



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101039700 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 27

(21) 申请号 200580032427. 9

(22) 申请日 2005. 07. 28

(30) 优先权数据

10/903, 191 2004. 07. 30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 03. 26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/027044 2005. 07. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02006/073493 EN 2006. 07. 13

(73) 专利权人 塞尔德克斯医疗公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 T·克勒 M·恩德雷斯 L·何

V·拉马克里什纳

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 刘冬 刘玥

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

A61P 37/04(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 03040169 A3, 2004. 01. 15,

FRLETA D ET AL. 《Class II-targeted
antigen is superior to CD40-targeted
antigen at stimulating humoral

responses in vivo.》. 《INTERNATIONAL
IMMUNOPHARMACOLOGY》. 2001,

RAMAKRISHNA VENKY ET AL. 《Synergistic
role of TLR Agonists in T cell-mediated
immunity induced by mannose receptor
antibody targeting of tumor
antigens to human DCs》. 《JOURNAL OF
IMMUNOTHERAPY》. 2005,

HE LIZHEN ET AL. 《An antigen presenting
cell-targeted cancer vaccine that elicits
CD4 and CD8 effector responses to the
hCGbeta tumor-associated antigen》.
《PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION
FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING》. 2003,

RAMAKRISHNA V ET AL. 《"Mannose receptor
targeting of tumor antigen pmell7 to human
dendritic cells directs anti-melanoma T
cell responses via multiple HLA molecules》.
《JOURNAL OF IMMUNOLOGY》. 2004,

HE L-Z ET AL. 《A Novel Human Cancer
Vaccine Elicits Cellular Responses to the
Tumor-Associated Antigen, Human Chorionic
Gonadotropin [beta]》. 《CLINICAL CANCER
RESEARCH 》. 2004,

审查员 王海鹏

权利要求书 2 页 说明书 34 页
序列表 18 页 附图 13 页

(54) 发明名称

包含能结合人树突细胞的单克隆抗体和 β
人绒毛膜促性腺激素的疫苗缀合物

(57) 摘要

本发明提供新的抗体疫苗缀合物及使用所述
缀合物诱导细胞毒性 T 细胞 (CTL) 应答的方法。
在一个具体的实施方案中, 该疫苗缀合物包含与
抗甘露糖受体 (MR) 抗体连接的人绒毛膜促性腺
激素 β 亚基 (β hCG) 抗原。

1. 一种用于诱导或增强针对抗原的 T 细胞介导的免疫应答的组合物,其含有 (a) 结合连接到抗原的人巨噬细胞甘露糖受体的抗体的分子缀合物,和 (b) toll 受体激动剂、polyI:C,或其组合,

其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 序列,所述轻链可变区包括 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 序列,其中:

(a) 所述重链可变区 CDR3 序列如 SEQ ID NO:15 所示;所述重链可变区 CDR2 序列如 SEQ ID NO:14 所示;和所述重链可变区 CDR1 序列如 SEQ ID NO:13 所示;并且

(b) 所述轻链可变区 CDR3 序列如 SEQ ID NO:18 所示;所述轻链可变区 CDR2 序列如 SEQ ID NO:17 所示;和所述轻链可变区 CDR1 序列如 SEQ ID NO:16 所示。

2. 一种用于诱导或增强针对抗原的 T 细胞介导的免疫应答的组合物,其含有 (a) 结合连接到抗原的人巨噬细胞甘露糖受体的抗体的分子缀合物,和 (b) toll 受体激动剂、polyI:C,或其组合,

其中所述抗体包含:

(a) 包含重链可变区和轻链可变区的抗体,所述可变区的氨基酸序列分别示于 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:8;或

(b) 与包含重链可变区和轻链可变区的抗体竞争结合人巨噬细胞甘露糖受体的抗体,所述可变区的氨基酸序列分别示于 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:8。

3. 权利要求 1-2 中任一项的组合物,其中所述抗原是细菌、病毒或肿瘤抗原。

4. 权利要求 3 的组合物,其中所述抗原是选自以下的肿瘤相关抗原: β hCG、gp100 或 Pmel17、HER2/neu、CEA、gp100、MART1、TRP-2、melan-A、NY-ESO-1、MN(gp250)、MAGE-1、MAGE-3、酪氨酸酶、端粒酶和 MUC-1 抗原。

5. 权利要求 3 的组合物,其中所述抗原是选自以下的病毒抗原: HIV-1gag、HIV-1env、HIV-1nef、HBV 核心、FAS、HSV-1、HSV-2、p17、ORF2 和 ORF3 抗原。

6. 权利要求 3 的组合物,其中所述抗原是选自以下的细菌抗原: 鼠弓形体 (*Toxoplasma gondii*) 抗原、苍白密螺旋体 (*Treponemapallidum*) 抗原、炭疽抗原、肉毒中毒抗原、破伤风抗原、衣原体病抗原、霍乱抗原、白喉抗原、莱姆病抗原、梅毒抗原和结核病抗原。

7. 权利要求 4 的组合物,其中所述抗原是 β hCG 抗原。

8. 权利要求 1 或 2 的组合物,其中所述 toll 受体激动剂或 polyI:C 连接分子缀合物。

9. 权利要求 8 的组合物,其中所述连接是共价连接、非共价连接或重组连接。

10. 权利要求 1 或 2 的组合物,其中所述抗体、抗原和 toll 受体激动剂、polyI:C,或其组合一起表达为一个重组融合蛋白。

11. 权利要求 1-2 任一项的组合物,其中所述抗体选自人抗体、人源化抗体和嵌合抗体。

12. 权利要求 1-2 任一项的组合物,其中所述抗体选自完整抗体、Fab 片段和单链抗体。

13. 权利要求 1 或 2 的组合物,所述组合物还包含药学上可接受的载体。

14. 权利要求 1 或 2 的组合物,所述组合物还包含佐剂。

15. 权利要求 1 或 2 的组合物,其中所述抗原还连接到一个额外抗原。

16. 权利要求 1 或 2 的组合物,其中所述分子缀合物由 APC 内化并加工,致使产生针对

所述抗原的 T 细胞介导的免疫应答。

17. 权利要求 16 的组合物,其中所述 T 细胞应答是由细胞毒性 T 细胞介导的。

18. 权利要求 16 的组合物,其中所述 T 细胞应答是由 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞介导的。

19. 权利要求 16 的组合物,其中所述 T 细胞应答是通过 I 类 MHC 途径和 II 类 MHC 途径诱导的。

20. 权利要求 1-19 中任一项的组合物在制备用于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。

21. 权利要求 1-19 中任一项的组合物在制备用于对受试者进行免疫的药物中的用途。

22. 权利要求 20 或 21 的用途,所述药物还包括佐剂。

23. 权利要求 20 或 21 的用途,所述药物还包括集落刺激因子。

24. 以下 (a) 和 (b) 一起在制备用于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:

(a) 含有抗原和结合人巨噬细胞甘露糖受体 (MMR) 的单克隆抗体的分子缀合物,其中所述抗体含有包含 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 序列的重链可变区和轻链可变区,并且其中:

重链可变区 CDR3 序列如 SEQ ID NO:15 所示;

重链可变区 CDR2 序列如 SEQ ID NO:14 所示;

重链可变区 CDR1 序列如 SEQ ID NO:13 所示;

轻链可变区 CDR3 序列如 SEQ ID NO:18 所示;

轻链可变区 CDR2 序列如 SEQ ID NO:17 所示;和

轻链可变区 CDR1 序列如 SEQ ID NO:16 所示;和

(b) toll 受体激动剂、polyI:C 或其组合。

25. 权利要求 24 的用途,其中所述抗原是细菌、病毒或肿瘤抗原。

26. 权利要求 24 的用途,其中所述抗体含有包含 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 序列的重链可变区,以及含有包含 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 序列的轻链可变区,其中:

(a) 重链可变区 CDR3 序列如 SEQ ID NO:15 所示;和

(b) 轻链可变区 CDR3 序列如 SEQ ID NO:18 所示;

(c) 重链可变区 CDR2 序列如 SEQ ID NO:14 所示;

(d) 轻链可变区 CDR2 序列如 SEQ ID NO:17 所示;

(e) 重链可变区 CDR1 序列如 SEQ ID NO:13 所示;和

(f) 轻链可变区 CDR1 序列如 SEQ ID NO:16 所示。

27. 权利要求 24 的用途,其中所述抗体包含氨基酸序列示于 SEQ ID NO:4 的重链可变区和包含氨基酸序列示于 SEQ ID NO:8 的轻链可变区,或者所述抗体与上述抗体竞争结合。

28. 权利要求 24 的用途,其中所述药物被制备成 (b) 与 (a) 同时给药的制剂。

29. 权利要求 24 的用途,其中所述药物被制备成 (b) 在 (a) 之前给药的制剂。

30. 权利要求 24 的用途,其中所述药物被制备成 (b) 在 (a) 之后给药的制剂。

包含能结合人树突细胞的单克隆抗体和 β 人绒毛膜促性腺激素的疫苗缀合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2004 年 7 月 30 日申请的美国临时专利申请号 10/903, 191 的优先权。上述申请的全部公开内容通过引用结合到本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 免疫应答起始于专门的抗原呈递细胞 (APC) 水平, 此类细胞包括存在于机体组织中的树突细胞 (DC) 和巨噬细胞 (Mg)。DC 表达高水平的细胞表面分子和补体受体, 它们与 T 淋巴细胞相互作用, 因此能够诱导有效的免疫应答。DC 也分泌细胞因子、趋化因子和蛋白酶, 它们能够启动免疫应答并使细胞免疫和体液免疫的扩增达到顶点。

[0005] DC 在其表面表达结合抗原片段的主要组织相容性复合体 (MHC) 分子。表达能识别这类抗原-MHC 复合物的 T 细胞受体 (TCR) 的 T 细胞被激活并启动免疫级联。一般而言, 有 I 类和 II 类 MHC 分子两类 MHC 分子。I 类 MHC 分子将抗原呈递给特定的 $CD8^+$ T 细胞, 而 II 类 MHC 分子将抗原呈递给特定的 $CD4^+$ T 细胞。

[0006] 为了有效治疗许多疾病, 特别是癌症, 疫苗必须引发有效的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答, 亦称细胞毒性 T 细胞应答。细胞毒性 T 细胞主要包括在 I 类 MHC 情况下识别抗原的 $CD8^+$ T 细胞。与 I 类 MHC 分子有关的抗原加工明显与 II 类 MHC 分子不同。外源性递送到 APC 的抗原主要与 II 类 MHC 分子一起加工。相比之下, 由于 I 类 MHC 分子位于胞内, 内源性递送到 APC 的抗原主要与 I 类 MHC 分子一起加工。这不仅对 APC 如此, 对所有表达 I 类 MHC 分子并在其表面连续展示与 I 类 MHC 分子相关的内源产生的抗原的有核细胞也是如此。

[0007] 因此, 当病毒或肿瘤抗原作为与 I 类 MHC 分子相结合的肽被展示时, CTL 可以靶向表达独特蛋白的感染病毒的细胞或肿瘤细胞。然而在特定条件下, DC 具有独特能力, 也能使外源抗原进入内部区室以结合 I 类 MHC 分子, 致使它们经由 I 类和 II 类 MHC 两种途径呈递给 T 细胞。此过程称为交叉敏化或交叉呈递。

[0008] 因此, 尽管抗体介导应答已经证明, 当直接针对特定的分泌抗原或细胞表面抗原时, 对特定疾病具有一定保护性或治疗性功效, 但是针对多种疾病的最有效的免疫疗法看来都需要 T 细胞介导的免疫应答, 尤其是 CTL 应答。由于有效的 CTL 应答并不限于胞外抗原, 所以有可能开发出基于抗原的治疗性疫苗, 所述疫苗并非有效的抗体靶标。因此, 响应疾病相关抗原而发生的 CTL 新方法具有重大意义, 因为, 通常认为这些细胞对许多疫苗功效来说是至关重要的, 并对大多数治疗性癌症疫苗来说是必不可少的。

[0009] 目前测试的一种疫苗方法使用抗原性肽进行免疫。此免疫方法绕过了对抗原摄取和加工的需求, 而是依赖于肽与 APC 表面已经表达的 I 类 MHC 分子的直接结合能力。尽管此方法已经清楚证明患者体内的 CTL 诱导, 但是该方法有些局限性。抗原性肽必须事先建立, 不同 MHC 单体型的个体需要不同肽, 而且肽在体内寿命短。

[0010] 另一种测试的方法是采用抗体-抗原复合物。Paul 等 (62) 表明, 对给定抗原具有特异性的抗体能增加小鼠针对所述抗原的体液免疫应答, 推测是通过将免疫复合物传递

给 APC 上表达的 IgG 的 Fc 受体 (Fc γ R)。Wernersson 及其同事 (63) 使用免疫复合物,研究了各 Fc γ R 在增强体内免疫应答中的作用。他们的研究证明 Fc γ RI 足以介导增强的免疫应答。然而,这类免疫复合物并不特异性靶向 APC,因为它们也与许多并不参与抗原呈递的细胞上的 Fc 受体结合,因而降低了抗原递送效率。

[0011] 随后的研究使用抗体,以将抗原选择性靶向 APC 上的各种受体,并且已经证明这类选择性呈递能够诱导体液应答 (66,67)。此外,已经知道,在 I 类 MHC 的情况下,与 DC 上的 FcR 结合的免疫复合物被加工和呈递 (64,65)。此外,许多这类靶向 FcR 的方法受到限制,因为 FcR 在许多非 APC 例如血小板和嗜中性白细胞上表达。理想条件下,特异性靶向 APC 并能诱导有效的 I 类 MHC 限制性 CTL 应答以及诱导有效的 II 类 MHC 限制性 TH 应答的疫苗,在治疗某些疾病方面可以提供增强的功效。

[0012] 同样,已经知道,甘露糖基化抗原能诱导体液免疫应答和 T 细胞介导免疫应答,例如 CTL 应答。然而,甘露糖基化抗原并不特异性靶向 APC,因为其它甘露糖结合蛋白含量丰富。而且,甘露糖基化蛋白由未成熟 DC 通过大胞饮机制而内化。因此,通过抗原甘露糖基化而产生的免疫应答机制和性质,与通过用抗体将抗原特异性靶向甘露糖受体的机制和特性截然不同。

[0013] 由于现有方法不能有效而特异性靶向 APC,所以许多治疗用疫苗都需要从患者中纯化 DC,接触抗原后再回输给该患者。

[0014] 因此,需要能有效靶向 APC 并产生抗原特异性 T 细胞介导免疫应答 (包括抗原特异性 CTL 应答) 的改进型疫苗,用于有效治疗多种疾病。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明提供基于抗体的疫苗和方法,用于产生有效治疗多种疾病所需的抗原特异性 T 细胞介导免疫应答。具体地说,使用能结合 APC 上表达的特定受体的抗体,通过将一种或多种蛋白质抗原靶向抗原呈递细胞 (APC) 而诱导有效的抗原特异性细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 应答。优选的受体包括 C-凝集素受体,尤其是树突细胞 (DC) 和巨噬细胞上表达的人甘露糖受体。正如本发明所证明,采用抗体-抗原缀合物靶向甘露糖受体,使得抗原通过 I 类和 II 类 MHC 途径而加工。因此,诱导抗原特异性 CTL (例如 CD8⁺T 细胞) 及其它重要的效应 T 细胞,包括辅助 T 细胞 (例如 CD4⁺T 细胞)。

[0017] 因此,一方面,本发明通过形成抗原与结合人 APC 的单克隆抗体 (例如结合人 APC 上表达的人甘露糖受体的单克隆抗体) 的缀合物,提供一种诱导或增强针对抗原的 CTL 应答的方法。然后,使缀合物在体内或离体与 APC 接触,使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、加工并呈递给 T 细胞。在一个优选实施方案中,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,免疫应答经由 I 类和 II 类 MHC 两种途径而诱导。也可以使 APC 与佐剂或免疫刺激剂例如细胞因子接触,所述免疫刺激剂刺激树突细胞增殖,以进一步增强免疫应答。上述免疫刺激剂可以与分子缀合物单独接触或者与分子缀合物连接。

[0018] 因此,在一个具体的实施方案中,本发明提供疫苗缀合物,其包含与抗原和免疫刺激剂连接的单克隆抗体,其中单克隆抗体能结合人 APC。免疫刺激剂可以与缀合物共价或非共价连接。或者,免疫刺激剂可以与缀合物用基因工程技术融合 (例如与缀合物共同表达为一个融合蛋白)。可以使用各种合适的免疫刺激剂,包括但不限于:CD40 配体;细胞因

子,例如 IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 和 IL-2;集落刺激因子,例如 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;to11 受体激动剂(例如鞭毛蛋白和 MALP-2(巨噬细胞活化脂肽-2);LPS(内毒素);R837(3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN);R848(3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN);聚肌胞苷酸(polyI:C,肌苷:胞苷多核苷酸);ssRNA;dsRNA;卡介苗(BCG);盐酸左旋咪唑;和静脉内免疫球蛋白。

[0019] 本发明的缀合物中可以使用各种合适的抗体,包括但不限于来源于任何物种(例如人、鼠、兔等)的抗体和/或经基因工程和重组表达的抗体(例如嵌合抗体、人源化抗体和人抗体)。优选的抗体包括人单克隆抗体。用于本发明的抗体也可包含任何抗体同种型,例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD 或 IgE,尽管优选的抗体为 IgG 同种型。抗体可为全抗体或其抗原结合片段,包括例如 Fab、F(ab')₂、Fv 和单链 Fv 片段。

[0020] 用于本发明的优选抗体包括与人甘露糖受体结合的人单克隆抗体。在一个实施方案中,抗体由人重链和人 κ 轻链核酸编码,该核酸在其可变区中包含分别示于 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列,或者与 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:7 同源性足够高的核苷酸序列,致使抗体保持与树突细胞结合的能力。

[0021] 另一些优选的人抗体包括具有以下特性的抗体:与人甘露糖受体结合并且具有人重链和人 κ 轻链可变区的抗体,可变区包含分别示于 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列,或者与 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:8 同源性足够高的氨基酸序列,致使抗体保持与树突细胞结合的能力。

[0022] 本发明其它具体的人抗体包括具有人重链和轻链 CDR1 区、人重链和轻链 CDR2 区及人重链和轻链 CDR3 区的互补决定区(CDR)的抗体,其中

[0023] (a) 人重链区 CDR1、CDR2 和 CDR3 包含选自图 8 所示的 CDR1 区、CDR2 区和 CDR3 区的氨基酸序列(SEQ ID NO:13、14 或 15)及其保守序列修饰(conservative sequence modification);和

[0024] (b) 人轻链区 CDR1、CDR2 和 CDR3 包含选自图 9 所示的 CDR1 区、CDR2 区和 CDR3 区的氨基酸序列(SEQ ID NO:16、17 或 18)及其保守序列修饰。

[0025] 本发明也包括得自特定的种系序列的抗体,例如用人免疫球蛋白序列从系统中获得的抗体,例如通过免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠或者通过筛选人免疫球蛋白基因文库获得的抗体。

[0026] 用于本发明的人抗体可在宿主细胞中重组产生,例如含有抗体重链和轻链编码核酸的转染瘤(例如由无限增殖化 CHO 细胞或淋巴细胞组成的转染瘤),或者直接得自表达抗体的杂交瘤(例如其中包含得自转基因非人类动物如转基因小鼠的 B 细胞,其基因组包含编码抗体的人重链转基因和人轻链转基因,并且与无限增殖化细胞融合)。在一个具体的实施方案中,抗体由杂交瘤产生,或者由含有人重链和人轻链核酸的宿主细胞(例如 CHO 细胞)转染瘤产生,所述人重链和人轻链核酸分别包含核苷酸序列 SEQ ID NO:3 和 7 及其保守修饰。

[0027] 用于本发明的合适抗原包括任何抗原或其抗原部分,其为保护性或治疗性免疫应答所必需的,包括例如各种肿瘤抗原和感染性疾病抗原。具体的抗原可选自人绒毛膜促性腺激素 β 亚基(β hCG)、Gp100、前列腺相关抗原(PSA)、Pmel-17、来源于结肠、肺、胰腺、乳腺、卵巢和生殖细胞的肿瘤细胞抗原、病毒蛋白、细菌蛋白、糖类和真菌蛋白。根据本发明,

这类抗原能与抗体连接,形成强效抗体疫苗缀合物。

[0028] 另一方面,本发明提供具体的抗体疫苗缀合物,其包含与抗体连接的 β hCG,其中抗体能结合人甘露糖受体。在一个实施方案中,缀合物包含与 β hCG 连接的人重链,例如本文所述的其重链包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列的 B11- β hCG 缀合物。也提供单链形式的 B11- β hCG 缀合物,其包含 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列。

[0029] 本发明还提供含有一种或多种本发明抗体疫苗缀合物的组合物(例如药物组合物)。

[0030] 所述组合物还可包含一种或多种佐剂或已知能增强免疫应答和/或增加 APC 活性的其它试剂。

[0031] 根据下面的发明详述和所附的权利要求书,本发明的其它特征和优势将会是显而易见的。

[0032] 附图简述

[0033] 图 1 显示分子缀合物 (SEQ ID NO:11 和 12) 的图谱 (pB11sfv- β hCG),编码含有与 β hCG 抗原连接的单链 B11 抗体的融合蛋白。

[0034] 图 2 显示分子缀合物 (SEQ ID NO:9 和 10) 的图谱 (β hCG-B11 构建体),编码含有与 β hCG 抗原连接的完整 B11 抗体的融合蛋白。

[0035] 图 3 是分子缀合物的示意图。抗原与完整抗体的重链用基因工程技术融合在一起。

[0036] 图 4 是流式细胞术研究图,显示 β hCG-B11 构建体与培养的表达 MR 的人 DC 特异性结合。

[0037] 图 5 是曲线图,显示 β hCG-B11 构建体诱导 β hCG 特异性细胞毒性 T 细胞。

[0038] 图 6 是柱状图,显示 β hCG-B11 构建体诱导 β hCG 特异性细胞毒性 T 细胞。

[0039] 图 7 是柱状图,显示 β hCG-B11 构建体诱导 T 辅助细胞应答。

[0040] 图 8 显示带有指定 CDR 区 (SEQ ID NO:13、14 和 15) 的人单克隆抗体 B11 的重链 V 区核苷酸序列 (SEQ ID NO:3) 和相应的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)。

[0041] 图 9 显示带有指定 CDR 区 (SEQ ID NO:16、17 和 18) 的人单克隆抗体 B11 的轻 (κ) 链 V 区核苷酸序列 (SEQ ID NO:7) 和相应的氨基酸序列 (SEQ ID NO:8)。

[0042] 图 10 是根据运用基于网络的预测算法 (BIMAS & SYFPEITHI) 分析,显示 β hCG-B11 构建体的预测 T 细胞表位的示意图。发现 T 细胞表位能潜在结合 HLA-A2、HLA-B7 和 HLA-DR 分子。根据 β hCG-B11 的 B11 区段,也预测了一些表位。在长 37 个氨基酸的 C 端肽中没有鉴定出 T 细胞表位。

[0043] 图 11 是曲线图,显示对 β hCG-B11 构建体具有特异性的 CTL 识别由 DC 呈递的 scFv 形式的抗原 B11sfv- β hCG。

[0044] 图 12 显示人单克隆抗体 B11 重链 V 区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4) 与种系序列 (SEQ ID NO:30) 即 VH5-51 种系序列的比较。

[0045] 图 13 显示人单克隆抗体 B11 重链 V 区的核苷酸序列 (SEQ ID NO:3) 与种系序列 (SEQ ID NO:29) 即 VH5-51 种系序列的比较。

[0046] 图 14 显示带有指定 CDR 区的人单克隆抗体 B11 轻 (κ) 链 V 区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:8) 与种系序列 (SEQ ID NO:32) 即 V κ 5-L15 种系序列的比较。

[0047] 图 15 显示带有指定 CDR 区的人单克隆抗体 B11 轻 (κ) 链 V 区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :7) 与种系序列 (SEQ ID NO :31) 即 V κ 5-L15 种系序列的比较。

[0048] 图 16 显示在表达人甘露糖受体的转基因小鼠 (huMR-tg 小鼠) 中, 间质树突细胞和淋巴结以及周围组织的巨噬细胞对 B11- β hCG 抗原的靶向摄取。

[0049] 图 17 是曲线图, 显示与对照小鼠相比以及与非靶向 β hCG 相比, huMR-tg 小鼠针对 B11- β hCG 的抗原特异性体液应答增强。

[0050] 图 18 是柱状图, 显示与对照小鼠相比以及与非靶向 β hCG 相比, huMR-tg 小鼠针对 B11- β hCG 的抗原特异性细胞应答增强。

[0051] 发明详述

[0052] 本发明基于这样的发现: 用针对特定细胞受体的抗体将抗原靶向抗原呈递细胞 (APC), 可产生重要的 T 细胞介导的免疫应答。具体地说, 为了有效治疗癌症和感染性疾病等多种疾病, 疫苗必须诱发有效的抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答, 在 I 类 MHC 情况下主要由识别抗原的 CD8⁺T 细胞介导。为了优化免疫, 优选伴有其它重要的效应 T 细胞功能, 包括诱导抗原特异性辅助 T 细胞, 例如在 II 类 MHC 途径的情况下识别抗原的 CD4⁺T 细胞。因此, 有效的疫苗应当诱导抗原特异性 CTL, 优选与其它 T 细胞介导免疫应答一起通过多种 MHC 途径诱导抗原特异性 CTL。

[0053] 因此, 本发明提供新的基于抗体的疫苗缀合物和用于诱导或增强抗原特异性细胞毒性 T 细胞 (CTL) 应答的新方法。本发明疗法使用分子缀合物, 该分子缀合物包含与抗原连接的抗体, 其中抗体能结合抗原呈递细胞 (APC), 例如树突细胞 (DC) 和巨噬细胞。分子缀合物可以单独给予或者与其它免疫刺激剂和 / 或佐剂一起给予, 以进一步增强针对抗原的免疫应答。在一个实施方案中, 免疫刺激剂与分子缀合物共同给予。在另一个实施方案中, 免疫刺激剂在给予分子缀合物之前或之后给予。在又一个实施方案中, 免疫刺激剂与分子缀合物连接 (例如共价连接、非共价连接或重组连接)。例如, 可以通过缀合物的抗体部分的重链和 / 或轻链, 将免疫刺激剂用基因工程技术或者用化学方法与分子缀合物融合或连接在一起。

[0054] 靶向 APC 的抗体是本领域已知的, 包括例如靶向 APC 上 I 类或 II 类主要组织相容性 (MHC) 决定簇的抗体 (78, 79, 81, 83)。其它抗体包括靶向 APC 上 Fc 受体的抗体 (77, 79, 80, 81, 82, 83), 以及 B 细胞上的表面免疫球蛋白 (84)。

[0055] 在一个本文示例性的具体实施方案中, 分子缀合物包括与 β hCG 抗原连接的抗体, 其中抗体能结合人 DC 上的甘露糖受体 (MR)。这类缀合物可与 APC 在体内或离体接触, 以产生所需的 CTL 应答。

[0056] 为使本发明更易于理解, 首先定义一些术语。其它定义在发明详述中给出。

[0057] 本文所用的术语“抗原呈递细胞 (APC)”是指一类免疫细胞, 该类细胞能够以能被免疫系统识别的方式内化并加工抗原, 致使抗原决定簇作为 MHC 相关复合体呈递在细胞表面 (例如 I 类 MHC 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞和 / 或 II 类 MHC 限制性辅助 T 淋巴细胞)。让细胞起到 APC 作用的两个必要性质为加工吞入细胞的抗原的能力和表达 MHC 基因产物的能力。APC 的实例包括树突细胞 (DC)、单核吞噬细胞 (例如巨噬细胞)、B 淋巴细胞、皮肤朗格汉斯细胞 (Langerhanscell) 和人体的内皮细胞。

[0058] 本文所用的术语“树突细胞 (DC)”, 包括未成熟 DC 和成熟 DC 以及能够分化成 DC

的相关骨髓样祖细胞或相关抗原呈递细胞（例如单核细胞和巨噬细胞）。DC 表达高水平的细胞表面分子和与 T 淋巴细胞相互作用的补体受体（例如 C 型凝集素受体，诸如甘露糖受体），因此能够诱导有效的免疫应答。DC 也分泌细胞因子、趋化因子和蛋白酶，它们能够启动免疫应答并使细胞免疫和体液免疫的扩增达到顶点。DC 也在其表面表达能结合抗原片段的主要组织相容性复合体（MHC）分子。识别这些抗原-MHC 复合体的 T 细胞被激活并启动免疫级联。在一个优选实施方案中，本发明分子缀合物的抗体部分与树突细胞结合，导致所述缀合物被树突细胞内化。

[0059] 术语“巨噬细胞甘露糖受体”或“MR”是指 C 型凝集素受体家族成员，其特征在于胞外部分重复的糖识别域（CDR）和含有两种推定的网格蛋白靶向序列的短胞质尾区（34，35，37）。此外，MR 含有 N 端丰富的半胱氨酸和纤连蛋白域。甘露糖受体的不同域具有特异性结合各种配体的能力，包括溶酶体酶、微生物、垂体激素、糖胺聚糖和硫酸化血型抗原（38-40）。

[0060] “MHC 分子”包括 I 类 MHC 和 II 类 MHC 两类分子。I 类 MHC 分子将抗原呈递给特异性 CD8⁺T 细胞，而 II 类 MHC 分子将抗原呈递给特异性 CD4⁺T 细胞。外源性递送到 APC 的抗原主要与 II 类 MHC 分子一起加工。相比之下，内源性递送到 APC 的抗原主要与 I 类 MHC 分子一起加工。然而，在特定条件下，DC 具有独特能力，除 II 类 MHC 分子以外，也使外源抗原进入内部区室以结合 I 类 MHC 分子。这一过程称为“交叉敏化”或“交叉呈递”。

[0061] 本文所用的术语“免疫刺激剂”是指能够刺激 APC（例如 DC 和巨噬细胞）的化合物。例如用于本发明的合适免疫刺激剂能够刺激 APC，加速 APC 的成熟过程，增加 APC 的增殖，和 / 或上调共刺激分子（例如 CD80、CD86、ICAM-I、MHC 分子和 CCR7）以及促炎细胞因子（例如 IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-15 和 IFN- γ ）的募集或释放。合适的免疫刺激剂也能增加 T 细胞增殖。这类免疫刺激剂包括但不限于 CD40 配体；细胞因子，例如 IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 和 IL-2；集落刺激因子，例如 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；tol1 受体激动剂（例如鞭毛蛋白和 MALP-2（巨噬细胞活化脂肽-2）；LPS（内毒素）；R837（3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN）；R848（3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN）；聚肌胞苷酸（polyI:C，肌苷：胞苷多核苷酸）；ssRNA；dsRNA；卡介苗（BCG）；盐酸左旋咪唑；和静脉内免疫球蛋白。

[0062] 本文所用的术语“连接”是指两个或多个分子的结合。连接可以是共价连接，或者是非共价连接。连接也可以通过基因工程连接（即重组融合）。可以采用化学缀合和重组蛋白制备等本领域公知的诸多技术，来完成这样的连接。

[0063] 本文所用的术语抗原“交叉呈递”是指经由 APC 上的 I 类和 II 类 MHC 分子将外源蛋白抗原呈递给 T 细胞。

[0064] 本文所用的术语“T 细胞介导的应答”是指所有由 T 细胞、包括效应 T 细胞（例如 CD8⁺ 细胞）和辅助 T 细胞（例如 CD4⁺ 细胞）介导的应答。T 细胞介导的应答包括例如 T 细胞细胞毒性和增殖。

[0065] 本文所用的术语“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。

[0066] 本文所用的术语“抗体”包括完整抗体或其抗原结合片段，包括例如 Fab、F(ab')₂、Fv 和单链 Fv 片段。合适的抗体包括任何形式的抗体，例如鼠抗体、人抗体、嵌合

抗体或人源化抗体和任何类型的抗体同种型,例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD 或 IgE 同种型。本文所用“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别。

[0067] 完整抗体含有通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链由重链可变区(在本文中缩写为 HCVR 或 V_H)和重链恒定区组成。重链恒定区由 CH1、CH2 和 CH3 三个区组成。每条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为 LCVR 或 V_L)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个 CL 区组成。 V_H 区和 V_L 区可进一步细分为高变区,称为“互补决定区(CDR)”,该区散布在更保守的构架区(FR)内。每个 V_H 和 V_L 由三个 CDR 和四个 FR 组成,按照以下顺序从氨基端到羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链可变区和轻链可变区含有与抗原相互作用的结合域。抗体恒定区可介导免疫球蛋白结合宿主组织或因子,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组分(C1q)。

[0068] 优选的本发明抗体包括人抗体,例如具有 IgG1(例如 IgG1k)重链和 κ 轻链的人抗体。其它优选的本发明抗体结合人 DC,例如结合人 DC 上 C 型凝集素受体(如人 DC 上的 MR)的抗体。在一个具体的实施方案中,抗体为人单克隆抗体,该抗体能结合人巨噬细胞甘露糖受体(经 SDS-PAGE 测定,其分子量约为 180kD,在本文中亦称“人 B11 抗原”)。这类抗体的制备方案在 WO 01/085798 有记载,所述专利文献的公开内容通过引用结合到本文中。具体的人抗体包括分别由 SEQ ID NO:2 和 6 所示的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列的抗体,或者与 SEQ ID NO:2 或 6 同源性足够高的氨基酸序列,致使抗体保持与树突细胞结合的能力。

[0069] 本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”(或者简称“抗体部分”),是指一种或多种保持与抗原(例如树突细胞上的抗原)特异性结合能力的抗体片段。已经证明,抗体的抗原结合功能可由全长抗体片段执行。包括在术语抗体的“抗原结合部分”之内的结合片段的实例包括(i)Fab 片段,由 V_L 、 V_H 、CL 和 CH1 区组成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,包含在铰链区通过二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段;(iii)由 V_H 和 CH1 区组成的 Fd 片段;(iv)由抗体单臂的 V_L 区和 V_H 区组成的 Fv 片段,(v)由 V_H 区组成的 dAb 片段(Ward 等,(1989)Nature 341:544-546);和(vi)分离的互补决定区(CDR)。而且,尽管 Fv 片段的 V_L 和 V_H 两个区由独立的基因编码,但是它们可以用重组方法连接在一起,通过合成接头使它们以单一蛋白链形式产生,其中 V_L 区和 V_H 区配对形成单价分子(称为单链 Fv(scFv);参见例如 Bird 等(1988)Science 242:423-426;和 Huston 等(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这类单链抗体也意指包括在术语抗体的“抗原结合部分”之内。这些抗体片段用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且以与完整抗体相同方式筛选出所述片段的用途。

[0070] 本文所用的术语“人抗体”,是用来包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可包括不為人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如随机或体外定点诱变或由体内体细胞突变引入的突变)。然而,本文所用的术语“人抗体”,并不包括来源于另一种哺乳动物(例如小鼠)的 CDR 序列已经移植到人构架序列中的抗体。

[0071] 本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单分子组合物的抗体分子制剂。单克隆抗体组合物对特定表位表现出单一结合特异性和结合亲和性。因此,术语“人单克隆抗体”是指表现出单一结合特异性的抗体,其可变区和恒定区来源于人种系免

疫球蛋白序列。在一个实施方案中,人单克隆抗体由杂交瘤产生,该杂交瘤包括与无限增殖化细胞融合并得自转基因非人类动物例如转基因小鼠的 B 细胞,其基因组包含人重链转基因和轻链转基因。

[0072] 本文所用的术语“重组人抗体”,包括所有用重组方法制备、表达、创建或分离的人抗体,例如 (a) 从带有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分离的抗体,(b) 从经转化以表达抗体的宿主细胞中分离出的抗体,例如,从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) 通过任何涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其它 DNA 序列上的其它方法制备、表达、创建或分离的抗体。这类重组人抗体具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,可对这类重组人抗体进行体外诱变(或者当使用人 Ig 序列的转基因动物时,进行体内体细胞诱变),因此,当得自和涉及人种系 V_H 和 V_L 序列时,重组抗体的 V_H 区和 V_L 区的氨基酸序列可以不是天然存在于体内人抗体种系库中的序列。

[0073] 本文所用的“特异性结合”是指抗体与预定抗原相结合。通常,抗体与预定抗原结合的解离常数 (K_D) 为 $10^{-7}M$ 以下,并且抗体与预定抗原结合的 K_D 比其与非特异性抗原(例如 BSA、酪蛋白)而不是预定抗原或密切相关抗原结合的 K_D 值至少低两倍。“识别抗原的抗体”和“抗原特异性抗体”与“特异性结合抗原的抗体”在本文中可以互换使用。

[0074] 本文所用的术语“高亲和性”,对于 IgG 抗体而言,是指抗体的 K_D 为 $10^{-8}M$ 以下,更优选为 $10^{-9}M$ 以下,甚至更优选为 $10^{-10}M$ 以下。然而,“高亲和性”结合可因其它抗体同种型而变化。例如,“高亲和性”结合,对于 IgM 同种型而言,是指抗体的 K_D 为 $10^{-7}M$ 以下,更优选为 $10^{-8}M$ 以下。

[0075] 本文所用的术语“ $K_{\text{结合}}$ ”或“ K_a ”,是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率,而本文所用的术语“ $K_{\text{解离}}$ ”或“ K_d ”,是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。本文所用的术语“ K_D ”,是指解离常数,其得自 K_d 与 K_a 之比(即 K_d/K_a)并用摩尔浓度(M)表示。

[0076] 本文所用的术语“ β hCG”是指人绒毛膜促性腺激素的 β 亚基,并且包括任何得自 β hCG 序列 (SEQ ID NO :20) 的完整抗原、其抗原性片段、其等位变异体和任何多态变异体。 β hCG 是妊娠成功建立所必需的激素。除妊娠之外,这种抗原的表达主要局限于生殖细胞肿瘤以及多种腺癌。

[0077] 本文所用的术语“核酸分子”,包括 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可为单链或双链,但优选为双链 DNA。

[0078] 本文所用的术语“分离的核酸分子”,是指编码本发明分子缀合物或其部分的核酸,例如 SEQ ID NO :9 和 11 或其部分,诸如抗原或抗体部分(即 V_H 、 V_L 或 CDR)。分离的核酸分子是指编码分子缀合物的核苷酸序列中不含其它污染核苷酸序列(例如不编码分子缀合物任何部分的核苷酸序列)的核酸分子。

[0079] 如本文所公开和所要求,SEQ ID NO :1-28 所示的序列可包括“保守序列修饰”,即核苷酸和氨基酸序列修饰,所述修饰并不显著影响或改变由核苷酸序列编码或含有氨基酸序列的分子缀合物的功能特征,例如构建体抗体部分的结合性质或抗原部分的免疫原性。这类保守序列修饰包括核苷酸和氨基酸的取代、添加和缺失。可通过定点诱变和 PCR 介导的诱变等本领域已知标准技术,将修饰引入 SEQ ID NO :1-28 中。保守氨基酸取代包括氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基置换的取代。具有类似侧链的氨基酸残基家族已在本

领域定义。这些家族包括带碱性侧链的氨基酸（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、带酸性侧链的氨基酸（例如天冬氨酸、谷氨酸）、不带电荷的极性侧链氨基酸（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）、带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）、带 β -分枝侧链的氨基酸（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和带芳族侧链的氨基酸（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。因此，人抗 DC 抗体中预测的非必需氨基酸残基优选相同侧链家族的其它氨基酸残基替代。

[0080] 或者，在另一个实施方案中，在所有或部分分子缀合物编码序列中随机引入突变，例如通过饱和诱变，并且所得修饰的分子缀合物可用来筛选合适的功能活性。

[0081] 因此，由本文公开的核苷酸序列编码的分子缀合物和 / 或含有本文公开的氨基酸序列的分子缀合物（即 SEQ ID NO:1-28），包括由经过保守修饰的类似序列编码的基本类似缀合物或含有所述类似序列的基本类似缀合物。具体地说，下面提供可产生何等基本类似抗体用于基于部分（即重链可变区和轻链可变区）序列（即 SEQ ID NO:3、4、7 和 8）的分子缀合物的讨论。

[0082] 就核酸而言，术语“基本同源”表示两个核酸或其指定序列，当优化比对和比较时是相同的，在至少约 80% 的核苷酸中，通常至少约 90% -95%，更优选至少约 98% -99.5% 的核苷酸中带有适当的核苷酸插入或缺失。或者，当区段在选择性杂交条件下与互补链杂交时，则是基本同源的。

[0083] 两个序列之间的百分同一性为由所述序列共享的相同位置数的函数（即 % 同源性 = 相同位置数 / 总位置数 $\times 100$ ），其中考虑到两个序列最佳比对需要引入空位的空位数，以及每个空位的长度。两个序列之间的序列比较和百分同一性的确定可运用数学算法完成，如以下非限制实例所述。

[0084] 两个核苷酸序列之间的百分同一性可用 GCG 软件包中 GAP 程序（在 <http://www.gcg.com> 上提供）确定，该软件包使用 NWSgapdna.CMP 矩阵，空位加权为 40、50、60、70 或 80，长度加权为 1、2、3、4、5 或 6。两个核苷酸序列或氨基酸序列之间的百分同一性也可用 E. Meyers 和 W. Miller 算法 (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) 确定，该算法已经结合到 ALIGN 程序 (2.0 版) 中，采用 PAM120 权重残基表，空位长度罚分为 12，空位罚分为 4。此外，两个氨基酸序列之间的百分同一性可用 Needleman 和 Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) 算法确定，该算法已结合到 GCG 软件包中 GAP 程序（在 <http://www.gcg.com> 上提供），该软件包使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵，空位加权为 16、14、12、10、8、6 或 4，长度加权为 1、2、3、4、5 或 6。

[0085] 例如，本发明核酸序列和蛋白质序列还可用作“查询序列”搜索公共数据库，以鉴定相关序列。这类搜索可用 Altschul 等 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10 的 NBLAST 和 XBLAST 程序 (2.0 版) 进行。BLAST 核苷酸搜索可用 NBLAST 程序进行，分值 = 100、字长 = 12，以获得与本发明核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白质搜索可用 XBLAST 程序进行，分值 = 50、字长 = 3，以获得与本发明蛋白分子同源的氨基酸序列。为了获得以比较为目的的带空位的比对，可如 Altschul 等，(1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 所述，利用 Gapped BLAST。当利用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序时，可使用相应程序的缺省参数（例如 XBLAST 和 NBLAST）。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0086] 核酸可存在于完整细胞、细胞裂解物或部分纯化的或基本纯化的形式中。当用标准技术,包括碱/SDS 处理、CsCl 分带、柱色谱、琼脂糖凝胶电泳和其它本领域众所周知的方法,从其它细胞组分或其它污染物如其它细胞核酸或蛋白中纯化出核酸时,则该核酸为“分离的”或变成“基本纯的”。参见 F. Ausubel 等(编辑),Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。

[0087] 当将核酸置于与另一核酸序列功能性关系中时,则该核酸与另一核酸序列“有效连接”。例如,如果启动子或增强子影响序列的转录,则它与编码序列有效连接。就转录调节序列而言,有效连接是指所连接的 DNA 序列是相邻的,并且必要时是指连接两个蛋白编码区相邻并符合读框。就开关序列而言,有效连接是指序列能够有效开关重组。

[0088] 本文所用的术语“载体”是指能够转运与其连接的其它核酸的核酸分子。一类载体为“质粒”,其为环状双链 DNA 环,其中可以接入额外 DNA 区段。另一类载体为病毒载体,其中额外 DNA 区段可连接到病毒基因组中。某些载体能够在其被导入的宿主细胞中自主复制(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(例如非附加型哺乳动物载体)在导入宿主细胞后,可整合到宿主细胞基因组中,并因此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与其有效连接的基因的表达。这类载体在本文中称为“重组表达载体”(或者简称“表达载体”)。一般而言,重组 DNA 技术中有用的表达载体通常为质粒形式。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。然而,本发明包括这类其它形式的表达载体,例如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒),它们发挥等效功能。

[0089] 本文所用的术语“重组宿主细胞”(或者简称“宿主细胞”),是指已经导入了重组表达载体的细胞。应当理解,这类术语不仅指具体研究的细胞,也指这类细胞的子代。因为某些修饰可因突变或环境影响而发生于后代中,实际上,这类子代可能与亲代细胞不同,但仍包括与本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。重组宿主细胞包括例如 CHO 细胞和淋巴细胞。

[0090] 本文所用的术语“受试者”包括任何人或非人类动物。术语“非人类动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0091] 本发明的各方面在以下各小节作更详细的描述。

[0092] I. 抗原

[0093] 用于本发明的合适抗原包括例如保护性或治疗性免疫应答所必需的感染性疾病抗原和肿瘤抗原,例如肿瘤细胞或病原生物体表达的抗原或感染性疾病抗原。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。肿瘤相关抗原的实例包括但不限于 β hCG、gp100 或 Pmel17、HER2/neu、CEA、gp100、MART1、TRP-2、melan-A、NY-ESO-1、MN(gp250)、独特型、MAGE-1、MAGE-3、酪氨酸酶、端粒酶、MUC-1 抗原和生殖细胞来源的肿瘤抗原。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。或者,本发明的抗原-抗体构建体中可包括不止一种抗原。例如,MAGE 抗原可与其它抗原(例如黑色素 A、酪氨酸酶和 gp100)以及佐剂(例如 GM-CSF 或 IL-12)组合,并连接到抗 APC 抗体上。

[0094] 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。病毒抗原的实例包括但不限于 HIV-1gag、HIV-1env、HIV-1nef、HBV 核心、FAS、HSV-1、HSV-2、p17、ORF2 和

ORF3 抗原。细菌抗原的实例包括但不限于鼠弓形体 (*Toxoplasma gondii*) 或苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)。本发明的抗体-细菌抗原缀合物可用于治疗或预防各种细菌性疾病,例如炭疽、肉毒中毒、破伤风、衣原体病、霍乱、白喉、莱姆病、梅毒和结核病。

[0095] 在一个本文示例性的具体实施方案中,本发明使用包含 β hCG 的抗原。该抗原包括完整 β hCG 序列 (SEQ ID NO:20) 或该序列的任何免疫原性(例如含 T 细胞表位)部分。如下所述,这类免疫原性部分可用本领域已知的 T 细胞表位作图技术鉴定,包括算法和已知的 T 细胞表位作图技术。来自 β hCG 的免疫原性肽的具体实例包括包含 SEQ IDNO:21、22、23、24、25、26、27 或 28 及其保守修饰的肽。来自 β hCG 的额外的免疫原性肽以及这类肽的鉴定方法,描述于美国专利号 US6,096,318 和 6,146,633 中,其内容通过引用结合到本文中。

[0096] 蛋白质的抗原性肽(即含有 T 细胞表位的肽)可以用各种本领域众所周知的方法鉴定。例如,可用基于网络的预测算法 (BIMAS & SYFPEITHI),通过分析蛋白质序列,预测 T 细胞表位,来产生潜在 I 类和 II 类 MHC 结合肽,该肽与 10,000 个此前由 CTL 界定的明确表征的 MHC 结合肽的内部数据库匹配。高打分肽可根据与给出的 MHC 分子的高亲和性进行排列并选择为“有意义”。如图 10 所示,用 β hCG-B11 缀合物的序列 (SEQ ID NO:10),两种算法都用于鉴定来自 β hCG 部分(芥子)的抗原性肽,合成型可由其形成,并可检测它们在体外引发 T 细胞应答的能力。因此,发现了与 HLA-A2、HLA-B7 和 HLA-DR 分子潜在结合的 T 细胞表位。一些表位也根据 β hCG-B11 缀合物的抗体 (B11) 片段预测(结果未显示)。此外,在长 37 个氨基酸的 C 端肽 (CTP) 中没有鉴定出 T 细胞表位。

[0097] 含有 T 细胞表位的抗原性肽的另一种鉴定方法为:将蛋白质分成所需长度的非重叠肽,或者所需长度的重叠肽,它们可通过重组、合成或在某些限制性位点用化学裂解蛋白质而产生,然后测试免疫原性质,例如引发 T 细胞应答(即增殖或淋巴因子分泌)。

[0098] 例如,为用精细作图技术精确确定蛋白质的 T 细胞表位,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(用 T 细胞生物学技术来测定),可通过在所述肽的氨基端或羧基端添加或缺失氨基酸残基而修饰,然后进行测试以确定 T 细胞对所修饰肽的反应性的变化。如果发现在天然蛋白质序列中重叠区共享的两种或更多种肽具有人 T 细胞刺激活性(用 T 细胞生物学技术来测定),可以产生包含全部或部分这类肽的额外肽,并且可以通过类似的方法对这些额外肽进行测试。按照这一技术,对肽进行选择并用重组或合成方法来生产。根据包括对所述肽的 T 细胞应答强度(例如刺激指数)在内的多种因素对肽进行选择。随后对这些所选肽的理化性质(例如溶解性、稳定性)进行检测以确定该肽是否适用于治疗用组合中,或者是否需要修饰。

[0099] II. 抗体疫苗缀合物

[0100] 本发明提供各种治疗性疫苗缀合物,其包含肿瘤抗原或病毒抗原等抗原,其中所述抗原与抗体连接,所述抗体能结合 APC,例如所述抗体通过甘露糖受体 (MR) 结合到 APC 上。这使得抗原被靶向 APC(例如树突细胞),以增强加工、呈递并最终增强针对所述抗原的免疫应答,例如 CTL 应答。

[0101] 另外,疫苗缀合物可包含一种或多种免疫刺激剂,它们也可增强针对抗原的免疫应答。本发明的抗体-抗原疫苗缀合物可通过基因工程方法或化学方法制备。在这两种情况下,缀合物的抗体部分都可由完整抗体或部分抗体(例如 Fab 片段或单链 Fv)组成。此

外,该缀合物中可包含不止一种抗原和 / 或免疫刺激剂。

[0102] 在一个实施方案中,疫苗缀合物包含能结合人 APC 的人抗体重链以及能结合人 APC 的人抗体轻链,其中该人抗体的任一条或两条链都能与抗原和免疫刺激剂连接。在另一个实施方案中,抗原和免疫刺激剂分别连接在这两条链的其中一条链上。在一个具体的实施方案中,抗原为 β hCG。

[0103] 遗传构建的抗树突抗体 - 抗原缀合物 (例如作为单一重组融合蛋白表达的缀合物) 可通过将所选抗原和 / 或免疫刺激剂 (在蛋白质和肽免疫刺激剂的情况下) 结合抗体的不同位置而制备。本发明具体的基因工程方法产生的缀合物 (融合构建体) 包括例如 β hCG-B11 构建体,如图 2 所示。 β hCG-B11 构建体包含人抗树突细胞抗体 B11,其与肿瘤相关抗原 β hCG 融合。编码该构建体的核苷酸序列示于 SEQ ID NO :9。

[0104] 例如,在一个实施方案中, β hCG-B11 抗原和 / 或免疫刺激剂可以与人抗体重链 CH₃ 区的末端融合。抗原和 / 或免疫刺激剂也可融合在 Fab- 融合构建体中抗体重链铰链区,或者在单链融合构建体 (ScFv 构建体) 中带有可变轻链和重链 (V_H 和 V_L) 的序列中。或者,抗原和 / 或免疫刺激剂可以与抗体轻链而不是抗体重链融合。可以使用免疫刺激剂、抗原和抗体之间的其它融合点,只要遗传融合构建体可引发 CTL 应答。完整 β hCG-B11 构建体和单链 B11 构建体的详细图谱 (pB11sfv- β hCG) 分别见表 1 和表 2。这类遗传融合缀合物可以包含以任何顺序连接抗体的抗原和免疫刺激剂 (例如抗体 - 抗原 - 免疫刺激剂缀合物或抗体 - 免疫刺激剂 - 抗原缀合物)。

[0105] 表 1 : β hCG-B11 特征图谱

[0106] CDS (共 3 个)

[0107] BU_{sfr}-bHCG

[0108] 开始 :921 结束 :2153neo

[0109] 开始 3375 结束 :4169 新霉素抗性基因

[0110] Amp

[0111] 开始 :5671 结束 :6531 (互补) 氨苄青霉素抗性基因

[0112] 其他特征 (共 5 个)

[0113] 启动子

[0114] 开始 :863 结束 :882 启动子

[0115] 信号序列

[0116] 开始 :921 结束 :977 B11 VL

[0117] 开始 :978 结束 :1296 B11 VH

[0118] 开始 :1344 结束 :1691 β HCG

[0119] 开始 :1712 结束 :2164

[0120] 聚腺苷酸化信号 (共 2 个)

[0121] 聚腺苷酸

[0122] 开始 :2267 结束 :2491 聚腺苷酸

[0123] 聚腺苷酸

[0124] 开始 :4343 结束 :4473SV40 聚腺苷酸化信号

[0125] 真核启动子 (共 1 个)

- [0126] 启动子
- [0127] 开始 :232 结束 :819 真核启动子
- [0128] 原核启动子 (共 1 个)
- [0129] 启动子
- [0130] 开始 6566 结束 :6572 (互补) 启动子
- [0131] 复制起点 (共 3 个)
- [0132] SV40 启动子和起点
- [0133] 开始 1 结束 :1 复制起点
- [0134] F1 起点
- [0135] 开始 :2537 结束 :2965 复制起点
- [0136] pUC 起点
- [0137] 开始 4856 结束 :5526 (互补) 起点
- [0138] 表 2 :pB11sfv- β hCG 特征图谱
- [0139] CDS (共 4 个)
- [0140] 轻链
- [0141] 开始 735 结束 :1433B11 轻链
- [0142] C κ
- [0143] 开始 :1113 结束 :1433AMP
- [0144] 开始 :7810 结束 :8670 (互补) amp
- [0145] 起始位点说明 :互补的 1..6871)
- [0146] DHFR
- [0147] 开始 :8921 结束 :9484dhfr
- [0148] 起始位点说明 :7122-7685
- [0149] 其他特征 (共 9 个)
- [0150] B11VL
- [0151] 开始 :792 结束 :1112 SV40 启动子 /Ori
- [0152] 开始 2298 结束 :2622
- [0153] SV40 启动子和复制起点
- [0154] Neo
- [0155] 开始 :2658 结束 :3452 新霉素抗性基因
- [0156] β HCG
- [0157] 开始 :4015 结束 :4467 (互补) bHCG
- [0158] CHS
- [0159] 开始 :4470 结束 :4790 (互补) 重链恒定区 3
- [0160] CH2
- [0161] 开始 :4791 结束 :5120 (互补) 重链恒定区 2
- [0162] CH1
- [0163] 开始 5166 结束 :5459 (互补) 重链恒定区 1
- [0164] B11VH

[0165] 开始 :5460 结束 :5807(互补) 启动子

[0166] 开始 :5905 结束 :6559(互补)

[0167] 聚腺苷酸化信号 (共 3 个)

[0168] 聚腺苷酸

[0169] 开始 :1526 结束 :1757 聚腺苷酸

[0170] 开始 :3744 结束 :3975(互补) 聚腺苷酸化信号 2

[0171] 开始 10282 结束 :10411 SV40 聚腺苷酸

[0172] 起始位点说明 :8483..8612

[0173] 真核启动子 (共 1 个)

[0174] 启动子

[0175] 开始 9 结束 :655

[0176] 化学方法构建的抗体-抗原缀合物可用各种众所周知和易于获得的交联剂制备。这些交联剂可为同官能化合物或杂官能化合物,例如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、磺基琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sulfo-SMCC)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB),它们与抗树突抗体和所选抗原上不同反应性氨基酸或糖侧链形成共价键。其它偶联剂和交联剂也可用于产生共价键,例如 A 蛋白、碳二亚胺和 N,N'-二马来酰(邻苯二)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)。其它方法包括以下文献中介绍的方法: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)。优选的缀合剂是 SATA 和 sulfo-SMCC,这两种都得自 Pierce ChemicalCo. (Rockford, IL)。也可采用与上述方法相同的连接方法,将免疫刺激剂与本发明的分子缀合物进行化学连接。

[0177] 免疫刺激剂和分子缀合物也可通过非共价方法连接,例如使用结合分子,例如链霉抗生物素和生物素。用于本发明的其它合适的结合分子是本领域众所周知的。在本发明的一方面,将编码链霉抗生物素分子的核苷酸序列掺入到编码分子缀合物的序列中,再将其与生物素化免疫刺激剂连接。

[0178] 可选择任何可被克隆和表达或纯化的抗原用于本发明。获得这类抗原的技术是本领域众所周知的。例如,肿瘤相关抗原可直接从癌细胞纯化,并用理化技术例如串联质谱进行鉴定。或者,可用肿瘤特异性 T 细胞克隆测试抗原阴性细胞,该细胞已经通过用质粒 DNA 克隆转染获得抗原,以分离表达抗原的克隆。然后可构建合成肽以精确鉴定抗原位点或表位。

[0179] 如上所述,本发明的分子疫苗缀合物可以与一种或多种免疫刺激剂一起给予,或者包括一种或多种免疫刺激剂。免疫刺激剂可以单独给予,或者按照上述结合技术,与缀合物结合,结合可以是共价结合、非共价结合、用基因工程方法结合或它们的组合。或者,免疫刺激剂可以单独共同给予(co-administered separately),例如该免疫刺激剂可以与分子缀合物同时给予,或在给予分子缀合物之前给予,或在给予分子缀合物之后给予。各种合适的免疫刺激剂是本领域众所周知的,包括例如 CD40 配体;细胞因子,例如 IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 和 IL-2;集落刺激因子,例如 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;tol1 受体激动剂(例如鞭毛蛋白和 MALP-2(巨噬细胞活化脂肽-2);LPS(内毒素);R837(3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN);R848(3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN);聚肌胞苷酸(polyI:C, 肌苷:胞苷多核苷酸);ssRNA;dsRNA;卡介苗(BCG);盐酸左旋咪唑;和静脉内免疫球蛋白。

[0180] 在本发明的另一方面,疫苗构建体的部分抗体序列可用于表达完整抗体。包括在本发明疫苗缀合物中的抗体如抗 APC 抗体(如 B11),主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)的氨基酸残基,与靶抗原(例如 C 型凝集素受体,例如 MR)相互作用。为此,CDR 中的氨基酸序列在各抗体之间比 CDR 外的序列更多样化。因为 CDR 序列负责大多数抗体-抗原相互作用,所以有可能通过构建表达载体而表达模拟特定天然存在抗体性质的重组抗体,所述表达载体包含从不同性质的不同抗体上移植到构架序列上的来自特定天然存在抗体的 CDR 序列(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)。这类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,因为它们不包含完全装配的可变基因,这类基因在 B 细胞成熟期间由 V(D)J 连接形成。种系基因序列也不同于个体中高亲和性第二抗体所有组成成分的序列,该序列均匀分布于可变区。例如,体细胞突变在构架区氨基端部分比较少见。例如,体细胞突变在构架区 1 氨基端部分和构架区 4 羧基端部分比较少见。此外,许多体细胞突变并不显著改变抗体的结合性质。为此,没有必要获得特定抗体的完整 DNA 序列,以重建具有与原始抗体结合性质类似的完整重组抗体(参见 WO 99/45962,其通过引用结合到本文中,用于所有的目的)。跨越 CDR 区的部分重链和轻链序列一般足以达到此目的。所述部分序列用于确定哪个种系可变基因和连接基因区段对重组抗体可变基因产生影响。然后,种系序列用来填补可变区的缺少的部分。重链和轻链前导序列在蛋白成熟期间被切割,并且不会影响最终抗体的性质。为此,有必要使用相应的种系前导序列,用于表达构建体。为了添加缺少的序列,克隆 cDNA 序列可通过连接或 PCR 扩增与合成寡核苷酸结合。或者,完整可变区可合成为一套短的重叠寡核苷酸并经 PCR 扩增结合,以产生完整合成可变区克隆。这一过程具有某些优点,例如消除或包含特定限制位点,或者优化特定密码子。

[0181] 杂交瘤的重链和轻链转录物的核苷酸序列用来设计一套重叠的合成寡核苷酸,以创建其氨基酸编码能力与天然序列相同的合成 V 序列。合成的重链和 κ 链序列在以下三个方面与天然序列不同:间插成串重复核苷酸碱基,以促进寡核苷酸合成和 PCR 扩增;根据 Kozak 规则(Kozak(1991)J. Biol. Chem. 266:19867-19870)加入优化翻译起始位点;HindIII 位点经基因工程改造置于翻译起始位点的上游。

[0182] 就重链可变区和轻链可变区两者而言,优化的编码链序列和相应的非编码链序列大约在相应的非编码寡核苷酸正中间被断裂成 30-50 个核苷酸。因此,对于每条链来说,寡核苷酸可装配成跨越 150-400 个核苷酸区段的重叠双链组。然后,该混合物(pool)用作模板,产生 150-400 个核苷酸的 PCR 扩增产物。通常,将一组可变区寡核苷酸再分成两组,这两组分别进行扩增,得到两种重叠 PCR 产物。这些重叠产物再通过 PCR 扩增结合形成完整的可变区。也可望在 PCR 扩增中包括重链恒定区或轻链恒定区重叠片段(包括 κ 轻链的 BbsI 位点,或者 γ 重链的 AgeI 位点),以产生容易克隆到表达载体构建体中的片段。

[0183] 然后,重建的重链可变区和轻链可变区与克隆的启动子、翻译起点、恒定区、3' 非

翻译聚腺苷酸化和转录终止序列结合,形成表达载体构建体。重链和轻链表达载体构建体可结合单一载体,共同转染、依次转染或独立转染到宿主细胞中,然后融合,以产生表达这两条链的宿主细胞。

[0184] 下面描述用于构建人 IgG κ 的表达载体的质粒。构建质粒,使得 PCR 扩增的 V 重链和 V κ 轻链 cDNA 序列可用来重建完整重链和轻链小基因。这些质粒可用来表达完整的人或嵌合 IgG κ 和 IgG λ 抗体。可构建类似的质粒,表达其它重链同种型,或者表达包含 λ 轻链的抗体。

[0185] 因此,在本发明另一方面,本文所述的疫苗缀合物抗体部分如 B11 的结构特征,用来创建保留至少一种本发明 B11 抗体功能性质(例如结合 APC)的结构相关抗体。更具体地说,B11 的一个或多个 CDR 区可与已知的人构架区和 CDR 重组结合,以创建用于本发明疫苗缀合物的额外的重组工程的抗 APC 抗体。

[0186] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供制备包含抗 DC 抗体的疫苗缀合物的方法,所述方法包括制备包含以下部分的抗体:(1) 人重链构架区和人重链 CDR,其中至少一种人重链 CDR 包含选自图 8 所示的 CDR 氨基酸序列 (SEQ ID NO:13、14 或 15) 的氨基酸序列;和 (2) 人轻链构架区和人轻链 CDR,其中至少一种人轻链 CDR 包含选自图 9 所示的 CDR 氨基酸序列 (SEQ ID NO:16、17 或 18) 的氨基酸序列;其中抗体保留与 APC 结合的能力。

[0187] 抗体与 APC 结合的能力可用例如实施例所述的标准结合试验(如 ELISA)来测定。因为本领域众所周知,抗体重链和轻链 CDR3 区在抗体对抗原的结合特异性/亲和性上起特别重要的作用,所以如上制备的本发明重组抗体优选包含 B11 的重链和轻链 CDR3。抗体还包含 B11 的 CDR2。抗体还可包含 B11 的 CDR1。因此,本发明还提供包含以下部分的抗 APC 抗体:(1) 人重链构架区、人重链 CDR1 区、人重链 CDR2 区和人重链 CDR3 区,其中人重链 CDR3 区为图 8 所示的 B11 的 CDR3 (SEQ ID NO:15);和 (2) 人轻链构架区、人轻链 CDR1 区,人轻链 CDR2 区和人轻链 CDR3 区,其中人轻链 CDR3 区为图 9 所示的 B11 的 CDR3 (SEQ ID NO:18),其中抗体结合 DC。抗体还包含 B11 的重链 CDR2 和 / 或轻链 CDR2。抗体还可包含 B11 的重链 CDR1 和 / 或轻链 CDR1。

[0188] 优选上述工程抗体的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 包含本文公开的 B11 的准确氨基酸序列。然而,普通技术人员将会认识到,在仍保留抗体有效结合 DC 的能力的同时,B11 的准确 CDR 序列的某些改变(例如保守取代)是可行的。因此,在另一个实施方案中,工程抗体可由一个或多个 CDR 组成,这些 CDR 与 B11 的一个或多个 CDR 至少具有例如 90%、95%、98% 或 99.5% 同一性。

[0189] 除了或撇开简单结合 APC 外,如上所述的工程抗体可以根据其保留本发明抗体的其它功能性质进行选择,例如:

[0190] (1) 以高亲和力与 APC 结合;

[0191] (2) 与 APC 上的独特表位结合(当结合使用时,可消除具有补体活性的单克隆抗体竞争结合同一表位的可能性);

[0192] (3) 诱导针对抗原而产生的 T 细胞介导的免疫应答;和 / 或

[0193] (4) 诱导 T 细胞应答,包括 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞介导应答。

[0194] 在另一个实施方案中,转化表达目标抗原如 β hCG 的完整细胞,以表达抗 APC 抗体(例如抗 MR 抗体),致使抗原和抗体由细胞共表达。例如,通过用编码含有跨膜域和抗 APC

抗体的融合蛋白的核酸转染靶细胞的方式,可以做到这一点。表达疫苗缀合物的细胞可接着用于靶向 APC(例如 DC),以诱导 CTL 应答。

[0195] 这类核酸、融合蛋白和表达这类融合蛋白的细胞的制备方法描述于美国专利申请顺序号 09/203,958,该专利文献通过引用全部结合到本文中。

[0196] 或者,可以通过使用化学接头、脂质标记或者其它相关方法,使抗体连接到细胞或病原体上(deKruif, J. 等(2000)Nat. Med. 6:223-227;Nizard, P. 等(1998)FEBS Lett. 433:83-88)。表达目标抗原并具有表面锚定抗体的细胞可用于诱导特异性免疫应答,例如 CTL 应答,以对抗细胞,例如肿瘤细胞或微生物病原体。

[0197] III. 药物组合物

[0198] 另一方面,本发明提供治疗用组合物如药物组合物,其含有一种或组合的本发明疫苗缀合物以及免疫刺激剂。在一个实施方案中,免疫刺激剂与疫苗缀合物连接。本发明的组合物还可包含一种或多种佐剂和/或药学上可接受的载体。给予本发明的疫苗缀合物,以导入受试者血流中,用于与受试者的 T 细胞相互作用。可以通过在体内或离体直接使用缀合物或通过使用先前已经用疫苗缀合物靶向的细胞,完成这类 T 细胞的靶向。

[0199] 本发明组合物还可包含其它治疗药,例如其它抗体、细胞毒素或药物(例如免疫抑制剂),并可单独给予或者与其它疗法例如放疗联合给予。例如,由 APC 快速内化的疫苗缀合物可与增强树突细胞抗原呈递细胞活性(例如释放免疫刺激性细胞因子)的单克隆抗体组合。

[0200] 本文所用的“药学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等生理相容物质。优选的载体适用于静脉内、肌内、皮下、胃肠外、脊柱或表皮给药(例如注射或输注)。根据给药途径,疫苗缀合物可包在材料中以保护化合物免受酸和其它可使化合物失活的自然条件的作用。

[0201] “药学上可接受的盐”是指保留母体化合物所需生物活性并且不产生任何不良毒性效应的盐(参见例如 Berge, S. M. 等(1977)J. Pharm. Sci. 66:1-19)。这类盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括得自无毒无机酸的盐,例如盐酸盐、硝酸盐、磷酸盐、硫酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、亚磷酸盐等,以及得自无毒有机酸的盐,例如脂肪族一和二羧酸盐、苯基取代的烷酸盐、羟基烷酸盐、芳族酸盐、脂族和芳族磺酸盐等。碱加成盐包括得自碱土金属的盐,例如钠盐、钾盐、镁盐、钙盐等,以及得自无毒有机胺的盐,例如 N,N'-二苯甲基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等。

[0202] 本发明的组合物可通过本领域已知的各种方法给予。本领域技术人员将会认识到,给药途径和/或给药方式将取决于所需结果。活性化合物可与防止化合物快速释放的载体一起制备,例如控释制剂,包括植入物和微囊化递药系统。可使用生物可降解的、生物相容性聚合物,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。这类制剂的许多制备方法取得了专利或为本领域技术人员公知。参见例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson 编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0203] 为了通过某些给药途径给予本发明疫苗缀合物,可能有必要用材料包裹化合物或者与将化合物与材料一起给予以防止其失活。例如,化合物可在合适载体(例如脂质体或稀释剂)中给予受试者。药学上可接受的稀释剂包括盐水和水性缓冲溶液。脂质体包括水

包油包水 CGF 乳剂,以及常规脂质体 (Strejan 等 (1984) J. Neuroimmunol. 7 :27)。

[0204] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散体以及用于临时配制成无菌注射液或分散液的无菌粉末。这类介质和药物活性物质的用途是本领域已知的。除任何与活性化合物不相容的常规介质或药物的情况外,考虑了将其用于本发明药物组合物。组合物中也可以加入补充活性化合物。

[0205] 治疗用组合物一般在生产和储藏条件下必须是无菌的,而且是稳定的。组合物可制备成溶液剂、微型乳剂、脂质体或其它适合于高药物浓度的有序结构。载体可为含有例如水、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。可保持合适的流动性,例如,通过使用包衣例如卵磷脂,通过在分散体的情况下保持所需的颗粒大小,以及通过使用表面活性剂等。在许多情况下,会在组合物中优选包含等渗剂,例如糖、糖醇 (例如甘露糖醇、山梨糖醇) 或氯化钠。可通过在组合物中包含延迟吸收剂 (例如单硬脂酸盐和明胶) 而达到注射用组合物的延长吸收。

[0206] 无菌注射液可通过将活性化合物按所需量加入到上述带有一种或组合成分的合适溶剂中制备,如果需要,再进行微滤除菌。一般而言,分散体通过将活性化合物加入到无菌溶媒中制备,该无菌溶媒中含有碱性分散介质和来自以上的所需其它成分。就用于制备无菌注射液的无菌粉针剂而论,优选的制备方法为真空干燥和冷冻干燥 (冻干),可得到活性成分的粉末外加任何来自此前无菌过滤溶液的额外所需成分。

[0207] 调整剂量方案以提供优化所需反应 (例如治疗反应)。例如,可给予一次大剂量,可在某时间段内给予几个分次剂量或根据治疗情况的紧迫性的指示按比例减少或增加剂量。尤其有利的是,为了便于给药和剂量的一致性,将胃肠外组合物配制成剂量单位形式。本文所用的剂量单位形式是指适于用作待治疗受试者单一剂量的物理分离单位;每单位含有经计算与所需药用载体一起产生所需疗效的预定量的活性化合物。本发明剂量单位形式的规格按照和直接根据 (a) 活性化合物的独特特征和所要达到的具体疗效,和 (b) 制备该活性化合物领域固有限制,以治疗敏感个体。

[0208] 药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1) 水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2) 油溶性抗氧化剂,例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,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸 (EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0209] 就治疗用组合物而言,本发明制剂包括适用于口服和 / 或胃肠外给药的制剂。制剂可以适当的单位剂型存在,并可由药学领域任何已知方法制备。可与载体物质混合以制备单一剂型的活性成分的量,将根据待治疗受试者和具体的给药方式而变动。可与载体物质混合以得到单一剂型的活性成分的量,一般会为组合物产生疗效的量。一般而言,以百分之百计,此量的范围为约 0.01% 至约 99% 的活性成分,优选约 0.1% 至约 70%,最优选约 1% 至约 30%。

[0210] 本文所用的短语“胃肠外给药”和“胃肠外给予”是指并非肠道和局部给药的给药方式,通常通过注射,包括并不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内的注射和输注。

[0211] 可用于本发明药物组合物的合适的水和非水载体的实例包括水、乙醇、多元醇

(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物,植物油如橄榄油,以及注射用有机酯如油酸乙酯。可通过例如使用包衣材料如卵磷脂,通过在分散体情况下保持所需颗粒大小,以及通过使用表面活性剂,来保持适当的流动性。

[0212] 这些组合物也可含有辅料,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过如上所述的灭菌程序,并通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂(如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚山梨酸等),确保防止微生物的存在。组合物中包含等渗剂(例如糖、氯化钠等)也是可取的。此外,也可通过包含延长吸收剂(如单硬脂酸铝和明胶)而达到延长注射用药物形式吸收的目的。

[0213] 当本发明化合物作为药物给予人和动物时,可单独给予或作为含有例如与药学上可接受的载体混合的 0.01-99.5% (更优选 0.1-90%) 的活性成分的药物组合物给予。

[0214] 不管所选的给药途径如何,通过本领域技术人员已知的常规方法,将可在合适的水合形式中使用的本发明化合物,和/或本发明药物组合物,配制成药学上可接受的剂型。

[0215] 本发明药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可变动,以获得对具体患者能有效取得所需治疗反应的适量的活性成分、组合物和给药方式,而不引起对患者的毒性。所选剂量水平将取决于各种药代动力学因素,包括本发明所用具体组合物或其酯、盐或酰胺的活性、给药途径、给药时间、所用具体化合物的排泄率、疗程、与所述具体组合物联用的其它药物、化合物和/或材料、待治疗患者的年龄、性别、体重、病情、一般健康状况和先前就医史,以及医疗领域熟知的类似因素。

[0216] 具有本领域普通技能的医师或兽医可轻易确定所需药物组合物的有效量并开出处方。例如,医师或兽医在药物组合物中可从低于达到所需疗效的所需量的本发明化合物开始,并逐渐增加剂量直到取得所需效果。一般而言,本发明组合物的合适日剂量,是所述化合物有效地产生疗效的最低剂量。这类有效剂量通常会取决于上述因素。优选给药途径为静脉内、肌内、腹膜内或皮下,优选在靶部位附近给药。如果需要,治疗用组合物的有效日剂量可在全天适当时间间隔内以 2、3、4、5、6 次或更多分次剂量分别给予,任选以单位剂型给予。虽然可以单独给予本发明化合物,但优选以药物制剂(组合物)给予化合物。

[0217] 治疗用组合物可以用本领域已知的医疗装置给予。例如,在一个优选实施方案中,本发明治疗用组合物可用无针皮下注射装置给予,例如公布于以下美国专利号的装置: 5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824 或 4,596,556。用于本发明的众所周知的植入物和模块的实例包括:美国专利第 4,487,603 号,该专利公开了以可控速率分配药物的可植入微量输液泵;美国专利第 4,486,194 号,该专利公开了通过皮肤给药的治疗装置;美国专利第 4,447,233 号,该专利公开了以精确输注速率给药的医用输液泵;美国专利第 4,447,224 号,该专利公开了连续给药用流速可变的可植入输液装置;美国专利第 4,439,196 号,该专利公开了具有多室隔间的渗透给药系统;和美国专利第 4,475,196 号,该专利公开了渗透给药系统。这些专利通过引用结合到本文中。许多其它这类植入物、给药系统和模块都是本领域技术人员已知的。

[0218] 组合物必须是无菌的,流动性要满足组合物用注射器递送的要求。除了水以外,载体可为等渗缓冲盐溶液、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。可通过例如使用包衣材料如卵磷脂,通过在分散体情况下保持所需颗粒大小,以及通过使用表面活性剂,以保持适当的流动性。在许多情况下,组合物中优选包含等渗剂,例

如糖、糖醇（例如甘露糖醇或山梨糖醇）和氯化钠。可通过在组合物中包含延迟吸收剂（如单硬脂酸铝和明胶等）以达到注射用组合物的长期吸收。

[0219] 当活性化合物如上所述得到适当保护时，化合物可与例如惰性稀释剂或可吸收的食用载体一起口服给予。

[0220] IV. 本发明的用途和方法

[0221] 本发明的疫苗缀合物可用于治疗和 / 或预防（例如免疫）各种疾病和病症。

[0222] 主要的适应症之一为癌症。这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、乳腺癌、白血病或类风湿性成纤维细胞瘤。另一主要的适应症为感染性疾病，包括但不限于 HIV、肝炎（例如甲型、乙型、丙型）、流行性感、疱疹、贾第虫病、疟疾、利什曼原虫病、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus Aureus*）病、铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）病。另一种主要的适应症为自身免疫病。

[0223] 在一个具体的实施方案中，疫苗缀合物用于治疗或预防由 β hCG 或表达 β hCG 的细胞介导的疾病和病症， β hCG 为半胱氨酸环生长因子超家族的成员。有证据表明， β hCG 作为生长因子、血管生成和 / 或转移促进因子，或者作为免疫功能抑制剂，在癌症的建立或发展中起作用（73）。因此，本发明可用于治疗癌症和其它涉及血管生成的疾病的进程。本发明也可通过抑制 β hCG 和 / 或表达 β hCG 的细胞在妊娠中的作用而用于预防或终止意外妊娠。

[0224] 就治疗用途而言，可以将本发明的疫苗缀合物单独或者与免疫刺激剂一起直接给予受试者（即体内）。一方面，免疫刺激剂与缀合物连接。或者，可以将缀合物间接给予受试者，即首先通过使缀合物与 APC 例如树突细胞接触（例如通过培养或孵育），然后将细胞给予受试者（即离体）。缀合物的接触与递送到 APC，致使它们在给药前被加工并由 APC 呈递，亦称抗原或细胞“负载”。将抗原加载到 APC 的技术是本领域众所周知的，并且包括例如 Gunzer 和 Grabbe, *Crit Rev Immunol* 21(1-3):133-45(2001) 和 Steinman, *Exp Hematol* 24(8):859-62(1996)。

[0225] 在所有情况下，疫苗缀合物和免疫刺激剂都以有效量给予，以发挥其所需疗效。术语“有效量”是指必需或足以实现所需生物效应的量。例如，有效量可为消除肿瘤、癌症或细菌、病毒或真菌感染的必需量。任何具体应用的有效量可根据待治疗疾病或病症、待给予的具体缀合物、受试者体型或疾病或病症的严重程度等各种因素而变化。本领域普通技术人员无需进行过多的实验，凭经验就可确定具体多特异性分子的有效量。

[0226] 疫苗缀合物的优选给药途径包括例如注射（例如皮下、静脉内、胃肠外、腹膜内、鞘内）。注射可为快速浓注或连续输注。其它给药途径包括口服给药。

[0227] 本发明的疫苗缀合物也可与辅料和其它治疗剂例如免疫刺激剂共同给予。缀合物通常与一种药学上可接受的载体或载体的组合配制在一起。这类载体的实例包括溶液、溶剂、分散介质、延迟剂、乳剂等。用于药物活性物质的这类介质的用途是本领域众所周知的。任何其它适合与所述分子联用的常规载体在本发明范围之内。

[0228] 与疫苗缀合物共同给予的合适的治疗剂包括其它抗体、细胞毒素和 / 或药物。在一个实施方案中，治疗剂为已知能帮助或诱导免疫应答的抗 CTLA-4 抗体。在另一个实施方案中，治疗剂为化疗药。疫苗缀合物也可与放疗一同给予。

[0229] 通过以下实施例进一步描述本发明,以下实施例不得解释为对本发明的进一步限制。本申请全篇所引用的所有数据和所有参考文献、专利和公布的专利申请的内容,全都通过引用结合到本文中。

[0230] 实施例

[0231] 方法与材料

[0232] 从全血或 leukopak 制备 DC:通过将肝素化全血或带有 Ficol1-Paque 的单采血液成分制剂进行密度梯度离心,获得人外周血单核细胞(PBMC)。然后,通过粘附塑料培养皿或淘析分离单核细胞,并通过向培养基中添加细胞因子(10ng/ml GM-CSF 和 2ng/ml IL-4),使单核细胞分化成未成熟 DC。在第 5 天和第 7 天之间收获 DC,用流式细胞术进行分析。以这种方式制备的 DC 为 CD14⁺、HLA-DR⁺、CD11c⁺ 甘露糖受体⁺ 并且高水平表达 I 类和 II 类 MHC、CD80 和 CD86。

[0233] 肿瘤抗原 β hCG 的选择: β hCG 是人绒毛膜促性腺激素(妊娠成功建立所必需的激素)的亚基。此糖蛋白亚基具有若干特点使其成为癌症免疫治疗中值得关注的抗原(有关综述参见 Triozzi P. L. 和 Stevens V. (1999) Oncology Reports 6:7-17)。首先,除妊娠外,此抗原的表达主要局限于生殖细胞肿瘤,以及大量腺癌(表 3)。其次,hCG 为半胱氨酸环生长因子超家族的成员,并可作为生长因子、血管生成和 / 或转移促进剂,或者作为免疫功能抑制剂在癌症的建立或发展中起作用。因此,限制功能性 hCG 表达的免疫疗法可提供额外的治疗益处。

[0234] 表 3

[0235] 通过免疫组织化学测定的对 β hCG 呈阳性的肿瘤百分率

[0236] (Triozzi P. L. 和 Stevens V. (1999))

[0237]

结肠 (52%)	膀胱 (21%)
肺 (34%)	卵巢 (19%)
胰腺 (31%)	子宫颈 (18%)
食管 (28%)	胃 (18%)
乳腺 (24%)	

[0238] 增殖试验:在 96 孔平底微量板中,效应 T 细胞 (5×10^4) 与有或没有荷载抗原 (MDX-1307 或其它的) 的自身 DC (5×10^3) 共同培养,终体积为 0.2ml。该混合物于 37℃ 共同培养。第 4 天,培养物用 ^3H -胸苷 (1 μ Ci/孔) 进行脉冲,18 小时后,直接在滤器 (Millipore) 上收获细胞。滤器用水洗涤三次,再用乙醇洗涤一次,最后在通风橱中干燥 5-10 分钟。随后将闪烁液 (Packard, 20 μ l/孔) 加入到滤器中。在 Wallac β 计数器上计数以确定滤器结合的放射性。结果表示为用抗原刺激的对未用抗原或用对照抗原刺激的 CTL 的刺激指数 (S. I.) 值 (cpm)。就 MHC 阻断分析而言,标记的靶与 HLA- 特异性 mAb W6/32 和 L243 (20 μ g/ml) 一起在室温下预孵育 30 分钟,其中 W6/32 用于阻断所有 I 类 HLA 分子, L243 用于阻断所有 II 类 HLA 分子。通过离心除去未结合的 mAb。

[0239] **流式细胞术**:通过在 GM-CSF 和 IL-4 中培养 5 天,用单核细胞制备人 DC。将 DC 与 $10 \mu\text{g/ml}$ β hCG 抗原 / 抗 MR 抗体疫苗缀合物或同种型对照一起在冰上孵育。疫苗缀合物直接用 FITC- 标记或用 FITC- 标记的抗 β hCG 第二单克隆抗体进行检测。用 LSR 流式细胞仪测定结合荧光的细胞。

[0240] **细胞毒性试验**:靶细胞 (3×10^6)、对照和荷载抗原 (β hCG-B11) 用 RPMI 培养基洗涤两次,将沉淀重悬于 $200 \mu\text{l}$ 培养基中并用 $100 \mu\text{Ci}$ $^{51}\text{Na}_2\text{CrO}_4$ 于 37°C 标记 60 分钟。标记的靶用 RPMI 培养基洗涤三次,沉淀重悬浮,使细胞浓度为 3×10^4 细胞 / ml。抗原特异性 CTL 在 96 孔 V- 形底板中进行滴定,得出比值为 100 : 1 (效应 T 细胞 (E) : 靶 (T)) 直到 12.5 : 1 或更低。加入恒定数目的标记靶 ($100 \mu\text{l}$ / 孔或 3,000 靶细胞 / 孔),将板以低速 ($180 \times g$) 离心并于 37°C 孵育。4 小时后,收获 $100\text{--}120 \mu\text{l}$ 上清液,用 γ - 计数器 (Wallac Instruments, Perkin-Elmer) 测定释放的放射性。CTL 活性用以下方程计算并表示为 % 特异性裂解 (杀伤) :

[0241]

$$\text{特异性裂解(\%)} = \frac{\text{实验性释放(cpm)} - \text{自发释放(cpm)}}{\text{最大释放(cpm)} - \text{自发释放(cpm)}} \times 100$$

[0242] 其中实验性释放 (cpm),是指含有 CTL (E) 和靶 (T) 的孔的放射性 (释放的铬);自发释放 (cpm),是指在 0.1ml 培养基中只有靶 (即没有添加 CTL) 的孔的放射性;而最大释放是指在 0.1ml 去污剂溶液 (Igepal CA 630 ;syn. NP-40 ;RPMI 培养基中的 5% 溶液) 中有靶孔的放射性。在孔 - 控制的实验条件下,自发释放值应为最大释放的 10% 以下。就 MHC 阻断分析而言,将标记的靶与 HLA- 特异性 mAb W6/32 和 L243 ($20 \mu\text{g/ml}$) 一起在室温下预孵育 30 分钟,其中 W6/32 用于阻断所有 I 类 HLA 分子,L243 用于阻断所有 II 类 HLA 分子。通过离心除去未结合的 mAb,将 mAb- 包被靶加到 CTL 上。用同种型匹配的 mAb 作为对照。

[0243] 还有另一种方法来检查细胞介导的免疫应答,该方法对抗原 - 驱动的 T 细胞的增殖能力进行研究。当事先暴露的抗原存在于 II 类 MHC 和程度较低的 I 类分子时,抗原敏化的 T 细胞往往优先增殖。因此,分裂细胞摄取放射性示踪物的计数提供了刺激的度量。

[0244] **体内抗原分布**:给小鼠两个前爪的每侧经皮下 (s. c.) 注射 $5 \mu\text{g}$ B11- β hCG/ $5 \mu\text{l}$ PBS。通过同样途径给予同样数量的无关人 IgG1 (Sigma-Aldrich) 作为无靶对照。24 小时后,收获注射部位周围和远端的皮肤,并收获近端 (腋窝) 和远端 (腹股沟) 淋巴结、脾、肝和肺。将这些器官快速冷冻并切片,用抗 hCG (抗原) 抗体或人 IgG 进行免疫组织化学染色 (以检测 B11)。

[0245] **免疫**:对于体液应答而言,每只 8-12 周龄的小鼠用 B11- β hCG/ $100 \mu\text{l}$ PBS 经 i. p. 免疫,间隔 2 周,共免疫 3 次。在用于比较的另一侧肢体,注射等量的无 β hCG (United States Biological, Swampscott, MA),注射制剂和时间进程均同上。每次研究都包括 5-6 只转基因 (tg) 小鼠和相同数量的年龄、性别相匹配的野生型 (Wt) 小鼠。第 0 天 (作为基线) 和每次注射后 1 周,在麻醉条件下从眼眶窦 (orbital sinus) 采集血样,分离血浆并贮存于 -20°C ,用于 ELISA。

[0246] 对于 T 细胞应答,通过 i. p. 给予 8-12 周龄小鼠 $1\text{--}2 \mu\text{g}$ B11- β hCG/ $100 \mu\text{l}$ 佐剂 (CPG 和 Poly:IC) 一次。每次研究都分别包括 2-3 只 tg 小鼠和 Wt 小鼠。重复这些研究中的某些工作,以证实结果。注射后 14 天,从这些小鼠采血和脾脏。从这些血中分离出的血

浆贮存于 -20°C ，用于抗体亚类的分析。

[0247] ELISA：通过标准 ELISA，用固定化 β hCG 或 B11 进行捕获，用碱性磷酸酶 (AP) - 缀合的山羊抗小鼠 IgG Fc γ 抗体 (JacksonImmunoResearch Lab, West Grove, PA) 进行检测，测定抗 β hCG 和抗 B11 效价。从 1 : 100 开始，连续稀释血浆样本，通过计算在 OD_{405} 所得到的吸光度比未免疫小鼠血清对照高出两倍的各样本稀释度，测定其效价。通过 ELISA 方法，用 SBA Clonotyping System/AP (SouthernBiotechnology Associates, Birmingham, AL) 对抗体亚类进行测定。

[0248] ELISPOT：用 ELISPOT 装置 (BD Biosciences)，按照制造商的方案进行测定。研磨脾脏并裂解红细胞，制备单脾细胞悬液。在包被了抗 IFN γ 或 IL-4 抗体的 96 孔滤板中，在 RPMI 1640 完全培养基中进行培养，浓度为 0.5×10^6 细胞 / 孔或 1×10^6 细胞 / 孔。向培养物中加入 15-mer β hCG 重叠肽混合物 (涵盖整个 β hCG 序列，由 Synpep Corporation (Dublin, CA) 合成)，终浓度为 $1.7 \mu\text{g/ml}$ ，在 37°C 孵育 40 小时。不含肽混合物的各孔 (空白) 作为非特异性背景对照。含有 10ng/ml PMA 外加 $1 \mu\text{g/ml}$ 伊屋诺霉素 (Sigma-Aldrich) 的各孔作为阳性对照，用于斑点显色试验和小鼠的免疫活性。每份样品的每种处理条件都一式三份。由 ZellNet Consulting, Inc. (Fort Lee, NJ) 分析各板。各样品的抗原 β hCG 特异性斑点数是减去空白对照的数目后的肽处理小孔的三次重复的平均值 $\pm$ SD。

[0249] 实施例 1： β hCG-B11 的产生

[0250] 疫苗缀合物的设计：通过将 β hCG 抗原与 B11 即结合树突细胞上的人巨噬细胞甘露糖受体的完整人抗体连接，产生该构建体。通过遗传融合方法，使抗原与抗体的重链通过共价结合完成键合，如图 3 所示。

[0251] β hCG-B11 疫苗缀合物的重组表达：如图 2 所示，产生含有新霉素基因和二氢叶酸还原酶基因的质粒，其含有与抗体 B11 在重链 CH_3 区融合的 β hCG 编码序列 (SEQ ID NO :9 和 10)。采用标准化方案 (Qiagen Inc, Valencia, CA)，将所得质粒构建体转染到 CHO 细胞中。将转染细胞在含有抗生素 G418 的培养基中进行选择。让细胞在浓度逐渐增高的甲氨蝶呤中生长，进一步扩增表达。扩增后，通过有限稀释克隆细胞，稳定的克隆系用来产生细胞库供进一步研究用。为了确证 β hCG-B11 构建体的表达，在还原性条件下，通过 SDS-PAGE 对蛋白质进行蛋白质印迹分析。观察到该融合蛋白具有预期分子量并适当装配 (即既含有重链融合物又含有轻链)。准确地说，疫苗缀合物和抗体单独通过 SDS-PAGE 用变性条件进行分析，用蛋白质印迹分析进行检测。然后所述印迹分别用山羊抗人 IgG 重链和轻链和 β hCGC 端肽特异性的 mAb (Sigma) 进行探测。结果证明，转化的 CHO 细胞特异性表达 B11- β hCG 疫苗缀合物，证据为融合产物的合适的大小和组成。

[0252] 实施例 2：B11scfv- β hCG 的产生

[0253] 疫苗缀合物的设计：通过使 β hCG 抗原与 B11 单链融合体 (ScFv) 连接产生第二构建体，B11 单链融合体 (ScFv) 是能与树突细胞上的人巨噬细胞甘露糖受体结合并且含有完整人 B11 抗体 V_L 和 V_H 片段的单链抗体。通过遗传融合方法，使抗原与 B11 ScFv 的羧基端通过共价结合完成键合，如图 1 所示 (称为 B11scfv- β hCG 构建体)。

[0254] B11scfv- β hCG 疫苗缀合物的重组表达：如图 1 所示，产生含有 B11scfv- β hCG 构建体 (SEQ ID NO :11 和 12) 的质粒。采用标准化方案 (Qiagen Inc, Valencia, CA)，将所得

质粒构建体转染到哺乳动物细胞中。将转染细胞在含有抗生素 G418 的培养基中进行选择。进行 ELISA 以证实 B11sfv- β hCG 构建体的表达。

[0255] 实施例 3 :疫苗缀合物的功能特征

[0256] 抗体-靶向疫苗对其在 APC 表面的关联受体的识别是此递药平台的第一步。用流式血细胞计数研究已证实 β hCG-B11 和 B11sfv- β hCG 构建体与表达 MR 的培养人 DC 特异性结合 (图 4)。

[0257] 用抗 MR 抗体作为探针,检查人皮肤 DC 和各种人体组织切片中巨噬细胞上 MR 的原位染色。人体组织冷冻切片用抗 MR 人抗体 B11 染色。存在于皮肤表皮层的 DC 用 B11 抗体清楚地标记 (数据未显示)。注意到在皮肤表皮层有与 DC 的结合。而且,用所有组织中的抗 MR B11 HuMAb 染色的树突细胞进行的免疫组织化学实验,检验并显示没有意外的交叉反应性 (结果未显示)。这些研究已经用 β hCG-B11 重复进行,得到相同的结果。

[0258] 实施例 4 :将 β hCG 抗原 / 抗 MR 抗体疫苗缀合物交叉呈递给 T 细胞

[0259] 评价了 β hCG-B11 构建体被 DC 加工以将 β hCG 抗原经由 DC 上的 I 类和 II 类 MHC 分子呈递给 T 细胞 (交叉呈递) 的能力。具体地说,通过将正常 T 细胞库与暴露给疫苗的 DC 一起培养,用 β hCG-B11 构建体引发抗原特异性 T 细胞 (应答)。然后,分析所得“敏化”T 细胞的活性 (增殖和杀伤) 和特异性。通过将响应具有 β hCG 抗原的靶细胞的 T 细胞活性与抗原阴性对照进行比较,可以证明 T 细胞的特异性。细胞毒性 T 细胞 (CTL),如果存在,应当只杀伤呈递 β hCG 相关抗原的那些靶,而放过缺乏所述抗原或呈递无关抗原的对照靶。因为 CTL 介导的抗原识别总是发生在带有所述肽的给定 MHC 分子的情况下,阻断 MHC :肽-CTL 与 MHC 特异性 mAb 的相互作用,从而证实 I 类或 II 类呈递。

[0260] 抗原特异性效应 T 细胞的诱导: 通过将贴壁单核细胞与 25ng/ml 重组人 GM-CSF (R&D systems, MN) 和 100ng/ml 重组人 IL-4 一起培养 5 天,由正常供体外周血单核细胞 (PBMC) 产生树突细胞。第 5 天,收获 DC (未成熟) 并将其重悬于 AIM-V (无血清) 培养基中。将 β hCG-B11 免疫缀合物 (20 μ g/ml) 加入到 1.2×10^6 DC 中并于 37°C 孵育 45 分钟。让荷载抗原的 DC 在 CD40L (Peprotech, NJ ; 20ng/ml) 存在下成熟至少 24 小时。洗涤成熟的 DC (1×10^6) 一次,并以 1×10^6 细胞 /ml (DC : T 细胞比值, 20) 加入到预先接种到 24 孔板的 T 细胞 (2×10^7 ; 总量) 中。采用以下培养条件 :先在第 0 天加入 10ng/ml IL-7,再在第 1 天 (在 24 小时) 加入 10ng/ml IL-10,最后在第 2 天 (在 48 小时) 加入 20U/ml IL-2。在第 7、14 和 21 天如上所述重新刺激,只是 β hCG-B11 的浓度减半 (分别为 10 μ g/ml、5 μ g/ml 和 2.5 μ g/ml)。检验 T 细胞 (以大量或用纯化 T 细胞亚群) 对 ^{51}Cr 标记的未荷载 DC、 ^{51}Cr 标记的荷载 β hCG-B11、B11sfv- β hCG 或 B11 的 DC 的反应性。在 HLA- 特异性 mAb 存在下确定 MHC- 特异性。

[0261] 如图 5 所示, β hCG-B11 构建体诱导 β hCG- 特异性细胞毒性 T 细胞。如果 T 细胞与不呈递 β hCG 的靶一起培养,则不能保证杀伤力。这些实验中使用的靶细胞是用 β hCG-B11 构建体或对照抗原处理过的 HLA- 匹配的 DC。仅用抗 MR 抗体 (B11) 处理的靶细胞对细胞毒活性不敏感,这证明了只有疫苗的抗原部分才能引发 CTL 活性。这些结果表明, β hCG-B11 构建体能诱导有效的 CTL 活性,准确地说, CTL 活性是针对 β hCG 抗原而不是靶向抗体 (B11)。

[0262] 而且,呈递 β hCG 抗原的靶的有效杀伤力用纯化的 CD8^+ T 细胞再现,在抗 I 类 MHC

抗体存在下,该杀伤力被阻断(图6)。具体地说, β hCG-B11 构建体用来由两个供体的外周血单核细胞产生 β hCG- 特异性 T 细胞。用免疫磁珠从大量培养物中纯化 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞。细胞毒性试验如上所述进行,效应物:靶比值设在 40 : 1。靶细胞(未成熟 DC) 未经处理(对照)或负载 β hCG-B11 构建体。为了证明 I 类 MHC 特异性,通过与 HLA 特异性抗体预孵育来阻断靶细胞杀伤力(W6/32)。

[0263] 总起来说,这些数据(图6和图7)证实 β hCG-B11 构建体诱导有效的 β hCG- 特异性 CTL 的能力,也证实 CTL 活性由 $CD8^+$ T 细胞以 HLA- 依赖性方式介导。用纯化的 $CD4^+$ T 细胞没有观察到杀伤活性。

[0264] 如图7所示, β hCG-B11 构建体引起的 T 细胞在响应靶向 DC 的 β hCG-B11 构建体时增殖。具体地说,用 β hCG-B11 构建体处理 DC,由外周血单核细胞产生 β hCG- 特异性 T 细胞。检测来自大量培养物的 T 细胞($CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞)在响应抗原刺激时的增殖。在有或没有 HLA 阻断抗体存在下,将 T 细胞与未经处理 DC(对照)或荷载 β hCG-B11 构建体的 DC 共同培养。为了测量增殖,培养 5 天后,用 3H - 胸苷分析 DNA 合成。数据表示为相对于对照的增殖的增加倍数(刺激指数)。就 CTL 活性来看,当 T 细胞被 DC 单独刺激(即无抗原)时,没有发现合适的应答。只用未缀合的抗体(抗 MR B11 mAb)靶向的 DC 不能诱导由 β hCG-B11 构建体引起的 T 细胞的增殖。T 细胞的增殖能力在抗 I 类以及 II 类 MHC- 特异性 mAb 存在下被有效阻断,证明 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞是有反应的。这些数据显示,由 DC 对 β hCG-B11 构建体的摄取,使得疫苗可以进入 I 类和 II 类 MHC 的加工途径,该途径与带有 MHC 区室的 MR 的共区域化是一致的。

[0265] 实施例 5 :DC 对抗 MR 抗体 B11 的内化较之于 DC 对甘露糖基化抗原的内化(对网格蛋白介导的内化的抑制)

[0266] 未成熟 DC 可通过胞饮或受体介导的胞吞机制吸收可溶性抗原(55)。抗原内化机制决定其细胞内命运并可影响对它的免疫应答质量(54,55,56)。通过 MR 的内化被描述为快速、网格蛋白介导的内化事件(57,58)。MR 本身在其胞质尾区内具有两个推定的网络蛋白靶向序列,甘露糖基化金颗粒的内化已经被 EM 定位到披网格蛋白小窝(58,59)。网络蛋白依赖型内吞可通过短暂高渗休克或 K^+ 耗尽而特异性中断(61)。为了确定结合甘露糖受体的甘露糖基化抗原或 B11 是否经披网格蛋白小窝内化,在 B11mAb 或甘露糖基化 BSA 存在下,将未成熟 DC 在含有或不含 400mM 蔗糖的 AIM5 培养基中、在冰上培养 30 分钟。随后将细胞加热到 37°C 并使其内化 20 分钟。洗涤并固定后,细胞用共焦显微镜法进行分析(数据未显示)。当 B11 结合 MR 时,其摄取被高渗休克所抑制,表明其内化机制是通过披网格蛋白小窝。甘露糖基化 BSA 的摄取正好相反,不被高渗休克抑制,这表明其内化机制不依赖于披网格蛋白小窝的形成。甚至在比 B11 的浓度高 20 倍的情况下,甘露糖基化 BSA FITC 的表面染色相对较弱。其后的研究揭示出内化的甘露糖基化 BSA FITC 与非特异性、液相示踪物共定位,其中作为含有内化 B11 的小囊泡排除非特异性示踪物(数据未显示)。与 B11-FITC 相反,甘露糖基化的 BSA-FITC 和液相示踪物的摄取,通过用 PI3K 抑制剂渥曼青霉素预处理,而大半被阻断(数据未显示)。这些结果表明,绝大多数甘露糖基化 BSA 通过未成熟树突细胞经非特异性大胞饮机制吸收,提示针对甘露糖基化抗原的免疫应答质量可能与特异性靶向 MR 的抗原相差甚远。

[0267] 实施例 6 :B11sfv- β hCG 与 DC 的结合

[0268] 在 37℃, 将单核细胞衍生的 DC 暴露于 PBS-BSA 缓冲液中的 B11sfv- β hCG 或 β hCG-B11 中达 45 分钟, 并在 CD40L 存在下, 使其成熟过夜。收获的 DC 随后经洗涤并先后用小鼠抗 β hCG、山羊抗 huIgG (F_c)-PE 缀合物染色。染色的细胞在流式细胞仪 (BD-LSR) 上进行分析。每个样品大约收集 10,000 个事例。背景自动荧光和同种型匹配的抗体染色用作对照。根据平均荧光强度 (MFI) (数据未显示), B11sfv- β hCG 与 DC 上表达的 MR 的结合类似于 β hCG-B11 的结合。

[0269] 实施例 7: 对 β hCG-B11 构建体具有特异性的 CTL 识别由 DC 呈递的抗原 (B11sfv- β hCG) 的 scFv 形式

[0270] 针对抗 DC- 呈递的 β hCG-B11 产生的 CTL, 要测试其暴露于 β hCG-B11 和 B11sfv- β hCG 的自体 DC 靶, 同时用未经处理 DC 或暴露于 B11 的 DC 作为对照。抗原暴露后, 靶用 ⁵¹ 铬标记并在一个 4 小时的试验中与 CTL 混合, 该试验测量上清液中放射性的释放。在该实验中, β hCG-B11- 特异性 T 细胞识别呈递 I 类 MHC 分子上抗原的 4 个靶中的 2 个。当 DC 缺少抗原时, 不发生靶的杀伤 (图 11)。因此, DC 对 β hCG-B11 的摄取, 导致 β hCG- 来源的 T 细胞表位被 CTL 识别。

[0271] 实施例 8 表达人甘露糖受体的转基因小鼠的产生

[0272] 靶向人甘露糖受体 (MR) 的抗体与来自实验室常用的其它物种 (包括猴) 的 MR 没有交叉反应。因此, 开发了能够表达人 MR 的转基因小鼠。采用标准微注射技术, 用全部 30 个外显子基因以及来自 5' 端和 3' 端的额外序列, 产生表达人 MR 的转基因小鼠。选择 C57B1/6 品系作为人 MR 转基因小鼠 (huMR-tg) 的背景, 因为对于该品系已经建立了免疫和肿瘤攻击实验。采用不同方法, 证明了人 MR 转基因的表达和调节类似于人体组织中 MR 的表达和调节 (数据未显示)。

[0273] 实施例 9 MR 表达细胞有效荷载 B11- β hCG

[0274] 给予 B11- β hCG 后 24 小时, 通过分析来自表达人甘露糖受体 (hMR) 的转基因小鼠组织, 研究了 B11- β hCG 的体内靶向能力。对淋巴结和邻近注射部位周围组织中的 β hCG 抗原进行免疫化学染色, 证明淋巴结组织和周围巨噬细胞和间质树突细胞 (图 16) 内明显有抗原蓄积。在不表达 hMR 的对照小鼠中没有观察到染色, 表明靶向 hMR 在抗原呈递细胞和淋巴结中有效地荷载了抗原。

[0275] 具体地讲, 给表达人甘露糖受体的转基因小鼠 (huMR-tg 小鼠) 或 WT 同窝出生的小鼠在其肢体注射 B11- β hCG (10 μ g)。24 小时后, 切取邻近淋巴结和周围组织, 对 β hCG 进行染色。组织切片用抗 β hCG 多克隆抗体染色, 再用过氧化物酶标记的抗兔 IgG 聚合物试剂处理。如图 16 所示, WT 小鼠未观察到染色, 而在 huMR-tg 小鼠的淋巴结和周围组织的间质树突细胞和巨噬细胞内都观察到染色。

[0276] 实施例 10 当靶向 MR 时, 针对 h β CG 的体液和细胞应答增强

[0277] 通过用 B11- β hCG 免疫 huMR-tg 小鼠及其 Wt 同窝出生小鼠, 研究了对 MR 具有特异性的靶向抗体的疫苗的潜力。与非转基因的同窝出生小鼠相比, 转基因小鼠针对 B11- β hCG 的抗原特异性体液免疫发展更快更高 (参见图 17)。具体地讲, 如图 17 所示, 用 10 μ g B11- β hCG 或等量的无 β hCG 给小鼠免疫 3 次 (第 1、15 和 29 天, 如箭头所指)。每次免疫后 1 周给小鼠放血。用标准 ELISA 测定抗 β hCG 效价。

[0278] 同样, 与非转基因的同窝出生小鼠相比, 用 B11- β hCG 免疫的 huMR-tg 小鼠表

现出针对 B11- β hCG 的细胞免疫应答较强 (图 18)。具体地讲,如图 18 所示,对照 (Wt) 和 huMR-tg 小鼠用 B11- β hCG (1 μ g i.p. 和佐剂) 免疫。14 天后收获脾细胞,并用标准 ELISPOT 测定分析响应 β hCG 肽的 IFN- γ 产生。这些研究进一步证明了在体内将抗原靶向 APC 的效力。此外,在缺乏佐剂时容易观察到体液应答,而当 B11- β hCG 与佐剂例如 poly-IC 和 CPG 联用时,细胞对 β hCG 的应答更显著。

[0279] 等同实施方案

[0280] 仅用常规实验,本领域技术人员就会认识或者能够确定本文所述发明的具体实施方案的许多等同实施方案。这些等同实施方案包括在所附权利要求书中。

[0281] 文献引用

[0282] 本文引用的所有专利、待审批的专利申请和其它出版物,全都通过引用结合到本文中。

[0283] 参考文献

[0284] 1. Steinman, R. M., 1991, The dendritic cell system and its role in immunogenicity (树突细胞系统及其在免疫原性中的作用). *Annu Rev Immunol.* 9 :271.

[0285] 2. Hart, D. N., 1997, Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response (树突细胞: 控制初次免疫应答的独特白细胞群体). *Blood.* 90 :3245.

[0286] 3. Banchereau, J. 和 R. M. Steinman, 1998, Dendritic cells and the control of immunity (树突细胞及其免疫控制). *Nature.* 392 :245.

[0287] 4. Thery C. 和 S. Amigorena, 2001, The cell biology of antigen presentation in dendritic cells (树突细胞抗原呈递的细胞生物学). *Curr Opin Immunol.* 13 :45.

[0288] 5. Hsu F. J., C. Benike, F. Fagnoni, T. M. Liles, D. Czerwinski, B. Taidi, E. G. Engleman 和 R. Levy, 1996, Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells (用自身抗原脉冲的树突细胞对 B 细胞淋巴瘤患者进行接种). *Nat Med.* 2 :52.

[0289] 6. Kirk C. J. 和 J. J. Mule, 2000, Gene-modified dendritic cells for use in tumor vaccines (用于肿瘤疫苗的经基因修饰的树突细胞). *Hum Gene Ther.* 11 :797.

[0290] 7. Thurner B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. von den Driesch, E. B. Brocker, R. M. Steinman, A. Enk, E. Kampgen 和 G. Schuler, 1999, Vaccination with mAGE-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma (在晚期 IV 黑素瘤中, 用 mAGE-3A1 肽脉冲的成熟、单核细胞来源的树突细胞进行免疫接种, 扩增特异性细胞毒 T 细胞并诱导某些转移瘤的消退). *J Exp Med.* 190 :1669.

[0291] 8. Dallal R. M. 和 M. T. Lotze, 2000, The dendritic cell and human cancer vaccines (树突细胞与人类癌症疫苗). *Curr Opin Immunol.* 12 :583.

[0292] 9. Nair S., J. S. Babu, R. G. Dunham, P. Kanda, R. L. Burke 和 B. T. Rouse, 1993, Induction of primary, antiviral cytotoxic, and proliferative responses with antigens administered via dendritic cells (用通过树突细胞给予的抗原诱导初次抗病

毒细胞毒性和增殖应答). J Virol. 67 :4062。

[0293] 10. Gilboa E., 1999, The makings of a tumor rejection antigen(肿瘤排斥抗原的制备). Immunity. 11 :263。

[0294] 11. Fields R. C., K. Shimizu, J. J. Mule, 1998, Murine dendritic cell pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immuneresponses in vitro and in vivo(用完全肿瘤裂解物脉冲的鼠树突细胞在体外和体内均介导有效抗肿瘤免疫应答). Proc Natl Acad Sci USA. 95 :9482。

[0295] 12. Carayanniotis G. 和 B. H. Barber, 1987, Adjuvant-free IgG responses induced with antigen coupled to antibodies against class II MHC(用与抗 II 类 MHC 抗体偶联的抗原诱导的无佐剂 IgG 应答). Nature. 327 :59。

[0296] 13. Snider D. P. and D. M. Segal, 1987, Targeted antigen presentation using crosslinked antibody heteroaggregates(用交联抗原杂聚集体进行靶向抗原呈递). J Immunol. 139 :1609。

[0297] 14. Wang H., M. N. Griffiths, D. R. Burton 和 P. Ghazal, 2000, Rapid antibody responses by low-dose, single-step, DCs-targeted immunization(低剂量一步法 DC 靶向免疫的快速抗体应答). Proc Natl Acad Sci USA. 97 :847。

[0298] 15. Jiang W., W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R. M. Steinman 和 M. C. Nussenzweig, 1995, The receptor DEC-205 expressed by DCs and thymic epithelial cells is involved in antigen processing(DC 和胸腺上皮细胞表达的受体 DEC-205 参与抗原加工). Nature. 375 :151。

[0299] 16. Keler, T., P. M. Guyre, L. A. Vitale, K. Sundarapandian, J. G. J. van de Winkel, Y. M. Deo 和 R. F. Graziano, 2000, Targeting weak antigens to CD64 elicits potent humoral responses in human CD64 transgenic mice(在人 CD64 转基因小鼠中, 将弱抗原靶向 CD64 引发有效体液应答). J. Immunol. 165 :6738。

[0300] 17. Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Théry, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli 和 S. Amigorena, 1999, Fc γ Receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization(免疫复合物内化后, Fc γ 受体介导的对树突细胞成熟的诱导和 I 类主要组织相容性复合体 - 限制性抗原呈递). J. Exp. Med. 189 :371。

[0301] 18. Wallace P. K., K. Y. Tsang, J. Goldstein, P. Correale, T. M. Jarry, J. Schlom, P. M. Guyre, M. S. Ernstoff 和 M. W. Fanger, 2001, Exogenous antigen targeted to Fc γ RI on myeloid cells is presented in association with MHC class I(靶向骨髓细胞上的 Fc γ RI 的外源抗原与 I 类 MHC 一起呈递). J Immunol Methods. 248 :183。

[0302] 19. Berlyn K. A., B. Schultes, B. Leveugle, A. A. Noujaim, R. B. Alexander 和 D. L. Mann, 2001, Generation of CD4(+) and CD8(+) T lymphocyte responses by dendritic cells armed with PSA/anti-PSA(antigen/antibody) complexes(用 PSA/ 抗 PSA(抗原 / 抗体) 复合物武装的树突细胞诱导产生 CD4(+) 和 CD8(+) T 淋巴细胞应答). Clin Immunol. 101 :276。

[0303] 20. Dhodapkar K. M. , J. Krasovsky, B. Williamson 和 M. V. Dhodapkar, 2002, Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells(抗肿瘤单克隆抗体增强细胞抗原的交叉呈递并由树突细胞产生骨髓瘤特异性杀伤 T 细胞). *J Exp Med.* 195 :125。

[0304] 21. Lonberg N. , L. D. Taylor, F. A. Harding, M. Trunstin, K. M. Higgins, S. R. Schramm, C. C. Kuo, R. Mashayekh, K. Wymore, J. G. McCabe 等, 1994, Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications(来自包含 4 个不同遗传修饰的小鼠的抗原特异性人抗体). *Nature.* 368 :856。

[0305] 22. Fishwild D. M. , S. L. O' Donnell, T. Bengoechea, D. V. Hudson, F. Harding, S. L. Bernhard, D. Jones, R. M. Kay, K. M. Higgins, S. R. Schramm, and N. Lonberg, 1996, High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice(来自小基因座转基因小鼠新品系的高亲和力人 IgG κ 单克隆抗体). *Nat Biotechnol.* 14 :845。

[0306] 23. Kohler G. 和 C. Milstein, 1975, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity(分泌预定特异性抗体的融合细胞连续培养). *Nature.* 256 :495。

[0307] 24. Fanger, N. A. , D. Voigtlaender, C. Liu, S. Swink, K. Wardwell, J. Fisher, R. F. Graziano, L. C. Pfefferkorn 和 P. M. Guyre, 1997, Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc γ RI (CD64) expressed on human blood DCs(人血 DC 上表达的高亲和性 IgG 受体 Fc γ RI (CD64) 的表达、细胞因子调节和效应子功能的表征). *J Immunol.* 158 :3090。

[0308] 25. Gosselin, E. J. , K. Wardwell, D. R. Gosselin, N. Alter, J. L. Fisher 和 P. M. Guyre, 1992, Enhanced antigen presentation using human Fc γ receptor (monocyte/macrophage)-specific immunogens(用人 Fc γ 受体(单核细胞/巨噬细胞)特异性免疫原使抗原呈递增强). *J. Immunol.* 149 :3477。

[0309] 26. Stahl P. D. , 1992, The mannose receptor and other macrophage lectins(甘露糖受体及其它巨噬细胞凝集素). *Curr Opin Immunol.* 4 :49。

[0310] 27. Uccini S. , M. C. Sirianni, L. Vincenzi, S. Topino, A. Stoppacciaro, I. Lesnani La Parola, M. Capuano, C. Masini, D. Cerimele, M. Cella, A. Lanzavecchia, P. Allavena, Mantovani, C. D. Baroni 和 L. P. Ruco, 1997, Kaposi's sarcoma cells express the macrophage-associated antigen mannose receptor and develop in peripheral blood cultures of Kaposi's sarcoma patients(在卡波西肉瘤患者外周血培养物中, 卡波西肉瘤细胞表达巨噬细胞相关抗原甘露糖受体并发育). *Am J Pathol.* 150 :929。

[0311] 28. Magnusson S. 和 T. Berg, 1993, Endocytosis of ricin by rat liver cells in vivo and in vitro is mainly mediated by mannose receptors on sinusoidal endothelial cells(大鼠肝细胞体内和体外胞吞作用主要由窦状小管内皮细胞介导). *Biochem J.* 291 :749。

- [0312] 29. Noorman F., E. A. Braat, M. Barrett-Bergshoeff, E. Barbe, A. van Leeuwen, J. Lindeman 和 D. C. Rijken, 1997, Monoclonal antibodies against the human mannose receptor as a specific marker in flow cytometry and immunohistochemistry for macrophages (在巨噬细胞流式细胞术和免疫组织化学中作为特异性标记的针对人甘露糖受体的单克隆抗体). *J Leukoc Biol.* 61 :63。
- [0313] 30. Nobes C., Marsh M., 2000, Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? (树突细胞: Cdc42 和 Rac 在抗原摄取中的新作用?) *Curr Biol.* 10 :20。
- [0314] 31. Lanzavecchia A., 1996, Mechanisms of antigen uptake for presentation (用于呈递的抗原摄取机制). *Curr Opin Immunol.* 8 :3。
- [0315] 32. Harris J., Werling D., Hope J. C., Taylor G., Howard C. J., 2002, Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions (免疫细胞中的胞膜窖和窖蛋白: 分布和功能). *Trends Immunol.* 23 :3。
- [0316] 33. Apostolopoulos V., McKenzie I. F., 2001, Role of the mannose receptor in the immune response (甘露糖受体在免疫应答中的作用). *Curr Mol Med.* 1 :4。
- [0317] 34. East L., Isacke C. M., 2002, The mannose receptor family (甘露糖受体家族). *Biochim Biophys Acta.* 1572 :2-3。
- [0318] 35. Lew D. B., Songu-Mize E., Pontow S. E., Stahl P. D., Rattazzi M. C., 1994, A mannose receptor mediates mannosyl-rich glycoprotein-induced mitogenesis in bovine airway smooth muscle cells (在牛呼吸道平滑肌细胞中, 甘露糖受体介导富含甘露糖基的糖蛋白诱导的有丝分裂发生). *J Clin Invest.* 94 :5。
- [0319] 36. Mueller A., Kelly E., Stramge P. G., 2002, Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5 (趋化因子受体 CCR5 的内化和再循环途径). *Blood.* 99 :3。
- [0320] 37. Taylor M. E., J. T. Canary, M. R. Lennartz, P. D. Stahl 和 K. Drickamer, 1990, Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains (甘露糖受体一级结构含有类似糖识别域的多个基序). *J Biol Chem.* 265 :12156。
- [0321] 38. Taylor M. E., 2001, Structure and function of the macrophage mannose receptor (巨噬细胞甘露糖受体的结构和功能). *Results Probl Cell Differ.* 33 :105。
- [0322] 39. Simpson D. Z., P. G. Kitchen, E. L. Elmhirst 和 M. E. Taylor, 1999, Multiple interactions between pituitary hormones and the mannose receptor (垂体激素和甘露糖受体之间的多重相互作用). *Biochem J.* 343 :403。
- [0323] 40. Irjala H., E. L. Johansson, R. Grenman, K. Alanen, M. Salmi 和 S. Jalkanen, 2001, Mannose receptor is a novel ligand for L-selectin and mediates lymphocyte binding to lymphatic endothelium (甘露糖受体是新的 L-选择蛋白的配体并介导淋巴细胞与淋巴内皮细胞结合). *J Exp Med.* 194 :1033。
- [0324] 41. Lee, S. J., S. Evers, D. Roeder, A. F. Parlow, J. Risteli, L. Risteli, Y. C. Lee, T. Feizi, H. Langen 和 M. C. Nussenzweig, Mannose receptor-mediated regulation of

serum glycoprotein homeostasis(血清糖蛋白稳态的甘露糖受体介导的调节). Science 295 :1898。

[0325] 42. Condaminet B., J. Peguet-Navarro, P. D. Stahl, C. Dalbiez-Gauthier, D. Schmitt 和 O. Berthier-Vergnes, 1998, Human epidermal Langerhans cells express the mannose-fucose binding receptor(人表皮朗格汉斯细胞表达甘露糖-岩藻糖结合受体). Eur J Immunol. 28 :3541。

[0326] 43. Reis e Sousa C., P. D. Stahl 和 J. M. Austyn, 1993, Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro(朗格汉斯细胞的体外吞噬抗原). J Exp Med. 178 :509。

[0327] 44. Mommaas A. M., A. A. Mulder, R. Jordens, C. Out, M. C. Tan, P. Cresswell, P. M. Kluin 和 F. Koning, 1999, Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules(人表皮朗格汉斯细胞缺乏功能性甘露糖受体和完全发育的核内体/溶酶体区室用于荷载 II 类 HLA 分子). Eur J Immunol. 29 :571。

[0328] 45. Lohse A. W., P. A. Knolle, K. Bilo, A. Uhrig, C. Waldmann, M. Ibe, E. Schmitt, G. Gerken, K. H. Meyer Zum Buschenfelde, 1996, Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells(鼠窦状小管内皮细胞和肝巨噬细胞的抗原呈递功能和 B7 表达). Gastroenterology. 110 :1175。

[0329] 46. Tan M. C., A. M. Mommaas, J. W. Drijfhout, R. Jordens, J. J. Onderwater, D. Verwoerd, A. A. Mulder, A. N. van der Heiden, D. Scheidegger, L. C. Oomen, T. H. Ottenhoff, A. Tulp, J. J. Neefjes 和 F. Koning, 1997, Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured DCs(甘露糖受体介导的抗原摄取强烈增强培养的 DC 对 II 类 HLA- 限制性抗原的呈递). Eur J Immunol. 27 :2426。

[0330] 47. Engering A. J., M. Cella, D. M. Fluitsma, E. C. Hoefsmit, A. Lanzavecchia 和 J. Pieters, 1997, Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human DCs(人 DC 中甘露糖受体介导的抗原摄取和呈递). Adv Exp Med Biol. 417 :183。

[0331] 48. Apostolopoulos V., G. A. Pietersz, S. Gordon, L. Martinez-Pomares 和 I. F. McKenzie, 2000, Aldehyde-mannan antigen complex target the MHC class I antigen-presentation pathway(醛-甘露聚糖抗原复合物靶向 I 类 MHC 抗原-呈递途径). Eur J Immunol. 30 :1714。

[0332] 49. Prigozy T. I., P. A. Sieling, D. Clemens, P. L. Stewart, S. M. Behar, S. A. Porcelli, M. B. Brenner, R. L. Modlin 和 M. Kronenberg, 1997, The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules(甘露糖受体将脂聚糖抗原递送给核内体用于通过 CD1b 分子呈递给 T 细胞). Immunity. 6 :187。

[0333] 50. Apostolopoulos V., B. E. Loveland, G. A. Pietersz 和 I. F. McKenzie, 1995, CTL in mice immunized with human mucin 1 are MHC-restricted(用人粘蛋白 1 免疫的小鼠 CTL 是 MHC 限制性的). J Immunol. 155 :5089。

[0334] 51. Dhodapkar M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz 和 N. Bhardwaj,

2001, Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells(人效应T细胞功能在注射未成熟树突细胞后的抗原特异性抑制). J Exp Med 193 :233。

[0335] 52. Hawiger D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman 和 M. C. Nussenzweig, 2001, Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo(在体内持续稳态条件下, 树突细胞诱导外周 T 细胞无反应性). J Exp Med. 194 :769。

[0336] 53. Wallace, P. K., Romet-Lemonne, J. L., Chokri, M., Fanger, M. W. 和 Fadul, C. E., Production of macrophage activated killer cells for invivo targeting to glioblastoma with a bispecific antibody to Fc γ RI and EGF receptor(巨噬细胞的产生激活杀伤细胞, 用于在体内靶向带有针对 Fc γ RI 和 EGF 受体的双特异性抗体的成胶质细胞瘤), Cancer Immunol. Immunother. 49 :493-503, 2000。

[0337] 54. Nobes C., Marsh M., Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? (树突细胞: Cdc42 和 Rac 在抗原摄取中的新作用?) Curr Biol. 2000 年 10 月 19 日; 10(20) :R739-41。

[0338] 55. Lanzavecchia A., Mechanisms of antigen uptake for presentation(用于呈递的抗原摄取机制). Curr Opin Immunol. 1996 年 6 月; 8(3) :348-54。

[0339] 57. Harris J, Werling D, Hope JC, Taylor G, Howard CJ, Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions(免疫细胞中的胞膜窖和窖蛋白: 分布和功能). Trends Immunol. 2002 年 3 月; 23(3) :158-64。

[0340] 58. Apostolopoulos V., McKenzie IF Role of the mannose receptor in the immune response(甘露糖受体在免疫应答中的作用). Curr Mol Med. 2001 年 9 月; 1(4) : 469-74. Review PMID :11899091[PubMed-indexed for MEDLINE]。

[0341] 59. East L, Isacke CM, The mannose receptor family(甘露糖受体家族). Biochim Biophys Acta. 2002 年 9 月 19 日; 1572(2-3) :364-86。

[0342] 60. Lew DB, Songu-Mize E, Pontow SE, Stahl PD, Rattazzi MC, A mannose receptor mediates mannosyl-rich glycoprotein-induced mitogenesis in bovine airway smooth muscle cells(在牛呼吸道平滑肌细胞中, 甘露糖受体介导富含甘露糖基的糖蛋白诱导的有丝分裂发生). J Clin Invest. 1994 年 11 月; 94(5) :1855-63。

[0343] 61. Mueller A, Kelly E, Strange PG, Related Articles, Links Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5(趋化因子受体 CCR5 的内化和再循环途径). Blood. 2002 年 2 月 1 日; 99(3) :785-91。

[0344] 62. Cohen, B. E., A. S. Rosenthal 和 W. E. Paul, 1973, Antigen-macrophage interaction. II. Relative roles of cytophilic antibody and other membrane sites(抗原-巨噬细胞相互作用. II. 嗜细胞抗体和其它膜位点的相对作用). J. Immunol. 111 :820。

[0345] 63. Wernersson, S., Karlsson M. C. I., **Dahlström** J., Mattsson R., Verbeek J. S. 和 Heyman B, 1999, IgG-mediated enhancement of antibody responses is low in Fc receptor γ δ chain-deficient mice and increased in Fc γ RII-deficient mice(IgG

介导的抗体应答增强在 Fc 受体 $\gamma\delta$ 链缺陷型小鼠中低下,但在 Fc γ RII 缺陷型小鼠中增加)。J. Immunol. 163 :618。

[0346] 64. Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Théry, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli 和 S. Amigorena, 1999, Fc $\gamma\delta$ Receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization(免疫复合物内化后, Fc $\gamma\delta$ 受体介导的对树突细胞成熟的诱导以及对 I 类主要组织相容性复合体-限制性抗原呈递的诱导)。J. Exp. Med. 189 :371。

[0347] 65. Wallace P. K., K. Y. Tsang, J. Goldstein, P. Correale, T. M. Jarry, J. Schlom, P. M. Guyre, M. S. Ernstoff 和 M. W. Fanger, 2001, Exogenous antigen targeted to Fc γ RI on myeloid cells is presented in association with MHC class I(靶向骨髓细胞上的 Fc γ RI 的外源抗原与 I 类 MHC 一起呈递)。J Immunol Methods. 248 :183。

[0348] 66. Snider D. P. 和 D. M. Segal, 1987, Targeted antigen presentation using crosslinked antibody heteroaggregates(用交联抗体杂聚集体进行靶向抗原呈递)。J. Immunol. 139 :1609。

[0349] 67. Carayanniotis G. 和 B. H. Barber, 1987, Adjuvant-free IgG responses induced with antigen coupled to antibodies against class II MHC(用与针对 II 类 MHC 的抗体偶联的抗原诱导的无佐剂 IgG 应答)。Nature. 327 :59。

[0350] 68. Taylor M. E., 2001, Structure and function of the macrophage mannose receptor(巨噬细胞甘露糖受体的结构和功能)。Results Probl Cell Differ. 33 :105。

[0351] 69. Fanger, N. A., D. Voigtlaender, C. Liu, S. Swink, K. Wardwell, J. Fisher, R. F. Graziano, L. C. Pfefferkorn 和 P. M. Guyre, 1997, Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc $\gamma\delta$ RI (CD64) expressed on human blood DCs(人血 DC 上表达的高亲和性 IgG 受体 Fc $\gamma\delta$ RI (CD64) 的表达、细胞因子调节和效应子功能的表征)。J. Immunol. 158 :3090。

[0352] 70. Tremblé, J. F., Deo, M. D., Wallace, P. K. 和 T. Keler, A Mannose receptor-specific human antibody for delivery of antigens to dendritic cells(用于将抗原递送给树突细胞的甘露糖受体特异性人抗体)。J. Leuk. Biol. 2003(待发表)。

[0353] 71. Keler, T., P. M. Guyre, L. A. Vitale, K. Sundarapandian, J. G. J. van de Winkel, Y. M. Deo 和 R. F. Graziano, 2000, Targeting weak antigens to CD64 elicits potent humoral responses in human CD64 transgenic mice(将弱抗原靶向 CD64 引发人 CD64 转基因小鼠有效的体液应答)。J. Immunol. 165 :6738。

[0354] 72. Guyre CA, Barreda ME, Swink SL, Fanger MW, 2001, Colocalization of Fc γ RI-targeted antigen with class I MHC: implications for antigen processing (Fc γ RI 靶向抗原与 I 类 MHC 共定位: 抗原加工的意义)。J. Immunol. 166(4) : 2469-78。

[0355] 73. Triozzi, P. L. and V. Stevens, 1999, Human Chorionic gonadotropin as a target for cancer vaccines (Review)(人绒毛膜促性腺激素作为靶标用于癌症疫苗(综

述)).Oncology reports 6 :7-17。

[0356] 74. Louchimo, J. , Carpelan-Holmstrom, M. , Alfthan, H. , Stenman, U. H. , Jarvinen, H. J. , Haglund, C. , 2002, Serum hCGb δ , δ δ CA 72-4, and CEA are independent prognostic factors in colorectal cancer(血清 hCGb δ , δ δ CA 72-4 和 CEA 是结肠直肠癌的独立预测因子)。Int. J. Can. 101 :545-548。

[0357] 75. Hotakainen, K. , Ljungberg, B. , Paju, A. , Alfthan, H. 和 U-H Stenman, 2002, The free b-subunit of human chorionic gonadotropin as a prognostic factor in renal cell carcinoma(缺乏人绒毛膜促性腺激素 b 亚基在肾细胞癌中作为预测因子)。British J. of Can. 86 :185-189。

[0358] 76. Heijnen, I. A. , M. J. van Vugt, N. A. Fanger, R. F. Graziano, T. P. de Wit, F. M. Hofhuis, P. M. Guyre, P. J. Capel, J. S. Verbeek 和 J. G. vande Winkel, 1996, Antigen targeting to myeloid-specific human Fc γ RI/CD64 triggers enhanced antibody responses in transgenic mice(靶向骨髓特异性人 Fc γ RI/CD64 的抗原触发转基因小鼠体内的抗体应答增加)。J. Clin. Invest. 97 :331。

[0359] 77. WO 91/00360。

[0360] 78. 美国专利第 4,950,480 号。

[0361] 79. Snider 等 (1990) J. of Exp. Med. 171 :1957-1963。

[0362] 80. Shen 等, J. of Immunol. 137(11) :3378-3382。

[0363] 81. Snider 和 Segal (1989) J. of Immunol. 143(1) :59-65。

[0364] 82. 美国专利第 4,954,617 号。

[0365] 83. Snider 和 Segal (1987) J. Immunology 139 :1609-1616。

[0366] 84. Kawamura 和 Berzofsky (1986) J. of Immunol. 136(1) :58-65。

序列表

<110> 塞尔德克斯医疗公司 (CELLDEX THERAPEUTICS, INC. et al.)

<120> 包含能结合人树突细胞的单克隆抗体和 β 人绒毛膜促性腺激素的疫苗缀合物

<130>CDJ-301CPPC

<140>PCT/US2005/027044

<141>2005-07-28

<150>10/903191

<151>2004-07-30

<160>32

<170>FastSEQ for Windows Version 4.0

<210>1

<211>1407

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>1

```
atgggatgga gctgtatcat cctgttcctc gtggccacag caaccggtgt ccactctgag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaggatctcc 120
tgtaagggtt ctggagacag ttttaccacc tactggatcg gctgggtgcg ccagatgccc 180
gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc tatcctgggtg actctgatac catatacagc 240
ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaagt ccatcagcac cgcctacctg 300
cagtggagca gcctgaagge ctgggacacc gccatgtatt actgtacgag aggggaccgg 360
ggcgttgact actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctcagctag caccaagggc 420
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 480
ggctgcctgg tcaaggacta ctcccccgag ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 540
ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggtc gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 660
aatcacaage ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaate ttgtgacaaa 720
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttccctc 780
tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 840
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 900
```

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 960
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1020
 gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatccccggg atgagctgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgcctggg caaaggttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
 tcctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggtctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
 ctgtctccgg gtaaaggctc gagctga 1407

<210>2

<211>468

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>2

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly
1				5					10					15	
Val	His	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25						30	
Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Asp	Ser	Phe
			35					40						45	
Thr	Thr	Tyr	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
			50					55						60	
Glu	Trp	Met	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Ile	Tyr	Ser
65				70					75					80	
Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser
			85						90					95	
Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met
			100					105						110	
Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Gly	Asp	Arg	Gly	Val	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			115					120						125	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
			130					135						140	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
145						150				155				160	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
				165					170					175	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu

	180		185		190
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser					
	195		200		205
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro					
	210		215		220
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys					
225		230		235	240
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro					
	245		250		255
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser					
	260		265		270
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp					
	275		280		285
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn					
	290		295		300
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val					
305		310		315	320
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu					
	325		330		335
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys					
	340		345		350
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr					
	355		360		365
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr					
	370		375		380
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu					
385		390		395	400
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu					
	405		410		415
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys					
	420		425		430
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu					
	435		440		445
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
	450		455		460
Lys Gly Ser Ser					
465					

<210>3

<211>348

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>3

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaggatc 60
 tcctgtaagg gttctggaga cagttttacc acctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccatatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggteaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtac gagaggggac 300
 cggggcgttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210>4

<211>116

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>4

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

<210>5

<211>702

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>5

```

atgggatgga gctgtatcat cctgttcctc gtggccacag caaccggtgt ccactccgac 60
atccagatga cccagtctcc atcctcactg tctgcatctg taggagacag agtcaccatc 120
acttgtcggg cgagtcaggg tattagcagg tggttagcct ggtatcagca gaaaccagag 180
aaagccccta agtcctgat ctatgctgca tccagtttgc aaagtggggt cccatcaagg 240
ttcagcggca gtggatctgg gacagatttc actctcacca tcagcggcct gcagcctgaa 300
gattttgcaa cttattactg ccaacagtat aatagttacc ctcggacgtt cggccaaggg 360
accaaggtgg aaatcaaacg tacggtggcg gcgccatctg tcttcatctt cccgccatct 420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 660
agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 702

```

<210>6

<211>233

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>6

```

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

```

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210>7

<211>321

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>7

gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgctc gggcgagtca ggggtattagc aggtgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gagaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcgg cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctcggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210>8

<211>107

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>8

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

<210>9

<211>1842

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>9

```

atgggatgga gctgtatcat cctgttccctc gtggccacag caaccggtgt ccactctgag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg agcagagggtg aaaaagcccg gggagtctct gaggatctcc 120
tgtaagggtt ctggagacag ttttaccacc tactggatcg gctgggtgcg ccagatgccc 180
gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatt taccctgggtg actctgatac catatacagc 240
ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaagt ccatcagcac cgcctacctg 300
cagtggagca gcctgaaggc ctccggacacc gccatgtatt actgtacgag aggggaccgg 360
ggcgttgact actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctcagctag caccaagggc 420
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 480
ggctgcctgg tcaaggacta ctcccccgag ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 540
ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 660
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtgt agcccaaata ttgtgacaaa 720
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttccctc 780
ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctccccga cccctgaggt cacatgcgtg 840
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgctg 900
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 960
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcagg 1020
gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatccccggg atgagctgac caagaaccag 1140
gtcagcctga cctgcctggc caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
tcctttcttc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
ctgtctccgg gtaaaggctc gagctccaag gagccgcttc ggccacgggtg ccgccccatc 1440
aatgccaccc tggctgtgga gaaggagggc tgccccgtgt gcatcacctg caacaccacc 1500

```

```

atctgtgccg gctactgccc caccatgacc cgcgtgctgc agggggtcct gccggccctg 1560
cctcaggtgg tgtgcaacta ccgcgatgtg cgcttcgagt ccatccggct ccctggctgc 1620
ccgcgcggcg tgaaccccggt ggtctcttac gccgtggctc tcagctgtca atgtgcactc 1680
tgccgcccga gcaccactga ctgcgggggt cccaaggacc accccttgac ctgtgatgac 1740
ccccgcttcc aggactcttc ttctcaaag gcccctcccc ccagccttcc aagtccatcc 1800
cgactcccgg ggccctcgga caccctcgat ctcccacaat aa 1842

```

<210>10

<211>613

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>10

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
  1              5              10              15
Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          20              25              30
Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Asp Ser Phe
          35              40              45
Thr Thr Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
          50              55              60
Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Ile Tyr Ser
65              70              75              80
Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
          85              90              95
Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
          100             105             110
Tyr Tyr Cys Thr Arg Gly Asp Arg Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
          115             120             125
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
          130             135             140
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
145             150             155             160
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
          165             170             175
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
          180             185             190
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
          195             200             205

```

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
210	215	220
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
225	230	235 240
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
	245	250 255
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
	260	265 270
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
	275	280 285
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
	290	295 300
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
305	310	315 320
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
	325	330 335
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
	340	345 350
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
	355	360 365
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
	370	375 380
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
385	390	395 400
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
	405	410 415
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
	420	425 430
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
	435	440 445
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	450	455 460
Lys Gly Ser Ser Ser Lys Glu Pro Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile		
465	470	475 480
Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr		
	485	490 495
Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Thr Arg Val		
	500	505 510
Leu Gln Gly Val Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg		

515	520	525
Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val		
530	535	540
Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu		
545	550	555
Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu		
565	570	575
Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro		
580	585	590
Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr		
595	600	605
Pro Ile Leu Pro Gln		
610		

<210>11

<211>1325

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>11

```

aagcttcacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtggccacag ctaccgggtgt 60
ccactccgac atccagatga cccagtctcc atcctcactg tctgcatctg taggagacag 120
agtcaccatc acttgctggg cgagtcaggg tattagcagg tggttagcct ggtatcagca 180
gaaaccagag aaagccccta agtccctgat ctatgctgca tccagtttgc aaagtggggt 240
cccatcaagg ttcagcggca gtggatctgg gacagatttc actctcacca tcagcggcct 300
gcagcctgaa gattttgcaa cttattactg ccaacagtat aatagttacc ctcggacgtt 360
cggccaaggg accaaggttg aaatcaaagg agggggcggt tccggaggag gcggcagcgg 420
gggaggaggt agcgaggtgc agctgggtgca gtctggagca gaggtgaaaa agcccgggga 480
gtctctgagg atctcctgta agggttctgg agacagtttt accacctact ggatcggtg 540
ggtgcgccag atgcccggga aaggcctgga gtggatgggg atcatctatc ctggtgactc 600
tgataccata tacagcccgt cttccaagg ccaggtcacc atctcagccg acaagtccat 660
cagcaccgcc tacctgcagt ggagcagcct gaaggcctcg gacaccgcca tgtattactg 720
tacgagaggg gaccggggcg ttgactactg gggccaggga accctgggtca ccgtctcctc 780
aggctctacc ggtgggggag gctcgagctc caaggagccg cttcggccac ggtgccgccc 840
catcaatgcc accctggctg tggagaagga gggctgcccc gtgtgcatca ccgtcaaacac 900
caccatctgt gccggctact gccccacat gaccgcgtg ctgcaggggg tcctgccggc 960
cctgcctcag gtggtgtgca actaccgga tgtgcgcttc gaggccatcc ggtcccttg 1020
ctgcccgcgc ggcgtgaacc ccgtgggtctc ctacgccgtg gctctcagct gtcaatgtgc 1080
actctgccgc cgcagcacca ctgactgcgg ggggtcccaag gaccaccct tgacctgtga 1140

```

```

tgacccccgc ttccaggact cctcttctc aaagggccct cccccagcc ttccaagtcc 1200
atcccgaact cgggggcct cggacacccc gatcctccca caataagcgg ccgcagaaca 1260
gaaactcatt tcagaagagg atctgaatgg cgccgcacat caccatcatt accattgatt 1320
ctaga                                             1325

```

<210>12

<211>411

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>12

```

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

```

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

<210>13

<211>5

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>13

Thr Tyr Trp Ile Gly

1

5

<210>14

<211>17

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>14

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Ile Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210>15

<211>7

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>15

Gly Asp Arg Gly Val Asp Tyr

1

5

<210>16

<211>11

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>16

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp Leu Ala

1

5

10

<210>17

<211>7

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>17

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1

5

<210>18

<211>9

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>18

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1

5

<210>19

<211>143

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>19

Ser Lys Glu Pro Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile Asn Ala Thr Leu

1

5

10

15

Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr Val Asn Thr Thr

20

25

30

Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Thr Arg Val Leu Gln Gly Val

35

40

45

Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg Asp Val Arg Phe

50

55

60

Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val Asn Pro Val Val

65

70

75

80

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

85

90

95

Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu Thr Cys Asp Asp

100

105

110

Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu

115

120

125

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu

130

135

140

<210>20

<211>9

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>20

Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu

1

5

<210>21

<211>9

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>21

Tyr Arg Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile

1

5

<210>22

<211>9

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>22

Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile Asn

1

5

<210>23

<211>9

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>23

Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr

1

5

<210>24

<211>9

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>24

Cys Arg Pro Ile Asn Ala Thr Leu Ala

1

5

<210>25

<211>9

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>25

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile

1 5

<210>26

<211>9

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>26

Cys Pro Arg Gly Val Asn Pro Val Val

1 5

<210>27

<211>9

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>27

Arg Pro Ile Asn Ala Thr Leu Ala Val

1 5

<210>28

<211>9

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>28

Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu

1 5

<210>29

<211>294

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>29

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
ccccggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gaga 294

<210>30

<211>98

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>30

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg

<210>31

<211>285

<212>DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>31

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtca ggggtattagc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120

gagaaageccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcgc gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctggagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accct 285

<210>32

<211>95

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>32

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					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	
				85						90					95

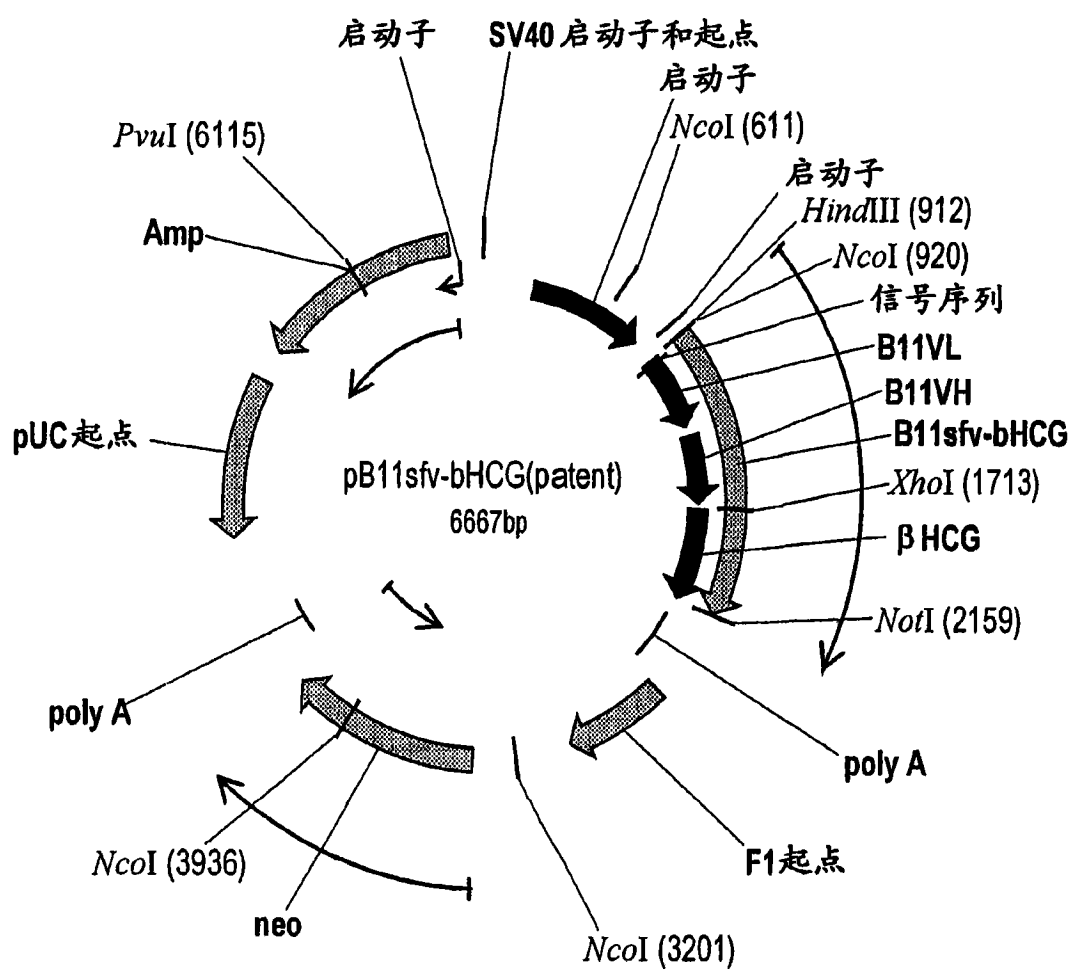


图 1

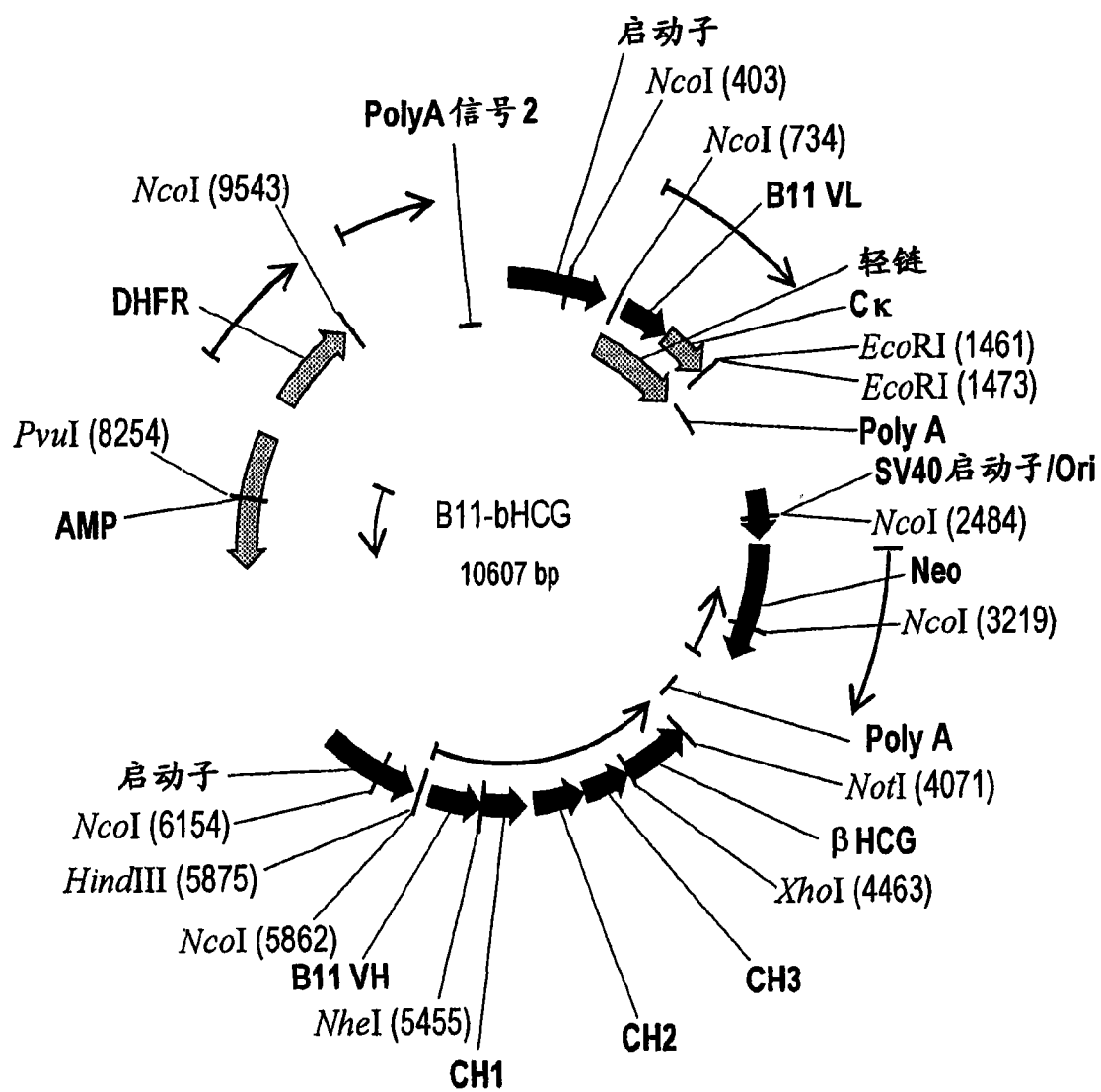


图 2

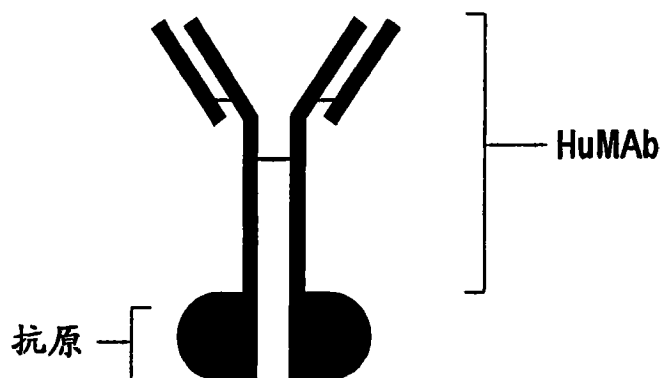


图 3

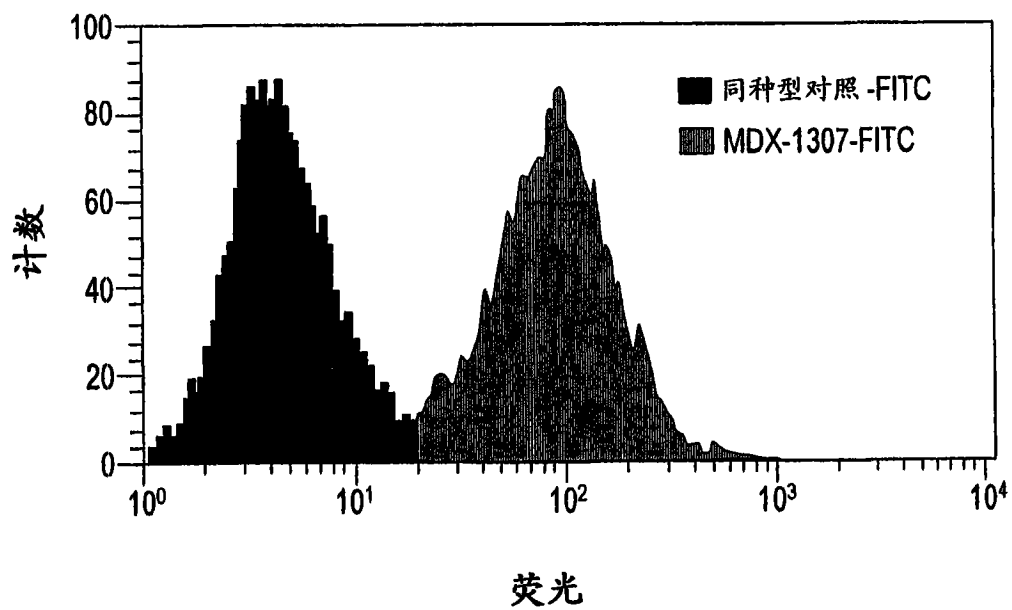


图 4

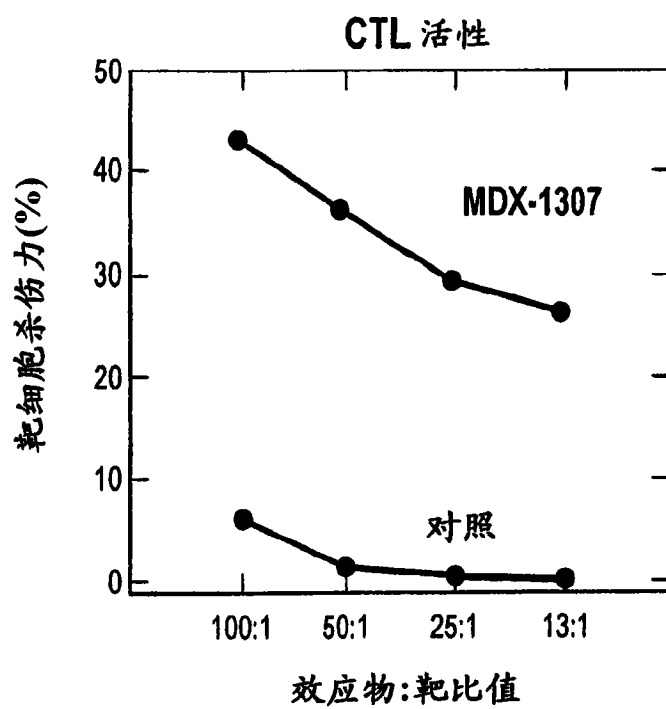


图 5

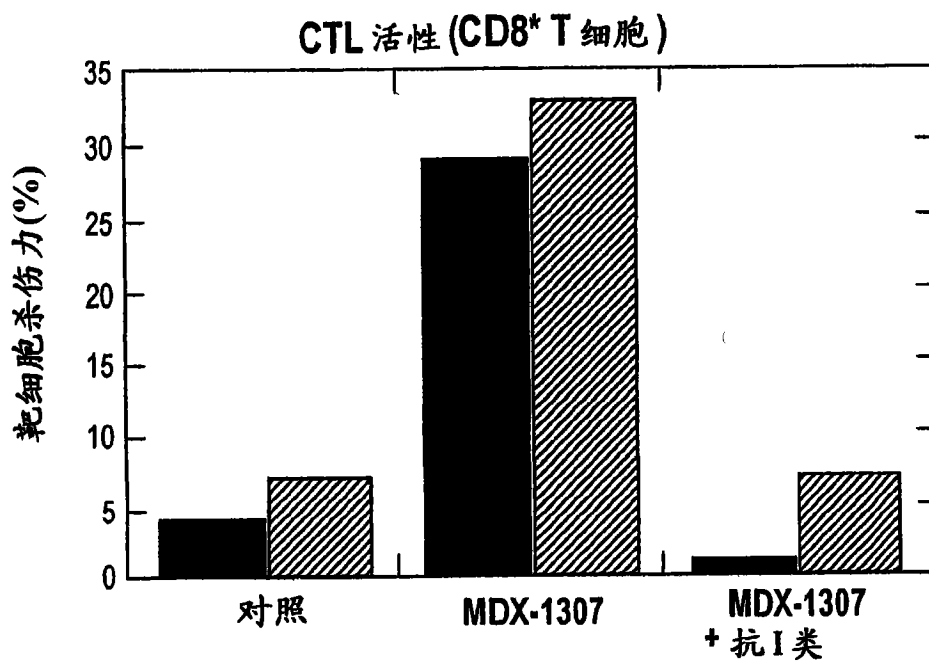


图 6

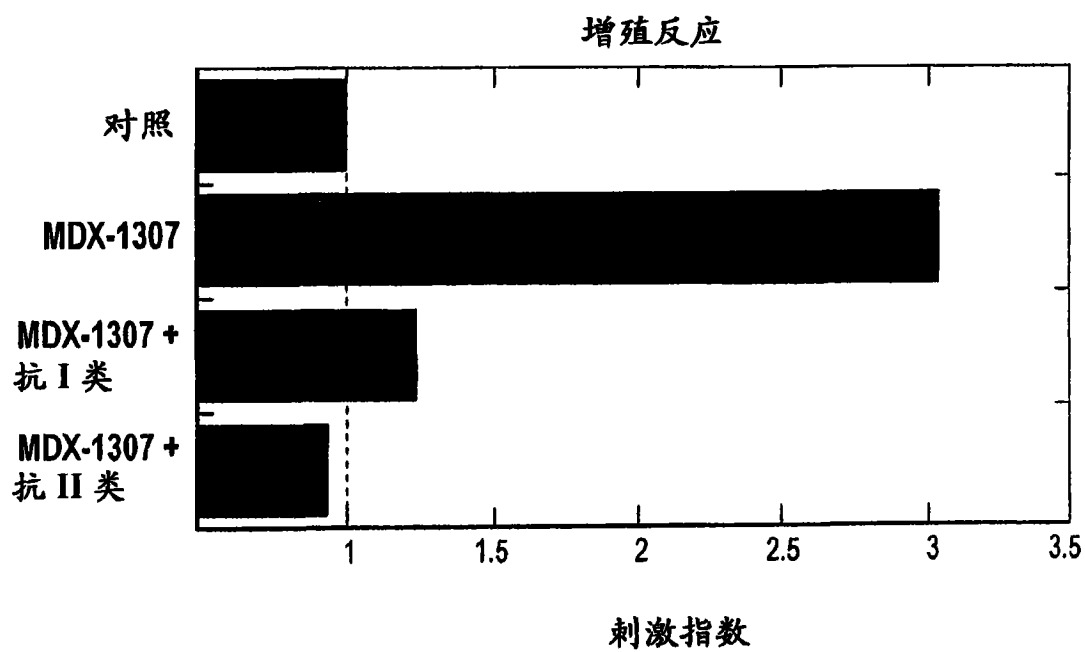


图 7

抗甘露糖受体 B11 VH

V-区段: 基因座 - 5-51 名称: DP-73/V5-51

D-区段: 未知

J-区段: JH4b

```

1      E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
      GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR 1
                                ~~~~~
55      R I S C K G S G D S F T T Y W I G W
      AGG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA GAC AGT TTT ACC ACC TAC TGG ATC GGC TGG

                                CDR 2
                                ~~~~~
109     V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G
      GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR 2
                                ~~~~~
163     D S D T I Y S P S F Q G Q V T I S A
      GAC TCT GAT ACC ATA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

217     D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D
      GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC

                                CDR 3
                                ~~~~~
271     T A M Y Y C T R G D R G V D Y W G Q
      ACC GCC ATG TAT TAC TGT ACG AGA GGG GAC CGG GGC GTT GAC TAC TGG GGC CAG
                                ↳ JH4b

325     G T L V T V S S
      GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

图 8

抗甘露糖受体 B11 VL

V-区段: 基因座 - L15 名称: DPK7/HK134

J-区段: JK1

```

1      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR 1
                                ~~~~~
55     V T I T C R A S Q G I S R W L A W Y
      GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGG TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR 2
                                ~~~~~
109    Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
      CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR 2
      ~~~~~
163    Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
      CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR 3
                                ~~~~~
217    L T I S G L Q P E D F A T Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC GGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR 3
      ~~~~~
271    Y N S Y P R T F G Q G T K V E I K
      TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

                                ↓ JK 1

```

图 9

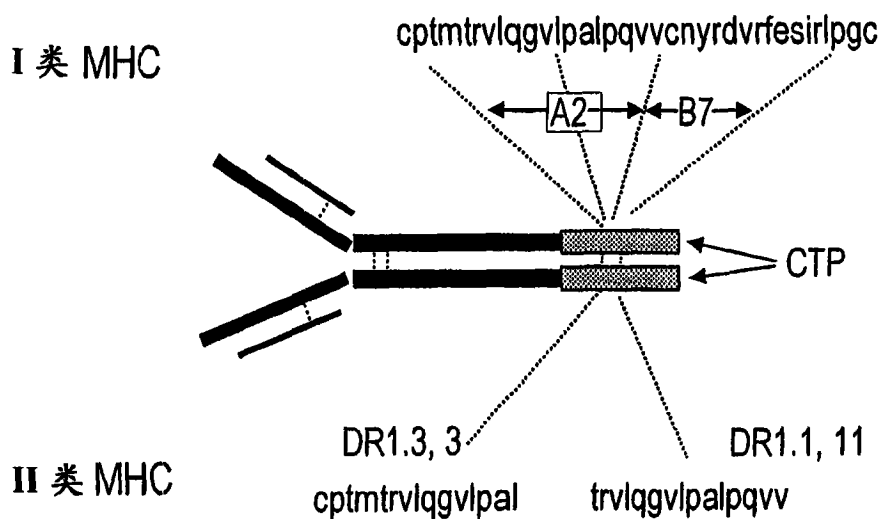


图 10

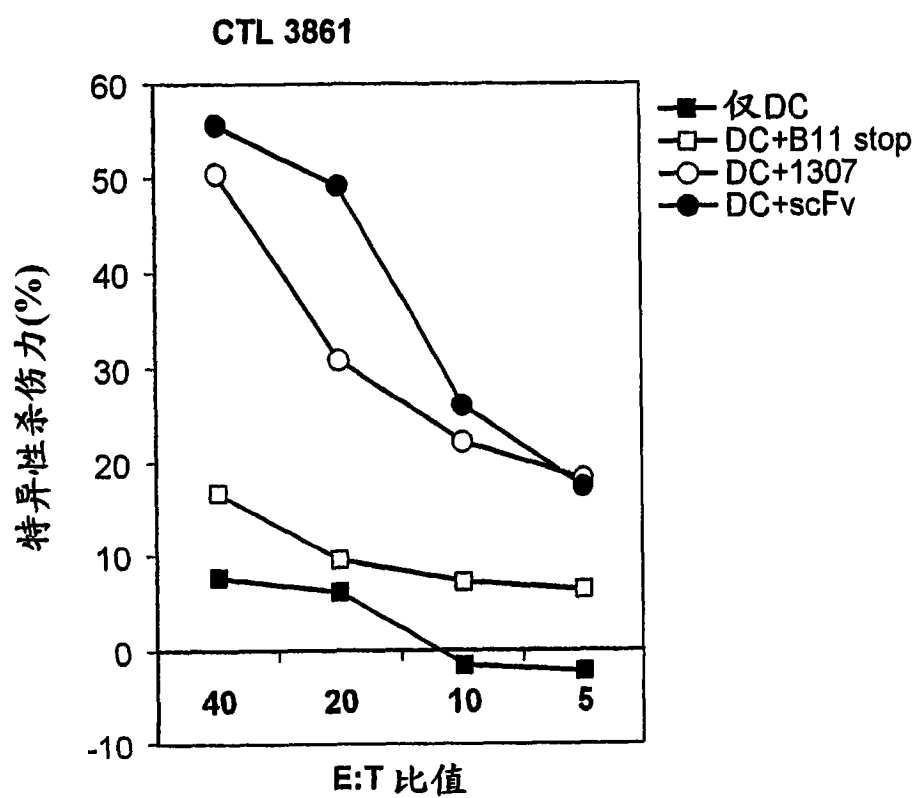


图 11

抗甘露糖受体 VH 区(VH5-51):

TS-51A

系

B11:

GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG AAG ATC TCC TGT AAG GGT
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- -G- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

CDRI

V 种系:

B11:

TCT GGA TAC AGC TTT ACC AGC TAC TGG ATC GGC TGG GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG
 --- G---T---C---

CDR2

V 种系:

B11:

[illegible]

V 种系:

B11:

GAC	AAG	TCC	ATC	AGC	ACC	GCC	TAC	CTG	CAG	TGG	AGC	AGC	CTG	AAG	GCC	TCG	GAC	ACC	GCC	ATG	TAT	TAC	TGT
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

CDR3

V 神经系:

11:

GCG	AGA
A--	---
GGG GAC CGG	GGC GTT GAC TAC TGG GGC CAG ACC CTG
	GTC ACC GTC ACC
	TCC TCA

13

抗甘露糖受体 V_K区

[illegible]

15

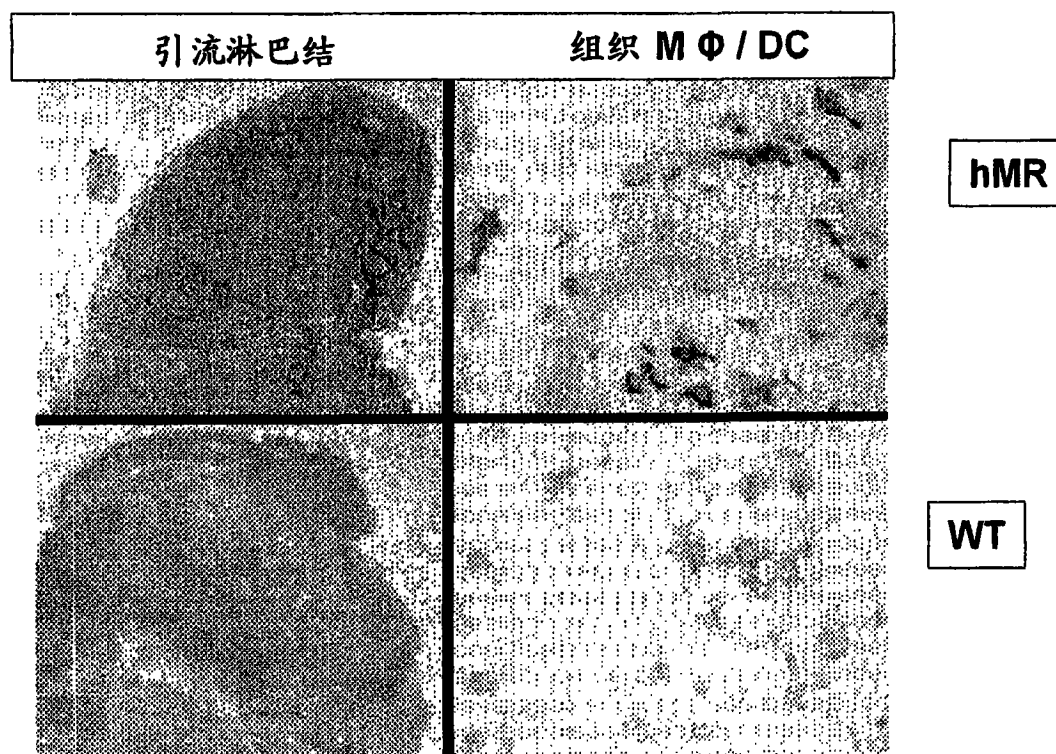


图 16

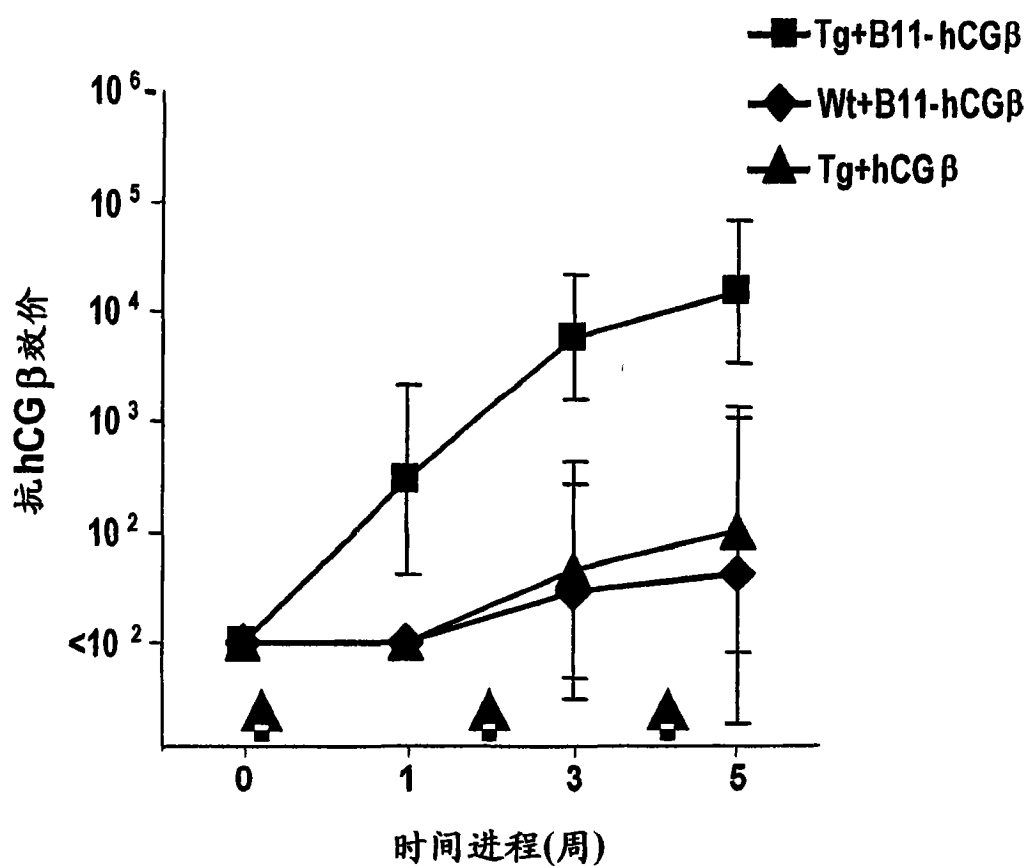


图 17

hCG β -特异性 T 细胞应答

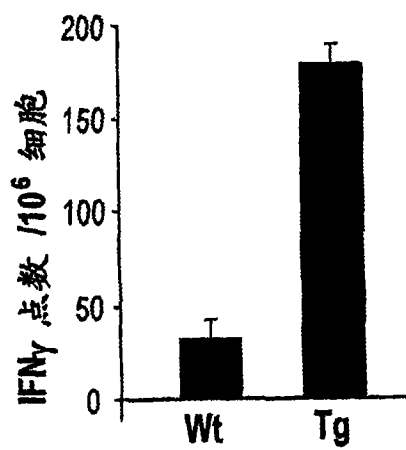


图 18