

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02821951.1

A61K 38/16

A61K 39/395

C07H 21/04

C12N 5/16

G01N 33/53

[43] 公开日 2005 年 6 月 22 日

[11] 公开号 CN 1630529A

[22] 申请日 2002. 11. 2 [21] 申请号 02821951. 1

[30] 优先权

[32] 2001. 11. 2 [33] US [31] 60/337,542

[86] 国际申请 PCT/US2002/035148 2002. 11. 2

[87] 国际公布 WO2003/039462 英 2003. 5. 15

[85] 进入国家阶段日期 2004. 4. 30

[71] 申请人 唐城公司

地址 美国德克萨斯州

[72] 发明人 S·W·王 G·胡 Y·李

Z·姚

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程 伟

权利要求书 4 页 说明书 26 页 序列表 9 页

[54] 发明名称 用于诊断和治疗 B 细胞恶性肿瘤的
B 细胞淋巴瘤特异性抗原

[57] 摘要

本发明提供疫苗、抗体及诊断工具以用于诊断和/或治疗 B 细胞介导的疾病，尤其是 B 细胞淋巴瘤。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种与 B 细胞特异抗原 (BLSA) (SEQ ID NO 2) 相结合的分子。
2. 根据权利要求 1 所述的分子, 其中该分子是促效剂。
- 5 3. 根据权利要求 1 所述的分子, 其中该分子是拮抗剂。
4. 根据权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的分子, 其中该分子是抗体、肽、配位体、小分子或寡核苷酸。
5. 根据权利要求 4 所述的分子, 其中该分子是抗体或其结合片断。
6. 根据权利要求 5 所述的抗体, 其中所述抗体是单克隆的、嵌合的、人类的、
10 人源化的、双特异性的或是异质结合体。
7. 根据权利要求 5 所述的抗体片断, 其中该片断是 F(ab')₂、F(ab)₂、Fab' 和 Fab。
8. 一种包括根据权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的分子和生理学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂和/或添加剂的组合物。
9. 一种用于治疗 B 细胞介导的疾病的方法, 其包括投用根据权利要求 8 所述的
15 组合物。
10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中该 B 细胞介导的疾病是 B 细胞淋巴瘤。
11. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中该 B 细胞介导的疾病是选自由下列各病组成的群组: 卵泡细胞淋巴瘤、弥散性小淋巴细胞淋巴瘤或慢性淋巴细胞白血病、淋巴类浆细胞或 Waldenstrom 氏巨球蛋白血症、边缘区淋巴瘤和毛细胞
20 白血病。
12. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中该 B 细胞介导的疾病是选自由下列各病组成的群组: 弥散性大细胞淋巴瘤、Burkit 氏淋巴瘤或弥散性小无裂细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤和与艾滋病相关的淋巴瘤。
13. 一种用于治疗 B 细胞淋巴瘤的疫苗, 其包括含有选自由下列各序列组成的群
25 组的胺基序列的多肽: SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:2 的变体和 SEQ ID NO:2 的片断, 其中该肽含有至少一个表位。
14. 一种用于治疗 B 细胞淋巴瘤的疫苗, 其包括通过含有选自由下列各序列组成的群组的核苷酸序列的分离的多核苷酸来编码的多肽: SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:1 的变体和 SEQ ID NO:1 的片断, 其中该肽含有至少一个表位。
- 30 15. 一种使病人对 B 细胞淋巴瘤或其它 B 细胞介导的疾病免疫的方法, 其包括使

- 用根据权利要求 13 或 14 所述的疫苗。
16. 根据权利要求 15 所述的方法,其另外包括与佐剂相结合同时或相继地给患者施用疫苗。
17. 根据权利要求 15 所述的方法,其另外包括与第二抗原相结合同时或相继给病人施用疫苗。
18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中该第二抗原是 II 类抗原。
19. 一种包含表达 BLSA 的核酸序列或其致免疫片断的 DNA 结构,其可操作性地与引物相结合。
20. 根据权利要求 19 所述的结构,其另外包括 II 类抗原。
21. 一种对应于权利要求 15 所述的方法而产生的分离的抗体。
22. 一种在哺乳动物中诱发对 BLSA 的免疫反应的方法,其包括投用包含编码 BLSA 的 DNA 分子的组合物,所述 DNA 分子可操作性地与控制所述 DNA 分子表达的调控序列相结合,其中 BLSA 表达于所述细胞且对 BLSA 产生免疫反应。
23. 一种包含至少一个引导细胞毒素 T 淋巴细胞(CTL)反应的表位的 BLSA 肽。
24. 一种在哺乳动物中诱发对 BLSA 免疫反应的方法,其包括投用细胞毒素 T 淋巴细胞(CTL)诱导的肽。
25. 一种在哺乳动物中诱发对 BLSA 免疫反应的方法,其包括投用表达以细胞毒素 T 淋巴细胞(CTL)诱导的 BLSA 肽的载体。
26. 一种包括表达以细胞毒素 T 淋巴细胞(CTL)诱导的 BLSA 肽的载体的宿主细胞。
27. 一种通过投用降低 B 细胞淋巴瘤细胞中 BLSA 翻译速率的组合物来抑制 BLSA 表达方法,其包括使细胞暴露于与所述 RNA 类或与对此 RNA 类编码的 DNA 杂交的反意义核酸或反意义核酸仿制品。
28. 一种筛选具有调控 BLSA 表达的能力的试剂的方法,其包括步骤:
- (a)使包括 BLSA 编码基因的细胞在充足的条件下与选择试剂 进行接触以准许调控自 BLSA 基因所转录的 mRNA 水平;
 - (b)分离 mRNA;
 - (c)比较检测的 mRNA 量与在选择试剂存在情况下所检测的量,且因此确定选择试剂调控 BLSA 表达的能力。

29. 一种筛选具有与 BLSA 结合的能力的试剂的方法，其包括步骤：
(a) 使 BLSA 在充足的条件下与选择试剂进行接触以准许结合；
(b) 检测 BLSA/试剂复合物的存在。
30. 根据权利要求 28 或 29 所述的方法，其中该选择试剂存在于小分子组合库。
- 5 31. 一种通过干扰 BLSA 编码 DNA 或 RNA 多核苷酸的转录或翻译来阻塞或调控细胞 BLSA 表达的方法，其包括使能够表达 BLSA 的细胞暴露于分子垫，该方法干扰了 BLSA 编码 DNA 或 RNA 多核苷酸的转录或翻译。
32. 根据权利要求 31 所述的方法，其中该分子是其干扰 BLSA 编码 DNA 或 RNA 多核苷酸的适当转录或翻译的反意义分子、RNAi 分子或核糖酶。
- 10 33. 根据权利要求 32 所述的方法，其中该分子是干扰 BLSA 编码 DNA 或 RNA 多核苷酸的适当转录或翻译的反意义核苷酸。
34. 一种用于诊断病人患上由 BLSA 无调节表达所引起的 B 细胞介导的疾病的诱因的方法，其包括：
自病人采集细胞、组织或体液样品；
15 分析组织或体液中 BLSA 的存在；及
在组织或体液中 BLSA 表达水平的基础上来预测病人对 B 细胞疾病 2 的诱因。
35. 一种用于诊断病人患上由 BLSA 无调节表达所引起的 B 细胞介导的疾病的诱因的方法，其包括：
自病人采集已知含有确定 BLSA 水平的细胞、组织或体液样品；
20 分析组织或体液以得到组织中 BLSA 的量；及
基于在组织或体液中相比于对正常细胞、组织或体液所建立的定义或测试水平的 BLSA 量的变化来预测病人患上某些免疫疾病的诱因。
35. 一种用于预防或治疗哺乳动物中 BLSA 蛋白质介导的疾病的方法，其包括给哺乳动物投用疾病预防或治疗剂量的 BLSA 促效剂或拮抗剂。
- 25 36. 根据权利要求 19 所述的方法，其中该 BLSA 促效剂或拮抗剂是抗体。
37. 一种用于产生与 BLSA 结合的抗体的方法，其包括一种选择自由下列各方法组成的群组的方法：
用分离的 BLSA 或其片断作为抗原；
用表达重组 BLSA 的宿主细胞作为抗原；及
30 用含有 BLSA 基因的 DNA 表达载体来表达作为抗原的 BLSA 以产生抗体。

38. 一种利用权利要求 37 所述的方法而产生的抗体。
39. 根据权利要求 38 所述的抗体，其选自由以下各物组成的群组：多克隆的、单克隆的、人源化的、人类的、双特异性的和异质结合的抗体。
40. 一种检测在特定细胞、组织或体液中所表达 BLSA 的诊断方法，其包括：
5 使细胞、组织或抗体或其成份暴露于权利要求 38 所述的抗体；且
测定细胞、组织和抗体或其成份是否与抗体相结合。
41. 一种用于自重组细胞培养物、污染物和天然环境来分离和提纯 BLSA 的方法，其包括：
使含有 BLSA 和污染物的组合物暴露于能够与 BLSA 结合的抗体；
10 允许该 BLSA 与抗体进行结合；
自污染物分离该抗体-BLSA 复合物；且
自复合物回收该 BLSA。
42. 根据权利要求 25 所述的方法，其中该抗体是权利要求 38 所述的抗体。
43. 一种转殖剔除动物，其基因组包括在其内生 BLSA 基因中的杂合或纯合分裂，
15 该内生 BLSA 基因抑制或阻止生物学功能性 BLSA 蛋白质的表达。
44. 一种用来显现以某些淋巴瘤为特征的病变的方法，其包括下述步骤：获得对 BLSA 特异的单克隆抗体；对所述抗体进行标记；使所述标记过的抗体与获得自哺乳动物的生物样品相接触；且显现所述标记。
45. 一种用于检测细胞中 BLSA 水平的方法，其包括实施定性聚合酶链反应
20 (PCR)。
46. 一种用于检测细胞中 BLSA 的方法，其包括实施免疫荧光法着色。

用于诊断和治疗 B 细胞恶性肿瘤的 B 细胞淋巴瘤特异性抗原

5 本专利申请要求 2001 年 11 月 2 日提交的第 60/337,542 号美国临时专利申请的优先权。

技术领域

10 本发明主要涉及分子,例如肽和抗体,其与 B 细胞淋巴瘤特异性抗原(“BLSA”)相结合。

背景技术

恶性肿瘤经常表达典型抗原或“标记”,其提供肿瘤预防抵抗或治疗的机制。这些以肿瘤为特征的抗原可以进行提纯和配制成疫苗。这可以刺激有助于控制肿瘤生长的抗体反应和细胞免疫反应。在最小值时,由这些抗原引起的抗体可用作
15 探测工具来监控宿主中与淋巴瘤相关的标记以便于跟踪疾病的进程、识别在通常无症状的疾病初期阶段的患者,或者监控治疗的效果。

B 细胞淋巴瘤显著地影响世界范围内癌症死亡率。此疾病分阶段发展。在初期阶段,B 细胞淋巴瘤常常是无痛疾病,其特征是具有相当长半衰期的小的成熟的功能不完全恶性 B 细胞的积聚。最终,恶性 B 细胞倍增时间减少且患者症状日益明
20 显。尽管治疗可以提供症状的减轻,但是患者的总存活期仅受到最低限度的影响。在晚期阶段,显著的贫血和/或血小板减少成为疾病的特征。由于细胞增殖的速率非常低,而且这种类型的 B 细胞淋巴瘤经常抵抗通用治疗,因此疾病导致死亡。

B 细胞淋巴瘤显著地影响世界范围内癌症死亡率。此疾病分阶段发展。在初期
25 阶段,B 细胞淋巴瘤常常是无痛疾病,其特征是具有相当长半衰期的小的成熟的功能不完全恶性 B 细胞的积聚。最终,恶性 B 细胞倍增时间减少且患者症状日益明显。尽管治疗可以提供症状的减轻,但是患者的总存活期仅受到最低限度的影响。在晚期阶段,显著的贫血和/或血小板减少成为疾病的特征。由于细胞增殖的速率非常低,而且这种类型的 B 细胞淋巴瘤经常抵抗通用治疗,因此疾病导致死亡。

30 B 细胞淋巴瘤通用的诊断方法包括:通常是通过针或外科活体解剖采集一个组织样品,然后对该组织中的癌性细胞进行分析。通常,采集一个血样并由病理学者分析 B 细胞的恶性。恶性细胞的存在表明病人有 B 细胞淋巴瘤。

治疗 B 细胞淋巴瘤的通用方法取决于疾病的阶段和程度。在疾病初期阶段的成年患者可以用带有或不带有化学疗法的局部放射疗法进行治疗。更晚期但是低
35 程度疾病的患者可以保持不治疗、观察和等候策略,只要无症状或无淋巴瘤相关

的器官损害发生。当治疗变得必要时，其选择通常包括：单一试剂烷化剂化学疗法、不含蒽环霉素（anthracycline）的低强度联合化学治疗和全身放射疗法。这些治疗 B 细胞淋巴瘤的传统方法由于毒性副作用而常常限制其效用。定向于放射性核素、毒素，或这些癌性细胞的其他治疗剂的单克隆抗体的用途提供了可选择的方法以用于限制自药物所产生的副作用和对正常组织的损害，其被认为是单克隆抗体疗法。

其单克隆抗体本身可以提高患者对癌症的免疫反应。同其他癌症一样在对淋巴瘤的抗体治疗中也看到了一些抗癌作用。单克隆抗体也可用于其它方法。这些抗体可与化学治疗药剂结合并联合用药。本方法允许自化学治疗的化学药品和自抗体的免疫反应接近细胞。并且，当通过单克隆抗体使细胞削弱时化学治疗会更有效。另外，单克隆抗体疗法可与放射治疗相联合。对于本方法，单克隆抗体含有诸如放射性碘的放射性物质，其对准和破坏癌细胞。本方法允许有毒细胞接收大量放射线而正常组织仅接收相当少的放射线。同样，也证实了示踪的放射性同位素在诊断某种类型癌症上有用。另外，单克隆抗体也可以与其他形式的生物反应改性剂（BRM）或毒素相联合。当连接的抗体同癌细胞结合时，他们立即释放这些物质给肿瘤，藉此希望破坏癌细胞。

单克隆抗体疗法已经显示有希望治疗某些类型的淋巴瘤，例如非-何杰金氏淋巴瘤（NHL）。几种单克隆抗体已可用或者处于试验阶段，例如 Rituxan™（IDEC Pharmaceuticals 公司，抗-CD20 抗体）、Bexxar™（Corixa/GlaxoSmithKline，配属于 NHL 治疗的含有放射性碘 131 的抗-CD20 抗体）和 Oncolym™（Peregrine Pharmaceuticals 公司，含有碘 131 放射性同位素的抗-HLA-Dr10 抗体）。可以通过注射人类癌细胞到老鼠和允许此鼠科动物免疫系统产生对癌细胞的特异蛋白质的抗体来制成单克隆抗体。采集制成抗体的细胞并同长生细胞（immortal cell）进行融合以形成杂交细胞。这些杂交细胞产生大量的与治疗癌症细胞的特异蛋白质相结合的纯单克隆抗体。就 B 细胞淋巴瘤而言，以上所讨论的抗体定向于蛋白质 CD20。这种形式治疗的一个优势在于：CD20 不表达于前 B 细胞淋巴瘤，而仅表达于成熟的 B 细胞。

因此，不断地需要供诊断和治疗该疾病的新颖方法，尤其是高度表达于前 B 细胞淋巴瘤细胞的抗原。本发明提供了这样的抗原，一种最近经确定的 B 细胞特异蛋白-BLSA。我们发现：BLSA 特定地表达于 B 细胞并且在包括前 B 细胞淋巴瘤的 B 细胞淋巴瘤细胞系中经受刺激。因此 BLSA 是供诊断和治疗包括诸如 NHL 和弥漫大 B 细胞淋巴瘤（DLBCL）的恶性 B 细胞疾病的新目标。

发明内容

本发明定向于诊断和治疗 B 细胞介导的疾病，包括但不限于 B 细胞淋巴瘤，例如低级别/小囊非霍杰金氏淋巴瘤（NHL）、小淋巴细胞（SL）NHL、中等级别/卵

泡细胞 NHL、中等级别弥散 NHL、高级别免疫母细胞 NHL、高级别免疫母细胞 (inimunoblastic) NHL、高级别小无裂细胞 NHL、巨大肿块 NHL、弥散大 B 细胞淋巴瘤 (BLBCL)、淋巴浆细胞淋巴瘤和 Waldenstrom 氏巨球蛋白血症。这些异常 B 细胞疾病的治疗可以单独或者与通常使用的治疗组合来完成，例如细胞素、放射

5 线疗法、骨髓去除治疗和化学疗法。

本发明的一个方面包括其定向于供治疗 B 细胞淋巴瘤或其他 B 细胞介导的疾病的 BLSA 的疫苗的生产 and 投用。

本发明的另一方面包括对体内蛋白质的 BLSA 表达进行编码以在患者中产生免疫反应的核苷酸构造，或者产生用于形成多克隆或单克隆抗体的蛋白质抗原。本

10 发明也包括用于控制 BLSA 表达的核苷酸构造。这些核苷酸序列可以是表达载体、反意义构造、结合体或含有片断的表位的形式。

本发明的另一方面包括提供与 B 细胞淋巴瘤特异抗原 (BLSA) 相互作用的化合物。这种相互感应可用于诊断 BLSA 的存在和其存在可同患者发展 B 细胞调节疾病的存在或可能性之间的相互关系。此相互感应可用于治疗经诊断为患有 B 细胞

15 介导的疾病的病人，这是通过利用相互感应杀死该细胞或者当用其他疗法治疗时使该细胞易于死亡而实现的。其他的化合物包括与 BLSA 相结合来控制其表达和/或作用的小分子。

本发明的另一方面包括筛选与 BLSA 相互作用的促效剂或拮抗剂。

本发明的另一方面包括用于使病人对 B 细胞淋巴瘤或其他 B 细胞介导的疾病

20 免疫的方法和在这些方法中有用的抗原构造。

本发明其他和另外的目的、特点和优势对于熟悉此技术的人来说是很显然的。

具体实施方式

25

定义

术语“B 细胞淋巴瘤特异抗原”或“BLSA”的意思是具有 SEQ ID NO: 1 所显示的序列的多肽或者其天然存在的变异体。

术语“B 细胞淋巴瘤”的意思是一个或多个 B 细胞介导的疾病，其特征为存在 BLSA 和特别地存在升高水平的 BLSA。

30 术语“变异体”的意思是在一个或多个氨基酸上不同于 BLSA (包括变型、替代、插入和删除)，及具有同 BLSA 相同或相似的生物学功能的氨基酸序列。

术语“促效剂”的意思是促进、增加或刺激 BLSA 的正常功能或其表达的任一分子。一种类型的促效剂是以模仿包括抗体或抗体片断的 BLSA 的配位体的形式来与其相互作用。

35 术语“拮抗剂”的意思是阻塞、阻止、抑制或压制 BLSA 的正常功能及其表达的任一分子。一种类型的拮抗剂是干扰 BLSA 同包括抗体或抗体片段的配位体之间

的相互作用的分子。另一类型的拮抗剂是抑制原有 BLSA 活化受体的适当转录的反意义核苷酸。

文中所用的术语“反意义”是指任何包含互补于特异 DNA 或 RNA 序列的核苷酸序列的组合物。所用的术语“反意义链”是关于互补于“意义”链的核酸链。

5 反意义分子包括肽核酸并且可通过任何包含合成或转录的方法来产生。一旦引入到一个细胞，互补的核苷酸就与由细胞产生的正常序列相互结合而形成复式并阻塞转录或翻译。名称“负”有时用于指反意义链，而“正”有时用于指意义链。

术语“剔除”是指至少一份经单细胞、选定细胞或哺乳动物的所有细胞的内生基因（例如 BLSA）解码的多肽表达的部分或完全减少。该哺乳动物可能是具有一方经破坏的内生基因的等位基因的“杂合剔除”或者具有双方经破坏的内生基因的等位基因。

术语“抗体片段”是抗体的一部份，例如 F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab 等。不考虑结构，抗体片段同经完整抗体确认的相同的抗原相结合。例如，抗 BLSA 单克隆抗体片断与 BLSA 的一个表位相结合。术语“抗体片段”也包括任何合成或遗传的工程蛋白，其通过与特异抗原相结合以形成复合体而起到与抗体一样的作用。

15 例如，抗体片断包括：由轻链可变区域组成的分离的片断、由重链和轻链组成的“Fv”片断、其轻链和重链可变区域由肽连接器（“sFv 蛋白质”）连接的重组单链多肽分子及由模仿超变量区域的氨基酸残基所组成的最小识别单元。

本发明不限于文中所述的特殊的方法论、方案、细胞系、载体和反应物，因为这些可能发生变化。另外，本文所用术语仅为描述特殊实施例的目的而并不是要限制本发明的范围。除非上下文另有明确规定，那么文中和附加的权利要求中所用的单数形式“一(a)”“一(an)”“该(the)”均包括复数基准，例如可参考“一种宿主细胞”包含多个此类宿主细胞。

除非另有定义，文中所用的所有技术和科学术语及任何缩略语具有与本发明领域的技术人员的通常理解相同的含义。尽管与文中所述相似或等同的任何方法和物质均可用于实施本发明，但是优选的方法、装置和物质在文中有所描述。

文中所提及的所有专利和出版物以法律所允许的程度并入本文，其目的是描述和揭示蛋白质、酶、载体、宿主细胞和所报告的可能同本发明一起使用的方法论。然而，本文决不可解释为承认本发明无权通过先前发明来提前公开此揭示。

30

发明

本发明提供 B 细胞淋巴瘤疫苗、BLSA 特异抗体和诊断工具。BLSA 的核酸序列描述于 SEQ ID NO 1 且氨基酸序列描述于 SEQ ID NO2。

B 细胞淋巴瘤疫苗的活性成分是 B 细胞淋巴瘤-特异抗原 BLSA 或其至少具有一个表位的片断。与抗原结合的 B 细胞淋巴瘤可通过自细胞、组织、淋巴瘤本身的提纯而获得或利用重组技术来合成。因为 BLSA 是人类中原有的蛋白质，因此 BLSA

的疫苗构造可包括，例如 T 细胞表位或其他超过宿主对抗原的免疫耐受性的抗原助剂。

5 BLSA 特异抗体可通过常见方法来制备，例如 Kohler 和 Milstein (Nature) (London, 256: 495, 1975 年) 所揭示的细胞与细胞融合以产生单克隆抗体，但是可以是多克隆或单克隆的，包括嵌合的、人源化的、人类的、去免疫的、双特异的及异质结合的抗体。抗体也可以重组制备。抗体可投用于治疗或用于诊断工具。在补体控制溶菌中这些抗体自身用作治疗的目的，或者与毒素偶合或者与治疗半族分子相偶合，例如蓖麻蛋白、细胞素。

10 诊断工具包括监测宿主中与淋巴瘤相关的标记物的分析和工具以便于跟踪疾病过程、确定具有初期无症状阶段的疾病的病人，或者监控治疗效用。

至此已经概括叙述了本发明，可通过参考本文所包括的更详细描述和某些仅用来说明且无意限制（除非另有说明）的特定实例而对此做更深入的理解。

诊断工具

15 我们发现用于筛选或诊断患有 B 细胞淋巴瘤的病人的新目标物。BLSA 极高度表达于 B 淋巴瘤及特别是显示于前 B 细胞淋巴瘤。（参看下文的表 1 和 2）

单克隆抗体的淋巴瘤的免疫表型特征研究证明对于组织诊断是有价值的附属物且有利于理解某些淋巴瘤的种类。探测不同抗原的单克隆抗体已用于或建议用于许多研究目及用于人类和动物中白血病和淋巴瘤的诊断研究。所采用的技术包括（但不限于）：

1. 白血球表型识别，利用流式细胞计数仪、免疫荧光法、免疫酶技术或免疫电子显微镜方法。
2. 白血球分离技术，包括流式细胞计数仪和筛选。
3. 淋巴瘤的识别和分级。
- 25 4. 动物和人类中淋巴瘤的放射免疫影像。
5. 动物和人类中淋巴瘤的放射免疫治疗。
6. 在试验模型和人类疾病中白血球分化、成熟和功能的研究。

30 可用标记物给抗体或抗原做记号而通过在本技术中已为我们所知的方法的变化来探测经诊断的抗原-抗体反应。通常所用的标记物为色原体，例如荧光染料、酶、放射性及不透射线的化合物。荧光染料是吸收放射线的染料，例如紫外光，此染料经受紫外光而激活且结果为发射可见光。可用作标记物的荧光染料可以与蛋白质分子形成共价键且具有以带有不同于组织的颜色的可见光谱的高荧光发射。通常所用的荧光染料为荧光素异硫氰酸盐 (FITC) 和三甲基若丹明异硫氰酸盐 (TRITC)。

35 使用荧光染料标记物作标记的抗体的方法通常称为免疫荧光方法。在所谓的“直接方法”中用荧光染料标记的抗体应用于制备包含相应抗原。在“间接方法”

中抗原用相应的未标记的抗体进行处理，且合成的抗原-抗体复合物利用经由荧光染料做标记的动物类免疫球蛋白的抗体来进行处理，该动物类提供第一步所用的未标记抗体。在诊断免疫学中，含有抗原的基质可用患者的血清来培养，然后用荧光染料标记的小鼠、小兔或小羊对人类免疫球蛋白的抗体来培养。间接方法提供更高的灵敏性。为了探测荧光免疫检验法样品，可使用经普通透射光显微镜简单更改的荧光显微镜。若有必要，可通过显微镜照相术来记录结果。

在与基质相互作用时如果形成可检测沉淀剂或可视发射，则酶也可用于标记。在经酶标记的抗体辅助下免疫酶过程可用于定位抗原。已采用几种酶作为标记物，例如辣根过氧化酶和碱性磷酸酶。广泛使用通过由酶结合的抗体来探测抗原的的方案称为酶结合免疫吸收分析法（ELISA），其可以直接方法或夹层形式进行。

可使用任一广泛所知的放射性核素作为放射性标记物。合适的放射性核素包括 Tc-99m、I-123、In-111、In-113m、Ga-67 或其他合适的 γ -发射体。可通过常见技术使放射性核素同单克隆抗体相结合。例如，可利用“S.Mills sup. 123 I-Radiolabeling of Monoclonal Antibodies for In Vivo Procedures, Hybridoma 5, 265-275 (1986)”中所述的氯胺 T 方法来完成碘酸盐。此技术可用于引起碘酸盐提供不透射线抗体或连接于放射线核素，例如 I-125 或 I-131。其他的放射线核素可通过用苯甲基 EDTA 或 DPTA 结合过程的螯合作用而与抗体相结合。其他合适的技术包括：碘化法（iodogen method），其展示于 M. Pimm 等人的“*In Vivo Localization of Anti-Osteogenic Sarcoma 791T Monoclonal Antibody*, *Int. J. Cancer*. 30, 75 (1982)”；及含有放射性碘化钠的直接碘酸盐。

适合于为抗体对抗体进行标记的不透射线物质包括碘化合物、钡化合物、镓化合物、铊化合物等。特殊的不透射线物质的实例包括：钡、泛影葡胺、乙硫磷化油、柠檬酸镓、碘卡酸、碘西他（iocetamic）酸、碘达酸、碘帕醇、碘多卡（iodoxamic）酸、碘古拉酸（iogulamide）、碘海醇（iohexol）、碘异酞醇、碘番酸、碘泼西（ioprocemic）酸、碘西法酸、碘苏拉酸（iosulamide）、甲葡胺、碘苏米（iosumetic）酸、碘他苏酸（iotasul）、碘四酸、碘他拉酸、碘托西酸、碘克沙酸、碘卡唑（ioxotrizoic）酸、ipodate、甲葡胺、甲泛葡酸、甲基三元影酸、丙碘酮和氯化亚铊。

另一方面，本发明涉及一种用来显现病变的方法。一种用来显现以某些淋巴瘤为特征的病变的方法可包含以下步骤：获得 BLSA 特异的单克隆抗体；对该抗体进行标记；用获得自哺乳动物的生物样品接触该经标记的抗体及显现该标记。为达到此目的，可对抗 BLSA 抗体进行标记。合适的标记物包括，例如放射性同位素示踪、不透射线物质和磁共振增强物质。放射性同位素示踪和不透射线物质在上面已有所讨论。定位于表达抗体的组织中的用于表达标记的合适技术在该技术中已为人所知。例如，如果标记物是 γ -发射放射性核素，那么合适的表达技术包括 γ 照相机和单光子发射计算机断层成像（SPECT）技术。如果抗体经不透射线物质

进行标记，那么可应用射线成像现象。其他合适的技术包括：轴向计算层析成像技术（CAT）扫描、荧光透视法和常见的 X 射线成像。

5 可探测或增强磁共振成像设备效果的物质也可以与抗体相结合。合适的常见磁共振增强化合物包括：钆、铜、铁和铬。这些金属原子可以常见有机金属螯合物的形式来制备，其后与抗体结合。前述方法连同其他免疫诊断常规技术一起揭示于标准实验课本。参看例如 Rose, N. R. 和 Pierluigi E. B. 的 “in Methods in Immunodiagnosis, 第二版, John Wiley & Sons 出版, 纽约, 奇切斯特, 布里斯班, 多伦多, 1980 年; Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates 和 Wiley-Interscience, 1987 年”。

10 本发明也提供用于检测患者中严重级别 BLSA 存在的方法。该方法对于确定病人是否患有 B 细胞淋巴瘤、对于监测疾病的进展和阶段或者监测疾病治疗的效果是有用的。方法包括：自患者采集样品；暴露样品至同 BLSA 相互作用的分子及检测 BLSA 与该分子之间存在的相互作用或测定所形成产物的量。

15 此样品可为含有 B 细胞的生物液体或组织，包括血液。通过任何广泛所知的方式来采集样品，例如，活体解剖或自患者简单抽血。

与 BLSA 相互作用的分子可为，例如小分子蛋白质、肽、抗体、寡核苷酸或配位体。优选的分子是与 BLSA 特定结合的抗体。分子与 BLSA 之间的相互租用可通过任何为人所知的方式来检测，例如荧光测定法、化学发光、ELISA、FACS 分析和固相 RIA 等。当该分子为与 BLSA 相结合的抗体时，较优的检测方法为 ELISA。

20 检测 BLSA 表达水平的方法包含 PCR 的测定，例如实时定量 PCR。此方法可利用寡核苷酸引物来进行，例如：

	F: CAGAGCCCCAGCTAGAGATC	(SEQ ID NO 3)
	R: GTGCAGCAGAGCTGGAAGC	(SEQ ID NO 4)
	F: GCAGTGGCATCTTCCAGAGC	(SEQ ID NO 5)
25	R: CAGATGCTGTTTCTGGGATCC	(SEQ ID NO 6)
	F: GATCAGAGTGCAGGGTGCTTC	(SEQ ID NO 7)
	R: GGATTCAATGTGGGAGGTGC	(SEQ ID NO 8)
	F: GTGAGGGACCTGTCTGCACTG	(SEQ ID NO 9)
	R: AGTCATCCTCCGTGTGGCA	(SEQ ID NO 10)
30	F: GAATTCCAGATCCCCACAGCT	(SEQ ID NO 11)
	R: ACACCAGTATGACCCGGAGTG	(SEQ ID NO 12)
	F: CGGGCCTAACAGGGAATTCT	(SEQ ID NO 13)
	R: CCCGCTGTCTGCCTTTTGTGTA	(SEQ ID NO 14)
	F: CCTCCCACATTGAATCCAGC	(SEQ ID NO 15)
35	R: GAGCAGTTCCTGGAGCAGCT	(SEQ ID NO 16)
	F: TGTGAGGGACCTGTCTGCAC	(SEQ ID NO 17)

R: AGTCATCCTCCGTGTGGCA (SEQ ID NO 18)

F: GGCTGATCCTCCAAGGTCC (SEQ ID NO 19)

R: ACCAGCAGGTCCCCTTCAA (SEQ ID NO 20)

5 由所属领域的技术人员通过为人所知的技术经其他引物组可易于确定。本方法也包括通过比较患者与正常组织之间的表达水平来测定 BLSA 的相对表达。

本发明也包括诊断套组，其包含例如，对 BLSA 的特异抗体或者用于检测 BLSA 表达水平的引物。

促效剂和拮抗剂

10 在另一方面，本发明提供与 BLSA 特定结合及抑制或激活其表达或作用的促效剂和拮抗剂。促效剂和拮抗剂类型包括（但不限于）：多肽、蛋白质、肽、糖蛋白、糖肽、糖脂、多糖、寡糖、核苷酸、有机分子、生物有机分子、肽模拟物、药物试剂及其代谢物和转录与翻译调控序列。

15 在一具体实施例中，促效剂和拮抗剂是反意义寡核苷酸或其他的核酸构造，该构造用于调控 BLSA 编码核酸分子的功能，并最终调控所产生 BLSA 的量。通过提供特定地与一个或多个 BLSA 编码核酸杂交的反意义化合物来完成该过程。寡聚化合物同其目标核酸的特定杂交干扰正常核酸功能。受干扰 DNA 的功能包括复制和转录。受干扰的 RNA 功能包括所有生命机能，例如，RNA 易位至蛋白质翻译位点、蛋白质自 RNA 的翻译、RNA 剪接以产生一个或多个 mRNA 式样及由 RNA 参与或促进的催化活性。对目标核酸功能的总体影响是 BLSA 表达的控制。在本发明的上下文中，20 “控制”意思是基因表达上的增加（刺激）或减少（抑制）。在本发明的上下文中，抑制是优选的基因表达控制形式且 mRNA 是优选目标。确定 BLSA 的反意义化合物的“目标”包括为发生反意义相互作用而在该基因内测定一个位点或多个位点以致于达到所希望的结果，例如蛋白质表达的检测或控制。优选的基因内位点是 BLSA 开放阅读框（ORF）的翻译起始或中止密码子的周围区域。该反意义技术的方法论有所揭示，例如，在“Crooke ST: Basic Principles of antisense 25 technology. In Antisense Drug Technology — Principles, Strategies and Applications. Crooke ST 编，纽约：Marcel Dekker 公司；2001：1-28”。

30 在另一具体实施例中，拮抗剂可以是通过 RNA 干扰（RNAi）途径的小分子干扰 RNA（siRNA），其对 BLSA 利用短（大概 21~23 bp）双链 RNA 来分解从而噪音抑制其表达。双重 siRNA 可根据文献所述的原则来设计（Elbashir, SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K 和 Tuschl T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411, 494-498），及以诸如病毒介导策略的多样形式来使用（Xia, H. 等 (2002) siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. Nature Biotechnology 35 20:1006）。

促效剂和拮抗剂可以是特定结合于 BLSA 的抗体且影响其生物作用和/或功能，

例如激发或抑制 BLSA 的产生。抗体可以是多克隆或单克隆抗体但是优选的为单克隆抗体。

5 促效剂抗体用于预防或治疗以相比无疾病情形的相当低的 BLSA 表达水平为特征的疾病。拮抗剂抗体用于预防或治疗以对比无疾病情形的相当高的 BLSA 表达水平为特征的疾病。

促效剂、拮抗剂和本发明的方法可用于治疗各种 B 细胞淋巴瘤，包括低级别/卵泡细胞非霍杰金氏淋巴瘤 (NHL)、小淋巴细胞 (SL) NHL、中等级别/卵泡细胞 NHL、中等级别弥漫性 NHL、高级别免疫母细胞 NHL、高级别淋巴母细胞 NHL、高级别小无裂细胞 NHL、巨大肿块 NHL 和 Waldenstrom 氏巨球蛋白血症。所属领域的技术人员应当很清楚：由于改变分类体系而该等淋巴瘤经常会有不同的名称，且患有在不同名称下分类的淋巴瘤的病人可能也受益于本发明的组合治疗方式。

10 例如，由欧洲和美国病理学者提议的最新分类提议叫做修订的欧美淋巴瘤 (REAL) 分类。此分类体系确认了其他周边 B 细胞肿瘤中的套细胞淋巴瘤和边缘细胞淋巴瘤，且将某些分类分成基于细胞学的级别，即小细胞、混合的大小细胞和大细胞。可以理解：所有经分类的淋巴瘤可以受益于本发明的组合治疗。

15 美国国立癌症研究院 (NCI) 依次将某些 REAL 分类划分成临床上更有用的“无痛”或“恶性”淋巴瘤标示。无痛淋巴瘤包括：分成细胞学“级别”的卵泡细胞淋巴瘤；弥漫性小淋巴细胞淋巴瘤/慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、淋巴浆细胞类囊肿/Waldenstrom 氏巨球蛋白血症、边缘区域淋巴瘤和毛细胞白血病。恶性淋巴瘤包括：弥漫性混合及大细胞淋巴瘤、Burkitt 氏淋巴瘤/弥漫性小无裂细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤和与艾滋病相关的淋巴瘤。该等淋巴瘤也可以受益于本发明的组合治疗方式。

20 非霍杰金氏淋巴瘤已以基于包括低级别、中度级别及高级别淋巴瘤的其他疾病特征的“级别”为基础进行分类。低级别淋巴瘤通常以节疾病出现，且经常无痛或者慢性发展。中度及高级别疾病通常以带有节外巨大肿瘤的极度恶性疾病而存在。中度和高水平疾病同低水平 NHL 一样，可以受益于本发明的组合治疗方式。

25 BLSA 特异性抗体也可以直接与其他杀死患病细胞的化合物结合，使得患病细胞更易于致死，例如噬菌作用，或者导致患病细胞经受下垂。抗体可以可操作性地与以下药物结合，例如，化学疗法药剂；放射疗法药剂；诸如血管生成素 (angiopoietin)、血管抑素 (angiostatin)、血管抑制素 (vasculostatin)、血管生成抑制因子 (canstatin) 或肿瘤抑制基因 (maspin) 的抗血管新生药剂；细胞死诱发剂；类固醇；抗代谢物；蒽环霉素；长春生物碱；抗微管蛋白药剂，例如秋水仙碱、红豆杉醇、长春花碱、长春新碱、vindescine；及 combretastatin；抗生素；细胞素；烷基化剂或凝结剂；可以杀死或抑制淋巴瘤细胞的成长与细胞分裂的细胞毒素或细胞抑制剂或抗细胞剂；衍生自植物或菌类或细菌的毒素，例如细胞细胞 A 链、脱糖基化蓖麻细胞 A 链；钝化蛋白质或 α -帚曲菌素或 gelonin

或曲霉素或局限曲霉素的核蛋白体；核糖核酸酶；表鬼白脂素或白喉毒素或假单胞菌外毒素。

BLSA 促效剂或拮抗剂的剂量依特殊哺乳动物及疾病的年龄、大小和特性而不同。有经验的技术人员能够确定基于以上因素的剂量。促效剂和拮抗剂可以与疾病一致的治疗方式来投用，例如单剂或分天分剂来改善疾病状况或者经过长时间的定期剂量来预防过敏症或哮喘病。

促效剂和拮抗剂可以任何可接受的方式投用于哺乳动物，包括通过注射、利用插入等。因为注射和插入容许对投用时间及剂量水平的精确控制因此是优先的选择。促效剂和拮抗剂优先选择以皮下投用，但是也可以通过静脉、肌肉或腹膜内注射，或者通过皮下插入。

当通过注射投用时，可由包含任何生物相容且同促效剂及拮抗剂相容的载体的可注射配方来将促效剂和拮抗剂授予哺乳动物，例如不同的媒介物、佐剂、添加剂和稀释剂。诸如不具有非挥发性热源物的水、无菌水及制菌水的水溶液媒介物也适合用于形成可注射溶液。除这些形式的水之外，也可以使用一些其他的水溶液媒介物。该等包括可杀菌的等压注射组合物，例如氯化钠、林格氏溶液、葡萄糖、葡萄糖及氯化钠和乳酸化林格氏溶液。非水媒介物，例如棉花子油、麻油或花生油及酯，例如异丙基豆蔻酸酯，也可以用作组合物的溶剂体系。另外，可添加包括抗菌剂、防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂的各种添加剂来提高组合物的稳定性、无菌性及等渗压性。然而，依据本发明所用的任一媒介物、稀释剂或添加剂必需生物相容且同促效剂和拮抗剂相容。

抗体和抗体的产生

在另一方面，本发明提供与本发明 BLSA 相结合的抗体及产生此抗体的方法，包括起天然 BLSA 促效剂和拮抗剂作用的抗体。在一实施例中，该方法包括在为人所知的产生抗原的抗体（包括多克隆和单克隆）的方案中利用分离的 BLSA 或其抗原片断作为产生与本发明 BLSA 结合的抗体的抗原。在另一实施例中，该方法包括利用表达重组 BLSA 的宿主细胞作为抗原。在又一实施例中，此方法包括利用含有以表达 BLSA 的 BLSA 基因的 DNA 表达载体来作为产生抗体的抗原。

有经验的技术人员熟知产生抗体的方法，其抗体包括多克隆的、单克隆的、单价的、人源化的、人类的、双特异的和异质结合的抗体。

多克隆抗体

多克隆抗体可在哺乳动物中通过单独注射免疫原或含佐剂的组合物而产生。通常，在哺乳动物中利用一个或多个皮下的或腹膜内的注射来注射免疫原。免疫原可包括相关的多肽或含有该多肽及在接受免疫的哺乳动物中的另一已知为可致免疫的多肽的融合蛋白。免疫原也可包括表达重组载体的细胞或含有 BLSA 基因的

DNA 表达载体。此类致免疫蛋白质的实例包括(但不限于): 钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)、血清白蛋白、牛甲状腺素和大豆胰岛素抑制剂。佐剂的实例包括(但不限于): Freund 氏完全佐剂、MPL-TDM 佐剂(单磷酸基油脂 A, 合成的海藻糖双棒状霉菌酸酯)及 CpG 相关的寡核苷酸。可由所属领域的技术人员在

5 无不当试验方法之下选择免疫方案。

单克隆抗体

单克隆抗体可通过杂交瘤方法来产生, 例如其 Kohler 和 Milstein 在 Nature, 256:495 (1975) 中有所描述。在杂交瘤方法中, 小鼠、仓鼠或其他合适的宿主哺乳动物经免疫原进行免疫从而引出可产生或有能力产生可特定地与免疫原结合的抗体的淋巴细胞。或者, 淋巴细胞可在体内进行免疫。免疫原通常包括与多肽相关的或含有此多肽的融合蛋白质。一般情况下, 如果想要得到人类起源细胞, 则使用周围的血淋巴细胞(“PBLs”)。如果想得到非人类哺乳动物起源细胞, 则使用脾细胞和淋巴结细胞。然后使用合适的融合剂(例如聚乙二醇)来使长生细胞系

10 与淋巴细胞相融合以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第 59-103 页(Academic Press, 1986))。长生细胞系通常是经转换的哺乳动物细胞, 特别是啮齿动物、牛或人类的骨髓瘤细胞。通常采用老鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可在合适的最好含有一个和多个抑制未经融合长生细胞生长或存活的物质的培养媒介中进行培养。例如, 如果亲本细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(HGPRT), 那么杂交瘤方法的培养媒介通常会包括: 次黄嘌呤、氨蝶呤和胸腺嘧啶核苷(HAT 媒介)。HAT 媒介阻止 HGPRT 所缺细胞的成长。

15

优选的长生细胞系是可操作性地融合、维持由所选抗体产生细胞时其抗体的稳定的高表达水平且对媒介敏感(例如 HAT 媒介)的细胞。更优选的长生细胞系是骨髓瘤细胞系, 例如衍生自 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤, 其获自 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA; 及获自 American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA 的 SP2/0 或 X63-Ag8-653 细胞系。对于人类骨髓瘤和人-鼠杂合骨髓瘤细胞系在人类单克隆抗体的产生上的使用也曾有所描述(Kozbor, J. Immunol. 133:3001(1984); Brodeur 等, Monoclonal antibody Production Techniques and Applications, 第 51-63 页(Marcel Dekker 公司, 纽约, 1987 年))。小鼠骨髓瘤细胞系 NS0 也可以使用(European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire UK)。所属领域人员已知, 人类骨髓瘤和鼠-人杂合骨髓瘤细胞系也可以用于产生人类单克隆抗体。

25

30

然后用于培养杂交瘤细胞的培养媒介经分析来用于对应相关多肽的单克隆抗体的存在。择优地, 由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性可通过免疫沉淀或体内结合分析来测定, 例如放射线免疫分析(RIA)或结合酶的免疫吸收剂分

35

析 (ELISA)。该等技术和分析在所属领域是为人所知的。例如, 抗体的结合亲和力可通过 Scatchard analysis of Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980) 来测定。

5 在所想要的杂交瘤细胞经确认后, 其克隆体可通过限制稀释程序进行亚克隆且通过普通方法进行生长。适用于此目的的培养介质包括 Duibecco 改良的 Eagle 媒介及 RPMI-1640 媒介。或者, 在哺乳动物中其杂交瘤细胞可在体内如腹水一样生长。

10 分离由亚克隆所分泌的单克隆抗体或者通过常见免疫球蛋白提纯程序来自培养媒介或腹水流体进行提纯, 例如蛋白质 A 琼脂糖、羟磷灰石色谱法、凝胶电泳、渗析或亲和色谱法。

单克隆抗体也可通过重组 DNA 法来产生, 例如其在美国专利第 4,816,567 号中有所描述。本发明的单克隆抗体编码 DNA 可利用常见程序容易地进行分离和定序, 例如利用具有与鼠科抗体重及轻链编码基因特定结合的能力的寡核苷酸探针 (Innis M. 等, In "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications",
15 *Academic, San Diego, CA*(1990), Sanger, F.S 等. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:5463-5467(1977))。文中所述的杂交瘤细胞作为该 DNA 的首选来源。一旦 DNA 得以分离, 则放置于表达载体。然后使载体转染至宿主细胞, 例如猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞。DNA 可以进行改性, 例如, 通过用人类重及轻链不变区域编码序列来替代类似鼠序列或者通过
20 使免疫球蛋白编码序列共价连接至非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列。此非免疫球蛋白多肽可用于替代抗体的不变区域或者用于替代抗体的抗原组合位点的可变区域而获得嵌合二价抗体。

25 利用免疫球蛋白轻链及改性重链的重组表达可产生单价抗体。通常在 Fc 区域的任一点切断此重链以阻止重链交联。或者, 相应的半胱氨酸残基可用另一个氨基酸残基来替代或者进行删除以阻止交联。类似地, 在体外的方法可用来产生单价抗体。利用已知的方法, 抗体致菌分解可用于产生优先为 Fab 片断的抗体片断。

可利用 McCafferty 等人的 *Nature* 348:552-554(1990) 中所述的技术由抗体噬菌体库产生抗体及抗体片断。在 Clackson 等人的 *Nature* 352:624-628 (1991) 和 Marks 等的 *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1991) 中描述了分别利用噬菌体库进行鼠
30 及人抗体的分离。随后的出版物既描述了以组合感染和在体内的重组作为策略来构建巨大的噬菌体库 (Waterhouse 等, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266(1993)), 也描述了通过链改组来产生高亲和力 (nM 范围) 人类抗体 (Marks 等, *Bio/Technology* 10:779-783(1992))。因此, 对于分离单克隆抗体而言, 这些技术是传统单克隆杂交瘤技术的可行替代。DNA 同样可以进行改性, 例如, 通过用人类重链及轻链不变区域编码序列来替代类似的鼠序列 (美国专利第 4,816,567 号;
35 Morrison 等, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81:6851(1984)), 或者通过使免疫球

蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列进行共价结合。通常，这些非免疫球蛋白多肽用来替代抗体的不变区域，或者其用来替代抗体的组合位点抗原的可变区域以获得嵌合的二价抗体，该抗体包含一具有抗原特异性的组合位点抗原或另一具有不同抗原特异性的组合位点抗原。

- 5 也可利用耗电融合而不是化学融合来产生抗体以形成杂交瘤。此技术已成功确定。也可以转移 B 细胞以使其长生，例如利用 Epstein Barr Virus，或者转移基因“Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity”（“Monoclonal Antibodies”，Zurawaki, V. R. 等, Kennett R. H. 编, Plenum Press, N.Y. 1980, 第 19-33 页）来代替融合。

10

人源化的抗体

可利用 Winter in Jones 等人在 Nature, 321:522-525 (1986)、Riechmann 等人在 Nature, 332:323-327(1988) 和 Verhoeyen 等人在 Science, 239:1534-1536(1988)中所述的方法来产生人源化的抗体。人类化可通过用啮齿动物 CDRs 或 CDR 序列替代人类抗体相应序列来完成。通常，人源化的抗体具有一种或多种自非人类来源引入的氨基酸。“人类化”抗体是嵌合抗体，其中实质上通过自非人类样品的相应序列仅替代了不完整的人类可变区域。实际上，人源化的抗体通常是人类抗体，其中某些 CDR 残基和可能的某些 FR 残基由来自啮齿动物抗体类似位点的残基所替代。非人（例如鼠或牛）抗体人类化形式为嵌合免疫球蛋白；免疫球蛋白链；免疫球蛋白片断，例如 Fv、Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 或者其他的含有衍生自非人类免疫球蛋白的极小序列的抗体的抗原结合序列。人源化的抗体包括人类免疫球蛋白（可接受抗体），其中来自接受体的互补确定区域（CDR）的残基由来自非人类样品（供体抗体）的 CDR 的残基所替代，诸如具有所想要的特异性、亲合力及包容力的小鼠、老鼠或小兔。有时，人类免疫球蛋白的 Fv 框架残基是由相应的非人类残基所替代。人源化的抗体既包含未在可接受抗体也未在所引入 CDR 或框架序列中发现的残基。大体上，人源化的抗体实质上包含所有或至少一个或通常两个可变区域，其中对应于非人类免疫球蛋白的全部或大致全部 CDR 区域以及全部或大致全部 FR 区域是人类免疫球蛋白一致序列。人源化的抗体最优包括至少一部份通常属于人类免疫球蛋白的免疫球蛋白不变区域（Fc）。

30

人类抗体

可利用各种所属领域已知的技术来产生，例如，在 Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 227:381(1991)和 Marks 等, J. Mol. Biol., 222:581(1991)中所描述的噬菌体显示库。人类单克隆抗体可利用在 Cole 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77(1985) 及 Boemer 等, J. Immunol., 147(1):86-95(1991)中所述的技术来产生。或者，可应用转基因

35

动物（例如小鼠），其在免疫时在内生免疫球蛋白产物存在的情况下可产生完整清
单人类抗体。此转基因小鼠获得自 California, Fremont 的 Abgenix 公司和 New
Jersey, Annandale 的 Medarex 公司。据描述：在嵌合及种系突变小鼠中的抗体重
链连接区域（JH）基因的纯合删除导致了内生抗体产物的完全抑制。在此种系突
5 变小鼠中，人类种系免疫球蛋白基因排列的转换将会引起在抗原激发之上的人类
抗体产生。参看例如 Jakobovits 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551(1993);
Jakobovits 等, Nature 362:255-258(1993); Bruggermann 等, Year in Immunol.
7:33(1993) 及 Duchosal 等, Nature 355:258(1992)。人类抗体也可衍生自噬菌体
显示库（Hoogenboom 等, J. Mol. Biol. 227:381(1991) ; Marks
10 等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991); Vaughan 等, Nature Biotech 14:309
(1996))。

双特异性抗体

双特异性抗体可通过两个免疫球蛋白重链/轻链对的重组共同表达来产生，其
15 中两重链具有不同的特异性。双特异性抗体是单克隆的，最好是人类或人源化的
具有对至少两个不同抗原的结合特异性的抗体。在本发明中，结合特异性之一是
对于 BLSA 且另一个是对于任意其他抗原，优选为细胞表层受体或受体亚组。由于
免疫球蛋白重链及轻链的任意分类，所以这些杂交瘤产生十个不同抗体的潜在混
合物。然而，这些抗体中仅一个具有正确的双特异性结构。修正分子的回收和提
20 纯通常通过色谱法来完成。

带有所希望结合特异性的抗体可变区域（抗体-抗原结合位点）可融合至免疫
球蛋白不变区域序列。该融合优选地是采用免疫球蛋白重链不变区域，其包含至
少部分铰链、CH2 及 CH3 区。较优地，含有轻链结合所必需的位点的第一重链不变
区（VH1）存在于至少一个融合中。将免疫球蛋白重链和（若须要）免疫球蛋白轻
25 链编码 DNA 插入至单独的表达载体中且共同转染至适当的宿主机体。用于产生双
特异性抗体的合适技术在 Suresh 等 Methods in Enzymology, 121:210 (1986) 中
有所描述。

异质结合的抗体

30 异质结合的抗体可通过已知的蛋白质融合方法而产生，例如通过将抗体的胺
基接合至另一个抗体或其他多肽的硫醇基。若需要，可利用已知方法引入硫醇基。
例如，包含抗体或抗体片段的免疫毒素和多肽毒素可利用二硫化物交换反应或通
过形成硫醚键来产生。为此目的而适用于的合适试剂的实例包括亚胺基硫醇盐和
甲基-4-巯基丁酰胺。这些抗体可用于使免疫体系细胞对准不需要细胞或用于治疗
35 HIV 感染。

多核苷酸

在另一方面，本发明提供含有选择由以下序列组成的群组的核苷酸序列的分离的多核苷酸：SEQ ID NO:1；SEQ ID NO:1 的变体；SBQ ID NO:1 片段；具有选自由 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:2 的变体及 SEQ ID NO:2 片断所组成的群组的核苷酸序列的多肽编码核苷酸序列。

本发明的分离的多核苷酸优先是为 BLSA 的译码序列。在本发明的另一方面，多核苷酸用于产生在可与 BLSA 特定结合且抑制或刺激 BLSA 的表达和作用的促效剂及拮抗剂抗体的生成过程中起抗原作用的 BLSA。在本发明的另一方面，多核苷酸可用作 DNA 免疫技术的疫苗。所述的将多核苷酸用于 BLSA 表达的各种其他方法也在期待中。

载体和宿主细胞

另一方面，本发明提供包含有本发明 BLSA 编码核苷酸序列的载体及包含此载体的宿主细胞。

宿主细胞的实例可以是哺乳动物的细胞（例如 CHO 细胞）、原核细胞（例如 E. coli）或酵母细胞（例如酿酒酵母）。另外提供了产生脊椎动物融合多肽的过程且其包括在合适条件下培养适于脊椎动物融合表达的宿主细胞及自细胞培养物中进行回收。

疫苗

治疗由免疫系统在自异质区分自身时的机能不良所引起疾病的理想方式是通过刺激此系统引出自保护免疫性，且因此当需要该反应时抑制其自身有毒反应。此任务可通过利用 DNA 疫苗接种来完成。DNA 接种是疫苗和免疫疗法发展的一种方法。DNA 疫苗是为产生体液和细胞免疫反应而表达体内的抗原的一种新颖方法。已证明此技术在获得不仅对异质抗原及肿瘤，而且对自身抗原（例如 T 细胞受体基因或自身细胞素）的免疫性上是成功的。由于 DNA 接种疫苗引出细胞和体液对给定构造的产物的两种反应，因此其在根除患病细胞上是非常有效的方法。基因表达盒在活宿主的直接注射可将若干细胞转移至用于产生经引入基因产物的工厂。这些经传送的基因的表达具有重要的免疫学结论且可导致宿主对新颖的经表达抗原的特异免疫激活。该免疫的独特方法能够克服基于抗原的传统方法的缺点且提供安全、有效的预防性及治疗性疫苗。宿主正常细胞（非造血的）能够表达和呈现免疫体系的肿瘤抗原。经转染细胞显示在其细胞表层的抗原片断和 I 类或 II 类主组织相容性复合基因（MHC I、MHC II）。该 MHC I 显示起到了细胞介导的免疫反应求救信号的作用，其发送可破坏经转染细胞的 CTL。CTL 对肿瘤退化是重要的。一般而言，当细胞变性病毒感染宿主正常细胞时，该病毒蛋白经内生处理且由 MHC 分子在细胞表层或碎片中得到呈现。由正常细胞感染和表达的外来的限定的核酸

能够模拟病毒感染。

文中所述的在载体上经编码的致免疫融合多肽包括 T 细胞表位部分及 B 细胞表位部分。在载体上经编码的 T 细胞表位部分包含广范围或“通用”辅助 T 细胞表位，其结合抗原呈现多位点（例如 2、3、4、5、6 或更多）种类 II 主组织相容性复合基因（MHC）分子且能与 T 细胞抗原受体一起形成三元复合物，例如 MHC：抗原：T 细胞受体。通过“非内生蛋白”意思是不是内生于即将进行处理的个体的蛋白质。这些用作致免疫融合多肽的 T 细胞表位部分的非内生蛋白或其片断包括：破伤风类毒素；白喉毒素；II 类主组织相容性复合基因相关的不变链；流感血球凝集素 T 细胞表位；锁孔血蓝蛋白（KLH）；来自已知的疫苗（包括百日咳疫苗、Bacille Calmette-Guerin (BCG) 肺结核疫苗、脊髓灰质炎疫苗、麻疹疫苗、腮腺炎疫苗、风疹疫苗及提纯的结核菌素蛋白衍生物（PPD）的蛋白质；及合成的肽，其结合呈现多个 II 类组织相容性分子位点的抗原，例如包含 Alexander 等人（Immunity, 1: 751-761(1994)）所述的天然氨基酸。当结合至 BLSA 的 B 细胞表位部分时，T 细胞表位部分启动致免疫融合多肽来破坏耐受性以产生同内生 BLSA 反应的抗体。通过“破坏耐受性”意思是强迫有机体支持对例如内生 BLSA 的蛋白质的免疫反应，有机体通常不具有致免疫性。

DNA 疫苗近来显示是一种对不同传染性疾病的免疫的有前途的方法。Michel, M L 等人、Huygen, K 等人和 Wang, B 等人。含有微生物抗原基因的裸露 DNA 的传送可以引发宿主中的抗原特异免疫反应。由基于 DNA 的疫苗所引发的抗原特异免疫反应已经显示某些有前途的结果。Wolff, J. A. 等人。进来研究已经证实使用 DNA 介导疫苗来使 CEA 和 MUC-1 免疫的潜在可行性。Conry, R. M. 等人及 Graham, R. A. 等人。

相比现场减弱病毒免疫而言，基于 DNA 的接种疫苗已经显示出对抗原表达、毒性及致病性的较高控制程度。上述用于 DNA 疫苗的医药学上可接受载体的构造、操作和用途及上述传送媒介物在 Dow 等人的标题为“gene therapy for T cell regulation”的第 5,705,151 号美国专利中有详细描述，其涉及抗癌治疗且因此就像在文中全面提及一样以引用的方式来并入本文。

在另一方面，本发明提供一种用于使病人对 B 细胞淋巴瘤或其他 B 细胞介导的疾病免疫的方法，其包括给病人注射 BLSA 或其致免疫片断。同其他治疗法一样，BLSA 或致免疫片断可单独或与合适的佐剂和/或其他抗原一起组合注射。

通常，用主组织相容性复合基因（MHC）分子使抗原呈现给免疫系统，即 MHC I 类和 MHC II 类分子。内生或自身抗原，例如就像 BLSA 一样的肿瘤抗原，通常必定是 MHC I 类分子且呈现给细胞毒素的 T 细胞（“CTL”）。外生抗原，例如病毒抗原，通常必定是 MHC II 类分子且呈现给与 B 细胞相互作用以产生抗体的 T 细胞。

经 II 类途径呈现的抗原，即 MHC II 类限制抗原或 II 类抗原，由 T 细胞认可且激活 T 细胞。该等经激活的 T 细胞引起对 II 类抗原的完全免疫反应。因为自身抗原

通常不通过 MHC II类方式来呈现给免疫系统，因此免疫体系不将这些抗原作为异质且不对此抗原形成完全免疫反应。

在本发明的一个具体实施例中，与其他指定用于刺激或操纵免疫反应的抗原一起同时 (simultaneously) 或同时期 (contemporaneously) 注射 BLSA。优选地，
5 使 BLSA 作为包含 BLSA 抗原及其他指定抗原的构造的一部分来进行注射以引发细胞免疫反应。该等其他抗原经指派用于增强对 T 细胞的抗原呈现且引发对抗原更有效的免疫反应，例如由于 BLSA 不被免疫系统认做异质抗原因此通常引发不完全免疫反应。

通常，BLSA 与 II类抗原一起组合注射。由免疫系统认做可引发弱的或不完全
10 免疫反应的自身抗原的其它抗原与 BLSA 抗原一起经 MHC II类途径来刺激免疫反应，此有助于帮助确保 BLSA 抗原将被免疫系统作为可引发完全免疫系统反应的异质抗原来处理。优选地，BLSA 抗原和 II类抗原是一构造的一部份，其中该等抗原是部分单分子。另一方面，本发明提供一种含有 BLSA 抗原和单分子中的另一抗原的构造。较优地，另一抗原为 II类抗原。

15

表达载体

可利用广泛所知技术来制备含有多肽编码核苷酸序列的重组表达载体。表达载体包括与合适的转录或翻译调控核苷酸序列 (例如衍生自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因) 可操作性结合的核苷酸序列。调控序列实例包括转录启动子、
20 操纵基因、增强基因、mRNA 核蛋白体结合位点及控制转录和翻译起始及中止的适当序列。当调控序列在功能上涉及合适多肽的核苷酸序列时，核苷酸序列是“可操作性结合的”。因此，如果此启动子核苷酸序列控制核酸核苷酸序列的转录那么启动子核苷酸序列与 BLSA 序列进行可操作性结合。

通常由复制起源及用以确认转换的选择基因所授予的在复制所想要宿主细胞
25 中所复制的能力可以另外并入表达载体。

此外，非自然地与 BLSA 相关联的适当信号肽编码序列可并入表达载体。例如，信号肽 (分泌引导段) 的核苷酸序列可以框架形式与多肽序列融合以使得多肽最初作为包含信号肽的融合蛋白质来翻译。在预定的宿主细胞中起作用的信号肽增强适当多肽的细胞外分泌。在自细胞的分泌多肽时，信号肽可以自多肽裂开。

30

宿主细胞

用于 BLSA 表达的合适宿主细胞包括原核生物、酵母、古生物和其他真菌细胞。与细菌、真菌、酵母及哺乳动物细胞宿主一起使用的合适克隆和表达载体已为所属领域的技术人员所知，例如 Pouwels 等人的 Cloning Vectors: A Laboratory
35 Manual, Elsevier, New York (1985)。载体可以是质粒载体、单个或双链噬菌体载体或者单个或双链 RNA 或 DNA 病毒载体。通过广泛所知的用于将 RNA 或 DNA 引

至细胞的技术,可将这些载体引入至细胞来作为多核苷酸,优选为 DNA。就噬菌体和病毒性载体来说,也可以且优选地通过广泛所知的用于感染和转换的技术来将该等载体引入至细胞以作为封装的或膜包裹的病毒。病毒性载体可以是完全复制或不完全复制。在较后面的案例中,病毒传播通常仅会在补体宿主细胞中发生。

5 非细胞翻译体系也可以利用衍生自当前 DNA 构造的 RNA 来产生蛋白质。

本发明中用作宿主细胞的原核生物包括格兰氏阴性或格兰氏阳性有机体,例如 *E. coli* 或 *Bacilli*。在原核宿主细胞中,多肽可包括促进其中重组多肽表达的 N 末端甲硫氨酸残基。N-端 Met 可切割自经表达的重组 BLSA 多肽。通常用于重组原核宿主细胞表达载体的启动子序列包括 β -内酰胺酶及乳糖启动子体系。

10 用在原核宿主细胞中的表达载体大概包括一个或多个表型可选择的标记物基因。例如,一个表型可选择的标记基因是提供抗生素或供应自养需求的蛋白质编码基因。对原核宿主细胞有用的表达载体的实例包括衍生自市面有售的质粒的基因,例如克隆载体 pBR322 (ATCC 37017)。pBR322 包含用于氨苄西林及四环素抗性的基因且因此提供简单方式来识别经转换细胞。为了利用 pBR322 构建表达载体,
15 可将适当启动子及 DNA 序列插入至 pBR322 载体。其他市面有售载体包括,例如, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)、pGEM1 (Promega Biotec, Madison, Wisconsin, USA) 和 pET (Novagen, Madison, Wisconsin, USA) 和 pRSET (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA) 系列载体 ((Studier, F. W., *J. Mol. Biol.* 219:37 (1991); Schoepfer, R. *Gene* 124:83 (1993))。

20 通常用于重组原核宿主细胞表达载体的启动子序列包括 T7 (Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D-S., Lin, S-W., Dunn, J. J. 和 Studier, F. W. (1987) *Gene* (Amst.) 56, 125-135)、 β -内酰胺酶 (penicillinase)、乳糖启动子系 (Chang 等 *Nature* 275:615, (1978) 和 Goeddel 等, *Nature* 281:544, (1979))、色氨酸 (*trp*) 启动子系 (Goeddel 等, *Nucl. Acids Res.* 8:4057, (1980)) 和
25 *tac* 启动子 (Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412 (1982))。

在本发明中用作宿主细胞的酵母包括来自类酵母菌的酵母, *Pichia*、*K. Actinomycetes* 及 *Kluyveromyces*。酵母载体经常包括来自于 2 μ 酵母质粒的复制序列起源、自发复制序列 (ARS)、启动子区域、多聚酰苷化序列、转录中止序列
30 和可选择的标记物基因。对酵母载体合适的启动子序列包括,其中,金属硫因的启动子; 3-磷酸甘油酸酯激酶 (Hitzeman 等, *J. Biol. Chem.* 255:2073, (1980)) 或者其他的糖酵解酶 (Holland 等, *Biochem.* 17:4900, (1978)), 例如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸酯磷酸酯脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸盐、脱羧酶、磷酸磷酸果糖激酶、葡萄糖激酶-6-磷酸酯异构酶、3-磷酸磷酸甘油酸盐变位酶、丙酮酸盐激酶、丙
35 糖磷酸酯异构酶、磷酸葡萄糖激酶葡萄糖异构酶和葡萄糖激酶。用于酵母表达的另外合适载体和启动子在 Fleer 等人的 "Gene, 107:285-195 (1991)" 中有进一步描述。

适用于酵母及酵母转换方案的其他启动子和载体在所属领域已为人所知。

酵母转换方案已为所属领域的技术人员所知。一个方案由 Hinnen 等人在“Proceedings of National Academy of Science USA, 75:1929 (1978)”中有所叙述。Hinnen 方案在可选择的培养基中选择 Trp. sup. +转换体, 其中可选择的培养基由 0.67%酵母氮原、0.5%酪蛋白氨基酸、2%葡萄糖、10 μ g/ml 腺嘌呤和 20 μ g/ml 尿嘧啶组成。

在所属领域已知的哺乳动物或昆虫宿主细胞也可以用于表达重组 BLSA, 例如用来在昆虫细胞中产生异种蛋白质的杆状病毒 (Luckow 和 Summers, Bio/Technology 6:47 (1988)) 或用于哺乳动物表达的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。用于哺乳动物宿主细胞表达载体的转录及翻译调控序列可以自病毒基因组来切离。通常所用的启动子序列及增强序列来自多瘤病毒、腺病毒 2、猿病毒 40 (SV40) 及人类细胞巨化病毒。由 SV40 病毒基因组所衍生的 DNA 序列可用于提供其他遗传原理以用于在哺乳动物宿主细胞中结构基因序列的表达, 例如 SV40 起源、早期及晚期启动子、增强因子、剪接及多聚酰苷化位点。病毒性早期及晚期启动子特别有用, 因为两者都可作为也包含病毒性起源复制的片断而易于自病毒性基因组得到。用于哺乳动物宿主细胞的例证性表达载体已为所属领域的技术人员所知。

当受益时, BLSA 可作为具有与融合判断结合的 BLSA 的融合蛋白来表达。融合片段经常辅助予蛋白质提纯, 例如, 通过准许融合蛋白质由亲和色谱法进行分离及提纯。融合蛋白质可通过培养经融合核酸序列转换的重组细胞来产生, 该核酸序列对包括与蛋白质羧基和/或氨基末端相结合的片断的蛋白质进行编码。首选的融合片断包括 (但不限于) 谷胱甘肽-S-移转酶、 β -半乳糖苷酶、有能力与二价金属离子结合的多组胺酸片段及麦芽糖结合蛋白。

表达和回收

根据本发明, 经分离和提纯的 BLSA 可通过上述重组表达体系来产生。该方法包括在重组条件下用含有多肽编码核苷酸序列的表达载体来培养经转换的宿主细胞以促进多肽的表达。然后视所采用的表达体系的不同而自培养基或细胞提取物回收多肽。正如技术人员所知, 提纯重组多肽的程序将根据以下因素而有所变化: 所用宿主细胞类型及重组多肽是否分泌至培养基。当采用分泌重组多肽的表达体系时, 可首先浓缩培养基。浓缩步骤之后, 浓缩物可应用作提纯基质, 例如凝胶过滤介质。或者, 可采用阴离子交换树脂, 例如具有悬挂二乙氨乙基 (DEAE) 基的基体或基质。基体可能是丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或者其他蛋白质提纯中的常用类型。此外, 可以采用阳离子交换步骤。合适的阳离子交换剂包括各种含有硫代丙基或羧甲基的不溶基体。另外, 可采用一个或多个采用疏水 RP-HPLC 介质 (例如具有悬挂甲基或其他脂肪族基团的硅胶) 反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 步骤、离子交换 HPLC (例如具有悬挂 DEAE 或硫代丙基 (SP) 基或者疏水交互 HPLC

(例如具有悬挂苯基、丁基或其他疏水基团的硅胶)的步骤以进一步提纯蛋白质。各种组合的某些或全部前述提纯步骤已为所属领域技术人员所知且可用于提供分离和提纯的重组多肽。

5 产生于细菌培养的重组多肽通常由宿主细胞的初期破裂、离心分离、自细胞小球的提取物离子(若为不溶多肽)或者自上层液(若可溶多肽),接着由一次或多次分离、盐析、离子交换、亲和提纯或尺寸排除色谱步骤来进行分离。最后,RP-HPLC 可用作决定性的提纯步骤。微生物细胞可通过任一常规方法来破坏,包括冰冻-解冻循环、声裂法、机械破裂或使用细胞溶解试剂。

促效剂和拮抗剂的筛选

10 在另一方面,本发明提供用于确定 BLSA 促效剂和拮抗剂的筛选方法。筛选方法包括使 BLSA 暴露至潜在的 BLSA 促效剂/BLSA 拮抗剂和测定潜在的 BLSA 促效剂/BLSA 拮抗剂是否与 BLSA 相结合。如果 BLSA 促效剂/BLSA 拮抗剂与 BLSA 相结合,则存在重大推测:当在体内给病人投用和暴露予天然 BLSA 时,潜在的 BLSA 促效剂/BLSA 拮抗剂实际上其促效剂或拮抗剂的作用。作为一种促效剂/拮抗剂而言,
15 通过此方法所识别的 BLSA 促效剂和 BLSA 拮抗剂的特征为:可使能够产生细胞素的细胞暴露至该促效剂/拮抗剂且测定相对于非暴露细胞的细胞素的产生。促效剂可增强细胞素产生;拮抗剂可削弱细胞素产生。另一筛选方法包括用含有 BLSA DNA 结合序列的报道基因构造来转染细胞。优选地,潜在的促效剂/拮抗剂是有机化合物或多肽,其包括抗体。筛选方法对于识别起预防或治疗疾病的药物作用的化合物是有用的,特别是以相比于无疾病情况下相当低或相当高的细胞素产生为特征的疾病。
20

BLSA 表达调控

在另一方面,本发明提供一种通过对 BLSA 编码 DNA 或 RNA 多核苷酸的转录或翻译进行干扰而阻塞或调控细胞 BLSA 表达的方法。此方法包括使可以表达 BLSA
25 的细胞暴露于干扰 BLSA 编码 DNA 或 RNA 的适当转录或翻译的分子。此分子可以是有机分子、生物有机分子、反意义核苷酸、RNAi 核苷酸或核糖酶。

在一优选实施例中,其方法包括通过使细胞暴露予反意义的或者与 BLSA DNA 或调节 BLSA 表达的 DNA 形成三元螺旋的多核苷酸来阻塞或调控细胞 BLSA 表达。细胞以充足的量暴露予反意义多核苷酸或三元螺旋成形的多核苷酸以致于抑制或
30 调节 BLSA 活化受体的表达。同时,本发明提供一种通过给动物投用反意义或与 BLSA 编码 DNA 或与调节 BLSA 编码 DNA 表达的 DNA 形成三元螺旋多核苷酸来阻塞或调控动物中 BLSA 表达的方法。给动物投用充足的量的反意义多核苷酸或三元螺旋成形的多核苷酸以致于抑制或调节动物中 BLSA 的表达。优选地,反意义多核苷酸或三元螺旋成形多核苷酸为 DNA 或 RNA 多核苷酸。

35 用来使细胞暴露予反意义多核苷酸和将反意义多核苷酸投用于动物的方法在所
所属领域已为人熟知。在一个首选的方法中,利用所知方法使多核苷酸并入细胞

基因组且允许其在细胞内进行表达。经表达的反意义多核苷酸与为 BLSA 译码的多核苷酸相结合且干扰其转录或翻译。

疾病诱因诊断

5 在另一方面，本发明提供一种诊断病人显现由 BLSA 未调节表达所引起疾病的诱因的方法。本发明基于以下发现：在某些病人细胞、组织或体液中 BLSA 的存在和增加的量表明病人易于感染上某些免疫疾病。在一具体实施例中，其方法包括：自病人采集已知 b-CELLS 的含有细胞、组织或体液样品，分析组织或体液以得到组织中 BLSA 水平及在组织或体液中检测 BLSA 水平的基础上来预测病人对某些
10 免疫疾病的诱因。在另一实施例中，其方法包括：自病人采集已知含有确定的 BLSA 水平的细胞、组织或体液样品，分析组织分析组织或体液以得到组织中 BLSA 水平及基于组织或体液中相比于对正常细胞、组织或体液所建立的已确定或已测试水平的 BLSA 量的变化来预测病人对某些免疫疾病的诱因。确定的 BLSA 水平可能是基于文献而知的或者是通过测量正常细胞、组织或体液中的量而预先决定的。具
15 体地说，某些组织或体液中 BLSA 水平的确定准许在患者中免疫疾病的特定及初期检测，最好在疾病发生前。可利用本方法诊断的免疫疾病包括（但不限于）文中所述的免疫疾病。在首选的实施例中，组织和体液是周围血液、周围血液白血球、生检组织，例如肺或皮肤生检及关节液体和组织。

20 疾病预防和治疗

BLSA 促效剂或拮抗剂的剂量依据特定哺乳动物和疾病的年龄、大小及特性而变化。熟练的技术人员可就基于这些因素而确定剂量。促效剂或拮抗剂可以与疾病一致的治疗方式来投用，例如单一或几天几剂以用来改善疾病情况或经长时间的周期剂量以用来预防过敏症或哮喘。

25 促效剂和拮抗剂可以任一可接受的方式来投用于哺乳动物，包括通过注射，利用植入等。注射和植入为首选的，因为两者容许用于投用时间和剂量水平的精确控制。促效剂和拮抗剂首选不经肠道进行投用。文中所用不经肠道投用意思是由静脉、肌肉和腹膜内的注射或由皮下植入。

当通过注射投用时，促效剂和拮抗剂可以含有任一生物相容及促效剂和抵抗
30 行相容的载体的可注射形式投用于哺乳动物，其载体例如，各种媒介物、佐剂、添加剂及稀释剂。液态媒介物，例如不具有非挥发性热源物的水、无菌水和制菌水也适用于形成可注射溶液。除了所说形式水外，几种其他液态媒介物也可以使用。其包括可杀菌的等压注射组合物，例如氯化钠、林格氏溶液、葡萄糖及氯化钠和乳酸化林格氏溶液。无水媒介物例如棉花子油、麻油或花生油及和酯例如异
35 丙基豆蔻酸酯也可以用作组合物的溶剂体系。另外，可加入不同添加剂以提高含有微生物抗菌剂、防腐剂、抗氧化剂、螯合剂及缓冲剂的组合物的稳定性、无菌

性及等渗压性。然而，根据本发明所用的任何媒介物、稀释剂或添加剂必需生物可溶且与促效剂和拮抗剂相容。

BLSA 多肽诊断

5 本发明的抗体也可用于供检测在特定细胞、组织或体液或其成份中所表达 BLSA 的诊断方法。此方法包括使细胞、组织或体液或其成份暴露于本发明的抗体且测定细胞、组织或体液或其成份是否与抗体结合。与抗体结合的细胞、组织或体液或其成份作为含有 BLSA 的细胞、组织或体液来诊断。利用了所属领域已知的各种方法，例如竞争性结合分析、直接或间接夹层分析及在异质或同质阶段实施的免疫沉淀反应分析。

剔除动物

10 在另一部分，本发明提供一种包含在其抑制或阻止生物学功能 BLSA 蛋白质表达的内生 BLSA 基因中具有杂合或纯合破损基因组的剔除动物。优选地，本发明的剔除动物在其内生 BLSA 基因具有纯合破损。本发明首选的剔除动物是小鼠。可利用熟练技术工人已知技术而容易制成剔除小鼠。基因破损可以几种方式来完成，包括：引入止码子至多肽译码序列的任一部分从而导致生物钝化多肽；引入突变至启动子或其他调控序列从而抑制或阻止多肽表达；插入外生序列至基因从而钝化基因及自基因删除序列。

20 几种技术可用于引导特定 DNA 序列至哺乳动物细菌系和实现所说序列稳定传递（转基因）到每一个后代。最常用的技术是直接显微注射 DNA 至受精卵母细胞原核。衍生自这些卵母细胞的小鼠和其他动物将是以约 10 至 20% 的频率的转殖缔造者，其整个增殖引起不同的转殖小鼠系列。尤其是像小鼠这样的动物，经由胚胎操作和显微注射而产生转殖动物的方法在所属领域已变得常见，例如美国专利第 4,736,866 号、第 4,870,009 号和第 4,873,191 号及 Hogan, B. 的 Manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986)。类似的方法用于产生其他转殖动物。

30 胚胎干细胞（“ES 细胞”）技术可用于建立带有特定删除基因的剔除小鼠（和其他动物）。在体外培养和遗传学改性的全能性胚胎干细胞经聚集或显微注射至小鼠胚胎以产生能传送所说遗传改性给其后代的嵌合小鼠。通过定向增殖可以得到缺乏此基因的小鼠。几种另外的方法可用于产生遗传学改性动物，例如，细胞质内精子注射技术（ICSI）可用于转殖小鼠产生。此方法需要显微注射精母细胞首领至未受精卵母细胞的细胞质，刺激卵母细胞的受精及随后的植入前胚胎的适当细胞分裂的激活。所得小鼠胚胎转移至假孕受体雌性体。雌性体产生小鼠幼仔。ICSI 用于转殖细胞产生中时，用含有所希望 DNA 分子（转基因）的溶液来孵化正
35 面朝上悬浮的精子或精母细胞。此与担当异质 DNA 载体媒介物的（一旦显微注射）精子相互作用。一旦 DNA 在卵母细胞内部结合至基因组，则产生转殖小鼠。本方

法提供比迄今利用传统原核显微注射方案所获得的更高的转殖小鼠产量（80%以上）。

基因治疗

由于 BLSA 高度表达于几种人类异常的 B 型白血病细胞系中，因此可用作对于
5 不同类型 B 细胞白血病（例如 Burkitts 氏淋巴瘤和免疫母细胞 B 细胞淋巴瘤等）
的基因治疗区域。基因治疗可在体外或体内应用且 BLSA 可定目标在 DNA、RNA 或
其蛋白质产物的水平上。例如，BLSA 特异寡脱氧核苷酸可用于形成带有嘌呤富余
双链 DNA 序列的三元螺旋以致于在癌细胞内钝化 BLSA 基因。在 RNA 水平上，可利用
10 反意义技术以阻止 BLSA 的传送及翻译，其通过提供互补 RNA 分子（例如，Collins,
J., Herman, P., Schuch, C. 和 Babgy G. (1992)）c-myc 反意义寡核苷酸来抑制
Colo320 结肠细胞的克隆成形能力。Journal of Clinical Investigation 89:1523-1527;
Ebbinghouse, S., Gee, J., Rodu, B., Mayfield, C. 和 Miller, D. (1993) Triplex formation inhibits
HER2/neu transcription in vitro. Journal of Clinical Investigation 92:2433-2439.

15

实例

通过以下其优选具体实施例的实例，本发明可进一步得到阐述，尽管应当理解所述实例仅为说明的目的而引用且除非另有明确说明，所述实例不限制本发明的范围。

20 实例 1: BLSA 的识别

通过利用免疫球蛋白（Ig）区域的隐马尔可夫模型（Hidden Markov Model）
（HMM）来搜索人类 EST 数据从而识别 BLSA。HMM 首先由自 113 个确定 Ig 区域排
列而建立且利用程序 HMMER 进行校准（S. R. Eddy. Profile hidden Markov models.
Bioinformatics 14:755-763, 1998）。从 Pfam（第 6.6 版，<http://pfam.wustl.edu/>）
25 数据库获得 HMM 且用于搜索人类 ESR 数据。为减少 Ig HMM 搜索时间，我们自 290
万公共 EST 序列产生了共计 189,623 个 EST contigs/一致序列，其利用相关数据库
系统进行储存和组织。

利用允许程序自动操作的特有软件系统执行本操作。简单的说，产生了含有
全部人类 EST contigs 快速格式化文件，然后为与 Ig HMM 匹配而通过程序
30 estwisedb（<http://www.sanger.ac.uk/Software/Wise2>）进行搜索。对所得结果
进行处理和计算，且选择所估算的 E 值原始分数界限以使假阴性和假阳性速率都
最小化。选择 555 EST contigs 进行进一步分析。全部 555 EST contigs 与采集
自所有种类的非多余蛋白质数据库进行碰撞。自所得采样数筛选所感兴趣的选择
物，其基于序列新颖性和对 Ig 区域的序列相似性。为了每一个含有选择物的 Ig
35 区域，实施一系列 in silico 表征，其包括基因组中位置和与相邻序列关系的分
析，单基因（UniGene）簇注解，编码区域的识别和验证，来自于区域是或包括 EST

的多重来源和在不同组织及细胞系中所表达的多重来源的证据。共挑选 10 个选择物以进行进一步试验表征。

实例 2 BLSA 的分子克隆和表征

5 利用 Daudi 细胞系 cDNA 作为模板通过 PCR 将预定的 BLSA 译码区克隆至位于含有 3' V5 和 His tag 序列的框架中的 pCR3.1-Topo 载体 (Invitrogen)。然后使用供表达的 Lipofectamine 2000 使 cDNA 瞬时转染至 293T 细胞。通过使 3×10^5 细胞于 $100 \mu\text{l}$ 的 ddH₂O 中再悬浮, 且在加入等体积 2 X 样品负载缓冲剂之后于 98 °C 加热 5 分钟来制备完整细胞蛋白质样品。在 15% 的 SDS-PAGE 中分离蛋白质并转移至膜。经加标记的 BLSA 蛋白质由使用抗 V5 mAb 的免疫印记法 (Western blot) 10 检测为 ~50kD 蛋白质带。此蛋白质带不存在于仅用质粒载体转染的细胞中。

实例 3 BLSA mRNA 表达的定量实时 PCR 分析

两组寡核苷酸引物:

15 (5' -GTGAACCCCTTCCACCTGATTGT (SEQ ID NO 21) 和 5' -GACCTTGGAGGATCAGCCAGT (SEQ ID NO 22; 5' -CGGGCCTAACAGGGAATTCT (SEQ ID NO 23) 和 5' -CCCCTGTCTGCCTTTTGTA (SEQ ID NO 24))

利用 Primer Express 2.0 (Applied Biosys 公司) 从 BLSA 核苷酸序列来挑选以上两组引物且经合成并用于实时 PCR 反应以测量 BLSA 的表达。分离 RNA 以便 20 于测量 BLSA 在以下细胞中的表达水平: Daudi, Burkitt 氏淋巴瘤细胞系; Ramos, B 淋巴细胞 Burkitt 氏淋巴瘤; Raji, B 淋巴细胞 Burkitt 氏淋巴瘤细胞系; SKO-007, 骨髓瘤细胞系; HL-60 的 Clone 15, 急性前髓细胞白血病细胞系; JM1, 前 B 淋巴瘤细胞淋巴瘤细胞系; REH, 祖 B 急性淋巴细胞白血病细胞系; THP-1, 急性单核细胞白血病; HMC-1, 未成熟人类肥大细胞系; HUVEC, 原代人类血管内皮细胞; 25 原代 B 细胞; CD34+原代粒细胞; 原代嗜碱细胞; 嗜中性白细胞; 单核细胞; 和 HPB-ALL, T 细胞白血病细胞系。

根据生产商说明书用 ABI Prism 7900 (Applied Biosystems 公司) 序列检测系统执行实时定量 PCR (Taqman)。来自以上所指示细胞的等量单个 RNA 在反应中用作 PCR 模板以得到界限周期 (Ct), 且利用来自 18S RNA 的已知 Ct 使得此 Ct 规格 30 化以得到 ΔCt 。为了比较在不同细胞系中 BLSA 的基因表达相对水平, 通过利用最低表达水平作为基础来计算 $\Delta \Delta Ct$ 值, 然后将其转换为真实倍数表达差异值。

结果发现: BLSA mRNA 高度表达于 B 细胞淋巴瘤细胞系 Daudi、Ramos 和 Raji, 及前 B 淋巴瘤细胞中, 指定为 JM1。在祖 B 细胞 REH 和在原代 B 细胞中发现极低的表达水平。在 HPB-ALL、THP-1、周围淋巴细胞、单核细胞、人类内皮细胞、CD34+ 35 祖代粒细胞、肥大细胞、嗜碱细胞和嗜中性白细胞中的表达水平可以忽略 (参看表 1 和 2)。

表 1 BLSA 在细胞系组 I 中的相对表达（真实倍数差异）

细胞	相对表达(任意的单位)
Daudi 细胞	75480.5
单核细胞	380.0
HMC-1	13.4
B-cell	1573.7
嗜碱细胞	184.6
肥大细胞(第 1 周)	34.8
肥大细胞(第 5 周)	206.8
肥大细胞(第 9 周)	788.0
肥大细胞(第 9 周, IgE)	634.1
HPB-ALL	17.9
淋巴细胞	135.6
嗜中性白细胞	118.4
HUVEC	1.0

表 2 BLSA 在细胞系组 II 中的相对表达（真实倍数差异）

细胞	相对表达(任意的单位)
Daudi 细胞	95840.7
Ramos (RA 1)	24042.3
Raji	79674.2
SKO-007	16.5
Clone 15 HL-60	1.0
JM1	122395.4
Reh	392.8
肥大细胞(第 1 周)	29.1
肥大细胞(第 5 周)	173.0
肥大细胞(第 9 周)	47.2
肥大细胞(第 9 周, IgE)	71.2
PRIMARY B (50%)	160.8

HMC-1	18.8
THP-1	4.3
HUVEC	1.6

实例 4 抗 BLSA 单克隆抗体的产生

利用基因枪 (Gene Gun) 以 BLSA 编码质粒来使小鼠免疫, 从而产生抗 BLSA 单克隆抗体。个体抗 BLSA 单克隆抗体的特点在于利用重组 BLSA 蛋白质的 ELISA 和 Western 印记。

实例 5 BLSA 蛋白质在 B 细胞淋巴瘤细胞系中的表达

为了确定 BLSA 是否表达于 B 细胞淋巴瘤细胞系, 我们执行免疫荧光实验。简单地说, 25,000 个细胞在玻璃载片上细胞离心并进行风干。在室温下用 Carnoy's Fix (60%乙醇、30%氯仿和 10%乙酸) 来固定细胞, 且用 PBS 洗涤三次。于冰存在下用封锁溶液 (1%马血清、1%TRITON X-100、2%小兔血清、1%BSA 和在 PBS 中的 1%山羊血清) 预封细胞 30 分钟且在室温下用抗 BLSA mAb (1 μ g/ml 在 PBS 中的 1%的 BSA) 孵化 30 分钟。然后洗涤细胞三次并在室温下用以 1:100 稀释的山羊抗小鼠 IgG (H+L)-FITC (Jackson Immuno Lab) 孵化 30 分钟。洗涤细胞、风干且用载片盖覆盖。利用荧光显微镜检测荧光着色并用 Snap-Shot 软件记录结果。结果发现: 在 B 细胞淋巴瘤 Daudi、人类前 B 淋巴母细胞 CRL10423 和 1569 中检测到了 BLSA, 但是在 T 细胞系 Jurkat 或肥大细胞系 HMC-1 中未检测到 (表 3)。

表 3 免疫荧光法着色

20

细胞系名称	细胞系描述	抗 BLSA 着色结果
HMC-1	未成熟人类肥大细胞系	-
Jurkat	人类 T 白血病细胞系	-
CRL10423	人类前 B 淋巴母细胞	+
CRL1596	人类 Burkitt 淋巴瘤 (EBV 阴性) 衍生细胞系	+
Daudi	人类淋巴瘤所衍生 B 细胞系	+

- <110> Tanox, Inc.
 Wang, Shen-Wu
 Hu, Guanghui
 Li, Yucheng
 Yao, Zhengbin
- <120> 用于诊断和治疗 B 细胞恶性肿瘤的 B 细胞淋巴瘤特异抗原
- <130> TNX01-10
- <150> US 60/337,542
- <151> 2001-11-02
- <160> 24
- <170> PatentIn version 3.0
- <210> 1
- <211> 2181
- <212> DNA
- <213> 智人 (Homo sapiens)
- <400> 1

```

ggcacgaggg atgcaaggag atgagacagt tagatttact tcctcttttc taatctgaga      60
ggtttcatgt tgaagaaaat cagtgttggg gttgcaggag acctaaacac agtcaccatg      120
aagctgggct gtgtcctcat ggcctgggcc ctctaccttt cccttggtgt gctctgggtg      180
gcccagatgc tactggctgc cagttttgag acgctgcagt gtgagggacc tgtctgcact      240
gaggagagca gctgccacac ggaggatgac ttgactgatg caaggaagc tggcttccag      300
gtcaaggcct acactttcag tgaacccttc cacctgattg tgcctatga ctggctgatc      360
ctccaaggtc cagccaagcc agtttttgaa ggggacctgc tggttctgcg ctgccaggcc      420
tggcaagact ggccactgac tcaggtgacc ttctaccgag atggctcagc tctgggtccc      480
cccgggccta acaggaatt ctccatcacc .gtggtacaaa aggcagacag cgggcactac      540
cactgcagtg gcatcttcca gagccctggt cctgggatcc cagaaacagc atctgttgtg      600

```

gctatcacag tccaagaact gttccagcg ccaattctca gagctgtacc ctcagctgea	660
ccccaagcag gaagcccat gaccctgagt tgtcagacaa agttgccct gcagaggca	720
gctgccgcc tcctcttctc cttctacaag gatggaagga tagtgcaaag cagggggctc	780
tcctcagaat tccagatccc cacagcttca gaagatcact ccgggtcata ctggtgtgag	840
gcagccactg aggacaacca agtttgaaa cagagcccc agctagagat cagagtgcag	900
ggtgcttcca gctctgctgc acctcccaca ttgaatccag ctctcagaa atcagctgct	960
ccaggaactg ctctgagga ggcccctggg cctctgcctc cgccccaac cccatcttct	1020
gaggatccag gcttttcttc tcctctgggg atgccagatc ctcatctgta tcaccagatg	1080
ggccttcttc tcaaacacat gcaggatgtg agagtcctcc tcggtcacct gctcatggag	1140
ttgagggaaat tatctggcca ccagaagcct gggaccacaa aggctactgc tgaatagaag	1200
taaacagttc atccatgatc tcacttaacc accccaataa atctgattct ttattttctc	1260
ttcctgtcct gcacatatgc ataagtactt ttacaagttg tcccagtggt ttgttagaat	1320
aatgtagtta ggtgagtgtg aataaattta tataaagtga gaattagagt ttagctataa	1380
ttgtgtattc tctcttaaca caacagaatt ctgctgtcta gatcaggaat ttctatctgt	1440
tatatcgacc agaatgttgt gatttaaaga gaactaatgg aagtggattg aatacagcag	1500
tctcaactgg gggcaatfff gccccccaga ggacattggg caatgtttg agacattttg	1560
gtcattatac ttgggggggtt gggggatggt gggatgtgtg tgctactggc atccagtaaa	1620
tagaagccag gggtgccgct aacatccta taatgcacag ggcagtacc cacaacgaaa	1680
aataatctgg cccaaaatgt cagttgtact gagtttgaga aaccccagcc taatgaaacc	1740
ctaggtgttg ggctctggaa tgggactttg tcccttctaa ttattatctc tttccagcct	1800
cattcagcta ttcttactga cataccagtc tttagctggt gctatggtct gttctttagt	1860
tctagtttgt atcccctcaa aagccattat gttgaaatcc taatcccaa ggtgatggca	1920
ttaagaagtg ggcctttggg aagtgattag atcaggagtg cagagccctc atgattagga	1980
ttagtgccct tatttaaaaa gggcccagag agctaactca cccttcacc atatgaggac	2040
gtggcaagaa gatgacatgt atgagaacca aaaaacagct gtcgccaac accgactctg	2100
tcgttgccct gatcttgaac ttccagcctc cagaactatg agaaataaaa ttctgttggt	2160
tgtaaaaaaa aaaaaaaaaa a	2181

<210> 2

<211> 359

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Lys Leu Gly Cys Val Leu Met Ala Trp Ala Leu Tyr Leu Cer Leu

1	5	10	15
Gly Val Leu Trp 20	Val Ala Gln Met	Leu Leu Ala Ala	Ser Phe Glu Thr 30
Leu Gln Cys Glu 35	Gly Pro Val Cys 40	Thr Glu Glu Ser	Ser Ser Cys His Thr 45
Glu Asp Asp Leu Thr 50	Asp Ala Arg Glu	Ala Gly Phe Gln	Val Lys Ala 60
Tyr Thr Phe Ser 65	Glu Pro Phe His 70	Leu Ile Val Ser	Tyr Asp Trp Leu 80
Ile Leu Gln Gly 85	Pro Ala Lys Pro	Val Phe Glu Gly	Asp Leu Leu Val 95
Leu Arg Cys Gln 100	Ala Trp Gln Asp	Trp Pro Leu Thr	Gln Val Thr Phe 110
Tyr Arg Asp Gly 115	Ser Ala Leu Gly 120	Pro Pro Gly Pro	Asn Arg Glu Phe 125
Ser Ile Thr Val 130	Val Gln Lys Ala	Asp Ser Gly His	Tyr His Cys Ser 140
Gly Ile Phe Gln 145	Ser Pro Gly Pro 150	Gly Ile Pro Glu	Thr Ala Ser Val 160
Val Ala Ile Thr 165	Val Gln Glu Leu	Phe Pro Ala Pro	Ile Leu Arg Ala 175
Val Pro Ser Ala 180	Glu Pro Gln Ala	Gly Ser Pro Met	Thr Leu Ser Cys 190
Gln Thr Lys Leu 195	Pro Leu Gln Arg	Ser Ala Ala Arg	Leu Leu Phe Ser 205
Phe Tyr Lys Asp 210	Gly Arg Ile Val 215	Gln Ser Arg Gly	Leu Ser Ser Glu 220
Phe Gln Ile Pro 225	Thr Ala Ser Glu	Asp His Ser Gly	Ser Tyr Trp Cys 235 240
Glu Ala Ala Thr 245	Glu Asp Asn Gln	Val Trp Lys Gln	Ser Pro Gln Leu 255
Glu Ile Arg Val 260	Gln Gly Ala Ser	Ser Ser Ser Ala	Ala Pro Pro Thr 270
Asn Pro Ala Pro 275	Gln Lys Ser Ala	Ala Pro Gly Thr	Ala Pro Glu Glu 285
Ala Pro Gly Pro 290	Leu Pro Pro Pro	Pro Thr Pro Ser	Ser Ser Glu Asp 300
Gly Phe Ser Ser 305	Pro Leu Gly Met	Pro Asp Pro His	Leu Tyr His Gln 315 320
Met Gly Leu Leu 325	Leu Lys His Met	Gln Asp Val Arg	Val Leu Leu Gly 335
His Leu Leu Met 340	Glu Leu Arg Glu	Leu Ser Gly His	Gln Lys Pro Gly 350
Thr Thr Lys Ala 355	Thr Ala Glu		

<210> 3

<211> 21

<212> DNA	
<213>人工的	
<220>	
<223> BLSA 的引物序列	
<400> 3	
cagagccccc agctagagat c	21
<210> 4	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> BLSA 的引物序列	
<400> 4	
gtgcagcaga gctggaagc	19
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> BLSA 的引物序列	
<400> 5	
gcagtggcat cttccagagc	20
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> BLSA 的引物序列	
<400> 6	
cagatgctgt ttctgggatc c	21
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	

<220>		
<223>	BLSA 的引物序列	
<400>	7	
	gatcagagtg cagggtgctt c	21
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	BLSA 的引物序列	
<400>	8	
	ggattcaatg tgggaggtgc	20
<210>	9	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	BLSA 的引物序列	
<400>	9	
	gtgagggacc tgtctgcact g	21
<210>	10	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	BLSA 的引物序列	
<400>	10	
	agtcacctc cgtgtggca	19
<210>	11	
<211>	21	
<212>	dna	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	BLSA 的引物序列	

<400> 11	
gaattccaga tccccacagc t	21
<210> 12	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> BLSA 的引物序列	
<400> 12	
acaccagtat gaccggagt g	21
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223>BLSA 的引物序列	
<400> 13	
cgggcctaac agggaattct	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> BLSA 的引物序列	
<400> 14	
cccgtgtct gcctttgta	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> BLSA 的引物序列	
<400> 15	
cctcccacat tgaatccagc	20

<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	BLSA 的引物序列	
<400>	16	
	gagcagttcc tggagcagct	20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	BLSA 的引物序列	
<400>	17	
	tgtgagggac ctgtctgcac	20
<210>	18	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	BLSA 的引物序列	
<400>	18	
	agtcacctc cgtgtggca	19
<210>	19	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	BLSA 的引物序列	
<400>	19	
	ggctgatcct ccaaggtcc	19
<210>	20	
<211>	19	

<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	BLSA 的引物序列	
<400>	20	
	accagcaggt ccccttcaa	19
<210>	21	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	BLSA 的引物序列	
<400>	21	
	gtgaaccctt ccacctgatt gt	22
<210>	22	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	BLSA 的引物序列	
<400>	22	
	gaccttggag gatcagccag t	21
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	BLSA 的引物序列	
<400>	23	
	cgggcctaac agggaattct	20
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	

<220>

<223> BLSA 的引物序列

<400> 24

cccgctgtct gcctttgta

20

专利名称(译)	用于诊断和治疗B细胞恶性肿瘤的B细胞淋巴瘤特异性抗原		
公开(公告)号	CN1630529A	公开(公告)日	2005-06-22
申请号	CN02821951.1	申请日	2002-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	唐城		
当前申请(专利权)人(译)	Tanox公司INC.		
[标]发明人	SW王 G胡 Y李 Z姚		
发明人	S·W·王 G·胡 Y·李 Z·姚		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/82 C07K16/18 C07K16/30 C07K16/32 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/574 A61K38/16 C07H21/04 C12N5/16 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/57407 A61K39/0011 C07K16/3061 C12Q1/6851 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57492		
代理人(译)	程伟		
优先权	60/337542 2001-11-02 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供疫苗、抗体及诊断工具以用于诊断和/或治疗B细胞介导的疾病，尤其是B细胞淋巴瘤。

细胞	相对表达(任意的单位)
Daudi 细胞	75480.5
单核细胞	380.0
HMC-1	13.4
B-cell	1573.7
嗜碱细胞	184.6
肥大细胞(第1周)	34.8
肥大细胞(第5周)	206.8
肥大细胞(第9周)	788.0
肥大细胞(第9周, IgE)	634.1
HPB-ALL	17.9
淋巴细胞	135.6
嗜中性白细胞	118.4
HUVEC	1.0