 和 Lane, 《抗体：实验室手册》，Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) 从兔血清中纯化免疫球蛋白，并用木瓜蛋白酶消化产生 Fab 和 Fc 片段。用蛋白 A 珠层析柱亲和层析分离 Fab 和 Fc 片段。

[0517] 可将本发明的单抗及其片段偶联于一种或多种治疗剂，如放射性核素、分化诱导剂、药物、毒素和它们的衍生物。优选的放射性核素包括： ^{90}Y 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 和 ^{212}Bi 。优选的药物包括氨甲喋呤、嘧啶和嘌呤类似物。优选的分化诱导剂包括佛波醇酯和丁酸。优选的毒素包括蓖麻毒蛋白、相思豆毒蛋白、白喉毒素、霍乱毒素、白树毒蛋白、假单胞菌外毒素、志贺菌毒素和商陆抗病毒蛋白。对于某些体内或活体内治疗，优选将抗体或

其片段偶联于细胞毒剂如放射性或化疗组成成分。

[0518] 可将治疗剂与合适的单克隆抗体直接或间接（通过一接头基团）偶联（如共价连接）。当药剂和抗体各自具有能相互反应的取代基时，二者之间可能发生直接反应。例如，一个分子上的亲核基团如氨基或巯基，能与另一分子上含羰基的基团如酸酐或卤酸反应，或与含有良好离去基团（如卤化物）的烷基反应。

[0519] 或者，可能需要将治疗剂和抗体通过一接头基团偶联。接头基团的功能是作为分隔抗体与药剂的间隔臂，以避免干扰结合能力。接头基团也可增加药剂或抗体上取代基的化学反应性，从而提高偶联效果。化学反应性的增加还便于使用药剂或其它药剂上的功能基团，否则中不可能的。

[0520] 本领域技术人员已证明各种双功能或多功能试剂，同功能和异功能试剂（见 Pierce Chemical Co, Rockford, IL 的产品目录上所述），可用作接头基团。可通过氨基、羧基、巯基或氧化的糖残基进行偶联。有许多参考文献描述了这类方法，如美国专利 4, 671, 958。

[0521] 当治疗剂从本发明免疫偶联物的抗体部分游离出来时其作用更强，因此可能需要采用细胞内化期间能切割的接头基团。已描述了许多不同的可切割的接头基团。从这些接头基团细胞内释放药剂的机制包括通过还原二硫键（美国专利 4, 489, 710）；照射对光不稳定键（美国专利 4, 625, 014）；水解衍生的氨基酸侧链（美国专利 4, 638, 045）；血清补体介导的水解（美国专利 4, 671, 958）和酸催化水解（美国专利 4, 569, 789）来切割。

[0522] 可能需要将一个以上的药剂偶联于抗体。一实施例中，将多个药剂的分子偶联于一个抗体分子。另一实施例中，可将一种以上的药剂偶联于一个抗体。不论具体的实施例，含一种以上药剂的免疫偶联物可用各种方法制备。例如，可将一种以上的药剂直接偶联于一抗体分子，或可用接头提供多个结合位点。或者，可采用载体。

[0523] 载体也可以不同方法携带药剂，包括直接，或通过接头基团共价接合。合适的载体包括蛋白质如白蛋白（美国专利 4, 507, 234）、肽和多糖如氨基葡聚糖（美国专利 4, 699, 784）。载体也可通过非共价结合或包囊化如包裹在脂质体载体中（美国专利 4, 429, 008 和 4, 873, 088）而携带药物。对放射性核素剂特异的载体包括放射性卤化的小分子和螯合性化合物。例如，美国专利 4, 735, 792 披露的代表性放射性卤化的小分子及其的合成方法。可从含有氮和硫原子作为结合金属或金属氧化物、放射性核素的供体原子的螯合性化合物中产生放射性核素螯合物。例如，见美国专利 4, 673, 562 披露的代表性螯合化合物及其合成方法。

[0524] 可采用各种途径给予抗体和免疫偶联物。给药途径通常是静脉内、肌肉内、皮下或肿瘤切除床部位。显然抗体 / 免疫偶联物的精确剂量视所用抗体、肿瘤上的抗原密度和抗体清除率而不同。

[0525] 4. 21 疫苗

[0526] 本发明的某些优选实施例中提供了疫苗。这些疫苗通常含有上述一种或多种药物组合物与免疫刺激剂组合。免疫刺激剂是任何能提高或增强对异源抗原的免疫应答（抗体和 / 或细胞介导应答）的物质。免疫刺激剂的例子包括佐剂、生物可降解微球体（如聚乳酸聚半乳交酯）和脂质体（将化合物掺入其中，见 Fullerton, 美国专利 4, 235, 877）。疫苗制品的一般描述见 M. F. Powell 和 M. J. Newman 编，《疫苗设计（亚基和佐剂方法）》（“Vaccine

Design(the subunit and adjuvant approach)),”PlenumPress(NY,1995)。本发明范围中的药物组合物和疫苗也可含有其它可能有或没有生物活性的化合物。例如,组合物或疫苗中,存在其它肿瘤抗原的一种或多种免疫原性部分,或掺入融合多肽中,或作为分开的化合物。

[0527] 说明性疫苗可含有编码上述一种或多种多肽的 DNA,从而可在原位产生该多肽。如上所述, DNA 可在本领域普通技术人员所知的各种输送系统内存在,包括核酸表达系统、细菌和病毒表达系统。许多基因输送技术是本领域熟知的,如见 Rolland Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems. 15 :143-198,1998,及其引用的参考文献。适当的核酸表达系统含有在患者中表达所需的 DNA 序列(如合适的启动子和终止信号)。细菌输送系统包括给予能在其细胞表面表达多肽的免疫原性部分,或分泌此种表位的细菌(如卡介苗)。一优选实施例中,可用病毒表达系统(如牛痘苗或其它痘病毒、逆转录病毒或腺病毒)。合适系统的描述见:Fisher-Hoch 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :317-321, 1989 ;Flexner 等, Ann. N. Y. Acad. Sci. 569 :86-103,1989 ;Flexner 等, Vaccine 8 :17-21, 1990 ;美国专利 4,603,112 ;4,769,3305,017,487 ;WO 89/01973 ;美国专利 4,777,127 ;GB 2,200,651 ;EP 0,345,242 ;WO91/02805 ;Berkner, Biotechniques 6 :616-27,1988 ;Rosenfeld 等, Science252 :431-4,1991 ;Kolls 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :215-19, 1994 ;Kass-Eisler 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :11498-502,1993 ;Guzman 等, Circulation88 :2838-48,1993 ;和 Guzman 等, Cir. Res. 73 :1202-07,1993。将 DNA 掺入这类表达系统的技术是本领域普通技术人员熟知的。DNA 也可能是“裸的”,例如见 Ulmer 等, Science 259 :1745-1749(1993)所述和 Cohen(1993)的综述。可通过将 DNA 包被在可生物降解的小珠上而有效地转运入细胞中,来提高裸 DNA 的摄入。显然所述疫苗可含有多核苷酸和多肽组分。提供这种疫苗用于增强免疫应答。

[0528] 显然所述疫苗可含有上述多核苷酸和多肽的药理学上可接受的盐。可从药理学上接受的非毒性碱,包括有机碱(如伯、仲、叔胺和碱性氨基酸的盐)和无机碱(如钠、钾、锂、钙和镁盐)制备此种盐。

[0529] 虽然本发明疫苗组合中可采用本领域普通技术人员已知的任何合适载体,但载体的类型将根据给药方式而不同。可配制本发明组合物用于任何合适的给药方式,包括例如局部、口、鼻、静脉内、颅内、腹膜内、皮下或肌肉内给药。对于胃肠道外给药如皮下注射,载体最好含有水、盐水、酒精、脂肪、蜡或缓冲剂。对于口服给药,可采用上述任一载体,或固体载体如甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、蔗糖和碳酸镁。也可采用生物可降解微球体(如聚乳酸聚甘醇酸酯)作为本发明药物组合物的载体。合适的生物可降解微球体见例如美国专利 4,897,268 ;5,075,109 ;5,928,647 ;5,811,128 ;5,820,883 ;5,853,763 ;5,814,344 和 5,942,252 中所述。也可采用美国专利 5,928,647 中所述包含宿主中能诱导 I 类限制性细胞毒 T 淋巴细胞应答的颗粒-蛋白复合物的载体。

[0530] 这类组合物可也含有缓冲剂(如中性缓冲盐水或磷酸缓冲盐水)、碳水化合物(如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖),甘露糖醇、蛋白质、肽或氨基酸如甘氨酸、抗氧化剂、抑菌剂,螯合剂如 EDTA 或谷胱甘肽、佐剂(如氢氧化铝)、能赋予制剂与受者血液等渗、低渗或弱高渗的溶质、悬浮剂、增稠剂和/或防腐剂。或者,可将本发明组合物配制成冻干剂,也可用熟知的将化合物包囊在脂质体内。

[0531] 在制备本发明疫苗时可采用各种免疫刺激剂如佐剂。大多数佐剂含有保护抗原免被快速分解的物质如氢氧化铝或矿物油、免疫应答刺激剂如脂质 A、百日咳鲍特氏菌或结核分枝杆菌衍生的蛋白。合适的佐剂可从市场上购得,如弗氏不完全佐剂和完全佐剂(Difco Laboratories, Detroit, MI);Merck 佐剂 65(Merck and Company Inc., Rahway, NJ);AS-2(Smithkline Beecham, Philadelphia, PA);铝盐如氢氧化铝凝胶(明矾)或磷酸铝、钙、铁或锌的盐;酰化酪氨酸的不溶性悬浮液;酰化糖;阳离子或阴离子衍生多糖;聚磷腈;生物可降解微球体;单磷酸脂质 A 和 Quil A。细胞因子如 GM-CSF 或 IL-2、IL-7 或 IL-12 也可用作佐剂。

[0532] 本文所述疫苗中,佐剂组合物优选设计成能诱导 Th1 型占优势的免疫应答。高水平的 Th1 型细胞因子(如 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 和 IL-12)有利于诱导对施用抗原的细胞介导免疫应答。相反,高水平的 Th2 型细胞因子(如 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10)有利于诱导体液免疫应答。应用本文所述疫苗后,病人将产生包括 Th1 和 Th2 型的免疫应答。优选实施例中,免疫应答是占优势的 Th1 型,Th1 型细胞因子水平的增加大于 Th2 型细胞因子的水平。采用标准测定不难评估这些细胞因子的水平。细胞因子家族的综述可参见 Mosmann 和 Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989。

[0533] 用于诱导占优势的 Th1 型应答的优选佐剂包括,例如单磷酸脂质 A(优选 3-脱氧酰化单磷酸脂质 a(3D-MPL)与铝盐合用。MPL 佐剂可从 Corixa Corporation(Seattle WA;见美国专利 4,436,727;4,877,611;4,866,034 和 4,912,094)购买。含 CpG 的寡核苷酸(其中 CpG 二核苷酸是非甲基化的)也诱导占优势的 Th1 型应答。这类寡核苷酸是熟知的,例如可参见国际专利申请 W096/02555 和 W099/33488 及美国专利 6,008,200;5,856,462 中所述。Sato 等, Science 273:352, 1996 也描述了免疫刺激 DNA 序列。另一种优选的佐剂是皂苷,优选 QS21(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA),可单独或与其它佐剂联用。例如,一种增强系统包括单磷酸脂质 A 和皂苷衍生物的组合,如 QS21 和 3D-MPL 的组合(见国际专利申请 W094/00153),或一种反应原性较低的组合物(其中采用胆固醇猝灭 QS21,见 W096/33739 所述)。其它优选制剂包括水包油乳剂和生育酚。特别强的佐剂包括 QS21、3D-MPL 和上述水包油乳剂中的生育酚,见国际专利申请 W095/17210。

[0534] 其它优选佐剂包括 Montanide ISA 720(Seppic)、SAF(Chiron)、ISCOMS(CSL)、MF-59(Chiron)、SBAS 系列佐剂(如 SBAS-2 或 SBAS-4,获得自 SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium)、Detox(Corixa 公司)、RC-529(Corixa 公司)和氨烷基氨基葡萄糖苷-4-磷酸盐(AGPs),这些可见待批美国专利申请 08/853,826 和 09/074,720,其内容纳入本文作参考。

[0535] 本文所述任何疫苗可用熟知的方法制备而得到抗原、免疫应答增强剂和合适的载体或赋形剂的组合。本文所述组合物可作为缓释剂型的一部分给药(即以多糖组成的胶囊、海绵或明胶剂型、能在给药后缓慢释放起作用的化合物)。可采用熟知技术(Coombes 等, Vaccine 14:1429-38, 1996)制备此种制剂,并通过口、直肠或皮下植入(植入在所需的靶位置)给药。缓释制剂可含有分散在载体基质,和/或包含在贮器(被一控速膜包围)中的肽、多核苷酸或抗体。

[0536] 这类制剂中所用的载体优选生物相容的,也可以是生物可降解的,该制剂优选提供较恒定水平的活性成分释放。这类载体包括聚(丙交酯-共乙交酯)的微球体聚丙烯酸、

乳胶、淀粉、纤维素和葡聚糖等。其它缓释载体包括超分子生物载体,其含有非液态亲水核心(如交联的多糖或寡糖)和任选地含两亲性化合物如磷脂的外层(美国专利 5,151,254、国际专利申请 W094/20078;W094/23701 和 W096/06638)。缓释制剂内活性化合物含量取决于植入的部位、释放的速度和持续时间,及待防治疾病的性质。

[0537] 所述药物组合物和疫苗中可采用各种输送载体,以促进靶向肿瘤细胞的抗原特异性免疫应答的产生。输送载体包括抗原呈递细胞(APC),如树突细胞、巨噬细胞、B 细胞、单核细胞和可被基因改造成有效的 APC 的其它细胞。这类细胞可以但不需要基因修饰以提高其呈递抗原的能力,促进 T 细胞应答的活化和 / 或维持本身具有的抗肿瘤作用,和 / 或在免疫学上与接受者相容(即 HLA 单倍体型相配)。一般可从各种生理性液体和器官,包括肿瘤和肿瘤外周组织中分离得到 APC,可以是自身的、同种异体的,同系或异种细胞。

[0538] 本发明某些优选实施例采用树突细胞或其祖细胞作为抗原呈递细胞。树突细胞是很强的 APC(Banchereau 和 Steinman, *Nature* 392:245-251,1998),已证明其有效作为诱导预防或治疗性抗肿瘤免疫的生理性佐剂(Timmerman 和 Levy, *Ann Rev Med* 50:507-529,1999)。通常可根据其典型形状(原位放射状,显著的胞质突起(树突)体外可见),摄取、加工和高效呈递抗原的能力及激活原初 T 细胞应答的能力,来鉴定树突细胞。当然,可基因改造树突细胞使其表达通常在体内或活体内树突细胞上没有的特异性细胞表面受体或配体,这类修饰的树突细胞也是本发明考虑的。另一种树突细胞,分泌的载体、载有抗原的树突细胞(称为外体)也可用于疫苗中(Zitvogel 等, *Nature Med* 4:594-600,1998)。

[0539] 树突细胞可获得自外周血、骨髓、肿瘤浸润细胞、肿瘤外周组织浸润细胞、淋巴结、脾脏、皮肤、脐带血或任何其它合适的组织或液体。例如,可通过在获自外周血的单核细胞培养物中加入细胞因子的组合物如 GM-CSF、IL-4、IL-13 和 / 或 TNF α 来体外分化树突细胞。或者,在培养基中加入能诱导树突细胞分化、成熟和增殖的 GM-CSF、IL-3、TNF- α 、CD40 配体、LPS、fit3 配体和 / 或其它化合物的组合物,使获自外周血、脐带血或骨髓的 CD34 阳性细胞分化为树突细胞。

[0540] 可方便地将树突细胞分成“不成熟”和“成熟”细胞,这是在两种鉴定良好的表型之间的简单方法。然而,这种命名法不应认为排除了所有可能的分化中间期细胞。作为 APC,不成熟树突状细胞特征是抗原摄取和加工能力高,这与其 Fc γ 受体和甘露糖受体的高表达相关。成熟表型的典型特征是这些标记的表达较低,但负责 T 细胞活化的细胞表面分子,如 I 类和 II 类 MHC 分子、粘附分子(如 CD54 和 CD11)和共刺激分子(如 CD40、CD80、CD86 和 4-1BB)高表达。

[0541] 一般用编码血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白(其部分或其它变体)的多核苷酸转染 APC,在细胞表面表达该血液恶性疾病相关肿瘤多肽或其免疫原性部分。可活体外进行这种转染,包含这种转染细胞的组合物或疫苗可用于上述治疗目的。或者,可将靶向树突细胞或其它抗原呈递细胞的基因输送载体给予病人,使其在体内转染。可用本领域已知的任何方法如 W097/24947 中所述的方法或 Mahvi 等, *Immunology and Cell Biology* 75:456-460,1997 所述基因枪方法进行树突细胞的体内或活体内转染。可将树突细胞或祖细胞与血液恶性肿瘤相关肿瘤多肽、DNA(裸的或在质粒载体内)或 RNA 一起培育,或与表达抗原的重组细菌或病毒(如牛痘、禽痘、腺病毒或慢病毒载体)一起培育,实现树突细胞的抗原负载。负载前,可将此多肽共价偶联于提供 T 细胞辅助的免疫伙伴(如载体分子)。或者,可分别

或存在此多肽时用非偶联的免疫伙伴脉冲刺激树突细胞。

[0542] 所述疫苗和药物组合物可装在单位剂量或多剂量容器中,如密封的安瓿或小瓶。这些容器最好密封以保持制剂的无菌,直到使用。一般将制剂作为悬浮液、溶液或乳液贮存在油性和水性载体中。或者,可将所述疫苗或药物组合物冻干贮存,使用前只需加入无菌液体载体即可。

[0543] 4.22 癌症治疗

[0544] 本发明的其它方面,可用本文所述组合物免疫治疗癌症如血液恶性肿瘤,这类方法中,通常给予患者药物组合物和疫苗。“患者”本文指温血动物,优选人。患者可以患有或没患有癌症。因此可用上述药物组合物和疫苗来预防癌症的发展或治疗患有癌症的患者。癌症可用该领域一般所接受的标准进行诊断,包括恶性肿瘤的存在。可在手术切除原发肿瘤和/或给予放疗或常规化疗药物等治疗之前或之后,给予药物组合物和疫苗。可用任何合适的方法,包括静脉内、腹腔内、肌肉内、皮下、鼻内、皮内、肛门、阴道、局部和口服途径给药。

[0545] 某些实施例中,免疫治疗可以是主动性免疫治疗,这种治疗依靠给予免疫应答修饰剂(如本文所述多肽和多核苷酸)体内刺激内源性宿主免疫系统产生抗肿瘤反应。

[0546] 其它实施例中,免疫治疗可以是被动性免疫治疗,这种治疗包括给予已建立的抗肿瘤免疫反应性制剂(如效应细胞或抗体)的输送直接或间接介导抗肿瘤作用,而不需要依赖宿主的完整免疫系统。效应细胞的例子包括上述表达本文所述多肽的T细胞、T淋巴细胞(如CD8⁺细胞毒T淋巴细胞和CD4⁺T辅助肿瘤浸润淋巴细胞)、杀伤细胞(如自然杀伤淋巴和因子激活的杀伤细胞)、B细胞和抗原呈递细胞(如树突细胞和巨噬细胞)。

[0547] 可将对上述多肽特异的T细胞受体和抗体受体克隆、表达和转移到用于过继免疫治疗的其它载体或效应细胞中。也可用上述多肽产生用于被动性免疫治疗的抗体或抗独特型抗体(见上述和美国专利4,918,164)。

[0548] 用于过继免疫治疗的效应细胞一般可如上所述通过体外生长而充分获得。本领域熟知将一个抗原特异性效应细胞体内扩增至数十亿数量并保留抗原识别能力的培养条件。体外培养条件通常在存在细胞因子(如IL-2)和非分裂饲养细胞的条件下采用抗原间歇刺激。如上所述,本文所述免疫反应性多肽可用于快速扩增抗原特异性T细胞培养物,以产生充分数量的细胞用于免疫治疗。特别是,可用本领域熟知的标准技术,以免疫反应性多肽脉冲刺激或用一种或多种多核苷酸转染抗原呈递细胞如树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、成纤维细胞和/或B细胞。例如,可用具有适合于提高重组病毒或其它表达系统中表达的启动子的多核苷酸转染抗原呈递细胞。培养的治疗用效应细胞必须能在体内生长并广泛分布和长期存活。研究显示,用补充了IL-2的抗原复制刺激可诱导培养的效应细胞在体内大量生长和长期存活(见例如Cheever等,Immunol Rev 157:177,1997)。

[0549] 或者,可将表达上述多肽的载体导入病人的抗原呈递细胞且在活体外克隆增殖供移植回同一病人中。可采用该领域已知的方法将转染的细胞再导入病人体内,优选以无菌形式通过静脉内,腔内,腹膜内或肿瘤内给药。

[0550] 给予本文所述治疗组合物的途径和次数以及剂量,个体之间不同,易用标准技术确定。一般可通过注射(如皮内、肌肉内、静脉内或皮下),鼻内(如吸入)或口服给予药物组合物和疫苗。最好在52周期间给药1-10个剂量。优选间隔1个月一次给予6个剂

量,然后可定期给予加强免疫接种。其它方案也适合各个病人。合适的剂量是如上给予时能促进抗肿瘤免疫应答并超过基础水平(即未治疗)至少 10-50%的量。免疫应答可通过测定病人的抗肿瘤抗体,或依赖疫苗产生的能体外杀伤病人肿瘤细胞的细胞毒效应细胞来监测。此种疫苗也应能引起免疫应答导致接种疫苗病人比未接种疫苗病人的临床结果改善(如更常见缓解、完全或部分缓解或较长时间的无病存活)。总之,药物组合物和疫苗含有一种或多种多肽,一个剂量中各多肽的量为每公斤宿主约 25 μ g-5mg 范围。合适的剂量范围因病人的体重而不同,但通常为约 0.1mL-5mL 范围。

[0551] 一般适合的剂量和治疗方案可提供充足量的活性化合物以获得治疗和/或预防效果。治疗病人与未治疗病人相比,可通过确定改善的临床结果(如更常见缓解、完全或部分缓解或较长时间的无病存活)来监测免疫应答。先前存在的对血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白的免疫应答得到提高,通常与改善的临床结果相关联。一般可用获自治疗前后病人的样品,以标准增殖、细胞毒性或细胞因子测定,来评价此种免疫应答。

[0552] 4.23 癌症的检测和诊断

[0553] 通常病人的癌症检测可根据获自该病人的生物样品(如血、血清、痰、尿和/或肿瘤活检)中存在的一种或多种血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白和/或编码此类蛋白的多核苷酸而定。换句话说,这类蛋白可用作表明是否存在血液恶性肿瘤的标志。此外,这类蛋白可用于检测其它癌症。本发明提供的结合剂通常能检测生物样品中结合药剂的抗原水平。可利用多核苷酸引物和探针来检测编码肿瘤蛋白的 mRNA 水平。通常肿瘤组织中存在的血液恶性肿瘤相关肿瘤的序列水平应比正常组织中至少高 3 倍。

[0554] 本领域普通技术人员已知有多种测定采用结合剂来检测样品中的多肽标记。见例如 Harlow 和 Lane 《抗体:实验室手册》,Cold Spring Harbor Laboratory,1988。通常病人中是否存在癌症可通过(a)使病人的生物样品与结合剂接触;(b)检测样品中结合该结合剂的多肽水平;和(c)将多肽水平与预定的截断值比较来测定。

[0555] 一优选实施例中,测定涉及利用固定在固相载体上的结合剂来结合样品中的多肽和去除其余成分。然后用含有报导基团能特异性结合该结合剂/多肽复合物的检测试剂检测结合的多肽。这类检测试剂可包括能特异性结合该多肽或抗体的结合剂,或能特异性结合该结合剂的其它试剂,如抗免疫球蛋白、蛋白 G、蛋白 A 或凝集素。或者,可用竞争性测定,此测定中用一报导基团标记多肽,培育结合剂和样品后,使标记的多肽与固定的结合剂结合。样品中的成分抑制该标记多肽与结合剂结合的程度,反映了样品与固定的结合剂的反应性,适合这类测定用的多肽包括上述能与结合剂结合的全长血液恶性肿瘤相关蛋白及其部分。

[0556] 肿瘤蛋白可附着的固相支持体是本领域普通技术已知的任何材料。例如,固相支持体可以是微量滴定板中的测试孔、或硝酸纤维素或其它合适的膜。或者,支持体可以是珠或圆片,如玻璃、玻璃纤维、乳胶或塑料如聚丙烯或聚氯乙烯。支持体也可以是上述磁性颗粒或光纤传感器,例如见美国专利 5,359,681。结合剂可用本领域技术人员已知专利和科学文献上所详细描述的各种技术固定在固相支持体上。本发明内容中,术语“固定”指非共价缔合(如吸附)和共价结合(可以是试剂和支持体上的功能基团之间直接连接或借助交联剂连接)。优选通过吸附于微量滴定板中的孔或膜上的固定。此类情况下,可使用合适缓冲液配的结合剂与固相支持接触适当时间而获得吸附。接触时间随温度而异,但

通常约 1 小时和约 1 天。一般与塑料微量滴定板的孔接触的结合剂量约 10ng-10 μ g, 优选 100ng-1 μ g, 能充分固定足够量的结合剂。

[0557] 结合剂与固相支持体共价结合的实现, 一般可先使该支持体与双功能试剂反应, 该双功能试剂可与支持体和结合剂上的功能基因如羟基或氨基反应。例如, 所述结合剂可共价结合于具有用苯醌包被的适当聚合物的支持体上, 或通过支持体上的醛基与结合伙伴上的胺基和活化氢缩合 (见 Pierce 《免疫技术样本和手册》, 1991, A12-13)。

[0558] 某些实施例中, 测定是双抗体夹心测定。进行该测定可先使固定在固相支持体 (通常是微量滴定板的孔) 上的抗体与样品接触, 使样品中的多肽结合于固定的抗体。然后从固定的多肽-抗体复合物中洗去未结合样品, 加入含报导基团的检测试剂 (优选能结合多肽上不同位点的第二抗体)。然后用适合于特异性报导基团的方法, 测定仍结合于固相支持体的检测试剂的量。

[0559] 更具体地说, 一理抗体被固定于上述支持体上, 通过封闭该支持体上的其余蛋白结合位点。合适的封闭剂是本领域普通技术人员已知的, 如牛血清白蛋白或 Tween20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)。然后, 一起培育固定化抗体和样品, 使多肽结合于该抗体。培育前可用合适的稀释液如磷酸缓冲液 (PBS) 稀释样品。一般, 适当的接触时间 (即培育时间) 是足以检测到获自血液恶性肿瘤患者样品中多肽存在的时间。优选的接触时间是获得的结合水平足以达到结合和非结合多肽之间平衡时至少约 95%。本领域普通技术人员知道, 不难通过测定该时间段出现的结合水平来确定实现平衡所需的时间。通常室温下培育时间约 30 分钟是足够的。

[0560] 可用适当的缓冲液如含 0.1% Tween20™ 的 PBS 洗去固相支持体上未结合的样品。然后将含报导基团的第二抗体加到固相支持体上。优选的报导基团包括上述基团。

[0561] 然后, 将检测试剂与固定的抗体-多肽复合物培育足够时间以检测结合的多肽。适当的时间通常可通过测定该时间段出现的结合水平来确定。然后洗去未结合的检测试剂, 并用报导基团检测结合的检测试剂。用于检测报导基团的方法取决于该报导基团的性质。对于放射性基团, 通常适合用闪烁计数或放射自显影方法。可用分光光度法检测染料、发光基团和荧光基团。偶联于不同报导基团 (通常为放射性或荧光基团或酶) 的生物素可用亲和素检测。一般可加入底物 (通常用于特定时间段) 然后用分光光度或反应产物的其它分析, 来检测酶报导基团。

[0562] 为确定是否存在癌症如血液恶性肿瘤, 通常将检测到的仍结合于固相支持体的报导基团的信号, 与相应于预定的截断值信号作比较。一优选实施例中, 测定癌症的截断值是固定化抗体与非癌症患者样品培育时获得的信号平均值。一般, 样品产生的信号高于预定截断值三个标准偏差即认为癌症阳性。另一优选实施例中, 按 Sackett 等, 《临床流行病学: 临床医学的基础科学》, Little Brown and Co., 1985, 106-7 页的方法, 用接受手术者曲线 (Receiver Operator Curve) 测定此截断值。简言之, 此实施例中, 可从真阳性率 (即灵敏度) 和假阳性率 (100% 特异性) 配对的曲线来确定此截留值, 其对应于诊断试验结果的每种可能截断值。该曲线上最靠近左上角处的截断值 (即围住最大区域的值) 是最精确的截断值, 能产生高于此法所测定的截断值的信号的样品被认为是阳性。或者, 可将截断值沿曲线向左移动以最低程度地减少假阳性率, 或向右移动以最低程度地减少假阴性率。通常, 能产生高于此法所测定的截断值的信号的样品被认为是癌症阳性。

[0563] 一相关实施例中,以流通或测试条方式进行测定,其中结合剂被固定在一膜如硝酸纤维素。流通试验中,样品中的多肽随样品流过膜时结合于已固定的结合剂。然后标记的第二结合剂在含第二结合剂的溶液流过该膜时,结合于结合剂-多肽复合物。然后如上所述检测结合的第二结合剂。测试条方式中,将结合剂所结合的膜的一端浸在含样品的溶液中。样品沿着膜移动,通过含第二结合剂的区域,进入固定结合剂的区域。固定抗体区域中聚集的第二结合剂表明有癌症存在。通常该部位聚集的第二结合剂产生一种模式,如可用肉眼看的线条。缺乏此模式表示阴性结果。一般在上述形式的双抗体夹心测定中,当生物样品含有的多肽水平足以产生阳性信号时,选择固定于膜上的结合剂的量以产生肉眼可辨别的模式。这类测定中所用的结合剂优选抗体和其抗原结合片段。固定在膜上的抗体量优选约 25ng-1 μ g,更优选约 50ng-500ng。这类试验一般用很少量的生物样品进行。

[0564] 当然,现有的许多其它测定方案也适合采用本发明的肿瘤蛋白或结合剂。以上所述仅是示范性的。例如本领域普通技术人员懂得,易对上述方案进行改进而采用血液恶性肿瘤相关多肽来检测与生物样品中此类多肽结合的抗体。检测这类血液恶性疾病相关肿瘤蛋白特异性抗体可能与癌症的存在相关。

[0565] 或者,也可根据存在能与生物样品中血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白特异性反应的 T 细胞测定癌症。某些方法中,将分离自病人的含 CD4⁺T 或 / 或 CD8⁺T 细胞的生物样品与血液恶性肿瘤相关肿瘤多肽一起培育,检测编码多肽的多核苷酸、和 / 或表达至少一种多肽的免疫原性部分的 APC,及特异性激活的 T 细胞存在与否。合适的生物样品包括但不限于分离的 T 细胞。例如可用常规技术(如 Ficol1-Hypaque 密度梯度离心外周血淋巴细胞)分离病人的 T 细胞。可体外 37°C 培养 T 细胞与多肽(如 5-25 μ g/ml)2-9 天(一般 4 天)。可能需要在缺少血液恶性肿瘤相关肿瘤多肽时培养另一等分 T 细胞样品作为对照。对于 CD4⁺T 细胞,优选通过评价 T 细胞的增殖来测定其激活。对于 CD8⁺T 细胞,优选通过评价细胞毒活性来测定其激活。与无此病患者相比,增殖水平至少高两倍,和 / 或细胞毒活性至少高 20% 表明该病人患有癌症。

[0566] 如上所述也可根据生物样品中编码血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白的 mRNA 水平来检测癌症。例如可在聚合酶链反应(PCR)测定中采用至少二种寡核苷酸引物来扩增衍生自生物样品的血液恶性肿瘤相关肿瘤 cDNA 的一部分,其中至少一种寡核苷酸引物对编码血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白的多核苷酸有特异性(即与之杂交)。然后用本领域熟知的技术(如凝胶电泳)分离和检测扩增的 cDNA。类似地,可在杂交测定中采用能特异性杂交编码血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白的多核苷酸的寡核苷酸探针,检测生物样品中存在的编码肿瘤蛋白的多核苷酸。

[0567] 为了能在测定条件下杂交,寡核苷酸引物和探针应含有的寡核苷酸序列应与至少长 10 个核苷酸,优选至少长 20 个核苷酸的编码血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白的多核苷酸一部分的同一性至少 60%,优选至少约 75%,更优选至少约 90%。优选在上述中等严谨条件下,寡核苷酸引物和 / 或探针与编码所述多肽的多核苷酸杂交。可用于所述诊断方法的寡核苷酸引物和 / 或探针长度最好至少 10-40 个核苷酸。一优选实施例中,寡核苷酸引物含本申请书所述序列的 DNA 分子的至少 10 个毗连核苷酸,更优选至少 15 个毗连核苷酸。PCR 测定和杂交测定技术是本领域熟知的(见例如 Mullis 等, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51 ;263,1987 ;Erlich 编《PCR 技术》Stockton Press, NY,1989)。一优选测定

采用 RT-PCR, 其中 PCR 与逆转录相结合。RNA 一般提取自生物样品如活检组织并逆转录产生 cDNA 分子。用至少一个特异性引物作 PCR 扩增, 产生的 cDNA 分子可分离并用凝胶电泳观察。对取自待测病人和取自非患癌症的个体的生物样品进行扩增。扩增反应可在横跨二个数量级的几种 cDNA 稀释液中进行。待测病人样品几种稀释液中的表达比非癌性样品的相同稀释度大 2 倍或以上通常视为阳性。

[0568] 另一实施例中, 上述组合物可用作癌症进展的标志。此实施例中, 可随时进行癌症诊断的上述测定, 且评价反应性多肽或多核苷酸水平的变化。例如, 可在 6 个月至 1 年中每隔 24-72 小时进行一次测定。然后按需要进行。通常这些病人中癌症发展时, 检测到的多肽或多核苷酸水平随时间而增加。相反, 当反应性多肽或多核苷酸水平保持恒定或随时间而降低时, 则癌症没有进展。

[0569] 某些体内诊断测定可直接在肿瘤上进行。这类试验包括使肿瘤细胞与结合剂接触。然后结合的结合剂可直接检测或通过报道基因间接检测。这类结合剂也可用于组织学。或者, 这类应用中可采用多核苷酸探针。

[0570] 如上所述, 为了提高灵敏度, 可测定给定样品中的多种血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白标记。显然在一个试验中可联用本文提供的对不同蛋白质特异的结合剂。另外, 可同时采用多个引物和探针。可根据常规试验选择肿瘤蛋白标记来确定能导致最佳灵敏度的组合。此外, 或者本文提供的肿瘤蛋白的测定可与其它已知肿瘤抗原的测定联合应用。

[0571] 4.24 制备 DNA 序列

[0572] 通过基于 PCRTM 的扣除分离了编码血液恶性肿瘤相关抗原部分的 cDNA 分子的某些核酸序列。此技术用来规范差异性表达的 cDNA, 有利于回收罕见的转录物, 还具有用小量 Poly A RNA 材料富集的 cDNA 和没有多轮杂交的优点。为获得在非霍奇金淋巴瘤中抗原的过度表达, 用三个 T 细胞非霍奇金淋巴瘤 mRNA 的集合体制备的实验对象文库进行了两次扣除。此两个独自扣除的文库具有驱动 cDNA 的不同集合体。驱动 #1 含有从特定的正常组织 (淋巴结、骨髓、T 细胞、心脏和脑) 制备的 cDNA, 此扣除产生文库 TCS-D1 (T 细胞非霍奇金淋巴瘤扣除文库具有驱动 #1)。驱动 #2 含非特定的正常组织 (结肠、大肠、肺、胰、脊髓、骨骼肌、肝、肾、皮肤和脑), 此扣除产生文库 TCS-D2 (T 细胞非霍奇金淋巴瘤扣除文库具有驱动 #2)。用三个 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 mRNA 的集合体制备的实验对象文库进行另二次扣除。此两个独自扣除的文库具有驱动 cDNA 的不同集合体。驱动 #1 含有从特定的正常组织 (淋巴结、骨髓、B 细胞、心脏和脑), 此扣除产生文库 BCNHL/D1 (B 细胞非霍奇金淋巴瘤扣除文库具有驱动 #1)。驱动 #2 含非特定的正常组织 (脑, 肺, 胰, 脊髓, 骨骼肌, 结肠, 脾, 大肠和 PBMC), 此扣除产生文库 BCNHL/D2 (B 细胞非霍奇金淋巴瘤扣除文库具有驱动 #2)。从扣除文库产生 PCRTM 扩增的库, 并测序克隆。用各种熟知技术之进一步表征了血液恶性肿瘤相关抗原序列。例如, 可将 PCRTM 扩增的克隆在玻璃载玻片上排成阵列作微阵列分析。为确定组织分布, 阵列的克隆可用作靶, 与不同的第一链 cDNA 探针包括淋巴瘤探针、白血病探针和不同正常组织的探针杂交。可从结果差的 (常规化疗后不能完全缓解或复发的病人) 或结果良好 (获得长期缓解的病人) 的 NHL、何杰金氏病、AML、CML、CLL、ALL、MDS 和骨髓瘤病人诊断时获得的冻存样品产生白血病和淋巴瘤探针。为了分析造血细胞分化期间的基因表达, 可从衍生自健康个体的 CD34⁺、CD2⁺、CD14⁺、CD15⁺ 和 CD19⁺ 的 95% 以上纯化组分中产生探针。

[0573] 多核苷酸变体一般可用该领域已知的任何方法制备,包括化学合成如:固相亚磷酸胺化学合成。也可用标准诱变技术如多核苷酸指导的定点诱变,在多核苷酸序列中导入修饰(见Adelman等,DNA 2:183,1983)。或者,可通过DNA序列的体外或体内转录产生RNA分子,只要将DNA掺入具有合适的RNA聚合酶启动子(如T7或SP6)的载体中。某些部分可用于制备上述的编码多肽。此外,或者可将一部分给予病人,这样在体内产生编码多肽(如通过用编码血液恶性肿瘤相关抗原的cDNA构建物转染抗原呈递细胞如树突细胞,并给予该病人此转染细胞)。

[0574] 与编码序列互补的序列的一部分(即反义多核苷酸)可用作探针,或调节血液恶性肿瘤相关抗原的表达。也可将转录入反义RNA中的cDNA构建物导入细胞或组织中,以促进反义RNA的产生。可用上述反义多核苷酸来抑制血液恶性肿瘤相关抗原的表达。反义技术可通过三股螺旋形成以折衷双螺旋充分打开的能力,用于聚合酶、转录因子或调节分子的结合,从而调控基因表达(见Gee等,Huber and Carr,《分子和免疫方法》,Futura Publishing Co. (Mt. Kisco, NY;1994)。或者可设计能与基因的控制区(如启动子、增强子、转录起始位点)杂交的反义分子,并阻断基因的转录,或通过抑制转录物与核糖体的结合来阻断翻译。也可设计编码序列的一部分或互补序列的一部分作为探针或引物来检测基因表达。可用各种报导基团如放射性核素和酶来标记探针,探针优选至少长10个核苷酸,更优选至少长20个核苷酸,最优选至少长30个核苷酸。如上所述引物优选长22-30个核苷酸。还可修饰任何多核苷酸提高其体内稳定性。可能的修饰包括但不限于在5'和/或3'末端加入侧翼序列;主链中采用硫代磷酸或2'-O-甲基而不是磷酸二酯酶键;和/或加入非传统碱基如肌苷,queosine和Wybutosine以及腺嘌呤、胞苷、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿苷的乙酰基、甲基、硫代和其他修饰形式。

[0575] 可用已建立的重组DNA技术将血液恶性肿瘤相关抗原的多核苷酸连接于各种其他核苷酸序列。例如,可将多核苷酸克隆入各种克隆载体中,包括质粒、噬菌粒, λ 噬菌体衍生物和粘粒。特别感兴趣的载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。一般说,载体含有能在至少一种生物中有功能的复制起点、方便的限制性内切核酸酶位点和一个或多个可选择标记。其它元件取决于所需用途,这是该领域普通技术人员显而易见的。

[0576] 某些实施例中,可制备多核苷酸使其能进入哺乳动物细胞中并在其中表达。如下所述,这类制剂对于治疗特别有用。本领域普通技术人员知道有许多方法可实现多核苷酸在靶细胞中的表达,并可采用任何合适的方法。例如,可将多核苷酸掺入病毒载体(但不限于腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、痘苗病毒或其他痘病毒如禽痘病毒)。将DNA掺入这类载体的技术是本领域普通技术人员熟知的。逆转录病毒还可转移或掺入可选择标记的基因(有助于鉴定或选择转导细胞),和/或靶向组成成分,如编码特异性靶细胞上受体的配体的基因赋予该载体靶向特异性。也可用该领域普通技术人员已知方法利用抗体来实现靶向。

[0577] 其它治疗制剂包括胶体分散系统如大分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠和基于脂质的系统包括水包油乳液、胶团、混合胶团和脂质体。用于体内和体外输送载体的优选胶体系统是脂质体(即人工膜载体)。这些系统的制备和使用是本领域熟知的。

[0578] 4.25 治疗方法

[0579] 本发明其他方面,上述组合物可用于免疫治疗血液恶性肿瘤,包括成人和儿童

AML、CML、ALL、CLL、骨髓增生异常综合症 (MDS)、骨髓增生综合征 (MPS)、继发性白血病、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。此外,所述组合物可用于治疗与对造血前体细胞自身免疫应答相关的疾病如严重再生障碍性贫血。

[0580] 免疫治疗可采各种技术进行,其中提供的化合物或细胞可发挥功能去除病人中的血液恶性肿瘤相关抗原表达细胞。发生这种去除的结果是增强或诱导了对血液恶性肿瘤相关抗原特异的病人中的免疫应答,或表达血液恶性肿瘤相关抗原的细胞。或可在活体内去除血液恶性肿瘤相关抗原表达细胞(如通过对自身骨髓、外周血、或骨髓或外周血组分的处理)。可用本领域的标准技术获得骨髓或外周血组分。

[0581] 这些方法中,通常可给予患者药物组合物和疫苗。“患者”本文用于指任何温血动物,优选人。患者可以患有或不患有血液恶性肿瘤。因此,上述药物组合物和疫苗可用于预防恶性肿瘤的发生或治疗恶性肿瘤患者。可用本领域普遍接受的标准诊断血液恶性肿瘤。可在手术切除原发性肿瘤和/或给予放疗或常规化疗药物或骨髓移植(自身、同种异体或同系)之前或之后给予药物组合物和疫苗。

[0582] 某些实施例中,免疫治疗可以是主动免疫治疗,这种治疗依赖给予免疫应答修饰剂(如本文所述多肽或多核苷酸)体内刺激宿主内源性免疫系统产生抗肿瘤反应。

[0583] 其它实施例中,免疫治疗可以是被动免疫治疗,这种治疗包括输送已建立抗肿瘤免疫反应性的制剂(如效应细胞或抗体)可直接或间接介导抗肿瘤作用,而不需要依赖完整的宿主免疫系统。效应细胞的例子包括上述表达本文所述多肽的T细胞、T淋巴细胞(如CD8⁺T细胞毒T淋巴细胞和CD4⁺T辅助肿瘤浸润淋巴细胞)、杀伤细胞(如天然杀伤细胞和淋巴因子激活的杀伤细胞)、B细胞和抗原呈递细胞(如树突细胞和巨噬细胞)。可将地上述多肽特异的T细胞受体和抗体受体克隆表达,转移入用于过继免疫治疗的其它载体或效应细胞中。也可用上述多肽来产生用于被动免疫治疗的抗体或抗独特型抗体(见上述和美国专利4,918,164)。

[0584] 用于过继免疫治疗的效应细胞可如上所述通过体外生长以足够数量获得。本领域熟知将一个抗原特异性效应细胞体内扩增至几十亿数量并保留抗原识别的培养条件。体外培养条件通常在细胞因子(如IL-2)和非分裂饲养细胞存在的条件下采用抗原间歇刺激。如上所述,本文所述免疫反应性多肽可用于快速扩增抗原特异性T细胞培养物,以产生充分数量的细胞用于免疫治疗。特别是,可用本领域熟知的标准技术,以免疫反应性多肽脉冲刺激或用一种或多种多核苷酸转染抗原呈递细胞如树突细胞、巨噬细胞或B细胞。例如,可用具有适合于提高重组病毒或其它表达系统中表达的启动子的多核苷酸转染抗原呈递细胞。培养的治疗用效应细胞必须能在体内生长并广泛分布和长期存活。研究表明,用补充了IL-2的抗原反复刺激可诱导培养的效应细胞在体内大量生长和长期存活(见例如Cheever等,Immunol. Rev. 157:177,1997)。

[0585] 或者,可将表达上述多肽的载体导入病人的抗原呈递细胞在活体外克隆增殖后用于移植回同一病人。可采用本领域已知的方法将转染的细胞再导入病人中,优选以无菌形式通过静脉内,腔内,腹膜内或肿瘤内给药。

[0586] 本文提供的组合物可单独使用或与常规治疗方案如手术、照射、化疗或骨髓移植(自身、同系、同种异体或无关的)联合。如以下更详细说明,本文提供的结合剂和T细胞可用于净化自身干细胞。这种净化(purging)在骨髓移植、输血或血液组分前可能有益处。

本文所述的结合制剂-T 细胞、抗原递呈细胞 (APC) 和组合物还可用于体外和 / 或体内扩增和刺激 (或致敏) 自身、同种异体、同系或无关的血液恶性肿瘤相关抗原特异性 T 细胞。这些血液恶性肿瘤相关抗原特异性 T 细胞可用于供者淋巴细胞输注。

[0587] 给予本文所述治疗组合物的途径和次数以及剂量随个体之间而异,易于用标准技术确定。一般可通过注射 (如皮内、肌肉内、静脉内或皮下),鼻内 (如吸入) 或口服给予。优选药物组合物和疫苗在 52 周期间给药 1-10 个剂量。优选间隔 1 个月给予 6 个剂量,然后可定期给予加强免疫接种。其它方案也适合各个病人。合适的剂量是如上给予后能促进抗肿瘤免疫应答并超过基础水平 (即未治疗) 至少 10-50% 的量。免疫应答可通过测定病人中的抗肿瘤抗体,或依赖疫苗产生的能体外杀伤病人肿瘤细胞的细胞毒效应细胞来监测。此种疫苗也应能引起免疫应答导致接种疫苗病人比未接种疫苗病人的临床结果改善 (如更常见缓解、完全或部分缓解或较长时间的无病存活)。总之,药物组合物和疫苗含有一种或多种多肽,一个剂量中各多肽的量为每公斤宿主约 100 μ g-5mg 范围。合适的剂量范围因病人的体重而不同,但通常为约 0.1ml-5ml 范围。

[0588] 一般适合的剂量和治疗方案可提供充足量的活性化合物以获得治疗和 / 或预防效果。治疗病人与未治疗病人相比,可通过确定改善临床结果 (如更常见缓解、完全或部分缓解或较长时间的无病存活) 来监测免疫应答。先前存在的对血液恶性肿瘤相关肿瘤抗原的免疫应答得到提高,通常与改善的临床结果相关联。一般可用获自治疗前后病人的样品,以标准增殖、细胞毒性或细胞因子测定,来评价此种免疫应答。

[0589] 其它方面,抑制与血液恶性肿瘤相关抗原表达有关的恶性疾病发生的方法,包括给予自身 T 细胞,此种 T 细胞在对上述血液恶性肿瘤相关抗原多肽或血液恶性肿瘤相关抗原表达的 APC 的反应中已被激活。这种 T 细胞可以是 CD4⁺ 和 / 或 CD8⁺,可如上所述增殖。将这种 T 细胞给予患者的量应能有效抑制恶性疾病的发生。通常为约 1×10^9 - 1×10^{11} 个 T 细胞 / 平方米,静脉内、腔内或肿瘤切除床内给药。该领域技术人员懂得给予的细胞数和次数取决于病人的反应。

[0590] 某些实施例中,可在自身骨髓移植前刺激 T 细胞。可在体内或体外进行此种刺激。对于体外刺激,可在足以刺激 T 细胞的上述条件和时间下使病人的骨髓和 / 或外周血 (或骨髓或外周血组分) 与血液恶性肿瘤相关抗原多肽、编码该抗原多肽的多核苷酸和 / 或表达该抗原多肽的 APC 接触。然后可用标准技术给予病人骨髓、外周血干细胞和 / 或血液恶性肿瘤相关抗原特异性 T 细胞。

[0591] 在有关实施例中,可在同系或同种异体 (相关或无关) 骨髓移植前刺激相关或无关供者的 T 细胞。可在体内或体外进行这种刺激。对于体外刺激,可在足以刺激上述 T 细胞的条件和时间下,使获自相关或无关供者的骨髓和 / 或外周血 (或骨髓或外周血的组分) 与血液恶性肿瘤相关抗原多肽、血液恶性肿瘤相关抗原多核苷酸和 / 或表达该抗原多肽的 APC 接触。然后可用标准技术给予病人骨髓、外周血干细胞和 / 或血液恶性肿瘤相关抗原特异性 T 细胞。

[0592] 在其它实施例中,上述血液恶性肿瘤相关抗原特异性 T 细胞、抗体或及抗原结合片段可用于从生物样品中去除表达血液恶性肿瘤相关抗原的细胞,如自身骨髓外周血 (PB),或骨髓或外周血的组分 (如在给予病人前富集 CD34⁺ 细胞的外周血)。可在足以降低血液恶性肿瘤相关抗原表达细胞至骨髓或外周中骨髓或淋巴细胞总数 10% 以下,优选 5%

以下,更优选 1% 以下的条件和时间下,使生物样品与这类 T 细胞、抗体或抗体片段接触。可采用标准技术使抗体结合于层析柱来实现这种接触。抗原表达细胞保留在柱上。除去这类细胞的程度易用标准方法,如定性和定量 PCR 分析、形态学、免疫组化和 FACS 分析进行测定。然后可用标准技术给予病人骨髓或 PB(或其组分)。

[0593] 4.26 诊断方法

[0594] 通常可根据获自病人的生物样品(如血、血清、痰、尿和/或肿瘤活检)中存在的血液恶性肿瘤相关抗原和/或多核苷酸检测病人中的血液恶性肿瘤。换句话说,血液恶性肿瘤相关抗原可用作表明是否存在此恶性肿瘤的标志。本发明提供的结合剂通常能检测生物样品中结合该试剂的抗原水平。可利用多核苷酸引物和探针来检测编码血液恶性肿瘤相关抗原的 mRNA 水平,这也是血液恶性肿瘤存在与否的标志。通常获自患血液恶性肿瘤病人的样品中血液恶性肿瘤相关抗原的水平,应比获自未患此病个体样品中水平至少高 3 倍。

[0595] 本领域普通技术人员已知有多种测定采用结合剂来检测样品中的多肽标记。见例如 Harlow 和 Lane 《抗体:实验室手册》,Cold Spring Harbor Laboratory,1988。通常病人中是否存在血液恶性肿瘤可通过(a)使病人的生物样品与结合剂接触;(b)检测样品中结合该结合剂的多肽水平;和(c)将多肽水平与预定的截取值比较来测定。

[0596] 一优选实施例中,测定涉及利用固定在一固相支持体上的结合剂来结合样品中的多肽和去除其余成分。然后用含有报导基团和特异性结合该结合剂/多肽复合物的检测试剂检测结合的多肽。这类检测试剂可包括特异性结合多肽或抗体的结合剂,或其它特异性结合该结合剂的试剂,如抗免疫球蛋白、蛋白 G、蛋白 A 或凝集素。或者可用竞争测定,此测定中用一报导基团标记多肽,培育结合剂和样品后,使标记报导基团的多肽与固定的结合剂结合。样品中的成分抑制该标记多肽与结合剂的结合程度,反映了样品与固定的结合剂的反应性。在这类测定中使用的合适的多肽包括上述与结合剂结合的全长血液恶性肿瘤相关肽抗原及其部分。

[0597] 血液恶性相关抗原多肽可附着的固相支持体是本领域普通技术已知的任何材料。例如,固相支持体可以是微量滴定板中的测试孔、或硝酸纤维素或其它合适的膜。或者,支持体可以是珠或圆片,如玻璃、玻璃纤维、乳胶或塑料如聚丙烯或聚氯乙烯。支持体也可以是上述磁性颗粒或光纤传感器,例如见美国专利 5,359,681。结合剂可用该领域技术人员已知专利和科学文献上详细描述的各种技术固定在固相支持体上。本发明内容中,术语“固定”指非共价缔合(如吸附)和共价结合(可以是试剂和支持体上的功能基团之间直接连接或借助交联剂连接)。优选通过吸附于微量滴定板的孔或膜上的固定。此类情况下,可使用合适缓冲液配的结合剂与固相支持体接触适当时间获得吸附。接触时间随温度而异,但通常约 1 小时和约 1 天。一般与塑料微量滴定板的孔接触的结合剂量约 10ng-10 μ g,优选 100ng-1 μ g,能充分固定足够量的结合剂。

[0598] 结合剂与固相支持体共价结合的实现,一般可先使该支持体与双功能试剂反应,该双功能试剂可与支持体和结合剂上的功能基团如羟基或氨基反应。例如,所述结合剂可共价结合于具有用苯醌包被的适当聚合物的支持体上,或通过支持体上的醛基与结合伙伴上的胺基和活化氢缩合(见 Pierce 《免疫技术样本和手册》,1991, A12-13)。

[0599] 某些实施例中,测定是双抗体夹心测定。进行该测定可先使固定在固相支持体(通常是微量滴定板的孔)上的抗体与样品接触,使样品中的多肽结合于固定的抗体。然后

从固定的多肽-抗体复合物中洗去未结合样品,加入含报导基团的检测试剂(优选能结合多肽上不同位点的第二抗体)。然后用适合于特异性报导基团的方法,测定仍结合于固相支持体的检测试剂的量。

[0600] 更具体地说,一旦抗体被固定于上述支持体上,通常封闭该支持体上的剩余蛋白结合位点。合适的封闭剂是本领域普通技术人员已知的,如牛血清白蛋白或 Tween20™(Sigma Chemical Co.St.Louis,MO)。然后,一起培育固定化抗体和样品,使多肽结合于该抗体。培育前可用合适的稀释液如磷酸缓冲液(PBS)稀释样品。一般,适当的接触时间(即培育时间)是足以检测到获自血液恶性肿瘤患者样品中多肽存在的时间。优选的接触时间是获得的结合水平足以达到结合和非结合多肽之间平衡时至少约95%。本领域普通技术人员知道,不难通过测定该时间段出现的结合水平来确定实现平衡所需的时间。通常室温下培育时间约30分钟是足够的。

[0601] 可用适当的缓冲液如含0.1% Tween20™的PBS洗去固相支持体上未结合的样品。然后将含报导基团的第二抗体加到固相支持体上。优选的报导基团包括上述基团。

[0602] 然后,将检测试剂与固定的抗体-多肽复合物培育足够时间以检测结合的多肽。适当的时间通常可通过测定该时间段出现的结合水平来确定。然后洗去未结合的检测试剂,并利用报导基团检测结合的检测试剂。用于检测报导基团的方法取决于该报导基团的性质对于放射性基团,通常适合用闪烁计数或放射自显影方法。可用分光光度法检测染料、发光基团和荧光基团。偶联于不同报导基团(通常为放射性或荧光基团或酶)的生物素可用亲和素检测。一般可加入底物(通常用于特定时间段)然后用分光光度或反应产物的其它分析,来检测酶报导基团。

[0603] 为确定是否存在血液恶性肿瘤,通常将检测到的仍结合于固相支持体的报导基团的信号,与相应于预定的截断值信号作比较。一优选实施例中,测定血液恶性肿瘤的截断值是固定化抗体与非恶性肿瘤患者样品培育时获得的信号平均值。一般,样品产生的信号高于预定截断值三个标准偏差即认为恶性肿瘤阳性。另一优选实施例中,按 Sackett 等,《临床流行病学:临床医学的基础科学》,Little Brow and Co.,1985,106-7 页的方法,用接受手术者曲线测定此截断值。简言之,此实施例中,可从真阳性率(即灵敏度)和假阳性率(100%特异性)配对的曲线来确定此截留值,其对应于诊断试验结果的每种可能截断值。该曲线上最靠近左上角处的截断值(即围住最大区域的值)是最精确的截断值,能产生高于此法所测定的截断值的信号的样品被认为是阳性。或者,可将截断值沿曲线向左移动以最低程度地减少假阳性率,或向右移动以最低限度地减少假阴性率。通常,能产生高于此法所测定的截断值的信号的样品被认为是恶性肿瘤阳性。

[0604] 一相关实施例中,以流通或测试条方式进行测定,其中结合剂被固定在一膜如硝酸纤维素。流通方式试验中,样品中的多肽随样品流过膜时结合于已固定的结合剂。然后标记的第二结合剂在含第二结合剂的溶液流过该膜时,结合于结合剂-多肽复合物。然后如上所述检测结合的第二结合剂。测试条方式中,将结合剂所结合的膜的一端浸在含样品的溶液中。样品沿着膜移动,通过含第二结合剂的区域,进入固定结合剂的区域,固定抗体区域中聚集的第二结合剂表明有癌症存在。通常,该部位聚集的第二结合剂产生一种模式,如可用肉眼观察看的线条。缺乏此模式表示阴性结果。一般在上述形式的双抗体夹心测定中,当生物样品含有的多肽水平足以产生阳性信号时,选择固定于膜上的结合剂的量

以产生肉眼可辨别的模式。这类测定所用的结合剂优选抗体和其抗原结合片段。固定在膜上的抗体量优选约 25ng-1 μ g, 更优选约 50ng-500ng。这类试验一般用很少量的生物样品进行。

[0605] 当然, 现有的许多其它测定方案也适合采用本发明的血液恶性肿瘤相关抗原序列或结合剂。以上所述仅是示范性的。例如本领域普通技术人员懂得, 易对上述方案进行改进而采用血液恶性肿瘤相关抗原多肽来检测与生物样品中此类多肽结合的抗体。血液恶性肿瘤相关抗原的特异性抗体的检测可能存在癌症相关。

[0606] 或者, 恶性肿瘤也可根据存在与生物样品中血液恶性肿瘤相关抗原特异性反应的 T 细胞来测定。某些方法中, 将分离自病人的含 CD4⁺T 或 / 或 CD8⁺T 细胞的生物样品与血液恶性肿瘤相关抗原多肽一起培育, 检测编码这类多肽的多核苷酸、和 / 或表达这类多肽的 APC, 及特异性激活的 T 细胞的存在与否。合适的生物样品包括但不限于分离的 T 细胞。例如, 可用常规技术 (如 Ficol1-Hypaque 密度梯度离心外周血淋巴细胞) 从病人中分离 T 细胞。可体外 37°C 培养 T 细胞与 Mtb-81 或 Mtb-67.2 多肽 (如 5-25 μ g/ml) 2-9 天 (一般 4 天)。可能需要在缺少血液恶性肿瘤相关抗原多肽时培养另一等分的 T 细胞样品作为对照。对于 CD4⁺T 细胞, 优选通过评价 T 细胞的增殖来测定其激活。对于 CD8⁺T 细胞, 优选通过评价细胞毒活性来测定其激活。与无此病患者相比, 增殖水平至少高两倍, 和 / 或细胞毒活性至少高 20%, 表明该病人患血液恶性肿瘤。

[0607] 如上所述, 血液恶性肿瘤也可根据生物样品中编码血液恶性肿瘤相关抗原的 mRNA 水平来检测。例如, 可在聚合酶链反应 (PCR) 测定中采用至少二种寡核苷酸引物来扩增生物样品中血液恶性疾病相关抗原 cDNA 的一部分, 其中至少一种寡核苷酸引物对编码血液恶性肿瘤相关抗原蛋白的多核苷酸有特异性 (即与之杂交)。然后用本领域熟知的技术 (如凝胶电泳) 分离和检测扩增的 cDNA。相似地, 可在杂交测定中采用特异性杂交编码血液恶性肿瘤相关抗原的多核苷酸的寡核苷酸探针, 检测生物样品中存在的编码血液恶性肿瘤相关抗原的多核苷酸。

[0608] 为了能在测定条件下杂交, 寡核苷酸引物和探针应包含的寡核苷酸序列与至少长 10 个核苷酸, 优选至少长 20 个核苷酸的编码血液恶性肿瘤相关抗原的多核苷酸一部分有至少 60%, 优选至少约 75%, 更优选至少约 90% 同一性。优选在上述中等严谨条件下, 寡核苷酸引物和 / 或探针与编码所述多肽的多核苷酸杂交。可用于上述诊断方法的寡核苷酸引物和 / 或探针优选至少 10-40 个核苷酸。PCR 测定和杂交测定技术是本领域熟知的 (见例如 Mullis 等, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263, 1987; Erlich 编, 《PCR 技术》, Stockton Press, NY. 1989)。

[0609] 一优选测定采用 RT-PCR, 其中 PCR 应用与逆转录相结合。一般从生物样品如活检中提取 RNA 并逆转录产生 cDNA 分子。用至少一个特异性引物作 PCR 扩增, 产生的 cDNA 分子可分离并用凝胶电泳观察。对取自待测病人和取自未患血液恶性肿瘤个体的生物样品进行扩增。扩增反应可在横跨二个数量级的几种 cDNA 稀释液中进行。待检病人样品的几种稀释液中的表达比正常个体样品的相同稀释度大 2 倍或以上通常视为阳性。

[0610] 优选实施例中, 采用富含能表达感兴趣血液恶性肿瘤相关抗原的细胞的样品进行此类测定。这种富集可用例如本文提供的结合剂从生物样品的剩余部分去除细胞。然后测定去除的细胞。

[0611] 其它实施例中,血液恶性肿瘤相关抗原可用作监测疾病进展或对血液恶性肿瘤治疗反应的标志。此实施例中,可随时进行上述测定来诊断血液恶性肿瘤,评价反应性多肽水平的变化。例如,可每隔 24-72 小时进行一次测定,持续 6 个月至 1 年,然后按需要进行。通常此种病人中恶性肿瘤发展时,结合剂检测到的多肽水平随时间而增加。相反,当反应性多肽水平保持恒定或随时间而降低时,恶性肿瘤没有进展。

[0612] 某些体内诊断测定可直接在肿瘤上进行。一种此类试验涉及使肿瘤细胞与结合剂接触。然后可直接或通过报告基团间接测定结合的结合剂。此类结合剂也可用于组织学。另外,此类应用中可采用多核苷酸探针。

[0613] 如上所述,为了提高灵敏度,可测定给定样品中的多种标志。显然在一试验中可联用对本文提供的对不同蛋白质特异的结合剂。此外,可同时采用多个引物或探针。标志物的选择可根据常规实验确定能导致最佳灵敏度的组合。

[0614] 其它诊断应用包括检测髓外疾病(如白血病中胚细胞的脑内浸润)。此类方法中,可将结合剂与一示踪物质偶联,并用熟知的技术在体内进行诊断。可如上所述给予偶联的结合剂,并根据测定示踪物质的存在检测髓外疾病。或者,示踪物质可与对血液恶性肿瘤相关抗原特异的 T 细胞结合,根据测定该示踪物质的定位检测髓外疾病。

[0615] 4.27 示范性定义

[0616] 本发明中,核酸序列包括但不限于 DNA(包括但不限于基因组或基因组外 DNA)、基因、肽核酸(PNA)、RNA(包括但不限于 rRNA, mRNA 和 tRNA)、核苷和合适的核酸片断不论获自天然来源、化学合成、修饰的还是全部或部分用人工制备的。

[0617] 除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语具有的含义与本发明所属领域普通技术人员共同理解的相同。虽然也可采用与上述相似或相等的方法和组合物来实施或检验本发明。但本文所述的是优选的方法和组合物。为说明本发明以下术语定义如下:

[0618] 一个、一种:按照长期存在的专利法惯例,单词“一个”和“一种”本申请书和权利要求书中用于指“一个或多个”、“一种或多种”。

[0619] 表达:多核苷酸如结构基因经历胞内加工过程的组合,包括转录和翻译以合成编码的肽或多肽。

[0620] 启动子:一般用于描述调节转录的核酸区域或序列的术语。

[0621] 调控元件:一般用于描述调节转录的核酸区域或序列的术语。

[0622] 结构基因:一种表达以产生编码的肽或多肽的基因或序列区域。

[0623] 转化:将外源多核苷酸序列(如载体、重组 DNA 或 RNA 分子)导入宿主细胞或原生质中,其中外源核酸片断掺入至少一个第一染色体中,或在转化的宿主细胞内能自身复制。转染、电穿孔和裸核酸摄取都是用一种或多种多核苷酸转化宿主细胞的技术的代表性例子。

[0624] 转化细胞:由于细胞中导入了一种或多种外源性多核苷酸因而其核酸补体,已改变的宿主细胞。

[0625] 转基因细胞:任何细胞衍生或再生自转化细胞,或衍生自转基因细胞或来自转化宿主细胞产生的子代或后代。

[0626] 转基因动物:衍生自转化动物细胞的动物或其产生的子代或后代,其中动物的 DNA 含有同种的天然、野生型、非转基因动物中原先不存在的导入的外源核酸分子。术语“转

基因动物”和“转化动物”本领域有时作为同义词使用,指其基因组成经修饰而含有一种或多种外源性核酸片段的动物。

[0627] 载体:一种核酸分子。通常含有能在宿主细胞中复制的和/或与另一核酸区段操作性连接以致附着区段引起复制的 DNA。质粒、粘粒或病毒是示范性的载体。

[0628] 本文所用术语“基本上相应于”、“基本上同源”或“基本上同一”指核酸或氨基酸序列的特征,其中所选核酸或氨基酸序列与所选参比核酸或氨基酸序列相比,至少有约 70% 或约 75% 序列同一性。更具体说,所选序列和参比序列至少有约 76,77,78,79,80,81,82,83,84 或甚至 85% 的序列同一性,和更优选至少有约 86,87,88,89,90,91,92,93,94 或 95% 的序列同一性。更优选高度同源序列在所选序列和参比序列之间的序列同一性大于至少约 96,97,98 或 99%。序列同一性百分比可根据比较序列的全长计算,或可排除总数不到所选参比序列的约 25% 的小量缺失或添加。参比序列可以是一亚组较大的序列,如基因的一部分或侧翼序列或染色体的重复部分。然而,就两种或多种多核苷酸序列的序列同源性而言,参比序列通常含有至少约 18-25 个核苷酸,更通常含约 26-35 个核苷酸,甚至更通常含至少约 40、50、60、70、80、90 或甚至 100 个以上核苷酸。理想地需要高度同源片断,二序列之间同一性百分率应至少约 80%,优选至少约 85%,更优选至少约 90% 或 95% 或更高。这不难用本领域技术人员熟知的一种或多种序列比较算法测定,如 Pearson 和 Lipman (1988) 所述的 FASTA 程序分析。

[0629] 术语“天然产生的”本文用于指某物质可在自然中找到。例如,生物体(包括病毒)中存在的多肽或多核苷酸序列可从天然来源中分离得到而不是在实验室中经人工有意修饰产生的,这就是天然产生的。如本文所用的实验啮齿类动物品系是按经典遗传学选择性饲养的,可认为是天然产生的动物。

[0630] 本文所用的“异源性”是与预定的参比基因序列有关而定义的。例如就结构基因序列而言,异源性启动子定义为,靠近参比的结构基因不天然产生但经实验操作而定位的启动子。同样,异源性基因或核酸区段定义为,靠近参比的启动子和/或增强子元件不天然产生的基因或区段。

[0631] “转录调控元件”指单独或与一个或多个其他核酸序列联合能激活转录的多核苷酸序列。转录调控元件例如可包括一个或多个启动子、一个或多个反应元件、一个或多个负调控元件和/或一个或多个增强子。

[0632] “转录因子识别位点”和“转录因子结合位点”本文用于指一种多核苷酸序列或序列基序,其鉴定为一种或多种转录因子的序列特异性相互作用的位点,通常采取直接的蛋白质-DNA 结合形式。通常可通过 DNA 足迹法、凝胶迁移率变动分析等鉴定转录因子结合位点,或可根据已知的共有序列基序或本领域技术人员已知的其它方法预测。

[0633] 术语“操作性连接”本文用于指两个或多个多核苷酸或两个或多个核酸序列以功能关系连接。当将核酸置于与另一核酸序列功能相关的位置上时,即为该核酸“操作性连接”。例如启动子或增强子操作性连接于编码序列,它就影响编码序列的转录。操作性连接意味着 DNA 序列通常是毗连连接的,需要将两种蛋白编码区毗连连接和在读框内连接。然而,因为与启动子分隔数千个碱基时增强子也能发挥功能,所以内含子序列可有不同长度,一些多核苷酸元件可操作性连接而非毗连。

[0634] “转录单元”指一种多核苷酸序列,其含有至少第一个结构基因(该结构基因操作

性连接于至少第一个顺式作用启动子序列,并任选地操作性连接于该结构基因序列的有效转录所必需的一个或多个其它顺式作用核酸序列),和至少一个该结构基因序列的适当的组织特异性和发育性转录所需的第一个远端调控元件,此结构基因序列操作性位于该启动子和 / 或增强子元件以及有效转录和翻译所需的其它顺式序列(如聚腺苷酸化位点, mRNA 稳定性控制序列等)的控制下。

[0635] 如上所述,本发明一般涉及治疗和诊断癌症如血液恶性肿瘤的组合物和使用该组合物的方法。本文所述的某些说明性组合物包括血液恶性肿瘤相关肿瘤多肽、编码这类多肽的多核苷酸、结合剂如抗体、抗原呈递细胞(APC)和 / 或免疫系统细胞(如 T 细胞)。“血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白”本文用于指在血液恶性肿瘤相关肿瘤细胞中表达的蛋白质,其表达水平用本文提供的代表性试验测定,比正常组织中的表达水平至少高 2 倍,优选至少高 5 倍。某些血液恶性肿瘤相关肿瘤蛋白是能与血液恶性肿瘤患者的抗血清起可检测反应(如 ELISA 或 Western 印迹等免疫测定)的肿瘤蛋白。

[0636] 4.28 生物功能等价物

[0637] 可在本发明的多核苷酸和肽的结构中进行修饰和改变,仍可获得编码具有所需特征的功能性分子,或仍能获得具有所需表达特异性和 / 或性能的遗传构建物。因为通常需要在特定多核苷酸序列中导入一个或多个突变。在多核苷酸或肽序列中导入突变的各种方法是本领域技术人员已知的,可用于制备异源性序列并将该异源性序列导入所选的细胞或动物中。某些情况下,此种突变改变了所得的编码的肽序列,或其它情况下,编码的多核苷酸中一个或多个突变不会改变肽的序列。其它情况下,在多核苷酸构建物的启动子区和 / 或增强子区中导入一个或多个变化,以改变表达元件的活性或特异性,从而改变操作性位于元件控制下的异源性治疗核酸区段的表达。

[0638] 当需要改变由表达构建物编码的一个或多个异源性肽的氨基酸序列以产生等价物,或甚至产生改进的第二代分子时,可按表 1 所列,通过改变该编码 DNA 序列的一个或多个密码子实现氨基酸改变。

[0639] 例如,蛋白质结构中某些氨基酸可被其它氨基酸取代而不会明显失去与抗体的抗原结合区,或底物分子上的结合位点等结构相互结合的能力。因为正是蛋白质的这种相互作用能力和性质确定了该蛋白质的生物功能活性。可在蛋白质序列中进行某些氨基酸序列的替代,当然其基础是 DNA 编码序列,从而获得性能相似的蛋白质。本发明人设想可在上述组合物的肽序列中或编码所述肽的相应 DNA 序列中,进行各种改变而不会明显失去其生物学用途或活性。

[0640] 表 1

[0641]

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

[0642] 进行这些改变可考虑氨基酸的亲水性指数。氨基酸亲水性指数在赋予蛋白质相互作用的生物功能中的重要性是本领域通常了解的 (Kyte 和 Doolittle, 1982, 纳入本文作参考献)。众所接受的是氨基酸的相对亲水性有助于所得蛋白质的二级结构, 进而确定了蛋白质与其它分子如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等的相互作用。根据氨基酸的疏水性和电荷特征排定各氨基酸的亲水性指数是: 异亮氨酸 (+4.5); 缬氨酸 (+4.2); 亮氨酸 (+3.8); 苯丙氨酸 (+2.8); 半胱氨酸 / 胱氨酸 (+2.5); 甲硫氨酸 (+1.9); 丙氨酸 (+1.8); 甘氨酸 (-0.4); 苏氨酸 (-0.7); 丝氨酸 (-0.8); 色氨酸 (-0.9); 酪氨酸 (-1.3); 脯氨酸 (-1.6); 组氨酸 (-3.2); 谷氨酸 (-3.5); 谷氨酰胺 (-3.5); 天冬氨酸 (-3.5); 天冬酰胺 (-3.5); 赖氨酸 (-3.9) 和精氨酸 (-4.5)。

[0643] 本领域知道某些氨基酸可被具有类似亲水性指数或评分的其它氨基酸替代, 仍导致蛋白质具有相似的生物活性, 即仍获得生物功能相等的蛋白质。进行这种变化中, 替代的氨基酸的亲水性指数优选在 ± 2 内, 特别优选在 ± 1 内, 更加特别优选在 ± 0.5 内。本领域

还知道可根据亲水性进行同类氨基酸的替代。美国专利 4,554,101(纳入本文作参考)阐述了蛋白质的最大局部平均亲水性受其毗连氨基酸的亲水性的控制,与该蛋白质的生物性能相关。

[0644] 如美国专利 4,554,101 所详述,氨基酸的亲水性值排列如下:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 $\pm$ 1);谷氨酸(+3.0 $\pm$ 1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 $\pm$ 1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。已知道氨基酸可被具有相似亲水性值的另一氨基酸替代且仍可获得生物等价物,具体是免疫等价蛋白质。这些变化中,替代的氨基酸的亲水性值优选在 ± 2 内,特别优选在 ± 1 ,更加特别优选在 ± 0.5 内。

[0645] 如上所述,氨基酸取替通常是根据氨基酸侧链取代基的相对相似性例如其疏水性、亲水性、电荷、大小等。考虑到上述几种特征的示范性取替是本领域技术人员熟知的,包括精氨酸和赖氨酸;天冬氨酸和谷氨酸;丝氨酸和苏氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0646] 5. 实施例

[0647] 以下实施例显示了本发明的优选实施例。然而本领域技术人员应知道,根据本文公开内容,可对这些公开的具体实施例进行许多改变仍可获得相似和类似结果而不背离附加权利要求书所述的本发明的精神和范围。

[0648] 5.1 实施例 1- 血液恶性肿瘤相关抗原多核苷酸的鉴定

[0649] 此实施例说明非霍奇金淋巴瘤的血液恶性肿瘤相关抗原多核苷酸的鉴定。

[0650] 通过 PCR 扣除法分离得到血液恶性肿瘤相关抗原多核苷酸。从 T 细胞非霍奇金淋巴瘤、B 细胞非霍奇金淋巴瘤和正常组织制备多聚 A mRNA。构建了 6 个 cDNA 文库,进行 PCR 扣除和分析。用 3 个 T 细胞非霍奇金淋巴瘤 mRNA 的集合体构建了二个文库(本文称为 TCS 文库)。用 3 个 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 mRNA 的集合体构建了其它二个文库(本文称为 BCNHL 文库)。用 2 个 T 细胞霍奇金淋巴瘤 mRNA 的集合体构建了其它二个文库(本文称为 HLS 文库)。按 Clontech 的用户手册(PCR-Select cDNA 扣除)进行了 cDNA 合成、杂交和 PCR 扩增,改变如下:1) 用包括 MscI, PvuII, StuI, 和 DraI 的酶混合物代替单一酶 RsaI 限制性消化 cDNA;2) 杂交步骤中提高驱动和测试 cDNA 的比率(至 76 : 1)以产生更严谨的扣除。

[0651] 用驱动 cDNA 的不同集合体单独扣除二个 TCS 文库。驱动 #1 含从特定正常组织(淋巴节、骨髓、T 细胞、心脏和脑)制备的 cDNA,此扣除产生文库 TCS-D1(T 细胞非霍奇金淋巴瘤扣除文库具有驱动 #1)。驱动 #2 含非特定的正常组织(结肠、大肠、肺、胰、脊髓、骨骼肌、肝、肾、皮肤和脑),此扣除产生文库 TCS-D2(T 细胞非霍奇金淋巴瘤扣除文库具有驱动 #2)。

[0652] 类似地,用驱动 cDNA 的不同集合体单独扣除二个 BCNHL 文库。驱动 #1 含从特定的正常组织(淋巴节、骨髓、T 细胞、心脏和脑)制备的 cDNA,此扣除产生文库 BCNHL/D1(B 细胞非霍奇金淋巴瘤扣除文库具有驱动 #1)。驱动 #2 含非特定的正常组织(脑、肺、胰、脊髓、骨骼肌、结肠、脾、大肠和 PBMC),此扣除产生文库 BCNHL/D2(B 细胞非霍奇金淋巴瘤扣除文库具有驱动 #2)。

[0653] 用驱动 cDNA 的不同集合体单独扣除二个 HLS 文库。驱动 #1 含从特定的正常组织（淋巴节、骨髓、B 细胞和肺）制备的 cDNA，此扣除产生文库 HLS-D1（霍奇金淋巴瘤扣除文库具有驱动 #1）。驱动 #2 含非特定的正常组织（结肠、大肠、肺、胰、脊髓、骨骼肌、肝、肾、皮肤和脑），此扣除产生文库 HLS-D2（霍奇金淋巴瘤扣除文库具有驱动 #2）。

[0654] 为了分析此扣除的效果，PCR 扩增扣除及不扣除 PCR 样品稀释液中的肌动蛋白（管家基因）。此外，通过测定各 PCR 扣除文库（TCS-D1、TCS-D2、BCNHL/D1、BCNHL/D2、HLS-D1、HLS-D2）的 96 个克隆的序列，表征了各文库的复杂性和丰余性。这些分析表明文库富含白血病组织中，特别是 T 细胞和 B 细胞非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤样品中过度表达的基因。

[0655] PCR 扩增后，将 cDNA 克隆入 pCR2.1-TOPO 质粒载体（Invitrogen）中。

[0656] 从这些分析中获得的序列用 BLAST2.0 释放法检索公共可利用的数据库中的已知序列。BLAST 默认参数如下：间隙参数：开放间隙 = 0，延伸间隙 = 0；输出参数：期望值 = 10.0，阈值 = 0，排列数 = 250。BLASTN 的检索参数如下：错配 = -3，正向 = 1，词大小 = 0。配对排列窗口同一性百分率 = 22。检索了所有可得到的蛋白质和核酸数据库，包括 PIR，SwissPROT，GenBank，小鼠 EST，人 EST，其它 EST，人重复和高通量序列，及公开的专利和专利申请数据库。

[0657] 从这些检索中鉴定到许多独特序列，它们代表 GenBank 和其它数据库中以前未描述的新的多核苷酸序列。鉴定到许多其它序列似乎含有与数据库中以前鉴定的一个或多个序列有显著同源性，虽然只描述它们为基因组或 cDNA 克隆但不知其功能。其余序列与已知基因相对应。从此分析获得的克隆概述于待批专利申请 USSN09/796,692 的表 2-6 中。

[0658] 5.2 实施例 2- 用微阵列分析扣除的 cDNA 序列

[0659] 用微阵列分析扣除的 cDNA 序列以评价它们在血液恶性肿瘤和正常组织中的表达。用此方法 PCR 扩增了 cDNA 序列，并用基本上如上述（Shena 等，1995）cDNA 微阵列技术检验了血液恶性肿瘤和正常组织中的 mRNA 表达模式。

[0660] 简言之，将扣除 cDNA 文库分析鉴定的克隆固定并在载玻片上列阵成为微阵列载玻片上的多个复制物，使载玻片与二组不同的探针杂交，各组探针分别位于微阵列载玻片上相应于一独特 cDNA 克隆的位置（一张载玻片或芯片上可排列多达 5500 个克隆）。每张芯片与分别荧光标记了 Cy3 和 Cy5 的一对 cDNA 探针杂交。衍生自血液恶性肿瘤的一组探针用 Cy3 标记，而另一组衍生自正常组织集合体的探针用 Cy5 标记。通常用 1 微克 poly A⁺RNA 来产生各 cDNA 探针。杂交后，扫描芯片并记录 Cy3 和 Cy5 通路的荧光强度。与二组探针杂交后的强度差异（即 Cy3/Cy5 比率）提供了固定在肿瘤和正常组织载玻片上各 cDNA 序列的相对表达水平的信息。这是多重内部质量控制步骤。首先用一组遍在表达基因监测探针质量。其次对照板也可包括酵母 DNA 片段，其互补 RNA 可掺入探针合成中以测定探针的质量和灵敏度的灵敏度。此方法提供的灵敏度为 100000 拷贝的 mRNA 中可测出 1 个，通过在不同位置包含重复的对照 cDNA 元件可确保此技术的重现性。

[0661] 通过在各种微阵列芯片上的微阵列分析血液恶性肿瘤扣除克隆，鉴定到待批专利申请 USSN 09/796,692 的所有 SEQ ID NO:668 中的 SEQ ID NO:1 所述序列，在血液恶性肿瘤中过度表达至少是正常组织中的二倍。

[0662] 5.3 实施例 3- 多核苷酸和多肽组合物：简要描述通过扣除杂交和微阵列分析鉴定

cDNA 克隆和开放读框

[0663] 待批专利申请 USSN 09/796,692 的表 7 列出了本发明分析中获得的多核苷酸序列。显示了 668 个多核苷酸序列和它们的克隆名字标志以及在先临时专利申请中第一次鉴定克隆的序列号和申请日期。

[0664] 待批专利申请 USSN 09/796,692 的表 8 鉴定了该待批专利申请中 SEQ ID NO : 1-SEQID NO :668 的 cDNA 序列分析获得的推测开放读框。显示了用于产生该开放读框的多核苷酸序列相应 DNA 序列中的序列标志、克隆名称、翻译框、起始和终止核苷酸。

[0665] 待批专利申请 USSN 09/796,692 的表 9 鉴定了用上述扣除文库和微阵列方法获得的其它具体血液恶性肿瘤相关的 cDNA 序列组。这些序列在该待批专利申请中命名为 SEQ ID NO :2533-SEQ ID NO :9597,表中还显示了最初的克隆名称,和在先临时专利申请中第一次描述克隆的序列号和申请日期。

[0666] 5.4 实施例 4- 通过扣除杂交和微阵列分析鉴定 cDNA 克隆和 Orf 的其它分析

[0667] 此实施例描述了白血病肿瘤特异 cDNA 和组织特异 cDNA 的微阵列分析。

[0668] 微阵列分析识别很多在特异组织 / 肿瘤中过度表达的潜在基因。然而,这些基因通常是已知基因或随后用实时 PCR 分析发现具有较宽表达模式 (expression profile) 的基因。本公开描述了将微阵列分析 (CorixArray) 和比较公共数据库相结合以确定和按重点排列实时分析的候选序列,从而可以更加有效的方式鉴定具有较好表达模式的序列。

[0669] 用 Corixa 白血病 / 淋巴瘤芯片 #3(Lyc3) 测得与正常组织相比,克隆在淋巴瘤样品中过度表达。被分析的克隆最初随机挑取自淋巴瘤 PCR 扣除文库 :B- 细胞非霍奇金淋巴瘤文库 (BCNHL/D1 和 BCNHL/D2 ;CID000153) ;T- 细胞非霍奇金淋巴瘤文库 (TCS-D1 和 TCS-D2 ;CID000166) ;霍奇金淋巴瘤文库 (HLS-D1 和 HLS-D2 ;CID000204 和 CID000275) 和 Clontech 产生的 T8 白血病 PCR 扣除文库。排列了总共 5184 个克隆 :2304 个来自 BCNHL 文库,288 个来自 TCS 文库,1344 个来自 HLS 文库,960 个来自 Clontech-T8 文库。此外,从上述文库中选择已经用白血病 / 淋巴瘤芯片鉴定的 288 个克隆在 LyC3 上再分析。

[0670] 用载体特异性引物通过 PCR 扩增排列用的 cDNA 插入物。用 43 个探针对探测这些阵列。用 CorixArray 计算分析进行分析。该分析包括用两组探针确定特定元件 (cDNA) 平均或中位值杂交信号的比例。该比例反应了元件 (cDNA) 在探针群体内过度表达或表达不足。建立探针组以鉴定在探针组 #1 中高度差异表达的元件 (cDNA)。探针组 #1 通常包括 20 个肿瘤 RNAs,每个探针代表一个淋巴瘤亚组 (如 B- 细胞非霍奇金淋巴瘤、T- 细胞非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤)。组 #2 中的探针包括 16T 必需和非必需的正常组织 (参见图 4)。阈值 (在探针组 #1 中的过表达倍数) 设在 3.0。设定这一阈值是为了鉴别基于芯片质量可能被重复检测的过度表达的元件。序列最初根据其 CorixArray 分析分选,尤其是基于它们的平均信号 2 值。

[0671] 平均信号 $2 < 0.1$ 的序列可被认为是在正常组织中低表达 / 不表达的序列。平均信号 2 在 0.1 和 0.2 之间的序列可被认为是在正常组织中可能有一些表达的克隆。平均信号 $2 > 0.2$ 的序列可被认为是在一些正常组织中可能表达的克隆。

[0672] 5.5 实施例 5- 鉴定具有与 CD20 和 CD52 有相同组织表达模式的候选基因

[0673] 此实施例鉴定了与 CD20 和 CD52 有类似组织表达模式的白血病肿瘤和组织特异性基因 (图 3)。抗这两种标记的抗体被用来治疗血液恶性疾病和其它与这些标记的表达有关

的疾病,即 FDA 批准的 Rituximab(抗 CD20Ab)和 Campath(抗 -CD52Ab)。我们的候选基因和 CD20 和 CD52 之间基因表达的类似性提示,所述基因作为诊断和治疗血液恶性疾病和其它与所述一种或多种抗原的表达有关的癌性和非癌性疾病的化合物也是有用的。

[0674] 实时 PCR 被用来比较候选基因的表达模式和 CD20 和 CD52 的表达模式。图 8 说明了候选基因在造血亚组和血液恶性肿瘤中的表达。这张图中总结的数据显示,联合使用 PCR 扣除的 cDNA 文库、微阵列分析和实时 PCR 可以鉴定在正常 B- 细胞、淋巴瘤、骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病和急性髓性白血病中差异表达的基因。

[0675] 5.6 实施例 6- 一种与 CD20 和 CD52 有类似表达模式的基因 Ly1484(SEQ ID NO : 16-18 和 120-121) 的分析

[0676] 此实施例说明了用来鉴定用作治疗剂、诊断剂等的抗原的典型程序,以及用于开发白血病 / 淋巴瘤疾病的治疗剂和诊断剂的优选方法。首先,用 PCR 扣除文库克隆鉴定白血病 / 淋巴瘤细胞中高度富集的候选基因。然后,通过微阵列分析法分析扣除的 cDNA 序列以评估它们在血液恶性肿瘤和正常组织中的表达。由于微阵列分析通常识别的基因是已知基因或随后用实时 PCR 分析发现具有较宽表达模式的基因,微阵列分析和比较公共数据库相结合以确定用按重点排列用于分析的候选序列。然后,用实时 PCR 来分析各种血液亚组中的表达模式。一些情况下,进一步的分析集中在与已知治疗剂有类似表达模式的抗原上。对于这些基因,结构预测程序被用来鉴定跨膜结构域,用人体外致敏产生了抗原特异性 CTL,并产生了人源化的单克隆和多克隆抗体,这些抗体作为试剂被用于诊断和治疗恶性疾病和与抗原表达有关的自身免疫疾病。

[0677] Ly1484P PCR 扣除文库克隆序列与 Genbank 克隆 KIAA1607(登录号 XM033378、XM033379 和 AB046827) 和 FJL00111(登录号 AK024502) 相匹配。用微阵列分析和实时 PCR 证实了 Ly1484 的过表达。Ly1484P 在 B 细胞瘤中过度表达,而在正常组织中的表达限于正常 B- 细胞。

[0678] 用 Genbank 数据库获得了候选 Ly1484P 的全长序列。Ly1484P 被绘制在人染色体 10 上。Ly1484P 具有长型和短型(长型-SEQ ID NO :120 ;短型-SEQ ID NO :121)。Ly1484P 的 TMpred 分析表明此蛋白质含有一个跨膜结构域。采用 TSITES 程序还鉴定了 T- 辅助细胞表位(图 7 和 8)。产生了多肽,这些多肽被用来产生对 Ly1484P 特异的抗体。这些人源化的单克隆抗体可用来(共轭或非共轭的)诊断和治疗恶性疾病和与 Ly1484 的表达有关的自身免疫疾病。

[0679] 5.7 实施例 7- 跨膜结构域的鉴定

[0680] 用精通本领域的技术人员熟知的结构预测程序来鉴定本文所述候选抗原中的跨膜结构域。

[0681] 对于 Ly1728P, SEQ ID NO :2 的氨基酸残基 6-22、47-65、227-243 和 228-245 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0682] 对于 Ly1732P, SEQ ID NO :4 的氨基酸残基 60-76 和 55-76 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0683] 对于 Ly1888P, SEQ ID NO :6 的氨基酸 1-22、3-21、52-68、254-273、252-273 和 256-272 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0684] 对于 Ly1452P, SEQ ID NO :10(剪接变体 1) 的氨基酸 354-375、355-377 和 425-441

被鉴定为假定的跨膜结构域, SEQ ID NO :12(剪接变体 2) 的氨基酸 354-375、355-377 和 425-441 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0685] 对于 Ly1462P, SEQ ID NO :15 的氨基酸 2-23、3-21、369-385、976-999、977-993 和 979-1000 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0686] 对于 Ly1484P, SEQ ID NO :18 的氨基酸 51-67、322-338、666-682、736-752、1078-1094、24-43、53-69、118-136、319-335、730-752、1586-1602、48-69、88-109、114-135、196-217、300-321、323-344、389-410、502-523、659-680、714-735、1076-1097、1158-1179 和 1321-1342 被鉴定为假定的跨膜结构域, SEQ ID NO :120 的氨基酸 10-86、63-84、118-139、480-501、562-583、725-746、70-86、113-129、134-156、280-296、481-497、560-577、653-674、721-738、734-752、833-869、879-895、990-1006、1023-1048、1070-1087、1112-1138、1135-1170 和 1146-1170 被鉴定为假定的跨膜结构域, SEQ ID NO :121 的氨基酸 94-129、102-123、367-383、394-423、447-464 和 493-513 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0687] 对于 Ly1486P, SEQ ID NO :21 的氨基酸 24-40 和 24-45 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0688] 对于 Ly1693P, SEQ ID NO :26 的氨基酸 47-63、80-96、114-130、158-174、207-223、237-253、289-305、117-134、144-160、167-184、516-535、44-65、85-106、111-132、150-171、204-225、242-263 和 290-311 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0689] 对于 Ly1715P, SEQ ID NO :29 的氨基酸 38-54、38-56 和 34-55 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0690] 对于 Ly1727P, SEQ ID NO :32 的氨基酸 68-100、214-234、304-320、84-105、217-238 和 302-323 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0691] 对于 Ly1905P, SEQ ID NO :40 的氨基酸 68-100、214-234、84-105 和 217-238 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0692] 对于 Ly1885P, SEQ ID NO :35 的氨基酸 218-234、219-235、626-654 和 219-240 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0693] 对于 Ly663S, SEQ ID NO :43 的氨基酸 22-38、41-57、60-76、92-108、242-258、20-38、23-57、60-77、86-102、241-257、14-35、89-110 和 248-269 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0694] 对于 Ly664S, SEQ ID NO :45 的氨基酸 11-27、15-31、74-93、209-227、8-29 和 67-88 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0695] 对于 Ly667S, SEQ ID NO :48 的氨基酸 13-31、139-157、184-202、231-247、329-351、435-451、473-490、609-626、685-705、688-704、7-28、233-254 和 685-706 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0696] 对于 Ly677S, SEQ ID NO :54 的氨基酸 149-165、10-30、144-165、7-28 和 144-165 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0697] 对于 Ly1891P, SEQ ID NO :56 的氨基酸 31-47、66-82、93-109、128-144、171-187、205-221、242-258、31-48、64-82、94-111、120-145、170-187、205-221、244-266 和 29-50、63-84、93-114、124-145、168-189、206-227 和 241-262 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0698] 对于 CD138, SEQ ID NO :58 的氨基酸 255-271、4-21、258-276、6-27 和 256-277 被

鉴定为假定的跨膜结构域。

[0699] 对于 CD22, SEQ ID NO :61 的氨基酸 688-704、3-19、29-46、157-174、185-201、349-366、386-406、479-505、688-709、1-22、159-180 和 689-710 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0700] 对于 CD79 β , SEQ ID NO :66 的氨基酸 161-177、4-29、59-78、160-181、4-25 和 161-180 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0701] 对于 Ly1454P, SEQ ID NO :74 的氨基酸 5-22、231-249、7-28 和 425-446 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0702] 对于 Ly1485P, SEQ ID NO :76 的氨基酸残基 2-19 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0703] 对于 Ly1500P, SEQ ID NO :80 (剪接变体 1) 的氨基酸残基 10-31 和 327-344 被鉴定为假定的跨膜结构域, SEQ ID NO :82 (剪接变体 2) 的氨基酸残基 13-38、71-92 和 388-405 被鉴定为假定的跨膜结构域, SEQ ID NO :84 (剪接变体 3) 的氨基酸 25-46 和 341-359 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0704] 对于 Ly1516P, SEQ ID NO :87 的氨基酸 142-158、177-193、207-223、238-254、271-287、142-158、177-193、207-223、238-254 和 271-287 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0705] 对于 Ly1729P, SEQ ID NO :101 的氨基酸 420-436 431-437 和 412-433 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0706] 对于 Ly1859P, SEQ ID NO :107d 氨基酸残基 128-144、293-311、408-425、435-454、465-483、516-533、290-311 ;435-456 和 507-528 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0707] 对于 Ly1866P, SEQ ID NO :109 的氨基酸 47-65 和 50-71 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0708] 对于 Ly669S, SEQ ID NO :114 的氨基酸 489-505、13-29、38-57、73-89、94-114、252-268、307-324、329-346、489-509、4-25 和 486-507 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0709] 对于 Ly672S, SEQ ID NO :117 的氨基酸 11-27、284-300、325-341、345-361、407-423、7-28、102-118、174-198、283-299、325-341、347-383、403-423、431-454、473-492、11-32、286-307、322-343、345-366、404-425、430-451 和 469-490 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0710] 对于 Ly675S, SEQ ID NO :119 的氨基酸 154-170、187-203、428-444、518-534、846-862、81-97、155-172、235-251、374-391、428-444、477-195、520-542、539-573、694-714、807-823、843-862、50-71、77-98、145-166、518-539、802-823 和 845-866 被鉴定为假定的跨膜结构域。

[0711] 5.8 实施例 8- 实时 PCR 分析以鉴定在慢性淋巴细胞白血病和多发性骨髓瘤中过长表达的抗原

[0712] 用实时 PCR 证实候选抗原在慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 和多发性骨髓瘤 (MM) 中的过度表达。

[0713] 实时 PCR 评价了扩增期间 PCR 产物积累的水平 (参见例如 Gibson 等, Genome Research 6 :995-1001 (1996) ;Heid 等, Genome Research 6 :986-994 (1996))。实时 PCR 可以定量评估多个样品中的 mRNA 水平。简言之, mRNA 提取自肿瘤和正常组织并用标准技术制备 cDNA。例如, 可用 Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, CA) 9700 棱

镜仪进行实时 PCR。可用例如 Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, CA) 提供的引物表达程序为感兴趣的基因设计匹配的引物。引物和探针的最佳浓度最初由本领域的一般技术人员确定,并通过商业如 Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, CA) 获得对照 (如 β -肌动蛋白) 引物和探针。为测定样品中特定 RNA 的量,用含有感兴趣基因的质粒产生了标准曲线。用实时 PCR 中确定的 Ct 值产生标准曲线,该值与测定中所用的最初 cDNA 浓度有关。感兴趣基因的 10^{-10^6} 拷贝的标准稀释通常是足够的。此外,产生了对照序列的标准曲线。出于比较的目的,可将组织样品的最初 RNA 含量标准化为对照的量。

[0714] 结果概略

[0715]

抗原	CLL	MM
Ly1728P	否	是
Ly1732P	是	是
Ly1888P	是	否
Ly1452P	是	否
Ly1462P	是	否
Ly1484P	未测定	未测定
Ly1486P	是	否
Ly1677P	是	否
Ly1682P	是	否
Ly1693P	是	是
Ly1697P	是	否
Ly1715P	是	是
Ly1727P	是	是
Ly1905P	是	是
Ly1885P	是	是
Ly663S	是	是
Ly664S	是	是

Ly667S	是	是
Ly677S	是	是
Ly1891P	未测定	未测定
CD138	否	是
CD22	是	否
CD79 β	是	是
Ly1450P	未测定	未测定
Ly1451P	是	是
Ly1454P	是	未测定
Ly1485P	未测定	未测定
Ly1500P	是	否
Ly1516P	未测定	未测定
Ly1678P	是	是
Ly1680P	是	否
Ly1686P	是	否
Ly1687P	是	否
Ly1706P	是	是
Ly1712P	是	是
Ly1729P	是	是
Ly1848P	是	是
Ly1859P	是	否
Ly1866P	是	是
Ly1867P	是	否
Ly1868P	是	否

Ly1886P	是	否
Ly669S	是	是
Ly672S	是	是
Ly675S	是	是

[0716] 这些序列方便地用于诊断、治疗和预防这些基因过度表达的恶性疾病,包括多发性骨髓瘤、B- 细胞淋巴瘤和 B-CLL。例如,单克隆抗体,包括人源化的单克隆抗体可用于诊断和治疗与抗原表达有关的疾病,所述抗原在血液恶性肿瘤中过度表达。

[0717] 5.9 实施例 9- 与 CD20 和 CD52 有类似表达模式的其它抗原的序列分析、表达分析和结构分析

[0718] 结果概略

[0719]

抗原	序列分析
Ly1728P	FOAP-2(“在巨噬细胞中过度表达的新基因”)
Ly1732P	B- 细胞成熟因子 (BCM), 肿瘤坏死因子受体超家族, 成员 17。BCM 结合 TALL-1、TNF 家族的成员
Ly1888P	抗 -Fas- 诱导的凋亡蛋白 (TOSO); 实验显示在细胞表面上表达
Ly1452P	抗 -Fas- 诱导的凋亡蛋白 (TOSO); 实验显示在细胞表面上表达
Ly1462P	II 型人 EB 病毒补体受体
Ly1484P	KIAA1607 (GenBank 中存在的 cDNA 序列)
Ly1486P	IgE 的 Fc 片段, 低亲和力 II 受体
Ly1677P	新
Ly1682P	新
Ly1693P	趋化因子受体 CXCR4
Ly1697P	新
Ly1715P	凝集素样 NK 细胞受体
Ly1727P	hpim-2 基因 (小鼠 pim-2 癌基因的同系物) 的剪接变体。预计是在细胞增殖中有作用的丝氨酸苏氨酸激酶

[0720]

Ly1905P	hpim-2 基因 (小鼠 pim-2 癌基因的同系物) 的剪接变体。预计是在细胞增殖中有作用的丝氨酸苏氨酸激酶
Ly1885P	细胞周期进程 8 蛋白的明显剪接形式,细胞周期进程 8 蛋白是参与细胞周期进程恢复的一个蛋白质家族 (通过在 G1 期中阻断抑制)
Ly663S	白细胞表面抗原 CD37
Ly664S	与各种硫氧还蛋白有 30-40% 同一性的具有未知功能的蛋白
Ly667S	脑信号蛋白 B (脑信号蛋白是一大类分泌并跨膜的蛋白质家族 ; 脑信号蛋白域出现在肝细胞生长因子受体中)
Ly677S	白细胞表面受体 CD79a
Ly1891P	孤独 G- 蛋白偶联受体 (GPCR5D)
CD138	CD138
CD22	CD22
CD79 β	CD79 β
Ly1450P	新 (匹配 GenBank 序列 FLJ23202 ; 无 ORF)
Ly1451P	新 (匹配 GenBank 序列 FLJ39358 ; 无 ORF)
Ly1454P	新 (匹配 GenBank 序列 FLJ40597 ; ORF)
Ly1485P	新 (仅匹配基因组 DNA)
Ly1500P	BANK 蛋白 : 具有锚蛋白重复的 B- 细胞支架蛋白 ; B- 细胞抗原受体刺激时酪氨酸磷酸化的底物
Ly1516P	Rh- 相关抗原 CD47, 信号转导蛋白整联蛋白相关蛋白
Ly1678P	新 (仅匹配基因组 DNA)
Ly1680P	新 (仅匹配基因组 DNA)
Ly1686P	新 (仅匹配基因组 DNA)
Ly1687P	新 (仅匹配基因组 DNA)
Ly1706P	新 (仅匹配基因组 DNA)

Ly1712P	新
Ly1729P	造血细胞特异的 Lyn 底物 1(HCLS1) 蛋白 ;具有与螺旋 - 转角 - 螺旋显著同一性的 N- 末端半心重复序列 ;C- 末端一半与作为蛋白质酪氨酸激酶底物的结构域类似,提示这种蛋白质可能参与信号转导和基因表达的调节

[0721]

Ly1848P	新 (仅匹配基因组 DNA)
Ly1859P	新 (匹配 GenBank 序列 FLJ00140 ;ORF)
Ly1866P	与 GenBank 中的一种基因匹配是指“与假定的蛋白质 PR01722 类似”
Ly1867P	新 (仅匹配基因组 DNA)
Ly1868P	新 (仅匹配基因组 DNA)
Ly1886P	新 (仅匹配基因组 DNA)
Ly669S	胞内粘附分子 3(ICAM3)
Ly672S	顺氯氨铂抗性相关蛋白 CRR9p
Ly675S	KIAA0906 (GenBank 中存在的部分 cDNA/ 蛋白质序列)

[0722] 5.10 实施例 10-Ly1451 的序列分析

[0723] 衍生自淋巴瘤 PCR 扣除文库克隆的 Ly1451 (SEQ ID NOS :69-71 和 124) 序列被用来查询一些公共数据库,包括 GenBank 和 GenSeq。未检测到 5' - 近端 51bp 的匹配 (> 90 同一性) 提示该序列可能含有重复元件。对 LifeSeq 数据库 (Incyte) 进行 BLASTN 检索鉴定出一个 980bp 模板 (模板 #1076101.8 ;SEQ ID NO :124,它含有 Ly1451 的所有 240bp。该模板由 6 个克隆的序列构成,其中 2 个 (33%) 来自血液 / 免疫组织文库。模板 #1076101.8 是 bin 的一部分,含有 11 个来自总共 104 个克隆的模板,其中 12 个 (9%) 来自血液 / 免疫组织文库。

[0724] 该序列 (SEQ ID NO :124) 被用来进一步检索公共数据库,但未得到其它序列。然而,这些检索表明该序列是一种人内源性反转录病毒序列 (HERV),它编码与部分整合酶和包膜基因相应的多肽。具有 ATG 转录起始位点的单个 ORF 包含在 LS1076101.8 的正向阅读中。

[0725] 预计此 ORF (SEQ ID NO :124) 编码的多肽不具有跨膜结构域。

[0726] 5.11 实施例 11- 由与 B 细胞白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤有关的特异性基因 LY1452 编码的 Ly1452 淋巴瘤抗原编码的

[0727] 构建了重组表达的 Ly1452 抗原以便迅速且简便地纯化蛋白质。

[0728] Ly1452 的开放读框被 PCR 扩增,并亚克隆入框内用 His 标记修饰的 pET28 载体中,

并在大肠杆菌中重组表达 (His-Ly1452 :SEQ ID NO :10,482(nt),SEQ ID NO :10,483(蛋白质))。

[0729] Ly1452P 在大肠杆菌中的表达

[0730] 用以下引物 PCR 扩增 LS 编码区域的开放读框：

[0731] PDM-7975' gtgtcacaatctacagtcaggcaggattctcc 3' Tm 64°C

[0732] (SEQ ID NO :10,975)

[0733] PDM-7995' gttatgtagcggccgcttatcatgttgctgcagag 3' Tm 67°C

[0734] (SEQ ID NO :10,976)

[0735] 采用以下条件：

[0736] 10 μ l 10X Herculase 缓冲液

[0737] 1 μ l 10MM dNTPs

[0738] 2 μ l 10 μ M 各种寡核苷酸

[0739] 83 μ l 无菌水

[0740] 1.0 μ l Herculase DNA 聚合酶 (Stratagene, La Jolla, CA)

[0741] 50ng DNA

[0742] 98°C 3 分钟

[0743] 98°C 40 秒 60°C 30 秒 72°C 2 分钟 $\times$ 10 循环

[0744] 98°C 40 秒 60°C 30 秒 72°C 2 分钟 30 秒 $\times$ 10 循环

[0745] 98°C 40 秒 60°C 30 秒 72°C 3 分钟 $\times$ 10 循环

[0746] 98°C 40 秒 60°C 30 秒 72°C 3 分钟 30 秒 $\times$ 10 循环

[0747] 72°C 4 分钟

[0748] PCR 产物用 XhoI 消化并克隆入已经用 Eco72I 和 XhoI 消化的 pPDM His(一种在 5' 末端的框中用 His 标记修饰的 pET28 载体)。构建物通过序列分析证实并转化入 BLR(DE3) pLysS 和 HMS 174pLys S 细胞。

[0749] 还表达了重组蛋白,无组氨酸标记或有其它淋巴瘤抗原。它们也在其它载体中表达,包括其它大肠杆菌构建物、杆状病毒、酵母和哺乳动物表达载体。此重组抗原可用来产生多克隆和单克隆抗体,或用于免疫测定。

[0750] 6. 参考文献

[0751] 以下参考文献提供了对于本文所述的示范性的程序或其它细节的补充,故具体纳入本文作参考。

[0752] 美国专利 3,817,827。

[0753] 美国专利 3,850,752。

[0754] 美国专利 3,901,654。

[0755] 美国专利 3,935,074。

[0756] 美国专利 3,984,533。

[0757] 美国专利 3,996,345。

[0758] 美国专利 4,034,074。

[0759] 美国专利 4,098,876。

[0760] 美国专利 4,235,877。

- [0761] 美国专利 4, 376, 110。
- [0762] 美国专利 4, 429, 008。
- [0763] 美国专利 4, 436, 727。
- [0764] 美国专利 4, 452, 901。
- [0765] 美国专利 4, 489, 710。
- [0766] 美国专利 4, 507, 234。
- [0767] 美国专利 4, 554, 101。
- [0768] 美国专利 4, 569, 789。
- [0769] 美国专利 4, 603, 112。
- [0770] 美国专利 4, 625, 014。
- [0771] 美国专利 4, 638, 045。
- [0772] 美国专利 4, 671, 958。
- [0773] 美国专利 4, 673, 562。
- [0774] 美国专利 4, 683, 195。
- [0775] 美国专利 4, 699, 784。
- [0776] 美国专利 4, 735, 792。
- [0777] 美国专利 4, 751, 180。
- [0778] 美国专利 4, 769, 330。
- [0779] 美国专利 4, 777, 127。
- [0780] 美国专利 4, 866, 034。
- [0781] 美国专利 4, 873, 088。
- [0782] 美国专利 4, 877, 611。
- [0783] 美国专利 4, 897, 268。
- [0784] 美国专利 4, 912, 094。
- [0785] 美国专利 4, 935, 233。
- [0786] 美国专利 5, 017, 487。
- [0787] 美国专利 5, 075, 109。
- [0788] 美国专利 5, 145, 684。
- [0789] 美国专利 5, 151, 254。
- [0790] 美国专利 5, 215, 926。
- [0791] 美国专利 5, 240, 856。
- [0792] 美国专利 5, 350, 840。
- [0793] 美国专利 5, 359, 681。
- [0794] 美国专利 5, 399, 346。
- [0795] 美国专利 5, 399, 363。
- [0796] 美国专利 5, 466, 468。
- [0797] 美国专利 5, 472, 869。
- [0798] 美国专利 5, 543, 158。
- [0799] 美国专利 5, 552, 157。

- [0800] 美国专利 5, 565, 213。
- [0801] 美国专利 5, 567, 434。
- [0802] 美国专利 5, 633, 234。
- [0803] 美国专利 5, 641, 515。
- [0804] 美国专利 5, 738, 868。
- [0805] 美国专利 5, 741, 516。
- [0806] 美国专利 5, 795, 587。
- [0807] 美国专利 5, 811, 128。
- [0808] 美国专利 5, 814, 344。
- [0809] 美国专利 5, 820, 883。
- [0810] 美国专利 5, 853, 763。
- [0811] 美国专利 5, 874, 265。
- [0812] 美国专利 5, 928, 647。
- [0813] 美国专利 5, 942, 252。
- [0814] 美国专利 6, 110, 702。
- [0815] 欧洲专利 No. EP 0, 345, 242。
- [0816] 英国专利 No. GB 2, 200, 651。
- [0817] 国际专利申请公开号 WO 89/01973。
- [0818] 国际专利申请公开号 WO 89/06280。
- [0819] 国际专利申请公开号 WO 91/02805。
- [0820] 国际专利申请公开号 WO 91/16116。
- [0821] 国际专利申请公开号 WO 92/07243。
- [0822] 国际专利申请公开号 WO 94/00153。
- [0823] 国际专利申请公开号 WO 94/20078。
- [0824] 国际专利申请公开号 WO/94/23701。
- [0825] 国际专利申请公开号 WO 95/17210。
- [0826] 国际专利申请公开号 WO 96/02555。
- [0827] 国际专利申请公开号 WO 96/06638。
- [0828] 国际专利申请公开号 WO 96/30516。
- [0829] 国际专利申请公开号 WO 96/33739。
- [0830] 国际专利申请公开号 WO 97/24447。
- [0831] 国际专利申请公开号 WO 99/33488。
- [0832] Aaroston 和 Todaro, J Cell. Physiol. 72 :141-18, 1968。
- [0833] Adelman 等, DNA, 2 :183, 1983。
- [0834] Amin 等, Am. J. Pathol. , 146 :344-56, 1995。
- [0835] Akaza 等, “抗肿瘤应答的表达。卡介苗对膀胱癌细胞的结合和存活性的作用,” Cancer, 72 :558-63, 1993。
- [0836] 美国模式培养物保藏中心《细胞系和杂交瘤目录》, 第 7 版, 1992。
- [0837] Avrameas, “天然抗体:自身识别和生理性自身免疫”, 载于《天然自身抗体及其生

理作用和调节意义》，Shoenfeld 和 Isenberg(编)，CRC Press, Boca Raton, Florida, 1-14 页, 1993。

[0838] Azuma 等, “用海藻糖 6-6’ 二霉菌酸治疗小鼠对流感病毒感染的抗性增强和肺中组织变化之间的相关性”, *Journal of Biological Response Modifiers*, 7 :473-82, 1988。

[0839] Bajorin 等, *Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 7 :A967, 1988。

[0840] Baker 等, “单磷酸酰脂质 A 增强幼鼠的抗体应答的能力” *Infection and Immunity*, 56 :3064-66, 1988a。

[0841] Baker 等, “通过与单磷酸酰脂质 A 结合方法富集抑制性 T 细胞” *Infection and Immunity*, 58 :726-31, 1990。

[0842] Baker 等, “通过无毒性单磷酸酰脂质 A 灭活抑制性 T 细胞活性”, 56 :1076-83, 1988b。

[0843] Baker 等, “影响细菌脂多糖的脂质 A 和内核区寡糖的免疫调节性能的分子结构”, *Infection and Immunity*, 62 :2257-69, 1994。

[0844] Baker 等, “影响脂质 A 及其类似物消除抑制性 T 细胞活性表达的结构特性”, *Infection and Immunity*, 60 :2694-701, 1992。

[0845] Baker 等, “由黑色素瘤衍生的肿瘤浸润淋巴细胞识别黑色素细胞谱系特异性抗原 gp100”, *J. Exp. Med.*, 179 :1005, 1994。

[0846] Banchereau 和 Steinman, *Nature*, 392 :245-51, 1998。

[0847] Banerji 等, “膜脂质组分调节抗脂质体单抗的结合特异性”, *Biochim. Biophys. Acta.*, 689 :319-26, 1982。

[0848] Barnd 等, “人细胞毒性 T 细胞对肿瘤相关粘蛋白的特异性肿瘤组织相容性复合体的非限制性识别”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 :7159, 1989。

[0849] Barnoud 等, *Am. J. Surg. Pathol.*, 24 :830-36, 2000。

[0850] Bartlett 和 Zbar, *J. Natl. Cancer Inst.*, 48 :1709, 1972。

[0851] Bast 等, “卡介苗与癌症” *N. Engl. J. Med.*, 290 :1413-20, 1974。

[0852] Bennett 等, “单磷酸酰脂质 A, 一种脱毒形式的内毒素诱导在卡介苗致敏小鼠的血清中内源性产生细胞毒因子” *J. of Biological Response Modifiers*, 7 :65-76, 1988。

[0853] Berkner, *Biotechniques*, 6 :616-27, 1988。

[0854] Berra 等, *Int. J. Cancer*, 36 :363-66, 1985。

[0855] Berra 等, *J. Neurochem.*, 40 :777-82, 1983。

[0856] Bogoch, “对脑神经节苷酯血清沉淀素的证据”, *Nature*, 183 :392-93, 1960。

[0857] Bouchon 等, *Biochem. Internatl.*, 10 :531-38, 1985。

[0858] Bowen-Pope 等, *Proc. Nat’l Acad. Sci. USA*, 81 :2396-400, 1984。

[0859] Bowness 等, “产气荚膜梭菌外毒素是一种与人 T 细胞受体 V β 6.9 和 V β 22 反应的超抗原”, *J. Exp. Med.*, 176 :893-96, 1992。

[0860] Brade 等, “含有脂质 A 的二磷酸化葡萄糖胺二糖骨架的人造葡萄糖偶联物能结合脂质 A 单抗”, *Infection and Immunity*, 61 :4514-17, 1993。

[0861] Brichard 等, “自身溶细胞 T 淋巴细胞识别 HLA-A₂ 黑色素瘤上编码抗原的酪胺酸酶基因”, *J. Exp. Med.*, 178 :489, 1993。

[0862] Brodin 等, “具有黑色素瘤相关神经节苷酯双唾液酸乳糖基酰神经酰胺 (CD3)

特异性的小鼠单抗也与结构类似物双唾液酸副细胞糖苷酯反应”, Biochim. Biophys. Acta., 837 :349-53, 1985。

[0863] Brooks 等, Clin. Exp. Immunol., 39 :477, 1980。

[0864] Brown 等, J. Biol. Chem., 255 :4980-83, 1980。

[0865] Burchell 等, J. Immunol., 131 :508-13, 1983。

[0866] Bystryn 等, Cancer, 61 :1065, 1988。

[0867] Cahan 等, “人神经外胚层肿瘤抗原 (OFA-I-2) 鉴定为神经节苷酯 GD2”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 :7629-33, 1982。

[0868] Campbell 等, “由膀胱癌细胞表达的胞内粘附分子 -1 :功能作用”, J. Urol., 151 :1385-90, 1994。

[0869] Campbell, 刊载《Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology》, 第 13 卷, Burden 和 Von Knippenberg (编), Amsterdam, Elsevier, 75-83 页, 1983。

[0870] Campbell 等, Int. J. Cancer, 78 :182-88, 1998。

[0871] Carr 和 Morrison, “Re- 脂多糖与红细胞膜相互作用的二步机制”, Rev. Infect. Dis. 6 :497-508, 1984。

[0872] Carubia 等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 120 :500-04, 1984。

[0873] Chang 等, Crit. Rev. Oncol. Hematol., 22 :213, 1996。

[0874] Chase 等, “单磷酸酰脂质 A 对宿主抵抗细菌感染的作用”, Infection and Immunity, 53(3) :711-12, 1986。

[0875] Chen 等, “脱毒脂质 a 对老年小鼠的巨噬细胞的激活” Journal of Leukocyte Biology, 49 :416-22, 1991。

[0876] Chen 等, Cancer Res., 54 :1065-70, 1994。

[0877] Cheng 等, “卡介苗与纤连蛋白羧基末端肝素结合区域的相互作用 :卡介苗介导的抗肿瘤活性的推断” J. Urol., 152 :1275-80, 1994。

[0878] Cheresh 和 Klier, “人黑色素瘤细胞附着于纤连蛋白时双唾液酸神经节苷酯 GD3 优先分布入人黑色素瘤细胞上微突起相关基底膜中” J. Cell. Biol., 102 :1887-97, 1986。

[0879] Cheresh 等, “一种单抗识别人黑色素瘤相关神经节苷酯中的 O- 乙酰唾液酸”, J. Biol. Chem., 259 :7453-59, 1984。

[0880] Cheresh 等, “人黑色素瘤上的双唾液酸神经节苷酯 GD3 作为单抗介导的肿瘤细胞溶解的相关靶抗原”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 :5155-59, 1985。

[0881] Cheresh 等, “双唾液酸神经节苷酯 GD2 和 GD3 参与人黑色素瘤和神经母细胞瘤细胞与胞外基质蛋白的附着”, J. Cell Bio., 102 :688-96, 1986。

[0882] Cheresh 等, “神经节苷酯 GD2 和 GD3 在粘着斑中和人黑色素瘤细胞表面上的定位”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 :5767-41, 1984。

[0883] Cheung 等, “用 GD2 特异性单抗检测骨髓中的神经母细胞瘤细胞”, J. Clin. Oncol., 4 :363-69, 1986。

[0884] Chu 和 Sharom, “神经节苷酯通过阻止白介素 -2 与其细胞表面受体的相互作用抑制 T 淋巴细胞增殖”, Immunology, 79 :10-16, 1993。

- [0885] Cohen, Science, 259 :1691-92, 1993。
- [0886] Colcher 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 :3199, 1987。
- [0887] Coligan 等, 载于《Current Protocols in Immunology》, 第 1 卷, Wiley Interscience. Greene(编), 1998。
- [0888] Coombes 等, Vaccine, 14 :1429-38, 1996。
- [0889] Coulie 等, 由 HLA-A2 黑色素瘤上的自身溶细胞 T 淋巴细胞“识别的一种编码分化抗原的新基因”, J. Exp. Med., 180 :35, 1994。
- [0890] Deavin 等, Mol. Immunol., 33 :145-55, 1996。
- [0891] DeBrujin 等, Eur. J. Immunol., 21 :1963-70, 1991。
- [0892] Dippold 等, “神经节苷酯在人恶性黑色素瘤、表皮肿瘤和正常组织中的免疫组化定位”, Cancer Res., 45 :3699-705, 1985。
- [0893] Dippold 等, “恶性黑色素瘤病人全身应用抗 GD-3 神经节苷酯单抗后肿瘤部位的炎症反应”, Am. Assoc. Cancer Res., 978 :247, 1984。
- [0894] Dippold 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :6115, 1980。
- [0895] Dresser 和 Phillips, 制载于《Immunopotentialization》, CIBA Foundation Symposium 18, Elsevier, Amsterdam, 第 3 页, 1973。
- [0896] Dwivedi 等, “肿瘤性疾病中血浆脂质结合的唾液酸变化”Experientia, 46 :91-94, 1990。
- [0897] Elder, “皮肤癌”, Cancer, 75 :245-56, 1995。
- [0898] Elliott 等, “D- 半乳糖胺负荷小鼠及其增强对脂多糖和单磷酸脂质 a 的敏感性 : 超氧化物的作用” J. Immunol., 10 :69-74, 1991。
- [0899] Euhus 等, Cancer Immunol Immunother., 29 :247-54, 1989。
- [0900] Fawwaz 等, Statutory Invention Registration Patent No. H819, 申请号 6-6-5, 439, 1990。
- [0901] Fischer, Handb. Lipid Res., 6 :123-234, 1990。
- [0902] Fisher-Hoch 等, Proc. Nat’l Acad. Sci. USA, 86 :317-21, 1989。
- [0903] Fitzgerald, “梅毒疫苗 : 环磷酸胺、Ribi 佐剂和吡啶美辛上调其免疫原性可显著地保护兔免受感染攻击”, Vaccine, 9 :265-72, 1991。
- [0904] Fleischmann, Park 和 Hassan, “手术标本上纤连蛋白的表达与对膀胱内卡介苗治疗的反应相关” J. Urol., 149 :268-71, 1993。
- [0905] Flexner 等, Ann. N. Y. Acad. Sci., 569 :86-103, 1989。
- [0906] Flexner 等, Vaccine, 8 :1721, 1990。
- [0907] Foster 等, Cancer Res., 57 :3325-30, 1997。
- [0908] Fraizer 等, Blood, 86 :4704-06, 1995。
- [0909] Fredman 等, Neurol. Res., 8 :123-26, 1986。
- [0910] Freimer 等, “神经节苷酯诱导 T 细胞非依赖性抗体应答”, J. Autoimmun., 6 : 281-89, 1993。
- [0911] Freudenberg 等, “用于检测脂质 A、脂多糖和其它疏水性抗原的抗体的 ELISA”, Infection, 17 :322-24, 1989。

- [0912] Gaiger 等, B100d, 96 :1334, 2000。
- [0913] Garg 和 Subbarao, “全身性和粘膜淋巴样器官对肺炎免疫疫苗的免疫应答随作为佐剂的单磷酸脂质 a 的寿命和效果而变数”, *Infection and Immunity*, 60 :2329-36, 1992。
- [0914] Gaugler 等, “人基因 MAGE-3 编码人黑色素瘤上自身溶细胞性 T 淋巴细胞识别的一种抗原”, *J. Exp. Med.*, 179 :921, 1994。
- [0915] Gefter 等, *Somatic Cell Genet.*, 3 :231-36, 1977。
- [0916] Gennaro 等, *Am. J. Ind. Med.*, 37 :275-82, 2000。
- [0917] Gillard 等, “I 型糖尿病人血清中的抗神经节苷酯 GT3 抗体”, *J. Immunol.*, 142 :3826-32, 1989。
- [0918] Gillis, *Nature*, 268 :154-56, 1977。
- [0919] Glynn, McCoy 和 Fefer, *Cancer Res.*, 28 :434-39, 1968。
- [0920] Goding, 载于《*Monoclonal Antibodies :Principles and Practice*》, 第二版, Orlando, FL, Academic Press, 第 60-61、65-66、71-74 页, 1986。
- [0921] Goff 等, *Eur. J. Biochem.*, 130 :553-57, 1983。
- [0922] Grabarek 等, “内毒素脂质 A 与人血小板的相互作用”, *The Journal of Biological Chemistry*, 256 :8117-21, 1990。
- [0923] Graus 等, “用 R24 小鼠单抗检测人神经系统中神经节苷酯 GD3 的分布”*Brain Res.*, 324 :190-94, 1984。
- [0924] Guzman 等, *Circulation*, 88 :2838-48, 1993a。
- [0925] Guzman 等, *Cir. Res.*, 73 :1202-07, 1993b。
- [0926] Hachida 等, *Transplant Proc.*, 22 :1663-70, 1990。
- [0927] Hachida 等, *Transplantation*, 56 :479-82, 1993。
- [0928] Harada 等, *Mol. Urol.*, 3 :357-364, 1999。
- [0929] Hardings 等, “pH 和多糖对 II 类主要组织相容性复合物分子结合肽的作用”,
- [0930] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 :2740-44, 1991。
- [0931] Harel 等, *Cancer Res.*, 50 :6311, 1990。
- [0932] Harlow 和 Lane, *Antibodies :A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1998。
- [0933] Helling 等, “构建免疫原性 GD-3- 缀合疫苗”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 690 :396-97, 1993。
- [0934] Hellstrom 等, “IgG3 抗体对人黑色素瘤相关神经节苷酯的强抗肿瘤活性”,
- [0935] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 :1499-1502, 1985。
- [0936] Hirabayashi 等, “具有种间交叉反应性的抗黑色素瘤抗原的同系单抗识别 GM3, 一种 B16 黑色素瘤的主要神经节苷酯”, *Biol. Chem.*, 260 :13328-33, 1985。
- [0937] Hirabayashi 等, “抗 B16 黑色素瘤细胞的小鼠单抗 M2590 与化学合成的 GM3 神经节苷酯的反应性”, *Biochim. Biophys. Acta*, 875 :126-28, 1986。
- [0938] Hirabayashi 等, *Jpn. J. Cancer Res.*, 78 :614-20, 1987。
- [0939] Hoon 等, “黑色素瘤的神经节苷酯免疫调节 T 细胞对 IL-2 的应答”, *Cell Immunol.*, 4 :1111-19, 1988。

- [0940] Horibata 和 Harris, *Exp. Cell. Res.*, 60 :61, 1970。
- [0941] Horgan, “癌症病人血清中总唾液酸和脂质结合的唾液酸水平”, *Clin. Chim. Acta.*, 118 :327-31, 1982。
- [0942] Houghten 等, “检测 GD3 神经节苷酯的小鼠单抗 IgG3 :恶性黑色素病人中的 I 期试验”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 :1242-46, 1985。
- [0943] Houghton, “癌抗原 :自身和改变的自身免疫识别”, *J. Exp. Med.*, 180 :1-4, 1994。
- [0944] Hraba 等, “单磷酸脂质 A (MPL™) 对红细胞自身抗体形成的影响”, *Immunobiol.*, 189 :448-56, 1993。
- [0945] Hunter 等, *Vaccine*, 9 :250 :1991。
- [0946] Inoue 等, *Blood*, 88 :2267-78, 1996。
- [0947] Irie 和 Morton, “病灶内注射神经节苷酯 GD2 的人单抗引起皮肤转移性黑色素瘤的消退”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 :8694-98, 1986。
- [0948] Irie 和 Ravindranath, “神经节苷酯作为癌症的单抗治疗的靶”, 载于《*Therapeutic monoclonal antibodies*》, Borrebaeck and Larrick(编), Stockton Press, New York, 75-94 页, 1990。
- [0949] Irie 等, “EB 病毒转化的人 B 淋巴细胞系体外产生肿瘤抗原 OFA-1 的人抗体”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 :5666-70, 1982。
- [0950] Irie 等, “黑色素瘤神经节苷酯和人单克隆抗体”, 刊载于《*Human Tumor Antigens and Specific Tumor Therapy*》, Metzgar and Mitchell(编), Alan R. Liss, Inc., New York, 115-126 页, 1989。
- [0951] Ishioka 等, “碳水化合物和糖肽的 MHC 相互作用和 T 细胞识别”, *J. Immunol.*, 148 :2445-51, 1992。
- [0952] Jackson 等, “卡介苗免疫治疗法诱导 ICAM-1 在膀胱肿瘤上表达”, *J. Clin. Pathol.*, 47 :309-12, 1994。
- [0953] Johnson 和 Tomai, “无毒性单磷酸脂质 A 佐剂作用的细胞和分子介体的研究”, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 133 :567-79, 1988。
- [0954] Johnson 等, “无毒性单磷酸脂质 A 的鉴定”, *Rev. Infect. Dis.*, 9 :512-16, 1987。
- [0955] Johnson 等, “获明尼苏达自沙门氏菌 Re5952 脂多糖的单磷酸脂质 A 同系物的结构鉴定” *J. Biol. Chem.*, 265 :8108-16, 1990。
- [0956] Johnston 和 Bystry, “细胞壁骨架和单磷酸脂质 A 佐剂对鼠 B16 黑色素瘤疫苗的免疫原性的作用”, *Journal of the National Cancer Institute*, 83 :1240-45, 1991。
- [0957] Jones 等, *J Natl Cancer Inst*, 66 :249-54, 1981。
- [0958] Kabat 等, 《免疫学上感兴趣蛋白质的序列》, 第五版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 647-669 页, 1991。
- [0959] Kass-Eisler 等, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA*, 90 :11498-502, 1993。
- [0960] Katopodis 等, “检测人类癌症的脂质相关唾液酸试验”, *Cancer Res.*, 42 :5270-75, 1982。
- [0961] Kawaguchi 等, “神经节苷酯在选择性调节人 T 淋巴细胞上 CD4 作用的特征模式”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 158 :1050-55, 1989。

- [0962] Kawakami 等,“通过自身 T 细胞浸润肿瘤中识别编码一种共有人黑色素瘤抗原的基因克隆”*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 :3515,1994。
- [0963] Kawakami, Eliyahu, Sakaguchi, Robbins, Rivoltini, Yannelli, Appella and Rosenberg,“大多数 HLA-A2 限制性肿瘤浸润淋巴细胞识别的 Mart-1 人黑色素瘤抗原的免疫优势肽的鉴定”,*J. Exp. Med.*, 180 :347-52,1994。
- [0964] Kensil 等,*J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 199 :1423,1991。
- [0965] Kloppel 等,“血清中的糖脂质结合的唾液酸:在患乳腺癌小鼠和人中水平的增加”,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 :3011-13,1977。
- [0966] Kohler 和 Milstein,*Nature*, 256 :495-97,1975。
- [0967] Kohler 和 Milstein,*Eur. J. Immunol.*, 6 :511-19,1976。
- [0968] Kolls 等,*Proc. Nat’ l. Acad. Sci. USA*, 91 :215-19,1994。
- [0969] Koscielak 等,“糖脂质抗原及其抗体”,*Immunochemistry*, 5 :441-55,1968。
- [0970] Kovach 等,“在活体外人全血中脂质 IV_A 抑制脂多糖诱导的肿瘤坏死因子的合成和释放”,*J. Exp. Med.*, 172 :77-84,1990。
- [0971] Kwok 和 Higuchi,*Nature*, 339 :237-38,1989。
- [0972] Kyogashima 等,*Jpn. J. Cancer Tes.*, 78 :1229-32,1987。
- [0973] Ladisch 等,“由人神经母细胞瘤脱落 GD2 神经节苷酯”,*Int. J. Cancer*, 39 :73-76,1987。
- [0974] Lamm 等,“膀胱内阿霉素和卡介苗免疫治疗膀胱的移行细胞癌的随机试验”*N. Engl. J. Med.*, 325 :1205,1991。
- [0975] Lengle 等,“糖脂质抑制凝集素诱导的胸腺细胞的有丝分裂反应”,*Cancer Res.*, 39 :817-922,1979。
- [0976] Liepkalns 等,*J. Neurochem.*, 36 :1959-65,1981。
- [0977] Livingston 等,“环磷酰胺治疗后对 Meth A 肉瘤疫苗的血清学应答受到各种佐剂的额外增加”,*The Journal of Immunology*, 135(2) :1505-09,1985。
- [0978] Livingston 等,“增加神经节苷酯 GM₂ 在小鼠中免疫原性的方法:纯化的 GM₂ 优于全细胞”,*J. Immunol.*, 138 :1524-29,1987a。
- [0979] Livingston 等,“含纯化的 GM₂ 神经节苷酯的疫苗在黑色素瘤病人中诱发 GM₂ 抗体”,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 :2911-15,1987b。
- [0980] Ljunggren 等,*Nature*, 346 :476-80,1990。
- [0981] Lozzio 和 Lozzio,*Blood*, 45 :321-34,1975。
- [0982] Madonna 和 Vogel,“在无胸腺(裸)鼠,B 细胞缺陷(xid)鼠和脾切除鼠中诱导早期毒素耐受”,*Infection and Immunity*, 53 :707-10,1986。
- [0983] Mahvi 等,*Immunology and cell Biology*, 75 :456-60,1997。
- [0984] Maratea 等,*Gene*, 40 :39-46,1985。
- [0985] Masihi 等,“无毒性脂质 A 和内毒素对小鼠抵抗鼠弓形体的作用”,*Journal of Biological Response Modifiers*, 7 :535-39,1988。
- [0986] Melling 等,*J. Immunol.*, 117 :1267-74,1976。
- [0987] Messen 等,*J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 126 :266-32,2000。

- [0988] Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85 :2149-46, 1963。
- [0989] Miller 和 Esselman, “抗原反应性淋巴细胞与神经节苷酯培育后调节免疫应答调节作用”, J. Immunol., 115 :839-43, 1975。
- [0990] Minden, “动物和人肿瘤及微生物之间的共有抗原”, 载于《BCG in Cancer Immunotherapy》, Lamoureux, Turcotte and Portelance (编); 73-81 页, 1976。
- [0991] Miotti 等, Cancer Res., 65 :826, 1985。
- [0992] Mitchell 等, “用同种异体细胞裂解液特异性主动免疫治疗黑色素瘤 :作用原理结果和可能的机理”, Ann. N. Y. Acad. Sci., 690 :153-66, 1993。
- [0993] Mitchell 等, “黑色素瘤的特异性主动免疫治疗 :同种异体裂解液和新佐剂的 I 期试验”, Cancer Res., 48 :5883-93, 1988。
- [0994] Mitchell 等, “黑色素瘤的特异性主动免疫治疗”, Journal of Clinical Oncology, 8 :856-89, 1990。
- [0995] Miyake 等, Cancer Res., 48 :6154-60, 1988。
- [0996] Mooney 等, “细菌超抗原信号经由人 B 淋巴细胞上的 HLA II 类分子传递”, Mol. Immunol., 31 :675-81, 1994。
- [0997] Morrison 等, “能结合 T 细胞上受体部位的特异性神经节苷酯与神经节苷酯偶联导致 CD4 表达的降低” Life Sci, 45 :1219-24, 1989。
- [0998] Morton 和 Ravindranath, 载于《Cancer Medicine》, 第三卷, Holland 等 (编), Leaand Febiger, Philadelphia, 第 967 页, 1993。
- [0999] Motron 等, “多价黑色素瘤疫苗改进了转移性恶性黑色素瘤病人的存活”, JohnWayne Cancer Institute at Saint John's Hospital and Health Center, Santa Monica, California, reprinted from Specific Immunotherapy of Cancer with Vaccines, Annals of the New York Academy of Sciences, 第 690 卷, 1993。
- [1000] Morton 等, Ann. Surg., 216 :463, 1992。
- [1001] Morton 等, 刊载于《Biological Function of Gangliosides》, Progress in Brain Research, 第 101 卷, 251-275 页, 1994。
- [1002] Mosmann 和 Coffman, Ann. Rev. Immunol., 7 :145-73, 1989。
- [1003] Munjal 等, “检测人癌症中脂质结合唾液酸和癌胚抗原的联合测定和意义” Diagn. Immunol., 2 :36-43, 1984。
- [1004] Murphy 等, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 83 :8258-62, 1986。
- [1005] Myers 等, “小鼠中半抗原特异性抗体应答的单磷酸脂质 A 起着 T 细胞非依赖性 I 型载体的作用”, Infection and Immunity, 63 :168-74, 1995。
- [1006] Naiki 等, “针对神经节苷酯 GM₁ 和脱唾液酸 GM₁ 的抗血清的性能”, J. Immunol., 113 :84-93, 1974。
- [1007] Nair 等, Nature Biotechnol., 16 :364-69, 1998。
- [1008] Natoli 等, “检测神经节苷酯 GM₂ 的鼠单抗 :细胞表面反应性的鉴定”, Cancer Res., 46 :4116-20, 1986。
- [1009] Nonomura 等, Hinyokika Kyo, 45 :593-97, 1999。
- [1010] Nudelman 等, “单抗 4.2 确定的人黑色素瘤相关神经节苷酯抗原的鉴定”, J. Biol.

Chem., 257 :12752-56, 1982。

[1011] Odean 等, “ γ 干扰素与佐剂对抗体的增强作用”, *Infection and Immunity*, 58 : 427-32, 1990。

[1012] Oji 等, *Jpn. J. Cancer Res.*, 90 :194-204, 1999。

[1013] Old 等, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 101 :80-106, 1962。

[1014] Pan 等, *Leukemia*, 14 :1634, 2000。

[1015] Parker 等, *J. Immunol.*, 152 :163, 1994。

[1016] Pascal 等, “关于正常和 Tay-Sach's 脑神经节苷酯的免疫化学研究”, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121 :739-43, 1966。

[1017] Patek, Collins 和 Cohn, “对体内监视肿瘤发生敏感或耐受的转化细胞系”, *Nature*, 276 :510-11, 1978。

[1018] Patmasiriwat 等, *Leukemia*, 13 :891-900, 1999。

[1019] Paul, 《Fundamental Immunology》, 第 3 版, Raven Press, 243-47 页, 1993。

[1020] Portoukalian 等, “疫苗接种黑色素相关神经节苷酯后无患病晚期黑色素瘤病人中的体液免疫应答”, *Int. J. Cancer*, 49 :893-99, 1991。

[1021] Portoukalian, “黑色素瘤病人血浆和红细胞中神经节苷酯的变化”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58 :916-20, 1978。

[1022] Portoukalian, “黑色素瘤脱落的神经节苷酯的免疫调节活性”, 刊载于《Gangliosides and Cancer》, Oettgen (编), New York, VCH Publishers, 207-16 页, 1989。

[1023] Powell 和 Newman (编), “Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach)”, Plenum Press, NY, 1995。

[1024] Prokazova 等, “唾液化的乳糖神经酰胺。非特异性免疫抑制和动脉粥样硬化病灶的可能诱导剂”, *Eur. J. Biochem.*, 171 :1-10, 1988。

[1025] Pukel 等, “GD3, 一种人黑色素瘤的主要神经节苷酯:小鼠单抗的检测和鉴定” *J. Exp. Med.*, 155 :1133-47, 1982。

[1026] Qureshi 等, “获自伤寒沙门氏菌脂多糖的无毒性脂质 A 的纯化和结构测定” *J. Biol. Chem.*, 257 :11808-15, 1985。

[1027] Rabinovich 等, “疫苗技术:展望未来” *Science*, 265 :1401-02, 1994。

[1028] Raines 和 Ross, *J. Biol. Chem.*, 257 :5154-60, 1982。

[1029] Rapport 和 Graf, “脂质的免疫化学反应”, *Prog. Allergy*, 13 :273-331, 1969。

[1030] Ravindranath 和 Irie, 刊载于《Malignant Melanoma: Biology, Diagnosis, and Therapy》, Nathanson (编), Kluwer Acad., Boston, 第 17 页, 1988。

[1031] Ravindranath 和 Morton, “神经节苷酯在黑色素瘤疫苗主动免疫治疗中的作用”, *Int. Rev. Immunol.*, 7 :303, 1991。

[1032] Ravindranath 等, “癌 antigen 凝集素识别的人黑色素瘤抗原 O-乙酰化神经节苷酯 GD3”, *J. Biol. Chem.*, 263 :2079-86, 1988。

[1033] Ravindranath 等, “特异性主动免疫治疗后黑色素瘤病人中的抗体识别神经节苷酯 O-乙酰 GD3 和 GD3 所共有的表位” *Cancer Res.*, 49 :3891-97, 1989。

[1034] Ravindranath 等, “神经节苷酯 GM₃ : GD₃ 比率作为处理黑色素瘤的指数”, *Cancer*,

67 :3029-35,1991。

[1035] Ravindranath 等,“在含肿瘤相关神经节苷酯的肿瘤细胞膜单掺入单磷酸脂质 A (MPL) 后,肿瘤细胞疫苗的效果”,*Experientia*,50 :648-653,1994a。

[1036] Ravindranath 等,“单磷酸脂质 A (MPL) 与细胞和脂质体的结合增强了对膜结合神经节苷酯的抗体应答”,*Journal of Autoimmunity*,7 :803-16,1994b。

[1037] Ravindranath 等,“影响 ELISA 中血清抗神经节苷酯抗体的精细特异性和灵敏度的因素”,*J. Immunol. Methods*,169 :257-72,1994c。

[1038] Real 等,“人黑色素瘤的 I 类 (独特) 肿瘤抗原。用自身抗体鉴定 90,000 道尔顿细胞表面糖蛋白”,*J. Exp. Med.*,160 :1219,1984。

[1039] Reeves 等,*Cancer Res.*,56 :5672-77,1996。

[1040] Reisfeld 等,*Melanoma Antigens and Antibodies*,p.317,1982。

[1041] Ribi,“内毒素分子的有利修饰”*J. Biol. Resp. Mod.*,3 :1-9,1984。

[1042] Ribi 等,“脂质 A 和免疫治疗法”,*Rev. Infect. Dis.*,6 :567-72,1984。

[1043] Ribi 等,“结构已确定的无毒性脂质 A 对体液和细胞介导免疫应答的调节”,刊载于《*Immunobiology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins*》,Szentivanji 和 Friedman (编),Plenum 出版社,New York,407-420 页,1986。

[1044] Rickman 等,*Lancet* 337 :998,1991。

[1045] Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems*,15 :143-98,1998。

[1046] Rosenberg 等,*Ann. Surg.*,210 :474,1989。

[1047] Rosenberg 等,*N. Engl. J. Med.*,319 :1676,1988。

[1048] Rosenfeld 等,*Science*,252 :431-34,1991。

[1049] Rothbard 和 Taylor, *EMBO J.*,7 :93-100,1988。

[1050] Rott 等,“应用细菌超抗原预防实验性过敏脑脊髓炎”,*Int. Immunol.*,4 :347-53,1992。

[1051] Sato 等,“分离自酿脓链球菌的胞质膜相关蛋白 (CAP) :作为一种新的细菌超抗原”,*Microbiol. Immunol.*,38 :139-47,1994。

[1052] Sato 等,*Science*,273 :352,1996。

[1053] Satoh 等,*Pathol. Int.*,50 :458-71,2000。

[1054] Schuster 等,“通过注射含脂质 A 的脂质体产生抗磷酸胆碱、磷脂酰胆碱、鞘磷脂和脂质 A 的抗体”,*J. Immunol.*,122 :900-05,1979。

[1055] Schwab 等,“超抗原可重激活细菌细胞壁诱导的关节炎”,*J. Immunol.*,150 :4151-59,1993。

[1056] Shafer 和 Spitznagel,“伤寒沙门氏菌对多形核粒细胞抽提物的敏感性 :脂质 A 的作用”*Rev. Infect. Dis.*,6 :577-81,1984。

[1057] Shepard 等,*J. Clin. Immunol.*,11 :117-27,1991。

[1058] Sherwin 等,“针对人神经组织的神经节苷酯的抗血清的产生”,*Canad. J. Biochem.*,42 :1640-48,1964。

[1059] Shimizu 等 *Int. J. Gynecol. Pathol.*,19 :158-63,2000。

[1060] Shy 等,“针对运动神经元疾病伴浆细胞病患者中的 GM1 和 GD1b 的抗体”,*Ann.*

Neurol. 25 :511-18,1989。

[1061] Siddiqui 等, Cancer Res. ,44 :5262-65,1984。

[1062] Sidell 等, Cancer Immunol Immunother,7 :151-55,1979。

[1063] Sigma, Cell Culture, 第 9 卷, 第 2 期, 1993。

[1064] Skeiky 等, Infection and Immun. ,67 :3998-4007,1999。

[1065] Slavin 和 Strober, Nature, 272 :624-26,1977。

[1066] Spinsanti 等, Leuk. Lymphoma, 38 :611-19,2000。

[1067] Stiess 和 Kruger, “哺乳动物细胞培养基概述和应用”,

[1068] The Source(Sigma Cell Culture Technical and Product News), 9 :1-8,1993。

[1069] Stoute 等, New Engl J. Med. ,336 :86-91,1997。

[1070] Svennerholm 等, “肿瘤神经节苷酯作为人黑色素瘤主动特异性免疫治疗的靶标”, 刊载于《Biological Function ofGangliosides, Progress in Brain Research》, 第 101 卷, 1994。

[1071] Tai 等, “神经节苷酯 GM2 作为一种人肿瘤抗原 (OFA-I-1)”,

[1072] Proc Natl Acad Sci. ,80 :5392-96,1983。

[1073] Takada 等, “小肠肠球菌 ATCC9790 的脂磷壁酸诱导细胞因子、抗肿瘤和抗原活性的分子和结构要求”, Infection and Immunity, 63 :57-65,1995。

[1074] Takahashi 等, J. Immunol. ,140 :3244,1988。

[1075] Tamaki 等, Leukemia, 13 :393-99,1999。

[1076] Tanamoto, “乙酰化后化学合成的脂质 A 前体中内毒素活性的解离”, Infection andImmunity, 63 :690-92,1995。

[1077] Tanamoto, “游离羟基不是脂质 A 的内毒素活性所需的”, Infection and Immunity, 62 :1705-09,1994a。

[1078] Tanamoto, FEBS Lott. ,351 :325-29,1994b。

[1079] Tautu 等, “测定血清脂质相关唾液酸的改进方法 :应用于早期诊断结肠直肠癌”, J. Natl. Cancer Inst. ,80 :1333-37,1988。

[1080] Thor 等, Cancer Res. ,46 :3118,1986。

[1081] Thurin 等, “质子 NMR 和快速原子轰击质谱分析黑色素瘤相关神经节苷酯 9-0- 乙酰 GD3”, J. Biol. Chem. ,260 :14556-563,1985。

[1082] Timmerman 和 Levy, Ann. Rev. Med. ,50 :507-29,1999。

[1083] Tomai 和 Johnson, “T 细胞和干扰素 γ 参与脱毒内毒素的佐剂作用”, Journal ofBiological Response Modifiers, 8 :625-43,1989。

[1084] Tomai 等, “无毒性单磷酸脂质 A 在低反应和老年小鼠中的佐剂特性”, Journal ofBiological Response Modifiers, 6 :99-107,1987。

[1085] Tsuchida 等, J. Dermatol. ,11 :129-38,1984。

[1086] Tsuchida 等, “人黑色素瘤的神经节苷酯 :体内和体外表达的改变”, CancerResearch, 47 :1278-81,1987。

[1087] Tsuchida 等, “作为人黑色素瘤的肿瘤标志的神经节苷酯 :生物化学和免疫学测定”载于《New Horizons of Tumor Immunotherapy》, Torisu 和 Yoshida 编, 315-325 页,

1989。

[1088] Tuting 等, J. Immunol. 160 :1139-47, 1998。

[1089] Ulmer 等, Science, 259 :1745-49, 1993。

[1090] Vadhan-Raj 等, J. Clin. Oncol. , 6 :1636, 1988。

[1091] Van der Bruggen 等, “由人黑色素瘤上溶细胞 T 淋巴细胞识别的编码抗原的基因”, Science, 264 :716, 1991。

[1092] Verma 等, “含脂质 A 的脂质体的佐剂作用: 脂质体抗原呈递的增强和巨噬细胞的募集”, Infection and Immunity, 60 :2438-44, 1992。

[1093] Vijayasaradhi 等, “黑色素瘤抗原 gp75 是小鼠 b (BROWN) 基因座基因产物的人同系物”, J. Exp. Med. , 171 :1375, 1990。

[1094] Von Bultzingslowen, Pneumologie, 53 :266-75, 1999。

[1095] Vosika 等, Cancer Immunol. Immunother. , 18 :107, 1984。

[1096] Watson, Ralph, Sarkar 和 Cohn, “白血病病毒与小鼠黑色素瘤细胞相关”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 66 :244, 1970。

[1097] Westrick 等, Biochim. Biophys. Acta, 750 :141-48, 1983a。

[1098] Westrick 等, Cancer Res. , 43 :5890-94, 1983b。

[1099] Whisler 和 Yates, “人神经节苷酯调节淋巴细胞应答。I. 抑制作用和诱导受损激活的特征” J. Immunol. 125 :2106-12, 1980。

[1100] Wide 等, 载于《Radioimmunoassay Methods》, Kirkham 和 Hunter 编, E and S. Livingstone, Edinburgh, 1970。

[1101] Wilschut, “磷脂载体的制备和性能”, 刊载于《Methodologie des Liposomes appliquée à la pharmacologie et à la biologie cellulaire, Leserman 和 Barbet》编, INSERM, Paris 1-10 页, 1982。

[1102] Yamaguchi 等, “人单克隆抗体识别的黑色素瘤细胞表面抗原” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 :2416-20, 1987。

[1103] Yamamoto 等, “用牛分枝杆菌 BCG 的脱氧核糖核酸组分体外增强天然杀伤细胞活性和干扰素 α/β 和 γ 的产生”, Jpn. J. Cancer Res. 79 :866-73, 1988。

[1104] Yeh 等, “神经节苷酯组分中存在和人黑色素瘤共有的细胞表面抗原”, Int. J. Cancer, 29 :269-75, 1982。

[1105] Yin 等, “各种佐剂对小鼠对肺炎球菌多糖抗体应答的影响” J. Bio. Resp. Modifiers, 8 :190-205, 1989。

[1106] Yokoyama 等, “神经节苷酯的免疫化学研究”, J. Immunol, 90 :372-80, 1963。

[1107] Zapata 等, Protein Eng. , 8 :1057-62, 1995。

[1108] Zitvogel 等, Nat. Med. , 4 :594-600, 1998。

[1109] 本文和权利要求书披露的所有组合物和方法通过阅读本文无需过多实验即可制备和实施。虽然已通过优选实施例描述了本发明的组合物和方法, 本领域技术人员应明白可在不脱离本发明的概念、精神和范围对本文所述组合物和方法及方法的步骤和步骤的顺序进行改进。更具体说, 显然可用化学或物理上相关的某些试剂来代替本文所述的试剂, 而仍能获得相同或相似结果。本领域技术人员明白, 所有这些相似的替代和改变都属于本发

明附如权利要求的精神、范围和概念之内。本文引用的所有出版物、专利、专利申请都纳入本文作为参考。因此,本发明申请的独占专利权如以下权利要求书所述。

[0001]

非正式序列表

<210> 1
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1
1>Ly1728P, 膜蛋白FOAP-12, 全长cDNA
cttccagagagcaatatggctgggtcccccaacatgcctcaccctcatctatatcctttggcagctcacag
ggtcagcagcctctggaccctgaaagagctgggtcggttccgttgggtggggccgtgactttccccctgaa
gtccaaagtaagcaagttgactctattgtctggaccttcaacacaacccctctgtgccatacagcca
gaagggggcactatcatagtgaacccaaatcgtaaatagggagagagtagacttcccagatggaggctact
ccctgaagctcagcaaaactgaagaagaatgactcagggatctactatgtggggatatacagctcatcact
ccagcagccctccaccaggtacgtgctgcatgtctacgagcacctgtcaaagcctaaagtaccatg
ggctctgagagcaataagaatggcaccctgtgtgaccaatctgacatgctgcatggaacatggggaagagg
atgtgatattatcctggaaagccctggggcaggcagccaatgagtcaccataatgggtccatcctcccat
ctcctggagatggggagaaagtgtatgaccttcatctgctgctgcccaggaaacccctgtcagcagaaacttc
tcaagccccctctggcaggaagctctgtgaaggtgctgctgtagaccagattcctccatggctcctcc
tgtgtctcctgttgggtgcccctcctgctcagtcctcttctgactggggctatttctttgggttctgaagag
agagagacaagaaggtacattgaagagaagaagagagtgacatttctcgggaaactcctaacatatgc
ccccattctggagagaacacagagtacgacacaatccttcacactaatagaacaatcctaaggaagatc
cagcaataacgggttactccactgtggaaaataccgaaaaagatggaaaatccccactcactgctcagat
gccagacacaccaaggctatttgcctatgagaatggttatctagacagcagtgcaactcccctaagctctg
ctcaaaaaaaaaaacaatttctcgcccaaaagaaaacaatcagaagaattcactgatttgactagaacatc
aaggaagaatgaagaacgttgactttttccaggataaattatctctgatgcttctttagatttaagagt
tcataattccatccactgctgagaaatctcctcaaacccagaagggttaatacacttcatcccaaaaatgg
gatgtgtaattgtcagcaaacaccataaaaaaagtgtctagaagtatcctatagaatgtaaatgcaaggct
acacataattaatgacagcctgttgtattaatgatggctccaggctcagtgctctggagtctcatccatccc
agggcttggatgtaaggattataccaagagctctgtaccaggaggggcaagaagaccaaaacagacagac
aagtcacagcagaagcagatgcacctgacaaaaatggatgtatttaattggctctataaaactatgtgccag
cactatgctgagcttacactaattggtcagacgtgctgtctgcccctcatgaaattggctccaaatgaatg
aactactttcatgagcagttgtgacaggcctgaccacagattcccagagggccagggtgtggatccacagg
acttgaagggtcaaagttcacaagatgaagaatcagggtagctgacctgtttggcagatactataatgg
agacacagaagtgctgcatggcccaaggacaaggacctccagccaggcttcatttatgcaacttgtgtgca
aaagaaaagtctagggttttaaggctgtgccaagaacccatcccaataaagagaccgagctctgaagtcacat
tgtaaatctagtgtaggagacttgagtcaggcagtgagactgggtggggcacggggggcagtggtactt
gtaaacctttaaagatgggttaattcatcaatagatatttattaagaacccatcgggcccgcatgggtgg
ctcacacctgtaatcccagcactttgggaggccaaggtgggtgggtcatctgaggtcaggagtccaagac
cagcctggccaacatgggtgaaaccccatctctactaaagatacaaaaaatttgctgagcgtgggtgtgca
acctgtaatcccagctactcgagaggccaaggcatgagaatcgcttgaaacctgggagggtggagggtgca
tgagctgagatggcaccactgcactccggcctaggcaacgagagcaaaactccaatacaaacaaaacaaac
aaacacctgtgctaggctcagtcgtgacgtaagatgaacatccctaccaacacagagctcaccatctctt
atacttaagtgaaaaacatggggaaggggaaaggggaatggctgcttttgatatgttccctgacacatat
cttgaatggagacctccctaccaagtgtgaaagtgttgaaaaacttaataacaaatgcttgttgggcaa
gaatgggatgaggattatcttctctcagaaaggcattgtgaaggaattgagccagatctctcctctac
tgcaaaacccctattgtagtaaaaagtccttcttactatcttaataaaaacagatattgtgagattcaaaa
aaaaaaaaaaaa

<210> 2
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

2>Ly1728P, FOAP-12, 全长蛋白质
MAGSPTCLTLIYLWQLTGSAAAGPVKELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIVWTFNTTPLVTIQPEGGTI
IVTQNRNRERVDVDFPDGGYSLKLSKLKNDSGIYYVGIYSSSLQQPSTQEYVLHVYEHLSKPKVTMGLQSN
KNGTCVTNLTCCMEHGEEDVIYTWKALGQAANESHNGSILPISWRWGESDMTFICVARNPVSRNFSSPIL
ARKLCEGAADDPDSMVLCLLLVPLLSLFLVGLFLWFLKRRERQEYIEKKRVDICRETPNICPHSGE
NTEYDTIPTHNRTILKEDPANTVYSTVEIPKKMENPHSLLTMPDTPRLFAYENVI

<210> 3
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

3>Ly1732P, BCM, 全长cDNA

[0002]

ttgtaagatattacttgccttccaggtgttcttcttctgtagctcccttgttttctttt
 gtgatcatgttgcagatggctgggagtgctcccaaatgaatattttgacagttgttg
 catgcttgcataccttgtcaacttcgagtgttcttctaatactcctcctctaacatgtcag
 cgttattgtaatgcaagtgtagcaattcagtgaaaggaacgaatgcgattctctggacc
 tgtttgggactgagcttaataatttcttggcagtttctgctgaatgttttggctaagg
 aagataagctctgaaccattaaaggacgagtttaaaaacacaggatcaggtctcctgggc
 atggctaacattgacctggaaaagagcaggactggatgaaattattcttccgagaggc
 ctcgagtacacggtggaagaatgcacctgtgaagactgcatcaagagcaaacggaaggtc
 gactctgaccattgtcttccactcccagctatggaggaaggcgcaaccattcttgtcacc
 acgaaaacgaatgactattgcaagagcctgccagctgcttggagtgtacggagatagag
 aaatcaatttctgctaggtaattaaccatttcgactcgagcagtgccacttataaaatct
 tttgtcagaatagatgatgtgtcagatctctttaggatgactgtatttttcagttgccga
 tacagcttttctcctctaactgtggaactctttagttagatatatttctctagggtta
 ctgttgggagcttaattggtagaaactccttgggttctctatgattaaagtctttt

<210> 4
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4

4>Ly1732P, BCM, 全长蛋白质

MLQMAQCQSQNEYFDSLHACIPQLRCSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCGLSLIISLAV
 FVLMFLLRKISSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEVTVEECTCEDCIKSKPKVDS
 DHCFLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR

<210> 5
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 5

5>Ly1888P, 抗-Fas-诱导的表位(TOSO), 全长cDNA

ttgcactctagaagggacaatggacttctggcttggccactttacttcttccagctatcgggggccctg
 aggatcctcccagaagtaaggttagagggggagctgggaggatcagttaccatcaagtgccacttcttg
 aaatgcatgtgaggatatactgtgcccggagatggctggatctggaacatgtggtaccgtgggtatccac
 caccaacttcatcaaggcagaatacaaggccgagttactctgaagcaatacccacgcaagaatctgttc
 ctagtggaggtaaacacagctgacagaaagtgcagcggagcttatgcttgcggagcgggcatgaacacag
 accggggaaagaccagaaagtcaacctgaatgtccacagtgaaacagagccatcatgggaagagcagcc
 aatgacctgagactccaaaatgggttctcatctgccctatttgttccagatgcctgcatagccagtcttcc
 aaattcgtaaccagagtaccacaccagctcaaaggggcaaggtccctccagttcaccactcctcccaca
 ccaccacaatcacccaccgacctcgagtgtccagagcatcttcagtagcaggtgacaagccccgaacctt
 cctgccatccactacagcctcaaaaatctcagctctggaggggctgctcaagccccagacgcccagctac
 aaccaccacaccaggctgcacaggcagagagcactggactatggctcacagctctgggaggggaaggccaag
 gatctcacatcctgatcccgaacctcctgggcttctcctgctggcacttctggggctgggtggtaaaag
 ggccgttgaaaggaggaaagccctctccaggcgggcccgcgactggcctgaggatgcccgcacctggag
 agctcccagaggcccgcggtcgcgcgcgacgcgcgctcccaaaaacaacatctacagcgccctgccgcggc
 gcgctcgtggagcggagcgtgcaggcacagggaagccccgttccggcccgagcgccgttgcccc
 cgccccgctgcaggtgtctgaatctccctggctccatgccccatctctgaagaccagctgtgaatacgtg
 agcctctaccaccagcctgccgcatgatggaggacagtgattcagatgactacatcaatgttcttgcct
 gacaactccccagctatcccccaaccagcctcggactgtgggtgccaaggagctctcatctatctgctga
 tgtccaataacctgcttcatgtgttctcagagccctcatcatcccatgccccatctcgatccccatcccc
 tctatctgt

<210> 6
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6

6>Ly1888P, 抗-Fas-诱导的表位(TOSO), 全长蛋白质

MDFNLWFLYFLPVSGALRILPEVKVEGELGGSVTIKCPLFEMHVRIYLCREMAGSGTCGTVVSTTNFIKA
 EYKGRVTLKQYPRKNLFLVEVTQLTESDSGVYACGAGMNTDRGKTQKVTNLNVHSEYEPSWEEQMPETPK
 WFHLPLYLFQMPAYASSSKFVTRVTPAQRGKVPVHHSSPTTQITHRPRVSRASSVAGDKPRTFLPSTTA
 SKISALEGLLPQTPSYNHHTRLHRQALDYGSQSGREGQGFILIPITILGLFLLALLGLVVKRAVERRK
 ALSRRARRLAVRMRALESSQRPRGSPRPSQNNIYSACPRRARGADAAGTGEAPVPGPGAPLPAPLQVS
 ESPWLHAPSLKTSCEYVSLYHQPAAMMEDSDSDDYINVPA

[0003]

<210> 7
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 7

7>Ly1452_His-tag- 融合蛋白,Old-SEQ-ID_10482, 全长cDNA
 atgcagcatcaccaccatcaccacgtgtcacaatctacagtcaggcaggattctcctgtg
 gagccctgggaagggatcagcgatcactctggcattattgatggttcgccagactcctg
 aacactgaccatcctccttgccaattagacatcaggctcatgaggcacaaagctgtctgg
 attaacccccaggatgtgcagcaacagccgcaggacttgcaatctcagggtgccagcagca
 gggaaacagtgggacccattttgtgacagatgctgcctctccctcaggcccttcaccttcg
 tgcctcggggactccctggcagagacaacgttgtctgaggataccacagactccgttggc
 agcgcttctccccatggctcgagtgaagagtagcagcttctctctgtcctcaacagag
 gtacacatggtccgcccaggatactctcatcgggtgtctctgcccacaagccctgggatt
 ttggccacctccccatctcctgagactgacagtgccttttttgagccttcccatctgaca
 tctgctgctgatgaaggtgctgttcaagtcagtagaagaaccatttcttcgaattccttc
 tcaccagaggattttgtgctgcctgttgatgtagaaaaggaaaatgccacttttatgtt
 gcagatatgatttatatcagcaatggagaaaatgaagtgttaacattctgagtcacacagcag
 acagagagctggagtaagaagttagtggttacttgggagtgatcagcctgactctgaa
 atgacttttgataccaacataaagcaagagtctgggtcttctacttcttcatacagtggc
 tatgaaggttgctgtgtgtacaggtcagccagtgactgaaacacgtacttaccatgat
 gtgaaagagatttgcaaatgcatgttgatgaatttggtatttttagagcttgagatttt
 aatgatatacagaaaacctgtagctgttccctgcagctcctctaagagtgctacttatgag
 ccagacttcaattctgcagaactattagccaaagagctgtaccgctgttccagaagtgc
 tggatactgtcagtagttaattctcagctggcagggtccctgagtgacagctggctcgata
 gtcgtaaatgaagagtgtgtccgaaaagactttgaatccagtatgaatgtagtacaggaa
 attaaatttaagtctaggatcagagggactgaagactgggctcctcctagatttcaaatc
 atatttaatttcatccaccactcaagaggaccttggtggcagcccgaaattttttc
 tgtgccggctgtggaactccagtagagcctaagtttgtagagcggctccggtactgcgaa
 tacctagggaagtatttctgtgactgctgccactcatatgcagagtcgtgcatccctgcc
 cgaatcctgatgatgtgggacttcaagaagtactacgtcagcaatttctccaaacagctg
 ctgcagcagcatatggcaccagccattttcaatttgctgagcatcgcccaaagcctgtat
 gcaaaagccaaaggagctggacagagtgaaggaaattcaggagcagctcctccatatcaag
 aagctgtgaagacctgtaggtttgctaacagtgcatataaggagttcgagcaggtgccg
 ggacacttgactgatgagctccacctgttctcccttgaggacctggtcaggatcaagaaa
 gggctgctggcacccttactcaaggacattctgaaagcttcccttgacatgtggctggc
 tgtgagctgtgtcaaggaaagggctttatttgtagaattttgcccagaatacagactgtcatc
 tccccatttcagacagcaacatgtagaagatgttcagcgtgcagggttgctttcacaaa
 cagtgccttcagtcctccgagtgcccccggtgtgagaggatcacagcagaggagaaaactt
 ctggaaagtgtgcctctgcagcaaca

<210> 8
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 8

8>Ly1452_His-tag-融合蛋白,Old-SEQ-ID_10483, 全长蛋白质
 MQHHHHHVSQSTVRODSPVEPWEGISDHSGIIDGSPRLNTHPPCQLDIRLMRHKAVW
 INPDVQQPQDLQSQVPAAGNSGTHFVTDAAAPSGPSPSCIGDSLAEITLSEDTTDSVG
 SASPHGSSEKSSSFSLSSTEVHMVRPGYSHRVSLPTSPGILATSPYPETDSAFFEPSHLT
 SAADEGAVQVSRRTISSNSFSPEVFLPVDVEKENAHFYVADMIISAMEKMKCNILSQQQ
 TESWSKEVSGLLGSDQPDSEMTFDTNIKQESGSSSTSSYSGYEGCAVLQVSPVTETRTYHD
 VKEICKCDVDEFVILELGFNDITETCSCSCSSSKSVTYEPDFNSAELLAKELYRVFQKC
 WILSVVNSQLAGSLAAGSIVVNEECVRKDFESSMNVVQEI KFKSRIRGTEDWAPPRFQI
 IFNIHPPLKRDVLVAAQNFFCAGCGTFVEPKFVKRLRYCEYLGYFCDCCHSYAESCI PA
 RILMMWDFKYYVSNFSKQLLDSIWHQPIFNLLSIGQSLYAKAKELDRVKEIQEQLFHIK
 KLLKTCRFANSALKEFEQVPGHLTDELHLFSLEDLVRIKKGLLAPLLKDILKASLAHVAG
 CELCQKGFICEFCQNTTVIFPQTATCRRCSSACRACFKQCFQSSECPRCARITARRKL
 LESVASAAT

<210> 9
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0004]

<400> 9

9>Ly1452P_LS_400351.4_ 编辑的, 剪接体-1, 全长cDNA

gggagcctataggggtcaataacttgcagtggttggggcttatggatgctggatgaagataagtgagggaggtttaca
gggacagcatcatgtcaggccttgagggaagaatagctctccagaccccagctggccatgtggtgagttcagggccca
aatcaagtagtagcagcaatcagggaaactcctatctgttttgatggattcacaccagccacaagcctggaaagatggtg
tcacaatctacagtcaggcaggatctctcctgtggagccctgggaagggaatcagcgatcactctggcattattgatgggttc
gccagactcctgaacactgaccatcctccttgccaattagacatcaggctcatgaggcacaagctgtctggattaacc
cccaggatgtgcagcaacagccgaggacttgcaatctcagggtgccagcaggggaacagtgggacccattttgtgaca
gatgctgctctcctcaggcccttcaccttcgtgctcggggactcctggcagagacaacgttgtctgaggataccac
agactccgttggcagcgcttctccccatggctcgagtgaagagtagcagcttctctctgctcctcaacagaggtagaca
tggtccgcccaggatactctcatcgggtgtctctgcccacaagccctgggattttggccacctccccatatcctgagact
gacagtgtcttttttgagccttccccatctgacatctgctgctgatgaagggtgctgttcaagtcagtagaagaaccatttc
ttcgaattccttctcaccagaggtattttgtgctgctgttgatgtagaaggaagaaatgccacattttatggtgcagata
tgattatatacagcaatggagaaaaatgaagtgtaacattctgtgacaaacagcagacagagagctggagtaagaagtcagt
gggttacttgggagtgatcagcctgactctgaaatgacttttgataccaacataaagcaagagctctgggtcttctacttc
ttcatacagtggctatgaagggttgctgtgttacaggtcagccagtgactgaaacagctacttaccatgatgtgaaag
agatttgcaaatgcatgttgatgaatttgttatttttagagcttgagattttaatgatatacagaaacctgtagctgt
tcctgcagctcctctaagagtgtcacttatgagccagacttcaattctgcagaactattagccaaagagctgtaccggt
gttccagaagtgtcggatctgtcagtagtttaattctcagctggcagggttccctgagtgagctggctcgatagtcgtaa
atgaagagtggtgcgaaagacttgaatccagtagaatgttagtacaggaaatataatttaagtcaggatcagaggg
actgaagactgggctcctcctagatttcaaatcatatttaatatccaccactcaagagggaccttgggtggcagc
ccagaatttttctgtgcccgtgtggaactccagtagagcctaagtttgtaagcggctccggtactgcgaatacctag
ggaagtatttctgtgactgtgcccactcatatgcagatcgtgcatccctgcccgaatcctgtatgtgtgggacttcaag
aagctactcagtcagcaatttctccaaacagctgtctgcagcatatggcaccagccattttcaatttgctgagcatcgg
ccaaagcctgtatgcgaagccaaggagctggacagagtgaaggaaattcaggagcagctcttccatatcaagaagctgt
tgaagacctgtaggtttgtaacagtgcatataaggagttcgagcaggtgcccgggacacttgactgatgagctccacctg
ttctccttgaggacctggtcaggatcaagaaagggtgctggcacccttactcaaggacattctgaaagcttcccttgc
acatgtggctggctgtgagctgtgtcaaggaaagggtcttatttgtaattttgcccagaatacagcttcatctcccat
ttcagacagcaacatgtagaagatgttcagcgtgcagggttgccttccacaaacagtgcttccagtcctccgagtgcccc
cgggtgtgcaggatcacagcgaggagaaaacttctggaagtggtgctctgcagcaacatgatgcccctgagtagctgtg
aaaaagactgttcaacatgccttatgataacaccgatttggtgtctattatttggtgacattgttttagatatgggtattg
tatatttaagaaaaagatggtctatattctctttattgcatatacttaattgttcaaaagaatgcagattctgtgtttaa
gcacagggctgatagttgtggttttgtttacaaatggttctgttttggtctgtattgggtttttaaagaggtttttatac
ttttgtatttgaatagttatgtttcactgagtgctgagccagttgtatgtgtgtgcatatagtgaactgtaactgacaa
gatgaattactcagtttctcttctctaaagcttggttgatgaaactgggttggtcctttcagtgaaacaaaaatagccc
caaattctgtttgtctgtggttttatttcttcaggaagcagacttccacttaaatgccattttgtgattgtgtcaatcata
cacattttatttacttcagagtttgaatagagtagacatttctctgcagatttatttcatgatgagtttgagttgct
tagcagggcgtgtgggtcccgttgaagtgcagtttgaagcaactgcttctagatggcactcttccagtggaacaaatg
aacctgtatttgcattctctgttccacacatgcatttcaagggatgcagaagttagtagaatccatccctgccccttg
aggatcttgccttaacagatgtaaaactgaacataaggtatttgagattttaaaccgaactgggggaaataatgaacagtg
tgattctagtaataacattaaaatcatagacattgactaataaggttaaatgaatcacaaaacctttatgaatttctttt
ttctaattagttcttatatgttttctgaaacatgtgagcctattcttttcttctactttctataactttctccact
tgagaaaggggcttgaggctgggtcccttcatggtatatacctttagactgaacgggttgcaacctagggttgggcat
cattccctgggattcacatgccctaactaaacctccttgatttctcagacagcacaggcaggcaataaagcgtcag
attgtcccttaaccccatccagccatgtgtatgagtggttttattcaatgggtagtagcagcatgaagaaatga
atgacttctgtcaatctcttttcatcagtccttctcattctgtcaattgttttctatccgagtgccctctgccagaact
gtgctcacatccattatttaagccagatcttttctaagtattatagaagtgtagaggcacatagaataaaataaacaga
cttc

<210> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10

10>Ly1452P_LS_400351.4_ 编辑的, 剪接体-1, 全长蛋白质

MVSQSTVRQDSPVEPWEGISDHSGIIDGSPRLNLDHPPCQLDIRLMRHKAVWINPQDVQQPQDLOSQVPAAGNSGTHF
VTDAASPSGSPSCLGDSLAETTLSEDTTDSVGSASPHGSSSEKSSFSLSSTEVMVRPGYSHRVSLPTSPGILATSPYP
ETDSAFFEPFSLTSADEGAVQVSRRTISSNSFSPEVFLPVDVEKENAHFYVADMIISAMEKMKCNILSQQTESWSKE
VSGLLGSDQPDSEMTFDNLIKQESGSSTSSYSYEGCAVLQVSPVTETRTYHDVKEICKCDVDEFVILELGFNDITETC
SCSCSSSKSVTYEPDFNSAELLAKELYRVFQKWLISVNSQLAGSLAAGSIVVNEECVRKDFESSMNVVQEI KFKSRI
RGTEWAPPRFQIIFNIHPPLKRDLVVAAQNFFCAGCGTPVEPKFVKRLRYCEYLGKYFDCCHSYAESCTPARILMMWD
FKKYYVSFNFSKQLLDSIWHQPIFNLLSIGQSLYAKAKELDRVKEIQEQLFHIKLLKTCRFANSALKEFEQVPGHLTDEL
HLFSLLEDLVRIKGLLAPLLKDILKASLAHVAGCELCQGGKFICEFCQNTTVIFPFQTATCRRCSACRACFHKQCPQSSE
CPRCARTARRKLESVASAAT

<210> 11

[0005]

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 11

11>Ly1452P, 剪接体 -2, FLJ21562, 全长蛋白质

ctttctgctgttaccgggagcgcggtggccacggaacgctgcccggagccgcgcgagggaggaccgacg
 cgcgcggtttaccgagcgagcggttccaccgctcgggtttggctggaatagctctccagacccccagctg
 gccatgtggtgagttcagggcccaaatcaagtagtaccagcaatcagggaaactcctatctgttttgaatg
 gattcacaccagccacaagcctggaagaatggtgtcacaatctacagtcaggcaggatttctcctgaggag
 ccctgggaagggatcagcgatcactctggcattattgatgggtcgcagcagactcctgaacactgaccatc
 ctctctgccaattagacatcagggtcatgaggcacaagctgtctggattaacccccaggatgtgcagca
 acagccgcaggacttgcaatctcaggtgccagcagcagggaaacagtgggacccattttgtgacagatgct
 gctctcctcagggcccttcaccttcgtgcctcggggactccctggcagagacaacgctgtctgaggata
 ccacagactccgttggcagcgcttctccccatggctcgagtgaagagtagcagcttctctctgtcctc
 aacagaggtacacatgggtccgcccaggatactctcatcgggtgtctctgcccacaagccctgggattttg
 gccacctccccatatcctgagactgacagtgttttttgagccttcccatctgacatctgctgctgatg
 aaggtgctgttcaagtcagtagaagaaccttctcgaattccttctcaccagagggtatttgtgctgccc
 tgttgatgtagaaaaaggaatgcccacttttatggttcagatatgattatatcagcaatggagaaaaatg
 aagtgaacattctgagtcacagcagacagagagctggagtaagaagtcagtgggttacttgggagtg
 atcagcctgactctgaaatgacttttgataccaacataaagcaagagtcctgggtcttctacttctcata
 cagtggctatgaaggtgtgctgtgttacaggtcagcccagtgactgaaacacgtacttaccatgatgtg
 aaagagatttgcaaatgcatgttgatgaatttggtatttttagagcttggagattttaatgatcacag
 aaacctgtagctgttctcagctcctctaagagtgctcattatgagccagacttcaattctgcagaact
 attagccaaagagctgtaccggtgttccagaagtgctggatactgtcagtagttaattctcagctggca
 ggttccctgagtgagctggctcgatagtcgtaaatgaagagtgcttccgaaaagactttgaatccagta
 tgaatgtagtacaggaaattaaatttaagtcaggatcagagggactgaagactgggtcctcctagatt
 tcaaatcatatttaatttcatccaccactcaagagggaccttgtggtggcagccagaatttttctgt
 gccggctgtggaactccagtagagcctaagtttgtgaagcggtccggtactgcgaatacctagggaggt
 atttctgtgactgctgccactcatatgcagagtcgtgcacccctgccgaatcctgatgatgtgggactt
 caagaagtactacgtcagcaatttctccaaacagctgtctgacagcatatggcaccagccatttcaat
 ttgctgagcatcggccaaagcctgtatgcgaagccaaggagctggacagagtgaaaggaaattcaggagc
 agctcttccatatcaagaagctgttgaagacctgtaggtttgctaacagctgtgtcaaggaaagggcttt
 atttgtgaattttgccagaatacagactgtcatcttccatttccagacagcaacatgtagaagatgttcag
 cgtgcagggcttgccttccaaaacagtgcttccagtcctccgagtgcccccggtgtgagagatcacagc
 gaggagaaaaacttctggaaagtgtggcctctgcagcaacatgatgcccttgagtactgtgaaaaagactg
 ttcaacatgccttatgataacaccgatttgtgtctatttattggtgacattgttttagatatgggtattg
 tatatttaaggaaaaagatgggtctatatctctcttattgcatatacttaattgtttcaaaagaatgcagatt
 ctgtgtttaagcacagggtgatagttgtgggtttgtttacaaatgttctgttttgggtgctattgggttt
 ttttaagagggttttttatacttttgtatttgaatagttatgtttcactgatgtgagccagtttgtatgt
 gtgtgcatatatgtgaactgtaactgacaagatgaattactcagtttctcttctctaaagcttggttga
 tgaaactgggtgggtccttccagtgaaacaaaatatgaccccaa

<210> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 12

12>Ly1452P, 剪接-形式-2, FLJ21562, 全长蛋白质

MVSQSTVRQDSPVEPWEGISDHSGLIDGSPRLNLDHPPCQLDIRLMRHKAVWINPQDVQQPQDLQSQV
 PAAGNSGTHFVTDAAASPGSPSPCLGDSLAETTLSEDTTDSVGSASPHGSSEKSSSFLSSSTEVHMRPG
 YSHRVSLPTSPGILATSPYPETDSAFFEPShLTSAADEGAVQVSRRTISSNSFSPEVFVLPVDVEKENAH
 FYYADMIISAMEKMKCNILSQQTESWSKEVSGLLGSDQPDSEMTFTDNIKQESGSSTSSYSGYEGCAVL
 QVSPVTETRTYHDKVEICKCDVDEFVILELGFNDITETCSCSCSSSKSVTYEPDFNSAELLAKELYRVF
 QKCWILSVVNSQLAGSLSAAGSIVVNEECVRKDFESSMNVQEIKFKSRIKRGTEWAPPFRFQIIIFNIHPP
 LKRDLVVAQNFFCAGCGTPVEPKFVKRLRYCEYLKGYFCDCHSYAESCIIPARILMMWDFKKYVSNFS
 KQLLDSIWHQPIFNLLSIGQSLYAKAKELDRVKEIQEQLFHIKKLLKTCRFANSVCVKERALFVNFARIRL
 SSSHFRQQHVEDVQRAGLAFTNSASSPPSAPGVRGSGRGENFWKVVPLQQHDAPEYCEKDCSTCLMITPI
 CVYYW

<210> 13

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13

[0006]

13>Ly1462P, Old-SEQ-ID_6411, 部分cDNA

ctggttcacgtgtggagctagtttaatacgtcctgccaaagatgggtaccagttgactggac
atgcttatcagatgtgtcaagatgctgaaatggaatttggttcaaaaagattccacttt
gtaaagttatccactgcaccctccacca

<210> 14

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 14

14>Ly1462P, 人EB病毒互补受体类型II (cr2)_全长

ccagagctgccggacgctcgcgggtctcggaaacgcacccgcgcgggggcttcggccgtggcatgggacg
ccgcgggctgtcgtcgggggtttcttgggtctcgtcgcaccgggggtcctcgggatttcttgggtctcctc
tccgcctatcctaataaggccgattagttatttctacccccattgtgttggtaccgtgataaggtac
agttgttcagggtaccttccgcctcattggagaaaaaagtctattatgcataactaaagacaaagtggatg
gaacctgggataaacctgctcctaaatgtgaattttcaataaatattcttcttgcctgagcccatagt
accaggaggatacaaaaattagaggctctacaccctacagacatggtgattctgtgacatttgccctgtaaa
accaacttctccatgaacggaaacaagtctgtttgggtgtcaagcaaatatgtgggggcccagacacgac
taccaactgtgtagtgtttccctctcgagtgtccagcacttcttatgatccacaatggacatcacac
aagtgagaatgtttggctccattgtctccaggattgtctgtgacttacagctgtgaaatctgggttacttgctt
gttggagaaaagatcatttaactgtttgtcttccgggaaaatggagtgctgtccccccacatgtgaagagg
cacgctgtaaatctcttaggacgatttcccaatgggaaggtaaggagcctccaatttctccgggttggtgt
aactgcaaaacttttctgtgagtgaagggtatcgactgcaaggccaccttctagtctgggtgttaattgct
ggacagggagtgtctggacaaaaatgccagtatgtgaagaaatttttgcccatcacctccccctattc
tcaatggaagacatataggcaactcactagcaaatgtctcatatggaagcatagtcaactacacttgtga
ccgggaccagaggaaggagtgaaacttcatccttattggagagagcactctccgttgtacagttgtagt
cagaagactgggacctggagtgccctgccccacgctgtgaacttctacttctgctgggttcagtggtccac
atccccagatcctaagaggccgaatggatctgggagcaaaagatcgatatacctataacgacactgtgat
atttgcttgcagtgtttggcttcaccttgaaggggcagcaagcaaatccgatgcaatgcccaggcacatgg
gagccatctgcaccagtctgtgaaaaggaatgccaggccccctcctaacaatcctcaatgggcaaaagggaag
atagacacatggtccgctttgaccctggaacatctataaaatatagctgtaaccttggtatgtgctgggt
gggagaagaatccatacagtgtagcttgccttgggggggtgtggacccccctgtacccaatgcaaaagggtgga
cgtgtgaagctcacaaggaaggcaactcttgacaaaaacccagcaccaatttgtagaccagatgtcaact
cttcttgggtgaagggtacaagttaagtgaggagtgttatcaggagtgtaaggcacaatttcttgggt
tatggagattcgtcttgtaaagaaatcactgccccaccacccctgttatctacaatggggcacacacc
gggagttccttagaagatttccatatggaaccacgggtcacttacacatgtaacctggggccagaaagag
gagtggaaattcagcctcattggagagagcaccatccgttgtacaagcaatgatcaagaaaggagccctg
gagtggccctgctccccctatgtaaacttccctccttgcctgtcagtgctcacatgtccatattgcaaat
ggatacaagatatctggcaagggaagccccatatttctacaatgacactgtgacattcaagtgttatagtg
gatttactttgaagggcagtagtcagattcgttgcaaacgtgataaacctgggatcctgaaataccagt
ttgtgaaaaaggctgccagccactcctggggtccaccatgggtcgtcatacaggtggaatacaggctcttc
ttgtctctgggagtagctgtagactacactgttgaccctgggtatttgcttggggaaacaaatccattc
actgtatgccttcaggaaattggagtccttctgccccacgggtgtgaagaaacatgccagcatgtgagaca
gagtcctcaagaacttccagctgggttcacgtgtggagctagttatatacgtcctgccaaagatgggtaccag
ttgactggacatgcttatcagatgtgtcaagatgctgaaaatggaatttggttcaaaaagattccacttt
gtaaagtattcactgtcacctccaccagtgattgtcaatgggaagcacacaggcatgtggcagaaaa
cttctataatggaaatgaagtccttatagaatgtgaccaaggattctatctctgggagagaaaaatgtc
agtgacagaagtgatttcaaggcatggatcttgagcagagccttcccacagtgttacgatctctgtgccc
ctaataccagaagtaaacatgggtacaagctcaataaaacacattctgcataattcccacaatgacatagt
gtatgttgactgcaatcctggcttcatcatgaatggtagtcggtgattagggtgtcactgataacaca
tgggtgccaggtgtgccaacttgtatcaaaaaagccttcatagggtgtccacctccgcctaagaccctta
acgggaaccataactggtggaaacatagctcgatttctcctggaatgtcaatcctgtacagctgtgacca
aggctacctgggtgggtggagagccactccttcttgcacacatgagggaacctggagccaacctgcccct
cattgttaaagaggtaaaactgtagctcaccagcagatatggatggaaatccagaaagggtggaaaccaagga
aaatgtatcagtatggagctgttgtaactctggagtgtaagatgggtatatgtggaaggcagtcacca
gagccagtgccaatcggatcaccaatggaacctccccctgggggttgagatcccggttacttgctcct
gtccttctgtggtattgtcaggtttgataacttcttaccttcttgattgtcattaccttatacgtgat
caaaacacagagaacgcaattattatacagatacaagccagaaagaagctttcatttagaagcacgaga
agtataattctgttgatccatacaaccagccagctgatacagaagacaaaactgggtgtgtcctcattgct
tggaattcagcggaaatttgattagaagaaactgctctaatacagcaagctctcttataatggcctcaa
gatcaatgaaatgatgtcataagcagtcacttctatatgacatttctcaagaagaacatcttattg
taaagatgggagccagtttactgcatataactcttcaaggacttctgaagcctcacttatgagatgc
ctgaagccaggccatggctataaacattacatggctctaaaagtgttgccttcttaaggaggcactaaa
aagagctgtcctggatctagaccatcttcttttgaaatcacatactcatgttactatctgcttttg
ttataatgtgttttaattatctaagatgaagcatttctgggggttatgatggccttacttttattag

[0007]

gaagtatgggttttattttgatagtagcttccttcctcggtgggtgtaataatcttcgtttttaccctttac
cttcggatttgagtttctctcacattactgtatatactttgccttcataatcactcagtgattgcaatt
tgacaaagtttttttaaatttatgggaatcaagatttaatacctagagatttggtgtacaattcaggctttg
gatgtttcttttagcagttttgtgataagttctagttgcttgtaaaatttcacttaataatgtgtacatta
gtcattcaataaattgtaattgtaagaaaacat

<210> 15
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 15

15>Ly1462P, CR2/CD21/C3d/ 病毒受体, 全长
MGAAGLLGVFLALVAPGVLGISCGSPPPIILNGRISYYSTPIAVGTVIRYSCSGTFRLLIGEKSLLCITKDK
VDGTWDKPAPKCEYFNKYSSCPEPIVPGGYKIRGSTPYRHGDSVTFACKTNFSMNGNKSVMQANNMWGP
TRLPTCVSVFPLECPALPMIHNGHHTSENVGSIAPGLSVTYSCESGYLLVGEKIINCLSSGKWSAVPPTC
EEARCKSLGRFPNGKVKEPPIILRVGVTANFFCDEGYRLQGPPSSRCVIAQGQVAVTKMPVCEEI FCPSP
PIILNGRHIGNSLANVSYGSI VTYTCDPDPEEGVNFILIGESTLRCTVDSQKTGTWSGPAPRCLESTSAVQ
CPHPQILGRMVSQKDRYTYNDTVI FACMFGFTLKGSQKIRCNAQGTWPSAPVCEKECQAPPNI LNQ
KEDRHMVRFDPGTSIKYSCNPGYVLVGEESIQCTSEGVTTPPVQCKVAACEATGRQLLT KPQHGFVRPD
VNSSCGEGYKLSGSVYQECQGTI PWFMEIRLCKEITCPPPPVIYNGAHTGSSLEDFFPYGTTVTYTCNPGP
ERGVEFSLIGESTIRCTSDQERGTWSGPAPLCKLSLLAVQC SHVHIANGYKISGKEAPYFYNDTVTFKC
YSGFTLKGSQKIRCADNTWDPEIPVCEKETCQHVRSQELQELPAGSRVELVNTSCQDGYQLTG HAYQMCQ
DAENGIWFKKIP LCKVIHCHPPPVIYNGKHTGMMAEENFLYGNESYECQDGFYLLGEKKLQCRSDSKGHG
SWSGPSPQCLRSPVTRCPNPEVKHGYKLNKTHSAYSHNDIVYVDCNPGFIMNGSRVIRCHTDNTWVPGV
PTCMKKAIDGCFPPKTPNGNHTGGNIARFSPGMSILYSCDQGYLLVGEALLLCTHEGTSQPA PHCKEV
NCSSPADMDGIQKGLEPRKMYQYGA VVTLCEGDGYMLEGSPQSQCQSDHQWNPPLAVCRSRSLAPVLCGI
AAGLILLTFLIVITLYVISKHRERNYTTDSQKEAFHLEAREVYSVDPYNPAS

<210> 16
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 16

16>Ly1484P, Old-SEQ-ID_10493, 部分cDNA
ctgggcaanaccaagtcacagtttccagcgtgctgctcagccctccgagtggtgtgtgctc
atccttttcatagaagtcctatmkgsatggagaggggttgggctgcaragctgwgattgc
cagagggccttctctgagaactgtgggaaggaggccctgggggttctctctgtaggcag
agctcaggccccagtcacctctgccaccctcagcctggcactgtgtgtccagagcctctg
ctgcctctctcttctcctacccatctgcagaccagcagaatattctccccctctcatcacca
accaggagtttggtgtgggttcttgacacggccagagcagtcactgcggggctgggttttg
ctgggcttccctgtcaagcaatgctaactgctcagctctcgactcaaggccaggttcttc
tcccacttgtggcctcttgggcttgaggctgagccaggggctcctctctctgctggcgt
ccaggaaacagacatcttcacatcctcagctcttccaaacccggaccatgccgtcttgactc
ccggtgatgatgatctggcttggtgtcccatgctgggcccctccatcaggcagcaacaggtt
atggctcctctctgggccccaggctgtggtgatgctgg

<210> 17
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 17

17>Ly1484P, KIAA1607, 全长cDNA
agcgagacttccagtcagaggtcctgctttctgctatggaactattccacatgacaagt
gaggtgatgcagcgatgttcagagacggcaagagcctcagccaagtcagaagctgctg
ctgcccccttctcttgccaacatctcctgcttcacccagaagctggaggagaagctgtaca
gtgggatgttctcggcagacccagcagatctcctcctcttcatcctggagcacatcatgg
tggtcatttgagactgcctcttctcaagggacactgtcctcagcactttatacagcagtt
taaataaagtcatcttcttctgctatccaagccccagcagtcctctccgaatgcctcg
gccttctcagcatcctgggcttctcgcaggagcactgggatgtgtgtctttgccacctaca
attccaacatcagcttctcctgtgtctcatgcatgcttttgctactcaatgagagaa
gttaccacagaagatttgattggagcccaagcctagaatgtctacttatcatcaagctc
tcttttcccaaatgaagacgtgaaagaaaaagagaagacttaccagtttgagtgatg

[0008]

tccaacacacatccagaagacagtgcagactctctggcagcagctggcggcacaaggc
 agcagaccctggaggtatgccttcaagatcgatctctctgtgaaacctggagagagggaag
 tgaagattgaagaggtcacaccgctctgggaggagcagatgctcaaggcctggcagcatt
 acttagcatctgagaagaagtcaactggcaagtcgttcaaatgttgacacacacagcaaa
 tcaacttctggagtggaagcctgtcctcagccatgaagctgatgcccggcgaggcca
 aggacccctgagtgcaagacagaggatttctgtctatgtatagagaactacagaagaagag
 gacaagagctatatgcattcttatatacaaaagacatgtgcaaaaggcgaatgtggcaca
 tcaaggcagccaacgctctgggcccaggtatccaggagcagcttttggggagctgggcttgt
 ggagccagggggaagaaaccaagccctgttcccctatgggaaactcgactggagagaaggac
 cagctcgaatgaggaaacgcatacaacgcttgtctcctttggaggccctgagctcaggaa
 ggcacaaggaaagcgaagacaaaatgatcatatttctcaaaacaaatgctgaaaaccaag
 atgaactgacactgagggaggtgagggcgagcggacgaggtgggggtgagctgaccc
 agctgaccttcttccagccttacacgaagctcgactcagaagacttcttggaactgt
 gtcgggaaagacaagtattttacaagagcttcttgataaaagaaaggtgacgcagaagt
 tctcctctgggtattgtgcaggccacctgggtgcagaagggtcctgcttttggccacc
 aacacttctacatctgcgagaacttcacactgttcccacgggtgatgtctactgtaccc
 gtactgcttattccaacatcagcgatccgttcatatttcaacctgtgcagcaaaagacaggt
 ccactgaccttactcgtgcagtgccacagctacgctgacatgcccggagctacggcagg
 ctgcttctcctcagcagacatcgccctggagatcttcttccacaatggatattccaagt
 tcttgttcttacaacaatgatcggagtgaaggcctttaaagcttctgctcttctcaac
 ccagcctgaaggggaagccacctcggaggacacctcaatcctaaggagataccccggct
 ctgacaggatcatgctgcagaagtggcagaaaaggagacatcagcaattttgagtatctca
 tgtacctcaacaccgaggctgggagaacctgcaatgactacatgacagtaccaggtgttcc
 cctgggtcctcgagactacacctcagagacattgaacttggcaaatccgaagatttcc
 gggatcttcaagcccatgggggctcagaccaaggaaaggagctgaatttatccaga
 ggtttaaagaagttagaanaactgaaggagacatgactgtccagtgccactactacacc
 actactcctcggccatcatcgtggcctcctacctgggtccggatgccaccttccaccagg
 ccttctgcgctcgcagggcggaagcttcgacgtgcgacagaaatgttccacagctga
 agagcacgtgggagtcggcctccagagagaacatgagtgacgtcaggagctgacccag
 agttcttctacctgcctgagttcttaaccaactgcaacggggtagagtctggctgcatgc
 aggaaggagctgtgctaggagacgtgcagctcctcctcgggctgatggggacctcggga
 aattcatcagcctgcacagaaggccttgaaagtgaacttctcagtgccaaacctccacc
 attggatagaccttattttgggtacaagcagcaggggccagcgcagtggaatgctgtta
 atatcttccaccctacttctacggtgacagaatggacctcagcagcatcactgaccccc
 rcatcaaaagcaccatcctgggggttgtcagcaacttggacaggtgccccaaacagctct
 ttaccaaacctcaccagccaggactgcagcagggaagcctctgcctggaaaggattct
 ccaccccgtagcctgcctggccacccacagccttttctacagcctgcagctcgtga
 ggccctcccaggctcacggtcaagatatgtacctcttctctaggctcagagctcccca
 aaggggccattggccacattgtctctactgagaagaccattctggctgtagagaggaa
 aagtgtgctgctcctctctctgggaacaggaccttcagctggggcttctgactcagct
 gctgcttggggagctacggctccgacaaggctcctgatgacattcgagaacctggctgct
 ggggcccgtgtctgtgcccgtgtgcccaccccaacacagatgtgcacctctgggacca
 gcactgtggtgtgtgtgggagctcagcatgaccaaaggccgcccagggggtgtgcgct
 tccggcaggccttgtatggacacacacaggctgtcacgtgcctggcagcgtcagtcacct
 tcagcctcctggtgagcggctcccaggactgcacctgtatcctgtgggatctggaccacc
 tcacccacgtgaccgcctgcccggccatcgggaaggcatctcagccatcaccatcagtg
 acgtctcagggcaccattgtctcctgtgcccggagcacacttgtcctctgtggaatgtcaatg
 gacagccctggccagcatcaccacagcctggggccagaaggagccataacctgtgtgt
 gctgtgagggggccagcatgggacacaaagccagatcatcatccgggagtcagacg
 gcatgggtccgggtttggaagactgaggtatgtgaagatgtctgttctggacggccagcag
 gagaggagcccctggctcagcctccaagcccaaggggccacaagtgggagaagaacctgg
 ccttgagtcgagagctggacgttagcattgtcttgacagggaagccagcaaaaccagcc
 ccgagctgactgctctggcgtgtccagaaccacaccaaactcctgggtgggtgatgaga
 ggggggagaataattctgctggtctgcagatgggtaggaagagagggcagcagaggctctg
 gcacaacagtgccaggctgaggggtggcagaggtgactggggcctgagctctgacctacaga
 agaaacccccagggctccttccccacagttctcaaggaaaggcctctggcaatcacagc
 tctgcagcccaacctctccatggcagatgggacttctatgaaaggatgagcacacaca
 ctggagggtgagcagcagctggaaactgtgacttggtgatgcccagctgcacacgaa
 attacacatgactcaccttattaagggtatttgactgaaaaaaagagatgggtcgc
 ctactggaattattgtattgtcttattttatttaagcaactatgtttt

<210> 18

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 18

18>Ly1484P, KIAA1607, 全长蛋白质

[0009]

MNISRDNAMPVFLRNCAGHLSGSLRTIGAVAVGQLGVRVHSSPAASSLDFIGGPAILLGLISLATDD
 HTMYAAVKVLHVSILTSNAMCDFLMQHICGYQIMAFLLRKKASLLNHRI FQLILSVAGTVELGFRSSAITN
 TGVFQHILCNFELWMNTADNLELSLFSHLEILQSPREGPRNAEAAHQALIPKLI FLNPSLIPSKIP
 TIIGILACQLRGHFSTQDLLRIGLFVVYTLKFPSSVNERQICMDGALDPSLPAGSOTSGKTIWLRNQLLEM
 LLSVISSPOLHLSSESKEEMFLKLPDWFLLLQGHLLHASTTVLALKLLLYFLASPSLRTFRDGLCAGS
 WVERSTEGVDIVMDNLKSQSPLEQSPCLLPGFRVLNDFLAHHVHIPEVYLIVSTFFLQTPLELMDGPK
 DSLDAMLQWLLQRHHQEEVLQAGLCTEGALLLEMLKATMSOPLAGSEDAWAQTFPASVLQFLSLVHRT
 YPODPAWRAPEFLQTLAIAAFPLGAQKGVGAESTRNTSSPEAAAEAGDSTVEGLQAPTKAHPARRKLREFT
 QLLRELLLGASSPKQWLPLEVLLLEASPDHATSQQKRDFOSEVLLSAMELFHMTSGGDAAAMFRDGKEPQP
 SAEAAAAPSLANISCFQKLVEKLYSGMFSADPRHILLFLEHIMVVIETASSQRDTVLSTLYSSLNKVI
 LYCLSKPQQSLSECLGLLSILGFLQEHWDVVFATYNSNISFLCLMHCLLLNERSYPEGFGLEPKPRMS
 TYHQVFLSPNEDVKEKREDLPSLSDVQHNIQKTQTLWQQLVAQRQOTLEDAFKIDL SVKPGEREVKIEE
 VTPLWEETMLKAWQHYLASEKKSLSASRNVAAHHSKVTLSWGSLSAMKMPGRQAKDPECKTEDFVSCIE
 NYRRRGQELYASLYKDHVQRRKCGNIIKANAWARIQEQLFGELGLWSQGEETKPCSPWELDWREGPARMR
 KRIKRLSPLEALSSGRHKESQDKNDHISQTNAEQDELTLREAGEPEDEVGVDCQTLTFFPALHESLHSE
 DFLELCRERQVILQELLDKEKVTQKFSLVIVQGHVSEGVLLFGHQHYICENFTLSPTGDVYCTRCLLS
 NISDPFI FNLCSKDRSTDHYSQCCHSYADMRELRLQARFLQDIALEIFFHNGYSKFLVFYNNDRSKAFKS
 FCSFQPSLKGKATSEDTLNLRRYPGSDRIMLQKWQKRDISNFEYLMYLNATAAGRTCN DYMOYFVFPWVLA
 DYTSETLNLANPKI FRDLSKPMGAQTKERKLKFIQRKEVEKTEGDMTVQCHYTHYSSAIIVASYLVRM
 PPFTQAFCALQGGSFVADRMFHSVKSTWESASRENMSDVRELTPEFFYLPEFLTNCNGVEFGCMQDGT
 LGDVQLPPWADGDPKFI SLHRKALESDFVSANLHHWIDLIFGYKQQGPAAVDAVNI FHPYFYGDRMDLS
 SITDPLIKSTILGFVSNFGQVPKQLFTKPHPARTAAAGKPLPGKDVSTPVS LPHGPQPFYSLQSLRPSQV
 TVKDMYLFSLGSESPKGAIGHIVSTEKTI LAVERNKVLLPPLWNRTFSWGFDDFSCCLGSYGSDKS

<210> 19

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 19

19>Ly1486P, Old-SEQ-ID_5058, 部分cDNA

ctgccccttccatgctcgtcacagcataccggcgctggaccactgcttggtgcccttgcc
 gaagtagtagcacttccgttggaaattgatccacttttcagggcacgtgtgacacacaa
 gccgctggacacctgcaactccatccttagctttgtcacctcctccggagctcttccag
 caaatctgaagcttcggttccctcctgcttcaattcctgggacttgaagctgctcagatctgc
 ttgaagcccgcttcaggttccaggacagctccaagctcctgagatttcaatctcgtgcttc
 agctcgaagttcctccagttcctgtgaaattcgtgactgggatttctgcccattctg
 gtcaccgtggtggcttcccaagttccttgaaacttgagagacgttccgggcagccctctc
 ttccag

<210> 20

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 20

20>Ly1486P, IgE的Fc片段, 低亲和力和II, (CD23A)的受体, 全长

ggcagcagggctgcttaaactctgtctctgacgggtccctgccaatcgctctgggtcgaccccaacacacta
 ggaggacagacacagggctccaaactccactaaccagagctgtgatgtgcccgtgagtggaactgctgtg
 tcagggagtgagtgctccatcatcgaggagaatccaagcaggaccgcatggaggaaggtcaatattcaga
 gatcgaggagcttcccaggaggcggtgtgacggcggtgggactcagatcgtgctgctggggctgggtgacc
 gccgctctgtgggctgggctgctgactctgcttctcctgtggcactgggacaccacagagctctaaac
 agctggaagagagggctgcccggaaactctctcaagtttccaagaacttggaagaccacacgggtgacca
 gatggcgcgagaaatcccagttccacgcagatttccaggaactggaggaacttcgagctgaacagcagaga
 ttgaaatctcaggacttggagctgtcctggaactggaacgggcttcaagcagatctgagcagcttcaagt
 cccaggaattgaacgagaggaacgaagcttcagatttgctggaaagactccgggaggagggtgacaaagct
 aaggatggagtgacaggtgtccagcggtttgtgtgcaacacgtgcccgtgaaaagtggaatcaatttccaa
 cgggaagtgtactacttcggcaggggcaccacagcagtggttccacgcccggatgctgtgacgacatgg
 aagggcagctgggtcagcatccacagcccggaggagcaggacttctgaccaagcatgccagccacaccgg
 ctctggattggccttcggaaacttggactgaagggggagtttatctgggtggatgggagccacgtggac
 tacagcaactgggctccaggggagcccaccagccggagccagggcgaggactgctgtgatgatgcccggct
 ccggtcgtggaacgacgccttctgcgaccgtaagctgggcgctgggtgtgacgacggctggccacatg
 cagccgccaagccaggaaggttccgaggagctccatgggacctgattcaagaccagaccctgacggccgc
 ctgcccacccccctctgccccctctccactcttgagcatggatcacagccagggccagagcaagacctgaag
 acccccaaccacggcctaaaagcctcttgggtgctgaaaggtccctgtgacatttctgcccacccaaacg
 gaggcagctgacacatctccgctcctctatggccctgcttccaggagtagaccccaacagcaccctctccag
 ctccagatgggagtgccccaacagcaccctctccagatgagagtagaccccaacagcaccctctccaga

[0010]

tgagagtacacccaacagcaccctctccagatgagagtacacccaacagcaccctctccagatgcagc
cccatctcctcagcaccacaggacctgagtatccccagctcaggtggtgagtcctcctgtccagcctgca
tcaataaaatggggcagtgatggcctccc

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

<400> 21

21>Ly1486P, IgE的Fc片段, 低亲和力II, (CD23A)的受体, 全长
MEEGQYSEIEELPRRRCCRRGTQIVLLGLVTAALWAGLLTLLLLWHWDTTQSLKQLEERAARNVSQVSKN
LESHHGQMAQKSQSTQISQLEELRAEQRLKSQDLELSWNLNGLQADLSSFKSQELNERNEASDLLER
LREEVTKLRLMELQVSSGFVCNTPCEKWINFQRKCYFYGKGTQKQVHARYACDDMEGQLVSIHSPEEQDFL
TKHASHTGSWIGLRNLDLKGFIWVDGSHVDYSNWPGEPTSRSQGEDCVMRGSGRWNDAFCDRKLGAW
VCDRLATCTPPASEGSAESMGPSRDPDPGRLLTPSAPLHS

<210> 22
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 22

22>Ly1677P, 新的, 部分, cDNA
atcagcacgaatacattcacgtccaacaacacatcaactaccaacaccatcaccacgagcacattcatgccaacaacac
atcaaccaccaacaccttgccacaaaacacattcatgtctaaacacacatcaattaccaacaccagcgccgaacacat
tcacgtccatcaacacatcaaccaccaacaccatcagcacgagcacattcacatccaataacacatcaactaccaacacc
agcaccatgaacacattcatgccaacaacacgtaaaacccctaacactgtcaccacaaaacaccttacagccagcagaacy
ccagtcactaacaccatcgccatcagcacttcgtggttagcaaacacctcagctgacgccaatgtcaccacaaaacacctca
tggccagaagcagctcaaccaccaacaccgttatataaatacattcttgaccatcaatgcttcaactgctgacaccatt
accataaaatacatccatggccagcaatacttcaatcaccaacaccatgaccagcagcagctcagcggccatcactgtcac
cacaacacaccttcataccaataacacttcaaccaccatcatcaccacaaaacacctcatagccaacagtgccctcagccac
caaccccatcatgacaaaacacctcatggccagcagcacttcaaccaccaacaaaacccctccaaggctcagcaaacacctca
tcaccgacatcattaaacagaggtaccaccaccagcagcagcttatctccaccacccacaccacagccaacaccatcttt
accaaccacaccagccgtgtcttcatcactggcaccgacagcaaaacagtgctgtggtggccaggtccaccagcgattactt
tccccaaagcaccatccctaccaacagccctgggtcatcatcactggcagaacccgccaacaccagcactcctagccaatgtc
tgggaaattgngatnatcttctccagtggtgggagctntggtcaggagagccaatgggattgcaagactaggtcccacaat
ccctcaatatggtctcttntcccccttccccccacc

<210> 23
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 23

23>Ly1682P, 新的, 部分cDNA
aggtagcggggagcttcaacgacttactggggagagaaaagaaaaggaaacgggagctgag
agctgggagtgagtagtagaagaccaaggaattctcttaaagacctgagcagttatctgga
actcctcacaaaatcacagtaattggatattttccagttcctactctacactgggcat
agatgttatggacatcttctgagtcaccacaacacccctgcaaggcagatatgatacactc
ctttcacctatggagaacggaggtcaaagaggctaggtagacctcaggaaacacagatg
agagggtccccgcccagctgcccagctctgaaatcttccatgccaaactcccttagggcga
tcctgagtcagcctgtacaggcagttcatgtggttgatattgaaataaaatccctttcct
ccagaataaaaaaaaaaaaaataaaaaaaaaaatgaaaaattgaaagggaiaaaaaa

<210> 24
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 24

24>Ly1693P, Old-SEQ-ID_2611, 部分cDNA
ccaccaacagtcagaggccaaggaagctgttggtgaaaagggtggtctatgttggcgctc
ggatccctgccctcctgctgactattcccgacttcactcttgccaacgtcagtgaggcag
atgacagatatatctgtgaccgcttctaccccaatgacttggtgggtggttggttccagt
ttcagcacatcatggttggtcttctcctgctggtattgtcatcctgtcctgctattgca

[0011]

ttatcatctccaagctgtcacactccaagggccaccagaagcgcaaggccctcaagacca
cagtcacctcatctctggctttcttcgctgttggtgccttactacattgggatcagca
tcgactccttcatcctcctggaaatcatcaagcaaggggtgtgagtttgagaacactgtgc
a

<210> 25

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 25

25>Ly1693P, CXCR4, 全长cDNA

caattctgaatcctgccttttgcacttaattgtttcataagtatctcccatgtcactaaa
aattcttccaaataacattcacgatgtccatatggaatttcagatgtggatgaacaaaa
tcttgtcaactattccactaacagtgggtatttagggatgttcagacatttactattta
aaaaaaaaatgtttccacaaataccttttggcagataagtttttatgagtgagggtactgtt
ctgaagtctctgtgaatagaaaaatgctttccagtgggctgtcccaaggcacattccca
tcagtgaacgagagagagagctgggtcttttcaaatccggagaccaaataattatctttga
aaaaaaaaatggatttttgcctaatttggtagtcaccaaatagcatctcattgttcttttaa
ttatctgcttcttttagtagagatccctaaaaagatctgaaaggagcttccagataaag
gaaggagcttcttttctgtctgtacaaatcaacaaatatttatgcaaacatttttgc
tccgagtttcttctcttcttcttcttggacagatttgggagatctcacttccaggtt
tagacatctgtcagggaggagttttaggttaggtgtcagcttacggtccaggataaaaca
tactgatttctgccactaccaggctttagtgaagcaagtcagaaacgctctgaaattc
tagacctcagtagataggatctaccgtgtctataaaaatatgaagatccttaagtttta
ttaaagattcgaaaaaagtaaaagtgttttaccggttttatttccatttttatttcttac
cgttatcgtttattataaaggatatataaaggatcacagatgaagagatcgtaatgcaa
ggcctgtgagaagggcggtggagcttccgaacctcttccagccaccacctccaagaac
ctggagtttctttttttttttttaaattctacaaatgtaattatagaattgattttatctg
gccattagtggtgtcttaactcggttctgtgagagtcctcctccggcccggggata
tcattcttctgtgtcagtgaaagtgcagagtagatgagaacctttaaccaccaacatt
gggaggggtccagacaaaggggtaagtcatgctctgtagagaaaaggttccctgcctc
cgaactacctctggaacactccagtaaatgttctcttctgtatagaaaagagggtatc
gtgtgtagagtcagctcgggcaatccctctctcgggaccatttccgggtaggggcctc
tgggggtccgtgtcgcagcgcgcgcctcggtcccagctatctccgcagcgggccaaccc
gcctgcggacgcagtttctcggcccccgcacactcgtctcccccgcacccagctctc
cgcccgagggaagtggcgcgagggggaaagcactgtctgcgcgccactgcgaacctc
agccagtcctgagatcgctttaaactgtgacccccacccccactccgccccgcccagttc
ttcaacctaatctctgattcgtgcacaaagctgtctctctgctcaaaatcgtggaagacgc
cgagtatggggaccgaagacctgggttcaagcccggttggaatccctgccatccctgg
catttcatctctcggggttatttgtgtgttctccgaatgcgggcttctgtgttccac
gtgtgattccccacgcctagaacagtgctgtgacgcagcttctctctataaatatcg
gactaatgcatctctgtgtgtgttaataccacacgggtgtgtgagaatgaatgagtgat
tctgtgcaagttcctagtgatctgttacaaaaagtaggtcgctaaattactcttataa
taaagcatacttttaggataataaagcactattcgcgaattgggtaccgctattatgaaa
ttactgagcaatacatatctacatctgacagtcctccgaattatgccaatactactctt
cttctgaaagtatctcctaattatctgcacctgacctagtgatgtgtgaaagtgcag
tatagctacatctccgaaggaaaggatctttactccttttacctcctgaatggggtgcg
tctgtgaaagcgcgggggaatggggtgtggaagcttggccctacttccagcattgccc
cctactggttgggttactccagcaagtcactcccccttccctgggctcagtgctctact
gtagcattcccaggtctggaattccatccactttagcaaggatggacgcgccacagagag
acgcgttccctagcccgcttccacactgtctttaggcgcacccgcttccctcaactt
aggaaatgcctctgggaggtcctgtccggctccggactcactaccgaccacccgcaaca
gcagggtcccttgggttcccaagccgcgcacctctccgccccgccccgcccgtcctt
cctcgcgtctgcccctctccccaccccgcttctccctccccgccccagcggcgcatgc
gcccgcgtcggagcgtgttttataaaagtccggccgcccagaaaacttcagttgttg
gctgcggcagcaggtagcaagtgacgcgagggtcctgagtgctccagtagccacgcgat
ctggagaaccagcgggtaccatggaggggtagtgtaagtcagtttcaacctgctttg
tcataaattgacaaacgtttgaacttagagcgcagccctctccgagcgggcagaagcgg
ccaggacattggaggtaccgtagctccaaaaaagggtcaccgaaaggagtttcttgacc
atgcctatagtgcggttgggtggggggggagcaggatgggaattctttctctgtgag
tcgaggagaaacgactggaagagcgttccagtggtgcatgtgtctcccccttgagtc
cgccgcgcgcggcggttgcacgctgtttgcaaacgttaagaacattctgtgcacaagtgc
agagaaggcgtgcgcgtgcctcgggactcagaccacccggtctcttcttggggaagcgg
ggatgtcttggagcaggttacattgtctgaatttagaggcggaggcggcgctgctgggc
tgagttcccaggaggagattgcgccgctttaaactcgggggttaagcgcctggtgactgt
tcttgacactgggtgcgtgttgttaaactctgtgcggccgacggagctgtgcccagtc
ccagcacagttaggcagagggcgggagagcgggtggacccacccgcccagatcctctgagg

[0012]

ggatcgagtggtggcagcagctaggagttgatccgcccgcgcgctttgggtttgaggggg
aaaccttcccgcgctccgaagcgcgccttccccacggccgcgagtggttctgcagtt
cgagagtttggggtcgtgcagaggtcagcggagtggtttgacctccctttgacaccgcg
cagctgccagccctgagatttgcgctccggggaaggagcgggtacggggtgagggggcgg
ggcggttaagaccgcacctgggctgccaggtcgccggccggaagactggcaggtgcaag
tggggaaaccgtttggctctctccgagtcagtttgtatgttttaaccgtcggtggtttcc
agaaaccttttgaacctctcttgctagggagtttttgggtttcttcgacggcgcgcaatt
caaagacgctcgccggcgagccgcccagtcgctcccagcaccttggggacagagcctg
gcgtgtcgcccgagcggagcccttcgagcgtgcttgcgggcggttggcgtgggtgtagtg
ggcagcccgccggcccggggtggacgacccggcccccgcgtgccaccgcctggagg
cttcagctgccacctccggccgggttaactggatcagtgccgggttaaggaaacca
ccggggagagtgaggaaatgaaacttggggcgaggaccacgggtgcagaccccgtaacct
tctccaccaggaaatgccccgctccctaacgtcccaaacgcgcaagtgtataaacag
aggatggcaagagaccacacccggaggagcggccgcttgggggaggaggtgcctttg
ttcattttctgacactcccgcccaatataccgaagcaccgaaggcccttcgttttaaga
ccgcatctcttttaccactacaagtgtcttgaagccagaatgggtttgtatttaggcag
gcgtgggaaatagtttttgcgcttaggagagtgagtccttgcaacgccccgcct
cccccgctgacccctcttccctcttccctccctggcgaaaaacttcttataaaaa
gttaatcactgcccctcttagcagcacccacccccccccacggccctgggagtgcc
tctttgtgtatttttttttctcctaaggaaggttttttcttccctctagtggc
ggggcagaggagttagccaagatgtgactttgaaacctcagcgtctcagtgccctttg
ttctaacaagaattttgtaattgggttctaccaagaaggtatataatgaagtcactatg
ggaaaagatggggaggagagttgtaggattctacattaatctcttgtgccttagccca
ctacttcagaatttccctgaagaaagcaagcctgaattgggtttttaaattgcttataaaa
atttttttaactgggttaagtcttgcgtgaattggaagtgaattgccattcctttgcctct
tttgagataatacacttcagataactacaccgaggaaatgggctcaggggactatgactc
catgaaggaaccctgttccgtgaagaaatgctaatttcaataaaatcttccctgccac
catctactccatcatcttcttaactggcattgtgggcaatggattgggtcatctggtcat
gggttaccagaagaactgagaagcatgacggacaagtagcaggtgcacctgtcagtgcc
cgacctcctctttgtcatcacgcttcccttctgggcagttgagccgtggcaactggta
ctttgggaacttccatgcaaggcagtcctatgtcatttacacagtcacacctctacagcag
tgtcctcatcctggccttcatcagctcggaccgctacctggccatcgtccacgccacca
cagtcagaggccaaggaagctgttggctgaaaagggtgggtctatgttggcgtctggatccc
tgccctcctgtgactatcccgacttcatctttgccaacgctcagtgaggcagatgacag
atatctctgtgaccgcttctaccccaatgacttgtgggtgggttgtgttccagtttcagca
catcatgggttggccttatcctgcctgggtattgtcatcctgtcctgtctattgcatatcat
ctccaagctgtcacactccaagggccaccagaagcgcaaggccctcaagaccacagtcac
cctcatcctggctttcttgcctgttggctgccttactacattgggatcagcatcgactc
cttcatcctcctggaaatcatcaagcaagggtgtgagtttgagaacactgtgcacaagtg
gatttccatcacggaggccctagctttcttccactgttgtctgaaccccatcctctatgc
tttcttggagccaaatttaaaacctctgccagcacgcactcacctctgtgagcagagg
gtccagcctcaagatcctctccaaaggaaagcgaggtggacattcatctgtttccactga
gtctgagcttcaagttttcactccagctaaccagatgtaaaagactttttttatacg
ataaataacttttttaagttacacatttttcagatataaaagactgaccaatatgtga
cagtttttattgtgtgtgtgtttttgtctgtgtttctttagtttttgtgaagcttaatt
tgacttattatataaaattttttttgtttcatattgatgtgtgtctaggcaggacctgtg
gccaagttcttagttgctgtatgtctcgtggtaggactgtagaaaagggaactgaacatt
ccagagcgtgtagtgaaatcacgtaaagctagaatgatccccagctgtttatgcatagat
aatctctccttcccggtggaaagcttttccctgttcttaagacgtgattttgctgtagaag
atggcacttataaccaagcccaaagtggtatagaatgctgggttttcagttttcagga
gtgggttgatttcagcacctacagtggtacagtccttgtattagttgttaataaaagtaca
tgttaacttacttagtggtatgttctgatttctgttgacattcttttggctagtagaag
acaaaagtaatacatttatggatgcaagcactatcctaggtatttcatgtgaatttt
tacttacccttatcacactctgatatagattctgcttctgttactaattacattttatag
aagaggaaacgggagggcacagaaagcctaagtaacttgggttaaaggcatgtagtaagtatc
aaatcctgtattttaaaccaggtaacatgacttaacgaatctgaagccttcaccacttta
aattcaaatggaagtttagaaatggccagccagcacctatttgtatgaaaggtcatctt
cagaggataagcatgtataaagaagaaaggtatgcagtcgtgtttggattttactccac
catccactgtgaaaccaggctctgtgcaatgccagacgggtgtgtgcttctcatccag
tatcctcagtgtagataaccatcactccctttcacagacaagagaactgagattcagag
actttccatacatgtcactttcaagggggcaaagccaagaactaattctgtttattgttc
cagctcttgcctcttaactcttacctactattgccttcagaacacctgggcataagtcac
ctgaactgtctaataaagaagccaaaagtgaatgttttctcataaaattaaccatgacc
aaaatactcctctgtgaatatcttctatgcaaatctcaacacttttattcttaaaactatc
gcaacacctagcacctcctcaaggactcagccaagcagctacaagttaatactgatattt
gttagagtcagaagggaaggtccactgaagcaagctccctgtgtgtcatattttgcacaag
attttggagacttatgtaaccacccgttgctatttaacacgaccattgtgcaagccccag
ctcttgagtaaattcagcttgggtttctatttaagataatttttaactctagccata

[0013]

cctacctcacattggaacacaaacaggggtacactccaggcatgactcagataataagta
 ggatataattacgacaataatttgggtctacttttagtaattggttctggcacagaaaatcc
 atttggaggaaaaattgcaatgccttatcttctgaggcaaatcacatttggtcaaggc
 aattatagatcctgtgaagggaaataacttaattacttaaaatagaatccaatttggt
 gtacatttttgcctgccgtctatggatctggggttaattcaaagtggattcatattctact
 tggagacacaaattagatttcagataggaaattatcttgagggttcttggttttccctgag
 aagcctaattggatcaccttcatttaagcatagttttacatgcactctctcaaaggctt
 agtcttaaagccacaaacattgagacagacttcaactgaaacctctctataaatatttat
 tctccgggagacaatagaagaaatccttggaggcatgctttttcttctcatcttggt
 tgaacctctcttacctcagattcctctccttaccgtggagtcacaacaaaggaaactga
 gccaaaacaaaattcccagtgctaccagtcttaattggatatttcatctccttggaaca
 aagatggaatagcttttttccaaaagaaaaacaagccttggtctctccttgcccaaa
 aggggtgccccccaccccatcatctctgtcccaacctgcatgttagagcgtctccaa
 agccttccctgtgtcgtggtttgtctgacaatgtggggaaccagctctgctggccagcc
 cttgcatgaagtagctgattgttccctctcctcatccttatgaatggggcccttgaagt
 tcagtcagtagattcagttgtataatgaaagctaaaatatttaaattgtatgcatgctg
 ccaataacagcatatctgacatctaacttattaataacattaagcctgcaactagggg
 ggaaagtggatgttttttcttgcaagcctttgttttccctaaaatgacacttgaaaattt
 atctccccctactgcaggcttcccagcccccttttataattatgcttaaattaaaataat
 gatctctgggatactcttttggggagataccctacaggctttattttaaataattgaaacta
 gtgtttgtgactttctcctagatattgtcaaatattaaataaaggctccataaacaattg
 agctgtcttattccagataatacccatcttaggaggggcaaggatcc

<210> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 26

26>Ly1693P, CXCR4, 全长蛋白质
 MDVDEGQDMSQVSGKESPPVSDTPDEGDEMPVPEDLSTTSGAQQNSKSDRGMASNVKVE
 TQSDENGRACEMNGEECAEDLRMLDASGEKMGNSHRDQSSALSGVGGIRLPNGKLKCD
 ICGIVCIGPNVLMVHKRSHTGERPFQCNQCSSALSGVGGIRLPNGKLKCDICGIVCIGPN
 VLMVHKRSHTGERPFQCNQCASFQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTG
 HLRTHSVGKPHKCGYCGRSYKQRSLEEHKERCHNYLESMLPGMPVPIKEETNHNEMAE
 DLCKIGAERSLVLDRLASNVAKRKSSMPQKFLGDKCLSDMPYDSANYEKEDMMTSHVMDQ
 AINNAINYLGAESLRPLVQTPPGSSSEVVPVISSMYQLHKPPSDGPPRSNHSQAQDAVDNLL
 LLSKAKSVSSEREASPSNSCQDSTDTESNAEEQRSLIYLTNHINPHARNGLALKEEQRA
 YEVLRAASENSQDAFRVSTSGEQLKVYKCEHCRVLFLDHVMYTIHMGCHGCHGFRDPFE
 CNMCQYHSQDRYEFSSHITRGEHRYHLS

<210> 27
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 27

27>Ly1697P, 新的, 部分cDNA

ccagagagtaagaataggaggagaaaacatgctgcagatgtaggcggggccagattgta
 gacagcatagaaataatttgggcttttccctgttaaattcctctagcttctaggatacat
 tttttttaacttttgcctttgagataatttttagatttacagaagagttgcaaaaagagta
 gagagagtctctgtacacccttcacccagcttctctactgctaacaatcttacataatca
 tagtttcaacctgagaaatttagcatggggtagagtcctattaatgaaacccaggcttta
 ttcagatttcaccagggttttcagtaacatcctttatctgtttcagaattt

<210> 28
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 28

28>Ly1715P, 凝集素样NK细胞受体(LLT1), 全长cDNA

gaattccggcgaataatgcatgacagtaacaatgtggagaaagacattacaccatctgaattgcctgcaaac
 ccagggttgtctgcatcctaaagagcattctattaaagctaccttaatttggcgcttattttcttaataca
 tgtttctgacaatcatagtggtggaatgggtgctgctttaagcgcaataaagagctaaactgccatcaaga
 gccatcagtatgtcttcaagctgcatgccagaaagctggattgggttttcaagaaagtgtttctatttt
 tctgatgacaccaagaactggacatcaagtcagaggttttgtgactcacaagatgctgatcttgctcagg
 ttgaaagcttccaggaaactgaatttctgttgagatataaaggcccatctgatcactggattgggctgag

[0014]

cagagaacaaggccaaccatggaaatggataaatgggtactgaatggacaagacagtttctctatcctggga
gcaggagagtgctgcctatttgaatgacaaaggtgccagtagtgccaggcactacacagagaggaagtggga
tttgttccaaatcagatatatagtgcttagtggttacagcaaaagcccaactaatctttagaagcatatcg
gaactgataactccattttaaaatgagcaagaatttatttcttataccaacagggtatatgaaaatatgc
tcaatatcactaataaactgggaaaaatacaaaatcaaaatcatagtaaaatattacctgttttcatgggtgct
aatattacctgttctccactgctaataacatacccgagaatgagtaatttataaataaaagagatttaa
ttgaaaaaaa

<210> 29
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 29

29>Ly1715P, 凝集素样NK细胞受体(LLT1), 全长蛋白质
MHDSNNVEKDI TPSEL PANPGCLHSKEHSI KATLIWRLFFLIMFLTIIVCGMVAALSAIRANCHQEPSVC
LQAACPESWIGFQRKCFYFSDDTKNWTSORFCDSDADLAQVESFQELNLLRYKGPSDHWIGLSREQG
QPWKWINGTEWTRQFFILGAGECAYLNDKGASSARHYTERKWICSKSDIHV

<210> 30
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 30

30>Ly1727P, Old-SEQ-ID_6042, 部分cDNA
ccatgggatggctcttctgacattggggggccaggccaggccaggccaggccttagggcag
caaggaccaggccaaaggggcagggcctcctttggaggggttgaggggtacatcctcggc
tgggtgtttgcatccagggtccagcaggatctcttccagtgagggtcgggaagaagggtt
ggggggccaggcacccggcggttagggcacagcaatcttgggaaaaacatgggcttgggaa
gtggagctcagcttccagaatctcctggtccctctcaaagggaatgtccccacacacat
gtcatagaggaggtgcccagtgaccagacagtgccgggagtgcatgggtactgggtgctg
agagatccactctggggggctgtacacccttgtcccatcaaagtcagtgtagggttcac
atgaagcaggggcaccagaacaaaatcaatgagtttggcacagccacggcgtaggtctat
caggatgntctcatccttgatgtcacgatggacaactncacgggaaatggcagtgctgga
tggctgcccactactttgg

<210> 31
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 31

31>Ly1727P, pim-2 原癌基因类似物pim-2h, 全长cDNA
gaattcggcacgagcgcgcggaatctcaacgctgcgcccgtctgcgggcgcttccggggccaccagtttc
tctgctttccaccctggcgccccccagccctggctccccagctgcgctgccccgggctccacgcccctgc
gggcttagcgggttcagtgggctcaatctgcgcagcgccacctccatgttgaccaagcctctacaggggc
ctcccgcgcccccgggacccccacgcccgcgcagggagggcaaggatcgggaagcgttcgaggccgagta
tcgactcggccccctcctgggtaaggggggcttgggcaccgtcttcgcaggacaccgcctcacagatcga
ctccaggtggccatcaaagtgtatccccggaatcggtgctggtggctgggtcccccttgctcagactcagtca
catgcccactcgaagtgcactgctatggaaagtgggtgcagggtgggtgggcacccctggcggtatccgcct
gcttgactgggttgagacacaggaaggcttcattgctggtcctcagcggccctttgccccccaggatctc
tttgactatatcacagagaaggggccactgggtgaaggcccaagccgctgcttctttggccaagttagtg
cagccatccagcactgccattccccgtggagtgtccatcgtgacatcaaggatgagaacatcctgtaga
cctacgcgctggctgtgcccactcattgattttgggtctggtgcccctgcttcatgatgaacccctacact
gactttgatgggacaagggtgtacagccccccagagtggtatctctcgacaccagtagcatgactcccg
ccactgtctggtcactgggcatcctcctctatgacatggtgtgtggggacatcccccttgagagggaacca
ggagatttctggaagctgagctccacttcccagcccatgtctcccagactgctgtgcccctaatccgccc
tgcttggcccccccaaaccttcttcccgaacctcactggaagagatcctgctggaccctggatgcaaacac
cagccgaggatgttaccttcaacctcccaaggaggccctgcccccttggcctggtccttgctaccct
aagcctggcctggcctggcctggcccccaatggtcagaagagccatccatggccatgtcacagggtatg
atggacatttgggtgacttgggttttacaggctattaccagtcattaaagtcaggtattactaaggtaagg
attgaggatcaggggttagaagacataaaaccaagtgtgccagttcccttcccaatcctacaaaggagcc
ttcctcccagaacctgtggtccctgattttggagggggaacttcttgcctctcattttgctaagggaagt
tattttggtaagttgttccattttgagccccgggactcttattttgatgatgtgtcacccccacattgg
cacctcctactaccaccacacaaacttagttcataatgcttttacttgggcaagggtgcttccctccaat
acccagtagcttttatatttagtaaaagggaaccttccccctagcctagggtcccataattgggtcaagctg
cttacctgcctcagcccaggattttttattttgggggaggtaatgccctgtgttaccaccaaggcttctt

[0015]

```
<210> 32
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 32
```

```
<210> 33
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 33
```

<210> 34
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 34

[0016]

aagaaaatcttgcaagggtgttggaacttactgaagcagagaagatgtcctttgaaactcagaaaacgaa
 ccttgctacagaaaaatcagatatttaagagatccctggagaaggaagaaaaagccttatcctcattacag
 gaagagtttaacaaaactaagagaacagattagaatattggaagataaagggacaagtactgaattagttta
 aagaaaatcagaaacttaagcagcatttggagagggaagcagaaaaaacacagctttcttagtcaag
 ggagactctgttgacagaagcaagatgctaaagagagaactggagagagaacgactagttaactacggct
 ttaaggggggaactccagcagtttaagtggtagtcagttacatggcaagtcagattctcccaatgtatata
 ctgaaaaaaaggaaaatagcaatcttacgggaaagactcactgagctggaacggaagctaactctcgaaca
 gcagcgttctgatttggggaaagattgtatgttgaggcaaaagatcaaaatggaaaacagggaacagat
 ggaaaaaagaaagggggcagagggaagccacaggggctaaaaataagtcaaaggaaacatttttgggttcag
 ttaaggaaacattttgatgcatgaagaattctaccaaggagtttgaaggcatcataaagagaaaattaa
 gcaggctaaagaagctgtgaaggaaaatctgaaaaaaattctcagattcagttaaatccactttcagacac
 tttaaagataccaccaagaatatctttgatgaaaagggttaataaaagatttgggtgctacaaaagaagcag
 ctgaaaaaccaagaacagtttttagtgactatttacatccacagtataaggcacctacagaaaaccattc
 aaggccctactatgcaaaaagatggaagggaagaaagccaggttcaactttaagaattcagaaaaaataca
 aattcaagaaatgcagtcctgggcatgattgtagagaaaattctcattcttccagaaaggcttgttctg
 gtgtatttgattgtctcaacaagagtcctgagccttttaacacagtggtgattccctataaggatgga
 tgaatttagacagataattcaagggtacatgttaaaagaactggatacttttgcgctggaacgaactt
 gatcagttcatcaataagtttttccctaaacgggtgtctttatcatgacagagctcttactgactttg
 ttaatgatgttaagattatcttaggaacatgaaggaaatgaagtagataatgatggagattttgagaa
 gttggatgaatatatatagacacttcttgggtcacacttttccctccatattggaccaggtcggtt
 tacataaaaacgggtgtcattacagtagtttgaacatttgtagattggatacagattttttagatttgatga
 gtttcttgaagggttaccgtttctaaagattgtgtctttatggccactgagagaattcagaataaaattgaa
 agatggagtcctaaaaattattagctgttacaaatggaacaatttcattataacgtgatcactttgacttg
 agcaaatgggttaatttttatcttaaaatcagttaagaatatataaaatccctacctttggccaagttgt
 tcttttctcattatagtttatatgaaaagatcaccttaagtgaattattttccttattttcctttaatct
 tttatgtattttattcacttctggaagctaggaatgagcaacacaaattttactctgaagtcagaagagct
 catatataaatttcaatgtcccacctatgtccattccatgtaccagcttagttatatactagtcacata
 attatctttgataaaggtagaggcacaagaggcaactaacaagtcacaaattctaatgtgtgtacttcat
 aataatttttatccattttcattcttcttatctttatattctgtacatgaaacttacctaattctcaa
 atgttagcttccatttttacctttgaaataacttaattctttctgaataaatataatgggtctataa

<210> 35
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 35

35>Ly1885P, CCP8, 全长蛋白质

MSSENSSDSSCGWTVISHEGSDIEMLSVPTDSCPEAPECSSLEQEELQALQIEQGESSQNGTVLMEE
 TAYPALEETSSTIEAEQKIPEDSIYIGTASDDSDIVTLEPPKLEEIGNQEVVIVEEAQSSSEDFNMGSS
 SSQYTFQCQPETVFSSQPSDESSDETSPAFRRRRARKKTVSASESEDRLVAEQETEPSKELSKRQ
 FSSGLNKCIVILALVIAISMFGHFYGTIQIKRQQLVRKIHEDELNDMKDYLSQCQEQESFIDYKSLKE
 NLARCWTLTEAEKMSFETQKTNLATENQYLRVLSLEKEKALSSLOEELNKLREQIRILEDKGTSTELVKE
 NQKLKQHLEEEKQKHSFLSQRETLTLEAKMLKRELERERLVTTALRGELQQLSGSQLHGKSDSPNVYTE
 KKEIAILRERLTELERKLTFEQQRSDLWERLYVEAKDQNGKQGTGKKKGGRGSHRAKNKSKETFLGSVK
 ETFDAMKNSTKEFVRHHKEKIKQAKEAVKENLKKFSDSVKSTFRHFKDTTKNIFDEKGNKRFKATKEAAE
 KPRTVFSDYLHPQYKAPTENHSRPPYAKRWKEEKPVHFKFRKNTNSKKCSPGHDCRENSHSFRKACSGV
 FDCAQQESMSLFTNTVPIPIRMDEFRIIQRVLMKELDTFCRWNELDQFINKFFLNGVFIHDQKLFTDFVN
 DVKIILGNMKEYEVDNDGVFEKLDEYIYRHFFGHTFSPPYGPRSVYIKPCHYSSL

<210> 36
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 36

36>Ly1905P_Old-SEQ-ID_546, 部分cDNA

ccatgggatggctcttctgaccattgggggcccaggccaggccaggccttagggcag
 caaggaccaggccaaaggggcagggcctcctttggaggggttgaggggtacatcctcggc
 tgggtgtttgcatccagggtccagcaggatctctccagtggggctcgggaagaaggttt
 gggggccaggccaccggcgattagggcacagcaatcttggggaaaacatgggcttgggaa
 gtggagctcagctccagaatctcctggtccctctcaaagggaatgtccccacacaccat
 gtcatagaggaggatgcccagtgaccagacagtgccgggagtgcatggtagtggtgctg
 agagatccactctgggggctgtacacccctgtcccatcaaagtcagtgtagggttcatc
 atgaagcaggggcaccagaaccaaataatcaatgagtttggcacagccacggcgtaggtctat
 caggatgntctcatccttgatgtcacgatggacaactncacgggaaatggcagtgctgga
 tggctgcccactactttgg

[0017]

<210> 37
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 37

37>Ly1905P, Old-SEQ-ID_2169, 部分蛋白质
 QVVAXIQHCHSRGVVHRDIKDENILIDLRRGCAKLIDFGSGALLHDEPYTDFDGRVYSP
 PEWISRHOYHALPATVWSLGIXLYDM

<210> 38
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 38

38>Ly1905P_Old_SEQ-ID_5277 部分cDNA
 aaataatccaggcaggagaagagaggaggcacacttggaaactcccctccccacaatacgt
 tgattatttaccatttttagtaattggacaatccccggctcaggaggaggttgcaagaatctg
 caaaagttggaggagcgccccaggagaacaaacagcaagccttatttcccctagcccat
 cccccaaaaaacatccatcccatcctagtgtctggtggtgtccggtggtgtccatcttc
 cattccttcccaaattatggaagtaaggttcttctcaccagaataagagcacttgggata
 acagagttagggctcccctcacccaaaaaaaaaaaaaaangaagccttggggttaacaaca
 gggcattacctccccagaataaagaatcctgggctgaggcaggttaagcagcttgaccca
 atatgggacccttaggttaggggaaaggttccctttactaaaataaaagctactggggtat
 tgggaaggaaagcacccttgccaagtaagagcatatgaactaagtttgnngtggnggtagt
 agggaggngccaatgtggggtgacacatcatcagaataaagagtc

<210> 39
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 39

39>Ly1905P pim-2 原癌基因全长cDNA
 cgcgcgggcggaatctcaacgctgcgccgtctgcgggcgcttccggggccaccagtttctctgctttccac
 cctggcgccccccagccctggctccccagctgcgctgccccgggogtccacgcccctgcgggcttagcggg
 ttccagtgggtcgaatctgcgcgagcgccacctccatgttgaccaagcctctacaggggctcccgcgcccc
 ccgggacccccacgcccgcgcccaggaggcaaggatcggaagcgttcgaggccgagtatcgactcgcccc
 cctcctgggtaaggggggctttggcaccgtcttcgaggacaccgctcacagatcgactccagggtggcc
 atcaaaagtgtatccccgggaatcgtgtgctgggtgggtcccccttgcagactcagtcacatgcccactcg
 aagtcgactgctatggaaagtgggtgcaggtgggtgggacccctggcggtgatccgcctgcttgactgggtt
 tgagacacaggagggttccatgctggtcctcgagcggtcttggccccccaggatctctttgactatatac
 acagagaaggggccactgggtgaaggcccaagccgctgcttctttggccaagtagtgccagccatccagc
 actgccattcccgtggagtgtccatcgtgacatcaaggatgagaacatcctgatagacctacgcccgtgg
 ctgtgcccacactcattgattttgggtctggtgcccgtgcttcagatgaaccctacactgactttgatggg
 acaagggtgtacagccccccagagtggatctctcgacaccagtacatgcactcccggccactgtctgggt
 cactgggcatcctcctctatgacatgggtgtgtggggacattccctttgagagggaccaggagattctgga
 agctgagctccacttcccagcccattgtctcccagactgctgtgccctaataccgcccgtgcttggcccc
 aaaccttcttcccagccctcactggaagagatcctgctggaccctggatgcaaaccaccagccgaggatg
 taccctcaacccctccaaaggaggccctgcccctttggcctggctccttgctaccctaagcctggcctgg
 cctggcctggcccccaatgggtcagaagagccatcccatggccatgtcacagggaatagatggacatttgtt
 gacttgggttttacaggtcattaccagtcattaaagtcagttactaaggttaagggtatgaggatcagg
 ggttagaagacataaaaccaagtctgcccagttcccttcccaatcctacaaaggagccttctcccagaac
 ctgtggtcctctgattctggagggggaacttcttgccttctcattttgctaagggaagtttattttgggtgaag
 ttgttccccattctgagccccgggactcttattctgtatgtgtcacccccacattggcacctcctactac
 caccacacaaacttagttcatatgctcttacttgggcaagggtgcttcttcccaataccccagtagctt
 ttatttttagtaagggaaccttccccctagcctagggtcccatattgggtcaagctgcttacctgcctca
 gccaggattctttattctgggggaggtaatgccctgttgttaccccaaggcttcttttttttttttttt
 tgggtgaggggacccctactctgttatcccaagtgtcttattctgggtgagaagaaccttacttccataat
 ttgggaaggaatggaagatggacaccacggacaccaccagacactaggatgggatggatgggttttttgg
 gggtgggctaggggaaataaggcttgccttctgttctcctggggcgctccctccaacttttgagattc
 ttgcaacctcctcctgagccgggattgtccaattactaaaatgtaaaataatcacgtattgtggggagggg
 agttccaagtgtgccctcctctcttctcctgctggattatttaaaaagccatgtgtggaaaccactat
 ttaataaaagtaataagaatcag

<210> 40

[0018]

<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 40

40>Ly1905P pim-2 原癌基因全长

MLTKPLQGPPAPFGTPTPPPGKDRFAEAEYRLGPLLGKGGFGTVFAGHRLTDRLQVAIKVIPRNRVLG
WSPLSDSVTCPLEVALLWKVGAGGGHPGVIRLLDWFETQEGFMLVLERPLPAQDLFDYITEKGPLGEGPS
RCFFGQVVAAIQHCHSRGVVHRDIKDENILIDLRGCAKLIDFGSGALLHDEPYTDFDGT RVYSPPEWIS
RHQYHALPATVWSLGILLYDMVCGDIPFERDQEI LEAELHFFPAHVSPDCCALIRRCLAPKSSRPSLEEI
LLDPWMQTPAEDVPLNPSKGGPAPLAWSLLP

<210> 41
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 41

41>Ly663S_Old_SEQ-ID_2757 部分cDNA

ctggaactgcacntagctcccagctctcctcggcgcggtctcctcggggntggtgccgta
cttttggaatggttttctctacnacntcccgaagcttcctccag

<210> 42
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 42

42>Ly663S CD37 抗原 (CD37) 全长cDNA

gtctccccactgtcagcacctcttctgtgtggtgagtggaaccgcttaccctactaggtgaagatgtcag
cccaggagagctgcctcagcctcatcaagtacttctctctcggttttcaacctcttcttctcgtcctcgg
cagcctgatcttctgcttcggcatctggatcctcatcgacaagaccagcttcgtgtcctttgtgggcttg
gccttcgtgcctctgcagatctggtccaaagtcctggccatctcaggaatcttcacatgggcatcgccc
tcttggtgtgtgtggggccctcaaggagctccgctgcctcctgggctgtattttgggatgctgctgct
cctgtttgcccacacagatcaccttggaatcctcatctccactcagcgggcccagctggagcgaagcttg
cgggacgtcgtagagaaaaccatccaaaagtacggcaccaaccccagggagaccgcggccgaggagagct
gggactatgtgcagttccagctgcgctgctgcggctggcactaccgcaggactggttccaagtcctcat
cctgagaggtaacgggtcggaggcgacccgctgcccgtgctcctgctacaacttgtcggcgaccaacgac
tccacaatcctagataaggatgcttgccccagctcagcaggcttggaacacctggcgcggtccagacaca
gtgcagacatctgcgctgtccctgcagagagccacatctaccgcgagggtgcgcgaggggcctccagaa
gtggctgcacaacaaccttatttccatagtgggcatttgccctgggctcggcctactcgagctcgggttc
atgacgctctcgatatctcgtgagaaaacctggaccacgtctacaaccggctcgtcgcataccgttagg
ccccgccctccccaaagtcccgccccgccccgctcacgtgcgctgggcaacttccctgctgctgtaaata
tttgtttaatccccagttcgctgagccctccgccttcacattccctggggaccacagtggtgctgctg
ccctgctgctgtcacctctcccacgggacctggggcttctgctccacagcttctgctccccatctgtcgg
cctac

<210> 43
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 43

43>Ly663S, CD37 抗原, 全长

MSAQESCLSLIKYFLFVFNLFVVLGSLIFCFGIWILIDKTSFVSFVGLAFVPLQIWSKVLAISGIFTMG
IALLGCVGALKELRCLLGLYFGMLLLLFATQITLIGILISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETA
AESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLIIRGNGSEAHVRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARS
RHSADICAVPAESHIYREGCAQGLQKWLHNNLISIVGICLGVLLELGFMTLSIFLCRNLDHVNRLARY
R

<210> 44
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 44

44>Ly664S, FLJ90810 fis, 类似于蛋白质二氯化物异构酶相关蛋白前体的每周克隆, 全长

[0019]

agccccgcgcgatgcccgcgcgccaggagcgcctcctcccgcgtgctggcccgcgcggcgccctgactg
 cgctgctgctgctgctgctgggccatggcggcgccggcgctggggcgcccgggcccaggaggcgccggc
 ggccggcgccggagcgggccccccgcggcagacggcgaggacggacaggacccgcacagcaagcacctgtac
 acggccgacatgttcacgcacgggatccagagcgccgcgcacttcgctcatgttcttcgcgccttggtgtg
 gacactgccagcgctgcagccgacttggaaatgacctgggagacaaatacaacagcatggaagatgccaa
 agtctatgtggctaaagtggactgcacggccactccgacgtgtgctccgcccagggggtgcgaggatac
 cccaccttaagcttttcaagccaggccaagaagctgtgaagtaccagggtcctcgggacttccagacac
 tggaaaactggatgctgcagacactgaacgaggagccagtgcaccagagccggaagtggaaaccgcccag
 tgccccgagctcaagcaagggtgtatgagctctcagcaagcaactttgagctgcacgttgcacaaggc
 gaccttttatcaagttcttcgctccgtgggtgtggtcactgcaaagccctggctccaacctgggagcagc
 tggctctgggcttgaacattccgaaactgtcaagattggcaagggtgattgtacacagcactatgaact
 ctgctccggaaaccagggttcgctggctatcccactcttctctgggtccgagatgggaaaaagggtggatcag
 tacaagggaagcgggatttggagtcactgagggagtagctggagtcgcagctgcagcgacagagactg
 gagcgacggagaccgtcacgcccctcagagggcccggtgctggcagctgagcccgaggctgacaagggcac
 tgtgttggcactcactgaaaaataacttcgatgacaccattgcagaaggaaataaccttcatcaagtttat
 gctccatgggtgtggtcattgttaggactctggctcctacttgggaggaaactctctaaaaaggaattccctg
 gtctgggggggtcaagatcgccgaagtagactgcactgctgaacggaatatctgcagcaagtatccggt
 acgaggttaccacaggttatgtcttccgaggagggaaagaaagtcagtgcagcagtgaggcgagagac
 ctctgactcgttacaccgcttctgctgagccaagcgaaagacgaactttaggaacacagttggagggtcac
 ctctcctgcccagctcccgcaccttcggtttaggagttcagtcaccacagaggccactgggttcccagtg
 tggctgttcagaaagcagaacataactaagcgtgaggtatcttcttctgtgtgtgtgttttccaagccaaca
 cactctacagattctttatataatgtgttaactcatggctcactgtgttaaacatttccagtgccgatatatc
 ccttttgaccttctcttgatgaaatttacaatgggttctctttagagactaaaatagcgttgagggaatgaa
 attgctggactatttgggtcctgagttgagtgatttgggtgaaagaaagcacatccaaagcatagttt
 acctgccacagattcttggaagggtgccttgtggcagtagtgcagttcctctgatcttaagggtcacagt
 tgactcaatactgtgttgggtccgtagcatggagcagattgaaatgcaaaaaccacacctctggaggata
 ccttcacggccgctgctggagcttctgttgcgtgtgaatacttctctcagtgtagagggtagccgtgtag
 aaagcagcgttacttctgacgtgcctgagtaagagaatgctgatgccataactttatgtgtcgatactt
 gtcaaatcagttactgttcaggggatccttctgttctcaoggggtgaaacatgtctttagttcctcatg
 ttaacacgaagccagagccacatgaactgttggatgtcttcttagaaagggtaggcatggaaaaattcc
 acgagggtcattctcagtagtctcatttaactcattgaaagattccagttgtatttgcacctgggggtgaca
 agaccagacaggttcccagggcctgggtatccagggaggtctgcagccctgctgaaggcccttaacta
 gaggttcagagttcttgattctgttctcagtagtccctttagagggttgcatacttgggtctgcttcaa
 ggaggtcgaccttctaattgtatgaagaatgggagtgacattgagctcacaagacaaagacagatgtcagtg
 gctgctcggccctgggtgtgcacggctgtggcagctgtgtgtagcagtgctcctcctaactcatgctgtct
 tgtgattaaacacctctatctccttgggaataagcacatacaggcttaagctcctaagatagatagggtgt
 ttgtccttttaccatcgagctacttccataataaaccactttgcatccaacactcttccaccacctccca
 tacgcaaggggatgtggataacttggcccaaagtaactgggtggtaggaattcttagaaacaagaccacttat
 actgtctgtctgagcagaagataacagcagcatctcgaccagcctctgccttaaaggaaatctttatta
 atcacgtatgggttcagagataattcttttttaaaaaaacccaacctcctagagaagcacaactgtcaag
 agtctgttacacacaacttcagcttgcatacagagctctgtatttccaagaaaatcaaagtggtacaatt
 tgtttgtttacactatgatacttttctaataaactcctttttttt

<210> 45

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 45

45>Ly664S, 全长

MPARPGRLPLLLARPAALTALLLLLLGHGGGGRWGARAQAAAAAADGPPAADGEDGQDPHSKHYLTADM
 FTHGIQSAHFVMPFAPWCGHCQRLQPTWNDLGDKYNSMEDAKVYVAKVDCTAHSDVCSAQGVRYPTLK
 LFKPGQEAVKYQGPRDFQTLNWMQLTLNEEPVTPPEPEVEPPSAPELKQGLYELASNFELHVAQGDHFI
 KFFAPWCGHCKALAPTWEQLALGLEHSETVKIGKVDCTQHYELCSGNQVRYPTLLWFRDGGKKVDQYKKG
 RDLESLEYVESQLQRTETGATETVTPSEAPVLAAPVLAPEADKGTVLALTENNFDITIAEGITFIKFYAPWC
 GHCRTPAPWEELSKKEFPGLAGVKIAEVDCTAERNICSKYSVRYPTLLWFRGGKKVSEHSGGRDLDSL
 HRFVLSQAKDEL

<210> 46

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 46

46>Ly667S, Old-SEQ-ID_9413, 部分cDNA

ccagccagtgacagaaaaagagtgaatgtgcctttaagaagaagagcaatgagacacag
 tgtttcaacttcatccgtgtcctgggttcttacaatgtcacccatctctacacctgcggc
 accttcgccttcagccctgcttgtaccttcaattgaacttcaagattcctacctgttgccc

[0020]

atctcggaggacaagggtcatggaggggaaaggccaaagccctttgaccccgctcacaag
 catacggctgtcttgggtggatgggatgctctattctggtactatgaacaacttcctgggc
 agtgagcccatcctgatgcccacactgggatcccagcctgtcctcaagaccgacaacttc
 ctccgctggctgcatcatgacgcctcctttgtggcagccatcccttcgacccagggtcgct
 tacttcttcttcgaggagacagccagcgagtttgacttctttgagaggctccacacatcg
 cgggtggcttagagcttgcaagaatgacgtgggcggcgaaaagctgctgcagaagaagtg
 accaccttcct

<210> 47

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 47

47>Ly667S, 脑信号蛋白B, 全长

aggatgatgaaagtgaagaccgtcttagggcccttccagatagtgaaccttctctgccccaatgccccacc
 cctgccaccaatacacacgcttctgctgctggggctctcctattgggtcctcggggggatgtggtgaaagaa
 ctgctcaccagaaagtgcgggggtgctgttccccagacctcctgggtgacagtctgtgggtgagcat
 ggccctccagccctgggacctggagccctcctgggcttctcctcttccaactgctcagctg
 ctgctgcgcagacgacgcggggggaggcggggcaggggcccatgcccagggtcagatactatgcagggg
 atgaacgtagggcacttagcttcttccaccagaaggccctccaggattttgacactctgctcctgagtg
 tgatggaaatactctctacgtgggggctcgagaagccattctggccttggtatccaggatccaggggtc
 ccagggttaagaacatgataccgtggccagccagtgacagaaaaagagtgaatgtgcctttaagaaga
 agagcaatgagacacagtggttcaacttcatcctggtcctgggttcttacaatgtcaccatctctacac
 ctgcgccaccttcgcttccagccctgcttgctaccttcatgaaactcaagattcctacctgtgccccatc
 tcggaggacaagggtcatggaggggaaaggccaaagccctttgaccccgctcacaagcatacggctgtct
 tgggtggaatggatgctctattctggtactatgaacaacttcctgggcagtgagcccatcctgatgctgcac
 actgggtatccagcctgtcctcaagaccgacaacttctcctgctggctgcatcatgacgcctcctttgtg
 gcagccatcccttcgacccagggtcgtctacttcttcttcgaggagacagccagcgagttgacttcttg
 agaggctccacacatcgcggttggtctagagtcgcaagaatgacgtgggcggcgaaaagctgctgcagaa
 gaagtggaccaccttctgaaggccagctgctctctgacccagccggggcagctgccttcaacgtca
 tccgccacgcgggtcctgctccccgcgattctcccacagctcccccacatctacgcagctcttcacctcca
 gtgggcaggttggggggaccaggagctctgcgggtttgtgccttctctctcttgagacattgaacgtgtctt
 taaggggaaattcaagagtgtaacaaagaacttcacgctggactacttataggggccttgagaccaac
 cccggccagcgagtgctcagtgggccctcctctgataaggccctgaccttcatgaaggaccttctcc
 tgatggatgagcaagtgtggggacgccccctgctgggtgaaatctggcgtggagtatacacggcttgagct
 ggagacagcccaggcccttgatgggcacagccatcttgctcatgtaacctgggaaccaccacaggggtcgctc
 cacaaggctgtggttaagtggggacagcagtgctcatctggtggaagagattcagctgttccctgacctg
 aacctgttcgcaacctgcagctggccccccacccagggtgcagtggtttgtaggcttctcaggaggtgtctg
 gagggtgccccgagccaaactgtagtgctctatgagagctgtgtggactgtgtccttgccgggacccccac
 tgtgctgggacccctgagtcgccgaacctgttgctcctgtctgcccccaacctgaactcctggaagcagg
 acatggagcgggggaaccagagtgggcatgtgccagtgggcccatgagcaggagccttcggcctcagag
 ccgcccgcaaatcatataagaagtctgggtgtccccaaactccatcctggagctccctgccccacctg
 tcagccttgccctcttattatggagtcagggccagcagcagtcccagaagcctcttccactgtctaca
 atggctccctctgctgtagtgaggtgaggtgggggtctctaccagtgctgggcaactgagaatgg
 ctcttccataacctgtgatctcctactgggtggacagccaggaccagacctggccctggatcctgaactg
 gcaggcatccccgggagcatgtgaagggtccggttgaccagggtcagtggtggggcgccctgggtgcc
 agcagtcctactggccccactttgtcactgtcactgtcctcttgccttagtgctttcaggagccctcat
 catcctcgtggcctccccattgagagcactccgggctcggggcaagggttcagggtctgtgagacctgcgc
 cctggggagaaggccccgttaagcagagagcaacacctccagctctccaagggaatgcaggacctctgcca
 gtgatgtggacgctgacaacaactgcctaggcactgaggtagcttaactctaggcacaggccggggctg
 cgggtgcaggcacctggccatgctgggtgggcggcccaagcacagccctgactaggatgacagcagcaaa
 aagaccacctttctcccctgagaggagcttctgctactctgcatcactgatgacactcagcagggtgatg
 cacagcagctgctcctccctatgggactcccttctaccaagcacatgagctctctaaagggtgggggct
 acccccagacctgctcctacactgatattgaagaacctggagaggatccttcagtctcggccattccagg
 gacctccagaacacagtggtttcaagagaccttaaaaaactgcctgtcccaggacctatggtaatga
 acaccaaactctaaacaatcatatgctaactgcccactcctggaaactccactctgaagctgccgcttt
 ggacaccaactccttctcccagggtcatgcagggtatctgctcctcctgcttccctaccagtcgtg
 caccgtgactcccaggaagtcttccctgaagctgaccaccttcttctgcttcagttggggcagact
 ctgatccttctgcccggcagaatggcaggggtaatctgagccttcttccactccttaccctagctgac
 ccttccactcctccccctccttcttcttgggttgggattcagaaaactgctgtcagagactgttat
 tttttattaaaaatataaggcttatgtatgat

<210> 48

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 48

[0021]

48>Ly667S, 脑信号蛋白B, 全长

MALPALGLDPWSLLGLFLFQLQLLLPTTTAGGGGQGPMPRVRYAGDERRALSFFHQKGLQDFDTLLLS
GDGNTLYVGAREAILALDIQDPGVPRLEKMIWPASDRKKSECAFKKKSNETQCFNFIRVLVSYNVTHLY
TCGTFAFSPACTFIELQDSYLLPISSEKVMGEGKQSPFDPAHKHTAVLVDGMLYSGTMNFLGSEPIILMR
TLGSQPVLKTDNFRWLHHDASFVAIIPSTQVVYFFFEETASEFDFFERLHTRVARVCKNDVGGEKLLQ
KKWTTTFLKAQLLSAPSRGSCPSTSSATRSCTSPFILLQLPTSTQSSPPSGQVGGTRSSAVCAFSLLDIERV
FKGKFKELNKETSRWTTYRGPETNPRPGSCSVGPSSDKALTFMKDHFMDQEVVGTPLLVKSGVEYTRLA
VETAQGLDGHSHLVMYLGTGTTGSLHKAIVSGDSSAHLVEEIQLFDPPEPVRNLQLAPTQGAFFVGFSGGV
WRVPRANCSVYESCVCVLARDPHCAWDPESRTCCLLSAPNLNSWKQDMERGNPEWACASGPMRSRLRPQ
SRPQIIKEVLAVPNSILELPCPHLSALASYWSHGPAVPEASSTVYNGSLLLIQDGVGGGLYQCWATEN
GFSYFVSIYWVDSQDQTLALDPELAGIPREHVKVPLTRVSGGAALAAQSYWPHFVTIVLFAVLVLSGAL
IILVASPLRALRARGKVQGCETLRPGEKAPLSREQHLQSPKECRTSASDVEDANNCLGTEVA

<210> 49

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 49

49>Ly677S, Old-SEQ-ID_465, 部分cDNA

accagcagtcctgcggcacctacctccgctgcgccagccgccccccagggccttcctgg
acatgggggagggcaccagaacccaatcatcacagccgaggggatcatcctcctgttct
gcgcgggtggtgcctgggacgctgctgctgttnaggaaacgatggcaagaacganaactcn
gg

<210> 50

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 50

50>Ly677S, Old-SEQ-ID_1923, 全长蛋白质

QQSCGTYLVRVQPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLLXRKRWQERXLX

<210> 51

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 51

51>Ly677S, Old-SEQ-ID_5989, 部分cDNA

accagcagtcctgcggcacctacctccgctgcgccagccgccccccagggccttcctgg
acatgggggagggcaccagaacccaatcatcacagccgaggggatcatcctcctgttct
gcgcgggtggtgcctgggacgctgctgctgttnaggaaacgatggcaagaacganaactcn
gg

<210> 52

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 52

52>Ly677S, Old-SEQ-ID_1496, 部分蛋白质

QQSCGTYLVRVQPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLLXRKRWQERXLX

<210> 53

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 53

53>Ly677S, CD79A 抗原(免疫球蛋白相关的 α), 全长

tgctgcaactcaactaaccaacccactgggagaagatgcctgggggtccaggagtcctccaagctctgc
ctgccaccatcttctcctcttctctgctgtctgctgtctacctgggcccctgggtgccagccctgtggat
gcacaaggtcccagcatcttgatggtgagcctgggggaagacgcccacttccaatgcccgcacaatagc
agcaacaacgccaacgtcacctggtggcgcctcctccatggcaactacacgtggccccctgagttccttg
gccccggcgaggaccccaatggtacgctgatcatccagaatgtgaacaagagccatgggggcataacgt

[0022]

gtgcccgggtccaggagggcaacgagtcataccagcagtcctgcggcacctacctccggtgcgccagccg
 cccccaggcccttcttgacatgggggagggcaccagaacccaatcatcacagccgaggggatcatcc
 tcctgttctgcgcgggtgggtgcctgggacgctgctgctgttcaggaaacgatggcagaacgagaagctcgg
 gttggatgcgggggatgaatatgaagatgaaaacctttatgaaggcctgaacctggacgactgctccatg
 tatgaggacatctccggggcctccagggcacctaccaggatgtgggcagcctcaacataggagatgtcc
 agctggagaagccgtgacacccctactcctgccaggctgcccccgctgctgtgacccagctccagtgt
 ctcagctcacttccctgggacattctcctttcagcccttctgggggcttcccttagtcataattccccagt
 ggggggtgggagggtaacctcactcttctccaggccaggcctccttggactccccctgggggtgtccact
 ctcttccctctaaactgccccacctcctaacctaatccccacgccccgctgcctttccaggctccct
 caccagcggttaatgagcccttaatcgctgcctctaggggagctgattgtagcagcctcgttagtgtca
 cccctctccctgattctgtcagggcacttagtgataataaatcttcccaactgc

<210> 54

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 54

54>Ly677S, CD79A 抗原, 完全蛋白质

MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALMMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSNNANVTWWRVL
 HGNYTWPEFLPGGEDPNGTLIIQNVNKS HGGIYVCRVQEGNESYQQSCGYLRVRQPPRPFLDMGEGT
 KNRIITAEGIILLFCAVVPGLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDSCMYEDI SRGLQGT
 QDVGSLNIGDVQLEKP

<210> 55

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 55

55>Ly1891P, 孤独G-蛋白偶联的受体 (GPRC5D), 全长

atgtacaaggactgcatcgagtcactggagactattttctctctgtgacgcgaggggcatggggca
 tcattctggagtccttggccatacttggcatcggtggtcacaattctgctactcttagcatcttctcttct
 catgcgaagatccaagactgcagccagtggaatgtctctcccccagctcctcttctccttgagtgct
 ctggggctcttcggactcgcttttgcttcatcatcgagctcaatcaacaaactgccccgtacgctact
 tctctcttgggttctcttctgctctgtttctcatgcctcttagctcatgcctccaatctagtgaagct
 ggttcggggttggtgtctcttctcctggagcacaattctgtgcattgctattggttgagctctgttgcaa
 atcattattgccactgagtagtgactctcatcatgaccagaggtatgatgttggtaatatgacacct
 gccagctcaatgtggactttgtgtactcctgggtctatgtcctcttcttgatggccctcacattctcgt
 ctccaaagccaccttctgtggccgtgtgagaactggaagcagcatggaaggctcatcttatacactgtg
 ctcttctccatcatcatctgggtgggtgtggatctccatgctcctgagaggcaacccgcagttccagcgac
 agccccagtgaggacgaccggctcgtctgcattgctcgtgcaccaacgcattgggttttctgctgtgta
 catcgtccctgagctctgcattctctacagatcgtgtagacaggagtgccctttacaaggcaatgcctgc
 cccgtcacagcctaccaacacagcttccaagtggagaaccaggagctctccagagcccgagacagtgatg
 gagctgaggaggatgtagcattaaacttcatatggtaactccattcagccgagactgttgatccacaca
 agagtgtttcatccacaggctaaactaagccccagcaagatgcaggaggagtataa

<210> 56

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 56

56>Ly1891P, 孤独G-蛋白偶联的受体 (GPRC5D), 全长

MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIIIESLAIIIGIVVTIILLLAFLLMRKIQDCSQWNVLPQLLFLLSV
 LGFLGLAFATIIELNQQTAPVRYFLFGVLFALCFSCLLAHASNVLKVRGCVSFSWTTILCIAIGCSLLQ
 I I IATEYVTLIMTRGMMFVNMTPCQLNVDFVVLVYVLFMALTFVSKATFCGFCENWKQHGRLLIFITV
 LFSIIIWVWVISMLLRGNPQFQRQPQWDDPVVCIALVTNAWVFLLLYIVPELCILYRSCRQECPLQGNAC
 PVTAYQHSFQVENQELSRARSDGAEDVALTSYGTPIQPQTVDPQECFIPQAKLSPQQDAGGV

<210> 57

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 57

57>CD138, 多配聚糖1 (SDC1), 全长cDNA

ggcacgaggaaggcctgtgggtttattataaggcggagctcggcgggagaggtgcgggccaatccgag

[0023]

ccgagcggagaggaatccggcagtagagagcggactccagccggcggaccctgcagccctcgctgggac
 agcggcgcgctgggagggcgcccaagagagcatcgagcagcggaaaccggaagcggcccgagccg
 acccgcgagcctgcccgtctcccggcgccggtccgggagcagatgaggcgcgcgcgctctggctctggc
 tgtgcgcgctggcgctgagcctgcagccggccctgcccgaatgtggctactaatttgccccctgaaga
 tcaagatggctctgggatgactctgacaacttctccggctcaggtgcaggtgctttgcaagatacacc
 ttgtcacagcagacccctccacttggaggacacgcagctcctgacggctattccacgtctccagaac
 ccacggcgctggaggctacagctgcctccacctccacccctgcccggctggagagggggcccaaggaggaga
 ggctgtagtctgcccagaagtggagcctggcctcaccgcccgggagcaggaggccacccccgagccagg
 gagaccacacagctcccgaccactcatcaggcctcaacgaccacagccaccagggccaggagcccgcca
 cctccccccccacagggacatgcagcctggccaccatgagacctcaaccctgcaggacccagccaagc
 tgaccttcacactccccacacagaggatggaggtccttctgccaccgagagggctgctgaggatggagcc
 tccagtacgtcccagcagcaggggtctggggagcaggacttcacctttgaaacctcgggggagaata
 cggctgtagtggcgctggagcctgaccgcccgaaccagtccccagtggatcagggggccacgggggctc
 acagggcctcctggacaggaagaggtgctgggaggggtcattgcccgtaggcctcgtggggctcatctt
 gctgtgtgcttgggttctcatgtgtaccgcatgaagaagaaggacgaaggcagctactccttggagg
 gcccgaacaagccaacggcggggctaccagaagccaccaaacaggagggaattctatgctgacgcgg
 gagcatgccccctccgcccctgcccactcactaggccccacttgccctcttccctgaagaactgcaggc
 cctggcctccccctgcccaccaggccacctccccagcattccagcccctctggtcgctcctgccacggagt
 cgtgggggtgctgctgggagctccactctgcttctctgacttctgctggagacttagggcaccaggggtt
 ctgcataaggaccttccaccacagccagccactggcatcgaccattctgactcgggttctccaaactg
 aagcagcctctccccaggtccagctctggaggggagggggatccgactgcttggacctaaatggcctca
 tgtggctggaagatcctgcccgtgggggttgggggtcacacacctgtagcacttactggtaggaccaagc
 atcttgggggggtggcgctgagtgggcaggggacaggaggtccactttgtttcgtggggaggtctaatcta
 gatatacagcttgttttgcacatgttctcttagttctttgttcatagcccagtagacctgttacttct
 gaggttaagttaagtaagttgattcggtatccccccatcttgcttccctaatactatggtcgggagacagca
 tcaggggttaagaagacttttttttttttttttaactaggagaacaaaatctggaagccaaaatgta
 ggcttagttgtgtgtgtgtctcttgagttgtgctcatgtgtgcaacagggtatggactatctgtctgg
 tggccccgttctctggtggtctgttggcaggtggccaggtccaggtgcccgtggggcgccgcccctcttca
 agcagtcgtgctgtgtccatgcgctcagggccatgctgaggcctgggcccgtgccacgttggagaagcc
 cgtgtgagaagtgaatgctgggactcagccttcagacagagagactgtaggaggggcgaggggcctg
 gagatcctcctgcagaccacgcccgtcctgctgtggcgccgtctccaggggctgcttccctcctggaaat
 tgacgaggggtgtcttgggcagagctggctctgagcgccctccatccaaggccagggttctccgttagctcc
 tgtggccccaccctgggcccctgggctggaatcaggaatattttccaaagagtgatagcttttgcctttg
 gcaaaactctacttaataccaatgggttttccctgtacagtagattttccaaatgtaataaactttaata
 taaagta

<210> 58
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 58

58>CD138, 多配聚糖1 (SDC1), 全长蛋白质
 MRRAALWLWLCALALSLQPALPQIVATNLPEDQDGSDDSDNFSGSGAGALQDITLSQQTPTSTWKDTQL
 LTAIPTSPPTGLEATAASTSTLPAGEOPKEGEAVVLPVEVEPGLTAREQEATPRPRETTQLPTTHQASTT
 TATTAQEPATSHPHRDMQPGHHETSTPAGPSQADLHTPHTEDGGPSATERAAEDGASSQLPAAEGSGEQD
 FTFETSGENTAVVAVEPDRRNQSPVDQATGASQGLLDRKEVLGGVIAVGLVGLIFAVCLVGFMLYRMKK
 KDEGSYSLEEPKQANGAYQKPTKQEEFYA

<210> 59
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 59

59>CD22, Old-SEQ-ID_4021, 部分cDNA
 ctggggctgaggatggagtcgaagactgagaaatggatggaacgaatacacctcaatgtc
 tctgaagggccttttccacctcatatccagctccctccagaaattcaagagtcccaggaa
 gtcactctgacctgcttgctgaatttctcctgctatgggtatccgatccaattgcagtgg
 ctcttagaggggggttccaatgaggcaggctgctgtcacctcgacctccttgacctcaag
 tctgtcttcaccggagcgagctcaagttctccccacagtgagtcaccatgggaagatt
 gtgacctgcccagcttcaggatgacagatgggaagtctcttccaatgacacgggtgcag

<210> 60
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 60

[0024]

60>CD22, 全长cDNA

ccatcccatagtgagggaagacacgcggaacaggcttgacccagacacgacacccatgcatctcctcgg
cccctggctcctgctcctggttctagaatacttggctttctctgactcaagtaaatgggttttttgagcac
cctgaaacccctctacgcctgggagggggcctgctggtatcccctgcacctacagagccctagatgggtg
acctggaagcttcatcctgttccacaatcctgagtataacaagaacacctcgaagtttgatgggacaag
actctatgaaagcacaaaggatgggaagggttcttctgagcagaaaagggtgcaattcctgggagacaag
aataagaactgcacactgagatccacccgggtgcacctcaatgacagtggtcagctggggctgaggatgg
agtccaagactgagaaatggatggaacgaatacacctcaatgtctctgaaaggccttttccacctcatat
ccagctcctccagaaattcaagagtcacaggaagtcactctgacctgcttctgctgaatttctcctgctat
gggtatccgatccaattgacgtggctcctagaggggttccaatgaggcaggctgctgtcacctcgacct
ccttgacctcaagtctgtcttccacggagcgagctcaagttctcccccagtgaggatcccatgggaa
gatttgtacctgccagcttcaggatgacagatgggaagttcctctccaatgacacggtgcagctgaacgtg
aagcacaccccgaaagtggagatcaaggtcactccagtgatgccatagtgagggaaggggactctgtga
ccatgacctgagaggtcagcagcagcaacccggagtacacgacgggtatcctggctcaaggatgggacctc
gctgaagaagcagaatacattcacgctaaacctgcgcgaagtgaaccaaggaccagagtggggaagtactgc
tgtcaggtctccaatgacgtgggcccgggaaggtcggaagaaggttctctgcaagtgcagatgccccgg
aaccttccacgggttcagatcctccactcaccggctgtggaggggaagtcagtcgagtttctttgcatgtc
actggccaatcctcttccacaataattacacgtggtaccacaatgggaaagaaatgcagggaaggacagag
gagaaagtccacatcccaaagatcctcccctggcagcgtgggacttattcctgtgtggcagaaaacattc
ttgggtactggacagagggggccgggagctgagctggatgtccagtatcctcccaagaggtgaccacagt
gattcaaaacccccatgcccattcgagagaggagacacagtgaccttctctgtaactacaattccagtaac
cccagtggtacccggtatgaatggaaacccccatggcgctgggagggagccatcgcttgggggtgctgaaga
tccaaaacgcttgggtgggacacacacacccatcgctgcgcacggttgtaataagttgggtgctcgtgggctc
ccctgtcgccctgaatgtccagtatgccccccgagacgtgaggggtccggaaaatcaagcccttccgag
attcactctggaaactcggtcagcctccaatgtgacttctcaagcagccaccccaagaagtcaggtctct
tctgggagaaaaatggcaggcttctggggaagaaagccagctgaattttgactccatctcccagaaga
tgctgggagttacagctgctgggtgaacaactccataggacagacagcgtccaaggcctggacacttgaa
gtgctgtatgcacccaggaggtgctgctgtccatgagcccgggggaccaagtgatggaggggaagagtg
caacctgacctgtgagagtgacgccaacctcccgctctccactacacctgggttgactggaaataacca
aagcctccccccacagccagaagctgagattggagccggtgaagggtccagcactcgggtgcctactgg
tgccaggggaccaacagtggtggcaaggggcgttccgctctcagcaccttactgtctactatagcccg
agaccatcgccagggcagtggtgctgggactcgggtcctgcctcgccatcctcatcctggcaatctgtgg
gctcaagctccagcgacgttggagagagacacagagccagcaggggcttcaggagaattccagcgggccag
agcttctttgtgaggaataaaaagggttagaagggccccctctctgaaggccccactccctgggagtgct
acaatccaatgatggaagatggcattagctacaccacctgcgcttcccgagatgaacataccacgaac
tggagatgcagagctcctcagagatgcagagacctccccggacctgcgatgacacggtcacttattcagca
ttgcacaagcgccaagtgggagctatgagaacgtcattccagattttccagaagatgaggggattcatt
actcagagctgatccagtttggggctggggagcggcctcaggcacaagaaaatgtggactatgtgatcct
caaacattgacactggatgggtgcagcagagggcactgggggcagcggggccaggggaagtcctccgagtt
tccccagacaccgcacatggcttctcctgcgtgcattgtgcgcacacacacacacacacacacacac
acacacacactcactgcggagaaacctgtgcctggctcagagccagtccttttgggtgagggtaaccccaa
acctccaaaactcctgcccctgttctcttccactctccttgctacccagaaatcatctaaataacctgccc
tgacatgcacacctcccctgcccaccagcccactggccatctccacccggagctgctgtgtcctctgga
tctgtcgtcattttcttcccttctcctctctctgcccctctaccctgatctgacatccccactcac
gaatattatgcccagtttctgcctctgagggaaagccagaaaaggacagaaaacgaagtgaagaagggggcc
cagtcctggcctggcttctccttggaaagtgaggcatgacggggagacgtacgtatcaggggcccctt
gactctggggactccgggtttgagatggacacactggtgtggattaacctgccaggagagacagagctcac
aataaaaatggctcagatgccacttcaaagaaaaa

<210> 61

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 61

61>CD22, 全长蛋白质

MHLLGPWLLLLVLEYLAFSDSSKWFEPHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFHNPEYNKNTSK
FDGTRLVYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNTLSIHVHLNDSGQLGLRMESKTEKWMERIHLNVSERP
FPPHIQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSCYGYPIQLQWLLEGVPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSQW
SHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKHTPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSNPEYTTVSWL
KDGTSLKKQNTFTLNLREVTKDQSGKYCCQVSNVDVGPGRSEEVFLQVQYAPPESTVQILHSPAVEGSQVE
FLCMSLANPLPTNYTWYHNGKEMQGRTEKVIHPKILPNHAGTYSVAENILGTGQRGPGAEILDVQYPPK
KVTTVIQNPMPIREGDTVTLSCNYSNPSVTRYEWKPHGAWEEPGLVGLKIQNVGWDNTTTIACARCSW
CSWASPVALNVQYAPRDVVRKIKPLSEIHSGNSVSLQCDFSSSHPEVQFFWEKNGRLLGKESQLNFD
ISPEDAGSYSCWVNNISIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVSMSPGDQVMEGKSATLTCESDANPPVSHYTF
DWNQSLPHHSQKLRLPEPVQHSWAYWCQTNSVGKGRSPLSTLTVYSPETIGRRVAVGLGSLAILI
LAICGLKLQRRWKRTQSQQGLQENSSQSFFVRNKKVRRAPLSEGPSLGLGCYNPMMEDGISYTTLRFPEM

[0025]

NIPRTGDAESSEMQRPPRTCDTDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPOAQENV
DYVILKH

<210> 62
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 62

62> CD79 β , old-SEQ-ID_504, 部分cDNA
ctgggggggtccgggaaaggggttgggcatgagccaggcagctccgaagcagtcactgag
gccaggggagcctgcaccagggtcatggggcgacctggctctcactcctggcctgggtgct
cacctacagaccacttcacttcccctgtccgcagcgtcactatgtcctcataggtggctg
tctggtcaatgtccaggccctcgtaggtgtgatcttccctccatgccagccttgctgtcat
ccttgtccagcagcaggaagataggcacgatgatgaagaggatgatcagcagcgtctgga
tcatgatgataccatccttcagcgtgttccctctgcttcag

<210> 63
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 63

63> CD79 β , old-SEQ-ID_1747, 部分蛋白质
LKQRNTLKDGIIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDI
VTLRTGEVKWSVGEHPGQE

<210> 64
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 64

64> CD79 β , Old-SEQ-ID_5238, 部分cDNA
ctgggggggtccgggaaaggggttgggcatgagccaggcagctccgaagcagtcactgag
gccaggggagcctgcaccagggtcatggggcgacctggctctcactcctggcctgggtgct
cacctacagaccacttcacttcccctgtccgcagcgtcactatgtcctcataggtggctg
tctggtcaatgtccaggccctcgtaggtgtgatcttccctccatgccagccttgctgtcat
ccttgtccagcagcaggaagataggcacgatgatgaagaggatgatcagcagcgtctgga
tcatgatgataccatccttcagcgtgttccctctgcttcag

<210> 65
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 65

65> CD79 β , 全长cDNA
ccacgcgtccgcccacgcgtccgcagagcgtgacctggccaggctggcgttgtctcctgtgccagcc
actggatgggtggcgttgtgtgctgctctcagctgagccagtagccagcagccagatcggaggaccggtg
ccggaatcccaaaggtagtgcttgcgcgatcctggcagagccacggttcatagccaggaaacggggc
ttcacggtgaaaatgcactgtcatgaacagcgcctccggcaatgtgagctggctctggaagcaggaga
tggacgagaatccccagcagctgaagctggaaaaggccgcagtggaagagtcacagaacgaatctctcgc
caccctcaccatccaaggcatccggtttgaggacaatggcatctacttctgccagcagaagtgaacaac
acctcggagggtctaccagggtgctggcacagagctgagctgagtgatgggattcagcaccttggcacagctga
agcagaggaacacgctgaaggatgggtatcatcatgatccagacgctgctgatcatcctcttcatcatcgt
gcctatcttccctgctgctggacaaggatgacagcaaggctggcatggaggaagatcacacctacgagggc
ctggacattgaccagacagccacctatgaggacatagtgacgctgacggacagggaagtgagtgctg
taggtgagcaccaggccaggagtgagagccaggtcgcccatgacctgggtgcaggctcctcctggcctca
gtgactgcttcggagctgctggctcatggcccaaccccttcccggaaccccccagctggcctctgaagc
tggccaccagagctgcatattgtctccagccctgggtcccccagctcttgccaaagggcctggagtagaa
ggacaacaggggcagcaacttggaggaggttctctggggatggacgggagccagccttctgggggtgctat
gaggtgatccgtccccacacatgggatgggggagggagagctgggtccagagcccgcaaatggactcggga
gccagggtcctccagcagagcttgggaagggtccatggacccaactgggccccagaagagccacagggaac
atcattcctctcccgcaaccactcccacccagggaaggccctggcctccagtgcccttccccgtggaata
aacggtgtgtccttgagaaaccccccccccccccccc

<210> 66

[0026]

<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 66

66> CD79 β , 全长蛋白质

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDYRNPKGSAQSRIWQSPRFIARKRGFTVKMHCYMNSA
SGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIYFCQKCNNTSEVYQGCGETL
RVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDI
VTLRTGEVKWSVGEHPGQE

<210> 67
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 67

67>Ly1450P, Old-SEQ-ID_6695, 部分cDNA

aaaattgatcacacnagggaacaaaataaaattagggggcaaagggtaggagtagtgg
ggggaggggagagcaaacctatcgaaatatatcttagaattttgctcagaaatcactgctg
cctctcaagtgttgcttgcctgcctaaaccaagaaggctaaacaaagccctcctgt
ttgaattcttaaggtaagaaatttctaagctaagaaaacactattgcctaaaaccaatga
tagtggagctcatttacaatataggcatgcctcacacacacagtccaaaggcaagacactg
gctttgaaattaggctcatgatgtgattcctattatgtacctgatttttttaggcccc
aggtagtggaccagagttaatgtcattgctcctcctcaagatatgatgaaaagttgcctca
gaaatctagagatgcattgtttttaatt

<210> 68
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 68

68>Ly1450P, 部分cDNA

ctttcaagaaaatacatctgtgctgtattttcccttccctcaggccatgatctctgctgttttcccttactaaactggcat
gtcagtagaagagtgattgtgaagctgctccggaagggtttatgctaacctctgttgccttgatgacatgtcctcaggac
tctgatattaaaactcaatccttagataacaggtagctttatcatggaagtaggtagcaatttggaaattagaccattcctt
agttatttttttcttaataatgaattgatacatgcactttaaaaaatatttttgttattttgggaagaaaactcagactttt
aaaaaagtgtatattgtccattataatatgtatatggaagtagtgaatctgaacgctgtcttatattagcagtagaat
taggtattatcataaaaagtcttaattctgtaggaattatgagtttatgtttatgagtcctgctcagtcctctttgagag
aattagttgaaacccagactctaaagtctgcttttatatttgtttgttaagaccacttatctgcagaaggtgcctttta
acccagtggttctaaaggtgtggaattgagtgaccctaataatttacataagagacttggttttagtgaggcataaggagg
ggcataaagttacaccgttttctgctgcttgagaactgtcttttaaaattgatcacacgagggaaaaacaaaataaaatta
gggggcaaagggtaggagtatggggggaggggagagcaaacctatcgaaatatatcttagaattttgctcagaaatcactg
ctgctctcaaggttgcattgtccctgcctaaaccaagaaggctaaacaaagccctcctggtttgaattcttaaggtaa
gaaatttctaaagctaagaaaacactattgcctaaaaccaatgatagtgagctcatttacaatatggcatgcctcacaca
cacagtcacaaaggcaagacactggctttgaaattaggtcatgatgtgattcctattatattgacactgatttttttaggc
cccaggtatgtggaccagagttaatgtcatgactcttcaaagatatgatgaaaagtgccttagaaatctagagatgcat
gtttatttaattccatagtttaaaaaaaaatttaagcaggtagttgtggcttatctgggggcaaaaataatatagtgaaa
ttgcttccagaggacaaagtatattttctaaagtcctgaaataggatcatgaacccttctgaagttttgggtttgaaatat
tatagtatatgatattaccaaagagcccttaattcagagtttaaggggtctcttctcgaactctcttcatcactcaggg
ttgaatgtgtaattgttcccttgctattgattgttattgttgattcttaggatcaggccaagaatcatctggaaaacattat
cttaattccgtctctcatatcctaacagtagattttactaagaaattccatatgaaaaactccactcatgtctcctgag
attatcctgtaagtgaagtagctttcatttaaccaagctaaattatttccatttagccatgttaagagagaagccaagtct
agagaaagcaatcctgtacccatgaatctgggtgacccattttcccttaacgtaacgggaagtgttttgaaattcccag
aagagagctgttttgaatcaaagtgtgattataagaaagccagactttggaaaaggataattggaataaaggagggt
gcttgaagattttccaaactactttatgtcatttagcttctattttctgaagggttcttgggtgccatgtactcagat
cagtcagttgactgaaagatgatcatgttttctcgtaaagatttaagcaattggcaactacaaagacattattttctta
ctgttctatatcatgtactgttgcctgacattacaaaagggtctggaagggaacccgtgctcactgttttatctttttct
ttaaatacaaaaagtatcccaactaatcatttattatgggtcagcttggtttacatgtccctatgatgagaaatgctatc
aacatctgtgatttctaagagtccttaccaaattgttactcttaattcttgtgtcctgctgagtggtttttcttttaaaata
ccatttttatccctgtggcactgggtgtgttactgcgattacactgatgattctgagctgtgcttcttcaagtagctc
agttcttgcgttttatattaggtaacagtttgtgagcttttgtgcattcttctgcatctctctgagttttcgaaatct
gtcataataaaactttttcactatgcacctggtaaaaa

<210> 69
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

[0027]

<400> 69

69>Ly1451P, Old-SEQ-ID_3507, 部分cDNA

cctaagccgcctaagggtgctcctggctgtccatcagttacctcgtttcttgagcagag
taattgggtgagattgttcatggagcattgctggctctctagtcctggaacctacagtt
ggtccaattcattatgccaaagggtccgtctaggaggttcttgttccaagtattgagatt
cccagagagaagtaggtcccttagatagaagcagagtttctcagaggtatttagcagcag

<210> 70

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 70

70>Ly1451P, 部分cDNA

gccgctgccgctccaggagacaggttcccatgcaggaatgaaagacatggaaggggaagag
gggggcccagctccctgagtcctgtgtccaccagctgtgctaaatccctctgagaaactc
tgcttctatctaaggggacctaacttctcctgggaatctcaatacttggaacaagaacctc
ctagacgggaccttggcataatgaattggaccaactgtaggttccaggactagagagcc
agcaatgctccatgaacaatctcaccgaatctctgctcaggaacagaggttaactgat
ggacagccgaggcagcccttaggcggcttaggcctccctgtggagcatccctgaggcg
gactccggccagcccgagtgatgcgatccaaagagcactcccggttaggaaattgccccg
gtggaatgctcaccagagcagcgtgtagcagttccctgtggaggttaacacagtggtc
gaacaccgggaaggaaactggcacttggagtcgggacatctgaaactttagactgggagc
tgtacatggatgggagcagcttcaccaacccctgcaaagtgaacttgaagaagacgacaa
gccctgctccagtcacaccgggaagctgactggtccacgcacagctgaagcatgaggaaa
ctcatcgccgggactaatttctttaaatttagacttgcacagtaaggacttcaactgac
cttctcagactgagaactgtttccagtatatacatcaagtcactgaggtaggacaaaag
attgctacattcctattattttaaggttacatttttggggacccctcttcttctgttct
agctattaccttcttctgtgtcacctagaaaaggaccagtccttaattgtattttaaaac
tgtgatcatgggaagctttaaattgggtcaataacacgcatcaagttgggtatttctctgg
gctacataccttggatagat

71>Ly1451P, 部分蛋白质

MDSRGSPLGGLGLPCGASLRRTPASPSDAIQRALPGRKLPRWNASPEQRVAVPCGGLTQWLNTGKELALGVRTSETCRLG
AVHWEQLHLQLQSDSEDDKPCSSHTRKLTGPRTAEA

72>Ly1454P, Old-SEQ-ID_3577, 部分cDNA

aaaaaggtaattttcagcattttggcacctaaaagggaaactttcatctgcttacacagg
ccagaagcaaaagacaagattgcatgttgttcttacagatgacttaaatcatctcttga
tgataaaaatatttttaagccgtgaaagttatgagatattctgggtgaagcctgattatca
aagaataaccacaaatagctttggagatcgtgtattgtttgtcactgagtcaaagagatct
gtgggattgtgaggattcttgggtggaggggtgactaatcctgcacgtcccttctgtaag
actccagtaagtactcgacacacgtacatgtgctttctcccatgtgctgtctggcttggag
taggtgtccttggcagaataactggcatccacagcaaaaatagggtccttttccataggat
acagcattttcccaacaaacttctattaaagccgtgctgattgacatatggcactgagt
ctgcatctgtcccatggaagagggtctctcattattctntatgggtcattct

73>Ly1454P, FLJ40597, 全长cDNA

attgttatcaactctttgatctgatgatcaatgctccaaagaattggattaatatattttacacaatat
tggtgtagtcagtaactgtttctatttccaggcattttttagatgaattcactaaactgggtcaagaataaat
cccaacaaggccaggattcccatggcaggagataccaaggtgtggtcgggactgtctctaagccttgtt
tcacagcatatgaaatgaaaatcgggtgcaattacttttcagggttgctactggagatatagccactgaaca
ggtagatgttattgtaaactcaacagcaaggacatttaatcggaaatcagggtgtgtcaagagctatttta
gaaggtgctggacaagctgtggaaagtgaatgtgctgtactagctgcacagcctcacagagattttataa
ttacaccagggtggatgcttaaagtgcaaaataataattcatgttccctgggggaaaagatgtcaggaaaac
ggtcaccagtgctctagaagagtgtagaacagaggaagtagacatcggtttcccttccagccatttgaaca
ggaaaatgccgggaaaaaacctatcacagttgctgataacataatogatgctattgttagacttctcatcac
aacattccaccccatcattaaaaacagttaaagtgtcatttttcaacctgagctgctaaatataattcta
cgacagcatgaaaaaagagacctaactctgcatcactgaacttccagtcacatttccatgactacatgt
aatcttccctgaacactggactgacatgaatcatcagctgttttgcattgggtccagctagagccaggacaat
cagaatataataaccataaaggacaagtcaccggaacttgttcttctacgcaatagagaagattgagag
gatacagaatgcatttctctggcagagctaccagggtaaagaaaaggcaaatggatatcaagaatgacct
aagaataatgagagactcctctccatgggacagatgcagactcagtgccatatgtcaatcagcacggct
ttaatagaagttgtgctgggaaaaatgctgtatcctatggaaaaggaaacctattttgctgtggatgccag
ttattctgccaaaggacacctaactccaagccagacagcaatgggagaaagcacatgtacgttgtgagagta
cttactggagcttccaaaaggagcgtgcaggatttagtcacccctccaccaagaatcctcacaaatccca

[0028]

cagatctctttgactcagtgacaaacaatacacgatctccaaagctatttgtggattctttgataatca
ggcttaccagaatatctcataactttcacggcttaaaatattttatcatcaaagagatgatttaagt
catctgtaagaacaacatgcaatctttgtctttgctcttgccctgtgtaagcagatgaaagttcccttt
taggtgccaatgctgaaaattacctttttaaagtgctctattgctgcatgtagcatacctttttt
tctcagcaaattgatgggtggaagctgagaaaatgtatggtaaatgtcacagagctacaaccattcagaga
caccaaatctctagggaataaaaagcacattattcttttctatcagaaaaaacaagatgcatcacct
taaaaccaagatgacattgttcttcttggaacatgttaagacatogaatgggtggcgggttaaactgtact
gcttaagtggagcggctaccgttatgcatctatcacagttggggattttgccttattaaggaactgt
caatagttcagctgaaatgactgaatcacagaatattaactctgttatggaacaaatcataacagattt
acctgtttacatttcagggtaaaaatgtatcgattgttatctaatttaaaaaattacccccaatt

74>Ly1454P, FLJ40597, 全长蛋白质

MLQRIGLI FLHNIVVSNCFYFQAFLEFNTWSRINPNKARI PMAGDTQGVVGTVS KPCFTAYEMKIGAI
TFQVATGDIATEQVDVIVNSTARTFNRKSGVSRILEGAGQAVESECAVLAAQPHRDFIITPGGCLKCKI
IIHVPGGKDVKRTVTSVLEECERKYTSVSLPAIGTGNAGKNPITVADNI IDAIVDFSSQHSPTSLKTVK
VVIQPELLNIFYDSMKRDLASLNFQSTFSMTTCNLPEHWTDMNHQLFCMVQLEPQQSEYNTIKDKFT
RTCSSYAIKIERIQNAFLWQSYQVKRQMDIKNDHKNNERLLFHGTADSVYPVNVQHGFNRSCAGKNAV
SYGKGTTFYAVDASYSKDTYSKPDNSNGRKHMYVVRVLTGVFTKGRAGLVTPPPKNPNHPTDLFDSVTNNT
RSPKLFVVFDDNQAYPEYLITFTA

75>Ly1485P, Old-SEQ-ID_2789, 部分cDNA

cgaggctctgagctcctctgggttcttctctagacctgctccctctctgaaatgcaaggccg
tgcccttaaatgggcttttggcattctgtctccagacctcccttctcatctgaagggtctct
caggagaacagagaaaaaacagcctgtctccaaactggccgctctcagggaactgggggc
ctttaccgccagtgaaagatgcagactttacagcgtgcagtacagtagagtcaagtgcac
tccttcagatagttggatgggtctctcgatcattctctgataataacattttgcctatgtt
aagtgtttccacctatcatgttaccttctaactactcccttggttggtacaggtattta
gccccatttcacaattaagaaattgaggcttaaaggattaaagagtttttagaggaga
aacagctcttctctacagaaggatcccaa

76>Ly1485P, Old-SEQ-ID_2417, 部分蛋白质

RSHLTLLYCSAVKSASF TGGKGPQSLRRASLETGWFFLCSPESP SDEKGGLETECQKPIK
GTALHFREGAGLEKNQRSS

77>Ly1485P, Old-SEQ-ID_10476, 部分cDNA

ggcacagcaatgggacttatcgctgctgatgttaaccttgatctcttgggttcagggtggt
gcctgccagctgtctccactgtggagtactatttttcccttttccccattttattcatca
gaagccagtcactaagcgaggtcaaaactccaggacaggggaattaaagtgccaccttctgg
agagggagcattcacatttatttacttgggatccttctgtaaggaaagagctgtttctctc
taaaaaaactctttaactccttttaagcctcaatttcttaattgtgaaatggggctaatacc
tgtatccaaccaagggagtagttagaaggtaacatgataggtggaagcacttaacatag
gcaaaatgttattatcaggaatgatcgagagacccatccaactatctgaaggagtcactt
aactctactgtactgcagcgtgtaaagtctgcatcttctactgggggtaaaggccccc
gtccctgagacggggcagtttggagacaggtgggttttctctgttctcctgagagccc
ttcagatgagaagggaggtctggagacagaatgccaaaagccattaaaggcagggcctt
gcatttcagagaggggagcaggtctagagaagaaccagaggagctcagctgagatatggtg
tatggattggattttggtagaagatgggaagaaccaaaccctgagaaaccactttgaag
atcggggtcagagtaaggcctaacacatagttggctcccagtaattattgggtgattgaa
cagctcaaagagcaactcgaccaagaacactggactgggagtcaggttacttggatcttg
cattctctgatttatttttattatgtatttttctatttttttgagacgaagtctca
ctcactctgtcgccaggtggactacaatggcacgatctcggtcactgcaaaactctgc
ctcccaggttcaagcgatttctcctgcctcagcctctcgagttaggtattacagggcatg
caccaccacgctggctaatttttgtatttttagtagagacgggggttttgccatggtggcc
atgctggtgtccacctcctgacctcagttgatcttctcctcagccttccaaaatggtg
ggattacaggcgtgagccaccgtgcctggcgtgatttatttttttggtgatgtttgtt
tttgtcaacttgctgtgtgaccttaagcaagttacttaacttctctgggcttactttcc
atggatgaacattgtaagaggctggagagagatgaggactaggtacaggcttttagagga
gagccaccgccccggacttctccctctgtcaccgccgtttccatgacctccttgctga
ctttgtgactccttgctcgtatcaaaaacagtgctgcaatctcagtgctttccaagag
ccctgcattgttagaaacttcccagcacgcagcaaaaggctgctgcaatactcgtctgccc
tgccctttgcccctgcgttctacttaccctcctttgttttctccaaacatctgtccctg
actatgctcatctcatgtttgtcctcagctgctgaaagggccacggtttgttttcatataca
aataagaccacagtggtggtcctggcgtggggcgaggagcagccgcgcgagcttccag
aggcagccccccaggtgtctctggagggtgtgtctctgcttcccttccccgtgtttat
tttcagacgaagccaagtggtggccgggggaccctccggactccagccttcagagaggag
ggcagctcgggctttcgccgcagtgcttctcctgcccgtcacgtgtgtgctcctagccgggg
tcgggggagctggtatcttggcccttctggggaggacgcgcagcccgaggaggcagagc
cccagacgggaatgggcttttcagaggtgggggtgcccggcgaggggacgatgcattttt

[0029]

taattatttgatttatTTTTTcaactggacttcttccggggctcttctgggcccagctg
ccttttgtgatcccgccccgggtcctcggectctcacctccagcgccggggcgccccctg
ctgtcggaaagcggctgtgaccgggagaggtgctatctgggactctgggttctcagccccg
gggacagcgaaccgagggggcagatgatccatcagaaaagagccggcactgccagccccg
cgccccggccccctgctttttccgggagcgccggcgcccgccacccgctacggccgcttga
ccccatctttgagcccgcccccaagctctgggacgctcgtgccccctcatcaaggaaagagc
caaggaccccccaaggagaaggtcaggagcggcggtgtggatgtcccttggctgcaggcccc
gcccgcgcaactcccttcagtccttcccttctctagggaccaggttagcatcagtgccctggat
ctcggccttgtgtgccccgtccttgcctccactactaagaaccaagtctggttcaccgg
ctcccaagagctggaacccatctcagctagctgggggcccaggccacccccctccctcca
gacctgtgtgcttctgccccggctccaggccccccacaccgtgaccaggcgggatcc
ctatggggctggccagtcggcaccgtgccaggccccacagtgccctgggctccatgggaag
tcgttctgtgtctttaaaatcagaaggaagacattaaaccttaggctgaagaaaatgttt
tagtacacagcaataacttatttgtctttatccaacagccataaaatataactttaata
ttctattgatatagagaagaggttcatgaaggcagaatgcctggggcccacgaacatccc
agtgtggccctggacgggacatcatgtgggcaacacagctaaaatgcgggtgaagacca
gatttcttgacatggcggtgacgggatgctccctagagagcttcaagtggattctttgc
tttttattttctctcttaataaaaatgtatgatgtttacattgtcagagaaaaaaaaa
aaaaaa

78>Ly1500P, Old-SEQ-ID_5226, 部分cDNA

aaagcgaattcactactataacagcagaaacaaaacttcagatttcagaatttgttattgg
caaaatttattctcattatacctgcttcatatgggtatattactattaaaacagaatacc
atagagtaatttgcattatttgaatttctntcattttacaatgcacttcaccaatgaaac
agntaatctccatttgaattttaaagaaaacagcacagagaagttaaatgcgggtgtag
caaagtattggggctgcttggggcactaacctcaacagattattcctcctctccttag
aataaccatgaaaatacaaatttacttagcacatttttgctttttaagttagctggttcat
tttctgaatttcccacattcagagttccagtcattattgttacatcatgtttgcagaaac
cttgtcttatttagtgtctatttgcatataaacctgaaaacattattatttgaaaacttt
tctatatctcaaatataatatacattttcataacctaccttgnattaagacttgcaattt
tatcaatctattat

79>Ly1500P, 剪接体 -1, FLJ20706, 完全cDNA

ccgcagcctccgcgggtggcgaagcgggctggggagagccgagggccaaaggaagagaaaatcgcggggag
tctctggccgggagagtcaggttagcgtcgccgggagcagtgccgagggccccctcggttcaaccgccca
caatgctgccagcagcggcaggaagggttggggagcccgacccccccccctgcggccagcgcccc
aggaaatacaaaagatataataatgatatagaagaagatgctgaggaaatgggctctgtacttgacagaa
gtatttttcatgttgtgaaaagggaagccatcctgttatatcgcttggagaatttctcttttcggcatt
tggagttgtggaacttaacgtcttacaatgttaacttttgatattatcaaatagcctgcttagagacct
aactccaaagaaatgtcagtttctggaaaagatacttcattcaccaaaaagtgtagtactttgctttgt
ggagtgaagagttcagatcagctctatgaattactaaatatctctcaaaagcagatgggagatctcaactg
aacaggaacctgaagactacatctctgtaatccagagtatcatattcaagattctgaagactactttga
ggtcaacattccaacagacctacgagcaaaaacatttctggggaataagtgaagagaaggaattgaagaa
ctatcagaagcttcaagaaacaccataccactagcagtggtgtcttccactgaaattccatgtgagaatc
ctggtgaaatatctataattttgagagatgaagtaattgggtgatactgtagaggttgaatttcatcaag
taataagcgcattagaacacggccagcccttgggaataagaaagtctgtgcatgaagcttttagagttt
cctgctggttcagtcctatgtcattgtctactgtgaggaatcggttaaagctacaacccaaaatgaagtact
acccaacagcaaggcaagggaatgcctattcagaatggcagattcaggagagagtttgtgccagaatag
cattgaagaacttgatggtgtccttacctcatttcaaacatgagataccatattatgagttccagttc
cttcaaaactgaaatttgttcttcaaaacaaatatacttcaaaagaacttccaactcttctccactgtg
cagcaaaatttggcttaaagaacctggctattcatttgcctcaatgttcaggagcaacctgggcatctaa
gatgaaaaatattggagggttcagaccccgacatattgctgaaaggcatggtcacaaagaactcaagaaa
atcttcgaagacttttcaatccaagaatttgacataaataatgagcaagaaaatgattatgaagaggata
ttgcctcattttccacatatattccttccacacagaacccagcatctcatcatgaaagcagaagacata
cgggcagagtgccagatggagctgaggcaaatgaaatggaagggaagggaacagaaatggatcaggcatg
gagaccaaacacagccacttagaggttggcagtgagagttctgaagaccagtatgatgacttgtatgtgt
tcattcctggtgctgatccagaaaataattcacaagagccactcatgagcagcagacctccttcccccc
gcccgcgacctgtagctaatgccttccaactggaaagacctcacttcaccttaccagggaacatgggtggaa
ggccaaaatggaaagaagtcaaaactggggctcatcctggtgttagacaagaaacaggagatgaacccaaag
gagaaaaagagaagaagaagggaagagcagggagggaagaaagacccatatacttttgcgtgagat
tgatgacagtgaaatgatgatgatattggccaatctgagtataaagaaaaaaactgggagtcggctcttc
attataaatagacctcctgccccacaccccgacccacaagtatacctccaaaagaggaaactacacctt
acatagctcaagtgtttcaacaaaagacagccagaagacaatctgatgatgacaagttccgtggtcttcc
taagaaacaagacagagctcggatagagagtcagaccttttctactctcaggggctgtctaaactgaggt
caggaagaactcatcctctgcaggagaaagttaaagaatggggaatgtctatggatgaagctctggaga
aatttaaacactggcagatgggaaaaagtggcctggaaatgattcagcaggagaaattacgacaactacg
agactgcattattgggaaaaaggccagaagaagaaaatgtctataataaactcaccattgtgcacccatcca
gggtggtgaaggaaactgcccaaatgaaaataagttttataatgtacacttcagcaataagcttctcgtctc

[0030]

gaccccaagt t gaaaaggaatt t tgggtttctgt t gcaagaaagat cattaaagaaggt tattataatgaaa
ctcacgaatctacggacatttttgccttcaggggtgaagcaagcttgaatttggattgacctgcttctcttaa
agcgaattcatactataacagcagaaacaaaacttcagatttcagaatttgttattggcaaaaatttatttc
tcattatacctgcttcataatgggtatattactattaaaacagaataccatagagtaattgcattatttga
aaattctctcattttacaatgcacttcaccaatgaaacagctaatttccattttgaaaattaaaagaaaa
cagcacagagaagttaaattgcgtgtagcaaagttatgggggtctgcttgagggcactaacctcaacagat
tattcctcctctccttagaataacatgaaaatacaaaatttacttagcacatttttgccttttaagtagc
tgggttcattttctgaattttctcacattcagagttccagtcattattgttacatcatgtttgcagaaacct
tgtcttatttagtgcttatttgcataaacctgaaaacattattatttgaaaacttttctatatctcaa
atataatatacattttcataacctacctttgtattaaagacttgcaattttatcaatctattatttcttaga
aacaatttactagcttagaatagaaagcaatgttatcgctcataataattttcatgtacaaatgccacaaat
aaattgaatgtttaagctaaaa

80>Ly1500P, 剪接体 -1 FLJ20706, 全长蛋白质

MIYEEDAEEWALYLTEVFLHVVKREAILLYRLNFSEFRHLELLNLTSYKCKLLILSNLLRDLTPKKQCF
LEKILHSPKSVVTLGCVKSSDQLYELLNISQSRWEISTEQEPEDYISVIQSIIFKDSSEDFEVNIPTDL
RAKHSGEISERKEIEELSEASRNTIPLAVLPTEIPCENPGEIFII LRDEVIGDTVEVEFTSSNKIRIRTR
PALWNKKVWCMKALEFPAGSVHVNVCYDGIKATTKIKYPTAKAKECLFRMADSGESLQNSIEELDGV
LTSIFKHEIPYEFQSLQTEICSONKYTHFKELPTLLHCAAKFGLKNLAIHLLQCSGATWASKMKMMEGS
DPAHIAERHGHKELKKIFEDFSIQEIDINNEQENDYEEDIAFSYIIPSTONPAFHHSRKTYQOSADGA
EANEMELEGKQNGSGMETKHSPLSVGSESEDQYDDLTVFIPGADPENNSQEPMLSSRPPLPPRPVANA
FQLERPHFTLPGMTVEGQMERSONWGHGVRQETGDEPKGEKEKKEEKEQEEEDPYTFAEIDDSEYDM
ILANLSIKKKTGSRFSIINRPPAPTTPRPTSIPPKKEETPYIAQVFOQKTARRQSDDDKFRGLPKKQDRAR
IESPAFSTLRGCLTDGQEEILILQEKVKNGKMSMDEALEKFKHWQMGKSGLEMIQOEKLRLRDCIIGKR
PBEENVYNKLTIVHHPGGKETAHNENKFYNVHFSNKLPARPQVEKEFGFCCKKDH

81>Ly1500P, 剪接体 -2 DKFZp667N1611, 全长cDNA

ggaagagaaaatcgcgggagctctctggccgggagagctccaggttagcgctcggcgggcagcagtgcgag
gccccctcggtctcaaccgcccacaaatgctgccagcagcgccaggcaaggggcttgggagcccgaccggc
ccccctgcggcccgcccgccccccaggaaatataaaagatatataatgatataatgaagaagatgctgaggaa
tgggctctgtacttgacagaagtatttttcatgttgtgaaaaggaagccatcctgttatatcgcttgg
agaatttctcttttcggcatttggagttgctgaacttaacgtcttacaatgtaaacttttgatattatc
aaatagcctgcttagagacctaacctcaagaaatgtcagtttctggaaaagatacttcattcaccaaaa
agtgtagtacttttgccttggagtggaaggttcagatcagctctatgaattactaaatactctctcaa
gcagatgggagatctcaactgaacaggaacctgaagactacatctctgtaatccagagatcatcttcaa
agattctgaagactactttgaggtcaacattccaacagacctacgagcaaaacattctggggaaaataagt
gagagaaaggaaattgaagaactatcagaagcttcaagaaacaccataccactagcagtggtgcttccca
ctgaaattccatgtgagaatcctgggtgaataattcataattttgagagatgaagtaattgggtgatactgt
agaggttgaatttacatcaagtaataagcgcattagaacacggccagcccttggaaataagaaagcttgg
tgcatgaaagcttttagagtttctgtggttcagtcctatgtcaatgtctactgtgtagggaatcgttaaag
ctacaacccaaaattaagtactaccaacagcaaaaggcaaggaatgcctattcagaatggcagattcagg
agagagtttgtgccagaatagcattgaagaacttgatgggtgctcttacatccatattcaaacatgagata
ccatattatgagttccagctctcttcaactgaaatttggttctcaaaacaaatatactcatttcaagaac
ttccaactcttctcactgtgcagcaaaatttgggttaaagaacctggctatttgcatttgcatttgcatt
aggagcaacctgggcatctaaagatgaaaaataaggaggggttcagaccccgacatattgctgaaaggcat
ggtcacaaagaactcaagaaaatcttcgaagacttttcaatccaagaaattgacataaataatgagcaag
aaaatgattatgaagaggatattgcctcattttccacatatattccttccacacagaacccagcatttca
tcatgaaagcagaagacatacgggcagagtgagatggagctgagggcaaatgaaatggaaggggaagga
aaacagaatggatcaggcatggagaccaaacacagccactagaggttggcagtgagagttctgaagacc
agtatgatgacttgatgtgttcttcttctgtgctgacccagaaaataattcacaaagagccactcatgag
cagcagacctctctcccccgccgagacctgtagctaatgccttccaactggaaagacctcacttcacc
ttaccagggacaatgggtggaaggccaaatggaaagaagtcaaaactggggctcatcctgggtgttagacaag
aaacaggagatgaacccaaaggagaaaaagagaagaagaagaggaaggaagagcaggagggaggaagaaga
cccatatacttttgctgagattgtgacagtgaaatgatgatgatattggccaatctgagtataaagaaa
aaaactggggagtcggtcttcttataaaatagacctcctgccccacaccccgacccacaagtatacctc
caaaagaggaaactacaccttacatagctcaagtggttcaacaaaagacagccagaagacaatctgatga
tgacaagttccgtggtcttcttaagaaacaagacagagctcgatagagagtcagccttttctactctc
aggggctgtcctaactgatgggtcaggaagaactcatcctcctgcagagagaaagtaaagaatgggaaaatgt
ctatggatgaagctctggagaaatttaaacactggcagatgggaaaaagtgccctggaaatgattcagca
ggagaaattacgacaactacgagactgcattattgggaaaaggccagaagaagaagaatgtctataataaa
ctcaccattgtgcaccatccaggtgggtaaggaaactgccacaatgaaaataagttttataatgtacact
tcagcaataagcttctgctcgaccccaagttgaaaaggaatttgggttctgttgcaagaaagatcat
aagaaggttattataatgaaactcagaatctacggacattttgcttccaggggtgaagcaagcttgaatt
tggattgcctgcttctttaaagcgaattcatactataacagcagaaaacaaaacttcagatttcagaatt
tgttattggcaaaatttattctcattatacctgcttctatgggtatattactattaaaacagaatacca
tagagtaattgcattatttgaaaattctctcattttacaatgcacttcaccaatgaaacagctaatttcc
attttgaaaattaaaagaaaacagcacagagaagttaaatgcgggtgtagcaagttatgggggtctgcttg
agggcactaacctcaacagattattcctcctcctcttagaataacatgaaaatacaaaatttacttagca

[0031]

catttttgccttttaagtagctgggttcattttctgaatttctcacattcagagttccagtcattattggt
acatcatgtttgcagaaacctgtcttatttagtgctctatttgcataataacctgaaacattattattt
gaaaacctttctatatctcaaatataatatacattttcataacctaccttctgtattagacttgcatttt
atcaatctattatttcttagaacaatttactagcttagaatagaagaatgttatcgctcataataatt
tcatgtacaaatgccacaaataaattgaatgtttaagctaaaaa

82>Ly1500P, 剪接体.-2, DKFZp667N1611, 全长蛋白质

GRENREGSLAGRVQVALGGQQCAGPSASTATMLPAAPGKGLGSPDPAPCGPAPPNGTKDIIMIYEEDAE
WALYLTEVFLHVVKREAILLYRLENFSFRHLELLNLTYSYCKLLILSNSLLRDLTPKKCFLEKILHSPK
SVVTLGCVKSSDQLYELLNISQSRWEISTEQEPEDYISVIQSIIFKDSSEDFEVNIPDLRAKHSGEIS
ERKEIEELSEASRNTIPLAVVLPTEIPCENPGEIFIILRDEVIGDTVEVEFTSSNKIRTRPALWNKKVW
CMKALEFPAGSVHVNVCYDGIKATTKIKYPTAKAKECLFRMADSGESLQNSIEELDGVLTISIFKHEI
PYEFQSLQTEICSONKYTHFKELPTLLHCAAKFGLKLNLAHLLQCSGATWASKMKNMEGSDPAHIAERH
GHKELKKIFEDFSIQEIDINNEQENDYEEDIASFSTYIPSTQNPFAFHESRKTYGQSADGAENEMEGEG
KQNGSGMETKHSPLFVSGESSEDQYDDL VYFIPGADPENNSQEPMLSSRPPLPPPRPVANAFQLERPHFT
LPGMTVEGQMERSQNWGHPGVRQETGDEPKGEKEKEKEKEKEEEDPYTFAEIDDSEYDMILANLSIKK
KTGSRFSFINRPPAPTPTPTSI PKKEETTPYIAQVFQOKTARRQSDDDKFRGLPKKQDRARIESPAFSTL
RGCLTDGQEELILLQEKVKNGKMSMDEALEKFHWQMGKSGLEMIQKEKLRLRDCIIGKRPEEENVYNK
LTIVVHPGGKETAHNENKFYNVHFSNKLPARPQVEKEFGFCCKKDH

83>Ly1500P, 剪接体 -3, FLJ34204 fis, 全长cDNA

attttgggttctcttcaagaattaacaaaccttactcttgaattctcttcttagttaacacaggcatca
ctacttccaattgatctcaggatgtggatcctcatcacattttgaacaaaatcctctgtttcagcaag
gaattcatatttgcataatggtgaagatggtttctgaagtgcagatcagaagtagagcttctaattgaccccc
agaagcactgagtgaccaagtgcataacctgccagccattgtgtccatcgctctcagagcagctgggg
attgtgcttggtcccagagctatggtgcaaaaggcgggtcgctaggggccactcagggaaagagaaccc
agaaacatggcatgctgacaaaaggtagtccctgcttatccagcttactttctgctgatttagttaccc
atggtcaactgccatctgaaaaataggaatacaaaagataataatgatataatgaagaagatgctgagg
aatgggctctgtacttgacagaagtattttacatgttgtgaaaagggaaagccatcctgttatcgctt
ggagaattctctcttctggcatttggagttgctgaacttaacgtcttacaatgtaaaattttgatatta
tcaaatagcctgcttagagacctaaactccaagaaatgtcagttcttgaaaagatacttcattcaccaa
aaagtgtagttactttgctttgtggagtgagagttcagatcagctctatgaattactaaatatctctca
aagcagatgggagatctcaactgaacaggaaacctgaagactacatctctgtaattccagagtatcatattc
aaagattctgaagactactttgaggtcaacattccaacagacctacgagcaaaacattctggggaaataa
gtgagagaaagggaattgaagaactatcagaagcttcaagaaacaccataccactagcagtggtgcttcc
cactgaaattccatgtgaggatcctggtgaaatattcataattttgagagatgaagtaattggtgatact
gtagaggttgaatttacatcaagtaataagcgcatagaacacggccagccctttggaataagaaagtct
ggtgcatgaaagctttagagtttctgctggttcagtcctatgtcaatgtctactgtgatggaatcgtaa
agctacaacaaaaattaaagtactaccaacagcaaaaggcaaaaggaatgcctattcagaatggcagatca
ggagagagtttgtgccagaatagcattgaagaacttgatgggtgcttccatccatattcacaatgaga
taccatattatgagttccagttcttcaaaactgaaatttgttctcaaaacaaatatactcatttcaaga
acttccaactcttctcactgtgcagcaaaatttggcttaagaaacctggctattcatttgcttcaatgt
tcaggagcaacctgggcatctaagatgaaaaatattggagggttcagacccccacacatatgtctgaaaggc
atgggtcacaagaactcaagaaaaatcttcgaagacttttcaatccaagaaattgacataaaataatggca
agaaaatgattatgaagaggatattgcctcatttccacatatattccttccacacagaacctcagcattt
catcatgaaagcaggaagacatacgggcagagtgagtgagctgaggcaaatgaaatggaaggggaag
gaaaacagaatggatcaggcatggagaccaaacacagccactagaggttggcagtgagagttctgaaga
ccagtatgatgacttgatgtgttatttctggtgctgatccagaaaaataattcacaagagccactcatg
agcagcagacctcctctcccccgccgcgacctgtagctaatgccttccaactggaagacctcacttca
ccttaccaggagacaatggtggaaggccaaatggaaagaagtcaaaactggggtcatcctggtgttagaca
agaaaacaggagatgaacccaaaggagaaaaagagaagaaagaggaaaaagagcaggaggaggaaagaa
gacccatatacttttgctgagatttgatgacagtgaatatgacatgatatggccaatctgagataaaga
aaaaaactgggagtcggtcttctcattataaatagacctcctgccccacaccccgacccacaagtatacc
tccaaaagaggaaactacgcttatactagctcaagtgttcaacaaaagacagccagaagacaatctgat
gatgacaagttccgtggtcttcttaagaaacagacagagctcggtatagagagtcagccttttctactc
tcaggggctgtctaaactgatggtcaggaagaactcatcctcctgcaggagaaagtaagaatgggaaat
gtctatggatgaagctctggagaaatttaaacactggcagatgggaaaaagtgccctggaaatgattcag
caggagaaattacgacaactacgagactgcattattgggaaaaggccagaagaagaaatgtctataata
aactcaccattgtgcacctccagggtggaaggaaactgcccacaatgaaaaaagttttataatgtaca
cttcagcaataagcttctgctcgaccccaagttgaaaaggaaatttgggttctgtgttgcaagaagatcat
taagaagggtattataatgaaactcacgaatctacggacattttgctttcagggtgaagcaagcttgaa
tttggtatgctgctctctttaaagcgaattcatactatgacagcagaacaaaaacttcagatttcagaa
tttggtattggcaaaatttattctcattatacttgccttatatgggtatattactattaaacagaatac
catagagtaattgcattatttgaatttctctcattttacaatgcacttcaccaatgaaacagctaaattt
ccatttgaataataaagaaaacagcagagaaagttaaatgcggtgtagcaaaagttatggggtctgct
tgagggcactaacctcaacagattattcctccctccttagaataacctgaaatacaaatctacttag
cacatttctgcttttaagtagctgggttcattttctgaatttctcacattcagagttccagtcattattg
ttacatcatgtttgcagaaacctgtcttatttagtgctattttgcataataacctgaaaacattattat

[0032]

ttgaaacttttctatatctcaaatataacattttcataacctacctttgtattagacttgcaatt
ttatcaatctattatttcttagaacaatttactagcttagaatagaaagcaatgttatogtcatataat
tttcatgtacaaatgccacaaataaattgaatgtttaagctatgtctgagtttttaagtaaaattata
agaattagccaataaaattgcttctcggccttttggttaagatc

84>Ly1500P, 剪接体 -3, FLJ34204 fis, 全长蛋白质

MVNCHLKI GNTKDIIM IYEEDAEWALYLTEVFLHVVKREAILLYRLNF SFRHLELLNLTSYKCKLLIL
SNSLLRDLTPKKQCFLEKILHSPKSVVTL LCGVKSSDQLYELLNISQSRWEISTEQEPEDYISVIQSII F
KDESDYFEVNIPTDLRAKHSGEISERKEI EELSEASRNTIPLAVVLPT EIPCEDPGEIFIILRDEVI GDT
VEVEFTSSNKRI RTRPALWNKKVCMKALEFPAGSVHVNVC DGI V KATTKI KYYPTAKAKECLFRMADS
GESLCQNSIEELDGVLT SIFKHEIPYEFQSLQTEI CSQNKYTHFKELPTLLHCAAKFGLKNLAIHL LQC
SGATWASKMKNMEGSDPT HIAERHGHKELKKI FEDFSIQEIDINNEQENDYEEDIA SFSTYI PSTONPAF
HHESRKYTGQSADGAENEMEGEGKQNGSGMETKHSPL EVGSESEDQYDDLYVFI PGADPENNSQEPLM
SSRPPLPPRPVANA FQLERPHFTLP GTMVEGQMERSQNWGHPGV RQETGDEPKGEKEKKEEKEQEEEE
DPYTTFAEID DSEYDMI LANLSIKKCTGSR SFI INRPPAPT PRPTS IPPKEETTPYIAQVFQQKTARRQSD
DDKFRGLPKKQDRARIES PAFSTLRGCLTDGQEELI L LQEKVKNGKMSMDEALEKF KHWQMKGSGLEMIQ
QEKLRQLRDCI IIGKRPEEENVYNKLTIVIH PGGKETAHNENKFYNVHFSNKLPARPQVEKEFGFCKKDH

85>Ly1516P, Old-SEQ-ID_8949, 部分cDNA

cctctcagaaaaactgagcatactagcaagacagctcttcttgaaaaaaaatatgtata
cacaaatatatacgtatatcttatatacgtatgtatatatacacacatgtatatcttctct
tgattgtgtagctgtccaaaataataacatatatagagggagctgtattcctttatacaa
atctgatggctcctgcagcacttttctcttgaaaaatattacattttgctaacctagt
ttgttactttaaaaatcagttttgatgaaaggaggaaaagcagatggacttgaaaaaga
tccaagctcctattagaaaaggatgaaaatctttatagtaaaatttttataaaactaaa
gttggtagcttttaaatgtagtaaaactctcatttatttggggttcgctcttgatctcat
ccatccattgtgttctctttaaagtgtgctgccttttgaggcattcactgccttagacaa
tgccaccagagatagtgggggaaatgccagatgaaaccaactcttgctctcactagttgt
cagcttctctggataaagtgaccac

86>Ly1516P, 类似于CD47抗原, 剪接形式-1, 全长cDNA

agcggagtgggctcctgcctgtgacgcgcggcggcggtcggtcctgcctgtaacggcggcggcggtgctg
ctccagacacctgcggcggcggcggcgaccacgcggcggcgaggatgtggcccttgtagcggcgct
gttgcctgggctcggcgtgctgcggatcagctcagctactatttaataaaacaaaaatctgtagaattcacg
ttttgtaatgacactgtcgtcattccatgctttgttactaatatggaggcacaaaactactgaagtat
acgtaaatgtggaatttaaaggagagatatttacacctttgatggagctctaacaagatccaactgctccc
cactgacttttagtagtgcaaaaatgaagtctcacaattactaaaaggagatgcctctttgaagatggat
aagagtgatgctgtctcacacacaggaactacacttgtagaagtaacagaattaaccagagaagggtgaaa
cgatcatcgagctaaaaatctgtgtgtttcatggttttctccaaatgaaaatattcttattgttatttt
cccaatttttgcatactcctgttctggggacagtttgggtattaaaacacttaaatatagatccgggtgg
atggatgagaaaaacaattgctttacttgttggactagtgatcactgtcattgtcattgttggagcca
ttcttttctgctccaggtgaatattcattaaagaatgctactggccttggtttaattgtgacttctacagg
gatattaatattacttactactatgtgttagtacagcgattggattaacctccttcgtcatttgccata
ttgggttattcaggtgatagcctatatcctcgctgtggttggaactgagtcctctgtatttgggcgtgtatac
caatgcatggccctcttctgatttcagggttgagtatcttagctctagcacattacttggactagttta
tatgaaatttttggcttccaatcagaagactatacaacctcctaggaataactgaagtgaagtgtgagc
tccgatttgagagtagtaagacgtgaaaggaatacacttgtgtttaagcaccatggccttgatgattca
ctgttggggagagaagaaacagaaaagtaactgggtgtcacctatgagacccttacgtgattgttagttaa
gtttttattcaaacgagctgtaatttagttaataaaataattatgatctatgttgtttgcccattgaga
tccagtttttgttgttatttttaatacattaggggcaatagtagaatggacaatttccaagaatgatgc
ctttcaggtccttagggcctctggcctctaggttaaccagtttaaatgggttcagggtgataaactacttagc
actgccctgggtgattaccagagatactatgaaaaccagtggttccatcaaacctttgccaactcagg
ttcacagcagctttgggcagttatggcagtatggcattagctgagaggtgtctgccacttctgggtcaat
ggaataataaaatgaagtaggcaggaatattgggtgggagcatcttgatgatctccgtatgatgtgata
ttgatggagatagtggtcctcattcttgggggttgccattcccacattcccccttcaacaaacagtgtaa
caggtccttcccagatttagggtacttttattgatggatatgttttcttttattcacataaccccttga
aacctctcttgtcctcctgttacttgccttctgctgtacaagatgtagcaccttttctcctcttgaaca
tggctcagtgacacggtagcaccagttgcaggaaggagccagactgttctcagagcactgtgttcacac
ttttcagcaaaaatagctatgggttgtaacatatgtattccctcctctgatttgaaggcaaaaatctaca
gtgtttcttctacttctttctgacttggggcatgaaaaagcaagattgaaatttgaactatgagtcctc
tgcatggcaaaaaatgtgtgtcaccatcaggccaacaggccagccttgaatggggatttattactgtt
gtatctatgttgcatgataaacattcatcacttctcctgttagtcctgctcgtactcccccttccccta
tgattgaaaagttaacaaaacccacatttccctatcctgggttagaagaaaattaatgttctgacagttgtg
atcgcttgagtagcttttagacttttagcattcggtttttacctgttttggtgagtggtgtttgtatgtgc
atacgtatgagataggcacatgcattctctgtatggacaaagggtgggttacctacaggagagcaaaaggtt
aattttgtgcttttagtaaaaacatttaaatatacaaaagtcttttattgggtggaatttatatttgatgcaaa
tatttgatcactttaaacttttaaacttctaggttaatttgccacgctttttgactgctaccaataccc
tgtaaaaatacgttaattcttctgtttgtgttaataagatattcatattttagttagtcatttaataatagtt
atttcttagtccatcagatgttcccggtgtgcctcttttatgccaatttgattgtcatatttcatgttggg

[0033]

accgaagtagtttggccatggcaaacctaaatttatgacctgctgaggcctctcagaaaactgagcatact
agcaagacagctcttcttgaaaaaaaatatgtatacacaatatatacgtatatctatatatacgtat
gtatatacacacatgtatatcttctccttgattgtgtagctgtccaaaataataacatatatagagggagc
tgatctcctttatacaaatctgatggctcctgagcacttttctcttgaaaatatttacattttgcta
acctagtttgttactttaaaaatcagttttgatgaaaggagggaaaagcagatggacttgaaaagatcc
aagctcctattagaaaaggatgaaaatctttatagtaaaatttttataaaactaaagttgtacctttta
atatgtagtaaaactctcattttttgggggtogctcttggatctcatccatccatttgtgtctctttaat
gctgctgcttttgaggcattcactgcccagacaatgccaccagagatagtgggggaaaatgccagatg
aaaccaactctgctctcactagttgtcagcttctctggataagtgaccacagaagcaggagtcctcctg
cttgggcatcattgggcccagttccttctctttaaatacagatttgtaatggctcccaaatccatcacatc
acatttaaattgcagacagtggtttgcacatcatgtatctgttttgcccataatatgctttttactccc
tgatcccagtttctgctgttgactcttccattcagttttatttatgtgtgttctcagctgacaccatt
tgtccttttctgcaacaacctttccagctacttttgccaaattctatttgtcttctcctcaaaaacttc
tctttgagcttctcttcatctgtgtagctgctcttttgtctcttaacttaccattcctatagtacttt
atgcatctctgcttagttctattagttttttggccttgctcttctccttgattttaaaaatccttctata
gctagagcttttctttcttctctcttctcctgagtggtttgcatacatcagaagctaggtacataa
gttaaatgattgagagttggctgtatttagatttatcactttttaaagggtgagcttgagagtttctt
tctttctgttttttttttttttttttgactaaattcacatgctctaaaaaccttcaaagggtgattatt
ttctcctggaaaactccaggctcattctgtttaaatccctaagaatgtcagaataaaaataacagggtcta
tcgctgaattggaaaatatcttcttttccaggatgctatagtcatttagtaagtgaccacaaatttgtta
tttgactaacaagctcaaaacacgataagtttactcctccatctcagtaataaaaaattaaagctgta
caaccttctagggttctctgttcttaaaatgggtattcaaaaatggggatctgtggtgtatgtatgaaa
cacatactccttaatttacctgtgttggaactgggagaaatgattgtcgggcaacogtttatttttat
tgtattttatttgggtgagggattttttataaacagtttacttgtgtcatattttaaattactaact
gccatcacctgctggggtcctttgttaggtcattttcagtgactaataggataatccaggaattctga
agagatgagcagtgagtgaccaggcagttttctgctttagctttgacagttcttaattaagatcattg
aagaccagcttctcataaaatttctcttttgaaaaaagaaagcatttgtactaagctcctctgtaaga
caacatcttaaatcttaaaagtgtgttatcatgactggtgagagaagaaaacattttgtttttattaaa
tgagcattatttacaataagccattgttgagaattagatcccacatcgtataaatatctattaccatt
ctaaataaagagaactccagtgctgtgcatagtgcaagatcctctctggagcttttttgcatagcaattaa
agggtgtgctatttgtcagtagccattttttgcagtgatttgaagaccaaagttgtttacagctgtgtt
accgttaaagggttttttttttatatgtattaaatcaatttatcactgtttaaagcttgaaatctgca
atctttgccaaggtaactttttatttaaaaaaaaacataactttgtaaatattaccctgtaatatatat
atacttaataaaaacattttaagctaaaaaaaacaaaaaaaacaaaaaaaacaaaaaaaacaaaaaaa

87>Ly1516P, 类似于CD47抗原, 剪接形式-1, 全长蛋白质

MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDG
ALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHNTGNYTCEVTEL TREGETI IELKYRVVSWFSPN
ENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGL
GLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILAL
AQLGLLVYMKFVASNQKTIQPPRNN

88>Ly1516P, cDNA DKFZp313F0317, 剪接形式, 部分cDNA

ggagatattttctgttcaatttaaggagaggtaaatttggtatcaatagaaaaaatgtttctgaaaaat
ttaaacccttggaatgtattttatggcatggagtcagatgtttcagggagagaagaacaaaatcaagaagca
ttgcaagtagtgcctcatatggaatgcttaaggcttggtgttaaaaaatatatatataggtgtgcaatgtc
ttaggctcatggttagcagcagaaatcgtaataattctttgtcacatgggttatatccatattggagaga
attaactcaggtgaaatttaactgtacactgtttgggtttataatatttagagggatcacaaactgactga
tgtccctttgaagtaccattcttataaatcttttttttttcagaatgggcccagccaactgtgacatccc
ttggatcggagatttagaactagaaagtattcttctacattattagggagaagaaaggagttaacttggcg
gttagcaatattctattttgtttttgttttttagagacagggctctcattatgttgaccaggctggcc
tcgagctcctgggctcaagcaatgctcccacctcagcctcccaagtagctgggactacgggcatgtgcca
ctacacctggcagtggtttattctgataaaatacatttatgagctcaaaaatgtaactctaaaaccttatct
ctgaacttccatattaccatcagaaatttagatagttgtttagttctctttttctttgtagaacatagat
ataaggcatgggttcatggaagtcagttgtatatacatgtaactatcctgagttcccaataaagctct
gtatttatgtcttagtttatggggaggctgctaaatgtagtgcatcccaacctatttacctgttctac
tttaaaaagaggttggtcttctgtttggatacaaggaccaagtcactccccaggttctctccacagtaag
ggaggcctatttaaagccgcccagtgactaacagaaactggactcctatgagctcagatataaactgg
gcctcacaggggtgggacagtatgtagtctaggaattggaaggatccattccatatcaagaactgaagc
atcgtgttgccctctcagcagcaagagtaaggtagtgcctctgtagttatagttcctgagttcctctgt
ctttgattctttgcctattagccagctagctcaccctctgtttatgccactgttttttatctctattcat
gccttctcacagacaacttttcttacctacagctttggactcatccttgtctcctttctgtttcttttct
actttcccttcccacccaactttctgggttttttctgtttcttcttagagtcagtgaggaggagaa
actgtcagtcagtcagttgttgcatttttctgttttgagaagactcaccagcttttggtggctcagag
atggctttcttgggtcaggaccacccctttccctgcccagctttggaagcttgacagaatcagagtg
gcatggtgtgtaaaatagtaaggaaacacagagcagtcctggaggcgtgctccatctgctgtgaga
aaatccagtgctgtcatccagcccaggtcccagcggaatgggctctctgttccagtaggatccccctcct
gctgagtggttcatggcatgtttctgttcaacgcttttccatctgtaggattcttattctgtatttattt

gttttttgggttttttttttttttttgagatggagctctcgctctgtgcccagggtggagtgagtggtggcac
gacccagctcgctgcagcctctgctccaggacgagggagatcctccacctcagccttccacgtagc
tgggactacagggcatgcaccacagggcatgcaccacagccagctaatttttgtatttttggtagagaca
gggttgcatcatgttgcccagggtgggtcttgaatgcctgagctcaagcaatctatttgccctggcctccc
aaagtgcctgggatttacaggcatgagccacagggcagccttctcatttggtttttttataagggaagcta
tctcttcttccctcccaactagggtattcttttcccttctgctcactttgctcatgtactgtattcctt
caacttcatataatgaatccatttggagcagtgaaaaaggcaactcagaagctaagaagaaatagatag
aggaatactcagagctatctgagtatcttcttttagtttggtagctcttggagctttgaaactggaaaga
cccagggtgagtggtggagaaagagactgagcttgaagacacaggagcagtgagctaagggtgagtgag
tagtggggacaaaattctggcacatctgtctacactctgggtagatagaggagggagtgagcaccaca
tgggtgggggtatgttgggtgacagcattttccaccagccagtgtaacaagtggctgatttgggggaaaga
tggcataaaacaaatagagagaatgtgtttactatttgatgtagatgggttatttggcttcatcttcaaatc
agtgtatataatcaagaatattcagcatgtttgaatagactgtcagagctggaactcttctattaacatc
tctggcaccttttagtttttagcctgaacattttatcttaaaattaaacattaccaaatgccttagtttat
ttcattttataaatttatattcttatttggttatttataatcagcttccaatcagaagactatacaacctcc
taggaataactgaagtgaagtgtggactccgatttggagagtagtaagacgtgaaaggaatacacttgt
gtttaagcaccatggccttgatgattcactgttggggagaagaaacaagaaaagtaactgggtgtcacct
atgagacccttacgtgattgttagttaagtttttattcaaacgagctgtaatttagttaataaaataatt
atgatctatgttgtttgcccatttgagatccagtttttggttgttatttttaatacaattaggggcaatag
tgaatgggcaaatttcaagaatgagtcctttcaggtcctagggcctctggcctctaggtaaccagttta
aatgggttcaggggtgataactacttagcactgcccctgggtgattaccccagagatatctatgaaaaccag
tggcttccatcaaacctttgccaactcaggttcacagcagcttggggcagttatggcagtatggcatttag
ctgagagggtgtctgccacttctgggtcaatggaataataaataaagtacagggcaggaatttgggtgggag
catcttgtatgactctccgtatgtagtgaatttgatggagatagtggtcctcattcttgggggttgccatt
cccacattccccctcaacaacagtgtaacaggtccttcccagatttaggggtactttttagtgagata
tgttttctttttattcacataacccccctgaaacccctgtcttgcctcctgttacttgccttctgtgtaca
agatgtagacacttttctcctcttgaacgtgggtctagtgacacggtagcaccagttgcaggaaaggagcc
agactgttctcagagcactgtgttcacacttttcagcaaaaaatagctatgggtgtaacatagtattcc
ctcctctgatttgaaggcaaaaaatctacagtggttcttctcacttctttctgactctggggcagtaaaaa
caagattgaaaattgaactatgagtcctcctgcactggcaacaaaatgtgtgtcaccatcaggccacagg
ccagccctgaaatggggatttattactgttgtatctatgttgcagataaaacattcatcaccttctcct
gtagtcctgcctcgtactccccctccccctatgattgaaaagttaacaaaacccacatttctatcctgggt
tagaagaaaaataaattgttctgacagttgtgtatcgctggagtaacttttagacttttagcattcgttttt
acctgtttgtggatgtgtgtttgtatgtgcatacgtatgagataggcacatgcattctctgtatggcaaa
aggtgggttaccctacagggagagcaagggttaattttgtgcttttagtaaaaacatttaatacaaaagttc
ttatttggggcgaattatatttgatgcaaatatttgatcacttaaaacttttaaaacttctaggttaattt
gccacgtttttgactgtcaccacatccctgttaaaaaatcgttaattcttctgtttgtgttaataagata
ttcatattttagttagtgcattataatagttatttcttagtccatcagatgttcccgtgtgcctcttttat
gccaaattgattgtcatatttcatgttgggaccaagtagtttggccatggcaaacctaaattttagcact
gctgaggcctctcagaaaaactgagcatactagcaagacagctcttcttgaaaaaaaaataatgtatacac
aaatataacgtatatctatatatacgtatgtatatacacacatgtatatcttctctgtattgtgtagct
gtccaaaaataataacatatatagagggagctgtattcctttatacaaatctgatggctcctgcagcactt
ttccttctgaaaaatatttacattttgttaacctagtttggttactttaaaaatcagttttgatgaaagga
gggaaaagcagatggacttgaaaaagatccaagctcctattagaaaaggtatgaaaaatcttatagtaaa
attttttataaactaaagtgtgtaccttttaatatgtagtaaaactctcatttatttgggggttcgctctgg
atctcatccatccattgtgttctctttaatgctgcctgccttttgaggcattcactgccttagacaatgc
caccagagatagtggggggaaatgccagatgaaaccaactcttgctctcactagttgtcagcttctctgga
taagtgaaccagagaagcaggagtcctcctgcttgggcatcattggggcagttccttctctttaaatacaga
tttgtaattggctcccaaatccatcacatcacatttaaatgcagacagtggtttgcacatcatgtatct
gttttgtcccataaataatgctttttactcctgacccagtttctgctgttgactcttccattcagtttta
ttaattgtgtgttctcacagtgacaccatttgccttttctgcaacaacctttccagctacttttgccaa
attctatttgtcttctccttcaaaacatttctcctttgcagttcctcttcatctgtgtagctgtcttttg
tctcttaacttaccattcctatagtaactttatgcattctgcttagttctatttagtttttggccttgct
cttctccttgattttaaattccttctatagctagagcttttcttcttcttcttctccttgcagtg
ttttgcatcacatcagaagctaggtacataagttaaatgattgagagttggctgtatttagatttatcact
ttttaatagggtgagcttgagagttttcttcttcttgggttttttttttttttttttttttttttttgact
aatttcacatgtctaaaaaccttcaaaggtgattatttttctcctggaaactccaggtccattctgttt
aaatccctaagaattgtcagaattaaaaataacaggggtatcccgttaattggaaatatttctttttcagga
tgctatagtcaatttagtaagtggccaccaaatgttatttgcactaacaagctcaaaacacgataagt
ttactcctccatctcagtaataaaaaatgaagctgtaatacaaccttctaggtttctctgtcttaaaatgg
gtattcaaaaaatggggatctgtgggtgtatgtatggaacacatactccttaattacctgtgtttggaaa
ctggagaaatgattgtcgggcaaccgtttattttttattgtattttatttgggttgagggatttttttata
aacagttttacttgtgtcatattttaaataactaactgccatcacctgctggggctcctttgttaggtca
ttttcagtgactaaatagggataatccaggttaacttgaagagatgagcagggagtgaccagggcagtttct
ttgccttttagctttgacagttcttaattaaagatcaattgaagaccagctttctcataaaattctcttttg
aaaaaagaaagcatttgtactaagctcctctgttaagacaacatcttaaatcttaaaagtgtgttatcat
gactgggtgagagaagaaaacgttttggtttttattaaatggagcattatttcaaaaaagccattgttgaga
attagatcccacatcgtataaatatctattaaccattctaaataaagagaactccagtggtgtcatgtgc

[0035]

aagatcctctcttggagcttttttgcataagcaattaaaggtgtgctatttgcagtagccatttttttgc
agtgatttgaagaccaaagtgttttacagctgtgttaccgttaaaggttttttttttatatgtattaa
atcaatttatcactgttttaagctttgaatatctgcaatcttggcaaggtactttttatttaaaaaaa
aacataactttgtaaatattaccctgtaatattatataacttaataaaacattttaagctataaaaaaa
89>ly1516p, flj39351 fis, 克隆 peblm2001072, 剪接形式-3, 部分cDNA
tttttaaaacttctaggttaatttggcagctttttagctgtcaccataaccctgtaaaaatcgttaattc
ttcctgtttgtgtaataagatattcatattttagttagtgcatttaataatagttatttcttagtccatcaga
tgttcccggtgtgctcttttatgccaattgattgtcatatttcatgttgggaccaagtagtttggccat
ggcaaacctaaatttatgacctgtgagggcctctcagaaaaactgagcatactagcaagacagctcttctt
gaaaaaaaaaatatgtatacacaataatatacgtatatctatatatacgtatgtatatacacacatgtat
attcttcccttgattgtgtagctgtccaaaataataacatatatagaggagctgtattcctttatacaaa
tctgatggctcctgcagcactttttccttctgaaaaattattacattttagtaacctagtttgttacttta
aaaatcagttttgatgaaaggagggaagagcagatggacttgaaaaagatccaagctcctattagaaaag
gtatgaaaaactttatagtaaaattctttataaaactaaagtgtaccttttaatatgtagtaaaactctca
tttatttgggggtcgctcttggatctcatccatccatttgtgttctctttaatgtgctgctgcttttgagg
cattcactgcccagacaatgccaccagagatagtgggggaaatgccagatgaaaccaactctgtctctc
actagtgtgtagcttctctggataagtgaccacagaagcaggagtcctcctgcttgggcatcattggggc
agttccttctctttaaatacagatttgaatggctcccaattccatcacatcacatttaattgcagaca
gtgtttgacatcatgtatctgttttgcacataatgtcttttactcctgatccagtttctgtctg
ttgactcttccattcagttttatttattgtgtgttctcacagtgacacatttgccttttctgcaacaa
cctttccagctacttttggcaaatctatttgtcttctccttcaaaacatttctcctttgcagttcctctt
catctgtgtagctgtcttcttctcttaacttaccattccttatagtagttttatgcatctctgcttagtt
ctattagttttttggccttgctcttctccttgattttaaattccttctatagctagagcttttcttctt
ttcattctctcttctcctgagtggttttgcatacatcagaagctaggtacataagttaaatgattgagagtt
ggctgtatttttagatttatacactttttaaagggtgagcttgagagtttcttcttcttctgtttttttt
tttttttttttttttttttttgaactaattcacatgctctaaaaaccttcaagggtgattattttctc
ctggaactccagggtccattctgttttaaattccctaagaatgtcagaattaaaaataacagggtctatcccgt
aattggaaatatttcttttttccaggatgctatagtcatttagtaagtgaccaccaaattgtttattgca
ctaacaagctcaaaacagataagtttactccttcatctcagtaataaaaaatagctgtaatacaacct
tctaggtttctctgtctttaaattgggtattcaaaaaatggggatctgtggtgtatgtatggaacacata
ctccttaatttacctgttgttggaaactggagaaatgattgtcgggcaaccgtttattttttattgtatt
ttatttgggtgagggatttttttataaacagtttacttgtgtcatattttaaaattactaaactgcccac
acctgctggggctccttgttaggtcattttcagtgactaatagggataatccaggtaactttgaagagat
gagcagtgagtgaccaggcagtttttctgctttagcttgcagcttcttaattagatcattgaagacc
agctttctcataaaatttcttcttttggaaaaaagaaagcatttgtactaagctcctctgtaagacaacat
cttaaatcttaaaagtgttgttatcatgactggtgagagaagaaaacatttgtttttattaaatggagc
attatttcaaaaaagccattgttgagaattagatcccacatcgtataaatatctattaaccatttctaatt
aaagagaactccagtggtgtgtatgtgcaagatcctctcttggagcttttttgcataagcaattaaaggtgt
gctatttgcagtagccatttttttgcagtgatttgaagaccaaagtgttttacagctgtgttaccggt
aaaggttttttttttatatgtattaaatcaatttatcactgtttaaagctttgaatatctgcaactttt
ggcaagggtacttttttttataaaaaaaacataactttgtaaatattaccctgtaatatataactt
aataaaacattttaagct

90>Ly1678P, Old-SEQ-ID_8607, 部分cDNA

ccatatcatgtaccaaaagtgtgctgaagtttctcttctagctggtaaagtaggagtttgc
atgacttcacacttttttgcgtagtttcttctgtgtatgatggcgtgagtggtgtct
tgggtaccgctgtgtactactgtgtgcctagattccatgcactctcgttgtgtttgaagt
aaatatggagaccggagggttaacaggttggcctgttgattacagctagtaatcgctgtg
tcttgttccgccccctccttgacaccccagcttcccaggatgtggaagcctggatctca
gctccttgccccatcccttctgtaatttgtacctaaagagtgtgattatcctaattca
agagctactaaaactcatcacattatcatgcataatcagcaagggttaagtcctagcac
caattgcttcacataccagcatgttccatttccaatttagaattagccacataataaaat
cttagaattcttcttgagaagagctgctgagatgtagttttgntatatggntccccac
cgaccatttt

91>Ly1678P, 剪接形式-1a(较短), 部分cDNA

ccatatcatgtaccaaaagtgtgctgaagtttctcttctagctggtaaagtaggagtttgc
cgtagtttcttctgtgtatgatggcgtgagtggtgtcttgggtaccgctgtgtactactgtgtgcctagattccatgc
actctcgttgtgtttgaagtaaatattggagaccggagggttaacaggttggcctgttgattacagctagtaatcgctgtg
tcttgttccgccccctccttgacaccccagcttcccaggatgtggaagcctggatctca
tctgtaatttgtacctaaagagtgtgattatcctaattcaagagctcactaaaactcatcacattatcattgcatatcagc
aaagggttaagtcctagcaccatttgccttcacataccagcatgttccatttccaatttagaattagccacataataaaat
cttagaattcttcttgagaagagctgctgagatgtagttttggttatatgggttccccaccgaccatttttgtgctttt
tcttgttttgttttgtttttagctgcaactgtgagttttagttagtgcctcttcttgcacaaaacacgcgagatgaactgga
cttatgtagacaaatcgtgatgccagtgatccttcttctcagttccagcaataatgaatgggtcaacttttttaaaa
tctagatctctctcatttcttcaatgtatttcttcttcaagtgacacaaaattattagacttatttaagatgtacagg
catcagaaaaaagaagcacataatgtcttttgggtgcgagtgccactcactgtgaacatgtgtaaccacataatgaatgcaa
tattgtttccaatacttcttaatacagttttttataatgttgtgtgtggtgattgttcagggtcgaatctgtgtgattccag

[0036]

aggaagaggaggaggaatggcactgctgaggtgagaaccccgccatccgtgctatgacatggaggcactggaagccgaggga
agggtgtgtggagattctaatcccaacaagcaagggtctccttcaagattaatgctatcaatcattaagggtcattactctc
aaccacctaaggcaatgaagaatataccatttcaaatatttacagtactgtcttcaccaacactgtcccaagggtgaaatg
aagcaacagagaggaaattgtacataagactacctcagcatttaatccaaacagggggtcttagctctcagcactatgacatt
ttgggctgactactattttgttagggcggaagctctctgtgctatgtaggataaattagcagtatcccttgggtgctacc
atagacgcgcagtagcaccccgaaattgcaaccccaactctccagacatcaccaactgtccccctgcgaggagaaatcactc
ctgggggagaaccactgacccaaatgaattctaaaccaatcaaatgtctgggaagccctccaagaaaaaaatagaaaag
cacttgaagaatatcccaatatcccggtcagcagtatcaaggctgacttgtgttcattgtggagtcattataaattctc
taaatacaattattccccctcgggtcttcaaaaatatatttctcataaacatttgagttttgttgaaaagatggagtttac
aaagataccattcttgagctcaggaattctctgtctcagacaagggtgtggcaatttggaaacgggaataaacaanaattgtc
gcaccaatgctcactgagtgaaagagagagacagaggatcaaggcttttagacagcactctcaattgcaattcacagag
aaagatgcgcccttatccaagttaatatctctaagggtgagagcctcttagagtcagtttgttgcaaatttcacctactct
gttcttttccatccatccccctgagtcagttgggtgaagggagttatttttcaagtggaattcaaacaaagctcaaacc
agaactgtaaatagtatgtagcaggaattcttttcaaaactgctttgccctttctctcactgctctttatagaaccaata
aatgtctctttgcaacaccttttgttgtgttttatattgtaaacacattttctttgaacctattgtatttaaagtaagg
tttcatattatgtcagcaagtaattaaacttatgtttaaaagggtggccatatcatgtacaaaaagttgctgaagttctct
tctagctggtaagtaggagtttgcatgacttcacacttttttgggtagttcttctgttgtatgtaggctgagtggtg
tgtcttgggtaccgctgtgtactactgtgtgcctagattccatgcactctcgtttgtgttgaagtaaatattggagaccg
gagggtaacagggtggcctgtgtattacagctagtaaatcgctgtgtcttgcgcgccctccctgacaccaccagcttcc
caggtatgtggaagcctggatctcagctccttgcccatatccctctgttaatttgtacctaaaggagtgtagttatccta
attcaagagctcactaaaactcatcacattatcatgtcatatcagcaaagggtaaagctctagcaccaattgcttcacata
ccagcatgttccatttccaatttagaattagccacataataaaattctagaattctccttgagaagagctgctcgagat
gtagttttgttatatgtgttccccaccgaccatttttgtgctttttcttgttttgtttgtttgtactgcaactgtgagtt
ttgtagtgctcctctcttgccaaaacaaacgcgagatgaactggacttatgtagacaaatcgtgatgccagtgatacctt
cctttctcagttccagcaataatgattggtcaactttttaaactctagatcattggaagccgagggtaacagggtgg
cctgtgtgattacagctagtaaatcgctgtgtttgttccgcgccctccctgacacccagcttccagagatgtggaaagcc
tggatctcagctccttgcccatatccctctgttaatttgtacctaaagagtgtagttatcctaattgatctctctcatt
catttcaatgtatttttactttaagatgaacaaaaattattagacttatttaagatgtacaggcatcagaaaaaagaagc
acataatgcttttgtgcgatggcactcactgtgaacatgtgtataaccacatataatatgcaattattgtttccaatactt
tctaatacagttttttgataatgttgt
agctgccttctgtgcgagtagcatgacaggaattgtaaatgagaatgcagtcataattccagtcctgcctctatgatgatg
ttaaattattgtgtgttagctgtgaacaagggaatgtaccactggaggaatagagtatccttttgtacacattttgaaatg
cttctctgtagtgtatagaacaaataaatgcaacgaatactctgtctgccttatccgtggaagtccaactggcgtaaga
gaaggccagcagagcaggaattctgcctagactttctccaatgagatcccaatatgagagggagaagagatgggcctca
ggacagctgcaataaccacttgggaacacatgtggtgtgtgtggcagcgacagcttcagcacacagctcactccca
ctacaacagctgtgagctgggaattctaagtcacagctcttgagggtgggtggagatggaggggcaacaagagatacatt
tccagttctccactgcagcatgcttcagtcattctgtgagtggtggggccaggggccctcacaatttcactaccttgtct
ttacatagtcataagaattatcctcaacatagccttttgacgctgtaaatcttgagattcatttaccctttctgtgac
tctgtgaaacagctgcctgcctgcatgacacttctcttcccgaggagtggggttaaatttaaagtcaggtattagttgg
atgttagtatagaatttgaattgggaattaaaaactcaggactgggagccagcaaaaatttctgattccattt
tgatgagatgtctcacaccttttctgtcaaaataaaatgtcttgagggttatgactccttggtgaaaaa

94>Ly1680P, 部分cDNA

aatcaaaaggtggaggattttccctaaactgacttagcaggactcttggtacaattggactaggcaggctgaagacagga
tgcaaggacaaagcttggtgaaaagaggcctcagaggagctcatctaaaaatttggtcaaggggagggtcttcttggtcc
ctctcttggtcaagggaaaaagagacattcttcttcttcttgacaataataagtcaatttctcattggtggccttttt
tcattaaaggacaagctgagccccctgctgaaacttggttagcagggcagccagttgagaagatttctagatgtcaaggcat
ctttagatgatgggtgaggactgagctggccatcccagatcatggatttcttggtcttgagtttgaatgtcttggtga
tggtcatagacatcagtgctacagtcattgggtatttttccgagcagagtgtagaagtgccaacttcatctgaaagggctt
ctttagcagtcacataaagatctgggaagtttaggttttagttctcagtgatgccaatcaggacagtgaggagaaaaat
taaaaacctcagtttgagagtggttagccagatagtaaagggaaactagaagaactgagaatttggttaaggactgacaagc
tgtgatgatgacaggatcccgttcaatttacaagtagataacaaaacctgaaagacaagtcaggaccagaataataac
ccataagaaggtgctatagtttttataaaatatctttctacagtcattcccccttttttgatccaaattaaaccaagtaag
atatctcttggtttacaaaataagctctgtctcattatatttgacttacttatttgcataattgvcagcaagaattggcaact
gaccagtgaggctattttaagtttgcatctgtggaactttttacaagtaattctcagattatggtttcaagagttcttgaa
gctataaagccaaagtcaagcaccaccaggcccttatctgcaatgccttagagattccagatgggttcttctctcttgaggt
cctaaaaacatcctgagtttcttggtgctgcaagaagtaccttctgactcacctgtaaggctgggaactccataatc
caggtaccaggcagacttccgggagggtctcatatgcatgggtccataaagttaaccttagttctctcaaaactgtctg
ttcatatgtgattttatgtcttattctcagttggaaatgcagaaatcacctgtcttctgctcgatcaggctgggagctg
cagacggagctgttcttattcggccatcttggaatggaccccatgtcttattctcaataaaaacatttggtcaaaaa
aaaa

95>Lv1686P. 部分cDNA

ccataatcagacattatttcaaagcttatataaaggaacagtaatacaactagtgcgaattttggcataaaagttagaaaaa
cagatcaatgaagcagaagagagagctccagaaacagaactgcacattatgtgttggtgaatgccagggatccagcttag
gtctgattgctcaccacacagaagccaatactgagacaacaagtactgcccaggaagaaggctttattgtggtgtagc
ccagccaggataatggggagacaaagcttaaaatctgtctctgtaaccaataaagttaggagtttatgtaggagttgtccaac
aggcagtaggtagttgaatcagggttctggccactgtctgttaggatgcagcgatcttggaatatcttcagctttctgatac

tatctgaggagg

96>Ly1687P, 部分cDNA

gtgccagttataaaatattcttatattttcttataatgcctccatagttttatttatatttactcaatacatcatttttc
tatgtggtatgaggtaagaattctaaacttttactgattttatctttatgcatttttttaatttaaaatgtgggtaggga
tctaacttttttcaaacacataaaatgtgcactactattttttaaattagctctgttctttcccttttattattatgct
atcttatctcacttgaattcaacctaaagcctgttttagactccaactaatactacagatcttctaccactcttccctt
gcataattaaacttcaagcacatttagcctcgggttccctcaagcacaccaaatttagtccagctcaggaactctgtactt
tctatttccatgctttaatgttcttctcttgatctcctgttttcttatttcttctcatttgcatttctgtcttgatttt
ctgtttctgggtccatggacatttttattttcttctttatagaacaaacacagctttttacattttgtatttttctgcca
ttgctatgtgcttggagctcagggaggcctcaaaggatggagtaggtgtgatcagaagtttgaacttctttg
tattgtatgatcatccctttaccttaatactcacatgaaatgtctatctatggcttcttaccattccacttcttctaatca
atttcttcttctcagaacttaaacgttcccatcatttttgatagggtctgtgagtttatttgtccaaaagcccaaaagc
agaatttaagattgatagcatagctttgtgctcaacagttgtaatatattttttccatggctgcttagcttcttctgtttt
ctttgagaaatctatgtaattgttgtttctttataaatttaattcttcttctcagttgcctttaagacttttataat
ttgatattatgcaatttctactatgatttgtctaaatgtgcatttattttgctagagatttaataactcaagtctaaaggtat
catgtcttttttcaagtttagaaaatatttggctattatctctttattatcatgtgctacagcattatttgaattcttt
ccctcagaaatttatattagaagtttgttagacttcttctagtctcatgactcttaattagcttgcagaaattttcatt
tcattatcacttattgcatttttaggtaatttcttaattctctgtcttccagtttactgggttcttcttccagctgtatctat
tttattgttttaacctattttatttctatttcaatgattacattttttgagatttttagcaaaatgggttaaaagcatgg
tttcagaggattgtctggatttacattttgcctccattatttactagctctccagtttgggttaaaattaaacttaacctttt
gtgcttcttgggtgtgtaaaattgaagtaacaattgtatataaataatagtggtttttggtaatttaattaaattatttgca
taaaatgcttaagacagggcctgaaatgacattgagtcctcaaaaaataaattattattatcatttcttcaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaanacca

97>Ly1706P, FLJ21578, 部分cDNA

tctaaaagctgcggaattcctcgagcactgttggccttttggtagatgcccctctgggagagatccccagg
gggtgacagccatgggcccctggaagggcctgggctagggacagggaccagagccagtcaggaggagggaca
ggccaatggactggggtgtactgtaacagccctgctggcgagagggaccagggcaccgtcttccagggga
tctccctgctgcaagtgggcccagaggtgcccctgaacctgaaggccaatgagaccgaagacagggccaagt
gggtgtgagaccctgaggagctgggcccctggtcccaggcagcgtggcccctgctgctgctgggtctg
gccatggtcgcccatggcctgctgcccgaatggttgaccgcaaagcggggaccagaccctggagcct
cagttggaagcagccgatccagcctgaggagcctgtggggcaggtaaggggcaagagatatgtgggggtc
ctgcagcagagctgggaaaggtgaccaaggggggacaagccagagagtgaggaggaaggttaacctct
aagaggggcccctgagctgacactggctttagtaattgggttgatattttgtccatcacagatttggattgatt
tactgtttttaaattcatattacgataattttttcttcttctgagtttctggcgccactttaaattt
tcaccagggctcagtgccatcaatcacctagtcctagtcctctgggtagggaaaggaacagaggcagggacag
gacatccacagggggtgggtggccactgtccccacaggggtgcccaggcctgttccctccccctcctcctctc
tgcccatgtgctcctgcccagtgagggcagggggccactccctggagaaggcagcaagggcttggtttgg
tctggcccgaaggtgctgttctgttcaaccaactgacataaaatacttactggggccaggctcaaggacacagg
gaggggtgggtagaacagggggagctgtccagtcattggaacagggcccagggcccatgtttgcagcaatg
aagggagagggcatctccctctgggtagtgccaggctggtctcacagatcgaggggcactggctggtg
atgggtgcccccaaaagacagagcagtgctcagaggagaggagagcacaggatgaggtgggagctcctgg
gtgactgggaagggagggaagaagaccataggggtccgtgcacattcccagtcaggacagctccttgg
tatttattaggtagattgattatcagagtcagatttgtgtttttggaaaaatcagcaccggaattggaggc
tgatgagcagcccaattagaggagggagagaggggtgtagggccaagtccagggtagggtggggatcctg
gaggaagccgtgcttggggtaggggagggagactcagattcagagcaccagggggccagtttccctatga
aatgggagcatgaggttgagtgagggtgagcagaggggagcagacacgctcggggactgtctatgggc
attgaaaaatgtataaccatttttagcaacagggcgagtcacaaacccaaggtgtgtttatctaaactggg
caattctctctctaggaattttatcctaagggttgggtgggggaaataatcaaagctgaaaccaaactctta
taacaaggggtgggttaggtcagcatttcttagtgatgggagaaaactggaaaaaatccaaatatctaccaga
aaggggtgtgaaaaaacacaattgtatttgggggactgtgttgattttgttttgaaacagctcttgatctg
ttgctcaggctggagtacagtggtggtgacagctcactgcagcctcaacctccagggtcctcaaaagatc
ctccagcctcagcctcctgagtagttaggactacagatgcaggccactacacctggctaattttgatttag
gattatcattagtttagagacagagcctcgctatatgtctcaggcctgtctcaaattcctaagctcgaagc
aatcttctctgctcagtttccacagtgctgggaattacaggcgtgagccactgcacctgacccaactgtgt
ttttaagtatataatgcattttcaaaaacctgtcagaaaatatagaaaaatgtcaatgggtgtgtctggct
ggctgatgggattttcacctaatttttaattgtggctttataattttctgggtttgtgaggtgttccaaaa
agagacatttcttctaataataatttttaatacaacagtaattgtactcatgtgcattactctttttgtaatt
gagtataatacaaaatgtaattgactttgtacattactctttttcttgcacaaaaaaa

98>Ly1712P, 部分cDNA

ccacaaaataaggtctaatccaataaattatagtaaattaatgtaatataatattacatgccactaaaaagaataaggta
gctgtatatttcttggtatggaaaaacatatataatgtttataaaactattaggttgggtgcaaaactaattgtgggtttt
gccattgaaatggcattgaaataaaagtgtaaagaaatctataccagatgtagtaacagtggtttgggtctgggaggttg
gattacagggagcatttgatttctatgttgngtatttctatantgtttgaattgtttagaatgaatcgtgntt

99>Ly1729P, Old-SEQ-ID_6586, 部分cDNA

[0039]

ccagtatggaatccagaaggaccgagtggtataagagcgctgtcggttcaatgaaatgga
ggccccgaccacagcttataagaagacgacgcccataagaagccgcttctagtgggccccg
tgggctgaaggcgaaatttgagtcctatggctgagggagaagaggaaagcgagagggaagaggga
gaaggcacagcaggtggccaggaggcaacaggagcgaaaggctgtgacaaaggaggagccc
tgaggctccacagccagtgatagctatggaagagccagcagtagccggccccactgcccga
gaaaatctcctcagagg
100>Ly1729P, 造血细胞特异性Lyn底物 (HCLS1), 全长cDNA
aattccgccccggcgttagaacagaggcttgacaggtggagatgtggaagtctgtagtgggcatgatg
tgtctgtttccgtggagacccaggggtgatgattgggacacagatcctgactttgtgaatgacatctctga
aaaggagcaacgatggggagccaagaccatcgagggtctggacgcacagaacacatcaacatccaccag
ctgaggaacaaagtatcagaggagcatgatgttctcaggaagaaagagatggagtcagggcccaagcat
cccatggctatggaggtcggttggagtagaaagagaccgaatggacaagagtgcagtgggcatgagta
tgttgcgagggtggagaagcactcttctcagacggatgctgcccagggtttgggggcaagtacggagtt
gagagggacagggcagacaagtgcagcagtcggcttggattataaaggagaagtggagaagcatacatctc
agaaagattactctcgtggcttgggtggcggtacgggtggagaaggataaatgggacaaagcagctct
gggatatgactacaaggagagacggagaaaacacagctcccagagagattatgccagggtttgggtggc
cagtatggaatccagaaggaccgagtggaataagagcgctgtcggttcaatgaaatggaggccccgacca
cagcttataagaagacgacgcccataagaagccgcttctagtgtgcccgtgggctgaaggcgaaatttga
gtccatggctgaggaagaagaggagcagaggaagaggagaaggcacagcaggtggccaggaggcaacag
gagcgaagggctgtgacaaaggagcctgaggctccacagccagtgatagctatggaagagccagcag
taccggccccactgcccagaaaatctcctcagaggcctggcctccagtgggactcctccatcatcaga
gtctgagcctgtgagaaccagcagggaaacacccagtgcccttgctgcccattaggcagactctcccgag
gacaatgaggagccccagctctgccccctaggactctggaaggcctccagggtggaggaagagccagtg
acgaagcagagcctgagcctgagccccgagcctgagcccgagcctgagaatgactatgaggacgttgagga
tagggacaggcatgagcagaggatgaaccagaggggactatgaggaggtgctcagcctgaagattct
tcttttcttctgctctggctggatcatcaggctgccccggtggggtggggtggggtgtggctctgg
ggatctcagctgtggctctatatgattaccaaggagagggaagtgtatgagcttctcttgatccggacga
cgtaataactgacatgagatgggtggacgagggtgggtggcggggagcttgccatggccactttggactc
ttccctgcaaatatgtcaagcttctggagtgcagtagagctcactgtctactgcaactgtgatttcccat
gtccaaagtggctcgtccacccccctcctattcctgatgcaaatgtctaacagagtaggtttctggac
agacttccctctcctgcttcatgaagggttggggcagagacagcatggggaaggaggtccccttcccc
agagctcctctctatcctggatgagctcatgaacatttctctgtgttctcctgactccttcccaatgaacac
ctctctgccacccaagctctgctctcctcctctgtgagctctgggcttccaggttgggttacccgggaa
agtacgtctagattgtgtggtttgacctatgtgtctatttggccacttcccttccctgaagaaatatctg
tgaaccttcttctgttcagtcctaaaattcgaaataaagtgaagctatgggttcacctgtaaaaaaaaa
aaggaatt

101>Ly1729P, 造血细胞特异性Lyn底物 (HCLS1), 全长蛋白质

MWKSUVGHDSVSVETQGDWDITDPDFVNDISEKEQRWAKTIEGSGRTEHINIHLRNKVSEEHDLRK
KEMESGPKASHGYGGRFGVERDRMDKSAVGHEYVAEVEKHSSQTDAAKGFGGKYVERDRADKSAVGFDY
KGEVEKHTSQKDYSGRFGGRYGVKDKWDKAALGYDYKGETEKHESQRDYAKGFGGQYGIQKDRVDKSAV
GFNEMEAPPTAYKKTPIEAASSGARGLKAKFESMAEEKRKREBEKAQQVARRQQRKAVTKRSPEAPQ
PVIAMEEPAVPAPLPKKISSEAWPPVGTTPSSSESEPVRTSREHPVPLLPPIRQTLPEDNEEPALPPRTLE
GLQVEEPEPVYEAPEPEPEPENDYEDVEEMDRHEQEDEPEGDYEEVLEPEDSSFSSALAGSSGCPA
GAGAGAVALGISAVALYDYQEGSDELSFDPDDVITDIEMVDEGWWRGRCHGHFGLFPANYVKLLE

102>Ly1848P, 部分cDNA

ctgacagcatctggtttcagttcctcagtcaccactactttgtaccaaattcactgttttggtctctgaaatctaatttt
gagtttagcaaggatg

103>Ly1859P, old-SEQ-ID_640, 部分cDNA

ccagagtgcaggatacatcattggcaccagggtctttttcaattcttggtcaatcctct
gcagcaagcaccgccgatgacgtcctcatagatgcctcagtggtcagagcctggctgc
ccacggcaaggacatccccctcgaactcaggcagctccttttgcagcctggctcgagt
ggctcagcacaaaaggtaaaaagatgcagagacccagcctcgatgaacctcctctgcg
ccaacctgctgtcgatttgaaatttcttcagcacgcgccccctgactctctccagcctct
gggcagcctgggtcacagttgaggggcgtcgtcagacactgggtcagccag

104>Ly1859P, old-SEQ-ID_2452, 部分蛋白质

LADQCLTTALNCDQAAQRLERVGRVLKKFKSDSGLAQRRFIRGWGLCIFLPFVLSQLEP
GCKKELPEFEGDVLAVGSQALTTEGIYEDVIRGCLLQRIQELKKTLGANDVSCTL

105>Ly1859P, old-SEQ-ID_3313, 部分cDNA

ctgcaagacagcagagaantgcgaatatccagttagcagatgactttgctggcaagcag
aggaagnocggtaaaaagcttctcctcagccaggaaacttgacaccaagntaagatttggg
gctagggaacaaacccaaaaggctcacagcaagcggagaaaaaaaccccaaatctgtaa
cctgtatcacaaagcgttcatactccttcagatataaagagttattagatatcaataagaa

[0040]

aatgcaaacactcctgaaaagtagaaaaagctatgaacaggcaattcactgaaattaa
aaaaaaaaaaaa

106>Ly1859P, FLJ00140, 全长cDNA

cgacggcggtggtcgtgagggaaggaagagagcccgaggagacagcagcagcatgggtgggcggccttc
gagccctctggacaagcagcagcggcagcactaagggtcaggtggacacccctgctgaggaaactcctg
ccttgctaccgtgggcagctggcagcgtctgtcctgcccagatctctcagagagctgggcctcaggagc
cgaccggaagccagttgctacgcagcaaaaagctgcccagctccgtgagcaccgaggacccctgaccca
gcttcggggccacccaccccggtggcagccgactcttctgtgttctgcgtgggaacggccgcttagagtgg
ttcagccacaaggaggaatatgaaaaagggggcccactgacctggctcaacagccctgacaggatacacgc
tctgacttcccagcgagaatatctccgcttttggatgctctctgcccgaatccttgggagaccatac
tcaggaagagcctgactccctcttggagtgctgtgagcttcccgtgttcttgcagcacccttccgc
cgccacctctgcttctctgcagccaccaggaggagcagcagcatgctggaggtggccctgcagggtggca
tccggcttcaggggcacagtctgcagcgaagccaggccctgctgcccgggcttcttggacgcgctccg
actctaccggcagcaccgaaggccactttggcgacgcagcgtgacccctaggctcagacgcgcagagctcg
accgggtgctgatgagggaagcaacttcccgcgtgagcagccagacccttcttggcctgggggggag
gcccgcggcgccgctgggctggaccgagcttctagacgcgttcaacgcagctgtctggccggggcctc
cgccgggctctgcgcttccagccgaaaaggacagctgcttgcgtgctggagaagacgatccgccc
gacgtggaccagctgctgcccagcgggagcgtgtggcgggcggtgaggaagcagatccaggggacggc
tcaggtcgtgacctgcgcccgggaggtggaccgcagctgcccgggtcgtgcagaccctgctgcgcacgt
ggaagcctcgctcagggcggtgaggaccctcctggctcaaggcatggaccgactgtccacccgctgcgc
cagagccctcgggcacgcggctgcgcagggaggttactcatttggggagatgcccgggacttggcg
tgatgcagacatgctaccgtgagggcagcggagccggggcgcttggggcagctggcagcaccgttgg
cttcttgggagtgacagcctcggtgttggggcccaagatcttgcacagcagctcatggctgacgcggtg
ccaccttctgcagctgggtgaccagctgtctgacgacggccctcaactgtgaccagctgcccagagcc
tggagagagtcaggggggcgctgctgaagaaattcaaatcggacagcgggttggcgagaggaggttcat
ccgaggctggggtctctgcatcttttaccttttgtgtgagcgaactcagcagcaggtgcaaaaagacg
gagtcctcgctctgtcgcacaggtgtagtgcagtggtgtgatcttggctcgctgcggcctccacctccta
ggctcaagcgatcctcccatctcgccctcccaagtagctgggattacaggcaccgctatagggaccagc
cctcaggtcggtgggtctctcctgtgtgcagagacaagagagtgtagaaaataaagacacaagaa
gagataaaagaaaagacagctgggcccggggaccactactaccaagttgcggagaccggtagtgggccc
gaatgtctggctgcgctgttatttattggatataaagcaaaaggggagggtaaagagtgtagtcatct
ccaatgataggtaaggtcacgtgggtcatgtgtccactggacagggggccctcctgcctggcagctga
ggcagagagagagagagagacaaagagaaagacagcttaagccattatttctgcatatcagagacttttag
tacttccactaactgactactgtctatctagaaggcagagccaggtgtacaggtatggaaacagagcgga
ctaggagcagagaccctgaagcacagcatcacagggagacgggttaggtctctggataactgtggcaagc
ctgactgatatcaggccctccacaagaggtggaggagcagagcttctctaaactccccgggagaaaagg
agactcccttcccggtctgctaaagtagccggtgttttcccttgacacttttcgctaccgctagaccaag
gtctgcctggcaacagcgatcttcccagacgctggcgctcacgctagaccaagagcccttctgctggcc
ctgtccgggcatataacagaaggtcgcaacttctgtcttgggtcatacctcactatgccccctcagctcct
atctctgtatggcctgggttttcttaggttatgattgttagagtgaggattatataatatggataaag
agtaactgtctaccaactaatcattaatgatattcatatataatcatatctaatatctatatctggtataa
ctattcttgttttatatttgttatactggaacagctcatgtcctcggtctcttgcctcagcaccctgggt
ggcttggcccccacaccccgccaccacgcccagctaattttgtacttttggtagagacggtgggttcac
catgttggtaggctggctcttgaactcctgacctcatgatccgcccacctcagccaaacaaagtgctggg
attacgggatgagccaccgcaccggcctgttattttaaataaaaaatattttaaataaagataagg
aaactaaggcccaagcccgcccccacccacagctaatcaggccagggctagggcagaagcctgtg
ttgtaggcctctagaggggcccctcctctccatccgagccctaaacccgcatgggtccaggagctgctg
agttcaggggggatgtccttgcgtgggcagccaggctctgaccactgagggcatctatgaggacgtcat
ccgggggtgcttgcgtcagaggatggaccagacccttgggtgccaatgatgtatcctgcactctggacgg
ctgcttggagggtcccatgggaaacaggaggagcagatgaggaaactgaggctgagcgggaaggagggt
tgtccaggcagccagactctggtgcccagatccagccactctgcccaccgcttctccaggaacattcc
ggagctgaatcttcaccacatctatcttgtttctattggataaatgtctacaagtggaaatttctgggccc
aaaacggatgtgccatctttaggcttttgaacccctgcaacttcagaaaactgtaccattttatactcc
aagcagcagcatcttctgtgtatttcccaaggcttcttattttaatttttttttttttttttggag
actgggtcttgcctctgtcaccgggctggggtgcagtgagcaggtctcggctcactgcgacctccgctc
ccgggttcaagcgattctcctgctcagcctcccgagtagctgggatttcaggcaccgcccaccatgcct
gggttaattgtgttttggtagagatgggggttccgctgttggccaggctgggtctcgaactcctgtcctt
agggtgggtctgcccgcctcagcctcccgagtgctgggattgcagggtgtgagccaccacagctggccta
tttttttttaataatagagacaaggctctcgctatgctgcccaggctgatctcaactcctggactca
agcaactcctcctgcttggcctcccaagtgctaggattataggagtgatccactatgtccagctccaa
atcctttctaaactaggacttttcatgaaaaagaaaaagctatgccagttagacacacacagaaatct
catgattttatttgaatttctttgactaaatgaactacaaataagtttatatggccgggctggcg
gtgcacacctgtggtcccggcactttgggaggtgaggcgggcagatcacttgagctcaggagttcggga
ccagcctggcgagctggtgggacctcatctacaaaaatacaaaattagcggccgggagtggtggct
cacgctgtcatcccagcactttgggaggtgagacaggtggattgcttgagccaaggagttttgaggcc
agcttgggcaatgtggtgaaacctgtctctactaaaaataaaataaataaataaataaataaataa
ataaataaataaataaataaataaagaagctgggctgagatgggagatttgccctgagcctgggaactcaaggc

[0041]

110>Ly1867P, Old-SEQ-ID_3570, 部分cDNA

aaaccttaagaaccacataatactatataatgcttttctgtacaaatctcaagaacact
ttcattcattaaaaacatcatgaaaatccttaaatgtgttaaatggaaaaaatgaaacca
tgaacaaaaagctatacatgtaggtgcatatctctcctcctgagttgggagaaatct
ttctaagcatagaacaatggtagcaaaagagaagaatagatttggctggattaacaata
aaaaatttctgccagaaatatgaaaattcaatttagacaaaattcaatataaacaaaatt
aatatagacaaaggtggtaaacaggtggttctcagagaagataaatacatgattatttaa
cataaaagaaatgttcaatgtttctagaagacaaataattacaaacctaacaatgtg
atatttgttagattggcataaattataataatccaacattgagttangtggaaatataaat
tggtaaaatatttctggaagacaatttgg

111>Ly1868P, 部分cDNA

agaagtgattatgggattaaaagaatacataattacagtgttttgggattgggctcttttttcttaatagaaaagcag
aaacttcataaataatagctgtgcttttagataccagataacaaatattgtttccctgaagatagacctactagaacta
ctcacatatatagtcacaataattgctgacttaataggtatggtaaaatagctgataataagtcagactctcaagagtttc
tgtaccttgatttatgacaaaattcattgttttcatcctactaaagaacatgtgtgtggggaggggtggggaactggtt
cacaacataatctgaaggagatcaaacatctgtaaggacaggtaccagtgatgataatatactgaaaacacaagccat
ttttattctttatcccaattaaacttgaggtactctaattgatgaagcactcgattgcactatgacctccttgagtgtggg
cagcttggttctctctcacttttggtttctttttaaatacgaaa

112>Ly1886P, Old-SEQ-ID_6454

aaaaaaagacaatttgagcaggacgacctctccaatctgggtagcatggttagcctgtg
cagtaacaacgtaggcttggaggatgggtncaatgaaaatgattctgattcggaacggt
ttgactttggactgtanaagcttttcttgatcacctgtgntggaggaaaggaaagaagc
ctt

113>Ly669S, 胞间粘附分子3 (ICM3), 完全cDNA

cagctctctgtcagaatggccaccatggtaccatccgtgttgtggccaggcctgctggactctgctgg
tctgctgtctgctgaccccaggtgtccaggggaggttccttttgccgggtggagcccagaaacctgt
gctctctgctggagggtccctgttgtgaactgcagtactgattgtcccagctctgagaaaaatcgcttg
gagacgtccctatcaaaggagctggtggccagtggtggtggcagccttcaatctcagcaacgtga
ctggcaacagctcggtacctctgctcagtgactgcaatggctccagataaacaggctcctctaactcac
cgtgtacgggctcccggagcgtgtggagctggcaccctgcctccttggcagcgggtgggcccagaacttc
accctgcgctgccaagtggagggtgggtcgccccggaccagcctcacggtggtgctgcttcgctgggagg
aggagctgagccggcagcccgagtgaggagccagcggaggtcactgccactgtgctggccagcagaga
cgaccacggagccctttctcatgcccacagaactggacatgcagccccaggggctgggactgttcgtg
aacacctcagccccccgcccagctccgaacctttgtcctgcccgtgaccccccccgccctcgaggcccc
ggttcttggagggtggaaacgtcgtggccgggtggactgcacctagacgggcttttccagcctcagaggc
ccagggtctacctggcgctgggggaccagatgctgaatgcgacagtcattgaaccacggggacacgctaacg
gccacagccacagccacggcgccgaggatcaggagggtgcccgggagatcgtctgcaacgtgacctag
ggggcgagagacgggaggcccgaggagaacttgacggtctttagcttcttaggacctattgtgaacctcag
cgagcccacggcccatgaggggtccacagtgacctgagttgcatggctggggctcgagtcagggtcacg
ctggacggaggttccggcccgccggcccgggcagccagctcaacttcagctaaaatgctaccgagagtgacg
acggacgcagcttcttctgagtgccactctcgaggtggacggcgagttcttgcacaggaacagtagcgt
ccagctgcgagtcctgtatggtcccaaaattgaccgagccacatgccccagcacttgaatggaaagat
aaaacgagacacgtcctgcagtgccaagccaggggcaaccctgaccccgagctgagggtgttgaaggaa
ggtccagccgggaggtgcccgggtggggtaccggttcttcgtcaacgtaaacacataatggtagcttaccgtg
ccaagcgtccagctcagcagggcaaaataccctgggtcggtggtgacattgaggctgggagctccac
tttgtcccgcttctcgtggcggtgttactgacctggggcggtggtgactatcgtagcttgccttaatgtacg
tcttcaggggagcaccacggagcggcagttaccatgttagggaggagagcactatctgcccctcacgtc
tatgcagccgacagaagcaatgggggaagaaccgtccagagctgagtgacgtgggatccgggatcaaa
ttggcggggggttggctgtgcctcagattccgcaccaataaagccttcaaactccctaaaaaaaaaaaa

114>Ly669S, 胞间粘附分子3 (ICM3), 完全蛋白质

MATMVPSVLWPRACWTLVCLLTPGVQQEFLLRVEPQNPVLSAGGSLFVNCSTDCPSSEKIALETSL
KELVASGMGWAAFNLSNVTGNSRI LCSVYCNQSQITGSSNITVYGLPERVELAPLPWQPVGQNF
VEGGSPTSLTVVLLRWEEELSRQPAVEEPAEVTATVLSRDDHGAPFSCRTLEDMPQGLGLFVN
TSAP RQLRTFVLVPTFRLVAPRFLEVETSWPVDCTLDGLFPASEAQVYLALGDQMLNATVMNH
GDTLTATATA TARADQEGAREIVCNVTLGGERREARENLT VFSFLGP IVNLSEPTAHEGSTV
TVSCMAGARVQVTLDGVP AAPGQPAQLQLNATESDDGRSF FCSATLEVDGEFLHRNSSVQLR
VLYGPKIDRATCPQHLKWKDKTRHV LQCQARGNPYP ERLCLKEGSSREVPVGI PFFVNV
THNGTYQCQASSSRGKYTLVVVMDIEAGSSHFVVFV VAVLLTLGVTVIVLALMYV
FREHQRSGSYHVREESTYLPLTSMQPTEAMGEPSRAE

115>Ly672S, Old-SEQ-ID_3042, 部分cDNA

cctgatgccgaatttcagtttggcacttacagcgaatctgagaggaaaaccgaggagta
cgatactcaggccatgaagtactgtcatacctgctgtaccctctctgtgtcgggggtgc
tgtctattcactcctgaatatcaaatataagagctggtactcctggttaatacacagctt

[0043]

cgtcaacgggggtctatgccttttggtttcctcttcatgctgccccagctcttttgtgaacta
caagttgaagtcagtgccacatctgccctggaagg

116>Ly672S, 顺铂抗性相关蛋白质CRR9p, 全长cDNA

cagctccttcaaccagccttggcgtggcggttcgtggcttaacgtgggtgcacacctgctgggtcatgtac
ggcatcgtctacacccgcccgtgctccggcgacgcgccaactgcatccagccctacctggcgcgccgcca
agctgcagctgagcgtgtacaccacgacgaggtccacacctgggtgctgagaacaacatcgacctggtctt
gaatgtggaagactttgatgtggaagtccaaatttgaaaggacagttaattgtttctgtaccaaaagaaaacg
agaaacaatgggacgctgtatgcctacatcttccctccatcacgctggggctcctgccgtggcagcagcgga
agcagggtgcacctgggtcagtcctctgaccacctaactgggtcccaagccagaagaaatcaacctgctcac
cggggagtgctgatacacagcagatcgaggcgagagaagaagccgacgagtgccctggatgagccagtgctcc
cactggcgacgcgggtggcgctgaacgtgatggcggacaactttgtctttgacgggtcctccctgacctg
ccgatgtgcatcggtacatgaagatgatccagctggggaaaaccgtgcattacctgcccatcctgttcat
cgaccagctcagcaaccgctgaaggacctgatggctataaacgctccaccaccgagctgccctcacc
gtgtcctacgacaaggctcctactgggcggtgctgcttctggatccacatgcaggacgcggtgtactccc
tgcagcagttcgggttttcagagaaagatgctgatgaggtgaaaggaatttttgtagataccaacttata
cttctggcgctgacctctttgtcgagcgttccatcttctctttgatttccctggcctttaaaaaatgac
atcagtttctggaagaagaagagcatgatcgccatgtccaccaaggcagtgctctggcgctgcttca
gcacogtggtcatcttctgttctgctggacgagcagacgagcctgctggtgctggtcccggcggggtgt
tggagccgcatctgagctgtggaaagtgaagaaggcatgaagatgactatttttggagaggcctgatg
ccgaatttcagtttggcacttacagcgaatctgagaggaaaaccgaggagtacgatactcaggccatga
agtacttgtcatatcctgctgtaccctctctgtgtcggggtgctgtctattcactcctgaatatcaata
taagagctggtactcctggttaatacaacgcttccgtcaacggggtctatgccttttggtttcctcttcatg
ctgccccagctcttctgtaactacaagtgaagtcagtgccacatctgccctggaaggccttccacctaca
aggctttcaacaccttcatgtatgacgtcttgccttcatcatcaccatgccacgtctcaccggctggc
ctgcttccgggacgacgtgggtgtttctgggtctacctgtaccagcggtggtttatcctgtggataaacgc
agagtgaacgagtttggggagtcctacgaggagaaggccacgcggcgccccacacggactgaaggccgc
ccgggctgcccgcagccaagtgcgaacttgaaattgtcaatgagtatttttggaagcatttgaggagaaatcc
tagacattgcgttttctgtgttgccaaaatcccttcggacatttctcagacatctcccaagtccccatca
cgtcagatttgaggctggtagcgtctacgatccccccacgtgtgaacatctgtcttggctcacagagctgg
gtgctgcccgtcaccttgagctgtgggtgggtcccggcacacgagtgctccggggttcggccatgtcctcac
gcgggcaggggtgggagccctcacaggcaagggggctgttggaatttccatttcagggtggttttctaagtg
ctccttatgtgaatttcaaacacgtatggaattcatccgcattggactctgggatacaaggctcttctct
cttttggttg

117>Ly672S, 顺铂抗性相关蛋白质CRR9p, 全长蛋白质

MWSGRSSFTSLVVGVEVVVVVHTCWVMYGIVYTRPCSGDANCIQPYLARRPKLQLSVYTTTRSHLGAENN
IDLVLNVEDFDVESKFERTVNVSVPKKTRMNGTLYAYIFLHHAGVLPWHDGKQVHLVSLPTTYMVPKPEE
INLLTGESDTQIEAEKKPTSAIDEPVSHWRPRLALNVMADNFVFDGSSLPADVHRMVKMIQLGKTVHYL
PILFIDQLSNRVKDLMVINRSTTELPLTVSYDKVSLGRLRFWIHMQDAVYSLQQFGFSEKDADEVKGI
DTNLYFLALTFVAAFHLLFDLAFINDISFWKKKSMIGMSTKAVLWRCFSTVVI FLFLLEQTSLLVL
VPAGVGAAILWVKVKKALKMTIFWRGLMPEFQFGTYSERKTEEYDQAMKYL SYLLYPLCVGGAVYSL
LNIKYKSWYSLINSFVNGVYAFGFLFMLPQLFVNYKLKSVAPLWPKAFYKAFNTFIDOVFAFIITMPT
SHRLACFRDDVVFVLYLYQRWLYPVDKRRVNEFGESYEEKATRAPHTD

118>Ly675S, KIAA0906 基因, 部分cDNA

cttcccggccccagccaaggctgctcgtttacgtgtcggacattcaggagctgtacatccgtgtgggttgac
aaggtggagattgggaagacagtgaaggcatacgtccgcgtgctggactgcaacaagaagcccttcccttg
ccaaatacttcccctttatggacctgaagctccgagcagcctccccgatcattacattggtggcccttga
tgaagcccttgacaactacaccatcacattcctcatccgcggtgtggccatccggccagaccagtctaact
gcaagtgtgaccaataaagctggacagagaatcaactcagccccacaacagattgaagtccttcccccgct
tcaggctgatgcccaggaagtgacactgcttatcggggccacgatgcagggtcacctccgagggcgggccc
ccagcctcagtcacaatccttttctccatcagcaatgagagcgttgcgctggtgagcgctgctgggctg
gtacagggcctcgccatcgggaacggcactgtgtctgggctcgtgcaggcagtggtgacagagaccggc
agggtggtcatctctcaggacctcgtgcagggtggaggtgctgctgctaaggccgctgaggaatccgcgc
ccccatcatgcggatgaggacgggcacccagatgccccatctatgtcacccgcatcaccaaccaccagaac
cctttctcctttggcaatgcccgtgccaggcctgaccttccactggtctgtcaccaagcgggacgtcctgg
acctccgagggcgccacacagggcgtcgatccgactcccgctcacagtacaacttgccatgaacgtgct
cggccgggtaaaaggccggaccgggctgaggggtggtggtcaaggctgtggacccccacatcggggcagctg
tatggcctggcagagaactctcggtatgagatccaagtccagggtggtttgagaagctgcagctgctcaacc
ctgaaatagaagcagaacaaatattaatgtcgcccaactcatatataaagctgcagacaaacagggaatgg
tgacgcctctctgagctaccgcgtcctggatggaccgaaaagggttcagttgtgcatgttgatgagaaa
ggctttctagcatcagggtctatgatcgggacatccaccatcgaagtgttgcaacagagccctttgggg
ccaaccaaaccatcatgttgtgtgtaaaggtatccctgtttcctacctgaggggtttccatgagccctgt
cctgcacacccagaaacaaaggagccctgggtggcgctgcttgggaatgacgtgaccttctactgtccac
ttccacgacaactctggagatgtcttccatgctcacagttcggtcctcaactttgccactaacagagacg
actttgtgagatcgggaaggcccccacaaacacactgcgttggtccgcacagtcagcgtgggcctgac
actgctccgtgtgtgggacgcagagcaccgggctctcggaacttcatgccctgctcctacagggc

[0044]

atctccccagagctgtctggtggccatggtggtggggagctgctctgtctggccactgttctgaccagcc
 tggaaaggcctctcaggaacctggagctcctcagccaacagcatcctccacatcgaccccaagcgggtgt
 ggctgtggcccgccgctgggatccctgacggtttactatgaggtcgctgggcacctgaggacctacaag
 gaggtggtggtcagcgctccctcagaggatcatggtccgctcacctccaccccatccagacaagcttccagg
 aggtacagcctccaaagtgttgttgcgtgggagacagaagcttaacctgagaggcgagtgaccccc
 caccagagggaagtcatccaggccttgacccagagacccctcatcagctgccagtcctcgtccggtcag
 gccgtcttctgatttcccatctcaagatgtgttccagctggagccacagtttgacactgctctcgtccggt
 acttctgctcaatcacaatgcacaggtgacggacaagcagcggaagcacctgagcatgaagaagacagc
 tctggtggtcagtgccctccctctccagcagccacttctccacagagcaggtggggggccgaggtgcccctc
 agcccagggtctctcgcgaccaggtgaaatccttttgagcaaccactacaccagttccgagatcaggg
 tctttggtgccccggagggtcttggaagaactggaggtgaaatccgggtccccggcgctgctggcattcgc
 aaaggagaagtctttgggtggccagcttcatcacatacacgggtcggtctcggacccccgggtggc
 agccaagggcctctgtccactaccctgaccttctccagccccgtgaccaaccaagccattgccatcccag
 tgacagtggtctttgtgatggatcgccgtggggccggtccttatggagccagcctctccagcacttcc
 ggattcctaccaggtcatgttctcagctcttgcgctgttggtggtggacagcggtcatgatcatagcc
 taccacactgtctgcacgccccgggtctgtgtgctgagccctcagcctcgagccagccctggac
 acagccccactatttctgctgctcatcaccacatctccaatgcattgcctcctgctcgaaagccag
 cctcctctcagggctgtggagccagcctatgcctccactaggccgctgaaaggttccccggaggatggg
 tctcagccgagcctcgtgcacccccaaagtgaacatccctgctgcattcacactggaacaagccctcc
 agatgagtgccccggccccaggccagcttccactgcccgtctcttcacacagagctgtagtctcgggtctgc
 ccattagctcatttatgtaggagtttaaatgtgtgtgttttctccttcaagctcttcaaaagcttaagac
 tttttgggtcatttcttttgcattggt
 ctgacctgtctaaaatcttccctctctcaagactttgagcagttagaagtgtctttagaagttgtctgt
 ggtgtgtgttactgtagtgtgtctcagggaaaggattgtccagttactttaggggggttttgggtgggttt
 tccccctgtgaaaacttactttgccctagtctggtgctgctgtaggacttctgaggagcaatgggacat
 gagtgtcctgtatctgcgcccactgcccgaagggaagcctcaggaaccagcacctggaaggccaggtatgc
 caagccctgggtgagcgagaggtgagaaacacaggagctcaccaggggtgctgcccccaacctgggcca
 ctgtgaacagacttcagtcctctgttttctgtttcataagccgttgagacatctgatggacttggcttagg
 cctgctgggacatccccagctgtgatcccttccactccatcaggacaccaggactgtccttaggaaaatg
 tcttgagatggcagcagaggtcatatttctgt
 cacaagacccagtgctattgtctcctcctgttctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
 cgcctgcccagtgtagagggcgccacttctcatggcagcttatcaggcgagggccccagacagcttccca
 gccggccctagagcccggcctgggccaatgatggagggcgccaccagccaggccctgcccattccagaa
 gggactccccagggcctgggggagggagacccctgggaaaagtcctctcttccagctcctgatctcggatc
 tgagattctcagatcacagggccctgtgtccagggcgaggtggggcaccctcaggagatccagagac
 tcatgccccatggccatccatgcgtggagcgtgtgtggagagtcaggatgacgggatccccgacaagctc
 ccttcagtccttcagggtgggccaatgt
 gcatattacttgagcttaactgacaacctggatgtaaataggagccttctactggtttatattaataaa
 gttctatgtgattttt

119>Ly675S, KIAA0906 蛋白质, 部分蛋白质

FPAPAKAVVYVSDIQELYIRVVDKVEIGKTVKAYVRVLDLHKPFLAKYFPFMDLKLRAASPIITLVALD
 EALDNYTITFLIRGVAIGQTSLTASVTNKAGQRINSAPQQIEVFPPFLMPRKVTLTLLIGATMQVTSEGGP
 QPQSNILFISISNESVALVSAAGLVQGLAIGNGTVSGLVQAVDAETGKVVIISQDLVQVEVLLRAVRIRA
 PIMRMRTGTQMPIYVTGITNHQNPFSFGNAVPGTLFHWSVTKRDVLDLRRHHEASIRLPSQYNFAMNVL
 GRVKGRTGLRVVVKAVDPTSGQLYGLARELSDEIQVQVFEKLQLLNPEIEAQILMSPNSYIKLQTNRDG
 AASLSYRVLDPGEKVPVVHVDEKGFASGSMIGTSTIEVIAQEPFGANQTIIVAVKVSFVSYLRSMSFV
 LHTONKEALVAVPLGNTVTFVHFHDNSGDVFAHSSVLNFATNRDDFVQIGKPTNNTCVVRTVSVGLT
 LLRVWDAEHPLSDFMPLPVLQAIPELSGAMVVGDLCLATVLTSLLEGLSGTWSSANSILHIDPKTG
 AVARAVGSVTVYVEVAGHLRTYKEVVVSVQIRIMARHLHPITQSFQATASKVIVAGDRSSNLRGECTP
 TQREVIQALHPETLISCSQSQKPAVDFPSQDVFTVEPQFDALGQYFCSITMHLRLTDKQRKHLMSMKTA
 LVVSASLSSSHFSTEQVGAEPFSPGLFADQAEILLSNHYTSSEIRVFGAPEVLENLEVKSGSPAVLFA
 KEKSFGWPSFITYTVGVSDPAAGSQGPLSTLTTFSSPVTNQAIAIPVTVAFVMDRRGPGPYGASLFQHFL
 DSYQVMFPTLFAALLAGTAVMIIAYHTVCTPRDLAVPAALTFRASPGHSPHYFAASSPTSPNALPPARKAS
 PPSGLWSPAYASH

<210> 121

<211> 1270

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 121

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

[0045]

```

Cys Phe Thr Gln Lys Leu Val Glu Lys Leu Tyr Ser Gly Met Phe Ser
 50          55          60
Ala Asp Pro Arg His Ile Leu Leu Phe Ile Leu Glu His Ile Met Val
 65          70          75          80
Val Ile Glu Thr Ala Ser Ser Gln Arg Asp Thr Val Leu Ser Thr Leu
          85          90          95
Tyr Ser Ser Leu Asn Lys Val Ile Leu Tyr Cys Leu Ser Lys Pro Gln
 100        105        110
Gln Ser Leu Ser Glu Cys Leu Gly Leu Leu Ser Ile Leu Gly Phe Leu
 115        120        125
Gln Glu His Trp Asp Val Val Phe Ala Thr Tyr Asn Ser Asn Ile Ser
 130        135        140
Phe Leu Leu Cys Leu Met His Cys Leu Leu Leu Leu Asn Glu Arg Ser
 145        150        155        160
Tyr Pro Glu Gly Phe Gly Leu Glu Pro Lys Pro Arg Met Ser Thr Tyr
          165        170        175
His Gln Val Phe Leu Ser Pro Asn Glu Asp Val Lys Glu Lys Arg Glu
 180        185        190
Asp Leu Pro Ser Leu Ser Asp Val Gln His Asn Ile Gln Lys Thr Val
 195        200        205
Gln Thr Leu Trp Gln Gln Leu Val Ala Gln Arg Gln Gln Thr Leu Glu
 210        215        220
Asp Ala Phe Lys Ile Asp Leu Ser Val Lys Pro Gly Glu Arg Glu Val
 225        230        235        240
Lys Ile Glu Glu Val Thr Pro Leu Trp Glu Glu Thr Met Leu Lys Ala
          245        250        255
Trp Gln His Tyr Leu Ala Ser Glu Lys Lys Ser Leu Ala Ser Arg Ser
 260        265        270
Asn Val Ala His His Ser Lys Val Thr Leu Trp Ser Gly Ser Leu Ser
 275        280        285
Ser Ala Met Lys Leu Met Pro Gly Arg Gln Ala Lys Asp Pro Glu Cys
 290        295        300
Lys Thr Glu Asp Phe Val Ser Cys Ile Glu Asn Tyr Arg Arg Arg Gly
 305        310        315        320
Gln Glu Leu Tyr Ala Ser Leu Tyr Lys Asp His Val Gln Arg Arg Lys
          325        330        335
Cys Gly Asn Ile Lys Ala Ala Asn Ala Trp Ala Arg Ile Gln Glu Gln
 340        345        350
Leu Phe Gly Glu Leu Gly Leu Trp Ser Gln Gly Glu Glu Thr Lys Pro
 355        360        365
Cys Ser Pro Trp Glu Leu Asp Trp Arg Glu Gly Pro Ala Arg Met Arg
 370        375        380
Lys Arg Ile Lys Arg Leu Ser Pro Leu Glu Ala Leu Ser Ser Gly Arg
 385        390        395        400
His Lys Glu Ser Gln Asp Lys Asn Asp His Ile Ser Gln Thr Asn Ala
          405        410        415
Glu Asn Gln Asp Glu Leu Thr Leu Arg Glu Ala Glu Gly Glu Pro Asp
 420        425        430
Glu Val Gly Val Asp Cys Thr Gln Leu Thr Phe Phe Pro Ala Leu His
 435        440        445
Glu Ser Leu His Ser Glu Asp Phe Leu Glu Leu Cys Arg Glu Arg Gln
 450        455        460
Val Ile Leu Gln Glu Leu Leu Asp Lys Glu Lys Val Thr Gln Lys Phe
 465        470        475        480
Ser Leu Val Ile Val Gln Gly His Leu Val Ser Glu Gly Val Leu Leu
          485        490        495
Phe Gly His Gln His Phe Tyr Ile Cys Glu Asn Phe Thr Leu Ser Pro
 500        505        510
Thr Gly Asp Val Tyr Cys Thr Arg His Cys Leu Ser Asn Ile Ser Asp
 515        520        525
Pro Phe Ile Phe Asn Leu Cys Ser Lys Asp Arg Ser Thr Asp His Tyr
 530        535        540
Ser Cys Gln Cys His Ser Tyr Ala Asp Met Arg Glu Leu Arg Gln Ala
 545        550        555        560
Arg Phe Leu Leu Gln Asp Ile Ala Leu Glu Ile Phe Phe His Asn Gly
          565        570        575
Tyr Ser Lys Phe Leu Val Phe Tyr Asn Asn Asp Arg Ser Lys Ala Phe
 580        585        590

```

[0046]

```

Lys Ser Phe Cys Ser Phe Gln Pro Ser Leu Lys Gly Lys Ala Thr Ser.
      595      600      605
Glu Asp Thr Leu Asn Leu Arg Arg Tyr Pro Gly Ser Asp Arg Ile Met
      610      615      620
Leu Gln Lys Trp Gln Lys Arg Asp Ile Ser Asn Phe Glu Tyr Leu Met
      625      630      635      640
Tyr Leu Asn Thr Ala Ala Gly Arg Thr Cys Asn Asp Tyr Met Gln Tyr
      645      650      655
Pro Val Phe Pro Trp Val Leu Ala Asp Tyr Thr Ser Glu Thr Leu Asn
      660      665      670
Leu Ala Asn Pro Lys Ile Phe Arg Asp Leu Ser Lys Pro Met Gly Ala
      675      680      685
Gln Thr Lys Glu Arg Lys Leu Lys Phe Ile Gln Arg Phe Lys Glu Val
      690      695      700
Glu Lys Thr Glu Gly Asp Met Thr Val Gln Cys His Tyr Tyr Thr His
      705      710      715      720
Tyr Ser Ser Ala Ile Ile Val Ala Ser Tyr Leu Val Arg Met Pro Pro
      725      730      735
Phe Thr Gln Ala Phe Cys Ala Leu Gln Gly Gly Ser Phe Asp Val Ala
      740      745      750
Asp Arg Met Phe His Ser Val Lys Ser Thr Trp Glu Ser Ala Ser Arg
      755      760      765
Glu Asn Met Ser Asp Val Arg Glu Leu Thr Pro Glu Phe Phe Tyr Leu
      770      775      780
Pro Glu Phe Leu Thr Asn Cys Asn Gly Val Glu Phe Gly Cys Met Gln
      785      790      795      800
Asp Gly Thr Val Leu Gly Asp Val Gln Leu Pro Pro Trp Ala Asp Gly
      805      810      815
Asp Pro Arg Lys Phe Ile Ser Leu His Arg Lys Ala Leu Glu Ser Asp
      820      825      830
Phe Val Ser Ala Asn Leu His His Trp Ile Asp Leu Ile Phe Gly Tyr
      835      840      845
Lys Gln Gln Gly Pro Ala Ala Val Asp Ala Val Asn Ile Phe His Pro
      850      855      860
Tyr Phe Tyr Gly Asp Arg Met Asp Leu Ser Ser Ile Thr Asp Pro Leu
      865      870      875      880
Ile Lys Ser Thr Ile Leu Gly Phe Val Ser Asn Phe Gly Gln Val Pro
      885      890      895
Lys Gln Leu Phe Thr Lys Pro His Pro Ala Arg Thr Ala Ala Gly Lys
      900      905      910
Pro Leu Pro Gly Lys Asp Val Ser Thr Pro Val Ser Leu Pro Gly His
      915      920      925
Pro Gln Pro Phe Phe Tyr Ser Leu Gln Ser Leu Arg Pro Ser Gln Val
      930      935      940
Thr Val Lys Asp Met Tyr Leu Phe Ser Leu Gly Ser Glu Ser Pro Lys
      945      950      955      960
Gly Ala Ile Gly His Ile Val Ser Thr Glu Lys Thr Ile Leu Ala Val
      965      970      975
Glu Arg Asn Lys Val Leu Leu Pro Pro Leu Trp Asn Arg Thr Phe Ser
      980      985      990
Trp Gly Phe Asp Asp Phe Ser Cys Cys Leu Gly Ser Tyr Gly Ser Asp
      995      1000      1005
Lys Val Leu Met Thr Phe Glu Asn Leu Ala Ala Trp Gly Arg Cys Leu
      1010      1015      1020
Cys Ala Val Cys Pro Ser Pro Thr Thr Ile Val Thr Ser Gly Thr Ser
      1025      1030      1035      1040
Thr Val Val Cys Val Trp Glu Leu Ser Met Thr Lys Gly Arg Pro Arg
      1045      1050      1055
Gly Leu Arg Leu Arg Gln Ala Leu Tyr Gly His Thr Gln Ala Val Thr
      1060      1065      1070
Cys Leu Ala Ala Ser Val Thr Phe Ser Leu Leu Val Ser Gly Ser Gln
      1075      1080      1085
Asp Cys Thr Cys Ile Leu Trp Asp Leu Asp His Leu Thr His Val Thr
      1090      1095      1100
Arg Leu Pro Ala His Arg Glu Gly Ile Ser Ala Ile Thr Ile Ser Asp
      1105      1110      1115      1120
Val Ser Gly Thr Ile Val Ser Cys Ala Gly Ala His Leu Ser Leu Trp
      1125      1130      1135

```

[0047]

```

Asn Val Asn Gly Gln Pro Leu Ala Ser Ile Thr Thr Ala Trp Gly Pro
      1140      1145      1150
Glu Gly Ala Ile Thr Cys Cys Cys Leu Met Glu Gly Pro Ala Trp Asp
      1155      1160      1165
Thr Ser Gln Ile Ile Ile Thr Gly Ser Gln Asp Gly Met Val Arg Val
      1170      1175      1180
Trp Lys Thr Glu Asp Val Lys Met Ser Val Pro Gly Arg Pro Ala Gly
1185      1190      1195      1200

Glu Glu Pro Leu Ala Gln Pro Pro Ser Pro Arg Gly His Lys Trp Glu
      1205      1210      1215
Lys Asn Leu Ala Leu Ser Arg Glu Leu Asp Val Ser Ile Ala Leu Thr
      1220      1225      1230
Gly Lys Pro Ser Lys Thr Ser Pro Ala Val Thr Ala Leu Ala Val Ser
      1235      1240      1245
Arg Asn His Thr Lys Leu Leu Val Gly Asp Glu Arg Gly Arg Ile Phe
      1250      1255      1260
Cys Trp Ser Ala Asp Gly
1265      1270

<210> 121
<211> 647
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 121
Met Leu Gln Lys Trp Gln Lys Arg Asp Ile Ser Asn Phe Glu Tyr Leu
 1      5      10      15
Met Tyr Leu Asn Thr Ala Ala Gly Arg Thr Cys Asn Asp Tyr Met Gln
      20      25      30
Tyr Pro Val Phe Pro Trp Val Leu Ala Asp Tyr Thr Ser Glu Thr Leu
      35      40      45
Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ile Phe Arg Asp Leu Ser Lys Pro Met Gly
      50      55      60
Ala Gln Thr Lys Glu Arg Lys Leu Lys Phe Ile Gln Arg Phe Lys Glu
      65      70      75      80
Val Glu Lys Thr Glu Gly Asp Met Thr Val Gln Cys His Tyr Tyr Thr
      85      90      95
His Tyr Ser Ser Ala Ile Ile Val Ala Ser Tyr Leu Val Arg Met Pro
      100      105      110
Pro Phe Thr Gln Ala Phe Cys Ala Leu Gln Gly Gly Ser Phe Asp Val
      115      120      125
Ala Asp Arg Met Phe His Ser Val Lys Ser Thr Trp Glu Ser Ala Ser
      130      135      140
Arg Glu Asn Met Ser Asp Val Arg Glu Leu Thr Pro Glu Phe Phe Tyr
      145      150      155      160
Leu Pro Glu Phe Leu Thr Asn Cys Asn Gly Val Glu Phe Gly Cys Met
      165      170      175
Gln Asp Gly Thr Val Leu Gly Asp Val Gln Leu Pro Pro Trp Ala Asp
      180      185      190
Gly Asp Pro Arg Lys Phe Ile Ser Leu His Arg Lys Ala Leu Glu Ser
      195      200      205
Asp Phe Val Ser Ala Asn Leu His His Trp Ile Asp Leu Ile Phe Gly
      210      215      220
Tyr Lys Gln Gln Gly Pro Ala Ala Val Asp Ala Val Asn Ile Phe His
      225      230      235      240
Pro Tyr Phe Tyr Gly Asp Arg Met Asp Leu Ser Ser Ile Thr Asp Pro
      245      250      255
Leu Ile Lys Ser Thr Ile Leu Gly Phe Val Ser Asn Phe Gly Gln Val
      260      265      270
Pro Lys Gln Leu Phe Thr Lys Pro His Pro Ala Arg Thr Ala Ala Gly
      275      280      285
Lys Pro Leu Pro Gly Lys Asp Val Ser Thr Pro Val Ser Leu Pro Gly
      290      295      300
His Pro Gln Pro Phe Phe Tyr Ser Leu Gln Ser Leu Arg Pro Ser Gln
      305      310      315      320
Val Thr Val Lys Asp Met Tyr Leu Phe Ser Leu Gly Ser Glu Ser Pro
      325      330      335

```

[0048]

```

Lys Gly Ala Ile Gly His Ile Val Ser Thr Glu Lys Thr Ile Leu Ala
340 345 350
Val Glu Arg Asn Lys Val Leu Leu Pro Pro Leu Trp Asn Arg Thr Phe
355 360 365
Ser Trp Gly Phe Asp Asp Phe Ser Cys Cys Leu Gly Ser Tyr Gly Ser
370 375 380
Asp Lys Val Leu Met Thr Phe Glu Asn Leu Ala Ala Trp Gly Arg Cys
385 390 395 400
Leu Cys Ala Val Cys Pro Ser Pro Thr Thr Ile Val Thr Ser Gly Thr
405 410 415
Ser Thr Val Val Cys Val Trp Glu Leu Ser Met Thr Lys Gly Arg Pro
420 425 430
Arg Gly Leu Arg Leu Arg Gln Ala Leu Tyr Gly His Thr Gln Ala Val
435 440 445
Thr Cys Leu Ala Ala Ser Val Thr Phe Ser Leu Leu Val Ser Gly Ser
450 455 460
Gln Asp Cys Thr Cys Ile Leu Trp Asp Leu Asp His Leu Thr His Val
465 470 475 480
Thr Arg Leu Pro Ala His Arg Glu Gly Ile Ser Ala Ile Thr Ile Ser
485 490 495
Asp Val Ser Gly Thr Ile Val Ser Cys Ala Gly Ala His Leu Ser Leu
500 505 510
Trp Asn Val Asn Gly Gln Pro Leu Ala Ser Ile Thr Thr Ala Trp Gly
515 520 525
Pro Glu Gly Ala Ile Thr Cys Cys Cys Leu Met Glu Gly Pro Ala Trp
530 535 540
Asp Thr Ser Gln Ile Ile Ile Thr Gly Ser Gln Asp Gly Met Val Arg
545 550 555 560
Val Trp Lys Thr Glu Asp Val Lys Met Ser Val Pro Gly Arg Pro Ala
565 570 575
Gly Glu Glu Pro Leu Ala Gln Pro Pro Ser Pro Arg Gly His Lys Trp
580 585 590
Glu Lys Asn Leu Ala Leu Ser Arg Glu Leu Asp Val Ser Ile Ala Leu
595 600 605
Thr Gly Lys Pro Ser Lys Thr Ser Pro Ala Val Thr Ala Leu Ala Val
610 615 620
Ser Arg Asn His Thr Lys Leu Leu Val Gly Asp Glu Arg Gly Arg Ile
625 630 635 640
Phe Cys Trp Ser Ala Asp Gly
645

```

<210> 122
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> His-Ly1452P的PDM-797 PCR引物

<400> 122
 gtgtcacaat ctacagtcag gcaggattct cc

32

<210> 123
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> His-Ly1452P的PDM-799 PCR引物

<400> 123
 gttatgtagc ggccgcttat catggtgctg cagag

35

<210> 124
 <211> 980
 <212> DNA
 <223> Incyte LifeSeq 数据库模板#LS_1076101.8

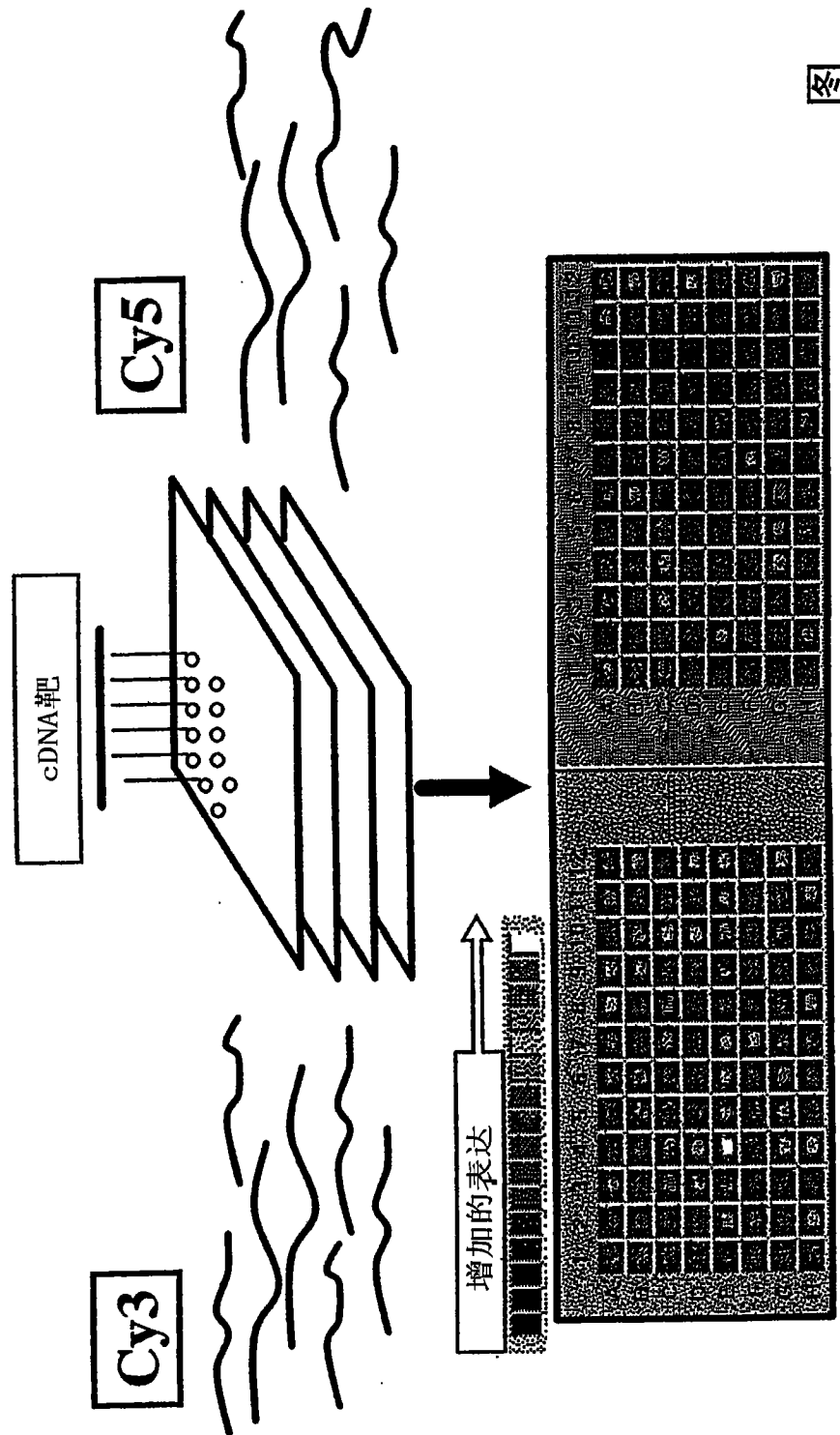
[0049]

人内源逆转录病毒序列 (HERV)

<400> 124

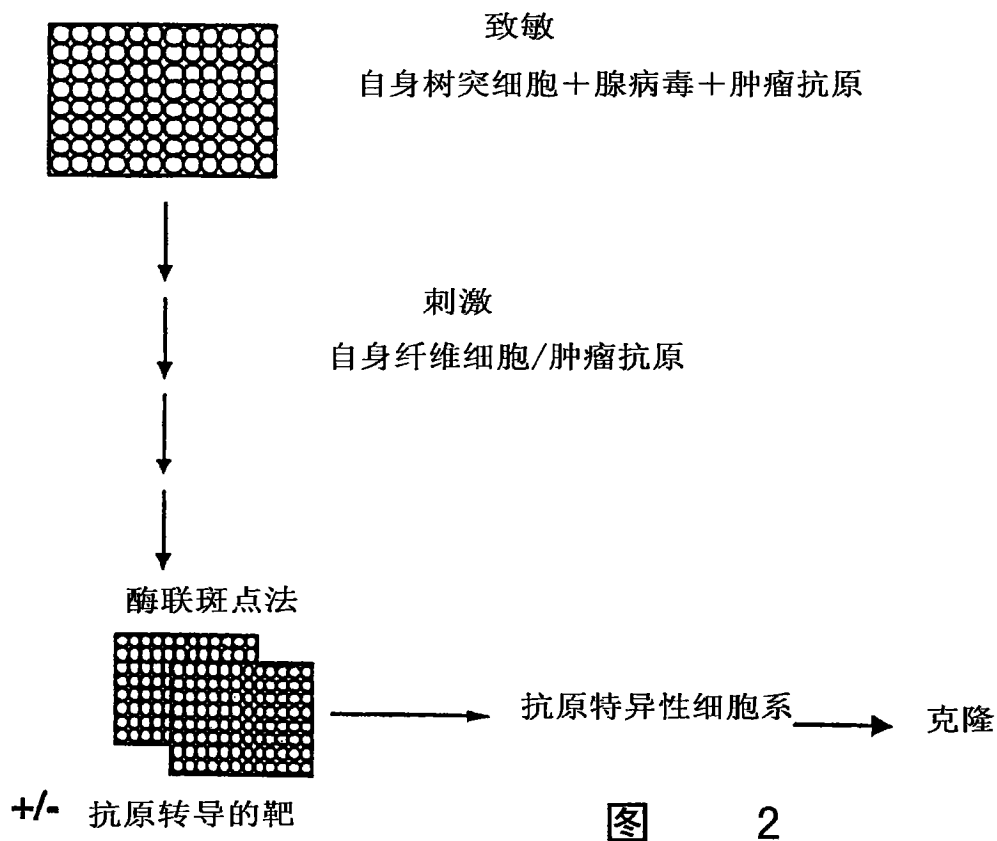
gccgctgccg	ctccaggaga	caggttccca	tgcaggaatg	aaagacatgg	aagggaagag	60
gggggcccagc	tccttgagtc	ctgtgtccac	cagctgctgc	taaatacctc	tgagaaactc	120
tgcttctatc	taaggggacc	tacttctctc	gggaatctca	atacttgga	caagaacctc	180
ctagacggac	cctttggcat	aatgaattgg	accaactgta	ggttccagga	ctagagagcc	240
agcaatgcct	ccatgaacaa	tctcacccaa	ttactctgct	caggaaacga	ggtaactgat	300
ggacagccga	ggcagcccct	taggcggctt	aggcctcccc	tgtggagcat	ccctgaggcg	360
gactccggcc	agcccagagt	atgcgatcca	aagagcactc	ccgggtagga	aattgccccg	420
gtggaatgcc	tcaccagagc	agcgtgtagc	agttccctgt	ggaggattaa	cacagtggct	480
gaacaccggg	aaggaactgg	cacttggagt	ccggacatct	gaaacttgta	gactgggagc	540
tgtacatgga	tgggagcagc	ttcaccaacc	cctgcaaagt	gactctgaag	aagacgacaa	600
gccctgctcc	agtcacaccc	ggaagctgac	tgggtccacgc	acagctgaag	catgaggaaa	660
ctcatcgcg	gactaatttt	ccttaaaatt	tagacttgca	cagtaaggac	ttcaactgac	720
cttcctcaga	ctgagaactg	tttccagtat	atacatcaag	tcactgaggt	aggacaaaag	780
attgctacat	tcctattatt	ttaagggttac	atttttgggg	acccctcttt	cttctgttct	840
agctattacc	tttcttgtgt	cacctagaaa	aggaccagtc	cttaattgta	tttataaaaac	900
tgtgatcatg	ggaagcttta	aattggttca	ataacacgca	tcaagttggg	tatttcctgg	960
gctacatacc	ttggatagat					980

微阵列芯片技术方法概要



1

体外全基因CD8T细胞致敏的总方案



体外CD4全基因T细胞致敏的总方案

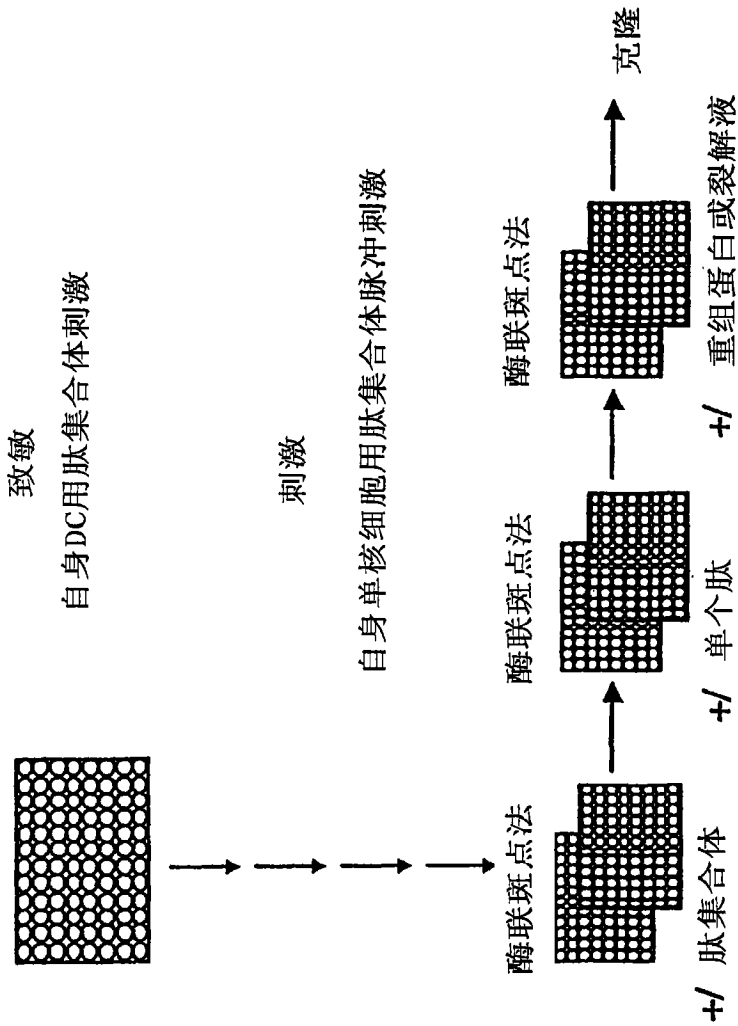


图 3

白血病/淋巴瘤芯片#3：分析用探针

Cy3探针		Cy5探针	
组织	RNA#	RNA#	组织
淋巴瘤, T细胞	952	SPACT74	肾
淋巴瘤, B细胞	955	SPACT81	肝
淋巴瘤, B细胞	953	SPACT78	肺
淋巴瘤	916	SPACT42	脑
霍奇金淋巴瘤	950	138598B	皮肤
霍奇金淋巴瘤	950	SPACT49	骨髓
淋巴瘤, B细胞	CL151	888	PBMC静止性
淋巴瘤, T细胞	904B	SPACT55	胃
霍奇金淋巴瘤, 见DNA959	CL153	SPACT70	胸腺
淋巴瘤, B细胞	CL152	SPACT75	骨骼肌
淋巴瘤, B细胞, 见DNA959	CL155	SPACT73	心脏
淋巴瘤, B细胞	944	243502B	食道
淋巴瘤, B细胞	958	1006	结肠
淋巴瘤, B细胞	954	SPACT65	小肠
淋巴瘤	960	779B	气管
淋巴瘤, T细胞	957	S9327328	膀胱
淋巴瘤, B细胞	914B		
淋巴瘤, B细胞	913		
淋巴瘤, B细胞	944B		
淋巴瘤, B细胞/失败	903		

图 4

绿 :在希望基因表达处的肿瘤探针

红 :在要避免基因表达处的正常必需的组织探针

黑 :在可接受基因表达处的正常的组织探针

血液学治疗性抗体候选物

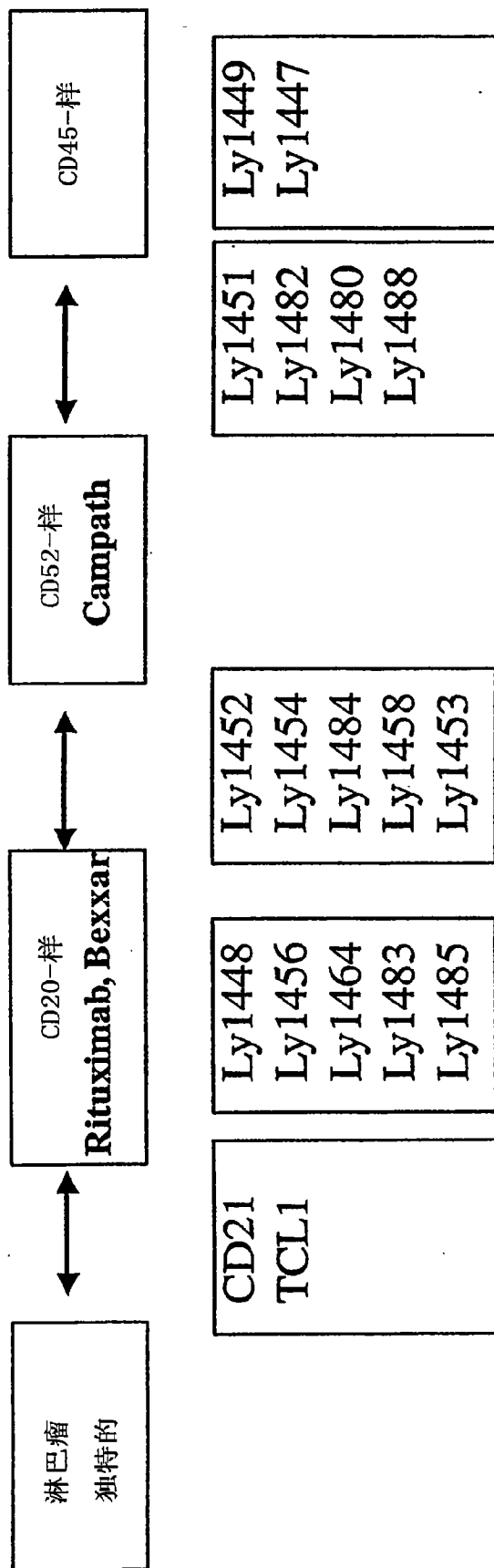


图 5

a. 1y1484长的TMpred报告

RDFQSEVLLSAMELFHMTSGGDAAMFRDGKEPQPSAEAAAAPSLANISCF
 TQKLVEKLYSGMFSADPRHILLFLEHIMVVE TASSQORDIVLSHLYSSL
 NKVILYGLSKPQOQSLSECLGLLSILGFLQEHWDVVFAT YNSNISFLCLM
 HCLLLLNERSYPEGFGLEPKPRMSTYHQVFLSPNEDVKEKREDLPSLSDV
 QHNIQKTVQTLWQQLVAQRQQTLEDAFKIDLSVKPGEREVKIEEVTPLWE
 ETMLKAWQHYLASEKKSLASRSNVAHHSKVTLWSGSLSSAMKLMPGRQAK
 DPECKTEDFVSCIENYRRRGQELYASLYKDHVQRRKCGNIKAANAWARIQ
 EQLFGELGLWSQGEETKPCSPWELDWREGPARMRKRIKRLSPLEALSSGR
 HKESQDKNDHISQTNAENQDELTLREAEGEPDEVGVDCTQLTFFPALHES
 LHSEDFLELCRERQVILQELLDEKVTQKFSLVIVQCHLVSEGVLLFCHQ
 HFYTICENFTLSPTEDVYCTRHCLSNISDPFITFNLCSKDRSTEDHVSQCHS
 VADMRELROARFLLODIALEIFFHNGYSKFLV FYNDRSKAFKSFCFSFQP
 SLKGKATSEDTLNLRRYPGSDRIMLQKWQKRDISNFEYLMYLNNTAAGRTC
 NDYMQYPVFPWVLADYTSETLNLANPKIFRDL SKPMGAQT KERKLKFIQR
 FKEVEKTEGDMTVQCHYYTHYSSAIIIVASYLVRMPPFTQAFCALQ GCSFD
 VADRMFHSVKSTWESASRENMSDVRELTPFFYLPEFLNCGEVVEFCMQ
 DGEVLGDVQLPPWADGDPKFTSLHRKALESDFVSANLHHWIDLTFCAKQ
 QCPAAVDVAVNIFHPYFYCDRMDLSSITDPLIKSTILCFVSNFCQVPKQLF
 TKPHPARTAAACKPLPGKDVSTPVSLSLPGHPQPPFYSLQSLRPSQVTVKDMY
 LFSLGSESPKCATGHIVSTFKTTLAVERNKVLLPPLWNRTFSWGFDDFSC
 CLGSYCSDKVLMTEFENLAAWGRCLCAVCPSPFTTIVTSCESTFVVCWELSM
 TKGRPRGLRLRQALYGHIOAVTCLAA SVTFSLVSGSODCTCTLWDLHL
 THVTRLPAHREGISAITISDVSGTIVSCAGAHLSLWNVNCOPLASTITAW
 CPEGATTCCLMECPANDISQITITCSODGMVRWIKTFEDVKMSVPCRPAC
 EEPLAQPPSPRGHKWNEKNLALSRELVDVSTALTCKPSKTESPAVTALAVSRN
 HFKLLVEDERGRITFCWSADG (SEQ ID NO: 120)

图 6

黑=胞内,红=跨膜,兰=胞外

Ly1484 具有 1269 个氨基酸和 5 个跨膜结构域

跨膜结构域 1:63-84 记分:1.36675

跨膜结构域 2:118-139 记分:1.38695

跨膜结构域 3:480-501 记分:1.36185

跨膜结构域 4:562-583 记分:1.31785

跨膜结构域 5 :725-746 记分 :1.3521

ly1484长的TMpred报告

MLQKWQKRDISNFEYLMYLNTAAGRTCNDYMQYPVFPWVLADYTSETLNL
ANPKIFRDLSKPMGAQTKERKLKFIQRFKEVEKTEGDMTVQCHYYTHYSS
AIIVASYLVRMPFFTQAFCAIQGGSFDVADRMFHSVKSTWESASRENMSD
VREILTPEFFFYLPPEFLNCGVEFCGMQDCTVLCDVOLPPWADGDPKFTIS
LHRKALESDFVSANLHHWIDLIFGVKQOQCPAAVDAVNIFHPYFYCDRMDL
SSITDPLIKSTILGFVSNFGQVPKOLFTRKPHPARTAACKPLPCKDVSTPV
SLPCHPQPPFFYSLOSRLRPSQVTVKDMYLFSLGSESPKCAICHIVSTFKTI
LAVERNKVLLPPLWNRFFSWGFDDFSCCLGSYCSDKVLMFFENLAANWERC
LCAVCPSPFTTIVTSCTSTVVCVWELSMFKERPRGLRLROALYCHTQAVTC
LAASVTFSLVSGSODCTCTLLNDLDHLTHIVTRLPAHRECTSAITTSQVSG
TTVSCAGAHLSLWNVNCOPLASTITFANCPGATTCCLMECPANDTSQIT
ITGCSQDCMVRVWKTEDVKMSVFCRPAEEPLAOPPSPRGHKWEKNLALSR
EILDVSTALTCKPSKTSPTAVTALAVSRNHKKLLVCDERGRIFGWSADG
(SEQ ID NO: 121)

图6(续)

黑=胞内,红=跨膜,兰=胞外

Ly1484 具有 646 个氨基酸和 1 个跨膜结构域

跨膜结构域 1 :102-123 记分 :1.3521

TSLTES程序的分析结果

以下是文件LY1484~1. TXT的分析结果

从残基1开始并以残基1270结束

AMPH2窗口大小: 11

A-AMPHI模块中点

R—匹配Rothbard/Taylor基序的残基

D—匹配IAd/Taylor基序的残基

d—匹配IEd/Taylor基序的残基

(SEQ ID NO: 120)

5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75
RDFQSEVLLS	AMELFHMT	SGGDAAM	FRD	KGEPQ	PSAEAAA	APSLANIS	CF	TQKL	VEKLY	SGMFS	ADPR	HILL	FIL	
.....	AAAAA			AAAA	AAA		AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	
.....	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	
.....				DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	
80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140	145	150
EHIMVVIET	ASSQ	RD	TVL	STLY	SSLN	KVILY	CL	SKP	QQSL	SECL	GLLS	ILGF	LQEH	WDVVF
.....		AAAA	AAA			AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA
.....	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR	RRRR
.....	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD	DDDD

图

7

```

155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225
HCLLLNERSYPEGFGLEPKPRMSTYHQVFLSPNEDVKEKREDLPSLSDVQHNIQKTVQTLWQQLVAQRQOTLED
.....AAAAA.AAAAA.AAAAAA.....RRRR.....R
.....
.....
.....
230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
AFKIDLSVKPGEREVKIEEVTPLWEETMLKAWQHLYLASEKSLASRSNVAHHSKVTLWSGSLSSAMKLMFGRQAK
.....AAAA..AAAAAAA.....AAAAAAA.....
RRR.....RRRRRRRRRR.....RRRR.....
.....
.....
.....
305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375
DPECKTEDFVSCIENYRRRGQELYASLYKDHVQRRKCGNIKAANAWARIOQLFGELGLWSQGEETKPCSPWELD
.....AAAAAA.....AAAAA.AAAAA.AAAAAA.....AAA.....
RRRR.....RRRR.....RRRR.....
.....
.....
.....
380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450
WREGPARMRKRIKRLSPLEALSSGRHKESQDKNDHISQTNQDELTLREAEGEPDEVGDCTQLTFFPALHES
...AAAAA.AAAAA.AAAAAA.....RRRR.....RRRR.....AAAA.AAAA.
.....RRRR.....RRRR.....DDDDDD.....
.....DDDD.....
.....

```

冬 7 (续)

```

455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525
LHSEDFLELCRERQVILQELLDKKVTQKFSLVIVQGHVSEGVLLFGHQHFYICENFTLSPTGDVYCTRHCLSN
AAAAA...
...RRRR...RRRR...
...
...
530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600
ISDPFIFNLCKDRSTDHYSCQCHSYADMRELQARFLLQDIALLEIFFHNGYSKFLVFYNDRSKAFKSFCSFQP
A.AAAAAA...AAAAAA...AAAAAA...RRRR...
...RRRRRRRRRRRR...
...
...
605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675
SLKGKATSEDTLNLRRYPGSDRIMLQKWQKRDISNFEYLMYLNNTAAGRTCNDYMQYPVFPWVLADYTSETLNLAN
...AAAAA...AAA...AAAAAA...
...RRRR.RRRR...RRRR...RRRR...RRRRRRRR...
.DDDDDD...
...
680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750
PKIFRDLCKPMGAQTKERKLKFIQRFKEVEKTEGDMTVQCHYYTHYSSAIIIVASYLVRMPFPTQAFCALQGGSFD
AAAAAA...AAAAAA...AAAAA...RRRR.RRRR...RRRR.RRRR...R
.RRRR...

```

图 7 (续)

```

.....DDDDDDDDDDDD.....
.....ddd.....
755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825
VADRMFHSVKSTWESASRENMSDVRELTPPEFFYLPEFLTNCNGVEFGCMQDGTVLGDVQLPPWADGDPKRFISLH
AAAAAAAAAAAA.AA.AAAA..AAAAA.....AAAAA.....AAA.....
RRRRRR.....RRRR.....RRRR.....RRRR.....RRRR..
.....
.....
830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900
RKALESDFVSANLHHWIDLIFGYKQGPAAVDAVNIFHPYFYGDRMDLSSITDPLIKSTILGFVSNFGQVPKQLF
.....AAAAAAA.....AAAAAAA.....AAAA..AAAAA.....AAAAA.....
.RRRR.RRRR.....RRRR.....RRRR.....RRRR.....
.....DDDDDD.....
.....
905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975
TKPHPARTAAGKPLPGKDVSTPVSPLPGHPQPFYSLQSLRPSQVTVKDMYLFSLGSESPKGAIGHIVSTEKTILA
.....AAAAAAA.....AAAAA.....
.RRRR.....RRRRRR.....RRRRRR.....
.DDDDD.....DDDDDD.....
.....

```

图 7 (续)

```

980 985 990 995 1000 1010 1015 1020 1025 1030 1040 1045 1050
VERNKVLLPPLWNRTFSWGFDDFSCCLGSYSDKVLMTFENLAAWGRCLCAVCPSPTTIVTSGTSTVVCWELSM
.....AAAAA.....
.....RRRRR.....
.....DDDDDDDDDD.....
.....
1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125
TKGRPRGLRLRQALYHTQAVTCLAASVTFSLLVSGSQDCTCILWDLDHLTHVTRLPAHREGISAITISDVSGTI
.....AAAAA.....AAA.....AAA
.....RRRRRR.....RRR
DDD...DDDDDD...DDDDDDDDDD...DDDDDD...DDDDDD
.dddddd
1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200
VSCAGAHLSLWNVNGOPLASITTAWGPEGAITCCCLMEGPAWDTSQIITGSQDGMVRVWKTEDVKMSVPGRPAG
A.....AAA.....AAAAA.....
RR.....RRRR.....RRRRRR.....
D.....DDDDDD.....DDDDDD...DDDDDD.....
.....
1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275
EEPLAQPPSPRGHKWKNLALSRELDVSIALTGPKSPTSPAVTALAVSRNHTKLLVGDERGRIFCWSADG
.....
.....RRRR.....
.....DDDDDDDD.....DDDDDD.....
.....

```

图 7 (续)

TSLTES程序的分析结果

以下是文件LY1484~2.TXT的分析结果

从残基1开始并以残基647结束

AMPH2窗口大小: 11

A-AMPHI模块中点

R—匹配Rothbard/Taylor基序的残基

D—匹配IAd/Taylor基序的残基

d—匹配IEd/Taylor基序的残基

(SEQ ID NO: 121)

```

5   10   15   20   25   30   35   40   45   50   55   60   65   70   75
MLQKWQKRDISNFEYLMYLNNTAAGRTCNDYMQYPVFPWVLADYTSFTLNLANPKIFRDLSKPMGAQTKERKLKFI
.....AAA.....AAAAAAA.....AAAAAAA.....AAA
.....RRR.....RRRRRR.....RRR.....RRR.....ddd
.....
80  85  90  95  100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150
QRFKEVEKTEGDMTVQCHYTHYSSAIIVASYLVRMPPTQAFCALQGSFDDVADRMFHSVKSTWESASRENMSD
AAAAAAA.....AAA.....AAAAAAA.....AAAAAAA.....AA
R.....RRRR.RRRR.....DDDDDDDDDD.....
.....
155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225
VRELTPPEFFYLPFLTNCNGVEFGCMQDGTVLGDVQLPPWADGDPKFI SLHRKALESDFVSANLHHWIDLIFGY
AAAA.....AAAAA.....AAA.....AAAAAAA.....
..RRRR.....RRRR.....RRRR.....RRR.RRRR.....RRRRRRR.
.....

```

图 8

```

230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
KQQGPAAVDVAVNIFHPYFYGDRMDLSSITDPLIKSTILGFVSNFGQVPKQLFTKPHPARTAAGKPLPGKDVSTPV
...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...
RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...
...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...
...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...

305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375
SLPGHPQPFYSLQSLRPSQVTVKDMYLFSLGSESPKGAIGHIVSTEKTI LAVERNKVLLPPLWNRRTFSWGFDDF
AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...
RRRRRRR...RRRRRRR...RRRRRRR...RRRRRRR...RRRRRRR...RRRRRRR...RRRRRRR...RRRRRRR...
D...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...
...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...

380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450
SCCLGSYGSDKVLMTFFENLAANGRCCLCAVCPSPTTIVTSGTSTVVCVWELSMTKGRPRGLRLRQALYGHTQAVTC
...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...
RRRRR...RRRRR...RRRRR...RRRRR...RRRRR...RRRRR...RRRRR...RRRRR...RRRRR...RRRRR...
...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...
...ddddd...ddddd...ddddd...ddddd...ddddd...ddddd...ddddd...ddddd...ddddd...

455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525
LAASVTFSLVSGSQDCTCILWDLDLHDLTHVTRLPAPHREGISAITISDVSGTIVSCAGAHLSLWNVNGQPLASITT
...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...
RRRRRRR...RRRRRRR...RRRRRRR...RRRRRRR...RRRRRRR...RRRRRRR...RRRRRRR...RRRRRRR...
DDDDDDDD...DDDDDDDD...DDDDDDDD...DDDDDDDD...DDDDDDDD...DDDDDDDD...DDDDDDDD...
...DDDDDDDD...DDDDDDDD...DDDDDDDD...DDDDDDDD...DDDDDDDD...DDDDDDDD...DDDDDDDD...

```

图 8 (续)

```

530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600
AWGPEGAITCCIMEGPAWDTSQIIITGSQDGMVRVWKTEDVKMSVPGRPAGEEPLAQPPSPRGHKWKNLALSR
.....AAAAAAA.....
.....RRRR.....
D.....DDDDDD.....
.....
605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675
ELDVSIALTGKPSKTSPAVTALAVSRNHTKLLVGDERGRIFCWSADG
.....RRRR.....
.DDDDDDDDD.....
.....ddddd.....

```

图 8 (续)