



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101888856 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 27

(21) 申请号 200880119337. 7

C07K 16/28 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 11. 07

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

61/002, 253 2007. 11. 07 US

61/191, 551 2008. 09. 10 US

W0 2004/035619 A1, 2004. 04. 29, 15-48.

US 2004/0258688 A1, 2004. 12. 23, 全文.

审查员 翟羽佳

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 06. 04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/082745 2008. 11. 07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/061996 EN 2009. 05. 14

(73) 专利权人 塞尔德克斯医疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 T·科勒 L·何 V·雷玛克里斯纳

L·A·维塔勒

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 尚继栋

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书45页

序列表53页 附图10页

(54) 发明名称

结合人树突和上皮细胞 205 (DEC-205) 的抗体

(57) 摘要

本发明公开了结合人 DEC-205 的分离的单克隆抗体和基于相关抗体的组合物和分子。也公开了包含所述抗体的药物组合物, 以及使用所述抗体的治疗和诊断方法。

1. 一种分离的单克隆抗体,其结合人树突和上皮细胞 205 受体并包含选自下组的重链和轻链可变区:

- (a) 如 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区和如 SEQ ID NO:34 所示的轻链可变区;
- (b) 如 SEQ ID NO:4 所示的重链可变区和如 SEQ ID NO:10 所示的轻链可变区;
- (c) 如 SEQ ID NO:16 所示的重链可变区和如 SEQ ID NO:22 所示的轻链可变区;
- (d) 如 SEQ ID NO:40 所示的重链可变区和如 SEQ ID NO:46 所示的轻链可变区;和
- (e) 如 SEQ ID NO:52 所示的重链可变区和如 SEQ ID NO:58 所示的轻链可变区。

2. 一种分离的单克隆抗体,其结合人树突和上皮细胞 205 受体并包含选自下组的重链和轻链可变区 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列:

- (i) 如 SEQ ID NO:29 所示的重链可变区 CDR1;
如 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区 CDR2;
如 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区 CDR3;
如 SEQ ID NO:35 所示的轻链可变区 CDR1;
如 SEQ ID NO:36 所示的轻链可变区 CDR2;
如 SEQ ID NO:37 所示的轻链可变区 CDR3;
- (ii) 如 SEQ ID NO:17 所示的重链可变区 CDR1;
如 SEQ ID NO:18 所示的重链可变区 CDR2;
如 SEQ ID NO:19 所示的重链可变区 CDR3;
如 SEQ ID NO:23 所示的轻链可变区 CDR1;
如 SEQ ID NO:24 所示的轻链可变区 CDR2;
如 SEQ ID NO:25 所示的轻链可变区 CDR3;
- (iii) 如 SEQ ID NO:5 所示的重链可变区 CDR1;
如 SEQ ID NO:6 所示的重链可变区 CDR2;
如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区 CDR3;
如 SEQ ID NO:11 所示的轻链可变区 CDR1;
如 SEQ ID NO:12 所示的轻链可变区 CDR2;
如 SEQ ID NO:13 所示的轻链可变区 CDR3;
- (iv) 如 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区 CDR1;
如 SEQ ID NO:42 所示的重链可变区 CDR2;
如 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区 CDR3;
如 SEQ ID NO:47 所示的轻链可变区 CDR1;
如 SEQ ID NO:48 所示的轻链可变区 CDR2;
如 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区 CDR3;和
- (v) 如 SEQ ID NO:53 所示的重链可变区 CDR1;
如 SEQ ID NO:54 所示的重链可变区 CDR2;
如 SEQ ID NO:55 所示的重链可变区 CDR3;
如 SEQ ID NO:59 所示的轻链可变区 CDR1;
如 SEQ ID NO:60 所示的轻链可变区 CDR2;
如 SEQ ID NO:61 所示的轻链可变区 CDR3。

3. 一种分离的单克隆抗体,其结合人树突和上皮细胞 205 受体并包含由选自下组的核苷酸序列编码的重链和轻链可变区:

- (a) 分别为 SEQ ID NO:26 和 32;
- (b) 分别为 SEQ ID NO:14 和 20;
- (c) 分别为 SEQ ID NO:2 和 8;
- (d) 分别为 SEQ ID NO:38 和 44;和
- (e) 分别为 SEQ ID NO:50 和 56。

4. 权利要求 1-3 任一项的抗体,其中所述抗体是人抗体或嵌合抗体。

5. 权利要求 1-3 任一项的抗体,其中所述抗体选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD 和 IgE 抗体。

6. 一种表达载体,其包含编码权利要求 1 或 2 的抗体的核苷酸序列。

7. 用权利要求 6 的表达载体转化的细胞。

8. 包含权利要求 1-3 任一项的抗体的分子偶联物,其中所述抗体与抗原连接。

9. 权利要求 8 的分子偶联物,其中所述抗原选自病原体的成分、肿瘤抗原、变应原和自身抗原。

10. 权利要求 8 的分子偶联物,其中所述肿瘤抗原选自 β hCG、gp100 或 Pme117、HER2/neu、WT1、间皮蛋白、CEA、gp100、MART1、TRP-2、NY-BR-1、NY-CO-58、MN gp250、酪氨酸酶、端粒酶、SSX2、MUC-1、MART1、melan-A、NY-ESO-1、MAGE-1、MAGE-3、MAGE-A3 和高分子量 - 黑素瘤相关抗原。

11. 权利要求 8 的分子偶联物,其中所述抗原来自 HIV、HPV、HBV 或 HCV。

12. 一种组合物,其包含权利要求 8 的分子偶联物和治疗剂,所述治疗剂选自细胞毒性剂、免疫抑制剂和化疗剂。

13. 一种组合物,其包含权利要求 1-3 任一项的抗体,和药学有效的载体。

14. 权利要求 13 的组合物,进一步包含治疗剂。

15. 权利要求 13 的组合物在制备用于将抗原靶向至受试者中的树突和上皮细胞 205 受体的药物中的用途。

16. 权利要求 13 的组合物在制备用于在受试者中诱导或增强针对抗原的免疫应答的药物中的用途。

17. 权利要求 13 的组合物在制备用于在受试者中诱导或增强针对抗原的 T 细胞介导的免疫应答的药物中的用途。

18. 权利要求 13 的组合物在制备用于免疫受试者的药物中的用途。

19. 权利要求 13 的组合物在制备用于治疗受试者的免疫疾病的药物中的用途。

20. 一种检测生物样品中是否存在树突和上皮细胞 205 受体的方法,包括:

- (a) 使生物样品接触权利要求 1-3 任一项的抗体,其中所述抗体用可检测物质标记;和
- (b) 检测与树突和上皮细胞 205 受体结合的所述抗体,从而检测生物样品中是否存在树突和上皮细胞 205 受体。

21. 包含与抗原连接的权利要求 1-3 任一项的抗体的分子偶联物在制备用于将该抗原靶向至受试者中的 B 细胞的药物中的用途。

22. 包含与抗原连接的权利要求 1-3 任一项的抗体的分子偶联物在制备用于在受试者

中诱导或增强针对该抗原的免疫应答的药物中的用途。

23. 包含与抗原连接的权利要求 1-3 任一项的抗体的分子偶联物在制备用于针对该抗原免疫受试者的药物中的用途。

结合人树突和上皮细胞 205 (DEC-205) 的抗体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2007 年 11 月 7 日提交的美国临时申请 61/002253 和 2008 年 9 月 10 日提交的美国临时申请 61/191551 的优先权,这些申请的内容通过参考并入本文。

背景技术

[0003] 树突细胞 (DC) 是免疫系统的特化细胞。DC 具有通过以结合到细胞表面主要组织相容性复合物 (MHC) 分子上的肽的形式呈递抗原以启动初级和次级 T 和 B 淋巴细胞应答的独特能力。树突细胞的抗原呈递功能已经与人树突和上皮细胞 205 受体 (DEC-205) 的高水平表达相关联 (Jiang 等 (1995) Nature 375(11) 151)。

[0004] DEC-205 是主要在树突细胞上发现的内存受体,但是也在 B 细胞、脑毛细血管、骨髓间质、肠绒毛和肺气管道的上皮以及胸腺的外质上皮和周围淋巴器官的 T 细胞区域中的树突细胞上发现。DEC-205 在淋巴器官的 T 细胞区域中的 DC 上高水平表达 (Kraal 等 (1986) J. Exp. Med. 163 :981 ;Witmer-Pack 等 (1995) Cell. Immunol. 163 :157)。DEC-205 具有 10 个膜外部的、相邻的 C 型凝集素结构域 (同上 ;Mahnke 等 (2000) J. Cell Biol. 151 :673),这些结构域介导体内抗原的有效加工和在 MHC II 类产物上的呈递 (Hawiger 等 (2001) J. Exp. Med. 194 :769)。已经证明,通过 DEC-205 吸收途径靶向至 DC 的少量的注射抗原能够诱导实体周围 CD8⁺T 细胞耐受性 (Bonifaz 等 (2002) J. Exp. Med. 196(12) :1627)。

[0005] 尽管最近在树突细胞的表征方面取得了进展,但是关于树突细胞特异性受体如 DEC-205 所知甚少,并且很少能够获得树突细胞特异性的试剂。与树突细胞特异性或优先反应 (例如通过 DEC-205) 的试剂,特别是抗体,具有作为靶向试剂诱导对肿瘤或传染病抗原的强免疫应答的巨大潜力。这些细胞特异性靶向剂可以被工程化,以递送毒素,从而消除骨髓和器官移植或其它自身免疫病中的强抗原呈递细胞 (例如,树突细胞)。因此,这些树突细胞特异性结合试剂具有巨大的治疗和诊断价值。

发明内容

[0006] 本发明提供结合人 DEC-205 并且显示特定性质的分离的抗体,例如人抗体。本发明也提供含有这种抗体的疫苗偶联物、双特异性分子和治疗组合物。因此,本发明的抗体和组合物可以在多种树突细胞靶向的治疗中使用,例如,用以增强抗原呈递和 / 或诱导针对多种靶细胞或病原体的 T 细胞应答,如细胞毒性 T 细胞 (CTL) 应答,或治疗抗原呈递细胞 (APC) 介导的疾病。

[0007] 在一个实施方案中,本发明的抗体显示一种或多种以下性质:(1) 根据表面等离子体共振测定,以至少 10^8M^{-1} 的亲合常数结合人 DEC-205;(2) 在结合表达 DEC-205 的人树突细胞后内化;(3) 产生或增强对抗原 (可能与抗体连接) 的人 T 细胞应答,例如 CD4⁺ 和 CD8⁺(CTL) T 细胞应答,适当地由 MHC I 类和 / 或 II 类途径介导;和 (4) 诱导周围 CD8⁺T 细胞耐受性。此外,抗体可以与非人灵长类动物或其它物种的树突细胞上的 DEC-205 交叉反应。再另外,抗体可以适当地显示一种或多种另外的性质,包括,例如:(1) 选择性结合位于

人 DEC-205 胞外域上的表位,该胞外域例如是一个或组合的富含半胱氨酸的结构域、FnII 结构域,或 10 个 C- 型凝集素样结构域中的一个或多个;和 (2) 定位于细胞中的抗原加工区室。

[0008] 本发明的抗体的具体实例包含重链和轻链可变区,该可变区利用特定人种系,即被种系基因编码,但是包括在抗体成熟过程中发生的基因重排和突变,例如体细胞突变。在一个实施方案中,本发明的抗体的重链可变区利用人种系 V_H 3-33 基因并且包含 SEQ ID NO:4、16、28、40、52、76 和 88 的任一个中相比 SEQ ID NO:95 的至少一个氨基酸置换。或者,重链可变区利用人种系 Orph-C 16 基因并且包含 SEQ ID NO:64 和 70 任一个中相比 SEQ ID NO:96 的至少一个氨基酸置换。

[0009] 在另一个实施方案中,抗体的轻链可变区选自一个区域,该区域 (a) 利用人种系 VK1-L15 基因并且包含 SEQ ID NO:10 中相比 SEQ ID NO:94 的至少一个氨基酸置换;(b) 利用人种系 VK1-L4 基因并且包含 SEQ ID NO:22 或 82 的任一个中相比 SEQ ID NO:93 的至少一个氨基酸置换;或 (c) 利用人种系 VK3-L6 基因并且包含 SEQ ID NO:34、46、58 的任一个中相比 SEQ ID NO:92 的至少一个氨基酸置换。

[0010] 在另一个实施方案中,重链可变区 CDR3 序列选自 SEQ ID NO:7、19、31、43、55、67、73、79、91 及其保守序列修饰(例如,保守氨基酸置换)。该抗体可以进一步包括选自 SEQ ID NO:13、25、37、49、61、85 及其保守序列修饰的轻链可变区 CDR3 序列。在另一个实施方案中,重链 CDR2 和 CDR1 序列分别选自 SEQ ID NO:6、18、30、42、54、66、72、78、90 和 SEQ ID NO:5、17、29、41、53、65、71、77、89,及其保守序列修饰。轻链 CDR2 和 CDR1 序列分别选自 SEQ ID NO:12、24、36、48、60、84 和 SEQ ID NO:11、23、35、47、59、83,及其保守序列修饰。

[0011] 在又另一个实施方案中,本发明提供结合 DEC-205 并且包括选自下组的重链和轻链可变区 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的分离的抗体:

[0012] (i) 包含 SEQ ID NO:5 的重链可变区 CDR1;

[0013] 包含 SEQ ID NO:6 的重链可变区 CDR2;

[0014] 包含 SEQ ID NO:7 的重链可变区 CDR3;

[0015] 包含 SEQ ID NO:11 的轻链可变区 CDR1;

[0016] 包含 SEQ ID NO:12 的轻链可变区 CDR2;

[0017] 包含 SEQ ID NO:13 的轻链可变区 CDR3;或

[0018] 其保守序列修饰;

[0019] (ii) 包含 SEQ ID NO:17 的重链可变区 CDR1;

[0020] 包含 SEQ ID NO:18 的重链可变区 CDR2;

[0021] 包含 SEQ ID NO:19 的重链可变区 CDR3;

[0022] 包含 SEQ ID NO:23 的轻链可变区 CDR1;

[0023] 包含 SEQ ID NO:24 的轻链可变区 CDR2;

[0024] 包含 SEQ ID NO:25 的轻链可变区 CDR3;或

[0025] 其保守序列修饰;

[0026] (iii) 包含 SEQ ID NO:29 的重链可变区 CDR1;

[0027] 包含 SEQ ID NO:30 的重链可变区 CDR2;

[0028] 包含 SEQ ID NO:31 的重链可变区 CDR3;

- [0029] 包含 SEQ ID NO :35 的轻链可变区 CDR1 ;
- [0030] 包含 SEQ ID NO :36 的轻链可变区 CDR2 ;
- [0031] 包含 SEQ ID NO :37 的轻链可变区 CDR3 ;或
- [0032] 其保守序列修饰 ;
- [0033] (iv) 包含 SEQ ID NO :41 的重链可变区 CDR1 ;
- [0034] 包含 SEQ ID NO :42 的重链可变区 CDR2 ;
- [0035] 包含 SEQ ID NO :43 的重链可变区 CDR3 ;
- [0036] 包含 SEQ ID NO :47 的轻链可变区 CDR1 ;
- [0037] 包含 SEQ ID NO :48 的轻链可变区 CDR2 ;
- [0038] 包含 SEQ ID NO :49 的轻链可变区 CDR3 ;或
- [0039] 其保守序列修饰 ;
- [0040] (v) 包含 SEQ ID NO :53 的重链可变区 CDR1 ;
- [0041] 包含 SEQ ID NO :54 的重链可变区 CDR2 ;
- [0042] 包含 SEQ ID NO :55 的重链可变区 CDR3 ;
- [0043] 包含 SEQ ID NO :59 的轻链可变区 CDR1 ;
- [0044] 包含 SEQ ID NO :60 的轻链可变区 CDR2 ;
- [0045] 包含 SEQ ID NO :61 的轻链可变区 CDR3 ;或
- [0046] 其保守序列修饰 ;
- [0047] (vi) 包含 SEQ ID NO :77 的重链可变区 CDR1 ;
- [0048] 包含 SEQ ID NO :78 的重链可变区 CDR2 ;
- [0049] 包含 SEQ ID NO :79 的重链可变区 CDR3 ;
- [0050] 包含 SEQ ID NO :83 的轻链可变区 CDR1 ;
- [0051] 包含 SEQ ID NO :84 的轻链可变区 CDR2 ;
- [0052] 包含 SEQ ID NO :85 的轻链可变区 CDR3 ;或
- [0053] 其保守序列修饰 .
- [0054] 例如,分离的抗体结合人 DEC-205 并且包含 :
- [0055] 包含 SEQ ID NO :29 的重链可变区 CDR1
- [0056] 包含 SEQ ID NO :30 的重链可变区 CDR2
- [0057] 包含 SEQ ID NO :31 的重链可变区 CDR3
- [0058] 包含 SEQ ID NO :35 的轻链可变区 CDR1 ;
- [0059] 包含 SEQ ID NO :36 的轻链可变区 CDR2 ;和
- [0060] 包含 SEQ ID NO :37 的轻链可变区 CDR3。
- [0061] 在另一个实施方案中,重链可变区 CDR3 序列包含选自共有序列 (A, G, Y, S, P, -) (P, W, S, R) (Y, A, H) F D(Y, L, V) (SEQ ID NO :99) 的氨基酸序列,其中“-“表示在该共有位点不存在氨基酸残基的选项。该抗体可以进一步包括轻链可变区 CDR3 序列,该序列包含选自共有序列 Q Q(R, Y, F) (R, N) (T, S, N) (Y, W, -) (P, -) (Y, L, H, -) (T, -) (SEQ ID NO :102) 的氨基酸序列,其中“-“表示在该共有位点不存在氨基酸残基的选项。在另一个实施方案中,重链可变区 CDR2 序列包含选自共有序列 (V, I, F, T, A) I (W, G) (Y, T) (D, G) G(S, G, Y) (N, T) (K, P) Y(Y, A, V) (A, G, -) DSVKG (SEQ ID NO :98) 的氨基酸序列,其中“-“表示在该共有

位点不存在氨基酸残基的选项,并且轻链可变区 CDR2 序列包含选自共有序列 (D,A)A S(N,S) (R, L) (A, Q, E) (T, S) (SEQ ID NO:101) 的氨基酸序列。在另一个实施方案中,重链可变区 CDR1 序列包含选自共有序列 (I, N, T, S)Y(G, N, A)M(H, Y) (SEQ ID NO:97) 的氨基酸序列;且轻链可变区 CDR1 序列包含选自共有序列 RASQ(S, G) (I, V)SS(Y, W, A)LA (SEQ ID NO:100) 的氨基酸序列。

[0062] 在又一个实施方案中,本发明提供结合 DEC-205 并且包括重链和轻链可变区 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的分离的抗体,其包含:

[0063] (i) 包含选自共有序列 (I, N, T, S)Y(G, N, A)M(H, Y) (SEQ IDNO:97) 的氨基酸序列的重链可变区 CDR1;

[0064] (ii) 包含选自共有序列 (V, I, F, T, A)I(W, G) (Y, T) (D, G)G(S, G, Y) (N, T) (K, P)Y(Y, A, V) (A, G, -)DSVKG (SEQ ID NO:98) 的氨基酸序列的重链可变区 CDR2;

[0065] (iii) 包含选自共有序列 (A, G, Y, S, P, -) (P, W, S, R) (Y, A, H)FD(Y, L, V) (SEQ ID NO:99) 的氨基酸序列的重链可变区 CDR3;

[0066] (iv) 包含选自共有序列 RASQ(S, G) (I, V)SS(Y, W, A)LA (SEQ ID NO:100) 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR1;

[0067] (v) 包含选自共有序列 (D,A)AS(N, S) (R, L) (A, Q, E) (T, S) (SEQ ID NO:101) 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR2;和

[0068] (vi) 包含选自共有序列 Q Q(R, Y, F) (R, N) (T, S, N) (Y, W, -) (P, -) (Y, L, H, -) (T, -) (SEQ ID NO:102) 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR3,其中“-”表示在该共有位点不存在氨基酸残基的选项。

[0069] 在另一个实施方案中,本发明的分离的抗体结合人 DEC-205 并且包括重链可变区,该重链可变区包含选自 SEQ ID NO:4、16、28、40、52、64、70、76、88 及其保守序列修饰的氨基酸序列。该抗体可以进一步包括轻链可变区,该轻链可变区包括选自 SEQ ID NO:10、22、34、46、58、82 及其保守序列修饰的氨基酸序列。

[0070] 在进一步的实施方案中,本发明的分离的抗体结合人 DEC-205 并且包括含有选自下组的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区:

[0071] (a) 分别为 SEQ ID NO:4 和 10,及其保守序列修饰;

[0072] (b) 分别为 SEQ ID NO:16 和 22,及其保守序列修饰;

[0073] (c) 分别为 SEQ ID NO:28 和 34,及其保守序列修饰;

[0074] (d) 分别为 SEQ ID NO:40 和 46,及其保守序列修饰;

[0075] (e) 分别为 SEQ ID NO:52 和 58,及其保守序列修饰;和

[0076] (f) 分别为 SEQ ID NO:76 和 82,及其保守序列修饰。

[0077] 包括与上述任何序列具有至少 80%、或至少 85%、或至少 90%、或至少 95%、或至少 96%、或至少 97%、或至少 98%、或至少 99%或更高序列同一性的重链和轻链可变区的分离的抗体也包括在本发明中。以上引用的数值中间的范围,例如,与上述任何序列具有至少 80-85%、85-90%、90-95%或 95-100%序列同一性的重链和轻链可变区,也旨在包括在本发明中。

[0078] 在另一个实施方案中,分离的抗体结合人 DEC-205 并且包括重链可变区,该重链可变区包含选自 SEQ ID NO:4、16、28、40、52、64、70、76、88 的氨基酸序列,或其中重链可变

区构架区内的至少一个氨基酸残基被相应的种系残基置换的序列。该抗体可以进一步包括轻链可变区,该轻链可变区包含选自 SEQ ID NO:10、22、34、46、58、82 的氨基酸序列,或其中轻链可变区构架区内的至少一个氨基酸残基被相应的种系残基置换的序列。置换的氨基酸残基可以包括:直接非共价结合抗原的残基;与 CDR 相邻的残基;CDR- 相互作用残基;参与 VL-VH 界面的残基;规范残基 (canonical residue)、游标区残基 (vernier zone residue) 或链间堆积残基 (interchain packing residue)。

[0079] 本发明也包括与本发明的抗体竞争结合 DEC-205 的分离的抗体。

[0080] 本发明的抗体可以是全长的,例如,以下任何同种型: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA 1、IgA2、IgAsec、IgD 和 IgE。或者,该抗体可以是片段,如抗原结合部分或单链抗体(例如, Fab、F(ab')₂、Fv、单链 Fv 片段、分离的互补决定区 (CDR) 或两个或多个分离的 CDR 的组合)。

[0081] 本发明也提供一种分子偶联物,其包含连接到抗原(包括片段、表位和抗原决定簇)如病原体、肿瘤抗原或自身抗原的成分上的本发明的抗体。例如,所述抗原可以包括肿瘤抗原,如 β hCG、gp100 或 Pmel17、CEA、gp100、TRP-2、NY-BR-1、NY-CO-58、MN(gp250)、独特型、酪氨酸酶、端粒酶、SSX2、MUC-1、MAGE-A3 和高分子量-黑素瘤相关抗原 (HMW-MAA) MART1、melan-A、NY-ESO-1、MAGE-1、MAGE-3、WT1、Her2、间皮蛋白或高分子量-黑素瘤相关抗原 (HMW-MAA)。

[0082] 本文使用的术语“肿瘤抗原”优选地是指存在于(或结合于)肿瘤细胞上而一般不存在于正常细胞上的任何抗原或抗原决定簇,或以比正常(非肿瘤)细胞上更大的量存在于或结合于肿瘤细胞上的抗原或抗原决定簇,或以不同于在正常(非肿瘤)细胞上发现的形式存在于肿瘤细胞上的抗原或抗原决定簇。该术语因此包括肿瘤特异性抗原,包括肿瘤特异性膜抗原、肿瘤相关抗原,包括肿瘤相关膜抗原、肿瘤上的胚胎抗原、生长因子受体、生长因子配体和与癌症有关的任何其它类型的抗原。肿瘤抗原可以是,例如,上皮癌抗原(例如,乳癌、胃肠癌、肺癌)、前列腺特异性癌抗原 (PSA) 或前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、膀胱癌抗原、肺(例如,小细胞肺)癌抗原、结肠癌抗原、卵巢癌抗原、脑癌抗原、胃癌抗原、肾细胞癌抗原、胰腺癌抗原、肝癌抗原、食道癌抗原、头颈癌抗原或结肠直肠癌抗原。

[0083] 术语“片段”是指作为全长蛋白质或多肽的一部分的氨基酸序列,例如,大约 8 个至大约 1500 个氨基酸长度,适当地为大约 8 个至大约 745 个氨基酸长度,适当地为大约 8 个至大约 300 个,例如大约 8 个至大约 200 个氨基酸,或大约 10 个至大约 50 或 100 个氨基酸长度。

[0084] 在另一个实施方案中,分子复合物进一步包括治疗剂,如细胞毒性剂、免疫抑制剂或化疗剂。

[0085] 本发明还提供一种双特异性分子,其包含与第二功能部分连接的本发明的抗体,该第二功能部分具有与所述抗体不同的结合特异性。

[0086] 还提供了包含此处所述的抗体、分子偶联物或双特异性分子和药学上可接受的载体的组合物。该组合物进一步包含治疗剂(例如,免疫抑制剂或与本发明的抗体不同的抗体)。

[0087] 本发明也包括编码本发明的抗体的核酸分子以及包含这些核酸的表达载体和包含这些表达载体的宿主细胞。而且,本发明提供包含人免疫球蛋白重链和轻链转基因的转

基因小鼠,其中该小鼠表达本发明的抗体,以及由这种小鼠制备的杂交瘤,其中该杂交瘤产生本发明的抗体。

[0088] 在另一个实施方案中,本发明提供将抗原靶向至受试者中的细胞(例如能够呈递抗原的细胞(如外周血单个核细胞(PBMC)、单核细胞(如 THP-1)、B 类淋巴母细胞(如 C1R、A2、1518 B-LCL)和单核细胞衍生的 DC)的方法,包括施用与抗原连接的结合细胞上的受体的分子(例如,以前所述的 DEC-205 抗体)。在一个实施方案中,被靶向的细胞(可为 B 细胞)刺激 MHC I 类限制的 T 细胞。

[0089] 本发明的抗体和其它组合物也可以用来在受试者中诱导或增强针对抗原的免疫应答(例如, T 细胞介导的免疫应答)。因此,在一个实施方案中,本发明提供了一种诱导或增强针对抗原的 CTL 应答的方法,包括使抗原与结合抗原呈递细胞上的受体例如人 DEC-205 的抗体形成偶联物。然后使该偶联物在体内或离体接触表达人 DEC-205 的细胞,使得所述抗原以诱导或增强针对抗原的 CTL 应答(例如,由 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞介导的应答)的方式被内化、加工和呈递给 T 细胞。在另一个实施方案中,这也用来诱导针对抗原的辅助 T 细胞应答(例如,由 CD4⁺ 辅助 T 细胞介导的应答)。因此,免疫应答可以通过 MHC I 类和 MHC II 类途径诱导。表达 DEC-205 的细胞也可以接触佐剂、刺激树突细胞增殖的细胞因子和/或免疫刺激剂,以进一步增强免疫应答。

[0090] 在另一个实施方案中,提供了检测样品中是否存在 DEC-205 或表达 DEC-205 的细胞的方法,包括:(a) 在允许在抗体和 DEC-205 之间形成复合物的条件下使样品接触本发明的抗体;和(b) 检测样品中抗体和 DEC-205 之间复合物的形成。

[0091] 本发明的范围内也包括试剂盒,该试剂盒包括本发明的组合物(例如,抗体、分子偶联物、多特异性和双特异性分子)和任选的使用说明。该试剂盒可以进一步包括至少一种额外的试剂,如细胞因子或补体,或一种或多种额外的本发明的人抗体(例如,与第一人抗体结合树突细胞上不同表位的具有补体活性的人抗体)。

[0092] 本发明的其他特征和优点通过下面的详述和权利要求书将是明显的。

附图说明

[0093] 图 1A-1I 包括通过使用 LSR™ 仪器(BD Biosciences, NJ, USA) 的荧光分析,显示人抗 -DEC-205 抗体(3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10) 与表达人 DEC-205 的 CHO-S 细胞结合的图。

[0094] 图 2A-2I 包括通过流式细胞分析,显示人抗 -DEC-205 抗体(3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10) 与人树突细胞上的 DEC-205 的结合的图。

[0095] 图 3 是显示使用 ELISA 检测的人抗 -DEC-205 抗体(3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10) 与 DEC-205 的结合的图。

[0096] 图 4A-4C 显示使用共聚焦显微镜检查,与对照(FITC- 人 IgG1) 相比, FITC- 标记的 HuMab (FITC-3G9-2D2) 向树突细胞的内化。

[0097] 图 5 是人 VH 和 VK 种系序列与抗 -DEC-205 抗体(3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5C3-2-3F6、1E6-3D10) 的 VH 和 VK 序列的比对。该图以出现的顺序分别披露了 SEQ ID NO 92、34、46、58、93、82、22、94、10、95、4、16、103-105、76、88、

96、106 和 70。

[0098] 图 6 显示人抗 DEC-205 抗体 (3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、3C7-3A3、2D3-1F5-2A9、1E6-3D10、5C3-2-3F6、5D12-5G1) 的 VH CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的比对。

[0099] 图 7 显示人抗 DEC-205 抗体 (3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、3C7-3A3、5C3-2-3F6) 的人抗 DEC-205HuMab VK CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的比对。

[0100] 图 8 显示抗 DEC-205/ 抗原融合 APC 靶向疫苗构建体的实例的示意图。

[0101] 图 9A 和 B 包括显示在外周血单个核细胞 (PBMC)、单核细胞 (THP-1)、B 类淋巴瘤细胞 (C1R. A2, 1518 B-LCL) 和单核细胞衍生的 DC 中使用 3G9- β hCG APC- 靶向疫苗偶联物的抗原特异性活性的图。

[0102] 发明详述

[0103] 本发明提供结合人 DEC-205 的抗体 (例如, 人抗体)。在特定实施方案中, 该抗体表现出多种功能特性, 例如, 通过表面等离子体共振测定, 以至少为 10^8M^{-1} 的亲合常数结合人 DEC-205; 在结合表达 DEC-205 的人树突细胞后内化; 产生或增强针对可与该抗体连接的抗原的人 T 细胞应答, 例如 CD4⁺ 或 CD8⁺ (CTL) 或 NKT 细胞应答, 例如, 通过 MHC I 类和 II 类途径介导的 CTL 应答; 定位于树突细胞中的抗原加工区室; 诱导周围 CD8⁺ T 细胞耐受性; 或与非人灵长类动物或其它物种的树突细胞上的 DEC-205 交叉反应。在其它实施方案中, 该抗体包括利用了特定人种系基因并且包括特定结构特征如特定 CDR 序列的重链和轻链可变区。本发明进一步提供制备这种抗体、包括这种抗体的分子偶联物和双特异性分子的方法, 以及含有这种抗体的组合物。本发明也提供了在体外或体内将抗原靶向抗原呈递细胞 (例如, 外周血单个核细胞 (PBMC)、单核细胞 (如 THP-1)、B 类淋巴瘤细胞 (如 C1R. A2、1518 B-LCL) 和单核细胞衍生的 DC) 的方法, 例如, 通过使用本发明的抗 DEC-205 抗体。本发明的方法也包括在受试者中诱导或增强针对抗原的免疫应答 (例如, T 细胞介导的免疫应答) 的方法。这些方法包括抗原通过抗原呈递细胞上的受体 (例如, DEC-205) 的呈递, 作为 MHC-I 和 / 或 MHC-II 偶联物的成分 (例如, T 细胞应答由 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞两者介导, 或由细胞毒性 T 细胞或辅助 T 细胞介导)。在一个实施方案中, 被靶向的细胞 (可以是 B 细胞) 刺激 MHC I 类限制性的 T 细胞。

[0104] 为了可以更容易地理解本发明, 首先定义了一些术语。另外的定义在整个详述中说明。

[0105] 术语“人树突和上皮细胞 205 受体”(DEC-205) 包括由细胞天然表达的 DEC-205 的任何变体或同工型 (例如, 以登录号 AAC17636 登记于 **GENBANK®** 的人 DEC-205, 和以登录号 AAL81722 登记于 **GENBANK®** 的小鼠 DEC-205)。因此, 本发明的人抗体可以与来自人以外的物种的 DEC-205 交叉反应。或者, 该抗体可以是人 DEC-205 特异性的, 并且可能不表现出任何与其它物种的交叉反应性。DEC-205 或其任何变体或同工型可以从天然表达它们的细胞或组织 (例如人、小鼠和猕猴细胞) 中分离, 也可以利用本领域公知的技术和 / 或本文描述的技术重组产生。

[0106] **Genbank®** (登录号 AAC17636A) 报告了如下的人 DEC-205 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :1) :

[0107] 1 mrtgwatprrr pagllmllfw ffdlaepsgr aandpftivh gntgkcikpv ygwivaddcd

[0108] 61 etedklwkvw sqhrllfhlhs qkclglditk svnelrmfsc dssamlwwkc ehhslygaar

[0109] 121 yrlalkdghg taisnasdvw kkggseeslc dppyheiytr dgnsygrpce fpflidgtwh
 [0110] 181 hdcildedhs gpwcattlny eydrkwgicl kpengcednw ekneqfgscy qfntqtalsw
 [0111] 241 keayvscqnq gadllsinsa aeltylkeke giakifwigl nqlysargwe wsdhkplnfl
 [0112] 301 nwdpdrpsap tiggsscarm daesglwqsf sceaqlypyvc rkplnntvel tdvwtysdtr
 [0113] 361 cdagwlpnng fcyllvnesn swdkahack afssdlisih sladvevvvt klhnedikee
 [0114] 421 vwiglknini ptlfqwsdgt evtltywden epnvpynktp ncvsylgelg qkwvqsceek
 [0115] 481 lkyvckrkge klndassdkm cppdegwkrh getcykiyed evpfgtncln titsrfeqey
 [0116] 541 lndlmkkydk slrkyfwtgl rdvdscgeyn watvggrrra vtfsnwnfle paspggcvam
 [0117] 601 stgksvgkwe vkdcersfkal sickkmsgpl gpeeaspkpd dpcpegwqsf paslscykvf
 [0118] 661 haerivrkrn weeaerfcqa lgahlssfs h vdeikeflhf ltdqfsgqhw lwiglknkrsp
 [0119] 721 dlqgswqwsd rtpvstiimp nefqqdydir dcaavkvfhr pwrrgwhfyd drefiyrlpf
 [0120] 781 acdtklewvc qipkgrtpkt pdwynpdrag ihgppliieg seywfvadlh lnyeeavlyc
 [0121] 841 asnhsflati tsfvglkai nkianisgdg qkwwirisew piddhftysr ypwhrfpvtf
 [0122] 901 geeclmysak twlidlgkpt dcstklpfic ekynvsslek yspdsaakvq cseqwipfq
 [0123] 961 kcflkikpvs ltfsqasdtc hsyggtlpsv lsqieqdfit sllpdmeatl wiglrwtaye
 [0124] 1021 kinkwtdnre ltysnfhpll vsgrlripen ffeesryhc alilnlqksp ftgtwnftsc
 [0125] 1081 serhfvslcq kysevksrqt lqnasetvky lnnlykiipk tltwhsakre clksnmqlvs
 [0126] 1141 itdpyqqaf l svqallhnss lwiglfsqdd elnfgwsdgk rlhfsrwaet ngqledcvvl
 [0127] 1201 dtdgfwktvd cndnqpgaic yysgneteke vkpvdsvkcp spvlntpwip fqnccynfii
 [0128] 1261 tknrhmattq devhtkcqkl npkshilsir dekennfvle qllyfnymas wvmlgityrn
 [0129] 1321 nslmwfdktp lsythwragr ptiknekfla glstdgfwdi qtfkvieeav yfhqhsilac
 [0130] 1381 kiemvdykee hnttlpqfmp yedgiysviq kkvtwyealn mcsqsgghla svhnqngqlf
 [0131] 1441 ledivkrdgg plwvgllshd gsessfewsd gstfdyipwk gqtspgncvl ldpkgtwkhe
 [0132] 1501 kcnsvkdgai cykptkskl srltyssrcp aakengsrwi qykgchcyksd qalhsfseak
 [0133] 1561 klcskhdsas tivsikdede nkfvslrmre nnnitmrwl glsqhsvdqs wswldgsevt
 [0134] 1621 fvkwenksks gvgrcsmlia snetwkkvec ehgfgrvck vplgpdytai aiivatlsil
 [0135] 1681 vlmggliwfl fqrhrhlhlag fssvryaqgv nedeimlpsf hd
 [0136] 人 DEC-205 的主要结构域可以表示如下：

[0137] N-CR-FNII-CTLD1-CTLD2-CTLD3-CTLD4-CTLD5-CTLD6-CTLD7-CTLD8-CTLD9-CTLD10-TMC

[0138] 其中 N 是 N- 末端, CR 表示“富含 Cys 的”结构域, FNII 表示“ II 型纤连蛋白”结构域, CTLD1 至 CTLD10 表示 10 个“C- 型凝集素样”结构域, TMC 表示跨膜和细胞质结构域。

[0139] 本文使用的术语“树突细胞”包括未成熟和成熟的树突细胞和能够分化为树突细胞的相关的骨髓祖细胞, 或相关抗原呈递细胞 (例如, 单核细胞和巨噬细胞), 因为它们与树突细胞表达相同的抗原。本文使用的术语“相关的”包括来源于共同祖细胞或细胞谱系的细胞。在一个实施方案中, 本发明的抗体与树突细胞的结合, 通过将具有确定的功能的分子或细胞 (例如, 肿瘤细胞、效应细胞、微生物病原体) 靶向至树突细胞, 介导了对树突细胞生长和 / 或功能的效应。在另一实施方案中, 本发明的抗体与树突细胞的结合导致抗体向树突细胞的内化。

[0140] “MHC 分子”包括两类分子:MHC I 类和 MHC II 类。MHC I 类分子将抗原呈递给特定的 CD8⁺T 细胞, MHC II 类分子将抗原呈递给特定的 CD4⁺T 细胞。外源地递送给 APC 的抗原主要为了与 MHC II 类结合而加工。相反,内源地递送给 APC 的抗原主要为了与 MHC I 类结合而加工。但是,在特定条件下,DC 具有使外源抗原进入内部区室用于除结合 MHC II 类分子以外还结合 MHC I 类分子的独特能力。该过程被称为“交叉引发”或“交叉呈递”。

[0141] 本文使用的术语“免疫刺激剂”是指能够刺激 APC 如 DC 和巨噬细胞的化合物。例如,用于本发明的合适的免疫刺激剂能够刺激 APC,使得 APC 的成熟过程得到加速,APC 的增殖得到加强,和 / 或共刺激分子(例如,CD80、CD86、ICAM-1、MHC 分子和 CCR7)和促炎细胞因子(例如,IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-15 和 IFN- γ)的补充或释放得到上调。合适的免疫刺激剂也能够增强 T 细胞增殖。这些免疫刺激剂包括但不限于:CD40 配体;细胞因子,如 IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 和 IL-2;集落刺激因子,如 G-CSF(粒细胞集落刺激因子)和 GM-CSF(粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子);抗 CTLA-4 抗体;LPS(内毒素);ssRNA;dsRNA;卡介苗(BCG);盐酸左旋咪唑;和静脉内免疫球蛋白。在一个实施方案中,免疫刺激剂可以是 Toll-样受体(TLR)激动剂。例如,免疫刺激剂可以是 TLR3 激动剂,如双链肌苷:胞嘧啶多核苷酸(Poly I:C,例如可以作为 AmpligenTM 获自 Hemispherx Bipharm, PA, US),或 Poly A:U;TLR4 激动剂,如单磷酸脂质 A(MPL)或 RC-529(例如,获自 GSK, UK);TLR5 激动剂,如鞭毛蛋白;TLR7 或 TLR8 激动剂,如咪唑喹啉 TLR7 或 TLR 8 激动剂,例如咪唑喹啉莫特(例如 AldaraTM)或雷西莫特(resiquimod)和相关的咪唑喹啉剂(例如,获自 3M Corporation);或 TLR 9 激动剂,如具有非甲基化 CpG 基序的脱氧核苷酸(所谓的“CpGs”,例如获自 ColeyPharmaceutical)。这些免疫刺激剂可以与本发明的抗体和构建体同时、分开或顺序施用,也可以物理连接到该抗体和构建体上。

[0142] 本文使用的术语“连接的”是指两个或多个分子的结合。该连接可以是共价的或非共价的。该连接也可以是遗传的(即重组融合)。这样的连接可以使用多种本领域公认的技术来实现,如化学偶联和重组蛋白质产生。

[0143] 本文使用的术语抗原“交叉呈递”是指外源蛋白质抗原通过 APC 上的 MHC I 类和 II 类分子向 T 细胞的呈递。

[0144] 本文使用的术语“T 细胞介导的应答”是指由包括效应 T 细胞(例如,CD8⁺细胞)和辅助 T 细胞(例如,CD4⁺细胞)在内的 T 细胞介导的任何应答。T 细胞介导的应答包括,例如,T 细胞细胞毒性和增殖。

[0145] 本文使用的术语“细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)应答”是指由细胞毒性 T 细胞诱导的免疫应答。CTL 应答主要由 CD8⁺T 细胞介导。

[0146] 这里提到的术语“抗体”包括完整抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。在一个优选实施方案中,“抗体”是指包含通过二硫键互相连接在一起的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,或其抗原结合部分。每条重链由重链可变区(在此缩写为 V_H)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每条轻链由轻链可变区(在此缩写为 V_L)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。V_H 和 V_L 区可进一步再分为高变区,称为互补决定区(CDR),CDR 散布在被称为构架区(FR)的更加保守的区域中。每个 V_H 和 V_L 均由三个 CDR 和四个 FR 组成,它们从氨基端向羧基端以如下顺序排列:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。重链和轻链的可变区含有可与抗

原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，该宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞（例如效应细胞）和经典补系统的第一成分（C1q）。

[0147] 本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”（或简称为“抗体部分”）是指保留特异性地结合抗原（如人 DEC-205）的能力的抗体的一个或多个片段。已经表明，抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段执行。术语抗体的“抗原结合部分”所包括的结合片段的例子包括：(i) Fab 片段，这是由 V_L 、 V_H 、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段，这是包括在铰链区由二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段；(iii) 由 V_H 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的 Fv 片段；(v) 由 V_H 结构域组成的 dAb 片段（Ward 等，(1989) *Nature* 341:544-546）；和 (vi) 分离的互补决定区（CDR）；或 (vii) 任选地可通过合成接头连接的两个或多个分离的 CDR 的组合。此外，虽然 Fv 片段的两个结构域 V_L 和 V_H 由不同基因编码，但可使用重组方法通过合成接头将它们连接在一起，该接头使它们能够形成其中 V_L 和 V_H 区配对形成单价分子的单条蛋白链（称为单链 Fv (scFv)；参见如 Bird 等 (1988) *Science* 242:423-426；和 Huston 等 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883）。这样的单链抗体也有意包括在术语抗体的“抗原结合部分”中。这些抗体片段可采用本领域技术人员公知的常规技术获得，且可采用与完整抗体一样的方式筛选这些片段的效用。抗原结合部分可以通过重组 DNA 技术产生，或者通过对完整免疫球蛋白进行酶或化学切割而产生。

[0148] “双特异性”或“双功能性抗体”是具有两个不同的重链 / 轻链对和两个不同的结合位点的人工杂合抗体。双特异性抗体可以通过多种方法产生，包括杂交瘤融合或 Fab' 片段的连接。参见，例如，Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990)；Kostelny 等, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992)。

[0149] 本文所用的术语“单克隆抗体”是指表现出对特定表位的单一结合特异性和亲和性的抗体。因此，术语“人单克隆抗体”是指表现出单一结合特异性并且具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和任选的恒定区的抗体。在一个实施方案中，人单克隆抗体由包括从转基因非人动物如转基因小鼠获得的 B 细胞与无限增殖化细胞融合的杂交瘤产生，所述转基因动物具有包括人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0150] 如此处所用的术语“重组人抗体”包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体，例如 (a) 从人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物（例如小鼠）或由其制备的杂交瘤中分离的抗体，(b) 从经转化表达抗体的宿主细胞如转染瘤中分离的抗体，(c) 从重组组合人抗体文库中分离的抗体，和 (d) 通过包括将人免疫球蛋白基因序列剪切为其他 DNA 序列的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。这些重组人抗体包含可变区和恒定区，所述可变区和恒定区利用特定的由种系基因编码的人种系免疫球蛋白序列，但是包括随后例如在抗体成熟过程中发生的重排和突变。如本领域公知的（参见，例如，Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1117-1125），可变区含有抗原结合域，该抗原结合域由重排的各种基因编码，以形成对外源抗原具有特异性的抗体。除了重排以外，可变区可以进一步通过多个单氨基酸改变而修饰（被称为体细胞突变或超突变），以提高抗体对外源抗原的亲和力。恒定区在对抗原的进一步应答方面发生改变（即，同种型转换）。因此，编码响应于抗原的轻链和重链免疫球蛋白多肽的重排和体细胞突变的核酸分子可能不具

有与原核酸分子的序列同一性,而是基本相同或相似(即,具有至少 80% 的同一性)。

[0151] 术语“人抗体”包括具有人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(如果存在的话)的抗体。本发明的人抗体可包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如经体外随机诱变或位点特异性诱变或体内体细胞突变所引入的突变)(参见, Lonberg, N. 等 (1994) *Nature* 368(6474):856-859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. 和 Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13:65-93, 和 Harding, F. 和 Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546)。但是,术语“人抗体”不包括其中来源于另一哺乳动物物种如小鼠的种系的 CDR 序列已被移植到人构架序列上的抗体(即,人源化抗体)。

[0152] 本文所用的“异源抗体”的定义关系到产生这种抗体的转基因非人生物体。该术语是指这样的抗体,其具有的氨基酸序列或编码核酸序列与在转基因非人动物以外的生物体中存在的序列相对应,而且通常所述序列来自转基因非人动物物种以外的物种。

[0153] 本文使用的“分离的抗体”是指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性结合人 DEC-205 的分离的抗体基本不含与除 DEC-205 以外的抗原特异性结合的抗体)。但是,特异性结合一个表位的分离的抗体与来自不同物种的其它 DEC-205 蛋白可能具有交叉反应性。但是,该抗体优选地总是结合人 DEC-205。而且,分离的抗体通常基本不含其他细胞材料和/或化学物质。在本发明的一个实施方案中,具有不同 DEC-205 特异性的“分离的”抗体组合在良好确定的组合物中组合。

[0154] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的位点。表位可以由相邻的氨基酸或通过蛋白质的三级折叠而靠近的不相邻的氨基酸形成。由相邻的氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂后保持,而通过三级折叠形成的表位通常在变性溶剂处理后丧失。表位通常在独特的空间构象中包括至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术和本文所述的技术,例如, x-射线晶体分析法和二维核磁共振(参见,例如, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996))。在此情况下,表位优选地位于人 DEC-205 的胞外域中,例如,在一个或组合的富含半胱氨酸的结构域、FnII 结构域或人 DEC-205 的 10 个 C-型凝集素样结构域中的一个或多个中。

[0155] 本文所用的术语“特异性结合”或“选择性结合”是指抗体与预定的抗原上的表位的结合。典型地,当使用重组人 DEC-205 作为分析物并使用抗体作为配体,在 BIACORE 2000 仪器中通过表面等离子体共振 (SPR) 技术测定时,抗体以大约低于 10^{-7} M, 如大约低于 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或甚至更低的平衡解离常数 (K_D) 结合预定的抗原,并且其与预定抗原结合的亲和力比其与预定抗原或紧密相关的抗原之外的非特异性抗原(如 BSA、酪蛋白)结合的亲和力至少高两倍。术语“识别抗原的抗体”和“抗原特异性抗体”在本文中可以与术语“特异性结合抗原的抗体”互换使用。

[0156] 本发明也包括结合相同表位的抗体和/或与此处所述的抗体竞争结合人 DEC-205 的抗体。识别相同表位或竞争结合的抗体可以使用常规技术来确认。这些技术包括,例如,免疫测定,其显示一种抗体阻断另一抗体与靶抗原结合的能力,即竞争结合分析。在一种分析中检测竞争结合,该分析中免疫球蛋白在检测条件下抑制参考抗体与共同抗原如 DEC-205 的特异性结合。许多类型的竞争结合分析是已知的,例如:固相直接或间接放

射免疫测定 (RIA)、固相直接或间接酶免疫测定 (EIA)、夹心竞争测定 (参见 Stahli 等, *Methods in Enzymology* 9:242(1983)); 固相直接生物素-亲和素 EIA (参见 Kirkland 等, *J. Immunol.* 137:3614(1986)); 固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定 (参见 Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press(1988)); 使用 I-125 标记的固相直接标记 RIA (参见 Morel 等, *Mol. Immunol.* 25(1):7(1988)); 固相直接生物素-亲和素 EIA (Cheung 等, *Virology* 176:546(1990)); 和直接标记的 RIA (Moldenhauer 等, *Scand. J. Immunol.* 32:77(1990))。典型地, 这种分析包括使用与固体表面结合的纯化抗原或带有其中任一种的细胞、未标记的测试免疫球蛋白和标记的参考免疫球蛋白。竞争性抑制通过在测试免疫球蛋白的存在下测定与固体表面和细胞结合的标记的量来测定。通常, 测试免疫球蛋白过量存在。通常, 当竞争抗体过量存在时, 它将抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合至少达 50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75% 或更高。

[0157] 其它技术包括, 例如, 表位作图法, 如抗原: 抗体复合物晶体的 x-射线分析, 其提供对表位的原子解析。其它方法监测抗体与抗原片段或抗原的突变变异的结合, 其中由于抗原序列内氨基酸残基的修饰导致的结合的丧失通常被认为是表位成分的指示。另外, 也可以使用用于表位作图的计算组合方法。这些方法依赖于目标抗体从组合噬菌体展示肽库中亲和力分离特异性短肽的能力。然后这些肽被视为用于定义对应于用来筛查肽库的抗体的表位的线索 (leads)。对于表位作图, 已经开发了证明可对构象不连续表位进行作图的计算算法。

[0158] 本文使用的术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。典型地, 当使用重组人 DEC-205 作为分析物、使用抗体作为配体, 在 BIACORE 2000 仪器中通过表面等离子体共振 (SPR) 技术测定时, 本发明的人抗体以大约 $10^{-8}M$ 或更低, 如低于 $10^{-9}M$ 或 $10^{-10}M$ 或甚至更低的解离平衡常数 (K_D) 结合 DEC-205。

[0159] 本文使用的术语“ k_d ”是指抗体从抗体/抗原复合物上解离的解离速率常数。

[0160] 本文使用的术语“ k_a ”是指抗体与抗原缔合的结合速率常数。

[0161] 本文使用的术语“ EC_{50} ”是指抗体或其抗原结合部分的浓度, 该浓度在体外或体内分析中诱导为最大应答 50% 的应答, 即, 最大应答与基线之间的中途。

[0162] 本文使用的术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别 (例如 IgM 或 IgG1)。在一个实施方案中, 本发明的人单克隆抗体是 IgG 1 同种型的抗体。在另一个实施方案中, 本发明的人单克隆抗体是 IgG2 同种型的抗体。

[0163] 术语“结合固定的 DEC-205”是指本发明的人抗体结合例如在细胞表面上表达或连接于固体支持物上的 DEC-205 的能力。

[0164] 本文使用的术语“交叉反应”是指本发明的抗体结合来自不同物种的 DEC-205 的能力。例如, 结合人 DEC-205 的本发明的抗体也可以结合猕猴 DEC-205。本文使用的交叉反应性的确定是通过在结合分析 (例如, SPR, ELISA) 中检测与纯化抗原的特异性反应性, 或与生理表达 DEC-205 的细胞的结合或其它方式的功能性相互作用。确定交叉反应性的方法包括如本文所述的标准结合分析, 例如, 使用 Biacore™2000 SPR 仪器 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) 的 Biacore™ 表面等离子体共振 (SPR) 分析, 或通过例如流式细胞分析技术检测与来自相关物种的表达 DEC-205 的细胞 (例如, 树突细胞) 的结合。

[0165] 本文所用的“同种型转换”是指抗体的类别或同种型从一种 Ig 类别变成另一种其它的 Ig 类别的现象。

[0166] 本文所用的“非转换同种型”是指没有发生同种型转换时产生的重链的同种型类别；编码非转换同种型的 CH 基因通常是紧接在功能性重排的 VDJ 基因下游的第一个 CH 基因。同种型转换分为典型或非典型同种型转换。典型同种型转换通过重组事件进行，所述重组事件涉及转基因中的至少一个转换序列区。非典型同种型转换可通过例如人 σ_{μ} 和人 Σ_{μ} (δ -相关性缺失) 之间的同源重组进行。另外的非典型转换机制，尤其如转基因间和/或染色体间重组，可以发生并实现同种型转换。

[0167] 本文所用的术语“转换序列”是指负责转换重组的那些 DNA 序列。“转换供体”序列，通常为 μ 转换区，位于转换重组过程中待缺失的构建体区的 5' 方向（即上游）。“转换接纳体”区在待缺失的构建体区和置换恒定区（如 γ 、 ϵ 等）之间。由于没有其中经常发生重组的特异性位点，最终基因序列通常不能从构建体预测到。

[0168] 本文所用的“糖基化模式”定义为共价连接到蛋白质、更具体而言连接到免疫球蛋白的碳水化合物单位的模式。异源抗体的糖基化模式实际上可被表征为在非人转基因动物物种产生的抗体上天然存在的糖基化模式类似，同时本领域一般技术人员知道，异源抗体的糖基化模式与衍生转基因的 CH 基因的物种的糖基化模式相比，更类似于非人转基因动物物种中的所述糖基化模式。

[0169] 本文所用的应用于某个对象的术语“天然存在的”是指这样的事实，即该对象可在自然界中发现。例如，存在于可从自然界来源分离得到的生物体（包括病毒）、且未经人工在实验室中有意修饰的多肽序列或多核苷酸序列即是天然存在的。

[0170] 本文所用的术语“重排的”是指重链或轻链免疫球蛋白基因座的构型，其中 V 区段以基本上分别编码完整 V_H 或 V_L 结构域的构象直接位于 D-J 或 J 区段邻近。重排的免疫球蛋白基因座可通过与种系 DNA 比较来鉴别；重排的基因座具有至少一种重组的七聚体/九聚体同源性成分。

[0171] 本文所用的涉及 V 区段的术语“非重排的”或“种系构型”是指这样的构型，其中 V 区段没有重组而直接邻近 D 或 J 区段。

[0172] 本文所用的术语“核酸分子”意指包括 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链的也可以是双链的，但优选双链 DNA。

[0173] 本文所用的涉及编码能结合 DEC-205 的抗体或抗体部分（如 V_H 、 V_L 、CDR3）的核酸的术语“分离的核酸分子”意指这样的核酸分子，其中编码抗体或抗体部分的核苷酸序列不含其它核苷酸序列，所述其它核苷酸序列编码能结合除 DEC-205 外的抗原的抗体或抗体部分，且其它序列可天然位于人基因组 DNA 中核酸的旁侧。例如，SEQ ID NO:2,3（具有信号肽）/4（不含信号肽）和 SEQ ID NO:8,9（具有信号肽）/10（不含信号肽）分别对应于包含本发明的人抗 DEC-205 抗体 3D6-2F4 的重链（ V_H ）和轻链（ V_L ）可变区的核苷酸和氨基酸序列。具体地，SEQ ID NO:2 和 3/4 分别对应于 3D6-2F4 抗体的 V_H 的核苷酸和氨基酸序列，SEQ ID NO:8 和 9/10 分别对应于 3D6-2F4 抗体的 V_L 的核苷酸和氨基酸序列。

[0174] 本发明也包括 SEQ ID NO:2-91 所示序列的“保守序列修饰”，即不消除由该核苷酸序列编码的或含有该氨基酸序列的抗体与抗原的结合的核苷酸和氨基酸序列修饰。这样的保守修饰包括保守的核苷酸和氨基酸置换，以及核苷酸和氨基酸添加和缺失。例如，可

以通过本领域公知的标准技术,如定点诱变和 PCR 介导的诱变,向 SEQ ID NO:2-91 中引入修饰。保守氨基酸置换包括将氨基酸残基替换为具有相似侧链的氨基酸残基的置换。具有相似侧链的氨基酸残基的家族在本领域中已经定义。这些家族包括:具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 β -分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,预测的人抗-DEC-205 抗体中的非必需氨基酸残基优选地被替换为来自相同侧链家族的另一氨基酸残基。确定不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守置换的方法在本领域中是公知的(参见,例如,Brummell 等, *Biochem.* 32:1180-1187(1993);Kobayashi 等 *ProteinEng.* 12(10):879-884(1999);和 Burks 等 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417(1997))。

[0175] 此外,在另一个实施方案中,可以沿抗 DEC-205 抗体编码序列的全部或部分随机引入突变,例如通过饱和诱变引入,得到的修饰的抗 DEC-205 抗体可以筛选结合活性。

[0176] 对于核酸,术语“基本同源性”表示两种核酸或其指定序列当以最佳方式进行对比和比较时,虽有适当的核苷酸插入或缺失,但至少约有 80% 的核苷酸是相同的,通常至少约 90% 至 95%,更优选至少约 98% 至 99.5% 的核苷酸是相同的。另外,当区段在选择性杂交条件下与该链的互补体杂交时,也存在基本同源性。

[0177] 两个序列之间的百分同一性是它们共有的相同位置的数目的函数(即%同源性=相同位置的数目/总位置数目 $\times$ 100),其中考虑了为达到两个序列的最佳对比而需要引入的缺口的数目及各缺口的长度。两条序列之间的序列比较和百分同一性的确定可用数学算法实现,这在以下非限制性实施例中有描述。

[0178] 两个核苷酸序列之间的百分同一性可以用 GCG 软件包(可从 <http://www.gcg.com> 获得)中的 GAP 程序、使用 NWSgapdna.CMP 矩阵和 40、50、60、70 或 80 的空位权重和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重来确定。两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分同一性也可以用已经整合入 ALIGN 程序(2.0 版本)中的 E. Meyers 和 W. Miller(CABIOS, 4:11-17(1988))的算法来确定,其使用 PAM 120 权重残基表,空位长度罚分为 12,空位罚分为 4。另外,两个氨基酸序列之间的百分同一性也可以用已经整合入 GCG 软件包(可从 <http://www.gcg.com> 获得)的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch(*J. Mol. Biol.* 48:444-453(1970))的算法来确定,其使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵,16、14、12、10、8、6 或 4 的空位权重,和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重。

[0179] 本发明的核酸和蛋白质序列可以进一步用作“查询序列”来对公共数据库进行检索,例如用来鉴定相关序列。这种检索可以用 Altschul 等(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10 的 NBLAST 和 XBLAST 程序(2.0 版本)进行。BLAST 核苷酸检索可以用 NBLAST 程序进行,得分=100,字长=12,以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白质检索可以用 XBLAST 程序进行,得分=50,字长=3,以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以采用如 Altschul 等(1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402 所述的空位 BLAST。当采用 BLAST 和空位 BLAST 程序时,可以使用各自程序(例如 XBLAST 和 NBLAST)的缺省参数。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0180] 该核酸可以存在于完整细胞、细胞裂解物中,或以部分纯化或基本上纯的形式存在。当通过包括碱 /SDS 处理、CsCl 显带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳在内的标准技术和本领域公知的其他方法与其他细胞成分或其他掺杂物(例如其他细胞核酸或蛋白质)分离纯化时,核酸是“分离的”或“基本上纯的”。参见, F. Ausubel 等编, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。

[0181] 本发明的核酸组合物,虽然经常为 cDNA、基因组或其混合物的天然序列(修饰的限制位点等除外),但可按照标准技术进行突变,以提供基因序列。对于编码序列,这些突变可按需影响氨基酸序列。尤其是,设想了基本上同源于或来源于本文所述的天然 V、D、J、恒定区、转换区和其它类似序列的 DNA 序列(其中“来源于”表示某序列与另一序列相同或从后者修饰得到)。

[0182] 当使一核酸与另一核酸序列处于功能性关系时,所述核酸即是“有效连接”的。例如,启动子或增强子如果能影响序列的转录,即是与编码序列“有效连接的”。对于转录调节序列,有效连接指被连接的 DNA 序列是相邻的,且当需要连接两个蛋白质编码区时,所述 DNA 序列是相邻的并位于读框中。对于转换序列,有效连接表示序列能够实现转换重组。

[0183] 本文所用的术语“载体”意指能够转运与其连接的另一种核酸的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”,它指环状双链 DNA 环,其它 DNA 区段可连接到其中。另一种载体类型是病毒载体,其中其它 DNA 区段可连接到病毒基因组内。某些载体能够在其引入的宿主细胞中进行自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体(如非附加型哺乳动物载体)可在引入到宿主细胞时整合到宿主细胞基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导其有效连接的基因的表达。这样的载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。一般而言,在重组 DNA 技术中有用的表达载体通常为质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。但是,本发明有意包括能提供等同功能的其它类型的表达载体,如病毒载体(如复制缺陷型反转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

[0184] 本文所用的术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)意指其中引入了重组表达载体的细胞。应该理解,这样的术语不但意指特定细胞,也指这样的细胞的后代。因为由于突变或环境影响在以后各代中可能发生某些修饰作用,这样的后代可能实际上与亲代细胞不相同,但仍包括在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0185] 术语“抗原呈递细胞”或“APC”是在其表面上展示与 MHC 复合的外来抗原的细胞。T 细胞利用 T 细胞受体 (TCR) 识别这种复合物。APC 的例子包括但不限于树突细胞 (DC)、外周血单个核细胞 (PBMC)、单核细胞(如 THP-1)、B 类淋巴母细胞(如 C1R. A2, 1518 B-LCL)和单核细胞衍生的树突细胞 (DC)。某些 APC 通过吞噬作用或者受体介导的胞吞作用内化抗原。APC 受体的例子包括但不限于 C 型凝集素,如人树突和上皮细胞 205 受体 (DEC-205), 和人巨噬细胞甘露糖受体。

[0186] 术语“抗原呈递”是指 APC 捕获抗原和使它们能够被 T 细胞识别的过程,例如,作为 MHC-I 和 / 或 MHC-II 偶联物的成分。

[0187] 术语“诱导免疫应答”和“增强免疫应答”可以互换使用,是指刺激对特定抗原的免疫应答(即,被动或适应性的)。

[0188] 本文使用的术语“治疗”是指此处所述的治疗性的或预防性的措施。“治疗”方法

是对需要这种治疗的受试者,例如,需要增强针对特定抗原的免疫应答的受试者,或最终可能患上这种疾病的受试者,施用本发明的人抗体,以预防、治愈、延迟疾病或复发疾病、减轻其严重程度,或缓解其一个或多个症状,或使受试者的生存期延长超过不使用这处治疗时预期的生存期。

[0189] 术语“有效剂量”被定义为足以达到或至少部分达到所需效果的量。术语“治疗有效量”被定义为足以治愈或至少部分停滞已患有疾病的患者的疾病及其并发症的量。对于此用途有效的量取决于所治疗的疾病的严重程度和患者自身免疫系统的总体状况。

[0190] 术语“患者”包括接受预防或治疗性处置的人和其它哺乳动物受试者。

[0191] 本文使用的术语“受试者”包括任何人或非人动物。例如,本发明的方法和组合物可以用来治疗患有免疫疾病的受试者。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如,哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖类、爬行类动物等。

[0192] 本发明的各个方面在下面的部分中进一步详细说明。

[0193] I. 抗 DEC-205 抗体的产生

[0194] 本发明包括结合 DEC-205 例如人 DEC-205 的抗体,例如,完全人抗体。示例性的结合 DEC-205 的单克隆抗体包括 3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6、5C3-2-3F6、1E6-3D10 和 3A4-1C10。

[0195] 本发明的单克隆抗体可以使用多种已知的技术产生,例如 Kohler 和 Milstein, Nature 256 :495 (1975) 所述的标准体细胞杂交技术。尽管体细胞杂交方法是优选的,但是原则上也可以使用其它生产单克隆抗体的技术,例如, B 淋巴细胞的病毒或致癌性转化、使用人抗体基因文库的噬菌体展示技术。

[0196] 因此,在一个实施方案中,使用杂交瘤方法产生结合人 DEC-205 的抗体。在该方法中,小鼠或其它合适的宿主动物可以用合适的抗原免疫,以诱导出产生或能够产生特异性结合免疫所用抗原的抗体的淋巴细胞。或者,淋巴细胞可以在体外免疫。然后可以使用合适的融合剂,如聚乙二醇,将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞 (Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。检测培养杂交瘤细胞的培养基中针对该抗原的单克隆抗体的产生。确认了产生具有所需特异性、亲和力和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以通过有限稀释程序对克隆进行亚克隆,并且使用标准方法进行培养 (Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。用于该目的的合适的培养基包括,例如, D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外,杂交瘤细胞可以作为腹水肿瘤在动物体内生长。可以通过常规免疫球蛋白纯化方法,例如,蛋白 A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,从培养基、腹水或血清中分离由该亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0197] 在另一个实施方案中,结合人 DEC-205 的抗体和抗体部分可以从利用如下所述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离:例如, McCafferty 等, Nature, 348 :552-554 (1990). Clackson 等, Nature, 352 :624-628 (1991), Marks 等, J. Mol. Biol., 222 :581-597 (1991) 和 Hoet 等 (2005) Nature Biotechnology 23, 344-348; Ladner 等的美国专利 No. 5, 223, 409; 5, 403, 484; 和 5, 571, 698; Dower 等的美国专利 No. 5, 427, 908 和 5, 580, 717; McCafferty 等的美国专利 No. 5, 969, 108 和 6, 172, 197; 和 Griffiths 等的美国专利 No. 5, 885, 793; 6, 521, 404; 6, 544, 731; 6, 555, 313; 6, 582, 915 和 6, 593, 081。另外,也可以采用通过链改

组产生高亲和力 (nM 范围) 的人抗体 (Marks 等, Bio/Technology, 10 :779-783(1992)), 以及感染和体内重组的组合作为构建极大噬菌体文库的策略 (Waterhouse 等, Nuc. Acids. Res., 21 :2265-2266(1993))。

[0198] 在特别的实施方案中, 利用 Hoet 等 (同上) 所述的噬菌体展示技术产生结合人 DEC-205 的抗体。该技术包括产生具有从人供体分离的免疫球蛋白序列的独特组合并且在重链 CDR 中具有合成多样性的人 Fab 文库。然后针对结合人 DEC-205 的 Fab 筛查该文库。

[0199] 优选的用于制备产生本发明抗体的杂交瘤的动物系统是鼠系统。在小鼠中产生杂交瘤是本领域中公知的, 包括免疫方案和分离和融合被免疫的脾细胞的技术。

[0200] 在一个实施方案中, 使用携带人免疫系统而不是小鼠系统的部分的转基因或转染色体小鼠来产生抗 DEC-205 抗体。在一个实施方案中, 本发明使用在本文中称为“HuMAb 小鼠”的转基因小鼠, 该小鼠包含编码未重排的人重链 (μ 和 γ) 和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因小基因座, 和使内源 μ 和 κ 链基因座失活的定向突变 (Lonberg, N. 等 (1994) Nature 368(6474) :856-859)。因此, 该小鼠表现为小鼠 IgM 或 κ 表达降低, 并且响应于免疫, 导入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变, 从而产生高亲和力人 IgG κ 单克隆抗体 (Lonberg, N. 等 (1994), supra; reviewed in Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113 :49-101; Lonberg, N. 和 Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 :65-93, 和 Harding, F. 和 Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci 764 :536-546)。HuMAb 小鼠的制备在下面的第 II 部分和以下文献中详细描述: Taylor, L. 等 (1992) Nucleic Acids Research 20 :6287-6295; Chen, J. 等 (1993) International Immunology 5 :647-656; Tuailon 等 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90 :3720-3724; Choi 等 (1993) Nature Genetics 4 :117-123; Chen, J. 等 (1993) EMBO J. 12 :821-830; Tuailon 等 (1994) J. Immunol. 152 :2912-2920; Lonberg 等, (1994) Nature 368(6474) :856-859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113 :49-101; Taylor, L. 等 (1994) International Immunology 6 :579-591; Lonberg, N. 和 Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 :65-93; Harding, F. 和 Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci 764 :536-546; Fishwild, D. 等 (1996) Nature Biotechnology 14 :845-851。进一步参见, Lonberg 和 Kay, 和 GenPharm International 的美国专利 No. 5, 545, 806 ; 5, 569, 825 ; 5, 625, 126 ; 5, 633, 425 ; 5, 789, 650 ; 5, 877, 397 ; 5, 661, 016 ; 5, 814, 318 ; 5, 874, 299 ; 和 5, 770, 429 ; Surani 等的美国专利 No. 5, 545, 807 ; 1998 年 6 月 11 日公布的国际公布 W0 98/24884 ; 1994 年 11 月 10 日公布的 W094/25585 ; 1993 年 6 月 24 日公布的 W0 93/1227 ; 1992 年 12 月 23 日公布的 W0 92/22645 ; 1992 年 3 月 19 日公布的 W0 92/03918。

[0201] 免疫

[0202] 为了产生抗 DEC-205 的完全人抗体, 含有人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体小鼠 (例如, HCo 12、HCo7 或 KM 小鼠) 可用纯化的或富集的 DEC-205 抗原制品和 / 或表达 DEC-205 的细胞进行免疫, 如 Lonberg 等 (1994) Nature 368(6474) :856-859; Fishwild 等 (1996) Nature Biotechnology 14 :845-851 和 W0 98/24884 所述。如本文所述, 用重组 DEC-205 蛋白或表达 DEC-205 的细胞作为免疫原免疫 HuMAb 小鼠。或者, 可以用编码人 DEC-205 的 DNA 免疫小鼠。优选地, 小鼠第一次输注时鼠龄在 6-16 周。例如, 可以使用纯化

的或富集的重组 DEC-205 抗原制品 (5-50 μ g) 经腹膜内免疫 HuMab 小鼠。如果用纯化的或富集的重组 DEC-205 抗原制品免疫不能导致抗体产生,也可用表达 DEC-205 的细胞例如细胞系免疫小鼠,以促进免疫应答。示例性的细胞系包括过量表达 DEC-205 的稳定的 CHO 和 Raji 细胞系。

[0203] 应用各种抗原积累的经验证明,当最初使用完全弗氏佐剂中的抗原腹膜内 (IP) 或皮下 (SC) 免疫,接着每隔一周用弗氏不完全弗氏佐剂中的抗原 IP/SC 免疫 (最多共 10 次) 时, HuMab 转基因小鼠产生最佳应答。在免疫方案进程中可以用眼眶后取血获得的血浆样品监测免疫应答。可通过 ELISA (如下所述) 筛选血浆,具有足够抗 DEC-205 人免疫球蛋白效价的小鼠可用于进行融合。用抗原对小鼠进行静脉内加强免疫,3 天后处死并且取出脾脏。

[0204] 产生抗 DEC-205 单克隆抗体的杂交瘤的产生

[0205] 为了制备产生抗 DEC-205 单克隆抗体的杂交瘤,从被免疫的小鼠中分离脾细胞和 / 或淋巴结细胞,并且与合适的无限增殖化细胞系 (例如小鼠骨髓瘤细胞系) 融合。然后抗原特异性抗体的产生筛选得到的杂交瘤。例如,使用 50% PEG (w/v),将来自被免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液与 SP2/0-Ag8.653 非分泌性小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC, CRL1580) 融合。将细胞以大约 1×10^5 的密度接种于平底微量滴定板中,接着在除常用试剂外含有 10% 胎克隆血清、5-10% origen 杂交瘤克隆因子 (IGEN) 和 1X HAT (Sigma) 的选择性培养基中温育两周。大约两周之后,在用 HT 替换了 HAT 的培养基中培养细胞。然后通过 ELISA 人抗 DEC-205 单克隆 IgM 和 IgG 抗体筛选各孔,或者通过 FLISA (荧光连接的免疫吸附测定) 根据与表达 DEC-205 的细胞 (例如表达 DEC-205 的 CHO 细胞系) 表面的结合筛选各孔。一旦发生广泛的杂交瘤生长,则通常在 10-14 天之后观察培养基。将分泌抗体的杂交瘤再次平板接种,再次筛选,如果对于人 IgG 仍然是阳性,则可以通过有限稀释将抗 DEC-205 单克隆抗体至少亚克隆两次。然后体外培养稳定的亚克隆,以在组织培养基中产生少量抗体用于表征。

[0206] 产生抗 DEC-205 单克隆抗体的转染瘤的产生

[0207] 例如,利用的重组 DNA 技术和基因转染方法的组合 (例如, Morrison, S. (1985) science 229:1202),也能在宿主细胞转染瘤中产生本发明的抗体。

[0208] 例如,在一个实施方案中,感兴趣的基因,例如,人抗体基因,可以连接到表达载体如真核表达质粒中,如 WO 87/04462、WO89/01036 和 EP 338 841 公开的 GS 基因表达系统或本领域公知的其它表达系统所使用的载体。具有克隆的抗体基因的纯化质粒可以被引入真核宿主细胞如 CHO 细胞或 NSO 细胞或其它真核细胞如植物来源的细胞、真菌或酵母细胞中。用来引入这些基因的方法可以是本领域中描述的方法,如电穿孔、lipofectine、lipofectamine 或其它方法。在将这些抗体基因引入宿主细胞后,可以确认和选择表达该抗体的细胞。这些细胞代表转染瘤,它们然后可以进行表达水平的扩增并扩大规模以产生抗体。可以从这些培养上清液和 / 或细胞中分离和纯化重组抗体。

[0209] 或者,这些克隆的抗体基因可以在其它表达系统中如大肠杆菌中或在完整生物体中表达,或者可以合成表达。

[0210] 应用部分抗体序列表达完整的抗体

[0211] 抗体主要是通过位于六个重链和轻链互补决定区 (CDR) 中的氨基酸残基与靶抗

原相互作用。为此原因,在各抗体之间,CDR 内的氨基酸序列比 CDR 之外的序列更加多样性。因为 CDR 序列负责大多数抗体-抗原相互作用,可以通过构建一种表达载体来表达模拟天然存在的特异性抗体的性质的重组抗体,该构建体包含来自天然存在的特异性抗体的 CDR 序列,这些序列已被移植到来自具有不同性质的不同抗体的构架序列上(参见,例如, Riechmann, L 等,1998, Nature 332 :323-327 ; Jones, P. 等,1986, Nature 321 :522-525 ; 和 Queen, C. 等,1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 :10029-10033)。这些构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库获得。这些种系序列将不同于成熟抗体基因序列,因为它们将不包括完全装配的可变基因,后者是在 B 细胞成熟过程中通过 V(D)J 连接形成的。种系基因序列在对应的单个可变区中也将不同于高亲和力次级全套抗体 (secondary repertoire antibody) 的序列。例如,构架区的氨基末端部分的体细胞突变是相对少见的。例如,体细胞突变在构架区 1 的氨基末端部分和构架区 4 的羧基末端部分相对少见。此外,许多体细胞突变不会显著改变抗体的结合性质。由于此原因,为了产生具有与原抗体类似的结合性质的完整重组抗体,不一定要获得特定抗体的完整 DNA 序列(参见 1999 年 3 月 12 日提交的 PCT/US99/05535)。对于此目的,跨过 CDR 区的部分重链和轻链序列一般是足够的。利用该部分序列确定哪些种系可变基因和连接基因区段贡献于重组抗体可变基因。然后利用种系序列补平可变区中丢失的部分。重链和轻链前导序列在蛋白质成熟过程中被切割,并且对最终抗体的性质没有贡献。为了添加丢失的序列,通过连接或 PCR 扩增,克隆的 cDNA 序列可以与合成的寡核苷酸组合。此外,完整的可变区可以合成为一组短的、重叠的寡核苷酸,并且通过 PCR 扩增组合,以产生完全合成的可变区克隆。这一方法具有一定的优点,例如消除或包含特定的限制性位点,或者优化特定的密码子。

[0212] 利用来自杂交瘤的重链和轻链转录物的核苷酸序列设计一组重叠的合成寡核苷酸,以产生具有与天然序列相同的氨基酸编码能力的合成 V 序列。合成重链和 κ 链序列可能在三个方面不同于天然序列:打断了重复核苷酸碱基串,以利于寡核苷酸合成和 PCR 扩增,根据 Kozak 原则 (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266 :19867-19870) 引入最佳翻译起始位点;并且将 HindIII 位点构建在翻译起始位点的上游。

[0213] 对于重链和轻链可变区,将优化的编码链序列和相应的非编码链序列分解成接近相应非编码寡核苷酸的中点的 30-50 个核苷酸。因此,对于每条链,寡核苷酸可以装配为重叠的双链组,它们跨过 150-400 个核苷酸的区段。然后使用该集合作为模板,产生 150-400 个核苷酸的 PCR 扩增产物。典型地,单可变区寡核苷酸组将分解为两个集合,它们分别扩增以产生两个重叠的 PCR 产物。这些重叠的产物然后通过 PCR 扩增进行组合,以形成完整的可变区。也可能希望在 PCR 扩增中包括重链或轻链恒定区的重叠片段(包括 κ 轻链的 BbsI 位点,或 γ 重链的 AgeI 位点),以产生能够容易地克隆到表达载体构建体内的片段。

[0214] 重构的重链和轻链可变区然后与克隆的启动子、前导序列、翻译起点、前导序列、恒定区、3' 非翻译区、聚腺苷酸化和转录终止序列组合,以形成表达载体构建体。重链和轻链表达构建体可以组合到一个载体中,共转染,系列转染,或分别转染宿主细胞,然后将该宿主细胞融合,形成表达两条链的宿主细胞。

[0215] 构建用于构建表达载体的质粒,使得可以利用 PCR 扩增的 V 重链和 V κ 轻链 cDNA 序列重新构建完整的重链和轻链小基因。这些质粒可以用来表达完全人 IgG₁ κ 或 IgG₄ κ 抗体。本发明的完全人抗体和嵌合抗体也包括 IgG2、IgG3、IgE、IgA、IgM 和 IgD 抗体。为

了表达其它重链同种型,或者为了表达包含 λ 轻链的抗体,可以构建类似的质粒。

[0216] 因此,在本发明的一个方面,利用本发明的抗 DEC-205 抗体的结构特征产生结构上相关的抗 DEC-205 抗体,该抗体保留本发明的抗体的至少一种功能性质,例如,根据表面等离子体共振测定,以至少 10^8M^{-1} 的亲合常数结合人 DEC-205 ;在结合表达 DEC-205 的人树突细胞后内化 ;定位于人树突细胞中的抗原加工区室 ;激活表达 DEC-205 的人树突细胞 ;与非人灵长类动物或其它物种的树突细胞上的 DEC-205 交叉反应 ;和产生或增强针对抗原的人 T 细胞应答,如 CTL 应答,优选由 MHC I 类和 II 类途径两者介导的 CTL 应答。

[0217] 在一个实施方案中,本发明的抗体的一个或多个 CDR 区可以与已知的构架区和 CDR 重组组合,以产生另外的重组构建的本发明的抗 DEC-205 抗体。其重链和轻链可变构架区可以来源于相同或不同的抗体序列。抗体序列可以是天然存在的抗体的序列,或者可以是几种抗体的共有序列。参见 Kettleborough 等,Protein Engineering 4 :773(1991) ; Kolbinger 等,Protein Engineering 6 :971(1993),和 Carter 等,WO 92/22653。

[0218] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供一种制备抗 DEC-205 抗体的方法,包括 :

[0219] 制备一种抗体,该抗体包括 : (1) 重链构架区和重链 CDR,其中至少一个重链 CDR 包括选自 SEQ ID NO :5、6、7、17、18、19、29、30、31、41、42、43、53、54、55、65、66、67、71、72、73、77、78、79、89、90 或 91 所示的 CDR 氨基酸序列的氨基酸序列 ;和 (2) 轻链构架区和轻链 CDR,其中至少一个轻链 CDR 包括选自 SEQ ID NO :11、12、13、23、24、25、35、36、37、47、48、49、59、60、61、83、84 或 85 所示的 CDR 氨基酸序列的氨基酸序列,其中该抗体保留结合 DEC-205 的能力。抗体结合 DEC-205 的能力可以使用标准结合分析来检测,如实施例所述的分析 (例如,ELISA 或 FLISA)。

[0220] 本领域公知,抗体的重链和轻链 CDR3 结构域在抗体对于抗原的结合特异性 / 亲和力中起特别重要的作用 (参见,Hall 等,J. Immunol., 149 :1605-1612(1992) ;Polymenis 等,J. Immunol., 152 :5318-5329(1994) ;Jahn 等,Immunobiol., 193 :400-419(1995) ;Klimka 等,Brit. J. Cancer, 83 :252-260(2000) ;Beiboer 等,J. Mol. Biol, 296 :833-849(2000) ;Rader 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 :8910-8915(1998) ;Barbas 等,J. Am. Chem. Soc., 116 :2161-2162(1994) ;Ditzel 等,J. Immunol., 157 :739-749(1996))。因此,如上所述制备的本发明的重组抗体优选地包含抗体 3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10 的重链和 / 或轻链 CDR3。该抗体可进一步包含抗体 3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10 的 CDR2。该抗体可进一步包含抗体 3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10 的 CDR1。该抗体可进一步包含 CDR 的任何组合。

[0221] 因此,在另一个实施方案中,本发明进一步提供了抗 DEC-205 抗体,该抗体包含 : (1) 重链构架区、重链 CDR1 区、重链 CDR2 区和重链 CDR3 区,其中重链 CDR3 区选自 3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10 的 CDR3,例如,如 SEQ ID NO :7 所示的 3D6-2F4 的重链 CDR3 区 ;和 (2) 轻链构架区、轻链 CDR1 区、轻链 CDR2 区和轻链 CDR3 区,其中轻链 CDR3 区选自 3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10 的 CDR3,例如,如 SEQ ID NO :13 所示的 3D6-2F4 的轻链 CDR3 区,其中该抗体结合 DEC-205。该抗体可进一步包含

抗体 3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10 的重链 CDR2 和 / 或轻链 CDR2。该抗体可进一步包含 3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10 的重链 CDR1 和 / 或轻链 CDR1。

[0222] 具有修饰序列的抗体的产生

[0223] 在另一个实施方案中,本发明的抗 DEC-205 抗体的可变区序列或其部分被修饰,从而产生结构上相关的抗 DEC-205 抗体,该抗体保留了结合(即,与修饰抗体结合相同的表位)能力,因此在功能上是等同的。确认可以被改变而不消除抗原结合的残基的方法是本领域公知的(参见,例如, Marks 等 (Biotechnology (1992) 10 (7) :779-83(通过用固定的 CDR3 序列改变改组轻链可变区,然后改组重链可变区,使单克隆抗体多样化), Jespers 等 (1994) Biotechnology 12 (9) :899-903(从针对抗原单表位的噬菌体展示谱中选择人抗体), Sharon 等 (1986) PNASUSA 83 (8) :2628-31(抗体的可变-多样性区段连接处的不变氨基酸残基的定点诱变); Casson 等 (1995) J. Immunol. 155 (12) :5647-54(抗体重链可变区随机诱变产生的特异性的丢失和变化的进化)。

[0224] 因此,在本发明的一个方面中,上述工程化抗体的 CDR1、2 和 / 或 3 区可以包含准确的氨基酸序列,如此处公开的抗体 3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10 的氨基酸序列。但是,在本发明的其它方面,所述抗体包含 3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10 的确切 CDR 序列的衍生物,而仍然保留有效结合 DEC-205 的能力。这些序列修饰可以包括一个或多个氨基酸添加、缺失或置换,例如上述保守序列修饰。序列修饰也可以基于抗体 3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10 的特定 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的上述共有序列。

[0225] 因此,在另一个实施方案中,工程化抗体可以包含一个或多个 CDR,所述 CDR 与抗体 3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10 的一个或多个 CDR 例如 90%、95%、98% 或 99.5% 相同。在上述数值中间的范围,例如,与上述序列中的一个或多个 90-95%、95-98% 或 98-100% 相同的 CDR,也包括在本发明中。

[0226] 在另一个实施方案中,可以改变 CDR 的一个或多个残基,以改变结合,从而达到更有利的结合速率、更有利的解离速率,或这两者,从而达到理想的结合常数。使用这一策略,可以获得具有例如 10^{10}M^{-1} 或更高的超高结合亲和力的抗体。本领域公知的和本文描述的亲和力成熟技术可以用来改变 CDR 区,然后针对希望的结合改变筛选得到的结合分子。因此,当一个或多个 CDR 改变时,可以监测到结合亲和力以及免疫原性的改变,并且进行评分,从而获得为了结合和低免疫原性的最佳组合而优化的抗体。

[0227] 除了 CDR 内的修饰以外或者作为其替代,也可以在抗体重链和 / 或轻链可变区的一个或多个构架区、FR1、FR2、FR3 和 FR4 内进行修饰,只要这些修饰不消除抗体的结合亲和力。例如,将本发明抗体的重链和 / 或轻链可变区的构架区中的一个或多个非种系氨基酸残基置换为种系氨基酸残基,即,与该抗体具有显著序列同一性的重链或轻链可变区的人种系序列中相应的氨基酸残基。例如,抗体链可以同与之具有显著序列同一性的种系抗体链对齐,在抗体构架序列和种系链构架之间不匹配的氨基酸残基可以用来自种系序列的相

应的残基置换。当抗体可变构架区和相当的人种系序列可变构架区之间的氨基酸不同时，抗体构架氨基酸通常应当用相应的人种系序列氨基酸代替，如果合理地预期该氨基酸落入以下类别之一中：

[0228] (1) 直接非共价结合抗原的氨基酸残基，

[0229] (2) 与 CDR 区相邻的氨基酸残基，

[0230] (3) 以其它方式与 CDR 区相互作用的氨基酸残基（例如，通过计算机建模确定，在 CDR 区的大约 3-6 Å 内），或

[0231] (4) 参与 VL-VH 界面的氨基酸残基。

[0232] “直接非共价结合抗原”的残基包括非常可能通过确定的化学力如氢键键合、范德华力、疏水相互作用等与抗原上的氨基酸直接相互作用的构架区内位置处的氨基酸。因此，在一个实施方案中，本发明抗体的构架区中的氨基酸残基被置换为直接与抗原非共价结合的相应的种系氨基酸残基。

[0233] “与 CDR 区相邻的”残基包括与抗体一级序列中的一个或多个 CDR 直接邻近的位置中的氨基酸残基，例如，在直接邻近根据 Kabat 定义的 CDR，或者根据 Chothia 定义的 CDR 的位置中的氨基酸残基（参见，例如，Chothia 和 Lesk J. Mol. Biol. 196 :901 (1987)）。因此，在一个实施方案中，本发明抗体的构架区内的氨基酸残基被置换为与 CDR 区相邻的相应的种系氨基酸残基。

[0234] “以其它方式与 CDR 区相互作用的”残基包括通过二级结构分析确定的、其空间定向足以影响 CDR 区的残基。这些氨基酸通常具有 CDR 中某些原子的大约 3 埃单位(Å)内的侧链原子，并且必然含有能够根据确定的化学力（如以上所列出的）与 CDR 原子相互作用的原子。因此，在一个实施方案中，本发明抗体的构架区内的氨基酸残基被置换为以其它方式与 CDR 区相互作用的相应的种系氨基酸残基。

[0235] 已知在许多抗体中，构架中的几个位置处的氨基酸对于确定 CDR 构象是重要的（例如，能够与 CDR 相互作用）(Chothia 和 Lesk, 同上, Chothia 等, 同上, 和 Tramontano 等, J. Mol. Biol. 215 :175 (1990), 所有这些都通过引用并入本文)。这些作者通过分析几种已知抗体的结构，确定了对 CDR 构象重要的保守构架残基。基于 CDR 的构象，所分析的抗体落入有限数量的结构或“规范”类别中。规范类别成员内的保守的构架残基被称为“规范”残基。规范残基包括轻链的残基 2、25、29、30、33、48、64、71、90、94 和 95 以及重链的残基 24、26、29、34、54、55、71 和 94。另外的残基（例如，决定 CDR 结构的残基）可以按照 Martin 和 Thornton (1996) J. Mol. Biol. 263 :800 的方法进行确认。特别是，已知轻链位置 2、48、64 和 71 和重链位置 26-30、71 和 94 处的氨基酸（根据 Kabat 编号）能够与多种抗体中的 CDR 相互作用。轻链位置 35 和重链位置 93 和 103 处的氨基酸也可能与 CDR 相互作用。可以实现 CDR 构象的另外的残基可以按照 Foote 和 Winter (1992) J. Mol. Biol. 224 :487 的方法进行确认。这些残基被称为“游标”残基，并且是接近地位于 CDR 下（即，在 CDR 下形成“平台”）的构架区中的残基。

[0236] “参与 VL-VH 界面的”残基或“堆积残基”包括例如 Novotny 和 Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 :4592-66 (1985) 或 Chothia 等（同上）定义的在 VL 和 VH 之间界面处的残基。

[0237] 偶然地，关于特定氨基酸是否落于一个或多个上述类别中，有一些不明确。在这些

情况下,产生替代的变异抗体,其中之一具有所述特定的置换,另一个没有。这样产生的替代的变异抗体可以在此处所述的任何分析中检测希望的活性,并且选择优选的抗体。

[0238] 构架区内置换的另外的候选物是在该位置处对于抗体而言不常见的或“罕见的”氨基酸。这些氨基酸可以被置换为来自人种系序列的等同位置或来自更典型抗体的等同位置的氨基酸。例如,当抗体构架区中的氨基酸对于该位置是罕见的,并且种系序列中相应的氨基酸对于免疫球蛋白序列中的该位置是常见的;或者当抗体中的氨基酸对于位置是罕见的,并且种系序列中相应的氨基酸相对于其它序列也是罕见的时,置换可能是需要的。预期通过将不常见的氨基酸置换为恰好是抗体典型的来自种系序列的氨基酸,可以使抗体的免疫原性较低。

[0239] 本文使用的术语“罕见的”表示在代表性的序列样本中,在低于大约 20%、优选地低于大约 10%、更优选地低于大约 5%、甚至更优选地低于大约 3%、甚至更优选地低于大约 2%、甚至更优选地低于大约 1% 的序列中在该位置处出现该氨基酸,本文使用的术语“常见的”表示在代表性样品中,在超过大约 25%、通常超过大约 50% 的序列中出现该氨基酸。例如,所有轻链和重链可变区序列分别分组为序列“亚组”,它们彼此特别同源,并且在某些关键位置处具有相同的氨基酸(Kabat 等,同上)。当确定抗体序列中的氨基酸在序列之间是“罕见的”还是“常见的”时,通常优选地只考虑那些与所述抗体序列属于相同亚组的序列。

[0240] 通常,抗体的构架区与它们所来源的人种系序列的构架区基本上相同,更通常的是相同。当然,构架区中的许多氨基酸对抗体的特异性或亲和力没有直接贡献或只有很小的贡献。因此,构架残基的许多保守置换可以耐受,而不会明显地改变得到的免疫球蛋白的特异性或亲和力。因此,在一个实施方案中,抗体的可变构架区与人种系可变构架区序列或这些序列的共有序列具有至少 85% 的序列同一性。在另一个实施方案中,抗体的可变构架区与人种系可变构架区序列或这些序列的共有序列具有至少 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性。

[0241] 除了简单结合 DEC-205 以外,可以根据本发明抗体的其它功能特性的保留来选择抗体,例如:

[0242] (a) 根据表面等离子体共振测定,以至少 10^8M^{-1} 的亲合常数结合人 DEC-205;

[0243] (b) 在结合表达 DEC-205 的人树突细胞后内化;

[0244] (c) 定位于树突细胞的抗原加工区室;

[0245] (d) 激活表达 DEC-205 的人树突细胞;

[0246] (e) 与非人灵长类动物或其它物种的树突细胞上的 DEC-205 交叉反应;

[0247] (f) 产生或增强由 MHC I 类和 II 类途径两者介导的人 T 细胞应答,优选 T 细胞应答;

[0248] (g) 产生或增强人 CD4⁺、CD8⁺ 或 NKT 细胞应答;和

[0249] (h) 诱导周围 CD8⁺T 细胞耐受性。

[0250] 抗 DEC-205 单克隆抗体的表征

[0251] 可以利用多种已知的技术表征本发明的单克隆抗体与 DEC-205 的结合。通常,最初通过 ELISA 表征抗体。简要地说,微量滴定板可以用 PBS 中的纯化的 DEC-205 包被,然后用 PBS 稀释的无关蛋白质如牛血清清蛋白(BSA)封闭。将来自 DEC-205 免疫的小鼠的血浆

稀释液加至各孔中,并在 37℃ 下温育 1-2 小时。用 PBS/Tween 20 洗板,然后与偶联至碱性磷酸酶的山羊-抗-人 IgG Fc 特异性多克隆试剂于 37℃ 温育 1 小时。洗涤后,用 ABTS 底物使板显色,并在 OD 405 处分析。优选地,形成最高效价的小鼠用于融合。

[0252] 如上所述的 ELISA 测定可以用来筛选抗体,并因此筛选可产生显示与 DEC-205 免疫原具有阳性反应性的抗体的杂交瘤。然后可以将优选地以高亲和力结合 DEC-205 的杂交瘤进行亚克隆并进一步表征。然后可以从每个杂交瘤选择一个保留亲本细胞反应性(根据 ELISA)的克隆,用于制备细胞库(cell bank),以及用于抗体纯化。

[0253] 为了纯化抗 DEC-205 抗体,选择的杂交瘤可以在摇瓶、2 升旋瓶或其它培养系统中生长。可以过滤并浓缩上清液,然后使用蛋白 A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) 进行亲和层析,以纯化该蛋白质。将缓冲液更换为 PBS 后,可以使用 1.43 的消光系数根据 OD₂₈₀ 或优选地通过浊度分析确定浓度。IgG 可以通过凝胶电泳和抗原特异性方法来检查。

[0254] 为了确定选择的抗 DEC-205 单克隆抗体是否结合独特表位,每种抗体可以用商购试剂(Pierce, Rockford, IL)生物素化。生物素化的 MAbs 的结合可以用链霉亲和素标记的探针来检测。为了确定纯化抗体的同种型,可以使用本领域公认的技术进行同种型 ELISA。例如,微量滴定板的孔可以用 10 μg/ml 抗 Ig 包被,4℃ 过夜。用 5% BSA 封闭后,培养板与 10 μg/ml 单克隆抗体或纯化的同种型对照在环境温度下反应 2 小时。孔然后可以与 IgG1 或其它同种型特异性偶联探针反应。如上所述使板显色并且进行分析。

[0255] 为了检测单克隆抗体与表达 DEC-205 的活细胞的结合,可以采用流式细胞术。简要说,表达膜结合 DEC-205 的细胞系和/或人 PBMC(在标准生长条件下生长)与在含有 0.1% BSA 和 0.01% NaN₃ 的 PBS 中的各种浓度的单克隆抗体于 4℃ 混合 1 小时。洗涤后,细胞与荧光素标记的抗 IgG 抗体在与第一抗体染色相同的条件下反应。样品可以通过 FACSscan 仪器进行分析,利用光散射和侧散射性质,以圈选单细胞,并确定标记的抗体的结合。(除了流式细胞分析以外或者代替它)可以采用使用荧光显微镜的替代分析。可以完全如上所述染色细胞,并进行荧光显微镜检查。该方法允许显示各细胞,但是根据抗原的密度,可能灵敏度降低。

[0256] 可以通过 Western 印迹法进一步检测抗 DEC-205 IgG 对于 DEC-205 抗原的反应性。简言之,可以制备来自表达 DEC-205 的细胞的细胞提取物,并且进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,将分离的抗原转移到硝酸纤维素膜上,用 20% 小鼠血清封闭,并用将要检测的单克隆抗体探查。IgG 结合可以使用抗 IgG 碱性磷酸酶来检测,并用 BCIP/NBT 底物片(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO)显色。

[0257] 分析各种抗 DEC-205 抗体的结合亲和力、交叉反应性和结合动力学的方法包括本领域中已知的标准分析,例如,使用 Biacore™ 2000 SPR 仪器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)的 Biacore™ 表面等离子体共振(SPR)分析,如本文中的实施例 2 所述。

[0258] II. 分子偶联物/免疫毒素

[0259] 本发明提供多种治疗性分子偶联物(例如,疫苗偶联物),其包括与结合 APC 上受体的抗体(例如,结合 DEC-205 的抗体)连接的抗原如肿瘤或病毒抗原。这允许将抗原靶向至 APC,如表达 DEC-205 的细胞(例如,树突细胞和 B 细胞),以增强加工、呈递及最终对抗原的免疫应答,例如 CTL 应答。这种偶联物的示意图示于图 8 中。在所示的实例中,抗原与基本上完整的抗 DEC-205 抗体的每一个重链的 CH3 域遗传融合。但是,应当理解,抗原

也可以连接到这种抗体或其片段的其它部分上,并且也可以使用其它形式的偶联如化学偶联,如下文进一步所述。

[0260] 用于本发明的合适的抗原包括,例如,希望发生针对它们的保护性或治疗性免疫应答的传染病抗原和肿瘤抗原,例如,肿瘤细胞表达的抗原或病原体生物或传染病抗原。例如,合适的抗原包括用于预防或治疗癌症的肿瘤相关抗原。肿瘤相关抗原的例子包括但不限于包含 β hCG、gp100 或 Pmel17、HER2/neu、WT1、间皮蛋白、CEA、gp100、MART1、TRP-2、melan-A、NY-ESO-1、NY-BR-1、NY-CO-58、MN(gp250)、独特型、MAGE-1、MAGE-3、MAGE-A3、酪氨酸酶、端粒酶、SSX2 和 MUC-1 抗原和生殖细胞来源的肿瘤抗原的序列的全部或部分的序列。肿瘤相关抗原也包括血型抗原,例如,Le^a、Le^b、LeX、LeY、H-2、B-1、B-2 抗原。此外,本发明的抗原-抗体构建体内也可以包含一种以上的抗原。例如,MAGE 抗原可以与其它抗原如黑色素 A、酪氨酸酶和 gp100 以及佐剂如 GM-CSF 或 IL-12 一起组合,并且连接至抗 APC 抗体上。

[0261] 其它合适的抗原包括用于预防或治疗病毒性疾病的病毒抗原。病毒抗原的例子包括但不限于 HIV-1 gag、HIV-1 env、HIV-1 nef、HBV(表面或核心抗原)、HPV、FAS、HSV-1、HSV-2、p17、ORF2 和 ORF3 抗原。细菌抗原的例子包括但不限于鼠弓形虫(*Toxoplasma gondii*)或苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)。本发明的抗体-细菌抗原偶联物可以用于治疗或预防多种细菌性疾病如炭疽、肉毒中毒、破伤风、衣原体、霍乱、白喉、莱姆病、梅毒和结核病。

[0262] 上述抗原的序列在本领域中是公知的。例如,MAGE-3 cDNA 序列的实例在 US 6,235,525(Ludwig Institute for Cancer Research)中提供;NY-ESO-1 核酸和蛋白质序列的实例在 US 5,804,381 和 US6,069,233(Ludwig Institute for Cancer Research)中提供;Melan-A 核酸和蛋白质序列的实例在 US 5,620,886 和 US 5,854,203(Ludwig Institute for Cancer Research)中提供;NY-BR-1 核酸和蛋白质序列的实例在 US 6,774,226 和 US 6,911,529(Ludwig Institute for Cancer Research)中提供;NY-CO-58 核酸和蛋白质序列的实例在 W002090986(Ludwig Institute for Cancer Research)中提供;HER-2/neu 蛋白的氨基酸序列的实例可从 **GENBANK®** 登录号 AAA58637 获得;人癌胚抗原-样 1(CEA-1)的核苷酸序列(mRNA)可从 **GENBANK®** 登录号 NM_020219 获得。

[0263] 可用于本发明药物组合物和方法中的 HPV 抗原可包括,例如,HPV-16 抗原、HPV-18 抗原、HPV-31 抗原、HPV-33 抗原和/或 HPV-35 抗原;合适地是 HPV-16 抗原和/或 HPV-18 抗原。HPV-16 的基因组在 Virology, 145:181-185(1985)中有描述,编码 HPV-18 的 DNA 序列在美国专利 No. 5,840,306 中有描述,其公开内容通过引用全文并入本文中。HPV-16 抗原(例如,HPV-16 的 E1 和/或 E2 蛋白的血清反应区)在美国专利 No. 6,531,127 中有描述,HPV-18 抗原(例如,HPV-18 的 L1 和/或 L2 蛋白的血清反应区)在美国专利 No. 5,840,306 中有描述,其公开内容通过引用全文并入本文中。类似地,HBV 的全基因组可从 **GENBANK®** 登录号 NC_003977 获得,其公开内容通过引用全文并入本文中。HCV 的基因组在欧洲专利申请 No. 318216 中有描述,其公开内容通过引用全文并入本文中。通过引用全文并入本文中的 PCT/US90/01348 公开了 HCV 基因组克隆的序列信息、HCV 病毒蛋白的氨基酸序列以及制备和使用这些组合物用于包含由其衍生的 HCV 蛋白和肽的 HCV 疫苗的方法。

[0264] 蛋白质的抗原性肽(即含有 T 细胞表位的那些)可以用本领域公知的多种方式确

认。例如，T 细胞表位可以通过利用基于 web 的预测性算法 (BIMAS & SYFPEITHI) 分析蛋白质的序列来预测，以产生潜在的 MHC I 类和 II 结合肽，它们匹配 10,000 个良好表征的以前用 CTL 定义的 MHC 结合肽的内部数据库。可以将高分的肽排序，并且基于对给定 MHC 分子的高亲和力和选择它们作为“感兴趣的”。

[0265] 另外一种确认含有 T 细胞表位的抗原性肽的方法是将蛋白质分为所需长度的非重叠肽或所需长度的重叠肽，它们可以通过重组、合成方法或在某些限制情况下通过化学切割蛋白质来产生，并检测其免疫原性，例如，引发 T 细胞应答（即，增殖或淋巴因子分泌）。

[0266] 为了通过例如精细作图技术确定蛋白质的精确的 T 细胞表位，通过 T 细胞生物学技术测定，具有 T 细胞刺激活性并因此包含至少一个 T 细胞表位的肽可以通过在该肽的氨基或羧基末端添加或删除氨基酸残基来进行修饰，并进行检测，以确定对修饰的肽的 T 细胞反应性的变化。如果通过 T 细胞生物学技术测定，发现在天然蛋白质序列中具有重叠区的两个或多个肽具有人 T 细胞刺激活性，可以产生包含这些肽的全部或一部分的另外的肽，并且可以通过类似的方法检测这些另外的肽。利用这一技术，重组或合成地选择和产生肽。肽的选择基于多种因素，包括对肽的 T 细胞应答的强度（例如，刺激指数）。然后可以检测这些选择的肽的物理和化学性质（例如，溶解性、稳定性），以确定这些肽是否适用于治疗组合物，或者这些肽是否需要修饰。

[0267] 另外，疫苗偶联物可以包含一种或多种也能增强针对抗原的免疫应答的免疫刺激剂。本发明的抗体-抗原疫苗偶联物可以通过遗传学或化学方法制备。在任一情况下，偶联物的抗体部分可以由完整抗体或该抗体的一部分组成，如 Fab 片段或单链 Fv。另外，偶联物中可以包含一种以上的抗原和 / 或免疫刺激剂。

[0268] 化学构建的抗体-抗原偶联物可以使用多种众所周知的并且易于使用的交联试剂制备。这些交联试剂可以是同功能的或异功能的化合物，如 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯 (SPDP)、N-琥珀酰亚氨基-S-乙酰-硫代乙酸酯 (SATA)、4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己基-1-羧酸磺基琥珀酰亚氨基酯（磺基-SMCC）、5,5'-联硫基双(2-硝基苯甲酸) (DTNB)，它们与抗树突细胞抗体和选择的抗原上的不同的反应性氨基酸或碳水化合物侧链形成共价键。也可以使用其它偶联剂和交联剂产生共价键，如蛋白 A、碳二亚胺和邻亚苯基二马来酰亚胺 (oPDM)；(参见，例如，Karpovsky 等 (1984) J. Exp. Med. 160 :1686；Liu, MA 等 (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :8648)。其他方法包括 Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132)；Brennan 等 (Science (1985) 229 :81-83)，和 Glennie 等 (J. Immunol. (1987) 139 :2367-2375) 所描述的方法。优选的偶联剂为 SATA 和硫代-SMCC，两者均可从 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) 获得。也可以使用上述相同的连接方法将免疫刺激剂与本发明的分子偶联物化学连接。

[0269] 在另一个实施方案中，本发明的抗体与治疗性部分如细胞毒素、药物或放射性同位素连接。当与细胞毒素偶联时，这些抗体偶联物被称作“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒剂包括对细胞有害（例如杀伤细胞）的任何试剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙啶、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、阿霉素、柔红霉素、二羟基蒽醌 (dihydroxy anthracindione)、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素 D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素和它们的类似物或同系物。治疗剂包括但不限于，抗代谢物（例如，氨甲喋呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤

呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、氨烯咪胺 (decarbazine)), 烷化剂 (例如, 氮芥、噻替派、苯丁酸氮芥 (thioepachlorambucil)、美法仑、卡莫司汀 (BSNU) 和洛莫司汀 (CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露糖醇、链唑霉素、丝裂霉素 C 和顺-二氯二胺合铂 (II) (DDP) 顺铂), 蒽环类抗生素 (例如, 柔红菌素 (以前称为道诺霉素) 和阿霉素), 抗生素类 (例如, 放线菌素 D (以前称为放线菌素)、博来霉素、光辉霉素和安曲霉素 (AMC)), 抗有丝分裂剂 (例如, 长春新碱和长春碱)。本发明的抗体可以与放射性同位素例如放射性碘偶联, 以产生细胞毒性放射性药物, 用于治疗树突细胞相关的疾病, 如自身免疫病或炎症性疾病, 或移植物抗宿主病。

[0270] 本发明的抗体偶联物可以用来改变特定的生物学反应, 且药物部分不应理解为局限于经典的化疗剂。例如, 药物部分可以是具有需要的生物活性的蛋白质或多肽。这样的蛋白质包括, 例如, 具有酶活性的毒素或其活性片段, 如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素或白喉毒素; 蛋白质, 如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ; 或生物反应调节物, 如淋巴因子、白介素-1 (“IL-1”)、白介素-2 (“IL-2”)、白介素-6 (“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子 (“G-CSF”) 或其他生长因子。

[0271] 将这种治疗性部分与抗体偶联的技术是众所周知的, 参见, 例如, Arnon 等, “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld 等 (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等, “Antibodies For Drug Delivery”, in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson 等 (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, in *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, Pinchera 等 (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibodies In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin 等 (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 和 Thorpe 等, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)。

[0272] 在另一个实施方案中, 本发明的抗体可以用来将完整细胞例如肿瘤细胞、效应细胞或微生物病原体直接靶向至树突细胞。例如, 抗 DEC-205 抗体可以在细胞表面直接表达, 例如, 通过用含有编码本发明抗体的核酸序列的载体转染或转导细胞。这可以通过例如用编码含有跨膜域和抗树突细胞抗体或其抗原结合片段的融合蛋白的核酸转染靶细胞来完成。产生这种核酸、融合蛋白和表达这种融合蛋白的细胞的方法例如在美国专利申请 No: 09/203, 958 中有描述, 在此通过引用并入本文。或者, 利用化学连接体、脂质标签或其它相关方法, 抗树突细胞抗体或其抗原结合片段可以结合到细胞或病原体上 (deKruif, J. 等 (2000) *Nat. Med.* 6:223-227; Nizard, P. 等 (1998) *FEBS Lett.* 433:83-88)。表面锚定有抗 DEC-205 抗体的细胞可以用来诱导针对细胞例如肿瘤细胞或微生物病原体的特异性免疫应答。

[0273] III. 药物组合物

[0274] 在另一个实施方案中, 本发明提供一种组合物, 例如药物组合物, 其含有与药学上可接受的载体配制在一起的一种或组合的本发明的单克隆抗体。也提供了含有包含本发明的抗体的双特异性分子或分子偶联物的组合物。在一个实施方案中, 组合物包括多种 (例

如两种或多种)本发明的分离的抗体的组合。优选地,组合物中的每种抗体结合 DEC-205 的不同的、预先选择的表位。

[0275] 本发明的药物组合物也可以在联合治疗中施用,即与其他药剂联用。例如,联合治疗可包括本发明的组合物联合至少一种或多种另外的治疗剂,如抗炎剂、DMARD(疾病改善抗风湿药)、免疫抑制剂和化疗剂。本发明的药物组合物也可以与放射疗法一起施用。与其它抗体如 CD4 特异性抗体或 IL-2 特异性抗体的共施用也包括在本发明中。这种与 CD4 特异性抗体或 IL-2 特异性抗体的组合被认为在治疗自身免疫病和移植排斥方面特别有用。与针对 CTLA4、CD40 等的抗体的组合在癌症和传染病的治疗中特别有用。

[0276] 在另一个实施方案中,被 APC 快速内化的疫苗偶联物可以与增强树突细胞的抗原呈递细胞活性(例如,免疫刺激性细胞因子的释放)的单克隆抗体组合。

[0277] 本文所用的“药学上可接受的载体”包括任何和所有生理上兼容的溶剂、分散介质、包衣料、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地,载体适用于静脉内、肌肉内、皮下、胃肠外、脊髓或表皮给药(如通过注射或输注)。取决于给药途径,活性化合物(即抗体、双特异性和多特异性分子)可包被以某种材料,以保护所述化合物免受可能使其失去活性的酸和其它自然条件的作用。

[0278] 可以与本发明的抗体和构建体一起使用的佐剂的例子包括:弗氏不完全佐剂和完全佐剂(Difco Laboratories, Detroit, Mich.);Merck Adjuvant 65(Merck and Company, Inc., Rahway, N. J.);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液;酰化糖;阳离子或阴离子衍生的多糖;聚磷腈;生物可降解的微球;细胞因子,如 GM-CSF、白介素-2、-7、-12 和其它类似因子;3D-MPL;CpG 寡核苷酸;和单磷酸脂质 A,例如 3-脱-O-酰化单磷酸脂质 A。

[0279] MPL 佐剂可从 Corixa Corporation(Seattle, Wash;参见,例如,美国专利 No. 4,436,727;4,877,611;4,866,034 和 4,912,094)获得。含有 CpG 的寡核苷酸(其中 CpG 二核苷酸未甲基化)是公知的,并且在例如 WO 96/02555, WO 99/33488 和美国专利 No. 6,008,200 和 5,856,462 中有描述。也描述了免疫刺激性 DNA 序列,例如, Sato 等, Science 273:352, 1996。

[0280] 其它替代佐剂包括,例如,皂草苷,如 Quil A 或其衍生物,包括 QS21 和 QS7(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, Mass.);七叶素;洋地黄皂苷;或石头花属(Gypsophila)或奎奴亚藜(Chenopodium quinoa)皂草苷;Montanide ISA 720(Seppic, France);SAF(Chiron, California, United States);ISCOMS(CSL), MF-59(Chiron);SBAS 系列佐剂(例如, SBAS-2 或 SBAS-4,可获自 SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium);Detox(Enhancyn™)(Corixa, Hamilton, Mont.);RC-529(Corixa, Hamilton, Mont.)和其它氨基烷基氨基葡萄糖苷 4-磷酸酯(AGP);聚氧乙烯醚佐剂,如 WO 99/52549A1 中所述的那些;合成咪唑并咪唑,如咪唑莫特[S-26308, R-837],(Harrison,等, Vaccine 19:1820-1826, 2001;和瑞唑莫德[S-28463, R-848](Vasilakos,等, Cellular Immunology 204:64-74, 2000;在抗原呈递细胞和 T 细胞表面组成型表达的羧基和胺的席夫碱,如妥卡雷琐(Rhodes, J. 等, Nature 377:71-75, 1995);作为蛋白质或肽的细胞因子、趋化因子和共刺激分子,包括例如促炎细胞因子,如干扰素、GM-CSF、IL-1 α 、IL-1 β 、TGF- α 和 TGF- β , Th1 诱导物,如干扰素 γ 、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18 和 IL-21, Th2 诱导物,如 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和

IL-13,和其它趋化因子和共刺激基因,如 MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、TCA-3、CD80、CD86 和 CD40L;免疫刺激剂靶向配体,如 CTLA-4 和 L-选择素,凋亡刺激蛋白和肽,如 Fas;基于合成脂质的佐剂,如 vaxfectin, (Reyes 等, Vaccine 19 :3778-3786, 2001)、鲨烯、 α -生育酚、聚山梨醇酯 80、DOPC 和胆固醇;内毒素, [LPS], (Beutler, B., Current Opinion in Microbiology 3 :23-30, 2000);引发 Toll 受体产生 Th1- 诱导细胞因子的配体,如合成分枝杆菌脂蛋白,分枝杆菌脂蛋白 p19、肽聚糖、磷壁酸和脂质 A;和 CT(霍乱毒素,亚单位 A 和 B) 和 LT(来自大肠杆菌的不耐热肠毒素,亚单位 A 和 B),热休克蛋白家族 (HSP) 和 LLO(单核细胞增多性李斯特菌素 O;WO 01/72329)。这些和各种其它 Toll- 样受体 (TLR) 激动剂例如在 Kanzler 等, Nature Medicine, May 2007, Vol 13, No 5 中有描述。

[0281] “药学上可接受的盐”是指保持了亲代化合物的所需生物活性而不引起任何不期望的毒理学作用的盐(参见如 Berge, S. M. 等 (1977) J. Pharm. Sci. 66 :1-19)。这样的盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括那些由诸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等无毒性无机酸衍生的盐,以及由诸如脂族单羧酸和脂族二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳族酸、脂族和芳族磺酸等无毒性有机酸衍生的盐。碱加成盐包括那些由诸如钠、钾、镁、钙等碱土金属衍生的盐,以及由诸如 N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等无毒性有机胺衍生的盐。

[0282] 本发明的组合物可以利用本领域公知的多种方法给药。本领域技术人员应当理解,给药途径和/或方式根据期望的结果而不同。活性化合物可以与保护该化合物不被快速释放的载体一起制备,例如控释制剂,包括植入物、透皮贴剂和微胶囊化递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞类、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这样的制剂的很多方法受专利保护或者通常为本领域技术人员所公知。参见,例如, Sustained and controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0283] 为通过某些给药途径施用本发明化合物,可能有必要使所述化合物包被以某种材料,或使所述化合物与某种材料一起给药,以防止其失去活性。例如,所述化合物可在适当的载体如脂质体或稀释剂中给予患者。药学上可接受的稀释剂包括盐水和含水缓冲溶液。脂质体包括水包油包水型 CGF 乳液以及常规脂质体 (Strejan 等 (1984) J. Neuroimmunol. 7 : 27)。

[0284] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌注射液或分散液的无菌粉末剂。这些用于药学活性物质的介质和试剂的使用是本领域公知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,涉及其在本发明的药物组合物中的应用。还可以向组合物中掺入补充的活性化合物。

[0285] 治疗性组合物一般必须是无菌的并且在制备和贮存条件下稳定的。可以将组合物配制成溶液、微乳状液、脂质体或其他适合高药物浓度的有序结构。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。例如,通过使用诸如卵磷脂等包被材料,在分散液的情况下通过保持所需的颗粒大小,以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。在很多情况下,组合物中优选包含等渗剂,例如,糖、多元醇例如甘露糖醇、山梨糖醇,或氧化钠。通过在组合物中加入延迟吸收剂,例如单硬脂酸盐和明胶,可实现注射型药物的延长的吸收。

[0286] 通过将活性化合物以需要的量混入合适的溶剂中,并且根据需要加入以上列举的成分中的一种或其组合,接着无菌微过滤,可制备无菌注射液。通常,通过将活性化合物掺入到含有基本分散介质和上面所列其他所需成分的无菌载体中制备分散剂。对于用于制备无菌注射液的无菌粉末剂,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),该方法由其预先无菌过滤的溶液得到活性成分加任何额外所需成分的粉末。

[0287] 调节剂量方案,以提供最佳的所需反应(例如,治疗反应)。例如,可以给予单次团注(single bolus),可以随时间施用几个分开的剂量,或者根据治疗状况的紧急情况所需,可以按比例减小或增加剂量。例如,本发明的抗体可以通过皮下注射每周施用一次或两次,或者通过皮下注射每月施用一次或两次。

[0288] 特别有利的是将肠胃外组合物配制成容易给药并且剂量均匀的剂量单位形式。此处使用的剂量单位形式是指适合作为剂量单位用于所治疗的受试者的物理不连续单位;每个单位含有预定量的活性化合物,经计算该预定量的活性化合物与需要的药物载体组合产生所需的治疗效果。对本发明剂量单位形式的具体说明限定于且直接依赖于(a)活性化合物的独特特性和要达到的特定治疗效果,和(b)本领域中固有的对于配制这种用于治疗个体敏感性的活性化合物的限制。

[0289] 药学上可接受的抗氧化剂的例子包括:(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如棕榈酸抗坏血酸酯、丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0290] 对于治疗性组合物,本发明制剂包括适于经口给药、鼻内给药、局部给药(包括口腔和舌下给药)、直肠给药、阴道给药和/或胃肠外给药的那些剂型。所述制剂可方便地以单位剂型的形式提供,且可通过药物技术领域公知的任何方法制备。能与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量根据待治疗的受试者和特定给药方式而变化。能与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常为产生治疗效果的组分量。通常,以总共百分之百计,这个量为约0.001%至约99%活性成分,优选约0.005%至约70%,最优选约0.01%至约30%。

[0291] 适于通过阴道给药的本发明制剂也包括阴道栓剂、卫生栓、霜剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾剂,它们含有如本领域公知的适当的载体。用于本发明组合物的局部给药或透皮给药的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。活性化合物可在无菌条件下与药学上可接受的载体混合,需要时也可与任何防腐剂、缓冲剂或抛射剂混合。

[0292] 本文所用的短语“肠胃外给药”是指不同于肠和局部给药的给药模式,通常是通过注射,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0293] 可用于本发明的药物组合物中的适当的水性或非水性载体的例子包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等),及其适当的混合物,植物油如橄榄油,和注射用有机酯如油酸乙酯。例如通过应用包被材料如卵磷脂,在分散液的情况下通过维持所需的颗粒大小,和通过应用表面活性剂,可维持适当的流动性。

[0294] 这些组合物也可含有佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可以通过上述的

灭菌程序或通过包含各种抗细菌和抗真菌剂如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚山梨酸等来确保防止存在微生物。也可能需要在组合物中包含等渗剂,例如,糖、氯化钠等。另外,通过包含延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可实现注射型药物的延长的吸收。

[0295] 当本发明化合物作为药物给予人和动物时,可单独给予和作为药用组合物给予,该组合物中包含例如 0.001-90% (更优选 0.005-70%,如 0.01-30%) 的活性成分及与其组合的药理学上可接受的载体。

[0296] 不管所选择的给药方式如何,本发明的化合物(可以适当的水合形式使用)和/或本发明的药用组合物可通过本领域技术人员公知的常规方法配制成药学上可接受的剂型。

[0297] 本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可能变化,以获得可有效实现对特定患者、组合物和给药方式的所需治疗反应,而对患者无毒性的活性成分的量。选择的剂量水平取决于多种药物代谢动力学因素,包括应用的本发明特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、给药途径、给药时间、所应用的特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与应用的特定组合物联合应用的其他药物、化合物和/或材料,接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康情况和病史、以及医学领域中公知的其它因素。在本领域具有普通技术水平的医师或兽医可容易地确定和开出所需的药用组合物的有效量。例如,医师或兽医开始开出的药物组合物中使用的本发明化合物的剂量水平低于为达到希望的治疗效果所需要的剂量水平,然后逐渐增加剂量,直至达到所希望的效果。通常,合适的本发明组合物的日剂量为有效产生治疗效果的最低剂量的化合物的量。这个有效剂量通常取决于上述因素。优选给药方式为静脉、肌内、腹膜内或皮下给药,优选在最接近目标部位处给药。如需要,治疗性组合物的有效日剂量可以两个、三个、四个、五个、六个或更多分剂量的形式在一天中以合适的间隔分开给药,且任选地以单位剂型给药。虽然本发明化合物有可能单独给药,但优选将所述化合物作为药用制剂(组合物)来给药。

[0298] 治疗性组合物可应用本领域公知的医疗装置给药。例如,在一个优选实施方案中,本发明的治疗组合物可用无针皮下注射装置给药,如在美国专利 No. 5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824 或 4,596,556 中公开的装置。可用于本发明的公知的植入物和模块的例子包括:美国专利 No. 4,487,603,该专利公开了用于以受控速率分散药物的可植入式微量输注泵;美国专利 No. 4,486,194,该专利公开了用于通过皮肤给药的治疗装置;美国专利 No. 4,447,233,该专利公开了用于以精确的输注速率递送药物的医用输注泵;美国专利 No. 4,447,224,该专利公开了用于连续递送药物的变流可植入式输注装置;美国专利 No. 4,439,196,该专利公开了具有多腔室的渗透药物递送系统;和美国专利 No. 4,475,196,该专利公开了一种渗透药物递送系统。本领域技术人员知道许多其他这样的植入物、递送系统和模块。

[0299] 在某些实施方案中,可以配制本发明的抗体以确保在体内的正确分布。例如,血-脑屏障(BBB)阻止了许多高度亲水性的化合物。为了确保本发明的治疗性化合物能够穿过BBB(如果需要时),可将它们配制在如脂质体中。至于制备脂质体的方法,参见,例如,美国专利 4,522,811;5,374,548;和 5,399,331。脂质体可以包含可被选择性地转运入特定细胞或器官内的一个或多个部分,从而增强定向药物递送(参见,例如,V. V. Ranade(1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685)。定向部分的例子包括叶酸或

生物素（参见，例如，Low 等人的美国专利 5,416,016）；甘露糖苷（Umezawa 等（1988）*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038）；抗体（P. G. Bloeman 等（1995）*FEBS Lett.* 357:140；M. Owais 等（1995）*Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180）；表面活性剂蛋白 A 受体（Briscoe 等（1995）*Am. J. Physiol.* 1233:134），其不同种类可包括本发明的制剂以及本发明的分子组分；p120（Schreier 等（1994）*J. Biol. Chem.* 269:9090）；也参见 K. Keinänen；M. L. Laukkanen（1994）*FEBS Lett.* 346:123；J. J. Killian；I. J. Fidler（1994）*Immunomethods* 4:273。在本发明的一个实施方案中，本发明的治疗性化合物配制于脂质体中；在更优选的实施方案中，所述脂质体包括定向部分。在最优的实施方案中，脂质体中的治疗性化合物通过团注递送到最接近肿瘤或感染的部位。组合物的流动性必须达到易于注射的程度。它在生产和储藏的条件下必须稳定，并且必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用。

[0300] 化合物抑制癌症的能力可以在预测对于人肿瘤的有效性的动物模型系统中评价。或者，组合物的这种特性可以通过利用熟练技术人员已知的分析检查该化合物抑制如体外抑制的能力进行评价。治疗有效量的治疗性化合物可以减少肿瘤大小，或者以其它方式缓解受试者的症状。本领域普通技术人员能够根据以下因素来确定所述化合物的量，如受试者的体型、受试者症状的严重程度以及选择的特定组合物或给药途径。

[0301] 也可以根据本领域公知的方法评价抗体增强抗原呈递或诱导针对多种靶细胞或病原体的细胞毒性 T 细胞（CTL）应答的能力。

[0302] 组合物必须是无菌的，其流动性必须达到能使组合物可通过注射器递药的程度。除水之外，载体可为等渗缓冲盐水溶液、乙醇、多元醇（如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等）及其合适的混合物。例如，通过使用如卵磷脂的包衣，在分散液情况下通过维持需要的颗粒大小，和通过使用表面活性剂，能够维持适当的流动性。在许多情况下，优选地在组合物中包括等渗剂，如糖类、多元醇如甘露糖醇或山梨糖醇，以及氯化钠。可通过在组合物中加入能延迟吸收的试剂，如单硬脂酸铝或明胶，来实现注射用组合物的长期吸收。

[0303] 当活性化合物如上所述被适当地保护时，它可经口给药，例如与惰性稀释剂或可同化的食用载体一起给药。

[0304] IV. 本发明的应用和方法

[0305] 在一个实施方案中，本发明的抗体、双特异性分子和分子偶联物可以用来治疗和/或预防（例如，针对其进行免疫）多种疾病和病症。

[0306] 可以用本发明的抗体治疗的一种主要的疾病适应症是癌症。包括但不限于结肠癌、黑素瘤、淋巴瘤、前列腺癌、胰腺癌、膀胱癌、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、肥大细胞瘤、乳房腺癌、白血病或类风湿性成纤维细胞瘤（fibroblastsoma）。另一种主要的疾病适应症是传染性疾病，包括但不限于 HIV、肝炎（例如甲、乙、丙型肝炎）、流感、疱疹、贾第虫病、疟疾、利什曼原虫病、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus Aureus*）、绿脓假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）。另一种主要的疾病适应症包括自身免疫病。

[0307] 为了用于治疗，本发明的疫苗偶联物可以单独或与免疫刺激剂一起直接施用于受试者（即，在体内）。在一个方面，免疫刺激剂与偶联物连接。或者，偶联物可以间接施用于受试者，这是通过首先使偶联物与 APC 如树突细胞接触（例如，通过培养或温育），然后将该细胞施用给受试者（即来自体内）。偶联物向 APC 的接触和递送，使得它们在施用前被

APC 加工和呈递,也被称为抗原或细胞“加载”。向 APC 加载抗原的技术在本领域中公知,包括,例如, Gunzer 和 Grabbe, Crit Rev Immunol 21(1-3):133-45(2001),和 Steinman, Exp Hematol 24(8):859-62(1996)。

[0308] 在所有情况中,疫苗偶联物和免疫刺激剂以有效量施用,以发挥它们的理想的治疗效果。术语“有效量”是指实现希望的生物学效应所所需的或足以实现该效应的量。例如,有效量可以是消除肿瘤、癌症或细菌、病毒或真菌感染所必需的量。用于任何特定用途的有效量可以根据如下因素而变化,如所治疗的疾病或病症、施用的具体偶联物、受试者的大小、或疾病或病症的严重程度。本领域普通技术人员可以根据经验确定特定多特异性分子的有效量,而无需过多的实验。

[0309] 疫苗偶联物的优选施用途径包括,例如,注射(例如,皮下、静脉内、肠胃外、腹膜内、鞘内)。注射可以是团注或连续输注。其它施用途径包括口服。

[0310] 本发明的疫苗偶联物也可以与佐剂和其它治疗剂共施用。应当理解,本文使用的术语“共施用”包括本发明的抗体和偶联物与佐剂和其它药物同时、分开或顺序施用的任何一种或全部,包括作为给药方案的一部分施用。偶联物一般配制在单独的或与这些药物组合的药学可接受的载体中。这些载体的例子包括溶液、溶剂、分散介质、延迟剂、乳剂等。这些介质用于药物活性物质的应用是本领域公知的。适用于分子的任何其它常规载体落入本发明的范围内。

[0311] 适合与疫苗偶联物共施用的药物包括其它抗体、细胞毒素和/或药物。在一个实施方案中,该药物是已知有助于或诱导免疫应答的抗 CTLA-4 抗体。在另一个实施方案中,该药物是化疗剂。疫苗偶联物也可以与放射一起施用。

[0312] 适于在肿瘤治疗中与本发明的抗体和偶联物共施用的化疗剂包括,例如:紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙啶、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、阿霉素、柔红霉素、二羟基蒽醌、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素 D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素和它们的类似物或同系物。其它治疗剂包括,例如,抗代谢物(例如,氨甲喋呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、氮烯咪胺(decarbazine)),烷化剂(例如,氮芥、噻替派、苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露糖醇、链唑霉素、丝裂霉素 C 和顺-二氯二胺合铂(II)(DDP)顺铂),蒽环类抗生素(例如,柔红菌素(以前称为道诺霉素)和阿霉素),抗生素类(例如,放线菌素 D(以前称为放线菌素)、博来霉素、光辉霉素和安曲霉素(AMC)),和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)和替莫唑胺。

[0313] 可消除或抑制例如免疫细胞(例如调节性 T 细胞、NKT 细胞、巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、未成熟的或抑制性树突细胞)或在肿瘤局部微环境中由肿瘤或宿主细胞产生的抑制性因子(例如, TGF β 、吡啶胺 2,3 双加氧酶-IDO)的免疫抑制活性的药物,也可以与本发明的抗体和偶联物一起施用。这些药物包括抗体和小分子药物,如 IDO 抑制剂,如 1 甲基色氨酸或衍生物。

[0314] 在另一个实施方案中,本发明的抗体可以用来治疗患有自身免疫病、免疫系统疾病或炎性疾病的患者,该疾病例如是以与树突细胞的免疫调节有关的异常或不希望的免疫活性为特征的疾病。可能受益于本发明的抗树突细胞治疗的自身免疫、免疫系统和炎性疾

病包括类风湿性关节炎、多发性硬化、免疫介导的或 1 型糖尿病、重症肌无力、恶性贫血、阿狄森病、干燥综合征、银屑病、红斑狼疮、炎性肠病如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎、硬皮病 / 雷诺氏综合征、莱特尔综合征和自身免疫性甲状腺病如桥本甲状腺炎和格雷夫斯病。例如，患有自身免疫病的患者可以受益于树突细胞介导的自身抗原呈递的抑制。

[0315] 本发明的抗体也可以用于预防和治疗所有形式的变态反应和变应性疾病，包括但不限于：眼科变应性疾病，包括变应性结膜炎、春季结膜炎、春季角结膜炎和巨乳头状结膜炎；鼻变应性疾病，包括变应性鼻炎和鼻窦炎；耳变应性疾病，包括咽鼓管搔痒，上呼吸道和下呼吸道的变应性疾病，包括内源性和外源性哮喘；皮肤的变应性疾病，包括皮炎、湿疹和风疹；和胃肠道的变应性疾病。

[0316] 与本发明的抗体共施用的用于治疗这类免疫疾病的合适的药物包括，例如，免疫抑制剂，如雷帕霉素、环孢菌素和 FK506；抗 TNF α 剂，如依那西普、阿达木单抗和英夫利昔单抗；和甾类。具体的天然和合成甾类的例子包括，例如：醛固酮、倍氯米松、倍他米松、布地奈德、氯泼尼醇、可的松、可的伐唑、脱氧皮质酮、地奈德、去羟米松、地塞米松、二氟可龙 (difluorocortolone)、氟氯缩松、氟米松、氟尼缩松、肤轻松、醋酸氟轻松、氟考丁酯、氟可的松、氟可龙 (fluorocortolone)、氟米龙、氟氢缩松、氟替卡松、氯氟舒松、氢化可的松、icometasone、甲泼尼松、甲泼尼龙、帕拉米松、泼尼松龙、泼尼松、替可的松和曲安西龙。

[0317] 可用本发明的人抗 DEC-205 抗体治疗的其它疾病的实例包括移植排斥和移植物抗宿主病。

[0318] 移植排斥

[0319] 近年来，在用于移植组织和器官，如皮肤、肾脏、肝脏、心脏、肺、脾脏和骨髓的手术技术的效果方面有相当大的进步。还没有解决的主要问题也许是缺少令人满意的用于在移植接受者中诱导对所移植的同种异体移植物或器官的免疫耐受性的药物。当同种异体细胞或器官移植到宿主（即供体和受体为同物种的不同个体）时，宿主免疫细胞很可能发起针对移植物中的外来抗原的免疫应答（宿主抗移植物病），导致移植的组织被破坏。CD8⁺ 细胞、CD4⁺ 细胞和单核细胞都参与对移植的组织的排斥。本发明的抗体可用于抑制受体中树突细胞介导的、同种抗原诱导的免疫应答，从而防止这些细胞参与对移植的组织或器官的破坏。

[0320] 移植物抗宿主病

[0321] 本发明的抗体的一个相关用途是调节参与“移植物抗宿主病”(GVHD) 的免疫应答。GVHD 是一种潜在的致命疾病，在具有免疫能力的细胞被转移到同种异体接受者时会发生该疾病。在这种情况下，供体中具有免疫能力的细胞会攻击接受者中的组织。皮肤、内脏上皮和肝脏中的组织是常见的攻击目标，它们在 GVHD 发病过程中会被破坏。当移植免疫组织时，如骨髓移植时，该疾病会造成特别严重的问题；但在其它情况下（包括心脏和肝脏移植物情况）也报道了较不严重的 GVHD。本发明治疗剂可用于抑制宿主抗原呈递细胞如树突细胞的活性。

[0322] 本发明进一步用以下实施例进行说明，这些实施例不能理解为是对本发明的进一步限制。在本申请中引用的序列表、附图和所有引用文献、专利和出版的专利申请的内容通过引用专门结合到本文中。

实施例

[0323] 实施例 1

[0324] DEC-205 特异性人单克隆抗体 (HuMab) 的产生

[0325] 通过用可溶性人 DEC-205 抗原免疫 **HuMab®** 转基因小鼠 (“HuMab”是 Medarex, Inc., Princeton, New Jersey 的商标) HC2/KCo7 株产生人抗 DEC-205 单克隆抗体。HC2/KCo7HuMab 小鼠如美国专利 5,770,429 和 5,545,806 所述产生,其全部公开内容通过参考并入本文。

[0326] 抗原和免疫:抗原是包含与抗体 Fc 域融合的 DEC-205 胞外域(包含全部 10 个凝集素结合域)的可溶性融合蛋白。人 DEC-205 的核酸和氨基酸序列在 PCT 专利公布 WO 96023882(Steinman) 中提供。抗原与完全弗氏佐剂 (Sigma) 混合用于第一次免疫。之后,抗原与不完全弗氏佐剂 (Sigma) 混合。另外的小鼠用 RIBI MPL+TDM 佐剂系统 (Sigma) 中的可溶性 DEC-205 蛋白免疫。溶于 PBS 的 5-25 微克可溶性重组 DEC-205 抗原或 PBS 中的为了表面表达人 DEC-205 而转染的 5×10^6 CHO 细胞与佐剂 1:1 混合。每 14 天向小鼠的腹腔注射 100 微升制备的抗原。融合前 3-4 天给产生抗 DEC-205 滴度的动物静脉注射 10 微克可溶性重组 DEC-205 抗原。取小鼠脾脏,分离的脾细胞用于杂交瘤制备。

[0327] 杂交瘤制备:P3x63Ag8.653 鼠骨髓瘤细胞系(ATCC CRL 1580)用于融合。含有 10% FBS 的 RPMI 1640 (Invitrogen) 用于培养该骨髓瘤细胞。向杂交瘤生长培养基中添加另外的培养基补充物,包括:3% Origen- 杂交瘤克隆因子 (Igen), 10% FBS (Sigma), L- 谷氨酰胺 (Gibco) 0.1% 庆大霉素 (Gibco), 2- 巯基乙醇 (Gibco), HAT (Sigma; 1.0×10^{-4} M 次黄嘌呤, 4.0×10^{-7} M 氨基蝶呤, 1.6×10^{-5} M 胸苷) 或 HT (Sigma; 1.0×10^{-4} M 次黄嘌呤, 1.6×10^{-5} M 胸苷) 培养基。

[0328] 脾细胞与 653 骨髓瘤细胞以 6:1 的比例混合,并离心沉淀。逐滴添加聚乙二醇,同时小心混合以促进融合。让杂交瘤生长 1-2 周,直到形成可见的集落。收集上清液,并利用人 κ 链特异性捕获和人 Fc 特异性检测通过 ELISA 用于初始筛选人 IgG。然后通过流式细胞术或使用 DEC-205 ELISA 测定 IgG 阳性上清液的 DEC-205 特异性。

[0329] 亚克隆并扩增产生特异性 HuMab IgG 的杂交瘤。然后按照标准条件通过蛋白 A 柱层析纯化产生的 HuMab,这导致分离出许多特别感兴趣的抗体。

[0330] 实施例 2

[0331] 通过表面等离子体共振 (SPR) 测定 HuMab 的亲力和速率常数

[0332] 使用 Biacore™ 2000 SPR 仪器 (Biacore AB, Uppsala, Sweden), 按照厂商指导,通过 Biacore™ 表面等离子体共振 (SPR) 分析检查来自实施例 1 的各种人抗 DEC-205 抗体的结合亲和力和结合动力学。

[0333] 使用 Biacore 提供的胺偶联试剂盒,按照厂商指导 (BIAcore Product No. BR-1000-50, 包括偶联试剂 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC)), 使用标准胺偶联化学,将纯化的重组人 DEC-205 融合 (或对照) 蛋白共价连接到 Biacore™ CM5 传感器芯片上 (共价连接到金表面上的羧甲基化的葡聚糖; Biacore Product No. BR-1000-14)。将低水平的配体固定,以限制分析物的质量转运对动力学参数的任何影响,使得观测的 R_{MAX} 为 200RU 等级。

[0334] 通过使抗体以 1.25-200nM 的浓度和 $35 \mu\text{L}/\text{分钟}$ 的低流速流经在 HBS-NP 缓冲

液 (HBS-N 缓冲液, Biacore Product No. BR-1003-69 ;4-(2- 羟 乙 基)-1- 哌 嗪 乙 磺 酸 (HEPES) 0.24%, 氯化钠 0.88%, 足量的水, 过滤 / 除气并且预平衡至室温, 使用 1 : 2000 稀释的表面活性剂 P20) 中的传感器芯片来检测结合。抗原 - 抗体缔合和解离动力学在每种情况下进行大约 300 至 600 秒。

[0335] 在每种情况下使用无关蛋白质进行相应的对照, 用于“背景”减除。以 35 μ l/min 单次注射 18mM NaOH 17 秒用作整个研究中的再生条件。

[0336] 在每种情况下使用 Biacore's 动力学向导从在 HBS-NP 运行缓冲液中稀释的分析物浓度系列得出动力学参数。使用 Biacore™ 动力学向导软件 (Biacore AB) 按照厂商指导将缔合和解离曲线与 1 : 1 Langmuir 结合模型拟合。测定的亲和力和动力学参数 (背景已减除) 在以下表 1 中显示。对于每种抗体, 所示的数字是两个单独实验系列的平均值, 在每种情况下使用分别制备的传感器芯片 (其中 k_a = 结合的速率常数, k_d = 解离的速率常数, K_D = 解离平衡常数 (亲和力的量度), K_A = 结合平衡常数, R_{max} = 最大 SPR 响应信号)。

[0337] 表 1

[0338]

mAb#	mAb ID	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_A (1/M)	K_D (M)	R_{Max} (RU)
#1	3A4-1C10	1.5×10^6	9.6×10^{-5}	1.6×10^{10}	6.6×10^{-11}	278
#2	5A8-1F1	3.6×10^5	2.0×10^{-4}	2.1×10^9	1.5×10^{-9}	172
#3	3C7-3A3	1.7×10^5	7.6×10^{-4}	5.2×10^8	5.6×10^{-9}	133
#4	2D3-1F5	3.3×10^5	2.2×10^{-5}	1.5×10^{10}	6.8×10^{-11}	275
#5	3D6-2F4	1.8×10^6	1.2×10^{-4}	1.5×10^{10}	8.0×10^{-11}	294
#6	5D12-5G1	5.4×10^5	3.2×10^{-4}	2.0×10^9	7.0×10^{-10}	272
#7	1G6-1G6	1.4×10^6	3.0×10^{-4}	4.7×10^9	2.3×10^{-10}	249
#8	3G9-2D2	9.0×10^5	1.9×10^{-4}	4.7×10^9	2.4×10^{-10}	268

[0339] 实施例 3

[0340] HuMab 与表达人 DEC-205 的细胞的结合

[0341] 抗 DEC-205HuMab 与在其表面上表达人 DEC-205 的 CHO-S 细胞上的 DEC-205 结合的能力如下所述通过流式细胞术进行研究。

[0342] 检测抗体与在其表面上表达人 DEC-205 的 CHO-S 细胞的结合。蛋白 A 纯化的 HuMab 3D6-2F4、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10 与表达人 DEC-205 的 CHO-S 细胞以及 CHO-S 对照细胞在 4°C 温育。所有抗体都以饱和浓度使用。1 小时后, 用含有 0.1% BSA 和 0.05% NaN_3 (PBA) 的 PBS 洗涤细胞, 并通过细胞与 PE 标记的山羊抗人 IgG Fc 特异性探针在 4°C 温育来检测结合的抗体。用 PBA 从细

胞上洗去过量的探针,按照厂商说明通过使用 LSR™ 仪器 (BD Biosciences, NJ, USA) 的分析确定细胞结合的荧光。结果示于图 1 中。

[0343] 如图 1 所示,证明 HuMab 高水平结合表达人 DEC-205 的 CHO-S 细胞。这些数据证明与对照细胞相比,这些抗体有效地和特异性地结合在活 CHO-S 细胞上表达的人 DEC-205。

[0344] 实施例 4

[0345] HuMab 与人树突细胞的结合

[0346] 人外周血单个核细胞 (PBMC) 通过对 Leukopak 血小板血浆分离制品 (platelet apheresis preparation) 进行密度梯度离心而获得。单核细胞通过粘附到组织培养瓶上 2 小时分离,然后通过巨噬细胞无血清培养基 (Gibco) 中与 2ng/ml GM-CSF 和 10ng/ml IL-4 温育 5-7 天分化为树突细胞。

[0347] 抗 DEC-205HuMab 结合如上制备的人树突细胞上的 DEC-205 的能力如下所述通过流式细胞术进行研究。

[0348] 蛋白 A 纯化的 HuMab 3D6-2F2、3D6-4C8、3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9、3C7-3A3、5D12-5G1、1G6-1G6 和 3A4-1C10 和同种型对照 (人 IgG) 与人树突细胞在 4℃ 温育。所有抗体都以饱和浓度使用。1 小时后,用含有 0.1% BSA 和 0.05% NaN₃ (PBA) 的 PBS 洗涤细胞,通过细胞与 PE 标记的山羊抗人 IgG Fc 特异性探针在 4℃ 温育来检测结合的抗体。用 PBA 从细胞上洗去过量的探针,按照厂商说明通过使用 LSR™ 仪器 (BD Biosciences, NJ, USA) 的分析来确定细胞结合的荧光。结果示于图 2,结果表明与同种型对照相比,证明 HuMab 与人树突细胞有高水平结合。

[0349] 实施例 5

[0350] 测定 HuMab 的 DEC-205 结合特征的 ELISA 分析

[0351] 微量滴定板用 PBS 中的可溶性 DEC-205/Fc 融合蛋白包被,然后用 PBS 中的 5% 牛血清白蛋白封闭。以饱和浓度添加蛋白 A 纯化的 HuMab 和同种型对照,并于 37℃ 温育。用 PBS/Tween 洗板,然后于 37℃ 与偶联有碱性磷酸酶的山羊抗-人 IgG Fc 特异性多克隆试剂温育。洗涤后,平板用 pNPP 底物 (1mg/ml) 显色,并使用微量滴定板读数器在 OD 405-650 处分析。结果示于图 3,结果表明与同种型对照相比,HuMab 被证明有高水平的结合。

[0352] 实施例 6

[0353] 抗体内化分析

[0354] 每等份 5×10^5 个人单核细胞衍生的树突细胞与人 IgG (1mg/ml) 温育,以阻断非特异性结合。然后细胞与 100 μ g/ml 溶于封闭缓冲液的 FITC- 偶联的抗-Dec-205HuMab 3G9-2D2 在冰上温育 30 分钟用于结合,随后转移到 37℃ 放置 0、10、30、60 和 120 分钟用于内化。使用相同浓度的 FITC- 偶联的人 IgG1 作为对照。然后洗涤细胞,并用 1% 低聚甲醛固定。洗涤固定的细胞,重悬浮于水中,并细胞离心到显微镜载玻片上。使用 Zeiss LSM 510 Meta 共焦显微镜获取图像。结果示于图 4 中,结果显示与对照相比,FITC- 标记的 HuMab 被证明有效地内化到树突细胞内。

[0355] 实施例 7

[0356] 抗体测序

[0357] 如以上实施例 1 所述,来自产生特异性 HuMab IgG 的杂交瘤的 HuMab 通过蛋白 A 柱层析法进行纯化,导致分离出 8 种特别感兴趣的抗体 (“HuMab”)。HuMab 3D6-2F4、3D6-4C8、

3G9-2D2、5A8-1F1、2D3-1F5-2A9 (V_H 区)、3C7-3A3、1E6-3D10 (V_H 区) 和 5C3-2-3F6 的 V_H 和 V_L 编码区使用来自相应杂交瘤的 RNA 进行确认。将 RNA 逆转录为 cDNA, 通过 PCR 扩增 V 编码区, 将 PCR 产物测序。以下是 HuMaB 的 V_H 和 V_L 区的核酸和氨基酸序列 (在氨基酸序列中, 互补决定区 (CDR) 以下划线标出)。

[0358] 3D6-2F4V_H 核酸序列 (VH3, 基因座 3-33 ;JH4) (SEQ ID NO :2) :

[0359] atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctggtggagctctgggggagggcgtgggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcatcttcagtatctatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtggtggcagttatatggtatgatggaa gtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctg caaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagctcctcactttgactactggggcca gggaaccctggtcaccgtctcctcagctagc

[0360] 3D6-2F4V_H 氨基酸序列 (SEQ ID NO :3), 包括信号肽 :

[0361] MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASGFI FSIYGMHWVRQAPGKGLEWVAV IWDGSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPHFDYWGQGLTVTS S

[0362] 3D6-2F4 V_H “成熟”氨基酸序列 (SEQ ID NO :4), 不包括信号肽 :

[0363] QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASGFI FSIYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPHFDYWGQGLTVTVSS

[0364] 3D6-2F4V_H CDR1 (SEQ ID NO :5) : IYGMH

[0365] 3D6-2F4V_H CDR2 (SEQ ID NO :6) : VIWDGSKYYADSVKG

[0366] 3D6-2F4V_H CDR3 (SEQ ID NO :7) : APHFDY

[0367] 3D6-2F4 V_L 核酸序列 (VK1, 基因座 L15 ;JK2) (SEQ ID NO :8) :

[0368] atgggatggagctgtatcatcctgttcctcgtggccacagcaaccgggtgtccactccgacatccagatg acccagttctccatcctcactgtctgcacatctgttgagacagagtcaccatcacttgtcgggcgagtcagggtattag cagctgggttagcctgggtatcagcagaaaccagagaaagcccctaagtccctgatctatgctgcacatccagtttgcaaa gtgggggtcccatcaaggttcagcggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaa gattttgcaacttattactgccaacagtataatagttacccgtacacttttgccaggggaccaagctggagatcaa acgtacg

[0369] 3D6-2F4V_L 氨基酸序列 (SEQ ID NO :9), 包括信号肽 :

[0370] MDMRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK

[0371] 3D6-2F4V_L “成熟”氨基酸序列 (SEQ ID NO :10), 不包括信号肽 :

[0372] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK

[0373] 3D6-2F4 V_L CDR1 (SEQ ID NO :11) : RASQGISSWLA

[0374] 3D6-2F4 V_L CDR2 (SEQ ID NO :12) : AASSLQS

[0375] 3D6-2F4 V_L CDR3 (SEQ ID NO :13) : QQYNSYPYT

[0376] 3D6-4C8V_H 核酸序列 (VH3, 基因座 3-33 ;JH4) (SEQ ID NO :14) :

[0377] atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctggtggagctctgggggagggcgtgggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcatcttcag

tatctatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgatggaa
gtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctg
caaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagctcctcactttgactactggggcca
gggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcac

[0378] 3D6-4C8V_H 氨基酸序列 (SEQ ID NO :15), 包括信号肽 :

[0379] MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFIFSIYGMHWVRQAPGKGLEWVAV
IWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPHFDYWGQGLTVTVSS

[0380] 3D6-4C8V_H “成熟” 氨基酸序列 (SEQ ID NO :16), 不包括信号肽 :

[0381] QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFIFSIYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAPHFDYWGQGLTVTVSS

[0382] 3D6-4C8V_H CDR1 (SEQ ID NO :17) :IYGMH

[0383] 3D6-4C8 V_H CDR2 (SEQ ID NO :18) :VIWYDGSNKYYADSVKG

[0384] 3D6-4C8 V_H CDR3 (SEQ ID NO :19) :APHFDY

[0385] 3D6-4C8V_L 核酸序列 (VK1, 基因座 L4 ;JK4) (SEQ ID NO :20) :

[0386] atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggcttctgctgctctggctcccaggtgccagatgtgcc
atccagttgaccagctctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtca
gggcattagcagtgcttttagcctgggtatcagcagaaaccagggaaagctcctaagctcctgatctatgatgcctcca
gttttgaaagtgggggtcccatcaaggttcagcggcagtggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctg
cagcctgaagattttgaacttattactgtcaacagtttaatagttaccctctcactttcggcggagggaaccaaggt
ggagatcaaa

[0387] 3D6-4C8V_L 氨基酸序列 (SEQ ID NO :21), 包括信号肽 :

[0388] MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLL
IYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK

[0389] 3D6-4C8V_L “成熟” 氨基酸序列 (SEQ ID NO :22), 不包括信号肽 :

[0390] AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK

[0391] 3D6-4C8 V_L CDR1 (SEQ ID NO :23) :RASQGISSALA

[0392] 3D6-4C8 V_L CDR2 (SEQ ID NO :24) :DASSLES

[0393] 3D6-4C8 V_L CDR3 (SEQ ID NO :25) :QQFNSYPLT

[0394] 3G9-2D2, V_H 核酸序列 (VH3, 基因座 3-33 ;D 未确定 ;JH4) (SEQ ID NO :26) :

[0395] atggagtttgggctgagctgggttttcctcgttgctcttttaagaggtgtccagtggtcaggtgcagctg
gtggagctctgggggaggcgtgggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcag
taattatggcatgtactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgatggaa
gtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctg
caaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagatctctggggatgggtactttgacta
ttggggccagggaaccctgggtcaccgtctcctcagctagc

[0396] 3G9-2D2, V_H 氨基酸序列 (SEQ ID NO :27), 包括信号肽 :

[0397] MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSNYGMYWVRQAPGKGL
EWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLWGWFYFDYWGQGLTVTVS

SASTKGPSVFPLA

[0398] 3G9-2D2, V_H “成熟”氨基酸序列 (SEQ ID NO :28), 不包括信号肽 :

[0399] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSNYGMYWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSNKYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLWGWFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA

[0400] 3G9-2D2, V_H CDR1 (SEQ ID NO :29) :NYGMY

[0401] 3G9-2D2, V_H CDR2 (SEQ ID NO :30) :VIWIYDGSNKYYADSVKG

[0402] 3G9-2D2, V_H CDR3 (SEQ ID NO :31) :DLWGWFYFDY

[0403] 3G9-2D2, V_L 核酸序列 (VK3, 基因座 L6 ;JK4) (SEQ ID NO :32) :

[0404] atgggatggagctgtatcatcctgttcctcgtggccacagcaaccggtgtccactccgaaattgtgttg
acacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttag
cagctacttagcctgggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcattcaacagggcc
ctggcatcccagccaggttcagtggtggcagtggtgtgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaa
gattttgcagttttattactgtcagcagcgtcgcaactggccgctcactttcggcggagggaaccaaggtggagatcaa
acgtacg

[0405] 3G9-2D2, V_L 氨基酸序列 (SEQ ID NO :33), 包括信号肽 :

[0406] MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY
DASNRATGIPARFSGSGGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRNWPLTFGGGTKVEIK

[0407] 3G9-2D2, V_L “成熟”氨基酸序列 (SEQ ID NO :34), 不包括信号肽 :

[0408] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGGT
DFTLTISSELPEDFAVYYCQQRNWPLTFGGGTKVEIK

[0409] 3G9-2D2, V_L CDR1 (SEQ ID NO :35) :RASQSVSSYLA

[0410] 3G9-2D2, V_L CDR2 (SEQ ID NO :36) :DASNRAT

[0411] 3G9-2D2, V_L CDR3 (SEQ ID NO :37) :QQRNWPLT

[0412] 5A8-1F1, V_H 核酸序列 (VH3, 基因座 3-33 ;JH2) (SEQ ID NO :38) :

[0413] atggagtttgggctgacctgggttttcctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctg
gtggagctctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcag
tacctatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtggtggcaattatatggtatgatggag
gtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctg
caaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagacttctacttggtacttcgatctctg
gggccgtggcaccctgggtcactgtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaagg

[0414] 5A8-1F1, V_H 氨基酸序列 (SEQ ID NO :39), 包括信号肽 :

[0415] MEFGLTWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVA
IIWIYDGGNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDFYWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSV
FPLA

[0416] 5A8-1F1, V_H “成熟”氨基酸序列 (SEQ ID NO :40), 不包括信号肽 :

[0417] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWIYDGGNKYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDFYWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLA

[0418] 5A8-1F1, V_H CDR1 (SEQ ID NO :41) :TYGMH

[0419] 5A8-1F1, V_H CDR2 (SEQ ID NO :42) :IIWIYDGGNKYYADSVKG

- [0420] 5A8-1F1, V_H CDR3 (SEQ ID NO :43) :DFYWYFDL
- [0421] 5A8-1F1, V_L 核酸序列 (VK3, 基因座 L6 ;JK1) (SEQ ID NO :44) :
- [0422] atggaagccccagctcagcttctcttctcctctgctactctggctcccagataccaccggagaaattgtgttgacacagttctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacaggccactggcateccagccaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgttaggacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaacga
- [0423] 5A8-1F1, V_L 氨基酸序列 (SEQ ID NO :45), 包括信号肽 :
- [0424] MEAPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRRRTFGQGTKVEIK
- [0425] 5A8-1F1, V_L “成熟”氨基酸序列 (SEQ ID NO :46), 不包括信号肽 :
- [0426] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRRRTFGQGTKVEIK
- [0427] 5A8-1F1, V_L CDR1 (SEQ ID NO :47) :RASQSVSSYLA
- [0428] 5A8-1F1, V_L CDR2 (SEQ ID NO :48) :DASNRAT
- [0429] 5A8-1F1, V_L CDR3 (SEQ ID NO :49) :QQRRRT
- [0430] 3C7-3A3, V_H 核酸序列 (VH3, 基因座 3-33 ;JH2) (SEQ ID NO :50) :
- [0431] atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctcttttaagaggtgtccagtggtcaggtgcagctgtggagtcctgggggagcggtgtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtagctataacatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtggtggcatttatatggtatgatggaa gtaataaatactatggagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaaaaacacgctgtatctg caaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagaagagctggggatcgggtggtactt cgatctctggggccgtggcaccctgggtcactgtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcac
- [0432] 3C7-3A3, V_H 氨基酸序列 (SEQ ID NO :51), 包括信号肽 :
- [0433] MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYNMHWVRQAPGKGLEWVAFIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREELGIGWYFDLWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLA
- [0434] 3C7-3A3, V_H “成熟”氨基酸序列 (SEQ ID NO :52), 不包括信号肽 :
- [0435] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYNMHWVRQAPGKGLEWVAFIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREELGIGWYFDLWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLA
- [0436] 3C7-3A3, V_H CDR1 (SEQ ID NO :53) :SYNMH
- [0437] 3C7-3A3, V_H CDR2 (SEQ ID NO :54) :FIWYDGSNKYYGDSVKG
- [0438] 3C7-3A3, V_H CDR3 (SEQ ID NO :55) :EELGIGWYFDL
- [0439] 3C7-3A3, V_L 核酸序列 (VK3, 基因座 L6 ;JK1) (SEQ ID NO :56) :
- [0440] atggaagccccagctcagcttctcttctcctctgctactctggctcccagataccaccggagaaattgtgttgacacagttctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacaggccactggcateccagccaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgttaggacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaacgaactgt

ggctgcaccatctgtcttcattcttcccgcacatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgcctgc

[0441] 3C7-3A3, V_L 氨基酸序列 (SEQ ID NO :57), 包括信号肽:

[0442] MEAPAQLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY
DASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQRRRTFGQGTKVEIK

[0443] 3C7-3A3, V_L “成熟”氨基酸序列 (SEQ ID NO :58), 不包括信号肽:

[0444] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSELPEDFAVYYCQRRRTFGQGTKVEIK

[0445] 3C7-3A3, V_L CDR1 (SEQ ID NO :59): RASQSVSSYLA

[0446] 3C7-3A3, V_L CDR2 (SEQ ID NO :60): DASNRAT

[0447] 3C7-3A3, V_L CDR3 (SEQ ID NO :61): QRRRT

[0448] 2D3-1F5-2A9, V_H 核酸序列 (VH3, 基因座 Orph-C16 ;JH3) (SEQ ID NO :62):

[0449] atggagtttgtgctgagctgggttctccttgttgctatattaaaagggtgtccagtgtgaggttcagctg
gtgcagctctgggggaggcttggtacatcctgggggggtccctgagactctcctgtgcaggctctggattcaccttcag
taactatgctatgcactgggttcgccaggctccaggaaaaggctctggagtgggtatcaactattggtactggtggtg
gcacaccctatgcagactccgtgaagggccgcttcaccatctccagagacaatgccaagaactccttgatcttcaa
atgaacagcctgagagccgaggacatggctgtgtattactgtgcattaagtgttttgatgtctggggccaaggac
aatggtcaccgtctcttcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcac

[0450] 2D3-1F5-2A9, V_H 氨基酸序列 (SEQ ID NO :63), 包括信号肽:

[0451] MEFVLSWVLLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSNYAMHWVRQAPGKGLEWVST
IGTGGGTPYADSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDMAVYYCALSAFDVWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLA

[0452] 2D3-1F5-2A9, V_H “成熟”氨基酸序列 (SEQ ID NO :64), 不包括信号肽:

[0453] EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSNYAMHWVRQAPGKGLEWVSTIGTGGGTPYADSVKGRFTI
SRDNANKSLYLQMNSLRAEDMAVYYCALSAFDVWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLA

[0454] 2D3-1F5-2A9, V_H CDR1 (SEQ ID NO :65): NYAMH

[0455] 2D3-1F5-2A9, V_H CDR2 (SEQ ID NO :66): TIGTGGGTPYADSVKG

[0456] 2D3-1F5-2A9, V_H CDR3 (SEQ ID NO :67): SAFDV

[0457] 1E6-3D10V_H 核酸序列 (VH3, 基因座 Orph-HC16 ;JH4)

[0458] (SEQ ID NO :68):

[0459] Atggagtttgtgctgagctgggttttcttctgttgctatattaaaagggtgtccagtgtgaggttcagct
ggtgcagctctgggggaggcttggtacatcctgggggggtccctgagactctcctgtgcaggctctggattcaccttc
agtagctatgctatgcactgggttcgccaggctccaggaaaaggctctggagtgggtatcagctattggtactggt
ggttacacatactatgtagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaatgccaagaagtccttgat
cttcaaatgaacagcctgagagccgaggacatggctgtgtattactgtgcaagagagccgttttacgatattttg
actggttattccccatactttgactactggggccagggaaccctgggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggc
ccatcggtcttccccctggcac

[0460] 1E6-3D10V_H 氨基酸序列 (SEQ ID NO :69), 包括信号肽:

[0461] MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSNYAMHWVRQAPGKGLEWVSA
IGTGGYTYVDSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDMAVYYCAREPFYDILTGYSPYFDYWGQGTMTVSS

[0462] 1E6-3D10V_H “成熟”氨基酸序列 (SEQ ID NO :70), 不包括信号肽:

- [0463] EVQLVQSGGGLVHPGSLRLSCAGSGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIGTGGYTYVDSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDMAVYYCAREPFYDILTGYSYFDYWGQGTLLTVSS
- [0464] 1E6-3D10 V_H CDR1 : (SEQ ID NO :71) :SYAMH
- [0465] 1E6-3D10 V_H CDR2 (SEQ ID NO :72) :AIGTGGYTYVDSVKG
- [0466] 1E6-3D10 V_H CDR3 (SEQ ID NO :73) :EPFYDILTGYSYFDY
- [0467] 5C3-2-3F6V_H 核酸序列 (VH3, 基因座 3-33 ;JH2) (SEQ ID NO :74) :
- [0468] Atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctgtggagctctgggggagcgctgggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtagctataacatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgatggaa gtaataaatactatggagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctg caaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagaagagctggggatcgggtgtactt cgatctctggggccgtggcaccctgggtcactgtctctcagcctccaccaaggggcccatcggtcttccccctggcac
- [0469] 5C3-2-3F6V_H 氨基酸序列 (SEQ ID NO :75), 包括信号肽 :
- [0470] MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYNMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREELGIGWYFDLWGRGTLTVSS
- [0471] 5C3-2-3F6V_H “成熟”氨基酸序列 (SEQ ID NO :76), 不包括信号肽 :
- [0472] QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYNMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREELGIGWYFDLWGRGTLTVSS
- [0473] 5C3-2-3F6 V_H CDR1 (SEQ ID NO :77) :SYNMH
- [0474] 5C3-2-3F6 V_H CDR2 (SEQ ID NO :78) :VIWDGSKNYYGDSVKG
- [0475] 5C3-2-3F6 V_H CDR3 (SEQ ID NO :79) :EELGIGWYFDL
- [0476] 5C3-2-3F6 V_L 核酸序列 (VK1, 基因座 L18 ;JK5) (SEQ ID NO :80) :
- [0477] Atggacatgagggtccccgctcagctcctggggcttctgtctgtctggctcccaggtgccagatgtgc catccagttgaccagctctccatctctcctgtctgtcatctgttaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagt cagggcattagcagtgctttagcctgggtatcagcagaaaccagggaagctcctaagctcctgatctatgatgcc tccagtttgaaagtgggggtcccatcaaggttcagcggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagc agcctgcagcctgaagattttgcaacttattactgtcaacagtttaatatgttaccctcacttcggccaagggaca cgactggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatct ggaactgcctctgttgtgtgcctgcaagggc
- [0478] 5C3-2-3F6V_L 氨基酸序列 (SEQ ID NO :81), 包括信号肽 :
- [0479] MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPHFQGQTRLEIK
- [0480] 5C3-2-3F6V_L “成熟”氨基酸序列 (SEQ ID NO :82), 不包括信号肽 :
- [0481] AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPHFQGQTRLEIK
- [0482] 5C3-2-3F6 V_L CDR1 (SEQ ID NO :83) :RASQGISSALA
- [0483] 5C3-2-3F6 V_L CDR2 (SEQ ID NO :84) :DASSLES
- [0484] 5C3-2-3F6 V_L CDR3 (SEQ ID NO :85) :QQFNSYPH
- [0485] 5D12-5G1 V_H 核酸序列 (VH3, 基因座 3-33 ;JH2) (SEQ ID NO :86) :

[0486] Atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctg
gtggagctctgggggagggcgtgggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcag
tagctatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggatatgatggaa
gtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctg
caaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggccccctcggtacttcgatctctg
gggccgtggcaccctggteactgtctctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcac

[0487] 5D12-5G1 VH 氨基酸序列 (SEQ ID NO :87), 包括信号肽 :

[0488] MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV
IWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPPRYFDLWGRGTLVTVSS

[0489] 5D12-5G1VH “成熟”氨基酸序列 (SEQ ID NO :88), 不包括信号肽 :

[0490] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPPRYFDLWGRGTLVTVSS

[0491] 5D12-5G1 VH CDR1 (SEQ ID NO :89) :SYGMH

[0492] 5D12-5G1 VH CDR2 (SEQ ID NO :90) :VIWYDGSNKYYADSVKG

[0493] 5D12-5G1 VH CDR3 (SEQ ID NO :91) :GPPRYFDL

[0494] 为了参考, 提出的相应种系序列 (没有偏见地指定) 的氨基酸序列如下 :

[0495] 种系 L6 (SEQ ID NO :92) :

[0496] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWP

[0497] 种系 L4 (SEQ ID NO :93) :

[0498] AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQFN SYP

[0499] 种系 L15 (SEQ ID NO :94) :

[0500] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRARQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQYN SYP

[0501] 系 V_H3-33 (SEQ ID NO :95) :

[0502] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

[0503] 系 Orph-C16 (SEQ ID NO :96) :

[0504] EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIGTGGGTYYADSVKGRFTI
SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCAR

[0505] V_L 和 V_H 序列相对于提出的相应种系序列的序列比对显示于图 5 中, 只是用于说明的目的。

[0506] 实施例 8

[0507] 3G9-β hCG APC- 靶向疫苗偶联物

[0508] DEC-205 靶向疫苗偶联物是通过将 β hCG 抗原连接到来自上述实施例 7 的 HuMab 3G9-2D2 (也确定与猕猴 DEC-205 交叉反应) 上产生的。连接是通过基因融合共价连接抗原与抗体的重链而实现的。

[0509] 产生含有新霉素和二氢叶酸还原酶基因的质粒, 其含有与抗体 3G9-2D2 重链的

CH3 结构域和 3G9-2D2 轻链融合的 β hCG 编码序列。使用标准方案 (Qiagen Inc, Valencia, CA), 用得到的质粒构建体转化 CHO 细胞。在含有抗生素 G418 的培养基中选择被转染的细胞。选择后, 通过有限稀释克隆细胞, 并用稳定的克隆系产生细胞库用于进一步研究。为了证实 3G9- β hCG 构建体的表达, 在还原和非还原条件下在 SDS-PAGE 上进行蛋白质的 Western 印迹分析。观察到该融合蛋白具有预期的分子量并且正确装配 (即, 同时含有重链融合和轻链)。具体地, 使用变性条件通过 SDS-PAGE 分析疫苗偶联物和单独的抗体, 并且通过 Western 印迹分析进行检测。然后使用山羊抗人 IgG、使用 β hCG C-末端肽特异性 mAb (US Biologicals) 分别探查该印迹。结果证实, 根据融合产物的适当大小和组成证明, 被转化的 CHO 细胞特异性表达 3G9- β hCG 疫苗偶联物。

[0510] 实施例 9

[0511] 使用 3G9- β hCG APC-靶向疫苗偶联物的抗原特异性活性

[0512] 能够呈递抗原的细胞是在来源上是人细胞, 并且在外周血单个核细胞 (PBMC)、单核细胞 (THP-1)、B 类淋巴母细胞 (C 1R. A2, 1518B-LCL) 和单核细胞衍生的 DC 之间不同。通过流式细胞术评估, 所有细胞的细胞表面 DEC-205 表达都是阳性的。

[0513] 将载体 pk :3G9-hCG β 转染入 CHO 细胞。使用 G418 选择稳定的克隆, 随后亚克隆。在上清液中收集细胞产生的融合蛋白 (3G9- β hCG 疫苗偶联物; 实施例 8), 并在蛋白 A 柱上纯化。

[0514] 从正常健康供体的 leukopack 获得 T 细胞。通过每周 2-3 次用 3G9-hCG β 所针对的和对于 CD8+ 和 CD4+T 细胞富集的自体 DC 刺激, 在体外产生抗原特异性 T 细胞, 之后通过 GrB 或 IFN γ ELISpot 分析 (MabTech) 用多种 APC (如上所述) 检测抗原特异性活性。每 3-4 天添加细胞因子 IL-7 和 IL-2, 以保持效应物的传递和活性。在低剂量 IL-2 的存在下使用 Miltenyi-MACS T 细胞扩增试剂盒扩增抗原特异性 T 细胞 10-12 天。利用 CD40L (Alexis Biochemicals) 诱导 DC 的成熟。如图 9A 所示, 在 DC 和单核细胞 (THP-1) 以及 B 类淋巴母细胞中获得 CD8+T 细胞应答 (图 9B)。因此, 抗原通过 DEC-205 受体向 B 细胞的靶向导致 MHC-I 类限制的 T 细胞的刺激。

[0515] 等同方案

[0516] 本领域技术人员只使用常规实验方法, 就可确认或能够确定本文所述的本发明特定实施方案的许多等同方案。这样的等同方案包括在以下权利要求书中。

序列表

<110>CELLEDEX THERAPEUTICS INC. 等

<120> 结合人树突和上皮细胞 205 (DEC-205) 的抗体

<130>CDJ-346PC

<140>PCT/US2008/082745

<141>2008-11-07

<150>61/002, 253

<151>2007-11-07

<150>61/191, 551

<151>2008-09-10

<160>106

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>1722

<212>PRT

<213> 人

<400>1

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

Met Phe Ser Cys Asp Ser Ser Ala Met Leu Trp Trp Lys Cys Glu His		
100	105	110
His Ser Leu Tyr Gly Ala Ala Arg Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Asp Gly		
115	120	125
His Gly Thr Ala Ile Ser Asn Ala Ser Asp Val Trp Lys Lys Gly Gly		
130	135	140
Ser Glu Glu Ser Leu Cys Asp Gln Pro Tyr His Glu Ile Tyr Thr Arg		
145	150	155
Asp Gly Asn Ser Tyr Gly Arg Pro Cys Glu Phe Pro Phe Leu Ile Asp		
165	170	175
Gly Thr Trp His His Asp Cys Ile Leu Asp Glu Asp His Ser Gly Pro		
180	185	190
Trp Cys Ala Thr Thr Leu Asn Tyr Glu Tyr Asp Arg Lys Trp Gly Ile		
195	200	205
Cys Leu Lys Pro Glu Asn Gly Cys Glu Asp Asn Trp Glu Lys Asn Glu		
210	215	220
Gln Phe Gly Ser Cys Tyr Gln Phe Asn Thr Gln Thr Ala Leu Ser Trp		
225	230	235
Lys Glu Ala Tyr Val Ser Cys Gln Asn Gln Gly Ala Asp Leu Leu Ser		
245	250	255
Ile Asn Ser Ala Ala Glu Leu Thr Tyr Leu Lys Glu Lys Glu Gly Ile		
260	265	270
Ala Lys Ile Phe Trp Ile Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ser Ala Arg Gly		
275	280	285
Trp Glu Trp Ser Asp His Lys Pro Leu Asn Phe Leu Asn Trp Asp Pro		
290	295	300
Asp Arg Pro Ser Ala Pro Thr Ile Gly Gly Ser Ser Cys Ala Arg Met		
305	310	315
Asp Ala Glu Ser Gly Leu Trp Gln Ser Phe Ser Cys Glu Ala Gln Leu		
325	330	335
Pro Tyr Val Cys Arg Lys Pro Leu Asn Asn Thr Val Glu Leu Thr Asp		
340	345	350
Val Trp Thr Tyr Ser Asp Thr Arg Cys Asp Ala Gly Trp Leu Pro Asn		
355	360	365
Asn Gly Phe Cys Tyr Leu Leu Val Asn Glu Ser Asn Ser Trp Asp Lys		
370	375	380
Ala His Ala Lys Cys Lys Ala Phe Ser Ser Asp Leu Ile Ser Ile His		
385	390	395
Ser Leu Ala Asp Val Glu Val Val Val Thr Lys Leu His Asn Glu Asp		

405	410	415
Ile Lys Glu Glu Val Trp Ile Gly Leu Lys Asn Ile Asn Ile Pro Thr		
420	425	430
Leu Phe Gln Trp Ser Asp Gly Thr Glu Val Thr Leu Thr Tyr Trp Asp		
435	440	445
Glu Asn Glu Pro Asn Val Pro Tyr Asn Lys Thr Pro Asn Cys Val Ser		
450	455	460
Tyr Leu Gly Glu Leu Gly Gln Trp Lys Val Gln Ser Cys Glu Glu Lys		
465	470	475
Leu Lys Tyr Val Cys Lys Arg Lys Gly Glu Lys Leu Asn Asp Ala Ser		
485	490	495
Ser Asp Lys Met Cys Pro Pro Asp Glu Gly Trp Lys Arg His Gly Glu		
500	505	510
Thr Cys Tyr Lys Ile Tyr Glu Asp Glu Val Pro Phe Gly Thr Asn Cys		
515	520	525
Asn Leu Thr Ile Thr Ser Arg Phe Glu Gln Glu Tyr Leu Asn Asp Leu		
530	535	540
Met Lys Lys Tyr Asp Lys Ser Leu Arg Lys Tyr Phe Trp Thr Gly Leu		
545	550	555
Arg Asp Val Asp Ser Cys Gly Glu Tyr Asn Trp Ala Thr Val Gly Gly		
565	570	575
Arg Arg Arg Ala Val Thr Phe Ser Asn Trp Asn Phe Leu Glu Pro Ala		
580	585	590
Ser Pro Gly Gly Cys Val Ala Met Ser Thr Gly Lys Ser Val Gly Lys		
595	600	605
Trp Glu Val Lys Asp Cys Arg Ser Phe Lys Ala Leu Ser Ile Cys Lys		
610	615	620
Lys Met Ser Gly Pro Leu Gly Pro Glu Glu Ala Ser Pro Lys Pro Asp		
625	630	635
Asp Pro Cys Pro Glu Gly Trp Gln Ser Phe Pro Ala Ser Leu Ser Cys		
645	650	655
Tyr Lys Val Phe His Ala Glu Arg Ile Val Arg Lys Arg Asn Trp Glu		
660	665	670
Glu Ala Glu Arg Phe Cys Gln Ala Leu Gly Ala His Leu Ser Ser Phe		
675	680	685
Ser His Val Asp Glu Ile Lys Glu Phe Leu His Phe Leu Thr Asp Gln		
690	695	700
Phe Ser Gly Gln His Trp Leu Trp Ile Gly Leu Asn Lys Arg Ser Pro		
705	710	715
		720

Asp Leu Gln Gly Ser Trp Gln Trp Ser Asp Arg Thr Pro Val Ser Thr			
725	730	735	
Ile Ile Met Pro Asn Glu Phe Gln Gln Asp Tyr Asp Ile Arg Asp Cys			
740	745	750	
Ala Ala Val Lys Val Phe His Arg Pro Trp Arg Arg Gly Trp His Phe			
755	760	765	
Tyr Asp Asp Arg Glu Phe Ile Tyr Leu Arg Pro Phe Ala Cys Asp Thr			
770	775	780	
Lys Leu Glu Trp Val Cys Gln Ile Pro Lys Gly Arg Thr Pro Lys Thr			
785	790	795	800
Pro Asp Trp Tyr Asn Pro Asp Arg Ala Gly Ile His Gly Pro Pro Leu			
805	810	815	
Ile Ile Glu Gly Ser Glu Tyr Trp Phe Val Ala Asp Leu His Leu Asn			
820	825	830	
Tyr Glu Glu Ala Val Leu Tyr Cys Ala Ser Asn His Ser Phe Leu Ala			
835	840	845	
Thr Ile Thr Ser Phe Val Gly Leu Lys Ala Ile Lys Asn Lys Ile Ala			
850	855	860	
Asn Ile Ser Gly Asp Gly Gln Lys Trp Trp Ile Arg Ile Ser Glu Trp			
865	870	875	880
Pro Ile Asp Asp His Phe Thr Tyr Ser Arg Tyr Pro Trp His Arg Phe			
885	890	895	
Pro Val Thr Phe Gly Glu Glu Cys Leu Tyr Met Ser Ala Lys Thr Trp			
900	905	910	
Leu Ile Asp Leu Gly Lys Pro Thr Asp Cys Ser Thr Lys Leu Pro Phe			
915	920	925	
Ile Cys Glu Lys Tyr Asn Val Ser Ser Leu Glu Lys Tyr Ser Pro Asp			
930	935	940	
Ser Ala Ala Lys Val Gln Cys Ser Glu Gln Trp Ile Pro Phe Gln Asn			
945	950	955	960
Lys Cys Phe Leu Lys Ile Lys Pro Val Ser Leu Thr Phe Ser Gln Ala			
965	970	975	
Ser Asp Thr Cys His Ser Tyr Gly Gly Thr Leu Pro Ser Val Leu Ser			
980	985	990	
Gln Ile Glu Gln Asp Phe Ile Thr Ser Leu Leu Pro Asp Met Glu Ala			
995	1000	1005	
Thr Leu Trp Ile Gly Leu Arg Trp Thr Ala Tyr Glu Lys Ile Asn			
1010	1015	1020	
Lys Trp Thr Asp Asn Arg Glu Leu Thr Tyr Ser Asn Phe His Pro			

1025	1030	1035
Leu Leu Val Ser Gly Arg	Leu Arg Ile Pro Glu Asn Phe Phe Glu	
1040	1045	1050
Glu Glu Ser Arg Tyr His	Cys Ala Leu Ile Leu Asn Leu Gln Lys	
1055	1060	1065
Ser Pro Phe Thr Gly Thr	Trp Asn Phe Thr Ser Cys Ser Glu Arg	
1070	1075	1080
His Phe Val Ser Leu Cys	Gln Lys Tyr Ser Glu Val Lys Ser Arg	
1085	1090	1095
Gln Thr Leu Gln Asn Ala	Ser Glu Thr Val Lys Tyr Leu Asn Asn	
1100	1105	1110
Leu Tyr Lys Ile Ile Pro	Lys Thr Leu Thr Trp His Ser Ala Lys	
1115	1120	1125
Arg Glu Cys Leu Lys Ser	Asn Met Gln Leu Val Ser Ile Thr Asp	
1130	1135	1140
Pro Tyr Gln Gln Ala Phe	Leu Ser Val Gln Ala Leu Leu His Asn	
1145	1150	1155
Ser Ser Leu Trp Ile Gly	Leu Phe Ser Gln Asp Asp Glu Leu Asn	
1160	1165	1170
Phe Gly Trp Ser Asp Gly	Lys Arg Leu His Phe Ser Arg Trp Ala	
1175	1180	1185
Glu Thr Asn Gly Gln Leu	Glu Asp Cys Val Val Leu Asp Thr Asp	
1190	1195	1200
Gly Phe Trp Lys Thr Val	Asp Cys Asn Asp Asn Gln Pro Gly Ala	
1205	1210	1215
Ile Cys Tyr Tyr Ser Gly	Asn Glu Thr Glu Lys Glu Val Lys Pro	
1220	1225	1230
Val Asp Ser Val Lys Cys	Pro Ser Pro Val Leu Asn Thr Pro Trp	
1235	1240	1245
Ile Pro Phe Gln Asn Cys	Cys Tyr Asn Phe Ile Ile Thr Lys Asn	
1250	1255	1260
Arg His Met Ala Thr Thr	Gln Asp Glu Val His Thr Lys Cys Gln	
1265	1270	1275
Lys Leu Asn Pro Lys Ser	His Ile Leu Ser Ile Arg Asp Glu Lys	
1280	1285	1290
Glu Asn Asn Phe Val Leu	Glu Gln Leu Leu Tyr Phe Asn Tyr Met	
1295	1300	1305
Ala Ser Trp Val Met Leu	Gly Ile Thr Tyr Arg Asn Asn Ser Leu	
1310	1315	1320

Met Trp Phe Asp Lys Thr Pro Leu Ser Tyr Thr His Trp Arg Ala		
1325	1330	1335
Gly Arg Pro Thr Ile Lys Asn Glu Lys Phe Leu Ala Gly Leu Ser		
1340	1345	1350
Thr Asp Gly Phe Trp Asp Ile Gln Thr Phe Lys Val Ile Glu Glu		
1355	1360	1365
Ala Val Tyr Phe His Gln His Ser Ile Leu Ala Cys Lys Ile Glu		
1370	1375	1380
Met Val Asp Tyr Lys Glu Glu His Asn Thr Thr Leu Pro Gln Phe		
1385	1390	1395
Met Pro Tyr Glu Asp Gly Ile Tyr Ser Val Ile Gln Lys Lys Val		
1400	1405	1410
Thr Trp Tyr Glu Ala Leu Asn Met Cys Ser Gln Ser Gly Gly His		
1415	1420	1425
Leu Ala Ser Val His Asn Gln Asn Gly Gln Leu Phe Leu Glu Asp		
1430	1435	1440
Ile Val Lys Arg Asp Gly Phe Pro Leu Trp Val Gly Leu Ser Ser		
1445	1450	1455
His Asp Gly Ser Glu Ser Ser Phe Glu Trp Ser Asp Gly Ser Thr		
1460	1465	1470
Phe Asp Tyr Ile Pro Trp Lys Gly Gln Thr Ser Pro Gly Asn Cys		
1475	1480	1485
Val Leu Leu Asp Pro Lys Gly Thr Trp Lys His Glu Lys Cys Asn		
1490	1495	1500
Ser Val Lys Asp Gly Ala Ile Cys Tyr Lys Pro Thr Lys Ser Lys		
1505	1510	1515
Lys Leu Ser Arg Leu Thr Tyr Ser Ser Arg Cys Pro Ala Ala Lys		
1520	1525	1530
Glu Asn Gly Ser Arg Trp Ile Gln Tyr Lys Gly His Cys Tyr Lys		
1535	1540	1545
Ser Asp Gln Ala Leu His Ser Phe Ser Glu Ala Lys Lys Leu Cys		
1550	1555	1560
Ser Lys His Asp His Ser Ala Thr Ile Val Ser Ile Lys Asp Glu		
1565	1570	1575
Asp Glu Asn Lys Phe Val Ser Arg Leu Met Arg Glu Asn Asn Asn		
1580	1585	1590
Ile Thr Met Arg Val Trp Leu Gly Leu Ser Gln His Ser Val Asp		
1595	1600	1605
Gln Ser Trp Ser Trp Leu Asp Gly Ser Glu Val Thr Phe Val Lys		

[illegible] $\langle 210 \rangle_2$ $\langle 211 \rangle_{408}$

<212>DNA

〈213〉 人

 $\langle 400 \rangle_2$

atggagtttg	ggctgagctg	ggttttcctc	gttgctcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagcgt	ctggattcat	cttcagtata	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcagttata	tggtatgatg	gaagtaataa	atactatgca	240
gactccgtga	agggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcctgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	agctcctcac	360
tttgactact	ggggccaggg	aacctgggtc	accgtctcct	cagctage		408

 $\langle 210 \rangle_3$ $\langle 211 \rangle 134$ $\langle 212 \rangle$ PRT

〈213〉 人

 $\langle 400 \rangle_3$

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

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

130

<210>4

<211>115

<212>PRT

<213>人

<400>4

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

<210>5

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>5

Ile Tyr Gly Met His

1 5

<210>6

<211>17

<212>PRT

<213> 人

<400>6

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210>7

<211>6

<212>PRT

<213> 人

<400>7

Ala Pro His Phe Asp Tyr

1 5

<210>8

<211>384

<212>DNA

<213> 人

<400>8

atgggatgga gctgtatcat cctgttcctc gtggccacag caaccggtgt ccaactccgac	60
atccagatga cccagtctcc atcctcactg tctgcatctg ttggagacag agtcaccatc	120
acttgctcggg cgagtcaggg tattagcagc tggttagcct ggtatcagca gaaaccagag	180
aaagccccta agtcctgat ctatgctgca tccagtttgc aaagtgggggt cccatcaagg	240
ttcageggca gtggatctgg gacagatttc actctcacca tcagcagcct gcagcctgaa	300
gattttgcaa cttattactg ccaacagtat aatagttacc cgtacacttt tggccagggg	360

accaagctgg agatcaaacg tacg

384

<210>9

<211>129

<212>PRT

<213> 人

<400>9

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

<210>10

<211>107

<212>PRT

<213> 人

<400>10

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

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr		80
	85	90
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		95
	100	105

<210>11

<211>11

<212>PRT

<213> 人

<400>11

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210>12

<211>7

<212>PRT

<213> 人

<400>12

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210>13

<211>9

<212>PRT

<213> 人

<400>13

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210>14

<211>439

<212>DNA

<213> 人

<400>16

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

<210>17

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>17

Ile Tyr Gly Met His
 1 5

<210>18

<211>17

<212>PRT

<213> 人

<400>18

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210>19

<211>6

<212>PRT

<213> 人

<400>19

Ala Pro His Phe Asp Tyr

1

5

<210>20

<211>387

<212>DNA

<213> 人

<400>20

atggacatga gggteccccgc tcagctcctg gggctttctgc tgctctggct cccaggtgcc	60
agatgtgcca tccagttgac ccagttctca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga	120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag	180
aaaccaggga aagctcctaa gctcctgac tatgatgcct ccagtttgga aagtggggtc	240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg	300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttaccc tctcactttc	360
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaa	387

<210>21

<211>129

<212>PRT

<213> 人

<400>21

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1

5

10

15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20

25

30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

35

40

45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

50

55

60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val

65

70

75

80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

85

90

95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110
Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125
Lys

<210>22

<211>107

<212>PRT

<213>人

<400>22

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

<210>23

<211>11

<212>PRT

<213>人

<400>23

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210>24

<211>7

<212>PRT

<213> 人

<400>24

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1

5

<210>25

<211>9

<212>PRT

<213> 人

<400>25

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1

5

<210>26

<211>417

<212>DNA

<213> 人

<400>26

atggagtttg	ggctgagctg	ggttttcctc	gttgctcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagcgt	ctggattcac	cttcagtaat	tatggcatgt	actgggtccg	ccaggtcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcagttata	tggtatgatg	gaagtaataa	atactatgca	240
gactccgtga	agggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcctgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	agatctctgg	360
ggatgggtact	ttgactattg	gggccaggga	accctgggtca	ccgtctcctc	agctagc	417

<210>27

<211>149

<212>PRT

<213> 人

<400>27

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

20

25

30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asn Tyr Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Trp Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala
 145
 <210>28
 <211>130
 <212>PRT
 <213>人

<400>28
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Leu Trp Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala

130

<210>29

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>29

Asn Tyr Gly Met Tyr

1 5

<210>30

<211>17

<212>PRT

<213> 人

<400>30

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210>31

<211>9

<212>PRT

<213> 人

<400>31

Asp Leu Trp Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210>32

<211>384

<212>DNA

<213> 人

<400>32

atgggatgga gctgtatcat cctgttcctc gtggccacag caaccggtgt ccaactccgaa	60
atttgtttga cacagtctcc agccaccctg tctttgtctc caggggaaaag agccaccctc	120
tcctgcaggg ccagtcagag tgtttagcagc tacttagcct ggtaccaaca gaaacctggc	180
caggctccca ggctcctcat ctatgatgca tccaacaggg ccactggcat cccagccagg	240

ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcagcagcct agagcctgaa	300
gattttgcag ttattactg tcagcagcgt cgcaactggc cgctcacttt cggcggaggg	360
accaaggtgg agatcaaacg tacg	384

<210>33

<211>127

<212>PRT

<213> 人

<400>33

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

<210>34

<211>107

<212>PRT

<213> 人

<400>34

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
			20					25						30	
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35					40						45	

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Trp Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210>35

<211>11

<212>PRT

<213> 人

<400>35

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210>36

<211>7

<212>PRT

<213> 人

<400>36

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210>37

<211>9

<212>PRT

<213> 人

<400>37

Gln Gln Arg Arg Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210>38

<211>447

<212>DNA

<210>40

<211>129

<212>PRT

<213> 人

<400>40

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

<210>41

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>41

Thr Tyr Gly Met His
1 5

<210>42

<211>17

<212>PRT

<213> 人

<400>42

Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210>43

<211>8

<212>PRT

<213> 人

<400>43

Asp Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5

<210>44

<211>372

<212>DNA

<213> 人

<400>44

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga	60
gaaatttgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	120
ctctcctgca gggccagtc gagtgtttag agctacttag cctggtacca acagaaacct	180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	240
aggttcagtg gcagtggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtaggacgt tcggccaagg gaccaagtg	360
gaaatcaaac ga	372

<210>45

<211>123

<212>PRT

<213> 人

<400>45

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

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg
 100 105 110
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120

<210>46

<211>103

<212>PRT

<213> 人

<400>46

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

<210>47

<211>11

<212>PRT

<213> 人

<400>47

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210>48

<211>7

<212>PRT

<213> 人

<400>48

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210>49

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>49

Gln Gln Arg Arg Thr

1 5

<210>50

<211>454

<212>DNA

<213> 人

<400>50

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc	120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tataacatgc actgggtccg ccaggtcca	180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcatttata tggtatgatg gaagtaataa atactatgga	240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaaaaacac gctgtatctg	300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaagagctg	360
gggatcggtt ggtacttcga tctctggggc cgtggcaccc tggtcactgt ctcctcagcc	420
tccaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcac	454

<210>51

<211>151

<212>PRT

<213> 人

<400>51

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

<210>52

<211>132

<212>PRT

<213>人

<400>52

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

	85	90	95
	Ala Arg Glu Glu Leu Gly Ile Gly Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg		
	100	105	110
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
	115	120	125
	Phe Pro Leu Ala		
	130		

<210>53

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>53

Ser Tyr Asn Met His

1 5

<210>54

<211>17

<212>PRT

<213> 人

<400>54

Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210>55

<211>11

<212>PRT

<213> 人

<400>55

Glu Glu Leu Gly Ile Gly Trp Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210>56

<211>454

<212>DNA

<213> 人

<400>56

```

atggaagccc cagctcagct tetettctc ctgtactct ggctcccaga taccaccgga      60
gaaatttgtt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc     120
ctctcctgca gggccagtc gagtggttag agctacttag cctggtacca acagaaacct     180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc     240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct     300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtaggacgt tcggccaagg gaccaaggtg     360
gaaatcaaac gaactgtggt tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag     420
ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc ctgc                                  454

```

<210>57

<211>123

<212>PRT

<213> 人

<400>57

```

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

```

<210>58

<211>103

<212>PRT

<213> 人

<400>58

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

<210>59

<211>11

<212>PRT

<213> 人

<400>59

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210>60

<211>7

<212>PRT

<213> 人

<400>60

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210>61

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>61

Gln Gln Arg Arg Thr

1 5

<210>62

<211>433

<212>DNA

<213> 人

<400>62

atggagtttg tgctgagctg gggttcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag	60
gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtcct gagactctcc	120
tgtgcaggct ctggattcac cttcagtaac tatgctatgc actgggttcg ccaggctcca	180
ggaaaagggtc tggagtgggt atcaactatt ggtactgggt gtggcacacc ctatgcagac	240
tccgtgaagg gccgcttcac catctccaga gacaatgcca agaactcctt gtatcttcaa	300
atgaacagcc tgagagccga ggacatggct gtgtattact gtgcattaag tgcttttgat	360
gtctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc tcttcagcct ccaccaaggg cccatcggtc	420
ttccccctgg cac	433

<210>63

<211>144

<212>PRT

<213> 人

<400>63

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

Tyr Cys Ala Leu Ser Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 130 135 140

<210>64

<211>125

<212>PRT

<213> 人

<400>64

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

<210>65

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>65

Asn Tyr Ala Met His
 1 5

<210>66

<211>16

<212>PRT

<213> 人

<400>66

Thr Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Pro Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1

5

10

15

<210>67

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>67

Ser Ala Phe Asp Val

1

5

<210>68

<211>466

<212>DNA

<213> 人

<400>68

atggagtttg tgctgagctg gggttttcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag	60
gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtcctt gagactctcc	120
tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgctatgc actgggttcg ccaggctcca	180
ggaaaagggtc tggagtgggt atcagctatt ggtactgggt gttacacata ctatgtagac	240
tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcc aagaagtcctt gtatcttcaa	300
atgaacagcc tgagagccga ggacatggct gtgtattact gtgcaagaga gccgttttac	360
gatattttga ctggttattc cccatacttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc	420
gtctcctcag cctccaccaa gggeccatcg gtcttcccc tggcac	466

<210>69

<211>143

<212>PRT

<213> 人

<400>69

Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

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

<210>70

<211>124

<212>PRT

<213>人

<400>70

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

<210>71

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>71

Ser Tyr Ala Met His

1 5

<210>72

<211>16

<212>PRT

<213> 人

<400>72

Ala Ile Gly Thr Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210>73

<211>16

<212>PRT

<213> 人

<400>73

Glu Pro Phe Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Ser Pro Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210>74

<211>454

<212>DNA

<213> 人

<400>74

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc	120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tataacatgc actgggtccg ccaggetcca	180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggtatgatg gaagtaataa atactatgga	240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaagagctg	360

gggatcgggt ggtacttcga tctctggggc cgtggcaccc tggtcactgt ctctcagcc 420
tccaccaagg gcccatcggt ctteccccctg gcac 454

<210>75

<211>139

<212>PRT

<213> 人

<400>75

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

<210>76

<211>120

<212>PRT

<213> 人

<400>76

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35	40	45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Glu Glu Leu Gly Ile Gly Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	

<210>77

<211>5

<212>PRT

<213> 人

<400>77

Ser Tyr Asn Met His

1 5

<210>78

<211>17

<212>PRT

<213> 人

<400>78

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210>79

<211>11

<212>PRT

<213> 人

<400>79

Glu Glu Leu Gly Ile Gly Trp Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210>80

<211>475

<212>DNA

<213> 人

<400>80

```

atggacatga gggteccccgc tcagtccttg gggctttctgc tgctctggct cccaggtgcc      60
agatgtgccca tccagttgac ccagttctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga      120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag      180
aaaccaggga aagctcctaa gctcctgate tatgatgcct ccagtttgga aagtggggtc      240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg      300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttaccc tcacttcggc      360
caagggacac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg      420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgca agggc      475

```

<210>81

<211>128

<212>PRT

<213> 人

<400>81

```

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

```

<210>82

<211>106

<212>PRT

<213> 人

<400>82

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

<210>83

<211>11

<212>PRT

<213> 人

<400>83

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala	Leu	Ala
1				5					10	

<210>84

<211>7

<212>PRT

<213> 人

<400>84

Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser
1				5		

<210>85

<211>8

<212>PRT

<213> 人

<400>85

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro His

1

5

<210>86

<211>445

<212>DNA

<213> 人

<400>86

atggagtttg	ggctgagctg	ggttttcctc	gttgctcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcggtg	gtccagcctg	ggaggteccct	gagactctcc	120
tgtgcagcgt	ctggattcac	cttcagtagc	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcagttata	tggtatgatg	gaagtaataa	atactatgca	240
gactccgtga	agggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcctgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	aggccccct	360
cggctacttcg	atctctgggg	ccgtggcacc	ctggtcactg	tctcctcagc	ctccaccaag	420
ggcccatcgg	tcttccccct	ggcac				445

<210>87

<211>136

<212>PRT

<213> 人

<400>87

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

	85	90	95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val			
100	105	110	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Pro Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg			
115	120	125	
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
130	135		

<210>88

<211>117

<212>PRT

<213>人

<400>88

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

<210>89

<211>5

<212>PRT

<213>人

<400>89

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210>90

<211>17

<212>PRT

<213> 人

<400>90

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210>91

<211>8

<212>PRT

<213> 人

<400>91

Gly Pro Pro Arg Tyr Phe Asp Leu

1 5

<210>92

<211>95

<212>PRT

<213> 人

<400>92

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro

85 90 95

<210>93

<211>95

<212>PRT

<213> 人

<400>93

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

<210>94

<211>95

<212>PRT

<213> 人

<400>94

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

<210>95

<211>98

<212>PRT

<213> 人

<400>95

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

<210>96

<211>97

<212>PRT

<213> 人

<400>96

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

<210>97

<211>5

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/note = " 人工序列说明 :合成共有序列 "

<220>

<221>VARIANT

<222>(1).. (1)

<223>/replace = " Asn " 或 " Thr " 或 " Ser "

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (1)

<223>/note = " 序列中给出的残基相对于所述位置的注释中的残基没有偏好性 "

<220>

<221>VARIANT

<222>(3).. (3)

<223>/replace = " Asn " 或 " Ala "

<220>

<221>misc_feature

<222>(3).. (3)

<223>/note = " 序列中给出的残基相对于所述位置的注释中的残基没有偏好性 "

<220>

<221>VARIANT

<222>(5).. (5)

<223>/replace = " Tyr "

<220>

<221>misc_feature

<222>(5).. (5)

<223>/note = " 序列中给出的残基相对于所述位置的注释中的残基没有偏好性 "

<400>97

Ile Tyr Gly Met His

1 5

<210>98

<211>17

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/note = " 人工序列说明 :合成共有序列 "

<220>

<221>VARIANT

<222>(1).. (1)

<223>/replace = " Ile " 或 " Phe " 或 " Thr " 或 " Ala "

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (1)

<223>/note = " 序列中给出的残基相对于所述位置的注释中的残基没有偏好性 "

<220>

<221>VARIANT

<222>(3).. (3)

<223>/replace = " Gly "

<220>

<221>VARIANT

<222>(4).. (4)

<223>/replace = " Thr "

<220>

<221>VARIANT

<222>(5).. (5)

<223>/replace = " Gly "

<220>

<221>misc_feature

<222>(3)..(5)
<223>/note = " 序列中给出的残基相对于所述位置的注释中的残基没有偏好性 "

<220>
<221>VARIANT
<222>(7)..(7)
<223>/replace = " Gly" 或 " Tyr"

<220>
<221>VARIANT
<222>(8)..(8)
<223>/replace = " Thr"

<220>
<221>VARIANT
<222>(9)..(9)
<223>/replace = " Pro"

<220>
<221>misc_feature
<222>(7)..(9)
<223>/note = " 序列中给出的残基相对于所述位置的注释中的残基没有偏好性 "

<220>
<221>VARIANT
<222>(11)..(11)
<223>/replace = " Ala" 或 " Val"

<220>
<221>VARIANT
<222>(12)..(12)
<223>/replace = " Gly" 或 " "

<220>
<221>misc_feature
<222>(11)..(12)
<223>/note = " 序列中给出的残基相对于所述位置的注释中的残基没有偏好性 "

<400>98

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210>99

<211>6

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/note = " 人工序列说明 :合成共有序列 "

<220>

<221>VARIANT

<222>(1).. (1)

<223>/replace = " Gly" 或" Tyr" 或" Ser" 或" Pro" 或" "

<220>

<221>VARIANT

<222>(2).. (2)

<223>/replace = " Trp" 或" Ser" 或" Arg"

<220>

<221>VARIANT

<222>(3).. (3)

<223>/replace = " Ala" 或" His"

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (3)

<223>/note = " 序列中给出的残基相对于所述位置的注释中的残基没有偏好性 "

<220>

<221>VARIANT

<222>(6).. (6)

<223>/replace = " Leu" 或" Val"

<220>

<221>misc_feature

<222>(6)..(6)

<223>/note = " 序列中给出的残基相对于所述位置的注释中的残基没有偏好性 "

<400>99

Ala Pro Tyr Phe Asp Tyr

1

5

<210>100

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/note = " 人工序列说明 :合成共有序列 "

<220>

<221>VARIANT

<222>(5)..(5)

<223>/replace = " Gly "

<220>

<221>VARIANT

<222>(6)..(6)

<223>/replace = " Val "

<220>

<221>misc_feature

<222>(5)..(6)

<223>/note = " 序列中给出的残基相对于所述位置的注释中的残基没有偏好性 "

<220>

<221>VARIANT

<222>(9)..(9)

<223>/replace = " Trp " 或 " Ala "

<220>

<221>misc_feature

<222>(9)..(9)

<223>/note = " 序列中给出的残基相对于所述位置的注释中的残基没有偏好性 "

<400>100

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210>101

<211>7

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/note = " 人工序列说明 :合成共有序列 "

<220>

<221>VARIANT

<222>(1).. (1)

<223>/replace = " Ala "

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (1)

<223>/note = " 序列中给出的残基相对于所述位置的注释中的残基没有偏好性 "

<220>

<221>VARIANT

<222>(4).. (4)

<223>/replace = " Ser "

<220>

<221>VARIANT

<222>(5).. (5)

<223>/replace = " Leu "

<220>

<221>VARIANT

<222>(6).. (6)

<223>/replace = " Gln " 或 " Glu "

<220>

<221>VARIANT

<222>(7)..(7)

<223>/replace = " Ser "

<220>

<221>misc_feature

<222>(4)..(7)

<223>/note = " 序列中给出的残基相对于所述位置的注释中的残基没有偏好性 "

<400>101

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210>102

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223>/note = " 人工序列说明 :合成共有序列 "

<220>

<221>VARIANT

<222>(3)..(3)

<223>/replace = " Tyr " 或 " Phe "

<220>

<221>VARIANT

<222>(4)..(4)

<223>/replace = " Asn "

<220>

<221>VARIANT

<222>(5)..(5)

<223>/replace = " Ser " 或 " Asn "

<220>

<221>VARIANT

<222>(6).. (6)

<223>/replace = " Trp" 或" "

<220>

<221>VARIANT

<222>(7).. (7)

<223>/replace = " "

<220>

<221>VARIANT

<222>(8).. (8)

<223>/replace = " Leu" 或" His" 或" "

<220>

<221>VARIANT

<222>(9).. (9)

<223>/replace = " "

<220>

<221>misc_feature

<222>(3).. (9)

<223>/note = " 序列中给出的残基相对于所述位置的注释中的残基没有偏好性"

<400>102

Gln Gln Arg Arg Thr Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210>103

<211>118

<212>PRT

<213>人

<400>103

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35				40				45							
Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
50				55				60							
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65				70				75				80			
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85				90				95							
Ala	Arg	Asp	Leu	Trp	Gly	Trp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
100				105				110							
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
115															

 $\langle 210 \rangle 104$

<211>117

<212>PRT

〈213〉 人

 $\langle 400 \rangle 104$

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

 $\langle 210 \rangle 105$ $\langle 211 \rangle 120$

<212>PRT

〈213〉 人

<400>105

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

<210>106

<211>113

<212>PRT

<213>人

<400>106

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

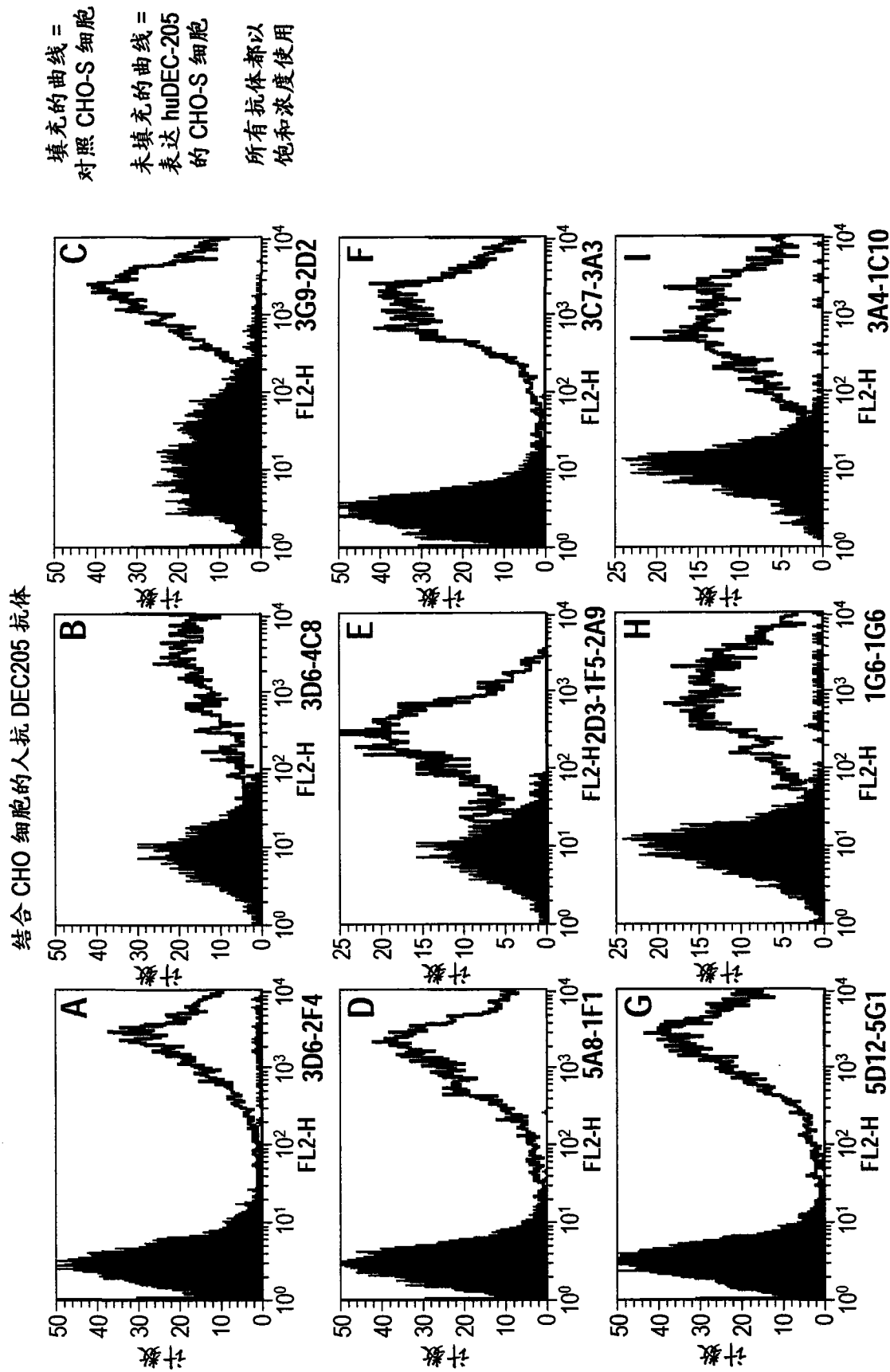


图 1

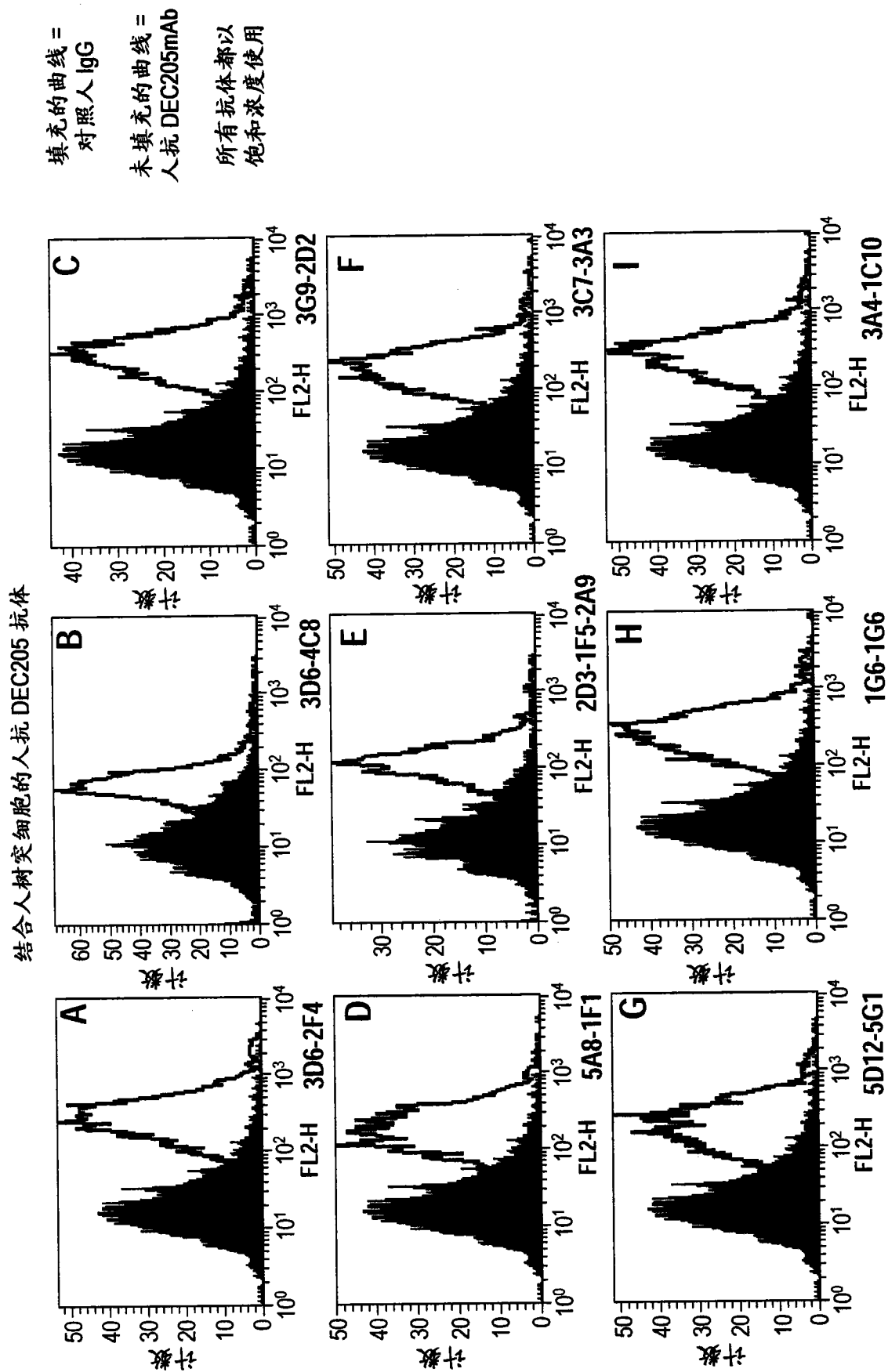


图 2

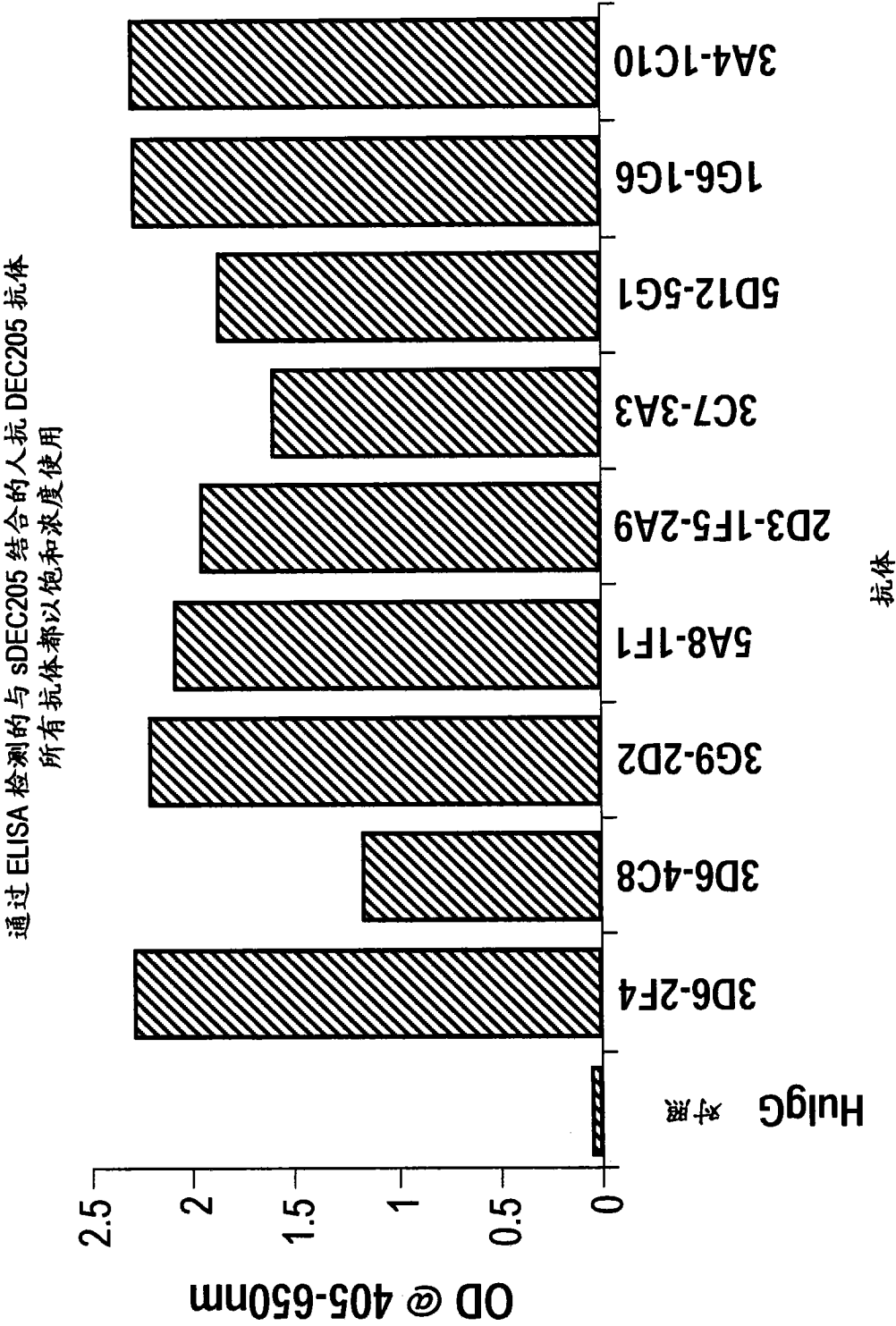


图 3

Dec205 mAb 的结合和在树突细胞中的内化

FITC-Hu IgG1



A

FITC-3G9, 0 min



B

FITC-3G9, 60 min



C

单核细胞衍生的人 DC 在冰上用 FITC-3G9-2D2 或 FITC- 人 IgG1 脉冲 30 分钟。
然后细胞于 37°C 培养指定的时间，使其内化。
用共聚焦显微镜捕捉图像，绿色染色揭示存在 FITC 标记的分子。

图 4

人 V_H 和 V_K 比对和种系序列
 V_H 比对

	CDR1	V	CDR2	CDR3	J
L6 种系					
3G9-2D2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSGRASQSVSYLAAYQOKPGQAPRLIIYDASNRATGIIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRNWP				LTFGGGKTKVEIK J _{K4}
5A8-1F1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSGRASQSVSYLAAYQOKPGQAPRLIIYDASNRATGIIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRNWP				TFGGGKTKVEIK J _{K1}
3C7-3A3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSGRASQSVSYLAAYQOKPGQAPRLIIYDASNRATGIIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRNWP				TFGGGKTKVEIK J _{K1}
L4 种系					
5C3-2-3F6	AIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISALAYQOKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPQEDFAVYYCQFNNSYP				TFGGGKTRLEIK J _{K5}
3D6-4C8	AIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISALAYQOKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPQEDFAVYYCQFNNSYP				LTFGGGKTKVEIK J _{K4}
LL5 种系					
3D6-2F4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRARQGISWLAAYQOKPEKAPKSLIYDASSLSQSEVPFRFSGSGSGTDFTLTITSSLPQEDFAVYYCQFNNSYP				YTFGGGKTKLEIK J _{K2}
3-33 种系					
3D6-2F4	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAAPGKGLEWVAIWYDGSNKYYVADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR				FDYWGQGTLLTVSS J _{K4}
3D6-4C8	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAAPGKGLEWVAIWYDGSNKYYVADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR				FDYWGQGTLLTVSS J _{K4}
3G9-2D2	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAAPGKGLEWVAIWYDGSNKYYVADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR				YFDYWGQGTLLTVSS J _{K4}
5A8-1F1	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAAPGKGLEWVAIWYDGSNKYYVADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR				YWFYDLYWGRGTLTVSS J _{K2}
3C7-3A3	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAAPGKGLEWVAIWYDGSNKYYVADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR				WYFDLYWGRGTLTVSS J _{K2}
5C3-2-3F6	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAAPGKGLEWVAIWYDGSNKYYVADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR				WYFDLYWGRGTLTVSS J _{K2}
5D12-5G1	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAAPGKGLEWVAIWYDGSNKYYVADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR				YFDLYWGRGTLTVSS J _{K2}
Orph-HC16					
2D3-1F5-2A9	EVQLVQSGGGLVHPGSLRLSCAGSGFTFSYAMHWVRQAAPGKGLEWVAISAITGGGTYVADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDMAVYYCAR				AFDYWGQGTLLTVSS J _{K3}
1E6-3D10	EVQLVQSGGGLVHPGSLRLSCAGSGFTFSYAMHWVRQAAPGKGLEWVAISAITGGGTYVADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDMAVYYCAR				YFDYWGQGTLLTVSS J _{K4}

D3-9

图 5

人 V_H CDR 共有序列

3D6-2F4 VH CDR1 (SEQ ID NO: 5):	IYGMH
3D6-4C8 VH CDR1 (SEQ ID NO: 17):	IYGMH
3G9-2D2 VH CDR1 (SEQ ID NO: 29):	NYGMY
5A8-1F1 VH CDR1 (SEQ ID NO: 41):	TYGMH
3C7-3A3, VH CDR1 (SEQ ID NO: 53):	SYNMH
2D3-1F5-2A9, VH CDR1 (SEQ ID NO: 65):	NYAMH
1E6-3D10 VH CDR1: (SEQ ID NO: 71):	SYAMH
5C3-2-3F6 VH CDR1 (SEQ ID NO: 77):	SYNMH
5D12-5G1 VH CDR1 (SEQ ID NO: 89):	SYGMH
VH CDR1 共有 (SEQ ID NO: 97): (I,N,T,S) Y (G,N,A) M (H,Y)	
3D6-2F4 VH CDR2 (SEQ ID NO: 6):	VIWYDGSNKYYADSVKG
3D6-4C8 VH CDR2 (SEQ ID NO: 18):	VIWYDGSNKYYADSVKG
3G9-2D2, VH CDR2 (SEQ ID NO: 30):	VIWYDGSNKYYADSVKG
5A8-1F1, VH CDR2 (SEQ ID NO: 42):	IIWYDGSNKYYADSVKG
3C7-3A3, VH CDR2 (SEQ ID NO: 54):	FIWYDGSNKYYGDSVKG
2D3-1F5-2A9, VH CDR2 (SEQ ID NO: 66):	TIGTGGGTPYA-DSVKG
1E6-3D10 VH CDR2 (SEQ ID NO: 72):	AIGTGGYTYV-DSVKG
5C3-2-3F6 VH CDR2 (SEQ ID NO: 78):	VIWYDGSNKYYGDSVKG
5D12-5G1 VH CDR2 (SEQ ID NO: 90):	VIWYDGSNKYYADSVKG
VH CDR2 共有 (SEQ ID NO: 98): (V,I,F,T,A) I (W,G) (Y,T) (D,G) G (S,G,Y) (N,T) (K,P) Y (Y,A,V) (A,G,-) D S V K G	
3D6-2F4 VH CDR3 (SEQ ID NO: 7):	APHFDY
3D6-4C8 VH CDR3 (SEQ ID NO: 19):	APHFDY
3G9-2D2, VH CDR3 (SEQ ID NO: 31):	DLWGWFYFDY
5A8-1F1, VH CDR3 (SEQ ID NO: 43):	DFYWFYFDL
3C7-3A3, VH CDR3 (SEQ ID NO: 55):	EELGIGWFYFDL
2D3-1F5-2A9, VH CDR3 (SEQ ID NO: 67):	SAFDV
1E6-3D10 VH CDR3 (SEQ ID NO: 73):	EPFYDILTGYSPYFDY
5C3-2-3F6 VH CDR3 (SEQ ID NO: 79):	EELGIGWFYFDL
5D12-5G1 VH CDR3 (SEQ ID NO: 91):	GPFRYFDL
VH CDR3 (核心) 共有 (SEQ ID NO: 99): (A,G,Y,S,P,-) (P,W,S,R) (Y,A,H) F D (Y,L,V) (其中,“-”表示在该位点不存在氨基酸残基的选项)	

图 6

人 V_L CDR 共有序列

3D6-2F4	VL CDR1 (SEQ ID NO: 11):	RASQGISSWLA
3D6-4C8	VL CDR1 (SEQ ID NO: 23):	RASQGISSALA
3G9-2D2,	VL CDR1 (SEQ ID NO: 35):	RASQSVSSYLA
5A8-1F1,	VL CDR1 (SEQ ID NO: 47):	RASQSVSSYLA
3C7-3A3,	VL CDR1 (SEQ ID NO: 59):	RASQSVSSYLA
5C3-2-3F6	VL CDR1 (SEQ ID NO: 83):	RASQGISSALA
VL CDR1	共有 (SEQ ID NO: 100): R A S Q (S,G) (I,V) S S (Y,W,A) L A	
3D6-2F4	VL CDR2 (SEQ ID NO: 12):	AASSLQS
3D6-4C8	VL CDR2 (SEQ ID NO: 24):	DASSLES
3G9-2D2,	VL CDR2 (SEQ ID NO: 36):	DASNRAT
5A8-1F1,	VL CDR2 (SEQ ID NO: 48):	DASNRAT
3C7-3A3,	VL CDR2 (SEQ ID NO: 60):	DASNRAT
5C3-2-3F6	VL CDR2 (SEQ ID NO: 84):	DASSLES
VL CDR2	共有 (SEQ ID NO: 101): (D,A) A S (N,S) (R,L) (A,Q,E) (T,S)	
3D6-2F4	VL CDR3 (SEQ ID NO: 13):	QQYNSYPYT
3D6-4C8	VL CDR3 (SEQ ID NO: 25):	QQFNSYPLT
3G9-2D2,	VL CDR3 (SEQ ID NO: 37):	QQRNWPPLT
5A8-1F1,	VL CDR3 (SEQ ID NO: 49):	QQRRT----
3C7-3A3,	VL CDR3 (SEQ ID NO: 61):	QQRRT----
5C3-2-3F6	VL CDR3 (SEQ ID NO: 85):	QQFNSYPH-
VL CDR3	共有 (SEQ ID NO: 102): Q Q (R,Y,F) (R,N) (T,S,N) (Y,W,-) (P,-) (Y,L,H,-) (T,-)	

(Where “-” denotes option of no amino acid residue present at that position)
(其中, “-” 表示在该位点不存在氨基酸残基的选项)

图 7

抗 DEC-205/ 抗原融合 APC 靶向
疫苗构建体的例子 (示意图)

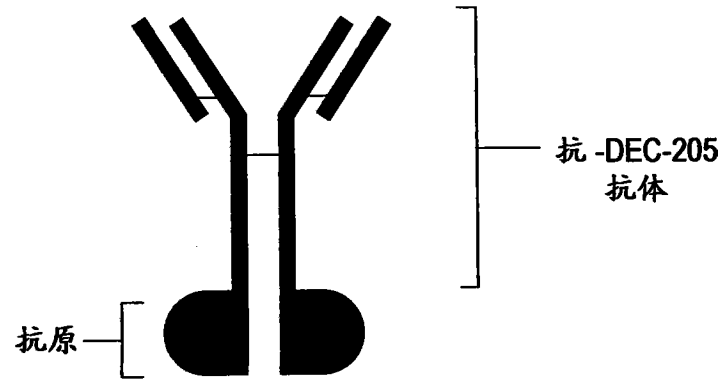


图 8

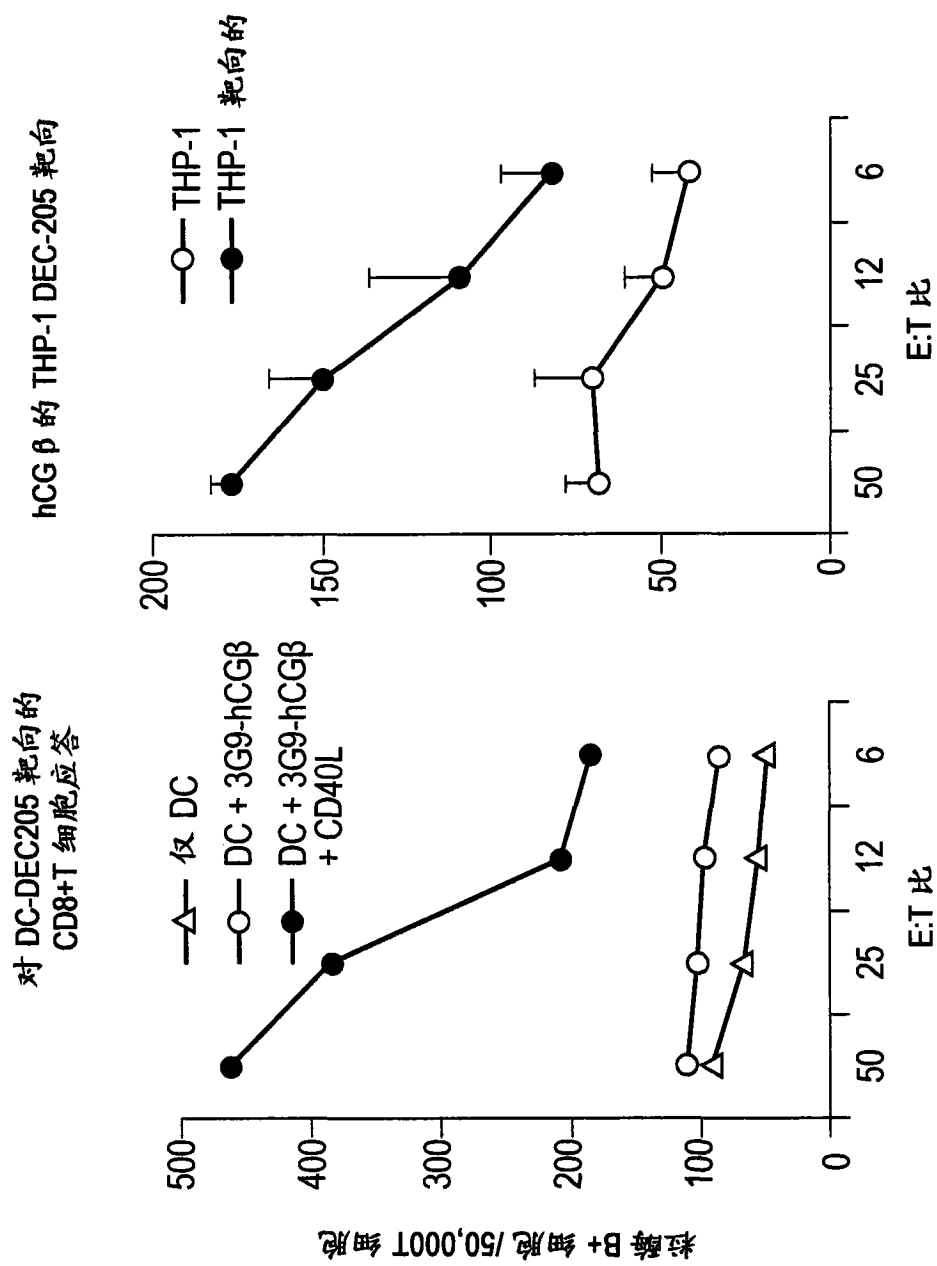


图 9A

DEC-205 在 B 细胞上具有功能

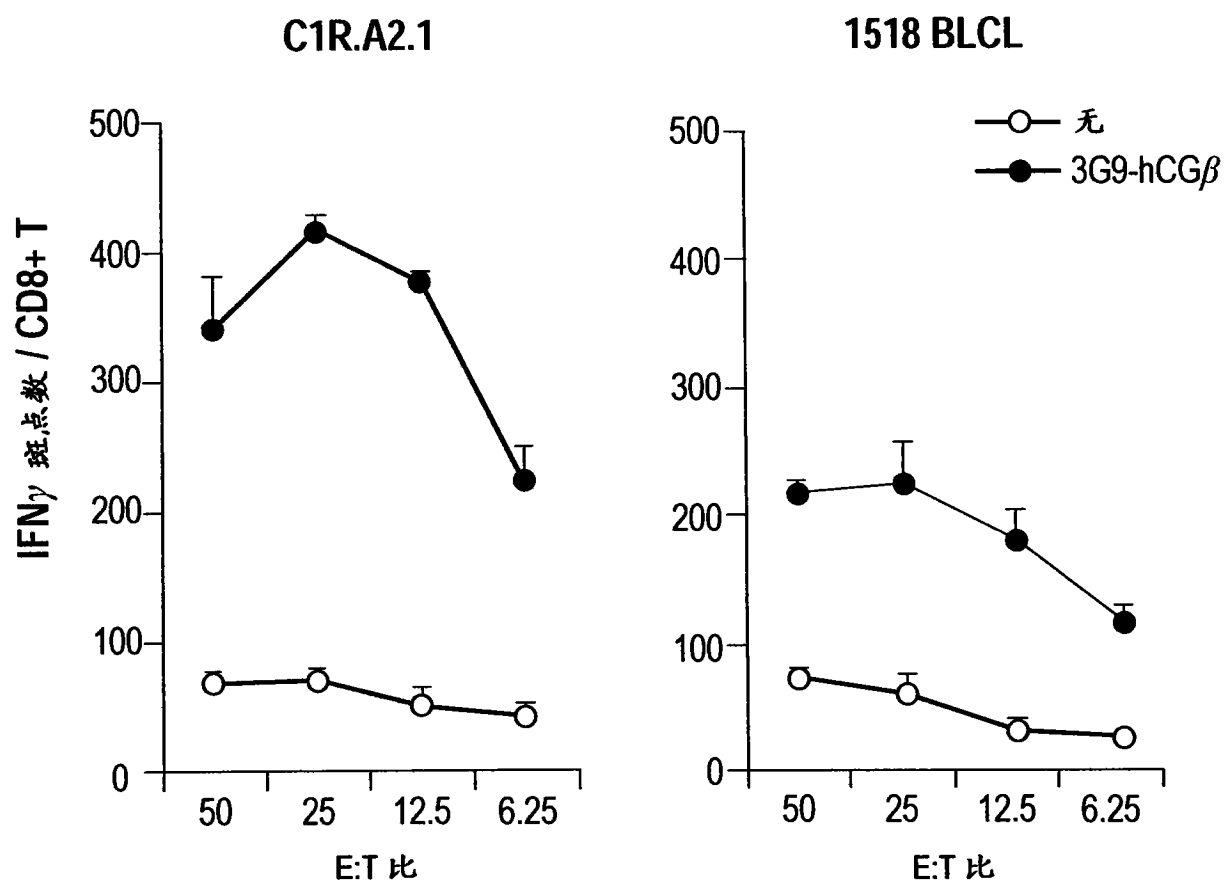


图 9B