

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480025763.6

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006年10月18日

[11] 公开号 CN 1849137A

[51] Int. Cl. (续)

C07K 16/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2004.7.8

[21] 申请号 200480025763.6

[30] 优先权

[32] 2003.7.8 [33] US [31] 10/615,343

[86] 国际申请 PCT/US2004/021812 2004.7.8

[87] 国际公布 WO2005/007198 英 2005.1.27

[85] 进入国家阶段日期 2006.3.8

[71] 申请人 阿托金有限公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 常小迦

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 过晓东

权利要求书 13 页 说明书 78 页 序列表 19 页
附图 6 页

[54] 发明名称

基于 VEGF, HER-2, PSA 蛋白质异构体的用于诊断和治疗的疾病的特效试剂

[57] 摘要

本发明提供制备和筛选抗体的方法。可以包括将许多抗原和编码抗原的核酸注射入宿主的方法。也可以包括对载体蛋白质使用抗原的融合蛋白质在制备和/或筛选抗体制剂的方法。可以是用于同时制备和/或筛选大量的不同的抗体的方法。本发明还提供用于治疗、防止或诊断与蛋白质的异构体相关的疾病或发展为疾病的可能的治疗和诊断的方法。

1. 一种治疗性的组合物，其包括表位抑制子和药物可接受的载体，该表位包含一个经测定是一种疾病相关的表位的外显子结合点。
2. 根据权利要求 1 中的治疗性的组合物，其中抑制子是特定绑定表位的抗体，该表位在 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 11, 13 或 15-25 之一列出。
3. 根据权利要求 2 中的治疗性的组合物，其中抗体是单克隆抗体。
4. 一种治疗性的组合物，其包括核酸和药物可接受的载体，该核酸包括编码与疾病相关的外显子结合点表位。
5. 根据权利要求 4 中的治疗性的组合物，其中核酸序列编码与疾病相关的外显子结合点表位，该表位包含在 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 11, 13 或 15-25 之一中。
6. 一种表达载体，其包括编码与疾病相关的表位的核酸序列，该表位包含在 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 11, 13 或 15-25 之一中。
7. 根据权利要求 6 中的表达载体，所述表达载体进一步包含编码载体蛋白的核酸序列。
8. 一种治疗性的组合物，其包括多肽和药物可接受的载体，所述多肽包括编码与疾病相关的外显子结合点表位多肽。

9. 根据权利要求 8 中的治疗性的组合物，其中的多肽包含编码与疾病相关的表位，该表位包含在 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 11, 13 或 15-25 之一中。
10. 一种 siRNA 绑定编码表位的核酸序列，该表位是从 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 11, 13 或 15-25 组中选择的氨基酸序列。
11. 一种核酸序列，其编码权利要求 10 中的 siRNA。
12. 一种载体，其包含权利要求 11 中的核酸。
13. 一种细胞，其包含权利要求 11 中的 siRNA。
14. 一种治疗性的组合物，其包含权利要求 10 中的 siRNA 或编码这种 siRNA 的核酸和药物可接受载体。
15. 一种治疗性的试剂盒，其包括表位抑制子和第二种药剂或用于治疗性方式的必须装置，该表位被测定是与疾病相关的表位的外显子结合点。
16. 根据权利要求 15 的试剂盒，所述试剂盒进一步包含使用说明书或注射抑制子的设备。
17. 一种诊断试剂盒，其包含表位抑制子和第二种药剂或用于治疗性方式的必须装置，该表位被测定是与疾病相关的表位的外显子结合点。

- 18.** 一种测定主体是否有可能在主体中形成与的疾病相关的异构体 VEGF 的方法，包括：
- (i) 来源于主体的样本与特定绑定表位的抗体相互作用，该表位在 SEQ ID NO:2 或 4 列出；
 - (ii) 测定与样本绑定的抗体，若抗体绑定样本表明主体有与疾病相关的异构体 VEGF。
- 19.** 一种测定主体是否有或可能产生与疾病相关的异构体 HER-2 的方法，包括：
- (i) 来源于主体的样本与特定绑定表位的抗体相互作用，该表位在 SEQ ID NO:6 或 8 列出；
 - (ii) 测定与样本绑定的抗体，若抗体绑定样本表明主体有与疾病相关的异构体 HER-2。
- 20.** 一种测定主体是否有或可能产生与疾病相关的异构体 PSA 的方法，包括：
- (i) 来源于主体的样本与特定绑定表位的抗体相互作用，该表位在 SEQ ID NO:10、11 或 13 列出；
 - (ii) 测定与样本绑定的抗体，若抗体绑定样本表明主体有与疾病相关的异构体 PSA。
- 21.** 一种测定主体是否有或可能产生与疾病相关的蛋白质异构体的方法，包括：
- (i) 来源于主体的样本与，根据声明 29 的方法鉴定的，特定绑定与疾病相关的表位的蛋白质异构体的抗体相互作用；

- (ii) 测定与样本绑定的抗体, 若抗体绑定样本表明主体有与疾病相关的蛋白质异构体。
22. 已经被鉴定与疾病相关的外显子结合点表位的抑制子在制备治疗该疾病的药物中的应用。
23. 根据权利要求 22 的应用, 制备癌症药物。
24. 根据权利要求 23 的应用, 进一步包含给患者注射另一种化学治疗的药剂。
25. 特定绑定在 SEQ ID NO:2 或 4, SEQ ID NO:6 或 8, SEQ ID NO:10、11 或 13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:20-21, SEQ ID NO:22-24, 或 SEQ ID NO:25 所列表位的抗体在制备治疗 VEGF, HER-2, PSA, PDGFR β ; PSMA; CD 86; 泌乳刺激素或胰岛素受体的异构体相关的疾病的药物中的应用。
26. 与根据权利要求 29 的方法鉴定的疾病相关的蛋白质异构体的外显子结合点表位特定结合的抗体在制备用于治疗蛋白质异构体相关的疾病的药物中的应用。
27. 一种从众多抗体中, 鉴定目标蛋白的抗体的方法, 包括:
- i. 提供互不相同的众多抗体, 其中至少有一种抗体特定绑定的融合蛋白至少包含连接载体蛋白的目标蛋白的一部分;
 - ii. 众多抗体与固相表面相连, 用以得到覆盖抗体的固相表面, 即不同抗体位于不同的固相表面;
 - iii. 覆盖抗体的固相表面与融合蛋白连接;

iv. 分析测定载体蛋白的存在性研究,若存在载体蛋白表明有目标蛋白的抗体存在。

28. 根据权利要求 27 的方法,目标蛋白包括蛋白质异构体或足以引发抗体对它的反应的其中一部分。
29. 根据权利要求 28 的方法,蛋白质异构体是与疾病相关的蛋白质异构体。
30. 根据权利要求 27 的方法,融合蛋白由哺乳动物的表达系统产生。
31. 根据权利要求 29 的方法,目标蛋白包括滤过性毒菌引起的蛋白。
32. 根据权利要求 29 的方法,载体蛋白包括分泌的碱性磷酸酶或足以保证酶活性的其中一部分。
33. 根据权利要求 29 的方法,载体蛋白包括辣根过氧化物酶或足以保证酶活性的其中一部分。
34. 根据权利要求 29 的方法,载体蛋白包括 β -半乳糖苷酶或足以保证酶活性的其中一部分。
35. 根据权利要求 29 的方法,载体蛋白包括荧光素酶或足以保证酶活性的其中一部分。
36. 根据权利要求 29 的方法,载体蛋白包括 IgG-Fc (γ 链)。
37. 根据权利要求 29 的方法,抗体连接的固相表面包含蛋白质 A 琼脂糖。

38. 根据权利要求 29 的方法, 抗体连接的固相表面包含蛋白质 G 琼脂糖。
39. 根据权利要求 29 的方法, 用于测定载体蛋白存在的分析属化学发光分析。
40. 根据权利要求 29 的方法, 用于测定载体蛋白存在的分析属荧光分析。
41. 根据权利要求 29 的方法, 用于测定载体蛋白存在的分析属比色分析。
42. 根据权利要求 29 的方法, 在 (iii) 和 (iv) 之间进一步包括洗脱步骤, 用于移去未绑定的融合蛋白。
43. 一种从众多抗体中鉴定绑定蛋白异构体的抗体的方法, 包括:
- i. 提供互不相同的众多抗体, 其中至少有一种抗体特定绑定的融合蛋白至少包含连接载体蛋白的蛋白异构体的一部分;
 - ii. 众多抗体与固相表面相连, 用以得到覆盖抗体的固相表面, 即不同抗体位于不同的固相表面;
 - iii. 覆盖抗体的固相表面与融合蛋白连接;
 - iv. 分析测定载体蛋白的存在性研究, 若存在载体蛋白表明有绑定蛋白异构体的抗体存在。
44. 一种产生众多绑定目标蛋白的单克隆抗体的方法, 包括:
- i. 给宿主注射众多融合蛋白或编码融合蛋白的核酸, 每一融合蛋白至少包含目标蛋白和载体蛋白的一部分;

- ii. 从宿主细胞中获得产生众多单克隆抗体的细胞;
 - iii. 根据声明 1 的方法筛选细胞, 获得绑定目标蛋白的众多单克隆抗体。
45. 根据权利要求 44 的方法, 目标蛋白包括蛋白质异构体或足以引起抗体对其产生反应的其中一部分蛋白质异构体。
46. 根据权利要求 45 的方法, 蛋白质异构体是与疾病相关的。
47. 根据权利要求 44 的方法, 目标蛋白包括滤过性毒菌引起的蛋白或足以引起抗体对其产生反应的其中一部分。
48. 根据权利要求 44 的方法, 载体蛋白包括分泌的碱性磷酸酶或足以保证酶活性的其中一部分。
49. 根据权利要求 44 的方法, 载体蛋白包括辣根过氧化物酶或足以保证酶活性的其中一部分。
50. 根据权利要求 44 的方法, 载体蛋白包括 β -半乳糖苷酶或足以保证酶活性的其中一部分。
51. 根据权利要求 44 的方法, 载体蛋白包括荧光素酶或足以保证酶活性的其中一部分。
52. 根据权利要求 44 的方法, 载体蛋白包括 IgG Fc (γ 链)。
53. 根据权利要求 44 的方法, 宿主是老鼠, 鸡, 兔子, 山羊, 绵羊, 马, 骆驼, 猴子和人。
54. 根据权利要求 44 的方法, 众多指至少 3 种。

55. 根据权利要求 44 的方法，众多指至少 10 种。
56. 根据权利要求 44 的方法，众多指至少 100 种。
57. 根据权利要求 44 的方法，众多指至少 1000 种。
58. 根据权利要求 44 的方法，核酸是一表达载体。
59. 一种产生众多绑的单克隆抗体的方法，其中至少一种单克隆抗体绑定与疾病相关的蛋白异构体，包括：
- i. 给宿主注射众多融合蛋白或编码融合蛋白的核酸，每一融合蛋白至少包含与疾病相关的蛋白异构体和载体蛋白的一部分；
 - ii. 从宿主脾细胞中获得产生众多单克隆抗体的细胞；
 - iii. 根据声明 1 的方法筛选细胞，获得绑定与疾病相关的蛋白异构体的一种单克隆抗体。
60. 根据权利要求 59 的方法，至少有一种融合蛋白包括血管的内皮生长因子（VEGF）异构体 165 多肽 DRARQENPCGPC SE(SEQ ID NO:2)或 VEGF121 多肽 DRARQEDCDKPRR(SEQ ID NO:4)。
61. 根据权利要求 59 的方法，至少有一种融合蛋白包括 HER-2 结合异构体 1 多肽 INCTHSPLTS(SEQ ID NO:6)或 HER-2 结合异构体 2 多肽 CTHSCVASPLT(SEQ ID NO:8)。
62. 根据权利要求 59 的方法，至少有一种融合蛋白包括 SEQ ID NOs: 16, 16 或 17-19 之一。

63. 根据权利要求 59 的方法，至少有一种融合蛋白包括 SEQ I D NOs: 20-25 之一。
64. 根据权利要求 59 的方法，载体蛋白包括分泌的碱性磷酸酶或足以保证酶活性的其中一部分。
65. 根据权利要求 59 的方法，载体蛋白包括辣根过氧化物酶或足以保证酶活性的其中一部分。
66. 根据权利要求 59 的方法，载体蛋白包括 β -半乳糖苷酶或足以保证酶活性的其中一部分。
67. 根据权利要求 59 的方法，载体蛋白包括荧光素酶或足以保证酶活性的其中一部分。
68. 根据权利要求 59 的方法，载体蛋白包括 IgG Fc (γ 链)。
69. 根据权利要求 59 的方法，宿主是老鼠，鸡，兔子，山羊，绵羊，马，骆驼，猴子和人。
70. 根据权利要求 59 的方法，众多指至少 3 种。
71. 根据权利要求 59 的方法，众多指至少 10 种。
72. 根据权利要求 59 的方法，众多指至少 100 种。
73. 根据权利要求 59 的方法，众多指至少 1000 种。
74. 根据权利要求 59 的方法，核酸是一表达载体。

75. 一种从众多抗体中，分离特异绑定与编码抗体的核酸相关的目标蛋白的抗体的方法，包括
- i. 至少部分目标蛋白连接到固相表面的突起，获得覆盖蛋白的突起；
 - ii. 在形成抗原/抗体复合物的适当条件下，覆盖蛋白的突起与编码抗体的核酸相关的众多抗体相连；
 - iii. 分离与突起相连的抗体，于是分离了针对目标蛋白的抗体。
76. 根据权利要求 75 的方法，与编码抗体的核酸相关的抗体是抗菌素。
77. 根据权利要求 75 的方法，进一步包括从突起中分离抗体的方法。
78. 根据权利要求 75 的方法，进一步包括在步骤 (ii) 和 (iii) 之间的洗脱步骤。
79. 根据权利要求 75 的方法，众多的蛋白质与众多的突起相连，不同的蛋白质与不同的突起相连。
80. 根据权利要求 75 的方法，固相表面至少包含 10 突起。
81. 根据权利要求 75 的方法，固相表面至少包含 100 突起。
82. 根据权利要求 75 的方法，固相表面至少包含 1000 突起。
83. 根据权利要求 75 的方法，至少部分目标蛋白与钥孔嘁血蓝素 (KLH) 相关。

84. 根据权利要求 75 的方法，至少部分目标蛋白与分泌的碱性磷酸酶（SEAP）相关。
85. 根据权利要求 75 的方法，至少部分目标蛋白与 IgG Fc（ γ 链）相关。
86. 根据权利要求 75 的方法，至少部分目标蛋白与谷胱甘肽 S 转移酶（GST）相关。
87. 根据权利要求 75 的方法，至少部分目标蛋白与多聚组氨酸标签相关。
88. 根据权利要求 75 的方法，固相表面包括生物素或链霉亲和素。
89. 根据权利要求 75 的方法，固相表面包括镍。
90. 根据权利要求 75 的方法，固相表面包括谷胱甘肽。
91. 一种在样品中测定抗原存在的方法，包括：
- (i) 在形成特异抗原/抗体复合物的条件下，样品与在其表面特定位置上包含多种抗体的固相表面相连；
 - (ii) 在形成特异抗原/抗体复合物的条件下，进一步固相表面与众多融合蛋白相连，每一融合蛋白包括特异绑定位于固相表面上的抗体的多肽和载体蛋白；
 - (iii) 在固相表面每一特定位置测定载体蛋白的存在性，若在特定位置无载体蛋白表明在特定位置有抗原特异绑定抗体，也就是在样本中存在抗原。
92. 根据权利要求 91 的方法，固相表面至少包括 100 种抗体。

93. 根据权利要求 91 的方法，固相表面至少包括 1000 种抗体。
94. 根据权利要求 91 的方法，固相表面是一抗体组，每一抗体位于抗体组的特定位置。
95. 根据权利要求 91 的方法，载体蛋白是酶或足以保证酶活性的其中一部分并且此方法进一步包括与固相表面连接的酶的底物。
96. 一种鉴定目标蛋白表位的方法，包括：
- i. 提供编码众多融合蛋白的众多核酸，每一融合蛋白包括目标蛋白的 6-15 个氨基酸多肽和载体蛋白，这些多肽包括不同的目标蛋白序列；
 - ii. 给宿主动物注射众多的核酸；
 - iii. 从宿主获得血清；
 - iv. 根据声明 1 的方法测定在血清中存在的绑定目标蛋白多肽的抗体数量。
97. 根据权利要求 96 的方法，多肽包括目标蛋白的交错序列。
98. 根据权利要求 96 的方法，蛋白质是细胞的表面受体并且融合蛋白包括位于受体胞外领域的氨基酸序列。
99. 根据权利要求 96 的方法，目标蛋白包括与疾病相关的蛋白质异构体。
100. 根据权利要求 96 的方法，多肽有 8-12 个氨基酸组成。

101.一种鉴定目标蛋白表位的方法，包括：

- i. 提供编码众多融合蛋白的众多核酸，每一融合蛋白包括目标蛋白的 6-15 个氨基酸多肽和载体蛋白，这些多肽包括不同的目标蛋白序列；
- ii. 给宿主动物注射众多的核酸；
- iii. 从宿主细胞制备大量产生单克隆抗体的细胞；
- iv. 根据声明 1 的方法扫描细胞，鉴定绑定目标蛋白的抗体，若存在绑定多肽的抗体，表明此多肽对应于目标蛋白的表位。

102.根据权利要求 96 的方法，目标蛋白包括与疾病相关的蛋白质异构体。

103.根据权利要求 96 的方法，多肽有 8-12 个氨基酸组成。

104.一种制备治疗疾病的 DNA 疫苗的方法，包括：

- i. 根据声明 96 的方法鉴定一种或更多与疾病相关的蛋白质表位；
- ii. 转染编码一种或更多表位的核酸序列进入表达载体，以此来制备治疗疾病的 DNA 疫苗。

105.一种制备治疗疾病的 DNA 疫苗的方法，包括：

- i. 根据声明 96 的方法鉴定一种或更多与疾病相关的蛋白质表位；
- 制备包括一种或更多表位的氨基酸序列的多肽，以此来制备治疗疾病的 DNA 疫苗。

基于 VEGF, HER-2, PSA 蛋白质异构体的用于诊断和治疗的疾病的特效试剂

背景

自身的抗体是由称之为浆细胞的特殊淋巴细胞最初生成的。宿主动物体内产生的强烈的抗体反应,是通过介导和调整 B 细胞分化为浆细胞的过程来进行控制的。这种分化包括由原初 B 细胞(含有修饰的抗体作为细胞表面抗原受体,并不分泌抗体)转变为活跃 B 细胞(含有细胞表面抗体并且也分泌抗体),然后转变为浆细胞(高度特异的抗体生产者,并不含表面抗原受体)。这种分化过程受抗原存在情况以及 B 细胞和 T 辅助细胞间通讯情况的影响。

由于抗体具有特异地结合抗原的能力,其已经被广泛地用于研究、诊断和治疗应用中。单克隆抗体的发展扩大了抗体潜在运用价值。与多克隆抗血清不同(其包含针对不同表位的抗体混合物),单克隆抗体直接针对抗原上的单一的决定因子或表位,并且具有均一性。此外,单克隆抗体可以无限量地被生产。

抗体试剂在蛋白质体研究和药物应用中的使用已被极大地扩展和多样化。这些运用包括抗体治疗,免疫测定,亲和纯化,蛋白质表达,功能分析,组织和生物体成像。抗体微阵列技术目前正处于其初期,但在诊断和其他广泛的临床应用上具有极大的发展潜力。然而,在人类全基因组编码的总数大于 100000 种蛋

白质中，目前只有少部分拥有其抗体配对物。这主要归因于目前抗体的生产在很小的范围基础上完成，并且其过程耗时费力。

例如，一种生产抗体的方法由 Kohler 和 Milstein 最初提出 (Kohler and Milstein (1975)Nature 256:495),一种分泌抗体的免疫细胞先从被免疫的小鼠中分离，然后与 B 细胞肿瘤的一种骨髓瘤细胞进行融合。最终的杂交细胞（例如：杂交瘤细胞）能够在体外存活。一旦建立，这些杂交瘤细胞将不断分泌特定的抗体。

另一种生产单克隆抗体的方法是噬菌体展示库的构建。这种方法通过提取人全部外周血细胞的 mRNA,随后构建 cDNA 文库，包含合适的所有免疫球蛋白可变区域的序列。这些 cDNAs 被插入噬菌体，将免疫球蛋白可变区表达为 Fab 片段。理论上，如果噬菌体库足够大，通过用感兴趣的抗原筛选噬菌体，可以分离出表达期望的 Fab 片段的特异噬菌体。然而，这种方法一般仅应用于充分纯化的抗原，而不能用于抗原混合物，如细胞表达的数千种表面抗原。

单克隆抗体目前应用于治疗急性和慢性人类疾病的临床试验，包括白血病，淋巴瘤，实体瘤（例如结肠，乳房，肝），AIDS 和自身免疫疾病。抗体治疗试剂作为商业应用的例子是抗-Her2(Trastuzumab 或 Herceptin)。抗-Her2 是第一种人工抗体，用于治疗 HER2 的阳性转移乳房癌，其针对并阻止 HER2 蛋白的过量表达活动。虽然抗-Her2 已经成功治疗乳房癌，然而这种药物的副作用导致 27% 的病人产生心肌症 (Horton J.(2002)Cancer Control,9:499-507,Ewer et al .(2002)Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol. 21:489)。这种药物的其他副作用也已有报道，包括一些超敏反应（包括过敏），浸润反应，肺部病变。

对于 Her2 的鼠同源物 erbB2 的更多研究，解释了在防止扩大化的心肌症中 Her2 的作用 (Crone et al.(2002)Nat Med 8(5):459-465)。另一独立的临床研究报道，在 20 位运用抗-Her2 的病人中，7 位病人出现心肌摄取放射标记的抗-Her2 现象 (Behe et al. (2002)N Engl J Med. 345:995-996)。这些研究让研究者得出结论：由于运用抗-Her2 进行治疗的病人中，抗-Her2 不能区分乳房和心肌中的 Her2，从而导致心肌炎的产生。抗-Her2 治疗性抗体的设计无法使抗体区分在疾病组织中过量表达的突变 Her2 和在心肌组织中表达的正常 Her2。虽然抗-Her2 对于其目标蛋白 Her2 具有高度的特异性，但是一个重要的问题是这个抗体无法区分疾病组织和正常、健康组织。综上所述，设计具备更好的特异性和有效性的抗体治疗方法十分必要。

这样，需要一种用于诊断和治疗应用的高产的抗体生产方法，以及药物发明。

摘要

这里提供了一些治疗性复合物，包含例如：一种表位的抑制物，该表位含有经证实为疾病相关表位的外显子结合点，和一个药物可接受载体。这种抑制物可以是一个抗体，如：一种单克隆抗体，可与 SEQ ID NO 序号为：2, 4, 6, 8, 10, 11, 13 或 15-25 的任何一个表位特异结合。

另外，提供了包含核酸的治疗性复合物，此核酸包含疾病相关外显子结合点的表位和药物接受载体编码序列。这种核酸序列可以编码一种在 SEQ ID NO 序号为：2, 4, 6, 8, 10, 11, 13 或 15-25 中与疾病相关的表位。包含编码疾病相关的包括在 SEQ ID NO 序号为：2, 4, 6, 8, 10, 11, 13 或 15-25 中的表位序列的核酸的表达载体也被显示。表达载体另外可以包含编码载

体蛋白序列的核酸。治疗性复合物也可包含一种多肽，该多肽包含疾病相关外显子结合点的表位和一个药物接受载体。这个多肽可以包含一种包括在 SEQ ID NO 序号为：2, 4, 6, 8, 10, 11, 13 或 15-25 的疾病相关的表位。

此外，提供了一些 siRNAs，针对编码表位的核酸序列，该表位包含从 SEQ ID NO 序号为：2, 4, 6, 8, 10, 11, 13 或 15-25 中任一个挑选出来的氨基酸序列，还提供了编码 siRNA 的核酸。另外还包括了包含有这些核酸的载体，以及包含 siRNA 或编码此类的核酸的细胞。SiRNA 或核酸可以以一种包含药物接受载体的治疗性复合物形式存在。

试剂盒也被提供。例如，治疗性试剂盒包含一种表位的抑制物，该表位包含一个外显子结合点，并被认为是一种疾病相关表位，试剂盒也可以包括治疗方案必需的第二种试剂或材料。试剂盒还包含使用说明书，以及施行抑制物的设备。诊断试剂盒包含一种表位的抑制物，该表位包含一个外显子结合点，并被认为是一种疾病相关表位，试剂盒也可以包括诊断方案必需的第二种试剂或材料。

此外显示了一些治疗方案。测定受试者是否患有 VEGF 异构体相关的疾病，包括 (1) 将来自受试者样本与特异结合表位 (来自 SEQ ID NO:2 或 4) 的抗体相联，(2) 测定抗体与样本的结合情况，若抗体与样本结合说明受试者患有 VEGF 异构体相关的疾病。测定受试者是否患有 HER-2 异构体相关的疾病，包括 (1) 将来自受试者样本与特异结合表位 (来自 SEQ ID NO:6 或 8) 的抗体相联，(2) 测定抗体与样本的结合情况，若抗体与样本结合说明受试者患有 HER-2 异构体相关的疾病。测定受试者是否患有 PSA 异构体相关的疾病，包括 (1) 将来自受试者样本与特异结合表位 (来自 SEQ ID NO:10,11 或 13) 的抗体相联，(2)

测定抗体与样本的结合情况，若抗体与样本结合说明受试者患有 PSA 异构体相关的疾病。测定受试者是否患有某蛋白异构体相关的疾病，包括（1）将来自受试者样本与特异结合蛋白质异构体疾病相关表位的抗体相联，该蛋白由这里所述的方法鉴定，（2）测定抗体与样本的结合情况，若抗体与样本结合说明受试者患有某蛋白异构体相关的疾病。

一种治疗性方法包括，例如，通过给予病人所需的治疗性有效剂量的试剂进行治疗，例如一种特异结合疾病相关的蛋白质异构体的抗体。这种试剂可以是之前所述的一种抗体。

一种治疗方案例子可以是这样一种方法：对于特异蛋白异构体相关疾病的病人的治疗，包括给予病人所需的疾病相关外显子-结合点表位的抑制物，例如：那些被认为是疾病相关外显子-结合点表位的抑制物。这种疾病可以是癌症，这些外显子结合点表位将在 SEQ ID NO:2,4,6,8,10,11,13,或 15-25 中任一个中列出。病人也可被给予化疗治疗。这里还提供了一种疾病相关外显子结合点表位抑制物的使用方法，在疾病治疗的药剂的制备中有所运用，而该抑制物被认为是疾病相关外显子结合点表位抑制物。该疾病可以是癌症，该药剂可以和其他化疗药剂联用。在某方面，与从 SEQ ID NO:2,4, SEQ ID NO:6,8, SEQ ID NO:10,11,13 列出的表位分别特异结合的抗体，将分别用于治疗 VEOF,HER-2,PSA 异构体相关疾病药剂的制备。另一方面，某一抗体被用于制备治疗蛋白质异构体相关疾病的药物，该抗体可特异结合一种由这里所述方法鉴定的与疾病相关的蛋白异构体的外显子结合点表位。

另一方面，提供了一些疾病相关外显子结合点表位抑制子的应用方法，其被认为是一种疾病相关外显子结合点表位的抑制

子，用于制备一种治疗疾病的药物。这些疾病可能是癌症。此方法可能额外包括给予病人其他化疗药剂治疗。

其他的方法包括与以下所列表位 (SEQ ID NO:2 或 4; SEQ ID NO:6 或 8; SEQ ID NO:10, 11 或 13; SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:16; SEQ ID NO:20-21; SEQ ID NO:22-24; 或 SEQ ID NO:25) 特异结合的抗体的应用，分别用于治疗 VEGF,HER-2,PSA PDGFR β ,PSMA,CD86,催乳素,或胰岛素受体的异构体相关疾病药物的制备。另一方法包括与一种由这里所述方法鉴定的疾病相关蛋白质异构体外显子结合点表位特异结合的抗体的应用方法，用于治疗蛋白质异构体相关疾病的药物制备。

另外提供了一些从众多抗体中鉴定与目标蛋白结合的抗体的方法：(1) 提供相互不同的连接有载体蛋白的众多抗体，其中至少有一种抗体可与包含目标蛋白部分结构的融合蛋白特异结合；(2) 将部分或全部抗体连接到一个固相表面，从而得到覆盖有抗体的固相表面，不同的抗体连接在固相表面的不同部位；(3) 将覆盖有抗体的固相与融合蛋白相连；(4) 通过实验方法验证载体蛋白的存在与否，存在载体蛋白的表明存在针对目标蛋白的抗体。这些抗体可以是纯化或未纯化的抗体制备物。它们可以是免疫或未免疫动物的血清，或杂交瘤细胞培养上清。

目标蛋白可以是一种蛋白或配基的异构体，可有效引发针对它的抗体。某一方面，一种蛋白的异构体是与疾病相关的异构体，例如：VEGF 异构体 VEGF165 和 VEGF121，或一种可以有效引发针对其抗体的配基。连接了目标蛋白的载体蛋白可以包含分泌性碱性磷酸脂酶 (SEAP)，辣根过氧化物酶， β -半乳糖酶，荧光素酶，或酶活性基团，以及 IgG Fc (γ 链) 或其配基。提供的抗体可能与一固体表面相连，如蛋白质 A，蛋白质 A 琼脂糖或其他蛋白质 A 偶联物；蛋白质 G，蛋白质 G 琼脂糖或其他蛋

白质 G 偶联物。分析载体蛋白存在情况的测定方法可以包括化学发光分析, 荧光分析或比色分析。从众多抗体中鉴定目标蛋白抗体的方法需进一步在步骤 3 和 4 之间包含一洗脱步骤用于移去未绑定的目标蛋白。

目标蛋白可以是一种蛋白或配基的异构体, 可有效引发针对它的抗体。某一方面, 一种蛋白的异构体是与疾病相关的异构体, 如病毒蛋白或可有效引发针对它的抗体的一种蛋白。连接了目标蛋白的载体蛋白可以包含分泌性碱性磷酸脂酶 (SEAP), 辣根过氧化物酶, β -半乳糖酶, 荧光素酶或酶活性基团以及 IgG Fc (γ 链)。融合蛋白或编码融合蛋白的核酸 (例如: 表达载体) 的集合物, 可以导入宿主体 (例如: 老鼠)。宿主能够同时接受至少 310100 种融合蛋白或 100 种编码蛋白的核酸。

另外提供了一种生产单克隆抗体集合物的方法, 其中至少有一种单克隆抗体能够结合疾病相关蛋白质异构体, 包括: (1) 将融合蛋白或编码融合蛋白的核酸的集合物导入某一宿主, 其中每一融合蛋白至少包含疾病相关蛋白异构体的配基和一个载体蛋白; (2) 从宿主脾细胞中制备单克隆抗体分泌细胞的集合物; (3) 由权利 1 所述方法筛选细胞, 得到至少一种可以结合疾病相关蛋白异构体的单克隆抗体。

这些融合蛋白可以包括血管内皮生长因子异构体 165 (VEGF165) 多肽 DRARQENPCGPCSE (SEQ IN NO:2); 血管内皮生长因子异构体 121 (VEGF121) 多肽 DRARQEKCDKPRR (SEQ IN NO:4); HER-2 接合异构体 1 多肽 INCTHSPLTS (SEQ IN NO:6); HER-2 接合异构体 2 多肽 CTHSCVASPLT (SEQ IN NO:8) 或任何 SEQ IN NOS:10,11,13 或 15-25。载体蛋白可包含分泌性碱性磷酸脂酶 (SEAP), 辣根过氧化物酶, β -半乳糖酶, 荧光素酶, 或酶活性基团以及 IgG Fc (γ 链)。融合蛋白或编码融合蛋白的核

酸（例如：表达载体）的集合物，可以导入宿主体（例如：老鼠）。宿主（例如：老鼠）能够同时接受至少 310100 种融合蛋白或 100 种编码蛋白的核酸。

这里提供了一些方法，从大量的抗体集合物中分离特异绑定目标蛋白的抗体，这些抗体与编码这些抗体的核酸相关，包括（1）将目标蛋白的至少一个配基与一个在固体表面的突起相连，（2）在适合抗原/抗体复合物形成的条件下，将连接有蛋白的突起与编码这些抗体的核酸相关的抗体集合物相连；（3）分离与突起相连的抗体，即分离到针对目标蛋白的抗体。

在某一方面，与编码这些抗体的核酸相关的抗体是噬菌体。分离抗体的方法可额外包括将抗体从突起上分离下来的过程，并且/或者在步骤（2）和（3）之间加入一步洗脱过程。与不同的突起连接的不同蛋白可包含在与突起集合物连接的蛋白集合物中。固相表面可以包含至少 10100 或 1000 个突起。目标蛋白的配基可与钥孔血蓝素(KLH)，分泌型碱性磷酸酶(SEAP),IgG Fc (γ 链),谷胱甘肽-S-转移酶(GST),或多聚组氨酸标记尾巴。固相表面可包含生物素或链霉亲和素,镍,或谷胱甘肽。

这里还提供了一些测定在样本中抗原存在情况的方法，包括（1）在适合抗原/抗体复合物形成的条件下，将样本与固相连接，该固相表面包含固定于特定位置的抗体集合物，（2）在适合抗原/抗体复合物形成的条件下，将融合蛋白集合物与固相表面相连，每一个融合蛋白包含一个与固相表面的抗体特异接合的多聚肽，以及一个载体蛋白，（3）测定固相表面的每一个特定位置上载体蛋白的存在情况，若在某特定位置有载体蛋白的缺失或减少，则表明具有在特定位置与抗体接合的抗原，即表明样本中具有抗原。

固相表面可以包含至少 100 或 1000 个抗体。固相表面也可以是一种抗体阵列，每一个抗体固定于阵列的特定位置。载体蛋白可以是酶或具有酶活性的配基，则此方法还可进一步包括将固相表面与酶底物相连的过程。

在这里还提供了一种鉴定目标蛋白中的表位的方法，包括（1）提供编码融合蛋白聚合物的核酸，这里的每一个融合蛋白包含目标蛋白的 6 到 15 个或 8 到 12 个氨基酸多肽和一个载体蛋白，并且这些多肽包括了目标蛋白的不同序列，（2）将核酸集合物导入动物宿主；（3）从宿主细胞中制备单克隆抗体分泌细胞的集合物；（4）由前述方法筛选细胞，以鉴定针对目标蛋白的抗体，若存在针对某一多肽的抗体则表明该多肽对应于目标蛋白上的表位。蛋白可以是细胞表面受体，融合蛋白还可包含受体胞外部分上的氨基酸序列。

制备针对疾病的 DNA 疫苗的方法包括（1）鉴定疾病相关的蛋白上的一个或多个表位，例如，通过这里描述的鉴定目标蛋白上的表位的方法；（2）将编码一个或多个表位的核酸序列导入以个表达载体，即制备针对疾病的 DNA 疫苗。这里还提供了制备针对疾病的疫苗方法，包括（1）通过这里描述的鉴定目标蛋白上的表位的方法，鉴定疾病相关的蛋白上的一个或多个表位；（2）制备包含一个或多个表位的氨基酸序列的多肽，即制备了针对疾病的疫苗。

图表的简单描述

图 1 显示一种筛选噬菌体显示文库的示范方法。

图 2 显示一种筛选表位的示范方法。

图 3 显示一种筛选抗体阵列的示范方法。

图 4 显示一种 VEGF 异构体 121, 165, 206 的陈列。

图 5 显示一种针对疾病相关 VEGF 异构体的示范抗体的设计方法。

图 6 显示一种针对疾病相关 CD44 异构体的示范抗体的设计方法。

详细描述

定义

出于方便, 在说明, 例子和附加声明中使用的术语都在这里汇集。除非另有定义, 这里使用的所有技术和科学术语拥有相同的含义, 被具备这项发明所属领域通常技能的人所共识。

在说明和声明中使用的单数形式“一个”, “一个”, “这个”包括了复数情况, 除非文中另有清楚说明。例如, 术语“一个细胞”包括了细胞的集合物, 包括它的混合物。

这里所用的术语“试剂”表示一种化学成分, 一种化学成分混合物, 一种生物大分子(如一种核酸, 一种抗体, 一种蛋白质或其配基, 例如: 一种多肽), 或一种来源于生物材料, 如细菌, 植物, 真菌, 或动物(特别是哺乳动物)细胞或组织的提取物。这些药剂的活性将作为“治疗试剂”或“诊断试剂”有效地实施, “治疗试剂”或“诊断试剂”指局部或系统地作用于主体的具有生物学的, 生理学的或药剂学的活性底物。

术语“氨基酸”是指包含所有分子，无论天然或人工合成的，其包括氨基活性和酸活性，并可以被包括在自然发生的氨基酸聚合体中。氨基酸的示范例子包括自然发生的氨基酸，类似物，派生物和其同源物；具有不同侧链的氨基酸类似物；以及所有前述的任何立体异构物。

这里所使用的术语：“抗体”指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子上的抗原接合配基，例如：包含（“以免疫反应”）特异接合抗原的抗原接合位点的分子。在一个示范性的例子中，术语“抗体”特定地包括单克隆抗体（包括促效药，拮抗剂和抑制性或中和抗体）。从结构上看，最简单的自然发生的抗体（如 IgG）包括四个多肽链，即以二硫键交联的两个重链（H）和两个轻链（L）。术语“VH”指抗体重链上的可变区域。术语“VL”指抗体轻链上的可变区域。天然的免疫球蛋白代表了包括数种分子，如 IgD, IgG, IgA, IgM, IgE 的分子大家族。该术语也包括杂交抗体，嵌合体抗体，人工化抗体，变更抗体，及其片段。包括但不仅限于 Fab 片段，和 Fv 片段。抗体可以用常规的技术片段化，并且用已述的完整抗体的筛选方法可筛选有效的片段。免疫球蛋白的 Fab 片段是一个多聚体蛋白，由免疫球蛋白的配基构成，包含了免疫球蛋白分子重链和轻链上的免疫活性部分，以共价键接合，并可以特异接合抗原。通过在此领域中所熟知的方法，可用木瓜蛋白酶将完整的免疫球蛋白分子水解成 Fab 片段。然而，Fab 片段还可通过此领域中其他方法，在合适的宿主细胞中表达期望的免疫球蛋白重链和轻链配基而获得。

这里使用的“抗原”指可以激发一种或多种抗体的物质。抗原包括，但不仅限于多肽，蛋白，糖蛋白，多聚糖和脂类，其配基和其接合物。

在众多其他抗原中，如果一种抗体更适宜结合某一抗原，那么可称这种抗体“特异结合”该抗原或抗原上的表位。例如，抗体可能具有少于 50%，20%，10%，5%，1%，0.1%的与其他一种或多种抗原的交叉反应。

这里使用的术语“载体蛋白”指一种蛋白或多肽，可以提高与某蛋白相关的针对此蛋白的抗体产生量，并且/或者能够用于测定与之相关的蛋白。出于免疫目的，许多不同的载体蛋白可以与多肽联用。选择使用何种载体蛋白取决于免疫原性，可溶性，（使之能获得与载体的最佳结合情况），以及鉴定针对目标蛋白的抗体的筛选方法。两种最常用的载体是钥孔虫戚血蓝蛋白(KLH)，和牛血清白蛋白（BSA）。其他例子包括碱性磷酸酶（SEAP），辣根过氧化酶，荧光素酶， β -半乳糖甘酶，IgG Fc(γ 链)，谷胱甘肽-S-转移酶（GST），多聚组氨酸标记和其他酶，如 β -内酰胺酶，其他分泌蛋白或多肽。

这用到的术语“蛋白质异构体”指任何长度的氨基酸的聚合体，起源于选择性拼接结果。选择性拼接是一种过程（在转录阶段），在以给定的 RNA 分子中，可选择的外显子（例如：编码某一蛋白上特定区域的基因的一部分）被合成（通过 RNA 聚合酶分子），在同一基因中形成不同的 mRNAs（信使 RNA 分子）。每一种这样的 mRNA 称为“基因转录子”。通常，通过不同外显子的细胞或组织特异性联合，一个单一的基因可以编码几种不同的 mRNA 转录。例如，VEGF165 和 VEGF121 都源自 VEGF 基因。通过删除外显子 6 得到 VEGF165（例：外显子 5 和外显子 7 接合），通过删除外显子 6 和 7 得到 VEGF121（例：外显子 5 和外显子 8 接合）。其他选择性拼接的产生原因/来源包括移码（例：mRNA/转录子中的不同的密码子被核糖体翻译）或翻译起始或终止位点的改变（在 mRNA 上，并在其翻译时），作为结果，给定的内含

子仍保留在 mRNA 转录子中。不同的身体组织以及一些疾病可以导致在给定的基因中产生选择性拼接（例：作为结果，在不同组织或疾病组织中产生不同的蛋白）。

“疾病相关的蛋白质异构体”或“疾病相关的蛋白质异构体”或“疾病相关的蛋白质异构体”指源自选择性拼接的任何蛋白质或多肽，其存在或异常的水平与疾病相关。例如，与非疾病影响的组织或细胞相比，可以发现其以异常水平或异常形式存在于受疾病影响的组织或细胞中。它可以是一种异常高表达的蛋白质异构体，或是一种异常低表达的蛋白质异构体，而其更改了的表达情况与疾病的发生和/发展相关。一种疾病相关蛋白质异构体也可以是一个突变或遗传变异过程中的基因翻译产物，其与其他与疾病起因有关的基因直接相关，或与之不均衡联接。

术语“表位”指抗原上一段与抗体适宜并特异接合的区域。一个单克隆抗体适宜结合某分子的单一特定表位，该分子可从分子特性上鉴定。一个特别的蛋白质或蛋白质异构体的表位可由有限的氨基酸残基构成，例如：5-15 或 8-12 个残基，其在蛋白质或蛋白质异构体上以线性或非线性形式存在。被抗体识别的表位可以是，例如：5-15 或 8-12 个残基构成的短肽，在疾病相关的（不以正常蛋白质异构体形式存在的）蛋白质异构体中，其跨越了两个区域，或两外显子，或两个多聚多肽片段的接合部位。疾病相关的蛋白质异构体可以是一种选择性拼接的 RNA 多变形式的翻译产物，其缺少一个或多个与编码正常蛋白的 RNA 相关的外显子。

ADAPI 表位是一线性的或非线性的表位，如 8-10 个或 10-15 个能用于提升抗体识别蛋白质异构体能力的氨基酸。而这种蛋白质异构体起源于 mRNA 的选择性拼接或蛋白质的不同的翻译后修饰，正如蛋白质的水解。对于横跨两个外显子“联接区域”

的线性表位而言，表位序列可能是在 20 个氨基酸残余区域之内的邻近序列，包含例如，外显子结合点两边的各 10 个氨基酸残余。

“疾病相关的蛋白质异构体的表位”指由外显子编码的表位，且由于例如拼接，在相同基因编码的正常蛋白质中并不表达。它也可以是由两个外显子结合点编码的表位，其外显子结合点在正常蛋白质中不表达。

这里使用的“表达”指多聚核苷酸转录成 mRNA 的过程和/或被转录的 mRNA 随之被翻译成肽，多肽或蛋白质的过程。转录和编码的多肽正确地被称为“基因产品”。如果多肽来源于染色体 DNA，表达可能包括在真核细胞中 mRNA 的拼接。

术语“免疫原”指在动物中引发免疫反应的化合物。这里使用的免疫原也指融合蛋白和编码这些融合蛋白的核酸。

“单克隆抗体”指在抗体制备中的抗体分子，所有抗体具有相同的特异性并且有相同的核酸产生。对于直接指向特异蛋白的单克隆抗体的制备来说，任何由细胞系连续培养提供的抗体分子产品的技术都可以利用。这种技术包括，但非限制于，杂肿瘤技术(见 Kohler 和 Milstein(1975)Nature 256:496-497);trioma 技术;人 B-细胞杂肿瘤技术(见 Kozbor,等。(Immunol Today 4:72), EBV 杂交瘤技术(见 Cole 等, 1985,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,pp.77-96)和噬菌体显示来生产人单克隆抗体。人单克隆抗体可以被应用于这里所述的方法实践中,并可由人杂交瘤(见 Cote 等。(1983).Proc.Natl.Acad.Sci. USA80:2026-2030)或 EB 病毒体外转化的人杂交瘤(见 Cole 等。(1985):Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)生产。

短语“非肠道给药”或“非肠道地给药”被熟知，并指区别于肠道内和局部给药的给药途径，通常通过注射方法，并包括但不限于：静脉内，肌肉内，动脉内，鞘内的，囊内的，眶内的，心脏内，皮内，腹膜内，气管，皮下，表皮下，关节内，包囊下的，蛛网膜下的，脊髓内，胸骨内注射和输液。

“病人”，“主体”或“宿主”指人类或动物。

术语“多聚核酸”，“核酸”可替换使用。它们指任何长度的核酸聚合物，无论是脱氧核糖核酸还是核糖核酸或其类似物。多聚核酸可具有任何三级空间结构，具有任何功能，可以是已知也可是未知的。以下是未受限的多聚核酸例子：基因或基因片段上编码或非编码区域，由连接分析定义的位点，外显子，内含子，信使 RNA(mRNA)，转运 RNA，核糖体 RNA，核酸酶，cDNA，重组多聚核酸，分支多聚核酸，质粒，载体，分离的 DNA 或任何序列，分离的 RNA 或任何序列，核酸探针，引物。多聚核酸可能包含修正的核酸，如甲基化核酸和核酸类似物。如果出现(修正的核酸)，核酸结构将在聚合物的装配之前或之后被给予修正。核酸序列可能被非核酸成分所中断。在聚合之后，多聚核酸能被进一步修正，例如结合一个标记成分。术语“重组”多聚核酸指在自然中不存在，或相连于其他多聚核酸以非自然形式排列的基因组，cDNA，源自半合成，或合成的核酸。“寡聚核酸”指少于 100，75，50，25，或 10 个核苷酸的单链核酸。

术语“多聚肽”，“多肽”和“蛋白质”(单链)在这里可交替使用，指任何长度的氨基酸聚合物。聚合物可以是线性或环状，可能包含修正的氨基酸，并可能被非氨基酸所中断。该术语也包含被修正的，如：二硫化物结合形式，糖基化，脂化，乙酰化，磷酸化，或其他任何处理，如联接标记成分的氨基酸聚合物。这

里使用的术语“氨基酸”指天然或非天然或合成的氨基酸，包括氨基乙酸和D或L型异构体，及氨基酸类似物和拟肽。

“预防性的”或“治疗性的”治疗此领域是熟知的，指给予宿主一种药物治疗。若在有害情况（如：疾病或其他对宿主动物有害的情况）的临床表现出现之前给予治疗，那么这种治疗是预防性的，例如，它保护宿主免受有害情况；而若在有害情况的临床表现出现之后给予治疗，那么这种治疗是治疗性的（例如：将减少，改良或改善现有的有害情况或其副作用）。

术语“药物可接受的载体”在此领域是熟知的，指药物可接受的材料，成分或媒介，如液体或固体填充物，稀释山梨(糖)醇液，赋形剂，溶剂或包装材料，起着将任何主体成分或组成，从一个器官，或身体部分，承载或转运到另一个器官，或身体部分的作用。每一个载体必须是可接受的，即与主体成分或组成具有同一性，并对病人无害。可作为药物可接受的载体的材料例子有：(1)糖，如乳糖，葡萄糖和蔗糖，(2)淀粉，如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3)纤维素，和其派生物，如羧甲基纤维素钠，乙烷基纤维素和醋酸纤维素；(4)粉状黄芪胶；(5)麦芽；(6)凝胶；(7)滑石；(8)赋形剂，如可可油和蜡栓剂；(9)油，如花生油，棉籽油，红花油，芝麻油，橄榄油，玉米油，大豆油；(10)乙二醇，如丙烯乙二醇；(11)多羟基化合物，如甘油，山梨(糖)醇，甘露醇和聚乙二醇；(12)硅脂，如乙烷油酸盐，乙烷十二酸酯；(13)琼脂；(14)缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；(15)褐藻酸；(16)去除热源的水；(17)等渗盐溶液；(18)Ringer's液；(19)乙醇；(20)磷酸盐缓冲液；(21)其他药物学使用的无毒可兼容物质。

短语“系统治疗”，“系统地治疗”，“外周治疗”，“外周地治疗”在此领域是熟知的，指某些成分，治疗剂或其他材料，不

直接针对中枢神经系统，而是进入病人的其他系统，从而影响新陈代谢和其他类似的过程。

“目标蛋白”指一种蛋白质，例如：一种蛋白的异构体，其可以引发抗体增高。

“治疗”一种疾病指至少改善疾病的症状或至少阻止疾病的恶化。

“载体”是一种能转化并导入核酸分子进入宿主细胞，并且/或者在宿主细胞间，可自我复制的核酸分子。该术语包括了最初功能为将一种核酸分子导入细胞的载体，最初功能为核酸复制的载体，及表达载体，其功能为转录并/或翻译 DNA 或 RNA。也可包括不只具有以上一种功能的载体。这里使用的“表达载体”被定义为多聚核酸，当导入合适的宿主细胞时可以被转录并翻译成多肽。“表达系统”通常指包含了表达载体的合适的宿主细胞，具有产生期望的表达产物的能力。

生产和筛选抗体的方法

这里提供了从众多的抗体中鉴定可以绑定目标蛋白的抗体的方法，包括（1）提供至少特定地绑定一种融合蛋白，至少包括连接载体蛋白的目标蛋白的部分的抗体。（2）至少某些抗体连接到一个固相表面，从而得到覆盖有抗体的固相表面，从而不同的抗体连接在不同的固相表面或在一个或多个固相表面的不同位点。（3）将覆盖有抗体的固相与融合蛋白相连；（4）通过实验方法验证载体蛋白的存在与否，载体蛋白的存在表明存在针对目标蛋白的抗体。这些抗体可以是纯化的抗体制备物，如免疫球蛋白制备物（血清，免疫动物的多克隆抗血清），单克隆抗体，细胞培养基（如杂交瘤细胞培养上清），或是实验动物的腹水。

相反的，抗体和融合蛋白连接后它们再与固相表面连接。这种方法也包括，首先生产结合融合蛋白的单克隆抗体，例如，给宿主注射融合蛋白并且从宿主得到的细胞中准备产生抗体的细胞。在某种情况下，生产单克隆抗体包括，(1) 给宿主注射众多融合蛋白或融合蛋白编码的核酸，每种融合蛋白至少包含目标蛋白和载体蛋白的一部分。(2) 准备产生大量单克隆抗体的细胞，如杂交瘤细胞，来源于宿主的细胞。(3) 筛选产生单克隆抗体的细胞来分离那些希望得到的特征，例如通过检测载体蛋白。例如，至少 3 10100300 或 1000 种融合蛋白或编码融合蛋白的核酸被注射入宿主。通过使用这里描述的筛选分析方法可便利地筛选针对每种融合蛋白产生抗体的细胞，如通过检测抗体绑定到融合蛋白后的载体蛋白可以检测希望得到的抗体的存在。在有些情况下，对宿主注射的所有融合蛋白而言，载体蛋白是相同的或基本相同。在后者的情况下，筛选相当简单，因为相同的分析将允许鉴定产生大量不同抗体的细胞。

这里描述的任何方法将进一步包括决定是否鉴定的绑定蛋白异构体的抗体是与疾病无关的，例如鉴定特异地或优先地绑定疾病相关的蛋白异构体的抗体。例如，抗体绑定与疾病相关的蛋白异构体的 K_m 值或亲和力至少高于与疾病无关的疾病蛋白异构体的 K_m 值或亲和力的 2, 3, 5, 10, 30 或 100 倍。

这一领域的技术人员将认识到针对目标蛋白的抗体也许并不连接载体蛋白，用包含至少一部分目标蛋白和载体蛋白的融合蛋白筛选抗体产生的细胞。因此，在有些情况下，注射入宿主的蛋白质不同于用于筛选抗体产生细胞的蛋白质。当然，即使宿主注射的蛋白质不包含用于鉴定抗体的载体蛋白的氨基酸序列，但是此蛋白质必定包含提高宿主免疫反应的蛋白质或多肽的氨基酸序列。

在有些情况下，通过给宿主注射众多蛋白质来得到抗体，例如融合蛋白。在另一些情况下，通过给宿主注射一种或多种编码众多蛋白质的核酸来得到抗体，例如融合蛋白。例如，编码众多蛋白质的一种核酸被注射入宿主来准备众多蛋白质的抗体。相反，编码两种或更多蛋白质的两种或更多核酸被注射入宿主来准备两种或更多蛋白质的抗体。当一种核酸编码两种或更多蛋白时，核酸包含两种或更多启动子和/或其他调控元件。核酸也可能在编码两个或更多蛋白质的开放式阅读框之间包含数个核糖体结合位点。

在有些情况下，载体蛋白是便于从众多抗体中鉴定绑定目标蛋白抗体的蛋白质。载体蛋白可通过多种方法鉴定。适当的方法以载体蛋白的种类而定。例如，

载体蛋白可以用特定绑定载体蛋白的抗体来鉴定。因此，载体蛋白可以是获得或准备抗体的任何蛋白质或分子。例如，载体蛋白可以是一种标签，如组氨酸标签。载体蛋白可以是免疫球蛋白分子的不变区域，如 IgG 区域。载体蛋白也可以是被标记的蛋白质或其他分子，如荧光，磷光，放射性标记。其他载体蛋白可以是使酶活性增强的酶或酶的部分。例如，载体蛋白可以是分泌性的碱性磷酸酶，辣根过氧化物酶，荧光素酶， β -半乳糖苷酶或使酶活性增加的它们中的部分。酶可以是任何希望得到的种类，如人或非人的，如鼠。

这里也提供了制备绑定疾病相关蛋白或疾病相关蛋白异构体的抗体的方法，入疾病相关的外显子结合点蛋白。在某些情况下，与载体蛋白相同地，从数据库和编码包含在表达载体中的 10-15 或 8-12 个目标序列的寡核苷酸中选择人目标基因序列。然后，核苷酸被引入动物（如鼠）在体内引起抗原的表达并且促进

免疫反应。从动物中分离 B 细胞并且产生杂交细胞。根据这里所述的方法筛选杂交细胞，如通过载体蛋白的鉴定。

可以根据这一领域的蛋白质合成的方法，通过化学合成制备蛋白质（如融合蛋白）。也可以通过重组获得蛋白质。尤其，可以通过融合编码目标蛋白或其一部分的核酸和编码载体蛋白或其一部分的核酸来制备融合蛋白。

编码目标蛋白和载体蛋白的核酸可以通过如聚合酶链反应（PCR），从基因组 DNA 中扩增基因片段，cDNA，RNA（如通过 RT-PCR）或克隆序列来获得。根据已知的基因或 cDNA 序列选择 PCR 初始序列，致使得得到相对唯一的扩增片段。为了达到特异性和最佳扩增目的的需要，计算机程序可以用于初始序列的设计。参见如，Oligo version 5.0（National Biosciences）。用于设计和选择扩增初始序列的因素在例如 by Rylchik, W. (1993) "Selection of primers for Polymerase Chain Reaction." In *Methods in Molecular Biology*, vol.15, White B.ed., Humana Press, N.J 中被述及。可以从基因库或其他公共资源中得到序列。相反地，这项发明的核酸也可以通过这一领域的标准方法来合成，如通过使用 DNA 自动合成器。（这种合成器可以从 Biosearch, Applied Biosystems, 等购买）

在宿主或细胞中表达蛋白质的合适的克隆载体可以根据标准技术构建，或从这一领域提供的大量的克隆载体中选择。尽管选择的克隆载体根据宿主细胞被用的意图而变，但是有用的克隆载体通常具有自我复制的能力，拥有独特的核酸限制性内切酶单一位点或带有能用于选择包含载体的克隆的标记基因。合适地，但非限制性地例子有，质粒和细菌病毒，如 PUC18, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, 噬菌体 DNAs 和穿梭载体

如 pSA3 和 Pat28。这些和许多其他载体可以从商业卖主购买，如 BioRad, Stratagene, 和 Invitrogen。

如果可适用，在这里描述的方法中使用的表达载体通常是包含编码目标蛋白或其一部分并且连接一种载体蛋白或其一部分的多聚核苷酸的可复制多聚核苷酸结构。这里描述的多聚核苷酸有效地连接合适的转录控制元件，例如启动子，增强子和终止子。对表达而言（如翻译），一种或更多的翻译控制元件通常也是需要的，如核糖体结合位点，翻译起始位点和终止代码。这种转录和翻译的调控元件起源于目标蛋白或其同源序列（来源于其他基因或生物体）。编码信号肽的多聚核苷酸序列也能包括允许穿越或横跨细胞膜或从细胞分泌的多肽。大量的表达载体适合在真核细胞中表达，包括在这领域已知的酵母细胞，鸟类细胞，哺乳动物的细胞。表达载体的其中一个例子是 pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.)，其转录起始于细胞巨化病毒 (CMV) 早期启动子/增强子。这个载体也包含用于多聚核苷酸插入的多个核酸限制性内切酶识别位点。合适的克隆和表达载体包括任何这一领域已知的用于细菌，哺乳动物，酵母和昆虫的表达系统。特殊的表达载体和合适的宿主细胞已被这一领域所知并且无需在这里详细描述。可参见 Gacesa and Ramji (1994) *Vectors*, John Wiley & Sons.

克隆和表达载体典型地包含一个可选择标记（如，与载体一起转化的编码宿主细胞存活或生长必需的蛋白质基因），尽管这种标记基因可能携带其他多聚核苷酸序列共同转染入宿主细胞。只有选择性基因被转染进入宿主细胞的那些细胞才能在选择性条件培养下生长。典型的选择性基因有下列特点之一（a）对抗生素或其他毒性物质（如氨基青霉素，新霉素，氨基叶酸）有抗性作用；（b）补充营养缺陷形缺失物质；（c）提供从培养基中不

能获得的必要营养。合适的标记基因的选择有宿主决定，不同宿主合适的基因已被这一领域所知。克隆和表达载体典型地包含被宿主识别的复制系统。

在宿主细胞中表达蛋白质的表达质粒可以是，例如：基于病毒的载体。

当给予宿主动物以蛋白治疗时，真核和原核宿主系统都可以用于生产重组蛋白质。聚合多肽可从细胞裂解物或培养基中分离，并按照其使用需要的程度进行纯化。这项发明中使用的合适的原核宿主细胞例子是埃希氏菌属大肠杆菌。真核宿主细胞的例子包括禽类，昆虫，植物，动物细胞如 COS7,HeLa,CHO 细胞。来源于真核生物的哺乳动物细胞系也经常作为表达聚合多肽的宿主细胞。培养的哺乳动物细胞的繁殖是众所周知的。见组织培养，学院出版社，Kruse 和 Patterson,eds.(1973)。

“转化”指通过已知的方法将带有期望的核酸的载体介导入宿主细胞。转化的方法，其依赖于宿主细胞的类型，包括电刺激转化；用于转化的氯化钙，氯化铷磷酸钙，DEAE-右旋糖苷，或其他试剂；微注射轰击；脂质体；感染（载体是一种感染性的试剂）；及其他方法。一般地，见 Sambrook 等。（1989）和 Ausubel 等（ed），(1987).上述核酸转入的参照细胞也包括这些细胞的子代细胞。

当转化入一个合适的宿主细胞，如，E.coli 或 COS-7,通过这里所述的方法可以检测到融合蛋白的表达。例如，基于鉴定连接了融合蛋白的载体蛋白，可以通过对培养上清或细胞裂解物进行化学发光，荧光，或比色分析来测定聚合多肽的存在情况。

通过酶切完整聚合多肽可以制备整个分子的特定聚合多肽片段。蛋白水解酶的例子包括，但不局限于，胰岛素，胰凝乳蛋白酶，胃蛋白酶，木瓜蛋白酶，V8蛋白酶，枯草杆菌蛋白酶，血纤维蛋白溶酶，凝血酶。完整聚合多肽可以同时，或分别与一种或多种蛋白酶反应。可选地，或另外，完整的聚合多肽还可被二硫化物去除试剂进行处理。通过此领域中所知的方法，多肽可以被相互分离，包括但不局限于，凝胶过滤色谱层析，凝胶电泳，和反相 HPLC。

通过大量的熟知的生产抗体的方法，可以制备抗体，例如，多克隆抗体和单克隆抗体。抗体可从许多物种中被激发并分离，如鸡，老鼠(mouse)，老鼠(rat)，兔子，山羊，绵羊，马，骆驼，猴子和人类。生产单克隆抗体的典型的方法，包括，用设计好的免疫原注射宿主动物，通常是老鼠。在某一方面，蛋白的集合物被用于注射，如一些融合蛋白，另一方面，一些核酸的集合物被用于注射，这些核酸编码蛋白，例如融合蛋白，其每一个融合蛋白包括了目标蛋白的至少一部分及一个载体蛋白。在某一特别方面，宿主是一种啮齿动物，例如，老鼠。如在 U.S.Pat.No.5721.122 中所述，作为一种例子，用于免疫的老鼠可以是“零-抗原”。

在某一方面，宿主是一种转基因动物，其带有人类免疫球蛋白位点。例如，转基因动物可以是包含了人免疫球蛋白基因的老鼠，其内生免疫球蛋白基因已经被部分或完全地抑制活性。通过应答，在转基因宿主中观察到人类抗体的产生，其在所有方面与人类中观察到的（抗体）十分相似，包括了基因重排，装配，抗体库。这些方法在以下专利，例如，U.S.Pat.Nos.5545,807;5545,806;5569,825,5625,126;5633,425;5661,016,及下列发表刊物：Marks et al.,*Bio/Technology* 10:779-783(1992);Lonberg et al., *Nature* 368:856-859(1994); Morrison, *Nature* 368:812-13(1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-51(1996); Neuberger, *Natur*

e Biotechnology 14:826(1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93(1995)中有所阐述。

一种或多种抗原可以通过运用各种不同的方法免疫宿主动物。例如，通过皮下，肌肉内，皮内，静脉内，并且/或者腹膜内的注射。此外，淋巴器官，腿弯部的淋巴结，并且/或者脚垫内的注射也是可行的。分别地并且/或者同时地联合运用两种或更多不同的免疫途径，对于动物免疫可能是更合适的。

用于宿主动物免疫的融合蛋白的用量，例如，可以在 0.01ug-250ug 之间，1ug-100ug 之间是比较合适的用量。可选地，用于宿主动物免疫的编码融合蛋白集合物的核酸的用量，例如，可以在 0.01ug-100ug 之间，1ug-25ug 之间是比较合适的用量。例如，一只老鼠可注射 10 ug 蛋白或 10 ug 核酸。

在一特定方面，一只宿主动物可以注射三种或更多不同的蛋白，如融合蛋白，或其编码核酸，例如，至少 3，10，30，100，300，或 1000 种不同蛋白或核酸或其联合物。在此项发明中的某一方面，一种宿主动物注射了包含 2 或更多不同蛋白或编码蛋白的核酸的混合物，可选地，还包含生理可接受的稀释液，如 PBS 或其他缓冲液。更适宜地，用于制备混合成分的融合蛋白已经至少经过一步的纯化过程。

这里所述的方法容许生产特异针对鉴定了的表位的抗体。更适宜地，被抗体识别的用于制备抗体的抗原，其氨基酸数量具有最少值，例如，至少具有 6 个氨基酸长度。抗原也可至少具有 10，15，20，50，100 个氨基酸长度。因此，抗原的氨基酸长度可以在 6 到 15 或 8-12 的范围。此外，针对线性表位（连续的氨基酸）的抗体，针对三维结构表位，例如，非线性表位，也可以通过例如，基于蛋白质结晶数据的方法进行制备。含有蛋白期望区

域重叠序列的聚合多肽可以用于注射宿主。例如，短抗原（或多肽抗原）可以被设计成某蛋白质氨基酸线性序列的串联结构，或蛋白质氨基酸线性序列的交错形式。包含期望目标蛋白的不同长度的多肽，也可以用于注射宿主动物。在抗体集合物中，期望至少有一种抗体可以和自身抗原全长或部分区域相结合。具备生物抑制功能的抗体或中和抗体也可以期望通过这里所述的方法进行鉴定。

短抗原的集合物，例如，具备某一表位的长度，可以（基于一个目标蛋白）被设计并用于注射宿主。可选地，具备不同蛋白序列的短抗原的集合物也可注射入一个宿主。

某一方面，可以产生蛋白质异构体抗体，如外显子结合点特异抗体。这些抗体可以针对短肽序列，其存在于（1）一种特殊的蛋白质异构体外显子中，（2）跨越特殊蛋白质异构体的外显子-外显子区域（3）跨越一个外显子删除位点。由于其特异针对一种特殊的异构体，这些短序列称为“标记表位”。“标记表位”可由非线性氨基酸序列构成三维表位形式。它可以，例如，代表了一种三维表位，其代表目标蛋白质异构体的一种构象特征，而这种构象特征在目标蛋白质其他异构体中未有出现。

在抗体集合物中鉴定针对某一蛋白质异构体的抗体的示范方法包括（1）提供彼此不同的抗体集合物，其中至少有一种抗体可特异结合融合蛋白，该融合蛋白至少包含了蛋白质异构体的一部分区域，并连接了一个载体蛋白；（2）将抗体集合物与某一固相表面相连，得到覆盖了抗体集合物的固相表面，不同的抗体结合在此固相表面上的不同位置，（3）将覆盖了抗体集合物的固相表面与融合蛋白相连，（4）执行一项可鉴定载体蛋白存在情况的实验方法，若存在载体蛋白则表面存在有针对某一蛋白质异构体的抗体。

在注射了编码期望蛋白的核酸集合物后的不同时期，可以通过检测被注射动物的血清，判断源自这些核酸的蛋白质的产生情况。用于检测的方法将依赖于该蛋白是否连接有载体蛋白，以及载体蛋白的类型。在某一方面，载体蛋白是分泌性碱性磷酸酶 (SEAP)。检测 SEAP 融合蛋白或其他产物的方法包括：从被注射动物静脉中抽取血液样本，血清经盐溶液稀释。SEAP 融合蛋白的水平可以通过检测加入碱性磷酸酶底物后其激发的信号的方法进行检测。商业化的 SEAP 利用方法包括，但不仅限于 Clontech's Great EscAPc™ SEAP 方法。其他融合蛋白的分析方法包括，但不仅限于一些商业化的方法，色度，半乳糖苷酶荧光或化学发光底物,HRP, 内酰胺酶和 luciferase. 这些方法擅长于抗体的高通量筛选。

当最初的反应较弱时，需要间隔性地加强免疫动物，直到抗体滴度升高或稳定。免疫后，(实验取血) 获得样本血清，以检测特异抗体的产生。更适宜地，从宿主动物分离免疫细胞的前 3-5 天再给予最后一次免疫追加。

通过筛选，可以从被注射动物中得到针对一个目标蛋白的短抗原或针对各种目标蛋白的抗体。所制备的针对一个多肽的抗体可以测试其与多肽以及自身目标蛋白的活性。抗体与多肽和/或自身目标蛋白的亲和力可以至少为 $10^{-6}M$, $10^{-7}M$, $10^{-8}M$, $10^{-9}M$, $10^{-10}M$, $10^{-11}M$, $10^{-12}M$ 。

单克隆抗体可以通过杂交瘤方法制备，最初在 Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) 中阐述。如前所述，在杂交瘤方法中，生产抗体或具备抗体生产能力的脾细胞可以从被免疫的动物中获得。运用合适的“融合试剂”，如聚乙二醇或仙台病毒，这些细胞可以和骨髓瘤细胞融合，从而形成杂交瘤细胞。(Goding,

Monoclonal Antibodies:Principles and Practice, pp.59-103(Academic Press,1986))

杂交瘤细胞在合适的培养基中生长，其中含有可地恰当地抑制未融合的父代骨髓瘤细胞的生长或存活物质。例如，如果父代骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶（HGPRT 或 HPRT），那么杂交瘤细胞培养基中可特别包含次黄嘌呤，氨嘌呤，和胸(腺嘧啶脱氧核)苷（HAT 培养基），这些物质可抑制 HG PRT-缺失细胞的生长。

首选的骨髓瘤细胞是那些可高效地融合，为已选择的抗体生产细胞提供高水平的稳定的抗体生产能力，及对 HAT 等培养基敏感。在这之中，首选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤细胞，如美国加利福尼亚州圣地亚哥 Salk 细胞分配中心提供的 MOPC-21 和 MPC-11 鼠肿瘤，和美国弗吉尼亚州马纳萨斯的 American Type Culture Collectable 提供的 P3X63AgU.1,SP-2,X63-AG8-653 细胞。210-RCY3.Ag1.2.3 鼠骨髓瘤细胞系也是适用的。人骨髓瘤和鼠-人无限骨髓瘤细胞系在人单克隆抗体生产中已有叙述（Kozbor,j.Immunol., 133:3001(1984);Brodeur et al.,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,pp.51-63(mareld Dekker,Inc.,New York,1987))

可选择地，可以通过其他方法从被免疫动物的免疫细胞中制备杂交瘤细胞系，例如，通过一种病毒（如，Epstein Barr 病毒）或一种癌基因作用于免疫细胞使之无限生长，从而获得生产期望的单克隆抗体的无限生长细胞系。见 Babcook et al. PNAS(USA), 93:7843-7848(1996),涉及将来源于产生特异单克隆抗体细胞的免疫球蛋白 cDNAs 进行克隆，从而生产单克隆抗体，而其他生产单克隆抗体的策略为使用被免疫动物的免疫细胞。

产生抗体的细胞随之通过筛选，鉴定出那些产生针对期望蛋白的抗体的细胞。筛选那些与已经进行动物免疫的每一个抗原结合的抗体的工作，通常在培养上清和/或纯化抗体中进行，例如，从这里叙述的源自融合过程的杂交瘤细胞培养上清中。

在某一方面，将要测定的单克隆抗体可以于一个固相连接，例如，包含蛋白 A,蛋白 A 琼脂糖(凝胶)，或其他蛋白 A 络合物，蛋白 G,蛋白 G 琼脂糖(凝胶)，或其他蛋白 G 络合物。通常在多孔板中筛选生产抗体的细胞。固相表面与抗原连接。可选地，在测定的单克隆抗体与固相结合之前，抗体-抗原复合物可以通过免疫沉淀反应形成。当抗体-抗原复合物结合到固相表面是，未结合的抗原可以通过冲洗除去，从而可以通过测定抗原来鉴定阳性结果。

在某一方面，可以包含一个载体蛋白。在这种情况下，可以通过测定载体蛋白的试剂来测定与抗体结合的抗原的存在情况。例如，载体蛋白可以通过使用一种特异结合载体蛋白的试剂，如一种抗体来测定。如果这种载体蛋白是一种酶或其具备酶活性的配基，该载体蛋白的测定可以通过酶学方法进行。相应地，可以根据此领域中已知的方法，进行化学发光方法，荧光方法，或比色方法。

当生产抗体杂交瘤细胞期望的特异性，亲和力和/或活性经鉴定后，单细胞克隆可以通过有限稀释方法进行亚克隆 (Goding, *Monoclonal antibodies:Principles and Practice*,pp.59-103(Academic Press,1986));单细胞通过挑选进行克隆，或在软琼脂上生长进行克隆 (Harlow and Lane,*antibodies:A laboratory Manual Cold Spring harbor Laboratory*(1988);pps 224-227)。

杂交瘤克隆何以由标准方法进行培养。用于培养的适合的培养基包括，例如 DMEM 或 RP-1640 培养基，杂交瘤细胞可以作为动物腹水瘤进行体内培养。(Harlow and Lane, *Antibodies: A laboratory Manual* Cold Spring harbor Laboratory(1988);Chapter 7) .

亚克隆分泌的单克隆抗体可以通过常用的方法从培养基，腹水，血清中分离，例如 G 蛋白或 A 琼脂糖凝胶，羟磷灰石色谱，凝胶电泳，透析，亲和色谱。

针对期望抗原的抗体分离过程之后，抗体可以进一步被利用或改良。在某一方面，嵌合体抗体被生产。“嵌合体”抗体是由经过遗传工程改造的基因编码的，这样其轻链和重链基因由不同物种的免疫球蛋白基因片段构成。例如，鼠单克隆抗体基因可变 (V) 片段，例如这里所述方法得到的，可以和人恒定 (C) 片段相连接。这样的嵌合体抗体对于人的抗原性可能比具有鼠恒定区和鼠可变区的抗体低。

这里使用的术语，人工化抗体 (HuAB) 指一种嵌合体抗体，其结构与人类结构具有充分的同一性 (例如至少 85%)，具有从非人源抗体中获得的 CDRs，并其任何恒定区中至少 85-90%，更适宜地，95% 的多肽序列与人免疫球蛋白恒定区相一致。见示例，PCT 出版 WO90/07861 和欧洲专利号 0451216。因此，一个 HuAb 的所有部分，除了 CDRs，都与一个或多个免疫球蛋白序列对应部分具有充分的同一性。这里使用的术语“结构区域”，指免疫球蛋白轻链和重链上可变区域的部分，其 (与 CDR's 不同) 在同一物种的不同免疫球蛋白中是相对保守的，见 kabat, et al. (1987) *Esequences of Proteins of Immunologic Interest*, 4th Ed., US Dept. Health and Human Servieds.

根据已知的方法，可从大量人细胞，但首选免疫 B 细胞中分离人类恒定区域的 DNA 序列。根据已知的方法，生产人类抗体的可变区域或 CDRs 可以从与此区域结合的单克隆抗体中分离，单克隆抗体可从任何方便的哺乳动物资源，包括老鼠，老鼠，兔子或其他可生产抗体的脊椎动物中产生。

用于 DNA 测序和表达并分泌抗体的细胞可以充许多地方得到，如 American type culture collection(“Catalogue of Cell Lines and Hybridomas”5th edition(1985)Rockville ,Md., USA).在上述提到的获得抗体的方法(通过一种或多种抗原免疫动物)以外，还有其他合适的生产抗体的方法。Cole et al. 和 Boerner et al. 提供的技术也可以用于制备人单克隆抗体。(Cole et al., Monoclonal antibodies and Cancer therapy, Alan R.Liss, p.77(1985)and Boerner et al., J.Immunol., 147(1):86-95(1991)).

在某些方面，抗体文库，其中每一个抗体对应于编码其的核酸，如噬菌体显示系统，被用于高通量筛选对应一种或多种抗原的抗体。在某种特定情况下，一种或多种抗原，如目标蛋白的配基，与固相表面上的一个或多个突起或延伸相连接，其中不同的抗原与不同的突起相连。固相表面可以具有众多突起，例如，至少为 2, 5, 10, 25, 50, 100, 300, 1000, 或 3000 个突起。带有突起集合物的固相表面称之为“多突起表面”。固相表面可以是具有大量突起的平板。连有突起的固相表面的一个示例是那些做成适合于承载的模式，如多孔板。商业性公司如 Nalge NUNC 或 V&P Scientific, Inc., 可以提供或制造连有突起的固相表面。蛋白和融合蛋白可以通过合成或重组的方法进行制备，例如，在 COS 细胞中表达。根据此领域中已知的方法，可以将蛋白质与固相表面进行连接。例如，固相表面可以被抗生物素蛋白，链菌素抗体，镍，谷氨酸盐抗-标志抗体或抗-人 Fc 抗体覆盖。接着固相表面可以被抗体文库覆盖，例如，噬菌体显示文库，其中每一个抗

体对应于编码该抗体的核酸。结合一段时间，有效形成或产生抗原-抗体复合物。接着冲洗以去除未连接的抗体，将置于一多孔容器上，使每一个突起或延伸都处于容器的不同孔中。根据此领域中已知的方法，通过酸溶液洗涤，抗原或抗原/抗体复合物可以从固相表面上分离下来，并进入的孔中。更多的抗体可以从对应该抗体的编码核酸中生产出来，例如噬菌体。这个方法可以重复多次。一个多孔容器可以含有 12, 24, 48, 96, 384, 1536 个孔。其他可利用的固相表面包括多孔容器或珠子（例如 Dynabeads），其中，抗原存在于不同的孔或珠子上。这里包括了以此目的设计的，并可选择地连接抗原的固相表面。

用于此方法的抗原可以由连接或未连接载体蛋白的蛋白质构成。当载体蛋白与抗原相连时，抗原/抗体复合物的检测可以通过检测载体蛋白的存在情况进行。可选地，载体蛋白可以用于使抗原和固相表面相连。当使用载体蛋白时，应排除抗体仅和载体蛋白反应的情况，例如，将文库覆盖于已经予连接载体蛋白的固相表面。

一种包括了筛选噬菌体显示文库的方法的某一方面在图 1 中有所阐明。

抗体文库，例如，噬菌体显示文库，可以从自身的人源文库或疾病关联文库中分离的核酸中制备。Hoogenboom 和 Winter 对噬菌体显示文库进行了进一步阐述，*J.Mol.Biol.*,227:381(1992); Marks et al., *J. Mol.Biol.*, 222:581(1991).制备噬菌体文库的适合方法已经有所综述和阐明，见 Wnter et al., *Annu. Rev.Immunol.*, 12:433-55(1994);Soderlind et al., *Immunological Reviews*, 130:109-123(1992); Hoogenboom.*Tibtech* February 1997,Vol.15;Neri et al., *Cell Biophysics*, 27:47-61(1995). 单链抗体文库的制备方法也有论述，见 WO92/01047,WO92/20791,WO93/06213,WO

93/11236,WO93/19172,WO95/01438,WO95/15388. 抗体文库也有商业化的供应,例如,剑桥抗体技术(C.A.T),英国剑桥。

抗体纯化的方法是此领域中所熟知的。见, Hriow 和 lane (1988)antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 纯化方法包括盐沉淀(例如,铵盐),离子交换色谱(例如,在阳离子或阴离子交换色谱柱上,以中性PH开始并以离子强度逐渐加强的梯度洗脱),凝胶过滤色谱(包括凝胶过滤HPLC),和亲和树脂色谱,例如蛋白A,蛋白G,羟磷灰石,抗-抗体。抗体还可以通过此领域中熟知的方法进行亲和柱纯化。

这里叙述的方法也可以用于“表位筛选”(作为一种示范方法,见图2,)。在某一方面,生产蛋白,如融合蛋白的表达载体上包含的寡聚核酸,具有特异目标蛋白的短重叠和交错序列。表达载体可以导入宿主以产生抗体,则可以鉴定受限于生产的抗体的表位。例如,免疫宿主中得到的血清可与融合蛋白相作用,测定对应于每个融合蛋白的抗体的总量。在特定情况下,编码多肽的寡聚核酸或多肽可以用于免疫宿主,包含多肽和载体蛋白的融合蛋白被用于血清筛选。方法还包括从被免疫宿主中制备单克隆抗体,并用包含载体蛋白的融合蛋白筛选单克隆抗体。

短重叠氨基酸序列也可以通过化学合成,并与一个载体蛋白相连。这些融合蛋白可用于覆盖固相表面的多-突起板,随后用抗体文库,例如噬菌体显示文库,进行覆盖。扫描区域上每一个表位的抗体可以从抗体文库中被分离,并用于中和或“抑制功能”活性试验。

抗体可以作为,例如抑制抗体,被使用。此外,序列的混合物,根据分离出抗体或未分离出抗体的情况,可以表明表位在目标蛋白上的位置。蛋白质上的表位定位信息可以用于生产治疗

剂，例如小分子。这也可以应用于，例如，测定受体胞外区域上的表位位置，例如 G 蛋白结合受体 (GPCRs)。此方法也可用于制备 GPCRs 抑制抗体，包括趋化因子和激素受体。

在有些情况下，检测针对目标蛋白表位的方法包括：(1) 提供编码众多融合蛋白的核酸，其中每种融合蛋白包含目标蛋白和载体蛋白的 6-15 或 8-12 个氨基酸多肽，而这些多肽又包含不同序列的目标蛋白。(2) 给动物宿主注射众多融合蛋白。(3) 从宿主动物中获得血清；筛选血清检测或确定目标蛋白表位的抗体数量，存在针对多肽的抗体表明此抗体对应于目标蛋白多肽。在另一些情况下，方法包含上面 (1)、(2)、(3) 从宿主细胞中制备产生众多单克隆抗体的细胞。(4) 根据这里描述的方法筛选细胞来鉴定目标蛋白抗体，存在针对多肽的抗体表明此抗体对应于目标蛋白多肽。多肽可能包含目标蛋白的交错序列。

这些方法，如这里描述的对于抗原与抗体绑定的探测分析，能进一步用于筛选抗体组。在某些方面，抗体组与测试蛋白（如，血清，细胞或组织蛋白）一起在抗原/抗体复合物能够形成的条件下孵育。（见图 3）没有绑定的蛋白质被洗去。然后，抗体组与包含多肽的融合蛋白接触，如绑定抗体组其中之一抗体并连接载体蛋白（如，SEAP）的多肽。在洗脱未绑定蛋白后，探测载体蛋白（如，通过增加碱性磷酸酶基质），可读取抗体组。读取抗体组特定区域是阳性将表明无多肽-载体蛋白的抑制绑定蛋白质被加入，并且测试的样品不包含由特定抗体识别的蛋白质。因此，在样品中，越少的载体蛋白被特定抗体检测，则越多被抗体识别的蛋白质存在。

与靶标疾病相关的蛋白质异构体的成分

特定绑定与疾病相关的蛋白质异构体的药剂能用于治疗 and 诊断的目的。这种药剂可以绑定由外显子编码且仅存在于 mRNA 中编码疾病相关的蛋白质异构体的蛋白质的一个区域，如由相同基因编码，在正常蛋白质中并不存在。这种药剂可以绑定包含外显子结合点的且仅存在于 mRNA 中编码疾病相关的蛋白质异构体的蛋白质的一个区域。药剂可以是绑定与疾病相关的蛋白特定区域的任何分子或分子络合物（或化合物）。

药剂可以是与疾病相关的蛋白质异构体的拮抗物或抑制剂，如与疾病相关的结合表位的拼接变异体的拮抗物或抑制剂。抑制剂可能先前并不知道或先前以为是疾病特定表位拼接变异体的抑制剂。抑制剂可能已经被测定为疾病特定表位拼接变异体的抑制剂。这种拮抗物或抑制剂可以被用于治疗或阻止与特殊拼接变异体相关的疾病，将进一步在这里被描述。

判断药剂是拮抗物或抑制剂的方法，包括用疾病的细胞或动物模型的方法，如包括将癌细胞的移植入裸鼠。

药剂可能是一种先前不知道的绑定疾病相关表位的蛋白质。例如，它可以是一种先前未知的抗体或先前未知的绑定表位的抗体。药剂可以是已经被测定的绑定疾病相关蛋白表位的药剂。药剂可以由这里描述的任何方法鉴定的药剂。

在某些方面，药剂是一种抗体，其中的片段或其中的派生物，如嵌合的或乳化的抗体。抗体可以根据这一领域已知的或这里描述的方法获得。绑定特定疾病相关的蛋白质异构体的抗体将进一

步在这里被描述，如疾病相关的表位可能包含一个外显子结合点。

抗体可以绑定特定的疾病相关蛋白异构体，如在表 1 中描述的那些。抗体可以是绑定特定的疾病相关蛋白质异构体的表位，如在表 1 中描述的那些。

已经被证明与疾病相关的蛋白质异构体可以通过如下数据库确定：

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>)，

PubMed Central (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/about/intro.html>)，

OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>)，

PROW(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PROW/>)。

一旦被鉴定，疾病相关异构体的序列可以从基因库得到 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenbankSearch.html>)。表 1 列出了与疾病相关蛋白异构体的例子和异构体的基因库编号。

表 1: 疾病相关的异构体蛋白示例

基因	编号	Spliced variant/ 蛋白质异构体	关联疾病
P53	NM_000546 NP_000537.2	许多 Spliced variant 和突变体	许多类型的肿瘤
Fas	M67454 AAA63174.1	跨膜区域缺失, 溶于血清	硅肺病
Factor H	M17517 AAA52016.1	Spliced short variant	卵巢癌, 拼接因子 H 在肿瘤中比正常组织高 5.5 倍
CD86	BC040261 AAH40261.1	CD86(deltaTM)	白血病, AML
erb-B2/ Her2	M11730 AAA75493.1	HER-2 (缺失胞外区域, 因此提高了激酶活性和转化活性)	乳腺等; 在转移性乳腺癌中 HER2-splice 表达量有 4.4 倍升高
VEGF	P15692 GI:17380528	VEGF165(缺失外显子 6)	肺, 结肠和胶质母细胞瘤中的肿瘤转移; 黄斑恶化
		VEGF121(缺失外显子 6&7)	乳腺癌, 肺, 胰腺 beta 细胞癌变, 黑素瘤
MDM2	BT007258 AAP35922.1	缺失外显子造成的 7 个短异构体, 与恶化高度相关	乳腺癌

FGF-8	D38752 BAA22527.1	异构体 FGF-8a, -8b, -8c,-8f, 肿瘤相关的 FGF-8b 异构体过量表达	乳腺癌
FGFR2-IIIb	NM_022975 NP_0752642	缺失外显子 7-10	软骨肉瘤
PSM	NM_004476 NP_004467.1	PSM”(226 核酸缺失)	前列腺癌-癌细胞中高表达, 正常细胞中基础表达
PSA	BC005307 AAH05307.1	缺失氨基酸 45-88, 在肿瘤中发现其他拼接变体	
KLK2	BC005196 AAH05196.1	缺失外显子 4	前列腺癌
Insulin R	NM_000208 NP_0001999.1	缺失外显子 17(删除 IR,无酪氨酸激酶区域)	糖尿病
Enovin (PDNFO)	AJ245628 CAB52396.1	组织特异拼接, 疾病/拼接形式	神经元不发生
(TCR)-z eta	J04032 AAA60394.1	外显子 IV/V 间插入密码子, 缺失外显子 II, VI, VII, (V + VI), (VI + VII), (II + III + IV), (V + VI + VII)	红斑狼疮和其他疾病

K S T 1 (钠 / 葡萄糖转运子)	NM_062944 NP_443176.2	外显子 6 缺失	BFIC,ICCA 综合症
Dystrophin	S73125 AAB20696.1	外显子缺失造成的几种异构体	肌营养不良症
IL-6 受体	NM_000565 NP_000556.1	可溶的 IL6R	RA
CD44	NM_000610	CD44R1(V8-10)	结肠,肺
		CD44v7/8	风湿性关节炎 (仅见于疾病连接)
		CD44v6	乳腺癌
		CD44v5	Wilms 癌; 其高表达与肿瘤关联
		CD44v7	自体免疫, 肠
		CD44v3	自体免疫, 皮肤
TGF- α ha	NM_003236	变异体 I(Va I)	在数种肿瘤系中提高转化活性
		变异体 II(Va II)	在数种肿瘤系中提高转化活性
Tenascin-C	NM_002160	缺失 FN III 区域	大泡性角膜病变, 人角膜
肌钙蛋白 T2	NM_000364.1	缺失外显子 7 (12 个氨基酸)	原发性心肌炎
肌钙蛋白	NM_000363	血清可溶形式	原发性心肌炎

白 I			
PRL-3	NM_032611 NM_007079	异构体 I 异构体 II	结肠直肠癌转移, 心肌肥大
EGFR-1 210a.a 618a.a 405a.a 705a.a 934a.a	NM_005228.3 NM_201282.1 NM_201283.1 NM_201284.1	异构体 a 异构体 b 异构体 c(可溶的) 异构体 d EGFRvIII(缺失外显子 2-7)	黑色素瘤, 粘液瘤 乳腺, 胰腺癌, 肝转移; NSCLC, 鳞状细胞瘤, 肾细胞瘤; 胶质母细胞瘤
雌激素受体-alpha		缺失外显子 5 缺失外显子 6 缺失外显子 7	乳腺癌增长 乳腺转移性癌/tomaxifen 抗性 雌激素-敏感和 tomoxifen 抗性
雌激素受体-beta a2 beta-delta a 3		I 在外显子 5 和 6 间缺失一部分 (54 核酸, 18a.a) 缺失外显子 3 (117 核酸, 39a.a)	在卵巢和肿瘤位点异常表达; 对促效剂 Estrogm, 和拮抗剂 Tomaxifen 响应
GPCR:	BC069611	第一个胞内环具	骨瘤

降血钙素 R 1674bp; 474a.a	AAH69611.1	有 16 个 a.a	
GPCR: 多巴胺 R(D2)		第三个胞内环具有 29 个 a.a	调整激素转录和分泌
GPCR:O PRM1	NM_000914 NP_000905.1	插入外显子 10 (5 8 个 a.a)	与阿片样物质高度亲和
Ca-感知受体	D50855 BAA09453		前列腺转移
原肌球蛋白 3-异构体 5	NM_152263 NP_689476	TM5 异构体	膀胱癌
PDGF A	NM_002607 NP_002598	外显子 6	许多生长调节恶性因子
PDGF B (通过染色体转移融合)	NM_002608 NP_002599	COL1A1-PDGFB 融合体 (der922) t (17;22))	表皮纤维肉瘤, 纤维胚细胞癌
PDGF β 受体 (通过染色体转移融合)	NM_002609 NP_002600.1	CEV14-PDGFRbet a (q33;q32); NIN-PDGFRB(q33;q24)	AML; 慢性骨髓及外骨髓增殖失调;

形成几个融合蛋白)		tel-PDGFR beta 融合体 (q33;p11.2) ; RABPT5/PDGFR B 融合体 (q33;p13) ;	AML; CMML
泌乳刺 激素受 体	BC059392 AAH59392.1	许多异构体, 例如 外显子6缺失和外 显子11缺失	乳腺癌

表 2: 疾病相关的病毒蛋白示例

病毒疾病	病毒蛋白	基因库编号
SARS	铆钉表面蛋白	GI:30027620
HIV	HIV-1(env)	AY223790 AAP57385.1
HCV,C 肝炎病毒	聚合蛋白	NC_004102 NP_67149.1
Mycoplasma hyorhihis	P37	X14140 CAA32357.1

于不同蛋白质异构体相关的疾病的示例包括, 但不仅限于: 风湿性关节炎, 糖尿病, 急性骨髓白血病 (AML), 慢性淋巴细胞白血病 (CLL), 卵巢癌, 前列腺癌, 乳腺癌, 结肠癌, 胶质母细胞瘤, 黑色素瘤, 肺癌, 肾癌, 肌肉萎缩症, 神经精神异常, 常染色体多囊肾病 (ADPKD), 心血管疾病, 阿尔茨海默氏病。与肺癌和结肠癌相关的蛋白质异构体包括血管内皮生长因子 (V

EGF) 165 和 VEGF121 (见示例和图 5)。膀胱, 乳腺, 卵巢和肺癌相关的蛋白质异构体包括 HER2 异构体 1 和 HER 异构体 2(见示例)。与许多癌症和自身免疫疾病相关的蛋白质异构体包括 CD 44 异构体 CD44R1, CD44v5, CD44v7, CD44v3 (见示例和图 6)。

疾病相关的表位可以包含仅在疾病相关蛋白质异构体中表达的, 该外显子不在正常蛋白质中, 例如不与疾病相关的蛋白质中表达。这些多肽的氨基酸序列包含了疾病相关外显子结合点, 并在表 3 中列出。

表 3: 疾病相关多肽的氨基酸序列

多肽氨基酸序列	疾病相关异构体
DRARQE/NPCGPCSE(SEQ ID NO;2)	VEGF-165
DRARQE/KCDKPRR(SEQ ID NO;4)	VEGF-121
INCTHS/PLTS(SEQ ID NO;6)	HER-2 结合异构体 1
CTHSCV/ASPLT(SEQ ID NO;8)	HER-2 结合异构体 2
AHCIR/KPGDD(SEQ ID NO;10)	PSA-delta44
HCIR/KPGDDS(SEQ ID NO;11)	PSA-delta44
PQWVLTAHHCIR/KPGDDSSH(SEQ ID NO;13)	PSA-delta44
EQIEELKRQT/LPFKVVVIS(SEQ ID NO;15)	CEV14-PDGFR β
QVTVQSSPNF/TQHVREQLSV(SEQ ID NO;16)	FGF-8b
SERLQDFDKS/NPIVLRMMND(SEQ ID NO;17)	PSMA 异构体-2
(a.a646-666)	
GLPDRPFYR/HVIYAPSSH(N(SEQ ID NO;18)	PSMA 异构体-2
(a.a.680-700)	
NEATNITPKHN(SEQ ID NO;19)(a.a.47-57;在	PSMA 异构体-1
PSMA 中序列缺失)	
TRLLSSPFSI/VLPTVIICV(SEQ ID NO;20)(a.a	CD86(delta TM)
235-251)	

ACTCTTATAAATGTG/AGAAAAAATCCATAT (SEQ ID NO;21)	CD86(delta TM)
LLFLNTCLLN/VQPDPPELAVE (SEQ ID NO;22)	泌乳刺激素受体, 异构体 -2, (缺失 a.a 24 - 124, 101 个氨基酸)
APVLVALALIESGMKYEDAIQFIRQ(SEQ ID NO;23)(a.a 111-135)	PRL-3 异构体-1
AVHCVAGLGR/KRRGAINSKQ(SEQ ID NO;24)	PRL-3 异构体-2
CGGCCAGAGGCTGAG/ACTTTGGAATGACCA (SEQ ID NO;25)	胰岛素受体 (IR, CD220), 糖尿病中缺失外显子 17 (160bp)

“/”指外显子结合点处。

试剂也可以是一种蛋白质 (除了抗体以外), 一个多肽或其派生物或类似物, 如拟肽。鉴定例如蛋白质, 多肽或其他分子或重组分子等试剂的方法在此领域中是熟知的。

其他针对疾病相关蛋白质异构体的试剂包括那些抑制疾病相关蛋白质异构体的生产的物质。例证性的试剂包括小干扰 RNAs(siRNAs)或核酸, 反义核酸, 核酸酶, 三重核酸密码子, 显性负性突变, 小干扰 RNAs(siRNAs)或核酸, 反义核酸, 核酸酶, 三重核酸密码子可以针对那些编码只存在于疾病相关蛋白质中的配基的核酸序列, 该配基在同样基因编码的正常蛋白质中不存在。例如, 这些试剂可以针对一种核酸序列, 其中的外显子只存在于疾病相关蛋白质异构体中, 而不存在于正常蛋白中。它们也可以针对那些跨越了外显子-外显子结合点区域, 并特异对应于疾病相关蛋白质异构体的核酸序列。

siRNA 分子可以包含一种核酸序列，本质上由存在于与疾病相关的拼接变异体中的一个序列组成，但不存在于相同基因的与疾病无关的拼接变异体中。例如，siRNA 分子可以包含一种核酸序列包含或本质上由列出的 SEQ ID NOs: 1 (VEGF 165 特定核酸序列)，SEQ ID NOs: 3 (VEGF 121 特定核酸序列)，SEQ ID NOs: 5 或 7 (Her2 拼接变异体特定核酸序列) 序列组成。或任何编码多肽的核酸序列：SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 或 15-25。

siRNA 分子可能包含两条链，每条链原则上包含至少相互互补的核酸序列。这种序列原则上对应于疾病相关的拼接变异体序列，作为 siRNA “正义序列” 或更常见地作为 “正义目标序列” 被提及并且这种序列原则上作为补充序列，作为 siRNA “反义序列” 或 “反义目标序列” 被提及。正义和反义目标序列可以是 15-30 左右的连续分子长；19-25 左右的连续分子长；19-23 左右的连续分子长或大约 19, 20, 21, 22 或 23 左右分子长。正义和反义序列的长度由这种情况决定，具有上述长度的正义和反义靶标序列的 siRNA 能抑制目标基因的表达，更适宜地，并不显著引发宿主的干扰反应。

siRNA 的正链目标序列可以是至少与目标基因部分 “本质上相同” 或 “充分地相同”，如至少有 95%，98 或 99% 相同，提供的 siRNA 包含的序列可以干扰基因序列的表达。

正链目标序列的核酸碱基构成可以是约 50% 的腺嘌呤 (As) 和胸腺嘧啶脱氧核苷 (Ts) 和 50% 的胞嘧啶 (Cs) 和鸟嘌呤 (Gs)。可选地，碱基的构成中 Cs/Gs 的含量也可以至少为 50%，例如含 60%，70%，80% 的 Cs/Gs。相应地，正链目标序列的选择将基于核酸的碱基构成。关于 siRNA 对于目标核酸的可及性，以下的方面是应考虑到的，例如 Lee 等在 Nature Biotech.(2002)19:500 中

描述的。此项应用包括寡核酸链的使用，其作为探针可与目标蛋白互补，以测定底物的可及性，例如在细胞提取物中。当与寡聚核酸探针形成二聚体后，该底物对于 RNase H 敏感。因此，通过（例如 PCR）测定 RNase H 对于给定探针的敏感性，反映了选择位点的可及性，并可能体现相应的 siRNA 对于抑制目标基因转录能力的预测值。可以通过算法来鉴定引物，用于聚合酶链反应（PCR）方法或者用于鉴定反义寡聚核酸以鉴定首个目标序列。

正链和反链目标序列是合适地、高效互补的，siRNA 包含的两条序列可以抑制目标基因的表达，例如，可介导 RNA 干扰。作为示例，该序列在期望的条件下可以高效地互补从而形成杂交链，例如在一种细胞中。相应地，正义链和反义链目标序列可以至少为 95%，97%，98%，99% 或 100% 同一性，例如，至少有 5，4，3，2，1，或 0 个核酸的不同。

正义链和反义链靶序列是一些合适的序列，除了目标核酸或其互补链，它们可能不与其他序列相互作用。这一点可以通过以下例子证实，将选择的序列和其他目标细胞基因组的序列进行比较。序列比较可以通过此领域中的方法进行，例如运用 BLAST 运算方法，在此将进一步阐述。当然，还可以进行小范围的试验，以验证特异的首个目标序列可以特异抑制目标核酸，而非其他基因的表达。

除了正义链和反义链以外，siRNA 还可以包含其他序列。例如，siRNA 可以由两股 RNA 构成的 RNA 双链，其中至少一股链具有 3' 突出端。另一股链可以是平末端或具有突出端。当 RNA 分子由双链构成，并且每条链都包含突出端的情况下，两条链的突出端可以是同样长度或不同长度。在一特别情况下，siRNA 包含正义链和反义链序列，其每一条序列存在于一条 RNA 链上，并由约 15-30，例如 19-25 个成对核酸构成，并在 RNA 3' 端具有

1-3 个，更常见为 2 个核酸构成的突出端。为了进一步提高此发明涉及的 RNA 的稳定性，3' 突出端可以增加抵抗降解的能力。在某一方面，加入嘌呤核苷酸，例如腺嘌呤或鸟嘌呤，可以加强 RNA 的稳定性。可选地，通过嘧啶替换形成改良的类似物，例如将 2 个尿嘧啶核酸形成的 3' 突出端替换成 2' 胸腺嘧啶，可以增强 siRNA 的稳定性，并不会影响其效力。在组织培养液中，2' 羟基的缺失可以增强核酸突出端的稳定性。SiRNA 的 RNA 链拥有 5' 磷酸基和 3' 羟基。

在某一方面，siRNA 分子包含两条 RNA 链，形成双链结构。在另一情况，siRNA 分子由一条 RNA 链构成，形成发卡环，其中正义链和反义链靶序列进行杂交，并且在两个序列间是一段空间结构，有效地形成发卡结构环。空间序列可以包含任何长度的任何核酸聚合物，具有此序列的空间结构连接的两条互补寡聚核酸可以形成发卡结构，其中至少空间结构的一部分可在发卡的近端形成环结构。例如，空间序列可以是 3 到 30 个核酸，或 3 到 20 个核酸，或 5 到 15 个核酸，或 5 到 10 个核酸，或 3 到 9 个核酸。该序列可以包含任何序列，只要不干扰发卡结构的形成。特别地，空间序列最好不应包含第一或第二靶序列的重要同源物，因其可以干扰发卡结构的形成。空间序列也不宜于其他序列相似，例如将要引入核酸的细胞基因组序列，因这将在细胞中造成不良情况。

具备此领域中一般技术的人可以理解，当特指一个核酸时，例如 RNA，此 RNA 可以包含自然发生的核酸或其派生物，只要该派生物可以增强核酸的稳定性。任何派生物都是可接受的，只要该核酸能够具备所期望的功能。例如，siRNA 可以包含核酸派生物，只要该 siRNA 仍能够抑制靶基因的表达。

例如, siRNA 可以包含一个或多个改良的碱基, 和/或一个为了增强稳定性或其他原因而改良的主链。例如, 自然 RNA 的磷酸二酯键可以被改良, 从而至少包含氮或硫原子中的一种。此外, 磷酸二酯包含不常见的碱基, 如次黄(嘌呤核)苷, 或改良碱基如三苯甲基化碱基, 作为两个例子, 在此发明中也可以被使用。对 RNA 的大量的改良提供了许多有用的效果, 并作为此领域中的技术被熟知。这里使用的术语“siRNA”包含了如化学的, 酶的或代谢的 siRNA 的改良形式, 它们是从内源模板演化而来。

合成和纯化 siRNA 的方法是此领域中所熟知的。介导 siRNA 进入细胞的方法也是此领域中所熟知的。siRNA 可以通过细胞外的介导进入体腔, 空隙, 哺乳动物循环系统, 或通过口服。口服介入的方法包括直接将 RNA 和哺乳动物的食物混合, 或通过工程技术, 将经工程改造后可表达 RNA 的物种作为食物, 然后喂食给实验动物。例如, 食用细菌, 如乳酸乳球菌, 可以通过转化生产 dsRNA(见 WO93/17117, WO97/14806)。血管或血管外环境, 血液或淋巴系统即脑髓液也是注射 RNA 的位点。

siRNA 也可以在细胞内生产, 例如来源于编码 siRNAs 的载体。此类载体在以下有所论述, 例如, Paul et al (2002)Nature Biotechnology 29:505; Xia et al.(2002)Nature Biotechnology 20:1006; aeng et al. (2002)Mol.Cell 9:1327, thijn et al. (2002)Science 296:550; BMC Biotechnol. 2002 Aug 28; 2(1):15; Lee et al. 9 2002)Nature Biotechnology 19:500; mmccmcanus et al. 9 2002)RNA 8:842; Miyagishi et al. (2002) Nature Biotechnology 19:497; Sui et al. (2002)PNAS 99:5515; Yu et al. (2002)PNAS 99:6047; Shi et al. (2003)Trends Genet. 19():9; Gaudilliere et al. (2002)J Biol Chem. 277(48):45442; US2002/0182223; US 2003/0027783; WO 01/36646; WO03/006477。也有商业化的载体供应。例

如, pSilencer 可从 Gene Therayp Systems,Inc. 获得, pSUPER RNAi 系统可从 Oligoengine 获得。

反义链核酸, 核酸酶, 及三重核苷酸可以作为 siRNAs 作用于基因上的同样区域。制备, 纯化或介导这些核酸进入细胞或物体的方法是此领域所熟知的。

在某一方面, 一种试剂, 如一个小分子, 是通过合理的药物设计而被鉴定的。该方法使用三维坐标资料库, 其中包含蛋白质疾病相关异构体的至少一个配基, 如蛋白质疾病相关异构体特异的表位。合理的药物设计方案包括计算机相关的方法, 来鉴定结合蛋白质表位的试剂, 包括 (1) 提供一个计算机模型应用软件, 一套分子或分子复合物的结构坐标, 分子或分子复合物包含表位上的至少一个配基; (2) 提供一个计算机模型应用软件, 一套试剂或化学物的结构坐标; (3) 测定化学物是否可以结合分子或分子复合物。测定是否结合分子或分子复合物的更适宜的方法, 包括在化学物和分子或分子复合物之间提供一个合适的操作, 通过计算机分析合适的操作的结构, 以量化化学物和分子或分子复合物之间的关联程度。该方法包括对化学物文库的筛选。该方法还包括提供和合成化学物, 并分析其与表位的结合能力。也包括测定化学物是否是表位的抑制物或对抗物, 例如, 通过测定化学物能否治疗或预防表位相关的疾病。可选地, 该方法进一步包括了测定化学物是否适合用于诊断方法。

这里还提供了一种方法, 制备结合蛋白质的疾病相关表位的试剂, 例如, 通过计算机相关方法设计, 并通过化学或酶合成该化学物, 如上所述。

此发明还提供了一种设备, 其包含了分子或分子复合物和化学物间形成的复合物的表现情况, 如结合了的抗体。其中一种设

备是在其记忆中包括了复合物表现情况的计算机。在某一方面，计算机包含一个可机器识别的记忆存储介质，其包含的数据存储材料，是由机器识别的包含复合物的原子坐标的数据编码的。计算机可能还包括一个贮存处理机器可识别的数据指令的工作记忆，其主要处理设备连接工作记忆和用于处理代表复合物三维空间的机器可识别数据的机器可识别数据贮存介质。计算机也可以包含连接显示三维空间表示的中央处理设备的显示。

治疗的效用

那些这里描述的或这里描述得到的药剂，如抗体，可以用于疾病的治疗或防治，其中该试剂，例如抗体的存在对于一个特异分子是收益的。在有些情况下，抗体用来做目标药剂，如作为特殊细胞的毒素。例如，可以用特定绑定癌细胞表面的蛋白质的抗体释放的一种癌细胞毒素杀死癌细胞。在另外情况下，这种目标抗体不绑定存在于正常细胞的蛋白质。如，我们可以用绑定特定的疾病相关的蛋白质的异构体或拼接变异体的抗体，如在癌细胞中本质上仅存在于疾病的蛋白异构体。当然，如果异构体出现在位于身体不同部位的正常组织，抗体可能会绑定该异构体，假设目标抗体并不杀死所有正常组织的细胞。

除了在外显子中的疾病相关异构体的目标序列，药剂（如抗体）也可以绑定并不于疾病相关的在蛋白异构体中未发现的外显子-外显子结合点。药剂还可以绑定并不在正常的蛋白质异构体中发现的与疾病相关的三维表位。除了绑定线性表位的药剂之外（contiguous 氨基酸），基于蛋白质异构体的结晶数据，绑定三维空间表位不绑定线性表位的药剂也能被制备。

在某些情况下，单一的药剂如抗体，被注射入病人体。在另些情况下，众多的抗体被注射入病人体。抗体可以是针对相同抗

原的不同抗体，如抗原的不同的表位，或抗体可以是针对不同抗原的抗体。特定的治疗可以包括两种计划的结合。不同的抗体可以根据这里描述的方法来制备。如，与特定的疾病相关的蛋白质或编码蛋白质的核酸的众多多肽，能被注射入宿主动物来制备单克隆抗体。

这里也提供包含编码疾病相关蛋白质异构体的表位的核酸序列的 DNA 疫苗，这种疫苗可用于防治或治疗如癌的疾病。表位可以是 10-15 或 8-12 个来源于疾病相关蛋白质异构体的线性或非线性序列的短小多肽的氨基酸残余。表位可以横跨两个外显子的连接位点，这种连接点对与疾病相关的特殊蛋白质异构体是唯一的，并且不存在于正常主体或疾病主体的正常组织中发现的蛋白质异构体中。在某种特定情况下，DNA 疫苗编码两个或多个来源于单一蛋白质异构体的或多个蛋白质异构体的表位并且可以用于这样如特定的疾病指示的结合。DNA 疫苗也可以是与载体蛋白（如血清蛋白，SEAP 或其他分泌多肽或蛋白质）融合，编码特殊序列的表位，如编码 10-15 个氨基酸。DNA 疫苗可用于在这里进一步描述的疾病的防治与治疗。可仿效地，DNA 疫苗包括编码或鉴定这里描述的多肽的核酸序列。

被绑定的蛋白质异构体和相关的疾病在这里进一步被描述，如表 1, 2 和 3。

治疗性的抗体也可以绑定与蛋白质 G 连接的受体(GPCRS)。事实上，目前被标记的药物有 60% 绑定不同 GPCRS，并且目前没有有效的方法用于提高针对这些受体的抗体。因此，如这里所述，可制备位于那些受体胞外区域的短小序列抗体。

能被抗体绑定的致病的疾病和蛋白质的例子包括细菌，病毒，微等离子和寄生虫的感染。病毒包括流行性感冒病毒，人免

疫缺陷病毒 (HIV), 肝炎病毒 (如肝炎病毒 C) 和冠状病毒 (如严重急性呼吸道综合症 (SARS-CoV)), 引起肺结核的结核菌和引起疟疾的疟原虫。

抗体可以是多克隆的或单克隆的, 整个分子或分子片段。许多保留整个抗体绑定活性的抗体片段被典型地使用。这种抗体片段非限制性的包括 Fab, Fab₂,

Fab', Fab'₂ 和单链 Fv (scFv)。

裸露的或非络合的, 单克隆抗体能用于治疗。一种可能的机制是宿主效应机制的补充, 如抗体覆盖的肿瘤细胞单克隆抗体上具有的抗体依赖的细胞细胞毒性, 和噬菌作用/白细胞郁滞。多项在动物和病人中的研究表明了当单克隆抗体与白介素 2 结合并补充其功能效应时的抗肿瘤效应。一个示例是针对非何杰金淋巴瘤的抗 CD-20 抗体 rituximab。

通常, 另一种利用裸露单克隆抗体的机制策略是其对于恶性细胞生长和分化的抑制。这可以通过阻止肿瘤生长和分化刺激分子的通路而完成。示例包括 herceptin (赫赛汀) 和抗表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体 C-225。

抗体或其片段可以和一种检测标签相联合, 连接, 匹配, 结合, 或其他任何连接。与测定标签间的连接可以是共价或非共价的; 牢固的连接是较适宜的。检测标签可以直接与特异针对目标的抗体相连接, 或可以通过一个第二部分进行连接, 如通过特异针对一抗的二抗, 通过蛋白 A 或通过生物素/抗生物素蛋白或生物素/链酶亲和素型连接。在抗体特异结合目标的同时或随后, 检测标签可以被释放。这些检测标签包括放射同位素或放射核酸, 荧光基团, 化学发光染料, 生物发光复合物, 磁性微粒, 酶

标, 底物, 辅助因子, 抑制子和其他类似物。见, 指, 导这些标签使用的专利, U.S.Pat.Nos. 3,817,837;3,850,752;3,939,350; 3,996,345; 4,277,437;4,275,149;4,366,241。标签可以在物体中对细胞进行追踪和放射。可以使用非侵入技术进行检测的标签是更适宜的, 虽然内窥镜也可以用来测定被检测的标签的位置。

抗体可与其他功能部分结合。当与毒素, 药物或前药物如化学治疗试剂或放射核酸结合时, 该抗体可被称为“免疫毒素”。适合与抗体结合的试剂包括 capecitabine, mitoxantrone (米托蒽醌), aflatoxin, 阿霉素, 环磷酰胺, 5-氟尿嘧啶, irinotecan, 丝裂霉素, 紫杉醇, cisplatinum, 假单胞菌毒素, 金环蛇毒素, 蓖麻毒素。正如这里进一步阐述的, 这些试剂可以共价结合抗体, 或通过带有特异结合配对成分的连接基团进行连接, 如生物素/抗生物素, 生物素/链霉亲和素, 抗体/抗原。出于这些治疗目的, 多肽和其他试剂, 也可以和细胞毒素试剂和化学治疗试剂相结合, 而该多肽可与已经鉴定的目标物质之一, 如与一种疾病相关蛋白质异构体特异结合。

抗体与细胞毒素或标签之间的连接可以通过许多异种双功能交叉连接无物完成, 如双功能蛋白结合试剂, 如 N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) 丙酸盐 (SPDP), 碳化二亚胺戊二醛, 巯醇亚胺 (TT), imidoesters 双功能派生物 (如二甲基 adipimide HCL), 活性脂 (如二琥珀酰亚胺底物), 醛 (如戊二醛), 叠氮复合物 (如叠 (p-叠氮基苯甲酰基) 己二胺), 叠-重氮派生物 (如叠-(p-diazoniumbenzoyl)-ehtylenediamine), 二异氰酸化物 (如 2,6-二异氰酸甲苯), 和双-活性氮复合物 (如 1,5-双氮-2,4-二硝基苯)。例如, 蓖麻毒素抗毒素可以通过以下方法制备, Vitetta et al. Science, 238:1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methylaiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA)

是一种螯合试剂，可以将放射核酸与抗体相连接。见 WO94/11026。它们可以通过合成或重组制备。

抗毒素，包括单链分子，可以通过重组方法制备。许多生产抗毒素的方法是该领域中所熟知的，并且可以在“单克隆抗体-毒素结合：瞄准魔力子弹，” Thorpe et al. (1982) *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic Press, pp. 168 - 190 ; vitatta, *Science*(1987)238:1098-1104;和 Winter ,Milstein(1991), *Nature* 349:293-299.

许多细胞毒素试剂都适宜作为抗毒素被使用。毒素试剂包括，但不仅限于，放射核酸，如碘-131，钷-90，铯-137，铋-212；许多化学治疗试剂，如长春地辛，氨甲蝶呤，阿霉素，cisplatinum；细胞毒素蛋白如核糖体抑制蛋白，如美洲商陆抗病毒蛋白，假单胞菌外毒素 A，蓖麻毒素，白喉毒素，蓖麻毒素 A 链，等，或在细胞表面具备活性的试剂，如磷脂酶（例如，磷脂酶 C）。通常见，“Chimeric Toxins,” Olsnes 和 Phil *Pharmacother.*,15:355-381(1981);和“Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy,”等。Baldwin 和 Byers,pp.159-179, 224-266, Academic Press (1985)。

另一方面，抗体可以和一个受体连接（如链霉亲和素），形成抗体-受体联合体并施用于病人作为肿瘤预定位运用，随后用洗涤试剂从循环系统中除去未结合的联合体，然后施用与细胞毒素试剂（如放射核酸）结合的“配基”（如抗生物素蛋白）。抗体也可以与前药物激活酶连接，该酶可以使前药物（如肽基化学治疗试剂，见 WO81/01145）转变为具活性的抗肿瘤药物。见，例如，WO88/07378 和 U.S.Pat.No.4,975,278. 相应地，免疫联合体的镁成分可以包括一种酶，其能以上述过程作用于一种前药物，是其转变成更具活性的，细胞毒性的形式。此发明中的方法使用

的酶包括,但不仅限于,可将包含磷酸的前药物转变为自由药物的碱性磷酸酶;可将包含硫酸盐的前药物转变为自由药物的 arylsulfatase;可将非-毒性 5-氟胞嘧啶转变为抗肿瘤药物,5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨(基)酶;可将含多肽的前药物转变为自由药物的蛋白酶,如沙雷氏菌蛋白酶,嗜热菌蛋白酶,枯草杆菌蛋白酶,羧基肽酶,组织蛋白酶(如 B 和 L);丙氨酰羧基肽酶,具有转变含有 D-氨基酸替代物前药物的功能;碳水化合物-裂解酶如 β -半乳糖苷酶和神经氨(糖)酸苷酶,可将含糖基化前药物转变为自由药物; β -内酰胺酶,可以将来源于 β -内酰胺的药物转变为自由药物;青霉素酰胺酶,如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶,可以将药物的胺氮替换为苯氧乙酰或苯乙酰,从而转变为自由药物。可选地,具备酶活性的抗体,在此领域中称为“抗体酶”,可以用于将前药物转变为自由活性药物(见,例, Massey, Nature 328:457-458(1987)). 抗体-抗体酶联合体可以如此所述被制备,并用于将抗体酶介导入肿瘤细胞中。

利用此领域中熟知的技术,如使用异相双功能交联试剂,可以将酶共价地和抗体结合。可选地,可以通过此领域中熟知的重组 DNA 技术构建酶/抗体融合物,此发明中,该融合物至少包括抗体的抗原-结合区域及其连接的酶活性功能配基。(见,例, Neuberger et al., nature, 312:604-608(1984)).

这里论述的抗体和其他试剂可以用于病人的治疗,当其与化学治疗试剂或方法(如手术)联用时。“联用”并不需要同时使用。例如,绑定了疾病相关蛋白质表位的试剂可以同时或连续地与化学治疗试剂联用。在某一方面,每一试剂在任何一天都可以用于病人治疗。

肿瘤的化学治疗可以通过抑制 DNA 合成来完成,或直接地,或非直接地抑制三磷酸脱氧核糖核酸前体的生物合成,以阻止 D

NA 复制和随后的细胞裂解。(见,例如, Gilman et al., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eighth Ed.(Pergamom Press, New York, 1990)) .这些包含烷[烃]化剂的试剂,如亚硝基脲,抗-代谢物,氮甲蝶呤和羟基脲,和其他试剂,如 etoposides, camptothecins, bleomycin, doxorubicin, daunorubicin, 等,虽然不特异针对细胞周期,但由于其对于 DNA 复制的影响,都在 S 阶段杀死细胞。其他试剂,特别是秋水仙素和长春藤碱,如长春碱和长春新碱,影响微管的装配,并导致有丝分裂的停滞。化学治疗方案通常包括运用化学治疗试剂来提高治疗的效果。

在某种特定情况下,这里叙述的试剂将用于那些对于先前的治疗无反应或仅有有限反应的病人的治疗。例如,一种试剂可以用于一位肿瘤病人,化学治疗对于他没有产生有效的效果。这样,作为已经接受了化学治疗的病人,他可以应用这里论述的方法。

用此领域中的任何方法,可以将抗体介导入病人体内。通常包括静脉内,肌肉内,皮下的,肿瘤内的注射或灌输。抗体被特异设计成水溶形式,使其保持正常结构和抗体结合能力,并对于病人是药物可接受的。期望的形式是无菌的并无热源的。

抗体能以药物复合物形式施用于病人,其包含了一些具治疗效果的抗体和一个药物可接受的载体(附加的)和/或稀释液。例如,对于固体肿瘤,包含抗体的复合物可以注射入肿瘤、或肿瘤周围。对于血液肿瘤,如白血病,复合物可以输入血液或骨髓。作为治疗的抗体的起效量依赖于作治疗的疾病的类型,疾病的发展阶段和病人的年龄。

适合注射治疗的药物成分可以包含一种或多种抗体,其可与一种或多种药物可接受的成分相结合,如无菌等渗水或非水溶

液，分散剂，悬浮剂，或乳化剂，或在使用前能溶解入无菌注射剂或分散剂的注射无菌粉末，它们可以包含糖，乙醇，抗氧化剂，缓冲液，抑菌剂，溶质，提供与血液等渗的环境期望所易接受的，或混悬或增稠剂。这些成分也包括佐剂，如防腐剂，湿润剂，乳化剂和分散剂。为防止复合物受微生物影响，可以加入许多抗细菌和抗真菌试剂，如 paraben，三氯叔丁醇，苯酚，山梨酸，和类似物。在复合物中加入等渗试剂如糖，氯化钠，和类似物也是合适的。另外，通过加入可延迟吸收的试剂，如单硬脂酸铝和凝胶，来延长注射药物制剂的吸收时间。

在一些情况下，为了延长药物的作用时间，在皮下或肌肉内注射时，通过设计来减缓抗体的吸收。这可以通过使用具备低水溶性的结晶悬浮液体或无定形材料实现。随之，抗体的吸收速度依赖于分解速度，而其依赖于结晶的大小和结晶的形态。可选地，可以通过将抗体溶解或悬浮在油相中，来减缓注射-治疗抗体的吸收。

抗体的微囊形式包含于可生物降解的聚合物，如聚交酯-聚糖脂之中，可以制备出注射存储库形式。依赖于抗体结合聚合体的速度和使用的聚合体的自然特异性，抗体释放的速度可以被控制。其他生物可降解聚合物的例子包括聚原酸酯和聚合（酐）。也可以通过将人体组织可接受的脂质体或微乳液包裹抗体，可以制备注射存储库形式。

作为预防应用，包含抗体或其鸡尾酒的成分可以给予受到疾病发展阶段的病人的治疗，以提高病人的抵抗力。其使用量定义为“疾病预防起效量”。在使用中，精确的用量依赖于病人的健康程度和综合免疫水平，通常在每剂量 0.1 到 100mg 的范围内，特别是每人 1 到 10mg。

在一些治疗方法中，与单独使用抗体相比，第二种试剂（例如，白介素）以可以激活细胞效应的用量，与抗体联合使用作为治疗，可增强对于恶性细胞的细胞毒作用。白介素-2 作为治疗的剂量可以是约 500000U/kg.

除了使用抗体之外，其他治疗方法包括给予病人一种试剂。至少使用这些试剂的意义与使用抗体相同。例如，和抗体结合表位的过程向类似，一条多肽可以被设计并结合于一个表位。结合疾病相关蛋白质的异构体或表位的多肽或其他分子，siRNA,反义链，核酸酶，或三重核酸或特异针对疾病相关蛋白质异构体的显性阴性突变，都可以给予患有疾病的病人治疗。包含这些试剂的药物复合物的治疗方法，包括了这里叙述的抗体的，和其他在此领域所熟知的方法。

这里叙述的方法，特别是表位的筛选方法，也可以被用于鉴定用于疫苗使用的多肽和其编码核酸。在某一方面，针对疾病如癌症或一种病源疾病的 DNA 疫苗，通常基于对目标疾病蛋白编码基因上表位筛选的结果。例如，大量覆盖了整个目标蛋白的多肽，或其编码的核酸，与载体相融合，给予宿主动物治疗后以激发其体内的免疫反应。通过测定被免疫动物的抗血清，可以鉴定表位多肽的免疫原性。装载表位多肽的融合蛋白，或目标异构体全长蛋白的一个片段，可以通过上述的方法用于检测抗血清的滴度。基于这些结果可以设计疫苗。特别地，疫苗可以包含多肽或其编码核酸，它们在宿主动物中已经生产出抗体。特别地，针对某多肽的高滴度血清表明此多肽具有特别好的免疫原性。几种高免疫原性的表位，无论其来源于单一目标蛋白异构体或几种蛋白异构体，都可以被联合选择并应用，作为针对一种给定疾病的联合疫苗。

为了测定 DNA 疫苗的效力，该疫苗可以对实验动物模型进行免疫。在此领域中，针对许多疾病，例如针对人类肿瘤的动物模型是熟知的。在一个例证中，无论在接受 DNA 疫苗免疫之前或之后，该动物将被接种人肿瘤。通过实验动物中肿瘤的减小情况可以反映该疫苗的保护性或积极效果。不受特异过程的限制，肿瘤-特异的 DNA 疫苗可以激发任一或全部身体的免疫反应，例如，细胞免疫和体液免疫。

这里也提供了一种制备疫苗，如 DNA 疫苗的方法，以应对某疾病，包括(1)鉴定疾病相关蛋白的一个或多个表位，(2)制备包含一个或多个表位的氨基酸序列的多肽，或将编码一个或多个表位的核酸序列插入一个表达载体。在目标蛋白中鉴定表位的放债将在此进一步叙述。“疾病相关蛋白”或“与疾病相关的蛋白”指某些蛋白，通过作用其本身可以进行疾病治疗或预防。

包含至少一个疾病相关蛋白表位，如一个外显子结合点表位的多肽，及其编码的核酸，也可以被用于治疗的目的。多肽本质上也可以由疾病相关蛋白表位构成。该表位可以是已经鉴定为疾病相关的表位。多肽可以用于，例如，疫苗应用，来保护病人，以使特异表位相关的疾病不再发展。多肽也可以用于疾病患者的治疗，例如，癌症。这样，如上所述，多肽可以和 DNA 疫苗以类似的方法使用。

多肽可以是 5 到 30，5 到 20，5 到 15，或 5 到 10 个氨基酸长度。多肽也可以是 50 个氨基酸长度，或至少 40，30，20，10 个氨基酸长度。多肽可以包含单个或多个表位，如 2，3，5 个表位。

示范的多肽包含一个表位，如疾病相关表位，其包含在 SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 或 15-25 中的任一个。表位

可以包含 SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 或 15-25 中任何一个中的外显子结合点区。多肽可以由, 或本质上由一个表位或一个外显子-连接构成。多肽可以包含或本质上由蛋白质上的表位或外显子-连接构成, 此多肽不包含全长蛋白质。

多肽可以有自然-发生的氨基酸, 或非-自然发生的氨基酸构成。可以是 D-或 L-型氨基酸。多肽的虚拟缩氨酸也可以被使用。例如, 多肽可以包含反相氨基酸。反相氨基酸可以是 D 镜像体。不同的氨基酸可以是一个内在多肽, 一个附属多肽或一个转运基团。一个内在的多肽可以包含果蝇触角足蛋白 (ant) 的 42-58 位氨基酸。

多肽可以包含在治疗或药物成分中, 包括, 例如, 治疗性的可接受载体。一个或多个多肽, 或其派生物或类似物可包括在内。其他分子或试剂也可以包含在复合物中, 如提高免疫应答的试剂。

其他成分, 例如, 治疗成分, 可以包含至少一条核酸, 其编码疾病相关蛋白质异构体, 例如, 一个疾病相关的外显子结合点表位。一个核酸的例证是这里所叙述的编码一条多肽的核酸。

一条核酸可以是 15 到 120, 或 15 到 90, 或 15 到 60, 15 到 45 个核苷酸长度。一条核酸也可以至多为 120, 90, 60, 45 核苷酸长度, 核酸可以是 DNA 或修改的 DNA。核酸的例证包括, 由 SEQ IN Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 12 所列出的核酸序列本质上构成或构成的。在特定情况下, 核酸可以包含或本质上由 SEQ IN D Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 12 中列出的核酸序列构成, 附带条件为这些核酸不包含 SEQ IND Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 12 中自然-发生的全长蛋白质。

核酸可以进一步包含一个或多个转录控制元素，如启动子和终止子。核酸可以是载体，如表达载体。载体可以是病毒载体，如腺病毒或腺病毒相关病毒（AAV）载体。这里还包括了含有所述核酸的细胞。

根据标准药物操作，在药物成分中，单独或和药物可接受载体，赋形剂或稀释液联合使用的治疗方法，可以对哺乳动物，尤其是人类进行治疗。可以直接对组织，如肿瘤组织进行治疗。可选地，治疗方法可以通过口服或注射进行，包括静脉内，肌肉内，腹膜内，皮下，直肠和局部。

治疗方法的毒性和治疗性效果可以通过在细胞培养或实验动物中进行标准药物程序来测定，例如，测定 LD_{50} (50% 数量死亡的剂量) 和 ED_{50} (50% 产生疗效的剂量)。毒性和疗效剂量间的比例作为治疗指标，可以表示为 LD_{50}/ED_{50} 的比值。治疗指标较大的试剂是跟合适的。当具有毒副作用的试剂被使用时，应当注意设计一种药物传输系统，使试剂准确针对所影响的组织位置，例如，使对于正常细胞的潜在的损害最小化，从而减少副作用。

在细胞培养方法和动物研究中得到的数据可以用于人的剂量范围。治疗的剂量最好处在包括 ED_{50} 并毒性较少或无毒性的循环浓度范围之内。在此范围内，依赖于剂量形式和治疗的路径，用药剂量可以有较大变动。

对于任何治疗而言，治疗的有效剂量可以通过最初的细胞培养实验进行评估。如同在细胞培养中测定，通过动物实验可以得到剂量，将反映包括 IC_{50} 的循环血浆浓度范围（例如，获得半数最高抑制症状的实验治疗浓度）。这些信息可以用于测定人类精确的起效剂量。

治疗所用的剂量将依赖于所治疗的疾病的程度或情况和其他临床因素，例如人类或动物的重量和情况及药物治疗的路径。当对人类和动物进行治疗时，治疗用量可以从 0.5mg/千克到 500 mg/千克之间。其他的用量范围可以是 1mg/千克到 100mg/千克之间；2mg/千克到 50mg/千克之间；2mg/千克到 10mg/千克之间。依赖于治疗药物在特殊动物和人类中的半衰期，治疗的频率可以是每天数次或每周一次。应用于人类和动物的治疗方法也将需要了解。单独或联合进行治疗的方法，可以同时地或长时期地进行。

包含药剂的药物成分可以制成适合口服的形式，例如，药片，片剂，止咳糖，水或油溶液，分散粉末或颗粒，乳剂，硬或软胶囊，糖浆或西也剂。药物生产商可以通过此领域中熟知的技术制备用于口服的药物成分，该药物成分可以选择包含以下试剂：甜味剂，调味剂，增色剂，保存剂，以使药物更优化及具备良好口感。无毒的适合于药物制备的药物可接受赋形剂，可与活性成分（例如治疗剂）联合包含在药片中。这些赋形剂可以是例如，惰性稀释液，如碳酸钙，碳酸钠，乳糖，磷酸钙或磷酸钠；粒化和崩解剂，如微结晶纤维素，交联羧甲基纤维素钠，玉米淀粉，或褐藻酸；结合剂，如淀粉，凝胶，聚乙烯吡咯烷酮或阿拉伯树胶，和润滑剂，例如，硬脂酸酶，硬脂酸和云母。药片可以是裸露的或用此领域中熟知的技术进行包裹，以避免药物的不好的口感，或减缓其在肠胃中的分解和吸收速度，使其发挥长期的稳定效力。例如，水溶性的味道屏蔽材料如 hydroxypropylmethl-纤维素或羟丙基纤维素或缓释试剂如乙基纤维素，乙酸丁酸纤维素都可以被使用。

为制备药剂的口服形式，可以将药物活性成分与固体稀释剂混合并包裹在硬凝胶胶囊中，固体稀释剂的例子有，碳酸钙，磷酸钙或瓷土，或将活性成分与水溶性载体混合并包裹在软凝胶胶

囊，水溶性载体的例子有聚乙二醇或油介质，例如花生油，石蜡油，或橄榄油。

水悬液中可以包含与赋形剂混合的活性材料，使之适合于水悬液的生产。这些赋形剂是悬浮试剂，例如羧甲基纤维素钠，甲基纤维素，羟基甲基纤维素-纤维素，藻酸钠，聚乙烯吡咯烷酮，黄芪树胶，阿拉伯树胶；分散剂或湿润剂是自然发生的磷脂，例如卵磷脂，或氧杂环烷脂肪酸的浓缩产物，例如聚氧乙烯硬脂酸盐，或带有长链脂肪乙醇的环氧乙烷浓缩产物，例如 heptadec aethylene-oxycetanol，或来源于脂肪酸的部分醇化的环氧乙烷浓缩产物，及己糖醇，例如聚氧乙烯山梨醇油基化合物，或来源于脂肪酸和己糖醇酐的部分醇化的环氧乙烷浓缩产物，例如聚乙烯山梨聚糖油酸基化合物。水悬液还可以包含一种或多种防腐剂，如乙烷基，或 n-苯基 p-羟基安息香酸盐，一种或多种增色剂，一种或多种调味剂，及一种或多种甜味剂，如蔗糖，糖精或天(门)冬氨酸苯丙氨酸甲酯。

油悬液可以通过将活性药物成分悬浮在植物油中制成，例如花生油，橄榄油，芝麻油或椰子油，或在矿物油如液体石蜡中制成。油悬液可以包含增稠剂，如蜂蜡，硬石蜡或十六(烷)醇。上述的甜味剂，及调味剂也可以加入其中使其具备较好的口感。这些成分可以通过加入抗-氧化剂，如丁基化羟基苯甲醚或 α -维生素 E。

分散粉末和颗粒通过水的加入，使之适合于水悬液的制备，并提供了与分散剂或湿润剂，悬浮剂和一种或多种防腐剂相混合的活性成分。合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂的例子在前面已经叙述了。更多的赋形剂，如甜味剂，调味剂和着色剂，也可以使用。这些成分可以通过加入抗-氧化剂如抗坏血酸维生素 C 进行储存

药物成分可以以水包油乳剂的形式存在，油相可以是植物油，如橄榄油或落花生油，也可以是矿物油，如液体石蜡或其混合物。合适的乳化剂可以是自然-产生的磷脂，如大豆卵磷脂，从脂肪酸或己糖醇酐中提取的脂或偏脂，如山梨聚糖油酸基化合物，和上述的偏脂与环氧乙烷的浓缩产物，如聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯。乳剂也可以包含甜味剂，调味剂，防腐剂和抗氧化剂。

糖浆和西也剂可以制成甜味剂，例如丙三醇，丙烯丙三醇，山梨(糖)醇或蔗糖。这些配方也可以包含缓和剂，防腐剂和调味剂和着色剂，抗氧化剂。

药物成分可以是注射的无菌水溶液形式。可接受的介质和溶剂是水，Ringer's 液，等渗氯化钠溶液。

无菌的注射制备物也可以是水包油微乳液，其中活性药物成分溶解在油相中。例如，活性药物成分首先溶解在大豆油和卵磷脂混合物中。油相被加入水和甘油混合物，并被制成微乳化剂。

注射溶液或微乳化剂可以通过局部注射进入病人的血液。可选地，通过某种方法给予病人溶液或微乳化剂的治疗，使其混合物保持一个恒定的循环浓度，将是更合适的。为了维持这一恒定浓度，可以使用一种连续的静脉内输送装置。示例是 Deltec CA DD-PLUS™ 5400 型静脉内泵。

药物成分可以制成注射水剂或油悬液用于肌肉内或皮下注射。这种悬液可以通过此领域中熟知的方法，利用上述合适的分散剂或湿润剂，悬浮剂，进行配制。这种无菌的注射制备物可以是一种含有无菌注射溶液或悬液的非-毒素、注射-可接受的稀释液或溶剂，例如含有溶液的 1, 3-丁烷二醇。此外，无菌，不易挥发的油通常作为溶剂或悬液被使用。基于此目的，任何柔和的

不挥发油都可以被利用，包括合成的单一或二倍甘油酯。此外，脂肪酸乳油酸也可用于注射剂的制备。

治疗剂也可以药栓形式在直肠内给予药物治疗。这些成分可以通过将药物和合适的非-刺激性赋形物混合制备，该赋形物在通常温度下是固态，而在直肠内的温度下是液态，从而在直肠内可融化并释放药物。这些材料包括可可油，甘油凝胶，氢化蔬菜油，大量不同分子量的聚乙二醇和聚乙二醇脂肪酸脂混合物。

基于局部应用，包含治疗剂的奶油，油膏，凝胶剂，溶剂或悬浮剂等都可以被使用。对于此应用的目的，局部应用包括口腔洗剂和含漱剂。

治疗剂可以鼻内吸收的形式给予治疗，通过合适的鼻内介质或输送装置在鼻内使用，或通过使用这些此领域熟知的透皮小片进行透皮吸收。为了以这种透皮输送系统形式进行治疗，治疗的剂量，当然，在剂量控制过程中其持续性要强于间歇性。

这里使用的术语“成分”规定为包括一种产物，其包含了特定有效成分的特定数量，如同任何产品，其源于特定量的特定的有效成分相结合的，直接或非直接的结果。

一种试剂或成分，例如，一种治疗成分，可以被包含在一种装置中，使试剂可以用于病人的治疗，例如，注射器，支架或管子。

治疗方法可以包括给予病人注射药剂，该病人被检测为患有特殊的疾病相关蛋白质异构体引起的疾病。此方法包括首先对病人进行诊断，确定其是否患有可用这里所述方法进行治疗的疾病，例如，癌症。包括这里所述的诊断方法都可以被使用。

诊断应用

抗体可以应用于诊断方法，以测定例如，在特定细胞，组织，或体液如血清中的抗原。在某一方面，一份生物学样本从患有或怀疑患有疾病（例如癌症）的病人身上获得，并且测定一种或多种癌症相关蛋白质异构体的含量。癌症相关的异构体的含量可以表明病人患有或容易患有癌症。相似地，抗体可以用于测定在病人中或体内任何组织或细胞或样本中病原体的含量。

诊断方法包括使用两种或更多抗体，其中，例如，仅有一种抗体特异针对疾病-相关蛋白，对于特异地清楚地诊断是不充足的。可选地，一种抗体可以是特异针对疾病相关蛋白质异构体的，第二种抗体是特异针对蛋白质正常形态的，其由编码疾病相关蛋白质异构体的同一基因编码。在样本测定中，两种或更多抗体可以同时或分别使用。

在“治疗剂”章节中叙述的同样的抗体和其他试剂可以用于诊断实验。

此领域中许多熟知的诊断实验技术都可以使用，如在异源或同源情况下操作的竞争结合实验，直接或非直接三明治实验和免疫沉淀反应。（Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. 1987）pp.147-158）。免疫组化测定，例如，对于外科手术样本或活组织的检查也可以进行。此外，在体外实验中，如 MRI，CAT 扫描，PET 扫描，电子束 CT 扫描，SPECT 成像， γ 成像，血管造影术，血管内超声，正电子放射 X 线断层摄影术（Renee M Moadel, et al., Breast Cancer Res 2003, 5:R199-R205），放射性或荧光检测也可以是诊断方法的一部分。

「以用检测基因

如上所述,用于诊断实验的抗体或其他试剂,可检测的信标记。该检测基因应该能够产生,无论直接或间接性同位素,如号。例如,检测基因可以是上述的一种,一种放射性物,如异硫氰 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , 一种荧光或化学发光复合物性磷酸酶, β 酸荧光素,若丹明,或虫萤光素,或一种酶,如抗体于检测基-半乳糖苷酶或辣根过氧(化)物酶。此领域中任何及 Hunter et 团连接的方法都可以应用,包括这里叙述的方法 Ministry, 13:1014 al., Nature, 144:945(1962); David et al., Biochem J; Nygren, J. (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40:219(1982). Histochem. and Cytochem., 30:407(1982)中所论述的

诊断方法包括将病人的生物样品与一种试剂向连接,该试剂可以特异结合疾病相关蛋白质异构体,随后测定该试剂和生物样品的结合情况,当结合发生时则表明存在疾病相关蛋白质异构体,因此病人患有或容易患有该疾病。

测定样品(例如,一种生物样品如体液或细胞或组织)中抗原的存在情况的方法,包括(1)在适合抗原/抗体复合物形成的条件下,将样本与固相连接,该固相表面包含固定于特定位置的抗体集合物,(2)在适合抗原/抗体复合物形成的条件下,将融合蛋白集合物与固相表面相连,每一个融合蛋白包含一个与固相表面的抗体特异接合的多聚肽,以及一个载体蛋白,(3)测定固相表面的每一个特定位置上载体蛋白的存在情况,若在某特定位置有载体蛋白的缺失或减少,则表明具有在特定位置与抗体接合的抗原,即表明样本中具有抗原。该固相表明可以是抗体阵列,其已有商业化供给或通过此领域中的方法制备。固相表明可以包含至少 10, 100, 1000, 10000, 100000 个抗体。具备该领域技术的人员可以识别其他与抗体相似的可以使用的分子,假若该分子可特异结合蛋白质。图 3 显示了一个示范性的方法。固相表明可

以包含特异结合一种抗原，或不同抗原的抗体的集合物。抗原可以是疾病-相关抗原，如癌-相关或病原体相关抗原。

除抗体之外，其他分子或分子复合物或试剂，只要其特异识别疾病相关蛋白质异构体，都可以用于诊断实验。示例的试剂，如多肽或其派生物，例如，虚拟缩肽，在这里将进一步叙述。

抗体也可以用于从重组细胞培养物中或自然源中亲和纯化抗原。此过程中，运用此领域中熟知的方法，抗体将被固定在合适的支持物上，如交联葡聚糖树脂或滤纸。固定的抗体接着与含有将纯化抗原的样品接触，接着该支持物用合适的溶液冲洗，去除样品中除抗原外的其他与固定抗体结合的物质。最后，该支持物用另一种冲洗，使抗原从抗体上释放出来。

Kits

目前的发明提供了试剂盒，如诊断和治疗试剂盒，以及制备和/或筛选抗体的试剂盒。例如，一种试剂盒可以包含一种或多种成分，例：一种药物成分，如这里所述以及可选地说明其用途。试剂盒还可以包含一种或多种装置来完成这些成分的治疗过程。例如，一种试剂盒主体可以包含一种药物成分和注射器或导管，以完成药物对于肿瘤的动脉直接注射。在另一方面，试剂盒主体可以包含预-灌装安瓿瓶，其中含有蛋白异构体的特异抗体结构，可选地做成药物或冻干形式，并通过输送装置使用。

试剂盒可以包含带有标签的容器。合适的容器包括，瓶子，小瓶，和试管。容器可以由多种材料制备成，如玻璃或塑料。容器可以装有一种药物成分，包括有效进行治疗或非-治疗应用的抗体，如上所述。容器上的标签能表明药物成分的特殊治疗或非-治疗应用，也可以表明其体内或体外的应用方法，如上所述。

试剂盒可以包含一种上述的容器，和一种或多种其他容器，其含有适合于商业或使用者的标准的材料，如缓冲液，稀释液，滤器，针，注射器，和含有说明书的包装盒。

一个示范性的试剂盒是治疗或诊断试剂盒，其包含一种包括了外显子结合点的的表位的抑制子，例如，该表位被鉴定为疾病相关的表位。

该发明已经进行了概括性的描述，参考下列的例子将加深对此发明的理解，这些例子仅出于说明此发明的某一特定方面和情况的目的，并非意图限定该发明。

范例

例 1: 制备特异结合 VEGF 的疾病相关异构体的单克隆抗体

血管内皮生长因子 (VEGF) 已经被鉴定为在生理和病理情况下介导血管生成的一种重要的因素。人 VEGF 基因由 8 个外显子构成，对应于下列 cDNA 的核酸序列，其来源于 GenBank Accession Number P15692 和 NM_003376, 及专利 SEQ ID NO:14.。SEQ ID NO:14 编码的氨基酸序列在 SEQ ID NO:15 列出。

人 VEGF 编码序列

	<u>NT</u>	
外显子 1:	1-66	23aa
外显子 2:	67-108	14aa
外显子 3:	109-315	69aa
外显子 4:	316-392	25aa

外显子 5:	393-42	10aa
外显子 6:	423-542	40aa
外显子 7:	543-674	44aa
外显子 8:	675-69	24aa
总和		231aa
信号肽		26aa

通过选择性拼接,至少4中 VEGF 的异构体被发现,分别包含 206, 189, 165, 121 氨基酸,表示为 VEGF206, VEGF189, VEGF165, VEGF121。形态 206, 165, 121 的阵列在图 4 中表示。4 种异构体共享 VEGF 同样的 155 个 N 末端氨基酸残基。在生物药效率上不同于 VEGF165 和 VEGF121,较长的形态 (VEGF206 和 VEGF189) 是矩阵绑定,较短的形态是可自由扩散的。这些形态表达的位置是多变的: VEGF165 和 VEGF121 在肺癌和结肠中表达量显著提高; VEGF189 在正常肺中表达; VEGF206 作为 precursor,在任何组织中都难以检测到 (Houck K A, Ferrara N, Winer j, Cachianes G, Li B, Leung DW., Mol Endocrinol.1991 Dec; 5(12)L1806-14)。VEGF165 和 121 的核酸序列由基因库提供,编号为 AAM0318/AF486837-1 和 AAF19659/AF214570-1。

绑定在癌组织中表达的两种异构体的单克隆抗体的制备见下面 (图 5)。两种异构体的每种核酸序列将与编码鼠 SEAP 的核酸序列一起插入表达载体。对 VEGF-165 特异抗体而言, 5' cta tct cgt tct gtt ctt tta ggg aca ccc gga acg agt ctc 3' (SEQ ID NO:1) 编码下列的氨基酸序列: DRARQE/NPCGPCSE (SEQ ID NO:2); 对 VEGF-121 特异抗体而言, 5' cta tct cgt tct gtt ctt ttt aca ttc ggc tcc gcc 3' (SEQ ID NO:3) 编码下列氨基酸序列: DRARQE/KCDKPRR (SEQ ID NO:4)。/代表 2 个外显子之

间的连接位点。融合蛋白或是 SEAP 多肽或是多肽 SEAP。这些序列的变异体也能被使用，如环绕外显子结合点的但是与所列序列有一或更多个氨基酸不同的序列，尤其是在 N 和 C 末端。异构体的氨基酸序列在图 4 列出，任何环绕在外显子结合点的序列能被使用，如包括在连接处末端或其他位置的 3, 5, 7, 10 或 15 个氨基酸序列。

根据标准步骤载体被转染入鼠。选则性地，包括连接 SEAP 的 VEGF 多肽的蛋白质能在 COS 细胞中合成并注射入老鼠。抗-血清滴度在免疫后一到两周时被测定。具有高滴度的动物被用于分离脾细胞。用脾细胞和骨髓瘤细胞纸币肿瘤细胞将根据标准操作程序进行。

利用高通量 ELISA 方案，存在于杂交瘤细胞培养上清的抗体将被测定其抗原结合情况。相应地，96 孔培养板中杂交瘤的培养上清被转移至 96-孔或 384-孔化验板，其中预先-包含了羊抗-鼠 IgG(或兔抗-鼠)。在 384-孔规格下，每次实验可使用 5 到 10 微升的培养基。在室温下孵育 30 分钟后，化验板将被冲洗去除未结合的抗体。SEAP-表位融合蛋白将被加入孔中并在室温下孵育 30 分钟。未结合的 SEAP-表位融合将被清洗。抗原-抗体结合情况将通过加入碱性磷酸酶底物并在检测器上测量进行测定。高 SEAP 活性表明存在识别 VEGF 表位的抗体。

抗-VEGF165 和-121 抗体将通过标准免疫化学方法证实，如利用重组 VEGF-165 和 VEGF-121 蛋白进行的 Western blotting。抗 VEGF-165 预期将特异结合 VEGF-165，但不与其他 VEGF 异构体结合，如 VEGF-121 和全长 VEGF206。抗 VEGF-121 预期将特异结合 VEGF-121，但不与其他 VEGF 异构体结合。

这些抗体可用于测定从培养的肿瘤细胞系中,如非-小细胞肺癌,和冰冻肿瘤组织切片中制备的蛋白质样品,例如,通过肿瘤组织冰冻切片上的免疫-组化实验。根据先前叙述的程序,抗体的生物学活性可以通过内皮细胞中有丝分裂发生实验测定(Hiratska et al. Proc Natl. acad. Sci. WSA. 95:9349-54(1998),Shibuya et al. Curr Top In Micro &Immu. 237:59-83(1999))。具有中和活性的抗-VEGF165或-121抗体可以抑制内皮细胞中VEGF介导的功能。

例 2: 制备包含 VEGF 疾病相关异构体的 DNA 疫苗

带有上述的特异表位序列的针对 VEGF165 和 VEGF121 的 DNA 疫苗可以在实验动物中开展。原则上,编码特异表位的寡聚核酸将被插入表达载体,并在体内产生分泌多肽。表达载体可以包含一个编码序列,其编码的分泌蛋白作为一种载体蛋白可以促进表位多肽的表达和/或分泌。载体蛋白的选择可以是血清白蛋白或其他分泌多肽,或细胞因子。针对给定疾病的 DNA 疫苗,例如结肠癌,其构成的表位序列可以来源于 VEGF-165,寡聚核酸: 5' gat aga gca aga caa gaa aat ccc tgt gg cct tgc tca gag 3'(SEQ IN NO:1)编码以下氨基酸序列: DRARQE/NPCGPCSE(SEQ ID NO:2); 以及来源于 VEGF-121,寡聚核酸: 5' gat aga gca aga caa gaa aaa tgt gac aag ccg agg cgg3'(SEQ ID NO:3)编码以下氨基酸序列: DRARQE/KCDKPRR(SEQ ID NO:4), "/" 表示两个外显子之间的结合位点。这些不同的序列也可以被使用,例如: 编码连续氨基酸的序列形成的外显子结合点,但与这里所列的序列有一个或多个核酸的不同,特别是在 5' 和 3' 末端。人 VEGF 的核酸序列见 SEQ ID NO:14(GenBank Accession No. NM_003376),及任何编码包含外显子结合点连续氨基酸的序列都可以使用,例如,在连接的一端或另一端包含 10, 20, 30, 或 50 个核苷酸的序列。

如前所述，针对癌症相关 VEGF 异构体的 DNA 疫苗作为血管生成抑制子可以在动物模型中进行试验。特别地，这些抗-VEGF 异构体疫苗将用于给定的人肿瘤转移试验，针对 VEGF165 和 121 异构体中的任一种或两种进行治疗。理想地，这些抗-VEGF 异构体疫苗可以用于早期诊断肿瘤病人的治疗，通过抑制血管生成因子如 VEGF165 和/或 VEGF121 的活性，而阻止肿瘤的扩散。

例 3: 特异结合 ErbB-2 疾病相关异构体的单克隆抗体的制备

大量的抗- ErbB-2 (鼠蛋白) 或抗-Her2 (人蛋白) 抗体已经被分离，其中一种抗体，4D5，是一种鼠科抗体，其用于产生治疗性的人源化形式抗体 herceptin。这中源化的抗体已经证明其治疗转移性乳腺癌中的效果 (Schaller et al. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 125:520(1999) 和 Shak et al. Herceptin Multinational Investigator Group. Semin Oncol. 26:71(1999))。然而，既然 c-erbB-2 也显示了在其他组织中的生理功能，针对 HER2 抗体的副作用包括心力衰竭，其是许多死亡的起因 (Horton et al. Cancer Control. 9(6):499-507(2002))。据报道，4D5 的表位存在于胞外区域 (ECD) 529-627 氨基酸之间 (Sliwowski et al. Semin Oncol. 26:60(1999))。Her2 (或 HER2) 的核酸序列在 GenBank 编号 P04626 和 NM_004448 及有提供。SEQ IN NO:16 编码的氨基酸序列罗列于 SEQ IN NO:17。

针对 Her2 疾病相关异构体单克隆抗体的制备方法如下。为了针对特殊的在其 ECD 缺少 16 个氨基酸的 HER2-拼接异构体 (氨基酸 634 到 649) (“拼接”或“HER2 拼接异构体 1”)，下列序列将被作为多肽使用：INCTHS/PLTS (SEQ ID NO:6) (“/”表示外显子结合点)。为了针对特异的在 ECD 缺失 12 个氨基酸的 HER2 (ECD DEL) 异构体 (氨基酸 636 到 647) (“ECD DEL”或“HER2 拼接异构体 2”)，下列序列将被作为多肽使用：CTHSCV/A

SPLT(SEQ ID NO:8) (“/” 表示外显子结合点)。这些序列的变异体也能被使用,如包含一个外显子结合点,但与这里所列的序列,特别是在 N-和 C-末端有一个或多个氨基酸不同的序列。人 HER2 的氨基酸序列罗列于 SEQ ID NO:17 并在图 8 中表示,并且包含一个外显子结合点的序列都可以被使用,例如,包含结合点的某端或另一端的 3, 5, 7, 10, 或 15 个氨基酸的序列。

如上所述,单克隆抗体可以按照 VEGF 抗体的方法得到,无论通过杂交瘤技术或噬菌体显示技术。

HER2 多肽的抗体将被测试其针对 HER2 异构体的特异性:抗体将预期结合两种表达两升高的异构体,而不结合野生型或其他 HER2 异构体。抗-HER2(拼接)和抗-HER2(ECD DEL)将在来源于乳腺癌的肿瘤组织芯片和非-小细胞肺癌细胞上进行试验。这些肿瘤细胞表达 HER2(拼接)和/或 HER2(EDC DEL),通过免疫-组化试验测定抗体的正信号。正常组织入心脏组织应该不表达这些 HER2 的变异的异构体。HER2 异构体的特异抗体的中和活性可以根据先前所述的测序,在动物模型中进行检测。(Schaller et al . J. Cancer Res .Clin . Oncol. 125:520 (1999))。

例 4: ErbB-2 疾病相关异构体 DNA 疫苗的制备

针对 HER2(拼接)和/或 HER2(EDC DEL)的 DNA 疫苗可以用于乳腺癌和卵巢癌的治疗和预防,如同上述的抗-VEGF 异构体疫苗。包含以下核酸序列的 DNA 载体将被制备: 5' atc aac tgc acc cac tcc/cct ctg acg tcc3'(SEQ IN NO :5)(HER2 拼接)和 5' tgc acc cac tcc tgt gtg /gcc agc cct ctg acg3'(SEQ ID NO:7)(HER2 ECD DEL)。这些序列的变体也可以使用,例如,编码连续氨基酸的一个外显子结合点的序列,但与这里所列的序列有一个或多个核苷酸的不同,特别在 5' 和 3'端。人 HER2 核酸序列

罗列于 SEQ ID NO:14(GenBank 编码 NM_004448), 任何包含一个外显子结合点的编码连续氨基酸的序列都可以使用, 例如, 在 junction 某端或另一端包含 10, 20, 30, 50 个核苷酸的序列。

此疫苗可以在抑制的动物模型中试验。

例 5: 特异结合前列腺特异抗原 (PSA) 的前列腺癌相关异构体的单克隆抗体的制备

PSA, 其由 hKLK3 基因编码, 是用于针对和监控前列腺癌病人最有力的工具。然而, 它的弱点在大量报道中已有体现 (见, 例如, Stamey.T.A.N Eng.J. Med,317:909-917(1987);Arai); Arai,., J. Urol., 144:1415-1419(1990);Catalona, W.J., Eng.J.med,324:1156-1161(1987);Heuze-Vourc'h,N,Eur J Biochem 268(16);4408-13(2001);tanaka, T, Cancer Res. 60(1):56-9(2000); Heuze Vourc'h, N, Eur J Biochem 270(4):706-14(2003)).作为差别抗原最佳特点, PSA 不是一种肿瘤-特异蛋白。PSA 作为与几种分子混合的形式存在于血清中。hKLK3 基因的选择性拼接导致在良性和恶性前列腺肿瘤中自由-PSA 的分子异质性。特定的拼接形式显示了其于前列腺癌的密切相关性。(见 Tanaka.T, Cancer Res. 60(1):56-9(2000);Heuze-Vourc'h,N,Eur J Biochem 270(4):706-14(2003))。这些 PSA 的分子类型可用于更好的诊断产品 and 治疗药物。

特异识别一种特殊的 PSA 异构体的单克隆抗体可通过下列方法制备。该 PSA 异构体是选择性拼接的结果, 其从成熟 PSA 上缺失了 44 个氨基酸 (氨基酸 45-88)。异构体 PSA-delta44 的表位设计如下所示。为了绑定 PSA-delta44 的异构体, 缺失的结合点生成序列作为多肽 AHCIR/KPGDD(SEQ ID NO:10)或 HCIR/KPGDDS(SEQ ID NO:11)被使用 (“/” 代表结合点)。多肽与载体蛋

白结合。结合的多肽通过杂交瘤技术或抗菌素显示技术作为免疫原产生单克隆抗体。

此外，编码上述氨基酸序列的核酸将合成：5' gcc cac tgc atc agg/agg cca ggt gat gac 3'(SEQ ID NO:9)。合成的寡核酸链被绑入表达载体产生带有 PSA-delta44 的表位的融合蛋白和载体蛋白。这样的表达载体表达的融合蛋白，如多肽 (HCIR/KPG DDS) -SEAP 能用于免疫老鼠产生杂交瘤。特异识别 PSA-delta44 的单克隆抗体根据阳性绑定免疫原多肽 (HCIR/KPGDDS) -SEAP 被筛选。SEAP 读出器提供被抗原绑定的 PSA-delta44 表位的阳性测定。

这一领域的技术人员认可这些序列的变体能被使用，如基于人 PSA 的核酸和氨基酸序列，其 PSA 的人 mRNA 的原始序列的基因库的编码为 X05332 和蛋白质的原始序列为 CAA28947。这些序列分别列在 SEQ ID NO:18 和 19 中。

绑定 PSA 的特异抗体的异构体由前列腺癌病人的血清样本被确认。从健康组获得的血清样本用于作为阴性对照。

正常的 PSA(划线部分表示在 PSA-delta44 中缺失的范围。)

PSA-delta44(黑体字母表示绑定 PSA-delta44 的抗体的表位。字母间的 "/" 表示缺失后的间接位点。)

例 6: 特异绑定 PDGFR β 融合蛋白的单克隆抗体的制备

这个例子描述了另一种 ADAPI 抗体，其作为一种治疗性的试剂能用于绑定引起恶性疾病的蛋白质突变体，这些恶性疾病与编码血小板起源生长因子 β 受体，PDGFR β 的基因中染色体的移位有关。染色体移位，包括 band 5q31-35 (其属于 PDGFR β 基

因定位处) 出现某些血液类疾病。如 PDGFR β /HCMOGT-1t(5; 17)(q33; p11.2) 的移位被发现出现在青少年脊髓(炎)白血病中 (Morerio C.等人, 2004 Cancer Research 64: 2649-51)。在急性骨髓性的白血病 (AML) 中, 作为染色体移位 (q33; q32) 的结果, PDGFR β 与 CEV14 形成融合蛋白 (Abe A 等人, 1997 Blood 90: 4271-77)。

CEV14-PDGFR β 融合基因被发现与攻击性白血病进程相关, 这就表明这种融合蛋白有致瘤的潜能。

CEV14-PDGFR β , t(5; 14)(q33; q32) 融合基因在 AML 病人的复发阶段出现, 这种病人在起始的诊断中只有单独的染色体移位, t(7; 11)。在 CEV14-PDGFR β , t(5; 14)(q33; q32) 融合基因出现后, 标记嗜曙红血球增多的白血病进程, 结合染色体治疗是无效的。DNA 分析显示, 在 5q33 位置 PDGFR β 基因的重组并不出现在初始诊断中。这种移位导致异常的转录, 使在 5q33 的 PDGFR β 基因与位于 14q32 的新基因 CEV14 融合。

用于治疗 and 诊断的 ADAPI 抗体, 能基于围绕在融合基因 CEV14-PDGFR β , t(5; 14)(q33; q32) 的断裂点的编码序列生长。这种抗体特异识别融合蛋白 CEV14-PDGFR β 能对 AML 有特异的治疗作用。针对 CEV14-PDGFR β 抗体的抗原决定簇序列可以用 30 个邻近的核酸序列或 10 个包括下列融合蛋白 CEV14-PDGFR β 区域的断裂点序列的氨基酸序列构建。(融合蛋白的断裂点用 “/” 表示):

在 CEV14 和 PDGFR β 融合蛋白之间的核酸序列 (CEV14 在左或上游或 5' 末端; PDGFR β 在右或下游或 3' 末端):

AGA AGA AAT TGA AGA ACT TAA AAG ACA AA/C
CTT GCC CTT TAA GGT GGT GGT GAT CTC(SEQ ID NO:
14)

在 CEV14 和 PDGFR β 融合蛋白之间的氨基酸序列: EQIEE
LKR QT/LPFKVVVIS (SEQ ID NO: 15)

目前的发明将需要试验, 除非有细胞生物学, 细胞培养, 分子生物学, 转基因生物学, 微生物学, DNA 重组和免疫学的常用技术指导并且在这一领域的技术之内。这些技术都在文献有所描述。见如, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed.by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press :1989) ;*DNA Cloning* , Volumes I and II (D.N.Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J.Gait ed, 1984); Mullis et al. U.S. Patent No: 4683195; *Nucleic Acid Hybridization* (B.D.Hames&S.J.Higgins eds.1984); *Culture Of Animal Cells* (R.I.Freshney, Alan R.Liss,Inc.,1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B.Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise , *Methods In Enzymology* (Academic Press , inc., N.Y.);*Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*(J.H. Miller and M.P.Calos eds ., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology* , Vols.154 and 155 (Wu et al.ed.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker , eds., Academic Press , London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volume I-IV(D.M.Weir and C.C.Blackwell, eds.,1986); *Antibodies : A Laboratory Manual* , and *Animal Cell Culture* (R.I.Freshney, ed. (1987), *Manipulating the Mouse Embryo* , (Cold Spring Harbor Laboratory Press , Cold Spring Harbor , N.Y.,1986) .

参考整合

所有这里涉及的出版物，基因库编码和专利作为整体被参考整合，正如通过参考整合每一单独的出版物或专利被特定地和单独地阐明。以免争议，目前的应用，包括定义都受控制。

等效性

尽管主体发明的特定方面已经被讨论，但是上述特例只具阐述性并无限制性。发明的许多变更将明显变为这一领域的技术，通过上面说明的评论和下面的声明。发明的整个范围和整个等效性的范围和说明书及变异体将通过参考声明被定义。

<110> 常小迦
 <120> 基于 VEGF, HER-2, PSA 蛋白质异构体的用于诊断和治疗的疾病的特效试剂
 <130> IGA-003.25
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.0

<210> 14
 <211> 1723
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1039)..(1686)

<400> 14
 tcgcgagggc ttggggcagc cgggtagctc ggaggtcgtg gcgctggggg ctagcaccag 60
 cgctctgtcg ggagggcagc cggtttaggtg gaccggtcag cggactcacc ggccaggggc 120
 ctcggtgctg gaatttgata ttcattgatc cgggttttat ccctcttctt ttttcttaaa 180
 catttttttt taaaactgta ttgtttctcg ttttaattta tttttgcttg ccattcccca 240
 cttgaatcgg gccgacggct tggggagatt gctctacttc cccaaatcac tgtggatttt 300
 ggaaaccagc agaaagagga aagaggtagc aagagctcca gagagaagtc gaggaagaga 360
 gagacggggt cagagagagc gcgcgggcgt gcgagcagcg aaagcgacag gggcaaagtg 420
 agtgacctgc ttttgggggt gaccgccgga gcgcggcgtg agccctcccc cttgggatcc 480
 cgcagctgac cagtcgcgct gacggacaga cagacagaca ccgccccag ccccagctac 540
 cacctctcc ccggccggcg gcggacagtg gacgcggcgg cgagccgcgg gcagggggccg 600
 gagcccgcgc ccggaggcgg ggtggagggg gtcggggctc gcggcgctgc actgaaactt 660
 ttcgtccaac ttctgggctg ttctcgcttc ggaggagccg tggctccgcgc gggggaagcc 720
 gagccgagcg gagccgcgag aagtgctagc tcgggcccgg aggagccgca gccggaggag 780
 ggggaggagg aagaagagaa ggaagaggag agggggccgc agtggcgact cggcgctcgg 840
 aagccgggct catggacggg tgaggcggcg gtgtgcgcag acagtgctcc agccgcgcgc 900
 gctccccagg ccctggcccc ggcctcgggc cggggaggaa gagtagctcg ccgaggcgcc 960
 gaggagagcg ggccgcccc aagcccagc cggagagggg gcgcgagccg cgccggcccc 1020

ggtcgggcct ccgaaacc atg aac ttt ctg ctg tct tgg gtg cat tgg agc	1071
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser	
1 5 10	
ctt gcc ttg ctg ctc tac ctc cac cat gcc aag tgg tcc cag gct gca	1119
Leu Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala	
15 20 25	
ccc atg gca gaa gga gga ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aag ttc	1167
Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe	
30 35 40	
atg gat gtc tat cag cgc agc tac tgc cat cca atc gag acc ctg gtg	1215
Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val	
45 50 55	
gac atc ttc cag gag tac cct gat gag atc gag tac atc ttc aag cca	1263
Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro	
60 65 70 75	
tcc tgt gtg ccc ctg atg cga tgc ggg ggc tgc tgc aat gac gag ggc	1311
Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly	
80 85 90	
ctg gag tgt gtg ccc act gag gag tcc aac atc acc atg cag att atg	1359
Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met	
95 100 105	
cgg atc aaa cct cac caa ggc cag cac ata gga gag atg agc ttc cta	1407
Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu	
110 115 120	
cag cac aac aaa tgt gaa tgc aga cca aag aaa gat aga gca aga caa	1455
Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln	
125 130 135	
gaa aaa aaa tca gtt cga gga aag gga aag ggg caa aaa cga aag cgc	1503
Glu Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg	
140 145 150 155	
aag aaa tcc cgg tat aag tcc tgg agc gtt ccc tgt ggg cct tgc tca	1551
Lys Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Pro Cys Gly Pro Cys Ser	
160 165 170	
gag cgg aga aag cat ttg ttt gta caa gat ccg cag acg tgt aaa tgt	1599
Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys	
175 180 185	
tcc tgc aaa aac aca gac tcg cgt tgc aag gcg agg cag ctt gag tta	1647
Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu	
190 195 200	
aac gaa cgt act tgc aga tgt gac aag ccg agg cgg tga gccgggcagg	1696
Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg	
205 210 215	
aggaaggagc ctccctcagg gtttcgg	1723

<210> 15

<211> 215

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 15

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
 35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
 130 135 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
 145 150 155 160

Lys Ser Trp Ser Val Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His
 165 170 175

Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr
 180 185 190

Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys
 195 200 205

Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 210 215

<210> 16

<211> 4530

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (151)..(3918)

<400> 16
 aattctcgcgag ctcgctcgacc ggtcgcgcgag ctcgagggtc gacgagctcg agggcgcgcg 60

cccggccccc acccctcgca gcaccccgcg ccccgcgccc tcccagccgg gtccagccgg 120

agccatgggg ccggagccgc agtgagcacc atg gag ctg gcg gcc ttg tgc cgc 174
 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg
 1 5

tgg ggg ctc ctc ctc gcc ctc ttg ccc ccc gga gcc gcg agc acc caa 222
 Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln
 10 15 20

gtg tgc acc ggc aca gac atg aag ctg cgg ctc cct gcc agt ccc gag 270
 Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu
 25 30 35 40

acc cac ctg gac atg ctc cgc cac ctc tac cag ggc tgc cag gtg gtg 318
 Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val
 45 50 55

cag gga aac ctg gaa ctc acc tac ctg ccc acc aat gcc agc ctg tcc 366
 Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser
 60 65 70

ttc ctg cag gat atc cag gag gtg cag ggc tac gtg ctc atc gct cac 414

Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val	Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His		
		75					80					85					
aac	caa	gtg	agg	cag	gtc	cca	ctg	cag	agg	ctg	cgg	att	gtg	cga	ggc		462
Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly		
	90					95				100							
acc	cag	ctc	ttt	gag	gac	aac	tat	gcc	ctg	gcc	gtg	cta	gac	aat	gga		510
Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly		
105				110				115							120		
gac	ccg	ctg	aac	aat	acc	acc	cct	gtc	aca	ggg	gcc	tcc	cca	gga	ggc		558
Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly		
			125					130						135			
ctg	cgg	gag	ctg	cag	ctt	cga	agc	ctc	aca	gag	atc	ttg	aaa	gga	ggg		606
Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly		
		140					145					150					
gtc	ttg	atc	cag	cgg	aac	ccc	cag	ctc	tgc	tac	cag	gac	acg	att	ttg		654
Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Asn	Pro	Gln	Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu		
	155					160						165					
tgg	aag	gac	atc	ttc	cac	aag	aac	aac	cag	ctg	gct	ctc	aca	ctg	ata		702
Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His	Lys	Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile		
	170					175				180							
gac	acc	aac	cgc	tct	cgg	gcc	tgc	cac	ccc	tgt	tct	ccg	atg	tgt	aag		750
Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	Cys	His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys		
185				190				195						200			
ggc	tcc	cgc	tgc	tgg	gga	gag	agt	tct	gag	gat	tgt	cag	agc	ctg	acg		798
Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser	Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr		
			205					210						215			
cgc	act	gtc	tgt	gcc	ggt	ggc	tgt	gcc	cgc	tgc	aag	ggg	cca	ctg	ccc		846
Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro		
		220					225						230				
act	gac	tgc	tgc	cat	gag	cag	tgt	gct	gcc	ggc	tgc	acg	ggc	ccc	aag		894
Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys		
	235					240						245					
cac	tct	gac	tgc	ctg	gcc	tgc	ctc	cac	ttc	aac	cac	agt	ggc	atc	tgt		942
His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	Leu	His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys		
	250					255					260						
gag	ctg	cac	tgc	cca	gcc	ctg	gtc	acc	tac	aac	aca	gac	acg	ttt	gag		990
Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu	Val	Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu		
265				270				275						280			
tcc	atg	ccc	aat	ccc	gag	ggc	cgg	tat	aca	ttc	ggc	gcc	agc	tgt	gtg		1038
Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val		
			285					290						295			

act gcc tgt ccc tac aac tac ctt tct acg gac gtg gga tcc tgc acc Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr 300 305 310	1086
ctc gtc tgc ccc ctg cac aac caa gag gtg aca gca gag gat gga aca Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr 315 320 325	1134
cag cgg tgt gag aag tgc agc aag ccc tgt gcc cga gtg tgc tat ggt Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly 330 335 340	1182
ctg ggc atg gag cac ttg cga gag gtg agg gca gtt acc agt gcc aat Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn 345 350 355 360	1230
atc cag gag ttt gct ggc tgc aag aag atc ttt ggg agc ctg gca ttt Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe 365 370 375	1278
ctg ccg gag agc ttt gat ggg gac cca gcc tcc aac act gcc ccg ctc Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu 380 385 390	1326
cag cca gag cag ctc caa gtg ttt gag act ctg gaa gag atc aca ggt Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly 395 400 405	1374
tac cta tac atc tca gca tgg ccg gac agc ctg cct gac ctc agc gtc Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val 410 415 420	1422
ttc cag aac ctg caa gta atc cgg gga cga att ctg cac aat ggc gcc Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala 425 430 435 440	1470
tac tcg ctg acc ctg caa ggg ctg ggc atc agc tgg ctg ggg ctg cgc Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg 445 450 455	1518
tca ctg agg gaa ctg ggc agt gga ctg gcc ctc atc cac cat aac acc Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr 460 465 470	1566
cac ctc tgc ttc gtg cac acg gtg ccc tgg gac cag ctc ttt cgg aac His Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn 475 480 485	1614
ccg cac caa gct ctg ctc cac act gcc aac cgg cca gag gac gag tgt Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys 490 495 500	1662
gtg ggc gag ggc ctg gcc tgc cac cag ctg tgc gcc cga ggg cac tgc Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys 505 510 515 520	1710

tgg ggt cca ggg ccc acc cag tgt gtc aac tgc agc cag ttc ctt cgg Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg	1758
525 530 535	
ggc cag gag tgc gtg gag gaa tgc cga gta ctg cag ggg ctc ccc agg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg	1806
540 545 550	
gag tat gtg aat gcc agg cac tgt ttg ccg tgc cac cct gag tgt cag Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln	1854
555 560 565	
ccc cag aat ggc tca gtg acc tgt ttt gga ccg gag gct gac cag tgt Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys	1902
570 575 580	
gtg gcc tgt gcc cac tat aag gac cct ccc ttc tgc gtg gcc cgc tgc Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys	1950
585 590 595 600	
ccc agc ggt gtg aaa cct gac ctc tcc tac atg ccc atc tgg aag ttt Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe	1998
605 610 615	
cca gat gag gag ggc gca tgc cag cct tgc ccc atc aac tgc acc cac Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His	2046
620 625 630	
tcc tgt gtg gac ctg gat gac aag ggc tgc ccc gcc gag cag aga gcc Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala	2094
635 640 645	
agc cct ctg acg tcc atc gtc tct gcg gtg gtt ggc att ctg ctg gtc Ser Pro Leu Thr Ser Ile Val Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val	2142
650 655 660	
gtg gtc ttg ggg gtg gtc ttt ggg atc ctc atc aag cga cgg cag cag Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln	2190
665 670 675 680	
aag atc cgg aag tac acg atg cgg aga ctg ctg cag gaa acg gag ctg Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu	2238
685 690 695	
gtg gag ccg ctg aca cct agc gga gcg atg ccc aac cag gcg cag atg Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met	2286
700 705 710	
cgg atc ctg aaa gag acg gag ctg agg aag gtg aag gtg ctt gga tct Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser	2334
715 720 725	
ggc gct ttt ggc aca gtc tac aag ggc atc tgg atc cct gat ggg gag Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu	2382
730 735 740	

aat gtg aaa att cca gtg gcc atc aaa gtg ttg agg gaa aac aca tcc Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser 745 750 755 760	2430
ccc aaa gcc aac aaa gaa atc tta gac gaa gca tac gtg atg gct ggt Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly 765 770 775	2478
gtg ggc tcc cca tat gtc tcc cgc ctt ctg ggc atc tgc ctg aca tcc Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser 780 785 790	2526
acg gtg cag ctg gtg aca cag ctt atg ccc tat ggc tgc ctc tta gac Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp 795 800 805	2574
cat gtc cgg gaa aac cgc gga cgc ctg ggc tcc cag gac ctg ctg aac His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn 810 815 820	2622
tgg tgt atg cag att gcc aag ggg atg agc tac ctg gag gat gtg cgg Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg 825 830 835 840	2670
ctc gta cac agg gac ttg gcc gct cgg aac gtg ctg gtc aag agt ccc Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro 845 850 855	2718
aac cat gtc aaa att aca gac ttc ggg ctg gct cgg ctg ctg gac att Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile 860 865 870	2766
gac gag aca gag tac cat gca gat ggg ggc aag gtg ccc atc aag tgg Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp 875 880 885	2814
atg gcg ctg gag tcc att ctc cgc cgg cgg ttc acc cac cag agt gat Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp 890 895 900	2862
gtg tgg agt tat ggt gtg act gtg tgg gag ctg atg act ttt ggg gcc Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala 905 910 915 920	2910
aaa cct tac gat ggg atc cca gcc cgg gag atc cct gac ctg ctg gaa Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu 925 930 935	2958
aag ggg gag cgg ctg ccc cag ccc ccc atc tgc acc att gat gtc tac Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr 940 945 950	3006
atg atc atg gtc aaa tgt tgg atg att gac tct gaa tgt cgg cca aga Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg 955 960 965	3054

ttc cgg gag ttg gtg tct gaa ttc tcc cgc atg gcc agg gac ccc cag Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln 970 975 980	3102
cgc ttt gtg gtc atc cag aat gag gac ttg ggc cca gcc agt ccc ttg Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu 985 990 995 1000	3150
gac agc acc ttc tac cgc tca ctg ctg gag gac gat gac atg ggg Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly 1005 1010 1015	3195
gac ctg gtg gat gct gag gag tat ctg gta ccc cag cag ggc ttc Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe 1020 1025 1030	3240
ttc tgt cca gac cct gcc ccg ggc gct ggg ggc atg gtc cac cac Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly Gly Met Val His His 1035 1040 1045	3285
agg cac cgc agc tca tct acc agg agt ggc ggt ggg gac ctg aca Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr 1050 1055 1060	3330
cta ggg ctg gag ccc tct gaa gag gag gcc ccc agg tct cca ctg Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu 1065 1070 1075	3375
gca ccc tcc gaa ggg gct ggc tcc gat gta ttt gat ggt gac ctg Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu 1080 1085 1090	3420
gga atg ggg gca gcc aag ggg ctg caa agc ctc ccc aca cat gac Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp 1095 1100 1105	3465
ccc agc cct cta cag cgg tac agt gag gac ccc aca gta ccc ctg Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu 1110 1115 1120	3510
ccc tct gag act gat ggc tac gtt gcc ccc ctg acc tgc agc ccc Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro 1125 1130 1135	3555
cag cct gaa tat gtg aac cag cca gat gtt cgg ccc cag ccc cct Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro 1140 1145 1150	3600
tcg ccc cga gag ggc cct ctg cct gct gcc cga cct gct ggt gcc Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala 1155 1160 1165	3645
act ctg gaa agg gcc aag act ctc tcc cca ggg aag aat ggg gtc Thr Leu Glu Arg Ala Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val 1170 1175 1180	3690

gtc aaa gac gtt ttt gcc ttt ggg ggt gcc gtg gag aac ccc gag	3735
Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu	
1185 1190 1195	
tac ttg aca ccc cag gga gga gct gcc cct cag ccc cac cct cct	3780
Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro	
1200 1205 1210	
cct gcc ttc agc cca gcc ttc gac aac ctc tat tac tgg gac cag	3825
Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln	
1215 1220 1225	
gac cca cca gag cgg ggg gct cca ccc agc acc ttc aaa ggg aca	3870
Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr	
1230 1235 1240	
cct acg gca gag aac cca gag tac ctg ggt ctg gac gtg cca gtg	3915
Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro Val	
1245 1250 1255	
tga accagaaggc caagtccgca gaagcctga tgtgtcctca gggagcaggg	3968
aaggcctgac ttctgctggc atcaagaggt gggagggccc tccgaccact tccaggggaa	4028
cctgccatgc caggaacctg tcctaaggaa ccttccttcc tgcttgagtt cccagatggc	4088
tggaaggggt ccagcctcgt tggaagagga acagcactgg ggagtctttg tggattctga	4148
ggcctgccc aatgagactc taggggtccag tggatgccac agcccagctt ggcctttcc	4208
ttccagatcc tgggtactga aagccttagg gaagctggcc tgagagggga agcggccta	4268
agggagtgtc taagaacaaa agcagcccat tcagagactg tcctgaaac ctagtactgc	4328
cccccatgag gaaggaacag caatggtgtc agtatccagg ctttgtacag agtgcctttc	4388
tgtttagttt ttactttttt tgttttgttt ttttaaagac gaaataaaga cccaggggag	4448
aatgggtgtt gtatggggag gcaagtgtgg ggggtccttc tccacacca ctttgtccat	4508
ttgcaaatat attttgaaa ac	4530

<210> 17

<211> 1255

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 17

Met	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	Arg	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu
1				5					10					15	

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
 85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
 115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
 130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
 145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
 165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
 180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
 195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
 210 215 220

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
 225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
260 265 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
340 345 350

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
355 360 365

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
370 375 380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
385 390 395 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
405 410 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
 485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
 500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 545 550 555 560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
 625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Val Ser
 645 650 655

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
 660 665 670

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
 675 680 685

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
690 695 700

Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
705 710 715 720

Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
725 730 735

Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
740 745 750

Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
755 760 765

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
770 775 780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
785 790 795 800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
805 810 815

Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
820 825 830

Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
835 840 845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
850 855 860

Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
865 870 875 880

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
885 890 895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
900 905 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
 915 920 925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
 930 935 940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
 945 950 955 960 965

Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
 965 970 975

Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
 980 985 990

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
 995 1000 1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
 1010 1015 1020

Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
 1025 1030 1035

Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
 1040 1045 1050

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
 1055 1060 1065

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
 1070 1075 1080

Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
 1085 1090 1095

Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
 1100 1105 1110

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
 1115 1120 1125

Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
 1130 1135 1140

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
 1145 1150 1155

Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Ala Lys Thr Leu
 1160 1165 1170

Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
 1175 1180 1185

Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
 1190 1195 1200

Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
 1205 1210 1215

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
 1220 1225 1230

Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 1235 1240 1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255

<210> 18

<211> 1466

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (44)..(829)

<400> 18

agccccaagc ttaccacctg caccgggaga gctgtgtgtc acc atg tgg gtc ccg
 Met Trp Val Pro
 1

55

gtt gtc ttc ctc acc ctg tcc gtg acg tgg att ggt gct gca ccc ctc	103
Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly Ala Ala Pro Leu	
5 10 15 20	
atc ctg tct cgg att gtg gga ggc tgg gag tgc gag aag cat tcc caa	151
Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu Lys His Ser Gln	
25 30 35	
ccc tgg cag gtg ctt gtg gcc tct cgt ggc agg gca gtc tgc ggc ggt	199
Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala Val Cys Gly Gly	
40 45 50	
gtt ctg gtg cac ccc cag tgg gtc ctc aca gct gcc cac tgc atc agg	247
Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Ile Arg	
55 60 65	
aac aaa agc gtg atc ttg ctg ggt cgg cac agc ctg ttt cat cct gaa	295
Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu Phe His Pro Glu	
70 75 80	
gac aca ggc cag gta ttt cag gtc agc cac agc ttc cca cac ccg ctc	343
Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe Pro His Pro Leu	
85 90 95 100	
tac gat atg agc ctc ctg aag aat cga ttc ctc agg cca ggt gat gac	391
Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg Pro Gly Asp Asp	
105 110 115	
tcc agc cac gac ctc atg ctg ctc cgc ctg tca gag cct gcc gag ctc	439
Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu Pro Ala Glu Leu	
120 125 130	
acg gat gct gtg aag gtc atg gac ctg ccc acc cag gag cca gca ctg	487
Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln Glu Pro Ala Leu	
135 140 145	
ggg acc acc tgc tac gcc tca ggc tgg ggc agc att gaa cca gag gag	535
Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile Glu Pro Glu Glu	
150 155 160	
ttc ttg acc cca aag aaa ctt cag tgt gtg gac ctc cat gtt att tcc	583
Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His Val Ile Ser	
165 170 175 180	
aat gac gtg tgt gcg caa gtt cac cct cag aag gtg acc aag ttc atg	631
Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val Thr Lys Phe Met	
185 190 195	
ctg tgt gct gga cgc tgg aca ggg ggc aaa agc acc tgc tgc ggt gat	679
Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr Cys Ser Gly Asp	
200 205 210	
tct ggg ggc cca ctt gtc tgt aat ggt gtg ctt caa ggt atc acg tca	727
Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln Gly Ile Thr Ser	
215 220 225	

tgg ggc agt gaa cca tgt gcc ctg ccc gaa agg cct tcc ctg tac acc 775
 Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro Ser Leu Tyr Thr
 230 235 240

aag gtg gtg cat tac cgg aag tgg atc aag gac acc atc gtg gcc aac 823
 Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr Ile Val Ala Asn
 245 250 255 260

ccc tga gcacccctat caaccccca ttgtagtaaa cttggaacct tggaaatgac 879
 Pro

caggccaaga ctcaagcctc cccagttcta ctgaccttg tccttaggtg tgaggtccag 939

ggttgctagg aaaagaaatc agcagacaca ggtgtagacc agagtgttc ttaaattgtg 999

taattttgtc ctctctgtgt cctggggaat actggccatg cctggagaca taccactcaa 1059

tttctctgag gacacagata ggatggggtg tctgtgttat ttgtggggta cagagatgaa 1119

agaggggtgg gatccacact gagagagtgg agagtgacat gtgctggaca ctgtccatga 1179

agcactgagc agaagctgga ggcacaacgc accagacact cacagcaagg atggagctga 1239

aaacataacc cactctgtcc tggaggcact gggaaaccta gagaaggctg tgagccaagg 1299

agggagggtc ttcctttggc atgggatggg gatgaagtaa ggagagggac tggaccccct 1359

ggaagctgat tcactatggg gggaggtgta ttgaagtcct ccagacaacc ctcagatttg 1419

atgatttcct agtagaactc acagaaataa agagctgtta tactgtg 1466

<210> 19

<211> 261

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 19

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
 65 70 75 80

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
 85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
 100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
 115 120 125

Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
 130 135 140

Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
 165 170 175

His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
 180 185 190

Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
 195 200 205

Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln
 210 215 220

Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro
 225 230 235 240

Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr
 245 250 255

Ile Val Ala Asn Pro
 260

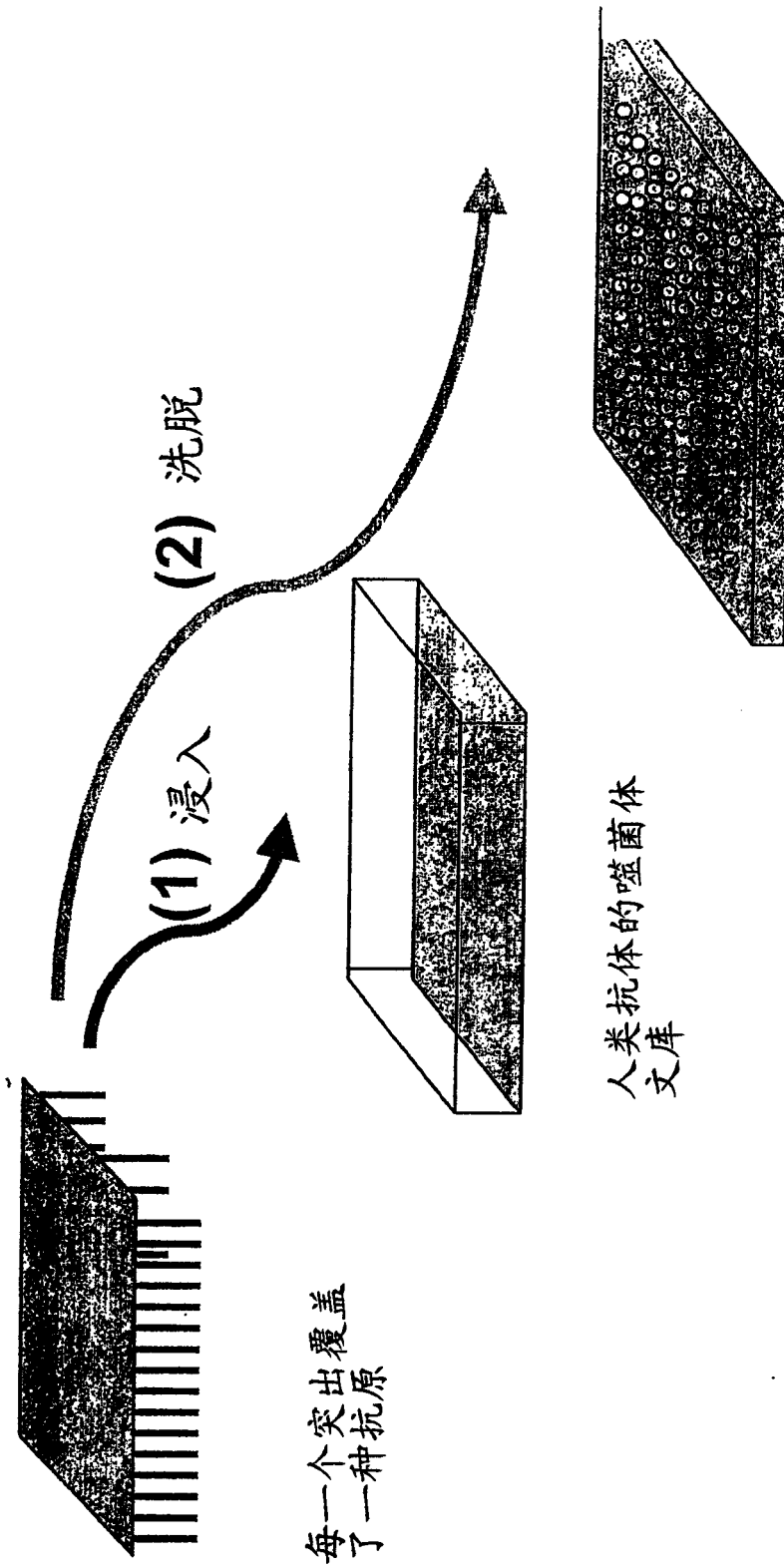


图 1

受体胞外区域的“表位筛选”

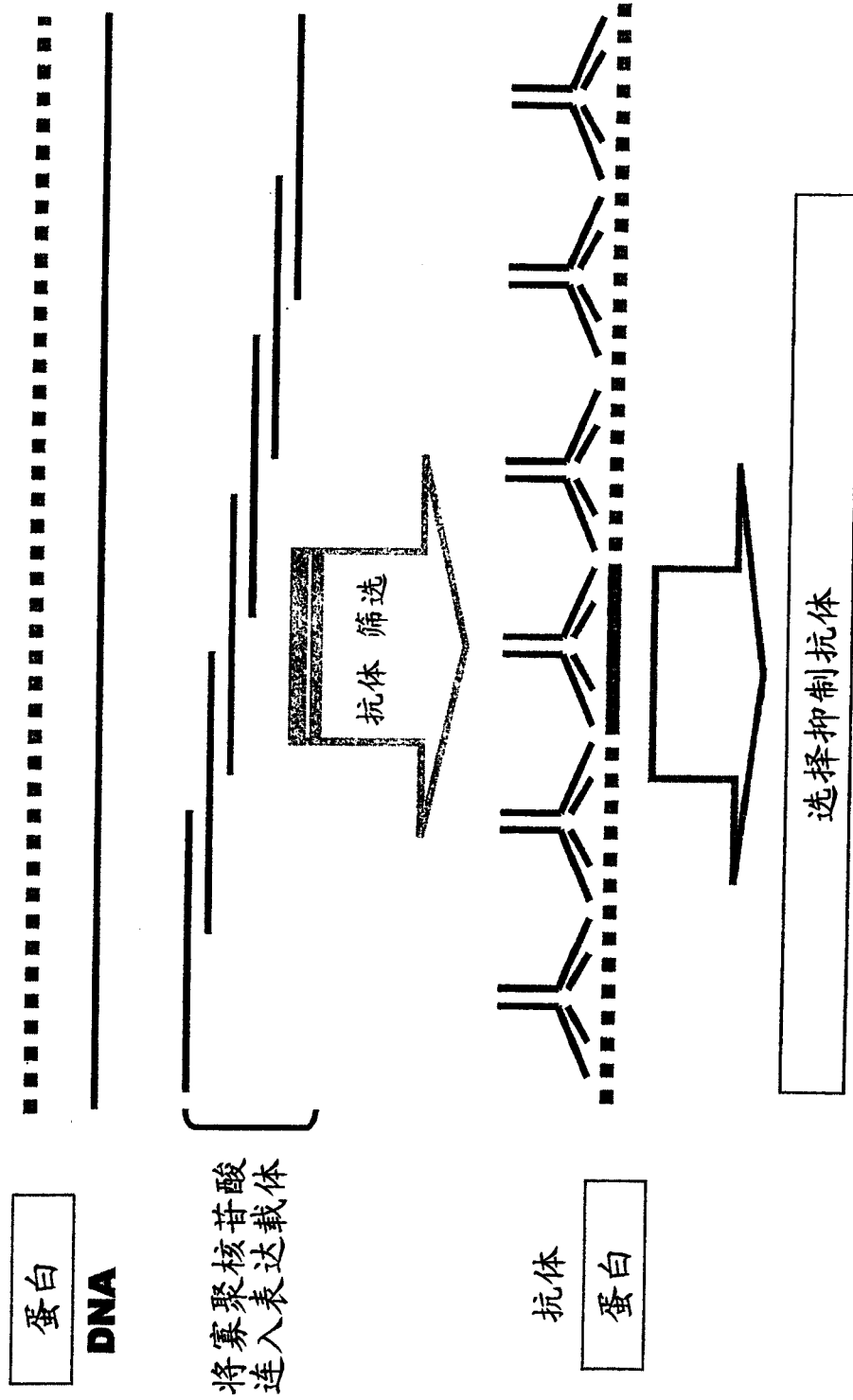
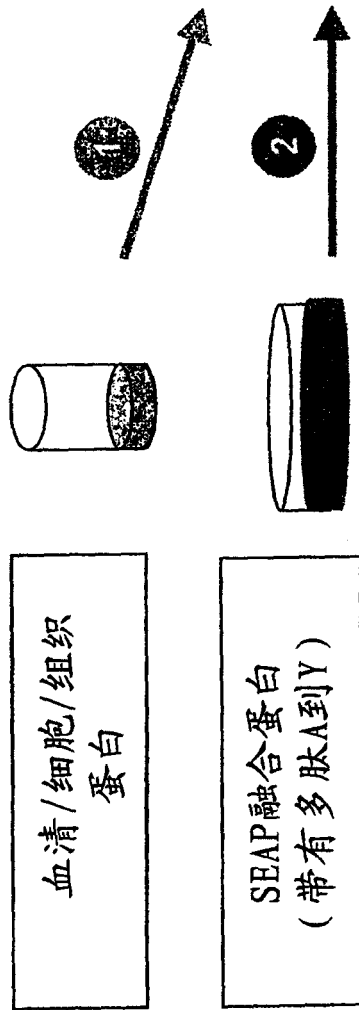
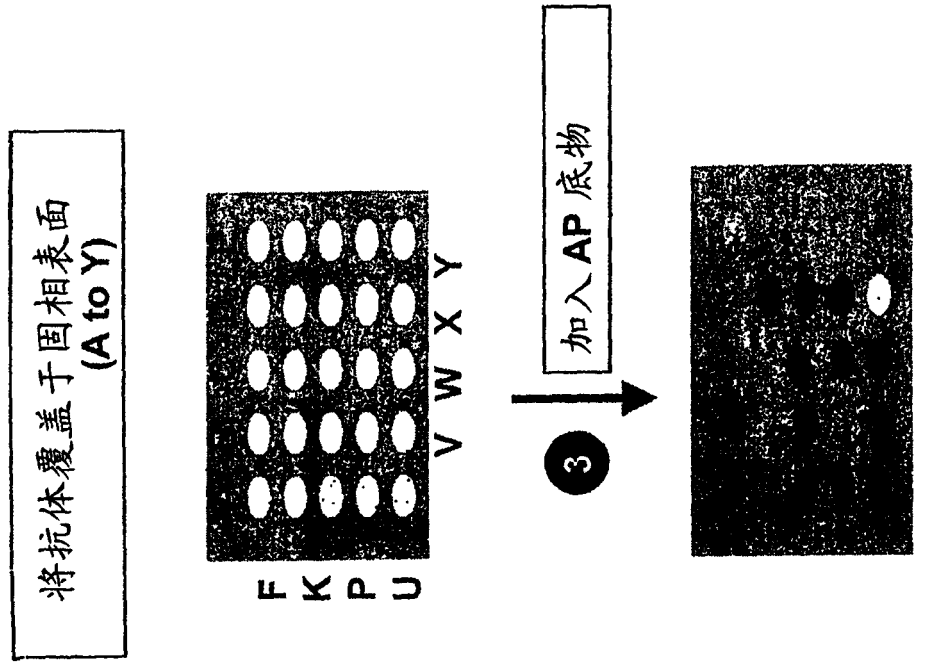


图 2

图 3



该竞争试验的结果

1) 黑色 = 阴性 (蛋白A, L, S, U, W)
 2) 蓝色 = 阳性 (色彩越亮表示阳性程度越高)

VEGF 异构体阵列 (VEGF-206, -165, -121)

VEGF206 = (232-26)

VEGF165 = (191-26) 缺失外显子 6

VEGF121 = (147-26) 缺失外显子 6 + 7

信号肽 1-26

 MNFLLSWVHW SLALLLHLHH AKWSQAAPMA EGGGQNHHEV VKFMDVYQRS YCHPIETLVD 206
 MNFLLSWVHW SLALLLHLHH AKWSQAAPMA EGGGQNHHEV VKFMDVYQRS YCHPIETLVD 165
 MNFLLSWVHW SLALLLHLHH AKWSQAAPMA EGGGQNHHEV VKFMDVYQRS YCHPIETLVD 121

异构体

抗体 A4.6.1
 表位区域

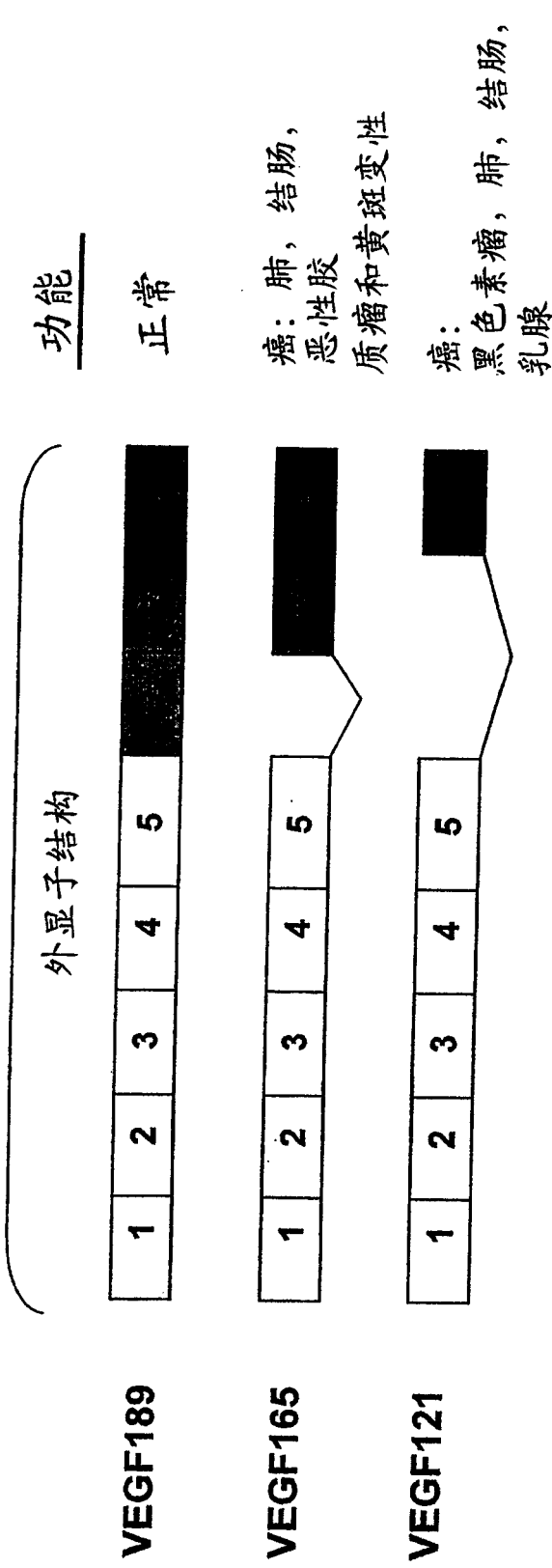
 IFQYYPDEIE YIFKPSVPL MRCGGCCNDE GLECVPTES NITMQIMRIK PHGQHIGEM 206
 IFQYYPDEIE YIFKPSVPL MRCGGCCNDE GLECVPTES NITMQIMRIK PHGQHIGEM 165
 IFQYYPDEIE YIFKPSVPL MRCGGCCNDE GLECVPTES NITMQIMRIK PHGQHIGEM 121

SFLQHNKCEC RPKKDRARQE KKSVRGKKG QKRKRKRSRY KSWSVYVGAR CCLMPWSLPG 206
 SFLQHNKCEC RPKKDRARQE 165
 SFLQHNKCEC RPKKDRARQE 121

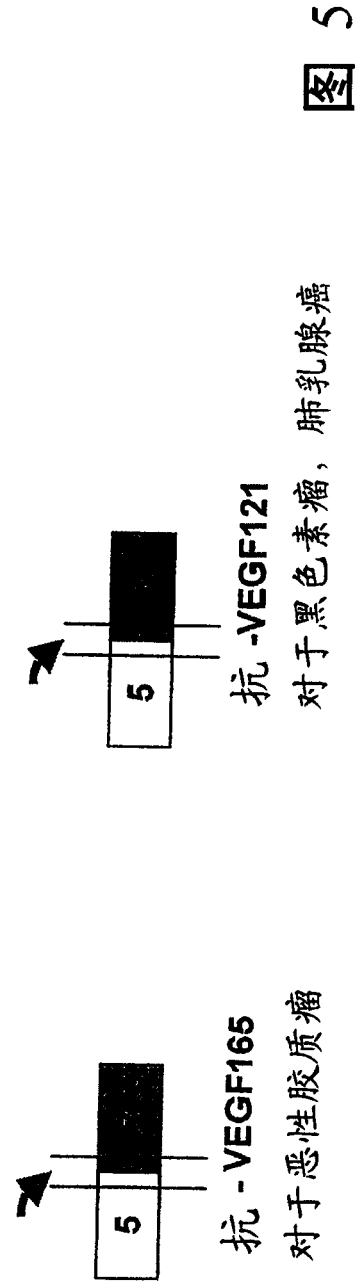
肝磷脂结合区域

 PHPGPCSER RKHLFVQDPQ TCKCCKNTD SRCKARQLEL NERTCRCDKP RR 206
 NPGPCSER RKHLFVQDPQ TCKCCKNTH SRCKARQLEL NERTCRCDKP RR 165
 KCDKP RR 121





VEGF异构体的特异表位



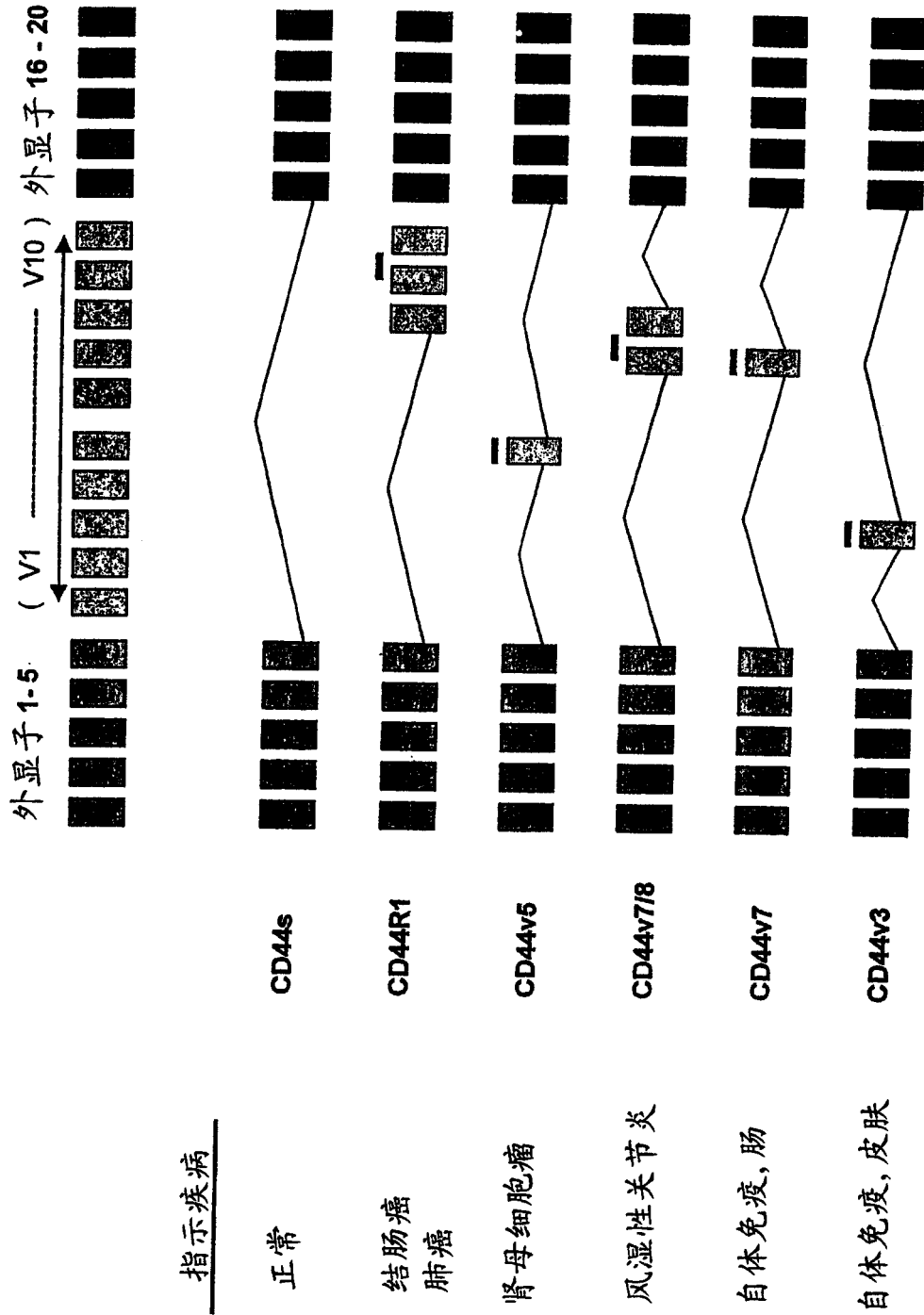


图 6

专利名称(译)	基于VEFG,HER - 2,PSA蛋白质异构体的用于诊断和治疗的疾病的特效试剂		
公开(公告)号	CN1849137A	公开(公告)日	2006-10-18
申请号	CN200480025763.6	申请日	2004-07-08
[标]发明人	常小迦		
发明人	常小迦		
IPC分类号	A61K39/395 A61K38/18 A61P35/00 C07K7/06 C07K7/08 C07K16/00 C07K16/22 C07K16/30 C07K16/32 C07K16/40 C12N5/00 C12N15/11 C12N15/63 C40B30/04 G01N33/53 G01N33/544 G01N33/68		
CPC分类号	C07K16/3069 C07K16/22 C07K16/32 C07K16/40 C40B30/04 G01N33/544		
优先权	10/615343 2003-07-08 US		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明提供制备和筛选抗体的方法。可以包括将许多抗原和编码抗原的核酸注入宿主的方法。也可以包括对载体蛋白质使用抗原的融合蛋白质在制备和/或筛选抗体制剂的方法。可以是用于同时制备和/或筛选大量的不同的抗体的方法。本发明还提供用于治疗、防止或诊断与蛋白质的异构体相关的疾病或发展为疾病的可能的治疗和诊断的方法。

